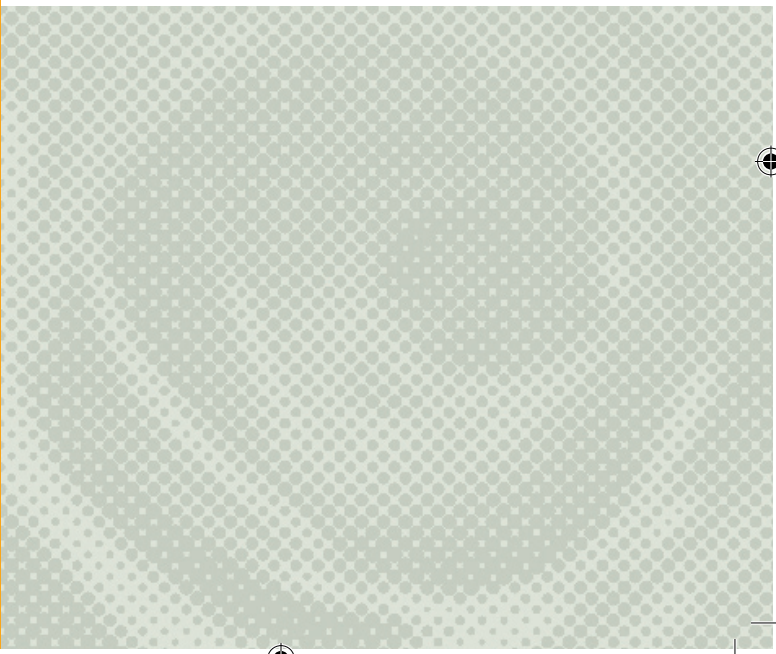


UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Forord

Masteroppgaven er utført ved Veterinær institutt (VI) i Oslo, seksjon for kjemi og toksikologi i samarbeid med Universitetet for bioteknologi og matvitenskap (UMB), institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKM). Denne oppgaven ble utført i tidsrommet august 2011 til desember 2012 og utgjør 30 studiepoeng og er en del av sivilingeniørprogrammet i kjemi og bioteknologi på til sammen 300 studiepoeng.

Dette er en kombinert analytisk og mikrobiologisk oppgave. Både den analytiske og den mikrobiologiske delen var utført ved VI.

Spesielt vil jeg takke veilederen min Silvio Uhlig for gode råd, oppmuntring og verdifull veiledning. Det har vært til uvurderlig hjelp! Vil også takke min veileder ved UMB, Dag Ekeberg for innspill og god samarbeid.

Takk til alle som jobber på VI ved seksjon for kjemi og toksikologi for et hyggelig laboratoriemiljø. Sist men ikke minst vil jeg takke min familie og gode venner som har vært en stor støtte for meg under hele prosessen.

Oslo, 12.2012

Fozia Hussain

Sammendrag

Trompetliljer (*Lilium longiflorum*) blomstene er mye benyttet i tradisjonell medisin i de asiatiske landene, og de fine attraktive blomstene er veldig populære til bruk som (inne) dekor til blant annet fester og som hageplanter. Uheldigvis har både bladene og blomstene vist å ha svært toksisk effekt på katter som knasker på disse. Trompetliljer er en god kilde til "steroide glykoalkaloider" (SGA) som er sekundære metabolitter. Tidligere har det vært påvist at glykoalkaloider fra potetene har toksiske effekter på dyr, men eksakt toksisk dose og stoffet i trompetliljer som er ansvarlig for tilstanden til kattene er fortsatt ukjent. I dette studiet ble seks grupper av SGA med en molekylvekt på 575, 883, 925, 967, 969 og 1011 Da studert ved bruk av massespektrometriske teknikker (ionefelle-massespektrometri, ITMS, og høytoppløsende massespektrometri, HRMS). Screening og multiple fragmenteringsforsøk ble gjennomført ved HPLC på en Kinetex C18 kolonne (Phenomenex, 50 x 2.1 mm i.d., 2.6µm) koblet til et lineært ITMS, mens HRMS-analyser ble gjort på et kvadrupol-time-of-flight MS (Q-TOF-MS). MS analyse viste at ekstraktet inneholdt minst 18 forskjellige SGA. Glykoalkaloidene ble ionisert med electrospray ionisering (ESI) i disse forsøkene. Enkelte isomerer ble isolert fra et metanolekstrakt fra *L. longiflorum* blomster med en opprensingsprosedyre som bestod av væske-væske ekstraksjon, kolonnekromatografi på silikagel og videre opprensing med semi-preparativ HPLC på en Luna C18 og en Luna C18(2) kolonne (Phenomenex, begge 250 x 10.00 mm i.d., 10 µm)

En separat metode for identifisering av sukkerne i SGA ble etablert basert på LC-APCI-ITMS- og optimalisert med standarder av heksoser, en deoksy-heksose og pentoser. Sukkermolekylene ble redusert med borhydrid og deretter acetylerert med eddiksyreanhydrid. Utførelse av samme metode på SGA prøve inkluderte en syrehydrolyse før reduksjon og acetylering. Til dette formålet ble en Kinetex C18 (100 x 4.6 mm i.d., 2.6 µm) kolonne brukt.

NMR spektroskopi ble foretatt med kommersiell solasodine og SGA MW 883(**1a**) og pyridine-d₅ brukt som løsningsmiddel. SGA **1a** viste seg å være et tidligere kjent SGA fra planten, (22*R*, 25*R*)-spirosol-5-en-3β-yl O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranoside og en av MW 925 isomerene er sannsynligvis (22*R*, 25*R*)-spirosol-5-en-3β-yl O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[6-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1→4)]-β-D-glucopyranoside som også er tidligere kjent fra trompetliljen. Alle SGA analysert i denne oppgaven har solasodine, MW 413, som sitt aglykon bundet til en heksose som videre er bundet til både en heksose og en deoksy-heksose. SGA som ble forsøkt basehydrolysert reagerte til SGA MW **1a** og 883(**2a**), noe som bekreftet MS-analysene, men metylering av de antatte karboksy-SGA med diazometan ga imidlertid ingen resultater.

Forsøk med CCL-94 celler som ble eksponert med løsninger laget av kommersiell solasodine, SGA MW 575 og **1a** (alle løst i DMSO), ga ikke konkret svar på om antall sukkermolekyler i SGA resulterte i en økning i toksisiteten, men dose-respons kurven indikerte at 883(**1a**) var mer toksisk enn SGA MW 575.

Abstract

Easter lily (*Lilium longiflorum*) flowers are widely used in traditional medicine in Asian countries, and the fine attractive flowers are very popular for use as (indoor) decoration such as parties as well as garden plants. Unfortunately both the leaves and flowers have shown to be very toxic for cats that chew on them. The Easter lilies are a rich source of secondary metabolites, among them steroidal glycoalkaloids (SGA). Earlier studies recorded that steroidal glycoalkaloids (found in potatoes), had toxic effects in animals, but the exact toxic dose and compound(s) in Easter lilies responsible for the observed toxicity in cats is still unknown. In this study, mass spectrometric techniques (ion-trap mass spectrometry, ITMS, and high resolution mass spectrometry, HRMS) were used for analysis of six groups of steroidal glycoalkaloid analogues with molecular weights 575, 883, 925, 967, 969 and 1011 Da. Screening and multiple fragmentation of SGA were performed by HPLC using a Kinetex C18 column (Phenomenex, 50 x 2.1 mm i.d., 2.6 μ m) connected to a linear ITMS. HRMS analysis was conducted using quadrupole- time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF-MS). Electrospray ionization in the positive mode was employed for ionization of SGA for analysis with these techniques. Several isomers were isolated from a methanol extract from *L. longiflorum* flowers with a clean-up- procedure consisting of liquid/liquid extraction, column chromatography on silica gel and further clean-up with semi-preparativ HPLC on a Luna C18 and a Luna C18(2) column (Phenomenex, both 250 x 10.00 mm i.d., 10 μ m).

A method for identification of the sugar moiety in SGA has been developed based on LC-APCI-ITMS and optimized with standards of hexoses, one deoxy-hexose and pentoses. Sugar molecules were first reduced using sodium borohydride followed by acetylation with acetic anhydride. The same method was thereafter applied on samples containing SGA, but including an extra step of acetic hydrolysis of SGA before reduction and acetylation. For LC-MS analyses of the reaction products a Kinetex C18 column (100 x 4.6 mm i.d., 2.6 μ m) was used.

NMR spectra were obtained for commercial solasodine and SGA MW 883 (**1a**). Spectra were acquired in pyridine-d₅. SGA MW 883 (**1a**) turned out to be an SGA earlier reported as (22*R*, 25*R*)-spirosol-5-en-3 β -yl O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside, and one of MW 925 isomers is most likely (22*R*, 25*R*)-spirosol-5-en-3 β -yl O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[6-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopyranoside, which was identified in previous studies of Easter lilies. SGA analyzed in this study all have solasodine as their aglycon bound to a hexose, which is further linked to both a hexose and deoxy-hexose moiety. Results of hydrolyse reaction with a bicarbonate buffer carried on some SGAs showed that these SGAs reacted to **1a** and 883 (**2a**) and this confirmed MS-analysis results in this study. Methylation of carbonyl group in SGAs, which were assumed to have a carboxy function, using diazomethane, gave however no results.

Bio-assays with CCI-94 cells were performed by exposing the cells to standard solutions of commercial solasodine, SGA MW 575 and **1a**. The solvent used for preparation of standards was dimethyl sulfoxide. The results did not indicate if the number of sugar molecules in SGA is of importance for their toxicity, but dose-response plots did indicate that **1a** was more toxic than SGA MW 575.

Forkortelser

Forkortelser

API	atmosfærisk trykk ionisasjon (atmospheric pressure ionization)
APCI	atmosfærisk trykk kjemisk ionisasjon (atmospheric pressure chemical ionization)
ATP	adenosin tri fosfat
B	magnetisk
CID	collisional-induced dissociation
cm ²	kvadrat centimeter
COSY	correlation spectroscopy
Da.	dalton
DMSO	dimetyl sulfoksid
DNA	deoksyribonukleinsyre
E	elektrisk
ESI	elektro spray ionisasjon (electrospray ionisation)
GC	gass kromatografi (gas chromatography)
GHz	gigahertz
g	gram
HILIC	hydrophilic interaction liquid chromatography
HMBC	heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HPLC	high performance liquid chromatography
HSQC	heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
I	totalt spinn
ITMS	ione felle masse spektrometer (Ion trap mass spectrometer)
kV	kilovolt
L	liter
LDH	laktat dehydrogenase
LC	væskekromatografi (liquid chromatography)

Forkortelser

LC-HRMS	liquid chromatography- high resolution mass spectrometry
m	masse
mm	milli meter
M	molar (mol/liter)
MeCN	acetonitrill
MeOH	metanol
mg	milligram
min.	minutter
mL	milliliter
mL/min	milliliter per minutt
MP	mobilfase
ms	milli sekund
MS	masse spektrometeri (mass spectrometry)
MS/MS	tandem masse spektrometri
MW	molekyl vekt
m/z	masse/ladning
nm	nanometer
NMR	kjernemagnetisk resonans (Nuclear magnetic resonance)
NR	nøytral rød
NRI	vaske løsning
NRII	nøytral rød løsning
NRIII	“fixing” løsning
NRIV	“solubilization” løsning
NOESY	nuclear Overhauser Spectroscopy
p.p.m	deler per million (parts per million)
Q-TOF-MS	quadropole-time of flight- mass spectrometer
QqQ	trippel kvarupol

Forkortelser

RF	radio frekvens
RP-HPLC	omvendt fase væske kromatografi (reversed phase high performance liquid chromatography)
SGA	steroidal glykoalkaloider
SIM	selected ion monitoring
TMS	trimethylsilisium
TOCSY	total correlation spectroscopy
TOF	time- of- flight
SP	stasjonær fase
SPE	fast fase ekstraksjon (solid phase extraction)
TIC	total ionekromatogram (total ion chromatogram)
V	volt
z	ladning
λ	lambda
μ	mikro

Innholdsfortegnelse

1.0	Introduksjon	1
1.1	Naturlig forekomst av glykoalkaloider	1
1.2	Strukturer	1
1.3	Metoder for isolering og deteksjon av glykoalkaloider	3
1.4	Biosyntese av glykoalkaloider	3
1.5	Bakgrunn og mål for prosjektet	4
2.0	Teori	5
2.1	Væske-væske ekstraksjon	5
2.2	Væskeskromatografi	5
2.2.1	Normalfase kromatografi	6
2.2.2	Omvendtfase kromatografi	6
2.3	Massespektrometri	7
2.3.1	Elektospray ionisering (ESI)	7
2.3.2	Kjemisk ionisering under atmosfærisk trykk "Atmospheric Pressure Chemical Ionisation" (APCI)	8
2.3.3	Ionefelle MS	8
2.3.4	Kvadrupol-MS	9
2.3.5	Time-of-flight (TOF)- MS	9
2.3.6	LC-MS og tandem massespektrometri	10
2.4	Kjernemagnetisk resonans spektroskopi (NMR spektroskopi)	10
2.4.1	Endimensjonal NMR (1D-NMR)	11
2.4.2	Endimensjonal NMR (1D-NMR)	11
2.5	Bioassay basert på cellekultur	12
2.5.1	Cytotoksitet	12
3.0	Eksperimentelt	13
3.1	Utstyr	13
3.1.1	Forbruksmateriell og apparatur	13
3.1.2	Kjemikalier og medier	14
3.1.3	Plantematerialet	15
3.2	Screening og fragmentering	16
3.2.1	LC-ITMS screening	16
3.2.2	LC-ITMS ⁿ for screening og fragmentering av steroidalkaloider	16
3.2.3	Fragmentering av Solasodine	16
3.2.4	LC-HRMS	17
3.3	Isolering og opprensing av utvalgte steroidalkaloider	17
3.3.1	Ekstraksjon av væske-væske ekstraksjon	17
3.3.2	Kolonne kromatografi på silikagel	18
3.3.3	Semi-preparative RP-HPLC	18
3.3.4	Videre opprensning på semi-preparativ HPLC koblet til LCQ	19
3.4	NMR	19
3.5	Derivatiseringsreaksjoner	20
3.5.1	Basehydrolyse av acetylerede steroidalkaloider	20
3.5.2	Reaksjon med diazometan	20
3.6	LC-MS basert metode for sukkeranalyse	22
3.6.1	Utprøving av metode for sukkeranalyse med kommersielle sukkerstandarder	22

Innholdsfortegnelse

3.6.2	Sukkeranalyse for SGA	23
3.7	Cellekultur	24
3.7.1	Nøytral Rød assay	24
4.0	Resultater og diskusjon	27
4.1	Isolering og opprensning av SGA	27
4.1.1	Ekstraksjon av glykoalkaloider fra <i>Lilium longiflorum</i> blomstene	27
4.1.2	Væske- Væske ekstraksjon	28
4.1.3	Opprensning på Silika kolonne	28
4.1.4	Semi-preparativt HPLC	30
4.1.4.1	Semi-preparativ HPLC på en Luna C18(kolonne 1)	30
4.1.4.2	Luna C 18 (kolonne 2)	30
4.1.5	Semi-preparativt HPLC koblet til et LCQ Classic ITMS	31
4.2	LC-ITMS basert screening av <i>Lilium longiflorum</i> blomster for glykoalkaloider og deres MS-fragmentering	32
4.2.1	Separasjon av SGA på Phenomenex Kinetex C18 (kolonne 1) versus Waters SunFire C ₁₈	33
4.2.2	Retensjonen av <i>Lilium longiflorum</i> glykoalkaloider på kinetex C18(kolonne 1) i forhold til mobilfase-pH	34
4.3	LC-HRMS og strukturoppklaring av glykoalkaloider fra <i>Lilium longiflorum</i>	36
4.3.1	MS-fragmentering av solasodine	36
4.3.2	Oversikt over observerte struktur analog	38
4.3.3	LC-MS ⁿ fragmentering av MW 883 glykoalkaloidene og LC-HRMS	39
4.3.4	LC-MS ⁿ fragmentering av MW 926 glykoalkaloidene og LC-HRMS	42
4.3.5	LC-MS ⁿ fragmentering av MW 967 glykoalkaloidene	46
4.3.6	LC-MS ⁿ fragmentering av MW 969 glykoalkaloidene og LC-HRMS	49
4.3.7	LC-MS ⁿ fragmentering av MW 1011 glykoalkaloidene og LC-HRMS	52
4.3.8	LC-HRMS for SGA MW 575	56
4.3.9	Sukker analyse av kommersiell sukker	57
4.3.10	Sukker analyse av glykoalkaloider (SGA)	59
4.3.10.1	Sukkeranalyse av SGA MW 575	59
4.3.10.2	Sukkeranalyse av SGA MW 883	60
4.3.10.3	Sukkeranalyse av SGA MW 969	62
4.3.11	Derivatiseringsreaksjoner	62
4.3.12	NMR spektroskopi	62
4.3.13	Celleforsøk	64
5.0	Konklusjon	69
6.0	Referanseliste	70
7.0	Vedlegg	74

1.0 Introduksjon

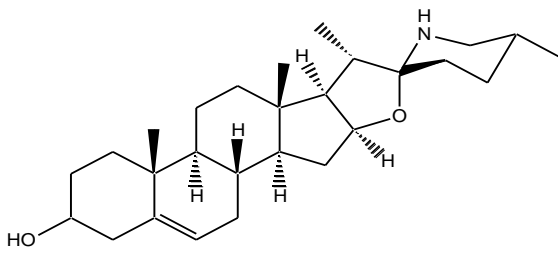
1.1 Naturlig forekomst av glykoalkaloider og bruksområdet

Glykoalkaloider, på engelsk gjerne kalt “steroidal glycoalkaloids” (SGA) er en gruppe av naturlige stoffer som er bioaktive forbindelser i planter og blir produsert som sekundære metabolitter. Sekundære metabolitter er en felles betegnelse for stoffer som syntetiseres av en organisme ved behov, men er ikke avgjørende for organismens grunnleggende funksjoner. Generelt kan sekundære metabolitter ha både toksikologiske og farmakologiske effekter på dyr og mennesker (1). SGA kjennetegnes blant annet ved at de er bygd opp av en heterosykliske steroid-liknende grunnstruktur og finnes hovedsakelig i plante familie Liliaceae som omfatter mer enn 3500 species (f.eks. *Lilium longiflorum*, *L. veratrum*, *L. fritillaria*)(2) og i familien Solanaceae (f.eks. potet, aubergine, tomat)(3). SGA forbindelser er både basisk i natur og er bitter i smak på grunn av nitrogen atomet de inneholder (1, 2, 4, 5). Tidligere forskningen har gitt indikasjon på at glykoalkaloidene utgjør en viktig del av forsvarmekanisme mot planteetere og mikrobiologiske patogener, de er også aktive i ødeleggelse av cellemembraner og utskillelse av enzymet peroxidase (katalysator) når sterol (steroid alkohol) er tilstedet.(4, 6, 7). I de asiatiske landene som Kina, Pakistan, Tyrkia har plantene med kilden til denne stoff gruppen vært sentralt for behandling av sykdommer i mange år (2). Blomstene til trompetliljer (*Lilium longiflorum*), som er en god kilde for glykoalkaloider, ble blant annet brukt til behandling av bronkitt, kreft og betennelse i tradisjonell medisin(8). Species fra arten *L. veratrum* (familien Liliaceae) har også vært attraktivt blant native amerikanere og europeere til behandling av sår hals, slangebit, hoste, epilepsi og har på tidlig 90- tallet, blitt brukt som medisin mot høyt blodtrykk(2). Trompetliljer og tigerliljer som er kjent som hageplanter er mye brukt som inne dekor til fester, bryllup og begravelser. Både bladene og blomstene har vist å ha å ha toksisk effekt på katter. Depresjon, oppkast, anoreksi (som observeres kun etter 1-3 timer etter inntak), dehydrering og nyresvikt er de vanlige symptomene hos kattene. Eksakt toksisk dose og stoffet som er ansvarlig for disse symptomene er fortsatt ikke kjent. (9, 10)

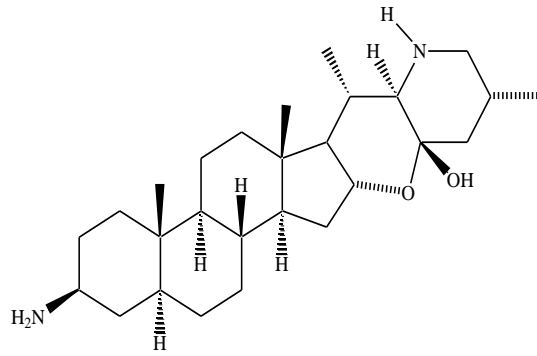
1.2 Strukturer

Glykoalkaloidene klassifiseres basert på struktur og egenskaper. Strukturen til SGA kjennetegnes av et upolar steroid enhet (C27), en hydrofil oligosakkarid-del og en nitrogen bindende enhet som danner en kjemisk binding med steroid delen av molekylet. Sukkerkjedene som inngår i molekylet kan variere fra monosakkarid til pentasakkarid. Den upolare steroidal delen refereres også til som *aglykonet* og sakkaridene er bundet til C-3 i aglykonet (3, 11, 12). Strukturen og konfigurasjonen til de 6 hoved klassene er presentert i Figur 1.1

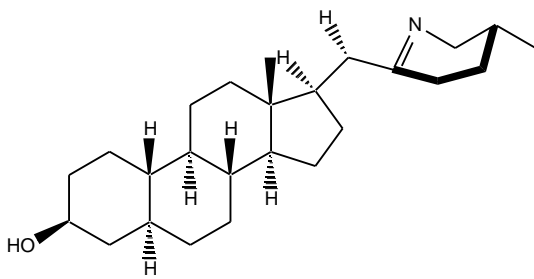
Introduksjon



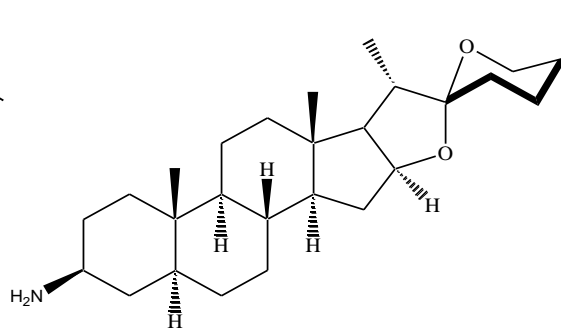
1) Solasodine



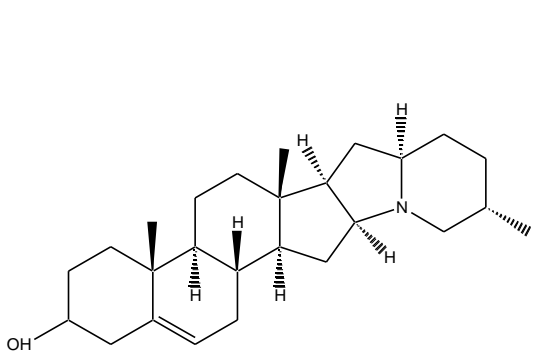
2) Solanocapsin



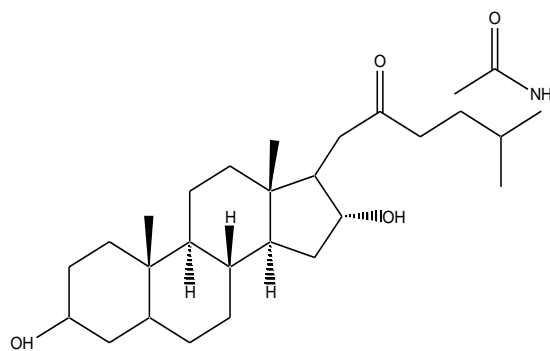
3) Solacongestidine



4) Jurubidine



5) Solanidine



6) 26-Acetylamoni-3β, 16α-dihydroxy-5α-cholestan-22-One

Figur 1.1: Oversikt over aglykonene til de 6 glykoalkaloid-hovedklassene.(11)

1.3 Metoder for isolering og deteksjon av glykoalkaloider

I de siste årene har det blitt publisert en del analysemetoder for isolering og deteksjon av SGA. Væske- væske ekstraksjon er den mest vanlige metoden som er benyttet for anrikning av SGA fra planteekstrakter. Det er dokumentert bruk av både tørre og ferske plantematerialer til analysen i kombinasjon med et organisk løsemiddel eller eventuelt en blanding bestående av polart og upolart løsemiddel som ekstraksjonsmiddel. For bruk av ekstraksjonsmiddel finnes det flere alternativer og de fleste brukes i kombinasjon med en svak syre. Noen av de vanligste løsemidler er metanol, kloroform, heksan, vann og etanol (11-13). Plantematerialet har oftest blitt malt opp før ekstraksjon for å få et pulver slik at det er en jevn blanding av alle komponentene. Dersom ferske blomster ble brukt, var flytende nitrogen benyttet for frysning av materialet og deretter materialet malt i blender. For oppkonsentrering av glykoalkaloidene kan det utføres en fastfase ekstraksjon (SPE) (5, 11). For å få en forbindelse til en viss renhet har semi preparativt HPLC (High Performance Liquid Chromatography) blitt brukt for fraksjonering av SGA fra trompetliljene (14, 15). Denne teknikken er annerledes fra analytisk HPLC som egner seg for kvantifisering og/eller indentifisering (16)

For separasjon og deteksjon er mange analysene utført ved bruk av væskerkromatografi (LC) koplet til et massespektrometer (MS) (11, 12, 14, 15, 17), Tandem massespektrometri (MS/MS) er de siste årene blitt en ettertrakt teknikk i og med at mer informasjon om strukturen og sakkariidene bindings posisjon kan oppnås (15, 18). I de massespektrometriske metodene brukes electrosprayionisering (ESI) som ioniserings teknikk med LC/MS som er godt egnet for å få glykoalkaloidene ionisert. Et massespektrum gir nyttig informasjon på massene til glykoalkaloidene, massen til aglykonet samt andre fragmenter.(3, 15). Data fra NMR eksperimenter gir mye informasjon om karbohydrat delen, substituenten (på både aglykonet og på sakkariidene) og ikke minst flere detaljer om aglykonet, noe som er begrenset ved bruk av massespektrometri. Men MS er allikevel nødvendig og en sentral teknikk brukt for analyser av naturlige produkter. Dette fordi det trengs vesentlig mer prøvematerialet for å kunne gjøre NMR opptak enn for MS, (18)

1.4 Biosyntese av glykoalkaloider

Det har vært lite forskning på biosyntese av glykoalkaloider men hypotetiske forslag for hvordan disse stoffene blir biosyntetisert har blitt presentert (11). α -chaconine og α -solanine er SGA som finnes i plante familien Solanaceae. Forskning på disse og tidligere studier har indikert at SGA følger en mekanisme som ikke involverer mevalonat (19). Selv om det ikke er nok informasjon for biosyntese av SGA, er det mest sannsynlig at stoffene har sitt opphav fra modifikasjon av kolesterol med modifisering av side kjedene gjennom hele syntesen. Dette er dokumentert for aglykonet solasodine (11, 20). En annen gruppe av sekundære metabolitter som er veldig lik i struktur som SGA er saponiner. Forskjellen i disse forbindelsene er nitrogen atomet som ikke inngår i strukturen til saponiner. Denne gruppen av metabolitter dannes ved syklisk derivatisering av oxidosqualen som videre omformes til karbo kationer ved hybrid skift, metylering og andre reaksjoner. (21). En viktig del av skjelettet til saponinene er steroiddelen (presentert i Figur 1.1) bestående av 27 karbon atomer som også er en vesentlig del av aglykonet til SGA. Det er derfor sannsynlig at SGA biosyntetiseres med en liknende mekanisme som man antar for saponinene.

Den nitrogen-innholdende enheten i SGA klassifiseres etter 1) type grunnstruktur (f.eks. indole, piperidine, tropane osv), 2) hvilken plantefamilie SGA tilhører (f.eks. solasonin fra *Solanum*, tomatin fra tomat (*Lycopersicon esculente*) (20) og 3) hvilket molekyl den nitrogen-innholdende delen ble biosyntetisert fra. (lysin, niacin, tyrosin, ornithin og tryptophan. . (20)

1.5 Bakgrunn og mål for prosjektet

Trompetliljer (*Lilium longiflorum*) tilhører liljefamilien (Liliaceae) og slekten (*Lilium*). De har på samme måte som med Tigerliljer og Asiatiske hybridliljer vist seg å være svært giftige for katter. Disse liljene er vanlige hageplanter og snittblomster er dermed lett tilgjengelig for katter. Det er først og fremst nyrene i kattene som blir rammet, og innen 3-5 dager dør kattene på grunn av den toksiske effekten. Andre symptomer som er observert er blant annet dehydratisering, oppkast og anoreksi. Tidligere prosjekt utført ved Veterinær Instituttet i Oslo (VI) ved seksjon for kjemi og toksikologi har midlertidig indikert observasjon av cytotoksitet hos en fraksjon bestående av minst fem forbindelser og de var oppkonsentrert fra ekstraktet fra planten trompetliljer. Forbindelsene var identifisert som glykosid av steroid alkaloider. En har ganske god kunnskap på hvilke morfologiske forandringer som skjer i forskjellige organer i katta etter at de har blitt eksponert til plantematerialet, men en har ikke kjennskap til eksakt hvilket stoffe(er) som forårsaker denne tilstanden hos kattene. Hensikten med denne oppgaven var derfor å utvikle en semi-preparativ metode for isolering og opprensing av glyko alkaloider fra trompetliljer, karakterisere disse med masse spektrometriske teknikker som ion trap-MS og Q-TOF-MS. Det skulle også gjøres biologiske tester i celler fra kattenyrer av de isolerte SGA for å få kjennskap til den toksiske effekten.

2.0 Teori

2.1 Væske – væske ekstraksjon

Ekstraksjon er en separasjonsmetode som baserer seg på å fordele molekyler fra en fase og over til en annen hvorav fasene ikke er blandbare. Best mulig ekstraksjon kan oppnås når ekstraksjonsmiddelet har høy affinitet med hensyn på analytten og at middelet har høy selektivitet. Det betyr at ekstraksjonsmiddelet bør være selektiv for analyttene som skal separeres og utelukke andre matriks komponenter som er tilstede i blandingen. Hvilket ekstraksjonsmiddel som er optimalt bestemmes blant annet av polariteten til analytten. ("likt løser likt") (22)

Det finnes flere ekstraksjons teknikker for væsker og den eldste og mest klassisk metode er *væske-væske ekstraksjon*. I denne metoden vil analyttene diffundere i en fase hvor løseligheten er bedre. Som oftest er den ene fasen vandig (polar) og den andre organisk (upolar). I væske-væske ekstraksjon er det veldig viktig å bruke ekstraksjonsmiddel som lett lar seg inndampe dersom oppkonsentrering blir nødvendig i kommende trinn. Dersom det lar seg gjøre anvender man gjerne en "tilbake ekstraksjon" for å få en bedre opprensing av ekstraktet. Her skjer det en utveksling av analytter mellom fasene i flere omganger. I tilbake ekstraksjon benyttes de sure eller basiske egenskapene til analyttene samt pH regulering av vannfasen. Analytter med basiske egenskaper separeres ved bruk av protondonerende (f.eks. kloroform) og til analytter med sure egenskaper brukes protonaksepterende løsemidler (f.eks. dietyleter) (22, 23)

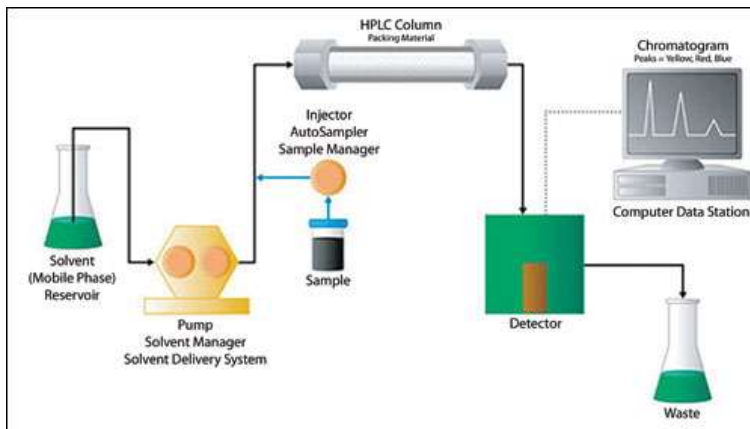
2.2 Væskekromatografi

Kromatografi er en felles betegnelse for separasjons teknikker som brukes til å separere komponentene i en blanding ved at disse komponentene blir transportert i en mobil fase (MP) over eller gjennom en stasjonær fase (SP). Separasjons prinsipp baserer seg på fordeling av stoffene mellom to faser, hvorav den ene fasen er mobil (beveger seg) mens den andre er stasjonær (står stille). Mobilfasen kan enten være i gassform, i væskeform eller være et superkritisk fluid, mens den stasjonære fasen kan være en væskefilm på overflaten av et fast stoff eller en inert support material. De kjemiske egenskapene til både analytten, mobil fasen og den stasjonære fasen bestemmer fordelingen. Mobilfasen kan bestemmes til å være enten polar eller upolar, det samme gjelder for stasjonærfasen. Valg av polaritet for disse fasene er avhengig av polariteten til analytten. Dersom et polart stoff skal analyseres velges stasjonær fase som er polar og en mobilfase som er mindre polar slik at analytten har høyere affinitet til stasjonærfase enn mobilfase, og dermed vil retensjonstiden gjennom kolonnen forsinkes. Stoffene separeres etter deres affinitet til stasjonærfase og de som har minst affinitet elueres først. På denne måten får stoffene ulik retensjonstid og kan detekteres hver for seg. (24, 25)

Når mobilfase er en væske kalles separasjons teknikk for væske kromatografi (engelsk: high performance liquid chromatography (HPLC)). I HPLC benyttes det høyt trykk slik at mobilfase får en drivkraft gjennom kolonnen. HPLC består grovt sett av følgende enheter: reservoar med mobilfase, pumpe som leverer mobilfase ved enten konstant trykk eller konstant volum per tidsenhet, prøve injektor, en kolonne, detektor og en pc. Prøven injiseres inn i mobilfase og blir transportert over en stasjonærfase som er i ro. I HPLC er det to definerte

Teori

systemer som eksisterer avhengig av den relative polariteten mellom mobilfase og stasjonærfase: *Normal fase separasjon* og *omvendt fase separasjon*. (26). I Figur 2.1 er det vist bilder av de viktige delene i en HPLC.



Figur 2.1: Skisse av de viktigste delene i en HPLC (27)

2.2.1 Normal fase kromatografi

I normalfase kromatografi har stasjonærfase høyere polaritet enn mobilfase og teknikken benyttes derfor for separasjon av stoffer med polare funksjonelle grupper. Den vanligste stasjonærfasen som er i bruk er silika-gel med silanolgrupper. Interaksjon av stasjonærfase og analytten skyldes dipol-dipol bindinger og hydrogenbindinger mellom de funksjonelle gruppene i analytten og silanolgruppene (Si-OH) på overflaten til silikapartiklene. Silika kalles også for silikagel, kiselgel og porøst glass. Silanolgruppen (Si-OH) som finnes på overflaten til silika gjør den svakt sur og det er til denne gruppen adsorpsjonsegenskapene er knyttet til.(22)

2.2.2 Omvendt fase kromatografi

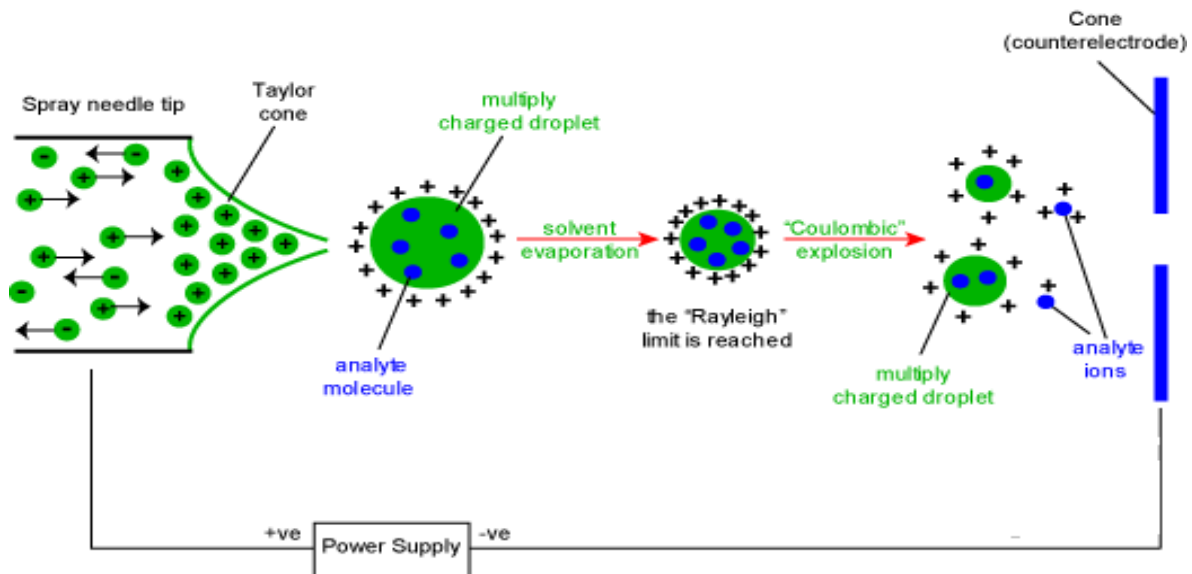
I omvendt fase er stasjonærfase upolar og mobilfasen er polar. Omvendt fase kromatografi er det viktigste separasjonsprinsippet innen væskrokromatografi (HPLC) og det mest brukte materialet til stasjonærfasen er C18, mens mobilfasen er en blanding av en vandig buffer og et organisk løsningsmiddel, typisk metanol (MeOH) eller acetonitril (MeCN). Bruk av buffer er viktig for å holde kontroll på pH under separasjon og for å få optimal separasjon. C18 kjennetegnes ved at silanolgruppen på silikaoverflaten er erstattet med en alkylgruppe på 18 karbonatomer. På den måten er stasjonærfase upolar og egnet for upolare stoffer. C18 materialet er mye tatt i bruk som stasjonærfase, på grunn av høy stabilitet og egenskapen materialet har til å adsorbere en lang rekke forbindelser er materialet lite selektiv. Modifisering av silikafasen med f.eks. fenyl, cyano og dioler gir større grad av selektivitet. (22, 28)

2.3 Massespektrometri

Massespektrometri (MS) er en analytisk teknikk som brukes til identifikasjon, kvantifisering og strukturoppklaring til kjemiske forbindelser. Et massespektrometer består av et prøveinnføringssystem, ionekilde, masseanalysator, detektor og et datasystem. Grunnprinsippet i massespektrometri er at forbindelsen som skal analyseres må bli ionisert i en ionekilde slik at det blir dannet *molekylioner* og/eller addukter og fragmenter. Molekylene ioniseres på ulike måter avhengig av ionekilden som benyttes. Ionene blir videre separert ved hjelp av en masseanalysator basert på forholdet mellom ionenes masse (m) og den formelle ladningen til ionene (z). Forholdet kalles massetall (m/z). Det finnes forskjellige masseanalysatorer som bruker enten bruker et elektrisk felt (E), magnetisk felt (B), eller en kombinasjon av begge til separasjon. Det er viktig å utføre forsøket ved svært lave trykk siden ioner som skal separeres og detekteres er i gasstilstand (29). Intensitet av ionene som funksjon av m/z verdi plottes som et histogram og kalles et *massespektrum*. Det mest stabile ionet vil forekomme i størst relativt antall og dette ionet utgjør det som kalles basisstoppen (eng: base peak). Når den totale ionestrømmen blir registrert og presentert i kromatogram kalles det for total ion current, (TIC). Hvis massespektrometer er programmert til å detektere en eller noen få m/z verdier, kalles det for selected ion monitoring, (SIM).

2.3.1 Elektrospray ionisering (ESI)

Elektrosprayionisering (ESI) er en ioniseringsteknikk som foregår i atmosfæretrykk og er en av de "atmospheric pressure ionization" (API) teknikkene og som gjerne blir brukt i forbindelse med LC-MS. Molekylene kan lades enten negative eller positive avhengig av om spenningen på spraytuppen er positiv eller negativ. I ESI blir eluenten fra HPLC eller prøveoppløsningen sendt gjennom et kapillær (metall eller silikaglass) og inn til en liten tip med liten indre diameter. Tipen er ladet med et elektrisk potensial på 3-6 kV. På grunn av potentialet vil væsken forstøves og resultere i små væskedråper med elektrisk ladning på overflaten. I noen tilfeller dannes det "taylor cone" som en forlengesle av væskestrømmen. Det blir sendt gass strømmer (oftest N_2) i samme og i motsatt retning av væskestrømmen som bidrar med å fordampe løsningsmidlet. Repulsive krefter mellom ionene og lik ladning vil føre til at ionene frastøter hverandre og større dråper vil dele seg i mindre dråper. Frie ioner ledes til slutt videre inn i masseanalysator for separasjon. Både positive og negative ioner kan analyseres enten ved bruk av positive eller negative potensialer. ESI er en av den mest vanlige ioniseringsteknikken som brukes ved kobling av et massespektrometer til en HPLC. (23, 29, 30). For analyser av polare forbindelser som polymerere (f.eks. proteiner, peptider, nukleotider) er ESI mye brukt på grunn av at denne teknikken er godt egnet til analyse av store molekyler med masse over 100 000 Da. ESI som ioniserings teknikk gir ionene både singel eller multippel ladning avhengig av strukturen. (31)



Figur 2.2: Skisse av ioniserings mekanisme i ESI (32)

2.3.2 Kjemisk ionisering under atmosfærisk trykk “Atmospheric Pressure Chemical Ionisation” (APCI)

I likhet med ESI er også APCI (Atmospheric pressure chemical ionization) en variant av atmosfæretrykkionisering som ofte brukes i kombinasjon med HPLC. Denne teknikken er ofte mer effektiv til ionisering av mindre polare molekyler. Væskestrømmen fordampes ved høy temperatur (typisk 350-450 °C) og ioniseringen skjer i gassfasen ved at gass strømmen føres forbi en elektrode som det er satt en høy spenning på (“corona needle”). Nitrogengass blir benyttet og hjelper til med å danne en varm tåke av små væskepartikler. Disse væskepartiklene videreføres til oppvarmet desolvateringskammer. På grunn av fordampning av dråpene dannes det molekyler i gassform som videre blir ionisert. De elektriske ladningene genererer et plasma hvor protonoverføring/protonabstraksjon foregår mellom analyttmolekylene og løsemiddel molekylene og resulterer i dannelsen av ioner. (30)

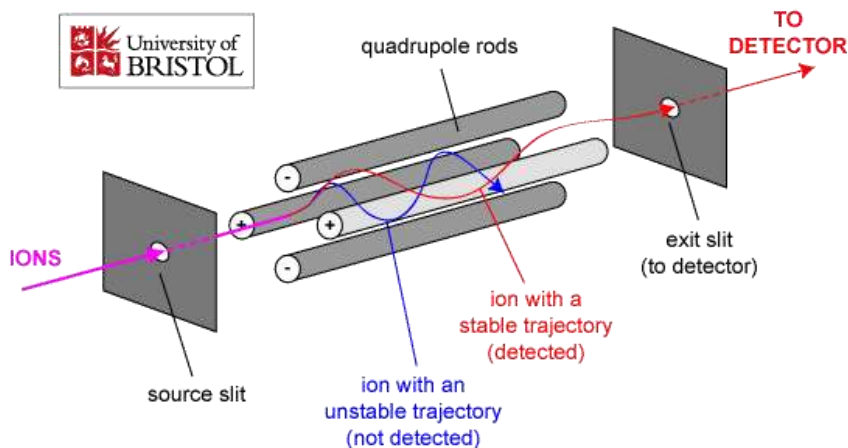
2.3.3 Ionefelle-MS

Ionefelle, også referert som iontrap(IT), er en masseanalysator som separerer ioner etter m/z . Ionene som kommer inn i et elektrisk felt vil enten få stabile eller ustabile oscillasjoner. I denne typen analysator vil de ustabile ionene bli kastet ut gjennom åpninger i endestykken til ionefellen og bli detektert (23, 30).

Ionekilde og analysatoren utgjør også en felleenhet og her kan det også produseres fragmenter. Ved MS^n forsøk kan det velges ut en forelder ion med bestemt m/z verdi som blir holdt tilbake i ionefellen og kan så bli fragmentert. Fragment ioner som forlater ionefellen detekteres en etter en og gir opphav til fragment ion spekteret (33). Helium kan bli brukt som både kollisjonspartner som hjelper til med fragmentering av ionene og som damp gass som sørger for at ionene blir fanget i ionefelle. (31, 34)

2.3.4 Kvadrupol-MS

Som navnet indikerer er en kvadrupol masseanalysator bygd opp av fire parallelle hyperbolske eller sylinderformede staver. To og to staver blir påsatt lik elektrisk ladning, hvorav to er positiv ladet og de to andre er negativ ladet. Ionene føres inn i området mellom stavene. Her vil ionene med riktig m/z verdi få stabile oscillerende bevegelser. Stabile ioner vil transmitteres mens de ustabile vil kollidere med stavene og utlades. Kvadrupol instrumenter er mye utbredt. Den er billigere i drift og er enkel å bruke. Denne type instrument kan registrere både positive og negative ioner, kan også bli brukt som detektor i kombinasjon med andre analyseinstrumenter (23, 30) og blir mye brukt i kombinasjon med både GC og LC (35).



Figur 2.3: Skisse av kvadrupol masse analysator(36)

2.3.5 Time-of-flight (TOF)- MS

Masse analysator Time- of- flight (TOF) separerer ionene basert på masse og hastighet ionene har når de forlater ionekilden. Separasjonen skjer i et rør uten elektromagnetisk felt noe som skiller TOF fra andre analysatorene. Ionene svever i et feltfritt rør og de med lav masse og høy hastighet vil bli detektert først. For bedre oppløsningsevne er det vanlig å benytte en refleksjons-TOF fordi det alltid vil være spredning i den kinetiske energien hos ionene noe som resulterer i at ioner som i utgangspunktet har lik masse detekteres med forskjellig massetall (m/z). Ved bruk av refleksjons-TOF vil derfor spredningen i ionene korrigeres ved at det monteres en elektrostatisk linse som setter opp en elektrisk felt og frastøter de svevende ionene som nærmer seg linsen. Ionene med høy hastighet vil trenge inn i feltet før de kastes tilbake og dermed vil ionene med lav kinetisk energi få et lite forsprang tilbake ut fra refleksjonslinsen. Oppholdstiden for ionene kompenserer for spredningen i kinetiske energien. Ionene blir da detektert av detektoren som er plassert i samme ende av røret som ionekilde. (30)

2.3.6 LC-MS og tandem massespektrometri

Væskekromatografi i kombinasjon med et massespektrometer blir mye brukt i blant annet i karakterisering og kvantifisering av naturlige forbindelser, sekvensanalyse av biopolymerer og innen miljø analyse (37). LC-MS kan gi mye verdifull informasjon om strukturen, mengden og renhet av molekyler i en blanding. En MS detektor er ofte foretrukket blant annet på grunn av sensitiviteten og selektiviteten den har over mange andre LC detektorer. En annen fordel med LC-MS er egenskap den har til å analysere forbindelser som mangler en kromofor (38). De mest brukte ioniseringsteknikker ved kobling mellom væskekromatografer og massespektrometer er API teknikker som inkluderer APCI og ESI. (30).

I de siste årene har Tandem massespektrometri, (MS/MS), blitt viktig verktøy for både kvalitativt og kvantitativt analyse. I tandem massespektrometri blir et ion eksaminert fra en blanding av ioner. MS/MS utfører masseanalyse i minst to trinn. Aller først blir prøven ionisert i ionekilde og deretter isoleres ionet som videre skal analyseres ved bruk av den karakteristiske m/z verdien. Ionet fragmenteres til datterioner som analyseres i det neste MS trinnet. I ionefelle instrument kan denne prosessen gjentas n ganger ut ifra hva som er nødvendig og ønskelig. Ulike kombinasjoner av masse analysatorer kan brukes til MS/MS eksperimentene, ikke nødvendigvis samme type. For eksempel hybrid sammensetning bestående av kvadrupol og magnet sektor, eller quadropole og TOF. En av den mest brukte kombinasjonen er trippel-kvadrupolen (QqQ) som analysatorer i tandem massespektrometri. MS/MS er mye brukt til identifikasjon av blant annet proteiner, farmasøytiske midler og giftige stoffer. (23, 30, 33, 37)

2.4 Kjernemagnetisk resonans spektroskopi (NMR spektroskopi)

NMR, (Nuclear Magnetic Resonance), er en avansert analyseteknikk som brukes mye for identifikasjon av bl.a. naturstoffer, proteinstrukturer og biologiske membraner. Teknikken baserer seg på å registrere signaler som en kjerne med magnetisk moment sender når den blir utsatt for et ytre magnetisk felt og blir forstyrret av elektromagnetisk stråling i radiofrekvensområdet.

De subatomære partiklene har et spinnmoment men netto spinnmoment er for de fleste atomkjernene lik null, men noen atomer som f.eks. ^1H og ^{13}C atomer skiller seg ut. Atomer med totalt spinn, I , vil ha $2I+1$ energitilstander. Energien til disse tilstandene vil være likt, men avvike dersom et magnetisk felt B påsettes som fører til at kjernen vil spinne rundt det ytre magnetiske feltet. Kjernen i den laveste energitilstanden vil kunne absorbere strålingen når den strålingen tilsvarer energiforskjellen mellom to spinn nivåer. Frekvensen ved denne endringen kalles larmor-frekvens og kjernen er da i resonans. Den lave energitilstanden eksiteres til den høyere energitilstanden, og når denne strålingen fjernes kommer kjernen tilbake til sin opprinnelige posisjon og det emitteres energi. Det er denne emisjonsenergien som måles i NMR og gir opphav til et spekter som viser topp for hver magnetisk aktiv kjerne i prøven. En viktig parameter i NMR er kjemisk skift som beskriver omgivelsene til kjernene som har et spinnmoment. Elektronene som sirkulerer rundt kjernen og naboatomer vil også gi opphav til magnetiske felt som vil frastøte det påsatte magnetiske felt. På grunn av frastøtningen vil samme type atomkjerner absorbere stråling ved ulike frekvenser avhengig av "miljøet" de er i og dermed får endring i det kjemiske skiftet. Som oftest blir trimethylsilisium (TMS) brukt som referanseforbindelse og den definerer nullpunkt. TMS er inert, flyktig og kommer i et kjemisk skift som ligger lavere enn for nesten alle organiske forbindelser. En stor fordel ved bruk av teknikken er at prøvematerialet ikke går tapt og kan benyttes igjen til en

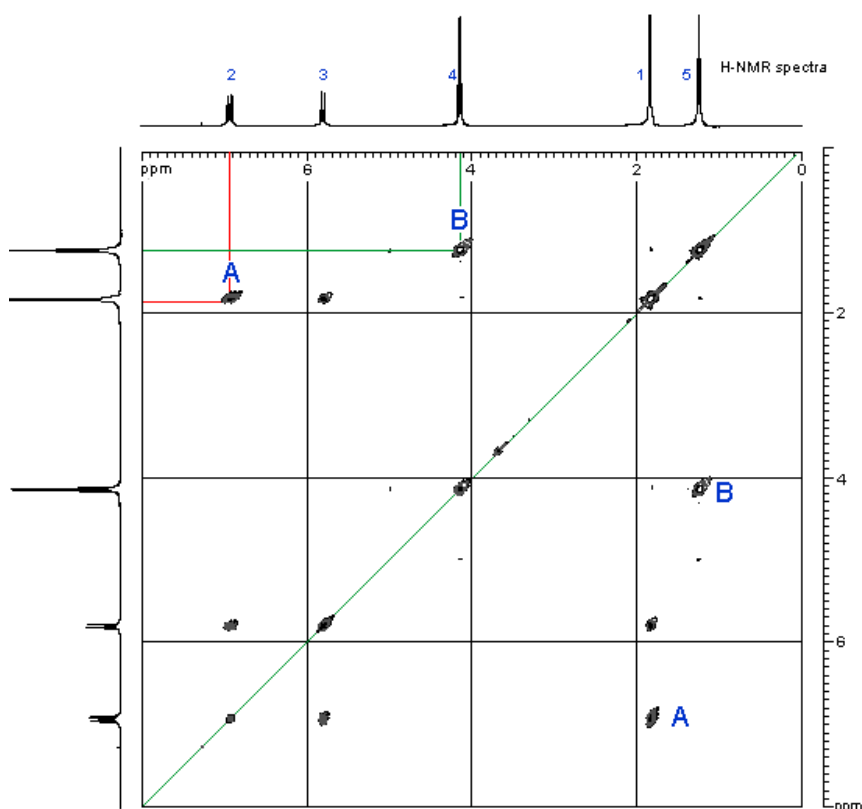
senere anledning. Løsningsmiddelet som blir brukt bør ikke gi signaler i NMR spekter og det brukes alltid deutererte løsemidler. De mest brukte er blant annet d_6 -DMSO, CD_3OD , C_6D_6 .(39, 40)

2.4.1 Endimensjonal NMR (1D-NMR)

I endimensjonal NMR observeres det kun en kjerne. 1D spekteret viser forskjellige signaler spredt over x-aksen i forhold til signalenes kjemiske skift og intensiteten på y-aksen. Frekvensspektre som har sitt opphav fra emitterte RF (radio frekvens) får man etter en Fourier-transformasjon. (39, 41)

2.4.2 Todimensjonal NMR (2D-NMR)

I todimensjonal NMR er data er presentert i et spekter avgrenset av to akser med frekvens verdier (i ppm) sammenlignet med endimensjonal hvor kun en akse angir frekvensen.. Det finnes ulike typer av todimensjonal spekter: COSY (1H - 1H kopling), TOCSY(1H - 1H kopling over flere bindinger), HSQC (1H - ^{13}C korrelasjoner over en binding), HMBC (1H - ^{13}C korrelasjoner over flere bindinger), NOESY(1H - 1H kopling i rommet) er noen av dem. 2D NMR gir mer informasjon om atom bindingene, koplingene i et molekyl enn en 1D NMR og brukes derfor mye for struktur bestemmelse, (39) Eksempel på et COSY spekter er vist i Figur 2.4



Figur 2.4: COSY spekter av molekylet etyl 2-butenoat (42)

2.5 Bioassay basert på cellekultur

Bioassay er en fellesbetegnelse for forsøk på biologiske organismer eller systemer som kan være kvantitativt og/eller kvalitativt. Kvalitative forsøk benyttes for å vurdere de fysiske virkningene av et stoff som ikke kan kvantifiseres. Bioassay er viktig for bestemmelse av blant annet vekstfaktorer og biologisk aktivitet av et stoff. Ved utførelse av cellekulturassay, som er en form for bioassay, er det noen faktorer som det er viktig å sørge for at de blir varetatt. Disse er blant annet: temperatur som cellene vokser under, pH verdien i medium og sterilt utstyr. Cellekulturforsøk er mye brukt for rangering av kjemiske stoffer og for undersøkelse av tilsetningsstoffer. Å utføre bioassay på den måten er foretrukket fremover in vivo-forsøk (dvs i levende dyr). Det er billigere, mindre risikabelt og det trengs mindre reagent hvorav in vivo blir det en større skala å forholde seg til (43, 44).

2.5.1 Cytotoksitet

Celledød er en form for et målbart endepunkt som enkle cellekultur forsøk er basert på. Cytotoksitet er et begrep som brukes for stoffer som har egenskap til å være giftig og inducere ødeleggelse av cellene. Cytotoksitet- assays er viktige verktøy for medikamentforskning, kosmetisk, tilsetningsstoffer i mat (fordi disse må testes før produktene blir tilgjengelig for folket) og for å få bedre forståelse for biologiske prosesser som styrer celle vekst, deling og død. Det er flere viktige parametere som kan måles i cytotoxicitets-assay, for eksempel cellulær metabolsk aktivitet (ATP assay), måling av membran ødeleggelse (LDH assay) og direkte måling av celler (DNA assay) (43-45)

3.0 Eksperimentelt

3.1 Utstyr

3.1.1 Forbruksmateriell og apparatur

Tabell 3.1 viser forbruksmateriell og utstyr som er brukt i metoden.

Tabell 3.1: *Forbruksmateriell og utstyr*

<i>Apparatur</i>	<i>Produkt</i>	<i>Leverandør</i>
pH meter	Delta 320	Mettler, Oslo, Norge
Whirlmikser	IKA Minishaker MS1	Heigar
Vekt	AE 163 og PE22	Mettler Toledo, Greifensee, Sveits
Varmeskap	TS 4115	Termaks, Bergen Norge
Nitrogen inndamper	Reactive Therm III og reactive Therm	Pierce
Rotavapor	R 200	Büchi
Ultralydbad	Branson 3200	Emerson Danbury, USA
Åpen glass kolonne	400x 15mm	VWR, England
Diazometangenerator	2411736-1EA	Sigma Aldrich, St. Louis Missouri, USA
Semi-prep HPLC	Injektor 232, pump 321, sprøytepumpe 402	Gilson, Middleton, Wisconsin USA
Mikro vekt	AT261	Mettler Toledo, Greifensee, Sveits
LC-ITMS	Funnigan Surveyor PDA plus detector, autosampler, MS pump plus, LTQ massespektrometer	Thermo Scientific, San Jose, California, USA
LC-ITMS	LCQ, SN 4000, AS 3000	Thermo Scientific, San Jose, California, USA
LC-Q-TOF-MS		Agilent Technologies, inc., Santa Clara, California USA
NMR spektrometer		Bruker BioSpin, Silberstreifen, Tyskland
Kolonne	SunFire C ₁₈ 3,5µm 2,1 x 50mm	Waters, Milford Massachusetts, USA
HPLC kolonne (1)	Kinetex 2,6µm C18-B 100A, 50 x 2,10 mm	Phenomenex, Torrance, California, Usa
HPLC kolonne (2)	Kinetex 2,6µm C18-B 100A, 100 x 4,60 mm	Phenomenex, Torrance, California, USA
Semi-preparativ kolonne	HPLC Luna 5µm C18(2) 100A 250 x 10,00 mm 5 micron	Phenomenex, Torrance California, USA
Semi-preparativ kolonne	HPLC Luna 5µm C18 100A 250 x 10,00 mm 5 micron	Phenomenex Torrance, California, USA
HILIC kolonne	Pack Polyamine II 250 x 3,0	YMC, Düsseldorf, Tyskland

	mm i.d 12 nm s-5µm	
CO ₂ inkubatorskap	Autoflow 5510	Nuaire, Plymouth, Massachusetts, USA
Lysmikroskop		Leica DMIL, Lysaker Norge
Platerister		VWR, England
Tellekammer type Bürker-Türk		VWR, England
Sentrifugeringsmaskin	BR4	Jouan, England
Plateleser	1420 Victor ²	Wallac, Waltham Massachusetts USA
Kulturflaske	Celle kultur flaske 75 cm ²	TPP, Switzerland

3.1.2 Kjemikalier og medier

Tabell 3.2 presenterer kjemikalier benyttet i dette forsøket og Tabell 3.3 viser løsninger og medier brukt for å utføre Nøytral rød forsøk for CCL-94 celle linje.

Tabell 3.2: Kjemikalier brukt i metoden

<i>Kjemikalier</i>	<i>Kvalitet</i>	<i>Produsent</i>
Acetonitril	HPLC kvalitet	Rathburn, Walkerburn Scotland
Acetonitril 190	HPLC kvalitet	Romil, Cambridge, England
Ammoniakk 25 %	p.a	Merck, Darmstadt Tyskland
Ammonium acetat	p.a	Merck, Darmstadt Tyskland
Ammonium karbonat	p.a	Fluka, Buch, Sveits
Borsyre gel		Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, USA
Diazald	99 %	Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, USA
Diklormetan	p.a	Merck, Darmstadt Tyskland
Dimetyl sulfoksid	p.a	Merck, Darmstadt Tyskland
Edikksyre 100 %	p.a	Merck
Eddiksyre anhydrid	≥ 98 %	Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, USA
Etylacetat	HPLC kvalitet	Rathburn, Walkerburn Scotland
Saltsyre	37 %	Merck, Darmstadt Tyskland
Kalium hydroksid	p.a	Merck, Darmstadt Tyskland
Kloroform	Stabilisert med ethanol (1 %)	Romil, Cambridge, England

Maursyre 98-100 %	p.a	Merck, Darmstadt Tyskland
Metanol 205	Gradient	Romil, England
Natrium borhydrid		Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, USA
Natrium hydroksid	p.a	Merck, Darmstadt Tyskland
Silika gel 60 0,063.-0,2mm		Fluka, Buch, Sveits
Pyridin	p.a	Merck, Darmstadt Tyskland
Pyridin- d ₅	“100 % “, 99.96 atom % D	Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, USA
Sakkarid standardene		Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, USA
Solasodine	>95 %	Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, USA
1-metylimidazol	99 %	Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, USA
H ₂ O	Destillert ionebytte	og VWR, Leicestershire, Enland

Tabell 3.3: Løsninger og medium brukt til nøytral rød forsøk for CCL-94

<i>Navn</i>	<i>Produkt</i>	<i>Leverandør</i>
Heste Serum	Ref: 16050-122	Gibco
Medium (EMEM med ikke-essensielle aminosyrer)		Lonza, Walkersville, USA
Nøytral rød kit	Art-nr: KRN96.300	Xenometrix, Allschwil Switzerland
Trypsin EDTA		Lonza, Walkersville, USA

3.1.3 Plantematerialet

Trompetliljene som ble brukt i dette arbeidet ble tidligere dyrket i en privat hage på Movatn i Oslo. Løkene (50 stk.) ble kjøpt inn på firmaet Hageglede og ble satt i midten av mai i 2008. Plantene stod i full blomst i midten av august og ble da klippet av, blomstene ble separert fra stilk og bladverk og umiddelbart frosset ned (-26 °C). Blomstene ble noen dager senere frysetørket og fortsatt lagret ved -26 °C.

3.2 Screening og fragmentering

3.2.1 LC-ITMS screening

Screening av SGA ble utført ved bruk av en Kinetex C18 (kolonne 1) fra Phenomenex på LC-ITMS. For eluering av analyttene var den brukte mobilfasen MeCN og 5mM ammoniumacetat (pH 6,5) med en volumstrøm av mobilfasen på 250 µL/min. Kolonna ble eluert med en lineær gradient som vist i Tabell 3.4. For ionisering ble ESI brukt i positiv "mode". Viktige ESI parametere var som følgende: spray spenning: 4kV, kapillær temperatur: 300 °C, "sheat" gass 55 enheter (ca. 55 L/min), hjelpe gass: 5 enheter (ca. 5 L/min)

Tabell 3.4: Tid og mobilfase gradient for screening av analyttene på Kinetex C18 (kolonne 1)

<i>Tid (min)</i>	<i>% A</i>	<i>% B</i>
0,00	25	75
0,50	25	75
17,00	35	65
17,50	95	5
19,50	95	5
20,00	25	75
23,00	100	0

3.2.2 LC-ITMSⁿ for screening og fragmentering av steroidalkaloider

Fragmentering av SGA MW 575, 883, 925, 967, 969 og 1011 ble utført ved bruk av samme HPLC metode som beskrevet i punkt 3.2.1

Fragmentering av analyttene ble utført ved bruk av ESI positiv. Viktige ESI parametere var følgende: kapillær temperatur 250 °C, kapillær spenning 37 V, spray spenning 5 kV, "sheat" gass 55 L/min, "sheat" gass 55 enheter (ca. 55 L/min), hjelpe gass 5 enheter (ca. 5 L/min), tube lens 115 V. For fragmentering av utvalgte ioner i ionefella ved "collisional-induced dissociation" (CID) ble ionene isolert med en massetoleranse på m/z 1, kollisjonsenergien ble satt til 30 % og parameteren "activation Q" ble satt til 0,25 med en aktiveringstid på 30 ms.

3.2.3 Fragmentering av Solasodine

MSⁿ forsøk av kommersiell solasasodine var utført ved direkte infusjon av en løsning i metanol i massespektrometeret. Fragmenterings parameter var de samme som beskrevet i punkt 3.2.2, men mobilfasen i dette trinnet bestod mobilfasen av MeCN/ H₂O (95:5 v/v)/ 5 mM ammoniumacetat buffer og 5mM ammoniumacetat buffer (pH 4,8). Det ble tatt opp spektre i 0,5 minutter og kollisjons energi var mellom 20-30 % avhengig av foreldre ionet som ble valgt.

3.2.4 LC-HRMS

Høytoppløselig massespektrometri ble utført med tanke på å finne ut hvilken elementærsammensetning SGA har. For dette ble en fraksjon fra kolonnekromatografi som inneholdt alle SGA (Tabell 3.5) kjørt på HPLC koplet til et Q-TOF-MS analysert. Q-TOF ble kjørt i “extended dynamic range”, og med en samling på 2 GHz. HPLC parameterne var som beskrevet i 3.2.1. Mobilfasen var MeCN og 2,5 mM ammoniumkarbonat (pH 8,5) og brukt kolonne var Kinetex C18(kolonna 1) Et Agilent 6520 accurate mass Q-TOF massespektrometer med ESI ble brukt med følgende instrumentparametere: spray spenning: 3,5 kV, “drying gas flow”: 5 L/min, gasstemperatur 325 °C og “nebuliser pressure”: 30 psi. MS'en ble skannet i massområdet m/z 100–1000 med en “sampling rate” på 1.4 spektre/s (4 GHz). Instrumentet ble kjørt med intern massekorrektur, og fragmentor og skimmer spenningen ble satt til henholdsvis 150 og 65 V. Beregning av all data ble utført ved bruk av programmet Xcalibur 2.0.7 (Thermo Scientific, San Jose, California, USA).

3.3 Isolering og opprensning av utvalgte steroidalkaloider

Isolering og opprensning av steroidalkaloider bestod av fire hoved trinn:

- 1) Ekstraksjon og væske-væske ekstraksjon
- 2) Kolonne kromatografi på silika gel
- 3) Fraksjonering på semi-preparativ HPLC
- 4) Opprensning på semi-preparativ HPLC med split til et ITMS

3.3.1 Ekstraksjon av væske-væske ekstraksjon

Ekstraksjon og isolering av SGA var utført ved modifisering av tidligere dokumentert metode (46) De frysetørkede blomstene til trompetliljene ble kvernet i en kaffemikser og deretter 10.6 g og 11.6 g overført til to flasker på 500 mL samt blandet med 150 mL av MeOH på en riste maskin i en time (150 rpm/min). Videre ble innholdet i begge flaskene filtrert i over samme pære kolbe (250 mL) og plantematerialet med filtrene overført tilbake til flaskene for å ekstrahere på nytt med samme prosedyre. Ekstraktet i pærekolben var grønnfarget og denne ble overført til en spisskolbe (250 mL) og fordampet i en rotasjonsfordamper. Temperaturen var valgt til å være 40 °C med et starttrykk på 200 mbar Trykket ble trinnvis redusert når fordampningen stoppet. Spiss kolben var veid både før og etter inndampning. Totalt utbytte av ekstrahert tørrstoff var 11,6 g.

150 mL av 5 % eddiksyre i vann og 100 mL av etylacetat ble brukt til å løse stoffene. Etylacetatfasen ble videre tatt bort og ytterligere 200 mL av etylacetat ble tilsatt i vannfasen igjen for ekstraksjon. Vannfasen ble videre filtrert over til en skilletrakt og tilsatt 25 % ammoniakke for pH økning (pH ca 9). Blandingen fikk en fargeforandring fra grønn til oransje-brun. 2x 150 mL kloroform var deretter benyttet for utførelsen av tilbake ekstraksjon. Kloroform fasen ble overført til en pærekolbe og fordampet i en rotasjonsfordamper. Start temperatur var på 40 °C og trykk på 400 mbar. Pære kolben var veid både før og etter fordampningen. Totalt utbytte av tørrstoff var 0,6 g.

3.3.2 Kolonne kromatografi på silikagel

Silika kolonnen var laget ved å blande 30,2 g silikagel med 100 mL kloroform etterfulgt av overføring til et åpen glass kolonne. Sjøsand ble lagt på toppen av gelen for å beskytte overflaten og lette påsettingen av prøven. Tørrstoffet i pærekolben (se delkapittel 3.3.1) ble løst i 8 mL kloroform og overført til silika kolonnen. Tabell 3.5 viser hvordan kolonne ble eluert.

Tabell 3.5: Blandingsforhold i elueringsmiddel og volum brukt for eluering av SGA på en silika kolonne fra ekstraktet etter væske-væske ekstraksjon.

<i>Eluent (SilikaF_x)</i>	<i>Elueringsmiddel</i>	<i>Blandingsforhold (v/v)</i>	<i>Volum (mL)</i>
SilikaF _{98:2}	CHCl ₃ /MeOH	98:2	3x40
SilikaF _{80:20}	CHCl ₃ /MeOH	80:20	3x40
SilikaF _{50:50}	CHCl ₃ /MeOH	50:50	3x40

100 µL av eluatene ble dampet inn, reløst i 100µL MeOH og deretter analysert på LC-MS med en Sunfire C₁₈ kolonna med en mobilfase av MeCN/H₂O (95:5 v/v) og 5mM ammonium acetatbuffer (pH 4.8). Eluerings gradienten er gitt i Tabell 3.6.

Tabell 3.6: Tid og mobilfase (A: MeCN/H₂O (95:5 v/v), B: 5mM ammonium acetatbuffer,) gradient for analyse av eluatene fra silikagel kolonne, på LC-MS med en Sunfire C₁₈ kolonna

<i>Tid (min)</i>	<i>A (%)</i>	<i>B (%)</i>
0	5	95
0,5	5	95
10	40	60
11	100	0
13	100	0
13,5	5	95
16	5	95

3.3.3 Semi-preparative RP-HPLC

SilikaF_{50:50} fraksjon ble dampet inn og reløst med 2 mL MeOH (ultralydbad, 10 min). Alikvoter ble fortynnet 1:4 med MeOH for semi-preparative HPLC med en diode-array-detektor (DAD). En Luna C18(kolonne 2) kolonne og en mobilfase bestående av MeCN og 5mM ammonium acetat (pH 6,5) ble brukt for dette formålet. Kolonna ble eluert med følgende program: 25 % MeCN i 1 min; lineær gradient til 60 % MeCN over 24 min; kolonnevask med 75 % MeCN i 5 min; equilibrering med 25 % MeCN i 5 min. Injeksjonsvolumet ble økt gradvis fra 50 µL og opp til 100 µL og volumstrømmen av mobilfasen var 3mL/min. Deteksjon ble foretatt ved λ= 205 nm.

Fra totalt seks fraksjoner, ble kun fem fraksjoner brukt for videre opprensning av SGA.

3.3.4 Videre opprensning på semi-preparativ HPLC koblet til LCQ

Videre opprensning av SGA ble foretatt med semi-preparativ HPLC som var koblet til et LCQ Classic ITMS. Følgende SGA ble rensert opp: MW 575, 925, to analoger av SGA 883, 883(**1a**) og 883(**2a**), to analoger av SGA MW 969, 969(**12d**) og 969(**13d**) og to analoger av SGA MW 1011 (**17e** og **18e**), Fraksjonering/ opprensning av SGA var utført ved at fraksjonene (F₂-F₅) ble fordampet i rotasjonsfordampet og videre reløst med 1mL MeOH. Tabell 3.7 presenterer de kromatografiske parametere for separasjonen utført på både Luna C18(kolonna 1) og Luna C18(kolonna 2) kolonna avhengig av SGA som ble rensert opp. SilikaF_(50:50) fraksjonen ble også brukt for samling av SGA MW 925 og 967. Disse ble benyttet for utførelse av basehydrolyse reaksjon.

Tabell 3.7: Kolonne, mobilfase og mobilfase gradient for fraksjonering av MeOH ekstraktet (SilikaF_{50:50}) og opprensning av fraksjoner F₂-F₅, på semi-preparativt HPLC koblet til LCQ med omvendt fase.

Fraksjon	SGA (m/z)	Kolonna	Mobilfase	Gradient
F ₂	576 og 926	Luna C18(1)	MeCN og 5mM ammonium acetat	29-58 % A
F ₃	884(1a), 884(2a), 970 (12d), 1012(17e) og 1012(18e))	Luna C18(2)	MeCN og 5mM ammonium acetat	-Isokratisk 36 % A og -Isokratisk 37 % A
F ₄	884(1a), 884(2a) og 970(13d)	Luna C18(1)	MeCN og 5mM ammonium acetat	-Isokratisk 29 % A
F ₅	884(1a), 884(2a), 926, 1012(17e) og 1012(18e)	Luna C18(2)	MeCN og 5mM ammonium acetat	-Isokratisk 37 % A -isokratisk 38 % A

Fra fraksjonen F₅ ble *m/z* 884(**1a+2a**) og *m/z* 926 samlet i en felles kolbe på grunn av overlapping. Dette ble videre separert på Luna C18(kolonna 1) og isokratisk eluering med en mobilfase bestående av MeCN og 0,1 % maursyre/H₂O. Separasjonen ble utført isokratisk med 30 % MeCN, og volumstrømmen var 3 mL/min.

3.4 NMR

NMR spektre av solasodine, SGA MW 575 og SGA MW 883(**1a**) ble tatt opp på et Avance AVII 600 MHz NMR spektrometer. Deuterert pyridin (pyridine-d₅), ble brukt som løsemiddel i 5 mm WILMAD NMR rør (Sigma-Aldrich). Rådata ble behandlet med programvaren Topspin versjon 2.1 pl4 eller 1.3. Følgende 1D-, 2D- og 3D-NMR forsøk ble kjørt: 1H, JMOD, COSY, TOCSY, SELTOCSY, g-HSQC, g-HMBC, H2BC og HSQC-TOCSY. NMR-spektrometret ble satt opp og prøvene kjørt av min veileder.

3.5 Derivatiseringsreaksjoner

3.5.1 Basehydrolyse av acetylerede steroidalkaloider

Det ble utført basehydrolyse på SGA MW 925 og 967. Formålet med denne reaksjonen var å avspalte substituerte grupper på sukker molekylet(ene). For dette ble 200 µL av oppkonsentrert SGA løsning (løst i MeOH) blandet med 200 µL bikarbonat buffer pH 10,2. SGA løsningen fra både før og etter tilsetning av buffer (etter en time med reaksjon) ble kjørt på LC-MS. Kinetex C18 (kolonna 1) ble brukt for separasjon med MeCN og 5 mM ammonium acetat (pH 6,5) som mobilfase. LC-MS metoden brukt er lik den som er beskrevet i punkt 3.2.1.

3.5.2 Reaksjon med diazometan

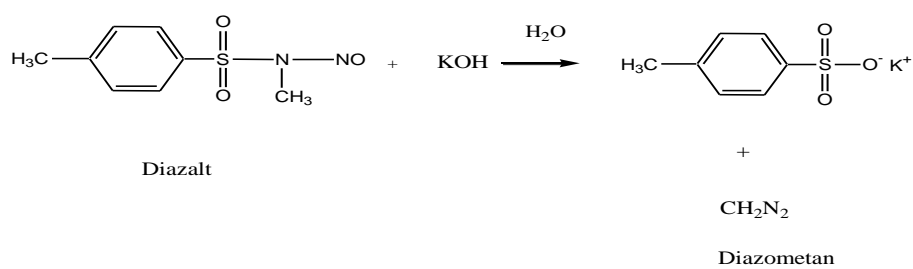
MS data for SGA MW 969(**13d**) og 1011 tydet på at disse inneholder en karbonsyrefunksjon. Derfor ble metylering av syre gruppene på SGA 969(**13d**) og MW 1011 utført ved hjelp av gassen diazometan. Til dette formålet ble det brukt en kommersiell reaktor som kan brukes til både å generere diazometan og utføre reaksjonen samtidig (Diazometangenerator, Figur 3.3). En modifisert metode ble gjennomført av den leverandøren diazometangenerator (Sigma aldrich) hadde beskrevet. Alikvoter av både fraksjonen som innholdt SGA MW 969(**13d**) og fraksjonen SilikaF_{50:50} (100 µL), som begge var tidligere løst i MeOH, ble overført i hver sin reaktor og dampet inn med nitrogengass. Dietyleter ble så brukt til å oppløse stoffene. Det indre røret av reaktoren ble fyllet med 0,3 g diazalt (Tabell 3.8) som så ble løst i 1 mL carbitol (Dietylen Glykol Monoetyl Eter).

Tabell 3.8 Mengde diazetal tilsatt i hvert sitt rør med SGA MW 969(**13d**) og i SilikaF_{50:50}

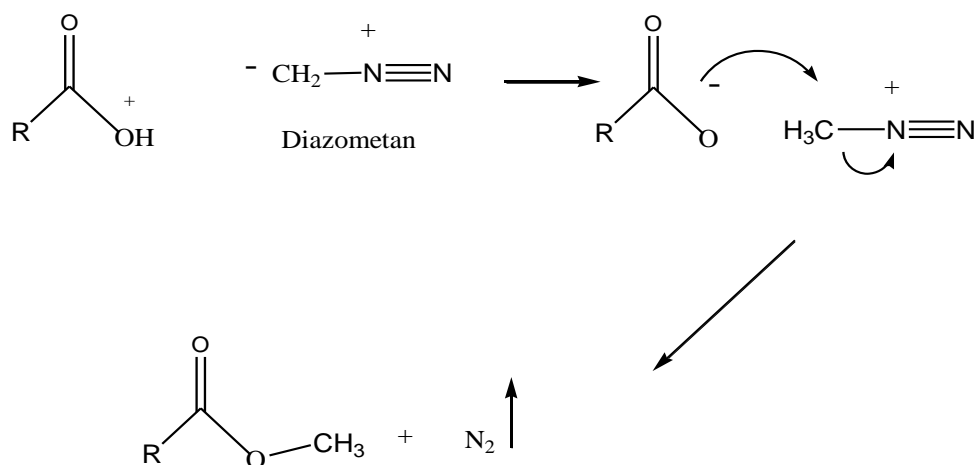
<i>Stoff/Fraksjon</i>	<i>Mengde diazald (g)</i>
970 (13d)	0,3152
SilikaF _{50:50}	0,2986

Diazometan generator ble lukket og satt på isbad for å forhindre dietyleteren fra å bli fordampet. Deretter ble 2 mL av 37 % KOH tilsatt gradvis til blandingen av carbitol og diazalt gjennom et septum i toppen av reaktoren vha. en sprøyte. Dette førte til en base hydrolyse reaksjon og gassen diazometan ble dannet som videre skulle reagere med SGA løsningen i det ytre røret. Etter at reaktoren hadde stått over natta ble det forsiktig tilsatt 1 mL eddiksyre til carbitol/KOH/diazometan blandingen. På denne måten fikk overskuddet av diazometan reagert med syren. Eter løsningen ble dampet inn (N₂) og reløst i 1 mL MeOH. Reaksjons mekanisme er presentert i Figur 3.1-3.2 og et bilde av diazometan generatoren i Figur 3.3.

Ekperimentelt



Figur 3.1: Dannelse av gassen diazometan ved at stoffet diazalt reagerer med basen kaliumhydroksid.(47)



Figur 3.2: Reaksjonsmekanismen bak metylering av en syregruppe ved hjelp av gassen diazometan.(47)



Figur 3.3: Den brukte diazometan generator for derivatisering av karboksylsyrer.

3.6 LC-MS basert metode for sukkeranalyse

3.6.1 Utprøving av metode for sukkeranalyse med kommersielle sukkerstandarder

I første omgang ble native sukker benyttet for å teste ut metoden for analyse av sukker. Til dette ble stamm løsninger av sukkerne ble laget i 10 mL målekolbe. Type sukker og konsentrasjonen i standard løsningene er gitt i Tabell 3.9. Sukkeranalysen ble gjennomført i to hoved trinn som bestod av reduksjon og acetylering etterfulgt av separasjon på LC-MS. Reduksjon og acetylering av sukkerne ble utført ved å følge en metode tidligere brukt for reduksjon og acetylering av sukkere (48)

Tabell 3.9: *Konsentrasjonene av komersiell sukker i sukkerstandardene*

<i>Sukker</i>	<i>Konsentrasjon, mg/mL</i>
D- Glukose	1,17
L- Glukose	1,27
D- Galaktose	1,01
L- Galaktose	1,10
D- Xylose	1,02
L- Xylose	1,17
D- Arabinose	1,19
L- Arabinose	0,38
L- Ramnose	1,0

➤ *Reduksjon:*

100 µL av sukkerstandardene ble dampet ved bruk av N₂ gass og reløst i 100 µL H₂O. 20 µL av 25 % amoniakk og 1 mL av 0,5M Natriumborhydrid (i DMSO) ble tilsatt i reaksjons rør, ristet og plassert i et varmeskap i 90 min ved 40 °C før den ble plassert i kjøleskapet til dagen etter.

➤ *Acetylering:*

Den neste dagen ble reaksjonsblandingen varmet opp i et varmeskap (40 °C) i fem min. Følgende reagenter ble så tilsatt til løsningen: 100 µL eddiksyre, 200 µL 1-metylimidazol og 1 mL eddiksyreanhydrid. Røret ble ristet etter tilsetning av hver reagent. Dette ble varmet opp i 10 min (40 °C) i varmeskap og deretter overført til et spissrør på 10 mL. For å sørge for at overskuddet av anhydrid fikk reagert ble 2,5 mL H₂O blandet inn i løsningen. Videre ble 1 mL av diklormetan blandet inn for å ekstrahere ut de acetylte sukkerne. Løsningen ble blandet på en minirister i fem min. Den organiske fasen ble overført til 10 mL spissrør, dampet inn og de derivatiserte sukkerne reløst i 1 mL av MeCN/ammoniumacetat buffer (75;25, v/v) pH 4,8.

Videre ble løsningen av derivatiserte sukker analysert på LC-MS. Kromatografi ble utført på en Kinetex C18(kolonna 2). Mobilfase sammensetningen var MeCN/H₂O (95:5, v/v) og 5 mM ammonium acetat (pH 6,5). Kolonna ble eluert isokratisk med 30 % MeCN/H₂O (95:5, v/v) med en volumstrøm på 700 µL/min. Ioniseringsteknikken i denne metoden var APCI positivt og viktige parametere var følgende: Alle masse spektrene var tatt opp i et masse området fra m/z 140-500, Kapillær temperatur 225 °C, APCI fordampnings temperatur 400 °C, "Sheat gas" 52 enheter, hjelpegass 27 enheter, "source voltage" (korona spenning) 6kV, kapillær spenning 27 V, tube lens 80 V.

3.6.2 Sukkeranalyse for SGA

Sukkeranalyse for SGA MW 575, 883 og 969(12d) ble gjennomført ved å følge metoden beskrevet i delkapittel 3.6.1.

Sukkeranalyse av SGA MW 575 og 969(12d) inneholdt et ekstra avsaltingstrinn på en borsyre-regel-minikolonne hvor SGA først ble hydrolysert og deretter eluert på en borsyre kolonne før reduksjon og acetylering. Det viste seg etter hvert at bruk av borsyre-regel-kolonna ikke var nødvendig. Hydrolyse av SGA på borsyre kolonnen var utført ved å følge en modifisert prosedyre av den anbefalt av leverandøren (49) Prosedyren er beskrevet nedenfor. Hydrolysatet ble reløst med 400 µL H₂O og ikke 100 µL H₂O slik som for sukkerene

➤ *Borsyre kolonne:*

For tillaging av kolonnen ble 3 mL H₂O tilsatt til 0,6 g borsyre-regel og overført til en SPE-hylse fylt med 3 mL vann. Ventet til alle partiklene var laddet opp på hverandre og deretter ble overskuddet av vannet tømt.

- Kondisjonering:
 - 3 mL 0,5M HCL
 - 5 mM ammoniumacetat (pH 6,5) var tilsatt til pH var stabilt ved kolonneutgang.
- Eluering:
 - Prøven påsettes kolonna
 - Vasket med 3 mL H₂O
 - Eluert med 3 mL 0,1 % maursyre

Siden bruk av borsyre-regel kolonne ikke var nødvendig ble den ikke brukt videre for SGA MW 883(1a) og 883(2a), men disse SGA ble først hydrolysert for å bryte glykosid bindingene mellom monosakkaridene, etterfulgt av acetylering og reduksjon (se delkapittel 3.6.1) Hydrolyse ble utført på følgende metode:

➤ *Hydrolyse:*

100 µL av analyttløsning ble blandet med 300 µL 1M HCL i et 5 mL reaksjonsrør og deretter plassert i varmeskap for tre timer ved 100 °C. For å nøytralisere løsningen ble 1M NaOH benyttet.

3.7 Cellekultur

Cellelinjen CCL-94 fra kattenyre var opprinnelig fra American Type Culture Collection (ATCC) og lagret ved Veterinærinstituttet i flytende nitrogen i 95 % Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) og 5 % DMSO, CCL-94 ble dyrket i EMEM + 10 % heste serum i en 75 cm² celle kultur flaske i inkubator skap ved 37.0 °C og en atmosfære som inneholdt 5 % CO₂. Mediet ble byttet etter 2-3 dager. Cellene ble trypsinert og splittet i forhold 1:3 når de var tilnærmet konfluente.

3.7.1 Nøytral Rød assay

Nøytral rød forsøket ble utført på CCL-94 cellene i en 96-brønns plate. Kommersielt solasodine og opprenset SGA MW 575 og 883(1a) ble brukt til celle eksponering på hver sin plate. Forsøket bestod av tre trinn som varte over tre dager: dag 1) å legge ut celler på plate, dag 2) eksponering av cellene med SGA eller solasodine og dag 3) tilsetning av nøytral rød og måling av nøytral rød-opptak i lysosomene. Disse trinnene er beskrevet mer detaljert nedenfor.

For SGA MW 575 og 883(1a) ble det preparert ti standard løsninger hvorav for kommersielt solasodine ble det gjort i stand 12 løsninger (Tabell 3.10)

Tabell 3.10: Konsentrasjon av solasodine, SGA MW 575 og 883(1a) i standard løsningene.

<i>Solasodine, (mg/mL)</i>	<i>MW 575, (mg/mL)</i>	<i>1a, (mg/mL)</i>
1,42	4,7	3,8
0,71	2,35	1,9
0,36	1,175	0,95
0,18	0,5875	0,48
0,09	0,29375	0,24
0,044	0,16875	0,12
0,022	0,0734375	0,059375
0,011	0,03671875	0,02968
0,006	0,01835938	0,01484
0,003	0,00917969	0,00742
0,0014		
0,0007		

➤ *Fordeling av cellene på plate:*

Konsentrasjonen av cellene i brønnene bør være $2,0 \cdot 10^4$ celler/100 µL, derfor ble 10 µL av celle suspensjonen pipettert over til en celle bürk- teller og cellene ble telt. Basert på den telte middelverdien ble cellesuspensjonen fortynnet med ren medium ved behov. 96-platen ble fylt på følgende måte:

Ekspérimentelt

- De ytterstebrønnene (36) ble fylt med 100 μL av EMEM
- 3x100 μL ren medium pipettert i tre brønner (medium kontroll),
- 3x100 μL celle suspensjon i tre brønner (vekst kontroll)
- 3x100 μL celle suspensjon i tre brønner (for løsningsmiddel kontroll)
- 100 μL celle suspensjon ble pipettert i de gjenværende brønnene

Platen ble satt inn i inkubator skap, 37 °C og 5 % CO₂.

➤ *Eksposering med solasodine og SGAs*

På dag 2 (etter 24 timer) ble brønnen med celle suspensjon eksponert med standard løsninger med ulike konsentrasjoner av SGA eller solasodine (løst i DMSO). Konsentrasjonen var bestemt til å være 0,5 % DMSO-løsning i brønnene (for SGA-løsning) og 1 % (for solasodine løsningene). For å få til dette ble henholdsvis 5 og 10 μL av eksponerings-løsningene blandet med 495 og 490 μL ren medium. $3 \times 100 \mu\text{L}$ av denne blandingen ble så tilsatt til tre brønner med celler. 5 μL av ren DMSO ble blandet med 495 μL ren medium og 100 μL av denne blandingen ble pipettert i brønnene for løsningsmiddel kontroll. Platen ble satt inn i inkubator skap på 37 °C og 5 % CO₂

➤ *Nøytral rød test:*

Nøytral rød assay ble utført ved å følge prosedyren beskrevet av leverandøren (Xenometric version 1.4). Nøytral rød løsning (NR II) ble laget ved å blande 6,93 mL av medium med 70 μL nøytral rød. Blandingene ble deretter lagt i inkubator skap i 2 timer.

Videre:

- Platen ble tatt ut av inkubator skapet og mediet i brønnene ble fjernet
- Cellene i brønnene ble vasket med 300 μL av vaske- løsning (NR I), og fjernet umiddelbart
- 200 μL av "labeling" (NR II) løsning pipettert i hver brønn og plassert i inkubator skap på 37 °C og 5 % CO₂ i 3 timer.
- Etter 3 timer inkubasjonstid ble NR II løsningen fjernet og 200 μL av en "fixing" løsning (NR III) som fulgte med kit'et pipettert i brønnene. Etter 1 min ble løsningen fjernet
- Til slutt ble 200 μL av "solubilization" (NR IV) løsning tilsatt og blandet vha. en platerister i 15 min. Videre, absorbansen ble målt ved 530 nm og 690 nm (bakgrunn).

Tabell 3.11 Angir sluttkonsentrasjonen av solasodine og SGA i brønnene i 96 brønns plate.

Tabell 3.11: *Konsentrasjonen av SGA MW 576, 883(1a) og kommersiell solasodine standardene benyttet i celle forsøk.*

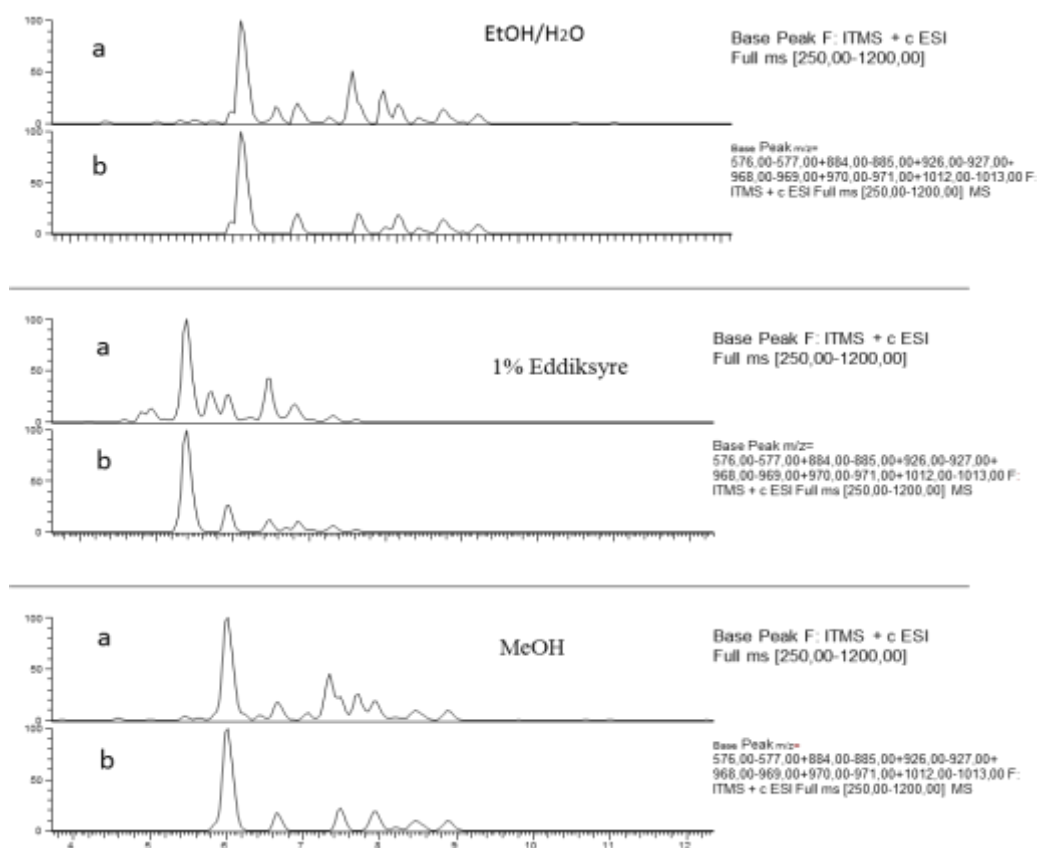
Standard løsninger	Konsetrasjon av Solasodine (μM)	Konsentrasjon av MW 576 (μM)	Konsetrasjon av MW 883(1a) (μM)
1	34,5	40,9	21,5
2	17,2	20,45	10,75
3	8,6	10,225	5,375
4	4,3	5,1125	2,6875
5	2,15	2,55625	1,34375
6	1,075	1,278125	0,671875
7	0,5375	0,6390632	0,3359375
8	0,26875	0,31953125	0,16796875
9	0,134375	0,15976563	0,08398438
10	$6,71875 \cdot 10^{-2}$	0,07988281	0,04199219
11	$3,359375 \cdot 10^{-2}$		
12	$1,679668 \cdot 10^{-2}$		

4.0 Resultater og diskusjon

4.1 Isolering og opprensing av SGA

4.1.1 Ekstraksjon av glykoalkaloider fra *Lilium longiflorum* blomstene

For ekstraksjon av SGA fra *Lilium longiflorum* blomstene ble MeOH, 1 % eddiksyre og EtOH/H₂O (7:3 v:v) etter vask av blomstermateriale med heksan testet ut. Valg av ekstraksjonsmidlene var basert på det som tidligere ble beskrevet i litteraturen (11, 14) MeOH, 1 % eddiksyre og heksan løsningene var tilsatt i hvert sitt rør med prøve materialet, ristet og deretter sentrifugert (punkt 3.3.1). Vasketrinnet med heksan skulle fjerne fett og andre lipofile stoffer fra materialet for å så gi et renere ekstrakt. Heksanfasen ble analysert på LC-MS for å teste om den inneholdt SGA, noe den ikke gjorde. Figur 4.1 viser ionekromatogrammer fra LC-MS av ekstraktene.



Figur 4.1: Ionekromatogram av SGA i ekstraktene til EtOH/H₂O, 1 % eddiksyre og MeOH analysert på LC-ITMS på en SunFire C₁₈ kolonne med metoden beskrevet i delkapittel 3.3.2. Figuren viser total ionekromatogrammet for m/z 250-1200 (a) og en summering av ionene for [M+H]⁺ til de viktigste SGA (b): m/z 576, 884, 926, 968, 970 og 1012. X-aksen angir retensjonstid i minutter og y-aksen relativ intensitet i prosent.

Ekstraksjonsutbyttet var tilnærmet lik for alle tre ekstraksjonsprosedyrene (kvalitativ vurdering fra topphøyden til individuelle SGA i LC-MS kromatogrammene). Bruken av 1 % eddiksyre førte imidlertid til svelling av prøvemateriale og gjorde ekstraktet noe vanskelig å arbeide med, mens kombinasjonen av heksan-vask/EtOH/H₂O ekstraksjon inneholdt et ekstra trinn. Det ble derfor bestemt at videre arbeid på isolering og opprensning av SGA skulle baseres på et MeOH-ekstrakt.

4.1.2 Væske- Væske ekstraksjon

MeOH ekstraktet ble dampet inn, løst og fordelt mellom 5 % eddiksyre og etylacetat. SGA som er basisk i natur vil forbli i vannfasen mens etylacetat vil ekstrahere organiske molekyler av surt til neutral karakter. Eksempel på dette er saponiner som er ganske lik SGA i struktur men mangler atomet nitrogen og dermed også de basiske egenskapene. 25 % ammoniakk bledråpevis tilsatt til vannfasen for å få basisk en løsning, i dette tilfellet til pH 9. Kloroform ble valgt for en tilbake ekstraksjon av SGA til organisk fase. Grunnet SGA sin basiske natur kan deres polaritet styres av pH, og det viste seg at tilbake ekstraksjon ved bruk av kloroform var vellykket og lite av SGA var å se i vannfasen og etylacetatfasen (aliquoter av fasene ble testet på LC-MS; resultater er ikke vist).

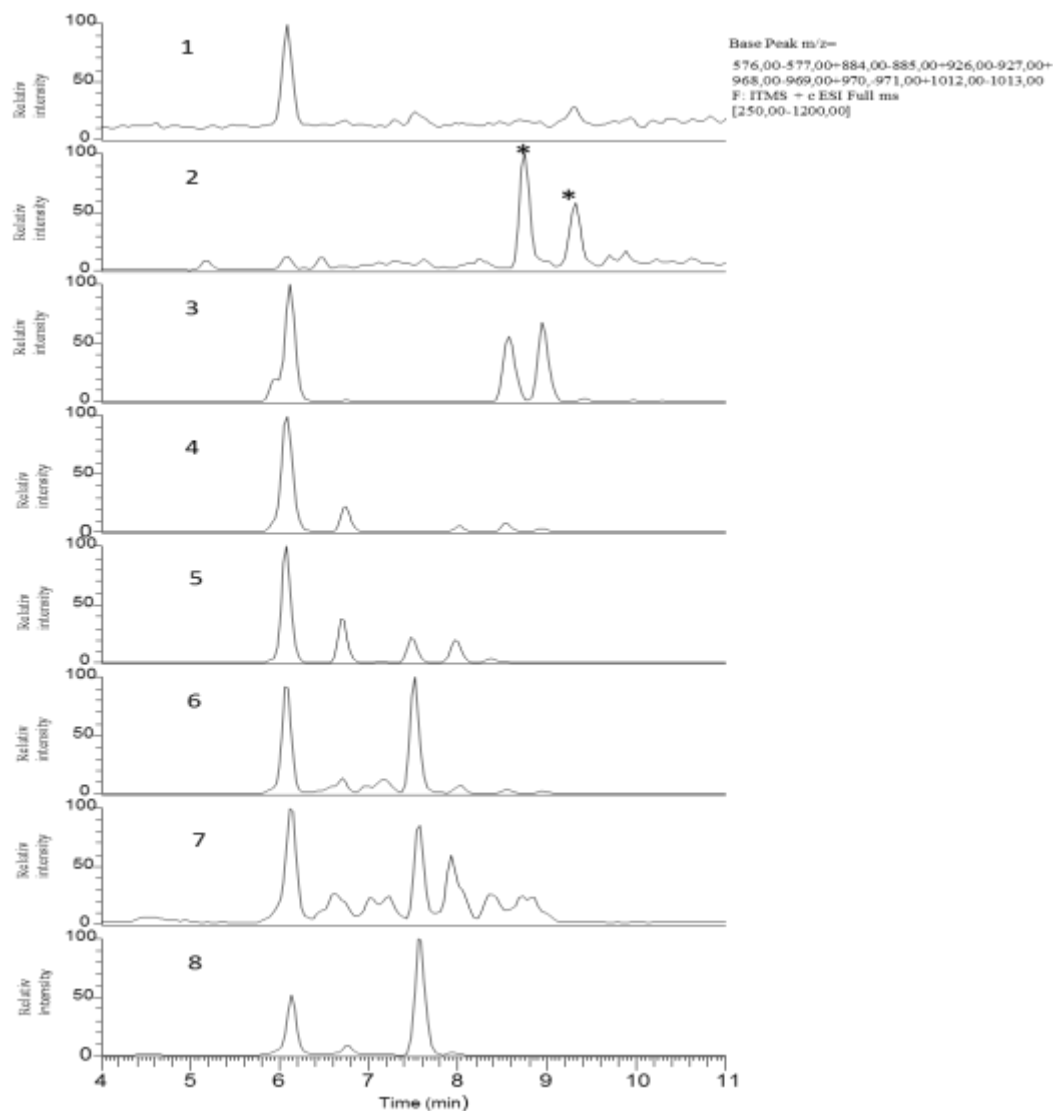
4.1.3 Opprensning på Silika kolonne

Videre opprensning av SGA ble utført med normalfase kromatografi på en silika kolonne. Silika-gel er et polart sorbent hvor silanolgruppen (Si-OH) danner hydrogenbindinger med SGA og fører til god retensjon. En trinnvis gradient av åtte løsemiddelkombinasjoner ble testet for eluering av analyttene, gitt i Tabell 4.1, og i Figur 4.2 er det presentert en summering av ionene for [M+H]⁺ til de viktigste SGA: *m/z* 576, 884, 926, 967, 970 og 1012.

Tabell 4.1: Trinnvis gradient for eluering av SGA fra silika-gel kolonna og SGA som ble eluert

Løsnings nr.	Løsning	Blandingsforhold (%)	SGA(MW)
1	CHCl ₃	100	575
2	CHCl ₃ /MeOH	95:5	----
3	CHCl ₃ /MeOH	90:10	575, 967
4	CHCl ₃ /MeOH	80:20	575, 925, 967
5	CHCl ₃ /MeOH	70:30	575, 883, 925
6	CHCl ₃ /MeOH	60:40	575, 883, 925, 967
7	CHCl ₃ /MeOH	50:50	575, 883, 925, 967, 969, 1011
8	MeOH	100	575, 883, 969,

Resultater og diskusjon



Figur 4.2 Totalionekromatogrammer fra LC-ITMS av eluatene nummerert 1-8, fra normalfasekromatografi av en væske/væske-ekstrahert MeOH-ekstrakt. SGA ble eluert på en Sunfire C₁₈ kolonna på LC-MS med metoden beskrevet i punkt 3.3.2. Toppene merket med * er ikke SGA.

Kloroform (eluent 1) eluerte kun SGA MW 575 og i eluat 2 ble det ikke detektert noen SGA. Dette kan skyldes at SGA MW 575 ikke var sterk bundet til sorbenten og rant gjennom kolonnen da kloroform var tilsatt. Toppene merket med * i Figur 4.2 er ikke SGA, men mest sannsynlig matrikskomponenter. De gjenværende løsningene var godt egnet som elueringsmiddel og for å få mest mulig utbytte av SGA og samtidig oppnå en grov opprensing og fraksjonering ble CHCl₃/MeOH (80:20, v/v) og CHCl₃/MeOH (50:50, v/v) brukt videre i forsøkene med å isolere og rense opp SGA i semi-preparativt skala. CHCl₃/MeOH (98:2, v/v) ble brukt for å vaske ut mer lipofile komponenter fra kolonna før eluering av SGA.

4.1.4 Semi-preparativt HPLC

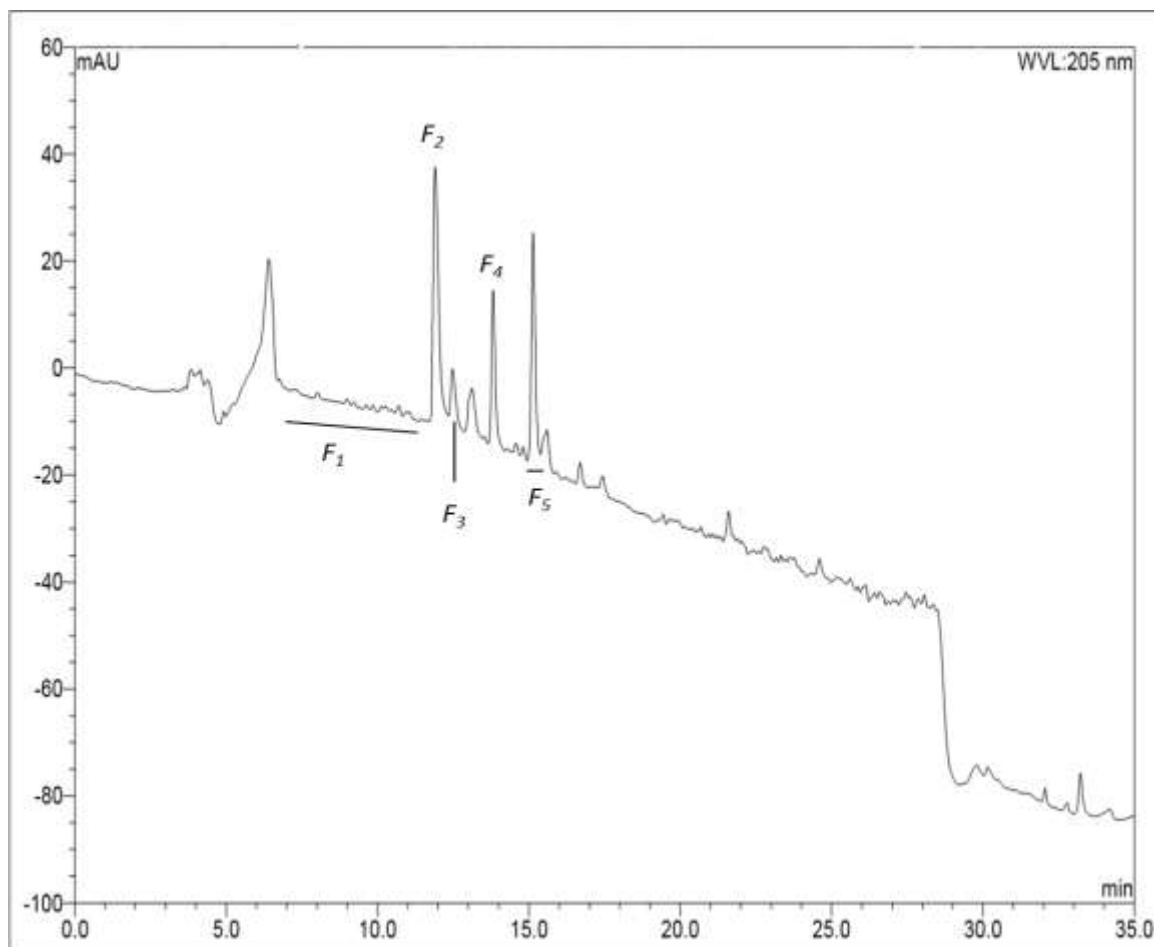
Semi-preparativ omvendt-fase HPLC skulle brukes som den siste metoden til å rense opp individuelle SGA fra *L. longiflorum* blomstene.

4.1.4.1 Semi-preparativ HPLC på en Luna C18(kolonne 1)

For fraksjonering av SGA ble SilikaF_(50:50) brukt dette fordi denne fraksjonen inneholdt størst samling av SGA. Partiklene i Luna C18(kolonne 1) er silika-basert, og den ble i første omgang eluert med mobilfase bestående av MeCN og 2,5 mM ammoniumkarbonat (pH 8,5). Denne mobilfasen var valgt etter å ha testet ut forskjellige mobilfasesammensetninger for separasjon av SGA på LC-MS (se punkt 4.2.2). Ulike gradienter var testet for separasjon på den semi-preparative kolonna, 20-50 % MeCN, 30-45 % MeCN og 30-55 % MeCN. Etter flere forsøk viste det seg at metoden som ga best separasjon og dermed brukt videre var: 25 % MeCN i 1 min; lineær gradient til 60 % MeCN over 24 min; kolonnevask med 75 % MeCN i 5 min; equilibrering med 25 % MeCN i 5 min. Valg av kolonnen var basert på det som tidligere har blitt brukt for fraksjonering av SGA på semipreparativt-HPLC (omvendtphase)(14) Til å begynne med var kromatografien lovende, stabilt og ikke minst var det bra separasjon mellom toppene. Det ble også observert to analoger for SGA MW 883 (verifisert ved LC-MS av testfraksjoner, resultater ikke vist). Dette var som forventet siden screening av SGA på LC-MS (ved bruk av Kinetex C18 (kolonne 1)) hadde vist at ekstraktet inneholdt to SGA-analoger med en molekylvekt på 883 (punkt 4.2.1). Etter kort tid ga dessverre kolonnen irreversibel dårlig separasjon. Leverandøren opplyste at den type kolonne er pH-stabil opptil pH 10 forutsatt isokratisk eluering, men det er uvisst hvor høy pH kolonna ville tåle ved gradient eluering. Antakeligvis førte den svak basiske pH-verdi til at kolonnematerialet ble irreversibelt skadet.

4.1.4.2 Luna C 18 (kolonne 2)

Bruken av en Luna C18 (kolonna 2) kolonne var et resultat av at Luna C18 (kolonna 1) hadde blitt skadet og leveringen av en tilsvarende kolonne ville ta tid. Sammenliknet med Luna C18 (kolonna 1) pakkematerialet har Luna C18 (kolonna 2) materialet lavere karbon-“load” og dermed litt lavere retensjon av SGA. For gradienteluering ble en mobilfase bestående av MeCN og 5mM ammoniumacetat,(pH 6,5) valgt. Gradient parametere var identiske med de beskrevet i punkt 4.1.4.1. SGAene eluerte som skarpe topper og separasjonen ble vurdert som tilfredsstillende. Dessverre co-eluerte analogene for SGA MW 883. Metoden ble brukt for å grov-fraksjonere den komplekse blandingen av SGA i fem fraksjoner som beskrevet i punkt 3.3.3 og vist i Figur 4.3 Fraksjonene F₂-F₅ ble brukt videre i et siste opprensingstrinn (se 4.1.5). LC-MS resultatene av F₁ viste at denne fraksjonen ikke inneholdt SGA.



Figur 4.3: Kromatogram av SilikaF_{50:50} (1:4) på semi-preparativ HPLC på en Luna C18(kolonne2) med MeCN og 5mM ammoniumacetat (pH 6,5) som mobilfase

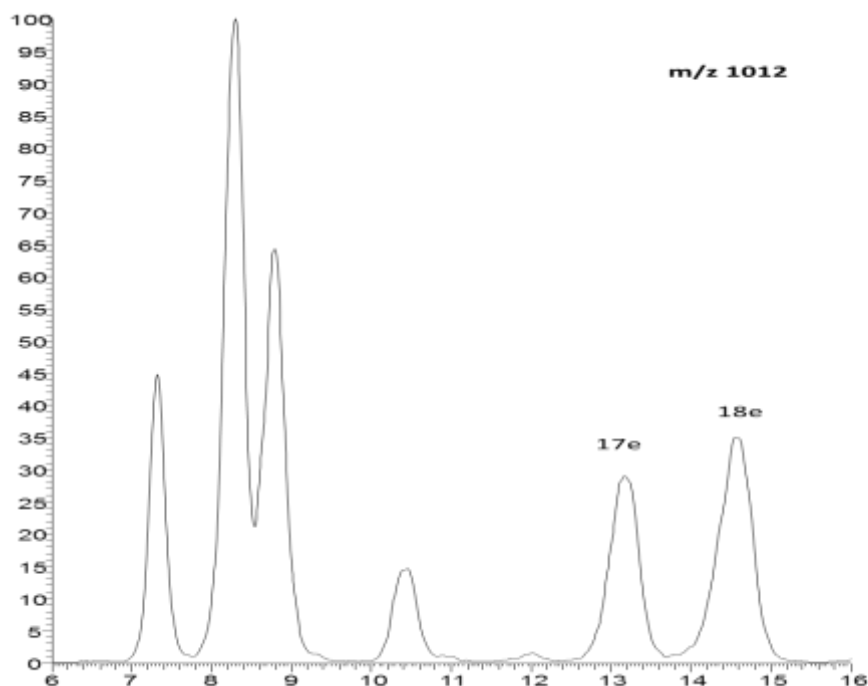
4.1.5 Semi-preparativt HPLC koblet til et LCQ Classic ITMS

I et siste opprensingstrinn ble fraksjonene F₂-F₅ (punkt 3.3.3.) videre rensert opp på semi-preparativt HPLC koblet til et LCQ Classic ITMS (punkt 3.3.4). En ny Luna C18(kolonna 1) ble bestilt og opprensning av SGA ble gjennomført ved bruk av både Luna C18(kolonna 1) og Luna C18(kolonna 2). Fraksjonene inneholdt fortsatt en blanding av SGA og derfor ble ulike SGA rensert opp fra samme fraksjon. Individuelle SGA ble manuelt samlet i hver sin kolbe ved å følge ionekromatogrammene tilsvarende m/z til $[M+H]^+$ til de forskjellige SGA. Fordelen ved bruk av MS i fraksjoneringen er at man får en renere fraksjon og unngår en samling av ikke ønskelige komponenter. Mobilfasen bestod av MeCN og 5mM ammoniumacetat (pH 6,5). Mobilfasegradienten varierte avhengig av hvilken fraksjon og kolonne som var tatt i bruk. (Tabell 3.7).

Hovedsakelig ble SGA med molekylvekt 883 samlet fra fraksjonene separert på Luna C18(kolonna 1) kolonna. Som beskrevet tidligere (punkt 4.1.4.1) ble det også her detektert to analoger for MW 883. Dette bekreftet at Luna C18(kolonna 1) som var tatt i bruk for fraksjonering av SGA på semi-preparativt HPLC, var ikke brukbar. Seks analoger med MW 1011 ble også observert (Figur 4.4), men kun to av disse ble samlet i hver sin kolbe

Resultater og diskusjon

(heretter kalt MW 1011(**17e**) og MW 1011(**18e**)) på grunn av co-eluering av de gjenværende analogene med andre ioner. Ionekromatogram for MW 1011 er presentert i Figur 4.4.

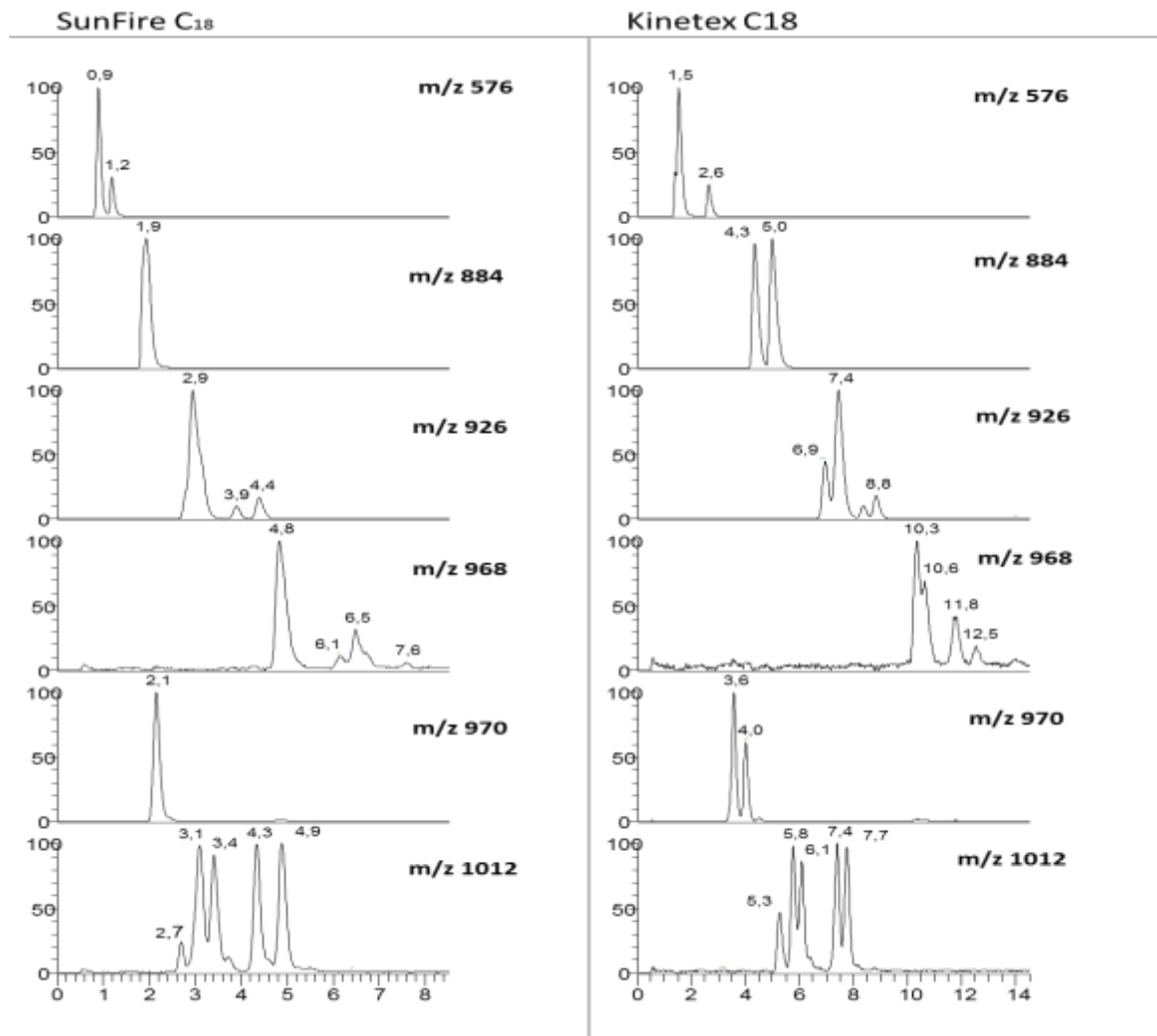


Figur 4.4 Ionekromatogram av m/z 1012 fra semi-preparativ HPLC av F_5 på en Luna C18(kolonna 2) kolonne som ble eluert isokratisk med 5 mM ammoniumacetat/ MeCN (63:37, v/v). X-aksen angir retensjonstid i minutter og y-aksen relativ intensitet i prosent.

4.2 LC-ITMS basert screening av *Lilium longiflorum* blomster for glykoalkaloider og deres MS-fragmentering

4.2.1 Separasjon av SGA på Phenomenex Kinetex C18 (kolonne 1) versus Waters SunFire C₁₈

To kolonner ble testet for screening av SGA på LC-MS med en lineær ionefelle analysator. Representative kromatogrammer fra LC-MS av SGA på de to kolonnene under identiske betingelser er presentert i Figur 4.5



Figur 4.5: Ionekromatogrammer av SGA separert på SunFire C₁₈ og Kinetex C₁₈ (kolonne 1) kolonna med et mobilfasesystem bestående av MeCN/ H₂O (95:5 v/v)/5mM ammoniumacetat buffer og 5mM ammoniumacetat buffer (pH 4,8) Se tekst for detaljer. X aksen viser tid i minutter og y aksen angir relativ intensitet i prosent

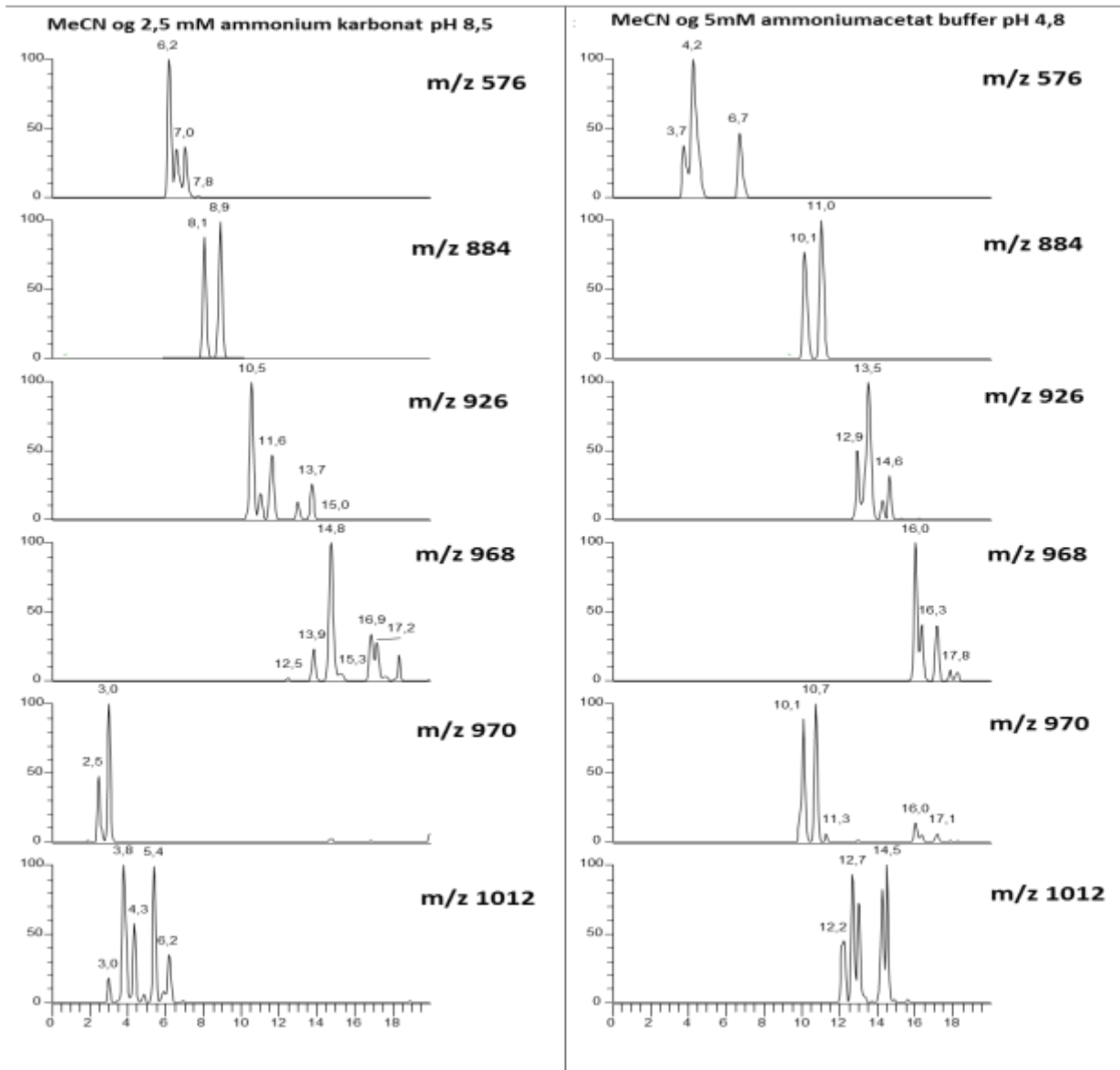
I begge tilfellene bestod mobilfasen av MeCN/ H₂O (95:5 v/v) 5mM ammoniumacetat buffer(A) og 5mM ammoniumacetat buffer (pH 4,8) (B). SGA ble separert med en gradient fra 25-35 % A over 17 minutter og deretter 95 % A i 2 minutter. Til slutt, 25 % A i 3 minutter (startsbetingelse) Til å begynne med ble SunFire C₁₈ brukt for analyse av ekstrakter og fraksjoner (Tabell 4.1). For å teste om separasjonen mellom de mange anlogene ble forbedret ved å bruke et såkalt core-shell-materiale med partikkelstørrelse under 3 µm ble en Kinetex C₁₈ (kolonne 1) testet ut. Bortsett fra partikkelstørrelsen var alle kolonneparameterene identisk med SunFire C₁₈ kolonna. Ved bruk av Kinetex C₁₈ (kolonna 1) ble SGA forskjøvet til høyere retensjonstid. På den kolonna ble MW 883 og 969 SGAene separert i to analoger som ikke var observert ved separasjon på Sunfire C₁₈ (Figur 4.5). På grunnlaget av dette ble Sunfire C₁₈ eliminert fra videre metodeutvikling, og Kinetex C₁₈ kolonna (kolonne 1, se Tabell 3.1) ble benyttet videre.

4.2.2 Retensjonen av *Lilium longiflorum* glykoalkaloider på Kinetex C18(kolonne 1) i forhold til mobilfase-pH

I første omgang ble både MeCN og MeOH ble testet ut som mobilfase i kombinasjon med 5mM ammoniumacetat buffer (pH 4,8) for å se på effekten på retensjonstid og separasjon på en Kinetex C18 (kolonne 1). I begge tilfellene var mobilfasegradienten bestemt til å være 18-27 % MeCN over 15 minutter. Det ble ikke observert noen forandringer i separasjons rekkefølge, men selve retensjonstiden for SGA var forsinket med 1,5-2 minutter med MeOH i mobilfasen. Separasjonen for SGA MW 967 analogene var bedre når MeCN ble benyttet enn ved bruk av MeOH. Vurdering av resultatene avgjorde at MeCN ble brukt som den organiske mobilfasen videre i forsøket.

Videre ble 5mM ammoniumacetat buffer (pH 4,8) og 2,5mM ammoniumkarbonat (pH 8,5) begge testet som mobilfase i kombinasjon med MeCN med ulike mobilfasegradienter for å observere effekten pH kunne forårsake. For MeCN og 5mM ammoniumacetat buffer (pH 4,8) ble en gradient på 18-27 % MeCN benyttet (Figur 4.6) mens for MeCN og 2,5 mM ammoniumkarbonat (pH 8,5) var gradienten 25-35 % MeCN. Figur 4.6 viser en tydelig endring i retensjonsrekkefølgen og dermed en sterk pH-avhengighet for noen av analogene. Separasjonen under basiske forhold er bedre for SGA MW 1011 og 969. Med en lett basisk mobilfase ble disse SGA eluert aller først (mellom 2-6 minutter) noe som ikke var tilfelle med en lett sur mobilfase da ikke SGA av den typen ble eluert før etter 10-12 minutter under ellers identiske betingelser. En slik oppførsel er karakteristisk for stoffer med grupper med syre-base egenskaper f.eks karboksylgruppe, og det kan tyde på at MW 969 og 1011 har denne funksjonelle gruppen i molekylet. Det ble også oppnådd bedre separasjon mellom analogene av MW 1011 i 2,5 mM ammoniumkarbonat. Siden bufferen ikke ga den beste separasjonen ble denne valgt bort og erstattet med 2,5mM ammoniumkarbonat (pH 8,5). Basert på dette ble derfor fraksjonering av SGA på semi-preparativt HPLC til å begynne med utført med 2,5 mM ammoniumkarbonat, men på grunn av problemene med stabiliteten til stasjonærfasen måtte pH-verdien i mobilfasen senkes.

Ulike mobilfasse grader ble testet ut (50 % og 80 % isokratisk MeCN i over 17 minutter) for eluering av SGA, men dette ga dessverre dårlig kromatografi. Etter flere runder viste det seg at best separasjon var med følgende gradient program: linær gradient fra 25-35 % MeCN i 17 minutter etterfulgt av 95 % MeCN i to minutter. Til slutt ble systemet endret tilbake til starts betingelser, altså 25 % MeCN som varte i tre minutter (Tabell 3.5). Denne gradienten ble også benyttet videre for LC-MSⁿ forsøk.



Figur 4.6: Ionekromatogrammer av SGA MW 575, 883, 925, 967, 969 og 1011 fra LC-ITMS av SilikaF_(50:50) separert på Kinetex C18 (kolonne 1) med MeCN /2,5 mM ammoniumkarbonat (pH 8,5)(gradienten 25-35 % MeCN), og MeCN /5mM ammoniumacetat buffer (pH 4,8) (gradient 18-27 % MeCN). X aksen viser tid i minutter og y aksen angir relativ intensitet i prosent

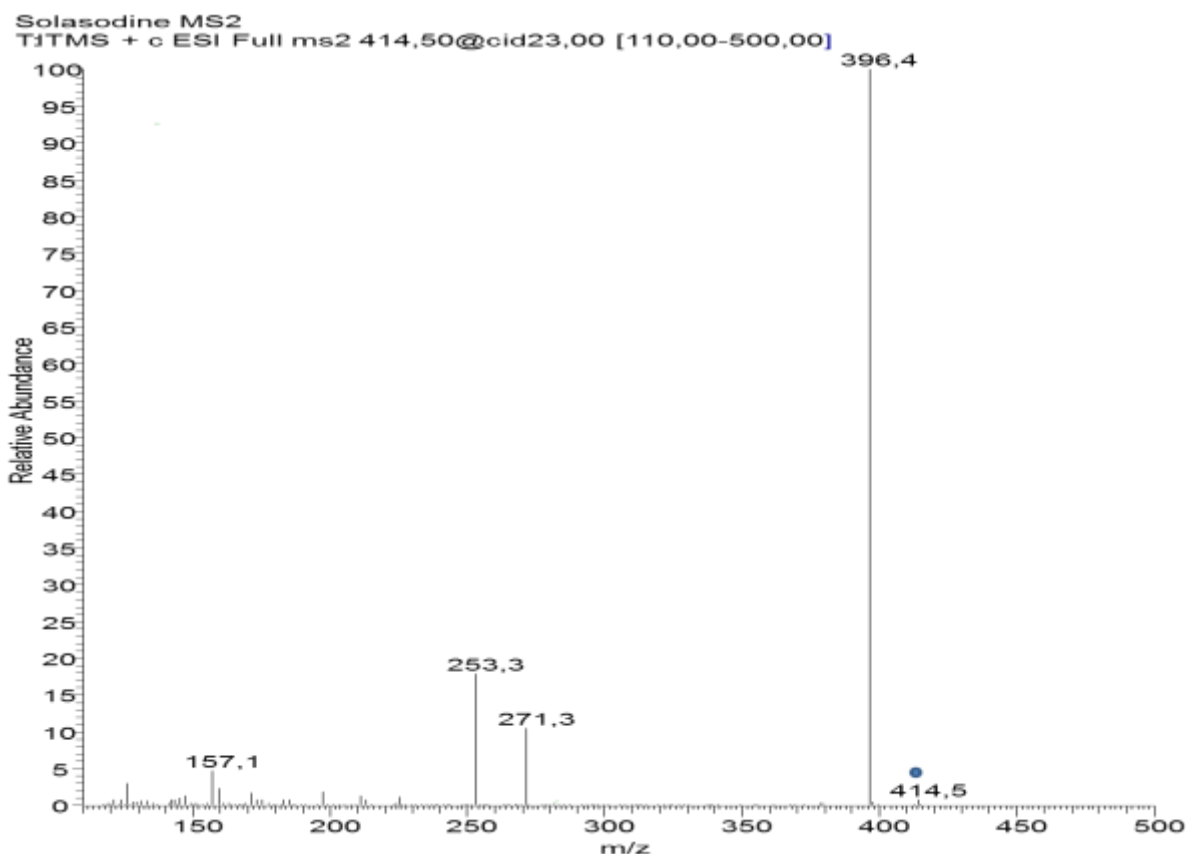
4.3 LC-HRMS og strukturoppklaring av glykoalkaloider fra *Lilium longiflorum*

Analyse av SilikaF_{50:50} fraksjonen (punkt 3.3.2) på HPLC koplet til et Q-TOF-MS (3.2.4) ga elementær sammensetningen av SGA. Resultatene er oppsummert i Tabell 4.2-4.5 for SGA MW 883, 925, 969 og 1011. For SGA MW 575 er dette drøftet i delkapittel 4.3.8. Data fra fragmenteringen av solasodin og SGA er presentert i delkapittel 4.3.1-4.3.7.

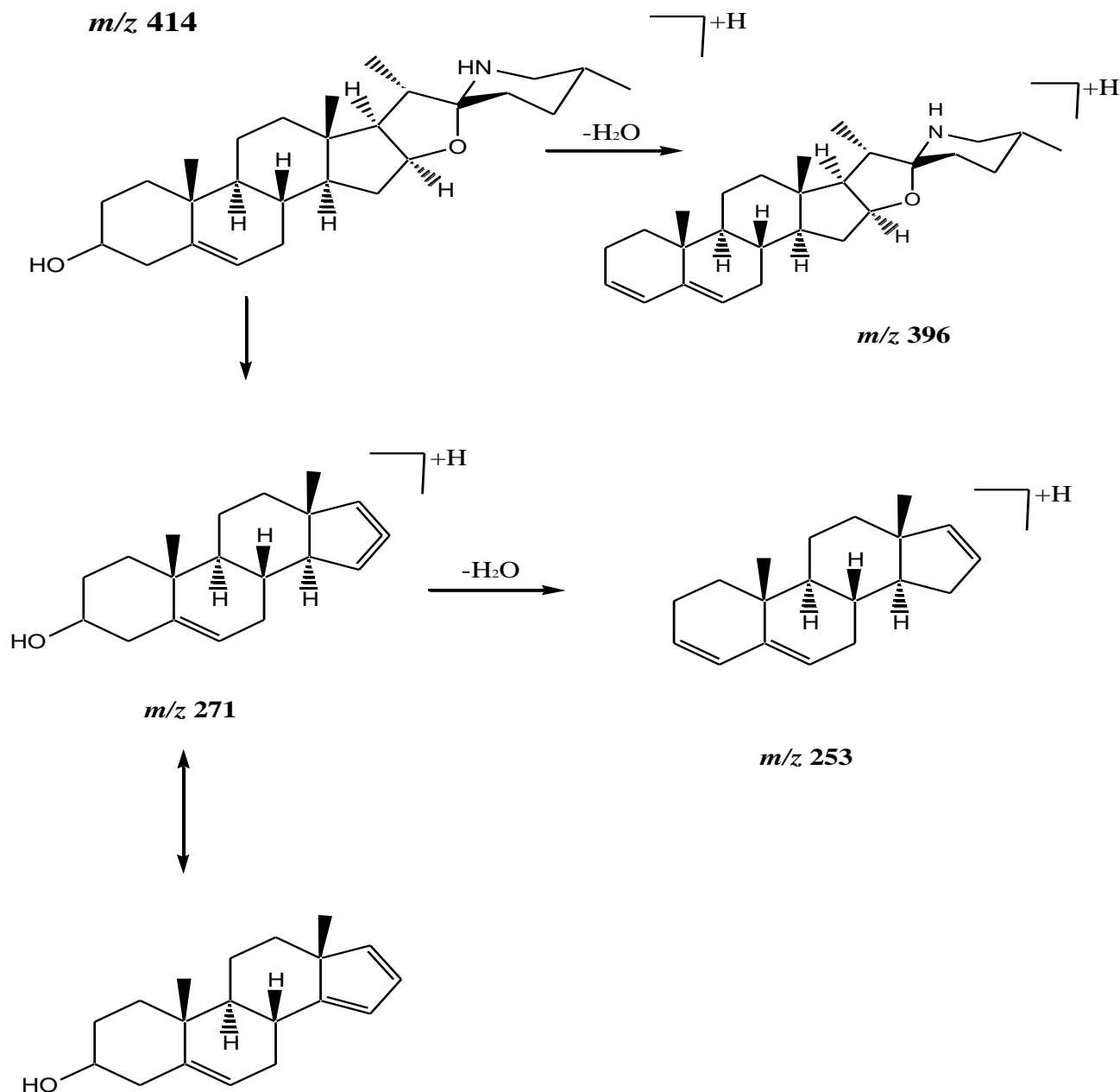
4.3.1 MS-fragmentering av solasodine

Solasodine (MW 413) tilhører en av de fem hovedklassene av aglykon-typer som SGAer er bygd opp av (Figur 1.1). Det ble utført MS-fragmentering av kommersiell solasodine ved direkte infusjon av en løsning i metanol. Dette ble utført for å sammenligne fragmentasjonspektret av kommersielt solasodine med spektrene fra LC-MSⁿ forsøk av SGAene i *L. longiflorum* og for å dermed vise at aglykon-delen er identisk med solasodine. Figur 4.7 viser et MS² massespektrum av solasodine fra fragmentering av [M+H]⁺, og Figur 4.8 viser fragmenteringsmekanismen for hovedfragmentene.

MS³ ble også utført ved videre fragmentering av *m/z* 396, *m/z* 271 og *m/z* 253. MS³-massespektrene viste at *m/z* 396 ble spaltet videre til *m/z* 271, 253 og 157, mens MS³ fragmentering av *m/z* 271 ga også *m/z* 253 og 157 som dominerende ioner og *m/z* 253 ga primært av *m/z* 157.



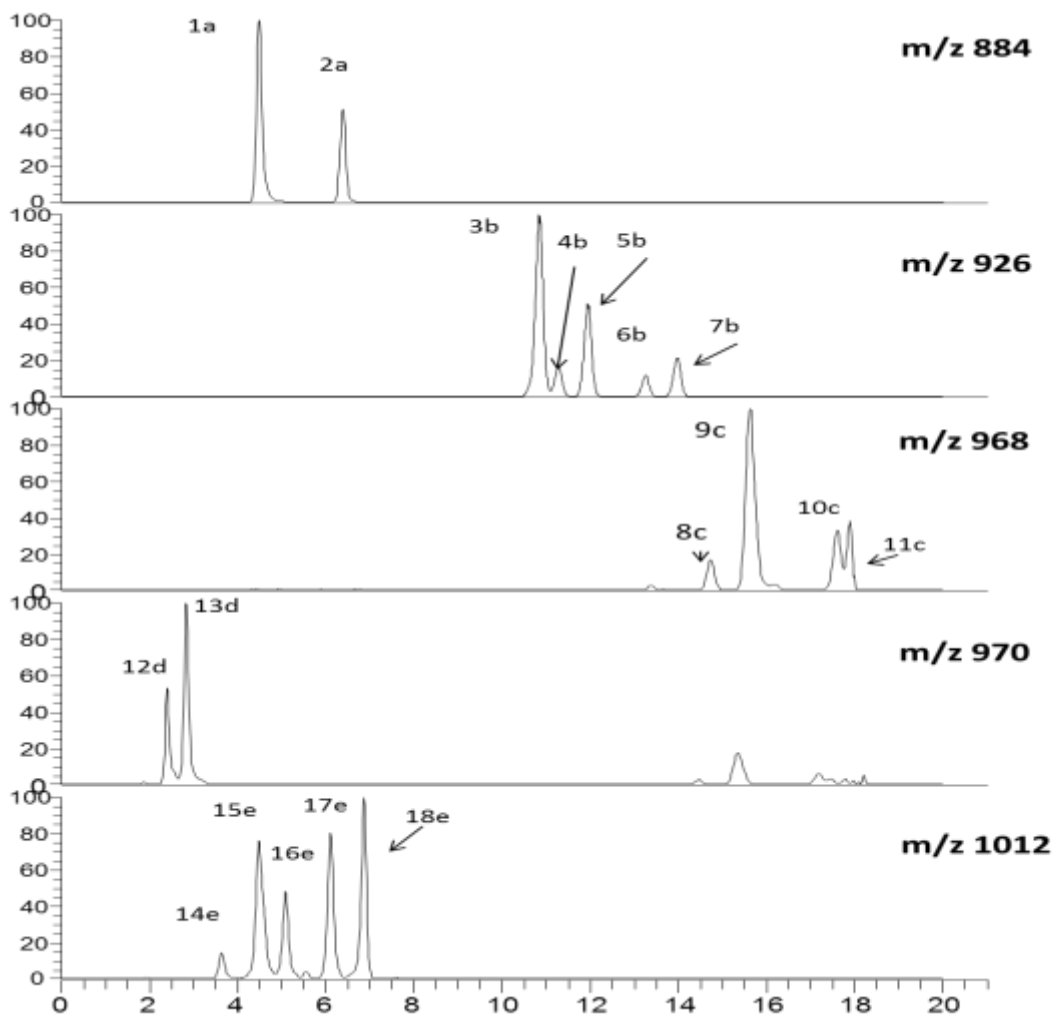
Figur 4.7 MS² massespektrum av solasodine (MW 413) fra fragmentering av [M+H]⁺.



Figur 4.8: Hovedfragmenter av solasodine fra fragmentering av $[M+H]^+$ med ESI-ITMS(11, 18)

4.3.2 Oversikt over observerte strukturanalog

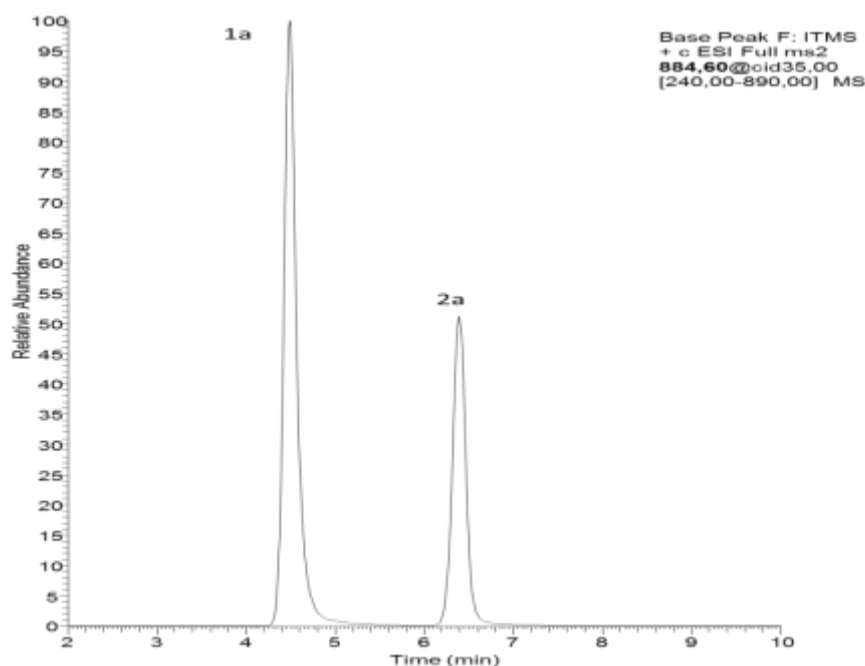
Figur 4.9 er viser ionekromatogram av SGA MW 883, 925, 967, 969 og 1011. For hver av SGA ble det observert flere analoger. Fragmentering av disse er drøftet nærmere i punkt 4.3.3-4.3.7. Analyse av eluat SilikaF_{50:50} fraksjonen (punkt 3.3.2) på HPLC koplet til et Q-TOF-MS ga elementær sammensetningen av SGA. Resultatene er oppsummert i tabell 4.2-4.5.



Figur 4.9: Ionekromatogrammer fra LC-MS av SGA separert på Kinetex C18 (kolonna 1) med en mobilfase bestående av MeCN og 5 mM ammoniumacetat (pH 6,5). I dette tilfelle ble kolonna eluert slik som beskrevet i punkt 3.2.1 Analogene er merket med et tall og de som tilhører samme SGA er merket med lik bokstav. X-aksen angir tiden i minutter og y-aksen viser relativ intensitet i prosent.

4.3.3 LC-MSⁿ fragmentering av MW 883 glykoalkaloidene og LC-HRMS

Figur 4.10 viser MS² kromatogram av SGA MW 883. Massespekter av MS² – MS⁴ for **1a** og **2a** er presentert i Figur 4.11-4.12 og diskutert nærmere

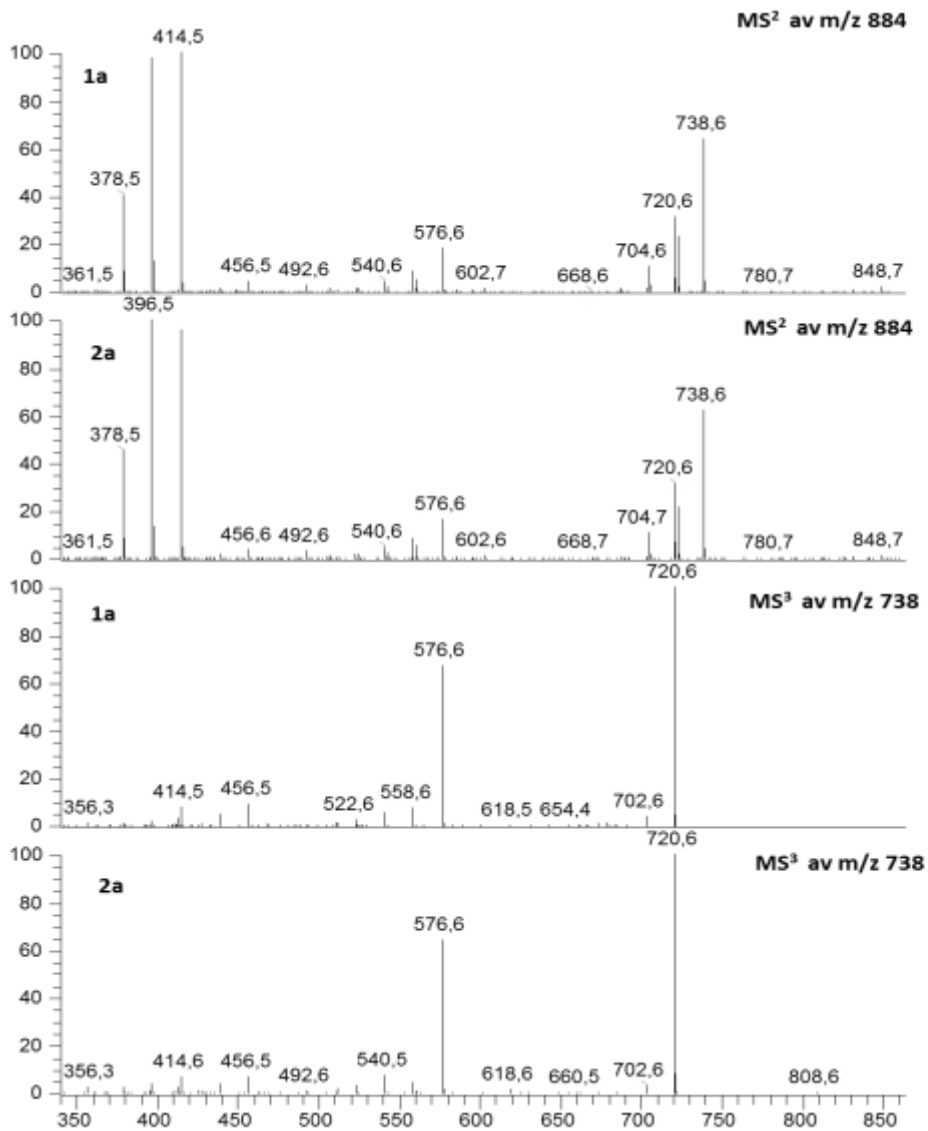


Figur 4.10: LC-ESI⁺ -MS² kromatogram av MW 883. Analogene er merket med samme bokstav som indikerer at de har lik elementær sammensetning og derfor lik molekylvek.t. LC-metoden er beskrevet i punkt 3.2.2.

Figur 4.11 viser blant annet fragment ioner m/z 738, 720, 576 og 414. Fragmentet med m/z 414 er mest sannsynlig relatert til aglykonet solasodine (punkt 4.3.1). Solasodine bundet til en heksose (162 Da) i en glykosid binding gir m/z 576 som i dette tilfelle også ble observert. Differansen mellom m/z 884 og m/z 738 tilsvarer 146 Da, som er lik massen til en deoksyheksose (en heksose med en OH gruppe mindre enn en “vanlig” heksose), som tydeligvis er en del av molekylets sukker-del.

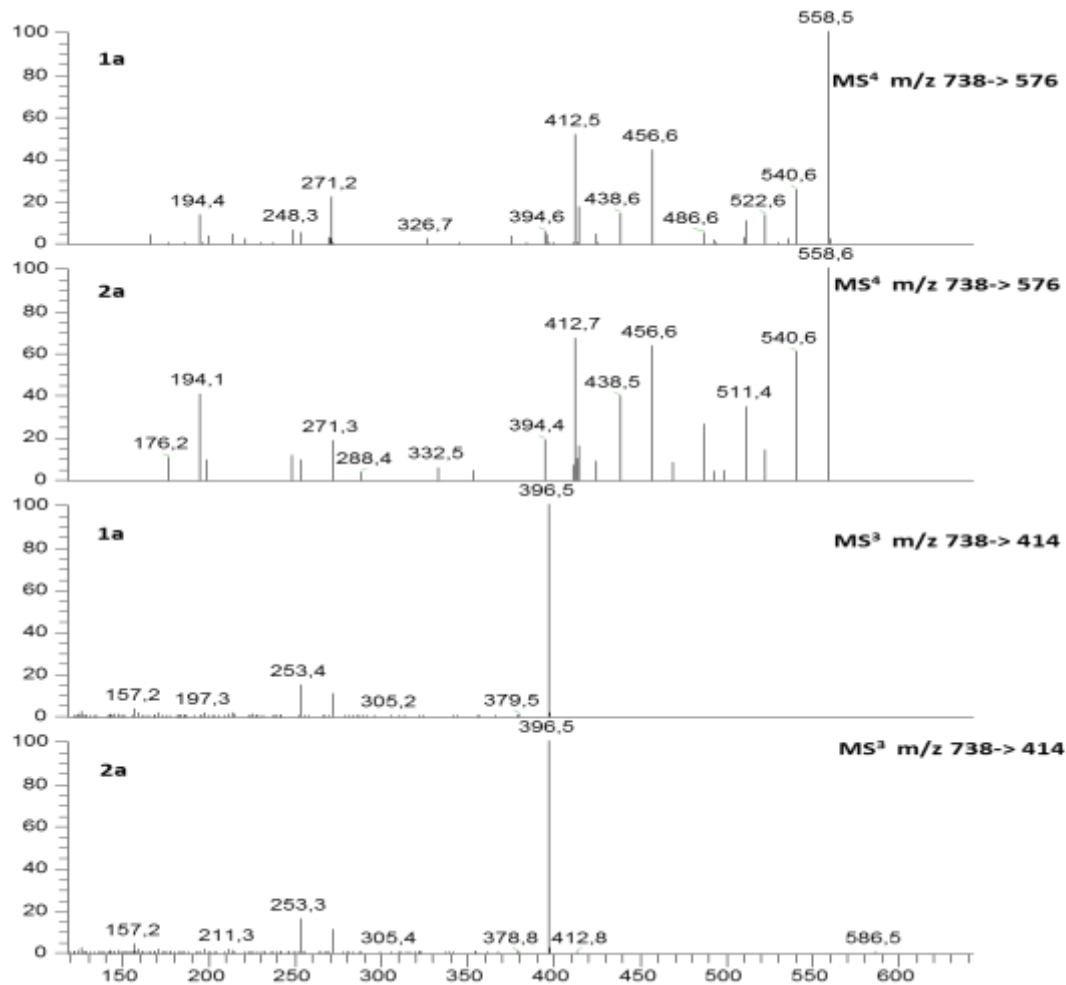
Et MS³-spektrum fra videre fragmentering av m/z 738 er også presentert i Figur 4.11. Fragmentet m/z 720 er et resultat av avspalting av vann fra m/z 738, og det samme gjelder for m/z 702 som er et resultat av vannavspalting fra m/z 720.

Resultater og diskusjon



Figur 4.11: MS^2 fra fragmentering av $[M+H]^+$ og MS^3 fra fragmentering av $[M-146+H]^+$ av **1a** og **2a**. X-aksen viser m/z verdien og y-aksen angir relativ intensitet.

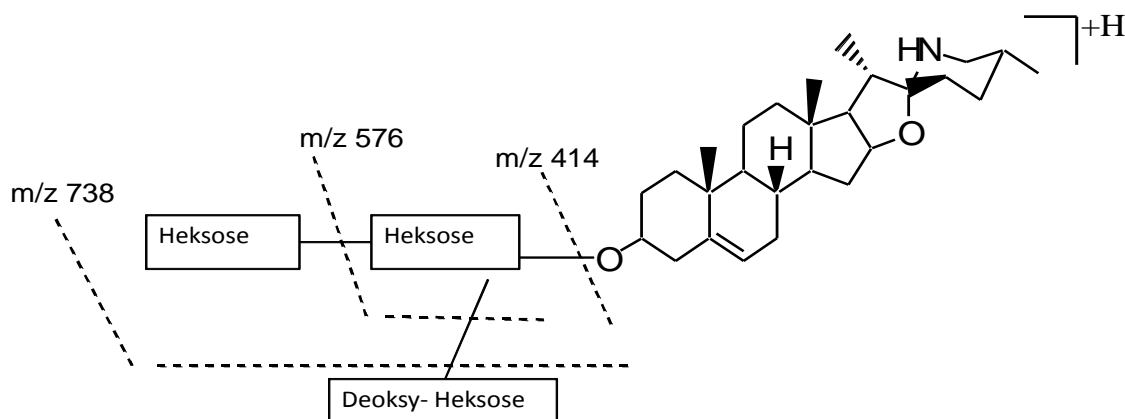
Det ble tatt opp MS^3 spektere av m/z 414 og MS^4 av m/z 576 for å sammenligne resultatene med fragmenteringen av solasodine (punkt 4.3.1). MS^4 massespektrumet av m/z 576 og MS^3 av m/z 414 er presentert i Figur 4.12. Fragmentene m/z 558, og 540 i MS^4 skyldes vanntap. Vanntap er karakteristisk for SGA på grunn av monosakkaridene som har –OH grupper. Fragmentering av m/z 414 (Figur 4.12) ga et likt fragmentation spektrum mønster som solasodine (Figur 4.7) som bekrefter at aglykonet i MW 883 SGAene virkelig er solasodine.



Figur 4.12: MS³ og MS⁴ fragmentasjonspektre av **1a** og **2a** X-aksen angir m/z verdien og y-aksen relativ intensitet i prosent.

I tidligere studier (4, 14) ble også fragmenteringsmønstre for et SGA med MW 883 (isolert fra *Lilium longiflorum*) utredet. I disse studiene observerte en de samme produksjonene som diskutert. Autorene viste også at aglykonet var solasodine som var videre bundet til et glukose molekyl som var glykosidisk bundet til enda et glukose molekyl via C-4 hydroksylet og et ramnose molekyl via C-2 hydroksylet. SGA MW 883 ble i tidligere studie identifisert som (2*R*, 25*R*)-spirosol-5-en-3 β -yl O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside. Det er sannsynlig at et av de to SGAene som ble funnet i vår studie er identisk med denne analogen, men dessverre kan ikke LC-MS i seg selv skille mellom de isobare sukkeranalogene (dvs. heksosene, pentosene og deoksy-heksosene).

Det at to analoger for MW 883 ble observert i dette forsøket kan skyldes at strukturen til de to analogene består av forskjellige heksosmolekyler. De oftest forekommende heksosene i SGAer er glukose og galaktose, og kombinasjonen av disse kan da være glukose-glukose, galaktose-galaktose, glukose-galaktose eller galaktose-glukose. Som nevnt kan denne sammensetningen ikke fastslås kun basert på MS-fragmentering. Dette må nærmere bestemmes ved å drøfte NMR data og/eller en spesifikk sukkeranalyse. Den skjematiskerte struktur til SGA MW 883 er vist i Figur 4.13



Figur 4.13: Skjematisk struktur av SGA MW 883 analogene funnet i *Lilium longiflorum*.

Tabell 4.2: Elementærsammensetning, teoretisk og funnet masse og error fra analysen av SGA MW 883 fra *L. longiflorum* på HPLC koplet til et Q-TOF-MS.

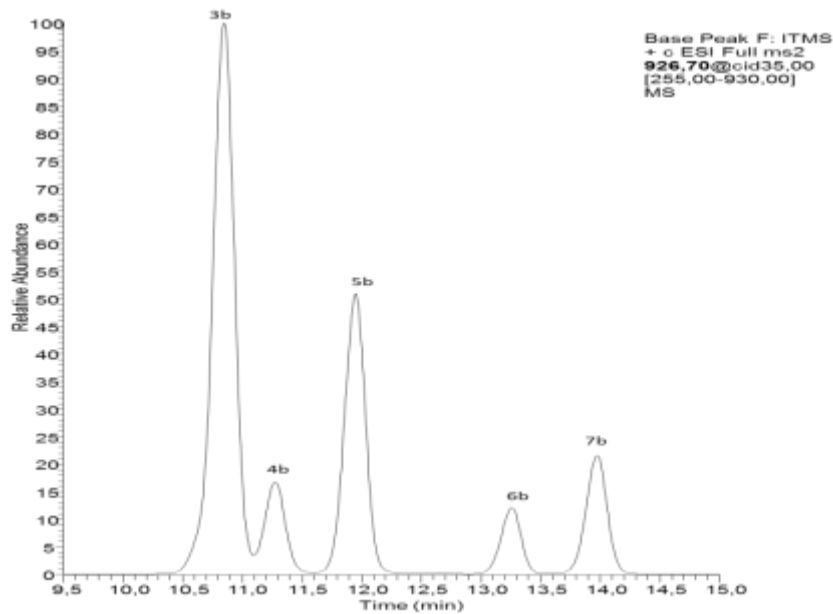
$[M+H]^+$, m/z		Molekylformel	Teoretisk molekylmasse (amu)	Målt molekylmasse (amu)	Error (ppm)
884					
	1a	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₆ N	884,5002	884,5000	-0,2
	2a	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₆ N	884,5002	884,5006	0,4

Resultatene fra høyt oppløsende MS viste at analogene med samme nominale molekylvekt hadde identisk elementærsammensetning. Størst error lå på 0,4 ppm som er svært bra. Målt molekylmasse for begge analogene avviker ikke mye og dette kan bli sett fra Tabell 4.2.

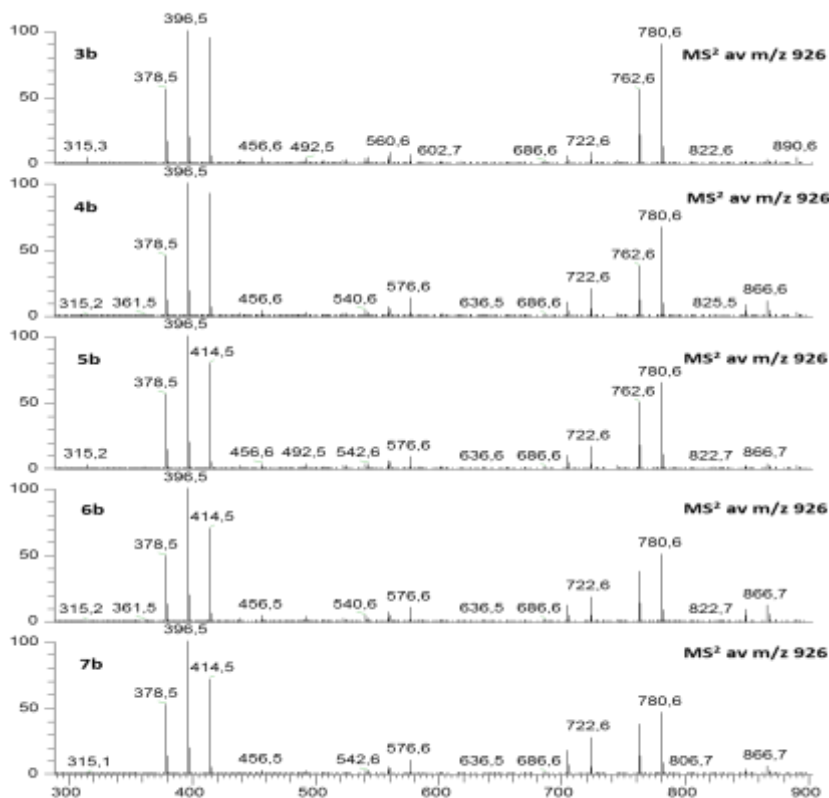
4.3.4 LC-MSⁿ fragmentering av MW 926 glykoalkaloidene og LC-HRMS

Figur 4.14 viser et LC-MS² kromatogram av SGA MW 925. MS² og MS³ massespektere av **3b-7b** er vist i Figur 4.15-4.16 og diskutert videre.

Resultater og diskusjon

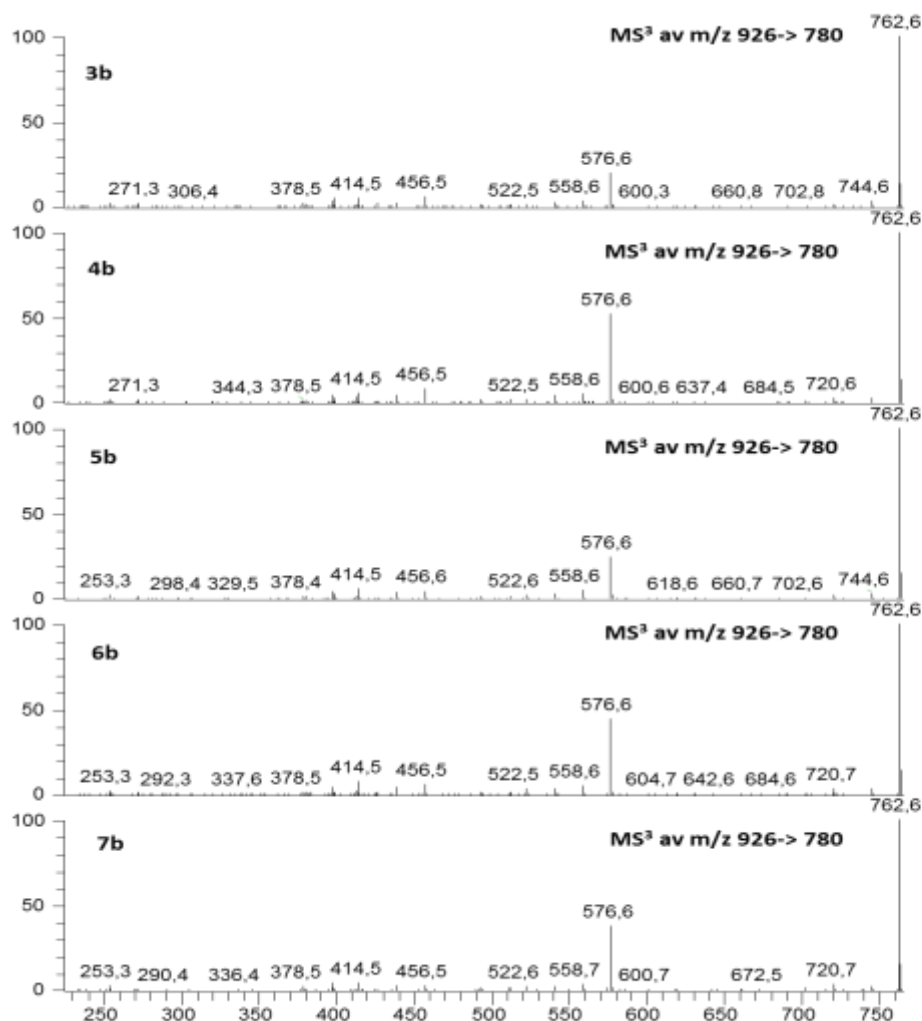


Figur 4.14: LC-ESI⁺ -MS² kromatogram av SGA MW 925. Analogene er merket med samme bokstav som indikerer at de har lik elementær sammensetning og derfor lik molekylvekt. LC-metoden er beskrevet i punkt 3.2.2.



Figur 4.15: MS² fragmentionspektre fra fragmentering av $[M+H]^+$ til 3b-7b. X -aksen viser m/z verdiene og y -aksen angir relativ intensitet i prosent.

Figur 4.15. viser at fragmentionspektrene til SGA MW 925 analogene som praktisk er identiske. Fragmentionet med m/z 780 (figur 4.15) dannes sannsynligvis fra m/z 926 ved avspaltning av en deoksy-heksose som tilsvarer et tap på 146 Da. Fragmentionet med m/z 762 er antakeligvis et resultat av vannavspaltning fra m/z 926. Spektrene viser også fragmentioner med m/z 576, 414 og 396 som er karakteristisk for aglyconet solasodine bundet til et heksose molekyl (m/z 576 = solasodine + heksose; m/z 414 = protonert solasodine; m/z 396 = protonert solasodine – vann). Differanse mellom m/z 780 og 576 er på 204 Da. Et slikt fragment kjenner en acetylt heksose, men dette skulle bekreftes nærmere.



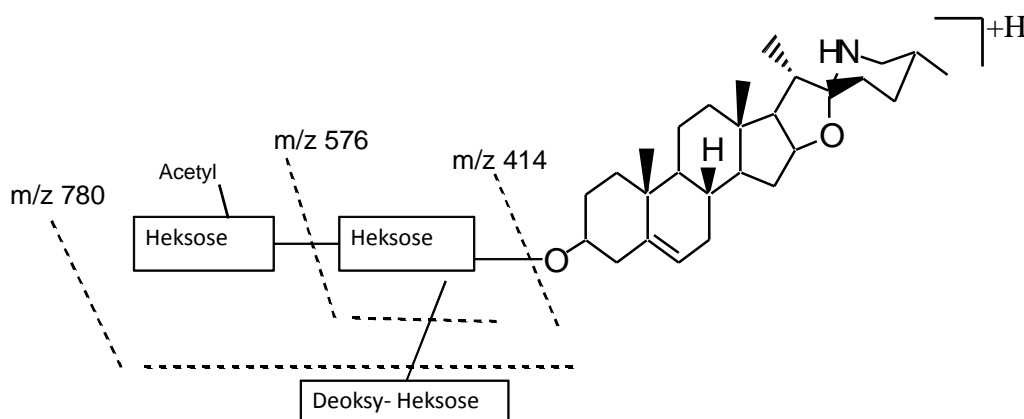
Figur 4.16: MS^3 fragmention spekter e av $[M-146+H]^+$ av **3b-7b**. X aksen viser m/z verdiene og y aksen angir relativ intensitet

Videre fragmentering av m/z 780 (MS^3) resulterte i et dominerende fragment med m/z 762 som tilsvarer et tap på 18 Da og er derfor et resultat av vannavspaltning. Det samme gjelder for fragmentene med m/z 744 som tilsvarer vannavspaltning fra m/z 762. Ionet m/z 576 dannes fra avspaltning av hele suktermolekylet (204 Da) fra m/z 780, som da kan være en acetylt heksose. Dette ble videre bekreftet ved fragmentering av m/z 762 til m/z 744. Differansen er på 42 Da som antakeligvis er relatert til en acetyl gruppe. Det kan derfor med god sikkerhet antas at alle MW 925 analoger er *O*-acetylte i et heksose molekyl. MS^3 av m/z 926- \rightarrow 414

bekreftet at aglyconet er solasodine. Det har tidligere blitt rapportert om et SGA med en acetyllert heksose (4, 14, 15) I disse studiene ble imidlertid kun en analog funnet i planten og strukturen identifisert som (22*R*, 25*R*)-spirosol-5-en-3β-yl O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[6-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1→4)]-β-D-glucopyranoside. (4, 14)

LC-MS² data viste indikerte at acetyl-gruppen sitter i heksosen som ikke er bundet til solasodine siden et (solasodine-acetyl-heksose)-fragment som ville tilsvare *m/z* 620, ikke ble observert. Dette heksose molekylet har fire OH-grupper som kan være forestret. Acetylgruppen er imidlertid sannsynligvis heller ikke plassert på deoksy-heksosen fordi et tilsvarende fragment på 188 Da (146 +42) ikke ble detektert.

Figur 4.14 viser fem analoger av SGA MW 925 og ikke fire. Dette betyr at molekylet sannsynligvis inneholder forskjellige typer heksose og/eller kombinasjoner av heksoser. Figur 4.17 viser en skjematisk struktur til SGA MW 925 basert på fragmentasjonspektrene presentert i Figur 4.15 og 4.16



Figur 4.17: Skjematisk struktur av SGA MW 925 analogene funnet i *Lilium longiflorum*.

I tabell 4.3 er det presentert LC-HRMS data for SGA MW 925. Elementærsammensetning for **3b-7b** er identisk og dermed er også den teoretiske molekylmassen det samme. Masse nøyaktigheten ligger innenfor +/- 1.4 ppm som er svært bra

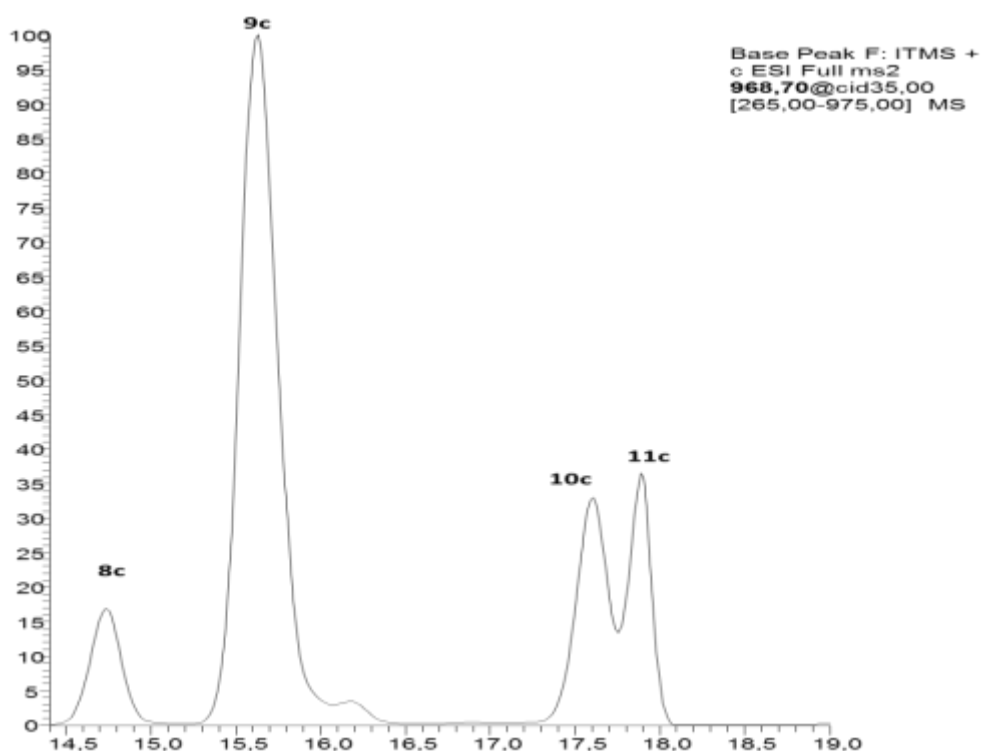
Tabell 4.3: Elementærsammensetning, teoretisk og funnet masse og error fra analysen av SGA MW 925 fra *L. longiflorum* på HPLC koplet til et Q-TOF-MS.

$[M+H]^+$, <i>m/z</i>		Molekylformel	Teoretisk molekylmasse (amu)	Målt molekylmasse (amu)	Error (ppm)
926					
	3b	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇ N	926,5108	926,5102	-0,6
	4b	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇ N	926,5108	926,5092	1,2
	5b	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇ N	926,5108	926,5095	-1,4
	6b	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇ N	926,5108	926,5103	-0,5
	7b	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇ N	926,5108	926,5099	-0,9

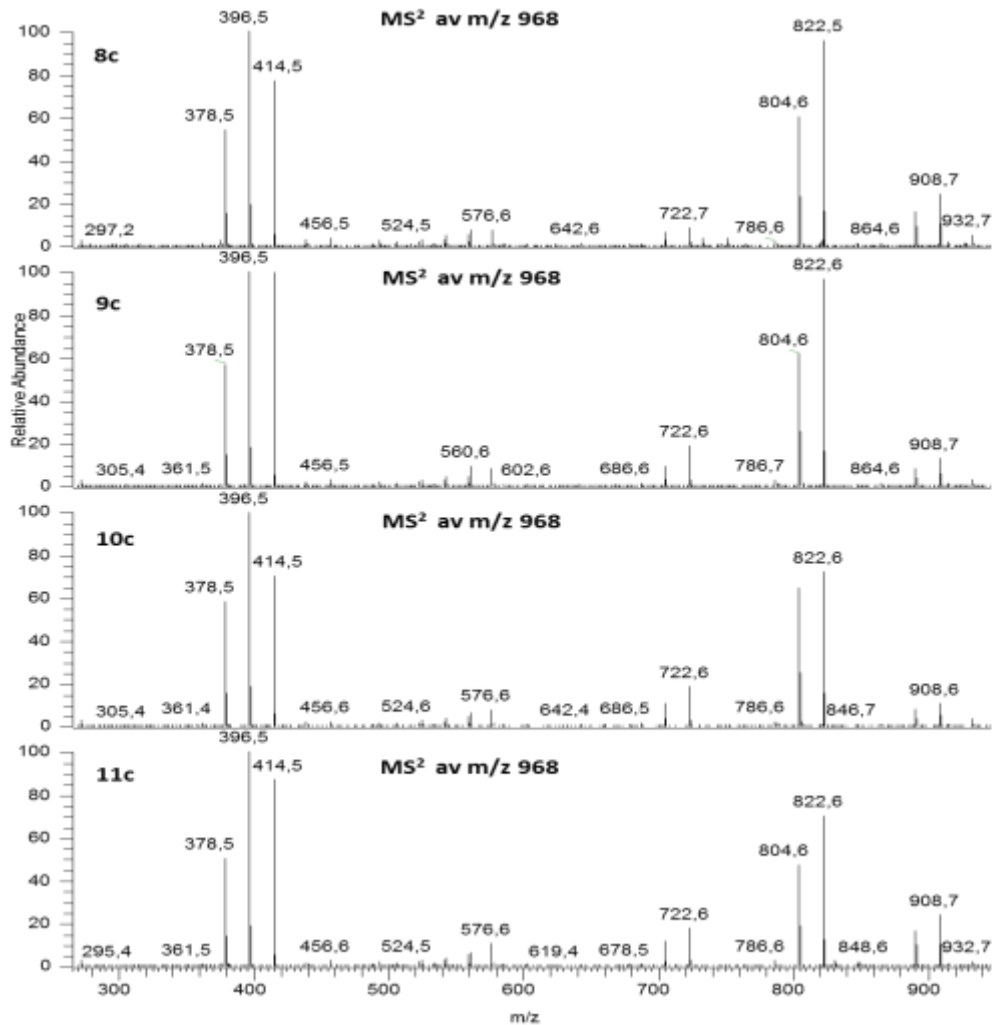
Masse forskjellen mellom MW 883 og 925 er på 42 Da. som blant annet er massen for en acetyl gruppen C₂H₂O. I naturstoff er kjemi acetylering et vanlig fenomen (også rapportert tidligere for SGA (4)) og siden forskjellen tilsvarer en acetyl gruppe så er det en god teori at forskjellen mellom de to analoggruppene er acetylering av MW 883.

4.3.5 LC-MSⁿ fragmentering av MW 967 glykoalkaloidene

Figur 4.18 viser et LC-MS² kromatogram av analogene **8c-11c** av SGA MW 967. MS² og MS³ massespektere er vist i Figur 4.19-4.20 og diskutert nærmere.



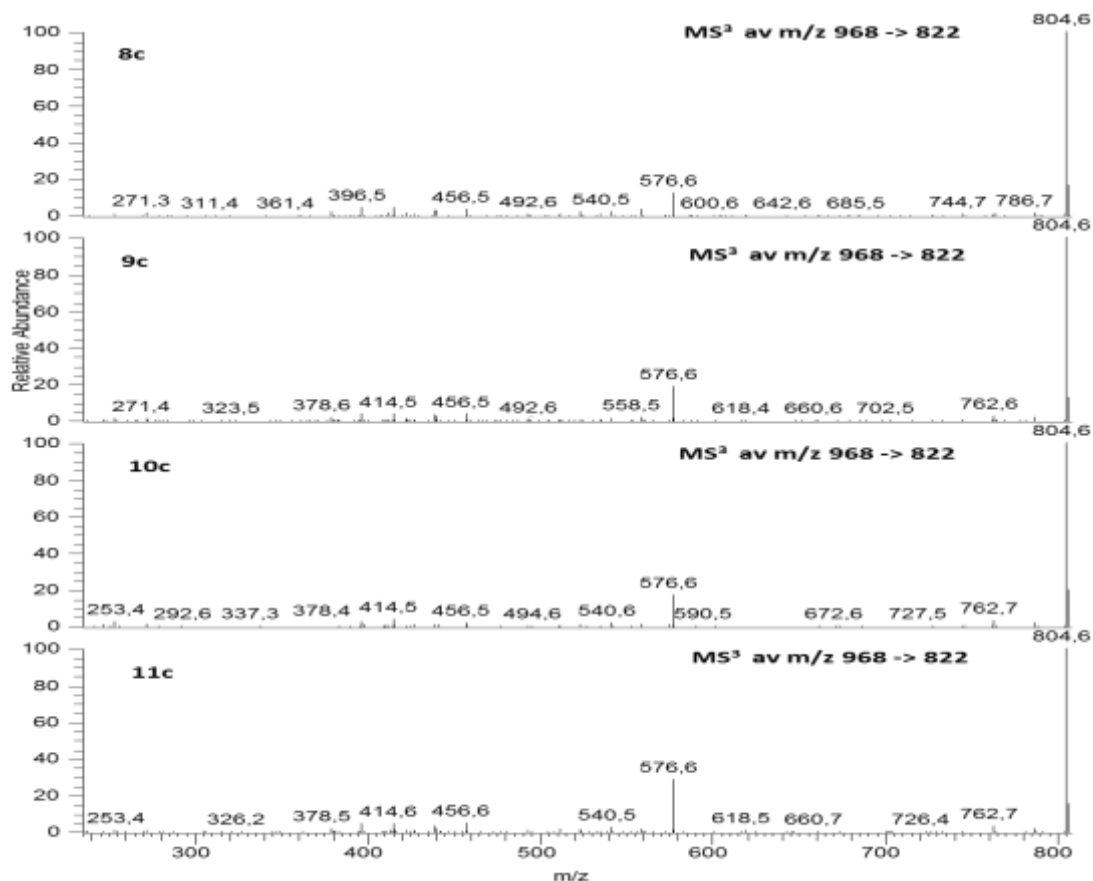
Figur 4.18: LC-ESI⁺ -MS² kromatogram av SGA MW 967. Analogene er merket med samme bokstav som indikerer at de har samme elementær sammensetning og derfor lik molekylvekt.. LC- metoden er beskrevet i punkt 3.2.2. X aksene angir tid i minutter og y aksene angir relativt intensitet i prosent.



Figur 4.19: MS² fragmentionspektre fra fragmentering av [M+H]⁺ til 8c-11c

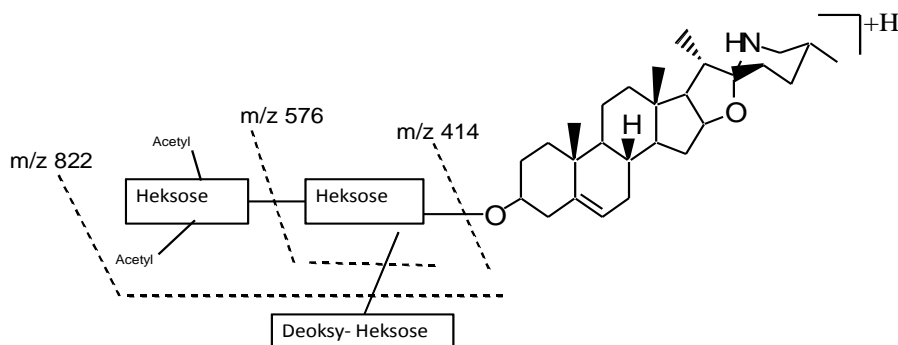
MS² fragmentionspektre (Figur 4.19) av [M+H]⁺ til SGA MW 967 viser m/z 414 og 396 som indikerer på aglykonet solasodine. Massen på m/z 576 indikerer solasodine bundet til et heksose molekyl. Et fragmention med m/z 908 tilsvarer avspaltning av et 60 Da-fragment fra m/z 968. Dette kan enten skyldes avspaltning av eddiksyre eller er en kombinasjon av vannavspaltning (-18 Da) og avspaltning av en acetyl-gruppe (-42 Da). Tilstedeværelse av et dominerende m/z 822 fragment tydet på avspaltning av en deoksy-heksose (-146 Da). Et m/z 722 fragment tydet på avspaltning av et diacetyl-heksose-molekyl fra [M+H]⁺

Resultater og diskusjon



Figur 4.20: MS³ fragmentationspektre fra videre fragmentering av $[M-146+H]^+$ for **8c-11c** (m/z 968-> 822).

MS³ av m/z 822, som er et resultat av avspaltning av en deoksy-heksose, ga m/z 804 og 786 som dannes av vannavspaltning fra hhv. m/z 822 og 804. Avspaltning av 246 Da. ga m/z 576 og bekrefter at analogene **8c-11c** inneholder en diacetyl-heksose Et fragmentation med m/z 762 tilsvarende et tap på 42 Da fra m/z 804 og kan være fra avspaltning av en acetylgruppe. MS³ fragmentering av $[M-146-246\text{-heksose}+H]^+$ (m/z 968>414) bekreftet at aglyconet til MW 967 SGAene er solasodine (Figur 4.7). Figur 4.21 viser en skjematisk struktur av MW 967 basert på informasjonen fra massespekterene.

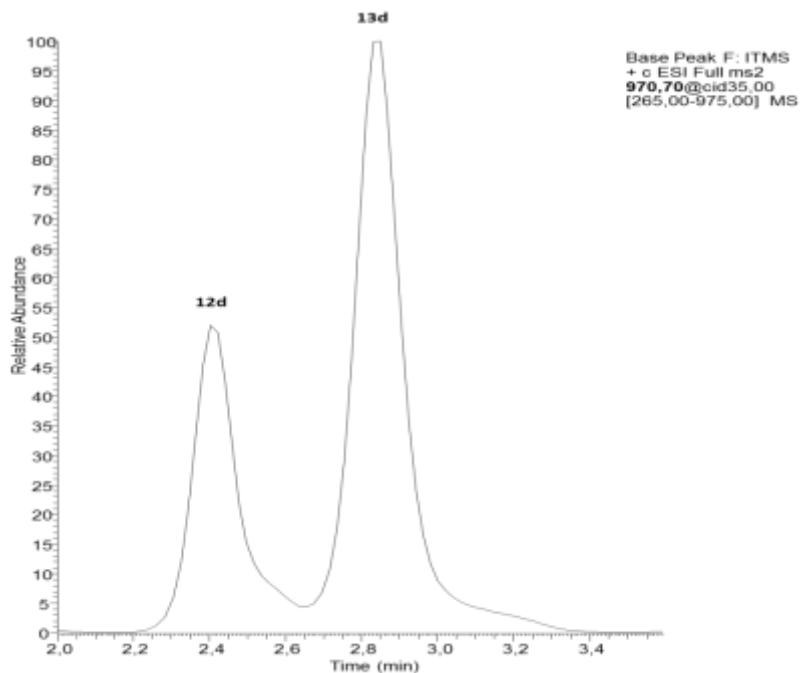


Figur 4.21: Skjematisk struktur av SGA MW 967 analogene funnet i *Lilium longiflorum*.

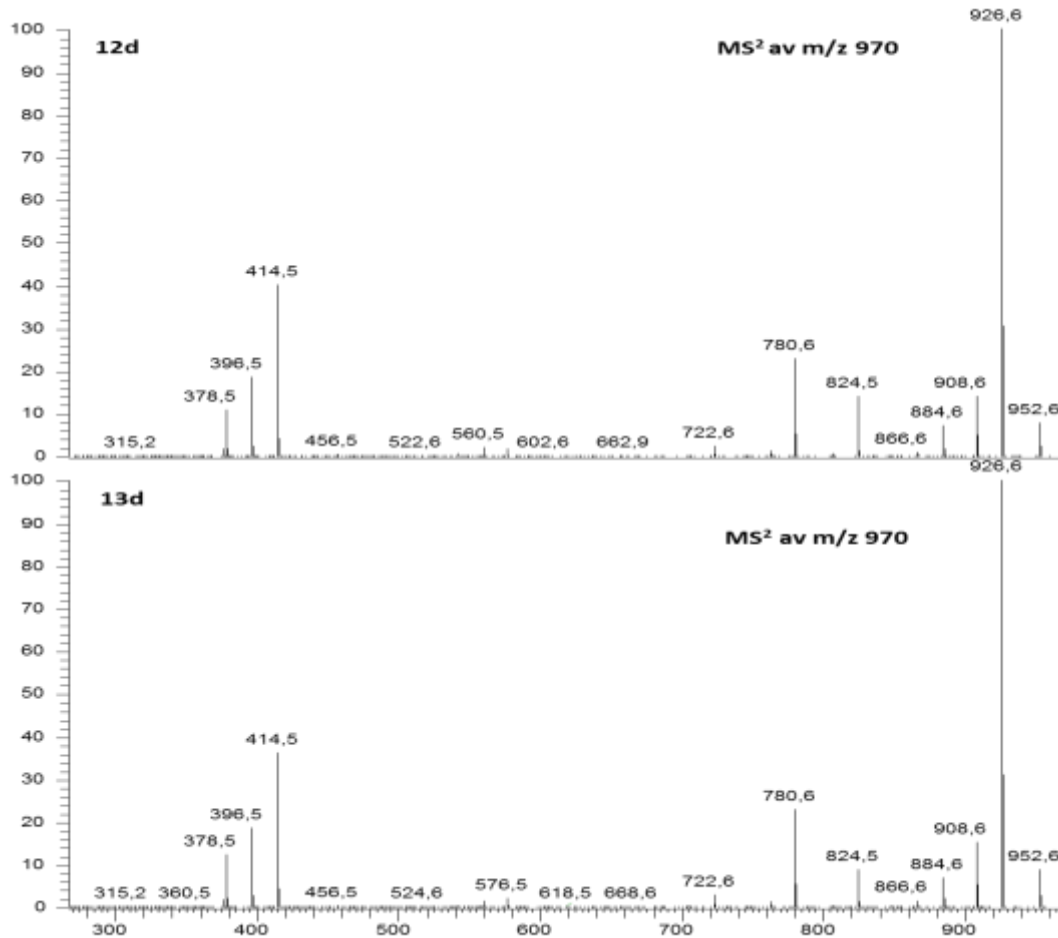
For SGA MW 967 ble ikke LC-HRMS data tatt opp som skyldes svak signal av analytten i prøven.

4.3.6 LC-MSⁿ fragmentering av MW 969 glykoalkaloidene og LC-HRMS

Figur 4.22 og 4.23 viser henholdsvis et LC-MS² kromatogram og massespektrene til analogene **12d** og **13d** av SGA MW 969 fra fragmentering av [M+H]⁺.

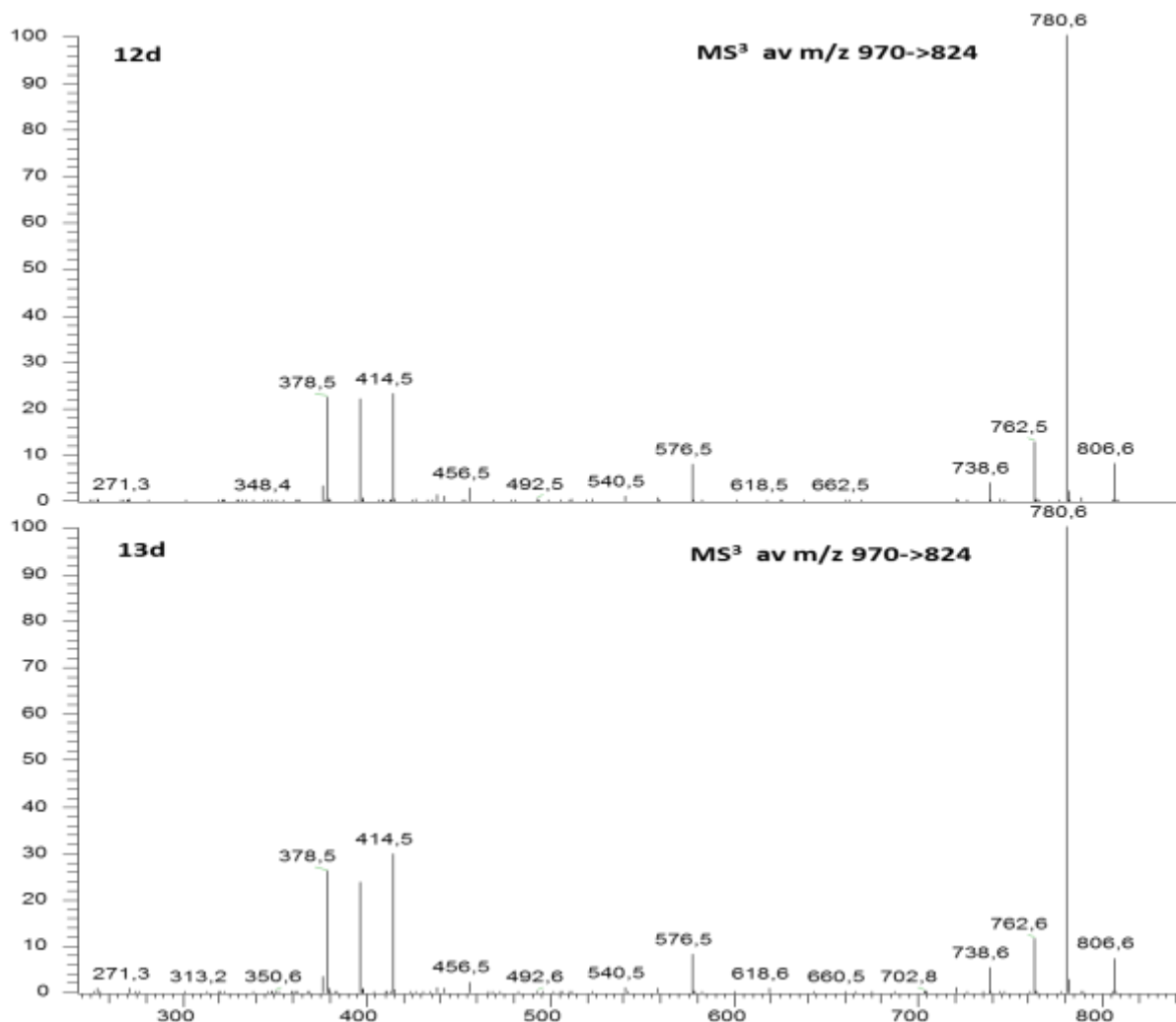


Figur 4.22: *LC-ESI⁺-MS² kromatogram av SGA MW 969. Analogene er merket med samme bokstav som indikerer at de har lik elementær sammensetning og derfor lik molekylvekt. LC-metoden er beskrevet i punkt 3.2.2*



Figur 4.23: MS^2 fragmentasjonspektrene fra fragmentering av $[M+H]^+$ til **12d** og **13d** av SGA MW 969. X-aksen angir m/z verdi og y-aksen, relativ intensitet.

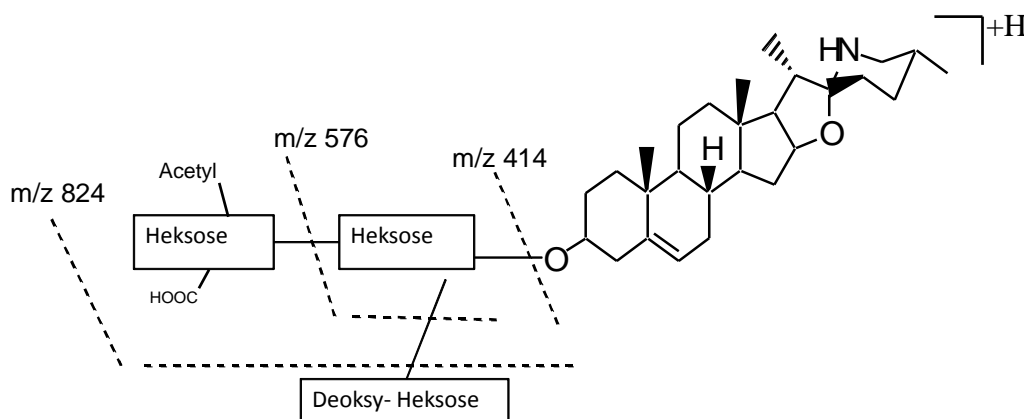
Fragmentionet med m/z 952 er sannsynligvis et resultat av vann avspaltning fra $[M+H]^+$. Fragmentionet med m/z 926 tilsvarer et tap på 44 Da som kan være et resultat av dekarboxylering ($-CO_2$) og indikerer en karboksylsyre. Tilstedeværelse av en karboksyl-funksjon i SGA 969 er videre bekreftet ved at forbindelsene eluerer vesentlig tidligere ved bruk av en lett basisk mobilfase sammenliknet med en sur (Figur 4.6). Forandringen i retensjonstiden kan skyldes at syregruppen er deprotonert (COO^-), mer polart og danner svakere binding til den upolare stasjonære fasen ved en høyere pH verdi. Avspaltning av et fragment på 146 Da fra m/z 926 gir et fragmention på m/z 780 og tilsvarer et deoksy-heksose molekyl (Figur 4.23)



Figur 4.24: MS³ fragmentasjonspektre fra fragmentering av $[M-146+H]^+$ for **12d** og **13d**. X-aksen angir m/z verdien og y-aksen relativ intensitet i prosent.

Figur 4.24 presenterer MS³ fragmentasjonspektre av $[M-146+H]^+$ for **12d** og **13d**. Fragmentet med m/z 780 skyldes avspaltning av et fragment med en masse på 44 Da og er sannsynligvis et resultat av dekarboksylering ($-\text{CO}_2$). Et fragment med m/z 738 er ekvivalent med et tap på 42 Da, og kan tyde på avspaltning av en acetyl gruppe fra m/z 780. Fra disse observasjonene kan det konkluderes at både karboksylgruppen og acetylgruppen ikke var bundet til deoksy heksose molekylet siden dette allerede var spaltet av i MS² (Figur 4.23), og dersom disse gruppene var relatert til deoksy heksose delen hadde ikke disse blitt observert i MS³ spektrene. Et fragment med m/z 576 tilsvarer en protonert solasodine-heksose rest og tyder på at både acetyl- og karboksylgruppen er relatert til heksosen som er lengst fra aglykonet (Figur 4.25).

Aglykonet i SGA MW 969 er også solasodine og kan bekreftes fra MS³-spekteret (Figur 4.24) som viser de solasodine-relaterte fragmentasjonene m/z 414 og 271. Figur 4.25 viser en skjematisk struktur av SGA MW 969 basert på informasjonen fra MS data til denne SGA.



Figur 4.25: Skjematisk struktur av SGA MW 969 analogene funnet i *Lilium longiflorum*.

LC-HRMS data for SGA 969 er vist i Tabell 4.4. Både her er den elementære sammensetningen av analogene **12d** og **13d** det samme og måle nøyaktigheten ligger også i intervallen ± 2 ppm, som er ganske bra. Masse differansen mellom MW 883 og 925 er hhv. 42 og 44 Da. Dette kan også tyde på acetylerings reaksjon og karboksylering.

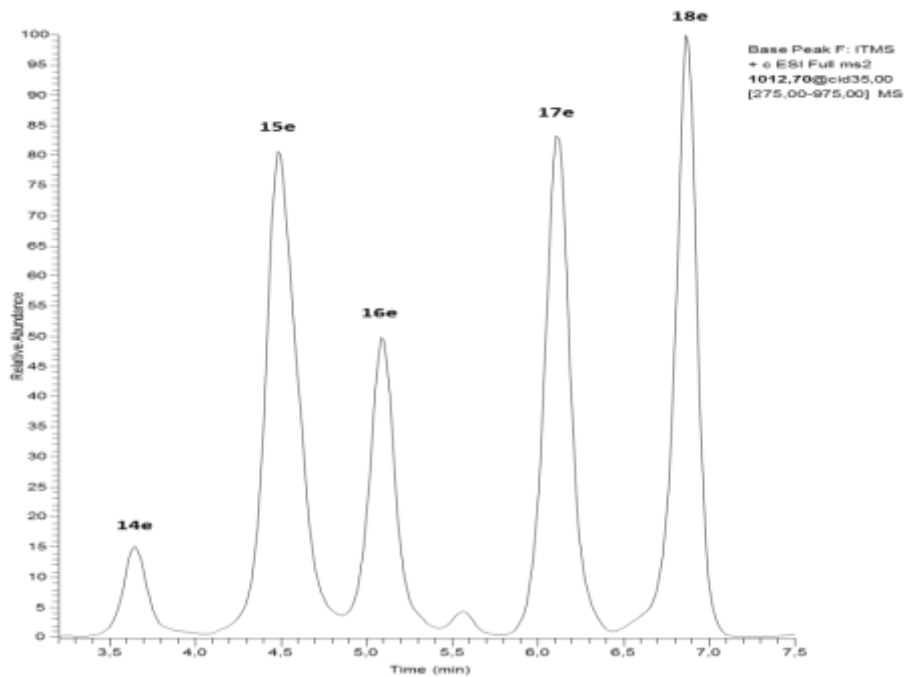
Tabell 4.4: Elementærsammensetning, teoretisk og funnet masse og error fra analysen av SGA MW 969 fra *L. longiflorum* på HPLC koplet til et Q-TOF-MS

$[M+H]^+$, m/z		Molekylformel	Teoretisk molekylmasse (amu)	Målt molekyl masse (amu)	Error (ppm)
970					
	12d	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉ N	970,5006	970,4998	-0,8
	13d	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉ N	970,5006	970,5003	-0,3

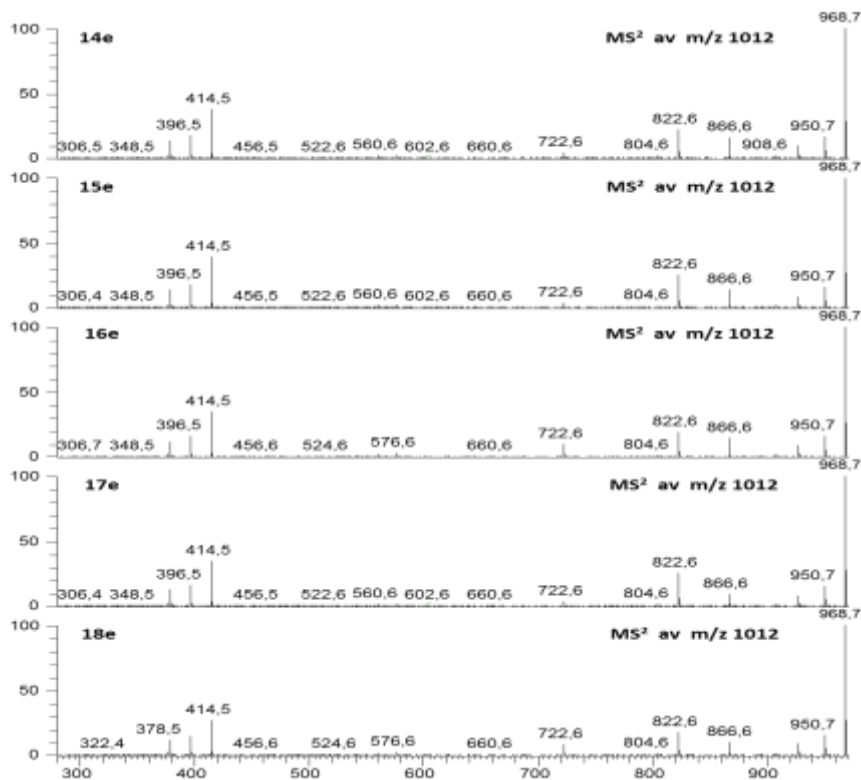
4.3.7 LC-MSⁿ fragmentering av MW 1011 glykoalkaloidene og LC-HRMS

I Figur 4.26er det presentert MS² kromatogram av analogene, **14e-18e**, til SGA MW 1011. Massespektrene er presentert i figur 4.27-4.29 og diskutert videre.

Resultater og diskusjon

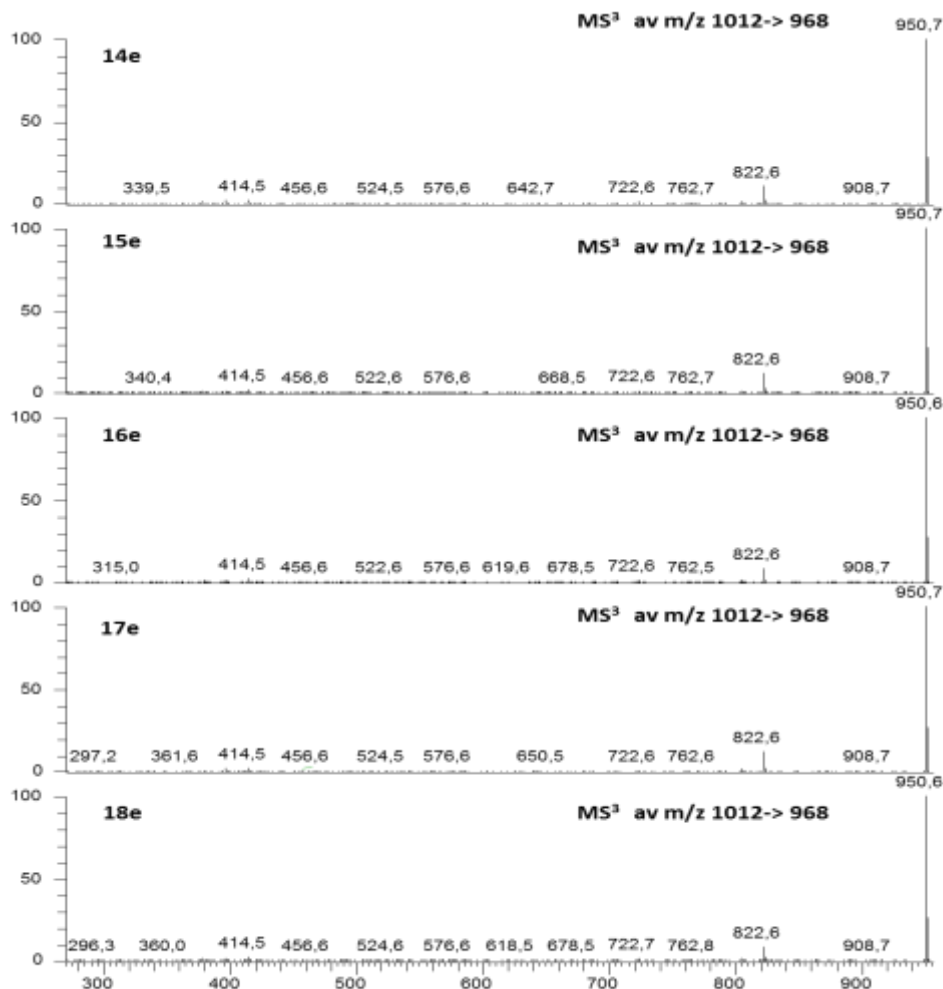


Figur 4.26: LC-ESI⁺ -MS² kromatogram av **14e-18e** av MW 1011. Analogene er merket med samme bokstav som indikerer at de har samme elementær sammensetning og derfor lik molekylvekt. LC- metoden er beskrevet i punkt 3.2.2..



Figur 4.27: MS² fragmentasjonspektre fra fragmentering av $[M+H]^+$ av **14e-18e**. X aksene angir m/z verdien og y-aksen viser relativ intensitet

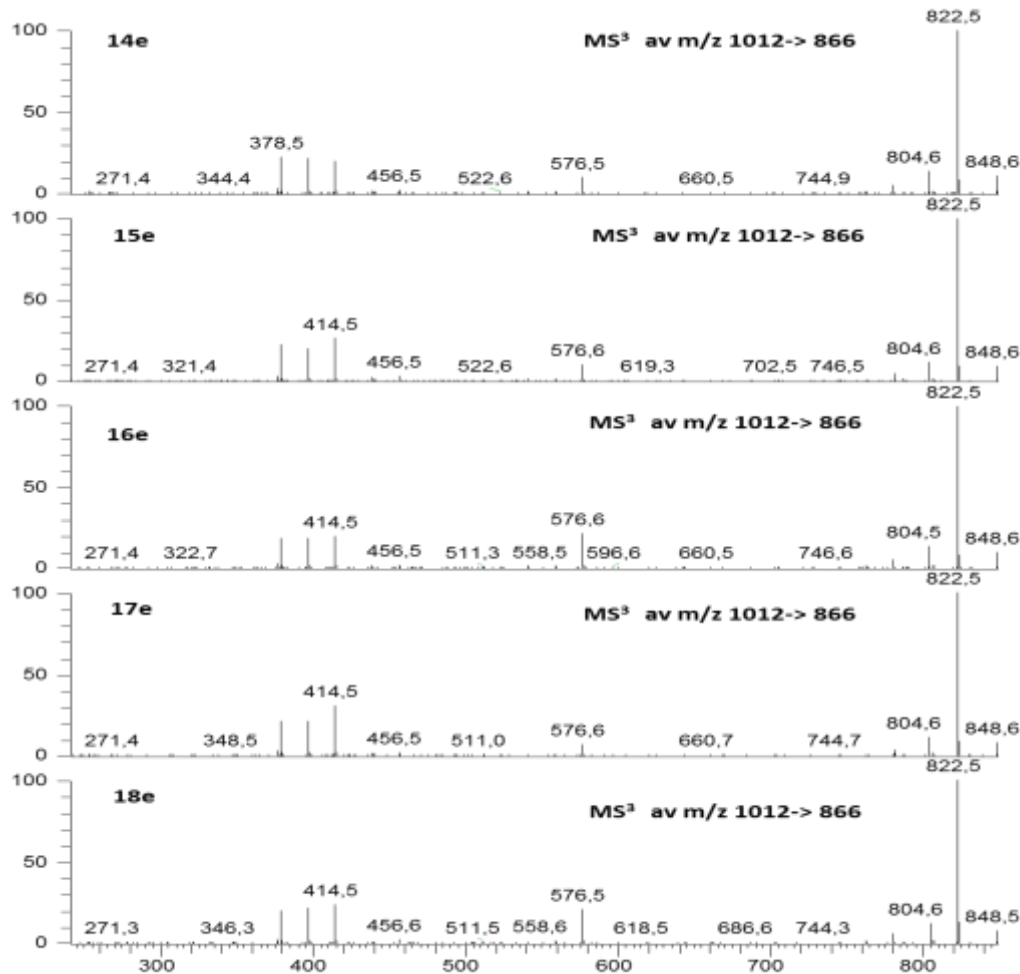
Fragmentionet med en masse på m/z 968 tilsvarer et tap av 44 Da som igjen kan skyldes avspaltning av CO_2 fra en karboksylgruppe. SGA 101 analogene ble også eluert tidligere med en lett basisk mobilfase enn med en sur mobilfase (Figur 4.6). Som for MW 969 SGAene kan dette være et resultat av syre-base egenskapene til en karboksyl-funksjon. Tap av 146 Da gir et fragmention med m/z 866 (Figur 4.27) som kjennetegner avspaltning av et deoksy-heksose



Figur 4.28: MS³ fragmentionspektre fra fragmentering av $[\text{M}-\text{CO}_2+\text{H}]^+$ av **14e-18e**. X aksene angir m/z verdi og y-aksen viser relativ intensitet i prosent.

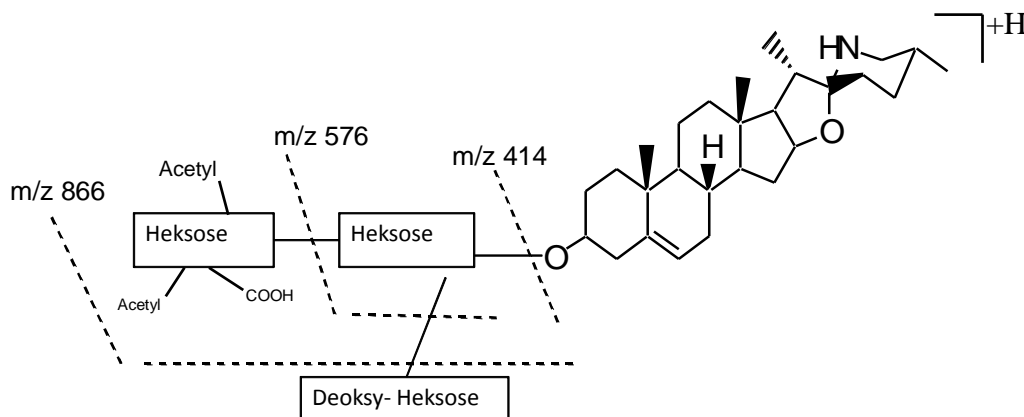
Figur 4.28 viser MS³ massespektre fra fragmentering av $[\text{M}-\text{CO}_2+\text{H}]^+$ (m/z 1012 > 968). Her ble det sett m/z 950 som er et produkt av vannavspaltning fra m/z 968. Et fragmention med m/z 908 er antakeligvis resultatet av avspaltning av en acetylgruppe fra m/z 950 (-42 Da). Tap av 146 Da gir et fragmention med m/z 822 og er resultatet av tap av en deoksy-heksose. Fragmentetionet med m/z 576 er sannsynligvis ekvivalent med solasodine bundet til et heksose molekyl. $[\text{M}-\text{CO}_2\text{-deoksy-heksose-576}+\text{H}]^+$ gir et molekyl på 246 Da som kjennetegner diacetyl heksose. Avspaltning av et fragment på 246 Da. fra m/z 968 gir fragment ion m/z 722 som vi kan se i MS³ spekteret (Figur 4.28)

Figur 4.29 viser MS³ massespektrene fra fragmentering av $[\text{M}\text{-deoksy-heksose}+\text{H}]^+$ (m/z 1012-> 866).



Figur 4.29: MS³ fragmentionmassespektre fra fragmentering av $[M\text{-deoksy-heksose}+H]^+$ av **14e-18e**. X aksene angir m/z verdien og y-aksen viser relativ intensitet i prosent.

Hovedfragmentet i MS³ spektrene fra fragmentering av $[M\text{-deoksy-heksose}+H]^+$ tilsvarer tap av 44 Da (m/z 866) og er sannsynligvis relatert til avspaltning av CO₂. Fragmentionene med m/z 271, 378, 396, 414 og 576 indikerer solasodine bundet til et heksose molekyl. Spektrene viser videre praktisk ingen fragmentioner med m/z (576+42) eller m/z (576+44). Det betyr at både acetyl- og syre-gruppen antakeligvis sitter på samme heksose molekylet som er lengst borte fra solasodine-aglykonet (Figur 4.30).



Figur 4.30: Skjematisk struktur av SGA MW 1011 analogene funnet i *Lilium longiflorum*.

Kun LC-HRMS data for **15e**, **17e** og **18e** til SGA MW 1011 er presentert i Tabell 4.5 fordi for de gjenværende analogene var signalet svakt.

Tabell 4.5: Elementærsammensetning, teoretisk og funnet masse og error fra analysen av SGA MW 1011 fra *L. longiflorum* på HPLC koplet til et Q-TOF-MS

$[M+H]^+$, m/z		Molekylformel	Teoretisk molekylmasse (amu)	Målt molekylmasse (amu)	Error (ppm)
1012					
	14e	-----	-----	-----	-----
	15e	C ₅₀ H ₇₈ O ₂₀ N	1012,4748	1012,5101	-1,1
	16e	-----	-----	-----	-----
	17e	C ₅₀ H ₇₈ O ₂₀ N	1012,4748	1012,5109	-0,3
	18e	C ₅₀ H ₇₈ O ₂₀ N	1012,4748	1012,5107	-0,5

4.3.8 LC-HRMS for SGA MW 575

Analyse av SGA MW 575 på HPLC koplet til et Q-TOF-MS viste målt molekyl masse av fem analoger. Analysen på HPLC koplet til MS detekterte derimot kun fire analoger med lik molekylvekt (Figur 4.5, ione kromatogram av m/z 576 separert på Kinetex C18 (kolonne 1)). Dette kan skyldes splittelse av signalene som ble registrert som et nytt signal. SGA MW 575 er bygd opp av aglykonet solasodine (MW 414) og et heksose molekyl. De oftest forekommende heksosene i SGAer er glukose og galaktose og dermed hadde en forventet å se to analoger av SGA MW 575. De andre analogene er mest sannsynlig er resultat av andre heksose molekyler.

Den elementære sammensetning var likt for alle fem analogene og molekyl formel var beregnet til å være C₄₇H₇₆O₁₇N av Xcalibur. Massenøyaktigheten lå innenfor -0,5-1,3 ppm og som er ganske bra og er et resultat av at intern massekorrektur ble brukt.

4.3.9 Sukker analyse av kommersiell sukker

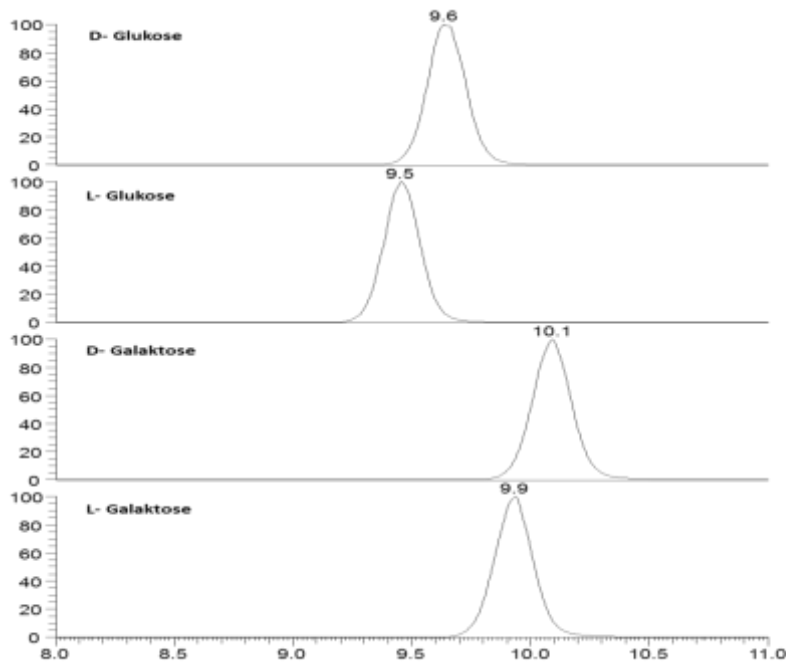
Tidligere er det dokumentert separasjon av mono og disakkarider på LC-APCI⁺-MS på en Polyamine II HILIC kolonne i kombinasjon med en mobilfase bestående av 99 % MeCN med 1 % kloroform og H₂O(50). I publikasjonen ble sukkrene separert isokratisk med 75 % av den organiske blandingen over 30 min, og dette viste seg å være en effektiv separasjonsmetode. Samme metoden ble testet ut i denne oppgaven for separasjon av native sukkere, både med APCI i negativ og positiv mode, men dette resulterte i utilstrekkelig separasjon og kromatografi. Basert på dette ble derfor HILIC kolonne valgt bort fra metode utviklingen.

I neste omgang ble Kinetex C18 (kolonna 2) testet med mobilfase bestående av en kombinasjon av MeCN/ H₂O(95:5, v/v) og 5mM ammoniumacetat (pH 6,5). Separasjonen ble utført isokratisk med 30 % av den organiske blandingen og ioniseringsteknikken var APCI positivt. Det ble fort klart at monosakkaridene måtte derivatiseres for å få tilstrekkelig separasjon av isobare analoge (for eksempel glukose og galaktose). I første omgang ble monosakkaridene kun acetyllert. Produktene dannet både acetat- $[M-60+H]^+$ og ammoniumaddukter $[M+NH_4]^+$. Bytting av kolonna og mobilfase resulterte i bra kromatografi og derfor brukt videre i analysen. I neste trinn ble karbonyl gruppen i monosakkaridene (rett kjede) først redusert. Grunnen til det er at monosakkaridene eksisterer i en likevekt mellom ring- og kjedeform, og ringformen kan foreligge som α -D/ β -D-pyranose eller α -D/ β -D-furanose. Ved å redusere aldehyd-gruppen i den åpne formen til en hydroksyl-gruppe vil suktermolekylene kun foreligge i åpen form og ikke isomerisere lengre. Etter reduksjon ble sukkerne acetyllert. Produktene formet primært ammoniumaddukter ved APCI (Tabell 4.6). Figur 4.31-4.32 presenterer kromatogrammer av de derivatiserte sukkerne fra analysen på LC-MS.

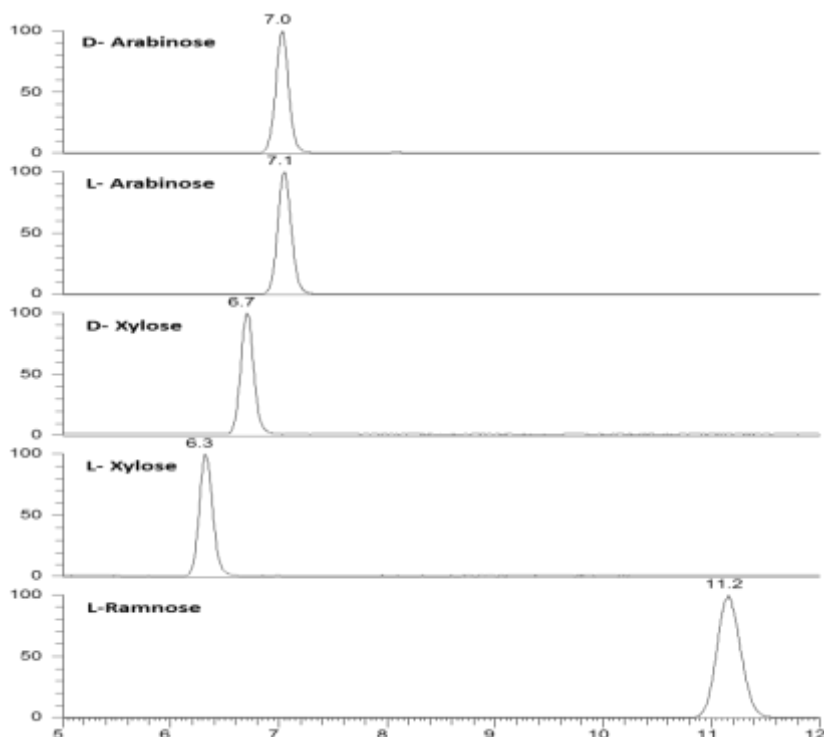
Tabell 4.6: Molekyl masse til kommersiell sukker, masse etter reduksjon og masse etter reduksjon og acetylering. Massen til ammonium addukt og acetat addukt til derivatiserte sukkerene er også gitt.

<i>Monosakkarid</i>	<i>Molekylmasse, (Da)</i>	<i>Molekylmasse etter reduksjon (Da.)</i>	<i>Molekylmasse etter acetylering, (Da.)</i>	<i>m/z [M+NH₄]⁺</i>	<i>m/z [M-60+H]⁺</i>
D- Glukose	180	182	434	452	375
L- Glukose	180	182	434	452	375
D- Glakotose	180	182	434	452	375
L- Galaktose	180	182	434	452	375
D- Arabinose	150	152	362	380	303
L- Arabinose	150	152	362	380	303
D- Xylose	150	152	362	380	303
L- Xylose	150	152	362	380	303
L- Ramnose	164	166	376	394	317

Resultater og diskusjon



Figur 4.31: Kromatogrammer fra LC-APCI-ITMS av monosakkarider (redusert og acetyllert) separert på Kinetex C18 (kolonna 2) med mobilfase bestående av MeCN/ H₂O (95:5,v/v) (A) og 5 mM ammonium acetat(pH 6,5) (B). Separasjonen var utført isokratisk med 30 % A. X-aksen angir retensjons tid i minutter og Y-aksen angir relativ intensitet i prosent.



Figur 4.32: Kromatogrammer fra LC-APCI-ITMS av monosakkarider (redusert og acetyllert) separert på Kinetex C18(kolonna 2) kolonne med mobilfase bestående av MeCN/ H₂O (95:5,v/v) (A) og 5 mM ammonium acetat (B). Separasjonen var utført isokratisk med 30 % A. X-aksen angir retensjons tid og Y-aksen angir relativ intensitet.

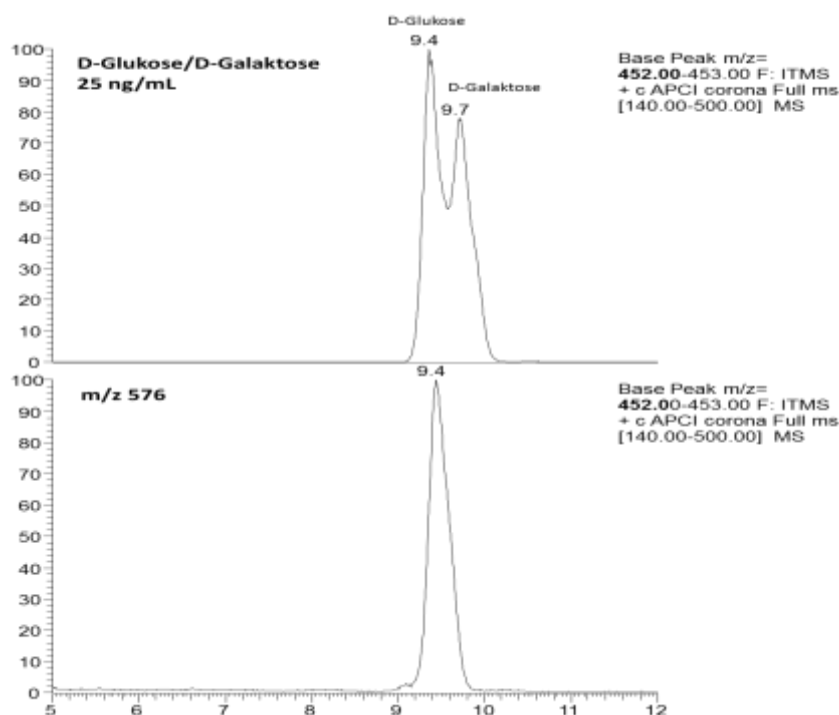
Hver isomer (D og L) av samme type sukker var godt separerte og kan bli sett fra Figur 4.31-4.32 som også viser skarpe og tydelige topper.

4.3.10 Sukker analyse av glykoalkaloider (SGA)

Sukker analyse metoden, beskrevet i delkapittel 3.6.1, ble utført på enkelte SGAer. For å kunne analysere sukkerne i SGA må disse først hydrolyseres for å bryte glykosidbindingene. Deretter ble monosakkaridene redusert med borhydrid og til slutt acetylt med eddiksyreanhydrid. Sukkeranalysene ble utført på isolater av SGA MW 575, 883 (**1a**), 883 (**2a**) og 969 (**12d**) Da. og er nærmere beskrevet i punkt 4.3.10.1- 4.3.10.3.

4.3.10.1 Sukkeranalyse av SGA MW 575

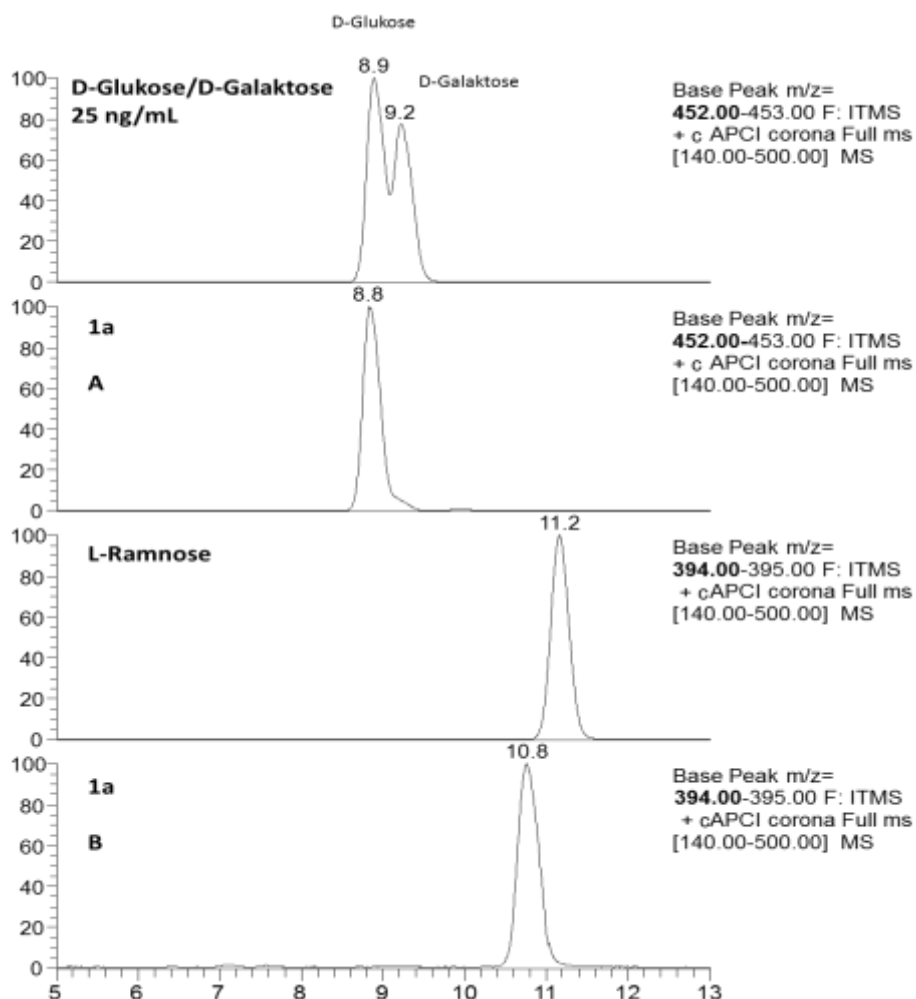
SGA MW 575 er bygd opp av aglykonet solasodine bundet til et heksose molekyl og kan være et nedbrytningsprodukt fra trisakkaridene. Tidligere forskning har dokumentert SGA MW 575 som metabolitt av SGA MW 883 og 925 (4). Figur 4.33 viser ionekromatogrammer fra LC-MS av en prøve av SGA MW 575 hydrolysert, redusert og acetylt og en standardløsning bestående av D-glukose og D-galaktose i et konsentrasjonsforhold på 1:1. Glukose eluerte tidligere enn galaktose og forskjell i separasjonen mellom de to heksosene var på 0,3 min (Figur 4.33). Kromatogrammet fra sukkeranalysen av MW 575 viser kun en topp med nøyaktig samme retensjonstid som glukose, og det er derfor svært sannsynlig at SGA MW 575 inneholdt et molekyl glukose. Det må anmerkes at det prinsipielt er mulig at SGA MW 575 inneholdt enda en annen heksose som tilfeldigvis coeluerte med glukose og som ikke ble tatt med som standard, men ifølge litteraturen er det vanligvis glukose og galaktose som forekommer i SGAer.



Figur 4.33: Ionekromatogrammer fra sukkeranalyse av SGA MW 575 og en standardløsning av D-glukose/D-galaktose i et konsentrasjonsforhold på 1:1. X-aksen viser retensjonstid i minutter og y-aksen angir relativ intensitet i prosent.

4.3.10.2 Sukkeranalyse av SGA MW 883

Ione kromatogram av SGA MW 883 **1a** og **2a** og av prøven bestående av en blanding av D-glukose/D-Galaktose (redusert/acetylert) er henholdsvis presentert i Figur 4.34 og 4.35.



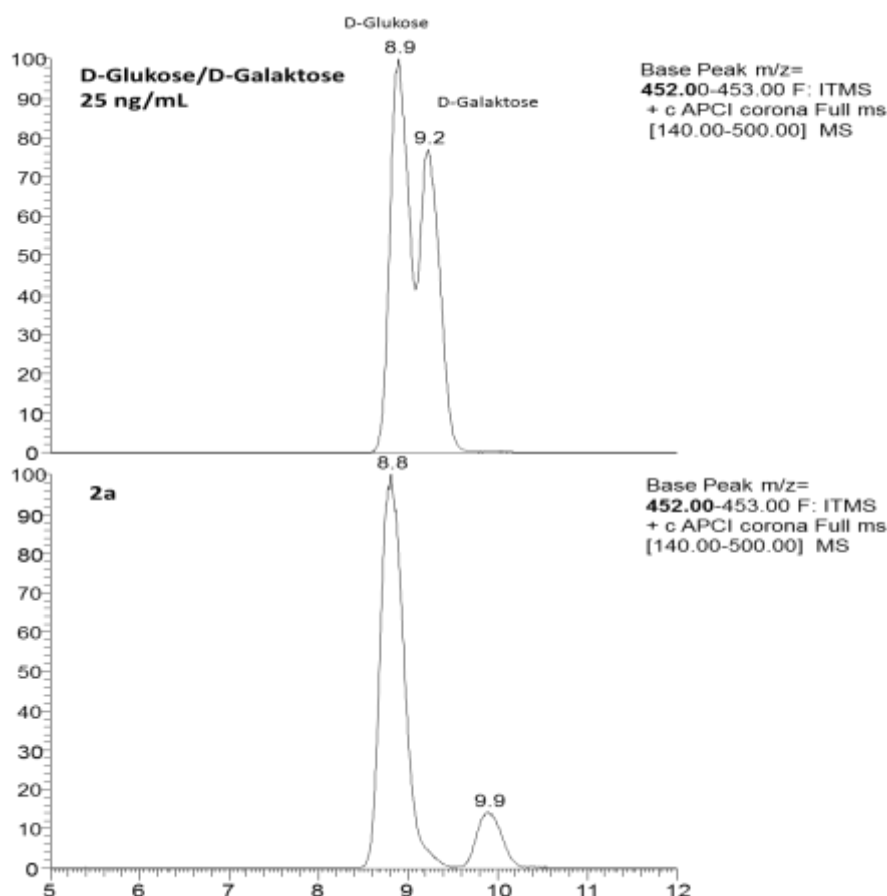
Figur 4.34: Ionekromatogrammer ($[M+NH_4]^+$) fra den LC-MS-baserte sukkeranalysen av SGA MW 883 (**1a**), av en standardløsning av D-glukose/D-galaktose i et konsentrasjonsforhold på 1:1 og av en standardløsning av L-ramnose. X-aksen viser retensjonstid i minutter og y-aksen angir relativ intensitet i prosent.

Figur 4.34 viser ionekromatogrammer av m/z 452 og m/z 394 som tilsvarer ammonium adduktene for henholdsvis en redusert og acetylert heksose og deoksy-heksose. Fra Figur 4.31 ble det klart at SGA MW 883 (**1a**) består av glukose siden kromatogrammene av hydrolysatet fra analogen (Figur 4.34, kromatogram A) ikke viser noe signal med samme retensjonstid som galaktose.

Figur 4.34 viser en topp med en retensjonstid på 10.8 minutter (kromatogram B). Den hadde identiske MS-karakteristika som L-ramnose. Standarden eluerte imidlertid 0,4 min senere (Figur 4.34). Det var allikevel det sakkaridet blant referansene som var nærmest i retensjonstid og som samtidig hadde lik molekylmasse. Siden L-ramnose i flere studier har blitt identifisert som en vanlig bestanddel av SGAer (4, 14, 15) og retensjonstiden av m/z 394 toppen i LC-MS kromatogrammet av hydrolysatet til SGA 883 (**1a**) lå svært nær den til

L-ramnose ble det konkludert med at sukkerresten av molekylet virkelig inneholdt ramnose. Forskjellen i retensjonstiden kan være et resultat av forskjellige konsentrasjoner i standard og prøve, eller retensjonen av ramnose i prøven kan være påvirket av andre bestanddeler i hydrolysatet som har innvirkning på retensjonsmekanismen.

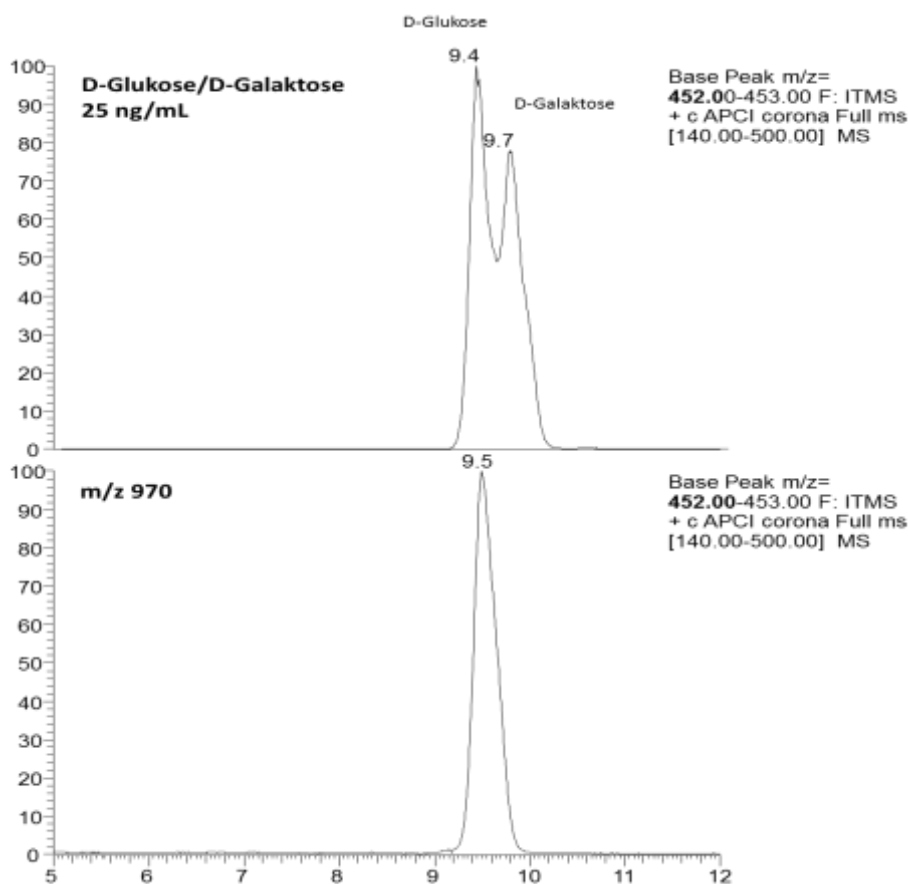
Figur 4.35 viser ionekromatogrammer som tilsvarer $[M+NH_4]^+$ til heksosene glukose og galaktose for en blanding av referansesubstanser og for hydrolysatet fra en SGA MW 883 (**2a**) prøve. Signalet ved 8,8 min ga utslag for et derivatisert heksose-molekyl som i dette tilfelle var glukose. Toppen ved 9,9 minutter er uklart siden den tilsvarer en acetylt heksose som eluerer 0,7 min senere enn galaktose (Figur 4.35). Det var også merkelig at toppens areal var vesentlig mindre enn det for glukose siden heksosene foreligger i et forhold på 1:1. Et signal som tilsvarte en deoksy-heksose ble heller ikke observert, muligens på grunn av utgangspunkt lavere utgangskonsentrasjon av SGA MW 883 (**2a**). Det virket dessuten som om acetyl-ramnose ioniserte noe dårligere enn acetyl-heksosene siden signal/støy forholdet var lavere for standarder med samme konsentrasjon. Det kan derfor kun med sikkerhet konkluderes at sukkerdelen til SGA MW 883 (**2a**) inneholder glukose og muligens en annen heksose enn det som var tilgjengelig som standard.



Figur 4.35: Ionekromatogrammer av $[M+NH_4]^+$ fra den LC-MS-baserte sukkeranalysen av SGA MW 883(**2a**) og av en standardløsning av D-glukose/D-galaktose i et konsentrasjonsforhold på 1:1 X-aksen viser retensjonstid i minutter og y-aksen angir relativ intensitet i prosent..

4.3.10.3 Sukkeranalyse av SGA MW 969

Kun én topp tilsvarende acetyleret glukose ble observert i LC-MS kromatogrammene fra hydrolysen av SGA MW 969 (**12d**) (Figur 4.36). Et signal tilsvarende en karboksyl-heksose ble ikke detektert noe som med stor sannsynlighet skyldtes at karboksylgruppen ble spaltet av under syrehydrolysen. Resultatene fra sukker analysen ga midlertidig heller ikke noe tegn på ionet m/z 394 som tilsvarende et ammonium addukt for et ramnose molekyl, muligens på grunn av for lav konsentrasjon som tidligere nevnt. Det kan konkluderes fra forsøket at SGA MW 969 (**12d**) inneholder to molekyler glukose hvorav et sannsynligvis er karboksylert.

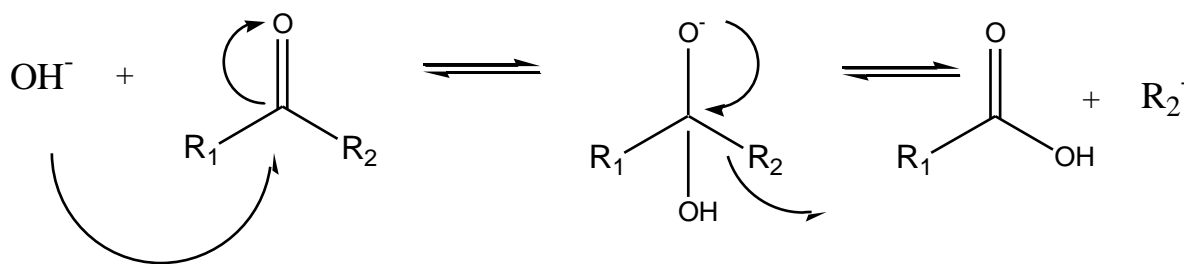


Figur 4.36: Ionekromatogrammer av $[M+NH_4]^+$ fra den LC-MS-baserte sukkeranalysen av SGA MW 969 (**12d**) og av en standardløsning av D-glukose/D-galaktose i et konsentrasjonsforhold på 1:1 X-aksen viser retensjonstid i minutter og y-aksen angir relativ intensitet i prosent.

4.3.11 Derivatiseringsreaksjoner

Basehydrolyse ble gjennomført på SGA MW 925 og 967, for å selektivt hydrolysere esterbindinger, men ikke glykosidbindinger. Felles for de nevnte SGA er avspaltning av de eksterne grupper som gir en masse på 883 Da. Masse differansen mellom 883 Da. og 925 og 967 Da. er henholdsvis på 42 og 84 Da, som kan være én og to acetyl grupper Felles for de eksterne gruppene er karbonylgruppen – C(O) og det er til karbonatomet i denne gruppen – OH⁻ danner binding. Mekanismen til en basehydrolyse reaksjon er presentert i Figur 4.37.

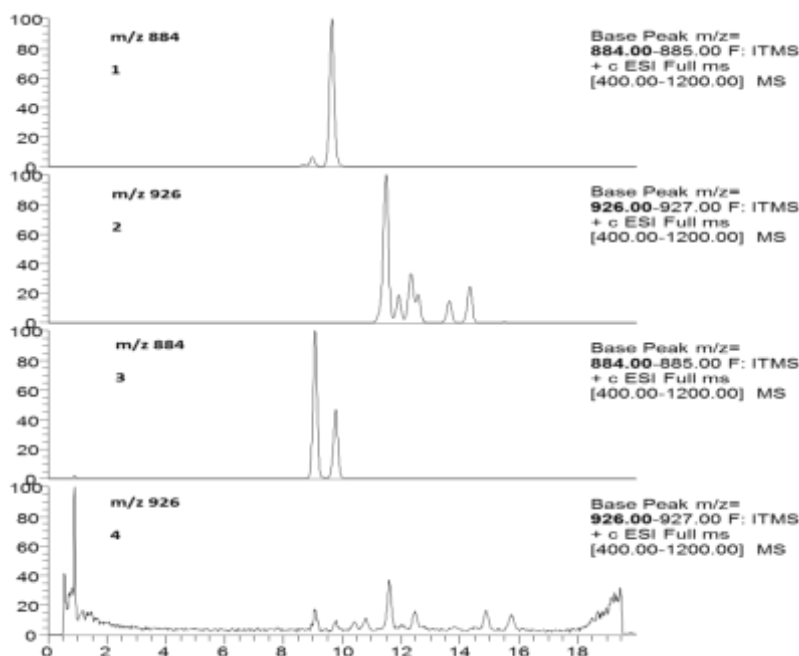
Resultater og diskusjon



Figur 4.37: Reaksjons mekanisme til en basehydrolyse reaksjon (51)

LC-MS resultatene fra før og etter innvirkning av en karbonatbuffer på SGA MW 925 er presentert i Figur 4.38. Ved sammenligning av kromatogrammene ser en at base hydrolyse reaksjon for SGA MW 925 var vellykket. Forbindelsen var nærmest fullstendig hydrolysert etter 50 minutter samtidig som signalene tilsvarende SGA MW 883 hadde vokst i intensitet. Resultatene av den samme reaksjonen med andre SGA er ikke presentert, men viste samme resultat, dvs. det var alltid en blanding av SGA 883 som var resultatet av basehydrolysen, for acetyl analogene.

MS resultatene tydet på innholdt av en karbonyl gruppe i SGA MW 969 og 1011, derfor ble det forsøkt metylering av karbonyl gruppene i disse SGA ved bruk av en diazometan generator. Dessverre ga denne reaksjonen ikke positive resultater. Dette kan skyldes at fragment på 44Da fra fragmenteringen av disse SGA, ikke var en karbonyl gruppe eller at reaksjonen var ikke vellykket.



Figur 4.38: LC-MS kromatogrammer fra basehydrolyse av SGA MW 925 med en bikarbonat buffer (pH 10,2). Kromatogrammer 1-2 er fra analysen før reaksjonen og 3-4 er kromatogrammer fra analysen etter 50 minutters reaksjon. X-aksen angir retensjonstid i minutter og y-aksen viser relativ intensitet i prosent.

4.3.12 NMR spektroskopi

NMR analyser ble foretatt med kommersiell solasodine og SGA MW 883(**1a**) og ^1H -shift og ^{13}C -shift verdiene tilordnet ved å interpretare ^1H -spektrene, ^{13}C -spektrene og 2D-spektrene COSY, TOCSY, HSQC, H2BC og HMBC. Dette ble gjort i samarbeid med veilederen og for å sikkert kunne fastslå at aglykonet var solasodine ble tidligere dokumentasjon av NMR data for solasodine, benyttet som referanse. (14, 52, 53)

Resultatene fra fragmenteringen (punkt 4.3.3) og sukkeranalyse (punkt 4.3.10.2) indikerte SGA MW 883(**1a**) består av aglykonet solasodine, to sukkerenheter av glukose og sannsynligvis en ramnose og er i samsvar med det som er blitt rapportert i tidligere studie I Tabell 4.7 er det presentert NMR data for solasodine fra litteraturen, for kommersiell solasodine, og for aglykonet til SGA MW 883 (**1a**). HSQC og JMOD-spektrene av kommersiell solasodine og SGA MW 883 (**1a**) er vedlagt i oppgaven appendiks. (Vedlegg 1-4). I dette forsøket ble pyridine- d_5 brukt som løsningsmiddel for solasodine mens det i studiet presentert i litteraturen ble det brukt deuterert klorofom. I litteraturen har en også analysert konformasjonen til noen analoger noe som ikke ble gjort i dette arbeidet, blant annet på grunn av lav stoffmengde og begrenset tid.

Karbon og proton skift verdiene presentert i Tabell 4.7 for både solasodine og aglykonet i SGA MW 883 (**1a**) er tilnærmet lik med det som er presentert i litteraturen. Shift-verdiene avviker med noen desimaler, noe som var forventet på grunn av bruk av to ulike løsningsmidler. Andre faktorer som kan påvirke resultatene kjemisk shift kan være renhet til analytten og temperatur. Proton skift verdi for karbon nr. 2,9,16,17,21,23,25,26 og 27 for kommersiell solasodine og SGA 883(**1a**) er identiske. For kommersiell solasodine er også protonskift verdiene like for karbon nr. 11 og 12 og 24 og 25. Dette skyldes overlapping av protonene. De spektroskopiske data viser at solasodine er aglykonet i SGA MW 883 (**1a**)

Tabell 4.7: ^1H og ^{13}C kjemisk skift verdi for kommersiell solasodine, aglykonet i SGA MW 883(1a), og NMR data for solasodine fra litteraturen

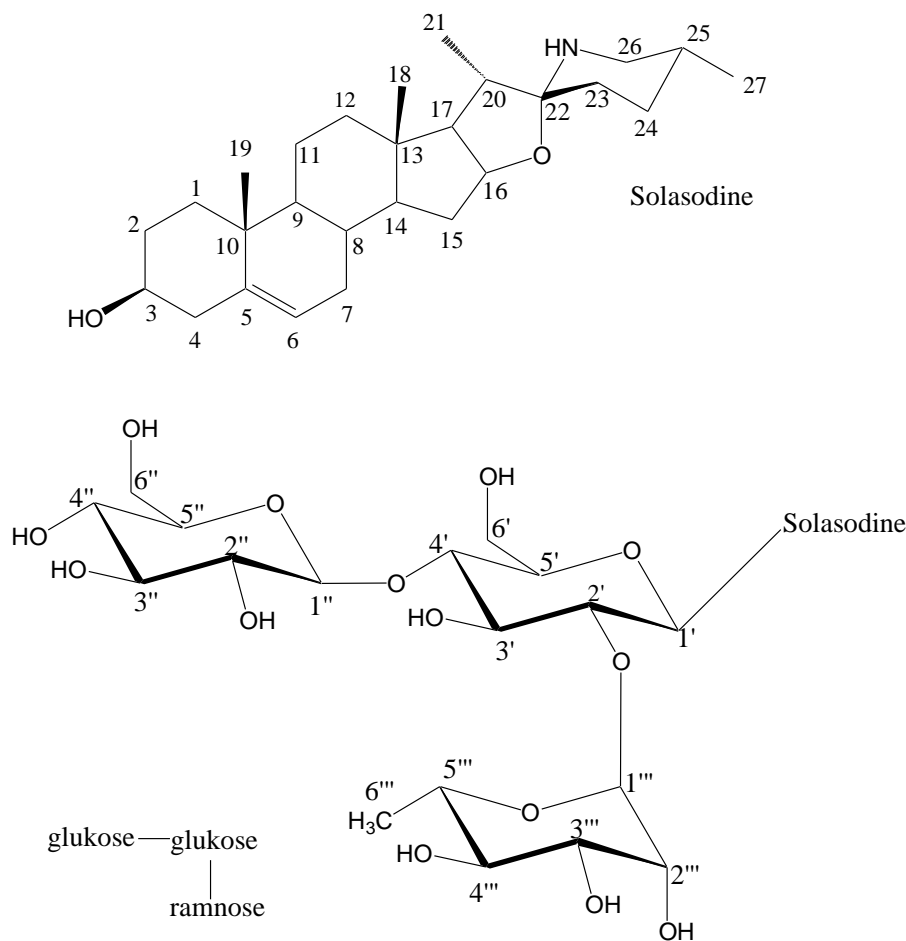
	Solasodine (53)		Kommersiell solasodine		1a	
	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
1	37,2	H- α 1,00 H- β 1,80	38,2	1,14 1,84	37,7	0,99 1,76
2	32,0	H- α 1,78 H- β 1,40	33,1	1,82 2,10	30,6	1,89 2,10
3	71,7	3,42	71,7	3,86	78,5	3,89
4	42,2	H- α 2,24 H- β 2,16	43,9	2,63 2,66	39,3	2,76
5	140,9	-----	142,4	-----	141,2	-----
6	121,4	5,23	121,5	5,41	122,2	5,3
7	32,1	H- α 1,48 H- β 1,97	32,8	1,53 1,94	32,8	1,49 1,88
8	31,5	1,58	32,2	1,64	32,1	1,57
9	50,0	0,90	50,8	0,98	50,8	0,98
10	36,6	-----	37,4	2,65	37,6	-----
11	20,8	1,48 1,41	21,7	1,48 1,53	21,6	1,45
12	39,9	H- α 1,10 H- β 1,68	40,6	1,48 1,77	40,5	1,13 1,72
13	40,5	-----	41,1	-----	41	-----
14	56,5	1,02	57,4	1,12	57,1	1,09
15	32,1	H- α 1,95 H- β 1,25	33,0	1,51	33,0	1,51
16	78,9	4,20	79,2	4,43	79,2	4,43
17	62,7	1,65	63,9	1,79	64,0	1,79
18	16,3	0,74	17,0	0,92	16,9	0,89
19	19,3	0,95	20,0	1,06	19,8	1,08
20	41,2	1,81	42,0	1,99	42,0	1,98
21	15,1	0,88	16,1	1,1	16,1	1,1
22	98,3	-----	98,8	-----	98,8	-----
23	33,9	1,56	35,1	1,73 1,78	35,1	1,73 1,78
24	30,1	H- α 1,55 H- β 1,35	31,5	1,64	30,9	1,64
25	31,3	1,48	32,1	1,64	32,0	1,65
26	47,5	H- α 2,58 H- β 2,52	48,5	2,78	48,5	2,78
27	19,2	0,77	20,5	0,83	20,3	0,83

Kjemisk skift verdiene for sukkermolekylene i SGA MW 883 (1a) er gitt i Tabell 4.8. NMR data fra litteraturen (presentert i Tabell 4.8), brukte pyridin- d_5 som løsningsmiddel.

Tabell 4.8: ^1H og ^{13}C kjemisk skift for sukkermolekylene i SGA MW 883(1a) og NMR data for SGA fra litteraturen

	(14)		(52)		(1a)	
	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
1'	100,0	4,97	100,1	4,95	100,4	4,98
2'	77,8	3,9	77,7	4,24-4,17	78,7	Ca 4,24
3'	76,2		76,2	4,24-4,17	78,2	Ca 4,25
4'	82,1		82,1	4,24-4,17	82,4	4,25
5'	77,3		77,3	3,86	76,6	3,87
6'	62,0	4,48	62,0	4,55-4,39	62,3	4,49
1''	101,8	6,27	101,8	6,24	102,2	6,28
2''	72,5		72,4	4,73	72,9	4,77
3''	72,8	4,61	72,8	4,57	73,2	4,61
4''	74,2		74,2	4,33	74,5	4,36
5''	69,5		69,4	4,93	69,9	4,97
6''	18,7	1,78	18,6	1,76	19,1	1,78
1'''	105,3	5,15	105,2	5,12	105,6	5,16
2'''	75,0		75,0	4,05	75,4	4,08
3'''	78,3		78,3	4,24-4,17	78,2	4,27
4'''	71,2		71,3	4,26	71,6	4,3
5'''	78,5		78,5	3,97	77,5	4,24
6'''	62,1	4,56-4,40 4,33	62,1	4,55-4,39 4,33	62,5	4,54 4,36

Forskning av en SGA med molekylvekt 883 har blitt identifisert som (22R, 25R)-spirosol-5-en-3 β -yl O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside (14) (Figur 4.39) og solasodine 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 24)]- β -D-glucopyranoside.(52)I syre hydrolyse reaksjon av sist nevnte SGA ble det observert solasodine, glukose og ramnose i stoff blandingen. Dette var også observert i vårt sukker analyse (punkt 4.3.10.2) for SGA 883(1a). Kjemisk skift verdiene iTabell 4.8 avviker litt fra referanse verdiene, men er innenfor de oppgitte intervallene. Både dette og MS_n resultatene bekrefter at SGA MW 883(1a) i vårt forsøk er mest sannsynlig SGA nevnt ovenfor.



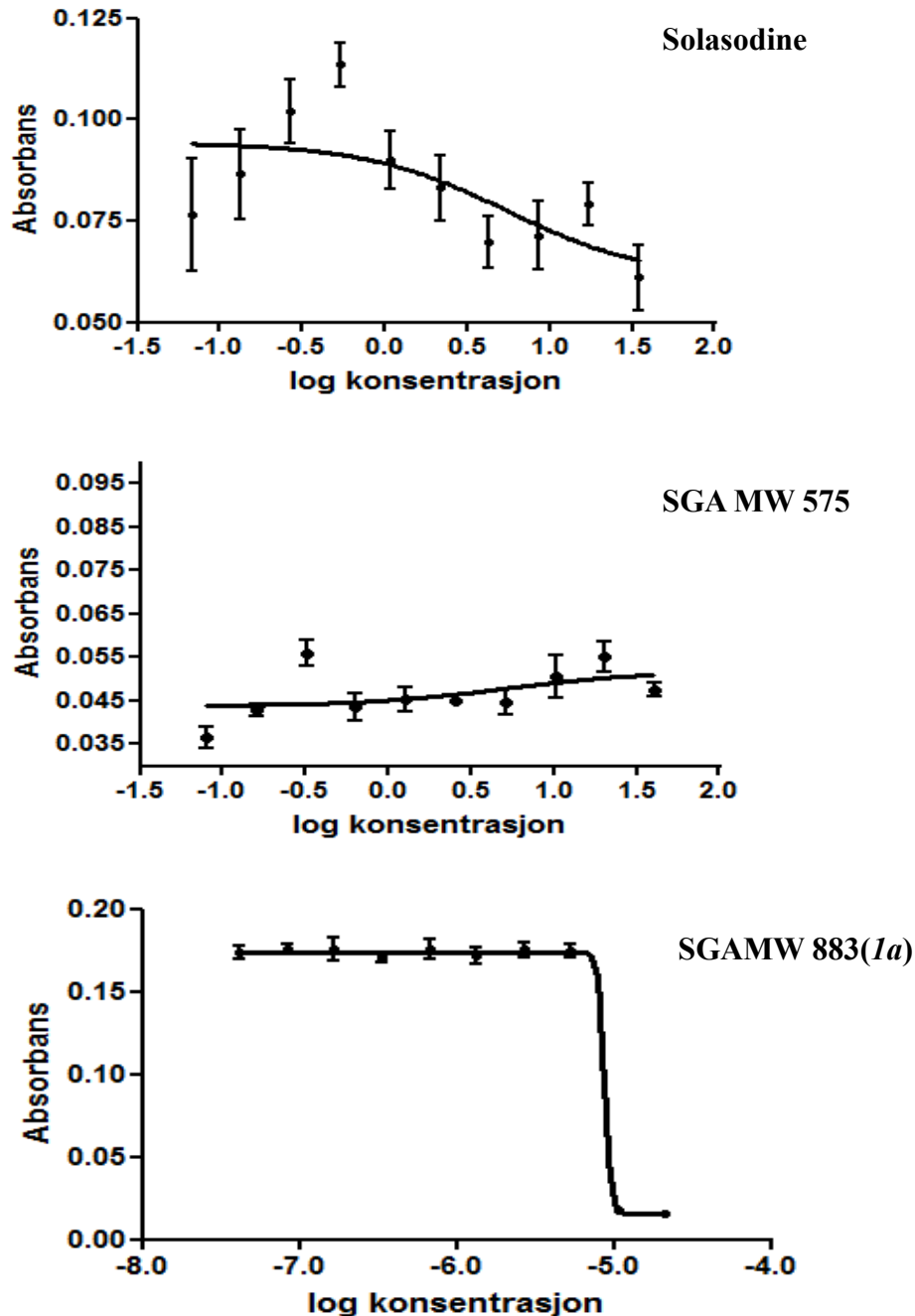
Figur 4.39: Molekyl struktur av (22R, 25R)-spirosol-5-en-3 β -yl O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside bestående av aglykonet solasodine, to glukose molekyler og et ramnose molekyl

4.3.13 Celle forsøk

Dose-respons kurver fra eksponering av kattenyreceller med solasodine, SGA MW 575 og 883(1a) ble plottet med programvaren Prism i samarbeid med veilederen (Figur 4.40). For dette ble de logaritmiske konsentrasjonene (Tabell 3.11) av substansene plottet mot absorbansen til fargestoffet neutral rød. Neutral rød er et rødt fargestoff som penetrerer gjennom celledvegger og samles opp i lysosomer forutsatt cellene er levedyktige. Hver konsentrasjon ble målt tre ganger (triplikater), og derfor ble en gjennomsnittsverdi av absorbansen for disse triplikatene brukt for dose-respons-plottene.

Ideelt sett bør absorbansen avta med stigende konsentrasjon av testsubstansen (forutsatt substansen er cytotoxisk) og kurven formere seg i en S-form ettersom konsentrasjonen øker, men dette var ikke tilfellet for SGA MW 575 og solasodine (Figur 4.40). Kun SGA MW 883(1a) viser en klar dose-respons-sammenheng (Figur 4.40). Vendepunktet for dose-respons-plottet til SGA MW 883(1a) ble av Prism beregnet til 5,2 M, noe som tilsvarer stoffets IC₅₀-verdi i den benyttete kattenyrecellelinjen. EC₅₀ er definert som konsentrasjonen av en substans når halvparten av cellene er død eller konsentrasjonen i vendepunktet. For

solasodine og SGA MW 575 kan en konkludere med at disse ikke har signifikant cytotoxicitet opp til den testete maksimalkonsentrasjonen. Forskjellen mellom solasodine og SGA MW 575 sammenliknet med SGA 883(1a) er på henholdsvis ett og tre sukkermolekyler. Ut ifra de svært begrensede forsøkene i dette arbeidet kan en ikke konkludere om de toksiske egenskapene til SGAer kun er avhengig av antall sukkermolekyler, men det ble vist at et solasodine-trisakkarid er mer cytotoxisk enn et solasodin-monosakkarid (Figur 4.40)



Figur 4.40: Dose- respons kurver av Solasodine, SGA MW 575 og 883(1a) konstruert på programvaren Prism.

5.0 Konklusjon

Denne studien har avdekket et stort mangfold av SGA i blomster fra trompetliljer som har vokst under naturlige forhold. Det lyktes med å etablere en metode for isolering av SGA fra trompetliljeblostmene som bestod av en ekstraksjon av glykoalkaloidene med metanol, væskevæske ekstraksjon og en kombinasjon av normalfase og omvendt-fase kromatografi. Bruken av et ionefelle-MS som detektor under opprensingen viste seg å være svært fordelaktig for fraksjoneringen av de forskjellige analogene.

Screening av SGA på LC-MS med en lineær ionefelle analysator avslørte et stort mangfold av forskjellige SGA-analoger ved bruk av et såkalt core-shell materiale for HPLC (Kinetex C18 fra Phenomenex). Separasjonen av SGA analogene som ble oppnådd med et slikt kolonnemateriale var vesentlig bedre enn med et silika-basert materiale som Waters SunFire C₁₈. Bruken av et core-shell-materiale skal kunne gi økt kolonneeffektivitet og kromatografisk oppløsning siden en kan benytte mindre partikler enn med silikabaserte materialer i en kolonne med ellers samme dimensjon.

Et eget delmål med denne studien var etableringen av en LC-MS basert metode for analyse av sakkariidene i SGA. Metoden var aller først testet på kommersielle sukkere som først ble redusert med borohydrid etterfulgt av acetylering. Det var tilfelle for flere av sukkerne at hver isomer (D og L) av samme type sukker var godt separerte. Anvendelse av metoden på SGA nødvendiggjorde en foregående hydrolyse av glykosidbindingene. For SGA MW 575 og 883 (**1a**) ble klare resultater oppnådd, men resultatene var mindre klare for SGA MW 883 (**2a**) og 969 (**13d**), noe som antakeligvis skyldes en for lav konsentrasjon av analyttene i prøvene.

Kjemiske reaksjoner ble forsøkt for å bekrefte noen strukturelle egenskaper til SGA analogene. MS-analysene viste at alle analogene med MW større enn 883 Da. sannsynligvis er acetylert og/eller karboksylert. Alle analogene som ble forsøkt basehydrolysert reagerte til **1a** og **2a**, noe som bekreftet MS-analysene. En forsøkt metylering av karboksyl-funksjonen i de antatte karboksy-SGA med diazometan ga imidlertid ingen resultater. Årsaken til dette ble ikke undersøkt videre.

Hensikten med celle forsøk var å avgjøre i hvilken grad SGA viser toksisk effekt på celler fra kattens nyreceller og om antall sukkermolekyler i SGA har noe betydning for toksisiteten. På grunn av begrenset resultater ble det ikke klar gjort om økning i sukker molekyler i SGA hadde påvirkning på toksisiteten, men det ble vist at SGA MW 883(**1a**) var mer toksisk enn SGA MW 575.

6.0 Referanseliste

1. Bernhoft, A. *Bioactive compound in plants*; Oslo, 2010.
2. Li, H. J.; Jiang, Y.; Li, P. Chemistry, bioactivity and geographical diversity of steroidal alkaloids from the Liliaceae family. *Nat Prod. Rep.* **2006**, *23* (5), 735-752.
3. Cataldi, T. R. I.; Lelario, F.; Bufo, S. A. Analysis of tomato glycoalkaloids by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19* (21), 3103-3110.
4. Munafo, J. P.; Gianfagna, T. J. Antifungal Activity and Fungal Metabolism of Steroidal Glycosides of Easter Lily (*Lilium longiflorum* Thunb.) by the Plant Pathogenic Fungus, *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2011**, *59* (11), 5945-5954.
5. Simonovska, B.; Vovk, I. High-performance thin-layer chromatographic determination of potato glycoalkaloids. *Journal of Chromatography A* **2000**, *903* (1ΓÇô2), 219-225.
6. Roddick, J. G.; Weissenberg, M.; Leonard, A. L. Membrane disruption and enzyme inhibition by naturally-occurring and modified chacotriose-containing *Solanum* steroidal glycoalkaloids. *Phytochemistry* **2001**, *56* (6), 603-610.
7. Keukens, E. A. J.; de Vrije, T.; van den Boom, C.; de Waard, P.; Plasman, H. H.; Thiel, F.; Chupin, V.; Jongen, W. M. F.; de Kruijff, B. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1995**, *1240* (2), 216-228.
8. Francis, J. A.; Rumbleha, W.; Nair, M. G. Constituents in Easter lily flowers with medicinal activity. *Life Sciences* **2004**, *76* (6), 671-683.
9. Fitzgerald, K. T. Lily Toxicity in the Cat. *Topics in Companion Animal Medicine* **2010**, *25* (4), 213-217.
10. Rumbleha, W. K.; Francis, J. A.; Fitzgerald, S. D.; Nair, M. G.; Holan, K.; Bugyei, K. A.; Simmons, H. A comprehensive study of Easter lily poisoning in cats. *J Vet Diagn Invest* **2004**, *16* (6), 527-541.
11. Ghisalberti L, E. Steroidal Glycoalkaloids: isolation, structure, Analysis, and Biosynthesis. *Natural product Communication* **2006**, *1* (10), 859-884.
12. Paul, A. T.; Vir, S.; Bhutani, K. K. Liquid chromatographyΓÇômass spectrometry-based quantification of steroidal glycoalkaloids from *Solanum xanthocarpum* and effect of different extraction methods on their content. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1208* (1ΓÇô2), 141-146.

13. Nakano, K.; Nishizawa, K. +.; Murakami, K. +.; Takaishi, Y.; Tomimatsu, T. Steroidal alkaloid glycosides from *Lilium cordatum*. *Phytochemistry* **1986**, 26 (1), 301-303.
14. Munafo, J. P.; Ramanathan, A.; Jimenez, L. S.; Gianfagna, T. J. Isolation and Structural Determination of Steroidal Glycosides from the Bulbs of Easter Lily (*Lilium longiflorum* Thunb.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58 (15), 8806-8813.
15. Munafo, J. P.; Gianfagna, T. J. Quantitative Analysis of Steroidal Glycosides in Different Organs of Easter Lily (*Lilium longiflorum* Thunb.) by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chem.* **2011**, 59 (3), 995-1004.
16. Hubor, U.; Majors, E. R. Principles in preparative HPLC. Agilent technologies Inc.: Germany, 2007.
17. Shakya, R.; Navarre, D. A. LC-MS analysis of solanidane glycoalkaloid diversity among tubers of four wild potato species and three cultivars (*Solanum tuberosum*). *Journal of Agricultural and Food Chem.* **2008**, 56 (16), 6949-6958.
18. Claeys, M.; Van den Heuvel, H.; Chen, S.; Derrick, P.; Mellon, F.; Price, K. Comparison of high- and low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry in the analysis of glycoalkaloids and their aglycons. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **1996**, 7 (2), 173-181.
19. Kozukue, N.; Tsuchida, H.; Friedman, M. Tracer Studies on the Incorporation of [2-¹⁴C]-dl-Mevalonate into Chlorophylls a and b, +-Chaconine, and +-Solanine of Potato Sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chem.* **2000**, 49 (1), 92-97.
20. Paul M, D. Alkaloids. In *Medicinal Natural products: A biosynthetic Approach*, 2nd ed.; Joth Wiley & Sons: 2002; pp 291-398.
21. Vincken, J. P.; Heng, L.; de Groot, A.; Gruppen, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **2007**, 68 (3), 275-297.
22. Rønning, O. P. Prøveopparbeidning. In *Prøvetaking og prøveopparbeiding*, Høgskolen I Oslo: Oslo, 2010; pp 22-59.
23. Greibrokk T, L. E.; Rasmussen, E. K. Koplinger med MS/ prøveopparbeidelse. In *Kromatografi separasjon og deteksjon*, 2005; pp 255-294.
24. Braithwaite, A. Introduction to chromatography. In *Chromatographic methods*, 2011; pp 17-18.
25. Greibrokk, T.; Lundanes, E.; Rasmussen, E. K. Kromatografisk teori. In *Kromatografi separasjon og deteksjon*, universitetsforlaget: Oslo, 2005; pp 6-7.

26. Greibrokk, T.; Lundanes, E.; Rasmussen, E. K. væskekromatografi (HPLC). In *Kromatografi Separasjon ig deteksjon*, 2005; pp 173-226.
27. http://www.comsol.com/stories/waters_corp_hplc_systems/full/. 2012.
28. Greibrokk, T.; Lundanes, E.; Rasmussen, E. K. Fordelingskromatografi. In *Kromatografi separasjon og deteksjon*, universitets forlaget: Oslo: 2005; pp 40-43.
29. Rønning, O. P. Introduksjon til massespektrometri. In *Innføring i massespektrometri*, 10 A.D.; pp 4-5.
30. Rønning, O. P. Ionekilde og ionisasjonsprosesser/ masseanalysator og detektor. In *innføring i massespektrometri*, 2011; pp 6-21.
31. Thermo, E. *Finnigan LTQ Hardware Manual 97055-97013 Revision A*; Technical publications, Thermo electron corporation: 2003.
32. <http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/hplcms.html>. 2012.
33. deHoffmann, E. Tandem mass spectrometry: A primer. *Journal of Mass Spectrometry* **1996**, *31* (2), 129-137.
34. http://www.mpipz.mpg.de/45513/LC-ESI-Ion_Trap. 2012.
35. Phillip E, M.; Denton M, B. The Quadrupole Mass Filter: Basic Operating Concepts. *Journal of chemical education* **1986**, *63* (7), 617-623.
36. <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/quad-massspec.html>. 2012.
37. Phillip S, W.; Cppk R, G. Ion trap massspectrometry. *HJELP* **1997**, *16* (3).
38. Basics og LC/MS. Agilent Technologies: 2001.
39. williams D, F. I. Nuclear magnetic resonance spectra. In *Spectroscopic Methods in organic chemistry*, 2011; pp 63-169.
40. Stenstrøm, Y. 2011.
41. Haussinger, D. Introduction to protein structure bioinformatics 2004 NMR spectroscopy. 2-7, 2004.
42. <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/350/Carey5th/Ch13/ch13-2dnmr-1.html>. 2012.
43. Freshney R, I. *Culture of animal cells, A manual of basic techniques*; 4th ed.; A john wiley & sons, Inc, publication: USA, 2000.
44. Eisenbrand, G.; Pool-Zobel, B.; Baker, V.; Balls, M.; Blaauboer, B. J.; Boobis, A.; Carere, A.; Kevekordes, S.; Lhuguenot, J. C.; Pieters, R.; Kleiner, J. Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology* **2002**, *40* (2), 193-236.

45. Weyermann, J.; Lochmann, D.; Zimmer, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, 288 (2), 369-376.
46. Maxwell, A.; Pingal, R.; Reynolds, W. F.; McLean, S. Two steroidal glycoalkaloids from *Solanum arboreum*. *Phytochemistry* **1996**, 42 (2), 543-545.
47. http://userpage.chemie.fu-berlin.de/~tlehmann/krebs/files_diazoalkanes.pdf. 2012.
48. Brunton, N. P.; Gormley, T. R.; Murray, B. Use of the alditol acetate derivatisation for the analysis of reducing sugars in potato tubers. *Food Chemistry* **2007**, 104 (1), 398-402.
49. Boric acid gel for column chromatography. Sigma Aldrich: 2012.
50. Ricochon, G. C.; Paris, C. G.; Muniglia, L. Highly sensitive, quick and simple quantification method for mono and disaccharides in aqueous media using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS). *Journal of Chromatography B* **2011**, 1529-1539.
51. <http://www-personal.une.edu.au/~sglover/CHEM120Topic%20G/sld012.htm>. 2012.
52. Mimaki, Y.; Sashida, Y. Steroidal Saponins and Alkaloids from the Bulbs of *Lilium-Brownii-Var-Colchesteri*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1990**, 38 (11), 3055-3059.
53. Puri, R.; Wong, T. C.; Puri, R. K. Solasodine and Diosgenin - H-1 and C-13 Assignments by 2-Dimensional Nmr-Spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1993**, 31 (3), 278-282.

Vedlegg

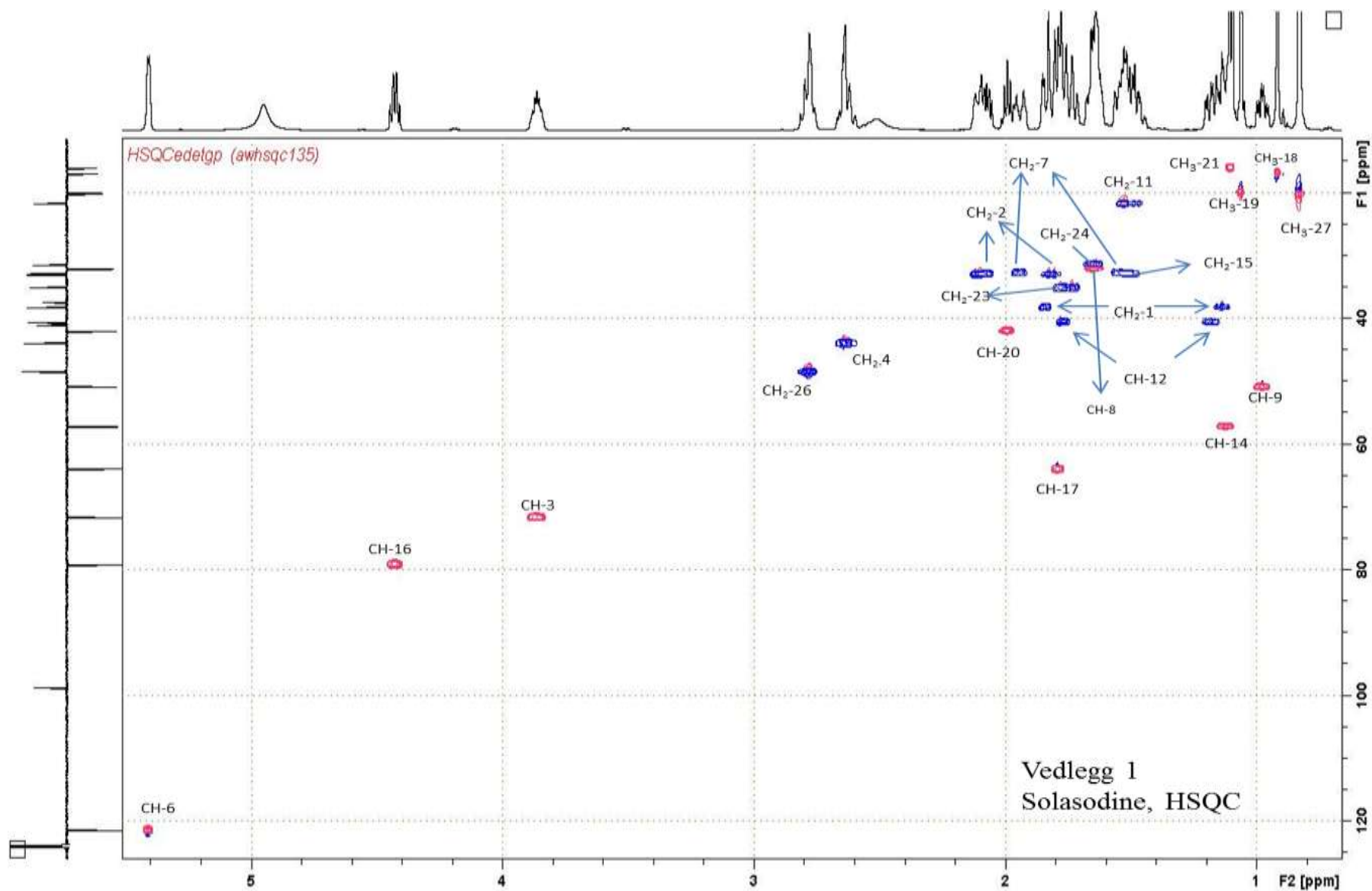
7.0 Vedlegg

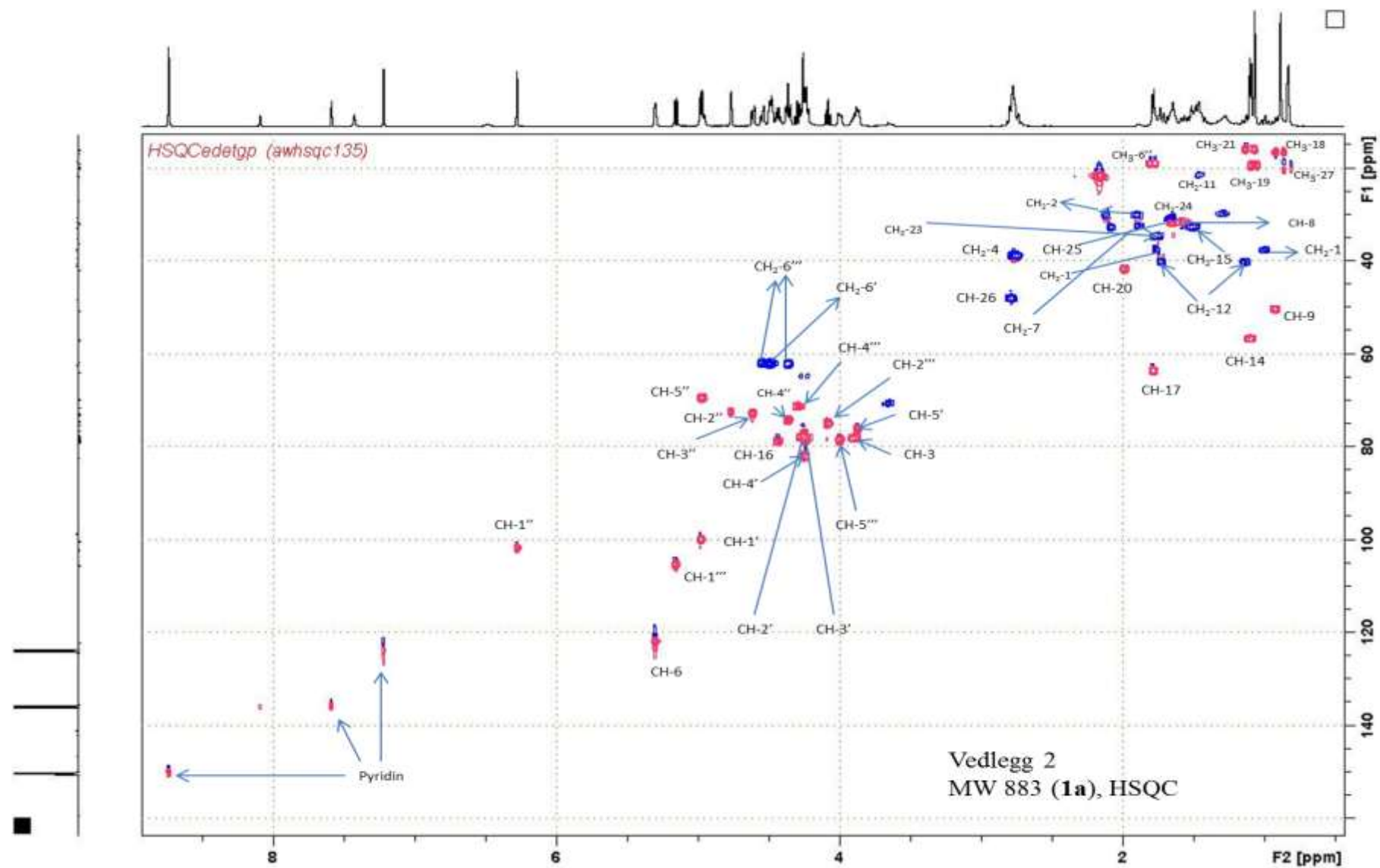
Vedlegg 1, HSQS Solasodine

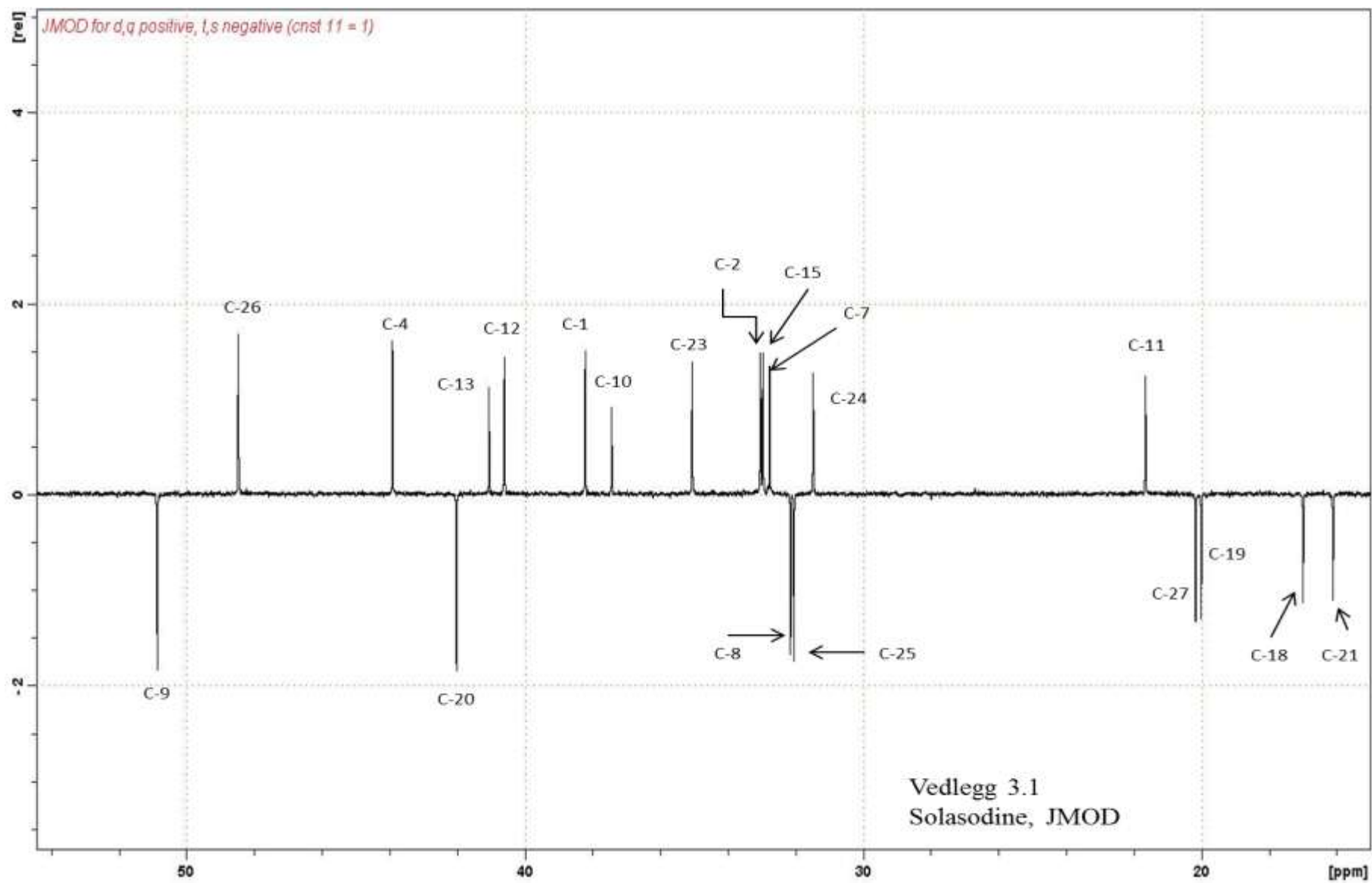
Vedlegg 2, HSQC 883(1a)

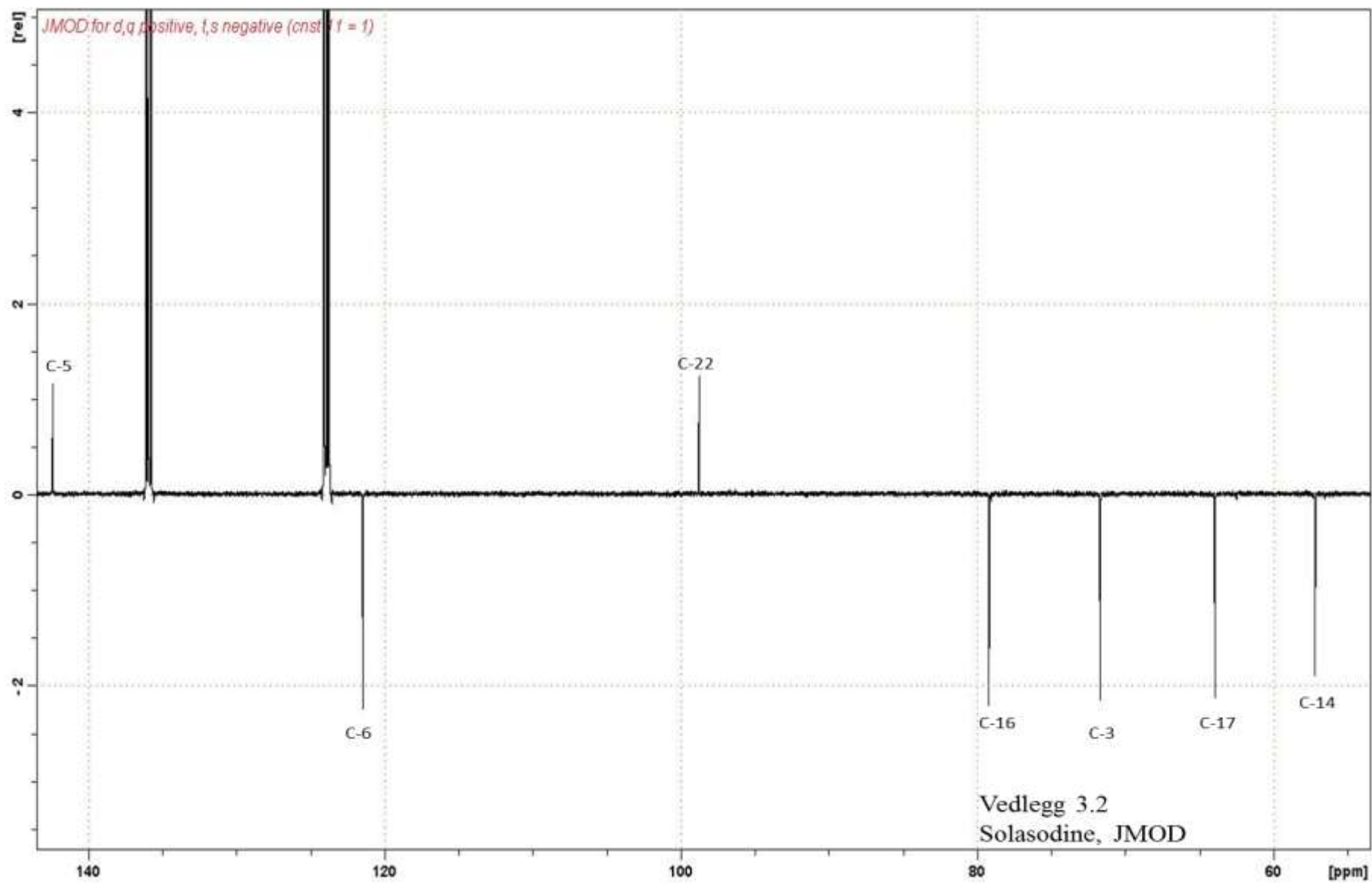
Vedlegg 3.1-3.2, JMOD Solasodine

Vedlegg 4.1-4.3, JMOD 883(1a)









Vedlegg

