

Rapport nr. 200

**Forbedret analyse-  
metodikk for peptid-  
størrelsesfordeling i  
marine protein-  
hydrolysater**

*Marked*

## RAPPORTTITTEL

**Forbedret analysemetodikk for peptidstørrelsesfordeling i marine proteinhydrolysater**

RAPPORTNUMMER	200	PROSJEKTNUMMER	4650
UTGIVER	RUBIN	DATO	Desember 2011

### UTFØRENDE INSTITUSJONER

#### **Nofima Ingrediens**

Kjerreidviken 16, 5141 Fyllingsdalen

Kontaktpersoner: Jarle Wang-Andersen ([jarle.wang-andersen@nofima.no](mailto:jarle.wang-andersen@nofima.no)) og Bjørn Ole Haugsgjerd ([bjorn.ole.haugsgjerd@nofima.no](mailto:bjorn.ole.haugsgjerd@nofima.no))

### SAMMENDRAG OG KONKLUSJONER

Peptidstørrelsesfordeling er en helt sentral parameter for karakterisering av proteinhydrolysat og er dessuten svært viktig for optimalisering av hydrolyseprosessen. Den analysemetoden som brukes i dag er for unøyaktig og fører til at produsenter av proteinhydrolysat ikke har kan drive prosessen optimalt. Den gir også begrensninger på deklarasjon og salg av produktene. Metoden omfatter et stort målerområde (1 000 – 60 000 Dalton), som riktignok gir et godt bilde på den totale distribusjonen, men for liten nøyaktighet både i det nedre og øvre måleområdet.

Nofima Ingrediens igangsatte starten av 2010 et prosjekt for utvikling, optimalisering og validering av ny forbedret analysemetodikk for måling av peptidstørrelsesfordeling ved bruk av HPLC-SEC (Size Exclusion Chromatography). Metodikken skulle gi et bedre estimat med lavere måleusikkerhet for molekylvektfordelingen, også for måling av de mindre molekylvektene. Prosjektet omfattet uttesting av ulike analyseparametre for et utvalg av kolonner og standarder, og i tillegg ulike former for deteksjon.

Av i alt 4 kolonner som ble undersøkt var det Superdex Peptid kolonnen ved 30% acetonitril, 0,1 % TFA som viste best lineære forhold innenfor måleområdet mellom 20 000 og 200 dalton. Superdex peptid metoden viser seg å være robust ift. bytte og skifte av eluent, samt svært reproducerbar. Riktigheten til metoden ble bestemt ved analyse av standarder samt sammenligning med andre analyser.

Måleusikkerheten er relativt stor som forventet for denne metodikken, men likevel lavere enn de metodene man sammenlignet innenfor det aktuelle måleområdet. Superdex Peptid metoden var det beste valget for å bestemme molekylvektfordeling for forbindelser < 20 000 Da og for de naturlige prøvene som inngikk i forsøkene, var denne metoden det beste alternativet. Dersom fordelingen er ønskelig for større peptider/proteiner er det andre kolonner som vil fungere bedre.

Det er også et klart pluss med metoden at man kan isolere de ulike fraksjonene etter separering på kolonnen og dampe av alle bestanddeler i den mobile fasen for deretter gå videre med andre teknikker (ionebytterkromatografi, revers-fase HPLC) der man kan få nye separasjoner og mulighet til å identifisere de ulike peptider. (Dette er forskjellig fra andre systemer med buffer og salttilsetninger som ikke fordampes).

# Rapport

ISBN: 978-82-7251-925-3 (trykt) ISBN: 978-82-7251-926-0 (pdf)	Rapportnr: 43/2011	Tilgjengelighet: <b>Åpen</b>
--	-----------------------	---------------------------------

<i>Tittel:</i> <b>Forbedret analysemetodikk for peptidstørrelsesfordeling i marine proteinhydrolysater</b>		<i>Dato:</i> 22. november 2011
		<i>Antall sider og bilag:</i> 30 + 3
<i>Forfatter(e):</i> Jarle Wang-Andersen og Bjørn Ole Haugsgjerd		<i>Prosjektnr.:</i> 20902
<i>Oppdragsgiver:</i> RUBIN		<i>Oppdragsgivers ref.:</i> Sigrun Bekkevold
<i>Tre stikkord:</i> Hydrolysater, peptid størrelsesfordeling		
<i>Sammendrag:</i>  Ved sammenligning av de ulike kolonnene var det Superdex Peptid kolonnen ved 30% acetonitril, 0,1 % TFA som viste best lineære forhold innenfor måleområdet mellom 20 000 og 200 dalton.  I alt fire ulike systemer ble vurdert:  1. Superdex Peptide 10/300 (ID: 10 mm, L: 300 mm) GL, GE Healthcare, Kolonnemateriale: Sfærisk komposittmateriale av kryssbundet agarose og dextran. Forkolonne i samme materiale.  2. PolySep-GFC-P2000, Phenomenex. Kolonnemateriale: Polyhydroxymethacrylate. Forkolonne i samme materiale.  3. PL aquagel-OH 30, 8µm, Varian. Kolonnemateriale: OH-, polyhydroksidoverflate, mer presist ikke oppgitt fra leverandør. Forkolonne i samme materiale  4. Gel-kolonne TSK G2000 SW 7,5 .mm x 300 mm, Tosoh Bioscience. Kolonnemateriale: Silika. Forkolonne i samme materiale.  Ulike metoder ble sammenlignet ved bruk av standarder, syntetiske homologe peptidserier og reelle prøver fra norsk marin ingrediensindustri.		

# Innhold

<b>1</b>	<b>Innledning .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Problemstilling .....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Eksperimentelt.....</b>	<b>3</b>
3.1	Kjemikalier, reagenser og prøvemateriale .....	4
3.2	Instrumentering .....	4
3.3	Analyser .....	5
3.4	Metode .....	5
<b>4</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>7</b>
4.1	PolySep-GFC .....	7
4.2	PL aquagel-OH 30 .....	9
4.3	Superdex Peptide 10/300.....	9
4.4	Sammenligning Superdex Peptide og TSK G2000 SW på reelle prøver .....	18
<b>5</b>	<b>Oppsummering og konklusjoner .....</b>	<b>29</b>
<b>6</b>	<b>Kilder .....</b>	<b>30</b>
	<b>Appendix</b>	

# 1 Innledning

Bestemmelse av peptidstørrelser er opplagt en helt sentral parameter for karakterisering av ulike protein/peptid fraksjoner og produkter fra kjemisk/enzymatisk hydrolysert protein av marin opprinnelse. Informasjonen om fordelingen er avgjørende både med hensyn til handel og lovverk. Fiskeproteinhydrolysat (FPH) brukes i dag først og fremst som en viktig fôringrediens, men FPH fremstilt ved bruk av enzymer har også store potensialer innefor human ernæring. Flere marine peptider er særlig interessante i denne sammenhengen fordi de er bioaktive og kan for eksempel virke immunstimulerende og blodtrykksenkende.

## 2 Problemstilling

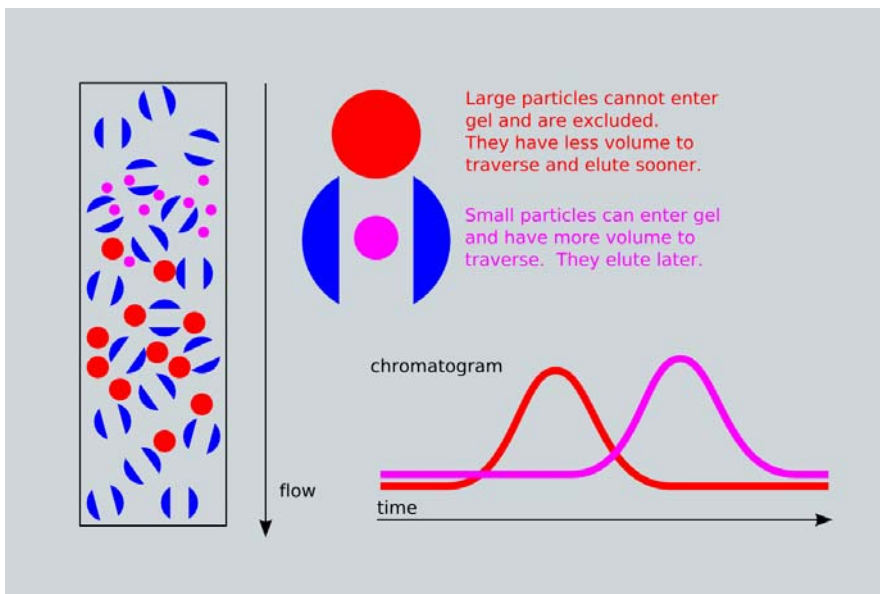
I forhold til problemstillinger som produsenter av marine proteinhydrolysater, fiskegelatin og ensilasje står ovenfor i dag, er ikke nødvendigvis dagens metoder selektive nok. Årsaken til dette er blant annet at metoder i bruk ofte omfatter et stort målerområde som riktignok gir et godt bilde på den totale distribusjonen, men for liten nøyaktighet både i det nedre og øvre måleområdet. Konsekvensene er at produsenter av fiskeproteinhydrolysat (FPH) ikke har tilstrekkelig informasjon til å drive prosessoptimalisering. Høyere måleusikkerhet er en naturlig følge av lav selektivitet, som umiddelbart vanskeliggjør produksjon etter spesifikasjoner.

Selv om det er publisert mye som omhandler bruk av HPLC Size Exclusion Chromatography (SEC) for studier av proteiner, er det relativt få publikasjoner der denne teknikken er benyttet på de lavere molekylvektene. En av årsakene til dette er sannsynligvis at peptider sammenlignet med større proteiner er mer utsatt for interaksjoner med kolonnematerialet. Under ideelle betingelser skal retensjon i SEC utelukkende basere seg på peptidenes størrelse/molekylvekt/volum, og ikke kjemisk interaksjon med stasjonærfasen som i vanlig kromatografi. Peptider har liten eller ingen tertiær struktur, noe som gjør at aminosyrenes sidekjeder er mer eksponert for binding. Tidligere var det heller ikke kommersielle kolonner tilgjengelig som var like egnet til peptider som proteiner, men nå finnes det stasjonær faser kommersielt tilgjengelig som i teorien kan gi bra oppløsning i molekylvektsområde fra noen få hundre til noen få tusen Da.

Innenfor analytisk kjemi er det feil å omtale en metode for gal og en annen for riktig. Alle metoder har en måleusikkerhet ( $\pm x\%$ ) assosiert til selve målestørrelsen som beskriver den grad av tilfeldig og systematiske feil som knytter seg til målingen, og selve målingen uansett parameter vil alltid være et estimat, men måleusikkerheten sier noe om selve kvaliteten til metoden og hvor godt dette estimatet kan sies å være. Erfaringsmessig vil reproduserbarheten for selve kromatograferingen være svært god forutsatt at man benytter betingelser ift. trykk og eluentsammensetning som kolonnen er laget for. Atskillig større del av måleusikkerheten er knyttet til riktigheten ved kromatografering av reelle prøver. Prosjektet bygger på den kunnskapen vi allerede har innfor dette feltet, men der vi nå tar utgangspunkt i å bruke de siste nye mulighetene som finnes i dag for å få mest mulig informasjon fra et HPLC-SEC system

### 3 Eksperimentelt

Med utgangspunkt i Size Exclusion Chromatography (SEC) var målet å komme frem til metodikk som separerer peptider med sterk avhengighet av deres størrelse og i så liten grad som mulig er avhengig av aminosyrenes sekvens. Prinsippet for kromatograferingen er at molekyler separeres etter deres størrelse. Matriksen i kolonnen består av små porøse perler/strukturer. Forbindelser som er små nok til å gå inn i strukturene får en lang vandringsvei og går saktere gjennom kolonnen. Forbindelser som ikke kan gå inn i disse hullene, blir vasket (eluert) først ut av kolonnen. Dette betyr at de største molekylene vil ha kortere vandringstid (retensjonstid, RT) enn de små molekylene, (Figur1). Det skiller mellom to typer SEC: Gel Filtration Chromatography (GFC) og Gel Permeation Chromatography (GPC). GFC er teknikken som benyttes for peptider og andre vannløslige forbindelser og som er benyttet i denne studien, mens GPC er kromatografering med organiske løsningsmidler som mobilfase. I litteraturen brukes disse begrepene litt om hverandre. Det finnes mange produsenter av SEC-kolonner uten at det nødvendigvis er vesentlige forskjeller i kolonnemateriale. De vanligste kolonnematerialene (stasjonære fase) som benyttes er polyacrylamide, dextran, agarose, silika eller kryssbundet polystyren.



Figur 1 Illustrasjon fra Wikipedia

Peptider er ulike sammenlignet med store proteiner på den måten at nesten alle sidegruppene fra de ulike aminosyrene i peptidet er posisjonert tilgjengelig for ulike interaksjoner med kolonnematerialet. "Ikke-størrelse" effekter som vi ønsker å minimere er: Form, ioniske interaksjoner og hydrofobiske interaksjoner. Ved kromatografering av definerte standarder med kjente kjedelengder kan man summere antall negative ladninger fra aminosyrer med syre side kjeder asparaginsyre (Asp) og glutaminsyre (Glu) samt syregruppen på enden av peptidet C-terminal  $-COOH$ . Tilsvarende kan man summere positive ladninger fra basiske aminosyrene arginin, lysin, histidin og N-terminal  $-NH_2$ . Denne summasjonen vil bestemme om du har et surt eller basisk peptid. For å undertrykke ioniske interaksjoner kan man for eksempel bruke eluenter ved veldig lav pH eller for eksempel

tilsette salt til vandige buffersystemer. Hydrolysater basert på marint råstoff vil forventes å ha et høyt innhold av essensielle aminosyrer der flere av disse er hydrofobe; tryptofan (Trp), isoleucin (Ile), leucin, Fenylalanin (Phe), Metionin (Met), valin (Val). I vanlige eluentsystemer vil et organisk løsningsmiddel effektivt kunne undertrykke de hydrofobiske interaksjonene som disse aminosyrene kunne tenkes å ha til den stasjonære fasen.

I denne rapporten er ulike kromatografiske systemer testet ut og sammenlignet ved bruk av kjente standarder, syntetiske peptidstandarder og reelle prøver. Ved valg av kolonner må man gjøre et valg ift. det størrelsesområdet man ønsker å vurdere. Med utgangspunkt i tidligere analyser av hydrolysater basert på marint råstoff fokuserte vi på å sammenligne kolonner som ville kunne fungere også for de mindre peptidene. I tillegg valgte vi kolonner av ulikt kolonnemateriale.

### **3.1 Kjemikalier, reagenser og prøvemateriale**

Syntetisk peptidstandard ("Alberta, A1 til A5") frysetørket, ble anskaffet fra Alberta Peptide Institute (Departement of Biochemistry, University of Alberta). Samtlige resterende peptidstandarder ble kjøpt av Sigma-Aldrich. Metanol, acetonitril og trifluoreddiksyre var av HPLC-kvalitet og vannet var renset.

I alt seks egnede og med hensikt ulike naturlige prøveemner ble gitt fra aktuelle norske produsenter av hydrolysater basert på marint råstoff:

FPH av lakseavskjær, pulver: Råstoffet er basert på slo/avskjær i forholdet 60/40.

Collagen hydrolysat, pulver

1-Rekeskall hydrolysat, pulver, 2-Rekeskall hydrolysat, pulver og 3-Rekeskall hydrolysat, pulver. Disse tre prøvene er fremstilt under ulike betingelser ved enzymatisk hydrolyse.

FPH, Tørrstoff ~60%

### **3.2 Instrumentering**

Det kromatografiske systemet besto av en Agilent Technologies 1200 Series HPLC instrument med degassing og 15°C kjølt autosampler. Styring av instrumentet og prosessering av data ble utført med EZChrom Elite Software system. Deteksjon ble utført med UV detektor tilhørende Agilent Technologies 1200 Series og en ESA Corona® Plus Charged Aerosol Detector (ESA Biosciences, Inc., Chelmsford, U.S.A.) seriekoblet til denne.

Kolonner:

1. Superdex Peptide 10/300 (ID: 10 mm, L: 300 mm) GL, GE Healthcare, Kolonnemateriale: Sfærisk komposittmateriale av kryssbundet agarose og dextran. Forkolonne i samme materiale.
2. PolySep-GFC-P2000, Phenomenex. Kolonnemateriale: Polyhydroxymethacrylate. Forkolonne i samme materiale.



3. PL aquagel-OH 30, 8µm, Varian. Kolonnemateriale: OH-, polyhydroksidoverflate, mer presist ikke oppgitt fra leverandør. Forkolonne i samme materiale
4. Gel-kolonne TSK G2000 SW 7,5 .mm x 300 mm, Tosoh Bioscience. Kolonnemateriale: Silika. Forkolonne i samme materiale.

### 3.3 Analyser

Samtlige kolonner ble testet ved flow-rate på 0,5 ml/min og ved 214 nm UV deteksjon bortsett fra Gel-kolonne TSK G2000 SW som ved kromatografering av prøveemner ble detektert ved 220 nm. Injeksjonsvolumet var 20µl og kolonnen stod i romtemperatur. Eluentsammensetningen for de ulike systemene ble valgt ut fra anbefaling fra produsent. Felles for kolonne 1. til 3. er at de ble testet med 0,1% TFA i en løsning med et organisk løsningsmiddel, mens bruk av kolonne 4. er en silikakolonne der det ble benyttet en fosfatbuffer.

Råprotein, Kjeldahl (Nx6.25):Nofima A01 (Nofima accredited method), ISO 5983-2

Vannløselig protein: Nofima A20 (Nofima accredited method), intern metode for ekstraksjon, kvantifisering som for ISO 5983-2

Råprotein, Forbrenningsmetode (Dumas): Nofima A25 (Nofima accredited method), ISO 16634-1.

Hydrolysegrad ved O-Phthaldialdehyd: Nofima A89, Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C. (2001) Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. Journal of Food Science Vol. 66, No.5, 642-646

Totale aminosyrer: Nofima A42. Steven A. Cohen and Dennis P. Michaud, Analytical Biochemistry 211 (1993).

Frie aminosyrer: Nofima M04 Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A., Tarvin, T. L. and Frost, B. (1987), J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70, 241-247

Vann/tørrstoff: Nofima A04 (Nofima accredited method), ISO 6496

### 3.4 Metode

Mant *et.al* (1987) beskriver en serie med fem homologe peptidstandarder med 10-50 aminosyrer som er sensitive for ikke-størrelseseffekter i SEC. Denne er foreslått som et felles sett av standarder ved utvikling av SEC-metoder. Så langt vi kan se i litteraturen er det ikke beskrevet bruk av disse peptidene av andre forfattere. Vi kan heller ikke se at den er brukt på kolonnene i vårt utvalg, med unntak av TSK G2000 SW. Peptidene omtales videre som Alberta peptid A1 til A5 (Institute for Biomolecular Design, University of Alberta, Canada). Peptidene er designet som en polymer serie av fem syntetiske peptid standarder. Ac-(G-L-G-A-K-G-A-G-V-G)<sub>n</sub>-amide, n= 1 til 5. Dette gir peptidstandarder med 10, 20, 30, 40 og 50 aminosyrer, tilsvarende ~800 til 4000 dalton. Rekken har økende basisk karakter med antall lysin (K) fra 1 til 5 noe som gjør de følsomme ift. anionisk karakter av kolonnen,

hydrofobisiteten øker med størrelsen slik at dette også må tas hensyn til. I tillegg har peptidene et høyt innhold av glycin for å minimere sekundære strukturer. Pga. peptidenes basiske karakter er de godt løselige i de sure vandige løsningsmidlene som vi har benyttet. Siden Albertastandardene kun dekker et begrenset måleområde har vi også analysert en rekke andre standarder. Ved ideelle SEC forhold vil et plot av logaritmen til molekylvekten ( $\log_{10}M_w$ ) mot retensjonstiden gi en lineær sammenheng. Ikke-lineær sammenheng vil enten si at den aktuelle forbindelsen er utenfor det måleområdet som gir seleksjon eller at forbindelsen på en eller annen måte har en affinitet til kolonnemateriale. Ved etablert lineær sammenheng er det mulig å beregne differansen i  $M_w$  for erfart og teoretisk verdi for de ulike standardene. Riktig kvantifisering av de ulike peptid størrelsesfraksjonene baserer seg på målingen av bølgelengdeabsorbansen til peptidbindinger (amid binding). Absorbansen for peptidbinding vil være fra 190-230 nm. Basert på tidligere publikasjoner og anbefalinger benytter vi 214 nm. I en ukjent kompleks prøvematriks vil det kunne være flere forbindelser som har sitt absorbansmaksimum annet enn ved 214 nm. For å vurdere signalresponsen ut fra helt andre målekriterier, ble det seriekoblet en universaldetektor til UV-detektoren. Deteksjonen utføres ved bruk av en Charged Aerosol Detector (CAD), som består av en nebulizer der mobilfasen fordampes før aerosolpartiklene lades og spenningen blir målt. CAD detekterer kun ut fra masse og er helt uavhengig av kromofor. Deteksjonen for en CAD er riktignok avhengig av eluentsammensetningen, men siden denne ikke varierer i SEC-systemer (isokratisk) er detektoren svært egnet forutsatt at eluentsammensetningen er kompatibel.

## 4 Resultater

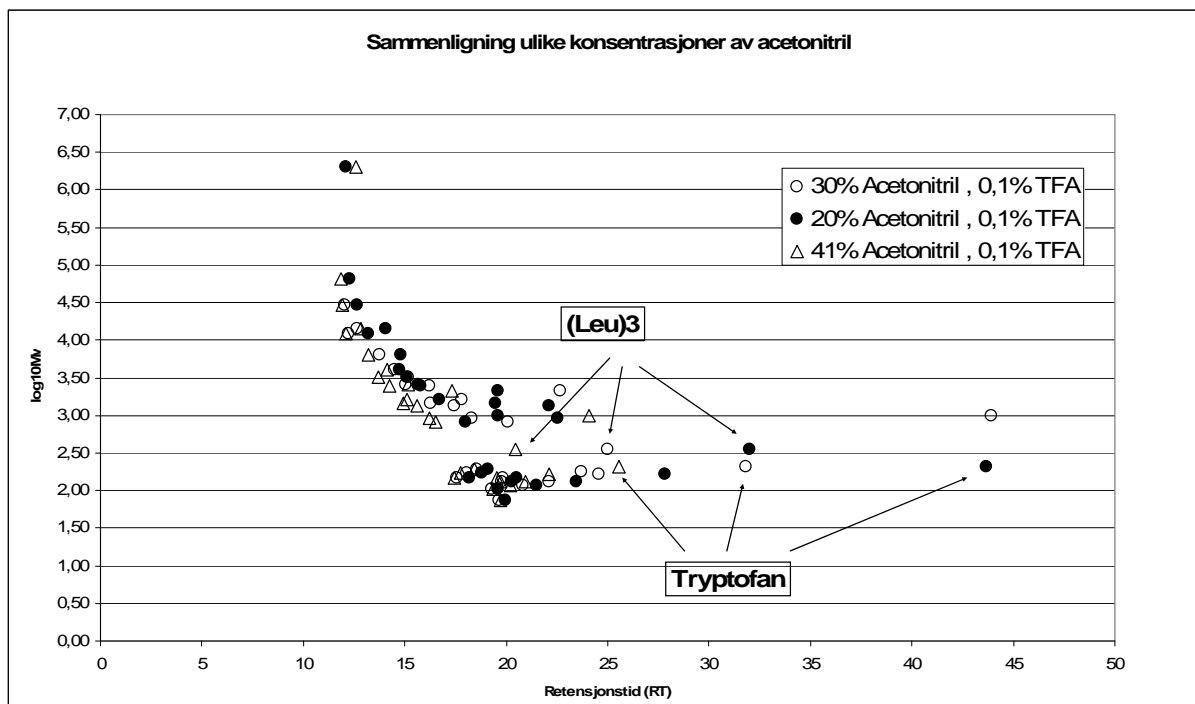
### 4.1 PolySep-GFC

Leverandørens anbefalinger og litteraturen ga ingen svar på de beste kromatografiske betingelsene med denne kolonnen ift. innblandingsnivå av organisk løsemiddel. Etter en forsiktig innblanding og kondisjonering av kolonnen ved 20% ACN ble dette først forsøkt med standarder gitt i tabell 1. 20% Acetonitril (ACN) i 0,1 % Trifluoreddiksyre (TFA). Flow var 0,5 ml/min. Normalt trykk under kromatografering var ~ 40 bar.

Tabell 1 Standarder ved test av PolySep-GFC-P2000

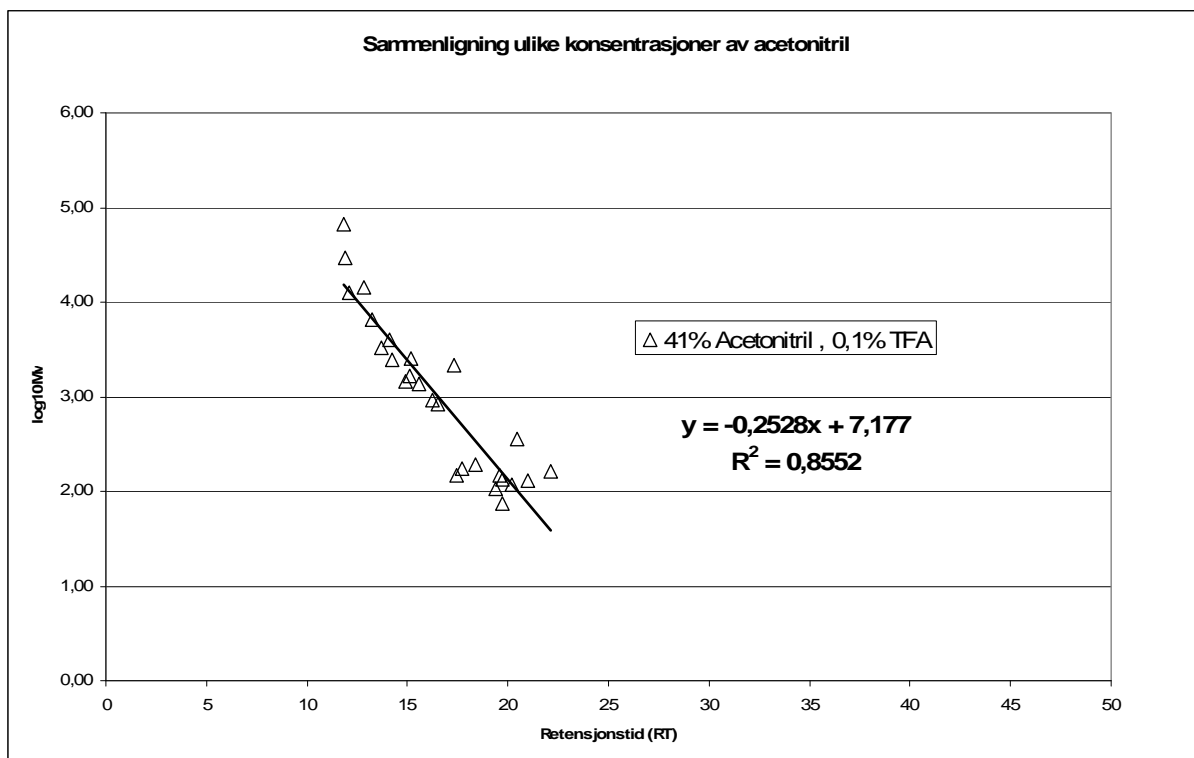
Standard:	Mw	log <sub>10</sub> Mw
Blue dextran	2000000	6,30
Bovine albumin	66000	4,82
Carbonic anhydrase	29000	4,46
Lysosyme	14300	4,16
Cyt C	12400	4,09
Aprotonin	6500	3,81
Alberta 5	4057,22	3,61
Alberta 4	3249,38	3,51
Insulin A	2531,64	3,40
Alberta 3	2441,54	3,39
Gastrin I	2126,28	3,33
Alberta 2	1633,7	3,21
Polymyxin	1470	3,17
Substance P	1347,63	3,13
(Tyr)6	997,05	3,00
[Val 4]-Ang III	917,06	2,96
Alberta 1	825,86	2,92
(Leu)3	357,49	2,55
(Gly)3	189,17	2,28
Trp	204,23	2,31
Tyr	181,19	2,26
Arg	174,2	2,24
Phe	165,19	2,22
Glu	147,13	2,17
Lys	146,19	2,16
Asp	133,1	2,12
Leu	131,17	2,12
Val	117,15	2,07
Ser	105,09	2,02
Gly	75,07	1,88

Systemet ble sammenlignet økende tilsetninger av acetonitril fra 20 til 30 og 41 %.



Figur 2 Effekt av økende mengde av organisk løsningsmiddel er vist for Phenomenex kolonnen. Gjennomsnittlig retensjonstid avtok med økende mengde acetonitril. De avvikende resultatene skyldes hydrofobe forbindelser som tryptofan og (Leu)3. (Tyr)6 som i likhet med Trp og (Leu)3 er aromatisk var avvikende ved 30% innblanding

Figur 2 viser effekten av økende mengde organisk løsningsmiddel. Best tilpassning til en lineær sammenheng er ved størst innblanding av organisk løsningsmiddel som bidrar til å undertrykke de hydrofobiske interaksjonene med den stasjonære fasen. I figur 3 er korrelasjonen vist for det aktuelle måleområdet for denne kolonnen.



Figur 3 Polysep med 41% Acetonitril, 0,1% TFA

Korrelasjonen vist i figur 3 er ikke spesielt god, eller ikke sammenlignet med andre data (Irvine, G. B. (1997)). Vi valgte å teste andre kolonner før kromatografering av naturlige prøver

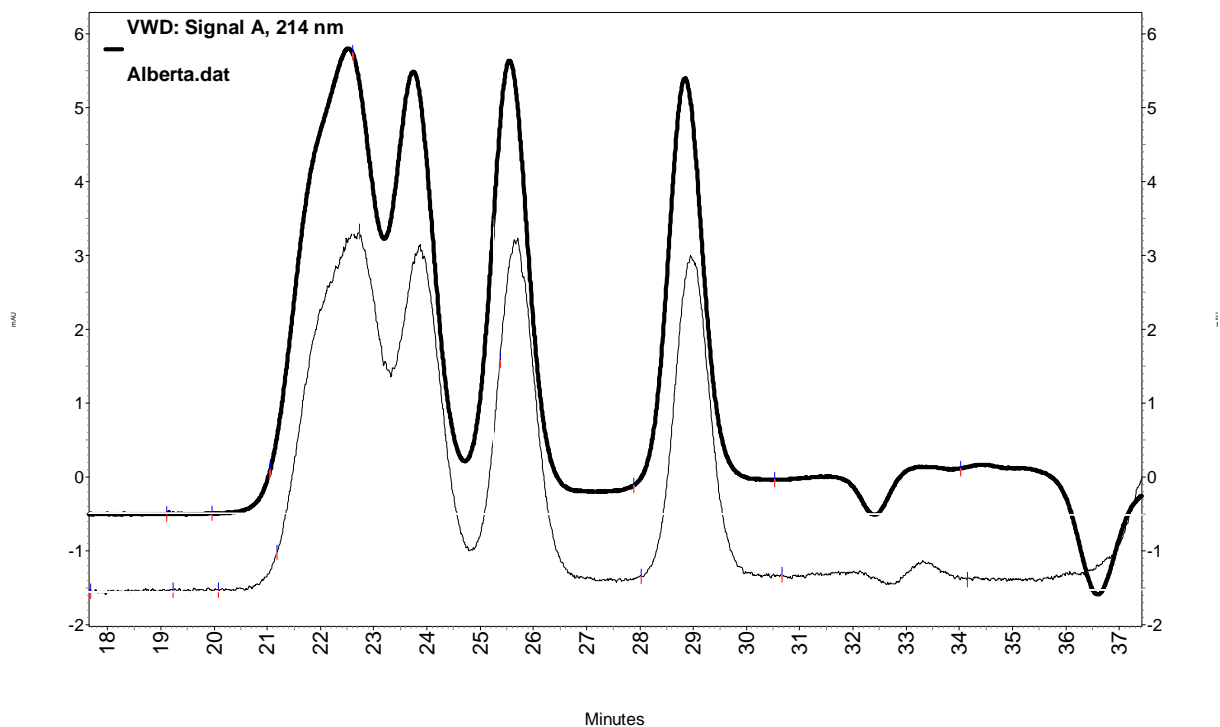
#### 4.2 PL aquagel-OH 30

Denne kolonnen viste seg å gi avvikende resultater ved de utprøvde betingelsene (30% metanol, 0,1% TFA), resultater er derfor ikke presentert.

#### 4.3 Superdex Peptide 10/300

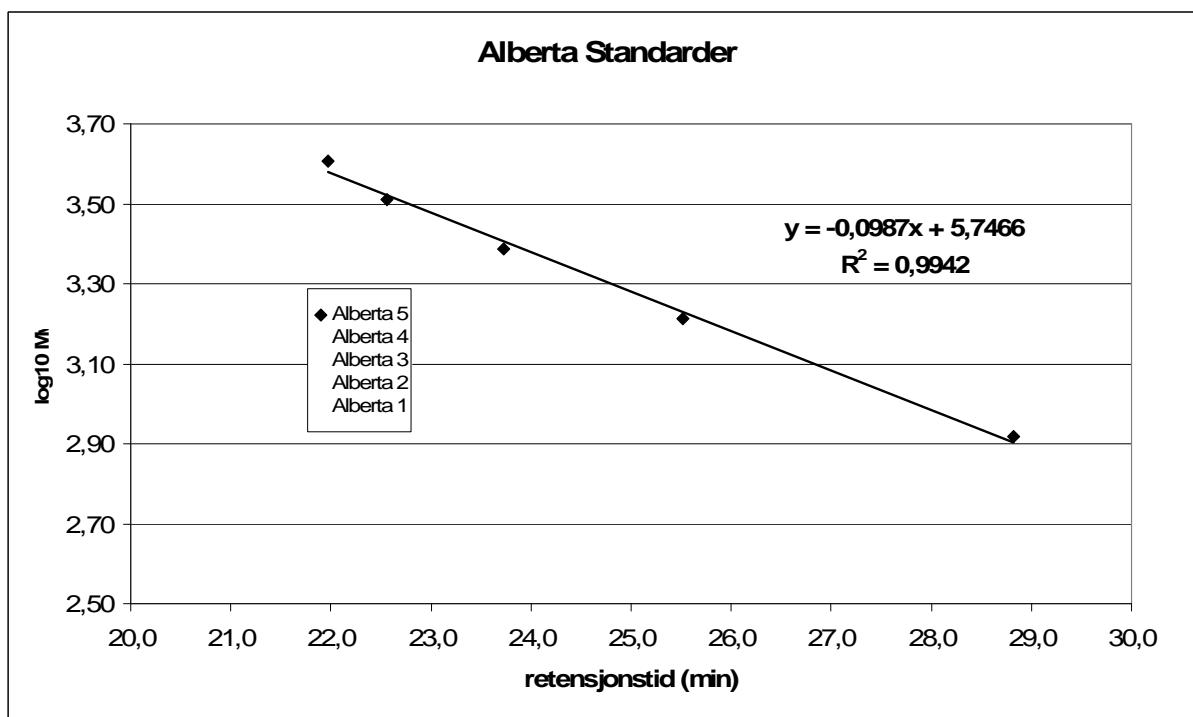
Kondisjonering av kolonnen ved 30% ACN i 0,1 % Trifluoreddiksyre (TFA). Flow var 0,5 ml/min. Normalt trykk under kromatografering var < 30 bar.

Analyse av alberta standardserie ved lav fortykning er vist i figur 4.



Figur 4 UV signal tykk linje, CAD-deteksjon smal linje

For Alberta-standardene forventet vi omtrent samme respons og arealene for de ulike peptidene var tilnærmet like. Massedeteksjon gir nøyaktig samme deteksjon som UV – deteksjon. Det var ikke toppseparasjon mellom alberta 4 og 5, men en knekk på kurven som angir  $R_t$  for Alberta 5. korrelasjonen er vist i figur 5.

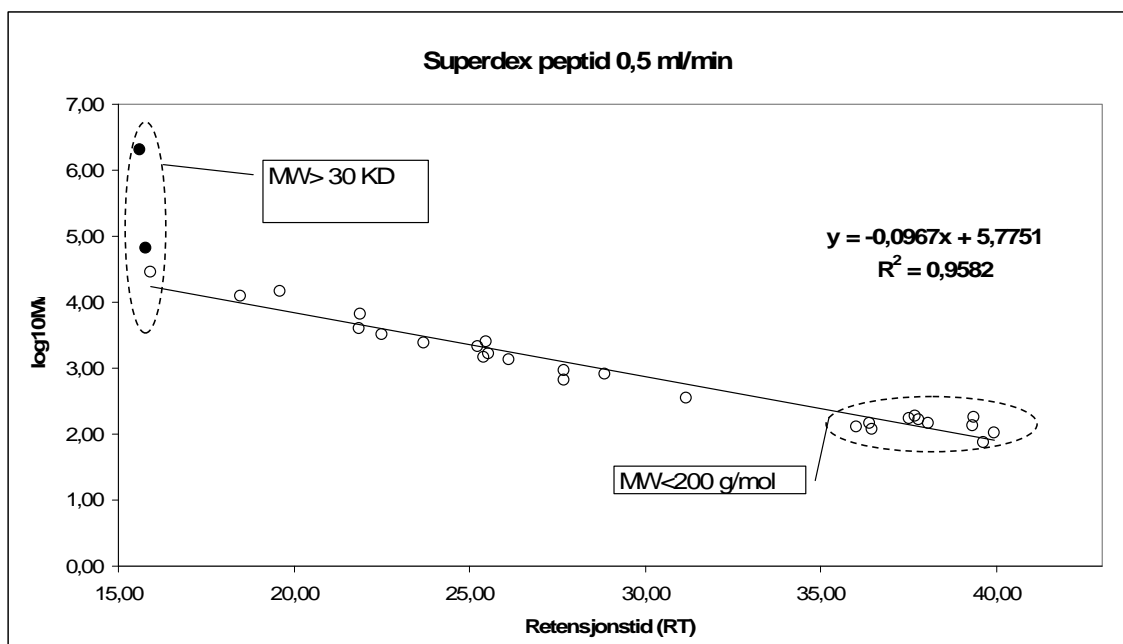


Figur 5 Korrelasjon for Alberta serien

Systemet ble testet ut med samme utvalg av standarder som for PolySep-GFC-P2000 i tillegg ble (Lys)5 med Mw 669,8 analysert. Oversikt over de gjennomsnittlige retensjonstider er vist i tabell 2.

Tabell 2 Standarder benyttet i uttesting av Superdex Peptid kolonne

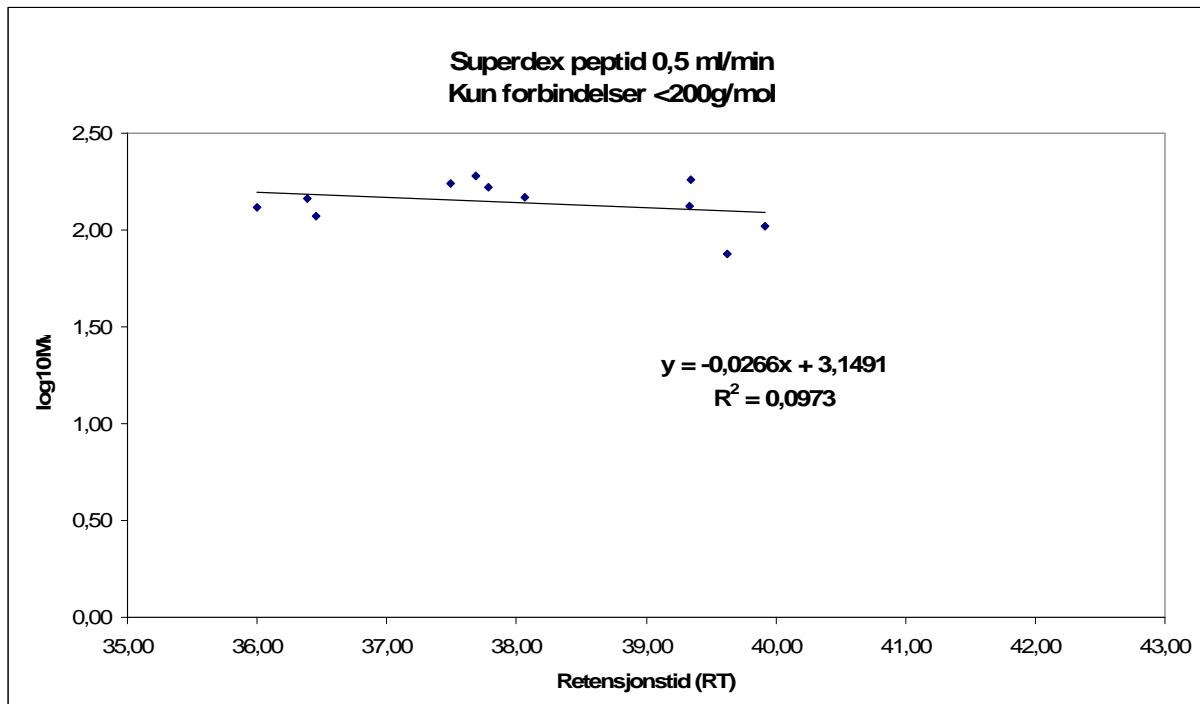
Standard:	Mw	log10 Mw	Rt
Blue dextran	2000000	6,30	15,60
Bovine albumin	66000	4,82	15,77
Carbonic anhydrase	29000	4,46	15,91
Lysosyme	14300	4,16	19,60
Cyt C	12400	4,09	18,47
Aprotonin	6500	3,81	21,89
Alberta 5	4057,22	3,61	21,86
Alberta 4	3249,38	3,51	22,50
Insulin A	2531,64	3,40	25,48
Alberta 3	2441,54	3,39	23,71
Gastrin I	2126,28	3,33	25,22
Alberta 2	1633,7	3,21	25,53
Polymyxin	1470	3,17	25,41
Substance P	1347,63	3,13	26,12
(Tyr)6	997,05	3,00	40,57
[Val 4]-Ang III	917,06	2,96	27,68
Alberta 1	825,86	2,92	28,84
(Lys)5	669,8	2,83	27,70
(Leu)3	357,49	2,55	31,17
(Gly)3	189,17	2,28	37,68
Trp	204,23	2,31	44,23
Tyr	181,19	2,26	39,35
Arg	174,2	2,24	37,50
Phe	165,19	2,22	37,79
Glu	147,13	2,17	38,06
Lys	146,19	2,16	36,38
Asp	133,1	2,12	39,33
Leu	131,17	2,12	36,00
Val	117,15	2,07	36,45
Ser	105,09	2,02	39,92
Gly	75,07	1,88	39,62



Figur 6 Samtlige standarder Superdex Peptid

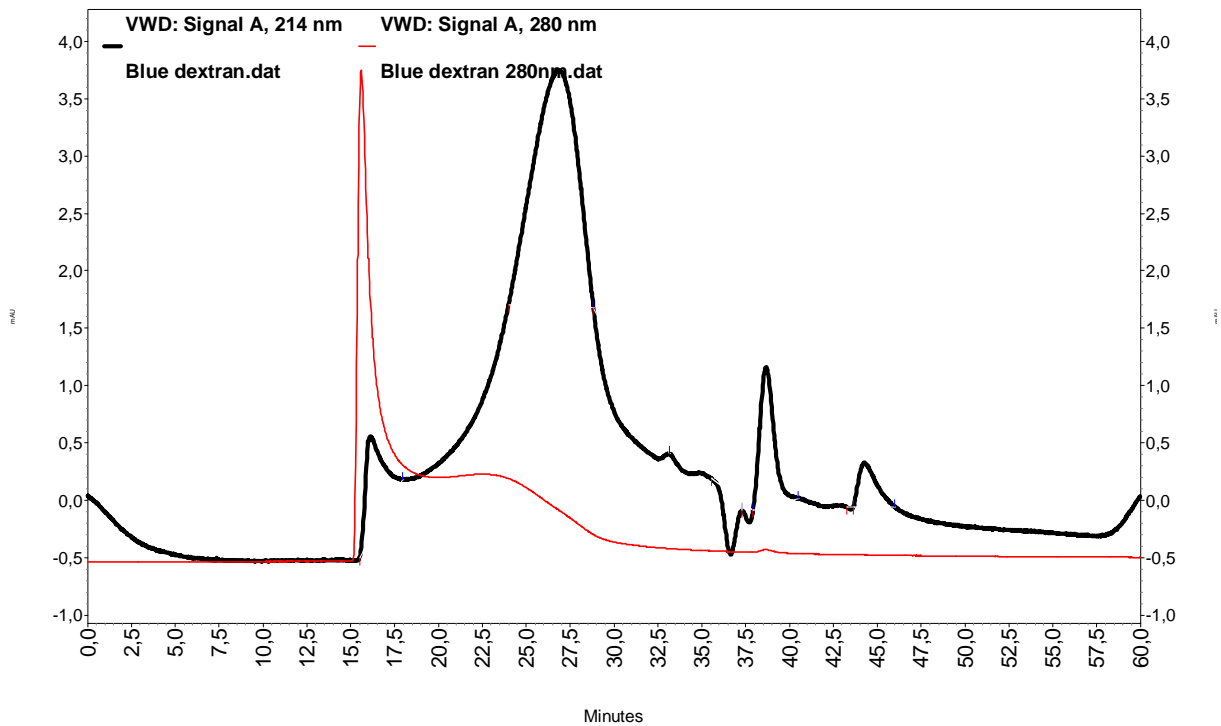
I alt 11 frie aminosyrer og andre forbindelser med lavere molekylvekt enn 200 D ga retensjon > 35 minutt, figur 6. Den relativt store spredningen for disse forbindelsene <200 ga ingen lineær sammenheng. Derfor er ikke mulig å bruke denne kolonnen for å identifisere og kvantifisere de ulike forbindelsene i denne gruppen, se figur 7. Spredningen skyldes ikke-størrelsesinteraksjoner. Størrelsesseparasjon ved disse lave Mw er eller ikke realistisk målsetning med SEC-metodikk, men resultatet viser likevel selektiv separasjon fra større molekyler. Tryptofan er ikke vist med har retensjon ved hele 44,2 min.





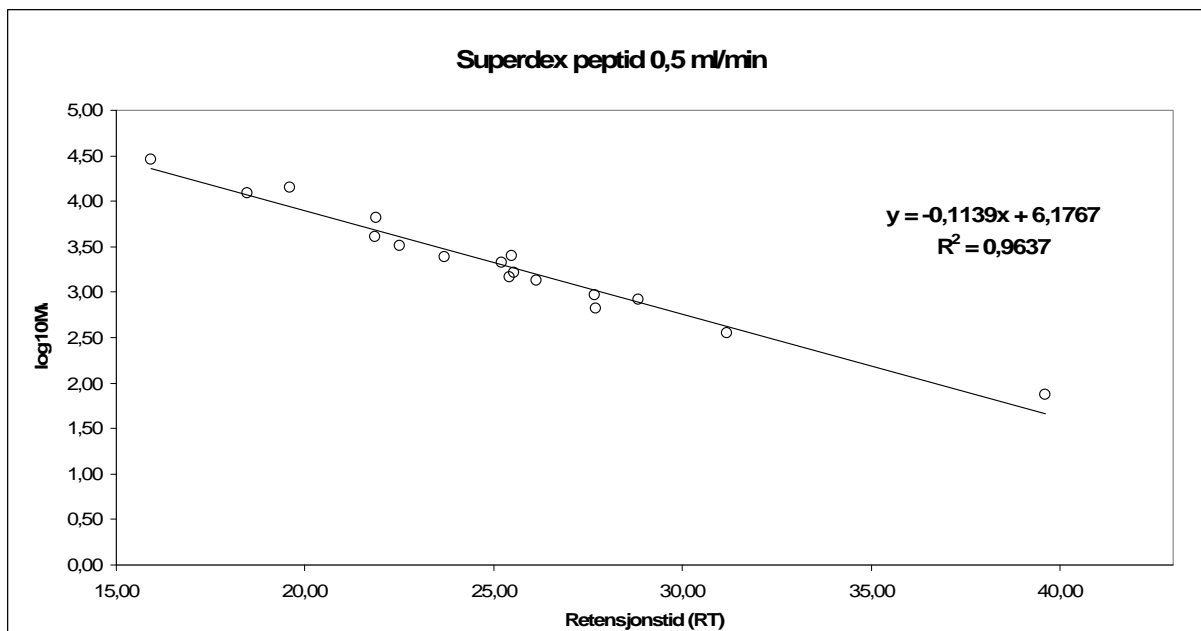
*Figur 7*

Det største molekylet som ble analysert på dette systemet var Blue Dextran med ca. 2 mill Dalton. Forbindelsen definerer "void volume" dvs. den blir minst hindret på vei gjennom kolonnen. Forbindelsen har dårlig respons ved 214 nm, men Rt ble bekreftet ved bruk av UV deteksjon ved 280 nm, fig 8. 280 nm benyttes i noen sammenhenger for å mer spesifikt detektere tyrosin og tryptofan som gir god absorbans ved denne bølgelengden pga. aromatisk ringstruktur. Den større toppen ved 214 nm deteksjon er sannsynligvis nedbrytningsprodukter, Blue Dextran er i romtemperatur lite stabilt. Bovine Albumin med ca. 66 000 Dalton ga noe lengre retensjonstid, men kolonnen er likevel uten mulighet til å bestemme spesifikk molvektsfordeling over 30 000 Dalton.



Figur 8 Kromatografering av Blue Dextran, ved 214 og 280 nm

Ved å vurdere det lineære måleområdet for denne kolonnen fikk vi følgende resultat, fig 9.



Figur 9 Erfart lineært måleområde for Superdex Peptid

Slik figur 6 tydelig viser er det ikke hensiktsmessig å la kalibreringskurven bli dominert av den tilfeldige størrelsesdistribusjonen for forbindelser <200 dalton. Glycin ble valgt pga. at dette er den minste aminosyren som inngår i systemet (75,07 g/mol), med lang elueringstid (stort elueringsvolum) og den forbindelsen som i litteraturen som regel benyttes for å definere  $V_{e\ max}$ . Vi analyserte glycin gjentatte ganger i dette systemet og fikk ved  $n=11$   $R_t=39,622 \pm 0,055$  std. Vi benyttet denne grafen til beregning av  $M_w$ -intervaller og med Gly som best representerer laveste punkt.

Ved beregning av molekylvektintervallene tas det hensyn til øvre og nedre grenser for metodens måleområde. Kvantifiseringen av de største forbindelsene vil ut fra vurderinger av respons ved 214 nm og deteksjon ved CAD gi tilsvarende resultat. Av dette kan vi si at selv om metoden er uspesifikk for  $M_w > 20\ 000$  D er andelen vel så riktig bestemt som de andre  $M_w$  intervallene.

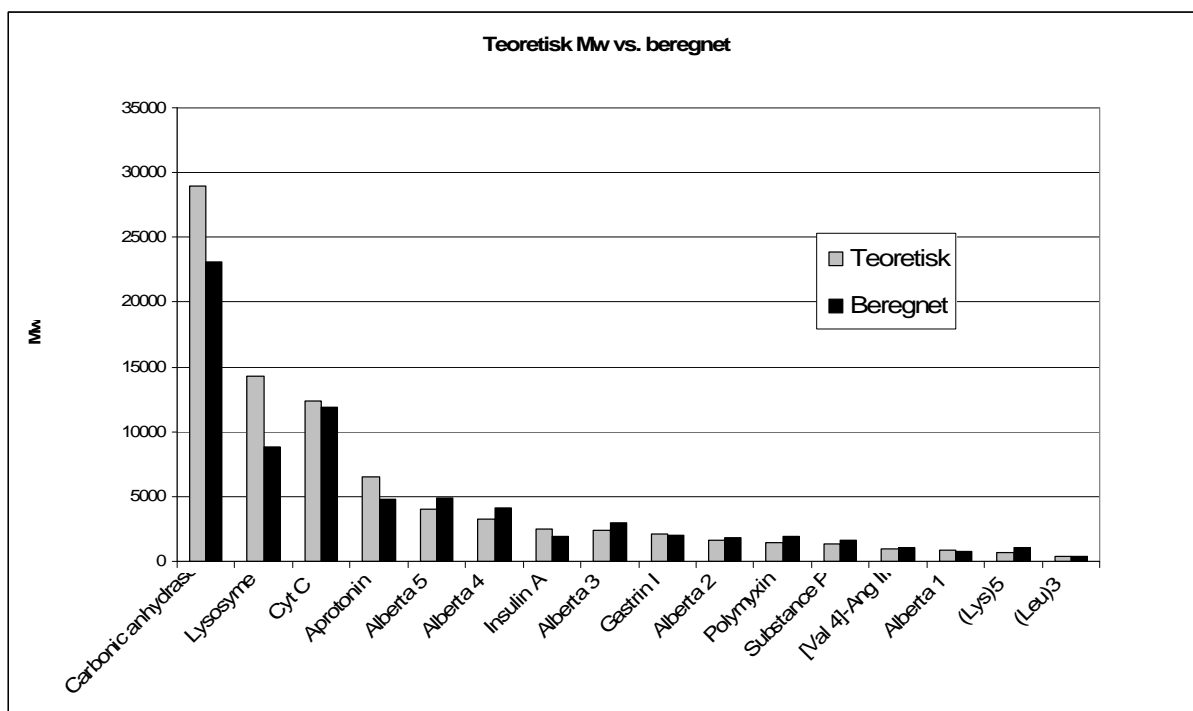
Reproduserbarheten for ulike standarder i hele kolonnens måleområde ble vurdert, tabell 3.

Tabell 3 Retensjonstid (RT) reproduserbarhet

Standard:	$M_w$	$\log_{10} M_w$	Snitt RT	RSD % RT	n =
Bovine albumin	66000	4,82	15,8	0,2	2
Carbonic anhydrase	29000	4,46	15,9	0,2	9
Lysosyme	14300	4,16	19,6	0,7	8
Cyt C	12400	4,09	18,5	0,7	9
Aprotonin	6500	3,81	21,9	0,8	3
Alberta 5	4057,22	3,61	21,9	0,7	15
Alberta 4	3249,38	3,51	22,5	0,5	15
Insulin A	2531,64	3,40	25,5	0,0	3
Alberta 3	2441,54	3,39	23,7	0,5	15
Gastrin I	2126,28	3,33	25,2	0,0	3
Alberta 2	1633,7	3,21	25,5	0,3	15
Polymyxin	1470	3,17	25,4	0,1	5
Substance P	1347,63	3,13	26,1	0,0	3
(Tyr)6	997,05	3,00	40,6	0,1	3
[Val 4]-Ang III	917,06	2,96	27,7	0,0	3
Alberta 1	825,86	2,92	28,8	0,2	15
Gly	75,07	1,88	39,6	0,1	11

Reproduserbarheten for dette systemet er akseptabel tatt i betraktning at gjentak er utført over lengre tidsperiode med tillaging og skifte av eluent, demontering som følge av annet bruk og ny oppstart og kondisjonering av kolonnen.

Den lineære sammenhengen for peptidstørrelsesfordeling er gitt etter en logaritmisk fordeling slik at selv små endringer i retensjonsstid kan få store utslag siden  $\log_{10}$  molekylvekten øker 10 ganger for hver enhet. Figur 10 viser sammenhengen mellom teoretisk og erfarte verdier for forbindelser over 357 dalton



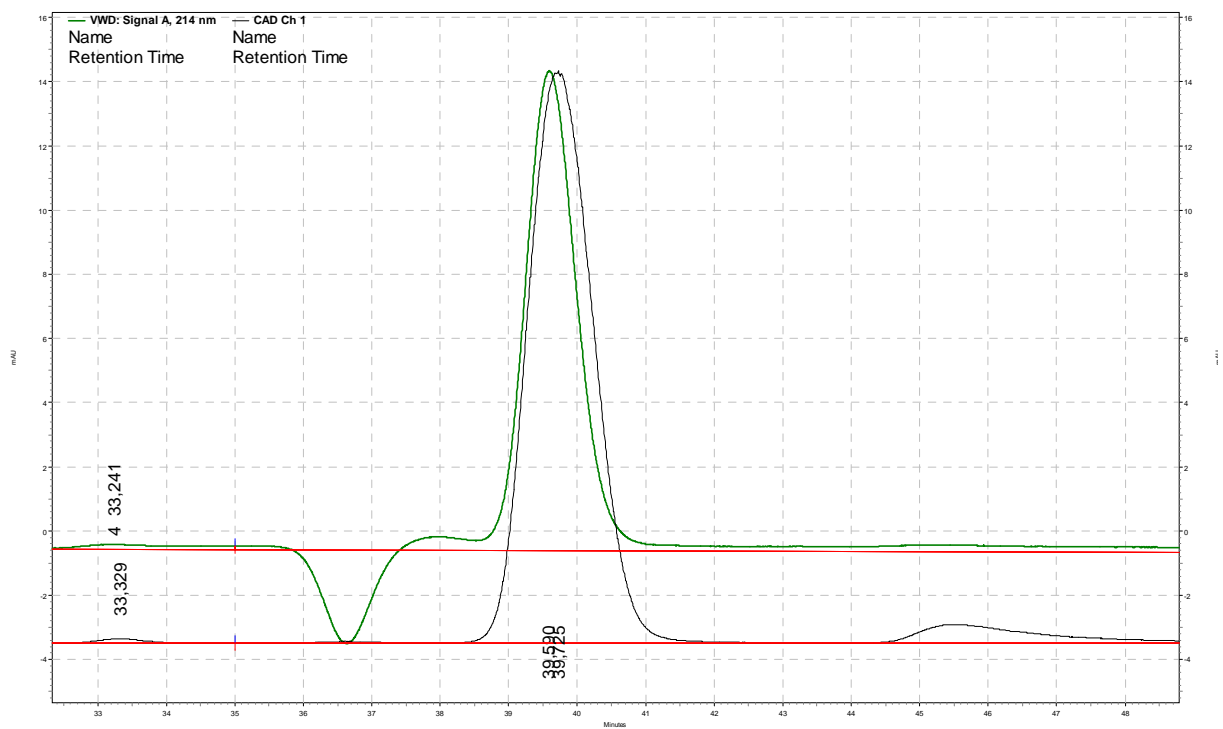
Figur 10

Molvektsintervallene for analysene med Superdex Peptid ble definert ut fra standardkurven og vurdering kromatogram av reelle prøver, Tabell 4.

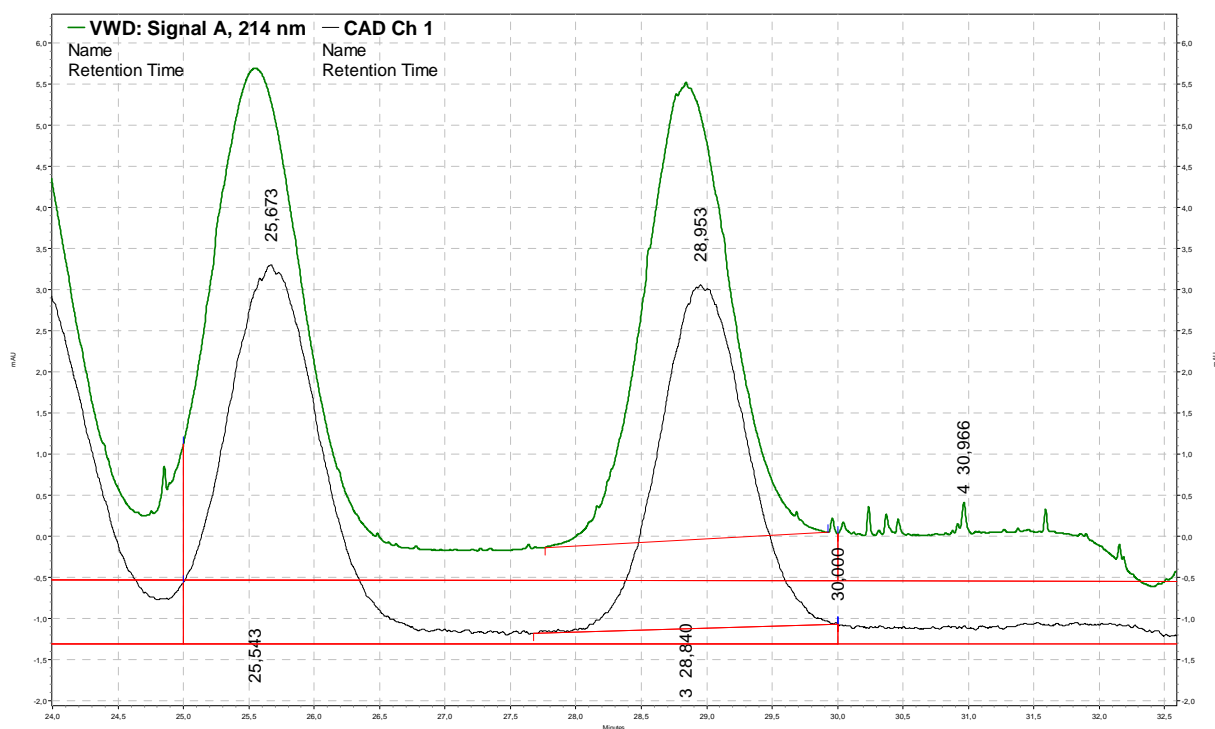
Tabell 4 Peptid molvektsintervall

Mw -Peptid	log10Mw	RT Beregnet	Tilsvarende Mw intervall
20 000	4,30	16,47	>20000
15 000	4,18	17,56	20 000- 15 000
10 000	4,00	19,11	15 000- 10 000
8 000	3,90	19,96	10 000-8 000
6 000	3,78	21,06	8 000-6 000
4 000	3,60	22,60	6 000-4 000
2 000	3,30	25,25	4 000-2 000
1 000	3,00	27,89	2 000- 1 000
500	2,70	30,53	1 000-500
200	2,30	34,03	500-200
Forbindelser under 200			<200

Arealfordelingen mellom CAD og UV var direkte sammenlignbar for alberta serien og ulike peptid og aminosyrestandarder, det ble tatt hensyn til Rt-differansen pga. seriekoblingen av detektorene, figur 11 og figur 12.



Figur 11 Differanse i retensjonstid mellom UV-detektor (grønn linje) seriekoblet med CAD universaldetektor målt for samme injeksjon av GLY.

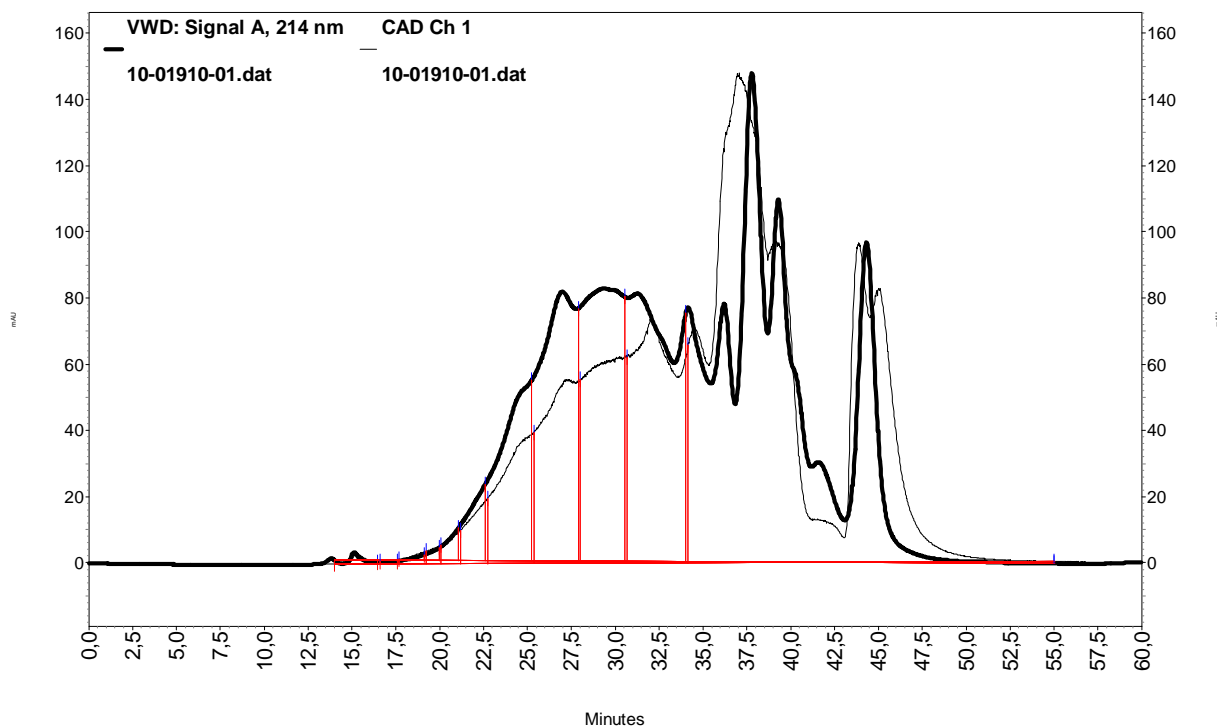


Figur 12 Differanse i retensjonstid mellom UV-detektor (grønn linje) seriekoblet med CAD universaldetektor målt for samme injeksjon av Alberta 2 og Alberta 1. Snitt beregnet for differansen i retensjonstid er tilnærmet konstant ved ulike RT og i snitt lik 0,126 min som legges til RT for CAD ved beregning av molekylvektfordeling.

#### 4.4 Sammenligning Superdex Peptide og TSK G2000 SW på reelle prøver

Basert på de lovende resultatene ved bruk av Superdex peptid-kolonne ved analyse av standarder, ble denne valgt til sammenligning med etablert metodikk (TSK G2000 SW) for reelle prøver. Kromatografering av prøvene gav som forventet svært ulike kromatogram siden deres råstoff og prosessbetingelser var ulike. Deteksjon med CAD ga tilsvarende kromatografiske profil som for UV-detektoren ved de største peptidstørrelsene men typisk flere detekterte forbindelser ved lavere molekylstørrelser. Det er grunn til å tro at forskjellene lar seg forklare med at mindre molekyler, salter og annet blir detektert med CAD som har god følsomhet og detekterer alle ikke flyktige forbindelser også annet enn peptider.

Forsøkene med de reelle prøvene ble utført i vannekstrakt der de vannløselige deler av prøven ekstraheres med kokende vann og proteininnholdet i væskefasen bestemmes etter Kjeldahlmetode. Det vannløslige ekstraktet blir deretter filtrert gjennom et 0,2µm sprøytefilter før fortynning til ca. 1 mg prøve i eluent. De fortyndede prøvene ble sentrifugert ved 7000 rpm i 5 min. før de ble plassert på autosamler ved 15 °C. Konsentrasjonsnivået er fra 1-3 mg/ml og injeksjonsvolum på kolonnen er 20µl.



Figur 13 FPH av lakseavskjær, pulver. Tykk linje er UV deteksjon

Tabell 5 Resultater FPH av lakseavskjær, pulver. Peptid størrelsesfordeling, UV deteksjon

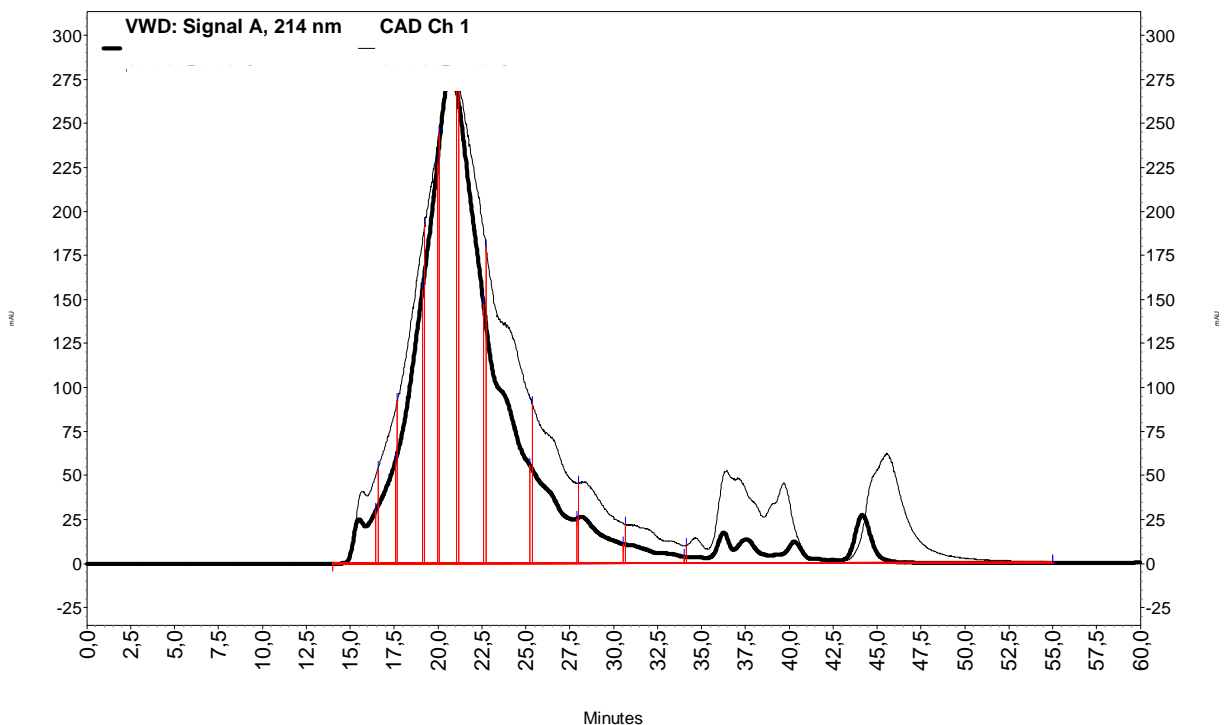
Mw intervall	FPH av lakseavskjær, pulver			Snitt Areal %	STD. AVVIK
	Para 1 Areal %	Para 2 Areal %	Para 3 Areal %		
>20000	0,007	0,0111	0,004	0,0	0,00
20 000- 15 000	0,038	0,027	0,032	0,0	0,01
15 000- 10 000	0,063	0,077	0,07	0,1	0,01
10 000-8 000	0,151	0,155	0,152	0,2	0,00
8 000-6 000	0,47	0,469	0,465	0,5	0,00
6 000-4 000	1,67	1,654	1,649	1,7	0,01
4 000-2 000	7,072	7,000	6,995	7,0	0,04
2 000- 1 000	12,512	12,413	12,408	12,4	0,06
1 000-500	14,157	14,073	14,068	14,1	0,05
500-200	16,712	16,646	16,648	16,7	0,04
<200	47,147	47,476	47,508	47,4	0,20
Gjennomsnitt Mw				801,4 D	
Hydrolysegrad OPA				32,6 %	
SUM Frie aminosyrer				17,4 g/100g prøve	
Protein Forbrenning (Prot. Faktor 6,25)				70,7 %	
Vannløselig protein, Kjeldahl				86,7 % av protein	
SUM Frie aminosyrer ift. proteininnhold i VL. Ekstrakt				28,4 g/100 g prøve vl. Protein	

Resultatene i tabell 5 viser god reproduserbarhet for arealbestemmelsene. Ved å analysere frie aminosyrer i prøven fikk vi et sammenligningsgrunnlag ift. andel av forbindelser <200 D. Avviket er forholdsvis stort og noe kan sikkert forklares ut fra andelen av for eksempel dipeptider i prøveekstraket som ikke blir detektert ved bestemmelse av frie aminosyrer.

Superdex Peptid metoden ble sammenlignet med tidligere analyser utført i denne prøven med TSK G2000 SW silika kolonne, tabell 6, basert på de intervallene som er felles for disse to metodene. For denne prøven var det god overensstemmelse.

Tabell 6 Sammenligning FPH av lakseavskjær, pulver på to kolonner

	Superdex Peptid	TSK G2000 SW
>20000	0,0	0,3
20 - 10K	0,1	0,8
10-1k	21,7	17,1
< 1K	78,1	81,6



Figur 14 Collagen hydrolysat, pulver

Collagen hydrolysatet var vesentlig forskjellig fra de andre prøvetypene blant annet pga. høyt innhold av glycin lik 21,3 % og prolin 9,2 %. Som det fremkommer av tabellen vil eller ikke den normale proteinfaktor lik 6,25 være riktig for denne type prøver.



Tabell 7 Resultater, collagen hydrolysat pulver. Peptid størrelsesfordeling, UV deteksjon

Mw intervall	Collagen hydrolysat			Snitt Areal %	STD. AVVIK
	Para 1 Areal %	Para 2 Areal %	Para 3 Areal %		
>20000	2,141	2,142	2,157	2,1	0,01
20 000- 15 000	3,075	3,054	3,053	3,1	0,01
15 000- 10 000	10,262	10,165	10,149	10,2	0,06
10 000-8 000	10,7	10,628	10,621	10,6	0,04
8 000-6 000	19,261	19,193	19,186	19,2	0,04
6 000-4 000	21,336	21,362	21,333	21,3	0,02
4 000-2 000	15,904	15,93	15,912	15,9	0,01
2 000- 1 000	6,504	6,516	6,518	6,5	0,01
1 000-500	3,187	3,196	3,201	3,2	0,01
500-200	1,662	1,671	1,674	1,7	0,01
<200	5,968	6,142	6,196	6,1	0,12

Gjennomsnitt Mw	11665,5 D
Hydrolysegrad OPA	3,0 %
SUM Frie aminosyrer	2,8 g/100g prøve
Protein Kjeldahl (Prot. Faktor 6,25)	105,6 %
Vannløslig protein, Kjeldahl	99,0 % av protein
SUM Frie aminosyrer ift. proteininnhold i VL. Ekstrakt	2,7 g/100 g prøve vl. Protein

Molvektsfordelingen for denne prøven ble også sammenlignet med analyse på TSK G2000 SW silika kolonne.

Tabell 8 Sammenligning collagen hydrolysat, pulver på to kolonner.

	Superdex Peptid	TSK G2000 SW
>20000	2,1	9,5
20 - 10K	13,3	26,4
10-1k	73,6	50,8
< 1K	11,0	13,4

Sammenligningen viser tilsvarende profil, men forholdsvis store relative forskjeller mellom metodene.

1-Rekeskall hydrolysat, pulver, 2-Rekeskall hydrolysat, pulver og 3-Rekeskall hydrolysat, pulver. Disse tre prøvene er fremstilt under ulike betingelser ved enzymatisk hydrolyse. Resultater for disse tre prøvene samlet er vist i tabell 9-11

Tabell 9

Mw intervall	1-Rekeskall hydrolysat, pulver			Snitt Areal %	STD. AVVIK
	Para 1 Areal %	Para 2 Areal %	Para 3 Areal %		
>20000	0,013	0,016	0,013	0,0	0,00
20 000- 15 000	0,007	0,007	0,007	0,0	0,00
15 000- 10 000	0,035	0,037	0,036	0,0	0,00
10 000-8 000	0,064	0,065	0,064	0,1	0,00
8 000-6 000	0,216	0,218	0,214	0,2	0,00
6 000-4 000	0,732	0,734	0,728	0,7	0,00
4 000-2 000	2,493	2,488	2,486	2,5	0,00
2 000- 1 000	7,081	7,05	7,052	7,1	0,02
1 000-500	15,719	15,642	15,66	15,7	0,04
500-200	38,876	38,743	38,799	38,8	0,07
<200	34,763	35,001	34,941	34,9	0,12

Gjennomsnitt Mw	569,8 D
Hydrolysegrad OPA	28,6 %
SUM Frie aminosyrer	2,1 g/100g prøve
Protein Kjeldahl (Prot. Faktor 6,25)	75,7 %
Vannløslig protein, Kjeldahl	98,0 % av protein
SUM Frie aminosyrer ift. proteininnhold i VL. Ekstrakt	2,9 g/100 g prøve vl. Protein

Tabell 10

Mw intervall	2-Rekeskall hydrolysat, pulver			Snitt Areal %	STD. AVVIK
	Para 1 Areal %	Para 2 Areal %	Para 3 Areal %		
>20000	0,027	0,025	0,025	0,0	0,00
20 000- 15 000	0,021	0,021	0,021	0,0	0,00
15 000- 10 000	0,108	0,108	0,106	0,1	0,00
10 000-8 000	0,204	0,203	0,197	0,2	0,00
8 000-6 000	0,708	0,706	0,69	0,7	0,01
6 000-4 000	2,179	2,174	2,154	2,2	0,01
4 000-2 000	6,684	6,665	6,639	6,7	0,02
2 000- 1 000	13,096	13,052	13,01	13,1	0,04
1 000-500	20,833	20,763	20,701	20,8	0,07
500-200	34,609	34,57	34,585	34,6	0,02
<200	21,531	21,712	21,871	21,7	0,17

Gjennomsnitt Mw	913,8 D
Hydrolysegrad OPA	21,5 %
SUM Frie aminosyrer	2,0 g/100g prøve
Protein Kjeldahl (Prot. Faktor 6,25)	72,7 %
Vannløslig protein, Kjeldahl	98,0 % av protein
SUM Frie aminosyrer ift. proteininnhold i VL. Ekstrakt	2,8 g/100 g prøve vl. Protein

Tabell 11

Mw intervall	3-Rekeskall hydrolysat, pulver			Snitt Areal %	STD. AVVIK
	Para 1 Areal %	Para 2 Areal %	Para 3 Areal %		
>20000	0,016	0,016	0,015	0,0	0,00
20 000- 15 000	0,01	0,011	0,01	0,0	0,00
15 000- 10 000	0,057	0,058	0,057	0,1	0,00
10 000-8 000	0,111	0,112	0,109	0,1	0,00
8 000-6 000	0,374	0,374	0,368	0,4	0,00
6 000-4 000	1,185	1,188	1,179	1,2	0,00
4 000-2 000	3,982	3,985	3,964	4,0	0,01
2 000- 1 000	10,01	10,01	9,947	10,0	0,04
1 000-500	18,945	18,947	18,815	18,9	0,08
500-200	38,392	38,368	38,308	38,4	0,04
<200	26,918	26,93	27,226	27,0	0,17

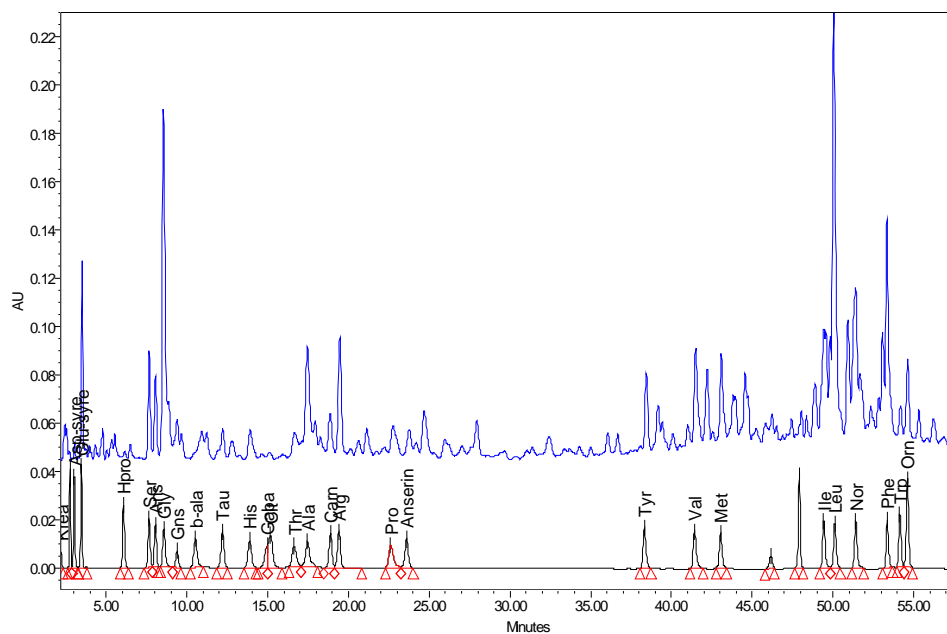
Gjennomsnitt Mw	706,5 D
Hydrolysegrad OPA	24,4 %
SUM Frie aminosyrer	2,5 g/100g prøve
Protein Kjeldahl (Prot. Faktor 6,25)	91,1 %
Vannløslig protein, Kjeldahl	98,0 % av protein
SUM Frie aminosyrer ift. proteininnhold i VL. Ekstrakt	2,8 g/100 g prøve vl. Protein

Tabell 12 Sammenligning ulike rekehydrolysat pulver på to kolonner

Reke hyd. 1	Superdex Peptid	TSK G2000 SW
>20000	0,0	0,1
20 - 10K	0,0	0,3
10-1k	10,6	12,0
< 1K	89,4	87,5
Reke hyd. 2	Superdex Peptid	TSK G2000 SW
>20000	0,0	0,0
20 - 10K	0,1	0,4
10-1k	22,8	21,8
< 1K	77,1	77,7
Reke hyd. 3	Superdex Peptid	TSK G2000 SW
>20000	0,0	0,0
20 - 10K	0,1	0,2
10-1k	15,6	18,4
< 1K	84,3	81,4

Superdex Peptid metoden ble sammenlignet med tidligere analyser utført i denne prøven med TSK G2000 SW silika kolonne, tabell 12 basert på de intervallene som er felles for disse to metodene. For disse prøvene vurderes resultatene å være tilnærmet like. Felles for prøvene er høy hydrolysegrad.

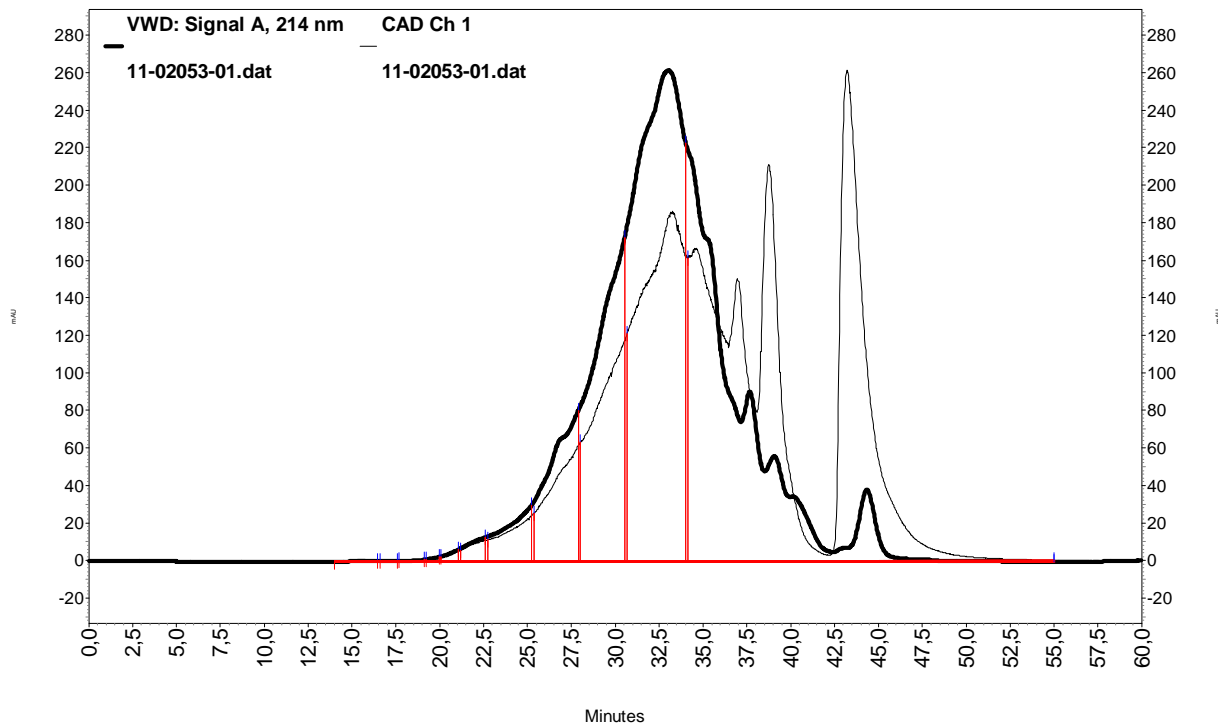
Derimot er det store avvik mellom summen av frie aminosyrer og peptid størrelsesfordelingene, tabell 9-11. Ved analyse av frie aminosyrer ble det tydelig at prøvene inneholdt et stort antall ukjente forbindelser som ikke ble kvantifisert, Fig 15.



Figur 15 –plott mellom standard og 1-rekeskallhydrolysat

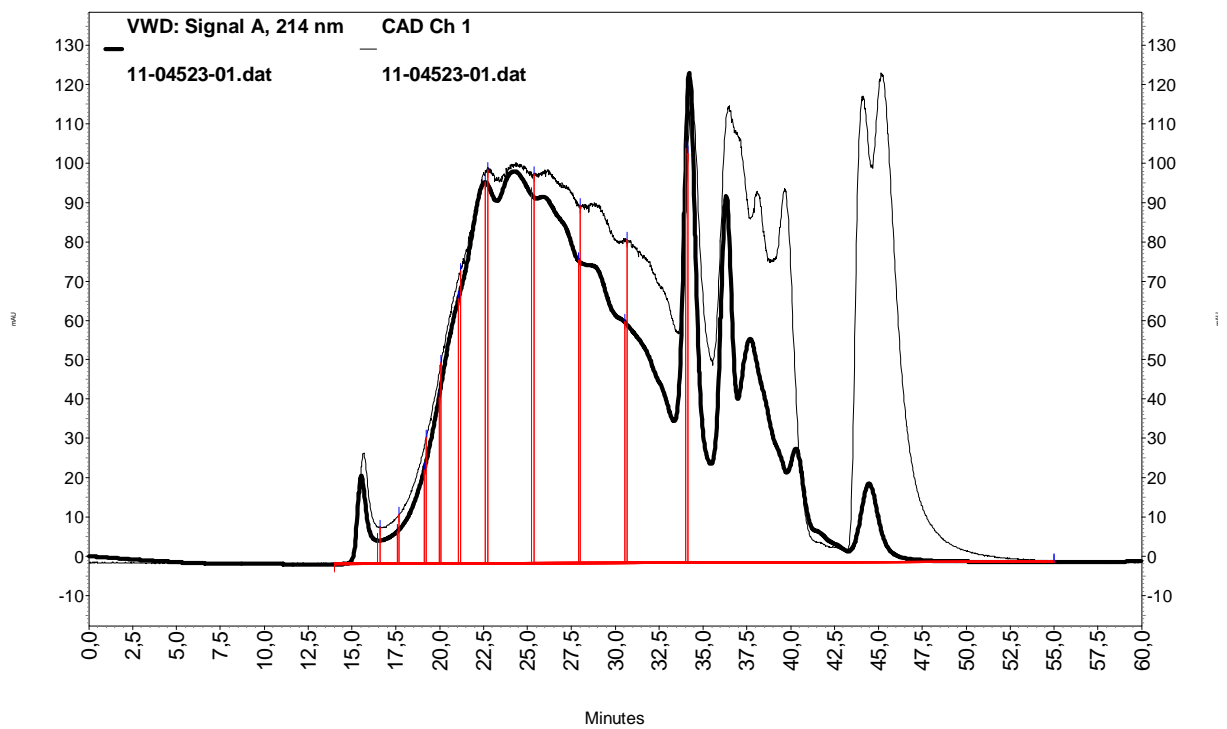
Det er grunn til å tro at alle disse ikke-kvantifiserte forbindelsene bidrar til ulikehetene ved sammenligning mellom frie aminosyrer og laver Mw-fordeling.

Selve kromatogrammet for prøve 1-rekeskallhydrolysat viser forholdsvis store avvik mellom CAD (tynn linje) og UV. Pga. dette er det sannsynlig at prøven også inneholder en god del forbindelser annet enn peptider.



Figur 16 1-rekeskallhydrolysat

Den siste prøvetypen som inngikk i sammenligningen var et FPH konsentrat med tørrstoffinnhold analysert til 60,1 %



Figur 17 FPH, Tørstoff ~60%

Differansen mellom UV og CAD deteksjon (tynn linje) viser responsen til andre vannløslige forbindelser som kan finnes i prøven

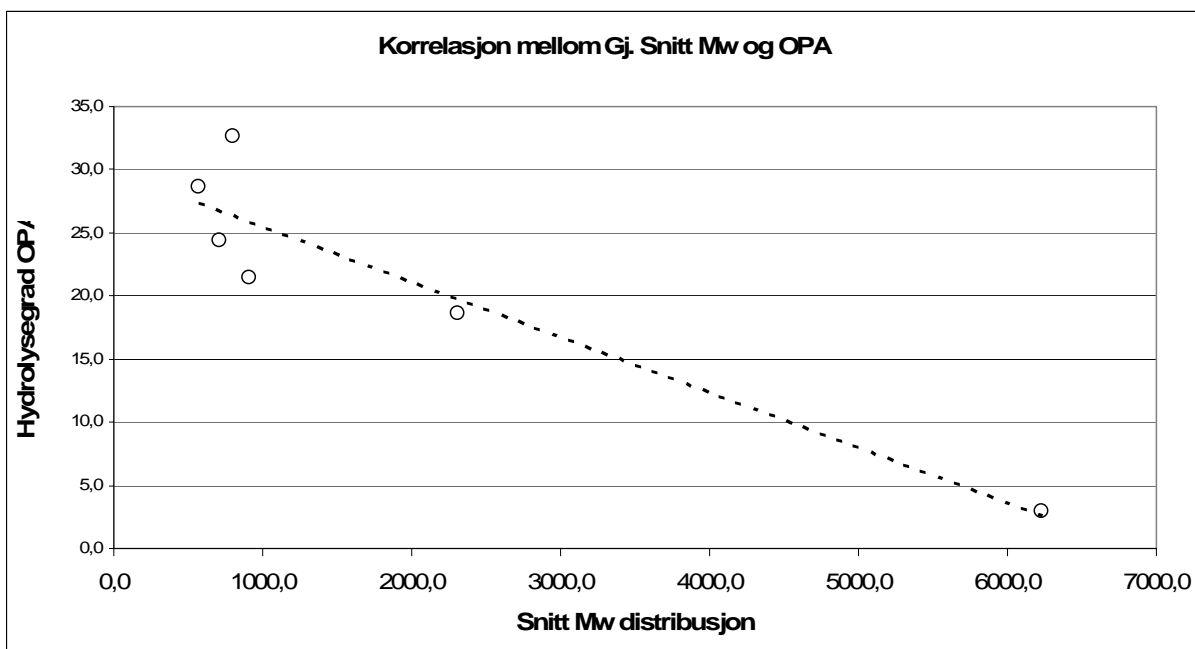
Tabell 13 Resultater, FPH, ts ~60%. Peptid størrelsesfordeling, UV deteksjon. Frie aminosyrer ble ikke analysert for denne prøven. Sammenligning mellom de to kolonnene for denne prøven ga vesentlig forskjellig resultat for Mw intervallet fra 20 til 10K Dalton.

Mw intervall	FPH, Tørstoff ~60%			Snitt Areal %	STD. AVVIK
	Para 1 Areal %	Para 2 Areal %	Para 3 Areal %		
>20000	1,096	1,091	1,1	1,1	0,00
20 000- 15 000	0,492	0,503	0,509	0,5	0,01
15 000- 10 000	1,479	1,481	1,497	1,5	0,01
10 000-8 000	1,858	1,85	1,863	1,9	0,01
8 000-6 000	4,112	4,098	4,104	4,1	0,01
6 000-4 000	8,615	8,587	8,591	8,6	0,02
4 000-2 000	17,117	17,102	17,058	17,1	0,03
2 000- 1 000	15,618	15,623	15,578	15,6	0,02
1 000-500	12,471	12,479	12,446	12,5	0,02
500-200	12,215	12,189	12,216	12,2	0,02
<200	24,928	24,996	25,037	25,0	0,06
Gjennomsnitt Mw				2310,0 D	
Hydrolysegrad OPA				18,6 %	
Protein Kjeldahl (Prot. Faktor 6,25)				55,0 %	
Vannløslig protein, Kjeldahl				99,6 % av protein	

Tabell 14 Sammenligning FPH, ts ~60%, på to kolonner

FPH, Tørstoff ~60%	Superdex Peptid	TSK G2000 SW
>20000	1,1	3,2
20 - 10K	2,0	12,2
10-1k	47,3	31,1
< 1K	49,7	53,0

For samtlige prøver ble det beregnet en gjennomsnittlig molekylvekt fra peptidfordelingen som ble sammenlignet med målinger med OPA hydrolysegrad. Prinsippet for denne metoden er at det ved hydrolyse av proteinene dannes en fri aminogruppe for hver peptidbinding som spaltes. Frie aminogruener reagerer med o-phthaldialdehyd i nærvær av thiothreitol og danner et farget stoff som absorberer lys ved 340 nm.



Figur 18 Korrelasjon mellom gjennomsnitt Mw for samtlige prøver og måling av OPA-verdier.

Korrelasjon,  $r$  (Gjennomsnitt Mw og OPA) ble målt til å  $-0,935$ .

Måleusikkerhet for metoden vil være den kombinerte måleusikkerheten  $u_c$  av den erfarte spredningen ved repeterte målinger  $u_{LAB}$  og de systematiske forskjellene som måtte være mellom faktisk og målt molekylvekter,  $u_{Erfart-teoretisk}$ .

$$u_c = \sqrt{u_{LAB}^2 + u_{Erfart-teoretisk}^2}$$

For molekylvekter over 357 dalton innenfor metodens måleområde er differansen vist i tabell 15. Den gjennomsnittlige måleusikkerheten ved repeterte målinger av reelle prøver utgjør  $u_{Lab}$  og er vurdert til å være 1% RSD.

Tabell 15 Beregnet kombinert måleusikkerhet

Program	Erfart	Teoretisk	Diff.	Diff^2	Snitt	Antall
<b>Carbonic anhydrase</b>	23135	29000	-5865	34399012	26067	1
<b>Lysosyme</b>	8808	14300	-5492	30161969	11554	2
<b>Cyt C</b>	11846	12400	-554	306516	12123	3
<b>Aprotonin</b>	4823	6500	-1677	2811675	5662	4
<b>Alberta 5</b>	4867	4057,22	810	655843	4462	5
<b>Alberta 4</b>	4115	3249,38	866	749627	3682	6
<b>Insulin A</b>	1881	2531,64	-650	422954	2206	7
<b>Alberta 3</b>	2995	2441,54	554	306468	2718	8
<b>Gastrin I</b>	2018	2126,28	-108	11707	2072	9
<b>Alberta 2</b>	1859	1633,7	226	50875	1746	10
<b>Polymyxin</b>	1919	1470	449	201172	1694	11
<b>Substance P</b>	1591	1347,63	243	59254	1469	12
<b>[Val 4]-Ang III</b>	1057	917,06	140	19628	987	13
<b>Alberta 1</b>	781	825,86	-45	2042	803	14
<b>(Lys)5</b>	1051	669,8	382	145653	861	15
<b>(Leu)3</b>	423	357,49	66	4304	390	16
<b>n=</b>	<b>16</b>	<b>SUM D^2=</b>	<b>70137072</b>	<b>Snitt=</b>	<b>6288,14</b>	
<b>Reproduserbarhet</b>			<b>Repeterbarhet</b>			
Gjennomsnitt:		6288,14		Sr = ROT(SUM(D*D)/2K)	1480,467	
Erfart-Teoretisk	%CV <sub>Sr</sub> =	23,54		r = 2.8 * Sr	4187,394	
SSF	%CV <sub>Sr</sub> =	1,00				
u(Erf-teoretisk)		1480,47				
u(Lab)		62,88				
<b>u<sub>c</sub></b>		<b>1481,80</b>				
<b>%RSD (+/-)</b>		<b>24</b>				



## 5 Oppsummering og konklusjoner

Ved sammenligning av de ulike kolonnene var det Superdex Peptid kolonnen ved 30% acetonitril, 0,1 % TFA som viste best lineære forhold innenfor måleområdet mellom 20 000 og 200 dalton. Uttesting av Phenomenex-kolonnen ga faktisk tilsvarende separasjon for Alberta-serien som for Superdex, men større avvik fra ideell SEC-kromatografering for en del enkeltforbindelser ved samtlige ulike innblandingene av organisk løsningsmiddel. I tillegg skjer separasjonen innenfor et lite retensjonstidsforløp ~ 10 min., sammenlignet med Superdex peptid som ved samme flow og eluentsammensetning separerer over et retensjonstidsforløp ~ 25 min.

Uttesting av PL aquagel-OH 30 er ikke gjengitt i resultatdelen siden denne ga flere avvikende resultat innefor et lite retensjonsvindu. Årsaken til disse avvikene er ikke kjent.

En eksisterende metode for peptid størrelsesfordeling ble benyttet for å sammenligne resultater for reelle prøver. Metoden baserte seg på TSK G2000 SW silikakolonne med 0,1M Na-fosfatbuffer med 0,1 M NaCl og 0,3% SDS og 0,001N natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ). Sodium dodecyl sulfate, benyttes for å gi en negativ ladning for hvert peptid proporsjonal til massen. SDS virker også denaturerende. For små peptider og frie aminosyrer er det tidligere nevnt (Rubin rapport nr. 4617/115) at evnen til å binde SDS er ulik. TSK- kolonnen dekker et større måleområde, fra ca. 60 000 til 2000 D og det gjenspeiles ved måling av retensjonsdifferanser. F.eks vil Rt differansen mellom Aprotinin (12600Mw) og Mw tilsvarende frie aminosyrer være ~ 9 minutter for TSK-kolonnen mens den er ~ 16 minutter for Superdex. En annen fordel ved bruke av Superdex oppsettet er at alle bestandeler i eluenten vil la seg fordampe i motsetning til buffersystemet som brukes på TSK-kolonnen. Etter oppsamling av ulike fraksjoner fra Superdex systemet kan man dampe inn disse og bruke de i andre analyser som ionebytterkromatografi og/eller revers fase systemer for videre identifisering av forbindelser. Superdex peptid metoden viser seg å være robust ift. bytte og skifte av eluent, samt svært reproducerbar. Riktigheten til metoden ble bestemt ved analyse av standarder samt sammenligning med andre analyser. I tabell 15 er det tatt hensyn til riktigheten ved angivelse av metodens måleusikkerhet. Måleusikkerheten er relativt stor som forventet for denne metodikken, men likevel lavere enn de metodene vi sammenlignet innenfor det aktuelle måleområdet.

Superdex Peptid metoden var det beste valget for å bestemme molekylvektsfordeling for forbindelser < 20 000 Da og for de naturlige prøvene som inngikk i forsøkene, var denne metoden det beste alternativet. Dersom fordelingen er ønskelig for større peptider/proteiner er det andre kolonner som vil fungere bedre.

**Takk til Rubin for finansiering av prosjektet og norske produsenter av marine ingredienser som velvillig stilte relevant prøvemateriale til disposisjon.**

## 6 Kilder

- Barth, H., C. Jackson, et al. (1994). "Size exclusion chromatography." *Analytical chemistry* 66(12): 595-620.
- Beaulieu, L., J. Thibodeau, et al. (2009). "Characterization of enzymatic hydrolyzed snow crab (*Chionoecetes opilio*) by-product fractions: A source of high-valued biomolecules." *Bioresource Technology* 100(13): 3332-3342.
- Bourseau, P., L. Vandanjon, et al. (2009). "Fractionation of fish protein hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration: impact on peptidic populations." *Desalination* 244(1-3): 303-320.
- Chabeaud, A., L. Vandanjon, et al. (2009). "Fractionation by ultrafiltration of a saithe protein hydrolysate (*Pollachius virens*): Effect of material and molecular weight cut-off on the membrane performances." *Journal of Food Engineering* 91(3): 408-414.
- Cudennec, B., R. Ravallec-Plé, et al. (2008). "Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystinin release in STC-1 cells." *Food Chemistry* 111(4): 970-975.
- Guérard, F., L. Dufossé, et al. (2001). "Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11(4-6): 1051-1059.
- Irvine, G. B. (1997). "Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review." *Analytica Chimica Acta* 352(1-3): 387-397.
- Mant. C.T., et al. (1987) "Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides, requirement for peptide standards to monitor column performance and non-ideal behaviour." *Journal of Chromatography*. 397: 99-112.
- Ren, J., M. Zhao, et al. (2008). "Optimization of antioxidant peptide production from grass carp sarcoplasmic protein using response surface methodology." *LWT - Food Science and Technology* 41(9): 1624-1632.
- RUBIN Rapport nr. 4617/115 "Metode for bestesmmelse av peptidstørrelse I fiskehydrolysat. Ensilasje og gelantin.
- Smyth, M. and R. J. FitzGerald "Characterisation of a new chromatography matrix for peptide molecular mass determination." *International Dairy Journal* 7(8-9): 571-577.

# APPENDIX

## Improved methodology for analysis of peptide size distribution in marine protein hydrolysates

### Principle

The method separates peptides by use of size exclusion chromatography technique. Fractionation is based on the diffusion of molecules into the pores of the resin. Larger peptides do not enter the pores of the resin as readily but pass through the fluid volume of a column faster than smaller peptides. Thus protein molecules elute from the column in order of decreasing molecular weight. There is a theoretically linear relationship between the retention time and the logarithms of the known molecular weights of peptide standards. The isocratic HPLC-system consists of a column with covalent bounded dextran to cross-linked agarose and a UV-detector set at 214 nm.

### Materials

Synthetic peptide standards Ac-(G-L-G-A-K-G-A-G-V-G)<sub>n</sub>-amide, n=1 to 5, lyophilised (Departement of Biochemistry, University of Alberta). Carbonic anhydrase Mw 29000, Lysosyme Mw 14300, Cyt C Mw 12400, Aprotonin Mw 6500, Alberta 5Mw 4057,22, Alberta 4 Mw 3249,38, Insulin A Mw 2531,64, Alberta 3 Mw 2441,54. Gastrin I Mw 2126,28, Alberta 2 Mw 1633,7m, Polymyxin Mw 1470, Substance P Mw 1347,63, [Val 4]-Ang III Mw 917,06, Alberta1 Mw 825,86, (Lys)5 Mw 669,8, (Leu)3 Mw 357,49, Gly Mw 75,07 (Sigma-Aldrich) , Acetonitril. HPLC-grade (Merck). Trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich). De-ionized water (milli-Q water).

### Equipment

HPLC with UV-detector. Superdex Peptide 10/30, (bed dimensions 10 X 300 mm), GE Healthcare. Whirl Mixer, Syringe filter cellulose resin 0.2 µm, centrifuge, pipettes and auto sampler vials preferably of silanized glass.

### Chromatographic method

Eluent: 0.1% TFA in 30 % acetonitrile. The column is first conditioned with water, followed by gradually increasing the amount of the eluent. Flow is set at 0.5 ml/min and total run time is 60 minutes. The concentration of each peptide should be 1-1.5 mg/ml in the actual eluent. The injection volume is 20 µl both for the standards and for the samples. Each standard is prepared separately except for the synthetic peptide standard mixture. The standard mixtures are stirred on a whirl mixer and filtrated through a 0.2 µm syringe filter and centrifuged at 7000 rpm in 5 min if poor solubility is suspected. Standards are used freshly or otherwise stored for a limited period in <-18 °C. Satisfactory separations of the Alberta standard should be achieved and repeatedly controlled prior to the analyses of the other

standards similar to the results in fig. 1. The separation between the two biggest compounds in this mixture is limited so the retention time for compound 5 is set at the curve bend.

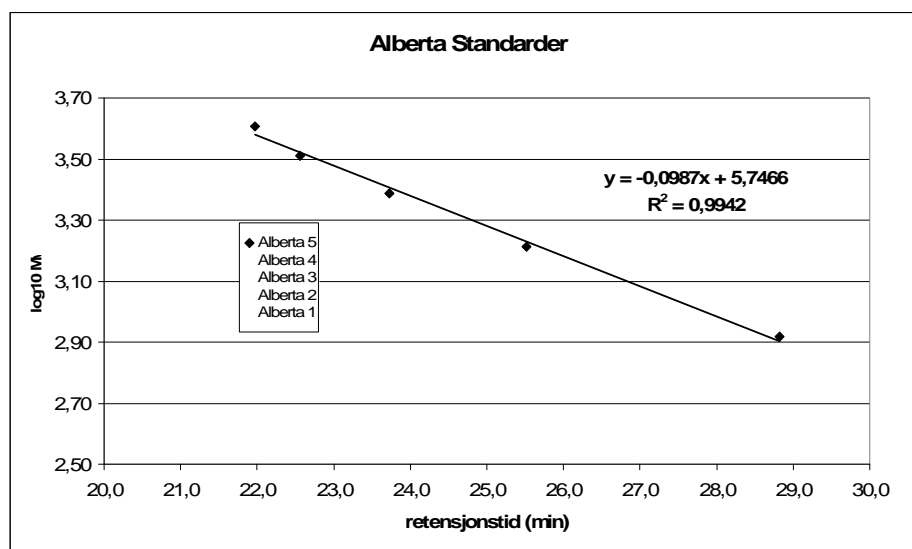


Figure 1 Calibration curve typically obtained for the Alberta series.

With all the standards run on under stable chromatographic conditions the experienced repeated value for the Correlation coefficient  $r$  is approximately 0.98. The retention time variation should be so small that it is unnecessary to use relative  $R_t$ -times.

## Sample preparation

The water soluble substances in samples of unknown level of solubility is extracted in boiling water. The protein in the water phase is determined by use of Kjeldahl (ISO 5983-2) and water soluble protein is calculated as percentage of total protein in the sample. An aliquot of the water extract is filtrated through a syringe filter (0.2  $\mu\text{m}$ ) and diluted to approximately 1 mg sample/ml eluent.

## Calculations

The molecule weight intervals are set according to the achieved standard curve and calculation of the retention times. Table 1.

Table 1 Peptide molecular weight intervals.

Mw -Peptid	log10Mw	Mw intervall
20 000	4,30	>20000
15 000	4,18	20 000- 15 000
10 000	4,00	15 000- 10 000
8 000	3,90	10 000-8 000
6 000	3,78	8 000-6 000
4 000	3,60	6 000-4 000
2 000	3,30	4 000-2 000
1 000	3,00	2 000- 1 000
500	2,70	1 000-500
200	2,30	500-200
		<200

The percentage distribution of the peptides are calculated as area percentage of each interval.