

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE  
FOR GRADEN MASTER I FARMASI

---

**ELEKTROMEMBRANEKSTRAKSJON MED  
FORSKJELLIG VÆSKEMEMBRANER**

MOHEBA FAIZI

FAGGRUPPEN FOR LEGEMIDDELANALYSE

AVDELING FOR FARMASØYTISK KJEMI

FARMASØYTISK INSTITUTT

DET MATEMATISKE-NATURVITENSKAPELIGE FAKULTET

UNIVERSITET I OSLO

**MAI 2013**



**UiO : Universitetet i Oslo**

**MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR  
GRADEN MASTER I FARMASI**

**ELEKTROMEMBRANEKSTRAKSJON MED FORSKJELLIG  
VÆSKEMEMBRANER**

**Moheba Faizi**

Masteroppgaven ble gjennomført i perioden august 2012-mai 2013 ved Faggruppe for Legemiddelanalyse, Avdeling for Farmasøytisk Kjemi Institutt, Universitet i Oslo.

Veiledere:           Professor Stig Pedersen-Bjergaard  
                          Førsteamanuensis Astrid Gjelstad  
                          Stipendiat Knut Fredrik Seip

## INNHALDSFORTEGNELSE

1	Forord.....	4
2	Sammendrag.....	5
3	Forkortelser .....	6
4	Innledning.....	8
5	Teori .....	10
5.1	Elektromembranekstraksjon .....	10
5.2	Massetransport.....	12
5.3	Spenning.....	12
5.4	Ekstraksjonstid .....	13
5.5	Organiskfase/ Membran .....	14
5.6	High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....	15
5.6.1	Omvendt-fase-kromatografi .....	16
6	Eksperimentelt.....	17
6.1	Modellsubstanser.....	17
6.2	Utstyr Og Fremgangsmåte For EME.....	18
6.3	Betingelser For HPLC .....	19
6.4	Kjemikalier .....	21
6.5	Løsninger.....	24
6.5.1	Stamløsninger .....	24
6.5.2	Standardløsninger .....	24
6.5.3	Donorfaser .....	25
6.5.4	Akseptorfase .....	25
6.5.5	Organiske faser .....	25
6.5.6	Mobilfaser til HPLC .....	29
6.6	Beregning Av Utbytte.....	29
7	Resultater og Diskusjon.....	30
7.1	Screening Av Ulike Organiske Faser .....	30
7.1.1	Ekstraksjon og spenning med nitroaromater som organiske fase.....	33
7.1.2	Ekstraksjon og spenning med ketoner som organiske fase .....	36
7.1.3	Tilsetning av ionepar-danner til den organiske fasen .....	39
8	Konklusjon .....	42
9	Referanser.....	43



## 1 FORORD

Arbeidet med denne masteroppgaven har vært en lang prosess, og markerer slutten på et femårig studium. Masteroppgaven har gitt meg muligheten til å fordype meg i den ny, og trendy teknikken i legemiddelanalyses verden, EME.

Jeg vil gjerne rette en stor takk til mine veiledere professor Stig Pedersen-Bjergaard, førsteamanuensis Astrid Gjelstad og stipendiat Knut Fredrik, som har kommet med gode, konstruktive innspill underveis.

I tillegg vil jeg takke Maren, Thanh, og øvrige ansatte på avdelingen for at dere gjorde tiden som masterstudent til en veldig hyggelig og minnerik tid for meg. En spesiell takk til Mustafa Stanikzai som hjalp meg med oppbygging av oppgaven, og kom med fine innspill.

Til sist vil jeg takke min flotte familie for all støtte, og min omtenksum forlovde Qais Ershadi for hans tålmodighet og oppmuntring som alltid har gitt meg energi til å fullføre arbeidet mitt.

Oslo, Mai 2013

---

Moheba Faizi

## 2 SAMMENDRAG

I denne oppgaven har det blitt arbeidet med elektromembranekstraksjon (EME) til ekstraksjon av upolare legemidler fra vandige prøver. Fem modellsubstanser, petidin, metadon, loperamid, nortriptylin, og haloperidol, ble ekstrahert fra 1000 µl vandig, sur prøveløsning (donorfase), bestående av 10mM HCl, over en organisk væskefase og inn i en sur akseptorfase (25 µl). Den organiske væskefasen besto av en porøs hulfiber hvor veggen var impregnert med et organisk løsemiddel.

I donor- og akseptorfasen ble det plassert elektroder, den negative elektroden i akseptorfasen, mens den positive elektroden var i donorfasen. Deretter ble det lagt på spenning. Ekstraksjonstiden var 5 minutter, og systemet ble hele tiden utsatt for risting ved 900 rpm. Etter endt ekstraksjon ble akseptorfasen fortynnet i forholdet 1:10 i 10mM HCl og analysert på et HPLC-instrument.

Det ble undersøkt om det var mulig å foreta en selektiv ekstraksjon av upolare analytter ved bruk av forskjellige organiske faser uten tilsatte transportmolekyler (carrier molecules). Hovedfokuset har vært å finne hvilke typer løsemiddel som er mest egnet for ikke-polare analytter som kan gi høyt ekstraksjonsutbytte ved lav strøm.

Forsøk som er utført omfatter ekstraksjoner med ulike organiske faser i væskemembranen med totalt 52 ulike løsningsmidler, ekstraksjoner med forskjellige sammensetninger av organiske faser, forsøk med ulik ekstraksjonstid på opptil 30 minutter, og forsøk med ulik påsatt spenning. En rekke forskjellige organiske løsningsmidler ble testet ut, og generelt ga nitroaromater og ketoner de høyeste utbyttene for modellanalyttene. Det har blitt vist at ekstraksjonsutbyttene av modellsubstansene ved elektromembranekstraksjon økte ved lengre ekstraksjonstider og for mange analytter nås steady-state etter 15 minutters ekstraksjon. På bakgrunn av det lave løsemiddel og prøvemateriell forbruket, den korte prøveopparbeidelsestiden, det enkle oppsettet samt renheten av ekstraktene, viste EME flere fordeler sammenlignet med andre prøveopparbeidelsesmetoder.

### 3 FORKORTELSER

HCl	Saltsyre
HCOOH	Maursyre
NPOE	2-Nitrofenyloktyleter
ENB	1-Etyl-2-nitrobenzen
IPNB	1-Isopopyl-4-nitrobenzen
TEHP	Tris(2-etylheksyl)fosfat
DEHP	Di(2-etylheksyl)fosfat
CE	Kapillærelektroforese
HPLC	High performance liquid chromatography
EME	Elektromembranekstraksjon
LPME	Liquid Phase Micro Extraction (Væskefasemikroekstraksjon)
SPE	Solid Phase Extraction (Fast-faseekstraksjon)
RSD	Relativt standardavvik
rpm	Revolutions per minute (Rotasjoner per minutt)
i.d.	Indre diameter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
g	Gram
mg	Milligram
mm	Millimeter
cm	Centimeter

$\mu\text{g}$	Mikrogram
M	Molar
mM	Millimolar
V	Volt
$\mu\text{A}$	Mikroampere
mA	Milliampere



## 4 INNLEDNING

De siste årene har det vært et økende fokus på å utforske mer miljøvennlige løsninger innen prøveopparbeidelse. Redusert forbruk av farlige organiske løsningsmidler, små mengder prøve, og redusert analysetid har ført i retning av nye prøveopparbeidelsesmetoder på mikronivå.

En av disse retningene var innføring av elektromembranekstraksjon (EME), en helt ny ekstraksjonsmetode [1]. Ved mikroekstraksjonen eliminerer man fullstendig eller nesten fullstendig bruken av organiske løsemidler. Den er enkel og tidssparende, samt enkel å automatisere, men dette krever kompetanse innen metodeutvikling.

EME er en videreutvikling av Hollow fiber liquid fase microextraction (HF-LPME), som har fått betydelig oppmerksomhet de siste årene. Prinsippet for EME baserer seg på elektrokinetisk migrasjon av et legemiddel over en tynn kunstig væskemembran. Variasjon på systemets parametere som ekstraksjonstid, spenning, volum, pH, akseptor, donor og organiske fase kan føre til bedre selektivitet og god mulighet til å påvirke ekstraksjonsmekanismen [2].

EME tilbyr flere fordeler fremfor LPME, som redusert ekstraksjonstid, mulighet til å justere det elektriske potensialet over SLM (drivkraften i EME) med tanke på styrke og retning ved enkelt justering av spenningskilden koblet til oppsettet. I tillegg er forbruket av organiske løsningsmidler per prøve redusert til 0,5µl i mikrochip format [2].

De fleste publiserte EME-arbeidene har hittil vist at EME har høy fleksibilitet, lavt forbruk av reagenser, løsningsmidler og råvarer, og er kompatibel med mange kompliserte matrikser innen bioanalyse. Det er gjort forsøk med vandige prøver, urin- og plasmaprøver [1]. På den andre side kan det være vanskelig for EME å konkurrere med de klassiske teknikkene som LLE og SPE, fordi disse teknikkene er godt integrert i validerte analytiske prosedyrer [3]. Derfor vil den fremtidige utviklingen trolig være basert mer i spesialiserte retninger og svært unike funksjoner. Nye og spesialiserte membraner er også under utvikling som kan gi EME flere funksjoner [4]. Nyere arbeid har vært å ekstrahere peptider [5], og en annen interessant tilnærming var bruk av mikrochip for ekstraksjon [6].

Hovedfokuset i dette arbeid har vært å:

Forsøke å finne måter for å øke ekstraksjonsutbyttene til upolare basiske legemidler.

Arbeidet i denne oppgaven har hatt til hensikt å finne mer passende organiske løsningsmidler enn de som er kjent fra før (ENB, NPOE), som kan gi høyere utbytte, og generere lav strøm for de aktuelle modellsubstansene. Alle stoffene som ble brukt i oppgaven er baser med pKa-verdier på mellom 8,0-10,47. Dette innebærer at de er helt eller delvis ladet ved fysiologisk pH, og er derfor egnet for ekstraksjon med EME. I tillegg til dette er stoffene relativt hydrofobe forbindelser med logP-verdier (fordelingsforholdet mellom n-oktanol og vann) på mellom 2,4 -4,77, noe som tilsier at de vil kunne løses i en organisk fase.

## 5 TEORI

### 5.1 ELEKTROMEMBRANEKSTRAKSJON

EME er en miniaturisert prøveopparbeidelsesteknikk der ladede analytter migrerer fra en prøveløsning, via en kunstig væskemembran og videre inn i en akseptorfase. Elektrisk spenning er drivkraften for massetransport av analyttene til akseptorfase. Ved å benytte spenning som drivkraft har man i tillegg til rask ekstraksjonshastighet og høy selektivitet, stor fleksibilitet fordi spenningen enkelt kan justeres både i størrelse og retning via spenningskilden [7]. Væskemembranen ble laget ved impregnering av veggene i hulfiberen med et organisk løsemiddel. Teknikken har flere fordeler sammenliknet med tradisjonelle prøveopparbeidelsesteknikker som fast faseekstraksjon (SPE) og væske-væskeekstraksjon (LLE), for eksempel hurtig ekstraksjonstid, oppkonsentrering og isolering av analytt, små prøvolum, rene ekstrakter samt lavt forbruk av organisk løsemiddel.

Oppsettet for EME består av en donor- og akseptorfase, en organisk fase immobilisert i en hulfiber, en spenningskilde og to elektroder. Et skjematisk oppsett er vist i Fig. 1. Oppsett for EME. [8]. Ved ekstraksjon av basiske substanser fylles donorfasen i et prøveglass, hulfiberen plasseres i donorfasen via prøveglassloket og den positive elektroden anoden plasseres i prøven. pH-en justeres slik at analytter av interesse er ladet. Donorfasen surgjøres slik at de blir positivt ladet og kan migrere gjennom væskemembranen mot katoden og akseptorfase. Den organiske fasen immobiliseres i en porøs hulfiber ved å dyppe fiberen i en organisk fase i cirka 5 sekunder. Deretter fylles hulrommet i fiberen med akseptorfase og den negative elektroden (katode) føres inn. Elektrodene kobles til en spenningskilde og hele systemet blir utsatt for kontinuerlig risting. Agitasjonen gjør at væsken sirkulerer og dette øker sannsynligheten for at alle analyttmolekyler får direkte kontakt med fiberveggene i løpet av ekstraksjonen.

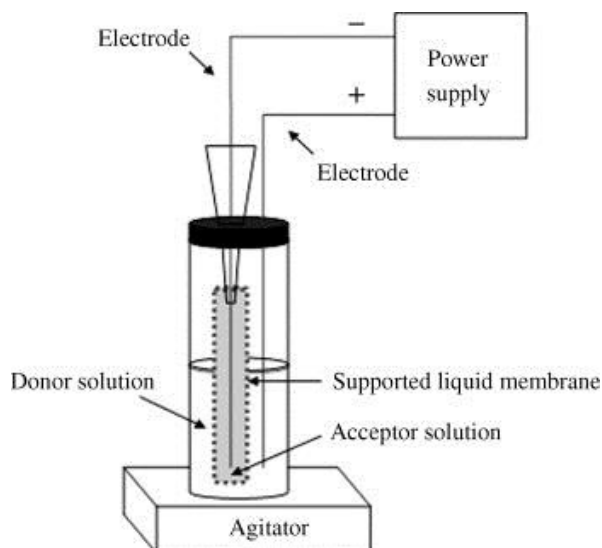


Fig. 1. Oppsett for EME

EME av basiske legemidler ble første gang utført i 2006, og genererte utbytter på 70 % eller mer for alle modellsubstansene med 5 minutter ekstraksjon og 300 V [1]. Tidligere forsøk har vist positive resultater ved bruk av nitroaromatiske forbindelser som organisk løsemiddel, i tillegg til mono-og di-alkylerte fosfater som transportmolekyl i væskemembranen [2].

EME har blitt brukt som prøveopparbeidelsesteknikk for blant annet analyse av opioidantagonister fra ubehandlede biologiske prøver [9], analyse av amfetaminer fra fullblod [10], ekstraksjon av peptider [11], bestemmelse av flere biologiske anioner i human fostervann [12], bestemmelse av klorfenoler i vannprøver [13], analyse av sure forbindelser som natrium diklofenak fra biologiske prøver [14].

## 5.2 MASSETRANSPORT

Massetransport av den ladde analytten i et elektrisk felt gjennom en kunstig væskemembran i EME har blitt beskrevet med Nernst-Planck massetransportligningen. Man kan beregne fluks for den ladde analytten ( $J_i$ ) gjennom den kunstige væskemembran [15].

$$J_i = -\frac{D_i}{h} \left( 1 + \frac{v}{\ln \chi} \right) \left( \frac{\chi - 1}{\chi - e^{-v}} \right) (c_i - c_{i0} e^{-v}) \quad (1)$$

Formelen (1) viser at massetransporten for et bestemt ion er avhengig av ionets diffusjonskoeffisient ( $D_i$ ), membran tykkelse ( $h$ ), den totale ionekonsentrasjonsrasjonen på donorsiden/akseptorsiden ( $\chi$ ), en dimensjonsløs drivkraft ( $v$ ), og  $c_i$  og  $c_{i0}$  er konsentrasjonen av den ladede analytten i henholdsvis kunstig væskemembran og akseptorløsning.

$$v = \frac{z_i e \Delta \phi}{kT} \quad (2)$$

$z_i$  er ladningen til analytt,  $e$  er elementærladning,  $\Delta \phi$  er det elektriske potensialet over den kunstige væskemembranen,  $k$  er Boltzman's konstant og  $T$  er absolutt-temperaturen [15]

Uttrykket ovenfor viser tydelig at spenning, ionebalanse, temperatur og membran-sammensetningen er avgjørende parametere for optimaliseringen av massetransport fra donorløsningen til akseptorløsningen.

## 5.3 SPENNING

Den viktigste drivkraften i EME er forskjellen på det elektriske potensialet. Derfor er det viktig at analyttene er ladet slik at det oppnås maksimalt ekstraksjonsutbytte [12]. Forutsetningen for ekstraksjoner der man bruker spenning som drivkraft er at det går strøm gjennom all de tre fasene [1]. Donorfase og akseptorfase er vandige og kan derfor lede strøm, mens hulfiberen med den organiske fasen gir den største elektriske motstanden i systemet. Med minkende motstand i væskemembranen vil det bli økt transport av analytter mot akseptorfase. Dette er imidlertid ikke den eneste

konsekvensen av å velge et organisk løsemiddel med høy elektrisk ledningsevne. Jo mer strøm det går i systemet, desto mer elektrolyse vil det skje ved elektrodene [16]. Forutsatt at væskemembranen og analyttene er inerte for elektrodereaksjoner, skjer elektrolysen etter følgende reaksjoner i henholdsvis donor- og akseptor-løsninger [12].

Donorfase (positiv elektrode):



Akseptorfase (negativ elektrode):



Justering av pH i akseptor- og donorfaser er nødvendig for å gi en pH-gradient som kan lette massetransport av analytter [12]. Valget av organisk løsemiddel bør derfor være basert på i hvilken grad det leder strøm og hvor stor sjanse det er for gassdannelse [1].

## 5.4 EKSTRAKSJONSTID

Det har blitt vist at ekstraksjonsutbytte øker med økt ekstraksjonstid inntil et visst punkt, der systemet når steady-state. Etter at steady-state er oppnådd ser man liten eller ingen økning i utbytte [1]. Årsaken til dette kan være blant annet at konsentrasjonsgradienten over væskemembranen minker som en følge av at analyttene ekstraheres over i akseptorfase. En annen mulig årsak kan være at økende ekstraksjonstid vil bygge opp et lag av ioner i grensesnittene på begge sider av væskemembranen, noe som vil hindre transport av analytter [17], [18]. I noen tilfeller kan det også hende at det blir en pH-gradient i systemet, som følge av elektrolyse, se ligning 3, og 4. Negativ elektrode står i akseptorfase mens den positive elektroden er plassert i donorfase. Når den påsatte spenningen står på lenge kan det, teoretisk sett, bli fjernet så mye  $\text{H}^+$  fra akseptorfase at pH i fasen stiger. Når pH stiger kan det forhindre at modellsubstansene holdes på fullstendig ionisert form og når modellsubstansene ikke er fullstendig ioniserte vil de få en fordeling tilbake til den organiske fasen. Elektrolyseaktivitet i EME fører til dannelse av gassbobler i akseptor- og donorfase som kan begrense utbyttet.

## 5.5 ORGANISKFASE/MEMBRAN

Den organiske fasen som immobiliseres i porene på en sylinder-formet hulfiber av polypropylen, er avgjørende for analyttens diffusjon ( $D_i$ ) og fordelingen ( $C_i - C_{i0}$ ) inn i akseptorløsningen. Sammensetning og tykkelse av den kunstige væskemembranen påvirker analyttens massetransport. Ulike organiske faser har blitt testet. Studier har vist at nitroaromatiske løsningsmidler som for eksempel, NPOE har ofte gitt relativt høyt utbytte ved EME av basiske legemidler. Sure legemidler gav imidlertid høyre utbytte med langkjedede alkoholer som organisk fase [3].

For å øke utbyttene kan det tilsettes et transport-molekyl som for eksempel DEHP eller TEHP. DEHP danner et nøytralt kompleks med analyttene som bidrar til transport av analytter over den organiske fasen mens mekanismen til TEHP er ukjent [18].

En vesentlig utfordring i EME er at væskemembranen delvis kan løses ut i prøven under ekstraksjon. Av denne grunn ble det nylig utviklet en membran som er basert på en homogen, ikke-porøs polymer inkluderings- membran (PIM). Den demonstrerte en betydelig forbedret mekanisk robusthet og enklere håndtering i forhold til tidligere erfaringer med SLM basert på porøs polypropylen [4].

## 5.6 HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

I denne oppgaven ble akseptorfasen etter endt ekstraksjon analysert på et instrument av typen *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). På norsk kalles apparaturen væskechromatografi. Hovedkomponentene i en væskechromatograf er vist i Fig. 2. [19].

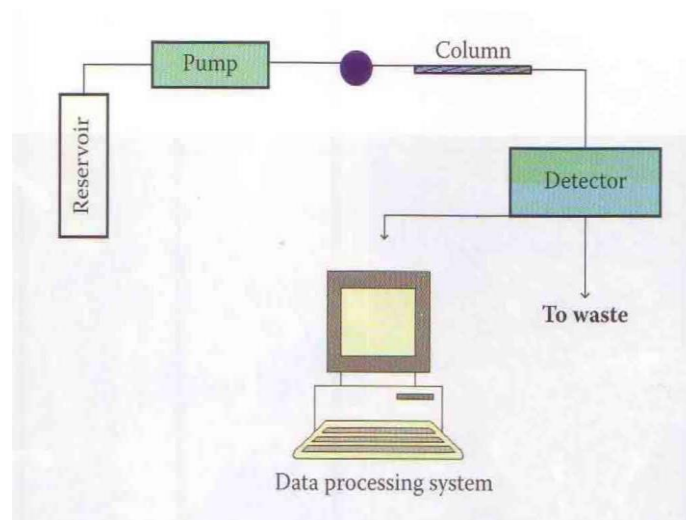


Fig. 2. HPLC-skisse

Systemet består av et mobilfasereservoar, en injektor for injeksjon av prøven, en pumpe som suger mobilfase fra reservoaret og presser det gjennom en kolonne pakket med pakkematerialet, en detektor som detekterer eluerte stoffer fra kolonnen, et avfallsreservoar og en datamaskin som bearbeider stoffenes respons. Hele analyseprosessen kan automatiseres og styres av datasystemet.

HPLC baserer seg på separasjon av stoffene på den stasjonære fasen, og stoffene blir separert med ulike retensjonstid på grunn av ulike interaksjoner, og alle delene som væskechromatografen består av er optimalisert for å gjøre separasjonen så effektiv som mulig. Detektoren skal gi en respons, det vil si et elektrisk signal for de stoffene som detekteres. Responsen skal være proporsjonal med konsentrasjon av stoff i mobilfase, slik at det kan utføres kvantitative analyse basert på måling av topparealer eller topphøyder. Injektoren skal føre et bestemt volum av prøveløsningen inn i strømmen av mobilfase like før mobilfasen presses inn i kolonnen. Prøveglassene settes i auto-injektoren og prøvene injiseres i programmert rekkefølge og etter bestemte tidsintervaller. Prosessen kan styres av HPLC-apparatets data-program slik at analysen kan foregå uten tilsyn [20].



Under oppgaven ble det benyttet omvendt-fase kromatografi, derfor blir kun dette prinsippet omtalt her.

### 5.6.1 Omvendt-fase-kromatografi

I omvendt-fase-kromatografi har stasjonærfasen hydrofobe funksjonelle grupper på overflaten som er bundet til silanolgrupper på silika som stasjonærfase. Octadecyl eller C18 er den mest hydrofobe fasen og cyanopropyl eller CN er de minst hydrofobe fasene. Stoffene blir retardert og separert ved hydrofobe interaksjoner på kolonnen. De viktigste kreftene er Van der Waal-krefter som er relativt svake krefter, men de øker med molekylstørrelsen til stoffene. De minst hydrofobe stoffene får derfor minst retensjon og følgelig kortest retensjonstid. Silika-baserte stasjonærphaser kan normalt brukes i pH-område 2-8.

Mobilfasen er typisk en vandig bufferløsning blandet med en organisk modifikator. Før bruk må en fjerne luft i løsningen, og løsningen må filtreres. Løsemidlene som benyttes i omvendt-fase-kromatografi, som vann, metanol og acetonitril, har lavest UV-cuttoff, og kan benyttes ved bølglengder over 205 nm. Disse løsemidlene er også lite toksiske og har lav viskositet. Generelt bør stoffer ikke løses i løsemidler som har en høyere løsemiddelstyrke enn mobilfase. Resultatet er at stoffene elueres ut av kolonnen som brede topper.

Styrken på mobilfasen styres av mengden organisk modifikator og av typen organisk modifikator. Økes innhold av organisk modifikator, økes styrken og retensjonen avtar. Retensjon av nøytrale stoffer styres av innhold organisk modifikator i mobilfasen. Økende innhold av organisk modifikator minsker retensjonen. Retensjon av nøytrale stoffer påvirkes ikke av pH, mens retensjon av ioniske stoffer øker etter som pH nedsetter ioniseringen, og avtar med økende ionisering. Deres retensjon er også avhengig av innhold organisk modifikator i mobilfasen. pH i mobilfasen styres ved å tilsette buffere. Bufferkonsentrasjonen er typisk i området 0,01-0,05 M. Ofte benyttes fosfatbuffere på grunn av lav UV-absorbans. For separasjon av syrer eller baser kan endring av pH i mobilfasen gi store endringer i separasjons selektivitet. For å få robuste analysemetoder er det viktig å velge en pH hvor retensjonen varierer lite med små endringer i mobilfasens sammensetning. Det er best å velge pH slik at stoffene enten er fullstendig ionisert eller ioniseringen er undertrykket.

Kolonnen skal separere stoffene på kortest mulig tid, og gi så liten spredning av stoffene som mulig når de transporteres av mobilfase. Den typiske HPLC-kolonnen er et 10-25 cm langt stålrør pakket med 5  $\mu\text{m}$  partikler. Indre diameter på røret er 4,6 mm. Det er typisk at mobilfase pumpes gjennom kolonnene med en hastighet på 0,5-2 ml/min [20]

## 6 EKSPERIMENTELT

### 6.1 Modellsubstanser

Tabell 1 viser en oversikt av pKa-verdi, log P-verdi og produsent for modellsubstansene som har blitt benyttet. Fig. 3. viser kjemisk struktur av modellsubstansene [21].

Tabell 1: Oversikt over pKa-verdi, log P-verdi og produsent for modellsubstansene

Analytt	pKa	Log P	Produsent
<b>Petidin</b>	8,1	2,4	Norsk medisinaldepot(Oslo, Norge)
<b>Loperamid</b>	9,4	4,7	Sigma (Steinheim), Tyskland
<b>Metadon</b>	9,1	5,0	Sigma (Steinheim), Tyskland
<b>Nortriptylin</b>	10,4	4,4	Sigma (Steinheim), Tyskland
<b>Haloperidol</b>	8,0	3,6	Sigma (Steinheim), Tyskland

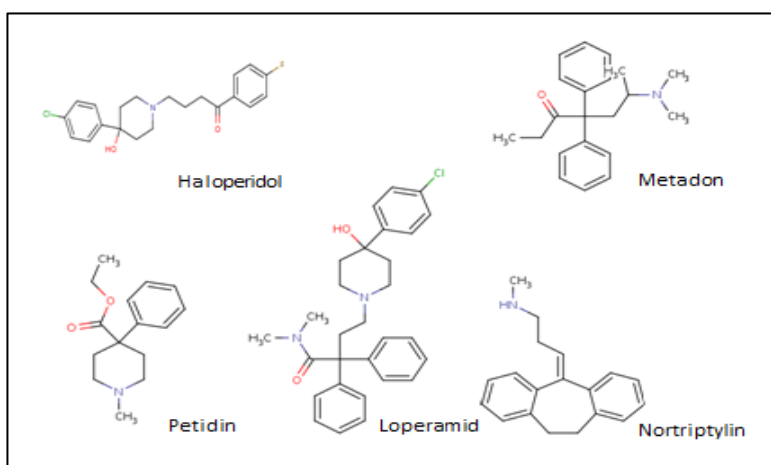


Fig. 3: Kjemisk struktur av haloperidol, metadon, nortriptylin, loperamid og petidin

## 6.2 UTSTYR OG FREMGANGSMÅTE FOR EME

En 2,4 cm lang hulfiber av typen PP (polypropylen) Q 3/2 (Membran, Wuppertal, Tyskland) med indre diameter 1,2 mm, veggtykkelse 200  $\mu\text{m}$  og porestørrelse 0,2  $\mu\text{m}$  ble klippet av og klemt mekanisk helt tett i den ene enden med en tang. I den andre enden ble tuppen av en 2,1 cm lang pipettespiss av typen Finntip 200 ext (Thermo Scientific, Vantaa, Finland) smeltet fast for å virke som trakt. Hulfiberen med tilhørende pipettespiss ble dyppet i organisk løsningsmiddel i cirka 5 sekunder for å mette porene i veggen med organisk fase, og overflødig væske på membranen ble tørket av med papir. Deretter ble den ført gjennom prøveglasslokket og 1000  $\mu\text{l}$  donorfase ble tilsatt i prøveglasset av typen Microtube with cap (Sarstedt, Numbrecht, Tyskland) med et volum på 2 ml, indre diameter 8 mm og høyde 45 mm. Ved hjelp av en 50  $\mu\text{l}$ -mikrosprøyte (Hamilton, Bonaduz, Sveits) ble 25  $\mu\text{l}$  akseptorfase (10 mM HCl) tilført via pipettespissen og inn i hulfiberen. Platinatråder med diameter 0,5 mm (K. Rasmussen, Hamar, Norge) ble plassert slik at elektroden med positivt potensial stod i donorfasen og elektroden med negativt potensial stod i akseptorfase. Membranen ble plassert i donorfasen og prøveglasslokket skrudd fast. Kablene ble koblet til platinatrådene og spenningskilden som ble brukt var av typen ES 0300-0,45 eller ES 015-10 fra Delta Power supplies (Delta Electronika, Zieriksee, Nederland). Hele systemet ble satt på ristebrett av typen Vibramax 100 agitator (Heidolph, Kelheim, Tyskland) eller Eppendorff thermomixer Comfort (Eppendorff, Hamburg, Tyskland) og risting ved 900 rpm ble utført. Ekstraksjonene ble utført i romtemperatur. Etter endt ekstraksjon ble 20  $\mu\text{l}$  akseptorfase overført til et autosamplerglass, fortynnet med 20  $\mu\text{l}$  10 mM HCl og analysert på HPLC. Fig. 4. viser en bildesekvens av denne arbeidsgangen:

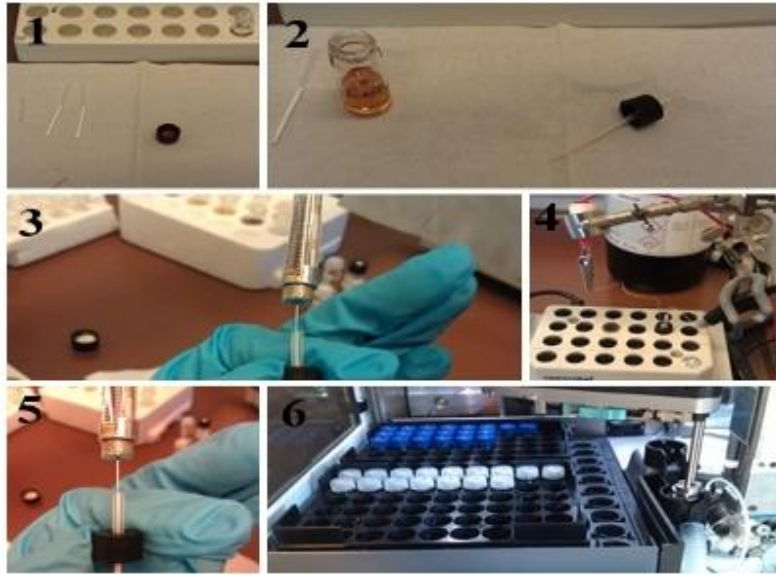


Fig. 4. Bilde 1 viser de ulike komponentene som ble benyttet under ekstraksjonen ved EME på lab. Bilde 2 viser hulfiberen impregnert med organiskfase. Bilde 3 viser tilsetning av akseptorfase. Bilde 4 viser donorfasen med positiv elektrode, og med den negative elektrodene i akseptorfase. Kablene ble koblet til og oppsettet ble satt på ristebrett. Bilde 5 viser hvordan akseptorfase blir overført med mikrosprøyte til vialer. Bilde 6 viser at de deretter blir ekstraktet analysert med HPLC

### 6.3 BETINGELSER FOR HPLC

I dette arbeidet ble HPLC med UV-detektor brukt som analyseinstrument. Instrumentet som ble brukt i forsøkene var av typen Agilent 1200 system med degasser (G1379B), pumpe (G1312B), autosampler (G1376C), prøvetermostat (G1330B), kolonneovn (G1316B), UV-detektor (G1315C), Chemstation for LC 3D system software Rev B.03.01-SR1 [317], alt fra Aligent technologies (Santa Clara, CA, USA). Tabell 2 viser en oversikt over parametere og tilsvarende verdier for HPLC-oppsettet.

Tabell 2: HPLC-parametere og-verdier

Parameter	Verdi
Kolonne	YMC-Triart C18 150 x 2,0 mm I.D.5 µm (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Tyskland)
Mobilfase A	5 % ACN i 20 mM maursyre
Mobilfase B	95% ACN i 20 mM maursyre
Deteksjon bølgelengde	214 nm
Flow	0,3 mL/min
Eluering	Gradienteluering 0 min. – 20 % mobilfase B 13 min. – 70 % mobilfase B 14 min. – 100 % mobilfase B 16 min. – 100 % mobilfase B 16,50 min. – 20 % mobilfase B 21 min. – 20 % mobilfase B
Kolonnetemperatur	23 °C
Injeksjonsvolum	20 µl
Analysetid	23,9 min

## 6.4 KJEMIKALIER

Tabell 3 viser en oversikt over kjemikalier som er brukt i tillaging av bufferløsninger, akseptor-, donor-, mobil- og organiske faser i forsøkene.

Tabell 3: Oversikt over kjemikalier som er brukt i forsøkene

Kjemikalie	Renhet/Kvalitet	Produsent
Acetofenon	≥98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Acetonitril (ACN)	99,9 %	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Benzaldehyd	≥99,5 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Benzyklorid	99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Benzyl metyl keton	99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Cinnamonitril	97 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
2-dekanon	≥98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
2,6-Dimetyl-4-heptanon	≥99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
2,4-Dimetyl-1-nitrobenzen	≥99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
(2,2-Dimetyl-1-propyl)benzen	≥97 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Di(2-etylheksyl)fosfat (DEHP)	Minimum 95 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Dibutylfosfat	≥ 97 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Di-sec-butylfenol	≥85%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)

Dodecyl acetat	97 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Etylnitro benzen (ENB)	≥ 98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
2-Etylhexyl-4-(dimetylamino) benzoat	98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
2-Etylfenol	99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Fenetol	≥ 98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
2-Fenyletanol	≥ 98	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Heptanaldehyd	95 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Isoforon	97 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
5-Isopropyl-2-metylfenol	≥99,5 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
2-Isopropylfenol	≥ 98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
M-kresol	≥ 98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Maursyre (HCOOH)	98-100 %	Merck(Darmstadt, Tyskland)
Metylacetofenon	≥ 95 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
2-Metoksy-4-metylfenol	≥ 98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Nitro benzol	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Nitro fenyl oktyl eter (NPOE)	99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)

Nitro fentyl alkohol	≥ 98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
2-Nitroacetofenon	95 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
N-oktansyre (Caprylic acid)	99,5 %	Fluka-Buchs, Switzerland
2-Nitrofenyl-pentyleter	≥ 99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
2-Nitrotoluen	≥ 99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
2-nonanon	≥ 99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
2-oktanon	≥ 98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
3,3-Oksidipropionitril	>98%	Fluka-Buchs, Switzerland
Poly dimetyl siloxan	Ukjent	Aldrich, Chemical Company, Inc. USA
Santolina alkohol	≥ 98,5 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Saltsyre (HCl)	37 %	Merck(Darmstadt, Tyskland)
Tris(2-etylheksyl)fosfat (TEHP)	≥ 98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Trietylfosfat	≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Triisopropyl fosfat	95 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Tetrahydrofurfuryl alkohol	≥98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
3,3,5- Trimetylsykloheksanon	98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)



Tetraklorofenyl-T-poly dimentyl siloxan	Ukjent	Gelest, INC. Tullytown, PA, USA
Tributylfosfat	≥98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Tri-tert-butyl borat	98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Tris(2-butoksyetyl) fosfat	94 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Tetralone	97 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Triheksylamin	99 %	Fluka- Buchs, Switzerland
2-Undekanon	≥97 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
6-Undekanon	97 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)

## 6.5 LØSNINGER

### 6.5.1 Stammløsninger

Rentstoff av modellsubstansene petidin sulfat, loperamid hydroklorid, metadon hydroklorid, nortriptylin hydroklorid og haloperidol ble løst i etanol i konsentrasjon på 1mg/mL og lagret ved 4 °C, beskyttet mot lys.

### 6.5.2 Standardløsninger

Standardløsninger ble tillaget ved å blande 10 mM HCl med stammløsninger slik at konsentrasjon av hver substans ble 10 µg/mL. Standardløsningene ble lagret i romtemperatur beskyttet mot lys.

### 6.5.3 Donorfaser

Det ble laget nye donorfaser for hvert forsøk ved å fortynne standardløsningen til en konsentrasjon på 1 µg/mL med 10 mM HCl.

### 6.5.4 Akseptorfase

I hele oppgaven ble 10 mM HCl brukt som akseptorfase og dette ble tillaget ved å fortynne høykonsentrert HCl-løsning med ionebyttet H<sub>2</sub>O.

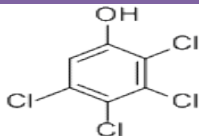
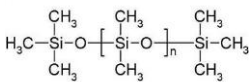
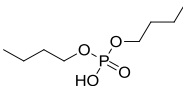
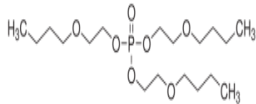
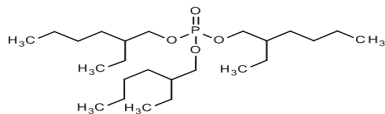
### 6.5.5 Organiske faser

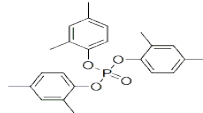
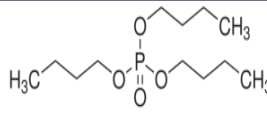
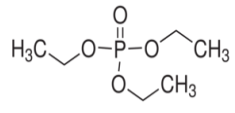
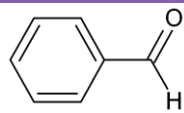

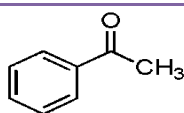
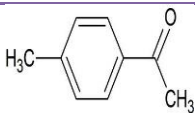
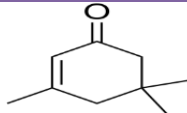
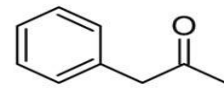
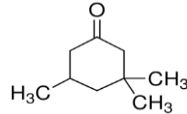
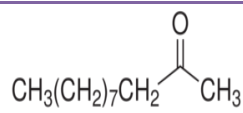
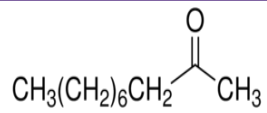
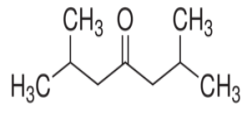
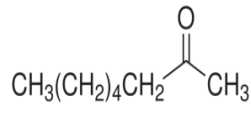
Tabell 4 viser molekylstrukturer for alle kjemikaliene brukt i de organiske fasene i oppgaven. Det ble også brukt transportmolekyler, men bare i kombinasjon med 6-undekanon som organisk fase for å se om utbyttene for de enkelte modellsubstansene øker eller ikke.

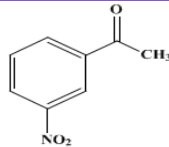
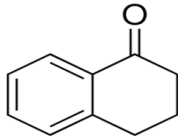
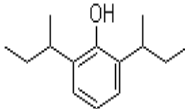
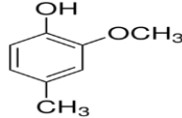
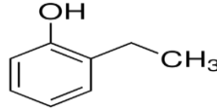
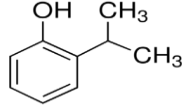
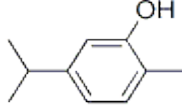
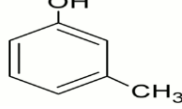
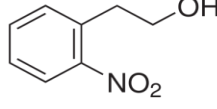
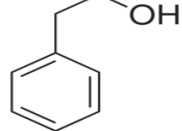
6-undekanon og DEHP ble veid opp og blandet i forholdet 90:10 (w/w).

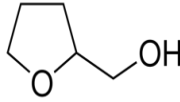
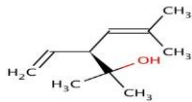
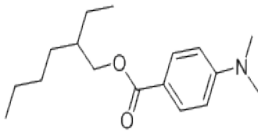
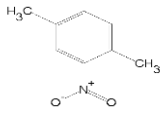
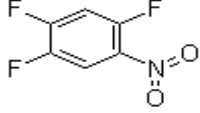
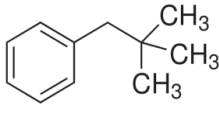
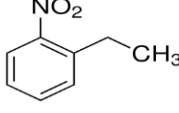
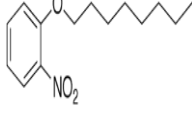
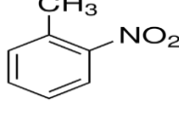
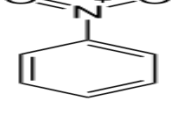
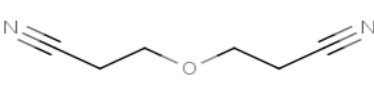
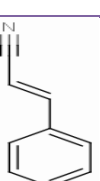
6-undekanon og TEHP ble veid opp og blandet i forholdet 95: 5, 90:10, 80:20 (w/w).

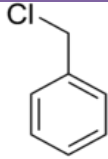
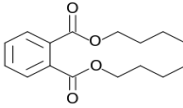
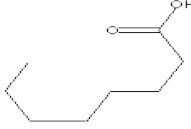
Tabell 4: Oversikt over molekylstrukturer for kjemikalier brukt i organiske faser

Kjemikalie	Molekylstruktur
Tetraklorofenyl T-poly dimetyl siloxan	
Poly-dimetyl siloxan	
Di-butyl-fosfat	
Tris (2-butoksy etyl) fosfat	
Tris(2-etylheksyl)fosfat	

Triksylyl fosfat	
Tri butyl fosfat	
Tri etyl fosfat	
Benzaldehyd	
Heptan aldehyd	
Acetofenon	
Metylacetofenon	
Isoforon	
Benzyl metyl keton	
3,3,5 - trimetylsykloheksanon	
2 – Undekanon	
2-Dekanon	
2,6-Dimetyl-4-Heptanon	
2-Oktanon	

2-Nonanon	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$
6 – Undekanon	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$
2-Nitroactofenon	
Tetralon	
Di-sec-butylfenol	
2-Metoksy-4-metylfenol	
2-Etylfenol	
2-Isopropylfenol	
5-Isopropyl-2-methylphenol	
m-kresol	
2-Nitrofentyl alkohol	
2-Fenyl etanol	

Tetrehydrofurfuryl alkohol	
Santolina alkohol	
2-Etylheksyl-4-(dimetylamino) benzoat	
2,4-Dimetyl-1-nitrobenzen	
1,2,4-Trifluor-5 nitrobenzen	
(2-2-Dimetyl-1-propyl) benzen	
Etyl nitro benzen	
Nitro fenyl oktyl eter	
2-Nitrotoluen	
Nitro benzol	
3,3' -Oksydipropionitril	
Cinnamonitril	

Benzyl klorid	
Dodesyl acetat	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$
Di butyl fatalat	
N-oktanoik syre (caprylic acid)	

### 6.5.6 Mobilfaser til HPLC

De mobile fasene ble sammensatt av acetonitril og 20mM maursyre i 5:95(v/v) forhold for mobil fase A og 95:5(v/v) forhold for mobil fase B.

Mobilfase A ble laget ved å blande 475 mL løsning av 20 mM maursyre med 25 mL ACN

Mobilfase B ble laget ved å blande 25 mL løsning av 20 mM maursyre med 475mL ACN

## 6.6 BEREGNING AV UTBYTTE

Ekstraksjon utbyttene ble beregnet i følge:

$$Utbytte = \frac{n_a}{n_s} * 100\% = \frac{C_a * V_a}{C_s * V_s} * 100\% \quad (5)$$

Der  $n_a$  er stoffmengde i akseptorløsningen etter endt ekstraksjon,  $n_s$  er stoffmengden i donorløsningen før ekstraksjon,  $V_a$  og  $C_a$  er volum og konsentrasjon av analytt i akseptorløsningen etter endt ekstraksjon,  $V_s$  og  $C_s$  er volum og konsentrasjon av analytt i donorløsningen før ekstraksjon.

## 7 RESULTATER OG DISKUSJON

Målet med oppgaven var å finne organiske faser som kunne gi brukbart utbytte og generere lav strøm. De basiske legemidlene petidin, metadon, loperamid, nortriptylin, og haloperidol ble valgt som modellanalytter. De basiske legemidlenes struktur er vist i Fig. 3., mens legemidlets kjemiske egenskaper som pKa-verdi og log-P-verdi er vist i Tabell 3. Fig. 1 viser oppsettet for ekstraksjonen. Det ble testet ut 52 ulike organiske faser i denne oppgaven. Det ble lagt hovedvekt på å undersøke hvilke funksjonelle grupper som ga høye ekstraksjonsutbytter for de valgte modellsubstansene. Kun de som har gitt best resultat er inkludert i resultatet. De resterende er presentert i Tabell 4. Det var også ønskelig å undersøke om utbyttene økte ved høyere spenninger, som 5 V, 20 V, 50 V, 100 V og 150 V for nitroaromatiske forbindelser, og 25 V, 100 V, og 250 V for ketoner. Legemiddelfluxen over den kunstige væskemembranen ( $D_i$ ), forventes i følge ligning 1, og 2 under *kapittel 5* å øke med økt spenningsforskjell. Forsøk ble gjort for å se om graden av spenning påsatt systemet kunne påvirke den elektrokinetiske migrasjon av analyttene over den kunstige væskemembranen.

### 7.1 SCREENING AV ULIKE ORGANISKE FASER

Den kjemiske sammensetningen av væskemembranen spiller en stor rolle for analyttfluxen. Også evnen til å lede strøm og være kompatibel med analyttene som ekstraheres er viktig. I tillegg bestemmes diffusjonskoeffisienten av den kjemiske sammensetningen i væskemembranen, og denne bestemmer også analyttfluxen (se ligning (4) *Kapitel 5*).

Forskjellige væskemembraner ble testet (se Tabell 1) for å se om migrasjon av modellsubstanser kunne økes i forhold til NPOE. 52 ulike organiske løsemidler ble testet, og blant alle løsemidlene som ble testet var det nitroaromatene og ketonene som fungerte best. Tabell 5 oppsummerer alle de løsemidlene som ga ikke bra resultat og årsaken til det resultatet. Resultatene til de som kom best ut er vist i Tabell 6, og utbytte blant annet NPOE i Fig. 5.

Tabell 5: organiske faser som ikke ga bra resultater.

Løsemiddel	Hvorfor
Tetraklorofenyl T-poly dimetyl siloxan	For lav konduktivitet
Poly dimetyl siloxan	For lav konduktivitet
Di butyl fosfat	For høy konduktivitet
Tris (2-butoksy etyl) fosfat	Ingen observerte topper
Tris(2-etylheksyl)fosfat	Ingen observerte topper
Triksylyl fosfat	For høy konduktivitet
Tri butyl fosfat	For høy konduktivitet
Tri etyl fosfat	For høy konduktivitet
Benzaldehyd	For høy konduktivitet
Heptan aldehyd	Ingen observeret topper
Acetofenon	For høy konduktivitet
Metylacetofenon	Ingen observerte topper
Isoforon	For høy konduktivitet
Benzyl metyl keton	For høy konduktivitet
3,3,5 - trimetylsykloheksanon	For høy konduktivitet
2 - Undekanon	Ikke brukbart resultat
2,6-Dimetyl-4-Heptanon	Ingen observerte topper
2-Oktanon	Ikke brukbart resultat
Tetralon	Ikke brukbart resultat
Di-sec-butylfenol	For høy konduktivitet
2-Metoksy-4-metylfenol	Ingen observerte topper
2-Etylfenol	Ingen observerte topper
2-Isopropylfenol	Ingen observerte topper
5-Isopropyl-2-methylphenol	Ingen observerte topper
m-kresol	For høy konduktivitet
2-Nitrofenyl alkohol	For lav konduktivitet
2-Fenyl etanol	For høy konduktivitet
Tetrehydrofurfuryl alkohol	For høy konduktivitet
Santolina alkohol	For høy konduktivitet
2-Etylheksyl-4-(dimetylamino) benzoat	For lav konduktivitet



1,2,4-trifluor-5 nitrobenzen	Ikke brukbart resultat
(2-2-dimetyl-1-propyl) benzen	Ingen observerte topper
2-Nitrotoluen	Ikke brukbart resultat
Nitro benzol	For høy konduktivitet
3,3' -Oksydipropionitril	Ingen observerte topper
Cinnamonitril	For lav konduktivitet
Benzyl klorid	Ingen observerte topper
Dodesyl acetat	For lav konduktivitet
Di butyl fatalat	For lav konduktivitet
N-oktanoik syre (caprylic acid)	For lav konduktivitet

For lav konduktivitet = 300 V (-0,1µA- 0,7µA), prøven ble blakket. For høy konduktivitet = 5 V(539 µAm), det ble observert damp, og bobler på veggene til prøveglasset. Ikke brukbart resultat = utbytter under 30 %

Tabell 6: Beste organisk faser med optimal spenning og strøm nivå, n=3

Løsemiddel	Spenning	Strøm
<b>2-nonanon</b>	20 V	3-6 µA
<b>2-dekanon</b>	100 V	6-7 µA
<b>6-undekanon</b>	100 V	1-2 µA
<b>2,4-dimetyl-1 nitrobenzen</b>	25 V	1-5 µA
<b>2-nitrofenyl-pentyl-eter</b>	25 V	5-13 µA

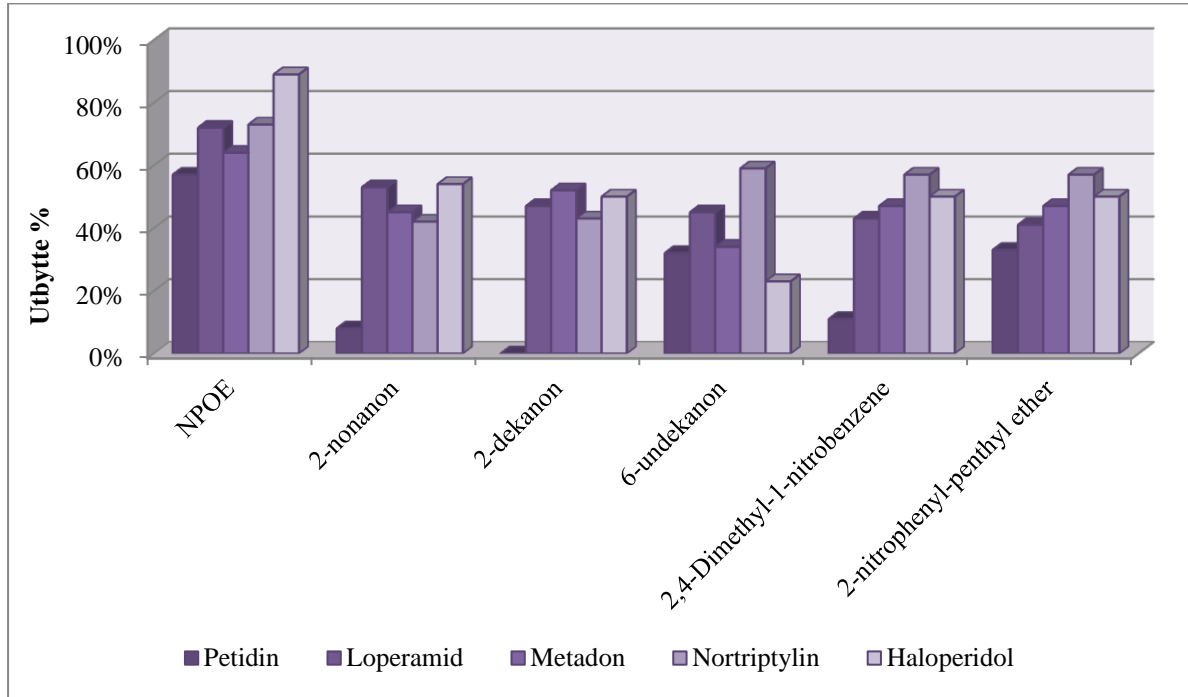


Fig. 5. Organiske faser med utbytte for modellsubstansene. Ekstraksjonstid, 5 min; agitasjon, 900rpm; akseptor, 20µl 10 mM HCL; sample, 100µl 10mM HCL inneholder 1µg/ml petidin, loperamid, metadon, nortriptylin, og haloperidol.

Fig. 5. illustrerer at nesten alle modellsubstansene får utbytter over 35 %, unntatt petidin. Petidin hadde en lavere affinitet generelt til nesten alle organiske faser enn de andre modellsubstansene. Den har en log P-verdi lik 2,4 og selv om en forventer høyere migrasjon over væskemembranen, skjer ikke dette. Erfaringer har vist at petidin bruker lengre ekstraksjonstid å gå opp i utbytte [17].

### 7.1.1 Ekstraksjon og spenning med nitroaromater som organiske fase

Utbyttene så ut til å øke jevnt med økt påsatt spenning ved bruk av nitroaromatiske forbindelser som organisk fase, men etter 50 V ble utbyttene dårligere/reduisert. Det at utbyttet reduseres med økende spenning kan trolig forklares ved en pH-ending i systemet grunnet henholdsvis reduksjon og oksidasjon som finner sted ved hver av elektrodene i systemet når spenningen er påsatt.

Elektrodereduksjon vil gjøre at det i akseptorfase dannes  $H_2$ -gass, ettersom  $H^+$ -atomer forbrukes når  $H_2$ -gass dannes, vil pH-verdien i akseptorfase økes og det dannes en pH gradient mot den kunstige væskemembranen.

Selv om de fleste av modellsubstanser har høye pka-verdier og fremdeles vil være på ionisert form når pH stiger, vil det kunne skje en tilbake diffusjon av analyttene til

væskemembranen. Fig. 6. og Fig. 7. illustrerer at det ikke er så mye å hente i utbytte ved å gå fra 50 V-250 V for nitroaromatiske forbindelser.

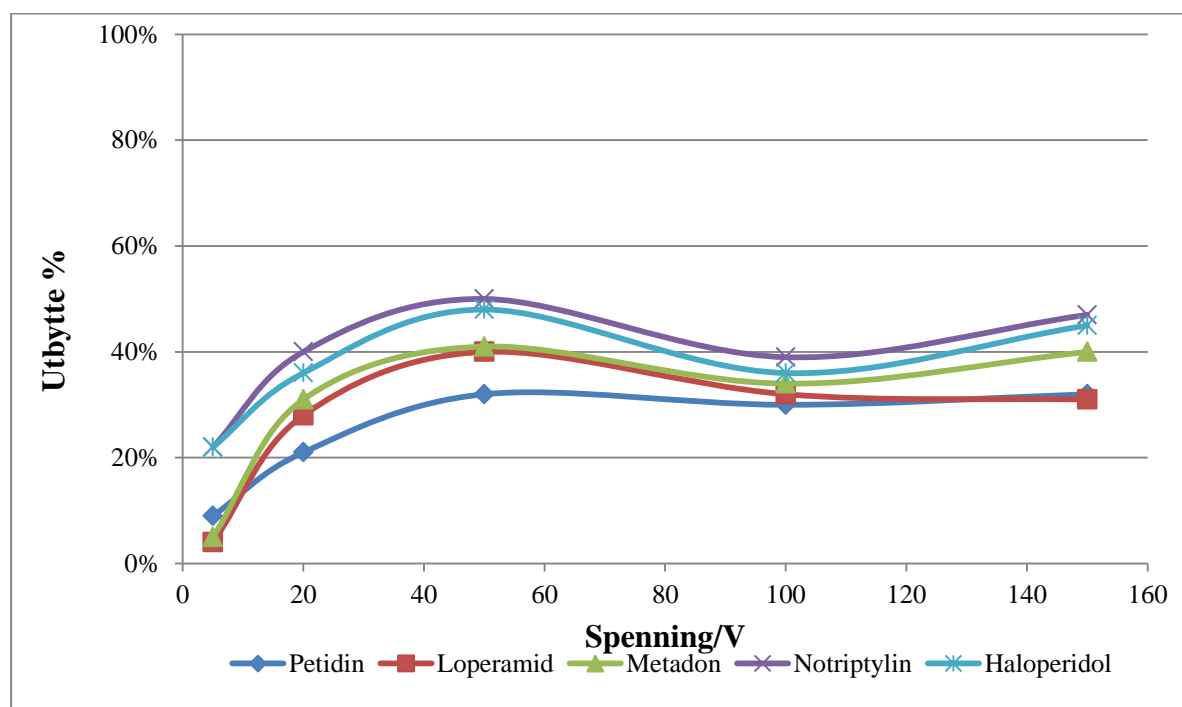


Fig. 6. Utbytte mot spenning. SLM, 2-nitrofenyl-pentyl eter; Ekstraksjonstid, 5 min; agitasjon, 900rpm; akseptor, 20µl 10 mM HCL; sample, 100µl 10mM HCL inneholder 1µg/ml petidin, loperamid, metadon, nortriptylin, og haloperidol.

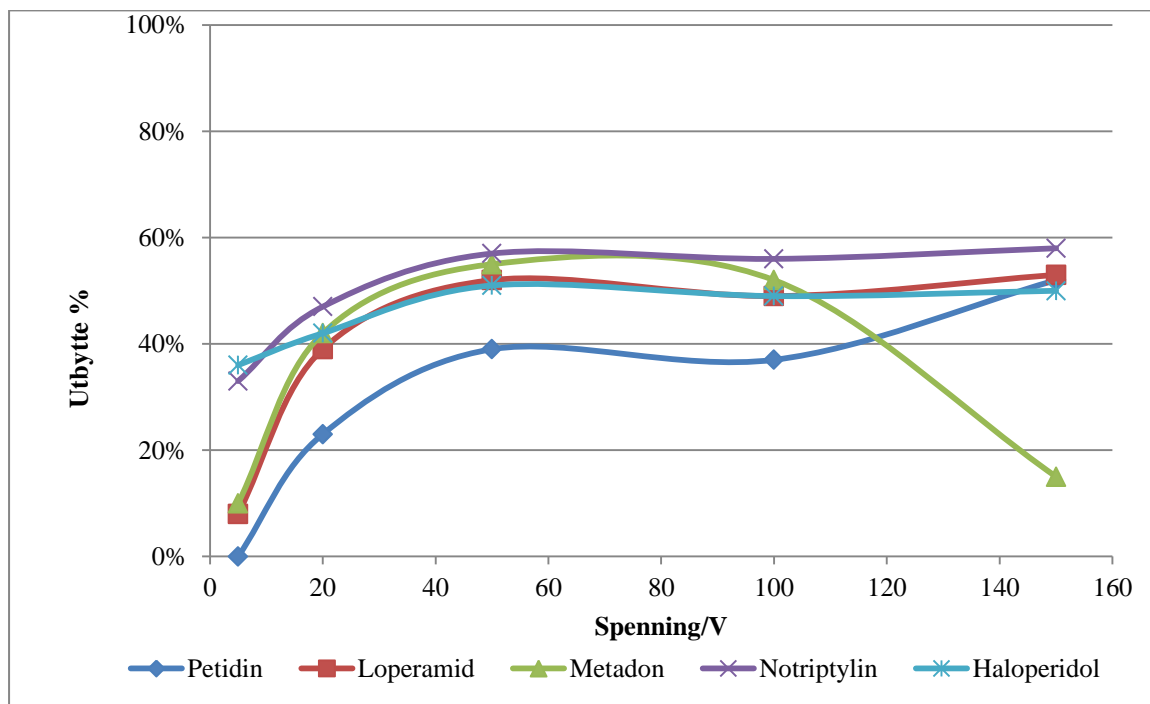


Fig. 7. Utbytte mot spenning. SLM, 2,4 -dimetyl-1-nitrobenzen; Ekstraksjonstid, 5 min; agitasjon, 900rpm; akseptor, 20µl 10 mM HCL; sample, 100µl 10mM HCL inneholder 1µg/ml petidin, loperamid, metadon, nortriptylin, og haloperidol

Fig. 6. og Fig. 7. viser at alle analyttene får et maksimalt utbytte når 50 V er påsatt systemet. Mellom 5 V og 50 V økte utbyttene jevnt, mens alle fikk tilbake ekstraksjon når spenningen ble økt til 100 V. Forsøket har vist at 50 V gav maksimalt utbytte for alle analyttene, og det oppnås gode utbytter med organiske faser som har nitrogrupper i sin kjemiske struktur. Årsaken er fortsatt ukjent, men kanskje det er på grunn av elektrisitet og elektron-negativitet. Nitro-grupper er reaktive på grunn av mange ledige elektronpar som kan gi opphav til mange resonans strukturer og elektronegativitet.

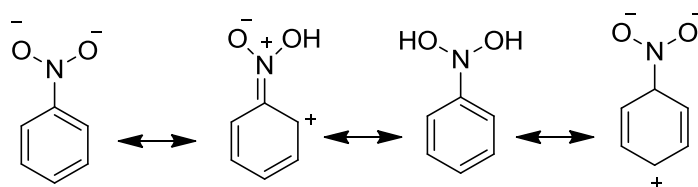


Fig. 8. Resonans strukturer

### 7.1.2 Ekstraksjon og spenning med ketoner som organiske fase

Når det gjelder ketoner, ble det valgt å gå videre med 6-undekanon. Selv om de andre ketonene (2-nonanon, og 2-dekanon) gav målbare utbytter, ble 6-Undekanon væskemembranen valgt fordi den leder nokså lav strøm (1-2  $\mu\text{A}$ ) sammenlignet med de andre organiske fasene. Som nevnt tidligere var det ønskelig å finne et organisk løsemiddel som kunne gi brukbare utbytter med mindre strøm. Fig. 9. viser 6-undekanon som organisk fase testet under forskjellig spenninger (25 V, 100 V, og 250 V). Utbytte for modellsubstansene økt med økt påsatt spenning.

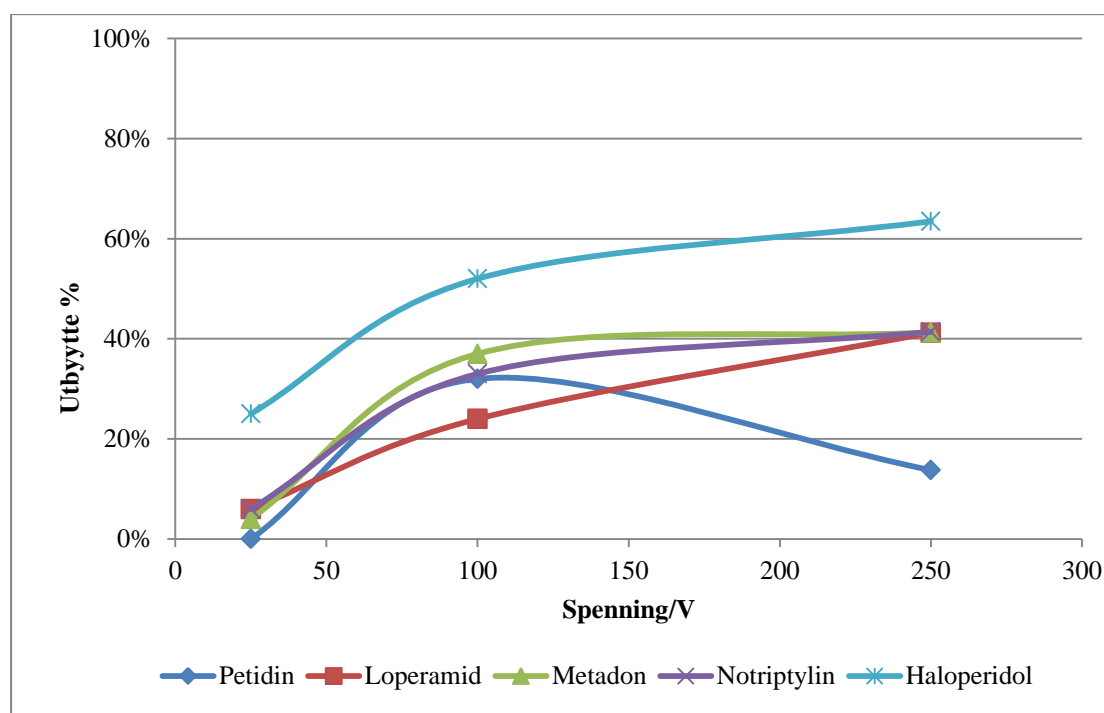


Fig. 9. spenningskurve. SLM, 6-undekanon; Ekstraksjonstid, 5 min; agitasjon, 900rpm; akseptor, 20 $\mu\text{l}$  10 mM HCL; sample, 100 $\mu\text{l}$  10mM HCL inneholder 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  petidin, loperamid, metadon, nortriptylin, og haloperidol

Frem til nå har NPOE vært den ledende organiske fasen for basiske legemidler [2]. For å sammenligne den beste organiske fasen som ble funnet i dette arbeidet, ligger 6-undekanon nærmest NPOE når det gjelder utbytte og generert lav strøm illustrert i Fig. 10. og har gitt det mest lovende resultatet. I tillegg har de to organiske fasene lav vannløselighet.

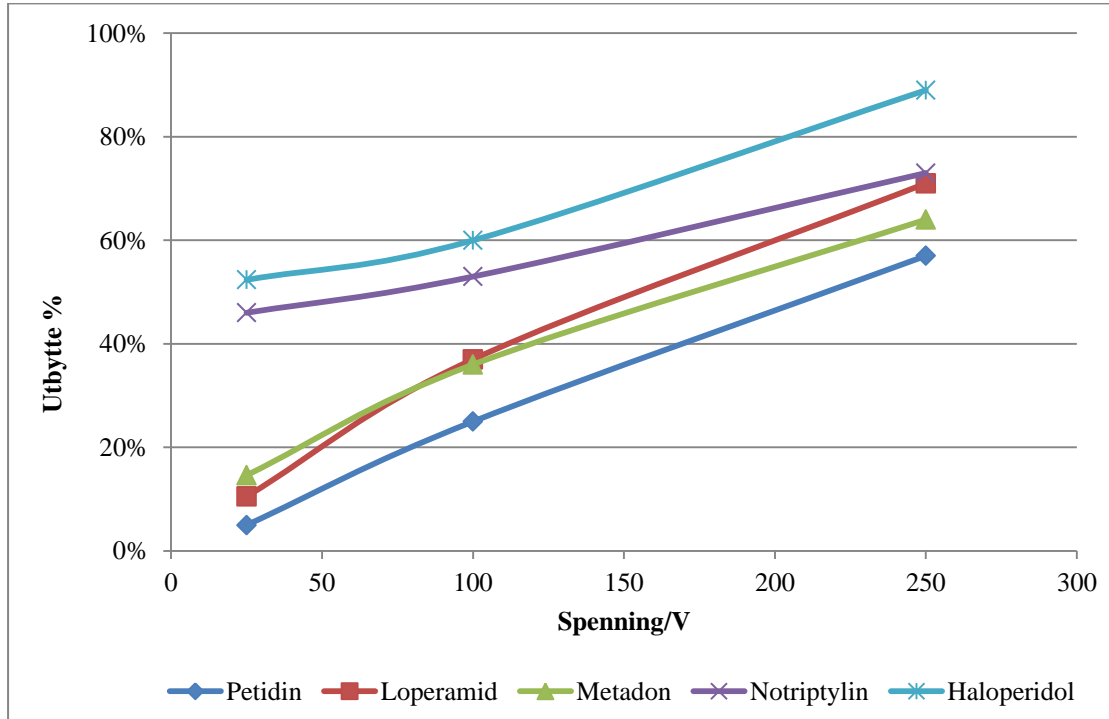


Fig. 10. spenningskurve. SLM, NPOE; Ekstraksjonstid, 5 min; agitasjon, 900rpm; akseptor, 20µl 10 mM HCL; sample, 100µl 10mM HCL inneholder 1µg/ml petidin, loperamid, metadon, nortriptylin, og haloperidol

Det ble gjort et forsøk på å blande 6-undekanon og NPOE i forhold til 50:50, og ble testet med tre forskjellige spenninger; 25 V, 100 V og 250 V. Fig. 11. viser at analyttene gir best resultat ved 250 V med en blanding av de to, både når det gjelder strøm og utbytte.

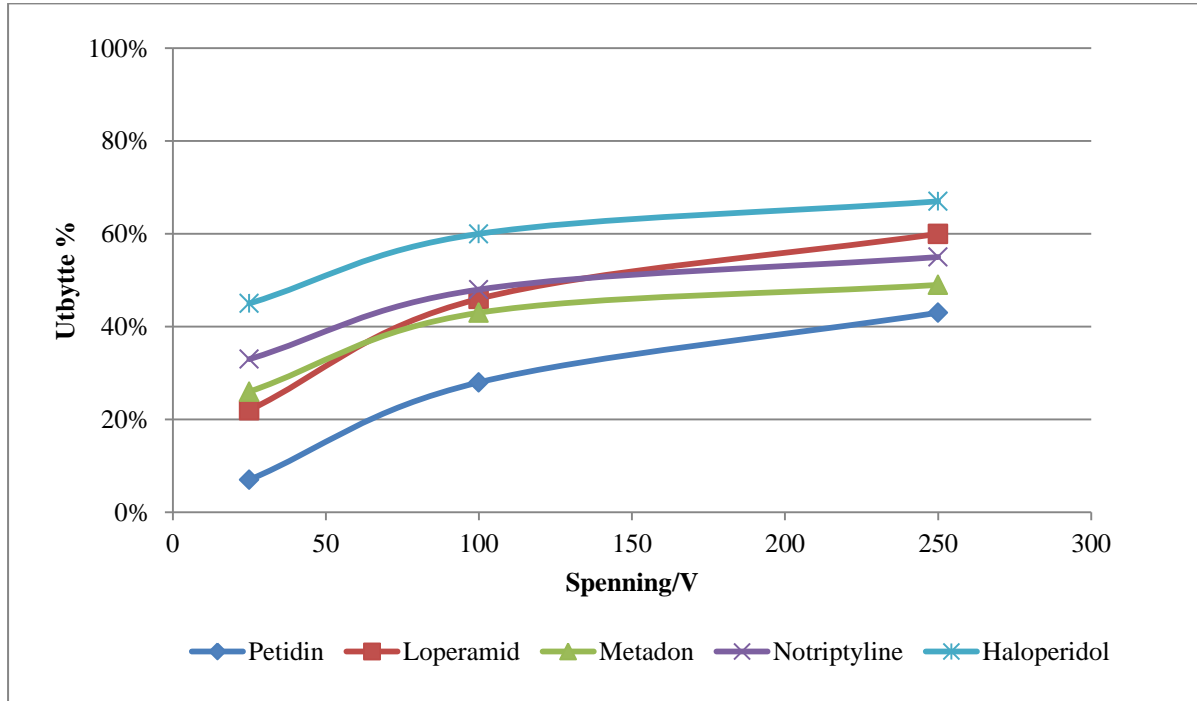


Fig. 11. Spenningskurve. SLM, NPOE + 6-undekanon; Ekstraksjonstid, 5 min; agitasjon, 900rpm; akseptor, 20µl 10 mM HCL; sample, 100µl 10mM HCL inneholder 1µg/ml petidin, loperamid, metadon, nortriptylin, og haloperidol

EME er som tidligere nevnt en teknikk der ekstraksjonsutbytte øker med økt ekstraksjonstid frem til systemet oppnår steady-state og utbyttene reduseres (Nernst-Planck ligning 1 og 2). I tillegg krever ulike substanser ulike ekstraksjonstider for å oppnå steady-state.

Fra forrige avsnitt ble det vist at 250 V spenning gav brukbare utbytter. Igjen var det ønskelig å undersøke om ekstraksjonstiden hadde noen påvirkning på utbyttene i dette systemet. Ekstraksjonstiden ble satt på 2,5, 5, 10, 15, og 30 minutter, og utbyttene ble målt ved hvert av disse tidspunktene med 6-undekanon og NPOE blanding i 50:50 forhold som organisk fase. Fig. 12. viser at alle analyttene fikk en økning i utbytte ved å øke tiden og RSD-verdiene minket med økende ekstraksjonstid.

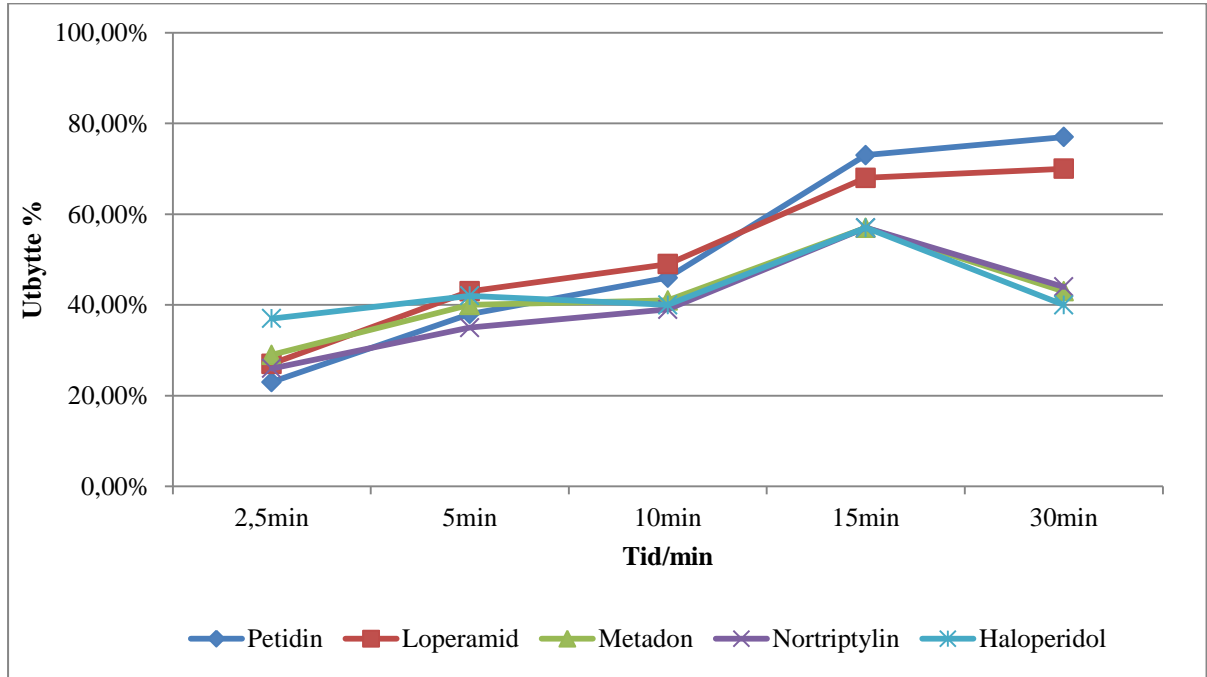


Fig. 12. Tidskurve. SLM, NPOE + 6-undekanon; spenning ,250 V; agitasjon, 900rpm; akseptor, 20µl 10 mM HCL; sample, 100µl 10mM HCL inneholder 1µg/ml petidin, loperamid, metadon, nortriptylin, og haloperidol

Noen stoffer ser ut til å migrere raskt, haloperidol fikk allerede etter 2,5 minutters ekstraksjon et høyt utbytte, og holder seg stabilt frem til 15 minutter hvor det begynner å synke. Den samme trenden observeres for nortriptylin. Dette kan skyldes tilbakeekstraksjon.

Mulige årsaker til at utbytte faller ettersom ekstraksjonstid øker er:

- a) Motstand mot masseoverføring over membranen
- b) Tilbakediffusjon av analytter fra akseptorfasen til den kunstige væskemembranen på grunn av oppnådd steady-state.

For å undersøke dette ble det gjort et forsøk på å analysere prøven etter ekstraksjon også. Forsøket viste at mye av analyttene som ikke har blitt ekstrahert over akseptorfasen hadde blitt igjen i den organiske fasen eller membranen.

### 7.1.3 Tilsetning av ionepar-danner til den organiske fasen

Som skrevet tidligere kan tilsetning av transportmolekyler øke utbytte for hydrofile analytter. Alkylerte fosfater kompleksbinder ulike legemidler slik at disse fikk høyere migrasjon, og en lavere ionestyrke i donorfase i forhold til akseptorfasen og dermed



høyere migrasjon av analyttene [16]. Det nøytralt hydrofobt komplekset dannes i grenseflaten mellom donor- og den organiske membranen, og når den kommer til grenseflaten mellom organiske fasen og akseptorfase løses komplekset opp. Analytten frigjøres i akseptorfase mens transportmolekylet transporteres tilbake i den organiske membranen [22].

Med dette utgangspunktet ble det gjort et forsøk ved å tilsette TEHP og DEHP til den valgte organiske fase (6-Undekanon). Første forsøket var med tilsetning av TEHP til 6-Undekanon. Blandinger med 6-undekanon ble laget i konsentrasjon av 5 % TEHP i 6-undekanon, 10 % TEHP i 6-undekanon, 20 % TEHP i 6-undekanon. Fig. 13. viser resultat fra forsøket. Ingen gevinst oppnås ved å tilsette TEHP til væskemembranen for å øke utbytte, men det ble en viss nedgang på RSD-verdiene ved å øke prosent andel til TEHP (se Tabell 7). Tilsetning av DEHP til 6-Undekanon ga ingen målbare resultater. Det ble ikke observert noen tydelige topper for noen av modellsubstansene, og for å undersøke dette ytterligere analyserte prøven etter ekstraksjonen, og resultatene viste at de fleste av analyttene satt fast i membranen.

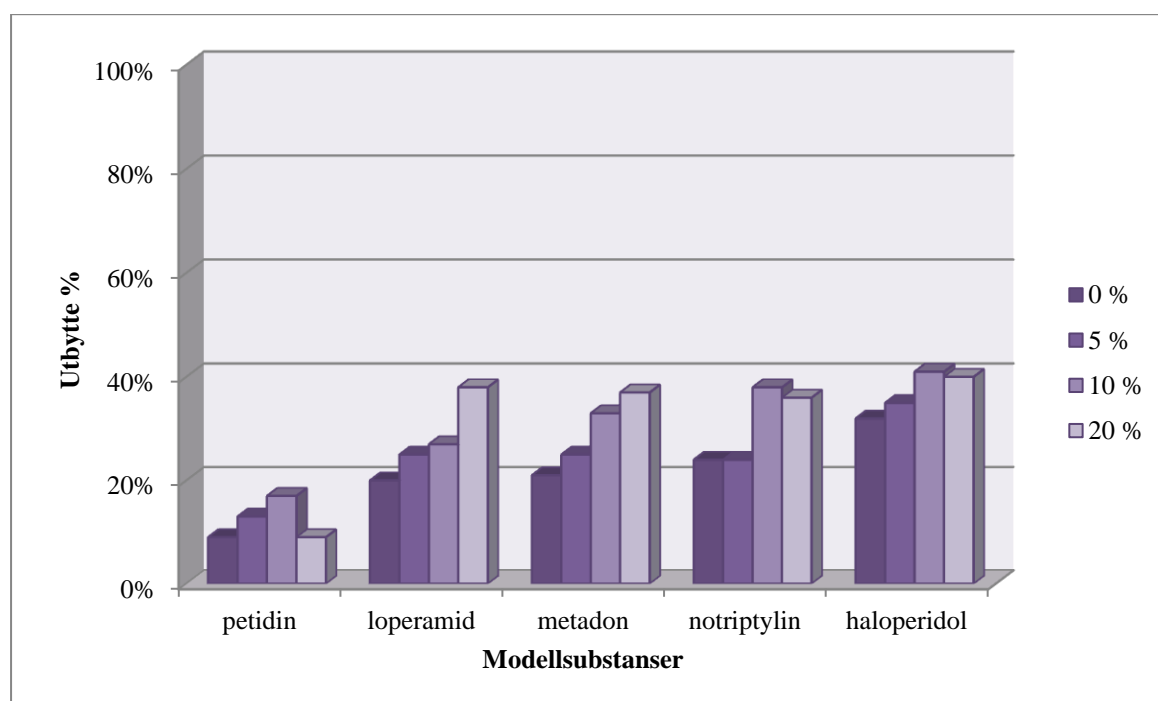


Fig. 13. Tilsetning av alkylert fosfat TEHP(0 %:5 %:10 %:20 %, w/w). SLM, 6-undekanon Ekstraksjonstid, 5 min; spenning, 250 V; agitasjon, 900 rpm; akseptor, 20µl 10 mM HCL; sample, 100µl 10mM HCL inneholder 1µg/ml petidin, loperamid, metadon, nortriptylin, og haloperidol

Tabell 7: Viser Relative standardavvik for modellsubstansene ekstrahert i kombinasjon av organiske fase 6-Undekanon, og transportmolekylet TEHP Spenning, 250 V; ekstraksjonstid, 5 min; agitasjon, 900rpm; (n=3)

Repeterbarhet (%RSD), n=3, konsentrasjon i prøveløsning 1µg/ml					
TEHP	Petidin	Loperamid	Metadon	Nortriptylin	Haloperidol
0 %	14	27	24	21	27
5 %	15	17	13	10	9
10 %	6	13	13	13	8
20 %	2	6	7	5	8

Tabell 7 viser at repeterbarheten til metoden øker ved at det blir mindre usikkerhet i hver måling, fordi % RSD blir lavere for samtlige modellsubstanser ved økende andel av TEHP.

## 8 KONKLUSJON

Målet med denne oppgaven var å finne den passende organiske fasen for å ekstrahere et utvalgt av hydrofobe basiske legemidler fra vandige prøver med EME-system. Det var ønskelig å ekstrahere fra små prøvevolumer, på et lavt spenningsnivå og med kort ekstraksjonstid. Med dette som målsetning ble de ulike organiske løsemidlene prøvd ut og de ulike komponentene og parameterne i EME-systemet optimalisert med hensyn på utbytte, og lavt spenningsnivå.

Noen analytter migrerer raskt over membranen, mens andre bruker lengre tid. For de fleste er en ekstraksjonstid på 5 minutter nok for videre analyse. En del interessante og lovende resultater er observert ved å anvende ketoner og nitroaromater som organiske faser i væske membranen. Det er imidlertid ikke funnet en klar årsak til dette, men dipolmomentet og vannløseligheten til løsemidlet kan være av betydning.

Resultatene fra optimaliseringen viste at nitroaromatiske forbindelser og ketoner var de organiske løsemidlene som ga best utbytte. Det ble forsøkt med forskjellig spenning og de fleste ekstraksjonstidene ble satt til 5 minutter. Forhåpentligvis kan dette fange interessen for videre utvikling av nitroaromater og ketoner som organiske faser i EME av hydrofobe legemidler.

Mye arbeid gjenstår for at EME skal kunne fungere som en viktig metode for opprensning og oppkonsentrering, blant annet mer kunnskap om hvorfor nitroaromatiske forbindelser og ketoner gir høyere utbytte.

## 9 REFERANSER

1. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids*. Journal of Chromatography A, 2006. 1109(2): p. 183-190.
2. Petersen, N.J. and Petersen, *Electromembrane Extraction from Biological Fluids*. Analytical Sciences, 2011. 27(10): p. 965-972.
3. Gjelstad, A. and S. Pedersen-Bjergaard, *Electromembrane extraction: a new technique for accelerating bioanalytical sample preparation*. Bioanalysis, 2011. 3(7): p. 787-797.
4. See, H.H., S. Stratz, and P.C. Hauser, *Electro-driven extraction across a polymer inclusion membrane in a flow-through cell*. Journal of Chromatography A, (0): p. 1-6.
5. Seip, K.F., A. Gjelstad, and S. Pedersen-Bjergaard, *The potential application of electromembrane extraction for the analysis of peptides in biological fluids*. Bioanalysis, 2012. 4(16): p. 1971-1973.
6. Petersen, N.J., *On-chip electro membrane extraction with online ultraviolet and mass spectrometric detection*. Analytical chemistry, 2011. 83(1): p. 44-51.
7. Eibak, L.E.E., et al., *Kinetic electro membrane extraction under stagnant conditions—Fast isolation of drugs from untreated human plasma*. Journal of Chromatography A, 2010. 1217(31): p. 5050-5056.
8. Balchen, M., et al., *Rapid isolation of angiotensin peptides from plasma by electromembrane extraction*. Journal of Chromatography A, 2009. 1216(41): p. 6900-6905.
9. Rezazadeh, M., Y. Yamini, and S. Seidi, *Electromembrane extraction of trace amounts of naltrexone and nalmefene from untreated biological fluids*. Journal of Chromatography B, 2011. 879(15): p. 1143-1148.
10. Seidi, S., et al., *Electrokinetic extraction on artificial liquid membranes of amphetamine-type stimulants from urine samples followed by high performance liquid chromatography analysis*. Journal of Chromatography A, 2011. 1218(26): p. 3958-3965.
11. Seip, K.F., et al., *Electromembrane extraction of peptides—Fundamental studies on the supported liquid membrane*. Journal of separation science, 2011: p. 3410-3417.
12. Tan, T.Y., et al., *Electro membrane extraction of biological anions with ion chromatographic analysis*. Anal Chim Acta, 2012. 739: p. 31-36.
13. Guo, L. and H.K. Lee, *Electro membrane extraction followed by low-density solvent based ultrasound-assisted emulsification microextraction combined with derivatization for determining chlorophenols and analysis by gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2012. 1243: p. 14-22.

14. Davarani, S.S.H., et al., *Electromembrane extraction combined with gas chromatography for quantification of tricyclic antidepressants in human body fluids*. *Analytica chimica acta*, 2012: p. 51-56.
15. Gjelstad, A., K.E. Rasmussen, and S. Pedersen-Bjergaard, *Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst-Planck equation*. *Journal of Chromatography A*, 2007. 1174(1-2): p. 104-111.
16. Gjelstad, A., K.E. Rasmussen, and S. Pedersen-Bjergaard, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances*. *Journal of Chromatography A*, 2006. 1124(1-2): p. 29-34.
17. Gjelstad, A., et al., *Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields*. *Journal of Chromatography A*, 2007. 1157(1): p. 38-45.
18. Middelthon-Bruer, T.M., et al., *Parameters affecting electro membrane extraction of basic drugs*. *J Sep Sci*, 2008. 31(4): p. 753-759.
19. *Forensic Application of High Performance Liquid Chromatography*. 2010, Shirley Bayne
20. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*. 2004, Bergen, Norge: Fagbokforlaget. 498.
21. Axon, C. *Name of each substance*. Besøkt 12.03.2013; Tilgjengelig fra: <http://www.chemicalize.org/>
22. Seidi, S., et al., *Determination of thebaine in water samples, biological fluids, poppy capsule, and narcotic drugs, using electromembrane extraction followed by high-performance liquid chromatography analysis*. *Analytica Chimica Acta*, 2011. 701(2): p. 181-188.