

# Elektromembranekstraksjon av hydrofile legemidler og endogene metabolitter

Frederik André Hansen

Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo  
E-post: [f.a.hansen@farmasi.uio.no](mailto:f.a.hansen@farmasi.uio.no)

## TITTEL

Electromembrane extraction of polar pharmaceutical bases and endogenous metabolites

## VEILEDERE

Stig Pedersen-Bjergaard, Avdeling for legemiddelanalyse, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo; Elisabeth Leere Øiestad, Avdeling for rettsmedisinske fag, Oslo universitetssykehus; Henrik Jensen, Institut for Farmaci, Københavns Universitet.

## STED OG TIDSPUNKT FOR DISPUTAS

Universitetet i Oslo, høst 2021

## HOVEDBUDSKAP

Elektromembranekstraksjon (EME) er en prøveopparbeidelsesteknikk som kan trekke ut bestemte stoffer fra komplekse blandinger, for eksempel blod, ved bruk av strøm og en tynn membran av væske. Prosessen er vanskelig for hydrofile (vannløselige) stoffer, og arbeidet har derfor fokusert på utvikling av nye væskemembraner og forbedret teoretisk forståelse.

## BAKGRUNN OG HENSIKT

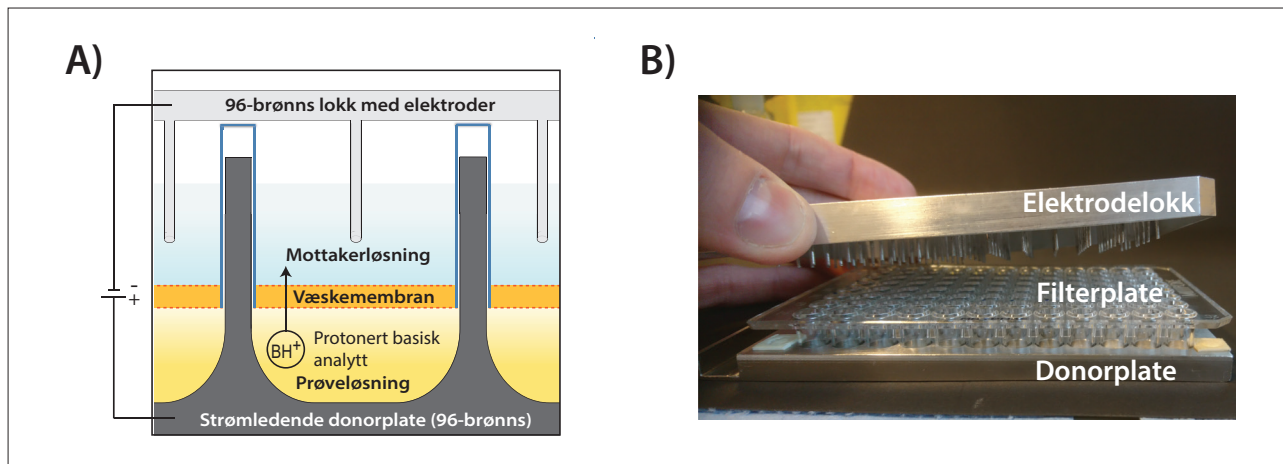
Det å kunne identifisere og kvantifisere innholdet av kjemiske forbindelser er viktig i mange sammenhenger, for eksempel innen diagnostikk, dopingkontroll, behandling med legemidler, legemiddelutvikling og så videre. De kjemiske forbindelsene man er interessert i, kalles ofte analytter. Måling av analytter (for eksempel legemidler eller proteiner) er ofte vanskelig dersom prøven man undersøker har en kompleks sammensetning og inneholder tusener av andre stoffer, som for eksempel for blod eller urin, fordi disse andre stoffene kan interferere med analysemetoden. For komplekse prøver må man derfor alltid utføre en opparbeidelse før analysen. En form for opparbeidelse er å fjerne bestemte kontaminanter fra prøven. En annen, og bedre, er i stedet å ekstrahere analyttene fra den komplekse prøven, til en ren løsning som da kan analyseres ganske uproblematisk. Tidligere, og i dag, er fastfase- eller væske-væske-ekstraksjon mye brukt. Begge metodene bruker dessverre store mengder organiske løsemidler som er potensielt helseskadelige og miljøfarlige. Derfor jobbes det innen forskningen med å miniatyrisere disse prinsippene, samt utvikle en mer «grønn» ekstraksjonskjemi. Et eksempel er teknikken elektromembranekstraksjon (EME) som ble utviklet på Universitetet i Oslo i 2006 (1).

I EME brukes en tynn membran av organisk løsemiddel (væskemembran) til å skille den komplekse prøven fra en ren mottakerløsning (figur 1A). Det brukes ofte bare noen få mikroliter ( $\mu\text{L}$ ) organisk løsemiddel, og derfor kan EME også kalles for en «mikroekstraksjonsteknikk». Ekstraksjonen skjer ved å pålegge systemet et elektrisk felt som trekker stoffer med ladning gjennom væskemembranen og inn i mottakerløsningen. Hvilke stoffer som ekstraheres, kontrolleres av stoffets ladning (positiv, negativ eller nøytral) og hvor god fordelingen mellom stoff og væskemembran er. Fordelingen avhenger i høy grad av hydrofobisiteten til stoffet, og hydrofobe (fettløselige) stoffer har generelt mye bedre fordeling enn hydrofile (vannløselige) stoffer. Hydrofile

stoffer er derfor vanskeligere å ekstrahere, både med EME og de tradisjonelle metodene. Det er mange legemidler og deres metabolitter, samt endogene metabolitter, som er hydrofile, og derfor er det et behov for utvikling av nye og bedre systemer for mikroekstraksjon av disse. Fokuset for denne avhandlingen har derfor vært å forbedre teoretisk og praktisk kunnskap om hvordan hydrofile stoffer kan ekstraheres med EME. Fra tidligere er det kjent at det er stor forskjell hvordan positivt og negativt ladde stoffer skal ekstraheres, og derfor har avhandlingen utelukkende tatt utgangspunkt i fordypning for positive stoffer.

## MATERIALER OG METODER

EME ble utført i et 96-brønnsformat (figur 1B) som muliggjør ekstraksjon av mange prøver samtidig. Formatet var bygd opp av en donorplate til prøveløsningen, en filterplate som holdt væskemembran og mottakerløsning, og et lokk med én elektrode til hver mottakerbrønn. Donorplaten og lokket var bygd i strømløsende materialer. Før ekstraksjon ble hver filtermembran tilsatt  $4 \mu\text{L}$  organisk løsemiddel, som trakk inn i den porøse strukturen og ble immobilisert i filteret av sterke kapillarkrefter. Løsemidlet ble dermed til en væskemembran. Etterfulgt av dette ble  $100 \mu\text{L}$  prøveløsning overført til hver brønn i donorplaten, og  $100 \mu\text{L}$  mottakerløsning til hver brønn i filterplaten. Filterplaten ble da klemt sammen med donorplaten, slik at væskemembranen kom i kontakt med prøveløsningen. Lokket med elektroder ble satt på topp av filterplaten, og donorplate og lokk ble forbundet til en strømforsyning og plassert på et ristebord. Ekstraksjonen ble startet ved samtidig påføring av risting (900 RPM) og spenning (typisk 30–75 V). Ekstraksjonen hadde typisk en varighet på 15–45 minutter, hvor inntil 96 prøver kunne prosesseres samtidig. Etter endt ekstraksjon ble mottakerløsningene tatt ut og analysert med HPLC med UV-spektrofotometer eller massespektrometer som deteksjonsmetode. De biologiske prøvene som ble undersøkt var hovedsakelig blodplasma og urin.



**Figur 1.** A) Illustrasjon av elektromembranekstraksjonsprinsippet i 96-brønnsformat. B) Bilde av 96-brønnsutstyret som ble benyttet i avhandlingen. Illustrasjon og foto: Frederik André Hansen

## RESULTATER

Den største utfordringen med å ekstrahere hydrofile analytter med EME er nok hvordan få vannløselige stoffer transportert gjennom en hydrofob væskemembran? Det elektriske feltet bidrar vesentlig til transporten, men er ikke tilstrekkelig hvis ikke kjemien til væskemembranen er riktig. En måte å overkomme hydrofobisiteten av væskemembranen er å designe kjemien så det oppnås sterke interaksjoner med analyttene. Disse interaksjonene kan være ioniske, hydrogenbindinger,  $\pi$ -type, og dipol, her listet etter fallende styrke. Et løsemiddel med veldig kraftige interaksjoner kan også gi problemer fordi det kan bli til faststoff i romtemperatur. En sentral del av denne avhandlingen var derfor å utforske dype eutektiske løsemidler som plattform for væskemembraner (2). Dype eutektiske løsemidler består av to eller flere komponenter som hver for seg er faste ved romtemperatur (grunnet kraftige interaksjoner), men som blir flytende når de blandes i bestemte blandingsforhold. Dermed kan løsemidlet designes til å ha de ønskede egenskapene i mye større grad enn det ellers var mulig. I tillegg kan komponentene velges slik at de har naturlig opprinnelse, hvilket i tillegg til den svært lille mengden av løsemiddel som brukes, gjør metoden veldig «grønn». De første dype eutektiske løsemidlene som ble testet var basert på hydrogenbindinger og  $\pi$ -type interaksjoner. Som modellanalytter til systemkarakterisering ble både hydrofile legemidler og endogene metabolitter benyttet. De første resultatene viste at løsemidler basert på de ovenfor nevnte interaksjonene kunne ekstrahere moderat hydrofile analytter ( $-1 < \log P < 2$ ), mens svært hydrofile analytter ( $\log P < -1$ ) måtte ha ioniske bærere tilsatt til membranen (3–5). Et eksempel på en ionisk bærer er di(2-etylheksyl)fosfat (DEHP) som ble tilsatt ulike løsemidler som væskemembraner.

Studier av virkningsmekanismen til DEHP viste at aktiviteten av bæreren er svært avhengig av pH-verdien i prøveløsningen, og at denne derfor bør optimaliseres sammen med mengde DEHP i væskemembranen ved utvikling av EME metoder for nye analytter.

Andre strategier for forbedret ekstraksjon av hydrofile analytter ble også undersøkt, herunder bruk av høyere spenning og strøm enn det vanlig anbefales (6). Denne strategien virket dessverre dårlig i komplekse prøver.

Videre ble det for en rekke væskemembraner også undersøkt hvilke analyttegenskaper som er avgjørende for om det oppnås god eller dårlig ekstraksjonseffektivitet. Dette ble gjort ved å ekstrahere 50 hydrofile modellanalytter, og deretter koble ekstraksjonseffektiviteten til 23 molekylære deskriptorer for hvert stoff, ved bruk av multivariate regresjonsanalyser (3). Dette ga større forståelse for hvilke forhold som avgjør ekstraksjonsselektivitet (bred eller snever), og delvis prediksjon av ekstraksjonsutbytte for nye stoffer ble mulig.

## DISKUSJON

Bruken av dype eutektiske løsemidler som plattform for væskemembraner i EME viste seg å være til stor fordel. I tillegg til at disse generelt er miljøvennlige var det til stor nytte at forholdet og type komponenter fleksibelt kunne tilpasses for fundamentale studier av ekstraksjonsmekanismer. Dermed er det nå klarlagt hvordan væskemembranskjemien bør designes for EME av hydrofile forbindelser, og hvordan snever og bred selektivitet kan oppnås. Biologiske prøver er generelt rike på hydrofile stoffer, og veldig selektiv ekstraksjon kan derfor potensielt være vanskelig. Et interessant spørsmål som fortsatt gjenstår er derfor: Hvilken selektivitet kan oppnås fra biologiske prøver? Dette arbeidet har vist at proteiner og fosfolipider, som ofte er problematiske for LC-MS-analyse, effektivt

renses bort gjennom ekstraksjonen. Opprensningen av små endogene molekyler er ennå ikke klarlagt.

## KONKLUSJON

Dette arbeidet har demonstrert at EME prinsipielt er egnet som ekstraksjonsmetode for hydrofile stoffer i biologiske prøver. Da fokus har vært å forbedre den fundamentale kunnskapen for hvordan dette kan utføres, må arbeidet primært betraktes som brikker i et fundament som senere utvikling kan bygges på, snarere enn ferdige klar-for-bruk-metoder. Før dette gjenstår mye arbeid, men det er håpet at denne avhandlingen kan inspirere andre forskere til i fremtiden å utvikle nye og smartere EME-systemer basert på veldig «grønn» ekstraksjonskjemi.

## REFERANSER

1. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Electrokintetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids. *J Chromatogr A* 2006; 1109: 183–90.
2. Hansen FA et al. Electromembrane extraction using deep eutectic solvents as the liquid membrane. *Anal Chim Acta* 2021; 1143: 109–16.
3. Hansen FA, Tirandaz S, Pedersen-Bjergaard S. Selectivity and efficiency of electromembrane extraction of polar bases with different liquid membranes—Link to analyte properties. *J Sep Sci* 2021; 44: 2631–41.
4. Hansen FA et al. Electromembrane extraction of highly polar bases from biological samples – Deeper insight into bis(2-ethylhexyl) phosphate as ionic carrier. *Anal Chim Acta* 2020; 1115: 23–32.
5. Hansen FA, Pedersen-Bjergaard S. Electromembrane extraction of streptomycin from biological fluids. *J Chromatogr A* 2021; 1639: 461915.
6. Hansen FA, Jensen H, Pedersen-Bjergaard S. Electromembrane Extraction Using Sacrificial Electrodes. *Anal Chem* 2020; 92: 5595–5603.