

Masteroppgave for graden Master i Farmasi

**Isolering og karakterisering av forbindelser
med anticancereffekt fra tre ulike
marine organismer**

Shwan Hiwa Jalal
2010



Veiledere:

Terje Vasskog, Universitetet i Tromsø
Jeanette H Andersen, Marbio, Universitetet i Tromsø
Espen Hansen, Marbio, Universitetet i Tromsø
Einar Jensen, Universitetet i Tromsø

Forskningsgruppe for naturstoff- og legemiddelkjemi
Institutt for farmasi
Det medisinske fakultet
Universitetet i Tromsø

Forord

Arbeidet som presenteres i denne oppgaven har vært mulig å gjennomføre takket være forskningsgruppe for naturstoff- og legemiddelkjemi ved Universitetet i Tromsø og Marbio. Arbeidet ble utført i perioden oktober 2009 til mai 2010 ved Marbio i forskningsparken.

Arbeidet med oppgaven har vært kjempe spennende, lærerikt, krevende, utfordrende og til tider frustrerende. Gjennom oppgavens løp har jeg fått mulighet til å bli kjent med svært dyktige mennesker og det er på sin plass å takke alle for den hjelpen jeg har fått.

Aller først vil jeg rette en gedigen takk til veilederne mine, Terje Vasskog ved IFA, Espen Hansen og Jeanette Hammer Andersen for råd, god hjelp, korrekturlesing, nyttige innspill i skriveprosessen og veiledning. En spesiell takk til Terje og Espen for å ha vært tålmodig med å svare på spørsmål, gitt meg inspirasjon, oppmuntring og ikke minst god oppfølging hele veien.

Jeg vil takke alle som jobber på Marbio og Marbank som har bidratt på hver sin måte underveis. En spesiell takk til Marianne Hjerpset og Bernt Igeland for hjelp med prøveopparbeidelse og ekstraksjon. Trine Stiberg for veiledning, hjelp og kommentarer for anticancerscreening arbeidet.

Jeg må også takke mine venner for minneverdige stunder under hele masterskrivingen. En spesiell takk til mine to lab partnere Yashar Ammari og Meera Thanki for hyggelig lag, diskusjoner, og ikke minst masse artige og uforglemmelige stunder. Jeg hadde ikke klart det her uten dere to. Herem M. for oppmuntring og holdt meg med selskap på seine kvelder under skriveprosessen. Bahador P., Toril A. og Haider H. for alle de gode stundene på datarommet, te-kjøkkenet og gjennom farmasistudiet. Jeg vil også takke alle mine venner og spesielt de i kull 05 for fem fantastiske år her oppe i Tromsø, Nordens Paris.

Til slutt vil jeg takke mine kjære foreldrene for all støtte og oppmuntring under hele studie perioden og livet generelt. Det er deres fortjenste at jeg er kommet til dette punktet i mitt liv. Takker mine søstre og bror for at dere har tro på meg, og alltid støtter meg. Jeg er glad i dere alle sammen.

Sammendrag	7
Summary	8
Forkortelser	9
Liste over figurer	10
Liste over tabeller	12
1 Innledning	13
1.1 Marin Bioprospektering	13
1.2 Marbank og Marbio	15
1.3 Parastichopus tremulus	16
1.3.1 Bioaktive forbindelser fra Echinodermata	17
1.4 Metridium senile	18
1.4.1 Bioaktive forbindelser fra Cnidaria	18
1.5 Halocynthia pyriformis (pæresekkyr)	19
1.5.1 Bioaktive forbindelser fra Chordata	19
1.6 Målet med oppgaven	20
1.7 Bakgrunn for metoder	21
1.8 Ekstraksjon	23
1.9 Anticancer og cellelinjer	23
1.9.1 Anticancerscreening	25
1.10 HPLC teori	26
1.11 Ultra performance liquid kromatografi (UPLC)	28
1.12 Flash kromatografi	28
1.13 Massespektrometri	29
2. Materiell og metoder	34
2.1 Innsamling og oppbevaring av prøvemateriale	34
2.2 Prøveopparbeidelse	34
2.2.1 Utstyr	34
2.2.2 Eksperimentelt	34
2.3 Ekstraksjon	35
2.3.1 Utstyr og kjemikalier	35

2.3.2 Eksperimentelt _____	35
2.4 Fraksjonering av vandige ekstrakter ved hjelp av HPLC _____	36
2.4.1 Prøveopparbeidelse før ekstraksjon _____	36
2.4.2 Klargjøring av vandige prøver til HPLC _____	37
2.4.2.1 Utstyr og kjemikalier _____	37
2.4.2.2 Vandige ekstrakt _____	37
2.4.3 Fraksjonering ved hjelp av HPLC _____	38
2.4.3.1 Utstyr og kjemikalier _____	38
2.4.3.2 Vandige ekstrakter _____	38
2.5 fraksjonering av organiske ekstrakter ved hjelp av HPLC _____	39
2.5.1 Utstyr og kjemikalier _____	39
2.5.2 prøveopparbeidelse før ekstraksjon _____	40
2.5.3 Klargjøring av organiske prøver til HPLC _____	40
2.5.3.1 Utstyr og kjemikalier _____	40
2.5.3.2 Organiske ekstrakt _____	41
2.5.4 Fraksjonering ved hjelp av HPLC _____	42
2.5.4.1 Utstyr og kjemikalier _____	42
2.5.4.2 Organiske ekstrakter _____	42
2.6 Oppløsning av HPLC-fraksjoner til første og andre screening _____	43
2.7 Anticancer screening _____	44
2.7.1 Utstyr, kjemikalier og cellelinje _____	44
2.7.2 Første screening _____	45
2.7.3 Andre screening _____	46
2.8 Refraksjonering (3. screening) _____	47
2.8.1 Utstyr og kjemikalier _____	47
2.8.2 Refraksjonering og 3. Screening _____	47
2.8.3 Oppløsning av fraksjoner _____	49
2.9 MS-analyse _____	49
2.9.1 Utstyr og kjemikalier _____	49
2.9.2 Eksperimentelt _____	49
2.10 Flash kromatografi _____	52
2.10.1 Utstyr og kjemikalier _____	52
2.10.2 Prøveopparbeidelse til Flash kromatografi _____	52
2.10.3 Fordamping av Flash fraksjoner _____	54
2.11 Doserenspons for organisk ekstrakt av M09036-0-L01 og M09038-0-L01 _____	55

3 Resultater	56
3.1 Prøveopparbeidelse og ekstraksjon	56
3.2 Anticancerscreening	57
3.3 Retesting	61
3.4 Refraksjonering	62
3.5 Flash kromatografi og doserespons	64
3.6 MS-analyse	67
4. Diskusjon	73
5. Appendiks	78
6. Referanser	80

Sammendrag

Marin bioprospektering er i hurtig fremmarsj både i Norge og på verdensbasis. Det kan defineres som en formålrettet og systematisk leting etter bestander, bioaktive forbindelser eller gener i marine organismer med sikte på utvikling av et produkt som er kommersielt eller samfunnsmessige viktige. Målet med denne oppgaven er å lete etter forbindelser med anticancereffekt i ekstrakter av tre ulike marine organismer.

Det ble laget både vandige og organiske ekstrakter fra tre ulike marine organismer, *Parastichopus tremulus*, *Metridium senile* og *Halocynthia pyriformis*. Det ble brukt rent vann for vandige ekstraksjoner og diklormetan:metanol (1:1) for organiske ekstraksjoner. Ekstraktene ble fraksjonert på preparativ HPLC og testet for aktivitet mot humane melanoma kreftceller (A2058). Fraksjoner som ga celleoverlevelse på mindre enn 40 % ble definert som aktive, mellom 40-50 % usikre og over 50 % inaktive. Totalt ble det detektert ti fraksjoner med sikker aktivitet og tre med usikker aktivitet fra de tre marine organismene ved screening etter primær fraksjonering. Det meste av bioaktiviteten ble funnet i de organiske fraksjonene. Aktive og usikre fraksjoner fra *P. tremulus* og *H. pyriformis* ble ikke prioritert for videre opprensning og strukturanalyser. Derimot ble de mest aktive fraksjonene fra *M. senile* valgt til videre opprensning og strukturanalyser ved hjelp av ulike massespektrometre som for eksempel LCMS-ESI-TOF, LCMS-ESI-Q, LCMS-ESI-QqQ og LTQ-Orbitrap. Generelt fikk vi svake og relativt få signaler på MS'ene når vi analyserte de aktive fraksjonene, noe som tyder på at prøvene ikke var konsentrerte nok. Vi fant imidlertid ett ion som kunne forklare anticancer effekten i en av de aktive fraksjonene. Det hadde en m/z på 300,2912 på LCMS-ESI-TOF og 300,2896 på LTQ Orbitrap og molekylformelen ble beregnet til å være $C_{18}H_{37}NO_2$. Et søk i databaser over kjente bioaktive forbindelser fra marine organismer med denne molekylformelen ga 6 treff. En av disse, Jaspine B, er beskrevet som en cytotoxisk forbindelse, og tandem MS analyser tyder på at det er denne forbindelsen vi har funnet i vårt ekstrakt.

Summary

Marine bioprospecting is under great progress in Norway and worldwide and is defined as the systematic search for valuable compounds in marine organism, bioactive substance and genetic material from marine sources. The aim is development of product that is of commercial or social importance. The main aim of this master thesis has been to investigate and locate a substance which has anticancer effect.

There has been extracted aqueous and organic extract from three marine organism, *Parastichopus tremulus*, *Metridium senile* and *Halocynthia pyriformis*. Purified water has been used for the aqueous extract and dichloromethane: methanol (1:1) for organic extraction. The extracts were fractionated using preparative HPLC and tested for anticancer activity against human melanoma cancer cells. The fractions where cell survival was less than 40 % were defined as active. Between the values 40-50 % the fractions were considered uncertain and values above 50 % were defined as inactive. It has been detected totally ten fractions with sure activity and three with uncertain activity from all the marine organisms after screening the primary fractions. Almost all the activity found was in the organic fractions. Active and uncertain fractions from *P. tremulus* and *H. pyriformis* were not prioritized for further purification and structure analysis. However the active fractions from *M. Senile* have been chosen for further purification and structure analysis like LCMS-ESI-TOF, LCMS-ESI-Q, LCMS-ESI-QqQ and LTQ-Orbitrap.

The results showed few ions with corresponding adducts in positive and negative mode. It has been noted that some of the chromatograms changed for each time the active fractions were analyzed. We found however one ion which may explain the anticancer effect. This had a m/z value of 300.2912 on LCMS-ESI-TOF and 300.2896 on LTQ-Orbitrap and molecular formula was calculated to be $C_{18}H_{37}NO_2$. Searches in database using this molecular formula gave 6 candidates. One of them, Jaspine B, has cytotoxic properties and tandem MS analyses suggest that this was the substance that was found in this thesis.

Forkortelser

A2058 celler	Melanoma hudkreftcelle
ACN	Acetonitril
APCI	Atmosfæretrykk-kjemisk-ionisering)
APPI	Atmosfæretrykk-foto-ionisering
AQOS	Aques one solution
BPI	Base Peak Index
Cl/ml	Antall celler/ml
DCM	Diklormetan
D-MEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMSO	Dimetyl sulfoksid
ESI	Elektrosprayionisering
FA	Formic acid; Maursyre
FBS	Fetalt bovint serum
GC	Gasskromatografi
HPLC	High performance liquid chromatography
<i>m/z</i>	Masse over ladning forhold
MeOH	Metanol
MS	Massespektrometri
MTT	2H-Tetrazolium,2-(4,5-dimetyl-2-tiazolyl)-3,5-difenyl-,bromid
M09036	<i>Metridium senile</i>
M09037	<i>Parastichopus tremulus</i>
M09038	<i>Halocynthia pyriformis</i>
NCI	National Cancer Institute
OD	Optical density; optisk tetthet
PBS	Phosphate buffered saline
RPMI	Rosell Park Memorial Institute medium
SPE	Solid Phase Extraction
TOF	Time of flight
UV	Ultrafiolett
UPLC	Ultra performance liquid chromatography

Liste over figurer

Figur 1- *Parastichopus tremulus* (foto: Robert A.Johansen, Marbank)

Figur 2- *Metridium Senile* (foto: Sten-R. Birkely, Marbank)

Figur 3- *Halocynthia pyriformis* (foto: Sten-R. Birkely, Marbank)

Figur 4- Prøveflyt fra ekstraksjon til MS-analyse for alle de tre artene.

Figur 5- Skjematisk oppbygging av HPLC (inspirert av Einar Jensen)

Figur 6- Skjematisk fremstilling av massespektrometer.

Figur 7- Skjematisk fremstilling av de ulike ionekildene (inspirert av

<http://www72.homepage.villanova.edu/frederick.vogt/ppt/2008/MS1.ppt#386,26,Comparison of Ionization Methods>)

Figur 8- Forenklet skjematisk fremstilling av ESI (trykket med tillatelse av Terje Vasskog [44]).

Figur 9- Skjematisk fremstilling av TOF-MS (www.waters.com).

Figur 10- Forenklet skjematisk fremstilling av ESI og MSMS massespektrometer og trippelkvadrupol (trykket med tillatelse av Kristian L. Forsberg [39])

Figur 11- Skisse av Orbitrap masseanalysator. Figuren er modifisert etter en figur av brukeren Gbdivers på Wikimedia Commons.

Figur 12- Oppsett til analysering av HPLC fraksjoner 1-20.

Figur 13- Oppsett til analysering av HPLC fraksjoner 21-40.

Figur 14- Oppsett til 2. screening, ufortynnet, 1:2 og 1:4 fortynninger av fraksjoner.

Figur 15- SNAP kolonne med både pakkemateriale og prøve.

Figur 16- Plateoppsett for organiske ekstrakter fra flash.

Figur 17- Celleoverlevelse etter eksponering av M09036-0-L01 og M09036-0-W01 (første screening), celleoverlevelse under 40 % indikerer aktive fraksjoner. Fraksjon 25-27 fra organiske og 38 fra vandige M09036 ble definert som aktive.

Figur 18- Celleoverlevelse etter eksponering av M09037-0-L01 og M09037-0-W01 (første screening), celleoverlevelse under 40 % indikerer aktive fraksjoner. Fraksjon 12 og 21 fra organiske og 3 fra vandige ble definert som usikre.

Figur 19- Celleoverlevelse etter eksponering av M09038-0-L01 og M09038-0-W01 (første screening), celleoverlevelse under 40 % indikerer aktive fraksjoner. Fraksjon 24-27 og 33 fra organiske definert som aktive fraksjoner, mens fraksjon 3 fra vandige er definert som usikker.

Figur 20- UV kromatogram (200-600 nm) av de organiske ekstraktene fra første fraksjonering av M09036-0-L01 (nederst), M09037-0-L01 (midten) og M09038-0-L01 (øverst).

Figur 21- UV kromatogram (200-600 nm) av de vandige ekstraktene fra første fraksjonering av M09036-0-W01 (nederst), M09037-0-W01 (midten) og M09038-0-W01 (øverst).

Figur 22- Grafisk fremstilling av retesting av fraksjon 25,26 og 27 fra M09036-0-L01, fraksjon 38 fra M09036-0-W01 og fraksjon 12,21 og 26 fra M09037-0-L01.

Figur 23- Grafisk fremstilling av de ulike fraksjonene som viste at de mister sin aktivitet under fortytning. Fraksjon 24-27 og 33 fra M09038-0-L01 og fraksjon fra 3 M09038-0-W01.

Figur 24- Celleoverlevelse i de 40 fraksjonene ved refraksjonering av M09036-0-L01 (25,26 og 27), hvor fraksjon 2,3,4 og 18 viser celleoverlevelse på under 40 %.

Figur 25- Celleoverlevelse i de 40 fraksjonene ved refraksjonering av M09036-0-W01 (38), hvor ingen av fraksjonene viste anticanceraktivitet.

Figur 26- Grafisk fremstilling av Flash fraksjoner med ulik fortytning, % overlevelse under 40 viser anticancereffekt.

Figur 27- Grafisk fremstilling av M09036-0-L01, 14-15 og 16 fra Flash prøver. % overlevelse under 40 viser anticanceraktivitet i brønn nummer 17-34.

Figur 28- Viser dose respons til råekstraktet av M09036-0-L01, % overlevelse under 40 % viser anticanceraktivitet.

Figur 29- Viser dose respons til råekstraktet av M09038-0-L01, % overlevelse under 40 % viser anticanceraktivitet.

Figur 30- Celleoverlevelse i de 40 fraksjonene da A2058 celler ble eksponert for ny primær fraksjoner av M09036-0-L01, celleoverlevelse under 40 % indikerer aktive fraksjoner.

Figur 31- Kromatogram av fraksjon 32 fra M09036-0-L01

Figur 32- Massespektret av fraksjon 32 fra M09036-0-L01 ved LCMS-ESI-TOF som viser molekylionet 300,2912 amu ved positiv modus

Figur 33- Massespekter av fraksjon 32 fra M09036-0-L01 ved LCMS-ESI-TOF som viser adduktene til 300,2912 amu ved negativ modus.

Figur 34- Viser struktur til Jaspine B.

Figur 35- MSMS-spekter av m/z 300.2896 fra M09036-0-L01 ved LTQ Orbitrap som viser molekylionet 300,2896 amu.

Figur 36- Kromatogram av 300 amu i M09036-0-L01-32.

Figur 37- Massespektret viser et signal av m/z 300 for M09036-0-L01-32 da den ble analysert på LCMS-ESI-Q.

Figur 38- Viser struktur til Jaspine B.

Liste over tabeller

Tabell 1- Marine organismer og prøveidentifikasjonsnummer.

Tabell 2- Oversikt over mengde vandige ekstrakter

Tabell 3- Mobilfasegradienten ved fraksjonering av vandige ekstrakter.

Tabell 4- Oversikt over mengde organiske ekstrakter.

Tabell 5- Mobilfasegradienten ved fraksjonering av organiske ekstrakter.

Tabell 6- Sammensetning av mobilfase A og B for optimalisering av separasjon av vandige fraksjoner.

Tabell 7- Sammensetning av mobilfase A og B for optimalisering av separasjon av organiske fraksjoner.

Tabell 8- Mobilfasegradienten som ble brukt ved LCMS-ESI-TOF.

Tabell 9- Mobilfasegradienten som ble brukt ved LCMS-ESI-Q.

Tabell 10- Mobilfasegradienten som ble brukt ved LCMS-ESI-Q

Tabell 11- Mobilfasegradienten som ble brukt ved LTQ Orbitrap.

Tabell 12- Vilkår for MS-analyse av fraksjoner med anticancereffekt.

Tabell 13- Step elution som ble benyttet under Flashkromatografi.

Tabell 14- Mobilfasegradienten ved fraksjonering av organiske ekstrakter.

Tabell 15- Oversikt over våtvekt, tørrvekt og % vann.

Tabell 16- Oversikt over mengde organiske og vandige prøver

Tabell 17- Viser marine organismer og fraksjoner som ble valgt til retesting til figur 22.

Tabell 18- Viser marine organismer og fraksjoner som ble valgt til retesting til figur 23.

1 Innledning

1.1 Marin Bioprospektering

Marin bioprospektering handler om å utforske egenskapene til marine organismer. Med andre ord er det en formålsrettet og systematisk leting etter bestanddeler, bioaktive forbindelser eller gener i marine organismer med sikte på utvikling av et produkt som er kommersielt eller samfunnsmessig viktige [1]. Sluttproduktet kan være et rensset molekyl med bioaktivitet som produseres biologisk eller syntetisk.

Norge har en lang historie for å utnytte marine ressurser, og har satset på å utvikle kompetanse innen den marine og maritime sektor. I de store havområdene som tilhører Norge er det trolig over 10 000 forskjellige arter av planter og dyr, og de fleste av disse er ikke undersøkt med hensyn til kommersiell utnyttelse. Kyst og havområdene rundt Nord-Norge er derfor et rikt skattkammer som gir tilgang til ulike arktiske marine organismer. Samtidig har landsdelen også miljø med høy kompetanse innen innsamling og klassifisering av disse organismene, og grupper innen bioteknologi som studerer de ulike aspektene ved de bioaktive forbindelsene som disse organismene måtte produsere. Tradisjonelt har man benyttet landjorda som utgangspunkt for leting etter nye bioaktive stoffer, men i seinere tid har man blitt mer interessert i marine organismer som kilder til nye bioaktive forbindelser. Havet byr på store muligheter innen bioprospektering fordi livet i havet er mangelfoldig og annerledes enn på land. Det finnes organismer som lever under ekstreme forhold med tanke på for eksempel temperatur, surstoff og lys [2]. Alle disse eksterne faktorene er med på å påvirke organismen og fører til at de kanskje kan produsere molekyler med helt andre egenskaper enn terrestriske organismer. Det å lete etter farmakologisk aktive stoffer i komplekse ekstrakter fra marine organismer kan sammenlignes med å lete etter nåla i høystakken [3]. Det er ikke lett å analysere hvilke forbindelser som finnes i marine ekstrakt på grunn av at noen marine organismer produserer stoffer med ønsket farmakologisk effekt i ekstremt små mengder. Dermed kreves det mye arbeid og tid for å oppdage eventuelle bioaktive forbindelser. I utgangspunktet er ekstraktene ikke rene og derfor må de renses i flere omganger for å få til en semi-ren blanding. Det kan kanskje føre til tap av bioaktive forbindelser under prøveopparbeidelsen. Screening av samme marine organisme fanget på ulike lokaliteter kan gi ulike forbindelser eller svært ulik mengde av samme forbindelse i ekstraktet. Dette kan blant annet forklares av at de marine organismene har forskjellig kjemisk fenotype [3].

Noen av de forbindelsene som finnes i marine organismer har stor fremtid på det farmasøytiske markedet, men mangel på en garantert tilførsel kan hemme utviklingsprosessen. Det finnes flere metoder som kan benyttes for å garantere en tilstrekkelig tilførsel av bioaktive forbindelser fra marine kilder. Disse inkluderer innsamling, akvakultur, vevskultur, symbiont kultur, kjemisk syntese og molekylærbiologiske tilnærminger. Det finnes likevel problemer som er relatert til disse metodene. Innsamling i stor skala er ofte risikabelt med tanke på økologiske aspekter, og at organismen, som nevnt ovenfor, ikke produserer store nok mengder av ønsket stoff [3].

I følge evolusjonsteorien ble livet utviklet i havet for flere milliarder år siden. Det er estimert at bare en liten andel av havets rike er blitt undersøkt, og mye står for tur. Det kan tenkes at kjemiske ulikheter som finnes hos marine organismer gjenspeiler biologisk ulikhet.

Over 60 % av nåværende legemiddel kan spores tilbake til naturen. Likevel er marine organismer svært lite utnyttet i den forstand. Etter hvert som innsamlingsredskaper har utviklet seg har tilgangen til havets resurser blitt betydelig bedre. Forskningen på marine bioaktive forbindelser har nå pågått i omlag 40 år, og nå er over 15 000 ulike forbindelser beskrevet i litteraturen [3].

Utviklingen innen marin bioprospektering, som startet tidlig på 1960-tallet, har vært enorm. Det er flere marine naturstoffer som nå er i sluttstadiet av kliniske forsøk eller har nådd det farmasøytiske markedet. Det første anticancer produktet fra marine kilder som gikk inn i kliniske studier var didemnin B, som er isolert fra tunikaten *Trididemnum solidum* [4]. Bioaktive metabolitter som isoleres fra marine organismer er for eksempel steroider, terpenoider, isoprenoider, nonisoprenoider og nitrogen heterosykliske metabolitter. Rekkevidden av terapeutiske egenskaper til naturstoffer som kan testes for biologisk aktivitet har utviklet seg ganske raskt. Dette på grunn av det enorme engasjementet til forskere på dette feltet. En av de store utfordringene ved utvikling av marine legemidler er at det ofte er begrenset biomasse tilgjengelig for kjemisk karakterisering og biologiske tester [5].

Kreft er fortsatt en av de vanligste årsakene til dødsfall i Europa og Nord Amerika [6]. I likhet med mange andre sykdommer finnes det ikke en kurativ behandlingsterapi av kreft. Oppdagelse og utvikling av nye og aktive kjemoterapeutiske middel er i høy grad nødvendig. Om lag 65 % av anticancer legemidler som er tilgjengelig på markedet i Europa og Amerika har sitt opphav i naturen (mikrobielt avledet eller ekstrahert fra planter). Gjennom

evolusjonen har mange organismer utviklet overlevelsesmekanismer for å beskytte seg mot angrep fra rovdyr. En av disse mekanismene er evnen til å produsere toksiske komponenter med potensiell bioaktivitet som f. eks. cytostatika, hvor utfordringen er bl.a. anskaffelse av disse organismene i havet [6].

1.2 Marbank og Marbio

Marbank er en marin biobank ved Universitetet i Tromsø. Deres oppgave er å samle inn, artsbestemme, og lage ekstrakter av marine organismer. Planter og dyr blir oftest samlet inn langs kysten av Nord-Norge og i Barentshavet, og Marbank sørger for at ekstrakter av de innsamlede organismene er tilgjengelig for ulike forskningsgrupper. I utgangspunktet inngår alle typer marine dyr og planter i Marbank sin samling, men hovedfokus i bioprospekteringssammenheng er lagt på organismer som lever på havbunnen (bentiske organismer).

Marbio nyttiggjør seg det mangfoldet av marint biologiske materiale som er samlet inn og ekstrahert av Marbank. Marbio identifiserer forbindelser fra de marine ekstraktene som påvirker immunsystemet, som kan bekjempe bakterier, virus og kreftceller, forbindelser som kan motvirke effekter av diabetes type II, samt forbindelser med antioksidative egenskaper. De marine ekstraktene blir fraksjonert og delvis renset før de testes for bioaktivitet i robotiserte systemer (HTS, high-throughput screening). Fraksjonene med aktivitet identifiseres og det videre arbeidet består i å forsøke å karakterisere og strukturoppklare de aktive forbindelsene.

1.3 Parastichopus tremulus

Parastichopus tremulus (se figur 1) tilhører rekken Echinodermata (pigghuder) og den omfatter blant annet klassene Asteroidea (sjøstjerner), Holothuroidea (sjøpølse), Ophiuroidea (slangestjerner) og Echinoidea (kråkeboller). Sjøpølsene (klasse Holothuroidea) har tre underklasser, og en av dem (Aspidochirotea) inneholder den sediment-spisende rekken Aspidochirotida som inkluderer familiene Holothuriidae og Stichopodidae. Familiene finnes på grunt vann i tempererte områder. Den andre familien suspensjon-spisende Dendrochirotida (underklasse Dendrochirotea) finnes også i tempererte områder, men den blir en dominerende del av faunaen kun i kjølig vann. Begge disse underklassene (Aspidochirotea og Dendrochirotea) har vannlunger, mens den tredje (Apodacea) er uten vannlunger [7-9].

Sjøpølser representerer i dag en uutnyttet ressurs her i landet, og når de blir tatt som bifangst ved for eksempel bunntråling blir de dumpet på havet. Felles for sjøpølsene er at de har en pølseformet kropp og tykk hud med kalkplater i huden [10]. Sjøpølsene kan være opptil 50 cm lange og 10 cm brede. Kroppens overflate kan være slimete. Sjøpølsene er utbredt langs hele norskekysten fra Varangerfjorden til Oslofjorden, i Skagerrak, og langs vestkysten av Sverige så langt sør som Kullen og i farvannene sør for Island. Sjøpølsene kan også observeres vestover i Atlanteren fra vestkysten av de Britiske øyer til Kanariøyene [11].

Langs norskekysten finnes det ca 31 ulike arter [8], noe som er mye mindre enn det som finnes på verdensbasis. Sjøpølsene lever på bløt bunn på 20-1200 meters dypt der solstråler ikke er merkbare [12]. Sjøpølsen *P. tremulus* (rødpølse), som ble brukt i dette studiet, er vanlig i norsk farvann og på bløtbunn i fjordene langs Norgeskysten.



Figur 1: *Parastichopus tremulus* (foto: Robert A. Johansen, Marbank)

1.3.1 Bioaktive forbindelser fra Echinodermata

Som mange andre marine organismer er også pigghudene (Echinodermata) en viktig kilde til bioaktive komponenter som kan ha medisinsk anvendelse. Det er isolert en del bioaktive forbindelse tidligere, bl.a. triterpen glykosid [13, 14], holostan [15], asterosaponiner som er et sterol derivat [16], fettalkoholer, holokinin som er homolog med bradykinin [17], og lectin [7]. Siden det finnes ulike typer sjøpølser ulike steder i havet, vil det være naturlig å ha ulike typer bioaktive stoffer i dem. De har et slags immunsystem som benyttes mot ulike parasitter og bakterier i havet, noe som er av interesse innen marin bioprospektering.

1.4 *Metridium senile*

Metridium senile tilhører rekken Cnidaria (Nesledyr) som er en stor og mangfoldig dyrerekke. I denne rekken hører manetene, sjøanemonene og korallene hjemme. *M. senile* (Sjønellik, se figur 2) tilhører klassen Anthozoa (koralldyr) som er en stor klasse under Nesledyr og er den største av sjøanemonene med sin høyde på opptil 500 mm. Sjønelliken langs norskekysten finnes i to varianter, en som lever på grunt vann, og en som lever på dypere vann ned til 100 meter. Det som er karakteristisk for utseende er det store antallet tynne, korte tentakler som gir arten et dunbløtt uttrykk. Kroppsveggen er helt glatt. I motsetning til de andre sjøanemonene lever sjønellingen av filtrert plankton [8, 10]. Den finnes vanligvis i tre ulike farger, oransje, hvit og guloransje.



Figur 2: *Metridium Senile* (foto: Sten-R. Birkely, Marbank)

1.4.1 Bioaktive forbindelser fra Cnidaria

Det finnes en del studier som viser at nesledyr inneholder bioaktive stoffer med anticancereffekt [18, 19]. Det forventes derfor at man finner treff på anticancer aktivitet under screening. Bioaktive forbindelser som er blitt funnet så langt i denne rekken er bl.a. metridiolysin [20], Sarcodictyin A [21], Scabrolide E [21] og Sarophytol A [22].

1.5 *Halocynthia pyriformis* (pæresekkdyr)

Halocynthia pyriformis (pæresekkdyr, se figur 3) hører til rekke Chordata (Ryggstrengdyr) som inneholder alle virveldyr. Ryggstrengdyr deles inn i tre underrekker; Urochordata (tunicata, på norsk kappedyr), Cephalochordata (lansettfisker) og Vertebrata (virveldyr) [8]. Sekkdyrene er altså relativt nær beslektet med mennesket. Pæresekkdyr er en vakker og stor, tønneformet solitær sjøpung. Høyden kan bli opp til 100 mm og arten opptrer på grunt vann. De finnes i ulike farger, enkelte av dem kan være helt hvite, mens den vanlige fargen er rødbrun med gulaktige striper. Sjøpungen finnes både i områder med sterk strøm og områder med mer stillestående vann. I Norge finnes de i området rundt Bodø. Sjøpungene er filter spisere, dvs. at vann blir trukket inn gjennom et sugerør, filtrert, og ført ut gjennom utblåsningsrøret.



Figur 3: *Halocynthia pyriformis* (foto: Sten-R. Birkely, Marbank)

1.5.1 Bioaktive forbindelser fra Chordata

Bioaktive forbindelser fra Chordata har vist anticancereffekt. Tunicata er en rik kilde til cytotoksiske naturprodukter. Den første anticancer forbindelsen fra en marin invertebrat, Trabectedin, ble godkjent i Europa i 2007 for behandling av bløtvevskreft [23]. Andre forbindelser som er avledet fra klasse tunicata er Aplidin, som for øyeblikket er under fase II klinisk utprøving [23], Didemnin B [21], og Dolastin 10 [21].

1.6 Målet med oppgaven

Målet med denne oppgaven var å lete etter forbindelser med anticancereffekt i ekstrakter av *P. tremulus*, *H. pyriformis* og *M. senile*. Det ble utført to ekstraksjoner, den ene med vann og den andre med et organisk løsningsmiddel. Deretter ble det forsøkt å rense og identifisere ukjente og kjente bioaktive forbindelser ved å søke i databaser som inneholder oversikt over slike forbindelser. De ukjente bioaktive forbindelsene ble karakterisert ved hjelp av MS.

1.7 Bakgrunn for metoder

Metodene som benyttes for ekstraksjon, opprensning og anticancer screening er basert på metoder som benyttes av National Cancer Institute (NCI, USA) i deres forskning for anticancer legemidler.

Marbank og Marbio har bygget opp et bibliotek av metoder for prøveopparbeidelse, ekstraksjon, fraksjonering og biologisk testing av marine organismer. Formålet er å muliggjøre oppdagelse av nye molekyler uansett størrelse eller sammensetning. Frossent prøvemateriale tas ut og en mengde av prøvemateriale blir veid på vekt. Deretter blir de kuttet i små terninger. Oppkuttete prøver som skal frysetørkes må ha størst mulig overflate og skal ikke stå i romtemperatur mer enn nødvendig med tanke på å unngå nedbrytning av ustabile forbindelser. Materiale blir plassert i glasskål og dekket med aluminiumsfolie med hull i.

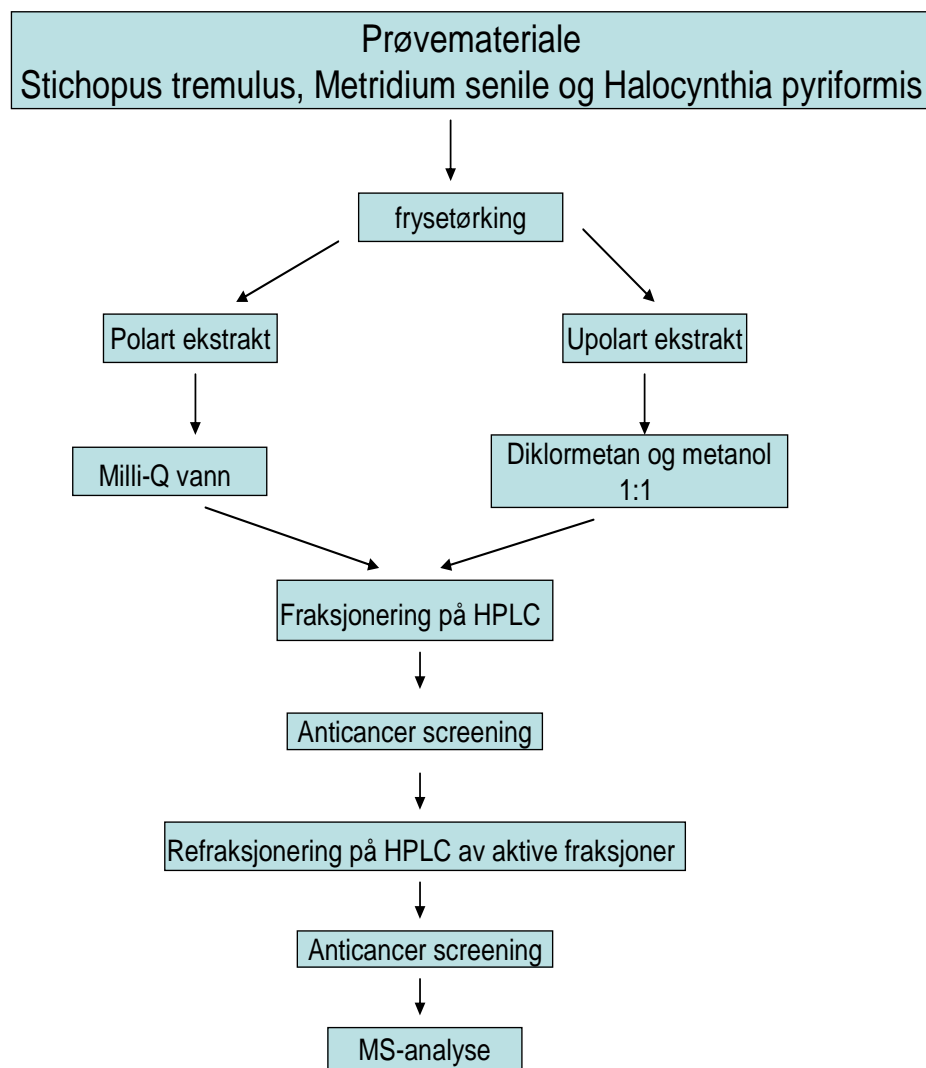
Etter frysetørring blir prøven malt i kvern og samlet i duran flaske for veiing. Ekstraksjonen startes med å blande materiale i vann for å trekke ut de polare forbindelsene. De upolare stoffene blander seg ikke i vannfasen og dette er en enkel metode for å skille polare og upolare forbindelser fra hverandre. Pelleten som skiller seg ut fra vannfasen blir ekstrahert med et organisk løsningsmiddel. Både vandig og organisk ekstrakt blir så fraksjonert ved hjelp av preparativ væskechromatografi (HPLC) i 40 fraksjoner før screening. De ulike fraksjonene blir senere screenet for anticancer effekt (se figur 4).

I anticancerscreening brukes celleoverlevelse som en målestokk for anticancer effektivitet. Kreftceller fra ulike typer cellelinjer inkuberes med fraksjoner fra marine ekstrakter, både vandige og organiske, og en undersøker hvor stor del av de humane kreftcellene som overlever. I dette oppsettet anses en fraksjon som aktiv først når celleoverlevelsen er under 40 %. Celleoverlevelse måles ved å tilsette tetrazolium, noe som metabolsk aktive celler omdanner til et mørkeblått stoff. Blåfargen vil dermed være avhengig av mengden celler som har overlevd.

I denne oppgaven ble alle fraksjoner testet mot en cellelinje av typen melanoma (hudkreft). Det er en form for kreft som begynner i melanocytene, celler som danner pigmentet melanin. Det kan begynne i en føflekk, men kan også begynne i annet pigmentert vev, for eksempel øyet eller tarmen.

Fraksjoner som viser biologisk aktivitet mot kreftceller renses videre ved bruk av HPLC før det kjøres en ny runde screening. Fraksjonene med bekreftet biologisk aktivitet etter andre

rensetrinn analyseres med massespektrometri (MS). Analyttene blir ionisert ved hjelp av elektropray ionisering, og nøyaktig masse med høy oppløsning bestemmes for å kunne beregne elementsammensetning for de aktive komponentene. Deretter kan de sammenlignes mot databaser for å se om de aktuelle molekylene allerede er kjente. Prosessen med å eliminere og identifisere kjente bioaktive forbindelser kalles dereplikering. Hvis forbindelsen ikke finnes i databaser, er det interessant å gå videre og om mulig oppklare strukturen fullstendig.



Figur 4: Prøveflyt fra ekstraksjon til MS-analyse for alle de tre artene.

1.8 Ekstraksjon

Ekstraksjonen som ble benyttet i denne oppgaven er en prosess der en eller flere komponenter i et fast stoff diffunderer over i vann eller en organisk væske. I oppgaven ble det brukt ulike ekstraksjonsløsninger for å trekke ulike forbindelser ut av det frysetørkede prøvematerialet. Polare vannløselige molekyler ble ekstrahert med vann, mens upolare fettløselige forbindelser ble ekstrahert i diklormetan:metanol.

Frysetørket prøvemateriale inneholder komplekse blandinger med svært mange ulike forbindelser. Det er derfor viktig at man ikke velger en for selektiv ekstraksjon og dermed risikerer å miste visse aktive forbindelser. En måte å unngå det på er å foreta en vandig ekstraksjon av prøven før man begynner med organisk ekstraksjon av det samme materialet. Det ble brukt rent vann for vandige ekstraksjoner og diklormetan:metanol (1:1) for organiske ekstrakter.

De marine prøvene ble frysetørket og homogenisert før ekstraksjon for å bedre tilgjengeligheten til de vandige og organiske komponentene i materialet for ekstraksjonsløsningene. Tanken bak det er at noen av de vandige biologiske komponentene er omringet av lipofile lag eller befinner seg i lipofile bilayer. En annen mulighet er at man kan blande vann med et organisk løsemiddel som for eksempel metanol for å løse lipofile lag i membraner og samtidig ekstrahere vandige forbindelser ut i løsningen.

1.9 Anticancer og cellelinjer

Det er ikke noe klar grense på hvilke aldersgrupper eller hvilke kjønn som rammes mest av kreft, selv om forekomsten kan forbindes med økende alder. Det finnes ulikheter mellom normale og kreftceller i cellestruktur, energiomsetning, blodkar, vekstfaktor og funksjoner, likevel vil det være vanskelig å målrette behandling mot kreftceller uten at normalceller blir påvirket ved eventuelle medikamentell behandling. Kreft skyldes vanligvis en ukontrollert celledeling hvor som helst i kroppen. Normalt vil celler som utsettes for kjemisk eller fysiologisk skade prøve å reparere den, men hvis skaden er omfattende, vil cellen iverksette apoptose (programmert celledød). Hvis den skadde cellen ikke går i apoptose, vil det kunne oppstå unormal celledeling og utvikling av kreft.

Det registreres om lag 1000 nye tilfeller av malignt melanom per år i Norge. Immunterapi av kreft er attraktivt fordi behandlingsformen kan utnytte immunsystemets spesifisitet. De fleste krefttyper kan bare helbredes i lokalt stadium, og derfor er det et sterkt ønske om behandlingsformer med systemisk rekkevidde (www.tidsskriftet.no, 20 feb 2010).

Medikamentell behandling avgjøres etter hvilken type kreft det er snakk om, og cytostatisk kjemoterapi eller endokrin behandling, og i noen enkelte tilfeller immunmodulerende terapi (www.legemiddelhandboka.no, 16 mai 2010). Målet er å fjerne kreftceller fullstendig uten å skade normale celler. Brystkreft er den mest utbredte krefttypen som diagnostiseres hos kvinner i USA etter lungekreft. Melanoma ligger på femte plass hos men og på sjete plass hos kvinner når det gjelder kreft generelt, det utgjør 4 % av all slags kreft [24]. Kutan melanoma er en av de mest aggressive formene for hudkreft med høyt metastase potensial. Samtidig viser den resistans mot strålebehandling, immunterapi og kjemoterapi [25, 26]. Melanoma er en ondartet svulst på melanocytene som finnes hovedsakelig i huden, men også i tarm og øyet. Melanocytene er normalt tilstede i huden og er ansvarlig for produksjon av melanin, pigmentet som gir huden sin naturlige farge. Når huden er eksponert for sol, vil melanocytter produsere mer melanin som beskytter huden mot celledelingskade. Patofysiologien til melanoma er fortsatt ikke helt klarlagt, men det er flere teorier som kan tyde på at UV-stråling kan ha en betydning, samtidig som det er flere faktorer som kan ha noe å si (for eksempel endokrinsystemet, tobakk, alder osv). UV-B stråling har vært mest knyttet til hudkreft og er ansvarlig for erythematous reaksjon i huden etter overdreven soleksposering. UV-A stråling har vist seg å ha en effekt på immunsystemet som kan spille en rolle i utvikling av hudkreft [27].

Det er stor interesse for å finne bioaktive stoffer fra marine organismer med anticancer effekt ettersom de ulike medisinene som brukes ved behandling av kreft har bivirkninger som kan være problematisk for den enkelte. Cytostatika skal i utgangspunktet virke på celler i celledelingssyklus, men den skiller ikke på maligne og normale celler. Dette gjør at forskere satser på å finne nye cytostatika (selektive) fra naturen, både terrestrisk og marint, for behandling av kreft.

Ulike aktive anticancerforbindelser er avledet fra planter og terrestriske organismer. Isolasjon av C-nukleosid fra svampen *Cryptotheca crypta* for fire tiår siden ga grunnlaget for videre syntese av cytrabine, som er det første marint avledete anticancermiddelet til klinisk bruk. I

løpet av det siste tiåret er det blitt oppdaget flere nye anticancerforbindelser som er avledet fra marine kilder og som er i prekliniske og kliniske studier. Dette feltet har utviklet seg markant som følge av forbedringer i teknologi brukt for prøveinnsamling på dypt vann, ekstraksjon og storskala produksjon i oppdrettsnæring og innen kjemisk syntese [28].

Nesten 60 % av legemidler brukt for behandling av kreft har sitt opphav i naturen. Vinkristine, irinotecan, etoposide, taxanes og camptothecin er eksempler på komponenter med planter som kilder. Dactinomycin, anthracycline, mitomycin og bleomycin er anticancer middel med opphav fra mikrobielle kilder. Marine økosystem representerer 95 % av biosfæren, og alle utenom én av de 33 phyla er representert i akvatisk miljø [4]. Det meste av virvelløse marine dyr har et primitivt immunsystem og produsere toksiske kjemikalier som en form for beskyttelse. Mange av disse komponentene virker som regulatorer av spesifikke biologiske funksjoner, og noen av disse komponentene har biologisk aktivitet på grunn av deres spesifikke interaksjon med reseptorer og enzymer[29]. De anses derfor å være potensielle kilder til nye anticancer forbindelser.

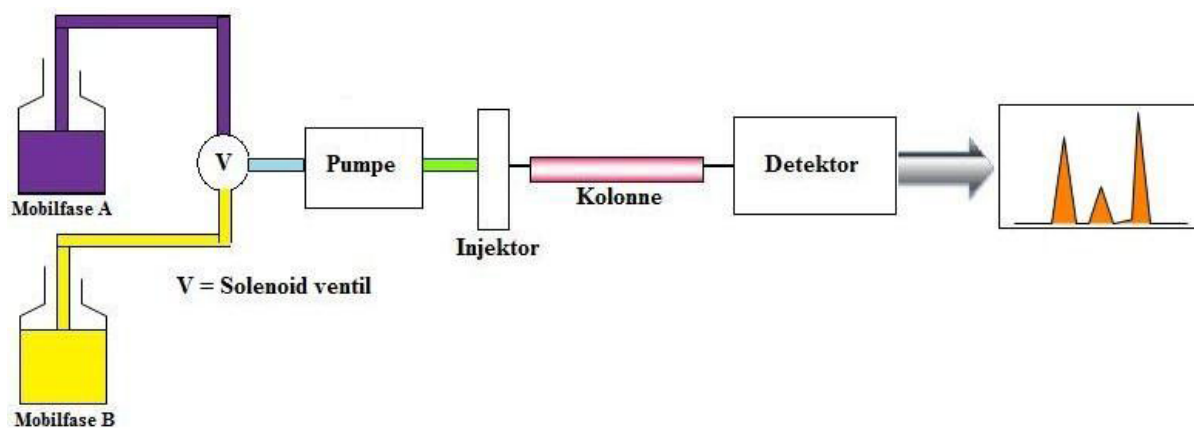
1.9.1 Anticancerscreening

Melanoma celle (A2058) ble eksponert for HPLC-fraksjoner fra de tre marine organismene for å se om noen av fraksjonene ga effekt. Det ble brukt en metode som kalles MTT-assay (2H-Tetrazolium, 2-(4,5-dimetyl-2-3,5-difenyl-, bromide). Anticancer effekt måles ved celleoverlevelse etter eksponering av de ulike testsubstansene. MTT er en tetrazolium forbindelse som blir redusert til et farget formazanprodukt som er løselig over cellemembran. Celler som er metabolisk aktive, levende celler, reduserer tetrazolium (gul forbindelse) til et formazanprodukt (mørkeblått). Antall overlevende celler er direkte proporsjonalt med nivået av formazanproduktet som dannes. Deretter kan man lese av fargekonsentrasjonen ved hjelp av et spektrofotometer, og fargekonsentrasjonen er direkte avhengig av celleoverlevelsen.

1.10 HPLC teori

Kromatografiske teknikker benyttes for å separere ulike forbindelser i en prøve. Forbindelsene i prøven separeres ved at de fordeler seg mellom en stillestående stasjonær fase og en mobilfase som er i bevegelse. Det finnes blant annet væske- og gass kromatografi for å separere stoffer. Gasskromatografi (GC) er en separasjonsteknikk der mobilfasen er gass. Det er mye brukt i analytisk kjemi og er mest egnet til flyktige og termisk stabile stoffer, eller hvor det kan dannes flyktige, stabile derivater. Polare og store molekyler som for eksempel legemidler, peptider og proteiner kan ikke separeres med GC [30]. Årsaken er blant annet at polare grupper som hydroksylgrupper, fenolgrupper, aminogrupeer og karboksylsyrergrupper nedsetter stoffers flyktighet og forårsaker adsorpsjon til overflater og gir brede topper med haledannelse i kromatografien [30]. Væskrokromatografi er en separasjonsteknikk innen analytisk kjemi som brukes for separasjon av kjemiske komponenter i en væske. Mest utbredt innen dette området er høytrykks væskrokromatografi (HPLC; High Pressure Liquid Chromatography). Navnene HPLC, High Performance Liquid Chromatography, og LC (Liquid Chromatography) brukes ofte om hverandre. Væskrokromatografi er den vanligste metoden til å separere f. eks. legemidler i farmasøytiske preparater og ulike forbindelser fra biologisk materiale. Prinsippet baserer seg på at en mobilfase som er en væske, presses gjennom en kolonne, typisk 5-25 cm lang og 1-5 mm indre diameter, pakket med et materiale som hindrer stoffene i å passere fritt gjennom kolonnen. Stoffene injiseres i strømmen av mobilfase før kolonnen (se figur 5). Etter separasjon på kolonnen blir forbindelsene detektert med en detektor [31]. Den store fordelen ved å bruke HPLC er følsomhet og oppløsning i forhold til andre væskrokromatografiske metoder. I tillegg er analysene raske og det kreves små mengder av analytten.

Polaritet, elektrisk ladning og andre parametere som påvirker analyttens affinitet til stasjonærfasen, og mobil- og stasjonærfasens sammensetning er viktige parametere som benyttes for å separere kjemiske forbindelser i HPLC. Omvendt-fase HPLC er et begrep som beskriver en type kromatografi som baserer seg på bruk av polare mobilfaser, slik som vann, metanol og acetonitril og en upolar (hydrofob) stasjonærfase. Omvendtfase kromatografi benyttes når analytten er relativt upolar, i motsetning til normal fase kromatografi som egner seg best til analytter med polare funksjonelle grupper. I tillegg kan det brukes buffer, syre eller base for å regulere pH. I oppgaven ble det brukt maursyre for å regulere pH i mobilfasen.



Figur 5: Skjematisk oppbygging av en HPLC. Inspirert av Einar Jensen.

Kolonnen har som oppgave å separere ulike stoffer og gi så liten båndspredning av stoffene som mulig når de transporteres gjennom kolonnen av mobilfasen. Stasjonærfasen består ofte av silikapartikler hvor hydrofobe grupper er bundet til silanolgruppene på overflaten. Porøse silikapartikler er de mest vanlige pakkingsmateriale som brukes til HPLC kolonner. Det som gjør silika til et ettertraktet pakkemateriale er at de kan formes i ulike former og størrelse (mikrosfæriske), overflaten kan lett modifiseres ved visse kovalente reaksjoner. De kan bli dannet etter ønsket porestørrelse, de er compatible med de fleste organiske og vandige mobilfaser, og man kan få superrene partikler med nesten nøytral pH på overflaten [32]. Silika-baserte kolonner tåler høyt trykk og brukes ofte til separasjon av lavmolekylære analytter ved hjelp av mobil fase og prøver med en pH på 2 til 8. I pH områder over 8 vil silika løses opp, mens i surt miljø med pH lavere enn 2 kan det skje avspalting av de funksjonelle gruppene. Hvis pH i mobilfasen ligger utenfor 2-8, er det vanlig å bruke modifisert silika eller en polymer stasjonærfase, eksempel polystyren-divinylbensen [33]. Flere nye silikabaserte materialer tåler pH helt opp til 12, som f. eks. Waters Acquity kolonnen som har blitt brukt i denne oppgaven. Silikapartiklene er i denne kolonnen modifisert med etylbroer som gir en bedre pH-stabilitet. Retensjonen på C_{18} -kolonner skyldes hovedsakelig at det skjer en hydrofob interaksjon mellom den upolare forbindelser i prøven og C_{18} kjeden. Retensjonen til analytten vil være større jo større den upolare gruppen er på molekylet. Dette skyldes at det blir en større kontaktflate mellom analytten og C_{18} – liganden [33]. I tillegg til dette så spiller analyttens løselighet i mobilfasen en viktig rolle.

1.11 Ultra performance liquid kromatografi (UPLC)

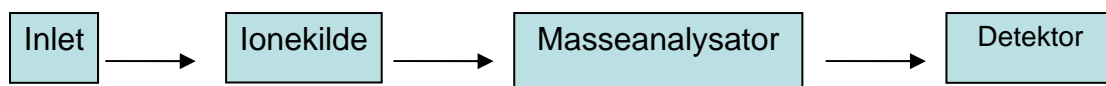
I kromatografiske separasjoner er det vanlig å ofre oppløsning for hastighet. Ved bruk av UPLC øker man oppløsningen betraktelig uten at det går på bekostning av tid, det vil si at man oppnår tilfredsstillende separasjon på kortere tid enn ved bruk av HPLC kolonner. Hovedforskjellen mellom UPLC og HPLC er at pakkematerialets partikler er mindre i likhet med kolonnes indre diameter hos UPLC. Samtidig vil UPLC kolonner gir bedre sensitivitet og separasjon i forhold til standard HPLC teknikk [34, 35].

1.12 Flash kromatografi

Flash kromatografi er en type preparativ væskekromatografi som brukes i separasjon av organiske forbindelser. Flash kromatografi er ikke ansett for å gi oppløsning eller reproduserbarhet som er like god som for HPLC. Det er derimot en teknikk som raskt kan forbedre renheten av større mengder prøver til et akseptabelt nivå [36]. Flash er en modifisert metode av åpen kolonne kromatografi hvor den mobile fasen beveger seg raskere gjennom kolonnen med hjelp av pumper. Dermed vil det være en rask og rimelig teknikk for rensing av organiske forbindelser. Flash kromatografi er relativt lite utbredt sammenlignet med HPLC, noe som skyldes de nevnte svakhetene angående oppløsning og reproduserbarhet, og i tillegg kreves mye tid og en stor mengde mobilfase dersom man har et stort antall prøver. Pakkemateriale som brukes i Flashkolonner må ofte pakkes manuelt, og eksempler på pakkematerialer kan være silika eller polymerer.

1.13 Massespektrometri

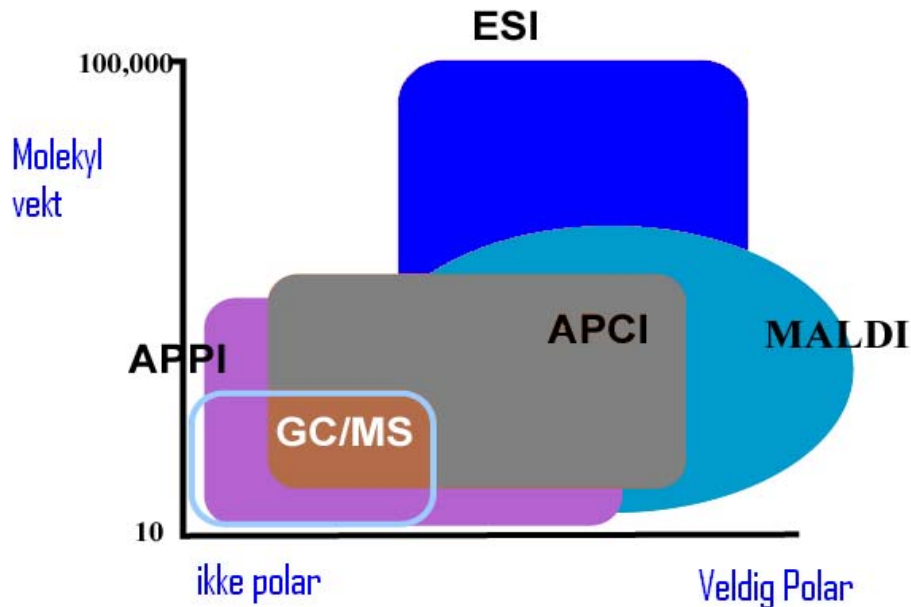
Et massespektrometer (MS) er et instrument som kan måle massen til molekyler eller atomer som er ionisert ved å separere dem etter forholdet mellom masse og ladning. Denne analytiske teknikken gjør det bl.a. mulig å bestemme den kjemiske sammensetningen (molekylformelen) til en kjemisk forbindelse. Instrumentet ble for første gang konstruert i 1912 og var ment til å analysere alt fra små uorganiske molekyler til biologiske makromolekyler, uten noen spesiell massebegrensning [37]. Et massespektrometer har tre viktige moduler, en ionekilde som omdanner molekyler i en prøve til ioner, en masseanalysator som separerer ionene etter masse over ladning ved å bruke magnetiske felt og/eller elektriske felt, og en detektor som registrerer antall av de ulike ionene (se figur 6).



Figur 6: Skjematisk fremstilling av et massespektrometer.

Væskrokromatografi (liquid chromatography, LC) er en separasjonsteknikk som bl.a. benyttes ved analyser av organiske molekyler. Med LC kan man separere et bredt spekter av organiske forbindelser, fra små legemiddelmetabolitter til peptider og proteiner. I denne oppgaven ble det blant annet benyttet en LC-MS, med elektrospRAY ionisering (ESI) og time-of-flight (TOF) masseanalysator. Inlet brukes til å føre prøven inn i massespektrometret. Det er flere eksempler på inlet, som sprøyteinjeksjon og HPLC. John B. Fenn er en amerikansk professor i analytisk kjemi som vant en nobelpris for sitt arbeid innen massespektrometri, spesielt for elektrospRAY-teknikken (ESI) som brukes for å ionisere alle typer biologiske molekyler. John B. Fenn og noen av hans kollegaer demonstrerte for første gang bruken av ESI for å ionisere forbindelser som f. eks. peptider, proteiner, karbohydrater og syrer som f. eks. karboksylsyrer [38]. I ionekilden omdannes nøytrale molekyler til ioner med enten negativ eller positiv ladning, og en får produsert bl.a. molekyllioner (i ESI enten protonerte eller deprotonerte molekyllioner) som er de intakte analyttene i ionisk form. Ioniseringen av molekyllene kan også føre til fragmentering avhengig av energien man tilfører molekyllene under ioniseringen og hvilken ioniseringsteknikk som brukes.

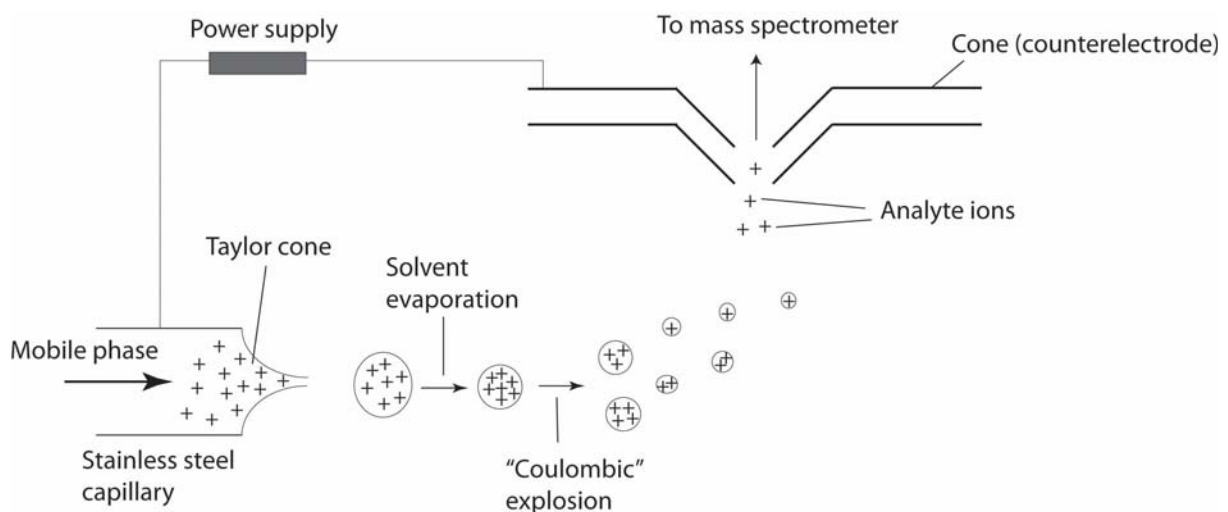
Det finnes flere ionekilder som kan brukes i kombinasjon med HPLC og massespektrometri, og de tre mest vanlige er ESI, APCI (atmosfæretrykk-kjemisk-ionisering) og APPI (atmosfæretrykk-foto-ionisering [39, 40]). Det er ikke lett å vite på forhånd hvilken av de tre ioniseringsteknikkene som vil gi optimal respons for en bestemt substans. Hvilken av de tre som bør velges vil det være avhengig av blant annet molekylvekt og polaritet (se figur 7).



Figur 7: Skjematisk fremstilling av de ulike ionekildene (inspirert av [http://www72.homepage.villanova.edu/frederick.vogt/ppt/2008/MS1.ppt#386,26,Comparison of Ionization Methods](http://www72.homepage.villanova.edu/frederick.vogt/ppt/2008/MS1.ppt#386,26,Comparison%20of%20Ionization%20Methods))

Elektrospray ionisering (ESI) er en atmosfæretrykk ioniseringsteknikk, dvs. at det dannes ioner utenfor vakuumsystemet av massespektrometeret, og det betraktes som en myk ioniseringsteknikk [41]. ESI kan ionisere alt fra små molekyler til store proteiner. Mobilfasen med prøven kommer fra væskekromatografen til ionekilden gjennom et kapillær. Det er en relativ stor spenning på enden av kapillæret (2-6 kV) [42], noe som fører til et sterkt elektrisk felt som får prøveløsningen til å omdannes til en aerosol med ladede dråper. Samtidig får den hjelp til å fordampe av en inert gass, ofte nitrogen, som strømmer nedover på utsiden av kapillæret [38]. Størrelsen på de ladede dråpene blir mindre på grunn av fordamping av mobilfasen forårsaket av varm nitrogengass som passerer på utsiden av kapillæret og tørkegass som kommer fra cone (se figur 8 for plassering av cone). Resultatet er at ladede

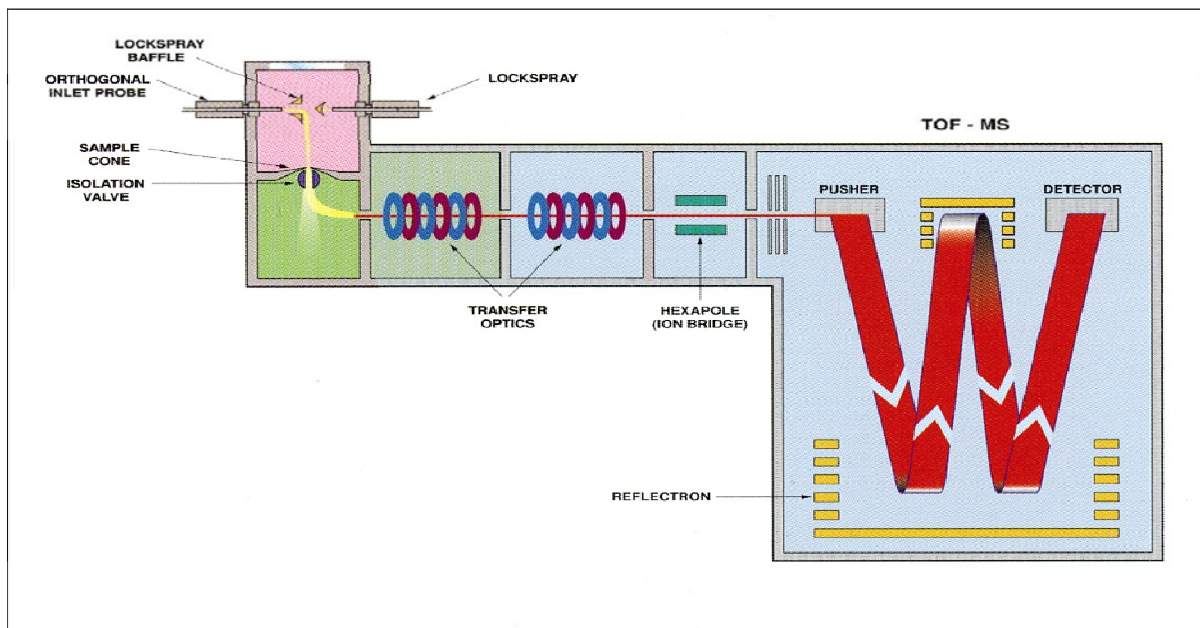
molekyler blir løst fra dråpene og noen av disse går inn i masseanalysatoren [41, 43]. Ionene akselereres fra ionekilden og inn i massefilteret ved hjelp av elektriske felt. I denne delen av instrumentet er det vakuum for å redusere sjansen for kollisjoner mellom ioner og andre molekyler i gassfase. Ionene har ikke nok intern energi og dermed har ikke de nok energi til å fragmentere. Mange av ionene som produseres ved denne metoden kan ha multippel ladning, det gjelder hovedsakelig store molekyler som f. eks proteiner, ellers er de enkelt ladet som i analyttene i denne oppgaven. Ved å produsere multiladete ioner, er elektronspray ionisering en god ioniseringsmetode for å måle nøyaktig masse på ulike forbindelser med høy molekylvekt [40].



Figur 8: Forenklet skjematisk fremstilling av ESI (trykket med tillatelse av Terje Vasskog[44])

Man bruker ulike typer av masseanalysatorer for LC-MS, de vanligste er kvadrupol og TOF. Hver av disse analysatorene har sine fordeler og ulemper, og hvilken man velger er avhengig av krav til analysen. TOF er sannsynligvis det enkleste massefiltret å forklare for massebestemmelse. Det første kommersielle TOF instrumentet ble markedsført av Bendix aksjeselskap i 1950. Deres design er basert på Wiley og McLarens verk som ble publisert i 1955 [45]. Den velhengende egenskapen ved TOF-MS er ekstrem følsomhet, nesten ubegrenset masseområde og høy hastighet på analysene. Ionene blir ført ved hjelp av elektrisk felt fra ionekilden til masseanalysatoren. Dette resulterer i at alle ioner mottar den samme opprinnelige kinetiske energien og dermed vil de bevege seg med forskjellig hastighet

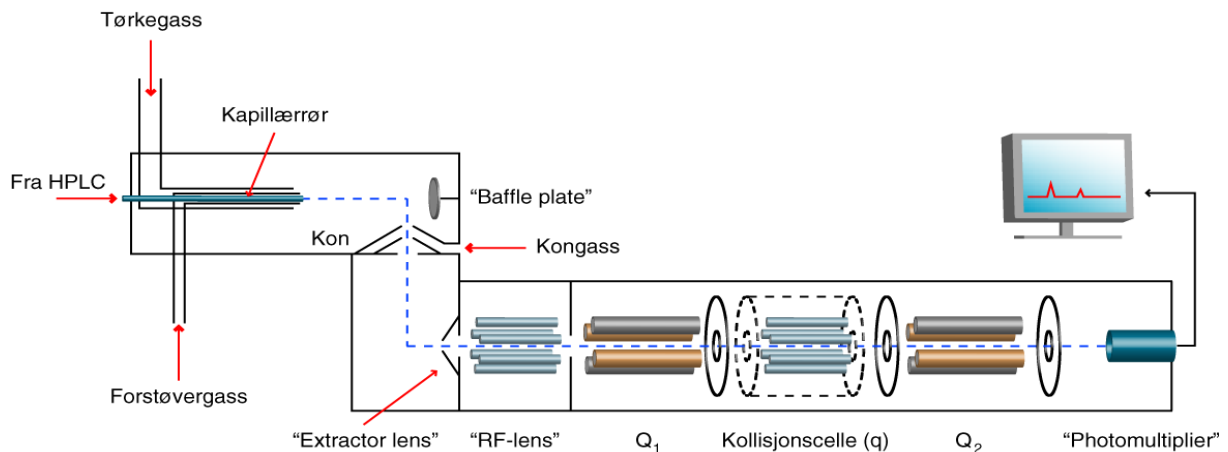
avhengig av deres masse. I praksis vil ikke alle ioner ha samme kinetisk energi, men det kan enkelt korrigeres for ved anvendelsen av en reflektor. Ionene som kommer inn vil først treffe en pusher (ion pulser) som dytter ioner med samme ladning til reflektor så til detektor. Tiden ionene bruker for på å nå frem til detektoren brukes for å regne ut m/z . Ionene med høyest masse vil bevege seg med lavest hastighet og vil bruke lengst tid fra pusher til detektoren (se figur 9).



Figur 9: Skjematisk fremstilling av TOF-MS (www.waters.com)

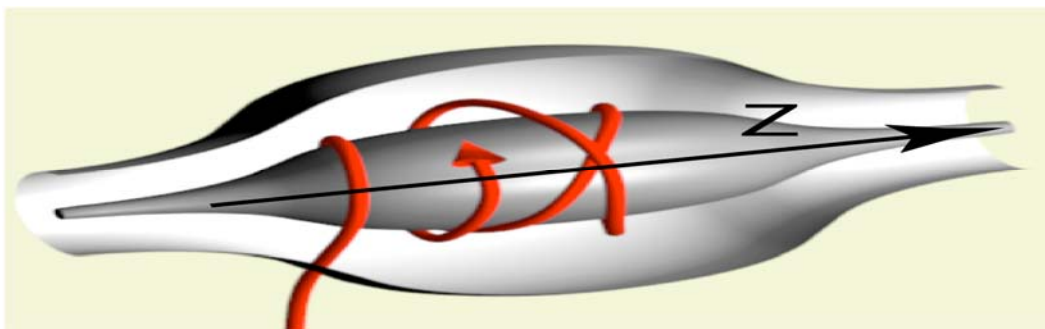
Man kan oppnå enda bedre oppløsning hvis man har flere reflektorer etter hverandre, og en W-konfigurasjon som vist i figur 9 er svært vanlig. En annen type masseanalysator som ble brukt i oppgaven er trippelkvadrupol (QqQ). Den teknikken har vært mye brukt for eksempel i å analysere plantevernmidler, industrikjemikalier og farmasøytiske preparater i en hel rekke ulike prøvematerialer [41]. Det består som regel av to kvadrupoler (masseseparator) og en heksapol eller oktapol (kollisjonscelle). Kvadrupolen består av fire parallelle metallstaver hvor to og to motsatte par kobles sammen med elektrisk spenning (se figur 10). Mellom parene setter man en kombinasjon av vekselstrøm og likestrøm, og ved bestemte vekselstrøm og likestrøm-spenninger kan ioner med bestemt m/z ratio styres gjennom kvadrupolen, dvs. at masseseparator separere ioner basert på deres m/z . Kollisjonscellen q har ikke samme oppgave som masseseparatorene Q_1 og Q_2 . Oppgaven består i å danne fragmenter av ionene som har passert første kvadrupol Q_1 for videre separasjon i Q_2 . Dette er mulig ved å sette vekselstrøm-spenning på stavene i kollisjonscellen (q) og lede en inert kollisjonsgass gjennom cellen. I

kollisjon med kollisjonsgassen danner ionene fragmenter som kan separeres i Q_2 . Hvor mye av ionene er mulig å fragmentere er avhengig om kollisjonen kan gi ioner med nok maksimale interne energi og trykk. Hvis QqQ brukes som en spesifikk detektor, vil en kombinasjon av bestemte vekselstrøm- og likestrøm-spenning la bare ioner med spesifikk m/z passere Q_1/Q_2 . Det er mulig at flere ioner kan analysere stegvis innefor et gitt tidsrom, men blir antall ulike ioner for mange vil detektoren bruke kortere tid på hvert ion enn ellers, og antall punkter over toppsignalet bli for få [44].



Figur 10: Forenklet skjematisk fremstilling av ESI og MSMS massespektrometer og trippelkvadrupol (trykket med tillatelse av Kristian L. Forsberg[39])

Det ble også brukt et massespektrometer av typen LTQ Orbitrap LC-MS i denne oppgaven (se figur 11). Orbitrap er et relativt nyutviklet massespektrometer der ioner blir fanget av en høy spenning rundt en sentralelektrode. Ionene som er fanget inntar en sirkelbevegelse rundt sentralelektroden samtidig som de gjennomgår stabile svingninger i z-planet før de blir detektert. Deteksjonen blir utført ved en ”avlesning” av de stabile ionebanene fulgt av en fourier-transformasjonsalgoritme. Orbitrap har flere egenskaper som gjør det til et meget interessant valg ved analyse. Den har høy masseoppløsning (opptil 150000), stor ladekapasitet og høy massenøyaktighet (2-5 ppm.) [46].



Figur 11 : Skisse av Orbitrap masseanalysator. Figuren er modifisert etter en figur av brukeren Gbdivers på Wikimedia Commons.

2. Materiell og metoder

2.1 Innsamling og oppbevaring av prøvemateriale

P. tremulus (sjøpølse), *M. senile* (sjønellik) og *H. pyriformis* (pæresekkdyr) ble samlet inn i henhold til tabell 1. Alle de tre marine organismene ble frosset inn ved -20 °C ved innsamling og lagret ved -20 °C hos Marbank til prøvene ble opparbeidet.

Tabell 1. Marine organismer og prøveidentifikasjonsnummer

Marine organismer	Prøveidentifikasjonsnummer	Fangstdato	Vanndybde	Lokalitet
<i>Metridium senile</i> , vandig og organisk	M09036-0-W01 og M09036-0-L01	30.mai.08	62m	Porsangerfjorden
<i>Parastichopus tremulus</i> , vandig og organisk	M09037-0-W01 og M09037- 0-L01	06.mar.09	378m	Tysfjorden
<i>Halocynthia pyriformis</i> , vandig og organisk	M09038 -0-W01 og M09038- 0-L01	29.mai.09	20m	Porsangerfjorden

2.2 Prøveoppbevaring

2.2.1 Utstyr

Heto PowerDry PL9000	Thermo (Waltham, USA)
Vekt	Mettler Toledo (Greifensee, Sveits)
Begre	VWR, International (West Chester, PA, USA)
Frysetørkingsskåler	
Kvern- IKA A11 basic	IKA Works (Staufen, Tyskland)

2.2.2 Eksperimentelt

Det ble tatt ut frosset prøvemateriale fra fryserom (-20 °C). Det ble ikke utført noen disseksjon siden hele organismen skulle frysetørkes. Det frosne prøvematerialet ble kuttet med ostekniv på trebrett til ca 1 cm³ terninger, overført til frysetørkingsskåler og veid. Etter ny innfrysning ble prøvene frysetørket i tre dager. Deretter ble materialet umiddelbart plassert på fryserom (-20 °C).

2.3 Ekstraksjon

2.3.1 Utstyr og kjemikalier

Rotavapor, Laborata 4002	Heidolph (Nürnberg, Tyskland)
Frysetørke, Heto PowerDry PL9000	Thermo (Waltham, USA)
Vekt	Mettler Toledo (Greifensee, Sveits)
Kjølesentrifuge	Multifuge 3 S-R Heraeus
Filtrering, filterkolbe Schott Duran, 500 og 250 ml med hals diameter 34 mm. Whatman no. 3 filterpapir, 90 mm. Filtertrakt ("Büchnertrakt"), porselen, for 90 mm filter, med gummimansjett	
Ildfast form	
50ml sentrifuge rør	
Milli-Q vann	Millipore, Billerica, (MA, USA)
Diklormetan	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Metanol	Merck (Darmstadt, Tyskland)

2.3.2 Eksperimentelt

Målet med ekstraksjonen er å produsere vannekstrakter og organiske ekstrakter som inneholder et bredest mulig spekter av kjemiske forbindelser. Derfor ble ekstraksjon utført etter to ulike metoder. Metode 1 var tilpasset de vannløselige forbindelse og metode 2 til de mer fettløselige forbindelsene. Det frysetørkede prøvematerialet ble pulverisert ved hjelp av en kvernemaskin, Kvern- IKA A11 basic, i avtrekkskap.

2.4 Fraksjonering av vandige ekstrakter ved hjelp av HPLC

2.4.1 Prøveopparbeidelse før ekstraksjon

De frysetørkede og homogeniserte prøvene ble overført til duranflasker og tilsatt Milli-Q vann, ca 10 x tørrvekta (suspensjonen bør ha konsistens som suppe). I første omgang ble det tilsatt 700 ml Milli-Q vann og blandet godt underveis. Etter et par timer ble konsistensen til ekstraktet sjekket for å se om prøven hadde suget til seg mye vann. Prøven var for tyktflytende, og derfor ble det tilsatt mer Milli-Q vann. Til slutt var det tilsatt totalt 1300ml Milli-Q vann til M09037, 860ml til M09038 og 1100 ml til M09036. Flasken ble ristet så ofte som mulig og stod ved 5 °C i kjøleskap til neste dag.

Påfølgende dag ble flasken ristet godt for hånd og prøven ble fordelt på to sentrifugeflasker. Det ble kontrollert at O-ringene var hele og flaskene ble balansert (maksimum ± 5 g). Sentrifugeflaskene med suspensjon ble sentrifugert i 30 min ved 4000 rpm og 5 °C. Etter sentrifugering ble supernatantene dekantert over til 1 L rundkolber (< 400 ml pr. kolbe). Pelleten ble ekstrahert én gang til med $\frac{1}{2}$ mengde av det vannet som ble tilsatt i første ekstraksjon. Det ble blandet godt og stod ved 5 °C i kjøleskap i 30 minutter. Blandingen ble sentrifugert i 30 min ved 4000 rpm og 5 °C. Etter sentrifugering ble supernatantene dekantert i 1 L rundkolber (< 400 ml pr. kolbe). Vannfasene som lå igjen over pelletene ble sugd opp med 50 ml plastpipette og overført til de samme rundkolbene. Deretter ble de vandige ekstraktene i rundkolbene frosset inn ved -20 °C. Kolben ble snudd under innfrysningen slik at ekstraktene fordelte seg på veggene i rundkolben. Dette ble gjort for å få større overflate og dermed redusert frysetørketid. De vandige ekstraktene ble satt til frysetørking i 3 døgn. Pelletene i sentrifugeflaskene ble skrappt ut og overført til frysetørkingsskåler (ildfast form). Den ble dekket med aluminiumsfolie og satt i biofrysere (-80 °C). Pelletene ble brukt ved organisk ekstraksjon seinere.

2.4.2 Klargjøring av vandige prøver til HPLC

2.4.2.1 Utstyr og kjemikalier

Polystyren sentrifugerør	
Ristemaskin, Heidolph Titramax 1000	(Nürnberg, Tyskland)
Rotavaporkolbe	(Schott, Tyskland)
Universal SM 30	Edmund Bühler GmbH, (Tyskland)
Laorata 4002	Heidolph, (Nürnberg, Tyskland)
Millex GS filter	Millipore, Billerica, (MA, USA)
HPLC-rør	
Milli-Q vann	Millipore, Billerica, (MA, USA)
Etanol 96 %	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Acetonitril	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Heksan	Merck (Darmstadt, Tyskland)

2.4.2.2 Vandige ekstrakt

De frysetørkede ekstraktene ble skrappt ut av rundkolbene og samlet i plastrør. Deretter ble det veid ut en mengde ekstrakt (se tabell 2) i et 13 ml polystyren sentrifugerør og tilsatt 2000 µl Milli-Q vann. Sentrifugerørene ble ristet på ristemaskin i ca 90 minutter v. 100-160 omdreininger/min. Det ble tatt ut 1 ml av løsningen til nytt sentrifugerør, tilsatt 4 ml 96 % etanol i hvert rør og blandet godt på minishaker før de ble satt på fryserom (-20 °C) over natt. Sentrifugerørene med vandige ekstrakter ble hentet ut fra fryserom og sto ved romtemperatur i ca 5-10 min før de ble sentrifugert v. 4000 rpm i 30 min. Supernatantene ble overført til 25 ml rotavaporkolber og vakuumbordampet ned til mindre enn 2ml ved ca 70 mbar og 40 °C. Volumet ble fordelt på 2 stykk 1 ml sentrifugerør og justert til 1 ml med Milli-Q vann før de ble sentrifugert ved 13000 rpm i 30 min og filtrert gjennom 0,22 µm Milles GS filter over i HPLC-rør. Filtratene ble blandet godt med pipette og volumet ble justert til 2x1000µL med Milli-Q vann.

Tabell 2: Oversikt over mengde vandige ekstrakter

Marine organismer	Vandige ekstrakt (mg)
M09036	213
M09037	209,9
M09038	211,8

2.4.3 Fraksjonering ved hjelp av HPLC

2.4.3.1 Utstyr og kjemikalier

Waters 600 Controller	Waters, (MA, USA)
Waters 2996 Photodiode Array Detector	Waters, (MA, USA)
Waters 2767 Sample Manager	Waters, (MA, USA)
Waters Prep degasser	Waters, (MA, USA)
Atlantis Prep C-18 (10x250mm; 10µm)	Waters, (MA, USA)
Masslynx v.4.1 software	Micromass, (Manchester, UK)
Acetonitril	Merck, (Darmstadt, Tyskland)
Milli-Q vann	Millipore, Billerica, (MA, USA)
Maursyre	Merck Maursyre >98%
MeOH	Merck, (Darmstadt, Tyskland)

2.4.3.2 Vandige ekstrakter

De opparbeidede vandige ekstraktene ble fraksjonert vha. semi-preparativ HPLC. HPLC-kolonnen som ble brukt var en Atlantis Prep C18 10µm; 10x250 mm og 10x10 mm som forkolonne. 1000 µL av prøven ble injisert i kolonnen. Det ble samlet 6 ml fraksjon i hver av de 40 fraksjonene som ble produsert. Deretter ble volumet på 6 ml fordelt på fire dypbrønnsplater. Her ble det produsert 8 plater totalt ved å gjøre to injeksjoner.

Kolonnen ble kondisjonert med H₂O m/ 0,1 % maursyre (A) og ACN m/ 0,1 % maursyre (B) i et forhold 95:5 og flow 6ml/min. Det ble brukt mobilfase A 95 % og mobilfase B 5 % i 3 minutter, deretter ble det kjørt en lineær gradient fra 5-50% mobilfase B over 27 minutter. Til

slutt ble mobilfasen holdt på 95 % ACN i 5 minutter, deretter ble kolonnen regenerert med A:B 95- 5 % i 10 minutter (se tabell 3).

Tabell 3: Mobilfasegradienten ved fraksjonering av vandige ekstrakter

Tid(min)	Flow(ml/min)	Mobilfase A %	Mobilfase B %	Curve
0	6	95	5	-
3	6	95	5	6
30	6	50	50	6
35	6	5	95	6
40	6	5	95	6
41	6	95	5	6
50	6	95	5	6

2.5 fraksjonering av organiske ekstrakter ved hjelp av HPLC

2.5.1 Utstyr og kjemikalier

Rotavapor, Laborta 4002

Frysetørker, Heto Power Dry PL9000

Vekt

Kjølesentrifuge

Milli-Q vann

Diklormetan

Metanol

Filterkolbe Schott Duran, 500 og 250 ml med hals diameter 34 mm.

Whatman no. 3 filtetpapir, 90 mm. Filtertrakt ("Büchnertrakt"),

Porselen, for 90 mm filter, med gummimansjett

Ildfast form

50ml sentrifuge rør

Heidolph (Nürnberg)

Thermo (Waltham)

Mettler Toledo (Greifensee)

Multifuge 3 S-R Heraeus

Millipore, Billerica, MA, USA

Merck (Darmstadt, Tyskland)

Merck (Darmstadt, Tyskland)

2.5.2 prøveopparbeidelse før ekstraksjon

Den tørkede pelleten, som var igjen etter den vandige ekstraksjonen, ble skrappt ut, pulverisert i kvern og overført til tarert Duran flaske. Det ble veid inn 51,76 g av *S. tremulus*, 52,33 g av *H. pyriformis* og 75,41 g av *M. senile* i Duran flaskene. Materialet stammer fra den resterende delen av den vandige ekstraksjonen.

Ekstraksjonsmiddelet ble laget ved å blande diklormetan og metanol, i forhold 1:1. Forholdet mellom volum ekstraksjonsmiddel og vekt tørket prøve skulle være omtrent 10:1. Ekstraksjonsmiddelet (600ml) ble gradvis tilsatt prøvemateriale i duranflasker i 3 omganger til suspensjonen fikk konsistens som en tynn suppe. Suspensjonen ble ristet og plassert i kjøleskap ved 5 °C til neste dag. Suspensjonen ble vakuumfiltrert på Whatmann nr. 3 filter. Retentatet ble overført til duranflasker og nytt ekstraksjonsmiddel ble tilsatt (300 ml). Prøven ble ekstrahert ved 5 °C i 30 minutter og ble filtrert på nytt. Filtratene fra de to ekstraksjonene ble slått sammen i 1 liters kolber og satt i avtrekk uten kork. Filtratene ble vakuumfordampet i rotavapor ved 180 mbar og 40 °C til det var ca 10-20 ml igjen. Deretter ble det overført til reagensrør (3 stykker) og lagret på fryserom (-20 °C).

2.5.3 Klargjøring av organiske prøver til HPLC

2.5.3.1 Utstyr og kjemikalier

Polystyren sentrifugerør	
Ristemaskin	Heildolph titramax 1000
Rotavapor kolbe	(Schott, Tyskland)
Millex GS filter	Millipore, Billerica, (MA, USA)
HPLC-rør	Waters
Pasteurpipette	VWR International
Milli-Q vann	Millipore, Billerica, (MA, USA)
Acetonitril	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Heksan	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Etanol 96 %	Merck (Darmstadt, Tyskland)

2.5.3.2 Organiske ekstrakt

De organiske ekstraktene ble hentet ut fra fryserom og latt komme til romtemperatur. Det ble veid ut to mengder på ca 300 mg av hvert av de organiske ekstraktene i to 13 mm reagensrør (se tabell 4). Det ble tilsatt 3ml heksan (ble brukt for å ekstrahere ut upolare komponenter fra ekstraktet) og ristet godt på minishaker. Det var en del bunnfall som ikke løste seg. Deretter ble det tilsatt 3 ml 90 % acetonitril (ACN) i Milli Q-vann og blandet godt med minishaker. Det ble dannet to faser hvor den ene er upolar øverst (heksan) og den andre er polar nederst (ACN). Det var ACN fasen som var interessant for videre arbeid. Reagensrørene ble satt i sentrifugerør og sentrifugert uten kork ved 300 rpm i 3 min. Etter sentrifugering ble ACN-fasen tatt ut (nederste fase) med glasspipette og samlet i små rotavaporkolber (25 ml). Til heksanfasen ble det tilsatt nye 3ml ACN 90 % og blandet og sentrifugert på nytt. ACN-fasene ble overført til rotavaporkolbene, og vakuumfordampet i rotavapor ved gradvis trykkreduksjon ned til 160 mbar og 40 °C. Inndampingen ble avsluttet da det var 1-1,5 ml igjen i kolbene, som ble fordelt på to stykk 1 ml eppendorfrør. De ble lagret ved -20 °C fram til fraksjonering.

Tabell 4: Oversikt over mengde organiske ekstrakter.

Marine organismer	Organisk ekstrakt (mg)
M09036	241,5 og 258,8
M09037	297,5 og 295,8
M09038	288 og 293

2.5.4 Fraksjonering ved hjelp av HPLC

2.5.4.1 Utstyr og kjemikalier

Waters 600 Controller	Waters, (MA, USA)
Waters 2996 Photodiode Array Detector	Waters, (MA, USA)
Waters 2767 Sample Manager	Waters, (MA, USA)
Waters Prep Degasser	Waters, (MA, USA)
XTerra® Prep RP ₁₈ (10x 300mm; 10mm)	Waters, (MA, USA)
Masslynx v.4.1 software	Micromass (Manchester, UK)
Acetonitril	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Milli-Q vann,	Millipore, Billerica, (Ma,USA)
Maursyre	Merck Maursyre >98%
MeOH	Merck, (DarmstadTyskland)

2.5.4.2 Organiske ekstrakter

Eppendorfrørene med de organiske ekstraktene ble hentet ut fra fryserom og sentrifugert ved 13000 rpm i 30 minutter. Deretter ble de to slått sammen i ett rør (kun væskefasen ble pipettert ut, ikke bunnfall). Volumet ble fordelt på to HPLC-rør sånn at det var 1000µL i hver, justert ved hjelp av ACN 90 %. HPLC instrumentet ble primet med mobilfasen og begge prøvene ble satt til fraksjonering.

De organiske ekstraktene ble fraksjonert på en XTerra Prep RP C-18 kolonne. De første to minuttene ble det brukt en flow på 6 ml/min med en sammensetning av 80 % mobilfase A (bestående av H₂O m/ 0,1 % maursyre) og 20 % mobilfase B (acetonitril m/ 0,1 % maursyre). Deretter ble det brukt en mobilfasegradient på 20-100 % mobilfase B over 28 minutter. Til slutt endret vi mobilfasegradienten til 100 % mobilfase B i 10 minutter (se tabell 5). Det ble samlet opp 40 fraksjoner i HPLC-rør med et volum på 6 ml/rør, men det ble gjort to injeksjoner og dermed ble 80 fraksjoner produsert totalt. Hver av fraksjonene ble fordelt på 4 dypbrønnsplater, dvs totalt 8 plater som for vannfasen, og platene ble først tørket i vakuumsentrifuge for å fjerne organisk løsemiddel og deretter frysetørket for å fjerne vann. Platene ble oppbevart ved -20 °C frem til screening.

Tabell 5: Mobilfasegradient ved fraksjonering av organiske ekstrakter.

Tid(min)	Flow(ml/min)	Mobilfase A %	Mobilfase B %	Curve
0	6	80	20	-
2	6	80	20	6
30	6	0	100	6
40	6	0	100	6
41	6	80	20	6
50	6	80	20	6

2.6 Oppløsning av HPLC-fraksjoner til første og andre screening

De tørkede HPLC-fraksjonene fra det organiske ekstraktet ble tilsatt 7,5 μ L DMSO og satt på risting i 2,5 timer. Deretter ble det løst videre i 750 μ L vekstmedie RPMI u/FBS med risting i 30 minutter. HPLC-fraksjonene fra det vandige ekstraktet ble tilsatt 750 μ L RPMI-1640 u/FBS og satt på risting i 30 minutter.

2.7 Anticancer screening

2.7.1 Utstyr, kjemikalier og cellelinje

DTX 880 Multimode Detector	Beckman Coulter, USA
Inkubator, 37°, 5 % CO ₂	Samyo Electric (Osaka, Japan)
Robot arm- ORCA	Beckman Coulter, USA
Platestasjon-SAGIAN	Beckman Coulter, USA
Multimode detection software	Beckman Coulter, USA
Multikanal-pipette	Eppendorf (Hamborg, Tyskland)
Dypbrønnsplater	Thermo, UK
Mikrotiterbrett	Nunc (Roskilde, Danmark)
Risteenhet	Heidolph Titramax1000
Avtrekkskap	Herasafe, Tyskland
DMSO	Sigma Aldrich,(München, Tyskland)
RPMI-1640	Biochrom, (Berlin, Tyskland)
D-MEM	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Gentamicin	Aventis pharma (Lysaker, Norge)
L-glutamin	Aventis pharma (Lysaker, Norge)
AQOS, Aqueous One Solution Reagent	Promega, USA
Fetalt Kalveserum (FBS)	Biochrom (Cambridge, UK)
Trypsin	Invitrogen (Carlsbad, USA)
EDTA	Invitrogen (Carlsbad, USA)
RPMI-1640	Invitrogen (Carlsbad, USA)
A2058 Melanoma	LGC Promochem AB (Sverige)

2.7.2 Første screening

Oppdyrking av celler i mikrotitterbrett

Anticanceraktivitet ble testet på melanoma cellelinje, A2058. Celler dyrket i D-MEM (tilsatt 10 % FBS, 10 µg/ml gentamicin og 2mM L-glutamin), ble sådd i mikrotitterbrett i en konsentrasjon på 2000 cl/brønn. Brettene ble inkubert i 24 timer v/37 °C og 5 % CO₂.

Tilsetting av HPLC fraksjoner

Cellemediet ble fjernet, så ble det tilsatt 50 µL RPMI-1640 m/10 % FBS og 50 µL av hver HPLC-fraksjon i 3 paralleller (figur 12 og 13). Som negativ kontroll ble det tilsatt 50 µL RPMI-1640 u/FBS istedenfor HPLC fraksjon. Platene ble så inkubert i 72 timer v/ 37 °C og 5 % CO₂.

	fraksjon 1-7			fraksjon 8-14			fraksjon 15-20			kontroll	
1	1	1	1	8	8	8	15	15	15	N	N
2	2	2	2	9	9	9	16	16	16	N	N
3	3	3	3	10	10	10	17	17	17	N	N
4	4	4	4	11	11	11	18	18	18	N	N
5	5	5	5	12	12	12	19	19	19		
6	6	6	6	13	13	13	20	20	20		
7	7	7	7	14	14	14					

Figur 12: Oppsett til analysing av HPLC fraksjoner 1-20

	fraksjon 21-27			fraksjon 28-34			fraksjon 35-40			kontroll	
21	21	21	21	28	28	28	35	35	35	N	N
22	22	22	22	29	29	29	36	36	36	N	N
23	23	23	23	30	30	30	37	37	37	N	N
24	24	24	24	31	31	31	38	38	38	N	N
25	25	25	25	32	32	32	39	39	39		
26	26	26	26	33	33	33	40	40	40		
27	27	27	27	34	34	34					

Figur 13: Oppsett til analysing av HPLC fraksjoner 21-40

Avlesning

Etter 3 dager (72 timer) inkubering på 37 °C ble 10 µL AQOS tilsatt til hver brønn i mikrotitterbrett og inkubert. AQOS vil farge mitokondriell aktivitet i cellene, noe som brukes som mål for celleoverlevelse. Etter inkubering i 1 time ved 37 °C og 5 % CO₂ ble absorbans målt ved 590 nm i DTX 880 Multimode Detector. Av OD-målingene (optisk tetthet) ble % overlevelse av cellene så beregnet.

X= sum av tre parallelle fraksjoner dividert på tallet 3

P= positiv kontroll

N= negativ kontroll

$$\% \text{ celleoverlevelse} = (X - P) / (N - P) * 100$$

2.7.3 Andre screening

Aktive fraksjoner, dvs fraksjoner som ga mindre enn 40 % overlevelse, ble retestet i en fortyningsserie. Det ble satt opp to paralleller for ufortynnet, 1:2 og 1:4 fortyning av fraksjonene (figur 14). Utførelse ellers var som beskrevet for 1. screening. Platene ble inkubert i 72 timer før avlesing.

U	U	1:2	1:2	1:4	1:4	U	U	1:2	1:2	1:4	1:4
U	U	1:2	1:2	1:4	1:4	U	U	1:2	1:2	1:4	1:4
U	U	1:2	1:2	1:4	1:4	U	U	1:2	1:2	1:4	1:4
U	U	1:2	1:2	1:4	1:4	U	U	1:2	1:2	1:4	1:4
U	U	1:2	1:2	1:4	1:4	U	U	1:2	1:2	1:4	1:4
U	U	1:2	1:2	1:4	1:4	U	U	1:2	1:2	1:4	1:4
U	U	1:2	1:2	1:4	1:4	KTR	KTR	1:2	1:2	1:4	1:4
U	U	1:2	1:2	1:4	1:4	KTR	KTR	1:2	1:2	1:4	1:4

Figur 14: Oppsett til 2. screening, ufortynnet, 1:2 og 1:4 fortyning av fraksjoner.

2.8 Refraksjonering (3. screening)

2.8.1 Utstyr og kjemikalier

600E Multisolvent Delivery System	Waters, (MA, USA)
Prep Degasser	Waters, (MA, USA)
2767 Sample Manager, Injector and Collector	Waters, (MA, USA)
2996 PDA Detector	Waters, (MA, USA)
Kolonner Symmetry Prep C18 7 µm; 7.8x 300mm	Waters, (MA, USA)
Software Masslynx 4.1; OpenLynx 3.5; FractionLynx 3.5	Micromass, (Manchester UK)
Dypbrønnsplater	Thermo, UK
Reagensrør	
HPLC-rør	
Milli-Q vann	Millipore, Billerica(MA, USA)
Maursyre	Merck (Darmsatd, Tyskland)
ACN	Merck Acetonitril hplc-grade
MeOH	Merck, (Darmstadt, Tyskland)
Maursyre	Sigma-Aldrich, USA

2.8.2 Refraksjonering og 3. Screening

Hensikten med refraksjoneringen er å rense videre de aktive molekylene i de ulike fraksjonene med anticancereffekt. Med refraksjonering vil man forsøke å skille aktivt molekyl fra andre forbindelser som er havnet i samme brønn etter første fraksjonering. Noen av de vandige og organiske fraksjonene viste aktivitet og ble dermed valgt ut for videre analyser. Aktive fraksjoner fra M09036-0-W01 og M09036-0-L01 ble refraksjonert. Fraksjoner med aktivitet fra tre identiske dypbrønnsplater av M09036-0-W01 ble løst i 200 µL 50 % MeOH, ristet i ca 1 time og slått sammen, og deretter ble de overført til HPLC vialer. Dette ble gjort for å få rensede større mengder av de aktive forbindelsene. De samme brønnene ble vasket en gang til med 100 µL 20 % MeOH for å sikre at alt materialet ble overført. Prøvene ble så vakuumsentrifugert i ca 10 min. før volumet ble justert til ca 550 µL med 50 % MeOH. Om

lag 500 µL av dette ble fraksjonert ved hjelp av Symmetry Prep C18 (7 µm; 7,8x300mm) og 40 fraksjoner ble produsert (se på tabell 6 for gradient).

Tabell 6: Sammensetning av mobilfase A og B for optimalisering av separasjon av vandige fraksjoner.

Tid(min)	Flow(ml/min)	Mobilfase A %	Mobilfase B %	Curve
0	4	30	70	-
30	4	0	100	6
40	4	0	100	6
41	4	30	70	6
50	4	30	70	6

De organiske fraksjonene med aktivitet fra tre dypbrønnsplater (for å få større mengder) ble løst i 200 µL 80 % MeOH i første omgang og ble ristet i ca 1 time og overført til HPLC vialer. Det ble så tilsatt 100 µL 80 % MeOH til de tre dypbrønnsplatene på nytt og ristet i ca ½ time denne gangen og overført til samme HPLC vial. Senere ble HPLC vialene vakuumsentrifugert i ca 1 time. Deretter ble volumet justert til 550 µL med 80 % MeOH. Dette for å løse opp eventuelt bunnfall som oppsto pga. fordamping av 80 % MeOH under vakuumsentrifuge og for å unngå å tette HPLC kolonnen senere. 500 µL ble fraksjonert ved hjelp av samme kolonne som over, Symmetry Prep C18 (7 µm; 7,8x300mm). Det ble brukt en flow på 4 ml/min med ulike mobilfasegradienter (se tabell 7). For refraksjonering ble det valgt en passende sammensetning av de ulike mobilfasene for å få best mulig separasjon. Prøvene ble samlet opp i 40 fraksjoner, med 4 ml i hver fraksjon. Fraksjonene ble fordelt på 3 dypbrønnsplater. De ulike platene til både de vandige og organiske fraksjonene ble vakuumsentrifugert i 1,5 time og oppbevart ved -20 °C. Deretter ble den frysetørket i to døgn.

Tabell 7: Sammensetning av mobilfase A og B for optimalisering av separasjon av organiske fraksjoner.

Tid(min)	Flow(ml/min)	Mobilfase A %	Mobilfase B %	Curve
0	4	30	70	-
2	4	30	70	6
30	4	0	100	6
40	4	0	100	6
41	4	30	70	6
50	4	30	70	6

2.8.3 Oppløsning av fraksjoner

Som beskrevet tidligere, se avsnitt 2.6 Oppløsning av HPLC-fraksjoner.

2.9 MS-analyse

2.9.1 Utstyr og kjemikalier

LCT Premier Micromass MS	Waters, (MA, USA)
Waters 2795 Separations Module	Waters, (MA, USA)
LTQ Orbitrap XL	Thermo, (Bremen, Tyskland)
ION_MAX, ESI	Thermo, (Bremen, Tyskland)
Thermo scientific Accela with Thermo Hypersil Gold 50x2,1mm, 1,9um C18 reverse phase colum	Thermo, (Bremen, Tyskland)
Waters Quattro Premier XE(MS)	Waters, (MA, USA)
Waters NanoAcquity UPLC	Waters, (MA, USA)
Waters Acquity UPLC BEH C18, 1,0x150mm, 1,7µm	Waters, (MA, USA)
Waters Micromass, CCT Premier	Waters, (MA, USA)
XTerra®MS C18 (1,0x50 mm; 3,5µm)	Waters, (MA, USA)
Masslynx v.4.1 software	Micromass, (Manchester, UK)
Nitrogengassgenerator- N2-22A	Parker Haverhill, (MA, USA)
Vakuumsentrifuge, speedvac Concentrator SC250	Thermo, (Bremen, Tyskland)
Acetonitril	Merck, (Darmstadt, Tyskland)
Milli-Q vann	Millipore, Billerica, (USA)
Maursyre	Sigma-Aldrich, USA

2.9.2 Eksperimentelt

De fraksjonene som viste anticancereffekt fra både primær fraksjonering og refraksjonering ble analysert på LCMS-ESI-TOF. Først ble platen med M09036-0-L01 hentet ut og tilsatt 100 µl 20 % ACN til brønn 14,15 og 16. Platen ble satt til risting i 10 min, deretter ble den plassert i autoinjektoren på HPLC som er koblet til MS og 10 µL av hver fraksjon ble injisert. Det ble brukt to ulike mobilfaser, mobilfase A (Milli Q vann i 0,1 % maursyre) og mobilfase B (ACN

i 0,1 % maursyre). Kolonnen som ble brukt for dette formålet var XTerra® MS, C18, 3,5µm; 1,0×50 mm (se tabell 8).

Tabell 8: Mobilfasegradienten som ble brukt ved LCMS-ESI-TOF

Tid(min)	Flow(µl/min)	Mobilfase A %	Mobilfase B %	Curve
0	200	95	5	0
9	200	30	70	6
11	200	5	95	6
19	200	5	95	6
20	200	95	5	6

Det ble foretatt ny primærfraksjonering for å få mer konsentrerte fraksjoner. Det ble produsert tre nye plater, men den ene var med dobbel så mye ekstrakt i med tanke på å få sterkere signal ved MS-analysene.

Ny primær fraksjonering og refraksjonering ble analysert på LCMS-ESI-Q. Platen merket med M09036-0-L01 ble hentet ut fra frysen og la sto i rom temperatur i noen minutter. Deretter ble den tilsatt 200 µL 20 % ACN og ristet litt på den. Platen ble plassert i autoinjektoren på UPLC som er koblet til MS og 10 µL av det ble injisert. Det ble brukt to ulike mobilfasegradient den gangen til forskjell fra den mobilfasegradienten som ble benyttet ved LCMS-ESI-TOF. Grunnen til det er at det ble observert noen topper som eluerte veldig sent, og man ønsket å undersøke om noen forbindelser kanskje eluerte ut etter analysens slutt. Det ble derfor bestemt å øke elueringstiden til 80 min for å se om det er noen forbindelser som eluerer ut så seint (se tabell 9 og 10).

Tabell 9: Mobilfasegradienten som ble brukt ved LCMS-ESI-Q.

Tid(min)	Flow(µl/min)	Mobilfase A %	Mobilfase B %	Curve
0	50	100	0	-
45	50	0	100	6
46	50	100	0	6
55	50	100	0	6

Tabell 10: Mobilfasegradienten som ble brukt ved LCMS-ESI-Q.

Tid(min)	Flow(μ l/min)	Mobilfase A %	Mobilfase B %	Curve
0	50	100	0	6
45	50	15	85	6
70	50	0	100	6
71	50	100	0	6
80	50	100	0	6

Det ble brukt OrbiTrap som tredje alternativ for å finne eventuelle topper som kunne forklare anticancer aktivitet under screening. Det ble injisert 10 μ L av fraksjonen i Orbitrap, altså like mye som ved de to andre metodene. Mobilfasegradienten var noe annerledes enn det som ble brukt ved LCMS-ESI-TOF og LCMS-ESI-Q (se tabell 11). Det ble brukt en HPLC som heter Thermo scientific Accela med Thermo Hypersil Gold 50x2,1 ,1,9 μ m C18 reverse fase kolonne. For vilkår som ble brukt ved Orbitrap se på Appendiks.

Tabell 11: Mobilfasegradienten som ble brukt ved LTQ Orbitrap.

Tid(min)	Flow(μ l/min)	Mobilfase A %	Mobilfase B %
0	200	70	30
8	200	5	95
10	200	5	95
10,01	200	70	30
12	200	70	30

Tabell 12: vilkår for MS-analyse av fraksjoner med anticancereffekt.

Betingelser	MSMS/ES +	LCMS-ESI-Q	LCMS-ESI-TOF
Capillary (kV)	3,3	3,3	2,6
Cone (V)	50	50	35
Temperature desolvation (°C)	250	250	300
Temprature source (°C)	100	100	120
Cone gas flow (L/hr)	11	11	5
Desolvation gas flow (L/hr)	98	98	550
Entrance	0	30	-
Collision	10	2	-
Exit	0	30	-

2.10 Flash kromatografi

2.10.1 Utstyr og kjemikalier

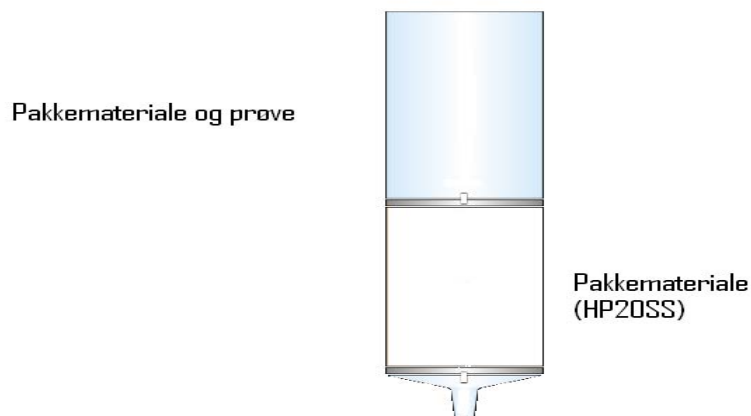
Diaion HP20SS	Supelco, USA
Tissue Wipers	VWR international
SNAP kolonne	Biotage®(Uppsala, Sverige)
Flash maskin Biofage SP4 EXP	(Uppsala, Sverige)
Avtrekk	HERAsafe. Tyskland

2.10.2 Prøveopparbeidelse til Flash kromatografi

Målet med Flash separasjoner av prøvene var å rense og oppkonsentrere større mengder av de aktive ekstraktene. Det ble veid inn 501mg, 503mg, 504mg og 501mg av det organiske ekstraktet merket med M09036-0-L01 i reagensrør i fire paralleller. Det ble besluttet å ikke kjøre anticancer screening på Flash fraksjoner fra M09038-0-L01. Hvert av rørene ble tilsatt 3 ml heksan og ristet på mini-shaker, deretter ble det tilsatt 3 ml 90 % MeOH til alle reagensrørene og ristet på mini-shaker på nytt. Rørene ble sentrifugert i kjølesentrifuge på 300 rpm i 3 minutter. Den nederste fasen som består av MeOH, ble pipettert over til glassrør 1 og 2 slik at det ble 6 ml i hver, og deretter ble de ristet på minishaker. Videre ble det tatt ut 2 ml fra glassrør 1 og 2, og overført til et tredje glassrør. Til slutt var det 4 ml blanding i hvert av de tre glassrørene. Pakkematerialet Diaion HP20SS, som er en porøs polystyrenbasert absorbent, ble tilsatt til de tre reagensrørene i omtrent like stor mengde som væsken, 2 g. Reagensrørene ble dekket med Tissue Wipers og vakuumsentrifugert til alt var tørt. Påfølgende dag ble reagensrøret (prøve + sorbent) hentet ut fra fryseren og overført til nytt sentrifugerør med kork. Av det ble det veid 3,24 g i tarert sentrifugerør. I et begerglass ble 25 g pakkemateriale, Diaion HP20SS, satt til svelling i 15 min med 100 ml MeOH. Deretter ble MeOH dekantert og pakkematerialet vasket med Milli Q vann (150 mL).

SNAP-Kolonne (2 cm i diameter) til Flash ble fylt med Milli-Q vann helt til øverste kanten, og deretter eluert for å fukte filtret. Pakkematerialet som var vasket med MeOH og Milli Q

vann ble tilsatt SNAP kolonne i flere omganger til kolonnene var full (8 g) og deretter ble prøvemateriale satt på (se figur 15).



Figur 15: SNAP kolonne med både pakkemateriale og prøve.

Påfølgende dag ble Flash systemet primet ved hjelp av vann og MeOH. Dette ble gjort for å fjerne gammel mobilfase som satt i rørene fra før. Kolonner med pakkemateriale som prøvemateriale var satt på ble montert i systemet og ekvilibrert med 5 % MeOH. Gradienten som ble brukt var ikke lineær (tabell 13). Det ble samlet opp eluat i 2 minutter per reagensrør. Mengde eluat per reagensrør var på 24 mL, bortsett fra det siste reagensrør med 12mL. Det ble overført 500 μ L fra hvert reagensrør til dypbrønnsplater som ble vakuumsentrifugert i 2 timer. Deretter ble det foretatt screening av flashfraksjonene i tre ulike serier (ufortynnet, fortdynnet 1:5, fortdynnet 1:10) etter det oppsettet som vises på figur 16.

Tabell 13: Step eluation som ble benyttet under Flashkromatografi.

% MeOH	min.	Fraksjoner
5	6	1-3
25	6	4-6
50	6	7-9
75	6	10-12
100	12	13-18

Oppløsning og screening av Flash prøver utført som tidligere(se avsnitt 2.6)

U	U	1:5	1:5	1:10	1:10	U	U	1:5	1:5	1:10	1:10
U	U	1:5	1:5	1:10	1:10	U	U	1:5	1:5	1:10	1:10
U	U	1:5	1:5	1:10	1:10	U	U	1:5	1:5	1:10	1:10
U	U	1:5	1:5	1:10	1:10	U	U	1:5	1:5	1:10	1:10
U	U	1:5	1:5	1:10	1:10	U	U	1:5	1:5	1:10	1:10
U	U	1:5	1:5	1:10	1:10	U	U	1:5	1:5	1:10	1:10
U	U	1:5	1:5	1:10	1:10	U	U	1:5	1:5	1:10	1:10
U	U	1:5	1:5	1:10	1:10	U	U	1:5	1:5	1:10	1:10

Figur 16: Plateoppsett for organiske ekstrakter fra flash

2.10.3 Fordamping av Flash fraksjoner

Fraksjonene som viste anticancereffekt ble slått sammen i en rundkolbe på 250 mL. Det ble dampet inn på rotavapor (ved 40 °C i vannbad). Inndampingen ble stoppet da det var ca 2 mL igjen i rundkolben, og det ble deretter overført med glasspipette til et på forhånd veid reagensrør. Det ble tilsatt MeOH til rundkolben for å få overført så mye som mulig fra kolben. Det ble samlet i et reagensrør, vakuum sentrifugert til prøven var tørr, og veid (0,0281 g). Det ble tilsatt 1 mL 50 % MeOH og prøven ble ristet på minishaker for å få den løst før den ble fraksjonert i 40 fraksjoner med HPLC. Systemet ble primet med mobilfase A og B for å fjerne luftboble og gamle mobilfaser, så ble kolonne (Xterra ®Prep RP18) kondisjonert med mobilfaser. Se tabell 14 for gradient. Det ble samlet 40 fraksjoner, og fraksjonene ble vakuumsentrifugert til de var tørre. Det ble ikke overført til plater for å unngå fortykning av de aktive forbindelsene. Fraksjonene ble løst opp i DMSO (7,5 µL) og satt til risting (se avsnitt 2.6). Deretter ble det foretatt screening av fraksjonene for å finne eventuell anticancereffekt. Mengden av hver fraksjon som ble benyttet er lik det som ble benyttet i avsnitt 2.7.2 som omhandler tilsetting av HPLC fraksjoner før testing av aktivitet.

Tabell 14: Mobilfasegradient ved fraksjonering av organiske ekstrakter.

Tid(min)	Flow(ml/min)	Mobilfase A %	Mobilfase B %
0	6	80	20
2	6	80	20
30	6	0	100
40	6	0	100
41	6	80	20
50	6	80	20

2.11 Doserrespons for organisk ekstrakt av M09036-0-L01 og M09038-0-L01

Doserresponsen ble foretatt for å undersøke potensen til ekstrakt, fraksjon eller forbindelse. Jo mer potent, desto mer interessant. Med utgangspunktet i den tankegangen ble det utført doserespons-eksperiment. Ca. 500 mg av det organiske ekstraktet M09036-0-L01 ble veid i to 13 mm reagensrør. Ekstraktene ble løst i 3 mL heksan, ristet godt på minishaker og deretter ble 3 mL 90 % ACN tilsatt og ristet. Reagensrørene ble satt i plastrør og sentrifugert, uten kork, ved 300 rpm i 3 min. Det ble dannet to ikke blandbare faser med klart faseskille. Det nederst laget ble pipettert ut (ACN-fasen) og overført til nytt reagensrør, mens det øverste laget (heksanfasen) ble tilsatt nye 3 mL 90 % ACN, blandet og sentrifugert i 3 min til. Reagensrørene med de sammenslåtte ACN-fasene ble vakuumsentrifugert i to timer til prøven var tørr. Det gikk over to døgn før den var tørr. De tørkede prøvene (28 mg) ble løst i 200 μ L DMSO og ristet på minishaker til det meste var relativt løst (det fantes fortsatt noe stoff på veggen av glassrøret som ikke lot seg løse). Deretter ble det laget en fortynningsserie på 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 2,5, 1,25 og 0,625 μ g/mL. Det ble foretatt screening for disse fraksjonene med tanke på dose-respons.

3 Resultater

3.1 Prøveopparbeidelse og ekstraksjon

De tre ulike artene ble veid inn og frysetørket. Etter prøveopparbeidelsen ble det produsert ulik mengde av tørrvekt for hver enkelt art.

Tabell 15: Oversikt over våtvekt, tørrvekt og % vann.

Marine organismer	Våtvekt (g)	Tørrvekt (g)	% Vann
M09036	1500	152,54	89,8
M09037	995	87,31	91,2
M09038	954,7	104,26	89,1

Deretter ble tørrstoffet ekstrahert med både vandige og organiske løsemidler. Prosedyren ble forklart under metode og materiale (avsnitt 2). Utbyttet av de vandige og organiske ekstraksjonene er vist i tabell 16.

Tabell 16: Oversikt over mengde organiske og vandige prøver.

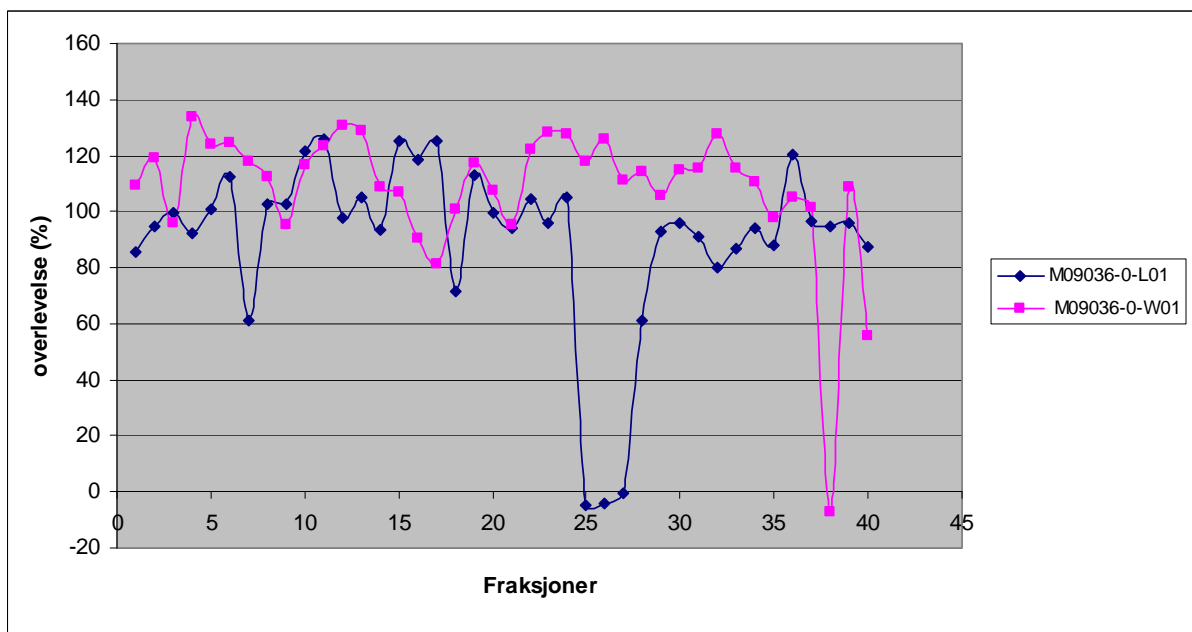
Marine organismer	Organisk ekstrakt (g)	Vandig ekstrakt (g)
M09036	75,41	45,37
M09037	51,76	31,91
M09038	52,33	x ¹

Med utgangspunktet i disse vektene ble det gjennomført fraksjonering ved hjelp av HPLC. Deretter ble kreftceller av typen Melanoma eksponert for fraksjonene for å måle celleoverlevelse i prosent. Det ble veid ut to mengder av det organiske ekstraktet fra de tre artene for å produsere HPLC fraksjoner. Grunnen til dette er at det var en del løsemiddel i de organiske ekstraktene sammenlignet med de vandige som var helt tørre.

¹ Vekten har gått tapt underveis i arbeidet.

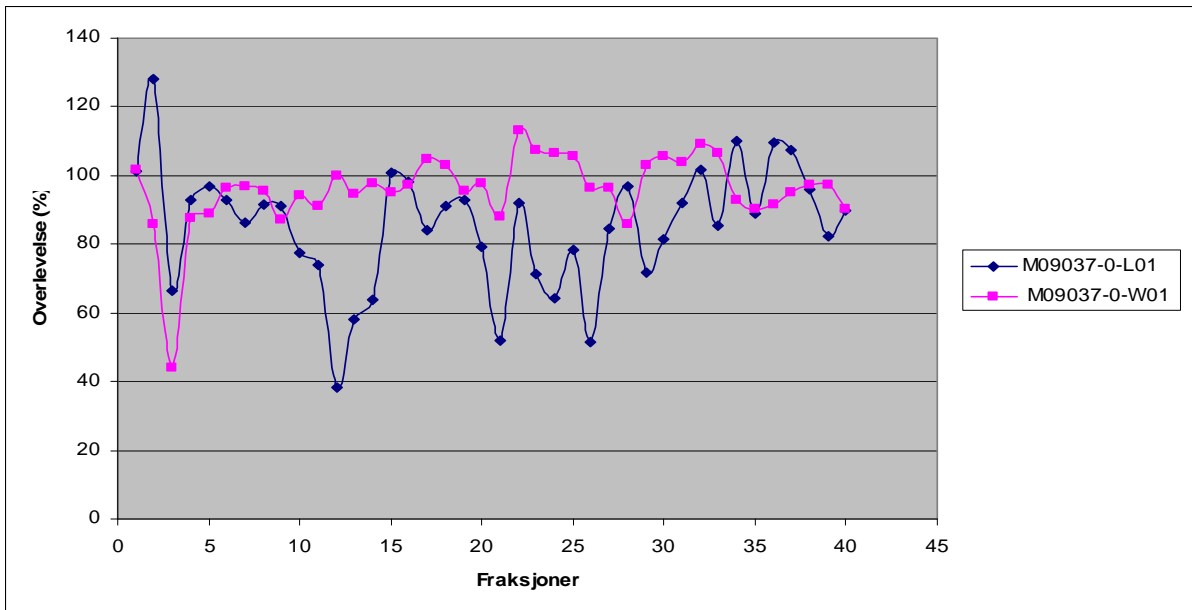
3.2 Anticancerscreening

Fraksjonene fra de tre marine organismene ble testet for anticancereffekt mot A2058. Fraksjonene ble definert som aktive ved mindre enn 40 % celleoverlevelse, usikre dersom det var mellom 40 -50 % celleoverlevelse og inaktive dersom det var mer enn 50 % celleoverlevelse. Man kunne se anticancereffekt på de organiske fraksjonene i flere etterliggende fraksjoner som i fraksjon 25-27 i M09036-0-L01 (se figur 17). Det var ikke tilfellet med aktiv fraksjon 38 i den vandige prøven M09036-0-W01.



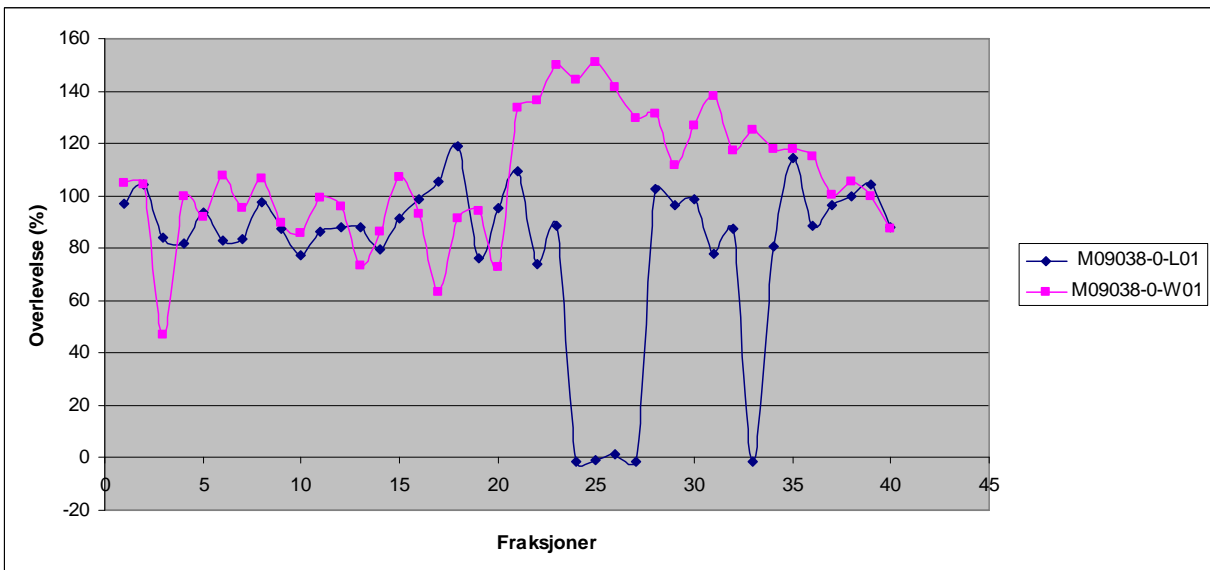
Figur 17: Celleoverlevelse etter eksponering av M09036-0-L01 og M09036-0-W01 (første screening), celleoverlevelse under 40 % indikerer aktive fraksjoner. Fraksjon 25-27 fra organiske og 38 fra vandige M09036 ble definert som aktive.

Fraksjon nummer 12 fra M09037-0-L01 var rett under 40 % overlevelse og ble definert som aktiv. Fraksjon 3 fra M09037-0-W01 og fraksjon 21 og 26 fra M09037-0-L01 viste mer enn 40 % overlevelse men mindre enn 50 % og var derfor definert som usikre (se figur 18). Bioaktiviteten funnet i den arten var mye svakere sammenlignet med M09036 og M09038. Celleoverlevelsen i aktive fraksjoner fra begge de to sistnevnte artene viste celleoverlevelse på 0 %. Det var ikke tilfelle hos organisk- eller vandige fraksjoner fra M09037. Fraksjon 12, 21 og 26 fra organiske og fraksjon 3 fra vandige ekstrakter i M09037 ble retestet for å vurdere om de skulle avsluttes eller tas videre i rensing.



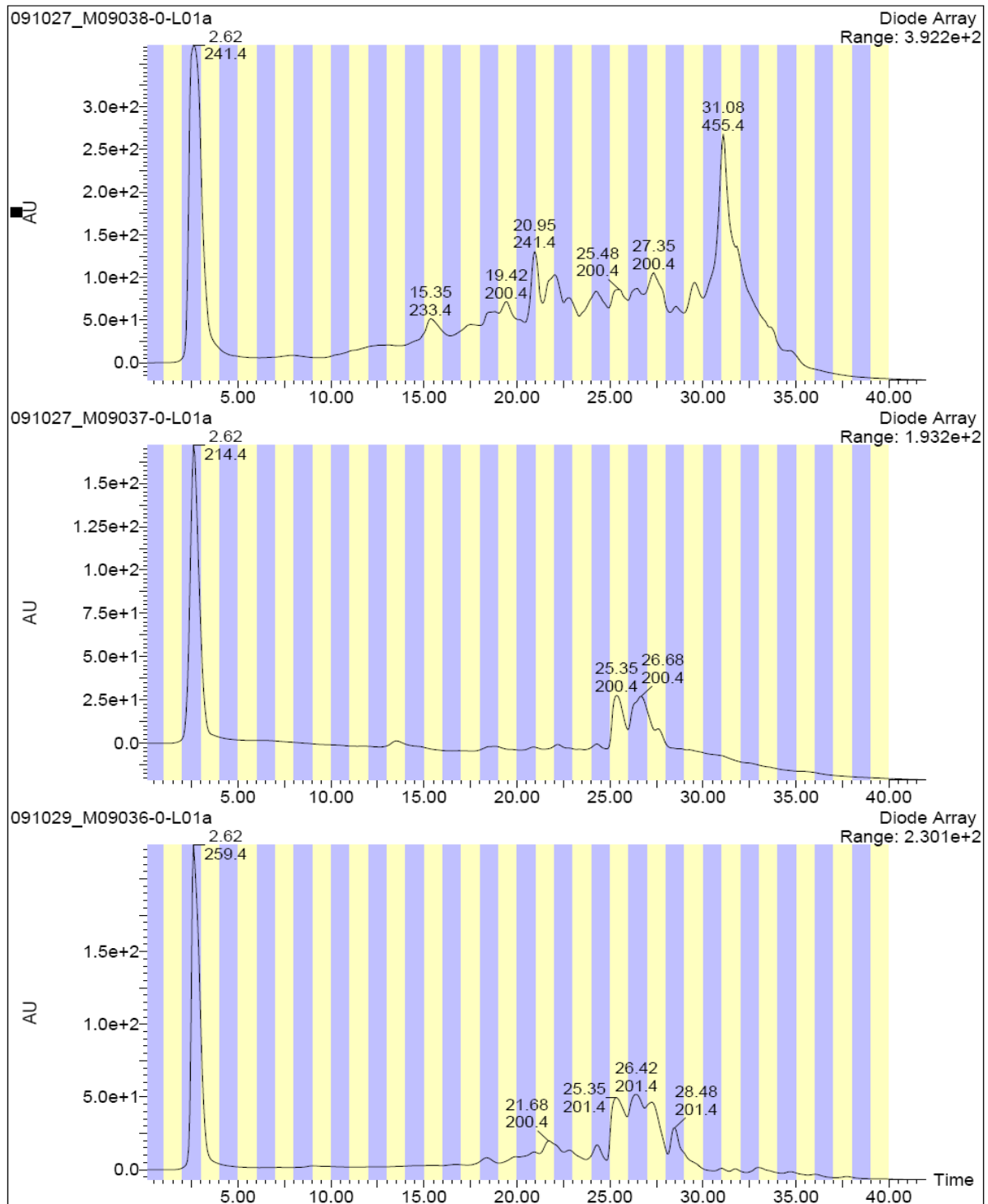
Figur 18: Celleoverlevelse etter eksponering av M09037-0-L01 og M09037-0-W01 (første screening), celleoverlevelse under 40 % indikerer aktive fraksjoner. Fraksjon 12 og 21 fra organiske og 3 fra vandige ble definert som usikre.

Fraksjon 24-27 og 33 fra M09038-0-L01 ble definert som aktive fraksjoner, mens fraksjon 3 fra M09038-0-W01 ble definert som usikker siden den lå på mellom 40 og 50 % overlevelse (se figur 19). En annen likhet var at de aktive fraksjonene kom i flere etterliggende fraksjoner, noe som kan bety at de har forbindelser som har like kjemiske egenskaper.

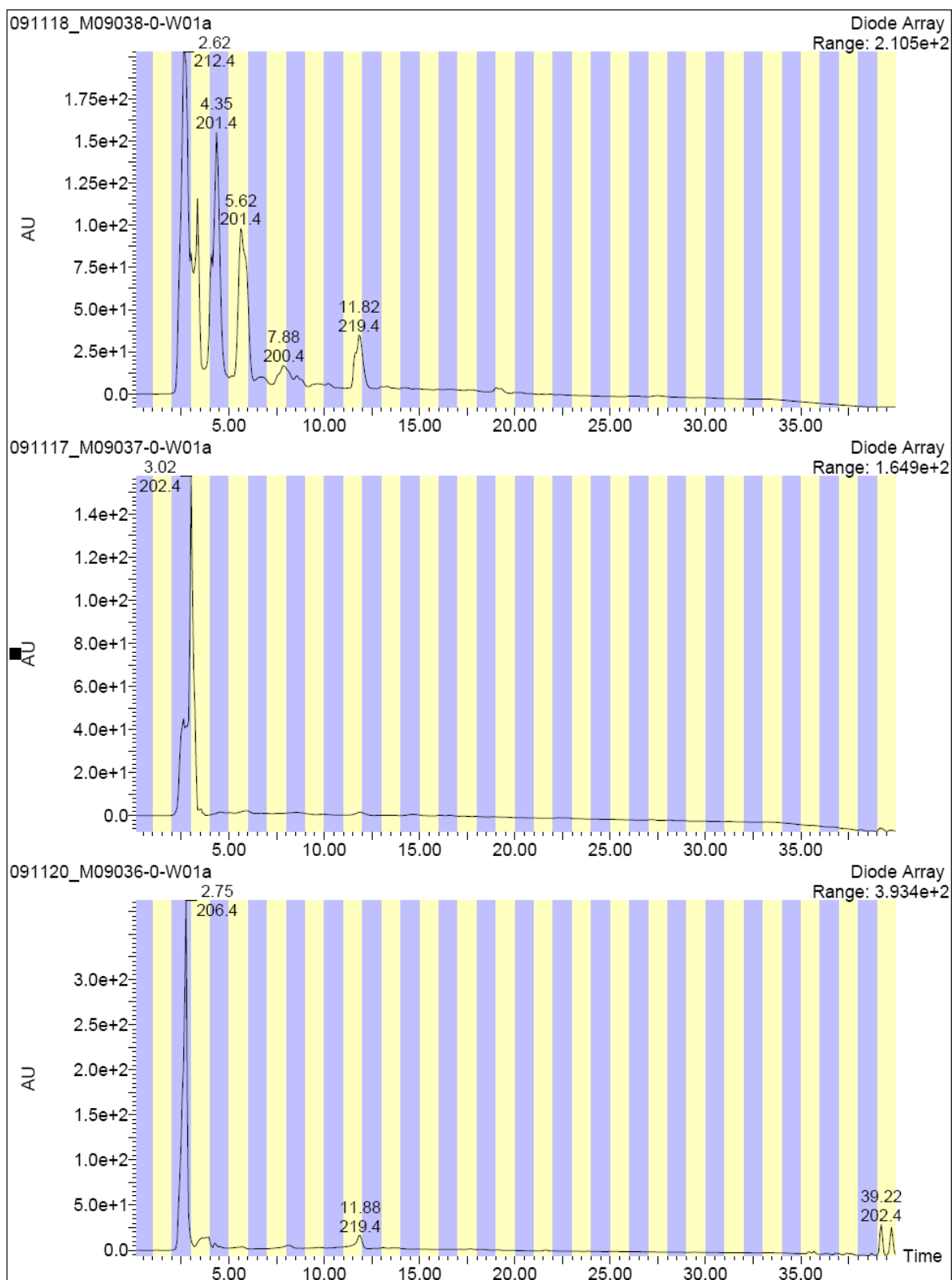


Figur 19: Celleoverlevelse etter eksponering av M09038-0-L01 og M09038-0-W01 (første screening), celleoverlevelse under 40 % indikerer aktive fraksjoner. Fraksjon 24-27 og 33 fra organiske definert som aktive fraksjoner, mens fraksjon 3 fra vandige er definert som usikker.

Figur 20 og 21 viser UV-kromatogrammene (200-600 nm) fra fraksjoneringene av de organiske- og vandige ekstraktene for alle de tre marine organismene som ble undersøkt. Man kunne se en økt absorpsjon i UV-spektret i de fraksjonene fra de organiske ekstraktene som var aktive i primær screeningen (se figur 17,18 og 19), men ingen økt absorpsjon i UV-spektret hos de vandige. Den første toppen som vises på alle spektrere er bare injeksjonstoppen.



Figur 20: UV kromatogram (200-600 nm) av de organiske ekstraktene fra første fraksjonering av M09036-0-L01 (nederst), M09037-0-L01 (midten) og M09038-0-L01 (øverst).



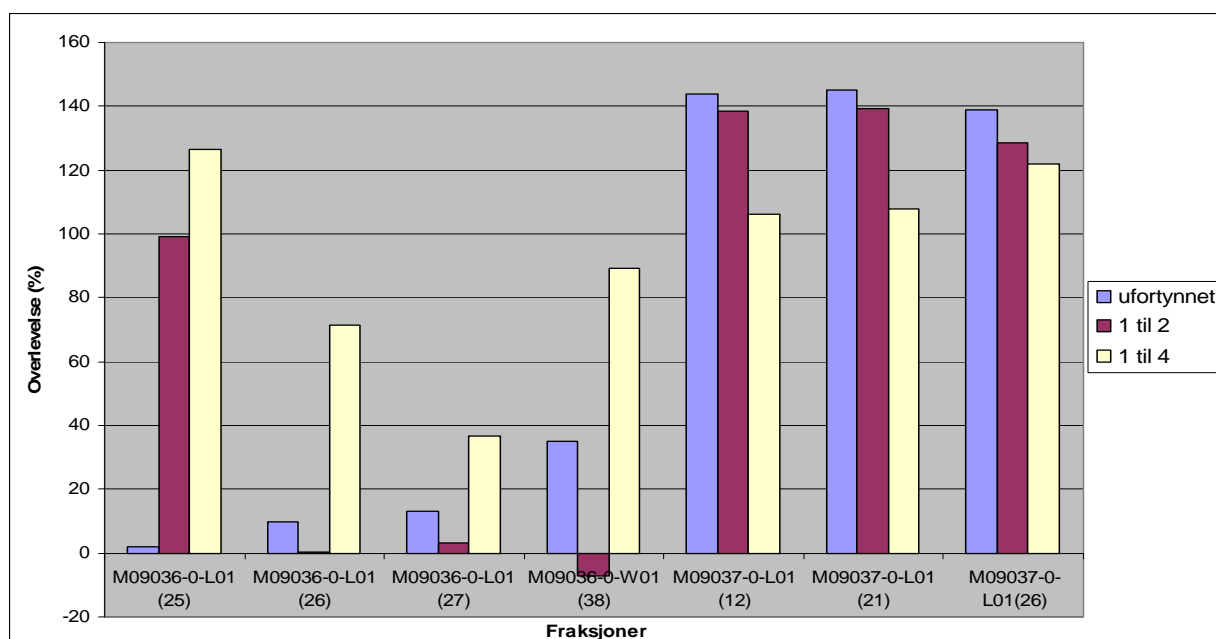
Figur 21: UV kromatogram (200-600 nm) av de vandige ekstraktene fra første fraksjonering av M09036-0-W01 (nederst), M09037-0-W01 (midten) og M09038-0-W01 (øverst).

3.3 Retesting

Aktive fraksjoner fra primær screening skulle videre retestes i en fortynningsserie. Fraksjonene ble testet i to paralleller for ufortynnet, samt i 1:2 og 1:4 fortyninger. Tabell 17 og 18 viser fraksjonene som ble retestet. Retestingen viste at noen av fraksjonene beholdt sin anticancer aktivitet selv etter fortykning (se figur 22 og 23). Derfor ble M09036-0-L01(fraksjonene 25, 26, 27) og M09036-0-W01(fraksjon 38) valgt til refraksjonering siden de hadde celleoverlevelse på under 40 %. De aktive fraksjonene fra M09038-0-L01 (24-27 og 33) og M09038-0-W01 (3) hadde vist god aktivitet i et parallelt forsøk hvor de ble screenet for antibakteriell aktivitet og ble derfor ikke prioritert videre i anticancer screening. Organiske og vandige fraksjoner av M09037 ble heller ikke rensset videre siden de ikke ga noen celleoverlevelse på under 40 % på retestingen i noen av fortynningsseriene (se figur 22). Man kan se at det er flere fraksjoner etter hverandre med aktivitet, noe som kan tyde på at det er samme substans eller lignende forbindelser som befinner seg i de påfølgende fraksjonene med anticancer aktivitet.

Tabell 17: Viser hvilke marine ekstrakter og fraksjoner som ble valgt til retesting til figur 22.

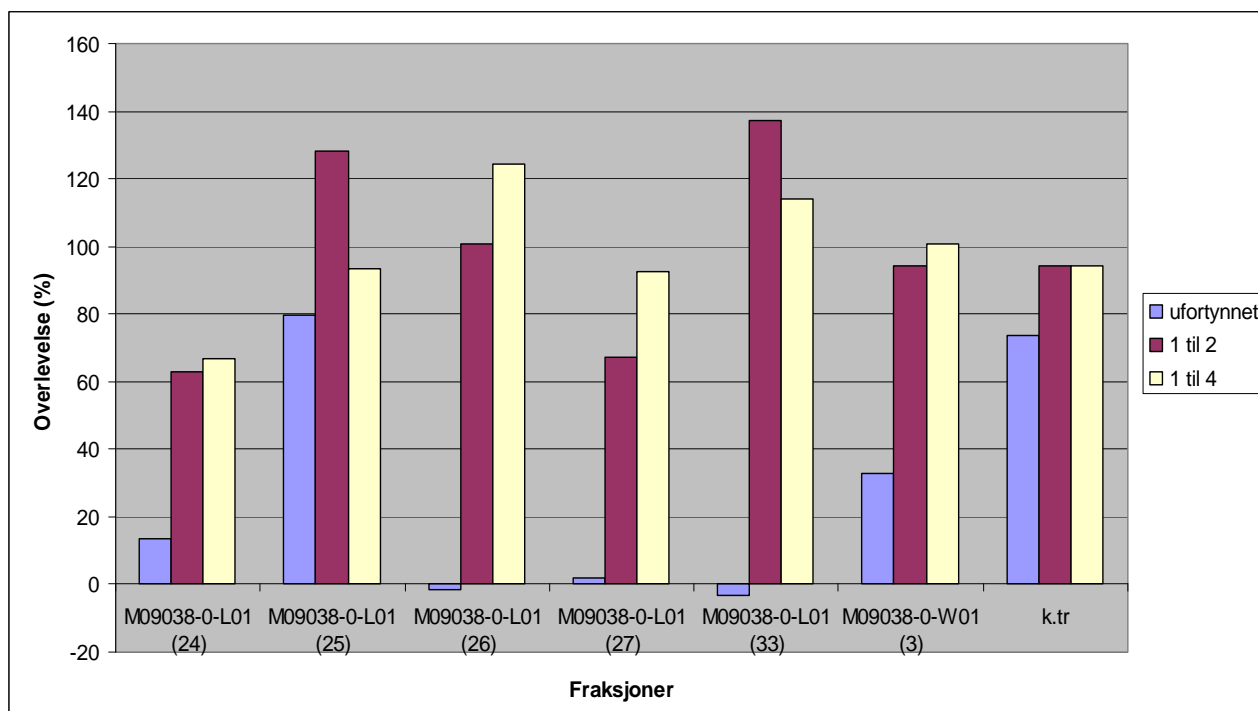
Ekstrakt	Fraksjoner
M09036-0-L01	25,26,27
M09036-0-W01	38
M09037-0-L01	12,21,26



Figur 22: Grafisk fremstilling av retesting av fraksjon 25,26 og 27 fra M09036-L01, fraksjon 38 fra M09036-0-W01 og fraksjon 12,21 og 26 fra M09037-0-L01.

Tabell 18: Viser hvilke marine ekstrakter og fraksjoner som ble valgt til retesting til figur 23.

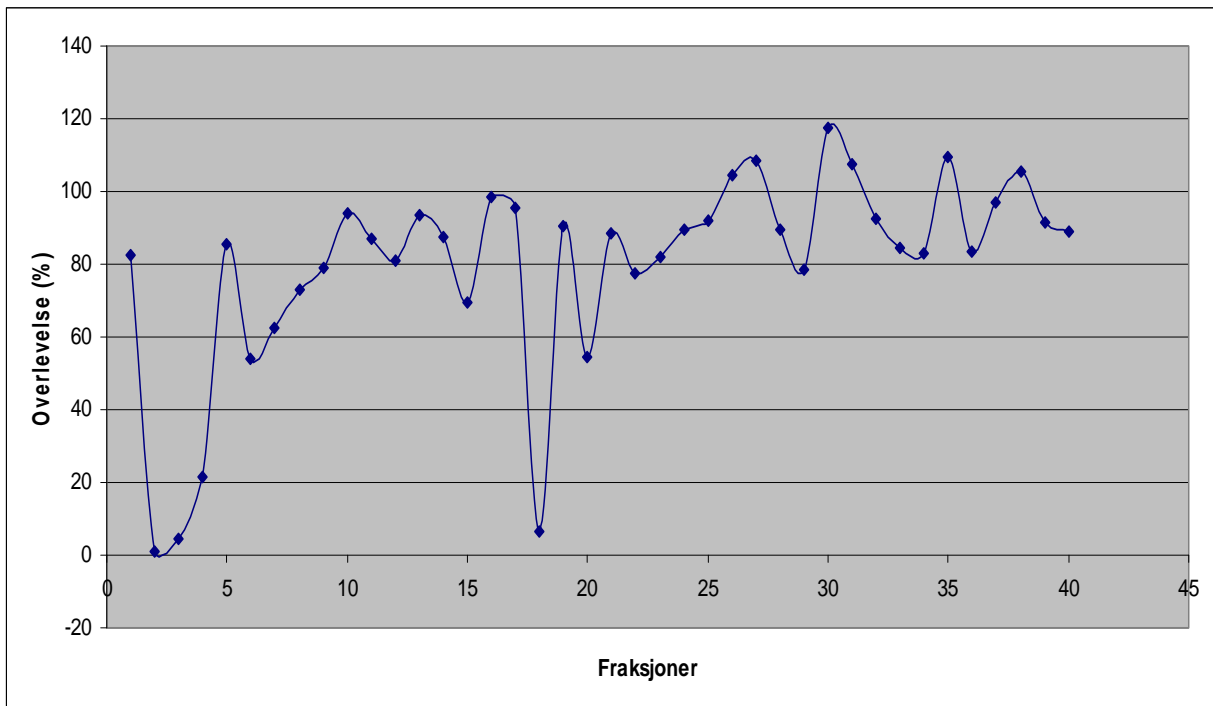
Ekstrakt	Fraksjoner
M09038-0-W01	3
M09038-0-L01	24,25,26,27,33



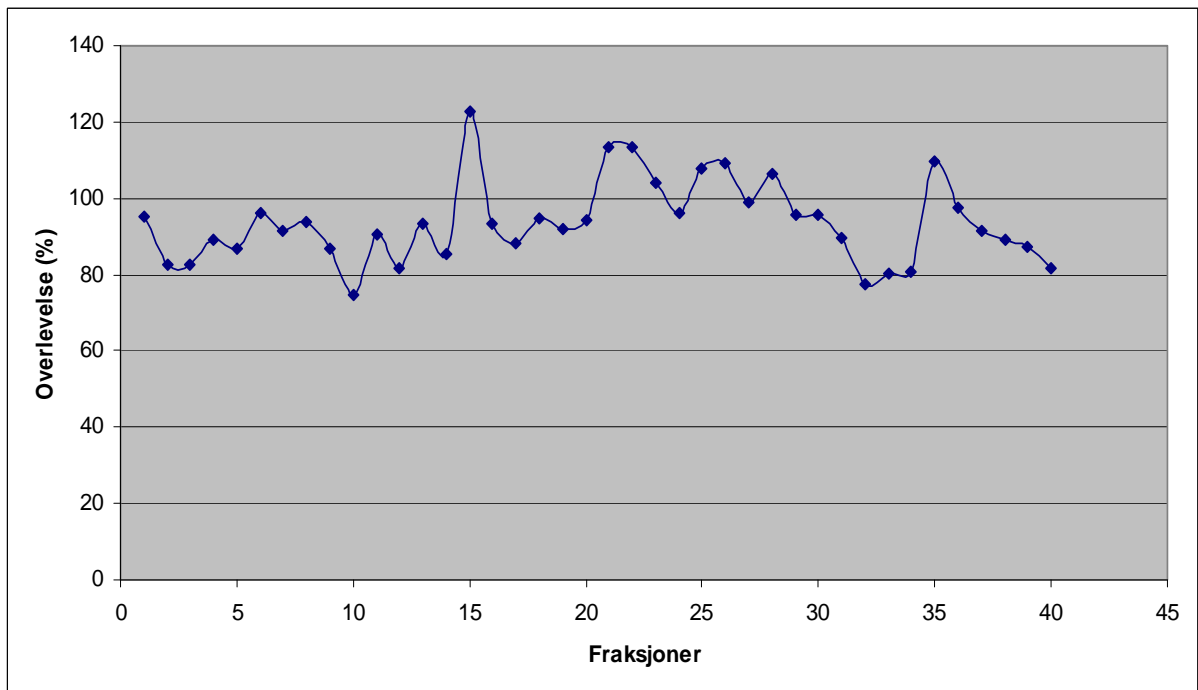
Figur 23: Grafisk fremstilling av de ulike fraksjonene som viste at de mister sin aktivitet under fortytning. Fraksjon 24-27 og 33 fra M09038-0-L01 og fraksjon 3 fra M09038-0-W01.

3.4 Refraksjonering

Etter første screening og retesting ble det foretatt refraksjonering av de aktive fraksjonene. Refraksjoneringen ble gjort på en annen HPLC-gradient og med en annen kolonne enn under de første fraksjoneringene. Dermed var det ikke forventet å få eluert de aktive forbindelsene i de samme fraksjonene som etter den første fraksjoneringen. Det var fire fraksjoner som var aktive etter refraksjonering (se figur 24), fraksjonene 2, 3, 4 og 18 fra M09036-0-L01. Etter refraksjonering av M09036-0-W01 forsvant aktiviteten fullstendig (se figur 25). Det kan være flere forklaringer for tap av aktivitet. Bl.a. tap av materiale er noe som skjer under opprensning og overføring underveis.



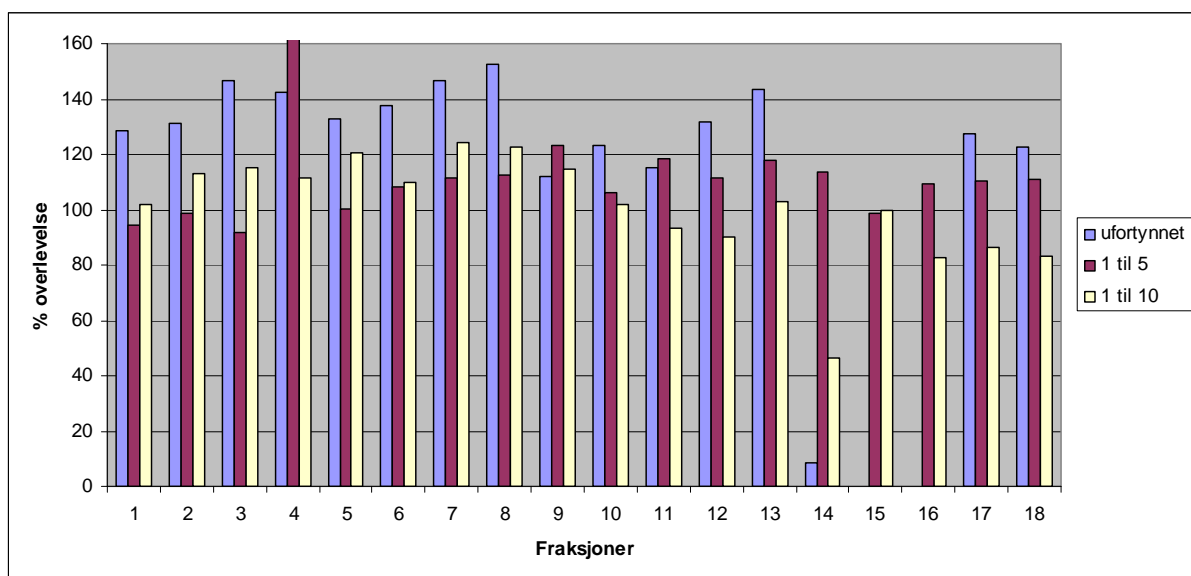
Figur 24: Celleoverlevelse i de 40 fraksjonene ved refraksjonering av M09036-0-L01(25,26,27), hvor fraksjon 2,3,4 og 18 viser celleoverlevelse på under 40 %



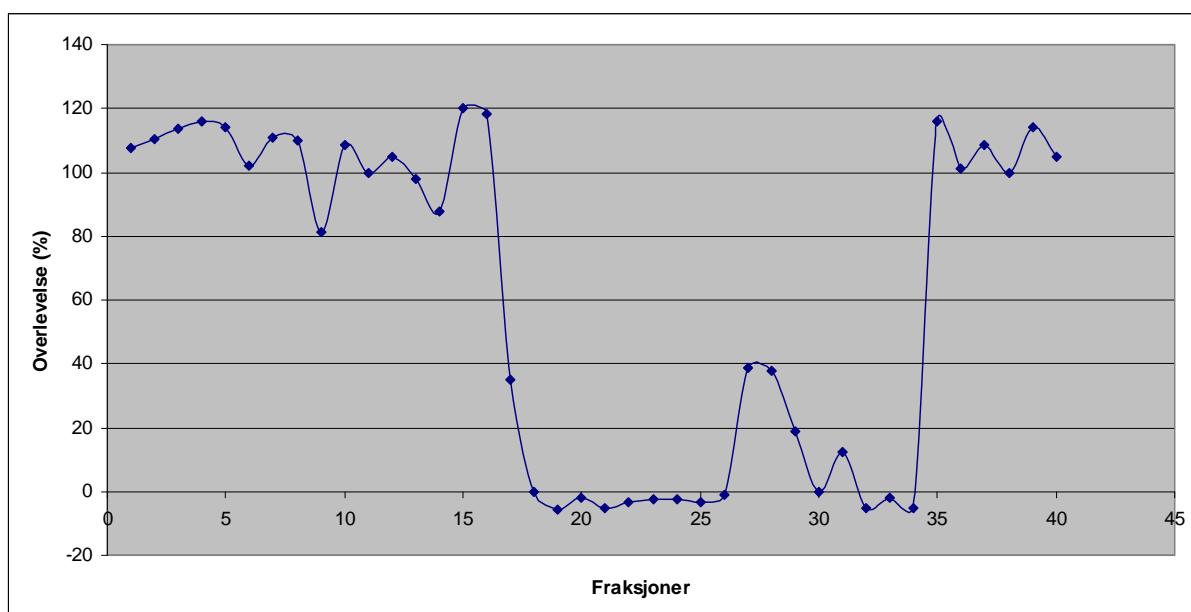
Figur 25: Celleoverlevelse i de 40 fraksjonene ved refraksjonering av M09036-0-W01(38), hvor ingen av fraksjonene viste anticanceraktivitet.

3.5 Flash kromatografi og doserespons

Det organiske ekstraktet M09036-0-L01 ble fraksjonert på Flash for å rense opp større mengder av de aktive forbindelsene å kunne gjøre strukturbestemmelse. Det ble observert anticancereffekt i tre av 18 Flashfraksjoner, 14, 15 og 16 (se figur 26). De tre fraksjonene ble slått sammen og fordelt på 40 nye fraksjoner ved hjelp av HPLC. Etter screening viste flere etterfølgende fraksjoner (17- 34) anticancer aktivitet, noe som viser at aktiviteten ikke forsvant under opparbeidelse (se figur 27).

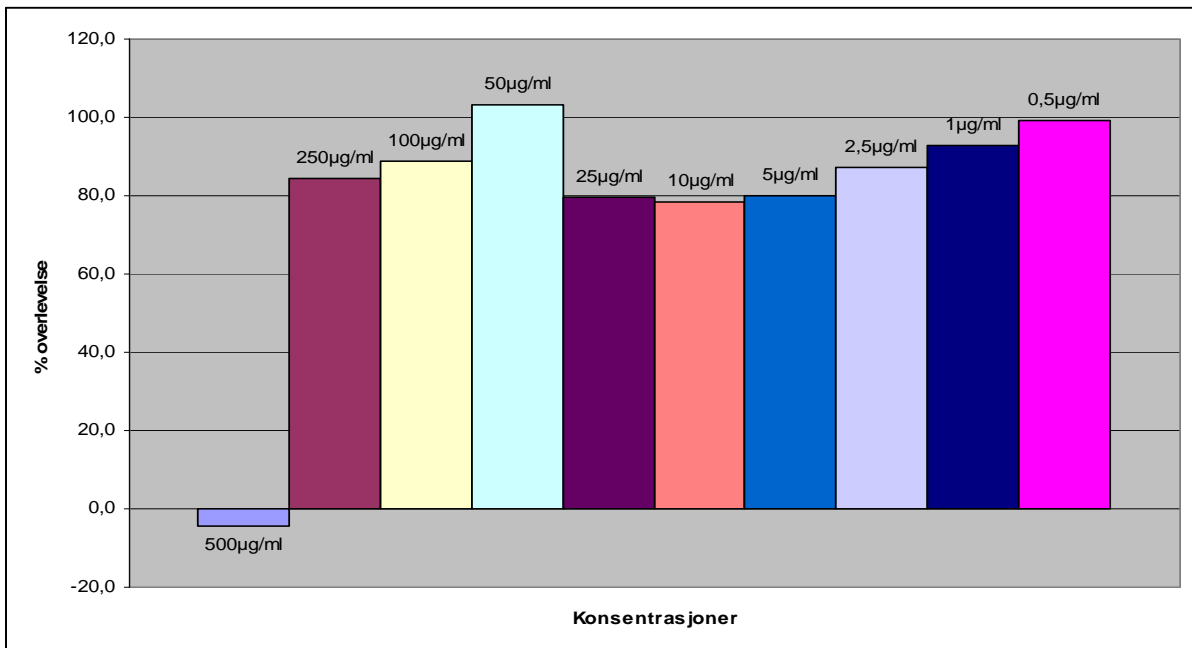


Figur 26: Grafisk fremstilling av Flash fraksjoner med ulik fortyning, % overlevelse under 40 viser anticancereffekt.

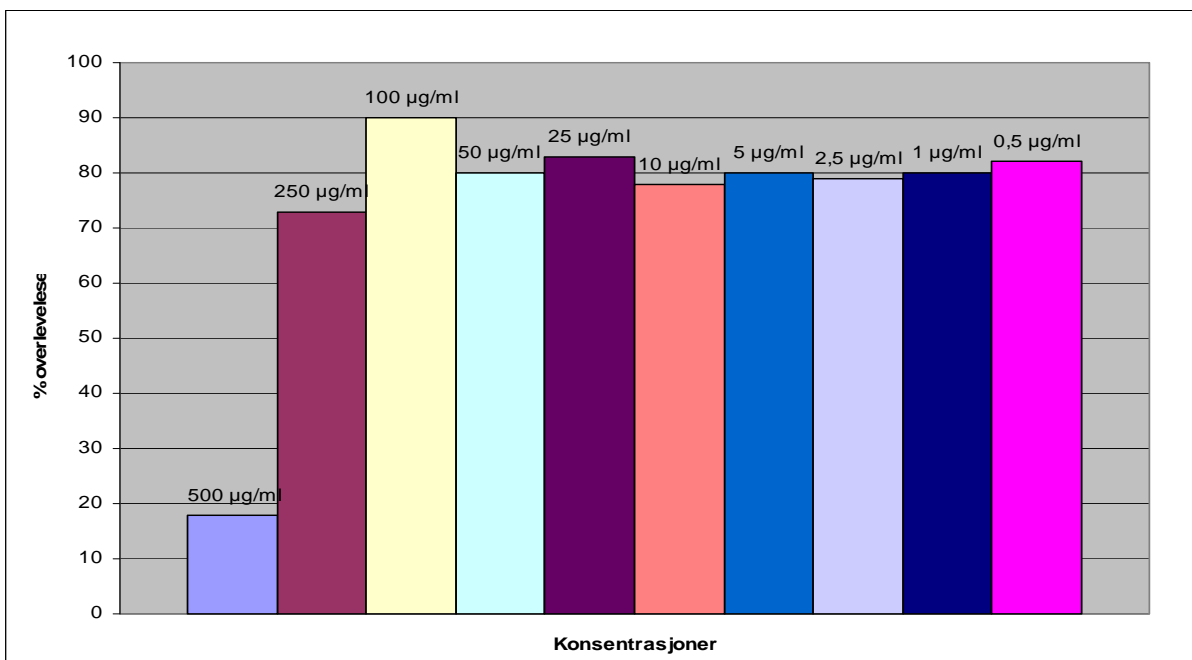


Figur 27: Grafisk fremstilling av M09036-0-L01, 14-15 og 16 fra Flash prøver. % overlevelse under 40 viser anticancer aktivitet i brønn nummer 17-34.

Det ble utført doserespons på de organiske ekstraktene fra M09036 og M09038 mot kreftcellene (A2058). Grunnen til at man tester råekstraktet for doserespons er for å beregne hvor potent et ekstrakt/fraksjon er i ett bioassay. Etter screening viste det seg at ekstraktene fra begge organismene ved 500 µg/ml viste anticancer aktivitet, mens de lavere konsentrasjonene fra fortynningsserien ikke viste noen merkbar aktivitet (se figur 28 og 29).

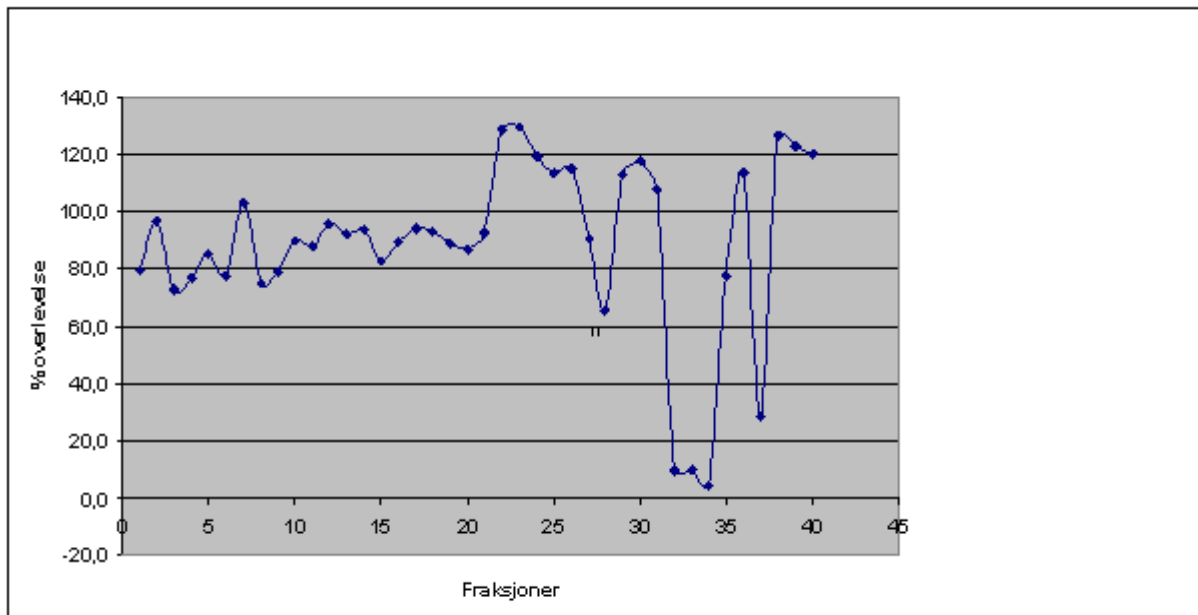


Figur 28: Viser dose respons til råekstraktet av M09036-0-L01, % overlevelse under 40 % viser anticanceraktivitet.



Figur 29: Viser dose respons til råekstraktet av M09038-0-L01, % overlevelse under 40 % viser anticanceraktivitet.

Denne aktiviteten var lavere enn forventet siden celleoverlevelsen i de aktive fraksjonene fra første fraksjonering, refraksjonering og Flash fraksjonering for M09036-0-L01 viste celleoverlevelse på nesten 0 %. Vi besluttet derfor å fraksjonere ekstraktet (M09036-0-L01) på nytt og teste fraksjonene for aktivitet mot melanoma kreftcelle for å bekrefte de resultatene vi hadde fått ved starten av prosjektet. Etter screening av de nye fraksjonene viste det seg at aktiviteten fremdeles var på plass i fraksjonene 32-34 og 37 (se figur 30). Til forskjell fra første primærfraksjonering eluerte ikke de aktive komponentene ut i de samme fraksjonene (se figur 17 og 30). Dette skyldes at det ble brukt en annen kolonne og et annet HPLC- system ved andre gangs gjennomføring, og det var derfor forventet at aktiviteten ikke ville komme i nøyaktig de samme fraksjonene.

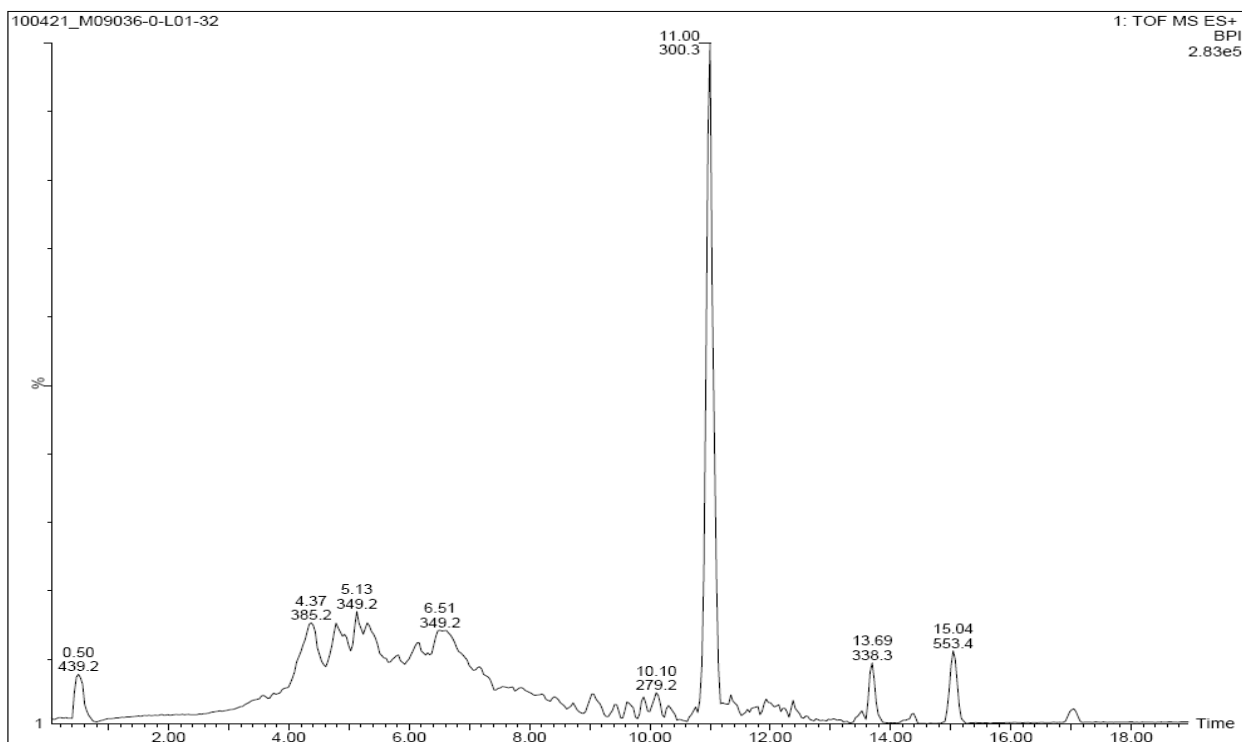


Figur 30: Celleoverlevelse i de 40 fraksjonene da A2058 celler ble eksponert for ny primær fraksjoner av M09036-0-L01, celleoverlevelse under 40 % indikerer aktive fraksjoner.

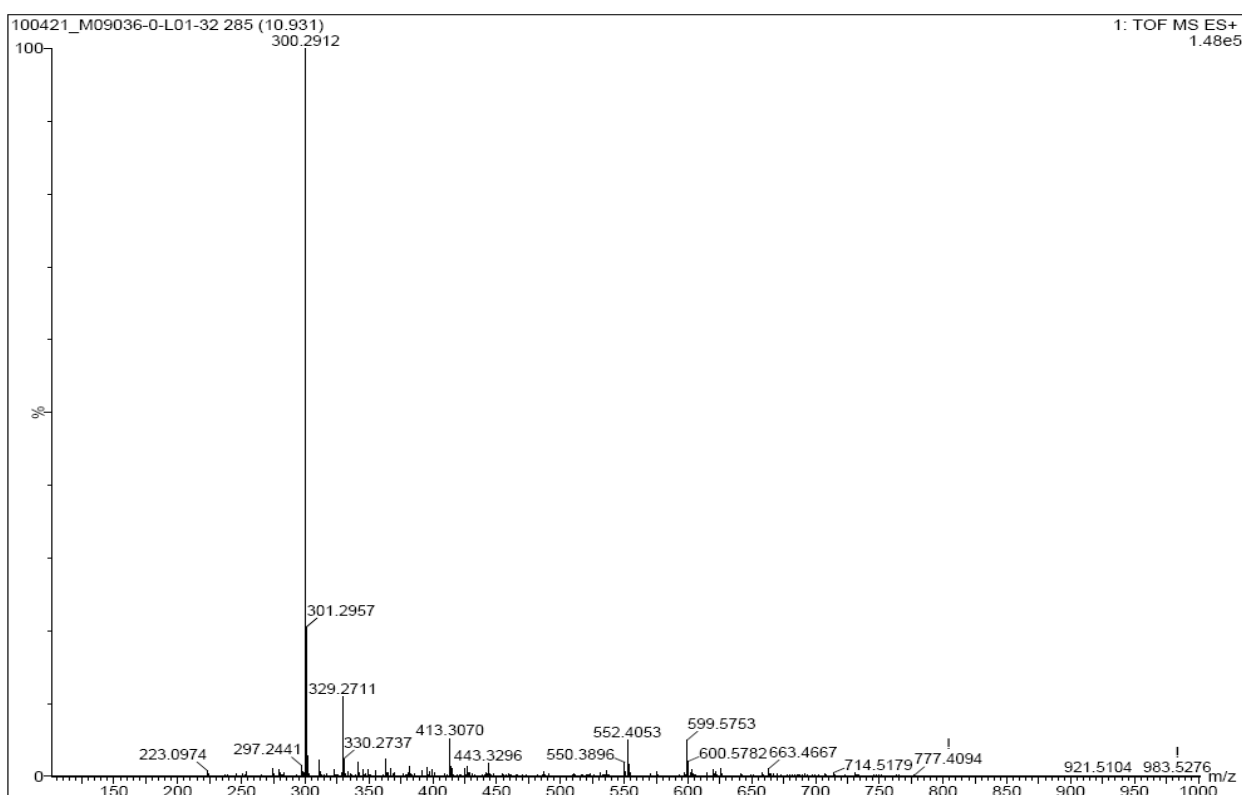
3.6 MS-analyse

De aktive fraksjonene fra primærfraksjonering (M09036-0-L01, 25-27) ble først analysert på LCMS-ESI-Q. Det ble benyttet positiv og negativ modus og gradienteluering. De signalene som ble observert var svake signaler, og ingen av disse kunne korrelerte særlig bra med bioaktiviteter og signal styrke. Svake signaler ble også observert i inaktive fraksjoner. De aktive fraksjonene (2-4 og 18) fra refraksjonering ble også analysert på LCMS-ESI-Q. Det var to ioner ved positiv modus som ble observert i alle de fire fraksjonene og ved negative modus var det noen andre ioner som ble observert uten å kunne tilkobles de ionene fra positiv modus. Siden det var mange svake signaler fra primær fraksjonering, ble det valgt å konsentrere prøven med dobbel så stor mengde (ny primær fraksjonering) slik at det ble forventet sterkere signal ved MS-analyse.

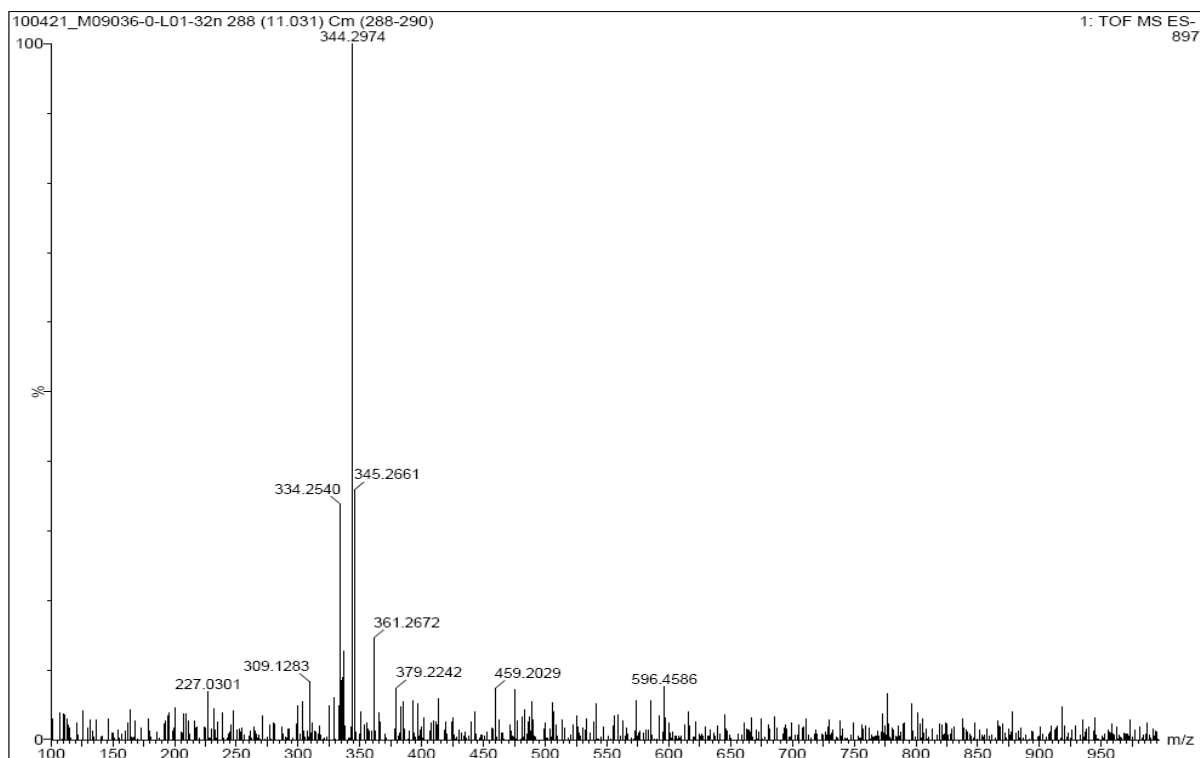
De aktive fraksjonene fra ny primærfraksjonering 32-34 og 37 fra M09036-0-L01 ble analysert på LCMS-ESI-TOF. Ionekromatogrammet for fraksjon 32 viste at en dominerende forbindelse eluerte etter 11 minutter (se figur 31). Massespektret til denne toppen hadde en base-peak med en m/z verdi på 300,2912 ved positiv modus (se figur 32). Dette signalet ble antatt å være den protonerte formen av molekylet ($[M+H]^+$), noe som ble støttet av at vi også observerte et svakt signal for natriumadduktet ved m/z 322,2754 ($[M+Na]^+$) og et sterkere signal for en protonert dimer ved m/z 599,5753 ($[2M+H]^+$). Dette tyder på at molekylvekten til den aktive forbindelsen var 299,2834 amu. Dette ble ytterligere bekreftet da samme fraksjon ble analysert i negativ modus og det ble observert signaler som korrelerte med addukter med deprotonert maursyre ved m/z 344,2794 ($[M+FA-H]^-$) og klorid ved m/z 334,2540 ($[M+Cl]^-$) (se figur 33).



Figur 31: Kromatogram av fraksjon 32 fra M09036-0-L01

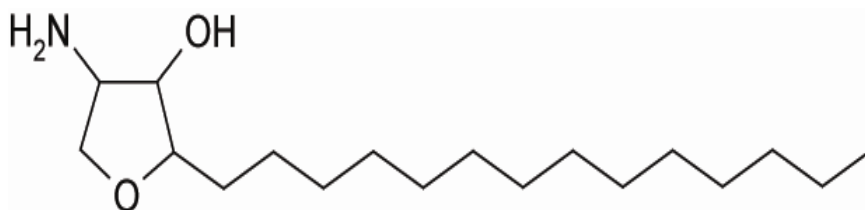


Figur 32: Massespekter av fraksjon 32 fra M09036-0-L01 ved LCMS-ESI-TOF som viser molekylionet 300,2912 amu ved positiv modus.

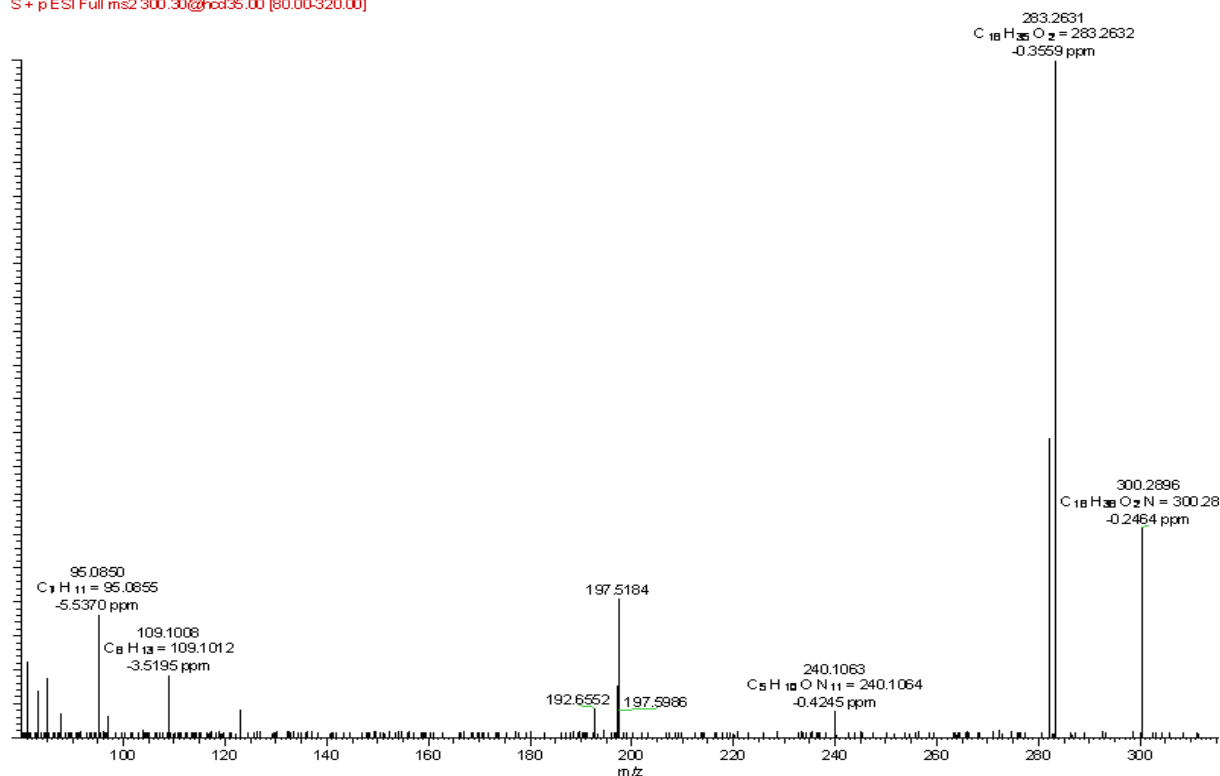


Figur 33: Massespekter av fraksjon 32 fra M09036-0-L01 ved LCMS-ESI-TOF som viser adduktene til 300,2912 amu ved negativ modus.

Ved å bruke den nøyaktige massen og isotopfordelingen til protonadduktet ble det beregnet at den mest sannsynlige molekylformelen til den bioaktive forbindelsen var $C_{18}H_{37}NO_2$. Fraksjon nummer 32 ble også analysert på LTQ Orbitrap for å se om man kunne finne forbindelse som ved LCMS-ESI-TOF. Massespektret viste et ion med m/z 300,2896 og ved å analysere disse ble molekylformelen til forbindelsen beregnet til å være $C_{18}H_{37}NO_2$ (se figur 35). Et søk i databaser over kjente bioaktive forbindelser fra marine organismer med denne molekylformelen ga 6 treff. En av disse, Jaspine B (se figur 34), er beskrevet som en cytotoxisk forbindelse, og tandem MS analyse tyder på at det er denne forbindelsen vi har funnet i vår ekstrakt.

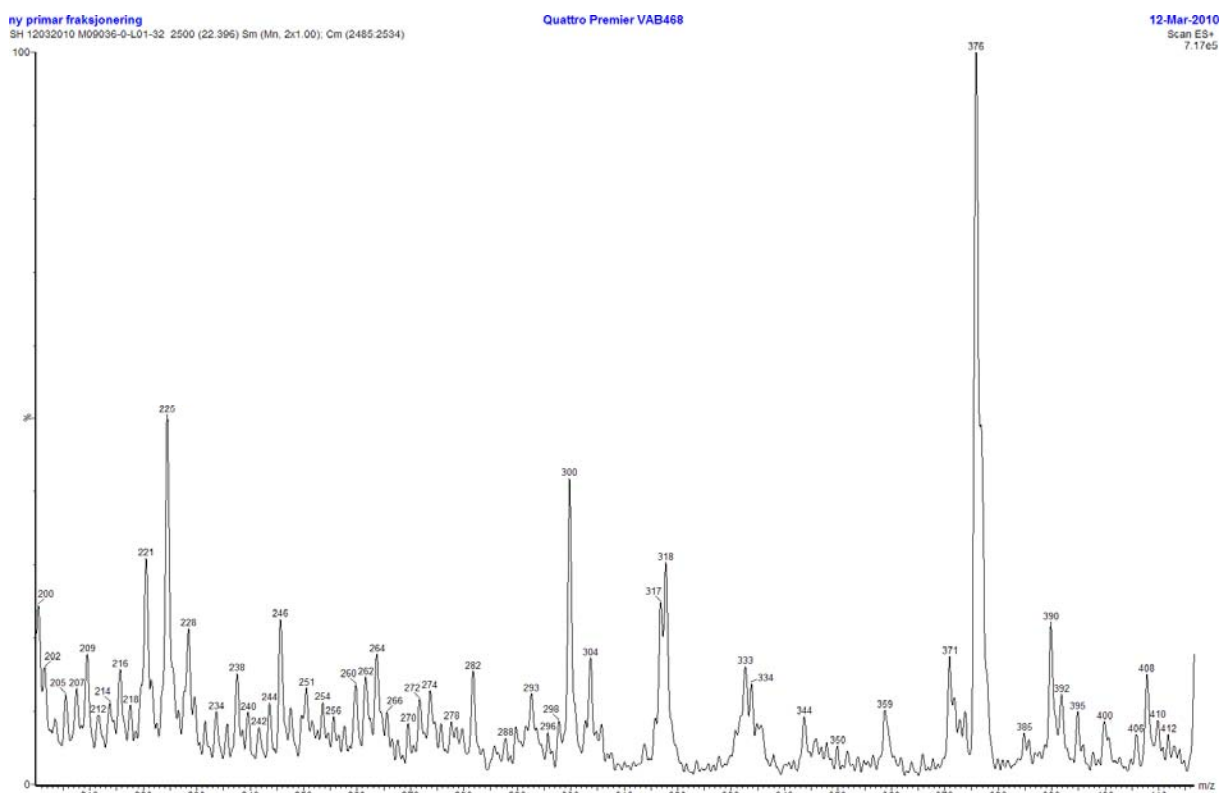
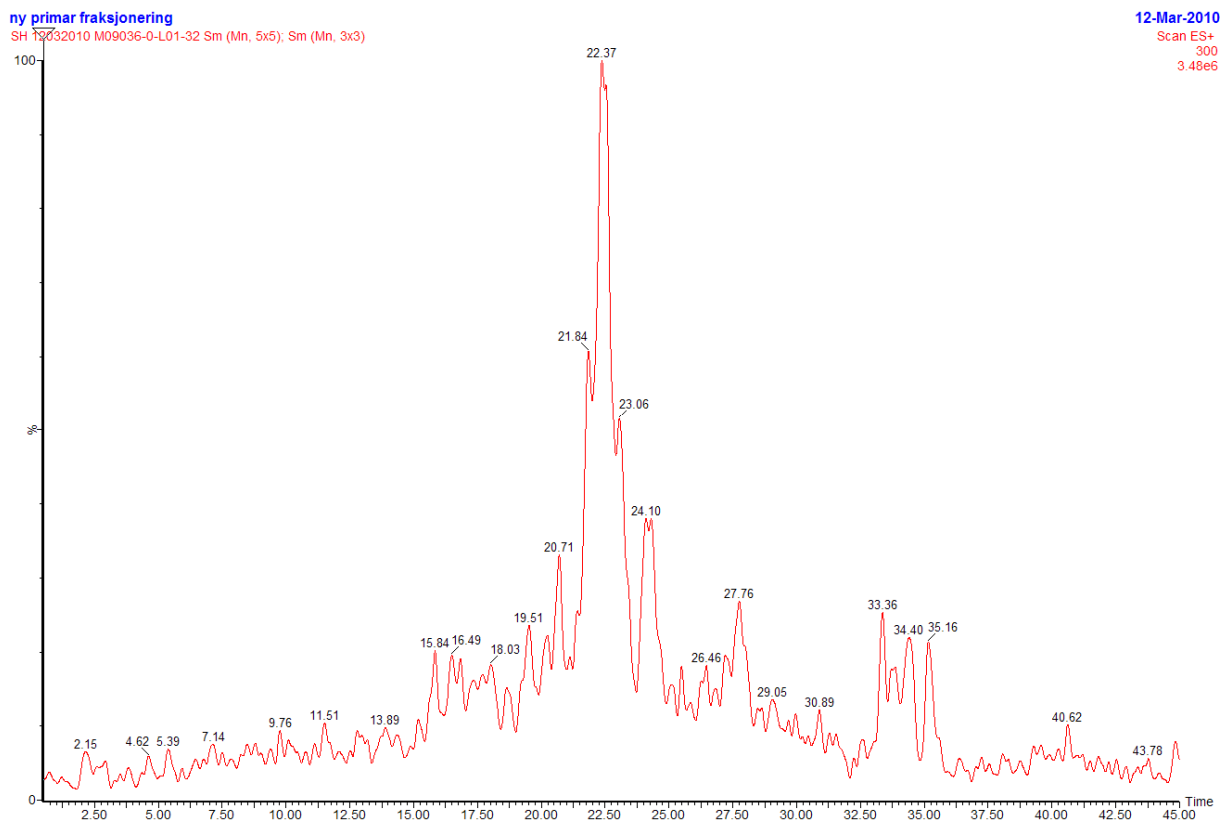


Figur 34: Viser struktur til Jaspine B.



Figur 35: MSMS-spekter av m/z 300,2896 fra M09036-0-L01 ved LTQ Orbitrap som viser molekylionet 300.2896 amu.

De aktive fraksjonene fra ny primærfraksjonering 32-34 og 37 fra M09036-0-L01 ble også analysert på LCMS-ESI-Q for å se etter ioner som kunne forklare aktivitet. Ved bruk av negativ modus på fraksjoner 32-34 og 37 ble det funnet noen svake signaler som ikke ble etterfulgt. Da det ble benyttet positiv modus på samme fraksjoner 32-34 og 37, ble det observert et ion i fraksjon 32 med m/z på 300. Kromatogrammet for 300 amu viste at ionet var eluert etter 22,37 minutter (se figur 36). Massespektret viste også et svakt signal på 300 amu (se figur 37).



De tre andre fraksjonene nummer 33, 34 og 37 hadde ikke vist noen spesielle ioner som kunne være av interesse. Det var for det meste svake signaler med noen kjente signaler som relateres til støy og plast.

4. Diskusjon

Det ble utført screening av fraksjoner av organiske og vandige ekstrakter til de tre marine organismene for å finne ut om de hadde anticanceraktivitet. Resultatene fra første screening viste ulik aktivitet for de tre marine organismene. De vandige ekstraktene av både M09037-0-W01 og M09038-0-W01 viste noe aktivitet i fraksjon nummer 3, en mulig forklaring på dette kan være at det finnes salt i nettopp den fraksjonen. Generelt finnes det store mengder av uorganiske salter i form av NaCl i marine prøver, noe som kan påvirke bioaktiviteten man måler i ulike bioassay. Tilstedeværelse av store mengder av uorganiske salter i marine ekstrakter kan dessuten forårsake forstyrrelser i kromatografiske systemer [47].

Man kunne se at aktiviteten i disse tidlige fraksjonene fra de vandige ekstraktene forsvant da det ble fortynt. Utfordringen med salt kan løses dersom det kjøres Flashkromatografi på forhånd, ettersom kolonnen som prøven elueres fra vil bli vasket med Milli Q-vann, men man risikerer likevel å miste små polare molekyler med bioaktivitet (f. eks. karbohydrater) siden disse er vanskelig å skille fra salter. Man så at det ikke fantes noen aktivitet i fraksjon tre fra Flash fraksjonene, men heller flere etterliggende aktive fraksjoner som eluerer seinere. I første runde hadde M09037-0-L01 og M09037-0-W01 ingen fraksjoner med klare aktiviteter, kun noen fraksjoner som viste svak aktivitet. Derfor ble ikke M09037 arten prioritert i videre arbeid.

Det er flere faktorer som kan påvirke produksjon av sekundære metabolitter hos marine organismer. Geografiske, miljøfaktorer, kjemiskfenotype og sesongmessige variasjoner kan spille en viktig rolle. Aktive fraksjoner fra M09036-0-L01 og M09038-0-L01 hadde noe likhet når det gjelder celleoverlevelse. Det ble observert flere etterliggende aktive fraksjoner og som ga 0 % i celleoverlevelse og de eluerte også til omtrent samme tid. De organiske ekstraktene fra primær fraksjonering hadde treff på flere fraksjoner, 10 treff totalt fra alle organismene, sammenlignet med de vandige med 3 treff.

Etter første runde med anticancerscreening ble det selektert aktive fraksjoner fra seks ulike ekstrakter for retesting (se figur 22 og 23). Målet med retesting var å bekrefte anticanceraktivitet i de ulike aktive fraksjonene og se om resultatene var reproducerbare. Det var store ulikheter mellom de ulike ekstraktene med tanke på celleoverlevelse. Man kunne se

at det var mindre celleoverlevelse på de organiske ekstraktene enn de vandige. Fraksjon 26 og 27 av M09036-0-L01 og 38 av M09036-0-W01 hadde vist mindre celleoverlevelse til og med ved uforynnet og 1 til 2 fortyninger. Det kan tyde på at forbindelser med anticancereffekt som befinner seg i disse tre fraksjonene beholder sin aktivitet selv ved fortyning. Etter retesting ble de aktive fraksjonene 25, 26 og 27 fra M09036-0-L01 og 38 fra M09036-0-W01 valgt ut til refraksjonering. Poenget med refraksjonering er videre opprensning av de aktive molekylene i de ulike fraksjonene med anticancereffekt. Det ble løst opp ekstrakter fra tre dypbrønnsplater til refraksjonering og de ble slått sammen for å oppnå høyere konsentrasjon.

For å rense opp større mengder ekstrakt og teste det for anticancereffekt ble M09036-0-L01 renses ved hjelp av Flash-kromatografi. Flashfraksjonene ble samlet i 18 reagensrør og testet for biologisk aktivitet (screening). Det ble påvist aktivitet i tre etterfølgende fraksjoner (14, 15 og 16, se figur 26). HP20SS ble brukt som pakkemateriale under flashkromatografien. Siden den har store porer og et stort overflateareal ($600 \text{ m}^2/\text{g}$) har den høy kapasitet for å adsorbere organiske komponenter. Det fører til at man klarer å rense større mengde marine ekstrakter og ikke minst oppkonsentrere de bioaktive forbindelsene. Metoden vil effektivt separere organiske bestanddeler fra uorganisk salt og kan oppkonsentrere den aktive komponenten. I tillegg skiller den kromatografiske atferden til HP20SS seg fra C18 i at det også skiller etter selektivitet for aromatiske komponenter. Derfor representerer HP20SS en ortogonal kromatografisk tilnærming til C18 [23]. Selektiviteten kan forklares ved at HP20SS danner en aromatisk ikke-polar overflate som anskaffer selektivitet for hydrofobe overflater i molekylet. Den store overflaten gjør at en stor mengde av prøven kan akkumulere i den fra en vandig løsning.

De tre aktive Flash-fraksjonene ble slått sammen, dampet inn og fraksjonert ved hjelp av HPLC i 40 nye fraksjoner. Da disse fraksjonene ble screenet ble det påvist anticancereffekt i flere etterliggende fraksjoner (fraksjon 17 til 24, se figur 27). En forklaring på denne brede aktiviteten kan være at HPLC-kolonnen ha vært belastet med for mye stoff og dermed vil de aktive forbindelsene eluere ut i flere etterliggende fraksjoner. Det ble ikke fulgt opp disse dataene pga knapphet med tid, men det er et godt utgangspunkt for videre studier. I noen av disse brønnene var aktivitet mot melanoma celler så høy at man må undersøke om friske humane celler vil overleve etter en slik eksponering. Hvis det ikke er tilfelle så vil det være ugunstig for videre utvikling av mulige anticancermedisin med mindre man fortyner det. Doserrespons ble utført for å finne i hvilke konsentrasjoner man kunne se anticancer effekt.

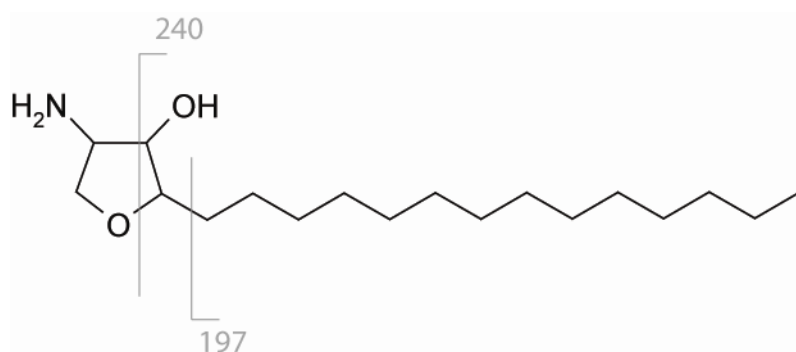
Den tørkede prøven som ble tilsatt 200 μ L DMSO var ikke helt løst selv om det ble ristet i cirka 1 time. Det kan være noe av forklaringen på hvorfor man ikke fikk aktivitet ved lave konsentrasjoner. Det kan tenkes ved å gå opp i mengde DMSO ved oppløsningen av fraksjoner generelt, ville man løst mer organiske forbindelser. Det vil muligens føre til flere anticancer treff under screening. En annen forklaring kan være utfelling som kan forekomme under fortynningsserien, for at forbindelsen som er løst i DMSO i utgangspunktet vil være mindre løselig i vekstmedia som benyttes i screening.

Det finnes mange verktøy som kan brukes for å strukturoppklare og identifisere ukjente forbindelser som finnes i plante- og marine råmaterialer. I oppgaven ble det ikke brukt kjernemagnetisk resonans (NMR) og infrarød (IR) spektroskopi. Det ble ikke brukt IR eller NMR fordi disse teknikkene forutsetter at prøven ikke inneholder forurensninger. De er dessuten mye mindre følsomme enn MS og krever større mengder av de aktive forbindelsene. Strukturoppklaring ble derfor gjennomført ved hjelp av MS i denne oppgaven.

De aktive fraksjonene fra første primær fraksjonering av M09036-0-L01, 25-27 (se figur 17) ble først analysert på LCMS-ESI-Q for å forsøke å bestemme molekylvekt. De ionene som ble observert på massespektret hadde generelt lav intensitet noe som igjen tyde på at det finnes små mengder av dem i fraksjonen. Det ble også observert noen andre ioner men disse forekommer i alle fraksjoner og skyldes blant annet signaler fra mobilfasene og forurensninger i analysesystemet, og de er dermed utelukket som eventuelle kandidater til bioaktive forbindelser. I kromatogrammet til fraksjon 27 ser man flere topper med lav intensitet både i positiv og negativ modus, og heller ikke her er det de samme ionene man ser i både positiv og negativ ESI. Hvis man sammenligner kromatogrammene fra positive og negative modus ser man også at ionene hadde ulike retensjonstider. I mange tilfeller vil tilgjengelighet av en ikke-selektiv komponent kunne maskere aktiviteten til en mer selektiv komponent. I tillegg vil mange aktive forbindelser være tilstede i rækstraktet i så lave konsentrasjoner at de er under detekteringsgrensen for analyseinstrumentene eller screeningmetodene. Aktive forbindelser kan utgjøre så lite som 0,01 % av rækstraktet, og kan i tillegg bli maskert av andre forbindelser som forekommer i større mengder [23]

Det ble gjort en ny primær fraksjonering av M09036-0-L01 på LCMS-ESI-Q for å se om det var mulig å finne sterkere signaler enn det som ble funnet ved første primær fraksjonering. Retensjonstiden for de aktive fraksjonene ble forsinket sammenlignet med første primær

fraksjonering (se figur 17 og 30). Det var på grunn av bruk av to ulike kolonner med forskjellig overflatekemi og gradient ved fraksjonering. Det var fire fraksjoner som viste anticancer effekt under screening (32-34 og 37). Fraksjon 32 hadde et ion som skilte seg ut fra de andre. Dette ionet ble observert i samme fraksjon 32 da M09036-0-L01 ble analysert på LCMS-ESI-TOF, Orbitrap og LCMS-ESI-Q med et protonaddukt på 300,3 amu. Først ble det foretatt en beregning av molekylformel ved å analysere de høyoppløselige og nøyaktige massdataene fra LCMS-ESI-TOF og Orbitrap-analysene, og i begge tilfeller var den mest sannsynlige molekylformelen $C_{18}H_{37}NO_2$. Deretter ble det søkt på denne summeformelen i Dictionary of Marine Natural Products for å se om det fantes kjente forbindelser med samme molekylvekt, og det ble funnet en forbindelse med navnet Jaspine B, $C_{18}H_{37}NO_2$, som har anticancer effekt og et molekylvekt på 299,49 amu. Den har tidligere blitt isolert fra to marine svamper med navnene *Pachasitissa sp.* og *Jaspin sp.* Jaspine B har evne til å drepe melanoma celler ved å virke på sphingomyelin syntase aktivitet og følgelig på ceramide dannelse som stimulerer apoptose [26]. I en syntesestudie som ble utført hvor det ble tatt utgangspunkt i D-ribo-Phytosphingosine fikk de samme molekylvekt, nemlig 300 amu, [48] noe som kan tyde på at samme stoff finnes i vår fraksjon nummer 32. Linjene som er vist på figur 38 indikerer mulige bindingsbrudd i Jaspine B som kan danne fragmentene som ses i MSMS. Det ble observert i massespektrometret til LTQ Orbitrap (se figur 35) en base-peak med en m/z verdi på 283,2631 som indikerer for tap av NH_3 og 282,2790 som indikerer tap av H_2O . I tillegg var det mulig å observere to andre signaler med m/z verdi på 197,5184 og 240,1063. Disse fragmentene kan antyde at vi har Jaspine B i vår ekstrakt, men videre strukturoppklaring med blant annet NMR vil være nødvendig for en sikker bekreftelse.



Figur 38: Viser struktur til Jaspine B.

Vi ønsket å sammenlikne fragmenteringsdataene av vår forbindelse med MSMS-spekter fra litteraturen dersom det var mulig å oppdrive for Jaspine B, men det ble ikke funnet MSMS data på den i litteratur. Det ble ikke funnet Jaspine B i de tre andre fraksjonene 33, 34 og 37

av M09036-0-L01 som kunne forklare anticancereffekt. Det kan forklares ved at det befinner seg andre substanser i fraksjonene som har anticancereffekt. Samtidig var det et problem at noen fraksjoner ga litt forskjellige kromatografiske resultater fra gang til gang selv om det ble brukt samme HPLC-kolonne og MS betingelser. Dette kan kanskje forklares blant annet av stabiliteten til ekstraktene og lave konsentrasjoner av aktive forbindelser i fraksjonene fra preparativ HPLC. Det er mulig at de ulike forbindelsene som befinner seg i prøven er ustabile pga kjemisk reaksjon eller degradering. Det er viktig å tenke på oksidasjon, pH, syrer og baser og lignende under ekstraksjon og analyse. Disse kan påvirke mengde bioaktive forbindelser som bevares gjennom en lang prosess med ulike analyser og biologiske tester etter at det er ekstrahert fra råmaterialet.

5. Appendiks

Tabell: Betingelser under MSMS analyse

Extractor (V)	3
RF Lens (V)	0,4
LM 1 Resolution	15
HM 1 Resolution	15
Ion Energy 1	1
LM 2 Resolution	14,5
HM 2 Resolution	14,5
Ion Energy 2	1
Multiplier (V)	600

MS-parameters typically used for positive mode high resolution spectra of peptides and similar molecules:

MS: Thermo electron LTQ Orbitrap XL + Electrospray ion source (ION-MAX) – The instrument was made at Thermo factory in Bremen, Germany

HPLC+Autosampler: Thermo scientific Accela with Thermo Hypersil Gold 50x2.1mm, 1,9um C18 reverse phase column

Typical values for ion source parameters when using syringe pump (may vary from sample to sample)

- Flow rate 5 ul/min
- ESI probe at position C in the ion source housing
- Sheat gas flow rate: 8
- Aux gas flow rate: 0
- Sweep gas flow rate : 0
- Spray voltage: 4.0 kV
- Capillary temp: 275°C
- Capillary voltage: 41V (variable)
- Tube lens: 120 (very variable)

Typical values for ion source parameters when using HPLC at flow 200 ul/min

- ESI probe at position C in the ion source housing
- Sheat gas flow rate: 40
- Aux gas flow rate: 5
- Sweep gas flow rate : 0
- Spray voltage: 4.0 kV
- Capillary temp: 300°C
- Capillary voltage: 41V (variable)
- Tube lens: 100 (variable)

Typical parameters for FTMS

- Mass Range: Normal
- Resolution: 100000 (syringe pump) , 30000 (HPLC) - (variable)
- Scan type: Full
- Microscans: 1

- Max. Inject Time: 250-500ms
- Locking on background ions m/z 391.284286 (Diisooctyl phthalate) + m/z 413.266231 (Diisooctyl phthalate sodium adduct) – others may also be used
- AGC target setting full MS: $5.00e+05$ – $1.00e+06$
- Data collected in profile mode
- Enable full scan injection waveforms checked

6. Referanser

1. Wensel, H. and A.-B. Herstad. *Ny strategi for Marin bioprospektering, pressemling Nr. 85/2009*
2. Frøstrup, J.C., *Liv og røre: norsk natur på nært hold*. 1990, Oslo: Grøndahl. 144 s.
3. Chris Battershill, M.J.a.P.L., *Marine biodiscovery; new drugs from the ocean depths 2005* **52**
4. Amador, M.L., et al., *Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources*. *Annals of Oncology*, 2003. **14**(11): p. 1607-1615.
5. Florence Folmer ¹ M.J., Mario Dicato ² and Marc Diederich *Marine Natural Products Libraries: Fast-Forwarding the Discovery of Potent Marine Drug Candidates*
6. Nuijen, B., et al., *Pharmaceutical development of anticancer agents derived from marine sources*. *Anticancer Drugs*, 2000. **11**(10): p. 793-811.
7. Matranga, V., *Echinodermata*. 2005, Berlin: Springer. XXIII, 275 s.
8. Moen, F.E. and E. Svensen, *Dyreliv i havet: nordeuropeisk marin fauna*. 2004, Kristiansund: KOM forl. 608 s.
9. Pawson, D.L. and H.B. Fell, *A revised classification of the dendrochirote holothurians*. *Breviora*, 1965. **214**: p. 1-7.
10. Moen, F.E. and E. Svensen, *Dyreliv i havet: håndbok i norsk marin fauna*. 2000, Kristiansund: KOM forl. 576 s.
11. Hansen, F.J.M.B., *Echinodermata, Holothurioidea in scandinavian University Press 1994*, Zoological Museum University of Copenhagen Copenhagen p. 72-75.
12. Kvenseth, P.G. and S. Mortensen (2006) *Lite utnyttede ressurser* 89-91.
13. Shimizu, Y., *Bioactive marine natural products, with emphasis on handling of water-soluble compounds*. *J Nat Prod*, 1985. **48**(2): p. 223-35.
14. Zhang, S.Y., Y.H. Yi, and H.F. Tang, *Bioactive triterpene glycosides from the sea cucumber *Holothuria fuscocinerea**. *J Nat Prod*, 2006. **69**(10): p. 1492-5.
15. Yuan, W.H., et al., *Antifungal triterpene glycosides from the sea cucumber *Bohadschia marmorata**. *Planta Med*, 2009. **75**(2): p. 168-73.
16. Bhakuni, D.S. and D.S. Rawat, *Bioactive marine natural products*. 2005, New York: Springer. XV, 382 s.
17. Birenheide, R., et al., *Peptides controlling stiffness of connective tissue in sea cucumbers*. *Biol Bull*, 1998. **194**(3): p. 253-9.
18. Mayer, A.M. and K.R. Gustafson, *Marine pharmacology in 2000: antitumor and cytotoxic compounds*. *Int J Cancer*, 2003. **105**(3): p. 291-9.
19. Suput, D., *In vivo effects of cnidarian toxins and venoms*. *Toxicon*, 2009. **54**(8): p. 1190-200.
20. Bernheimer, A.W., L.S. Avigad, and K.-S. Kim, *Comparison of metridiolysin from the sea anemone with thiol-activated cytolytins from bacteria*. *Toxicon*, 1979. **17**(1): p. 69-71, 73-75.
21. Mayer, A.M.S. and K.R. Gustafson, *Marine pharmacology in 2003-2004: Anti-tumour and cytotoxic compounds*. *European Journal of Cancer*, 2006. **42**(14): p. 2241-2270.
22. Fahmy, H., et al., *Potent Skin Cancer Chemopreventing Activity of Some Novel Semi-synthetic Cembranoids from Marine Sources*. *Marine Drugs*, 2006. **4**(2): p. 28-36.
23. Bugni, T.S., et al., *Fractionated marine invertebrate extract libraries for drug discovery*. *Molecules*, 2008. **13**(6): p. 1372-83.
24. Helms, R.A., *Textbook of therapeutics: drug and disease management*. 2006, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. XXXIV, 2780 s., [16] pl.

25. Thompson, J.F., R.A. Scolyer, and R.F. Kefford, *Cutaneous melanoma*. The Lancet, 2005. **365**(9460): p. 687-701.
26. Salma, Y., et al., *The natural marine anhydrophytosphingosine, Jaspine B, induces apoptosis in melanoma cells by interfering with ceramide metabolism*. Biochem Pharmacol, 2009. **78**(5): p. 477-85.
27. Herfindal, E.T. and D.R. Gourley, *Textbook of therapeutics: drug and disease management*. 1996, Baltimore: Williams & Wilkins. XXI, 1958 s.
28. Schwartsmann, G., et al., *Marine organisms as a source of new anticancer agents*. Lancet Oncol, 2001. **2**(4): p. 221-5.
29. Amador, M.L., et al., *Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources*. Ann Oncol, 2003. **14**(11): p. 1607-15.
30. Kolflåth, Ø.N., *Organiske utlekkstoffer fra resinbaserte tannrestaureringsmaterialer: utvikling av analysemetode ved bruk av kombinert gasskromatografi-massespektrometri og kjemisk ionisasjon*. 2009, Universitetet i Tromsø: Tromsø. p. 55 s.
31. E.Rasmussen, S.P.-B.K., *Apparatur for væskrokromatografi*, in *Legemiddelanalyse*. 2004, fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Oslo. p. 167-169.
32. Kirkland, J.J., F.A. Truszkowski, and R.D. Ricker, *Atypical silica-based column packings for high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2002. **965**(1-2): p. 25-34.
33. Stig Pedersen-Bjergaard, K.E.R., *Legemiddelanalyse*. 2004, Bergen Fagbokforlaget.
34. Swartz, M.E. *Ultra Performance Liquid Chromatography(UPLC): An Introduction*. may 2005.
35. Wilson, I.D., et al., *High Resolution "Ultra Performance" Liquid Chromatography Coupled to oa-TOF Mass Spectrometry as a Tool for Differential Metabolic Pathway Profiling in Functional Genomic Studies*. Journal of Proteome Research, 2005. **4**(2): p. 591-598.
36. Jr, W.C.S. and D.C. Hill, *General methods for flash chromatography using disposable columns* Springerlink May, 2009 **13**(Volume 13, Number 2/ May, 2009): p. 247-252.
37. El-Aneed, A., A. Cohen, and J. Banoub, *Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers*. Applied Spectroscopy Reviews, 2009. **44**(3): p. 210 - 230.
38. Yamashita, M. and J.B. Fenn, *Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme*. Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(20): p. 4451-4459.
39. Forsberg, K.L., *Utviklingen av en metode for påvisning av selektive serotonin reopptakshemmere i sjøvannsprøver med stort volum*. 2009, Universitetet i Tromsø: Tromsø. p. 93 s.
40. Herbert, C.G. and R.A.W. Johnstone, *Mass spectrometry basics*. 2003, Boca Raton, Fla.: CRC Press. 474 s.
41. Niessen, W.M.A., *Liquid chromatography-mass spectrometry*. 2006, Boca Raton, Fla.: Taylor & Francis. 608 s.
42. Hoffmann, E.d., J. Charette, and V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications*. 1996, Chichester: Wiley. XII, 340 s.
43. Ashcroft, A.E., *Methods in organic mass spectrometry*
44. Vasskog, T., *Occurrence of selected antidepressants in the Norwegian environment: pharmaceuticals in the environment*. 2008, Section of Medicinal Chemistry, Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Tromsø: [Tromsø]. p. 1 b. (flere pag.).
45. Wiley, W.C. and I.H. McLaren, *Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution*. Review of Scientific Instruments, 1955. **26**(12): p. 1150-1157.

46. Hu, Q., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. J Mass Spectrom, 2005. **40**(4): p. 430-43.
47. Shimizu, Y., *Bioactive Marine Natural Products, with Emphasis on Handling of Water-Soluble Compounds*. Journal of Natural Products, 1985. **48**(2): p. 223-235.
48. van den Berg, R.J.B.H.N., et al., *An Efficient Synthesis of the Natural Tetrahydrofuran Pachastrissamine Starting from d-ribo-Phytosphingosine*. The Journal of Organic Chemistry, 2005. **71**(2): p. 836-839.
49. Ledroit, V., et al., *Jaspines A and B: two new cytotoxic sphingosine derivatives from the marine sponge Jaspis sp.* Tetrahedron Letters, 2003. **44**(2): p. 225-228.