

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP





## Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Studieprogram for Bioteknologi og kjemi, Institutt for industriell utvikling, Fakultet for teknologi, kunst og design ved Høgskolen i Oslo og Akershus (HiOA) i perioden 2011-2012.

Jeg vil først og fremst takke min veileder, Per Ola Rønning ved HiOA for mange gode råd med det praktiske arbeidet og med skrivearbeidet. Din faglige dyktighet har vært til inspirasjon og motivasjon for å forske og forstå faget analytisk kjemi.

Takk til veileder, Gaut Gadeholt, ved Oslo Universitetssykehus, Ullevål, for faglige innspill, humoristiske sans og oppmuntrende ord underveis.

Jeg vil takke Morten Sørli ved Instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap (UMB) for godkjenning og veiledning av denne oppgaven.

En takk rettes til Roger Thrones, ved Teknolab, for gode råd og anbefalinger for valg av kolonne.

Takk, kjære mamma, for at du har gitt meg livet og alt hva du har lært meg, men som døde i sommer før oppgaven skulle leveres inn.

Oslo, 13/12-2012

---

Merete Schulte

## Innholdsfortegnelse

Forord .....	I
Innholdsfortegnelse .....	II
Sammendrag .....	VI
Summary .....	VII
Forkortelser og ordforklaringer .....	VIII
1. Innledning.....	1
1.1 Bakgrunn for arbeidet .....	1
2. Generell teori.....	2
2.1 Bakteriecellen .....	2
2.2 Fluorokinoloner - en gruppe antibiotika .....	3
2.3 Utslipp til naturen .....	4
2.5 Fluorokinoloner - fysiokjemiske egenskaper og struktur .....	5
2.6 Serum og proteinfelling .....	7
3. Kjemikalier og utstyrsliste .....	8
3.1 Kjemikalier .....	8
3.2 Utstyrsliste .....	9
3.2.1 Instrumenter .....	9
3.2.2 Kolonner .....	9
3.2.3 Laboratorieutstyr .....	9
4. Spektroskopi - fluorokinoloner .....	11
4.1 Teori for spektroskopi .....	11
4.2 Eksperimentell prosedyre for UV-målinger .....	13
4.3 Resultater fra UV-målinger .....	14
4.4 Eksperimentell prosedyre for fluorescens-målinger .....	15
4.5 Resultater fra fluorescens-målinger .....	15
5. Prinsipp for kapillærelektroforese .....	17

5.1 Kapillærelektroforese teori .....	17
5.2 Separasjonsprosesser i kapillærrøret .....	18
5.2.1 Kapillærrør .....	18
5.2.2 Basis for elektroforetisk separasjon .....	18
5.2.3 Elektroosmotisk strøm .....	20
5.3 Effekt av separasjonsparametre .....	22
5.3.1 Effekten av bufferens pH .....	22
5.3.2 Effekten av bufferkonsentrasjonen .....	22
5.3.3 Effekten av organiske løsningsmidler.....	23
5.3.5 Kontroll av elektroosmotisk strøm.....	23
5.3.6 Effektivitet .....	23
5.3.7 Oppvarmingseffekter - «Joule heating».....	25
5.4 Injeksjon av prøveløsninger.....	25
5.4.1 Hydrodynamisk injeksjon .....	26
5.4.2 Elektrokinetisk injeksjon .....	26
5.5 Teknikker for oppkonsentrering .....	27
5.5.1 Normal oppkonsentreringsteknikk - «Normal stacking mode» .....	27
5.5.2 Oppkonsentrering av store volum - «LVSS».....	28
5.5.3 «Sweeping».....	28
5.2 Tillaging av stamløsninger og buffere .....	29
5.2.1 Eksperimentelt - tetraboratbuffer som separasjonsbuffer.....	30
5.2.2 Resultater og konklusjon - tetraboratbuffer som separasjonsbuffer .....	31
5.3 Eksperimentelt - «LVSS».....	34
5.4 Eksperimentelt - fosfatbuffer som separasjonsbuffer .....	36
5.4.1 Eksperimentelt - tilsetning av organisk modifikator.....	36
5.4.2 Resultater og konklusjon - tilsetning av organisk modifikator.....	38
5.4.3 Effekt av pH.....	39

5.4.4 Resultater og konklusjon - effekt av pH .....	40
5.4.5 Effekt av feltstyrke, kapillærlengde og injeksjonstid.....	41
5.4.6 Resultater og konklusjon - effekt av feltstyrke, kapillærlengde og injeksjonstid....	41
5.4.7 Verifikasjon av ciprofloksacin og norfloksacin .....	41
5.4.8 Resultater - verifikasjon av ciprofloksacin og norfloksacin .....	42
5.5 Optimalisering av fosfatbuffer.....	42
5.5.1 Eksperimentelt - optimalisering av fosfatbuffer .....	42
5.5.2 Resultater og konklusjon - optimalisering av fosfatbuffer.....	42
5.5.3 Fortynningrekke med den optimaliserte fosfatbufferen.....	43
5.5.4 Resultater og konklusjon - fortynningsrekke med den optimaliserte bufferen .....	43
5.6 Repeterbarhetsforsøk .....	45
5.6.1 Resultater og konklusjon - repeterbarhetsforsøk .....	45
5.7 Oppsummering og konklusjon.....	46
6. Prinsipp for HPLC.....	47
6.1 HPLC teori.....	47
6.1.2 Temperatureffekter i væskekromatografi.....	48
6.1.3 Stasjonærfaser i HPLC.....	48
6.1.4 Stasjonærfaser basert på kjemisk bundne stasjonærfaser.....	49
6.1.5 Løsemiddelstyrke .....	51
6.1.2 Kromatografisk teori.....	52
6.1.3 Kvantitative analyser .....	54
6.1.4 Analyse av fluorokinoloner.....	55
6.1.5 Analyse av fluorkinoloner ved bruk av omvendt fase C18-kolonner .....	56
6.1.6 Analyse av fluorokinoloner ved bruk av C8-kolonner.....	57
6.2 Tillaging av stamløsninger og buffere.....	58
6.2.1 Eksperimentelt - Restek C18-kolonne .....	59
6.2.2 Resultater og konklusjon - Restek C18-kolonne.....	60

6.3 Eksperimentelt - PAH C18-kolonne .....	62
6.3.1 Resultater og konklusjon - PAH C18-kolonne .....	62
6.4 Tillaging av nye stamløsninger og testløsning .....	63
6.4.1 Eksperimentelt - ACE 3, C18-HL.....	63
6.4.2 Resultater og konklusjon - ACE 3, C18-HL.....	64
6.5 Kromatografiske beregninger fra den optimaliserte separasjonen .....	66
6.5.1 Konklusjon av kromatografiske beregninger.....	67
6.6 Beregning av deteksjonsgrensen - LOD .....	67
6.7 Oppsummering og konklusjon.....	68
7. Kvantitativ analyse av serumforsøk .....	70
7.1 Innledning grunnen for HPLC .....	70
7.2 Eksperimentelt - serumforsøk.....	70
7.3 Resultater og diskusjon.....	75
8. Oppsummering og konklusjon .....	84
8.1 Oppsummering .....	84
8.2 Konklusjon.....	86
8.3 Videre arbeid .....	86
9. Referanser.....	88
10. Vedlegg .....	93
10.1 Absorbansspektre fra UV- og fluorescens spektrofotometer .....	93
10.2 Kapillærelektroforese - elektroferogrammer .....	98
10.3 HPLC-kromatogrammer .....	103
10.4 Statistiske resultater fra det kvantitative serumforsøket.....	106

## Sammendrag

Hensikten med denne oppgaven var å teste ut og evaluere to metoder for å analysere noen utvalgte fluorokinoloner i humant serum ved hjelp av væskekromatografi, HPLC, og kapillærelektroforese, CE.

Det ble testet ut to separasjonsbuffer, en tetraboratbuffer og en fosfatbuffer. Tetraboratbuffer oppnådde ikke tilstrekkelig separasjon.

En oppkonsentreringsteknikk som «LVSS» ble testet ut med 20 µM norfloksacin. Med denne teknikken ble det oppnådd en signaløkning som var 34x bedre enn med «normal mode stacking».

En analyse av fluorokinolonene med 50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), pH 7,57 gav best separasjon, men den var ikke fullstendig. Migrasjonstidene er stabile, men arealene av toppene er ustabile. Kapillærelektroforese er ikke egnet for kvantitative forsøk. Systemet viste ikke god nok robusthet.

I metodeutviklingen i HPLC ble ulike sammensetninger og kolonner testet ut. Den kolonnen som gav optimal separasjon av analyttene var med ACE 3, C18-HL kolonne med 25 mM fosfatbuffer/MeOH (75:25, v/v) (TEA, pH 3,03). Analysetidene var under 10 minutter for alle fluorkinolonene. De kromatografiske beregningene av den optimale separasjonen tilfredsstiller kravene for god analytisk separasjon. Metoden var rask og systemet viste god robusthet.

Med disse analysebetingelsene ble et kvantitativt forsøk utført der fluorokinolonene ble tilsatt humant serum. Dette gav resultater med 90 % gjenfinning av analyttene.



## Summary

The goal of this study was to test and evaluate two different methods for analyzing selected fluoroquinolones in human serum with the help of liquid chromatography, HPLC and capillary electrophoresis.

Two different separation buffers, one tetraborate buffer and one phosphate buffer were tested.

An on-line sample preconcentration technique, LVSS, was tested with 20  $\mu$ M norfloxacin. A signal improvement of 34x compared to normal mode stacking was achieved with this technique.

An analysis of the fluoroquinolones with 50 mM phosphate buffer/AcN (60:40, v/v); pH 7.57 gave the best separation, though it was not an entire separation. The migration times are reproducible in repeated tests, but the areas of the peaks vary. Capillary electrophoresis is unsuited for quantitative analysis. The system was not sufficiently robust.

Three columns and three different buffer combinations were tested in the methodological development in HPLC. The column that gave optimal separation of the compounds was with ACE 3, C18-HL column with 25 mM phosphate buffer/MeOH (75:25, v/v) (TEA, pH 3.03). The analysis times were under 10 minutes for all the fluoroquinolones. The chromatographic calculations were based on the optimal separation.

Within this analytical condition, a quantitative experiment was performed in which fluoroquinolones were added to human serum. This resulted in a 90 % recovery of the analyzed compounds.

## Forkortelser og ordforklaringer

AcN	Acetonitril
BGE	Bakgrunnelektrolytt
CE	“Capillary electrophoresis” - kapillær elektroforese
EOF	Elektroosmotisk flow - elektroosmotisk strøm
FQ	“Fluoroquinolones” - fluorokinoloner
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography” (høyoppløselig væskrokromatografi) interesse
Isokratisk eluering	Konstant mobilfasesammensetning under analysen
ISTD	Intern standard
LOD	Deteksjonsgrense, bestemt til 3,3 x SD
LOQ	Kvantifiseringsgrense, bestemt til 10 x SD
LVSS	“Large volume sample stacking” -
Matriks	Alle komponenter i en prøve bortsett fra analytten av
MeOH	Metanol
Min.	Minutter
NaOH	Natriumhydroksid
Omvendt fase	Upolar stasjonærfase med polar mobilfase
S/N	“Signal/Noise” - signal/støy forhold
Sek.	Sekunder
Spike serum	Serum tilsatt en kjent mengde og kjent konsentrasjon av et stoff
TCA	“Trichloroacetic” - trikloreddiksyre
TEA	Trietylamin
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer

# 1. Innledning

## 1.1 Bakgrunn for arbeidet

Formålet med oppgaven var å utvikle og evaluere metoder for å analysere noen utvalgte fluorokinoloner ved hjelp av væskerkromatografi og kapillærelektroforetisk metode. Metoden skulle utvikles for å måle fluorokinoloner i biologiske væsker for eksempel blodprøver fra mennesker. Ved metodeutvikling for HPLC ble det lagt vekt på testing og karaktisering av tilgjengelige separasjonskolonner med fokus på å utvikle en rask, selektiv og robust analysemetode. Deteksjonsprinsippet i analysene var basert på UV-målinger og bruk av fluorescens. Prøveopparbeidingsteknikkene for HPLC-analysene ble testet ut med hensyn på ekstraksjon og oppkonsentrering av fluorokinoloner fra humant serum.

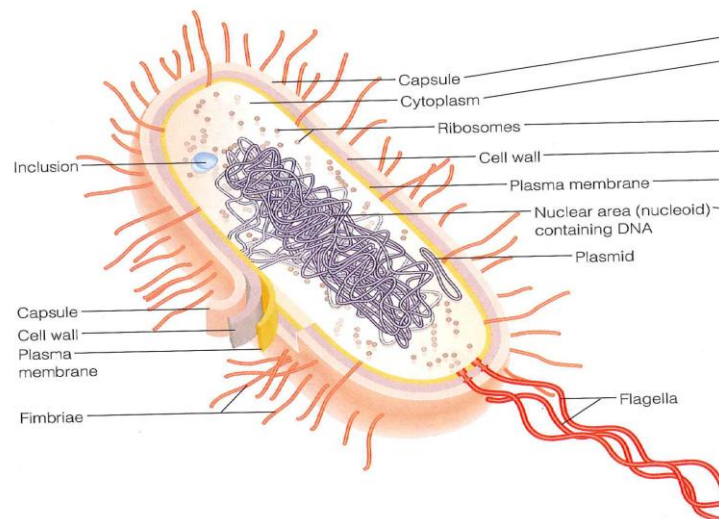
Kapillærelektroforese er et interessant alternativ til konvensjonelle væskerkromatografiske teknikker. Teknikken kjennetegnes av et høyt separasjonseffektivitet, lite prøveforbruk og korte analysetider. Ved bruk av kapillærelektroforese kan det utføres oppkonsentrering og fokusering av analyttene direkte i kapillæret som en del av injeksjons- og separasjonsprosessen, såkalt «stacking» -teknikk.

Det var ønskelig å teste ut kapillærelektroforetisk separasjon som en alternativ teknikk for å detektere og kvantifisere fluorokinoloner i de nevnte prøvematerialene.

## 2. Generell teori

### 2.1 Bakteriecellen

Bakterieceller deles inn som prokaryoter og eukaryoter celler. De er kjemisk like i oppbyggingen og de inneholder nukleinsyrer, proteiner, lipider og karbohydrater. Nesten alle prokaryotene har cellevegg, se figur 2.1, mens eukaryotene mangler cellevegg. Prokaryotene kan deles videre inn i eubakterier og archaeobakterier. Celleveggen til bakterieceller er kompleks og strukturen danner grunnlaget for formen til bakteriene. Funkjonen til celleveggen er å beskytte cellen mot mekanisk påvirkning utenfra. Celleveggen er bygd opp av et nettverk av peptidoglycan som består av et repeterende «mønster» av disakkarider knyttet til polypeptider og danner et gitter rundt cellen. Disakkaridene er bygd opp av N-acetylglukoseamin (G) og N-acetylmuraminsyre (M) bundet til hverandre i lange kjeder. Disse kjedene er knyttet til hverandre av peptidbroer dannet av aminosyrer. Flere lag av dette danner peptidoglykanlag (1). Celleveggen er årsaken til at noen specier bidrar til å forårsake sykdommer, men er også et sete for antibiotika. Sammensetningen av celleveggen er forskjellig i ulike bakterier.



**Figur 2.1.** Strukturen til en typisk prokaryot celle (1).

Bakterier kan deles inn i gram positive og gram negative bakterier ut fra hvilken sammensetning celleveggen har. I gram positive bakterier består celleveggen av flere lag av peptidoglykanlag som er tykt og rigid, og i tillegg er det en alkohol gruppe, for eksempel glyserol, og en fosfat gruppe som har en negativ ladning der kationer (positive ioner) kan

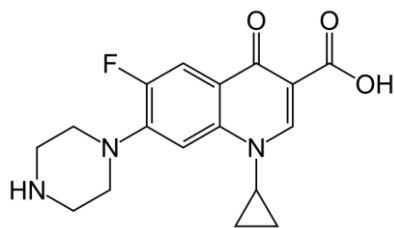
binde seg. I gram negative bakterier er det et tynt lag med peptidoglykanlag og en ytre membran. Peptidoglykanlaget er bundet til lipoproteiner. Den ytre membranen har mange spesifikke funksjoner. Membranen er negativt ladet og er en barriere for enkelte antibiotika.

Ved gramfarging av bakteriecellene blir de gram positive bakteriene farget blå og gram negative bakteriene farget rød.

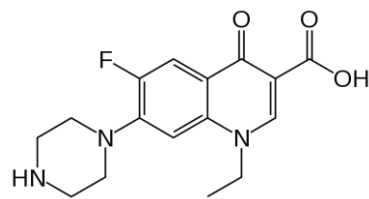
## 2.2 Fluorokinoloner - en gruppe antibiotika

Fluorokinoloner er en gruppe antibakterielle legemidler som brukes innen human medisin og veterinærmedisin (2). Fluorokinoloner har et bredt anti-infeksjonsspekter mot gram positive og gram negative bakterier.

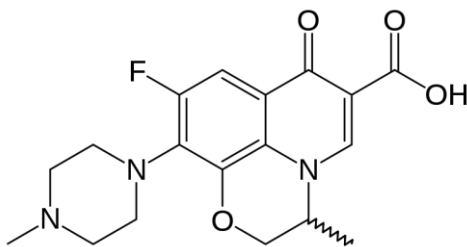
Den første generasjonen, kinoloner, ble brukt til behandling av urinveisinfeksjon. Basisstrukturen til kinolonene består av en karboksylgruppe i posisjon tre (C-3) og en karbonylgruppe i posisjon fire (C-4). Figur 2.2 - 2.5 viser strukturen til henholdsvis ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin, lomefloksacin hydroklorid og pefloksacin.



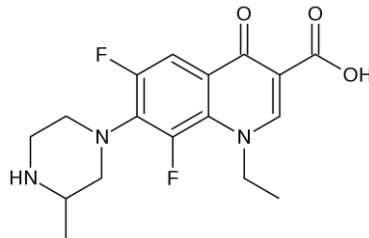
**Figur 2.2.** *Strukturen til ciprofloksacin.*



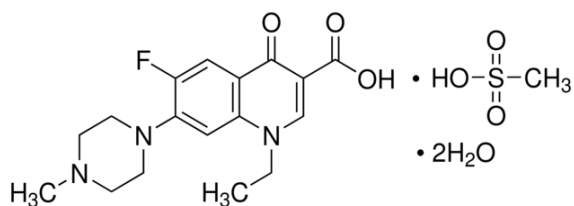
**Figur 2.3.** *Strukturen til norfloksacin.*



**Figur 2.4.** *Strukturen til ofloksacin.*



**Figur 2.4.** *Strukturen til lomefloksacin hydroklorid.*



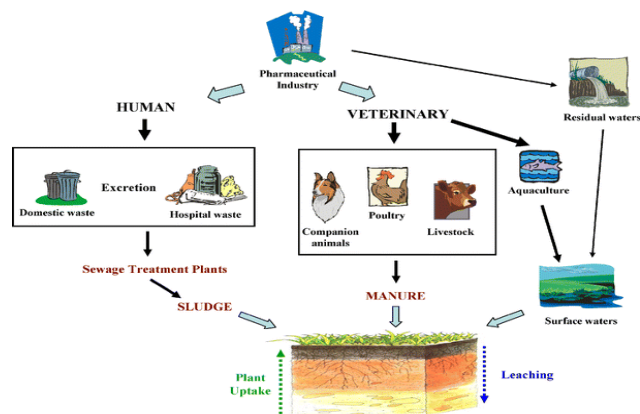
**Figur 2.5.** *Strukturen til pefloksacin mesylate dihydrate.*

Utviklingen av fluorokinoloner, som er andre generasjon, begynte ved en tilfeldighet der nalidiksinsyre ble oppdaget som et biprodukt i syntesen av klorkinolon til behandling av malaria (3). Nalidiksinsyre var den første forbindelsen mot gram negative bakterier. En innføring av et fluor atom i sjette posisjon (C-6) og en piperazinyl gruppe i syvende posisjon (C-7) gir en forsterket effekt på den antibakterielle aktiviteten og en bedre farmakokinetisk profil. Norfloxacin var det første fluorokinolonet som ble brukt til behandling av urinveisinfeksjon og prostatitis. Fluorokinoloner hemmer to enzymer i bakterie DNA syntesen, nemlig topoisomerase II (DNA gyrase) og/eller topoisomerase IV. Prosessen involverer et kompleks av fluorokinoloner, DNA og enzymet som interfererer med transkripsjonen som sammen fører til en bakteriell celledød.

Det er stadig behov for å utvikle nye antibakterielle legemidler mot infeksjoner, noe som er tidkrevende og utfordrende. Da kan det heller være mer effektivt å modifisere allerede eksisterende antibiotika. Det avgjørende er det mikrobiologiske potensialet og farmakokinetiske profil av den utvalgte forbindelsen.

### 2.3 Utslipp til naturen

Utslipp av fluorokinoloner til naturen skjer ved human og animal ekskresjon. Det humane utslippet skjer fra private husholdninger og fra sykehus til avløpsanlegg, se figur 2.6. Fluorokinoloner kan spres fra animal ekskresjon og flytende husdyrgjødesel på tvers av jorder og beiteområder og når grunnvannet. Det er funnet spor av antibiotika i vann i lave konsentrasjoner og det utgjør en risiko for vandige økosystemer. Spredningen av antibiotika gir en økning av antibiotika resistens i patogene mikroorganismer. Spredning av fluorokinoloner til jord og sedimenter er også et økende problem (4).



**Figur 2.6.** Figuren viser ulike veier av utslipp av fluorokinoloner fra private husholdninger, sykehus og veterinærmedisin til jord og avløpsanlegg (5).

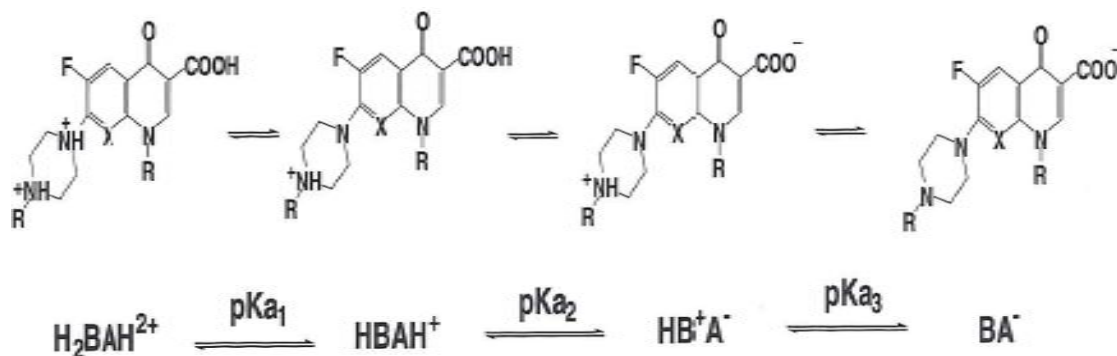
Det mest anvendte fluorokinoloet er ciprofloksacin, det andre er ofloksacin etterfulgt av norfloksacin. Innen veterinærmedisin er enrofloksacin, danofloksacin, sarafloksacin og orbifloksacin de mest anvendte fluorokinolonene. De mest overvåkede klassene av antibiotika er penicillin, tetrasykliner, sulfonamider og makrolider. Disse har bidratt til viktig informasjon om miljøeksponering og er blitt brukt til å fastsette miljørisiko (5) av kjemikaliene. Metaboliseringen av fluorokinolonene skjer i lever og utskilles med urinen. Halveringstiden kan variere fra 1,5 til 16 timer og fluorokinolonene skilles ut uendret (< 25 % metabolisering). Væskekromatografi er blitt et viktig verktøy for å overvåke fluorokinoloner i terapeutisk bruk, men også til klinisk farmasøytisk utvikling og kvalitetskontroll av farmasøytiske preparater (6). Væskekromatografi kan detektere, separere og kvantifisere foreldreforbindelsen og de metabolske degraderingsproduktene.

## 2.5 Fluorokinoloner - fysiokjemiske egenskaper og struktur

I molekylstrukturen til de utvalgte fluorokinolonene inngår både funksjonelle grupper (karboksylsyre) og basiske aminogrupper (7). Egenskapene til fluorokinolonene blir påvirket av den fysiokjemiske karakteren til løsningsmidlet de er løst i. Løsningsmidlets pH vil kunne påvirke fluorokinolonenes antibakterielle aktivitet og evne til å trenge inn i bakterier.

De ulike fysiokjemiske egenskaper til fluorokinolonene er viktig å forstå for å kunne utvikle analytiske prosedyrer og for å monitorere fluorokinolonene i mennesker og i naturen. Fluorokinolonene har svakt fluorescerende egenskaper og kan danne høyt fluorescerende komplekser med lantanider. Blant disse lantanidene er Ca(II), Mg(II) og Al(II) som fører til komplekser med stor stabilitetskonstant (5). Fluorokinolonene er kjemisk stabile for hydrolyse og høy temperatur, men blir fotolysert av UV-lys. De fotokjemiske reaksjonene forårsaker defluorisering.

Studier har vist at kinoloner med en piperazinyl substituent og en karboksyl-gruppe, som ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin og lomefloksacin, har tre syre/baselikevekter, se figur 2.7.



**Figur 2.7.** Skjematisk diagram av syre/baselikevekten for kinoloner med en piperazinyl substituent (8).

pH-verdien i løsningsmidlet til fluorokinolonene er bestemmende for ioniseringsgraden til analyttene. Ved lave pH-verdier ( $\text{pH} < \text{pKa}_1$ ) er begge amniogrupperne protonert ( $\text{H}_2\text{BAH}^{2+}$ ), slik at analyttene foreligger på kationisk form. Økende pH vil føre til redusert positiv ladning. Ved høye pH-verdier ( $\text{pH} > \text{pKa}_3$ ) vil molekylene være negativt ladet.

I området  $\text{pKa}_2 < \text{pH} < \text{pKa}_3$  vil fluorokinoloner foreligge på zwitterionisk form ( $\text{HB}^+\text{A}^-$ ).

I elektroforetiske analyser hvor separasjonen blant annet er avhengig av ladningen til analyttene, vil pH i separasjonsbufferen ha stor betydning for fluorokinolonenes migrasjonshastighet. I tabell 2.1 er pKa-verdiene til utvalgte fluorokinoloner vist.

**Tabell 2.1.** pKa-verdier for noen utvalgte kinoloner som ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin og lomefloksacin hydroklorid med en piperazinyl substituent (8).

Analytter	pKa-verdier		
	pKa <sub>3</sub>	pKa <sub>2</sub>	pKa <sub>1</sub>
Ciprofloksacin	8,25 ± 0,03	5,75 ± 0,15	5,15 ± 0,20
Norfloksacin	8,10 ± 0,04	5,85 ± 0,08	5,10 ± 0,15
Ofloksacin	8,00 ± 0,03	5,85 ± 0,05	5,20 ± 0,08
Lomefloksacin hydroklorid	8,55 ± 0,04	5,80 ± 0,10	5,15 ± 0,15



Til analyse på væskechromatografi brukes det fortynnede syrer eller svakt sure buffere basert på fosforsyre, sitronsyre og maursyre siden fluorokinolonene er polare i sin natur. Dette gjøres for å regulere ioniseringsgraden til fluorokinolonene og motvirke binding til de frie silanol-gruppene på silikabaserte kolonner (5).

## **2.6 Serum og proteinfelling**

Serum er en kompleks matriks som inneholder mange komponenter, blant annet proteiner (9), som må fjernes før analyse. Matrikskomponentene kan gi uønskede signaler i detektoren til analyseinstrumentet og/eller interferere med signalene fra analyttene (10). I HPLC kan proteiner adsorbere på kolonnen. Proteiner kan i verste fall tette igjen kolonnen og gjøre den ubrukelig (11). Det er da behov for en prøveopparbeidelse som fjerner disse proteinene. Proteinfelling brukes til prøver som har et høyt proteininnhold slik som i serum. Serum har 8 % (w/w) protein (11).

En av de mest kjente og effektive proteinfellingsteknikkene er felling gjennom tilsetning av et organisk løsningsmiddel som acetonitril, AcN, (12-14), men også syrefelling eksempelvis med 20 % trikloreddiksyre, TCA, (15, 16) og ultrafiltrering er mye anvendt (16, 17). Mange legemidler har en betydelig binding til proteiner. Fjerning av proteiner kan dermed føre til tap av analytter under prøveopparbeidningen. Proteinbindingsgraden av ciprofloksacin i plasma og serum er 20 - 40 % (18), for norfloksacin er den 10 -15 % (19), for ofloksacin er den 30 % (20) og for lomefloksacin hydroklorid er proteinbindingsgraden 10 % (21). Verdiene er omtrentlige og det er til dels stor forskjell mellom verdiene som er oppgitt i litteraturen.

### 3. Kjemikalier og utstysrliste

#### 3.1 Kjemikalier

Alle løsninger og kjemikalier er av HPLC grad er vist i tabell 3.1.

**Tabell 3.1.** Kjemikalier som ble brukt i oppgaven.

Kjemikalie	Molekylvekt, g/mol	CAS #	Renhet	Leverandør
Ciprofloksacin $C_{17}H_{18}FN_3O_3$	331,35	85721-33-1	For HPLC $\geq 98\%$	Sigma - Aldrich
Norfloksacin $C_{16}H_{18}FN_3O_3$	319,33	70458-96-7	Analytical standard	Sigma - Aldrich
Ofloksacin $C_{18}H_{20}FN_3O_4$	361,4	82419-36-1	$\geq 99\%$	Sigma - Aldrich
Lomefloksacin hydroklorid $C_{17}H_{19}F_2N_3O_3$	387,8	98079-52-8	$\geq 98\%$	Sigma - Aldrich
Pefloksacin mesylate dihydrat $C_{17}H_{20}FN_3O_3$	465,49	70458-95-6	$> 97\%$	Sigma - Aldrich
Acetonitril $C_2H_3N$	41,05	75-05-8	For HPLC $\geq 99,9\%$	Sigma - Aldrich
100 % Eddiksyre $CH_3COOH$	60,05	64-19-7	GPR Rectapur	BDH Prolabo
Metanol $CH_3OH$	32,04	67-56-1	For HPLC	VWR International
Natriumhydroksid NaOH	40,00	1310-73-2	Pro analysis $> 99\%$	VWR International
Natriumtetraborat dekahydrat $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	381,37	1303-96-4	Normapur $> 99\%$	BDH Prolabo
Natriumdihydrogenfosfat $NaH_2O_4P$	119,98	7558-80-7	$> 99\%$	Sigma - Aldrich
85 % Ortofosforsyre $H_2PO_4$	98,00	7664-38-2	Pro analysi	Merck
37 % Saltsyre HCl	36,46	7647-01-0	Pro analysi	Merck, Emsure
Trietylamin $C_6H_{15}N$	101,19	121-44-8	For syntese $> 99\%$	Merck
Humant serum: Autonorm™ Human Liquid, Level 1		Lot:0812578		SERO AS

## 3.2 Utstyrliste

### 3.2.1 Instrumenter

HPLC, Dionex Ultimate 3000, Instrumentteknikk

Fluorescens detector: Dionex RF 2000 Fluorescence Detector

Software: *Chromeleon Client, version: 6.80*

Kapillærelektroforese, Beckman Coulter, ProteomeLab™ PA 800

Software: *32 Karat 8*

UV-VIS spektrofotometer: Helios Omega, UV-VIS, Thermo Scientific

Fluorescens spektrofotometer: Varian Cary Eclipse, Fluorescence Spectrophotometer, Holger Teknologi

Sentrifugeinndamper, Centrivap Concentrator, model 780011, Labconco

Vakuumpumpe, vacuubrand, PC 3001, Vario, Chiron AS

Mikrosentrifuge, Galaxy 16DH, VWR

### 3.2.2 Kolonner

Pinnacle™ II, Restek, C18, 100x4,6 mm i.d, 5,0 µm, sfærisk, 13 % C-innhold, full endcapping, pH: 2,5 - 8, porestørrelse: 110 Å, Teknolab as, Norge

SUPECOSIL™ LC-PAH HPLC COLUMN, PAH, C<sub>18</sub>, 150x4,6 mm i.d, 5 µm, 13 % C-innhold, porestørrelse: 120 Å, Sigma-Aldrich, Norge

ACE 3, C18-HL150x3 mm i.d, 3 µm, 20 % C-innhold, full endcapping, porestørrelse: 90 Å, overflateareal: 400 m<sup>2</sup>/g, Teknolab as, Norge

Kvartsglass, «fused silica», kapillærrør, TSP075375, indre diameter: 75 µm, ytre diameter: 375 µm, Polymicro Technologies, Teknolab as, Norge

### 3.2.3 Laboratorieutstyr

HPLC vial, 1,5 mL, med snapplukk, Chromacol

PCR rør, 0,2 mL Thermo tube med flatt lokk, Thermo Scientific

Plastsprøyte, 1 mL, BD Plastipak™

13 mm sprøytefilter, 0,2 µm PTFE-membran, VWR

Sentrifugerør med filter, Millipore, non-sterile Ultrafree®-MC, 10000 NMWL filter unit, (centrifugal filtration of aqueous solutions), low binding regenerated cellulose (Ultacel YM-10)

Sentrifugerør, 1,5 mL og 2,0 mL

Analysevekt, Mettler Toledo, Switzerland, Type: New Classic MF, Model: ML 204/01

pH-meter, PHM 210, Standard pH-meter, Meterlab<sup>R</sup>, Radiometer analytical

## 4. Spektroskopi - fluorokinoloner

### 4.1 Teori for spektroskopi

Molekyler eksiteres ved tilførsel av energi i form av varme, lys, elektromagnetisk stråling eller gjennom kjemiske reaksjoner. Eksitasjonen av et molekyl til eksitert tilstand kan bli beskrevet, som vist i (4.1).



Den høyere energitilstanden kalles for eksitert tilstand (22) for molekyler. Eksiterte molekyler er ustabile og vender tilbake til sin grunntilstand etter veldig kort tid ( $10^{-6}$  til  $10^{-9}$  s). Når et molekyl vender tilbake til grunntilstanden skjer det gjerne ved avgivelse av varme, som vist i (4.2). I noen tilfeller skjer det også ved avgivelse av lys, som fluorescens eller fosforescens.



Den laveste energitilstanden molekylene kan være i er grunntilstanden,  $E_0$ . Molekyler kan absorbere eller emittere en definert energi (22), i form av lys, som er lik energidifferansen mellom to energitilstander, som vist i (4.3).

$$E_1 - E_0 = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (4.3)$$

der  $E_1$  er et høyere energi nivå enn  $E_0$ , og  $E_0$  er grunntilstanden,  $\nu$  er frekvensen,  $c$  er lysets hastighet,  $3,00 \cdot 10^8$  m/s og  $\lambda$  er bølgelengden og  $h$  er Planks konstant  $6,62 \cdot 10^{-34}$  J·s.

Energien som blir absorbert kan påvirke molekylet på forskjellige måter. Det kan skje ved overføring av et elektron til en orbital på et høyere energi nivå (elektronisk overgang), en økning av vibrasjoner i molekylet (vibrasjonsovergang) eller en økning av rotasjonen i bindingen til molekylet (rotasjonsovergang).

## Molekylær absorpsjon

Molekylspektroskopi er basert på måling av transmittans eller absorbans vanligvis i væskeformige prøver. Sammenhengen mellom absorbans og analyttens konsentrasjon er uttrykt i Lambert - Beers lov (4.4)

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (4.4)$$

der  $P_0$  er intensiteten til innkommende stråling,  $P$  er intensiteten til transmittert stråling,  $\epsilon$  er molar absorptivitet (L/mol·cm),  $b$  er lysveien i cm og  $c$  er konsentrasjonen (mol/L) til løsningen.

## UV-VIS spektrofotometri

UV-VIS spektrofotometri er en spektroskopisk teknikk som kan brukes til kvalitative og kvantitative analyse av molekyler som absorberer lys i UV og synlig bølglengdeområde. Kvalitative undersøkelser er basert på opptak av spektre, mens de kvantitative analysene er basert på måling av absorbans ved en gitt bølglengde.

Identifikasjonen er basert på UV-spektra der absorbans av stoff blir registrert som funksjon av bølglengden (11). UV- VIS spektrofotometri alene kan ikke identifisere stoffer, da forskjellige stoffer kan ha lignende UV-spektra. Instrumentet passer for målinger som kan utføres i det ultrafiolette og synlige området av spektrum. Det optiske systemet produserer monokromatisk stråling i bølglengdeområdet 200 - 800 nm (UV: 200 - 400 nm, synlig: 400 - 800 nm). Prøver som skal undersøkes ved hjelp av UV-VIS spektroskopi må være løst i et passende løsningsmiddel som ikke absorberer lys i det aktuelle bølglengdeområdet. Vann er et egnet løsningsmiddel (vann har en lav cutoff, brukes over 190 nm) og ikke-absorberende buffere som fosfat og borat kan også brukes (11). Organiske løsningsmidler som acetonitril, metanol eller etanol er også godt egnet/passende for UV-VIS spektroskopi.

Ved adsorpsjon av UV- eller synlig lys vil man få en elektronovergang i molekylet. Et elektron flyttes opp fra en molekylorbital med lavere energi til en tom molekylorbital med høyere energi. Typisk skjer elektronovergangen mellom den fylte orbitalen med høyest energi (HOMO) til den tomme (ikke-bindende) molekylorbitalen med lavest energi (LUMO). Den delen av molekylet som absorberer lys kalles for en kromofor, og bølglengden for

absorpsjon av lys er bestemt av forskjellen i energi mellom de elektrontilstandene som molekylet befinner seg i. Elektronoverganger mellom  $\sigma > \sigma^*$  orbitaler krever mye energi (korte bølgelengder), mens overganger mellom  $\pi > \pi^*$  orbitaler skjer ved lengre bølgelengder. Økende innslag av konjugerte dobbeltbindinger (22) i molekylene gir absorpsjon av lys ved økende bølgelengder. UV-VIS spektroskopi kan derfor gi verdifull informasjon om bindingsforhold i molekylene.

UV-VIS spektrofotometri kan brukes i kombinasjon med HPLC, teknikken er både robust og enkel med relativt lave deteksjonsgrenser.

### Fluorescensspektroskopi

Fluorescensspektroskopi er basert på at noen molekyler som absorberer UV-VIS lys også vender tilbake til grunntilstanden ved å sende ut lys. Det emitterte lyset har en lengre bølgelengde enn bølgelengden til lyset som ble brukt til eksitasjon. Et spektrofluorimeter gir oss muligheten til å bestemme både optimale eksitasjonsbølgelengder og emisjonsbølgelengder for fluorescerende analytter. Opptak av emisjonsspektre skjer ved å eksitere molekylet ved den bølgelengden som gir maksimal absorpsjon, samtidig som instrumentet skanner over det bølgelengdeområdet hvor lys emitteres. Til kvantitative analyser benyttes de bølgelengdene som gir maksimal absorpsjon og lysemisjon. For sterkt fortynnede løsninger er det en lineær sammenheng mellom målt fluorescens og konsentrasjon til analytten som undersøkes. Fluorescenssignalet avhenger også av intensiteten til eksitasjonslyset.

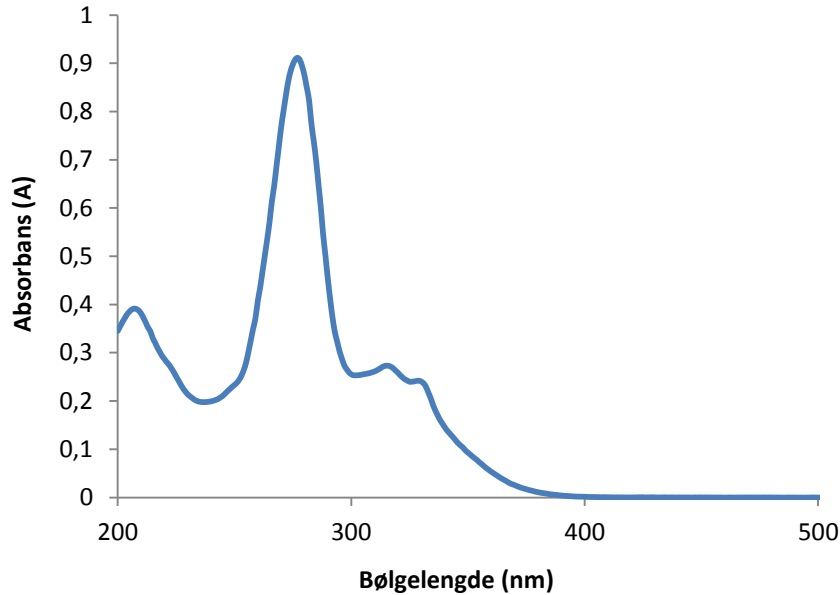
I vanlige fluorimetre er gjerne lyskilden en xenonlampe, men også lasere kan benyttes (laserindusert fluorescens, LIF). Bruk av fluorescens detektorer i HPLC betyr økt selektivitet og mye lavere deteksjonsgrenser enn det som oppnås med en ordinær UV-VIS detektor.

### **4.2 Eksperimentell prosedyre for UV-målinger**

Opptak av absorpsjonsspekter av hver av analyttene ble utført på Helios Omega, UV-VIS, Intelliscan. Analyttene som ble undersøkt var ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin, lomefloksacin hydroklorid og pefloksacin. Analyttene ble løst i 0,1 % eddiksyreløsning og hadde en konsentrasjon på 50  $\mu\text{M}$ . Bølgelengden ble avlest der det var høyest absorpsjon. Det ble benyttet kvartskyvette for målingene. Målingene ble utført i romtemperatur ved 22°C og i bølgelengdeområdet 200 - 600 nm. Figur 4.1 viser målt absorpsjon av ciprofloksacin som funksjon av bølgelengden.

### 4.3 Resultater fra UV-målinger

Absorbansspekter av ciprofloksacin løst i 0,1 % eddiksyreløsning målt på UV-VIS spektrofotometer er vist i figur 4.1.



**Figur 4.1.** Absorbansspekter av ciprofloksacin (50  $\mu\text{M}$ ), der absorbans (A) er målt som funksjon av bølgelengden (nm). Maksimal absorbans observeres ved 277 nm.

Tilsvarende målinger ble utført med norfloksacin, ofloksacin, lomefloksacin hydroklorid og pefloksacin. Resultatene for avlest maksimal absorbans er vist i tabell 4.1

**Tabell 4.1.** Tabell over avleste bølgelengder (nm) som ga maksimal absorbans for ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin, lomefloksacin hydroklorid og pefloksacin målt på UV-VIS spektrofotometeret.

Analytt	Bølgelengde (nm)
Ciprofloksacin	277
Norfloksacin	277
Ofloksacin	294
Lomefloksacin hydroklorid	287
Pefloksacin	277

Absorbansspektrene for norfloksacin, ofloksacin, lomefloksacin hydroklorid og pefloksacin er vist i vedlegg 10.1, figur 4.2 - 4.5.

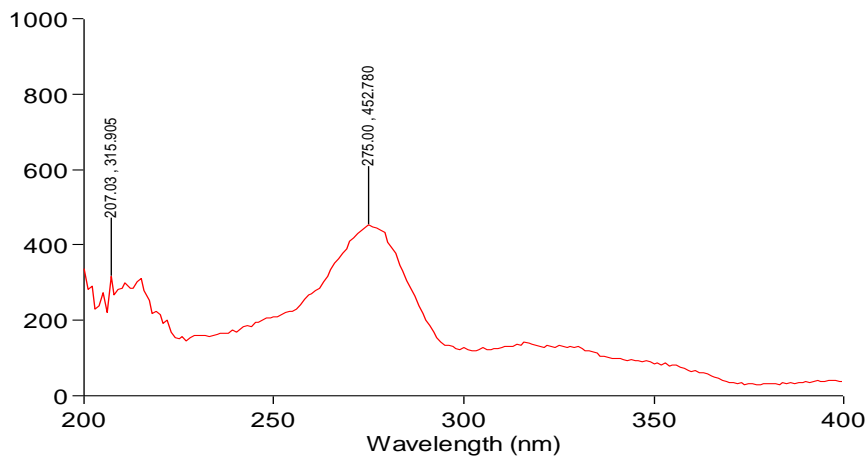


#### 4.4 Eksperimentell prosedyre for fluorescens-målinger

Opptak av eksitasjonsbølglengden og emisjonsbølglengden for hver av analyttene ble utført på et fluorescens spektrofotometer, Cary Eclipse Fluorescens Spectrophotometer (Varian, Australia). Alle målingene ble utført i romtemperatur ved 22°C. Blindprøven var 0,1 % eddiksyreløsning, som har en absorpsjonstopp ved 207 nm. Det ble tatt opp et spekter av blindprøven før hvert opptak av analyttene. Analyttene som ble undersøkt var ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin og lomefloksacin hydroklorid. Forbindelsene var løst i 0,1 % eddiksyreløsning og hadde en konsentrasjon på 0,01 µM. Løsningene ble målt i kvartskvyette med speil. Opptaket ble gjort for eksitasjonsbølglengden i området 200 - 400 nm og emisjonsbølglengden i området 320 - 530 nm. Figur 4.6 og figur 4.7 viser absorbansspekter for henholdsvis eksitasjonsbølglengden og emisjonsbølglengden av ciprofloksacin.

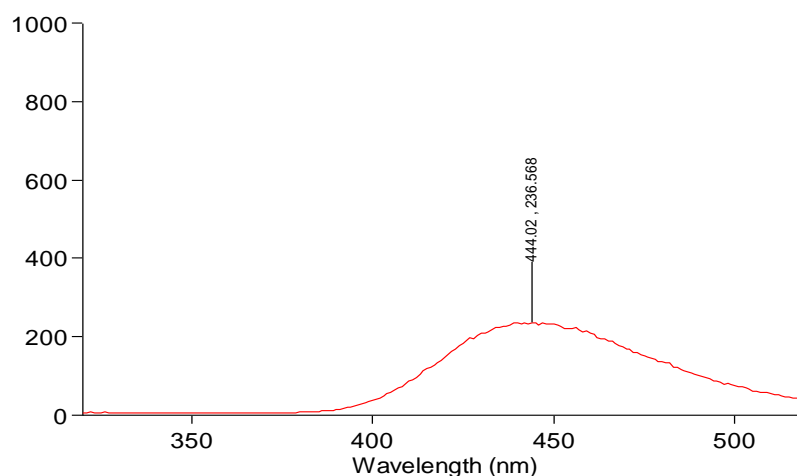
#### 4.5 Resultater fra fluorescens-målinger

Absorbansspekter for bestemmelse av eksitasjonsbølglengden for ciprofloksacin løst i 0,1 % eddiksyreløsning målt på fluorescens spektrofotometer er vist i figur 4.6. Observerte eksitasjonsbølglengde er i god overensstemmelse med tilsvarende absorbanmåling foretatt på UV-VIS spektrofotometeret.



**Figur 4.6.** Absorbansspekter for bestemmelse av optimal eksitasjonsbølglengde for ciprofloksacin, der intensiteten (a.u) er en funksjon av bølglengden (nm).

Emisjonsspekter for bestemmelse av den optimale emisjonsbølglengden for ciprofloksacin løst i 0,1 % eddiksyreløsning er vist i figur 4.7.



**Figur 4.7.** Emisjonsspekter for bestemmelse av maksimal emisjonsbølglengde for ciprofloksacin, der intensiteten (a.u) er en funksjon av bølglengden (nm). Maksimal emisjon observeres ved en bølglengde på 444 nm.

Tilsvarende målinger ble utført med norfloksacin, ofloksacin og lomefloksacin. Resultatene for avlest maksimal eksitasjonsbølglengde og emisjonsbølglengde er vist i tabell 4.2.

**Tabell 4.2.** Tabell over avleste maksimale emisjonsbølglengder (nm) og eksitasjonsbølglengder (nm) for ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin og lomefloksacin målt på fluorescens spektrofotometeret.

Analytt	Eksitasjonsbølglengde (nm)	Emisjonsbølglengde (nm)
Ciprofloksacin	275	444
Norfloksacin	275	443
Ofloksacin	273	432
Lomefloksacin	272	432

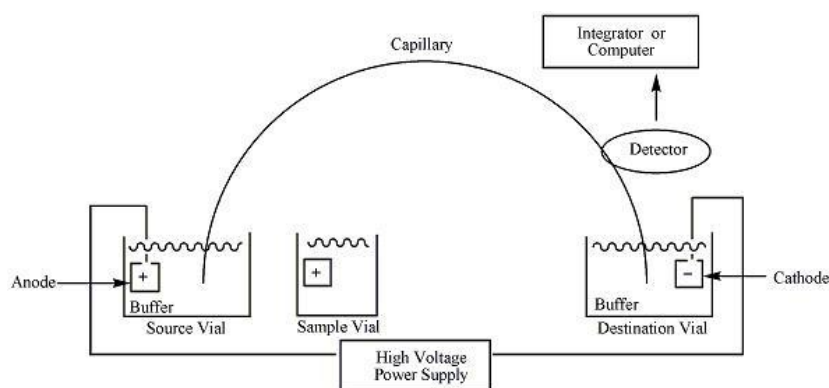
Absorbansspektrene for emisjonsbølglengden og eksitasjonsbølglengden for norfloksacin, ofloksacin og lomefloksacin er vist i vedlegg 10.1, figur 4.8 - 4.13.

Resultatene fra de spektroskopiske målingene ble brukt som utgangspunkt for innstilling av de optiske detektorene som ble benyttet i forsøkene med kapillærelektroforese og væskechromatografi (HPLC).

## 5. Prinsipp for kapillærelektroforese

### 5.1 Kapillærelektroforese teori

Kapillærelektroforese er en metode for å kunne utføre analytiske separasjoner og den har mange fordeler fremfor andre separasjonsteknikker. Teknikken krever lite prøvevolum og lite bruk av organiske løsningsmidler, den har en rask og effektiv separasjon og en unik separasjonsmekanisme (23). Separasjonen skjer i et kapillærrør fylt med en elektrolyttløsning med påsetting av høyspenning (5 - 30 kV) over kapillæret. Ulike ioner vil ha forskjellige mobiliteter og migrer gjennom kapillæret med ulike hastigheter. En elektroforetisk separasjon starter typisk med at et lite volum injiseres i den ene enden av kapillæret. Endene på kapillæret plasseres deretter i to bufferløsninger, også kalt bakgrunselektrolytter, BGE, og høyspenningen påsettes mellom to platinaelektroder som står i hver sin bufferløsning. Prinsippet for kapillærelektroforese er vist i figur 5.1.



**Figur 5.1.** En enkel prinsippskisse av kapillærelektroforese. Skissen viser instrumentet som består av to elektroder, et kapillærrør, et injeksjonssystem for prøver, et buffersystem, en strømforsyning og en detektor som registrerer og viser resultatene (23).

Anioner vil migrere mot den positive elektroden (anoden), mens kationer vil vandre mot den negative elektroden (katoden). Migrasjonshastigheten til ionene er styrt av forholdet mellom ionenes ladning og størrelse, og av styrken til det elektriske feltet i kapillæret. Små ioner vil eksempelvis ha en høyere migrasjonshastighet enn større ioner med tilsvarende ladning.

Deteksjon av ionene skjer vanligvis direkte i kapillæret (on-line) ved at en spektrofotometrisk detektor måler en passasje av ionene forbi et transparent «vindu» som er laget i kapillærrøret. Typiske spektrofotometriske detektorer måler enten absorbans av UV-VIS lys eller

fluorescens. Et kapillærelektroforese instrument kan anvendes (22) til å separere både små og store molekyler. Analyse av store biomolekyler (peptider, proteiner, DNA og RNA) har utpekt seg som et område hvor kapillærelektroforese er velegnet.

## 5.2 Separasjonsprosesser i kapillærrøret

### 5.2.1 Kapillærrør

Kapillærrør til kapillærelektroforese fremstilles av silisiumoksid - «fused silica» - kvartsglass. «Fused silica» er høyt kryssbundet polymer av silisiumdioksid med stor styrke, men det er hardt og sprøtt. På utsiden er det belegg med polyimid for mekanisk styrke (24).

Kommersielle kapillærrør fins fra 2 - 700  $\mu\text{m}$  i indre diameter, men typisk er en indre diameter som kan variere fra 25 til 100  $\mu\text{m}$  og en ytre diameter på 325  $\mu\text{m}$ . Kapillærrørene kan være 30 - 70 cm lange. «Fused silica» er et godt egnet materiale som passer til UV-deteksjon og har god holdbarhet (24). Kassetene som er integrert på instrumentene inneholder kapillærrør som er i kontakt med kjølesystemet og som vil gi en bedre optisk integrasjon. Den totale lengden,  $L_t$ , til kapillæret og lengden til detektorvindu,  $L_d$ , ( $L_t - L_d$ ) bør ideelt være så kort som mulig (24). Kapillærsegmentet som kommer etter detektorvindu er nødvendig for å skape elektrisk kontakt med elektrolyttreservoaret på utgangssiden.

### 5.2.2 Basis for elektroforetisk separasjon

I kapillærrøret foregår det flere fysiske prosesser når en elektrisk strøm passerer gjennom en ionisk løsning. Når ioner er i et elektrisk felt,  $E$ , utsettes de for en akselererende kraft,  $F$ , (25) som vist i ligning (5.1).

$$F=q \cdot E = q \cdot \frac{V}{L} \quad (5.1)$$

der  $q$  er ladning,  $L$  er lengde på kapillærrøret og  $V$  er påsatt spenning.

Når ionet beveger seg gjennom en elektrolyttløsning virker en friksjonskraft på ionet. Etter en kort akselerasjonsperiode vil friksjonskraften balansere den elektriske kraften som vist i ligning (5.2).

$$F=F_f \quad (5.2)$$

Friksjonskraften,  $F$ , følger fra Stokes lov i ligning (5.3).

$$F_f = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot u_e \quad (5.3)$$

der  $r$  er radiusen til partikkelen,  $v$  er hastigheten til partikkelen,  $\eta$  er viskositeten til mediumet og  $u_e$  er elektroforetisk mobilitet. Fra Stokes lov i ligning (5.3) vil en effektiv hydrodynamisk radius til et molekyl være sfærisk, basert på den observerte mobiliteten (26). Ut i fra ligning (5.3) vil mobiliteten være lavere, jo større radiusen er.

I en væskeløsningen vil ioner ha en mobilitet som blir styrt av deres ladning/størrelse forhold. Størrelsen er basert på molekylvekten, den tre-dimensjonale strukturen og graden av løsningsmiddel (24). Kraftene som styrer ionenes bevegelse kan som vist uttrykkes i Stokes ligning (5.3).

Ved innsetting blir ionets migrasjonshastighet som vist i ligning (5.4).

$$u_e = \frac{qE}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} = u_e \cdot E = u_e \cdot \frac{V}{L} \quad (5.4)$$

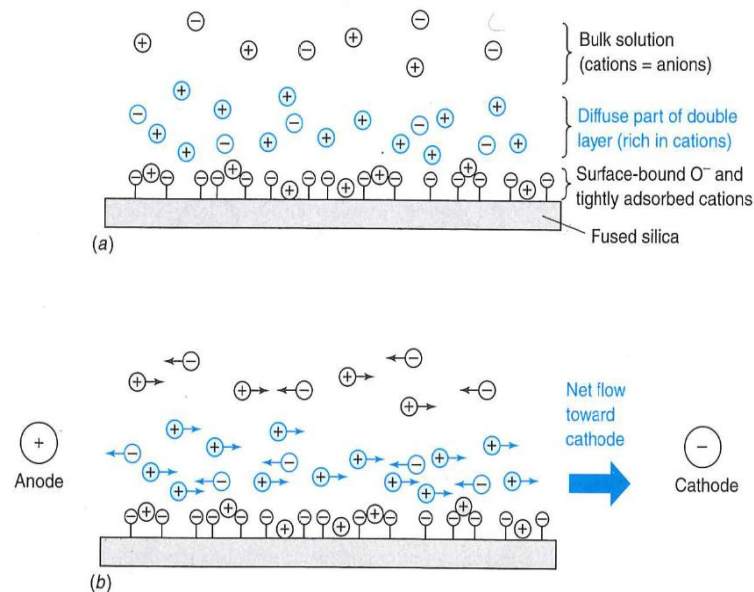
Når et ion med en ladning  $q$  befinner seg i et elektrisk felt,  $E$ , vil kreftene som virker på ionet være  $qE$ . I en løsning vil det være hemmende friksjonskrefter,  $fu_e$ , der  $u_e$  er hastigheten til ionet og  $f$  er friksjonskoeffisienten. Hastigheten til et ion blir stabilt når akselerasjonskreftene er lik friksjonskreftene, altså når  $qE = fu_e$ . Den elektroforetiske mobiliteten,  $u_e$ , er proporsjonalitetskonstanten mellom hastigheten til ionet og styrken til det elektriske feltet som vist i ligning (5.4).

Når to ioner har samme ladning og samme størrelse er det ingen separasjon. En separasjon vil foregå når to ioner som har samme ladning, men forskjellig størrelse, vil ionet som er minst ha mindre friksjonskrefter, ha størst migrasjonshastighet. For to ioner som har samme størrelse, men forskjellig ladning, vil ionet med størst ladning ha større drivkrefter og migrere raskere. Friksjonskreftene blir påvirket av form og størrelse på analyttionet, men i tillegg vil viskositeten ionet migrere i påvirke den friksjonshemmende kraften (22). I et elektrisk felt har et ion en migrasjonshastighet  $v$  som er lik produktet til feltstyrken  $E$  og den elektroforetiske mobiliteten  $\mu_e$ .

Det elektriske feltet er i sin tur proporsjonal med størrelsen på den påførte spenningen  $V$  og omvendt proporsjonal med lengden  $L$  som blir påført spenning.

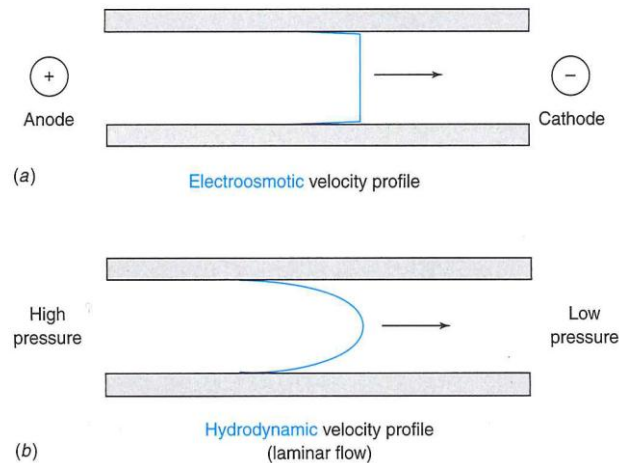
### 5.2.3 Elektroosmotisk strøm

En egenskap ved kapillærelektroforese er elektroosmose som er en av de fundamentale prosessene. I kvartsglass kapillærkolonner (26) har overflaten sure silanogrupper ( $\text{Si-OH}$ ) med  $\text{pK}_a \sim 3$  ionisert ved  $\text{pH} > \text{pK}_a$  med en negativ ladning ( $\text{Si-O}^-$ ) ved  $\text{pH} \approx 2$ . De negativt ladete veggene tiltrekkes av de positivt ladete ionene fra bufferen og danner et elektrisk dobbeltlag, figur 5.2. Når en spenning blir påført på kapillæret vil kationer i den diffuse delen av dobbeltlaget migrere i retning av katoden (27).



**Figur 5.2.** (a) Et elektrisk dobbeltlag dannet av negativt ladet silikaoverflate og nærliggende kationer. (b) Overveiende flere kationer i den diffuse delen av dobbeltlaget produserer en netto elektroosmotisk strøm mot katoden når et eksternt felt er påført (26).

Dobbeltlaget har negativt ladete ioner (anioner) som er festet på veggen og overskudd av positivt ladete ioner (kationer) nær veggen. Et ubevegelig tett lag av kationer nøytraliserer delvis de negativt ladete ionene, mens de resterende negativt ladete ionene blir nøytralisert av mobile kationer i den diffuse delen av dobbeltlaget i løsningen nær veggen. Tykkelsen på den diffuse delen kan variere fra  $\sim 10$  nm når ionestyrken er 1 mM til 0,3 nm når ionestyrken er 1M. Kationer blir tiltrukket til den negative elektroden - katoden og anioner blir tiltrukket til den positive elektroden - anoden. I den diffuse delen av dobbeltlaget vil netto overskuddet av kationer migrere mot katoden. Disse kationene er hydratiserte og trekker med seg løsningsmiddelmolekyler. Resultatet blir en elektrolyttløsning gjennom kapillæret mot katoden. Dette er elektroosmotisk strøm, EOF, som kjennetegnes av en flat strømningsprofil som vist i figur 5.3 (a). Figur 5.3 (b) viser en hydrodynamisk strømningsprofil.



**Figur 5.3 (a).** Elektroosmose gir en «flat» strømningsprofil i tverrsnittet av kapillæret. **(b).** Laminær hastighetsprofil av hydrodynamisk strøm med høyest hastighet i midten av kapillærrøret og ingen hastighet ved veggene. Hastigheten minsker nær veggene (26) i kapillæret.

Det elektriske potensialet som oppstår mellom silikaveggen (kvar glassvegg) og det diffuse laget, kan uttrykkes som zetapotensialet,  $\zeta$ . Potensialet vil falle eksponentielt med en faktor på  $e^{-1}$  til null over en distanse,  $\delta$ , som er tykkelsen til dobbeltlaget (28). Zetapotensialet er avhengig av produktet til  $\delta$  og overflate ladningen  $\sigma$ . Tykkelsen på dobbeltlaget avhenger av  $\epsilon_r$  og på  $I$ , ionestyrken til elektrolyttløsningen. Zetapotensialet er vist i ligning (5.5).

$$\zeta = \frac{\sigma \delta}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad (5.5)$$

der  $\epsilon_0$  er elektrisk permittivitet i vakuum og  $\epsilon_r$  er elektrolyttløsningens dielektriske konstant. Når kationer i det diffuse laget beveger seg mot katoden vil de ta med seg løsningsmiddelmolekylene. Det resulterer i elektroosmotisk mobilitet,  $u_e$ , som er relatert til  $\delta$  og  $\eta$  i viskositeten i løsningen, gitt ved ligning (5.6). Den elektroosmotiske mobiliteten øker proporsjonalt med zetapotensialet.

$$u_e = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta}{\eta} \quad (5.6)$$

Kationer beveger seg i samme retning som den elektroosmotiske strømmen,  $u_e$  og  $u_{eo}$  har samme fortegn. Den observerte mobiliteten,  $u_{app}$ , vil være større enn den elektroosmotiske strømmen,  $u_e$ . Anioner som beveger seg i motsatt retning som den elektroosmotiske

strømmen, altså i den elektroforetiske strømretningen. I ligning (5.7) kan anionene ha to fortegn (– fortegn eller + fortegn). Ved en høy eller nøytral pH vil anionene transporteres elektroforetisk til katoden siden elektroosmosen er raskere enn elektroforesen. En lav pH fører til at anionene ikke når detektoren siden elektroosmosen er svak.

$$\mu_{app} = \mu_e + \mu_{eo} \quad (5.7)$$

For en spesie vil den observerte mobiliteten,  $\mu_{app}$ , være netto hastigheten til en spesie dividert på det elektriske feltet. Det uttrykkes i ligning (5.8).

$$\mu_{app} = \frac{u}{E} = \frac{L_d / t}{V / L_t} \quad (5.8)$$

I elektroforese vil ulike analytter passere forbi detektorvindu med ulike hastigheter. En analytt med høy mobilitet vil migrere raskere, ha kortere migrasjonstid og bruke mindre tid til detektor. Elektroforetisk mobilitet for et nøytralt spesie uttrykkes i ligning (5.9).

$$\mu_{eo} = \frac{u_{nøytral}}{E} = \frac{L_d / t_{nøytral}}{V / L_t} \quad (5.9)$$

### 5.3 Effekt av separasjonsparametre

#### 5.3.1 Effekten av bufferens pH

pH i bufferen er avgjørende for den målte elektroosmotiske strømmen, EOF. Silanolgruppene er helt ionisert ved høy pH og det genererer et sterkt zetapotensial og et tett elektrisk dobbeltlag. Det resulterer i at EOF øker når pH i bufferen øker, se ligning 5.5. EOF gjør det mulig å separere anioner, kationer og nøytrale spesier samtidig i en løsning under en analyse. Under analyser må den elektroosmotiske strømmen, EOF, være under kontroll (19). Ved høy pH vil silanol gruppene være helt ionisert. Det genererer et sterkt zetapotensial og øker tettheten på dobbeltlaget. Det fører til at EOF øker når pH i bufferen blir høy.

Valg av pH bør være minst to enheter over eller under  $pK_a$  av analytten for fullstendig ionisasjon (27).

#### 5.3.2 Effekten av bufferkonsentrasjonen

Når den ioniske styrken øker, vil zetapotensialet og EOF minke tilsvarende i proporsjon med kvadratroten med bufferkonsentrasjonen (24). Det er funnet at like EOF for forskjellige buffer typer så lenge ionestyrken holdes konstant.



### 5.3.3 Effekten av organiske løsningsmidler

Organiske løsningsmidler kan modifisere EOF, fordi de har en påvirkning på bufferviskositeten og zetapotensialet. Alkoholer som metanol, etanol og isopropanol reduserer EOF, fordi de øker viskositeten på elektrolyttløsningene (24). Det er ikke påvist at acetonitril påvirker eller øker EOF. Organiske løsningsmidler blir ofte brukt for å hjelpe løseligheten til prøven. Selektiviteten til organiske løsningsmidler er av betydning for konsentrasjonen, så fordampningen av løsningsmidler må kontrolleres. Da er det en fordel med helt vandige separasjoner.

### 5.3.5 Kontroll av elektroosmotisk strøm

Elektroosmotisk strøm, EOF, kan separere kationer, anioner og nøytrale spesier i en løsning, men den bidrar også til variasjoner i migrasjonstiden fra analyse til analyse, fra dag til dag og kapillær til kapillær (24). EOF påvirkes av flere parametre som bufferkonsentrasjonen, pH-en til bufferen, temperaturen, viskositeten, kapillæroverflaten, feltstyrken og organisk modifikator. Det eneste som ikke EOF direkte kan påvirke under eksperimentelle forhold er kapillæroverflaten. Denne faktoren påvirker migrasjonstiden. Av den grunn er det viktig å kondisjonere kapillæroverflaten etter hver analyse for få reproducerbare overflater. Til de fleste anvendelser av analyser i kapillærelektroforese er det unødvendig medfullstendig undtrykkelse av EOF, men kontroll av EOF er kritisk for å oppnå reproducerbare migrasjonstider og oppløsning.

### 5.3.6 Effektivitet

I kapillærelektroforese er det ikke de samme utfordringene med båndspredning som i væskrokromatografi. Det er ingen trykkfall i kapillærelektroforese og EOF blir generert uniformt langs hele kapillærrøret, der strømprofilen er flat unntatt nær veggene der strømningshastigheten er tilnærmet null. Effektiviteten er avledet fra grunnprinsippene, men under antagelsen at bare diffusjon er kilden til båndspredning. I tillegg kan oppvarmingseffekter («joule-heating»), bindinger til kapillærveggen, injeksjon, deteksjon og elektromagnetisk spredning føre til færre teoretiske plater. Migrasjonshastigheten for en løsning er vist i ligning (5.10).

$$v = \mu E = \frac{\mu V}{L} \quad (5.10)$$

der  $\mu$  = mobiliteten,  $E$  = feltstyrke,  $V$  = spenning,  $L$  = lengden på kapillæret. Tiden,  $t$ , det tar for en løsning å migrere en lengde,  $L$ , i kapillæret er vist i ligning (5.11).

$$t = \frac{L}{V} = \frac{L^2}{\mu V} \quad (5.11)$$

Diffusjon i væsker som fører til spredning til et skarpt bånd er beskrevet i ligning (5.12).

$$\sigma_L^2 = 2Dt = \frac{2DL^2}{\mu V} \quad (5.12)$$

der  $D$  = diffusjonskoeffisienten av den enkelte analytt. Antall teoretiske plater  $N$  er gitt ved ligning (5.13). Det er den longitudinal diffusjonen som dominerer båndspredningen. Den er viktig så lenge det er EOF.

$$N = \frac{L^2}{\sigma_L^2} \quad (5.13)$$

Påfølgende vil ligning (5.13) settes inn i ligning (5.14).

$$N = \frac{\mu V}{2D} \quad (5.14)$$

Fra ligning (5.14) kan det oppsummert si at en høy spenning gir størst antall teoretiske plater siden separasjonen fortsetter raskt, minimaliserers effekten av diffusjon. Mobilløsninger produserer høyt platetall, fordi en rask hastighet gjennom kapillæret minimaliserer diffusjonstiden. Løsninger med liten diffusjonskoeffisient gir høy effektivitet i forhold til diffusjonal båndutvidelse.

### Oppløsningsevne

Oppløsningen av to prøvekomponenter er en viktig faktor i alle separasjoner.

I kapillærelektroforese er oppløsningen mellom to komponenter definert i ligning (5.15).

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{\Delta\mu_e \sqrt{N}}{\mu_e + \mu_{eo}} \quad (5.15)$$

der  $\Delta\mu$  er forskjellen i mobiliteten mellom to løsningsmidler og  $N$  er antall teoretiske plater.

Ved å sette ligning (5.12) inn i ligning (5.15), der  $V=EL$ , vil platetallet bli

$$R_s = 0,177 \Delta\mu_e \sqrt{\frac{EL}{(\mu_e + \mu_{eo}) D_m}} \quad (5.16)$$

Ligning (5.16) indikerer en økning i spenningen er den begrensende faktoren ved en forbedring av oppløsningen (27).

Oppløsningen kan bedres ved å øke  $\Delta\mu_e$ . Separasjonen i kapillærelektroforese er drevet av effektiviteten. Det kan være små forskjeller i mobiliteten for å få tilstrekkelig oppløsning.

### 5.3.7 Oppvarmingseffekter - «Joule heating»

Det genereres en friksjonsvarme når det er kollisjoner mellom migrasjonsionene og buffermolekyler i en elektrolyttløsning som det går strøm gjennom. Siden feltstyrken er høy kan det oppstå en oppvarmingseffekt - «joule heating». Oppvarmingseffekten oppstår som et følge av en temperaturforandring i forhold til en varmespredning eller en utvikling av en termisk gradient i kapillæret.

Den mengden varme som må fjernes er proporsjonal med konduktiviteten til bufferen og kvadratet til feltstyrken. I kapillærrør vil det være varmere i midten av røret enn langs veggene. Viskositeten til væsker minker med økende temperatur, og mobiliteten og EOF øker når temperaturen stiger. Temperaturforskjellen mellom bufferen i midten av kapillæret og veggen kan bli beregnet som i ligning (5.17).

$$\Delta T = 0,24 \frac{Wr^2}{4K} \quad (5.17)$$

der  $W$  = effekt,  $r$  = radiusen på kapillæret og  $K$  = termisk konduktivitet til bufferen, kapillærveggen og polyimidlaget. Siden den termiske gradienten er proporsjonal med kvadratet av radiusen på kapillæret, vil bruk av smale kapillærrør gi høy oppløsning.

Oppvarmingseffekter er avhengig av diameteren på kapillæret, feltstyrken og bufferkonsentrasjonen. Høye konsentrasjoner på bufferen er mer ledende, gir høyere strøm og produserer mer varme enn fortynnete løsninger.

### 5.4 Injeksjon av prøveløsninger

I kapillærelektroforese kreves det et veldig lite injeksjonsvolum (1-50 nL) av prøven. De to vanligste injeksjonsteknikkene er hydrodynamisk injeksjon og elektrokinetisk injeksjon (29).

I de kommersielle kapillærelektroforese instrumentene er injeksjonssystemet integrert.

Teknikkene er presise og kan automatiseres. Injeksjonsbetingelsene er kontrollert mikroprosessor og gjør det mulig å få god repeterbarhet. Prøvene som injiseres må være fri for partikler og kolloider. Før injeksjonen må spenningen være av, men etter injeksjonen er spenningen trappet opp til driftbetingelsene. Det kreves en spenning for å beholde prøven inni

kapillæret. Hvis en spenning blir påført med en gang vil bakgrunnelektrolytten varmes opp og ekspandere (24). Hvis hastigheten til væskeekspansjonen er større enn hastigheten til løsningsmidlet migrasjonen i kapillæret, vil noe av prøven bli vasket bakover til inngangsreservoaret. Spenningsrampen hindrer at dette skjer.

#### 5.4.1 Hydrodynamisk injeksjon

Hydrodynamisk injeksjon kan utnytte trykk eller vakuum. Trykkinjeksjon er den vanligste injeksjonen, der 1-2 % av det kapillærets totale volum blir brukt. Injeksjonen bruker trykkforskjellen mellom kapillærendene (26). Kapillæret dypper ned i en prøveløsning og det injiserte volumet kan uttrykkes som i ligning (5.18).

$$\text{Volum} = \frac{\Delta P \pi d^4 t}{128 \eta L_t} \quad (5.18)$$

der  $\Delta P$  er trykkforskjellen mellom endene av kapillæret,  $d$  er indre diameter av kapillæret,  $t$  er injeksjonstiden,  $\eta$  er viskositeten til prøven og  $L_t$  er den totale lengden på kapillæret. Det injiserte volumet blir kontrollert av injeksjonstiden. Inngangsenden av kapillæret er plassert i en prøvevial og et definert trykk er plassert på vialen for et gitt tidsrom (sekunder). Kapillærenden går fra prøvevialen tilbake til buffervialen og når spenningen påføres starter separasjonen.

#### 5.4.2 Elektrokinetisk injeksjon

I elektrokinetisk injeksjon brukes elektroosmotisk og/eller elektroforetisk migrasjon for å injisere prøven inn i kapillæret. Ved å påføre en lav spenning (24) for en kort periode blir mengden av prøven kontrollert (24). Kvantiteten,  $Q$ , av en prøveløsning som er injisert er gitt i ligning (5.19).

$$Q = (\mu_e + \mu_{eo}) \pi r^2 E C t \quad (5.19)$$

der  $\mu_e$  og  $\mu_{eo}$  er elektroforetisk og elektroosmotisk mobilitet,  $r$  er radiusen på kapillæret og  $E$  er feltspenningen og  $C$  er konsentrasjonen av hver analytt.

Fordelen med elektrokinetisk injeksjon er at utvalgte analytter kan injiseres, fordi ladete analytter kan bli injisert. Analytter som da har høyere  $pK_a$  enn  $pH$  i prøveløsningen kan effektivt bli injisert ved positiv polaritet og omvendt.

Prøver blir forberedt i en matriks med lav konduktivitet og prøveløsningen blir injisert ved spenning. Positive og negative ioner kan effektivt bli konsentrert ved å bruke en enkel

elektrokinetisk injeksjon - det samme som for LVSS. Bare negative ioner kan bli injisert og konsentrert når den positive elektroden er ved utgangsreservoaret gjennom den elektrokinetiske injeksjonen. Hvis EOF retningen er motsatt av prøveionene så er hastigheten til EOF lavere enn prøveionene. Dette forsikrer oppføringen av prøve ioner i kapillæret. Det vil favorisere høy mobilitet av analyttene. En større mengde ioner med høy mobilitet vil bli introdusert og fokusert på en ioner med lavere mobilitet.

## 5.5 Teknikker for oppkonsentrering

Kapillærelektroforese er en utmerket analyse teknikk for separasjon av ladete spesier. UV-deteksjonen er den mest anvendte deteksjonsmetoden. Problemet med deteksjonen er sensitiviteten av små injiserte volum og kort optisk veilengde i forbindelse med «on-column» UV-deteksjon (30). Andre sensitive deteksjonsmetoder som elektrokjemisk deteksjon og laserindusert fluorescens (LIF) deteksjon er blitt brukt. Elektrokjemisk deteksjon krever lang, vanskelig oppstillingsprosedyre av elektrodene med kapillæret. Laserindusert fluorescens krever derivasjon av prøven med en fluorescerende probe.

### 5.5.1 Normal oppkonsentreringsteknikk - «Normal stacking mode»

Det er blitt introdusert «on-line» konsentrasjonsteknikk for å kompensere for svakhetene ved UV-deteksjon. Den enkleste metoden er «normal stacking mode». En prøve løses i en matris med lav konduktivitet og injiseres hydrodynamisk i kapillæret som er fylt med en buffer som har høyere konduktivitet (30-32). Når en spenning blir påført kapillæret vil ionene i prøveløsningen oppleve en høyere feltstyrke enn bufferionene. Resultatet er forskjell i konduktivitet mellom sonene. Dette forårsaker at ionene i prøveløsningen migrerer raskere til grensesnittet til prøve-bufferen, som her vil oppleve en lavere feltstyrke og sakte ned. Ved grensesnittet dannes det en smal sone av analytter. Mengden prøve som blir injisert må være liten for at det skal være en effektiv separasjon. Hvis EOF blir undertrykt blir konsentrasjonen høyere enn med en sterk EOF (33). En begrensning i «normal stacking mode» er den korte lengden på prøvepluggen som kan bli injisert i kapillæret uten tap av separasjonseffektivitet eller oppløsning (34). Prøvepluggen bør ikke overskride 10 % av kapillærets lengde. Denne teknikken har ikke mer enn 10x effektiv oppkonsentrasjon (33).

### 5.5.2 Oppkonsentrering av store volum - «LVSS»

En måte å fjerne matriksen umiddelbart etter injeksjonen etter stacking prosessen er «large volume sample stacking» - «LVSS» (30). LVSS er en effektiv «on-line» oppkonsentrasjonsteknikk som er basert på at EOF pumpen kan «stacke» spor mengder av negativt ladete analytter (35). En metode som er blitt utviklet for separasjon av anioner (36). En stor prøveplugg, opptil 90 % av kapillærets lengde, med lav ledningsevne blir introdusert hydrodynamisk i kapillæret. Den store løsningsmiddelpluggen blir elektroosmotisk pumpet ut av kapillæret, mens de negativt ladete spesiene samles ved grensesnittet mellom prøvesonen og bakgrunns elektrolytten. Med en gang hoveddelen av den lave konduktivitetssonen er blitt dyttet ut av kapillæret, blir en positiv spenning påført for det skal skje en separasjon. Denne metoden eliminerer de negative effektene av pluggen med lav konduktivitet og separasjonen utføres (36). Det som er det begrensende ved LVSS er at bare positive eller negative ioner løsninger kan bli effektivt oppkonsentrert om gangen (34). Teknikken kan ha en konsentrasjonsfaktor på 100x.

### 5.5.3 «Sweeping»

Sweeping er en oppkonsentreringsteknikk som forbedrer konsentrasjonssensitiviteten og reduserer deteksjonsgrensen, LOD. Dette skjer inni kapillæret før separasjonen og deteksjonen (35, 37, 38). Teknikken baserer seg på et fenomen der analyttene blir plukket opp og akkumulert av en pseudostasjonærfase (micelle) som penetrerer prøvesonen (39). Lengden på analyttsonen etter «sweep» er gitt i ligning (5.20).

$$l_{sweep} = l_{inj} \left[ \frac{1}{(1+k)} \right] \quad (5.20)$$

der  $l_{inj}$  er lengden av den injiserte prøveløsningen og  $k$  er retensjonsfaktoren. Ligning (5.20) gir lengden av prøvesonen når sweeping er fullstendig og ikke den observerte sonelengden ved deteksjonen.

Konsentrasjonen av micellen som kommer inni prøvesonen er antatt lik micelle konsentrasjonen i bakgrunnsanalytten. Analytten som har en høyere  $k$ -verdi er mer effektivt konsentrert. Når interaksjonen mellom analytten og pseudostasjonærfasen er sterk eller  $k$ -verdien er stor kan konsentrasjonseffektiviteten bli opptil 5000x.

## 5.2 Tillaging av stamløsninger og buffere

### Tillaging av stamløsninger

Det ble laget stamløsninger av ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin, lomefloksacin hydroklorid og pefloksacin med konsentrasjoner på ca. 1000 mg/L ved å løse ca. 0,0250 g i 25 mL målekolber løst i AcN/vann (50:50, v/v). Til ciprofloksacin og norfloksacin ble det tilsatt 100 µL konsentrert saltsyre (HCl) for å få løst opp stoffene. Stamløsningene var utgangspunktet for alle kvalitative løsninger for metodeutviklingen. Videre fortyninger ble gjort med AcN/vann (50:50, v/v). Det ble laget arbeidsløsninger med konsentrasjoner på 100 µM av de respektive analyttene som ble brukt videre. Blindprøven som ble brukt under analysene var AcN/vann (50:50, v/v). Analysene ble utført på kapillærelektroforese instrumentet, Beckman Coulter, ProteomeLab<sup>TM</sup>PA 800.

### Tillaging av 50 mM tetraboratbuffer ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ )

Ved tillaging av tetraboratbuffer ble det veid inn 1,9066 g natriumtetraborat dekahydrat (40) til en 100 mL flaske som ble fylt opp med 100 mL Milli-Q vann. pH ble justert til 9,23 ved hjelp av pH-elektrode ved 22 °C. Bufferen ble filtrert før bruk med 1 mL plastsprøyte og 13 mm sprøytefilter, 0,2 µm PTFE-membran.

### Tillaging av 50 mM fosfatbuffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )

Ved tillaging av fosfatbuffer ble det veid inn 0,6002 g natriumdihydrogenfosfat (41) til en 100 mL flaske som ble fylt med Milli-Q vann og pH justert til 7,34 ved tilsetning av 1,0 M NaOH. pH ble målt med pH-elektrode ved 22 °C. Bufferen ble filtrert før bruk med 1 mL plastsprøyte og 13 mm sprøytefilter, 0,2 µm PTFE-membran.

### Fosfatbuffer/AcN, 50 mM, pH 7,05 og pH 7,70

Ved å ta utgangspunkt i 50 mM fosfatbuffer, pH 7,34, ble det tatt ut 15 mL til to målesylindere og pH i bufferene ble justert til 7,05 og 7,70 ved tilsetning av henholdsvis 1 M HCl og 1 M NaOH. pH ble målt med pH-elektrode ved 22 °C. Bufferene ble filtrert før bruk med 1 mL plastsprøyte og 13 mm sprøytefilter, 0,2 µm PTFE-membran.

## Kapillærkolonne

I metodeutviklingen på kapillærelektroforese instrumentet ble det anvendt kvartsglass "fused silica" kapillærrør, Polymicro Technologies, Teknolab, TSP075375, med indre diameter på 75 µm og ytre diameter på 375µm.

## Kondisjoneringsprosedyre av kapillærkolonnen

Nye kapillærkolonner ble forbehandlet med 1,0 M natriumhydroksid i 10 minutter, vasket med Milli-Q vann i 5 minutter, så 0,1 M natriumhydroksid i 10 minutter og til slutt vask med Milli-Q vann i 5 minutter. Prosedyren ble utført ved et trykk på 20 psi.

Kapillæret ble kondisjonert hver dag, i begynnelsen av dagen, med 0,1 M NaOH i 5 minutter, etterfulgt med Milli-Q vann i 3 minutter og kjørebufferen i 10 minutter ved et trykk på 20 psi.

## Betydningen av kondisjoneringen

Nye kapillærkolonner må kondisjoneres før det kan brukes. Prosedyren sørger for at hele overflaten blir helt og fullt uniformt ladet (27). I noen metoder er det nødvendig å regenerere overflaten mellom hver analyse, det gjelder spesielt ved bruk av buffere i pH-området 2 - 6. Regenerering er ikke nødvendig ved pH over 9.

I kapillærrør som ikke er kondisjonert vil løsningen migrere mot den neagtive elektroden hvis ikke buffertilsetninger eller kapillær kondisjonering blir brukt for å redusere eller reverse EOF. Reproduerbarheten til EOF gir mest problemer i pH området 4 - 6, siden EOF vil påvirke migrasjonstidens presisjon.

### **5.2.1 Eksperimentelt - tetraboratbuffer som separasjonsbuffer**

Av fluorokinolonene ble det laget en fortynningsrekke med konsentrasjoner på 1,0, 5,0, 10,0, 50,0 og 100 µM. Løsningene ble laget med utgangspunkt i en sekvensiell fortykning av den foregående i fortykningrekken. Fortyningrekken ble analysert med 50 mM tetraboratbuffer, pH 9,23 og resultatene er vist i tabell 5.1.

Fra hver av arbeidsløsningene med konsentrasjon på 100 µM av de respektive fluorkinolonene ble det laget en blanding på 20 µM. Denne blandingen ble analysert med 50 mM tetraboratbuffer, pH 9,23. Elektroferogrammet er vist i figur 5.2.



### 5.2.2 Resultater og konklusjon - tetraboratbuffer som separasjonsbuffer

Tabell 5.1 viser konsentrasjoner og migrasjonstider av fortynningrekken til hver av fluorkinolonene. Når ciprofloksacin ble analysert kom det EOF-topper etter ca. 4,20 minutter og deteksjonsgrensen er lavere enn 1,0  $\mu\text{M}$ . I analysene av norfloksacin kom det EOF-topper etter ca. 4,30 minutter og deteksjonsgrensen er lavere enn 1,0  $\mu\text{M}$ . I elektroferogrammene til ofloksacin observeres det EOF-topper etter ca. 4,30 minutter. Det er ingen observerte signaler på 5,0  $\mu\text{M}$ , men først på 10,0  $\mu\text{M}$ . Deteksjonsgrensen ligger i dette intervallet på UV-deteksjonen. Ved analyser av lomefloksacin hydroklorid observeres det EOF-topper etter 4,3 - 4,4 minutter og deteksjonsgrenser lavere enn 1,0  $\mu\text{M}$ . Når pefloksacin analyseres er det EOF-topper etter 4,4 minutter og ingen observerte signaler på 5,0  $\mu\text{M}$ , men først på 10,0  $\mu\text{M}$ . Deteksjonsgrensen ligger i dette intervallet på UV-deteksjonen.

I vedlegg 10.2, figur 5.1 - 5.5, er det eksempler på elektroferogrammer for lomefloksacin hydroklorid i kalibreringsområdet 1,0 -100,0  $\mu\text{M}$ .

**Tabell 5.1.** Tabellen viser konsentrasjoner og migrasjonstider for ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin, lomefloksacin hydroklorid og pefloksacin. Injeksjonen var hydrodynamisk (0,5 psi, 3,0 sek.), under en feltspenningen på 20 kV, temperatur 25°C og normal polaritet. Bølgelengden for UV-deteksjonen var ved 280 nm. Den totale lengden på kapillærkolonnen var 53,4 cm og den effektive lengden var 43,4 cm. Den totale analysetiden var 10 minutter.

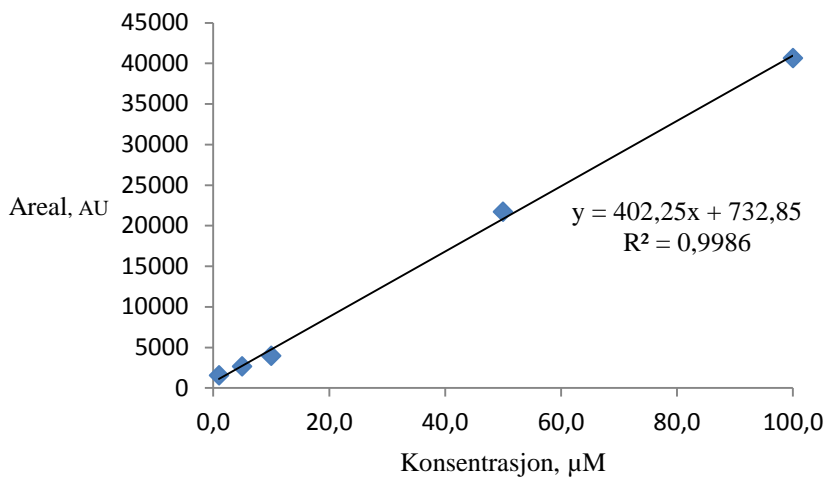
	Ciprofloksacin	Norfloksacin	Ofloksacin	Lomefloksacin hydroklorid	Pefloksacin
Konsentrasjon i prøveløsning (µM)	Migrasjons-tid min.	Migrasjons-tid min	Migrasjons-tid min	Migrasjons-tid min	Migrasjons-tid min
1,0	5,629	6,017	Signal ikke observert	5,617	Signal ikke observert
5,0	5,683	5,987	Signal ikke observert	5,579	Signal ikke observert
10,0	5,679	5,992	6,175	5,563	6,408
50,0	5,700	5,967	6,162	5,612	6,479
100,0	5,892	5,967	6,171	5,612	6,400

Fra tabell 5.1 viser det seg at migrasjonstidene for fluorkinolonene er reproducerbare og lite påvirket konsentrasjonsendring. Det gjør det lettere å identifisere analyttene. Migrasjonstidene for ciprofloksacin har en relativ standardavvik på 1,78 %, norfloksacin har en relativ standardavvik på 0,35 %, mens lomefloksacin har en relativ standardavvik på 0,43 %. Ofloksacin og pefloksacin har ikke det statistiske grunnlaget for å kunne beregne det relative standardavviket.

EOF-toppene viser en stabilitet i systemet ved gjentatte injeksjoner.

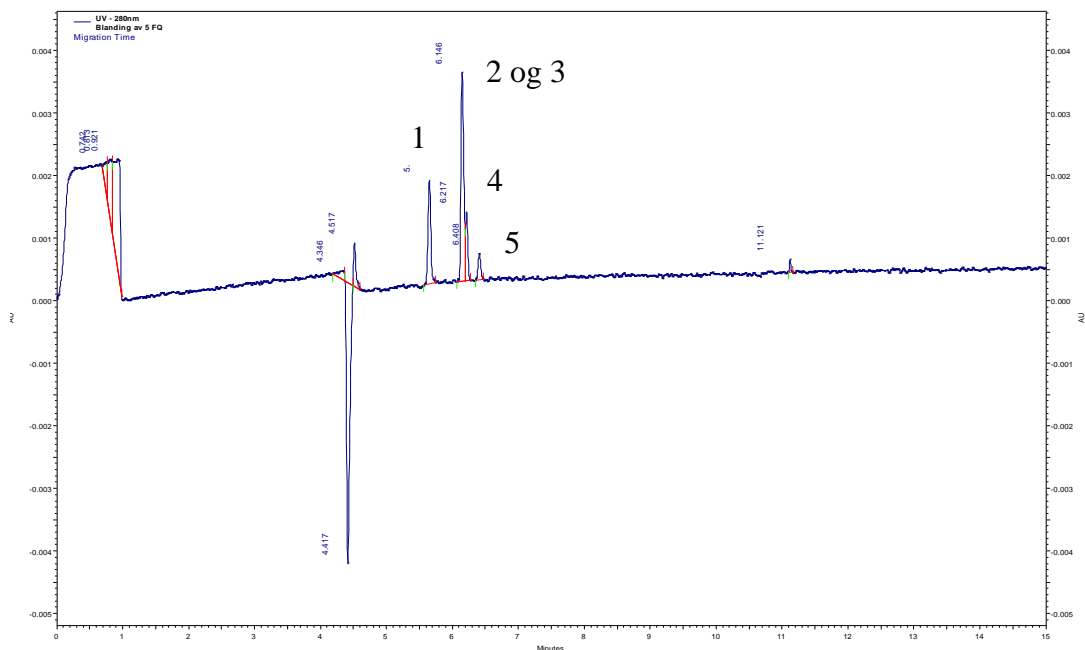
Fra elektroferogrammene ble det laget kurver der topparealet er plottet mot konsentrasjonen. Figur 5.6 viser eksempel på norfloksacin som har god linearitet. Det ble også oppnådd god linearitet for ofloksacin og lomefloksacin, og arealet øker lineært med økende konsentrasjon. Ciprofloksacin og pefloksacin fikk ikke god linearitet. Dette kan skyldes tillaging av løsningsene eller det kan være ustabilitet i injeksjonene. Det er likevel grunn til å tro at ciprofloksacin og pefloksacin vil oppføre seg likt.

Kalibreringskurven for norfloksacin er vist i figur 5.6. Analysebetingelsene er tidligere omtalt i tabell 5.1.



**Figur 5.6.** Kalibreringskurve for norfloksacin der toppareal er plottet som funksjon av konsentrasjon i kalibreringsløsningsområdet 1,0 -100,0 µM.

En 20 µM blanding av de fem fluorokinolonene ble analysert med 50 mM tetraboratbuffer, pH 9,23, se figur 5.7.



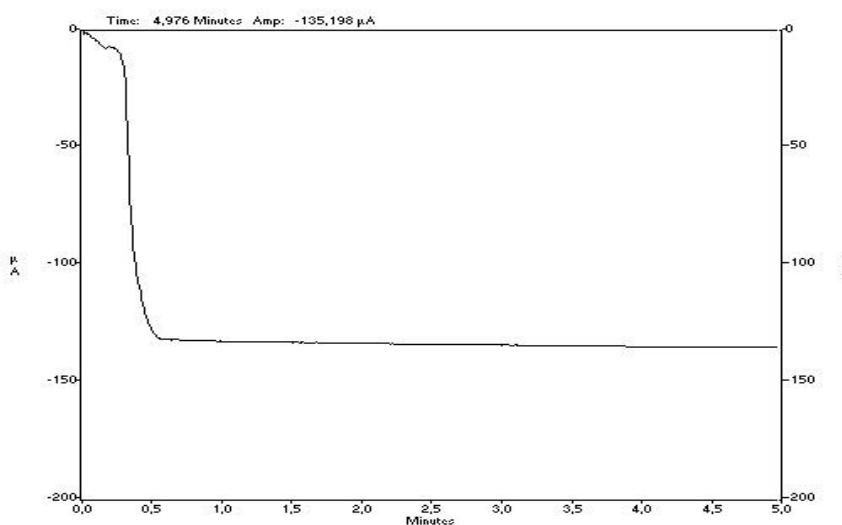
**Figur 5.7.** En 20 µM blanding av ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin, lomefloksacin hydroklorid og pefloksacin ble analysert med 50 mM tetraboratbuffer, pH 9,23. Injeksjonen var hydrodynamisk (0,5 psi, 3,0 sek.), under en feltspenning på 20 kV, temperatur 25°C og normal polaritet. Bølgelengden for UV-deteksjonen var ved 280 nm. Analyttene kan antas å ha følgende migrasjonsrekkefølge, 1: lomefloksacin hydroklorid, 2 og 3: ciprofloksacin og norfloksacin, 4: ofloksacin og 5: pefloksacin. Den målte absorbansen, AU, plottet mot migrasjonstiden, minutter. Den totale analysertiden var 15 minutter.

Fra elektroferogrammet, figur 5.7, vises at analytt-toppene ikke kunne separeres fullstendig. Eksempelvis elueres ciprofloksacin og norfloksacin samtidig.

### 5.3 Eksperimentelt - «LVSS»

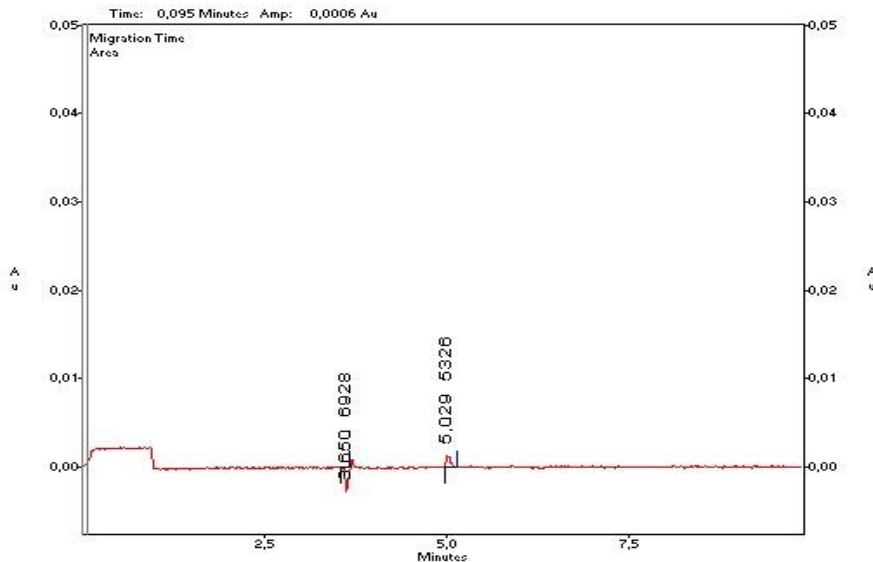
Det var av interesse å se hvordan en oppkonsentreringsteknikk som «large volume sample stacking» - «LVSS», kunne utføres på kapillærelektroforese. Dette ble prøvd på 20  $\mu\text{M}$  norfloksacin løst i AcN/vann (50:50, v/v). En blindprøve av AcN/vann (50:50, v/v) ble anvendt for å finne strømprofil med revers polaritet. Alle stackingforsøk ble utført på en kapillærkolonne som var UV-transparent med total lengde på 50 cm, effektiv lengde på 40 cm, 75  $\mu\text{m}$  i.d og 375  $\mu\text{m}$  o.d. Feltspenningen var 20 kV og temperaturen 25 °C.

For bestemmesle av  $i_0$  ble blindprøven injisert ved revers polaritet.  $i_0$  er strømmen i den rene bakgrunnsanalytten, BGE. Det ble prøvd ut ulike injeksjonstider i tidsintervallet 20 - 60 sekunder ved konstant injeksjonstrykk på 1,0 psi for å finne optimal oppkonsentreringstid - «stackingtid». Stabil strømprofil ble oppnådd for en injeksjonstid på 25 sekunder. Lengre injeksjonstider gav bortfall av strøm. Ved grafisk avlesning, se figur 5.8, av strømprofilen var  $i_0 = 0,46$  minutter av stackingtiden og amplituden  $A = -132,0 \mu\text{A}$ .



**Figur 5.8.** Opptak av typisk revers strømprofil for å bestemme  $i_0$ -strøm og tid for polaritetsskifte. Injeksjonen ble utført med blindprøven AcN/vann(50:50,v/v) og hydrodynamisk injisert (1,0 psi, 25 sek.) med revers polaritet. Tiden det tok i dette forsøket for å nå  $i_0 = -132 \text{ mA}$  var 0,46 min., dette vil tilsvare en optimal stackingtid på ca. 0,41 min. ( $i = 0,95 \cdot i_0$ ) og amplituden  $A = 125 \text{ mA}$ .

Stackingforsøket ble utført med 20  $\mu\text{M}$  norfloksacin uten LVSS. Analyse med 20  $\mu\text{M}$  norfloksacin som var fortynnet med AcN/vann (50:50, v/v) fra 100  $\mu\text{M}$  arbeidsløsning av norfloksacin. Analysen ble utført med normal polaritet injeksjon (1,0 psi, 3,0 sek.) med 50 mM tetraboratbuffer, pH 9,23. Elektroferogrammet fra analysen er vist i figur 5.9.

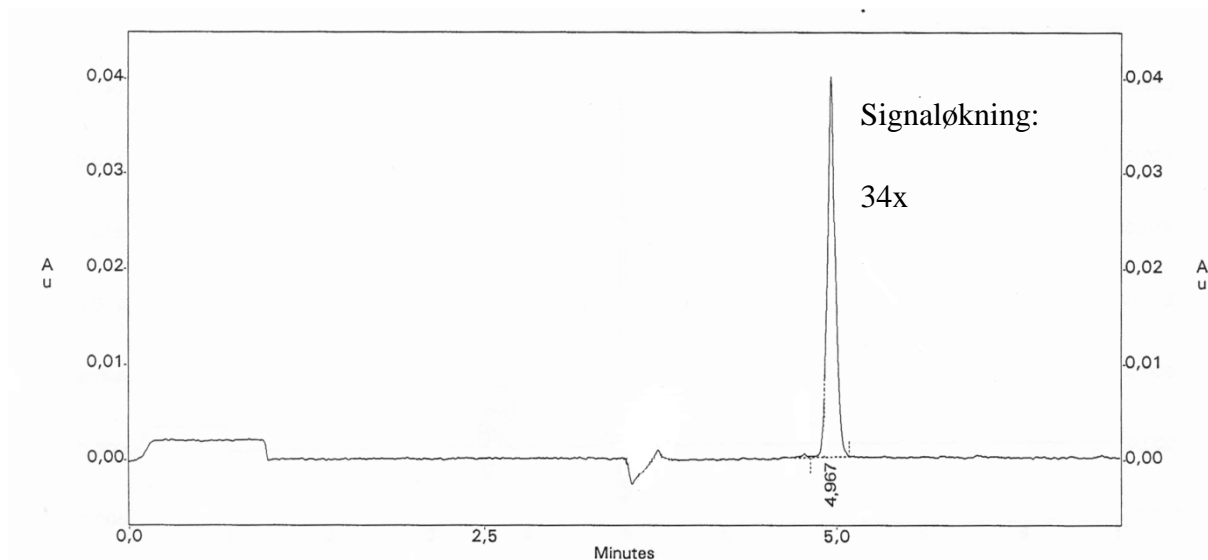


**Figur 5.9.** Analyse av 20  $\mu\text{M}$  norfloksacin med normal polaritet injeksjon (0,5 psi, 3,0 s). Bakgrunnsselektrolytten var 50 mM tetraboratbuffer, pH 9,23.

I praksis er det vanskelig å bestemme nøyaktig, men med sikkerhetsmargin ble det valgt å lese av oppkonsentreringstiden for den tiden det tok å oppnå ca 80 % av  $i_o$ -strømmen. Det vil si  $t_i$  avlest for  $i = 0,8 \cdot i_o$ , det vil si  $t_i = 0,50$  minutter. Ideelt kan oppkonsentreringstiden «stackingtiden» være 90 - 95 % det tar å oppnå  $i_o$  strømmen.

Stackingforsøket ble utført med 20  $\mu\text{M}$  norfloksacin med LVSS med 50 mM tetraboratbuffer, pH 9,23. Injeksjonstiden var 25 - 35 sekunder som tilsvarer ca. 20 % fylling av kapillærrøret.

Elektroferogrammet, figur 5.10, viser en analyse med en injeksjonstid på 35 sek. og det ble en signaløkning på 34x med LVSS i forhold til en normal polaritets injeksjon. Med lengre injeksjonstider oppstod det problemer med å opprettholde strømgjennomgangen i kapillæret. Stackingen ble utført på analyttene på anionisk form.



**Figur 5.10.** Analyse av 20  $\mu\text{M}$  norfloxacin med LVSS (35 s, 1,0 psi). Bakgrunns elektrolytten var 50 mM tetraboratbuffer, pH 9,23. Reversert polaritet i 0,50 min. før skifte til normal polaritet. Dataopptak startet ved polaritetsskiftet.

## 5.4 Eksperimentelt - fosfatbuffer som separasjonsbuffer

### 5.4.1 Eksperimentelt - tilsetning av organisk modifikator

Tetraboratbufferen ble byttet ut med 50 mM fosfatbuffer (41) som er en mye anvendt separasjonsbuffer innen kapillærelektroforese. I det innledende forsøket ble det analysert med 50 mM fosfatbuffer, pH 7,34 på en 20  $\mu\text{M}$  blanding av ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin, lomefloksacin hydroklorid og pefloksacin. Deretter ble det prøvd ut tilsetning av organisk modifikator som acetonitril, AcN, med 20, 30 og 40 % AcN (42). Under eksperimentene oppstod det brudd i kolonnene og de kunne tette seg igjen. Derfor ble det laget kolonner med litt forskjellige lengder, det vil si kapillærkolonner som har total lengde på 59 - 62 cm og en effektiv lengde på 49 - 52 cm. På instrumentet var det gitt at segmentet fra detektorvindu og til kapillærenden (utgangsenden) var 10 cm.

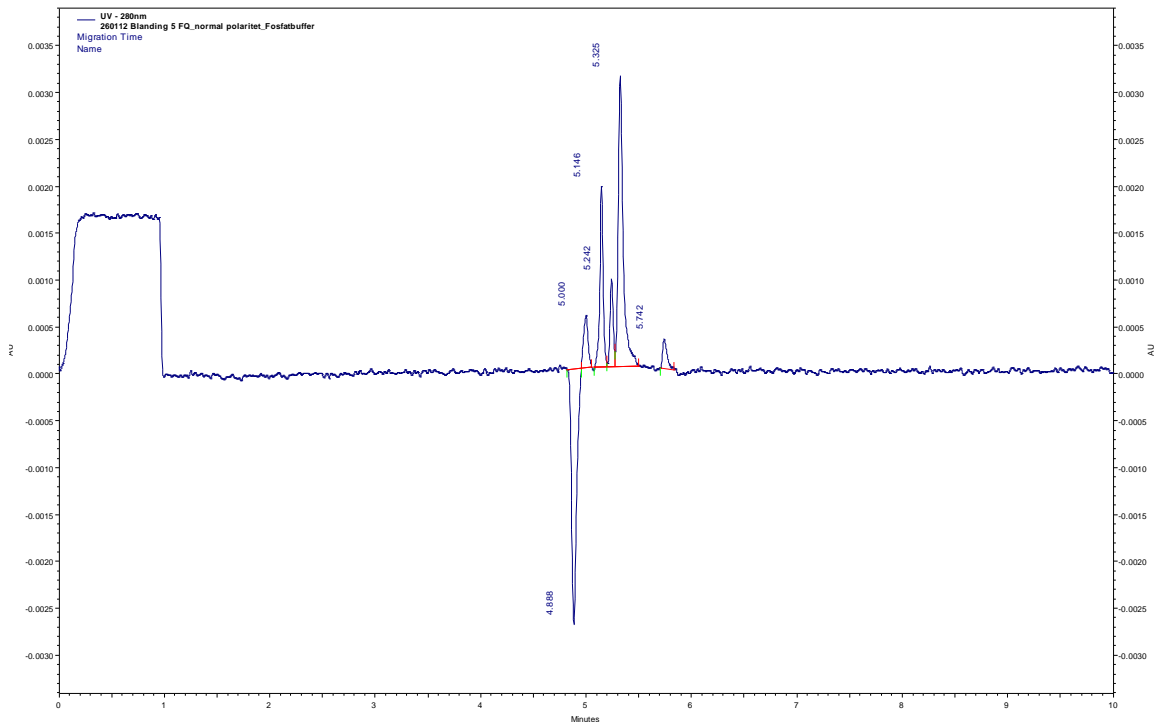
Tabell 5.2 viser forsøksserien med 50 mM fosfatbuffer og AcN analysert på en 20  $\mu\text{M}$  blanding av de fem respektive fluorkinolonene.

**Tabell 5.2.** Oversikt over separasjonsbufferer med ulike prosentvise sammensetninger av 50 mM fosfatbuffer og AcN analysert på en 20 µM blanding med de fem fluorokinolonene. Injeksjonene var hydrodynamisk (0,5 psi, 3,0 sek.), under en feltspenningen på 20 kV, temperatur 25 °C og normal polaritet. Bølgelengden for UV-deteksjonen var ved 280 nm. Den totale analysetiden var 10 minutter.

Kapillærkolonne (Total lengde, cm effektiv lengde, cm)	Buffersammensetning	Observasjoner
Total lengde: 59,2 cm og effektiv lengde: 49,2 cm	50 mM fosfatbuffer, pH 7,34	Ingen separasjon eller selektivitet. Analyttene ble observert etter 5,6 - 6,0 min., de kom tett og hadde lite areal.
Total lengde: 59,2 cm og effektiv lengde: 49,2 cm	50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), pH 7,34	Høyere analyttopper, men ingen grunnlinje separasjon. Analyttene observert etter 8,1 - 8,3 min.
Total lengde: 59,2 cm og effektiv lengde: 49,2 cm	50 mM fosfatbuffer/AcN (80:20, v/v), pH 7,34	Brede analyttopper og ingen separasjon. Lite areal. Analyttene observert etter 6,2 min.
Total lengde: 60,5 cm og Effektiv lengde: 50,9 cm	50 mM fosfatbuffer/AcN (70:30, v/v), pH 7,34	Ingen separasjon av analyttene, men høye topper. Analyttene observert etter 7,1 - 7,7 min.

## 5.4.2 Resultater og konklusjon - tilsetning av organisk modifikator

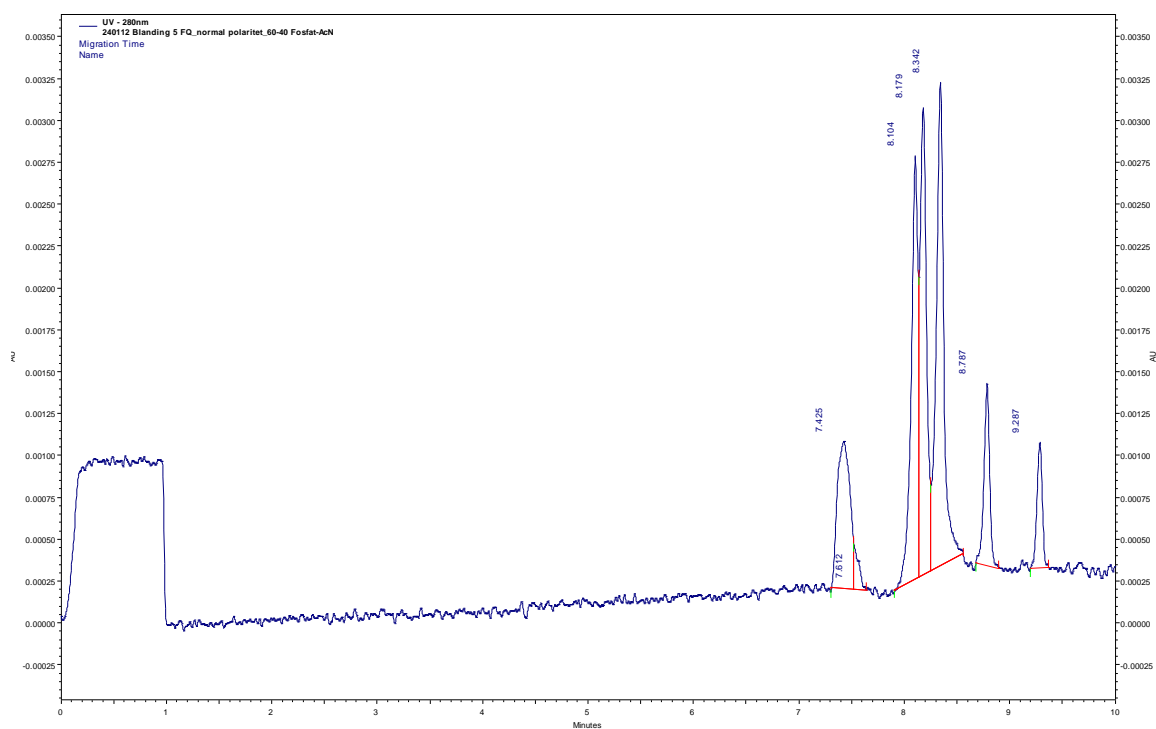
Figur 5.11 viser elektroferogram av analyse av en 20 µM blanding av de fem fluorkinolonene med 50 mM fosfatbuffer, pH 7,34, som var utgangspunktet for forsøksserien.



**Figur 5.11.** Analyse av en 20 µM blanding av ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin, lomefloksacin hydroklorid og pefloksacin med 50 mM fosfatbuffer, pH 7,34.

Videre i forsøksserien ble 50 mM fosfatbuffer med 20, 30 og 40 % AcN- innhold, pH 7,34, prøvd ut. Figur 5.12 viser analyse av 20 µM blanding med 50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), pH 7,34 som gav best selektivitet fra denne forsøksserien. Denne buffersammensetningen ble det valgt å gå videre med.





**Figur 5.12.** Analyse av en 20 µM blanding av ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, lomefloxacin hydroklorid og pefloxacin med 50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), pH 7,34.

I vedlegg 10.2, figur 5.13 - 5.14, vises elektroferogrammene av analyse av 20 µM blanding av de fem fluorkinolonene med separasjonsbuffer av 50 mM fosfatbuffer/AcN (80:20, v/v), pH 7,34, og 50 mM fosfatbuffer/AcN (70:30, v/v), pH 7,34.

### 5.4.3 Effekt av pH

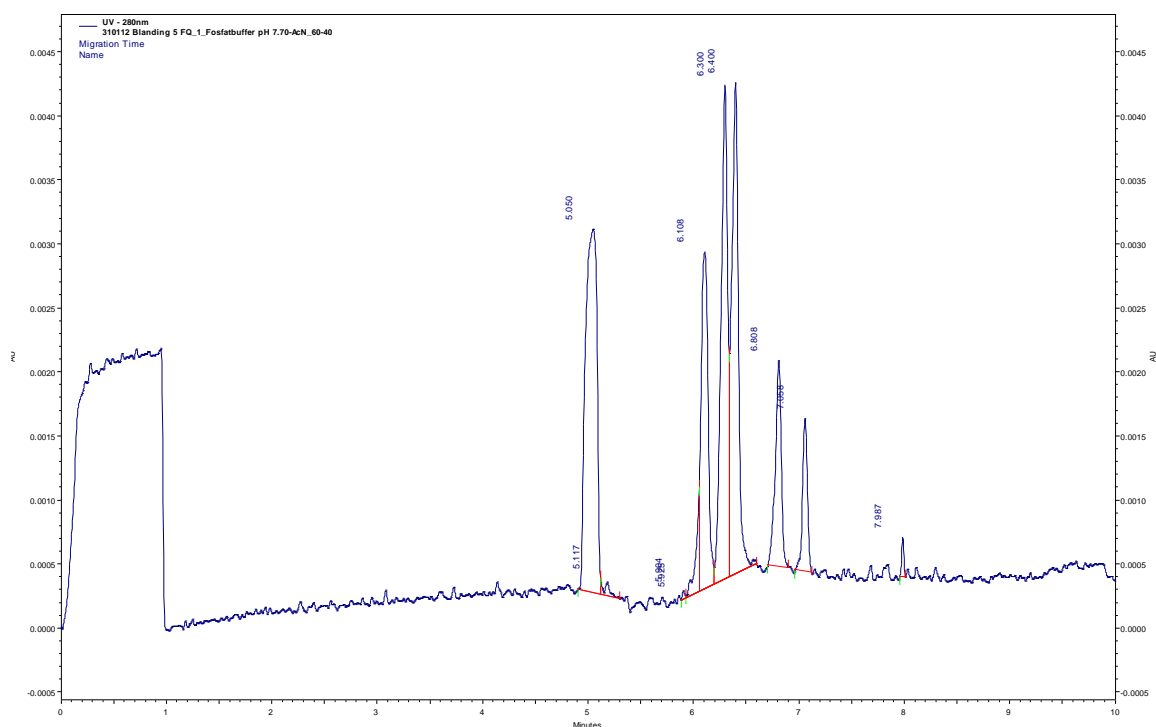
En parameter som kan påvirke selektiviteten av analyttene i separasjonsbufferen er effekten av pH. Det ble laget fosfatbufferer med ulike pH-verdier. Med utgangspunkt i 50 mM fosfatbufferen og fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v) ble det laget fosfatbufferer med ulike pH-verdier. Tillaging av bufferer er beskrevet tidligere.

**Tabell 5.3.** Oversikt over ulike pH-verdier av 50 mM fosfatbuffer og 50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v) analysert på en 20 µM blanding med de fem fluorokinolonene. Injeksjonene var hydrodynamisk (0,5 psi, 3,0 sek.), under en feltspenningen på 20 kV, temperatur 25 °C og normal polaritet. Bølgelengden for UV-deteksjonen var ved 280 nm. Den totale analyssetiden var 10 minutter.

Kapillærkolonne (Total lengde, cm og effektiv lengde, cm)	Buffersammensetning	Observasjoner
Total lengde: 60,5 cm og effektiv lengde: 50,9 cm	50 mM fosfatbuffer, pH 7,05	Ingen separasjon, toppene kom tett.
Total lengde: 60,5 cm og effektiv lengde: 50,9 cm	50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), pH 7,05	Ikke mulig skille toppene, brede analytt-topper.
Total lengde: 60,5 cm og effektiv lengde: 50,9 cm	50 mM fosfatbuffer, pH 7,34	Ingen selektivitet. Smale topper. Toppene kom 3,6 - 3,9 etter minutter.
Total lengde: 60,5 cm og effektiv lengde: 50,9 cm	50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), pH 7,34	Ingen separasjon. Høye og smale topper. Toppene kom etter 4,8 - 5,0 minutter.
Total lengde: 60,5 cm og effektiv lengde: 50,9 cm	50 mM fosfatbuffer, pH 7,70	Ingen separasjon, men smale og høye topper. Analytt- toppene kom etter 6,1 - 6,4 minutter.
Total lengde: 60,5 cm og effektiv lengde: 50,9 cm	50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v) pH 7,70	En stor topp etter 7 minutter.

#### 5.4.4 Resultater og konklusjon - effekt av pH

Ut fra resultatene fra forsøksserien ble det valgt å gå videre med 50 mM fosfatbuffer/AcN, (60:40, v/v), pH 7,70, siden denne bufferen gav bedre separasjon av fluorkinolonene enn de øvrige bufferene, men ikke en fullstendig separasjon. Elektroferogrammet er vist i figur 5.15. Elektroferogrammer av 50 mM fosfatbuffer (60:40, v/v), pH 7,05, og 50 mM fosfatbuffer (60:40, v/v), pH 7,34, er vist i vedlegg 10.2, figur 5.16 - 5.17.



**Figur 5.15.** Analyse av en 20 µM blanding med ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin, lomefloksacin hydroklorid og pefloksacin med 50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), pH 7,70.

#### 5.4.5 Effekt av feltstyrke, kapillærlengde og injeksjonstid

Det ble eksperimentert hvordan ulike lengder på kapillæret (60,5 cm/ 50,5 cm og 50,4cm/40,4 cm) (total lengde/effektiv lengde), feltstyrker (15 - 30 kV) og injeksjonstider (3 sek., 5 sek.) kunne påvirke eller forbedre separasjonen. 20 µM blandingen av analyttene ble analysert med 50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), pH 7,70 med ulike kolonnengder, feltstyrker og injeksjonstider.

#### 5.4.6 Resultater og konklusjon - effekt av feltstyrke, kapillærlengde og injeksjonstid

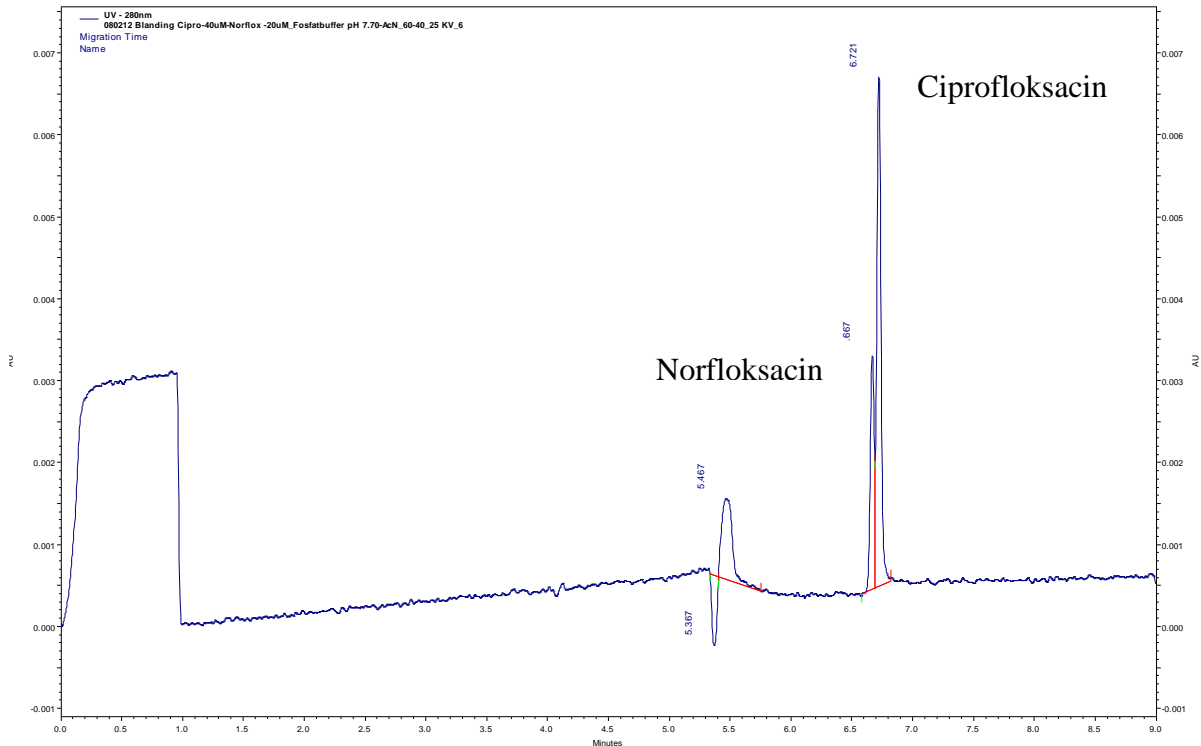
Resultatene fra forsøkene viste at kapillæret med lengden 60,5 cm/ 50,5 cm gav mer antydning til splittelse av analyttene enn kapillæret med lengden 50,4 cm/ 40,4 cm og med feltstyrken 20 kV. En injeksjonstid på 5,0 sekunder av førte til at analyttene ble høyere, men det bidro ikke til en forbedring av separasjonen av analyttene. Det vil derfor holde med 3 sekunders injeksjonstid som er den vanligste injeksjonstiden i kapillærelektroforese.

#### 5.4.7 Verifikasjon av ciprofloksacin og norfloksacin

For å verifisere hvilke av analyttene som kom først ble det laget en blanding av ciprofloksacin og norfloksacin, der norfloksacin hadde en konsentrasjon på 20 µM og ciprofloksacin hadde en konsentrasjon på 40 µM. Analyttene ble analysert med 50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), pH 7,70.

### 5.4.8 Resultater - verifikasjon av ciprofloksacin og norfloksacin

Ut i fra elektroferogrammet, figur 5.18, har norfloksacin kortere migrasjonstid, 6,887 minutter, enn ciprofloksacin, 6,721 minutter.



**Figur 5.18.** En blanding med 20 $\mu$ M norfloksacin og 40  $\mu$ M ciprofloksacin. Blandingen ble hydrodynamisk injisert (0,5 psi, 3,0 sek.), under en feltspenning på 25 kV og normal polaritet. Den totale lengden på kapillær kolonnen var 59,7 cm og den effektive lengden var 49,7 cm. Den totale analysetiden var 9 minutter. Den målte absorbansen, AU, er plottet mot migrasjonstiden, minutter.

## 5.5 Optimalisering av fosfatbuffer

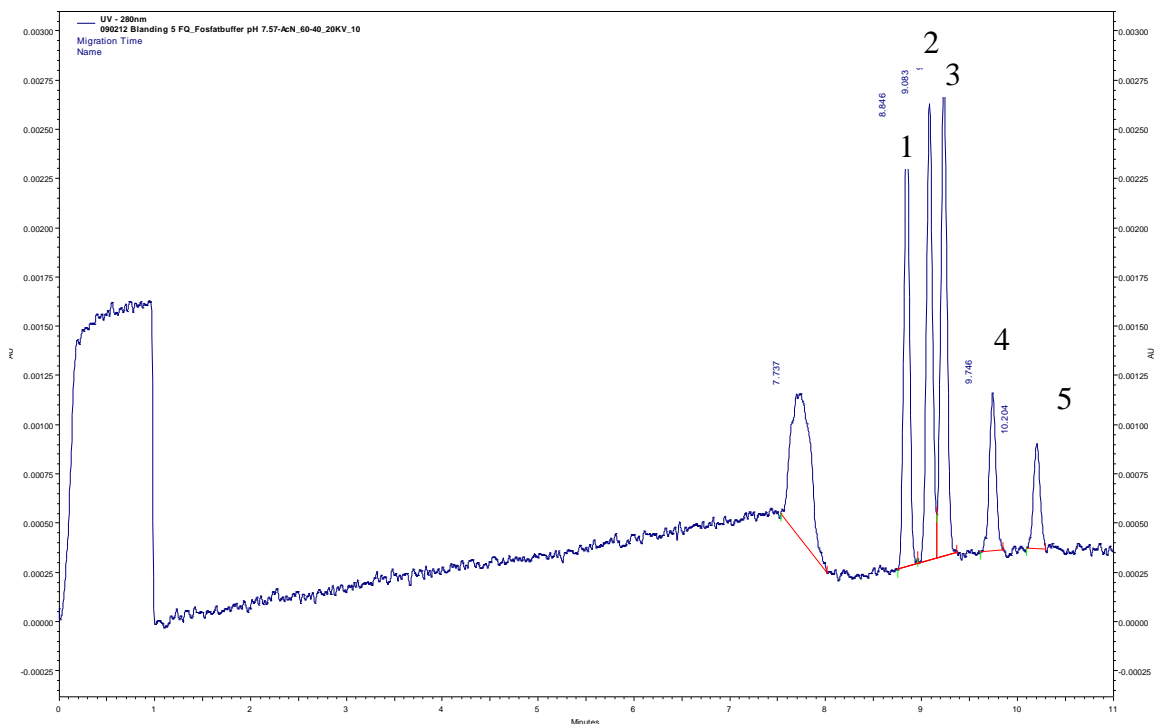
### 5.5.1 Eksperimentelt - optimalisering av fosfatbuffer

Det ble laget en 50 mM fosfatbuffer med pH 7,57 for se om det kunne bedre separasjonen av analyttene.

En 20  $\mu$ M blanding av de fem respektive fluorokinolonene ble analysert med 50 mM fosfatbuffer/AcN, (60:40, v/v), pH 7,57.

### 5.5.2 Resultater og konklusjon - optimalisering av fosfatbuffer

Under de nevnte analysebetingelsene var dette den analysen som gav nesten tilstrekkelig separasjon av fem fluorokinoloner på kapillærelektroforese. Dette viser følsomheten av pH i separasjonsbufferen. Figur 5.19 viser en analyse av separasjonen av de fem fluorokinolonene.



**Figur 5.19.** En 20  $\mu\text{M}$  blanding av ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, lomefloxacin og pefloxacin ble analysert. Løsningen ble hydrodynamisk injisert (0.5 psi, 3.0 sek.) under en feltstyrkespenning på 20 kV og normal polaritet. Migrasjonsrekkefølgen er 1: lomefloxacin, 2: norfloxacin, 3: ciprofloxacin, 4: ofloxacin og 5: pefloxacin. Den målte absorbansen, AU, plottet mot migrasjonstiden, minutter. Den totale migrasjonstiden er 11 minutter.

### 5.5.3 Fortynningsrekke med den optimaliserte fosfatbufferen

Av fluorokinolonene ble det laget en fortynningsrekke med konsentrasjoner på 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 20,0 og 50,0  $\mu\text{M}$ . Løsningene ble laget med utgangspunkt i en sekvensiell fortynning av den foregående i fortynningsrekken. Fortynningsrekken ble analysert med 50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), pH 7,57.

### 5.5.4 Resultater og konklusjon - fortynningsrekke med den optimaliserte bufferen

Tabell 5.4 viser konsentrasjoner og migrasjonstider av fortynningsrekken til hver av fluorkinolonene. Når ciprofloxacin ble analysert kom det EOF - topper etter ca. 7,8 minutter og deteksjonsgrensen er lavere enn 1,0  $\mu\text{M}$ . I analysene av norfloxacin og ofloxacin kom det EOF - topper etter ca. 7,2 - 7,3 minutter og deteksjonsgrensen er lavere enn 1,0  $\mu\text{M}$  for norfloxacin. I elektroferogrammen til ofloxacin er det ingen observerte signaler på 1,0  $\mu\text{M}$ . Deteksjonsgrensen ligger mellom 2,5 og 1,0  $\mu\text{M}$ . Ved analyser av lomefloxacin hydroklorid og pefloxacin observeres det EOF - topper etter 6,8 - 7,0 minutter. Lomefloxacin hydroklorid har en deteksjonsgrense som er lavere enn 1,0  $\mu\text{M}$ . Når pefloxacin analyseres er

detingen observerte signaler på 10,0 µM, men først på 20,0 µM. Deteksjonsgrensen for pefloksacin ligger defor et sted innenfor dette intervallet når UV-deteksjon benyttes.

**Tabell 5.4.** Tabellen viser konsentrasjoner og migrasjonstider av ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin, lomefloksacin og pefloksacin. Separasjonsbuffer var 50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), pH 7,57. Løsningene ble injisert hydrodynamisk (3,0 sek., 0,5 psi) med konstant feltspenning på 20 kV, temperatur 25°C og normal polaritet. Bølgelengden for UV-deteksjonen var ved 280 nm. Den totale analys tiden var 10 minutter.

	Ciprofloxacine	Norfloksacin	Ofloksacin	Lomefloksacin hydroklorid	Pefloksacin
Konsentrasjon i løsningene (µM)	Migrasjonstid (min.)	Migrasjonstid (min.)	Migrasjonstid (min.)	Migrasjonstid (min.)	Migrasjonstid (min.)
1,0	9,521	8,642	Signal ikke observ.	8,079	Signal ikke observ.
2,5	9,417	8,633	9,200	8,071	Signal ikke observ.
5,0	9,379	8,617	9,146	8,058	Signal ikke observ.
7,5	9,342	8,608	9,133	8,054	Signal ikke observ.
10,0	9,329	8,633	9,100	8,054	Signal ikke observ.
20,0	9,325	8,621	9,108	8,046	9,517
50,0	9,296	8,600	9,121	8,042	9,671

Fra tabell 5.4 viser det seg at migrasjonstidene for fluorkinolonene er reproducerbare og lite påvirket konsentrasjonsendring. Det gjør det lettere å identifisere analyttene. Migrasjonstidene for ciprofloksacin har en relativ standardavvik på 0,81 %, norfloksacin har en relativ standardavvik på 0,17 %, ofloksacin har en relativ standardavvik på 0,39 % mens lomefloksacin har en relativ standardavvik på 0,16 %. Pefloksacin har ikke det statistiske grunnlaget for å kunne beregne det relative standardavviket.

Analysene viser stabile EOF-topper i systemet ved gjentatte injeksjoner.

Fra elektroferogrammene ble det laget kalibreringskurver der topparealet er plottet mot konsentrasjonen. Det ble ikke oppnådd god linearitet for fluorkinolonene. Årsaken til dårlig linearitet kan være problemer med stabilitet under injeksjonen (trykksettingen) eller ustabile forhold i kolonnen.

## 5.6 Repeterbarhetsforsøk

En løsning med 10 µM ciprofloksacin ble anvendt for å sjekke reproducerbarheten av injeksjonen og arealet på instrumentet. Det ble foretatt ti injeksjoner på instrumentet. Injeksjonene var hydrodynamiske (0,5 psi, 3,0 sek.) under en feltspenning på 20 kV, normal polaritet og temperatur 25 °C. Separasjonsbufferen var 50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), pH 7,57. Den totale lengden på kapillæret var 59,6 cm og den effektive lengden var 49,6 cm. Den totale analysetiden var 11 minutter. Tabell 5.5 viser migrasjonstidene og arealene av de 10 injeksjonene.

**Tabell 5.5.** Tabellen viser migrasjonstider og arealer av ti injeksjoner av 10 µM ciprofloksacin analysert med 50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), pH 7,57.

Injeksjon #	Migrasjonstid (minutter)	Areal (AU)
1	9,892	4550
2	9,854	3808
3	9,921	4232
4	9,846	4395
5	9,825	3942
6	9,842	4235
7	9,767	3910
8	9,783	3024
9	9,575	2632
10	9,679*	3851

\*Etter vask med 1,0 M NaOH i 15 minutter ved et trykk på 20 psi.

### 5.6.1 Resultater og konklusjon - repeterbarhetsforsøk

Det ble foretatt 10 injeksjoner av 10 µM ciprofloksacin for å undersøke stabiliteten i injeksjonsteknikken. Etter den syvende injeksjonen sank arealet og kapillæret måtte rekondisjoneres etter den niende injeksjonen. På den tiende injeksjonen øker arealet igjen,

se tabell 5.5. Det relative standardavviket i migrasjonstidene er 0,77 % for injeksjonnr. 1-7 og 10. Migrasjonstidene ser veldig stabile ut. Det relative standardavviket for repeterbarheten i arealene er 6,70 % for injeksjonsnr. 1-7 og 10. Injeksjonsnr. 8 og 9 er ikke tatt med i det statistiske grunnlaget, da disse injeksjonene har lavere areal. Det er nødvendig med vask av kolonnen for å opprettholde stabile arealer. Dette understreker at intern standard metode bør benyttes som kvantifiseringsteknikk i kapillærelektroforese.

## 5.7 Oppsummering og konklusjon

Det ble testet ut to separasjonsbuffer, en tetraboratbuffer og en fosfatbuffer på kapillærelektroforese. Fluorkinolonene ble analysert enkeltvis med tetraboratbuffer og resultatene viste reproducerbare migrasjonstider uavhengig av konsentrasjonen. Lineariteten var god for norfloksain, ofloksacin og lomefloksacin, selv om det for ciprofloksacin og pefloksain ikke oppnådde god linearitet. Dette kan ligge i injeksjonene på instrumentet eller i kolonnen. I en blanding med fluorokinolonene ble det ikke oppnådd tilstrekkelig separasjon mellom ciprofloksacin og norfloksacin.

I forsøket med oppkonsentrering av 20  $\mu\text{M}$  norfloksacin med «large volume sample stacking» som teknikk ble det oppnådd en signaløkning som var 34x bedre en med «normal mode stacking».

Med fosfatbuffer som separasjonsbuffer ble fluorokinolonene analysert. I en blanding med de fem fluorkinolonene ble det ikke oppnådd separasjon. Det ble testet ut ulike parametre som kunne forbedre separasjonen av fluorkinolonene. Det var innslag av organisk modifikator som acetonitril, ulike pH-verdier på separasjonsbufferen, kapillærlengde, feltstyrke og injeksjonstid. Den bufferen som gav best separasjon av fluorkinolonene var med 50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), pH 7,57 med en kolonnelengde ca. 60 cm /50 cm, en feltspenning på 20 kV og 3 sekunders injeksjonstid. På det optimale elektroferogrammet ble en blanding analysert og elueringsrekkefølgen er lomefloksacin, norfloksacin, ciprofloksacin, ofloksacin og pefloksacin. Da fluorkinolonene ble analysert enkeltvis viste det seg at migrasjonstidene var reproducerbare uavhengig av konsentrasjonene.

Repeterbarheten til arealene for 10 injeksjoner ble testet ut. Arealene av injeksjonene synker etter ca. 7 - 8 injeksjoner viser en ustabilitet i instrumentet. Vask av kolonnen er viktig ved bruk av kapillærelektroforese.

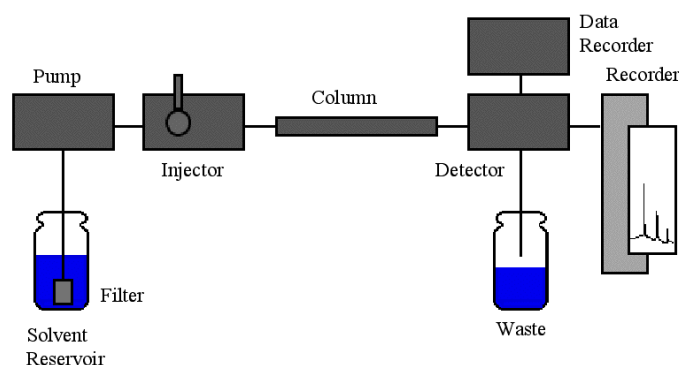


## 6. Prinsipp for HPLC

### 6.1 HPLC teori

Væskerkromatografi er en de mest brukte teknikkene innen analytiske separasjoner.

I HPLC, «High Performance Liquid Chromatography», brukes det et høyt trykk for å «tvinge» en væskefase, kalt mobilfasen, gjennom en separasjonskolonne (25) som er pakket med små partikler. Et HPLC-system består av et mobilfasereservoar, en pumpe, et injeksjonssystem, en høytrykkskolonne (100 - 300 bar), en detektor og en datamaskin som registrerer og viser resultatene. En prinsipp skisse av et HPLC-system er vist i figur 6.1.



**Figur 6.1.** En enkel skjematisk skisse av oppsettet til HPLC instrumentet (43).

Et HPLC instrument kan måle lave konsentrasjoner, det kan automatiseres, og er godt egnet for kvantitative bestemmelser. Teknikken er egnet for upolare, polare, og termolabile forbindelser. HPLC har stor anvendelse innen forskning og industri, og kan brukes til analyse av materialer som for eksempel proteiner, aminosyrer, nukleinsyrer (22), hydrokarboner, karbohydrater, farmasøytiske preparater og ulike organiske analytter.

I HPLC benyttes det analytiske kolonner som vanligvis er laget av rustfritt stål, men glass eller plastmaterialer kan også forekomme (26). Kolonnen kan være 5 - 25 cm lange, men de fleste analytiske kolonnene er 10 - 15 cm lange. Typiske HPLC-kolonner har partikkelstørrelser som er 3 - 10  $\mu\text{m}$ , og en indre diameter på typisk 2,1 - 4,6 mm. Kolonnene kan bli ødelagt av partikler i prøvene, og partikler i løsningsmidler som benyttes i mobilfasen. Hvis det er fare for partikler i prøve eller mobilfase bør løsningene filtreres. Det benyttes ofte en forkolonne som beskytter den analytiske kolonnen. Forkolonnen (26) inneholder den samme stasjonær fasen som analysekolonnen. I forkolonnen blir fine partikler og sterkt adsorberende

forbindelser holdt igjen. Det må benyttes løsningsmidler med høy renhetsgrad for å unngå degradering av analysekolonnen og minimere bakgrunnssignaler fra forurensninger.

### 6.1.2 Temperatureffekter i væskrokromatografi

Retensjonen i en kromatografisk kolonne er styrt av likevektskonstanten for analyttens fordeling mellom stasjonærfasen og mobilfasen. Likevektskonstanten er en temperaturavhengig, termodynamisk størrelse. I tillegg påvirker temperaturen en rekke fysiske forhold i kolonnen, og temperaturkontroll i en HPLC-analyse er derfor viktig. Når det er en økning i temperaturen i kolonnen vil det redusere viskositeten til mobilfasen, og dermed reduseres trykket og slitasjen på kolonnen og pumpesystemet. Det gjør det mulig å øke mobilfasehastigheten for å få raskere elueringer. Ved en temperaturøkning minsker ofte retensjonstiden av analyttene og forbedrer oppløsningen av toppene til analyttene. En økt temperatur betyr økt løselighet av analyttene i mobilfasen, noe som medfører kortere retensjonstider i kolonnen. Samtidig reduseres viskositeten i mobilfasen, noe som gir økte diffusjonskoeffisienter i mobilfasen. Konsekvensen av dette er redusert båndspredning på grunn av bedre masstransport. I enkelte tilfeller kan selektiviteten til forbindelsene endres og det kan føre til endring i retensjonsrekkefølgen. Den økte temperaturen kan føre til at stasjonærfasen degraderes og reduserer levetiden av kolonnen. Det er viktig å følge de spesifikasjonene som kolonne leverandørene gir angående maksimal kolonnetemperatur. Temperaturen i en ubeskyttet kolonne kan svinge med omliggende romtemperatur. Derfor kan det benyttes en kolonneovn som stilles inn på en temperatur som er høyere enn romtemperaturen. Vanlige kolonneovner kan operere med temperatur fra romtemperatur og opp til 85 °C. Det vil forbedre reproduserbarheten til retensjonstiden og forbedre presisjonen til den kvantitative analysen. I forhold til gasskromatografi er det altså bare relativt moderate temperaturendringer som er mulig i HPLC.

### 6.1.3 Stasjonærfaser i HPLC

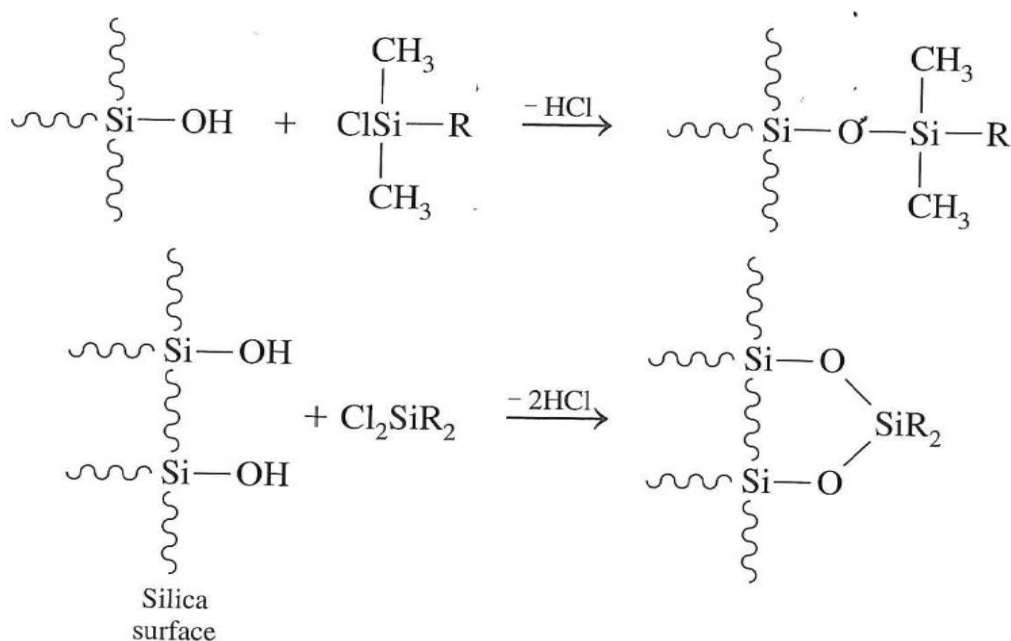
Stasjonærfasen som fyller kolonnen kan bestå av sfæriske mikroporøse partikler av silika (silisiumoksid), med høy renhetsgrad (26). Partiklene er gjennomtrengelig for løsningsmidler og har et overflateareal på flere hundre m<sup>2</sup>/gram. En silikaoverflate kan ha opptil 8 μmol/m<sup>2</sup> av silanolgrupper (Si-OH). Silika kan brukes som stasjonærfase i adsorpsjonskromatografiske separasjoner. Sterke interaksjoner mellom silanolgruppene og ulike analyttmolekyler, særlig basiske forbindelser som aminer, kan føre til problemer med stor haledannelse og dårlig toppsymmetri i kromatogrammene. På samme måte kan metallforurensninger i silikamaterialet føre til uønskede bindinger og økt haledannelse. Slike uønskede effekter kan reduseres ved å

bruke høyrent silika eller ved kjemisk modifisering av overflaten til silikaen, slik at silanolgruppene fjernes eller gjøres mindre tilgjengelige. Ulike former for kjemisk modifisert silika utgjør idag den viktigste stasjonærfasematerialtypen. Separasjonen i slike systemer er basert på såkalt omvendt fase kromatografi, som kjennetegnes av at mobilfasen er mer polar enn den kjemisk modifiserte silikafasen.

I tillegg til totalporøse stasjonærfasematerialer finnes det idag poroshell partikler som er overflateporøse, pellikulære. Partiklene består av en kjerne av ikke-porøs silika omgitt av et lag med et porøst stasjonærfasemateriale (44). Partikkelstørrelsen på slike overflateporøse materialer er på typisk 5 µm i diameter og det porøse overflatelaget er imidlertid bare ca. 0,25 µm i tykkelse. Fordelen med denne type partikler er korte diffusjonsveier og som gir mindre båndspredning og raskere separasjon.

#### 6.1.4 Stasjonærfaser basert på kjemisk bundne stasjonærfaser

I fordelings-kromatografi (væske-væske kromatografi) er stasjonærfasen kovalent bundet til silika-overflaten ved en reaksjon som vist i figur 6.2.



**Figur 6.2.** Figuren viser hvordan stasjonærfasen binder seg til silikaoverflaten ved en reaksjon som vist over (26).

Stasjonærfasen blir kovalent bundet til bærematerialet ved å la et alkylklorosilan reagere med silika og det dannes monomere eller polymere overflatelag. Dette vil avhenge av substituentene, R, på alkylklorosilanet, og gir ulike kolonnematerialer med forskjellige polaritet og egenskaper. Substituentene, R, kan være alkylgrupper som C<sub>8</sub> og C<sub>18</sub>, fenylgruppe som

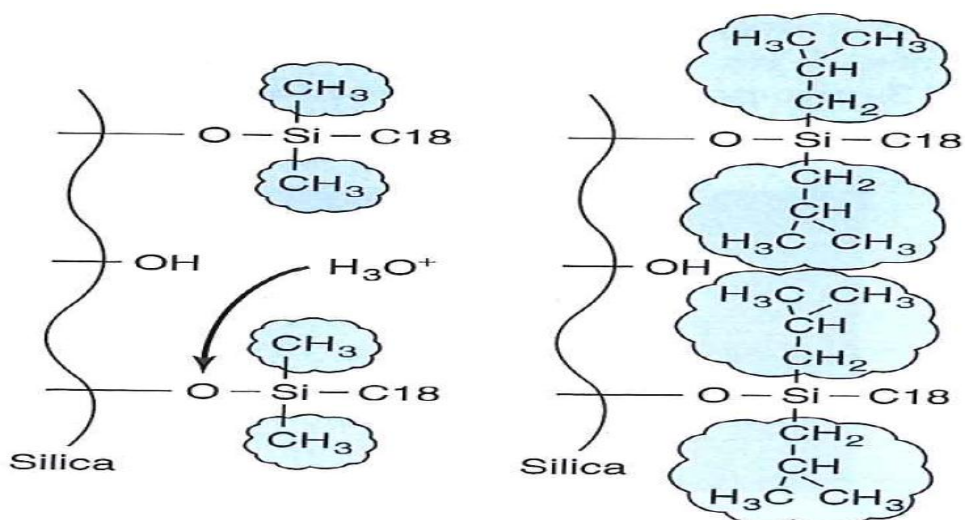
$C_6H_5$ , cyanogruppe eller ioniserbare grupper som aminogruppe som  $(CH_2)_3NH_2$ , sulfonsyregruppe  $(CH_2)_3SO_3H$ , og karboksylsyregruppe som  $(CH_2)_3COOH$ .

Ved kjemisk modifikasjon av silika (25) kan det være silanolgrupper som ikke er derivatisert. Det vil også påvirke toppsymmetrien og føre typisk til uønsket haledannelse og da spesielt på aminogruener. Stasjonærfasen kan bli etter-silanisert, «end-capped», med et silyleringsmiddel, slik som trimetylklorosilan.

Stabiliteten til denne typen stasjonærfasematerialer øker med kjedelengden og karboninnholdet. Stasjonærfaser basert på oktadekylgrupper ( $C_{18}H_{37}$ , «C18») er de mest utbredte. Kolonner som ble brukt i oppgaven har vist at høyt innhold av karbon gir mindre haledannelse og bedre dekning på overflaten enn kolonner med lavt karboninnhold.

Separasjonsmekanismen i C-18 er basert på hydrofobiske interaksjoner. En upolar stasjonærfase vil ha størst affinitet til upolare molekyler. Jo lengre karbonkjede, jo sterkere interaksjon vil upolare stoffer ha til stasjonærfasen (45). Omvendt fase kromatografi basert på upolare stasjonærfasematerialer er den mest brukte teknikken i HPLC, fordi den gir et høyt teoretisk platetall, gode separasjoner, reproduserbarhet og lett å bruke (46). Separasjonen kan bedres ved å bruke lengre kolonner, endre temperaturen eller mobilfasen. En generell regel er at jo lengre kolonnen er, jo lengre retensjonstid. På C-8 kolonner vil det være kortere retensjonstid og mindre bruk av løsningsmiddel enn på C-18. Jo lengre karbonkjede, jo sterkere interaksjon vil upolare stoffer ha til stasjonærfasen (45).

Under pH 2 hydrolyserer siloksan bindingen (Si-O-SiR), slik at en HPLC-kolonne med en stasjonærfase av modifisert silika vil kun være stabil i det begrensede pH - området 2 - 8. Hvis en stor og klumpete isobutylgruppe blir knyttet til silisiumatomet i siloksanbindingen, vil Si-O-Si bindingen være mindre tilgjengelig for angrep på  $H_3O^+$  og stasjonærfasen er stabil for en lengre periode ved lav pH. Dette vises i figur 6.3.



**Figur 6.3.** Figuren viser hvordan en stor klumpete isobutylgruppe beskytter siloksan bindingen fra hydrolyse ved lav pH (26).

De fleste silikamaterialer kan ikke benyttes når pH er over 8, fordi det løses opp. Ved separasjoner av basiske forbindelser mellom pH 8 og 12 kan det benyttes modifisert silika med bidentate C18-grupper med etylen bruer eller polymermaterialer som polystyren.

### 6.1.5 Løsemiddelstyrke

I adsorpsjonskromatografi er løsemiddelstyrken  $\epsilon^{\circ}$  et mål for løsemidlets evne til å fortrenge analyttmolekylene fra adsorbentens (dvs stasjonærfasens) overflate. Løsemiddelstyrken er dermed et mål for løsemidlets adsorpsjonsenergi, altså hvor godt løsemiddelet binder seg til stasjonærfasen. Angivelse av løsemiddelstyrken er en relativ skala, der løsemiddelstyrken rangeres i forhold til løsemiddelstyrken til pentan, som for polare adsorbenter som silika og alumina satt til 0. For polare stasjonærfaser vil løsemiddelstyrken til mobilfasen øke med økende polaritet. Begrepet «løsemiddelstyrke» er overførbart til andre kromatografiske systemer som omvendt fase systemer, der løsemiddelstyrken blir et mål for løsemidletenes evne til raskt å eluere analyttene fra kolonnen.

Løsemiddelstyrken er et mål på løsningsmidlets adsorpsjonsenergi, og med en verdi for pentan definert som 0 for adsorpsjon på ren silika. Jo mer polart løsemiddelet er, jo større er løsemiddelstyrken for adsorpsjonskromatografi med silika. Jo større løsemiddelstyrke, jo raskere vil stoffet bli eluert fra kolonnen. I adsorpsjonskromatografi med normal fase brukes det en polar stasjonærfase og upolare løsemiddeler. Et høyt polart løsemiddel har en høyere elueringsstyrke. I omvendt fase kromatografi er stasjonærfasen upolart eller svakt polart og løsemiddelet er polart. Jo mindre polart løsemiddelet er, jo høyere elueringsstyrke. To elueringsteknikker som brukes innen HPLC er isokratisk eluering og gradient eluering.

Isokratisk eluering innebærer at mobilfasesammensetningen holdes konstant gjennom analysen. Med gradient eluering er det en kontinuerlig endring i sammensetningen av mobilfasen som øker elueringsstyrken.

### 6.1.2 Kromatografisk teori

Kromatografi er basert på prinsippet om at stoffer separeres i forhold til hvordan de binder seg til stasjonærfasen og i forhold til hvordan de løser seg i mobilfasen. Basisen for en separasjon er forskjellen i vandringshastigheten. Vandringshastigheten er styrt av analyttens likevektsfordeling mellom stasjonærfasen og mobilfasen.

Det er ulike prosesser som forekommer i en kolonne, også kalt båndspredningsprosesser, i tillegg til selve den kromatografiske separasjonen. Dette er prosesser som fører til spredning i analyttens oppholdstid i kolonnen. Dette er prosesser som skyldes fysiske forhold i kolonnen.

Programvaren, *Chromeleon Client, versjon 6.80*, på HPLC-instrumentet (Ultimate 3000) som følger standarden til den Europeiske Farmakopé definerer retensjonsfaktoren,  $k$ , som et mål på hvor raskt analytten beveger seg gjennom kolonnen og retensjonsfaktoren er proporsjonal med likevektskonstanten. Retensjonsfaktoren til en analytt kan beregnes ut fra analyttens retensjonstid og kolonnens nullretensjonstid, se ligning (6.1).

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (6.1)$$

der  $k$  er retensjonsfaktoren,  $t_R$  er retensjonstiden og  $t_0$  er nullretensjonstid. Nullretensjonstiden kan bestemmes ved å måle retensjonstiden til et stoff som ikke binder seg til stasjonærfasen. Retensjonsfaktoren bør være mellom 1 og 5 for å oppnå forsvarlig kompromiss mellom retensjonstiden og separasjonsevnen.

En annen egenskap for en kolonne er platetallet,  $N$ , som er et mål på kolonnens effektivitet. Effektiviteten er et mål for kolonnens evne til å gi smale topper (25), altså et mål på båndspredningen. En effektiv kolonne har liten båndspredning. Et generelt uttrykk for båndspredningen er platetallet,  $N$ , dette er beskrevet i ligning (6.2).

$$N = \left( \frac{t_R}{\sigma_t} \right)^2 \quad (6.2)$$

der  $t_R$  er retensjonstiden til toppen og  $\sigma_t$  er standardavviket til toppen.

Platehøyden,  $H$ , er en alternativ måte å uttrykke kolonnens effektivitet på (25), platehøyden er uavhengig av kolonnelengden og gir mulighet til å sammenlikne effektiviteten til kolonner med ulike lengder. Det er en korrelasjon mellom platetallet og lengden på kolonnen uttrykt i ligning (6.3).

$$H = \frac{L}{N} \quad (6.3)$$

der  $H$  er platehøyden og  $L$  er lengden på kolonnen. Det er et mål å få høyt platetall, men så liten platehøyde som mulig.

Programvaren, *Chromeleon Client, versjon 6.80*, på HPLC-instrumentet (Ultimate 3000) som følger standarden til den Europeiske Farmakopé definerer det teoretiske platetallet,  $TP$ , i ligning (6.4). Programvaren bruker betegnelsen  $TP$  - «Theoretical plates» som er identisk med platetallet,  $N$ .

$$TP = 5,54 \cdot \left( \frac{t_R}{W_{50\%}} \right)^2 \quad (6.4)$$

$t_R$  er retensjonstiden og  $W_{50\%}$  er toppbredden ved 50 % topphøyde og forutsetter normalfordelt topp.

Et annet begrep innen kromatografi er det kvantitative målet oppløsningsevnen,  $R_s$ , som beskriver kolonnens separasjonskapasitet. Det er et mål på separasjonen mellom to topper som elueres rett etter hverandre som i *Chromeleon Client, versjon 6.80*, følger den Europeiske Farmakopé, er oppløsningsevnen definert i ligning (6.5).

$$R_s = 1,18 \cdot \frac{t_{\text{referansetopp}} - t_R}{(W_{50\%, \text{referansetopp}} - W_{50\%, R})} \quad (6.5)$$

$t_R$  er retensjonstiden til den første toppen,  $t_{\text{referansetopp}}$  er retensjonstiden til den toppen som elueres rett etter den første.  $W_{50\%, R} / W_{50\%, \text{referansetopp}}$  er bredden av toppen ved 50 % topphøyde.

Oppløsningen er avstanden mellom to maksimumstopper dividert på den aritmetiske gjennomsnittet av toppbredden. Høye verdier av oppløsningen, gir bedre separasjon, enn lave verdier av oppløsningen som gir dårligere separasjon. For kvantitative analyser (25) bør oppløsningen,  $R_s$ , være 1,5. For god robusthet er anbefalingen ofte at oppløsningen er 2.

Asymmetrien,  $A_s$ , til en topp er en variabel som er et mål på om toppen har fronting eller hale. Ideelt er det ønskelig med en symmetrisk gaussisk form på toppene, der asymmetrien bør ligge mellom 0,9 og 1,5. Asymmetrien beregnes på grunnlag av avviket fra denne symmetrien, altså ved å måle avstanden mellom toppens maksimum og toppens forkant eller bakkant ved 5 % topphøyde. *Chromeleon Client, versjon 6.80* beregner asymmetrien som i ligning (6.6).

$$A_s = \frac{RW_{5\%} + LW_{5\%}}{2 \cdot LW_{5\%}} \quad (6.6)$$

der  $RW_{5\%}/LW_{5\%}$  er høyre/venstre toppbredde i 5 % av topphøyden. Asymmetrifaktoren vil alltid være positiv, men enten større eller mindre enn 1 avhengig om man har hale eller fronting.

### 6.1.3 Kvantitative analyser

Deteksjonsgrensen, «Limit of Detection» (LOD), er den laveste konsentrasjonen til en analytt som gir opphav til et detektorsignal som er signifikant forskjellig fra signalet til en blindprøve.

Bestemmelse av deteksjonsgrensen kan gjøres ved å beregne den stoffmengden som gir et signal/støy forhold til 3 som tilsvarer ca. 93 % konfidensnivå eller 3,3 signal/støy forhold som tilsvarer ca. 95 % konfidensnivå. En generell regel er at ved deteksjonsgrensen bør gjennomsnittet av analyttsignalet være minst 3x standardavviket til en blindprøve.

Deteksjonsgrenser kan alternativt bestemmes fra en kalibreringskurve. Under antakelse at standardavviket i y-verdien (signalet) i kalibreringskurven gjenspeiler støyen i målingene, kan deteksjonsgrensen beregnes fra følgende ligning (6.7).

$$LOD = \frac{3,3 \cdot S_{y/x}}{a} \quad (6.7)$$

der  $a$  er stigningstallet og  $S_{y/x}$  er standardavviket i y (kalibreringsligningen).

Jo lavere støyen er gjennom analysen, jo lavere er deteksjonsgrensen. Deteksjonsgrensen er avhengig av følsomheten på detektoren. Følsomheten til detektorer er korrekt definert som signalrespons pr. endring i stoffmengden som når detektoren. Dette vil tilsvare stigningstallet til detektorens signalresponskurve.



En bestemmelse av deteksjonsgrensen som er blitt benyttet i oppgaven er å bruke *Chromeleon Client versjon 6.80* på et ønsket kromatogram og definere støyen - «noise» i et tidsdefinert område. Deteksjonsgrensen er basert på signal/støy forhold,  $S/N_{p-p} \geq 3$ , ved å måle toppsignal fra en prøve med en kjent konsentrasjon til neste toppsignal (11).

Kvantifiseringsgrensen, «Limit of Quantification» (LOQ), er vanligvis definert som den stoffmengden som gir opphav til et signal som er 10x større enn støyen eller mengden som kan bli målt med rimelig nøyaktighet, uttrykt i ligning (6.8).

$$LOQ = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{a} \quad (6.8)$$

der  $a$  er stigningstallet og  $S_{y/x}$  er standardavviket i  $y$  (kalibreringsligningen).

Ved hjelp av programvaren *Chromeleon Client, versjon 6.80*, kan signal/støy forholdet automatisk beregnes for toppene i et kromatogram.

Kalibreringskurven er målt signal for analytt i standardprøver plottet mot de kjente konsentrasjonene eller konsentrasjonsendringer til analytten. Mengden av analytt i ukjente prøver finnes ved å ta verdien for det målte signalet og sette dette inn i likningen for kalibreringskurven. I kromatografi benyttes toppenes målte areal som innsetningsverdi i kalibreringskurven.

Intern standard metode, ISTD, er en metode der en kjent mengde av en forbindelse, som er forskjellig fra analytten, tilsettes den ukjente prøven. Tilsettingen skjer før prøveopparbeidingen tar til. Metoden brukes i de tilfellene der det er mistanke om tap av analytt underveis eller ikke-reproduserbare analysebetingelser. Denne metoden brukes til å bestemme kvantiteten til prøveanalytten eller instrumentresponsen som av ulike grunner varierer fra analyse til analyse og som kan være vanskelig å kontrollere. Intern standard metode kan si noe om tapet av prøven i prøveopparbeidelsen.

#### **6.1.4 Analyse av fluorokinoloner**

Det er blitt gjort mange studier av analyse av fluorokinoloner på HPLC og da spesielt på ciprofloksacin, alt fra biologiske prøver til avløpsvann (13, 47-49). Studier har vist at HPLC er en metode som har god sensitivitet, nøyaktighet og presisjon (50). I studier for metodeutvikling av fluorokinoloner har det blitt prøvd ut forskjellige kolonner og mobilfaser. Fluorokinoloner i humant blod, plasma eller serum går igjennom en prøveopparbeiding før de kan analyseres på HPLC. Prøveopparbeidelsen vil omfatte proteinfelling/proteinfjerning for å

unngå tette kolonner. Analyser av fluorkinoloner på HPLC er C18-kolonne den mest dominerende, men C8-kolonne og RP-amid kolonner er også blitt brukt.

### **6.1.5 Analyse av fluorkinoloner ved bruk av omvendt fase C18-kolonner**

Et studie (50) gikk på kvantifisering av ciprofloksacin i humant plasma på en C<sub>18</sub> kolonne (250x4mm i.d, 5µM) med fluorescens detektor. Mobilfasen var en acetonitril-fosfat blanding (pH 3; 20 mM) og tetrametylammonium hydroksid løsning ble tilsatt mobilfasen for å bedre formen på toppene i mobilfasen. Det var en gradient eluering der 7,5 minutt var isokratisk eluering med 83 % fosfat, etter det ble fosfat økt med 20 % i 2 minutter og opprettholdt i 1,5 minutt. Hensikten med studiet var å kvantifisere ciprofloksacin i human plasma etter proteinfelling med perklorsyre . Resultatene fra forsøkene viste at metoden er enkel, spesifikk, nøyaktig og presis. Analysetiden ble  $4,7 \pm 0,2$  minutter. De kromatografiske betingelsene er egnet til å separere ciprofloksacin fra fire mulige fluorescerende meatbolitter som hadde analysetider på henholdsvis 3,4, 3,5, 6,2 og 6,8 minutter. Konsentrasjonene for ciprofloksacin og metabolittene lå i området 0,0412 - 3,1 µg/mL.

I et studie (51) ble ciprofloksacin og ciprofloksacin metabolitter (metabolitt M 1 fortynnet med fosfatbuffer, 0,03 mg/mL, metabolitt M 2 og M 3 fortynnet med ammonium hydroksid, 0,5 - 0,8 mg/mL) i serum og plasma analysert. Deretter ble de kvantifisert ved bruk av en isokratisk eluering etter proteinfelling. Prøvene ble tilsatt trikloreddiksyre og acetonitril for proteinfelling. Intern standard var N-isopropyl analog av ciprofloksacin. Mobilfasen var 0,02 M trikloreddiksyre - acetonitril - metanol (pH 3;74:22:4 %,v/v/v) på en polystyren-divinylbenzen omvendt fase kolonne (150x4,6 mm i.d, 5µm). Det ble oppnådd fullstendig separasjon av ciprofloksacin og ciprofloksacin metabolitter. UV- detektor ble brukt i studie. Neglisjerbare interferenser ble observert ved retensjonstidene for ciprofloksacin, ciprofloksacin metabolitt M 1 og M 3, mens det var delvis interferens for metabolitt M 2 (høy fluorometrisk respons) i serum og plasma prøver. Metoden separerer og kvantifiserer alle analyttene.

Ciprofloksacin ble i et annet studie (52) analysert i plasma og i urin på en C18- kolonne (150x6 mm i.d, 5µm) med en mobilfaseblanding bestående av 900 mL av 50 mL/L eddiksyre, 50 mL/L acetonitril og 50 mL/L metanol. Separasjon av ciprofloksacin ble oppnådd med isokratisk eluering. Under forsøket ble det brukt UV- detektor ved en bølgelengde på 280 nm. Intern standard var lomefloksacin. Retensjonstiden for ciprofloksacin og lomefloksacin var på henholdsvis 12 og 16 minutter. Resultatene viste at metoden er reproducerbar, sensitiv og nøyaktig. Kvantifiseringsgrensen ble 0,01 mg/L for plasma og 0,5 mg/L for urin. Det var lave

deteksjonsgrenser som ble oppnådd for en UV-detektor. UV- detektoren ga reproduerbare og stabile responser.

I litteraturen (53) vises det til en enkel og sensitiv bestemmelse av fem forskjellige kinoloner, deriblant enrofloxacin og ciprofloxacin, fra vev i fisk og svin ble utført på en C18-kolonne (150x4,6mm i.d, 5µm) med 0,02 M acetonitril- fosfat buffer (18:82 %, v/v), 0,05 M pH 3,0 med fluorescens detektor. Metoden innebar en ekstraksjon og et renseprosedyre trinn. Vev fra fisk og svin ble homogenisert og tilsatt 10 mL 0,05 M fosfat og sentrifugert i 10 minutter. I omvendt fase kolonner er det et generelt problem med brede topper og hale for basiske og polare forbindelser, men dette vil avhenge av hvor god den omvendte fasen er. Aktive silanolgrupper og metallforurensninger i stasjonærfasen kan gi slike uønskede effekter. Enrofloxacin og dens hovedmetabolitt ciprofloxacin er amfolytiske og gav brede topper og hale på omvendt fase kolonner. Interaksjoner med silanolgruppen og renheter i kolonnen forårsaker dette. Studiet konkluderte med at dette kan reduseres ved bruk av mobilfase med høy surhet og ionestyrke, men basiske tilsetningsstoffer som aminer kan også brukes for å undertrykke effekten av de sure silanolgruppene. Høy rene silika kolonner med lavt innhold av metalliske urenheter er laget for polare og basiske forbindelser. Så med bruk av riktige kromatografiske betingelser som riktig valg av kolonne og mobilfase gav separasjoner av fem forskjellige kinoloner.

#### **6.1.6 Analyse av fluorokinoloner ved bruk av C8-kolonner**

En annen analytisk kolonne som er blitt brukt til analyse av fluorokinoloner er C8- kolonne. I et studie (54) der enoksacin, norfloxacin, ofloxacin og ciprofloxacin ble direkte kvantifisert i humant serum, ble det brukt en C8-kolonne (250x4 mm i.d, 5µm) og en mobilfase blanding bestående av 0,4 mol/L sitronsyre -metanol- acetonitril (7:15:78 %, v/v). En UV-detektor ble brukt i studie og analysene utført ved en bølgelengde på 275 nm. Det ble laget løsninger i området 0,001- 8,0 ng/µL fra stamløsninger på 1 mg/mL. Metoden viste god linearitet, var rask, nøyaktig og spesifikk for bestemmelse av fluorokinoloner i humant serum. Den er egnet for kliniske analyser for å overvåke fluorokinoloner i biologiske væsker. Analysetiden viste seg å være under 10 minutter og det ble oppnådd høy gjenfinningsprosent for fluorokinolonene var over 90 %.

Med en C8-kolonne (250x4mm i.d, 5µm) ble en rask, nøyaktig og sensitiv metode utviklet for kvantitativ bestemmelse av fem fluorokinoloner. I dette studie (49) ble enoksacin, ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin og enrofloxacin fra spiselige dyrevev (fra muskel vev, lever, nyre og egg) undersøkt. Mobilfasen bestod av en blanding av 0,4 mol/L sitronsyre- metanol-

acetonitril (87:9:4 %, v/v). Analyttene ble isokratisk eluert. Fast - fase ekstraksjon ble anvendt som opprenselsestrinn av matriksen. Resultatene av studiene viste at de fem fluorokinolonene gav grunnlinjeseparasjon innen 15 minutter. Analysetiden var 7,9 min. for enfloksacin, 9,0 min. for ofloksacin, 10,3 min. for norfloksacin 11,6 min. for ciprofloksacin og 13,5 min. for enrofloksacin. Intern standard var lamotrigin, hadde en retensjonstid på 15,6 min. Fluorokinoloner kan brukes til behandling av infeksjoner i mat-produserende dyr og metoden er validert for å kunne brukes i laboratorier for kvantitative bestemmelser av de fem fluorokinolonene.

## 6.2 Tillaging av stamløsninger og buffere

### Tillaging av stamløsninger

Det ble laget stamløsninger av ciprofloksacin, norfloksacin og ofloksacin med konsentrasjoner på ca. 1000 mg/L. Stamløsningene ble laget ved å veie inn ca. 0,0250 g av hver av forbindelsene, overført til 25 mL målekolber og løst i 0,1 M saltsyreløsning. Stamløsningene var utgangspunktet for alle kvalitative løsninger for metodeutviklingen. Videre fortyninger ble gjort med 0,1 % eddiksyreløsning. Det ble laget arbeidsløsninger med konsentrasjoner på 100 µM av de respektive analyttene som ble brukt videre i arbeidet. Blindprøven var 0,1 % eddiksyreløsning. Analysene ble utført med isokratisk eluering på HPLC.

I litteraturen (48, 50, 52, 53) er det oppgitt ulike løsningmidler som forbindelsene er løst i, som i praksis ikke seg å være gjennomførbart.

### Tillaging av eddiksyreløsning (0,1%) med trietylamin, TEA

Mobilfasen ble laget ut fra prosedyre beskrevet i litteraturen (51, 52, 56). Til en 1,0 L flaske ble det pipert ut 100 mL 1,0 % eddiksyreløsning og fortynnet med 800 mL Milli-Q vann. Det ble tilsatt noen dråper trietylamin, TEA, og pH i løsningen ble kontrollert ved hjelp av en pH-elektrode. Løsningene ble fortynnet med Milli-Q vann til 1000 mL og blandet godt. Den endelige pH i løsningen ble 3,46 ved 21°C.

### Tillaging av 10, 25 og 50 mM fosfatbuffer med trietylamin, TEA

Det ble pipert ut henholdsvis 0,171 mL, 1,700 mL og 0,856 mL ortofosforsyre (57) til hver sin flaske på 250 mL, 1000 mL og 250 mL, og fortynnet med Milli-Q vann. Noen dråper trietylamin, TEA (58), ble tilsatt for å justere pH til ca 3. Den endelige pH i bufferene ble

følgende for 10 mM fosfat med TEA; pH 3,02, for 25 mM fosfat med TEA; pH 3,03 og for 50 mM fosfat med TEA; pH 3,05, målt med pH-elektrode ved 21 °C.

### **6.2.1 Eksperimentelt - Restek C18-kolonne**

Utgangspunktet var å se hvordan analyttene, ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin, ble separert på en typisk C18-kolonne på HPLC. Det ble valgt en C18-kolonne fra Restek (100x4,6 mm i.d), opplysninger om kolonnedimensjoner og stasjonærfase er gitt i tabell 6.1. Det ble først testet ut en binær mobilfaseblanding med forskjellige sammensetninger av eddiksyreløsning (0,1 %)(justert med TEA til pH 3,46) og acetonitril, AcN, som vist i tabell 6.1. Fra eddiksyreløsningen ble det valgt å gå over til å teste mobilfaser med fosfatbuffer med ulike bufferkonsentrasjoner som 10, 25 og 50 mM fosfat/AcN (85:15, v/v) (pH justert med TEA). En tertiær mobilfaseblanding bestående av fosfatbuffer (25 mM og 50 mM), acetonitril og metanol (75:12:13, v/v/v) (justert med TEA til pH 3,03) ble deretter testet ut. Til slutt ble en tredje mobilfase med fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (uten TEA) med bufferkonsentrasjonene 10, 25 og 50 mM ble også forsøkt på kolonnen. Alle buffersammensetningene er vist i tabell 6.1.

**Tabell 6.1.** Oversikt over uttesting av forskjellige mobilfasesystemer på Restek C18-kolonnen (100x4,6 mm), 5 µm partikkelstørrelse, 11 % C-innhold. Analysene ble utført med pumpehastighet: 1,000 mL/min., injeksjonsvolum: 5,000 µL, temperatur: 30 °C, UV-deteksjonen var ved: 279 nm/254 nm, analysetiden: 10 min. Mobilfasesammensetningene for hvert forsøk er spesifisert.

Kolonne	Mobilfase
Pinnacle™ II, Restek, C <sub>18</sub> , 100x4,6 mm i.d, partikkelstørrelse: 5,0 µm, 13 % C-innhold, full endcapping, pH: 2,5 - 8, porestørrelse: 110 Å,	0,1 % eddiksyreløsning/AcN (60:40, v/v) (TEA, pH 3,46)
	0,1 % eddiksyreløsning/AcN (50:50, v/v) (TEA, pH 3,46)
	0,1 % eddiksyreløsning/AcN (70:30, v/v) (TEA, pH 3,46)
	10 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (TEA, pH 3,02)
	25 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (TEA, pH 3,03)
	50 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (TEA, pH 3,05)
	50 mM fosfatbuffer/MeOH/AcN (75:13:12, v/v/v) (TEA, pH 3,05)
	25 mM fosfatbuffer/MeOH/AcN (75:13:12, v/v/v) (TEA, pH 3,03)
	10 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (pH 3,07)
	25 mM fosfatbuffer/AcN (85:15,v/v) (pH 3,10)
50 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (pH 3,16)	

### 6.2.2 Resultater og konklusjon - Restek C18-kolonne

Analyttene ble analysert enkeltvis på en Restek C18-kolonne og med forskjellige sammensetninger av 0,1 % eddiksyreløsning (TEA, pH 3,46) og AcN. Analysene gav korte retensjonstider av analyttene, under 2 minutter. Analyttene hadde veldig like retensjonstider og de ville derfor ikke blitt separert i en blanding. Analytt-toppene hadde betydelig haledannelse. Et kromatogram med 100 µM ciprofloksacin analysert med 0,1 % eddiksyreløsning/AcN (60:40, v/v) (TEA, pH 3,46) er vist i vedlegg 10.3, figur 6.1. Mobilfasen er uegnet, fordi analyttene går nesten rett gjennom kolonnen og blir lite retardert.

Ved bruk av fosfatbuffer/ AcN (85:15, v/v) (med TEA) med ulike bufferkonsentrasjoner som 10, 25 og 50 mM gav retensjonstider på analyttene på henholdsvis 2,1 - 2,7 minutter, 2,1 - 2,4

minutter og 2,1 - 2,3 minutter. Nullretensjonstiden,  $t_0$ , ble anslått til å være 1,05 minutter ut i fra kromatogrammene. Analytt-toppene kom tett og raskt. Kromatogrammene viser at analytt-toppene hadde mindre hale med 50 mM fosfatbuffer/AcN (85/15, v/v) (TEA, pH 3,05) enn 25 mM fosfat/AcN (85:15, v/v) (TEA, pH 3,03) som igjen viser mindre haledannelse enn med 10 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (TEA, pH 3,02). I vedlegg 10.3, figur 6.2, vises et kromatogram av 100  $\mu$ M ciprofloksacin analysert med 25 mM fosfat/AcN (85:15, v/v) (TEA, pH 3,03). Høyere bufferkonsentrasjoner ser ut til å gi redusert haledannelse noe som kan forklares med at bufferen undertrykker hydrogenbindingen med stasjonærfasen. Mobilfasen 10 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (TEA, pH 3,02) gav best selektivitet og retensjon, men ga mye haledannelse i kromatogrammene.

Ved å bruke mobilfasen 50 mM fosfatbuffer/MeOH/AcN (75:13:12, v/v/v) (TEA, pH 3,05) kom analyttene etter 1,5 - 1,7 minutter, det betyr for liten retensjon og separasjon.

Det ble gjort forsøk ved å se på 25 mM fosfatbuffer/MeOH/AcN (75:13:12, v/v/v) (TEA, pH 3,03). Denne fosfatbufferen ble valgt som et kompromiss, mellom retensjonen og haledannelse. De enkelte analytt-toppene kom mellom 2,3 - 2,7 minutter, og ciprofloksacin hadde mer hale enn norfloksacin, som hadde mer hale enn ofloksacin. Analyttene blir lite retardert og en separasjon er nesten ikke mulig.

Det ble testet mobilfaser som fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (uten TEA) med bufferkonsentrasjonene 10, 25 og 50 mM. Mobilfasen 10 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) gav topper som var brede og med haledannelse. Retensjonstidene på toppene var 3,1 - 5,1 minutter. Mobilfasen 25 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) gav retensjonstider på analytt-toppene mellom 2,6 - 3,0 minutter. Toppene hadde mindre hale enn med 10 mM fosfat/AcN (85:15, v/v). Mobilfasen 50 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) gav analytt-topper med retensjonstider mellom 2,4 - 2,8 minutter. Toppene hadde mindre haledannelse med 50 mM fosfatbuffer/AcN (85/15, v/v) enn med 25 mM fosfatbuffer/ AcN (85:15, v/v). Et kromatogram med 100  $\mu$ M ciprofloksacin analysert med 25 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (uten TEA) er vist i vedlegg 10.3, figur 6.3.

Konklusjon: med økende konsentrasjon på bufferen får analyttene kortere retensjonstid, men de kommer tettere i kromatogrammene. En høy bufferkonsentrasjon gir topper med mindre haledannelse. Dette forsøket viste at uten innslag av TEA i fosfatbufferen gav det mer haledannelse enn med TEA. TEA undertrykker de ikke-derivatiserte silanolgruppene og dermed haledannelsen. Symmetrien for analytt-toppene er bedre med mobilfase tilsatt TEA

enn mobilfase uten TEA. Asymmetrifaktoren er lavere med TEA enn uten TEA. Det viser betydningen av TEA har på topp-formen.

### 6.3 Eksperimentelt - PAH C18-kolonne

På en lengre C18-kolonne, PAH-kolonne (150x4,6 mm i.d), ble testet ut for å se om den ga bedre separasjon av analyttene. Opplysninger om kolonnedimensjoner og stasjonærfase er oppgitt i tabell 6.2. Det ble valgt å gå videre med 25 mM fosfatbuffer (TEA, pH 3,03) fra Restek forsøket, som så ut til å være den mest lovende med tanke på separasjonstider og selektivitet. Mobilfasen 25 mM fosfatbuffer ble testet med forskjellige prosentvise innhold av MeOH, men med konstant AcN innhold som vist i tabell 6.2.

**Tabell 6.2.** *Oversikt over uttesting av 25 mM fosfatbuffer med innslag av AcN og MeOH på PAH C18-kolonnen. Analysene ble utført med pumpehastighet: 1,00 mL/min., injeksjonsvolum: 5,000 µL, temperatur: 30 °C, UV-deteksjonen var ved: 279 nm/254 nm, den totale analysetiden: 15 min. Mobilfasesammensetningene for hvert forsøk er spesifisert.*

Kolonne	Mobilfase
SUPECOSIL™ LC-PAH HPLC COLUMN, PAH, C <sub>18</sub> , 150x4,6 mm i.d, partikkelstørrelse: 5 µm, 13 % C-innhold, porestørrelse: 120 Å	25 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (TEA, pH 3,03)
	25 mM fosfatbuffer/AcN/MeOH (75:15:10, v/v/v) (TEA, pH 3,03)
	25 mM fosfatbuffer/AcN/MeOH (70:15:15, v/v/v) (TEA, pH 3,03)
	25 mM fosfatbuffer/AcN/MeOH (65:15:20, v/v/v) (TEA, pH 3,03)

#### 6.3.1 Resultater og konklusjon - PAH C18-kolonne

Med ulike sammensetninger av fosfatbuffer og AcN/MeOH gav det retensjonstider av analyttene som lå på henholdsvis 4,34 - 4,87 minutter, 3,87 - 4,39 minutter, 3,06 - 3,42 minutter og 2,78 - 3,11 minutter.

Kromatogrammene fra analysene viste at toppformen til analyttene var den samme, med betydelig haledannelse. Ut i fra kromatogrammene er det ikke mulig med grunnlinjeseparasjon.

Mobilfasen 25 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (TEA, pH 3,03) ga lengre retensjonstider og bedre selektivitet enn de øvrige mobilfasesammensetningene som inneholder innslag av



MeOH. Et kromatogram med 100  $\mu\text{M}$  ciprofloksacin analysert med 25 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (TEA, pH 3,03) er vist i vedlegg 10.3, figur 6.4.

Konklusjon: disse forsøkene viste at jo mindre prosentvis innhold av MeOH sammen med 25 mM fosfatbuffer (TEA, pH 3,03) gir økt retensjon av de enkelte analyttene. Resultatene viste analytter med korte retensjonstider (3 - 5 minutter) og topper med hale. PAH-kolonnen er lengre enn Restek C18-kolonnen og gav lengre retensjonstider. Lengre kolonne gir mer retensjon enn en kortere kolonne, men det er fremdeles haledannelse på analytt-toppene.

## **6.4 Tillaging av nye stamløsninger og testløsning**

### Tillaging av nye stamløsninger

Det ble laget nye stamløsninger av ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin og lomefloksacin hydroklorid. Analyttene ble løst i 0,1 % eddiksyreløsning, men til ciprofloksacin ble det tilsatt 210  $\mu\text{L}$  konsentrert saltsyre (58) for å få løst ciprofloksacin i eddiksyreløsning. Analyttene har en konsentrasjon på ca. 1000 mg/L. Fra stamløsningene ble det laget arbeidsløsninger med konsentrasjoner på 100  $\mu\text{M}$ . En testløsning med samtlige analytter ble laget ved at det ble pipert ut 250  $\mu\text{L}$  av hver 100  $\mu\text{M}$  arbeidsløsning som ble blandet i en HPLC vial (total volum 1,00 mL).

### **6.4.1 Eksperimentelt - ACE 3, C18-HL**

Den tredje kolonnen som ble testet ut var en ny C18-kolonne, ACE 3, C18-HL (150x3mm i.d.). Fra tidligere forsøk viste det seg at mobilfasen med 25 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (TEA, pH 3,03) gav best resultat på PAH-kolonnen for separasjon av analyttene. De enkelte analyttene og testløsningen ble analysert med denne mobilfasen. Testløsningen og de enkelte analyttene ble også analysert med 25 mM fosfatbuffer/MeOH/AcN (75:13:12, v/v/v) (TEA, pH 3,03), se tabell 6.3.

Ved optimalisering på denne kolonnen ble AcN byttet ut med MeOH (59). Mobilfasen ble testet ut med ulike prosentvise sammensetninger av 25 mM fosfatbuffer (TEA, pH 3,03) og MeOH, som vist i tabell 6.3.

**Tabell 6.3.** Oversikt over uttesting av 25 mM fosfatbuffer med innslag av AcN og MeOH på ACE 3, C18-HL -kolonnen. Analysene ble utført med pumpehastighet: 1,00 mL/min., injeksjonsvolum: 5,000 µL, temperatur: 30 °C, UV-deteksjonen var ved: 279 nm/254 nm, den totale analysesiden: 12 min. Mobilfasesammensetningene for hvert forsøk er spesifisert.

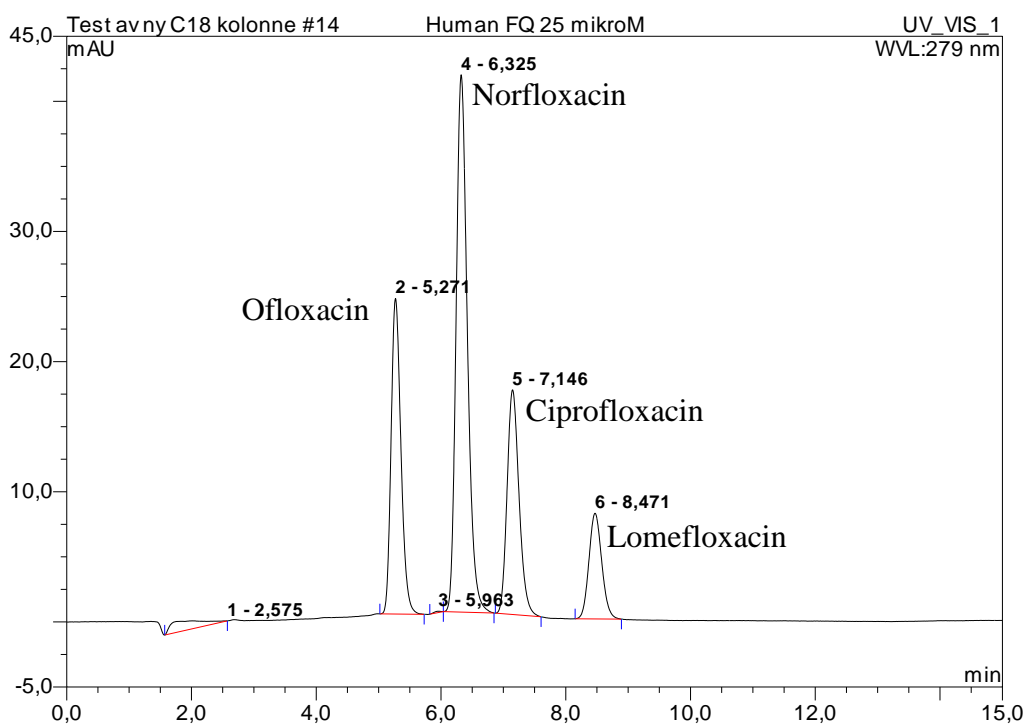
<p>ACE 3, C<sub>18</sub>-HL, 150x3 mm i.d, partikkelstørrelse: 3 µm, 20 % C-innhold, full endcapping, porestørrelse: 90 Å, overflateareal: 400 m<sup>2</sup>/g</p>	<p>25 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (TEA, pH 3,03)</p> <p>25 mM fosfatbuffer/ MeOH /AcN (75:13:12, v/v/v) (TEA, pH 3,03)</p>
<p>ACE 3, C<sub>18</sub>-HL, 150x3 mm i.d, partikkelstørrelse: 3 µm, 20 % C-innhold, full endcapping, porestørrelse: 90 Å, overflateareal: 400 m<sup>2</sup>/g</p>	<p>25 mM fosfatbuffer/ MeOH (80:20, v/v) (TEA, pH 3,03)</p> <p>25 mM fosfatbuffer/ MeOH (60:40, v/v) (TEA, pH 3,03)</p> <p>25 mM fosfatbuffer/ MeOH (20:80,v/v) (TEA, pH 3,03)</p> <p>25 mM fosfatbuffer/ MeOH (70:30, v/v) (TEA, pH 3,03)</p> <p>25 mM fosfatbuffer/ MeOH (75:25, v/v) (TEA, pH 3,03)</p>

#### 6.4.2 Resultater og konklusjon - ACE 3, C18-HL

Fra forsøket viste det seg at mobilfasen 25 mM fosfatbuffer /AcN (85:15, v/v), (TEA, pH 3,03), gav lengre retensjonstider for analyttene enn tidligere forsøk. Kromatogram av 100 µM ciprofloksacin er vist i vedlegg 10.3, figur 6.5. Retensjonstidene for analyttene var 3,6 - 4,6 minutter analysert enkeltvis, men norfloksacin og ofloksacin hadde samme retensjonstid. I testblandingen ble det bekreftet at norfloksacin og ofloksacin ikke lot seg separere, de kom som en stor topp etter 3,6 minutter, se vedlegg 10.3, figur 6.6. Toppene var høye og smale, og hadde ikke haledannelse. Fra kromatogrammene viste det seg at analyttene som var analysert enkeltvis og i testblandingen hadde samme retensjonstider. Det tyder på god stabilitet i analysene på HPLC-instrumentet.

Mobilfasen 25 mM fosfatbuffer/AcN/MeOH (75:13:12, v/v/v) (TEA, pH 3,03) gav retensjonstider på 3,5 - 4,7 minutter, når analyttene ble analysert enkeltvis. Norfloksacin og ofloksacin hadde nesten samme retensjonstid. I testblandingen ble det en overlapping mellom norfloksacin og ofloksacin. Toppene var høye og smale, og hadde ikke haledannelse.

Forsøket med mobilfasen 25 mM fosfatbuffer/MeOH (75:25, v/v) (TEA, pH 3,03) var den mobilfasen som gav best separasjon av analyttene i testblandingen, se kromatogram i figur 6.7.



**Figur 6.7.** Kromatogram av den optimaliserte separasjonen av analyttene. Retensjonsrekkefølgen var ofloksacin, norfloksacin, ciprofloksacin og lomefloksacin. Kolonne: ACE 3, C18-HL. Mobilfase: 25 mM fosfatbuffer/MeOH (75:25, v/v)(TEA, pH 3,03). Analysene ble utført med pumpehastighet: 0,500 mL/min., injeksjonsvolum: 5,000  $\mu$ L, temperatur: 30 °C, UV-deteksjonen var ved: 254 nm/ 279 nm, den totale analysetiden: 10 min.

Det ble oppnådd grunnlinjeseparasjon og den totale analysetiden er under 10 minutter.

Retensjonstidene for analyttene i 25  $\mu$ M testblanding er vist i tabell 6.4.

**Tabell 6.4.** Tabellen viser oversikt over retensjonstidene for ofloksacin, norfloksacin, ciprofloksacin og lomefloksacin fra det optimaliserte kromatogrammet, figur 6.7.

Analytt	Retensjonstider (minutter)
Ofloksacin	5,271
Norfloksacin	6,325
Ciprofloksacin	7,146
Lomefloksacin	8,471

På det optimaliserte kromatogrammet, figur 6.7, har analytt-toppene meget god toppsymmetri. Det betyr at det ikke er uønskede interaksjoner med forurensinger og udekkede silanolgrupper i stasjonærfasen. Kolonnen har høyt karboninnhold, slik at eventuelle uderivatiserte silanolgrupper er «skjermet» og ikke gir uønskede hydrogenbindinger.

### 6.5 Kromatografiske beregninger fra den optimaliserte separasjonen

Fra programvaren *Chromeleon Client*, versjon 6.8 på HPLC-instrumentet ble ulike kromatografiske parametre som asymmetri, platetall, retensjonsfaktoren beregnet, tabell 6.4, og oppløsningsevnen beregnet, tabell 6.5. Beregningene er gjort for den optimaliserte separasjonen. Formlene i *Chromeleon Client*, versjon 6.8 er definert ut i fra standarden til den Europeiske Farmakopé (EP).

Tabell 6.4 viser oversikt over kromatografiske parametre som asymmetri, platetall og retensjonsfaktor som ble beregnet på det kromatogrammet som gav optimal separasjon, figur 6.7.

**Tabell 6.4.** Beregnete parametre som asymmetri, platetall og retensjonsfaktor utført på *Chromeleon Client*, versjon 6.8, på HPLC-instrumentet på det optimaliserte kromatogrammet av analyttene, fra figur 6.7.

Analytt	Asymmetri (A)	Platetall (TP)	*Retensjonsfaktor (k)
Ofloksacin	1,23	5464	2,38
Norfloksacin	1,23	6107	3,05
Ciprofloksacin	1,21	6787	3,58
Lomefloksacin	1,11	8127	4,43

\*Nullretensjonstiden,  $t_0$ , ble avlest til å være 1,56 min.

Tabell 6.5 viser de beregnede oppløsningsevnene for båndparene i det kromatogrammet som gav optimal separasjon, figur 6.7.

**Tabell 6.5.** Beregnet oppløsningsevne for de respektive båndparene på det optimaliserte kromatogrammet av analyttene, figur 6.7, utført på Chromeleon Client, versjon 6.8, på HPLC- instrumentet.

Analytt (båndpar)	Oppløsning ( $R_s$ )
Ofloksacin - Norfloksacin	3,47
Norfloksacin - Ciprofloksacin	2,45
Ciprofloksacin - Lomefloksacin	3,68

### 6.5.1 Konklusjon av kromatografiske beregninger

Ut i fra det optimaliserte kromatogrammet, figur 6.7, ble noen kromatografiske parametre som asymmetrien, platetall, retensjonsfaktor og oppløsningen for analyttene beregnet.

Asymmetrifaktoren til analytt-toppene ligger på ca. 1,1 -1,2 som er veldig bra for en HPLC-analyse av polare analytter som fluorkinolonene. Asymmetrifaktoren for analyttene er mellom 0,9 og 1,5 noe som gjør at symmetrien kan betraktes som god.

Platetallene ligger på ca. 5000 - 8000. Det er ingen haledannelse eller båndspredning. Analytt-toppene har god symmetri og de er smale.

Retensjonsfaktoren på alle analyttene ligger mellom 2,38 og 4,43, og oppfyller kravet for god retensjon. Det vil si  $k$ -verdier mellom 1 og 5, som viser at retensjonen verken er for lav eller for høy.

Beregninger av oppløsningen av analyttene viser høye verdier og det betyr god oppløsningsevne for hver av analytt-toppene. Det er god separasjon av analyttene og i kvantitativ analyse er det ønskelig med oppløsningsevner som er større enn 1,5 og det har analyttene.

### 6.6 Beregning av deteksjonsgrensen - LOD

En estimering av deteksjonsgrensene til ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin og lomefloksacin hydroklorid ble gjort. Det ble laget en testløsning av fluorkinolonene med utgangspunkt i hver av arbeidsløsningene på 100  $\mu$ M med en sekvensiell fortykning av den

foregående i fortytningrekken til 1,0 µM. Løsningene ble fortynnet med 0,1 % eddiksyreløsning i HPLC vial (total volum 1,00 mL). Testløsning ble analysert med 25 mM fosfatbuffer/MeOH (75:25, v/v) (TEA, pH 3,03). Deteksjonsgrensen ble beregnet ved å bruke ligning (6.9). I dette tilfelle ble støyen definert 2,5 - 3,5 minutt før første analytt-topp. Støyen hadde en høyde på 0,14 mV.

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot C_{STD}}{\frac{S}{N_{STD}}} \quad (6.9)$$

der C er konsentrasjonen til analytt, S er signalet, N er støy - «noise»

Resultatene fra analysene er gitt i tabell 6.6.

**Tabell 6.6.** Tabellen viser den estimerte deteksjonsbestemmelsen av fire fluorkinoloner. Analysene ble utført med: ACE 3, C18-HL kolonne. Mobilfase: 25 mM fosfatbuffer/MeOH (75:25, v/v) (TEA, pH 3,03). Analysene ble utført med pumpehastighet: 0,500 mL/min., injeksjonsvolum: 5,000 µL, temperatur: 35 °C, bølgelengden for UV-deteksjonen var ved: 279 nm/450 nm, den totale analysetiden: 10 min.

Fluorokinolon	Deteksjonsgrense, LOD (µM)
Ofloksacin	0,072
Norfloksacin	0,011
Ciprofloksacin	0,012
Lomefloksacin hydroklorid	0,013

## 6.7 Oppsummering og konklusjon

Forskjellige mobilfasesystemer har blitt testet ut på ulike omvendt fase kolonner på HPLC. Eddiksyreløsning er uegnet på Restek-kolonne, fordi analyttene ikke blir retardert. Det ble prøvd ut fosfatbufferer med ulike konsentrasjoner og med ulike blandingsforhold med organiske komponenter som AcN og MeOH. TEA ble brukt for å justere pH og for å undertrykke uønskede bindinger med udekkede silanolgrupper i stasjonærfasen. Fra disse forsøkene viste det seg at en høy bufferkonsentrasjon gir mindre haledannelse, men her ble det påvist at retensjonen ble for liten og selektiviteten for dårlig slik at 25 mM fosfatbuffer/AcN var et bedre total alternativ.

En blanding av fosfatbuffer/AcN/MeOH (75:13:12, v/v/v) (TEA, pH 3,05) gir ingen retensjon av analyttene på Restek-kolonnen.

Fosfatbuffer/AcN uten tilsatt TEA gir større haledannelse på analytt-toppene enn med TEA i fosfatbuffer/AcN som gir bedre toppform på analyttene. Det ble testet ut en C18 PAH-kolonne som er en lengre kolonne enn Restek-kolonnen. Her ble 25 mM fosfatbuffer/AcN prøvd og med ulike prosentvise innslag av MeOH. PAH-kolonnen og 25 mM fosfatbuffer/AcN uten MeOH gir lengre retensjonstider av analyttene.

Den siste kolonnen som ble testet ut var en nyinnkjøpt kolonne, ACE 3, C18-HL kolonne, med høyt innhold av silika (20 %) som er høyere enn de øvrige kolonnene. I tillegg var stasjonærfasen fremstilt av høyrent silika, altså med et minimum av metalliske forurensninger. Siden mobilfasen 25 mM fosfatbuffer/AcN gav best resultat på PAH-kolonnen ble denne bufferen valgt å gå videre med på den nye kolonnen ACE 3, C18-HL. Det var av interesse å se på 25 mM fosfatbuffer/AcN/MeOH på denne kolonnen også. For å kunne komme frem til en optimalisering og tilstrekkelig separasjon av analyttene ble AcN byttet ut med MeOH. Den mobilfasen som gav grunnlinjeseparasjon av analyttene var 25 mM fosfatbuffer/MeOH (75/25, v/v) (TEA, pH 3,03). Ved å bytte ut AcN med MeOH ga det den ønskede selektiviteten i separasjonen av fluorkinolonene, samtidig som det fikk passende retensjonstider. Det optimaliserte buffersystemet gir altså utgangspunkt for å teste metoden i kvantitative analyser. Med ACE 3, C18-HL kolonne med høyrent silika og høyt karboninnhold var uønskede interaksjoner som kan føre til haledannelse, nesten helt eliminert.

Det ble foretatt kromatografiske beregninger på det optimaliserte krommatogrammet som viste at analysen av analyttene tilfredsstillende kravene for god analytisk separasjon.

Deteksjonsgrensen for analyttene ble anslått til å være 0,072  $\mu\text{M}$  for ofloksacin, 0,011  $\mu\text{M}$  for norfloksacin, 0,012  $\mu\text{M}$  for ciprofloksacin og 0,013  $\mu\text{M}$  for lomefloksacin hydroklorid.

## 7. Kvantitativ analyse av serumforsøk

### 7.1 Innledning grunnen for HPLC

Ut fra resultatene i metodeutviklingen i kapillærelektroforese og HPLC ble det tatt en vurdering som tilsa at HPLC med fluorescens deteksjon og ACE 3, C18-HL-kolonnen ga det beste resultatet. Et valideringsforsøk med humant serum ble derfor utført for å teste metodene ut i en kvantitativ analyse hvor kontrollprøver ble benyttet.

### 7.2 Eksperimentelt - serumforsøk

Det ble laget to sett med stamløsninger for hver av analyttene i 25 mL målekolber. Stamløsningene ble løst i 0,1 % eddiksyreløsning, men til ciprofloksacin ble det tilsatt 210 µL konsentrert HCl for å få løst i eddiksyreløsningen. Disse to settene med stamløsninger ble brukt som utgangspunkt for tillaging av henholdsvis kalibreringsløsninger og kontrollprøver, QC-prøver. Tabell 7.1 viser innveide mengder av analyttene og konsentrasjoner av stamløsningene til kalibreringsløsningne og kontrollprøvene, QC-prøvene.

**Tabell 7.1.** Innveide mengder og konsentrasjoner av ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin og lomefloksacin hydroklorid for tillaging av stamløsninger til kalibreringsløsninger og kontrollprøver, QC-prøver.

Analytt	Innveid mengde til kalibreringsløsninger (g)	Konsentrasjon av stamløsninger til kalibreringsløsning (mg/mL)	Innveid mengde til kontrollprøver (g)	Konsentrasjon av stamløsninger til kontrollprøver (mg/mL)
Ciprofloksacin	0,0254	1,016	0,0254	1,016
Norfloksacin	0,0253	1,012	0,0251	1,004
Ofloksacin	0,0256	1,024	0,0253	1,012
Lomefloksacin hydroklorid	0,0257	1,028	0,0256	1,024

Lomefloksacin hydroklorid ble brukt som intern standard. Det ble laget en intern standardløsning felles for hele forsøket. Fra stamløsningen til lomefloksacin hydroklorid ble det laget en arbeidsløsning på 530,17 µM i en 25 mL målekolbe. Fra arbeidsløsningen ble det laget en spikeløsning i en 10 mL målekolbe med en konsentrasjon på 32,9 µM.



### Tillaging av spikeløsninger

Det ble videre laget en arbeidsløsningsmikse av ofloksacin, norfloksacin og ciprofloksacin fra stamløsningene, der konsentrasjonen var på henholdsvis 566,68  $\mu\text{M}$ , 316,90  $\mu\text{M}$  og 306,62  $\mu\text{M}$ . Fra denne arbeidsløsningsmiksen ble det laget 6 spikeløsninger i 10 mL målekolber. Det utpiperte volumet fra arbeidsløsningsmiksen er vist i tabell 7.2. Alle løsninger ble fortynnet med 0,1 % eddiksyreløsning. I spike 0 ble det ikke tilsatt noe av arbeidsløsningsmiksen.

**Tabell 7.2.** *Utpipert volum fra arbeidsløsningsmiksen med ofloksacin, norfloksacin og ciprofloksacin. Alle løsninger ble fortynnet til 10 mL i målekolber.*

Forbindelse	Spike 0	Spike 1	Spike 2	Spike 3	Spike 4	Spike 5	Spike 6
Arbeidsløsningsmikse (mL)	0	0,200	0,400	0,750	1,000	1,600	2,200

Tabell 7.3 viser konsentrasjonene i de 6 spikeløsningene i 10 mL målekolber.

**Tabell 7.3.** *Blandetabell for tillaging av spikeløsninger som ble brukt til fremstilling av kalibreringsløsningene. Tabellen viser konsentrasjonene av hver av analyttene i spikeløsningene i 10 mL målekolber til kalibreringsløsningene.*

Analytt	Spikeløsninger i 10 mL målekolber ( $\mu\text{M}$ )						
	Spike 0	Spike 1	Spike 2	Spike 3	Spike 4	Spike 5	Spike 6
Ofloksacin	0	6,34	12,68	23,77	31,69	50,71	124,67
Norfloksacin	0	6,13	12,26	23,00	30,66	49,06	69,72
Ciprofloksacin	0	11,33	22,67	42,50	56,67	90,67	67,46

Kalibreringsløsninger ble deretter laget ved å tilsette fast volum av spike-løsninger og intern standard løsning til 400  $\mu\text{L}$  humant serum. Dette ble gjort for å ha mest mulig lik matris i alle kalibreringsløsninger.

### Tillaging av kalibreringsløsninger i humant serum

Kalibreringsløsningene ble laget i 6 sentrifugerør ved å tilsette 400  $\mu\text{L}$  humant serum, 50  $\mu\text{L}$  intern standard (32,9  $\mu\text{M}$  lomefloksacin) og 50  $\mu\text{L}$  spikeløsning. Til hvert av de 6 sentrifugerørene ble det tilsatt 50  $\mu\text{L}$  spikeløsning med henholdsvis spikeløsning 0 - 6, se tabell 7.3. Totalt volum i hver av sentrifugerørene er 0,500 mL. Det ble laget to sett med kalibreringsløsninger, et til serumforsøket med prøveopparbeiding der ultrafiltrering ble brukt

til proteinfjerning og et til serumforsøket hvor AcN ble benyttet til proteinfelling.

Konsentrasjonene av til kalibreringsløsningene er vist i tabell 7.4.

**Tabell 7.4.** Tabellen viser konsentrasjoner av kalibreringsløsningene med 400  $\mu\text{L}$  humant serum, 50  $\mu\text{L}$  intern standard og 50  $\mu\text{L}$  spikeløsning 0 - 6.

Spikeløsning	Konsentrasjon av ofloksacin ( $\mu\text{M}$ )	Konsentrasjon av norfloksacin ( $\mu\text{M}$ )	Konsentrasjon av ciprofloksacin ( $\mu\text{M}$ )
0	0	0	0
1	1,13	0,63	0,61
2	2,26	1,26	1,22
3	4,25	2,37	2,29
4	5,66	3,16	3,06
5	9,06	5,07	4,90
6	12,46	6,97	6,74

#### Tillaging av kontrollprøver - QC-prøver

Kontrollprøvene, QC-prøvene, ble laget fra et separat sett med stamløsninger, se tabell 7.1.

Fra stamløsningene til ofloksacin, norfloksacin og ciprofloksacin ble det laget en arbeidsløsningsmik i en 25 mL målekolbe der konsentrasjonene ble henholdsvis 560,04  $\mu\text{M}$  for ofloksacin, 314,40  $\mu\text{M}$  for norfloksacin og 306,62  $\mu\text{M}$  for ciprofloksacin.

Arbeidsløsningen ble utgangspunktet for tillaging av spikeløsninger til QC-prøver. Samme tillagingsprosedyre for tillaging ble brukt som ved tillaging av spikeløsninger til kalibreringsløsningene, se tabell 7.2.

Spikeløsninger til QC-prøvene: QC-prøve 1, 2 og 3 ble laget ved å følge samme prosedyre som ved tillaging av kalibreringsløsning 1, 3 og 5. Det ble laget tre QC-prøver på hvert analytiske nivå, altså 3x3 prøver. Det ble laget to sett med QC-prøver, et til serumforsøket der ultrafiltrering ble brukt til proteinfjerning og et til serumforsøket med prøveopparbeiding hvor AcN ble benyttet til proteinfelling. Kontrollprøvene ble laget i 9 sentrifugerør ved å tilsette 400  $\mu\text{L}$  humant serum, 50  $\mu\text{L}$  intern standard (32,9  $\mu\text{M}$  lomefloksacin) og 50  $\mu\text{L}$  spikeløsning. Til hvert av de 9 sentrifugerørene ble det tilsatt 50  $\mu\text{L}$  spikeløsning med henholdsvis spikeløsning 1, 2 og 3, se tabell 7.5.

**Tabell 7.5.** Blandetabell for tillaging av spikeløsninger som ble brukt til fremstilling av kontrollprøver, QC- prøver. Tabellen viser konsentrasjonene av hver av analyttene i spikeløsningene 1, 2 og 3 i 10 mL målekolber til kontrollprøver.

Analytt	Spikeløsninger i 10 mL målekolber ( $\mu\text{M}$ )		
	Spike 1	Spike 2	Spike 3
Ofloksacin	11,20	42,00	89,61
Norfloksacin	6,29	23,58	50,31
Ciprofloksacin	6,13	23,00	49,06

Det ble laget to sett med kontrollprøver, et til serumforsøket med prøveopparbeiding der ultrafiltrering ble brukt til proteinfjerning og et til serumforsøket hvor AcN ble benyttet til proteinfelling. Konsentrasjonene til kontrollprøvene er vist i tabell 7.6.

**Tabell 7.6.** Tabellen viser konsentrasjoner av kontrollprøver med 400  $\mu\text{L}$  humant serum, 50  $\mu\text{L}$  intern standard og 50  $\mu\text{L}$  spikeløsning 1, 2 og 3.

Kontrollprøve/replikant	Konsentrasjon av ofloksacin ( $\mu\text{M}$ )	Konsentrasjon av norfloksacin ( $\mu\text{M}$ )	Konsentrasjon av ciprofloksacin ( $\mu\text{M}$ )
QC-1-1	1,12	0,63	0,61
QC-1-2			
QC-1-3			
QC-2-1	4,20	2,36	2,30
QC-2-2			
QC-2-3			
QC-3-1	8,96	5,03	4,90
QC-3-2			
QC-3-3			

#### Prøveopparbeiding - ultrafiltrering

Fra sentrifugerørene ble kalibreringsløsningene og QC-prøvene, overført til sentrifugerør med filter, Millipore, non-sterile Ultrafree®-MC, og sentrifugert på en mikrosentrifuge (Galaxy 16DH, VWR) ved 13000 rpm/15900 g i 45 minutter. Filtratet ble pipert ut og overført til en HPLC-vial med innlegg av en 0,2 mL PCR-rør. Prøvene ble analysert på HPLC-instrumentet under de analysebetingelsene som er beskrevet nedenfor.

### Prøveopparbeiding - AcN felling med inndamping

Kalibreringsløsningene og QC-prøvene, ble tilsatt 1200 µL AcN til sentrifugerør (total volum: 1700 µL) og blandet på en vortex mikser. Sentrifugerørene ble sentrifugert på en mikrosentrifuge (Galaxy 16DH, VWR) 13000 rpm/15900 g i 15 minutter og supernatanten ble overført til nye sentrifugerør.

Sentrifugeinndamper (Centrivap Concentrator, model 780011) ble forvarmet til 45°C og sentrifugerørene ble satt i sentrifugeinndamper uten kork. Prøvene ble dampet inn til tørrhet ved å bruke temperaturprogram som vist under:

- 1) 45°C - 80 minutter → volumet ble redusert fra 1700 µL til ca. 500 µL
- 2) 60°C - 60 minutter → volumet ble redusert fra ca. 500 µL til ca. 200 µL
- 3) 60°C - 30 minutter → volumet ble redusert fra ca. 200 µL til ca. 50 - 100 µL
- 4) 60°C - 30 minutter → volumet ble redusert fra ca. 50 - 100 µL til tørrhet.

Det faste residuet i sentrifugerørene ble reløst ved at det til hvert av sentrifugerørene ble tilsatt 500 µL 0,1 % eddiksyreløsning og løsningene ble satt i 10 minutter på ultralydbad. Rørene ble blandet på vortex mikser i 5 sekunder før de ble sentrifugert ved 6000 rpm i 5 minutter. Fra sentrifugerørene ble det pipert ut 150 µL og overført til en HPLC-mikrovial (200 µL). Prøvene ble analysert på HPLC-instrumentet under de analysebetingelsene som er beskrevet nedenfor.

### Analysebetingelser på HPLC

Analysebetingelsene på HPLC-instrumentet (Dionex, Ultimate 3000) som det kvantitative serumforsøket ble utført på er:

Kolonne: ACE-3, C18-HL, 150x3 mm i.d, 3 µm, 20 % C-innhold.

Mobilfase: 25 mM fosfatbuffer/ MeOH (75:25, v/v) (TEA, pH 3,06)

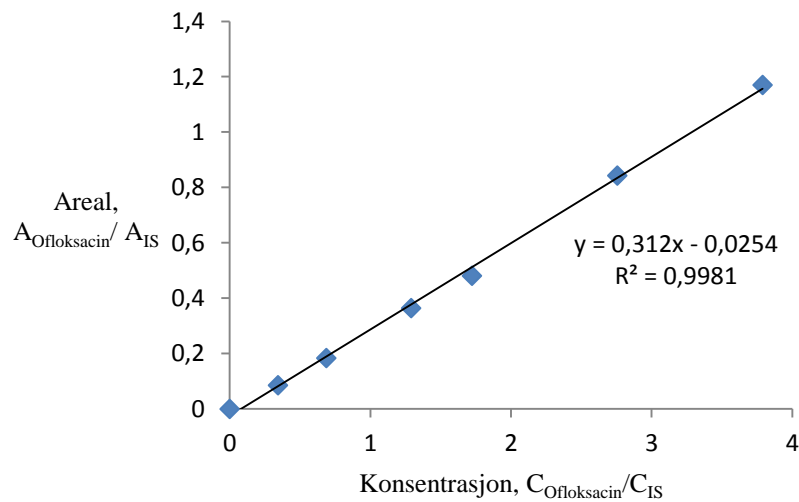
Detektor: fluorescens, bølgelengde: 254 nm/ 279 nm, kolonnetemperatur: 35°C,

Detektorinnstillinger; sensitivity: medium, gain: 1, response: 0,5 s.

### 7.3 Resultater og diskusjon

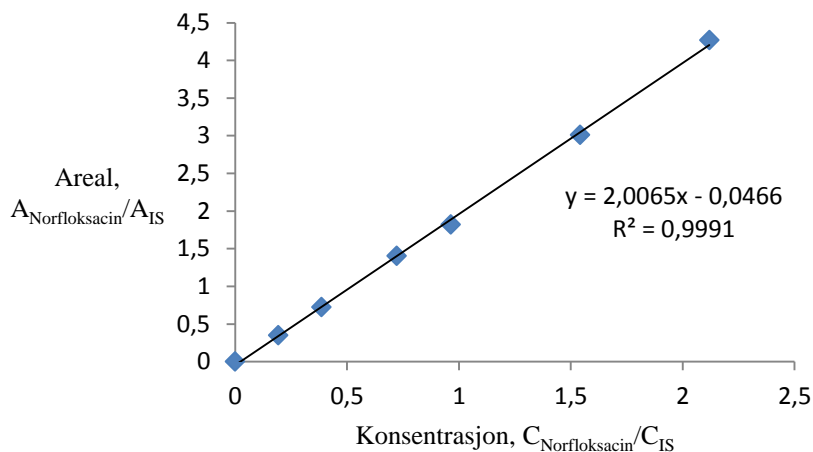
For ofloksacin , norfloksacin og ciprofloksacin ble det laget kalibreringskurver. Der arealforholdet (areal av analytt/areal av intern standard, IS) er plottet mot konsentrasjonsforholdet (konsentrasjon av analytt/intern standard, IS). Forholdene er uten benevning.

Dette er resultatet på kalibreringskurven for ofloksacin der ultrafiltrering ble brukt til proteinfjerning.



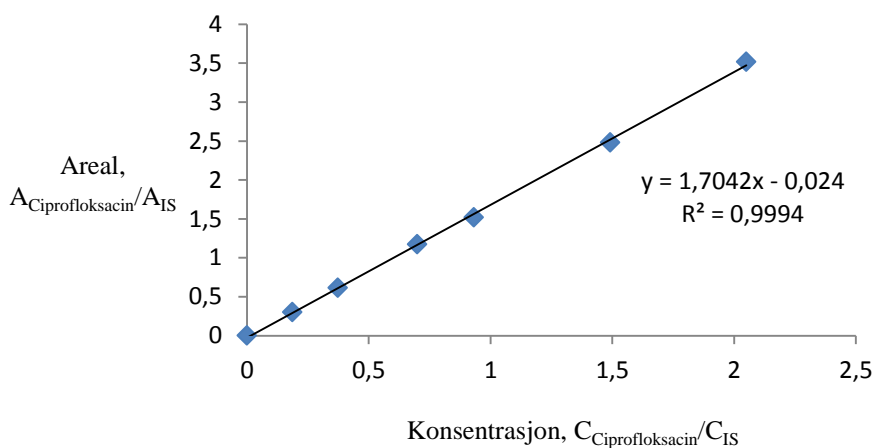
**Figur 7.1.** Kalibreringskurven for ofloksacin der arealforholdet er plottet som funksjon av konsentrasjonsforholdet der ultrafiltrering er brukt som proteinfjerning.

Dette er resultatet på kalibreringskurven for norfloksacin der ultrafiltrering ble brukt som proteinfjerning.



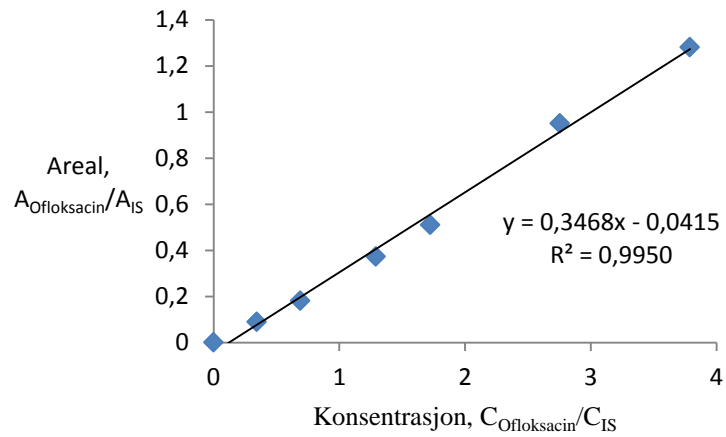
**Figur 7.2.** Kalibreringskurven for norfloksacin der arealforholdet er plottet som funksjon av konsentrasjonsforholdet der ultrafiltrering er brukt som proteinfjerning.

Dette er resultatet på kalibreringskurven for ciprofloksacin der ultrafiltrering ble brukt som proteinfjerning.



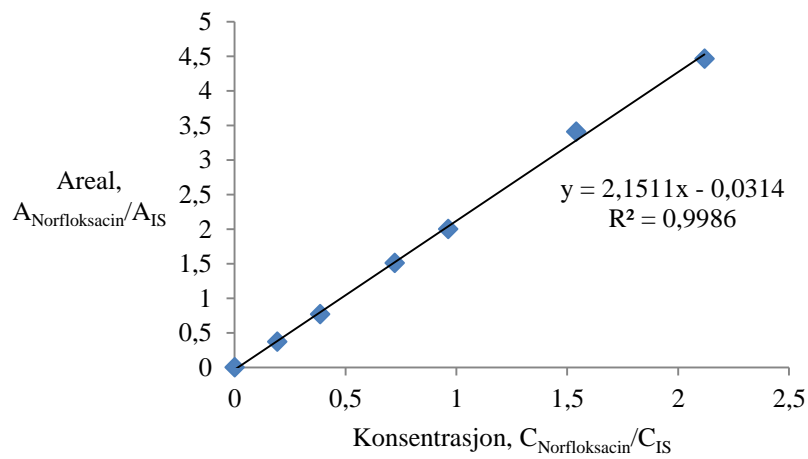
**Figur 7.3.** Kalibreringskurven for ciprofloksacin der arealforholdet er plottet som funksjon av konsentrasjonsforholdet der ultrafiltrering er brukt som proteinfjerning.

Dette er resultatet på kalibreringskurven for ofloksacin hvor AcN ble benyttet som proteinfelling.



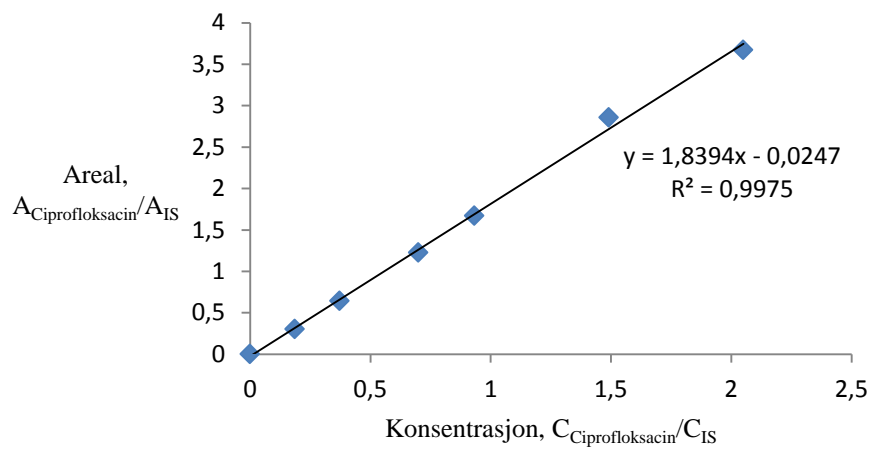
**Figur 7.4.** Kalibreringskurven for ofloksacin der arealforholdet er plottet som funksjon av konsentrasjonsforholdet der AcN er brukt som proteinfelling.

Dette er resultatet på kalibreringskurven for norfloksacin hvor AcN ble benyttet som proteinfelling.



**Figur 7.5.** Kalibreringskurven for norfloksacin der arealforholdet er plottet som funksjon av konsentrasjonsforholdet der AcN er brukt som proteinfelling.

Dette er resultatet på kalibreringskurven for ciprofloksacin hvor AcN ble benyttet som proteinfelling.



**Figur 7.6.** Kalibreringskurven for ciprofloksacin der arealforholdet er plottet som funksjon av konsentrasjonsforholdet der AcN er brukt som proteinfelling.

Alle tabellene, tabell 7.7 – 7.12, viser konsentrasjonene fra kontrollprøvene, QC-prøvene, i serumforsøket. Resultatene er angitt med 95 % konfidensintervall for middelveiden av konsentrasjonen og for middelveiden av gjenfinning.



**Tabell 7.7.** Tabellen viser beregnede konsentrasjoner av middelvei, standardavvik, relativt standardavvik og gjenfinning med konfidensintervall fra kontrollprøvene av ofloksacin der ultrafiltrering ble brukt som proteinjerning.

QC-prøver		Presisjon - repeterbarhet			Nøyaktighet
Nominelle verdier $\mu\text{M}$	Målt verdi $\mu\text{M}$	Middelvei med konfidensintervall $\mu\text{M}$	Standardavvik (SD) $\mu\text{M}$	Relativt standardavvik (RSD) %	Gjenfinning med konfidensintervall %
1,12	1,12	1,16 1,09-1,23	0,03	2,45	103,22 96,93-109,51
	1,17				
	1,17				
4,20	3,76	3,78 3,69-3,88	0,04	1,01	90,06 87,81-92,31
	3,76				
	3,83				
8,96	8,27	8,51 7,95-9,07	0,23	2,65	95,02 88,76-101,27
	8,72				
	8,55				

**Tabell 7.8.** Tabellen viser beregnede konsentrasjoner av middelvei, standardavvik, relativt standardavvik og gjenfinning med konfidensintervall fra kontrollprøvene av norfloksacin der ultrafiltrering ble brukt som proteinjerning.

QC-prøver		Presisjon - repeterbarhet			Nøyaktighet
Nominelle verdier $\mu\text{M}$	Målt verdi $\mu\text{M}$	Middelvei med konfidensintervall $\mu\text{M}$	Standardavvik (SD) $\mu\text{M}$	Relativt standardavvik (RSD) %	Gjenfinning med konfidensintervall %
0,63	0,63	0,62 0,58-0,65	0,01	2,07	97,86 92,82-102,90
	0,61				
	0,61				
2,36	2,14	2,14 2,11-2,17	0,01	0,54	90,78 89,57-92,00
	2,13				
	2,15				
5,03	4,66	4,70 4,54-4,86	0,06	1,35	93,41 90,28-96,54
	4,77				
	4,66				

**Tabell 7.9.** Tabellen viser beregnede konsentrasjoner av middelværdi, standardavvik, relativt standardavvik og gjenfinning med konfidensintervall fra kontrollprøvene av ciprofloksacin der ultrafiltrering ble brukt som protein fjerning.

QC-prøver		Presisjon - repeterbarhet			Nøyaktighet
Nominelle verdier $\mu\text{M}$	Målt verdi $\mu\text{M}$	Middelværdi med konfidensintervall $\mu\text{M}$	Standardavvik (SD) $\mu\text{M}$	Relativt standardavvik (RSD) %	Gjenfinning med konfidensintervall %
0,61	0,53	0,56 0,51-0,61	0,02	3,73	90,82 82,40-99,24
	0,56				
	0,58				
2,30	1,96	1,96 1,92-1,99	0,01	0,72	85,06 83,55-86,58
	1,94				
	1,97				
4,91	4,17	4,28 4,02-4,54	0,10	2,45	87,22 81,91-92,53
	4,38				
	4,29				

**Tabell 7.10.** Tabellen viser beregnede konsentrasjoner av middelvei, standardavvik, relativt standardavvik og gjenfinning med konfidensintervall fra kontrollprøvene av ofloksacin der AcN ble brukt som proteinfelling.

QC-prøver		Presisjon - repeterbarhet			Nøyaktighet
Nominelle verdier $\mu\text{M}$	Målt verdi $\mu\text{M}$	Middelvei med konfidensintervall $\mu\text{M}$	Standardavvik (SD) $\mu\text{M}$	Relativt standardavvik (RSD) %	Middelvei av gjenfinning med konfidensintervall %
1,12	1,16	1,17 1,13-1,22	0,02	1,43	104,82 101,09-108,55
	1,19				
	1,17				
4,20	3,76	3,77 3,72-3,82	0,02	0,53	89,67 88,49-90,85
	3,75				
	3,79				
8,96	8,52	8,60 8,36-8,83	0,09	0,01	95,92 93,30-98,54
	8,56				
	8,70				

**Tabell 7.11.** Tabellen viser beregnede konsentrasjoner av middelvei, standardavvik, relativt standardavvik og gjenfinning med konfidensintervall fra kontrollprøvene av norfloksacin der AcN ble brukt som proteinfelling.

QC-prøver		Presisjon - repeterbarhet			Nøyaktighet
Nominelle verdier $\mu\text{M}$	Målt verdi $\mu\text{M}$	Middelvei med konfidensintervall $\mu\text{M}$	Standardavvik (SD) $\mu\text{M}$	Relativt standardavvik (RSD) %	Gjenfinning med konfidensintervall %
0,63	0,57	0,57 0,55-0,59	0,01	1,57	91,04 87,49-94,59
	0,58				
	0,57				
2,36	2,18	2,15 2,08-2,21	0,03	1,23	91,12 88,33-93,90
	2,14				
	2,13				
5,03	4,52	4,55 4,47-4,62	0,03	0,66	90,41 88,92-91,91
	4,58				
	4,55				

**Tabell 7.12.** Tabellen viser beregnede konsentrasjoner av middelvei, standardavvik, relativt standardavvik og gjenfinning med konfidensintervall fra kontrollprøvene av ciprofloksacin der AcN ble brukt som proteinfelling.

QC-prøver		Presisjon - repeterbarhet			Nøyaktighet
Nominelle verdier $\mu\text{M}$	Målt verdi $\mu\text{M}$	Middelvei med konfidensintervall $\mu\text{M}$	Standardavvik (SD) $\mu\text{M}$	Relativt standardavvik (RSD) %	Gjenfinning med konfidensintervall %
0,61	0,54	0,54 0,53-0,56	0,01	1,43	88,84 85,69-92,00
	0,55				
	0,54				
2,30	1,90	1,90 1,82-1,98	0,03	1,65	82,63 79,24-86,01
	1,96				
	1,95				
4,91	4,10	4,13 4,06-4,21	0,03	0,75	84,24 82,67-85,81
	4,16				
	4,14				

En toveis variansanalyse ble utført med hensyn på ulike analytiske nivåer og proteinfellingsteknikk, altså med ultrafiltrering som prøveopparbeidelse eller med acetonitril som prøveopparbeidelse. Resultatene fra toveis variansanalyse (ANOVA), se vedlegg 10.3.

Resultatene fra variansanalysen viser for ofloksacin at mellom de ulike analytiske nivåene er det en signifikant forskjell ( $p < 0,05$ ) uavhengig av proteinfellingsteknikk. For de to ulike proteinfellingsteknikkene er det ikke en signifikant ( $p \geq 0,05$ ) forskjell mellom de to kolonnene. Interaksjonen mellom de ulike analytiske nivåene og proteinfellings-teknikkene er heller ikke signifikant ( $p \geq 0,05$ ) forskjell.

Resultatene fra variansanalysen viser for norfloksacin at mellom de ulike analytiske nivåene er det en signifikant forskjell ( $p < 0,05$ ) i gjenfinningen. For de to ulike proteinfellingsteknikkene er det også påvist en signifikant ( $p < 0,05$ ) forskjell mellom de to metodene. For interaksjonen mellom de ulike analytiske nivåene og proteinfellingsteknikkene er det en signifikant ( $p < 0,05$ ) effekt.

Resultatene fra variansanalysen viser for ciprofloksacin at mellom de ulike analytiske nivåene er det en signifikant forskjell ( $p < 0,05$ ). For de to ulike proteinfellingsteknikkene er det en signifikant ( $p < 0,05$ ) forskjell. Det er ikke påvist en interaksjon mellom de ulike analytiske nivåene og proteinfellingsteknikkene ( $p \geq 0,05$ ).

## 8. Oppsummering og konklusjon

### 8.1 Oppsummering

Det er prøvd ut to metoder for analyse av noen utvalgte fluorokinoloner i serum, nemlig væskechromatografi, HPLC, og kapillærelektroforese, CE.

Kapillærelektroforese anvendes ikke til rutineanalyser (23), med unntak av DNA-analyser og proteinanalyser. Metoden er rask, effektiv og har lave kostnader (små prøvevolum og lite bruk av løsningsmidler). Det lille prøvevolumet (nL) i kapillærelektroforese (33) gjør at det blir en høy-effektiv separasjon.

Ulempene med CE kan være den dårlige konsentrasjons sensitivitet i UV-VIS detektorer som er en av de mest anvendte blant CE-detektorer. Det injiserte volumet (nL) og lengden (mm) på prøven er veldig lite, så det er nødvendig å bruke «on-capillary» deteksjon fremfor separate detektorceller for å unngå båndspredning og tap av separasjon. Denne deteksjonsteknikken har kort lysvei som er nesten lik diameteren på kapillæret (50 -100  $\mu\text{m}$ ), mindre enn 1/100 av den tradisjonell deteksjons celle som blir brukt i HPLC. Siden målt absorbans er avhengig av både analyttens konsentrasjon og lengden på lysevein, forklarer dette hvorfor sensitiviteten i UV- detektoren i CE er dårligere enn i HPLC. Med fotometrisk deteksjon er man altså avhengig av å ha relativt høye analyttkonsentrasjoner i prøvene. Dette kan løses ved å bruke en høysensitiv detektor (33) som laser indust fluorescens (LIF) eller elektrokjemisk detektor. Ulempen med de to siste detektortypene er at de forutsetter at analyttene enten har naturlig fluoriserende eller oksiderbare/reducerbare grupper. Alternativt må de gjennom en prøveopparbeiding der slike grupper introduseres i molekylene. Dette øker betraktlig tidsbruken i analysen.

Teknikker for oppkonsentrering av analyttene i kapillærrørene som en del av injeksjonsprosedyren kan bidra til å kompensere for svakheten med fotometrisk deteksjon i kapillærrør. En oppkonsentreringsteknikk som «LVSS» ble prøvd ut med tetraboratbuffer, og det ble oppnådd en signaløkning for norfloksasin som var 34x bedre enn ved «normal mode» stacking. Denne teknikken ble utført i et basisk miljø slik det var anioner som ble oppkonsentrert i dette forøket. Dette viste at det er mulig å forbedre signalet selv om det i utgangspunktet er lav konsentrasjon.

Ulempen med kapillærelektroforese er at kolonnene tetter seg igjen etter et antall injeksjoner hvis prøvene er «skitne», og det krever hyppig vask eller rekondisjonering av kolonnen. Det stilles også krav til operatøren om å følge med på væsknivået av bufferene i vialene for å unngå en hevert-effekt. Det er viktig å bytte ut bufferen ofte, da buffersammensetningen endrer seg over tid på grunn av elektrolyse og migrasjon (elektrosmose og elektroforese) av ioner fra ett bufferresevoar til det andre.

I utviklingen av metoden på kapillærelektroforese ble det prøvd ut to buffersystemer. Det ene var tetraboratbuffer som separasjonsbuffer og den andre var med fosfatbuffer. Det ble ikke oppnådd tilstrekkelig separasjon med tetraboratbufferen, derfor ble fosfatbufferen testet ut for å oppnå separasjon. Ved å prøve ut ulike parametre (organisk modifikator, pH) som kunne forbedre optimaliseringen av separasjonsbufferen, ble det allikvel ikke oppnådd fullstendig grunnlinjeseparasjon av analyttene. Erfaringene som ble gjort underveis viste midlertidig at migrasjonstidene har høy stabilitet, men det var ustabile topparealer. Dette kan trolig skyldes variasjoner i injeksjonen (trykksettingen) eller i kolonnen. Det var derfor ikke grunnlag for kvantitative forsøk. Systemet viste ikke god nok robusthet.

## HPLC

Med væskerkromatografi, HPLC, ble det testet ut ulike kolonner og mobilfasesystemer. Binære og tertiære mobilfasesystemer på tre ulike kolonner ble testet ut. Med en Restek C18-kolonne ble analyttene raskt eluert (mellom 2 - 3 minutter), men det var ingen separasjon. Det ble prøvd ut fosfatbufferer med ulike konsentrasjoner, og med/ uten TEA i bufferen. Fosfatbuffer med TEA gav mindre haledannelse enn uten TEA. Ved å prøve en lenger C18-kolonne (PAH-kolonne) med 25 mM fosfatbuffer med AcN og AcN/MeOH ble retensjonstidene lengre, men det er fremdeles problemer med haledannelse. Det ble heller ikke oppnådd tilstrekkelig separasjon av analyttene. En ny C18-kolonne, ACE 3, C18-HL, med høyere karboninnhold, enn de to øvrige kolonnene ble prøvd ut. Fosfatbuffer med AcN og ACN/MeOH ble testet ut. Da AcN ble byttet ut med MeOH gav dette grunnlinjeseparasjon av analyttene. Mobilfasesammensetningen som ga den optimale separasjonen var 25 mM fosfatbuffer/ MeOH (75:25, v/v) (TEA, pH 3,03). Analysetidene var under 10 minutter for alle analyttene. Retensjonsfaktoren for analyttene er mellom 2,38 - 4,43 og det er godt siden retensjonsfaktoren bør ligge mellom 1 og 5. Oppløsningsevnen for analyttene ligger mellom 2,45 - 3,38. Dette er bedre enn 1,5 som tilsvarer grunnlinjeseparasjon og tilfredstiller kraven til robusthet som sier at separasjonsfaktoren bør være minst 2. Asymmetrien til analyttoppene

er god, og toppene er høye og smale. Det er ingen fronting eller haledannelse.

Asymmetrifaktoren er på 1,1 -1,2. Dermed er kriteriet om at asymmetrifaktoren bør ligge mellom 0,9 og 1,5 oppfylt. God toppsymmetri forklares ved at ACE 3, C18-HL-kolonnen har et høyere C-innhold (20 %) enn de to øvrige kolonnene (som har 12-13 % C-innhold). Det viser at et høyt innhold av karbon i kolonnen skjermer silikaoverflaten og hindrer uønskede interaksjoner med de polare gruppene som er i fluorokinolonene. Dermed reduserer haledannelsen i kromatogrammene.

Deteksjonsgrensene til fluorescensdetektoren for analyttene er anslått til å være 0,072  $\mu\text{M}$  for ofloksacin, 0,011  $\mu\text{M}$  for norfloksacin, 0,012  $\mu\text{M}$  for ciprofloksacin og 0,013  $\mu\text{M}$  for lomefloksacin hydroklorid.

Metoden tilfredsstiller kravene for god kromatografisk separasjon..

## 8.2 Konklusjon

Ut fra resultatene i metodeutviklingen ble det vurdert at HPLC var bedre egnet for analyse av fluorokinoloner i serum enn CE. Det er utviklet en rask og robust analyse på HPLC med analysetider under 10 minutter. Metoden ble brukt i et kvantitativt forsøk der det ble tilsatt kjente mengder fluorokinoloner til humant serum. Serumprøve gjennomgikk først en prøveopparbeiding der to forskjellige teknikker for proteinfjerning ble testet ut (UF og AcN-felling). Gjenfinning av analyttene lå rundt 90 %. Det var i utgangspunktet antatt at pga analyttenes binding til proteiner at tap av analytt ville være størst når UF ble benyttet. Det ble imidlertid ikke påvist signifikante forskjeller i gjenfinning av analyttene når ultrafiltrering eller felling med AcN ble brukt som proteinfjerningsteknikk.

## 8.3 Videre arbeid

Metoden for CE må utvikles videre for å kunne benyttes kvantitativt. Prøveopparbeidelse av serum kan utvikles for analyse på CE. Det var det ikke tid med i denne masteroppgaven. Det hadde også vært interessant og prøve ut flere oppkonsentreringsteknikker på CE som sweeping. En oppkonsentreringsforsøk med optimalisert fosfatbuffer hadde også vært interessant.

På HPLC kunne det være av interesse å analysere fluorokinoloner på kolonner som fenyلكolonne og pentafluorfenylkolonne. Dette er kolonner som forventes å ha ulik selektivitet enn det C18-kolonner har.



Med ultrafiltrering som fellingsteknikk på serum ble det sentrifugert i 45 minutter, men det kan være av interesse å undersøke hvor mye protein som blir felt ut både ved kortere og lengre sentrifugeringstider.

Denne kromatografiske separasjonen var god nok og kan også brukes til å analysere andre matrikser med fluorokinoloner som avløpsvann. Det som trengs er å videreutvikle en prøveopparbeidingsmetode.

## 9. Referanser

1. Tortora GJ, Case CL, Funke BR. Microbiology: an introduction. 8th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings; 2004. 898 p.
2. Samanidou VF, Christodoulou EA, Papadoyannis IN. Advances in Chromatographic Analyses of Fluoroquinolones in Pharmaceuticals and Biological Samples - A Review Article. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2005;1(3):283-308.
3. Völgyi G, Vizserálek G, Takács-Novák K, Avdeef A, Tam KY. Predicting the exposure and antibacterial activity of fluoroquinolones based on physicochemical properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;47(1):21-7.
4. Mc Ardell C. Antibiotics - the flipside of the coin. *Eawag news* [Internet]. 2002, 22.11.2012; (53):[21-3 pp.]. Available from: [http://www.eawag.ch/publications/eawagnews/www\\_en53/en53e\\_screen/en53e\\_mcardell\\_s.pdf](http://www.eawag.ch/publications/eawagnews/www_en53/en53e_screen/en53e_mcardell_s.pdf).
5. Picó Y, Andreu V. Fluoroquinolones in soil-risks and challenges. *Anal Bioanal Chem*. 2007;387(4):1287-99.
6. Sousa J, Alves G, Abrantes J, Fortuna A, Falcão A. Erratum to: Analytical methods for determination of new fluoroquinolones in biological matrices and pharmaceutical formulations by liquid chromatography: a review. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403(5):1459-.
7. Polishchuk AV, Karaseva ET, Emelina TB, Karasev VE. Spectroscopic and Photophysical Properties of Protonated Forms of Some Fluoroquinolones in Solutions. *Journal of Fluorescence*. 2012;22(1):373-9.
8. Lin C-E, Deng Y, Jr., Liao W-S, Sun S-W, Lin W-Y, Chen C-C. Electrophoretic behavior and pKa determination of quinolones with a piperazinyl substituent by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2004;1051(1-2):283-90.
9. Sand O, Haug E, Sjaastad ØV, Toverud KC. *Menneskets fysiologi*. Oslo: Gyldendal akademisk; 2001.
10. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. *Legemiddelanalyse*. Bergen: Fagbokforl.; 2010.
11. Hansen S, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K. *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis*: Wiley; 2011. Available from: <http://hioa.ebilib.com/patron/FullRecord.aspx?p=822569>.
12. Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2003;785(2):263-75.
13. Zotou A, Miltiadou N. Sensitive LC determination of ciprofloxacin in pharmaceutical preparations and biological fluids with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002;28(3-4):559-68.

14. Muchohi SN, Thuo N, Karisa J, Muturi A, Kokwaro GO, Maitland K. Determination of ciprofloxacin in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection: Application to a population pharmacokinetics study in children with severe malnutrition. *Journal of Chromatography B*. 2011;879(2):146-52.
15. Souverain S, Rudaz S, Veuthey JL. Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by LC–ESI–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004;35(4):913-20.
16. Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography A*. 2004;1023(2):317-20.
17. Al-Hadiya BMH, Khady AA, Mostafa GAE. Validated liquid chromatographic-fluorescence method for the quantitation of gemifloxacin in human plasma. *Talanta*. 2010;83(1):110-6.
18. Clinical:Ciprofloxacin (Ciprofloxacin) (Accessed 10.11.2012) [database on the Internet]. Ben Venue Laboratories, Inc. Bedford Laboratories™. 2007. Available from: [http://wiki.medpedia.com/Clinical:Ciprofloxacin\\_\(Ciprofloxacin\)](http://wiki.medpedia.com/Clinical:Ciprofloxacin_(Ciprofloxacin)).
19. TABLETS NOROXIN® (NORFLOXACIN) (Accessed 10.11.2012)2008. Available from: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2008/019384s052lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/019384s052lbl.pdf).
20. FLOXIN® Tablets (Ofloxacin Tablets) (Accessed 10.11.2012), 2008. Available from: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2008/019735s059lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/019735s059lbl.pdf).
21. Clinical:Maxaquin (lomefloxacin hydrochloride) (Accessed 10.11.2012). Medpedia [Internet]. 2010. Available from: [http://wiki.medpedia.com/Clinical:Maxaquin\\_\(lomefloxacin\\_hydrochloride\)](http://wiki.medpedia.com/Clinical:Maxaquin_(lomefloxacin_hydrochloride)).
22. Skoog DA, Crouch SR, Holler FJ. Principles of instrumental analysis. Belmont, Calif.: Thomson; 2007. XV, 1039 s. p.
23. Suntornsuk L. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Anal Bioanal Chem*. 2010;398(1):29-52.
24. Weinberger R. Practical capillary electrophoresis. 2th ed. San Diego, Calif.: Academic Press; 2000. XVII, 462 s. p.
25. Greibrokk T, Lundanes E, Rasmussen KE, Karlsen J. Kromatografi: separasjon og deteksjon. [Oslo]: Universitetsforlaget; 1994. 300 p.
26. Harris DC. Quantitative chemical analysis. 7th ed. New York: Freeman; 2007. XVII, 663, [136] p.
27. Beckman Instruments I. Introduction to capillary electrophoresis, (Accessed 05.10.2012). Switzerland: Beckman Instruments; 2010.
28. Bartle KD, Myers P. Theory of capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*. 2001;916(1–2):3-23.

29. Kuban P, Pirmohammadi R, Karlberg B. Flow injection analysis–capillary electrophoresis system with hydrodynamic injection. *Analytica Chimica Acta*. 1999;378(1–3):55-62.
30. Baryla NE, Lucy CA. pH-Independent large-volume sample stacking of positive or negative analytes in capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*. 2001;22(1):52-8.
31. Quirino JP, Terabe S. Large volume sample stacking of positively chargeable analytes in capillary zone electrophoresis without polarity switching: Use of low reversed electroosmotic flow induced by a cationic surfactant at acidic pH. *ELECTROPHORESIS*. 2000;21(2):355-9.
32. Zhang H, Zhou L, Chen X. Improving sensitivity by large-volume sample stacking combined with sweeping without polarity switching by capillary electrophoresis coupled to photodiode array ultraviolet detection. *ELECTROPHORESIS*. 2008;29(7):1556-64.
33. Simpson SL, Quirino JP, Terabe S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis Fundamentals and applications. *Journal of Chromatography A*. 2008;1184(1-2):504-41.
34. Quirino JP, Terabe S. Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2000;902(1):119-35.
35. Chen YL, Lu WJ, Chen XG, Teng M. Review of recent developments of on-line sample stacking techniques and their application in capillary electrophoresis. *Central European Journal of Chemistry*. 2012;10(3):611-38.
36. Albert M, Debusschere L, Demesmay C, Rocca JL. Large-volume stacking for quantitative analysis of anions in capillary electrophoresis I. Large-volume stacking with polarity switching. *Journal of Chromatography A*. 1997;757(1–2):281-9.
37. Quirino JP, Kim J-B, Terabe S. Sweeping: concentration mechanism and applications to high-sensitivity analysis in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2002;965(1–2):357-73.
38. Aranas A, Guidote A, Quirino J. Sweeping and new on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis. *Anal Bioanal Chem*. 2009;394(1):175-85.
39. Simpson Jr SL, Quirino JP, Terabe S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis: Fundamentals and applications. *Journal of Chromatography A*. 2008;1184(1–2):504-41.
40. Sun H-w, He P, Lv Y-k, Liang S-x. Effective separation and simultaneous determination of seven fluoroquinolones by capillary electrophoresis with diode-array detector. *Journal of Chromatography B*. 2007;852(1–2):145-51.
41. Fierens C, Hillaert S, Van den Bossche W. The qualitative and quantitative determination of quinolones of first and second generation by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000;22(5):763-72.

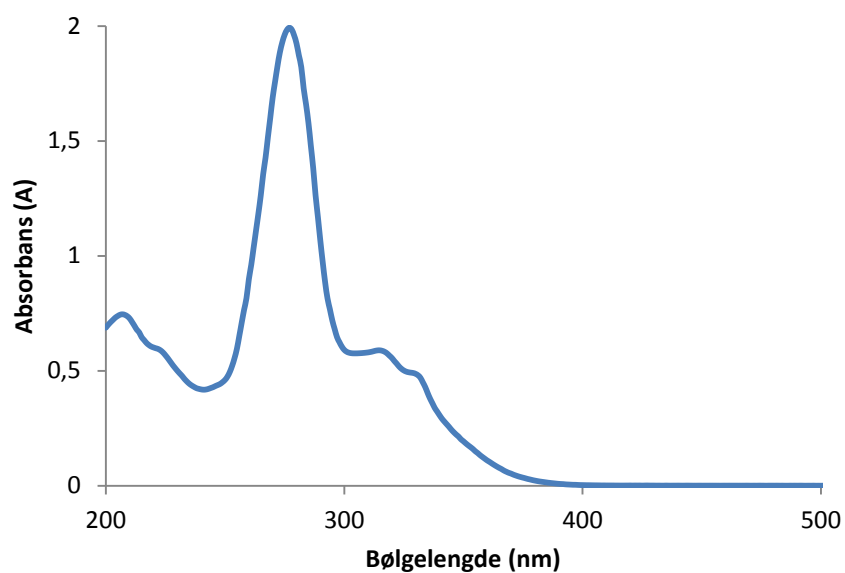
42. Ferdig M, Kaleta A, Thanh Vo TD, Buchberger W. Improved capillary electrophoretic separation of nine (fluoro)quinolones with fluorescence detection for biological and environmental samples. *Journal of Chromatography A*. 2004;1047(2):305-11.
43. Bourne DWA. High Performance (Pressure) Liquid Chromatography (HPLC) (Accessed 11.09.2012). Boomer.org; 2001-3 [updated 26.05.2010]; Available from: <http://www.boomer.org/c/p3/c03/c0305.html>.
44. Harris DC. Quantitative chemical analysis. New York: Freeman; 2010. XVII, 719, [145] p.
45. Advanced Chromatography Technologies Ltd. Applications summary (Accessed 18.07.2012). ACE; 2012; Available from: <http://www.ace-hplc.com/applications.aspx>.
46. Nacalai tesque. Cosmosil 2012-2013 High Performance Liquid Chromatography (Accessed 18.07.2012). Kyoto, 2012; Available from: [https://www.nacalai.co.jp/support/catalog/flash/cosmosil\\_E/book\\_swf.html](https://www.nacalai.co.jp/support/catalog/flash/cosmosil_E/book_swf.html).
47. Seifrtová M, Pena A, Lino CM, Solich P. Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem*. 2008;391(3):799-805.
48. Seifrtová M, Aufartová J, Vytlačilová J, Pena A, Solich P, Nováková L. Determination of fluoroquinolone antibiotics in wastewater using ultra high-performance liquid chromatography with mass spectrometry and fluorescence detection. *Journal of Separation Science*. 2010;33(14):2094-108.
49. Samanidou VF, Christodoulou EA, Papadoyannis IN. Determination of fluoroquinolones in edible animal tissue samples by high performance liquid chromatography after solid phase extraction. *Journal of Separation Science*. 2005;28(6):555-65.
50. Imre S, Dogaru MT, Vari CE, Muntean T, Kelemen L. Validation of an HPLC method for the determination of ciprofloxacin in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003;33(1):125-30.
51. Krol GJ, Beck GW, Benham T. HPLC analysis of ciprofloxacin and ciprofloxacin metabolites in body fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1995;14(1-2):181-90.
52. Kamberi M, Tsutsumi K, Kotegawa T, Nakamura K, Nakano S. Determination of ciprofloxacin in plasma and urine by HPLC with ultraviolet detection. *Clinical Chemistry*. 1998;44(6):1251-5.
53. Ramos M, Aranda A, Garcia E, Reuvers T, Hooghuis H. Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2003;789(2):373-81.
54. Samanidou VF, Demetriou CE, Papadoyannis IN. Direct determination of four fluoroquinolones, enoxacin, norfloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, in pharmaceuticals and blood serum by HPLC. *Anal Bioanal Chem*. 2003;375(5):623-9.

55. Mitani K, Kataoka H. Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2006;562(1):16-22.
56. Husain S, Khalid S, Nagaraju V, Nageswara Rao R. High-performance liquid chromatographic separation and determination of small amounts of process impurities of ciprofloxacin in bulk drugs and formulations. *J Chromatogr A*. 1995;705(2):380-4.
57. Torniainen K, Tammilehto S, Ulvi V. The effect of pH, buffer type and drug concentration on the photodegradation of ciprofloxacin. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996;132(1–2):53-61.
58. Sousa J, Alves G, Fortuna A, Pena A, Lino C, Falcão A. Development and validation of a fast isocratic liquid chromatography method for the simultaneous determination of norfloxacin, lomefloxacin and ciprofloxacin in human plasma. *Biomedical Chromatography*. 2011;25(5):535-41.
59. Chamseddin C, Jira Th. Comparison of the chromatographic behavior of levofloxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin on various HPLC phases. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;66(4):244-8.

## 10. Vedlegg

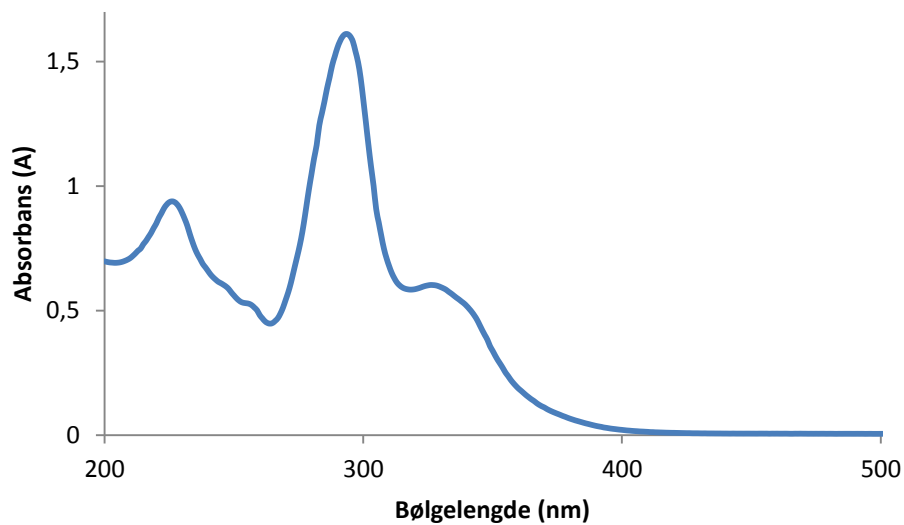
### 10.1 Absorbansspektre fra UV- og fluorescens spektrofotometer

Absorbansspekter av norfloksacin løst i 0,1 % eddiksyreløsning målt på UV-VIS spektrofotometer er vist i figur 4.2.



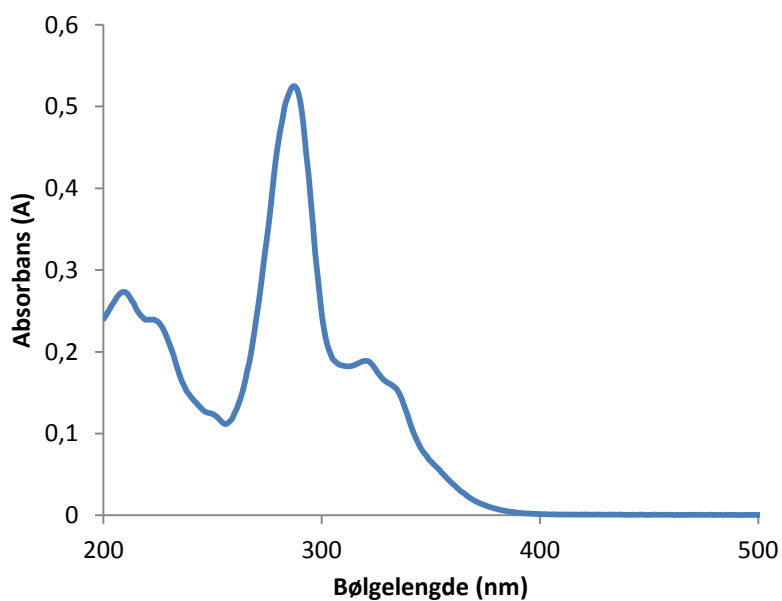
**Figur 4.2.** Absorbansspekter av norfloksacin ( $50 \mu\text{M}$ ), der absorbans (A) er målt som funksjon av bølgelengden (nm). Maksimal absorbans observeres ved 277 nm.

Absorbansspekter av ofloksacin løst i 0,1 % eddiksyreløsning målt på UV-VIS spektrofotometer er vist i figur 4.3



**Figur 4.3.** Absorbansspekter av ofloksacin ( $50 \mu\text{M}$ ), der absorbans (A) er målt som funksjon av bølgelengden (nm). Maksimal absorbans observeres ved 294 nm.

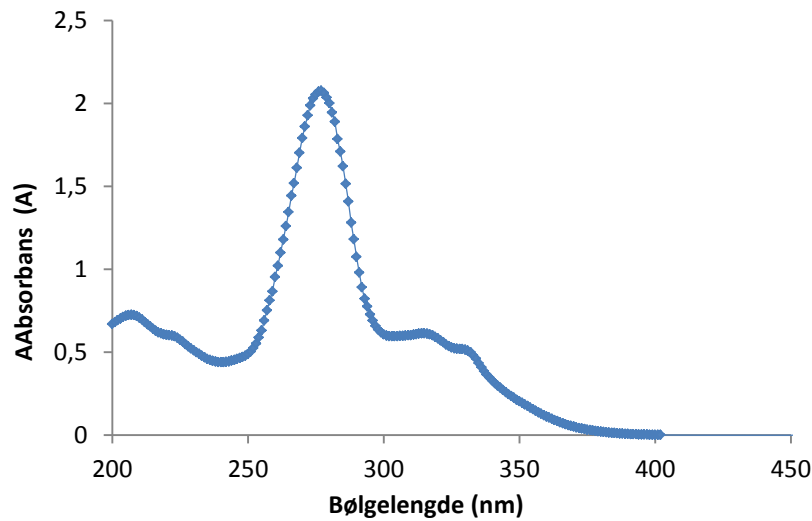
Absorbansspekter av lomefloksacin hydroklorid løst i 0,1 % eddiksyreløsning målt på UV-VIS spektrofotometer er vist i figur 4.4.



**Figur 4.4.** Absorbansspekter av lomefloksacin hydroklorid ( $50 \mu\text{M}$ ), der absorbans (A) er målt som funksjon av bølgelengden (nm). Maksimal absorbans observeres ved 287 nm.

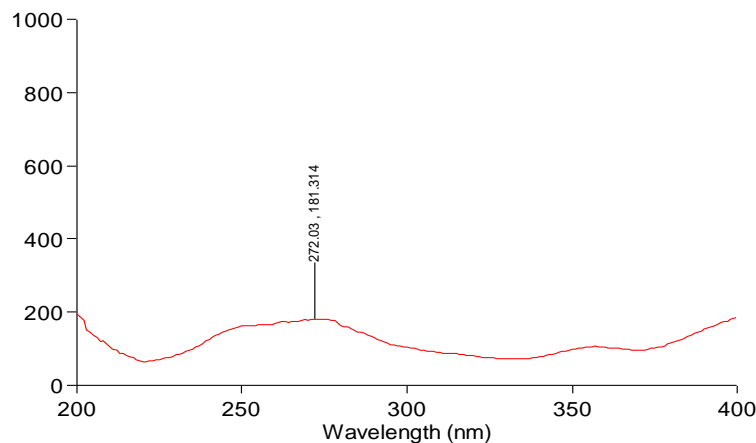


Absorbansspekter av pefloksacin løst i 0,1 % eddiksyreløsning målt på UV-VIS spektrofotometer er vist i figur 4.5.



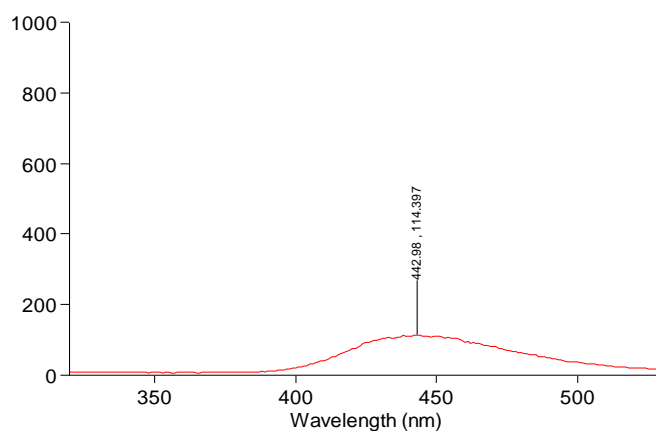
**Figur 4.5.** Absorbansspekter av pefloksacin ( $50 \mu\text{M}$ ), der absorbans (A) er målt som funksjon av bølgelengden (nm). Maksimal absorbans observeres ved 277 nm.

Absorbansspekter for bestemmelse av eksitasjonsbølgelengden for norfloksacin løst i 0,1 % eddiksyreløsning målt på fluorescens spektrofotometer er vist i figur 4.8. Observerte eksitasjonsbølgelengde er i god overensstemmelse med tilsvarende absorbansmåling foretatt på UV-VIS spektrofotometeret.



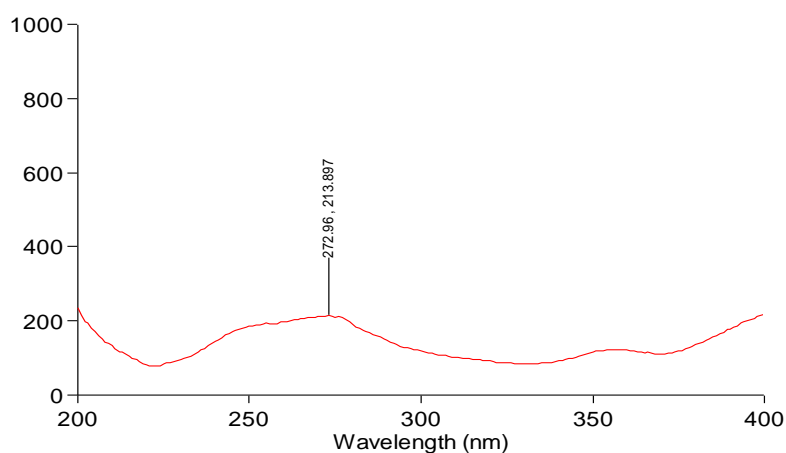
**Figur 4.8.** Absorbansspekter for bestemmelse av optimal eksitasjonsbølgelengde for norfloksacin, der intensiteten (a.u) er en funksjon av bølgelengden (nm).

Emisjonsspekter for bestemmelse av den optimale for emisjonsbølglengden for norfloksacin løst i 0,1 % eddiksyreløsning målt på fluorescens spektrofotometer er vist i figur 4.9.



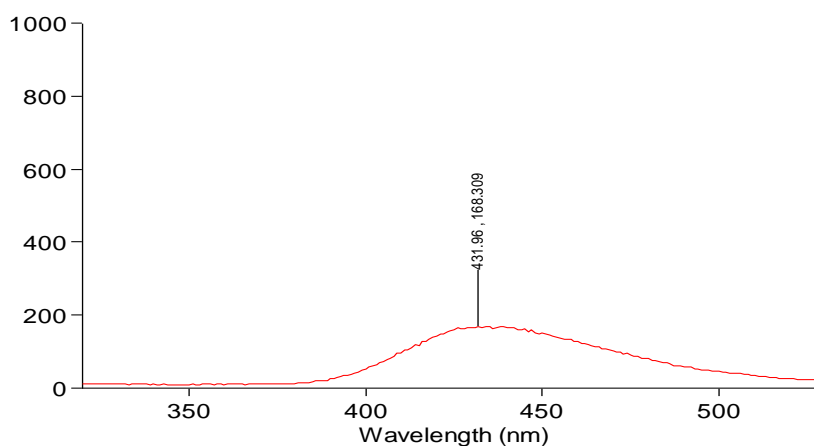
**Figur 4.9.** Emisjonsspekter for bestemmelse av maksimal emisjonsbølglengde for norfloksacin, der intensiteten (a.u) er en funksjon av bølglengden (nm). Maksimal emisjon observeres ved en bølglengde på 443 nm.

Absorbansspekter for bestemmelse av eksitasjonsbølglengden for ofloksacin løst i 0,1 % eddiksyreløsning målt på fluorescens spektrofotometer er vist i figur 4.10. Observerte eksitasjonsbølglengde er i god overensstemmelse med tilsvarende absorbansmåling foretatt på UV-VIS spektrofotometeret.



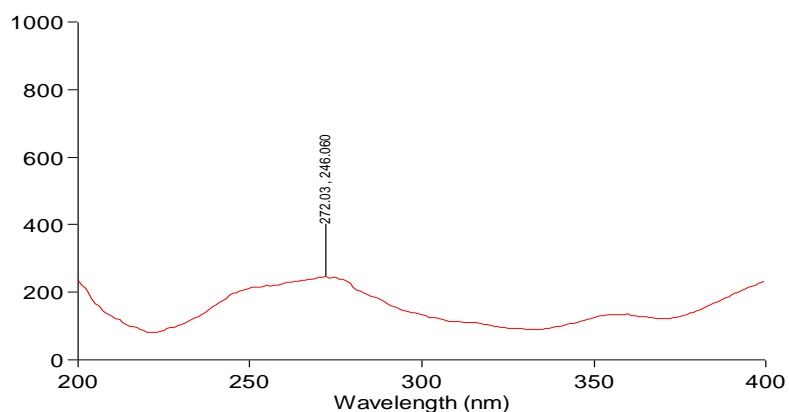
**Figur 4.10.** Absorbansspekter for eksitasjonsbølglengden for ofloksacin, der intensiteten (a.u) er en funksjon av bølglengden (nm).

Emisjonsspekter for bestemmelse av den optimale for emisjonsbølglengden for ofloksacin løst i 0,1 % eddiksyreløsning målt på fluorescens spektrofotometer er vist i figur 4.11.



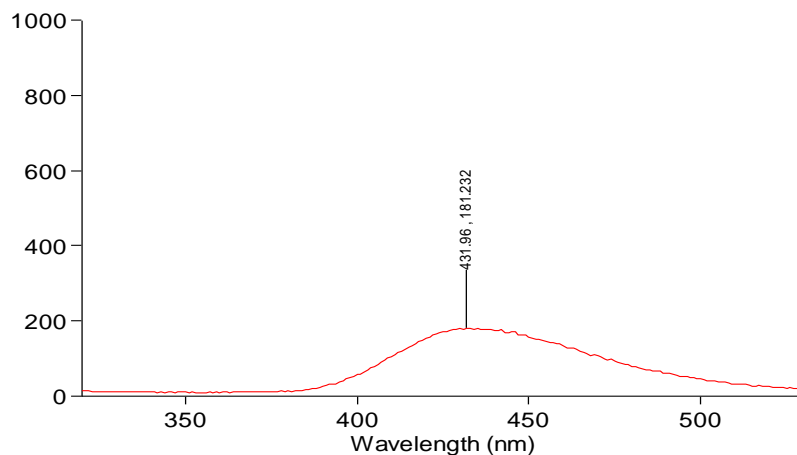
**Figur 4.11.** Emisjonsspekter for bestemmelse av maksimal emisjonsbølglengde for ofloksacin, der intensiteten (a.u) er en funksjon av bølglengden (nm). Maksimal emisjon observeres ved en bølglengde på 432 nm.

Absorbansspekter for bestemmelse av eksitasjonsbølglengden for lomefloksacin hydroklorid løst i 0,1 % eddiksyreløsning målt på fluorescens spektrofotometer er vist i figur 4.12. Observert eksitasjonsbølglengde er i god overensstemmelse med tilsvarende absorbansmåling foretatt på UV-VIS spektrofotometeret.



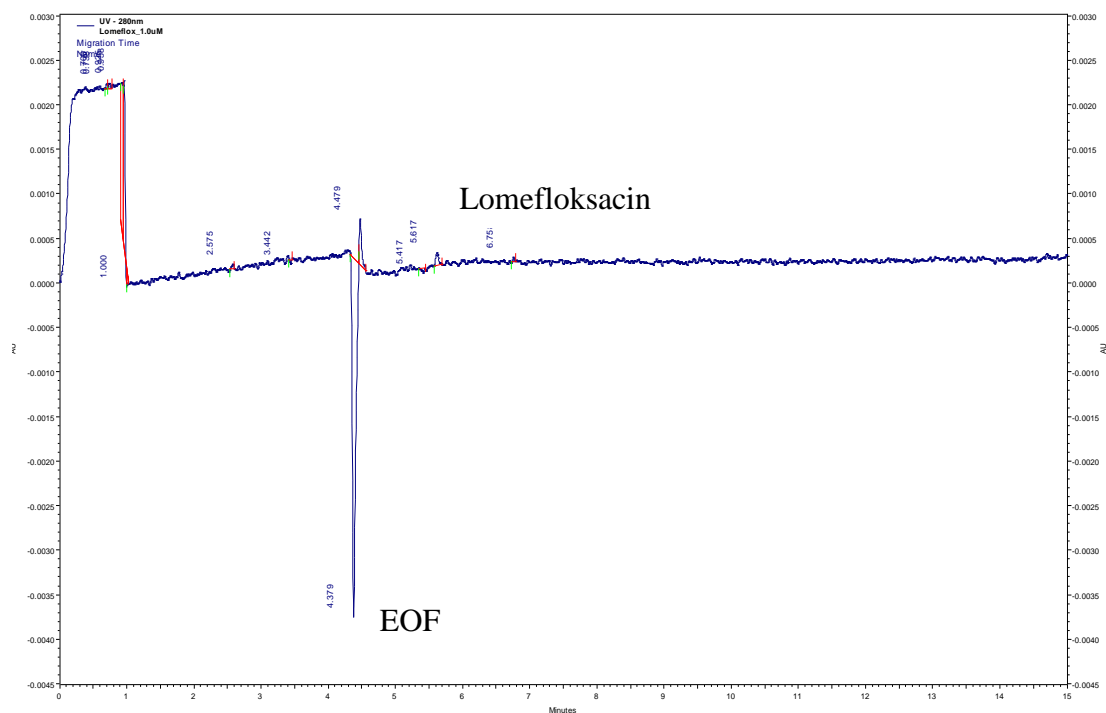
**Figur 4.12.** Absorbansspekter for eksitasjonsbølglengden for lomefloksacin hydroklorid, der intensiteten (a.u) er en funksjon av bølglengden (nm).

Emisjonsspekter for bestemmelse av den optimale emisjonsbølglengden for lomefloksacin hydroklorid løst i 0,1 % eddiksyreløsning målt på fluorescens spektrofotometer er vist i figur 4.13.

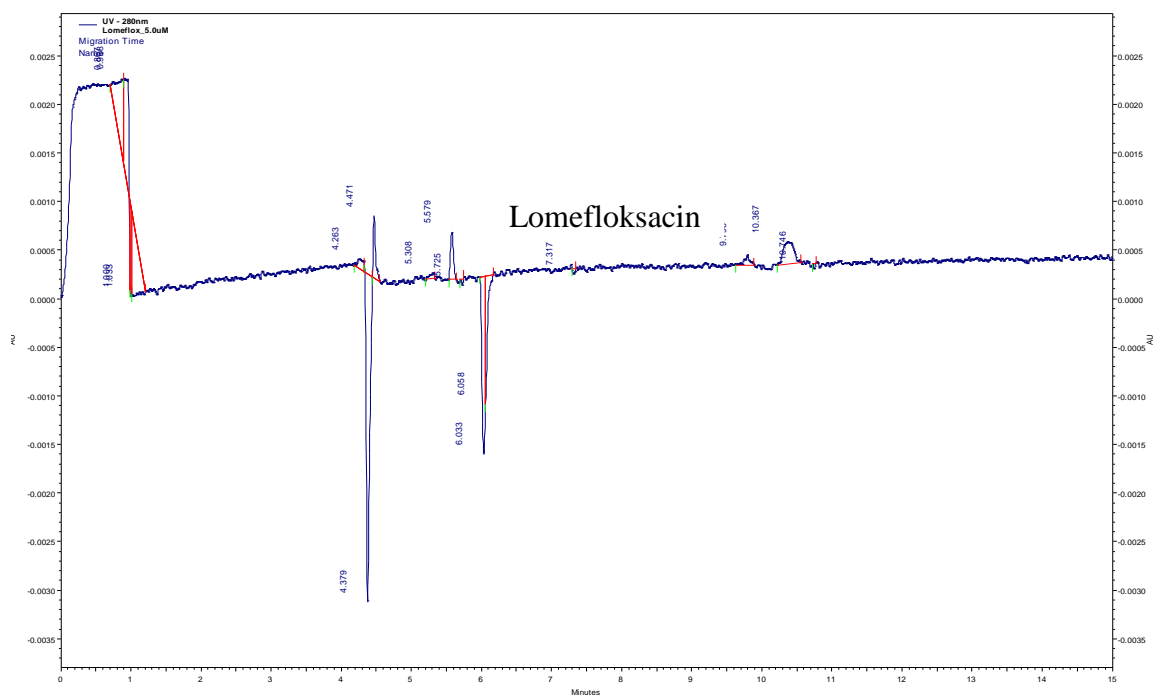


**Figur 4.13.** Emisjonsspekter for bestemmelse av maksimal emisjonsbølglengde for lomefloksacin hydroklorid, der intensiteten (a.u) er en funksjon av bølglengden (nm). Maksimal emisjon observeres ved en bølglengde på 432 nm.

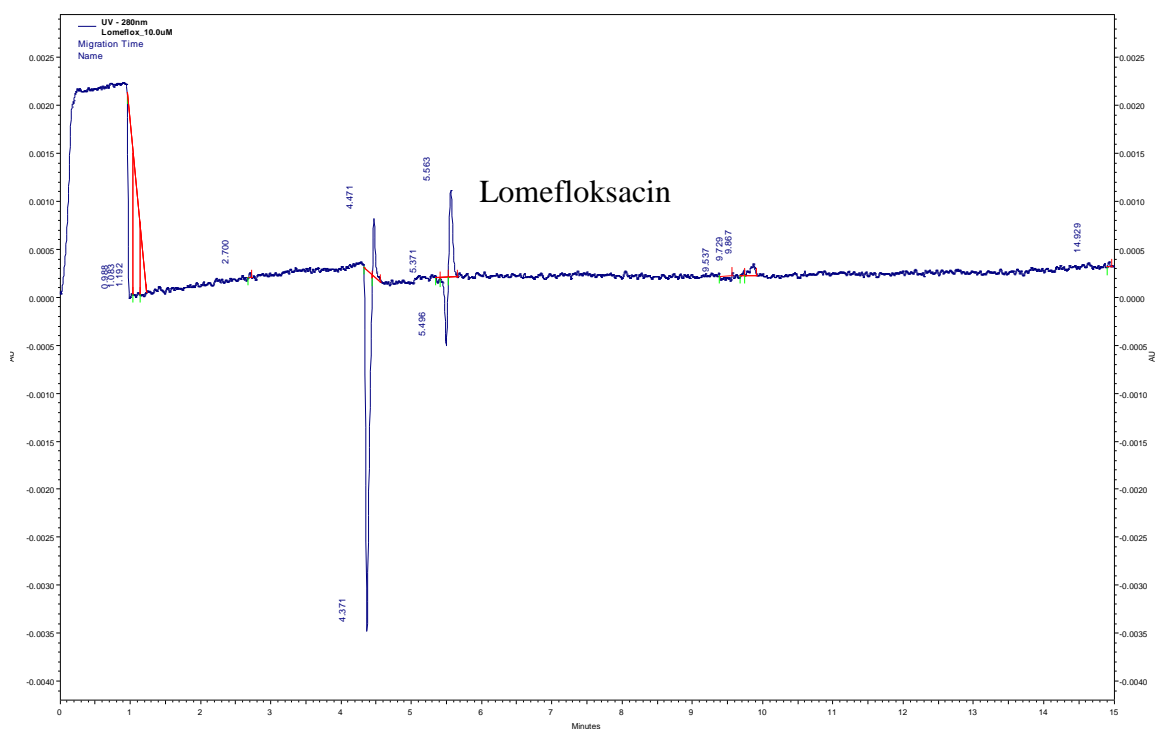
## 10.2 Kapillærelektroforese - elektroferogrammer



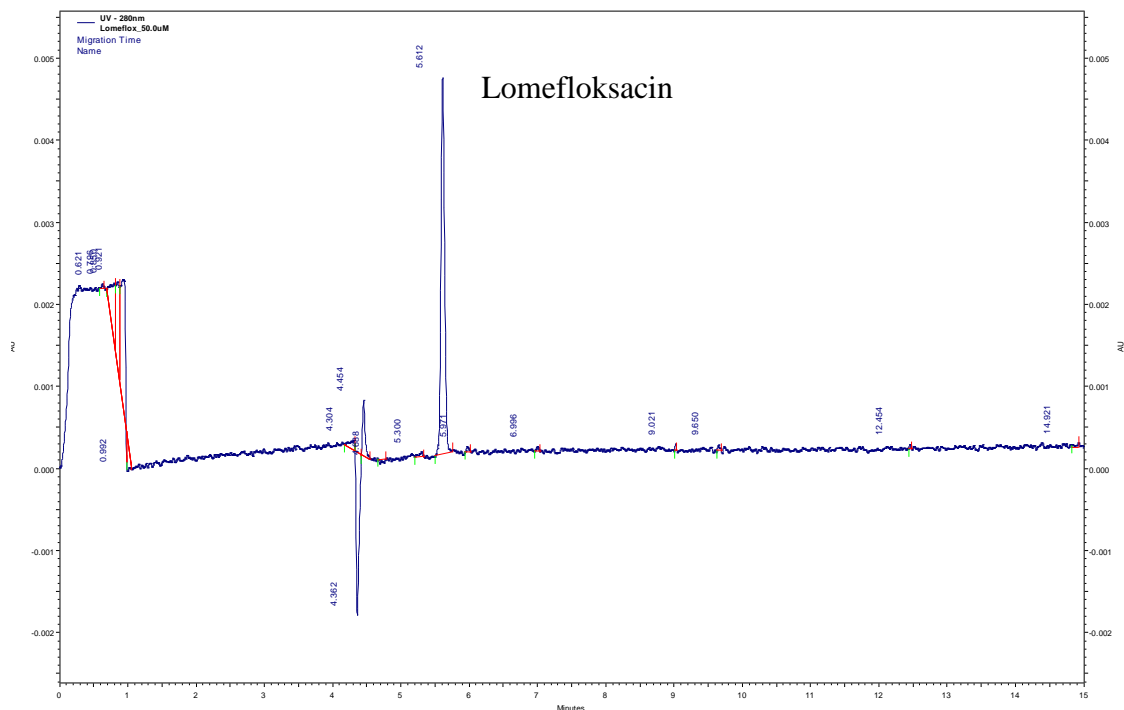
**Figur 5.1.** Analyse av 1,0  $\mu\text{M}$  lomefloksacin med 50 mM tetraboratbuffer, pH 9,23. Migrasjonstiden var 5,617 minutter.



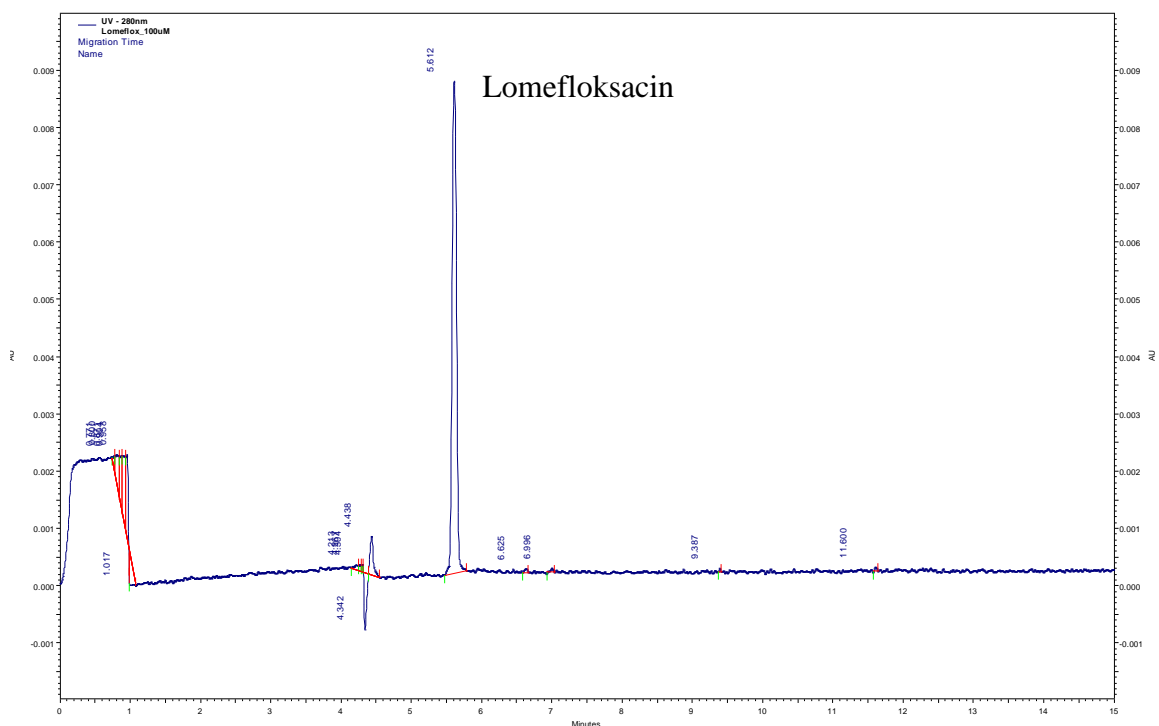
**Figur 5.2.** Analyse av 5,0 µM lomefloxacin med 50 mM tetraboratbuffer pH 9,23. Migrasjonstiden var 5,579 minutter.



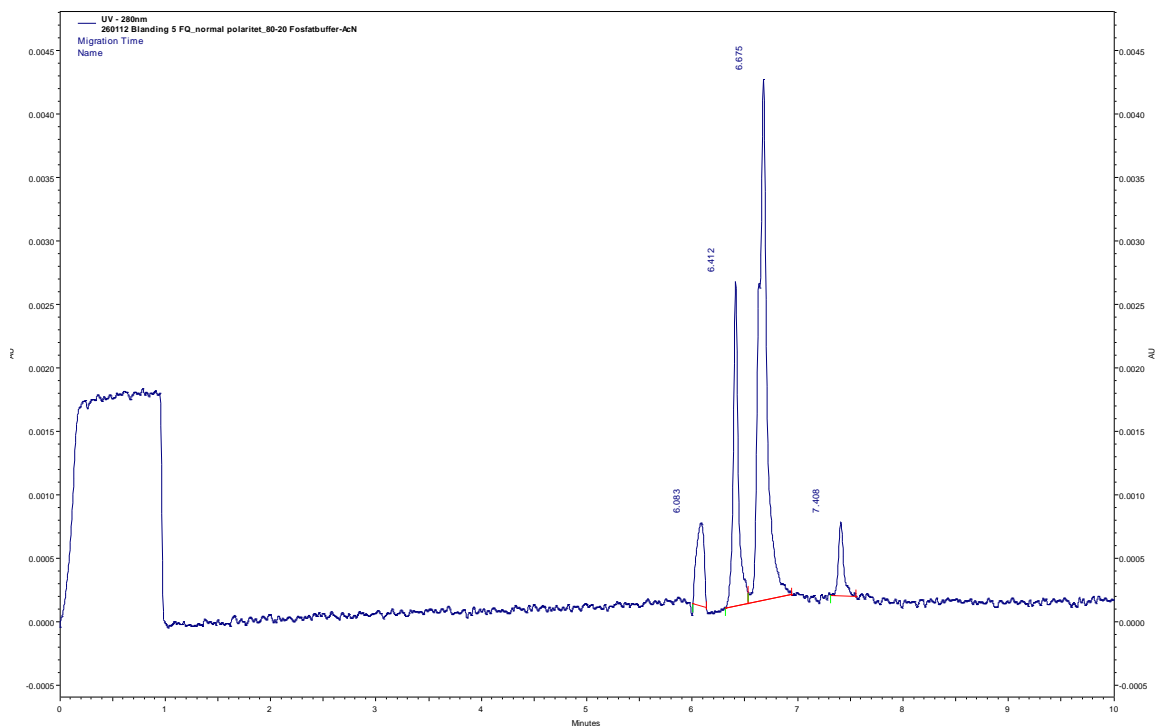
**Figur 5.3.** Analyse av 10,0 µM lomefloxacin med 50 mM tetraboratbuffer, pH 9,23. Migrasjonstiden var 5,563 minutter.



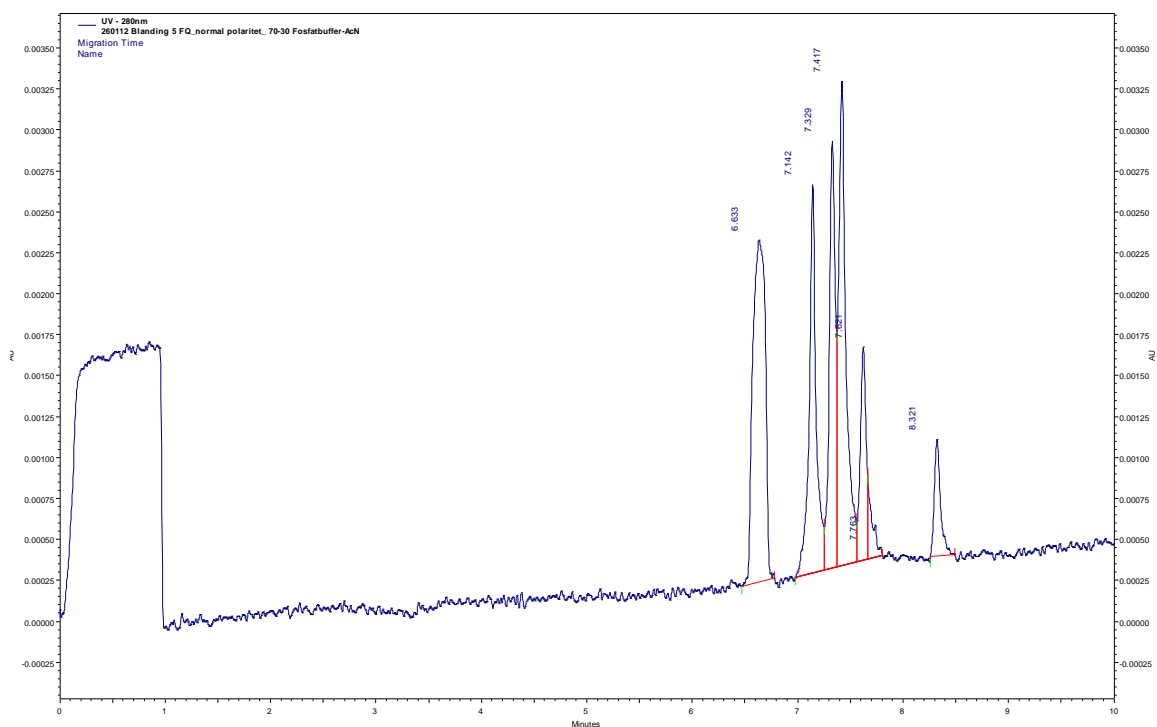
**Figur 5.4.** Analyse av 50,0 µM lomefloxacin med 50 mM tetraboratbuffer, pH 9,23. Migrasjonstiden var 5,612 minutter.



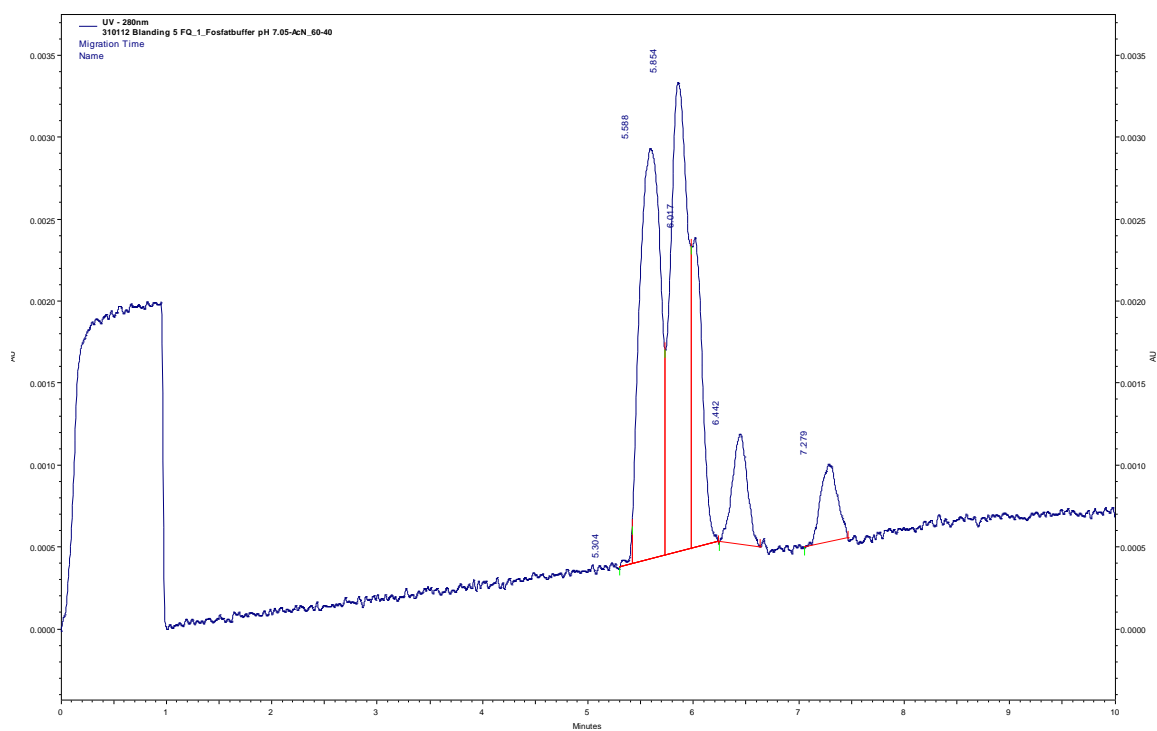
**Figur 5.5.** Analyse av 100,0 µM lomefloxacin med 50 mM tetraboratbuffer, pH 9,23. Migrasjonstiden var 5,612 minutter.



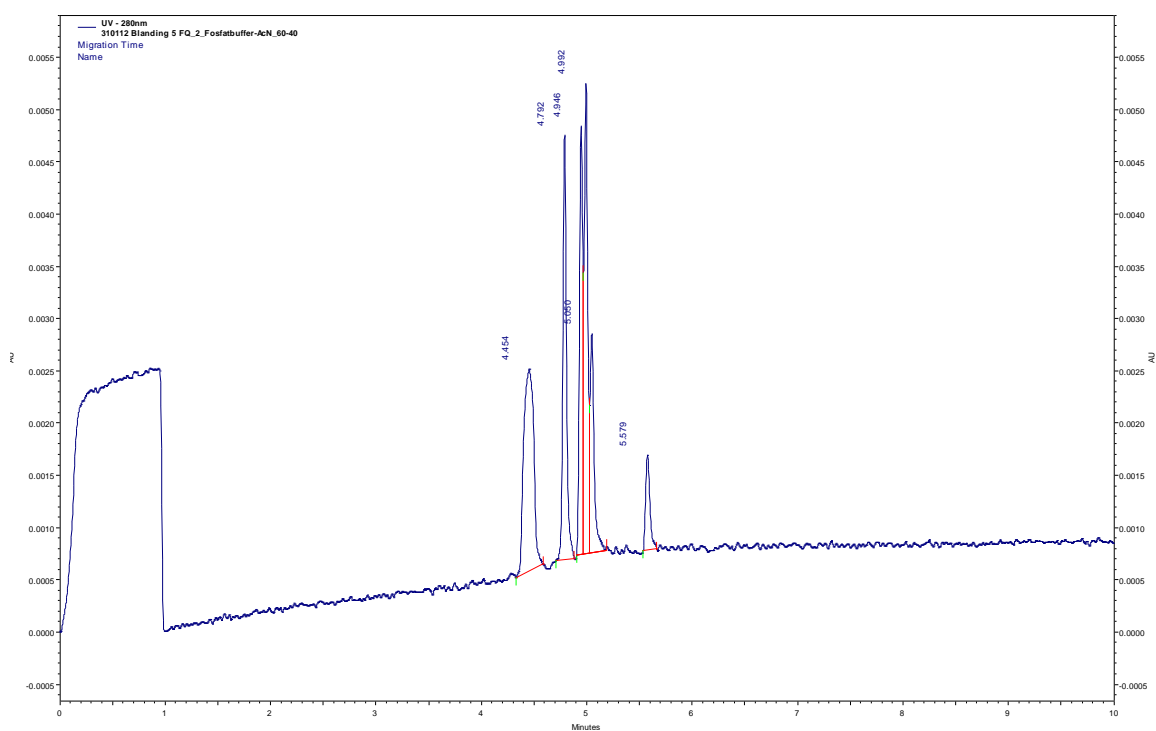
**Figur 5.13.** Analyse av en 20 µM blanding med ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, lomefloxacin og pefloxacin med 50 mM fosfatbuffer/AcN (80:20, v/v), pH 7,34.



**Figur 5.14.** Analyse av en 20 µM blanding med ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, lomefloxacin og pefloxacin med 50 mM fosfatbuffer/AcN (70:30, v/v), pH 7,34.



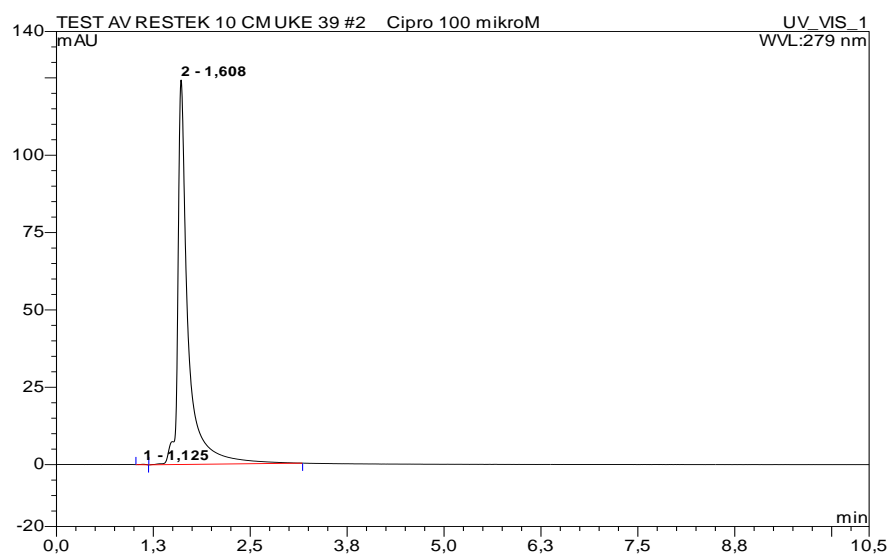
**Figur 5.16.** Analyse av en 20 µM blanding med ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, lomefloxacin og pefloxacin med 50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), (TEA, pH 7,05).



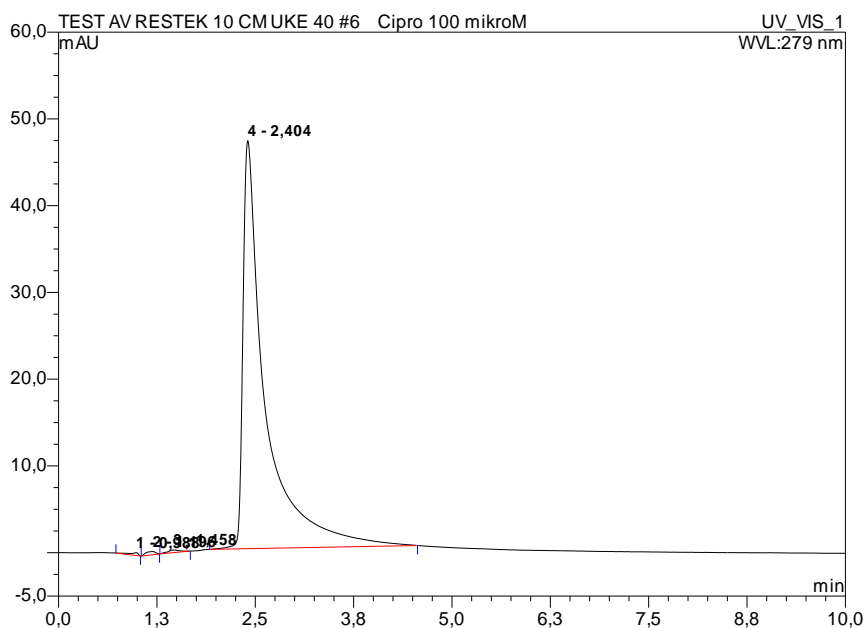
**Figur 5.17.** Analyse av en 20 µM blanding med ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, lomefloxacin og pefloxacin med 50 mM fosfatbuffer/AcN (60:40, v/v), pH 7,34.



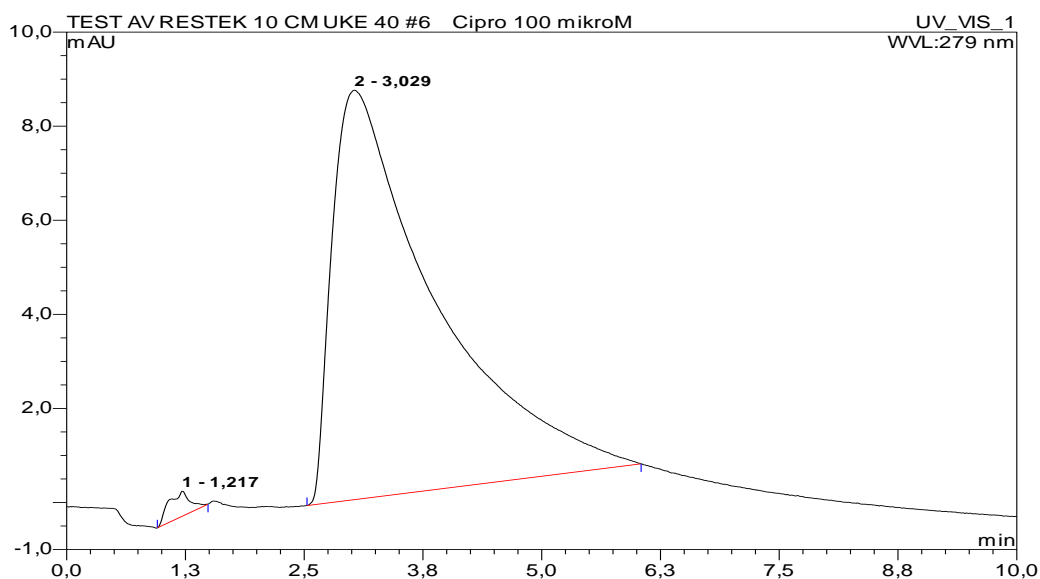
### 10.3 HPLC-kromatogrammer



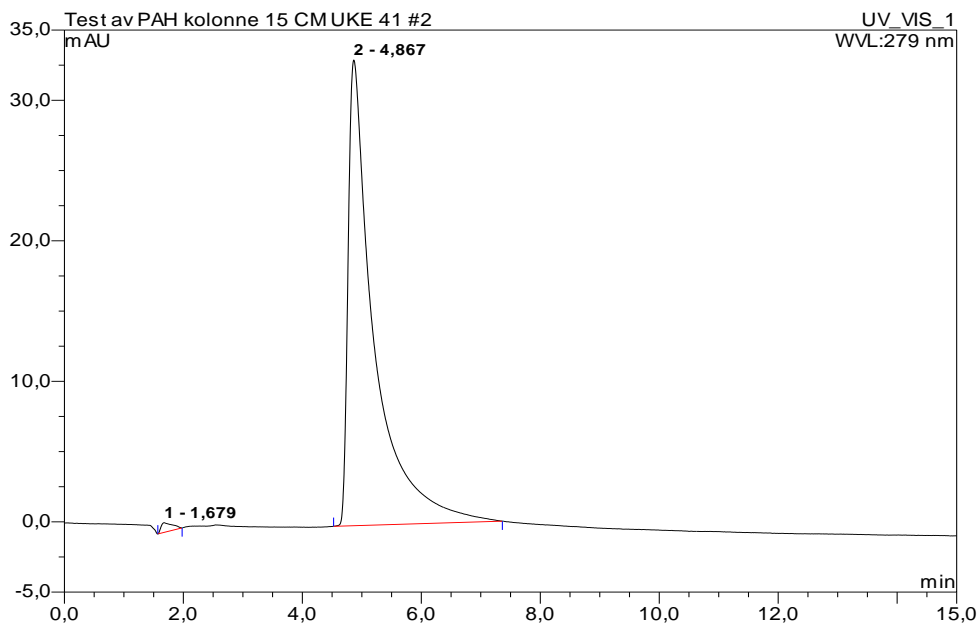
**Figur 6.1.** Kromatogram av 100  $\mu\text{M}$  ciprofloksacin analysert med 0,1% eddiksyreløsning/AcN (60:40, v/v) (TEA, pH 3,46).  
Kolonne: Restek  $\text{C}_{18}$ -kolonne, 100x4,6 mm i.d., partikkelstørrelse: 5,0  $\mu\text{m}$ , 13 % C-innhold.  
Analysene ble utført med pumpehastighet: 1,000 mL/min., injeksjonsvolum: 5,000  $\mu\text{L}$ ,  
temperatur: 30  $^{\circ}\text{C}$ , UV-deteksjonen var ved: 279 nm/254 nm, den totale analysetiden: 10 min.



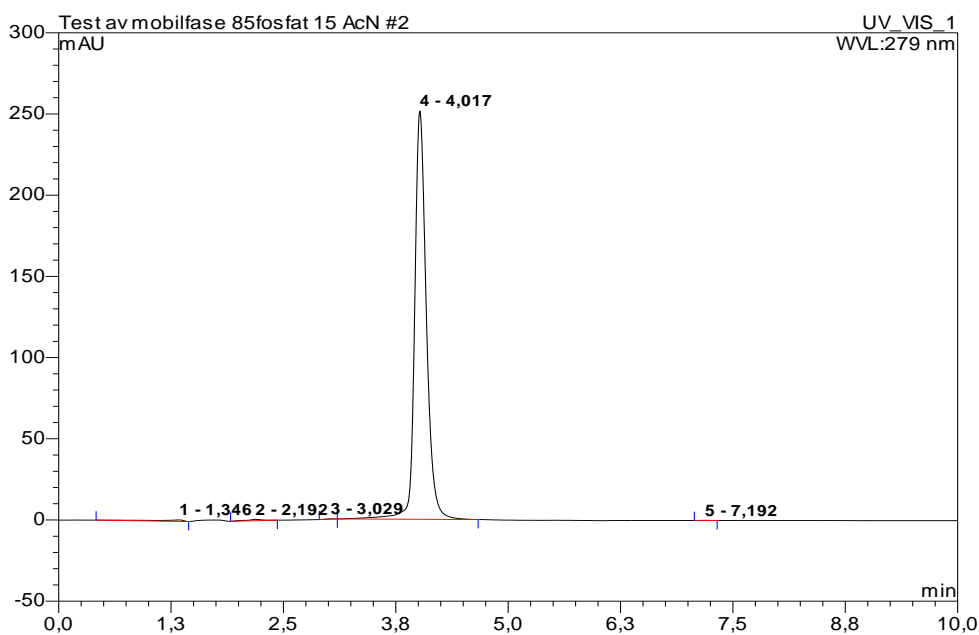
**Figur 6.2.** Kromatogram av 100 µM ciprofloksacin analysert med 25 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v)(TEA, pH 3,05). Kolonne: Restek C<sub>18</sub>-kolonne, 100x4,6 mm i.d., partikkelstørrelse: 5,0 µm, 13 % C-innhold. Analysene ble utført med pumpehastighet: 1,000 mL/min., injeksjonsvolum: 5,000 µL, temperatur: 30 °C, UV-deteksjonen var ved: 279 nm/254 nm, den totale analys tiden: 10 min.



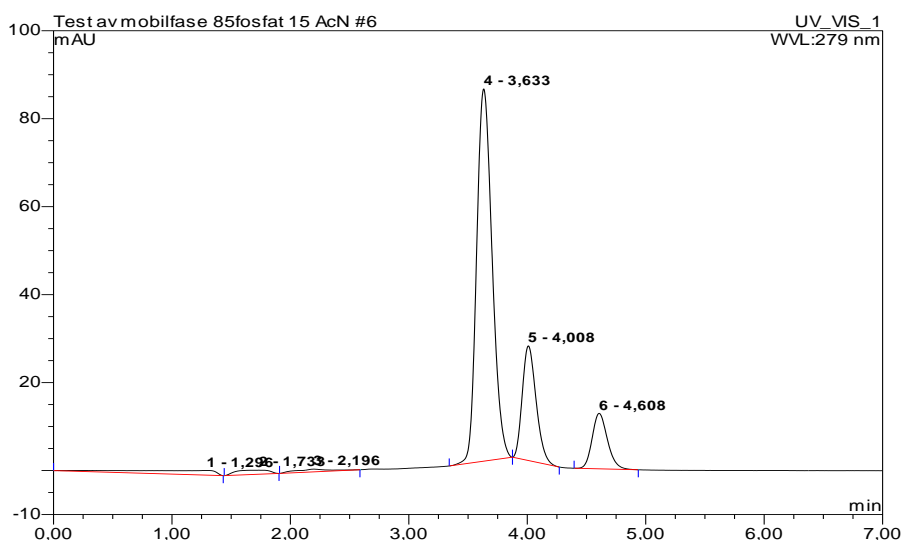
**Figur 6.3.** Kromatogram av 100 µM ciprofloksacin analysert med 25 mM fosfat/AcN (85:15, v/v)(pH 3,10). Kolonne: Restek C<sub>18</sub>-kolonne, 100x4,6 mm i.d., partikkelstørrelse: 5,0 µm, 13 % C-innhold. Analysene ble utført med pumpehastighet: 1,000 mL/min., injeksjonsvolum: 5,000 µL, temperatur: 30 °C, UV-deteksjonen var ved: 279 nm/254 nm, den totale analys tiden: 10 min.



**Figur 6.4.** Kromatogram av 100  $\mu$ M ciprofloksacin analysert med 25 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (TEA, pH 3,05). Kolonne: C18, PAH-kolonne 150x4,6 mm i.d, partikkelstørrelse: 5  $\mu$ m, 13 % C-innhold. Analysene ble utført med pumpehastighet: 1,000 ml/min, injeksjonsvolum: 5,000  $\mu$ L, temperatur: 30 °C, UV-deteksjonen var ved: 279 nm/254 nm, den totale analys tiden: 15 min.



**Figur 6.5.** Kromatogram av 100  $\mu$ M ciprofloksacin analysert med 25 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (TEA, pH 3,03). Kolonne: ACE 3, C18-HL, partikkelstørrelse: 3  $\mu$ m, 20 % C-innhold. Analysene ble utført med pumpehastighet: 0,500 ml/min, injeksjonsvolum: 5,000  $\mu$ L, temperatur: 30 °C, UV-deteksjonen var ved: 279 nm/254 nm, den totale analys tiden: 15 min.



**Figur 6.6.** Kromatogram av 25  $\mu\text{M}$  testløsning bestående av ciprofloksacin, norfloksacin, ofloksacin og lomefloksacin hydroklorid analysert med 25 mM fosfatbuffer/AcN (85:15, v/v) (TEA, pH 3,03). Kolonne: ACE 3,C18-HL, partikkelstørrelse:3  $\mu\text{m}$ , 20 % C-innhold. Analysene ble utført med pumpehastighet:0,500 ml/min, injeksjonsvolum:5,000  $\mu\text{L}$ , temperatur: 30  $^{\circ}\text{C}$ , UV-deteksjonen var ved: 279 nm/254 nm, den totale analysetiden:7 min.

#### 10.4 Statistiske resultater fra det kvantitative serumforsøket

Det ble utført en toveis variansanalyse (ANOVA test) på de respektive kalibreringskurvene. Regresjonsdataene for ofloksacin, norfloksacin og ciprofloksacin der ultrafiltrering ble brukt som proteinfjerning og hvor AcN ble benyttet som proteinfelling er gjengitt i tabellene 7.13 - 7.18.

**Tabell 7.13.** Regresjonsdata for ofloksacin der ultrafiltrering ble brukt som proteinfjerning.

Variabel	Verdi	St.avvik	Konf.intervall, nedre	Konf.intervall, øvre
Stigningstall (a)	0,312	0,006	0,296	0,328
Skjæringspunkt (b)	- 0,0254	0,012	-0,056	0,005
Kvadrert korrelasjon ( $R^2$ )	0,9981			
Standardavvik i $S_{y/x}$	0,0203			

**Tabell 7.14.** Regresjonsdata for norfloksacin der ultrafiltrering ble brukt som proteinfjerning.

Variabel	Verdi	St.avvik	Konf.intervall, nedre	Konf.intervall, øvre
Stigningstall (a)	2,0065	0,0263	1,939	2,074
Skjæringspunkt (b)	-0,0466	0,0290	-0,121	0,028
Kvadrert korrealsjon ( $R^2$ )	0,9991			
Standardavvik i $S_{y/x}$	0,0491			

**Tabell 7.15.** Regresjonsdata for ciprofloksacin der ultrafiltrering ble brukt som proteinfjerning.

Variabel	Verdi	St.avvik	Konf.intervall, nedre	Konf.intervall, øvre
Stigningstall (a)	0,3242	0,019	0,296	0,328
Skjæringspunkt (b)	-0,0342	0,021	-0,056	0,005
Kvadrert korrealsjon ( $R^2$ )	0,9958			
Standardavvik i $S_{y/x}$	0,0348			

**Tabell 7.16.** Regresjonsdata for ofloksacin der AcN ble benyttet som proteinfelling.

Variabel	Verdi	St.avvik	Konf.intervall, nedre	Konf.intervall, øvre
Stigningstall (a)	0,3468	0,0110	0,3186	0,3750
Skjæringspunkt (b)	-0,0415	0,0216	-0,0970	0,0140
Kvadrert korrealsjon ( $R^2$ )	0,9950			
Standardavvik i $S_{y/x}$	0,0366			

**Tabell 7.17.** Regresjonsdata for norfloksacin der AcN ble benyttet som proteinfelling.

Variabel	Verdi	St.avvik	Konf.intervall, nedre	Konf.intervall, øvre
Stigningstall (a)	2,151	0,036	2,058	2,245
Skjæringspunkt (b)	-0,031	0,040	-0,134	0,072
Kvadrert korrealsjon ( $R^2$ )	0,9986			
Standardavvik i $S_{y/x}$	0,068			

**Tabell 7.18.** Regresjonsdata for ciprofloksacin der AcN ble benyttet som proteinfelling.

Variabel	Verdi	St.avvik	Konf.intervall, nedre	Konf.intervall, øvre
Stigningstall (a)	1,839	0,041	1,734	1,945
Skjæringspunkt (b)	-0,025	0,044	-0,137	0,088
Kvadrert korrealsjon ( $R^2$ )	0,9975			
Standardavvik i $S_{y/x}$	0,075			





**Tabell 7.19.** Oversikt over gjenfinningsdata for ofloksacin, norfloksacin og ciprofloksacin på ulike analytiske nivåer med ultrafiltrering (UF) som proteinfjerning og acetonitril (AcN) som proteinfelling .

QC-prøver	Ofloksacin		Norfloksacin		Ciprofloksacin	
	UF Gjenfinnings- grad pr.prøve (%)	AcN Gjenfinnings- grad pr.prøve (%)	UF Gjenfinnings- grad pr.prøve (%)	AcN Gjenfinnings- grad pr.prøve (%)	UF Gjenfinnings- grad pr.prøve (%)	AcN Gjenfinning- grad pr.prøve (%)
QC-1_1 (Spike 1)	100,30	103,60	100,15	89,90	87,23	87,84
QC-1_2 (Spike 1)	104,53	106,50	97,18	92,64	91,27	90,27
QC-1_3 (Spike 1)	104,83	104,37	96,27	90,58	93,96	88,42
QC -2_1 (Spike 3)	89,59	89,45	90,78	92,33	85,26	82,63
QC -2_2 (Spike 3)	89,48	89,34	90,30	90,89	84,38	85,18
QC -2_3 (Spike 3)	91,10	90,21	91,27	90,12	85,55	84,72
QC-3_1 (Spike 5)	92,31	95,10	92,68	89,81	85,02	83,57
QC-3_2 (Spike 5)	97,28	95,56	94,86	91,02	89,30	84,82
QC-3_3 (Spike 5)	95,45	97,11	92,68	90,42	87,35	84,34

**Tabell 7.20.** Eksempel på en toveis variansanalyse (ANOVA test) med interaksjon for ciprofloksacin.

Anova: Two-Factor With Replication						
SUMMARY	Gjenfinningsgrad pr.prøve (%)		Total			
<i>QC-1_1 (Spike 1)</i>						
Count	3	3	6			
Sum	272,4589377	266,5292689	538,9882066			
Average	90,81964591	88,84308963	89,83136777			
Variance	11,48224905	1,609664618	6,408797893			
<i>QC-2_1 (Spike 3)</i>						
Count	3	3	6			
Sum	255,1944177	252,5256775	507,7200951			
Average	85,06480589	84,17522582	84,62001586			
Variance	0,371102799	1,852641831	1,126903658			
<i>QC-3_1 (Spike 5)</i>						
Count	3	3	6			
Sum	261,6669446	252,7284925	514,3954371			
Average	87,22231485	84,24283085	85,73257285			
Variance	4,571792606	0,399018347	4,651521862			
<i>Total</i>						
Count	9	9				
Sum	789,3203	771,7834389				
Average	87,70225555	85,75371543				
Variance	10,44551355	6,334819171				
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Sample	90,39218334	2	45,19609167	13,36736	0,000884	3,885294
Columns	17,08563866	1	17,08563866	5,053311	0,044159	4,747225
Interaction	3,27753991	2	1,638769955	0,484689	0,627441	3,885294
Within	40,5729385	12	3,381078208			
Total	151,3283004	17				