

HOVEDFAGSOPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN CAND.PHARM.

OPTIMALISERING AV 3-FASE VÆSKEFASEMİKROEKSTRAKSJON

KARI FOLDE BÅRDSTU



Faggruppen for Legemiddelanalyse,
Avdeling for farmasøytisk kjemi,
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige Fakultet,
Universitetet i Oslo.

OPTIMALISERING AV 3-FASE VÆSKEFASEMIKROEKSTRAKSJON

KARI FOLDE BÅRDSTU

Arbeidet ble utført fra november 2005 til oktober 2006 ved Faggruppen for Legemiddelanalyse, Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Veildere: Professor Stig Pedersen-Bjergaard
Professor Knut Einar Rasmussen
Dr. scient Tung Si Ho

FORORD

Jeg ønsker å takke min hovedveileder Stig Pedersen-Bjergaard for all støtte og hjelp gjennom hele hovedfaget. Jeg vil også takke mine to andre veiledere, Knut Einar Rasmussen og Tung Si Ho, for all hjelp og gode råd. Stipendiat Astrid Gjelstad fortjener også en stor takk for praktisk hjelp på laboratoriet og til støtte og tips i forbindelse med skriving av oppgaven.

Jeg vil også takke Hanne, Petter, Torill og Marte for en avslappende stemning og godt humør på kontoret. Dere har bidratt til å holde humøret oppe på tross av perioder med uteblitte resultater og lite samarbeidsvillige maskiner på laboratoriet. En spesiell takk til Petter for hjelp med side 7.

Oslo, 23 Oktober 2006

Kari Folde Bårdstu

Sammendrag

I dette arbeidet ble 3-fase væskefasemikroekstraksjon (LPME) undersøkt med fokus på optimalisering av eksperimentelle prosedyrer med hensyn på utbytte og repeterbarhet. De antidepressive legemidlene nortriptylin, doxepin, amitriptylin, clomipramin og mianserin ble valgt ut som modellsubstanser. Legemidlene ble ekstrahert fra 1 ml vandig prøveløsning (donorfase), gjennom et organisk løsemiddel immobilisert i fiberens porer (organisk væskemembran), og inn i 15 µl vandig mottakerløsning (akseptorfase) i fiberens lumen. Akseptorfase ble deretter analysert ved væskrokromatografi (HPLC). Ekstraksjonsutbyttene lå typisk innenfor 60 - 93 % for de ulike modellsubstansene med relative standardavvik (RSD) på under 15 %. Ingen enkeltfaktor ble funnet å være ansvarlig for denne variasjonen. Volum av den organiske væskemembranen varierte fra 11,8 - 15,0 µl med 0,4 - 3,1 % RSD, alt etter hvilken tillagingsmetode som ble benyttet. Akseptorfases volum varierte med 4,8 % etter ekstraksjon. Likevel ble både ekstraksjonsutbytter og repeterbarhet funnet å være relativt upåvirket av disse variasjonene. Den organiske væskemembranen kunne tillages på flere ulike måter med sammenlignbare utbytter og repeterbarhet, og det ble ikke funnet sammenheng mellom variasjoner i akseptorfases volum etter ekstraksjon og variasjoner i ekstraksjonsutbyttene. Innføring av luftboble i tillegg til 15 µl akseptorfase ved fylling ga signifikant høyere ekstraksjonsutbytte, men dårligere repeterbarhet. Relative standardavvik lå ved innføring av luftboble mellom 14 og 18 %, mot 4 til 12 % uten innføring av luftboble. Gjenbruk av fiber ga carry-over av analyttene og et utbytte på 2 - 6 % ved ekstraksjon i blank prøve på grunn av tilstedeværelse av analytter i den organiske væskemembranen etter ekstraksjon. Selv etter vask av brukt fiber i saltsyre ble det ved ekstraksjon av blank prøve observert topper i kromatogrammet. Det ble sett en tendens til bedre ekstraksjonsutbytter ved acetonvask av fiber før bruk, spesielt for de mest hydrofobe analyttene, med en forbedring i utbytte på ca 40 % for mianserin. Best repeterbarhet ved ekstraksjon av analyttene ble oppnådd ved plassering av fiber i donorfase rett før ekstraksjon, og ved uttak av akseptorfase rett etter tilmålt ekstraksjonstid.

INNHALDSFORTEGNELSE

| | |
|--|-----------|
| 1. INNLEDNING | 6 |
| 2. TEORI | 9 |
| 3. EKSPERIMENTELT | 13 |
| 3.1 VALG AV MODELLSUBSTANSER | 13 |
| 3.2 VALG AV HPLC- METODE FOR ANALYSE AV MODELLSUBSTANSENE | 13 |
| 3.3. MODELLSUBSTANSER OG KJEMIKALIER | 13 |
| 3.3.1 <i>Modellsubstansenes struktur og kjemiske egenskaper</i> | 13 |
| 3.3.2 <i>Oversikt modellsubstanser og kjemikalier</i> | 15 |
| 3.4 LØSNINGER | 16 |
| 3.5 UTSTYR OG BETINGELSER FOR VÆSKEKROMATOGRAFI (HPLC) | 16 |
| 3.6 UTSTYR FOR VÆSKEFASE MIKROEKSTRAKSJON (LPME) | 16 |
| 3.7 PROSEDYRE FOR UTFØRELSE AV VÆSKEFASE MIKROEKSTRAKSJON (LPME) | 17 |
| 3.8 VEKTFORSØK | 17 |
| 3.9 BEREGNINGER | 17 |
| 3.9.1 <i>Beregning av ekstraksjonsutbytte</i> | 17 |
| 3.9.2 <i>T-tester og Q-tester</i> | 18 |
| 4. RESULTAT OG DISKUSJON | 19 |
| 4.1 KJEMISKE BETINGELSER | 19 |
| 4.2 TILLAGING AV ORGANISK VÆSKEMEMBRAN | 20 |
| 4.2.1 <i>Valg av organisk løsemiddel</i> | 20 |
| 4.2.2 <i>Metoder for tillaging av organisk væskemembran</i> | 21 |
| 4.2.3 <i>Fjerning av overskudd av organisk løsemiddel</i> | 22 |
| 4.2.4 <i>Sammenligning av de ulike metodene for coating av fiber</i> | 23 |
| 4.3 AKSEPTORFASE | 25 |
| 4.3.1 <i>Fylling av akseptorfase</i> | 25 |
| 4.3.2 <i>Luftbobler i akseptorfase</i> | 26 |
| 4.3.3 <i>Oppbevaring av akseptorfase etter ekstraksjon</i> | 27 |
| 4.4 POLYPROPYLENFIBER | 29 |
| 4.4.1 <i>Valg av fiber</i> | 29 |
| 4.4.2 <i>Variasjon i fiberlengde</i> | 29 |
| 4.4.3 <i>Acetonvask av fiber</i> | 30 |
| 4.4.4 <i>Preeksonering av tørr fiber for donorfase</i> | 31 |
| 4.5 GJENBRUK AV FIBER | 32 |
| 5. KONKLUSJON | 34 |
| 6. REFERANSER | 35 |

1. Innledning

Legemiddelanalyse av biologiske væsker som urin og plasma kompliseres ofte av lave analyttkonsentrasjoner, begrenset prøvevolum og et stort antall matrikskomponenter som kan interferere i den videre analyse. Prøveopparbeidelse er derfor vanlig for å oppkonsentrere analyttene til et nivå som kan detekteres, og for å isolere analyttene fra matrikskomponentene. Prøveopparbeidelsen gjøres som oftest ved væske-væske ekstraksjon (LLE) eller fast-fase ekstraksjon (SPE). I LLE ekstraheres legemidlene over i et organisk løsemiddel som ikke er blandbar med vann eller vandige prøver. Fordelen ved LLE er at metoden gir forholdsvis rene ekstrakter. Siden metoden utføres med løsningsmidler som ikke er blandbare med vann, er ekstraktet ikke direkte kompatibelt med analysemetoder som væskrokromatografi (HPLC) og væskrokromatografi- massespektrometri (LC-MS). For å benytte disse analysemetodene må ekstraktet dampes inn og reløses i et mer vandig medium. Det er også mulig å tilbakeekstrahere til en vandig fase, men dette er både tids- og arbeidskrevende. LLE er vanskelig å automatisere, og oppkonsentrering mer enn 10 ganger opprinnelig konsentrasjon lar seg vanskelig gjøre ved små prøvevolum (0,1-1ml) [10]. SPE ble raskt en populær metode for prøveopparbeidelse både fordi den er lett å automatisere, og fordi det er mulig med stor variasjon i ekstraksjonskjemi. I SPE retarderes analyttene på en liten kolonne mens matrikskomponenter vaskes ut. Deretter elueres legemidlene ut i et eget trinn. Metoden gir imidlertid liten mulighet for oppkonsentrering ved små prøvevolum (0,1-1ml) [10]. Det er av stor interesse å finne en metode for prøveopparbeidelse som kan kombinere det beste av de allerede etablerte metodene LLE og SPE. En metode som gir rene ekstrakter, er lett å automatisere, og som i tillegg gir god oppkonsentrering. Svaret på mange av problemene kom med introduksjon av væskefase mikroekstraksjon (LPME), en miniaturisert form for LLE [11].

LPME ble først introdusert i 1996 [11]. Metoden gikk ut på at analytter i en vandig prøveløsning ble ekstrahert inn i en dråpe organisk løsemiddel hengende fra tuppen av en mikrosprøyte. Dråpen ble deretter trukket inn i sprøyten, og ekstraktet analysert ved gaskromatografi (GC). I tillegg til dette 2-fasesystemet, ble LPME også utført i et 3-fasesystem der analyttene ble ekstrahert fra en vandig prøveløsning, gjennom et tynt lag organisk løsemiddel på toppen av prøveløsningen, og inn i en vandig dråpe hengende fra tuppen av en mikrosprøyte. Med vandig ekstrakt var metoden kompatibel med HPLC-analyse. Denne nye metoden ga rene ekstrakter, god oppkonsentrering og forbruket av

1. INNLEDNING

organiske løsemidler var lavt. Imidlertid var metoden ikke særlig robust. Dråpen falt lett av sprøytespissen, spesielt hvis man ønsket forgang i ekstraksjonen og forsøkte å røre i løsningen [12]. Pedersen-Bjergaard og Rasmussen introduserte i 1999 et mer robust format for LPME, basert på bruk av porøs hulfiber laget av polypropylen [13]. I dette LPME-systemet ble mikroekstraktet holdt inne i en hulfiber, og var ikke i direkte kontakt med prøveløsningen. Prøveløsningen kunne derfor vibreres og røres i uten at mikroekstraktet gikk tapt [13]. Metoden har blitt utført både som 2-fasesystem og 3-fasesystem [1]. I et 2-fasesystem ble analyttene ekstrahert fra en vandig donorfase, gjennom en organisk væskemembran immobilisert i fiberens porer, og inn i en organisk akseptorfase inne i fiberens hulrom. Mikroekstraktet var direkte kompatibelt med GC. I et 3-fasesystem ble analyttene ekstrahert fra en vandig prøveløsning, gjennom et organisk løsemiddel immobilisert i hulfiberens porer, og inn i en vandig akseptorløsning inne i fiberens hulrom. Dette mikroekstraktet var direkte kompatibelt med CE og HPLC [1].

LPME er en metode som har mange fordeler i forhold til de mer etablerte metodene. I motsetning til LLE er metoden så godt som løsemiddelfri. Utstyret er rimelig i innkjøp og kan kasseres etter bruk, noe som eliminerer risikoen for carry-over mellom analysene. Den organiske væskemembranen i fiberens porer forhindrer at matrikskomponenter kommer inn i ekstraktet. I tillegg reguleres pH i donor- og akseptorfasen slik at diffusjon favoriseres for analyttene av interesse, og andre stoffer vil i liten grad diffundere over i akseptorfasen. Metoden gir derfor svært rene ekstrakter [14]. I LPME ekstraheres analyttene over fra et volum på 1-4 ml og over i akseptorfase, typisk 15 µl. Metoden gir derfor også svært god oppkonsentrering [10].

Tidligere publikasjoner viser at LPME kan benyttes til analyse av legemidler i fullblod [2, 3], plasma [4] og brystmelk [5]. Metoden kan anvendes til prøveoppbevaring av legemidler som er basiske og hydrofobe [6], basiske og hydrofile [7], og til sure legemidler [8]. Analysemetoder som er blitt brukt til sluttanalyse er blant annet CE, HPLC, GC og Flow Injection Analysis (FIA) kombinert med MS [12]. Metoden har derfor et bredt anvendelsespotensiale, både når det gjelder ulike analytter, type prøvematriks og sluttmetoder for analyse. Det er, imidlertid, mangler i litteraturen når det gjelder praktiske anbefalinger rundt tillaging av væskemembran, håndtering av fiber, og modifisering av akseptor- og donorfase. Dette arbeidet vil ta for seg praktisk bruk av LPME, både når det gjelder sammensetning av akseptor- og donorfase, behandling av fiber før og etter ekstraksjon og

1. INNLEDNING

tillaging av organisk væskemembran. Slike praktiske anbefalinger kan komme til nytte i forbindelse med arbeid rundt en automatisering av metoden, og vil kunne gi flere valgmuligheter når det gjelder valg av metode og prosedyre ved det enkelte laboratorium.

2. Teori

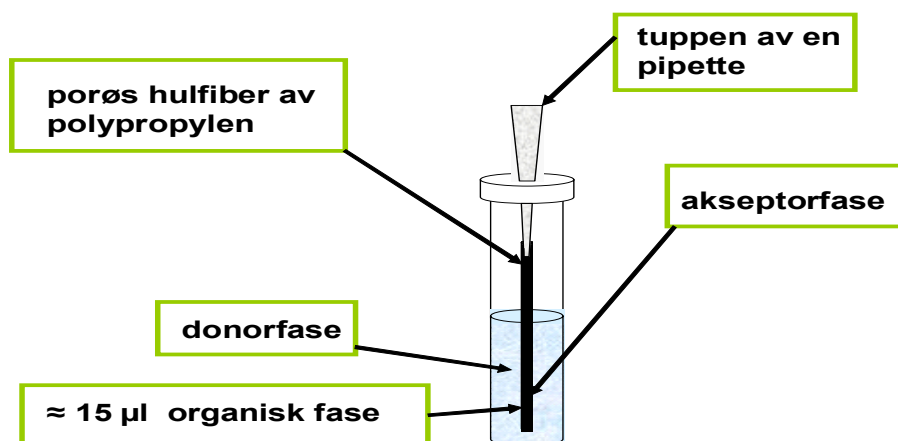
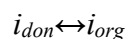


Fig. 2.1 Prinsippskisse av LPME-oppsett

Selve ekstraksjonsenheten er bygd opp rundt en prøvevial med skrukork og silikonseptum, se figur 2.1. På tuppen av en pipettespiss festes en hulfiber som er lukket i den nedre enden. Hulfibren vil som regel være 1,5-8 cm lang [12]. Pipettespissen festes i et hull i silikonseptumet. Hulfibren er impregnert med et organisk løsemiddel som ikke er blandbart med vann. Løsemiddelet fyller porene i hulfibren og sitter fast (er immobilisert) slik at det dannes en organisk væskemembran. Donorfase fylles i vialen. Volum av donorfase kan variere, men er som regel 0,1-4 ml. Akseptorfase føres ned i hulfibren ved hjelp av en mikrosprøyte. Akseptorfases volum er typisk 15-20 μl [15].

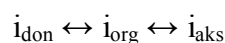
LPME kan utføres både som 2-fasesystem og 3-fasesystem. Ved et 2-fasesystem ekstraheres analytten i fra en vandig donorløsning, gjennom et organisk løsemiddel immobilisert i fiberens porer, og inn i det samme organiske løsemiddelet inne i fiberens hulrom. En organisk akseptorfase gir organisk ekstrakt som er kompatibel med GC-analyse. Ekstraksjonsprosessen for analytten i i et 2-fasesystem kan illustreres slik:



2. TEORI

Prosessen styres av fordelingskoeffisienten $K_{\text{org}/\text{don}}$ som er definert som konsentrasjonsratioen av analytten i i organisk fase og i donorfase ved likevekt. For at ekstraksjonen skal være suksessfull kreves vanligvis en høy verdi for $K_{\text{org}/\text{don}}$. Dette tilsvarer moderat hydrofobe eller meget hydrofobe stoffer med sure eller basiske grupper, eller nøytrale hydrofobe stoffer. pH i donorfasen justeres slik at analyttene foreligger på uionisert form [14].

I 3-fase LPME ekstraheres analytten i fra en vandig donorfase, gjennom et organisk løsemiddel immobilisert i fiberens porer, og inn i en vandig akseptorfase. Den organiske fasen tjener her som en barriere mellom akseptor- og donorfase, og forhindrer at disse blander seg sammen. 3-fase LPME benytter vandig akseptorfase og ekstraktet er derfor direkte kompatibelt med HPLC, LC-MS eller CE. Fordelingen av analytten i i 3-fasesystemet kan illustreres slik:



Ekstraksjonsprosessen styres av $K_{\text{org}/\text{don}}$ og $K_{\text{aks}/\text{org}}$, som er fordelingskoeffisientene ved likevekt mellom organisk fase og donorfase, og mellom akseptorfase og organisk fase.

Total fordelingskoeffisient kan uttrykkes slik:

$$K_{\text{aks}/\text{don}} = K_{\text{org}/\text{don}} \cdot K_{\text{aks}/\text{org}}$$

For å oppnå god ekstraksjon er det nødvendig å justere sammensetningen av donor- og akseptorfase slik at $K_{\text{aks}/\text{don}}$ blir høyest mulig [14]. For basiske legemidler justeres pH i donorfasen opp til det basiske området, slik at stoffene foreligger på uionisert form. For sure legemidler justeres pH i donorfasen ned til det sure området. Løseligheten i donorfasen reduseres, og på uionisert form vil hydrofobe legemidler ha større løselighet i den organiske fasen [10]. Dette fremmer diffusjon fra donorfasen og inn i den organiske fasen. For basiske legemidler benyttes en sur, vandig akseptorfase, mens det for sure legemidler benyttes en basisk, vandig akseptorfase. Legemidlene diffunderer inn i akseptorfasen og foreligger der på ionisert form. Dette forhindrer tilbakeekstraksjon til den organiske fasen [14].

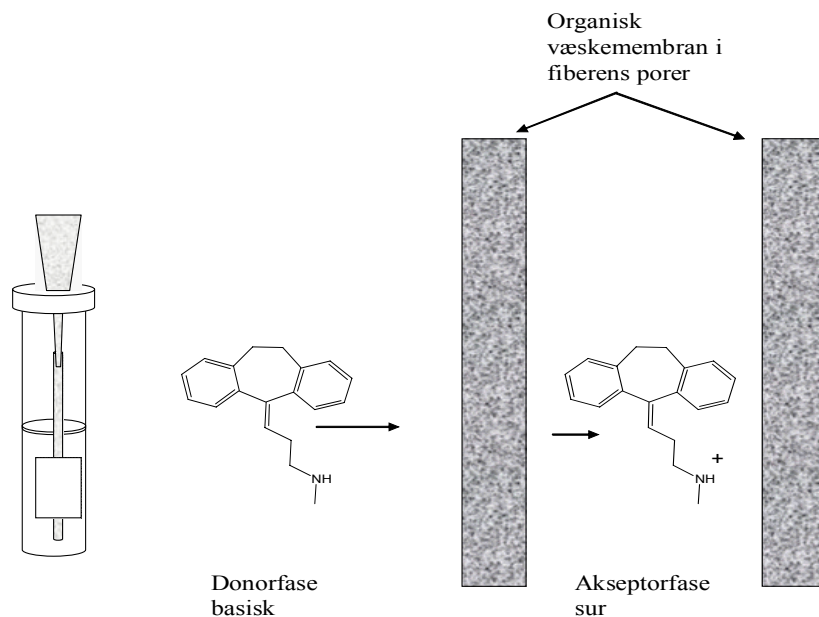


Fig. 2.2 Ekstraksjonsprosessen visualisert for modellsubstansen nortriptylin.

Ekstraksjonsprosessen baserer seg på passiv diffusjon. For å få akseptable ekstraksjonstider og for å øke repeterbarheten av ekstraksjonen, settes hele ekstraksjonsenheten med innhold på kraftig vibrering. Akseptorfase er inne i fiberen, og tolererer derfor kraftig vibrering uten at ekstraktet går tapt [14]. LPME gir god opprensning og rene ekstrakter uten proteiner og de fleste andre matrikskomponenter til stede i humane prøver. Proteinene vil ikke ekstraheres over i akseptorfase fordi de ekskluderes av den organiske fasen i fiberens porer [10]. Ved 3-fase LPME vil pH-justeringene i donorfase som nevnt ovenfor føre til at sure stoffer forblir i donorfase ved ekstraksjon av baser fordi de har størst løselighet der. Det blir omvendt ved ekstraksjon av sure forbindelser. Nøytrale og hydrofile stoffer vil forbli i donorfase, mens nøytrale og hydrofobe forbindelser i hovedsak vil gjenfinnes i den organiske fasen etter ekstraksjon [10]. På denne måten er LPME svært effektiv til å utelukke forurensende stoffer fra ekstraktet.

En annen av fordelene med LPME er den høye graden av oppkonsentrering man kan oppnå med metoden. Fra 1 ml plasma og inn i 15 μ l akseptorfase er det teoretisk mulig å oppkonsentrere 67 ganger hvis ekstraksjonsutbyttet er 100 %. Ekstraksjonsutbyttene ligger

2. TEORI

som regel på 60 – 95 % for hydrofobe stoffer, og dette gir en oppkonsentrering på 40 - 65 ganger. Dette gjør at man kan detektere legemidler i meget lave konsentrasjoner, helt ned i pg/ml nivå ved bruk av LC-MS som analysemetode. LPME har derfor et stort potensial for fremtidig bruk, siden utviklingen av nye legemidler går mot stadig mer potente forbindelser hvor måling på meget lave konsentrasjonsområder kan bli helt nødvendig [10]. Høy oppkonsentreringsfaktor gjør også at man kan benytte analysemetoder som har relativt høye deteksjonsgrenser til analyse av legemidler i terapeutiske doser, for eksempel CE. Dette gir større valgmuligheter ved valg av analysemetode.

3. Eksperimentelt

3.1 Valg av modellsubstanser

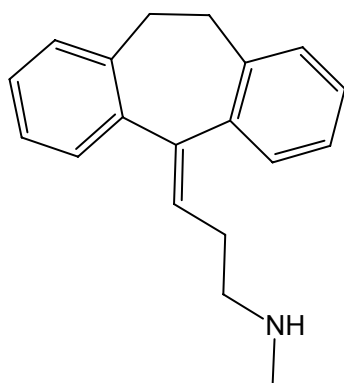
Det ble valgt ut 5 antidepressive legemidler som modellsubstanser på bakgrunn av tidligere gode erfaringer ved ekstraksjon i LPME med høye utbytter [16]. I tillegg ble substansene valgt ut på grunnlag av retensjonstid og UV-absorbans ved bruk av utvalgt HPLC- metode.

3.2 Valg av HPLC- metode for analyse av modellsubstansene

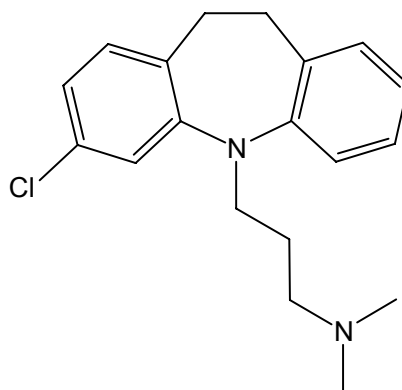
Det ble tatt utgangspunkt i en tidligere publikasjon som omhandlet analyse av antidepressiva ved bruk av HPLC- UV [17]. Metoden beskrevet der ble modifisert noe for å tilpasses modellsubstansene og retensjonstid.

3.3. Modellsubstanser og kjemikalier

3.3.1 Modellsubstansenes struktur og kjemiske egenskaper

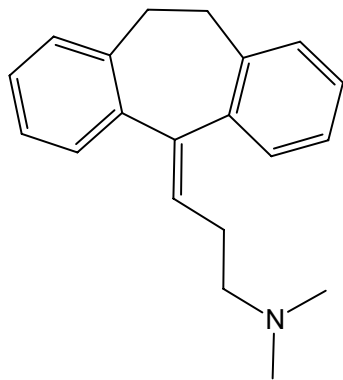


Nortriptylin Log P = 1,7 pK_a = 9,7

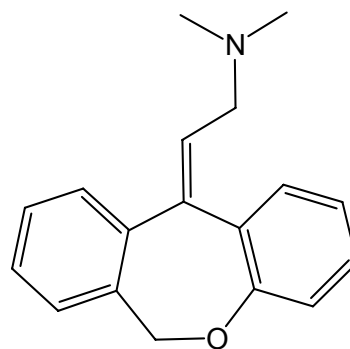


Clomipramin Log P = 5,2 pK_a = 9,5

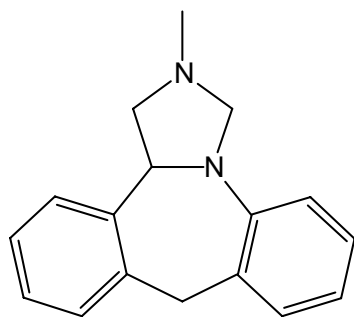
3. EKSPERIMENTELT



Amitriptylin Log P = 4,9 pK_a = 9,4



Doxepin Log P = 2,4 pK_a = 9,0



Mianserin Log P = 3,7 pK_a = 8,3

Fig. 3.1. Strukturformler, dissosiasjonskonstanter (pK_a) og log P- verdi for analyttene benyttet i arbeidet

3.3.2. Oversikt modellsustanser og kjemikalier

Oversikt over legemidler anvendt i arbeidet er oppført i tabell 3.1.

Tabell 3.1

| Legemiddel | Leverandør |
|--------------------------|----------------------------|
| Amitriptylin hydroklorid | Sigma, Steinheim, Tyskland |
| Clomipramin hydroklorid | Sigma, Steinheim, Tyskland |
| Doxepin hydroklorid | Sigma, Steinheim, Tyskland |
| Mianserin hydroklorid | Sigma, Steinheim, Tyskland |
| Nortriptylin hydroklorid | Sigma, Steinheim, Tyskland |

Kjemikalier anvendt i arbeidet er oppført i tabell 3.2

Tabell 3.2

| Kjemikalier | Leverandør | Kvalitet |
|----------------------------------|----------------------------|-------------|
| Acetonitril | Merck, Darmstadt, Tyskland | >99,8 % |
| Dihexyleter | Sigma, Steinheim, Tyskland | ≥97 % |
| Dinatriumhydrogenfosfat 2-hydrat | Merck, Darmstadt, Tyskland | Pro Analysi |
| Etanol | Arcus, Oslo, Norge | 96 % |
| Metanol | Sigma, Steinheim, Tyskland | ≥99,9 % |
| Natriumdihydrogenfosfat 1-hydrat | Merck, Darmstadt, Tyskland | Pro Analysi |
| Natriumhydrogenkarbonat | Merck, Darmstadt, Tyskland | Pro Analysi |
| Natriumkarbonat | Merck, Darmstadt, Tyskland | Pro Analysi |

3.4 Løsninger

Stamløsninger ble laget fra renstoff av amitriptylin hydroklorid, clomipramin hydroklorid, doxepin hydroklorid, mianserin hydroklorid og nortriptylin hydroklorid. Stoffene ble løst i etanol til 1 mg/ml. Stamløsningene ble oppbevart ved 4-8 °C beskyttet mot lys.

Prøveløsninger ble laget til hver analyseserie rett før bruk ved å fortynne legemidlene fra stamløsning i 25 mM fosfatbuffer pH 7,0, som oftest til 1 µg/ml.

3.5 Utstyr og betingelser for væskekromatografi (HPLC)

Automatisk injeksjon av prøve ble utført med en ASTED -Dilutor 401 (Gilson, Viliers-le-Ble, Frankrike). Kromatografisk separasjon ble utført på en Gemini™ HPLC C18-kolonne (3,0 * 150 mm, 3 µm partikler) fra Phenomenex (Harbor City, CA, USA). Isokratisk eluering ble utført med mobilfase som bestod av 55 % (v/v) 25 mM fosfatbuffer pH 7,0 og 45 % (v/v) acetonitril. Denne ble levert med en Shimadzu LC-6A/LC-9A HPLC- pumpe (Shimadzu, Kyoto, Japan). Analyttene ble detektert med UV- detektor (SPD-6AV) fra Shimadzu ved 230 nm. Databehandling ble i begynnelsen av arbeidet utført med Class-VP Chromatography Data System (Shimadzu, Kyoto, Japan), deretter med Chromeleon chromatography management system (Dionex, Sunnyvale, CA, USA).

3.6 Utstyr for væskefase mikroekstraksjon (LPME)

LPME ble utført i 2 ml prøveglass (modell 2-SV) med skrukork og silikonseptum (modell 8-SC-ST15) fra Chromacol (Welwyn Garden City, UK) slik vist tidligere i figur 2.1. En Finntip 200 Ext pipette fra ThermoLabsystems (Helsingfors, Finland) ble innført i silikonseptumet i skrukorken, tuppen ble festet til en hulfiber av polypropylen av type Q3/2 (Membrana, Wuppertal, Tyskland). Hulfiberens indre diameter var 1,2 mm, veggene var 200 µm tykke og porestørrelsen var 0,2 µm. Ekstraksjonsenheten med innhold ble vibrert på en Vibramax 100 (Heidolph, Kelheim, Tyskland) ved 1050 rpm.

3.7 Prosedyre for utførelse av væskefase mikroekstraksjon (LPME)

0,2 ml av prøveløsning ble fylt i et prøveglass. Prøven ble gjort basisk med 0,8 ml 0,1 M karbonatbuffer pH 10,8. En manuelt tilklippet del av en porøs hulfiber, oftest 2,0 cm, ble lukket i den ene enden med en tang. Den andre enden ble trædd på tuppen av en 200 µl Finnpiquette, og loddebolt ble benyttet for å forsiktig smelte fiber og pipettespiss sammen i toppen av fiberen. Den øvre del av pipettespissen ble tilklippet slik at en mikrosprøyte akkurat kunne komme ned til bunnen av den lukkede fiberen. Fiberen ble deretter immobilisert med organisk fase, som oftest ved å dyppe fiber i diheksyleter slik beskrevet under Resultat og diskusjon. Akseptorfase, typisk 15 µl 10 mM maursyre, ble ført inn i fiberens hulrom med en mikrosprøyte, og fiberen ble satt ned i prøveglasset. Prøveglasset med innhold ble deretter vibrert i 45 minutter for ekstraksjon. Etter ekstraksjon ble 10 µl av akseptorfase tatt ut med en mikrosprøyte, fortynnet med 25 µl 25 mM fosfatbuffer pH 7,0, og injisert i HPLC-systemet.

3.8 Vektforsøk

Alle vektforsøk ble utført på en XS205 analysevekt fra Mettler-Toledo (Oslo, Norge)

3.9 Beregninger

3.9.1 Beregning av ekstraksjonsutbytte

Utbyttene (R) ble beregnet fra følgende formel:

$$R = (C_{\text{aks, etter}} * V_{\text{aks}} / C_{\text{donor, før}} * V_{\text{donor}}) * 100 \%$$

der $C_{\text{aks, etter}}$ er konsentrasjonen av analytt i akseptorfase etter ekstraksjon, $C_{\text{donor, før}}$ er konsentrasjon av analytt i donorfase før ekstraksjon, V_{donor} er volum av donorfase, og V_{aks} er volum av akseptorfase

3.9.2 T-tester og Q-tester

For å kunne trekke slutninger om ulike variablers mulige innvirkning på måleresultatet ble det utført T-tester med 95 % konfidensnivå ved sammenligning av forsøk. T-testene ble utført ved å sammenligne gjennomsnittlig toppareal (X_1) for hvert legemiddel i en serie mot gjennomsnittlig toppareal for samme legemiddel (X_2) i en annen serie. T-verdi ble beregnet fra følgende formel:

$$T = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{S_1}{n_1} \oplus \frac{S_2}{n_2}}}$$

Antall målinger for et av legemidlene i serie 1 ble benevnt n_1 , mens antall målinger for samme legemiddel i serie 2 ble benevnt n_2 . S_1 var standardavviket til målingene i serie 1 og S_2 var standardavviket til målingene i serie 2. Beregnet verdi ble sammenlignet med T-verdi fra tabell. En beregnet T-verdi høyere enn tabellverdi, ga 95 % sannsynlighet for at sann verdi for de to måleseriene er forskjellig. Resultatet ble ikke signifikant forskjellig dersom beregnet T-verdi var mindre enn eller lik tabellverdi. [18, 19]

Ved enkeltmålinger som avvok betydelig fra resten, ble det utført Q-test for å se om måleresultatet kunne forkastes. Q-test ble beregnet ut i fra følgende formel:

$$Q = \frac{X_i - X_{krit}}{X_1 - X_{krit}}$$

Den avvikende verdien ble benevnt X_{krit} , og X_i var verdien i måleserien nærmest X_{krit} . X_1 var verdien i måleserien lengst fra X_{krit} . Dersom X_{krit} var større enn de andre verdiene i måleserien, så var X_i den minste verdien i måleserien. Dersom X_{krit} var mindre enn de andre måleverdiene, så var X_i den største måleverdien i serien. Dersom beregnet Q-verdi ble større enn tabellverdi for Q ved 96 % konfidensnivå, så ble avvikende verdi forkastet og ikke tatt med i beregning av T-test. Avvikende verdi ble ikke forkastet dersom beregnet Q-verdi var lavere enn tabellverdi [19].

4. Resultat og diskusjon

4.1 Kjemiske betingelser

Ved 3-fase LPME har pH i donor- og akseptorfase stor betydning for ekstraksjonen. Ved ekstraksjon av basiske legemidler er det vanlig å benytte natriumhydroksid (NaOH) til å justere opp pH i donorfase, og som akseptorfase er saltsyreløsning (HCl) mest brukt [1-3, 20, 21]. Innledningsvis i dette arbeidet ble 0,2 ml prøveløsning tilsatt 0,1 ml 2,0 M natriumhydroksid og 0,7 ml deionisert vann. Akseptorfase bestod av 15 µl 10 mM saltsyre. Ekstraksjonsutbyttene varierte fra 72,5-95,0 % for de ulike analyttene, og relative standardavvik var under 10 % (n = 4). Resultatene er oppsummert i tabell 4.1.

Tabell 4.1

Ekstraksjonsutbytte og repeterbarhet ved bruk av natriumhydroksid i donorfase og saltsyre i akseptorfase

| Analytt | Utbytte (%) | Repeterbarhet (% RSD) |
|--------------|-------------|-----------------------|
| Nortriptylin | 73 | 8 |
| Doxepin | 95 | 2 |
| Amitriptylin | 89 | 2 |
| Clomipramin | 83 | 6 |
| Mianserin | 89 | 5 |

Valg av pH i donorfase kan ha stor innvirkning på ekstraksjonsprosessen. Dersom pH i donorfase er lik pK_a - verdien til den basiske analytten av interesse, vil 50 % av analytten være på baseform og resterende 50 % vil være på syreform [19]. Det er i praksis anbefalt at pH er 2-3 enheter over pK_a - verdien til analyttene, slik at de aller fleste av molekylene befinner seg på uionisert form [15]. God pH- kontroll er viktig, og dette oppnås best ved bruk av buffere. Det ble derfor utført forsøk der 0,2 ml prøveløsning ble tilsatt 0,8 ml 0,1 M karbonatbuffer (pH 10,8). Akseptorfase bestod av 15 µl 10 mM saltsyre. Resultatene fra forsøket var ikke signifikant forskjellig fra resultatene i tabell 4.1. Karbonatbuffer 0,1 M ble derfor benyttet videre i arbeidet til å justere pH i donorfase.

4. RESULTAT OG DISKUSJON

pH i akseptorfase er også viktig for optimale ekstraksjonsbetingelser. For å unngå at analyttene diffunderer tilbake til den organiske væskemembranen bør pH ligge 2-3 enheter under analyttens pK_a - verdi, slik at de aller fleste av molekylene er på ionisert form [15]. Som nevnt ovenfor har løsninger av saltsyre ofte blitt benyttet som akseptorfase, da i konsentrasjoner på 10 mM [5], 0,1 M [13, 21], og 0,5 M [20]. Saltsyre er en sterk syre og en konsentrasjon på 10 mM vil ha en pH- verdi på 2,0, en 0,1 M løsning vil ha en pH- verdi på 1,0, og 0,5 M saltsyre vil ha en pH- verdi helt ned i 0,3. Bruk av saltsyre som akseptorfase kan begrense valg av analysemetode etter ekstraksjon. Det kan for eksempel være problematisk å injisere meget sure løsninger ved HPLC- analyse med tanke på kolonnestabiliteten. I tillegg kan oppbevaring av analyttene i sterk syre føre til degradering. Det er tidligere blitt utført ekstraksjoner med fosfatbuffer (pH 2,75) som akseptorfase, noe som gir god pH-kontroll [4, 6]. Et annet alternativ til saltsyre er å benytte en svakere syre som ikke gir fullt så lav pH. Maursyre (HCOOH) er et eksempel på en slik syre. En løsning på 10 mM maursyre vil gi en pH- verdi på 2,8. Dette er tilstrekkelig lav pH til å ionisere svake baser med en Pk_a - verdi på rundt 9. Det ble utført forsøk med 15 μ l 10 mM maursyre som akseptorfase, der donorfasen bestod av prøveløsning, natriumhydroksid og vann slik beskrevet ovenfor. Resultatene var ikke signifikant forskjellige fra resultatene i tabell 4.1. Maursyre, 10 mM, ble derfor benyttet som akseptorfase i resten av arbeidet..

4.2 Tillaging av organisk væskemembran

4.2.1 Valg av organisk løsemiddel

Valg av riktig organisk løsemiddel er et avgjørende trinn i metodeoptimalisering av LPME. Det organiske løsemiddelet bør ha lav vannløselighet slik at det kan fungere som en barriere mellom donor- og akseptorfase. Det bør ikke være for flyktig, da man ikke ønsker fordamping av løsemiddelet under ekstraksjon. Videre bør løsemiddelet gi høye verdier for $K_{org/don}$ og $K_{aks/org}$ for å sikre tilfredsstillende utbytte av analyttene [1]. Ulike organiske løsemidler er blitt benyttet som organiske væskemembraner i LPME, blant annet diheksyleter [6,2], 1-oktanol [13,22], dodecylacetat [4, 23] og polyfenyl-metylsiloxane [5]. Det er også gjort forsøk med bruk av vegetabiliske oljer og essensielle oljer [24]. I dette arbeidet ble diheksyleter valgt som organisk løsemiddel. Diheksyleter tilfredsstiller kravene nevnt ovenfor, og gir høye ubytter for de modellsubstanser som er valgt ut i dette arbeidet, se tabell 4.1 ovenfor.

4.2.2 Metoder for tillaging av organisk væskemembran

Ekstraksjonen foregår på overflaten av den organiske væskemembranen [1]. Membranen dannes ved at det organiske løsemiddelet immobiliseres i hulfiberens porer. Væsken holdes på plass i porene ved hjelp av kapillærkrefter. I litteraturen har tillaging av organisk væskemembran (coating) som oftest blitt utført ved å dyppe fiberen i 5-10 sekunder i det organiske løsemiddelet [6-9, 20-22, 25]. Fjerning av overskudd av organisk løsemiddel er vanlig ved bruk av denne metoden, og utføres som regel ved bruk av ultralydbad [6-9, 21]. Enkelte har benyttet tørkepapir til å fjerne overskuddet [5]. Dette er enkle prosedyrer, men de er vanskelig å automatisere. I tillegg gir de liten kontroll på hvor mye organisk fase som tas opp i fiberen. Flere ulike metoder for immobilisering ble derfor testet ut, blant annet med tanke på fremtidig automatisering av LPME. Mengde organisk fase som ble tatt opp i fiber ble bestemt ved veiing på analysevekt. Ulike metoder for fjerning av overskudd av organisk løsemiddel ble også undersøkt. Metoder og resultater er oppsummert i tabell 4.2:

Tabell 4.2

Mengde organisk fase som immobiliseres i hulfiberens porer

| Teknikk | Fjerning av overskudd | Vekt (mg) ¹ | RSD (%) ² |
|---------------|---|------------------------|----------------------|
| Dypping 1 | Ingen fjerning | 10,93 | 2,9 |
| Dypping 2 | Fiber holdes i ultralydbad (i vannbad) i 15s | 9,84 | 3,1 |
| Dypping 3 | Utsiden av fiber tørkes med tørkepapir | 9,66 | 1,2 |
| Fylling 15 µl | Ingen fjerning | 12,27 | 0,4 |
| Overfylling | Overskudd trekkes ut av fiber etter overfylling | 11,23 | 2,7 |

¹ Gjennomsnitt av 10 veieforsøk² Relativt standardavvik (RSD) av 10 veieforsøk

Resultatene tilsier at man får best kontroll på opptak av organisk løsemiddel ved å fylle fiberen med 15 µl innenfra, med en repeterbarhet på 0,4 % (RSD). Immobilisering ved dypping ga 2,9 % (RSD) når overflødig organisk løsemiddel ikke ble fjernet, og gjennomsnittlig 10,93 mg diheksyleter ble immobilisert i fiberens porer. Fjerning av overflødig løsemiddel reduserte den organiske væskemembranen med 1,09-1,27 mg ved bruk

4. RESULTAT OG DISKUSJON

av henholdsvis ultralydbad og tørkepapir, der sistnevnte metode var mest effektiv og ga best repeterbarhet.

4.2.3 Fjerning av overskudd av organisk løsemiddel

Som nevnt ovenfor er det vanlig prosedyre hos de fleste at man etter coating av fiber ved dypping fjerner overskuddet av organisk løsemiddel før ekstrahering. Det er, for øvrig, enkelte som har valgt å ikke inkludere dette ekstra trinnet [20, 26]. Hensikten med å fjerne overskuddet har vært å unngå lekkasje av organisk løsemiddel ut i donor- eller akseptorfase. Man kan tenke seg at ukontrollert lekkasje av organisk løsemiddel fra fibrene i en forsøksserie, kan gi dårligere repeterbarhet og påvirke ekstraksjonsutbyttene. Det ble utført forsøk for å undersøke denne teorien nærmere. Prosedyren med dypping av fiber ble sammenlignet med dypping og deretter tørking av fiber med tørkepapir. Utbyttene ble signifikant bedre ved fjerning av overskudd organisk løsemiddel for de tre mest hydrofobe analyttene; amitriptylin, clomipramin og mianserin. Dette er illustrert i figur 4.1. Det er derfor mulig at analyttens hydrofobisitet kan ha betydning for om det er nødvendig å fjerne overskudd eller ikke. Ut i fra resultatene kan det inntil videre anbefales å fjerne overskudd organisk løsemiddel når fiber coates ved dypping.

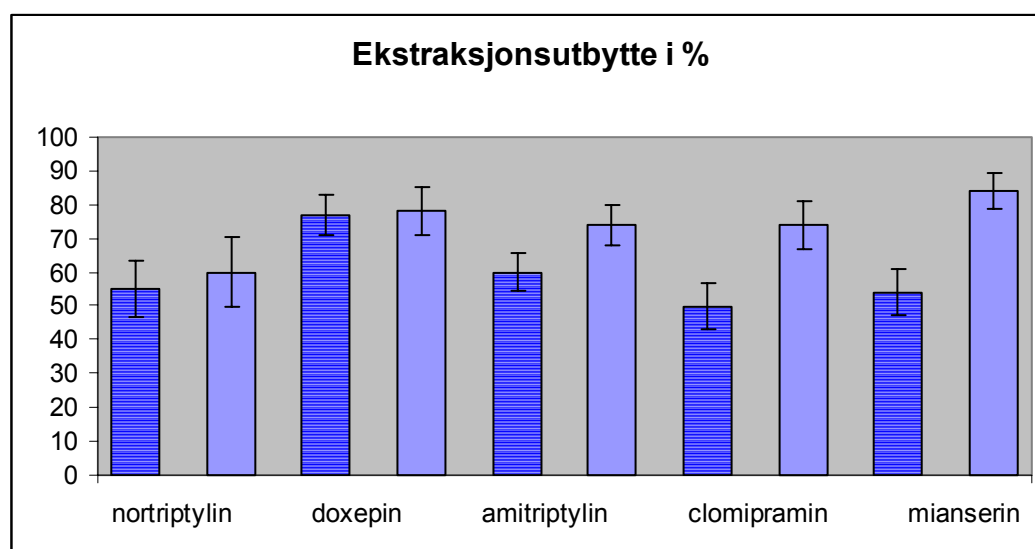


Fig.4.1. Ekstraksjonsutbytter for ekstraksjon uten fjerning av overskudd organisk løsemiddel (skraverte søyler), og ekstraksjonsutbytter for ekstraksjoner der overskudd av organisk fase ble fjernet før ekstraksjon (ensfargede søyler).

4.2.4 Sammenligning av de ulike metodene for coating av fiber

De ulike metodene for immobilisering og fjerning av overskudd organisk løsemiddel ga ulike resultater med hensyn på mengde løsemiddel tatt opp i fiber. Fylling av fiber innenfra immobiliserte mer organisk løsemiddel enn coating av fiber fra utsiden. 11,23 mg ble immobilisert i fiber ved overfylling av fiber innenfra med påfølgende fjerning av overskudd, mens coating av fiber ved dypping etterfulgt av ultralydbad immobiliserte 9,84 mg organisk løsemiddel. Denne forskjellen i opptak kan forklares ut ifra ujevn porestørrelse, der porestørrelsen øker innover i fiber. Tverrsnittsanalyser av fiber har vist denne tendensen [26]. Det ble undersøkt om forskjeller i mengde organisk løsemiddel immobilisert i fiberens porer, slik sett for immobilisering fra utsiden og fra innsiden, kan ha betydning for ekstraksjonsutbyttene eller repeterbarheten ved ekstraksjon. Forsøkene ble utført ved å sammenligne de ulike metodene for coating og fjerning av overskudd med den til nå mest etablerte metoden; dypping og fjerning av overskudd ved bruk av ultralydbad. Sistnevnte metode ga resultater som er oppsummert i tabell 4.3.

Tabell 4.3

Ekstraksjonsutbytte og repeterbarhet ved tillaging av organisk væskemembran på etablert måte ved dypping og fjerning av overskudd ved ultralydbad.

| Analytt | Utbytte i % (RSD i %) |
|--------------|-----------------------|
| Nortriptylin | 74 (9) |
| Doxepin | 88 (7) |
| Amitriptylin | 77 (6) |
| Clomipramin | 69 (5) |
| Mianserin | 88 (5) |

4. RESULTAT OG DISKUSJON

Ekstraksjonsutbyttene ved ekstraksjon der organisk væskemembran ble tillaget ved fylling av 15µl organisk løsemiddel innenfra og overfylling av organisk løsemiddel innenfra ble sammenlignet med resultatene i tabell 4.3 og ikke funnet å være statistisk forskjellige fra disse. Dette kan også verifiseres teoretisk ved å benytte en ligning for beregning av utbytte ved likevekt for LPME [15]:

$$R = [100 \cdot K_{\text{aks/don}} \cdot V_{\text{aks}}] / [K_{\text{aks/don}} \cdot V_{\text{aks}} + K_{\text{org/don}} \cdot V_{\text{org}} + V_{\text{don}}] \quad (1)$$

Der $K_{\text{aks/don}}$ er fordelingskoeffisienten for analytten mellom akseptorfase og donorfase. $K_{\text{org/don}}$ er fordelingskoeffisienten for analytten mellom organisk væskemembran og donorfase. V_{aks} er volum av akseptorfase, og V_{org} er volum av av organisk væskemembran, og V_{don} er volum av donorfase. Hvis man antar at $K_{\text{aks/don}} = 1000$, $K_{\text{org/don}} = 100$, $V_{\text{aks}} = 15 \mu\text{l}$ og $V_{\text{don}} = 500 \mu\text{l}$, så vil en stor forandring i V_{org} fra 15 til 12 µl resultere i bare 1,0 % økning i kalkulert utbytte. Med andre ord, både eksperimentelle data og teoretiske beregninger bekrefter at små variasjoner i volum av den organiske væskemembranen spiller mindre rolle i LPME, og at prosedyren man velger for immobilisering og fjerning av overskudd organisk løsemiddel ikke er kritisk for kvaliteten på de analytiske data. Det at coating av fiber kan utføres på flere ulike måter med sammenlignbare resultater, vil kunne være viktig informasjon for fremtidig automatisering.

4.3 Akseptorfase

4.3.1 Fylling av akseptorfase

Akseptorfase måles opp og fylles manuelt i fiber i de fleste tilfeller. Gjennomsnittsverken av akseptorfase fylt i fiberens lumen for 10 fibre ble beregnet og resultatet viste en gjennomsnittlig vekt av akseptorfase på 15,4 mg med fiber-til-fiber RSD på 0,9 %. Et lignende forsøk ble utført etter ekstraksjon, og resultatene viste nå en gjennomsnittsverk på 14,5 mg med fiber-til-fiber RSD på 4,8 %. Forskjellen i gjennomsnittsverk før og etter ekstraksjon kan skyldes at små mengder akseptorfase blir gjenværende i fiberens lumen, og ikke lar seg trekke ut med en mikrosprøyte. Det er sannsynlig at disse små mengdene akseptorfase likevel er med og bidrar som akseptorfase under ekstraksjonen. Denne slutning kan trekkes på bakgrunn av at det ble utført forsøk der de ulike akseptorfasevolum fra vektforsøkene ble analysert med hensyn på analyttinnhold, og at resultatene ikke viste korrelasjon mellom eksakt vekt av akseptorfase og tilsvarende ekstraksjonsutbytte. Små forskjeller i akseptorfasevolum etter ekstraksjon ble ikke funnet å påvirke de analytiske data.

Det ble videre utført et forsøk der det ble benyttet 13 µl akseptorfase (n = 6), og et tilsvarende forsøk med 15 µl akseptorfase (n = 6). Toppareal og ekstraksjonsutbytter for de to forsøkene ble sammenlignet. Det viste seg at bruk av 13 µl akseptorfase ga signifikant høyere toppareal for analyttene enn bruk av 15 µl akseptorfase, slik illustrert i figur 4.2. Dette skyldes at omtrent samme mengde analytter ble ekstrahert over i akseptorfasene, og at mengden analytter per volum derfor ble høyere ved bruk av 13 µl akseptorfase. Ekstraksjonsutbyttene ble ikke funnet å være forskjellige dersom det ble tatt hensyn til forskjellen i akseptorfasevolum ved beregning av utbytte. Dette kan også verifiseres teoretisk ved ligning (1). Om man antar at $K_{aks/org} = 1000$, $K_{org/don} = 100$, $V_{org} = 15 \mu l$ og $V_{don} = 500 \mu l$, så vil en relativt stor forandring i akseptorfasens volum (V_{aks}) fra 15 µl til 13 µl bare medføre en 1,6 % reduksjon i beregnet ekstraksjonsutbytte

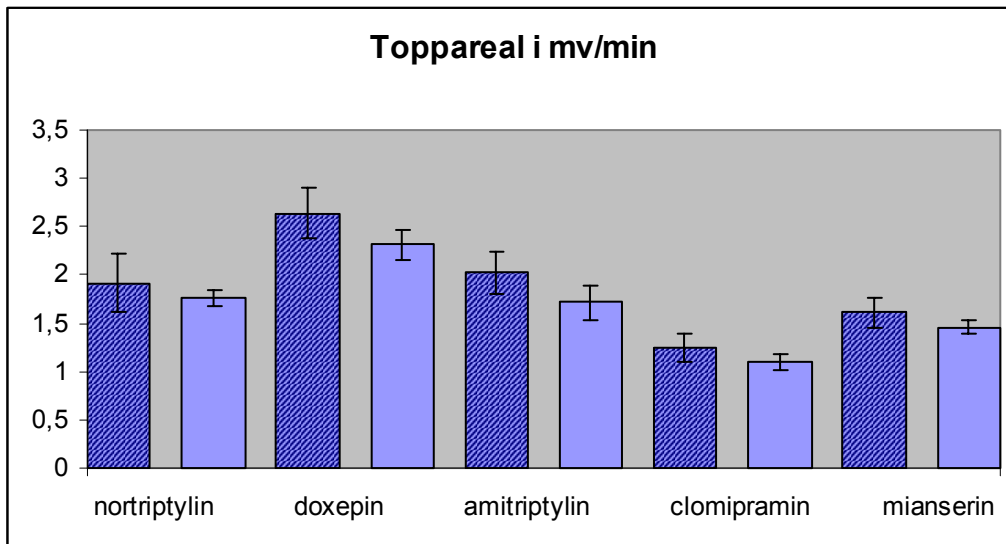


Fig. 4.2 Gjennomsnittlig toppareal ved bruk av 13 µl akseptorfase (skravert søyle) og 15 µl akseptorfase (ensfarget søyle).

Selv om små variasjoner i akseptorfasevolum er forventet å spille liten rolle når det gjelder kvaliteten på de analytiske data, er det viktig å ha kontroll på akseptorfasevolumet som innføres i fiber

4.3.2 Luftbobler i akseptorfase

Ved manuell innføring av akseptorfase i fiberen med mikrosprøyte hender det at man kan få med luftbobler. Dette kan resultere i små områder i hulfiberen som ikke inneholder akseptorfase. For å undersøke om tilstedeværelse av luftbobler i akseptorfase kan innvirke på ekstraksjonsutbyttene, ble det utført forsøk der 1 µl luft ble sugd inn i mikrosprøyten sammen med 15 µl akseptorfase. Luftboblen ble lagt omtrent midt inne i akseptorfase. Resultatene fra ekstraksjonen ble sammenlignet med et lignende forsøk utført samme dag uten innføring av luftboble. Resultatene viste signifikant høyere utbytte for alle analytter ved innføring av luftboble. Det er mulig at denne effekten av luftboblen skyldes forbedring i vibrasjon av akseptorfase på grunn av brudd i væskefasen forårsaket av luftboblen. På den annen side ble repeterbarheten til ekstraksjonene merkbart dårligere ved innføring av luftboble, slik illustrert i figur 4.3. Det kan derfor konkluderes med at luftbobler i akseptorfase bør unngås i fremtidig arbeid.

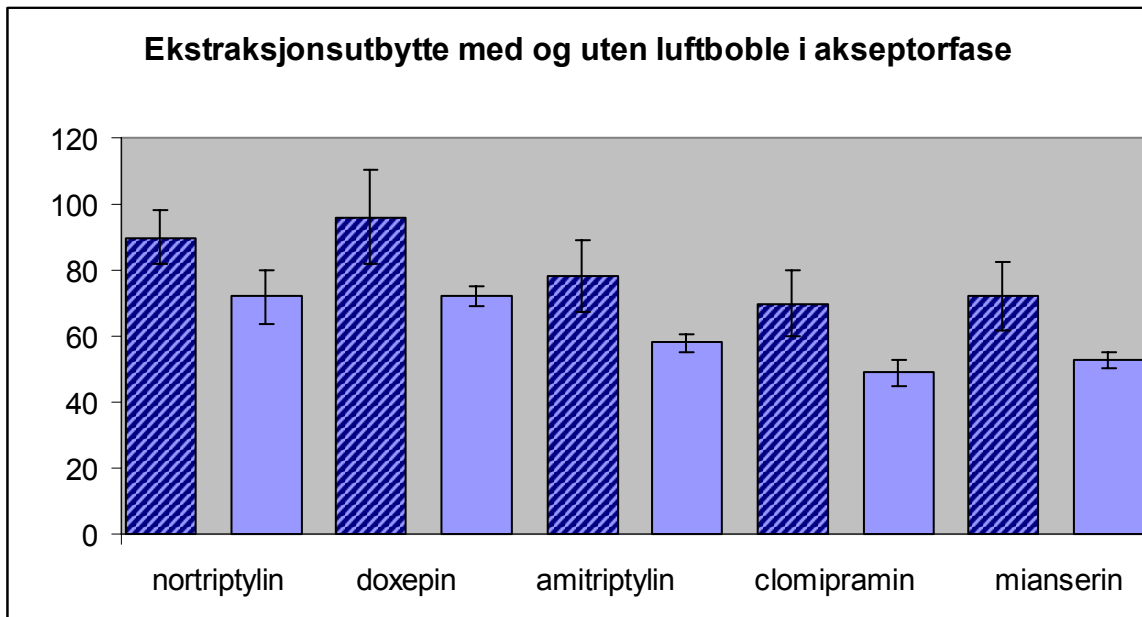


Fig. 4.3 Ekstraksjonsutbytte og standardavvik ved ekstraksjoner med luftboble i akseptorfase (skravert søyle) og vanlige ekstraksjoner uten luftboble utført samme dag (ensfarget søyle)

4.3.3 Oppbevaring av akseptorfase etter ekstraksjon

Med tanke på framtidig automatisering av LPME, og undersøkelse av metodens fleksibilitet, ble det undersøkt om man kan la fiber med akseptorfase bli stående i lengre tid (i donorfase) før akseptorfase tas ut, uten at dette vil påvirke resultatene. Syv fibre ble ekstrahert på vanlig måte, akseptorfase i fire av fibre ble tatt ut og analysert rett etter vibrering av ekstraksjonsenheten, mens de resterende tre fibre forble i donorfase i 22 timer. Resultatene viste høyere ekstraksjonsutbytte der hvor fiber hadde stått i 22 timer etter vibrering, men repeterbarheten var dårligere. Resultatene er vist i figur 4.3.

4. RESULTAT OG DISKUSJON

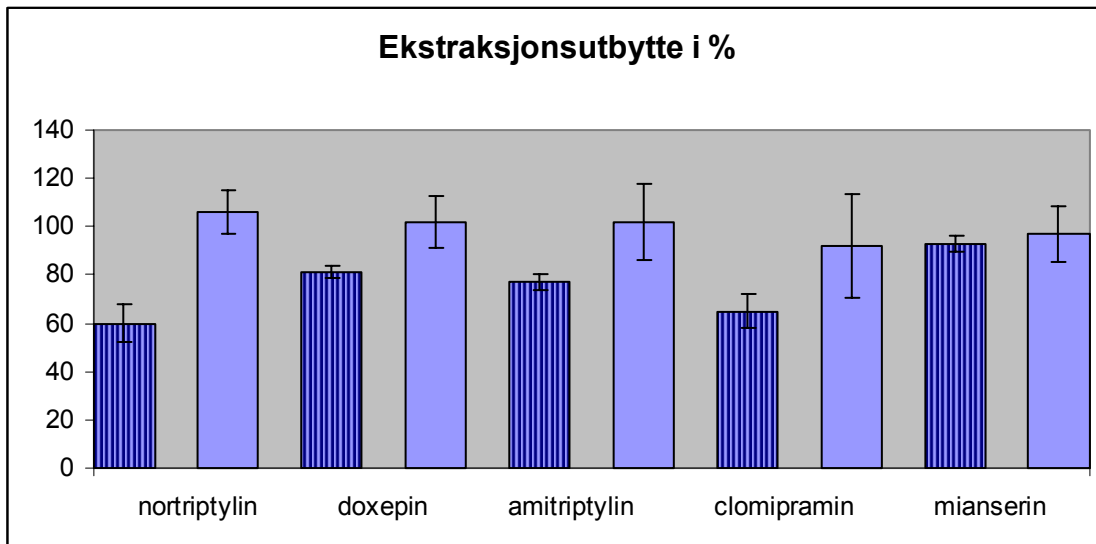


Fig.4.4: ekstraksjonsutbytter og relative standardavvik for analyttene ved t = 0 (skravert) og t = 22 (ensfarget)

Forskjellen i ekstraksjonsutbytte kan skyldes at ekstraksjonene ikke er ført helt til likevekt ved vibrering i 45 minutter, og at ekstraksjonen fortsatte i en tid etter vibrering var avsluttet. Oppbevaring av akseptorfase i fiber etter ekstraksjon kan også kompliseres av degradering av den organiske væskemembran. Det anbefales derfor å fjerne akseptorfase rett etter vibrering, og overføre denne til en annen beholder før analyse.

4.4 Polypropylenfiber

4.4.1 Valg av fiber

De fleste tekniske oppsett av LPME baserer seg på bruk av porøs hulfiber av polypropylen [15]. Polypropylen er gunstig blant annet fordi det er kompatibelt med et bredt utvalg av organiske løsemidler. Den mest brukte polypropylenfiberen er kommersielt tilgjengelig og har en indre diameter (ID) på 600 μm , veggtykkelse på 200 μm og en porestørrelse på rundt 0,2 μm [9]. Med en porestørrelse på rundt 0,2 μm , gir polypropylen en sterk immobilisering av organisk løsemiddel, noe som er viktig for å unngå lekkasje under ekstraksjon [14]. En veggtykkelse på 200 μm har vist seg å gi god mekanisk stabilitet av den organiske væskemembranen, også under sterk vibrering av ekstraksjonsenheten. Veggtykkelse på under 200 μm kan føre til dårligere stabilitet, og verdier over 200 μm kan resultere i utvidet ekstraksjonstid og reduserte ekstraksjonsutbytter på grunn av økning av volum og tykkelse på den organiske væskemembranen [15]. Pedersen- Bjergaard og Rasmussen har i tidligere arbeid benyttet en fiber spesielt laget for LPME med en ID på 1200 μm , veggtykkelse på 200 μm og porestørrelse på rundt 0,2 μm [15]. Med denne ikke-kommersielle fiberen kan fiberens lengde reduseres for bruk av 15 μl akseptorfase. Den reduserte lengden forbedrer kompatibiliteten med små prøvevolum, noe som er viktig ved analyse av biologiske prøver [15]. Sistnevnte polypropylenfiberen ble valgt ut i også dette arbeidet på grunn av lite prøvevolum og tidligere gode resultater ved bruk av denne typen fiber.

4.4.2 Variasjon i fiberlengde

Fiberens indre volum bestemmes av fiberens indre diameter, fiberens lengde og hvordan man lukker fiber i den ene enden. Siden tilklipping og lukking av fiber gjøres manuelt vil det forekomme en viss variasjon i indre volum fra fiber til fiber. Denne variasjonen ble undersøkt nærmere i dette arbeidet. 10 fibre ble klippet manuelt i biter på 2,0 cm og deretter veid på analysevekt. Hvis man antar at fiberen har konstant porøsitet vil variasjon i vekt mellom fibre være en indikasjon på variasjon i fibrenes lengde. Resultatene er oppsummert i tabell 4.4.

Tabell 4.4

Vekt og variabilitet av 10 fiber klippet til 2,0 cm lengde

| | |
|------------------------|---------|
| Gjennomsnitt | 4,46 mg |
| Relativt standardavvik | 1,5 % |

Som tabell 4.4 viser, må man regne med en viss variasjon i fiberens lengde når denne tillages manuelt. I tillegg kommer variasjoner i hvordan fiber lukkes i enden. Det må derfor forventes variasjoner i fiberens indre volum. For å teste ut om dette kan påvirke de analytiske data, ble ekstraksjonsutbyttene fra ekstraksjon med 6 fibre, lengde 2,0 cm, sammenlignet med ekstraksjonsutbyttene fra ekstraksjon med 6 fibre, lengde 2,2 cm. Resultatene viste ingen signifikant forskjell i ekstraksjonsutbytter for de to ulike fiberlengdene. Det er derfor sannsynlig at en relativt liten variasjon i fiberens indre volum ikke vil påvirke sluttresultatet.

4.4.3 Acetonvask av fiber

Porøse polypropylenfibre har vist seg å inneholde tilsetningsstoffer som i enkelte tilfeller kan påvirke ekstraksjonen av legemidler i LPME. Enkelte har derfor valgt å vaske fiber i aceton før ekstraksjon for å fjerne slike forurensninger [20, 27], mens andre har benyttet fiber uten slik vask [5, 8]. Det ble videre undersøkt i dette arbeidet om acetonvask av fiber kunne forbedre ekstraksjonsutbyttene. Hulfiber ble lagt i et begerglass med aceton i ultralydbad i 15 minutter. Aceton ble skiftet ut, og det hele ble gjentatt i ytterligere 15 minutter. Deretter ble fiberen lagt i avtrekk for avdamping av aceton. Ekstraksjonsutbytter fra fibre vasket i aceton ($n = 4$) ble sammenlignet med ekstraksjonsutbytter fibre ekstrahert på vanlig måte, uten acetonvask ($n = 6$). Resultatene er oppsummert i tabell 4.5

4. RESULTAT OG DISKUSJON

Tabell 4.5

Ekstraksjonsutbytte og repeterbarhet ved vask av fiber med aceton før ekstraksjon og uten acetonvask av fiber.

| Analytt | Med acetonvask | Uten acetonvask |
|--------------|-----------------------|-----------------------|
| | Utbytte i % (RSD i %) | Utbytte i % (RSD i %) |
| Nortriptylin | 70 (4) | 64 (14) |
| Doxepin | 83 (3) | 77 (4) |
| Amitriptylin | 67 (9) | 59 (9) |
| Clomipramin | 54 (17) | 43 (17) |
| Mianserin | 63 (20) | 45 (21) |

Resultatene viste en tendens til at acetonvask kunne gi økning i ekstraksjonsutbytte. Tendensen var størst for de mest hydrofobe stoffene amitriptylin, clomipramin og mianserin. Repeterbarheten var lik med eller uten acetonvask. Det kan se ut som om forurensninger i fiber kan påvirke ekstraksjonen, spesielt for de mest hydrofobe stoffene, og at acetonvask av fiber før ekstraksjon kan bedre ekstraksjonsutbyttene for disse analyttene, men det er nødvendig med flere undersøkelser for å trekke en konklusjon.

4.4.4 Preaksponering av tørr fiber for donorfase

Med tanke på fremtidig automatisering av LPME, er det viktig å undersøke om hulfiberen kan plasseres i donorløsning før immobilisering med organisk løsemiddel, eller om immobilisering av fiber bør utføres før kontakt med donorfase. Dette ble videre undersøkt ved at 5 hul fibre ble immobilisert ved fylling med 15 µl diheksyleter rett før ekstraksjon ($t = 0$), mens 5 tørre hul fibre ble stående i donorløsning i 5 timer ($t = 5$) før immobilisering ved samme prosedyre og ekstraksjon. Resultatene ble ikke statistisk signifikant forskjellige med hensyn på ekstraksjonsutbytte, men best repeterbarhet ble oppnådd ved plassering av fiber i donorfase rett før ekstraksjon, se tabell 4.6.

4. RESULTAT OG DISKUSJON

Tabell 4.6

Ekstraksjonsutbytte og repeterbarhet ved eksponering av tørr fiber for donorfase i 0 timer og 5 timer før immobilisering og ekstraksjon

| Analytt | Eksponering i 0 timer | Eksponering i 5 timer |
|--------------|------------------------------|------------------------------|
| | Utbytte i % (RSD i %) | Utbytte i % (RSD i %) |
| Nortriptylin | 91 (9) | 81 (16) |
| Doxepin | 85 (14) | 85 (15) |
| Amitriptylin | 75 (14) | 69 (20) |
| Clomipramin | 64 (16) | 58 (28) |
| Mianserin | 75 (16) | 60 (26) |

Det anbefales derfor at tørr fiber ikke eksponeres for donorfase i lang tid før immobilisering og ekstraksjon.

4.5 Gjenbruk av fiber

I LPME har det fram til nå vært vanlig praksis at hver fiber kun brukes til én ekstraksjon. Det var derfor interessant å undersøke om det er mulig å bruke fiber flere ganger.

3 hul fibre ble ekstrahert på vanlig måte. Donorfase ble tillaget med 0,2 ml prøveløsning 5 µg/ml og 0,8 ml karbonatbuffer 0,1 M. Det ble benyttet en standardløsning på 5 µg/ml, 5 ganger høyere enn normalt, for å lettere kunne detektere den gjenværende mengden av analytter i den organiske væskemembranen etter ekstraksjon. Etter ekstraksjon av fibrene ble akseptorfase tatt ut, og 10 µl ble overført til analyse. 2 av de 3 fibrene ble deretter gjenbrukt. Den ene fiberen ble straks fylt med ny akseptorfase, satt ned i en blank donorfase (donorfase uten analytter), og ekstrahert på nytt. Den andre fiberen ble fylt med 10 mM saltsyre fra innsiden, og satt ned i en vial fylt med 10 mM saltsyre. Enheten ble satt til vibrering, 1050 rpm, i 30 minutter. Deretter ble saltsyren fjernet, fiberen ble fylt med ny akseptorfase og satt ned i en blank donorfase for ekstraksjon. Etter ekstraksjon av begge disse fibrene ble 10 µl akseptorfase overført til analyse. Resultatene er oppsummert i tabell 4.7.

4. RESULTAT OG DISKUSJON

Tabell 4.7

Gjenbruk av fiber

| Analytt | Utbytte ¹ (%) | Utbytte ² (%) | Utbytte ³ (%) |
|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Normal | Gjenbruk | Gjenbruk med vask |
| Nortriptylin | 79 | 4 | 1 |
| Doxepin | 85 | 2 | 0,4 |
| Amitriptylin | 79 | 3 | 0,5 |
| Clomipramin | 69 | 5 | id ⁴ |
| Mianserin | 84 | 6 | id ⁴ |

¹ gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte for 3 paralleller

² ekstraksjonsutbytte ved 1 ny ekstraksjon i blank prøve

³ ekstraksjonsutbytte ved 1 ny ekstraksjon i blank prøve etter vask med 10 mM saltsyre

⁴ ikke detekterbart

Resultatene viser at en betydelig mengde analytter befant seg i fiberens organiske væskemembran etter den første ekstraksjonen, og at analyttene diffunderte ut i akseptorfasen ved gjenbruk. Etter vask av fiber med saltsyre kunne 3 analytter fremdeles detekteres i akseptorfase. For å unngå carry-over anbefales det derfor å kun benytte fiber én gang. Denne anbefaling støttes også av fiberens lave pris.

5. Konklusjon

Dette arbeidet har vist at maursyre kan benyttes som akseptorfase og at karbonatbuffer kan benyttes som donorfase ved ekstraksjon av basiske, hydrofobe legemidler. 3-fase LPME er relativt usensitiv for små variasjoner i volum av organisk væskemembranen, og den organiske væskemembranen kan tillages på flere måter. Fjerning av overskudd organisk løsemiddel anbefales dersom immobilisering skjer ved dypping, fordi det er vist å bedre ekstraksjonsutbyttene.

3-fase LPME er også relativt usensitiv ovenfor små forskjeller i akseptorfasevolum etter ekstraksjon. Det er derimot viktig å se til at riktig volum akseptorfase innføres i fiber, og ta hensyn til dette ved beregning. Luftbobler i akseptorfase ble funnet å påvirke både ekstraksjonsutbyttet og repeterbarhet. Luftbobler som innføres under fylling av akseptorfase, eller luftbobler som oppstår under ekstraksjonen bør unngås for å få repeterbare data. Akseptorfase bør tas ut av fiber etter normert ekstraksjonstid, fordi langvarig oppbevaring i ekstraksjonsenheten kan gi dårligere repeterbarhet.

Små variasjoner i fiberens lengde er av mindre betydning i LPME, og er ikke vist å forringe de analytiske data. Vasking av fiber i aceton før ekstraksjon kan være en fordel, spesielt for ekstraksjon av hydrofobe stoffer, men det må utføres flere forsøk for å trekke en konklusjon. Det kan anbefales å immobilisere fiber med organisk løsemiddel før kontakt med donorfase for å gi god repeterbarhet. Fiber bør kun benyttes til én gangs bruk, da gjenbruk av fiber kan gi carry-over av analytter som er gjenværende i den organiske væskemembranen. Den lave prisen på fiber bidrar til at dette lar seg gjennomføre økonomisk.

Denne oppgaven komplementerer tidligere arbeid med eksperimentelle prosedyrer ved utførelse av 3-fase LPME. Resultatene tilfører ny kunnskap på området som kan komme til god nytte ved en framtidig automatisering av metoden.

6. Referanser

1. Rasmussen, K.E., Pedersen-Bjergaard, S., Krogh, M., Ugland, H.G., Grønhaug, T.: *Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 873 (2000) 3-11
2. Halvorsen, T.G., Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E.: *Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction*. Journal of Chromatography B, 760 (2001) 219-226
3. Ugland, H.G., Krogh, M., Reubsaet, L.: *Three-phase liquid-phase microextraction of weakly basic drugs from whole blood*. Journal of Chromatography B, 798 (2003) 127-135
4. Andersen, S., Halvorsen, T. G., Pedersen-Bjergaard, S., et al.: *Stereospecific determination of citalopram and desmethylcitalopram by capillary electrophoresis and liquid-phase microextraction*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 33 (2003) 263-273
5. Bjørhovde, A., Halvorsen, T. G., Rasmussen, K. E., Pedersen-Bjergaard, S.: *Liquid-phase microextraction of drugs from human breast milk*. Analytica Chimica Acta, 49 (2003) 155-161
6. Halvorsen T. G., Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E.: *Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of citalopram, an antidepressant drug*. Journal of Chromatography A, 909 (2001) 87-93
7. Ho, T. S., Halvorsen, T. G., Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E.: *Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport*. Journal of Chromatography A, 998 (2003) 61-72
8. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E.: *Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of acidic drugs*. Electrophoresis, 21 (2000) 579-585
9. Ho, T. S., Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E.: *Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction Comparison with conventional liquid-liquid extraction*. Journal of Chromatography A, 963 (2002) 3-17
10. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E.: *Væskefase mikroekstraksjon med porøse hul fibre*. Kjemi, 2 (2002) 14-16

11. Jeannot, M. A., Cantwell, F. F.: *Solvent Microextraction into a Single Drop*. Analytical Chemistry, 68 (1996) 2236-2240
12. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E.: *Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques*. Journal of Chromatography B, 817 (2005) 3-12
13. Pedersen- Bjergaard, S., Rasmussen, K. E.: *Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis*. Analytical Chemistry, 71 (1999) 2650-2656
14. Psillakis, E., Kalogerakis, N.: *Developments in liquid-phase microextraction*. Trends in Analytical Chemistry, 22 (2003) 565-574
15. Rasmussen, K. E., Pedersen.Bjergaard, S.: *Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction*. Trends in Analytical chemistry, 23 (2004) 1-10
16. Halvorsen, T. G., Pedersen-Bjergaard, S., Reubsaet, J. L. E., Rasmussen, K. E.: *Liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. Extraction from small volumes of biological samples*. Journal of Separation Science, 26 (2003) 1520-1526
17. Frahnert, C., Rao, M. L., Grasmäder, K.: *Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring*. Journal of Chromatography B, 794 (2003) 35-47
18. Moore, D.S., McCabe, G.P.: *Introduction to the practise of statistics*, 3. opplag, W.H. Freeman and Company, USA 1999, s. 540-542
19. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E.: *Legemiddelanalyse*, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS, Bergen 2004, s. 58-61
20. Zhao, L., Zhu, L., Lee, H. K.: *Analysis of aromatic amines in water samples by liquid-liquid-liquid microextraktion with hollow fibers and high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 963 (2002) 239-248
21. Andersen, S., Halvorsen, T. G., Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E.: *Liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices*. Journal of Chromatography A, 963 (2002) 303-312

22. Melwanki, M. B., Hsu, W., Huang, S.: *Determination of clenbuterol in urine using headspace solid phase microextraction or liquid-liquid-liquid microextraction.* Analytica Chimica Acta, 552 (2005) 67-75
23. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E., Brekke, A., Ho, T. S., Halvorsen, T. G.: *Liquid-phase microextraction of basic drugs- selection of extraction mode based on computer calculated solubility data.* Journal of Separation Science, 28 (2005) 1195-1203
24. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E.: *Liquid-phase microextraction utilising plant oils as intermediate extraction medium- towards elimination of synthetic organic solvents in sample preparation.* Journal of Separation Science, 27 (2004) 1511-1516
25. Yamini, Y., Reimann, C. T., Vatanara, A., Jönsson, J. Å.: *Extraction and preconcentration of salbutamol and terbutaline from aqueous samples using hollow fiber supported liquid membrane containing anionic carrier.* Journal of Chromatography A, 1124 (2006) 57-67
26. www.membrana.com
27. Zhu, L., Ee, K. H., Zhao, L., Lee, H. K.: *Analysis of phenoxy herbicides in bovine milk by means of liquid-liquid-liquid microextraction with a hollow-fiber membrane.* Journal of Chromatography A, 963 (2002) 335-343