

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN MASTER I FARMASI

Væskefasemikroekstraksjon av peptider

Sara Dehestani



Faggruppen for legemiddelanalyse,

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi,

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Vår 2012

Væskefasemikroekstraksjon av peptider

Sara Dehestani



Masteroppgaven ble gjennomført ved avdeling for legemiddelanalyse, Farmasøytisk institutt ved Universitetet i Oslo i perioden januar 2011 til mai 2012

Veiledere:

Professor Stig Pedersen-Bjergaard, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Post doktor Astrid Gjelstad, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Stipendiat Knut Fredrik Seip, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

FORORD

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til mine veiledere professor Stig Pedersen-Bjergaard, doktor Astrid Gjelstad og stipendiat Knut Fredrik Seip for en enestående veiledning og oppfølging gjennom hele oppgaven. Dere har motivert og oppmuntret meg gjennom hele prosessen og har vært uvurderlig hjelpelige.

Jeg vil også gjerne takke stipendiat Lars Erik Eibak for stor hjelp både med det faglig og det praktiske. Takk for at du alltid var tilgjengelig når jeg trengte hjelp.

Tusen takk til alle ansatte på legemiddelanalyse avdelingen og hovedfagstudentene for et godt og trivelig arbeidsmiljø.

En stor takk til Aisha, Shabana, Zeshan, Klara, Lene og Shirin for støtte, oppmuntring og en uforglemmelig studietid.

Jeg vil videre rette en stor takk til foreldrene mine som har støttet og inspirert meg gjennom hele farmasi utdanningen. Til slutt stor takk til broren min for all støtte og omsørg gjennom studien.

Oslo, Mai 2012

Sara Dehestani

INNHALDSFORTEGNELSE

1. SAMMENDRAG	5
2. FORKORTELSER.....	7
3. INNLEDNING	9
3.1. BAKGRUNN	9
3.2. FORMÅL	11
4. TEORI.....	12
4.1. PEPTIDER.....	12
4.2. BIOLOGISK UTBREDELSE, FUNKSJON OG STRUKTUR.....	13
4.2.1. ANGIOTENSIN I-II-III	15
4.2.2. ANGIOTENSIN II-AP	16
4.2.3. VASOPRESSIN	16
4.2.4. ENDOMORFIN	17
4.2.5. ENKEFALIN	17
4.3. VÆSKEKROMATOGRAFI, HPLC.....	18
4.4. VÆSKEFASEMİKROEKSTRAKSJON, LPME	19
4.4.1. Væskefasemikroekstraksjon av peptider	21
5. MATERIALER OG METODE	23
5.1. UTSTYR, KJEMIKALIER OG PEPTIDER	23
5.2. TILAGING AV LØSNINGER	26
5.2.1. Peptidløsninger	26
5.2.2. Mobilfaser	26
5.2.3. Bufferløsninger	26
5.3. HPLC-metode	28
5.4. LPME	30
5.4.1. Prøveopparbeidelse	30
5.4.2. Donorfase	31
5.4.3. pH i donorfase.....	31
5.4.4. pH i akseptorfase	32

5.4.5. Test av ionpardannere	32
5.4.6. Fargeindikator som ionpardanner	34
5.4.7. Kombinasjon av ionpardannere	34
5.4.8. Valg av organisk fase.....	34
5.5. PLASMAPRØVER	35
5.5.1. LPME i plasma	35
5.5.2. Plasma forsøk.....	36
5.6. UTBYTTE	37
6. RESULTATER OG DISKUSJON.....	38
6.1. LPME.....	38
6.1.1. Ionpardanner	38
6.1.2. Ionpardanner i organisk fase	39
6.1.3. pH i donorfase.....	39
6.1.4. pH i akseptorfase	43
6.1.5. Test av ionpardannere.....	44
6.1.6. Fargeindikator som ionpardanner	48
6.1.7. Kombinasjon av ionpardannere	50
6.1.8. Valg av organisk fase.....	52
6.1.9. Ekstraksjonstid	54
6.2. PLASMAPRØVER	56
6.2.1. LPME i plasma	56
6.2.2. Plasma forsøk.....	56
7. KONKLUSJON.....	58
8. REFERANSELISTE.....	60

1 SAMMENDRAG

I denne oppgaven ble væskefasemikroekstraksjon (LPME) testet som prøveopparbeidelsesmetode for ekstraksjon av peptidene angiotensin I, II, III, angiotensin, II-antipeptid, vasopressin, endomorfin og enkefalin. Peptidenes egenskaper under ulike ekstraksjonsparametere ble studert og ekstraksjonsmetoden ble optimalisert. For å analysere prøvene ble det utviklet en HPLC-metode med gradienteluering der mobilfasesammensetningen bestod av acetonitril, vann, maursyre og 1-heptansulfonsyre. Det ble benyttet UV-detektor og C18 kolonne for deteksjon og separering av peptidene.

Peptidene ble ekstrahert fra en vandig donorløsning med et volum på 1 ml, gjennom en porøs hulfiber impregnert med organisk løsningsmiddel og ionpardanner, over i en 12 µl sur vandig akseptorløsning injisert inn i fiberens hulrom. Det ble benyttet ionparmediert-LPME i ekstraksjonene, med ionpardanner tilsatt til den organiske fasen. Denne teknikken ble utprøvd som ekstraksjonsmetode av peptider for første gang i denne oppgaven. Resultatene viste at ionpardanner tilsatt til organisk fase var like effektivt som ekstraksjoner utført med ionpardanner i donorfasen. Det ble i tillegg utført forsøk som beviste at ekstraksjonen var fullstendig avhengig av en ionpardanner.

Ulike ionpardannere, løst i ulike organiske løsningsmidler ble testet i oppgaven. Di(2-etylheksyl)fosfat (DEHP) og fargeindikatoren bromtymolblått ga de høyeste utbyttene i forsøkene. (Tridecylfosfat /TDP og bromfenolblått ga i tillegg brukbare utbytteresultater). Det ble eksperimentert med ulike organiske løsningsmidler som ketoner, alkoholer, etere som mulige organiske faser. 1-oktanol og 2-oktanon og diisobutylketon ga de beste utbytteresultatene i oppgaven. Det ble i tillegg gjort eksperimenter med ulike konsentrasjoner av ionpardanner i organisk løsning. Konsentrasjonene var mellom 5-20 % DEHP(Di(2-etylheksyl)fosfat) i 1-oktanol. Det viste seg at ekstraksjonsutbyttene reduseres betydelig ved økende konsentrasjon av ionpardanner. De høyeste utbyttene var observert med 10% DEHP(Di(2-etylheksyl)fosfat).

Væskefasemikroekstraksjon av peptider er som kjent avhengig av pH og utbytteresultatene endrer seg ved endringer i pH. I oppgaven var det stort fokus på å undersøke peptidenes oppførsel ved pH-endringer i donor- og akseptorfase. De høyeste utbyttene ble observert ved pH~1 i akseptorfase og pH~3 i donorfase. Det ble også vist at utbytteresultatene for 5 av 7 peptidene økte ved økt ekstraksjonstid.

De høyeste utbytteverdiene for peptidene under optimale forhold var 80% angiotensin III, 70% for angiotensin I, II og angiotensin II-AP, 20% for vasopressin, enkefalin og endomorfin.

Den optimaliserte metoden med de beste ekstraksjonsforholdene ble testet ut på plasmaprøver. Prøveløsningene med plasma hadde ulike pH-verdier. Det ble utført ekstraksjoner med rent plasma (pH ~ 8), fortynt plasma med destillert vann (pH ~7), surgjort plasma med HCl (med pH 3,5 og 4,0). Utbytteverdiene for 5 av 7 peptidene var rundt 10% ved pH 3,5 mens utbyttene gikk ned til 6-7 % ved økt pH (pH 4,0).

Ionpar-mediert LPME, der ionpardanner er løst i væskemembranen (organiske fasen) er som nevnt ikke blitt brukt før i forbindelse med ekstraksjon av peptider fra plasma. Det kreves mer forskning og flere eksperimenter for å optimalisere metoden ved ekstraksjon fra plasmaprøver.

2 FORKORTELSER

HPLC Væskekromatografi (High performance liquid chromatography)

LC-MS Væskekromatografi-massespektrometri (Liquid chromatography-Mass spectrometry)

LPME Væskefase mikroekstraksjon (Liquid phase microextraction)

UV-detektor Ultrafiolett-detektor (Ultraviolet detector)

HCl Saltsyre

NH₃ Ammoniakk

H₃PO₄ Orto-fosforsyre

NaH₂PO₄ Natriumdihydrogenfosfat

Na₂HPO₄ Dinatriumhydrogenfosfat

CH₃COOH Eddiksyre

CH₃COONa Natriumacetat

ABC ammonium bicarbonate

HCOOH Maursyre

DEHP Di(2-etylheksyl)fosfat

TDP Tridecylfosfat

NPOE 2-Nitrofenyl oktyl eter

TEHP tris-(2-etylheksyl) fosfat

DBP Dibutyl fosfat

ATIII/AT3 Angiotensin 3

ATII/AT2 Angiotensin 2

ATI/AT1 Angiotensin 1

VP Vasopressin

AT II-AP Angiotensin-2-antipeptid

Endo/END Endomorfin

Enk/EK Enkefalin

LLE Liquid Liquid Extraction (Væske-væskeekstraksjon)

LPME Liquid Phase Micro Extraction (Væskefasemikroekstraksjon)

UV Ultrafiolett

rpm Revolutions per minute (Rotasjoner per minutt)

i.d. Indre diameter

ml Milliliter

μ l Mikroliter

g Gram

mg Milligram

μ g Mikrogram

Mw Molekylvekt (g/mol)

mm Millimeter

μ m Mikrometer

nm Nanometer

M Molar (mol/liter)

mM Millimolar

pI Isoelektrisk punkt

3 INNLEDNING

3.1 BAKGRUNN

Peptider og proteiner er nøkkelmolekyler i livsprosessen, og det er etterhvert blitt kjent at de igangsetter og opprettholder alle levende organismers aktivitet.

Det finnes mange viktige endogene peptider, som for eksempel peptidhormonene insulin og glukagon fra pankreas som regulerer glukosenivået i kroppen, kortikotropin fra adenohypofyse som stimulerer binyrebarken til frigjøring av kortisol ved infeksjoner, oksytosin som stimulerer sammentrekninger i livmoren under fødsel, vasopressin fra neurohypofysen som spiller en viktig rolle i regulering av vannutskillelsen i nyrene og angiotensiner fra blodplasma som har stor betydning for blodtrykket .

Peptider har de siste tiårene fått mye oppmerksomhet fra ulike retninger. De kan nå brukes som verktøy i diagnostikk, som biomarkører og legemiddelindustrien på den andre siden vist stor interesse, for eksempel innenfor utvikling av peptid legemidler. På grunn av den økte interessen for peptider og for å få bedre kjennskap til dem, forskes det stadig på nye analysemetoder av peptider.

Mange prøver fra biologisk materiale har en sammensatt innhold og kan ikke analyseres direkte. Analyse av slike prøver krever et forbehandlingstrinn der analyttene renses opp og oppkonsentreres fra biologisk matriks. Dette blir gjort for å fjerne stoffer som skaper problemer i analyseprosessen og for å oppkonsentrere analytter som har for lav konsentrasjon til å kunne detekteres av analyseapparatet. De to mest anvendte måter å isolere analytter på er væske-væske ekstraksjon (LLE) og fast-fase ekstraksjon (SPE). I LLE ekstraheres analyttene vanligvis fra en vandig prøveløsning til et organisk løsemiddel som ikke er blandbart med vann. Analyttene skal være mer løselig i den organiske fasen enn i prøveløsningen. I SPE på den andre siden, ekstraheres analyttene over til et fast stoff/sorbent. I denne metoden vil analyttene interagere med det faste materialet, mens forurensningene som har lav affinitet til det faste stoffet vaskes ut.

Søket etter automatisering av LLE, begrensning i forbruket av organiske løsemidler og reduksjon av prøveopparbeidelses tid har ført til utvikling av en ny ekstraksjonsmetode, væske-fase mikroekstraksjon (LPME). [1]

Hovedforskjellen mellom trefase LLE og trefase LPME er at i LLE vil analyttene samle seg i organisk fase og dampes til tørrhet for å deretter reløses i en akseptorløsning mens i LPME ekstraheres analyttene over i organisk fase som er impregnert i veggen til en hulfiber. Analyttene i hulfibermembranen ekstraheres videre over i akseptorløsning som er inne i fiberens hulrom.

I LPME blir analyttene ekstrahert fra et stor volum av prøveløsning til et mye mindre volum av akseptorløsning. Den store differansen i volum fører til høy oppkonsentrering av analyttene uten behov for fordamping og tilbakeekstraksjon. En annen fordel ved trefase LPME i forhold til tradisjonell LLE er den betydelige reduksjonen i løsemiddelforbruket.

LPME har vist seg å være en effektiv ekstraksjonsmetode av upolare forbindelser fra biologisk matriks som plasma. LPME har vært en foretrukket prøveopparbeidelsesmetode ettersom den gir høy oppkonsentrering av analytter i biologiske væsker som ofte inneholder små mengder med analytt. Den andre store fordelen er den gode opprensningen metoden gir av biologiske prøver. Ved å benytte LPME som ekstraksjonsmetode, unngår en å bruke mye tid på forarbeid og rensing av prøvematerialet.

Ionpar-mediert LPME er en ny teknikk som ble introdusert for å muliggjøre LPME av polare ioniserbare forbindelser, ettersom normal trefase LPME var mest egnet for upolare ioniserbare substanser [2]. Denne nye teknikken har etter hvert vist seg å være ganske effektiv i en rekke studier i forbindelse med ekstraksjon av polare legemidler, diverse peptider og små modellpeptider [3-5].

For å analysere ekstraktene fra LPME brukes det vanligvis væskrokromatografi HPLC (high performance liquid chromatograph). HPLC er kompatibel med LPME ettersom ekstraktene fra LPME er i vandig løsning og kan direkte analyseres/ injiseres i HPLC, uten å gjøre ekstra forberedende trinn. Væskrokromatografi er en velegnet analysemetode som i kombinasjon med UV-deteksjon gir veldig presise og nøyaktige målinger.

3.2 FORMÅL

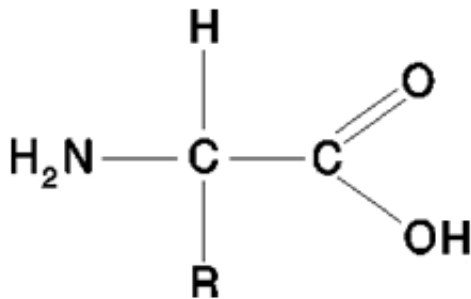
Målet med oppgaven var å utforske og utvikle ny ekstraksjonskjemi i forbindelse med væskefasemikroekstraksjon av peptider. Det skulle i en stor del av oppgaven være fokus på å eksperimentere med ionpar-mediert LPME av peptider, der ionpardanneren var impregnert i væskemembranen sammen med den organiske fasen. I utgangspunktet var det viktig å undersøke om dette nye konseptet var effektiv som prøveopparbeidelsesmetode for peptider ettersom dette ikke var kjent fra før.

Et utvalg av peptider med ulike funksjonelle grupper, molekylvekt og kjemiske strukturer ble brukt i oppgaven. Det var for å observere oppførselen til de forskjellige peptidene ved de ulike ekstraksjonsforholdene og eventuelle variasjoner i utbytteresultatene. Til analyse av de 7 involverte peptidene, (angiotensin I, II og III, angiotensin II-AP, vasopressin, enkefalin, endomorfin) var det nødvendig å utvikle en HPLC-metode. Det ble satt som mål å optimalisere prøveopparbeidelsen ved å eksperimentere og undersøke ulike ekstraksjonsforhold. Den optimaliserte ekstraksjonsmetoden skulle utprøves på plasmaprøver.

4 TEORI

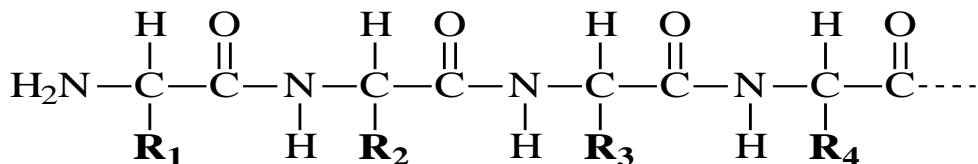
4.1. PEPTIDER

Peptider er oligomerer eller polymerer av aminosyrer bundet via amid-bindinger (peptidbindinger) mellom karboksyl-gruppen av en aminosyre og amino-gruppen til en annen aminosyre. Det finnes 22 forskjellige α -aminosyrer (inkludert den sekundære aminosyren Proline og de sjeldne aminosyrene Selenocysteine og Pyrrolisine). Grunnstrukturen til alle aminosyrer består av en karboksylgruppe og en aminogruppe, bundet til samme karbonatom. Det som skiller aminosyrene er egenskapen til sidekjeden "R" (figur 4-1)



Figur 4-1 Generell peptid grunnstruktur

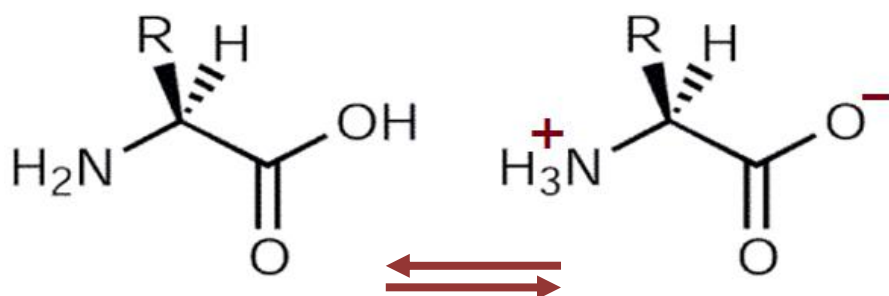
Ved kondensasjonreaksjoner mellom karboksylsyregruppen i en aminosyre og aminogruppen i en annen kan aminosyrene bindes sammen i uforgrenede kjeder. Disse bindingene kalles peptidbindinger og kjedene av aminosyrer kalles polypeptider (figur 4-2). Hvis antall aminosyrer er mindre enn 50 kalles de peptider og større en 50 for proteiner.



Figur 4-2 Generell struktur til et polypeptid

Aminosyrer blir klassifisert i forskjellige grupper basert på deres R-gruppe, spesielt deres polaritet eller tendens til å interagere med vann ved pH 7 (biologisk pH). Polariteten av R-gruppene varierer helt fra å være ikke-polar eller hydrofob (vann-uløselig) til polare eller

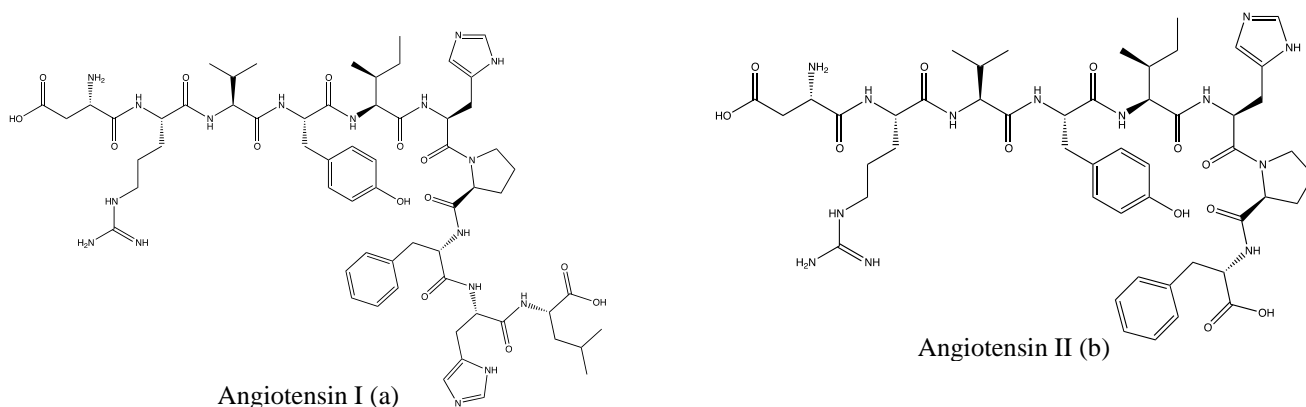
hydrofil (vann-løselig). Det er vanlig å dele R-gruppene innen de polare alifatiske, upolare uladete, aromatiske, positiv og negativ ladete. Alle aminosyrer har som nevnt en α -aminogruppe (C-terminal) med pKa rundt 9-10 og en α -karboksylsyre gruppe (N-terminal) med pKa rundt 2-2,5. En aminosyre i en nøytral løsning vil derfor hovedsakelig eksistere i zwitterionisk form (figur 4-3) og egenskapene til aminosyren vil derfor være pH-avhengig.

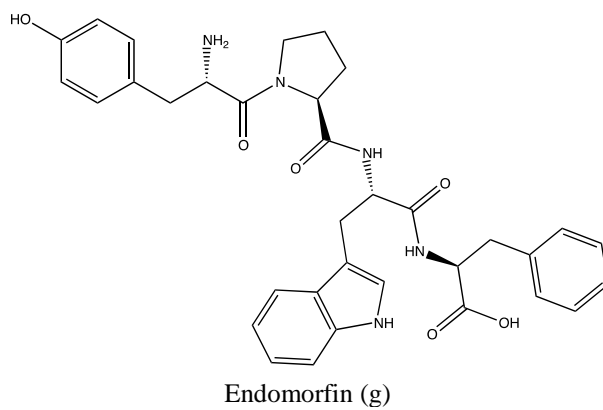
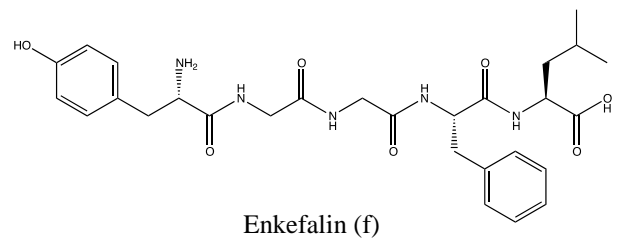
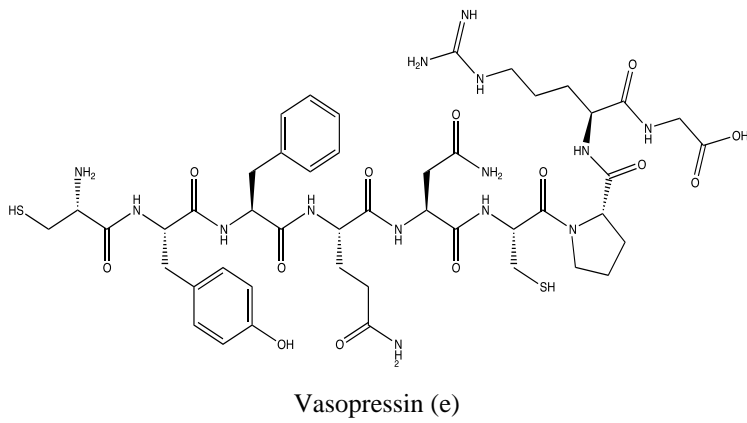
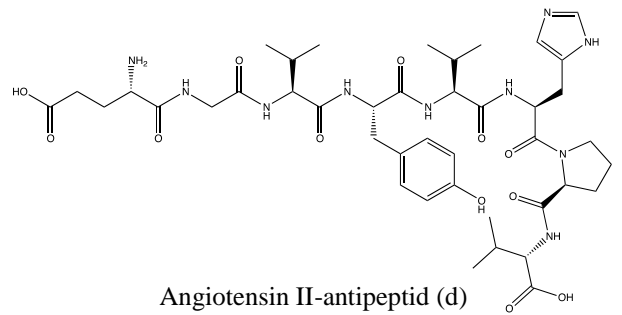
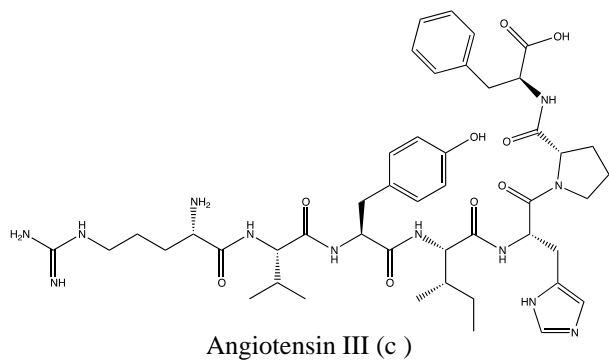


Figur 4-3 Aminosyre i zwitterionisk form

4.2. BIOLOGISK UTBREDELSE, FUNKSJON OG STRUKTUR

Kjemiske strukturer av peptidene i standardløsningen som ble brukt i oppgaven, er som vist i figur 4-4. Peptid blandingen bestod av angiotensin I (a), II (b), III (c), angiotensin II-antipeptid (d), vasopressin (e), enkefalin (f) og endomorfin (g).





Figur 4-4 Kjemiske strukturer til peptidene som var brukt i prøveløsningen

Peptid	Molekylvekt (g/mol)	Isoelektrisk punkt (pI) *
Angiotensin I	1296.47	6,9
Angiotensin II	1046.17	6,7
Angiotensin III	931.09	8,8
Vasopressin	1056.21	10,8
Enkefalin	555.62	5,5
Endomorfin	610.70	9,9
Angiotensin II-AP	899	5,1

Tabell 4-1 Molekylvekt til peptidene brukt i analysen

*. Referansene [22-24].

4.2.1. Angiotensin I, II og III

Angiotensiner er vevshormoner som er tilstedet i både det perifere og sentrale nervesystemet og har stor innvirkning på blodtrykket. Kilden til angiotensiner er angiotensinogen. Dette er et plasmaprotein som dannes i leveren og sirkulerer alltid i blodet og har ingen kjente biologiske funksjoner selv. Angiotensinogen blir i utgangspunktet spaltet av nyrens proteinspaltende enzym, renin, som gir den inaktive ATI (angiotensin I).

Renin blir produsert av spesialiserte glatte muskelceller i nyrenes glomeruli (på de tilførende arteriolene). AT II (angiotensin II), som er viktige peptider i renin-angiotensin systemet blir dannet ved en proteolytisk spaltning av AT I katalysert av ACE (angiotensin converting enzyme). ACE katalyserer konverteringen av inaktiv AT I til potent vasokonstriktur AT II som består av 8 aminosyrer. Sirkulerende AT II induserer vasokonstriksjon, stimulerer binyrebarkens aldosteron-produksjon, som igjen stimulerer reabsorpsjon av natrium som samtidig medfører reabsorpsjon av klorid og vann. Angiotensin spiller en nøkkelrolle i regulering av blodtrykket ved å kontrahere alle arteriolene i kroppen og motvirke fall i det arterielle blodtrykket. AT II er også kjent for å stimulere utskillelse av hormoner som prolaktin og veksthormon fra fremre delen av hypofysen. [12] Den stimulerer også tørstsenteret slik at en drikker mer.

AT III (angiotensin III) blir dannet ved spalting av AT II via aminopeptidase A. AT III fungerer som en sentral regulator av vasopressin-utskillelse og blodtrykket. [13,18].

4.2.2. Angiotensin II antipeptid (ANG II-AP)

Angiotensin II antipeptid er en type antipeptid. Antipeptider er egentlig bare aminosyresekvenser som genereres fra komplementær DNA. Angiotensin II-antipeptid er en (type 1) antagonist som hemmer den kontraktile funksjonen angiotensin II har på glatt muskulatur. Dette gjør de ved å binde seg til et negativ regulerende sete på angiotensin reseptoren som er atskilt fra angiotensins bindingssete. (Dette viser at det fins et inhiberende bindingssete på angiotensin reseptoren som sørger for binding mellom reseptoren og naturlig eksisterende inhibitorer). [12]

AT II antipeptid ser ut til å ha en viss indirekte effekt på muskelkontraktiliteten. Angiotensin II antipeptid er strukturmessig veldig lik angiotensin som demonstrert i figur 4-4.

4.2.3. Vasopressin (VP)

Vasopressin som også kalles antidiuretisk hormon (ADH) er syntetisert av magnocellulære celler i hjernens hypothalamus. VP forårsaker flere respons, både sentralt og perifert, den induserer for eksempel vannoppretholdelsen i nyrene, bidrar til regulering av osmotisk og kardiovaskulær homeostase. Vasopressin virker antidiuretisk, det vil si at den øker permeabiliteten for vann i distale tubuli og i samlerørene og fører til at mindre vann slippes ut med urinen. Ved lav sekresjon av vasopressin derimot, vil vannreabsorpsjonen bli redusert og kroppen taper mer vann (urinmengden øker). Høye doser av VP øker blodtrykket. VP mangel forårsaker diabetes insipidus.

De biologiske effektene av AVP (8-argininvasopressin) er mediert av tre G-protein koblede resepturer, subtyper V_{1a} (vaskulær), V_{1b} (pituitær), V_2 (renal).

4.2.4. Endomorfin (END)

Endomorfiner blir isolert fra hjernen og viser høyest affinitet og selektivitet for μ -opioid reseptorer blant alle de kjente endogene opiatene. Endomorfiner gjenspeiler deres endogene funksjoner i mange viktige, omfattende fysiologiske prosesser, inkludert sansning av smerter, responser relatert til stress og komplekse funksjoner i hjernens belønningscenter og andre funksjoner i det autonome nervesystemet, kognitive og neuroendokrint.

Det fins 2 type endomorfiner, endomorfin-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) og endomorfin-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂). Endomorfin-2 er mer tilstede i ryggmargen og nedre del av hjernestammen, mens endomorfin-1 er mer og tett utbredt i hele hjernen (i forhold til endomorfin-2)

4.2.5. Enkefalin (ENK/EK)

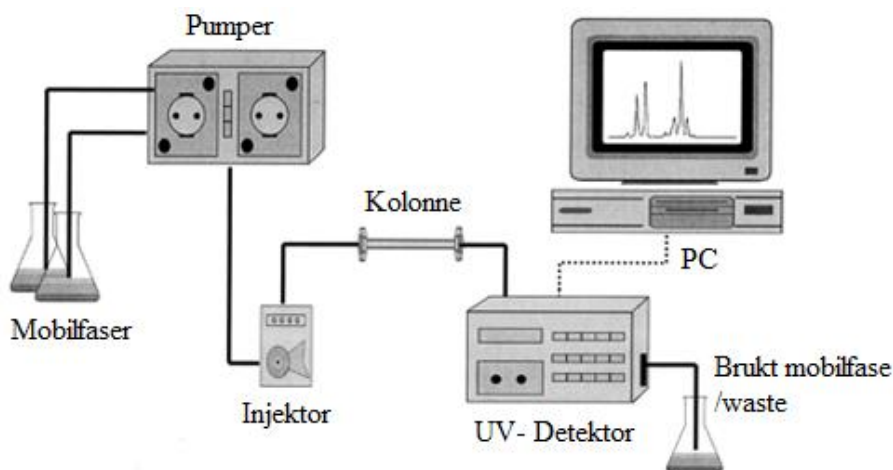
Enkefaliner produseres i hippocampus i hjernebarken og bindes som fysiologiske agonister til opioidreseptorer i hjernen og tilhører samme stoffgruppe som opium og morfin. Enkefaliner er naturlig tilstedet i hjernen og virker som endogene ligander for μ , κ , δ (mu, kappa, og delta) opioidreseptorene.

Metionin enkefalin (Met-enkefalin) og leucin enkefalin (Leu-enkefalin) er to kjente enkefaliner som viser sterk antinociceptiv effekt *in-vivo*, og er sammenlignbare med de av mest potente opioidene brukt i legemiddelforskning, som Morfin eller Fentanyl.

Met-enkefalin, Tyr-Gly-Gly-Phe-Met og Leu-enkefalin, Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu fungerer både som neurotransmittere og neuromodulatorer. Anvendelse av enkefaliner som analgetikum har vært forhindret av deres dårlig stabilitet *in-vivo* og deres manglende evne til å penetrere blod-hjernebarrieren. [13,18]

4.3 VÆSKEKROMATOGRAFI, HPLC

High performance liquid chromatography, HPLC kalles væskechromatografi på norsk. I denne separasjonsteknikken, presses en væske eller mobilfasen gjennom en kolonne pakket med et materiale som retarderer analytter. En HPLC består vanligvis av et mobilfasereservoar, pumpe, injektor, kolonne, detektor og PC som vist i figur 4-5



Figur 4-5 Oppbygging av HPLC systemet [26]

Analyttene skal separeres ved hjelp av en konstant strøm av mobilfase i kolonnen. Kolonnen som er et stålrør har en lengde mellom 5-25 cm og skal først og fremst separere stoffene på kortest mulig tid og gi så liten spredning av stoffene som mulig, når de fraktes av en mobilfase. Kolonnen inneholder retarderende komponenter/stasjonærfase som avgjør kolonnens polaritet.

Separasjonsprinsippet i væskechromatografi er enten omvendtfase chromatografi, normalfasechromatografi eller eksklusjonschromatografi. I normalfasechromatografi brukes det porøse partikler med polar overflate som stasjonærfase. Silika er den vanligste stasjonærefasen i normalfase chromatografi. Silanol grupper (Si-OH) er de aktive gruppene på silika og gjør den polar og fører til polare interaksjoner mellom den og stoffene som skal separeres. I normalfase chromatografi er stasjonærefasen mer polar enn mobilfasen og størst retensjon oppnås av upolare løsemidler. Omvendtfase chromatografi prinsippet, som også er benyttet i oppgaven, er det viktigste separasjonsprinsippet i væskechromatografi. Her er stasjonærefasen i motsetning til normalfase, hydrofobt og mobilfasen er en vandig polar løsning. Stasjonærefasen består vanligvis av overflatemodifisert silika med alkylkjeder av

forskjellige lengder. Analyttene blir injisert i en strøm av mobilfase før kolonnen og viser interaksjon med stasjonærefasen. Det er pumpen som har ansvar for å presse ut mobilfase med en konstant hastighet, det brukes vanligvis flere pumper i HPLC systemer. Videre vil detektoren registrere stoffene som skal analyseres og gi respons/elektrisk signal. Responsen skal være i et konstant forhold med enten konsentrasjon eller masse av et stoff i mobilfase. Det fins forskjellige detektorer med forskjellige deteksjonsprinsipper og deteksjonsgrenser, UV-detektor, fluorescens og massespektrometere er noen eksempler. Signalene fra detektoren registreres av en PC eller skriver og fremstilt som et kromatogram.

4.4 VÆSKEFASEMİKROEKSTRAKSJON, LPME

Analyse av forskjellige kjemiske og biologiske substanser i ulike matrikser krever som regel et prøveopparbeidelsestrinn. Disse matriksene kan være komplekse og inneholde forskjellige komponenter som ikke er av interesse for analysen. I tillegg er det ofte veldige lave konsentrasjoner av analytter i disse matriksene. Prøveopparbeidelse er en måte å isolere analytter av interesse fra ulike (biologiske) matrikser (for eksempel plasma, blod eller urin).

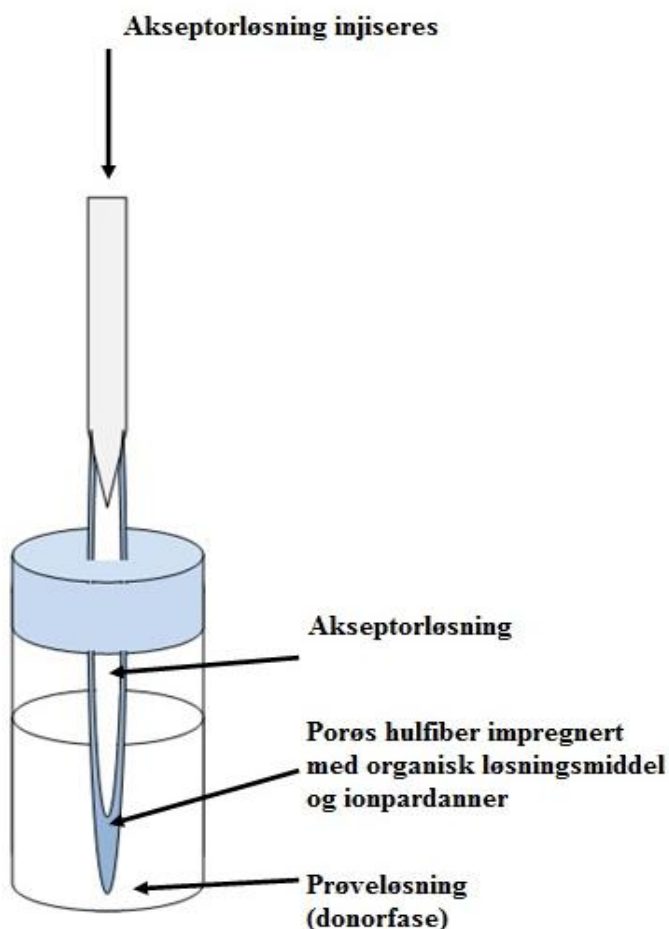
LPME er en effektiv prøveopparbeidelsesmetode med et ekstraksjonsprinsipp som er videreutviklet fra LLE (væske-væske ekstraksjon). Det er omtrent 10-12 år siden ”hulfiber væskefasemikroekstraksjon” ble først introdusert. [1,25]

LPME kan anvendes som både tofase eller trefase system. I tofase metoden ekstraheres analyttene fra en nøytral vandig løsning over til en organisk akseptorfase gjennom en porøs hulfiber impregnert med det samme organiske løsningsmidlet som i akseptorfase. Analyttene blir deionisert (ved å tilpasse pH-verdien), og får redusert løselighet i donorløsningen, noe som fører til økt løselighet i organisk akseptorløsning og diffusjon av analytter. I trefase systemet blir analyttene ekstrahert fra vandig donorløsning, gjennom organisk fase (organisk løsemiddel) i porene til en hulfiber og over til en vandig akseptorfase i fiberens hulrom.

pH i akseptor og donorfase er avgjørende for vandringen (ionisering og deionisering) av analyttene. Denne tre-fase ekstraksjonsmetoden er velegnet for ioniske forbindelser med en viss grad av hydrofobisitet som i sin nøytrale form er svært løselige i den organiske membranen og i sin ioniske form er de svært løselige i den vandige akseptor løsningen.

Denne ekstraksjonsmetoden har vist seg å være dårlig egnet til ekstraksjon av polare forbindelser som peptider. Det ble av den grunn videreutviklet en teknikk, ”ionpar-mediert LPME” for å kunne ekstrahere disse forbindelsene [3]. I denne LPME metoden blir det tilsatt en ionpardanner vanligvis til donorløsningen. Ionpardanneren danner komplekser med forbindelsene og gjør dem mer hydrofobe. Disse kompleksene får lav løselighet i donorfasen og flytter seg over i organiske væskemembranen hvor de har bedre løselighet.

Det fins ulike typer av ionpardannere med ulik løselighetsgrad i vann (og organisk løsningsmiddel). Det er av den grunn mulig å tilsette ionpardanneren til de ulike ekstraksjonsfasene (donor- eller organisk fase).



Figur 4-6 Ekstraksjonsoppsett ved LPME

Ekstraksjonsoppsettet for trefase LPME er illustrert i figur 4-6. Som figuren viser blir det brukt et prøveglass med donorløsning som har et volum vanligvis mellom 0,5 - 1 ml. Det er en hulfiber festet til spissen av et plastpipette som er impregnert med organisk løsemiddel (og ionpardanner) og fylt med en vandig akseptorløsning med volum mellom 15-25 μ l. Hulfiberen

er stukket gjennom skrukorken til prøveglasset. Fiberen blir dyppet i donorløsningen og korken blir skrudd fast før ekstraksjonen settes igang.

Det er stor volumforskjell mellom donor- og akseptorløsning. Dette fører til høy oppkonsentrering av analyttene. Etter avsluttet ekstraksjon kan den vandige ekstraktet i akseptorfase analyseres/ injiseres direkte i HPLC (eller andre analyseapparater).

4.4.1. LPME av peptider

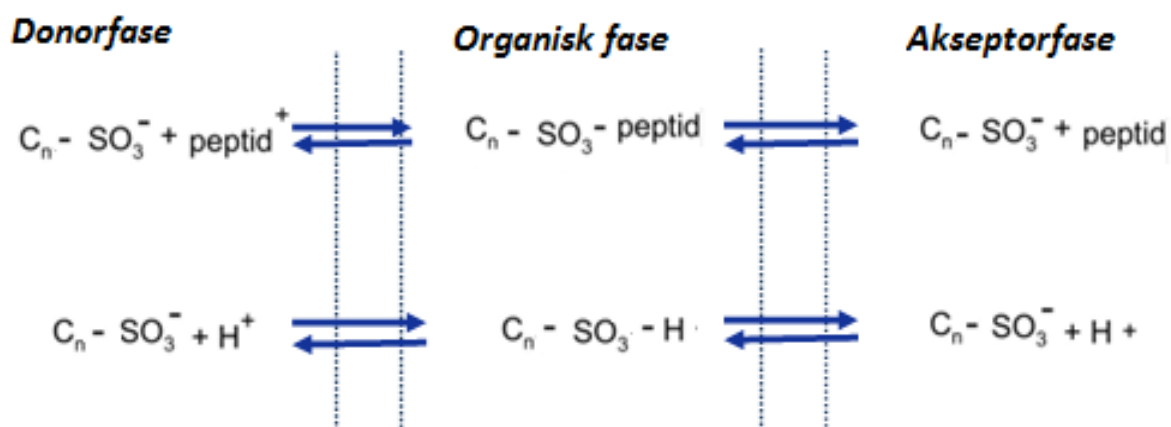
LPME har opprinnelig vært basert på passiv diffusjon. Dette er et velegnet system for ekstraksjon av ioniske komponenter med hydrofobe egenskaper, som i nøytral tilstand har høy løselighet i organisk løsemiddel og i ionisk tilstand høyest løselighet i vandig akseptor løsning [2]. Denne type LPME er lite egnet som ekstraksjonsmetode for polare substanser.

Carrier-mediert LPME er et ekstraksjonsprinsipp som ble introdusert for å utvide anvendelsen av LPME som opparbeidelsesmetode og muliggjøre LPME av polare forbindelser, som peptider (som forklart i 5.4.2.).

Det er utført studier [4-6] som bekrefter at LPME av peptider er avhengig av et transportmolekyl som overfører peptidene til organiskfase. Transportmolekylet som vanligvis er en hydrofob ionpardanner, blir som regel tilsatt til prøveløsningen for å danne komplekser med analyttene og igangsette ekstraksjonen. Ved LPME av peptider fra en sur donorløsning vil peptidene være positiv ladet og for hydrofile til å vandre over til organisk fase. En ekstraksjon av peptidene er dermed avhengig av et transportmolekyl. En negativ ladet ionpardanner vil gjøre peptidene mer hydrofobe ved å danne komplekser med dem. Peptid-ionpardanner kompleksene har nå høyere løselighet i organisk fase enn i donorfasen og beveger seg over til den organiske væskemembranen.

Videre i ekstraksjonsprosessen vil peptidene i kontaktområdet med akseptorløsning løse seg fra komplekset og ekstraheres over i akseptorfase. Ionpardanneren vil dermed danne nye komplekser med H^+ -ionene fra donorløsningen. Etersom det er et stort antall H^+ -ioner tilstedet i donorløsningen vil det bli høyere andel av H^+ -ionpardanner kompleks enn peptid-ionpardanner. Dette øker mengden av ubundete peptider i donorløsningen.

Prinsippet for denne teknikken er demonstrert i figur 4-7.



Figur 4-7 Prinsippet for ionpar-mediert LPME av peptider. $C_n-SO_3^-$ = ionpardanner [5]

De senere årene er det gjennomført en del studier [1-3] som demonstrerer at en kombinasjon av ionpardanner med organisk løsemiddel virker som en velfungerende teknikk ved LPME av hydrofile og polare legemidler. Ved å bruke denne teknikken unngår en å ha ionpardanner i prøveløsningen. Dette er en stor fordel ved LPME av plasmaprøver som krever et proteinfellings trinn for å fjerne plasmaproteiner som feller ut med ionpardanneren og hindrer ekstraksjonen.

Ionpar-mediert LPME med ionpardanner og organisk fase impregnert i veggen til en hulfiber er et nytt konsept innen legemiddelanalyse. Denne teknikken har som nevnt vist lovende resultater ved LPME av hydrofile legemidler og det er stor interesse rundt utvikling og anvendelse av teknikken. Per i dag er det ingen gjennomførte studier på LPME av peptider der denne nye teknikken er anvendt som ekstraksjonsmetode. Det er manglende kjennskap til effektiviteten av denne metoden når ekstraksjonssubstansene er peptider.

5 MATERIALER OG METODE

5.1 UTSTYR, KJEMIKALIER OG PEPTIDER

Tabellene 5-1, 5-2, 5-3 og 5-4 viser oversikt over peptider, kjemikalier og øvrige utstyr som er brukt i oppgaven.

Tabell 5-1 Peptider

<i>Peptid</i>	<i>Leverandør</i>
Angiotensin I trifluoroacetat salt	Bachem AG, Bubendorf, Switzerland
Angiotensin II acetat salt	Bachem AG, Bubendorf, Switzerland
Angiotensin III	Bachem AG, Bubendorf, Switzerland
(Arg ⁸)-Vasopressin	Bachem AG, Bubendorf, Switzerland
Leu-Enkephalin	Bachem AG, Bubendorf, Switzerland
Endomorphin-1	Bachem AG, Bubendorf, Switzerland
Angiotensin II antipeptide	Bachem AG, Bubendorf, Switzerland

Tabell 5-2 Kjemikalier (fortsettelse på neste side)

<i>Kjemikalie</i>	<i>Kvalitet</i>	<i>Leverandør</i>
Saltsyre (HCL)	Pro analysii, 37 %	Merck (Damstadt, Tyskland)
Maursyre (HCOOH)	98-100%	Merck (Damstadt, Tyskland)
1-oktanol	~99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Acetonitril	HPLC-kvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
Metanol	HPLC-kvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
Di(2-etylheksyl)fosfat (DEHP)	min. 95%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Tridecylfosfat (TDP)	-	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Dibenzylfosfat (DBP)	99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)

Tris (2-etylheksyl) fosfat (TEHP)	98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Switzerland)
1-nonanol	~98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Natriumdihydrogenfosfatmono hydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Pro analysii	Merck (Damstadt, Tyskland)
Dinatriumhydrogenfosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	Pro analysii	Merck (Damstadt, Tyskland)
2-oktanol	~ 99,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
2-nonanon	~ 97%	SAFC, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Dihexyleter	97%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
1-Naphtyl fosphat	99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Bis (4-Nitrophenyl) phosphate	99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Naphtic acid	96%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Caprylic acid	99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Phenyl boronic	97%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Dihexadecyl phosphate	-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Dodecyl acetat	97%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Borsyre (H_3BO_3)	99,8%	Merck (Damstadt, Tyskland)
Borat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)	99,5-100,5%	Mallinckrodt, Kentucky, USA
Natriumkarbonat (Na_2CO_3)	99,5%	Merck (Damstadt, Tyskland)
Natriumhydrogenkarbonat (Na_2HCO_3)	99,5%	Merck (Damstadt, Tyskland)
Bromtymolblått	~95%	Aldrich chem. Co. Milw.,53201
NPOE (2-Nitrofenyl oktyl eter)	-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)

Tabell 5-3 HPLC-apparatet benyttet i oppgaven

<i>HPLC</i>	<i>Type</i>	<i>Leverandør</i>
Kolonne	YMC-Triart C18, 150x2,0 mm I.D. S-5 µm, 12 nm	YMC Europe GmbH, Dinslaken, Tyskland
Pumpe	Binary pump SL G1312-90011	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Detektor	UV 214 nm	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Programvare	ChemStation	Agilent Technologies, (Santa Clara, CA, USA)

Tabell 5-4 Øvrige utstyr benyttet i oppgaven

<i>Øvrige utstyr</i>	<i>Type</i>	<i>Leverandør</i>
Prøveglass	500x2-DV	Chromacol, Hertz, USA
Mikroinserts	20 µL	National scientific, Rockwood, USA
Kork	5185-5820	Agilent technologies, USA
Mikroliter sprøyte	25 µL	Hamilton, Bonadazu, Switzerland
Ekstraksjonsfiber	Accurel PPQ 3/2 Polypropylen hulfiber (i.d.600 µm, veggtykkelse 200 µm, porestørrelse 0,2 µm)	Membrana, Wuppertal, Tyskland
Pippettespiss	20 µL	Eppendorf, Switzerland
pH-meter	E 632 Digitalt pH-meter	Metrohm, Herisau, Sveits
Vibrator	Vibramax 100	Heidolph, Kelheim, Tyskland
pH-papir	Acilit [®] pH 0-6	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ultralydbad	USC300T	VWR, MALAYSIA
Vekt	AE 200	Metler, Sveits

5.2 TILAGING AV LØSNINGER

5.2.1. Peptidløsninger

Stamløsninger ble laget ved å veie 2,5 mg av hver av peptidene, endomorfin, enkefalin, vaspressin, angiotensin I, II, III, og angiotensin II-AP (antipeptid) og løse dem i 10 ml metanol. Konsentrasjonen av peptidene i stamløsningen var på 250 µg/ml. 1 ml (1000 µl) av stamløsningen ble fortynnet i 900 µl 10 mM HCl, løsningen hadde konsentrasjon på 25 µg/ml. Løsningen på 25 µg/ml ble fortynnet ytterligere ved å løse 1 ml av den i 9 ml 10 mM HCl. Den siste fortynnet løsningen som hadde en konsentrasjon på 2,5 µg/ml ble brukt i eksperimentene. Stamløsning og fortynnete løsninger ble oppbevart i kjøleskap ved 2 °C, beskyttet mot lys.

5.2.2 Mobilfaser

Mobilfasene ble laget ved at 1,011 g 1-heptansulfonsyre ble løst i 1000 ml destillert vann og tilsatt 377 µl maursyre. Denne sammensetningen ga 10 mM maursyre og 5 mM 1-heptansulfonsyre.

Denne løsningen ble blandet med acetonitril (ACN) slik at mobilfase A bestod av 5 % ACN i 10mM CHOOH og 5mM C₇H₁₅NaO₃S og mobilfase B bestod av 95 % ACN i 10mM CHOOH og 5mM C₇H₁₅NaO₃S. Mobilfasene ble satt på ultralydbad etter tillaging for å fjerne eventuell luft i blandingen.

5.2.3. Bufferløsninger

Tabellene 5-5, 5-6 og 5-7 viser tillagings prosedyren til bufferløsningene brukt i oppgaven.

Tabell 5-5 Bufferløsningene med pH 5-9 er lånt av labkollega med nedskreven tillagingsprosedyre.

pH	Prosedyre for tillaging av bufferløsninger
3.0	25 mM løsning av NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O (1,724 g i 500 ml H ₂ O) ble titrert med 25 mM fosforsyre (856 µl i 500 ml H ₂ O) til pH 3,0.
5.0	0,1 M løsning av HCOOH (425 µL til 100 ml H ₂ O) ble titrert med 0,1 M NH ₃ (675 µl i 100 ml H ₂ O) til pH 5,0.
7.0	25 mM løsning av NaH ₂ PO ₄ *1H ₂ O (1,7285 g løst i 500 ml H ₂ O) ble titrert med NaH ₂ PO ₄ *12H ₂ O (4,4717 g løst i 500 ml H ₂ O) til pH 7,0.
9.0	25 mM løsning av ammoniumklorid (0,5349 g løst i 100 ml H ₂ O) ble titrert med 0,1 M NH ₃ (675 µl i 100 ml H ₂ O) til pH 9,0.

Tabell 5-6 Bufferløsningene er lånt av labkollega med nedskreven tilagings prosedyre

pH	Prosedyre for tillaging av bufferløsninger
3.0	Titrerte 25 mM HCOOH (0,0475 mL HCOOH til 50 mL H ₂ O) med 25 mM NH ₃ (0,0923 mL NH ₃ til 50 mL H ₂ O).
5.0	25 mM tri-natriumcitrat-2-hydrat (0,368 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x2H ₂ O til 50 mL H ₂ O) titrert med 25 mM sitronsyremonohydrat (0,263 g C ₆ H ₈ O ₇ xH ₂ O med 50 mL H ₂ O)
5.0	Titrerte 25 mM CH ₃ COONa (0,2051 g til 100 mL H ₂ O) og 25 mM CH ₃ COOH (143 µL CH ₃ COOH til 100 mL H ₂ O)
7.4	25 mM tris (hydroksymetyl) aminometan (0,151 g C ₄ H ₁₁ NO ₃ til 50 mL H ₂ O)
7.8	50 mM ABC –buffer (40 mg ammonium bicarbonate, NH ₄ HCO ₃ , i 10 ml ionebyttet H ₂ O)

Tabell 5-7 Ulike peptidløsninger med pH 9-10.5

pH	Prosedyre for tillaging av natriumkarbonat/bikarbonat og borat/borsyre bufferløsninger
9.0	0,2 M løsning av borsyre (1,24 g løst i 100 ml vann) ble titrert med 0,05 M løsning av borat (1,905 g løst i 100 ml vann) til pH 9,0.
9.5	0,1 M løsning av Na ₂ HCO ₃ (2,1 g løst i 250 ml vann) ble titrert med 0,1 M løsning av Na ₂ CO ₃ (7,15 g løst i 250 ml vann) til pH 9,5.
10.0	0,1 M løsning av Na ₂ HCO ₃ (2,1 g løst i 250 ml vann) ble titrert med 0,1 M løsning av Na ₂ CO ₃ (7,15 g løst i 250 ml vann) til pH 10,0.
10.5	0,1 M løsning av Na ₂ HCO ₃ (2,1 g løst i 250 ml vann) ble titrert med 0,1 M løsning av Na ₂ CO ₃ (7,15 g løst i 250 ml vann) til pH 10,5.

5.3. HPLC-METODE

Prøvene/ekstraktene i oppgaven ble analysert med HPLC. Det ble brukt omvendt fase kromatografi og gradienteluering i separasjon av peptidene. Det ble brukt en YMC-Triart C18 størrelse 150 x 2.0 mm ID 5 µm kolonne (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Tyskland). Dette er en flerlag silika-basert C18 kolonne med høy omfang av karbonkjeder med høy hydrofobisitet og modifisert overflate som gir bra separasjon av peptidene.

Kolonnen ble vasket før og etter hver analyserunde for å fjerne forurensninger, salter og rester som kan eventuelt ha festet seg eller ligger igjen på kolonnen. Kolonnen ble vasket i 15 minutter med 100% mobilfase A₂ (som bestod av ACN og vann, 10:90 (v/v)) for å blant annet fjerne rester fra analysene, 10 minutter med 100% mobilfase B₂ (som bestod av ACN og vann, 90:10 (v/v)) for å fjerne eventuelle salter og forurensninger, og til slutt vaskes kolonnen i 10 minutter med 100% A₂ for å fjerne organiske løsemiddelrester.

En HPLC-metode ble utviklet for å analysere de 7 peptidene som var med i oppgaven. Metoden skulle gi best mulig analysetid, separasjon og samtidig skulle det være tilskrekkelig tid for utvask av analytter/rester i slutten av hver analyse.

Mobilfasegradienten og analysebetingelser er listet under.

Tabell 5-8 Mobilfase gradienten

Tid (min)	Mobilfase A ₁ (%)	Mobilfase B ₁ (%)	Flow (ml/min)
0.00	77,5	22,5	0,3
20.00	60,0	40,0	0,3
21.00	20,0	80,0	0,3
24.00	20,0	80,0	0,3
25.00	77,5	22,5	0,3
35.00	77,5	22,5	0,3

HPLC-instrument: Agilent Technologies, 1200 serie (Matrix, Oslo, Norge).

Injeksjonsmengde : 20 µl

Mobilfase :

A1: 10 mM maursyre, 5 mM 1-heptansulfonsyre: ACN (95 : 5 v/v)

B1: 10 mM maursyre, 5 mM 1-heptansulfonsyre: ACN (5 : 95 v/v)

Flow : 0,3 ml/min

Kolonne : YMC-Triart C18 150×2 mm ID 5 µm kolonne

Deteksjon : UV, 214 nm

Analysetid: 35 min

Temperatur : 23 °C

Mobilfasen som ble brukt i oppgaven var tilsatt 5 mM 1-heptansulfonsyre og 10 mM maursyre. Disse ble løst i acetonitril på forholdet som er vist under:

A₁: 5 mM C₇H₁₅NaO₃S og 10 mM CHOOH i 5% ACN

B₁: 5 mM C₇H₁₅NaO₃S og 10 mM CHOOH i 95% ACN

1-heptansulfonsyre ble brukt i mobilfasen for å øke retensjonen av peptidene. 1-heptansulfonsyre danner ionpar med positiv ladede peptider som gjør dem til mer hydrofobe forbindelser med bedre retensjon på kolonnen. For at peptidene skal få positiv ladning og lage komplekser med 1-heptansulfonsyre, ble det benyttet maursyre i mobilfasen.

Før hver omgang med analyse ble kolonnen vasket som tidligere nevnt. Mobilfasen ble deretter stilt på startforhold i gradienten og kjørt gjennom kolonnen i minst 10-15 minutter før analyse start. Analysen startet alltid med 2-3 prøver av standardløsningen (med peptidene). Det var for å kontrollere kromatogrammene og sammenligne retensjonstid og oppdage eventuelle avvik før prøvene ble kjørt. I tillegg var det en analyse av standardløsning etter hver 3. prøve. Dette ble gjort for å ha kontroll på retensjonstid av peptidene, stabilitet av topparealene og samtidig observere endringer eller tilstedeværelse av forurensninger gjennom hele analyseoppsettet.

5.4 LPME

5.4.1. Prøveopparbeidelse

Prøvene ble istandgjort ved hjelp av trefase væskefasemikroekstraksjon. Ekstraksjonen startet med klargjøring av prøveløsning eller donorfasen. Donorfasen inneholdt som regel 800 µl enten vann, bufferløsning, eller plasma og 200 µl peptidløsning. Donorfasen ble deretter overført til prøveglass ved hjelp av mikroliterpipette.

En porøs hulfiber av polypropylen ble koblet fra den ene enden til en plast pipettespiss som var stukket gjennom skrukorken til prøveløsningsglasset mens den andre enden var tettet igjen. (se figur 4-6). Hulfiberen ble dyppet i en blanding med organisk løsningsmiddel som oftest bestod av 1-oktanol og en ionpardanner som vanligvis ble det benyttet 10% DEHP eller di(2-etylheksyl)fosfat. Porenene til hulfiberen med følgende størrelse; lengde på 2,7 cm, indre diameter 600 µm og porestørrelse på 0,2 µm, ble impregnert med denne blandingen av ionpardanner og organisk løsningsmiddel i 5 sekunder til den var mettet. Rester av væske fra organiske fasen som var på utsiden av fiberen ble forsiktig tørket med et papirtørkle.

12 µl akseptorfase, som vanligvis var 100 mM HCl, ble injisert i fiberens hulrom gjennom den øverste åpningen til plast pipetten som hulfiberen var koblet til (som illustrert i figur 4-6 i kapittel 4.4). Akseptorløsningen ble injisert ved hjelp av en mikrolitersprøyte. Skrukorken med pipette og fiber ble satt inn i prøveglasset og skrudd fast. Hele prøveglasset med montert kork og fiber ble plassert på en vibrator og ristet i 45 minutter med en hastighet på 750 rpm.

Etter 45 minutter og avsluttet ekstraksjon ble det injisert ut 10 µl ekstrakt fra akseptorfasen i fiberens hulrom over i en plastbeholder (analyse vial). Ekstraktet ble fortynnet med enten 30 µl 10 mM HCl eller 30 µl av mobilfase A₁. Sluttvolumet var 40 µl hvorav 20 µl ble injisert i HPLC-apparatet. Av ekstraksjonsenheten ble alt benyttet kun en gang utenom skrukorken til prøveglass som ble vasket, tørket og brukt på nytt.

5.4.2. Donorfase

På grunn av begrenset tilgjengelighet av biologiske prøvemateriale er det mest gunstig å ta utgangspunkt i små prøvevolum og lave konsentrasjoner i analysen. Tatt dette med i betraktning ble donorfase eller prøveløsningen laget ved å blande 200 µl peptidløsning med en konsentrasjon på 2,5 µg/ml med 800 µl donorløsning. Sluttkonsentrasjonen på peptidene ble dermed 0,5 µg/ml. Sammensetningen av donorløsningen var ulik i de forskjellige eksperimentene.

5.4.3. pH i donorfase

For å få mer kjennskap rundt innvirkningen av ulike pH-verdier i donorfasen på ekstraksjonen, ble det brukt forskjellige bufferløsninger med pH fra 3,0-10,5. Donorfase i de forskjellige forsøkene bestod av 800 µl bufferløsning og 200 µl peptidløsning med en sluttkonsentrasjon på 0,5 µg/ml av peptidene. Peptidene var løst i 10 mM løsning av HCl. Ekstraksjonsforholdene var uendret i alle forsøk med en akseptorfase med pH 2,0, og organisk fase med 10% DEHP og *n*-oktanol. Det ble i begynnelsen utført ekstraksjoner med ionpardanner i donorfase og deretter ionpardanner i organiskfase for å få bekræftelse på om begge metodene gir tilfredsstillende utbytteverdier ved LPME av peptider. Ved ekstraksjon der ionpardanner var tilstedet i donorfase var det brukt 800 µl 1-heptansulfonsyre (62,5 mM) og 200 µl peptidblanding (5µg/ml), *n*-oktanol som organisk fase og 100 mM HCl i akseptorfase med en ekstraksjonstid på 45 minutter. I eksperimentet der organisk fase var tilstede i organisk fase var det 800 µl vann og 200 µl peptidblanding (5µg/ml), *n*-oktanol og 10% DEHP (ionpardanner) som organiskfase og 100 mM HCl i akseptorfase med en ekstraksjonstid på 45 minutter.

,

5.4.4. pH i akseptorfase

For å få mer kjennskap rundt pH-verdiens rolle og virkningen av H⁺-konsentrasjonen i akseptorfase på ekstraksjonsutbytte ble det utført en rekke eksperimenter. Akseptorfaser som ble testet inneholdt 0.1 M HCl, 0.01 M HCl, 0.001 M HCl, med pH-verdier på henholdsvis 1, 2, 3. Andre forhold i ekstraksjonen ble holdt konstant med en donorfase som bestod av 200 µl peptidløsning og 800 µl bufferløsning med pH 3. Sluttkonsentrasjon av peptidene var 0,5 µg/ml. Organisk fase bestod av 10% DEHP og 1- oktanol.

5.4.5. Test av ionpardannere

Forskjellige konsentrasjoner av de ionpardannere med høyest utbytte ble testet ut i tillegg. Ekstraksjonene ble utført ved konstant sammensetning av donorfase og akseptorfase. 800 µl bufferløsning med en pH~3 og 200 µl peptidblanding med konsentrasjon på 0,5 µg/ml. Akseptorfasen bestod av 12 µl 100 mM HCl (pH~1). Ekstraksjonsbetingelsene og ionpardannerne som ble testet er vist i tabell 5-9.

Forsøkene ble utført etter rekkefølgen under:

- Ekstraksjon med og uten ionpardanner
- Ekstraksjon med og uten ionpardanner i organisk fase
- Test av forskjellige konsentrasjoner av DEHP som ionpardanner
- Ekstraksjon med diverse negativ ladede ionpardannere
- Ekstraksjon med positiv ladet ionpardanner

Tabell 5-9 Ekstraksjonsoppsett ved test av ulike ionpardanne. * Methyltriocetyl ammonium

chlorid.

Ionpardanner i organisk fase	Organisk fase	Donorfase	Akseptorfase
-	1-oktanol	H ₂ O med 62,5 mM C ₇ H ₁₅ NaO ₃ S, peptid	0,1 M HCl
-	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
5% DEHP	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% DEHP	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
15% DEHP	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
20% DEHP	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% TEHP	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% TDP	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% DBP	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% Caprylic acid	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% Phenyl boronic	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% Naphtyl phosphate	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% Naphtoic acid	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% Bis (4-Nitrophenyl) phosphate	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% Dihexadecyl phosphate	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% Dibenzyl phosphate	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% Tetrahexyl ammonium bromid	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% Methyl.*	1-oktanol	Buffer pH 9,0 peptid	0,1 M HCl
10% Methyl.*	1-oktanol	Buffer pH 9,5, peptid	0,1 M HCl
10% Methyl.*	1-oktanol	Buffer pH 10,5, peptid	0,1 M HCl

5.4.6. Fargeindikator som ionpardanner

I forbindelse med test av diverse ionpardannere ble en del fargeindikatorer prøvd ut som mulige kandidater.

Fargeindikatorene bromfenolblått, bromtymolblått, bromfenolblått med 1% displacer ble løst i organisk løsningsmiddel, som enten bestod av 1-oktanol eller 1-oktanon. Fargeindikatorene hadde en konsentrasjon på 10% og de som ikke løste seg til 10% ble tilsatt til metning. Donorfase i forsøkene bestod av 800 µl bufferløsning med en pH~3 og 200 µl peptidblanding med konsentrasjon på 0,5 µg/ml. Akseptorfase bestod av 12 µl 100 mM HCl (pH~1) og ble injisert i fiberens hulrom som ble videre fuktet i organisk fase i 5 sekunder. Ekstraksjonstid var 45 minutter på vibrator med en hastighet på 750 rpm.

5.4.7. Kombinasjon av ionpardannere

I forsøkene var det fokus på å finne ionpardannere som viste best kompatibilitet i blanding og som ga høyest utbytte. Ionpardannerne ble valgt ut etter nivået på utbytteverdiene fra tidligere forsøk i oppgaven og det ble tatt utgangspunkt i forsøkene utført i avsnitt 5.4.5. og 5.4.6. Det ble utført eksperimenter av organiske løsningsmidler som i kombinasjon med ionpardannerne ga høyeste utbytte.

I disse forsøkene ble det laget kombinasjoner av ionpardannere med 10% konsentrasjon av i ulike organiske løsningsmidler. Ekstraksjonsforholdene bestod av donorfase med 800 µl bufferløsning med en pH~3 og 200 µl peptidblanding med konsentrasjon på 0,5 µg/ml. Akseptorfase bestod av 12 µl 100 mM HCl (pH~1) og ble injisert i fiberens hulrom som ble videre fuktet i organisk fase med kombinasjon av ionpardannerne i 5 sekunder. Ekstraksjonstid var 45 minutter på vibrator med en hastighet på 750 rpm.

5.4.8. Valg av organisk fase

I oppgaven ble en rekke forskjellige ketoner og alkoholer testet som organiske faser. Det ble utført ekstraksjoner med diverse organiske faser som 1-oktanol, 2-oktanon, 1-nonanol, 2-nonanon, dodecyl acetat, isopentylbenzen, dihexyleter og NOPE. Disse ble kombinert med forskjellige ionpardannere. Ekstraksjonsforhold for ulike tester av organiske faser er som vist i tabell 5-10

Tabell 5-10 Ekstraksjonsforhold ved test av ulike organiske faser

Ionpardanner i organisk fase	Organisk fase	Donorfase	Akseptorfase
10 % DEHP	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% DEHP	1-Nonanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% TEHP	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10 % DEHP	1-oktanon	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10 % DEHP	1-nonanon	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% Bromtymolblått	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10% Bromtymolblått og 10% DEHP	1-oktanol	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10 % DEHP	dodecyl acetat	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10 % DEHP	isopentylbenzen	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10 % DEHP	dihexyleter	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl
10 % DEHP	NPOE	Buffer/H ₂ O pH 3, peptid	0,1 M HCl

5.5. PLASMAPRØVER

5.5.1. LPME i plasma

Det har tidligere vært vanlig å fjerne plasmaproteinene i plasmaprøver før ekstraksjon/ LPME av peptider [6]. Disse plasmaproteinene skaper problemer ved tilsetning av ionpardanner ved å danne uløselige komplekser med den og felle ut som bunnfall.

I oppgaven er det benyttet det nye ekstraksjonsprinsippet med ionpardanner og organisk fase impregnert i hulfiberens membran. Ionpardanner vil ikke være tilstedet i donorfase her og det var av den grunn ikke nødvendig med proteinfelling før ekstraksjonen. Det ble utført forskjellige forsøk med ulike pH-verdier i plasmaprøvene (donorfasen).

5.5.2. Plasma forsøk

I plasmaekstraksjonene ble det brukt en 12 µl akseptorløsning med 100 mM HCl, 10% DEHP i 1-oktanol som ionpardanner og organisk fase. Donorfase i plasmaforsøkene varerte da forskjellige mengder av HCl ble brukt for å bryte bufferkapasiteten plasma har og oppnå ønsket pH. Resten av ekstraksjonsprosedyren var som beskrevet i avsnitt 5.4.1. Tabell 5-11 viser ekstraksjonsoppsettet ved plasma testene.

Tabell 5-11 Ekstraksjonsoppsettet ved test av plasmaprøver

Ionpardanner i organisk fase	Organisk fase	Donorfase/Plasma	Akseptorfase
10 % DEHP	1-oktanol	1 ml av blandingen (2,5 ml 0,1 M HCl+2 ml plasma+1 ml peptidløsning 2,5 µg/ml, slutt kons. 0,45 µg/ml) pH 3,5	0,1 M HCl
10 % DEHP	1-oktanol	1 ml av blandingen (2 ml 0,1 M HCl+2 ml plasma+1 ml peptidløsning 2,5 µg/ml, slutt kons. 0,5 µg/ml) pH 4,0	0,1 M HCl
10 % DEHP	1-oktanol	1 ml av blandingen (2 ml H ₂ O+2 ml plasma+1 ml peptidløsning 2,5 µg/ml, slutt kons. 0,5 µg/ml) pH~ 7,0	0,1 M HCl
10 % DEHP	1-oktanol	1 ml av blandingen (4 ml rent plasma+1 ml peptidløsning 2,5 µg/ml, slutt kons. 0,5 µg/ml) pH~ 8,0	0,1 M HCl

5.6. UTBYTTE

Formelen under viser hvordan ekstraksjonsutbytte ble regnet ut.

$$Utbytte \% = R = \left(\frac{n_a}{n_p} \right) * 100 \% = \left(\frac{V_a \cdot C_a}{V_p \cdot C_p} \right) * 100 \%$$

C_a er sluttkonsentrasjon av analytt/peptid i akseptorfase etter ekstraksjon og C_p er konsentrasjon av analytt/peptid i prøveløsningen før ekstraksjon. V_a er volum i akseptorfase og V_p er volumet i prøveløsning.

n_p er mengde analytt som var opprinnelig i prøven, og n_a er mengde analytt som er ekstrahert over i akseptorfasen.

6 RESULTATER OG DISKUSJON

6.1 LPME

6.1.1. Ionpardanner

Trefase væskemikroekstraksjon, (LPME) har som nevnt i avsnitt 4.4.1. gitt dårlig ekstraksjonsresultater av peptider (polare forbindelser). Denne metoden er dårlig egnet som prøveopparbeidelsesmetode av polare forbindelser på grunn av deres lave oppløselighet i væskemembranen (organisk fase). For å utvide bruken av hulfiber LPME og forbedre permeabiliteten av polare substanser gjennom den organiske væskemembranen ble det presentert et nytt ekstraksjonsprinsipp, carrier-mediert LPME av polare legemidler. I denne metoden tilsettes det en "carrier" eller hydrofob ionpardanner direkte til prøveløsningen. Ionpardanneren lager komplekser med analyttene og transporterer analyttene over i den organiske væskemembranen i veggen til en porøs hulfiber. Analyttene blir derfra frigjort fra ionparkomplekset og ekstraheres over til akseptorløsningen, mens ionparreagenset lager komplekser med protoner i den sure akseptorløsningen og blir tilbakeekstrahert til prøveløsningen. Prinsippet for denne metoden er illustrert i Figur 4-7. [1]

De senere årene har ionpar-mediert LPME blitt utprøvd på peptider [4,5]. I studiene har ionpardanneren vært tilsatt i prøveløsningen (donorløsningen). Av disse studiene fremgikk det at ekstraksjon av peptidene mediert av ionpardanner krevde lavere pH-betingelser (pH 1-4) i donorfasen enn tidligere brukt for legemidler. I studiene viste det seg at all transport av peptidene over til organisk fase var mediert av ionpardanneren. Heptansulfonsyre har gitt høyest utbytte ved LPME av peptider. I et surt miljø vil positiv ladede peptider danne hydrofobe komplekser med negativ ladet ionpardanner og trenge seg inn i organisk fasen som er impregnert i hulfiberveggen. Sulfonsyre-peptid-komplekset (ionpar komplekset) som er blitt hydrofobt vil ha høyere løselighet i organisk fase enn i donorfasen. Dette favoriserer ekstraksjon over til organisk fase. I kontakt med sur akseptorfase i fiberens hulrom, vil peptidene frigjøre seg fra ionpardanneren og bevege seg innover akseptorfase. Høyt antall H⁺-ioner vil erstatte peptidene og lage kompleks med ionpardanneren som tilbakeekstraheres over i organiske fase som demonstrert i figur 4-7.

I senere studier av ionpar-mediert LPME av hydrofile og polare legemidler, er ionpardanneren enten tilsatt til prøveløsningen (vannløselig ionpardanner) eller til den organiske fasen (vannuløselig ionpardanner). Begge metodene har gitt bra resultater [2,3]. Det er til nå ikke gjort

studier på LPME av peptider der ionpardanner/carrier er tilsatt til den organisk fase. I denne oppgaven ble dette prøvd ut for første gang.

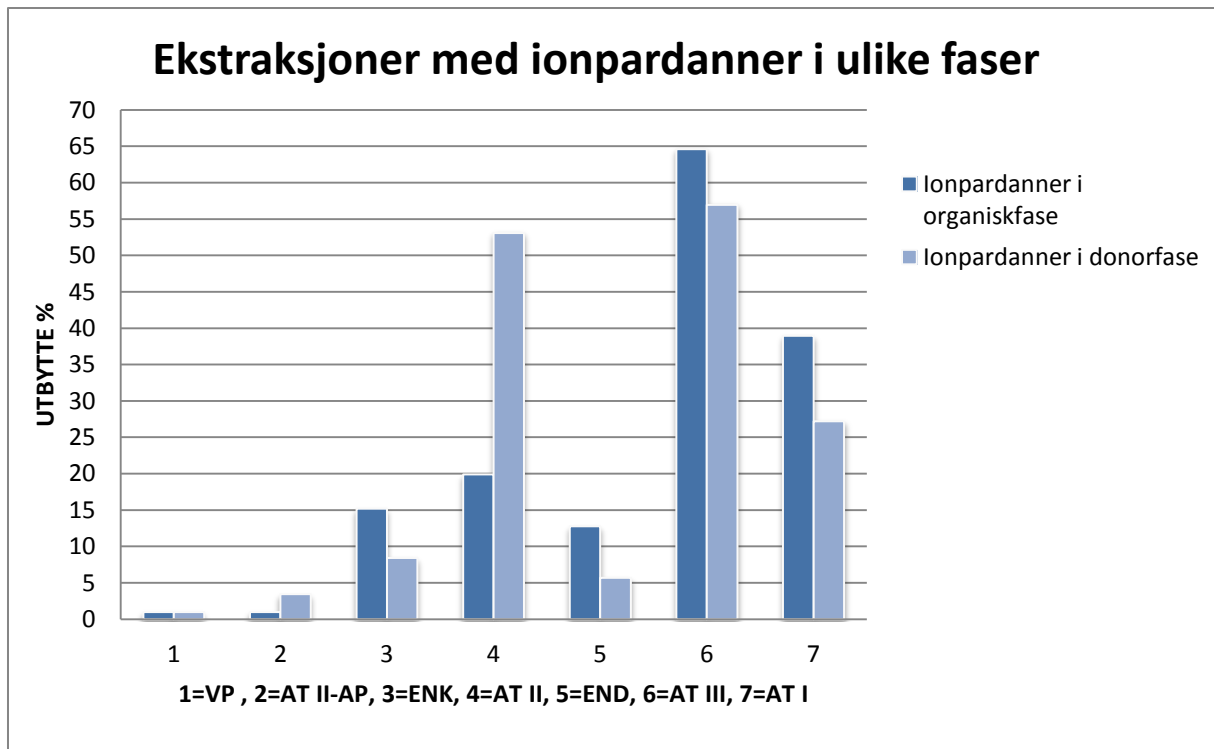
6.1.2. Ionpardanner i organisk fase

Tidligere i ionpar-mediert LPME av peptider, som nevnt, har ionpardanneren vært direkte tilsatt i prøveløsningen. Dette har vist seg å være problematisk ved LPME av peptider fra plasma. Ved tilsetning av negativ ladet ionpardanner til en (sur) løsning av plasma vil det bli dannet uløselige komplekser av plasmaproteiner og ionpardanner. Det har derfor vært vanlig å fjerne plasmaproteiner før tilsetning av ionpardanner. Dette gjøres ved hjelp av en proteinfellingsreagens. Dette blir sett på som et "ekstra" trinn i ekstraksjonen og forlenger analyseprosessen, noe som er uønskelig.

I oppgaven ble ionpardanner/carrier fjernet fra donorfasen og tilsatt til den organiske fasen istedet, det er brukt samme ekstraksjonsprinsipp som tidligere. Det er sett på effekten av ionpardanner, forskjellige typer ionpardannere, ulike ekstraksjonsbetingelser og diverse organiske faser.

6.1.3. pH i donorfase

Det er kjent at pH-verdi har stor innvirkning på ekstraksjonen. I tidligere studier har det vist seg at lav pH-verdi i donorfase (pH mellom 1-4) gir de beste utbytteresultatene [4,5]. Videre er det observert at peptidene har ulike utbytteneivå ved forskjellige pH og optimal pH for ulike peptider varierer mye. Det var ønsket å få mer kjenneskap rundt effekten av ulike pH-verdier på ekstraksjonen. Det ble i første omgang utført forsøk for å bekrefte at tilstedsværelse av ionpardanner i organiskfase isteden for i donorfase var en pålitelig ekstraksjonsprinsipp og metodene kunne vurderes som likeverdige og eventuelt avdekke store forskjeller.

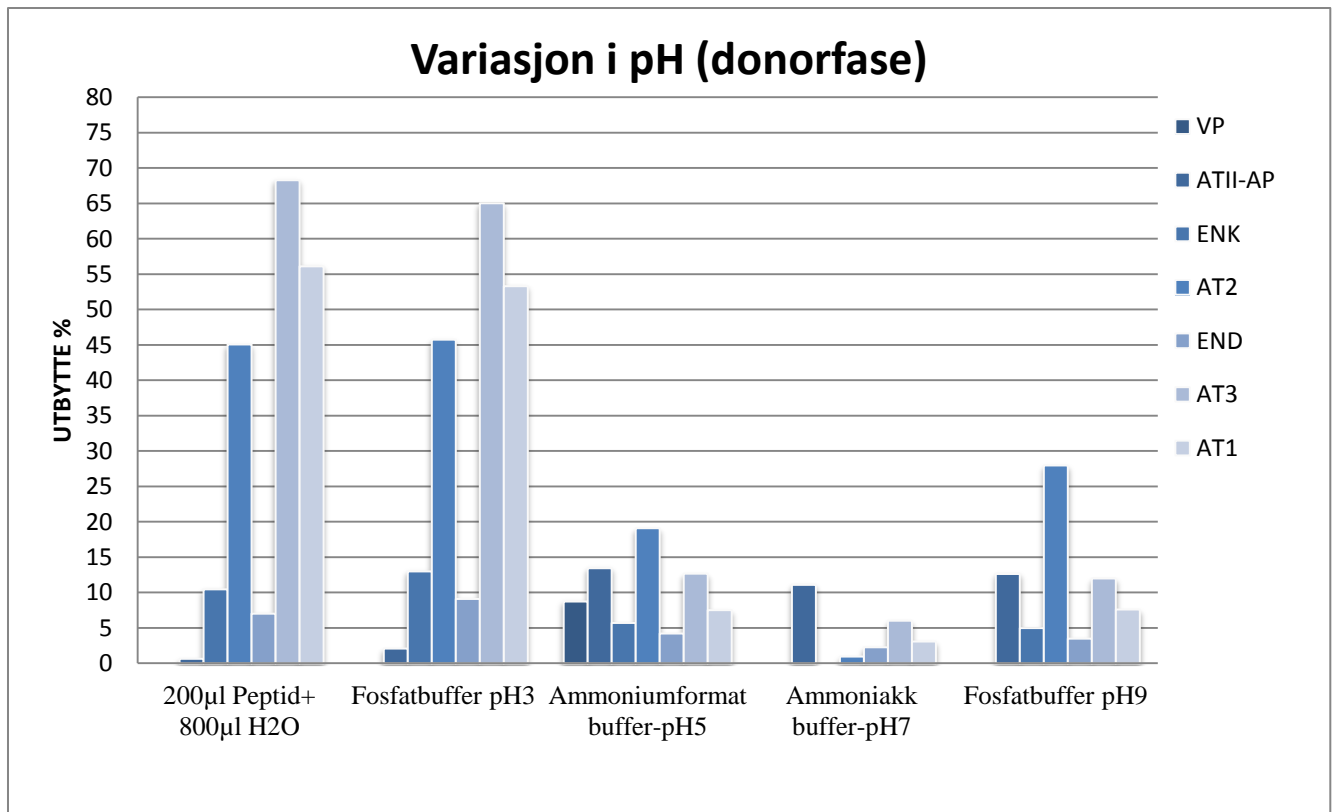


Figur 6-1 Ulike ekstraksjonsutbytter ved ionpardanner i organisk fase og donorfase

Figur 6-1 viser at det er liten forskjell i utbytter når ionpardanner er benyttet i de ulike fasene. Angiotensin II- AP (2) og Angiotensin II (4) har noe lavere utbytte når ionpardanner kombineres med organisk fase mens de andre peptidene har litt høyere utbyttverdier. Resultatet fra begge ekstraksjonene var akseptable og det beviste at ionpardanner kombinert med organisk fase kunne brukes som ekstraksjonsmetode ved senere eksperimenter.

Forskjellige bufferløsninger med ulik pH ble brukt som donorfase for å observere peptidenes variasjon i utbytte ved de ulike pH områdene.

I første omgang ble fosfatbuffer med pH 3, ammoniumformatbuffer med pH 5, fosfatbuffer med pH 7, ammoniakk buffer med pH 9 testet som donorfaser. For å observere endringer og sammenligne analyseresultatet ble det utført en ekstraksjon med konstante forhold i alle ekstraksjons rundene. Donorfasen i denne ekstraksjonen med uendrede forhold bestod av 200 µl peptidløsning med pH 2,0 og 800 µl destillert vann (som ga en slutt-pH på ~ 3,0).



Figur 6-2 Utbytte av ekstraksjoner med forskjellige pH i donorfasen

Figur 6-2 viser at ekstraksjonsutbyttet er høyest ved lav pH. Lav pH i donorfase fører til positiv ladete aminogrupeer på peptidene. I kontaktområdet mellom donorfase og organisk fase (i hulfiber veggen), vil de positiv ladete aminogrupeene danne komplekser med den negativ ladete ionpardanneren i væskemembranen. Disse hydrofobe kompleksene hjelper peptidene å diffundere inn i organisk fase i hulfiberens membran. Utbyttet avtar med økende pH og lavest utbytte oppnås ved nøytral pH. Dette kan forklares av at ved økende pH blir peptidene deprotonert og det er mindre tiltrekkningspotensiale mellom negativladet ionpardanner i organisk fase og peptidene i donorfasen. Videre viser figuren at det er en økning i utbyttene når pH økes fra 7,0 til 9,0. I et svakt basisk miljø vil de fleste peptidene være delvis negativt ladet da mange av peptidene har isoelektrisk punkt under pH 9 med unntak vasopressin og endomorfin som har henholdsvis pI ved pH 10,8 og 10,0. En kan tenke at økning i utbytte kan komme av den reduserte løseligheten de svak negativt ladet peptidene har i donorfase. Ved pH 9 vil de være mer hydrofobe og løselighet i organisk fase vil favoriseres. En annen teori kan være at de peptidene med pI ved pH over 9 fortsatt vil være

positivt ladet og danner dermed komplekser med negative ionpaddanneren i hulfibermembranen og dermed blir ekstrahert over i organiskfase.

Det var litt uklart om peptidenes variasjon i utbytte var et resultat av pH-endringene eller om sammensetningen av de ulike buffere hadde innvirkning på utfallet. Det var spesielt usikkert om utbytteøkning ved pH 9 var direkte påvirket av pH-økningen og om en annen bufferløsning med pH 9 eller høyere, ville gi høyere eller lik utbytte som ammoniakbufferen.

Det ble utført nye eksperimenter med nye bufferløsninger i ulike pH-områder.

Tabell 6-1 Ekstraksjonsutbytte fra ulike bufferløsninger i donorfase

UTBYTTE %	pH 3 Ammoniak- maursyre	pH 5 Acetat Buffer	pH 5 citrat buffer	pH 7 Trisbuffer	pH 7,7 ABC buffer
Vasopressin	0	18	2-3<	9	7
Angiotensin II- AP	5	8	2-3<	0	0
Enkefalin	16	1	2-3<	2	0
Angiotensin II	56	4	2-3<	4	2
Endomorfin	11	2	2-3<	3	3
Angitensin III	70	1	2-3<	4	4
Angiotensin I	60	1	2-3<	4	4

Tabell 6-1 viser at ekstraksjonsutbyttet er høyest ved pH 3, noe som samstemmer med tidligere utført forsøk. Tabellen bekrefter at ekstraksjonsutbyttene er avhengig av pH og at bufferløsningene med lik pH har omtrent like utbytter.

I første eksperimentrunde ble det observert en økning i ekstraksjonsutbytte ved pH-overgangen fra 7 til 9. Det ble av den grunn fokus på å utprøve nye bufferløsninger med

basiske pH-områder. Bufferløsningene hadde pH-verdier fra 9,0-10,5. Natriumkarbonat/ bikarbonat buffer ble benyttet i pH-områdene 9,5-10,5 og borat/ borsyre buffer med pH 9 ble testet i forsøket.

Disse nye bufferløsningene ga ingen utbytte med unntak av Endomorfin som hadde en utbytte på rundt 2% i alle tilfellene. Dette beviser at pH-verdi ikke er den eneste faktoren som påvirker peptidenes ekstraksjonsutbytte og sammensetningen i bufferløsningene er av betydning. Det ble ikke gjort ytterligere forsøk med bufferløsninger ved pH-området ~ 9 eller høyere. Samme ekstraksjonsprosedyre ble testet igjen med positiv ladet ionpardanner som er diskutert mer i 6.1.5.

6.1.4. pH i akseptorfase

Fra tidligere studier [4-6] var det kjent at en sur akseptorfase med lav pH ~1 gir de høyeste utbyttene. Overskudd av H⁺-ioner i akseptorløsningen vil øke ekstraksjonen av ionpardanner-peptid komplekset over i akseptorfase ved at H⁺-ionene binder seg til ionpardanneren i kontaktområdet mellom akseptor og organisk fase og hydrogen-ionpardannerkompleks erstatter peptid-ionpardannerkompleksene. Ulike peptider ble analysert i denne oppgaven og de hadde alle ulike hydrofobisitet. Det var ønsket å observere eventuelle variasjoner i utbytte ved pH-endring i akseptorfase. Det ble utført ekstraksjoner med ulike konsentrasjoner av HCl, 0.1 M, 0.01 M, 0.001 M med pH-verdier på henholdsvis 1, 2, 3. pH i donorfase (bufferløsning med pH 3) og sammensetningen av organiskfase (10% DEHP i Oktanol) var holdt konstant gjennom forsøkene.

Tabell 6-2 Ekstraksjoner utført med ulike pH-verdier i akseptorfasen

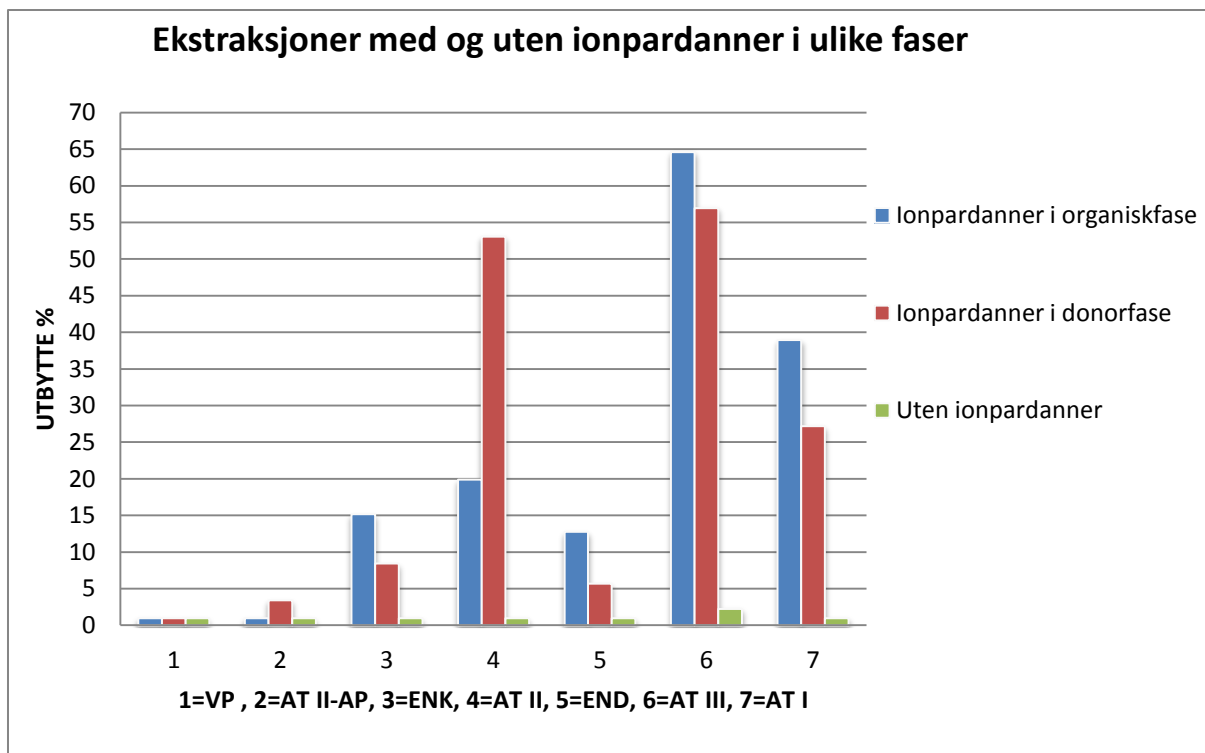
Utbytte %	100 mM HCl	10 Mm HCl	1 mM HCl
Vasopressin	0	0	0
Angiotensin II-AP	2	1	0
Enkefalin	12	3	0
Angiotensin II	41	18	0
Endomorfin	9	2	0
Angitensin III	67	8	0
Angiotensin I	54	3	0

Som man ser fra tabell 6-2 er det akseptorfase med pH 1 som gir desidert de høyeste utbyttene. Dette bekrefter forklaringen om at ved lave pH-verdier (~1), vil negativt ladet ionpardanner binde seg enklere til de positive ionene i akseptorfase. I akseptorfase vil ionpardanneren løsne seg fra peptidene og danne nye komplekser med H⁺-ioner. I ekstraksjon med 1 mM HCl, der både donor- og akseptorfase hadde pH 3, ble ingen utbytter observert.

6.1.5. Test av ionpardannere

Som det er belyst i 6.1.1. ble det bestemt å utføre ionpar-mediert LPME av peptider der ionpardanneren var tilsatt i organisk fase i stedet for i donorfase, noe som har vært vanlig i tidligere studier av peptider [4-6]. Det var usikkerhet rundt innvirkningen av ionpardanner (løst i organisk fase) på ekstraksjonen. Det var også manglende kjennskap til type carrier/ionpardannere som kunne benyttes i forbindelse med ekstraksjonen og som ville eventuelt gi høyest mulig utbytte.

Det ble gjort forsøk for å bevise at ekstraksjonen var avhengig av transportmolekyl som fraktet peptidene over i organisk fase ved å danne hydrofobe komplekser med dem. Videre var det hensiktsmessig å utføre eksperimenter med ionpardanner i henholdsvis donorfase og organisk fase for å sammenligne metodene. Ionpardanneren som var tilsatt i donorfase var 1-heptansulfonsyre (800 µl 62,5 mM 1-heptansulfonsyre løsning og 200 µl peptid løsning i donorfase, n-oktanol som organiskfase, og 12 µl 100 mM HCl som akseptorfase) og DEHP ble brukt som ionpardanner i organiskfase (med 800 µl H₂O og 200 µl peptid i donorfase, n-oktanol og 10% DEHP i organisk fase og 12 µl 100 mM HCl som akseptorfase).



Figur 6-3 Ekstraksjonsutbytter med ionpardanner i organisk- og donorfase og ekstraksjon uten ionpardanner

Det er tydelig fra figur 6-3 at ekstraksjonen er totalt avhengig av ionpardannerens tilstedeværelse. Som tidligere nevnt i avsnitt 6.1.1. og 6.1.2. har ionpardanner i kombinasjon med organisk fase gitt akseptable utbytteverdier og kan brukes i LPME av peptider og kan bli sett på som et likeverdig alternativ til ionpardanner-donorfase kombinasjonen.

I en rekke ekstraksjoner ble ulike forbindelser med forskjellige kjemiske egenskaper prøvd ut som ionpardannere. Det ble blant annet utført forsøk med alkoholer, syrer og fosfater. Disse ionpardannerne er brukt i tidligere studier i forbindelse med LPME av hydrofile legemidler [2] og EME av modell-peptider [7] og har vist akseptable utbytter. Disse ionpardannerne er valgt ut basert på deres anioniske funksjonelle grupper som fremmer kompleksdannelse med de positiv ladete forbindelsene og også med tanke på deres hydrofobe egenskaper som er viktig for å frakte kompleksene over i organisk fase.

DEHP eller di(2-ethylhexyl) fosfat har i flere utførte studier [2,7] gitt de høyeste utbyttene og var derfor førstevalg som ionpardanner i oppgaven. For å undersøke mer rundt DEHPs potensiale som ionpardanner og optimalisere utbytte, ble det eksperimentert med ulike konsentrasjoner av DEHP (i ulike organiske løsningsmidler som diskutert i 6.1.8.).

I alle ekstraksjonene der ionpardannere ble prøvd ut var det brukt stabile ekstraksjonsbetingelser med 800 µl H₂O og 200 µl peptidløsning (5µg/ml) som donorløsning (slutt-pH ~3), alle ionpardannere løst i n-oktanol og hadde konsentrasjon på 10% (de som ikke løste seg til 10% ble tilsatt til metning) og akseptorfasen var 12 µl 100 mM HCl og alle prøvene ble ristet på vibrator i 45 minutter med en hastighet på 750 rpm.

Tabell 6-3 viser ekstraksjonsutbytte ved LPME med ulike ionpardannerne. * Methyltriocetyl ammonium chlorid

Ionpardanner i organisk fase	VP	ANG II-AP	ENK	ANG II	END	ANG III	ANG I
*Ekstraksjon uten ionpardanner	–	–	–	–	–	2,3	–
5% DEHP	–	–	11	13	11	44	40
10% DEHP	–	3	12	57	8	69	61
15% DEHP	–	5	9	57	7	48	51
20% DEHP	–	–	11	6	12	27	8
10% TDP	–	–	8	28	6	48	45
10% DBP	–	5	11	1	–	–	–
10% Methyl.* pH 9,0	0	3	6	1	5,5	1	3
10% Methyl.* pH 9,5	0	1	5	1	6	1	2
10% Methyl.* pH 10,5	0	1	8,5	1	8	1	3

Ionpardannerne listet under ga veldig lave eller ingen utbytte:

10% TEHP, 10% caprylic syre, 10% fenyl borsyre, 10% naftyl fosfat, 10% Naftalin syre, 10% Bis (4-Nitrofenyl) fosfat, 10% Diheksadecyl fosfat, 10% Dibenzyl fosfat, 10% Tetraheksyl ammonium bromid.

Innledningsvis i oppgaven ble det utført ekstraksjoner med og uten ionpardanner for å demonstrere den avgjørende rollen ionpardanner har i ekstraksjonen. Dette er også tatt med øverst i tabell 6-3.

Som resultatene viser, ga mange av ionpardannerne veldig lavt eller ingen ekstraksjonsutbytte. DEHP, TDP og DBP var blant de få ionpardannerne som ga utbytte. Disse resultatene er i samsvar med tidligere studier der EME (elektromembran ekstraksjon) er utført på peptider [7], og de samme ionpardannere som i den studien er testet ut. Dette viser at strukturegenskapene og hydrofobisiteten til transportmolekylene er avgjørende for peptidenes ekstraksjon over i organisk fase.

Som tabell 6-3 viser så har verken lavere eller høyere konsentrasjoner av ionpardanner noe virkning på ekstraksjonsutbytte. Enkefalin og endomorfin ser ikke ut til å være påvirket av konsentrasjonsendringen mens de andre peptidene har lavere utbytte ved høyere eller lavere konsentrasjoner av DEHP. En styrke på 10% viser seg å være den optimale konsentrasjonen for DEHP.

I en runde med forsøk ble det benyttet positiv ladet ionpardanner i ekstraksjonene, der donorfase bestod av basiske bufferløsninger med pH-området 9,0-10,5.

Mange av peptidene i peptidløsningen, utenom vasopressin og endomorfin, har isoelektrisk punkt under 9 og vil teoretisk sett være negativ ladet ved pH-området 9,0-10,5. Det ble av den grunn bestemt å bruke en positiv ladet ionpardanner for å initiere ekstraksjonen.

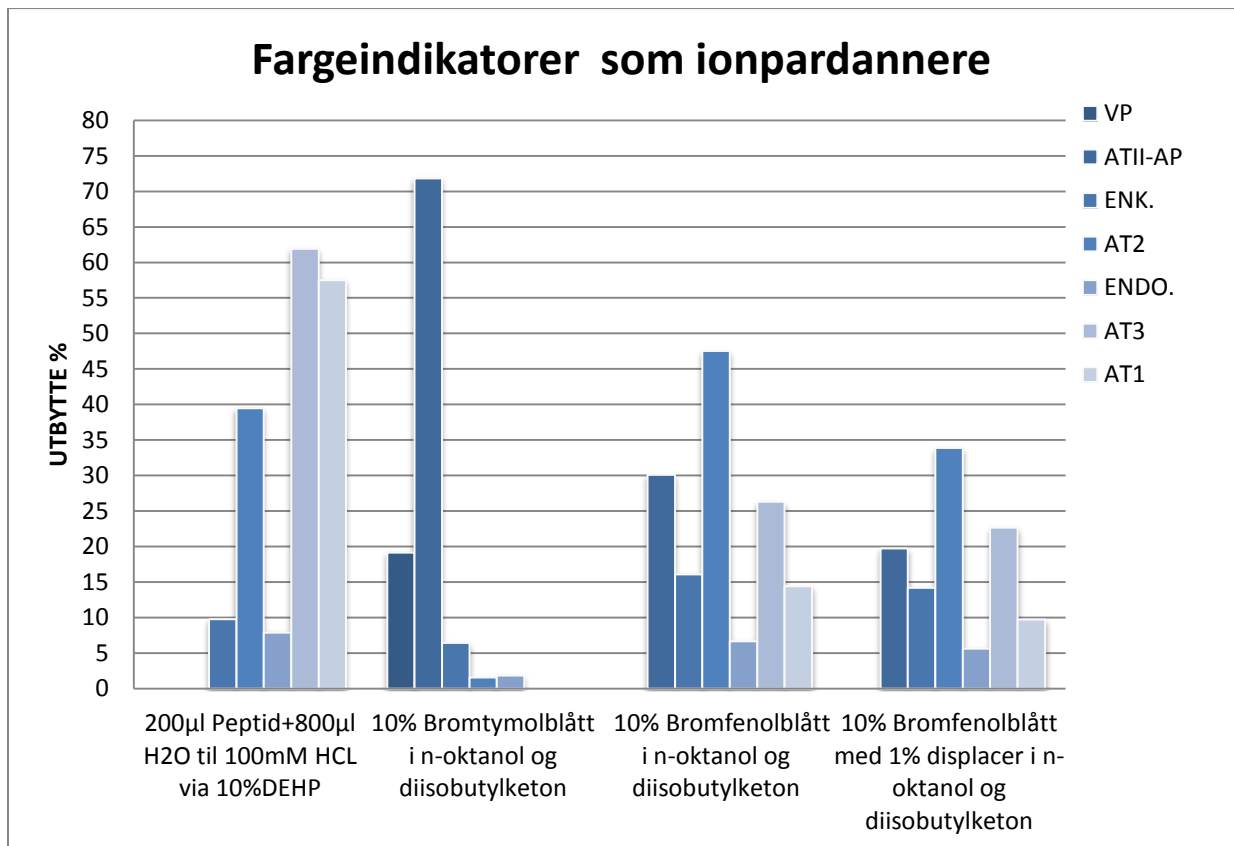
I tidligere forsøk som diskutert i 6.1.3. var det utført ekstraksjoner med pH-verdier 9,0-10,5 i donorløsningen. I de forsøkene var ekstraksjonen mediert av den negativ ladede ionpardanneren DEHP. Forsøkene med DEHP ga ingen ekstraksjonsutbytte (med unntak av ekstraksjon med fosfatbuffer med pH 9,0 i donorløsningen).

I den nye runden av ekstraksjoner med positiv ladet ionpardanner (10 % metyltrioktylammoniumklorid) kunne en observere et lavt nivå av ekstraksjonsutbytte. Denne svake økningen i utbytteverdiene i forhold til ekstraksjoner med DEHP kan som sagt skyldes kompleksdannelse mellom den positive ionpardanneren og de delvis negativ ladede peptidene. Peptidene er i dette tilfelle litt mer hydrofobe for å kunne diffundere over i organisk fase. Utbytteverdiene er fortsatt veldig lave og det tyder på at ekstraksjonforhold ikke er optimale. Strukturegenskaper til bufferene og ionpardanneren er avgjørende faktorer i denne

ekstraksjonen. Det ble da ikke utført ytterligere forsøk for å optimalisere ekstraksjonsoppsettet.

6.1.6. Fargeindikator som ionpardanner

Det ble tatt utgangspunkt i tidligere studier [2] og gjennomført eksperimenter med utvalgte fargeindikatorer. Tidligere er fargeindikatorer prøvd i LPME av hydrofile legemidler og gitt lovende utbytteverdier [2] men det er først nå dette ble prøvd i forbindelse med LPME av peptider. Bromtymolblått, bromfenolblått, bromfenolblått med 1% displacer (2-etylheksyl 4-dimetyl aminobenzoat) og lecitin, alle med en konsentrasjon på 10% i en blanding av n-oktanol og di-isobutyl keton og DEHP (i henholdsvis 55:35:10 w/w), ble prøvd ut som ionpardannere. De fargeindikatorne som ikke løst seg opp til 10% ble tilsatt til metning.

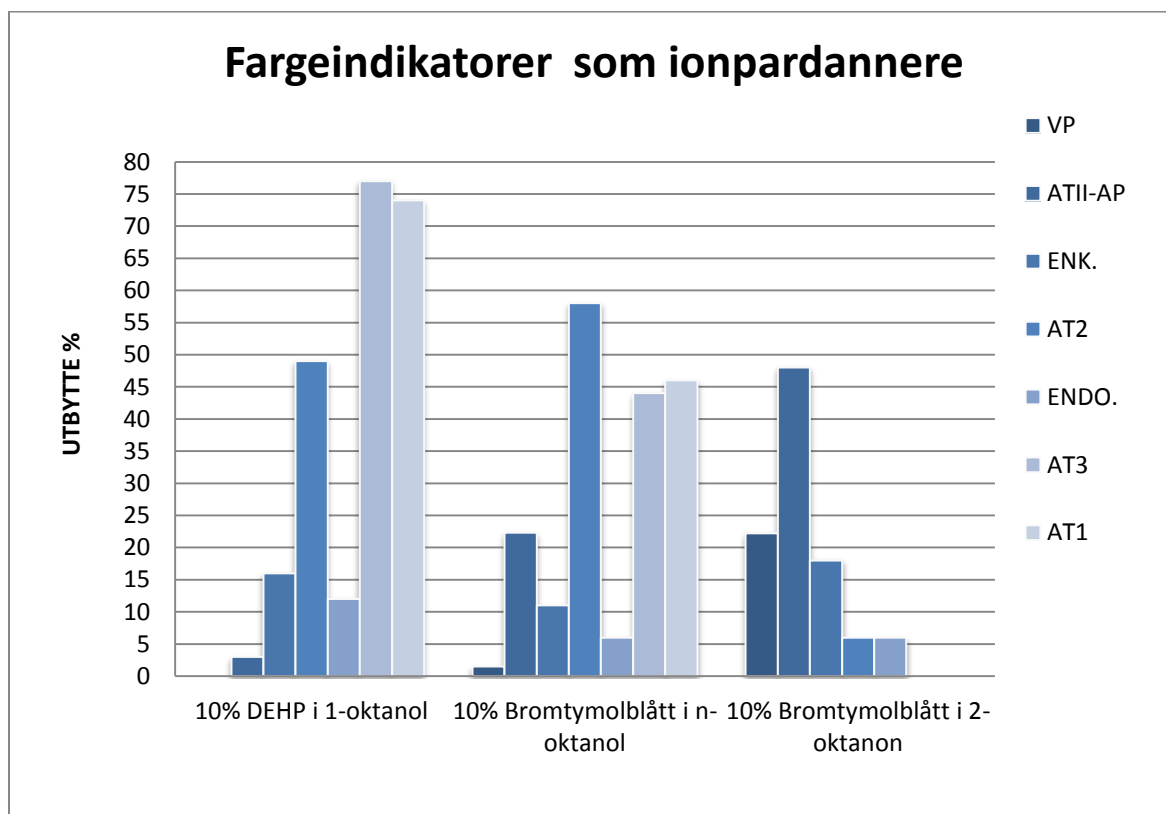


Figur 6-4 Ekstraksjonsutbytter med fargeindikatorer som ionpardanner

Som figur 6-4 viser er det ekstraksjonsutbytter av angiotensin II-AP i alle tilfellene der fargeindikator er brukt som ionpardanner. Det er høye utbytteverdier av angiotensin II-AP i

forhold til ekstraksjon med DEHP. Figuren viser videre ekstraksjonsutbytte av vasopressin når bromtymolblått er brukt som ionpardanner, det er ikke ved noen tidligere ekstraksjoner observert utbytte av vasopressin. Fargeindikatorne har sammenlagt vist høyere affinitet til og gitt høyere utbytte av peptidene, angiotensin II-AP, vasopressin, enkefalin, som vanligvis gir lavest utbytteverdier med DEHP og andre utprøvde ionpardannere.

I en ny runde med forsøk ble bromtymolblått testet i nye kombinasjoner med organisk fase. Bromtymolblått hadde vist spesielt bra selektivitet ved ekstraksjon av en del av peptidene og det ble igangsatt ekstraksjoner for å undersøke rundt dens potensiale som ionpardanner. Det ble eksperimentert med løsninger av bromtymolblått med konsentrasjon på 10% i henholdsvis n-oktanol og 2-oktanon.



Figur 6-5 Ekstraksjonsutbytte med fargeindikator som ionpardanner

Det er tydelig fra figur 6-5 at med bromtymolblått og n-oktanol i organisk fase er utbytteverdiene for vasopressin og Ang II-AP mye redusert i forhold til ekstraksjon med den tidligere kombinasjonen av bromtymolblått med n-oktanol og di-isobutyl keton. På den andre siden har ekstraksjonsutbyttene for Ang I, II og III hatt en sterk økning med den nye bromtymolblått-n-oktanol kombinasjonen.

Som man ser fra figur 6-5 er det høyere utbytteverdier for de 3 første peptidene (vasopressin, angiotensin II-AP og enkefalin) når fargeindikatoren er blandet med 2-oktanon og lave verdier for resten av peptidene.

Det man kan konkludere med utfra figur 6-4 og 6-5 er at tilstedsværelse av en keton som organisk løsningsmiddel bidrar til økte utbytteverdier for 3 av peptidene (Vasopressin, Angiotensin II-AP og Enkefalin) som vanligvis gir lave/ingen utbytter med alkoholer i organiske fasen (som n-oktanol).

6.1.7. Kombinasjon av ionpardannere

Med utgangspunkt i den ulike selektiviteten ionpardannerne hadde, og for å optimalisere utbytteresultatene, ble det satt i gang eksperimenter for å teste kombinasjoner av ionpardannere.

De beste ionpardannere med forskjellige selektivitet ble valgt ut til nye forsøk. DEHP med spesiell selektivitet for angiotensin I, II og III ble blandet med bromtymolblått som hadde vist spesiell selektivitet for vasopressin, angiotensin II-AP og enkefalin. Det ble utført ekstraksjoner med kombinasjoner av ionpardannere som var løst i ulike organiske løsningsmidler.

Tabell 6-4 Utbytteverdier for diverse ionpardannere i forskjellige organiske løsningsmidler. (*Bromtymolblått)

UTBYTTE%	DEHP i n-oktanol	DEHP i 2-oktanon	Bromtym. i n-oktanol	Bromtym. i 2-oktanon	Bromtym.* og DEHP i n-oktanol	Bromtym.* og DEHP i 2-oktanon
Vasopressin	0	0	1.5	22	0	0
Angiotensin II-AP	3	0	22	47	14	0
Enkefalin	15	18	11	18	9	10
Angiotensin II	49	8	57	5.5	61	0
Endomorfin	11	17	5	5	5	0
Angitensin III	77	44	44	0	42	57
Angiotensin I	74	2.6	46	0	39	0

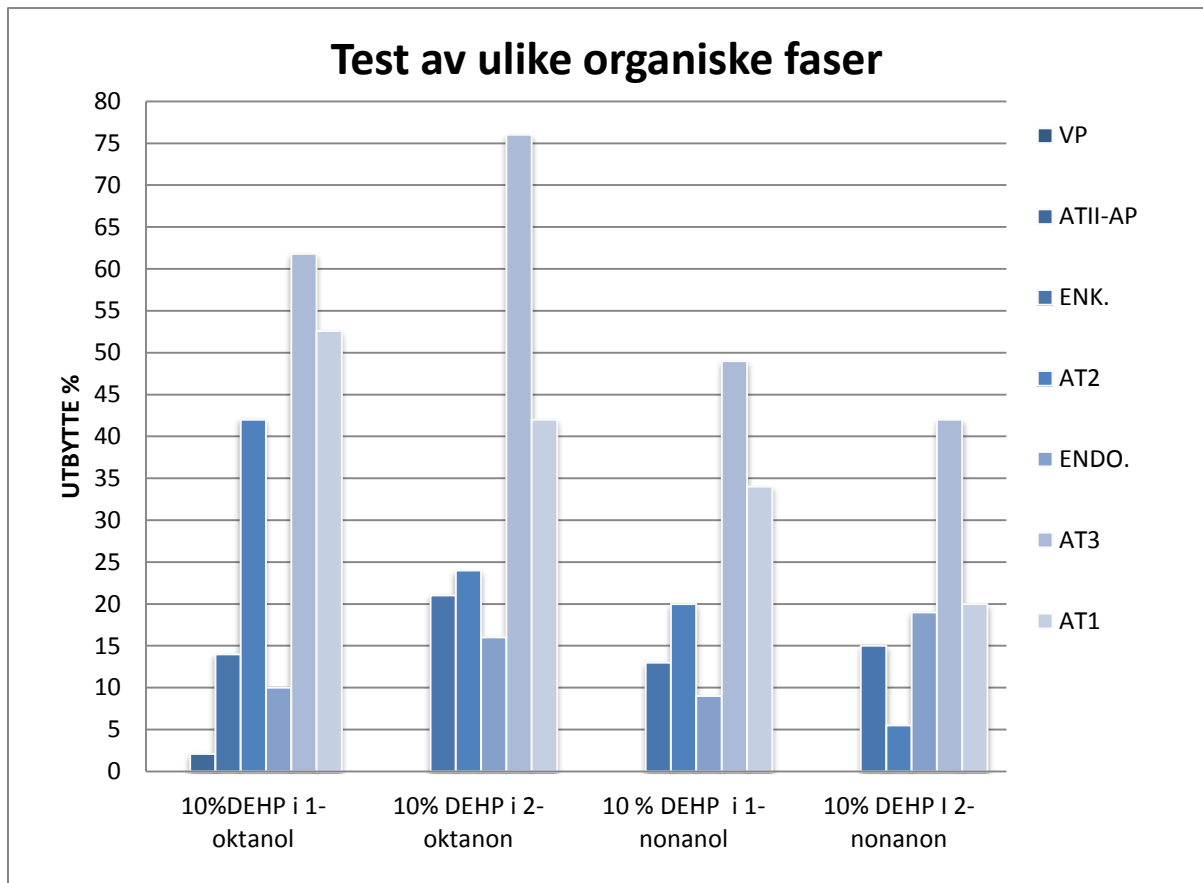
Som tabell 6-4 viser så har DEHP høyeste utbytteverdier når den er løst i n-oktanol. Bromtymolblått ser derimot ut til å ha variert selektivitet i de ulike løsningsmidlene. Fargeindikatoren gir høyest utbytte av angiotensinene når den er løst i n-oktanol (alkohol) mens utbytteverdiene for angiotensin II-AP, vasopressin og enkefalin er høyest når ionpardanneren er løst i 2-oktanon (keton).

Videre ble det utført ekstraksjoner med kombinasjonen av DEHP-bromtymolblått i både n-oktanol og 2-oktanon. Som tabellen over viser er det en liten økning i utbytteverdiene for angiotensin II og angiotensin II-AP og et svakt fall i utbytteverdiene for resten av peptidene når fargeindikator og DEHP er løst i oktanol. Bromtymolblått og DEHP i 2-oktanon ser ut til å ikke fungere like bra i kombinasjon. Utenom angiotensin og enkefalin var det ikke observert ekstraksjonsutbytte for de andre peptidene i blandingen.

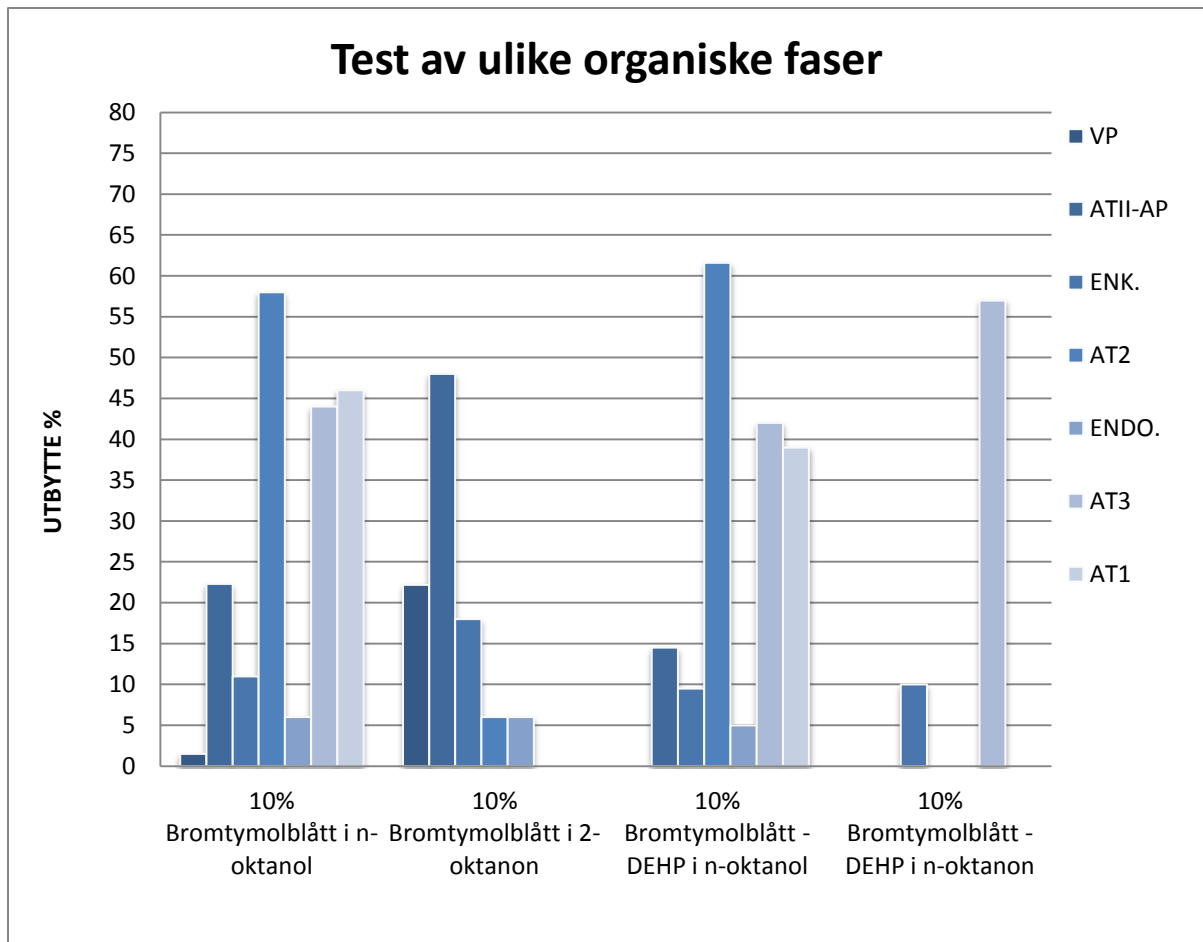
Et argument for de lave utbytteverdiene i henholdsvis n-oktanol og 2-oktanon kan være den for høye konsentrasjon av ionpardannere. En 10% konsentrasjon av hver ionpardanner kan føre til en overskudd av negative ladninger i organisk fase og dannelse av hydrofobe komplekser med peptidene. I en slik tilstand kan kompleksene være for hydrofobe til å bryte binding og bevege seg over i akseptorfase.

6.1.8. Valg av organisk fase

1-oktanol, 2-oktanon, 1-nonanol, 2-nonanon, dodecyl acetat, isopentylbenzen, dihexyleter og NPOE var alle testet ut som organiske fase, med forhold som angitt i tabell 5-10 i avsnitt 5.4.8.



Figur 6-6 Ekstraksjonsresultater av LPME med ulike organiske faser



Figur 6-7 Ekstraksjonsresultater av LPME med ulike organiske faser

Ved tidligere studier har 1-oktanol og 1-nonanol vist bra resultater blant flere organiske løsningsmidler, og 1-oktanol har gitt høyest utbytte av de to [2,5]. Bakgrunnen for eksperimenter med ketoner som organiske faser er deres tilfredsstillende utbytteverdier fra tidligere forsøk [7]. LMPE av peptider, mediert av organisk løsningsmiddel kombinert med ionpardannere var ikke utført tidligere og det var usikkert om denne kombinasjonen ville fungere like bra som ved EME (elektromembran ekstraksjon) [7].

Ekstraksjoner med løsemidlene dodecyl acetat, isopentylbenzen, dihexyleter og NOPE (Nitrofenyl-octyl eter) ga veldig lavt eller intet utbytte. Dette beviser at strukturegenskapene til løsningsmidlene er avgjørende for ekstraksjonen. Den hydrofobe peptid-ionpardanner komplekset vil for eksempel løse seg dårlig i et for hydrofilt løsningsmiddel.

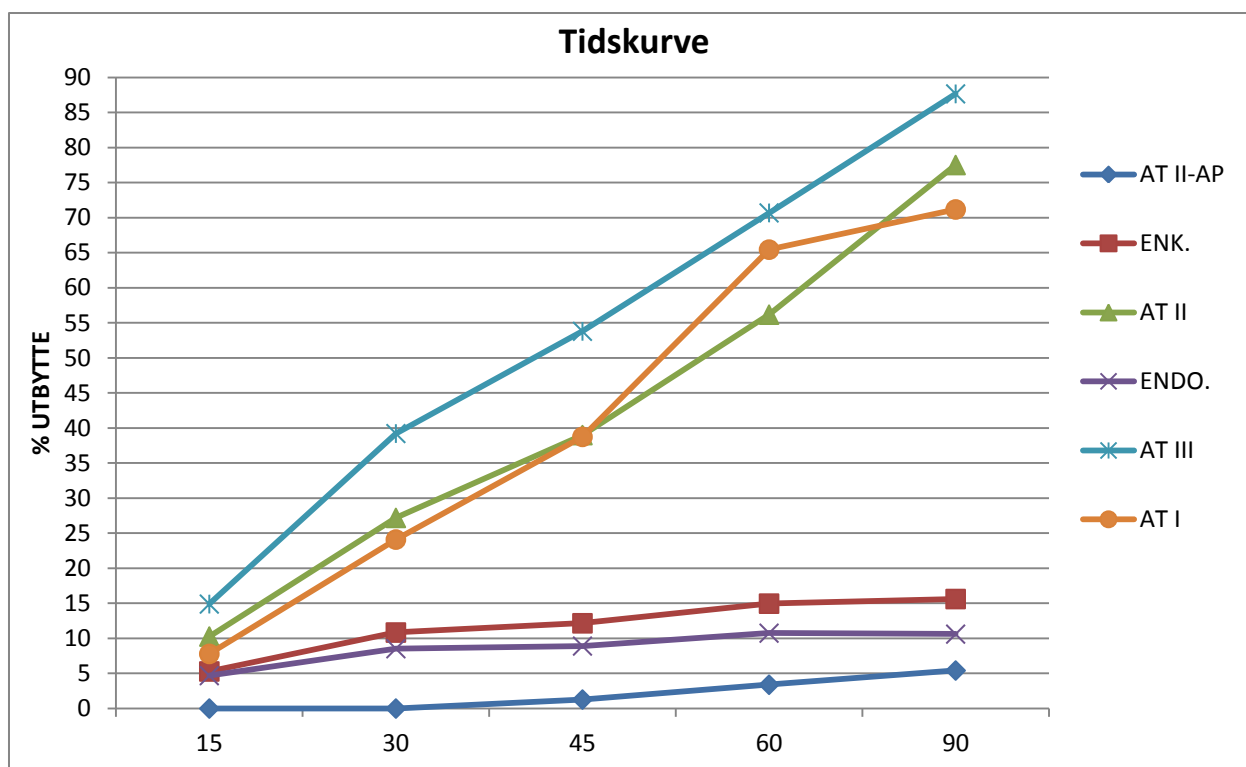
Som Figurene 6-6 og 6-7 viser, ga 1-oktanol (alkohol), 2-oktanon (keton) (og diisobutylketon) de høyeste utbytteverdiene blant løsningsmidlene som ble testet. Disse to viser ganske like utbytteverdier når de er kombinert med DEHP som ionpardanner mens de gir utbytter på ulike

peptider i kombinasjon med bromtymolblått. I siste tilfellet gir alkoholen (1-oktanol) høyest utbytte av angiotensinene I, II og III mens keton (2-oktanon) viser høyest affinitet til vasopressin, angiotensin II-AP, og enkefalin.

Som tidligere diskutert i 6.1.7. ble det bestemt å eksperimentere med kombinasjon av ionpardannere for å dra nytte av selektiviteten deres og eventuelt optimalisere ekstraksjonsutbytte. En blanding av de beste ionpardannerne ble testet i 1-oktanol og 2-oktanon som hadde gitt de høyeste utbytteresultatene. Denne kombinasjonen i løsning med 1-oktanol (som vist i figur 6-7), ga ingen betydelige endringer i utbytteresultatene. Ionparkombinasjonen løst i 2-oktanon ga derimot betydelig lavere utbytteresultater. Med unntak av enkefalin og angiotensin III var det ingen utbytte observert for de andre peptidene. Det kan være flere årsaker til den betraktelige nedgangen av utbytteverdiene. Det kan for eksempel begrunnes av den økte hydrofobisiteten til kompleksene og/eller sterke (dipol-) bindinger mellom de og organiske fasen som gjør det vanskelig for kompleksene å diffundere over i akseptorløsningen.

6.1.9. Ekstraksjonstid

Det ble utført en serie ekstraksjoner av peptider med ulike ekstraksjonstider. Dette ble gjort for å observere ekstraksjonstidens påvirkning på utbytteresultatene. 5 ulike ekstraksjonstider ble benyttet (15, 30, 45, 60 og 90 minutter). Til ekstraksjonene var det brukt 200 µl peptidløsning (2,5 µg/ml) og 800 µl bufferløsning (pH 3) som donorløsning, 10% DEHP i 1-oktanol som organisk fase, 12 µl 100 mM HCl som akseptorløsning. Prøvene ble plassert i vibrator og ekstrahert med ulike ekstraksjonstider med en hastighet på 750 rpm.



Figur 6-8 Ekstraksjonsutbytter ved ulike ekstraksjonstid

Som figur 6-8 viser har lengere ekstraksjonstid gitt betydelig høyere ekstraksjonsutbytte (opptil 70-90 %) for angiotensinene I, II, og III. På den andre siden var ekstraksjonsutbyttene for vasopressin, enkefalin og endomorfin nesten ikke påvirket av ekstraksjonstiden. Tidskurven viser at de peptidene som øker i utbytte ved økt ekstraksjonstid er de samme peptidene som gir høyest utbytte under normale ekstraksjonsforhold (ved standard ekstraksjonstid i metoden, 45 minutter) og de peptidene med laveste utbytteverdier forblir uendret. Ved lengere ekstraksjonstid har peptidene mer tid til å diffundere over i de ulike fasene. Dette viser at denne metoden, ved de angitte ekstraksjonsforholdene er en velegnet ekstraksjonsmetode for angiotensinene I, II og III.

6.2. PLASMAPRØVER

6.2.1. LPME i plasma

Etter å ha eksperimentert med ulike pH i donor- og akseptorfase, testet forskjellige ionpardannere og organiske faser, skulle det mest optimale ekstraksjonsoppsettet benyttes ved LPME av plasma.

Ingen opprenskningsprosedyre av plasmaproteiner var utført da ionpardanner ikke var tilsatt i donorfasen. Et surgjort plasma (med pH 3-4 som var vist å være optimal pH i metoden) vil da ha et høyt innhold av positiv ladede proteiner som kunne fortsatt skape vanskeligheter for ekstraksjonsprosessen. Ulike plasmaprøver med ulik pH ble testet i forsøkene.

6.2.2. Plasma forsøk

Prøveløsningene med plasma bestod av rent plasma, fortynnet plasma med destillert vann, plasma surgjort med 0,1 M HCl til pH ~3,5 og ~ 4,0.

Det var ingen utbytter observert for prøveløsninger med rent plasma og plasma fortynnet med destillert vann. Utbytteverdiene for surgjort plasma er som angitt i tabell 6-5.

Tabell 6-5 Ekstraksjonsutbytte ved LPME i plasmaprøver

UTBYTTE%	Plasma prøve pH ~ 3,5	Plasma prøve pH ~ 4,0
Vasopressin	0	0
Angiotensin II-AP	2	3
Enkefalin	9	8
Angiotensin II	11	5
Endomorfine	7	7
Angitensin III	13	6
Angiotensin I	12	4

Som tabell 6-5 viser, er utbytteverdiene ved plasma ekstraksjonene veldig lave. Det er litt høyere verdier ved pH ~ 3,5 enn ved pH ~ 4. Som tidligere nevnt er det ikke utført LPME av peptider i plasma når ionpardanneren har vært impregnert i hulfiberens vegg sammen med organisk fase og dermed ingen studier tilgjengelig for sammenligning. Det kan være flere årsaker som påvirker/hindrer ekstraksjonsprosessen og det er vanskelig å trekke konkrete konklusjoner, men en kan drøfte mulige teorier.

Donorfasen i begge tilfellene (tabell 6-5) var til dels blakket etter å ha blitt ekstrahert i 45 minutter. Dette kan være et resultat av kompleksdannelse mellom ionpardanner i hulfiber veggen og positive ladete plasmaproteiner i donorfasen. En mulig kompleksdannelse mellom plasmaproteinene og ionpardanneren fører til betydelig hindring av peptidekstraksjonen (utfellinger i donorfase og begrenset omfang av kompleksdannelse mellom ionpardanner og peptidene da de må konkurrere med plasmaproteinene) .

Donorfasen til plasmaprøvene med pH ~ 4 så blakkere ut enn de med pH ~ 3,5. Det er muligens litt mindre grad av proteinfelling ved pH ~ 3,5, noe som kan være årsaken til det svakt høyere utbyttet. Det ble ikke utført ytterligere forsøk for å studere ekstraksjonsutbytte ved pH-endringer i plasma, dette kan eventuelt undersøkes i framtidige studier.

7 KONKLUSJON

I oppgaven er det blitt utført grunnleggende studier av ulike ekstraksjonsforhold ved ionparmediert LPME av peptidene angiotensin I, II og III, vasopressin, enkefalin, endomorfin og angiotensin II-antipeptid.

I oppgaven ble det bevist at ekstraksjon av peptider med LPME som metode er avhengig av en ionpardanner (transportmolekyl). Det ble videre bekreftet at tilsetning av ionpardanner til organisk løsningsmiddel virker like bra som ionpardanner tilsatt til donorløsning. Dette var ikke prøvd tidligere i forbindelse med LPME av peptider. En tilsetning av transportmolekyl i organisk fase reduserer prøveopparbeidelsestiden ettersom det blir unødvendig med opprensning av prøver med biologisk materiale (proteinfelling av plasma). Denne teknikken ble brukt som grunnlag for alle eksperimentene som er utført i oppgaven.

Metoden ga brukbare og akseptable ekstraksjonsutbytter med vann som prøveløsning. Metoden ble optimalisert etter å ha eksperimentert med ulike ekstraksjonsforhold. Utbytter opptil 70% og 80% av de ulike peptidene var observert i forsøkene.

Arbeidet med oppgaven førte til økt forståelse for peptidenes diffusjon gjennom de ulike fasene. Betydningen av pH i de ulike fasene ble erkjent og studert i oppgaven. Det var tydelig at et overskudd av positive ioner i akseptorfase var nødvendig for at peptidene skal bli ekstrahert (akseptorfase skal være mer protonert enn donorløsningen). Høyest utbytte ble oppnådd ved lave pH-verdier (~ 3) i donorløsningen. Det ble imidlertid observert høy utbytte ved svak basisk donorløsning i noen få tilfelle av forsøkene.

Viktigheten av strukturegenskapene til de ulike transportmolekylene ble studert og påvist. Det er tydelig at peptidene har ulik affinitet til de ulike ionpardannerne. Kompatibiliteten til ionpardannerne med organisk fase er også betydningsfull for en optimalisert ekstraksjonsprosess.

På bakgrunn av tidligere studier ble det mest fokus på virkning av negativ ladede ionpardannere på ekstraksjonen. DEHP og fargeindikatoren bromtymolblått ga de høyeste utbytteresultatene blant ionpardannerne. Disse to transportmolekylene virket selektive og ga utbytter av ulike peptider. Ved å ta selektiviteten deres i betraktning ble det utført ekstraksjoner med kombinasjon av de to ionpardannerne. Utbytteverdiene med ionpardanner kombinasjonen var ikke høyere enn allerede oppnådde utbytter med ionpardannere enkeltvis.

Det kan i videre forsøk eksperimenteres med ulike organiske faser for å optimalisere betingelsene.

En rekke forsøk med positiv ladet ionpardanner ble gjennomført i både sur og basisk donorløsning. Det viste seg at den positive ionpardanneren var mer effektiv når prøveløsningen var basisk, men det var likevel oppnådd lave utbytteverdier (under 10%). Videre optimalisering av ekstraksjonsbetingelsene ble ikke utført i oppgaven. Dette er et interessant moment ved LPME av peptider da peptider er bygd opp av zwitterioniske aminosyrer og har pH-avhengige egenskaper. Mer grunnleggende eksperimenter med positiv ladet ionpardanner i basisk miljø kan være et interessant utgangspunkt i videreutvikling av ionparmediert LPME av peptider.

Den optimaliserte ekstraksjonsmetoden med de beste ekstraksjonsbetingelsene ble prøvd ut med plasma i prøveløsningen. Utbytteverdiene i plasma var rundt 10% og lave i forhold til ekstraksjoner fra vann. Det ble imidlertid ikke utført forsøk for å optimalisere metoden i plasma. Som nevnt, har ikke transportmolekylen blitt kombinert med organisk fase tidligere ved LPME av peptider og det var lite kjennskap rundt virkningen. Dette kan eventuelt bli et forsøksgrunnlag i fremtidige studier.

8 REFERANSER

Referanse 1

Ho TS, Reubsaet JL, Anthonsen HS, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. *Liquid-phase microextraction based on carrier mediated transport combined with liquid chromatography-mass spectrometry. New concept for the determination of polar drugs in a single drop of human plasma..* Journal of Chromatography A 2005, 1072(1):29-36

Referanse 2

Ho TS, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. *Experiences with carrier-mediated transport in liquid-phase microextraction.* Journal of Chromatographic Science 2006, 44(6):308-16

Referanse 3

Ho TS, Halvorsen TG, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE: *Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport.* Journal of Chromatography A 2003, 998(1-2):61-72.

Referanse 4

Reubsaet JL, Paulsen JV. *Ion-pair mediated transport of small model peptides in liquid phase micro extraction under acidic conditions.* Journal of Separation Science. 2005, 28(3):295-300

Referanse 5

Reubsaet JL, Loftheim H, Gjelstad A. *Ion-pair mediated transport of angiotensin, neurotensin, and their metabolites in liquid phase microextraction under acidic conditions.* Journal of Separation Science 2005, 28(11):1204-10

Referanse 6

Gjelstad, A., *Selektiv væskefasemikroekstraksjon av angiotensin I, II og III i humant plasma.* 2004: Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Referanse 7

Seip KF, Stigsson J, Gjelstad A, Balchen M, Pedersen-Bjergaard S. *Electromembrane extraction of peptides – Fundamental studies on the supported liquid membrane.* Journal of Separation Science 2011, 34(23):3410-7

Referanse 8

Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE.: *Legemiddelanalyse.* Fagbokforlaget, Vigmostad & Bjørke AS, Trondheim 2004

Referanse 9

Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. *Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques*. Journal of Chromatography. B Analytical Technologies in the biomedical and life Sciences. 2005, 817(1):3-12

Referanse 10

Ho, T.S., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen. *Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions*, Analyst, 2002. 127(5): 608-613

Referanse 11

Moore GJ, Ganter RC, Franklin KJ. *Angiotensin 'antipeptides': (-)messenger RNA complementary to human angiotensin II (+)messenger RNA encodes an angiotensin receptor antagonist*. Biochemical and biophysical Research Communications 1989, 160(3):1387-91.

Referanse 12

Ptasinska-Wnuk D, Mucha SA, Lawnicka H, Fryczak J, Kunert-Radek J, Pawlikowski M, Stepień H. *The effects of angiotensin peptides and angiotensin receptor antagonists on the cell growth and angiogenic activity of GH 3 lactosomatotroph cells in vitro*. Endocrine 2012, DOI: 10.1007/s12020-012-9659-2

Referanse 13

Sand O, Sjaastad ØV, Haug E, Toverud KC. *Menneskets fysiologi*. 4.opplag, gyldendal norsk forlag AS, Oslo 2001

Referanse 14

Pedersen-Bjergaard, S, Rasmussen KE. *Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction*. Journal of Chromatography A, 2008. 1184(1-2):132-142

Referanse 15

Pedersen-Bjergaard, S, Rasmussen KE. *Liquid-phase microextraction (LPME) and capillary electrophoresis of acidic drugs*. Electrophoresis. 2000, 21(3):579-85

Referanse 16

Pedersen-Bjergaard, S. Ho T.S, Rasmussen, K.E. *Fundamental Studies on Selectivity in 3-Phase Liquid-Phase Microextraction (LPME)*. Journal of Separation Science 2002, 25(3) 141-146

Referanse 17

Doonan S.: *Peptides and Proteins*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK 2002

Referanse 18

Jakubke hd, Sewald N.: *Peptides: chemistry and biology*. 2. Opplag, Wiley VCH, Weinheim 2009

Referanse 19

Loftheim H. *Selektiv væskefasemikroekstraksjon av neurotensin og metabolittene i vann og biologiske væsker*. 2004: Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

Referanse 20

Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S, Krogh M, Grefslie H, Grønhaug T. *Development of a Simple In-Vial Liquid-Phase Microextraction Device (LPME) for Drug Analysis Compatible with both Capillary Gas Chromatography, Capillary Electrophoresis, and High-Performance Liquid Chromatography*. *Journal of Chromatography A* 2000, 873(1) 3-11

Referanse 21

Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. *Liquid-phase Microextraction utilizing Plant Oils as Intermediate Extraction Medium – Towards Elimination of Hazardous Organic Solvents in Sample Preparation*. *Journal of Separation Science* 2004, 27(17-18):1511-15164

Referanse 22

Cologna SM, Russell WK, Lim PJ, Vigh G, Russell DH. *Combining isoelectric point-based fractionation, liquid chromatography and mass spectrometry to improve peptide detection and protein Identification..* *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 2010, 21(9):1612-9

Referanse 23

Santagostino A, Giagnoni G, Fumagalli P, Pavesi D, Torretta E. *Isoelectric point determination of human and camel beta-endorphin, alpha-endorphin and enkephalins*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1982, 104(2):577-82.

Referanse 24

Stigsson J. *Studier av peptiders elektrokinetiske migrasjon over en kunstig væskemembran*. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo 2010

Referanse 25

Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. *Liquid-Liquid-Liquid Microextraction (LLLME) for Sample Preparation of Biological Fluids prior to Capillary Electrophoresis*. *Analytical Chemistry* 1999, 71(14) 2650-2656.

Referanse 26

Butler WR, Guthertz LS. *Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of Mycobacterium species*. *Clinical microbiology reviews* 2001, 14(4):704-26