

# Utvikling av elektromembranekstraksjon-chip koblet direkte til kapillærelektroforese

Marit Li



Masteroppgave i legemiddelanalyse  
Master i farmasi  
45 studiepoeng

Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2019



# **Utvikling av elektromembranekstraksjon-chip koblet direkte til kapillærelektroforese**

**Marit Li**

Masteroppgave ved Faggruppen for Legemiddelanalyse,  
Seksjon for Farmasøytisk Kjemi  
Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Det praktiske laboratoriearbeidet ble utført ved  
Institutt for Farmaci,  
Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

## **Veiledere:**

Professor Stig Pedersen-Bjergaard

Professor Jörg Kutter

Associate Professor Nickolaj J. Petersen

Assistant Professor Drago Sticker

Doktorgradsstipendiat Frederik André Hansen

© Marit Li

2019

Utvikling av elektromembranekstraksjon-chip koblet direkte til kapillærelektroforese

Marit Li

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

# Sammendrag

I dette arbeidet har det blitt utviklet en thiol-ene basert mikrochip for elektromembranekstraksjon (EME) koblet direkte til kapillærelektroforese (CE) og UV-deteksjon. EME-chipen har potensial for framtidige analyser knyttet til organ-on-a-chip. Det ble utført EME av seks modellanalytter: amfetamin, metamfetamin, amitriptylin, petidin, kokain og metadon. Modellanalyttene ble ekstrahert fra en 50 µl vandig prøveløsning (pH 2,7), gjennom en væskemembran (SLM) som bestod av 2-nitrofenyloktyleter (NPOE), og over i en 43 nL vandig akseptorfase (pH 2,7). EME ble utført med 15 V i 60 sekunder. Akseptorfase ble så overført direkte til et kapillær og analysert med CE med separasjonsspenning 20 kV, separasjonsbuffer pH 2,7 og UV ved 200 nm.

Systemet viste å kunne ekstrahere, separere og detektere alle de seks modellanalyttene. Utbyttet for modellanalyttene var mellom 0,01-0,23 %, og systemet ga dermed myk ekstraksjon. Systemet hadde noen utfordringer knyttet til repeterbarhet (RSD 4,1-70,7 %) og oppkonsentrering (maks. 2,6 ganger). EME-chipen viste å ha potensiale, men det må gjøres ytterligere arbeid EME-chipen før organ-on-a-chip forsøk.



# Forord

Jeg vil først og fremst rette en stor takk til min hovedveileder Stig Pedersen-Bjergaard for super veiledning både under oppholdet i København og ved oppgaveskriving i Oslo. Jeg setter stor pris på strukturerte og tydelige tilbakemeldinger jeg har fått fra deg gjennom hele masterperioden.

Videre vil jeg takke mine veiledere ved Københavns Universitet: Nickolaj J Petersen, Drago Sticker og Jörg Kutter. Takk for god veiledning på laboratoriet og for at dere tok meg så godt imot i forskningsgruppa. Jeg vil også takke doktorgradsstipendiat Frederik André Hansen for introduksjon på laboratoriet i København samt god veiledning under laboratoriearbeidet og skriving av oppgaven.

Takk til alle mine medstudenter på farmasi for fem fantastiske år, disse årene hadde vært mye tyngre uten dere. Takk for mye moro både innenfor og utenfor Farmasøytisk Institutt! Til slutt vil jeg takke min familie for støtte gjennom disse fem årene, og spesielt takk til mamma for korrekturlesing av masteroppgaven.

Oslo, mai 2019

Marit Li





# Innholdsfortegnelse

<b>Forkortelser</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 Innledning</b> .....	<b>1</b>
1.1 Bakgrunn .....	1
1.2 Hensikt.....	2
<b>2 Teori</b> .....	<b>3</b>
2.1 Prinsipp for elektromembranekstraksjon.....	3
2.2 Betingelser ved elektromembranekstraksjon.....	4
2.2.1 Valg av organisk væskemembran (SLM) .....	5
2.2.2 Valg av ekstraksjonstid- og spenning.....	5
2.2.3 Valg av pH i prøve- og akseptorløsning.....	6
2.3 On-chip elektromembranekstraksjon.....	6
2.4 Kapillærelektroforese.....	7
2.4.1 Prinsipp .....	7
2.4.2 Elektroforetisk mobilitet.....	8
2.4.3 Elektroosmotisk flow .....	9
2.4.4 Effektivitet ved CE.....	10
2.5 Microfluidics.....	11
2.5.1 Materialer .....	12
2.5.2 Fabrikasjonsmetoder.....	14
2.5.3 Plasmaaktivering av overflater.....	15
<b>3 Eksperimentelt</b> .....	<b>16</b>
3.1 Modellanalytter.....	16
3.2 Utstyr.....	17
3.3 Programvare .....	18
3.4 Kjemikalier og materialer.....	18
3.5 Løsninger.....	19
3.6 Design og fabrikking av EME-chipen.....	20
3.6.1 Protokoll for fabrikking av EME-chipen.....	21
3.7 Betingelser for ekstraksjon av rhodamine 6G.....	23
3.8 Oppsett av EME og CE med EME-chipen .....	23
3.8.1 Oppsett for EME.....	23
3.8.2 Oppsett for CE.....	24
3.9 Ekstraksjonsbetingelser.....	25
3.9.1 Optimalisering av ekstraksjonsspenning og ekstraksjonstid .....	25
3.10 CE-betingelser.....	26
3.10.1 Optimalisering av separasjonsspenning .....	26
3.11 Beregning av repeterbarhet, oppkonsentreringsfaktor og utbytte.....	26

3.1.1.1 Repeterbarhet .....	26
3.1.1.2 Oppkonsentreringsfaktor .....	27
3.1.1.3 Utbytte.....	27
<b>4 Resultat og diskusjon.....</b>	<b>28</b>
4.1 <i>Teknisk utvikling av mikrochips</i> .....	28
4.1.1 Konsept og utfordringer .....	28
4.1.2 Chip 1.....	30
4.1.3 Chip 2.....	32
4.1.4 Chip 3.....	33
4.1.5 Chip 4.....	34
4.2 Ekstraksjon av rhodamine 6G under mikroskop .....	35
4.3 <i>Konvensjonell kapillærelektroforese av modellanalyttene</i> .....	36
4.3.1 Separasjonsrekkefølge av modellanalyttene .....	37
4.3.2 Tilpassing av kapillær i deteksjonscelle .....	37
4.4 <i>Kapillærelektroforese med injeksjon av prøve utenfor CE-instrumentet</i> .....	39
4.4.1 <i>Undersøkelse av separasjonsspenning</i> .....	39
4.4.2 Separasjon av modellanalyttene ved injeksjon utenfor CE-instrumentet.....	40
4.5 <i>EME-chip koblet til CE-instrument</i> .....	41
4.5.1 Optimalisering av ekstraksjonsspenning .....	42
4.5.2 Optimalisering av ekstraksjonstid.....	43
<b>5 Konklusjon.....</b>	<b>45</b>
<b>Litteraturliste.....</b>	<b>46</b>
<b>Vedlegg .....</b>	<b>48</b>

# Forkortelser

NPOE	2-nitrofenyloktyleter
NPPE	2-nitrofenylpentyleter
EME	Elektromembranekstraksjon
EOF	Elektroosmotisk flow
SPE	Fast-fase ekstraksjon (Solid phase extraction)
SPME	Fast-fase mikroekstraksjon (Solid Phase Microextraction)
CE	Kapillærelektroforese
CE-MS	Kapillærelektroforese-massespektrometri
kV	Kilovolt
$\mu$ A	Mikroampere
$\mu$ L	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
mm	Millimeter
mM	Millimolar
nL	Nanoliter
OSTE	Off-stoichiometric thiol-ene
OSTE+	Off-stoichiometric thiol-ene epoxy
PDMS	Polydimetylsiloksan
PMMA	Polymetylmetakrylat

s	Sekund
SEM	Sveipelektronmikroskop (Scanning Electron Microscope)
UV	Ultrafiolett
V	Volt
LPME	Væske-fase mikroekstraksjon (Liquid Phase Microextraction)
HPLC	Væskrokromatografi (High Performance Liquid Chromatography)
SLM	Væskemembran (Supported liquid membrane)
LLE	Væske-væske ekstraksjon (Liquid liquid extraction)

# 1 Innledning

## 1.1 Bakgrunn

Analyse av biologiske prøver som blod og urin er i dag helt avgjørende for diagnostisering og behandling av en rekke sykdommer. De biologiske prøvene har en kompleks sammensetning av blant annet proteiner, lipider, salter og celler. Disse komponentene kalles matrikskomponenter og er en av grunnene til at de biologiske prøvene i de aller fleste tilfeller krever en forbehandling før analyse. Denne forbehandlingen kalles prøveoppbehandling og har som formål å isolere analytten(e) som det skal gjøres måling(er) på. Prøveoppbehandling kreves vanligvis fordi 1) de fleste biologiske prøver er inkompatible med analyseinstrumenter, 2) matrikskomponenter kan interferere med målingene, og 3) konsentrasjonen av analytten(e) er ofte veldig lav, og det kreves derfor en oppkonsentrering som kan oppnås ved prøveoppbehandling [1]. Tradisjonelle metoder for prøveoppbehandling er væske-væske ekstraksjon (LLE) og fast-fase ekstraksjon (SPE). I en typisk LLE prosedyre ekstraheres analytten(e) fra en vandig prøve, og inn i et organisk løsemiddel som er ikke-blandbart med vann. Drivkraften til prosessen er fordelingskoeffisienten til analytten(e) mellom de to væskene, og transport drevet av passiv diffusjon [2]. I SPE overføres analytten(e) til en fast fase hvor de holdes tilbake. Resten av prøvematriksen vaskes så bort, og til slutt kan analytten(e) elueres ut fra den faste fasen [3].

LLE og SPE er enkle og effektive metoder for prøveoppbehandling, men de har også flere ulemper. Metodene krever et høyt løsemiddelforbruk, er tidkrevende, kostbare og vanskelige å automatisere. På grunn av dette har det blitt utviklet miniaturiserte alternativer kalt væske-fase mikroekstraksjon (LPME) og fast-fase mikroekstraksjon (SPME) [1, 4]. SPME krever lite organisk løsemiddel, men er relativt dyr og gir problemer med carry-over. LPME er billig, gir høy oppkonsentrering, kan automatiseres og krever lite organisk løsemiddel [4, 5]. LPME kan utføres i to- eller tre-fase system. I et to-fase system ekstraheres analytten(e) fra en vandig fase og over i en organisk fase gjennom en organisk væskemembran. I et tre-fase system ekstraheres analytten(e) fra en vandig prøveløsning, gjennom en organisk væskemembran og over i en vandig akseptorløsning [6].

I 2006 ble elektromembranekstraksjon (EME), en ny metode for prøveopparbeidelse introdusert [7]. EME baserer seg på et tre-fase LPME system, men ekstraksjonen er drevet av et elektrisk felt i tillegg til diffusjon. For ekstraksjon av basiske analytter plasseres anoden i prøveløsningen, og katoden i akseptorløsningen. Påføringen av det elektriske feltet gir raske og selektive ekstraksjoner [8].

De siste årene har det blitt utviklet flere ulike EME-oppsett med ulike applikasjoner. Eksempler er ekstraksjon av aminosyrer [9], peptider [10] og legemiddelmetabolitter [11]. Konvensjonell EME utføres vanligvis offline, dvs. at akseptorløsningen må overføres manuelt til analyseinstrumentet etter ekstraksjon. Det manuelle steget kan elimineres ved å inkorporere EME til en lab-on-a-chip. On-chip EME ble først introdusert i 2010 [12]. Fordeler med on-chip EME er at prøve- og akseptorløsning kan leveres kontinuerlig, online analyse muliggjør monitorering av legemiddelmetabolisme og andre typer reaksjoner, og den korte diffusjonsveien gir rask masseoverføring. I 2018 ble det utviklet et nytt system for on-chip elektromembranekstraksjon på nanoliter-nivå. Denne mikrochipen hadde et svært begrenset ekstraksjonsområde og en akseptorfase på bare 6 nL. Dette førte til at EME-chipen ga lave ekstraksjonsutbytter (< 1%) og høy oppkonsentrering [13]. On-chip EME systemer forventes å være viktige i framtidens utvikling av analysemetoder [14].

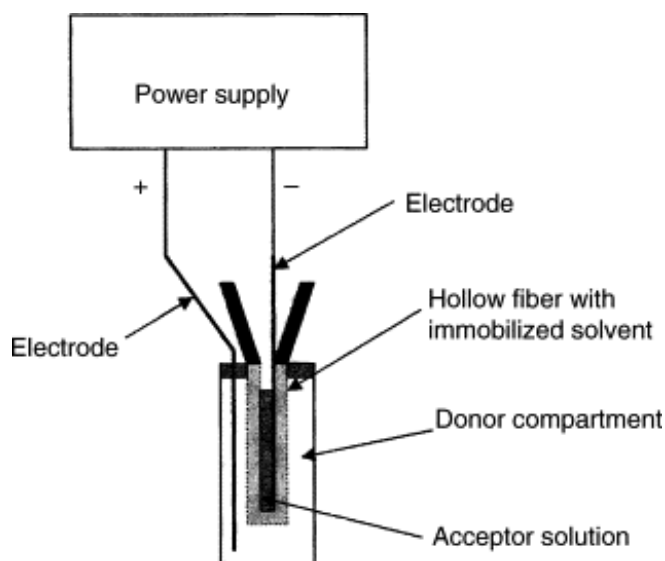
## 1.2 Hensikt

I denne oppgaven var den overordnede hensikten å videreutvikle en tidligere utviklet EME-chip [13]. Denne EME-chipen var koblet til LC-MS for separasjon og deteksjon. Dette førte til utfordringer knyttet til fortynning av akseptorfase (6 nL) da den ved overføring til HPLC ble fortynnet omtrent 5000 ganger. Denne fortynningen kan unngås ved å koble et kapillær for kapillærelektroforese (CE) direkte til akseptorkanalen i EME-chipen. En slik EME-chip har potensiale for anvendelse mot organ-on-a-chip.

# 2 Teori

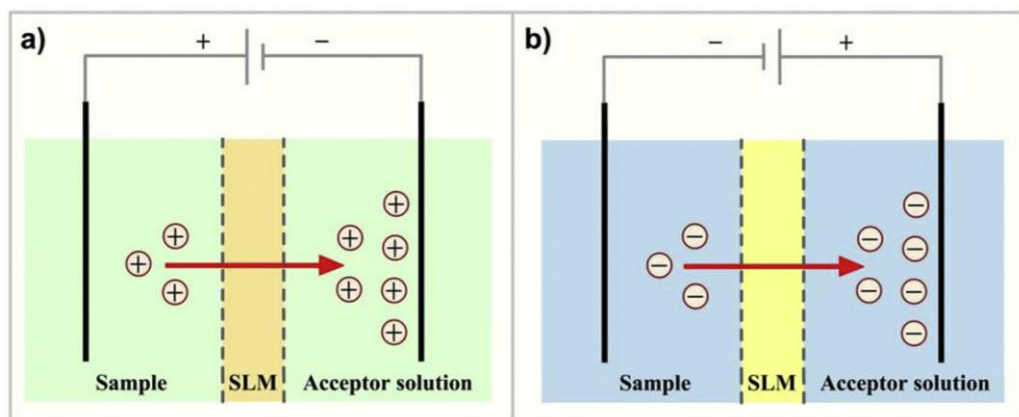
## 2.1 Prinsipp for elektromembranekstraksjon

Elektromembranekstraksjon (EME) er en prøveopparbeidelsesmetode for ekstraksjon av sure og basiske analytter. EME er et tre-fase system som består av en prøveløsning, en organisk væskemembran (SLM) immobilisert i porene til en membran, og en akseptorløsning. Elektroder plasseres i prøve- og akseptorløsningen, og et spenningsfelt driver ekstraksjonen (Figur 1) [7].



Figur 1: Skjematisk illustrasjon av utstyr som brukes ved EME [7].

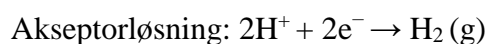
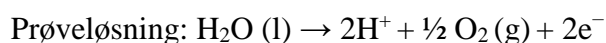
I EME er prøveløsningen og akseptorløsningen vandig, mens væskemembranen (SLM) som skiller de to løsningene er organisk. pH justeres i de to vandige løsningene slik at analyttene er på ionisert form. Ekstraksjonen drives av et elektrisk felt over SLM i tillegg til passiv diffusjon. Når spenning påsettes vil negativt ladde analytter (anioner) migrere mot anoden, og positivt ladde analytter (kationer) vil migrere mot katoden (Figur 2) [14].



Figur 2: Skjematisk illustrasjon av prinsipp for EME for a) kationer og b) anioner [14].

## 2.2 Betingelser ved elektromembranekstraksjon

For å muliggjøre EME må hele systemet være i en elektrisk krets. SLM er ansvarlig for mesteparten av den elektriske motstanden i systemet fordi det organiske løsemidlet leder strøm dårlig. Motstanden bestemmes av membrantykkelsen og av type organisk væskemembran som benyttes. Dersom SLM og analyttene ikke reagerer med elektroden, vil elektrolyse ved anoden og katoden foregå etter følgende reaksjoner [7]:



Elektrolyse kan føre til dannelse av bobler, og gir en teoretisk mulighet for endring av pH i prøve- og akseptorløsningen [7]. Strømmen som går gjennom systemet styrer graden av elektrolyse, og strømmen er avhengig av spenningen og motstanden, forklart av Ohms lov [15] ved Ligning 1:

$$I = \frac{U}{R}$$

Ligning 1



der  $I$  er strømmen,  $U$  er spenningen og  $R$  er motstanden. For å begrense elektrolyse og bobledannelse er det viktig å velge de optimale betingelsene for elektromembranekstraksjon [7]. Disse betingelsene diskuteres i de følgende avsnitt.

### **2.2.1 Valg av organisk væskemembran (SLM)**

For å muliggjøre EME må som tidligere nevnt hele systemet være i en elektrisk krets, og den største motstanden i systemet er forbundet med den organiske væskemembranen (SLM). Det er derfor viktig å velge en SLM med tilstrekkelig polaritet. Samtidig er det fare for for mye elektrolyse ved elektrodene dersom den er for polar og leder strøm for godt. Denne elektrolysen kan føre til bobledannelse og pH-endringer i prøve- og akseptorløsningen. For å få best mulig ekstraksjon velges det dermed en SLM som gir tilstrekkelig ledningsevne til at analyttene migrerer gjennom systemet, men samtidig har en motstand som begrenser ledningsevnen og dermed minimerer graden av elektrolyse [7].

Valg av organisk væskemembran baserer seg også på analyttene sine hydrofobe egenskaper. For de fleste EME-systemer for basiske, upolare ( $\log P > 2$ ) analytter har 2-nitrofenyloktyleter (NPOE) blitt brukt som organisk væskemembran [16-18]. NPOE er ikke-flyktig og så å si uløselig i vann. Dette gjør at den er stabil som SLM og fordamper eller diffunderer ikke inn i prøve- og akseptorløsningen [19]. Andre organiske væskemembraner som har blitt brukt er 2-nitrofenylpentyleter (NPPE) [20] og 2-oktanon [21]. For sure analytter har organiske løsemidler som heptanol og oktanol vist best resultater som SLM [22].

### **2.2.2 Valg av ekstraksjonstid- og spenning**

Den påsatte spenningen over den organiske væskemembranen er drivkraften for masseoverføringen i EME. Studier har vist at ekstraksjonsutbyttet generelt øker med økt påsatt spenning, men bare opp til en optimal spenning. Etter denne optimale spenningen, vil ekstraksjonsutbyttet flate ut eller reduseres. Grunnen til dette er at strømmen gjennom

systemet er relativt høy, og elektrolyse ved elektrodene kan forekomme [7, 22]. Elektrolyse ved elektrodene kan føre til endring av pH og konsekvensen kan bli at graden av ionisering i de vandige fasene går ned, og dermed favoriseres tilbakeekstraksjon ved diffusjon [22].

Ekstraksjonstiden må også optimaliseres, og den optimale ekstraksjonstiden blir også påvirket av ekstraksjonsspenningen. Ekstraksjonsutbyttet øker generelt med økende ekstraksjonstid, helt til systemet når en slags steady-state, og ekstraksjonsutbyttet når sitt maksimum. Dette maksimumet nås som regel etter ca. 5-10 minutter ekstraksjonstid. Lengere ekstraksjoner fører ofte til lavere ekstraksjonsutbytter. Dette er sannsynligvis grunnet elektrolyse, som fører til endringer i pH, og tilbakeekstraksjon ved diffusjon [22].

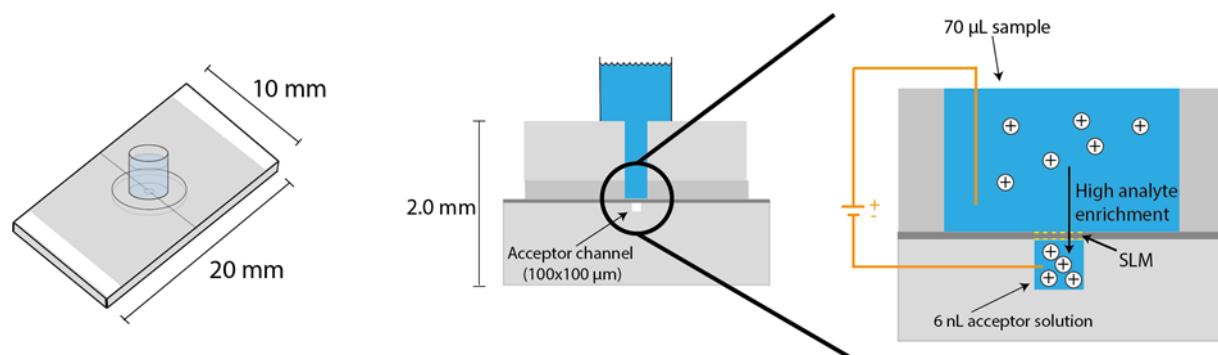
### **2.2.3 Valg av pH i prøve- og akseptorløsning**

Elektrokinetisk migrasjon er drivkraften i EME, og det er derfor viktig at analyttene er på ionisert form både i prøve- og akseptorløsningen. Dette gjøres ved å justere pH i begge løsningene til en pH der analyttene er på ionisert form. Ved EME av basiske analytter vil den elektrokinetiske migrasjonen til akseptorløsningen reduseres med økende pH grunnet deprotonering, og de kan diffundere tilbake til SLM ved passiv diffusjon [7].

## **2.3 On-chip elektromembranekstraksjon**

On-chip EME ble for første gang demonstrert i 2010 [23]. Systemet hadde stillestående akseptorløsning og dynamisk prøveløsning, og viste å gi rask masseoverføring og høy ekstraksjonseffektivitet på kort tid. Dette systemet ble videreutviklet til et system med dynamisk akseptorløsning og prøveløsning som ga utbytter på opp mot 86% [14, 24]. On-chip EME har til nå fokusert på ekstraksjon av basiske, ikke-polare analytter samt ekstraksjon av analytter for online monitorering av legemiddelmetabolisme [13, 23].

I 2018 ble et nytt system for on-chip EME på nanoliter-nivå demonstrert. Denne mikrochipen hadde fire lag, og et av lagene var en polypropylenmembran (Figur 3). En liten dråpe NPOE ble immobilisert i polypropylenmembranen for å muliggjøre EME. Området for immobilisering av NPOE var en sirkel med diameter 700  $\mu\text{m}$ . På grunn av det lille område for EME oppnådde systemet veldig lave ekstraksjonsutbytter ( $< 1\%$ ), såkalt myk ekstraksjon. Myk ekstraksjon er nyttig ved studier av komplekse biologiske systemer der det ikke er ønskelig å forstyrre biokjemiske likevekter. Systemet oppnådde også veldig høy oppkonsentrering på grunn av lite akseptorvolum (6 nL) i forhold til prøvevolum (70  $\mu\text{L}$ ). Nanoliter-skala EME har potensiale til å kobles til *in vitro* mikrofysiologiske systemer, lab-on-a-chip, og point-of-care diagnostisering [13].



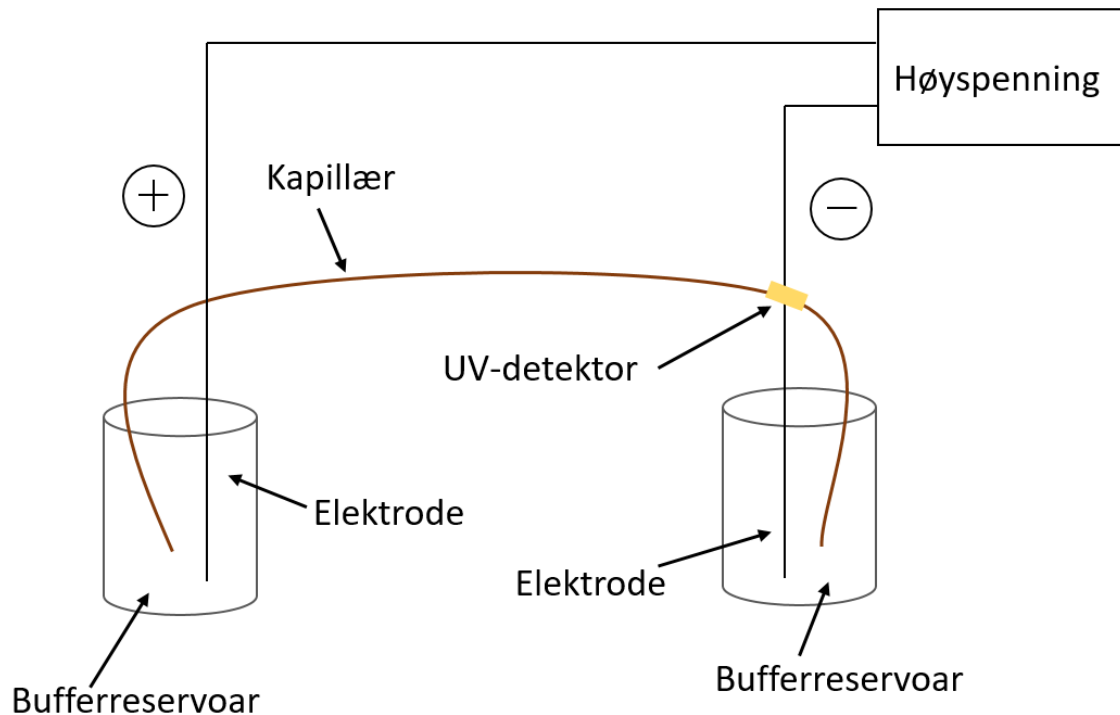
Figur 3: Illustrasjon av mikrochip for nanoliter-skala EME [13].

## 2.4 Kapillærelektroforese

### 2.4.1 Prinsipp

Kapillærelektroforese (CE) er en separasjonsmetode som baserer seg på stoffers forskjellige vandringshastighet i et elektrisk felt. Vandringshastigheten avhenger i hovedsak av stoffenes masse og ladning. Separasjonen skjer i smale kapillær som er fylt med vandig buffer. Et lite volum av prøveløsning føres inn i innløpet til kapillæret, og deretter føres begge endene av kapillæret ned i hvert sitt bufferreservoar. I hvert av bufferreservoarene er det en elektrode, og når høyspenning pålegges vil positive ioner (kationer) vandre mot den negative elektroden (katoden) og negative ioner (anioner) vandre mot den positive elektroden (anoden). I nærheten av utløpet av kapillæret er det en deteksjonscelle (UV-detektor) som detekterer

stoffene når de passerer den. Deretter plottes detektorsignalet som funksjon av tid, og dette plottet kalles et elektroferogram [25]. Figur 4 viser prinsippskisse for CE.



Figur 4: Prinsippskisse for kapillærelektroforese (CE).

## 2.4.2 Elektroforetisk mobilitet

Vandringshastigheten,  $v$  til et ion ved kapillærelektroforese avhenger av ionets elektroforetiske mobilitet og det pålagte elektriske feltet, og gis ved Ligning 2 [26]:

$$v = \mu_e \cdot E, \quad \text{Ligning 2}$$

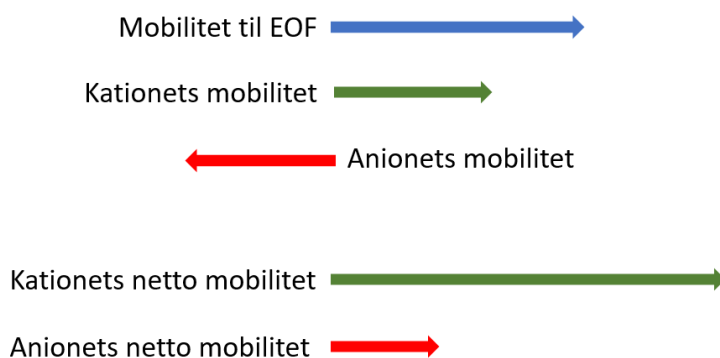
der  $\mu_e$  er elektroforetisk mobilitet, og  $E$  er pålagt elektrisk felt. Alle ioner har sin egen elektroforetiske mobilitet. Den elektroforetiske mobiliteten,  $\mu_e$  kan beskrives av Ligning 3 [26]:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad \text{Ligning 3}$$

der  $q$  er ionets ladning,  $\pi$  er 3,14,  $\eta$  er løsningens viskositet og  $r$  er ionets radius. Denne ligningen viser at små, sterkt ladede ioner har høy elektroforetisk mobilitet, mens store, svakt ladede ioner har lavere elektroforetisk mobilitet [26].

### 2.4.3 Elektroosmotisk flow

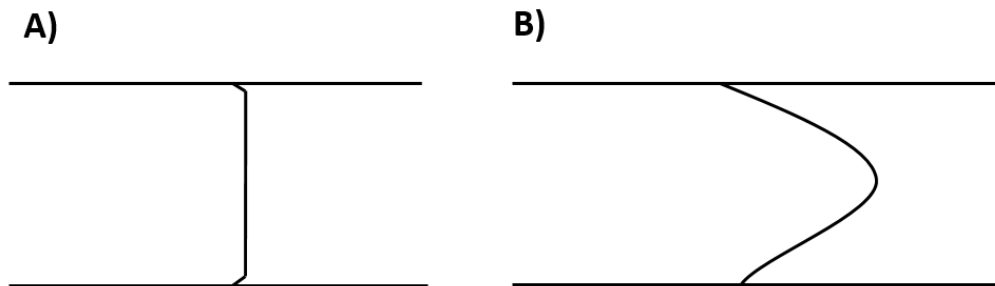
Elektroosmotisk flow (EOF) er væskestrømmen inne i kapillæret, og er en konsekvens av ladningen på overflaten av kapillærveggen [26]. Kapillærveggen er dekket av silanolgrupper som er sure. Ved pH høyere enn 4 blir silanolgruppene negativt ladet, og balanseres av et motionlag av kationer som er i bufferen. Disse kationene vil være hydratiserte. Det vil si at de er bundet til omgivende vannmolekyler, som igjen er bundet til andre vannmolekyler. Når det pålegges et negativt potensial ved utløpet til kapillæret vil de hydratiserte kationene langs kapillærveggen migrere mot utløpet, og dermed få hele bufferen til å bevege seg mot utløpet [25]. Anioner vil i utgangspunktet tiltrekkes den positive elektroden ved innløpet av kapillæret, men ofte dytter EOF de kraftigere i retning detektoren enn den elektrostatiske tiltrekningen drar de mot den negative elektroden ved utløpet av kapillæret. På grunn av EOF vil derfor også anioner kunne detekteres med CE. Anioner separeres etter forhold mellom molekylstørrelse og ladning, men migrasjonsrekkefølgen vil bli omvendt i forhold til kationene [25]. Figur 5 viser en illustrasjon av kationers og anioners relative mobilitet i et system med EOF.



**Figur 5: Kationers og anioners relative mobilitet i et system med EOF.**

Når det er EOF i kapillæret gir det en flat flytprofil (Figur 6A). Siden drivkraften til flyten er distribuert langs kapillærveggen er det ikke noe trykkfall inne i kapillæret og flyten er så å si

lik gjennom hele kapillæret. Den flate flytprofilen ved CE er forskjellig fra for eksempel HPLC hvor det brukes eksterne pumper som gir en parabolisk flytprofil (Figur 6B) [26].



**Figur 6:** A) Flat flytprofil (CE), B) parabolisk flytprofil (HPLC).

Den flate flytprofilen ved CE resulterer i lite båndspredning, og er en av grunnene til at man kan oppnå veldig høy effektivitet ved CE [27]. Andre faktorer som avgjør effektiviteten ved CE vil beskrives i det følgende.

#### 2.4.4 Effektivitet ved CE

Effektiviteten til separasjonen uttrykkes ved båndbredden, altså bredden av toppene i elektroferogrammet. Jo smalere toppene er i forhold til migrasjonstiden, jo bedre effektivitet og mindre båndspredning er det. Effektiviteten kan uttrykkes av parameteren  $N$  som kalles antall teoretiske plater. Jo flere teoretiske plater, jo mer effektiv er separasjonen. Ved CE er det vanlig med platetall ( $N$ ) rundt 50 000-500 000. Platetallet,  $N$  kan beregnes med Ligning 4 [25]:

$$N=5,54 \cdot \left(\frac{t}{W_{1/2}}\right)^2 \quad \text{Ligning 4}$$

der  $t$  er migrasjonstiden og  $W_{1/2}$  er bredden av toppen ved halvparten av topphøyden.

Ved CE er langsgående diffusjon det viktigste bidraget til båndspredning. Langsgående diffusjon skjer på grunn av at ioner har en naturlig tendens til å diffundere til områder som er mindre konsentrerte enn der de befinner seg. Den langsgående diffusjonen øker proporsjonalt med diffusjonskonstanten til ionet [27]. Store molekyler som proteiner og DNA har lave

diffusjonskoeffisienter sammenlignet med mindre molekyler. Derfor vil store molekyler generelt ha mindre bidrag fra langsgående diffusjon til båndspredning enn små molekyler [26].

En annen parameter som påvirker effektiviteten er injeksjonsvolumet, eller lengden på pluggen som injiseres utgjør i kapillæret. Lengden på pluggen som injiseres skal ikke være lengre enn båndspredningen som skyldes diffusjon. I praksis sier man at lengden skal være mindre enn 1-2 % av den effektive lengden av kapillæret. Den effektive lengden av kapillæret vil si lengden fra inngangen av kapillæret der prøven blir injisert til deteksjonscellen. Dersom injeksjonsvolumet er for stort vil det kunne føre til båndspredning [26].

## 2.5 Microfluidics

Microfluidics er vitenskapen og teknologien som omhandler systemer som håndterer små mengder væske ( $10^{-9}$ - $10^{-18}$  liter), ved bruk av kanaler med små dimensjoner (mikrometer-skala). Microfluidics ble først introdusert i 1990, og har siden da vist et enormt potensial innenfor miniatyriserte, bærbare lav-kostnadsprodukter [28]. Disse systemene har flere nyttige funksjoner: 1) mulighet til å benytte svært små volumer av både prøve og reagenser, 2) utføring av analyser med høy oppløsning og sensitivitet, og 3) lave produksjonskostnader [29]. På grunn av de små dimensjonene i systemene er avstanden for masse- og varmeoverføring relativt liten, og det muliggjør raskere analyser enn for systemer på makronivå [29].

Parallele strømninger av væske kan ha laminær flyt eller turbulent flyt. Ved turbulent flyt er det uregelmessige og tilsynelatende tilfeldige variasjoner i væskens bevegelse [30]. Laminær flyt er uten turbulens, og væsken beveger seg tilnærmet langs en rett bane med ingen forflytning til høyre eller venstre [31]. Parameteren Reynolds' tall,  $Re$ , avgjør hvilken type flyt det er, og kan beregnes med Ligning 5 [32]:

$$Re = \frac{v \rho}{\mu}$$

Ligning 5

der  $v$  er væskens hastighet,  $l$  er rørets diameter,  $\rho$  er væskens tetthet, og  $\mu$  er væskens viskositet. Overgangen fra laminær til turbulent flyt skjer ved en bestemt verdi av Reynolds' tall [30]. For typiske microfluidics systemer er det små kanaler og lav flythastighet.  $Re$  er dermed nesten alltid lav ( $Re < 1$ ), og det er laminær flyt. Disse egenskapene muliggjør utvikling av en rekke nye teknologier [32].

### 2.5.1 Materialer

De første mikrochipene ble laget av glass eller silikon. Disse materialene har en rekke fordeler som at de leder varme godt, er kompatible med organiske løsemidler og har stabil elektroosmotisk mobilitet, og de er derfor fortsatt mye brukt [28]. På tross av dette har glass og silikon som material flere ulemper som høye fabrikasjonskostnader og at det benyttes farlige kjemikalier ved fabrikasjon [28]. Senere ble polymerer introdusert som material for fabrikasjon av mikrochips. De er billige og lett tilgjengelige, og har derfor blitt en av de mest brukte materialer for fabrikasjon av mikrochips [28]. Polymerer kan deles inn i tre grupper: termoplastiske polymerer, termoset polymerer og elastomere. Det skilles mellom de tre typene polymerer på bakgrunn av deres ulike fysiske egenskaper.

Termoplastiske polymerer er ikke kryss-linkede og kan reformes etter polymerisering. Dette gjøres ved oppvarming. En typisk termoplastisk polymer er polymetylmetakrylat (PMMA). Termoset polymerer består av kryss-linkede polymerkjeder som danner et rigid nettverk ved oppvarming eller bestråling. Dette rigide nettverket kan ikke reformeres når de først er polymerisert. Disse materialene er som regel stabile selv ved høye temperaturer, resistente mot en del organiske løsemidler og optisk transparente [28]. Elastomere består av kryss-linkede polymerkjeder som kan strekkes og komprimeres ved påføring av kraft, men går tilbake til sin opprinnelige form når kraften ikke lenger påføres. Den mest populære elastomeren til fabrikasjon av mikrochips er polydimetylsiloksan (PDMS). PDMS er flytende, og polymeriseres ved milde temperaturer (40-70°C) til et fast, elastisk materiale. Fordeler med PDMS som materiale for fabrikasjon av mikrochips er at det er billig og enkelt i fabrikasjon. I tillegg er PDMS gasspermeabel, og er dermed kompatibel med cellekulturer. Dette gjør at mikrochips laget av PDMS kan brukes til forskning på celler, celle screening og biokjemisk analyse [33]. PDMS har også noen begrensinger, som at det ikke er kompatibelt

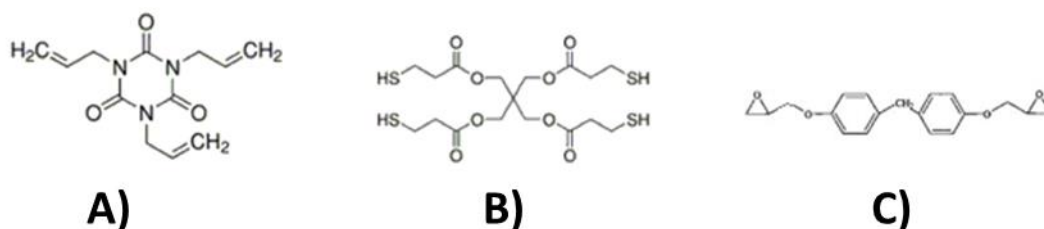


med organiske løsemidler. Det kan også forekomme adsorpsjon av små hydrofobe molekyler og biomolekyler til kanalveggene og endringer i konsentrasjon av løsningen på grunn av fordampning av vann gjennom kanalveggen [28].

### 2.5.1.1 Thiol-ene polymerer

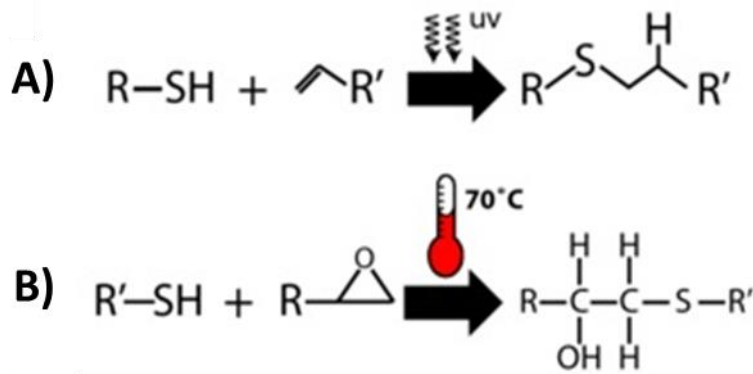
Thiol-ene er en termoset polymer som brukes mye i industrien. Reaksjonen mellom allyl-grupper og thiol-grupper gir thiol-ene. Thiol-ene polymeriseres raskt og er en såkalt "click" reaksjon [34]. "Click" reaksjoner karakteriseres ved at de er raske, enkle å bruke og rense opp, regiospesifikke og gir høye utbytter [35].

Ved blanding av de to monomere i et støkiometrisk forhold vil thiol-ene bli fullstendig polymerisert med UV-lys, og bli et stivt materiale. Dersom det derimot er et ikke-støkiometrisk forhold vil ikke materialet bli fullstendig polymerisert da det er overskudd av noen funksjonelle grupper. For ikke-støkiometrisk thiol-ene brukes betegnelsen OSTE, som står for "off-stoichiometric thiol-ene" [34]. Ved å tilsette epoksy monomer til OSTE dannes materialet OSTE+ (off-stoichiometric thiol-ene epoxy). Dette materialet har evnen til å reagere med nesten hvilken som helst tørr overflate, og muliggjør binding til materialer. Figur 7 viser strukturformelen til thiol, allyl og epoksy monomeren.



Figur 7: A) Allyl monomer, B) thiol monomer, C) epoksy monomer [34].

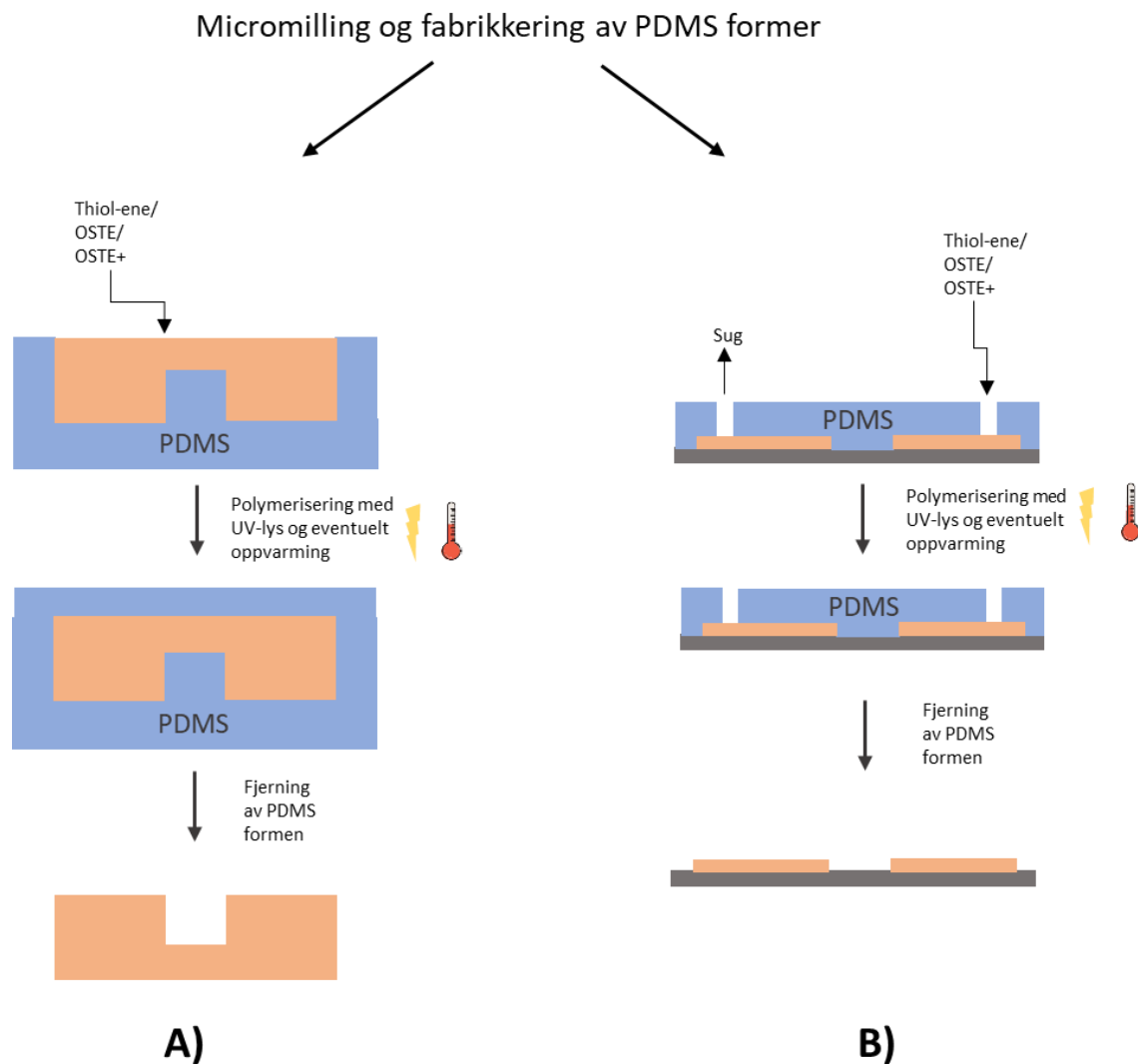
Polymeriseringen av OSTE+ foregår i to trinn. I det første trinnet polymeriseres materialet med UV-lys. Her reagerer thiol og allyl monomere fullstendig og danner et fleksibelt materiale som er godt egnet for binding til andre materialer (Figur 8A). I det andre steget reagerer thiol og epoksy monomere. Reaksjonen skjer ved romtemperatur, men kan akselereres ved oppvarming til ca. 70°C (Figur 8B). Etter det andre trinnet blir materialet helt stivt [36].



Figur 8: Polymerisering av OSTE+. A) Første trinn: UV-lys, B) andre trinn: oppvarming. Modifisert fra [36].

## 2.5.2 Fabrikasjonsmetoder

En vanlig metode for fabrikasjon av mikrochips er two-step replica molding. Først fabrikkeres ”master” former, ofte ved hjelp av mikromilling [37]. Mikromilling er en fabrikasjonsmetode som benytter et roterende verktøy (endmill) som fjerner materiale fra et startmateriale avhengig av hvilke strukturer man vil lage i startmaterialet. Systemet for mikromilling består av en arbeidsplate hvor startmaterialet plasseres, en endmill som fjerner materiale og en spindel som sikrer rotasjon av endmill [38]. Fra denne ”master” formen lages det en PDMS form som videre brukes til å fabrikere mikrochip med thiol-ene/OSTE/OSTE+ (Figur 9A) [37]. Injection molding er en annen fabrikasjonsmetode hvor polymeren injiseres inn i en form med et hulrom med det ønskede designet (Figur 9B) [38].



Figur 9: Fabrikasjonsmetoder for mikrochips, A) two-step replica molding, B) injection molding.

### 2.5.3 Plasmaaktivering av overflater

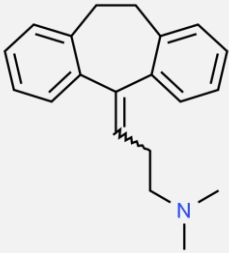
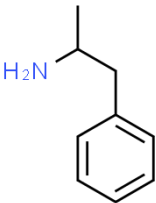
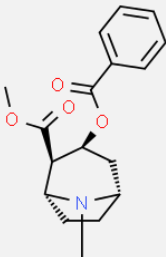
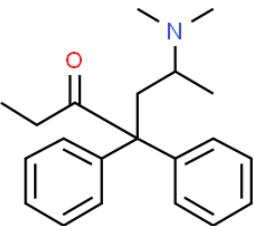
Plasmaaktivering av overflater er en kraftfull prosess som modifierer overflatekarakteristikken til materialer. Teknikken kan brukes både for metalliske overflater og polymermaterialer [39]. Aktiveringen kan skje med kaldt eller varmt plasma. Aktivering med plasma øker fukteegenskapene til overflaten av materialet og bedrer materialets mekaniske styrke [39]. Behandling med plasma har vist å introdusere polare grupper som C=O, C-O og COH på polypropylenoverflater [40].

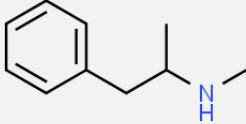
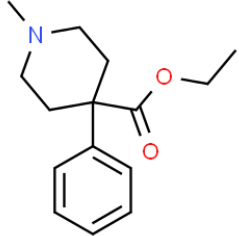
# 3 Eksperimentelt

## 3.1 Modellanalytter

Modellanalytter som ble brukt i dette arbeidet er oppsummert i Tabell 1.

Tabell 1: Molekylstruktur, log P, pKa og molekylvekt for modellanalyttene.

Modellanalytt	Molekylstruktur <sup>1)</sup>	log P <sup>2)</sup>	pKa <sup>2)</sup>	Molekylvekt (Da) <sup>1)</sup>
Amitriptylin		4,81	9,76	277,18
Amfetamin		1,80	10,01	135,10
Kokain		2,28	8,85	303,15
Metadon		5,01	9,12	309,21

<b>Metamfetamin</b>		2,24	10,21	149,12
<b>Petidin</b>		2,46	8,16	247,16

<sup>1)</sup>Molekylstrukturer og molekylvekt er hentet fra: <http://www.chemspider.com/>.

<sup>2)</sup>log P og pKa er hentet fra: <https://chemicalize.com/#/calculation>.

## 3.2 Utstyr

Tabell 2: Oversikt over utstyr brukt.

Utstyr	Produktnavn	Bruk
<b>Micromilling machine</b>	Minitech 3 CNC micromilling machine (Minitech Machinery Corp., Norcross, GA, USA)	Mikromilling av PMMA plater.
<b>UV-lampe</b>	Dymax EC 5000 Series UV curing flood lamp (Dymax Corp, Torrington, CT, USA)	Festing av prøvereservoar og bufferreservoar til EME-chipene.
<b>UV-lampe</b>	Collimated UV lamp LS-100-3C2 (Bachur & Associates, Santa Clara, CA, USA)	Polymerisering av thiol-ene og OSTE+ ved fabrikasjon av EME-chipene.
<b>Plasma aktivator</b>	Atto plasma chamber (Diener electronic GmbH + Co. KG, Ebhausen, Germany)	Plasmabehandling av polypropylenmembranen.
<b>Laserkutter</b>	Epilog Mini18 CO <sub>2</sub> laser (Epilog laser, Golden, CO, USA)	Laserkutting av PMMA plater ved fabrikasjon av PDMS former.
<b>CE-instrument</b>	Agilent CE. Ser. No. DE01602316 (Santa Clara, CA, USA)	Instrument for kapillærelektroforese.
<b>Strømforsyning</b>	Programmable power supply ISO-TECH, IPS-603. Ser. No 703D153G1	Strømforsyning ved EME.

	(Southport, England)	
<b>Kapillærkutter</b>	Biccotest cutter. Ser. No 16976 EN. (Biccotest limited, Cheshunt, England)	Kutting av kapillærene.
<b>Sveipelektronmikroskop</b>	SEM TM3030 Tabletop Microscope (Fuji Electric FA E.L. Breaker, Japan)	Undersøking av interface på EME-chipene.
<b>Mikroskop</b>	Nikon Eclipse Ti fluorescence microscope (Tokyo, Japan)	Monitorering av ekstraksjon av Rhodamine 6G.
<b>Mikroskop</b>	Proscan Microscope (Rockland, MA, USA)	Tilpassing av kapillær ved fabrikasjon av EME-chipene.

### 3.3 Programvare

Tabell 3: Oversikt over programvare brukt.

Programvare	Bruk
Autodesk Inventor Professional 2015 (San Rafael, CA, USA)	Tillaging av design for EME-chipene.
Agilent ChemStation for CE/CE-MS systems (Agilent technologies, California, USA)	Kontrollering av CE-systemet.
CorelDraw 12 (Corel Corporation, Ottawa, Canada)	Tillaging av design for laserkutting.
Graphpad Prism 8.1.1 (GraphPad Software Inc, California, USA)	Tillaging av grafer.

### 3.4 Kjemikalier og materialer

Tabell 4: Oversikt over kjemikalier og materialer brukt.

Navn	Tilvirker/leverandør
Poly(metylmetakrylat) PMMA plater	Nordisk plast (Randers, Danmark)
Sylgard 184-PDMS elastomer kit	Dow Corning (Midland, MI, USA)
Ostemer 322, Crystal clear, component A	Mercene Labs AB (Stockholm, Sverige)
Ostemer 322, Crystal clear, component B	Mercene Labs AB (Stockholm, Sverige)
Methadone hydrochloride	Nordisk Droge og Kemikalie A/S (København,

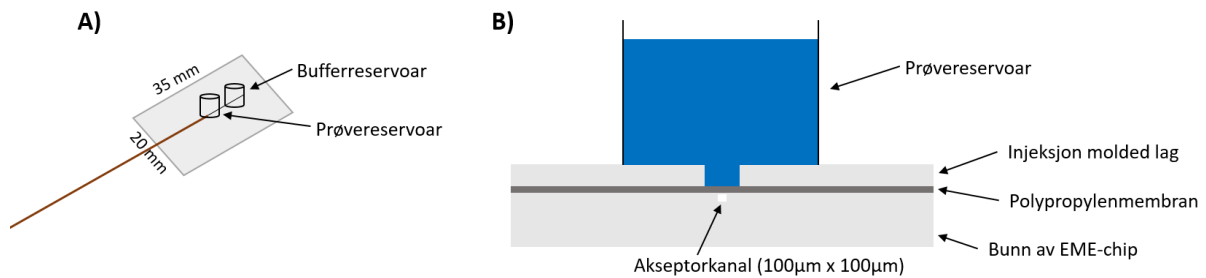
	Danmark)
Cocaine hydrochloride	Nordisk Droge og Kemikalie A/S (København, Danmark)
Amphetamine sulfate	Nordisk Droge og Kemikalie A/S (København, Danmark)
Methamphetamine hydrochloride	Nordisk Droge og Kemikalie A/S (København, Danmark)
Pethidine hydrochloride	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Amitriptyline hydrochloride	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Rhodamine 6G	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Deionisert vann (dH <sub>2</sub> O, 18 MΩ cm)	Milli-Q unit (Millipore, Massachusetts, USA)
Methanol	VWR chemicals (Gliwice, Polen)
Kaliumdihydrogenfosfat	Merck KgaA (Darmstadt, Tyskland)
Ortho-phosphoric acid	Merck KgaA (Darmstadt, Tyskland)
2-nitrophenyl octyl ether (NPOE)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Porøs polypropylenmembran	Celgard (Charlotte, NC, USA)
Norland blocking adhesive 107	Thorlabs (Newton, NJ, USA)
Kapillær, polymicro technologies	CM Scientific (Silsden, United Kingdom)

### 3.5 Løsninger

Stamløsninger av amfetamin, amitriptylin, metamfetamin, metadon, kokain og petidin ble tillaget i konsentrasjon på 1 mg/mL, løst i metanol og oppbevart i kjøleskap (4°C). Fra disse stamløsningene ble det tillaget oppløsninger i fosfatbuffer av de seks modellanalyttene. Fosfatbuffer ble tillaget ved å blande kaliumdihydrogenfosfat med deionisert vann til bufferkonsentrasjon 40 mM. Denne løsningen ble så pH-justert med ortho-fosforsyre til pH 2,7.

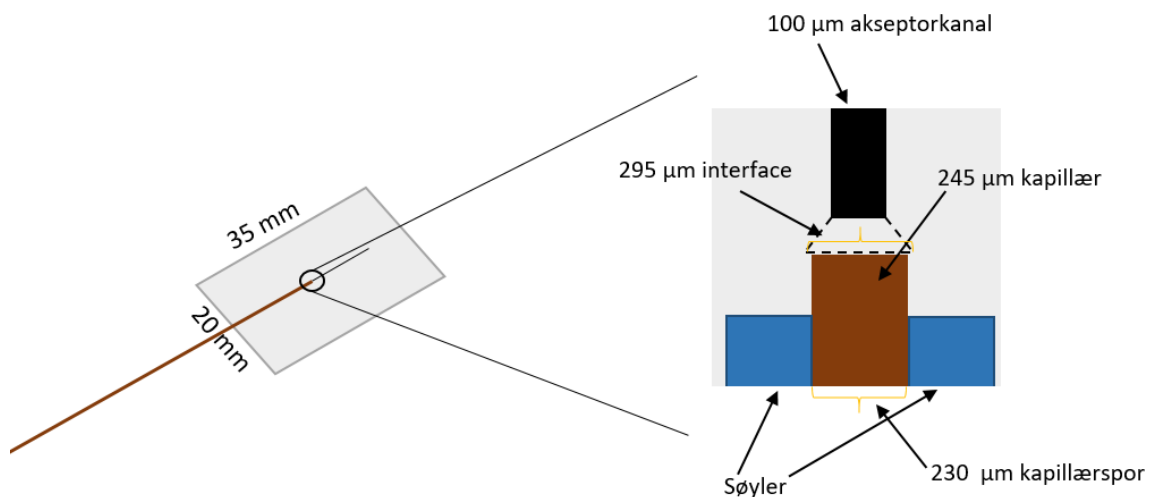
### 3.6 Design og fabrikking av EME-chipen

Den bruksferdige EME-chipen var 35 mm x 20 mm og var sammensatt av tre lag. Det nederste og øverste laget var laget av materialet OSTE+, mens det midterste laget var en polypropylenmembran. EME-chipen hadde en akseptorkanal på 100 µm x 100 µm x 10 mm. Over akseptorkanalen var det plassert to reservoar som fungerte som prøvereservoar og bufferreservoar (Figur 10).



**Figur 10:** A) Prinsippskisse av EME-chip, B) illustrasjon av tverrsnitt av EME-chipen ved ekstraksjonssonen.

Bunnen av EME-chipen var 1 mm tykk, og bestod av et kapillærspor (som var avgrenset av små søyler), en interface og en akseptorkanal. Kapillærsporet var 230 µm bredt, og akseptorkanalen var 100 µm bred. Kapillæret var 245 µm ytre diameter og 100 µm indre diameter. Kapillæret og akseptorkanalen var koblet sammen via en interface (Figur 11).



**Figur 11:** Interface for EME-chipen.

Det neste laget var en polypropylenmembran. Denne polypropylenmembranen ble laminert på akseptorkanalsiden av bunnen av EME-chipen. Porene i polypropylenmembranen ble fylt

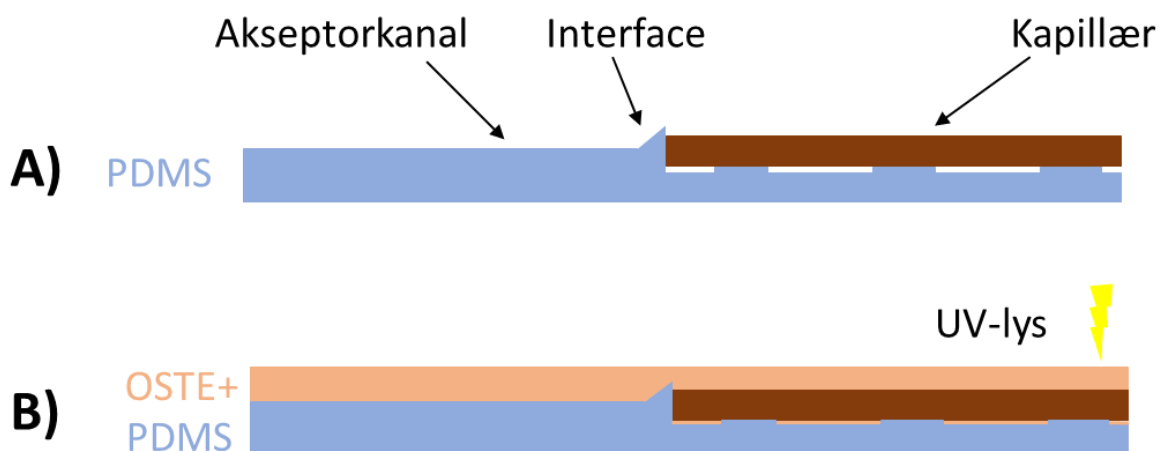


med OSTE+ ved injection molding, og dette ble det tredje og øverste laget av EME-chipen. Porene i hele polypropylenmembranen ble fylt, utenom to små sirkler på 700  $\mu\text{m}$  og 1000  $\mu\text{m}$  over akseptorkanalen. Disse sirklene fungerte som henholdsvis ekstraksjonsområde og som adgang ned til akseptorkanalen for bufferløsning. Til slutt ble det limt på to glassreservoar over de to sirklene. Et prøvereservoar og et bufferreservoar som begge rommet 70  $\mu\text{l}$ .

### 3.6.1 Protokoll for fabrikking av EME-chipen

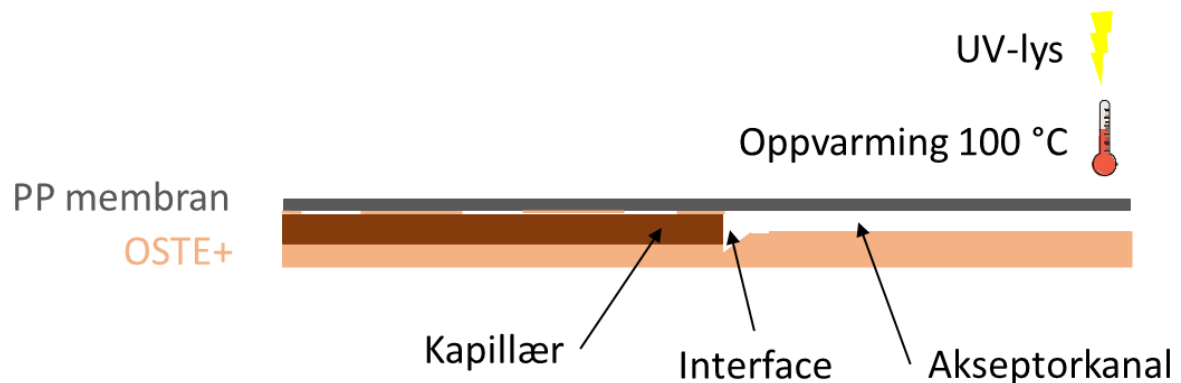
De to lagene som var fabrikkert med OSTE+ ble laget ved hjelp av former laget av polydimetylsiloksan (PDMS). Disse formene ble laget ved å først tegne et design i en programvare (Autodesk Inventor). Dette designet ble så freset i PMMA plater som var 5 mm tykke, og ved hjelp av disse ble det støpt PDMS former. PDMS formene ble så brukt til å støpe EME-chipene med OSTE+. Fabrikkingen av EME-chipen vil i det følgende beskrives i detalj. Alle illustrasjonene er illustrert som et tverrsnitt på langs av EME-chipen.

Bunnen av EME-chipen ble laget ved å finjustere et kapillær i kapillærsporet i PDMS formen til å passe med interface og akseptorkanalen. Dette ble gjort under mikroskop ved hjelp av en «micrometre stage» (Se vedlegg 3 og 4 for detaljer). Deretter ble hele PDMS formen fylt med OSTE+, og polymerisert med UV-lys i 70 sekunder. Den ble så snudd og polymerisert med UV-lys i 30 sekunder på den andre siden (Figur 12).



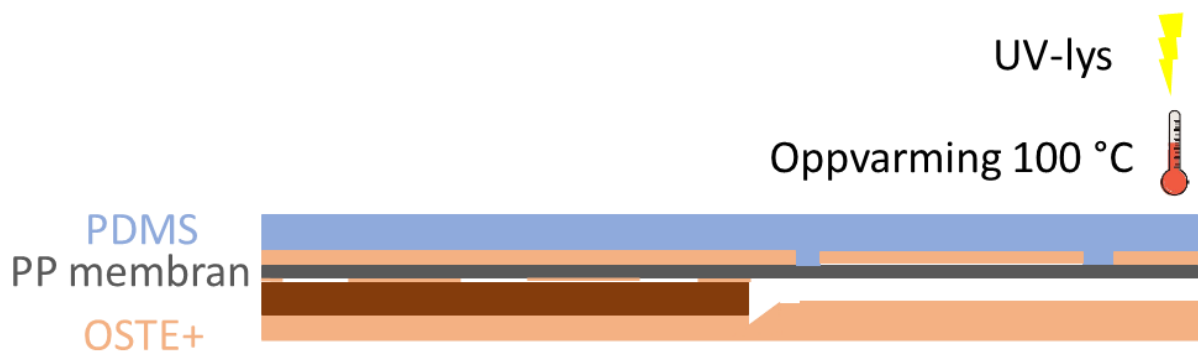
Figur 12: A) Finjustering av kapillær i PDMS form, B) fylling av OSTE+ og polymerisering med UV-lys.

Det andre laget var en polypropylenmembran som ble laminert på av bunnen av EME-chipen. EME-chipen ble tatt ut av PDMS formen, og polypropylenmembranen ble laminert på akseptorkanalsiden (Figur 13). Polypropylenmembranen var plasmabehandlet i 60 sekunder på den siden som vendte ned mot bunnen for å muliggjøre festing til OSTE+ materialet. EME-chipen ble så polymerisert under UV-lys i 100 sekunder på OSTE+ siden, og deretter ved 100°C i 1-2 timer.



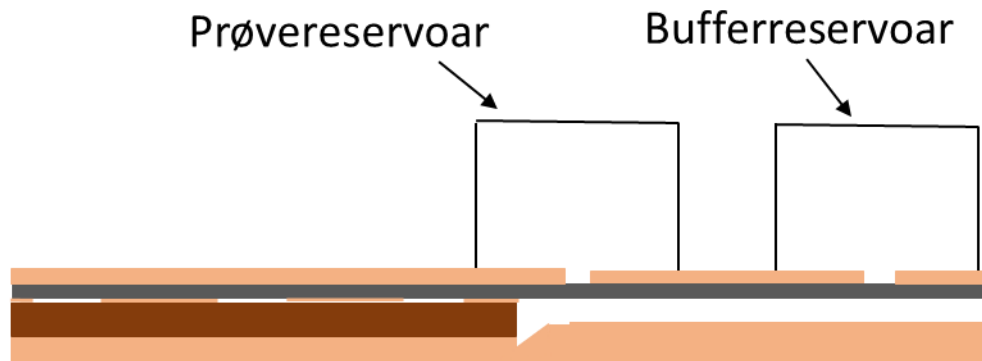
**Figur 13: Laminering av polypropylenmembranen på akseptorkanalsiden av EME-chipen og påfølgende polymerisering med UV-lys og oppvarming.**

Det øverste og siste laget ble fabrikkert ved injection molding (Figur 14). Dette laget var 125  $\mu\text{m}$  tykt og bestod av OSTE+. PDMS formen som ble brukt hadde to hull hele veien gjennom på 700  $\mu\text{m}$  i diameter i begge ender. PDMS formen ble tilpasset over polypropylenmembransiden av EME-chipen slik at de to sirkulære områdene på 700  $\mu\text{m}$  og 1000  $\mu\text{m}$  var plassert rett over akseptorkanalen. En liten dråpe OSTE+ ble så påført over det ene hullet i PDMS formen. Sug ble påført hullet i den andre enden av PDMS formen ved hjelp av en vakuumpumpe. OSTE+ fylte så porene i polypropylenmembranen, utenom de to sirkulære områdene over akseptorkanalen.



**Figur 14: Injection molding med OSTE+ og påfølgende polymerisering med UV-lys og oppvarming.**

Det siste steget i fabrikasjonen var å feste på to glassreservoar ved hjelp av et lim som stivnet ved bestråling med UV-lys. Et prøvereservoar over sirkelen for ekstraksjon og et bufferreservoar over sirkelen for adgang ned til akseptorkanalen (Figur 15).



Figur 15: Festing av prøvereservoar og bufferreservoar på toppen av EME-chipen.

## 3.7 Betingelser for ekstraksjon av rhodamine 6G

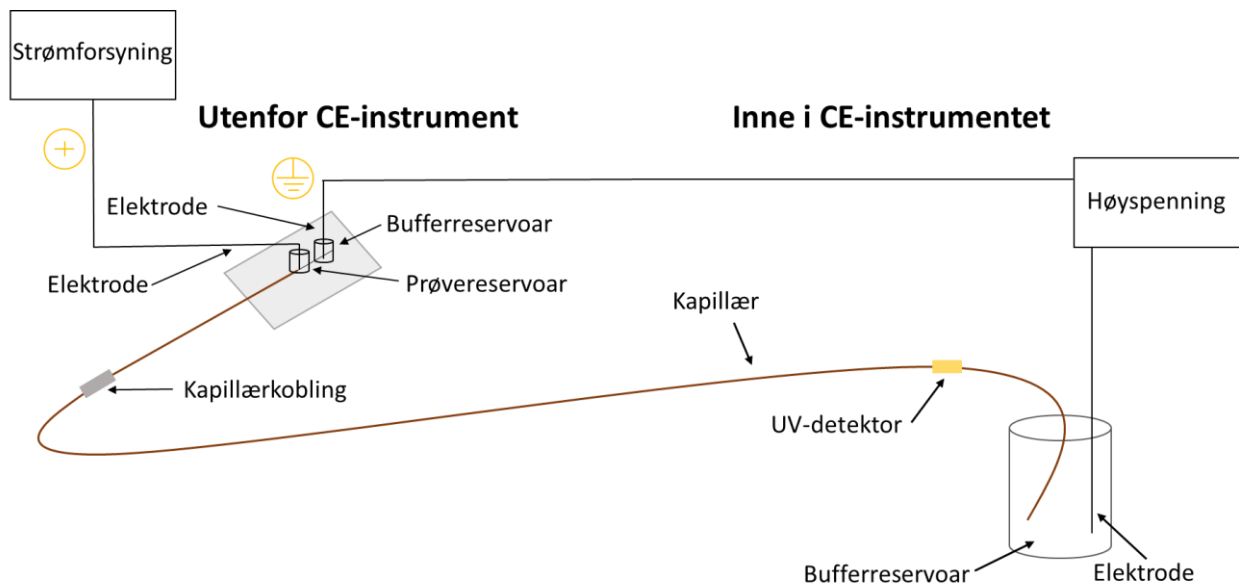
Rhodamine 6G ble fortynnet med 10 mM maursyre med pH 2,9 til en konsentrasjon på 0,1 mM. Bufferreservoaret ble fylt med 10 mM maursyre som akseptorfase, og 2-nitrofenyloktyleter (NPOE) ble immobilisert i porene til polypropylenmembranen. 50  $\mu$ L prøveløsning ble tilsatt prøvereservoaret. Negativ elektrode ble plassert i bufferreservoaret, og positiv elektrode ble plassert i prøvereservoaret. Spenning på 15 V ble påsatt i 60 sekunder. Etter ekstraksjonen ble prøveløsningen fjernet fra prøvereservoaret, og et fluorescensmikroskop ble bruk til å undersøke om rhodamine 6G hadde blitt ekstrahert over SLM og til akseptorkanalen.

## 3.8 Oppsett av EME og CE med EME-chipen

### 3.8.1 Oppsett for EME

Under EME ble negativ elektrode plassert i bufferreservoaret på EME-chipen, og positiv elektrode plassert i prøvereservoaret. På den måten ble positivt ladde modellanalytter

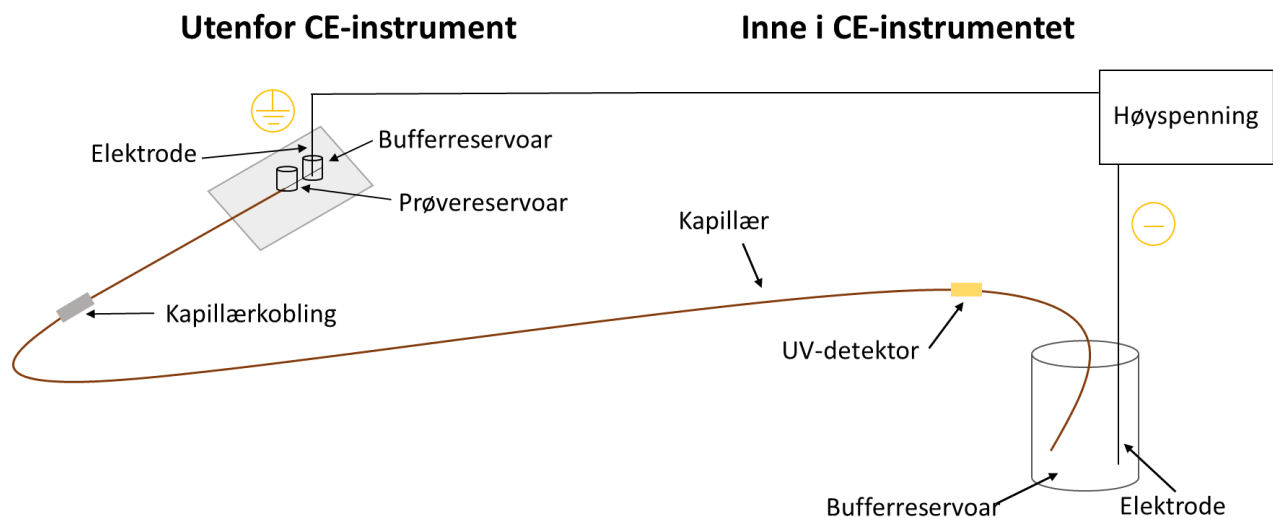
ekstrahert fra prøveløsningen, over SLM og til akseptorkanalen ved hjelp av en strømforsyning (Figur 16). Betingelsene for EME er oppsummert i Tabell 5.



Figur 16: Oppsett ved elektromembranekstraksjon (EME) med EME-chipen.

### 3.8.2 Oppsett for CE

Under CE ble positiv elektrode plassert i bufferreservoaret på EME-chipen, og negativ elektrode ble plassert i bufferreservoaret inne i CE-instrumentet. De positivt ladde modellanalyttene vandret mot negativ elektrode, og ble detektert med en UV-detektor (Figur 17). Kapillæret i EME-chipen og kapillæret inne i CE-instrumentet hadde ulik ytre diameter, og de ble derfor koblet sammen med en kapillærkobling. Betingelsene for CE er oppsummert i Tabell 6.



Figur 17: Oppsett ved kapillærelektroforese (CE) med EME-chipen.

## 3.9 Ekstraksjonsbetingelser

Tabell 5: Oppsummering av optimale ekstraksjonsbetingelser for EME.

<b>Prøveløsning</b>	Prøveløsning med seks modellanalytter, løst i 40 mM fosfatbuffer med pH 2,7. Konsentrasjon: 10 µg/mL.
<b>Akseptorfase</b>	40 mM Fosfatbuffer med pH 2,7
<b>Ekstraksjonsspenning</b>	15 V
<b>Ekstraksjonstid</b>	60 sekunder
<b>Organisk væskemembran (SLM)</b>	2-nitrofenyloktyleter (NPOE)

### 3.9.1 Optimalisering av ekstraksjonsspenning og ekstraksjonstid

I optimaliseringsforsøkene ble det undersøkt hvilken ekstraksjonsspenning og hvilken ekstraksjonstid som var optimal for analysen. I alle forsøkene ble det benyttet en prøveblanding med konsentrasjon 10 µg/mL av de seks modellanalyttene. Modellanalyttene var løst i 40 mM fosfatbuffer pH 2,7. Det ble påsatt 50 µl prøve i prøvereservoaret, og akseptorfase var 40 mM fosfatbuffer pH 2,7. Ekstraksjonsspenninger mellom 5 og 40 V ble

undersøkt. Ekstraksjonstidene som ble undersøkt var 30 s, 45 s, 60 s og 90 s. Forsøk med spenning og tid ble gjort med tre parallelle målinger for hvert datapunkt.

## 3.10 CE-betingelser

Tabell 6: Oppsummering av CE-betingelsene.

<b>Separasjonsbuffer</b>	40 mM fosfatbuffer, pH 2.7
<b>Separasjonsspenning</b>	20 kV
<b>Modus</b>	Positiv
<b>Temperatur</b>	25°C
<b>Pre-kondisjonering</b>	3 minutter skylling med buffer
<b>Deteksjon</b>	UV, 200 nm

### 3.10.1 Optimalisering av separasjonsspenning

Før EME-chipen ble koblet til CE ble det undersøkt hvilken separasjonsspenning som var optimal for analysen. Spenninger mellom 5-30 kV ble undersøkt. Forsøkene ble gjort med tre parallelle målinger for hvert datapunkt.

## 3.11 Beregning av repeterbarhet, oppkonsentreringsfaktor og utbytte

### 3.11.1 Repeterbarhet

Repeterbarhet ble beregnet ved relativt standardavvik (RSD) av gjentatte analyser (n=3). RSD ble beregnet med Ligning 6 [25]:

$$\text{RSD} = \frac{s}{x} \cdot 100 \%$$

Ligning 6

Hvor  $s$  er standardavviket og  $\bar{x}$  er gjennomsnittet. RSD ble utregnet for de ulike ekstraksjonsspenningene og ekstraksjonstidene.

### 3.11.2 Oppkonsentreringsfaktor

Oppkonsentreringsfaktor (EF) etter EME av de seks modellanalyttene ved ulike ekstraksjonsspenninger og ekstraksjonstider ble beregnet med Ligning 7 [25]:

$$EF = \frac{C_e}{C_p} \quad \text{Ligning 7}$$

Der  $C_e$  er konsentrasjon av analytt i ekstraktet, og  $C_p$  er opprinnelig konsentrasjon av analytt i prøven.

### 3.11.3 Utbytte

Utbytte (R) etter EME og CE av de seks modellanalyttene ved ulike ekstraksjonsspenninger og ekstraksjonstider ble beregnet med Ligning 8 [25]:

$$R = \frac{C_e V_e}{C_p V_p} \cdot 100\% = \frac{V_e}{V_p} \cdot EF \cdot 100\% \quad \text{Ligning 8}$$

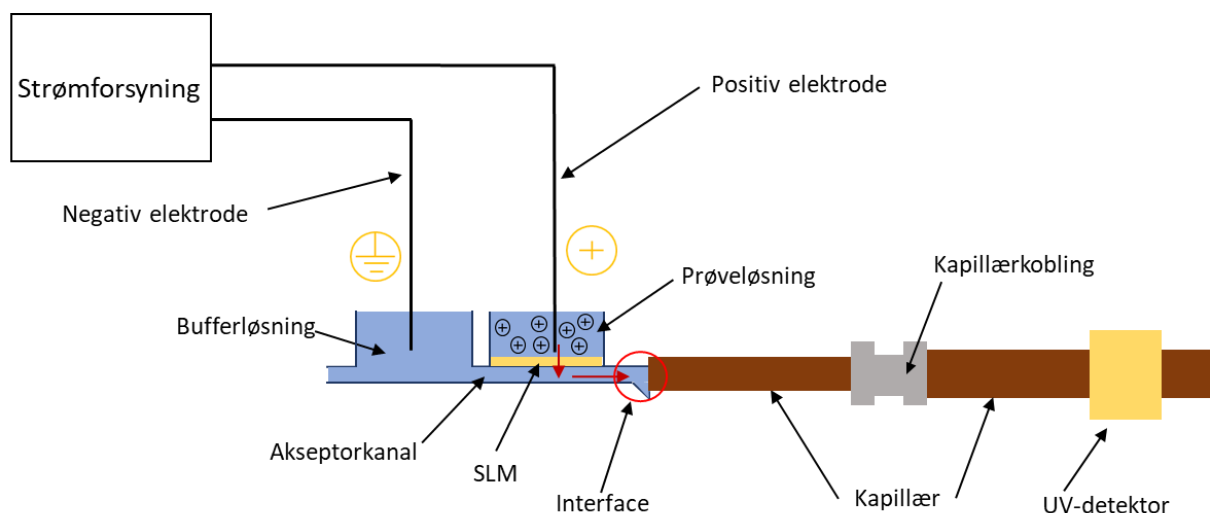
Der  $V_e$  er volumet av ekstrakt og  $V_p$  er volum av prøven.

# 4 Resultat og diskusjon

## 4.1 Teknisk utvikling av mikrochips

### 4.1.1 Konsept og utfordringer

I dette masterprosjektet ble en mikrochip for elektromembranekstraksjon (EME) og påfølgende kapillærelektroforese (CE) og UV-deteksjon utviklet. En prøveløsning med positivt ladde modellanalytter ble ekstrahert gjennom en SLM fra en prøveløsning og over i en akseptorkanal som inneholdt sur bufferløsning. Selve ekstraksjonen ble drevet av et elektrisk felt over SLM. Etter ekstraksjonen vandret de positivt ladde modellanalyttene fra akseptorkanalen, gjennom en interface og inn i kapillæret hvor de ble separert ved CE og detektert ved UV-deteksjon (Figur 18).



**Figur 18: Prinsipp for EME på chip med påfølgende CE-separasjon og UV-deteksjon.**

Elektromembranekstraksjon (EME) på chip har den fordelen at man kan oppnå en veldig høy oppkonsentrering på grunn av små akseptorvolum i forhold til prøvevolum. Typisk har man et prøvevolum på 10-100 mikroliter, og akseptorvolum på 5-10 nanoliter. En utfordring er å håndtere så små akseptorvolum. Ved overføring til for eksempel væskechromatografi (HPLC) vil prøven i stor grad fortynnes på grunn av den paraboliske flytprofilen, og en får ikke utnyttet den høye oppkonsentreringen som oppnås under EME. Ved å utvikle en EME-chip koblet direkte til kapillærelektroforese (CE) og UV-deteksjon kan denne fortynningen unngås. På grunn av at væskemembranens areal er svært begrenset ved EME på chip kan man oppnå

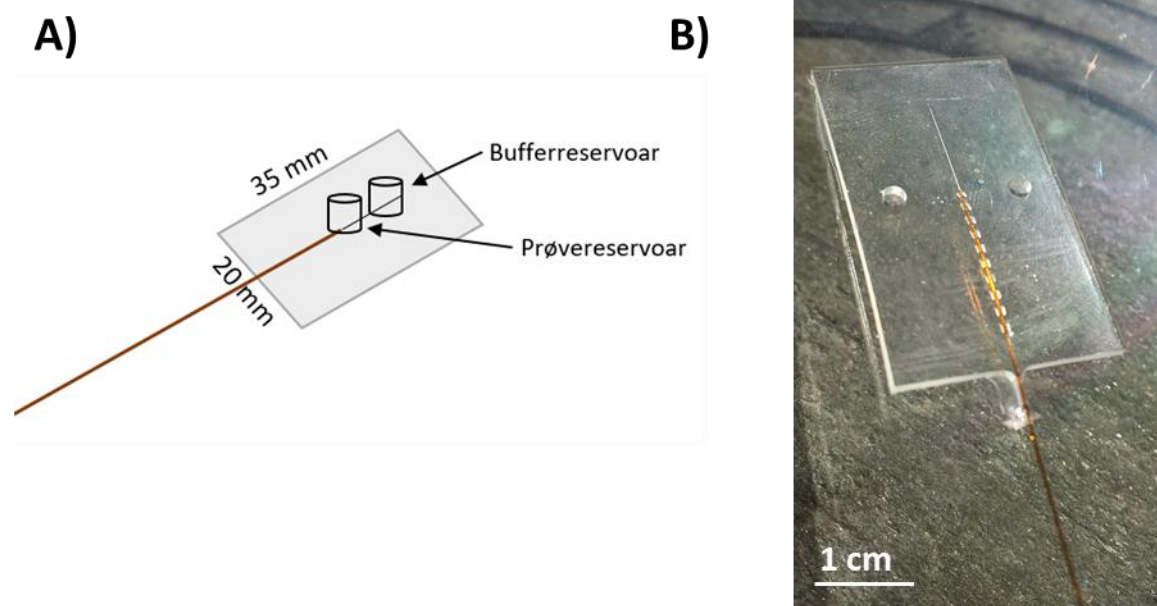


myk ekstraksjon. Ved myk ekstraksjon er ekstraksjonsutbyttet lavere enn 1-2 %. Når ekstraksjonsutbyttet er så lavt påvirker ekstraksjonen ikke likevektene i systemet, og dette kan være til stor nytte ved for eksempel måling av legemiddelmetabolisme med ulike organ-on-a-chip system.

Ved utvikling av en slik EME-chip følger det med noen utfordringer. Det er svært krevende teknisk å koble akseptorkanalen med kapillæret uten at det fører til problemer. Problemene er knyttet til dødvolum, lekkasje i EME-chipen og blokkering av kapillæret, og dette ble en stor del av oppgaven å løse. Det er også teknisk krevende å koble to kapillær av ulik ytre diameter, og dette ble gjort ved hjelp av en kommersiell løsning. Det følger også med utfordringer med å unngå strømbrudd ved CE.

Utviklingen av EME-chipen involverte fire ulike design. De fire designene hadde både likheter og ulikheter. Alle chipene var sammensatt av tre lag, som beskrevet i kapittel 3.6. Ulikhetene mellom de fire chipene var koblingen mellom akseptorkanalen og kapillæret (interface). Denne var forskjellig for alle de fire chipene. Interface er den delen av EME-chipen som er ringet rundt med rød sirkel i Figur 18. I tillegg ble materialet for fabrikasjon endret fra thiol-ene til OSTE+ fra chip 2 til chip 3. En annen ulikhet var at chip 4 (den bruksferdige EME-chipen) hadde tre små søyler i midten av kapillærsporet som var nødvendige for å unngå lekkasje i EME-chipen. Utviklingen av den bruksferdig EME-chipen vil i det følgende beskrives i detalj.

## 4.1.2 Chip 1



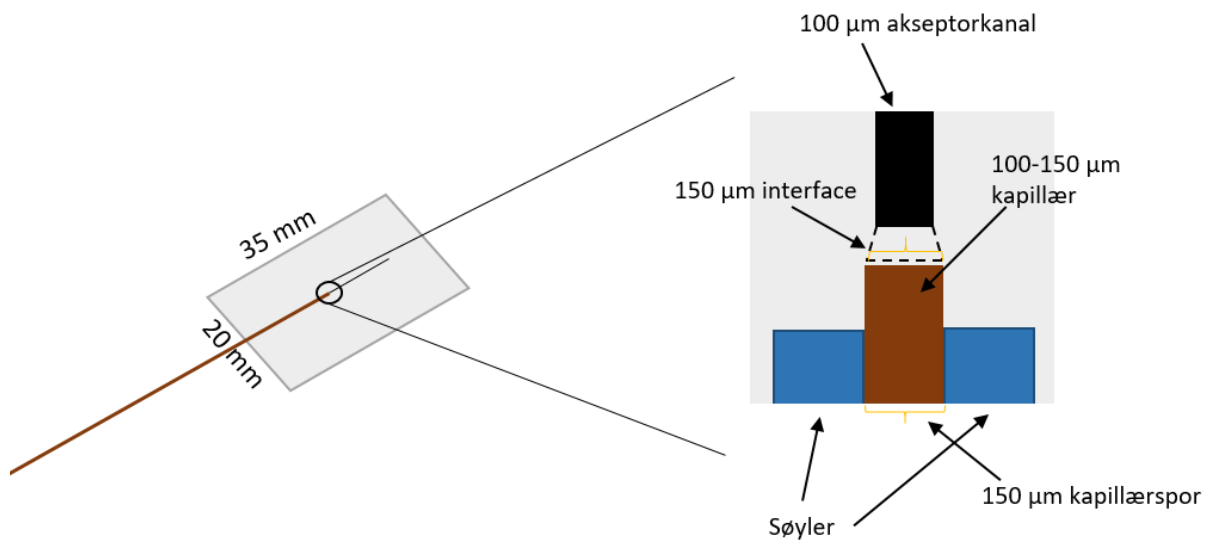
**Figur 19:** A) Prinsippskisse av chip 1, B) foto av delvis ferdig chip 1. Merk at de to reservoarene og polypropylenmembranen ikke er festet på fordi bare bunnen av chip 1 ble fabrikkert.

Chip 1 var laget av materialet thiol-ene og var 35 mm x 20 mm. Chipen hadde to reservoar som fungerte som prøvereservoar og bufferreservoar. Begge reservoarene hadde adgang ned til en akseptorkanal (Figur 19). I prøvereservoaret ble prøveløsningen påsatt og elektromembranekstraksjon (EME) ble utført fra prøveløsningen til akseptorfase. Bufferreservoaret ble fylt med en bufferløsning som fungerte både som akseptorfase i EME og som separasjonsbuffer i CE.

Chip 1 bestod av tre lag, som beskrevet i kapittel 3.6. Den porøse polypropylenmembranen, som var det midterste laget av chipen fungerte som bærer for den organiske væskemembranen (SLM). Polypropylenmembranen var hydrofob sammenlignet med thiol-ene, og den måtte dermed plasmabehandles på den ene siden (den siden som vendte ned mot thiol-ene) for å bindes fast til thiol-ene [40]. Uten denne plasmabehandlingen kunne membranen lett rives av. Porene til polypropylenmembranen ble fylt med thiol-ene, bortsett fra en sirkel under prøvereservoaret og en sirkel under bufferreservoaret. Sirkelen under prøvereservoaret var 700  $\mu\text{m}$  i diameter og denne sirkelen definerte arealet og volumet av SLM. I dette området ble polypropylenmembranen holdt porøs slik at NPOE kunne immobiliseres i porene. Sirkelen under bufferreservoaret var 1000  $\mu\text{m}$  i diameter og her ble det laget et hull i

polypropylenmembranen slik at det var adgang fra bufferreservoaret og ned til akseptorkanalen.

Akseptorkanalen var  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 10\ \text{mm}$ . Den var koblet til kapillæret som ble bruk til kapillærelektroforese via en interface. Kapillæret lå i et kapillærspor som var  $150\ \mu\text{m}$  bredt og ble holdt i korrekt posisjon av små søyler (Figur 20).

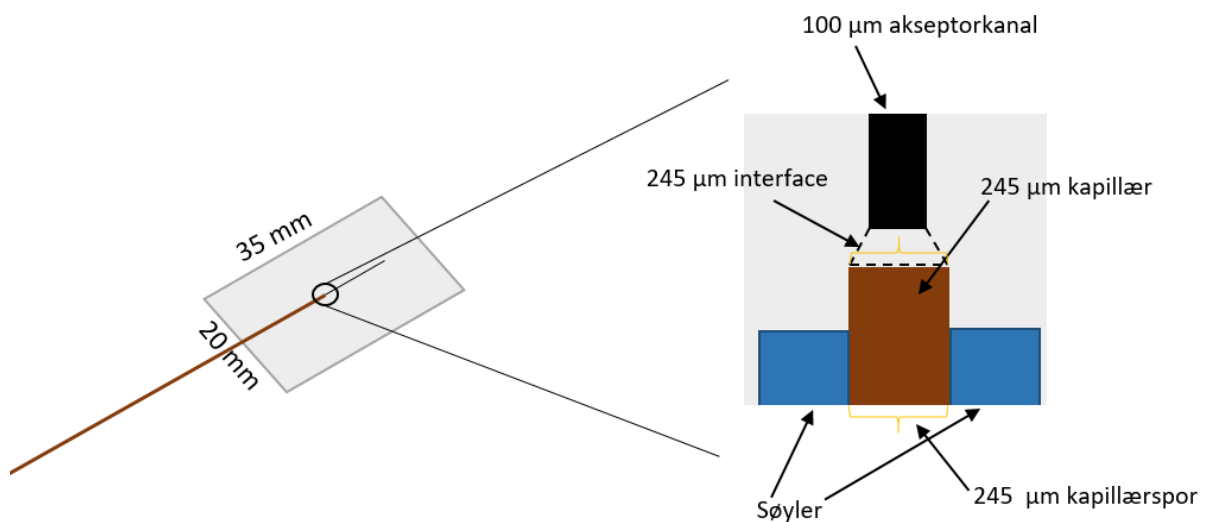


**Figur 20: Illustrasjon av interface for chip 1.**

Utfordringen med denne chipen var å lage en kobling mellom akseptorkanalen og kapillæret som ikke ga dødvolum. Løsningen på dette var å redusere den ytre diameteren til kapillæret som lå i kapillærsporet. Kapillæret var i utgangspunktet  $375\ \mu\text{m}$  ytre diameter. For at kapillæret skulle passe best mulig med akseptorkanalen som var  $100\ \mu\text{m}$  måtte den ytre diameteren reduseres ned mot  $100\ \mu\text{m}$ . Dette ble gjort ved å etse kapillæret med flussyre ned til en ytre diameter mellom  $100\text{-}150\ \mu\text{m}$ . Ved etsning med flussyre ble polyimidlaget og delvis kvartsmaterialet på kapillæret fjernet. Denne løsningen viste å gi utfordringer ved fabrikasjon av chipen. For det første ble kapillærene veldig skjøre og dermed vanskelige å arbeide med fordi de lett kunne brekke. For det andre var det vanskelig å kutte enden av kapillæret i rett vinkel. Tilnærmet rett vinkel var viktig for å ha en tett kobling mellom akseptorkanalen og kapillæret. Denne måten å fabrikere chipen på viste seg dermed å ikke være en robust løsning. Det ble ikke laget en komplett EME-chip, men bare bunnen av chipen, som vist på foto i Figur 19B.

### 4.1.3 Chip 2

For chip 2 ble det besluttet å benytte et ikke-etset kapillær for å unngå utfordringene fra chip 1, og dermed gjøre fabrikasjonen enklere. Chip 2 hadde et bredere kapillærspor slik at et ikke-etset kapillær kunne benyttes. Det ble benyttet et kapillær med ytre diameter 245  $\mu\text{m}$ , og kapillærsporet hadde derfor en bredde på 245  $\mu\text{m}$  slik at kapillæret kunne holdes i riktig posisjon. Dette krevde en liten endring av interface (Figur 21). Denne endringen ville føre til et større dødvolum, men gjorde fabrikasjonen mye enklere.

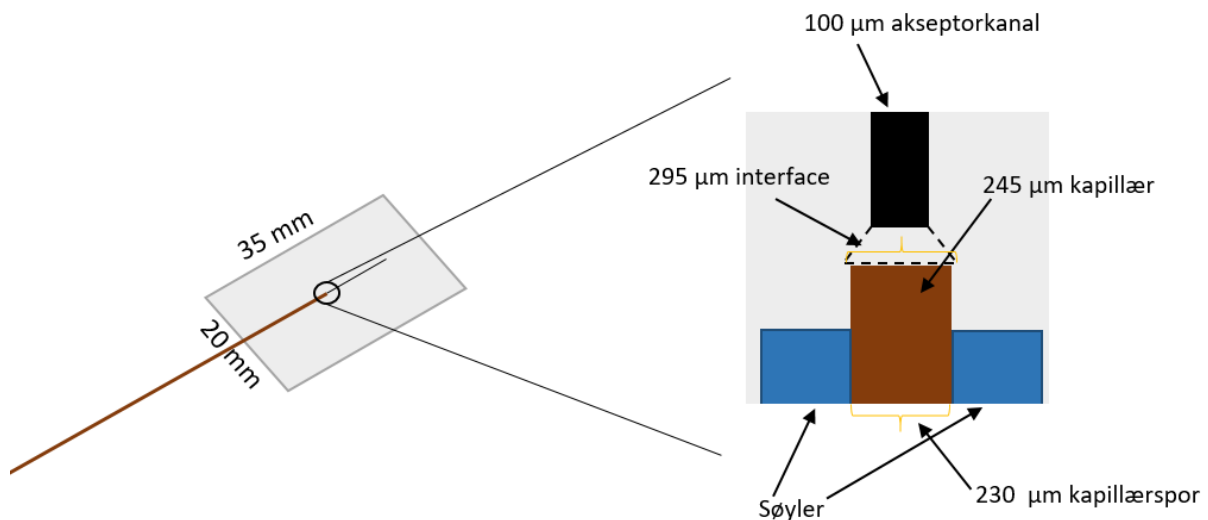


Figur 21: Illustrasjon av interface for chip 2.

Utfordringer ved fabrikasjon av chip 2 var at thiol-ene lakk inn i kapillæret, og dermed blokkerte det. Grunnen til dette var at kapillærsporet var litt for bredt sammenlignet med kapillæret, og dermed ble det ikke holdt i korrekt posisjon i kapillærsporet ved fylling av thiol-ene. I tillegg var interface litt for smal, og det var dermed vanskelig å tilpasse kapillæret i korrekt posisjon uten at det førte til lekkasje inn i kapillæret. På grunn av utfordringene med lekkasje inn i kapillæret, og dermed blokkering av kapillæret ble det ikke laget en bruksferdig EME-chip av chip 2.

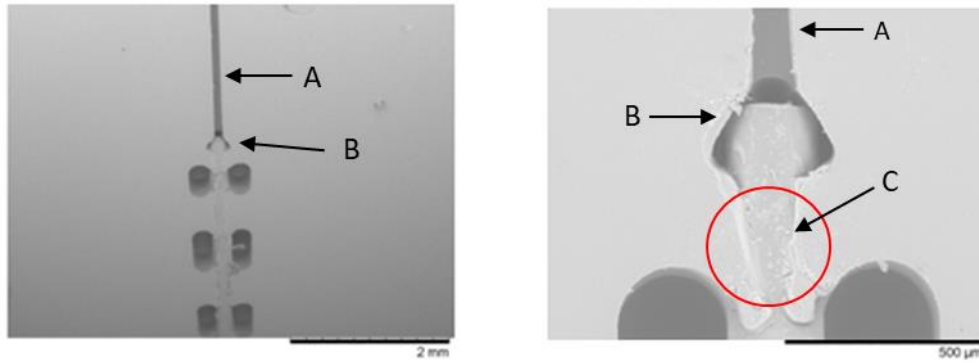
### 4.1.4 Chip 3

Chip 3 hadde et kapillærspor som var 230  $\mu\text{m}$  bredt. Det var altså smalere enn for chip 2. Dette var for å sørge for at kapillæret ble holdt i korrekt posisjon mellom søylene i kapillærsporet. På denne måten kunne kapillæret justeres perfekt til å passe med interface, og lekkasje inn i kapillær ble unngått. Interface ble også laget litt bredere for å unngå lekkasje av thiol-ene inn i kapillæret (Figur 22).



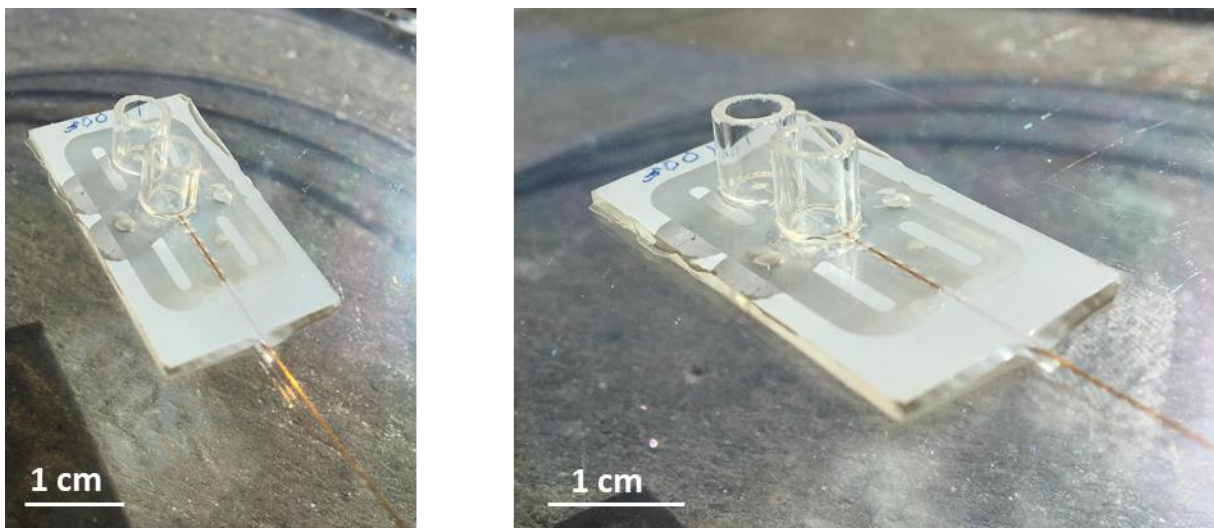
Figur 22: Illustrasjon av interface for chip 3.

For chip 3 ble materialet thiol-ene byttet ut med OSTE+. OSTE+ skiller seg fra thiol-ene ved at materialet inneholder en epoksy monomer i tillegg til allyl og thiol monomerene. Dette fører til at OSTE+ polymeriseres i to steg (UV-lys og temperatur) og det muliggjør andre egenskaper ved fabrikasjon [34]. Thiol-ene og OSTE+ er beskrevet i detalj i kapittel 2.5.1. Ved å bruke OSTE+ i stedet for thiol-ene kan lekkasje i den bruksferdige EME-chipen unngås. Det ble laget en EME-chip, og problemene fra chip 1 og chip 2 var eliminert. Chip 3 viste imidlertid å gi lekkasje i kapillærsporet til den bruksferdige EME-chipen. For å identifisere problemet ble det tatt bilder av bunnen av chipen med sveipelektronmikroskop (SEM). Bildene viste at OSTE+ ikke tettet koblingen mellom akseptorkanalen og kapillæret godt nok, og dette førte til lekkasje i kapillærsporet til EME-chipen (Figur 23).



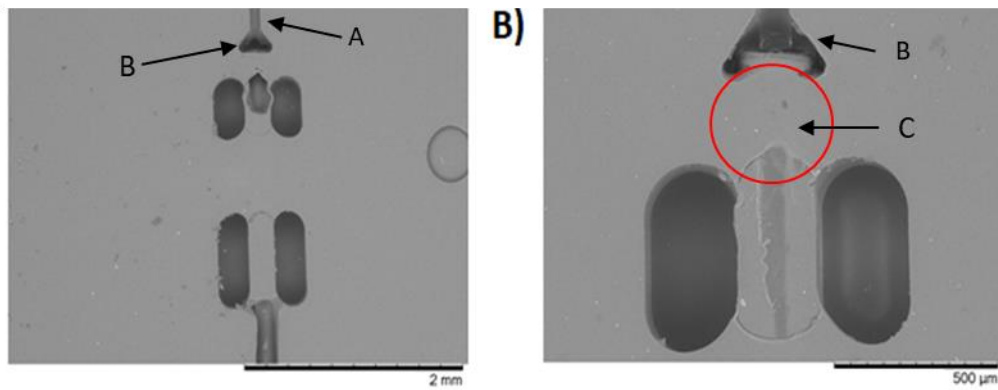
**Figur 23:** Bilder tatt med SEM av chip 3. A) Akseptorkanalen, B) interface, C) ikke-polymerisert OSTE+ som førte til lekkasje i kapillærsporet til EME-chipen.

#### 4.1.5 Chip 4



**Figur 24:** Foto av chip 4.

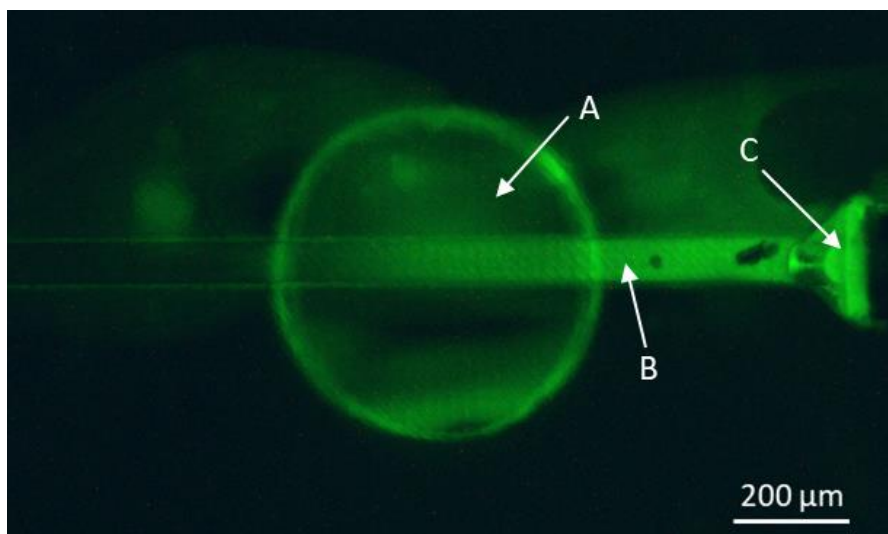
Chip 4 ble laget med OSTE+, og hadde en liten endring fra chip 3 (Figur 24). I bunnen av kapillærsporet ble det laget tre små søyler som var 20  $\mu\text{m}$  høye. Dette førte til at kapillæret ble løftet litt opp under fabrikasjonen og problemet med lekkasje i kapillærsporet ble eliminert (Figur 25). Det ble laget en bruksferdig EME-chip som ble brukt videre til EME og CE.



Figur 25: Bilder tatt med SEM av chip 4. A) Akseptorkanalen, B) interface, C) fullstendig polymerisert OSTE+ som førte til at lekkasje i kapillærsporet til EME-chipen ble unngått.

## 4.2 Ekstraksjon av rhodamine 6G under mikroskop

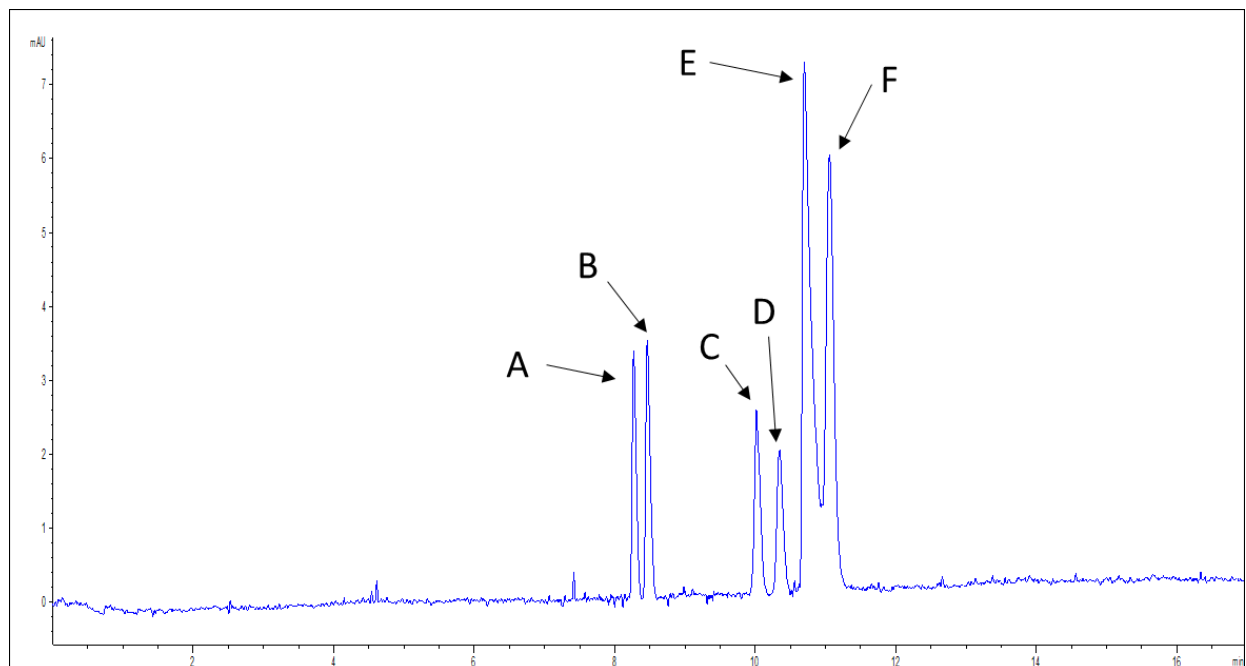
Når EME-chipen var ferdigstilt ble ekstraksjonen visualisert under mikroskop med rhodamine 6G som analytt. Betingelsene for ekstraksjon er oppsummert i kapittel 3.7. Hensikten med dette var å verifisere at EME-chipen fungerte. Rhodamine 6G ble benyttet fordi det fluorescerer og kan dermed visualiseres under mikroskop. Rhodamine 6G er en velegnet modellsubstans fordi den er basisk, og har molekylstørrelse og log P av samme størrelsesorden som modellanalyttene. Figur 26 viser et bilde tatt med mikroskop etter ekstraksjon av rhodamine 6G. Av bildet kan man se at rhodamin 6G har blitt ekstrahert over i akseptorkanalen, og det ble konkludert med at EME-chipen fungerte til ekstraksjon.



Figur 26: Bilde tatt av EME-chip etter ekstraksjon av rhodamine 6G i 60 s med ekstraksjonsspenning 15 V. A) Det sirkulære ekstraksjonsområdet, B) akseptorkanalen, C) koblingen mellom akseptorkanalen og kapillæret (interface).

## 4.3 Konvensjonell kapillærelektroforese av modellanalyttene

Modellanalyttene ble først analysert med konvensjonell kapillærelektroforese (CE). Her var EME-chipen ikke tilkoblet systemet. Formålet med dette var å undersøke hvilke betingelser som var optimale for separasjon av modellanalyttene. Det ble utført analyse av de seks modellanalyttene med 20 mM fosfatbuffer pH 3,0 som separasjonsbuffer. Hver av modellanalyttene var i konsentrasjon på 50 µg/mL og separasjonsspenningen var 30 kV. Figur 27 viser et elektroferogram av separasjonen.



**Figur 27: Elektroferogram av separasjon av de seks modellanalyttene ved konvensjonell CE. A) Amfetamin, B) metamfetamin, C) amitriptylin, D) petidin, E) kokain, F) metadon.**

Forsøket viste god separasjon av modellanalyttene, utenom kokain og metadon som ikke var fullstendig separert. Det ble besluttet å øke bufferkonsentrasjonen fra 20 til 40 mM og samtidig minke pH fra 3,0 til 2,7. Ved øking av bufferkonsentrasjonen fra 20 til 40 mM øker strømmen gjennom systemet, og det ble dermed besluttet å redusere separasjonsspenningen fra 30 til 20 kV for å unngå økt strøm. Reduksjon i pH, økning i bufferkonsentrasjon og reduksjon i separasjonsspenning fører til redusert elektroosmotisk flow (EOF), og redusert EOF fører til bedre separasjon (se side 41).

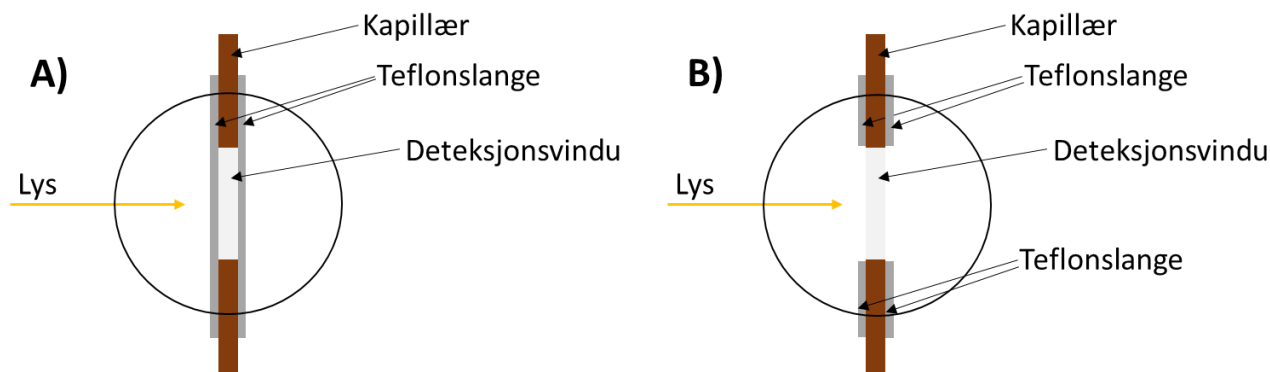


### 4.3.1 Separasjonsrekkefølge av modellanalyttene

Som tidligere beskrevet er vandringshastigheten til modellanalytter ved CE avhengig av deres elektroforetiske mobilitet,  $\mu_e$  og det pålagte elektriske feltet. Hvert molekyl har sin egen elektroforetiske mobilitet som er avhengig av molekylets ladning og radius samt separasjonsbufferens viskositet. De seks modellanalyttene er alle baser, med ett amin som blir positivt ladet sur i løsning. Modellanalyttenes molekylstruktur, log P, pKa og molekylvekt er beskrevet i Tabell 1. Det er rimelig å anta at de seks modellanalyttene vil separeres etter økende molekylvekt. For å undersøke separasjonsrekkefølgen ble de seks modellanalyttene injisert enkeltvis. Separasjonsrekkefølgen ble amfetamin ( $M_w=135,1$ ), metamfetamin ( $M_w=149,1$ ), amitriptylin ( $M_w=277,2$ ), petidin ( $M_w=247,2$ ), kokain ( $M_w=303,2$ ) og metadon ( $M_w=309,2$ ). De ble separert i rekkefølge etter stigende molekylvekt, bortsett fra amitriptylin og petidin. Amitriptylin viste å ha kortere migrasjonstid enn petidin. Dette kan skyldes at ionets radius (som egentlig er bestemmende for elektroforetisk mobilitet), ikke alltid kan vurderes direkte fra molekylvekt.

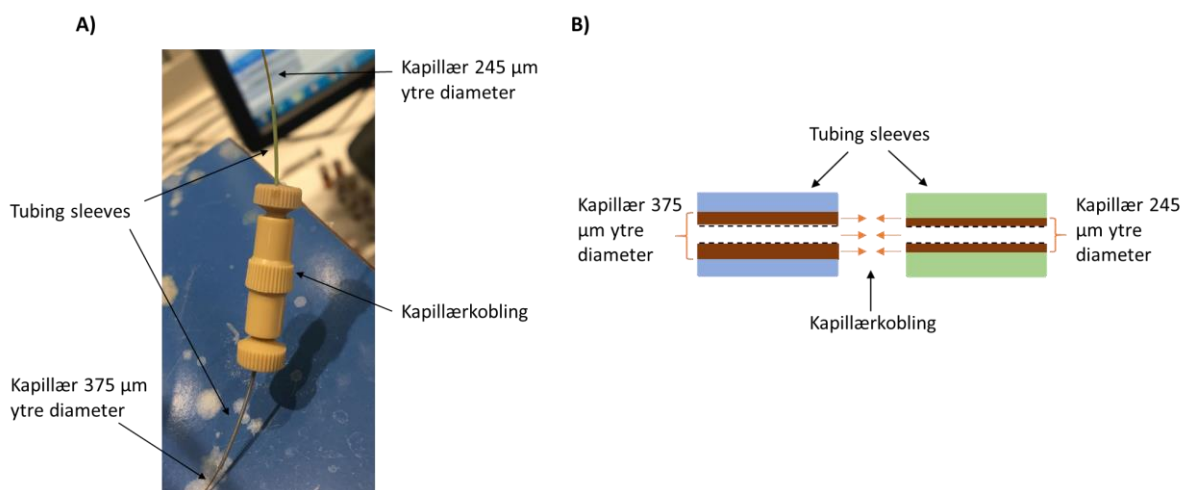
### 4.3.2 Tilpassing av kapillær i deteksjonscelle

Kapillæret som ble integrert i EME-chipene ved fabrikasjon var 245  $\mu\text{m}$  ytre diameter, mens deteksjonscellen som ble benyttet ved CE var tilpasset kapillær som er 375  $\mu\text{m}$  ytre diameter. For at kapillæret skulle passe i deteksjonscellen måtte dermed den ytre diameteren økes. Dette ble forsøkt gjort ved hjelp av teflonslanger (se vedlegg 1 for detaljer). For å muliggjøre UV-deteksjon ved CE må det tillages et lite deteksjonsvindu i kapillæret. Deteksjonsvinduet tillages normalt ved å brenne bort polyimidlaget som omslutter kapillæret. Det ble først forsøkt med teflonslange langs hele området der kapillæret var i deteksjonscellen. Her var altså kapillæret dekket av teflonslange også over deteksjonsvinduet (Figur 28A). Denne løsningen viste å ikke gi repeterbart UV-signal, sannsynligvis fordi teflonslangen ikke slapp gjennom tilstrekkelig UV-lys. Videre ble det forsøkt å brenne bort teflonslangen i det området der deteksjonsvinduet var (Figur 28B).



**Figur 28:** Kapillæret i deteksjonscellen ved A) bruk av teflonslange langs hele deteksjonsvinduet, og B) ved teflonslangen brent bort i deteksjonsvinduet.

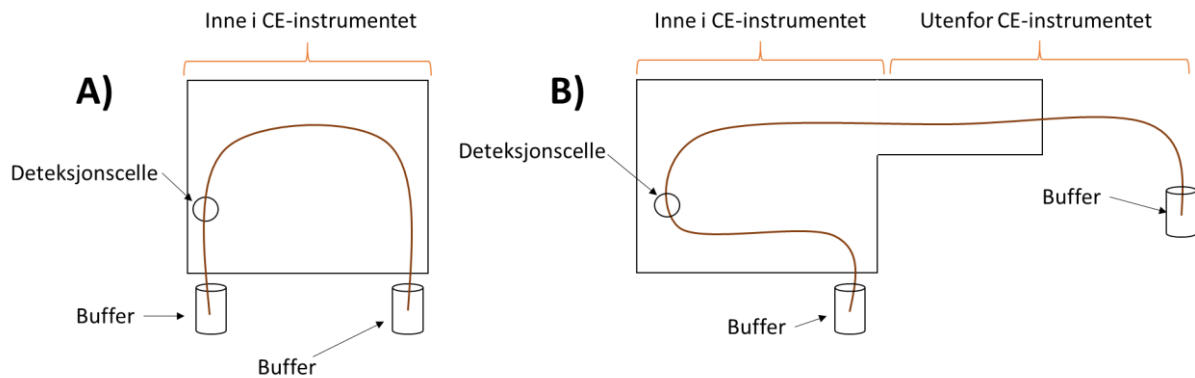
Denne løsningen viste å heller ikke gi repeterbart detektorsignal, i tillegg til at det var utfordringer med strømbrudd under analysen. Det ble dermed besluttet å koble sammen 245  $\mu\text{m}$  og 375  $\mu\text{m}$  kapillær som begge hadde indre diameter 100  $\mu\text{m}$ . På den måten kunne kapillæret med 245  $\mu\text{m}$  ytre diameter være integrert i EME-chipen, og kapillæret med 375  $\mu\text{m}$  ytre diameter gå inn i CE-instrumentet. Kapillærkoblingen ble gjort med en kommersiell løsning ved hjelp av tubing sleeves. Tubing sleeves ble tredd på kapillærene, og tilpasset slik at kapillærenes indre diameter passet med hverandre (Figur 29). Før kapillærene ble koblet sammen var det viktig å sørge for at endene var kuttet i tilnærmet 90° vinkel.



**Figur 29:** A) Bilde av kapillærkoblingen, B) tverrsnitt av kapillær ved kapillærkobling.

## 4.4 Kapillærelektroforese med injeksjon av prøve utenfor CE-instrumentet

I kapittel 4.3 ble alle analyser utført ved konvensjonell CE, med injeksjon inne i CE-instrumentet. Før EME-chipen kunne kobles til CE-instrumentet måtte det undersøkes om separasjonen av modellanalyttene kunne opprettholdes ved injeksjon av prøve utenfor CE-instrumentet. Dette ble gjort ved å sette CE-instrumentet i "CE-MS" modus som muliggjør injeksjon av prøve utenfor CE-instrumentet. For å gjøre dette ble det brukt en spesialkassett som kapillæret monteres i, der den ene enden av kapillæret går ut av CE-instrumentet (Se vedlegg 2). Figur 30 viser forskjellen på en vanlig CE kassett og en spesialkassett som benyttes ved «CE-MS».



Figur 30: A) Vanlig CE kassett, B) «CE-MS» kassett.

### 4.4.1 Undersøkelse av separasjonsspenning

Vandringshastigheten til et ion ved CE avhenger som tidligere beskrevet av ionets elektroforetiske mobilitet og det pålagte elektriske feltet. Ved høyere påsatt spenning vil modellanalyttene vandre raskere og dermed gi raskere analysetider. CE-instrumentet som ble brukt kunne maksimalt gi 30 kV som separasjonsspenning, og det var dermed ønskelig å bruke 30 kV for raskest mulig analyse. Det ble testet hvor høy separasjonsspenningen kunne være uten å føre til for høy strøm og påfølgende bobledannelse og strømbrudd. Det ble kjørt analyser med ulike separasjonsspenninger mellom 5 og 25 kV. Alle forsøkene ble utført med injeksjon av bufferløsning utenfor CE-instrumentet. Tabell 7 viser hvilken strøm de ulike separasjonsspenningene førte til.

**Tabell 7: Oversikt over strømmen de ulike separasjonsspenningene førte til.**

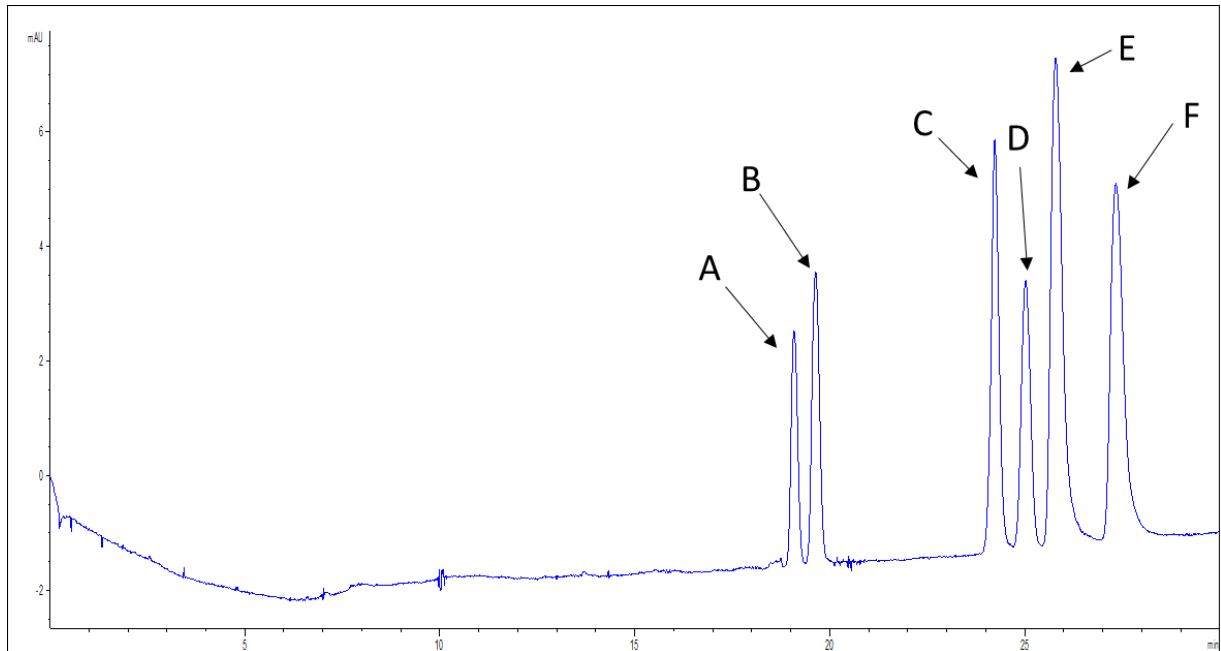
<b>Separasjonsspenning<sup>1)</sup></b>	<b>Strøm</b>
5 kV	16,5 $\mu$ A
10 kV	34,5 $\mu$ A
15 kV	55,0 $\mu$ A
20 kV	79,0 $\mu$ A
22,5 kV	92,0 $\mu$ A
25 kV	107,5 $\mu$ A

<sup>1)</sup>Felles betingelser: Separasjonsbuffer: 40 mM fosfatbuffer pH 2,7, temperatur: 25 °C, total kapillærlengde: 80 cm.

Høyere separasjonsspenning enn 20 kV viste å gi for høy strøm gjennom systemet, og dette førte til bobledannelse og strømbrudd under analysen. Det ble dermed konkludert med at den høyeste separasjonsspenningen som kunne brukes var 20 kV.

#### **4.4.2 Separasjon av modellanalyttene ved injeksjon utenfor CE-instrumentet**

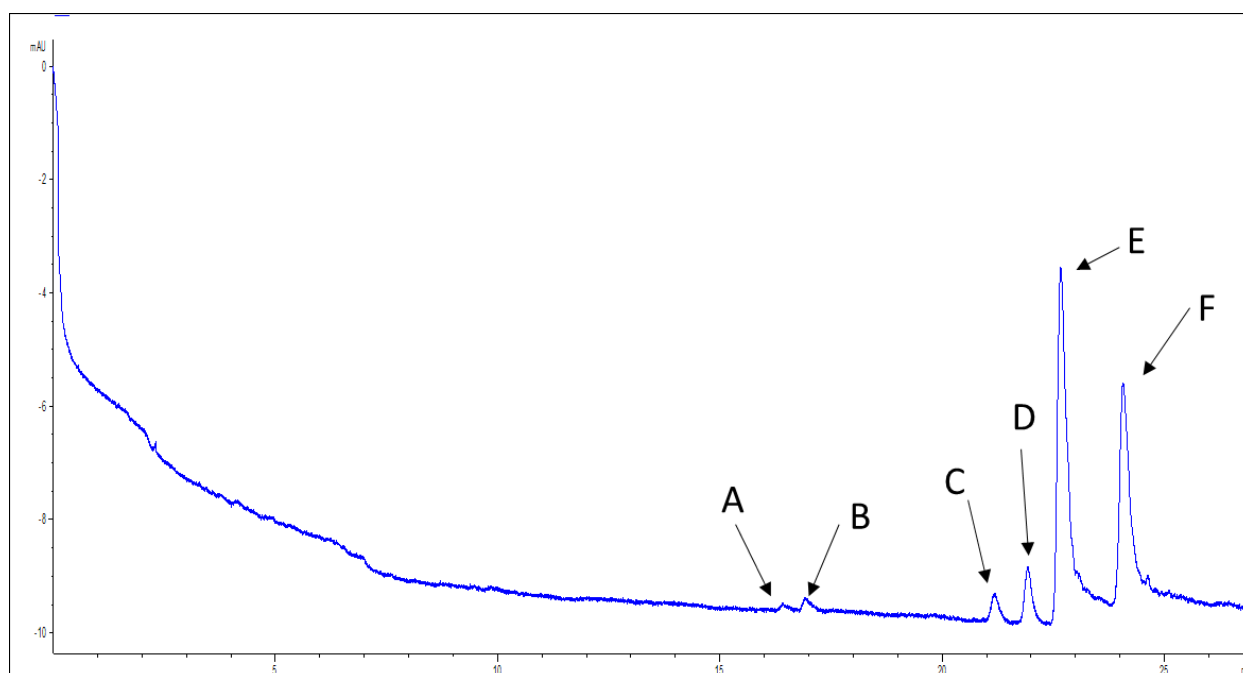
Modellanalyttene ble videre analysert ved injeksjon utenfor CE-instrumentet. Figur 31 viser et elektroferogram av separasjonen. Prøvekonsentrasjonen var 10  $\mu$ g/mL, separasjonsbufferen var 40 mM fosfatbuffer, pH 2,7 og separasjonsspenningen var 20 kV. Separasjonsrekkefølgen var som diskutert i kapittel 4.3.1



Figur 31: Separasjon av de seks modellanalyttene ved injeksjon utenfor CE-instrumentet. A) Amfetamin, B) metamfetamin, C) amitriptylin, D) petidin, E) kokain, F) metadon.

## 4.5 EME-chip koblet til CE-instrument

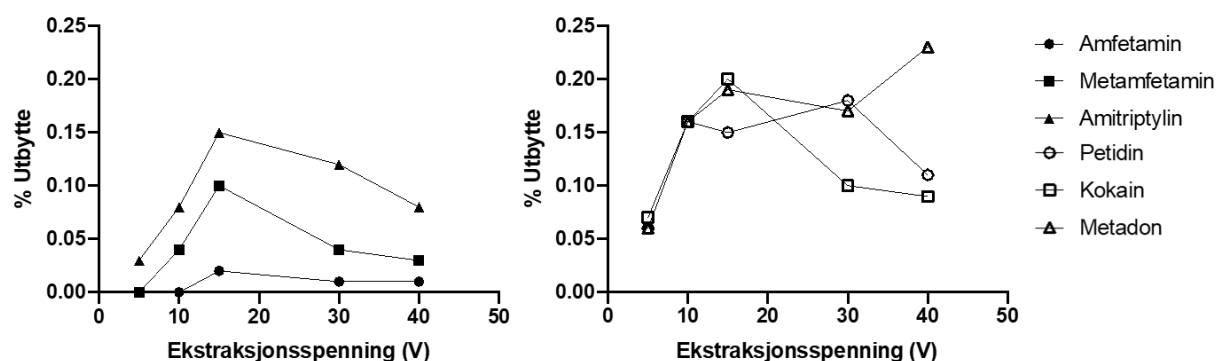
EME-chipen ble koblet til CE-instrumentet og det ble utført elektromembranekstraksjon (EME) med påfølgende CE-separasjon av de seks modellanalyttene. Figur 32 viser et elektroferogram av separasjonen etter EME. Oppsett av EME og CE er beskrevet i kapittel 3.8. Konsentrasjonen på prøveløsningen som ble ekstrahert var 10 µg/mL, separasjonsbufferen var 40 mM fosfatbuffer, pH 2,7 og separasjonsspenningen var 20 kV. Separasjonsrekkefølgen var som diskutert i kapittel 4.3.1.



Figur 32: Elektroferogram av EME i 60 s med 15 V av de seks modellanalyttene. A) Amfetamin, B) metamfetamin, C) amitriptylin, D) petidin, E) kokain, F) metadon.

#### 4.5.1 Optimalisering av ekstraksjonsspenning

For å bestemme den optimale ekstraksjonsspenningen ble det utført analyser med ulike ekstraksjonsspenninger mellom 5 og 40 V. I alle forsøkene ble det brukt en prøveløsning med konsentrasjon 10 µg/mL av hver modellanalytt løst i 40 mM fosfatbuffer pH 2,7. Denne fosfatbufferen ble også brukt som separasjonsbuffer. Separasjonsspenningen var 20 kV. Figur 33 viser utbytte som funksjon av ekstraksjonsspenning.



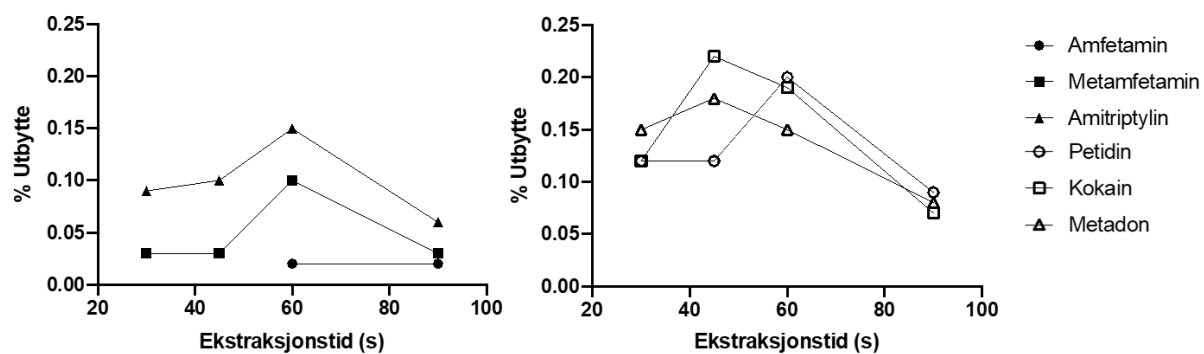
Figur 33: Utbytte som funksjon av ekstraksjonsspenning. n=3. Standardavvikene var mellom 4,6-70,7%.

Alle modellanalyttene hadde et utbytte under 1 % ved spenninger mellom 5 og 40 V, og systemet viste dermed å gi myk ekstraksjon av modellanalyttene. Grafen viser at de fleste av modellanalyttene har høyest utbytte ved 15 V. Den påsatte spenningen over SLM er drivkraften for masseoverføringen i EME, og studier har vist at utbyttet øker generelt med økt påsatt spenning, men bare opp til en optimal spenning. Etter den optimale spenningen vil utbyttet flate ut eller reduseres på grunn av at strømmen gjennom systemet er relativt høy, og elektrolyse ved elektrodene kan forekomme [7, 22]. Denne elektrolysen kan føre til endringer av pH og konsekvensen kan bli at graden av ionisering i de vandige fasene går ned, og dermed favoriseres tilbakeekstraksjon ved diffusjon [22]. Resultatene med EME-chipen viser at utbyttet for de fleste modellanalyttene øker opp mot 15 V, for så å reduseres ved høyere ekstraksjonsspenning.

Amfetamin ble ikke detektert ved 5 V og 10 V, og metamfetamin ble ikke detektert ved 5 V. Amfetamin og metamfetamin har lavest log P og molekylvekt av modellanalyttene, og de har i tidligere studier vist at de ekstraheres med lavest utbytte av de seks modellanalyttene med NPOE som SLM [13]. Det kan dermed antas at amfetamin og metamfetamin ikke ble ekstrahert tilstrekkelig til å bli detektert ved lav ekstraksjonsspenning.

#### **4.5.2 Optimalisering av ekstraksjonstid**

Ulike ekstraksjonstider ble undersøkt for å bestemme den optimale ekstraksjonstiden. Ekstraksjonene ble utført med 15 V i 30 s, 45 s, 60 s og 90 s. I alle forsøkene ble det brukt en prøveløsning med konsentrasjon 10 µg/mL av hver modellanalytt løst i 40 mM fosfatbuffer pH 2,7. Denne fosfatbufferen ble også brukt som separasjonsbuffer. Separasjonsspenningen var 20 kV. Figur 34 viser utbytte som funksjon av tid.



Figur 34: Utbytte som funksjon av ekstraksjonstid. n=3. Standardavvikene var mellom 4,1-48,3 %.

Amfetamin ble ikke detektert ved 30 s og 45 s. Grunnen til dette kan antas å være den samme som diskutert i kapittel 4.5.1. Alle modellanalyttene hadde utbytte under 1 %, og systemet gir dermed myk ekstraksjon. Typisk for EME er at utbyttet øker med økende ekstraksjonstid, helt til systemet når en slags steady-state. Lengere ekstraksjonstider fører ofte til lavere utbytter. Dette er sannsynligvis på grunn av elektrolyse, som kan føre til pH endringer, og tilbakeekstraksjon ved diffusjon [22]. Forsøkene viste at de fleste modellanalyttene har høyeste utbytte ved 60 s, mens metadon og kokain har optimum ved 45 s. Utbyttet stiger opp mot 60 s ekstraksjonstid for de fleste modellanalyttene, og reduseres ved 90 sekunder.



## 5 Konklusjon

I denne oppgaven har det blitt utviklet en mikrochip for elektromembranekstraksjon (EME) og påfølgende kapillærelektroforese (CE). Prøveløsningen ble ekstrahert ned i en akseptorkanal som var koblet direkte til et kapillær for kapillærelektroforese (CE). EME-chipen muliggjorde ekstraksjon av legemiddelstoffer fra små prøvevolum, etterfulgt av elektroforetisk separasjon og UV-deteksjon.

Det fulgte med flere utfordringer ved fabrikking av EME-chipen. Utfordringene var knyttet til koblingen mellom akseptorkanalen og kapillæret, og denne var teknisk utfordrende å få til å fungere. Utfordringene besto i å 1) fabrikkere koblingen uten dødvolum, 2) unngå blokkering av kapillæret, og 3) unngå lekkasjer i EME-chipen. Når denne koblingen fungerte ble det gjennomført test av hele EME-systemet (EME, elektroforetisk separasjon og UV-deteksjon) med vandige prøveløsninger som inneholdt seks legemiddelstoffer.

Systemet viste å kunne ekstrahere, separere og detektere de seks legemiddelstoffene med utbytter  $< 1\%$ , og systemet ga dermed myk ekstraksjon. Myk ekstraksjon er viktig for å ikke forstyrre biokjemiske likevekter i mikrofysiologiske systemer. Systemet har fortsatt noen utfordringer som står igjen med tanke på oppkonsentrering og repeterbarhet. Når disse utfordringene er løst vil systemet kunne brukes til målinger med organ-on-a-chip hvor den myke ekstraksjonen kan utnyttes.

# Litteraturliste

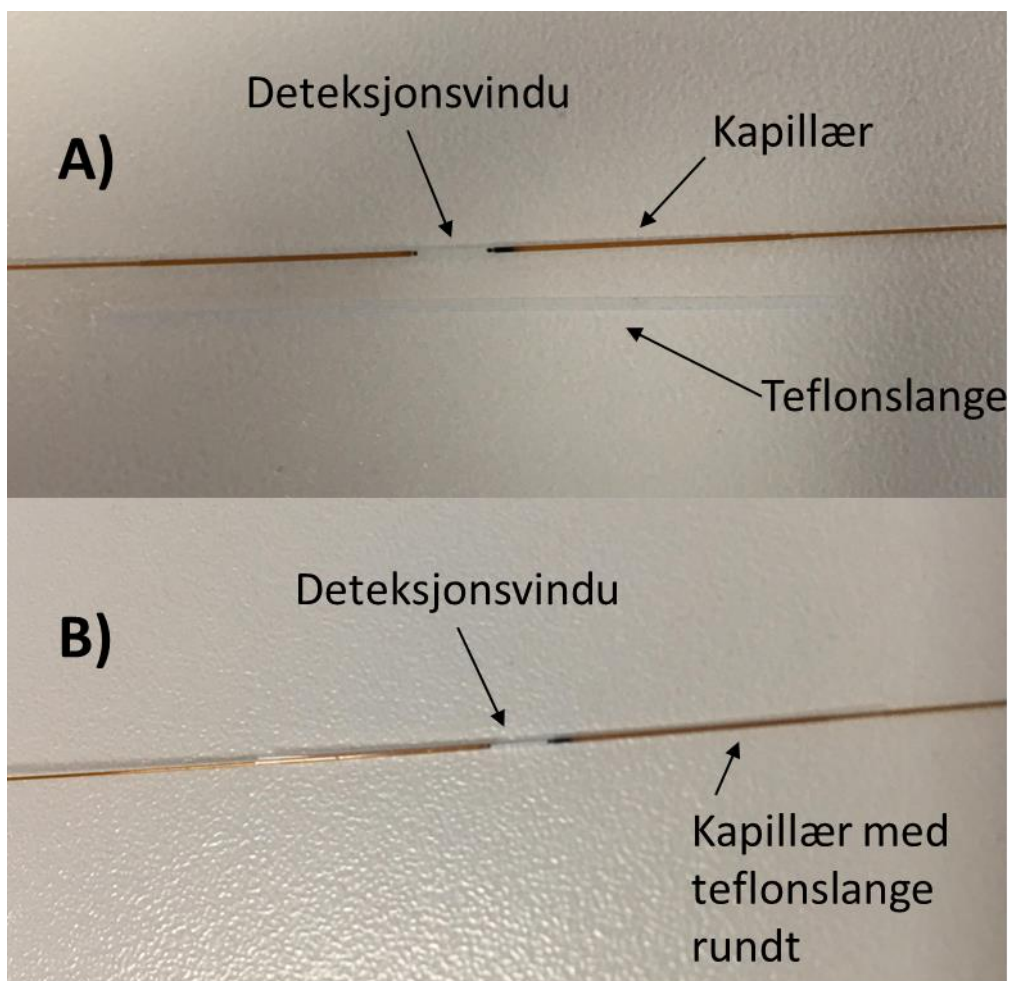
1. Ocaña-González, J.A., et al., *New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review*. Anal. Chim. Acta, 2016. **905**: s. 8-23.
2. Pedersen-Bjergaard, S. and Rasmussen, K.E., *Electrical potential can drive liquid-liquid extraction for sample preparation in chromatography*. Trends Anal. Chem., 2008. **27**(10): s. 934-941.
3. Poole, C.F., *New trends in solid-phase extraction*. Trends Anal. Chem., 2003. **22**(6): s. 362-373.
4. Afshar Mogaddam, M.R., et al., *Headspace mode of liquid phase microextraction: A review*. Trends Anal. Chem., 2019. **110**: s. 8-14.
5. Han, D. and Row, K.H., *Trends in liquid-phase microextraction, and its application to environmental and biological samples*. Microchim. Acta., 2012. **176**(1): s. 1-22.
6. Sarafraz-Yazdi, A. and Amiri, A., *Liquid-phase microextraction*. Trends Anal. Chem., 2010. **29**(1): s. 1-14.
7. Pedersen-Bjergaard, S. and Rasmussen, K.E., *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids*. J. Chromatogr. A, 2006. **1109**(2): s. 183-190.
8. Drouin, N., et al., *Electromembrane extraction: Overview of the last decade*. Trends Anal. Chem., 2018. **113**: s. 357-363.
9. Rezazadeh, M., et al., *One-way and two-way pulsed electromembrane extraction for trace analysis of amino acids in foods and biological samples*. Anal. Chim. Acta, 2013. **773**: s. 52-59.
10. Balchen, M., Reubsaet, L., and Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane extraction of peptides*. J. Chromatogr. A, 2008. **1194**(2): s. 143-149.
11. Rye, T.K., et al., *Direct coupling of electromembrane extraction to mass spectrometry - Advancing the probe functionality toward measurements of zwitterionic drug metabolites*. Anal. Chim. Acta, 2017. **983**: s. 121-129.
12. Petersen, N., et al., *On-chip Electro Membrane Extraction*. 2010. **9**(4-5): s. 881-888.
13. Hansen, F.A., et al., *Nanoliter-Scale Electromembrane Extraction and Enrichment in a Microfluidic Chip*. Anal. Chem., 2018. **90**(15): s. 9322-9329.
14. Huang, C., et al., *Electromembrane extraction*. Trends Anal. Chem., 2017. **95**: s. 47-56.
15. Andersen, P.B. *Ohms lov*. 2015 [hentet 2019 02.05]; Tilgjengelig fra: [https://snl.no/Ohms\\_lov](https://snl.no/Ohms_lov).
16. Vårdal, L., et al., *Electromembrane extraction with solvent modification of the acceptor solution: improved mass transfer of drugs of abuse from human plasma*. Bioanalysis, 2019. **11**.
17. Restan, M.S., et al., *Comprehensive study of buffer systems and local pH effects in electromembrane extraction*. Anal. Chim. Acta, 2017. **984**: s. 116-123.
18. Nojavan, S. and Fakhari, A.R., *Electro membrane extraction combined with capillary electrophoresis for the determination of amlodipine enantiomers in biological samples*. J. Sep. Sci., 2010. **33**(20): s. 3231-3238.
19. Huang, C., et al., *Investigation of alternative supported liquid membranes in electromembrane extraction of basic drugs from human plasma*. J. Membrane. Sci., 2018. **548**: s. 176-183.
20. Middelthon-Bruer, T.M., et al., *Parameters affecting electro membrane extraction of basic drugs*. J. Sep. Sci., 2008. **31**(4): s. 753-759.

21. Seip, K.F., et al., *Electromembrane extraction of peptides – Fundamental studies on the supported liquid membrane*. J. Sep. Sci., 2011. **34**(23): s. 3410-3417.
22. Huang, C., et al., *Electromembrane extraction for pharmaceutical and biomedical analysis – Quo vadis*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2015. **113**: s. 97-107.
23. Petersen, N.J., et al., *On-chip electromembrane extraction for monitoring drug metabolism in real time by electrospray ionization mass spectrometry*. Analyst, 2012. **137**(14): s. 3321-3327.
24. Petersen, N.J., et al., *On-Chip Electro Membrane Extraction with Online Ultraviolet and Mass Spectrometric Detection*. Anal. Chem., 2011. **83**(1): s. 44-51.
25. Pedersen-Bjergaard, S. and Rasmussen, K.E., *Legemiddelanalyse*. Vol. 2. 2010: Fagbokforlaget. s. 55-56, 232-245, 279-281.
26. Heiger, D., *High Performance capillary electrophoresis*. 2000: Agilent Technologies. s. 16-26, 28-36l.
27. Lundanes, E., Reubsaet, L., and Greibrokk, T., *Chromatography*. 2013: Wiley-VCH. s. 135-141l.
28. Ren, K., Zhou, J., and Wu, H., *Materials for Microfluidic Chip Fabrication*. Acc. Chem. Res., 2013. **46**(11): s. 2396-2406.
29. Whitesides, G.M., *The origins and the future of microfluidics*. Nature, 2006. **442**: s. 368-373.
30. Pedersen, B. *Turbulens*. 2018 [hentet 2019 02.05]; Tilgjengelig fra: <https://snl.no/turbulens>.
31. Sivle, A.D. *Laminær strømning*. 2017 [hentet 2019 02.05]; Tilgjengelig fra: [https://snl.no/lamin%C3%A6r\\_str%C3%B8mning](https://snl.no/lamin%C3%A6r_str%C3%B8mning).
32. Sia, S.K. and Whitesides, G.M., *Microfluidic devices fabricated in Poly(dimethylsiloxane) for biological studies*. ELECTROPHORESIS, 2003. **24**(21): s. 3563-3576.
33. Chung, B.G., et al., *Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device*. Lab. Chip., 2005. **5**(4): s. 401-406.
34. Carlborg, C.F., et al., *Beyond PDMS: off-stoichiometry thiol-ene (OSTE) based soft lithography for rapid prototyping of microfluidic devices*. Lab. Chip., 2011. **11**(18): s. 3136-3147.
35. Hein, C.D., Liu, X.-M., and Wang, D., *Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences*. Pharm. Res., 2008. **25**(10): s. 2216-2230.
36. Saharil, F., et al., *Dry adhesive bonding of nanoporous inorganic membranes to microfluidic devices using the OSTE(+) dual-cure polymer*. J. Micromech. Microeng., 2013. **23**(2).
37. Lafleur, J.P., et al., *Rapid and simple preparation of thiol-ene emulsion-templated monoliths and their application as enzymatic microreactors*. Lab. Chip., 2015. **15**(10): s. 2162-2172.
38. Guckenberger, D.J., et al., *Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices*. Lab. Chip., 2015. **15**(11): s. 2364-2378.
39. Carrino, L., Moroni, G., and Polini, W., *Cold plasma treatment of polypropylene surface: a study on wettability and adhesion*. J. Mater. Process. Technol., 2002. **121**(2): s. 373-382.
40. Sellin, N. and Campos, J.S.d.C., *Surface composition analysis of PP films treated by corona discharge*. Mater. Res, 2003. **6**: s. 163-166.

# Vedlegg

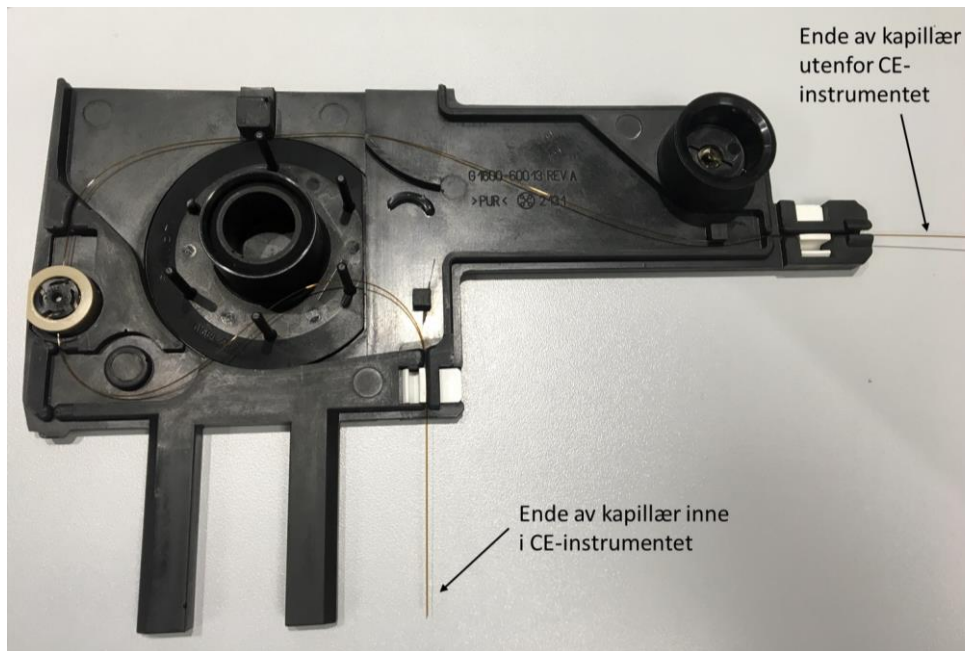
## Vedlegg 1: Arbeid med teflon tubes

For å forsøke å få 245  $\mu\text{m}$  kapillær til å passe i deteksjonscellen ble det forsøkt å bruke teflonslager rundt kapillæret for å øke den ytre diameteren. På den måten ville kapillæret sitte fast i deteksjonscellen. Teflonslangene var transparente, og kunne klippes til ønsket lengde og tres på kapillæret. Deretter ble det tilført varme som førte til at de smeltet og satt godt fast rundt kapillæret. A) viser kapillæret med deteksjonsvindu og teflonslangen. B) viser kapillæret med deteksjonsvindu, og med teflonslangen festet rundt.



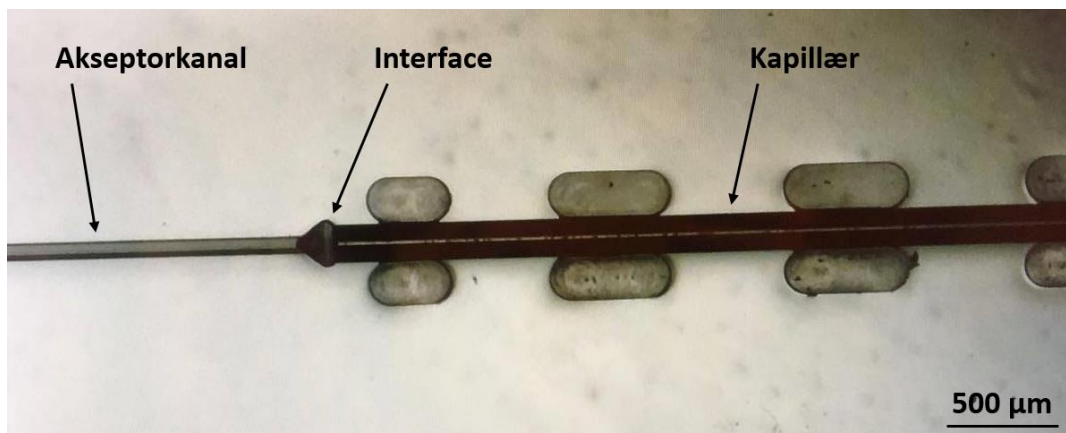
## Vedlegg 2: Bilde av «CE-MS» kassett

Bildet viser en «CE-MS» kassett der utgangen av kapillæret er plassert inne i CE-instrumentet, og inngangen til kapillæret går ut av CE-instrumentet. Det er ved inngangen av kapillæret det gjøres prøveinjeksjon, og bruk av denne kassetten muliggjør dermed injeksjon fra utsiden av CE-instrumentet.



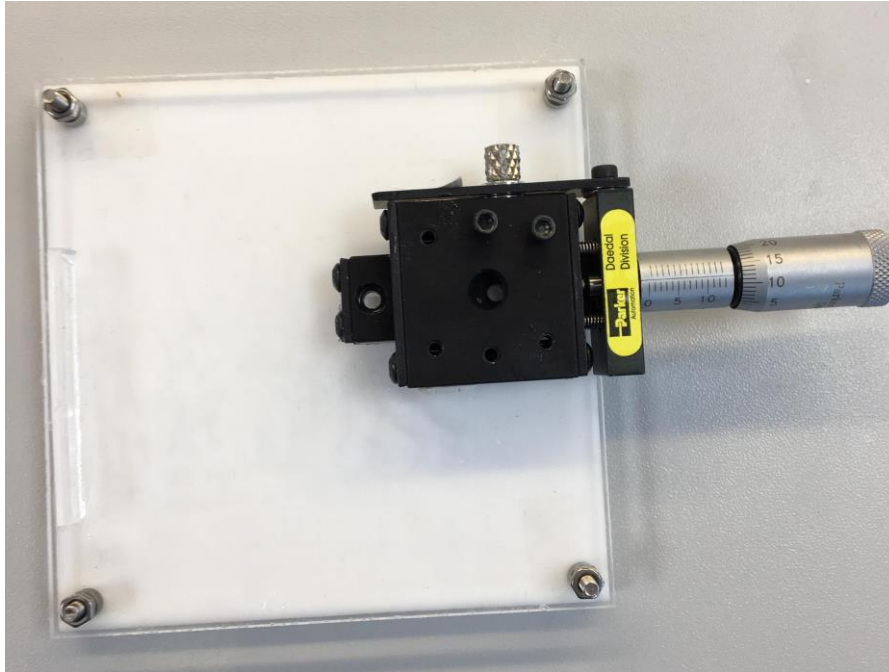
## Vedlegg 3: Tilpassing av kapillær under mikroskop

Bildet viser et bilde av monitoren til mikroskopet ved tilpassing av kapillæret under mikroskop ved fabrikasjon av bunnen av EME-chipen.



#### Vedlegg 4: «Micrometre stage» for finjustering av kapillær

Bilde av «micrometre stage» som ble brukt til finjustering av kapillæret ved fabrikasjon av bunnen av EME-chipen. «Micrometre stage» ble festet fast på en PMMA plate.



Bilde av «micrometre stage» og PDMS formen med kapillæret tilpasset.

