

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN MASTER I FARMASI

# Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) til analyse av hydrofile stoffer

Mumtaz Sultani



Faggruppen for Legemiddelanalyse,  
Avdeling for Farmasøytisk kjemi  
Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

April 2015



# **Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) til analyse av hydrofile stoffer**

**Mumtaz Sultani**

Masteroppgaven ble gjennomført ved faggruppen for legemiddelanalyse, avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo perioden august 2014 til april 2015.

## **Veiledere:**

Stig Pedersen-Bjergaard professor ved avdeling for farmasøytisk kjemi, farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Astrid Gjelstad førsteamanuensis ved avdeling for farmasøytisk kjemi, farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

© Mumtaz Sultani

2015

Parallell artificial liquid membrane extraction (PALME) til analyse av hydrofile stoffer

Mumtaz Sultani

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Representeren, Universitetet i Oslo

# Sammendrag

I denne oppgaven ble Parallell artificial liquid membrane extraction (PALME) testet som prøveopparbeidelse for ekstraksjon av åtte basiske substanser som hydralazin, fenylpropanolamin, efedrin, metaraminol, cimetidin, sotalol, salbutamol og praktolol med log P under 1,5. Analyttene ble ekstrahert fra vandige standardløsninger og fra plasmaprøver med et volum på 250 µl, gjennom en kunstig væskemembran dannet av et organisk løsemiddel og et transportmolekyl, over i en vandig akseptorfase med et volum på 50 µl. Dette førte til oppkonsentrering av analyttene i tillegg til at forbruket av organisk løsemiddel var betydelig minimert. PALME er en relativ ny ekstraksjonsteknikk som er i likhet med LPME, egnet til ekstraksjon av analytter med noe hydrofobe egenskaper. For å fremme ekstraksjon av hydrofile forbindelser gjennom den organiske fasen, ble det tilsatt transportmolekyler i den organiske fasen. Dette medfører at det dannes et hydrofobt ionparkompleks mellom kationiske analytter og ioniske transportmolekyler. Ionparkomplekset som dannes er hydrofobt nok til å kunne diffundere gjennom en lipofil væskemembran. Transportmolekyler som ble benyttet i denne oppgaven besto av mono-, di- og tri-alkylerte fosfater og ble tilsatt i organiske løsemidler. Deretter ble ekstraktene analysert enten direkte eller fortynnet med destillert vann avhengig av HCl konsentrasjonen i akseptorfase. I tillegg ble det utført ulike ekstraksjoner med ulike organiske og ioniske løsemidler. For deteksjon av analyttene ble det utviklet en CE-metode med UV-detektor. Kapillærelektroforese CE med UV-detektor er kompatibel med PALME ettersom ekstraktene fra PALME er i vandig løsning og dermed kan analyseres direkte. Resultatene fra forsøkene viste at ekstraksjon av polare substanser gjennom en organisk væskemembran er både avhengig av pH og viskositet i akseptorfase, sammensetning av væskemembranen, konsentrasjon av protoner i akseptorfase og ekstraksjonstid. 2-Nonanon ga bedre ekstraksjonsutbytte sammenliknet med andre organiske løsemidler, men ingen av analyttene ble detektert ved bruk av ioniske løsemidler. I tillegg ble det vist at utbytte av analyttene økte med økende ekstraksjonstid til steady-state ble oppnådd, der utbyttene flat ut. I oppgaven var det stort fokus på hvilke ekstraksjonsforhold som førte til høy utbytte. De høyeste utbyttene ble observert med 15 % DEHP i 2-nonanon med ekstraksjonstid på 30 minutter og ristehastighet på 900 rpm. Evaluering av analysemetoden viste at den tilfredsstilte krav til linearitet ( $R^2 > 0,99$ ) og relativ standard avvik  $RSD \leq 15\%$ . Dette arbeidet har vist at PALME kan kombineres med ionparmediert transport for ekstraksjon av hydrofile substanser.

# Forord

Først og fremst vil jeg rette en meget stor takk til mine veiledere professor Stig Pedersen-Bjergaard og førsteamanuensis Astrid Gjelstad, for enestående faglig og praktisk veiledning under arbeidet med mastergradsoppgaven. Jeg har satt stor pris på deres gode råd, og ikke minst for den tålmodighet dere har vist meg.

Videre vil jeg takke alle på legemiddelanalyse avdelingen og hovedfagstudentene Christine, Line og Odd Gøran for et godt og trivelig studiemiljø og samtaler på hovedfagskontoret. Dere har bidratt til å gjøre studietiden minnerik og jeg kommer til å savne våre samtaler.

I tillegg vil jeg takke foreldrene mine, mannen min og alle mine flotte søsken for enestående støtte, tålmodighet og inspirasjon. Uten deres støtte og oppmuntring ville jeg aldri klart dette.

Oslo, april 2015

Mumtaz Sultani

# Innholdsfortegnelse

<b>Forkortelser</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Innledning</b> .....	<b>10</b>
1.1. Bakgrunn .....	10
1.2. Hensikt .....	12
<b>2. Teori</b> .....	<b>13</b>
2.1. Prøveopparbeidelse .....	13
2.1.1. Væskefase-mikroekstraksjon (LPME).....	14
2.1.2. Parallell Artificial Liquid Membrane Extraction (PALME).....	17
2.1.3. Ionparmediert LPME og PALME.....	18
2.2. Betingelser for ekstraksjonen.....	21
2.2.1. Donorfase .....	21
2.2.2. Organisk fase.....	21
2.2.3. Akseptorfase.....	23
2.3. Egenskapen til hulfiber membranen .....	23
2.4. Kapillærelektroforese (CE).....	23
<b>3. Eksperimentelt</b> .....	<b>27</b>
3.1. Valg av modellanalytter .....	27
3.2. Betingelser for CE.....	28
3.3. Ekstraksjon fra vandige prøveløsninger.....	30
3.4. Ekstraksjon fra plasmaløsninger .....	32
3.5. Betingelser for ekstraksjonen.....	32
3.5.1. Donorfase .....	32
3.5.2. Organisk fase.....	32
3.5.3. Akseptorfase.....	35
3.6. Veieksperiment .....	35
3.7. Kjemikaler og utstyr.....	35
3.8. Løsninger .....	37
3.8.1. Stamløsning.....	37

3.8.2. Standardløsning.....	37
3.8.3. Prøveløsning.....	37
3.8.4. Seperasjonsbuffer.....	38
3.8.5. Akseptorfase.....	39
3.8.6. Andre løsninger.....	39
3.9. Beregninger.....	40
3.9.1. Utbytte (R).....	40
3.9.2. Relativt standardavvik.....	40
3.9.3. Oppkonsentrering.....	40
3.10. Evaluering.....	41
3.10.1. Identifikasjon.....	41
3.10.2. Presisjon.....	41
3.10.3. Standardkurver og linearitet.....	41
3.10.4. Metodens deteksjons- og kvantifiseringsgrense.....	42
<b>4. Resultat og diskusjon.....</b>	<b>43</b>
4.1. Migrasjonsrekkefølge i kapillærelektroforese.....	43
4.2. Ekstraksjoner fra vandige løsninger.....	46
4.2.1. Ekstraksjoner uten transportmolekyler.....	46
4.3. Optimalisering av ekstraksjonsparametere.....	48
4.3.1. Donorfase.....	48
4.3.2. pH i akseptorfase.....	52
4.3.3. Sammensetning av organiskfase.....	54
4.4. Ekstraksjoner fra plasma.....	58
4.5. Ekstraksjonstid.....	59
4.6. Evaluering av metoden.....	62
4.6.1. Presisjon.....	62
4.6.2. Standardkurver og linearitet.....	63
4.6.3. Deteksjons (LOD)- og kvantifiseringsgrense (LOQ).....	65
<b>5. Konklusjon.....</b>	<b>66</b>
<b>6. Litteraturliste.....</b>	<b>67</b>
<b>7. Appendiks.....</b>	<b>71</b>



# Forkortelser

PALME	Parallell artificial liquid membrane extraction
CE	Kapillærelektroforese
µg	Mikrogram
µl	Mikroliter
HCl	Hydrogenklorid
Log P	Fordelingskoeffisient mellom oktanol og vann
LLE	Liquid-liquid extraction / væske-væske ekstraksjon
LPME	Liquid-phase microextraction / væske-fase mikroekstraksjon
SPE	Solid- phase extraction/fast-fase ekstraksjon
SPME	Solid- phase microextraction/fast-fase mikroekstraksjon
GC	Gas Chromatography/gasskromatografi
HPLC	High Performance Liquid Chromatography/væskekromatografi
SLM	Supported liquid membrane
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
PVDF	Polyvinylidenfluorid
mM	Millimolar
H	Hydrogen
DP	Donorfase
AP	Akseptorfase
DEHP	Di-(2-etylheksyl) phosphate
RSD	Relativt standardavvik
LOD	Limit of Detection / Minste detekterbare mengde
LOQ	Limit of Quantification / Minste kvantifiserbare mengde
NaOH	Natriumhydroksid
UV	Ultraviolet (ultrafiolett)

# 1. Innledning

## 1.1. Bakgrunn

Ekstraksjon av vannløselige og basiske substanser fra urin og plasma er av stor interesse innenfor farmasøytisk industri på grunn av at de fleste eksisterende legemidler er små og vannløselige molekyler med basiske egenskaper. Biologiske materialer som urin, blod og spytt er komplekse prøver som ikke kan analyseres direkte. Dette er fordi innholdsstoffene i slike prøver i verste fall kan ødelegge analysesystemet og interferere med analyseresultater som igjen påvirker analysens sensitivitet og reproduserbarhet [1].

Det finnes forskjellige teknikker for prøveopparbeidelse [2]. Væske-væske ekstraksjon (LLE) har lenge vært brukt som prøveopparbeidelsesmetode for analyse av biologiske aktive substanser fra biologiske væsker som urin og blod [2]. Det kan være flere grunner for den oppfattende bruken av LLE. Først og fremst er den enkelt å utføre, metoden gir en effektiv opprensing og oppkonsentrering av analytt av interesse, i tillegg tilbyr metoden høy reproduserbarhet og høy prøvekapasitet [3].

Til tross for den oppfattende bruken av LLE, er den ansett å være tidskrevende, metoden gir økt risiko for emulsjonsdannelse mellom fasene, høyt forbruk av organisk løsemiddel og er vanskelig å automatisere [4]. I tillegg er graden av oppkonsentrering i LLE veldig begrenset [5]. Derfor var det et reelt behov for utvikling av alternative teknologier for å kunne løse problemer knyttet til blant annet LLE.

Kombinasjon av mikroekstraksjon med membran basert teknologi har inspirert bruken av moderne prøveopparbeidelsesteknikker som gir både en høy grad av opprensing av analytter, minimaliserer bruken av organiske løsemidler og gir også mulighet til automatisering.

I 1999 ble *hollow fiber liquid phase microextraction* (HF-LPME) introdusert av Pedersen-Bjergaard og Rasmussen [3]. HF-LPME er et mer robust og pålitelig alternativ til LPME, og hvor ekstraksjonen utføres i et tofase- eller et trefase LPME [3]. Prinsippet er basert på ekstraksjon av analytter fra en vandig prøveløsning, gjennom en porøs hulfiber membran inkorporert med organisk løsemiddel over til en organisk fase ( tofase LPME) eller over til vandig fase (trefase LPME) [3,6].

Tofase LPME er egnet til analyse av analytter med høy løselighet i upolare organiske løsemidler, hvor akseptorfasen kan enten analyseres direkte med gasskromatografi (GC), eller

oppløses i et ønsket løsemiddel etter evaporering. Trefase LPME kan benyttes for ekstraksjon av ioniserbare analytter som syrer og baser [3].

Ekstraksjon i både to og trefase LPME er basert på passiv diffusjon hvor en høy fordelingskoeffisient av analyttene fra prøveløsning til akseptorfase er en viktig faktor, men hydrofile forbindelser har lav fordelingskoeffisient i en membran inkorporert med organisk løsemiddel [3,6].

Ulempen med LPME-systemet er blant annet at prinsippet er selektivt med hensyn på hydrofobe forbindelser. For å fremme ekstraksjon av hydrofile substanser og utvide bruken av denne type ekstraksjons mekanisme, er det introdusert ionparmediert transport [7], hvor det ble tilsatt transportmolekyler i prøveløsningen eller løst i organiskfasen [8].

Ekstraksjon av hydrofile komponenter fremmes ved at det dannes et hydrofobt ionparkompleks mellom analytt og transportmolekyl ved en optimalt pH i prøveløsningen, deretter diffunderer komplekset lett gjennom organiskfasen, og over til akseptorfase.

I 2013 ble parallell *artificial liquid membrane extraction* (PALME) presentert av Gjelstad, Pedersen-Bjergaard og Rasmussen ved avdeling for legemiddelanalyse, Farmasøytisk Institutt, Universitet i Oslo. Dette er en videreutvikling av HF-LPME, men i stedet for hul fibre brukes flate membraner i en 96-brønnsplate for å danne den kunstige væskemembranen [9].

Ekstraksjonsprinsippet i PALME likner på trefase LPME, analyttene ekstraheres fra et stort volum donorfase (250  $\mu\text{l}$ ), gjennom et mikroliter volum av organisk løsemiddel (2,5  $\mu\text{l}$ ), og over til et mindre volum akseptorfase (50  $\mu\text{l}$ ). Dette fører til oppkonsentrering av analyttene uten videre behov for evaporering av ekstraktene.

I arbeidet med denne oppgaven ble åtte basiske og hydrofile legemidler fra både vandige løsninger og fra plasma ekstrahert med PALME med ulike alkylerte fosfater som transportmolekyler. Justering av blant annet pH i donorfase vil være essensielt for at analyttene som inneholder basiske funksjonelle gruppe, kunne danne ionparkomplekser med alkylerte fosfater. Ekstraktene ble etter ekstraksjonen med PALME analysert med kapillærelektroforese (CE). CE med UV-detektor er kompatibel med PALME ettersom ekstraktene fra PALME er i vandig løsning og kan direkte analyseres. CE er også en attraktiv separasjonsmetode på grunn av høy separasjonseffektivitet, kort separasjonstid og lavt forbruk av reagenser [10,11].

## 1.2. Hensikt

Hensikten med oppgaven var å undersøke hvorvidt det var mulig å benytte mikroekstraksjonsteknikken PALME til å ekstrahere polare og vannløselige forbindelser som hydralazin, fenylpropanolamin, efedrin, metaraminol, cimetidin, sotalol, salbutamol og praktolol både fra vandig løsning og fra plasma ved hjelp av transportmolekyler.

Punktvis fremstilling av hensikten i dette prosjektet:

- Anvende PALME for ekstraksjon av hydrofile forbindelser
- Tilsette transportmolekyler for å kunne ekstrahere hydrofile forbindelser
- Ekstrahere stoffene fra biologiske matrikser
- Analysere ekstraktene med CE
- Optimalisere ekstraksjonen
- Evaluere analysemetoden

## 2. Teori

### 2.1. Prøveopparbeidelse

For hver analyse av biologiske materialer som urin, blod og spytt kreves det en prøveopparbeidelsesmetode, der det foretas en opprensing og oppkonsentrering av analyttene dersom analyttene foreligger i et lavt konsentrasjon slik at deteksjon er vanskelig. Prøveopparbeidelse har også som formål å overføre analytten til et ønsket løsemiddel som egner seg for den videre analysen. Noen ganger kan uønskede substanser i en prøveløsning gi respons i analyseapparatet og kan gjøre det vanskelig å skille responsen fra analytten. Derfor er en annen hensikt med prøveopparbeidelse å isolere analytten fra forurensningene før analysen av prøven [2].

Matriks effekter er system spesifikke. Det vil si at hva slags forurensninger eller matrikser som ødelegger analyseapparatet, og som interferer med bestemmelser, er avhengig av hvilken analysemetode som utnyttes. Dette er fordi noen analysemetoder som for eksempel spektroskopiske metoder er mer følsomme i forhold til matrikskomponenter enn for eksempel kromatografiske metoder [2].

Prøveopparbeidelse er det mest tidskrevende trinnet i analytiske prosedyrer som utgjør omtrent 2/3 av analysetiden [12]. Det finnes forskjellige teknikker for prøveopparbeidelse. Den vanligste er fortynning og proteinfelling. Noen ganger er det nok med å fortynne eller proteinfelle prøveløsningen for å redusere eller minimalisere matriks effekter, men ofte kreves intensive metoder som væske-væske ekstraksjon (LLE), fast-fase ekstraksjon (SPE) eller andre mikroekstraksjonsteknikker.

LLE er basert på hvordan organiske stoffer fordeler seg mellom to ikke blandbare faser, en vandig fase og en ikke polar, organisk fase. I LLE utnyttes analyttens fordelingskoeffisient for å beskrive fordeling av analyttene i de to fasene. Fordeling av analytten i de to fasene bestemmes av blant annet løsemidlets polaritet som er gitt av polaritetsindeksen, og lipofilisiteten til analyttene [2].

I SPE vil analytten retarderes i en fast fase eller kolonne, mens forurensningene vaskes bort. I denne metoden utnyttes interaksjoner mellom analytt og kolonnes funksjonelle grupper på overflaten til å isolere, rense og oppkonsentrere analytten på en effektiv måte. Etter fjerning av

uønskede forbindelser, elueres analytten ut med et løsemiddel som bryter interaksjoner mellom analytten og den faste fasen [2].

Til tross for den omfattende bruk av LLE og SPE, er de ansett å være tidskrevende. LLE krever i tillegg høyt forbruk av organisk løsemiddel noe som er ugunstig med tanke på deres egenskaper i forhold til toksisitet og brennbarhet. LLE er videre vanskelig å automatisere [2].

Derfor har forskningsaktiviteter i de siste årene vært fokusert mot utvikling av effektive, økonomiske og miniaturiserte prøveopparbeidelsesteknikker som kan løse problemer knyttet til både LLE og SPE

Mikroekstraksjonsteknikker utgjør et viktig bidrag i utvikling av prøveopparbeidelse med hensyn til miniaturisering, automatisering, kort analysetid og mindre forbruk av organiske løsemidler [13]. Mikroekstraksjon defineres som en ekstraksjonsteknikk hvor volum av ekstraktet (akseptorfase) er mye mindre (mikroliter eller lavere) i forhold til volumet av prøveløsning [13,14]. Det finnes ulike mikroekstraksjonsteknikker som fast-fase mikroekstraksjon (SPME) og væske-væske mikroekstraksjon (LPME). De er miniaturiserte former av henholdsvis SPE og LLE.

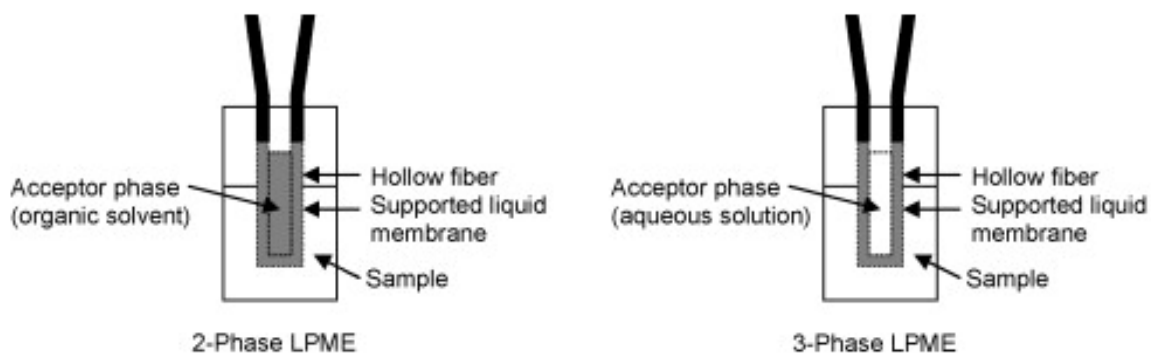
### **2.1.1. Væskefase-mikroekstraksjon (LPME)**

Single drope LPME (SD-LPME) er en ekstraksjonsteknikk hvor ekstraksjonen er basert på en dråpe organisk løsemiddel i tuppen av en kanyle hvor dråpen plasseres i prøveløsningen. Analyttene i prøveløsningen ekstraheres etter hvert fra prøveløsningen til den organiske fasen via passiv diffusjon. Den organiske fasen analyseres videre for deteksjon av analytter med GC. Volumforholdet mellom prøveløsningen og den organiske fasen bestående av en dråpe fører til en betydelig oppkonsentrering av analyttene og mindre forbruk av organisk løsemiddel [13]. Fordelen med SD-LPME var lavt forbruk av organisk løsemiddel og høy oppkonsentrering av analytter av interesse, men noe av grunnen til den manglende interesse rundt denne teknikken var forbundet til dråpens mekanisk stabilitet under ekstraksjon, særlig under risting for å fremskynde ekstraksjonen [13].

En videreutvikling av SD-LPME er hulfiberbasert LPME (HF-LPME) som er et mer robust og stabilt format, ble først introdusert av Pedersen-Bjergaard og Rasmussen i 1999 [10,15].

Ekstraksjon i HF-LPME er basert på en hulfiber membran fuktet med organisk løsemiddel, hvor det organiske løsemidlet etter hvert penetrer inn i porene til fiberen og fungerer som en organisk fase eller væskemembran (SLM = supported liquid membrane). Analyttene diffunderer da fra donorfasen, gjennom SLM, og over til akseptorfasen inne i hulfiberen. SLM fungerer som en effektivt barriere mellom donor-og akseptorfase og dermed hindrer tilbake-diffusjon av analyttene til donorfase [10].

HF-LPME utføres med en porøs polypropylen fiber membran som tradisjonelt har hatt en porøsitet på 70 %, porestørrelse på 0,2 µm, veggtykkelse på 200 µm, og en indre diameter på 600 µm [15]. Ekstraksjon i HF-LPME kan utføres med et tofase-system eller et trefase-system [7,15].



Figur 2.1 Oppsett for tofase og trefase LPME [15].

I tofase LPME ekstraheres nøytrale og hydrofobe forbindelser fra en vandig løsning over i et organisk løsemiddel som er inkorporert i porøs hulfiber membran av polypropylen. På grunn av akseptorfasen er et organisk løsemiddel, er tofase LPME kompatibelt med GC. Ved bruk av analysemetodene HPLC og CE kan ekstraktet fordampes og reløses i et ønsket løsemiddel før de kan analyseres [12,13].

Fordeling av analytter (A) mellom en vandig donorfase og en organisk akseptorfase kan beskrives ved hjelp av ligning 1.

$$A_{\text{donorfase}} \rightleftharpoons A_{\text{akseptorfase (organisk)}} \quad \text{Ligning 1}$$

Ligning 1 viser at det er en likevekt mellom konsentrasjon av analyttene i donor og akseptorfase. Fordelingskoeffisienten K for en analytt beskriver stoffets evne til å fordele seg mellom to ikke blandbare væsker og uttrykkes med ligning 2 i et tofase system.

$$K_{\text{akseptor/donor}} = \frac{C_{\text{akseptorfase}}}{C_{\text{donorfase}}} \quad \text{Ligning 2}$$

$C_{\text{akseptorfase}}$  = konsentrasjon av analytt i akseptorfase som er organisk i tofase system

$C_{\text{donorfase}}$  = Konsentrasjon av analytt i donorfase

Når akseptorfase er vandig løsning kalles teknikken for trefase HF-LPME. Da ekstraheres analyttene fra vandig fase til organisk fase og tilbake igjen til en ny vandig fase. Ekstraktet fra trefase LPME kan injiseres direkte i HPLC og CE, siden akseptorfase er vandig.

Ligning 3 beskriver fordeling av analyttene mellom tre faser i et trefase system.

$$A_{\text{donorfase}} \rightleftharpoons A_{\text{organisk fase}} \rightleftharpoons A_{\text{akseptorfase (vandig)}} \quad \text{Ligning 3}$$

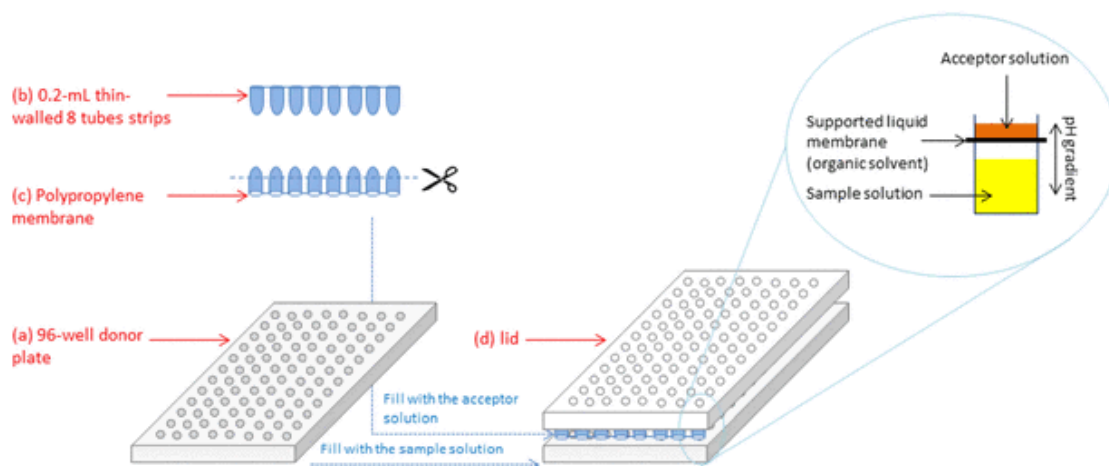
I et trefase LPME er det viktig med justering av pH i både donor og akseptorfase. Analytten av interesse skal være unionisert i donorfase for å ha høy fordeling mellom den vandige donor og den organiske fasen, men samtidig skal fordelingen mellom den organiske fasen og akseptorfase være lav nok til at analytten kan diffundere fra den organiske fasen videre til den vandige akseptorfase [15].

Derfor innebærer ekstraksjon i trefase LPME justering av pH i donorfase og akseptorfase til et pH området hvor analyttene er uladet i donor men ladet i akseptorfase. Det er da analyttene lett kan diffundere fra donorfase, gjennom organisk løsemiddel immobilisert i porene til fiberen, og over til akseptorfase. Ladning på analyttene i akseptorfase øker løseligheten av analyttene i akseptorfase og hindrer også tilbakeekstraksjon av analyttene til organiskfase [7]. Fordeling av analyttene i ulike fasene i et tre fase system beskrives i avsnitt 2.1.2.



## 2.1.2. Parallell Artificial Liquid Membrane Extraction (PALME)

Ekstraksjonene i arbeidet med denne oppgaven ble utført med flate membraner i et kommersielt tilgjengelig 96-brønnsformat kalt PALME. PALME er en miniaturisert form av LLE og baserer seg på samme prinsipp som trefase-LPME. PALME oppsettet består av en donorplate av polypropylen med 96-brønner, en akseptor plate og et topplokk eller lid [9]. Utstyr og oppsett for PALME er vist i Figur 2.2.



Figur 2.2 Oppsett for PALME [16].

a = Donorplate av polypropylen med 96-brønner

b = 0,2-ml tynn-vegg 8 strips

c = Polypropylen membran festet på stripsene

d = Toppløkk

Hver brønn i donorplaten har en kapasitet på 0,5 ml væske. Akseptorplaten består av 96 brønner med tilhørende filtre med 0,45  $\mu\text{m}$  porestørrelse av polyvinylidene fluoride (PVDF) membran. På grunn av uspesifikk binding mellom analyttene og PVDF membranen, ble PVDF membran erstattet med selvlagde porøse polypropylen membraner med en tykkelse på 100  $\mu\text{m}$  og porestørrelse på 0,1  $\mu\text{m}$  [9]. Akseptorplaten består av åtte brønner, som gir mulighet for å utføre åtte ekstraksjoner samtidig.

Den kunstige væskemembranen dannes ved å pipettere ett lite volum av organisk løsemiddel på filtret på akseptorplaten, da vil det organiske løsemidlet inkorporeres i membranen ved å vente i omtrent ett minutt [9].

Ekstraksjonen i PALME er i likhet med trefase LPME basert på passiv diffusjon og dermed er det viktig å ta hensyn til fordelingskoeffisienten  $K$  både mellom organiskfase (SLM) og prøveløsning (donorfase), samt mellom akseptorfase og organisk fase [15]. Dette kan uttrykkes ved ligning 4 og 5.

$$K_{\text{organisk /donor}} = \frac{C_{\text{organiskfase}}}{C_{\text{donorfase}}} \quad \text{Ligning 4}$$

$$K_{\text{akseptor/organisk}} = \frac{C_{\text{akseptorfase}}}{C_{\text{organiskfase}}} \quad \text{Ligning 5}$$

$C_{\text{organiskfase}}$  = Konsentrasjon av analytt i organiskfase

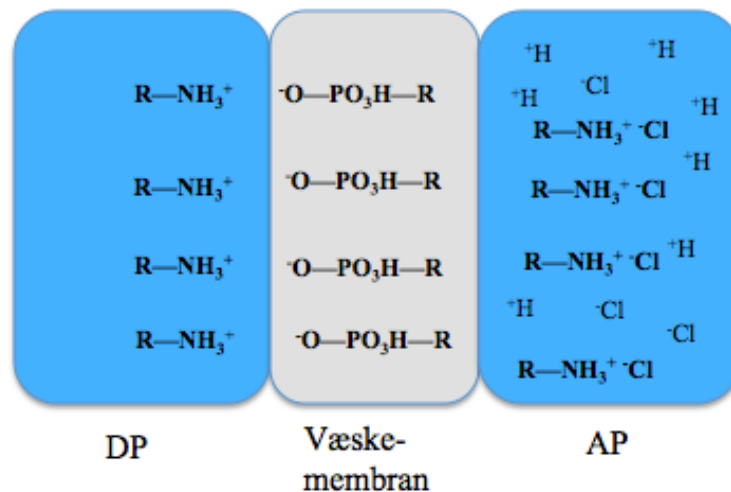
Ligning 4 og 5 viser høye fordelingskoeffisienter er fordelaktig for en effektiv ekstraksjon av analytter fra vandig donorfase, gjennom den organiske fasen, og videre til vandig akseptorfase. En høy fordelingskoeffisient kan oppnås ved riktig valg av organisk væske (SLM) og justering av pH i donorfase og akseptorfase [15]. For basiske analytter er det fordelaktig å ha høy pH i donorfase, helst tre enheter høyere enn pKa-verdien til analytten slik at fordelingskoeffisienten blir høy og basen får sin optimal løselighet i organiskfase. Samtidig vil justering av pH i akseptorfase, helst tre enheter lavere enn pKa-verdien for basen, gjøre at basen får god løselighet i akseptorfase, og vice versa for sure forbindelser.

### 2.1.3. Ionparmediert LPME og PALME

PALME er i likhet med trefase LPME selektiv med hensyn på ioniske komponenter med noe hydrofobe egenskaper. På uladet form er analyttene godt løselige i den organiske membranen, og på deres ioniske form blir de lett løselig i den vandige akseptorfase. For å fremme transport av en mer hydrofile substanser og for å utvide bruken av denne type ekstraksjons mekanisme, er det introdusert *Carrier-Mediated Transport* (ionparmediert transport) i LPME [7]. Ionparmediert transport har tidligere blitt brukt i farmasøytiske og ulike industrielle sammenhenger hvor spormetaller har vært ekstrahert fra avløpsvann [7].

Ionparmediert transport som mekanisme for ekstraksjon av hydrofile substanser fra biologiske væsker i tre-fase LPME ble først publisert i 2003 [7].

I den publiserte artikkelen, ble basiske og hydrofile legemidler med  $\log P < 1$  ble ekstrahert gjennom en porøs, hul polypropylenfiber membran immobilisert med n-oktanol som organisk løsemiddel, og videre inn i en vandig akseptorfase i fiberens hulrom. 50 mM Natrium octanoate ble brukt som transportmolekyl og ble tilsatt i prøveløsning med en pH på 7,0. Det ble oppnådd ekstraksjonsutbytter sammenliknbare med ekstraksjonsutbytter av hydrofobe forbindelser via passiv diffusjon [7]. Selve ekstraksjonen gjennom den organiske væskemembranen foregår i tre steg [7]. Prinsippet er vist i Figur 2.3



Figur 2.3 Modell for ekstraksjon av analyttene i PALME.

DP = donorfase

AP = akseptorfase

Første trinn i ekstraksjonen foregår i donorfase og involverer transport av analytter til membranfase. Ekstraksjon av hydrofile analytter utføres ved en pH i donorfase hvor både analyttene og transportmolekylene er ioniserte. Transportmolekyler kan enten tilsettes i prøveløsningen eller løses i den organiske væskemembranen. I dette prosjektet ble transportmolekyler løst i den organiske fasen med en konsentrasjon på 15 % (w/w). Dette var på grunn av alkylerte fosfater lav vannløselighet [8], som gjør at de kun løses i organiskfasen. Den dårlige vannløseligheten av alkylerte fosfater medfører at de blir igjen i organiskfase under ekstraksjon, noe som betyr at ionpar komplekset sannsynligvis dannes på overflaten

mellom donorfase og organiskfase ved pH hvor analyttene er ionisert [8]. pH i prøveløsningen ble justert ved hjelp av bufferløsning. Under slike forhold er muligheten for dannelse av et hydrofobt ionparkompleks mellom analytt og transportmolekyl tilstede. Når dette komplekset er dannet, må komplekset i neste trinn i ekstraksjonen diffundere inn i porene av fiberen, deretter gjennom den organiske væskemembranen og videre inn til akseptorfase.

Lav pH i donorfasen er essensiell for dannelse av kompleks mellom analyttene og transportmolekylene, og transportmolekylene som anvendes må ha motsatt ladning av analyttene slik at det kan dannes ioniske interaksjoner mellom analyttene og transportmolekylene. Ionparkomplekset som dannes har større løselighet i organisk fase enn i donorfase, og dermed skyves likevekten mot organisk fase som vist i Figur 2.3

Tredje og siste trinn i ekstraksjonsprosessen er dissosiasjon av analyttene fra transportmolekylene og frigjøring av analyttene i akseptorløsningen. Dette skjer i kontaktflaten mellom organisk fase og akseptorfase.  $H^+$ -ioner i akseptorfase vil erstatte analyttene i komplekset. Akseptorfases sammensettinger av protoner som brukes som motioner, har vist seg å være en viktig faktor både for å hindre tilbakeekstraksjon av analyttene og nøytralisering av transportmolekylene [7].

Ionparmediert transport av hydrofile substanser gjennom en væskemembran avhenger av ulike faktorer, som for eksempel egenskapen og konsentrasjon av transportmolekyler, fordelingskoeffisienten av ionparkomplekset, egenskapen til SLM, sterk proton gradient og vibrasjons hastighet [7].

## **2.2. Betingelser for ekstraksjonen**

Ekstraksjon av analytter fra en vandig løsning eller plasma, gjennom en kunstig væskemembran, og over til en akseptorfase styres av flere faktorer i donorfase, organisk fase og akseptorfase og ikke minst av analyttens fysikalske og kjemiske egenskaper [7].

### **2.2.1. Donorfase**

pH i donorfasen er en viktig faktor for å få optimal ladning på basiske analytter. Ekstraksjon under slike forhold gir mulighet for kompleksdannelse mellom analytter og transportmolekyler, hvilket fremmer ekstraksjon av analyttene gjennom en lipofil membran, immobilisert med organisk løsemiddel.

### **2.2.2. Organisk fase**

Både egenskapene til det organiske løsemiddel og transportmolekylene er viktige parametere for dannelse av en stabil væskemembran [9].

#### **2.2.2.1. Organiske løsemidler**

Det må tas hensyn til ulike faktorer ved valg av organisk løsemiddel som skal brukes til å danne den kunstige væskemembranen [7]. Fordelingskoeffisienten er et mål på stoffets fettløselighet. Jo større fordelingskoeffisienten er, desto mer fettløselig er stoffet. En høy fordelingskoeffisient er viktig både for transport av analyttene fra prøveløsningen til organisk fase, samt transport fra den organisk fasen til en vandig akseptorfase [17]. Organiske løsemidler som brukes for å danne den kunstige væskemembranen må ha lav viskositet, da lav viskositet gir høy diffusjon gjennom membranen [7].

Den organiske fasen må i tillegg være uløselig i vann. Den må kunne immobiliseres i hulfiberens porer og bør også ha høyt kokepunkt og være så lite flyktig som mulig slik at den

ikke fordampes under ekstraksjonen [10]. Dersom løsemidlet er for vannløselig, vil det helt eller delvis løses i donorfasen og membran desintegreres.

Ioniske væsker er væsker som er fullstendig ionisert [18]. Felles for de fleste ioniske væsker er, at de er sammensatt av kationer og anioner (negativ ladet ion). Kation delen er positivt ladet og er ofte organiske med ladning fordelt over flere atomer som imidazolium, N-alkylpyridinium osv. Anionet kan både være organisk og uorganisk. Denne delen inkluderer også halogener, nitrater, heksafluorofosfater, tetrafluoroburat osv. [19].

Ioniske væsker er mer viskøse enn typisk organiske løsemidler [20]. Viskositeten av ioniske væsker ligger i området 35-500 cP sammenliknet med vann med en viskositet på 0,9 cP og toluen på 0,6 cP [21]. Høy viskositet gjør at slike væsker diffunderer langsommere inn i porene til den faste membranen enn vanlig organiske løsemidler.

Fordelen ved bruk av ioniske løsemidler er, at de er miljøvennlige, har høy grad av selektivitet, gir høy ekstraksjonseffektivitet, har lengre holdbarhet, og viser motstand mot termiske nedbrytning [21].

#### **2.2.2.2. Egenskaper til transportmolekyler**

Fysikalske og kjemiske egenskaper til transportmolekyler er viktig for en vellykket ekstraksjon [7]. Transportmolekylet som velges må først og fremst inneholde minst en ioniserbar funksjonell gruppe med motsatt ladning av analyttene. Det er da et hydrofobt ionparkompleks som kan dannes. Men er transportmolekylet for hydrofilt, kan det muligens løses i prøveløsning før det dannes et hydrofobt ionparkompleks [7]. Ikke bare dannelse men også stabiliteten av ionparkomplekset er avgjørende for transporten av det gjennom den organiske fasen. Ustabile komplekser kan føre til at analytten frigjøres i den organiske fasen før de rekker akseptorfasen. Det er helt nødvendig for ekstraksjonsutbyttet at analytten frigjøres fra komplekset inn i akseptorløsningen, og dermed er det viktig at binding mellom analytten og transportmolekylet er ikke for sterk.

### **2.2.3. Akseptorfase**

Dissosiasjon av analytter fra ionparkomplekset skjer i kontaktflaten mellom organisk fase og akseptorfase, og dermed har akseptorfasens innhold av protoner vist seg å ha stor innvirkning på ekstraksjonsutbyttet [22].

Ionparmediert transport fører til et kontinuerlig forbruk av protoner i akseptorfasen etterhvert som analyttene oppkonsentreres i akseptorfasen [22], og dermed er et tilstrekkelig overskudd av protoner i akseptorfasen nødvendig både for å utføre ekstraksjon av polare substanser og ikke minst for å hindre tilbakeekstraksjon av analytter [22].

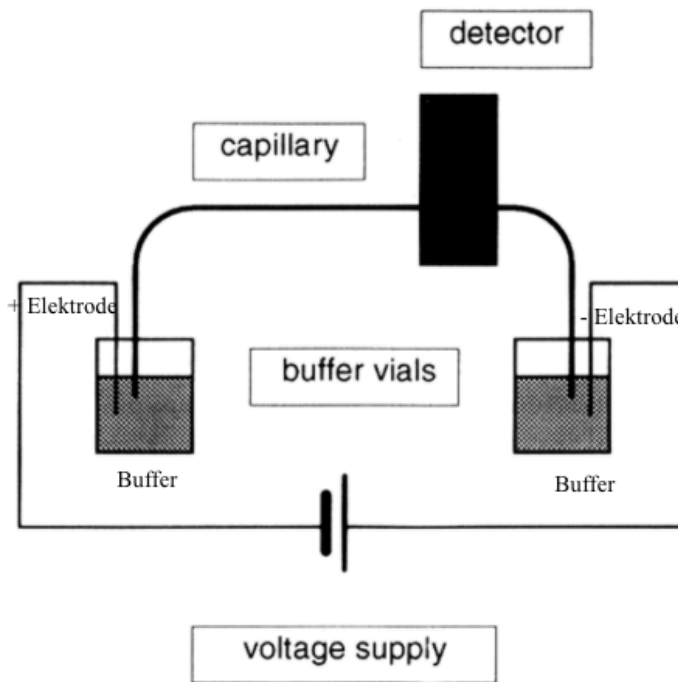
## **2.3. Egenskapen til hulfiber membranen**

Til tross for begrenset kontakt overflate mellom donorfasen og væskemembranen i PALME ( $\approx 0,3 \text{ cm}^2$ ) sammenliknet med HF-LPME ( $\approx 1,5 \text{ cm}^2$  for 3 cm hulfiber), er tiden for oppnå likevekt svært lav i PALME sammenliknet med HF-LPME som er 45-60 min. Dette er på grunn av reduksjon i membranens tykkelse i PALME. Dermed er tykkelse av membranen også en viktig faktor som kan påvirke massetransport gjennom membranen [9].

## **2.4. Kapillærelektroforese (CE)**

Kapillærelektroforese (CE) som ble introdusert tidlig i 1980 årene [24], har blitt en attraktiv separasjonsmetode for både ioniske og nøytrale komponenter, peptider, proteiner, råvarekontroll, enantiomere forbindelser og DNA [10]. CE er en separasjonsmetode hvor separasjonen er basert på stoffenes vandringshastighet i et elektrisk felt. På grunn av elektrostatisk tiltrekning vil positiv ladete ioner tiltrekkes av den negative elektroden og vice versa. Migrasjonshastigheten av stoffer er proporsjonal med molekylstørrelse og antall ladninger på molekylene. Små molekyler og molekyler med flere ioniserbare grupper vandrer raskere mot elektroden enn store og uladete molekyler [2].

CE oppsettet består av et tynt silikakapillær, kalles fused-silika som er fylt med en vandig buffer, en anode og en katode tilkoblet en høyspenningskilde med en spenning på 10-30 kV, to beholdere med vandig buffer tilsvarende det som finnes i kapillæret, og en detektor som vanligvis er en UV-detektor som er i nærheten av utløpet til kapillæret [2,23]. En enkelt skisse av CE er vist i Figuren 2.4.



**Figur 2.4** Prinsippskisse for CE [23].

Selve separasjonen foregår i et lite kapillær med indre diameter på mellom 20-100  $\mu\text{m}$ , og lengden kan variere mellom 30-70 cm og kan være enda lengre ved separasjon av et stort antall stoffer [23].

Et lite volum av prøveløsning ( $< 1 \mu\text{L}$ ) injiseres i kapillæret. Hver ende av kapillæret plasseres i et buffer reservoar. På utsiden av kapillærene er det et tynt lag av polyimid som er nødvendig for fleksibiliteten av kapillæret og hindrer at de tynne kapillæret brekker [2].

Bufferen som brukes for separasjon av basiske forbindelser har lav pH. Dette er fordi analyttene som separeres ved CE må foreligge i ionisert form for å kunne migrere i et elektriskfelt, og bufferen må ha en styrke slik at pH holdes konstant under hele analysen. Årsaken til at buffere brukes til å justere pH er at buffere gir stabil pH, dermed interferer ikke med analyttenes respons.

Dersom modellanalyttene er basiske plasseres anoden ved innløpet av kapillæret, og katoden ved utløpet. Høyspenning mellom de to elektrodene vil gjøre at analyttene begynner å migrere [2,23].



Detektoren gir respons eller et elektrisk signal for de stoffene som skal detekteres. I CE er UV-detektoren den mest brukte detektor [25]. UV-detektorer har en nedre deteksjonsgrense på 1-100 ng og brukes for å detektere stoffer som absorberer UV-stråling ved bølgelengder over 190 nm [2]. UV-detektoren er den mest anvendte detektor i farmasøytiske analyse på grunn av at mange legemidler absorberer UV-lys

Signalet fra detektoren kan plottes som funksjon av tid og kalles for elektroferogrammet. Elektroferogrammet benyttes til å identifisere organiske stoffer i en blanding ved å bruke migrasjonstiden til stoffene. Migrasjonstiden er den tiden stoffene begynner å migrere fra starten av kapillæren, og til de passerer detektoren. I tillegg til identifisering er man normalt også interessert i å foreta en kvantitativ bestemmelse. Kvantitative bestemmelser baserer seg på at arealet under en gitt topp i et elektroferogram er proporsjonalt med konsentrasjonen av analyttene. Dette kan gjøres ved å plote standardkurver med toppareal som funksjon av konsentrasjon og ut fra det kan man bestemme mengden av stoffet i prøven [2].

Strøm gjennom bufferen i kapillæret fører til at det utvikles en del varme under analysen. En konstant temperatur gjennom kapillæret er viktig for repeterbare migrasjonstider og topparealer [2]. Høy temperatur i kapillæret reduserer viskositeten av løsningen, og vandringshastigheten av de fleste ioner øker med 2% per °K [26], noe som kan redusere migrasjonstiden og kan bidra til båndspredning. Derfor er det viktig at kapillærene avkjøles. Ved å sette kapillæret i spesielle kassetter sikrer man en konstant temperatur gjennom kapillæret. Enten innblåsing av luft langs kapillæret eller innstrømming av kjølevæske rundt kapillæret som sikrer avkjøling av kapillæret. [2]

Fordelen med bruk av CE er:

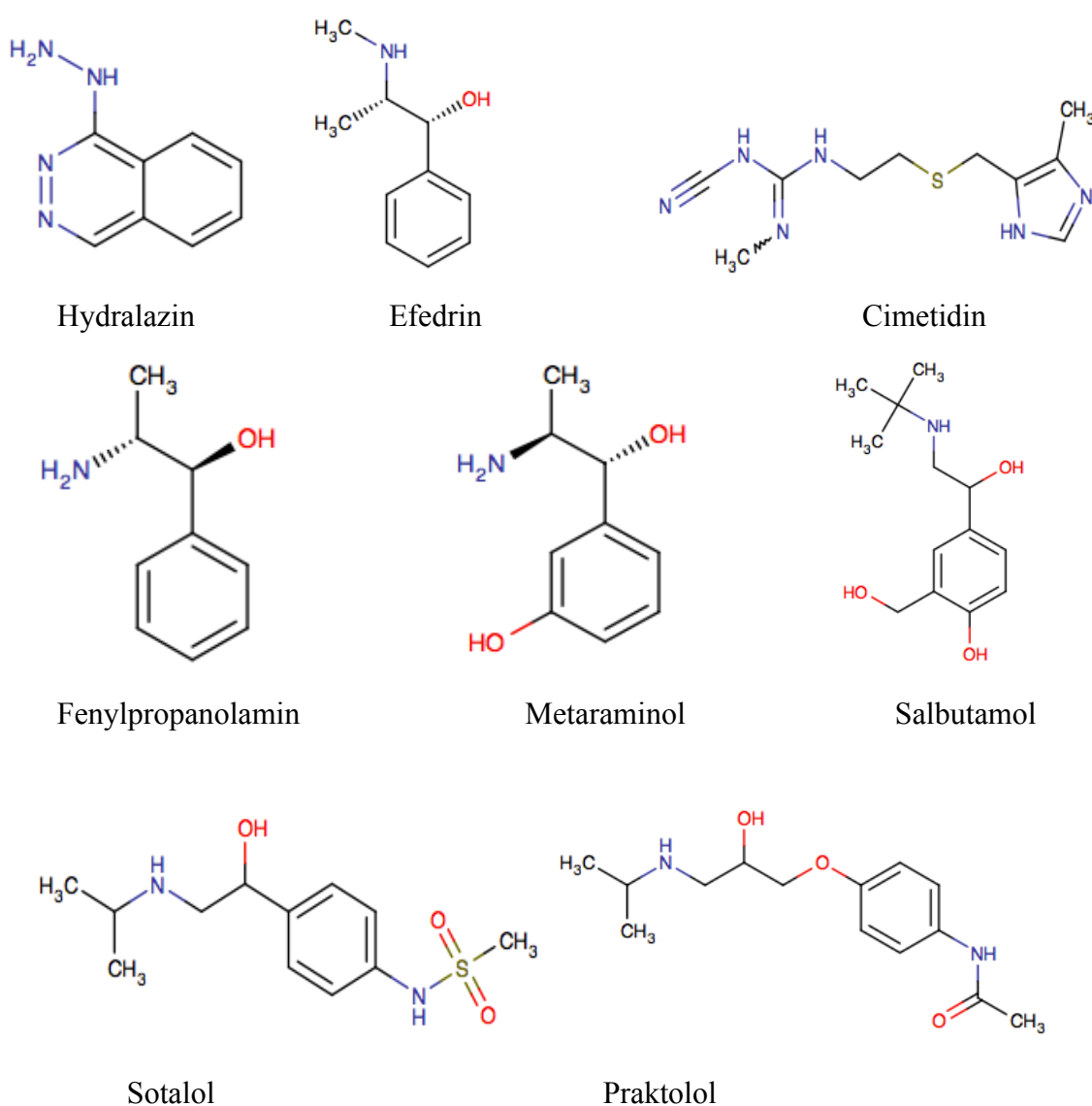
- Kan lett automatiseres for kvantitativ analyse.
- Instrumentet er utstyrt med små karuseller hvor flere prøver kan settes og analyseres samtidig.
- Er en effektiv separasjonsmetode som gir høyere separasjonseffektivitet enn HPLC [26]
- Kan brukes både til identifikasjon av stoffer og til kvantitativ bestemmelse av analyttene i prøven [2].
- Separasjon utføres på kort tid

- Mindre forbruk av løsemiddel, sammenliknet med HPLC, hvor det kreves større mengder av løsemidler i mobilfase [23].

# 3. Eksperimentelt

## 3.1. Valg av modellanalytter

Modellanalyttene som ble benyttet i forsøket besto av åtte basiske legemidler med relativt hydrofile egenskaper. Figur 3.1 viser kjemiske strukturer og tabell 3.1 gir en oversikt over pKa-verdier og log P-verdier for modellanalyttene.



Figur 3.1 Analyttens kjemiske strukturer [26].

**Tabell 3.1** Oversikt over modellanalyttenes molekylformel, pKa-verdier, log P molekylvekt [27,29] og produsent.

Analytter	Molekylformel	pKa	Log P	Molekylvekt	Produsent/by/land
Hydralazin	$C_8H_8N_4$	6,40	0.75	160.18	Sigma Aldrich/ St. Louis , MO / USA
Efedrin	$C_{10}H_{15}NO$	9.52	1.32	165.23	Sigma Aldrich/ St. Louis , MO / USA
Cimetidin	$C_{10}H_{16}N_6S$	6,72	-0.29	252.34	Sigma Aldrich/ St. Louis , MO / USA
Fenylpropanolamin	$C_9H_{13}NO$	9.44	0.89	151.21	Sigma Aldrich/ St. Louis , MO / USA
Metaraminol	$C_9H_{13}NO_2$	9.68	-0.05	167.20	Sigma Aldrich/ St. Louis , MO / USA
Sotalol	$C_{12}H_{20}N_2O_3S$	9,19	-0.40	272.36	Sigma Aldrich/ St. Louis , MO / USA
Salbutamol	$C_{13}H_{21}NO_3$	9.40	0.34	239.31	Sigma Aldrich/ St. Louis , MO / USA
Praktolol	$C_{14}H_{22}N_2O_3$	9.67	0.83	266.34	Sigma Aldrich/ St. Louis , MO / USA

## 3.2. Betingelser for CE

CE med UV-detektor ble brukt som analyseinstrument i dette arbeidet. Prinsippet for CE er beskrevet detaljert i avsnitt 2.5. Tabell 3.2 viser en oversikt over parametere og betingelser for CE-oppsettet. Instrument som ble brukt var av typen MDQ (Beckman, Fullerton, CA, USA).

**Tabell 3.2** Betingelser for CE.

Parameter	Betingelse
Kapillær	Fused Silika med i.d. på 75 µm, total lengde på 55 cm
Deteksjonsbølgelengde	200 nm
Spenning	30,0 kV
Seperasjonsbuffer	Fosfatbuffer pH 2,75, 25mM
Kassettemperatur	20 °C
Analysetid	9,0 minutter
Trykk ved injeksjon	50.0 mbar
Injeksjonstid	5,0 sekunder

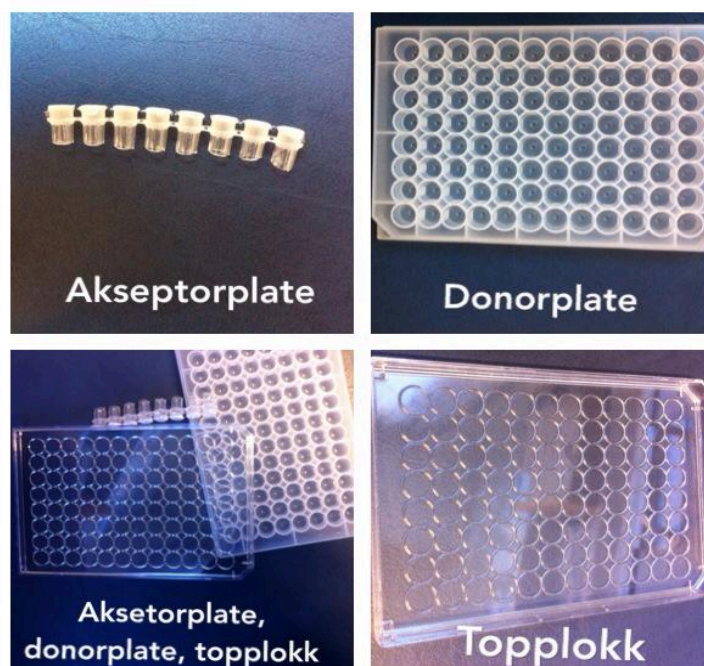
Tabell 3.3 viser en oversikt over daglig prosedyre ved oppstart, mellom hver prøve og etter analyse i forbindelse med kapillærelektroforese.

**Tabell 3.3** Prosedyrer før og etter hver analyse ved kapillærelektroforese.

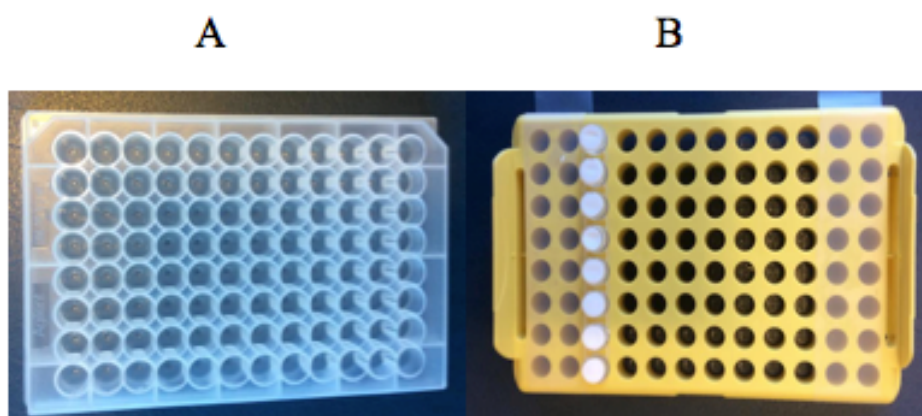
Oppstartprosedyre ved nytt kapillær	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spyling med 10mM NaOH i 30 minutter</li> <li>- Spyling med destillert vann i 15 minutter.</li> <li>- Spyling med seperasjonsbuffer i 30 minutter</li> </ul>
Oppstartprosedyre ved daglig bruk	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Slå på UV-lampe</li> <li>- Fjern gamle vialer</li> <li>- Spyling med 10mM NaOH i 15 minutter</li> <li>- Spyling med destillert vann i 3 minutter.</li> <li>- Spyling med seperasjonsbuffer i 15 minutter</li> </ul>
Avsluttingsprosedyre	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spyling med 10mM NaOH i 5 minutter</li> <li>- Spyling med destillert vann i 2 minutter.</li> <li>- Spyling med luft i 2 minutter</li> <li>- Slå av UV-lampen</li> </ul>
Prosedyre mellom hver analyse	Spyling med seperasjonsbuffer i 2 minutter

### 3.3. Ekstraksjon fra vandige prøveløsninger

Ekstraksjon ble utført fra både vandig løsning og plasma. PALME-oppsettet er beskrevet i avsnitt 2.3. PALME ble utført med selvlagde akseptorplater med membranfiltre bestående av polypropylen. Figur 3.2 viser de ulike delene i PALME-oppsettet.

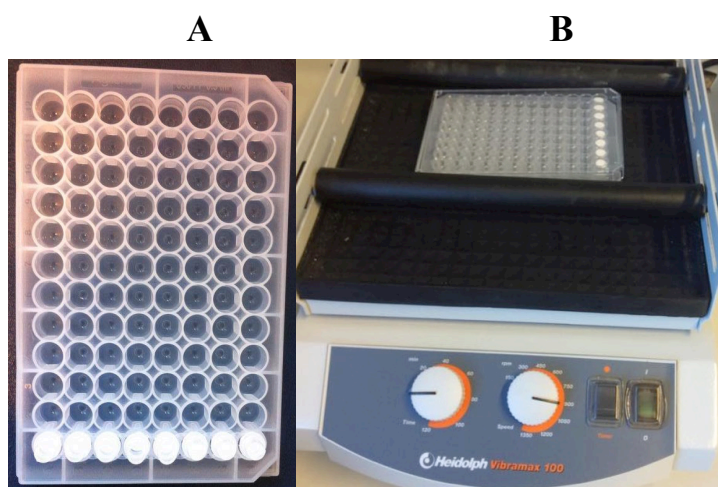


**Figur 3.2** Akseptorplate, donorplate og toppløkk i PALME-oppsettet.



**Figur 3.3** Overføring av prøveløsning A og dannelse av væskemembran B

Før ekstraksjon ble 250  $\mu$ l prøveløsning overført til brønnene i donorplaten, topplokk satt på for å hindre fordamping og eventuell forurensning av prøveløsning som vist i Figur 3.3 A. Til sammen 2,5  $\mu$ l av organiske løsemidlet med og uten transportmolekyl ble pipettert på den selvlagde membranen (figur 3.3 B). Overskudd av organisk løsemiddel ble tørket bort og membranen ble lufttørket i cirka ett minutt. Deretter ble akseptorplaten snudd riktig vei, plassert rett over donorplaten og fylt med 50  $\mu$ l akseptorfase (Figur 3.4 A). Toppløkket satt på donor-og akseptorplaten. Toppløkket gjør at ekstraksjonsenheten blir tett slik at hele enheten kan ristes under ekstraksjonen (Figur 3.4 B)



**Figur 3.4** A er donorplaten med akseptorplaten og B viser prøven på ristemaskin

Ved endt ekstraksjon ble ekstraktet overført umiddelbart fra akseptorplaten til plastvialer for å avbryte eventuelle videre ekstraksjon. Ved bruk av 10 mM HCl konsentrasjon i akseptorfase, ble ekstraktet direkte overført til vialer før de ble analysert med CE, men ved bruk av 50 mM HCl i akseptorfase, ble 30  $\mu$ l av ekstraktet fortynnet med 30  $\mu$ l destillert vann direkte i vialene før analysen.

## **3.4. Ekstraksjon fra plasmaløsninger**

Organisk væskemembran ble dannet på samme måte som ved ekstraksjon fra vandig løsning, men med tre ulike organisk løsemidler, 1-oktanol, 2-nonanon og 2-oktanon med DEHP som transportmolekyl.

Ekstraksjon ble i likhet med vandige løsninger utført med en riste-hastighet på 900 rpm og en ekstraksjonsvarighet på 30 minutter. Sluttkonsentrasjon av analyttene i alle prøveløsninger var 1 µg/ml. Ufortynnet plasma, ulike fortynninger av plasma og buffer, samt blankprøve av alle forsøkene ble undersøkt med hensyn på ekstraksjonsutbytte, separasjonseffektivitet og eventuelle topper fra matriks komponenter. Forskjellige forhold mellom plasma og buffer ble testet. Fortynningsforholdet som ga høyest utbytte av analyttene ble brukt videre i forsøket. Plasmaløsninger ble opparbeidet som vist i Tabell 3.4.

## **3.5. Betingelser for ekstraksjonen**

### **3.5.1. Donorfase**

Donorfasen bestod av 250 µl vandige løsninger og plasma med alle analyttene løst i, med en sluttkonsentrasjon av analyttene på 1 µg/ml.

### **3.5.2. Organisk fase**

Den kunstige væskemembranen ble dannet ved at 2,5 µl organisk løsemiddel med og uten transportmolekyler ble pipettert til selvlagde membranen. Valget av volumet var på grunnlag av tidligere studier [9]. Tabell 3.5 og 3.6 gir en oversikt over henholdsvis organiske løsemidler og ioniske løsemidler brukt i oppgaven.

Ulike alkylerte fosfater, kombinasjon av de, og fargeindikator bromtymolblått ble prøvd ut som transportmolekyl i dette arbeidet. Transportmolekyler hadde en konsentrasjon på 15 % (w/w) og var løst i ulike organiske løsemidler. Tabell 3.7 gir en oversikt over transportmolekylene molekylstrukturer, log P og molekylmasse.



**Tabell 3.4** Oversikt over organiske løsemidler som er brukt som væskemembran i PALME.

Navn	Kvalitet	Produsent	By/Land
Dodecyl acetat	97 %	Sigma Aldrich	Buchs /Sveits
2-Nonanon	≥ 99 %	Sigma Aldrich	Steinheim/Tyskland
Heksadekan	99 %	Sigma Aldrich	Steinheim/Tyskland
2-Heksyl-1-dekanol	97 %	Sigma Aldrich	Steinheim/Tyskland
1-Oktanol	≥ 99 %	Sigma Aldrich	Dorset/ UK
Diheksyleter	97 %	Sigma Aldrich	Steinheim/Tyskland
2-Oktanon	≥ 97 %	Sigma Aldrich	Buchs /Sveits
2-Nitrofenyl octyl eter	≥ 99 %	Fluka	Buchs /Sveits
Isopentyl benzen	≥ 97 %	Sigma Aldrich	Buchs /Sveits

**Tabell 3.5** Oversikt over ioniske væsker.

Navn	Kvalitet	Produsent	By/Land
1-Heksyl-3-metylimidazolium tris (pentafluoroetyl) trifluorofosfat	High purity	Merck KGaA	Damstadt/ Tyskland
1-Heksyl-3-metylimidazolium bis (trifluorometylsulfonyl) imid	High purity	Merck KGaA	Damstadt/ Tyskland
1-Butyl-1-metylpyrrolidinium bis (trifluorometylsulfonyl) imid	High purity	Merck KGaA	Damstadt/ Tyskland
1-Metyl-3-octylimidazolium tetrafluoroborat	99 %	Solvent Innovation GmbH	Damstadt/ Tyskland
1-Metyl-3-octylimidazolium heksafluorofosfat	Ikke angitt	Solvent Innovation GmbH	Damstadt/ Tyskland

**Tabell 3.6** Oversikt over molekylstrukturer, molekylmasse (Mm), log P og molekylformel til transportmolekyler [26,27].

Transportmolekyler	Molekylstruktur
Tributylfosfat $C_{12}H_{27}O_4P$ Mm=266,3141 Log P= 4,09	
Tris (2-etylheksyl)fosfat $C_{24}H_{51}O_4P$ Mm= 434,6331 Log P= 9,18	
Trietylfosfat $C_6H_{15}O_4P$ Mm= 182,1547 Log P= 1,18	
Tridecylfosfat $C_{13}H_{27}O_4P$ Mm= 278,3259 Log P = 4,68	
Trifenylfosfat $C_{18}H_{15}O_4P$ Mm= 326,2831 Log P = 5,09	
Di(2-etylheksyl)fosfat $C_{16}H_{34}O_4P$ Mm= 321,4131 Log P = 5,78	

**Tabell 3.7** Oversikt over transportmolekyler.

Transportmolekyler	Kvalitet	Leverandør/by/land
Trietyl fosfat	≥ 98 %	Sigma Aldrich, Buchs, Sveits
Tris(2-etylheksyl) fosfat	99 %	Sigma Aldrich, Steinheim, Tyskland
Tributyl fosfat	98 %	Sigma Aldrich, Dorset, UK
Trifenyl fosfat	98 %	Sigma Aldrich, Steinheim, Tyskland
Di(2-etylheksyl) fosfat	95 %	Sigma Aldrich, Steinheim, Tyskland
Tridecyl fosfat	Ikke angitt	Sigma Aldrich, Buchs, Sveits
Bromtymol blått	Ikke angitt	E-Merck, Darmstadt, Tyskland

### 3.5.3. Akseptorfase

Akseptorløsning fri for analyttene besto av ulike konsentrasjoner av HCl. HCl-konsentrasjonen som ble testet besto av 10 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM og 50 mM HCl.

## 3.6. Veieksperiment

Veiing av modellanalyttene ble utført på vekten Mettler Toledo AG285 ( Columbus, Ohio, USA).

## 3.7. Kjemikaler og utstyr

Tabell 3.8, 3.9 og 3.10 viser diverse kjemikaler, PALME-oppsettet og diverse utstyr som er benyttet under prosjektet.

**Tabell 3.8** Diverse kjemikaler.

Navn	Kvalitet	Produsent	By/Land
Natriumdihydrogenfosfat monohydrat	Pro analysi	Merck Millipore	Darmstadt/Tyskland
Orto-fosforsyre	Pro analysi	Merck Millipore	Darmstadt/Tyskland
Natriumhydroksid NaOH	Pro analysi	Prolabo	Leuven/Belgia
Hydrogenklorid HCl 37 %	For analyse	Merck Millipore	Darmstadt/Tyskland

**Tabell 3.9** PALME-oppsett.

	Beskrivelse	Produsent	By/Land
Bunnplate	96 well plates, 0,5 ml, polypropylene 120/pk	Agilent	Santa Clara, CA, USA
Mottakerplate	MAIPN4550 96-well Multiscreen-IP Filter plate with 0,45 µm porous polyvinylidene fluoride (PVDF). Intern diameter = 6.0 mm.	Millipore	Billerica, MA, USA
Topplukk		Millipore	Billerica, MA, USA

**Tabell 3.10** Diverse utstyr

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By/Land
Ristemaskin	Vibramax 100	Heidolph	Schwabach/Tyskland
Vortex maskin	MS 3 digital	IKA®	Staufen/Tyskland
pH meter	pH meter	Metrohm AG	Herisau/Sveits
CE-capillary Burner		Electro-Kinetic	Broxburn/UK
Ultralydbad	Branson 2200	Branson	Connecticut/ USA
Plastvialer	0,2 ml	Thermo Scientific	Loughborough/UK
Plastrør	5 ml	Sarstedt	Hildesheim/Tyskland
Filter	0,45 µm	Sartorius stedim	Goettingen, Tyskland
Eppendorfrør	10 og 20 ml	VWR	Radnor, PA/USA
Finnpipette		Biohit	Helsinki, Finland
Pipettespiser til finnpipette		Sartorius stedim	Helsinki, Finland

## **3.8. Løsninger**

### **3.8.1. Stamløsning**

Stamløsningen ble laget ved å veie inn renstoff av modellanalyttene, hydralazin, efedrin, cimetidin, fenypropamolamin, metaraminol, sotalol, salbutamol og praktolol, ved å løse dem i etanol til en konsentrasjon på 1 mg/ml. Stamløsningen ble oppbevart ved -20 °C.

### **3.8.2. Standardløsning**

Standardløsningen ble laget ukentlig ved å fortynne stamløsningen på 1 mg/ml i 10 mM og 25 mM HCl slik at sluttkonsentrasjonen ble 10 µg/ml. Standardløsningen ble oppbevart ved 2-8 °C.

### **3.8.3. Prøveløsning**

#### **3.8.3.1. Vandig prøveløsning**

I den første delen av oppgaven ble vandig prøveløsninger med alle analyttene, laget ved å fortynne stamløsningen med 10 mM NaOH-løsning til en konsentrasjon på 1 µg/ml. I andre delen av oppgaven ble fosfatbuffer med pH 7,0 brukt til fortynning av stamløsning slik at konsentrasjonen av hver analytt ble 1 µg/ml. Prøveløsningen ble oppbevart i kjøleskap (2-8 °C).

### 3.8.3.2. Plasma prøveløsning

**Tabell 3.10** Fremgangsmåte for tilberedning av ulike plasmaløsninger.

Løsningene	Konsentrasjon	Tillaging
Ufortynnet plasma	1 µg/ml	200 µl av 10 µg/ml + 1800 µl plasma
Plasma: buffer 2 : 1	1 µg/ml	200 µl av 10 µg/ml + 1330 µl plasma + 470 µl buffer
Plasma : buffer 1 : 1	1 µg/ml	200 µl av 10 µg/ml + 1000 µl plasma + 800 µl buffer
Plasma : buffer 1 : 2	1 µg/ml	200 µl av 10 µg/ml + 1330 µl buffer + 470 µl plasma
Blankprøve av alle	Uten analyttene	samme prosedyre som selve prøvene

### 3.8.4. Seperasjonsbuffer

#### **25 mM Fosfatbuffer pH 2,74**

En løsning med 25 mM orto-fosforsyre ble laget ved å løse 1,225 g  $H_3PO_4$  (85 %) i 500 ml destillert vann. I tillegg ble en løsning med  $NaH_2PO_4$  laget ved å veie ut 1,725 g  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  og løse det til 500 ml destillert vann.

25 mM fosfatbuffer som ble brukt til separasjon av modellanalyttene i CE ble laget ved å titrere  $NaH_2PO_4$  med  $H_3PO_4$  til pH 2,74. pH i løsningen ble målt ved hjelp av et 744 pH Meter (Metrohm). Bufferen ble først filtrert med 0,45 µm Minisart RC 25 single use syringe filter, deretter satt i ultralyd bad for 15 minutter. Løsningen ble oppbevart ved rom temperatur.

### **25 mM Fosfatbuffer pH 7,0**

0,3462 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  ble veid ut og løst i destillert vann til 100 ml. I tillegg ble en løsning av  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$  laget ved å løse 0,8959 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$  i destillert vann til 100 ml. Denne løsningen ble titrert med  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ -løsningen. pH i løsningen ble målt til pH 7,0 ved hjelp av et 744 pH Meter (Metrohm). Løsningen ble oppbevart ved rom temperatur.

## **3.8.5. Akseptorfase**

### **10 mM HCl**

0,828 ml HCl 37 % (v/v) ble fortynnet med destillert vann til totalvolum på 1000 ml. Løsningen ble oppbevart ved rom temperatur.

### **50 mM HCl**

2,070 ml HCl 37 % (v/v) ble fortynnet med vann til totalvolum på 500 ml. Akseptorløsninger på henholdsvis 20, 25, 30, 35 og 40 mM ble fortynnet videre fra denne løsningen. Løsningen ble oppbevart ved rom temperatur.

## **3.8.6. Andre løsninger**

10 mM NaOH-løsning, som ble benyttet både til aktivering av silanol grupper på kapillæret og tilberedelse av prøveløsning til en pH-verdi på 12, ble laget ved å veie ut 0,3999 g natrium hydroksid og fortynnet videre med destillert vann til 100 ml. 5 ml av denne løsningen ble fortynnet med 500 ml destillert vann. Løsningen ble oppbevart ved rom temperatur.

## 3.9. Beregninger

### 3.9.1. Utbytte (R)

Ekstraksjonsutbyttet begrenses i tilfeller det utvikles ny ekstraksjonsmetode, og hvor det kan være fare for tap av analytter. Utbyttet (R) gis i prosent og regnes ut fra følgende formel:

$$R = \frac{C_e \times V_e}{C_p \times V_p} \cdot 100\%$$

Hvor R er utbytte,  $C_e$  er konsentrasjon av analytter i ekstraktet,  $V_e$  er volum av ekstraktet,  $C_p$  er konsentrasjon av analytter før ekstraksjon og  $V_p$  er volum av prøven [2].

### 3.9.2. Relativt standardavvik

Relativt standardavvik (RSD) er beregnet ved hjelp av følgende formel:

$$RSD = \frac{s}{x} \times 100 \%$$

Der x er gjennomsnittet for målingene og s er standardavviket [2].

### 3.9.3. Oppkonsentrering

Oppkonsentreringen (E) er beregnet ut fra følgende formel:

$$E = \frac{C_e}{C_p} = \frac{V_p R}{V_e \cdot 100}$$

Der  $C_e$  er konsentrasjon av analytt i ekstraktet,  $V_p$  er den opprinnelige konsentrasjon i prøven, R er ekstraksjonsutbyttet og  $V_e$  er volum av ekstraktet [2].



## **3.10. Evaluering**

Enhver analysemetode bør evalueres for å dokumentere og sikre at analysemetoden er egnet til sitt formål. Evaluering av metoden ble ikke vektlagt, da dette ikke er et ferdig prosjekt.

Derfor ble bare noen viktige parametere som identifikasjon, linearitet, presisjon, ekstraksjonsutbytte, matrikseffekter, deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ) vurdert. Evaluering av metoden til alle analyttene ble utført i plasmaløsning.

### **3.10.1. Identifikasjon**

Analyttene ble identifisert ut fra migrasjonstiden. Migrasjonstiden er når stoffet begynner å migrere, og til det passerer detektoren [2]. Migrasjonstidene til de ulike analyttene ble bestemt ved å analysere stoffene enkeltvis i kapillærelektroforese.

### **3.10.2. Presisjon**

Presisjon i en metode forteller noe om spredning av analyseresultater etter gjentatte målinger. [28]. Den angis som prosent relativt standardavvik (RSD) og kan være avhengig av konsentrasjon til analyttene. Derfor måles den ved ulike konsentrasjoner. Presisjon ble bestemt for tre konsentrasjonsnivåer 1, 10 og 25 µg/ml med tre paralleller av hver konsentrasjonsnivåer.

### **3.10.3. Standardkurver og linearitet**

Linearitet er metodens egenskap til å gi standardkurver med lineære sammenheng mellom konsentrasjon og respons for analyttene. Alle analyttene ble testet for linearitet i konsentrasjonsområdet mellom 1- 25 µg/ml. Blankt plasma ble tilsatt stamløsning til en konsentrasjon på 1, 5, 10, 15 og 25 µg/ml. Konsentrasjonene 1, 10 og 25 µg/ml hadde tre paralleller, mens konsentrasjonsnivåene 5 og 15 µg/ml hadde seks paralleller.

### 3.10.4. Metodens deteksjons- og kvantifiseringsgrense

Deteksjonsgrense (LOD) tilsvarer (limit of detection) den laveste konsentrasjonen av analytt som med sikkerhet kan detekteres i prøven. Kvantifiseringsgrense tilsvarer LOQ (limit of quantification), den laveste konsentrasjon av analytter i prøveløsning som kan kvantifiseres med god sikkerhet [28]. Topphøyden og høyden ble målt, og LOD og LOQ ble bestemt ut fra et signal - støy forholdet (S/N) lik henholdsvis 3 og 10.

LOD og LOQ ble beregnet ut etter følgende formler:

$$\text{LOD} = C \cdot 3 \cdot \frac{h}{H}$$

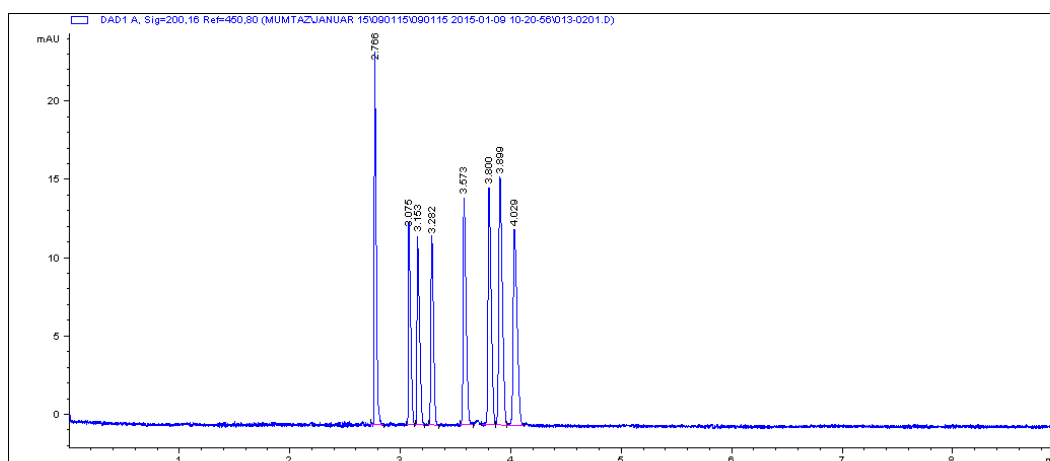
$$\text{LOQ} = C \cdot 10 \cdot \frac{h}{H}$$

Der C er den opprinnelige konsentrasjonen av analytt i prøven, h er høyden på støyen, og H er topphøyden [2].

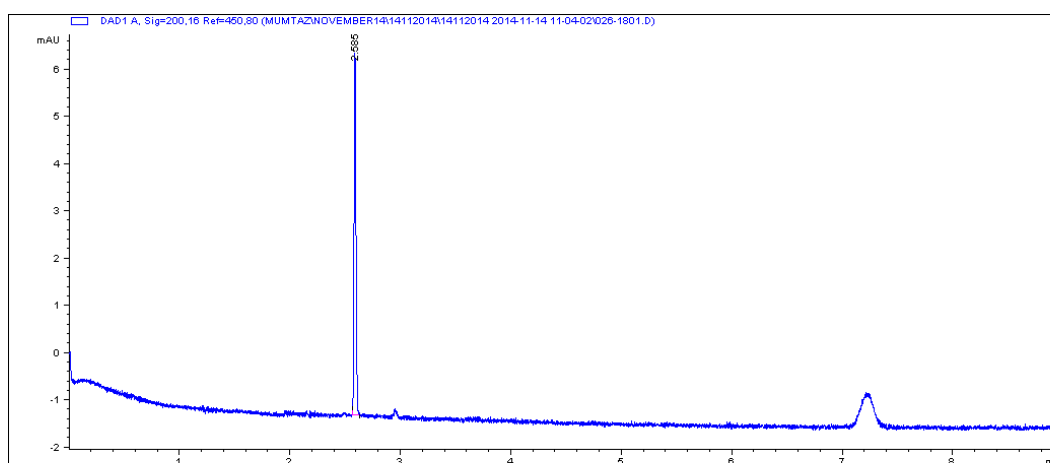
# 4. Resultat og diskusjon

## 4.1. Migrasjonsrekkefølge i kapillærelektroforese

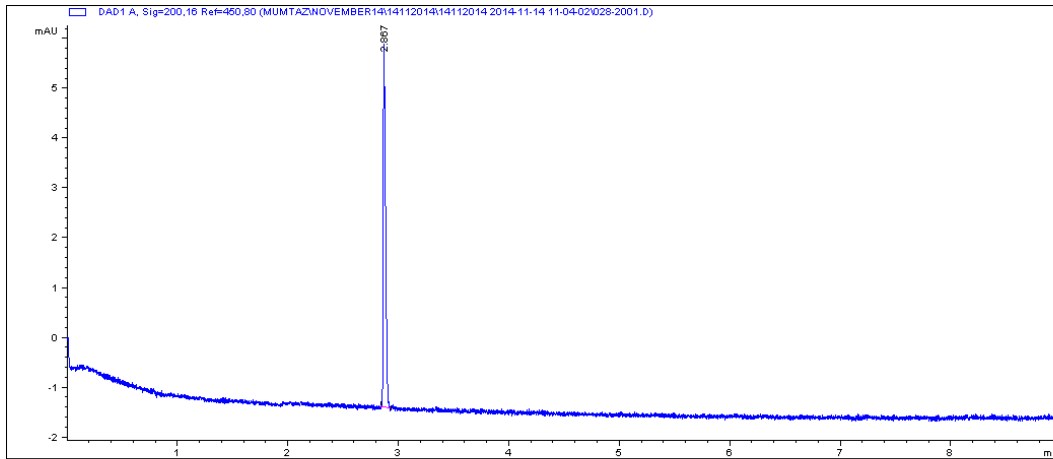
Innledningsvis ble det utvalgt åtte basiske analytter basert på deres hydrofile egenskaper. Deretter ble deres migrasjonstid bestemt ved å analysere stoffene enkeltvis i CE. Kjemiske og fysiske egenskaper av modellanalyttene er vist i Tabell 3.1. Elektroferogrammet til hver analytt ble deretter sammenliknet med et elektroferogram med en blanding av alle modellanalyttene. Elektroferogrammet til henholdsvis standarden og analyttene er vist i figurene nedenfor.



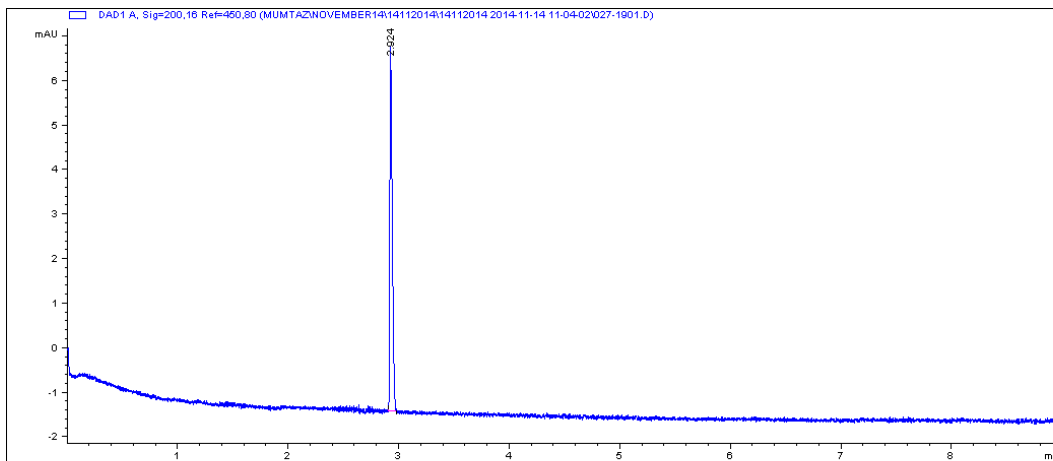
**Figur 4.1** Migrasjonsrekkefølge av analyttene i CE. Hydralazin (2.766 min), fenylpropanolamin (3.076 min), efedrin (3.153 min), metaraminol (3.282 min), cimetidin (3.573 min), sotalol (3.800 min), salbutamol (3.899 min) og praktolol (4,029 min).



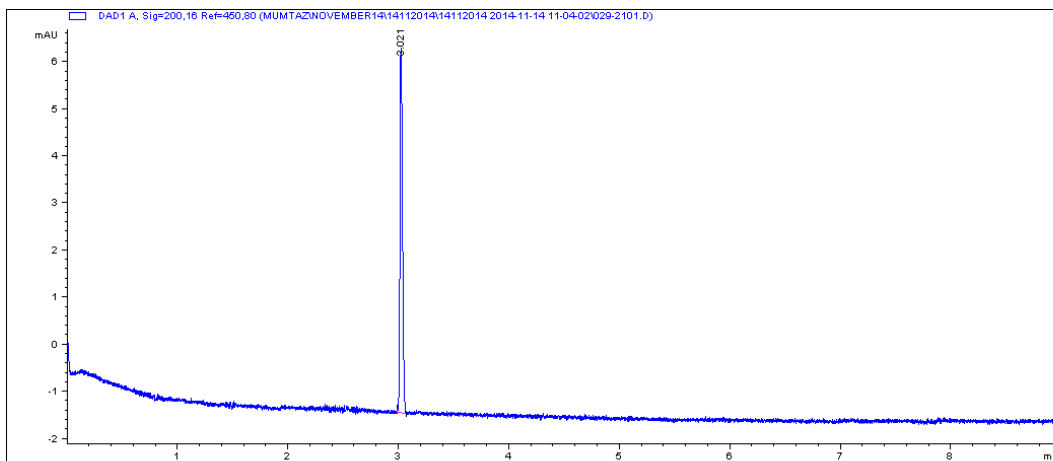
**Figur 4.2** Elektroferogrammet til hydralazin



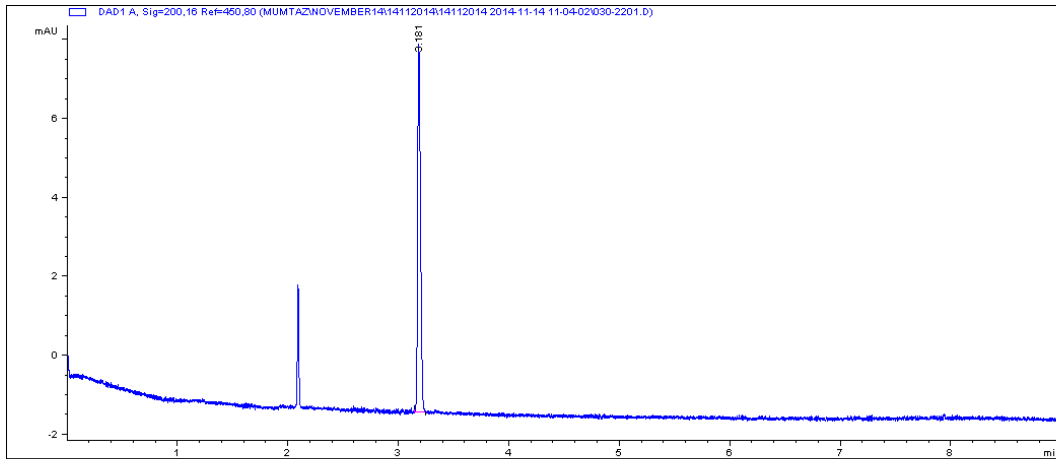
**Figur 4.3** Elektroferogrammet til fenylpropanolamin



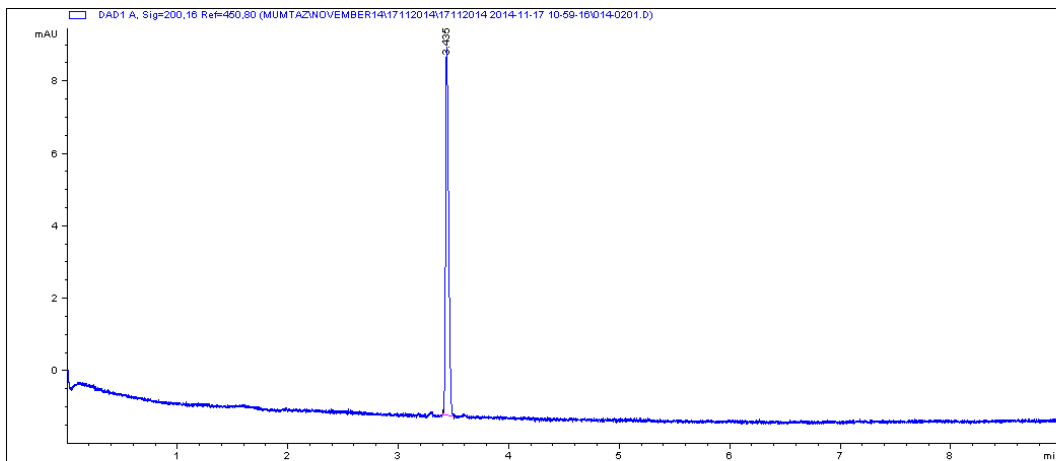
**Figur 4.4** Elektroferogrammet til efedrin



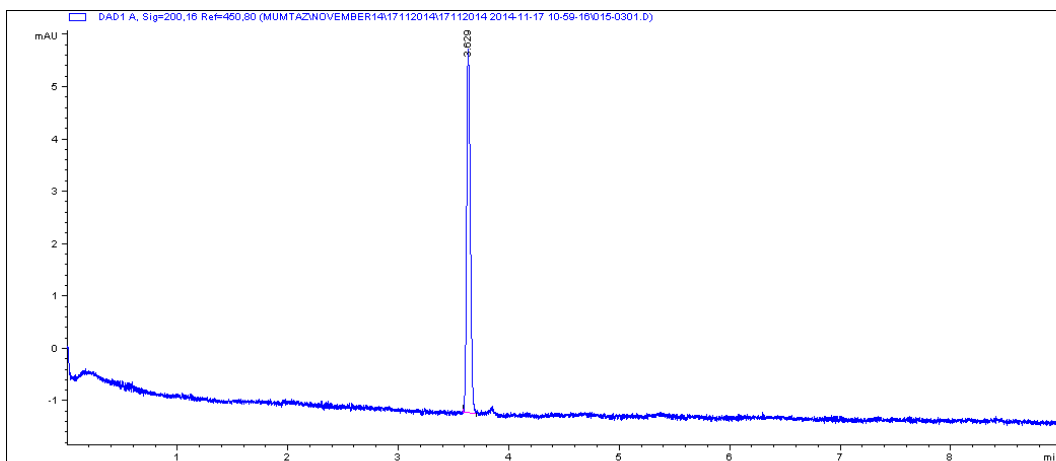
**Figur 4.5** Elektroferogrammet til metamfetaminol



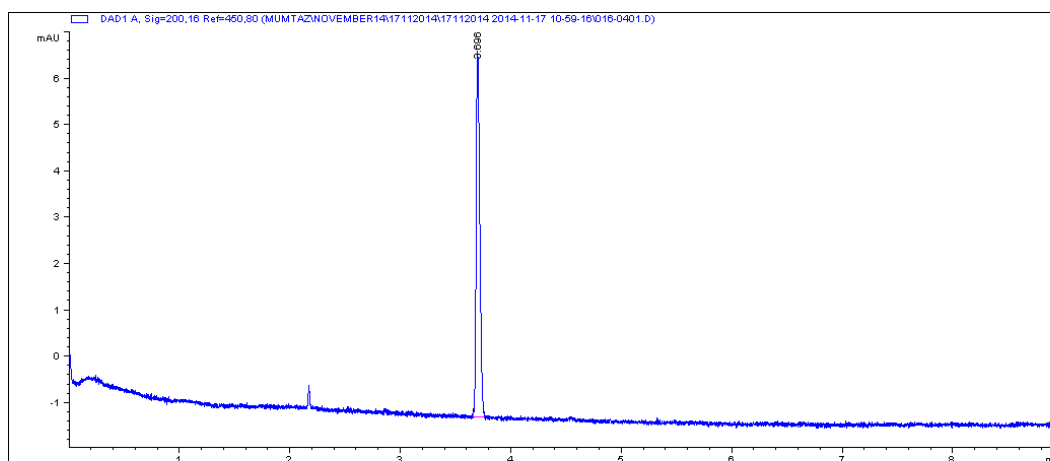
**Figur 4.6** Elektroferogrammet til cimetidin



**Figur 4.7** Elektroferogrammet til sotalol



**Figur 4.8** Elektroferogrammet til salbutamol



**Figur 4.9** Elektroferogrammet til praktolol

Elektroferogram i Figur 4.1 viser grunnlinjeseparasjon av alle analyttene. Rekkefølgen av analyttene viste at hydralazin migrerte raskest, deretter fenylpropanolamin, efedrin, metaraminol, cimetidin, sotalol, salbutamol og tilslutt praktolol. Rekkefølgen av analyttene ble bestemt når konsentrasjonen av analyttene i blandingen var på 10 µg/ml.

## 4.2. Ekstraksjoner fra vandige løsninger

### 4.2.1. Ekstraksjoner uten transportmolekyler

Innledningsvis ble det utført ekstraksjoner, hvor ulike ekstraksjonsparametere ble undersøkt for å finne hva som ga de høyeste ekstraksjonsutbyttene. Som nevnt tidligere i oppgaven, er PALME egnet for ekstraksjon av ioniske forbindelser med noe hydrofobe egenskaper. Dette er på grunn av begrenset penetrering av hydrofile forbindelser gjennom den organiske væskemembranen. Ekstraksjon av hydrofile forbindelser kan imidlertid gjøres mer selektivt og effektivt ved tilværelse av transportmolekyler med motsatt ladning som analyttene. Slik at det kan dannes et mer hydrofobt ionparkompleks. I denne delen av oppgaven ble alkoholer med ulike kjedelengder, ketoner, etere og dodecylacetat testet som organisk væskemembran i PALME av polare analytter. De forskjellige løsemidlene ble valgt på bakgrunn av tidligere [7,8,22]. Hensikten var å få mer kjennskap rundt innvirkning av organiske løsemidler og pH

på ekstraksjon av hydrofile analytter uten tilstedeværelse av transportmolekyler. Resultatet er oppsummert i Tabell 4.1.

**Tabell 4.1** Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte med ulike organiske løsemidler uten transportmolekyler.

Organisk Væskemembran	% Utbytte * (og % RSD )							
	Hydralazin	Fenylpropa- nolamin	Efedrin	Metaraminol	Cimetidin	Sotalol	Salbutamol	Praktolol
Dodecylacetat	6 (5)	11(11)	27(15)	ND	ND	ND	ND	ND
Diheksyleter	4 (59)	11 (69)	11 (45)	ND	2 (169)	ND	ND	ND
2-Heksyl dekanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-Oktanone	29 (7)	25 (10)	51 (8)	ND	10 (13)	ND	ND	16 (12)
n-Oktanone	3 (10)	3 (14)	7 (11)	ND	1 (15)	ND	ND	3 (12)
* n = 4								

*Donorfase: 250 µl vandig løsning    Organisk væskemembran: 2,5 µl    pH i prøven: 12*  
*Akseptorfase: 50 µl 10mM HCl    Ekstraksjonstid: 15 minutter    Risting: 900rpm*

Analyttenes kjemiske strukturer er vist i Figur 3.1, og deres kjemiske egenskaper som pKa-verdier og log P-verdier er vist i Tabell 3.1. Ut fra pKa-verdiene til analyttene kan det ses at disse er uioniserte ved pH 12 i donorfase, og dermed forventes noe ekstraksjon gjennom den organiske væskemembranen. Men på grunn av de hydrofile egenskapene til analyttene, er ekstraksjon gjennom væskemembranen begrenset. Egenskaper som vannløselighet og log P av de organiske løsemidlene som ble brukt i oppgaven er gitt i Tabell 4.2.

**Tabell 4.2** Vannløselighet, log P og molekylmasse til organiske løsemidler som ble brukt til å danne den organiske fasen i PALME [27,29].

Organiske løsemidler	Vannløselighet ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	log P	Molekylmasse
Dodecylacetat	20	4,80	228,37
n-Diheksyleter	110	4,55	186,33
2-Heksyl-1 dekanol	0,039	6,06	242,44
2-Oktanon	5290	2,59	128,12
n-Oktanol	1200	2,58	130,22
2-Nonanon	1100	3,03	142,24

Resultatene fra Tabell 4.1 viser at de fleste analyttene ble ikke ekstrahert gjennom membranen uansett organisk løsemiddel. Fenylpropanolamin er den minst polare av alle åtte analyttene med en log P på 1,32, og dette stoffet ble ekstrahert med et utbytte på 25 %. For den mer polare analytten efedrin med en log P på -0,29, var ekstraksjonsutbytte på 51 % med 2-oktanon som organisk løsemiddel. 2-Oktanon som vist i tabell 4.2 har høyere vannløselighet enn andre løsemidler som ble brukt. Grunnen til det høye ekstraksjonsutbytte kan være på grunn av intramolekulære interaksjoner mellom analyttene og 2-oktanon. Både fenylpropanolamin og efedrin inneholder alifatiske OH- og NH<sub>2</sub>-grupper, hvor begge har mulighet til å danne H-bindinger med O i 2-oktanon. Dette kan føre til ekstraksjon gjennom den organiske fasen uten tilstedeværelse av transportmolekyler. Ekstraksjon med 2-heksyl-1 dekanol som organisk løsemiddel ga ingen målbare utbytter av analyttene. Dette kan være både på grunn av molekylmassen og de hydrofobe egenskapene til løsemidlet.

## 4.3. Optimalisering av ekstraksjonsparametere

### 4.3.1. Donorfase

Som nevnt tidligere er transport av analyttene fra donorfase, over membranen og inn i akseptorfase avhengig av pH både i donor og akseptorfase. For å få mer kjennskap om innvirkning av ulike pH-verdier i donorfase på ekstraksjon av hydrofile analytter gjennom den kunstige væskemembranen, ble det utført ekstraksjoner med både pH 12 og pH 7 i donorfase. Til ekstraksjonene ble det brukt alkylerte fosfater og kombinasjon av de som



transportmolekyler i væskemembranen. Resultatene fra disse forsøkene er oppsummert i henholdsvis Tabellene 4.3 og 4.4. I første omgang ble ulike mono-, di-, og tri-alkylerte fosfater brukt som transportmolekyl med n-oktanol som organisk løsemiddel. pH i donorfasen var 12. Valget av n-oktanol som organisk løsemiddel var basert på tidligere studier [8].

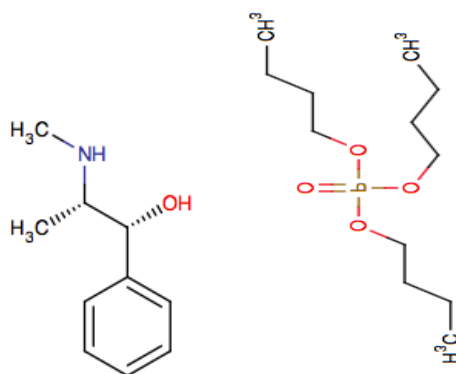
**Tabell 4.3** Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte med n-oktanol som organisk løsemiddel med ulike transportmolekyler.

Transportmolekyler	% Utbytte* (og % RSD)							
	Hydralazin	Fenylpropa-nolamin	Efedrin	Metaraminol	Cimetidin	Sotalol	Salbutamol	Praktolol
<b>Tributylfosfat</b>	32 (9)	39 (17)	98 (11)	12 (0)	26 (68)	ND	ND	22 (45)
<b>Tris(2-etylheksyl)fosfat</b>	17 (10)	31(91)	29(113)	ND	13 (72)	ND	ND	42 (48)
<b>Trietylfosfat</b>	15 (11)	16 (9)	31 (11)	ND	7 (47)	ND	ND	13 (14)
<b>Tridecylfosfat</b>	32 (18)	37 (27)	40 (32)	ND	21 (12)	ND	ND	37 (15)
<b>Trifenylfosfat</b>	16 (8)	20 (15)	40 (11)	ND	17 (11)	ND	ND	18 (8)
<b>Di(2-etylheksyl) fosfat</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Di(2-etylheksyl) fosfat + tris(2-etylheksyl) fosfat</b>	12 (7)	35 (11)	50 (12)	ND	11 (12)	ND	ND	23 (7)
<b>Di(2-etylheksyl) fosfat+ tributyl fosfat</b>	13 (5)	28 (35)	47 (35)	ND	11 (18)	ND	ND	23 (5)
<b>Bromethyl blue</b>	11 (7)	13 (25)	22 (13)	ND	6 (12)	ND	ND	9 (21)
* n = 4								

*Donorfase: 250 µl vandige løsninger    Organisk væskemembran: 2,5 µl    pH i prøven: 12*  
*Akseptorfase: 50 µl 10mM HCl    Ekstraksjonstid: 15 minutter    Risting: 900rpm*

Som Tabellen 4.3 viser er det ulikt for hver analytt hvilket transportmolekyl som øker ekstraksjonen gjennom membranen. Analytter som sotalol og salbutamol hadde ikke et målbart utbytte uansett transportmolekyl ved basisk pH i donorfasen. Fra Tabell 4.3 kan det også forstås at di (2-etylheksyl) fosfat eller DEHP alene var mindre egnet til ekstraksjon av analytter, men fikk målbart bedre utbytte ved kombinasjon med andre alkylerte fosfater. Efedrin ble derimot ekstrahert med en utbytte på 98 % med 15 % tributylfosfat (TBP) i n-oktanol. Dette kan ikke være på grunn av ionisk interaksjon mellom efedrin og TBP, siden TBP er et tri-alkylert fosfat uten mulighet for ionisk interaksjon. Men det kan være på grunn

av H-interaksjoner mellom OH- og NH- på efedrin og ledige elektronpar på oksygenatomet i TBP. Alifatiske -OH og -NH i efedrin påvirkes lite av den basiske donorfase, og dermed kan H-binding mellom de to føre til at det dannes et kompleks som er tilstrekkelig hydrofobt til å vandre inn i porene i den organiske fasen.



**Figur 4.10** Struktur av efedrin og TBP [26].

Det ble utført flere ekstraksjoner ved pH 12 i donorfase. Resultatet er vist i appendiks. Ved å sammenlikne Tabell 4.1 med n-oktanol som organisk løsemiddel med Tabell 4.3, kan det ses at tilstedeværelse av transportmolekyler forbedrer ekstraksjonen av de fleste analytter, men det alene er ikke nok for å øke utbyttene. I neste trinn ble derfor pH i donorfase endret fra 12 til 7. De tre mest effektive transportmolekylene fra Tabell 4.3 ble prøvd ut videre i forsøket og resultatene er illustrert i Tabell 4.4.

**Tabell 4.4** Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte med n-oktanol som organisk løsemiddel med tre utvalgte transportmolekyler.

Organisk væskemembran	% utbytte* (og % RSD )							
	Hydralazin	Fenylpropanolamin	Efedrin	Metaraminol	Cimetidin	Sotalol	Salbutamol	Praktolol
Tridecyl fosfat	15 (15)	7 (15)	7 (17)	12 (17)	15 (9)	13(11)	13 (17)	15 (13)
Di(2-etylheksyl) fosfat + tris(2-etylheksyl)fosfat	26 (35)	ND	ND	ND	31 (23)	31(23)	26 (22)	35 (18)
Di(2-etylheksyl) fosfat+ tributyl fosfat	7 (23)	ND	ND	3 (54)	6 (13)	5 (10)	4 (7)	5 (15)
* n = 4								

Donorfase: 250  $\mu$ l vandige løsninger      Organisk væskemembran: 2,5  $\mu$ l      pH i prøven: 7  
 Akseptorfase: 50  $\mu$ l 10mM HCl      Ekstraksjonstid: 15 minutter      Risting: 900rpm

Teoretisk sett forventes ionparkompleks dannelse ved pH 7, fordi det da er mulighet for optimal ionpar interaksjon mellom basiske analytter og ioniske fosfater. Når alkylerte fosfater kompleksbinder de ioniserte analyttene, dannes det ionepar som kan lett diffunderer gjennom den kunstige væskemembranen. Men resultatene fra Tabell 4.4 viser relativt små forandringer i utbytte ved pH endring fra 12 til 7. For enkelte analytter som hydralazin ble det observert en nedgang i utbytte fra 13 % til 7 % ved bruk av DEHP+TBP ( Di(2-etylheksyl) fosfat + tributyl fosfat ). Ved pH 7 vil 80,7 % av hydralazin være uladet [27], dette betyr at kun 19,3 % er tilgjengelig for ionpar interaksjon med transportmolekyler. I og med at det er likevekt mellom ladet og uladet form av hydralazin i prøveløsningen, kan utbytte økes med økende ekstraksjonstid. Fenylpropanolamin og efedrin ble derimot ikke ekstrahert. Den samme trenden ble også sett ved bruk av tridecylfosfat. Det kunne dermed forstås som pH justering i donorfase kanskje ikke alene fører til økt ekstraksjonsutbytte. Av den grunn ble fokuset rettet mot bruk av høyere konsentrasjoner av HCl i akseptorfase. Resultater fra forsøket er presentert i Tabell 4.5.

### 4.3.2. pH i akseptorfase

Fra tilsvarende LPME studier er det kjent at akseptorfases sammensetning har større innvirkning på ekstraksjonsutbytte av hydrofile analytter gjennom den kunstige væskemembranen [22], noe som også ble observert i denne oppgaven. Tabell 4.5 viser resultater fra forsøket utført med 50 mM HCl i akseptorfase, donorfasen ble ekstrahert med en pH 7, ekstraksjonen ble utført i 30 minutter med en ekstraksjonshastighet på 900 rpm.

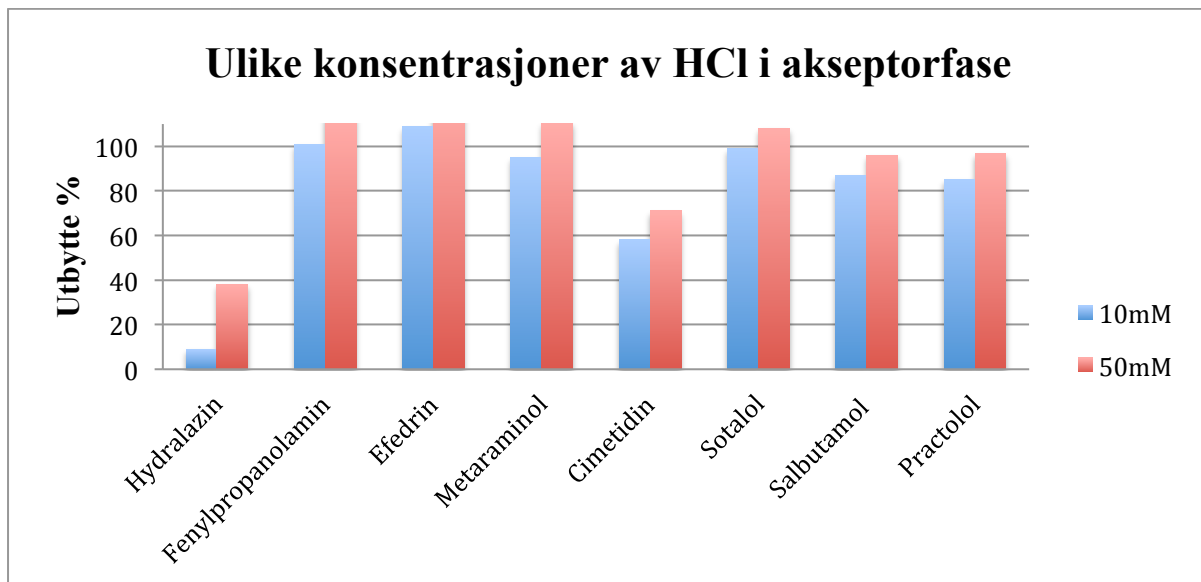
**Tabell 4.5** Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte med n-oktanol som organisk løsemiddel med tre utvalgte transportmolekyler.

Organisk Væskemembran	% utbytte*(og % RSD )							
	Hydralazin	Fenylpropa- nolamin	Efedrin	Metaraminol	Cimetidin	Sotalol	Salbutamol	Praktolol
Di (2-etylheksyl) fosfat	80 (3)	78 (8)	78 (9)	76 (8)	69 (4)	57 (2)	58 (4)	62 (4)
Di (2-etylheksyl) fosfat + Tris(2-etylheksyl)fosfat	67 (5)	85 (4)	84 (3)	79 (4)	58 (4)	55 (3)	58 (3)	63 (5)
Di (2-etylheksyl) fosfat + Tributyl fosfat	66 (9)	79 (10)	94 (7)	74 (11)	60 (7)	58(12)	55 (14)	59 (59)
* n = 4								

*Donorfase: 250 µl vandige løsninger      Organisk væskemembran: 2,5 µl      pH i prøven: 7*  
*Akseptorfase: 50 µl 50mM HCl      Ekstraksjonstid: 30 minutter      Risting: 900rpm*

Ettersom konsentrasjonen av HCl i akseptorfase økte, ble diffusjonen av analyttene over membranen, og inn i akseptorfase forbedret. Resultatene viste en signifikant forskjell i ekstraksjonsutbytte sammenliknet med resultatene i Tabellene 4.3 og 4.4. Di-alkylerte fosfater som DEHP med 50 mM HCl i akseptorfase viste lovende resultater for ekstraksjon av hydrofile substanser og samtidig ble RSD-verdiene for analyttene mindre enn 10 %. Utbytte av de mest polare analyttene som hydralazin økte fra 7 % (Tab.4.3) til 66 % ved bruk av DEHP + TBP i n-oktanol. Det var ønsket å observere ekstraksjonseffektivitet og eventuelle

variasjoner i ekstraksjonsutbytte ved endringer av sammensetningen i akseptorfase. Det ble av den grunn utført ekstraksjoner med 10 og 50mM HCl i akseptorfase, deretter ble utbytte fra ekstraksjonene sammenliknet. Resultatet av forsøket er illustrert i Figur 4.11. Valget av HCl som akseptorfase var på grunn av tidligere studier og erfaring [8], og ikke minst kompatibiliteten av HCl med CE.



**Figur 4.11** Utbytter med 10 og 50mM HCl i akseptorfase.

Forsøket viste at en sterk sur pH i akseptorfase var nødvendig for et godt resultat. Årsaken til dette er som nevnt tidligere i oppgaven, på grunn av protoner i akseptorfase. Protoner i akseptorfase fungerer som motioner, de nøytraliserer transportmolekylene slik at de frigjør analyttene i kontaktflaten mellom den organiske fasen og akseptorfase og blir igjen tilgjengelig til å danne et nytt ionparkompleks. I tillegg hindrer en høy adgang til protoner i akseptorfase tilbakeekstraksjon av analyttene, noe som har stor innvirkning på ekstraksjonsutbyttet [7]. Derfor ble en 50 mM HCl-løsning brukt som akseptorfase i resten av oppgaven. Resultatene i Figur 4.11 viser at en høy konsentrasjon av HCl har spesielt innvirkning på ekstraksjon av enkelte analytter som for eksempel hydralazin. Utbytte av hydralazin nesten tredobles ved å endre konsentrasjonen av HCl fra 10mM til 50mM. Dette kan være fordi hydralazin har stor affinitet til den organiske fasen slik at dissosiasjon fra komplekset og inn i akseptorfase er krevende, dermed trengs det høyere konsentrasjon av protoner i akseptorfase for både dissosiasjon av hydralazin fra transportmolekyler og for å hindre tilbakeekstraksjon av hydralazin.

Det ble også analysert standarder med 10, 20, 25, 30, 35, 40 og 50 mM HCl for å undersøke hvilke effekt konsentrasjon av HCl hadde på separasjonsselektiviten av analyttene i CE. Standarder med konsentrasjoner høyere enn 25mM HCl, ga toppen som ikke var fullstendig separert fra hverandre, toppene av analyttene overlappet i elektroferogrammet og det var dermed vanskelig å identifisere analyttene. Dette kan være på grunn av stacking [26]. Når ionestyrken i ekstraktet som injiseres er høyere enn ionestyrken i buffere i kapillæret, ble toppene ikke fullstendig separert. Av den grunn ble 25mM HCl valgt som en gunstig konsentrasjon for separasjonen. Derfor ble det ved bruk av 50mM HCl som akseptorfase, tatt ut 30 µl av ekstraktet som ble fortynnet med 30 µl destillert vann før analyse med CE.

### 4.3.3. Sammensetning av organiskfase

Valg av kunstig væskemembran spiller en vesentlig rolle for ekstraksjon av hydrofile forbindelser. Det organiske løsemidlet som utgjør væskemembranen må som nevnt i kapittel 1 ikke være vannløselig, ikke flyktig og bør ha et visst dipol-moment. Tidligere studier har vist at n-oktanol fungerer godt som organiskfase i trefase LPME hvor ulike alkylerte fosfater ble brukt som transportmolekyl [8].

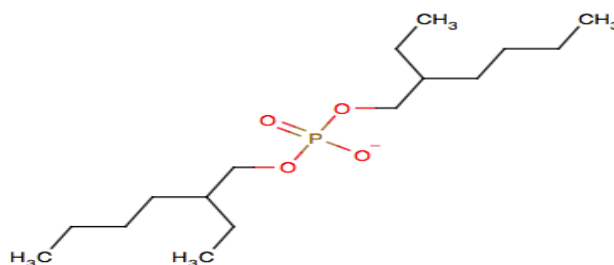
I arbeidet med denne oppgaven, var det imidlertid usikkert om n-oktanol kunne være like effektiv i PALME som i LPME, både ved ekstraksjon fra vandige løsninger og fra plasma. Samtidig var fokuset også å finne et transportmolekyl med høy selektivitet og som også ga høye ekstraksjonsutbytter. Dermed ble 10 ulike organiske løsemidler og fire ioniske løsemidler testet som potensielle væskemembraner for PALME av basiske og polare analytter. Valg av organiske løsemidler var delvis basert på tidligere LPME erfaring [8], men et utvalg fra ulike løsemiddelgrupper med velegnede egenskaper som væskemembran ble også tatt i betraktning. Tabellene 3.5 og 3.6 i kapittel 3 viser lister over henholdsvis organiske og ioniske løsemidler som ble brukt i denne oppgaven.

Bruk av ioniske væsker for å danne den kunstige væskemembranen ble studert for første gang i PALME. Ioniske væsker har unike egenskaper og mange fordeler fremfor organiske løsemidler, blant annet at de er miljøvennlige, termisk stabile og ikke minst kan de gi mulighet for ekstraksjon av hydrofile forbindelser gjennom væskemembran uten tilstedeværelse av transportmolekyler. Dette er på grunn av den permanente ladningen som de bærer [22]. Ekstraksjon ved bruk av ioniske væsker utført med en ristehastighet på 900 rpm og med en

sluttkonsentrasjon på 1 µg/ml for analyttene i prøven. Ekstraksjonstiden i dette tilfellet ble utvidet til 45 minutter for å få analyttene til å komme gjennom den viskøse membranen. Væskemembranen ble dannet på samme måte som ved ekstraksjon fra vandige løsninger og plasma. Til akseptorfase ble det brukt 50 mM HCl. Etter endt ekstraksjon ble 30 µl av ekstraktet fortynnet med 30 µl destillert vann direkte i vialene før analysen.

Resultatene viste at ingen av analyttene lot seg ekstrahere ved bruk av ioniske væsker. PALME i likhet med LPME er et trefase system og analyttene kan kun befinne seg i donor eller organiskfase når de ikke detekteres i akseptorfase. For å kartlegge hvor analyttene befant seg, ble donorfasen etter ekstraksjonen analysert både ved pH 7 og 12. Ingen topp ble observert. Dette viste at analyttene i stor grad ble ekstrahert ut fra donorfasen og inn i væskemembranen. Videre ekstraksjon fra den organiske fasen til akseptorfase viste seg å være vanskelig. Årsaken til dette var imidlertid ukjent. En forklaring kan være at ioniske væsker er altfor viskøse. Som nevnt tidligere i oppgaven, er sammensetning av den organiske membranen viktig for diffusjon av analyttene gjennom membranen. Løsemidler som brukes for å danne kunstig væskemembran må ha lav viskositet, da lav viskositet gir stor diffusjonskoeffisient, og dermed høy diffusjon gjennom membranen [7].

Som transportmolekyl ble både mono alkylert fosfat (tridecyl fosfat), di alkylerte (DEHP) og tri alkylerte fosfater (tributyl fosfat, tris (2etylheksyl)fosfat, trietylfosfat og trifenylfosfat) og kombinasjon av di alkylerte med tri alkylerte fosfater prøvd ut. Resultatene fra Tabell 4.4 viser at tri-alkylerte fosfater er mindre egnet for ekstraksjon av polare analytter. Dette er sannsynligvis på grunn av manglende evne til å danne ionparbinding med kationiske analytter. Det at ekstraksjon av enkelte analytter likevel skjer med tri alkylerte fosfater er muligens en annen form for intramolekylære interaksjoner. I et forsøk ble effekt av DEHP i ulike organiske løsemidler studert, deretter ble ekstraksjonsutbytte sammenliknet. Kjemisk struktur av DEHP er vist i Figur 4.11 og ekstraksjonsutbyttene med tilhørende relative standardavvik er illustrert i tabell 4.6.



**Figur 4.12** Struktur av DEHP [27]

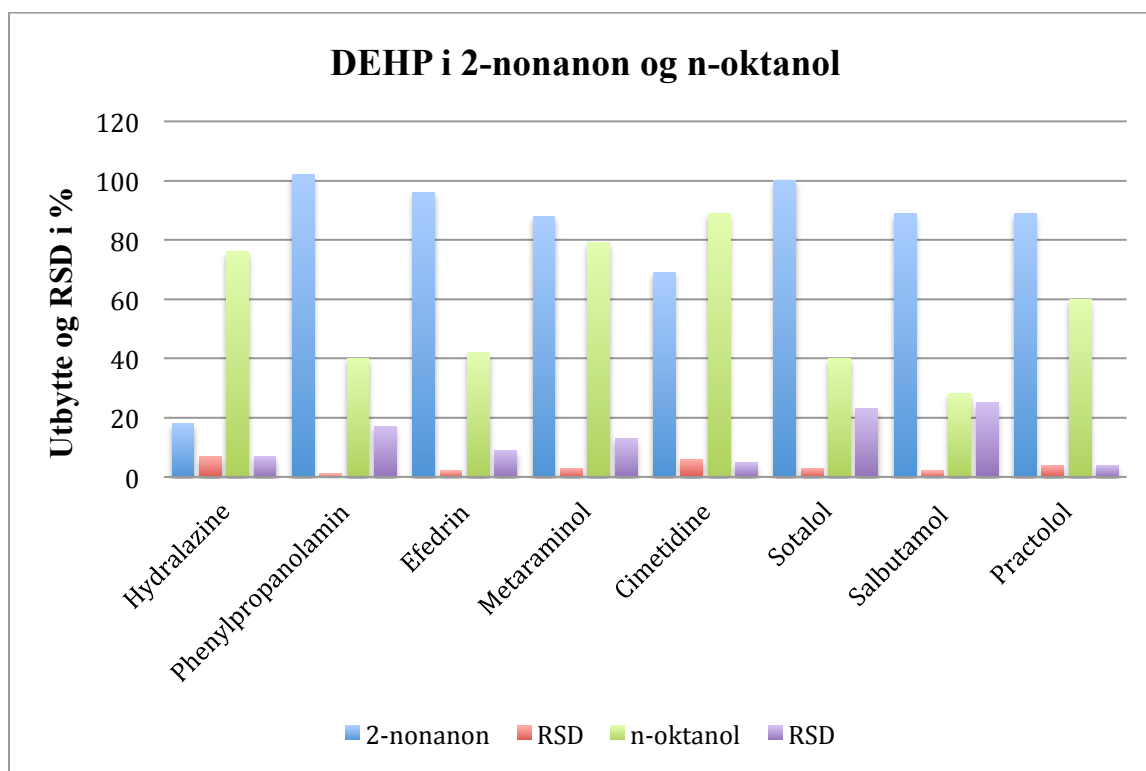
**Tabell 4.6** Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytter med DEHP i ulike organiske løsemidler.

Organisk væskemembran	% utbytte*(og % RSD )							
	Hydralazin	Fenylpropa- nolamin	Efedrin	Metaraminol	Cimetidin	Sotalol	Salbutamol	Praktolol
<b>Dodecylacetat</b>	16 (5)	67 (2)	94 (1)	20 (4)	7 (8)	22 (3)	9 (7)	9 (1)
<b>Diheksyleter</b>	16 (8)	57 (8)	86 (9)	12 (27)	9 (36)	7 (23)	9 (46)	10 (60)
<b>2-Heksyl dekanol</b>	12 (8)	74 (9)	80 (8)	40 (3)	16 (17)	18 (9)	12 (9)	18 (5)
<b>2-Nonanon</b>	18 (7)	102 (1)	96 (2)	88 (3)	69 (6)	100 (3)	89 (2)	89 (4)
<b>Heksadekan</b>	6 (6)	12 (3)	18 (2)	ND	ND	ND	ND	ND
<b>n-Oktanol</b>	76 (7)	40 (17)	42 (9)	79 (13)	89 (5)	40 (23)	28 (25)	60 (4)
* n = 4								

*Donorfase: 250 µl vandig løsning    Organisk væskemembran: 2,5 µl    pH i prøven: 7*  
*Akseptorfase: 50 µl 50mM HCl    Ekstraksjonstid: 30 minutter    Risting: 900rpm*

Som vist i Tabell 4.6 ga de ulike væskemembranene svært forskjellige resultater. Av alle væskemembranene som ble testet, var 15% DEHP i 2-nonanone og n-oktanol ga høyest utbytter og lavest RSD-verdier. Begge væskemembranene ekstraherte alle åtte analytter med et utbytte mellom 18 og 100 %. Heksadekan som var det mest hydrofobe organiske løsemiddel med en log P på 7,58, ekstraherte kun tre av åtte analytter. Dette kan være på grunn av manglende dipolmoment. For å få et bedre oversikt over resultatene fra forsøket ble utbytter fra n-oktanol og 2-nonanon påført i en egen graf vist i Figur 4.13.



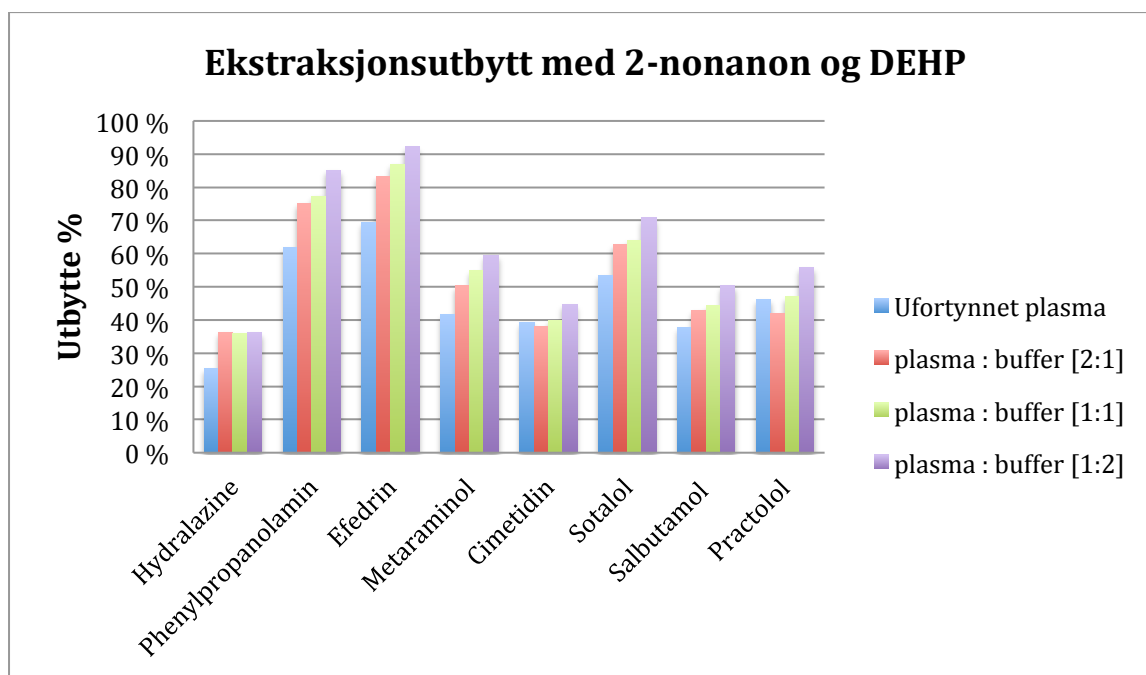


**Figur 4.13** Ekstraksjonsutbytter og RSD med DEHP i 2-nonanone og n-oktanol.

Med transportmolekyl DEHP ble for eksempel efedrin ekstrahert med et utbytte på 96 % og 42 % med henholdsvis 2-nonanon og n-oktanol. Resultatene viser både en markant økning i utbytte ved bruk av DEHP i 2-nonanon, og betydelig redusert RSD-verdier for alle analyttene. Dette kan være fordi n-oktanol er mer polart enn 2-nonanone (se Tabell 4.2). Som nevnt tidligere må organiske løsemidler som velges for å danne væskemembran ha lav vannløselighet [10]. I og med at vannløseligheten av 2-nonanone og n-oktanol ikke skiller seg vesentlig fra hverandre, kan det lave ekstraksjonsutbytte med n-oktanol være på grunn av at noe av n-oktanol løses i donorfase, og dermed membranen mistes i noen grad. På bakgrunn av resultatene fra ekstraksjonsforsøkene med DEHP i 2-nonanone og n-oktanol, ble det valgt å gå videre med 15 % DEHP i 2-nonanon som organiskfase. I de senere forsøkene spesielt ved bruk av plasma, ble denne organiske fasen foretrukket.

## 4.4. Ekstraksjoner fra plasma

For å undersøke om metoden var kompatibel med biologiske prøver ble plasma testet som prøveløsninger. Ulike fortynninger av plasma og buffer ble testet ut med hensyn på ekstraksjonsutbytte, høy separasjonseffektivitet i CE og antall signaler for matrikskomponenter i elektroferogrammene. Til ekstraksjonene ble det brukt 250 µl prøveløsning med en konsentrasjon på 1 µg/ml som donorfase med pH 7, 2,5 µl 15 % DEHP i 2-nonanon som organisk væskemembran, og 50 µl 50 mM HCl som akseptorløsning. Etter endt ekstraksjon i likhet med vandige løsninger, ble 30 µl av ekstraktet fortynnet med 30 µl destillert vann før det ble analysert. Figur 4.14 viser ekstraksjonsutbytte av analytter i uforynnet plasma og ulike fortynninger av plasma og buffer. Resultatet viste seg at 1:2 forholdet mellom henholdsvis plasma og buffer ga bedre separasjon av alle åtte analytter i CE og høyest ekstraksjonsutbytte. Derfor ble denne kombinasjonen brukt videre i arbeidet.



**Figur 4.14** Ekstraksjonsutbytte fra plasma med DEHP i 2-nonanon som organisk væskemembran.

Ekstraksjoner fra uforynnet plasma så ut til å være mer problematiske enn ekstraksjoner fra fortynnet plasma. Likevel kunne man detektere alle analytter fra uforynnet plasma men ekstraksjonsutbyttene var mye lavere enn fra fortynnet plasma. Årsaken til denne kan være blant annet protein binding mellom analyttene og proteinene i plasma. Plasma består av 92 %

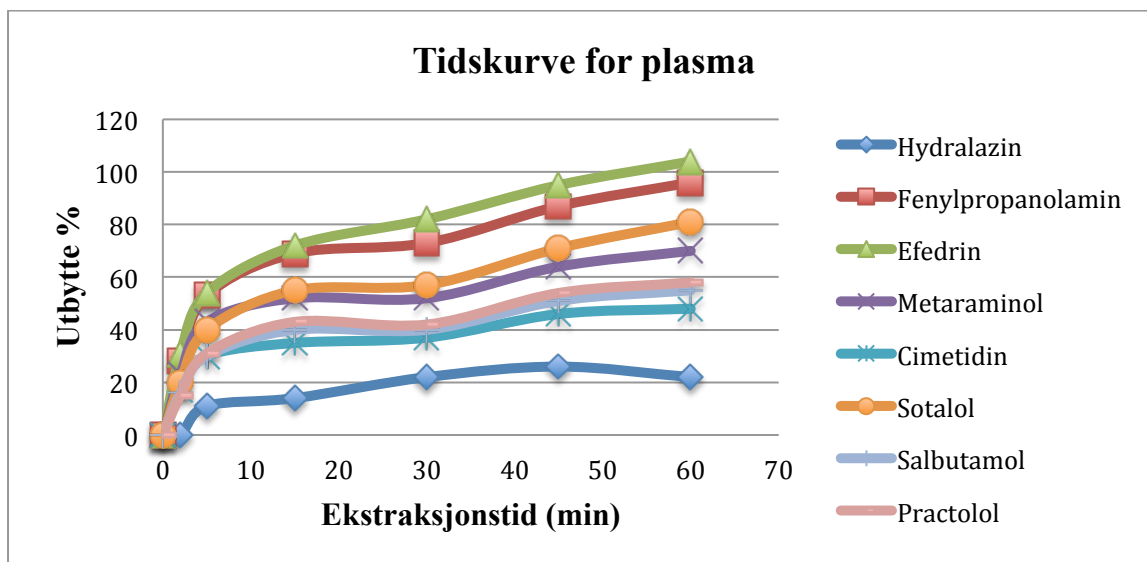
vann, 7 % proteiner og 1 % oppløste gasser, elektrolytter, næringsstoffer og avfallsstoffer [30]. Proteinene i plasma kan binde til seg analytter, dermed reduseres den frie fraksjonen av analyttene som kan danne ionparkompleks med transportmolekyler i PALME. Dessuten er plasma mer viskøs enn vann, og dermed kan transport av analyttene fra donorfase til den væskemembranen påvirkes av den høye viskositeten.

Som nevnt tidligere er det viktig med lav viskositet, da lav viskositet gir høy diffusjon gjennom membranen [7]. Jo mer fortynnet plasma er, desto høyere ble ekstraksjonsutbytte unntatt for hydralazin. Dette kan igjen være på grunn av at jo mer fortynnes plasma, desto mer blir analyttene tilgjengelig for ionpar interaksjoner med transportmolekyler.

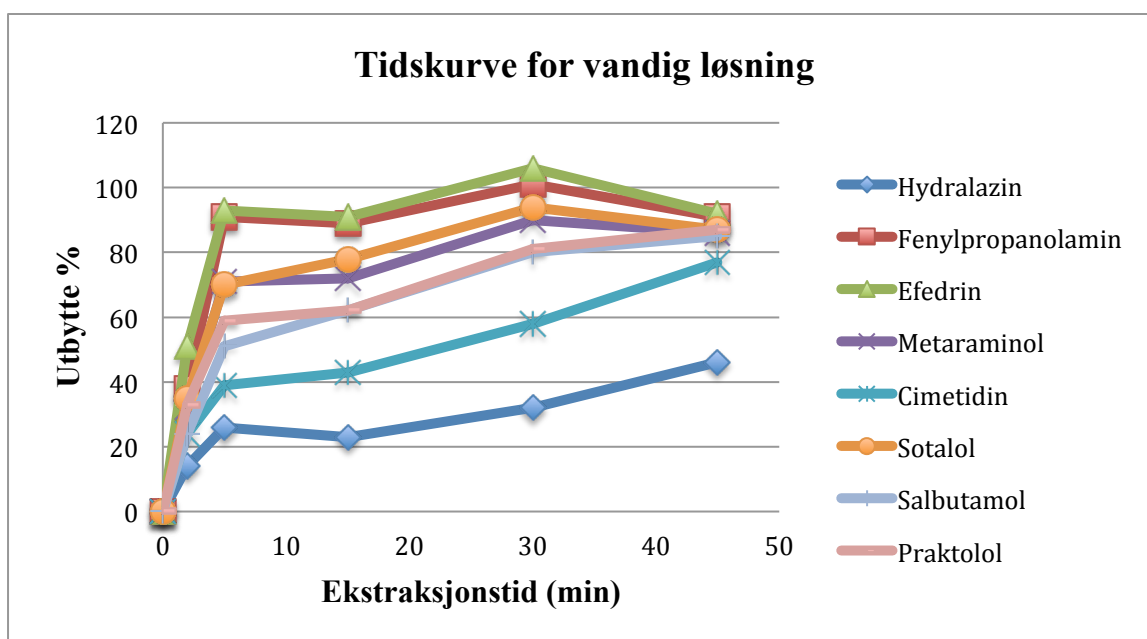
Det at enkelte analytter som hydralazin hadde mye lavere ekstraksjonsutbytte sammenliknet med andre, kan være at 87 % av hydralazin i plasma er bundet til proteinene [26], noe som kan være årsaken til det lave utbytte fra plasma (25 %) i forhold til vandig løsning (36 %).

## 4.5. Ekstraksjonstid

Det ble utført en rekke sammenlignende ekstraksjoner fra plasma (Figur 4.15) og vandige løsninger (Figur 4.16) med ulike tidsintervaller. Dette ble utført for å undersøke hvilken betydning ekstraksjonstiden har på ekstraksjonsutbytte både fra vandige løsninger og plasmaprøver. Ekstraksjonstiden som ble undersøkt var 2, 5, 15, 30, 45 og 60 minutter. Det ble utført fire paralleller av hver ekstraksjonstid. Til ekstraksjonene ble det brukt 250 µl prøveløsning med en konsentrasjon på 1 µg/ml med pH 7, 2,5 µl 15 % DEHP i 2-nonanon som organisk væskemembran, og 50 µl 50 mM HCl som akseptorløsning. Prøvene ble ekstrahert med ulike ekstraksjonstider med en hastighet på 900 rpm. Etter endt ekstraksjon ble 30 µl av ekstraktet fortynnet med 30 µl destillert vann før de ble analysert i CE



Figur 4.15 Parallel artificial liquid membrane extraction utbytte versus ekstraksjonstid



Figur 4.16 Parallel artificial liquid membrane extraction utbytte versus ekstraksjonstid

Figurene 4.15 og 4.16 viser ekstraksjonsutbytter fra henholdsvis plasma og vandige løsninger. Av figurene kan det ses at utbytte for alle analyttene øker med tiden. Ekstraksjon utføres ofte til likevekt, da er utbytte uavhengig av ekstraksjonstid og kurven flater ut. Resultatet fra vandige løsninger viste at de fleste analyttene nådde likevekt etter omtrent 30 minutter. I motsetning til plasmaprøver, gikk ekstraksjonsutbyttene for de fleste analyttene nedover etter 30 minutter ekstraksjon. Likevekten ble oppnådd ved ulike tidsintervaller i vandige prøver og plasma, men for de fleste analyttene er det u hensiktsmessig med ekstraksjoner lengre enn 30

minutter. Dermed ble 30 minutter ekstraksjonstid valgt for det videre arbeidet. Årsaken til at ulike analytter når maksimal utbytte ved ulike tidsintervaller kan være at forbindelsene har ulike permeabilitet og hastighet gjennom membranen avhengig av deres kjemiske egenskaper. Ulik permeabilitet kan også være på grunn av forskjellig affinitet av analyttene til transportmolekyler og fordelingen av ionparkomplekset inn i den organiske væskemembranen. Men det som er felles for alle analyttene unntatt hydralazin fra plasmaer at de diffunderer gjennom den kunstige væskemembranen allerede etter to minutter ekstraksjonstid. Erfaringer har vist at hydralazin har generelt lavere affinitet til nesten alle væskemembraner enn de andre modellanalyttene og bruker også lengre ekstraksjonstid å oppnå maksimalt utbytte.

Ved å sammenlikne tidskurven for plasma (Figur 4.15) med tidskurven for vandig løsning (Figur 4.16) kan det oppdages at ekstraksjonsutbytter etter for eksempel 30 minutters ekstraksjon er noe lavere for plasma enn for vandig løsning. Dette kan være som nevnt tidligere den høye viskositeten i plasma som påvirker transporten av analyttene til væskemembranen. En annen grunn til lavere ekstraksjonsutbytter fra plasma kan være som følge av proteinbinding. Dette gjør at likevekten for ekstraksjonsutbyttene oppnås noe senere for de fleste analyttene. Det at utbyttet for enkelte legemidler som hydralazin fra plasma, efedrin, fenylpropanolamin, sotalol og metaraminol fra vandig løsning begynte å synke etter lang ekstraksjonstid, kan være på grunn av metningsproblemer i akseptorfasen. Normalt vil transportmolekyler frigi legemidlet på kontaktflaten mellom den organiske fasen og akseptorfasen via utbytting av legemidlet med protoner i akseptorløsningen [22]. Ionparmediert transport kan dermed føre til et kontinuerlig tap av protoner i akseptorfasen. Protoner i akseptorfasen er som nevnt tidligere drivkraften for ekstraksjonen. En høy konsentrasjon av protoner er viktig både for å vedlikeholde høyt ekstraksjonsutbytte og for å hindre tilbakeekstraksjon av analyttene [7]. Etter hvert som ekstraksjonstiden øker vil en viss grad av tilbakeekstraksjon skje for alle forbindelser.

## 4.6. Evaluering av metoden

Evaluering av metoden ble utført i plasma fortynnet med buffer med 1:2 forhold. Den organiske væskemembranen ble dannet av DEHP i 2-nonanon. Ekstraksjon ble utført med en ristehastighet på 900 rpm og en ekstraksjonsvarighet på 30 minutter. 50 mM HCl ble brukt som akseptorfase, og etter endt ekstraksjon ble 30 µl av ekstraktet fortynnet med 30 µl destillert vann direkte i vialene før analysen. Det må understrekkes at dette ikke var en fullstendig validering av metoden.

### 4.6.1. Presisjon

Presisjon er et mål på reproduserbarhet, uttrykt som relativt standardavvik (RSD) [31], og er spesielt viktig når prøveopparbeidelse er involvert [31]. Presisjon ble undersøkt for tre konsentrasjonsnivåer 1, 10 og 25 µg/ml i plasmaprøver med tre paralleller av hver konsentrasjonsnivåer. Tabell 4.6 viser ekstraksjonsutbytter med tilhørende relative standardavvik for tre konsentrasjonsnivåer. Presisjon angis som prosent RSD og resultatene fra Tabell 4.6 viser at RSD for analyttene lå i området 3-17 % og utbytte var mellom 18-92 %. Ifølge EMAs krav til presisjon bør RSD ikke overstige 15 % [28]. Metodens presisjon er dermed innenfor kravet unntatt for hydralazin.

**Tabell 4.7** Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte og RSD i % for tre konsentrasjonsnivåer med DEHP i 2-nonanon som organisk væskemembran \*.

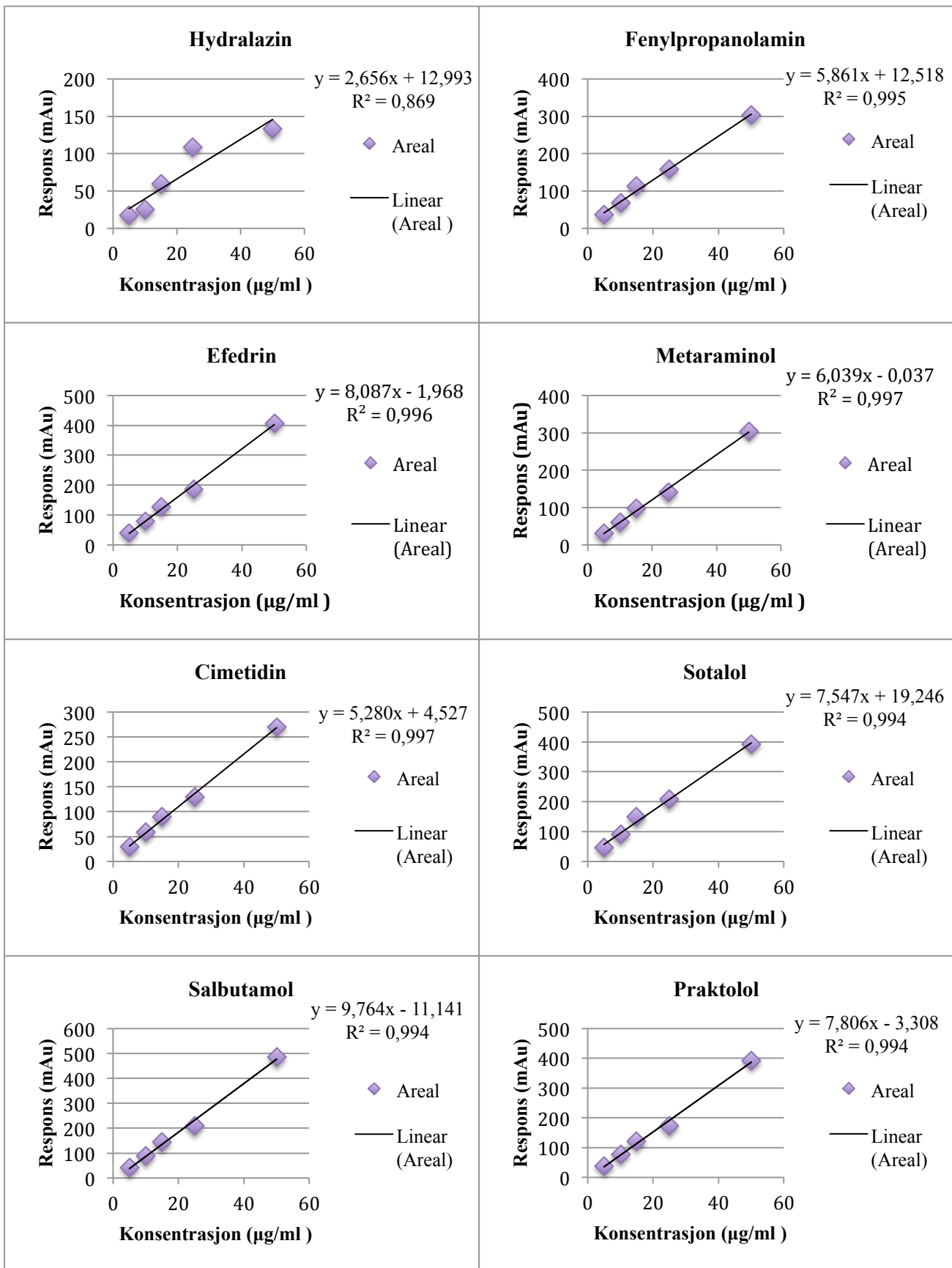
	Lav		Mellom		Høy	
	1µg/ml	RSD	10µg/ml	RSD	25µg/ml	RSD
Hydralazin	36	9	18	10	28	17
Fenylpropanolamin	85	3	67	5	63	2
Efedrin	92	4	75	5	71	4
Metaraminol	60	9	55	4	53	3
Cimetidin	45	15	39	4	35	5
Sotalol	71	11	55	3	52	2
Salbutamol	50	13	47	4	44	3
Praktolol	56	13	46	4	41	2

\* n = 3

*Donorfase: 250 µl plasma løsning    Organisk væskemembran: 2,5 µl    pH i prøven: 7*  
*Akseptorfase: 50 µl 50mM HCl    Ekstraksjonstid: 30 minutter    Risting: 900rpm*

#### 4.6.2. Standardkurver og linearitet

Alle analyttene ble testet for linearitet i konsentrasjonsområdet mellom 1- 25 µg/ml. Konsentrasjonene 1, 10 og 25 µg/ml hadde tre paralleller, mens konsentrasjonsnivåene 5 og 15 µg/ml hadde seks paralleller. Linearitet kan dokumenteres ved lineære regresjon med regresjonslinje  $y = ax + b$ , hvor y er responsen, x er konsentrasjon, b er kurvens skjæringspunkt med y-aksen og  $R^2$  er regresjonskoeffisienten som bør helst ha en verdi på  $>0,99$ . Figur 4.17 viser standardkurver for alle analyttene.



Figur 4.17 Standardkurver med konsentrasjonsområder 1- 25 µg/ml.



Resultatene fra Figur 4.17 viser at metoden er linear for syv av analyttene innenfor konsentrasjonsområdet 1 - 25 µg/ml. Regresjonskoeffisientene for alle analyttene er tilfredsstillende ( $R^2 \geq 0,99$ ) unntatt fra hydralazin som har 0,86.

### 4.6.3. Deteksjons (LOD)- og kvantifiseringsgrense (LOQ)

Deteksjonsgrense LOD defineres som den laveste konsentrasjon av analytt som med sikkerhet kan detekteres i prøven. LOD og LOQ ble bestemt ut fra et signal - støy forholdet (S/N), ved den laveste konsentrasjonen som var på 1 µg/ml i kalibreringskurven. For LOD skulle signalet til analyttene være mer enn tre ganger så høyt som støyen, mens for LOQ skulle signalet til analyttene være ti ganger så høyt som signalet til støyen. Tabell 4.9 oppsummerer resultatet for deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense.

**Tabell 4.8** Deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ)

Analytter	LOD	LOQ
Hydralazin	1 µg/ml	3,3 µg/ml
Fenylpropanolamin	0,5 µg/ml	1,65 µg/ml
Efedrin	0,5 µg/ml	1,65 µg/ml
Metaraminol	1 µg/ml	3,3 µg/ml
Cimetidin	1 µg/ml	3,3 µg/ml
Sotalol	0,5 µg/ml	1,65 µg/ml
Salbutamol	0,5 µg/ml	1,65 µg/ml
Praktolol	1 µg/ml	3,3 µg/ml

*Donorfase: 250 µl plasma løsning    Organisk væskemembran: 2,5 µl    pH i prøven: 7*  
*Akseptorfase: 50 µl 50mM HCl    Ekstraksjonstid: 30 minutter    Risting: 900rpm*

LOD var i området 0,5-1 µg/ml mens LOQ var i området 1,65-3,3 µg/ml for samtlige stoffer. I kombinasjon med LC-MS, kan det detekteres lavere LOD og LOQ.

## 5. Konklusjon

Målet med oppgaven var å teste mikroekstraksjonsteknikken PALME til ekstraksjon av polare forbindelser både fra vandige løsninger og plasma. Et annet viktig mål var å finne en væskemembran som kunne fremme ekstraksjon av hydrofile analytter. De basiske og hydrofile analyttene hydralazin, fenylpropanolamin, efedrin, metaraminol, cimetidin, sotalol, salbutamol og praktolol ble valgt som modellanalytter. Analyttene ble ekstrahert fra 250 µl donorfase, gjennom 2,5 µl væskemembran, og over til 50 µl vandig akseptorfase. I oppgaven ble det observert at PALME av basiske analytter var mest effektiv ved lav pH i donorfase. Det var fordi en lav pH i donorfasen gir økt ioniseringsgrad av analyttene som igjen gir forbedret diffusjon av analyttene ved at det dannes ionparkompleks med transportmolekyler. Samtidig viste forsøket at en sterkt sur pH i akseptorfase var nødvendig for å vedlikeholde høyt utbytte og hindre tilbakeekstraksjon av analyttene. En annen viktig faktor som spiller viktig rolle i ekstraksjon av hydrofile analytter gjennom den kunstige væskemembranen er sammensetning av væskemembranen. Av de ulike organiske væskemembraner som ble testet, ga 15 % DEHP i 2-nonanone høyt utbytte opptil 100 % for enkelte analytter med en RSD <15 %. Bruk av ioniske væsker for å danne den kunstige væskemembranen ble studert for første gang i PALME, men mer forskning trengs for å få økt kunnskap om bruken av slike væsker i ekstraksjon av analytter.

Sammenliknet med eksisterende metoder for prøveopparbeidelse, vil det spares mye tid under prøveopparbeidelsen ved at 96-brønnsformatet muliggjør ekstraksjon av 96 prøver samtidig. I tillegg kan det oppnås opptil fem ganger oppkonsentrering av analytter med relativt rene ekstrakter fra plasma. Forbruk av organiske løsemidler i PALME er også svært lavt, ettersom det ikke benyttes mer enn 2,5 µl på membranen, noe som er gunstig både med tanke på miljø, helse og økonomi.

Evaluering av metoden ble ikke vektlagt, da dette ikke er et ferdig prosjekt, men metoden viste tilfredsstillende resultater for presisjon og linearitet. Standardkurvene hadde  $R^2 > 0,99$  unntatt fra hydralazin som hadde 0,86. LOD var i området 0,5-1 µg/ml mens LOQ var i området 1,65-3,3 µg/ml. En fullstendig standardisering av metoden i henhold til retningslinjer er viktig før det kan trekkes noe endelige konklusjoner om metodens selektivitet, men oppgaven danner et godt grunnlag for fremtidige studier.

Forhåpentligvis vil utvikling av PALME til en full automatisert prøveopparbeidelsesteknikk, utvide metoden ytterligere innenfor bioanalyse.

## 6.Litteraturliste

- [1] Chiu, M. L., Lawi, W., Snyder, S. T., Wong, P. K., Liao, J. C., & Gau, V. (2010). Matrix effects—a challenge toward automation of molecular analysis. *Journal of the association for laboratory automation*, 15(3), 233-242.
- [2] Pedersen-Bjergaard, S. and Rasmussen, K.E., *Legemiddelanalyse*. 2004, Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS.
- [3] Pedersen-Bjergaard, S., & Rasmussen, K. E. (2005). Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 817(1), 3-12. doi: 10.1016/j.jchromb.2004.08.034
- [4] Sanagi, M. M., Ibrahim, W., Heng, S. H., Raharjo, Y., Miskam, M., & Ismail, R. (2008). Advances in analytical microextraction methods towards green chemistry.
- [5] Jönsson, J. Å., & Mathiasson, L. (2001). Membrane extraction in analytical chemistry. *Journal of separation science*, 24(7), 495-507.
- [6] Panighel, A., & Flamini, R. (2014). Applications of solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry (SPME-GC/MS) in the study of grape and wine volatile compounds. *Molecules*, 19(12), 21291-21309. doi: 10.3390/molecules191221291
- [7] Ho, T. S., Halvorsen, T. G., Pedersen-Bjergaard, S., & Rasmussen, K. E. (2003). Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport. *J Chromatogr A*, 998(1-2), 61-72.
- [8] Ho, T. S., Pedersen-Bjergaard, S., & Rasmussen, K. E. (2006). Experiences with carrier-mediated transport in liquid-phase microextraction. *J Chromatogr Sci*, 44(6), 308-316.

- [9] Gjelstad, A., Rasmussen, K. E., Parmer, M. P., & Pedersen-Bjergaard, S. (2013). Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid-liquid-liquid extraction in the 96-well format. *Bioanalysis*, 5(11), 1377-1385. doi: 10.4155/bio.13.59
- [10] Pedersen-Bjergaard, S., & Rasmussen, K. E. (1999). Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 71(14), 2650-2656.
- [11] Pedersen-Bjergaard, S., & Rasmussen, K. E. (2004). Liquid-phase microextraction utilising plant oils as intermediate extraction medium—Towards elimination of synthetic organic solvents in sample preparation. *Journal of separation science*, 27(17-18), 1511-1516.
- [12] Bello-López, M. Á., Ramos-Payán, M., Ocaña-González, J. A., Fernández-Torres, R., & Callejón-Mochón, M. (2012). Analytical applications of hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME): a review. *Analytical Letters*, 45(8), 804-830.
- [13] Pawliszyn, J., & Pedersen-Bjergaard, S. (2006). Analytical microextraction: current status and future trends. *J Chromatogr Sci*, 44(6), 291-307.
- [14] More, V., & Mundhe, D. (2013). Microextraction techniques in analysis for drugs. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 3, 330-344.
- [15] Pedersen-Bjergaard, S., & Rasmussen, K. E. (2008). Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *J Chromatogr A*, 1184(1-2), 132-142. doi: 10.1016/j.chroma.2007.08.088
- [16] Roldan-Pijuan, M., Pedersen-Bjergaard, S., & Gjelstad, A. (2015). Parallel artificial liquid membrane extraction of acidic drugs from human plasma. *Anal Bioanal Chem*. doi: 10.1007/s00216-015-8505-9
- [17] Gjelstad, A., Rasmussen, K. E., & Pedersen-Bjergaard, S. (2006). Electrokinetic migration across artificial liquid membranes Tuning the membrane chemistry to

- different types of drug substances. *J Chromatogr A*, 1124(1-2), 29-34. doi: 10.1016/j.chroma.2006.04.039
- [18] Ioniske væsker, fremtidens designeropløsningsmidler
- [19] Han, X., & Armstrong, D. W. (2007). Ionic liquids in separations. *Accounts of Chemical Research*, 40(11), 1079-1086.
- [20] Ignat'ev, N., Welz-Biermann, U., Kucheryna, A., Bissky, G., & Willner, H. (2005). New ionic liquids with tris (perfluoroalkyl) trifluorophosphate (FAP) anions. *Journal of Fluorine Chemistry*, 126(8), 1150-1159.
- [21] Anderson, J. L., Armstrong, D. W., & Wei, G.-T. (2006). Ionic liquids in analytical chemistry. *Anal Chem*, 78(9), 2892-2902.
- [22] Ho, T. S., Reubsaet, J. L., Anthonsen, H. S., Pedersen-Bjergaard, S., & Rasmussen, K. E. (2005). Liquid-phase microextraction based on carrier mediated transport combined with liquid chromatography-mass spectrometry. New concept for the determination of polar drugs in a single drop of human plasma. *J Chromatogr A*, 1072(1), 29-36.
- [23] Tagliaro, F., Turrina, S., & Smith, F. P. (1996). Capillary electrophoresis: principles and applications in illicit drug analysis. *Forensic Sci Int*, 77(3), 211-229.
- [24] Grossman, P. D., & Colburn, J. C. (2012). *Capillary electrophoresis: Theory and practice*: Academic Press.
- [25] Beckman. (1994). *Introduction to Capillary Electrophoresis* Beckman Instruments, Inc. USA.
- [26] DrugBank.Molekylformler, strukturer, pKa og log P verdier [cited 2014.11.01]; Available from: <http://www.drugbank.ca>.
- [27] ChemAxon. Strukturformler, molekylformler og log P verdier. [Cited 2014.11.01]; Available from: <http://www.chemicalize.org>

- [28] Smith, G. (2010). Bioanalytical method validation: notable points in the 2009 draft EMA Guideline and differences with the 2001 FDA Guidance. *Bioanalysis*, 2(5), 929-935.
- [29] SciFinder. Vannløselighet, log P verdier. [cited 2015.02.01]; Available from: <https://origin-scifinder.cas.org/scifinder/login>.
- [30] Sand, O. Sjaastad, V.Q., Haug, E. and Bjålie, J. G. *Menneskekroppen, fysiologi og anatomi*. 2006, Gyldendal Norsk Forlag AS.
- [31] Mitra, S. (2004). *Sample preparation techniques in analytical chemistry* (Vol. 237): John Wiley & Sons.

## 7. Appendiks

Tabell I : Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytter med tridecylfosfat i med ulike organiske løsemidler

Organisk Væskemembran	Utbytte* %							
	Hydralazin	Fenylpropa- nolamin	Efedrin	Metaraminol	Cimetidin	Sotalol	Salbutamol	Praktolol
2-Oktanone	13	2	2	ND	3	ND	ND	4
Diheksyleter	13	2	26	ND	3	ND	ND	6
2-Nitrofenyl octyl eter	7	4	6	ND	1	ND	ND	2
2-Nonanone	19	48	49	21	25	18	17	41
Heksadekan	3	5	7	6	4	3	3	2
Isopentyl- benzen	26	30	32	ND	14	ND	2	30

\* n = 4

Donorfase: 250 µl plasma løsning    Organisk væskemembran: 2,5 µl    pH i prøven: 12  
 Akseptorfase: 10 µl 50mM HCl    Ekstraksjonstid: 15 minutter    Risting: 900rpm

Tabell II : Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte med n-oktanol som organisk løsemiddel med ulike transport molekyler.

Transport- molekyler	% Utbytte *(og % RSD )							
	Hydralazin	Fenylpropa- nolamin	Efedrin	Metaraminol	Cimetidin	Sotalol	Salbutamol	Praktolol
Tributyl fosfat	10 (9)	ND	ND	18 (5)	13 (5)	ND	ND	50 (16)
Tris(2- etylheksyl)fosfat	33 (6)	ND	ND	14 (1)	10 (4)	ND	ND	86 (2)
Trietyl fosfat	40 (2)	ND	ND	14 (4)	16 (6)	ND	ND	72 (3)
Tridecyl fosfat	76 (3)	62 (8)	61 (11)	81 (3)	71 (4)	40 (11)	43(10)	58 (10)
Trifenyl fosfat	31 (5)	ND	ND	ND	12 (7)	ND	ND	35 (4)
Di(2-etylheksyl) fosfat	76 (7)	40 (17)	42 (9)	79 (13)	89 (5)	40 (23)	28 (25)	60 (4)
Di(2-etylheksyl) fosfat + Tris(2- etylheksyl)fosfat	72 (6)	70 (3)	81 (6)	85 (4)	82 (6)	53 (4)	54 (4)	68 (4)
Di(2-etylheksyl) fosfat+ Tributyl fosfat	92 (1)	65 (2)	65 (7)	92 (3)	93 (4)	52 (6)	48 (5)	76 (2)

\* n = 4

Donorfase: 250 µl plasma løsning    Organisk væskemembran: 2,5 µl    pH i prøven: 7  
 Akseptorfase: 50 µl 50mM HCl    Ekstraksjonstid: 30 minutter    Risting: 900rpm

Tabell III : Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytter med di(2-etylheksyl) fosfat som transport molekyl i ulike organiske løsemidler.

Organisk Væskemembran	% Utbytte* (og % RSD )							
	Hydralazin	Fenylpropa- nolamin	Efedrin	Metaraminol	Cimetidin	Sotalol	Salbutamol	Praktolol
<b>Dodecylacetat</b>	16 (5)	67 (2)	94 (1)	20 (4)	7 (8)	22 (3)	9 (7)	9 (1)
<b>Diheksyleter</b>	16 (8)	57 (8)	86 (9)	12 (27)	9 (36)	7 (23)	9 (46)	10 (60)
<b>2-Heksyl dekanol</b>	12 (8)	74 (9)	80 (8)	40 (3)	16 (17)	18 (9)	12 (9)	18 (5)
<b>2-Oktanone</b>	27 (3)	96 (6)	103 (8)	84 (3)	75 (3)	90 (5)	80 (3)	80 (3)
<b>2-Nonanone</b>	18 (7)	102 (1)	96 (2)	88 (3)	69 (6)	100 (3)	89 (2)	89 (4)
<b>Heksadekan</b>	6 (6)	12 (3)	18 (2)	ND	ND	ND	ND	ND

\* n = 4

Donorfase: 250 µl plasma løsning    Organisk væskemembran: 2,5 µl    pH i prøven: 7  
 Akseptorfase: 50 µl 50mM HCl    Ekstraksjonstid: 30 minutter    Risting: 900rpm

Tabell IV : Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytter med di(2-etylheksyl)fosfat + tris(2-etylheksyl) fosfat i ulike organiske løsemidler.

Organisk løsemidler	% Utbytte* (og %RSD)							
	Hydralazin	Fenylpropa- nolamin	Efedrin	Metaraminol	Cimetidin	Sotalol	Salbutamol	Praktolol
<b>Dodecylacetat</b>	11 (1)	39 (3)	43 (3)	12 (2)	3 (7)	11 (1)	4 (3)	4 (2)
<b>Diheksyleter</b>	15 (23)	40 (13)	38 (14)	15 (9)	9 (18)	9 (21)	6 (24)	6 (21)
<b>2-heksyl dekanol</b>	21 (8)	52 (47)	52 (45)	30 (5)	7 (14)	10 (11)	8 (14)	11 (12)
<b>2-oktanone</b>	54 (11)	98 (6)	100 (7)	80 (5)	42 (20)	94 (7)	70 (7)	67 (6)
<b>2-Nonanone</b>	48 (8)	98 (13)	106(14)	64 (15)	30 (9)	81 (12)	49 (9)	47 (9)
<b>Heksadekan</b>	5 (5)	10 (4)	10 (2)	4 (3)	ND	ND	ND	ND

\* n = 4

Donorfase: 250 µl plasma løsning    Organisk væskemembran: 2,5 µl    pH i prøven: 7  
 Akseptorfase: 50 µl 50mM HCl    Ekstraksjonstid: 30 minutter    Risting: 900rpm

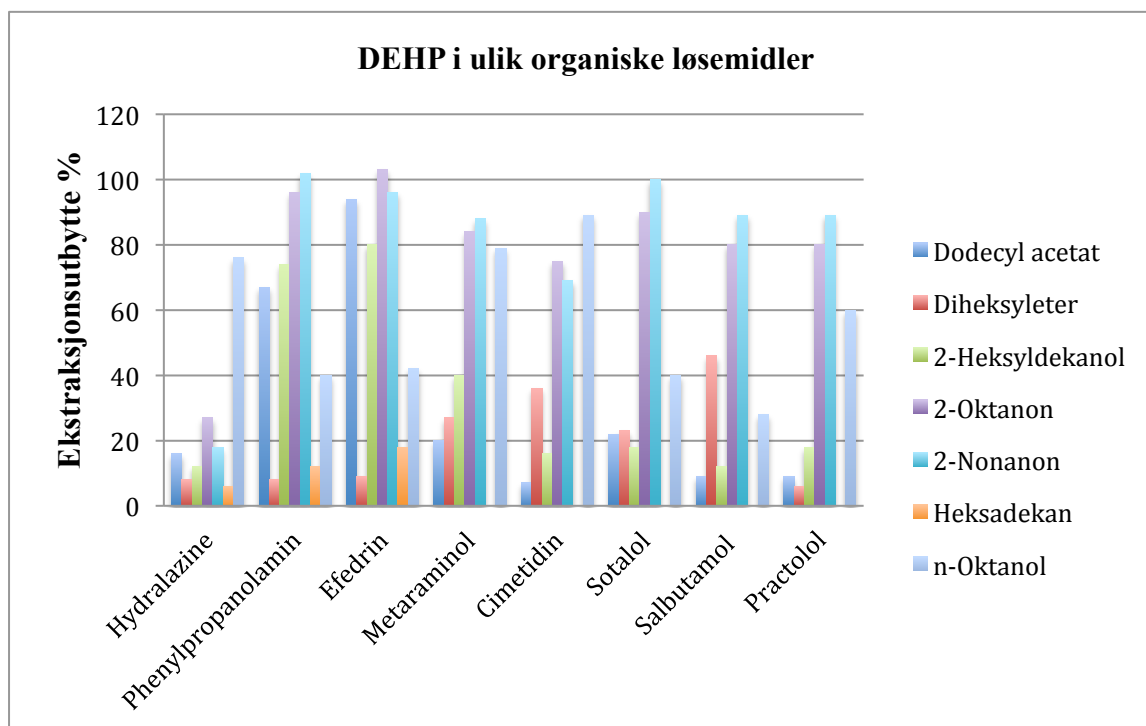


Tabell V : Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytter med di (2-etylheksyl) fosfat + tributyl fosfat i ulike organiske løsemidler.

Organisk væskemembran	% Utbytte* (og %RSD )							
	Hydralazin	Fenylpropa- nolamin	Efedrin	Metaraminol	Cimetidin	Sotalol	Salbutamol	Praktolol
Dodecylacetat	11 (7)	58 (11)	69 (7)	31 (13)	6 (11)	22 (17)	10 (15)	8 (8)
Diheksyleter	10 (10)	62 (11)	65 (12)	26 (13)	9 (13)	12 (23)	9 (21)	5 (20)
2-Heksyl-dekanol	14 (26)	64 (22)	75 (21)	31 (18)	11 (20)	14 (16)	10 (14)	13 (19)
2-Oktanone								
2-Nonanone								
Heksadekan	9 (6)	30 (13)	30 (9)	14 (4)	6 (6)	ND	ND	ND

\* n = 4

Donorfase: 250 µl plasma løsning    Organisk væskemembran: 2,5 µl    pH i prøven: 7  
 Akseptorfase: 50 µl 50mM HCl    Ekstraksjonstid: 30 minutter    Risting: 900rpm



Figur I: DEHP i ulike organiske løsemidler.