

Elektromembranekstraksjon – ny teoretisk forståelse og nye anvendelser

Magnus Sæd Restan

AbbVie

E-post: magnusrestan@gmail.com

TITTEL

Electromembrane extraction – enhanced theoretical understanding and new applications

VEILEDERE

Stig Pedersen-Bjergaard, avdeling for legemiddelanalyse, Farmasøytisk institutt (FI), Universitetet i Oslo (UiO); Astrid Gjelstad, Antidoping Norge og avdeling for legemiddelanalyse, FI, UiO; Ørjan Grøttem Martinsen, Elektronikk, Fysisk institutt, UiO.

STED OG TIDSPUNKT FOR DISPUTAS

Universitetet i Oslo, høst 2020

HOVEDBUDSKAP

Elektromembranekstraksjon (EME) er en prøveopparbeidelsesteknikk som benytter seg av et elektrisk felt til å ekstrahere stoffer ut fra prøveløsninger basert på deres ladning. For å demonstrere potensialet og øke den vitenskapelig plattformen for EME, har dette arbeidet vært fokusert på å utvikle ny teoretisk forståelse og utforske nye anvendelsesområder.

BAKGRUNN OG HENSIKT

Innen analytisk kjemi er målet å kunne detektere eller måle konsentrasjon av en eller flere analytter (for eksempel legemidler eller proteiner). Ved analyse av biologiske prøver, slik som blod og urin, vil det derimot være mange andre kjemiske forbindelser, i tillegg til analytten man ønsker å finne, noe som kan gjøre denne prosessen komplisert og potensielt gi feilaktig svar. Derfor er ofte en såkalt prøveopparbeidelse en essensiell del av en kjemisk analyse, der formålet enten er å fjerne stoffer i prøven som kan påvirke analysesvaret, eller trekke analytten (ekstraksjon) over i en mindre kompleks prøve.

På grunn av at prøveopparbeidelse ofte er den mest tidskrevende prosessen i en kjemisk analyse, er det et stort insentiv innen fagmiljøet å gjøre denne prosessen raskere og mer selektiv. Elektromembranekstraksjon (EME) som ble utviklet på Universitetet i Oslo i 2006, har potensialet til å forbedre de ovennevnte utfordringene (1). EME er en 3-fase mikroekstraksjonsteknikk der analytter blir ekstrahert fra en prøveløsning over en væskemembran og til en akseptorfase, ved elektrokinetisk migrasjon som følge av et elektrisk felt påsatt over væskemembranen (figur 1). Som en følge av det elektriske feltet er ekstraksjonen raskere enn ved passiv diffusjon, og gir et ekstra selektivitetsparameter ved at man kan kontrollere styrken og retningen på det elektriske feltet.

EME er fortsatt i sin barndom, og mer forskning er nødvendig før teknikken kan anvendes i analytiske sammenhenger i rutinelaboratorier. Derfor har fokuset i dette arbeidet vært å underbygge den teoretiske plattformen til EME og demonstrere nye applikasjonsområder. Dette ble utført ved å undersøke effekten av ulike pH-betingelser på selektivitet og ekstraksjonsutbytte av basiske legemidler og hvorvidt EME kan brukes til å fjerne uønskede matrikskomponenter fra prøveløsninger.

MATERIALE OG METODER

EME ble utført i tre forskjellige formater, to 8-brønnsformater og et 96-brønnsfor-

mat (figur 2). Alle tre formatene var bygd opp rundt samme prinsipp; en donorplate for prøveløsningen, og en akseptorplate for væskemembranen og akseptorfasen. Normal prosedyre var som følger: En prøveløsning med analytten (50–200 µl) ble overført til én brønn i donorplaten. Deretter ble væskemembranen (*supported liquid membrane*, SLM) lagd ved å påføre 3 µl organisk væske på den porøse filtermembranen som danner bunnen av akseptorplaten. Etterfulgt av dette ble 50–100 µl akseptorfase overført til akseptorplaten, og de to platene ble klemt sammen. For å danne det elektriske feltet ble to elektroder tilkoblet en ekstern strømkilde, plassert i henholdsvis prøveløsningen og akseptorfasen. Ekstraksjonen ble igangsatt ved å plassere ekstraksjonsenheten på en ristepattform og påføre spenning (1–100 V) og agitasjon (900 omdreininger per minutt) samtidig. Etter ekstraksjonen (1–60 minutter) ble akseptorfasen pipettert ut og analysert ved HPLC-UV/MS eller UV-spektroskopi.

EME-betingelsene ble optimalisert etter hvilke analytter som ble forsøkt ekstrahert. I tre av arbeidene ble upolare basiske legemidler ekstrahert. For at stoffene skal bevege seg i det elektriske feltet, må de protoneres (ioniseres). Derfor ble disse ekstraksjonen utført under sure pH-betingelser i både prøveløsningen og akseptorfase. I to av arbeidene ble det ekstrahert sure matrikskomponenter, og pH-betingelsene ble gjort basiske. Alle pH-justering ble gjort ved hjelp av buffersystemer.

RESULTATER

På grunn av elektrolyse kan pH i prøveløsningen og akseptorfasen forandres i løpet av ekstraksjonen. Dette arbeidet har vist at bruken av buffersystemer til pH-justering fremfor saltsyre (HCl) beskytter mot elektrolyse og gir en stabil pH-profil gjennom hele ekstraksjonen og samtidig et høyt ekstraksjonsutbytte av upolare basiske legemidler. Det ble forsøkt å selektivt ekstrahere de basiske legemidlene basert på deres basestyrke (pK_a), ved å justere pH til et nivå der kun noen av legemidlene var protonert.

Dette forsøket mislyktes, men det ble samtidig avdekket et ionisk grenselag med forhøyet pH mellom væskemembranen og akseptorløsningen, noe som medførte at analyttene mistet sin ionisering tidligere enn forventet (2). En teoretisk modell som også tok høyde for analyttens fettløselighet (log P), ble utviklet og ga en bedre predikasjon på hvilke legemidler som ville ekstraheres optimalt ved spesifikke pH-verdier (3).

EME som en ekstraksjonsteknikk for matrikskomponenter ble demonstrert med sodium dodecyl sulfate (SDS) og fluorescein isothiocyanate (FITC) (4, 5). Det ble påvist at rene organiske løsemidler (oktanol og nonanol) som væskemembran ikke var effektive for å fjerne matrikskomponentene fra prøveløsningen. Dette ble løst ved å tilsette et kvaternært ammoniumsalt, Aliquat 336 (A336), i væskemembranen. Ved høye konsentrasjoner av SDS (≥ 5 mg/ml) i prøveløsningen var ikke normal ekstraksjonstid på 10 minutter tilstrekkelig for å oppnå optimal ekstraksjon. Dette kunne til en viss grad løses ved å forlenge ekstraksjonstiden til ≥ 60 minutter.

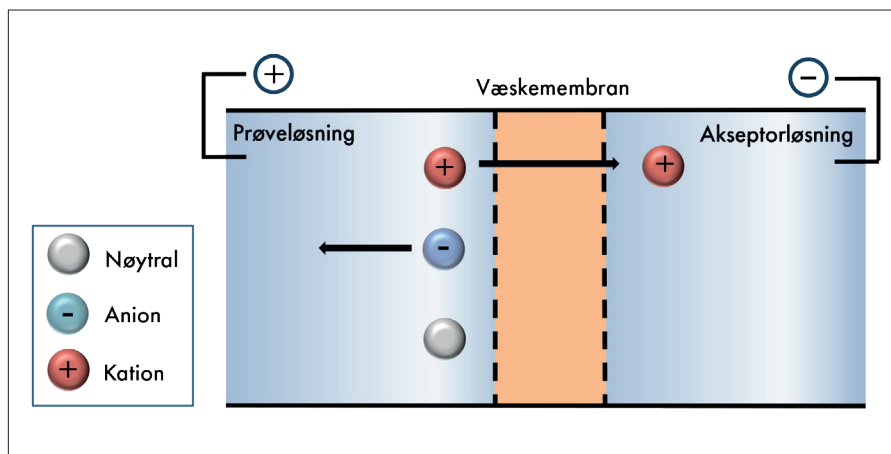
DISKUSJON

Dannelse av det ioniske grenslaget med forhøyet pH ble antatt å skyldes at væskemembranen fungerer som en kondensator, som igjen medfører en akkumulasjon av pH-modifiserende ioner på begge sider av membranen. Dette gjør at selv om pH i prøveløsningen og akseptorfasen er justert til pH 5, vil pH i grenselaget være 2–3 pH-enheter over dette. Dette forklarte i stor grad tidligere observasjoner om at pH bør justeres til 3–4 pH-enheter under en basisk analytts pK_a -verdi, for å oppnå tilstrekkelig ionisering.

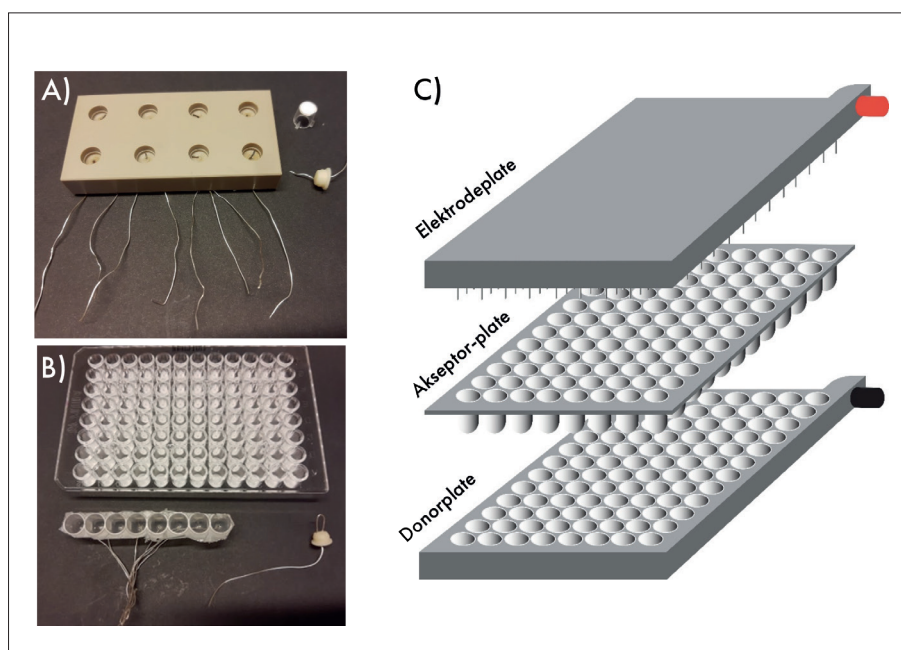
Problemet med ekstraksjon av matrikskomponenter med konsentrasjon ≥ 5 mg/ml ble antatt å skyldes A336. SDS og FITC er negativt ladde molekyler og danner et fettløselig kompleks med det positivt ladde A336-molekylet. Dette komplekset ble i stor grad «fangt» inne i væskemembranen. For FITC var konsentrasjonen (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) tilstrekkelig lav til at dette ikke ga noe problem, men for SDS var konsentrasjonen høy nok til at kapasiteten til membranen ble oversteget og videre overgang til akseptorfasen ble hindret. Løsningen på dette ble en større væskemembran med større kapasitet og lengere ekstraksjonstid, som gjorde det mulig å fjerne SDS fra 5 mg/ml prøveløsninger.

KONKLUSJON

Dette arbeidet har vært med på å styrke det teoretiske fundamentet til EME og demonstrert et nytt anvendelsesområde. Dette vil forhåpentligvis være en viktig del i videreutviklingen av EME, fra en akademisk disiplin til en kommersiell anvendbar prøveopparbeidelsesteknikk. Selv



Figur 1. Illustrasjon av EME-prinsippet. Under påvirkning av et elektrisk felt vil ioniserte analytter elektrokinetisk migrere over væskemembranen. Retning på migrasjonen kontrolleres av polariteten på elektrodene og ladningen på analyttene. I dette eksemplet vil protonerte analytter migrere fra prøveløsningen over til akseptorløsningen.



Figur 2. Illustrasjon av de tre EME-konfigurasjonene. A) 8-brønnsformat for 50 μl prøveløsning. B) 8-brønnsformat for 200 μl prøveløsning. C) 96-brønnsformat.

om mye av arbeidet i denne oppgaven var såkalte *proof of concepts*, vil dette være med på å stimulere fagmiljøet til videre forskning. EME har allerede blitt demonstrert til å være en rask, selektiv og fleksibel ekstraksjonsteknikk, og dette potensialet gjør at målet om å bli brukt i rutinelaboratorier er innen rekkevidde.

REFERANSER

1. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids. *J Chromatogr A* 2006; 1109: 183–90.

- Restan MS, Jensen H, Shen X et al. Comprehensive study of buffer systems and local pH effects in electromembrane extraction. *Anal Chim Acta* 2017; 984: 116–23.
- Restan MS, Ramsrud SB, Jensen H et al. Influence of acid-base dissociation equilibria during electromembrane extraction. *J Sep Sci* 2020; 43: 3120–8.
- Restan MS, Pedersen ME, Jensen H et al. Electromembrane Extraction of Unconjugated Fluorescein Isothiocyanate from Solutions of Labeled Proteins Prior to Flow Induced Dispersion Analysis. *Anal Chem* 2019; 91: 6702–8.
- Restan MS, Skottvoll FS, Jensen H et al. Electromembrane extraction of sodium dodecyl sulfate from highly concentrated solutions. *Analyst* 2020; 145: 4957–63.