

Lokalisering av (*R*)-artikain i et lipidbilag

En fast-fase NMR-undersøkelse av interaksjon mellom (*R*)-metyl-4-metyl-3(2-[propylamino]propanamido)-tiofen-2-karboksylat hydroklorid og fosfolipid av 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

Anna Vår Lande



Masteroppgave i kjemi

Kjemisk Institutt

Universitet i Bergen

2020

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Kjemisk Institutt ved Universitet i Bergen.

Først vil jeg takke min hovedveileder, Willy Nerdal, og min biveileder, Signe Lilia Steinkopf, for at dere introduserte meg for denne oppgaven. Det har vært en meget interessant oppgave som har gitt meg ny og spennende kunnskap innenfor feltet. En ekstra takk til Willy Nerdal for veiledning gjennom det eksperimentelle arbeidet og for å være lett tilgjengelig når spørsmål har dukket opp. En spesiell takk til Signe Lilia Steinkopf som har vært aktiv i veiledningen med konstruktive tilbakemeldinger gjennom skriveprosessen.

Jeg vil også takke de i NMR-forskergruppen, José C. R. Guerrero, John Georg Seland, Henrik Nicolay Sørgård og Nils Åge Frøystein, som har vært behjelpelige ved bruk av NMR-instrumentene. Takk til Nicolai Etwin Alsaker som utarbeidet en hurtigprosedyre i liposomopparbeidelsen. En stor takk til Zeeshan Muhammad ved forskergruppen *Organisk syntese og legemiddelkjemi* som syntetiserte (*R*)-artikain til min oppgave.

Takk til Elise Østensen som har vært gjennom det samme løpet som meg. Hun har vært en god støttespiller gjennom masterperioden.

Til slutt vil jeg rette en takk til mine foreldre, søstre og venner for all støtte de har gitt meg i denne tiden.

Bergen, november 2020

Anna Vår Lande

Sammendrag

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke interaksjonen mellom (*R*)-artikain og lipidbilag av POPC ved bruk av fast-fase NMR-spektroskopi.

Artikain hydroklorid brukes som et lokalbedøvelsesmiddel innen tannbehandling, der begge enantiomerer er inkludert i bedøvelsesmiddelet. Det er imidlertid mistenkt at enantiomerene interagerer ulikt i membranen, og at en av disse kan bidra til uheldige effekter som forårsaker lammelse i kjeveområdet. Hvis den uheldige effekten er relatert til molekylets lokalisering i membranen, er det viktig å undersøke enantiomerene separat. Målet med oppgaven var derfor å lokalisere (*R*)-enantiomerer av artikain i et lipidbilag av POPC.

Det finnes ikke mange studier utført på enantiomerene av artikain hver for seg, og det har heller ikke blitt utført stabilitetsundersøkelse på enantiomerene. Det er derfor blitt gjort et innledende forsøk på (*R*)-artikain, løst i D₂O og undersøkt ved væske-NMR over et tidsrom på åtte måneder. Undersøkelsen viste mindre endringer i kjemisk skift og resonanser som tyder på forflytning av konformasjonslikevekten, men at (*R*)-artikain ellers konkluderes å være stabil over lengre tid.

Interaksjon mellom (*R*)-artikain og lipidbilag av POPC er undersøkt med bruk av fast-fase NMR-spektroskopi ved ¹H-, ³¹P- og ¹³C-eksperimenter. Det ble opparbeidet liposomprøver som ble justert til pH 7,4 (fysiologisk pH), og resultatene fra NMR-undersøkelsen fokuserer på eksperimenter tatt opp ved 310 K (37 °C) da bedøvelsesmiddelet normalt injiseres i levende vev. Resultatene fra denne studien gir grunnlag til å lokalisere den uladde formen av (*R*)-artikain ved glyserol og acylkjeder nær acylidel, mens den protonerte formen vil interagere med lipidbilaget ytterst ved hodegruppe. Fosfolipid av POPC er brukt i undersøkelsen da dette er et lipid det finnes store mengder av i cellemembraner. Resultatene som oppnås i denne undersøkelsen kan derfor være nyttige ved videre studie av (*R*)-artikain.

Forkortelser

POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
POPS	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serine
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
DOPS	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serine
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DSPC	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
PC	Phosphatidylcholine
T_m	Gel-til-flytende-krystallinsk-fase-transisjonstemperatur
<i>sn</i>	Stereospesifikk nummerering
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
HR	High Resolution
MAS	Magic-Angle Spinning
CSA	Chemical Shift Anisotropy
rf	Radiofrekvens
ppm	Parts per million
S/N	Signal-to-noise
LB	Line broadening
MLV	Multilamellar vesicles
LUV	Large unilamellar vesicles
SUV	Small unilamellar vesicles

Innholdsfortegnelse

Forord	ii
Sammendrag	iii
Forkortelser	iv
1. Innledning	1
1.1 Bakgrunn for oppgaven	1
1.2 Problemstilling	2
2. Teori	3
2.1 Biologiske membraner	3
2.2 Glyserofosfolipider	4
2.2.1 1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (POPC)	5
2.3 Lokalbedøvelse og mekanisme	6
2.4 Artikain	7
2.4.1 Artikain og nevrotoksisitet?	9
2.5 NMR	10
2.5.1 Atomvinkelmoment og magnetisk moment	10
2.5.2 Magnetisk felt og energi	12
2.5.3 Grunnleggende prinsipp for kjernemagnetisk resonans (NMR)-eksperiment	15
2.5.4 Magisk-vinkel spinn	17
3. Eksperimentelt	18
3.1 Material og utstyr	19
3.2 Eksperimentelt ved NMR-spektroskopi	20
4. Innledende forsøk: Stabilitetsundersøkelse av (<i>R</i>)-artikain	21
4.1 Eksperimentelt: Stabilitetsundersøkelse av (<i>R</i>)-artikain	21
4.2 Resultat	22
4.2.1 ¹ H-spektre av (<i>R</i>)-artikain med og uten vannundertrykking	22
4.2.2 ¹ H -spektre av (<i>R</i>)-artikain med presaturering tatt opp ved ulike tidspunkt	29
4.3 Diskusjon av ¹ H -spektre med (<i>R</i>)-artikain	40
4.4 Konklusjon av (<i>R</i>)-artikains stabilitet	42
5. Undersøkelse av interaksjon mellom (<i>R</i>)-artikain og POPC	43
5.1 Eksperimentelt: Dannelse av unilamellære liposomer	44
5.1.1 Eksperimentelt: Dannelse av unilamellære liposomer med (<i>R</i>)-artikain	47
5.2 Resultat	49
5.2.1 ¹ H- NMR av POPC	49
5.2.2 ¹ H-NMR av POPC med (<i>R</i>)-artikain	52

5.2.3 ^{31}P -NMR	54
5.2.4 ^{31}P -NMR med (<i>R</i>)-artikain.....	55
5.2.5 ^{13}C -NMR av POPC	63
5.2.6 ^{13}C -NMR av POPC med (<i>R</i>)-artikain	68
6. Diskusjon.....	85
6.1 ^1H -NMR av POPC med (<i>R</i>)-artikain	85
6.2 ^{31}P -NMR av POPC med (<i>R</i>)-artikain.....	86
6.3 ^{13}C -NMR av POPC med (<i>R</i>)-artikain	89
6.4 Tidligere studier og interaksjon mellom (<i>R</i>)-artikain og POPC	90
7. Konklusjon	94
8. Videre arbeid	95
Referanser.....	96
Vedlegg A: Utrekninger	100
Vedlegg B: Parametere brukt i væske- og fast-fase NMR-opptak.....	102
Vedlegg C: ^1H -spekter av (<i>R</i>)-artikain (Zeeshan Muhammad).....	104
Vedlegg D: Spektre av POPC ved 298 K og 310 K.....	105
Vedlegg E: Statische- og spinnende fosforspektre fra studien av Song et al. [5]	111
Vedlegg F: Lipidforberedelse av 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (DPPC) ...	113
F.1 Eksperimentelt	113
F.2 Resultat	114
F.3 Diskusjon	117
Vedlegg G: Lipidforberedelse av blandingsprøve DOPE/DOPS/DOPC.....	118
G.1 Eksperimentelt	119
G.2 Resultat.....	119
G.3 Diskusjon	124

1. Innledning

I denne oppgaven er det blitt undersøkt hvordan (*R*)-enantiomeren av anestesimiddelet artikain hydroklorid, metyl-4-metyl-3(2-[propylamino]propanamido)-tiofen-2-karboksylat hydroklorid påvirker lipidbilaget av glyserofosfolipidet POPC, 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine. Effekten (*R*)-artikain har på lipider av POPC har blitt undersøkt ved bruk av fast-fase kjerne magnetisk resonans (NMR)-spektroskopi. I tillegg er det blitt gjort en stabilitetsstudie på ren (*R*)-artikain over et tidsrom på åtte måneder. Til denne stabilitetsstudien er det blitt benyttet væskefase - NMR-spektroskopi.

Artikain hydroklorid ble først syntetisert av Rusching og kollegaer i 1969 og var i bruk i Tyskland fra 1976 [1]. Artikain hydroklorid brukes som lokalbedøvelse i odontologien, og blant andre amid- lokalbedøvelsesmidler er artikain unikt ved å bestå av en tiofengruppe som foreslås å øke hydrofobisitet til molekylet, og en estergruppe som bidrar til biotransformasjonen i plasma. Imidlertid har anestesimiddelet blitt mistenkt i å være nevrotoksisk da komplikasjoner som vedvarende lammelse i kjeveområde har blitt erfart hos pasienter [2].

1.1 Bakgrunn for oppgaven

Artikain hydroklorid som bedøvelsesmiddel blir behandlet som en rasemisk blanding. Enantiomerer av et molekyl kan opptre svært ulikt i levende systemer som kan være helt avgjørende når det kommer til dets effekter. Slik som enantiomerene, er også levende systemer kirale som betyr at én enantiomer kan være biologisk aktiv, mens den andre ikke [3]. Enantiomerer kan også begge være aktive der den ene gir ønsket effekt, mens den andre kan gi uønskede effekter. Det er uvisst om både (*R*)- og (*S*)-enantiomer av artikain er like effektive som lokalt bedøvelsesmiddel, men også om en av de kan forårsake uheldige effekter.

Cellene i kroppen er omgitt av en cellemembran hvor glyserofosfolipider utgjør en større komponent. Glyserofosfolipider med kolin som hodegruppe utgjør en stor del av biologiske membraner [4], og blant disse brukes ofte POPC som lipid for å etterligne en cellemembran ved undersøkelser av interaksjoner mellom lipidbilag og andre molekyler.

Studie av interaksjon mellom artikain hydroklorid og fosfolipidbilag har tidligere blitt gjort ved bruk av fast-fase NMR [5], men ikke av enantiomerene separat. Studien av Song et al. [5] som ble utført på lipidet DSPC, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, viste blant annet at prøve med artikain gav større forstyrrelser i den molekylære pakkingen av den polare

(hodegruppe) regionen i bilaget. Det ble også utført undersøkelser med ulike molprosent av artikain der en øking fra 40 til 55 mol% viste mindre endringer i lipidbilaget som da ga grunnlag for å foreslå at artikain former aggregater ved høy konsentrasjon. En annen interaksjonsstudie av Steinkopf et al. [6] er blitt gjort av (*R*)- og (*S*)- enantiomerene separat sammen med et utvalg fosfolipider, samt lipidekstrakt fra hjerne av gris ved bruk av Langmuir monolagsteknikk. Fra denne studien tyder det blant annet på at enantiomerene lokaliseres ved ulike regioner på lipidet POPS, 1-palmitoyl-2-oloyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine, der (*R*)- enantiomer lokaliseres i acylkjede-region, mens (*S*)- enantiomer ved hodegruppen.

1.2 Problemstilling

Hensikten med denne oppgaven er å undersøke interaksjonen mellom (*R*)-artikain og lipid av POPC ved bruk av fast-fase NMR-spektroskopi. Lokaliseringen av molekylet er avgjørende når det kommer til dets effekt som bedøvende middel, og det er ønskelig at et anestesimiddel har evnen til å trenge dypere i lipidbilaget i en cellemembran. Det foreligger en teori om at (*R*)-artikain går dypere ned i lipidmembranen enn (*S*)-artikain [6], noe som gir grunnlag for hypotesen om at (*R*)-artikain vil lokaliseres i acylkjedene i POPC.

Informasjon om interaksjonen mellom (*R*)-artikain og lipidbilag kan oppnås ved hjelp av tillagte liposomer som modell av en biologisk membran. NMR-spektroskopi av ^1H -, ^{13}C - og ^{31}P -kjerner kan bidra til å avdekke området (*R*)-artikain interagerer med lipidbilaget av POPC.

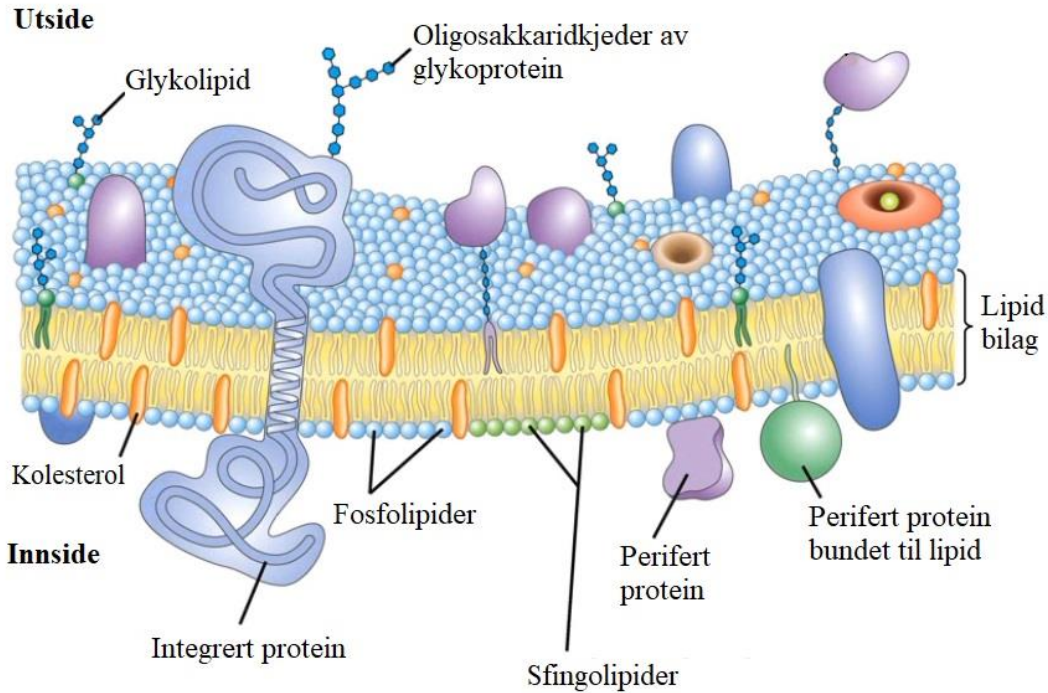
2. Teori

2.1 Biologiske membraner

En celle er omgitt av en membran som virker som en barriere som definerer innsiden og utsiden hos cellen. Denne barrieren forhindrer molekyler fra innsiden å lekke ut og uønskede molekyler fra utsiden å diffundere inn. Likevel, membranene er selektiv permeable og inneholder transportsystemer som tillater cellen å ta opp polare molekyler og ioner, og fjerne andre [7]. De fleste cellemembraner er elektrisk polarisert slik at innsiden er negativ, og membranpotensialet spiller en viktig rolle i transport og energikonversjon.

Biologiske membraner er like mangfoldig i strukturer som de er i funksjon, men felles for de alle er at de er i bilag. Bilagene består hovedsakelig av lipider og proteiner, men også karbohydrater som er bundet til disse som glykolipider og glykoproteiner [4, 7]. Membranlipider er amfipatiske molekyler som betyr at de har en hydrofob og en hydrofil del. Membranbilaget blir orientert ved hydrofobiske interaksjoner mellom hydrokarbonkjedene, og hydrofile interaksjoner mellom hodegruppe og vandig fase. Proteiner er bundet til bilagene og danner kanaler, reseptorer, energitransdusere og enzymer [4, 7]. Membranproteinene påvirker i tillegg strukturen og dynamikken av membranlipidene [8].

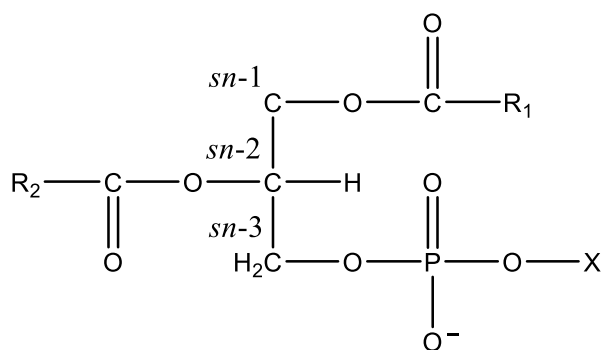
Membraner har væskeaktig struktur som betyr at de har stor bevegelighet. I tillegg til at fluiditeten i membranen påvirkes av steroidet kolesterol (dyreceller), vil fluiditeten også påvirkes i stor grad av egenskapene til fettsyrekjedene hos lipidene. Smeltepunkt, eller transisjonstemperatur (T_m), for fettsyrer avhenger av deres kjedelengde og grad av umettethet. Mettede fettsyrer vil ha sterkere interaksjoner grunnet flere van der Waals krefter og vil gi en mer fast struktur. Umettede fettsyrer som består av en eller flere cis-dobbeltbindinger vil gi en knekk i hydrokarbonkjeden som fører til mindre ordnet pakking av kjeder og igjen lavere T_m . Ved økt temperatur vil fosfolipidmembranen endres fra en mer tettpakket tilstand til en nærmere tilfeldig tilordning [7].



Figur 2.1.1: Strukturmodell av cellemembranen. Fettsyrekjedene gir en flytende hydrofob region på innsiden der proteiner holdes ved hydrofobiske interaksjoner med deres ikke-polare aminosyrekjeder. Både proteiner og lipider har fri bevegelse langs membranplanet. Karbohydratenheter er bundet til lipider og proteiner på den ekstracellulære overflaten [4].

2.2 Glyserofosfolipider

Glyserofosfolipider, også kalt fosfolipider, utgjør den største andelen av lipider i biologiske membraner. Fosfolipider har et glyserolmolekyl som rygggrad. Glyserol er et prokiralt molekyl der det prokirale karbonatomet er bundet til to CH_2OH -grupper. Ved binding av fosfat (eller annen substituent) til et av C-atomene på enden, konverteres det til et kiralt molekyl med to enantiomeriske former [4, 9]. Stereospesifikk nummerering (*sn*) brukes til å angi glyserol-inneholdende komponenters stereokjemi. Med det sekundære hydroksylet til venstre for det prokirale karbonet på glyserolet, blir atomene nummerert 1, 2 og 3 fra topp til bunn [9] (Figur 2.2.1).

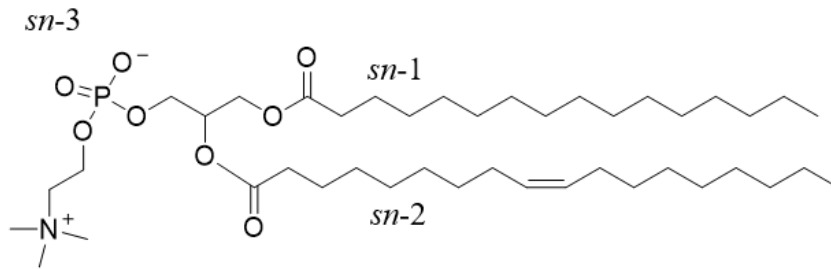


Figur 2.2.1: Grunnstruktur av glyserofosfolipider. To fettsyrer ($R_1\text{-COOH}$ og $R_2\text{-COOH}$) vil bindes direkte til glyserolmolekylet, mens en polar hodegruppe ($X\text{-OH}$) bindes til fosfatdelen ved kondensasjonsreaksjoner.

To fettsyrer blir bundet ved esterbinding til glyserolryggrad som utgjør to hydrofobe haler på molekylet. Ofte inneholder fosfolipider en mettet fettsyre i *sn*-1 posisjon og en umettet fettsyre i *sn*-2 posisjon. Den polare hodegruppen er bundet til en fosfatgruppe til glyserolmolekylet i *sn*-3 posisjon [9]. Ved nøytral pH er fosfatgruppen negativt ladet, mens ladningen hos de polare gruppene varierer. Disse ulike ladningene bidrar til ulike overflateegenskaper til lipider som igjen vil påvirke membranen. Glyserofosfolipider blir navngitt som derivater av den overordnede forbindelsen, fosfatidylsyre. For eksempel har fosfatidylserin hodegruppen serin bundet til seg [4]. De vanligste hodegruppene hos fosfolipider er aminosyren serin, etanolamin, kolin, glyserol og inositol [4, 7].

2.2.1 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC)

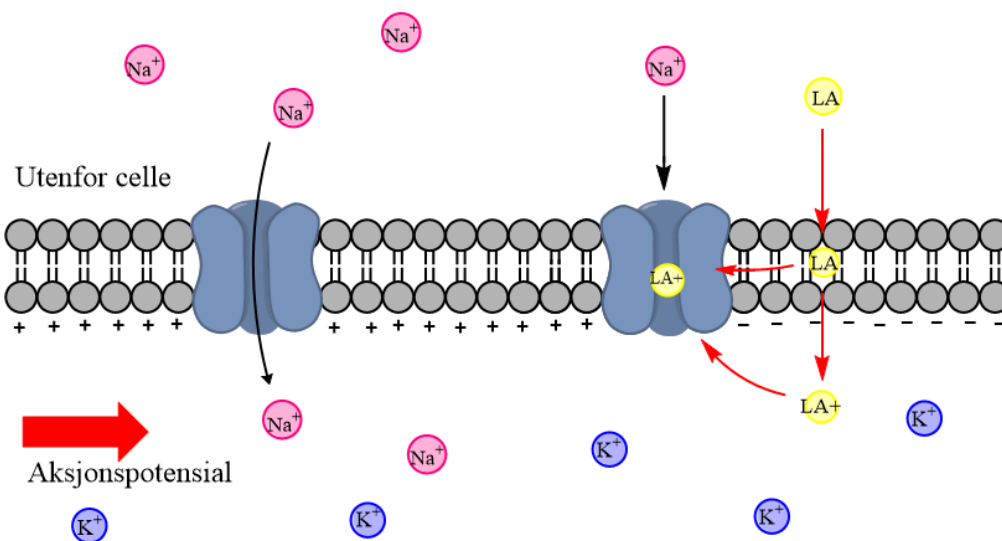
Eksperimentene skal utføres på unilamellære liposomer av 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, POPC, et lipid det finnes mye av i cellemembraner [10]. POPC som også kan omtales som fosfatidylkolin (phosphatidylcholine - PC) har som navnet tilsier, hodegruppen kolin bundet til fosfatgruppen i *sn*-3 posisjon på glyserolmolekylet. Acylkjedene er den mettede fettsyren palmitinsyre i *sn*-1 posisjon som består av 16 karboner (16:0), og den umettete oleinsyre med dobbeltbinding mellom C-9 og C-10 i *sn*-2 posisjon, bestående av 18 karbonatomer (18:1). Molekylformelen er $C_{42}H_{82}NO_8P$ med molekylvekt 760,076 g/mol [11].



Figur 2.2.2: Molekylstruktur av 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC). Lipidet har en transisjonstemperatur ved 270 K [12]. Med kolin som hodegruppe, er POPC et zwitterionisk lipid [13].

2.3 Lokalbedøvelse og mekanisme

Lokalbedøvende stoffer tilhører en klasse forbindelser som virker i å reversibelt blokkere de perifere og sentrale nervebaner i et spesifikt område. Bedøvelsen forhindrer generering av nerveimpulser ved å binde seg til natriumkanalen. Denne bindingen vil blokkere den indre transporten av natriumioner som danner aksjonspotensialet/impuls hos aksoner [14]. De fleste lokale bedøvelsesmidler er ioniserbare aminer, og det foreligger teorier om at både ladet og uladet form skal være relevant for mekanismen bak anestesi. Den uladete formen er den som transporteres over cellemembranen, mens den ladete formen skal bindes til et spesifikt sete i natriumkanalen [15]. Det er imidlertid også blitt forslått at den uladete formen når natriumkanalen gjennom det hydrofobiske området i lipidbilaget [16] (*Figur 2.3.1*).

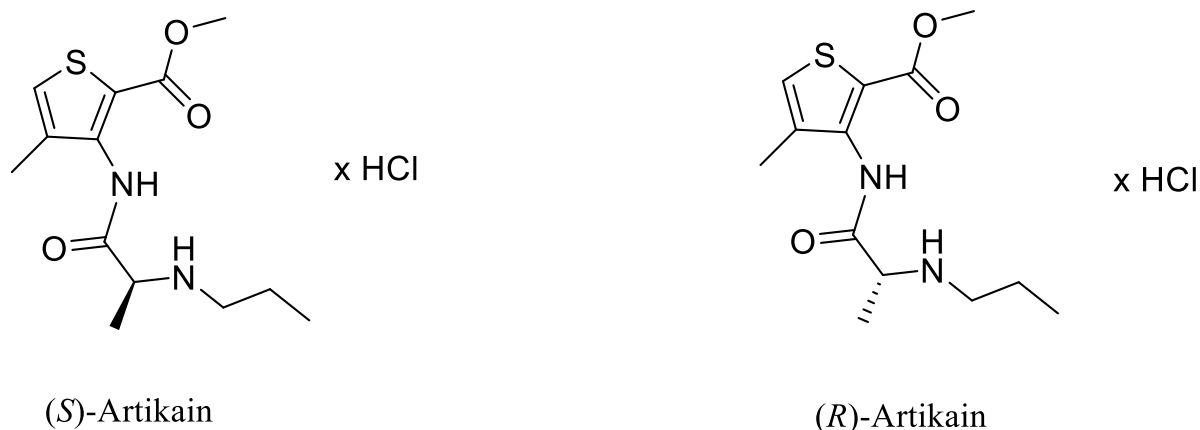


Figur 2.3.1: Skisse av de to foreslåtte mekanismene til lokalanestesi (LA). Rød pil med aksjonspotensial (impuls) gir mer positiv ladning inni cellen (+) på grunn av influks av Na^+ . Dette blir stanset når ionechannelen blokkeres av bedøvelsesmiddelet.

Lipidbilaget kan være involvert ved å opptre som mediumet hvor fra LA når natriumkanalen og/eller ved å gjennomgå organisasjonsendringer [15]. Forbindelsens bedøvende effekt kan derfor også være forbundet med forstyrrelsen (perturbasjon) i pakking av fosfolipider og mulige endringer i membranproteinenes struktur og funksjon [5, 17]. Lokalbedøvelsen sin integreringsevne i membranen er avhengig av molekylets hydrofobiske egenskap slik at jo mer hydrofobisk bedøvelsesmidlet er, jo bedre integreringsevne [18].

2.4 Artikain

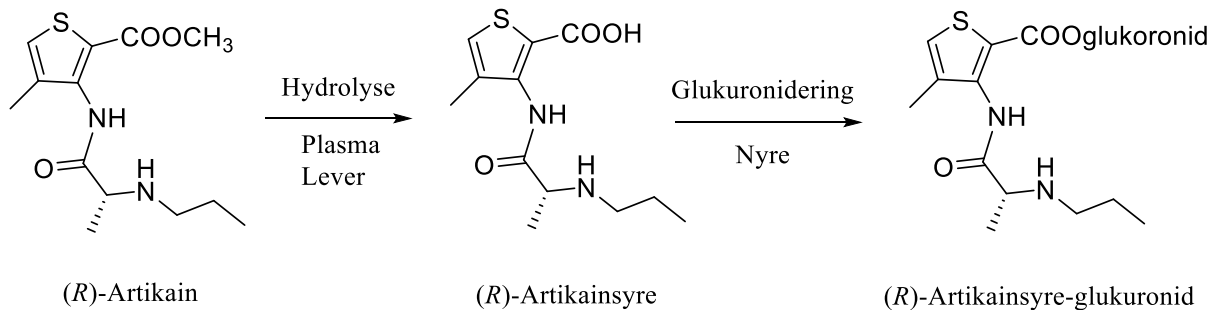
Artikain hydroklorid, metyl-4-metyl-3(2-[propylamino]propanamido)-tiofen-2-karboksylat hydroklorid, er et lokalbedøvelsesmiddel, vanlig brukt innen odontologi [2, 19]. Bedøvelsesmiddelet er en rasemisk blanding slik at det enda ikke er stadfestet om (*R*)- og (*S*)-enantiomerene er like effektive som lokalt bedøvelsesmiddel. De fleste lokale aminoamid-bedøvelsesmidler inneholder en benzenring [6], men hos artikain er denne en tiofendel som foreslås å gi en høyere hydrofobisitet sammenlignet med andre bedøvelsesmidler [2, 20, 21].



Figur 2.4.1: Struktur av (*S*)- og (*R*)-enantiomer av artikain hydroklorid. Formulert med HCl for å forbedre vannløseligheten, og for å øke grad og hastighet inn i sirkulasjonssystemet (biotilgjengelighet) [22]. Syntese av enantiomerene er beskrevet i studie av Steinkopf et al. [6].

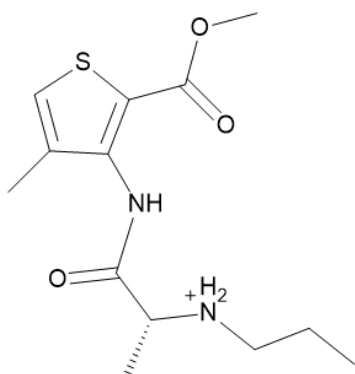
Artikain inneholder en ester som gjør artikain til et substrat for biotransformasjonen i plasma ved hydrolyse med plasma esteraser, og i lever med hepatiske mikrosomale enzymer [2, 16].

Hydrolyse av estergruppen gir artikainsyre som er den primære metabolitten (inaktiv). Artikain og dens metabolitter blir videre nedbrutt i nyrene [19, 23] (Figur 2.4.2).



Figur 2.4.2: Nedbrytning av (R)-artikain. I plasma og lever hydrolyseres (R)-artikain til (R)-artikainsyre og noe av (R)-artikainsyren blir videre omdannet i nyrene [23] til den glukuroniderte formen.

Lokalanestesimidler må trenge ned i lipidcellemembranen for å ha effekt. Uladede former vil være mer potente enn ladede, slik at artikain med en pK_a -verdi på 7,8 vil ha større interaksjonsevne ved fysiologisk pH 7,4 sammenlignet med bupivacaine ($pK_a=8,1$) [24]. Artikain har i tillegg en høy oktanol/vann partisjonskoeffisient på 257 som betyr at molekylet i større grad vil foretrekke det hydrofobe miljøet i lipidmembranen [25].



(R)-Artikain, ladet form

Figur 2.4.3: Viser den ladede formen av (R)-artikain, der nitrogen ved kiralt karbon er protonert [26]. Det vil være omtrent 70% av denne formen ved fysiologisk pH på 7,4 [24].

2.4.1 Artikain og nevrotoksisitet?

I klinisk sammenheng blir artikain brukt i en fire prosent blanding med adrenalin 1:200 000. Denne mengden er funnet til å være god i forhold til tid til virkning, varighet og effekt av middelet [19]. Adrenalin er inkludert i den kliniske formelen for å både forsinke absorpsjonen av artikain som gir forlenget anestetid, og for å minimere systemisk absorpsjon av det aktive stoffet [2].

Ved parestesi oppstår en følelse med prikking eller nummenhet i munn eller ansikt [2]. I studie fra Malamed et al. [2] ble to grupper med pasienter behandlet med forskjellig bedøvende middel. I den ene gruppen ble inngrep utført med artikain 4% og adrenalin, mens hos den andre gruppen ble det brukt lidokain 2% og adrenalin. Studien viste blant annet at flere opplevde parestesi i artikaingruppen (0,9%) enn hos lidokaingruppen (0,45%), men ingen av tilfellene gav vedvarende parestesi. Artikain ble dermed konkludert til å være et trygt lokalbedøvelsesmiddel til bruk i klinisk odontologi [2]. I en annen studie av Hopman et al. [27] gjennomgås flere retrospektive studier fra flere land der forekomsten av vedvarende parestesi etter bruk av lokalbedøvelse ble undersøkt. Denne viste også at det var en høyere prosent av parestesirammede som var artikainrelatert, og med tilfeller av vedvarende parestesi. Her blir «vedvarende parestesi» definert som varigheten av parestesi i minst tre måneder etter administrasjon av bedøvelsesmiddelet [27]. En høyere konsentrasjon av bedøvelsesmiddel kan øke risiko for nerveskade, men også andre faktorer som høyt trykk ved injeksjon, eller dannelse av oksygenradikaler kan være en utløsende årsak. Toksisitet av bedøvelsesmidler ble også undersøkt i dyre- og *in vitro* studier der artikain ble vist å være mindre toksisk enn andre bedøvelsesmidler som lidokain og tetrakain. Disse undersøkelsene ble gjort ved lik konsentrasjon som dermed også betød at artikain var mindre effektivt enn de andre lokalbedøvende medikamentene [27].

2.5 NMR

Kjernemagnetisk resonans spektroskopi er basert på en magnetisk egenskap til atomkjernene kalt *spinn*, I . Spinnen er relatert til atomnummer og massenummer, og NMR-spektroskopi detekterer i teorien enhver isotop hvor kjernene har et magnetisk moment større enn null ($I > 0$). De viktigste kjernene er proton (^1H) og karbon-13 (^{13}C) som begge har et spinn på $\frac{1}{2}$. Deres resonanser er viktige for å bestemme strukturer hos organiske molekyler [28, 29]. Når et magnetisk felt tilføres spinnene, som fungerer som små barmagneter, vil disse orienteres parallelt med det påførte feltet [30]. Elektromagnetisk stråling i radiobølgeområde med rett frekvens kan vekselvirke med atomkjernene og gi et spektrum som viser det magnetiske fingeravtrykket hos molekylet. Dette gir også informasjon om det fysiske og kjemiske miljøet molekylet er i [31].

2.5.1 Atomvinkelmoment og magnetisk moment

De fleste kjerner har et eget vinkelmoment, \mathbf{P} , og ifølge det klassiske bilde roterer en kuleformet atomkjerne rundt en akse. Kvantemekaniske betraktninger viser at dette vinkelmomentet er kvantisert:

$$\mathbf{P} = \sqrt{I(I + 1)}\hbar \quad (2.5-1)$$

Hvor $\hbar = h/2\pi$, der h er Plancks konstant ($6,6256 \cdot 10^{-34}$ J s), og I er vinkelmomentets kvantetall, ofte kalt kjernespinnet.

Kjernespinnet kan ha verdier $I = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, 2, \frac{5}{2} \dots$ helt opp til 6, men hverken verdier av I eller \mathbf{P} kan forutsies fra teorien [28, 29]. Vinkelmomentet \mathbf{P} henger sammen med et magnetisk moment $\boldsymbol{\mu}$, der begge er vektormengder og er proporsjonale til hverandre:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma\mathbf{P} \quad (2.5-2)$$

Hvor proporsjonalfaktoren, γ er en konstant for hver (kjerneisotop) av hvert grunnstoff. Konstanten blir kalt den magnetogyriske konstant, og deteksjonssensitiviteten til en kjerne i NMR-eksperimenter avhenger av denne. Kjerner med stor γ sies å være sensitive som betyr at de er lette å observere. Magnetisk moment, $\boldsymbol{\mu}$, blir bestemt ved å kombinere de to likningene (2.5-1) og (2.5-2):

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma\sqrt{I(I + 1)}\hbar \quad (2.5-3)$$

Kjerner med spinn $I = 0$, vil ikke ha kjernemagnetisk moment. De vanligste atomene i organiske forbindelser er isotopene ^{12}C og ^{16}O som har spinn $I = 0$. Disse kan ikke detekteres ved hjelp av NMR-spektroskopi [28, 29, 32]. Karbon-13, ^{13}C , har lav naturlig forekomst som betyr at den er lite sensitivt for målinger. Utvikling av NMR-spektrometer og nye måleteknikker har gjort at det også er mulig å kunne detektere ^{13}C , noe som bidrar til nyttig informasjon om struktur hos forbindelser. I denne oppgaven vil det bli utført NMR-eksperimenter på kjernene ^1H , ^{13}C og ^{31}P der egenskaper er oppgitt i *Tabell 2.5.1*.

Tabell 2.5.1: Tabell over størrelser som er avgjørende for egenskapene hos proton, karbon-13 og fosfor-31 ved utføring av NMR-eksperimenter.

Nuklide	Spinn, I	Naturlig forekomst ^{a)} [%]	Magnetisk moment ^{b)} , μ_z/μ_N	Magnetogyrisk forhold ^{a)} , γ [$10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	NMR frekvens ^{a)} [MHz] ($B_0 = -2,3488 \text{ T}$)	Relativ mottakelighet ^{c)}
^1H	1/2	99,9885	2,7928	26,7522	100,000	1,00
^{13}C	1/2	1,07	0,7024	6,7283	25,1504	$1,59 * 10^{-2}$
^{31}P	1/2	100	1,1316	10,8394	40,5178	$6,65 * 10^{-2}$

^{a)} Verdier hentet fra Harris et al. [33].

^{b)} z-komponent av kjernemagnetisk moment i enheter av kjernemagneton μ_N . Verdier fra Bruker Almanakk 2010. $\mu_N = eh/4\pi m_p$, m_p : masse av proton = $5,05095 * 10^{-27} \text{ JT}^{-1}$ [34].

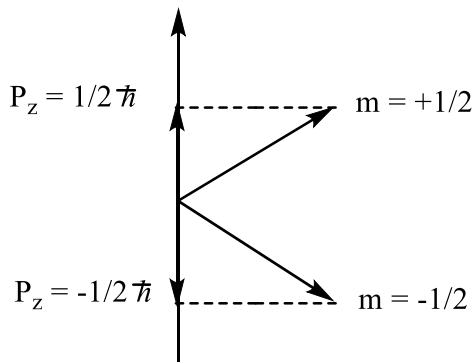
^{c)} Mottakelighet er uttrykt i forhold til ^1H (=1) for konstant felt og likt antall kjerner. Verdier fra Bruker Almanakk 2010 [34].

2.5.2 Magnetisk felt og energi

En kjerne med vinkelmoment \mathbf{P} og magnetisk moment $\boldsymbol{\mu}$ blir plassert i et statisk magnetisk felt \mathbf{B}_0 . Vinkelmomentet vil orienteres slik at dens komponent P_z langs retningen av feltet er en integrert eller halvintegrert multiplum av \hbar :

$$P_z = m\hbar \quad (2.5-4)$$

Hvor m er magnetisk kvantetall med verdier $m = I, I-1 \dots -I$. Det er $(2I + 1)$ forskjellige verdier av m , som vil gi likt antall av mulige orienteringer for vinkelmoment og magnetisk moment [28, 32]. Kjerner i magnetisk felt vil oppføre seg med det som kalles *retningsbestemt kvantisering* [28]. For protoner og andre kjerner med spinn $I = 1/2$ vil det være to m -verdier: $+1/2$ og $-1/2$ (Figur 2.5.1), mens for eksempel deuterium, ${}^2\text{H}$, med $I = 1$ vil ha tre verdier ($m = +1, 0, -1$).



Figur 2.5.1: Viser retningsbestemt kvantisering av vinkelmomentet \mathbf{P} i det magnetiske feltet for kjerner med $I=1/2$ [28].

Fra likningene (2.5-2) og (2.5-4) oppnås komponentene i det magnetiske momentet langs feltretning z :

$$\mu_z = m\gamma\hbar \quad (2.5-5)$$

I klassisk representasjon vil kjernedipoler presesere rundt z -aksen som er retningen i det magnetiske felt. Presesjonsfrekvensen, også kalt Larmorfrekvensen ν_L er proporsjonal til magnetisk fluks tetthet B_0 :

$$\nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0 \quad (2.5-6)$$

På grunn av retningsbestemt kvantisering vil kun spesifikke vinkler være tillatt for en preseserende kjernedipol. For eksempel vil vinkel for en kjerne med $I=1/2$ være $54^\circ 44'$ [28].

Likningen for energien av en magnetisk dipol i magnetisk felt med flux tetthet B_0 blir uttrykt ved:

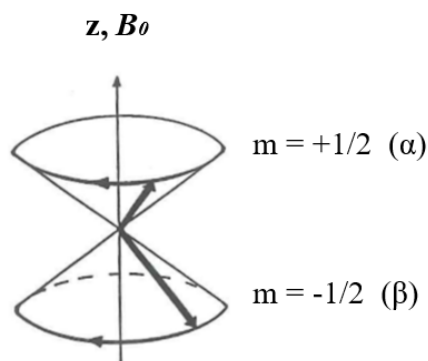
$$E = -\mu_z B_0 \quad (2.5-7)$$

For kjerner gjelder uttrykket $(2I + 1)$ for mulige orienteringer også for antall energitilstander (*Zeemaneffekten*) [28]. Kombinasjon av (2.5-5) og (2.5-7) gir da uttrykket:

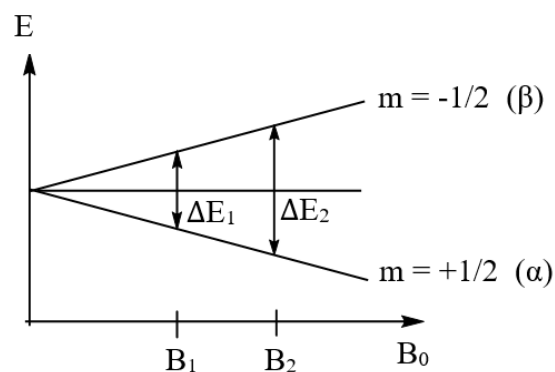
$$E = -m\gamma\hbar B_0 \quad (2.5-8)$$

Det vil altså være to energinivåer for kjerner med spinn $I=1/2$ i det magnetiske feltet. Det magnetiske momentet, μ_z , vil være parallell til feltretningen med $m= +1/2$ og er energetisk foretrukket orientering. I kvantemekanikk er tilstanden $m= +1/2$ beskrevet ved spinnfunksjon α . Når $m= -1/2$ derimot er μ_z antiparallell og beskrevet ved spinnfunksjon β [28, 32]. Energiforskjellen, ΔE er proporsjonal med B_0 (*Figur 2.5.3*) og forskjellen mellom to energinivåer er:

$$\Delta E = \gamma\hbar B_0 \quad (2.5-9)$$



Figur 2.5.2a: Viser presesjonen til kjernedipoler med $I = 1/2$ rundt z-aksen med vinkel $54^\circ 44'$ [22].



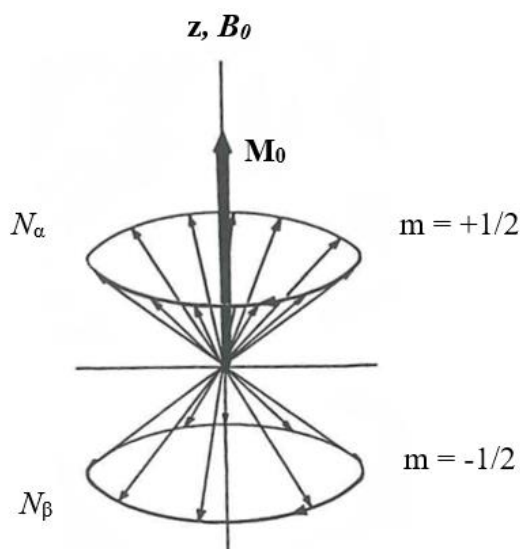
Figur 2.5.2b: Energiforskjellen ΔE mellom to energinivåer som funksjon av magnetisk flux tetthet B_0 for kjerner med spin $I=1/2$ [22].

Ved Boltzmann statistikk kan kjerner med $I=1/2$ bli representert som antall kjerner i øvre energinivå, N_β , og antall kjerner i nedre energinivå, N_α , slik at:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\Delta E/k_B T} \quad (2.5-10)$$

Der k_B er Boltzmann konstant ($=1,3805 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) og T er temperatur (K). Energiforskjellen ΔE er veldig liten for kjerner sammenlignet med gjennomsnittsenergien $k_B T$ for termiske bevegelser. Følgelig er populasjonene hos energinivåene nesten like, (kun overskudd på antall i ppm i nedre energinivå). Forskjellen øker ved økt magnetisk flux tetthet B_0 [28, 32].

Figur 2.5.2a viser kjerne med $I=1/2$ som preseserer rundt feltaksen z . Tilføres det z -komponenter til alle kjernemagnetiske momenter i en prøve, oppnås en makroskopisk magnetisering \mathbf{M}_0 langs feltretningen, siden N_α er større enn N_β . I beskrivelse av alle typer pulsede NMR-eksperimenter spiller vektoren \mathbf{M}_0 en vesentlig rolle [28].



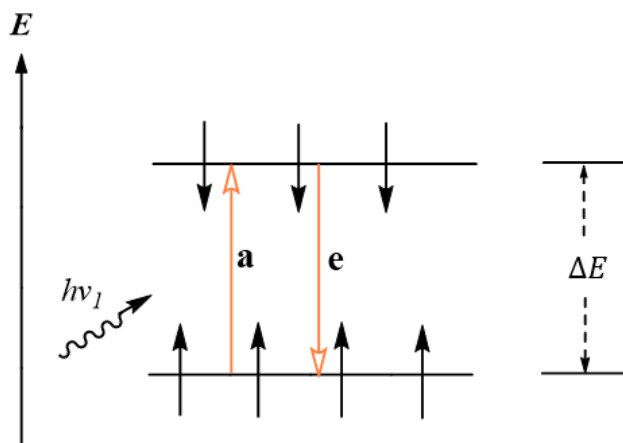
Figur 2.5.3: Figuren viser fordeling av precesserende kjernedipoler rundt z-aksen. Da N_α er større enn N_β vil den makroskopiske magnetiseringen, \mathbf{M}_0 , være langs feltretningen [28].

2.5.3 Grunnleggende prinsipper for kjernemagnetisk resonans (NMR)-eksperiment

I et NMR-eksperiment blir overganger (transisjoner) induisert mellom forskjellige energinivåer ved å bestråle kjernene med elektromagnetiske bølger med passende frekvens ν_1 [28, 29]:

$$h\nu_1 = \Delta E \quad (2.5-11)$$

Transisjoner fra nedre til øvre energinivå korresponderer til en absorpsjon i energi, mens emisjon fra motsatt retning (*Figur 2.5.4*). Hver transisjon er assosiert med en reversering av spinnorienteringen og på grunn av populasjonsoverskuddet i nedre nivå vil absorpsjon av energi være den dominante prosessen. Dette blir observert som et signal hvor intensiteten er proporsjonal til forskjellene i populasjonene, $N_\alpha - N_\beta$. Hvis populasjonene er like ($N_\alpha = N_\beta \rightarrow$ *metning*) vil absorpsjons- og emisjonsprosessene kanselleres og det observeres ikke signal [28].



Figur 2.5.4: Energisystem for kjerner med spinn $I=1/2$. Bestrålingen med frekvens ν_1 slik at $h\nu_1 = \Delta E$, induserer absorpsjons- (**a**) og emisjons (**e**)-transisjoner [28].

Transisjoner kan kun skje når frekvensen ν_1 samsvarer med *Larmor frekvensen*, ν_L . Fra likningene (2.5-9) og (2.5-11) fås *resonansbetingelsen* [28, 32]:

$$\nu_L = \nu_1 = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0 \quad (2.5-12)$$

Kjerner vil ha forskjellige resonansfrekvenser ved ulike magnetisk flux tettheter, B_0 (*Tabell 2.5.2*).

Tabell 2.5.2: Noen resonansfrekvenser ved ulike magnetisk feltstyrker, B_0 . Utregning vist i *Vedlegg A*.

B_0 [T]	Resonansfrekvenser [MHz] ^{a)}		
	^1H	^{13}C	^{31}P
2,35	100	25,15	40,52
4,70	200	50,32	81,08
9,40	400	100,61	162,16
11,75	500	125,76	202,70
18,79	800	201,19	324,15

a) Verdier fra Bruker almanakk 2010 [34]

2.5.4 Magisk-vinkel spinn

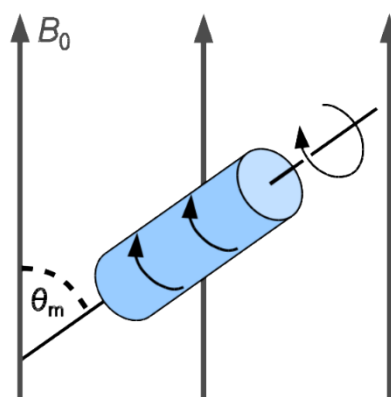
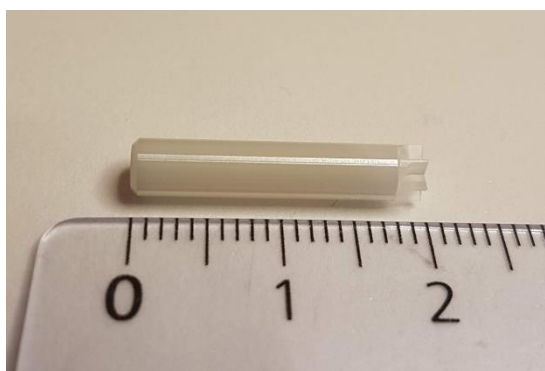
I denne oppgaven er det blitt brukt fast-fase NMR-spektroskopi. NMR-spektre av faste stoffer gir brede signaler. Det finnes flere grunner for dette.

Kjernedipoler i et fast stoff interagerer med hverandre. Styrken av interaksjonen avhenger av distansen, og er spesielt høy for kjerner som er direkte bundet til hverandre, som et ^{13}C -H-fragment, eller kjerner separert med bare to bindinger, som i en CH_2 -gruppe. Det magnetiske feltet rundt kjernene vil altså overlappes og oppståtte dipol-dipol interaksjoner vil resultere i brede signaler.

For et fast stoff vil atomenes bevegelse være sterkt begrenset eller helt forhindret. Kjemisk skift er avhengig av orienteringen av molekylet i forhold til det ytre magnetiske feltet (kjemisk skift anisotropi, CSA), som resulterer i disse brede signalene.

Hvis prøven inneholder kjerner med spinn større enn $\frac{1}{2}$, som ^{14}N ($I = 1$), vil disse kjernene ha et elektrisk kvadrupol moment Q , som bidrar ytterligere til signalbredden [28].

Ved å bruke magisk-vinkel spinn (MAS) kan skarpe signaler hos faste stoffer også oppnås. Prøven vil da bli plassert og spinnes i en vinkel på $54,74^\circ$ i forhold til det magnetiske feltet [28, 30]. Med MAS-teknikken blir prøven vanligvis rotert med en frekvens på 2 til 18 kHz. Spektrene er lettest å tolke når spinningsfrekvensen overstiger den totale bredden av det anisotropiske spekteret, som blir funnet ved å måle en statisk prøve. MAS-teknikken egner seg godt for undersøkelse av polymerer og andre materialer [28].

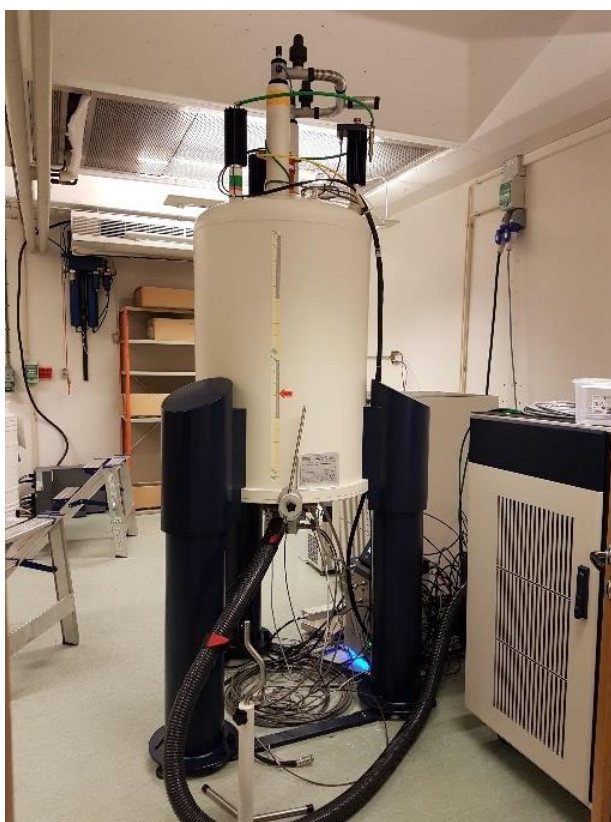


Figur 2.5.5a: Bilde viser en 4 mm ZrO_4 rotor som blir brukt i fast-fase NMR-eksperimentene.
b: Prøven roteres ved den magiske vinkelen, $\theta_m = 54,74^\circ$, med hensyn til retningen av B_0 [35].

3. Eksperimentelt

Til prosjektet var det viktig å finne ut om (*R*)-artikain holdt seg stabilt over lengre tid. På Bruker AV 500 MHz NMR-instrumentet på Kjemisk Institutt ble det utført en rekke eksperimenter av (*R*)-artikain løst i D₂O. Prøven ble oppbevart ved romtemperatur uten beskyttelse mot lys.

Fast-fase NMR-spektroskopi ble benyttet ved undersøkelse av liposomprøver med og uten (*R*)-artikain. Eksperimentene ble utført på Bruker 500 MHz WB NMR-instrumentet på Kjemisk Institutt ved Universitetet i Bergen.



Figur 3.1.1: Bilde av magneten til 500 MHz WB NMR-instrumentet på Kjemisk Institutt ved UiB. I denne undersøkelsen ble instrumentet benyttet for fast-fase NMR-eksperimenter på kjerner av proton (¹H), fosfor-31 (³¹P) og karbon-13 (¹³C).

3.1 Material og utstyr

1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) ble skaffet fra Avanti® Polar Lipids, og syntetiseringen av (*R*)-artikain beskrevet i Steinkopf et al. [6] ble utført av postdoktor Zeeshan Muhammad fra forskergruppen *Organisk syntese og legemiddelkjemi* ved Kjemisk Institutt ved Universitet i Bergen.

I fast-fase NMR-eksperimentene er det brukt 4 mm ZrO₄ rotor, mens NMR-rør av typen NORELL 507-HP ble brukt i stabilitetsundersøkelsen av (*R*)-artikain.

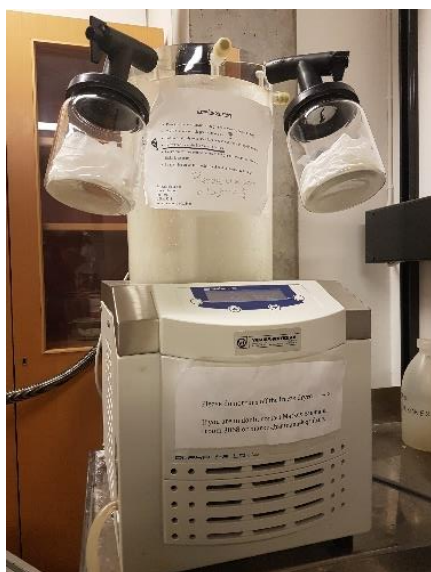
Tabell 3.1.1: Oversikt og informasjon over forbindelser som ble brukt under laboratoriearbeidet til studiet av (*R*)-artikain og dannelse av unilamellære liposomer.

Forbindelse	Molekylformel	Molar masse [g/mol]	Renhet [%]	Konsentrasjon [mol/L]
Artikain hydroklorid	C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₃ S +HCl	320,836	-	-
POPC	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	760,076	-	-
Kloroform	CHCl ₃	119,378	99,0-99,4	-
Superdestillert vann	H ₂ O	18,015	Deionisert	-
Natriumhydroksid	NaOH	39,997	≥99,5	0,05
Deuteriumoksid	D ₂ O	20,028	99,8	-
Kaliumklorid*	KCl	74,551	>99	-

*Mettet kaliumkloridløsning ble laget for revitalisering av pH-elektrode.

Tabell 3.1.2: Utstyr med beskrivelse brukt under laboratoriearbeidet til undersøkelsen av (*R*)-artikain og dannelse av unilamellære liposomer.

Utstyr	Type	Beskrivelse
Frysetørker	ALPHA 1-2 LD plus	Skånsomt ekstrahere vann fra frosset prøve
Rotavapor	Heidolph, Laborota 4003	Fordampe kloroform, samt varmebad under ekvilibrerings
pH-meter	Sentron pH-meter SI400 7400-005	pH-målinger av (<i>R</i>)-artikain-løsning og lipidprøver



Figur 3.1.2: ALPHA 1-2 LD plus frysetørker som brukes under forberedelsen av unilamellære liposomer, hvor vann blir ekstrahert fra prøve i frosset tilstand ved sublimasjon. Prøvene oppbevares i glassbeholdere som blir festet ved gummiventilene med låsehåndtak og luftingstilkobling for å danne vakuum. Kondensatoren holder en temperatur på -55°C .

3.2 Eksperimentelt ved NMR-spektroskopi

Ved væske-NMR ble det utført ^1H -eksperimenter på (*R*)-artikain. Fast-fase eksperimenter ble utført på proton, fosfor-31 og karbon-13 av liposomprøver med og uten (*R*)-artikain. Fosforsyre (85 %) som har kjemisk skift på 0 ppm ble brukt som referanse ved justering av spektrenes ^{31}P -kjemiske skift (*Vedlegg B*).

Tabell 3.1.2: Oversikt over eksperimenttype og pulsprogram kjørt på ulike kjerner i prøvene av (*R*)-artikain og POPC. Parametere for eksperimenter i *Vedlegg B*.

Prøve	Eksperimenttype	Kjerne	Pulsprogram	Beskrivelse pulsprogram
(<i>R</i>)-artikain i D_2O	Væskefase	^1H	zg30	Bruk av 30° flip pulsvinkel
(<i>R</i>)-artikain i D_2O	Væskefase	^1H	zgpr	1D sekvens med f1 presaturering
POPC	Fast-fase	^1H	onpulse	Én rf-puls sendes per syklus
POPC	Fast-fase	^{31}P	zg30	Bruk av 30° flip pulsvinkel
POPC	Fast-fase	^{13}C	hpdec	Høyeffekts-dekobling

4. Innledende forsøk: Stabilitetsundersøkelse av (*R*)-artikain

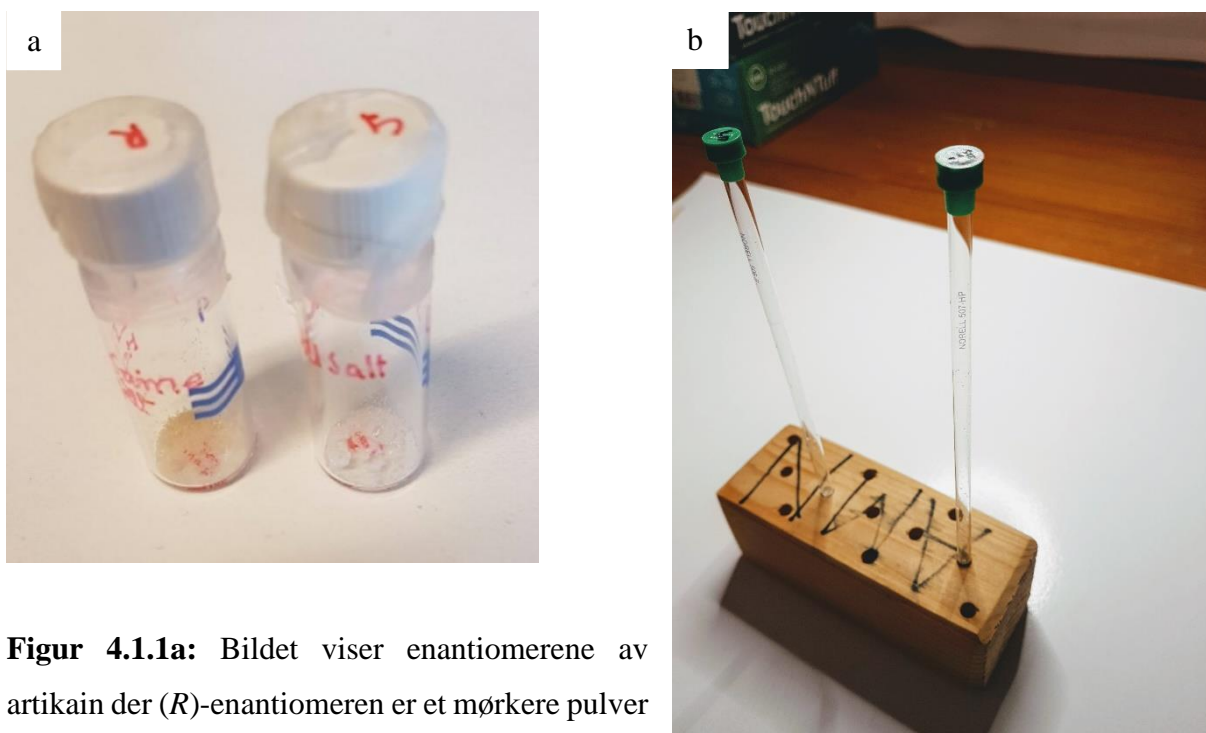
Hensikten med undersøkelsen var å finne ut om (*R*)-artikain holdt seg stabilt over tid. Resultatene kan gi informasjon om resonansenes posisjon i spektrene og holdbarheten til (*R*)-artikain, som kan være nyttig til undersøkelsen av interaksjonen mellom (*R*)-artikain og lipidbilag av POPC.

4.1 Eksperimentelt: Stabilitetsundersøkelse av (*R*)-artikain

Pulver av (*R*)-artikain hydroklorid ble løst i D₂O og pH ble målt til 6,20 i løsningen. Det ble tilsatt NaOH for å justere pH til fysiologisk pH=7,4. Løsningen ble videre overført til NMR-rør og latt stå i laboratorieskap over hele perioden mens det ble utført dataopptak av prøven.

Tabell 4.1.1: Vekt, volum og konsentrasjon av stoff brukt i eksperimentell del.

	Vekt [mg]	Volum [μ L]	Konsentrasjon [mol/L]
(<i>R</i>)-artikain	4,0	-	-
D₂O	-	700	-
NaOH	-	60	0,05
(<i>R</i>)-artikain løsning	-	-	$16,4 \cdot 10^{-3}$



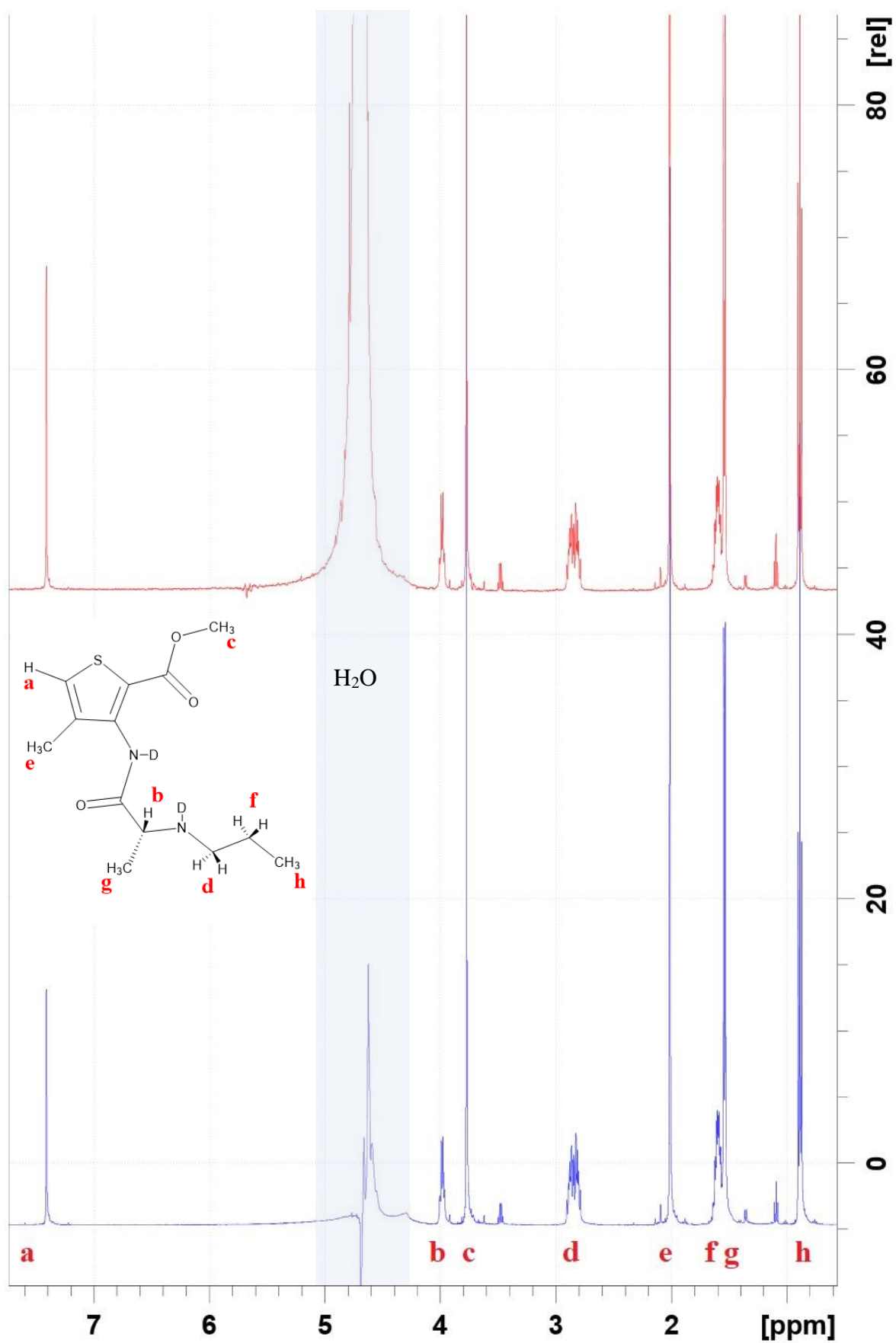
Figur 4.1.1a: Bildet viser enantiomerene av artikain der (*R*)-enantiomerer er et mørkere pulver enn (*S*)-enantiomerer som er hvit. **b:** Bilde viser NMR-rør som ble benyttet til å ta opp spektre av (*R*)-artikain i D₂O.

4.2 Resultat

Først vil spektre med og uten vannundertrykking sammenlignes og kjemiske grupper tilordnes. Videre vil spekter med vannundertrykking sammenlignes med spekter tatt opp ved senere tidspunkt for observering av mulige endringer. Under hele undersøkelsen ble alle eksperimenter og parametre beholdt like (*Vedlegg B*).

4.2.1 ¹H-spektre av (*R*)-artikain med og uten vannundertrykking

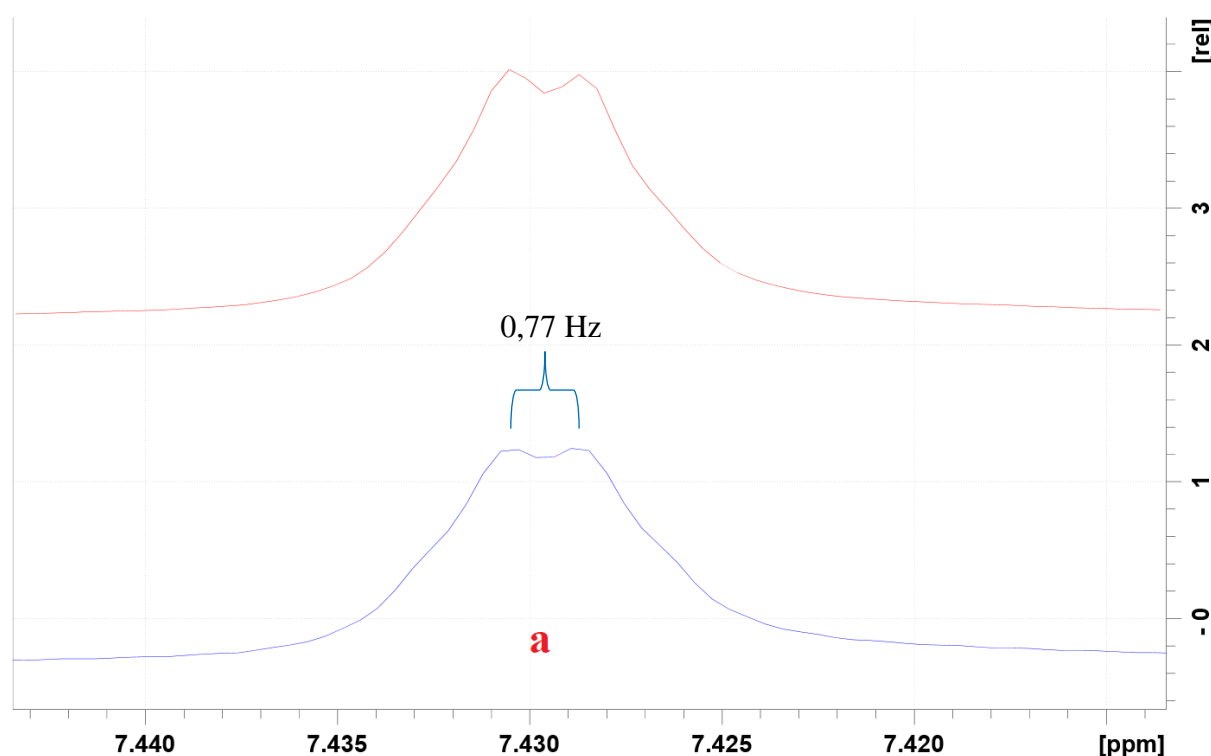
Dataopptak av (*R*)-artikain utført med og uten vannundertrykking (presaturering) presenteres der spektrene vises i samme figur. Øverste spekter med rød farge viser uten vannundertrykking, mens nederste spekter i blått er med vannundertrykking.



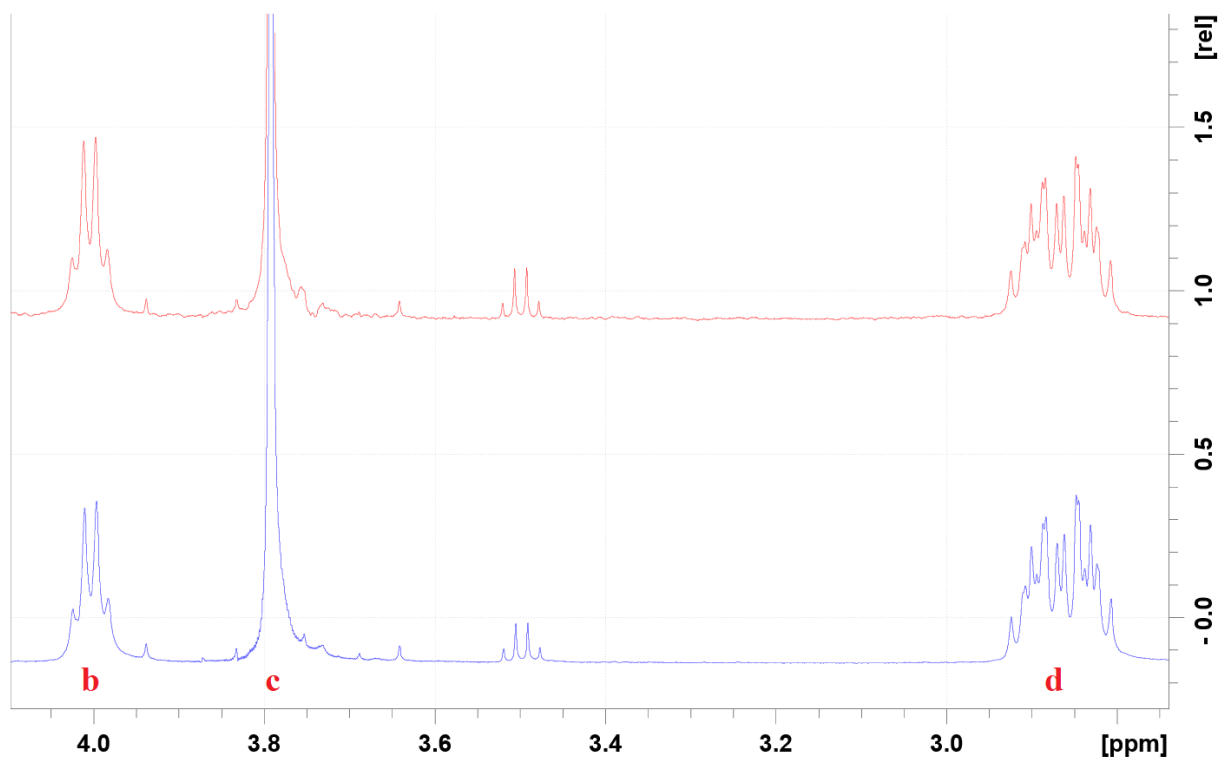
Figur 4.2.1: Figur viser 500 MHz ¹H-spektre av (R)-artikain tatt opp ved 300K. Øverste spekter

i rødt viser uten vannundertrykking, mens nederste spekter i blått er med vannundertrykking. De ulike resonansene er merket med bokstaver *a-h*, mens skyggelagt felt indikerer område for vannsignalet (~4,7 ppm).

Protonspektrene i *Figur 4.2.1* viser forskjellen mellom med og uten bruk av presaturering. Bruk av vannundertrykking vil gi økt signal for de andre resonansene og mindre støy, men denne figuren viser ikke store forskjeller med unntak av signalet av vann. Det er noe støy rundt 5,6 ppm som blir borte ved bruk av presaturering. Resonanser markert med bokstaver viser til ulike kjemiske grupper der *a*: H bundet til aromat (tiofen), *b*: H bundet til kiralt karbon, *c*: metyl bundet til oksygen, *d*: CH₂ ved nitrogen, *e*: metyl bundet til tiofen, *f*: CH₂, *g*: metyl bundet til kiralt karbon og *h*: metyl.

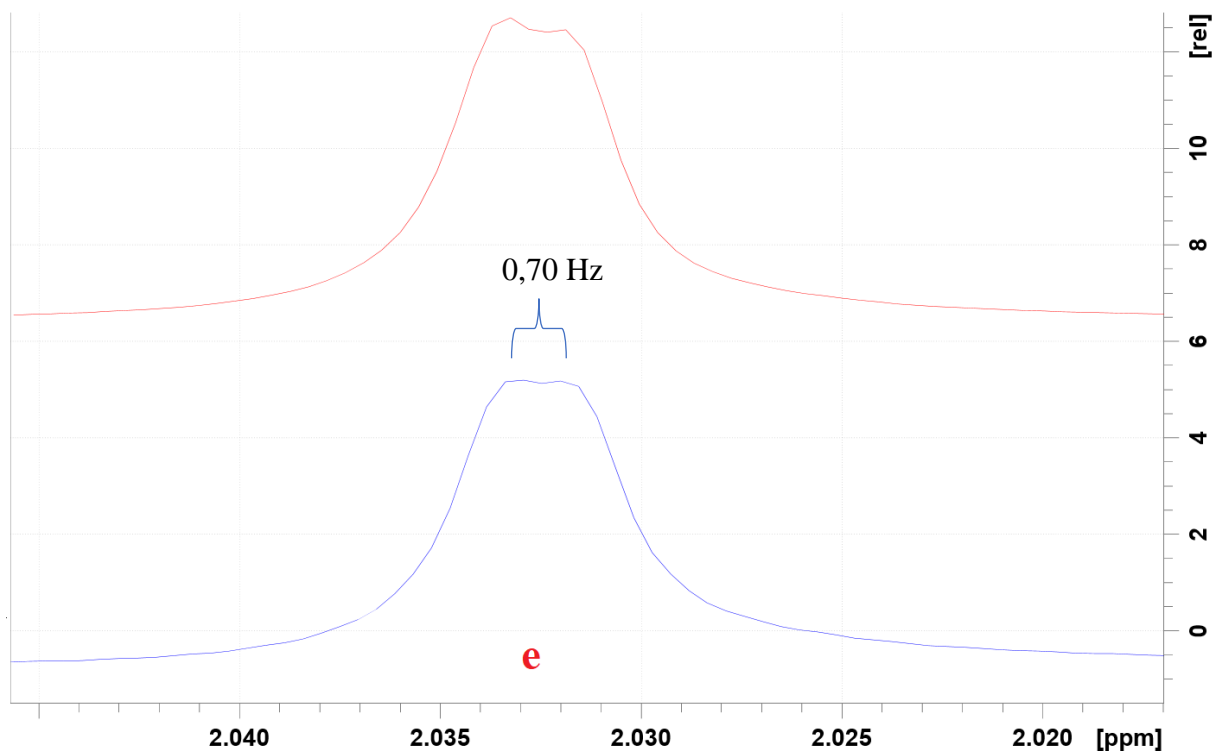


Figur 4.2.2: ¹H-spekter av (*R*)-artikain viser område for aromater der resonans *a* er proton bundet til tiofen. I begge spektrere har resonansene en splitting med avstand målt til 0,77 Hz. Nederste spekter i blått med presaturering observeres splittingen litt svakere. Antydning til skuldre observeres for resonansene i begge spektrere.



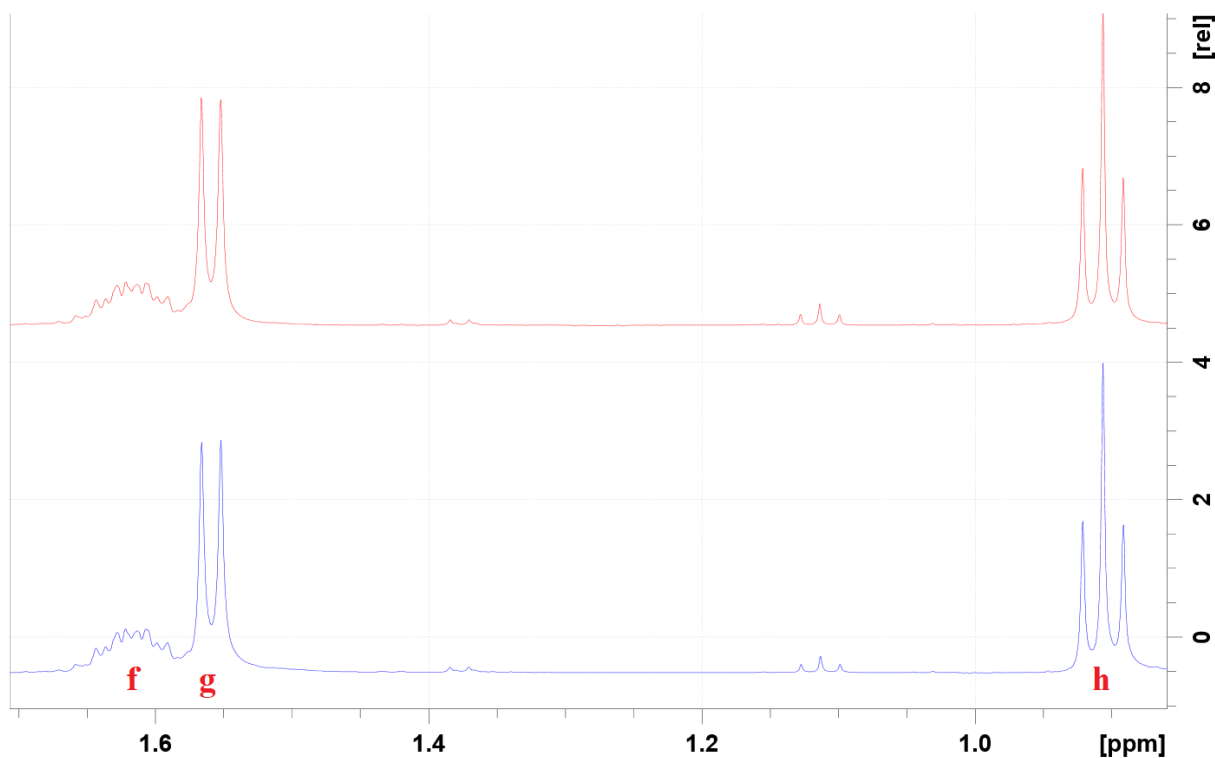
Figur 4.2.3: ^1H -spekter av (*R*)-artikain hvor spekteret nederst i blått er med presaturering. Spektrene viser kvartett *b* med kjemisk skift på 4,00 ppm for proton bundet til kiralt karbon, singlett *c* med kjemisk skift 3,79 ppm for metyl bundet til oksygenatom (metoksygruppe), og multipllett *d* for CH_2 -gruppe med kjemisk skift 2,87 ppm.

Det observeres også en liten kvartett i spektrene rundt 3,50 ppm. Integralet av dette signalet er 0,11. Ved å sammenligne spektrene med og uten vannundertrykking viser denne figuren mindre støy i spekteret med vannundertrykking, spesielt i området rundt singletten (*c*).



Figur 4.2.4: ¹H-spekter av (*R*)-artikain for metylgruppen bundet til tiofen med kjemisk skift på 2,03 ppm (*e*). Nederste spekter i blått er med presaturering. Begge signaler har en svak splitting der avstanden mellom splittingen blir målt til å være rundt 0,70 Hz.

Verdien for splittingen for resonans *e* i *Figur 4.2.4* er litt lavere enn verdien for splittingen for resonans *a* vist i *Figur 4.2.2*. I begge figurene (4.2.2 og 4.2.4) observeres det en svakere splitting i signalet tatt opp med presaturering.



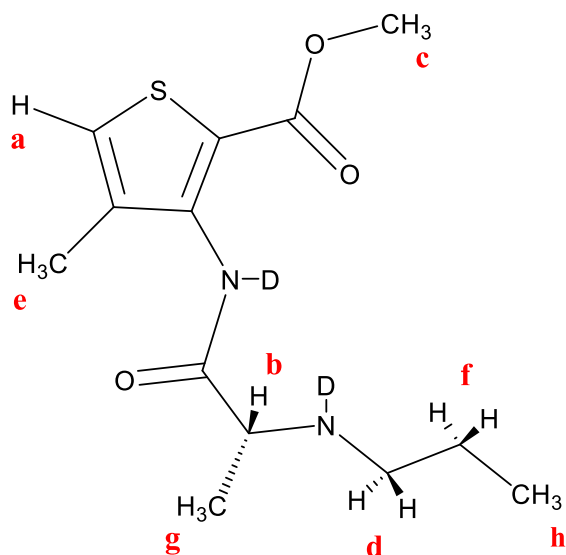
Figur 4.2.5: ^1H -spekter av (*R*)-artikain for regionen 0,9-1,7 ppm (*f*, *g* og *h*). Spekter med vannundertrykking er nederst i blått. Figuren viser en multipllett ved 1,62 ppm for CH_2 (*f*), en nærliggende duplett lenger upfield på 1,56 ppm for metyl bundet til kiralt karbon (*g*), og en tripllett for metyl rundt 0,90 ppm (*h*).

Spektrene viser også en svak tripllett med kjemisk skift rundt 1,11 ppm og antydning til en dublett rett under 1,40 ppm. Integralet av tripletten er 0,15, mens dubletten har et integral på 0,12. Det observeres ingen forskjeller i spektrene med hensyn til presaturering.

Tabell 4.2.1: Verdier for kjemisk skift med tilhørende signaltipe, integral, koblingskonstant og tilordning for ^1H -spekter av (*R*)-artikain. Resonansene er integrert i forhold til metyl (*h*) som har verdi på 3.

Signal	Kjemisk skift [ppm]	Signaltipe (multiplisitet)	Integrasjonsverdi (avrundet)	Koblingskonstant, J [Hz]	Tilordning
a	7,43	Kvartett (svak splitting)	1	0,77 4J	$\text{H}-\text{C}_{\text{tiofen}}$
b	4,00	Kvartett	1	7,03 3J	$\text{H}-\text{C}_{\text{kiral}}$
c	3,79	Singlett	3	-	$\text{H}_3\text{C}-\text{O}$
d	2,87	Multipllett	2	*	$\text{N}-\text{H}_2\text{C}-\text{C}$
e	2,03	Dublett (svak splitting)	3	0,70 4J	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}_{\text{tiofen}}$
f	1,62	Multipllett	2	*	$\text{C}-\text{H}_2\text{C}-\text{C}$
g	1,56	Dublett	3	7,05 3J	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}_{\text{kiral}}$
h	0,91	Tripllett	3	7,44 3J	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}$
SUM = 18H					

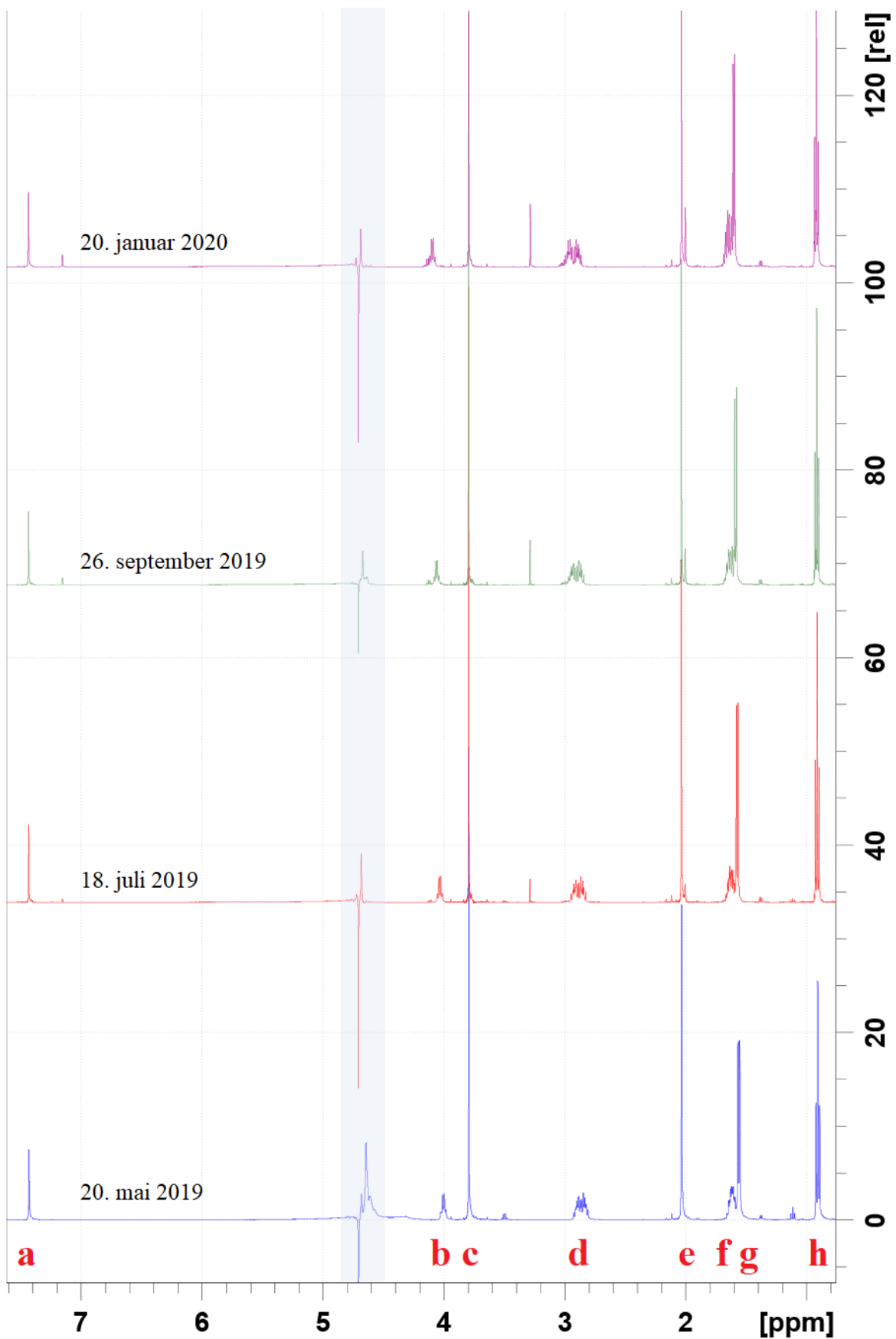
* Ikke målbart.



Figur 4.2.6: Struktur av (*R*)-artikain der de ulike kjemiske gruppene er vist med bokstavene *a-h* for tilordning fra ^1H -spekteret. Med D_2O som løsemiddel vil protonet bundet til nitrogen spontant byttes ut med deuterium, og vil dermed ikke gi signal i ^1H -NMR-spekter.

4.2.2 ^1H -spektre av (*R*)-artikain med presaturering tatt opp ved ulike tidspunkt

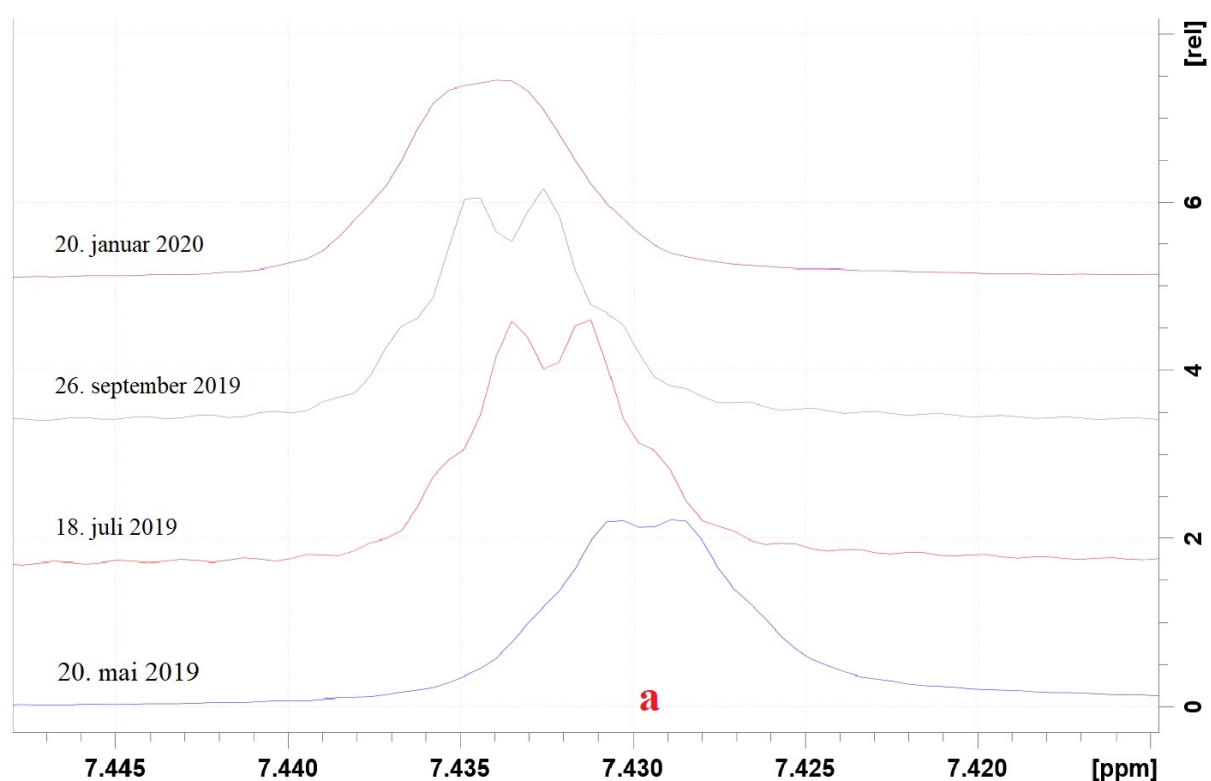
Det ble utført eksperimenter på (*R*)-artikain over en tidsperiode. I starten av undersøkelsen ble det gjort to opptak hver uke, men siden minimal forandring ble observert etter så kort tid, ble opptakene gjort annenhver uke. I resultatene viser figurene protonspektre med presaturering fra mai, juli og september fra 2019, og protonspekter fra januar 2020.



Figur 4.2.7: ^1H -spektre av (*R*)-artikain med vannundertrykkning tatt opp ved 300 K ved ulike tidspunkt. Resonansene er merket med bokstaver *a-h*, mens det skyggelagte feltet er området

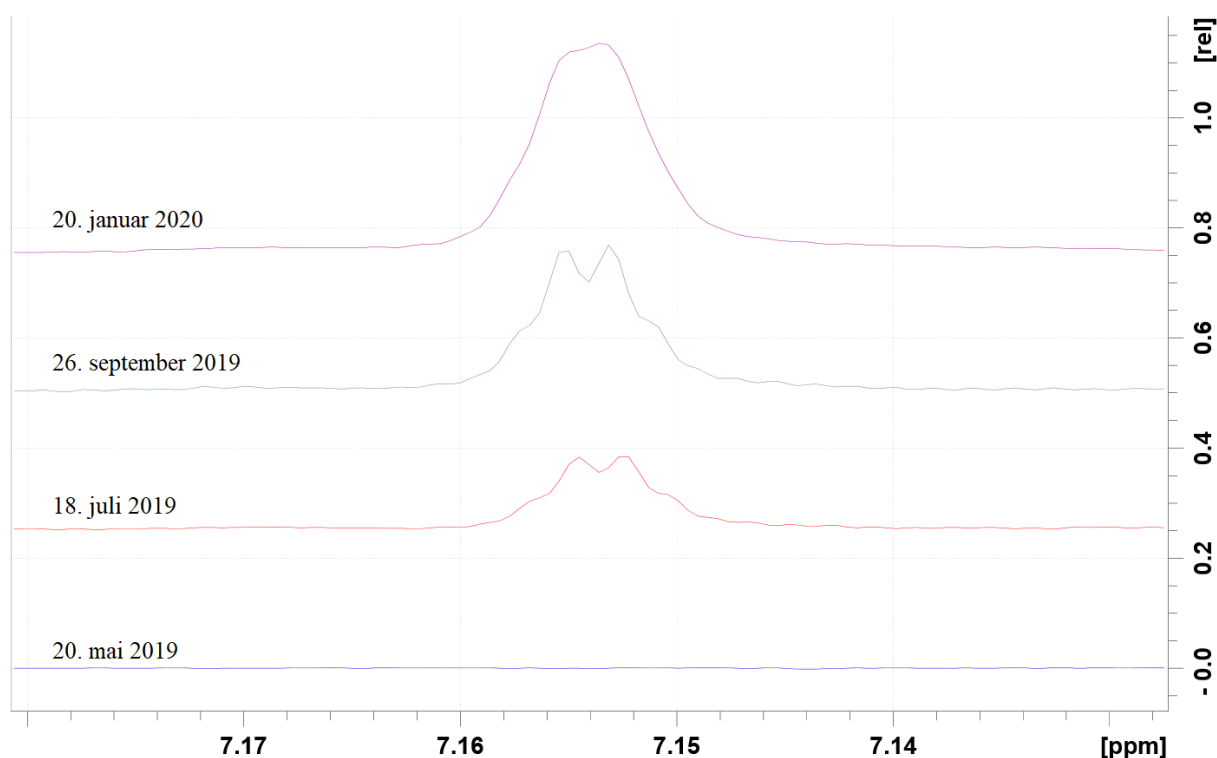
for vannsignal ($\sim 4,70$ ppm).

Spektrene i *Figur 4.2.7* viser nye resonanser fra juli som øker i intensitet over tiden ved resonans *a* med kjemisk skift på 7,20 ppm, mellom resonansene *c* og *d* ved kjemisk skift 3,30 ppm, og ved resonans *e* ved 2,03 ppm. Endringer observeres også i resonansene *b*, *d* og *f*.



Figur 4.2.8: ^1H -spektre av (*R*)-artikain med vannundertrykking tatt opp ved ulike tidspunkt. Figuren viser området hvor proton bundet til tiofen gir signal (*a*). Det observeres at formen på splittingen i signalet endres over tid. Kjemisk skift endres også lengre downfield over tiden.

Protonspektrene i *Figur 4.2.8* viser at splittingen på signalet blir tydeligere senere i juli og september, og viser i tillegg tydelige skuldre til kvartetten. I januar er splittingen omtrent borte. Splittingene observert i mai, juli og september måler lik avstand (0,77 Hz). Parameterne er like for alle eksperimenter, men det observeres mer støy på baselinjen i juli og september.



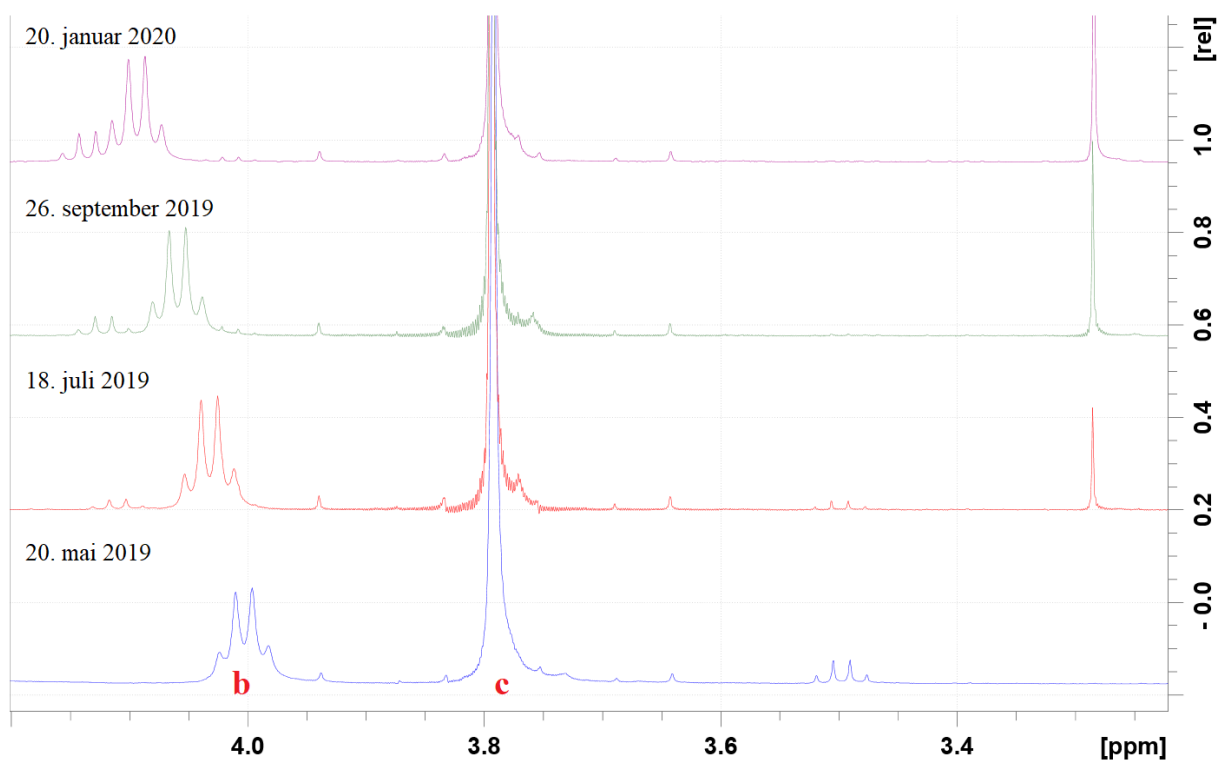
Figur 4.2.9: ^1H -spektre av (*R*)-artikain med vannundertrykking tatt opp ved ulike tidspunkt. Nederste spekter fra mai viser ingen signal, mens signalet fra juli øker i intensitet over tiden.

Figuren viser voksende resonans med kjemisk skift rundt 7,15 ppm som ligger nær området hvor proton bundet til tiofen (*a*) har kjemisk skift (7,43 ppm). Integrasjon av resonansen viser at verdien øker over tid (*Tabell 4.2.2*). Resonansene observeres like som resonansene for *a* i *Figur 4.2.8* for tilsvarende måneder. Koblingskonstanten målt på splittingen er også lik som hos resonans *a* (0,77 Hz).

Tabell 4.2.2: Kjemisk skift og integral av resonans *a* ved 7,43 ppm og voksende resonans ved 7,15 ppm fra *Figur 4.2.8* og *4.2.9*. Signalene er integrert i forhold til signal fra metyl (*h*) som har integrasjonsverdi på 3.

Dato	Signal <i>a</i>		Signal ved 7,15 ppm	
	Kjemisk skift [ppm]	Integral	Kjemisk skift [ppm]	Integral
20.05.19	7,430	0,792	-	-
18.07.19	7,433	0,764	7,153	0,033
26.09.19	7,434	0,729	7,154	0,068
20.01.20	7,435	0,695	7,154	0,108

Verdiene fra *Tabell 4.2.2* viser økende areal for resonansen som dukker opp fra juli, mens minkende areal av resonans *a* over tiden. Resonans *a* forflytter seg lengre downfield fra mai til januar, men forflytningen endres mindre over tiden.



Figur 4.2.10: Figuren viser spekter av kvartett *b* ved 4,00 ppm for proton bundet til kiralt karbon og singlett *c* ved 3,79 ppm for metylsignalet bundet til oksygen. Det observeres en liten kvartett med kjemisk skift rundt 4,11 ppm i spekter fra juli som øker i intensitet over tiden. En liten kvartett observeres ved 3,50 ppm i mai, men er nærmest borte i september. En tydelig singlett ved 3,29 ppm vises i spekter fra juli som øker i intensitet med tiden.

Tabell 4.2.3: Kjemisk skift for resonansene i *Figur 4.2.10*, der kvartett *b* ved 4,11 ppm er proton bundet til kiralt karbon og singlett *c* ved 3,79 ppm er protoner i metoksygruppen i (*R*)-artikain.

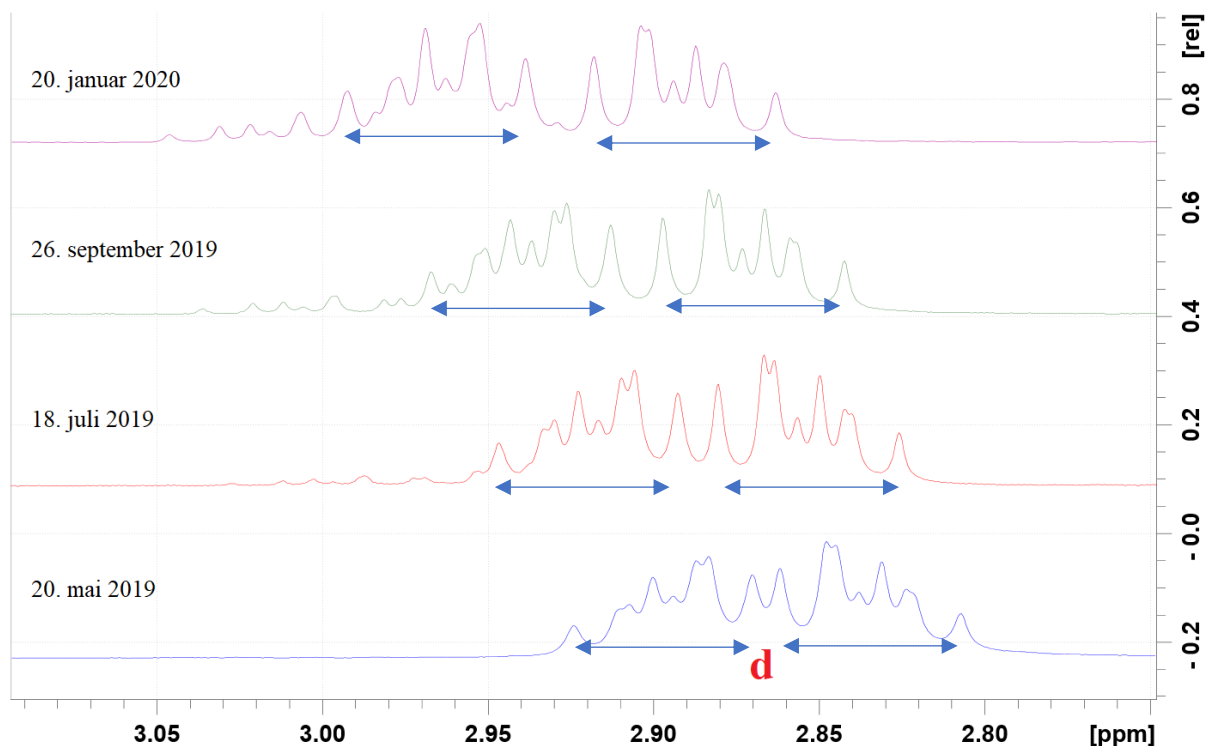
Dato	Kvartett b	Kvartett 4,11 ppm	Kvartett 3,50 ppm	Singlett c	Singlett 3,29 ppm
	Kjemisk skift [ppm]	Kjemisk skift [ppm]	Kjemisk skift [ppm]	Kjemisk skift [ppm]	Kjemisk skift [ppm]
20.05.19	4,003	-	3,498	3,792	-
18.07.19	4,033	4,110	3,499	3,794	3,285
26.09.19	4,060	4,123	-	3,794	3,285
20.01.20	4,094	4,136	-	3,793	3,284

Tabell 4.2.3 viser at kvartett *b* flytter seg downfield med rundt 0,03 ppm mellom hvert dataopptak. Kvartetten ved 4,11 ppm som oppstår i juli overlapper med kvartett *b* i januar ved at den forflytter seg med kortere distanse. Kjemisk skift for singlettene endres i liten grad.

Tabell 4.2.4: Integral for resonansene i *Figur 4.2.10*. Signalene er integrert i forhold til signal fra metyl (*h*) som har integrasjonsverdi satt til 3.

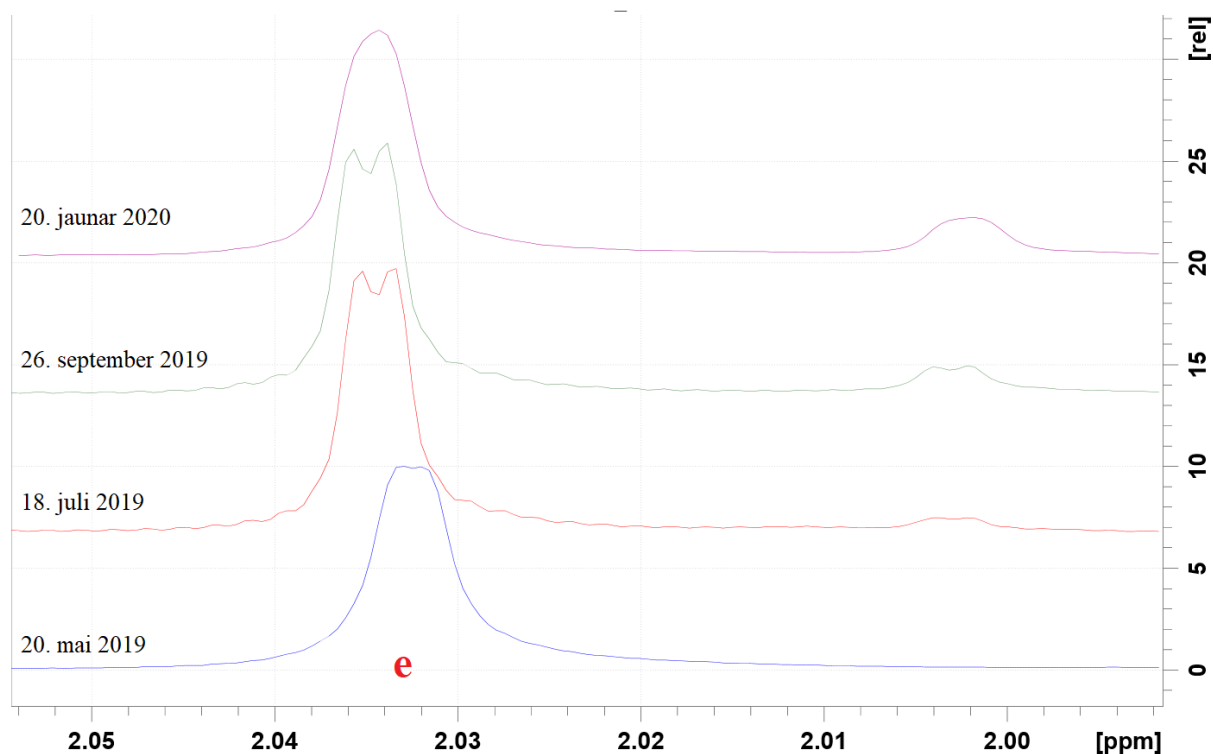
Dato	Kvartett b	Kvartett 4,11 ppm	Kvartett 3,50 ppm	Singlett c	Singlett 3,29 ppm
	Integral	Integral	Integral	Integral	Integral
20.05.19	0,912	-	0,108	2,986	-
18.07.19	0,849	0,055	0,026	2,841	0,085
26.09.19	0,756	0,099	-	2,712	0,155
20.01.20	0,656	0,190	-	2,551	0,263

Det observeres i tabellen at arealet av de oppståtte resonansene blir større over tiden, mens arealet fra de opprinnelige resonansene fra mai blir mindre over tiden.



Figur 4.2.11: Viser multipllett *d* for CH₂- gruppe. Multipletten forflyttes lengre downfield og økes i linjebredde over tiden. Pilene på multipletten indikerer en distanse på ~27 Hz (0,05 ppm). Det observeres også signaler ved siden av multipletten i spekter fra juli rundt 3,00 ppm.

I *Figur 4.2.11* observeres det at multipletten for CH₂-gruppen med kjemisk skift rundt 2,87 ppm endrer seg både i linjebredde og i kjemisk skift. Linjebredden av multipletten økes over tid, men dette skjer bare i det midtre området av signalene, mellom pilene i figuren. Mellom hvert opptak øker distansen mellom de to midtre signalene i multipletten med omtrent 2 Hz. Signalene i midten og signalene i ytterkant av multipletten måler avstand rundt 27 Hz gjennom hele tidsperioden (demonstrert med piler i *Figur 4.2.11*). Nye signaler ved 3,0 ppm vises i spekter fra juli med økende intensitet. Disse signalene endrer også kjemisk skift lengre downfield med tiden.



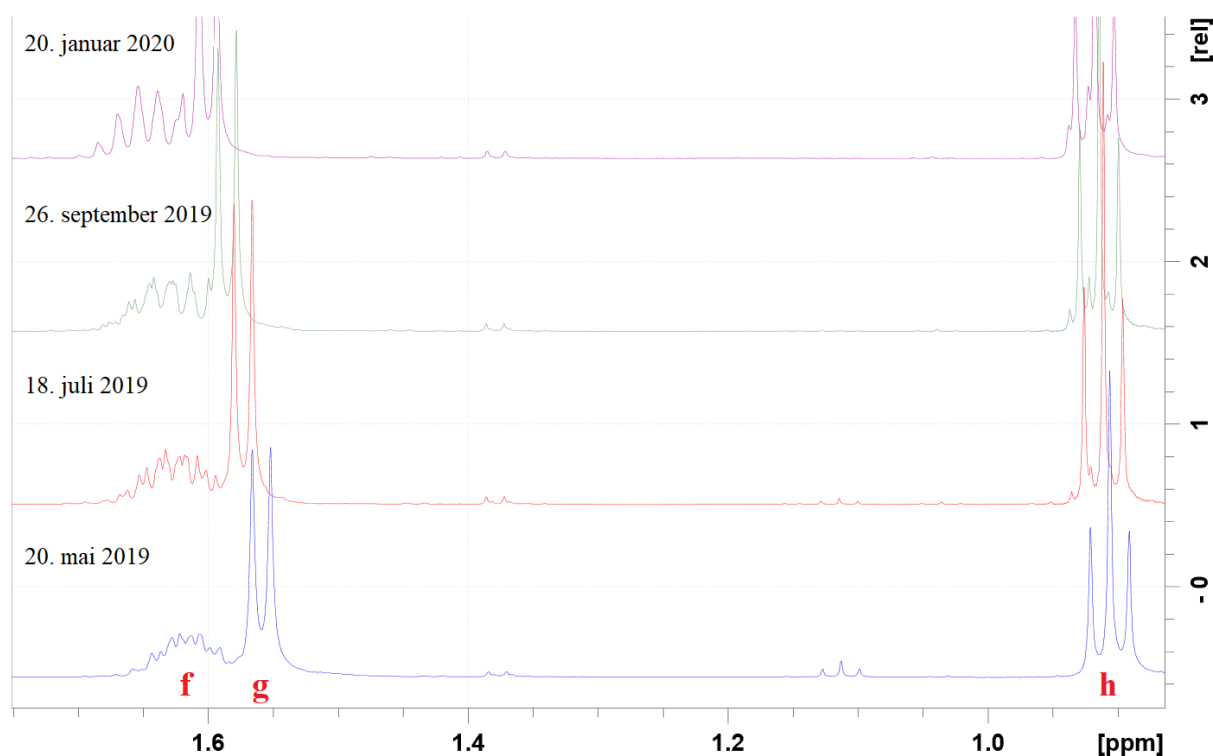
Figur 4.2.12: Viser signal for metyl bundet til tiofen (*e*) med kjemisk skift ved 2,03 ppm og signal rundt 2,00 ppm med økt intensitet. Splittingen på signalet *e* i første spekter fra mai er svak, men blir tydeligere senere i juli og september. I januar er ikke splittingen lenger synlig. Signalet flytter seg lengre downfield med tiden, men i januar har resonansen flyttet seg upfield. Tilsvarende observeres også for de svake resonansene ved 2,00 ppm.

Målingene viser at splittingen på signalet i mai er på 0,70 Hz, mens de fra juli og september måler litt større splitting (~0,75 Hz). Splitting på de voksende signalene ved 2,00 ppm fra juli og september måler samme verdi som splitting for resonans *e* for tilsvarende måneder.

Tabell 4.2.5: Kjemisk skift og integraler for signal *e* med kjemisk skift ved 2,03 ppm og voksende signal med kjemisk skift 2,00 ppm fra *Figur 4.2.12*. Signalene er integrert i forhold til metyl (*h*) som har integrasjonsverdi satt til 3.

Dato	Signal <i>e</i>		Signal ved 2,00 ppm	
	Kjemisk skift [ppm]	Integral	Kjemisk skift [ppm]	Integral
20.05.19	2,032	2,925	-	-
18.07.19	2,034	2,829	2,003	0,167
26.09.19	2,035	2,620	2,003	0,355
20.01.20	2,034	2,526	2,002	0,483

Fra *Tabell 4.2.5* viser verdiene at forflytning av resonansene skjer i liten grad. Integralet av det nye signalet viser økning i areal med tiden, mens areal av signal *e* avtar.



Figur 4.2.13: Viser området for multipllett *f*, dublett *g* og tripllett *h*. Både multiplletten *f* for CH₂-gruppe med kjemisk skift 1,63 ppm og dubletten *g* for metyl bundet til kiralt karbon ved 1,55 ppm flytter seg lengre downfield med tiden. Kjemisk skift for triplletten *h* endres i mindre grad, men en ny tripllett observeres i denne fra spekter i juli.

Tydelige endringer i formen mellom hvert dataopptak observeres for multipletten f for CH₂, men denne ser ikke ut til å endre seg i linjebredde slik som multiplett d i *Figur 4.2.11* gjør. Rett under 1,40 ppm er en vedvarende liten dublett, mens en triplett ved 1,11 ppm minker i intensitet med tiden (*Tabell 4.2.7*).

Tabell 4.2.6: Kjemisk skift av resonansene i *Figur 4.2.13*.

Dato	Multiplett f	Dublett g	Dublett 1,38 ppm	Triplett 1,11 ppm	Triplett h
	Kjemisk skift [ppm]	Kjemisk skift [ppm]	Kjemisk skift [ppm]	Kjemisk skift [ppm]	Kjemisk skift [ppm]
20.05.19	1,618	1,559	1,377	1,113	0,906
18.07.19	1,629	1,573	1,378	1,114	0,911
26.09.19	1,635	1,586	1,378	1,114	0,914
20.01.20	1,650	1,600	1,378	-	0,918

Tabell 4.2.7: Integral for resonansene i *Figur 4.2.13*. Signalene er integrert i forhold til signal fra metyl (h) som har integrasjonsverdi satt til 3.

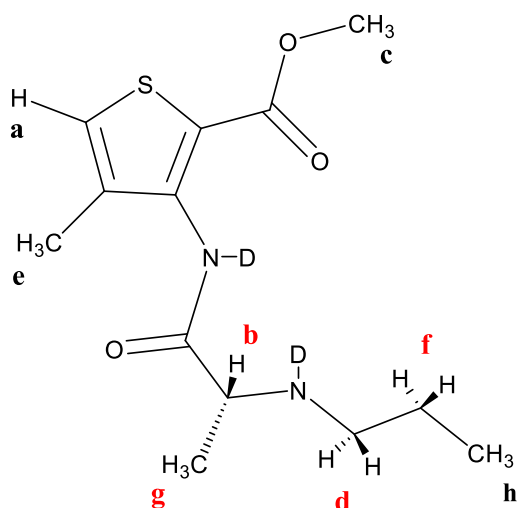
Dato	Multiplett f	Dublett g	Dublett 1,38 ppm	Triplett 1,11 ppm	Triplett h
	Integral	Integral	Integral	Integral	Integral
20.05.19	1,969	3,092	0,125	0,155	3,000
18.07.19	2,224	2,977	0,082	0,046	3,125
26.09.19	2,327	2,880	0,095	0,020	3,122
20.01.20	2,232	3,005	0,083	-	3,076

En større endring i kjemisk skift for multiplett f og dublett g observeres i *Tabell 4.2.6*. Integralene målt av f , g og h , samt dublett ved 1,38 ppm viser ingen tydelig trend med redusert areal slik som observert for de andre resonansene. Tripletten ved 1,11 ppm reduseres i areal over tiden.

Tabell 4.2.8: Kjemisk skift og forflytningen downfield fra opprinnelig kjemisk skift for de kjemiske gruppene *a-h* i (*R*)-artikain. Verdiene merket i rødt viser til de kjemiske gruppene som har større endring i kjemisk skift.

Signal	Kjemisk skift	Endring fra opprinnelig kjemisk skift [ppm]		
	[ppm]	20. mai 2019	18. juli 2019	26. september 2019
a	7,430	0,003	0,004	0,005
b	4,003	0,030	0,057	0,091
c	3,792	0,002	0,002	0,001
d	2,866	0,020	0,039	0,061
e	2,032	0,002	0,003	0,002
f	1,618	0,011	0,017	0,032
g	1,559	0,014	0,027	0,041
h	0,906	0,005	0,008	0,012

De kjemiske gruppene slik som *a* og *e* som er proton og metyl bundet til tiofen har liten endring i kjemisk skift. Dette gjelder også for metyl *c* bundet til oksygen som har tilsvarende lav endring. Gruppene nærmest det kirale området har størst forflytning i kjemisk skift (*Figur 4.2.14*).

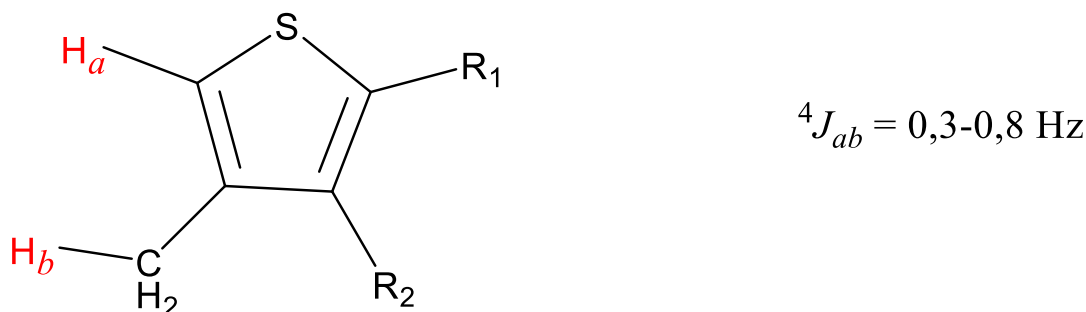


Figur 4.2.14: Struktur av (*R*)-artikain der de ulike kjemiske gruppene er vist med bokstavene *a-h* fra tilhørende resonanser i ^1H -spektre. Bokstavene *b*, *d*, *f* og *g* er merket i rødt og tilsvarer de gruppene som endrer seg mest i kjemisk skift med tiden.

4.3 Diskusjon av ^1H -spektre med (*R*)-artikain

I første avsnitt 4.2.1 blir spektrene presentert med og uten presaturering fra første opptak i mai 2019. Ved presaturering blir en lang puls med lav effekt påført vannresonansen før pulsskvensen [36] (*Vedlegg B*). Vannsignalet som er sterkt og kan overlappe nærliggende resonanser blir da mye svakere, men teknikken fører også til mindre støy generelt i spekteret (økt S/N forhold). *Figur 4.2.3* viste mer støy i spekteret uten vannundertrykking ved singlett *c*, og svakere splitting i signalene av proton (*a*) og metyl (*e*) bundet til tiofen ble observert med vannundertrykking (*Figur 4.2.2* og 4.2.4). Ved at det store vannsignalet ble betydelig mindre med presaturering, ble disse spektrene videre brukt ved sammenligning av spektre tatt opp over tiden.

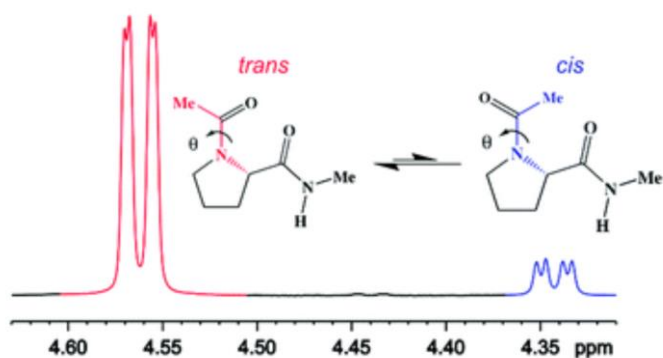
I protonspektrene ble splitting observert på signalene av proton direkte bundet til tiofen (*a*), og metylgruppen bundet til tiofen (*e*). Fra mai 2019 viste splittingen koblingskonstanter på henholdsvis 0,77 Hz og 0,70 Hz som tyder på en langdistanse-kobling (4J), som oppstår i aromatiske system. Proton *a* er da langdistanse-nabo til tre protoner i metyl som dermed kan forklare den svake kvartetten som observeres for resonans *a* (*Figur 4.2.2* og 4.2.8).



Figur 4.2.15: For en heterogen aromat som tiofen vil en 4J -kobling ha en koblingskonstant med verdi i området 0,3-0,8 Hz [32].

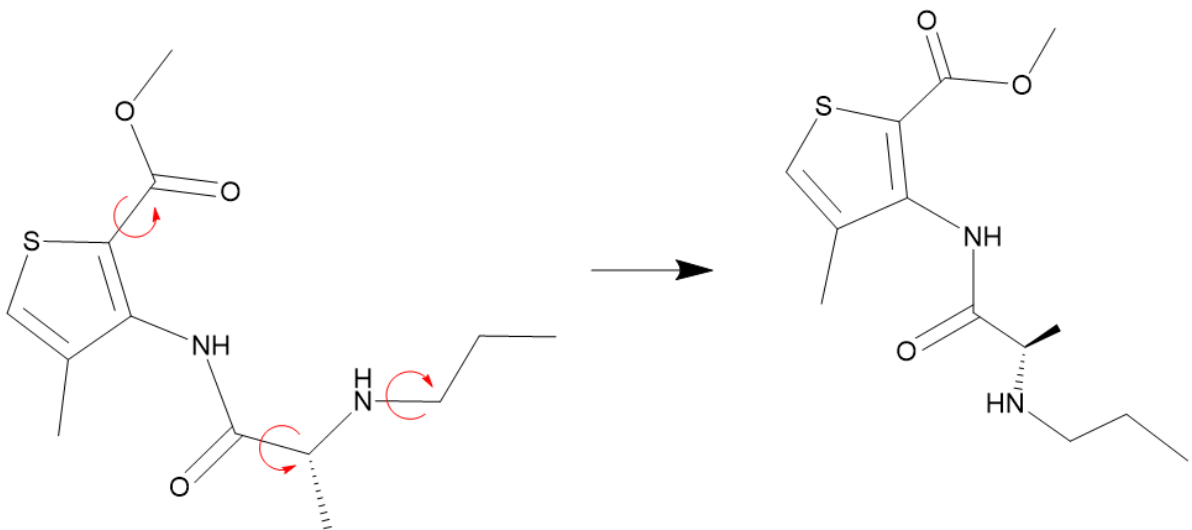
Fra dataopptakene utført over tiden observeres det endringer i splittingen på disse signalene (*a* og *e*), som først blir tydeligere i juli og september, men som nesten forsvinner i januar. Det antas ikke at (*R*)-artikain har ubegrenset holdbarhet, og ved at prøven ble latt stående i romtemperatur og uten beskyttelse mot lys var endringer forventet. Det observeres også mer støy i spektrene fra juni og september som antas å være av instrumentelle grunner da parameterne er like for alle eksperimenter.

Proton og metyl bundet til tiofenring (*a* og *e*) og metoksygruppen (*c*) endrer seg lite i kjemisk skift over tiden, men det oppstår nye tilsvarende resonanser lengre upfield. De nye resonansene øker i intensitet, mens de opprinnelige resonansene avtar i intensitet. Det ble også observert andre små resonanser allerede fra mai som gav lave verdier da de ble integrert. Tilstedeværelse av ulike konformasjoner av molekylet anslås å være en årsak til disse observasjonene. Fra en konformasjonsstudie av Braga et al. [37] gjort av små peptidmodeller, viser $^1\text{H-NMR}$ to ulike kjemiske skift av to konformasjoner av samme molekyl (*Figur 4.2.16*). Det anslås derfor at de små resonansene som er tilstede og oppstår i protonspektrene over tiden, er forskjellige konformasjoner av (*R*)-artikain.



Figur 4.2.16: ^1H -spekter av *N*-acetyl-*N'*-methylprolineamid fra Braga et al. [37] viser to konformasjoner som gir opphav til like resonanser, men med ulike kjemiske skift og intensiteter. Figuren viser at *trans*-konformasjonen av molekylet er den dominerende formen.

I dataopptakene utført over tid vises større endring i kjemisk skift for signalene fra proton *b* og metyl *g* bundet til kiralt karbon, og CH_2 -gruppene i karbonkjeden, *d* og *f*. Ulike konformasjoner av molekylet kan oppstå fritt ved rotasjon rundt enkeltbindingene (*Figur 4.2.17*). Dette kan gi endring i kjemiske omgivelser mellom de ulike kjemiske gruppene i molekylet. Det anslås dermed at likevekten forskyves mellom ulike konformasjoner og dermed endring i kjemisk skift for gruppen over tiden.



Figur 4.2.17: Rotasjon rundt enkeltbindinger i molekylet. Denne figuren viser kun rotasjon rundt tre enkeltbindinger for å demonstrere en annen mulig konformasjon av molekylet.

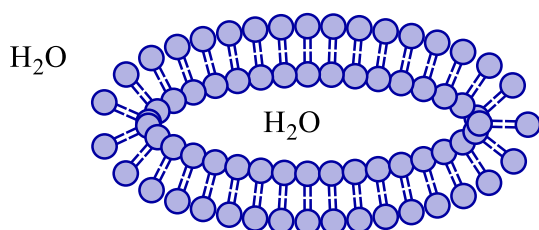
Dataopptak av (*S*)-artikain ble utført av Elise Østensen til hennes masteroppgave (ikke publisert enda). Forskjellen mellom spektrene av (*R*)- og (*S*)-enantiomerene er de kjemiske gruppene nær det kirale karbonatomet, der resonansene av (*S*)-enantiomeren ligger litt lengre upfield. Det kunne tenkes at endringene som oppstår i spektrene skyldes at det skjer en likevekt mot (*S*)-konfigurasjon, men siden resonansene av både (*R*)- og (*S*)- artikain beveger seg mot et høyere kjemisk skift virker dette mindre sannsynlig.

4.4 Konklusjon av (*R*)-artikains stabilitet

En prøve blir vanligvis oppbevart i kjøleskap eller frys. Prøven i denne undersøkelsen stod i romtemperatur og uten beskyttelse mot lys slik at endringer av prøven var forventet. Etter flere måneders dataopptak er det fortsatt tydelige resonanser som observeres for molekylet, men det er endringer som voksende resonanser og kjemisk skift som tyder på forskyvning av konformasjonslikevekten. Endringene i konformasjonen er liten i væskefase, men viktig å ha oversikt over. Det forventes ikke endring av (*R*)-artikain bundet til POPC i tiden forsøkene pågikk. Det konkluderes med at (*R*)-artikain holder seg stabilt over et lengre tidsrom.

5. Undersøkelse av interaksjon mellom (*R*)-artikain og POPC

Hensikten med opparbeidingen av liposomprøver var å lage flest mulig unilamellære liposomer fra multilamellære vesikler (MLV). Dette, for å etterligne en biologisk membran som består av et enkelt lipidbilag, men også for å oppnå entydige signaler i NMR-spektre til sammenligning av spektre av POPC med (*R*)-artikain. Prosedyren som ble fulgt under opparbeidingen er fra Song et al. [5] som utførte fast-fase NMR på racemisk blanding av artikain med DSPC.



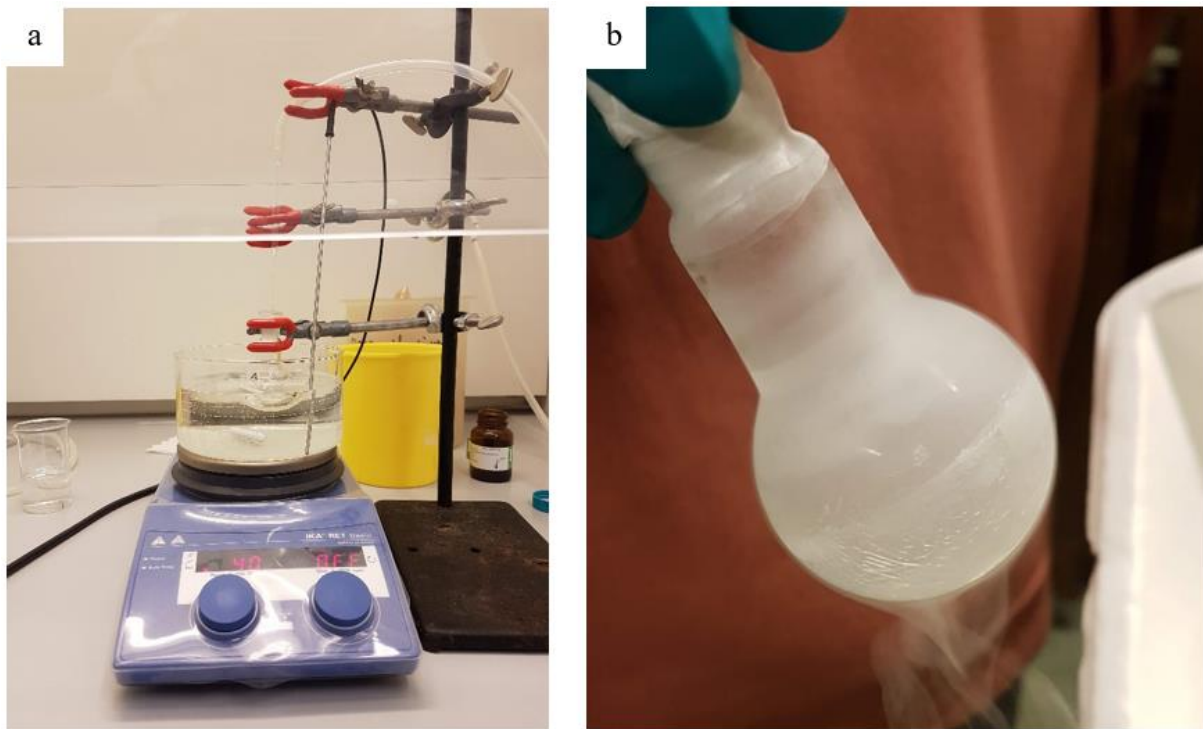
Figur 5.1.1: Skisse over en unilamellær liposom av POPC. Lipidbilaget vil orientere seg spontant i forhold til vannet slik at de hydrofile hodegruppene vil være den ytre delen av lipidbilaget som er vendt mot vandig fase på innsiden og utsiden av liposomet. Fosfolipider med kolin som hodegruppe vil vanligvis ha en sylindrisk form. POPC som inneholder en umettet kjede vil gi en litt løsere pakking av lipidene [38].

Under opparbeiding av liposomer ble prøven behandlet i argonatmosfære for blant annet å forhindre oksidering av dobbeltbinding i acylkjede [39]. Prosedyren ble i forkant utført på lipid av DPPC (*Vedlegg F*) og lipidblanding av DOPE/DOPS/DOPC (*Vedlegg G*) i øvelse ved tillagingen av liposomer. Fra disse øvelsene ble det erfart hvor viktig hydrering av prøve er for å oppnå ønskede resultater.

Lipidprosedyren på ren POPC-prøve ble utført slik at pH-måling ble gjort en gang om dagen, og tiningen av prøven foregikk i romtemperatur. Hele prosedyren ble utført på litt under en måned. Phd-student Nicolai Etwin Alsaker ved forskergruppen *NMR-spektroskopi* ved Kjemisk institutt ved UiB utarbeidet en hurtigprosedyre som gav gode resultater der tining ble gjort i vannbad med høyere temperatur (40°C), og flere pH-målinger ble utført i løpet av dagen. Denne hurtigmetoden ble derfor benyttet ved tillagingen av POPC-prøver med (*R*)-artikain. Hurtigprosedyren ble utført på syv dager.

5.1 Eksperimentelt: Dannelse av unilamellære liposomer

Lipidet av POPC var løst i kloroform i en flaske fra Avanti® Polar Lipids. Dette ble overført til en rundkolbe. Prøveløsningen ble satt i avtrekkskap og kloroformen ble fordampet (Tabell 5.1.2) med hjelp av argonstrøm. Prøven med oljete konsistens ble fordelt i kolbe samtidig som den ble fryst med flytende N₂, og videre frysetørket over natten.



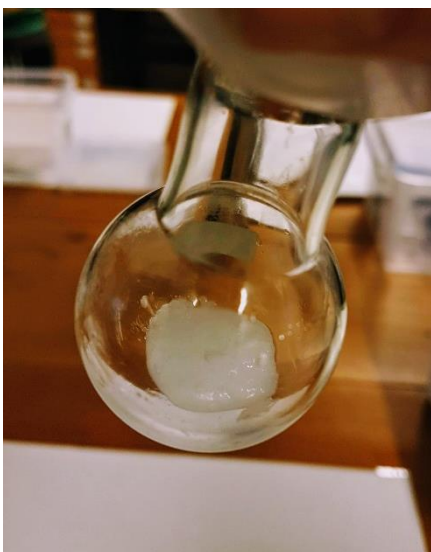
Figur 5.1.2a: Oppstilt stativ med strøm av argongass over løsningen ved avdamping av kloroform. Dette bilde ble tatt ved opparbeiding av liposomer med (*R*)-artikain der prøven også ble varmet opp under avdamping av kloroform. **b:** Frosset prøve etter behandling med flytende nitrogen før den blir frysetørket.

Den frysetørrede prøven ble suspendert i avgasset, argon-boblet superdestillert vann og ble satt i oljebad (Tabell 5.1.2). Suspensjonen ble overført til et plastrør og frosset ved hjelp av flytende nitrogen og satt til avtining i skap. Fryse-tine prosedyren ble utført 7 ganger. Det ble gjort pH-måling av prøven (pH=3,70) og pH ble videre justert ved å tilsette små mengder NaOH. Suspensjonen ble fryst og tint gjentatte ganger til pH 7,4 ble oppnådd.

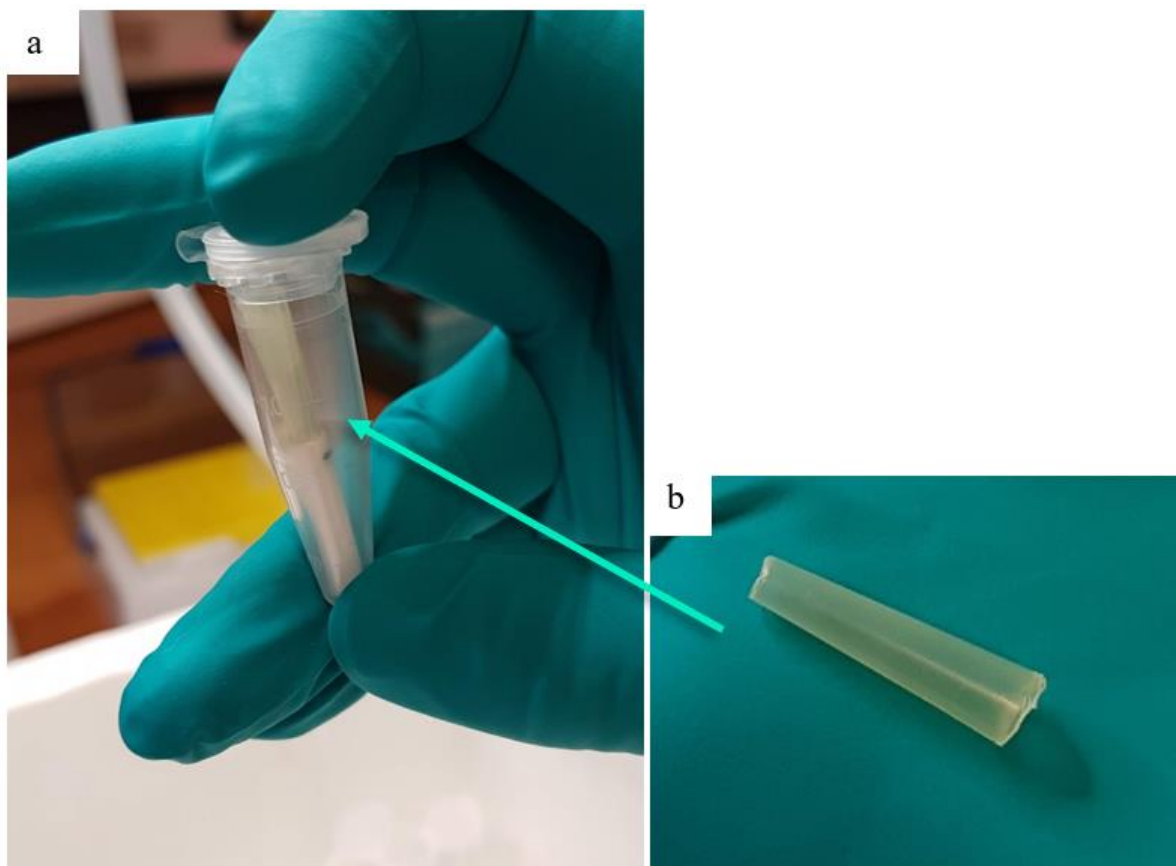


Figur 5.1.3a: Prøven vist etter et døgn med frysetørring. Den har et hvitt utseende. **b:** Bilde viser suspensjonen av prøven overført til plastrør.

Prøven ble overført til en ny rundkolbe, og frysetørket over natten. Argonboblet vann ble tilført for å oppnå minst 50% hydrerte liposomer (utregning i *Vedlegg A*). Prøven ble så satt på oljebad med rotasjon for ekvilibrering (*Tabell 5.1.2*). Den hydrerte liposomprøven hadde et hvitt og seigt utseende og ble videre pakket i en MAS-rotor.



Figur 5.1.4: Hydrert liposomprøve etter 3 døgn med ekvilibrering.



Figur 5.1.5a: Prøve ble pakket i rotor ved hjelp av sentrifugering. Bilde viser et eppendorfrør med rotorbeholder og tillaget trakt. **b:** Trakten er laget av en pipettespiss.

Tabell 5.1.1: Volum av beholdere brukt i opparbeiding av unilamellære liposomer.

Utstyr	Volum [mL]
Rundkolbe	25
Plastrør	50
4 mm rotor	0,106

Tabell 5.1.2: Tid og temperatur ved behandling av prøve under eksperimentell del.

	Tid [timer]	Temperatur [°C]
Fordamping av kloroform	1 ½	Romtemperatur
Suspensjon	2	40
Ekvilibrering	72	40

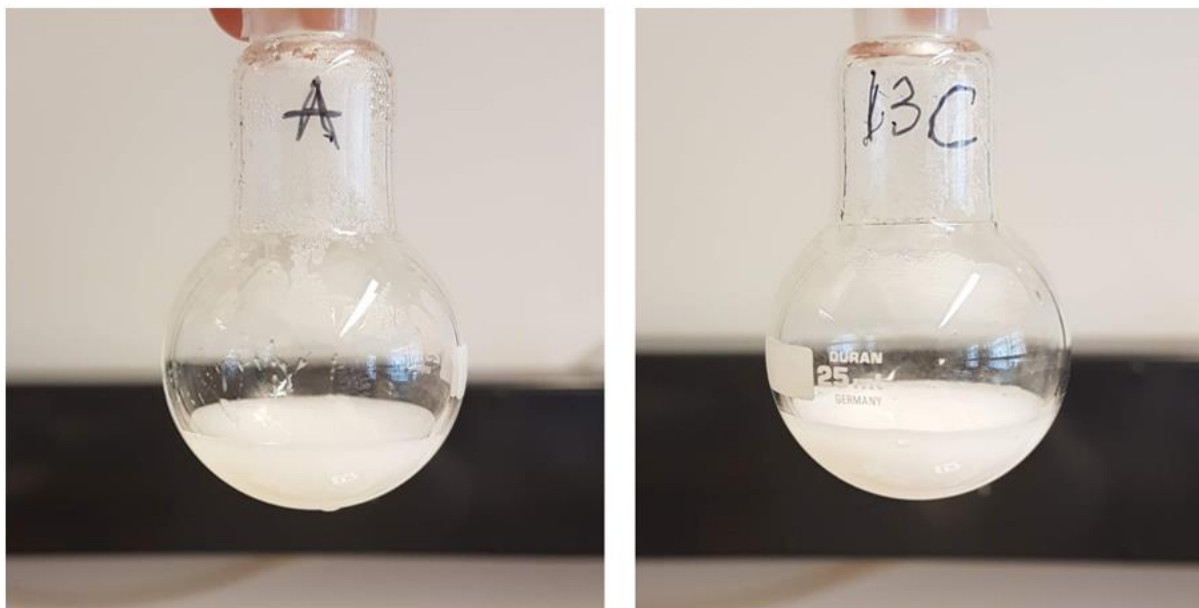
Tabell 5.1.3: Volum av væske tilsatt til lipidprøve under eksperimentell del, vekt og vektprosent av vann tilsatt for å oppnå hydrert liposomprøve, og vekt av prøve før og etter hydrering, samt mengde i MAS-rotor.

	Volum [mL]	Vekt (g) ($d=\pm 0,0003g$)	Vektprosent [%]
Kloroform	23	-	-
Superdestillert vann til suspensjon	5	-	-
NaOH	0,555 (14 tilsetninger)	-	-
Lipid	-	0,4990	-
Superdestillert vann for å oppnå hydrerte liposomer	-	0,6759	57,5
Hydrert prøve	-	1,1749	-
Prøve i MAS-rotor	-	0,1011	-

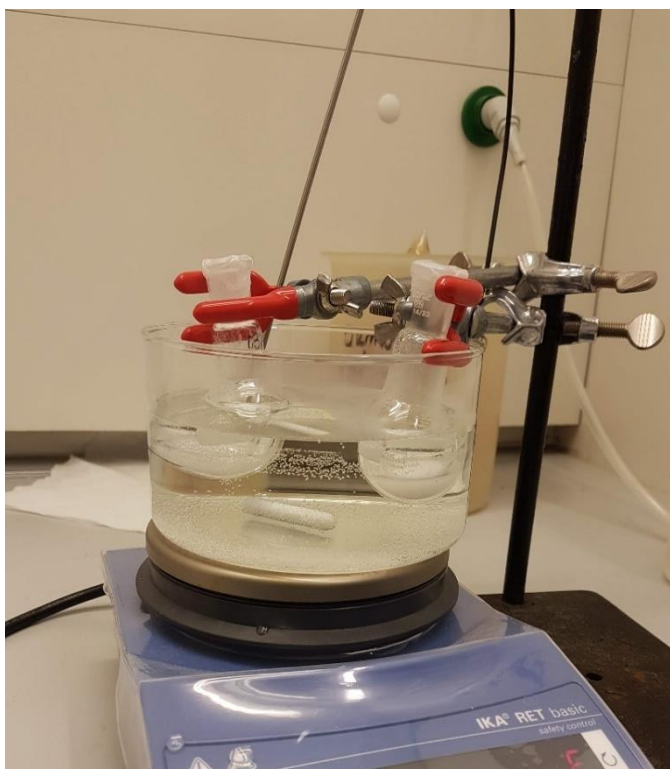
5.1.1 Eksperimentelt: Dannelse av unilamellære liposomer med (*R*)-artikain

Det ble tillaget en prøve av POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain, og en prøve av POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain med ^{13}C -anrikning. (*R*)-artikain ble løst i kloroform og overført til kolbe med POPC-lipid løst i kloroform. Videre ble hurtigprosedyren utført på prøvene.

Små forskjeller på de to prøvene ble observert underveis i prosedyren. Prøven med høyest konsentrasjon av (*R*)-artikain (8,3 mol%) hadde en seigere konsistens enn prøven med (*R*)-artikain (4,0 mol%) med ^{13}C -anrikning der et mer kornete utseende ble observert (*Figur 4.1.7*). Prøvene med 4,0 mol% og 8,3 mol% (*R*)-artikain hadde en pH henholdsvis på 5,23 (^{13}C) og 5,36. Til prøven med 8,3 mol% (*R*)-artikain ble det tilsatt omtrent to ganger så mye lut som til prøven med 4,0 mol% (*R*)-artikain for å justere pH til 7,4 (*Tabell 5.1.4*). Begge prøver hadde en seig og tykk konsistens ved pakking i rotor.



Figur 5.1.7: POPC-prøver der prøven med 8,3 mol% (*R*)-artikain (A) viser en tykkere konsistens enn prøven med 4,0 mol% (*R*)-artikain som kan observeres langs kanten av suspensjonen på bilde av A. Bildene ble tatt før pH-justering av prøvene.



Figur 5.1.8: Prøvene på varmebad (40 °C) for opptining etter frysing med flytende N₂ under pH-justering til 7,4. Selve opptiningen varte i under ett minutt. Prøvene ble deretter avkjølt til romtemperatur før pH-måling.

Tabell 5.1.4: Tabellen viser mengder, molprosent, tilsatt lut og vektprosent vann ved hydrering for POPC-prøvene tilsatt (*R*)-artikain med og uten ^{13}C -anrikning. Utrekninger for molprosent (*R*)-artikain og vektprosent av vann er i *Vedlegg A*.

POPC-prøve (250 mg)	Mengde [mg]	Molprosent [%]	Tilsatt NaOH [μL]	Vektprosent vann [%]	Prøvemengde i 4 mm rotor [mg]
(<i>R</i>)-artikain	9,5	8,3	225	54,3	105,3
(<i>R</i>)-artikain med ^{13}C	4,4	4,0	115	50,1	106,5

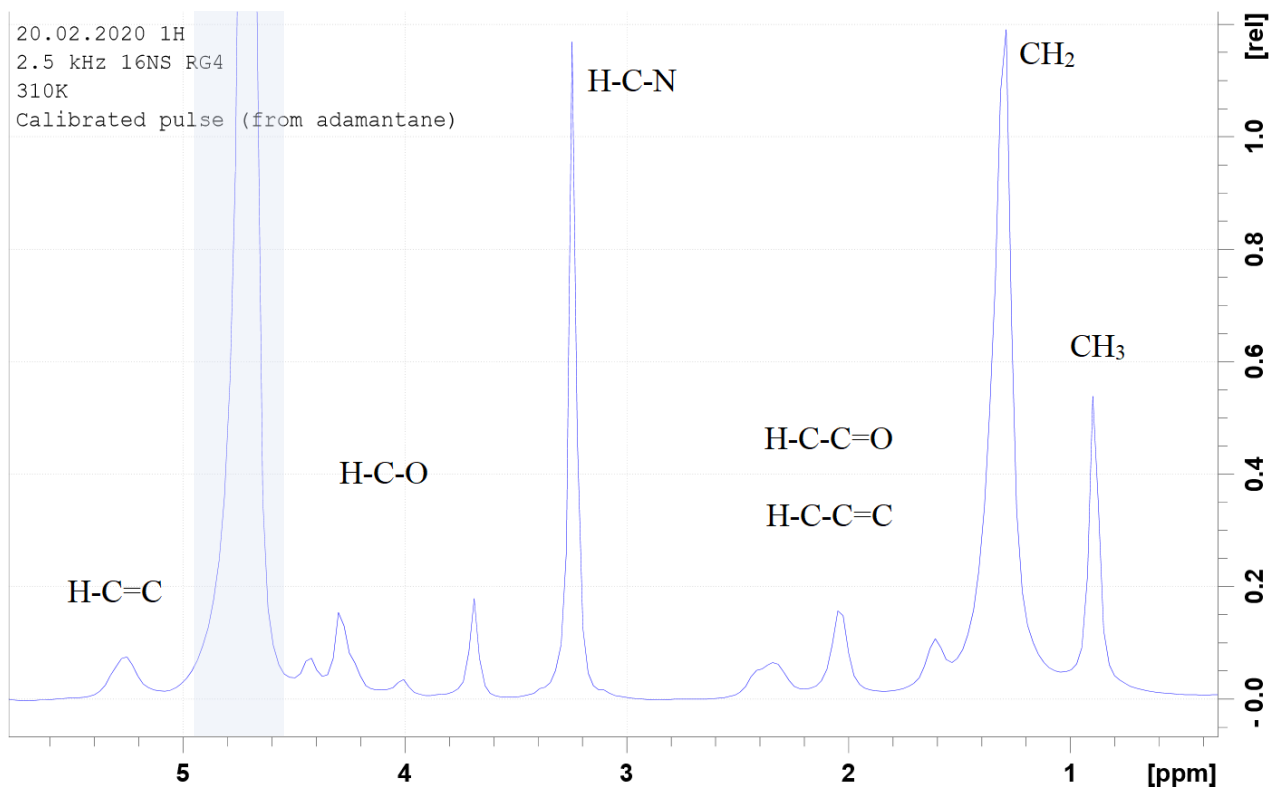
5.2 Resultat

I undersøkelsen er det blitt utført ^1H , ^{13}C og ^{31}P -eksperimenter på liposomprøver av POPC med og uten (*R*)-artikain ved fast-fase NMR-spektroskopi. Ved at denne interaksjonsstudien baseres på et bedøvelsesmiddel som injiseres i vev med kroppstemperatur rundt $37\text{ }^\circ\text{C}$, er spektrene som presenteres tatt opp ved 310 K. Det ble også utført opptak av prøvene ved 298 K hvor hovedforskjellen mellom temperaturene observeres i linjebredden som er redusert ved høyere temperatur (*Vedlegg D*).

Ved sammenligning av spektrene med og uten (*R*)-artikain blir spektrene presentert slik at nederste *spekter 1* er av ren POPC-prøve, i midten er *spekter 2* av POPC med høyest konsentrasjon av (*R*)-artikain (8,3 mol%), og øverst er *spekter 3* av POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain med ^{13}C -anrikning. Det er gjort i den rekkefølgen fordi fokuset ligger hovedsakelig på sammenligning mellom *spekter 1* og *2*. Konsentrasjonen av (*R*)-artikain er liten i *spekter 3*, men kan være av interesse til sammenligning med resonansene i *spekter 2*.

5.2.1 ^1H - NMR av POPC

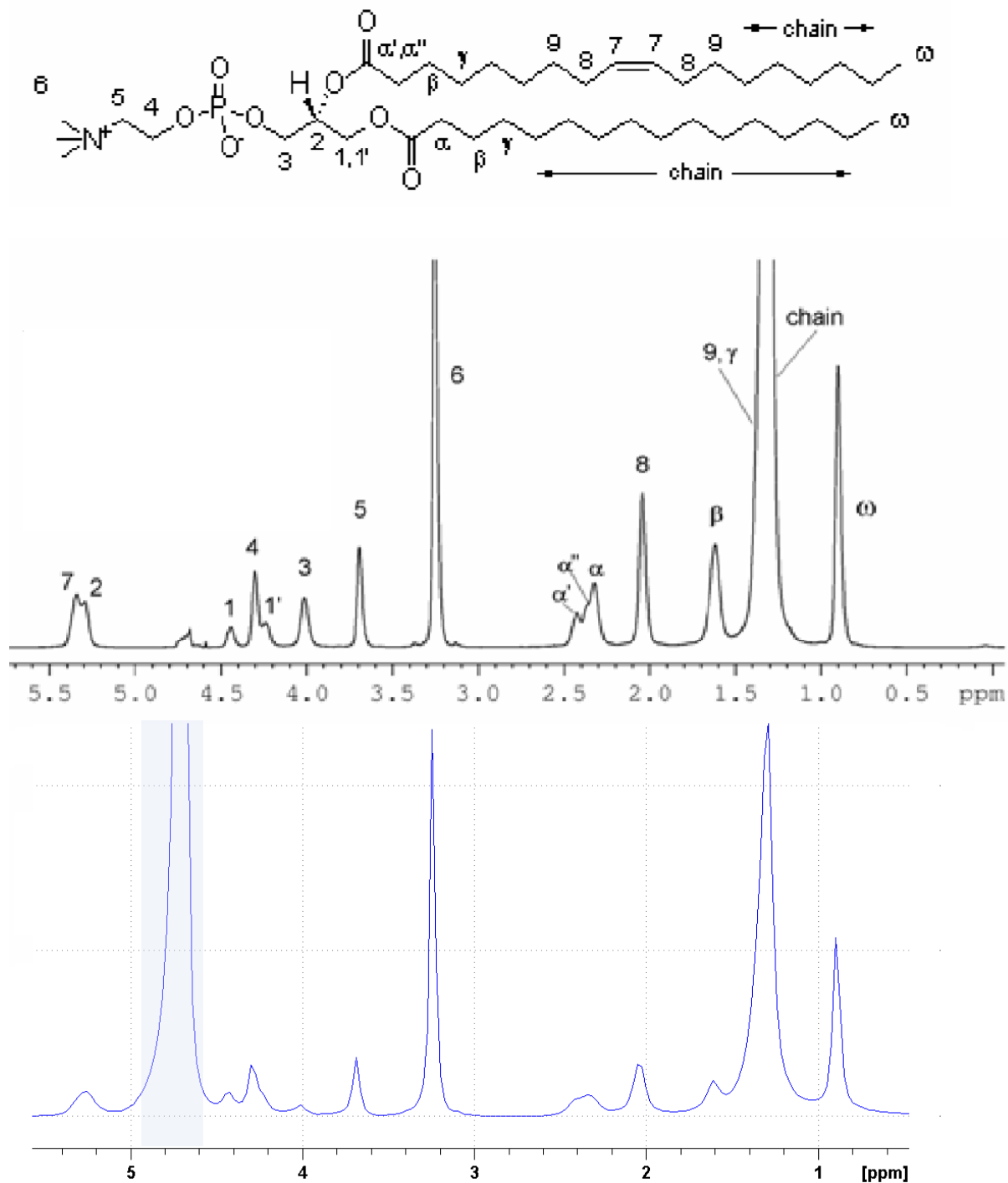
Det ble utført protoneksperimenter med Onepulse-program med spinnhastighet 2,5 kHz. Resultatene viser protonspektre ved 310 K av POPC med tilordning som vil bli brukt ved sammenligning i avsnitt 5.2.2 ^1H -NMR av POPC med (*R*)-artikain.



Figur 5.2.1: 500 MHz ^1H -spekter ved 310 K og med spinnhastighet 2,5 kHz. Det skyggelagte feltet viser området med kjemisk skift rundt 4,7 ppm for vannsignal. De ulike kjemiske gruppene er plassert i figuren i det området de resonerer.

I *Figur 5.2.1* vises signaler i området mellom 0 og 6 ppm hvor protonene for de ulike kjemiske gruppene i POPC resonerer. Signalet lengst upfield er metylgruppene på acylkjedene som utgjør 6 protoner. Ved å kalibrere metylsignalet til 6 og integrere vannsignalet i forhold til metylsignalet, har vannsignalet et integral på 80 (~1:13). Det betyr at hvert lipidmolekyl omgis av omtrent 40 vannmolekyler.

I artikkel av Cruciani et al. [40] blir POPC undersøkt ved bruk av fast-fase NMR som viser ^1H -spekter i området 0 til 5,5 ppm av de samme resonansene som observeres i ^1H -spekter av POPC i denne oppgaven (*Figur 5.2.2*). I studien fra Cruciani et al. er det brukt presaturering i opptaket.

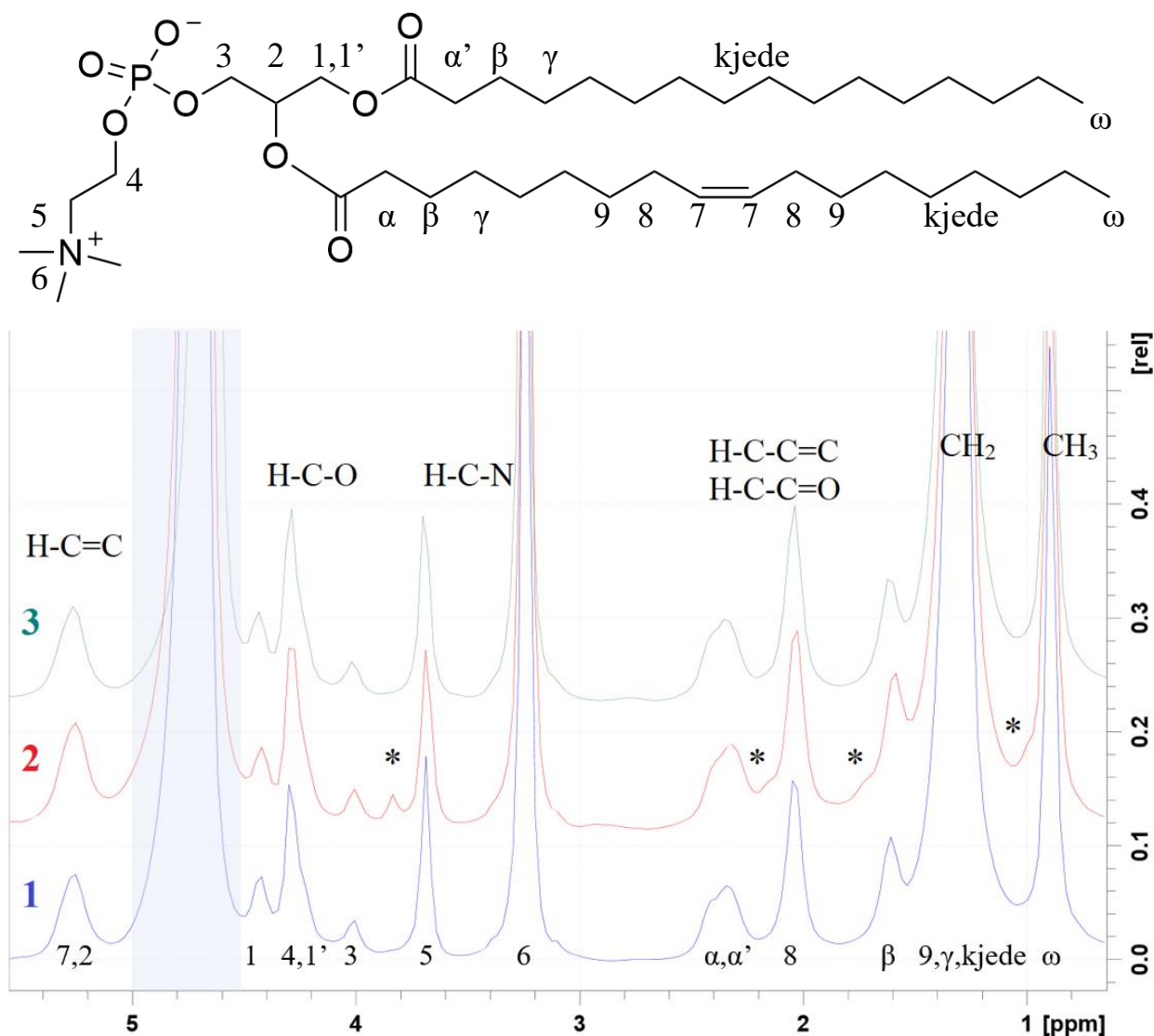


Figur 5.2.2: Øverst vises struktur av POPC med tilordning av Cruciani et al. [40]. Karbon i glyserol bundet til palmintinsyre er merket 1 og 1', og karbonyl i oleinsyre er merket α' og α'' på grunn av ikke-ekvivalente protoner og derav forskjellige kjemiske shift [41]. I midten vises 600 MHz ^1H -spekter av MLV av POPC med presaturering, ved 314,8 K og spinnhastighet på 12 kHz fra NMR-studien [40]. Nederst er ^1H -spekter av POPC i samme region ved 310 K fra denne oppgaven. Resonansen skyggelagt i nederste ^1H -spekter er vannsignalet.

Tydelige likheter observeres mellom ^1H -spektrene i *Figur 5.2.2*, men 600 MHz ^1H -spekter av POPC fra Cruciani et al. [40] viser større oppløsning og er i tillegg utført ved høy spinnhastighet på 12 kHz mot 2,5 kHz av POPC i denne oppgaven.

5.2.2 ^1H -NMR av POPC med (*R*)-artikain

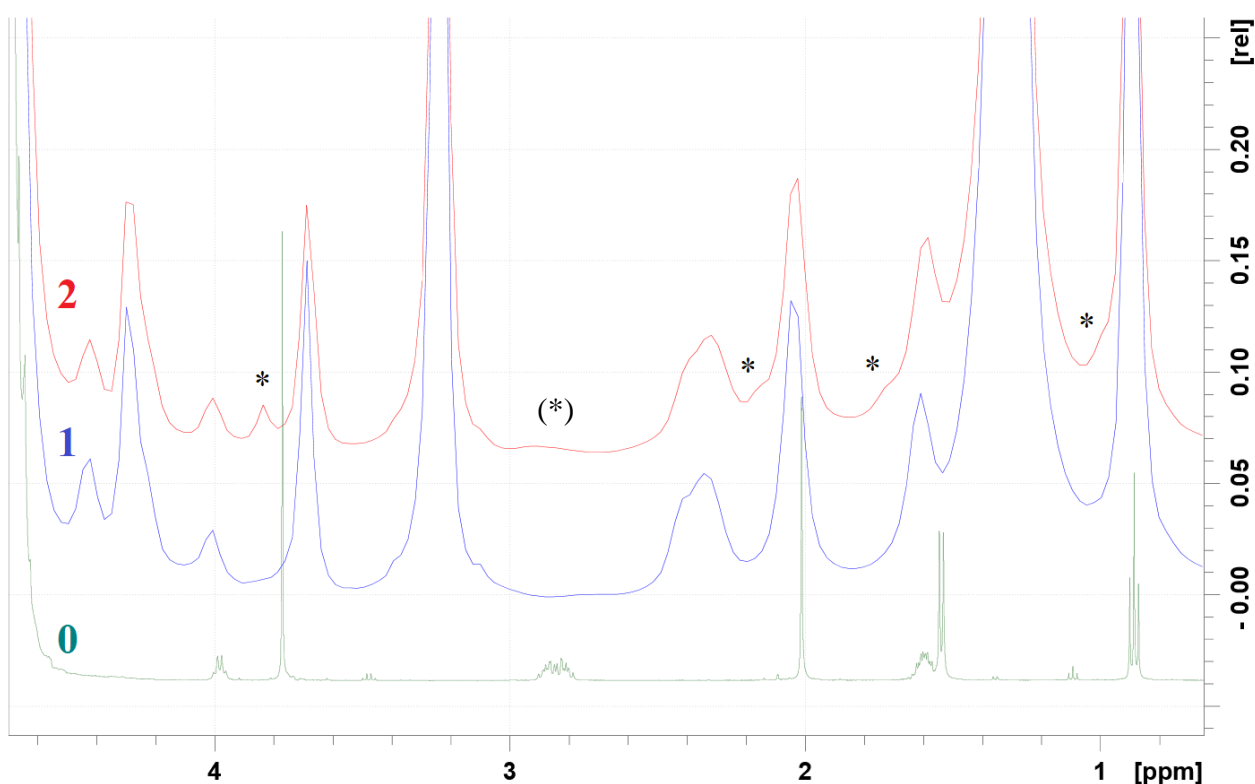
Spektre av POPC-prøvene med og uten (*R*)-artikain ved 310 K presenteres i figurer til sammenligning. ^1H -spekter av ren (*R*)-artikain tatt opp ved væskefase-NMR blir også tatt med i resultatene til sammenligning av de nye resonansenes posisjon i spektrene.



Figur 5.2.3: POPC-struktur med tilordning fra Cruciani et al. [40] og ^1H -spektre tatt opp ved 310 K og 2,5 kHz der *spekter 1*: POPC, *2*: POPC med (*R*)-artikain (8,3 mol%) og *3*: POPC med

(*R*)-artikain (4,0 mol%) med ^{13}C -anrikning. Skyggelagt område markerer vannresonansen. Nye resonanser er markert med * i *spekter 2*. Det observeres ingen tydelige endringer i *Spekter 3*.

I *spekter 2* observeres det nye svake resonanser i acylkjederegionen (0,9-2,2 ppm), og en ny tydelig resonans med kjemisk skift på 3,82 ppm som er i området hvor signal fra glyserolrygggrad og kolin resonerer. Denne observeres ikke i *spekter 3*, der det heller ikke vises merkbare endringer i forhold til ren POPC-prøve (*spekter 1*).

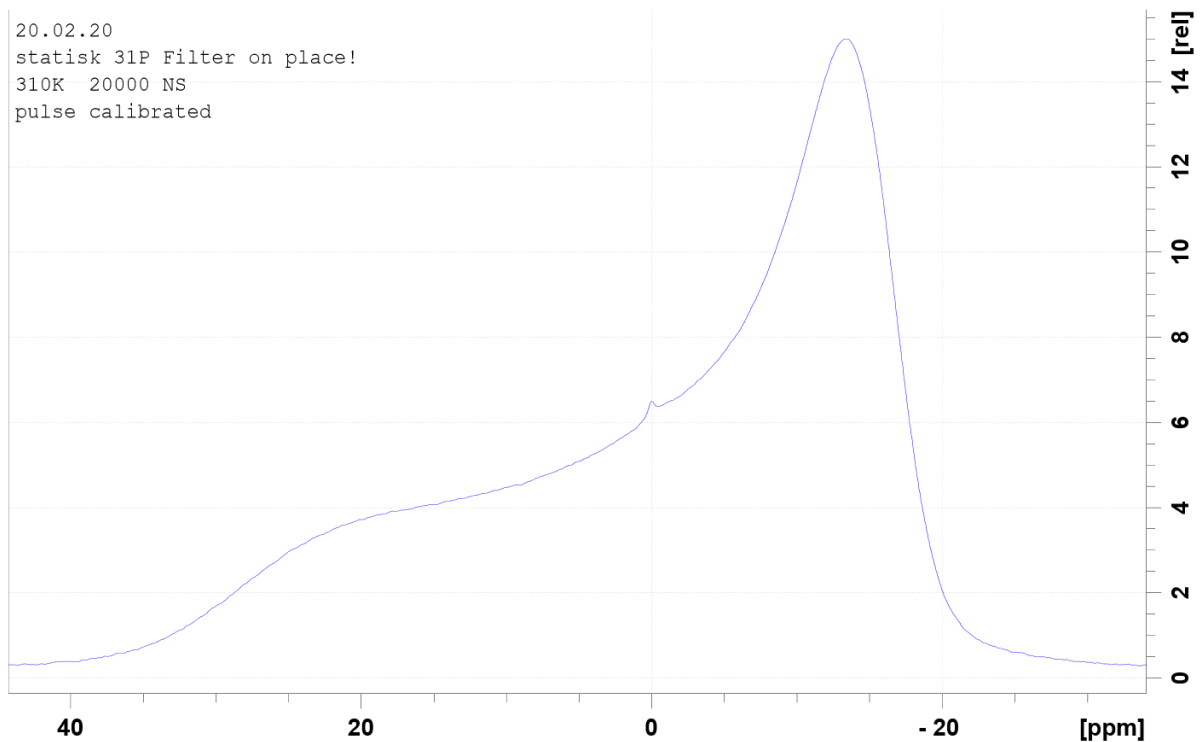


Figur 5.2.4: ^1H -spektre der *spekter 0* er av ren (*R*)-artikain (væske-fase), *1* er POPC og *2* er POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain. Nye resonanser er markert med stjerne øverst i *spekter 2*. Det er også markert en stjerne i parentes ved 2,8 ppm der det mistenkes å være opphav til ny resonans.

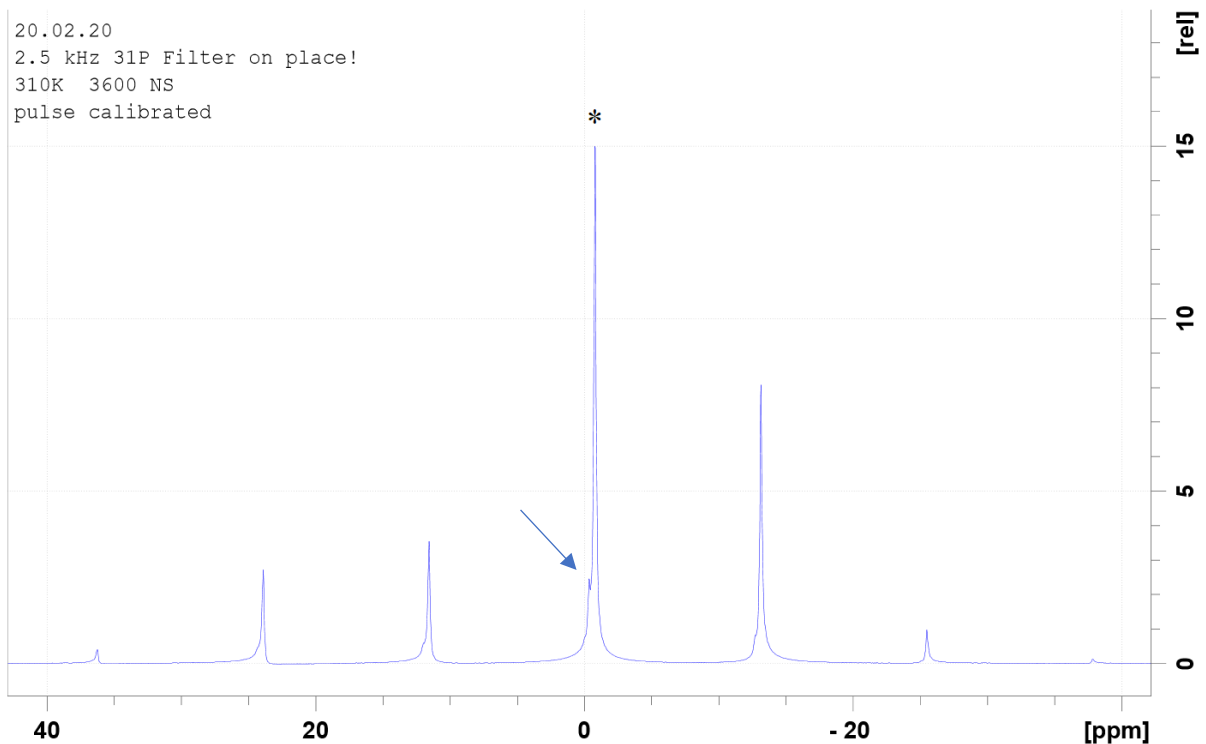
I *Figur 5.2.4* er spekter fra væske-NMR av (*R*)-artikain tatt med til sammenligning av resonansene. I kjemisk-skift områdene der *spekter 0* har resonanser med sterk intensitet er også nær områdene der nye resonanser er i *spekter 2*.

5.2.3 ^{31}P -NMR

Det ble utført ^{31}P -eksperimenter med 30° pulsvinkel av POPC. Resultatene viser eksperimenter tatt opp statisk og med spinnhastighet på 2,5 kHz ved temperaturer på 310 K. Linjebredning (LB) er satt til 50 Hz ved statiske spektrere, og 10 Hz i spektrere med spinnhastighet.



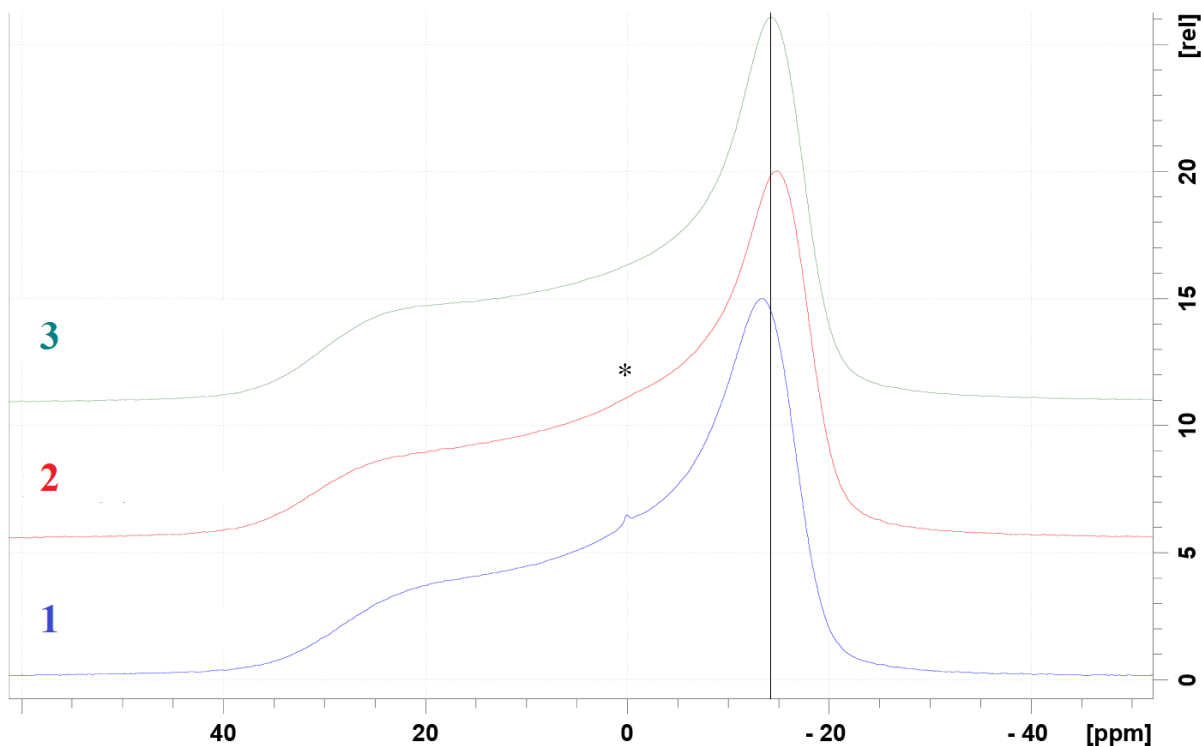
Figur 5.2.5: Statisk ^{31}P - fast-fase NMR-spekter av POPC tatt opp ved 310 K og 20 000 transienter. Formen på resonansen viser mønster for fosfat i lipidmembraner [24]. Linjebredden (CSA) av resonansen måler 46,8 ppm. Det observeres et lite signal ved kjemisk skift rundt 0 ppm.



Figur 5.2.6: ^{31}P -spekter av POPC med spinnhastighet 2,5 kHz ved 310K. Fosfat-signal markert med stjerne i figuren har et kjemisk skift på -0,76 ppm med et isotropt signal ved -0,33 ppm markert med pil. Figuren viser også spinnende sidebånd med avstand av rotert frekvens (2500 Hz).

5.2.4 ^{31}P -NMR med (*R*)-artikain

Spektrene presenteres i figurer med POPC uten og med (*R*)-artikain (8,3- og 4,0 mol%) tatt opp ved 310 K. Ved måling av CSA ble det laget teoretiske spektre av resonansene i TopSpin. Teoretiske spektre med antall komponenter av POPC og POPC med (*R*)-artikain vil også bli presentert i resultatene.

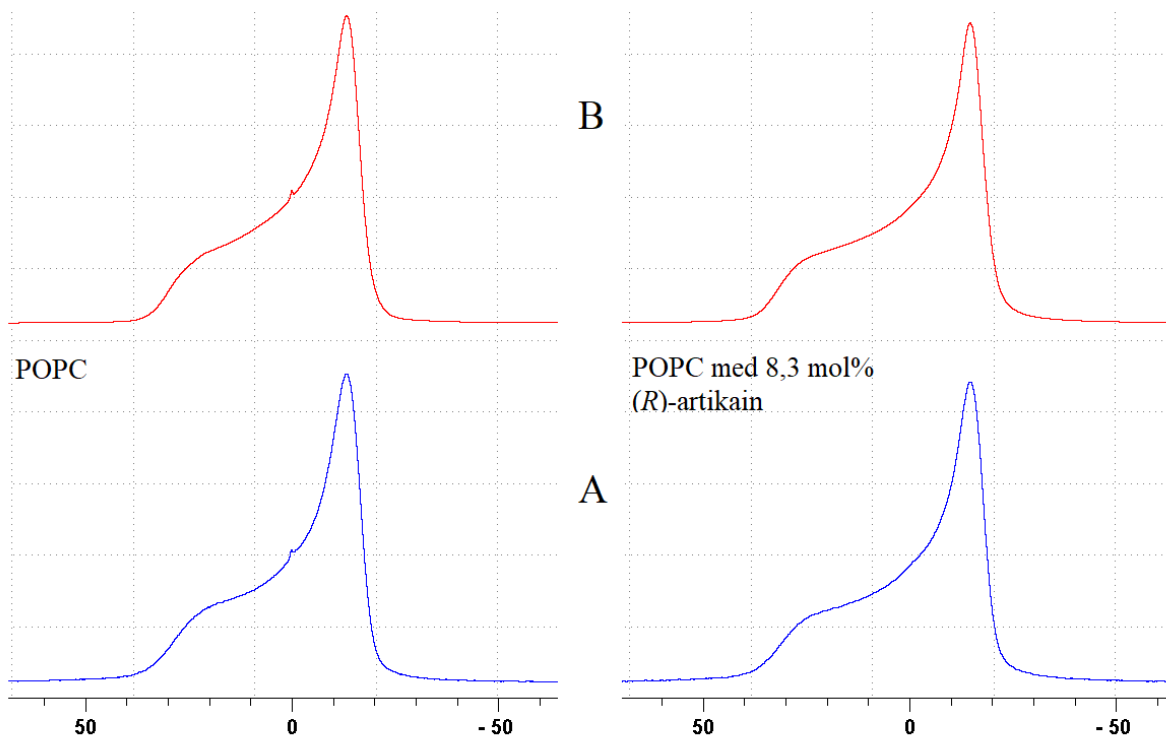


Figur 5.2.7: Statistiske ^{31}P -spektre ved 310 K der *spekter 1* er av POPC, *2* av POPC med (*R*)-artikain (8,3 mol%) og *3* av POPC med (*R*)-artikain (4,0 mol%) med ^{13}C -anrikning. Det observeres ingen tydelige isotroper i spektrene av POPC med (*R*)-artikain, men en antydning til skulder observeres i *spekter 2* ved 0 ppm markert med stjerne. Det er satt en vertikal linje fra toppunktet ved øverste spekter for å tydeliggjøre de ulike toppunktens posisjon i forhold til hverandre.

Tabell 5.2.1: Mol% (*R*)-artikain, resonansenes toppunkt og CSA ($\Delta\delta$) i ppm for spektre i *Figur 5.2.7*.

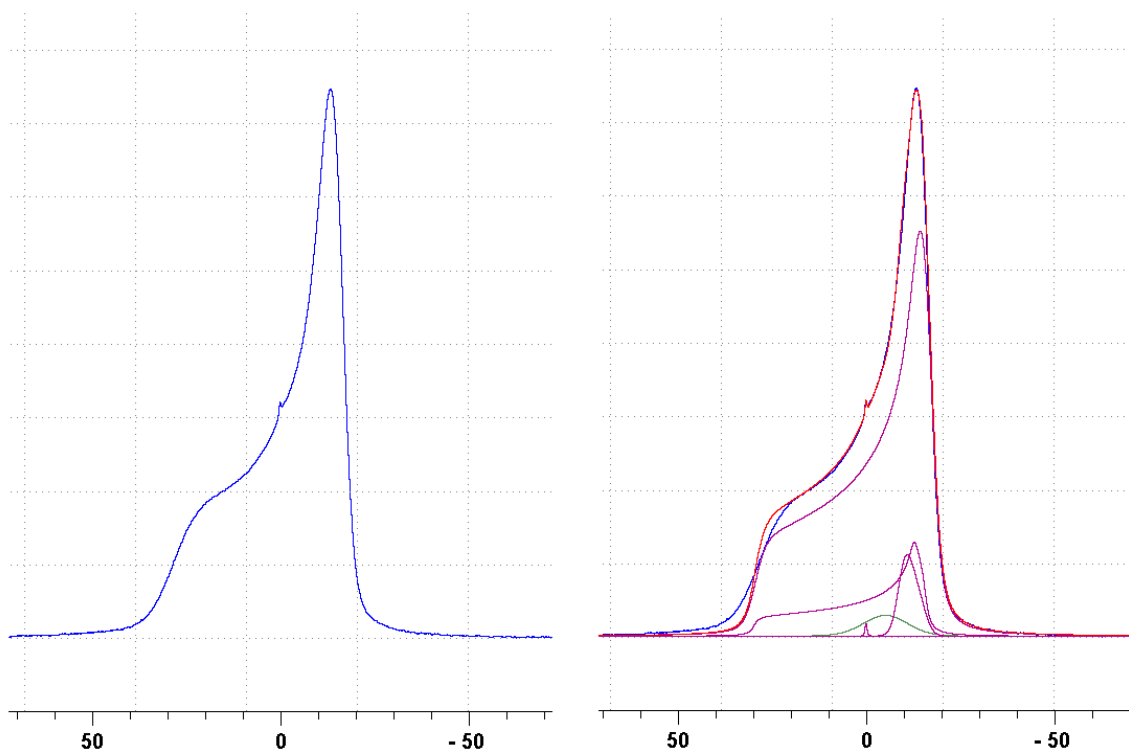
Spekter	Mol% artikain	Toppunkt [ppm]	$\Delta\delta$ [ppm]
1	-	-13,35	46,8
2	8,3	-14,90	50,1
3	4,0	-14,25	48,8

Fra *Tabell 5.2.1* viser målinger av resonansene at prøven med høyest konsentrasjon av (*R*)-artikain (8,3 mol%) har bredest CSA med toppunkt lengst upfield.

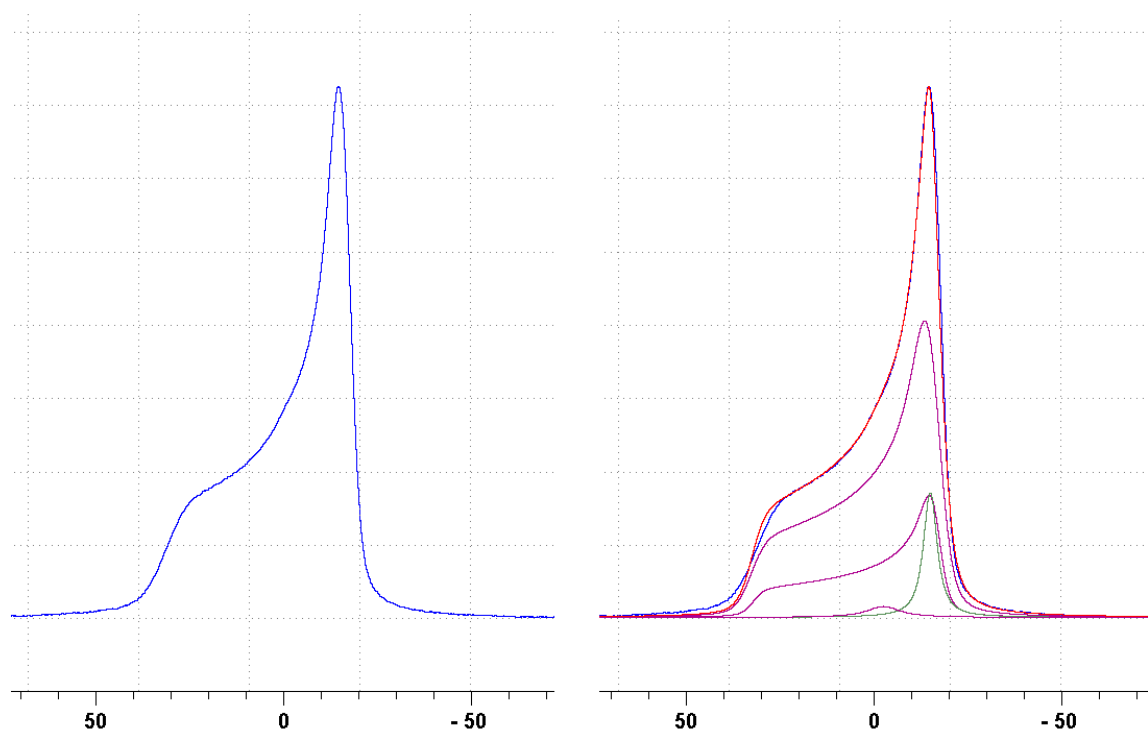


Figur 5.2.8: Viser statistiske ^{31}P -spektre der de nederste (A) er de eksperimentelle spektrene, mens de øverste (B) er de tilsvarende teoretiske spektrene. Teoretisk spekter av POPC er satt sammen av 5 komponenter, mens spekter av POPC med (R)-artikain er satt sammen av 4 komponenter.

Neste side viser de statistiske fosforspektrene med deres tilsvarende simulerte spektre med antall komponenter. Tilpasningen til de statistiske spektrene er fokusert slik at målinger av halvlinjebredde (CSA) kunne utføres. Figurene viser at flere komponenter måtte tas i bruk for å lage passende modeller for resonansene.

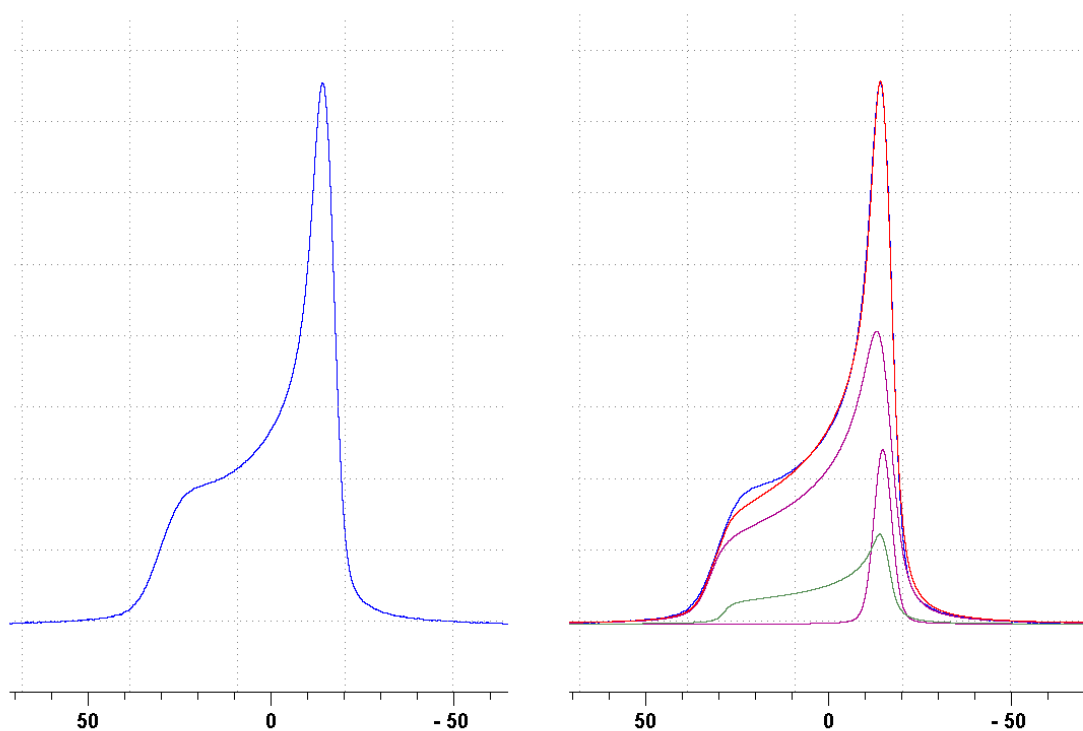


Figur 5.2.9: Statisk eksperimentell (venstre) ^{31}P -spekter av POPC-prøve ved 310 K og tilsvarende simulert spekter til høyre med 5 komponenter. Det er blant annet brukt en bred komponent ved 0 ppm som vises i grønt i simuleringen til høyre.

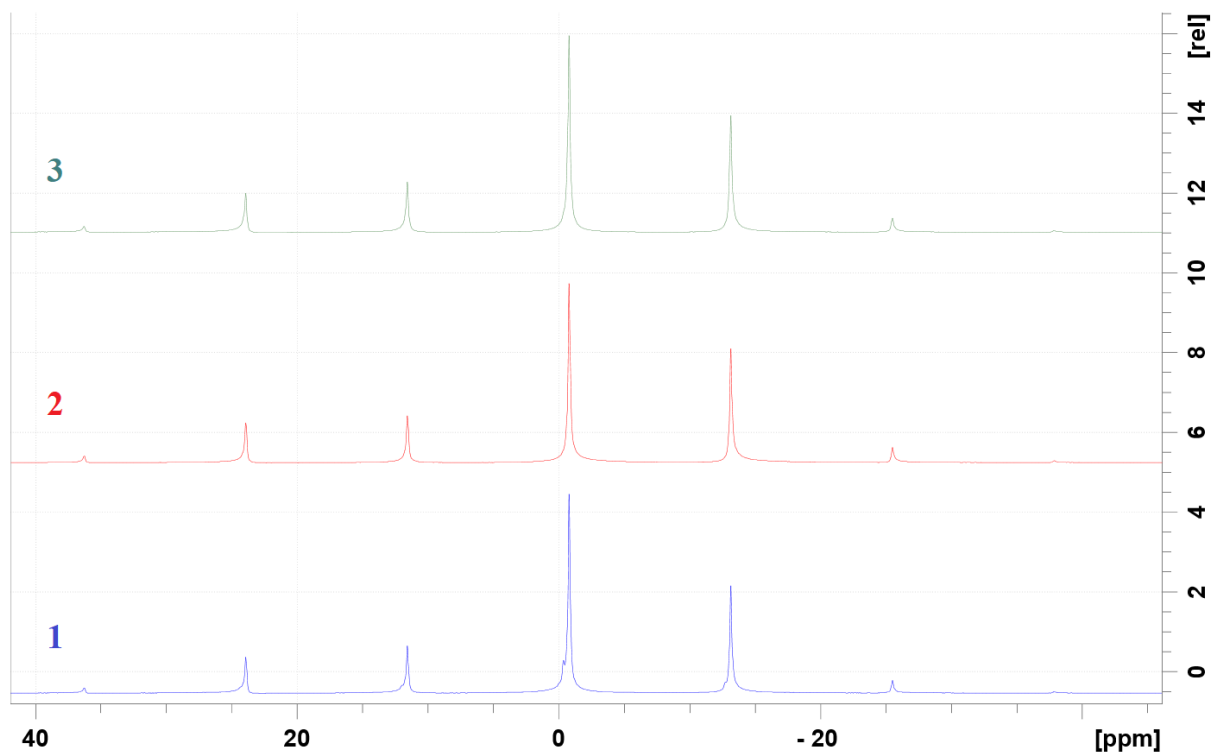


Figur 5.2.10: Statisk eksperimentell (venstre) ^{31}P -spekter av POPC-prøve med høyest konsentrasjon av (*R*)-artikain (8,3 mol%) ved 310 K og tilsvarende modell til høyre med 4

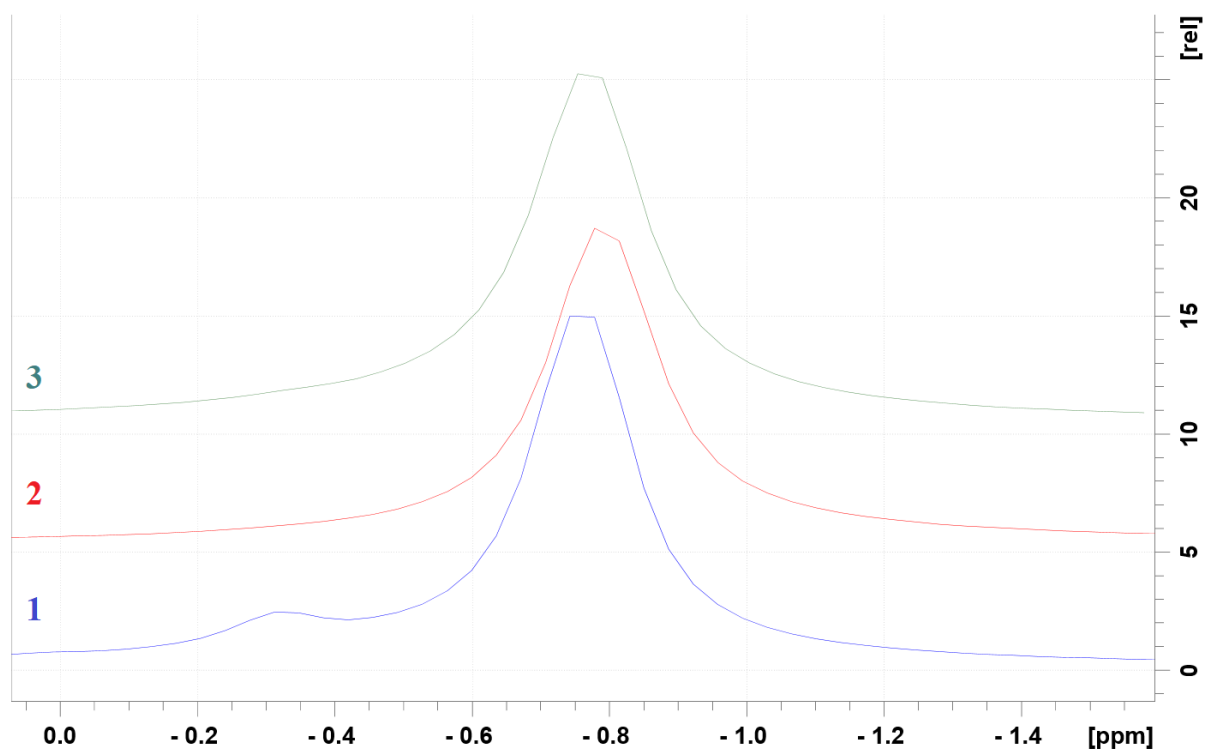
komponenter for å tilpasse det teoretiske spekteret. En liten bred komponent ved 0 ppm ble brukt for å tilpasse det teoretiske spekteret til høyre.



Figur 5.2.11: Statisk eksperimentell (venstre) ^{31}P -spekter av POPC-prøve med 4 mol% (*R*)-artikain med ^{13}C -anriking ved 310 K og tilsvarende modell med 3 komponenter for å tilpasse det teoretiske spekteret til høyre.



Figur 5.2.12: ^{31}P -spektre ved 310 K med spinnhastighet på 2,5 kHz der *spekter 1* er av POPC, 2 er POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain og 3 er POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain (^{13}C).



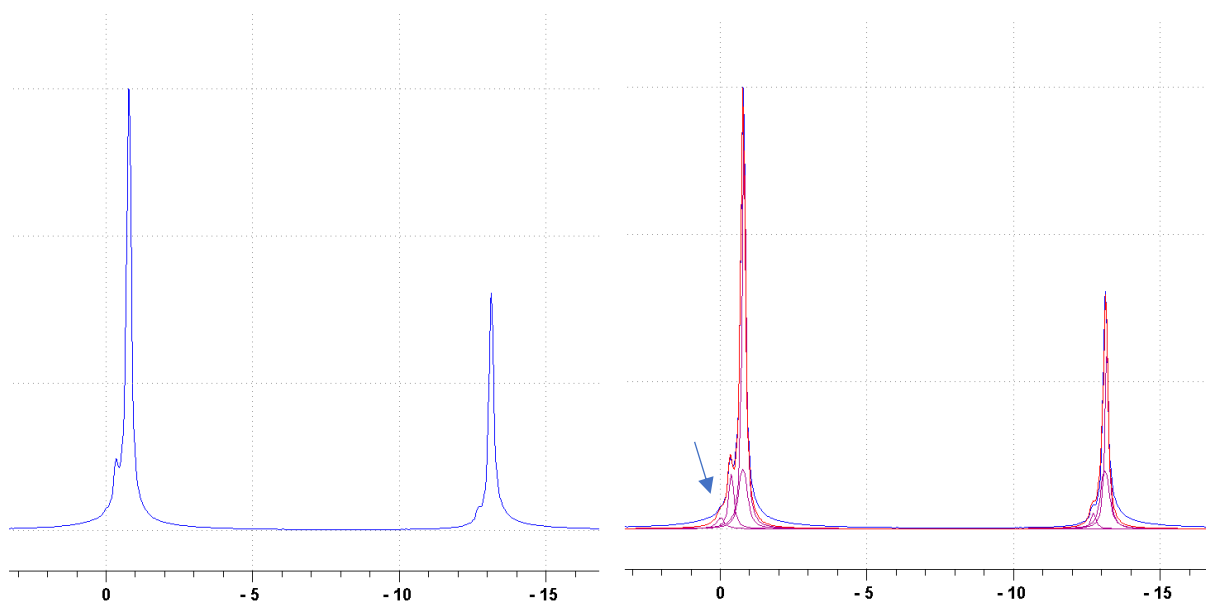
Figur 5.2.13: ^{31}P -spektre der *spekter 1* er av POPC, 2 av POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain og 3 av POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain ved 310 K og spinnhastighet på 2,5 kHz. I nederste

spekter av POPC observeres skulder fra isotrop ved -0,3 ppm. Det observeres ingen isotrope signaler i *spekter 2* og *3* der prøvene inneholder (*R*)-artikain.

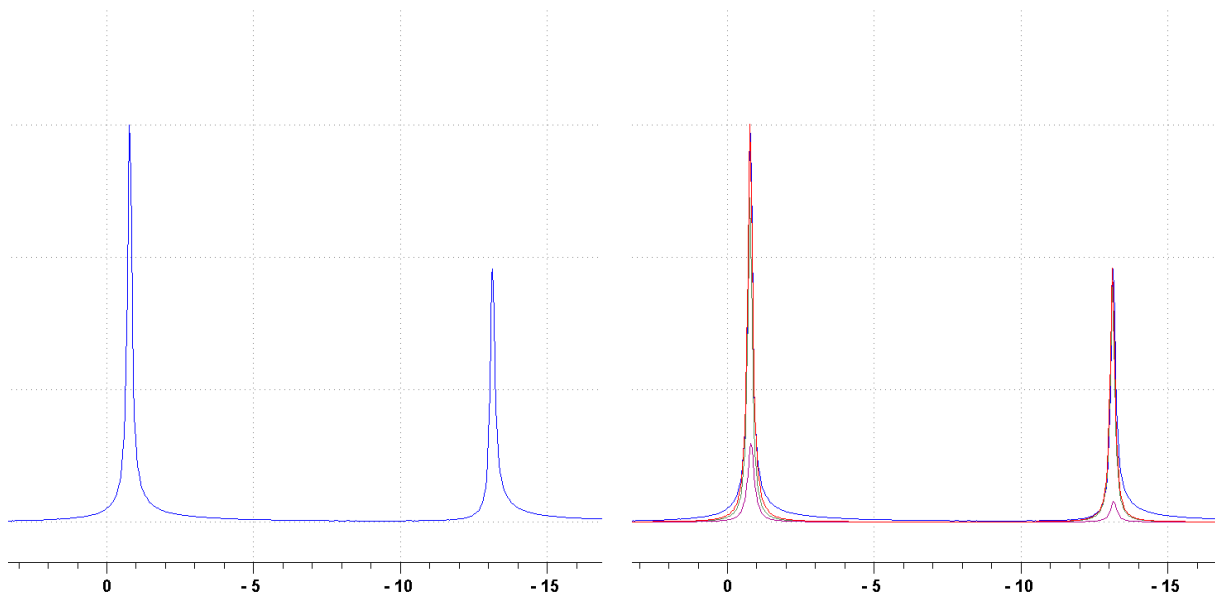
Tabell 5.2.2: Mol% (*R*)-artikain, kjemisk skift og linjebredde ($\Delta\delta$) av resonansene målt ved halv høyde i *Figur 5.2.13*.

Spekter	Mol% artikain	Kjemisk skift [ppm]	$\Delta\delta$ [Hz]
1	-	-0,76	38,7
2	8,3	-0,80	39,8
3	4,0	-0,77	42,7

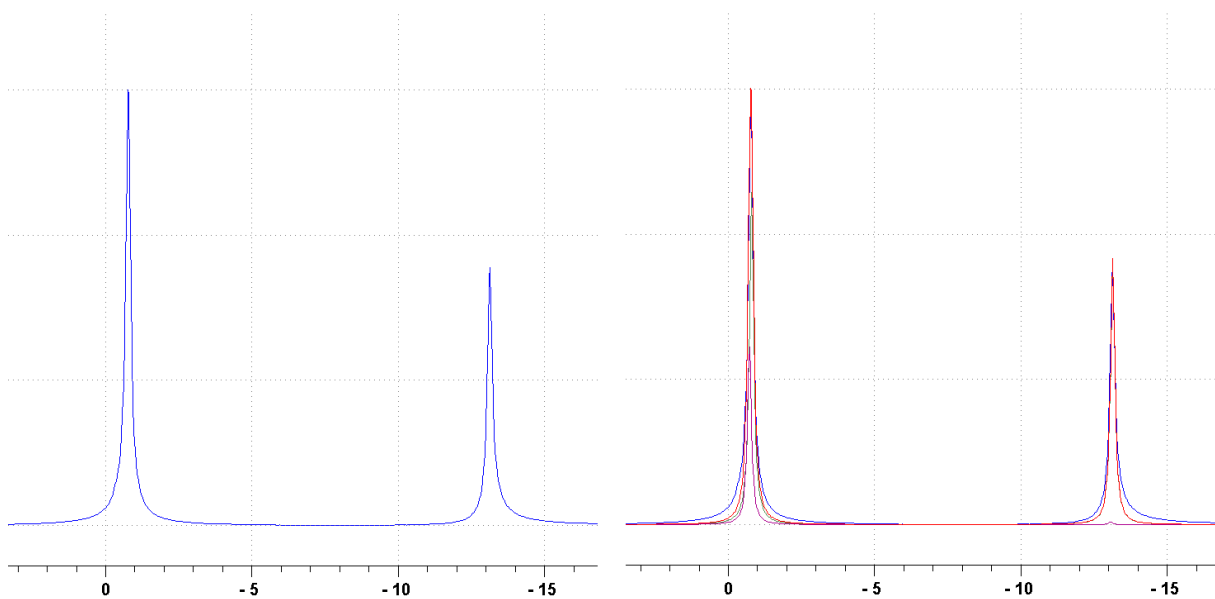
Spinnende ^{31}P -spektr (Figur 5.2.13) viser resonans lengre upfield i *spekter 2* der konsentrasjonen av (*R*)-artikain er høyest. Resonans i *spekter 3* måler størst linjebredde.



Figur 5.2.14: ^{31}P -spekter av POPC med spinnhastighet 2,5 kHz ved 310 K som viser eksperimentelt spekter (venstre) med et spinnende sidebånd upfield, og tilsvarende modell med 4 komponenter for å tilpasse det teoretiske spekteret til høyre. En komponent ble brukt for å tilpasse det isotrope signalet ved -0,33 ppm, men det ble også brukt en ekstra komponent rundt 0 ppm markert med pil for å tilpasse det teoretiske spekteret.



Figur 5.2.15: ^{31}P -spekter av POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain med spinnhastighet 2,5 kHz ved 310 K som viser eksperimentelt spekter (venstre) med et spinnende sidebånd upfield, og tilsvarende modell med 2 komponenter for å tilpasse det teoretiske spekteret til høyre.

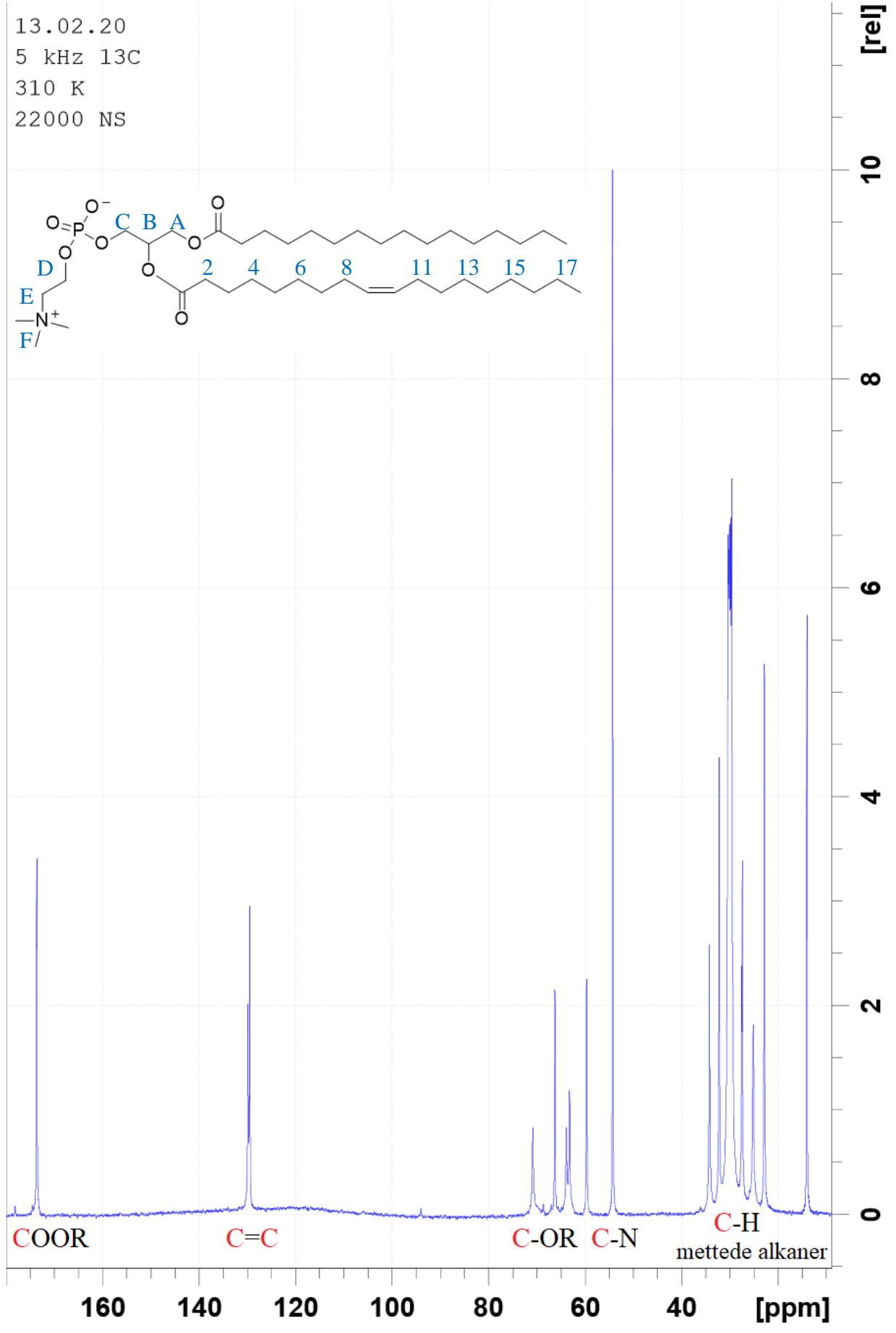


Figur 5.2.16: ^{31}P -spekter av POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain med spinnhastighet 2,5 kHz ved 310 K som viser eksperimentelt spekter (venstre) med et spinnende sidebånd upfield, og tilsvarende modell med 2 komponenter for å tilpasse det teoretiske spekteret til høyre.

5.2.5 ^{13}C -NMR av POPC

Karbon-13 eksperimenter ble utført med dekobling av proton. Teknikken sletter alle interaksjoner mellom protoner og ^{13}C -kjerner slik at det kun vil observeres singletter i spektrene [32]. Eksperimentene ble gjort med spinnhastighet 5 kHz, og LB ble justert til 5 Hz i spektrene.

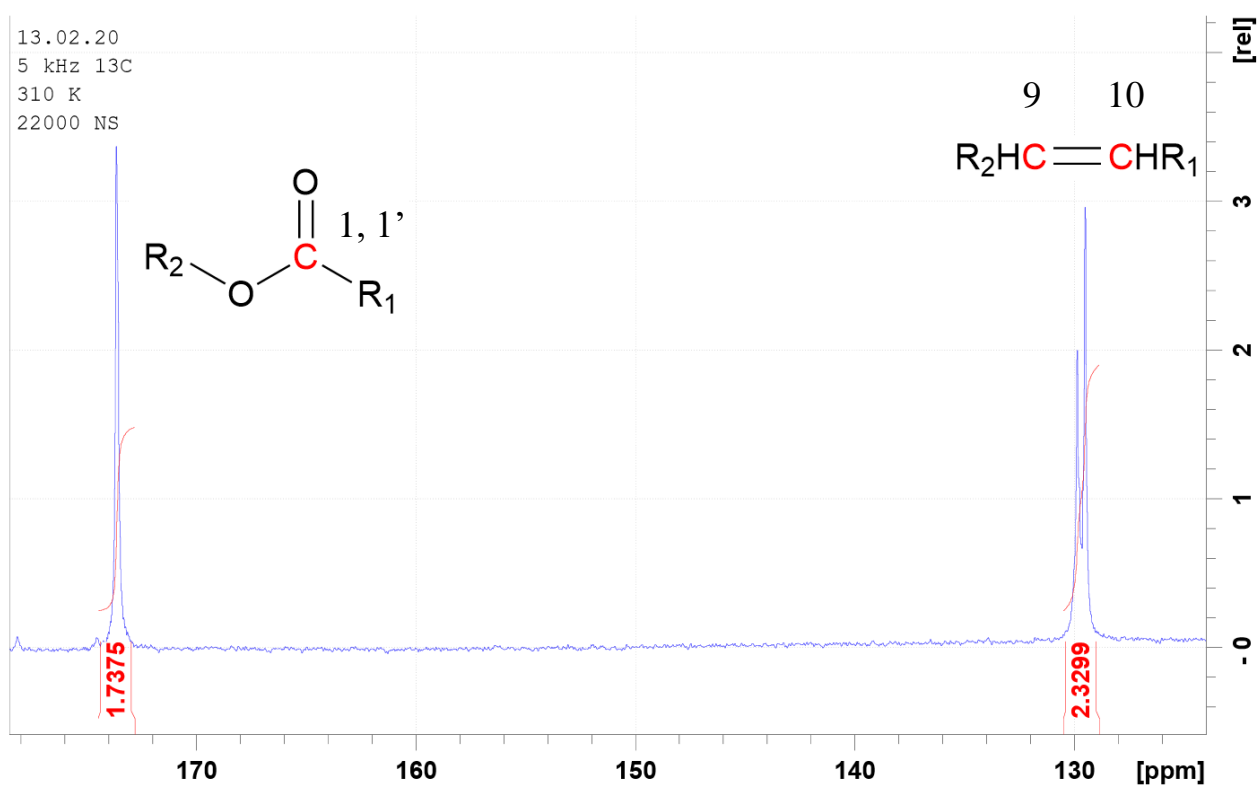
Resonansene i spektrene er integrert i forhold til metylresonansen der integrasjonsverdi blir satt til 2. Informasjon av integraler i ^{13}C -spektre er vanligvis ikke like pålitelig som i ^1H -spektre, men i dette tilfelle gav signalenes integraler nyttig informasjon om størrelsene, der antall karbonatomer samsvarte med den kjemiske strukturen av lipidet.



Figur 5.2.17: ¹³C-spekter av POPC tatt opp med spinnhastighet på 5 kHz og 22 000 transienter

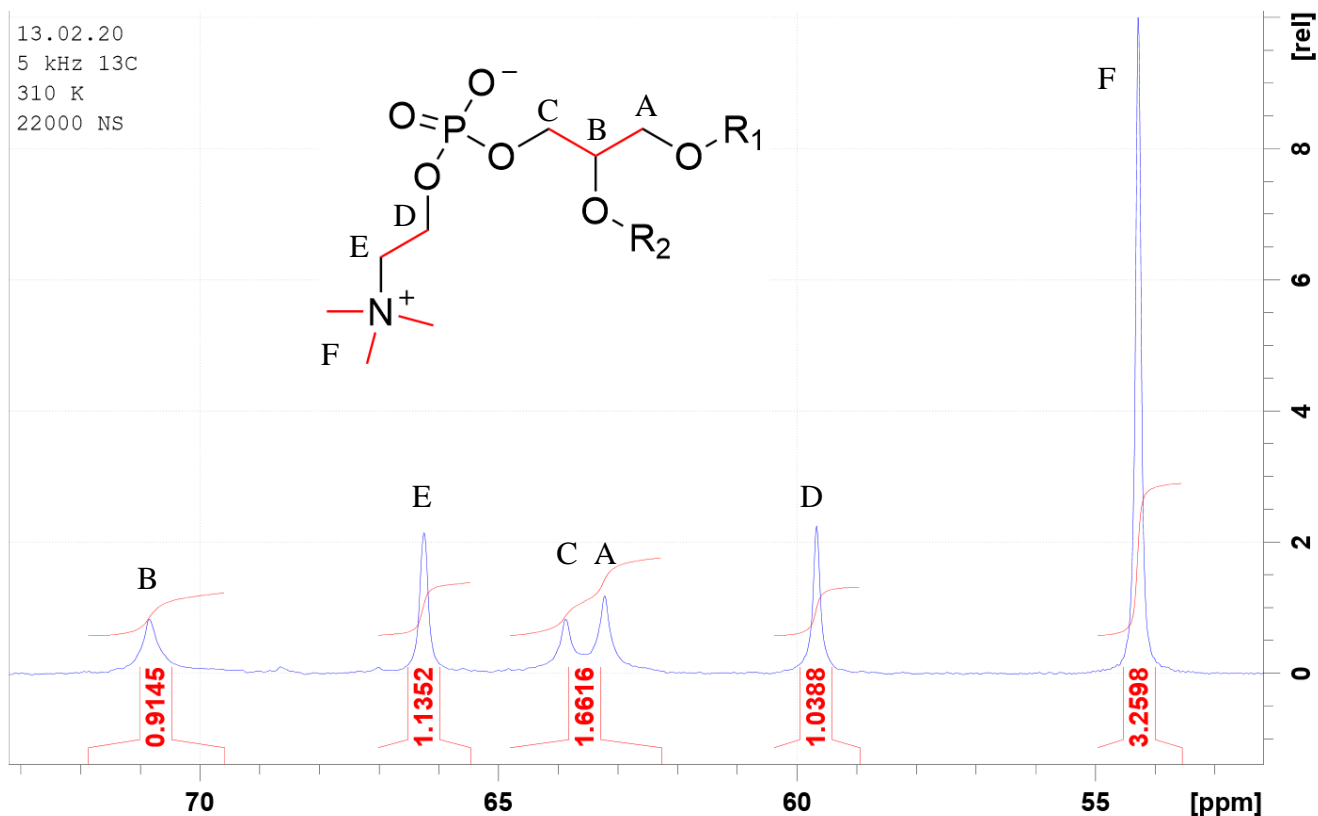
ved 310 K. De ulike kjemiske gruppene er oppgitt i de kjemiske skiftsområdene som de resonerer i. Det observeres at baselinjen i spekteret ikke er helt rett, men har en svak økning med antydning til toppunkt rundt 120 ppm.

Lengst downfield i spekteret ved 170 ppm resonerer karbonyl i ester tilhørende acylkjeden (*I*, *I'*). Ved 130 ppm er C=C i oleinsyre (*9*, *10*), og i regionen med kjemisk skift 50-70 ppm resonerer glyserolryggraden (*A*, *B*, *C*) og hodegruppen kolin (*D*, *E*, *F*). Lengst upfield er de mettede alkanene i acylkjedene (*2'-16'* og *2-18* utenom *C-9* og *C-10*).



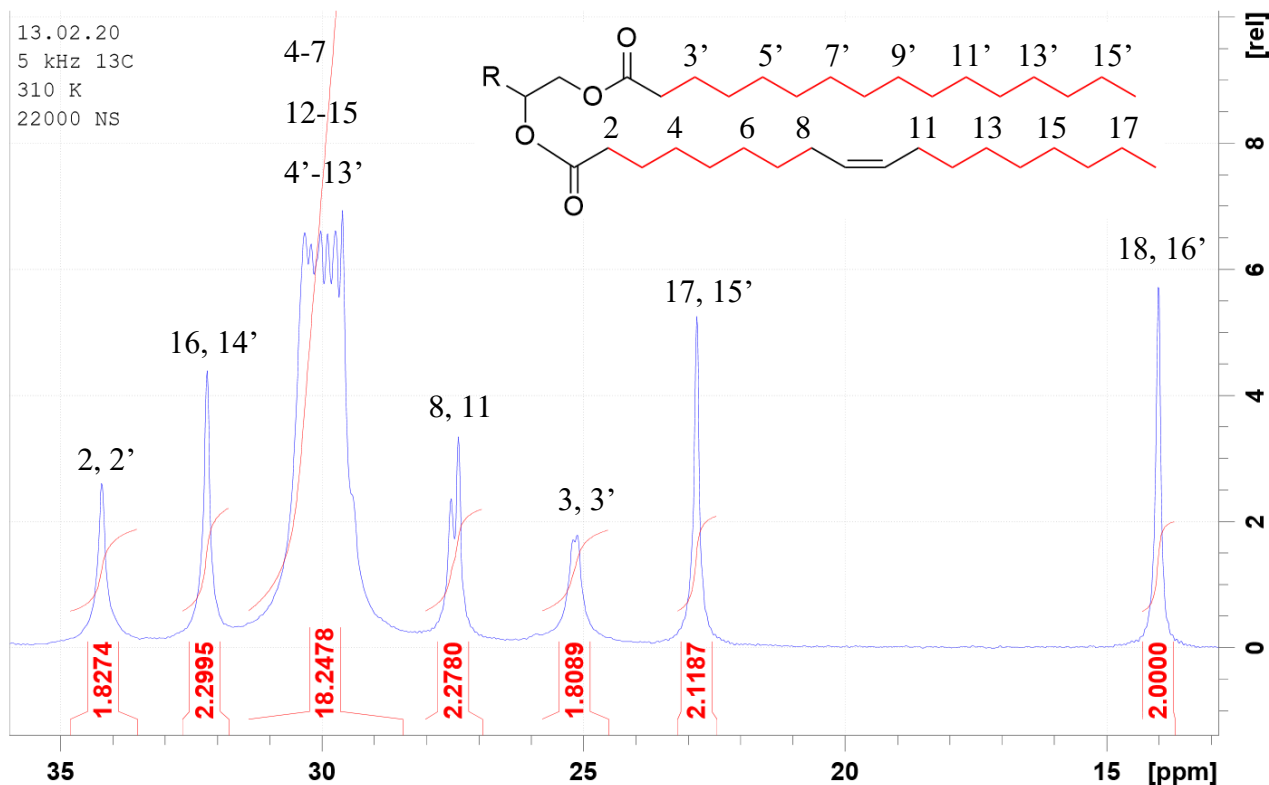
Figur 5.2.18: Viser ^{13}C -spekter for kjemisk skiftsområdet 126-176 ppm hvor ester og umettede hydrokarboner gir signal. Resonansene er integrert i forhold til metyl i acylkjedene som har integrasjonsverdi satt til 2.

Lipidet har to acylkjeder og derav to karbonylgrupper som har kjemisk skift på 173,6 ppm (*I*, *I'*), og en dobbeltbinding i den umettede acylkjeden (oleinsyre), ved C-9 og C-10 med kjemisk skift på 129,9 ppm og 129,5 ppm [10]. Ved at det synes to tydelige signaler for C=C, mens det kun ser ut til å være ett signal for CO_2R tyder det på at karbonatomene i C=C er i mer ulike kjemiske miljø enn det karbonatomene i karbonylene er.



Figur 5.2.19: Viser ^{13}C -spekter for kjemisk skift-området 54-71 ppm hvor signaler for karbon bundet til oksygen og nitrogen resonerer. Spekteret viser signalene fra glyserol og kolinhodegruppe. Resonansene er integrert i forhold til metyl med integrasjonsverdi satt til 2.

Signalet med sterkest intensitet har tre karbonatomer i samme kjemiske miljø med kjemisk skift på 54,4 ppm, som stemmer med metylgruppene (*F*) bundet til nitrogen i kolin. De to nærmest liggende signalene (*A* og *C*) med kjemisk skift henholdsvis på 63,9 og 63,2 ppm er endekarbonene i glyserolryggraden som er i lignende kjemiske miljø. ChemDraw og tidligere studier gjort av POPC og kolinklorid [10, 42-44], er brukt som hjelpemiddel i tilordningen der resonansene med kjemisk skift på 59,7 og 66,2 ppm er karbonatomene bundet til oksygen og nitrogen i kolin (*D* og *E*) og resonansen med høyest kjemisk skift på 70,9 ppm er karbonatomet i *sn*-2 posisjon i glyserol (*B*).

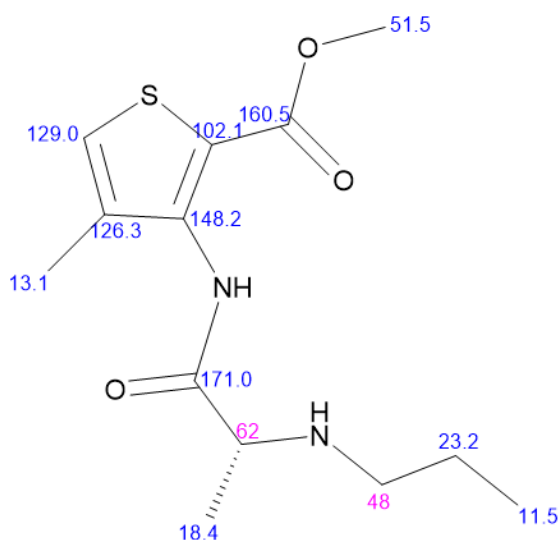


Figur 5.2.20: Viser ^{13}C -spekter i området der signaler for mettede karboner resonorer. Acylkjedene i lipidmolekylet har to metylgrupper med kjemisk skift på 14,1 ppm (18 , $16'$) som er brukt i forhold til å integrere de andre resonansene i spekteret.

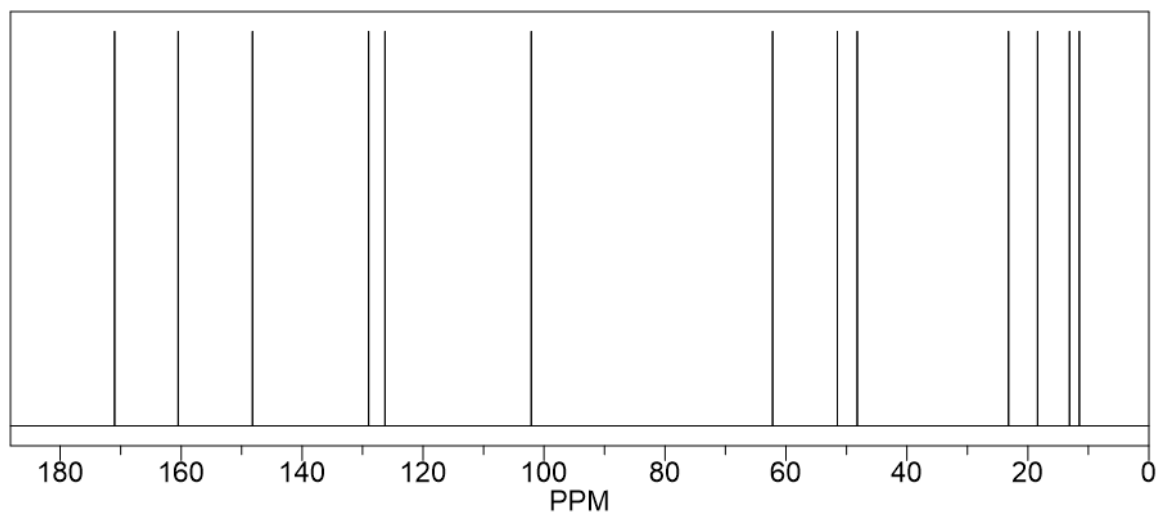
Fra integrasjon av signalene utenom signalene ved 30 ppm, observeres det at hvert signal tilsvarer to karbonatomer. Kjemisk skift for CH_2 bundet til metyl er rundt 23 ppm [45], som stemmer til resonansen med kjemisk skift på 22,8 ppm (17 , $15'$). Ved 30 ppm er det flere overlappende resonanser. I dette område har CH_2 i karbonkjeder kjemisk skift, som ikke er direkte bundet til andre typer kjemiske grupper. De vil allikevel påvirkes litt av det kjemiske miljøet rundt og gir derfor flere signaler i dette området. Det anslås at de to resonansene med kjemisk skift rundt 27 ppm (8 , 11) tilhører karbonatomene bundet til $\text{C}=\text{C}$ ved at disse er i mer ulike kjemiske miljø som også vises for $\text{C}=\text{C}$ i *Figur 5.2.18*. Karbonene bundet til acylidel ($\text{C}-\text{CO}_2\text{R}$) vil ha kjemisk skift lengre downfield og tilordnes signalet med kjemisk skift på 34,2 ppm (2 , $2'$). Tilordningen kan sammenlignes med NMR-studier gjort med lipider av POPS og DPPC [24, 44]. Fra disse studiene blir resonansen med kjemisk skift på 32,3 ppm tilordnet $\text{C}-16$ og $\text{C}-14'$ i kjeden, og resonansen for $\text{C}-3$ og $\text{C}-3'$ ved 25,0 ppm.

5.2.6 ^{13}C -NMR av POPC med (*R*)-artikain

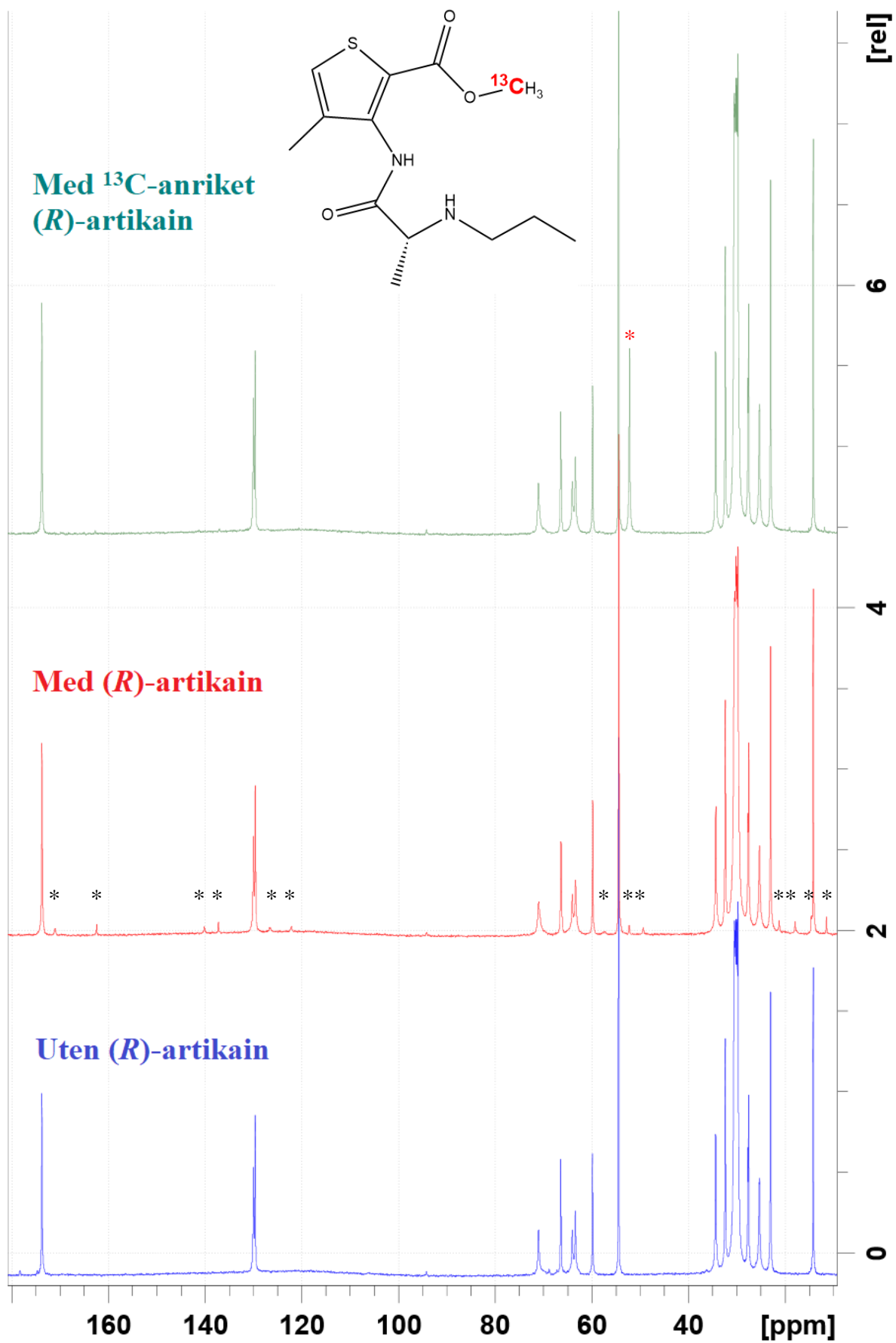
Karbon-13 spektre ved 310 K av POPC-prøver med og uten (*R*)-artikain blir presentert. Det har ikke blitt utført ^{13}C -opptak av ren (*R*)-artikain, men ut ifra prediksjon i ChemDraw (*Figur 5.2.21*) og fra MOLBASE Chemical Database [46], viser disse en god tilnærming til resonansene i ^{13}C -spektrene av POPC med (*R*)-artikain. Resonansene som avviker i kjemisk skift, er karbonatomene i tiofenring som anslås å være på grunn av tilstedeværelse av POPC.



Estimation quality is indicated by color: **good**, **medium**, **rough**

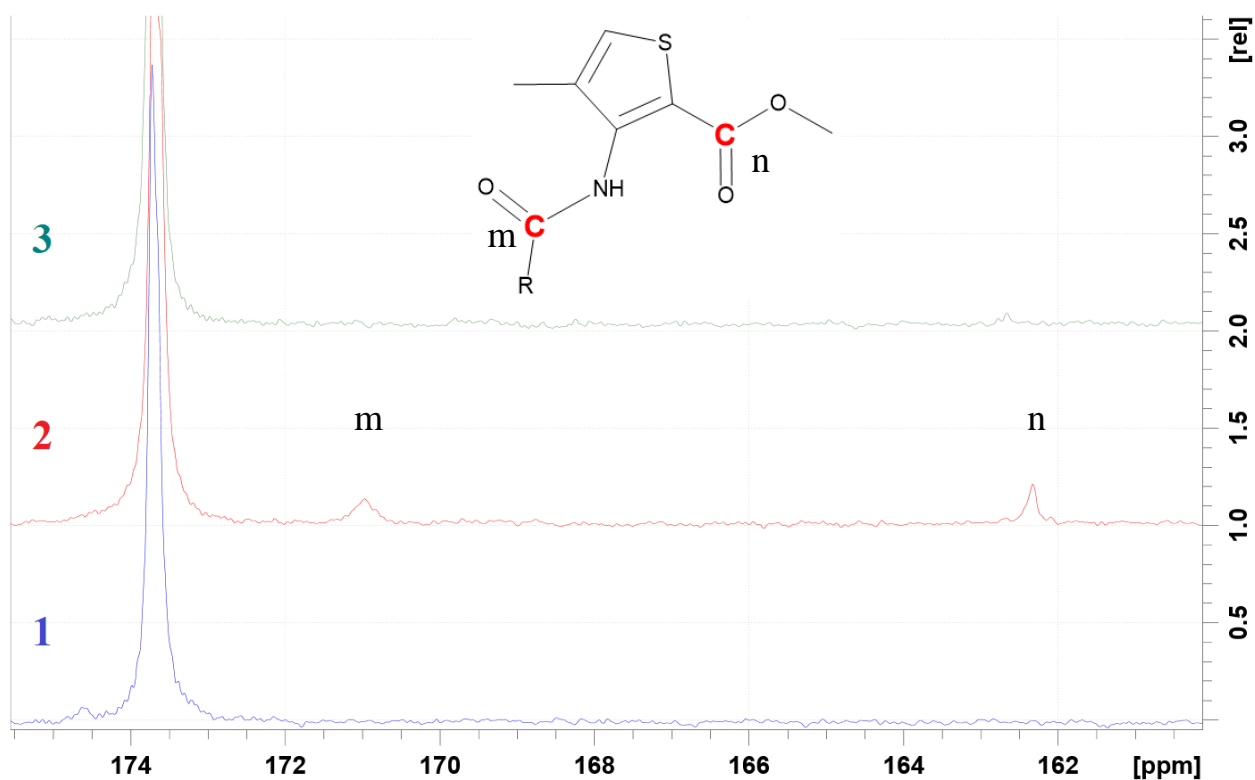


Figur 5.2.21: Struktur av (*R*)-artikain med kjemisk skift (ppm) predikert i ^{13}C -NMR-spekter av (*R*)-artikain utført i ChemDraw. Hovedforskjellene mellom predikerte verdier og verdier fra resultatet i denne oppgaven, er i tiofenring der resonansene i denne figuren er mellom 100 og 150 ppm, mens de fire resonansene er mellom 120 og 140 ppm i resultatene i denne oppgaven.

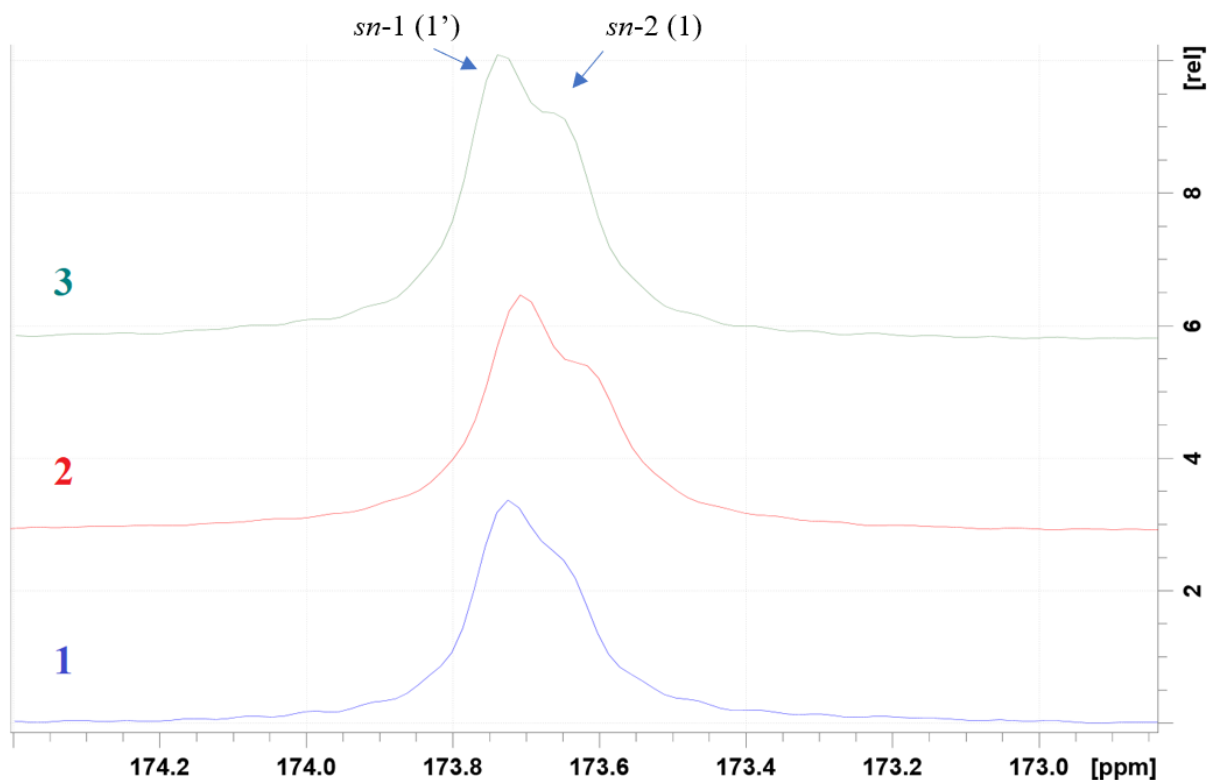


Figur 5.2.22: Karbon-13-spektre av POPC tatt opp ved 310 K og 5 kHz der det nederste spekter

viser POPC, midterste spekter av POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain, og øverst spekter av POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain med ^{13}C -anrikning av karbon i metoksygruppen. I midtre spekter viser tretten tydelige nye resonanser i spekter fra (*R*)-artikain markert med stjerner. Noen av resonansene vises svakt i øverste spekter bortsett fra et sterkt signal fra metoksyresonansen markert med rød stjerne. Kjemisk skift av resonansene er justert av metylresonansen fra acylkjedene i POPC, som har kjemisk skift på 14,1 ppm.



Figur 5.2.23: ^{13}C -spektre tatt opp ved 310 K og 5 kHz der 1: POPC, 2: POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain og 3: POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain (^{13}C). Området viser karbonylresonans i acylkjedene i POPC med kjemisk skift på 173,7 ppm, samt resonanser for (*R*)-artikain der karbonyl i amidgruppe har kjemisk skift på 171,0 ppm (*m*) og karbonyl i ester ved 162,3 ppm (*n*).

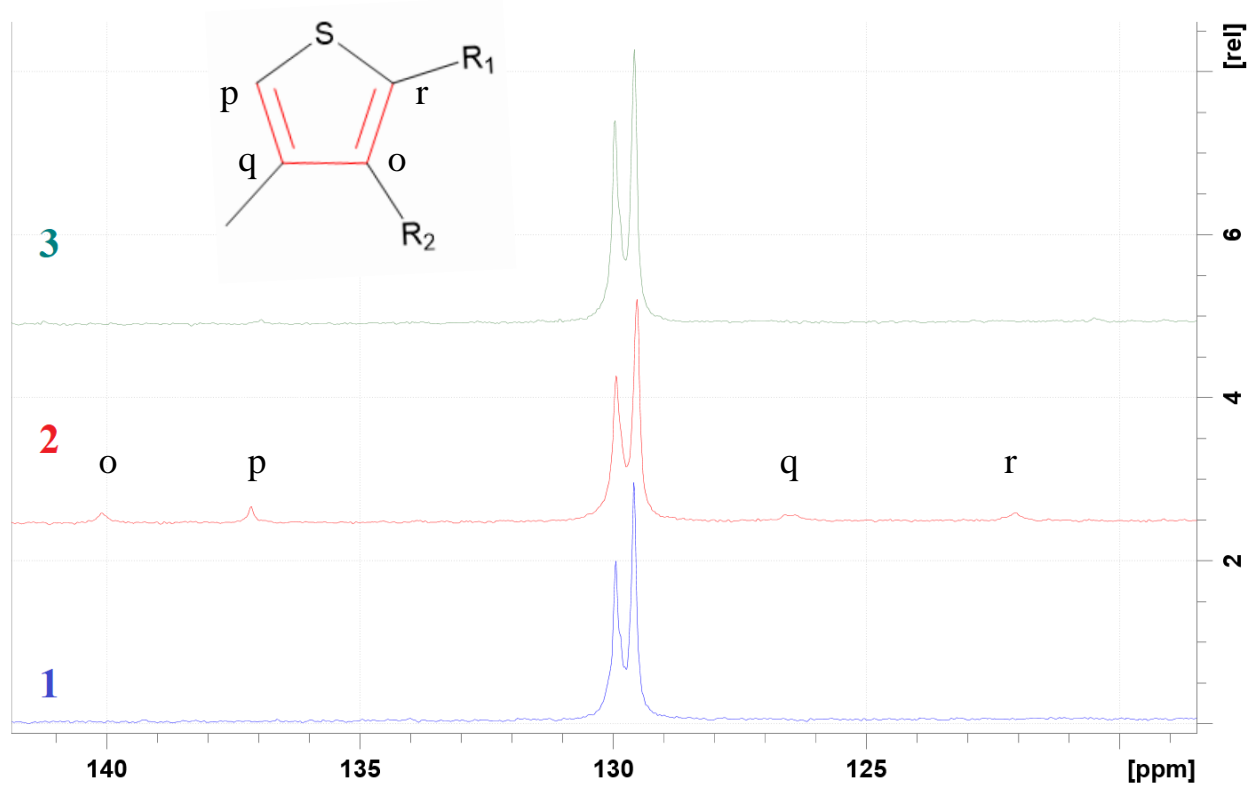


Figur 5.2.24: ^{13}C -spektre av karbonyl i acylkjedene i POPC der 1: POPC, 2: POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain og 3: POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain (^{13}C). *Spekter 2 og 3* viser mindre overlappende resonanser av de to karbonylgruppene i acylkjedene.

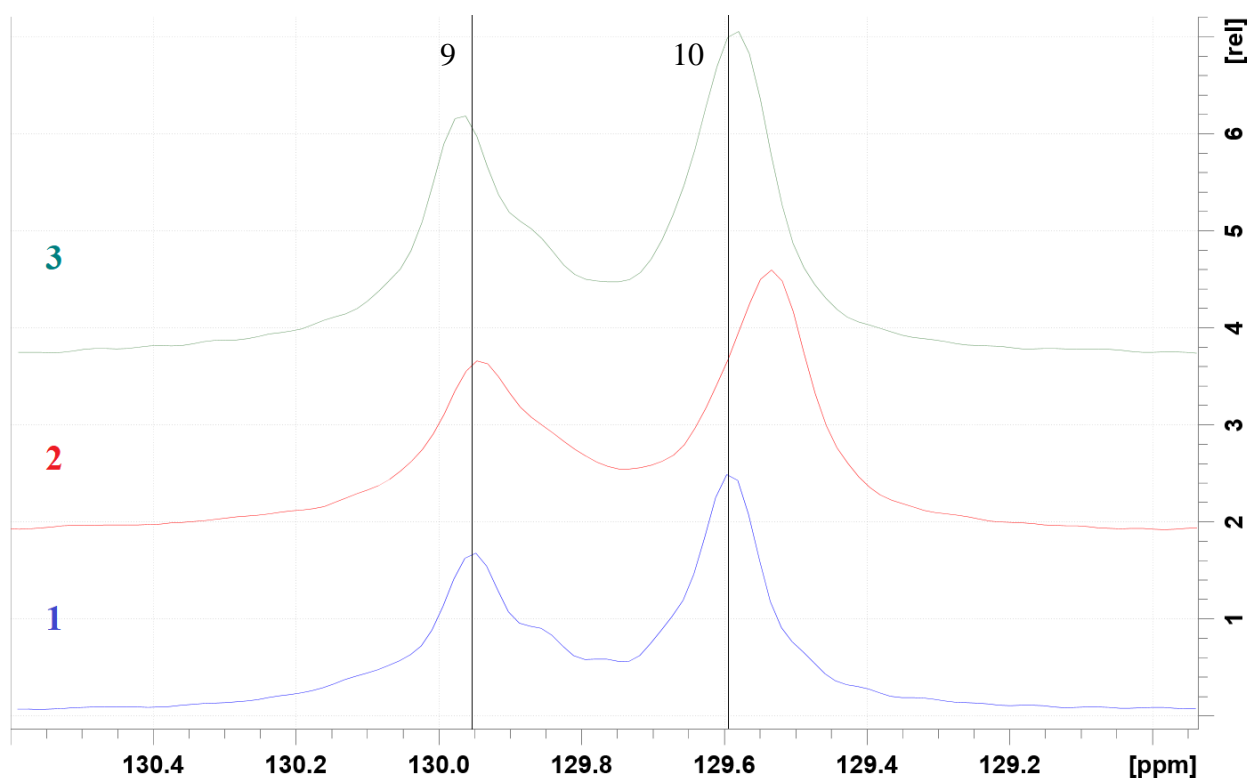
Tabell 5.2.3: Kjemisk skift av resonansene der resonans av *sn*-1 karbonyl er lengst downfield og *sn*-2 karbonyl upfield [10], samt linjebredde målt ved halv høyde (peakw i Topspin).

Prøve (spekter)	Kjemisk skift av C=O,	Kjemisk skift av C=O,	Linjebredde [Hz]
	<i>sn</i> -1 [ppm]	<i>sn</i> -2 [ppm]	
1	173,726	173,650	20,774
2	173,706	173,615	23,489
3	173,732	173,648	23,123

Tabell 5.2.3 viser at resonansene i *spekter 2* med høyest konsentrasjon av (*R*)-artikain (8,3 mol%) ligger lengre upfield og har økt linjebredde. *Spekter 3*, der konsentrasjonen av (*R*)-artikain er lavere (4,0 mol%), er resonansen fra *sn*-1 karbonyl lenger downfield i forhold til tilsvarende resonans i *spekter 1*.



Figur 5.2.25: ^{13}C -spektre av området hvor signal for umettede hydrokarboner resonerer der *spekter 1* er POPC, *2* er POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain og *3* er POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain (^{13}C). Resonansene fra C=C i acylkjede i POPC har kjemisk skift ved 130 ppm, mens nye resonanser fra tiofenring i (*R*)-artikain vises i *spekter 2*. Lengst downfield er resonans *o* med kjemisk skift på 140,1 ppm, etterfulgt av *p* med kjemisk skift 137,1 ppm, resonans *q* med kjemisk skift 126,5 ppm og *r* med kjemisk skift på 122,0 ppm. Resonanser av (*R*)-artikain er vanskelig å observere i *spekter 3*, men antydning til signal kan observeres av *p* med samme kjemisk skift som i *spekter 2*.



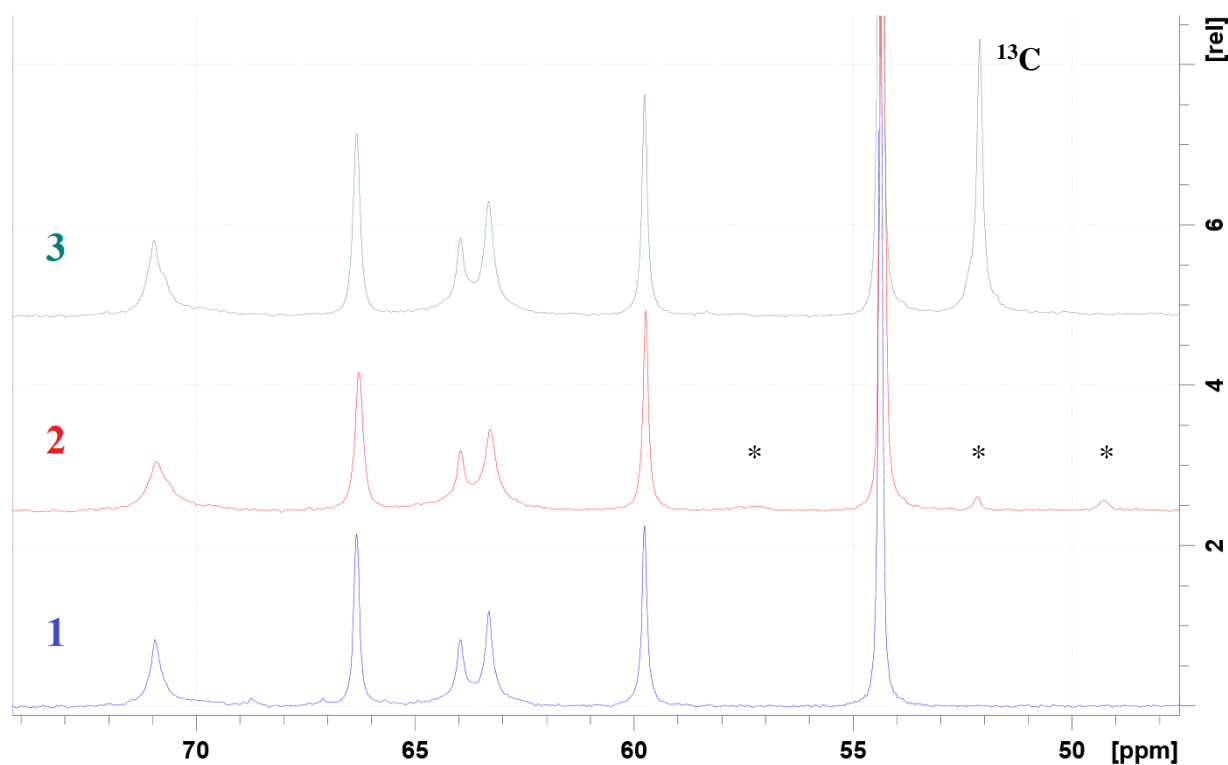
Figur 5.2.26: Resonansene av C=C der C-9 er downfield for C-10 [10]. Figuren viser spektrene der 1 er POPC, 2 er POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain og 3 er POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain (^{13}C). To vertikale linjer er satt gjennom topppunktene i *spekter 1* til sammenligning av kjemiske skift for tilsvarende resonanser i *spekter 2* og *3*. Ved resonans C-9 i både *spekter 1* og *3* observeres en tydelig skulder med kjemisk skift på 129,85 ppm som ikke er observerbar i *spekter 2*.

Tabell 5.2.4 Kjemisk skift og linjebredde ved halv høyde av C=C-resonansene i POPC fra spektrene i *Figur 5.2.26*.

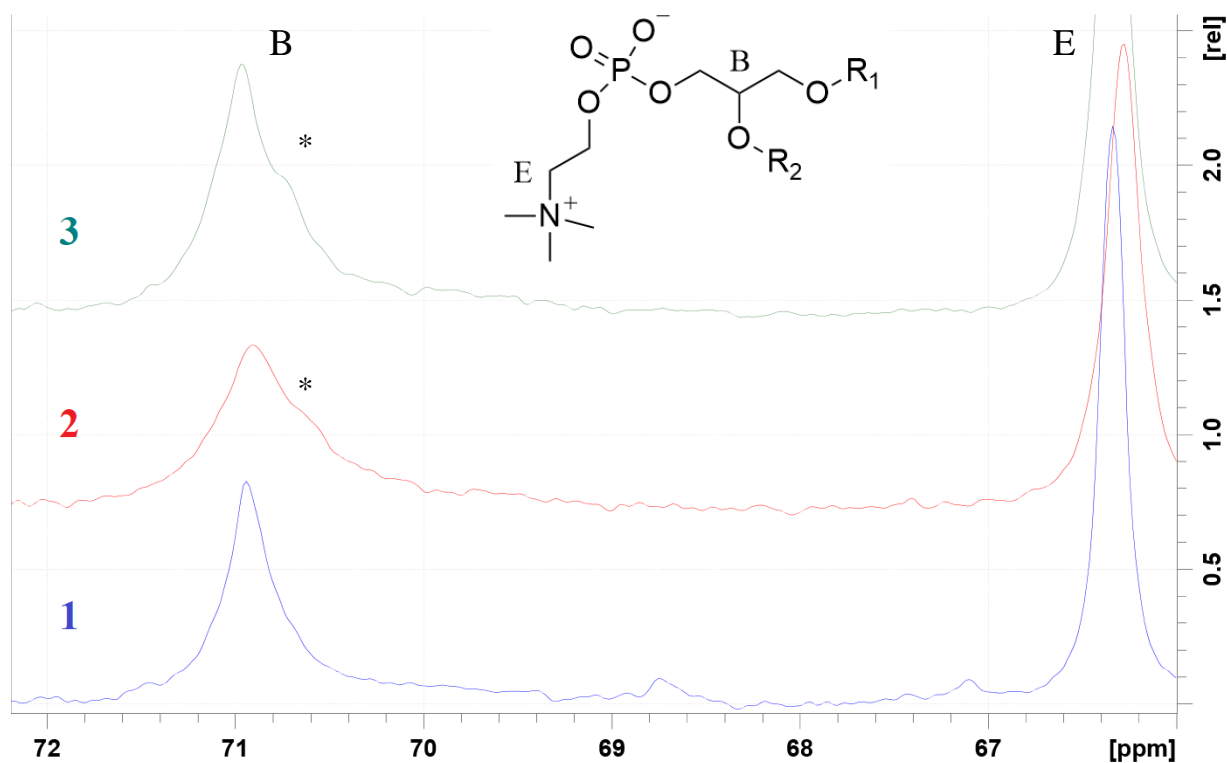
Prøve (spekter)	Kjemisk skift av C-9 [ppm]	Linjebredde [Hz]	C-9	Kjemisk skift av C-10 [ppm]	Linjebredde [Hz]	C-10
1	129,946	21,589		129,595	14,807	
2	129,944	26,620		129,536	19,988	
3	129,962	21,808		129,586	17,717	

Fra *Figur 5.2.26* observeres det at kjemisk skift for C-10 endres i større grad i kjemisk skift i forhold til C-9 i *spekter 2*. Kjemiske skift for resonansene er lengre upfield i *spekter 2*, mens i

spekter 3 er C-9-resonansen lengre downfield enn for tilsvarende resonans i ren POPC-prøve (*spekter 1*). Linjebredden av resonansene er størst i *spekter 2*.



Figur 5.2.27: ^{13}C -spektre av resonanser av hodegruppe og glyserolryggrad av POPC, samt resonanser fra (*R*)-artikain som er markert med stjerner i *spekter 2*. *Spekter 1* er av POPC, *2* av POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain og *3* av POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain (^{13}C). I *spekter 3* vises et tydelig signal ved 52,1 ppm for metoksygruppe med ^{13}C -anrikning i (*R*)-artikain.

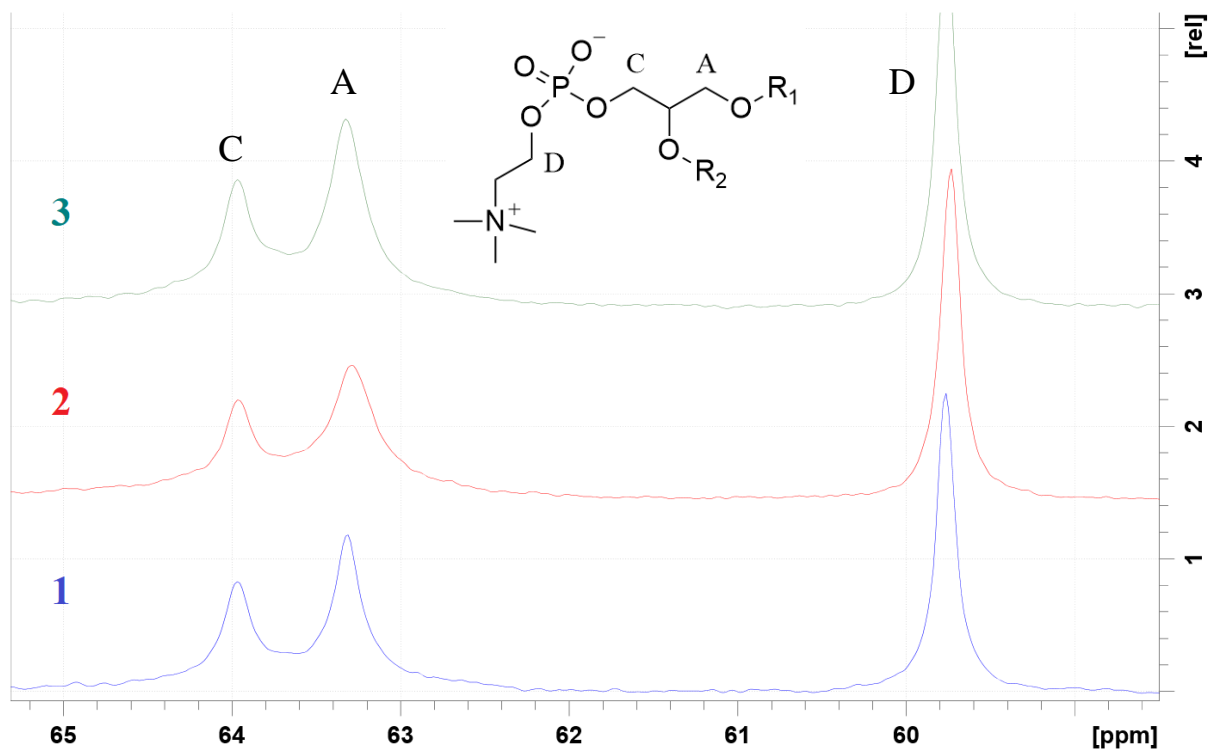


Figur 5.2.28: ^{13}C -spektre viser resonansene for karbon-B i glyserolryggrad ved kjemisk skift på 71,0 ppm og karbon-E bundet til nitrogen i kolinhodegruppen ved 66,3 ppm. *Spekter 1* er av POPC, *2* av POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain og *3* av POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain (^{13}C). I *spekter 2* og *3* observeres en ny resonans markert med stjerne ved resonans B.

Tabell 5.2.5: Kjemisk skift og linjebredde ved halv høyde av signalene for karbon i glyserol (B) og karbon bundet til nitrogen i kolinhodegruppen (E) i *Figur 5.2.28*.

Prøve (spekter)	Kjemisk skift C-B [ppm]	Linjebredde C-B [Hz]	Kjemisk skift C-E [ppm]	Linjebredde C-E [Hz]
1	70,946	35,983	66,340	19,777
2	70,907	70,203	66,280	25,997
3	70,966	54,499	66,331	23,612

Økt linjebredde og lavere intensitet vises tydelig i *spekter 2* av resonans B der en skulder/resonans er dukket opp. Det måles også økt linjebredde av resonans E i *spekter 2*, og resonansene ligger mer upfield enn de tilsvarende resonansene i *spekter 1* og *3*.

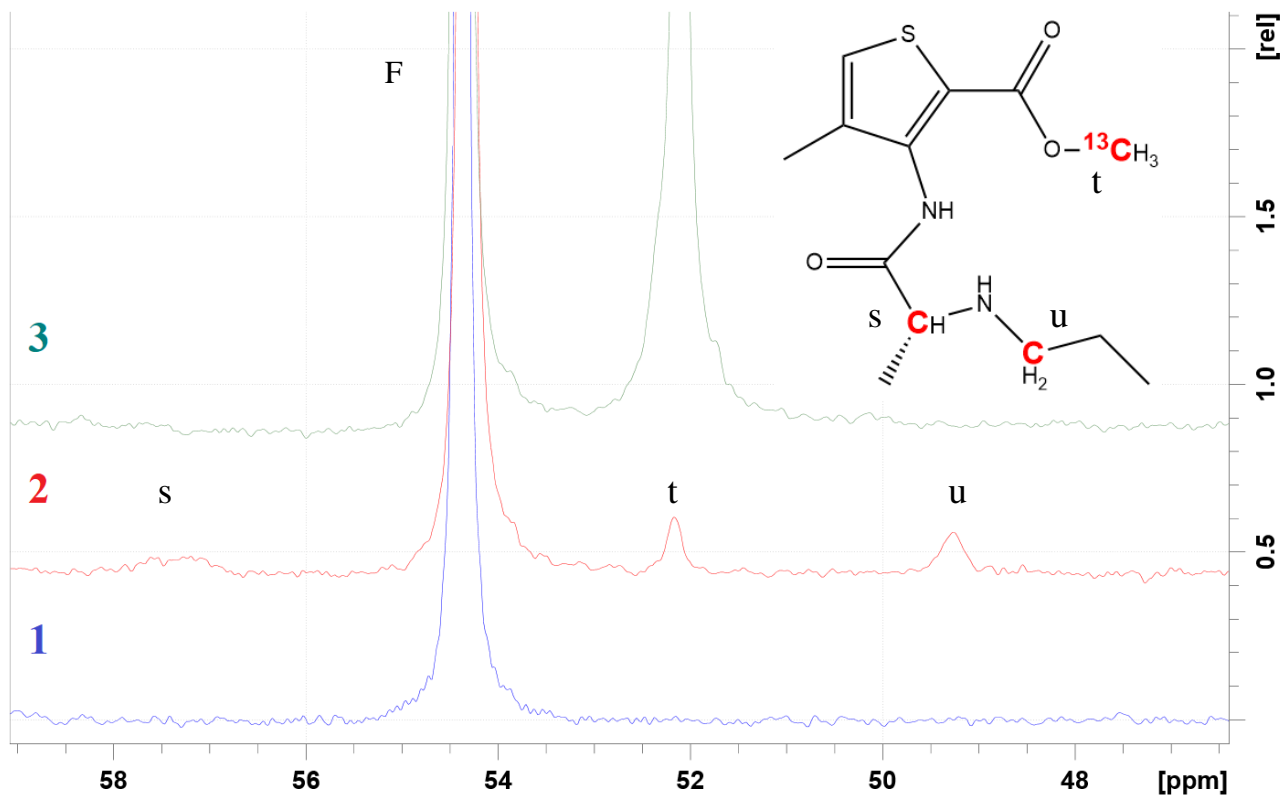


Figur 5.2.29: ^{13}C -spektre viser resonansene for karbonatomer i glyserolrygggrad ved kjemisk skift på 64,0 ppm og 63,3 ppm (C og A) og karbon bundet til oksygen i kolinhodegruppen ved 59,7 ppm (D). *Spekter 1* er av POPC, *2* av POPC med 8,3 mol% (R)-artikain og *3* av POPC med 4,0 mol% (R)-artikain (^{13}C).

Tabell 5.2.6: Kjemisk skift, δ , og linjebredde ved halv høyde, $\Delta\delta$, av signaler for karboner i glyserol (C og A) og karbon bundet til oksygen i kolinhodegruppen (D) i *Figur 5.2.29*.

Prøve (spekter)	δ C-C [ppm]	$\Delta\delta$ C-C [Hz]	δ C-A [ppm]	$\Delta\delta$ C-A [Hz]	δ C-D [ppm]	$\Delta\delta$ C-D [Hz]
1	63,969	28,817	63,310	26,905	59,764	16,404
2	63,969	32,260	63,296	42,440	59,737	17,247
3	63,966	32,853	63,326	34,104	59,767	17,589

Signalet for karbon-A som er bundet til *sn*-1 acylkjede viser en tydelig større linjebredde i *spekter 2*. Karbon-C som er bundet til fosfat og hodegruppe i *sn*-3 posisjon, og karbon-D i kolin viser mindre forskjell i linjebredden i de ulike spektrene der størst linjebredde av disse resonansene er målt i *spekter 3*.

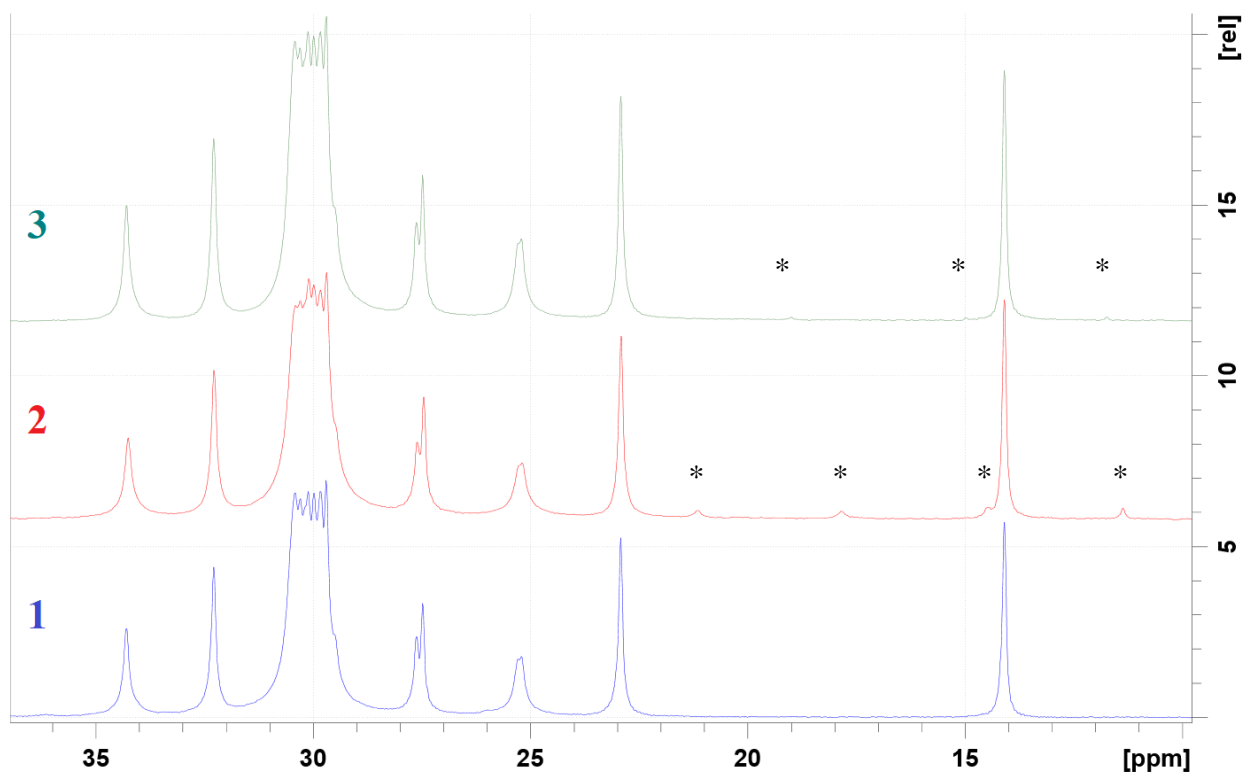


Figur 5.2.30: ^{13}C -spektre der *spekter 1* er av POPC, *2* av POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain og *3* av POPC med 4 mol% (*R*)-artikain (^{13}C). Spektrene viser resonans for metylgruppene bundet til nitrogen i kolin (*F*) ved kjemisk skift på 54,3 ppm. I *spekter 2* viser i tillegg resonansene for (*R*)-artikain der kiralt karbon (*s*) har kjemisk skift 57,2 ppm, metyl fra metoksygruppe ved 52,1 ppm (*t*) og CH_2 -gruppe bundet til nitrogen ved 49,3 ppm (*u*). *Spekter 3* viser resonans med stor intensitet av metoksygruppen med ^{13}C -anriking (*t*).

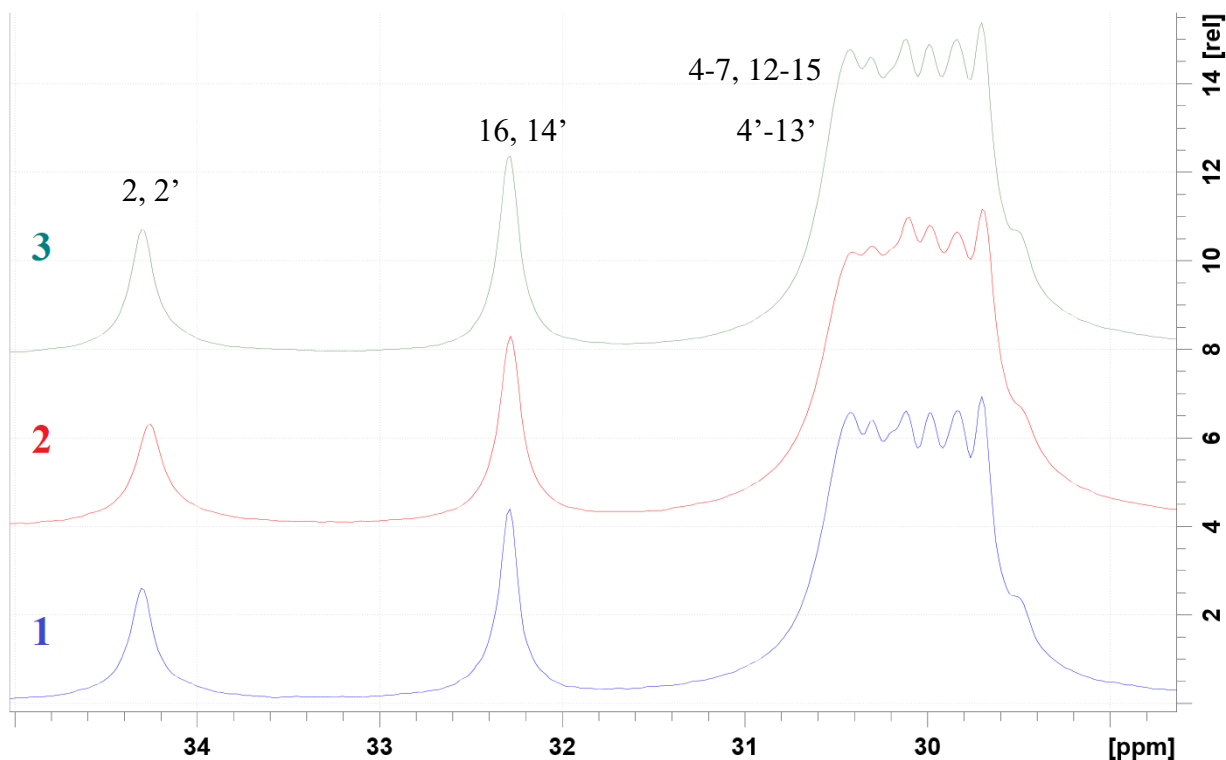
Tabell 5.2.7: Kjemisk skift og linjebredde av resonans ved halv høyde for metylgruppene bundet til nitrogen (*F*) i kolin i POPC-prøve fra *Figur 5.2.30*.

Prøve (spekter)	Kjemisk skift [ppm]	Linjebredde [Hz]
1	54,381	13,040
2	54,340	16,007
3	54,387	15,571

Resonansen *F* er lengst upfield og måler størst linjebredde i *spekter 2*.



Figur 5.2.31: ^{13}C -spektre over resonansene i acylkjedene i POPC der *spekter 1* er av POPC, *2* av POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain og *spekter 3* er av POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain (^{13}C). *Spekter 2* viser en tydelig forskjell i området rundt 30 ppm der resonansene lengst downfield avtar i intensitet sammenlignet med tilsvarende resonanser i *spekter 1* og *3*. Markert med stjerner vises fire små resonanser fra (*R*)-artikain i området 11-23 ppm i *spekter 2*, og tre mindre resonanser i *spekter 3*.

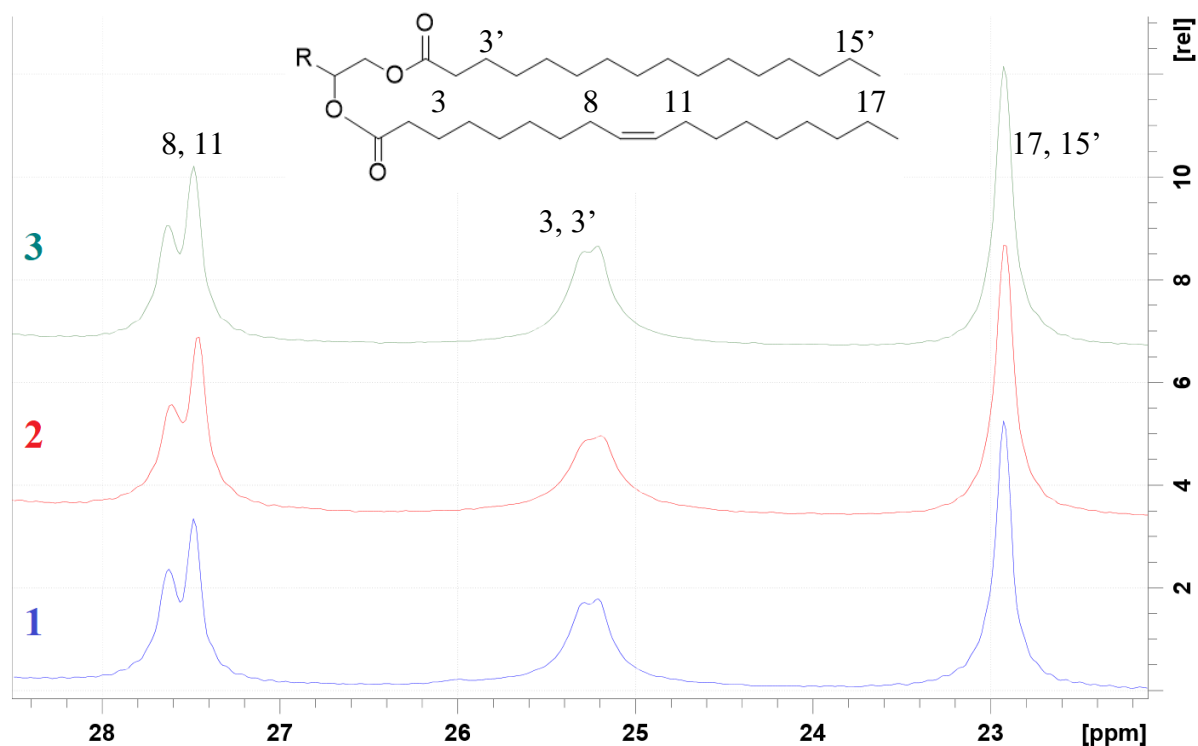


Figur 5.2.32: ^{13}C -spektre der *spekter 1* er av POPC, *2* av POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain og *3* av POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain (^{13}C). Tallene over resonansene viser til deres posisjon i acylkjedene der *2* og *2'* er bundet til karbonylene i acylidel. Tydeligste forskjellen kommer fram i *spekter 2*, av de overlappende resonansene fra acylkjedene ved 30 ppm, der flere av signalene viser redusert intensitet.

Tabell 5.2.8: Kjemisk skift (δ) og linjebredde ($\Delta\delta$) av resonansene tilhørende acylkjedene i POPC i området 29- 35 ppm i *Figur 5.2.32*.

Prøve (spekter)	δ 2, 2' [ppm]	$\Delta\delta$ 2, 2' [Hz]	δ 16, 14' [ppm]	$\Delta\delta$ 16, 14' [Hz]	δ 4-7, 12-15, 4'-13' [ppm]	$\Delta\delta$ 4-7, 12-15, 4'-13'[Hz]
1	34,305	20,913	32,289	16,585	30,435- 29,495	124,193
2	34,260	25,388	32,288	19,251	30,429- 29,483	126,631
3	34,301	21,006	32,288	17,578	30,429- 29,495	123,234

Tabell 5.2.8 viser resonansen for karbon 2 og 2' er lengst upfield og bredest i *spekter 2*. Resonansen av 16 og 14' endrer seg lite i kjemisk skift i spektrene, men er litt bredere ved høyest konsentrasjon av (*R*)-artikain (8,3 mol%) (*spekter 2*). De overlappende resonansene ved 30 ppm viser også en større linjebredde i *spekter 2*.

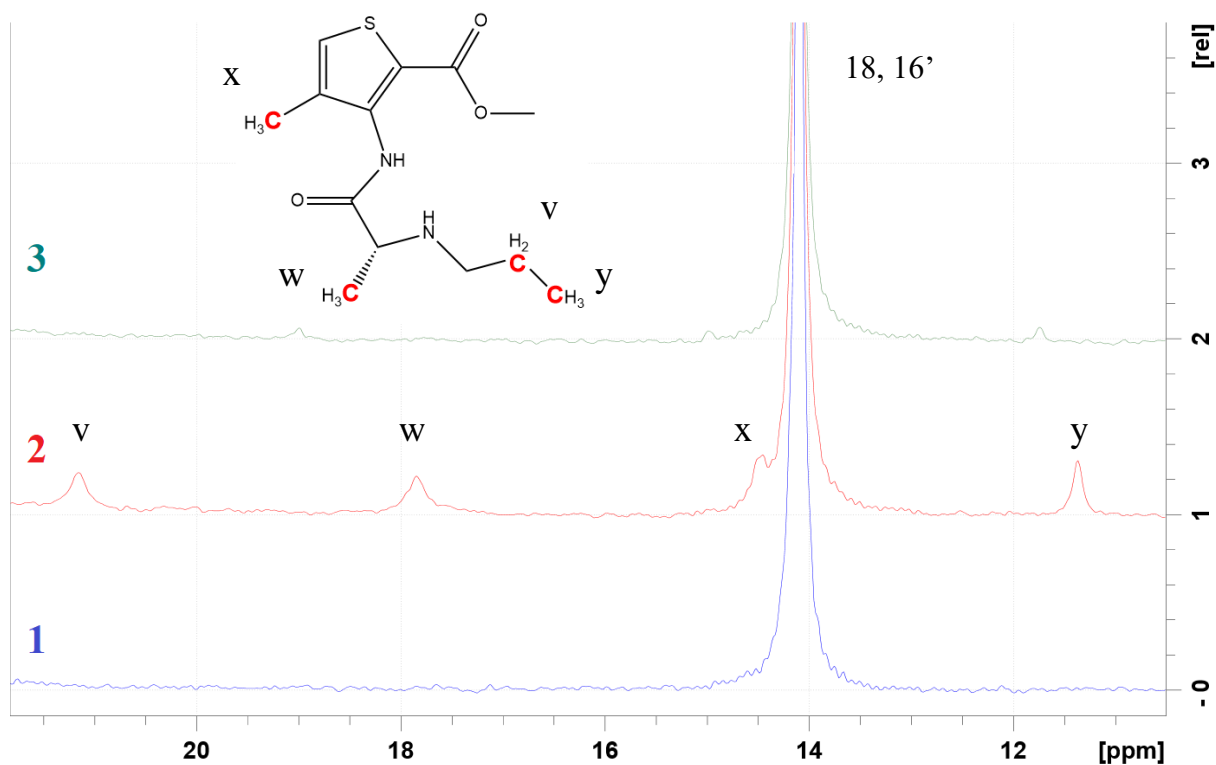


Figur 5.2.33: ^{13}C -spektre av området for CH_2 -resonanser i acylkjedene der resonansene 8 og 11 bundet til $\text{C}=\text{C}$ ved kjemisk skift 27,6 og 27,5 ppm, resonansene 3 og 3' ved 25,3 og 25,2 ppm og 17 og 15' som er bundet til metyl i acylkjedene med kjemisk skift på 22,9 ppm.

Tabell 5.2.9: Kjemisk skift, δ , og linjebredde, $\Delta\delta$, av resonansene tilhørende acylkjedene i POPC i området 22- 28 ppm i *Figur 5.2.33*.

Prøve (spekter)	δ 8, 11 [ppm]	$\Delta\delta$ 8, 11 [Hz]	δ 3, 3' [ppm]	$\Delta\delta$ 3, 3' [Hz]	δ 17, 15' [ppm]	$\Delta\delta$ 17, 15' [Hz]
1	27,619	30,426	25,283	36,807	22,927	13,567
	27,477		25,205			
2	27,604	31,682	25,278	43,589	22,928	15,429
	27,453		25,188			
3	27,623	31,004	25,278	36,118	22,929	14,371
	27,478		25,207			

Den største endringen som observeres i *Figur 5.2.33*, er resonansene for karbon 3 og 3' i *spekter 2* som har større linjebredde. I figuren observeres det forskjeller i de overlappende resonansene 8 og 11, der 8 lengst downfield [10] observeres med lavere intensitet i *spekter 2*. Det observeres ingen tydelige forskjeller i resonansene for karbon 17 og 15' med og uten (*R*)-artikain og disse har heller ikke stor endring i målt linjebredde (*Tabell 5.2.9*).



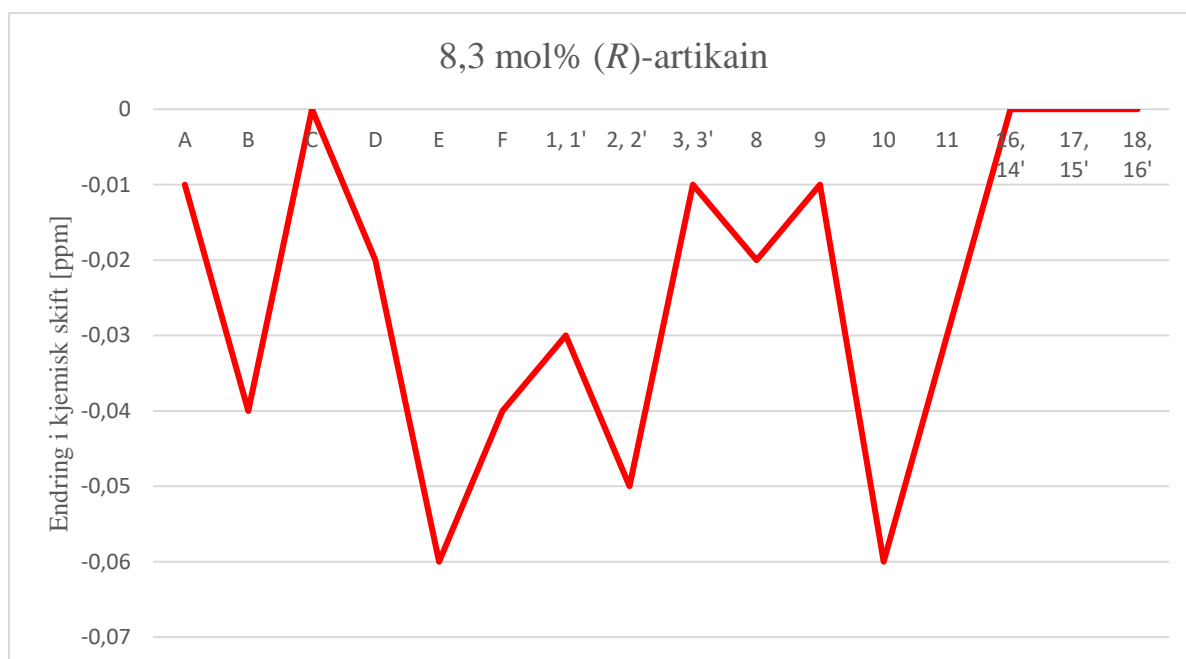
Figur 5.2.34: ^{13}C -spektre der *spekter 1* er av POPC, *2* av POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain og *3* av POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain (^{13}C). Resonansene viser metylgruppene i acylkjedene i POPC med kjemisk skift på 14,1 ppm. I *spekter 2* observeres tydelige resonanser av (*R*)-artikain fra metylgruppene og CH_2 . Lengst downfield er CH_2 i kjede (*v*) med kjemisk skift på 21,2 ppm, metyl bundet til kiralt karbon (*w*) ved 17,9 ppm etterfulgt av metyl bundet til tiofen (*x*) ved 14,5 ppm og metyl i kjede (*y*) med kjemisk skift på 11,4 ppm. Resonansene for metylgruppene i (*R*)-artikain kan svakt observeres i *spekter 3*, men lengre downfield og med lavere intensitet med kjemisk skift på 19,0 ppm (*w*), 15,0 ppm (*x*) og 11,8 ppm (*y*). Resonans *v* i *spekter 3* observeres ikke.

Tabell 5.2.10: Kjemisk skift og linjebredde ved halv høyde av metylresonansene 18 og 16' i acylkjedene i POPC i *Figur 5.2.34*.

Spekter	Kjemisk skift [ppm]	Linjebredde [Hz]
1	14,100	13,130
2	14,100	13,445
3	14,100	13,100

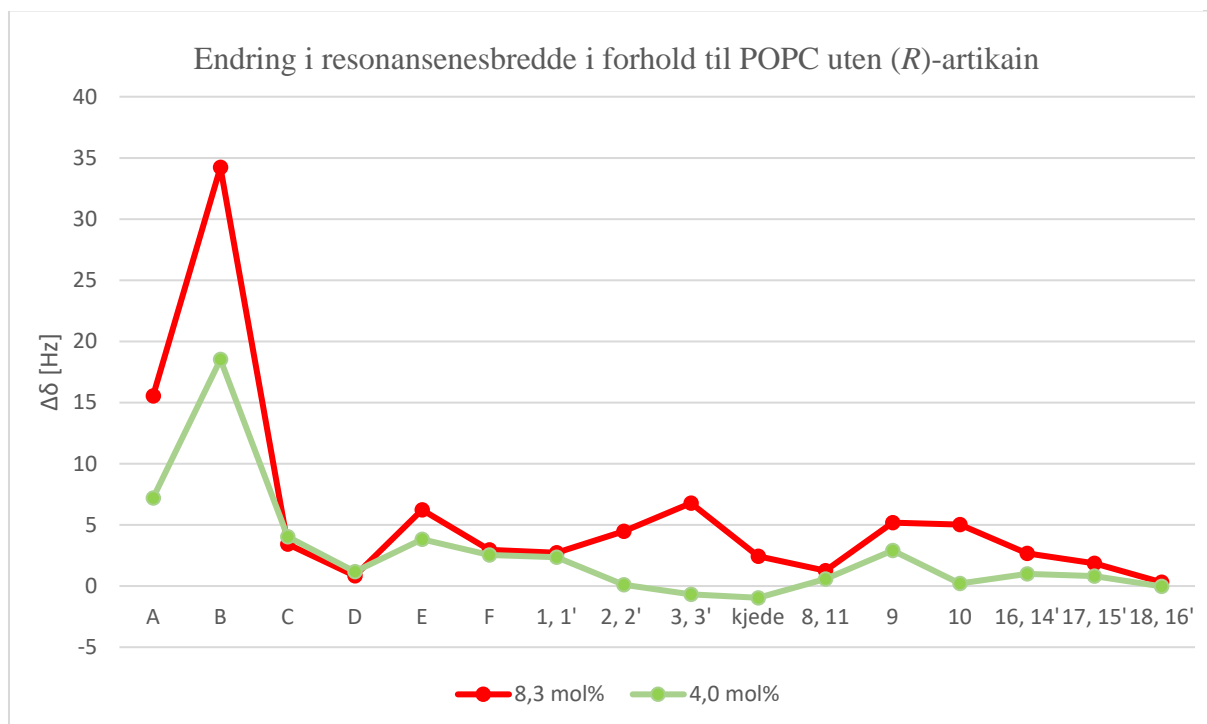
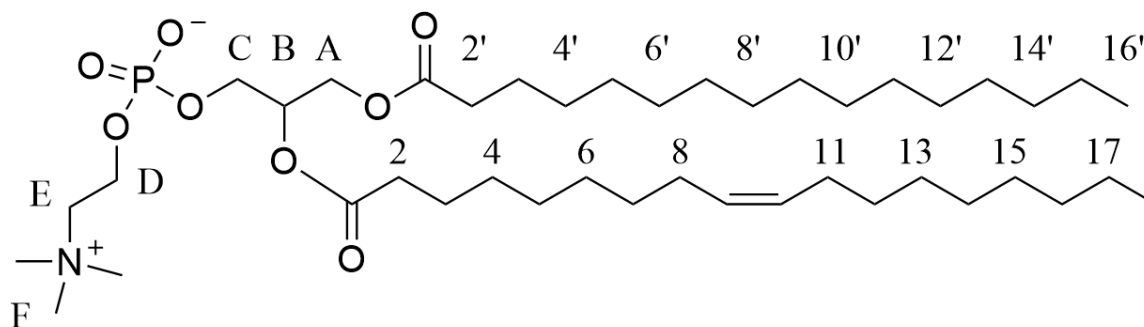
Målingene av metylresonans i POPC vist i *Tabell 5.2.10* viser svært liten forskjell i linjebredde i de ulike spektrene.

Ved å sammenligne kjemiske skift av resonansene i spektrene for POPC (*spekter 1*) og POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain (*spekter 2*) blir forskjellene tydeligere i diagrammet vist i *Figur 5.2.35*.



Figur 5.2.35: Endring i kjemisk skift i *spekter 2* for prøve av POPC med 8,3% (*R*)-artikain i forhold til POPC-prøve uten (*R*)-artikain. Resonansene fra CH₂-gruppene i acylkjedene ved 30 ppm er ikke tatt med. Negativ verdi betyr at resonansen har endret kjemisk skift oppfield.

Det som kommer tydeligst fram i diagrammet er at kjemisk skift av signalene for karbon-C og karbonene ytterst i acylkjedene har lite eller ingen endring i kjemisk skift. Størst endring observeres for signalene for karbon-E i kolin og karbon-10 i C=C i acylkjeden, samt B i glyserol, F i kolin, 1,1' og 2, 2' i acylkjede. Karbon-11 viser også endring i kjemisk skift (-0,03 ppm). Karbon-12 er i acylkjederegionen ved 30 ppm og derfor ikke med i diagrammet.



Figur 5.2.36: POPC-struktur med tilordning og diagram som viser forskjell i økt linjebredde av de ulike resonansene for prøvene med (*R*)-artikain i forhold til resonansene for ren POPC-prøve.

Fra diagrammet observeres det at prøvene med ulik konsentrasjon følger en lignende trend, med unntak av resonansene for karbon 2, 2', 3, 3', *acylkjede* og karbon-10 der resonansene for prøve med 4,0 mol% (*R*)-artikain viser en omtrent lik eller lavere linjebredde enn for ren POPC-prøve. Fra diagrammet observeres det størst forskjell i linjebredden av resonansene for karbon-A og -B i glyserolryggraden som er bundet til acylkjedene henholdsvis i *sn*-1 og *sn*-2 posisjon. Karbon-C som er bundet til fosfatgruppen i *sn*-3 posisjon, og karbon-D og -F i kolin viser mindre forskjeller i spektrene. Noe endring observeres for karbon-E i kolin. Forskjeller observeres i acylregionen for særlig 3, 3', men også 2, 2', og 9 og 10 (C=C) for prøve med 8,3 mol% (*R*)-artikain. Metylgruppene i acylkjedene (18, 16') endres minst.

6. Diskusjon

Resultatene av interaksjonen mellom (*R*)-artikain og lipidbilag av POPC viser tydelige endringer i prøven med 8,3 mol% av (*R*)-artikain (*spekter 2*). Ved pH 7,4 eksisterer det både positivt ladede og uladede former av artikain i et forhold på omtrent 70 % og 30 %. De uladede formene har bedre interaksjonsevne med lipidmembranen, noe som betyr at disse vil gå dypere inn i lipidmembranen ved fysiologisk pH [5, 17]. Tidligere studier av artikain og tetrakain vil bli brukt i diskusjonen til sammenligning ved lokalisering av (*R*)-artikain i lipidbilaget av POPC. Fast-fase- NMR-studien av Song et al. [5] som undersøkte interaksjonen av racemisk blanding av artikain med lipidbilag av DSPC vil sammenlignes med resultatene av ^{31}P -NMR-opptakene i denne oppgaven.

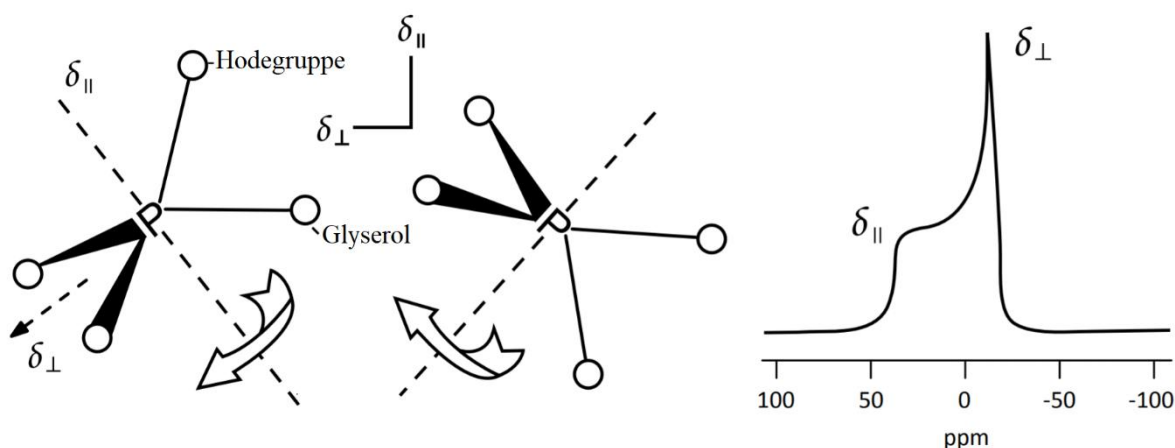
6.1 ^1H -NMR av POPC med (*R*)-artikain

Forskjeller ble observert i *spekter 2* av POPC med høyest konsentrasjon på 8,3 mol% av (*R*)-artikain. Spekteret viser endringer i acylkjederegionen, men også en ny tydelig resonans med kjemisk skift på 3,82 ppm i området der hodegruppe og glyserol resonerer. I *Figur 5.2.4* er *spekter 0* av ren (*R*)-artikain ved væske-NMR også tatt med. Det observeres i figuren at resonansene med stor intensitet i *spekter 0* ligger nær kjemisk skiftsområdene der endringene i *spekter 2* av POPC med (*R*)-artikain observeres. Endringene i *spekter 2* er derimot ikke synlige i *spekter 3* der prøven inneholder 4,0 mol% (*R*)-artikain. Resonansen i glyserol/kolin region med kjemisk skift på 3,82 ppm er tydelig i *spekter 2*, men eksisterer ikke i *spekter 3*. Denne resonansen anslås dermed å være et signal av et nytt kjemisk miljø i lipidet, oppstått ved interaksjonen med (*R*)-artikain.

Resultatene fra ^1H -NMR tyder på at lipidprøven må inneholde en mengde på minst 8 mol% (*R*)-artikain for å få en indikasjon på hvor molekylet kan lokaliseres i lipidmembranen. Bruk av 2D-eksperimenter kunne ha avdekket mer informasjon om interaksjonen mellom (*R*)-artikain og POPC. I fast-fase NMR-studien av Cruciani et al. [40] ble det utført ^1H - ^1H COSY- og ^1H - ^1H NOESY-eksperimenter ved tilordning av de kjemiske gruppene i POPC. NOESY-eksperimentet viste også koblinger mellom metyl i kolinhodegruppen og protonene i glyserol, som tyder på at kolin vil være nær glyserol i lipidet [40].

6.2 ^{31}P -NMR av POPC med (*R*)-artikain

Fosfor- 31 NMR er godt egnet for å avdekke konformasjon i biopolymere systemer som biomembraner. Kjemisk skift av fosfolipider i biomembraner avhenger av orienteringen og dynamikken av hodegruppene i forhold til det tilførte magnetiske feltet, og generelt trekk for ^{31}P - statiske NMR- spektre er stor kjemisk skift anisotropi, CSA. Fosfat-gruppen kan gjennomgå flere typer bevegelser med et gjennomsnitt av komponentene av kjemiske skift tensoren. Det vil si en 3×3 matrise av reelle tall som tilsvare kjemiske skiftkomponenter i forskjellige kombinasjoner av retningene ($-xy$, $-yz$, $-zz$, osv.). Tensoren vil ta hensyn til at det induerte feltet, B_{ind} , ikke vil være parallelt med det anvendte feltet, B_0 . Kjemisk skift anisotropi observeres i et hydrert miljø som er typisk for biologiske membraner (*Figur 6.1.1*). Der vil kjemisk skift σ_{\parallel} definere feltet parallelt til den bevegelige aksens, mens kjemisk skift σ_{\perp} definerer feltet vinkelrett til denne aksens [24, 47].

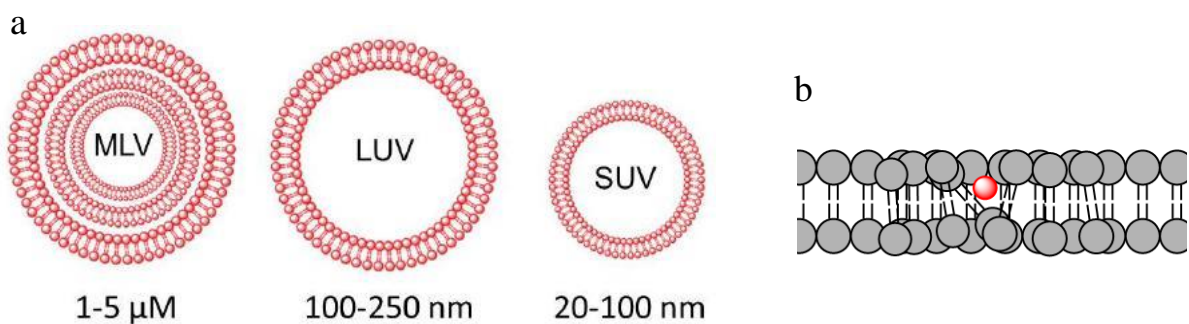


Figur 6.1.1: Fosfat i membranlipid kan ha flere mulige bevegelige tilstander. Figuren viser uordnet fosfat med hurtig aksial rotasjon og dets forventede ^{31}P -NMR spekter [24].

Fra resultatet i *Figur 5.2.5* av POPC-prøve viser formen på fosforspekteret mønsteret til et hydrert og uordnet miljø som er tilfellet i biologiske membraner [24]. I tillegg observeres et lite isotropt signal rundt 0 ppm. Signalet antas å være fra dannede miceller/micellær fase som har større mobilitet enn liposomer. Det isotrope signalet vises også i *Figur 5.2.6* ved -0,33 ppm av fosforspekteret med spinnhastighet på 2,5 kHz. Ved tillaging av det teoretiske spekteret av POPC med spinnhastighet på 2,5 kHz ble det i tillegg oppdaget et svakt signal downfield for isotropen ved 0 ppm (*Figur 5.2.14*). POPC-prøven ble godt hydrert (over 50 vekt% vann), og behandlet

over et lengre tidsrom som antas å ha sammenheng med de isotrope signalene observert i spektrene.

Ved å sammenligne resultatene fra statiske ^{31}P -spektre av POPC med og uten (*R*)-artikain, vises det forskjeller der en større CSA observeres ved økt konsentrasjon av (*R*)-artikain. Fra denne observasjonen anslås det derfor at fosfatgruppen påvirkes slik at rigiditeten i dette området økes ved flere interaksjoner mellom (*R*)-artikain og POPC. Ved tillaging av teoretiske kurver måtte det tas med en bred komponent ved 0 ppm for ren POPC-prøve og for POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain ved 310 K (Figur 5.2.9 og 5.2.10). Den brede komponenten for POPC uten og med (*R*)-artikain kan tyde på isotropiske områder i den lamellære fasen i liposomet. Disse isotropiske lipidene er da ikke fullstendig separert fra de lamellære lipidene, men fører til endringer innad i lipidbilaget [48] (Figur 6.1.2.b). Antall komponenter kan også tyde på at fosfat er i flere ulike kjemiske miljø ved ulike størrelser og former på liposomer (MLV, LUV og SUV). Ved at opparbeidningen av ren POPC-prøve gikk over flere uker kan det tenkes at flere miljøer vil oppstå, mens i prøvene med (*R*)-artikain antas det at interaksjonen skaper de ulike kjemiske miljøene.



Figur 6.1.2a: De ulike klassifiseringene av liposomer med deres størrelsesorden i diameter [49]. Multilamellær vesikkel (MLV) består av flere lipidbilag separert av vandig fase, mens stor og liten unilammellær vesikkel (LUV og SUV) består av et enkelt lipidbilag med vandig fase innvendig og utvendig. **b:** Skisse av forstyrrelse av lipidbilag ved interaksjon med (*R*)-artikain, som fører til at fosfatgruppen vil være i endret kjemisk miljø.

Studien av Song et al. [5] viste et tydelig isotropt signal i statiske fosforspektre av DSPC-prøve med en konsentrasjon på 40 mol% artikain ved pH 10,0 (Vedlegg E). Ved denne pH-en er 99 % av molekylene i uladet form og vil ha bedre interaksjonsevne som også kan være årsaken til at det oppstår en klar isotropisk lipidfase. Prøve med pH 7,4 viste imidlertid ingen isotrope

signaler i de statiske ^{31}P -spektrene i studien, men en lavere CSA i prøvene med artikain ble observert ved begge pH-ene (*Vedlegg E*).

Ved å sammenligne resultatene fra ^{31}P -NMR med spinnhastighet på 2,5 kHz av POPC med og uten (*R*)-artikain, observeres det at resonansen er lengst upfield i *spekter 2* med høyest konsentrasjon av (*R*)-artikain (8,3 mol%). Linjebredden er størst hos resonansen i *spekter 3* med 4 mol% (*R*)-artikain. Forskjellene på linjebreddene er imidlertid ikke veldig forskjellige, og spektrene av POPC med (*R*)-artikain gir ellers ikke tydelig indikasjon på interaksjon da ingen isotroper observeres. I studien av Song et al. [5] ble eksperimentene utført ved pH 10 med spinnhastighet på 3 kHz. I spektrene dukker det opp nye resonanser med artikain ved alle konsentrasjoner (10, 25, 40 og 55 mol%), som indikerte at nye kjemiske miljøer oppstår for fosfatgruppen ved artikain-interaksjon (*Vedlegg E*).

DSPC har to mettede stearylkjeder som gir tettere pakking av lipidene. Lipidet har en T_m på 54 °C, slik at ^{31}P -NMR opptakene i studien av Song et al. [5] ble utført ved høyere temperaturer på 42 °C og 57 °C. Spektrene i studien viste nye resonanser i prøver med artikain hvor prøvene hadde en pH på 10. DSPC og POPC har begge kolin som hodegruppe, men ut ifra resultatene i studien og i denne oppgaven, observeres det at CSA for fosfat i DSPC reduseres med interaksjon med artikain, mens CSA for fosfat øker i POPC i interaksjon med (*R*)-artikain. Dette kan tyde på at acylkjedene spiller en større rolle ved interaksjon.

En annen NMR-studie av Boulanger et al. [17] der interaksjon av bedøvelsesmiddelet tetrakain med fosfolipidet DPPC ble undersøkt, viste også en økning i CSA av fosfatgruppen ved tilstedeværelse av tetrakain. Økningen ble observert ved pH på 5,5 der mesteparten av tetrakain er i protonert form. Ingen forskjell av CSA ble observert i statisk fosforspekter av prøve med samme mengde tetrakain ved pH på 9,0 ppm, hvor tetrakain er i uladet form. Dette gir en indikasjon på at pH vil være vesentlig i undersøkelse av interaksjon mellom et anestesimiddel og lipider.

6.3 ^{13}C -NMR av POPC med (*R*)-artikain

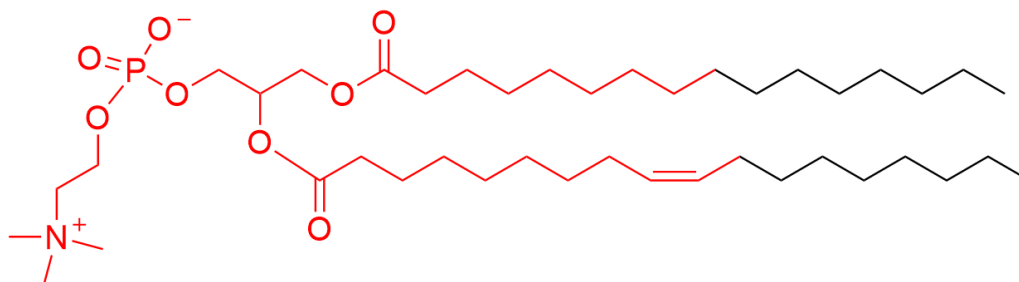
Forskjeller i signalenes kjemiske skift og linjebredder kommer tydeligst fram i spektrene av POPC med høyest konsentrasjon av (*R*)-artikain (8,3 mol%) (*spekter 2*). I acylkjedeområdene observeres det minst endring av resonansene tilhørende metylgruppene som tyder på at (*R*)-artikain ikke har effekt her. Mindre forskjeller i linjebredde og kjemisk skift vises også for karbonene nær metylgruppene, *16*, *14'* og *17*, *15'* (*Figur 5.2.32* og *5.2.33*).

Fra spektrene med signalene tilhørende acylkjedene, tyder det på at interaksjonen med (*R*)-artikain påvirker karbonene nærmest acylidel, *2*, *2'* og særlig *3*, *3'* i kjeden, der målinger viser større linjebredde av disse i prøve med 8,3 mol% (*R*)-artikain. Karbonylgruppene i acylkjedene, *1* og *1'* (*Figur 5.2.24*), viser mindre overlappende resonanser i prøvene med (*R*)-artikain som tyder på at karbonyl i *sn*-1 og *sn*-2 posisjon er i mer ulike kjemiske miljø ved interaksjon med (*R*)-artikain. Resonansene for C=C, *9* og *10* i *Figur 5.2.26* viser at begge resonansene avtar i intensitet og blir bredere i *spekter 2*. Fra denne figuren er det også observert en skulder ved resonansen til C-9 som blir mindre tydelig i *spekter 3*, og nærmest borte i *spekter 2* som derfor anslås å ha sammenheng med konsentrasjon av (*R*)-artikain i prøve. Diagrammet i *Figur 5.2.35* viser større forflytning i kjemisk skift upfield for C-10-resonansen av POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain. Dette gir en indikasjon på at (*R*)-artikain har en tydelig effekt her. Linjebredde og kjemisk skift av overlappende resonanser for karbon *8* og *11* (som er bundet til C=C) viser mindre forskjeller i spektrene. I *Figur 5.2.31* observeres det imidlertid at resonansen lengst downfield, C-8, har lavere intensitet i *spekter 2* enn for de tilsvarende resonansene i *spekter 1* og *3*. Resonansen av C-11 i *Figur 5.2.31* måler ikke forskjell i linjebredde, men har kjemisk skift lengre downfield i *spekter 2* som tyder på at C-11 også er påvirket av interaksjonen. Signal fra karbon-12 er en del av de overlappende signalene i acylkjeden ved 30 ppm, som gjør denne vanskelig å vurdere med hensyn på interaksjon. De overlappende resonansene i *spekter 2* ved 30 ppm (*Figur 5.2.31*), viser lavere intensitet ved flere av resonansene lengst downfield som antas å tilhøre CH₂-gruppene i området mellom acylregion og C=C i lipidet (*Figur 6.1.3*).

I glyserolryggrad viser signalet for karbon-C, som er bundet til fosfat, en mindre påvirkning av (*R*)-artikain i både kjemisk skift og linjebredde av resonansene (*Figur 5.2.35* og *5.2.36*). Karbon-A og -B, som er bundet til acylkjedene viser større forskjeller der resonansene har mindre intensitet og større linjebredder ved høyest konsentrasjon av (*R*)-artikain (*Figur 5.2.28* og *5.2.29*). Resonansene for disse to karbonene er de som endrer seg mest i linjebredde av alle resonansene i lipidmolekylet. I tillegg observeres det en tydelig skulder som dukker opp i

resonans *B* som er bundet til den umettede oleinsyren i *sn*-2-posisjon. Det anslås derfor at disse karbonene, og særlig karbon *B* der et nytt kjemisk miljø ser ut til å oppstå, spiller en vesentlig rolle i interaksjonen med (*R*)-artikain.

Fra observasjonene og målingene av ^{13}C -spektre tyder det på at hodegruppen i lipidet også blir påvirket av interaksjonen med (*R*)-artikain. Tydelig endring i kjemisk skift og linjebredde ble observert for resonansene *E* og *F* som er metyl og CH_2 bundet til nitrogen i kolin.



Figur 6.1.3: POPC hvor området i lipidet er farget rødt der (*R*)-artikain anslås å ha effekt.

Alle ^{13}C -spektrene viser en svak økning av støy i baselinjen ved 120 ppm som anslås å være fra artefakter. I noen tilfeller i ^{31}C -spektrene var resonansene bredest i *spekter 3* med 4,0 mol% (*R*)-artikain. Forskjellen var imidlertid ikke særlig stor i forhold til tilsvarende resonanser i *spekter 2* med 8,3 mol% (*R*)-artikain. Resonansene tilhørende karbonyl i acylkjede (*1*, *1'*) og karbon-9 i $\text{C}=\text{C}$ i *spekter 3* viste også et kjemisk skift lengre downfield enn for tilsvarende resonanser av ren POPC-prøve. Dette var motstridende ved at økt konsentrasjon av (*R*)-artikain virker å korrelere med kjemiske skift lengre upfield som vises for resonansene i *spekter 2*. Ulike kjemiske skift for metylresonansene av (*R*)-artikain ble også observert i *spekter 2* og *3* (Figur 5.2.34). En mulighet er at interaksjonen er konsentrasjonsavhengig slik at kjemisk skift for både (*R*)-artikain og resonansene til POPC blir annerledes ved lavere konsentrasjon av (*R*)-artikain.

6.4 Tidligere studier og interaksjon mellom (*R*)-artikain og POPC

I Figur 6.1.3 er en større del av POPC farget rødt som indikerer at (*R*)-artikain interagerer med flere områder i lipidet. Ifølge studien gjort av Song et al. [5] vil estergruppen i uladet artikain interagere med PC-bilaget ved hodegruppen i prøve med pH på 10,0, men at dette ikke skjer eller skjer i svært liten grad ved pH på 7,4. I studien ble det også funnet større endringer ved

karbon-2 og -3 i tillegg til den polare regionen som la til grunn at artikain vil lokaliseres i regionen nær hodegruppe. Studien undersøkte racemisk blanding av artikain slik at lokaliseringen også kan ha vært påvirket av (*S*)-artikain i prøven.

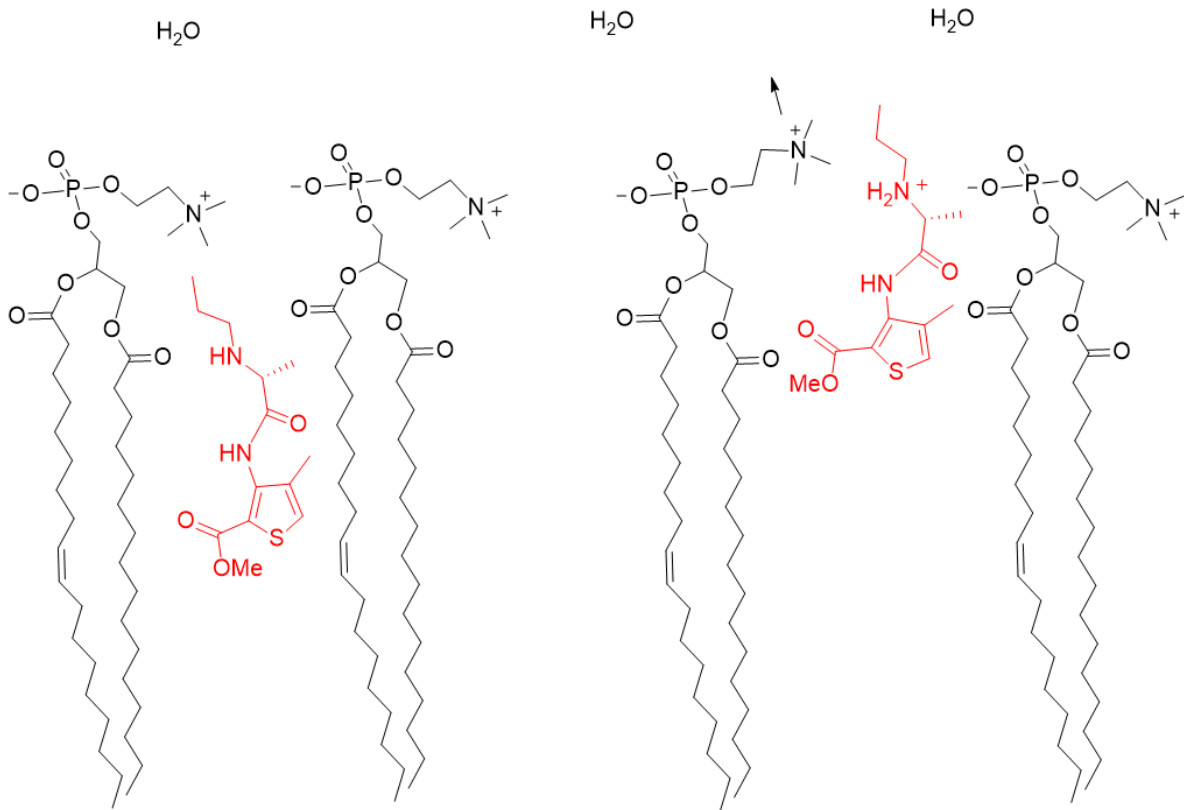
I NMR-studien av Boulanger et al. [17] ble det imidlertid foreslått at den protonerte formen av tetrakain interagerer med hodegruppen av lipidet DPPC. Resultatene oppnådd i studien indikerte at de to formene ble bundet til membranen ved ulike områder, der den uladete formen ble lokalisert dypere i acylkjederegionen. Acylkjeden ble påvirket ved begge pH (5,5 og 9,0) som indikerte at begge former av tetrakain interagerer med lipidmembranen.

I en molekylodynamikkstudie av Skjevik et al. [21] resulterte simuleringene i at den protonerte formen av (*R*)-artikain inngår i elektrostatiske interaksjoner med fosfatgruppen i POPC som hindrer deler av molekylet i å interagere inn i membranen. Den uladete formen av (*R*)-artikain ble derimot funnet i den indre delen av membranen der hydrogenbindinger ble dannet mellom (*R*)-artikain og oksygenatomene i acylkjedene. Det ble i tillegg foreslått at uladet (*R*)-artikain danner en intramolekylær hydrogenbinding mellom karbonyl i ester og aminogruppen når det entrer lipidlaget som vil øke hydrofobisiteten til molekylet. Dette ble også funnet i en annen molekylodynamikkstudie av Mojumdar et al. [26] som undersøkte interaksjon mellom uladet og protonert form av artikain og lipid av DMPC. Det ble også i denne studien observert at de ulike formene av artikain interagerer ved forskjellige områder i lipidet, der den protonerte formen ble lokalisert ved lipidhodegruppen og ved acylidel i acylkjedene, mens den uladete formen av artikain ble funnet i den øvre delen av acylkjedene nær glyserol.

I studien av Steinkopf et al. [6], der Langmuir monolagsteknikk ble brukt til å studere interaksjon mellom enantiomerene og et utvalg av ulike fosfolipider, viste resultatene størst endringer for lipider med PS hodegruppe. Resultatene fra studien viste også at artikainformene kunne skilles ved å innføre en umettet acylkjede i monolaget, der (*R*)-enantiomeren ble lokalisert dypt i acylkjederegionen i POPS. I studien ble det også funnet at artikain-molekylene vil være nærmere hodegruppen kolin i forhold til serin, men at (*R*)-enantiomeren vil gå dypere inn i acylkjederegionen enn (*S*)-artikain. Denne studien foreslår også interaksjon mellom protonert artikain og hodegruppe, der det foreslås elektrostatiske interaksjoner mellom den negativt ladete hodegruppen, serin, og den ladete aminogruppen i protonert artikain.

Fra resultatene oppnådd i denne oppgaven og resultater fra tidligere studier, er det laget en skisse som illustrerer forslaget til interaksjon mellom begge former av (*R*)-artikain og POPC. Det anslås at (*R*)-artikain kan lokaliseres i glyserol og acylkjederegion ned til og med C-11,

men også at den protonerte formen av (*R*)-artikain vil interagere med lipidbilaget ved hodegruppen og fosfat ned til acylregionen ved karbon 2, 2' og 3, 3' (*Figur 6.1.4*).



Figur 6.1.4: Illustrasjon av (*R*)-artikains foreslåtte interaksjon med lipidmonolag av POPC for uladet (til venstre) og protonert (*R*)-artikain (til høyre). Den hydrofobe tiofenringen er vendt innover mot acylkjedene. Det anslås elektrostatiske interaksjoner mellom aminogruppen som er positivt ladet i protonert (*R*)-artikain og det negative oksygen i fosfatgruppen i POPC. Den positivt ladede aminogruppen i (*R*)-artikain vil da frastøte kolinhodegruppen som vil vende ut mot vannfasen (pil i figur) [26].

Retningen molekylet er plassert mellom lipidene i *Figur 6.1.4* er et forslag. Det er også mulig at molekylet skal være snudd eller vridd på en annen måte. Forslaget begrunnes ved at det ble observert større forskjeller i linjebredder og kjemisk skift i både acylkjeder og hodegruppe i lipidet som tyder på at både uladet og ladet form av (*R*)-artikain interagerer med lipidmembranen.

Ut ifra de andre studiene og resultatet fra denne oppgaven, kan det tyde på at både lipidets hodegruppe og acylkjeder er avgjørende for lokaliseringen av molekylet. I de statiske fosforspektrene viste økt konsentrasjon av (*R*)-artikain en økt CSA av signalet, som betyr at rigiditeten av fosfatgruppen øker. Det vil være omtrent 70% av den protonerte formen av (*R*)-artikain ved fysiologisk pH slik at det anslås at en større mengde vil interagere med den ytre delen av lipidlaget ved fosfat. Flere av studiene foreslår at den protonerte formen av bedøvelsesmidler (artikain og tetrakain) interagerer med fosfat i POPC. Hodegruppen, kolin, vil normalt ligge nær glyserolområdet ifølge NMR-studien av POPC av Cruciani et al. [41]. I molekylodynamikkstudien av Mojumdar et al. [26] resulterer interaksjonen i at den kvaternære ammoniumgruppen i kolin vil frastøtes, og vende utover mot vandig fase. Ut ifra illustrasjonen av uladet (*R*)-artikain i POPC i *Figur 6.1.4*, vises det at en del av (*R*)-artikain vil være i glyserolområdet nær hodegruppen. Det er derfor en sannsynlighet for at den uladete formen av (*R*)-artikain også kan ha en effekt på hodegruppen. Ut ifra molekylodynamikkstudiene [21, 26] vil det dannes en intramolekylær hydrogenbinding i (*R*)-artikain som figuren ikke illustrerer. Da vil (*R*)-artikain mest sannsynlig interagere ved et mindre område i lipidlaget enn det som er illustrert i *Figur 6.1.4*. Ved at flere av CH₂-resonansene i acylkjedene i resultatene er overlappende, kan det ikke avgjøres om (*R*)-artikain interagerer dypere enn til C-11, men ut ifra resultatene tolkes det at (*R*)-artikain ikke har effekt på metyl og CH₂ ytterst i acylkjedene.

Enantiomeren til et molekyl kan være avgjørende for toksiske effekter. I en tidligere studie på aminoamid-lokalbedøvelsesmidler av Tomin et al. [16], ble det funnet at (*R*)-enantiomeren av bupivacaine var syv ganger mer potent i å blokkere natriumkanalen enn (*S*)-enantiomeren, men at inntrengningsevnen til (*R*)-bupicaine var proporsjonal til toksiske effekter på det kardiovaskulære systemet og på sentralnervesystemet. (*S*)-enantiomeren av mepivacaine ble også funnet å være mindre toksisk enn (*R*)-enantiomeren. Studie av interaksjonen mellom (*S*)-artikain og POPC er blitt utført ved samme tidspunkt av Elise Østensen (ikke publisert enda). Hvis (*S*)-artikain lokaliseres ved et annet området i POPC enn det (*R*)-artikain gjør, vil dette gi ytterligere informasjon om enantiomerenes evne som bedøvende middel. I tillegg vil ulike lokaliseringer av enantiomerene være avgjørende for å videre undersøke (*R*)- og (*S*)-artikain separat med hensyn på toksisitet.

7. Konklusjon

Hensikten med denne studien var å identifisere hvor (*R*)-artikain interagerer med lipidbilag av POPC ved bruk av fast-fase NMR-spektroskopi. *Figur 6.1.4* viser den foreslåtte interaksjonen mellom lipid av POPC og (*R*)-artikain, både for uladet og protonert form. Resultatene fra ^{13}C -NMR viser at (*R*)-artikain har større effekt på karbonene i glyserolryggrad, *A* og *B*, som er bundet til acylkjedene i henholdsvis *sn*-1 og *sn*-2 posisjon, og karbon 2, 2' og 3, 3' i acylkjedene. Da større forskjeller av kjemisk skift og linjebredde av signalene observeres for disse anslås det at denne regionen i lipidet vil være påvirket av begge former av (*R*)-artikain. Dette blir også begrunnet med tidligere studier utført på artikain og tetrakain. Elektrostatiske interaksjoner anslås mellom den protonerte aminogruppen i ladet (*R*)-artikain og det negativt ladete oksygenet i fosfatgruppen i lipidet. En del av molekylet antas dermed å være ved kolin. Begrunnelsen for dette er at metylgruppene bundet til nitrogen i kolin viser en større endring i kjemisk skift og linjebredde ved 8,3 mol% (*R*)-artikain i ^{13}C -spektre. I tillegg viser målinger økt CSA ved økt konsentrasjon av (*R*)-artikain i de statiske fosforspektrene, som tyder på at interaksjonen vil gjøre fosfatgruppen i POPC mer rigid.

Protonspektrene viste ingen tydelige endringer på spektrene med ren POPC og POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain som tyder på at konsentrasjonen av (*R*)-artikain bør være minst 8 mol% for at det skal kunne observeres forskjeller i ^1H -spektre med og uten (*R*)-artikain. Dette gjelder også i noen grad for opptak av ^{13}C -spektrene der flere av resonansene til (*R*)-artikain ikke var synlige i spektrene der prøven inneholdt 4,0 mol% (*R*)-artikain. I tillegg var spektrene vanskeligere å tolke ut ifra verdiene målt av resonansene i *spekter 3* av POPC med 4,0 mol% (*R*)-artikain. Målinger gjort av linjebredde og kjemisk skift for noen av resonansene i *spekter 3* viste en annen trend enn for resonansene i *spekter 2* av POPC med 8,3 mol% (*R*)-artikain. De statiske fosforspektrene viste derimot at økt konsentrasjon av (*R*)-artikain gav økt CSA av resonansen. Utenom noe endring i kjemisk skift, gav ikke de spinnende fosforspektrene tydelig indikasjon på tilstedeværelse av (*R*)-artikain i prøvene.

Fast-fase NMR-spektroskopi er en meget nyttig analysemetode for å studere kvalitative egenskaper i et system som interaksjoner mellom molekyler og fosfolipidbilag. Resultatene oppnådd i denne oppgaven gav nyttig informasjon om lokalisering av (*R*)-artikain (8,3 mol%) i POPC. Det konkluderes dermed med at målet i oppgaven er oppnådd. Ut ifra disse resultatene tyder det også på at liposomopparbeidelsen med (*R*)-artikain har vært vellykket, slik at hurtigprosedyren antas å være velfungerende også for opparbeiding av andre typer fosfolipider.

8. Videre arbeid

Bruk av 2D-NMR kan gi mer informasjon om koblinger mellom de ulike kjemiske gruppene i systemet. Ved å utføre 2D-eksperimenter på prøvene kan det være mulig å bestemme de kjemiske gruppene som er involvert i interaksjonen med (*R*)-artikain i protonspektrene. Det ble også diskutert å utføre HETCOR-eksperiment på POPC før covid-19, som kunne vært interessant for å undersøke og verifisere antagelsene gjort for interaksjonen mellom (*R*)-artikain og POPC.

Å studere interaksjonen ved en høyere pH som pH 10, vil det nærmest kun være den nøytrale og potente uladete formen av (*R*)-artikain i prøven, noe som kunne gi en tydeligere indikasjon på hvor (*R*)-artikain interagerer med fosfolipidbilaget. Fast-fase NMR-studien av Song et al. [5] legger grunnlag for dette der isotroper ble observert mellom artikain og DSPC for prøvene som var justert til pH 10, men ikke i de statiske fosforspektrene av prøvene justert til pH 7,4.

Å bruke fast-fase NMR for å studere interaksjon mellom (*R*)-artikain og andre membranlipider kan avdekke andre lokaliseringer av (*R*)-artikain i lipidbilag. I studien av Steinkopf et al. [6] ble det funnet at glyserofosfolipider med serin, som er en mindre hodegruppe enn kolin, var mest påvirket av tilstedeværelse av artikain. I studien ble det også avdekket at enantiomerene ble funnet nærmere hodegruppen av kolin enn av serin i lipidene. Å studere interaksjon av (*R*)-artikain med lipider med andre hodegrupper med ulike størrelser og ladninger som etanolamin, inositol eller fosfatidylsyre vil derfor tenkes å gi ny informasjon om lokaliseringen av (*R*)-artikain. Grad av mettetthet i acylkjeder vil også spille en rolle der resultater fra studien [6] viste at (*R*)-artikain ble lokalisert dypere i lipidlaget hos lipider med umettede kjeder. Det kan derfor være viktig å undersøke nærmere umettede kjeders rolle ved interaksjon. Flerumettede fettsyrer som omega-3-fettsyrer kan være nyttig å undersøke da disse har en effekt på sammensetningen i cellemembranen og bidrar til at funksjonen til membranproteiner fungerer slik de skal [50].

Andre nyttige systemer å bruke i interaksjonsstudier med (*R*)-artikain kan være lipidblandinger eller totallipid ekstrakt fra grisehjerne hvor informasjon nærmere faktiske forhold kan oppnås. Hovedkomponentene i en biologisk membran er fosfolipider og kolesterol, hvor sterolen påvirker pakkingen av lipidene og membranfluiditeten [13, 51]. Informasjon om hvilken rolle kolesterol har ved interaksjon med (*R*)-artikain kan oppnås ved å undersøke et to-komponent-system av lipid og kolesterol.

Referanser

1. Kumar, D.P., Sharma, M., Patil, V., Subedar, R. S., Lakshmi, G. V., Manjunath, N. V., *Anesthetic Efficacy of Single Buccal Infiltration of 4% Articaine and 2% Lignocaine in Extraction of Maxillary 1(st) Molar*. *Annals of maxillofacial surgery*, 2019. **9**(2): p. 239-246.
2. Malamed, S.F., Gagnon, S., Leblanc, D., *Articaine hydrochloride: a study of the safety of a new amide local anesthetic*. *The Journal of the American Dental Association*, 2001. **132**(2): p. 177-185.
3. McConathy, J., Owens, M. J., *Stereochemistry in Drug Action*. Primary care companion to the *Journal of clinical psychiatry*, 2003. **5**(2): p. 70-73.
4. Nelson, D.L., Lehninger, A. L., Cox, M. M., *Lehninger principles of biochemistry*. 7th int. ed. *Principles of biochemistry*. 2017, New York: W.H. Freeman. p. 366-369, 388-391.
5. Song, C., Lygre, H., Nerdal, W., *Articaine interaction with DSPC bilayer: a ¹³C and ³¹P solid-state NMR study*. *Eur J Pharm Sci*, 2008. **33**(4-5): p. 399-408.
6. Steinkopf, S., Hanekam, L., Schaathun, M., Budnjo, A., Haug, B. E., Nerdal, W., *Interaction of local anaesthetic articaine enantiomers with brain lipids: A Langmuir monolayer study*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012. **47**(2): p. 394-401.
7. Tymoczko, J.L., Berg, J. M., Stryer, L., *Biochemistry : a short course*. 3rd ed. 2015, New York: Macmillan. p. 194-195, 205-220.
8. Huster, D., *Solid-state NMR spectroscopy to study protein–lipid interactions*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2014. **1841**(8): p. 1146-1160.
9. Gunstone, F.D., *Fatty acid and lipid chemistry*. 1996, London: Blackie Academic & Professional. p. 35-41.
10. Totland, C., Nerdal, W., Steinkopf, S., *Effects and Location of Coplanar and Noncoplanar PCB in a Lipid Bilayer: A Solid-State NMR Study*. *Environ Sci Technol*, 2016. **50**(15): p. 8290-5.
11. Avanti Polar Lipids, I. 850457 / 16:0-18:1 PC (POPC). [cited 2019 11.09]; Available from: <https://avantilipids.com/product/850457>.
12. Leekumjorn, S., Sum, A. K., *Molecular characterization of gel and liquid-crystalline structures of fully hydrated POPC and POPE bilayers*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007. **111**(21): p. 6026-6033.
13. Alhakamy, N.A., Elandaloussi, I., Ghazvini, S., Berkland, C. J., Dhar, P., *Effect of lipid headgroup charge and pH on the stability and membrane insertion potential of calcium condensed gene complexes*. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 2015. **31**(14): p. 4232-4245.
14. Butterworth, J.F., Strichartz, G. R., *Molecular mechanisms of local anesthesia: a review*. *Anesthesiology*, 1990. **72**(4): p. 711-34.
15. De Paula, E., Schreier, S., *Use of a Novel Method for Determination of Partition-Coefficients to Compare the Effect of Local-Anesthetics on Membrane-Structure*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1995. **1240**(1): p. 25-33.

16. Tomin, J., Živanov-Čurlis, J., Popović, D., Glogovac, S., Bašić, D., *Differences in local anesthetic effects of optically active isomers of local anesthetic compounds*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2006. **20**(3): p. 9-14.
17. Boulanger, Y., Schreier, S., Smith, I. C. P., *Molecular details of anesthetic-lipid interaction as seen by deuterium and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance*. Biochemistry, 1981. **20**(24): p. 6824-6830.
18. Hata, T., Matsuki, H., Kaneshina, S., *Effect of local anesthetics on the phase transition temperatures of ether- and ester-linked phospholipid bilayer membranes*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2000. **18**(1): p. 41-50.
19. Malamed, S.F., Gagnon, S., Leblanc, D., *Efficacy of articaine: a new amide local anesthetic*. J Am Dent Assoc, 2000. **131**(5): p. 635-42.
20. Kambalimath, D.H., Dolas, R. S., Kambalimath, H. V., Agrawal, S. M., *Efficacy of 4 % Articaine and 2 % Lidocaine: A clinical study*. Journal of maxillofacial and oral surgery, 2013. **12**(1): p. 3-10.
21. Skjevik, Å.A., Haug, B. E., Lygre, H., Teigen, K., *Intramolecular hydrogen bonding in articaine can be related to superior bone tissue penetration: A molecular dynamics study*. Biophysical Chemistry, 2011. **154**(1): p. 18-25.
22. Pharmacist By Your Side. *What Does HCl Mean on a Prescription Bottle? Understanding Salt Forms of Medication*. 2019 [cited 2019 17.12]; Available from: <https://www.pharmacistbyyourside.com/blog/2019/3/9/what-does-hcl-mean-on-a-prescription-bottle-understanding-salt-forms-of-medication-tt3rm>.
23. Vree, T.B., Gielen, M. J. M., *Clinical pharmacology and the use of articaine for local and regional anaesthesia*. Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology, 2005. **19**(2): p. 293-308.
24. Song, C., *Solid-State NMR Study of Drug Interaction with Phospholipid Bilayers Chlorpromazine, olanzapine and articaine interacting with saturated and unsaturated phosphatidylserines and saturated phosphatidylcholines*. 2007: p. 20-23.
25. Lüllmann, H.T., P. B., Weikert, G. M., Ziegler, A., *Accumulation of drugs by guinea pig isolated atria. Quantitative correlations*. Journal of medicinal chemistry, 1980. **23**(5): p. 560-565.
26. Mojumdar, E.H., Lyubartsev, A. P., *Molecular dynamics simulations of local anesthetic articaine in a lipid bilayer*. Biophysical chemistry, 2010. **153**(1): p. 27-35.
27. Hopman, A.J.G., Baart, J. A., Brand, H. S., *Articaine and neurotoxicity - a review*. Br Dent J, 2017. **223**(7): p. 501-506.
28. Friebolin, H., *Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy*. 5th completely rev. and enl. ed. Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. 2011, Weinheim: Wiley-VCH. p. 2-39, 349-351.
29. Mohrig, J.R., *Laboratory techniques in organic chemistry : supports inquiry-driven experiments*. 4th ed. 2014, New York: W. H. Freeman. p. 349-352.
30. Duer, M.J., *Solid State NMR Spectroscopy : Principles and Applications*. 2001, Chichester: Chichester: John Wiley & Sons, Incorporated. p. 4, 73-75.
31. Kjemisk intitutt - UiB. *NMR-spektroskopi*. [cited 2019 04.11]; Available from: <https://www.uib.no/fg/nmrspektro>.

32. Learning, C., *Introduction to Spectroscopy, 5th Edition, Pavia-Lampman-Kriz-Vyvyan, 2015: Introduction to Spectroscopy*. 2015: Bukupedia. p. 215-230, 260, 405-424.
33. Harris, R.K., Becker, E. D., Cabral de Menezes, S. M., Goodfellow, R., Granger, P., *NMR Nomenclature: Nuclear Spin Properties and Conventions for Chemical Shifts: IUPAC Recommendations 2001*. Solid State Nuclear Magnetic Resonance, 2002. **22**(4): p. 458-483.
34. Bruker Corporation, *Almanac 2010, 50 Years of Innovation*. 2010. p. 2-4 (tabeller).
35. Wikipedia. *Magic angle spinning*. [cited 2020 04.05]; Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Magic_angle_spinning.
36. Hoult, D., *Solvent peak saturation with single phase and quadrature Fourier transformation*. Journal of Magnetic Resonance (1969), 1976. **21**(2): p. 337-347.
37. Braga, C.B., Silva, W., Rittner, R., *Conformational preferences of N-acetyl-N'-methylprolineamide in different media: a 1 H NMR and theoretical investigation*. New Journal of Chemistry, 2019. **43**(4): p. 1757-1763.
38. Nele, V., Holme, M. N., Kauscher, U., Thomas, M. R., Douth, J. J., Stevens, M. M., *Effect of formulation method, lipid composition, and PEGylation on vesicle lamellarity: a small-angle neutron scattering study*. Langmuir, 2019. **35**(18): p. 6064-6074.
39. Attwood, S.J., Choi, Y., Leonenko, Z., *Preparation of DOPC and DPPC Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic Force Spectroscopy*. International journal of molecular sciences, 2013. **14**(2): p. 3514-3539.
40. Cruciani, O., Mannina, L., Sobolev, A., Cametti, C., Segre, A. L., *An Improved NMR Study of Liposomes Using 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine as Model*. Molecules (Basel, Switzerland), 2006. **11**: p. 334-44.
41. Cruciani, O., Mannina, L., Sobolev, A., Segre, A. L., Luisi, P., *Multilamellar Liposomes Formed by Phosphatidyl Nucleosides: An NMR– HR-MAS Characterization*. Langmuir, 2004. **20**(4): p. 1144-1151.
42. Othman, Z., Hassan, N., Zubairi, S., *Response Surface Optimization of Rotenone Using Natural Alcohol-Based Deep Eutectic Solvent as Additive in the Extraction Medium Cocktail*. Journal of Chemistry, 2017. **2017**: p. 10.
43. Malewicz, B., Valiyaveetil, J., Jacob, K., Byun, H.-S., Mattjus, P., Baumann, W., Bittman, R., Brown, R., *The 3-Hydroxy Group and 4,5-trans Double Bond of Sphingomyelin Are Essential for Modulation of Galactosylceramide Transmembrane Asymmetry*. Biophysical journal, 2005. **88**: p. 2670-80.
44. Gjerde, A.U., Holmsen, H., Nerdal, W., *Chlorpromazine interaction with phosphatidylserines: a 13C and 31P solid-state NMR study*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2004. **1682**(1-3): p. 28-37.
45. University of Colorado, C.a.B.D. *Chemical Shifts: Carbon*. 2011 [cited 2020 18.04]; Available from: <https://orgchemboulder.com/Spectroscopy/nmrtheory/carbonchemshift.shtml>.
46. MOLBASE Chemical E-Commerce Platform. *Articaine hydrochloride*. [cited 2020 07.07]; Available from: http://www.molbase.com/en/hnmr_23964-57-0-moldata-348031.html.

47. Questions and Answers in MRI. *Supplemental Material on the Chemical Shift*. [cited 2020 14.04]; Available from: <http://mriquestions.com/chemical-shift-advanced.html>.
48. Wang, T., Cady, S. D., Hong, M., *NMR determination of protein partitioning into membrane domains with different curvatures and application to the influenza M2 peptide*. *Biophysical journal*, 2012. **102**(4): p. 787-794.
49. Pandey, H., Rani, R., Agarwal, V., *Liposome and Their Applications in Cancer Therapy*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2016. **59**.
50. Surette, M.E., *The science behind dietary omega-3 fatty acids*. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 2008. **178**(2): p. 177-180.
51. Andersson, J., Grey, C., Larsson, M., Ferreira, T., Sparr, E., *Effect of cholesterol on the molecular structure and transitions in a clinical-grade lung surfactant extract*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017. **114**: p. 201701239.
52. Avanti Polar Lipids, I. 850355 / 16:0 PC (DPPC). [cited 2020 21.05]; Available from: <https://avantilipids.com/product/850355>.
53. Avanti Polar Lipids, I. 850725 | 18:1 (Δ 9-Cis) PE (DOPE). [cited 2020 25.05]; Available from: <https://avantilipids.com/product/850725>.
54. Avanti Polar Lipids, I. 840035 / 18:1 PS (DOPS). [cited 2020 25.05]; Available from: <https://avantilipids.com/product/840035>.
55. Avanti Polar Lipids, I. 850375 | 18:1 (Δ 9-Cis) PC (DOPC). [cited 2020 25.05]; Available from: <https://avantilipids.com/product/850375>.
56. Avanti Polar Lipids, I. *Phase Transition Temperatures for Glycerophospholipids*. [cited 2020 25.05]; Available from: <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/phase-transition-temps>.
57. Kontogeorgis, G.M., Kiil, S., *Introduction to Applied Colloid and Surface Chemistry*. 2016, Chicester: Chicester: John Wiley & Sons, Incorporated. p. 99-101.

Vedlegg A: Utrekninger

Regne ut resonansfrekvens

Resonansfrekvens, ν_L , for ^{31}P ved $B_0 = 11,75 \text{ T}$ ($\gamma = 10,8394 \cdot 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ fra *Tabell 2.5.1*):

$$\nu_L = \left| \frac{10,8394 \cdot 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}}{2\pi} \right| 11,75 \text{ T} = 202704430,6 \text{ s}^{-1} (\text{Hz}) = 202,7 \text{ MHz} \quad (2.5-12)$$

Formel ved hydrering av liposom (5.1 Eksperimentelt)

$$m\% \text{ vann} = \frac{m_{\text{vann}}}{m_{\text{vann}} + m_{\text{lipid}}} * 100\% \quad (5.1-1)$$

Der m = masse i gram

Hydrering med 55 vekt% vann ved 0,500 g lipid:

$$m\% \text{ vann} = \frac{xg_{(\text{vann})}}{xg_{(\text{vann})} + 0,500g} * 100\% = 55\% \quad (5.1-1)$$

$$= \frac{xg_{(\text{vann})}}{xg_{(\text{vann})} + 0,500g} = 0,55$$

$$= x = 0,55(xg + 0,500g)$$

$$x = 0,55x + 0,275g$$

$$0,45x = 0,275g$$

$$x = 0,611g$$

Regne ut molprosent (R)-artikain for 0,25g prøve av POPC

Regne ut antall mol av POPC:

$$n_{POPC} = \frac{m_{POPC}}{Mm_{POPC}} \quad (5.1-2)$$

Der n = mol, m = masse og Mm = molar masse

Tabell A.1: Molar masse av 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) og artikain hydroklorid til bruk i utregninger av molprosent av artikain i prøve.

	Molar masse [g/mol]
POPC	760,076
Artikain hydroklorid	320,836

$$mol\ POPC = \frac{0,25g}{760,076g/mol} = 3,289 \times 10^{-4} mol \quad (5.1-2)$$

Formel for molprosent:

$$n\% A = \frac{n_A}{n_A + n_B} * 100\% \quad (5.1-3)$$

Utrekning til 4 mol% artikain (= 96 mol% POPC):

$$mol\% POPC = \frac{3,289 * 10^{-4} mol}{3,289 * 10^{-4} mol + x mol_{(artikain)}} * 100\% = 96\% \quad (5.1-3)$$

$$= \frac{3,289 * 10^{-4} mol}{3,289 * 10^{-4} mol + x mol_{(artikain)}} = 0,96$$

$$= \frac{3,289 * 10^{-4} mol}{0,96} = 3,289 * 10^{-4} mol + x mol_{(artikain)}$$

$$= 3,426 * 10^{-4} mol - 3,289 * 10^{-4} mol = x mol_{(artikain)}$$

$$x mol_{(artikain)} = 1,372 * 10^{-5} mol$$

$$gram\ artikain = 1,372 * 10^{-5} mol * 320,836 \frac{g}{mol} = 4,401 * 10^{-3} g = 4,40 mg$$

Vedlegg B: Parametere brukt i væske- og fast-fase NMR-opptak

Parametere for program uten (zg30) og med vannundertrykking (zgpr) i væskefase:

Antall transienter (NS): 32

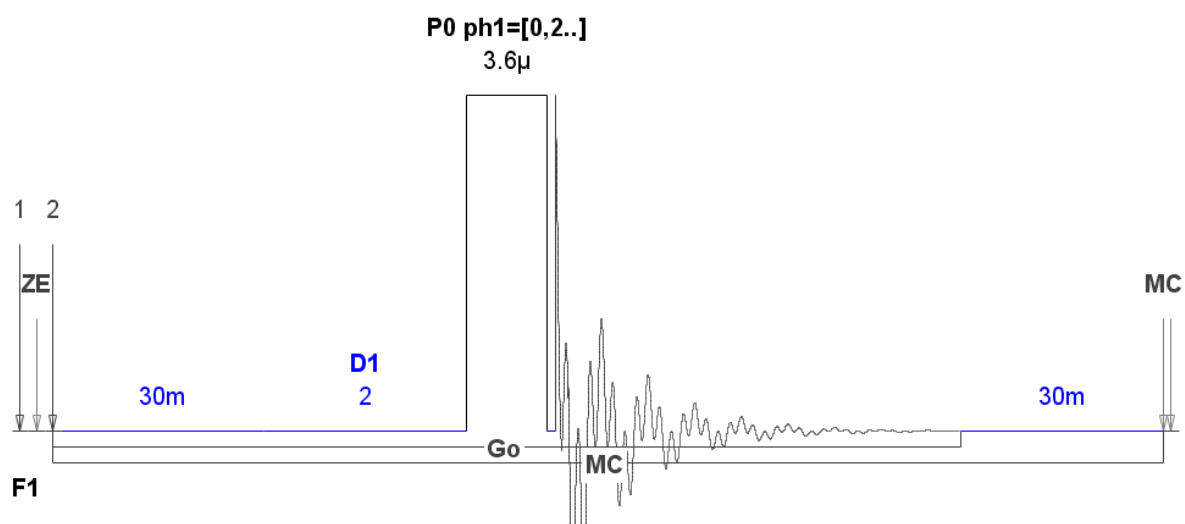
Størrelse på FID (TD): 64k

Spektral bredde (SW): 15 ppm

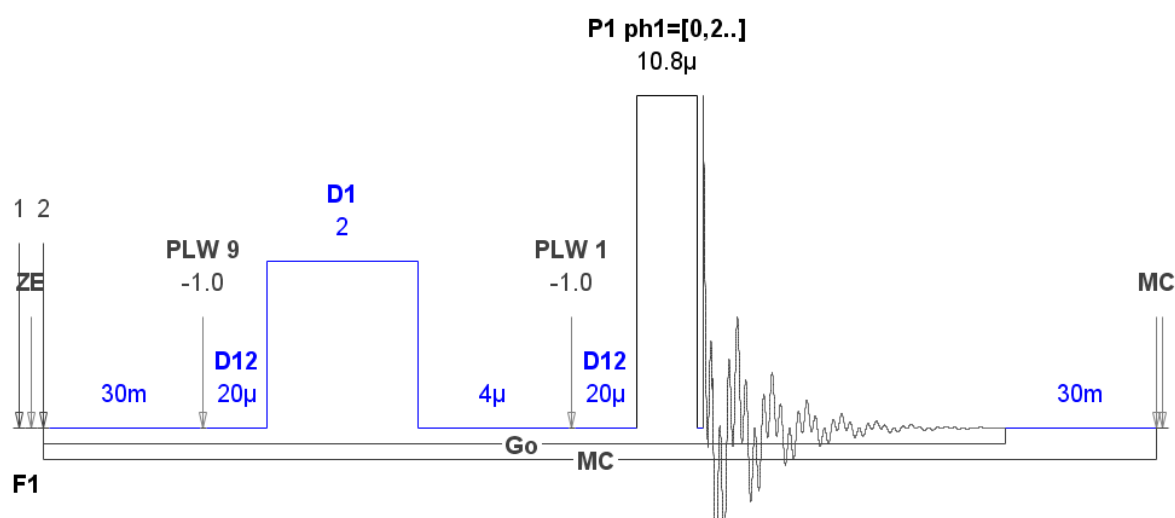
Forskyvningssenter ved SW (O1P): 4,7 ppm

Ventetid mellom hver transient (D1): 2 sek

Rotasjonsfrekvens av prøve (RO): 20 Hz



Figur B.1: Pulsprogram for ¹H-eksperiment uten vannundertrykking (zg30).



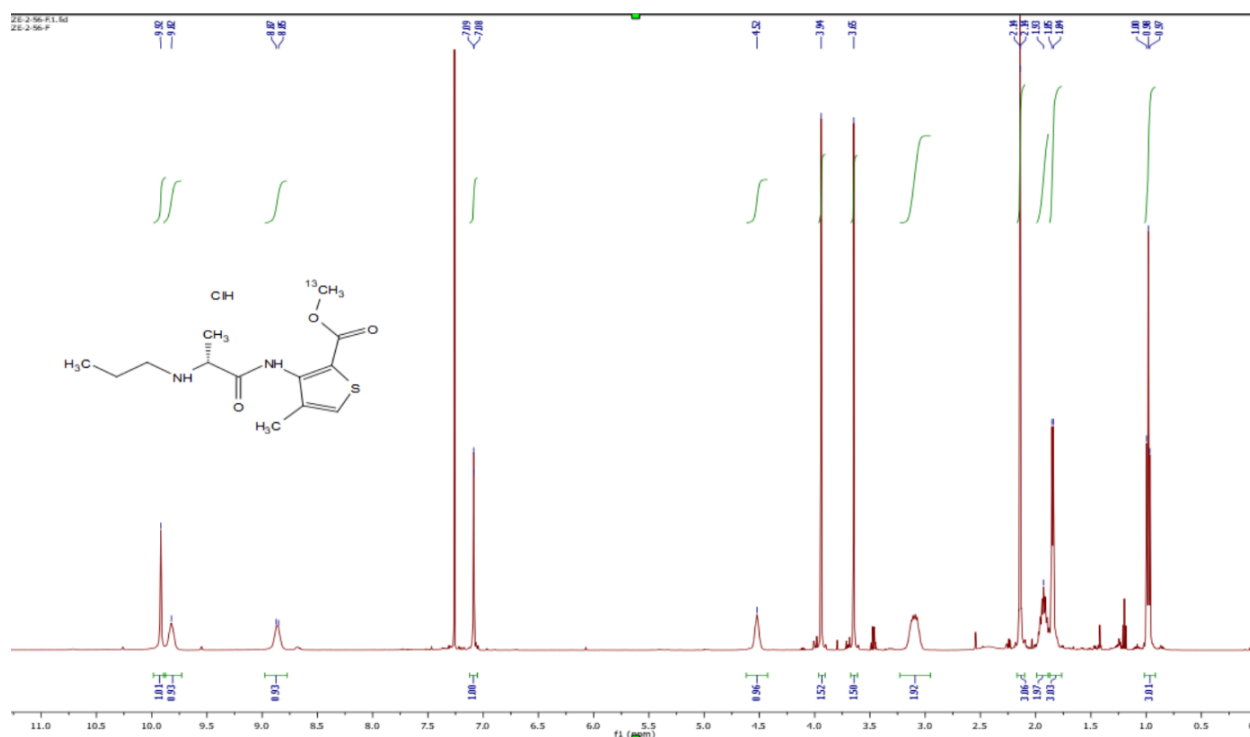
Figur B.2: Pulsprogram for ^1H -eksperiment med presaturering (zgpr).

Parametere for fast-fase NMR-eksperimentene er oppgitt i Tabell B.1:

Tabell B.1: Antall transienter, pulslengde, ventetid og størrelse på FID for eksperimenter utført ved fast-fase NMR. Verdier som er ulike i eksperimentene oppgis med tall foran der 1: POPC, 2: POPC med (*R*)-artikain (8,3 mol%) og 3: POPC med (*R*)-artikain (4,0 mol%) med ^{13}C -anrikning. Pulslengder og ventetid for ^1H og ^{13}C er optimalisert i Brukers TopSolids™.

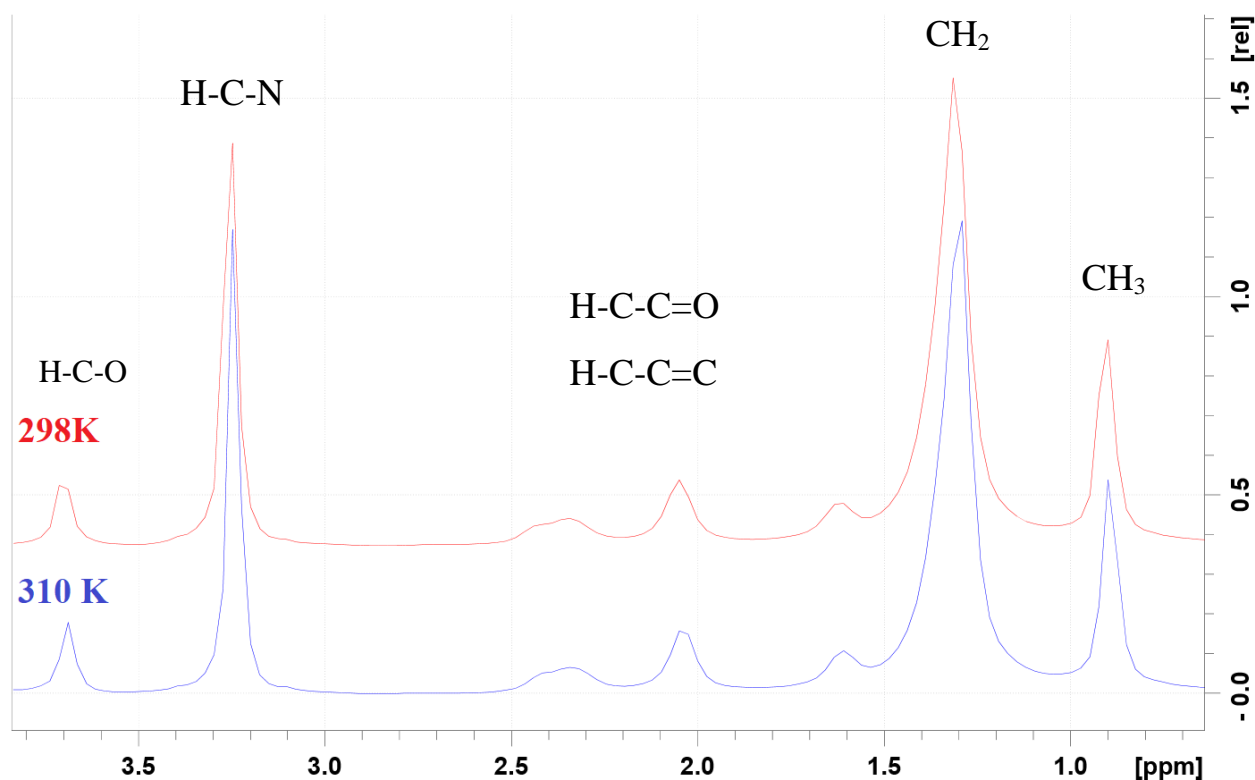
Eksperiment	^1H	^{13}C	^{31}P (statisk)	^{31}P (spinnende)	^{31}P (fosforsyre 85 %)
Antall transienter (NS)	16	22 000	20 000	3 600	1
Pulslengde (p1) [μsek]	2,5	1: 2,3 2: 2,4 3: 2,4	15	15	3,3
Ventetid mellom hver NS (d1) [sek]	2,5	3	3	3	3
Størrelse på FID (TD)	4k	6k	12k	12k	12k

Vedlegg C: ^1H -spekter av (*R*)-artikain (Zeeshan Muhammad)



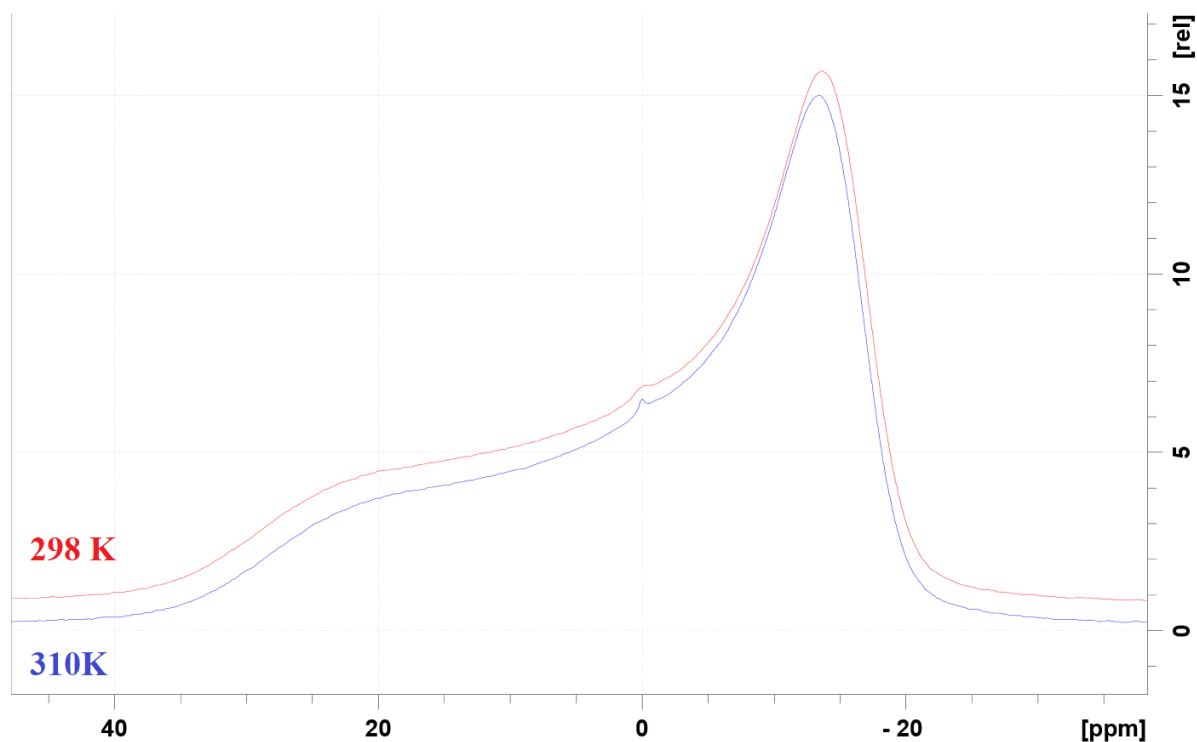
Figur C.1: ^1H -spekter av (*R*)-artikain løst i deuterert kloroform (CDCl_3) utført av Zeeshan Muhammad fra forskergruppen organisk syntese og legemiddelkjemi ved Kjemisk Institutt, Universitet i Bergen.

Vedlegg D: Spektre av POPC ved 298 K og 310 K



Figur D.1: ¹H-spektre av området 0,7-3,8 ppm av POPC ved 298 K øverst i rødt og ved 310 K nederst i blått. Metylgruppene har kjemisk skift ved 0,90 ppm. Lengre downfield observeres CH₂-gruppene i acylkjedene ved 1,30 ppm og resonansen med kjemisk skift på 3,25 ppm tilhører metylgruppene bundet til nitrogen i kolinhodegruppen.

Det observeres ikke store forskjeller ved å sammenligne spektrene ved 298 K og 310 K av POPC fra *Figur D.1*. Linjebredden av resonansene blir litt smalere ved 310 K der eksempel metyl bundet til nitrogen ved 3,25 ppm måler linjebredden ved halv høyde på 18,5 Hz mot 25,6 Hz ved 298 K. Resonansene ved 310 K ligger litt lengre upfield enn tilsvarende resonanser ved 298 K.

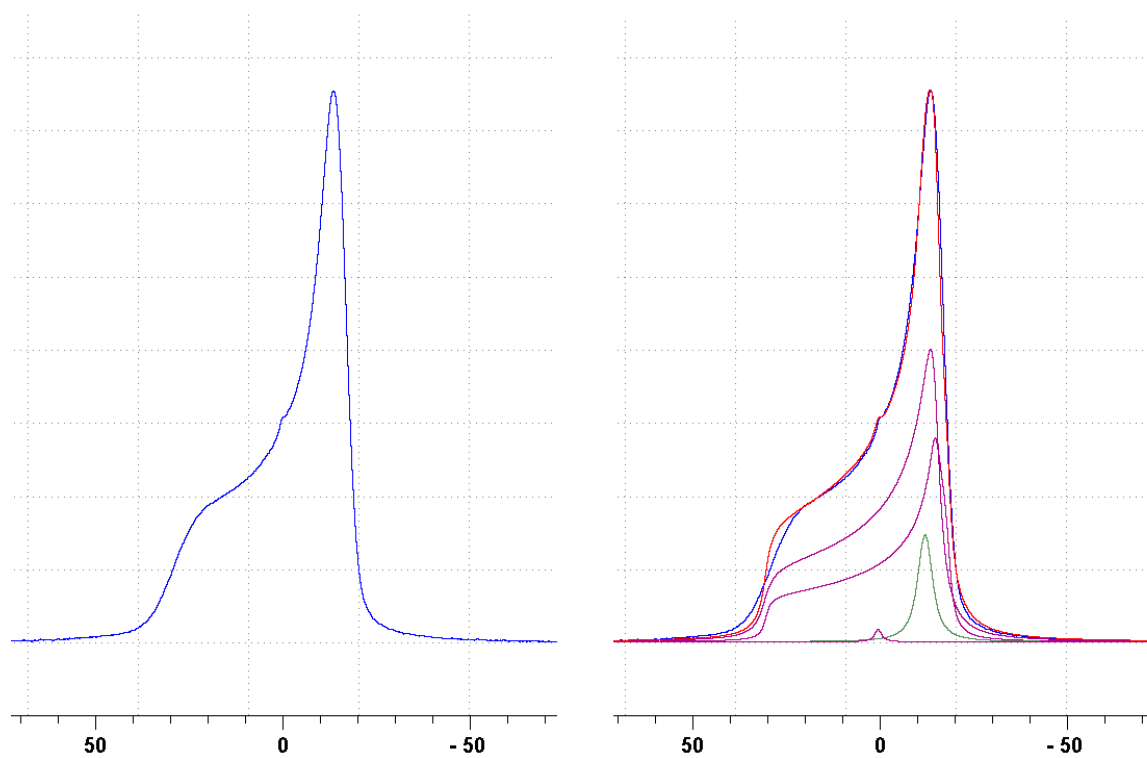


Figur D.2: Statiske ^{31}P -spektre av POPC tatt opp ved 298 K øverst i rødt og 310 K i blått. Spekteret tatt opp ved 310 K har en litt smalere kurve enn spekter ved 298 K (*Tabell D.1*). Begge spektre har isotropt signal ved 0 ppm.

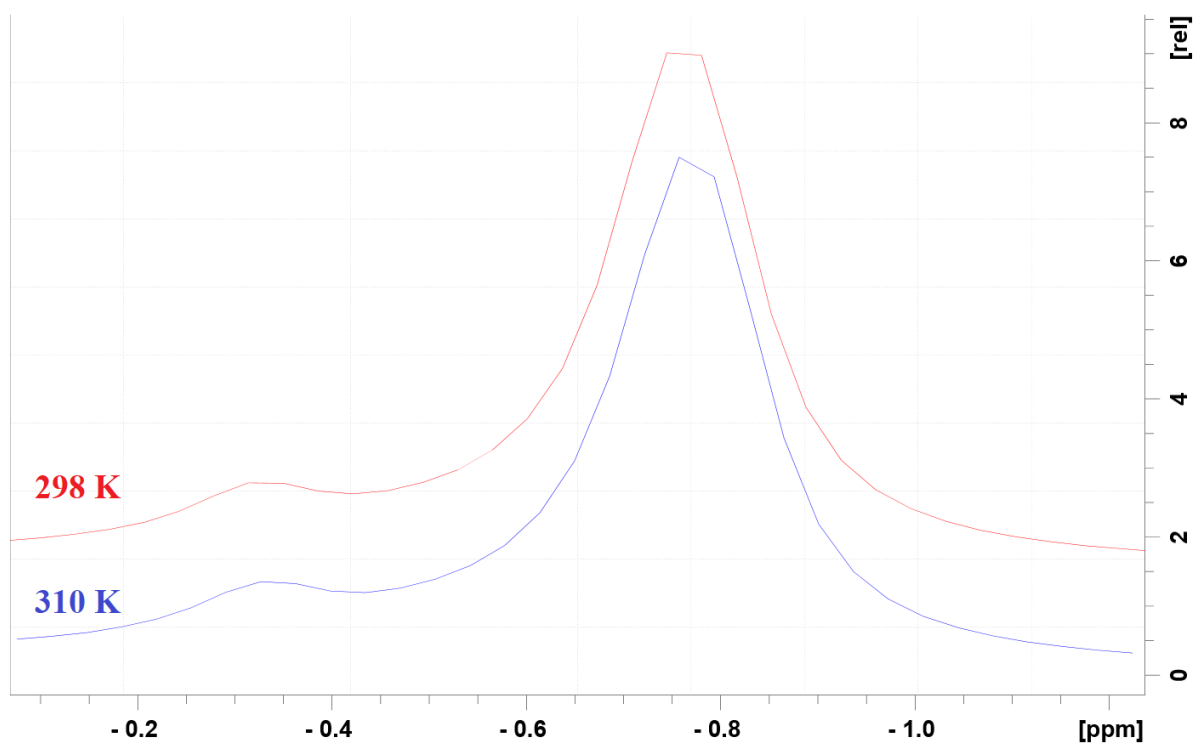
Tabell D.1: Kjemisk skift og CSA i ppm ved temperaturene 298 K og 310 K av statiske fosforspektre fra *Figur D.2*.

Spekter ved temperatur [K]	Toppunkt av resonans [ppm]	CSA [ppm]
298	-13,64	48,1
310	-13,35	46,8

Tabell D.1 viser at resonansen ved 310 K måler en litt smalere CSA enn resonansen ved 298 K på grunn av økt temperatur øker mobiliteten til fosfat-gruppen. Toppunktet for resonansen ved 298 K er litt lengre upfield i forhold til resonansen ved 310 K.



Figur D.3: Statisk eksperimentell ^{31}P -spekter av POPC-prøve ved 298 K vises til venstre. Tilsvarende simulert spekter er til høyre med 4 komponenter for å tilpasse det teoretiske spekteret.



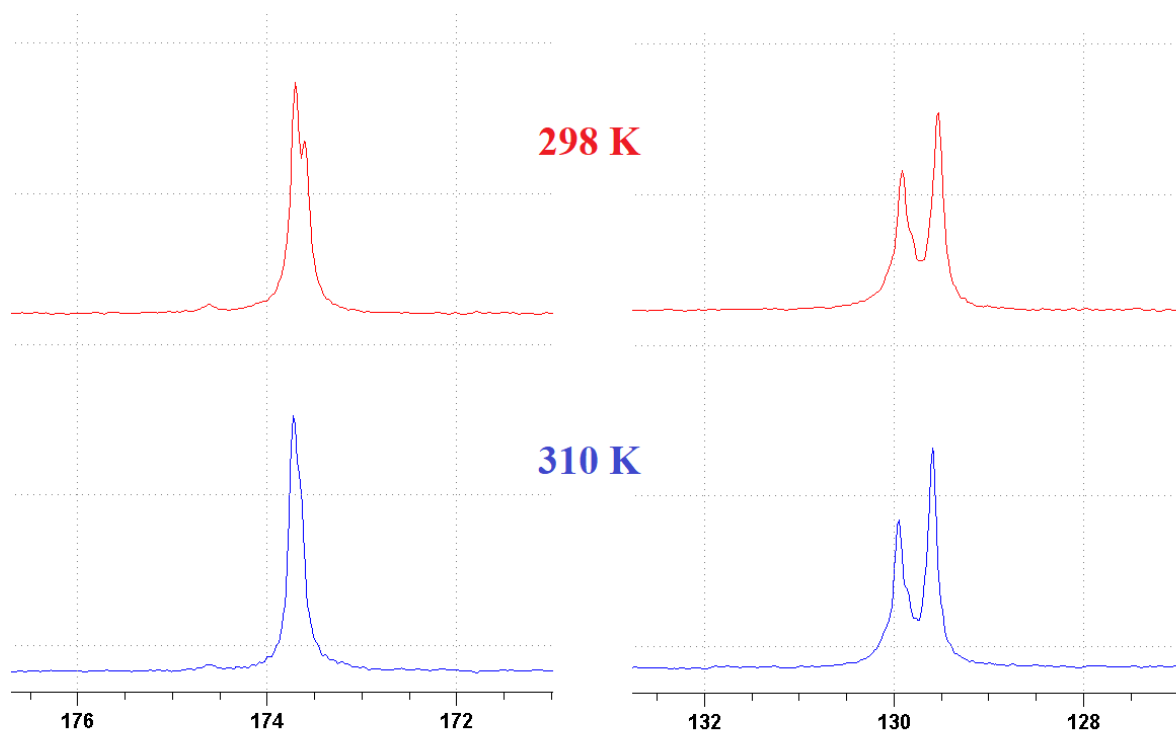
Figur D.4: ^{31}P -spektre med spinnhastighet på 2,5 kHz av fosfat-resonans ved 298 K øverst i rødt og 310 K nederst i blått. En liten skulder fra en isotrop observeres ved -0,33 ppm.

Tabell D.2: Kjemisk skift og linjebredde ved halv høyde av resonans ved temperaturene 298 K og 310 K av statisk fosforspektre fra *Figur D.4*.

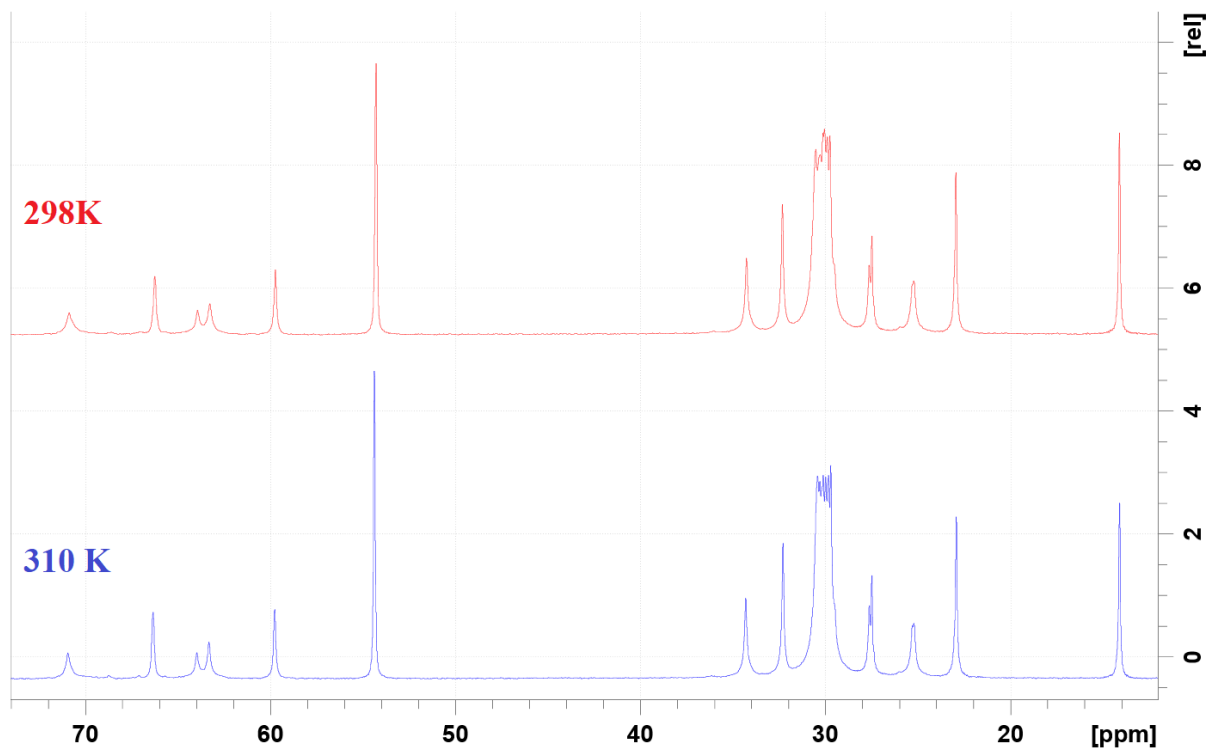
Spekter ved temperatur [K]	Kjemisk skift av resonans [ppm]	Linjebredde [Hz]
298	-0,76	39,2
310	-0,76	38,7

Figur D.4 av spinnende fosforspektre viser resonanser av en fosfat-gruppe med kjemisk skift på -0,76 ppm, men også et toppunkt ved -0,33 ppm av en isotrop. Forskjell på linjebreddene av resonansene er liten.

Grunnet Covid-19 ble spekter ved 298 K først tatt opp tre måneder etter første spekter. Figurene under (D.5 og D.6) viser spektrere av POPC ved 298 og 310 K der en liten forskjell vises ved karbonylresonansene i acylkjede og CH₂-resonansene i acylkjede ved 30 ppm.



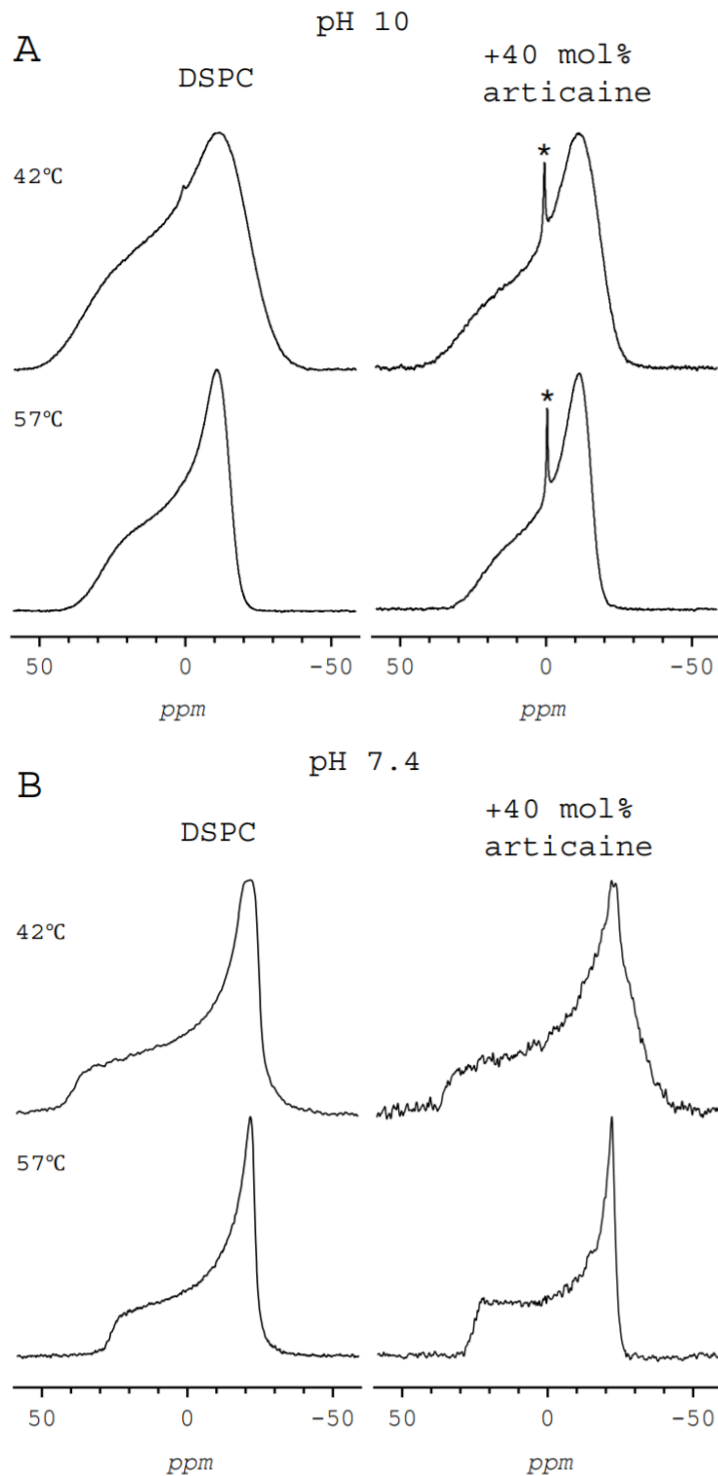
Figur D.5: ¹³C-spektre av POPC ved 298 K øverst i rødt, og ved 310 K nederst i blått. Karbonylresonansene ved 173,9 ppm er mindre overlappende ved 298 K. Resonansene for C=C observeres like ved begge temperaturer.



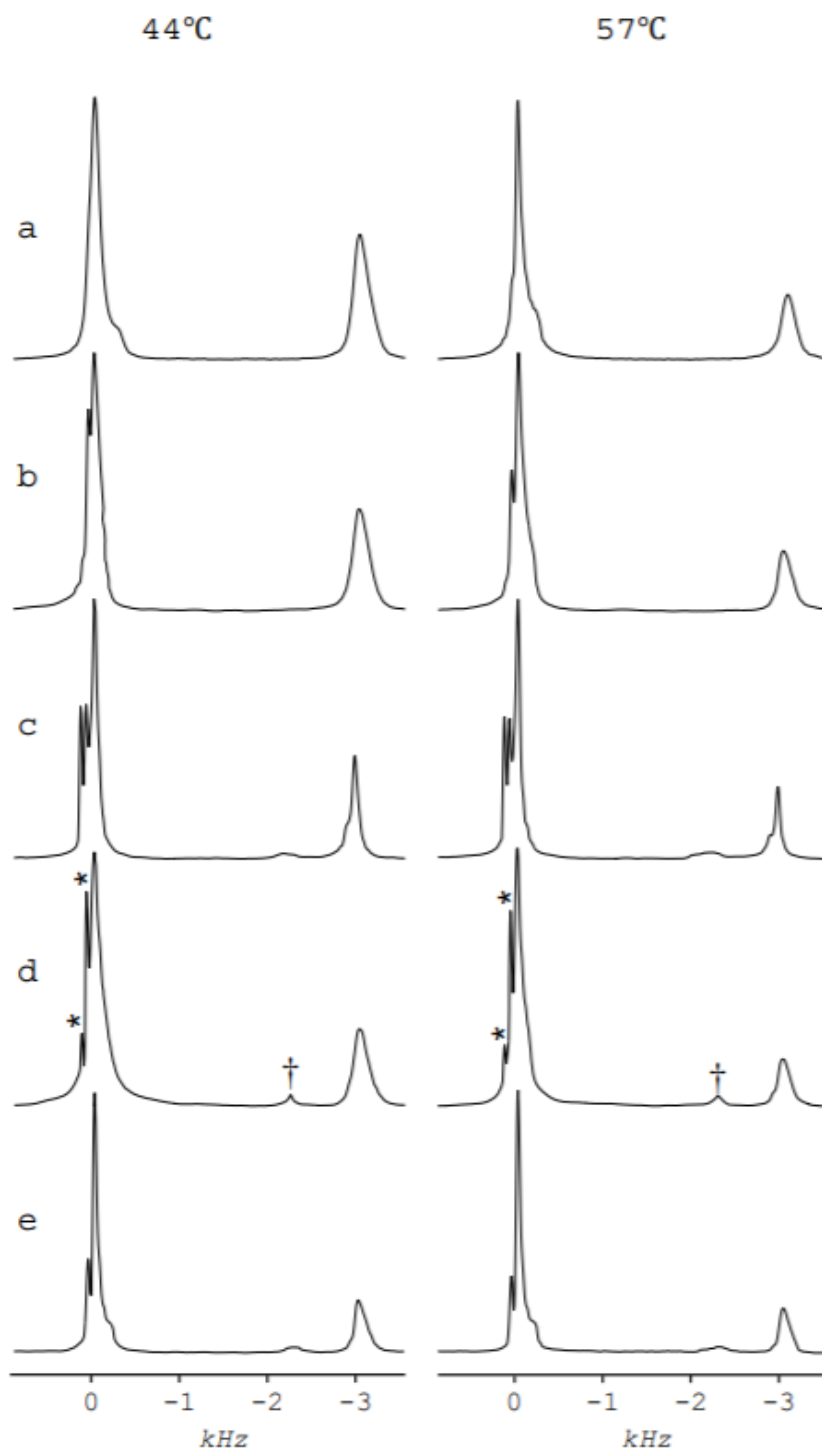
Figur D.6: ^{13}C -spektre av POPC ved 298 K øverst i rødt, og ved 310 K i blått. Spektre ved 310 K viser mer ordnet struktur av de overlappende resonansene ved 30 ppm, men resonansene observeres ellers like ved begge temperaturer.

Forskjellene mellom spektrene er hovedsakelig økt linjebredder ved 298 K, og forskjeller ved karbonylresonansene ved 173,9 ppm og resonansene for acylkjede ved 30 ppm som anslås å være på grunn av temperaturforskjeller.

Vedlegg E: Statistiske- og spinnende fosforspektre fra studien av Song et al. [5]



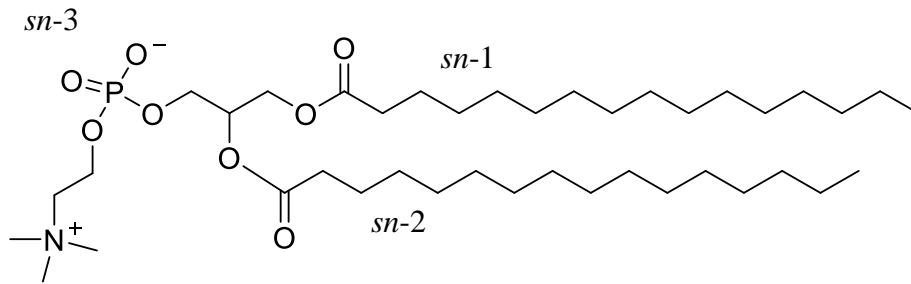
Figur E.1: Statistiske fosforspektre der *A* viser spektre av prøve med pH på 10 og *B* med pH 7,4. Spektrene i venstre kolonne er av ren DSPC-prøve, mens spektrene til høyre er med 40 mol% artikain.



Figur E.2: Fosforspektre med spinnhastighet på 3 kHz der *a* er av ren DSPC, og *b-e* er spektre av DSPC med henholdsvis 10 mol%, 25 mol%, 40 mol% og 55 mol% artikain. Stjernene markerer isotroper, mens kors er uidentifiserte resonanser.

Vedlegg F: Lipidforberedelse av 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC)

Det ble utført eksperimenter på lipider som øvelse av prosedyren for liposomopparbeiding. Lipidet blir behandlet under argonatmosfære gjennom hele opparbeidingen.



Figur F.1: Molekylstruktur av 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC). Lipidet har en transisjonstemperatur ved 41,3 °C og vil være i gelfase ved romtemperatur [39]. Acylkjedene er den mettede fettsyren palmitinsyre i *sn*-1 og *sn*-2 posisjon som består av 16 karboner (16:0). Molekylformelen er C₄₀H₈₀NO₈P med molekylvekt 734,039 g/mol [52].

F.1 Eksperimentelt

Prosedyren ble utført slik som beskrevet under del 5.1 *Eksperimentelt*. Det som avviker fra prosedyren, var at kloroform ble forsøkt fordampet kun ved oljebad med rotasjon. Dette var ikke effektivt og mye av kloroformen gjensto etter en time. Temperaturen ved oljebad var på 48 °C på grunn av lipidets høyere smeltepunkt. Prøven hadde allikevel en hard konsistens som kan sammenlignes med et stearinlys.

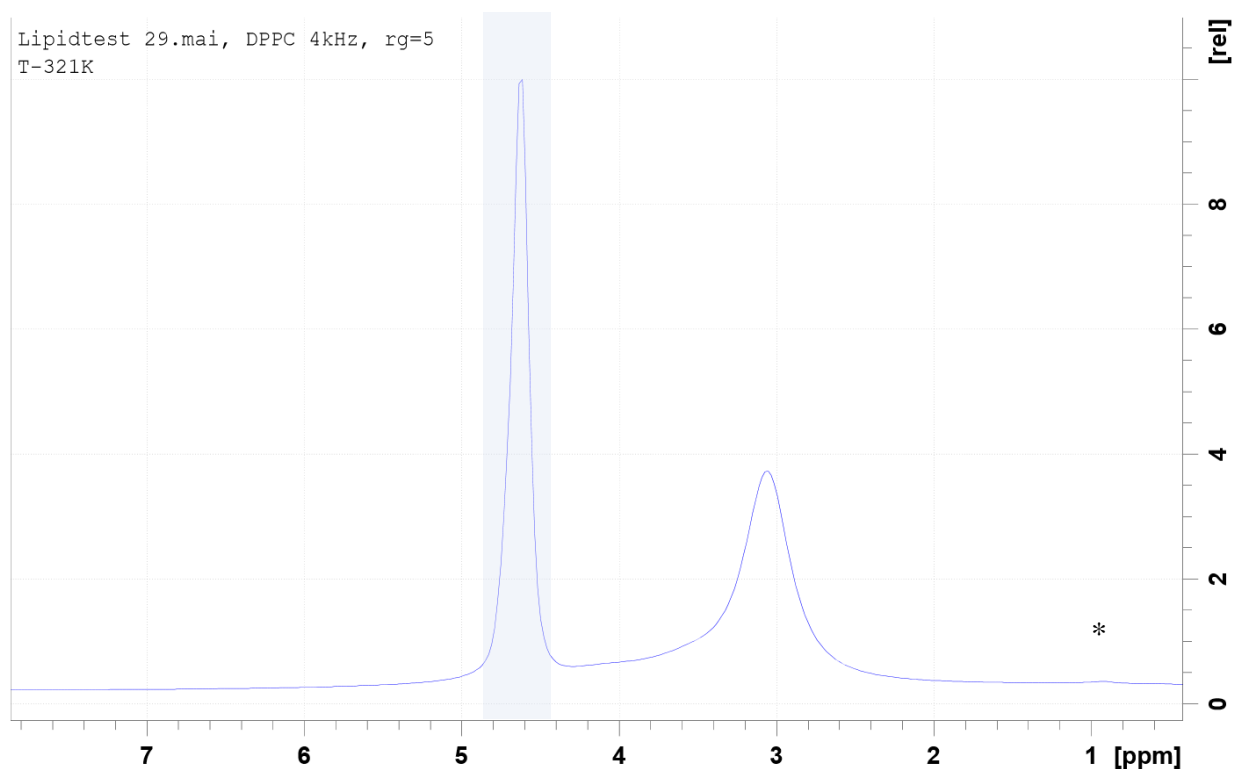
Etter dårlig resultat ved NMR-opptak med mistanke om at liposomene ikke var godt nok hydrert, ble prøven igjen frysetørket og hydrert, og siden pakket etter ekvilibrerings.



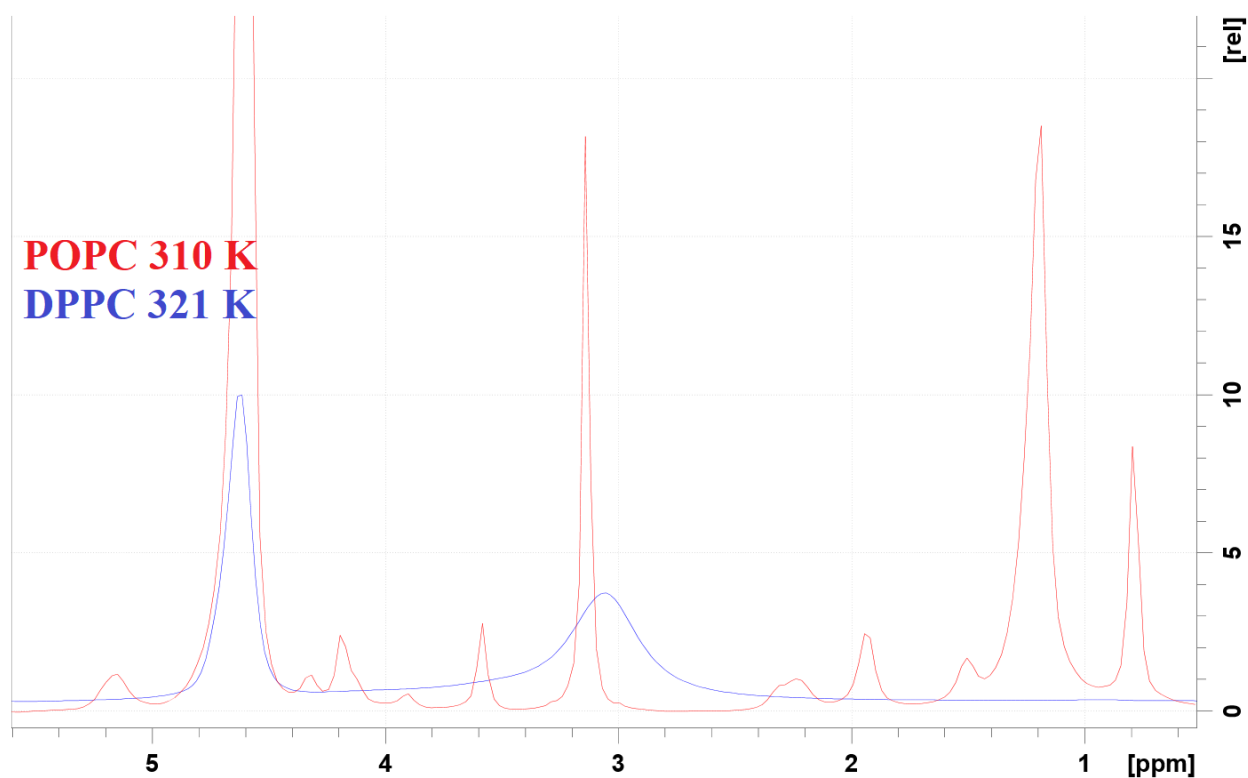
Figur F.2: Prøven etter et døgn på oljebad viser hard konsistens.

F.2 Resultat

Resultater fra prosedyren viser proton, fosfor-31- og karbon-13 spektre. Spektre av proton og karbon-13 er tatt opp ved 321 K hvor lipidet er i flytende form. Fosfor-31-spektre er tatt opp ved 298 K hvor DPPC er i gelfase. Det ble ikke tatt opp statisk fosforspektre.

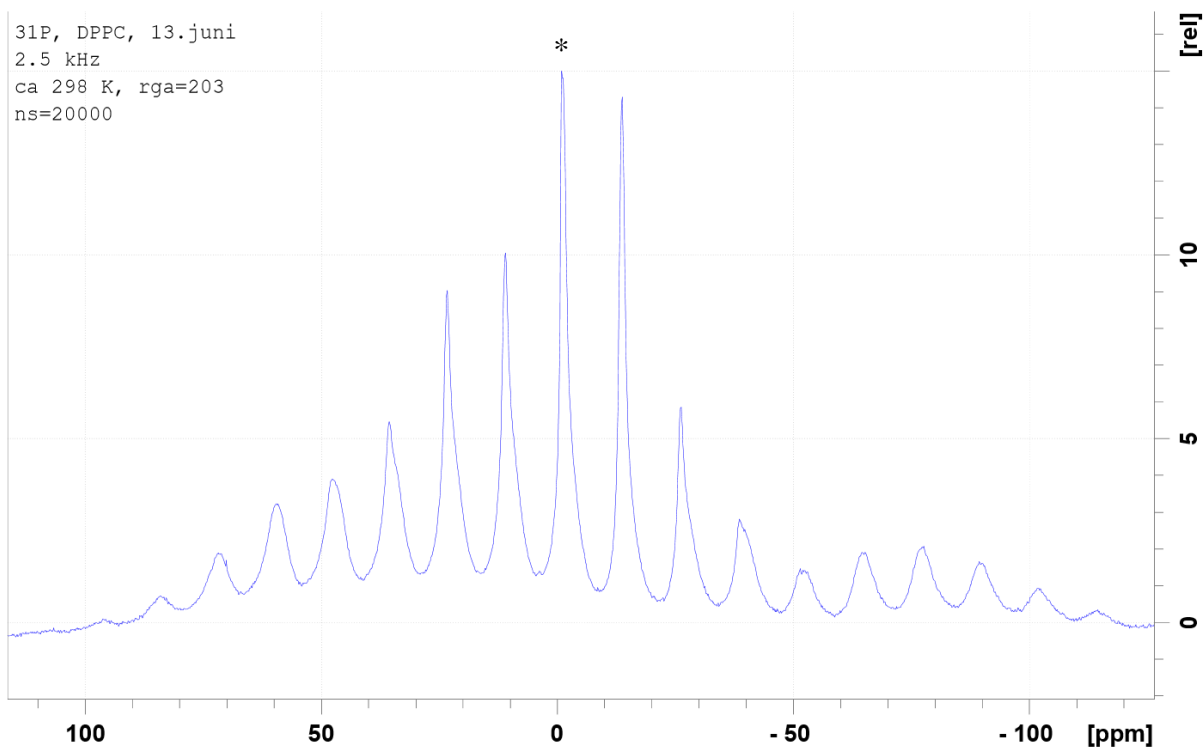


Figur F.3: ^1H -spekter av DPPC ved 321 K og med spinnhastighet på 4 kHz. Området markert er der vannsignalet resonerer. Metylresonans vil gi signal rundt 0,9 ppm, hvor på spekteret kan observeres noe signal (*).

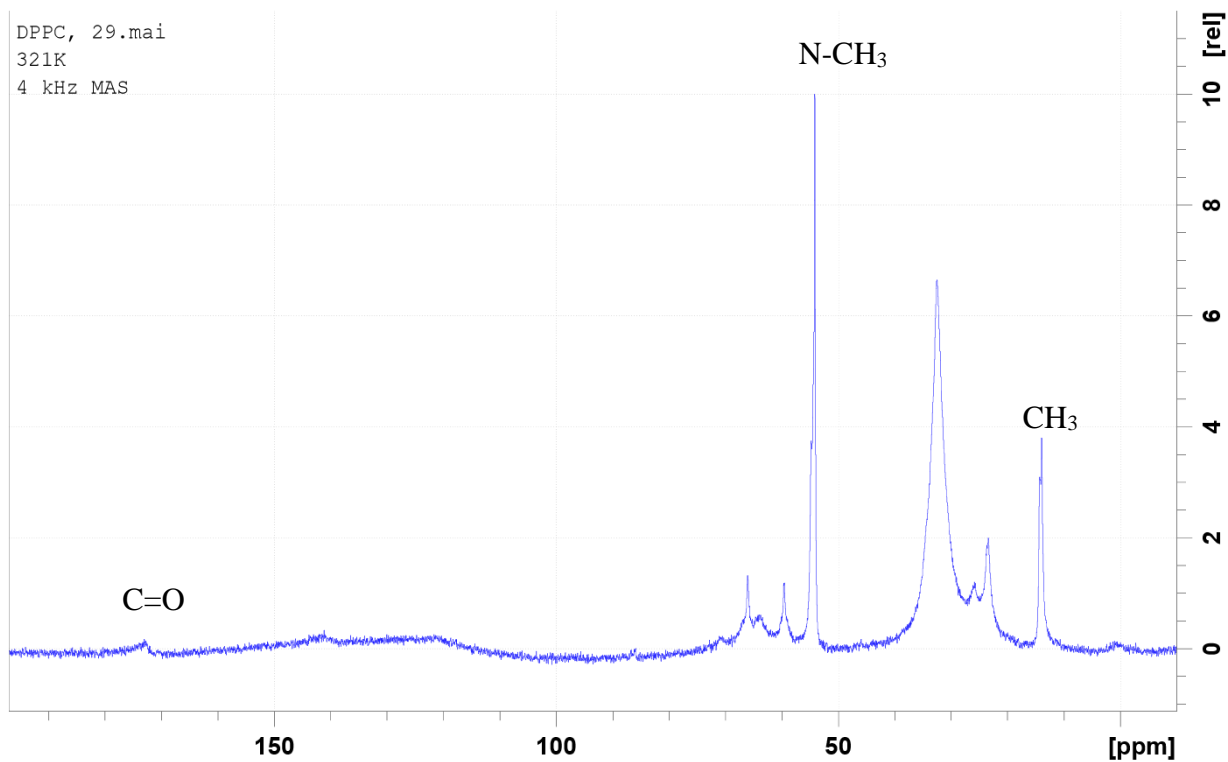


Figur F.4: ^1H -spekter av DPPC og POPC i omtrent samme størrelsesforhold plassert over hverandre. Kjemisk skift for signalene av POPC (rødt spekter) er ikke riktig på grunn av ulik temperatur, men er plassert slik for å lettere kunne sammenligne spektrene.

Det som skiller lipidene POPC og DPPC i struktur, er fettsyrene der DPPC har to palmitinsyrer bundet til glyserol, mens POPC har en palmitinsyre og en umettet oleinsyre bundet til glyserol. Det vil derfor kunne forventes lignende signaler i spektrene. Fra *Figur F.4* viser det tydelige forskjeller i størrelse og informasjon i spektrene. Det antatte vannsignalet i spekteret i DPPC er betydelig lavere enn vannsignalet i POPC-spekter.



Figur F.5: ^{31}P spekter tatt opp med spinnhastighet på 2,5 kHz ved 298 K. Fosfatresonans er markert med stjerne og spinnende sidebånd viser avstand med 2500 Hz.



Figur F.6: ^{13}C -eksperiment tatt opp med spinnhastighet på 4 kHz ved 321 K. Signaler observeres i området 10-70 ppm der kjede og hodegruppe resonerer. Et lite signal rundt 170 ppm kan tyde på karbonylgruppene i acylkjedene i lipidet.

F.3 Diskusjon

Under ekvilibreringen av prøven ble prøvemassen veldig hard under det første døgnet, og vanskelig å få homogen (*Figur F.2*). Liposomopparbeiding av DPPC er beskrevet i en studie av Attwood et al. [39], der opparbeidingen på DPPC ble utført ved 60 °C som legger til grunn at prøven under opparbeiding på oljebad burde ha blitt behandlet under høyere temperatur.

Fra *Figur F.3* blir det klart at resultatet ikke er godt nok for tolkning. Ved at prøven skal ha blitt hydrert med lik mengde vann som lipid (50 vekt%) burde dette signalet være mye sterkere, og flere resonanser burde vært observert med tanke på at det finnes flere kjemiske miljø i molekylet (*Figur F.4*). Ut ifra spekteret ser det ut til at signalene sammenfaller ved 3 ppm.

Figur F.5 av ^{31}P -NMR-spekter tyder på et resultat av en hard og inhomogen prøve. Da rotor ble åpnet, ble det også observert at rotoren var hul som betyr at prøven ikke var godt nok pakket. Kombinasjon av hard og inhomogen prøve, samt hul rotor kan anslås å være avgjørende faktorer for resultatet observert i figuren.

Figur F.6 viser karbonspekter med brede signaler og en forstyrret baselinje. Spekteret tyder også på en inhomogen prøve som vil resultere i lite definerte og brede signaler. To signaler skiller seg ut rundt 14 ppm (CH_3) og 55 ppm (N-CH_3) ved å være smale som er ønskelig i spekteret.

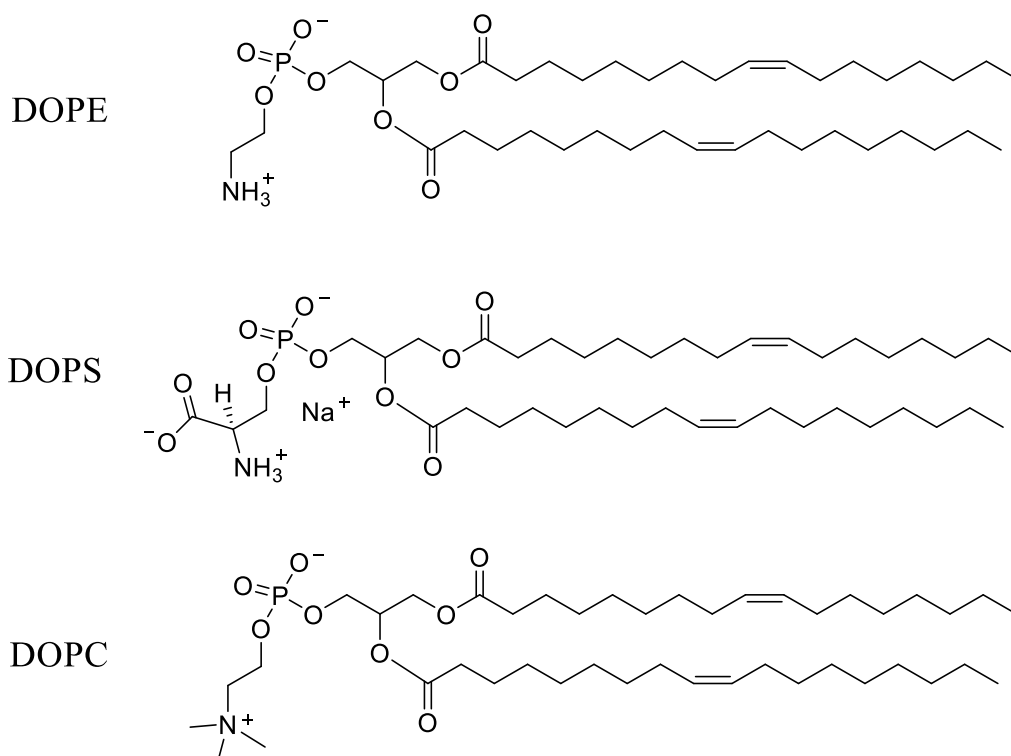
Vedlegg G: Lipidforberedelse av blandingsprøve DOPE/DOPS/DOPC

Andre forsøk på opparbeiding av liposomprøve ble gjort på en lipidblanding av DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin), DOPS (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin (natrium salt)) og DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin).

Tabell G.1: Lipidene brukt i prosedyren med tilhørende hodegruppe, molekylformel og -vekt, og transisjonstemperatur.

Lipid	Lipid-hodegruppe	Molekylformel	Molekylvekt [g/mol]	T_m^4 [°C]
DOPE ¹	etanolamin	C ₄₁ H ₇₈ NO ₈ P	744,034	-16
DOPS ²	serin	C ₄₂ H ₇₇ NO ₁₀ PNa	810,025	-11
DOPC ³	kolin	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	786,113	-17

^{1,2,3,4}Verdier fra Avanti Polar Lipids, Inc. [53-56].



Figur G.1: Struktur av de ulike lipidene. Acylkjedene hos lipidene består av den umettede fettsyren oleinsyre (C18:1) i *sn*-1 og *sn*-2 posisjon med dobbeltbinding mellom C-9 og C-10, som gjør at disse har lave smeltepunkt.

G.1 Eksperimentelt

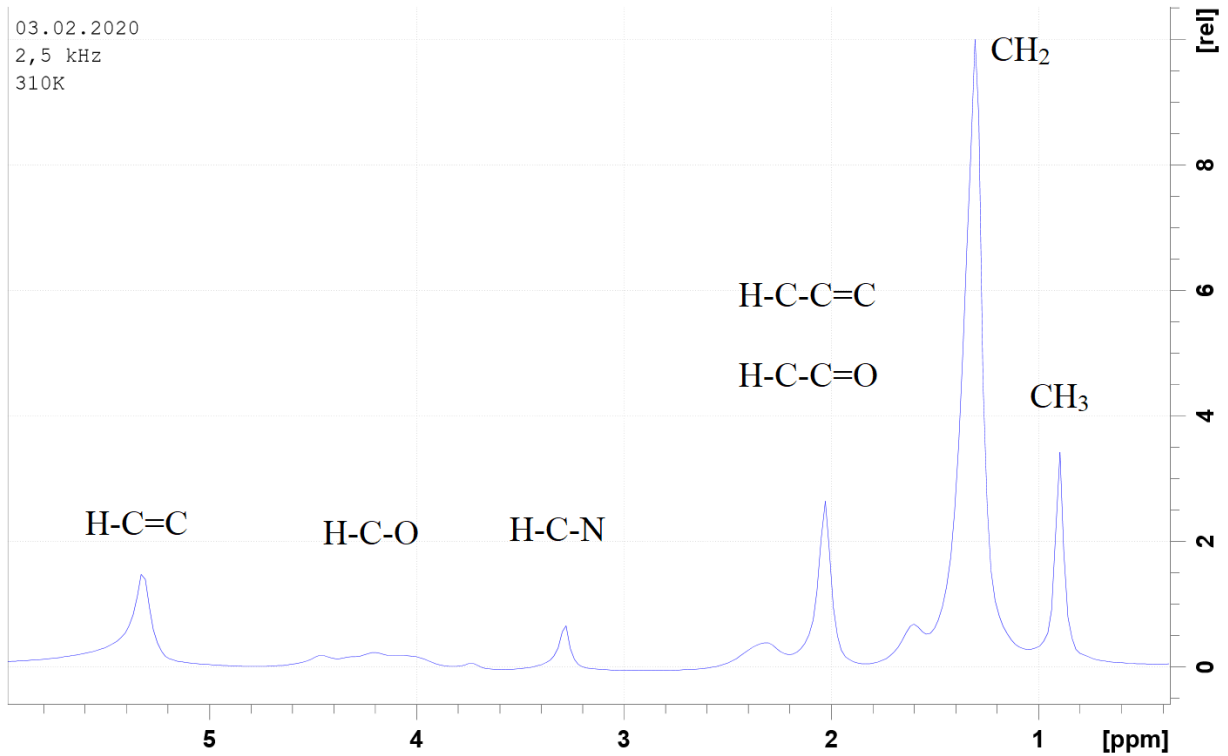
Prosedyren ble utført slik som beskrevet under *5.1 Eksperimentelt*. Det som avviker fra prosedyren, var at kloroform ble forsøkt fordampet kun ved oljebad med rotasjon som ikke var effektivt og mye av kloroform ble gjenværende. I siste steg hvor prøven skal hydreres og ekvilibreres i tre døgn, ble det tilsatt 50 vekt% vann, men ingen videre tilsetning av vann for å opprettholde prosenten.



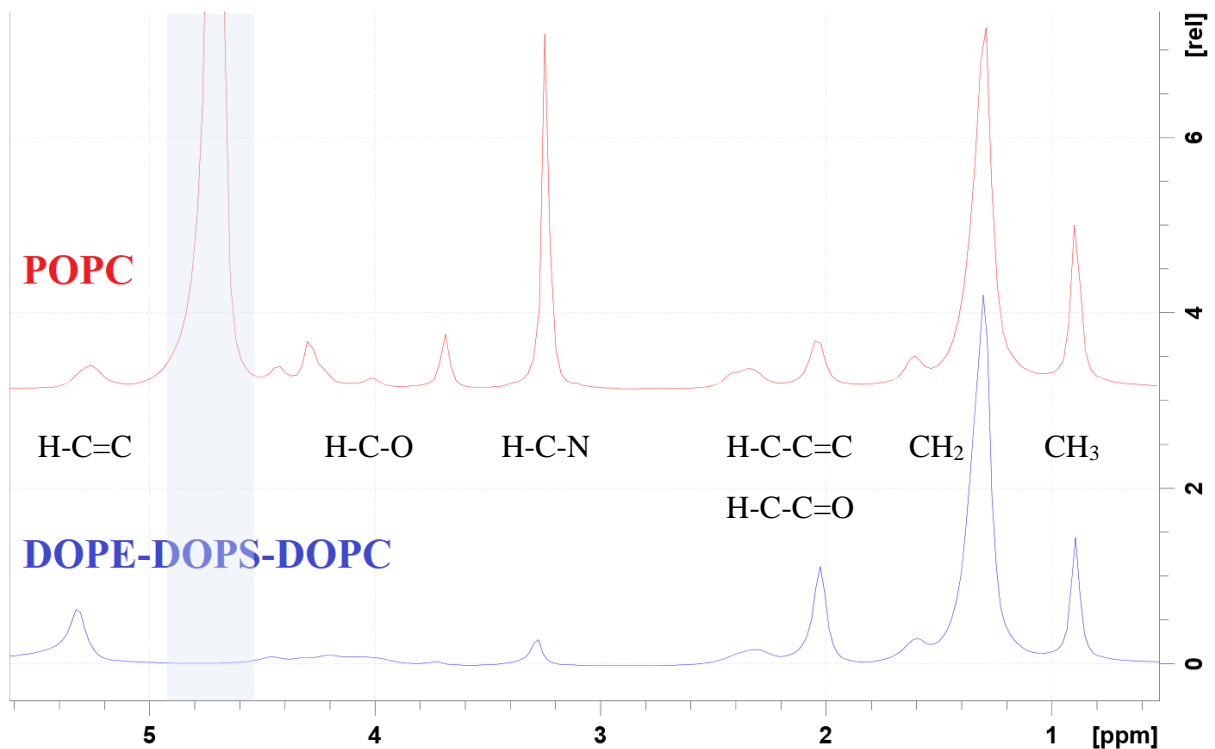
Figur G.2: Etter tre døgn på varmebad for ekvilibrering hadde lipidblandingen en myk konsistens sammenlignbar med smør.

G.2 Resultat

Det ble utført dataopptak av prøven fire måneder etter opparbeidelsen på grunn av 4 mm proben til 500WB -instrumentet var til reparasjon. Spektrene i resultatene viser ^1H -, ^{31}P - og ^{13}C -spektre ved 310 K, med unntak av statisk ^{31}P som er tatt opp ved 298 K.

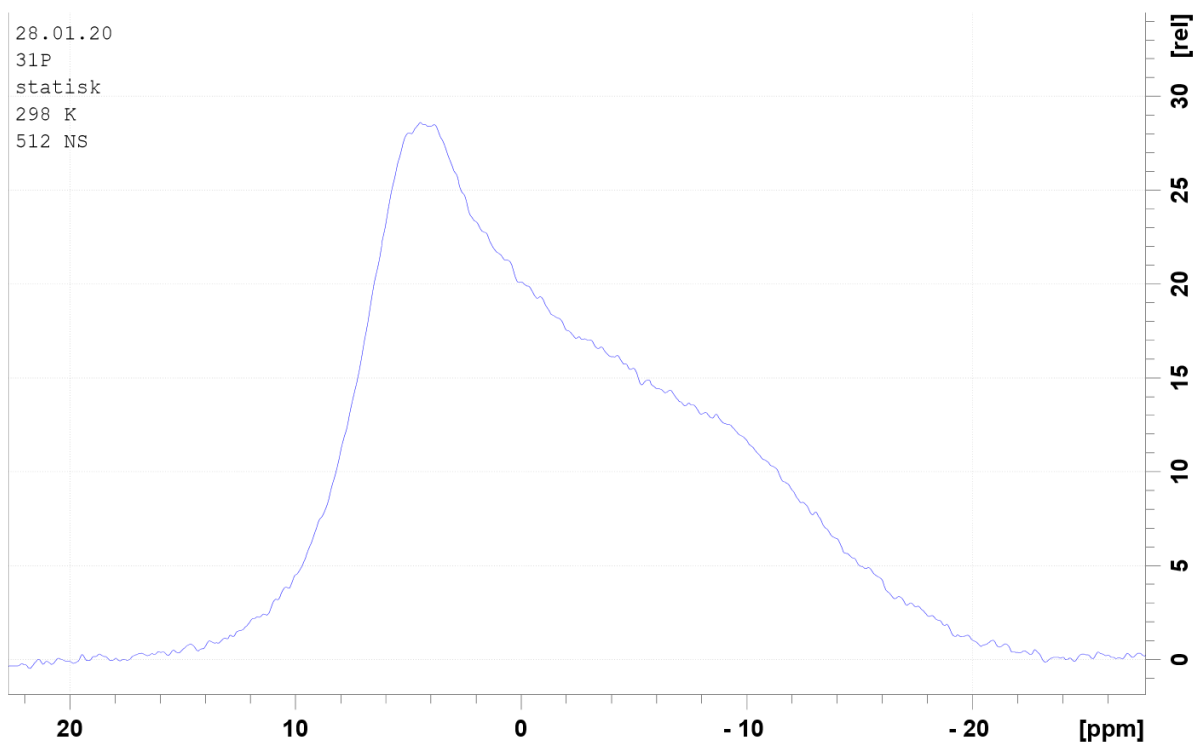


Figur G.3: ^1H -spekter av lipidblanding ved 310 K og med spinnhastighet 2,5 kHz. Resonanser observeres i regionen hvor de kjemiske gruppene oppgitt i figuren gir signaler.

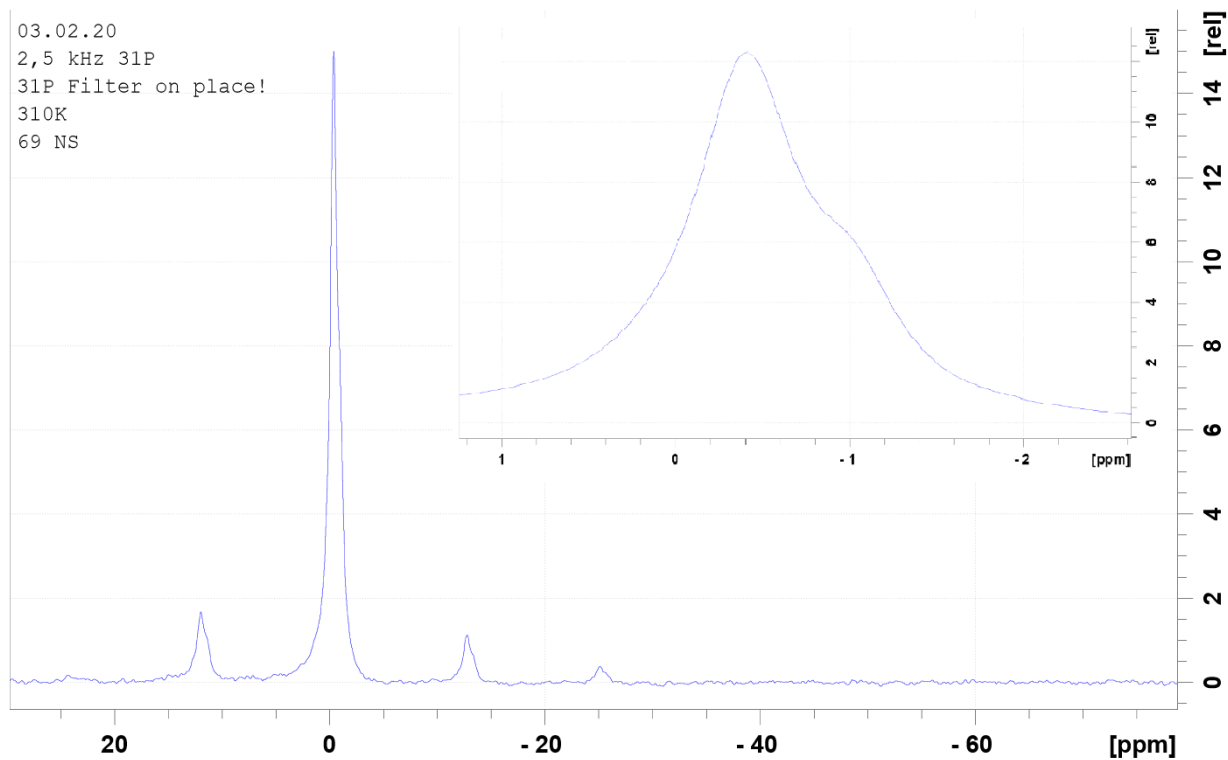


Figur G.4: ^1H -spektre av lipidblanding og POPC ved 310 K med spinnhastighet 2,5 kHz. Et tydelig signal for vann observeres i spekteret av POPC ved kjemisk skift $\sim 4,7$ ppm. Et tilsvarende signal i spekteret av DOPE/DOPS/DOPC observeres ikke i dette området.

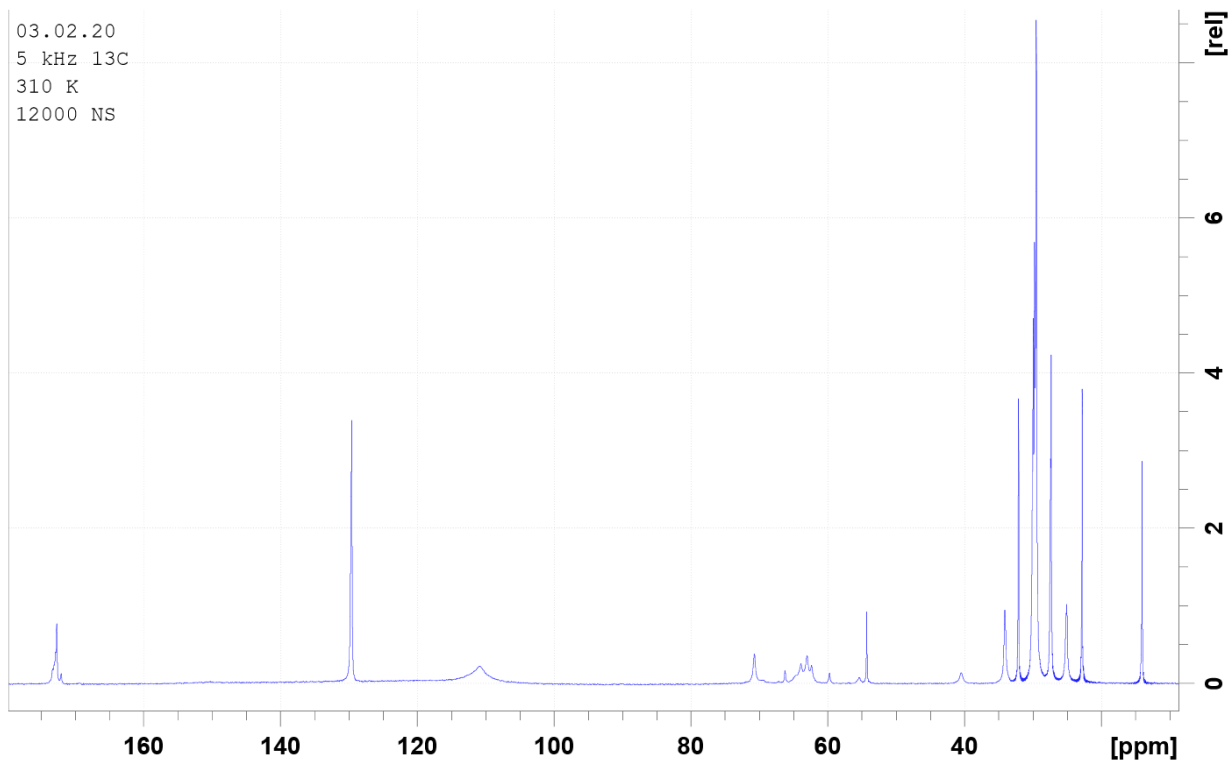
Ved å sammenligne spektrene *Figur G.4* er det flere resonanser i spektrene i området 0,9-2,0 ppm som gir lignende observasjoner. Metylresonansen med kjemisk skift rundt 0,9 ppm og signalet rett over 1,0 ppm for CH₃ og CH₂ i acylkjedene er tydelige i begge spektre. Det observeres større/mindre intensiteter av de ulike signalene i spekteret av lipidblandingen sammenlignet med tilsvarende signaler i spekter av POPC. Eksempel er resonansen ved 5,5 ppm for H-C=C tydeligere i spekteret av lipidblanding, som kan skyldes lipidenes ulike mengder av de kjemiske gruppene (dobbel så mange C=C-grupper i lipidblandingen).



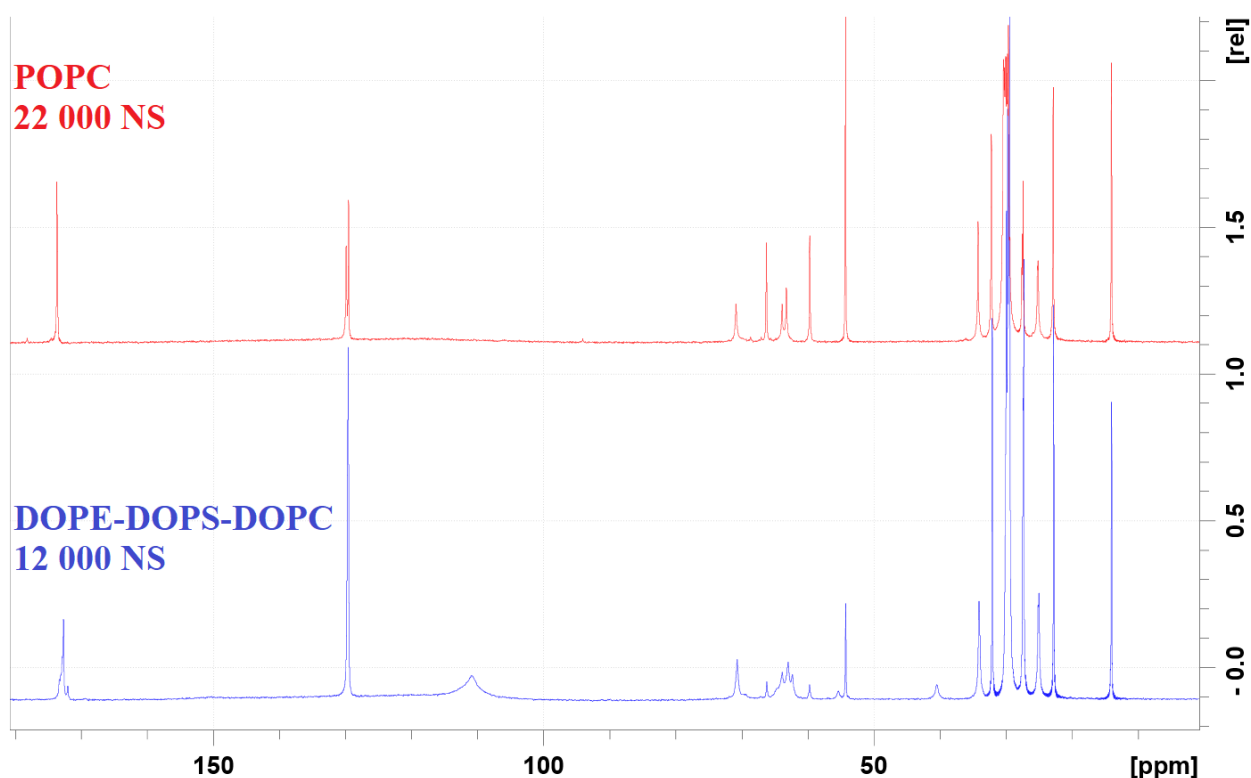
Figur G.5: Statisk ³¹P-NMR-spekter av lipidblanding ved 298 K og 512 transienter. Resonansen måler en CSA-verdi på omtrent 22 ppm i spekteret og toppunktet har kjemisk skift rundt 5 ppm.



Figur G.6: Fosforspekter av lipidblanding ved 310 K og spinnhastighet 2,5 kHz med utvidet figur av signalene for fosfatgruppene med kjemisk skift i området 0,5- til -1,5 ppm. Lipidblandingen har tre fosfatgrupper som vil være i forskjellige kjemiske miljø og derav disse overlappende resonansene vist i forstørret figur, som også kan observeres i spinnende sidebånd.



Figur G.7: ¹³C-spekter av DOPE/DOPS/DOPC ved 310 K og spinnhastighet på 5 kHz. Resonanser for karbonkjedene observeres i området 10-40 ppm, med unntak av C=C som resonerer ved 130 ppm. Hodegruppene observeres ved 50-70 ppm, med unntak av karboksylsyregruppen i serin som resonerer i samme området som ester i acylkjedene ved 170 ppm. En bred resonans med kjemisk skift ved 110 ppm observeres også i spekteret.



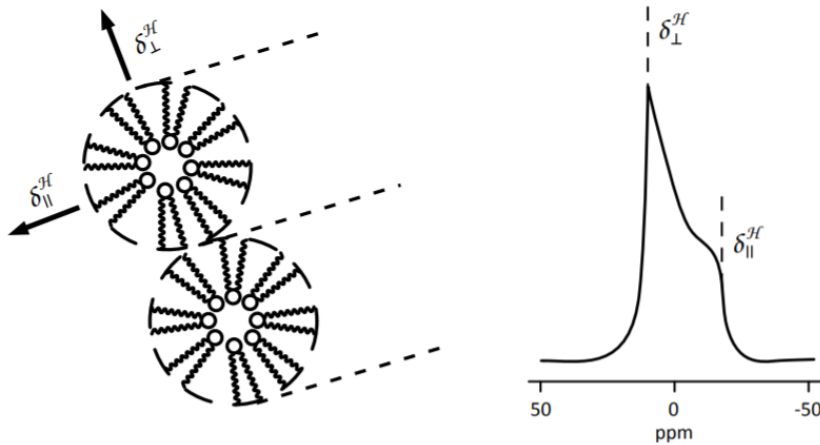
Figur G.8: ^{13}C -spektre av lipidblanding og POPC tatt opp ved 310 K og spinnhastighet på 5 kHz. Dataopptak av POPC ble utført med 22 000 transienter, mens 12 000 transienter ble utført av lipidblanding. Det observeres blant annet forskjeller i hodegrupperegionen ved 50-70 ppm, men også i grad av intensiteter på resonansene. Opptaket av spekteret av DOPE/DOPS/DOPC er utført med pulslengde (p_1) på 3,9 μs , mot 2,3 μs av POPC. Begge eksperimentene ble utført med ventetid (d_1) mellom hver transient på 3,0 sekunder.

G.3 Diskusjon

I protonspekter av lipidblandingen (*Figur G.3 og G.4*) observeres ikke signalet for vann. Dataopptak ble gjort rundt fire måneder etter prøven var pakket i rotor der prøve i rotor ble oppbevart i kjøleskap over lengre tid. I tillegg ble det ikke tilsatt mer vann ved hydreringssteget slik at vekt% vann i prøve kan ha vært under 50%. Allikevel viser prøven tydelige resonanser av kjemiske grupper som forventes fra lipidblandingen, men trolig ikke alle.

Det statiske fosforspekteret (*Figur G.5*) viser en smalere CSA for resonansen av lipidblanding enn lipid av POPC (5.2.3 ^{31}P -NMR) og med toppunkt ved 5 ppm mot rundt -15 ppm av POPC. Lipidpolymorfisme, der geometrien av lipidfasen endres fra lamellær til heksagonal struktur, er blitt beskrevet av tidligere doktorgradsstudent ved NMR-forskergruppen, Chen Song [24].

Lipidenes acylkjeder vil vende utover og hodegruppene innover som former inverterte sylindriske miceller (*Figur G.9*).



Figur G.9: Representasjon av fosfolipider som formes til inverterte miceller og dets forventede ^{31}P -NMR spekter [24].

Etanolamin i DOPE er en svært liten hodegruppe som gjør at lipidet har en invertert kjegleform som gir invertert micellestruktur [57]. Lipider med umettede kjeder vil redusere pakketettheten og øke membranfluiditeten [13]. Ved at lipidene i lipidblandingen inneholder to oleinsyrer med to cis-dobbeltbindinger i tillegg til små hodegrupper som serin og etanolamin, kan det anslås at lipidene vil pakkes i heksagonal struktur.

Ved å sammenligne ^{13}C -spektrene av POPC og DOPE/DOPS/DOPC i *Figur G.8* observeres likheter i resonansene og deres kjemiske skift for de ulike kjemiske gruppene, men det er store forskjeller i intensiteten av resonansene tilhørende i acylkjeder (10-40 ppm og 130 ppm). På tross av 10 000 mindre transienter av lipidblandingen har noen av resonansene større intensitet enn resonanser i POPC. Pulslengde og ulike mengder av de kjemiske gruppene i prøvene anslås å være årsak til observering av ulike intensiteter. Pulslengden utført ved dataopptak på DOPE/DOPS/DOPC var ikke optimalisert i TopSolids-programmet.

