

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN MASTER I FARMASI

# Elektromembranekstraksjon av peptider fra vandige prøver

Marit Hovde



Faggruppen for legemiddelanalyse

Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Mai 2012



# Forord

Først og fremst vil jeg takke mine veiledere professor Stig Pedersen-Bjergaard, postdoktor Astrid Gjelstad og stipendiat Knut Fredrik Seip for utmerket veiledning, konstruktive tilbakemeldinger og en hyggelig og imøtekommende innstilling fra første stund. Dere har gitt meg et godt innblikk i hva forskningsarbeid innebærer og jeg er veldig glad for at jeg har fått utført min masteroppgave hos dere.

Jeg vil også takke alle andre ved avdelingen for at dere har bidratt til et godt læringsmiljø og ikke minst et godt sosialt miljø. Spesielt takk til stipendiat Lars Erik Eng Eibak for god hjelp med mer eller mindre store laboratorieproblemer.

Til de andre masterstudentene ved avdelingen: Ann Helene, Christine, Kari Christiane, Sandra og Sara – dere er supre kontorkamerater og gode venninner! Takk for all saklig og usaklig skravling på lab og kontoret i løpet av mastertiden.

En stor takk går også til min flotte familie og mine gode venner for all støtte og hjelp. Dere er alltid der når jeg trenger dere. Dere er de beste!

Til slutt, til min kommende ektemann i august, Henrik Sønsteby: Tusen takk for uendelig tålmodighet, oppmuntring, gode råd og støtte som du alltid gir meg.

Oslo, mai 2012

---

Marit Hovde

# Innholdsfortegnelse

1. Sammendrag	1
2. Forkortelser	2
3. Innledning	4
4. Teori	7
4.1. Elektromembranekstraksjon	7
4.2. Organisk fase i elektromembranekstraksjon av peptider	8
4.3. Modellpeptidene	9
4.4. Massetransport	11
4.5. High-performance liquid chromatography (HPLC)	13
4.5.1. Omvendt-fase-kromatografi	13
4.5.2. Ionparkromatografi	14
5. Eksperimentelt	15
5.1. Modellpeptider	15
5.2. Utstyr og fremgangsmåte for EME	15
5.3. Betingelser for HPLC	16
5.4. Kjemikalier	17
5.5. Løsninger	19
5.5.1. Stamlløsninger	19
5.5.2. Standardløsninger	19
5.5.3. Donorfaser	19
5.5.4. Akseptorfase	20
5.5.5. Organiske faser	20
5.5.6. Mobilfaser til HPLC	22
5.6. Beregning av utbytte	22
5.7. T-test	23
6. Resultater og diskusjon	24
6.1. Innledende forsøk	24
6.2. Tids- og spenningsforsøk	26

6.3. Konkurrerende kationer i donorfasen	27
6.4. Bytte av akseptorfase i løpet av ekstraksjonen	29
6.5. Forsøk med lave spenninger	30
6.6. Forsøk med ulik akseptorfase	32
6.7. Ekstraksjoner med ulik pH i donorfasen	33
6.8. Forsøk med fysiologisk pH i donorfasen	37
7. Konklusjon	38
8. Referanseliste	39

# 1. Sammendrag

I denne oppgaven har det blitt arbeidet med videreutvikling av elektromembranekstraksjon (EME) som prøveopparbeidelsesmetode av peptider fra vandige prøver. Sju modellpeptider ble ekstrahert fra 1000  $\mu\text{L}$  vandig, sur prøve (donorfase) som oftest bestående av 1 mM HCl, gjennom en kunstig væskemembran og over til 25  $\mu\text{L}$  vandig, sur løsning (akseptorfase) som oftest bestående av 50 mM HCl. Negativ elektrode (katode) og positiv elektrode (anode) ble plassert i henholdsvis akseptor- og donorfase, og den pålagte spenningen over væskemembranen var hoveddrivkraften for ekstraksjonen av peptidene. Det ble hovedsakelig påsatt spenning på 10 V, ekstraksjonstid var normalt 5 minutter og systemet ble satt til risting ved 900 rpm. Etter endt ekstraksjon ble akseptorfase fortynnet i 1:1-forhold og satt til analyse på et *high performance liquid chromatography* (HPLC)-instrument.

Hovedfokuset i dette arbeidet har vært å utvide forståelsen for hva som skjer under EME av peptider, å forsøke å finne måter å øke ekstraksjonsutbyttene på, samt å undersøke mulig selektivitet i systemet. Forsøk som er utført, omfatter ekstraksjoner med ulike sammensetninger av organiske faser i væskemembranen, forsøk med ulik ekstraksjonstid på opp til 45 og 75 minutter, tilsetning av konkurrerende kationer i donorfase, endring av akseptorfase underveis i ekstraksjonen, forsøk med ulik påsatt spenning, forsøk med ulik akseptorfase og forsøk med ulike pH-verdier i donorfase.

Selv om alle nevnte fremgangsmåter ut ifra teorien var antatt å påvirke ekstraksjonskinetikken i positiv retning, har ingen vist stor forbedring av ekstraksjonsutbytte, med unntak av økt ekstraksjonstid, der resultatet var at mange av peptidene når *steady-state* etter omtrent 20 minutters ekstraksjon. Det har heller ikke blitt rapportert klare selektivitetstrender i systemet.

Dette arbeidet har økt forståelsen av ekstraksjonskinetikken i EME av peptider og vil være med å danne det videre forståelsesgrunnlaget for fremtidig arbeid.

## 2. Forkortelser

ACN	Acetonitril
AT-I	Angiotensin I
AT-II	Angiotensin II
AT-II-AP	Angiotensin II antipeptid
AT-III	Angiotensin III
DBP	Dibutylfosfat
DEHP	Di(2-etylheksyl)fosfat
EME	Electromembrane extraction (elektromembranekstraksjon)
Endo	Endomorfin
Enke	Enkefalin
HCl	Saltsyre
HPLC	High-performance liquid chromatography (væskekromatografi)
i.d.	Indre diameter
LLE	Liquid-liquid extraction (væske-væskeekstraksjon)
LPME	Liquid-phase microextraction (væske-fasemikroekstraksjon)
MAH	Metylaminhydroklorid
rpm	Revolutions per minute (omdreininger per minutt)
SD-LPME	Single-drop liquid-phase microextraction
SLM	Supported liquid membrane
SPE	Solid phase extraction (fast-faseekstraksjon)
SPME	Solid phase microextraction (væske-fasemikroekstraksjon)

TDP	Tridecylfosfat
TEAB	Tetraetylammoniumbromid
TEHP	Tris(2-etylheksyl)fosfat
TMA	Tetrametylammoniumklorid
UV	Ultrafiolett
VP	Vasopressin
w/w	Vektprosent



### 3. Innledning

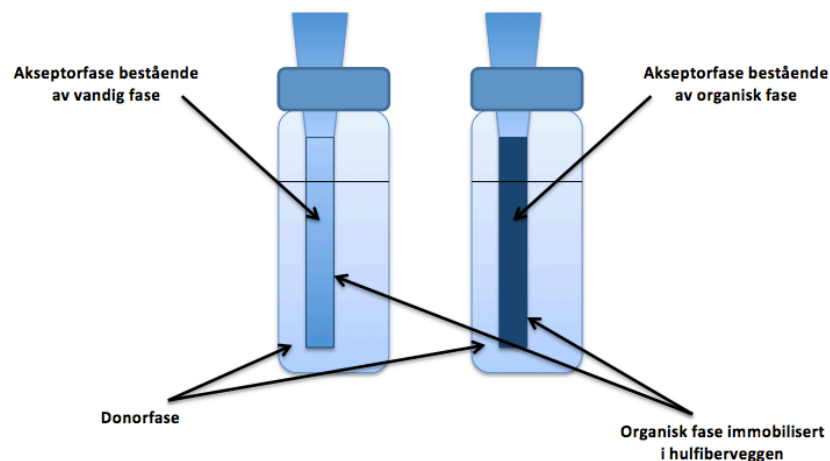
Prøveopparbeidelse er viktig innen bioanalyse da prøvematrikser som urin, plasma og serum ofte har lave analyttkonsentrasjoner i tillegg til forurensende stoffer som kan ødelegge analyseinstrumenter ved direkte injeksjon. Det er derfor ønskelig med prøveopparbeidelsesmetoder som fjerner stoffer som potensielt kan være ødeleggende og i tillegg gir oppkonsentrering av analytt.

Tradisjonelt sett har fast-faseekstraksjon (SPE) og væske-væskeekstraksjon (LLE) vært mye brukt. Disse metodene baseres på fordelingen av stoffer mellom henholdsvis én fast- og én væskefase og to ikke-blandbare væsker. Ulempene med disse prøveopparbeidelsesmetodene er høyt løsemiddelforbruk og tidkrevende prosesser. Det har derfor i årene etter 1990 blitt mer og mer populært med miniatyrisering av metodene, der løsemiddelforbruket reduseres. Dette er en gunstig utvikling både med tanke på å unngå miljøskade og å redusere eksponering av organiske løsemidler for operatøren.

I 1990 ble fast-fasemikroekstraksjon (SPME) introdusert som en videreutvikling av og en miniatyrisert utgave av SPE [1]. I dette systemet er løsemiddelforbruket betydelig redusert og analyttene blir adsorbent på et fast materiale basert på en likevektsfordeling mellom væskefasen og den faste fasen. Den faste fasen er silikafiber som er belagt med en polymerisk organisk fase, og likner på en sprøytekanyle [2]. Denne fiberen holdes enten over eller dyppes i prøveløsningen. Etter endt ekstraksjon blir analyttene desorbent eller dampet av og satt til analyse, som regel på en gasskromatograf (GC).

Væske-fasemikroekstraksjon (LPME) er en prøveopparbeidelsesmetode som ble utviklet på 1990-tallet. Det startet med prinsippet for *single-drop* LPME (SD-LPME) [3], der kun én dråpe løsemiddel på tuppen av en kanyle utgjør den organiske fasen. Denne dråpen plasseres i prøveløsningen og analytter blir ekstrahert fra prøven til den organiske fasen på bakgrunn av likevektsfordelingen. Den organiske fasen injiseres videre i et analyseinstrument. Med SD-LPME oppnås høy oppkonsentrering og et lavt løsemiddelforbruk, men ved forsøk på å sette systemet på risting for å få ekstraksjonen til å gå raskere, oppstår problemer med at dråpen med organisk fase faller av kanylespissen [3].

En ny LPME-teknikk ble utviklet i 1999, og i denne teknikken er det en porøs hulfibermembran impregnert med løsemiddel som fungerer som organisk fase (*supported liquid membrane* (SLM)) [4]. Analytter ekstraheres fra en prøve (donorfase) via en membran og videre inn i hulrommet i fiberen der en akseptorfase er tilført. Ved å bruke organisk løsemiddel som akseptorfase skapes et tofasesystem, mens man ved å bruke vandig fase som akseptorfase får et trefasesystem (figur 1). Prinsippet baserer seg på passiv diffusjon mellom den vandige donorfasen via membranen og inn i den vandige akseptorfase inni hulfiberen, styrt av pH-forskjeller i donor- og akseptorfase. Den største ulempen med dette systemet er at det er en tidkrevende prosess med typiske ekstraksjonstider på 20-60 minutter.



Figur 1. LPME med trefasesystem (venstre) og tofasesystem (høyre).

I 2006 ble elektromembranekstraksjon (EME) utviklet som en ny teknikk der man hadde videreutviklet LPME-prinsippet og redusert ekstraksjonstiden [5]. Ekstraksjonsoppsettet er likt som i LPME med trefasesystem, med unntak av at man setter på spenning over hulfiberveggen ved hjelp av elektroder i donor- og akseptorfase. pH i donorfasen reguleres slik at det er ladde analytter som blir ekstrahert ved hjelp av elektrokinetisk migrasjon fra donor- til akseptorfase. I dette systemet kan parametere som ekstraksjonstid, spenning, volum, pH, type akseptor-, donor- og organisk fase varieres, noe som gir god mulighet for å påvirke ekstraksjonsmekanismen og eventuelt føre til bedre selektivitet.

Peptider er en interessant stoffgruppe innen bioanalyse da de i mange tilfeller virker som sykdomsindikatorer, brukes som legemidler og er involvert i en rekke biologiske prosesser. EME har i senere år blitt anvendt som prøveopparbeidelsesmetode av peptider [6-11] og forsøkene som er utført i denne masteroppgaven bygger på disse arbeidene. Det har vært utfordringer med lave ekstraksjonsutbytter av peptidene og siden dette er et relativt nytt område innen prøveopparbeidelse, er det begrenset forståelse for hva som skjer under ekstraksjonene.

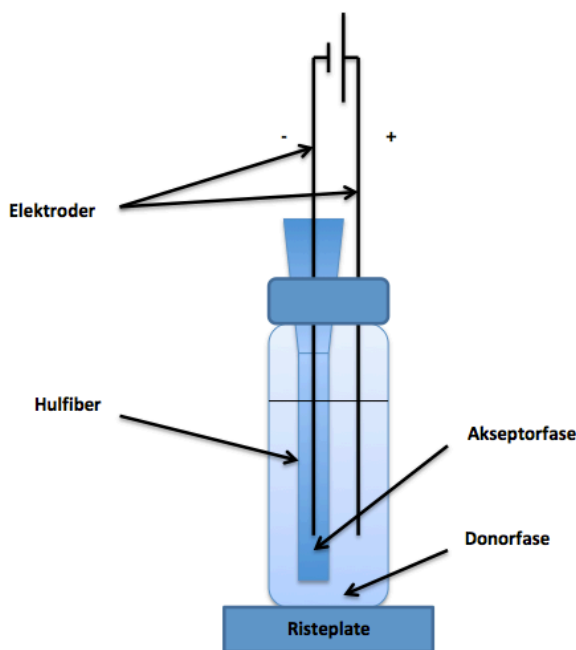
Hovedfokuset i dette arbeidet har vært å:

- Øke kunnskapen om optimalisering av EME av peptider
- Utvide forståelsen for hva som skjer under EME av peptider
- Forsøke å finne måter å øke ekstraksjonsutbyttene på
- Undersøke mulig selektivitet i systemet

# 4. Teori

## 4.1. Elektromembranekstraksjon

I elektromembranekstraksjon (EME) migrerer ladde analytter fra en prøve (donorfase) gjennom organisk fase som er immobilisert i en hulfibermembran og videre inn i hulrommet i membranen (akseptorfase). Hoveddrivkraften i ekstraksjonene er påsatt spenning over væskemembranen. EME har flere fordeler sammenliknet med tradisjonelle prøveopparbeidelsesteknikker som fast-faseekstraksjon (SPE) og væske-faseekstraksjon (LLE), for eksempel relativt rask ekstraksjonstid, høy oppkonsentrering, små prøvevolum, rene ekstrakter og lavt forbruk av organisk løsemiddel.



Figur 2. Oppsett for EME slik det er benyttet i oppgaven.

Figur 2 viser et ekstraksjonsoppsett for EME der det er fylt vandig akseptorfase inn i hulfiberen med organisk fase immobilisert i veggene. Hulfiberen plasseres i den vandige donorfase via viallokket, og det plasseres platinatråder som fungerer som elektroder i akseptor- og donorfase. Donorfase pH-justeres slik at analytter av interesse er ladet. Vialen settes på et ristebrett for at ekstraksjonene skal gå raskere ved å sørge for konveksjon i prøveløsningen og å forhindre et stillestående væskelag utenpå den organiske fasen.

De første arbeidene med EME ble utført på basiske legemidler og genererte utbytter på 70 % eller mer for alle modellanalyttene med 5 minutters ekstraksjonstid og spenning på 300 V [12]. I de videre arbeidene ble ulik pH i akseptorfase utprøvd og man fant at økt pH gir nedsatt elektrokinetisk migrasjon inn i akseptorfase grunnet deprotonering av analyttene og tilbakediffusjon til væskemembranen. Oppsettet ble også testet på biologiske prøver og ved bruk av plasma og urin ble det generert god prøveopprensing. I 2007 ble de første forsøkene med EME av sure legemidler utført på elleve forskjellige typer sure legemidler [13]. I motsetning til EME av basiske legemidler ble anoden i dette systemet plassert i akseptorfase og katoden i donorfasen.

EME har også blitt brukt som prøveopparbeidelsesteknikk for blant annet analyse av opioidantagonister fra ubehandlede biologiske prøver [14], analyse av amfetaminer fra fullblod [15], analyse av ikke-steroid antiinflammatoriske midler (NSAIDs) fra avløpsvann [16], analyse av tungmetaller fra vandige prøver [17] og analyse av aminosyrer fra behandlet serum, plasma og fullblod [18].

EME av peptider ble først beskrevet i 2008 av Balchen *et al.* [8]. I disse forsøkene ble åtte peptider ekstrahert fra 500  $\mu$ L 1 mM HCl donorfase til 25  $\mu$ L 100 mM HCl akseptorfase med påsatt spenning på 50 V og risting ved 1050 rpm. Senere har EME blitt anvendt på peptider i flere tilfeller [6-11] og det er disse tidligere arbeidene som danner grunnlaget for forsøkene i denne oppgaven. Lave ekstraksjonsutbytter har vist seg å være en utfordring, og forståelsen av hva som skjer under EME av peptider er fremdeles begrenset da dette er en relativt ny prøveopparbeidelsesteknikk.

## **4.2. Organisk fase i elektromembranekstraksjon av peptider**

Som tidligere nevnt er hoveddrivkraften i EME av peptider den påsatte spenningen som trekker de ladde peptidene fra donorfasen, gjennom væskemembranen og inn i akseptorfase. I tillegg har sammensetningen av den organiske fasen stor betydning for transport av peptider. I den organiske fasen tilsettes et transportmolekyl som virker ved å danne ionpar med de negativt ladde peptidene i overgangen mellom donor- og organisk fase, og fremmer sådan transporten av peptider gjennom væskemembranen. I overgangen

mellom akseptor- og organisk fase vil ionparet brytes opp ved at transportmolekylet protoneres og peptidet frigjøres inn i akseptorfase. Tidligere forsøk har vist positive resultater ved bruk av alifatiske alkoholer og alifatiske ketoner som organisk løsemiddel, i tillegg til mono- og di-alkylerte fosfater som transportmolekyl i væskemembranen [11]. Man har sett at tri-alkylerte fosfater gir lavere ekstraksjonsutbytter enn mono- og di-alkylerte fosfater. Tri-alkylerte fosfater har ikke mulighet til å danne ionpar, men det er en mulighet at de kan utvikle en annen form for kompleksdannelse som bidrar til transport av peptider over væskemembranen.

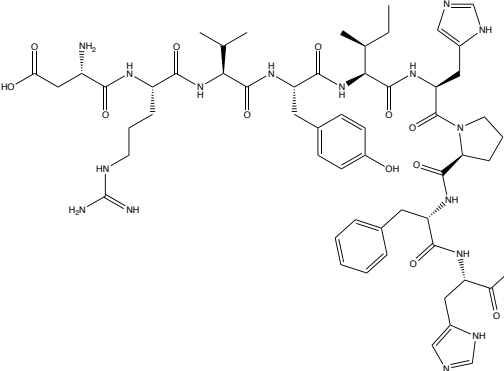
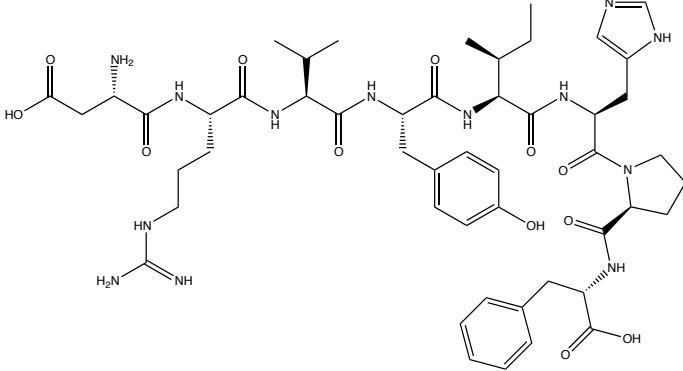
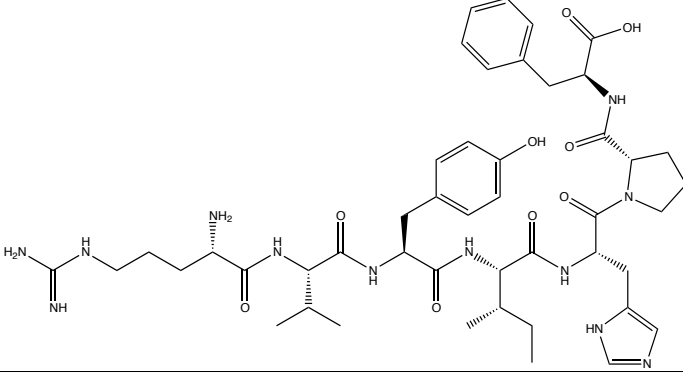
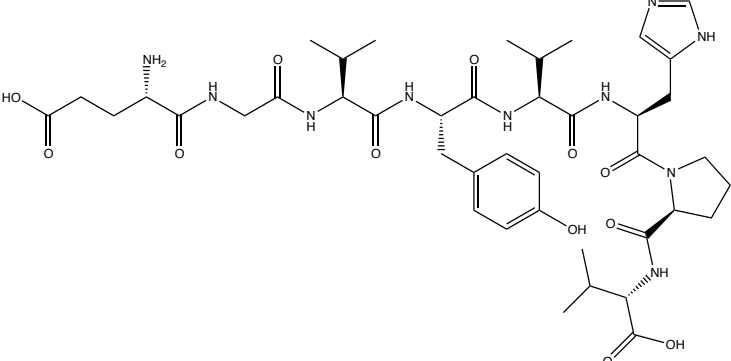
### 4.3. Modellpeptidene

Peptidene som er brukt i alle forsøkene består av lengder på 4-10 aminosyrer. Tabell 1 viser molekylstrukturene for alle sju peptidene.

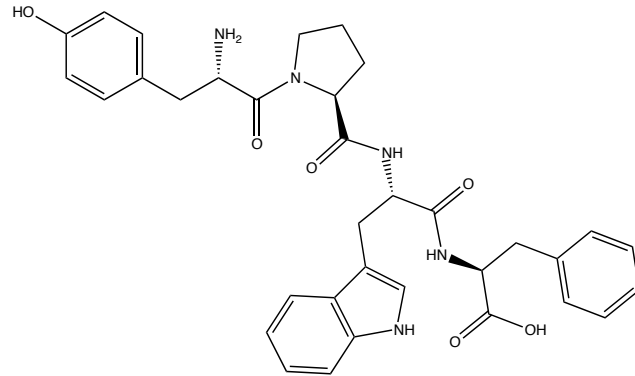
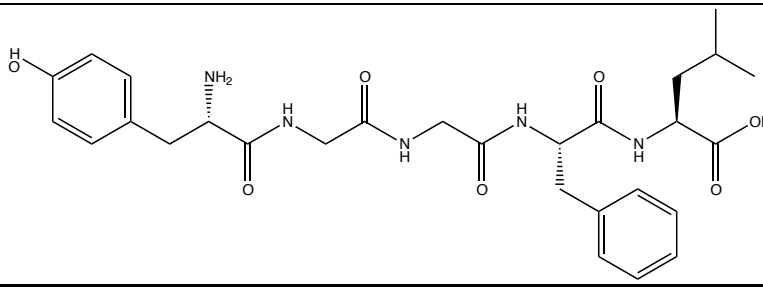
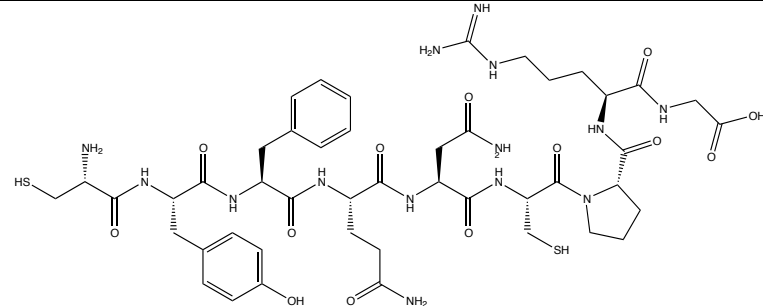
AT-I og AT-II inngår i renin-angiotensin-systemet i kroppen. AT-II blir omdannet fra AT-I av enzymet *angiotensin converting enzyme* (ACE) og stimulerer aldosteronsekresjonen [19]. Ved økt aldosteronproduksjon økes utskillingen av kalium i kroppen, og blodtrykket stiger fordi aldosteron stimulerer nyrenes reabsorpsjon av natrium. AT-III blir omdannet fra AT-II og virker som sentral regulator av vasopressinutskillelse og blodtrykk [20]. AT-II-2 er strukturelt relatert til AT-II og er en antagonist [21].

Enkefalin er et neuropeptid som tilhører samme stoffgruppe som opioider [20]. Enkefaliner er smertestillende og øker følelsen av velvære ved å binde seg til opioidreseptorer i hjernen. Vasopressin (eller antidiuretisk hormon, ADH) virker i kroppen ved å øke reabsorpsjonen av vann og reduserer følgelig urinvolumet [19]. Endomorfin har høy affinitet til opioidreseptorer, spesielt for  $\mu$ -opioidreseptorer, og virker derfor smertestillende [20].

Tabell 1. Molekylstrukturer for modellpeptidene.

Peptid	Molekylstruktur
<p>Angiotensin I (AT-I)</p>	
<p>Angiotensin II (AT-II)</p>	
<p>Angiotensin III (AT-III)</p>	
<p>Angiotensin II antipeptid (AT-II-2)</p>	

Tabell 1 forts.

<p>Endomorfin (Endo)</p>	
<p>Enkefalin (Enke)</p>	
<p>Vasopressin (VP)</p>	

## 4.4. Massetransport

Massetransport av en analytt over en væskemembran i EME ble for første gang beskrevet i 2007 av Gjelstad *et al.* [22, 23]. Ved å ta i bruk en modifisert Nernst-Planck fluksligning, ble det rapportert at man kan beregne fluks for den *i*te kationiske analytt ( $J_i$ ) gjennom en væskemembran (formel 1):

$$J_i = \frac{-D_i}{h} \left( 1 + \frac{v}{\ln \chi} \right) \left( \frac{\chi - 1}{\chi - \exp(-v)} \right) (c_i - c_{i0} \exp(-v)) \quad (1)$$

hvor  $D_i$  er diffusjonskoeffisienten for ionet,  $h$  er membranens tykkelse,  $\chi$  er den totale ionekonsentrasjonsratioen på donorsiden/akseptorsiden (formel 2),  $v$  er en dimensjonsløs drivkraft (formel 3) og  $c_i$  og  $c_{i0}$  er konsentrasjonen av den *i*te kationiske analytt i henholdsvis væskemembranen og akseptorfase. Det totale ionekonsentrasjonsforholdet ( $\chi$ ) er definert ved:



$$\chi = \frac{\sum_i c_{ih} + \sum_k c_{kh}^*}{\sum_i c_{i0} + \sum_k c_{k0}^*} \quad (2)$$

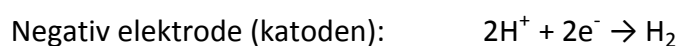
hvor  $c_{ih}$  og  $c_{i0}$  er konsentrasjonen av den *i*te kationiske analytt i henholdsvis donor- og akseptorfase,  $c_{kh}^*$  og  $c_{k0}^*$  er konsentrasjonen av den *k*te anioniske analytt i henholdsvis donor- og akseptorfase.

Den dimensjonsløse drivkraften ( $v$ ) er definert ved:

$$v = \frac{z_i e \Delta \phi}{kT} \quad (3)$$

hvor  $z_i$  er ladningen av den *i*te kationiske analytten,  $e$  er elementladningen,  $\Delta \phi$  er det elektriske potensialet over væskemembranen,  $k$  er en konstant og  $T$  er temperaturen.

De kritiske parameterne for optimalisering av massetransport av analytter fra donor- til akseptorfase er spenning, ionebalanse, sammensetning av væskemembran og temperatur. Man kan se av formel 1 og 3 at man får økt massetransport ved økt spenningsforskjell ( $\Delta \phi$ ). I mange tilfeller er det observert at økt spenning gir økt ekstraksjonsutbytte, men at når høy spenning påsettes systemet øker strømnivået, som igjen fører til økt elektrolyseaktivitet ved elektrodene:



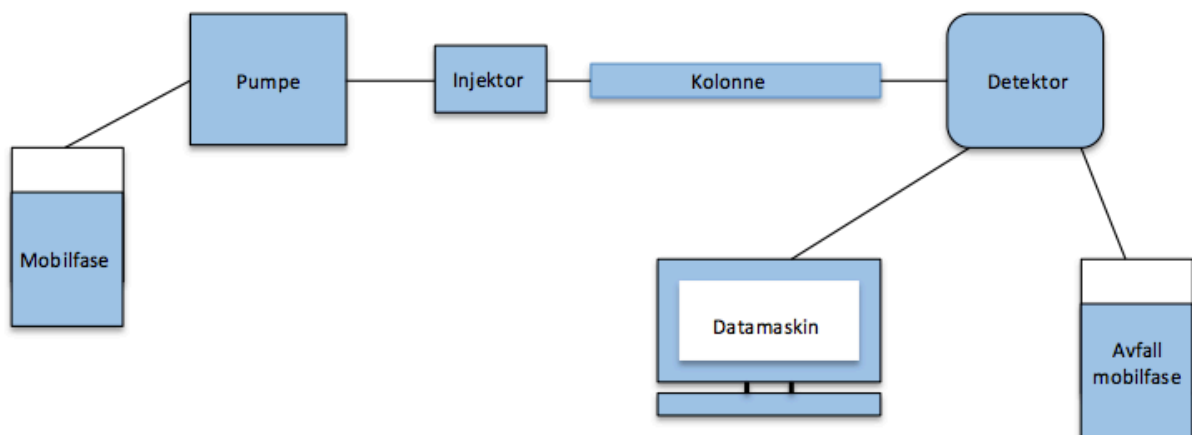
Elektrolyseaktivitet i EME fører til dannelse av gassbobler i akseptor- og donorfase og en mulig medfølgende endring i pH i begge faser. Gassbobler i akseptorfase gjør det vanskelig å ha volumkontroll ved overføring av væske til analyse. I noen tilfeller fører det også til at akseptorfase renner over pipettespissen, i tillegg til at kontaktoverflaten mellom væskemembranen og akseptorfase reduseres og fører til redusert ekstraksjonskinetikk.

Ionebalansen på donor- og akseptorsiden er også en bestemmende faktor for massetransporten. Høyere ionekonsentrasjon i akseptorfase i forhold til donorfase gir økt massetransport. Konsentrasjonen av HCl vil påvirke både ionebalansen og pH i fasene. Temperatur inngår også i beregning av massetransport, drivkraften ( $v$ ) vil bli redusert ved

økt temperatur (formel 3), mens diffusjonskoeffisienten ( $D_i$ ) øker ved økt temperatur [22]. I tidligere forsøk er det vist at massetransporten øker ved temperaturer høyere enn romtemperatur, men når den økes til over 40 °C kan det føre til degradering av væskemembranen [22]. Ekstraksjonene i dette arbeidet er utført i romtemperatur.

## 4.5. High-performance liquid chromatography (HPLC)

Akseptorfasene i denne oppgaven ble analysert på et instrument av typen *high-performance liquid chromatography* (HPLC). Hovedbestanddelene i et HPLC-instrument er mobilfasereservoar, pumpe, injektor for injeksjon av prøve, separasjonskolonne, detektor, avfallsreservoar og en datamaskin som systemet er koblet opp mot som bearbejder informasjonen fra analysene (figur 3).



Figur 3. HPLC-skisse.

HPLC baserer seg på separasjon av analytter på en stasjonær kolonne der analytter har ulike retensjoner grunnet ulike grader og typer interaksjon. Det finnes flere typer interaksjoner man kan basere seg på, og i dette arbeidet har omvendt-fase-kromatografi og ionpakkromatografi blitt benyttet, derfor blir kun disse prinsippene omtalt her.

### 4.5.1. Omvendt-fase-kromatografi

I omvendt-fase-kromatografi er den stasjonære fasen hydrofob, og det er ofte brukt hydrofobe grupper som er bundet til silanolgrupper på silika som stasjonærfase. Slike silikabaserte stasjonære faser tåler mobilfaser i pH-området 2 - 8, og den mest brukte

hydrofobe fasen i omvendt-fase-kromatografi er oktadecyl, eller C18. Analytter blir retardert og separert ved hydrofobe interaksjoner på kolonna. Den viktigste av disse interaksjonene er van der Waals-krefter som er relativt svake krefter, men de øker med molekylstørrelsen til analytten. De minst hydrofobe analyttene får minst retensjon og følgelig kortest retensjonstid [24].

#### **4.5.2. Ionparkromatografi**

I ionparkromatografi blir pH i mobilfasen justert slik at analyttene som skal separeres er ioniserte. Det tilsettes også et motion i mobilfasen som ved å interagere med analytten utgjør et ionpar som er mer hydrofob enn analytten alene. Ionparet får derfor økt retensjon på den stasjonære kolonna. Hvis analyttene av interesse er basiske stoffer, tilsettes et negativt ladet motion som ionparreagens, for eksempel en sulfonsyre som oktansulfonsyre. Hvis analyttene av interesse er sure stoffer, tilsettes et positivt ladet motion som ionparreagens, for eksempel en kvartær ammoniumforbindelse som tetrabutylammonium. En måte å justere retensjonen på, er å anvende motioner av ulik molekylstørrelse fordi økt størrelse gir økt retensjon på kolonna [24]. I denne oppgaven ble natrium-1-heptan-sulfonat ( $C_7H_{15}NaO_3S$ ) brukt som ionparreagens.

## 5. Eksperimentelt

### 5.1. Modellpeptider

Oversikt over de sju modellpeptidene som er benyttet i dette arbeidet er vist i tabell 2 og strukturene for peptidene er tidligere oppsummert i tabell 1.

Tabell 2. Aminosyresekvens, molekylvekt og leverandør for modellpeptidene som er benyttet i arbeidet.

Peptid	Aminosyresekvens	M <sub>w</sub>	Leverandør
AT-I	Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe - His - Leu	1084	Bachem AG (Bubendorf, Tyskland)
AT-II	Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe	1046	Bachem AG (Bubendorf, Tyskland)
AT-III	Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe	931	Bachem AG (Bubendorf, Tyskland)
AT-II-2	Glu - Gly - Val - Tyr - Val - His - Pro - Val	899	Bachem AG (Bubendorf, Tyskland)
Endo	Tyr - Pro - Trp - Phe	611	Bachem AG (Bubendorf, Tyskland)
Enke	Tyr - Gly - Gly - Phe - Leu	556	Bachem AG (Bubendorf, Tyskland)
VP	Cys - Tyr - Phe - Gln - Asn - Cys - Pro - Arg - Gly	1297	Bachem AG (Bubendorf, Tyskland)

### 5.2. Utstyr og fremgangsmåte for EME

Oppsettet for EME er vist tidligere i figur 2. En 2,4 cm lang hulfiber av typen PP (polypropylen) Q 3/2 (Membrana, Wuppertal, Tyskland) med indre diameter 1,2 mm, veggtykkelse 200 µm og porestørrelse 0,2 µm ble klipt av og klemt mekanisk helt tett i den ene enden med en tang. I den andre enden ble tuppen av en 2,1 cm lang pipettespiss av typen Finntip 200 ext (Thermo Scientific, Vantaa, Finland) smeltet fast for å virke som trakt for lettere å tilsette akseptorfase inni hulfiberen. Hulfiberen med tilhørende pipettespiss ble

ført gjennom viallokket og 1000  $\mu\text{L}$  donorfase (som regel 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  peptid i 1 mM HCl) ble tilsatt i prøvevialen av typen *Microtube with cap* (Sarstedt Nümbrecht, Tyskland) med et volum på 2 mL, indre diameter 8 mm og høyde 450 mm. Membranen ble fuktet i cirka 5 sekunder i organisk fase og overflødig væske på membranen ble tørket av med papir. Ved hjelp av en 50  $\mu\text{L}$ -mikrosprøyte (Hamilton, Bonaduz, Sveits) ble 25  $\mu\text{L}$  akseptorfase (som oftest 50 mM HCl) tilført via pipettespissen og inn i hulfiberen. Platinatråder med diameter 0,5 mm (K. Rasmussen, Hamar, Norge) ble plassert i de respektive fasene (elektroden med negativt potensial (katode) i akseptorfase og elektroden med positivt potensial (anode) i donorfasen). Membranen ble plassert i donorfasen og viallokket skrudd fast. Kablene ble koblet til platinatrådene og spenningskilden som ble brukt var av typen ES 0300-0,45 eller ES 015-10 fra Delta Power Supplies (Delta Electronika, Zierikzee, Nederland). Hele systemet ble satt på et ristebrett av typen Vibramax 100 agitator (Heidolph, Kelheim, Tyskland) eller Eppendorff thermomixer comfort (Eppendorff, Hamburg, Tyskland) og risting ved 900 rpm ble utført. Ekstraksjonene ble utført i romtemperatur. Etter endt ekstraksjon ble 20  $\mu\text{L}$  akseptorfase overført til en autosamlervial, fortynnet med 20  $\mu\text{L}$  1 mM HCl og overført til analyse på HPLC.

### 5.3. Betingelser for HPLC

HPLC med UV-detektor ble brukt som analyseinstrument i dette arbeidet (prinsippet for HPLC er beskrevet i 4.5.). Tabell 3 viser en oversikt over parametere og tilsvarende verdier for HPLC-oppsettet. Instrumentet som ble brukt i forsøkene var av typen Agilent 1200 system med degasser (G1379B), pumpe (G1312B), autosampler (G1367C), prøvetermostat (G1330B), kolonneovn (G1316B), UV-detektor (G1315C), chemstation for LC 3D system software Rev B.03.01-SR1 [317], alt fra Agilent technologies (Santa Clara, CA, USA).

Tabell 3. HPLC-parametere og -verdier.

Parameter	Verdi
Kolonne	YMC-Triart C18 150 x 2,0 mm I.D. 5 µm (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Tyskland)
Mobilfase A	5 % ACN i 5 mM natrium-1-heptan-sulfonat og 10 mM maursyre
Mobilfase B	95 % ACN i 5 mM natrium-1-heptan-sulfonat og 10 mM maursyre
Deteksjonsbølglengde	214 nm
Flow	0,3 mL/min
Eluering	Gradienteluering 0 min. – 20 % mobilfase B 17 min. – 37 % mobilfase B 18 min. – 100 % mobilfase B 23 min. – 100 % mobilfase B 24 min. – 20 % mobilfase B 32 min. – 20 % mobilfase B
Kolonnetemperatur	23 °C
Injeksjonsvolum	20 µL
Analysetid	32 minutter

## 5.4. Kjemikalier

Tabell 4 viser oversikt over kjemikalier som er brukt i tillaging av bufferløsninger, akseptor-, donor-, mobil- og organiske faser i forsøkene.

Tabell 4. Oversikt over alle kjemikaliene som er brukt i forsøkene.

Kjemikalie	Renhet/kvalitet	Leverandør
1-oktanol	≥ 99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
2-dekanon	98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
2-nonanon	≥ 97 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
2-oktanon	≥ 97 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)

Tabell 4 forts.

Acetonitril (ACN)	99,9 %	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Ammoniakk (NH <sub>3</sub> )	25 %	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Ammoniumbikarbonat (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> )	≥ 99,5 %	Fluka Chemie (Sveits)
Di(2-etylheksyl)fosfat (DEHP)	Minimum 95 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Dibutylfosfat (DBP)	≥ 97 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Diisobutylketon (C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O)	80 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Dinatriumfosfatdihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	Pro analysi, minimum 99,5 %	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Maursyre (HCOOH)	98-100 %	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Metylaminhydroklorid (MAH)	Ikke oppgitt	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Natrium-1-heptan-sulfonat (C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NaO <sub>3</sub> S)	Ikke oppgitt	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Natriumdihydrogenfosfat- monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	Pro analysi, 99-102 %	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Saltsyre (HCl)	37 %	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Tetraetylammoniumbromid (TEAB)	Minimum 99 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Tetrametylammoniumklorid (TMA)	> 98 %	Fluka Chemie (Sveits)
Tridecylfosfat (TDP)	Ikke oppgitt	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)

Tabell 4 forts.

Trinatriumcitrat-2-hydrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	Minimum 99 %	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Tris(2-etylheksyl)fosfat (TEHP)	≥ 98 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Tris(hydroksymetyl)aminometan (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Minimum 99,5 %	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Vann (H <sub>2</sub> O)	lonebyttet	Millipore (Billerica, MA, USA)

## 5.5. Løsninger

### 5.5.1. Stamløsninger

Renstoff av modellpeptidene angiotensin I trifluoroacetatsalt, angiotensin II acetatsalt, angiotensin II antipeptid, angiotensin III, leu-enkefalin, endomorfine-1 og Arg<sup>3</sup>-vasopressin trifluoroacetatsalt ble enkeltvis blandet med ionebyttet H<sub>2</sub>O i konsentrasjoner på 1 eller 2 mg/mL og lagret ved -25 °C, beskyttet mot lys.

### 5.5.2. Standardløsninger

Standardløsninger ble tillaget ved å blande 1 mM HCl med stamløsninger slik at konsentrasjonen av hvert peptid ble 20 µg/mL. Standardløsningene ble lagret ved -25 °C, beskyttet mot lys.

### 5.5.3. Donorfaser

Det ble laget nye donorfaser for hvert forsøk ved å fortynne standardløsning til en konsentrasjon på 2,5 µg/mL med 1 mM HCl, med unntak av forsøkene under avsnittene 6.3., 6.7. og 6.8.

I forsøkene under 6.3. ble det tillaget løsninger på 1 mM av tetrametylammoniumklorid (TMA), tetraetylammoniumbromid (TEAB) eller metylaminhydroklorid (MAH) og blandet med 1 mM HCl før fortynning av stamløsninger.



I forsøkene under 6.7. ble bufferne tillaget på følgende måte før fortynning av stamløsninger:

- ammoniakk-maursyre-buffer: titrering av 25 mM maursyre mot 25 mM ammoniakk til pH 3
- sitronsyre-natriumcitrat-buffer: titrering av 25 mM tri-natriumcitrat-2-hydrat mot 25 mM sitronsyremonohydrat til pH 5
- tris-buffer: 25 mM tris(hydroksymetyl)aminometan pH 7,4
- ABC-buffer: 25 mM ammoniumbikarbonat pH 8

I forsøkene under 6.8. ble donorløsningene tillaget ved å titrere 25 mM løsning av natriumfosfatmonohydrat med 25 mM løsning av dinatriumfosfatdihydrat til pH 7,4 før fortynning av stamløsninger.

#### **5.5.4. Akseptorfase**

I hele oppgaven, med unntak av avsnitt 6.6., ble 50 mM HCl brukt som akseptorfase og dette ble tillaget ved å fortynne høykonsentrert HCl-løsning med ionebyttet H<sub>2</sub>O.

I forsøket under 6.6. ble løsning fra mobilfase A uten ACN anvendt som akseptorfase.

#### **5.5.5. Organiske faser**

Tabell 5 viser molekylstrukturer for alle kjemikaliene brukt i de organiske fasene i oppgaven. pKa-verdiene for DBP, TDP og DEHP er i området 1,47-1,53 [11], mens TEHP ikke har pKa-verdi fordi den mangler grupper som kan protoneres eller deprotoneres. Siden pH i donorfasen er over pKa-verdiene, vil transportmolekylene bli deprotonert i overgangen mellom donor- og organisk fase, og siden pH i akseptorfasen er under pKa-verdiene, vil transportmolekylene bli protonert i overgangen mellom akseptor- og organisk fase. På denne måten vil transporten av peptider over væskemembranen foregå slik som beskrevet i avsnitt 4.2. For TEHP vil ikke dette være tilfellet, en mulighet er derfor at kompleksdannelse skjer på en annen måte.

1-oktanol, diisobutylketon og DEHP ble veid opp og blandet i forholdet 55:35:10 (w/w/w).

1-oktanol og DBP ble veid opp og blandet i forholdet 90:10 (w/w).

1-oktanol og DEHP ble veid opp og blandet i forholdet 90:10 (w/w).

1-oktanol og TDP ble veid opp og blandet i forholdet 90:10 (w/w).

1-oktanol og TEHP ble veid opp og blandet i forholdet 90:10 (w/w).

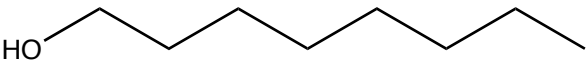
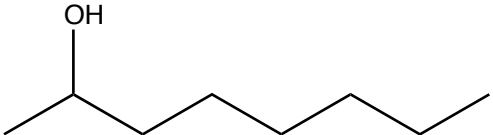
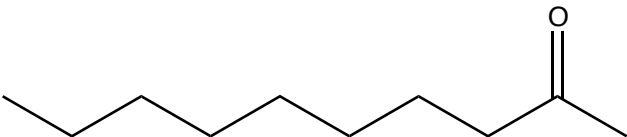
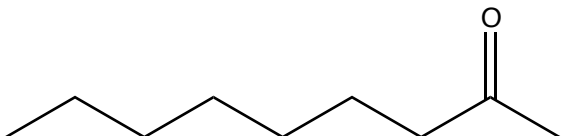
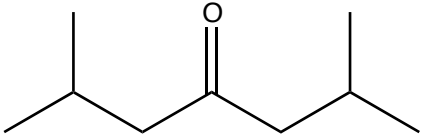
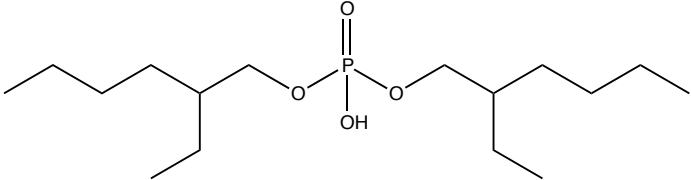
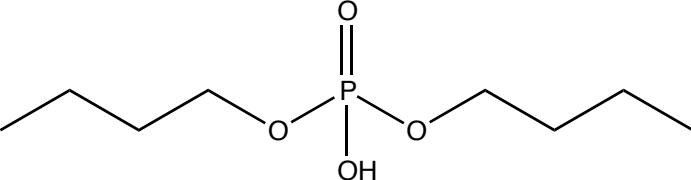
2-dekanon og TDP ble veid opp og blandet i forholdet 90:10 (w/w).

2-nonanon og TDP ble veid opp og blandet i forholdet 90:10 (w/w).

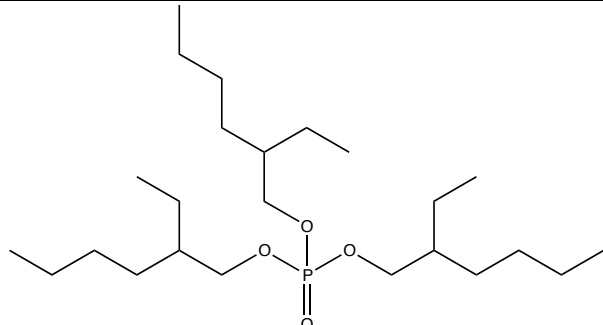
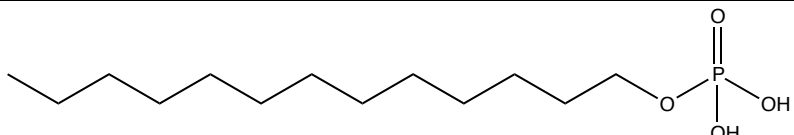
2-nonanon og DEHP ble veid opp og blandet i forholdet 90:10 (w/w).

2-oktanon, diisobutylketon og TDP ble veid opp og blandet i forholdet 55:35:10 (w/w/w).

Tabell 5. Tabell over molekylstrukturene for kjemikalier brukt i de organiske fasene.

Kjemikalie	Molekylstruktur
1-oktanol	
2-oktanol	
2-dekanon	
2-nonanon	
Diisobutylketon	
Di(2-etylheksyl)fosfat (DEHP)	
Dibutylfosfat (DBP)	

Tabell 5 forts.

Tris(2-etylheksyl)fosfat (TEHP)	
Tridecylfosfat (TDP)	

### 5.5.6. Mobilfaser til HPLC

Mobilfase A ble laget ved å blande 950 mL løsning av 5 mM natrium-1-heptan-sulfonat og 10 mM maursyre med 50 mL ACN.

Mobilfase B ble laget ved å blande 50 mL løsning av 5 mM natrium-1-heptan-sulfonat og 10 mM maursyre med 950 mL ACN.

## 5.6. Beregning av utbytte

Ekstraksjonsutbytte ble beregnet i følge:

$$Utbytte\% = \frac{n_a}{n_s} \times 100\% = \frac{V_a C_a}{V_s C_s} \times 100\% \quad (4)$$

der  $n_a$  er stoffmengden i akseptorløsningen etter endt ekstraksjon,  $n_s$  er stoffmengden i donorløsningen før ekstraksjon,  $V_a$  og  $C_a$  er volum og konsentrasjon av analytt i akseptorløsningen etter endt ekstraksjon,  $V_s$  og  $C_s$  er volum og konsentrasjon av analytt i donorløsningen før ekstraksjon.

## 5.7. T-test

I noen tilfeller er det interessant å sammenlikne to sett med målinger for å undersøke om de er signifikant forskjellige med hensyn på ekstraksjonsutbytte. I disse tilfellene er det utført en t-test der felles standardavvik ( $s_{felles}$ ) og t-verdi beregnes ut ifra følgende formler [24]:

$$s_{felles} = \sqrt{\frac{s_1^2(n_1-1) + s_2^2(n_2-1)}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (5)$$

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{s_{felles}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \quad (6)$$

der  $s_1$  og  $s_2$  er standardavvikene,  $x_1$  og  $x_2$  er gjennomsnittene og  $n_1$  og  $n_2$  er antall målinger i måleseriene 1 og 2.

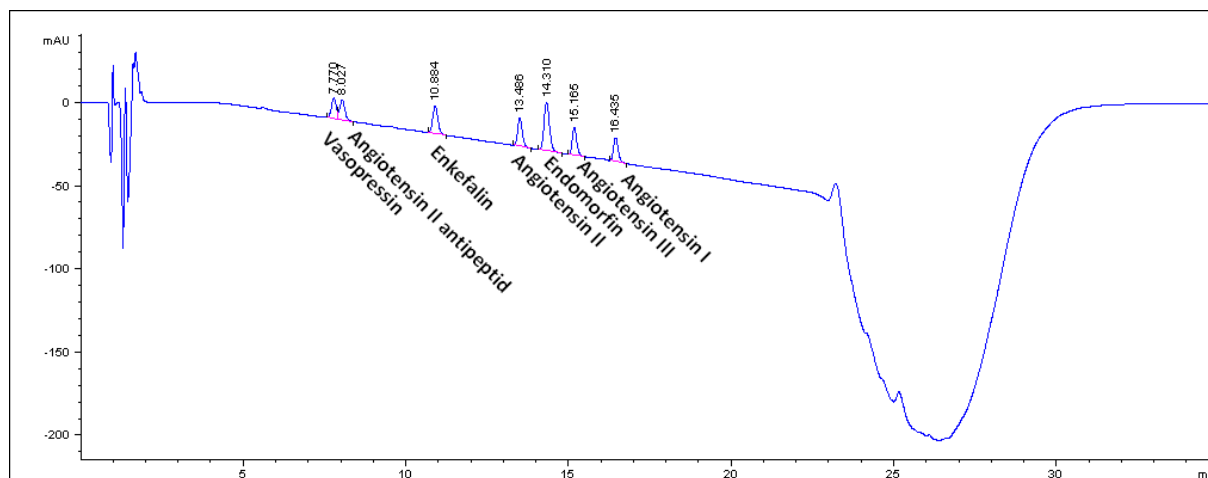
T-verdien sammenliknes med tilhørende t-verdi fra en tabell [24] på 95 % konfidensnivå og med antall frihetsgrader  $n_1 + n_2 - 2$ . Resultatene er signifikant forskjellige dersom den beregnede t-verdien er høyere enn tabellverdien og resultatene er ikke signifikant forskjellige dersom den beregnede t-verdien er lavere eller lik som tabellverdien.

I denne oppgaven er det benyttet et hjemmelaget ekstraksjonsoppsett og det vil derfor variere både fra samme operatør og fra operatør til operatør. I tillegg er ingen ledd i ekstraksjonen automatiserte og dette gjør systemet mer utsatt for variasjoner og følgelig høyere standardavvik enn ved kommersielt tilgjengelig utstyr. Det er utført en t-test i denne oppgaven der det er interessant å undersøke om ekstraksjonsutbyttene for to målinger er signifikant forskjellige.

## 6. Resultater og diskusjon

### 6.1. Innledende forsøk

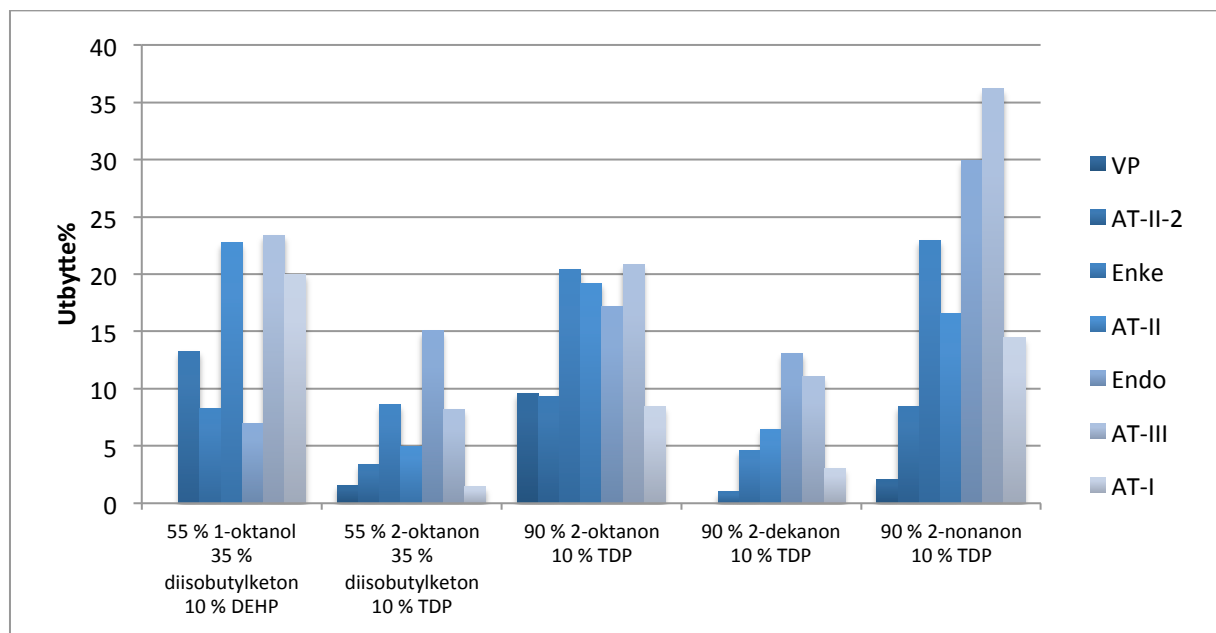
Ekstraktene ble analysert på HPLC, og siden arealene i HPLC-kromatogrammet relateres til konsentrasjonene i prøven og inngår i utbytteberegning, er det viktig å kunne relatere toppene i kromatogrammet til hvert enkelt modellpeptid. Derfor gikk et av de første forsøkene ut på å bestemme de sju peptidenes retensjonsrekkefølge. Det ble utført forsøk ved å analysere hvert enkelt peptid hver for seg, lese av retensjontiden og bruke et referansekromatogram med alle sju peptidene for å bestemme rekkefølgen. Resultatet av bestemmelsen av retensjonsrekkefølgen er vist i figur 4. For at ionekonsentrasjonen i HPLC-standardløsningen skal være mest mulig lik som i akseptorfasen, er det brukt en standardløsning hvor stamløsninger av hvert enkelt peptid er løst i 1 mM HCl.



Figur 4. Retensjonsrekkefølgen av de sju peptidene på HPLC.

I EME av peptider er sammensetningen av organisk fase viktig for ekstraksjonsutbyttene. Derfor gikk de neste forsøkene ut på å teste ut forskjellige sammensetninger av organisk fase og gå videre med den organiske fasen som vurderes som mest lovende av disse med tanke på ekstraksjonsutbytte av peptidene. Flere organiske faser ble utforsket, både kjente sammensetninger som har blitt brukt i tidligere arbeid og nye, ukjente sammensetninger (figur 5). De kjente sammensetningene av organisk fase inkluderer 55 % 1-oktanol, 35 %

diisobutylketon og 10 % di(2-etylheksyl)fosfat (DEHP), samt 2-oktanon og 10 % tridecylfosfat (TDP) [11].



**Figur 5. Utbytte av de sju modellpeptidene med forskjellige organiske faser. Spenning: 10 V, ekstraksjonstid: 5 minutter.**

På bakgrunn av disse forsøkene ble det valgt å gå videre med den organiske fasen med sammensetning 90 % 2-nonanon og 10 % TDP. I de videre forsøkene er det denne organiske fasen som oftest har fungert som sammenlikningsgrunnlag av ekstraksjonsutbytter når nye fremgangsmåter og oppsett har blitt studert.

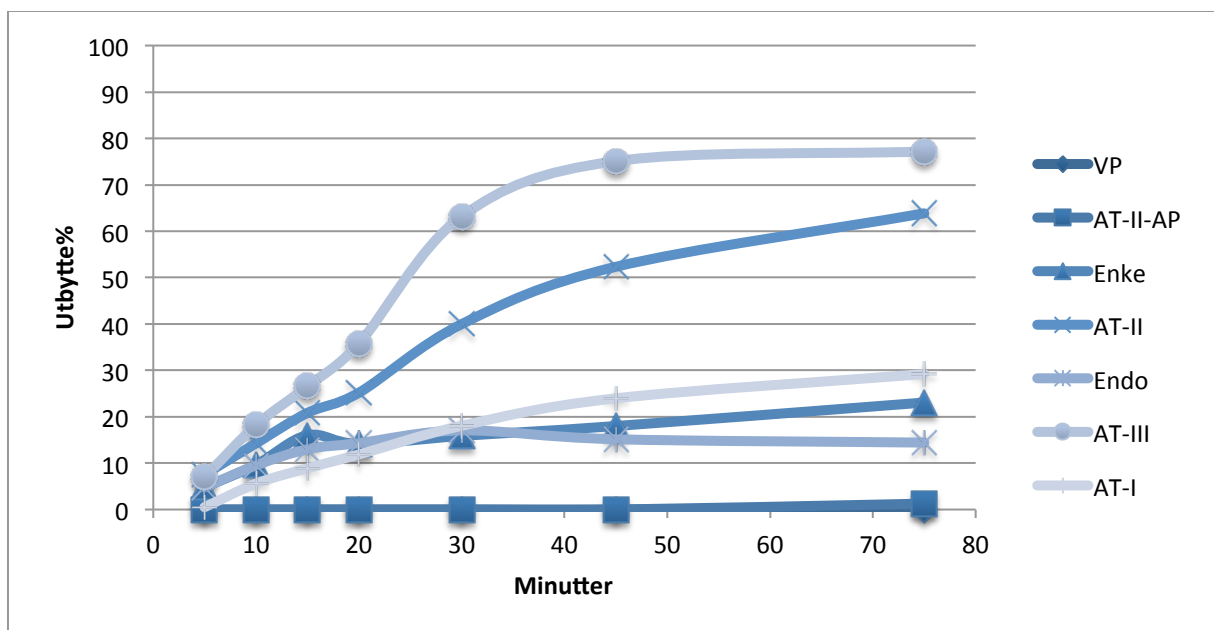
I EME har peptider kun tre faser de kan befinne seg i (donor-, akseptor- og organisk fase), og for å kartlegge hvor analyttene befinner seg, ble det utført et forsøk der både akseptor- og donorfase ble analysert på HPLC etter endt ekstraksjon. Mengde analytt for disse to fasene ble beregnet og resterende mengde i organisk fase ble beregnet ut ifra dette. Tabell 6 viser mengde analytt i akseptor-, donor- og organisk fase etter 5 minutters ekstraksjon. Ut ifra tabellen ser man at mengde peptid i donorfasen går relativt raskt ned og i noen tilfeller helt ned til 0 %. Mengde peptider i organisk fase er relativt høy etter kun 5 minutter og det er derfor tydelig at utfordringen med lave ekstraksjonsutbytter ligger i transporten av peptider fra organisk fase og inn i akseptorfase, og ikke i like stor grad transporten fra donor- til organisk fase.

Tabell 6. Mengde i akseptor-, donor- og organisk fase.  
Spenning: 10 V, ekstraksjonstid: 5 minutter, organisk fase: 90 % 2-nonanon og 10 % TDP.

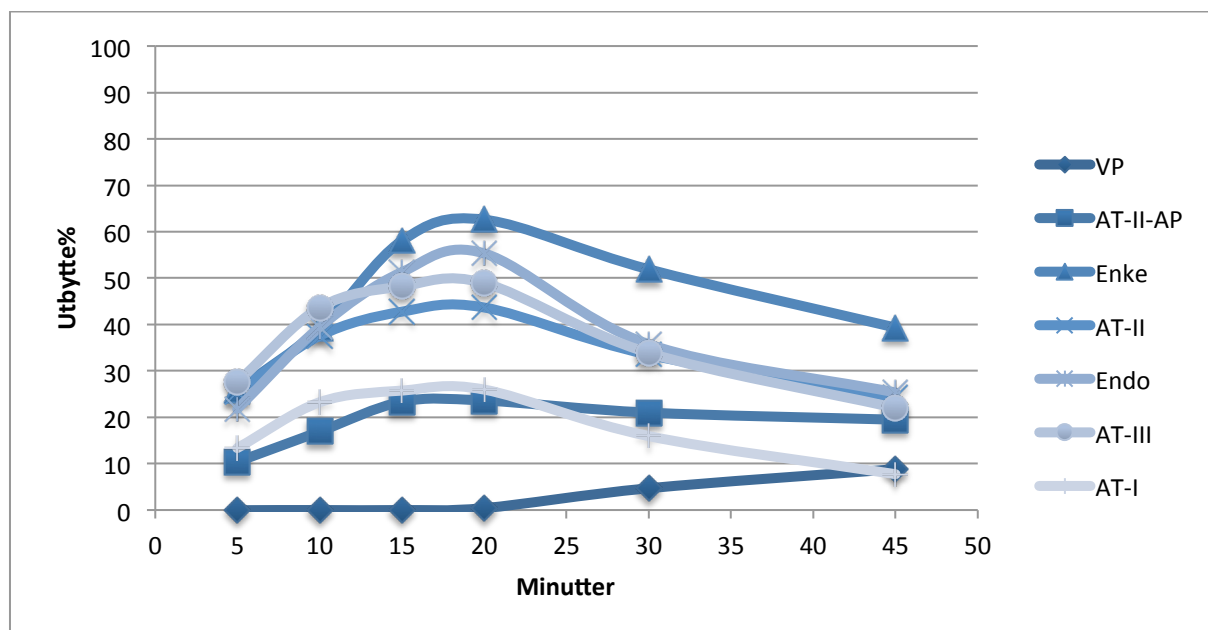
Peptid	Mengde i akseptorfase	Mengde i donorfase	Mengde i organisk fase
VP	0 %	27 %	73 %
AT-II-AP	6 %	61 %	33 %
Enke	15 %	53 %	32 %
AT-II	19 %	12 %	69 %
Endo	16 %	47 %	37 %
AT-III	24 %	0 %	76 %
AT-I	22 %	0 %	78 %

## 6.2. Tids- og spenningsforsøk

For å undersøke hvor mye den påsatte spenningen har å si for ekstraksjonsutbyttene av peptidene i EME, ble det utført to tilsvarende forsøk hvor kun påsatt spenning ble endret. I det ene forsøket var påsatt spenning 10 V, mens for det andre ble det ikke påsatt spenning. Det sistnevnte forsøket tilsvarer et LPME-oppsett og dette var derfor en sammenlikning av EME og LPME av modellpeptidene. Ekstraksjonstidene for forsøkene varierte fra 5 minutter og opp til 45 minutter for EME og opp til 75 minutter for LPME (figur 6 og 7), både fordi LPME-ekstraksjoner er mer tidkrevende, og for å utforske hvor lang tid det tar før peptidene når *steady-state* for begge oppsettene.



Figur 6. Graf over ekstraksjoner med ulik ekstraksjonstid.  
Spenning: 0 V, organisk fase: 90 % 2-nonanon og 10 % TDP.



Figur 7. Graf over ekstraksjoner med ulik ekstraksjonstid. Spenning: 10 V, organisk fase: 90 % 2-nonanon og 10 % TDP.

Figur 6 viser at det tar omtrent 45 minutter før noen av peptidene når *steady-state* i LPME-systemet, mens andre ikke ser ut til å ha nådd *steady-state* selv etter 75 minutters ekstraksjon. I figur 7 ser man at de fleste peptidene når *steady-state* etter omtrent 20 minutter i EME. I motsetning til LPME-oppsettet, går ekstraksjonsutbyttet for de fleste peptidene nedover etter 20 minutter i EME, noe som sannsynligvis skyldes en overbelastning i systemet ved at væskemembranen degraderes eller lekker ut, i tillegg til økt elektrolyse i systemet som fører til bobledannelse. Dette forsøket viser at tidsbesparelsen ved bruk av spenning i EME av peptider sammenliknet med uten påsatt spenning er rundt 25 minutter, i tillegg til at det er viktig å avslutte ekstraksjonen i tide for å unngå at ekstraksjonsutbyttene reduseres.

### 6.3. Konkurrerende kationer i donorfase

Forsøket i avsnitt 6.1. viser at analyttene relativt raskt ekstraheres over i organisk fase i væskemembranen, men at det tar lengre tid før de går ut fra organisk fase og inn i akseptorfase. Dette tilsier at interaksjonen mellom peptid og transportmolekyl er en viktig

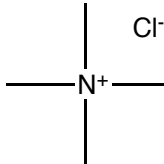
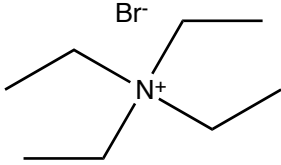
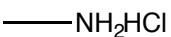


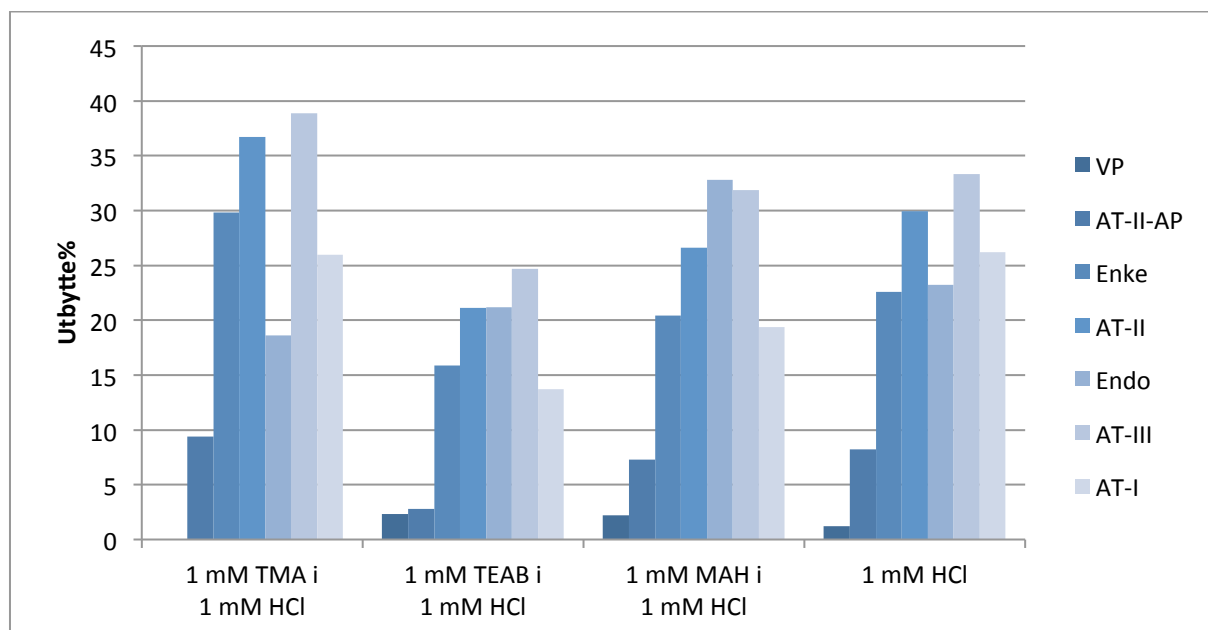
faktor for transport av peptid inn i organisk fase, men at det er en utfordring å bryte denne interaksjonen for å få peptidene over i akseptorfasen.

Et forsøk som ble utført, baserte seg på prinsippet om at ulike kationer har forskjellig affinitet, og at ved å tilsette et kation som konkurrerer med peptidene om binding til transportmolekylet, kan man bryte peptid-transportmolekyl-interaksjonen i organisk fase for å få peptidene over i akseptorfasen.

Innledningsvis ble det forsøkt med tetrametylammoniumklorid (TMA) i donorfasen i konsentrasjonene 0,1 mM, 1 mM og 50 mM, og utbyttene viste seg å være likeverdige ved de forskjellige konsentrasjonene. Følgende kationer ble deretter tilsatt i 1 mM til donorfasen: tetrametylammoniumklorid (TMA), tetraetylammoniumbromid (TEAB) og metylaminhydroklorid (MAH) (tabell 7), og utbyttene ble sammenliknet med 1 mM HCl i donorfase (figur 8).

Tabell 7. Molekylstrukturer for TMA, TEAB og MAH.

Kjemikalie	Molekylstruktur
Tetrametylammoniumklorid (TMA)	
Tetraetylammoniumbromid (TEAB)	
Metylaminhydroklorid (MAH)	



Figur 8. Prosentvis utbytte med konkurrerende kationer i donorfasen sammenliknet med 1 mM HCl i donorfasen. Spenning: 10 V, ekstraksjonstid: 5 minutter, organisk fase: 90 % 2-nonanon, 10 % TDP.

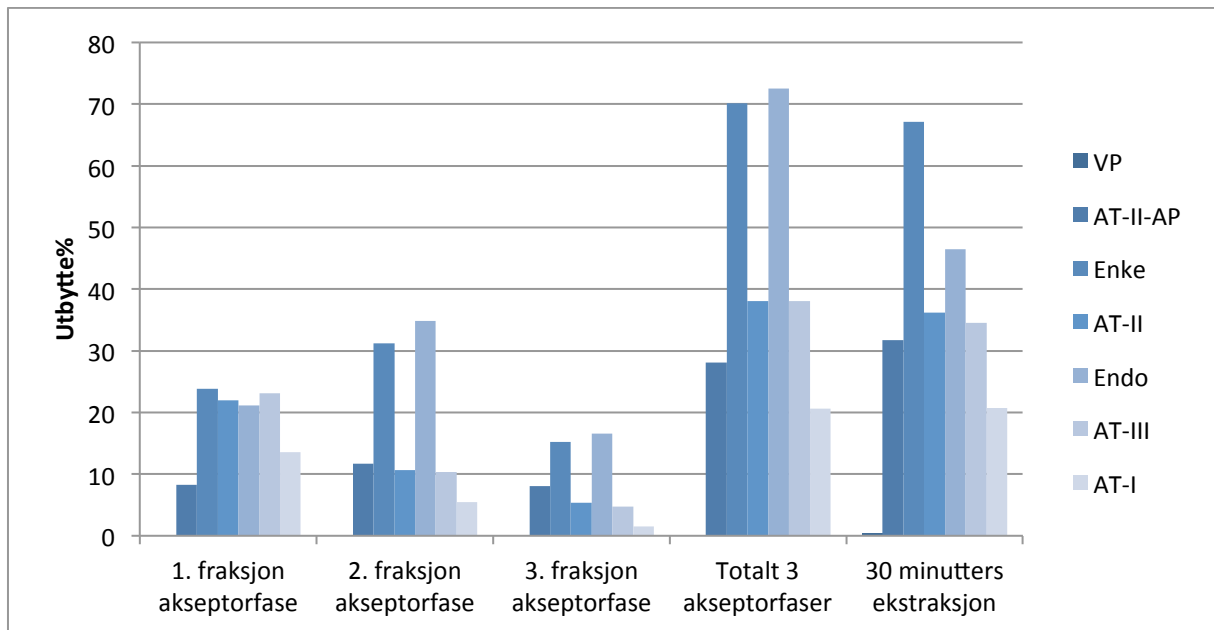
Ekstraksjonsutbyttene for oppsettene med kationer til stedet i donorfasen sammenliknet med vanlig donorfase med 1 mM HCl viser ingen signifikant forskjell på 95 % konfidensnivå. Det er imidlertid interessant å se at ekstraksjonsutbyttene ikke er signifikant redusert, fordi en mulighet var at kationene kunne blokkere for interaksjonen mellom peptid og transportmolekyl i overgangen mellom donor- og organisk fase og på den måten redusere transporten av peptidene over væskemembranen.

## 6.4. Bytte av akseptorfase i løpet av ekstraksjonen

Akseptorfase i EME er normalt den samme løsningen under hele ekstraksjonen. I EME-systemet er det lavt volum av akseptorfase og det er en mulighet at akseptorfase raskt blir mettet av modellpeptidene og at det er en årsak til de lave ekstraksjonsutbyttene. Derfor ble det utført et forsøk for å simulere *flow* av akseptorfase. Første fraksjon akseptorfase (25 µL 50 mM HCl) ble tilsatt som normalt og ekstraksjonen ble utført i 10 minutter, deretter ble hele akseptorfase tatt ut av hulfiberen og satt til analyse som normalt. En ny fraksjon akseptorfase (25 µL 50 mM HCl) ble tilsatt det samme systemet og ekstrahert i nye 10 minutter. Den andre akseptorfase ble tatt ut og satt til analyse som vanlig. Dette ble også

gjort for en tredje fraksjon akseptorfase (25  $\mu$ L 50 mM HCl), og resultatet ble en total ekstraksjonstid på 30 minutter, men med tre forskjellige fraksjoner av samme akseptorfase.

Til sammenlikning med denne prosedyren, ble det kjørt vanlig ekstraksjonsoppsett med kun én fraksjon akseptorfase (25  $\mu$ L 50 mM HCl) i 30 minutter. Figur 9 viser utbyttene med disse to ulike oppsettene.



Figur 9. Prosentvis utbytte av tre akseptorfaser hver for seg og totalt sammenliknet med 30 minutter ekstraksjon. Spenning: 10 V, organisk fase: 90 % 2-nonanon og 10 % TDP.

Ekstraksjonsutbyttene for de to oppsettene viser ingen signifikant forskjell på 95 % konfidensnivå, med unntak av Endo som viser signifikant forskjell. Figur 9 viser at ekstraksjonsutbyttet for Endo er høyere for oppsettet med 3 ulike fraksjoner akseptorfase.

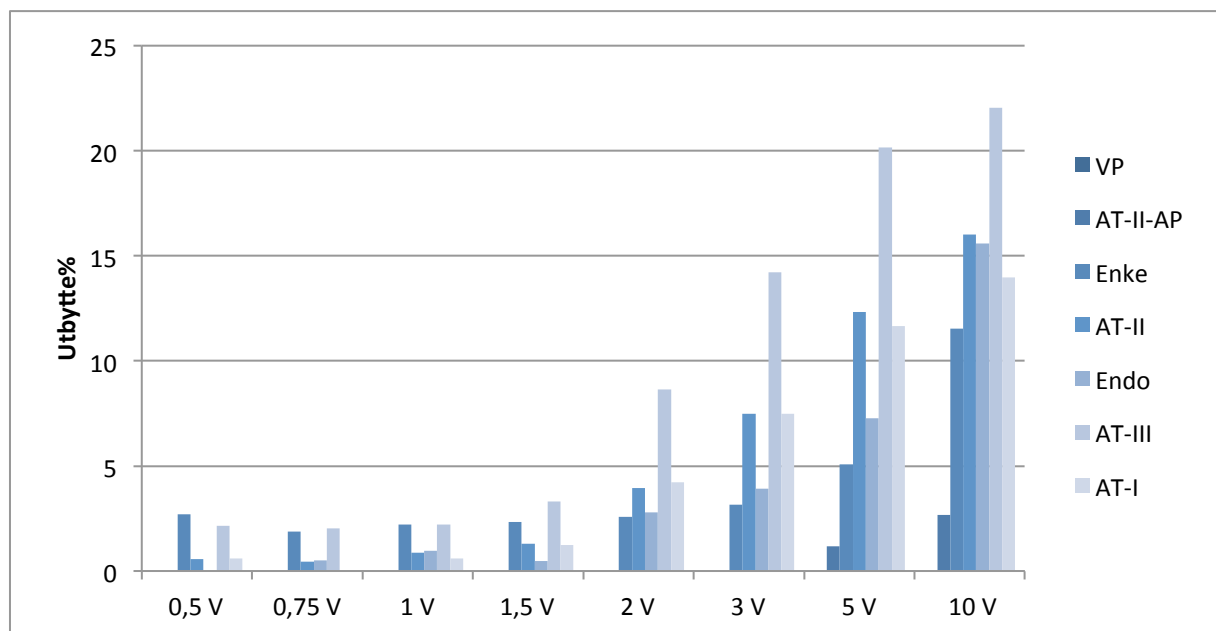
Hypotesen om at det foregår metning av peptider i akseptorfase viser seg å ikke stemme, da ekstraksjonsutbyttene holder seg relativt like selv med simulert *flow* i systemet.

## 6.5. Forsøk med lave spenninger

Modellpeptidene i dette arbeidet er av ulik størrelse med lengder på 4-10 aminosyrer, og oppfører seg derfor ulik i EME-systemet. De større peptidene trenger sannsynligvis høyere påsatt spenning for å ekstraheres fra donor- til akseptorfase, og dersom man ved å variere

spenning på lave nivåer kan skape selektivitet i systemet ved å utelukke ekstraksjon av de større peptidene, kan dette være interessant. Det ble derfor forsøkt med påsatte spenninger så lave som 0,5 V og opp til 10 V. Figur 10 viser utbyttene av peptidene da det ble anvendt normal ekstraksjonsprosedyre, men med varierende spenning.

Det ble også gjort forsøk med 25 V påsatt spenning, men det viste seg at dette gjorde systemet veldig ustabil på grunn av dannelse av gassbobler som følge av elektrolyse i akseptorfasen.



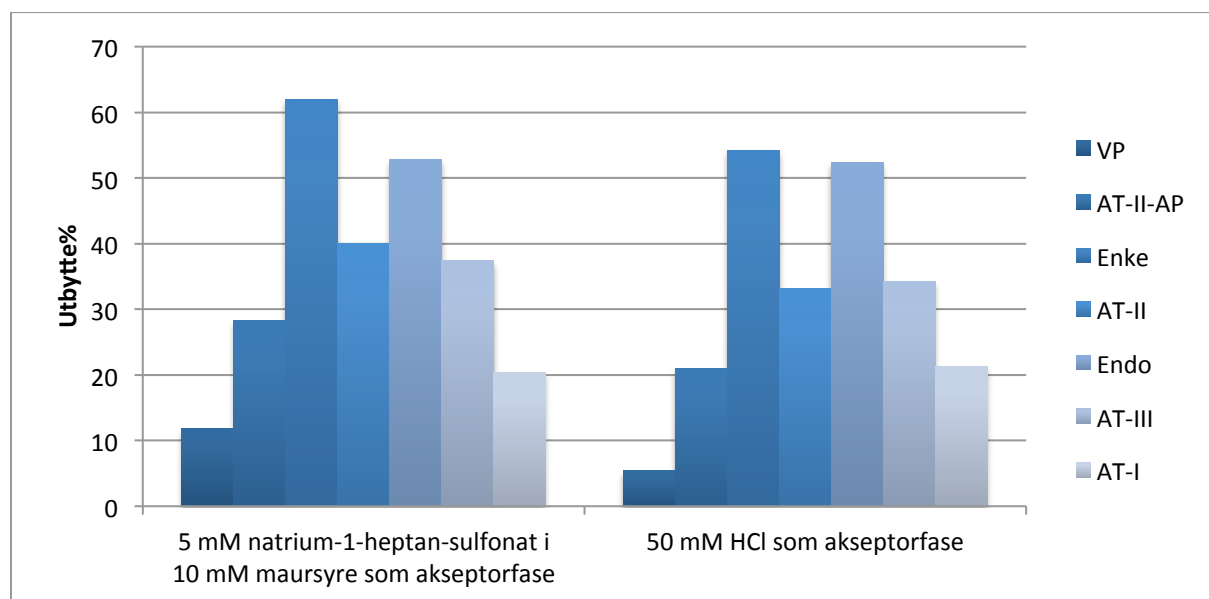
**Figur 10. Prosentvis utbytte med lave spenninger.**  
Ekstraksjonstid: 5 minutter, organisk fase: 55 % 1-oktanol, 35 % diisobutylketon og 10 % DEHP.

Figur 10 viser tydelig at man ved økt spenning får økt ekstraksjonsutbytte av peptider, i tillegg til at flere peptider ekstraheres ved økt påsatt spenning. Likevel ser det ikke ut til at noen klar selektivitet genereres ved lave påsatte spenning. VP, som er modellpeptidet med høyest molekylvekt, ekstraheres ikke ved noen av spenningene. VP har i alle utførte forsøk vist varierende ekstraksjonsutbytter, noe som kan skyldes at ekstraksjon over væskemembranen er mer problematisk på grunn av størrelsen av peptidet. Med unntak av dette, er det ingen klar selektivitetstrend i systemet.

## 6.6. Forsøk med ulik akseptorfase

I tidligere arbeid har hovedsakelig HCl blitt benyttet som akseptorfase, og i alle de foregående forsøkene i denne oppgaven er det brukt 50 mM HCl. Det er viktig at pH er i et område som gjør at analyttene er ionisert, og i dette arbeidet er det viktig at pH er justert slik at peptidene er netto positivt ladet og dermed blir trukket mot den negative elektroden (katoden) i akseptorfase.

For å undersøke om bruk av en annen type akseptorfase kan øke ekstraksjonsutbyttene i dette systemet, ble 5 mM natrium-1-heptan-sulfonat ( $C_7H_{15}NaO_3S$ ) og 10 mM maursyre (samme løsning som brukt i mobilfase A med unntak av ACN) testet som akseptorfase (figur 11). Det er kjent at  $C_7H_{15}NaO_3S$  danner ionpar med peptidene i HPLC og med bakgrunn i dette, var hypotesen at  $C_7H_{15}NaO_3S$  i akseptorfase vil kunne bryte interaksjonen peptidene har med transportmolekylet og trekke peptidene over i akseptorfase ved å danne ionpar med peptidene.



Figur 11. Ekstraksjonsutbytte med to forskjellige akseptorfaser.  
Spenning: 10 V, ekstraksjonstid: 20 minutter, organisk fase: 90 % 2-nonanon og 10 % TDP.

Ekstraksjonsutbyttene med den nye akseptorfase viser ingen signifikant forskjell på 95 % konfidensnivå sammenliknet med 50 mM HCl som akseptorfase. Dette forsøket viser derfor at ekstraksjonsutbyttene ikke blir økt ved å tilsette ionparreagens til akseptorfase.

## 6.7. Ekstraksjoner med ulik pH i donorfasen

Peptider er relativt store og komplekse molekyler i tillegg til at de er zwitterioner (de kan bli både positivt og negativt ionisert). De sju modellpeptidene har ulikt isoelektrisk punkt (pI-verdi) [25], noe som betyr at ved den bestemte pH-verdien vil peptidet ha en netto ladning på 0 (tabell 8). Ved pH-verdier over pI-verdien vil peptidene være netto negativt ladet, mens ved pH-verdier under pI-verdien vil peptidene være netto positivt ladet.

Tabell 8. Oversikt over peptidenes pI-verdier.

Peptid	AT-I	AT-II	AT-III	AT-II-2	Endo	Enke	VP
pI-verdi	7,91	7,76	9,84	5,13	5,93	5,93	8,28

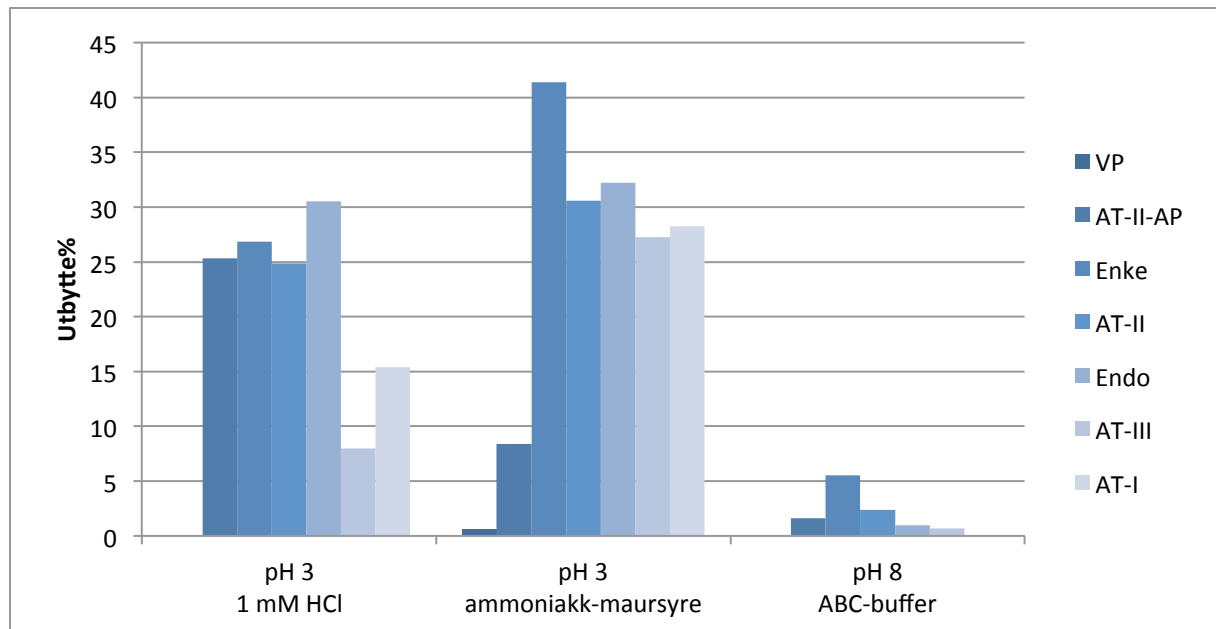
Som følge av dette vil peptidene være ulikt ionisert ved ulike pH-verdier. Ionisering av analytt er som tidligere nevnt en viktig faktor for migrasjon i EME. I det neste forsøket ble det derfor studert ulike pH-verdier i donorfasen, hypotesen her var at man kan skape selektivitet i systemet ved at man utelukker ekstraksjon av visse peptider ved bestemte pH-verdier fordi ladningen slukkes eller peptidene er negativt ladet slik at tiltrekkingen til den negative elektroden i akseptorfasen er redusert.

I forkant av dette forsøket ble det utført strømmålingsforsøk av ekstraksjonene fordi det er ønskelig med lav strøm i EME-systemet. Målingene ble utført på ekstraksjoner uten peptider til stede i donorfasen. Donorfasene som ble anvendt var ammoniakk-maursyre-buffer med pH 3, sitronsyre-natriumcitrat-buffer med pH 5, tris-buffer med pH 7,4 og ABC-buffer med pH 8. Alle bufferene ble testet med tre organiske faser: 90 % 2-nonanon og 10 % TDP, 55 % 1-oktanol, 35 % diisobutylketon og 10 % DEHP og 55 % 2-nonanon, 35 % diisobutylketon og 10 % TDP. Strømnivåene i systemet ble målt ved at spenningskilden ble koblet til en datamaskin med programvare for måling av strøm. Fra disse 12 forsøkene ble det gått videre med de oppsettene hvor strømmålingene holdt seg relativt stabile og under 350  $\mu$ A. Dette er ønskelig fordi tidligere forsøk har vist at 350  $\mu$ A er nærme øvre grense for et stabilt system [7].

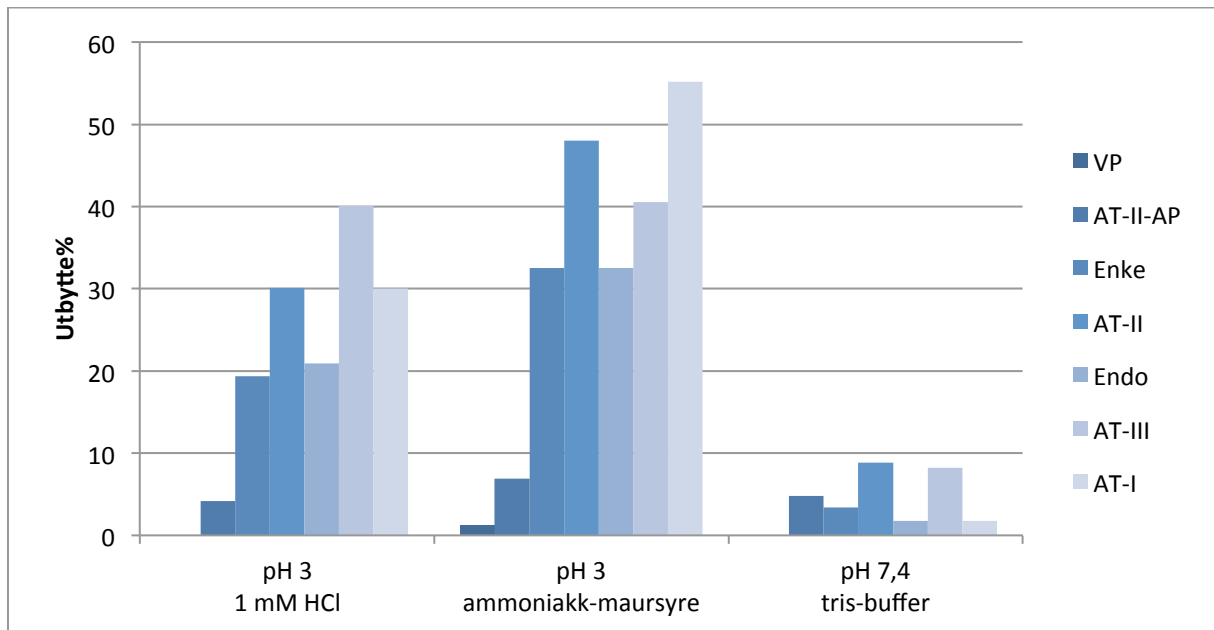
De oppsettene som viste tilfredsstillende strømmålinger var:

- 90 % 2-nonanon og 10 % TDP i kombinasjon med ammoniakk-maursyre-buffer og ABC-buffer
- 55 % 1-oktanol, 35 % diisobutylketon og 10 % DEHP i kombinasjon med ammoniakk-maursyre-buffer og tris-buffer
- 55 % 2-nonanon, 35 % diisobutylketon og 10 % TDP i kombinasjon med ammoniakk-maursyre-buffer, sitronsyre-natriumcitrat-buffer og ABC-buffer.

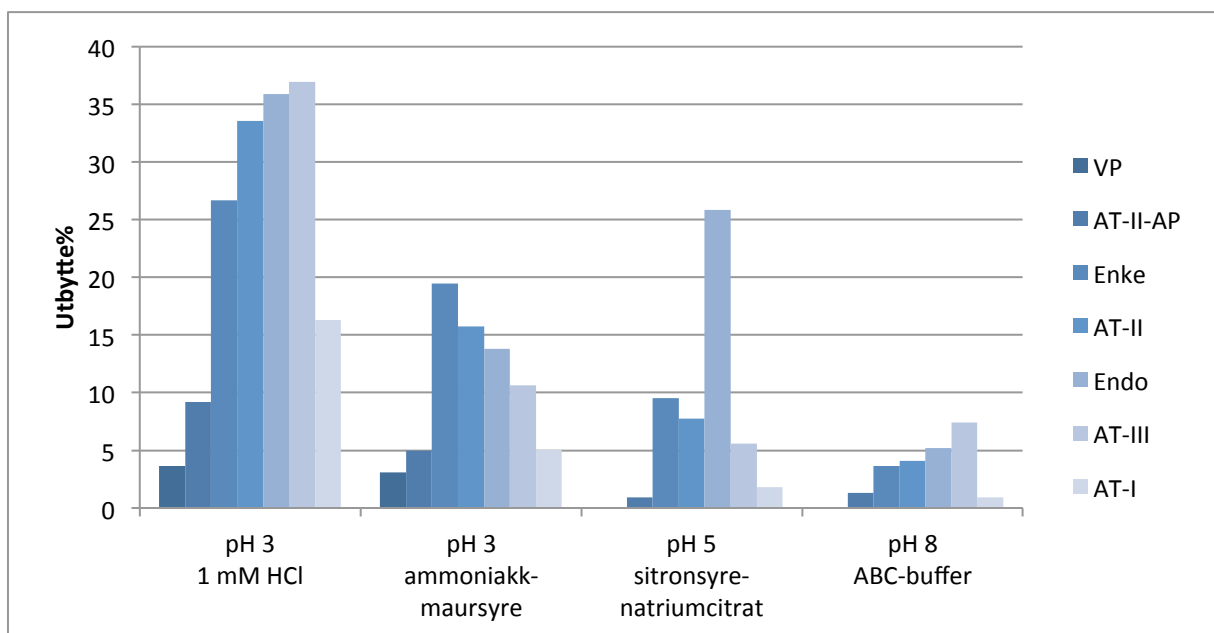
Ekstraksjoner med disse oppsettene ble deretter utført med vanlig ekstraksjonsprosedyre og sammenliknet med 1 mM HCl i donorfasen (figur 12, 13 og 14).



**Figur 12. Ekstraksjoner med ulik pH og organisk fase: 90 % 2-nonanon og 10 % TDP. Spenning: 10 V, ekstraksjonstid: 10 minutter.**



Figur 13. Ekstraksjon med ulik pH og organisk fase: 55 % 1-oktanol, 35 % diisobutylketon og 10 % DEHP. Spenning: 10 V, ekstraksjonstid: 10 minutter.



Figur 14. Ekstraksjoner med ulik pH med organisk fase: 55 % 2-nonanon, 35 % diisobutylketon og 10 % TDP. Spenning: 10 V, ekstraksjonstid: 10 minutter.

Ekstraksjonsoppsettene som viser lovende resultater er ammoniakk-maursyre-buffer med pH 3 i kombinasjon med organisk fase 90 % 2-nonanon og 10 % TDP og 55 % 1-oktanol, 35 % diisobutylketon og 10 % DEHP. Her er pH lik som i det normale ekstraksjonsoppsettet, og gir derfor ingen endring i netto ladning av peptidene. Ekstraksjonsutbyttene med 90 % 2-



nonanon og 10 % TDP viser ingen signifikant forskjell på 95 % konfidensnivå sammenliknet med 1 mM HCl med unntak av AT-II-AP. Figur 12 viser at ekstraksjonsutbyttet for AT-II-AP er høyere for pH 3 1 mM HCl sammenliknet med pH 3 ammoniakk-maursyre. T-test ble ikke utført for ekstraksjonene med organisk fase 55 % 1-oktanol, 35 % diisobutylketon og 10 % DEHP grunnet for lite data.

De resterende ekstraksjonsoppsettene viser ikke positiv forandring i ekstraksjonsutbytte. Ekstraksjonsoppsettet med sitronsyre-natriumcitrat-buffer med pH 5 i kombinasjon med 55 % 2-nonanon, 35 % diisobutylketon og 10 % TDP viser derimot tegn til selektivitet ved at ekstraksjonsutbyttet for Endo er en god del høyere enn for de andre peptidene, men viser ikke signifikant forskjell på 95 % konfidensnivå sammenliknet med 1 mM HCl i donorfasen. pI-verdien for Endo er 5,93 og peptidet vil derfor være netto negativt ladet. De resterende peptidene har også pI-verdi over 5, det er derfor ikke mulig å forklare det høye ekstraksjonsutbyttet for Endo sammenliknet med de andre peptidene i oppsettet ut ifra pI-verdiene alene.

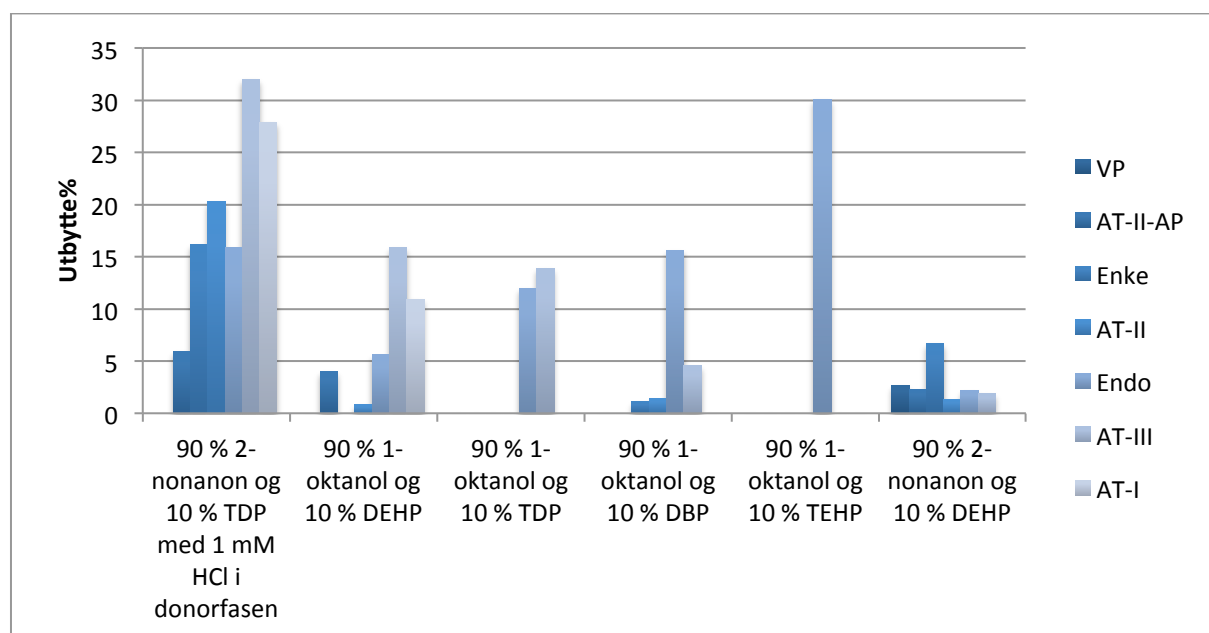
For ekstraksjonsoppsettet med ABC-buffer med pH 8 i kombinasjon med 90 % 2-nonanon og 10 % TDP, blir ikke VP og AT-I detektert i akseptorfasen. VP og AT-I har pI-verdier relativt nærme pH 8, henholdsvis 8,28 og 7,91, og med unntak av AT-III (pI-verdi 9,84) er disse pI-verdiene høyest av modellpeptidene. AT-III blir derimot detektert i akseptorfasen, disse funnene kan derfor ikke forklares med bakgrunn i pI-verdier alene.

Det ser ut til at netto ladning av peptidene ikke er hovedårsaken til ekstraksjon i EME. Peptidene blir ekstrahert selv om deres netto ladning ifølge pI-verdien er rundt 0 og til og med når den er netto negativ. Dette tilsier at peptidenes likevektsfordeling inn i organisk fase også spiller en rolle i ekstraksjonene. I alle forsøkene ble det benyttet 50 mM HCl som akseptorfase, noe som gjør at peptidene vil få tilbake sin netto positive ladning i overgangen mellom organisk fase og akseptorfase. Dette vil trekke dem mot den negative elektroden og de vil bli detektert i akseptorfasen.

## 6.8. Forsøk med fysiologisk pH i donorfasen

I bioanalyse er det viktig med prøveopparbeidelsesteknikker som egner seg for biologiske prøver som serum, plasma og fullblod. Disse prøvene har pH-verdi rundt 7,4 og for å teste om EME av peptider kan utføres på prøver med pH 7,4 i donorfasen, ble det utført et forsøk med flere ulike organiske faser og med pH 7,4 i donorfasen.

Siden tris-buffer med pH 7,4 i forrige avsnitt ikke viste lovende resultater, ble det i dette forsøket benyttet fosfatbuffer med pH 7,4 som donorfase.



Figur 15. Prosentvis utbytte for ulike organiske faser med pH 7,4 i donorfasen. Spenning: 10 V, ekstraksjonstid: 5 minutter.

Som man ser ut ifra figur 15, varierer antallet peptider som transporteres over i akseptorfase og utbyttene av disse mye i forhold til type organisk fase. 90 % 1-oktanol og 10 % TEHP viser en viss selektivitet ved at denne organiske fasen kun ekstraherer Endo, men ekstraksjonsutbyttet er ikke signifikant forskjellig på 95 % konfidensnivå sammenliknet med 90 % 1-nonanon og 10 % TDP med 1 mM HCl i donorfasen.

Dette forsøket viser at EME av peptider fra donorfase med fysiologisk pH er mulig.

## 7. Konklusjon

Ved å utføre forsøk som omfatter ekstraksjoner med forskjellige sammensetninger av organiske faser i væskemembranen, forsøk med ulik ekstraksjonstid på opp til 45 og 75 minutter, tilsetning av konkurrerende kationer i donorfasen, endring av akseptorfase underveis i ekstraksjonen, forsøk med ulik påsatt spenning, forsøk med ulik akseptorfase og forsøk med ulik pH i donorfasen, har man sett at ekstraksjonsutbyttene av modellpeptidene ved hjelp av elektromembranekstraksjon har blitt økt ved lengre ekstraksjonstider og for mange peptider nås *steady-state* etter 20 minutters ekstraksjon.

En del interessante og lovende resultater er observert ved å anvende ulike pH-verdier i donorfasen under ekstraksjonene, hvor tegn til selektivitet i visse tilfeller er observert. Det er imidlertid ikke funnet en klar årsak til dette, men sammenhengen mellom pI-verdien til det enkelte peptidet og pH i donorfase er foreslått i denne oppgaven som en bidragsyter til dette. I tillegg er det i dette arbeidet bevist at elektromembranekstraksjon av peptider er mulig fra prøver med fysiologisk pH.

Arbeidet i denne masteroppgaven har resultert i økt forståelse for ekstraksjonskinetikken under elektromembranekstraksjon av peptider.

## 8. Referanseliste

1. Ramos, L., *Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques*. Journal of chromatography. A, 2012. **1221**: s. 84-98.
2. Kumar, A., et al., *Analysis of biological samples using solid-phase microextraction*. Bioanalytical Reviews, 2009. **1**(1): s. 35-55.
3. Pawliszyn, J. og Pedersen-Bjergaard, S., *Analytical microextraction: current status and future trends*. Journal of chromatographic science, 2006. **44**(6): s. 291-307.
4. Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K. E., *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. Analytical chemistry, 1999. **71**(14): s. 2650-6.
5. Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K. E., *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. New concept for rapid sample preparation of biological fluids*. Journal of chromatography. A, 2006. **1109**(2): s. 183-90.
6. Balchen, M., et al., *Rapid isolation of angiotensin peptides from plasma by electromembrane extraction*. Journal of chromatography. A, 2009. **1216**(41): s. 6900-5.
7. Balchen, M., et al., *Potential-driven peptide extractions across supported liquid membranes: investigation of principal operational parameters*. Journal of separation science, 2010. **33**(11): s. 1665-72.
8. Balchen, M., Reubsaet, L. og Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane extraction of peptides*. Journal of chromatography. A, 2008. **1194**(2): s. 143-9.
9. Balchen, M., et al., *Fast, selective, and sensitive analysis of low-abundance peptides in human plasma by electromembrane extraction*. Analytica chimica acta, 2012. **716**: s. 16-23.
10. Balchen, M., et al., *Fundamental studies on the electrokinetic transfer of net cationic peptides across supported liquid membranes*. Journal of separation science, 2011. **34**(2): s. 186-95.
11. Seip, K. F., et al., *Electromembrane extraction of peptides--fundamental studies on the supported liquid membrane*. Journal of separation science, 2011. **34**(23): s. 3410-7.
12. Petersen, N. J., et al., *Electromembrane extraction from biological fluids*. Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry, 2011. **27**(10): s. 965-72.
13. Balchen, M., et al., *Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane*. Journal of chromatography. A, 2007. **1152**(1-2): s. 220-5.

14. Rezazadeh, M., Yamini, Y. og Seidi, S., *Electromembrane extraction of trace amounts of naltrexone and nalmefene from untreated biological fluids*. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 2011. **879**(15-16): s. 1143-8.
15. Jamt, R. E., et al., *Electromembrane extraction of stimulating drugs from undiluted whole blood*. Journal of chromatography. A, 2011.
16. Payan, M. R., et al., *Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples*. Talanta, 2011. **85**(1): s. 394-9.
17. Kuban, P., et al., *Electromembrane extraction of heavy metal cations followed by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection*. Electrophoresis, 2011. **32**(9): s. 1025-32.
18. Strieglerova, L., Kuban, P. og Bocek, P., *Electromembrane extraction of amino acids from body fluids followed by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection*. Journal of chromatography. A, 2011. **1218**(37): s. 6248-55.
19. Sand, O., et al., *Menneskets fysiologi*. 1. utgave 2007, Oslo, Norge: Gyldendal Akademisk. 600.
20. Sewald, N. og Jakubke, H.-D., *Peptides: Chemistry and Biology*. 2. utgave 2009, Weinheim, Tyskland: Wiley-VCH. 578.
21. Moore, G. J., Ganter, R. C. og Franklin, K. J., *Angiotensin 'antipeptides': (-)messenger RNA complementary to human angiotensin II (+)messenger RNA encodes an angiotensin receptor antagonist*. Biochemical and biophysical research communications, 1989. **160**(3): s. 1387-91.
22. Gjelstad, A., Rasmussen, K. E. og Pedersen-Bjergaard, S., *Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst-Planck equation*. Journal of chromatography. A, 2007. **1174**(1-2): s. 104-11.
23. Kjelsen, I. J., et al., *Low-voltage electromembrane extraction of basic drugs from biological samples*. Journal of chromatography. A, 2008. **1180**(1-2): s. 1-9.
24. Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K. E., *Legemiddelanalyse 2004*, Bergen, Norge: Fagbokforlaget. 498.
25. Peptide property calculator. [24.04.12]; Tilgjengelig fra: <http://innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>.