

# Robusthet og systemytelse av væskemembraner under elektromembranekstraksjon av peptider fra humant plasma

Sara Haglund Moen



Masteroppgave i legemiddelanalyse

45 studiepoeng

Seksjon for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-vitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2022



# **Robusthet og systemytelse av væskemembraner under elektromembranekstraksjon av peptider fra humant plasma**

Sara Haglund Moen

Masteroppgaven ble gjennomført ved Faggruppen for legemiddelanalysen, Seksjon for Farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt Universitetet i Oslo, i perioden august 2021 til mars 2022.

## **Veiledere:**

Professor Stig Pedersen-Bjergaard

Postdoktor Frederik Andre Hansen

Stipendiat Torstein Kige Rye

© Sara Haglund Moen

2022

Robusthet og systemytelse av væskemembraner under elektromembranekstraksjon av peptider  
fra humant plasma

Sara Haglund Moen

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

## Forord

Først vil jeg rette en stor takk til mine veiledere Stig Pedersen-Bjergaard, Torstein Kige Rye og Fredrik Andre Hansen. Deres imøtekommenhet og veiledning har vært over all forventning, og jeg setter stor pris på de gode faglige samtalene vi har hatt det siste året. Deres kloke hoder har virkelig inspirert meg. Tusen takk til Anne Hay for veiledning og hyggelige timer på lab. Radio Classic har nå fått en helt spesiell plass i hjertet mitt. Til resten av gjengen på legemiddelanalyse, tusen takk for at jeg har fått være en del av deres forskningsmiljø. Dere er en dyktig og herlig gjeng, og det siste året på farmasi kunne ikke blitt bedre.

Takk til Krister Gjestvang Grønlien for hjelp med viskositetsmålinger, og en hyggelig (galenisk) prat.

Tusen takk til mine medstudenter Emma, Ingeborg og Linda for fem herlige år på farmasi. Dere er dyktige, og jeg ser virkelig frem til å få dere som kollegaer.

Til slutt vil jeg gi en stor takk til min familie, for all støtte og oppmuntring underveis på studiet. Tusen takk til min samboer Robert for din trygghet og optimisme. Din kunnskap og kritiske tankegang utfordrer meg, og gjør at jeg strekker meg enda lenger.

## Sammendrag

I dette arbeidet ble elektromembranekstraksjon (EME) testet for ekstraksjon av 11 modellpeptider fra humane plasmaprøver. Peptidene ble ekstrahert gjennom en organisk ekstraksjonsfase immobilisert i en polypropylenmembran (SLM), til en vandig akseptorløsning ved hjelp av et elektrisk felt. EME ble utviklet i 2006, og har vist å være en effektiv teknikk i ekstraksjon av basiske lavmolekylære legemidler fra biologiske væsker. SLM fungerer som en barriere i systemet ved å selektivt ekstrahere analytt og hindre ekstraksjon av hydrofile matrikskomponenter. Basert på dette er ekstraksjon av peptider noe mer utfordrende, og det er behov for en fundamental forståelse av hvilke egenskaper SLM bør ha for å effektiv ekstraksjon av peptider fra biologiske væsker.

Det ble testet en rekke ulike EME-systemer med forskjellige SLM'er, hvor den beste besto av karvakrol:2-nitrofenyloktyleter (NPOE) (1:1, w/w) + 2 % dietylheksylfosfat (DEHP) (w/w) (9  $\mu$ L) immobilisert i en polypropylenmembran. Modellpeptidene ble ekstrahert som baser i 30 min ved 10 V fra 300  $\mu$ L donor, bestående av humant plasma fortynnet 1:1 med 5 M fosforsyre og 50 mM sitrat/fosfatbuffer (pH 3,0); over i 300  $\mu$ L 50 mM fosforsyre (pH 1,8). Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte var 58 % (RSD = 5 %); syv peptider ble ekstrahert med utbytte > 60 %, ett peptid ble ekstrahert med utbytte = 45 %, og tre peptider fikk ekstraksjonsutbytte i området 25-40 %. Høyest ekstraksjonsutbyttet ble oppnådd for peptidene med lavest molekylstørrelse og høyest log D (pH 3)-verdi, da disse effektivt transporteres i en relativt upolar SLM. For effektiv ekstraksjon av peptider er ioniske interaksjoner mellom peptidene og SLM essensielt, i tillegg til hydrogenbindings-, kation- $\pi$ - og hydrofobe interaksjoner. Ekstraksjon med systemet sikret strøm < 50  $\mu$ A per prøve og stabil strøm som funksjon av tiden (30 min). Resultatene har for første gang vist elektromembranekstraksjon av peptider fra plasma med et stabilt ekstraksjonssystem. I tillegg har de gitt viktig erfaring med hva som påvirker ekstraksjonssystemets stabilitet, og hvordan ulike peptider ekstraheres i forskjellige grad avhengig av deres kjemiske struktur.

## Forkortelser

|         |  |
|---------|--|
| ACN     | Acetonitril  |
| AT I    | Angiotensin I  |
| AT II   | Angiotensin II   |
| AT III  | Angiotensin III  |
| AT IV   | Angiotensin IV   |
| cm      | Centimeter   |
| DBP     | Dibutylfosfat ( <i>di-butyl phosphate</i> )  |
| DEHP    | dietylheksylfosfat ( <i>di-(2-ethylhexyl) phosphate</i> )                                |
| DES     | Dypeutektisk væske ( <i>Deep Eutectic Solvent</i> )                                      |
| DLLE    | Dispersiv væske-væskekstraksjon ( <i>Dispersive Liquid-Liquid Extraction</i> )           |
| EMA     | <i>European Medicines Agency</i>   |
| EME     | Elektromembranekstraksjon  |
| ESI     | Elektrosprayionisering   |
| FA      | Maursyre ( <i>Formic acid</i> )  |
| g       | Gram   |
| GC      | Gasskromatografi ( <i>Gas Chromatography</i> )   |
| GSP     | Grønn prøveopparbeidelse ( <i>Green Sample Preparation</i> )                             |
| HBA     | Hydrogenbindingsakseptor   |
| HBD     | Hydrogenbindingsdonor  |
| HDES    | Hydrofobe dypeutektiske væsker ( <i>Hydrophobic Deep Eutectic Solvents</i> )             |
| HF-LPME | Hulfiber Væske-fasemikroekstraksjon ( <i>Hollow-Fibre Liquid Phase Microextraction</i> ) |
| HPLC    | Væskekromatografi ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )                      |

|          |  |
|----------|--|
| kV       | Kilovolt   |
| L        | Liter  |
| LC-MS/MS | Væskekromatografi-tandem-massespektrometri ( <i>Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry</i> ) |
| LLE      | Væske-væskeekstraksjon ( <i>Liquid-liquid extraction</i> )   |
| m/z      | Masse-over-ladningsforhold ( <i>mass-to-charge ratio</i> )   |
| M        | Molar (mol/L)  |
| mg       | Milligram  |
| min      | Minutter   |
| mL       | Milliliter   |
| mM       | Millimolar (mmol/L)  |
| mm       | Millimeter   |
| MRM      | Multipel reaksjonsmonitorering   |
| MS       | Massespektrometri  |
| NPOE     | 2-Nitrofenyloktyleter ( <i>2-Nitrophenyl octyl ether</i> )   |
| NPPE     | 2-Nitrofenylpentyleter ( <i>2-Nitrophenyl pentyl ether</i> )   |
| NT       | Neurotensin  |
| pI       | Isoelektrisk punkt   |
| PPT      | Proteinfelling ( <i>Protein Precipitation Techniques</i> )   |
| Q        | Kvadrupol  |
| q        | Kollisjonscelle  |
| QqQ      | Trippelkvadrupol   |
| rpm      | Rotasjoner per minutt  |
| RSD      | Relativt standardavvik ( <i>Relative Standard Deviation</i> )  |
| SDME     | <i>Single Drop Microextraction</i>   |



|       |  |
|-------|--|
| SLM   | Væskemembran ( <i>Supported Liquid Membrane</i> )                          |
| SPE   | Fast-faseekstraksjon ( <i>Solid Phase Extraction</i> )                     |
| SPME  | Fast-fasemikroekstraksjon ( <i>Solid Phase Microextraction</i> )           |
| SRM   | Selektiv reaksjonsmonitorering   |
| TDM   | Terapeutisk legemiddel monitorering ( <i>Therapeutic Drug Monitoring</i> ) |
| UHPLC | ( <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> )                    |
| V     | Volt   |
| w/w   | vekt/vekt ( <i>weight/weight</i> )   |
| μA    | Mikroampere  |
| μL    | Mikroliter   |
| μm    | Mikrometer   |

# Innholdsfortegnelse

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Introduksjon .....  | 1  |
| 1.1   | Bakgrunn .....  | 1  |
| 1.2   | Hensikt.....  | 4  |
| 2     | Teori.....  | 4  |
| 2.1   | Peptider.....   | 4  |
| 2.2   | Prøveopparbeidelse.....                                     | 6  |
| 2.2.1 | Grønn prøveopparbeidelse (GSP) .....                        | 7  |
| 2.3   | Prinsippet for elektromembranekstraksjon (EME).....         | 9  |
| 2.3.1 | Massetransport av analytt i SLM .....                       | 11 |
| 2.3.2 | SLM.....  | 15 |
| 2.4   | Væskekromatografi koblet til massespektrometer (LC-MS)..... | 18 |
| 2.4.1 | Væskekromatografi (LC) .....                                | 18 |
| 2.4.2 | Elektrosprayionisering (ESI).....                           | 21 |
| 2.4.3 | Trippelkvadrupol (QqQ) masseanalysator .....                | 22 |
| 3     | Materialer og metode .....                                  | 23 |
| 3.1   | Modellpeptidene .....                                       | 23 |
| 3.2   | Kjemikalier .....   | 24 |
| 3.3   | Løsninger .....   | 25 |
| 3.3.1 | Donorløsninger .....  | 26 |
| 3.3.2 | Akseptorløsninger .....                                     | 26 |
| 3.3.3 | Andre løsninger .....                                       | 27 |
| 3.3.4 | Væskemembraner.....   | 28 |
| 3.3.5 | Løsninger til LC-MS .....                                   | 30 |
| 3.4   | Utstyr .....  | 31 |
| 3.5   | EME-betingelser .....                                       | 34 |
| 3.5.1 | Ekstraksjonsprosedyre.....                                  | 35 |
| 3.5.2 | Optimaliseringsforsøk .....                                 | 36 |
| 3.5.3 | Viskositetsmålinger .....                                   | 38 |
| 3.5.4 | Vaskeprosedyre av EME-vialene .....                         | 38 |
| 3.6   | LC-MS/MS-betingelser .....                                  | 38 |
| 3.6.1 | LC-betingelser .....  | 38 |
| 3.6.2 | MS/MS-betingelser .....                                     | 39 |
| 3.7   | Beregninger .....   | 41 |
| 4     | Resultater og diskusjon .....                               | 42 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.1   | Krav stilt til væskemembranen .....                                       | 42 |
| 4.2   | Evaluering av væskemembraner fra litteraturen.....                        | 43 |
| 4.3   | Evaluering av nye væskemembraner .....                                    | 47 |
| 4.4   | Optimalisering av system E og F.....                                      | 51 |
| 4.4.1 | Bevis av konsept med innledende forsøk .....                              | 51 |
| 4.4.2 | Optimalisering av pH i donor .....  | 55 |
| 4.4.3 | Optimalisering av pH i akseptor.....                                      | 57 |
| 4.4.4 | Optimalisering av ratio mellom komponentene i SLM.....                    | 58 |
| 4.4.5 | Erstatning av tymol med karvakrol .....                                   | 63 |
| 4.4.6 | Erstatning av NPOE med NPPE.....  | 64 |
| 4.4.7 | Optimalisering av prosentandel DEHP .....                                 | 66 |
| 4.4.8 | Optimalisering av spenning påført systemene ved ulike prosentandeler DEHP | 69 |
| 4.5   | Evaluering av optimalisering av system E og F .....                       | 71 |
| 4.6   | Grønnhet av metoden.....  | 74 |
| 5     | Konklusjon.....   | 77 |
| 6     | Videre arbeid.....  | 78 |
| 7     | Referanseliste .....  | 79 |
| 8     | Vedlegg .....   | 84 |
| 8.1   | Modellpeptider som ikke lot seg ekstrahere .....                          | 84 |
| 8.2   | Problemer som oppstod underveis.....                                      | 84 |
| 8.2.1 | Krypstrøm i systemet .....  | 84 |
| 8.2.2 | Fast stoff synlig i akseptor .....  | 85 |
| 8.2.3 | NPOE til viskositetsmålinger .....  | 85 |

# 1 Introduksjon

## 1.1 Bakgrunn

Bioanalyse har som formål å identifisere og/eller kvantifisere ulike forbindelser av interesse fra biologiske matriser som fullblod, plasma, urin og spytt [1]. Forbindelsene av interesse kalles for analytter, og kan være både endogene og eksogene. Hvilke analytter som er av interesse, vil variere avhengig av formålet med analysen. Forståelsen av peptider og deres potensial har økt med årene. Peptider kan være biomarkører, hormoner og legemidler [2], som gjør dem til svært aktuelle analytter innen bioanalyse. Bioanalyse av peptider utføres blant annet innen terapeutisk legemiddel monitorering (TDM), diagnostikk, doping analyse, toksikologisk- og rettstoksikologisk analyse [1, 3].

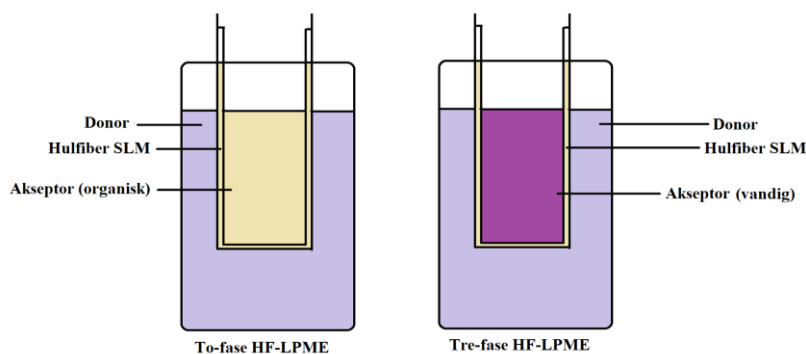
Væskekromatografi koblet til et massespektrometer (LC-MS) er blant de mest brukte instrumentene til deteksjon av analytter fra biologiske prøver [4], da instrumentet både er svært spesifikt og sensitivt [5]. Biologiske prøver er svært komplekse, og en direkte injisering av prøven på instrumentet vil fort skape problemer. Med bakgrunn i dette er prøveopparbeidelse essensielt for å få analytt overført til en injiserbar løsning, som sikrer pålitelige og nøyaktige resultater [6]. En prøveopparbeidelse er ofte basert på selektiv ekstraksjon av analytt fra prøveløsning, over i en løsning som er kompatibel med det analytiske instrumentet [1]. Dette resulterer i en prøveopprensing som minimerer risikoen for interferens, og som gjør prøven mer kompatibel med instrumentet slik at det ikke kontamineres. Prøveopparbeidelse kan også brukes til oppkonsentrering av analytt, som gjør at instrumentet kan detektere lavere konsentrasjoner av analytt [5].

Blant de mest brukte prøveopparbeidelsesteknikkene er proteinfelling (PPT), fast-faseekstraksjon (SPE) og væske-væskeekstraksjon (LLE) [5]. I dag er disse teknikkene automatiserte og mye brukt i rutinelaboratoriene [4]. De siste tiårene har det likevel vært behov for å utvikle nye teknikker med hensikt på økt effektivitet, selektivitet og mindre bruk av organiske løsemidler.

Begrepet «Grønn kjemi» ble introdusert tidlig 1990, og belyste behovet for ikke-toksiske og miljøvennlige analytiske prosedyrer, både av hensyn til miljøet og helsen til operatøren [6]. I dette ligger blant annet ønske om prøveopparbeidelser med bruk av så lite organisk løsemiddel som mulig. Det økte fokuset på grønn prøveopparbeidelse (*Green Sample Preparation, GSP*), har resultert i veiledende prinsipper som fremmer miljøvennlige prøveopparbeidelser [7].

Med bakgrunn i dette har det de siste tiårene blitt utviklet mikroekstraksjonsteknikker, hvor volum involvert i prøveopparbeidelsen er redusert til  $\mu\text{L}$ -nivå. Reduksjon i volum er også en fordel, da det er begrenset hvor mye biologisk prøve man kan få fra pasienten. Mikroekstraksjon er i stor grad basert på prinsippene for de tradisjonelle prøveopparbeidelsesteknikkene, SPE og LLE. Ettersom at den fundamentale forståelsen for masseoverføring mellom teknikkene er lik, ble mikroekstraksjonsteknikkene raskt akseptert i forskningsmiljøet. Flere av teknikkene har blitt kommersialisert [8]. Fast-fasemikroekstraksjon (SPME) [9], «single-drop»-mikroekstraksjon (SDME), dispersiv væske-væskemikroekstraksjon (DLLE), hulfiber væskefasemikroekstraksjon (HF-LPME) er blant de nyere teknikkene [4, 8, 10].

HF-LPME ble introdusert i 1999 av Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, og baserer seg på at den organiske ekstraksjonsfasen ved kapillærkrefter holdes på plass i en hulfibermembran bestående av polypropylen [11, 12]. En slik væskemembran ga opphavet til det som på engelsk kalles en *supported liquid membrane* (SLM). Ved å immobilisere ekstraksjonsfasen i en membran på denne måten, reduseres behovet for organiske løsemidler til  $\mu\text{L}$ -nivå. HF-LPME kan både settes opp som et to- og tre-fasesystem, se *Figur 1*, hvor systemet man velger ofte avhenger av om man ønsker å analysere med gasskromatografi (GC) eller LC. Ønsker man å analysere analytt med GC, er det ønskelig å velge et to-fasesystem, da akseptorfasen er organisk. I et slikt system består akseptorfasen av de samme organiske løsemidlene som SLM, og det er viktig at pH i donor deioniserer analytt slik at analytt ved passiv diffusjon ekstraheres over i akseptorfasen. Et tre-fasesystem skiller seg fra et to-fasesystem ved at akseptorfasen i likhet med donorfasen er vandig, som er en fordel da akseptor kan injiseres direkte i LC-MS. I et slikt system skjer ekstraksjon av analytt basert på passiv diffusjon og pH-gradient, og systemet er derfor godt egnet for ekstraksjon av sure og basiske analytter. pH i donor justeres slik at analytt er uionisert og diffunderer inn i SLM, mens pH i akseptor sørger for at analytt ioniseres og fanges for å unngå tilbake-ekstraksjon [12].



Figur 1: skissering av to-fase og tre-fase HF-LPME, modifisert fra figur i artikkel [12].

Elektromembranekstraksjon (EME) er en videreutvikling av tre-fase HF-LPME, og ble beskrevet av Pedersen-Bjergaard og Rasmussen for første gang i 2006 for basiske forbindelser og i 2008 for peptider av Balchen, Reubsaet og Pedersen-Bjergaard [2, 13]. EME ble først introdusert i en hulfibermembran (HF-EME) og skiller seg fra HF-LPME ved at analytt ekstraheres basert på elektrokinetisk migrasjon, som følge av påføring av et ytre elektrisk felt [13]. For at analyttene skal bevege seg i det elektriske feltet må pH i donor og akseptor justeres slik at analyttene foreligger på ionisert form. Ved å styre retningen og styrken på det elektriske feltet kan man i stor grad styre selektiviteten av ekstraksjonen [4]. Sammenlignet med HF-LPME gir EME mer effektiv ekstraksjon av analytt, samt høyere utbytter ved kortere ekstraksjonstider [13]. Dette er en fordel, da prøveopparbeidelse regnes som det mest tidkrevende trinnet i bioanalyse [14]. Fra HF-EME er det utviklet en rekke EME-konfigurasjoner, blant annet chip-basert EME [15, 16], parallelelektromembranekstraksjon [17, 18], EME med elektrisk ledende polymervialer [19, 20].

Selektiviteten i systemet styres også i stor grad av komponentene i SLM, da komponentene basert på deres fysikalsk-kjemiske egenskaper i stor grad bestemmer hva slags forbindelser som ekstraheres. SLM'en består av organiske løsemidler med lav vannløselighet; og vil i teorien primært ekstrahere små, upolare forbindelser [3]. Større, polare matrikskomponenter forblir i prøveløsning, da SLM fungerer som en barriere. Dette gjør effektiv ekstraksjon av peptider til en større utfordring, sammenlignet med lavmolekylære legemidler, da peptider i likhet med matrikskomponenter ofte er større, hydrofile forbindelser. Basert på dette er man nødt til å utvikle nye væskemembraner med fysikalsk-kjemiske egenskaper som fremmer ekstraksjon av peptider [3].

Til tross for at det siden 2008 er utført EME av peptider med ulike sammensetninger av organiske løsemidler i væskemembranen og ekstraksjonsbetingelser, er EME av peptider

fortsatt i startfasen. Tidligere studier viser blant annet at overgang fra vandige bufferbaserte donorløsninger til plasmabaserte donorløsninger gir redusert ekstraksjonsutbytte grunnet matrikseffekter [4]. I tillegg til matrikseffekter, har ekstraksjon fra plasma vist å gi opphav til mer ustabile systemer [21]. Med bakgrunn i dette er det interessant å finne væskemembraner som effektivt ekstraherer peptider fra plasma, og hvor stabiliteten til væskemembranen opprettholdes under hele ekstraksjonen.

## 1.2 Hensikt

Hensikten med oppgaven var å finne stabile væskemembraner med god systemytelse for ekstraksjon av peptider fra plasma.

For å best finne slike membraner, ble følgende forskningsspørsmål vurdert:

- a) kan vi definere kriterier for stabilitet av SLM?
- b) kan vi identifisere en ionebærer og bestemte løsemidler som i kombinasjon gir en stabil SLM for ekstraksjon av peptider fra plasma?
- c) kan vi forklare hvorfor denne SLM'en er stabil?
- d) hvor sensitiv er stabiliteten til denne SLM'en i forhold til endring av operasjonelle parametere?
- e) gir SLM opphav til et selektivitetsmønster, og hvordan endres dette ved å justere mengden av SLM-komponentene?

## 2 Teori

### 2.1 Peptider

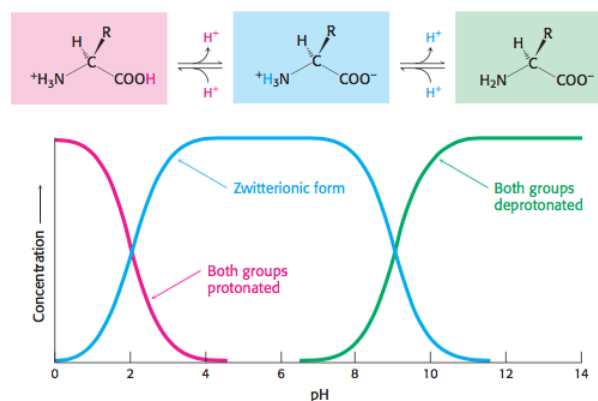
Peptider er en stor, heterogen gruppe av forbindelser. Peptider består av et mindre antall aminosyrer (< 50), til forskjell fra proteiner som består av lange kjeder av aminosyrer (> 50). Hver aminosyre i peptider og proteiner kalles for residuer. Aminosyrer er kirale forbindelser og består av et  $\alpha$ -karbon som er bundet til et amin ( $-\text{NH}_2$ ), en karboksylsyre ( $-\text{COOH}$ ), et hydrogenatom ( $-\text{H}$ ) og en sidekjede ( $-\text{R}$ ). Sidekjeden er ulik for hver aminosyre, og brukes til å klassifisere aminosyrene inn i fire grupper:

- 1) Hydrofobe aminosyrer med upolare sidekjeder
- 2) Polare aminosyrer med nøytrale sidekjeder

- 3) Positivt ladde aminosyrer, med positivt ladde sidekjeder ved fysiologisk pH
- 4) Negativt ladde aminosyrer, med negativt ladde sidekjeder ved fysiologisk pH

Avhengig av hvilke sidekjeder som er til stede vil aminosyrene, peptidene og proteinene ha ulike egenskaper. Aminosyrene bindes sammen til peptider og proteiner ved peptidbindinger, også kalt amidbindinger. Bindingen dannes ved at aminogruppen til den ene aminosyren reagerer med karboksylsyren til den andre aminosyren, med vann som avspaltningprodukt. Dette gir opphav til en peptidkjede hvor peptidbindingene utgjør en konsistent ryggrad med sidekjedene stikkende ut [22]. Som følge av peptidbindingene er ryggraden rik på karbonyler ( $R_2-C=O$ ) og amider ( $R_2-NH$ ), som er gode hydrogenbindingsakseptorer (HBA) og hydrogenbindingsdonorer (HBD) respektivt [23]. Enden av peptidet med aminet kalles for N-terminal, mens enden med karboksylsyren kalles for C-terminal.

Alle aminosyrer inneholder minst to ioniserbare grupper, aminet ( $pK_a \approx 9$ ) og karboksylsyren ( $pK_a \approx 2$ ) [23]. Dersom sidekjedene ikke er sure eller basiske, vil aminosyren hovedsakelig eksistere som zwitterion ved nøytral pH [23], se *Figur 2*. Et zwitterion er et ion med både positiv og negativ ladning [24]. En pH lavere enn 2 ioniserer aminet ( $-NH_3^+$ ), mens karboksylsyren er nøytral. En pH høyere enn 9 ioniserer karboksylsyren ( $-COO^-$ ), mens aminet forblir nøytralt [4, 23]. Med bakgrunn i dette vil endringer i pH endre ioniseringsstatusen av den aktuelle aminosyren. I mange tilfeller består aminosyrer, peptider og proteiner av flere ioniserbare funksjonelle grupper. Ved å observere hver funksjonelle gruppe for seg; vil pH høyere enn  $pK_a$  resultere i at gruppen foreligger som base, mens pH lavere enn  $pK_a$ -verdien resulterer i at gruppen foreligger som syre. Den pH-verdien hvor netto-ladningen til molekylet er null, kalles det isoelektriske punktet ( $pI$ ) [4].



*Figur 2: skissering av prinsipp for protonering av aminosyrer med endring i pH. Figur hentet fra [23].*



## 2.2 Prøveopparbeidelse

Innen bioanalyse er det ofte av interesse å detektere legemidler eller biomarkører i en biologisk matriks, som for eksempel humant fullblod eller plasma. Slike biologiske matrikser er komplekse og består blant annet av proteiner, fosfolipider og salter. Ved direkte injisering av slike prøver på et analytisk instrument vil det raskt oppstå problemer. Det er derfor helt nødvendig å gjennomføre en prøveopparbeidelse innen injisering av prøven på instrumentet. Hensikten med prøveopparbeidelse er å få en opprensing av prøven, redusere ioneundertrykkelse og interferens, og i noen tilfeller oppkonsentrere analytten [5].

Prøveopparbeidelse er viktig for å sikre kompatibilitet med instrumentet. Under prøveopparbeidelsen får man gjerne en såkalt prøveopprensing, hvor man eliminerer matrikskomponenter som proteiner og fosfolipider. Ved eliminering av slike komponenter unngår man forurensing av instrumentet, som resulterer i forbedret driftsstabilitet [5].

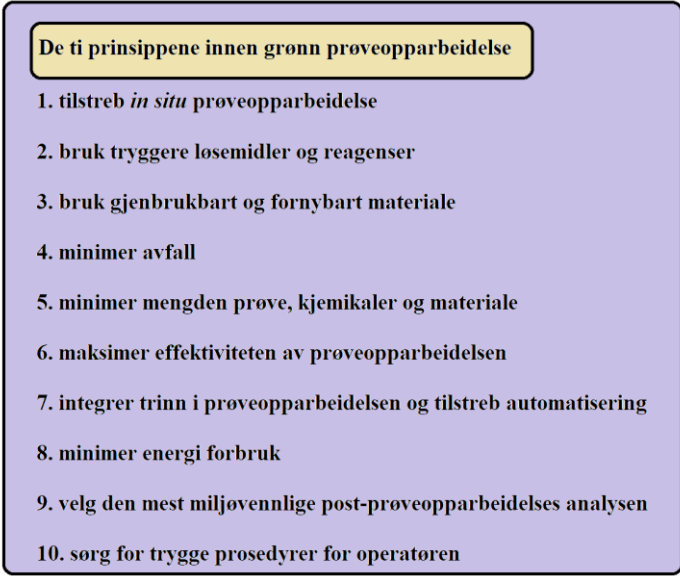
Eliminering av matrikskomponenter reduserer også risikoen for ioneundertrykkelse og interferens ved LC-MS analyse. Ioneundertrykkelse oppstår når man har komponenter i prøven som eluerer samtidig med analytten fra LC-kolonnen. Til tross for at massespektrometeret klarer å skille massene til forbindelsene fra hverandre, vil samtidig eluering påvirke instrumentets evne til å ionisere analytten. En ikke-tilstrekkelig ionisering resulterer i et lavere signal, og gir feil grunnlag for kvantifisering av analytten [5].

Dersom massespektrometeret ikke klarer å skille massene til forbindelser med samme retensjonstid fra hverandre gir det opphav til interferens. Interferens gir et for høyt positivt signal og en falsk positiv respons, som resulterer i unøyaktig kvantifisering og identifisering av analytten [5].

Prøveopparbeidelse kan også benyttes til oppkonsentrering av analytten. Lavmolekylære legemidler og biofarmaka i biologiske matrikser kan befinne seg i svært lave konsentrasjoner. Ved bruk av prøveopparbeidelse har man muligheten til å oppkonsentrere analytten [5].

### 2.2.1 Grønn prøveoppbeidelse (GSP)

Grønn kjemi ble først et tema på 1990-tallet [7]. I senere tid er det foreslått ti prinsipper for grønn prøveoppbeidelse (GSP), se *Figur 3*. De ti prinsippene skal vurderes som et integrert system. Prinsippene fokuserer på prøveoppbeidelse, samtidig som de knytter prøveoppbeidelse til den analytiske prosessen som helhet; prøvetaking, prøveoppbeidelse, analytisk måling og databehandling [7].

- 
- De ti prinsippene innen grønn prøveoppbeidelse
1. tilstreb *in situ* prøveoppbeidelse
  2. bruk tryggere løsemidler og reagenser
  3. bruk gjenbrukbart og fornybart materiale
  4. minimer avfall
  5. minimer mengden prøve, kjemikaler og materiale
  6. maksimer effektiviteten av prøveoppbeidelsen
  7. integrer trinn i prøveoppbeidelsen og tilstreb automatisering
  8. minimer energi forbruk
  9. velg den mest miljøvennlige post-prøveoppbeidelses analysen
  10. sørg for trygge prosedyrer for operatøren

*Figur 3: de ti prinsippene innen GSP*

Hensikten med det første prinsippet, er å redusere transport av prøve fra prøvetakingssted til lokasjonen hvor prøveoppbeidelsen skal finne sted, derav *in situ* som betyr «på stedet» [25]. Ved *in situ* prøveoppbeidelse minimerer man mengden prøve og materiale (prinsipp 5) som normalt transporteres til et laboratorium for analyse. Dette gir mindre avfall (prinsipp 4), samt spart tid (prinsipp 6) og energi (prinsipp 8) [7].

Det andre prinsippet reduserer bruk av løsemidler og reagenser som er skadelig for miljøet og human helse. Redusert bruk av skadelige kjemikalier gir en økt sikkerhet for operatøren (prinsipp 10), og kan i tillegg relateres til reduksjon av avfall (prinsipp 4). Dette er et av hovedfokusene og en av de vanligste begrensningene innen GSP [7].

Det tredje prinsippet fremmer bruk av fornybart og resirkulert materiale, som resulterer i mindre avfall (prinsipp 4) og generelt lavere kostnader. Prinsippet promoterer bruk av gjenbrukbart materiale, og bruk av materiale hvor skadelige kjemikaler og løsemidler er benyttet til produksjon bør unngås (prinsipp 10) [7]. For å øke bærekraften og redusere bruken av fossilt

brensel, bør bruken av bio-basert materiale erstatte petroleums-baserte kjemikalier der det er mulig [26].

Det fjerde prinsippet har som formål å redusere mengden avfall som dannes under prøveopparbeidelsen, og vurderer alle handlinger relatert til prøveopparbeidelsen som nøkkelementer linket til miljøvennlige metoder. Ambisjonen om null avfall er ambisiøs og er ikke oppnådd for noen prøveopparbeidelses teknikker så langt [7].

Det femte prinsippet har som formål å redusere mengden av prøve og kjemikalier som benyttes i prøveopparbeidelsen, da disse faktorene har en generell påvirkning på mengden avfall som dannes (prinsipp 4). Med bakgrunn i dette er diverse trinn i den analytiske prosessen, særlig innen prøveopparbeidelsen, blitt miniatyriserte. Nedskalerte prøveopparbeidelser har vist seg å være lettere å forflytte og automatisere (prinsipp 1 og 7), i tillegg til å være mer effektive og minimerer eksponerings risiko for operatøren (prinsipp 6 og 10). Det er likevel viktig å være klar over at reduksjon i mengden kjemikalier som brukes ikke nødvendigvis medfører en grønnere prøveopparbeidelse, dersom kjemikaliene er toksiske [7].

Det sjette prinsippet sikrer grønn prøveopparbeidelse, ved å øke effektiviteten av teknikken. Desto høyere antall prøver som kan behandles per tidsenhet, desto lavere blir energiforbruket (prinsipp 8), eksponeringsrisikoen (prinsipp 10) og analysekostnaden. Man kan øke effektiviteten av prøveopparbeidelsen på to måter:

- a) akselerere prøveopparbeidelsen og tilpasse det til tiden som er nødvendig for instrumentell analyse (prinsipp 9)
- b) behandle flere prøver samtidig, ved 96-brønnsformat

Prøveopparbeidelse kan eksempelvis akselereres ved å redusere prøvevolum (prinsipp 5), ved automatisering av metoden (prinsipp 7), eller ved å påføre et eksternt felt (for eksempel elektrisk felt, ultralyd, mikrobølger). *In situ* prøveopparbeidelse vil redusere total tid brukt på prøveopparbeidelsen [7].

Det syvende prinsippet har som formål å slå sammen flere av trinnene i prøveopparbeidelsen og få til automatisering om mulig. Dette resulterer i en økt effektivitet (prinsipp 6), redusert risiko for kontaminering, redusert forbruk av kjemikalier, materiale og energi som igjen resulterer i redusert avfall (prinsipp 4, 5, 8). I tillegg vil automatisering redusere eksponeringsrisiko for operatøren (prinsipp 10) og menneskelige feil [7].

Det åttende prinsippet har som formål å redusere energiforbruket involvert i prøveopparbeidelsen, og er relatert til prinsipp 1, 6, 7 og 9 (se egne avsnitt) [7].

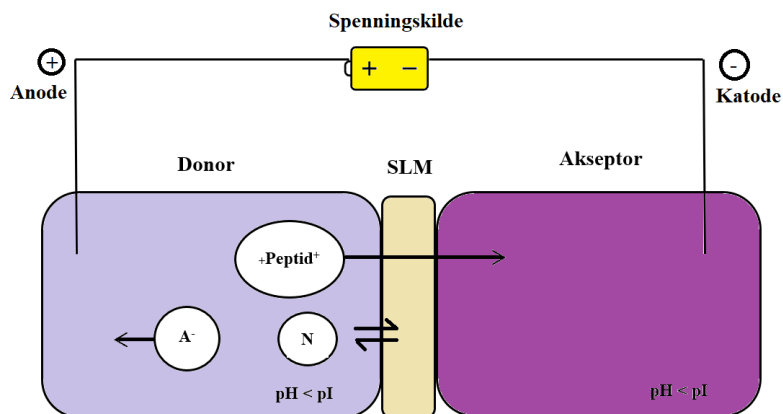
Det niende prinsippet handler om å velge miljøvennlige post-prøveopparbeidelses analyser. Prøveopparbeidelse er et trinn i den analytiske metoden, og valg av analyseinstrument er kritisk med tanke på metodens miljøvennlighet. Valg av analyseinstrument avhenger i stor grad av grad av selektivitet og sensitivitet som krevers, samt hva som er tilgjengelig. Med bakgrunn i dette bør man tilstrebe bruk av instrumenter som passer formålet med analysen, sparer materialer, energi (prinsipp 8) og reduserer risiko for skade på operatør og miljø (prinsipp 10) [7].

Det tiende prinsippet har som formål å beskytte operatørens helse. Dette kan oppnås ved å sikre bruk av mindre skadelige og toksiske kjemikalier, samt bruk av automatiserte og miniatyriserte prøveopparbeidelsesteknikker med sammenslåtte trinn som reduserer håndtering og eksponering av prøve for operatøren (relatert til prinsipp 2, 3, 4, 5, 6, 7 og 9). Skade på operatør inkluderer også biologisk-, fysisk- og elektrisk skade [7].

### **2.3 Prinsippet for elektromembranekstraksjon (EME)**

EME er en prøveopparbeidelsesteknikk utviklet fra tre-fase systemet HF-LPME. Ekstraksjon av analyttene foregår ved elektrokinetisk migrasjon som følge av påføring av et elektrisk felt, fremfor passiv diffusjon som er drivkraften i HF-LPME. Dette resulterer i redusert ekstraksjonstid og en mer effektiv prøveopparbeidelse [13], uten at det går på bekostning av fordelene knyttet til mikroekstraksjonssystemer; som effektiv prøveopprensning, lavt forbruk av organiske løsemidler, høy oppkonsentrering og muligheten for automatisering [27].

Ekstraksjonen baserer seg på at motsatte ladninger tiltrekker hverandre og like ladninger frastøter hverandre. Dersom peptidene ekstraheres som baser, bør pH i donor og akseptor settes til under peptidenes isoelektriske punkt (se *Figur 4*). Katoden plasseres i akseptor og anoden i donor. Spenning fra en ekstern strømkilde påføres systemet, og analyttene migrerer fra en vandig donorfase, gjennom en organisk ekstraksjonsfase immobilisert i en polymerbasert membran (SLM) og over i en vandig akseptorfase. Som følge av analyttens positive ladning og strømmens retning, vil det elektriske feltet sikre at analyttene effektivt fanges i akseptor og at man unngår tilbake-ekstraksjon [8]. Med bakgrunn i dette kan man i stor grad styre ekstraksjonsselektiviteten i EME, ved å styre retningen (polariteten) og styrken (spenningen) av det elektriske feltet [27].

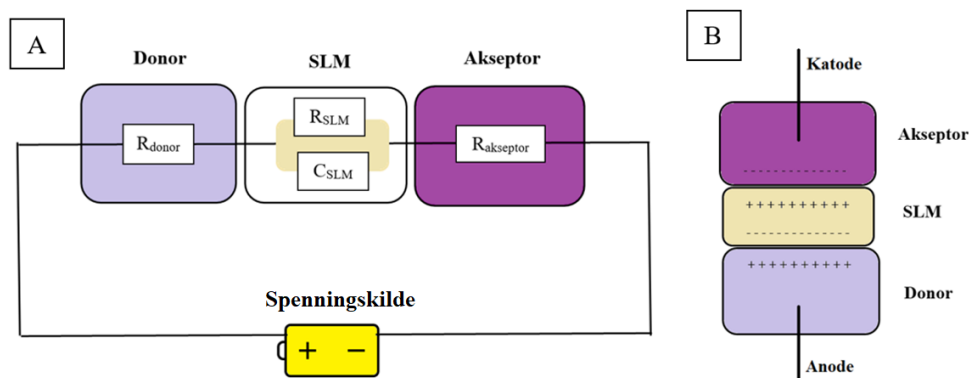


Figur 4: skissering av ekstraksjonsprinsippet for EME

EME-oppsettet gir opphav til en sluttet strømkrets (se Figur 5), hvor strømmen som går i systemet kan forklares av Ohms lov [28]:

$$I = \frac{U}{R} \quad (\text{Likning 1})$$

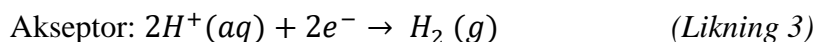
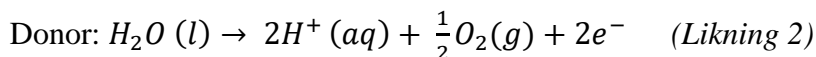
hvor  $I$  = strømmen,  $U$  = spenningen og  $R$  = motstanden. Strømmen er proporsjonal med spenningen og omvendt proporsjonal med motstanden i systemet. Det vil si at strømmen øker med økende spenning og redusert motstand i systemet.



Figur 5: skissering av EME-strømkrets ( $R$  = motstanden i SLM,  $C$  = kondensatoren i SLM) (A) og de elektriske dobbeltlagene ved grenseflatene (B),

Motstanden i systemet bestemmes av komponentene og tykkelsen av SLM. Valg av organiske løsemidler til SLM er derfor svært viktig for opprettholdelse av det elektriske feltet, og den elektrokinetiske migrasjonen av analytt. For å sikre tilstrekkelig elektrisk konduktivitet er det viktig at løsemidlet som velges ikke er for upolart. Likevel er det viktig å velge et løsemiddel som ikke er for polart, da dette kan gi redusert motstand og stabilitet av systemet. Et ustabil

system kan gi opphav til økt elektrolyse ved elektrodene, se *Likning 2 og 3*, som følge av at SLM og analyttene er inerte mot reaksjoner ved elektrodene [13].



Elektrolyse som følge av økt strøm i systemet gir opphav til bobledannelse. Bobledannelse kan føre til redusert kontakt mellom SLM og analytt, samt endret pH i donor og akseptor (se *Likning 2 og 3*) [13]. Blir endringen i pH for stor vil dette kunne påvirke ladningen til analytten eller SLM-komponentene, og gi redusert ekstraksjonsutbytte.

Redusert transport av analytt gjennom SLM, og følgelig redusert ekstraksjonsutbytte, er også observert ved lokalt høyere pH-verdier i akseptor inn mot SLM-grenseflaten [27]. Den lokale pH-forandringer oppstår som følge av dannelsen av et elektrisk dobbeltlag (se *Figur 5*). En teoretisk modell for økt pH i SLM/akseptor-grenseflaten er at SLM har kondensatoregenskaper, i tillegg til å være motstanden i den elektriske kretsen. De to kondensatorene i systemet er SLM/donor- og SLM/akseptor-grenseflaten. Strømmen i systemet øker innledningsvis når kondensatorene lades, før den reduseres og fullstendig avhenger av motstanden i SLM. Ved ekstraksjon av baser vil kationer akkumuleres ved SLM/akseptor-grenseflaten, da katoden er plassert i akseptor. Anioner i akseptor vil trekkes mot kationene og danne et elektrisk dobbeltlag, som resulterer i økt pH ved SLM/akseptor-grenseflaten. Dette kan delvis deprotonere analytt, og redusere ekstraksjonsutbytte. pH i resten av akseptor forblir uforandret som følge av konveksjon i systemet. Med bakgrunn i dette kan endringer av pH i akseptor være en kritisk operasjonell parameter med hensyn på ekstraksjonsutbytte. pH i akseptor bør være 3-4 enheter lavere enn analyttens pKa-verdi, for å redusere mulig risiko for deprotonering av analytt [27].

### 2.3.1 Massetransport av analytt i SLM

Transport av analytt gjennom SLM regnes som det hastighetsbestemmende trinnet i EME, og det er lagd modeller som beskriver massetransporten gjennom SLM [29, 30]. Ingen av likningene beskriver massetransporten i EME fullstendig, men de er viktige for forståelsen av viktige operasjonelle parametere som påvirker massetransport [8].

Den enkleste modellen er den som beskriver massetransport av analytt ved likevekt, på engelsk kalt *steady-state*. Antagelsene som ble gjort i utviklingen av likningen var; alle ioner i systemet

har kun en enkelt ladning, SLM er en konveksjonsfri væske, det er en balanse mellom positive og negative ioner i SLM [8]. Modellen er utviklet fra Nernst-Planck flukslikning, og er vist i *Likning 4*.

$$J_i = \frac{-D_i}{h} \left(1 + \frac{v}{\ln \chi}\right) \left(\frac{\chi^{-1}}{\chi - \exp(-v)}\right) (c_{ih} - c_{io} \exp(-v)) \quad (\text{Likning 4})$$

Hvor  $J_i$  = fluks av analytt over SLM,  $D_i$  = diffusjonskoeffisienten,  $h$  = tykkelsen av SLM,  $v$  = dimensjonsløs drivkraft (definert av *Likning 5*),  $\chi$  = ionebalanse (definert av *Likning 6*),  $c_{ih}$  = konsentrasjon av analytt ved SLM/donor-grenseflaten,  $c_{io}$  = konsentrasjon av analytt ved SLM/akseptor-grenseflaten.

Den dimensjonsløse drivkraften forklares av følgende likning:

$$v = \frac{z_i F \Delta \varphi}{RT} \quad (\text{Likning 5})$$

Hvor  $z_i$  = ladning på analytt,  $F$  = Faradays konstant,  $\Delta \varphi$  = forskjell i potensial over SLM,  $R$  = gasskonstant,  $T$  = absolutt temperatur.

Ionebalansen, ratioen av total ionisk konsentrasjon i donor og akseptor, forklares av følgende likning:

$$\chi = \frac{\sum_i c_{ih} + \sum_k c_{*kh}}{\sum_i c_{io} + \sum_k c_{*ko}} \quad (\text{Likning 6})$$

Hvor  $c_{*kh}$  = konsentrasjon av k-te anioniske substans i donor,  $c_{*ko}$  = konsentrasjon av k-te anioniske substans i akseptor.

Det ses av likningene at massetransport av analytt avhenger av tykkelsen av SLM, diffusjonskoeffisienten til analytt i SLM, temperatur, ionebalansen over SLM og påført spenning på SLM. Analyttens distribusjonskoeffisient er også av betydning, da den påvirker konsentrasjonen av analytt ved grenseflatene [8].

Det er også utviklet tids-avhengig modeller som beskriver massetransport av analytt gjennom SLM. I utarbeidelsen av likningen er det antatt at transport gjennom SLM er det hastighetsbestemmende trinnet i EME. I tillegg til at det er en forsinkelse av analyttkonsentrasjon i akseptor (*lag time* på engelsk) bestemt av hvor lenge analytt er i SLM, men at analytt fullstendig overføres til akseptor etter tilstrekkelig lag time. Det er også antatt tilstrekkelig konveksjon, slik at massetransport i donor og akseptor ikke er hastighetsbegrensende, og at transporten gjennom SLM er ensretta for et gitt sett parametere [30]. Konsentrasjon av analytt i akseptor som funksjon av tiden er gitt av *Likning 7*.

$$C_{Ai}(t) = \frac{V_D C_{Di}^0 - C_{Di}^0 \exp\left(\frac{A_f P_i^{D \rightarrow A}}{V_D} t\right) (V_D + K_d^* V_m)}{V_A} \quad (\text{Likning 7})$$

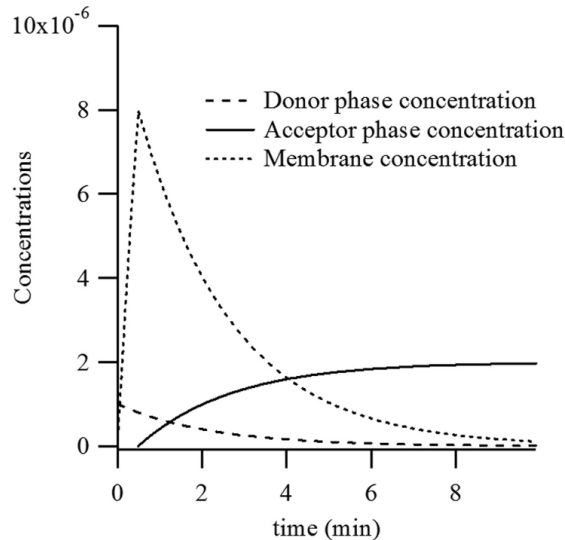
Hvor  $V_D$  = volum av donor,  $C_{Di}^0$  = initial ( $t=0$ ) konsentrasjon av analytt i donor,  $A_f$  = aktivt overflateareal,  $P_i^{D \rightarrow A}$  = SLM-permeabilitetskoeffisient av analytt fra donor til akseptor,  $V_m$  = volum av SLM,  $V_A$  = volum av akseptor,  $K_d^*$  = distribusjonskoeffisienten.

Distribusjonskoeffisienten  $K_d^*$  beskrives av følgende likning:

$$K_d^* = \exp\left(\frac{z_i F}{RT} (\Delta_0^w \varphi - \Delta_0^w \varphi_i^0)\right) \quad (\text{Likning 8})$$

Hvor  $\Delta_0^w \varphi$  = forskjellen i Galvani-potensial mellom donor og SLM,  $\Delta_0^w \varphi_i^0$  = Gibbs frie energi for transport av analytt fra donor til SLM uttrykt på en spenningskala.

Figur 6 er et generelt plott av Likning 7, og viser hvordan konsentrasjonen av analytt endrer seg i donor, akseptor og SLM som funksjon av tid. Først vil konsentrasjonen i donor synke, som følge av at analytt beveger seg inn i SLM. Dette resulterer i en kraftig økning og opphopning av analytt i SLM initialt. Analytten bruker litt tid på å bevege seg gjennom SLM og ut i akseptorfasen, som ses av forsinket økning i konsentrasjon i akseptor. Konsentrasjonen i akseptor vil øke som funksjon av tiden til den når likevekt. Når ekstraksjonen når likevekt bør ekstraksjonen termineres [8, 30].



Figur 6: generelt plott av Likning 7; hvor konsentrasjon i donor, akseptor og SLM endres som funksjon av tid [30].



Den tidsavhengige modellen tillater oss å estimere teoretisk utbytte  $R_i(t)$  ved likningen:

$$R_i(t) = \frac{n_a(t)}{n_d(t=0)} \cdot 100\% \quad (\text{Likning 9})$$

Hvor  $n_a(t)$  = antall mol av analytt i akseptor,  $n_d(t=0)$  = antall mol av analytt initialt i donor.

*Likning 7* og *9* hjelper å vurdere betydningen av de ulike ekstraksjonsparameterne. Det bør benyttes små donorvolum og SLM-volum, da dette reduserer tiden til oppnådd likevekt og tiden analytten bruker på å diffundere gjennom SLM. For å redusere tiden analytt bruker i SLM er det foretrukket med en høy permeabilitetskoeffisient ( $P_i^{D \rightarrow A}$ ).  $P_i^{D \rightarrow A}$  avhenger av komponentene brukt i SLM og de fysikalsk-kjemiske egenskapene av analytten, og bestemmer i stor grad elektrokinetisk migrasjon av ionisert analytt i SLM. Variasjon i  $P_i^{D \rightarrow A}$  er matematisk sett det samme som å variere aktivt overflateareal av SLM ( $A_f$ ).  $P_i^{D \rightarrow A}$  er i likhet med distribusjonskoeffisienten ( $K_d^*$ ) avhengig av forskjell i potensial påført SLM, som er relatert til spenningen påført systemet (se *Likning 8*). Endringer i spenning vil derfor ha mye å si for oppnådd utbytte av analytt [8]. Risting påført systemet er ikke gitt av likningen, men ligger i antagelsen om tilstrekkelig konveksjon slik at massetransport i donor og akseptor ikke er hastighetsbegrensende for ekstraksjonen [31].

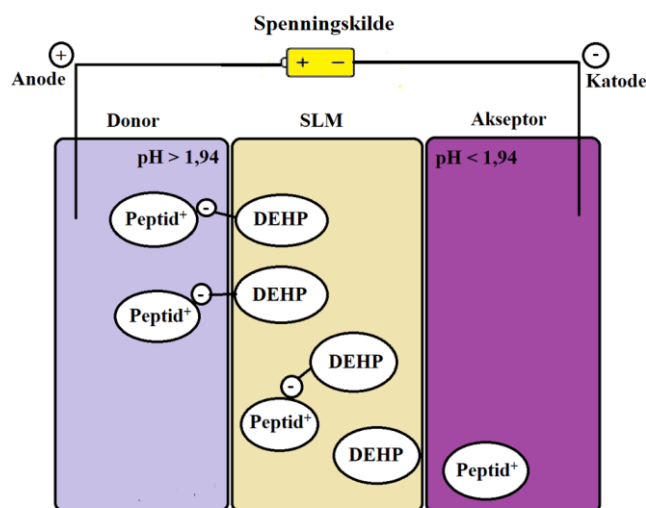
Teoretisk vil konsentrasjon av analytt i akseptor øke til den når likevekt. I praksis kan utbytte plutselig reduseres etter at systemet har nådd likevekt. Dette skyldes endring av pH i donor og akseptor, som følge av økt elektrolyse (se *Likning 2* og *3*). Effekten av elektrolyse kan spille en signifikant rolle ved høy spenning påført systemet, lang ekstraksjonstid, høy fluks av bakgrunnsioner som matrikskomponenter, redusert volum av donor og akseptor [32]. Lang ekstraksjonstid kan også gi reduksjon i utbytte som følge av degradering av SLM, enten ved lekkasje av SLM-komponenter ut i donor og akseptor eller ved penetrasjon av vann inn i SLM [33].

Det er en generell observasjon at ekstraksjonsutbytter av ulike analytter reduseres ved ekstraksjon fra plasmabasert donor. Dette gjelder også for peptider, og kan forklares av matrikseffekter fra plasma. Matrikspeptider og -proteiner som finnes naturlig i plasma er vist å adsorbere til overflaten av SLM, og gi redusert massetransport av analyttpeptider [34]. Det er også observert at uorganiske salter i plasma lettere ekstraheres enn større forbindelser, som for eksempel peptider [34]. Dette resulterer til økt strøm i systemet og en redusert stabilitet.

### 2.3.2 SLM

SLM brukes til å skille to vandige faser fra hverandre og består av organiske løsemidler, som ikke er blandbare med vann. Løsemidlet blir immobilisert av kapillærkrefter i et porøst polymermateriale, som for eksempel polypropylen [3]. I prinsippet vil SLM kun ekstrahere små og upolare molekyler, mens større og hydrofile matrikskomponenter vil bli værende i donor. Dette gjør at SLM fungerer som en barriere i systemet, og sikrer effektiv prøveopprensning. Likevel regnes EME som en av de mest effektive mikroekstraksjonsteknikkene i ekstraksjon av polare forbindelser, da man i stor grad kan justere selektiviteten i systemet med komponentene i SLM [8, 35]. Da peptider ofte er større, mer hydrofile forbindelser enn lavmolekylære legemidler, må det velges andre SLM-komponenter for effektiv ekstraksjon [3, 36].

SLM til ekstraksjon av peptider bør bestå av en ionebærer for effektiv ekstraksjon. En ionebærer er en ladet forbindelse, som tilsettes den organiske ekstraksjonsfasen for å fremme ekstraksjon av analytt ved ioniske interaksjoner [36]. Ladningen av forbindelsene kan enten være permanent, som for eksempel alkylerte kvaternære ammoniumgrupper, eller avhengig av pH i omkringliggende vandige løsninger, som for eksempel alkylerte fosfater [36]. De eneste tilfellene SLM uten ionebærer er vist seg å være effektiv i ekstraksjon av peptider, er for peptider med svært lav polaritet [4, 36]. Mono- eller di-alkylerte fosfater, som dibutylfosfat (DBP) og dietylheksylfosfat (DEHP), er ionebærere som har vist seg å være egna til ekstraksjon av peptider, hvor DEHP er den mest brukte [3, 36]. DEHP binder seg til peptidene ved ioniske interaksjoner, og danner et kompleks ved SLM/donor-grenseflaten. Komplekset er mer hydrofobt enn peptidene alene, og letter migrasjon av peptidene gjennom SLM. Ved SLM/akseptor-grenseflaten dissosierer komplekset som følge av en ionebytteprosess. DEHP protoneres og peptidene slippes ut i akseptor, da det er overskudd av  $H^+$ -ioner i akseptor [3, 37]. Økt mengde DEHP, øker som regel utbytte av analytt inntil et visst nivå hvor komplekset fanges i SLM'en grunnet for kraftige interaksjoner mellom analytt og DEHP. I tillegg vil en økt mengde DEHP øke strømmen i systemet, da DEHP øker transporten av matriksioner [36]. Med bakgrunn i dette er det viktig å finne en balanse med hensyn på hvor mye DEHP som skal tilsettes SLM [2]. DEHP har en beregnet pKa-verdi på 1,94 [38]. pH i donor må derfor være høy nok til å ionisere DEHP, mens pH i akseptor må være lav nok til å deionisere DEHP. I akseptor er det foretrukket med en sterk syre, med pKa-verdi  $<$  pKa-verdien til DEHP, da dette gjør ionebytteprosessen mer favorabel og reduserer sannsynligheten for fanging av peptider i SLM [39].



Figur 7: skissering av prinsippet for dannelsen av kompleks mellom DEHP og modellpeptidene ved ioniske interaksjoner.

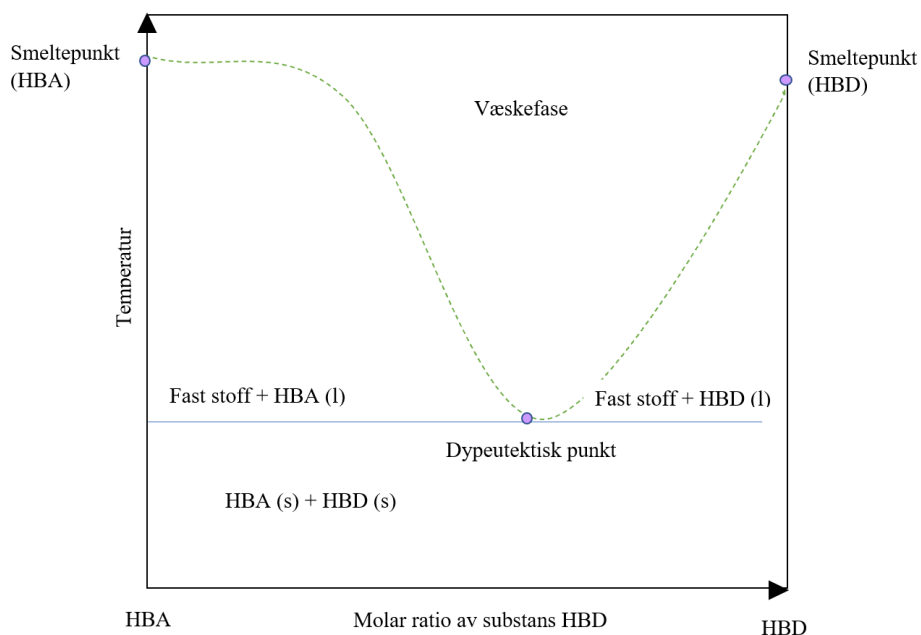
Da DEHP er en ioniserbar forbindelse bør log D til DEHP tas hensyn til ved valg av pH i donor og akseptor. DEHP er ionisert ved  $pH > pK_a$ , som resulterer i økt vannløselighet ved  $pH > 1,94$ . Dette øker risikoen for lekkasje av DEHP ut i akseptor og donor, samtidig som ladningen av DEHP teoretisk sett muliggjør elektrokinetisk migrasjon av DEHP [37]. Lekkasje av DEHP til akseptor og donor er observert ved  $pH > 4$  i bufferløsning, og har vist seg å gi gode utbytter av noen polare basiske forbindelser. Det som følge av at dannelsen av kompleks med analytt foregår i bulkløsning av donor, istedenfor ved grenseflaten. Dette gir økt tilgjengeligheten av DEHP og dannelse ioniske interaksjoner. Mengden DEHP som lekker ut avhenger av pH, og gir opphav til grenseflate-kompleksring, bulkløsning-kompleksring og mikset-kompleksring [37, 40].

Tidligere studier viser at selektivitet alene ikke bestemmes av ionebæreren, men også av de andre organiske løsemidlene i SLM [3]. Blant de ulike SLM komponenter som har blitt undersøkt, er det vist at alifatiske alkoholer og ketoner kan benyttes til ekstraksjon av peptider [3, 41]. Alifatiske alkoholer bidrar i stor grad med HBA-egenskaper, mens alifatiske ketoner bidrar med relativt sterkt dipolmoment. De organiske komponentene bidrar også med hydrofobe interaksjoner, som er vist seg å være viktig for ekstraksjon av peptider. Likevel er det viktig at hydrofobisiteten av det organiske løsemidlet ikke blir for stor, da dette reduserer ekstraksjonsutbytte betraktelig [3].

Det er vist å være fordelaktig med en væskemembran som disponerer for hydrogenbindingsinteraksjoner, da slike interaksjoner sammenlignet med ioniske interaksjoner

gir redusert ledningsevne i væskemembranen og dermed mindre strøm i systemet [42]. En dypeutektisk væskemembran (DES) bestående av kumarin:tymol (1:2) + 2 % DEHP ble for første gang studert i 2021 for ekstraksjon av peptider, og indikerte at hydrogenbindingsinteraksjoner er viktige og komplimenterer ioniske interaksjoner i ekstraksjon av peptider [42]. Resultater fra studien tydet også på at  $\pi$ -interaksjoner var viktige for ekstraksjon av peptider.

Dypeutektiske væsker er væsker som dannes når to (eller flere) faste stoffer blandes sammen og får lavere smeltepunkt i blanding enn hver for seg, som følge av intermolekulære hydrogenbindinger mellom stoffene (se *Figur 8*) [43]. En dypeutektisk væske må derfor bestå av en HBA og en HBD, som for eksempel kumarin og tymol respektivt. Man deler gjerne DES inn i hydrofile og hydrofobe dypeutektiske væsker (HDES), som igjen kan deles inn i ioniske og ikke-ioniske [44]. Det er ikke-ioniske HDES som er aktuelle innen elektromembranekstraksjon, da ledningsevnen ellers hadde blitt altfor høy. Sammenlignet med mange tradisjonelle løsemidler er DES mindre toksiske, billigere å syntetisere og mer biodegraderbare [44, 45]. Dette gjør DES til et mer miljøvennlig alternativ, og kan betraktes som et grønt løsemiddel. Dette har resultert i en økt interesse for bruk av DES innen analytisk kjemi de siste årene, og videre forskning med bruk av DES er forventet å øke i fremtiden [46].



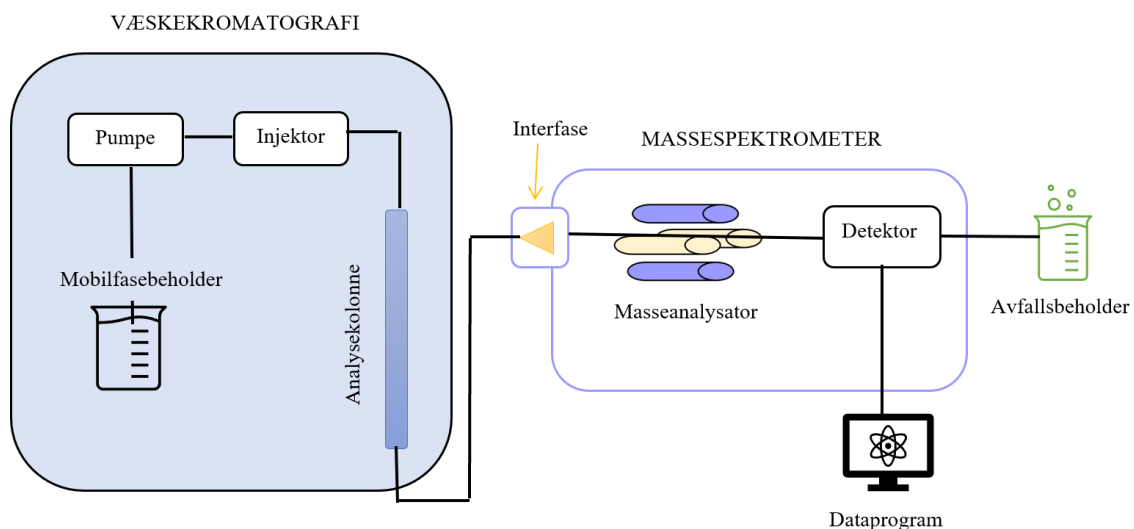
*Figur 8: fasediagram over endring i smeltepunkt i en blanding av komponent A og B, modificert fra [44].*

NPOE er et mye brukt organisk løsemiddel til ekstraksjon av upolare, basiske analytter, og som disponerer for hydrogenbindings-, dipol- og hydrofobe interaksjoner [36]. Dette er interaksjoner som har vist seg å være gunstig for ekstraksjon av peptider. Likevel gir NPOE lave utbytter av peptider [36]. Overgang av analytt til væskemembran bestemmes av interaksjoner mellom analytt og SLM-komponenter [40], samt solvatiseringsgrad av analytt i donor. Peptider er polare forbindelser, som gjør at de trives godt i den vandige donorfasen. For at peptidene effektivt skal transporteres gjennom SLM, må de ha kraftig interaksjon med komponentene i væskemembranen, fremfor vannmolekylene i donor [36].

I begynnelsen ble SLM immobilisert i en hulfibermembraner, men gikk i 2015 man over til SLM immobilisert i en flatmembran [39]. Bytte av membran ga opphav til et større volum av SLM, samt overflateareal, som resulterte i økte utbytter.

## 2.4 Væskrokromatografi koblet til massespektrometer (LC-MS)

Væskrokromatografi koblet til et massespektrometer (LC-MS) er et mye brukt analytisk instrumentet innen bioanalyse, hvor en oversikt er skissert i *Figur 9* [5, 36].



*Figur 9: skissering av LC-MS*

### 2.4.1 Væskrokromatografi (LC)

Væskrokromatografi (HPLC), fikk sitt store gjennombrudd rundt 1970, da stabile stasjonærfaser til omvendtfase kromatografi ble utviklet [5]. Omvendtfase kromatografi gjorde det mulig å analysere vandige prøver direkte, og er derfor det mest brukte separasjonsprinsippet innen bioanalyse [1].

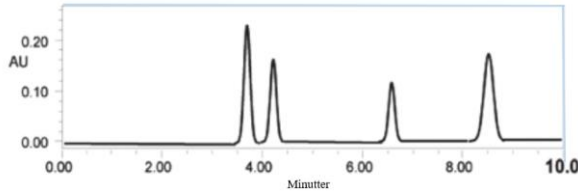
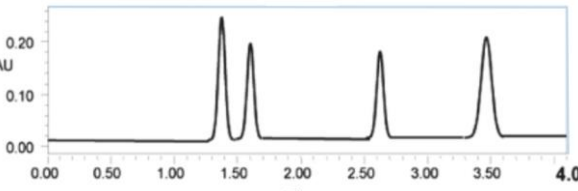
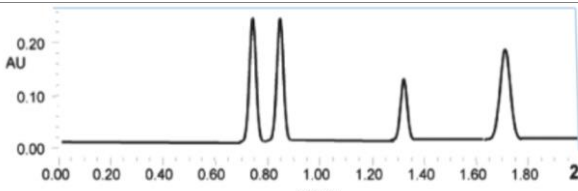
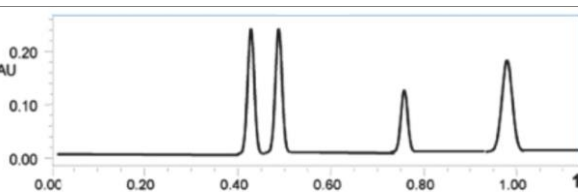
Separasjon av analyttene foregår i kolonnen, som gjør kolonnen til hjertet av HPLC. Omvendtfase kromatografi er det mest brukte separasjonsprinsippet i HPLC; hvor analyttene separeres ved ulik fordeling mellom en hydrofob stasjonærfase og en vandig mobilfase. Mobilfasen består av vandig buffer og et organisk løsemiddel, gjerne acetonitril eller metanol. En stasjonærfase bestående av sfæriske silikapartikler, modifisert med hydrofobe reagenser, er mest brukt. Hvilke hydrofobe reagenser silikapartiklene modifiseres med, er avhengig av kjemisk struktur av analyttene som skal separeres. Rangert etter synkende hydrofobisitet, er C18, C8, fenyl og CN blant de typiske stasjonærfasene benyttet, hvor C18 er den mest brukte. Silikapartiklene er utmerket til separasjon, da de er meget porøse og gir et stort overflateareal. Dette resulterer i god kontakt mellom analytt i mobilfase og stasjonærfasen [1].

Fordelingen mellom stasjonærfase og mobilfase baserer seg på hydrofobe interaksjoner, som van der Waalske krefter. Jo mer hydrofobe analyttene er, desto høyere grad av retensjon vil de få på kolonnen. Økt mengde organisk løsemiddel i mobilfasen øker styrken på mobilfasen; bindingene mellom analytt og stasjonærfasen brytes, og analyttene foreligger i mobilfasen. Mengden organisk løsemiddel i mobilfasen kan være konstant eller varieres underveis i kromatografien, isokratisk- eller gradient eluering respektivt, avhengig av analyttens fysikalsk-kjemiske egenskaper. Gradient eluering er det mest brukte, da det gir mer effektiv og raskere separasjon av analytter med ulike fysikalsk-kjemiske egenskaper. Andre interaksjoner som kan oppstå er sekundære interaksjoner mellom analytt og restsilanolgrupper på stasjonærfasen. Interaksjonene oppstår som følge av silanolgruppens sure egenskaper i kontakt med basiske funksjonelle grupper, gjerne aminer, på analytten. For økt reproducerbarhet av metoden, bør pH i mobilfasen justeres slik at analyttene enten er fullstendig protonert eller deprotonert. pH i mobilfasen må være i området 2-8, for å unngå degradering av silikapartiklene i stasjonærfasen [1].

Hastigheten av mobilfasen bestemmer i stor grad analysetiden, hvor man tilstreber så korte analysetider som mulig uten at det går på bekostning av separasjonen. Med økt hastighet øker baktrykket i systemet. For å redusere baktrykket kan man velge organiske løsemidler i mobilfasen med lav viskositet, for eksempel ved å velge acetonitril fremfor metanol [1]. Økt kolonnetemperatur vil også redusere viskositeten av mobilfasen og gi økt masseoverføring. Dette resulterer i økt kolonneeffektivitet, som defineres av antall teoretiske plater (N). Ved analyse av analytter som peptider og proteiner må temperaturøkninger vurderes nøye, da økt temperatur kan resultere i aggregering, hydrolyse og konformasjonsendringer av analytten [5].

For å øke kolonneeffektiviteten, er det ønskelig å pakke kolonnen med så små silikapartikler som mulig. Dette reduserer også bidraget av båndspredning, som resulterer i smale og symmetriske kromatografiske topper. En utfordring med redusert partikkelstørrelse er økt baktrykk i systemet. Dette kan håndteres ved å redusere lengden av kolonnen eller velge systemer som kan opereres under høyt trykk, såkalt *ultra high performance chromatography* (UHPLC) på engelsk. Sammenlignet med standard HPLC (partikkelstørrelse 3-5  $\mu\text{m}$ ), som opererer under en trykkgrense på 400 bar, kan UHPLC (partikkelstørrelse 1,5-2  $\mu\text{m}$ ) håndtere trykk opp mot 1000-1500 bar. Den økte effektiviteten med UHPLC gjør at man kan redusere lengden på kolonnen, som resulterer i kortere analysetider og mindre forbruk av mobilfase (se *Tabell 1*) [5].

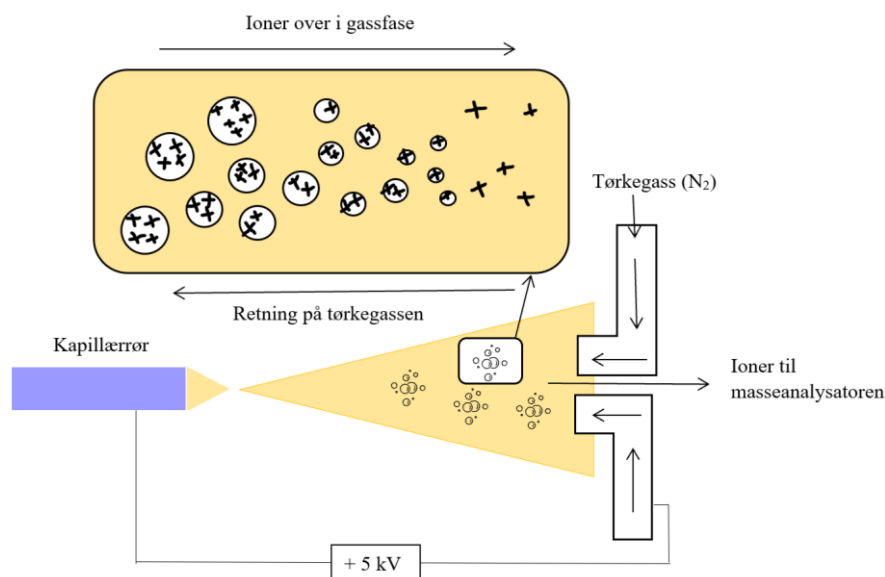
*Tabell 1: eksempel på hvordan kolonnenlengde, partikkelstørrelse og mobilfasehastighet kan påvirke analysetiden og separasjon mellom analyttene i et kromatogram.*

|              | <b>Kromatogrammer</b>   | <b>Betingelser</b>   |
|--------------|---|--|
| <b>HPLC</b>  |   | Kolonnenlengde: 150 mm<br>Partikkelstørrelse: 5 $\mu\text{m}$<br>Mobilfase hastighet: 0,2 mL   |
| <b>HPLC</b>  |  | Kolonnenlengde: 100 mm<br>Partikkelstørrelse: 3,5 $\mu\text{m}$<br>Mobilfase hastighet: 0,3 mL |
| <b>HPLC</b>  |  | Kolonnenlengde: 75 mm<br>Partikkelstørrelse: 2,5 $\mu\text{m}$<br>Mobilfase hastighet: 0,5 mL  |
| <b>UHPLC</b> |  | Kolonnenlengde: 50 mm<br>Partikkelstørrelse: 1,7 $\mu\text{m}$<br>Mobilfase hastighet: 0,6 mL  |

## 2.4.2 Elektrosprayionisering (ESI)

Elektrosprayionisering (ESI) er en av de mest brukte ioniseringsteknikkene innen LC-MS, og prosessen finner sted i grensesnittet mellom væskrokromatografien og massespektrometeret [5]. Analyttene i mobilfasen ioniseres slik at de kan bevege seg inn i vakuum i massespektrometeret. ESI opereres ved atmosfærisk trykk og regnes som en myk ioniseringsteknikk, da ioniseringen ikke gir opphav til fragmentering [1, 5].

Analyttene fraktes med mobilfasen inn gjennom et kapillær påført høy spenning, gjerne +/- 5 kV, inn til grensesnittet. Ved utgangen av kapillærrøret dannes en aerosol, som et resultat av at mobilfasen blandes med en nebuliseringsgass, nitrogen ( $N_2$ ). Dråpene i aerosolen får elektrisk ladning, som følge av påført spenning. Etter hvert som dråpene beveger seg mot massespektrometeret vil de reduseres i størrelse, da mobilfasen underveis vil fordampe og spyles vekk av en tørkegass. Det er viktig at mobilfasen i kromatografien er flyktig, slik at den er kompatibel med massespektrometeret. Reduksjon i dråpestørrelse fører ladningene på overflaten av dråpene nærmere hverandre. Ettersom at ladningene er like vil en redusert overflate bidra til økte repulsive krefter på overflaten, som resulterer i at dråpene eksploderer til mindre dråper, kalt Coloumbs fisjon. Prosessen gjentas til man sitter igjen med ioner i gassfase [5].



Figur 10: skissering av ESI. Modifisert og oversatt fra Figur 7.20 [5].

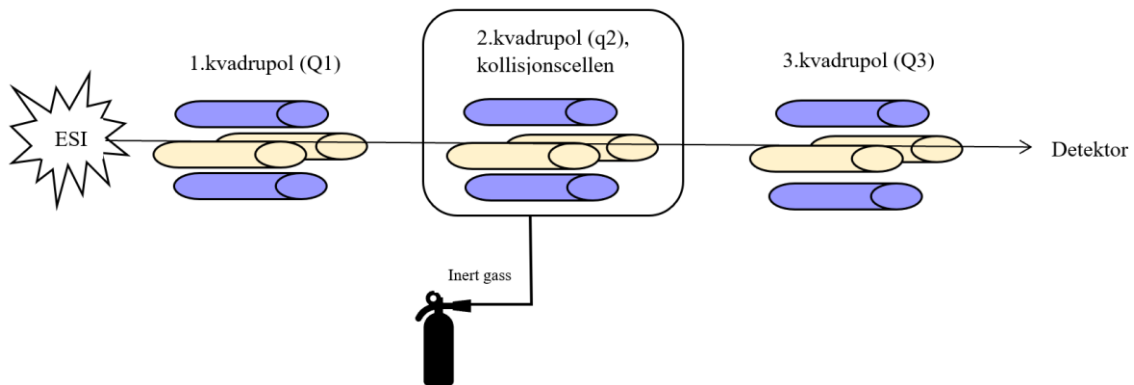


Spenningen nevnt innledningsvis kan gis positivt- eller negativt potensial, og hva man velger bestemmes ut ifra om analytten har sure eller basiske funksjonelle grupper [5]. For peptidanalyse benyttes positiv ionisering som oftest.

Elektrosprøyten benyttet i denne oppgaven har en høysensitiv «jet stream» teknologi, basert på bruk av en oppvarmet nitrogen-forstøvergass (*sheath gas* på engelsk). Den overopphetede nitrogen-forstøvergassen begrenser nebuliseringsgassen, og gir opphav til en mer effektiv tørking og konsentrering av ionene. Dette resulterer i en økt sensitivitet [47]. Gassen vil også lette fordamping av mobilfasen.

### 2.4.3 Trippelkvadrupol (QqQ) masseanalysator

Trippelkvadrupol er en mye brukt masseanalysator i analyse av legemiddelsubstanser og – metabolitter i biologiske matrikser som plasma, grunnet analysatorens høye sensitivitet og selektivitet [1]. Masseanalysatoren består av tre kvadrupoler koblet i serie, se *Figur 11*, og brukes hovedsakelig i tandem MS (MS/MS). Ionene fra grensesnittet beveger seg inn i den første kvadrupolen, hvor ønskede masser selekteres ut. Ionene som selekteres kalles forløperion, *precursor ion* på engelsk. Den første kvadrupolen kan filtrere ut et bestemt eller flere ioner, og man får kvantitativ bestemmelse etter *selected reaction monitoring (SRM)* eller *multiple reaction monitoring (MRM)* respektivt. De bestemte ionene vil deretter bevege seg videre til den andre kvadrupolen, kollisjonscellen [1]. Ionene akselereres mot utgangen av kollisjonscellen hvor de underveis kolliderer med inert gass, gjerne nitrogen (N<sub>2</sub>) eller argon (Ar). Dette resulterer i dannelsen av fragmenter [1, 5]. Fragmentene kalles produksjoner, *product ion* på engelsk. Produksjonene som er karakteristiske for stoffet vi ønsker å kvantifisere selekteres ut i den tredje kvadrupolen og sendes til detektoren [1]. Blant fragmentene som oppstår i massekromatogrammet, velges en kvantifiserer (*quantifier* på engelsk) og en kvalifiserer (*qualifier* på engelsk). Dette er fragmenter man alltid finner i massekromatogrammet for den aktuelle analytten. Begge fragmentene må være til stede for at man skal kunne identifisere analytten.



Figur 11: skissering av en trippelkvadrupol. Modifisert og oversatt fra Figur 7.29 [5].

Ionene separeres i kvadrupolen basert på deres masse-over-ladningsforhold ( $m/z$ -verdi). De fire stengene i kvadrupolen deles inn i par, hvor stengene parallelt overfor hverandre kobles elektrisk og danner et oscillerende felt. Ionene sendes inn i det oscillerende feltet i  $z$ -retning mot detektoren. Det oscillerende feltet får ionene til å oscillere, som vil si at de beveger seg vekselvis i  $y$ - og  $x$ -retning i tillegg til  $z$ -retning. Kvadrupolen kalibreres slik at ionene som ønskes detektert oscillerer stabilt. Ionene som ikke oscillerer stabilt vil kollidere med en av stengene i kvadrupolen, og dermed ikke detekteres [5].

### 3 Materialer og metode

#### 3.1 Modellpeptidene

Modellpeptidene brukt til ekstraksjon er kjøpt av Bachem (Bubendorf, Sveits) og valgt på bakgrunn av deres varierende fysikalsk-kjemiske egenskaper, se *Tabell 2*. Det ble valgt et bredt spekter av peptider for å få bedre forståelse av selektivitet knyttet til de ulike væskemembranene, og dermed en økt forståelse av hvilke egenskaper som er viktig hos væskemembranen for ekstraksjon av peptider med ulike fysikalsk-kjemiske egenskaper.

Tabell 2: modellpeptidene, samt noen av deres fysikalsk-kjemiske egenskaper. Utviklet fra tabell 1 [42].

| Modell-peptider | Antall aminosyrer | Molekylvekt (g/mol) | Isoelektrisk punkt | Sure/basiske residuer | Log D pH 3 | Log D/ladning ratio pH3 |
|-----------------|-------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|------------|-------------------------|
| Angiotensin I   | 10                | 1296,50             | 7,66               | 1/3                   | -7,9       | -2,1                    |
| Angiotensin II  | 8                 | 1046,20             | 7,45               | 1/2                   | -6,5       | -2,4                    |
| Angiotensin III | 7                 | 931,11              | 8,48               | 0/2                   | -5,8       | -2,2                    |
| Angiotensin IV  | 6                 | 774,92              | 7,45               | 0/1                   | -1,9       | -1,0                    |
| Bradykinin      | 9                 | 1060,23             | 10,88              | 0/2                   | -11,8      | -4,1                    |
| Endomorfin-1    | 4                 | 610,72              | 8,61               | 0/0                   | -1,0       | -1,0                    |
| Ile-Pro-Ile     | 3                 | 341,45              | 6,05               | 0/0                   | -1,5       | -1,6                    |
| Leu-enkefalin   | 5                 | 555,63              | 5,86               | 0/0                   | -2,4       | -2,6                    |
| Met-enkefalin   | 5                 | 573,67              | 5,82               | 0/0                   | -2,9       | -3,3                    |
| Neurotensin     | 13                | 1672,95             | 9,24               | 1/3                   | -11,2      | -4,1                    |
| Val-Pro-Leu     | 3                 | 327,43              | 6,05               | 0/0                   | -2,0       | -2,2                    |

### 3.2 Kjemikalier

Kjemikalier benyttet i forsøkene er listet under i Tabell 3.

Tabell 3: oversikt over kjemikalier, samt deres renhet, produsent og sted.

| Navn   | Renhet     | Produsent     | Sted                      |
|--|------------|---------------|---------------------------|
| Acetonitril (ACN)  | LC-MS-grad | Merck KGaA    | Darmstadt, Tyskland       |
| 2-Dekanon  | 98%        | Sigma-Aldrich | St. Louis, MO, USA        |
| Deionisert vann  | MilliQ     | Millipore     | Oslo, Norge<br>(FAI, UiO) |
| Dietylheksylfosfat (DEHP)  | 97%        | Sigma-Aldrich | St. Louis, MO, USA        |
| Dinatriumhydrogenfosfat Dodecahydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | 99-102 %   | Merck KGaA    | Darmstadt, Tyskland       |
| Etanol (EtOH)  | 96 %       | Antibac AS    | Asker, Norge              |
| Karvakrol  |            | Sigma-Aldrich | St. Louis, MO, USA        |
| Kumarin  | ≥ 99 %     | Sigma-Aldrich | St. Louis, MO, USA        |

|   |                   |                                 |                     |
|---|-------------------|---------------------------------|---------------------|
| <b>Maursyre (FA)</b>  | ≥ 99 %            | VWR Chemicals                   | Leuven, Belgia      |
| <b>Metanol (MeOH)</b>   | LC-MS-grad        | Merck KGaA                      | Darmstadt, Tyskland |
| <b>6-Metylkumarin</b>   | ≥ 99%             | Sigma-Aldrich                   | St. Louis, USA      |
| <b>Natriumdihydrogenfosfat monohydrat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b> | 99-102 %          | Merck KGaA                      | Darmstadt, Tyskland |
| <b>2-Nitrofenyloktyleter</b>  | ≥ 99 %            | Sigma-Aldrich                   | St. Louis, MO, USA  |
| <b>2-Nitrofenyl n-oktyleter (NPOE)</b>                                    | > 98 %            | TCI Amerika                     | Portland, OR, USA   |
| <b>2-Nitrofenylpentyleter (NPPE)</b>                                      | ≥ 99 %            | Sigma-Aldrich                   | St. Louis, MO, USA  |
| <b>1- Nonanol</b>   | 98 %              | Sigma-Aldrich                   | St. Louis, MO, USA  |
| <b>1- Oktanol</b>   | ≥ 99 %, HPLC-grad | Sigma-Aldrich                   | St. Louis, MO, USA  |
| <b>Orto-fosforsyre (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)</b>                      | 85 %              | VWR Chemicals                   | Leuven, Belgia      |
| <b>Plasma</b>   |                   | Oslo Universitets Sykehus (OUS) | Oslo, Norge         |
| <b>2-Propanol (PrOH)</b>  | LC-grad           | Merck KGaA                      | Darmstadt, Tyskland |
| <b>Sitrat monohydrat</b>  | ≥ 99%             | Sigma-Aldrich                   | St. Louis, MO, USA  |
| <b>Tymol</b>  | 99-101%           | Sigma-Aldrich                   | St. Louis, MO, USA  |

### 3.3 Løsninger

Det ble laget en stamløsning for hvert peptid på 1 mg/mL i deionisert vann (MilliQ-vann). Fra stamløsningene ble det laget en felles standardløsning på 50 µg/mL, ved å tilsette stamløsning for hvert enkelt peptid og fortynne med MilliQ-vann. Både stamløsninger og standardløsningene ble oppbevart i fryser (-18 °C), og beskyttet for lys.

Plasma fra 2019 ble fordelt i Protein LoBind® eppendorfrør med 1,5-2 mL i hver, og ble oppbevart i fryser inntil plasma skulle brukes i donorløsning.

### 3.3.1 Donorløsninger

Før hver ekstraksjon ble det laget en donorløsning ved å fortynne standardløsningen på 50 µg/mL med ønsket prøvematriks til en konsentrasjon på 1 µg/mL. Det ble laget donorløsninger med ulike pH. Løsningene ble tillaget i Protein LoBind® eppendorfrør. Alle donorløsningene besto av plasma, 50 mM\* sitrat/fosfatbuffer, 5 M fosforsyre og standardløsning av peptidene i ulike forhold, se *Tabell 4*.

*Tabell 4: sammensetningene av donor for de ulike pH-verdiene.*

| <b>Plasma: bufferløsning (1:1)</b> | <b>Sammensetning av 1 mL donorløsning</b>   |
|------------------------------------|---|
| <b>pH 2,5</b>                      | 500 µL plasma + 455 µL 50 mM* sitrat/fosfatbuffer (pH 3,0) + 25 µL 5 M fosforsyre + 20 µL standardløsning |
| <b>pH 3,0</b>                      | 500 µL plasma + 460 µL 50 mM* sitrat/fosfatbuffer (pH 3,0) + 20 µL 5M fosforsyre + 20 µL standardløsning  |
| <b>pH 3,5</b>                      | 500 µL plasma + 465 µL 50 mM* sitrat/fosfatbuffer (pH 3,6) + 15 µL 5M fosforsyre + 20 µL standardløsning  |
| <b>pH 4,0</b>                      | 500 µL plasma + 470 µL 50 mM* sitrat/fosfatbuffer (pH 4,0) + 10 µL 5M fosforsyre + 20 µL standardløsning  |
| <b>pH 4,5</b>                      | 500 µL plasma + 470 µL 50 mM* sitrat/fosfatbuffer (pH 4,4) + 10 µL 5M fosforsyre + 20 µL standardløsning  |

\* Tilnærmet konsentrasjon på 50 mM (se tillaging av buffer i kap. 3.3.3 Andre bufferløsninger)

Ettersom at løsningene inneholdt 50 % plasma ble pH i løsningene sjekket ved bruk av pH-papir istedenfor pH-meter. Løsningenes pH ble funnet ved å sammenligne pH i løsningen med pH i en bufferløsning med ønsket pH. Kontrollerte pH i bufferløsningen i forkant av sammenligningen ved bruk av pH-meter.

### 3.3.2 Akseptorløsninger

#### 50 mM fosforsyre (pH 1,8)

100 mL 50 mM fosforsyre ble laget ved å pipettere ut 342 µL orto-fosforsyre (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) til en 100 mL målekolbe fylt med en mindre mengde MilliQ-vann. MilliQ-vann ble deretter fylt til merket på målekolben, før løsningen ble overført til en Erlenmeyerkolbe av passende størrelse. pH-meter ble benyttet til å måle pH i løsningen.

### **50 mM fosfatbuffer (pH 2,5)**

100 mL 50 mM natriumdihydrogenfosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )-løsning ble lagd ved å veie inn 690 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  og løse stoffet i 100 mL MilliQ-vann. Brukte denne løsningen til å titrere pH i 50 mM fosforsyre løsningen (pH 1,8) til pH 2,5, ved bruk av pH-meter.

### **50 mM fosfatbuffer (pH 3,0)**

100 mL 50 mM natriumdihydrogenfosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )-løsning ble lagd ved å veie inn 690 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  og løse stoffet i 100 mL MilliQ-vann. Brukte denne løsningen til å titrere pH i 50 mM fosforsyre løsningen (pH 1,8) til pH 3,0 ved bruk av pH-meter.

## **3.3.3 Andre løsninger**

### **5 M fosforsyre**

Løsningen var ferdig tillaget av Frederik Andre Hansen.

### **50 mM\* sitrat/fosfatbuffer (pH 3,0)**

100 mL 50 mM sitronsyre løsning ble lagd ved å veie ut 1,05 g sitronsyre og løse i 100 mL MilliQ-vann. Deretter ble 1,79 g dinatriumhydrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) veid ut og løst i 100 mL MilliQ-vann, for å lage 100 mL 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -løsning. Overførte en relativt liten mengde 50 mM sitronsyre over til et begerglass. Deretter ble 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -løsningen brukt til å titrere pH til pH 3,0 ved bruk av pH-meter.

### **50 mM sitrat/fosfatbuffer (pH 3,6)**

Bufferen var ferdig tillaget av Frederik Andre Hansen.

### **50 mM sitrat/fosfatbuffer (pH 4,0)**

Bufferen var ferdig tillaget av Frederik Andre Hansen.

### **50 mM sitrat/fosfatbuffer (pH 4,4)**

Bufferen var ferdig tillaget av Frederik Andre Hansen.

Bufferløsningene ble oppbevart i kjøleskap (2-8 °C) når ikke de var i bruk.

### 3.3.4 Væskemembraner

Alle komponentene ble veid inn på analysevekt. Godtok et avvik på +/- 1% for innveide mengder. Væskemembranene ble oppbevart i romtemperatur, beskyttet for lys når ikke de var i bruk.

#### Væskemembraner til system E

6-Metylkumarin og tymol ble veid ut i veieskip på analysevekt og overført til et eppendorfrør av egnet størrelse. Blandingene ble satt i varmeskap på ca. 80 °C i omtrent 30 min, for å fremskynde dannelsen av dypeutektisk væske. Løsningene ble blandet på en vortex mikser før bruk. *Tabell 5* gir en oversikt over innveide mengder for væskemembranene i system E.

*Tabell 5: innveide mengder av komponentene til SLM for system E.*

| Væskemembraner system E                            | Innveide mengder   |
|--|--|
| <b>6-Metylkumarin:tymol (1:1)</b>                  | 6-Metylkumarin: 1,510 g<br>Tymol: 1,509 g  |
| <b>6-Metylkumarin:tymol (1:1) + 5%DEHP</b>         | DEHP: 25,10 mg<br>6-Metylkumarin:tymol(1:1): 476,6 mg  |
| <b>6-Metylkumarin:tymol (1:1) + 2%DEHP</b>         | DEHP: 20,30 mg<br>6-Metylkumarin:tymol(1:1): 994,0 mg  |
| <b>6-Metylkumarin:tymol (1:1) + 1%DEHP</b>         | 6-Metylkumarin:tymol(1:1) + 2%DEHP: 235,0 mg<br>6-Metylkumarin:tymol(1:1): 234,7 mg  |
| <b>6-Metylkumarin:tymol (1:1) + 0,5% DEHP</b>      | 6-Metylkumarin:tymol(1:1) + 1%DEHP: 217,5 mg<br>6-Metylkumarin:tymol(1:1): 216,5 mg  |
| <b>6-Metylkumarin:tymol (1:2) + 0,5%DEHP</b>       | DEHP: 10,40 mg<br>6-Metylkumarin:tymol: 511,0 mg<br>→ 6-Metylkumarin:tymol (1:2) + 2 % DEHP<br>6-Metylkumarin:tymol (1:2) + 2 % DEHP: 260,4 mg<br>6-Metylkumarin:tymol (1:2): 261,0 mg<br>→ 6-Metylkumarin:tymol (1:2) + 1 % DEHP<br>6-Metylkumarin:tymol (1:2) + 1 % DEHP: 237,2 mg<br>6-Metylkumarin:tymol (1:2): 237,2 mg |
| <b>6-Metylkumarin:karvakrol (1:1) + 0,5 % DEHP</b> | 6-Metylkumarin: 1,510 g<br>Karvakrol: 1,490 g<br>→ 6-Metylkumarin:karvakrol (1:1)<br>DEHP: 10, 53 mg   |

---

6-Metylkumarin:karvakrol (1:1): 526,61 mg  
 → 6-Metylkumarin:karvakrol (1:1) + 2 % DEHP

6-Metylkumarin:karvakrol (1:1) + 2 % DEHP: 254,5 mg  
 6-Metylkumarin:karvakrol (1:1): 254,1 mg  
 → 6-Metylkumarin:karvakrol (1:1) + 1 % DEHP

6-Metylkumarin:karvakrol (1:1) + 1 % DEHP: 252,7 mg  
 6-Metylkumarin:karvakrol (1:1): 252,3 mg

---

### Væskemembraner til system F

Komponentene til SLM i system F ble pipettert over i eppendorfrør og veid på analysevekt. Alle løsningene ble blandet på vortex mikser før bruk. *Tabell 6* viser oversikt over innveide mengder for væskemembranene i system F.

*Tabell 6: innveide mengder av komponentene til SLM for system F.*

| Væskemembraner system F                  | Innveide mengder   |
|--|--|
| <b>Karvakrol:NPOE (1:1)</b>              | Karvakrol: 1,483 g<br>NPOE: 1,483 g  |
| <b>Karvakrol:NPOE (1:1) + 5 % DEHP</b>   | DEHP: 25,30 mg<br>Karvakrol:NPOE (1:1): 480,4 mg   |
| <b>Karvakrol:NPOE (1:1) + 2 % DEHP</b>   | DEHP: 12,10 mg<br>Karvakrol:NPOE (1:1): 593,3 mg   |
| <b>Karvakrol:NPOE (1:1) + 1 % DEHP</b>   | DEHP: 59,80 mg<br>Karvakrol: 2,946 g<br>→ Karvakrol + 2 % DEHP<br>Karvakrol + 2 % DEHP: 505,0 mg<br>NPOE: 507,1 mg               |
| <b>Karvakrol:NPOE (1:1) + 0,5 % DEHP</b> | Karvakrol: 2 % DEHP: 1,458 g<br>Karvakrol: 1,459 g<br>→ Karvakrol + 1 % DEHP<br>Karvakrol + 1 % DEHP: 466,1 mg<br>NPOE: 445,6 mg |
| <b>Karvakrol:NPOE (1:2) + 1 % DEHP</b>   | Karvakrol: 248,6 mg<br>NPOE: 501,4 mg<br>→ Karvakrol:NPOE (1:2)  |

---



|  |   |
|--|---|
|  | DEHP: 6,5 mg<br>Karvakrol:NPOE (1:2): 643,4 mg  |
| <b>Karvakrol:NPOE (2:1) + 1 % DEHP</b> | Karvakrol: 506,9 mg<br>NPOE: 254,0 mg<br>→ Karvakrol:NPOE (2:1)<br>DEHP: 6,6 mg<br>Karvakrol:NPOE (2:1): 654,2 mg |
| <b>Karvakrol:NPPE (1:1) + 1 % DEHP</b> | Karvakrol + 2 % DEHP: 109,7 mg<br>NPPE: 109,0 mg  |

### Væskemembraner til system A-D

Kumarin og tymol til SLM i system A ble veid inn i veieskip på analysevekt, og plassert i varmeskap på ca. 80 °C i omtrent 30 min. Komponentene til SLM i system B-D er flytende, og ble direkte innveid i eppendorfrør av egnet størrelse. Alle løsninger blandes på vortex mikser før bruk. *Tabell 7* viser innveide mengder av de ulike komponentene.

*Tabell 7: innveide mengder av komponentene i SLM for system A-D.*

| Væskemembraner til system                       | Innveide mengder   |
|---|--|
| <b>A: Kumarin:tymol (1:2) + 2 % DEHP</b>        | Kumarin: 499,9 mg<br>Tymol: 999,1 mg<br>→ Kumarin:tymol (1:2)<br>DEHP: 9,900 mg<br>Kumarin:tymol (1:2): 489,7 mg |
| <b>B: 1-Oktanol + 5 % DEHP</b>                  | DEHP: 25,1 mg<br>1-Oktanol: 478,1 mg   |
| <b>C: 1-Nonanol:2-dekanon (1:1)</b>             | 1-Nonanol: 501,5 mg<br>2-Deknanon: 504,2 mg  |
| <b>D: 1-Nonanol:2-dekanon (1:1) + 15 % DEHP</b> | DEHP: 74,90 mg<br>1-Nonanol:2-dekanaon: 424,3 mg   |

### 3.3.5 Løsninger til LC-MS

Alle løsningene ble ristet godt, før de ble satt i ultralydbad i 10-15 min for å fjerne luft fra løsningen. Mobilfase 1 A ble oppbevart på brun glassflaske.

*Tabell 8* presenterer en oversikt over de ulike løsningene, og hvordan de ble lagd.

Tabell 8: LC-MS løsninger.

| Løsninger           | Innhold  | Tillaging  |
|---------------------|--|--|
| <b>Mobilfase 1A</b> | MilliQ-vann:ACN<br>(95:5, v/v) med 0,1<br>% FA | 1 L målekolbe ble skylt med MilliQ-vann, før den ble fylt med noe MilliQ-vann. 50 mL ACN og 1 mL FA ble tilsatt, før MilliQ-vann ble fylt til merket. Løsningen overføres til 1 L glassflaske. |
| <b>Mobilfase 1B</b> | ACN:MilliQ-vann<br>(95:5, v/v) med 0,1<br>% FA | Noe ACN ble tilsatt 1 L målekolbe. Deretter ble 50 mL MilliQ-vann og 1 mL FA tilsatt. ACN ble fylt til merket. Løsningen overføres til 1 L glassflaske   |
| <b>Mobilfase 2A</b> | MeOH:MilliQ-vann<br>(10:90, v/v)               | 100 mL MeOH ble målt opp i en 100 mL målesylinder, og overført til en gradert 1 L glassflaske. Resten av glassflasken ble fylt med MilliQ-vann.  |
| <b>Mobilfase 2B</b> | MeOH 100%                                      | 1000 mL MeOH ble tilsatt en 1 L glassflaske.   |
| <b>Seal wash</b>    | PrOH:MilliQ-vann<br>(10:90, v/v)               | 100 mL PrOH ble målt opp i en 100 mL målesylinder, og overført til en gradert 1 L glassflaske. Deretter ble MilliQ-vann fylt til merket for 1000 mL.   |
| <b>Needle wash</b>  | MeOH:MilliQ-vann<br>(20:80, v/v)               | 200 mL MeOH ble målt direkte ut i gradert 1L glassflaske. Resten av glassflasken ble fylt med MilliQ-vann.   |

### 3.4 Utstyr

Diverse utstyr brukt i forsøkene er listet i Tabell 9-13.

Tabell 9: utstyr i det snart kommersielle EME-utstyret.

| Utstyr            | Beskrivelse  | Produsent | Sted                |
|-------------------|--|-----------|---------------------|
| <b>Elektroder</b> | Kobbertråd, med tilhørende strømledninger, loddet til topplate |           |                     |
| <b>Membraner</b>  | ACCUREL®   | MEMBRANA  | Wuppertal, Tyskland |

|               |  |                          |            |
|---------------|--|--------------------------|------------|
| <b>Vialer</b> | Strømledende vialer av modifisert polypropylen | Extraction Technology AS | Ski, Norge |
| <b>Union</b>  | Ikke-strømledende plast                        | Extraction Technology AS | Ski, Norge |

Tabell 10: utstyr brukt til MS.

| Utstyr                              | Beskrivelse  | Produsent             | Sted           |
|-------------------------------------|--|-----------------------|----------------|
| <b>Glassvialer til autosamplere</b> | 1,5 mL <i>Short Thread vial</i> , 32x11,6 mm klart hydrolytisk glass.          | Nerliens<br>Meszansky | Oslo, Norge    |
| <b>Innsats til vialer</b>           | Mikro innsatser<br>0,1 mL, 31x6 mm   | VWR                   | Leuven, Belgia |
| <b>Kork til glassvialene</b>        | 9 mm polypropylen (PP) rød kork, 1 mm silikonhull av polytetrafluoreten (PTFE) | VWR                   | Leuven, Belgia |

Tabell 11: elektronisk utstyr.

| Utstyr               | Beskrivelse                                  | Produsent       | Sted                   |
|----------------------|--|-----------------|------------------------|
| <b>Analysevekt</b>   | NewClassic Balances,<br>MS Semi-Micro Models | Mettler Toledo  | Greifensee, Sveits     |
| <b>Multimeter</b>    | FLUKE 287<br>True RMS Multimeter             | FLUKE           | Everett, WA,<br>USA    |
| <b>MilliQ-anlegg</b> | Millipak® 0,22 µm filter                     | Merck KGaA      | Darmstadt,<br>Tyskland |
| <b>pH-meter</b>      | 744 pH-meter                                 | Metrohm         | Herisau, Sveits        |
| <b>Risteapparat</b>  | MX-M<br>0-1500 rpm<br>260 x 150 x 80 mm      | DLAB Scientific | Beijing, Kina          |
| <b>Sentrifuge</b>    | Centrifuge 5804                              | Eppendorf       | Hamburg,<br>Tyskland   |
| <b>Stoppeklokke</b>  | Digital Timer<br>Count Down/Up               | VWR             | Leuven, Belgia         |

|                       |                             |                          |                                 |
|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| <b>Ultralydbad</b>    | Ultrasonic Cleaner<br>USC-T | VWR                      | Leuven, Belgia                  |
| <b>Varmeskap</b>      | ED 53                       | Binder GmbH              | Tuttlingen,<br>Tyskland         |
| <b>Spenningskilde</b> | ES 015-10                   | Delta Elektronika<br>B.V | Zierikzee,<br>Nederland         |
| <b>Spenningskilde</b> | ES 0300-0,45                | Delta Elektronika<br>B.V | Zierikzee,<br>Nederland         |
| <b>Vortex mikser</b>  | SA8<br>Beskyttet av BioCote | Stuart                   | Staffordshire,<br>Storbritannia |
| <b>Vortex smikser</b> | Analog Vortex Mixer         | VWR                      | Leuven, Belgia                  |

Tabell 12: pipetter.

| Utstyr                              | Beskrivelse  | Produsent         | Sted              |
|-------------------------------------|--|-------------------|-------------------|
| <b>BIOHIT pipetter</b>              | m20 (2-20 µL),<br>m200 (20-200 µL), m1000<br>(100-1000 µL) | BIOHIT, Sartorius | Helsinki, Finland |
| <b>Sartorius<br/>pipettespisser</b> | Optifit refill tips<br>200 µL, 1000 µL                     | Sartorius         | Helsinki, Finland |

Tabell 13: forbruksmateriell.

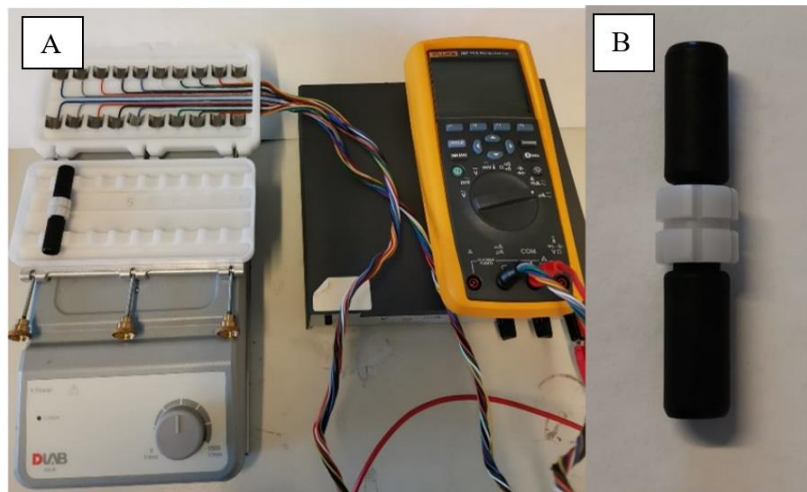
| Utsyr               | Beskrivelse                               | Produsent     | Sted                  |
|---------------------|---|---------------|-----------------------|
| <b>Hansker</b>      | Nitril hansker, puddefri.                 | VWR           | Leuven, Belgia        |
| <b>Vipes</b>        | 20 x19,5 cm                               | VWR           | Leuven, Belgia        |
| <b>Eppendorfrør</b> | Protein LoBind Tube<br>1,5 mL, 2 mL, 5 mL | Eppendorf     | Hamburg,<br>Tyskland  |
| <b>pH-papir</b>     | pH Test Strips<br>0,0-14,0                | Sigma-Aldrich | St. Louis, MO,<br>USA |
| <b>pH-papir</b>     | pH-indikator strips<br>pH 0-14            | VWR           | Leuven, Belgia        |

### 3.5 EME-betingelser

Til ekstraksjon av peptidene ble prototypeutstyr produsert av Extraction Technology Norway AS (ETN AS) benyttet. Utstyret besto av to strømledende polymerbaserte vialer (donor- og akseptorvial), en ikke-strømledende union, en polypropylenmembran, en bunnplate, en toppplate med kobber Elektroder, en modifisert vortex mikser, et multimeter og en spenningskilde. Utstyret ble koblet opp slik at man fikk en sluttet strømkrets.

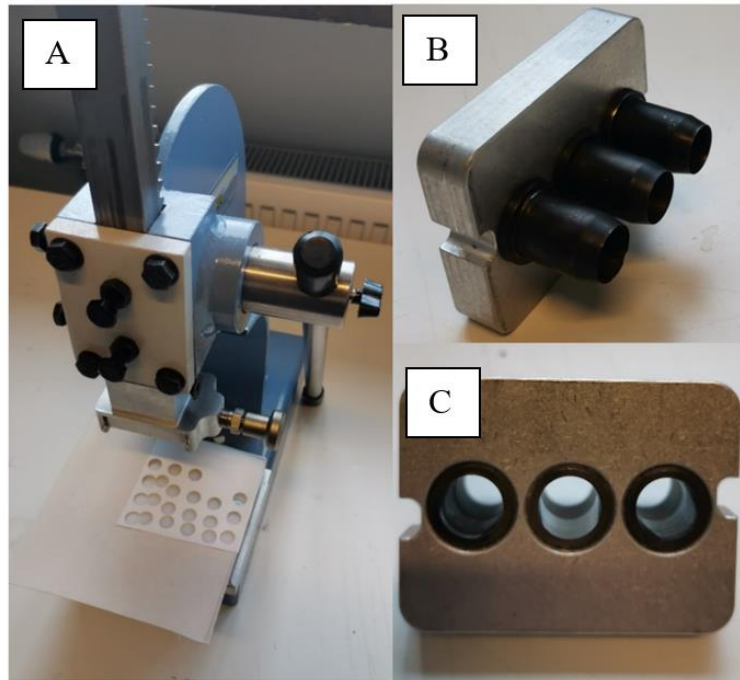
Til forskjell fra tradisjonelt EME-utstyr, som benytter platinaelektroder, er det de strømledende vialene som er elektrodene i systemet [19]. I toppplaten er kobber Elektroder limt fast i to parallelle rader, se

*Bilde 1.* Hver kobber Elektrode har tilhørende ledninger som kan kobles på negativ- eller positiv pol i spenningskilden avhengig av hvilken vial man ønsker skal være katode og anode.



*Bilde 1: EME prototypeutstyr fra ETN AS. A: utstyret brukt i ekstraksjonene, B: donor- og akseptorvial sammenkoblet via en union.*

Polypropylenmembranen var flat og sirkelformet, med en diameter på 254 mm og en tykkelse på 168  $\mu\text{m}$  [19]. Porestørrelsen var i området 0,1-0,5  $\mu\text{m}$ , og holdt løsemidlet i væskemembranen på plass ved hjelp av kapillærkrefter. Membranene ble presset ut på laboratoriet ved bruk av en membranpresse, se *Bilde 2*. Polypropylenmaterialet er skjørt og ble derfor lagt på en papplate før de ble presset ut. Dette var nødvendig for ikke å ødelegge polypropylenmaterialet.



*Bilde 2: membranpressen. A: membranpressen, B: stempel til membranpressen vist fra siden, C: stempel til membranpressen vist ovenfra.*

### **3.5.1 Ekstraksjonsprosedyre**

For hver ekstraksjon ble det utført tre replikater, slik at relativt standardavvik (RSD) kunne vurderes for utbyttene. Alle løsningsene benyttet i ekstraksjonene ble blandet på en vortex mikser før bruk, for å sikre homogene løsninger.

300  $\mu\text{L}$  akseptorløsning ble pipettert over i akseptorvialen. Polypropylenmembranen ble plassert i unionen på den siden av unionen som ble skrudd på akseptorvialen, slik at membranen lagde et løkk og dermed forhindret akseptorløsningen i å renne ut av systemet når donorvialen ble skrudd på. 9  $\mu\text{L}$  ekstraksjonsfase ble deretter pipettert på polypropylenmembranen, før 300  $\mu\text{L}$  donorløsning ble pipettert over i donorvialen og skrudd på den andre siden av unionen. Volumet av akseptor og donor var likt, ekstraksjonene ga derfor ingen oppkonsentrering.

De sammenkoblede vialene ble lagt på plass i bunnplaten som var festet til den modifiserte vortex mikseren, før topplaten med kobber elektrodene ble lagt over og skrudd fast. Kobber elektrodene koblet til positiv- og negativ pol på strømforsyningen ble lagt over donor- og akseptorvialene respektivt, ettersom at peptidene skulle ekstraheres med netto positiv ladning. Et multimeter ble koblet inn i strømkretsen, slik at det var mulig å vurdere strømmen

i systemet. Multimeteret ble igjen koblet via en USB-kabel til en PC, for å kunne logge strømmen som funksjon av tiden.

Når utstyret var satt opp ble ønsket spenning og horisontal risting (750 rpm) påført systemet. Ekstraksjonen gikk i 30 min. Dersom strømmen økte som funksjon av tiden før 30 min var gått, ble ekstraksjonen avsluttet. Ved endt ekstraksjon ble spenningen skrudd av og 100 µL akseptorfase ble pipettert over i en vial med innsatser og injisert på LC-MS/MS.

### 3.5.2 Optimaliseringsforsøk

Følgende optimaliseringsforsøk ble gjort:

- Testet ulik pH i donor
- Testet ulik pH i akseptor
- Testet ulik ratio av komponentene i SLM
- Testet karvakrol istedenfor tymol i system E
- Testet NPPE istedenfor NPOE i system F
- Testet ulik prosentandel DEHP
- Testet ulik spenning påført systemet

Hensikten med forsøkene var å undersøke hvor sensitiv stabiliteten av væskemembranene var for endringer i operasjonelle parametere. Ekstraksjonsprosedyren var som beskrevet ovenfor for alle optimaliseringsforsøkene, og de ulike ekstraksjonsbetingelsene er vist i *Tabell 14*.

*Tabell 14: endringer av operasjonelle parametere gjort i optimaliseringsforsøkene.*

| Undersøkte parametere | Ekstraksjonsbetingelser |                              |
|-----------------------|-------------------------|------------------------------|
|                       |                         | Spenning påført systemet (V) |
| <b>pH i donor</b>     | pH-verdier testet:      | 3                            |
|                       | 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 |                              |
| <b>pH i akseptor</b>  | pH-verdier testet:      | 3                            |
|                       | 1,8, 2,5, 3,0           |                              |

|   |  |   |
|---|--|---|
| <b>Ratioer av komponentene i SLM</b>                | <u>System E: 6-metylkumarin:tymol+ 0,5 % DEHP</u><br>Ratioene testet:<br>1:1, 1:2<br>*2:1 ble ikke undersøkt da forholdet ikke ga løsning                            | 3   |
|   | <u>System F: karvakrol:NPOE + 1 % DEHP</u><br>Ratioene testet:<br>1:1, 1:2, 2:1  | 3   |
| <b>Erstatning av tymol med karvakrol (system E)</b> | 6-Metylkumarin:tymol(1:1) + 0,5 % DEHP   | 3   |
|   | 6-Metylkumarin: karvakrol (1:1) + 0,5 % DEHP   | 3   |
| <b>Erstatning av NPOE med NPPE (system F)</b>       | Karvakrol:NPOE (1:1) + 1 % DEHP  | 3   |
|   | Karvakrol: NPPE (1:1) + 1 % DEHP   | 3   |
| <b>Prosentandel DEHP i SLM</b>                      | Prosentandel DEHP testet:<br>0 %, 0,5 %, 1 %, 2 % og 5 %   | 2   |
| <b>Spenning påført systemet</b>                     | <u>System E: 6-metylkumarin:tymol</u><br>- 0,5 % og 1 % DEHP<br>- 2 % og 5 % DEHP<br><br><u>System F: karvakrol:NPOE</u><br>- 0,5 % og 1 % DEHP<br>- 2 % og 5 % DEHP | <b>Spenningsrekkene for de aktuelle % DEHP:</b><br>0, 2,5, 5, 10, 20<br>0, 1,25, 2,5, 5, 10<br>*stoppet ved 10 V for 2 % DEHP, 5 V for 5 % DEHP<br><br>0, 2,5, 5, 10, 20<br>0, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 |



### **3.5.3 Viskositetsmålinger**

Det ble utført viskositetsmålinger av tre replikater av væskemembranene 6-metylkumarin:tymol (1:1) + 2 % DEHP (system E) og karvakrol:NPOE (1:1) + 2 % DEHP (system F). Viskositeten ble målt med en Brookfield DV2T viskometer (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA, USA) med en CPA-40Z spindel (prøve volum = 0,5 mL). Temperaturen ble holdt konstant på  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  under viskositetsmålingene (Grant LTD6G vannbad, Grant Instruments, Cambridge, Ltd., Royston, UK). En enkeltpunktsviskositetsmåling ble utført med endeparameter satt til 2 min ved 5 (system E) eller 15 rpm (system F) for alle prøver (nøyaktighet:  $\pm 0,61$  eller  $0,20 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ , respektivt).

### **3.5.4 Vaskeprosedyre av EME-vialene**

Etter endt ekstraksjon ble vialene tømt for innhold og spylt med etanol (EtOH), før de ble lagt i et begerglass fylt med EtOH. Begerglasset med vialene ble ristet med roterende bevegelser, før EtOH ble tømt ut i egnet avfallsbeholder. Vialene ble overført til et begerglass, som ble fylt med MilliQ-vann. Begerglasset ble igjen ristet. Vialene ble skylt 2-3 ganger med MilliQ-vann før de ble satt til tork, i romtemp over natten eller i varmeskap om vialene skulle brukes flere ganger samme dag.

## **3.6 LC-MS/MS-betingelser**

### **3.6.1 LC-betingelser**

Kromatografien ble utført i en Agilent 1290 Infinity II UHPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), bestående av en G7120A binær pumpe og G7167B multisamplere. Analyttene ble retardert og separert på en Agilent Eclipse Plus C18 reversfasekolonne (2,1 x 50 mm,  $1,8 \mu\text{m}$ , part number 959757-902) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). LC-betingelsene er gitt av *Tabell 15*.

Tabell 15: LC-betingelser.

| Parameter          | Verdi                                     |
|--------------------|---|
| Injeksjonsvolum    | 0,1 µL                                    |
| Kolonnetemperatur  | 40 °C                                     |
| Mobilfasehastighet | 0,6 mL/min                                |
| Mobilfase A        | MilliQ-vann: ACN (95:5, v/v) med 0,1 % FA |
| Mobilfase B        | ACN: MilliQ-vann (95:5, v/v) med 0,1 % FA |

Peptidene ble separert med gradienteluering som vist i Tabell 16.

Tabell 16: gradienten av mobilfasene i kromatografien.

| Tid (min) | A (%) | B (%)  | Hastighet<br>(mL/min) | Maksgrense for<br>trykk (bar) |
|-----------|-------|--------|-----------------------|-------------------------------|
| 0,00      | 97,00 | 3,00   | 0,6                   | 1000,00                       |
| 0,50      | 97,00 | 3,00   | 0,6                   | 1000,00                       |
| 2,50      | 70,00 | 30,00  | 0,6                   | 1000,00                       |
| 2,51      | 0,00  | 100,00 | 0,6                   | 1000,00                       |
| 3,00      | 0,00  | 100,00 | 0,6                   | 1000,00                       |
| 3,01      | 97,00 | 3,00   | 0,6                   | 1000,00                       |

### 3.6.2 MS/MS-betingelser

Peptidene ble ionisert i en Agilent Jet Stream Ion Source (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), se ioniseringsbetingelser i Tabell 17, og videre overført til G6495C Agilent 6495 LC/TQ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Identifisering og kvantifisering av peptidene ble utført ved en MRM-scan (se 2.4.3 Trippelkvadrupol (QqQ) masseanalysator). En oversikt over kvantifiserer og kvalifiserer for hvert peptid er vist i Tabell 18. Analysen av en prøve tok 4,50 min. Dataprogrammet QQQ Quantitative Analysis ble brukt til integrering og analysering av prøvene.

Tabell 17: ESI-betingelser i MS.

| Parameter               | Verdi          |
|-------------------------|----------------|
| Ioniseringsmodus        | Positiv modus  |
| Kapillærspenning        | 3,50 kV        |
| Nebuliseringsgass       | N <sub>2</sub> |
| Forstøvergass           | N <sub>2</sub> |
| Forstøvergasstemperatur | 200 °C         |
| Forstøvergasshastighet  | 12 L/min       |
| Tørkegass               | N <sub>2</sub> |
| Tørkegasstemperatur     | 120 °C         |
| Tørkegasshastighet      | 11 L/min       |

Tabell 18: modellpeptidenes overganger i MRM-scan.

| Peptid          | Forløperion (m/z) | Produksjon (m/z) | Kollisjonsenergi (V) |
|-----------------|-------------------|------------------|----------------------|
| Angiotensin I   | 325               | 382              | 5                    |
|                 | 325               | 110              | 29                   |
| Angiotensin II  | 349,6             | 136,1            | 9                    |
|                 | 349,5             | 255,1            | 21                   |
| Angiotensin III | 311               | 256              | 5                    |
|                 | 311               | 136              | 9                    |
| Angiotensin IV  | 388               | 676,3            | 9                    |
|                 | 388               | 263              | 9                    |
| Bradykinin      | 354               | 419              | 9                    |
|                 | 354               | 348,3            | 5                    |
| Endomorfin-1    | 611               | 447,3            | 21                   |
|                 | 611               | 159              | 37                   |
| Ile-Pro-Ile     | 342               | 229,2            | 13                   |
|                 | 342               | 211,2            | 9                    |
| Leu-enkefalin   | 556               | 278,2            | 25                   |
|                 | 556               | 120              | 37                   |
| Met-enkefalin   | 574               | 397              | 17                   |
|                 | 574               | 120              | 40                   |

|             |       |       |    |
|-------------|-------|-------|----|
| Neurotensin | 558,5 | 643,5 | 21 |
|             | 558,5 | 136   | 29 |
| Val-Pro-Leu | 328   | 229,2 | 13 |
|             | 328   | 197,2 | 9  |

### 3.7 Beregninger

#### Mengde DEHP tilsatt SLM

Mengden DEHP som tilsettes SLM avhenger av ønsket volum av SLM, og estimeres ved følgende formel:

$$\text{Mengde DEHP (mg)} = \frac{\text{ønsket mengde av SLM (mg)} \cdot \text{ønsket prosent DEHP}}{100\%} \quad (\text{Likning 10})$$

#### Utbytte

Utbytte estimeres ved følgende formel:

$$\text{Utbytte} = \frac{\text{Areal til peptidet}}{\text{Gjennomsnittlig areal av standardene}} * 100\% \quad (\text{Likning 11})$$

#### Normalisert utbytte

Utbyttene for hvert peptid normaliseres med hensyn på maksimalt utbytte for peptidet i måleserien ved følgende formel:

$$\text{Normalisert utbytte} = \frac{\text{Utbytte ved x-\% DEHP}}{\text{Maksimalt utbytte for peptidet}} * 100\% \quad (\text{Likning 13})$$

## 4 Resultater og diskusjon

### 4.1 Krav stilt til væskemembranen

Det er viktig at væskemembranen er stabil under ekstraksjon, i tillegg til å gi gode ekstraksjonsutbytter, slik at systemet holdes intakt og er robust. Med bakgrunn i dette ble følgende kriterier definert for væskemembraner med akseptabel stabilitet og ekstraksjonseffektivitet:

1. Komponentene i SLM skal ha en vannløselighet  $< 0,5$  mg/mL
2. Strømmen skal være stabil som funksjon av tiden
3. Maksimal strøm i systemet skal være  $< 50$   $\mu$ A per vial
4. For peptidene med utbytte  $> 40\%$  skal RSD være  $< 15\%$
5. Systemet må være stabilt ved 1:1 fortykning av plasma med en bufferløsning

Det første kravet er at komponentene i SLM skal ha en vannløselighet  $< 0,5$  mg/mL for å redusere risikoen for degradering av SLM; enten ved lekkasje av SLM-komponentene ut i donor og akseptor, eller ved diffusjon av vann inn i SLM [8, 33]. Kriteriet er satt på bakgrunn av vannløseligheten til oktanol på 0,539 mg/mL [38], da oktanol er observert å være på grensen med hensyn på stabilitet [4]. Krav nr. 1 sikrer at motstanden i SLM ikke endres med ekstraksjonstiden. Ved redusert motstand i systemet, som følge av gradvis tap av væskemembran til vandige løsninger, vil strømmen øke som funksjon av tiden. Det gir opphav til krav nr. 2: strømmen skal være stabil som funksjon av tiden. Strømmen i systemet defineres som stabil når den ikke øker som funksjon av tiden. Krav nr. 3: den maksimale strømmen per prøve skal være  $< 50$   $\mu$ A, da dette reduserer risikoen for økt elektrolyse og øker påliteligheten av ekstraksjonen betraktelig. Påliteligheten av resultatene sikres også gjennom krav nr. 4: RSD  $< 15\%$  for peptider med utbytter  $> 40\%$ . RSD knytter standardavviket til gjennomsnittet av dataene, og sier noe om hvor presist gjennomsnittet er. Bakgrunnen til krav nr. 5 er for å forhindre for stor fortykning av prøven, da dette fortykker analytten og potensielt reduserer ekstraksjonsutbyttet. Likevel er en viss grad av fortykning av plasma nødvendig for pH-justering av donorfasen. Tidligere studier har også vist at ekstraksjon fra ubehandlet plasma kan gi økt elektrolyse, ved at emulgerende stoffer i plasma fører til lekkasje av den organiske ekstraksjonsfasen ut i donor [21, 48].

## 4.2 Evaluering av væskemembraner fra litteraturen

Tidligere i litteraturen er det beskrevet en rekke sammensetninger av organiske ekstraksjonsfaser til væskemembraner i EME. De fleste systemene er optimalisert for ekstraksjon fra en donorfase bestående av en vandig buffer, eller plasma fortynnet med buffer mer enn to ganger [4]. Med bakgrunn i dette er det optimalisert få væskemembraner for EME fra plasma fortynnet 1:1. Det ble valgt fire væskemembraner beskrevet tidligere i litteraturen basert på deres organiske ekstraksjonsfase, modellpeptidene brukt til ekstraksjon, donorfase brukt til ekstraksjon av modellpeptidene og beskrevet systemytelse. Væskemembranene deles for ordens skyld inn i system A-D, som vist i *Tabell 19*.

*Tabell 19: system A-D, samt noen av SLM-komponentenes fysikalsk-kjemiske egenskaper [38].*

| System          | Komponenter                              | log P           | Vannløselighet (mg/mL)   |
|-----------------|--|-----------------|--|
| <b>System A</b> | Kumarin:tymol (1:2) +<br>2 % DEHP        | Kumarin: 2,20   | Kumarin: 0,384   |
|                 |  | Tymol: 3,43     | Tymol: 0,263   |
|                 |  | DEHP: 5,78      | DEHP:<br>pH 1,7: 0,00, pH 4,6: 0,220,<br>pH 6,5: 17,8, pH 7,4: 141 |
| <b>System B</b> | 1-Oktanol + 5 % DEHP                     | 1-Oktanol: 2,58 | 1-Oktanol: 0,539   |
| <b>System C</b> | 1-Nonanol:2-deknaon<br>(1:1)             | 1-Nonanol: 3,03 | 1-Nonanol: 0,174   |
|                 |  | 2-Dekanon: 3,47 | 2-Dekanon: 0,0840  |
| <b>System D</b> | 1-Nonanol:2-dekanon<br>(1:1) + 15 % DEHP | 1-Nonanol: 3,03 | 1-Nonanol: 0,174   |
|                 |  | 2-Dekanon: 3,47 | 2-Dekanon: 0,0840  |
|                 |  | DEHP: 5,78      | DEHP: pH 1,7: 0,00, pH<br>4,6: 0,220, pH 6,5: 17,8, pH<br>7,4: 141 |

System A besto av kumarin, tymol og 2 % DEHP og er den første dypeutektiske væsken (DES) brukt til ekstraksjon av peptider [42]. DES som SLM ga bedre ekstraksjonsutbytter for de gitte modellpeptidene, sammenlignet med tidligere væskemembraner. Artikkelen belyste også viktigheten av ioniske-, hydrogenbindings- og aromatiske interaksjoner for ekstraksjon av peptider [42]. Det er liten erfaring med DES som SLM ved ekstraksjon fra biologiske matrikser;

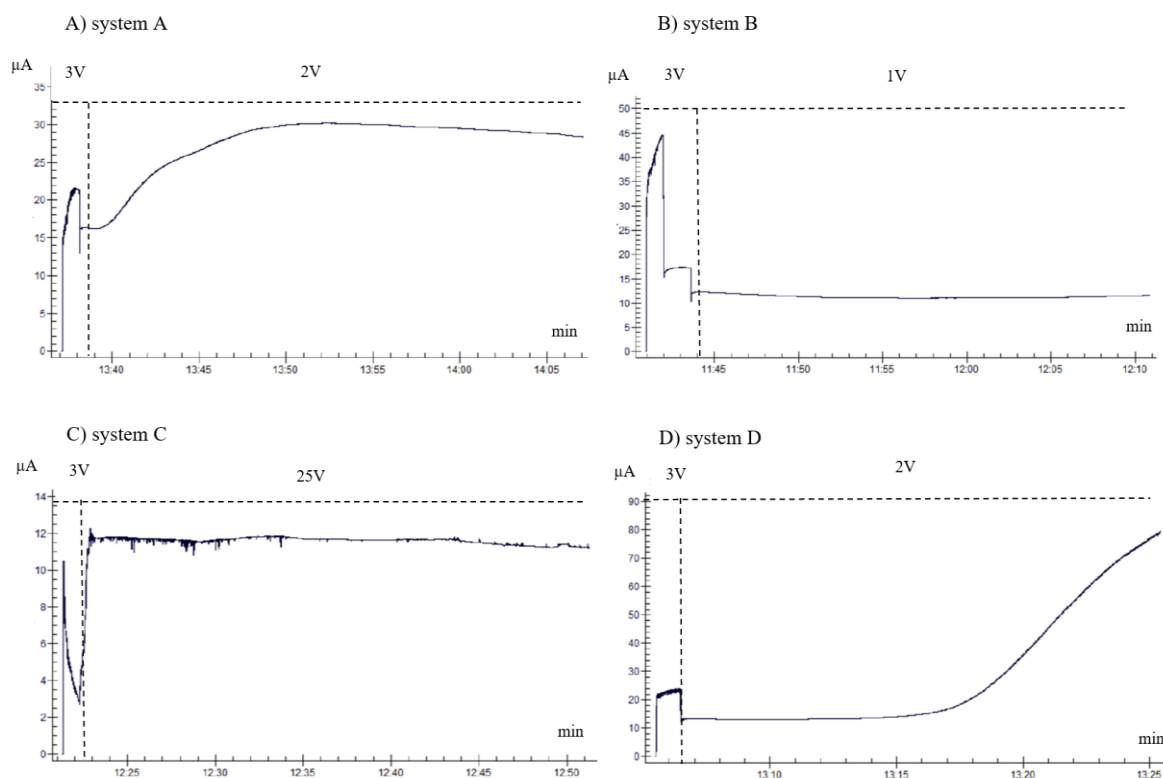
og da det i denne oppgaven ble brukte de samme modellpeptidene, var det interessant å teste DES som SLM fra to ganger fortynnet plasma.

System B besto av den alifatiske alkoholen 1-oktanol og 5 % DEHP, og er tidligere blitt brukt i ekstraksjon av blant annet agonister av gonadotropinfrisettende hormon [49]. Alifatiske alkoholer, særlig 1-oktanol, i kombinasjon med ulik mengde DEHP har tidligere vist seg å være effektive i ekstraksjon av peptider [2]. Det er kjent at både plasmabasert donorfase og økt mengde DEHP i væskemembranen, øker strømmen i systemet. Da system B inneholdt både en alifatisk alkohol og en relativt lav prosentandel DEHP, var det ønskelig å ekstrahere med system B fra to ganger fortynnet plasma.

System C besto av 1-nonanol og 2-dekanon (1:1), og kombinasjonen er blant annet blitt benyttet til ekstraksjon av neuropeptider fra cerebrospinalvæske [50]. Kombinasjonen av de organiske løsemidlene, og mangelen på ionebærere, gjorde system C til det systemet med minst elektrisk ledningsevne. I likhet med alifatiske alkoholer, har ketoner vist seg å være gode til ekstraksjon av peptider [3]. Ketoner vil i tillegg sørge for mer stabil strøm i systemet [51], som var å foretrekke når det skulle ekstraheres fra to ganger fortynnet plasma.

System D besto av 1-nonanol, 2-dekanon og 15 % DEHP og var den første væskemembranen benyttet til ekstraksjon av peptider med flat membran [39]. Ekstraksjonen ble gjort fra en bufferbasert donor, og ga høye ekstraksjonsutbytter av modellpeptidene brukt i ekstraksjonen. Da modellpeptidene benyttet er blant modellpeptidene benyttet i denne oppgaven, var det interessant å studere ekstraksjonsutbyttene med system D ved ekstraksjon fra en plasmabasert donor. System D er likt system C, foruten andelen DEHP. Vurdering av ekstraksjonsutbytte for system C og D vil belyse påvirkningen av DEHP i systemet, både med hensyn på stabilitet og systemytelse.

Modellpeptidene ble ekstrahert fra plasma fortynnet 1:1 med 50 mM\* fosfatbuffer (pH 3,0), over den aktuelle væskemembranen til 50 mM fosforsyre (pH 1,8). Betingelsene ble valgt på bakgrunn av tidligere publiserte artikler. Alle ekstraksjonene fikk initialt påført en spenning på 3 V. Etter 1 min av ekstraksjonstiden ble spenningen justert slik at strømmen i systemene lå i området 10-20  $\mu$ A. Det resulterte i ulik spenning påført systemene. Ekstraksjonstiden var 30 min. Dersom strømmen i systemene økte som funksjon av tiden, ble ekstraksjonen stoppet før. Strømmen ble logget som funksjon av tiden, og genererte strømkurver for system A-D er vist i *Figur 12*.



Figur 12: logget strøm ( $\mu\text{A}$ ) som funksjon av tiden (min) for system A-D ( $n = 3$ ). System A: kumarin:tymol (1:2) + 2 % DEHP (A), system B: 1-oktanol + 5 % DEHP (B), system C: 1-nonanol:2-dekanon (1:1) (C), system D: 1-nonanol:2-dekanon (1:1) + 15 % DEHP (D).

Gjør oppmerksom på at y-aksene er ulikt skalert.

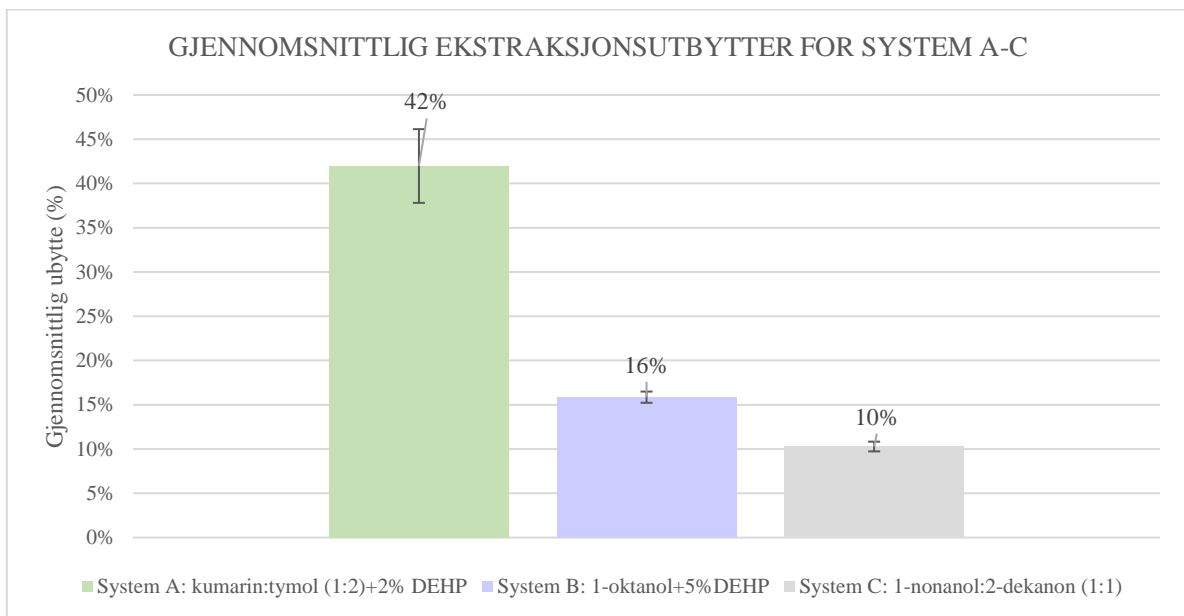
System A holdt seg stabilt ved 30 minutters ekstraksjon, da strømmen ikke økte som funksjon av tiden og var  $< 50 \mu\text{A}$  per prøve (se Figur 12). Den første reduksjonen i strøm skyldes reduksjon i påført spenningen fra 3 V til 2 V, med hensikt om strøm i systemet på 10-20  $\mu\text{A}$ . Likevel økte strømmen utover den satte maks grensen på 20  $\mu\text{A}$  i løpet av kort tid. Strømmen lå på omtrent 26  $\mu\text{A}$  under ekstraksjonen. System A oppfylte likevel kravet om stabil strøm stilt til en optimal væskemembran, og ble testet i etterfølgende forsøk med hensyn på systemytelse.

System B og C oppfylte også kravet om stabil strøm stilt til en optimal væskemembran (se Figur 12). Både første og andre reduksjon i strøm for system B skyldes reduksjon av spenning fra 3 V til 1 V. For system B holdt strømmen seg stabil på omtrent 10  $\mu\text{A}$  under hele ekstraksjonstiden på 30 min. For system C ble strømmen økt til 25 V etter 1 min, da strømmen i systemet sankt til omtrent 3  $\mu\text{A}$  etter svært kort tid. Strømmen i system C fluktuerte noe, men økte ikke som funksjon av tiden. Med bakgrunn i dette ble både system B og C testet i etterfølgende forsøk med hensyn på systemytelse.



System D var det eneste systemet som ikke oppfylte kravet om stabil strøm (se *Figur 12*). Første reduksjon i strøm skyldes reduksjon i spenning fra 3 V til 2 V. Strømmen i systemet holdt seg stabil på omtrent 10  $\mu\text{A}$  de første 12 minuttene, før den begynte å øke som funksjon av tiden. Ekstraksjonen ble stoppet etter 20 min, og ble ikke testet videre.

System A, B og C tilfredsstilte kravet om stabil strøm som funksjon av tiden, samt en strøm < 50  $\mu\text{A}$  per vial. Systemytelse ble vurdert basert på ekstraksjonsutbyttet. Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte av modellpeptidene med de ulike væskemembranene ble estimert og er presentert i *Figur 13*.



*Figur 13: gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytter av modellpeptidene oppnådd med system A-C. Feilfelt indikerer gjennomsnittlig standardavvik av modellpeptidene, hvor  $n = 3$  per peptid.*

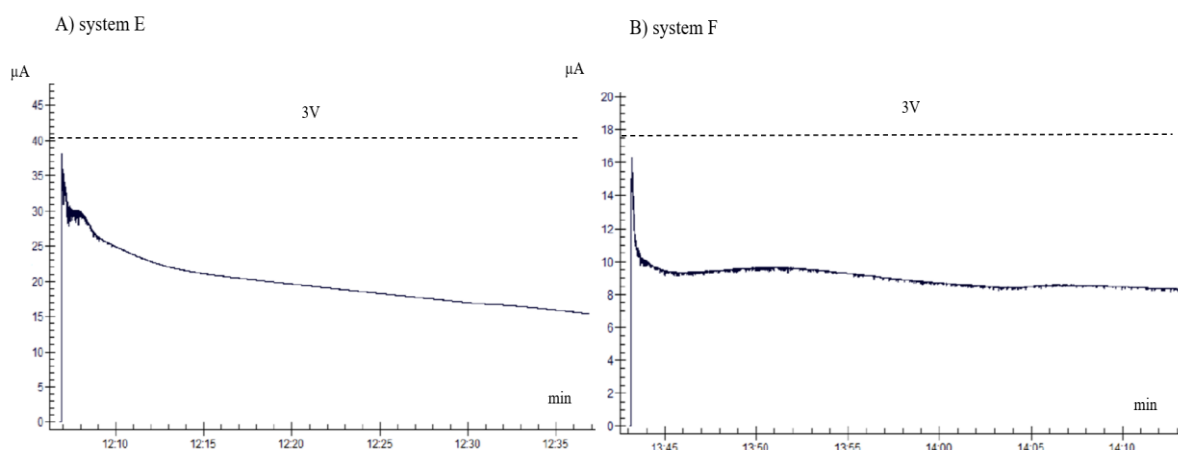
System A var overlegent med hensyn på systemytelse sammenlignet med system B og C, se *Figur 13*. Det kan forklares av systemets kjemiske egenskaper. Både tymol og kumarin er aromatiske forbindelser med HBA-egenskaper, tymol har også HBD-egenskaper. Det betyr at system A kan ekstrahere peptidene basert på en kombinasjon av ioniske-, hydrogenbindings- og kation- $\pi$  interaksjoner. Til tross for at system B inneholdt en større mengde DEHP, var systemet mindre egnet for modellpeptidene. Det skyldes trolig at systemet mangler aromatisk karakter, og at HBA-egenskapene i systemet er svakere sammenlignet med system A. System C var lite effektivt, fordi det ikke inkluderer ioniske interaksjoner. Basert på disse resultatene var det ønskelig å gå videre med system A. En utfordring med systemet var at strømmen i systemet var relativt høy i forhold til påført spenningen. Dette indikerer lite motstand i systemet, som skaper en usikkerhet med hensyn på stabilitet.

### 4.3 Evaluering av nye væskemembraner

For å bedre stabiliteten i systemet ble kumarin erstattet av 6-metylkumarin, mengden DEHP redusert til 0,5 %, og forholdet mellom 6-metylkumarin og tymol satt til 1:1. Dette ga opphav til system E. 6-Metylkumarin har en vannløselighet på 0,123 mg/mL [38], sammenlignet med kumarin som har en vannløselighet på 0,384 mg/mL [38]. Ved å bytte til en mindre vannløselig komponent vil risikoen for lekkasje av SLM-komponenten ut i donor og/eller akseptor reduseres, som i større grad sikrer at motstanden i systemet opprettholdes. Mengden DEHP ble redusert til 0,5 % for å redusere strømmen som går i systemet, og dermed risikoen for økt elektrolyse. Andelen tymol ble også redusert for å sikre stabiliteten i systemet.

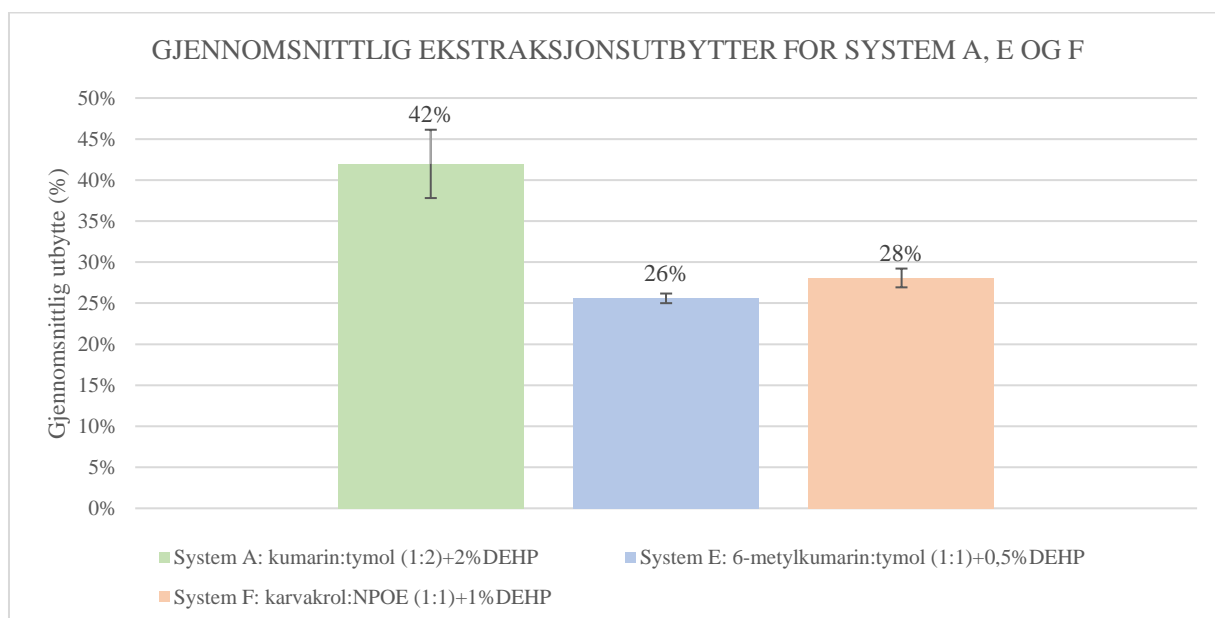
I likhet med system A, var væskemembranen i system E en DES. Det var ønskelig å utvikle et ikke-eutektisk system basert på klassiske løsemidler, som kunne konkurrere med system E på stabilitet og systemytelse. Det som følge av at stabiliteten av DES over tid er ukjent. System A indikerte at tymol var nyttig for ekstraksjon av peptidene. Karvakrol er en isomer av tymol, som har følgelig tilnærmet like fysikalsk-kjemiske egenskaper, men som i motsetning til tymol er flytende ved romtemperatur. Det gjør at karvakrol kan benyttes i alle blandingsforhold. Karvakrol erstattet tymol og ble kombinert med NPOE i forholdet 1:1, da ekstraksjon med karvakrol alene ga opphav til ustabil strøm. NPOE er en mye brukt organisk komponent i SLM for EME av upolare, basiske forbindelser, og er derfor en forbindelse man har utviklet mye erfaring med. NPOE har i seg selv vist seg å ikke være egnet til EME av peptider, men vil i kombinasjon med et mer polart stoff, som karvakrol, bidra til stabilitet i systemet [51]. Basert på informasjonen fra system A-D var det essensielt å inkludere en ionebærer i ekstraksjon av peptidene, og 1% DEHP ble inkludert. Dette ga opphav til den ikke-eutektiske ekstraksjonsfasen karvakrol:NPOE (1:1) + 1 % DEHP, videre kalt system F.

System E og F ble testet under de samme ekstraksjonsbetingelsene som system A-D, og strømmen ble logget som funksjon av tiden (se *Figur 14*).



Figur 14: logget strøm ( $\mu\text{A}$ ) som funksjon av tiden (min) for system E og F ( $n = 3$ ). System E: 6-metylkumarin:tymol(1:1) + 0,5 % DEHP (A), system E: karvakrol:NPOE (1:1) + 1 % DEHP (B). Gjør oppmerksom på at y-aksene er ulikt skalert..

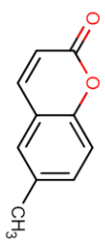
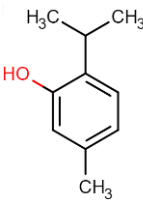
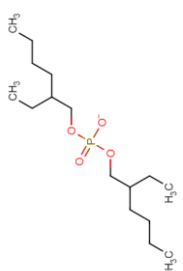
Strømmen i systemene økte kraftig i starten av ekstraksjonene, før den sank etter kort tid. I system E ble strømmen redusert som funksjon av tid, mens strømmen i system F holdt seg stabil. Strømnivået i system E var høyere enn i system F, trolig som følge av forskjellene i væskemembranenes polaritet. Begge systemene oppfylte kravet om strøm satt til en optimal væskemembran. Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte for system E og F ble beregnet, og er sammenlignet med gjennomsnittlig ekstraksjonsutbyttet av system A i Figur 15.

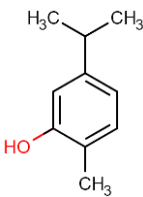
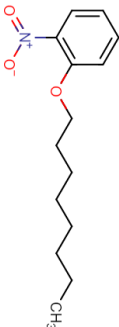
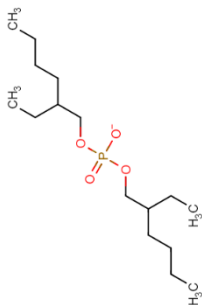


Figur 15: gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytter for modellpeptidene oppnådd med system A, E og F. Feilfelt indikerer gjennomsnittlig standardavvik av modellpeptidene, hvor  $n = 3$  per peptid.

System A ga fremdeles det høyeste gjennomsnittlige ekstraksjonsutbyttet av modellpeptidene fra plasma fortynnet 1:1. Til tross for bedre systemytelse i system A, var system E og F bedre med hensyn på stabilitet. Det gikk mindre strøm i systemene ved høyere spenninger, som tyder på større kapasitet i systemene. Med bakgrunn i dette foregikk videre optimalisering med system E og F. Noen av SLM-komponentenes fysikalsk-kjemiske egenskaper er vist i *Tabell 20*.

*Tabell 20: system E og F, samt noen av SLM-komponentenes fysikalsk-kjemiske egenskaper [38].*

| Systemer | Komponenter                 | Struktur  | Egenskaper                       |  |
|----------|-----------------------------|---|----------------------------------|--|
| E        | 6-Metylkumarin:             | <b>6-Metylkumarin</b><br> | <b>log P</b>                     | 2,71   |
|          | tymol<br>(1:1) + 0,5 % DEHP |   | <b>Vannløselighet</b><br>(mg/mL) | 0,123  |
|          |                             |   | <b>Interaksjoner</b>             | HBA, $\pi$ - $\pi$ ,<br>kation- $\pi$                        |
|          |                             | <b>pKa</b>  | ingen                            |  |
|          | <b>Tymol</b>                |                          | <b>log P</b>                     | 3,43   |
|          |                             |   | <b>Vannløselighet</b><br>(mg/mL) | 0,263  |
|          |                             |   | <b>Interaksjoner</b>             | HBD/HBA,<br>$\pi$ - $\pi$ , kation- $\pi$                    |
|          |                             |   | <b>pKa</b>                       | 10,6   |
|          | <b>DEHP</b>                 |                          | <b>log P</b>                     | 5,78   |
|          |                             |   | <b>Vannløselighet</b><br>(mg/mL) | pH 1,7: 0,00<br>pH 4,6: 0,220<br>pH 6,5: 17,8<br>pH 7,4: 141 |
|          |                             |   | <b>Interaksjoner</b>             | Ioniske, HBA,<br>van der<br>Waalske                          |
|          |                             |   | <b>pKa</b>                       | 1,94   |

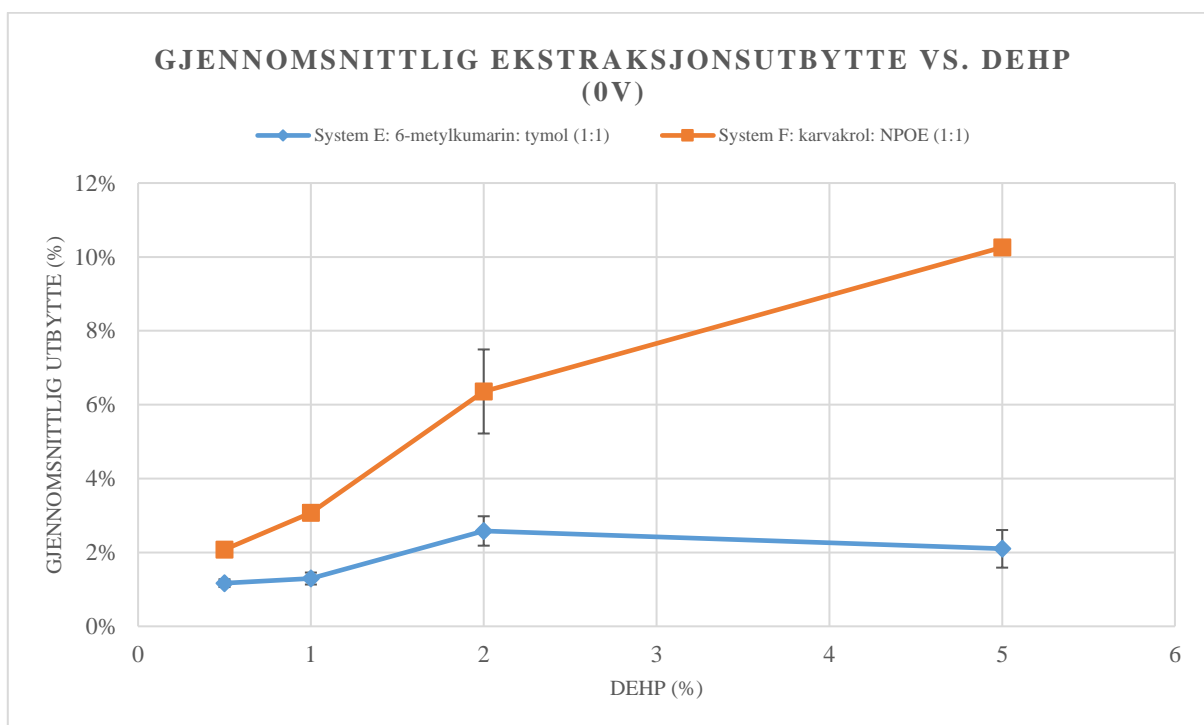
|          |                                    |                  |   |  |   |
|----------|------------------------------------|------------------|---|--|---|
| <b>F</b> | Karvakrol:NPOE<br>(1:1) + 1 % DEHP | <b>Karvakrol</b> |    | <b>log P</b>   | 3,43                                      |
|          |                                    |                  |   | <b>Vannløselighet (mg/mL)</b>                                | 0,263                                     |
|          |                                    |                  |   | <b>Interaksjoner</b>   | HBD/HBA,<br>$\pi$ - $\pi$ , kation- $\pi$ |
|          |                                    |                  |   | <b>pKa</b>   | 10,4                                      |
|          |                                    | <b>NPOE</b>      |    | <b>log P</b>   | 4,86                                      |
|          |                                    |                  | <b>Vannløselighet (mg/mL)</b>   | 0,001  |   |
|          |                                    |                  | <b>Interaksjoner</b>  | HBA, $\pi$ - $\pi$ ,<br>kation- $\pi$ , van<br>der Waalske   |   |
|          |                                    |                  | <b>pKa</b>  | Ingen, ladning<br>som følge av<br>resonans av<br>elektroner  |   |
|          |                                    | <b>DEHP</b>      |  | <b>log P</b>   | 5,78                                      |
|          |                                    |                  | <b>Vannløselighet (mg/mL)</b>   | pH 1,7: 0,00<br>pH 4,6: 0,220<br>pH 6,5: 17,8<br>pH 7,4: 141 |   |
|          |                                    |                  | <b>Interaksjoner</b>  | Ioniske, HBA,<br>van der<br>Waalske                          |   |
|          |                                    |                  | <b>pKa</b>  | 1,94   |   |

## 4.4 Optimalisering av system E og F

### 4.4.1 Bevis av konsept med innledende forsøk

Innledningsvis ble det utført ekstraksjoner uten spenning og uten DEHP i SLM. Hensikten med disse ekstraksjonene var å bekrefte at det er helt nødvendig å påføre spenning til systemene, samt betydningen av ioniske interaksjoner for ekstraksjon av peptidene.

Peptidene ble ekstrahert med system E og F fra en donorfase av plasma:buffer (1:1) pH 3,0 over i en akseptorfase med pH 1,8, ved ulik prosentandel DEHP i SLM og 0 V. Mengden DEHP i SLM varierte fra 0,5-5 %. *Figur 16* viser hvordan gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte økte med økende prosentandel DEHP i SLM for system E og F.



*Figur 16: gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte som funksjon av DEHP (%) for system E og F i fravær av et elektrisk felt. Feilfelt indikerer gjennomsnittlig standardavvik av modellpeptidene, hvor  $n = 3$  per peptid.*

System F ekstraherte peptidene i større grad enn system E i fravær av et elektrisk felt, som betyr at bidraget fra passiv diffusjon var større i system F (se *Figur 16*). Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbyttet av peptidene med system E var så lavt at bidraget fra passiv diffusjon kan ses på som neglisjerbart (maksimalt gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte på 3 %, ved 2 % DEHP i SLM). Væskemembranen i system E består av mer hydrofile komponenter enn den i system F, se *Tabell 20*. Ettersom at peptidene er polare forbindelser var det forventet at bidraget fra

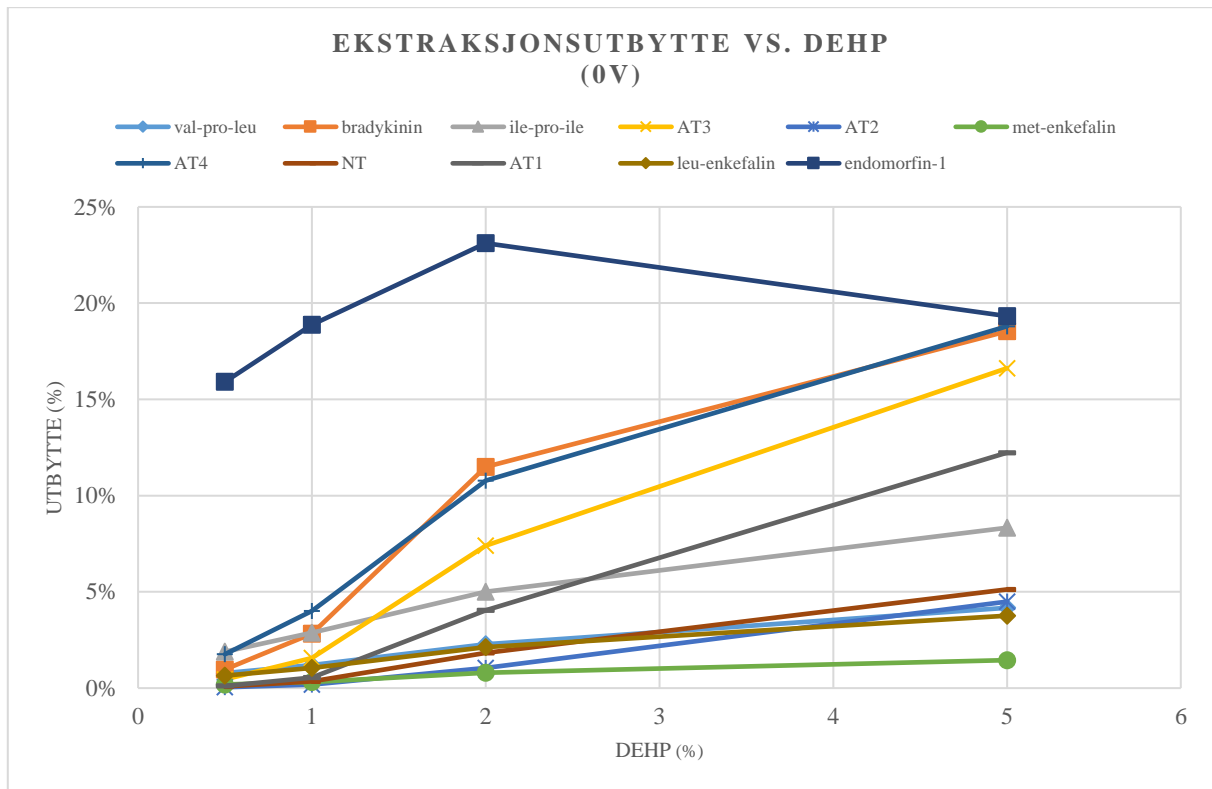
passiv diffusjon skulle være større i system E enn F, da peptidene trolig har større fordeling til system E. En mulig forklaring på dette er viskositetsforskjeller mellom væskemembranene, som påvirker peptidenes diffusjon. Viskositetsmålinger av løsemiddelblandinger ble utført, se **3.5.3 Viskositetsmålinger**, og en oversikt over resultatene er presentert i *Tabell 21*.

*Tabell 21: resultatene fra viskositetsmålingene av væskemembranene for system E og F. Det var nødvendig å redusere hastigheten (rpm) for viskositetsmålingene av SLM i system E, for å kunne måle den høye viskositeten i løsningen. Dette gikk ut over nøyaktigheten av målingen.*

|                                   | <b>Viskositet<br/>(mPa*s)</b> | <b>Nøyaktighet<br/>(± mPa*s)</b> | <b>Hastighet<br/>(rpm)</b> |
|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| <b>System E</b>                   |                               |                                  |                            |
| <b>Replikat 1</b>                 | 36,30                         | 0,61                             | 5,0                        |
| <b>Replikat 2</b>                 | 35,93                         | 0,61                             | 5,0                        |
| <b>Replikat 3</b>                 | 35,99                         | 0,61                             | 5,0                        |
| <b>Gjennomsnittlig viskositet</b> | 36,1 mPa*s                    |                                  |                            |
| <b>Standardavvik</b>              | 0,2 mPa*s                     |                                  |                            |
| <b>RSD</b>                        | 1%                            |                                  |                            |
| <b>System F</b>                   |                               |                                  |                            |
| <b>Replikat 1</b>                 | 14,29                         | 0,20                             | 15                         |
| <b>Replikat 2</b>                 | 14,49                         | 0,20                             | 15                         |
| <b>Replikat 3</b>                 | 14,41                         | 0,20                             | 15                         |
| <b>Gjennomsnittlig viskositet</b> | 14,4 mPa*s                    |                                  |                            |
| <b>Standardavvik</b>              | 0,1 mPa*s                     |                                  |                            |
| <b>RSD</b>                        | 1%                            |                                  |                            |

Viskositeten i system E er over det dobbelte av viskositeten i system F, se *Tabell 21*. Til tross for at peptidene trolig har bedre fordeling til væskemembranen i system E, basert på væskemembranens kjemiske struktur, vil den høye viskositeten vanskeliggjøre diffusjonen gjennom membranen og gi redusert ekstraksjonsutbytte.

System F viser derimot et større bidrag av passiv diffusjon, med et maksimalt gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte på 10 % (RSD = 5 %) ved 5 % DEHP i SLM, se *Figur 16*. *Figur 17* viser ekstraksjonsutbytte av de ulike peptidene ved ekstraksjon med system F i fravær av et elektrisk felt.



*Figur 17: ekstraksjonsutbytte av peptidene som funksjon av DEHP (%) i system F i fravær av et elektrisk felt.*

Endomorfin-1 var peptidet som oppnådde høyest ekstraksjonsutbytte i fravær av et elektrisk felt, og skilte seg betydelig fra de andre peptidene (se *Figur 17*). Det høye ekstraksjonsutbyttet kan i stor grad forklares av peptidets lave molekylstørrelse (610,7 g/mol) og høye log D (pH 3)-verdi (-0,98), se *Tabell 2*. Endomorfin-1 er peptidet med høyest verdi for log D (pH 3), og er dermed det mest hydrofobe peptidet. Dette resulterer i god diffusjon gjennom den upolare væskemembranen, og bekrefter observasjoner gjort for endomorfin-1 i tidligere studier [3]. Peptidet har ingen sure eller basiske residuer utover aminosyrene på N- og C-terminal. Den positive ladningen på N-terminal muliggjør ioniske interaksjoner med DEHP, som resulterer i økt ekstraksjonsutbytte av peptidet med økende prosentandel DEHP (se *Figur 17*).

*Figur 17* viser relativt høyt ekstraksjonsutbytte av ile-pro-ile. Peptidet har i likhet med endomorfin-1 ingen sure eller basiske residuer utover aminosyrene på N- og C-terminal, lav



molekylvekt (341,5 g/mol) og er peptidet med nest høyeste log D (pH3)-verdi (-1,45) (se *Tabell 2*). Dette ga et relativt høyt ekstraksjonsutbytte av ile-pro-ile.

Val-pro-leu, met-enkefalin og leu-enkefalin har i likhet med endomorf-1 og ile-pro-ile lav molekylvekt, høy verdi for log D (pH 3) og ingen sure eller basiske residuer utover aminosyrene på N- og C-terminal (se *Tabell 2*). Likevel var det disse peptidene som fikk lavest ekstraksjonsutbytte ved ekstraksjon i fravær av et elektrisk felt. Til tross for høy log D (pH 3)-verdi, har peptidene noe lavere verdi enn endomorf-1 og ile-pro-ile. Peptidene er dermed mer hydrofile, som resulterer i redusert diffusjon gjennom SLM. Dette indikerer at peptider med lav molekylvekt, høy log D (pH 3)-verdi og ingen ioniserbare residuer ekstraheres godt i fravær av et elektrisk felt med system F, gitt at de ikke blir for hydrofile.

Etter endomorf-1 var det peptidene med overskudd av basiske residuer som ble ekstrahert best i fravær av et elektrisk felt (bradykinin, AT I, AT II, AT III, AT IV, NT) (se *Tabell 2* og *Figur 17*). Blant disse peptidene var det peptidene uten noen sure residuer som fikk høyest ekstraksjonsutbytte. Det inkluderer bradykinin, AT IV og AT III, som alle har 1-2 basiske residuer og ingen sure. AT I, AT II og NT har alle sammen et surt residu, som trolig bremset ekstraksjonen gjennom SLM. Ekstraksjonsutbytte av alle disse peptidene økte med økende prosentandel DEHP i SLM. Desto større prosentandel DEHP i SLM, desto større blir bidraget fra ioniske interaksjoner. Dette er en fordel for de større peptidene med en lavere log D (pH 3)-verdi, da de ved ioniske interaksjoner med DEHP blir mer upolare og lettere diffunderer gjennom SLM.

Peptidene ble også forsøkt ekstrahert uten DEHP i SLM ved 2V. De større peptidene med overskudd av basiske residuer ble ikke ekstrahert ved 0 % DEHP i SLM, og er dermed fullstendig avhengig av DEHP i SLM for ekstraksjon gjennom SLM. System E og F favoriserte ekstraksjon av peptidene uten noen ioniserbare residuer, med lavest molekylvekt og med høyest log D (pH 3)-verdi (se *Tabell 22*). Ved disse betingelsene viste systemene en forskjell i selektivitet, da system E til forskjell fra system F ekstraherte met-enkefalin og leu-enkefalin. Met- og leu-enkefalin har log D (pH 3) lik -2,94 og -2,37 respektivt, og er mer hydrofile enn de resterende peptidene. System E og F består av isomerene tymol og karvakrol, og 6-metylkumarin og NPOE respektivt, se *Tabell 20*. 6-Metylkumarin er en mer hydrofil komponent sammenlignet med NPOE, som resulterer i en økt hydrofilisitet av SLM i system E. Med bakgrunn i dette er det lettere for met- og leu-enkefalin å penetrere SLM/donorgrenseflaten i system E enn i system F.

Tabell 22: ekstraksjonsutbytte av de minste, mest upolare peptidene med system E og F i fravær av DEHP i SLM.

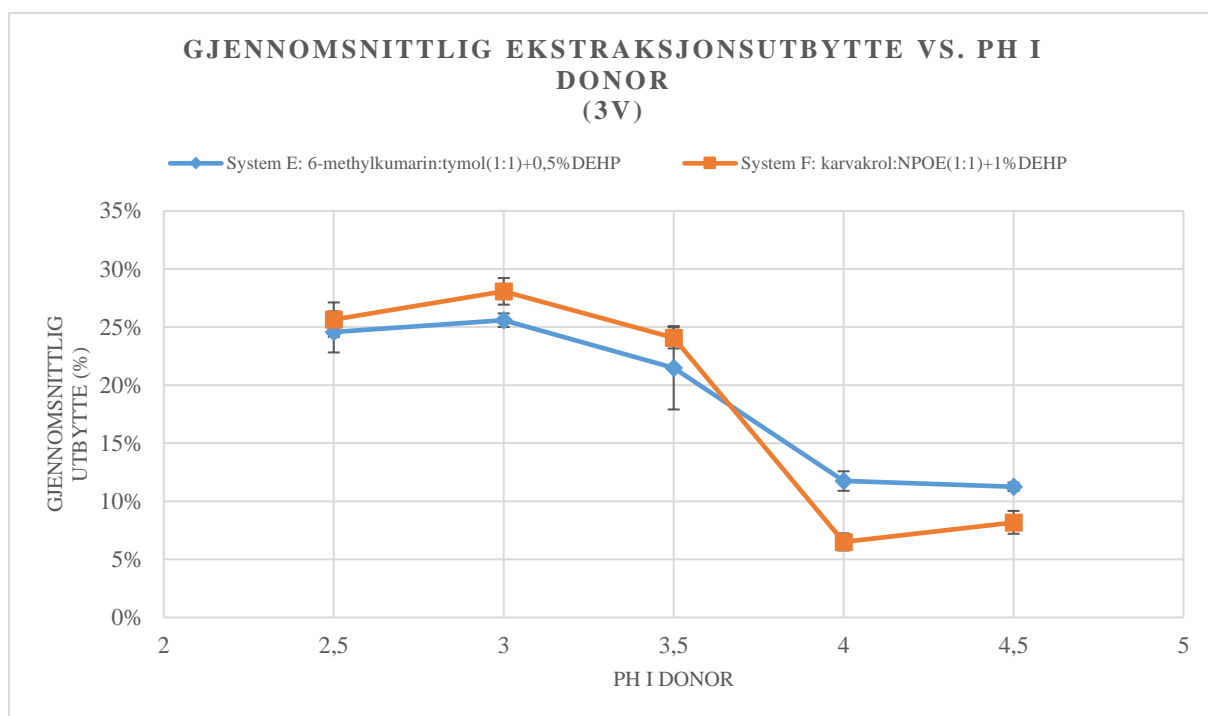
| Peptid        | Ekstraksjonsutbytter |          |
|---------------|----------------------|----------|
|               | System E             | System F |
| Val-pro-leu   | 5 %                  | 7 %      |
| Ile-pro-ile   | 10 %                 | 17 %     |
| Met-enkefalin | 7 %                  | 0 %      |
| Leu-enkefalin | 17 %                 | 3 %      |
| Endomorfin-1  | 75 %                 | 77 %     |

De innledende forsøkene indikerer at påføring av et elektrisk felt er avgjørende for høyt utbytte av de små, hydrofobe peptidene. Ladning av peptidene viste seg å være viktig for elektrokinetisk migrasjon, men mindre viktig for ioniske interaksjoner med DEHP. Mens de større, hydrofile peptidene med overskudd av basiske residuer er helt avhengig av ioniske interaksjoner for effektiv ekstraksjon gjennom SLM.

#### 4.4.2 Optimalisering av pH i donor

For at peptidene skal ekstraheres med EME, er det essensielt at pH i donor er lav nok til å ionisere peptidene. Ettersom at væskemembranene i system E og F inneholdt ionebæreren DEHP, må pH i donor også sikre at DEHP er ionisert inn mot SLM/donor-grenseflaten. DEHP har en beregnet pKa-verdi på 1,94. pH i donor bør derfor ikke være lavere enn tilnærmet 2, da dette resulterer i at DEHP protoneres og ikke kan danne ioniske interaksjoner med peptidene. De ulike pH-verdiene som ble undersøkt i donor var 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 og 4,5, se **3.5.2 Optimaliseringsforsøk**. Figur 18 viser gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte av peptidene som funksjon pH i donor.

System E og F ga høyest gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte med pH 3,0 i donor, med et gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte på 26 % (RSD = 4 %) og 28 % (RSD = 5 %) respektivt. Med økende pH i donor reduseres gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte for peptidene. System E ga lavest ekstraksjonsutbytte ved pH 4,5 på 11 % (RSD = 3 %), mens ekstraksjonsutbyttet var lavest for system F ved pH 4,0 på 7 % (RSD = 11 %).



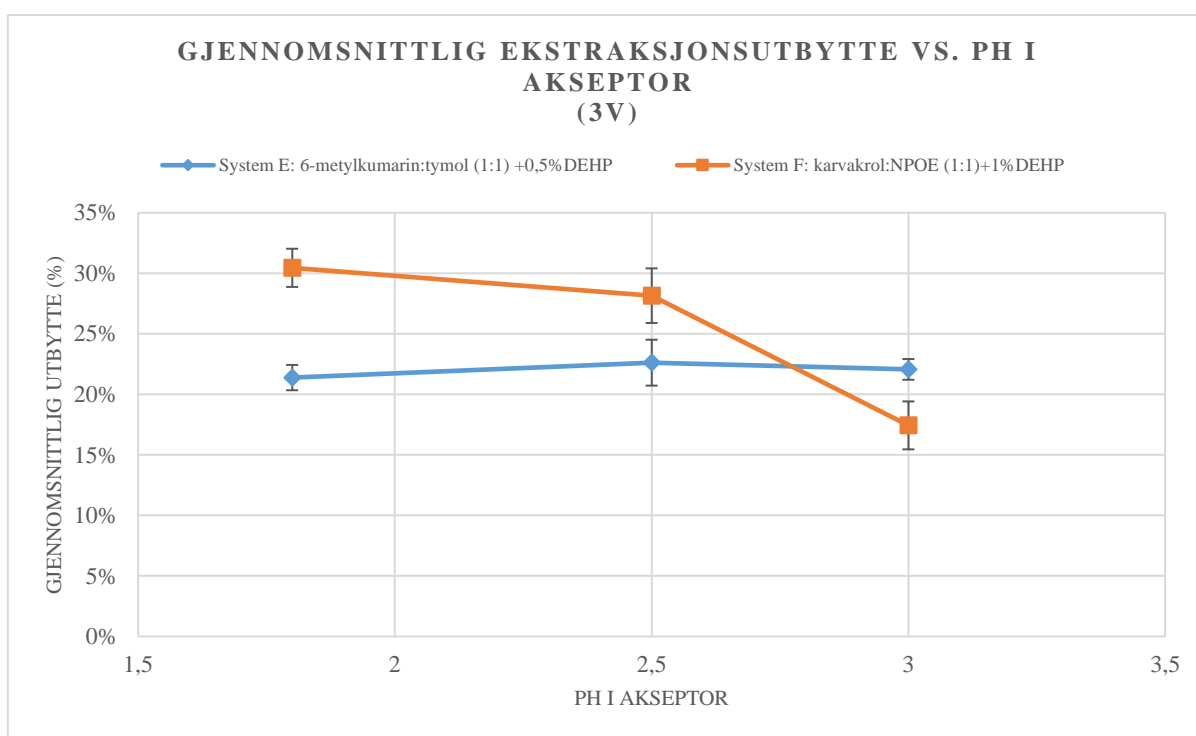
Figur 18: gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte som funksjon av pH i donor. Feilfelt indikerer gjennomsnittlig standardavvik av modellpeptidene, hvor  $n = 3$  per peptid.

Løseligheten av DEHP øker med økende pH, som følge av økt ionisering av DEHP, og det er observert lekkasje av DEHP ut i donor ved  $\text{pH} > 4$  i bufferløsning [37]. Lekkasje ut i donor kan være gunstig, da dette resulterer i bulkløsning-kompleksing, se **2.3.2 SLM**. Dette forutsetter at peptidene er ionisert ved den gitte pH-verdien i donor, og ikke hindres av matrikseffekter fra plasma. En kjent matrikseffekt er konkurranse mellom analytt og polare matrikskomponenter om binding til DEHP, som resulterer i redusert ekstraksjonsutbytte av analytt [37]. I dette arbeidet ble det liten tid til å studere matrikseffekter av plasma nærmere, med resultater fra tidligere studier tyder på at interaksjon mellom plasmaproteiner og DEHP spiller en rolle [37]. Da proteinfelling av plasma har vist seg å ha stor positiv effekt i ekstraksjon av små polare stoffer med DEHP [37].

Ekstraksjonene utført med økende pH i donor ga redusert utbytte, og skyldes trolig at man ved å øke pH i donor nærmer seg peptidenes isoelektriske punkt. Da vil netto positiv ladning reduseres, og peptidene vil gå mot det stadiet hvor de opptrer som nøytrale forbindelser. Dette vanskeliggjør elektrokinetisk migrasjon, og bidraget fra ioniske interaksjoner med DEHP reduseres betraktelig. I tillegg ble stabiliteten av systemene redusert ved de høyeste pH-verdiene. Da systemene ga best ekstraksjonsutbytte ved pH 3,0, og holdt seg stabile ved 30 minutters ekstraksjon, ble videre optimalisering utført med pH 3,0 i donor.

### 4.4.3 Optimalisering av pH i akseptor

For at den elektrokinetiske migrasjonen skal opprettholdes, må pH i akseptor være lav nok til at peptidene blir positivt ladet i kontakt med akseptorfasen. pH-verdien bør også være lav nok til å protonere DEHP, slik at DEHP foreligger på protonert form inn mot SLM/akseptor-grenseflaten og dermed frigjør peptidene ut i akseptor. Optimalisering av pH i akseptor ble gjort ved å ekstrahere med pH 1,8, 2,5 og 3,0, se **3.5.2 Optimaliseringsforsøk**. Det ble ikke testet pH-verdier lavere enn 1,8, da løsninger med pH-verdier mye lavere enn 2,0 er ugunstig for peptidene og uønskelig å injisere på LC, se **2.4.1 Væskefasekromatografi (LC)**. *Figur 19* viser gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte av peptidene som funksjon av pH i akseptor.



*Figur 19: gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte som funksjon av pH i akseptor. Feilfelt indikerer gjennomsnittlig standardavvik av modellpeptidene, hvor  $n = 3$  per peptid.*

Ekstraksjonene med system E ga ingen store forskjeller i gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte ved de ulike pH-verdiene, se *Figur 19*. Med økende pH i akseptor, økte strømmen i systemet som funksjon av tiden. I tillegg til dette var spredningen i resultatene større ved pH 2,5 enn pH 1,8. Med bakgrunn i dette ble videre optimalisering av system E utført med pH 1,8 i akseptor.

System F ga best gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte ved pH 1,8 på 30 % (RSD = 5 %), se *Figur 19*. For system F var det forskjell i ekstraksjonsutbyttene mellom de ulike pH-verdiene, og det minste ekstraksjonsutbyttet ble oppnådd ved pH 3,0 på 17 % (RSD = 11 %). Strømmen

i systemet økte som funksjon av tiden med økende pH i akseptor. For å sikre stabiliteten i systemet ble pH 1,8 i akseptor valgt for videre optimalisering.

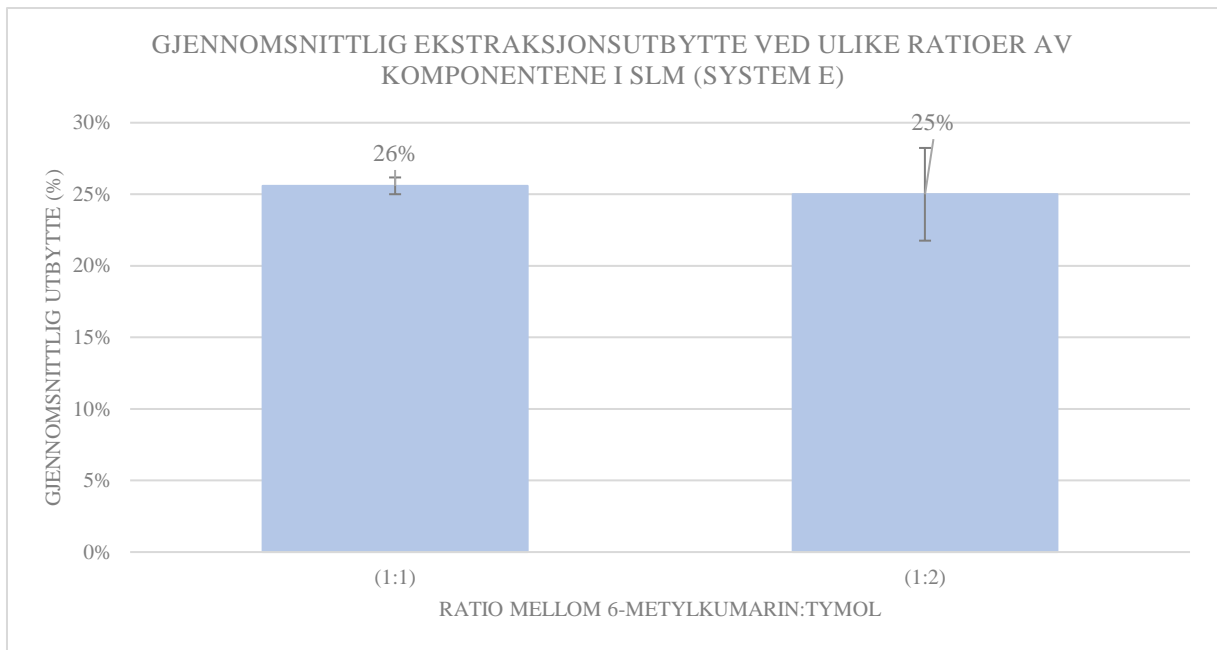
Det er ønskelig med en lav pH i akseptor for å redusere risikoen for eventuelle pH-forandringer som følge av økt elektrolyse [2, 52]. Elektrolyse kan gi en økt pH i akseptor, og dermed redusere analytt/proton bytte og gi redusert ekstraksjonsutbytte [49]. Likevel vil det trolig ta lang tid før pH endres fra 1,8, ettersom at spenningen påført systemet er så lav. Reduksjon i ekstraksjonsutbytte skyldes trolig redusert protonering av DEHP. DEHP-peptid-komplekset forblir, og mengden analytt som slippes ut i akseptor reduseres. Videre undersøkelse av pH-enderinger i akseptor ble ikke utført i dette arbeidet, men kunne vært interessant å undersøke for å vurdere graden av elektrolyse.

Hvor mange ladninger som akkumuleres ved SLM/akseptor-grenseflaten og bidrar til det elektriske dobbeltlaget, kan avhenge av SLM-komponenter. Dette kan være en mulig forklaring på systemenes ulike respons på endring av pH i akseptor. Det ble ikke tatt hensyn til det elektriske dobbeltlaget ved justering av de operasjonelle parameterne i dette arbeidet.

#### **4.4.4 Optimalisering av ratio mellom komponentene i SLM**

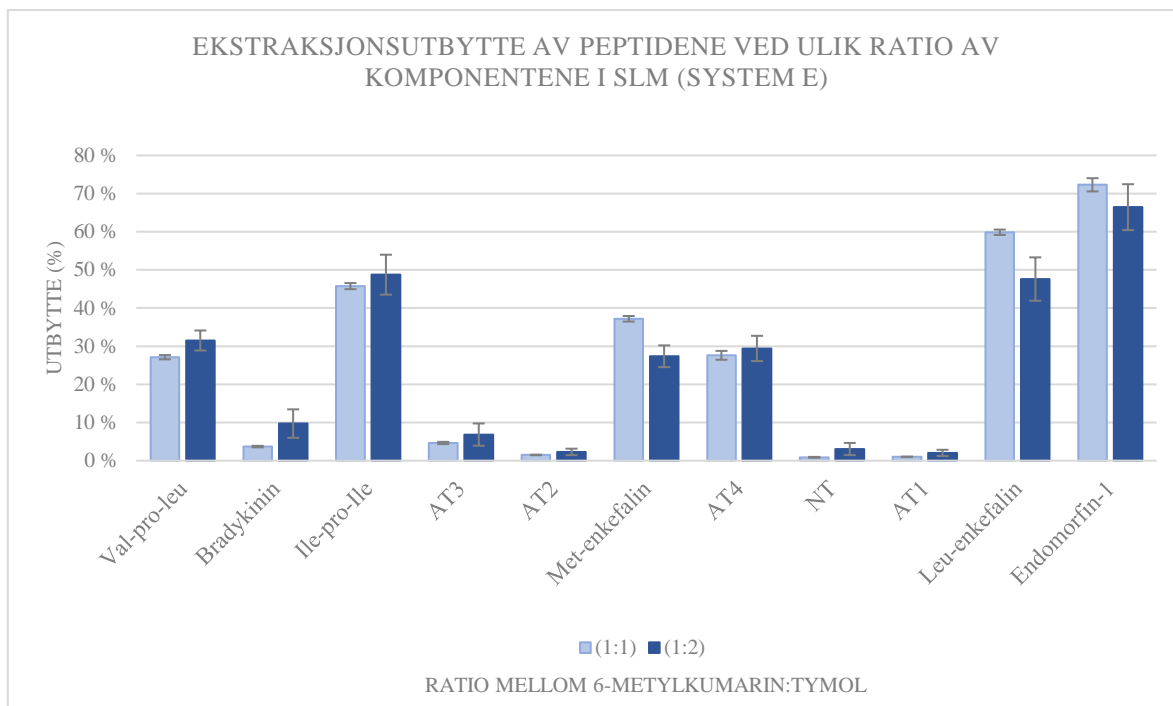
De ulike komponentene i SLM har ulike egenskaper og bidrar forskjellig til ekstraksjon av peptidene, se *Tabell 20*. Væskemembranene i de to systemene ble derfor optimalisert med hensyn på ratio mellom komponentene. De ulike ratioene som ble undersøkt var 1:1, 2:1 og 1:2, se **3.5.2 Optimaliseringsforsøk**.

Tillaging av SLM i system E krever varmeskap i ca. 30 min for å fremskynde prosessen med å lage en DES. Etter løsningen tas ut av varmeskap er det viktig at den holder seg stabil i flytende form ved romtemperatur. Dette var problematisk når 6-metylkumarin:tymol ble blandet i forholdet 2:1, hvor løsningen felte ut etter ca. 10 min i romtemperatur etter uttak fra varmeskap. Dette som et resultat at man beveger seg for langt unna det dypeutektiske punktet, se *Figur 8*. Forholdet 2:1 ga altså ikke en DES, og ble derfor ikke undersøkt for system E.

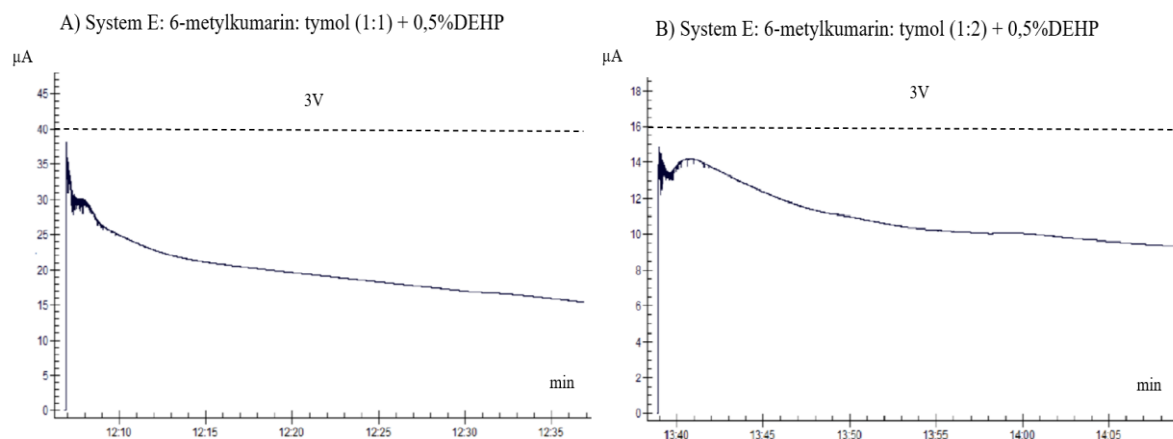


*Figur 20: gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte av peptidene ved ratio 1:1 og 1:2 av 6-metylkumarin og tymol i SLM med 0,5% DEHP (system E). Feilfelt indikerer gjennomsnittlig standardavvik av modellpeptidene, hvor  $n = 3$  per peptid.*

Gjennomsnittlige ekstraksjonsutbytte av peptidene ved 6-metylkumarin og tymol med ratioene 1:1 og 1:2 var tilnærmet likt, se *Figur 20*. Til tross for dette var spredningen i resultatene større ved ratioen 1:2. *Figur 21* viser ekstraksjonsutbytte av peptidene og standardavvik ved de ulike ratioene. Met-enkefalin, leu-enkefalin og endomorf-1 var peptidene som ble ekstrahert best ved ratioen 1:1, mens ekstraksjonsutbyttet av de resterende peptidene økte med økt mengde tymol i SLM. Tymol har HBD-egenskaper, mens peptidene basert på deres konsistente polypeptid ryggrad har overskudd av HBA-egenskaper. Dette resulterte i økt bidrag fra hydrogenbindingsinteraksjoner og økt ekstraksjonsutbytte for de aller fleste peptidene. Disse resultatene bekrefter tidligere erfaringer med ekstraksjon av peptider med DES-basert SLM [42]. Likevel anses 6-metylkumarin:tymol i forholdet 1:1 som mest pålitelig, og er med bakgrunn i dette det systemet som ble optimalisert videre. Strømmen i systemene var stabil ved 3 V i 30 minutters ekstraksjon, se *Figur 22*.



Figur 21: ekstraksjonsutbytte av peptidene ved ulik ratio av 6-metylkumarin og tymol i SLM med 0,5 % DEHP (system E). Feilfelt indikerer standardavvik per peptid, hvor  $n = 3$ .



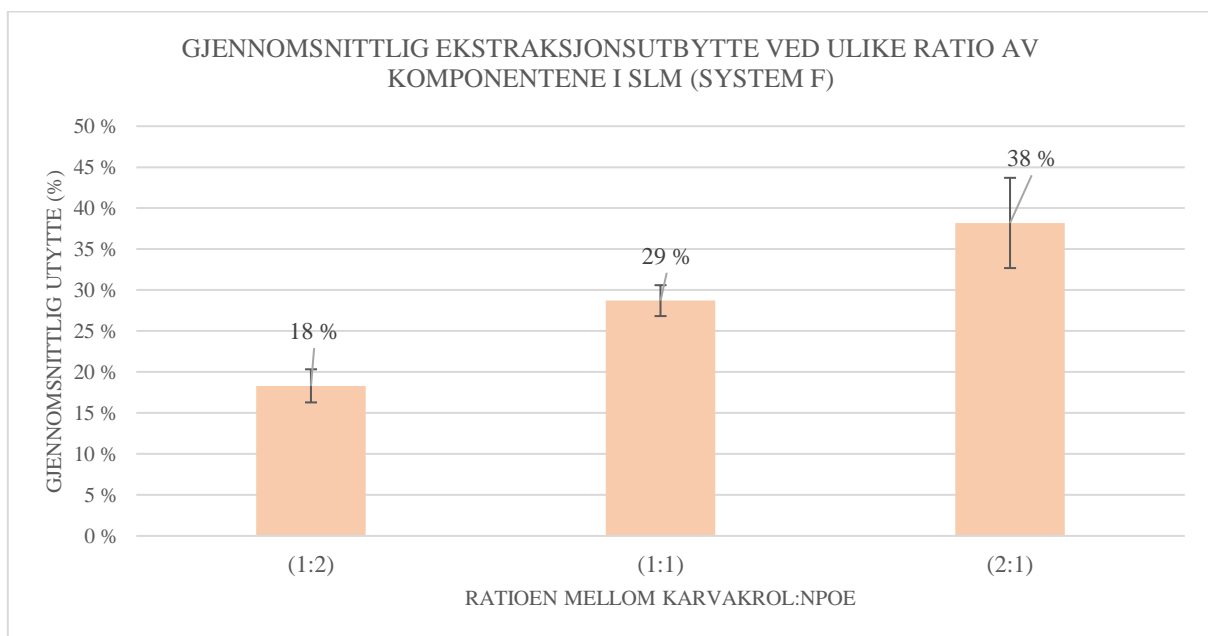
Figur 22: logget strøm ( $\mu\text{A}$ ) som funksjon av tiden (min) for system E med ratio 1:1 (A) og 1:2 (B) ( $n = 3$ ). Gjør oppmerksom på at y-aksene er ulikt skalert.

Karvakrol og NPOE (system F) ble undersøkt i forholdene 1:1, 1:2 og 2:1. Figur 23 viser gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte av peptidene ved de ulike forholdene. Det gjennomsnittlige ekstraksjonsutbyttet økte med økt andel karvakrol i SLM. Basert på resultatene oppnådd med system E var dette å forvente, da karvakrol er den flytende isomeren av tymol og har i stor grad

like fysikalsk-kjemiske egenskaper. Det økte ekstraksjonsutbyttet av peptidene skyldes derfor økt bidrag av hydrogenbindingsinteraksjoner mellom karvakrol og peptidene.

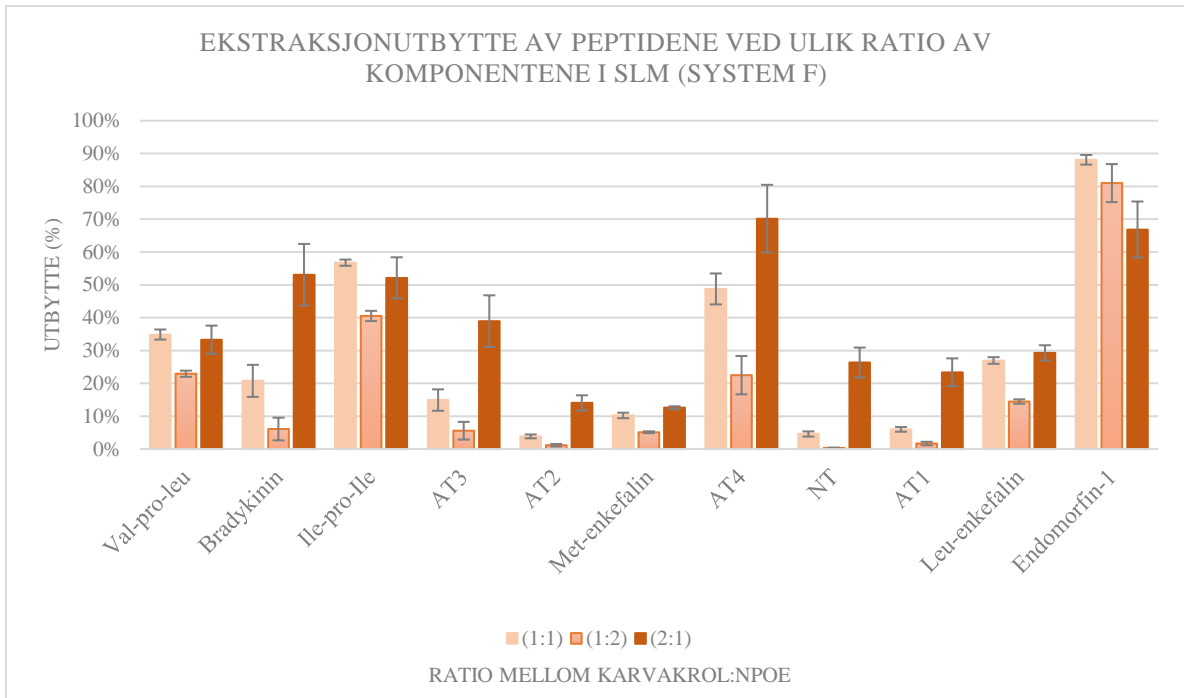
*Figur 24* viser ekstraksjonsutbytte for hvert peptid ved de ulike ratioene av karvakrol og NPOE. Karvakrol:NPOE (1:1) ga høyest ekstraksjonsutbytte for de minste, mest hydrofobe peptidene (val-pro-leu, ile-pro-ile, endomorfin-1). Ved å øke mengden karvakrol i SLM økte ekstraksjonsutbytte av de større og mer hydrofile peptidene (met-enkefalin, leu-enkefalin, bradykinin, AT III, AT II, AT IV, NT, AT I). Ser en spesielt stor økning for de peptidene med overskudd av basiske residuer, de seks siste peptidene respektivt. Som følge av økt hydrogenbindingsinteraksjon ved overskudd av karvakrol, økte polariteten i SLM. Økt polaritet lettet ekstraksjon av de større og mer hydrofile peptidene. Dette forklarer også hvorfor overskudd av NPOE ga lavest ekstraksjonsutbytte for alle peptidene.

Til tross for økte ekstraksjonsutbytter som følge av økt mengde karvakrol i SLM, ga dette redusert stabilitet av systemet. Strømmen i system F, når SLM hadde overskudd av karvakrol, økte som funksjon av tiden (se *Figur 25*). NPOE var ikke avgjørende for ekstraksjon av peptidene, men viktig for å sikre et stabilt system. Med bakgrunn i dette ble karvakrol:NPOE (1:1) + 1 % DEHP valgt for videre optimalisering.

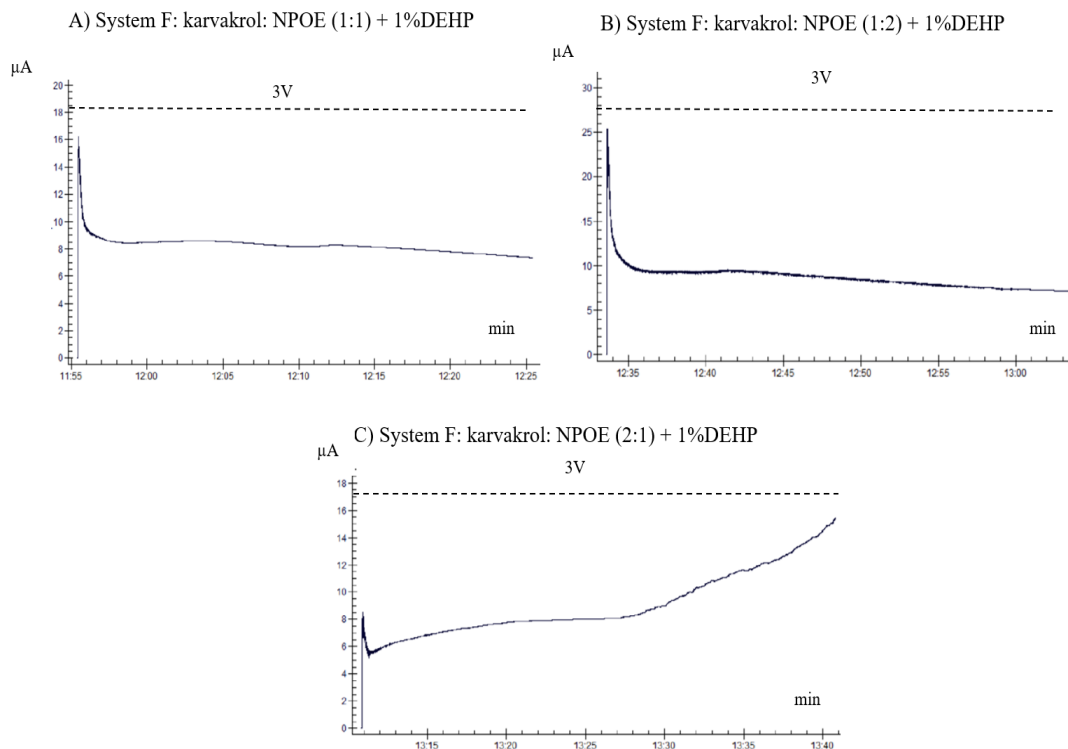


*Figur 23: gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte av peptidene ved ulik ratio av karvakrol og NPOE i SLM med 1% DEHP (system F). Feilfelt indikerer gjennomsnittlig standardavvik av modellpeptidene, hvor  $n = 3$  per peptid.*





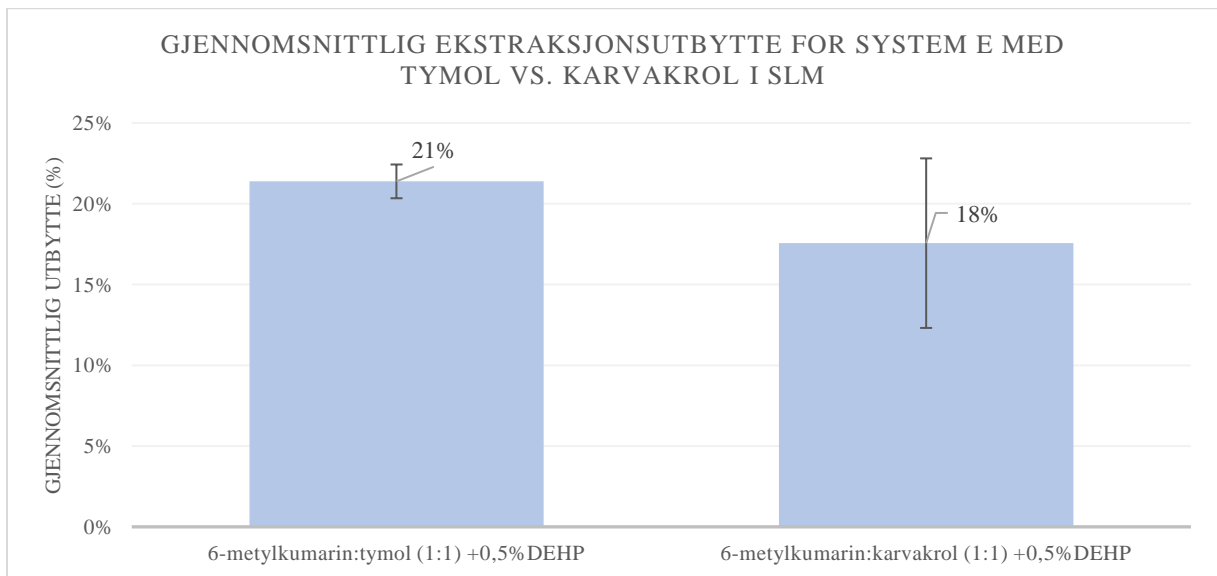
Figur 24: ekstraksjonsutbytte for peptidene ved ulik ratio av karvakrol og NPOE i SLM med 1% DEHP (system F). Feilfelt indikerer standardavvik per peptid, hvor  $n = 3$ .



Figur 25: logget strøm ( $\mu\text{A}$ ) som funksjon av tiden (min) for system F med ratio 1:1 (A), 1:2 (B) og 2:1 (C) ( $n = 3$ ). Gjør oppmerksom på at y-aksene er ulikt skalert.

#### 4.4.5 Erstatning av tymol med karvakrol

System E består av 6-metylkumarin:tymol (1:1) + 0,5 % DEHP, mens system F består av karvakrol:NPOE (1:1) + 1 % DEHP. Karvakrol er den flytende isomeren til tymol, og har derfor tilnærmet like fysikalsk-kjemiske egenskaper. Det var derfor interessant å undersøke utbytte og stabilitet av ekstraksjonen når tymol ble erstattet av karvakrol i system E, se **3.5.2 Optimaliseringsforsøk**.



Figur 26: gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte av peptidene for SLM med tymol og karvakrol. Feilfelt indikerer gjennomsnittlig standardavvik av modellpeptidene, hvor  $n = 3$  per peptid.

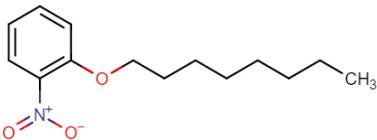
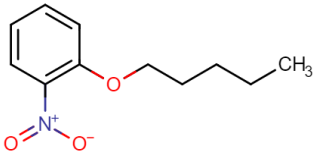
Det var ingen signifikant forskjell mellom væskemembranene ( $p = 0,28$ ), til tross for høyere gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte og mindre spredning i data oppnådd med tymol i SLM (se Figur 26). Ulik spredning i data kan skyldes stabilitetsforskjellen av løsningene. Både 6-metylkumarin og tymol er faste stoffer ved romtemperatur, som i bestemte forhold gir opphav til en DES. Den eutektiske væsken dannes som et resultat av at smeltepunktet for blandingen er lavere enn smeltepunktet til stoffene hver for seg (se Figur 8). Dette kan forklares kjemisk ved at 6-metylkumarin og tymol danner intermolekylære hydrogenbindinger med hverandre [42]. Karvakrol er allerede flytende ved romtemperatur, og gir sammen med 6-metylkumarin ikke en DES per definisjon. Karvakrol og 6-metylkumarin i forholdet 1:1 + 0,5 % DEHP ga spindelvelignende strukturer i løsningen etter løsningen ble tatt ut av varmeskap. Dette er trolig et resultat av at karvakrol ikke klarer å løse 6-metylkumarin i dette forholdet. Dersom det skulle være ønskelig med en SLM bestående av karvakrol istedenfor tymol, måtte karvakrol vært i overskudd for å sikre en stabil løsning. Andre forhold mellom karvakrol og 6-metylkumarin ble

ikke videre studert, da tymol ga opphav til et bedre og mer pålitelig system. Begge systemene oppfylte kravene til stabilitet.

#### 4.4.6 Erstatning av NPOE med NPPE

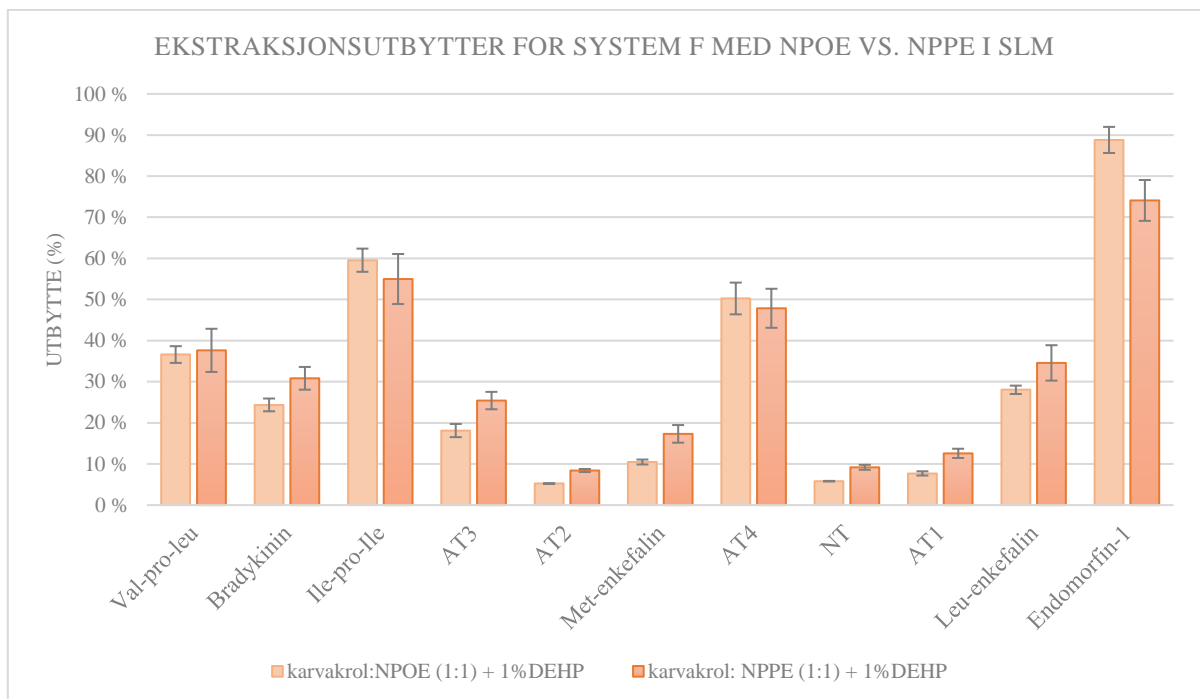
System F består av karvakrol:NPOE (1:1) + 1 % DEHP. NPOE er den mest hydrofobe SLM-komponenten, se *Tabell 20*. Som diskutert i avsnitt **4.4.4 Optimalisering av ratio mellom komponentene i SLM**; har NPOE vist seg å være viktig med hensyn på stabilitet av SLM, og mindre viktig for ekstraksjon av peptidene. Med bakgrunn i dette var det interessant å undersøke ekstraksjonsutbytte og stabilitet av system F, ved å erstatte NPOE med en mer polar forbindelse. 2-Nitrofenylpentyleter (NPPE) ligner NPOE i struktur, men skiller seg fra NPOE ved at alkylkjeden består av fem karbonatomer istedenfor åtte (se *Tabell 23*). Dette gjør NPPE til en mer polar forbindelse som ikke skiller seg alt for mye fra NPOE, og var en forbindelse som det var interessant å undersøke videre (se **3.5.2 Optimaliseringsforsøk**).

*Tabell 23: struktur og noen fysikalsk-kjemiske egenskaper av NPOE og NPPE [38].*

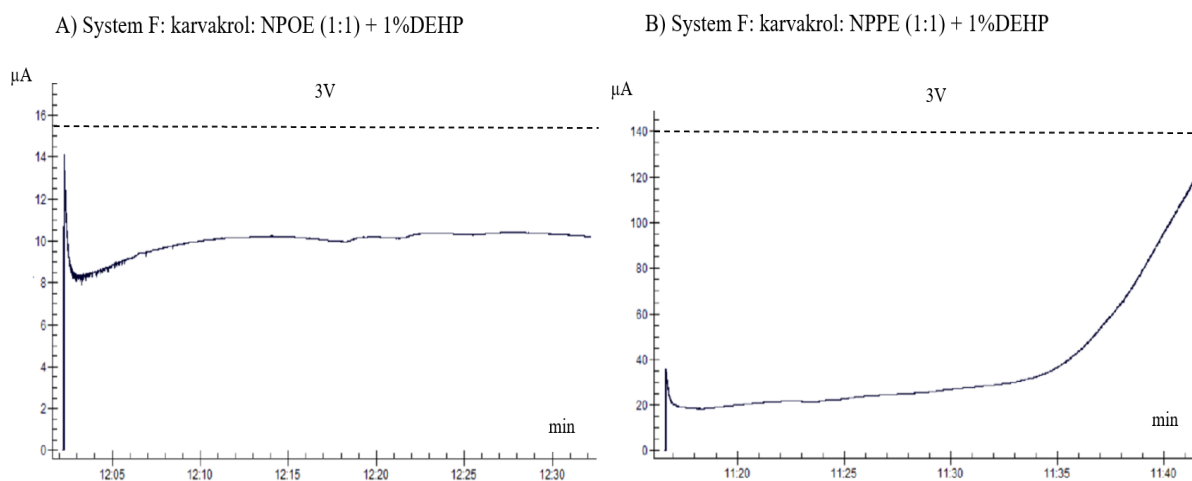
| Forbindelse | Struktur  | Egenskaper                    |  |
|-------------|---|-------------------------------|--|
| NPOE        |  | <b>log P</b>                  | 4,86   |
|             |   | <b>Vannløselighet (mg/mL)</b> | 0,001  |
|             |   | <b>Interaksjoner</b>          | HBA, $\pi$ - $\pi$ , kation- $\pi$ , van der Waalske |
|             |   | <b>pKa</b>                    | Ingen, ladning som følge av resonans av elektroner   |
| NPPE        |  | <b>log P</b>                  | 3,53   |
|             |   | <b>Vannløselighet (mg/mL)</b> | 0,024  |
|             |   | <b>Interaksjoner</b>          | HBA, $\pi$ - $\pi$ , kation- $\pi$ , van der Waalske |
|             |   | <b>pKa</b>                    | Ingen, ladning som følge av resonans av elektroner   |

Figur 27 viser ekstraksjonsutbytte av de ulike peptidene når SLM besto av NPOE, sammenlignet med ekstraksjonsutbyttene når SLM besto av NPPE. SLM bestående av NPOE ga høyest ekstraksjonsutbytte for de små, hydrofobe peptidene (val-pro-leu, ile-pro-ile, AT IV, endomorfin-1), mens de større og mer hydrofile peptidene (bradykinin, AT III, AT II, met-enkefalin, NT, AT I, leu-enkefalin) ble ekstrahert med høyest ekstraksjonsutbytte med NPPE. Dette med bakgrunn i at NPPE er mer hydrofil enn NPOE, og ga et mer polart system.

Til tross for økt ekstraksjonsutbytte av de fleste peptidene med NPPE i SLM, økte strømmen i systemet som funksjon av tiden, se Figur 28. Væskemembranen oppfylte derfor ikke kravet stilt til en stabil væskemembran, og karvakrol:NPOE (1:1) + 1 % DEHP var systemet som ble valgt ut for videre arbeid.



Figur 27: ekstraksjonsutbytte av peptidene for system F når SLM inneholdt NPOE og NPPE. Feilfelt indikerer standardavvik per peptid, hvor  $n = 3$ .

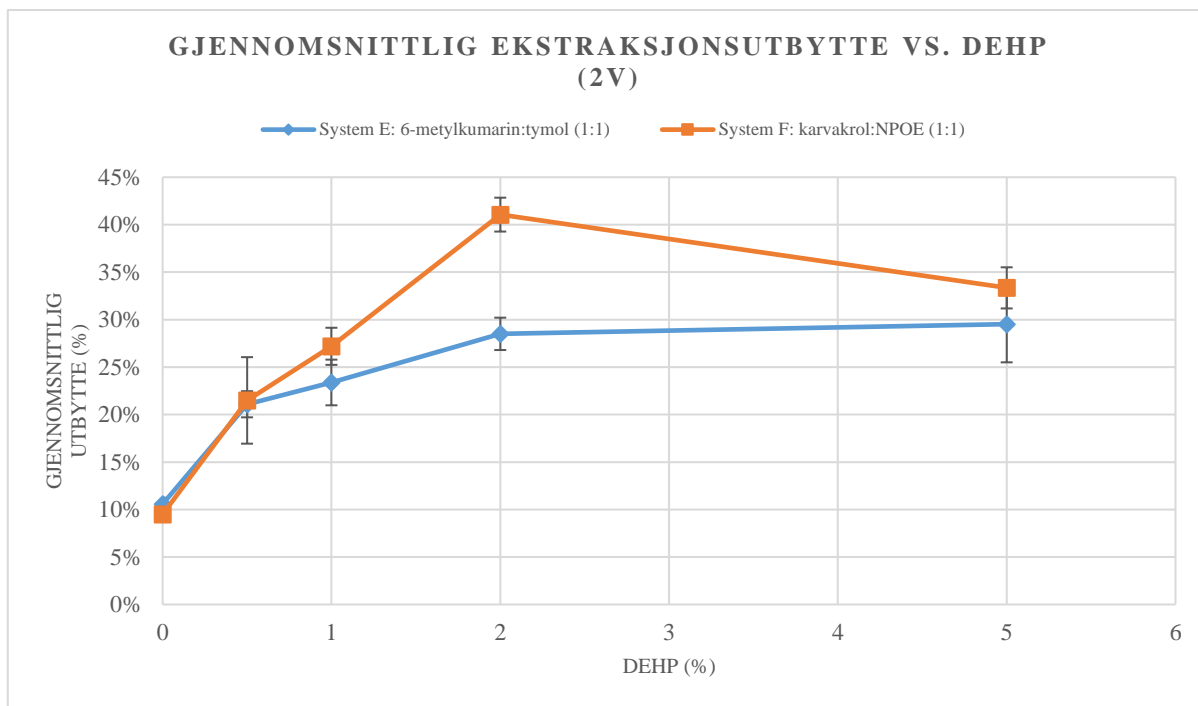


Figur 28: logget strøm ( $\mu\text{A}$ ) som funksjon av tid (min) for system F med NPOE (A) og NPPE (B) ( $n = 3$ ). Gjør oppmerksom på at y-aksene er ulikt skalert

#### 4.4.7 Optimalisering av prosentandel DEHP

Optimalisering av system E og F ble også utført med hensyn på prosentandel DEHP i SLM. De ulike prosentandelene som ble undersøkt var 0 %, 0,5 %, 1 %, 2 % og 5 %, se **3.5.2 Optimaliseringsforsøk**. Hensikten med å undersøke ulike mengder DEHP i SLM var å studere peptidenes avhengighet av ioniske interaksjoner for effektiv ekstraksjon, som ikke går på bekostning av stabiliteten i systemene. Figur 29 viser hvordan ekstraksjonsutbyttene endret seg med økende prosentandel DEHP i SLM for system E og F.

Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte av peptidene økte i begge systemene med økende prosentandel DEHP i SLM. System E ga maksimalt gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte med 5 % DEHP på 30 % (RSD = 14 %), mens system F ga maksimalt gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte med 2 % DEHP i SLM på 41 % (RSD = 7 %). Lavere ekstraksjonsutbytter for system E, sammenlignet med system F, skyldes trolig systemets høye viskositet. Strømnivået i begge systemene økte med økende prosentandel DEHP i SLM, men strømmen økte ikke som funksjon av tid i noen av systemene.



*Figur 29: gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte som funksjon av DEHP (%). Feilfelt indikerer gjennomsnittlig standardavvik av modellpeptidene, hvor  $n = 3$  per peptid.*

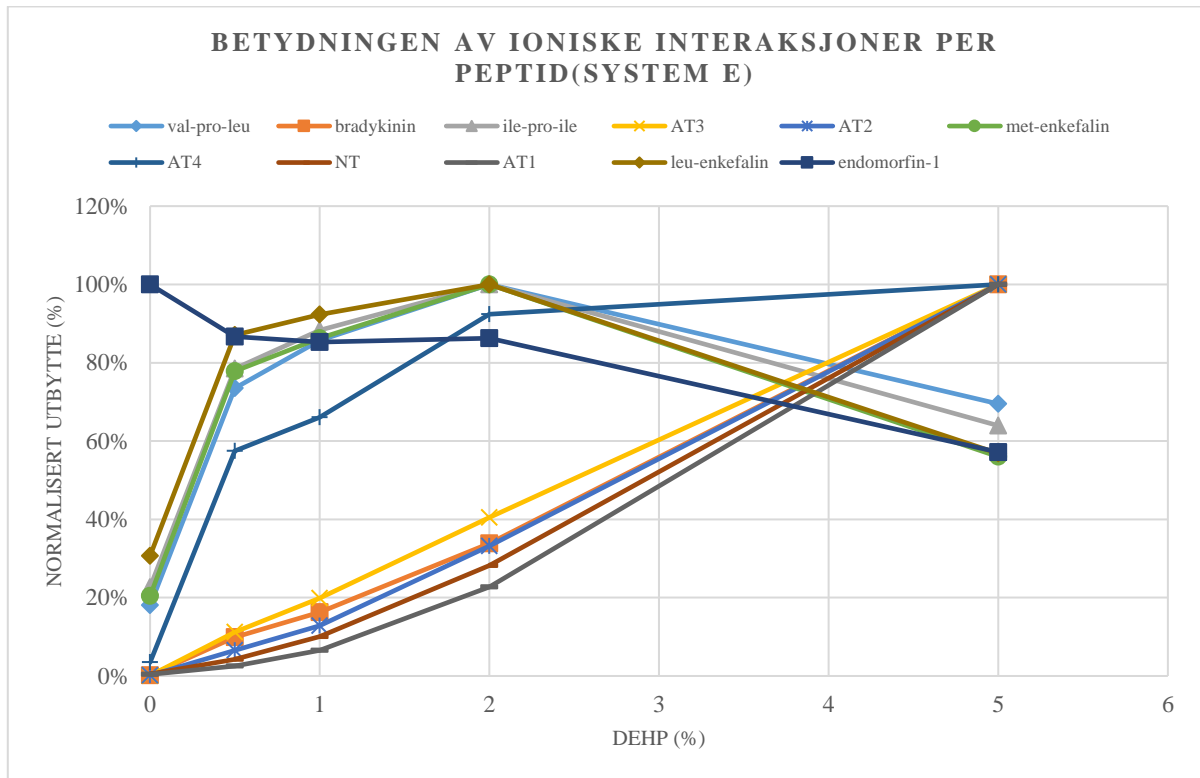
For hvert peptid ble ekstraksjonsutbyttene normalisert i forhold til maksimalt ekstraksjonsutbytte oppnådd i måleserien. Dette gir et relativt ekstraksjonsutbytte for hvert peptid, som sier noe om betydningen av ioniske interaksjoner med DEHP for de ulike peptidene.

*Figur 30* viser normalisert ekstraksjonsutbytte som funksjon av DEHP for system E. Det ses at peptidene ga opphav til tre ulike mønster:

1. Utbyttet reduseres med økende prosentandel DEHP i SLM
2. Utbyttet øker raskt med økende prosentandel DEHP i SLM, før det når et optimum og deretter reduseres
3. Utbyttet øker langsomt med økende prosentandel DEHP i SLM

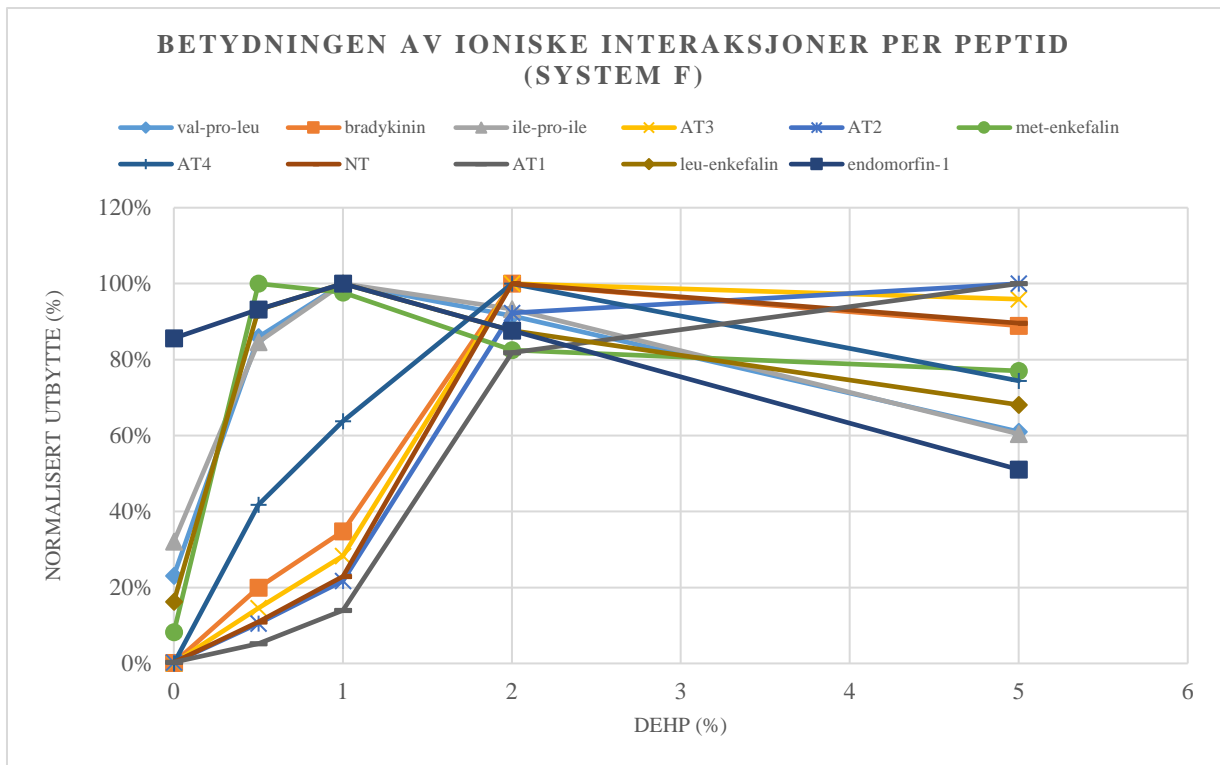
Endomorf-1 var det eneste peptidet som dannet mønster nr. 1. Peptidet var ikke avhengig av ioniske interaksjoner for effektiv ekstraksjon i systemet, til forskjell fra peptidene som dannet mønster nr. 2 og nr. 3. For peptidene som dannet mønster nr. 2 kom effekten av ioniske interaksjoner ganske umiddelbart ved tilsetning av en ionebærer til SLM. Det er de minste peptidene med høyest log D (pH 3)-verdi som dannet dette mønsteret (leu-enkefalin, ile-pro-ile, met-enkefalin, val-pro-leu). Disse ga maksimalt ekstraksjonsutbytte med 2 % DEHP i SLM. Peptidene som dannet mønster nr. 3 var også avhengig av ioniske interaksjoner, men her var effektiviteten avhengig av mengden DEHP i SLM. Det er peptidene med overskudd av basiske

residuer som danner dette mønsteret (AT III, bradykinin, AT II, NT, AT I, AT IV). Disse peptidene ga maksimalt ekstraksjonsutbytte med 5 % DEHP i SLM. Desto mer DEHP som fantes i SLM, desto større ble bidraget fra ioniske interaksjoner med de basiske residuene på peptidene. Dette resulterte i at en større andel av peptidene ble upolare og lettere ble ekstrahert gjennom SLM.



Figur 30: normalisert ekstraksjonsutbytte per peptid som funksjon av DEHP (%) i system E.

Figur 31 viser normalisert ekstraksjonsutbytte som funksjon av prosentandel DEHP i system F. System F ga i likhet med system E opphav til de tre mønstrene. Forskjellen var at peptidene innen hvert mønster når maksimalt ekstraksjonsutbytte ved ulike prosentandeler DEHP. For peptidene som danner mønster nr. 2 ga for eksempel met-enkefalin maksimalt ekstraksjonsutbytte ved 0,5 % DEHP, mens leu-enkefalin ga maksimalt ekstraksjonsutbytte ved 1 % DEHP. Noen av peptidene med mønster 3 ga maksimalt ekstraksjonsutbytte ved 2 % DEHP, til forskjell fra med system E hvor alle peptidene nådde maksimalt ekstraksjonsutbytte ved 5 % DEHP i SLM. Det er verdt å nevne at ekstraksjonsutbyttene ved de høyere prosentandelene DEHP i SLM ligger ganske nært hverandre, og at det er et relativt standardavvik for hver gjennomsnittlig verdi. Det vil si at forskjellen i ekstraksjonsutbytte fra 2 til 5 % DEHP er minimal for mange av peptidene som danner mønster nr. 3.

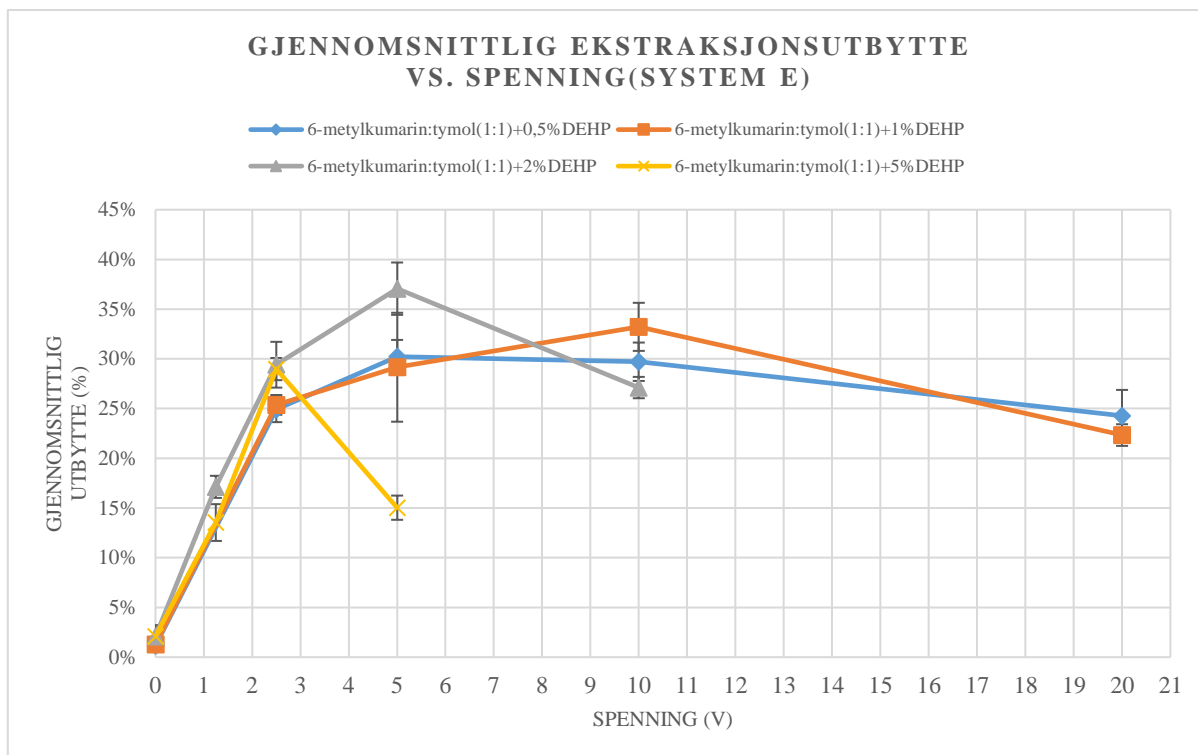


Figur 31: normalisert ekstraksjonsutbytte per peptid som funksjon av DEHP (%) for system F.

#### 4.4.8 Optimalisering av spenning påført systemene ved ulike prosentandeler DEHP

Spenningen som påføres systemet er en av de viktigste parameterne for økt ekstraksjonsutbytte av analytt med EME. Ekstraksjonsutbyttene ved EME øker lineært med økende spenning påført systemet, inntil systemet når en likevekt og økt spenning ikke lenger har noe å si for utbytte. For høy spenning påført systemet øker risikoen for elektrolyse og et ustabil system, som følge av økt strøm i systemet. DEHP tilsatt SLM er også vist å øke mengden strøm som passerer SLM. Dersom ikke spenningen som påføres systemet kontrolleres, vil dette kunne gi opphav til elektrolyse og bobledannelse [8]. Med bakgrunn i dette var det ønskelig å undersøke ekstraksjonsutbyttene og stabiliteten av systemene når man varierer spenningen påført systemet ved ulike prosentandeler DEHP i SLM. For SLM med 0,5 % og 1 % DEHP ble 0 V, 2,5 V, 5 V, 10 V og 20 V undersøkt. For SLM med 2 % og 5 % DEHP ble 1,25 V, 2,5 V, 5 V, 10 V og 20 V undersøkt (se **3.5.2 Optimaliseringsforsøk**). Når systemene ikke lenger holdt seg stabile, ble det ikke utført videre ekstraksjoner. *Figur 32* og *Figur 33* viser hvordan gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte endret seg som funksjon av spenning for de ulike væskemembranene med ulik mengde DEHP, for system E og F respektivt.



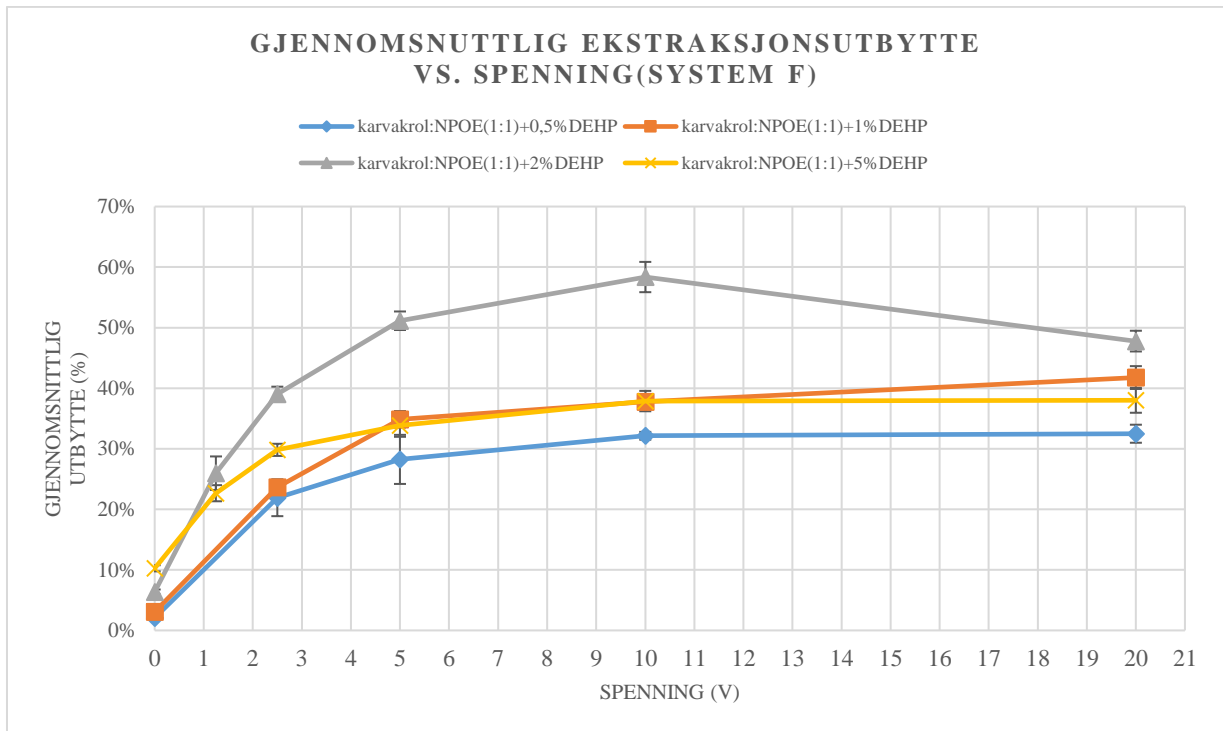


*Figur 32: gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte som funksjon av spenning (V) påført system E ved ulike prosentandeler DEHP i SLM. Feilfelt indikerer gjennomsnittlig standardavvik av modellpeptidene, hvor  $n = 3$  per peptid.*

De gjennomsnittlige ekstraksjonsutbyttene i system E økte med økende spenning påført systemet, uavhengig av mengden DEHP i SLM (se *Figur 32*). Permeabilitetskoeffisienten og distribusjonskoeffisienten av analyttene er avhengig av det elektriske potensialet som er påført SLM, og koeffisientene øker med økende spenning [8]. Spenningen fungerer derfor som en drivkraft for peptidenes vandring i SLM, og er årsaken til økt ekstraksjonsutbytte med økende spenning. En økt mengde DEHP i SLM resulterer også i økte ekstraksjonsutbytter, se *Figur 32*, hvor system E får de høyeste gjennomsnittlige ekstraksjonsutbytter ved 2 % DEHP. Høyest gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte ble oppnådd med 2 % DEHP tilsatt SLM ved 5 V (37 %, RSD = 6 %). *Figur 32* beviser teorien diskutert ovenfor; strømmen i systemet øker ved økt mengde DEHP tilsatt SLM. Væskemembranene med de høyeste prosentandelene av DEHP, 2 % og 5 %, er mindre robuste ved økt spenning, sammenlignet med væskemembranene med 0,5 % og 1 % DEHP. Væskemembranene vil med økende spenning nå en spenning hvor de blir ustabile, og gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte reduseres.

*Figur 33* viser gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte som funksjon av påført spenning ved de ulike prosentandelene av DEHP i SLM for system F. Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte økte

med økende spenning påført systemet, slik som for system E. Sammenlignet med system E, holdt system F seg lenger stabilt med 2 % og 5 % DEHP tilsatt SLM. Alle væskemembranene holdt seg stabile inntil 20 V ble påført systemene. System F består av mer hydrofobe komponenter enn system E, som resulterer i en økt robusthet og stabilitet. Dette gjorde det mulig å tilsette mer DEHP til system F, samt å påføre systemet høyere spenning. System F med 2 % DEHP viste en overlegenhet, sammenlignet med de andre prosentandelene DEHP, og fikk høyest gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte på 58 % (RSD = 5 %) ved 10 V.



Figur 33: gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte som funksjon av spenning (V) påført system F ved ulik prosentandel DEHP i SLM. Feilfelt indikerer gjennomsnittlig standardavvik av modellpeptidene, hvor  $n = 3$  per peptid.

#### 4.5 Evaluering av optimalisering av system E og F

En rekke optimaliseringsforsøk resulterte i to optimaliserte systemer og ekstraksjonsbetingelser, se Tabell 24. Både system E og F ga høyest gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte for peptidene med 2 % DEHP tilsatt SLM, på 37 % (RSD = 6 %) og 58 % (RSD = 5 %) respektivt.

Tabell 24: ekstraksjonsbetingelser for de optimaliserte væskemembranene i systemene E og F.

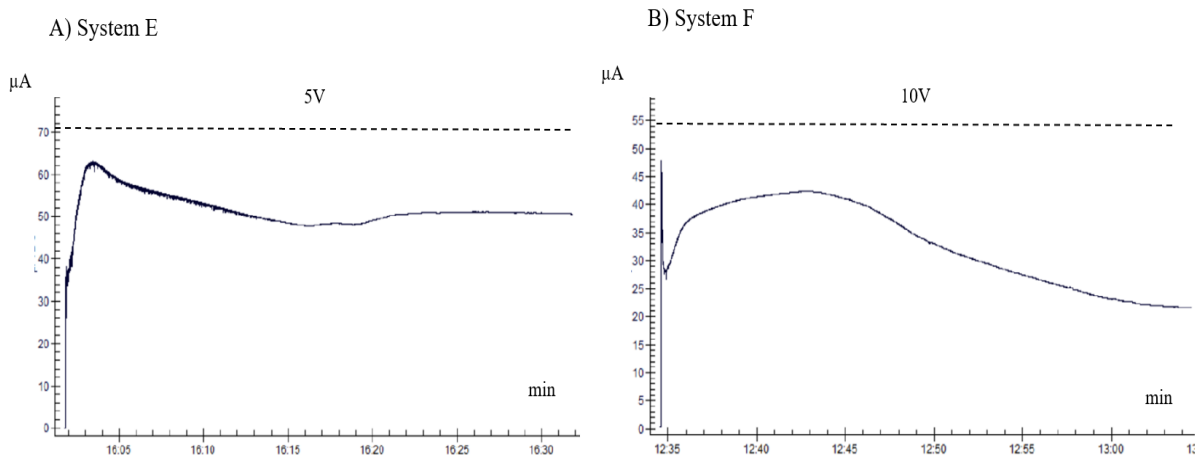
| Systemer | Komponenter                              | Spenning<br>(V) | Ekstraksjonstid<br>(min) | Risting<br>(rpm) |
|----------|--|-----------------|--------------------------|------------------|
| E        | 6-Metylkumarin:tymol (1:1) +<br>2 % DEHP | 5               | 30                       | 750              |
| F        | Karvakrol:NPOE (1:1) +<br>2 % DEHP       | 10              | 30                       | 750              |

Innledningsvis ble følgende krav definert for en stabil og ekstraksjonseffektiv væskemembran:

1. Komponentene i SLM skal ha en vannløselighet < 0,5 mg/mL
2. Strømmen skal være stabil som funksjon av tiden
3. Strømmen i systemet skal være < 50  $\mu$ A per vial
4. For peptidene med utbytte > 40% skal RSD være < 15%
5. Systemet må være stabilt ved 1:1 fortyning av plasma med en bufferløsning

Komposisjonen av væskemembranene i system E og F ble valgt på bakgrunn av evaluering av væskemembraner beskrevet tidligere i litteraturen. Med bakgrunn i krav nr. 1 ble det kun valgt organiske løsemidler med vannløselighet < 0,5 mg/mL, og begge væskemembranene oppfylte således det første kravet stilt til en stabil SLM. Systemene tilfredsstilte også krav nr. 5, ettersom at systemene ble optimalisert med hensyn på ekstraksjon fra plasma fortennet 1:1 med en bufferløsning.

Ekstraksjonsbetingelsene var tilnærmet like for begge systemene, foruten om spenningen påført systemene; hvor spenningen påført system F var dobbelt så høy som spenningen påført system E (se Tabell 24). Begge væskemembranene oppfylte kravet om stabil strøm stilt til SLM, da maksimal strøm per vial var < 50  $\mu$ A og strømmen i systemene ikke økte som funksjon av tiden (se Figur 34). System F var likevel mer robust enn system E, som følge av større motstand i systemet. Større motstand i system F ses av de genererte strømkurvene, ved at strømnivået i system F var lavere enn i system E.

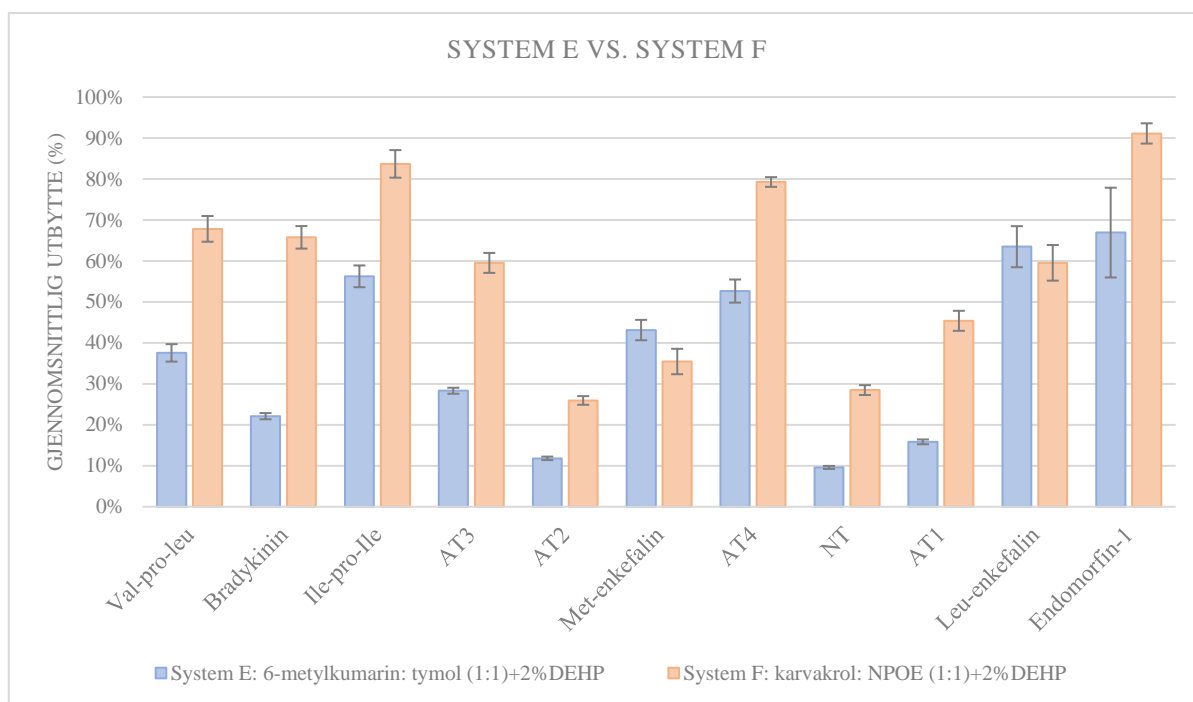


Figur 34: logget strøm ( $\mu\text{A}$ ) som funksjon av tid (min) for system E og F ( $n = 3$ ).

System E: 6-metylkumarin:tymol (1:1) + 2 % DEHP (A), system F: karvakrol:NPOE (1:1) + 2 % DEHP (B). Gjør oppmerksom på at y-aksene er ulikt skalert.

Til tross for høyere motstand i system F, ga systemet de høyeste ekstraksjonsutbyttene av modellpeptidene (se Figur 35). System F ga høyest ekstraksjonsutbytte av alle modellpeptidene, foruten om met- og leu-enkefalin. Selektivitetsforskjellen i systemene er diskutert i **4.4.1 Bevis av konsept med innledende forsøk**. System F viste en overlegenhet med ekstraksjonsutbytter  $> 40\%$  (RSD  $< 15\%$ ) for 8 av 11 modellpeptider. Til sammenligning oppnådde kun 5 av 11 modellpeptider ekstraksjonsutbytter  $> 40\%$  med system E, hvor 4 av 5 hadde RSD  $< 15\%$ . Endomorfins-1 var peptidet som oppnådde høyest ekstraksjonsutbytte i både system E og F, med ekstraksjonsutbytte på  $67\%$  (RSD =  $16\%$ ) og  $91\%$  (RSD =  $3\%$ ) respektivt. Generelt lavere ekstraksjonsutbytter av peptidene med system E, forklares trolig av væskemembranens høye viskositet.

Basert på de definerte kravene stilt til SLM, var system F det beste systemet. System F var signifikant bedre enn system E for alle peptidene ( $p < 0,024$ ), foruten om leu-enkefalin ( $p = 0,42$ ). Syv av peptidene oppnådde ekstraksjonsutbytte  $> 60\%$  (RSD fra 1-7 %), ett peptid med ekstraksjonsutbytte =  $45\%$  (RSD = 5%), og tre peptider oppnådde ekstraksjonsutbytte i området 25-40% (RSD fra 4-9%). Kun endomorfins-1 oppnådde komplett ekstraksjon (*exhaustive extraction* på engelsk)  $> 85\%$  (RSD  $< 15\%$ ). Systemet var best i ekstraksjon av de små modellpeptidene med høyest log D (pH 3)-verdi. Systemet oppnådde likevel en stor økning i ekstraksjonsutbytter av de større, hydrofile peptidene med overskudd av basiske residuer ved å øke mengden DEHP i SLM og spenningen påført systemet.



Figur 35: ekstraksjonsutbytte for de ulike peptidene oppnådd med system E og F. Feilfelt indikerer standardavvik per peptid, hvor  $n = 3$ .

#### 4.6 Grønnhet av metoden

EME er en mikroekstraksjonsteknikk, hvor både prøvevolum og volum av den organiske ekstraksjonsfasen er redusert til  $\mu\text{L}$ -nivå. Dette alene gjør EME til en mer miljøvennlig metode, sammenlignet med tradisjonelle prøveopparbeidelser. I dette arbeidet var mengden organisk ekstraksjonsfase  $9 \mu\text{L}$ . System E besto av 6-metylkumarin, tymol og DEHP, mens system F besto av karvakrol, NPOE og DEHP. I grønn prøveopparbeidelse er ønsket om reduksjon av toksiske kjemikalier høyt prioritert. Da prinsippet for grønn prøveopparbeidelse er et integrert system, vil reduksjon av mengden kjemikalier som brukes ikke nødvendigvis gi en grønn prøveopparbeidelse, om kjemikaliene har høy toksikologisk profil. Toksikologisk profil av de ulike SLM-komponentene er presentert i *Tabell 25*. Basert på denne informasjonen stiller system F noe bedre enn system E, men systemene vil totalt sett være tilnærmet like miljøvennlige.

Tabell 25: toksikologisk profil av SLM-komponenter. Informasjonen er hentet fra kjemikalienes sikkerhetsdatablader funnet i EcoOnline.

| Forbindelse            | Faremerking   |
|------------------------|---|
| <b>Karvakrol/tymol</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Farlig ved svelging</li> <li>- Gir alvorlig etseskade på hud og øyne</li> <li>- Giftig med langtidsvirkning for liv i vann</li> <li>- Unngå utslipp til miljøet</li> </ul> |
| <b>6-Metylkumarin</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Farlig ved svelging</li> <li>- Utløse allergisk reaksjon</li> <li>- Kan gi allergi, astmasymptomer eller pustevansker ved innånding</li> </ul>                             |
| <b>NPOE</b>            | Ingen   |
| <b>DEHP</b>            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Farlig ved hudkontakt</li> <li>- Gir alvorlig etseskade på hud og øyne</li> </ul>  |

Sett i et miljøperspektiv er det tymol og karvakrol som kommer dårligst ut, da disse er giftig på langsikt for liv i vann og fravær av utslipp til miljøet er viktig. Mange av kjemikaliene kan også potensielt gi helseskader hos operatøren. Til tross for dette er eksponeringsrisikoen lav, da metoden er en mikroekstraksjonsteknikk. Prototypustyret benyttet i metoden har plass til totalt 10 replikater, og eksponeringsrisiko reduseres ytterligere dersom alle plassene fylles med vialer. Ved fullstendig fylling av utstyret vil også effektivitet av metoden økes ytterligere, og energiforbruket enda mindre. Effektiviteten i metoden er allerede høy; da det i metoden er gjort lite forarbeid med donorfasen før ekstraksjon, og at analyttene ekstraheres under påvirkning av et elektrisk felt.

Vialene benyttet til ekstraksjon og til injeksjon av akseptor på LC-MS, ble vasket og gjenbrukt. Sammen med reduksjon av volum, vil dette redusere mengden avfall som generes underveis i metoden. Avfallet generert i metoden er knyttet til SLM, gjenværende donor- og akseptorfase, pipettespisser, eppendorfrør benyttet til oppbevaring av donorfase og innsatser til MS-vialene. For å redusere forbruk av sistnevnte, kunne det vært aktuelt og analysert akseptor direkte fra

ekstraksjonsvialen. Ulempen med dette er at ekstraksjonsvialen ikke er transparent, og man mister evnen til å vurdere om akseptor er egnet til injisering på LC-MS (se **8.2.2 Fast stoff synlig i akseptor**).

LC-MS/MS ble benyttet som analyseinstrument i metoden, grunnet tilgjengelighet. Ulemper med bruk av LC-MS/MS er at det bruker en del organisk løsemiddel og dermed genererer en del avfall. Til tross for dette er det viktig å velge et analyseinstrument som tilfredsstillende behovet for selektivitet og sensitivitet ønsket i metoden. I denne metoden ble UHPLC benyttet til separasjon av analyttene. Dette gir kortere analysetider og mindre forbruk av mobilfase, se **2.4.1 Væskrokromatografi (LC)**.

## 5 Konklusjon

I dette arbeidet ble prototypustyr for EME utviklet av ETN AS benyttet til å finne robuste væskemembraner med god systemytelse til ekstraksjon av peptider fra plasma. Basert på tidligere væskemembraner benyttet til ekstraksjon av peptider, ble to nye væskemembraner utviklet og vurdert mot satte kriterier til en optimal væskemembran; SLM-komponentene bør ha en vannløselighet < 0,5 mg/mL; strømmen skal være stabil som funksjon av tiden; maksimal strøm i systemet < 50  $\mu$ A per prøve; RSD < 15 % for peptider med ekstraksjonsutbytte > 40 %; prøveløsning skal ikke fortynnes mer enn 1:1 med en bufferløsning.

Den ene væskemembranen var en DES og besto av 6-metylkumarin:tymol (1:1) + 2 % DEHP, og den andre var en ikke-eutektisk væske bestående av karvakrol:NPOE (1:1) + 2 % DEHP. Utviklingen av de to væskemembranene belyste viktigheten av ioniske interaksjoner for effektiv ekstraksjon av peptider. Ekstraksjonen av peptidene baserte seg ikke på ioniske interaksjoner alene; da hydrogenbindings-, kation- $\pi$ - og hydrofobe interaksjoner også var viktige. Viskositeten av væskemembranen var også avgjørende for ekstraksjonsutbytte. Mengden DEHP, samt spenning påført systemene, må kontrolleres nøye for å redusere risikoen for økt elektrolyse og ustabile systemer. Dette er særlig viktig ved ekstraksjon fra plasma, da plasma øker strømmen som går i systemene.

Den ikke-eutektiske væskemembranen var best, med et gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte på 58 % (RSD = 5 %) ved 10 V; sammenlignet med den DES-baserte væskemembranen, hvor gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte var 37 % (RSD = 6 %) ved 5 V. I den ikke-eutektiske væskemembranen oppfylte 8 av 11 modellpeptider kravet om systemytelse stilt til en optimal væskemembran; syv peptider fikk ekstraksjonsutbytte > 60% (RSD fra 1-7 %); ett peptid fikk ekstraksjonsutbytte = 45 % (RSD = 5%); tre peptider fikk ekstraksjonsutbytte i området 25-40% (RSD fra 4-9%).

Spenningen påført den ikke-eutektiske væskemembranen var dobbelt så høy som spenningen påført den DES-baserte væskemembranen. Likevel var strømnivået lavest i den ikke-eutektiske væskemembranen. Den ikke-eutektiske væskemembranen hadde derfor større kapasitet og var mer robust, sammenlignet med den DES-baserte væskemembranen.



## 6 Videre arbeid

Arbeidet har for første gang vist EME av peptider fra plasma med et stabilt ekstraksjonssystem. I tillegg har det gitt viktig erfaring med hva som påvirker ekstraksjonssystemets stabilitet, og hvordan ulike peptider ekstraheres i forskjellig grad avhengig av deres kjemiske struktur. Likevel var det kun ett av modellpeptidene som oppnådde komplett ekstraksjon (*exhaustive extraction* på engelsk) > 85 %. For at metoden skal kunne konkurrere med nåværende prøveopparbeidelsesteknikker og brukes i fremtiden, er det ønskelig med komplett ekstraksjon av analytt.

I dette arbeidet ble det ikke tid til å vurdere de operasjonelle parameterne risting og ekstraksjonstid. Det kunne vært interessant, da disse parameterne er kjent for å påvirke ekstraksjonsutbytte. Arbeidet tyder også på at det lønner seg å ha en SLM-komponent som sikrer stabiliteten i systemet. Ved å i større grad finjustere forholdet mellom de ulike komponentene og mengden ionebærer tilsatt SLM, kan man muligens oppnå enda høyere ekstraksjonsutbytter.

For at metoden skal kunne benyttes i fremtiden til virkelige analyser, må man kunne stole på resultatene fra metoden. Derfor er det helt nødvendig å utføre en metodevalidering. Metodevalidering gjøres på bakgrunn av EMAs (*European Medicines Agency*) retningslinjer. Basert på nåværende nivå av EME ville det vært tilstrekkelig med følgende valideringstester: linearitet, nøyaktighet, presisjon (daglig variasjon og dag-til-dag variasjon), LOD ( $S/N = 3$ ) og LOQ ( $S/N = 10$ ), teste for ioneundertrykking.

## 7 Referanseliste

1. Pedersen-Bjergaard, S., Gammelgaard, B., and Halvorsen, T.G., *Introduction to Pharmaceutical Analytical Chemistry*. Vol. 2. 2019: John Wiley & Sons, Ltd.
2. Balchen, M., Reubsaet, L., and Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane extraction of peptides*. J. Chromatogr. A, 2008. **1194**(2): p. 143-149.
3. Seip, K.F., Stigsson, J., Gjelstad, A., Balchen, M., and Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane extraction of peptides – Fundamental studies on the supported liquid membrane*. J. Sep. Sci., 2011. **34**(23): p. 3410-3417.
4. Eie, L.V., Rye, T.K., Hansen, F., Halvorsen, T.G., and Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane extraction of peptides and amino acids – status and perspectives*. Bioanalysis, 2021. **13**(4): p. 277-289.
5. Pedersen-Bjergaard, S. and Hansen, S.H., *Bioanalysis of pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques and Mass Spectrometry*. Vol. 1. 2015, United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd.
6. Kohler, I., Schappler, J., and Rudaz, S., *Microextraction techniques combined with capillary electrophoresis in bioanalysis*. Anal. Bioanal. Chem., 2013. **405**(1): p. 125-141.
7. López-Lorente, Á.I., Pena-Pereira, F., Pedersen-Bjergaard, S., Zuin, V.G., Ozkan, S.A., and Psillakis, E., *The Ten Principles of Green Sample Preparation*. Trends Anal. Chem., 2022: p. 116530.
8. Huang, C., Jensen, H., Seip, K.F., Gjelstad, A., and Pedersen-Bjergaard, S., *Mass transfer in electromembrane extraction - The link between theory and experiments*. J. Sep. Sci., 2016. **39**: p. 188-197.
9. Arthur, C.L. and Pawliszyn, J., *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. Anal. Chem., 1990. **62**(19): p. 2145-2148.
10. Yamini, Y., Rezazadeh, M., and Seidi, S., *Liquid-phase microextraction—The different principles and configurations*. Trends Anal. Chem., 2019. **112**: p. 264-272.
11. Pedersen-Bjergaard, S. and Rasmussen, K.E., *Liquid– liquid– liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. Anal. Chem., 1999. **71**(14): p. 2650-2656.
12. Pedersen-Bjergaard, S. and Rasmussen, K.E., *Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction*. J. Chromatogr. A, 2008. **1184**(1-2): p. 132-142.

13. Pedersen-Bjergaard, S. and Rasmussen, K.E., *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids*. J. Chromatogr. A, 2006. **1109**(2): p. 183-190.
14. Balchen, M., Lund, H., Reubsaet, L., and Pedersen-Bjergaard, S., *Fast, selective, and sensitive analysis of low-abundance peptides in human plasma by electromembrane extraction*. Anal. Chim. Acta, 2012. **716**: p. 16-23.
15. Santigosa-Murillo, E., Muñoz-Berbel, X., MasPOCH, S., Muñoz, M., and Ramos-Payán, M., *Impedance model for voltage optimization of parabens extraction in an electromembrane millifluidic device*. J. Chromatogr. A, 2020. **1625**: p. 461270.
16. Asl, Y.A., Yamini, Y., Seidi, S., and Ebrahimpour, B., *A new effective on chip electromembrane extraction coupled with high performance liquid chromatography for enhancement of extraction efficiency*. Anal. Chim. Acta, 2015. **898**: p. 42-49.
17. Eibak, L.E.E., Rasmussen, K.E., Øiestad, E.L., Pedersen-Bjergaard, S., and Gjelstad, A., *Parallel electromembrane extraction in the 96-well format*. Anal. Chim. Acta, 2014. **828**: p. 46-52.
18. Eibak, L.E.E., Parmer, M.P., Rasmussen, K.E., Pedersen-Bjergaard, S., and Gjelstad, A., *Parallel electromembrane extraction in a multiwell plate*. Anal. Bioanal. Chem., 2014. **406**(2): p. 431-440.
19. Skaalvik, T.G., Øiestad, E.L., Trones, R., Pedersen-Bjergaard, S., and Hegstad, S., *Determination of psychoactive drugs in serum using conductive vial electromembrane extraction combined with UHPLC-MS/MS*. J. Chromatogr. B, 2021. **1183**: p. 122926.
20. Drobnjak, M., Hansen, F., Øiestad, E.L., Løvli, T., Trones, R., Martinsen, Ø.G., and Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane Extraction with Vials of Conducting Polymer*. LC GC. N. Am., 2020. **38**(8): p. 435-439.
21. Balchen, M., Halvorsen, T.G., Reubsaet, L., and Pedersen-Bjergaard, S., *Rapid isolation of angiotensin peptides from plasma by electromembrane extraction*. J. Chromatogr. A, 2009. **1216**(41): p. 6900-6905.
22. UiO. *Peptid*. 2011 10.09.2019 [cited 2011 04.04]; Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/peptid.html>.
23. Tymoczko, J.L., Berg, J.M., Stryer, L., and *Biochemistry: A Short Course*. 3 ed. 2015: W.H. Freeman and Company.
24. Pedersen, B. *Zwitterion*. 2020; Available from: <https://snl.no/zwitterion>.
25. *in situ*. 2021 25.07.2021; Available from: [https://snl.no/in\\_situ](https://snl.no/in_situ).

26. Horváth, I.T., *Introduction: sustainable chemistry*. 2018, ACS Publications. p. 369-371.
27. Restan, M.S., Jensen, H., Shen, X., Huang, C., Martinsen, O.G., Kuban, P., Gjelstad, A., and Pedersen-Bjergaard, S., *Comprehensive study of buffer systems and local pH effects in electromembrane extraction*. *Anal Chim Acta*, 2017. **984**: p. 116-123.
28. *Ohms lov*. 2021 23.07.2021; Available from: [https://snl.no/Ohms\\_lov](https://snl.no/Ohms_lov).
29. Gjelstad, A., Rasmussen, K.E., and Pedersen-Bjergaard, S., *Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst–Planck equation*. *J. Chromatogr. A*, 2007. **1174**: p. 104-111.
30. Seip, K.F., Jensen, H., Sonstebj, M.H., Gjelstad, A., and Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane extraction: distribution or electrophoresis?* *Electrophoresis*, 2013. **34**(5): p. 792-9.
31. Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane extraction—looking into the future*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019. **411**(9): p. 1687-1693.
32. Kuban, P. and Bocek, P., *The effects of electrolysis on operational solutions in electromembrane extraction: The role of acceptor solution*. *J. Chromatogr. A*, 2015. **1398**: p. 11-19.
33. Seip, K.F., Faizi, M., Vergel, C., Gjelstad, A., and Pedersen-Bjergaard, S., *Stability and efficiency of supported liquid membranes in electromembrane extraction--a link to solvent properties*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014. **406**(8): p. 2151-61.
34. Drapała, A. and Wiczorek, P., *Facilitated SLM extraction of peptides with D2EHPA as a carrier*. *Desalination*, 2004. **163**(1-3): p. 47-53.
35. Knoll, S., Rösch, T., and Huhn, C., *Trends in sample preparation and separation methods for the analysis of very polar and ionic compounds in environmental water and biota samples*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020. **412**(24): p. 6149-6165.
36. Eie, L.V., Pedersen-Bjergaard, S., and Hansen, F.A., *Electromembrane extraction of polar substances – status and perspectives*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2022. **207**: p. 114407.
37. Hansen, F.A., Kubáň, P., Øiestad, E.L., and Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane extraction of highly polar bases from biological samples – Deeper insight into bis(2-ethylhexyl) phosphate as ionic carrier*. *Anal. Chim. Acta*, 2020. **1115**: p. 23-32.
38. ChemAxon. Available from: <https://chemicalize.com/app/calculation>.
39. Huang, C.X., Gjelstad, A., and Pedersen-Bjergaard, S., *Exhaustive extraction of peptides by electromembrane extraction*. *Anal. Chim. Acta*, 2015. **853**: p. 328-334.

40. Hansen, F.A. and Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane extraction of streptomycin from biological fluids*. J. Chromatogr. A, 2021. **1639**: p. 461915.
41. Seip, K.F., Gjelstad, A., and Pedersen-Bjergaard, S., *The potential application of electromembrane extraction for the analysis of peptides in biological fluids*. Bioanalysis, 2012. **4**(16): p. 1971-3.
42. Rye, T.K., Martinovic, G., Eie, L.V., Hansen, F.A., Halvorsen, T.G., and Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane Extraction of Peptides using Deep Eutectic Solvents as Liquid Membrane*. Anal. Chim. Acta, 2021. **1175**: p. 338717.
43. Zhang, Q., Vigier, K.D.O., Royer, S., and Jérôme, F., *Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications*. Chem. Soc. Rev., 2012. **41**(21): p. 7108-7146.
44. Makoś, P., Słupek, E., and Gębicki, J., *Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques—A review*. Microchem. J., 2020. **152**: p. 104384.
45. Alonso, D.A., Baeza, A., Chinchilla, R., Guillena, G., Pastor, I.M., and Ramón, D.J., *Deep eutectic solvents: the organic reaction medium of the century*. Eur. J. Org. Chem., 2016. **2016**(4): p. 612-632.
46. Shishov, A., Bulatov, A., Locatelli, M., Carradori, S., and Andrich, V., *Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review*. Microchem. J., 2017. **135**: p. 33-38.
47. Mordehai, A. and Fjeldsted, J., *Agilent Jet Stream Thermal Gradient Focusing Technology*, Technologies, A., Editor. 2009, Agilent Technologies: Santa Clara, USA.
48. Gjelstad, A., Rasmussen, K.E., and Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane extraction of basic drugs from untreated human plasma and whole blood under physiological pH conditions*. Anal. Bioanal. Chem., 2009. **393**(3): p. 921-928.
49. Nojavan, S., Bidarmanesh, T., Mohammadi, A., and Yaripour, S., *Electromembrane extraction of gonadotropin-releasing hormone agonists from plasma and wastewater samples*. Electrophoresis, 2016. **37**(5-6): p. 826-833.
50. Drouin, N., Rudaz, S., and Schappler, J., *Dynamic-Electromembrane Extraction: A Technical Development for the Extraction of Neuropeptides*. Anal. Chem., 2016. **88**(10): p. 5308-15.
51. Balchen, M., Jensen, H., Reubsæet, L., and Pedersen-Bjergaard, S., *Potential-driven peptide extractions across supported liquid membranes: Investigation of principal operational parameters*. J. Sep. Sci., 2010. **33**(11): p. 1665-1672.

52. Balchen, M., Gjelstad, A., Rasmussen, K.E., and Pedersen-Bjergaard, S.,  
*Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane.* J.  
Chromatogr. A, 2007. **1152**(1): p. 220-225.

## 8 Vedlegg

### 8.1 Modellpeptider som ikke lot seg ekstrahere

Glu-glu-leu, neurotensin 1-8, neurotensin 1-6, vasopressin og oksytocin var også blant modellpeptidene som ble undersøkt. Peptidene er ikke inkludert i selve oppgaven, da oppnådde ekstraksjonsutbytter var fra 0-2% ved alle ekstraksjonsbetingelsene, foruten om oksytocin. Oksytocin er likevel blant peptidene som oppnådde lavest ekstraksjonsutbytter og høyest RSD-verdier ved alle ekstraksjonsbetingelser, og er derfor ikke inkludert i oppgaven. Det er verdt å merke seg at oksytocin oppnår sitt maksimale ekstraksjonsutbytte på 6-7%, ved ekstraksjon med følgende systemet:

- system F: karvakrol:NPOE (1:1) + 2 % DEHP ved 10 V (6%, RSD = 14 %)
- system A: kumarin: tymol (1:2) + 2 % DEHP ved 2 V (7 %, RSD = 13 %)
- system F: karvakrol:NPOE (2:1) + 1 % DEHP ved 3 V (7 %, RSD = 18 %)

### 8.2 Problemer som oppstod underveis

#### 8.2.1 Krypstrøm i systemet

Systemene hadde i utgangspunktet vist seg å være stabile ved gitte ekstraksjonsbetingelser. Underveis i noen av forsøkene ga systemene ustabil strøm, som økte som funksjon av tiden. Diskusjon med forskningsgruppen åpnet opp for flere årsaker til problemet. Blant disse var valg av vialer, tilstramming av vialene og bruk av nye vs. brukte vialer til ekstraksjon.

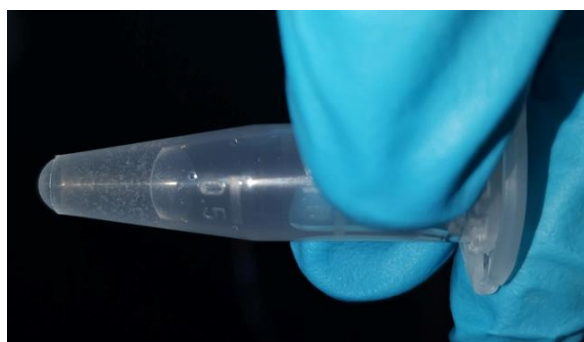
Det ble diskutert om valg av vialer kunne ha noe si for plutselig økt strøm i systemet. Overflaten av vialene ble undersøkt under mikroskop, hvor vialene med glattest og jevnest overflate ble tatt ut til ekstraksjon. I tillegg til dette ble vialene skrudd godt sammen før ekstraksjonen startet. Disse tiltakene ga stabil strøm i systemene igjen. Antallet vialer var begrenset i utgangspunktet. Det gjorde det vanskelig å velge de fineste vialene for hver ekstraksjon i videre forsøk, da dette ville resultert i mye tid brukt til vasking og avdamping av vialer i varmeskap mellom ekstraksjonene. Ved videre forsøk ble vialene fremdeles skikkelig skrudd sammen, og strømmen holdt seg stabil i systemene. Viktig når man strammer til vialene at polypropylenmembranen ikke krølles, da dette kan gi ustabil strøm. Mulig årsak til stabil strøm med tilstrekkelig strammet vialer, er redusert sannsynlighet for krypstrøm i systemet. Krypstrøm oppstår som følge av at strømmen velger den korteste og raskeste veien i systemet, og kan gi opphav til ustabil og mindre reproducerbart system.

Ettersom at alle vialene tilgjengelig allerede var brukt, var det vanskelig å sjekke om valg av nye eller brukte vialer hadde noe å si for hvordan strømmen går i systemet under ekstraksjon. Tonje Gottenberg Skaalvik, stipendiat ved St. Olavs hospital (Trondheim, Norge), undersøker dette videre ved å få tilsendt nye markerte vialer. Ved å markere vialene blir det lettere å skille donor- og akseptorvialene fra hverandre, samtidig som man lettere kan loggføre hva vialene er blitt brukt til.

### **8.2.2 Fast stoff synlig i akseptor**

Etter endt ekstraksjon med system F ble det til tider observert fast stoff i akseptorfasen. Det er usikkert hva dette kan skyldes. Mulige forklaringer er at komponentene i SLM har lekket ut i akseptorfasen.

Det er uønskelig å injisere en slik løsning i LC-MS/MS, i fare for å skape blokada i systemet. Når dette ble observert, ble akseptor pipettert over i et Protein LoBind® eppendorfrør og sentrifugert. Etter endt sentrifugering ble supernatanten pipettert ut. Dersom supernatanten var en klar væske, ble den overført til vial med innsats og injisert på LC-MS/MS.



*Bilde 3: en akseptorfase med partikler etter endt ekstraksjon og før sentrifugering*

### **8.2.3 NPOE til viskositetsmålinger**

Viskositetsmålingene av væskemembranene ble utført etter alle forsøkene var utført. Det ble lagd nye væskemembraner til målingene, ettersom at gjenværende mengde av væskemembranene ikke var nok til å utføre målingene. I tillaging av væskemembranen i system F var det tomt for NPOE fra Sigma Aldrich, og NPOE fra TIC ble benyttet. CAS nummer var 37682-29-4, og var likt fra begge produsentene. Ettersom at viskositetsmålingene kun ble utført for å bevise teorien om at system E var mer viskøst enn system F, ble kjemikaliene sett på som likeverdige for dette formålet.