

HOVEDFAGSOPPGAVE I ORGANISK KJEMI

FARGESTOFFER I TROPISKE PLANTER

Analyse av antocyaner i *Callistemon citrinus*,
Phyllanthus ovalifolia og *Jacaranda mimosifolia*.



Ellen Sirnes



Kjemisk institutt
Universitetet i Bergen
2003

Forord

Arbeidet med denne hovedfagsoppgaven ble påbegynt våren 2002. Noe av arbeidet ble utført ved Makerere University i Uganda, mens største delen ble utført ved Universitetet i Bergen.

Jeg vil gjerne takke professor Øyvind M. Andersen for god veiledning gjennom hele hovedfaget. Antocyaner har virkelig vært et spennende felt å arbeide med.

I tillegg ønsker jeg å takke post.doc. Torgils Fossen for den ekstra hjelp han har tatt seg tid til å gi. Ellers en stor takk til hele antocyangruppen for opplæring og hjelp med det eksperimentelle og til Håvard S. Nateland for utførelsen av MS-analyser. Ved kjemisk institutt ønsker jeg spesielt å takke førsteamanuensis Nils Åge Frøystein for tilrettelegging av NMR-bruk og Morten-Christian Bernson for hjelp med det tekniske rundt utforming av oppgaven.

Til slutt ønsker jeg å takke familie for støtte og venner for å ha gjort dette til en svært trivelig studietid.

Ellen Sirmes

Bergen, juni 2003

Innholdsfortegnelse

Motivasjon		1
Sammendrag		2
Kapittel 1	Innledning	3
1.1	Plantepigmenter	3
1.2	Antocyaner	5
1.2.1	Struktur	5
1.2.2	Stabilitet og farge	8
1.2.3	Biosyntese	10
1.2.4	Naturlig forekomst og funksjon	12
1.2.5	Menneskenes bruk og nytte av antocyaner	12
1.3	Plantene i oppgaven	13
Kapittel 2	Eksperimentelle metoder og prosedyrer	14
2.1	Ekstraksjon	14
2.2	Rensing med tofasesystem	14
2.3	Kromatografiske metoder	15
2.3.1	Amberlite XAD-7	15
2.3.2	Sephadex LH-20	16
2.3.3	Toyopearl HW-40F	17
2.3.4	TLC (Tynnskiktskromatografi)	17
2.3.5	HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	18
2.4	Spektroskopiske analysemetoder	21
2.4.1	UV/synlig-spektroskopi	21
2.4.2	NMR (Nuclear Magnetic Resonance spektra)	22
2.4.3	MS (massespektrometri)	26
Kapittel 3	Resultater og diskusjon – <i>Callistemon citrinus</i>	27
3.1	Isolasjon og analyse	27
3.1.1	Analyse av råekstrakt	27
3.1.2	Isolering med Sephadex-kolonne	28
3.1.3	UV/synlig-spektre av pigmentene	30
3.1.4	Tynnskiktskromatografi	31
3.2	Strukturbestemmelse med NMR	33
3.2.1	Pigment 2; cyanidin 3- <i>O</i> - β -glukopyranosid	33
3.2.2	Pigment 1; cyanidin 3,5-di- <i>O</i> - β -glukopyranosid	41
3.3	Oppsummering	51

Kapittel 4	Resultater og diskusjon – <i>Phyllanthus ovalifolia</i>	52
4.1	Isolasjon og analyse	52
4.1.1	Analyse av råekstrakt	52
4.1.2	Isolering med Sephadex-kolonne	54
4.1.3	UV/synlig-spektre av pigmentene	57
4.1.4	Tynnskiktskromatografi	58
4.2	HPLC og UV/synlig-spektroskopi (pigment 2 og 4)	59
4.3	Strukturbestemmelse med NMR (pigment 1 og 3)	61
4.3.1	Pigment 3; cyanidin 3-(6''- <i>O</i> - β -glukopyranosyl- <i>O</i> - β -glukopyranosid)	61
4.3.2	Pigment 1; delphinidin 3-(6''- <i>O</i> - β -glukopyranosyl- <i>O</i> - β -glukopyranosid)	72
4.4	Oppsummering	80
Kapittel 5	Resultater og diskusjon – <i>Jacaranda mimosifolia</i>	81
5.1	Isolasjon og analyse	81
5.1.1	Analyse av råekstrakt	81
5.1.2	Fraksjonering med Sephadex-kolonne	82
5.1.3	Rensing av hovedpigment med Toyopearl-kolonne	84
5.1.4	UV/synlig-spekter av hovedpigmentet	85
5.2	Strukturbestemmelse med MS og NMR	87
5.2.1	Massespektrometri	87
5.2.2	Strukturbestemmelse med NMR; malvidin 3,7-di- <i>O</i> - β -glukopyranosid	89
5.3	Oppsummering	100

Litteraturliste

Motivasjon

Antocyaner er av de viktigste og mest utbredte røde og blålige fargestoffene hos planter. I naturen har de en rekke funksjoner, blant annet knyttet til formeringsprosess og forsvarsmekanisme hos planter. Hos menneskene ser de ut til å ha positiv helsemessig effekt på flere områder.¹

Det er fremdeles mye uoppgitt innen feltet og det gjøres stadig interessante funn. Dette gjelder både med hensyn på nye strukturer og på antocyaners funksjon i naturen, men kanskje mest av alt på deres effekt på vår egen helse. På grunn av deres sterke farger ligger det også et stort industrielt potensiale i å kunne bruke antocyaner som fargetilsetningsstoffer i mat.¹

Denne oppgaven omhandler isolasjon og analyse av antocyaner i tre tropiske planter. Som del av arbeidet inngikk et opphold ved Makerere University i Kampala, Uganda, hvor noe av det eksperimentelle arbeidet ble utført. Utfordringene og erfaringene ved å arbeide i et så annerledes miljø har vært en stor motivasjonsfaktor.

Det er tidligere utført flere arbeid på antocyaninnholdet i de røde blomstene til *Callistemon citrinus*, men med motstridende konklusjoner.^{2,3} Det samme gjelder for blomstene til *Jacaranda mimosifolia*.^{4,5} Denne planten er dessuten interessant da den har blå blomster, noe som kan tyde på at den inneholder komplekse antocyaner. Bærene i *Phyllanthus ovalifolia* er det utført et arbeid på, men uten at det ble oppnådd noen konkret identifisering av antocyaner.⁵ Utfordringen lå derfor i å strukturoppklare pigmentene i disse plantene ved bruk av moderne analyseteknikker.

Sammendrag

Antocyaner er av de viktigste og mest utbredte pigmentene i planteriket. De gir opphav til et spekter av røde og blålige farger. Dette gjør dem blant annet til en nødvendig brikke i spredningen av frø og pollen, da planter slik tiltrekker insekter og fugler. Hos menneskene har antocyaner positiv effekt på ulike områder av vår helse. Det arbeides også med å kunne bruke antocyaner som fargetilsetningsstoffer i mat for slik å erstatte de i dag mye brukte kunstige variantene.

Denne oppgaven tar for seg identifisering av antocyaner i tre tropiske planter, *Callistemon citrinus*, *Phyllanthus ovalifolia* og *Jacaranda mimosifolia*. Det eksperimentelle arbeidet inkluderer ekstraksjon, rensing og separasjon av pigmentene i tillegg til strukturoppklaring ved hjelp av ulike kromatografiske og spektroskopiske teknikker.

Antocyanene ble ekstrahert fra plantematerialet med metanol tilsatt TFA. Ekstraktet ble videre rensert med et tofasesystem, bestående av etylacetat og vann, og på Amberlite XAD-7-kolonne. For å separere de ulike antocyanene ble det benyttet en Sephadex LH-20-kolonne og Toyopearl HW-40F-kolonne. Strukturoppklaringen ble utført ved bruk av TLC (tynnskiktskromatografi), HPLC (høytrykk væskechromatografi), UV/synlig-spektroskopi, MS (massespektrometri) og NMR (magnetisk kjerneresonans spektroskopi).

I de røde blomstene til *Callistemon citrinus* ble det identifisert to antocyaner, cyanidin 3,5-di-*O*- β -glukopyranosid (**1**) og cyanidin 3-*O*- β -glukopyranosid (**2**). Strukturoppklaringen av pigmentene ble hovedsakelig utført ved bruk av ulike 1D og 2D NMR-teknikker.

I bærene av *Phyllanthus ovalifolia* ble det identifisert fire antocyaner, delfinidin 3-(6''-*O*- β -glukopyranosyl-*O*- β -glukopyranosid) (**1**), delfinidin 3-glukosid (**2**), cyanidin 3-(6''-*O*- β -glukopyranosyl-*O*- β -glukopyranosid) (**3**) og cyanidin 3-glukosid (**4**). På TLC kokromatograferte pigment 2 og 4 med de tilsvarende og allerede kjente antocyanene i solbær. Det ble derfor utført et HPLC-eksperiment som sammen med UV/synlig-spektroskopi ga identiteten til pigment 2 og 4. For å få en fullstendig strukturoppklaring av pigment 1 og 3 ble det i tillegg til HPLC og UV/synlig-spektroskopi benyttet en rekke ulike NMR-teknikker. Begge disse antocyanene viste seg å inneholde det relativt sjeldne sukkeret gentiobiose.

I blomstene til *Jacaranda mimosifolia* ble arbeidet konsentrert om hovedpigmentet. Dette ble identifisert til malvidin 3,7-di-*O*- β -glukopyranosid. De isolerte fraksjonene viste seg å inneholde en del andre forbindelser. Dette kan tyde på at det identifiserte antocyanet er del av et kompleks i planten, spesielt da det ble ekstrahert fra blå blomster. Antocyanet ble forsøkt skilt ut på Toyopearl HW-40F-kolonne, men uten at det lyktes. Det var derfor nødvendig med massespektre av pigmentet og LC-MS ble kjørt. Strukturoppklaringen av hovedpigmentet ble til slutt oppnådd ved en kombinasjon av NMR- og MS-data.

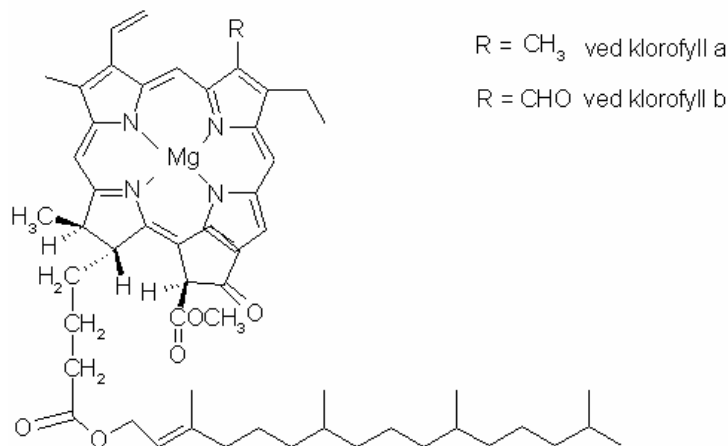
Kapittel 1 – Innledning

1.1 Plantepigmenter

Planteriket har et mangfold av farger hvor grønnfargen er den dominerende. Dette skyldes klorofyllmolekyler. I tillegg gir karotenoider, betalainer og flavonoider opphav til ulike farger hos planter.⁶

Klorofyll gir opphav til grønnfargen i planters bladverk, men kan også sees i skallet på epler og andre frukter, da spesielt når de er umodne. De finnes hovedsakelig i kloroplastmembraner, som er organellene hvor plantenes fotosyntese foregår.⁶ Her bidrar de i plantenes omdannelse av lysenergi til kjemisk energi.

Klorofyllmolekyler er relativt store og utgjør en ringstruktur rundt et magnesiumatom. I tillegg har de en lang kjede av karbon- og hydrogenatomer, noe som gjør dem fettløslige.⁷ Alger og fotosyntetiske bakterier har en del ulike typer klorofyllmolekyler, mens i høyere planter er det klorofyll a og b som dominerer (figur 1.1.1).⁶

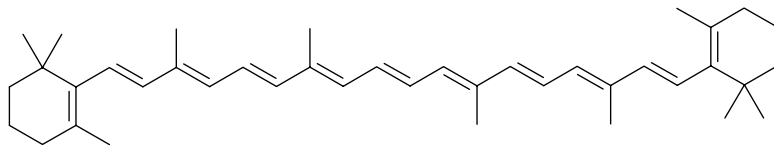


Figur 1.1.1: Strukturen til klorofyll a og b som er vanlig i høyere grønne planter.

Karotenoider gir opphav til de fleste gule og orange fargene i frukt og grønnsaker.⁶ I noen tilfeller, som i tomater, gir de også tydelig røde farger. De forekommer i alle fotosyntetiske organismer, noen mikroorganismer og i enkelte dyr.⁷

Karotenoidene hører til terpenoidene og deles inn i to undergrupper; karotener, som er hydrokarboner, og xantofyller, som i tillegg inneholder oksygen.⁶ I likhet med klorofyller er også karotenoider fettløselige pigmenter. Deres biologiske funksjon er hovedsakelig en konsekvens av deres lysabsorberende egenskaper. De kan delta i fotosyntesen, beskytte mot lysets nedbrytende virkninger og dirigere lysrettet bevegelse.⁷

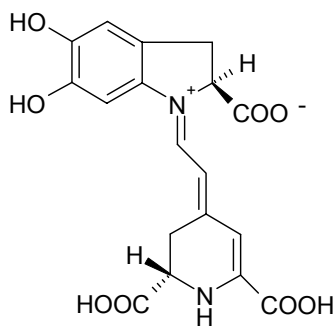
β -karoten (figur 1.1.2) er en viktig karotenoide hos dyr, da denne forbindelsen er råstoff for framstillingen av vitamin A. Den orange fargen hos gulrot skyldes dette pigmentet og gjør grønnsaken til en verdifull vitaminkilde.⁷



Figur 1.1.2 Strukturen til β -karoten som finnes i gulrøtter.

Betalainer gir opphav til røde og i mer sjeldne tilfeller gule farger.⁶ De finnes i blomster, frukt, blader og rotknoller og er bare funnet i omkring 10 plantefamilier.⁹ I motsetning til klorofyller og karotenoider er betalainene vannløselige pigmenter.⁶

Fargen er avhengig av hvilken av de to undergruppene av betalainer forbindelsen tilhører. Betacyaninene har en rødlilla farge som er spesielt godt synlig i rødbeter. Betaxantinene er mer sjeldne og gir opphav til gulfarger. I tillegg spiller pH-verdien på omgivelsene inn på fargenyansene.⁶

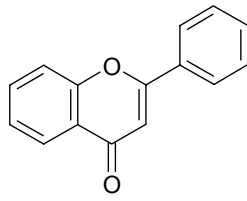


Figur 1.1.3 Strukturen til betanidin som finnes i rødbeter.

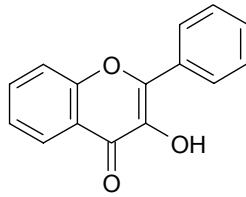
Flavonoider er vannløselige forbindelser som gir opphav til et vidt spekter av farger, fra gult og orange til rødt og blått. De finnes omtrent bare i høyere planter og i noen typer bregner og moser.¹⁰

Biologisk spiller flavonoidene en viktig rolle i insektpollinering.¹¹ Insekter og dyr, da spesielt fugler, tiltrekkes av fargene og bidrar til å spre frø og pollen over lengre avstander.¹ Egenskapene og utbredelsen til flavonoider gjør dem til gode taksonomiske markører.¹⁰

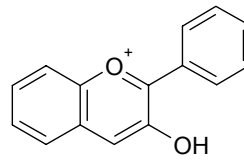
Strukturmessig er flavonoidene basert på et C_{15} grunnkjelett. Dette består av to aromatiske ringer, A og B, som er knyttet sammen med en C_3 bro. Broen kan enten være åpen eller inngå som del av en tredje ring, C-ringen. Tilknytningspunktet til B-ringen, oksidasjonsnivået på C-ringen og antall monomere enheter som er involvert varierer hos de ulike gruppene av flavonoider.¹⁰ De mest utbredte gruppene av flavonoider er vist i figur 1.1.4. En av disse er antocyaner (se avsnitt 1.2).



Flavon



Flavonol



Antocyanidin

Figur 1.1.4 Strukturen til de mest utbredte gruppene av flavonoider.

1.2 Antocyaner

Antocyaner er pigmenter som gir farge til en rekke ulike planter. Fargene kan variere fra lys rosa gjennom rød, lilla og til mørk blå.¹²

Antocyaner finnes stort sett bare i høyere planter, med unntak av noen få bregner og moser. Pigmentene finnes mest i frukt, bær og blomster, men også i noen planters bladverk, stengler og røtter. I tillegg kan de forekomme i pollen og yngleknopper.⁷

1.2.1 Struktur

Antocyaner er en undergruppe av flavonoidene, beskrevet i avsnitt 1.1.¹³ De består av et aglykon (antocyanidin) som er substituert med en eller flere sukkerenheter (glykosidenheter). I tillegg kan det være syregrupper (acylenheter) bundet til sukkerenhetene.¹²

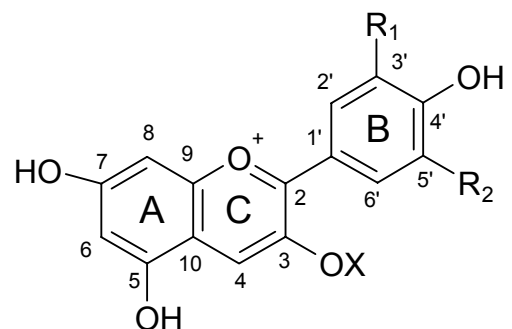
Aglykonet

Aglykonene er polyhydrokso- og polymetoksyderivater av 2-fenylbenzopyrylium (flavylium kation).¹⁴ Strukturen består av to aromatiske ringer, A og B, som er bundet sammen ved en O-heterosyklisk ring, C-ringen. Disse ringene gir til sammen 15 karbonatomer som er nummerert som vist i figur 1.2.1.1.

Tross i at det er identifisert 30 ulike typer aglykon er omtrent samtlige av de rapporterte antocyanene (over 600) basert på bare seks av disse.¹⁵ Figur 1.2.1.1 gir en oversikt over strukturen til de seks aglykonene. Det er substituentene på karbon 3' og 5' som gir opphav til ulikhetene, avhengig av om de er hydrogen, hydrokso- eller metoksygrupper.

Aglykon		R ₁	R ₂
Pelargonidin	Pg	H	H
Cyanidin	Cy	OH	H
Peonidin	Pn	OCH ₃	H
Delfinidin	Df	OH	OH
Petunidin	Pt	OCH ₃	OH
Malvidin	Mv	OCH ₃	OCH ₃

Figur 1.2.1.1 Strukturen til de seks vanligste aglykonene.
X; sukker.



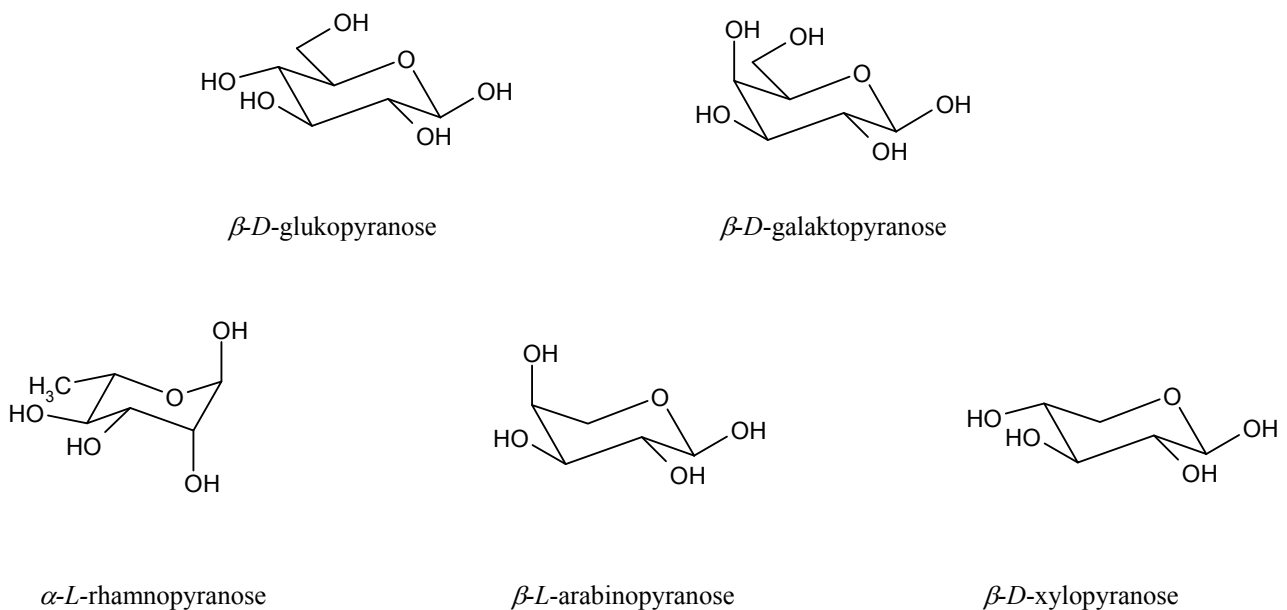
Sukkerenheter

Antocyaner har en eller flere sukkergrupper knyttet til aglykonet. Sukkergruppene øker stabiliteten og vannløsligheten til antocyanene.¹²

De enkleste antocyanene har bare et sukker i 3-posisjon. Denne posisjonen på aglykonet vil vanligvis være substituert med et sukker. Ved flere sukre vil disse hovedsakelig knytte seg til 5-posisjonen og mer sjeldent til 7-, 3'-, 4'- eller 5'-posisjon.¹⁶

De vanligste antocyanidinglykosidene er 3-monosider, 3-biosider, 3-triosider i tillegg til 3,5-diglukosider og mer uvanlig 3,7-diglukosider. I sjeldnere tilfeller er det også funnet andre kombinasjoner.¹⁴

Det vanligste monosakkaridet hos antocyaner er glukose, men galaktose, rhamnose, arabinose og xylose forekommer også ofte (figur 1.2.1.2).¹⁶

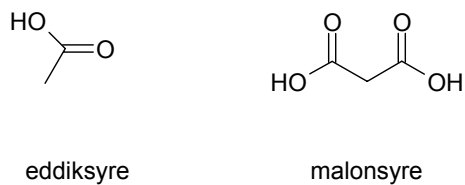


Figur 1.2.1.2: Strukturene til de vanligste monosakkaridene i antocyaner.

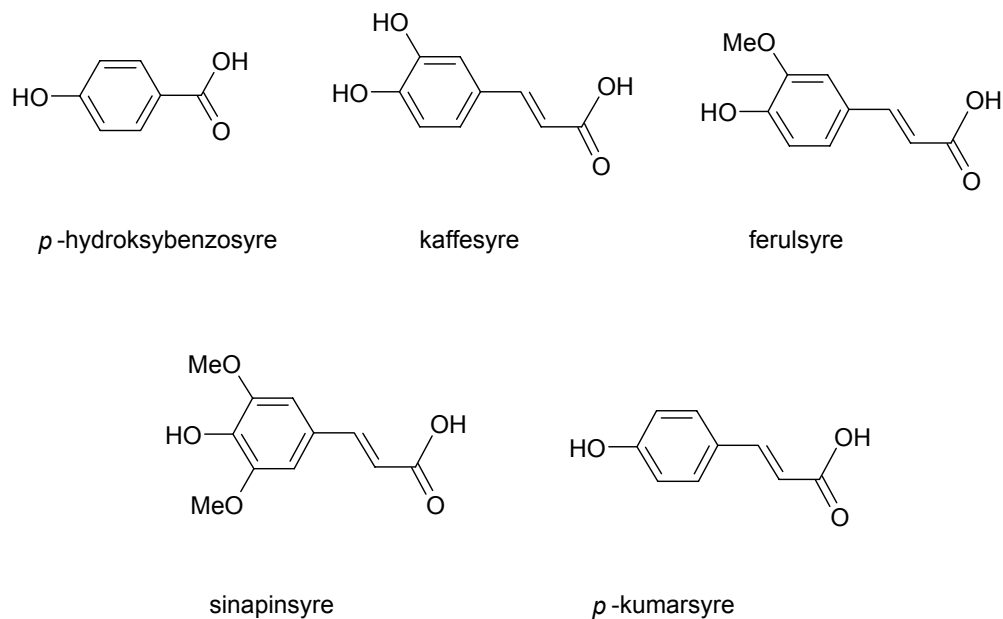
Syreenheter

Mange antocyaner er acylert med alifatiske eller aromatiske syregrupper. Syrene er aldri knyttet direkte til aglykonet, men til sukkerenhetene. Karboksylgruppen til syren danner en esterbinding med en av hydroksygruppene til sukkeret. Acylgruppen er vanligvis bundet til sukkeret i 6-posisjon, men 2-, 3- og 4-acylering forekommer også.¹²

De vanligste alifatiske syrene er malonsyre og eddiksyre (figur 1.2.1.3), mens de vanligste aromatiske syrene er *p*-kumarsyre, kaffesyre, ferulsyre, sinapinsyre og *p*-hydroksybenzosyre (figur 1.2.1.4).¹²



Figur 1.2.1.3: Strukturer til de vanligste alifatiske syrene i antocyaner.



Figur 1.2.1.4: Strukturer til de vanligste aromatiske syrene i antocyaner.

1.2.2 Stabilitet og farge

Antocyanenes variasjon i farge bestemmes av en rekke faktorer. Spesielt pigmentets struktur sammen med pH, intra- og intermolekylær kopigmentering, metallkompleksring og konsentrasjon er avgjørende. Også stabiliteten er avhengig av pH, men temperatur og tilstedeværelse av oksygen påvirker her i stor grad.¹⁷

Type antocyanidin

Ved en pH lavere enn 3 vil antocyaner i vandig løsning foreligge som flavyliumion (figur 1.2.2.1). Fargen bestemmes da hovedsakelig av type aglykon. De vanligste aglykonene skiller seg fra hverandre ut fra substituentene på B-ringene. Adsorpsjonsspektre av ulike antocyaner har vist at økende antall hydrokso- og metoksogrupper på B-ringene gir en økning i λ_{\max} , noe som resulterer i en mer blålig farge. Dette fører til at i vandige løsninger med pH lavere enn 3 vil pelargonidinderivater i utgangspunktet være rødorange, peonidin- og cyanidinderivater røde og delphinidin-, petunidin- og malvidinderivater rødfiolette.^{7, 17}

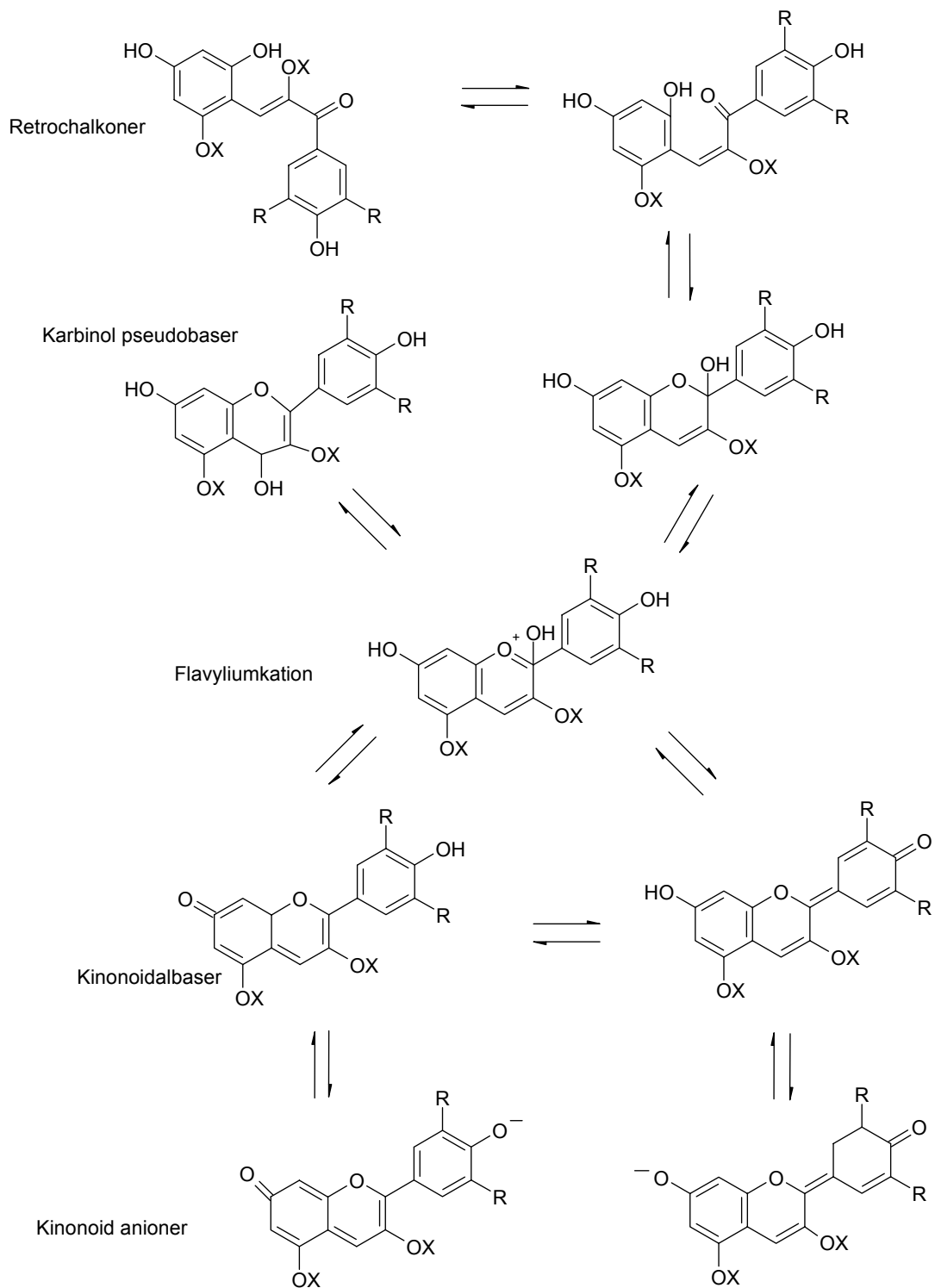
pH-miljø

Antocyaner er ustabile med hensyn på pH, og variasjon av denne gir ulike likevektsformer. Dette resulterer i at samme antocyan kan gi opphav til et spekter av ulike farger.⁷

Ved pH lavere enn 3 vil som nevnt det positivt ladete flavyliumionet dominere. Dersom pH økes vil det oppstå en konkurranse mellom en kinetisk og en termodynamisk reaksjonsvei.¹²

Den kinetiske reaksjonen innebærer et nukleofilt vannangrep i 2- og 4-posisjon på flavyliumionet. Dette gir opphav til en fargeløs karbinol pseudobase som ved ringåpning gir gule retrochalconer.¹²

Den termodynamiske reaksjonen skjer ved en protonoverføringsreaksjon relatert til de sure hydroksogruppene. Dette innebærer at flavyliumionet avgir et proton og det dannes en mer lilla kinonoidalbase. Ved pH mellom 6 og 7 skjer en videre deprotonering av kinonoidalbasen. Det dannes da et resonansstabilisert kinonoid anion med en mer blålig farge.¹²



Figur 1.2.2.1: Vanlige likevektsformer for antocyaner i vandig løsning. X angir glukosyl og R angir H, OH eller OCH₃.

Temperatur og oksygen

Som nevnt innledningsvis spiller også temperatur og tilstedeværelse av oksygen viktige roller i forhold til stabilitet. Ved lagring av antocyaner i vandige løsninger vil de sakte oksideres.¹² Økt temperatur og eksponering for lys vil gi en raskere degradering.¹⁷

Kopigmentering

Planters celleda har vanligvis en pH mellom 3 og 7. Ut fra beskrivelsene tidligere vil en da forvente at antocyanene foreligger som fargeløse karbinolbaser før de omdannes til chalkon former. De kan altså ikke alene stå for de røde og blålige fargene i planter, men får hjelp av et fenomen kalt kopigmentering.¹²

Ved intramolekylær kopigmentering hindrer tilstedeværelsen av en eller flere acylgrupper i antocyanmolekylet hydrolysen av flavyliumionet til fargeløse former. Samtidig fremmer det dannelsen av de blålige kinonoidalbasene og deres anion og fører slik til en uventet blålig farge. Antocyaner kan også ha intermolekylær kopigmentering, da med andre molekyler eller antocyaner.¹²

Metallkompleksring

Fenoliske forbindelser med to nabohydroksylgrupper på aglykontes B-ring kan danne komplekser med enkelte metallioner. Antocyaner som er basert på cyanidin, delphinidin eller petunidin kan slik gi en mer blålig farge enn ventet.⁷

Konsentrasjon

Mengden av antocyaner i en plante påvirker også fargen. Dersom en sammenligner to planter med samme type antocyan kan disse derfor likevel ha ganske ulik farge. Fargen vil bli betydelig mørkere ved økt konsentrasjon. Samme antocyan kan slik i noen tilfeller gi lyseblå blomster og i andre tilfeller mørkelilla.⁷

1.2.3 Biosyntese

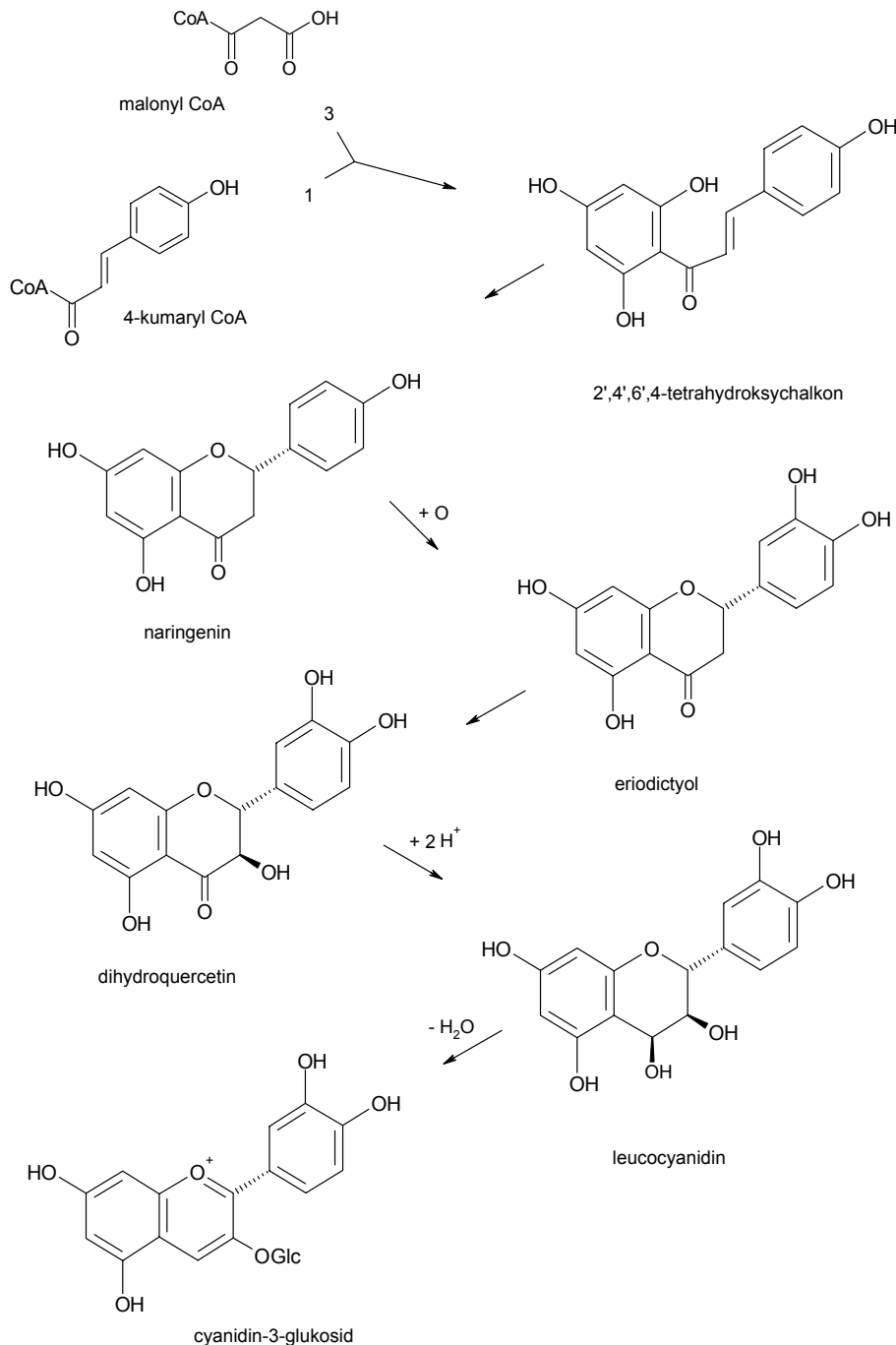
Antocyaner dannes ved en kombinasjon av to ulike synteseveier. B- og C-ringen i aglykonet er et derivat fra shikimisyre, mens A-ringen dannes via polyketidveien.¹³

Det første steget i biosyntesen av alle flavonoider er kondensasjon av 4-kumerat CoA med tre malonyl CoA-enheter for å gi 2',4',6',4-tetrahydroksychalcon. Denne reaksjonen katalyseres av enzymet chalcone synthase. Chalkonet isomeriseres så til flavanonet naringenin ved hjelp av enzymet chalcon isomerase. Naringenin er et nøkkelintermediat og kan gi opphav til en rekke ulike sluttprodukt.¹³ Figur 1.2.3.1 viser biosyntesen av cyanidin 3-glukosid, som er et av de enkleste antocyanene. Biosyntesen av dette antocyanet er videre brukt som eksempel.

I syntesen av cyanidin 3-glukosid oksideres B-ringen til å gi eriodictyol. Dette molekylet oksideres så i 3-posisjon og gir dihydroquercetin. Karbonylenhetene i 4-posisjon reduseres

deretter til hydroksylenheter og gir leucocyanidin. Leucocyanidin er et ustabil intermediat som kan foreligge som ulike stereoisomere. En av disse isomere oksideres og danner cyanidinmolekylet. Dette skjer ved hjelp av ulike enzymer.¹³ Nøyaktig hvilke er det fremdeles noe tvil om.

Biosyntesen av andre antocyaner ligner i stor grad på syntesen av cyanidin 3-glukosid. Hvilke enzymer som er involvert er en avgjørende faktor for hvilket antocyan som til slutt dannes.



Figur 1.2.3.1: Biosyntese av cyanidin 3-glukosid.

1.2.4 Naturlig forekomst og funksjon

Antocyaner finnes som nevnt hovedsakelig bare i høyere planter i tillegg til noen få bregner og moser. Det er mest av pigmentene i frukt, bær og blomster, men de forekommer også i noen planters bladverk, stengler og røtter. I sjeldnere tilfeller er de også å finne i pollen og yngleknopper.⁷

Vanligvis vil antocyaner finnes jevnt fordelt i løsning i cellenes vakuoler. I noen planter derimot foreligger de i adskilte deler av vakuolene, i såkalte AVI (anthocyanic vacuolar inclusion). En slik akkumulasjon av antocyaner har innvirkning på fargen ved at det fører til en økt intensitet og økt blåfarge.¹⁸

I naturen spiller antocyanene en viktig rolle i spredningen av frø og pollen, da de sterke fargene deres tiltrekker insekter og fugler. Det er også observert at antocyanmengden i planter øker når de utsettes for stressfaktorer som ekstreme lys- og temperaturforhold eller angrep fra sopp og virus. Det antas derfor at antocyaner også har en beskyttende funksjon.¹

Det er fremdeles mye uoppgaget innen feltet naturstoffkjemi, som er i stadig utvikling. Dette gjelder også for arbeidet med antocyaner. Antall identifiserte antocyaner øker raskt og en oppdager stadig nye strukturer. Det arbeides også med å bedre forståelsen av deres funksjon i naturen og hvordan vi mennesker kan gjøre best mulig nytte av dem.

1.2.5 Menneskenes bruk og nytte av antocyaner

Medisinsk er det dokumentert at antocyaner har positiv virkning på kapillærårene. De medvirker også til at blodplater ikke klumper seg og reduserer dermed faren for blodpropp. Fargestoffene i blåbær er dessuten brukt til å lege brannsårl¹⁹.

Det er en rekke prosjekteter på gang som arbeider med den medisinske nytten av antocyaner, hvor både kreft- og HIV-forskningen er involvert.

En av de store utfordringene i arbeidet med antocyaner er å forstå deres oppførsel *in vitro* i forhold til *in vivo*. Naturen er så komplisert at en aldri med sikkerhet kan si at antocyaner oppfører seg på samme måte i en kompleks organisme som de gjør i ren form på et laboratorium.

En viktig egenskap ved antocyaner er fargene, noe som gir dem stor estetisk verdi. Mange land er i det siste blitt skeptiske til den store bruken av kunstige fargetilsetningsstoffer i mat, og et naturlig alternativ er ønskelig. Her har antocyanene et stort potensiale, men det ligger fremdeles en del utfordringer med hensyn på stabiliteten før de kan brukes i utbredd grad.^{1,14}

1.3 Plantene i oppgaven

Callistemon citrinus



Callistemon citrinus, tidligere kalt *C. lanceolatus*, er en busk i familien *Myrtaceae*.²⁰ Den blomstrer tidlig på sommeren med mange avlange røde blomster som sitter tett sammen.²¹

Callistemon citrinus er utbredt i store deler av Australia²¹ og de tropiske områdene av Afrika²². Den tåler dårlig temperatur lavere enn 20°C og vokser derfor bare i varmere områder.²³

I tidligere arbeid med å identifisere antocyaner i *Callistemon citrinus* er det funnet 3,5-diglukosider cyanidin og pelargonidin³ og cyanidin 3-glukosid².

Phyllanthus ovalifolia



Phyllanthus ovalifolia hører til familien *Euphorbiaceae*, som er satt sammen av både busker, trær og urter.²⁴

Phyllanthus ovalifolia er en relativt stor busk med lange bladdekkede greiner. Under disse vokser det grønne bær, som får en blålilla farge når de modnes.²²

Planten brukes hovedsakelig som brennved og staur, mens bærene benyttes til å farge palmeblader.²⁵

Det er utført et arbeid på analyse av antocyaner i *Phyllanthus ovalifolia* som indikerer at bærene inneholder cyanidin- og delfinidinderivater.⁵ Dette arbeidet er basert på HPLC og UV/synlig-spektroskopi data og gir ingen strukturoppklarende konklusjon.

Jacaranda mimosifolia



Jacaranda mimosifolia er et tre i familien *Bignoniaceae*.²⁶ Det har klokkeformede blomster med en blålilla farge.²⁷

Jacaranda mimosifolia vokser i de fleste jordsmonn med unntak av de spesielt fuktige sumpområdene. Den har dype røtter og foretrekker høylandsområder. *Jacaranda mimosifolia* er utbredt i tropiske områder.²⁷

I tidligere arbeid med å identifisere antocyaner i *Jacaranda mimosifolia* blir det påvist at planten antagelig bare inneholder delfinidin 3,5-diglukosid.⁴ Nyere arbeid basert på NMR-analyser indikerer derimot at planten inneholder et malvidin glykosid og malvidin 3,5-diglukopyranosid, hvorav det siste utgjør hovedpigmentet.⁵

Kapittel 2 - Eksperimentelle metoder og prosedyrer

Det ble benyttet ulike kromatografiske og spektroskopiske metoder under arbeidet med plantene i oppgaven. Antocyanene ble først ekstrahert fra plantematerialet med et egnet ekstraksjonsmiddel og deretter renset. Til dette ble det benyttet et tofasesystem og ulike kolonner. Identifiseringen av pigmentene ble så utført med TLC, HPLC, UV/synligspektroskopi, NMR og MS. Alle disse teknikkene er beskrevet i det følgende kapittelet.

2.1 Ekstraksjon

Plantematerialet som brukes ved ekstraksjon av antocyaner kan enten være ferskt, frosset, tørket eller frysetørket. Det mest brukte ekstraksjonsmiddelet er metanol tilsatt litt syre. Antocyaner har ulike likevektsformer avhengig av pH (fig 1.2.2.1) og syren tilsettes for å sikre at antocyanene foreligger på den ønskede flavyliumionformen. Hvilken syre som brukes er avgjørende for resultatet. Antocyaner som er acylert med alifatiske syrer kan lett undergå syrehydrolyse dersom det brukes for sterke syrer i ekstraksjonen. Sterke mineralsyrer som saltsyre er derfor ikke å anbefale i arbeid med slike pigmenter, eller med ukjente pigmenter generel.¹² Relativt svake organiske syrer, som trifluoreddiksyre (TFA), vil derimot kunne gi bra resultat. TFA fungerer fint til ekstraksjon samtidig som den gir mildere betingelser og er dermed en godt egnet syre til arbeid med antocyaner.²⁸

Prosedyre

Det ble benyttet ferskt plantemateriale til ekstraksjonen. Ekstraksjonsmiddelet var metanol tilsatt 0,5-1 % TFA. Materialet ble ekstrahert i flere omganger med minimal mengde ekstraksjonsmiddel. Det samlede råekstraktet ble filtrert gjennom glassull for å fjerne eventuelle rester av plantemateriale. Ekstraktet ble hele tiden oppbevart mørkt og kjølig for å minimalisere nedbryting av pigmentene.

2.2 Rensing med tofasesystem

I et system bestående av to væsker som ikke er blandbare med hverandre vil det dannes to faser. Væsken med høyest tetthet vil utgjøre den nedre fasen. Dersom et stoff tilsettes dette systemet vil det fordele seg i de to fasene og det oppstår en likevekt. Forbindelsens relative løslighet i de to væskene vil avgjøre hvordan stoffet fordeler seg. Fordelen med en slik væskevæske ekstraksjon er at systemet kan optimaliseres mot type forbindelse det jobbes med. Ved rensing av antocyanholdig plantemateriale brukes ofte et væskesystem bestående av etylacetat og vann.²⁹

Råekstrakt av plantemateriale inneholder polare forbindelser som antocyaner, frie syrer og sukre, i tillegg til upolare forbindelser som klorofyller og karotenoider. Når en vannlig løsning av dette ristes i etylacetat vil de upolare forbindelsene gå over i etylacetatfasen mens antocyanene vil bli værende i vannfasen sammen med de andre polare forbindelsene. Råekstraktet kan slik renses for upolare forbindelser.

Prosedyre

Råekstraktet fra avsnitt 2.1 ble først dampet inn til nesten tørrhet og så tilsatt vann. Dette ble gjort fordi det er ønskelig å holde metanolinnholdet så lavt som mulig. Metanol er løselig både i etylacetat og vann og vil dermed kunne hindre at det dannes et tofasesystem. Ekstraktet ble så ristet i en skilletrakt med lik mengde etylacetat. Etter kort tid dannet det seg to tydelige faser. Den nedre fasen, vannfasen, ble tappet av og så ekstrahert igjen med en ny mengde etylacetat. Vaskingen ble gjentatt til etylacetatfasen var omtrent fargeløs. Det rensede vannekstraktet ble så oppkonsentrert til et mindre volum på rotavapor.

Temperaturen ble hele tiden holdt under 30°C for å minimalisere nedbrytingen. Siste del av inndampingen ble gjort med nitrogen. Når prøven dampes inn, vil metanolen forsvinne først og det relative syreinnholdet i ekstraktet øker dermed. Dette er ikke gunstig for antocyanenes stabilitet. Det er derfor viktig at ekstraktet er helt tørt før det løses opp igjen i metanol med rett syrekonsentrasjon.

2.3 Kromatografiske metoder

Kromatografi er et fellesbegrep for separasjonsmetoder som er basert på prinsippet at stoffene som skal separeres fordeler seg ulikt mellom to faser, hvorav den ene fasen er stasjonær og den andre mobil.³⁰

Prøven som skal analyseres føres med mobilfasen over eller gjennom den stasjonære fasen. Stasjonærfasen kan være festet til en planar overflate, som ved tynnskikt-kromatografi, eller den kan være festet til veggen av en kolonne, noe som er tilfelle ved kolonnekromatografi.³⁰

Mobilfasen kan enten være en gass eller en væske. Kromatografisk system benevnes etter hvilken av disse som brukes. Dersom separasjonen utføres med væske som mobilfase, kalles metoden væskekromatografi.³⁰

2.3.1 Amberlite XAD-7

Amberlite XAD-7 er en svakt polar resin av akrylester med en relativt stor overflate som brukes ved adsorpsjonskromatografi.⁵

Adsorpsjonskromatografi er en kromatografisk metode hvor et finfordelt fast adsorpsjonsmiddel fungerer som stasjonærefase. Mobilfasen kan enten være en væske eller en gass. Siden gass ofte er lite praktisk å bruke, er væske den mest anvendte mobilfasen. En vellykket separasjon er avhengig av at stoffene i prøven har ulik grad av affinitet til adsorpsjonsmiddelet og at interaksjonen mellom adsorpsjonsmiddel og stoff er reversibel. De stoffene som har lavest affinitet beveger seg hurtigere enn de som har høyere og forbindelsene kan slik skilles fra hverandre. Selve affiniteten skyldes krefter som dispersjon, dipol interaksjon, hydrogenbinding og svake kovalente bindinger.³⁰

I arbeid med antocyanholdige prøver benyttes kolonnematerialet Amberlite XAD-7 til å skille ut polare alifatiske forbindelser, som frie sukre og syrer. De aromatiske antocyanene adsorberes til kolonnematerialet til de elueres ut med metanol tilsatt syre.

Prosedyre

Først ble væskefronten senket til rett over kolonnematerialet. Ekstraktet fra avsnitt 2.2 ble så forsiktig applisert jevnt på overflaten av kolonnematerialet med pipette. Deretter ble væskefronten igjen senket slik at prøven fikk festet seg til kolonnematerialet. Det ble skylt med store mengder destillert vann, mens pH-verdien til eluenten ble målt fortløpende. Idet mesteparten av de alifatiske forbindelsene er vasket ut blir eluenten nøytral og vaskingen avsluttes. De gjenværende aromatiske forbindelsene ble så eluert ut med metanol tilsatt 1% TFA. All farget løsning ble samlet opp og dampet inn til et mindre volum på rotavapor og så til tørrhet på nitrogen.

2.3.2 Sephadex LH-20

Sephadex LH-20 er et porøst kolonnemateriale som hovedsakelig separerer etter eksklusjonsprinsippet. Molekyler som er små nok til å trenge inn i hulrommene vil få økt vandringsslengde i forhold til de større molekylene som ikke slipper inn i porene. Økende molekylstørrelse gir dermed avtagende retensjon. Bruk av Sephadex LH-20-kolonne i arbeid med antocyaner indikerer likevel at også andre faktorer enn bare molekylmasser innvirker på elueringsrekkefølgen.³¹

Sephadex LH-20 brukes hovedsakelig til å separere de ulike antocyanene, men renser også ekstraktet noe.

Prosedyre

Det Amberlite XAD-7-rensede materialet fra avsnitt 2.3.1 ble løst i ca 20 ml mobilfase. Væskefronten ble først senket til rett over kolonnematerialet, ekstraktet applisert på overflaten og så ble væskefronten igjen senket for at stoffet skulle trekke ned i kolonnematerialet. Det er viktig at stoffet appliseres jevnt på overflaten for å få en vellykket separasjon. Et reservoar av mobilfase forbundet med kolonnen ble så plassert høyt oppe slik at tilførselen av denne til kolonne skjedde ved hevertprinsippet. Siden antocyaner har tydelige røde eller blålige farger kan en lett se de separerte båndene og samle fraksjoner av disse.

Mobilfasen som ble benyttet besto av metanol og vann tilsatt 0,5 % TFA (volumprosent). Det ble benyttet gradienteluering med økende innhold metanol og dermed avtagende innhold vann. Syreprosenten ble holdt konstant. Lavt metanolinnhold gir best separasjon og det ble derfor startet med en mobilfase med 20:80 sammensetning mellom metanol og vann. Denne ble så endret til 40:60 og til slutt til 70:30. I slutten av elueringen vil båndene ofte være så tydelig separert at høyt metanolinnhold ikke er noe problem. Det vil være direkte fordeler ved å bruke et høyt metanolinnhold mot slutten, da antocyaner er ustabile og et høyt metanolinnhold gir en raskere eluering.

Fraksjonene ble dampet inn til mindre volum på rotavapor og så til tørrhet på nitrogen.

2.3.3 Toyopearl HW-40F

Toyopearl HW-40F er et kolonnemateriale som i enda større grad enn Sephadex LH-20 separerer på eksklusjonsprinsippet (se avsnitt 2.3.2).³¹ Forbindelsene separeres altså hovedsakelig etter størrelse. Materialet brukes til å separere antocyaner i en prøve. Toyoperl-HW-40F ble her benyttet etter Sephadex LH-20 og da bare på noen få fraksjoner som ikke så ut til å være helt rene.

Prosedyre

Selve prosedyren er identisk med den for Sephadex LH-20-kolonnen (se avsnitt 2.3.2). Væskefronten ble senket, stoffet applisert jevnt på overflaten av kolonnematerialet, væskefronten senket igjen og så ble elueringen satt i gang. Ved start besto mobilfase av 20 % metanol og 0,5 % TFA i vann. Metanolinnholdet ble så økt og vanninnholdet senket tilsvarende, mens syreinnholdet ble holdt konstant, som ved eluenten benyttet på Sephadex LH-20-kolonnen.

Fraksjonene ble igjen samlet opp etter bånddannelse, men siden det bare ble applisert noen få fraksjoner etter Sephadex LH-20-rensingen, dannet det seg tydelig færre bånd på Toyopearl HW-40F-kolonnen.

Fraksjonene ble dampet inn til et mindre volum og så til tørrhet på nitrogen, før de ble benyttet i videre analyse.

2.3.4 TLC (Tynnskiktkromatografi)

Thin Layer Chromatography, forkortet TLC, er en mye brukt analysemetode også i arbeid med antocyaner. Fordelen med TLC er at det raskt gir resultater samtidig som bare en liten mengde stoff er nødvendig. Utstyret som kreves er dessuten minimalt og analysen er enkel å utføre. I TLC er mobilfasen en væske og stasjonærfasen ligger som et tynt sjikt på en flat underlagsplate av glass, plast eller metall.³⁰

Prinsippet for TLC er adsorpsjonskromatografi (se avsnitt 2.3.1). Prøver og standarder applikeres på stasjonærfasen før TLC-platen settes i et kar med mobilfase og en mettet atmosfære av denne. Mobilfasen vil trekke oppover platen ved hjelp av kapillærkrefter. Komponentene transporteres med mobilfasen, men samtidig vil stasjonærfasen retardere dem. Når komponentene har ulik affinitet til stasjonærfasen, vil de retarderes forskjellig og slik separeres.³⁰

Vandringen til en bestemt forbindelse i et bestemt løsemiddel blir beskrevet med en retardasjonsfaktor, en R_f -verdi, som er definert som følgende:

$$R_f = L_s / L_{mf}$$

L_s : stoffets vandringsavstand fra startlinjen til flekkens senterpunkt

L_{mf} : avstanden fra startlinjen til mobilfasefronten

Som stasjonærfase ble det benyttet plater av plastikkfolie med et 0,1 mm lag cellulose F (Merck).

Det ble benyttet to typer mobilfase, FHW og BAW.

FHW består av metansyre, saltsyre og vann, her i forholdet 1:1:2. Vandringen til antocyanene bestemmes i denne mobilfasen av ulike faktorer. Ved antocyaner med lignende struktur vil økende antall hydrokso- og metokso grupper på B-ringen gi lavere R_f -verdi. Sammenlignet vil hydroksylering ha større effekt enn metoksylering.²⁸ Aromatisk acylering fører til en senking av R_f -verdien mens alifatisk acylering gir en tilsvarende økning.³² R_f -verdien øker generelt med antall sukkerenheter. Ved 3-monoglykosider av antocyaner vil type sukker ikke ha særlig innvirkning på R_f -verdien, mens ved diglykosider av antocyaner påvirkes R_f -verdien av hvilken posisjon sukkerenhetene er knyttet i, interglykoside bånd og type sukker.²⁸

BAW består av 1-butanol, eddiksyre og vann i forholdet 4:5:1. Med BAW som mobilfase vil R_f -verdien øke ved addisjon av acylenheter og avta med økende antall sukkerenheter.³²

Alle disse elementene kan sammen gi en del informasjon om type antocyan. Dette er likevel generelle trender og spesielle kombinasjoner av substitusjonsgrupper kan gi opphav til motstridende resultater.

Siden antocyaner har tydelig røde og blålige farger kan de ved TLC detekteres visuelt.

Prosedyre

R_f -verdier varierer blant annet avhengig av platetykkelse. Det brukes derfor ofte standarder. Solbærekstrakt, som er en godt egnet standard ved arbeid med antocyaner, ble her benyttet. Prøvene og standard ble løst i metanol tilsatt 0,5 % TFA. De ble applikert ved bruk av kapillærrør ca 1 cm over nedre kant av TLC-platen og med omtrent 1 cm avstand mellom hver prøve. Etter at løsemiddelet var dampet av ble platen satt ned i et kar med mobilfase. Det er viktig at væsknivået i karet er lavere enn applikeringspunktene på TLC-platen. For å unngå fordampning av mobilfasen og for å beholde en mett atmosfære ble det lagt et lokk over karet.

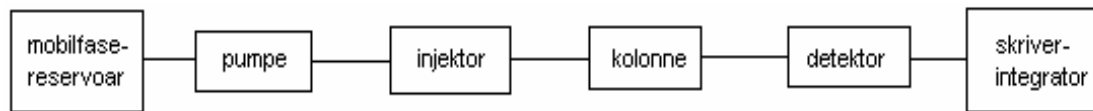
Mobilfasen trakk oppover TLC-platen. Platen ble fjernet fra karet idet væskefronten var noen få cm fra øvre kant. R_f -verdiene ble så beregnet ved å lese av vandringslengder med linjal.

2.3.5 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

HPLC har en stor fordel både når det gjelder følsomhet og resolusjon i forhold til andre kromatografiske metoder.³³ I tillegg er analysene raske og det kreves ikke store mengder stoff.

HPLC kan deles inn i analytisk og preparativ skala. Preparativ HPLC benyttes til rensing og separasjon av forbindelser, mens analytisk benyttes til å bestemme ulike egenskaper ved prøven, som sammensetning og renhet. Det ble bare benyttet analytisk HPLC i dette arbeidet.

Et HPLC-instrument består grovt sett av følgende komponenter:



Figur 2.3.5.1: Generell sammensetning av et HPLC-instrument.

Mobilfasen pumpes først gjennom kolonnen under høyt trykk. Prøven injiseres og komponentene fordeler seg ulikt mellom mobil- og stasjonærfasen. Forbindelsene vil dermed separeres og til slutt gå gjennom en detektor.

HPLC kan utføres som normal fase eller som omvendt fase kromatografi, avhengig av type kolonne. Den mest brukte kolonnetypen er basert på omvendt fase kromatografi med kjemisk bundet stasjonærfase. I omvendt fase kromatografi er stasjonærfasen upolar mens mobilfasen er polar.³⁰ Det ble i disse HPLC-analysene benyttet omvendt fase kromatografi.

HPLC-analyser kan enten utføres isokratisk eller ved gradient analyse. Ved isokratisk analyse holdes sammensetningen av mobilfasen konstant, mens den ved gradient analyse endres underveis. Det ble her benyttet gradient analyse. For å få best mulig separasjon, er det vanlig å bruke en gradient som gir mobilfasen en økende affinitet til stasjonærfasen utover i kjøringen.³⁴ Siden det her ble benyttet omvendt fase ble det startet med en mobilfase med høy polaritet for så å gå mot laverer polaritet.

Det ble benyttet en UV-detektor. UV-detektorer er selektive for forbindelser som absorberer lys ved bølglengder over 190 nm. De er svært følsomme og egner seg godt til gradienteluering.³⁰ Detektoren er basert på måling av absorbert lys i følge Beers lov:

$$A = \log(I_0/I) = \varepsilon * b * c$$

A: Absorbans målt i absorbansenheter (AU)

ε : Molar absorptivitet (L/mol cm)

b: Lysvei (cm)

c: Konsentrasjon (mol/L)

UV-detektoren som ble benyttet var av typen diode-array. I en slik detektor sendes polykromatisk hvitt lys gjennom prøvecellen, vanligvis fra en deuteriumlampe. Etter prøvecellen splittes det transmitterte lyset i et gitter av de enkelte bølglengdene og intensiteten til hver av disse måles. Slik kan hele bølglengdeområdet detekteres samtidig.³⁰

Selve kromatogrammet kan vises på ulike måter. I datasystemet som her ble benyttet ble kromatogrammet vist todimensjonalt med retensjonstid vannrett og absorbans loddrett. Fire bølglengdeintervallet ble valgt:

A: 520 ± 20 nm

B: 360 ± 10 nm

C: 320 ± 10 nm

D: 280 ± 10 nm

Antocyaner har absorpsjonsmaksima rundt 520 nm og dette området er derfor valgt til A-vindu. De fleste aromatiske forbindelser absorberer dessuten rundt 280 nm. D-vinduet er derfor valgt rundt denne bølgelengden for å kunne si noe om renheten til prøven.

Separasjon av antocyaner:

UV-spektre kan gi mye informasjon om antocyaner i en prøve. Dette er omhandlet under spektroskopiske metoder i avsnitt 2.4.1.

Retensjonstidene fra kromatogrammene er også svært nyttige. Det er dokumentert noen generelle trender for hvordan antocyaner retarderes på omvendt fase kolonne:¹⁴

De ulike aglykonene defineres ut fra substitusjonen på B-ring. Hydroksygrupper øker mobiliteten mens metoksygrupper senker mobiliteten. Økningen i retensjonstid for hver ny metoksygruppe er litt mindre enn minkingen i retensjonstid på grunn av introduksjon av en hydroksygruppe. Dette gir følgende elueringsrekkefølge: delfinidin < cyanidin < petunidin < pelargonidin < peonidin < malvidin.¹⁴ Parene cyanidin/petunidin og peonidin/malvidin er ofte vanskelige å skille.

Til aglykonet er det knyttet sukre. Glykosylering vil generelt øke mobiliteten til et pigment. I tillegg påvirker substitusjonspunktene, og en får følgende elueringsrekkefølge: 3,7-diglykosider < 3,5-diglykosider < 3-glykosider. Denne regelen er ikke helt konsekvent, siden også type sukker har innvirkning på pigmentets mobilitet. For eksempel vil 3-galaktosider elueres før 3-glukosider som igjen elueres før 3-arabinosider.¹⁴

Acylering av pigmentene gir økt retensjon. Det er polariteten til syrene som da avgjør elueringsrekkefølgen.¹⁴

Ekspérimentelt

Følgende utstyr ble benyttet:

Instrument:	Hewlett-Packard – 1050 HPLC-system med 1050-DAD (diode-array-detektor)		
Programvare:	HP-Chemstation		
Kolonne:	ODS Hypersil 5 μ , 250 x 4 mm		
Injeksjonsvolum:	10-12 μ l		
Flow:	0,75 ml/min		
Trykk:	rundt 100 bar ved start av hver kjøring		

Mobilfase A:	H ₂ O:HCOOH	i forhold 9:0,5
Mobilfase B:	H ₂ O:MeOH:HCOOH	i forhold 4:5:0,5

Gradient 1:	0-17 min.	10% - 100% B i A	(lineær)
	17-23 min.	100% B	(isokratisk)
	23-24 min.	100% - 10% B i A	(lineær)

Gradient 2:	0-23 min.	10% - 100% B i A	(lineær)
	23-28 min.	100% B	(isokratisk)
	28-29 min.	100% - 10% B i A	(lineær)

Gradient 1 ble benyttet ved kjøring av *Callistemon citrinus* og *Jacaranda mimosifolia*, mens gradient 2 ble benyttet under arbeidet med *Phyllanthus ovalifolia*.

I analysen av *Callistemon citrinus* ble det injisert 12 µl, mens det i analysen av *Jacaranda mimosifolia* og av *Phyllanthus ovalifolia* ble injisert 10 µl. Dette skyldes at HPLC-injektoren ble byttet mellom disse analysene.

Til hjelp i analysen, og for å teste stabiliteten til systemet, ble det kjørt standarder med kjente forbindelser i tillegg til prøvene. Det ble benyttet et solbærekstrakt som standard. Ved mange kjøringene samme dag ble standarden injisert med jevne mellomrom for å kontrollere at retensjonstidene holdt seg konstant.

2.4 Spektroskopiske analysemetoder

Historisk sett refererer begrepet spektroskopi til en gren av vitenskapen der synlig lys løses opp i dets ulike bølgelengder for å gi et spekter. Disse spektrene var plot av strålingsintensitet mot bølgelengde eller frekvens. I moderne tid ble begrepet utvidet til å inkludere ikke bare stråling fra synlig lys, men også andre typer elektromagnetisk stråling. Eksempler på disse er røntgenstråler, UV og IR. I den siste tida er begrepet blitt enda mer utvidet og omfatter nå også teknikker som massespektrometri, som ikke en gang bruker elektromagnetisk stråling.³⁵

Spektroskopiske metoder kan være svært nyttige i strukturbestemmelse av molekyler. I arbeid med antocyaner er det spesielt UV/synlig-spektroskopi, NMR og MS som benyttes.

2.4.1

UV/synlig-spektroskopi

UV/synlig-spektroskopi er en metode som måler mengde lys absorbert ved en eller flere gitte bølgelengder. Når et molekyl tilføres energi i form av lys kompenserer dette for opptaket ved å eksitere elektroner fra orbitaler med lav energi til orbitaler med høyere energi. For at molekylet i det hele tatt skal kunne absorbere strålene må energien til lyset tilsvare den nøyaktige energidifferansen mellom orbitalene. Dette fører til at ulike forbindelser gir opphav til karakteristiske spektra.⁸

UV/synlig-spektroskopi er en nyttig analysemetode ved strukturbestemmelse av antocyaner. Den kan gi sterke indikasjoner både på hvilke elementer antocyanet er satt sammen av og posisjonen til disse.

Antocyaners absorpsjon i det synlige området skyldes konjugasjon mellom det sentrale heterosykliske systemet (C-ringen) og de to benzenringene (A- og B-ringene).

Hydroksylerings- og metoksyleringsmønstret til B-ringene er avgjørende for absorpsjonen i det synlige området. Hydroksy- og metoksygrupper har omtrent samme effekt. Dette fører til at antocyaner med tilsvarende substitusjonsmønster på B-ringene har omtrent lik absorpsjon i det synlige området.²⁸ Tabell 2.4.1.1 viser området for maksimal synlig absorpsjon til enkle antocyaner uten acylering detektert *on-line* HPLC-analyse.

Tabell 2.4.1.1 Enkle antocyaners absorpsjon av synlig lys. Verdiene er fra UV/synlig-spektre detektert *on-line* under HPLC-analyse.²⁸

Aglykon	$A_{\text{vis,max}}$ (nm)
Pg	500-502
Cy, Pn	516-518
Dp, Mv, Pt	524-526

Sukkersubstitusjonen ser ikke ut til å ha særlig innvirkning på maksimal absorpsjonen i det synlige området. Dette slår derimot ut i andre deler av spekteret. Når 5-posisjonen i et antocyan ikke er substituert, gir dette en økt absorpsjon rundt 440 nm og slik en svak topp. Resultatet av dette er at ratioen $A_{440}/A_{\text{vis,max}}$ er dobbelt så stor for 3-glykoksider som for 3,5-diglykoksider.²⁸ En $A_{440}/A_{\text{vis,max}}$ rundt 20-40 % indikerer 3-substitusjon mens en ratio under 20 % indikerer 3,5-substitusjon.⁵ Dette fenomenet er nyttig i bestemmelsen av tilknytningspunktet til sukre, siden antocyaner med substitusjoner i andre posisjoner enn 3 og 5 er relativt sjeldne. Det gir likevel ikke noen direkte bekreftelse, siden muligheten for andre substitusjonsmønstre er til stede.²⁸

Acylering av antocyanet med aromatiske syrer gir en økt absorpsjon i UV-området. Alifatiske syrer derimot gir ingen utslag i UV/synlig-spekteret.²⁸

2.4.2 NMR spektroskopi (Nuclear Magnetic Resonance spektra)

NMR er en av de mest eksakte og derfor også en av de viktigste teknikkene i strukturbestemmelse av organiske molekyler. I NMR måles atomkjernenes absorpsjon av elektromagnetisk stråling. Nesten alle elementer har en isotop med et observerbart magnetisk moment, men på grunn av lav forekomst eller γ (magnetisk ratio) er det bare noen få kjerner som det vanligvis måles på.³⁶ I analyse av antocyaner er det atomkjernene til ^1H og ^{13}C som detekteres.

Selve absorpsjonsfrekvensen til et atom vil være avhengig av type kjerne i tillegg til dens magnetiske og dermed kjemiske miljø. Antall naboatom og deres plassering har innvirkning på frekvensen. En får dermed informasjon om alle disse faktorene og kan ut fra dette gjengi en nøyaktig struktur.

Prosedyre

Det er veldig viktig at både prøve og utstyr er rent og tørt ved tillaging av en NMR-prøve. Bare litt urenheter vil kunne gi betydelig og ofte forvirrende utslag. Så lavt vanninnhold som mulig er ønskelig fordi vannsignalet ellers vil være forstyrrende både under analysen og i det endelige spekteret.

Stoffprøver som skulle brukes til NMR ble derfor plassert i eksikator under vakuum sammen med NMR-rør og pipetter. Det ble brukt NMR-rør av typen Wilmad 528. Etter tørking ble prøven løst i deuterert metanol tilsatt 0,5 % deuterert trifluoreddiksyre (TFA). Det brukes deutererte forbindelser for å unngå forstyrrende signal fra protonene i løsemiddelet. Problemet med bruk av deutererte løsemiddel er at protoner i antocyanet vil kunne byttes ut med deuterium. Denne utbyttingen skjer spesielt raskt med protoner i hydroksygrupper, og disse vil derfor ikke vises i spektrene.³⁶ I lengden vil også andre protoner kunne byttes ut og prøven oppbevares derfor i fryser for å minke utbyttingshastigheten.

Eksperimentene ble utført på et Bruker DRX 600 MHz instrument ved Universitetet i Bergen. Protonfrekvens for opptak var 600 MHz og karbonfrekvensen var 150 MHz. Temperaturen var 298 K. Til prosessering ble programmet X-Win-NMR benyttet.

Eksperimentelle metoder

Det ble utført både endimensjonelle (1D) og todimensjonelle (2D) eksperiment, hvor det ble målt både på proton og på karbon. I et 1D eksperiment angir x-aksen frekvens og y-aksen signalstyrke. I et 2D eksperiment angir begge aksene frekvenser mens signaler vises som diagonal- og krysstopper.

I 1D eksperiment måles det bare på en kjerne. I et proton 1D spekter vises altså bare signaler fra protoner, mens det i et 1D karbonspekter bare vises signaler fra karbonatomer. Proton spektre kan være veldig nyttige i arbeid med antocyaner. De gir ofte sterke indikasjoner på hvilket aglykon det er, antall sukre og om det er acylering. 1D karbonspektre som CAPT er spesielt nyttige til å finne antall karbon i sukker- og syreenheter. Likevel, 1D spektre alene gir begrenset mengde informasjon.

2D eksperiment kan enten utføres på samme kjerne eller på ulike kjerner. Disse typene eksperiment kalles henholdsvis homonukleære og heteronukleære eksperiment. Det finnes altså 2D eksperiment med proton langs begge akser, som COSY og TOCSY, og det finnes 2D eksperiment der proton utgjør den ene dimensjonen og karbon den andre. HSQC og HMBC er eksempel på slike eksperiment.³⁷

Homonukleære eksperiment vil vanligvis gi symmetriske spektre med en diagonal i tillegg til krysstopper. Heteronukleære eksperiment vil ikke gi symmetriske spektre og dermed heller ingen diagonal, bare krysstopper.³⁷

For en korrekt identifisering og fullstendig tilordning av alle karbon og proton i et antocyan, er det vanligvis nødvendig med en kombinasjon av ulike NMR-eksperiment. Hvilke eksperiment som utføres er hovedsakelig avhengig av kompleksiteten til molekylet og kvaliteten på prøven.

¹H

Endimensjonelle protonspektre viser signaler fra alle protonene i prøven og er svært nyttige i de fleste typer NMR-analyser. Det tar kort tid å utføre et slikt eksperiment og det ligger ofte mye informasjon i denne type spektre. Kvaliteten blir ofte god, men som i alle andre typer NMR-eksperiment er vanninnhold, konsentrasjon og prøvens renhet avgjørende for resultatet.

I tolking av ^1H spektre er skiftverdier, koblingsmønster og integralverdier spesielt nyttige:

Skiftverdiene leses av direkte fra x-aksen. I analyse av antocyaner deles ofte spekteret inn i to regioner. Den mest dowfield regionen ligger rundt 6-9 ppm og kalles aromatregionen. Her vil de aromatiske protonene gi utslag og regionen gir dermed informasjon om type aglykon og om eventuell aromatisk acylering. Området fra 6 ppm og nedover kalles sukkerregionen, siden det er her signalene fra sukkerene vises. I den øvre delen, rundt 4-6 ppm, finnes de anomere signalene, mens signaler fra alifatiske syrer vises i den nederste delen.

Koblingsmønsteret og koblingskonstanter gir informasjon om hvilke protoner som kobler med hvilke og om posisjonen dem i mellom. For eksempel kan koblingskonstanten til signalet fra et anomert proton angi om sukkeret har α - eller β -konfigurasjon.

Integrering av signaler kan noen ganger være til stor hjelp i tolkningen. Symmetri i aglykonet kan for eksempel gi oppgav til signal som har dobbelt så høye integralverdier som de resterende protonsignalene fra aglykonet.

CAPT (Compensated Attached Proton Test)

I motsetning til 1D protonspektre er 1D karbonspektre vanskeligere å få fram. Dette skyldes en kombinasjon av ulike faktorer. For å kunne utføre NMR-eksperiment er en avhengig av atomer med et magnetisk moment. Hos karbon er det ^{12}C -isotopen som dominerer, mens det er ^{13}C -isotopen som har det målbare magnetiske momentet. Siden denne isotopen bare utgjør 1% av karbonsammensetningen vil en få mye svakere signal enn i protonspektre der en måler på den dominerende ^1H -isotopen. I tillegg er den magnetogyriske konstanten (γ) betydelig lavere hos karbon enn hos proton. Disse ulempene løses i ulike grad ved forskjellige typer karbonspektre.³⁶

En metode for å få økt signalstyrke er dekobling. Når karbonatomer har protoner knyttet til seg vil disse gi opphav til multiplerter. Ved å dekode samles multipletten til en singlett og intensiteten på signalet øker. CAPT er av de eksperimentene som benytter seg av dette. Ulempen er at signalene nå blir vanskeligere å identifisere. I CAPT er dette løst ved at kvarternære og metylensignal får motsatt fase av metin- og metylsignal og kan slik skilles fra hverandre.³⁷

Ved analyse av antocyaner er CAPT er nyttig for å få nøyaktige karbonskiftverdier. Siden de fleste sukre, syrer og aglykon har karakteristiske skiftverdier er CAPT i kombinasjon med andre spektre nyttig i tilordningen.

COSY (COrrrelation SpektroskopY)

COSY er et homonukleært 2D eksperiment hvor J-koblinger mellom protoner vises i spekteret. Selve spekteret er symmetrisk med ^1H -skiftakser langs begge dimensjonene. Det består av en diagonal som tilsvarer et vanlig 1D protonspekter. Symmetrisk på begge sider av diagonalen er det krysstopper. Disse skyldes protoner som J-kobler med hverandre, og viser dermed hvilke protoner som kobler med hvilke direkte via binding.³⁶

I analyse av antocyaner er COSY et viktig verktøy til å anordne protonene i sukkerenhetene. Krysstopper som skyldes kobling mellom H1 og H2, mellom H2 og H3 og tilsvarende videre gjør at man i prinsipp kan tilordne ^1H -skiftverdier til alle protonene i en sukkerenhet.

De fleste antocyaner har mer enn en sukkerenhet, noe som kan føre til overlappende topper i spekteret. COSY-spekteret alene er derfor ofte ikke nok til å anordne protonene i en sukkerenhet. Det gir dessuten ingen informasjon om koblingskonstanter og karbonskiftverdier. I kombinasjon med andre eksperimenter som ^1H , TOCSY og HSQC, er det derimot mulig å få en fullstendig identifisering av sukkerenhetene.

TOCSY (TOtal Correlation SpektroskopY)

Også TOCSY er et 2D homonukleært eksperiment som viser koblinger mellom protoner, men i motsetning til COSY viser TOCSY en korrelasjon av alle protonene i samme spinsystem, selv om de ikke er direkte J-koblet. TOCSY-spekteret har flere av de samme trekkene som et COSY-spekter: Det er symmetrisk med to ^1H -skiftakser, det har en diagonal og det har krysstopper.

I analyse av antocyaner brukes TOCSY hovedsakelig sammen med andre eksperimenter til å identifisere sukre og tilordne deres protoner. Ved å ta utgangspunkt i et anomert proton vil en kunne lese av skiftverdiene til de andre protonene i det samme spinsystemet, altså den samme sukkerenheten. Dette gjør det mulig å skille signalene til de ulike sukkerenhetene også i de andre spektrene.

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

HSQC er et 2D heteronukleært eksperiment som viser korrelasjoner mellom ^1H og ^{13}C gjennom enbindings skalarkoblinger ($^1\text{H}_{\text{CH}}$).³⁷ Spekteret har en protonakse og en karbonakse, hvorav den horisontale viser skiftverdiene til proton og den vertikale skiftverdiene til karbon. Krysstopperne viser hvilke protoner som er direkte knyttet til hvilke karboner. Kvarternære karboner vil dermed ikke vises, siden disse ikke har noen protoner direkte knyttet til seg.

Ved å ta utgangspunkt i skiftverdien til et kjent protonsignal kan en via krysstoppen lese av tilhørende karbonskiftverdi. Slik kan en identifisere alle de ikke-kvarternære karbonene i antocyanet. Siden sukre og syrer ofte har karakteristiske skiftverdier er dette spesielt nyttig i identifiseringen av disse.

HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

I likhet med HSQC er HMBC et 2D heteronukleært eksperiment som viser korrelasjoner mellom proton- og karbonatomer. Forskjellen ligger i at HMBC korrelerer ^1H og ^{13}C kjemiske skift via flerbindings skalarkoblinger.³⁷ Hovedsakelig er det $^2\text{J}_{\text{CH}}$ og $^3\text{J}_{\text{CH}}$ som gir opphav til krysstopper, men også $^4\text{J}_{\text{CH}}$ vil i noen tilfeller vises. En av fordelene med dette er at også skiftverdier for kvarternære karboner kan leses av.

Tross i at $^1\text{J}_{\text{CH}}$ -koblingene blir forsøkt filtrert bort, vil de i mange tilfeller vises. Siden disse koblingskonstantene er betydelig større enn flerbindingskoblingskonstanter, vil

enbindingskoblingen gi en splittet krysstopp, som en dublett, mens de resterende krysstoppene vil se ut som singletter.³⁷

HMBC-spekteret er spesielt viktig for å kunne angi sammensetningen av de ulike enhetene i antocyanet. Ved å se etter krysstopper mellom en sukkerenhet og aglykonet vil en kunne finne ut i hvilken posisjon disse er knyttet sammen.

2.4.3 MS (massespektrometri)

I massespektrometri brukes et massespektrometer til å bestemme molekylmassen (molekylærion) og fragmenter til et stoff.

Et massespektrometer er hovedsakelig laget for å utføre tre funksjoner: Det skal fordampe forbindelser med varierende flyktighet, det skal lage ioner av gass-molekylene som dannes og det skal separere disse ionene etter deres masse-til-ladning-ratio (m/z). Siden det sjeldent dannes ioner med annen ladning enn e^- , kan z settes lik 1. Elektronets ladning (e) er konstant og m/z gir dermed massen til ionet.³⁶

Det finnes ulike teknikker for å danne ionene. I dette arbeidet ble det benyttet elektropray ionisering, som medfører relativ liten grad av fragmentering.³⁶ Dette er en fordel i analyse av antocyaner, da en hovedsakelig ønsker å finne molekylærionet (M^+). I tillegg kan hele enheter, som sukre og syrer, spaltes av og slik gi massedata på disse.

I kombinasjon med blant annet NMR kan massespektre være til stor nytte i arbeid med identifisering av antocyaner.

Ekspérimentelt

Det ble kjørt MS og LC-MS på ett av pigmentene i oppgaven, hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia*. Det ble benyttet en Micromass LSZ med elektropray ionisering. Analysen ble utført av Håvard S. Nateland (Polyphenols AS).

Mobilfase A':	H ₂ O:TFA	i forhold 19:1	
Mobilfase B':	MeCN: TFA	i forhold 19:1	
Gradient 3:	0 -10 min.	10% - 18% B' i A'	(lineær)
	10-18 min.	18% - 28% B' i A'	(lineær)
	18-19 min.	28% - 40% B' i A'	(lineær)
	19-22 min.	40% B' i A'	(isokratisk)
	22-23 min.	40% - 10% B' i A'	(lineær)
	23-25 min.	10% B' i A'	(isokratisk)

Kapittel 3 - Resultater og diskusjon – *Callistemon citrinus*

Det er tidligere utført to arbeid med hensyn på antocyaninnholdet i de røde blomstene til *Callistemon citrinus*. Det ene konkluderer med at planten inneholder pelargonidin og cyanidin 3,5-diglukosid³, mens det andre oppgir cyanidin 3-glukosid².

Kapittelet er delt inn i to hoveddeler. Kapittel 3.1 omhandler isolasjon og analyse av antocyanene i *Callistemon citrinus* ved hjelp av UV/synlig-spektroskopi og ulike kromatografiske teknikker. Kapittel 3.2 tar for seg strukturoppklaring av antocyanene ved bruk av ulike NMR-teknikker. Til slutt er det gitt en kort oppsummering av resultatene i de to delkapitlene.

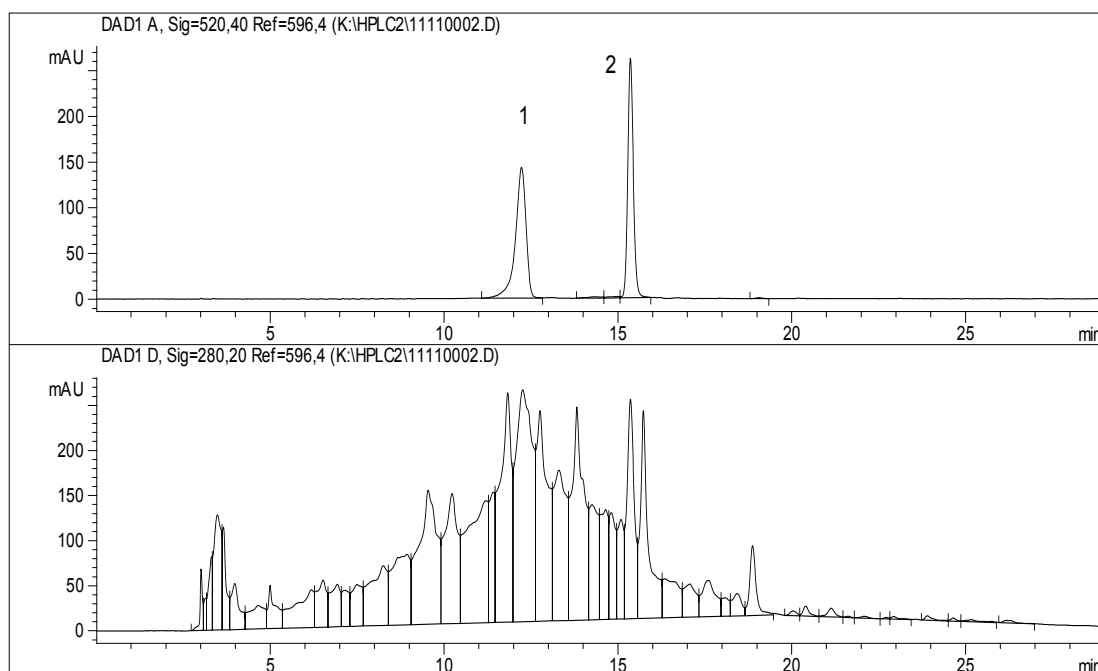
3.1 Isolasjon og analyse

Det ble brakt med 51,8 g *Callistemon citrinus* blomster fra Uganda januar 2001. 41,17 g av disse ble brukt i det videre arbeidet. Blomstene ble ekstrahert med metanol tilsatt TFA og deretter renses ved hjelp av etylacetat og Amberlite XAD-7-kolonne. Detaljert beskrivelse av metoder og prosedyrer er gitt i kapittel 2.

3.1.1 Analyse av rækstrakt

Det ble kjørt en HPLC-profil av rækstraktet for å få en indikasjon på innholdet i ekstraktet. I kromatogrammet ved 520 ± 20 nm vises det to tydelig adskilte topper (figur 3.1.1.1, øverste vindu). Forutsatt at det ikke er noen overlapping av topper, er det altså to pigmenter til stede.

Kromatogrammet ved 280 ± 10 nm (figur 3.1.1.1, nederste vindu) viser andre aromatiske forbindelser til stede i prøven. For å kunne bruke ekstraktet til videre analyse måtte det derfor først renses.



Figur 3.1.1.1: HPLC-kromatogram av rækstrakt av *Callistemon citrinus* detektert ved 520 ± 20 nm (øverste vindu) og 280 ± 10 nm (nederste vindu).

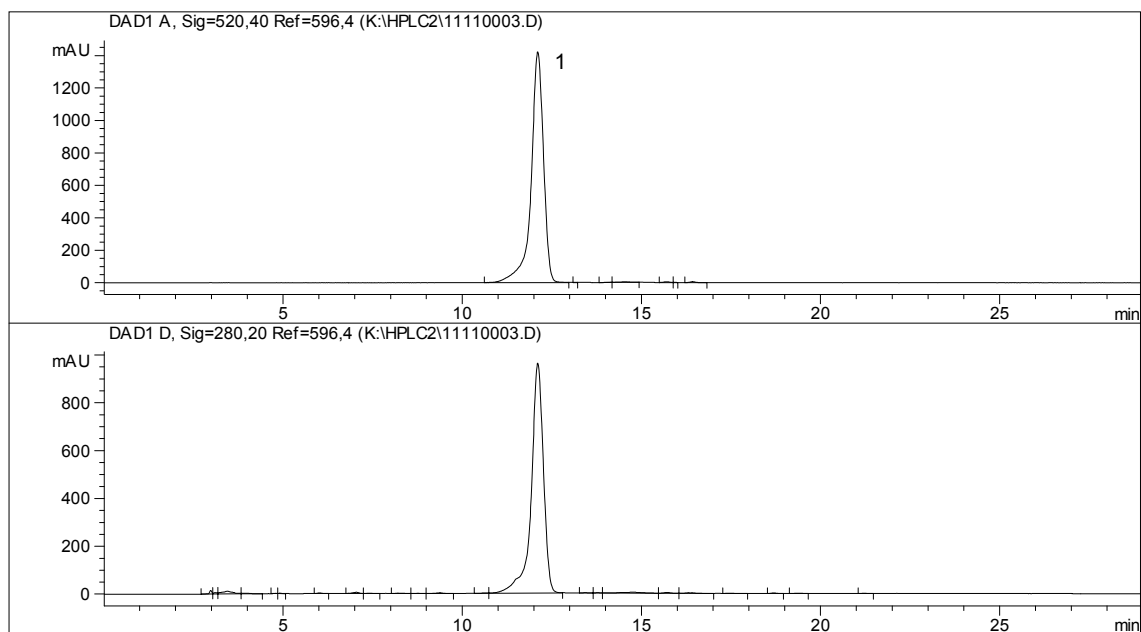
3.1.2 Isolering med Sephadex-kolonne

Etter at ekstraktet var blitt rensert på Amberlite XAD-7-kolonne ble det applisert på en Sephadex LH-20-kolonne for å isolere de ulike pigmentene. Det dannet seg to tydelige og godt separerte bånd på kolonnen (figur 3.1.2.1). Fargen på begge båndene var dyp rødrosa. Båndet som kom ut først benevnes fra nå av pigment 1 og det siste pigment 2.

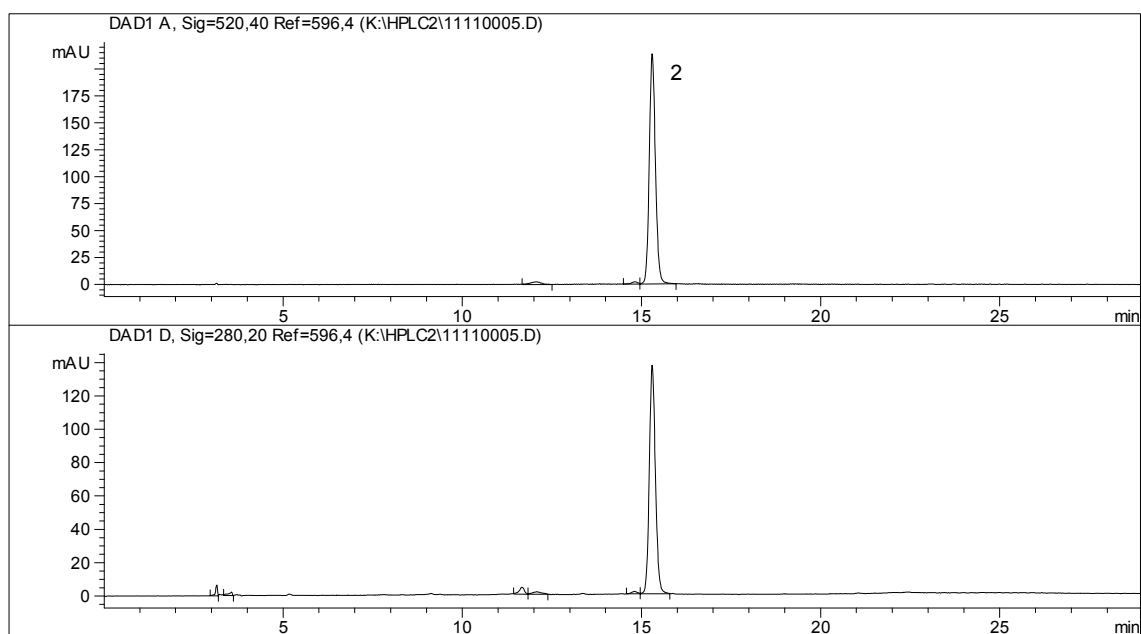


Figur 3.1.2.1: Separasjon av pigmentene i *Callistemon citrinus* på Sephadex LH-20-kolonne.

Det ble kjørt en HPLC-profil på fraksjoner av hver av båndene for å sjekke renheten. Figur 3.1.2.2 og 3.1.2.3 viser at det omtrent ikke er noen absorpsjon ved 280 ± 20 nm av andre forbindelser enn de to pigmentene. Selve isolasjonen av pigmentene var også god, da det omtrent ikke er spor av pigment 1 i kromatogrammet til pigment 2, og tilsvarende for pigment 2 i forhold til pigment 1.



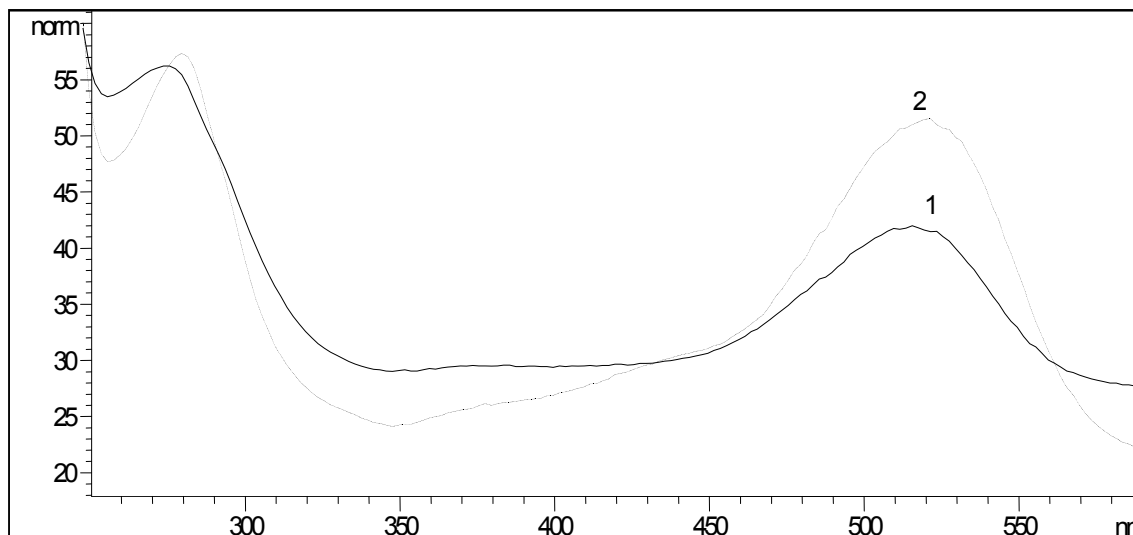
Figur 3.1.2.2: HPLC-kromatogram av pigment 1 i *Callistemon citrinus* detektert ved 520 ± 20 nm (øverste vindu) og 280 ± 10 nm (nederste vindu) etter rensing med Sephadex LH-20-kolonne.



Figur 3.1.2.3 HPLC-kromatogram av pigment 2 i *Callistemon citrinus* detektert ved 520 ± 20 nm (øverste vindu) og 280 ± 10 nm (nederste vindu) etter rensing med Sephadex LH-20-kolonne.

3.1.3 UV/synlig-spektre av pigmentene

Under HPLC-analysen ble det fortløpende tatt opp UV/synlig-spektre av pigmentene. Figur 3.1.3.1 viser spektrene til begge pigmentene. Tabell 3.1.3.1 gir data fra analysen.



Figur 3.1.3.1: UV-spektre av begge pigmentene i *Callistemon citrinus* detektert *on-line* under HPLC-analyse.

Tabell 3.1.3.1: Verdier fra HPLC med UV-detektor av pigmentene i *Callistemon citrinus*.

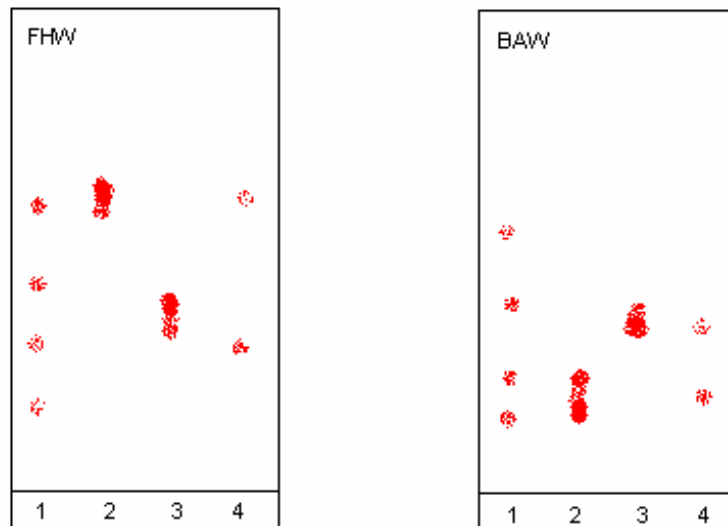
Pigment	t_R (min)	UV_{max} (nm)	Vis_{max} (nm)	$A_{440}/A_{vis-max}$ (%)
1	12,11	275	518	18
2	15,30	282	522	30

Begge pigmentene absorberer maksimalt synlig lys i området 518-522 nm. Dette er vanligvis verdier for cyanidin- og peonidinderivater.²⁸ Ut fra absorbanen i UV-regionen ser det ikke ut til at noen av pigmentene har aromatisk acylering.

Tabell 3.1.3.1 viser at $A_{440}/A_{vis-max}$ er mye høyere for pigment 2 enn for pigment 1. Verdiene tyder på at pigment 2 bare er substituert i 3-posisjon, mens pigment 1 har substitusjon i både 3- og 5-posisjon.^{5, 28}

3.1.4 Tynnskiktskromatografi

Det ble kjørt TLC på fraksjoner av begge pigmentene. Et ekstrakt av solbær ble brukt som referanse. Det ble benyttet to ulike mobilfaser, FHW og BAW. Sammen kan disse mobilfasesystemene gi en del informasjon om type aglykon, antall sukkerenheter og eventuell acylering.



Figur 3.1.4.1: TLC av pigmentene i *Callistemon citrinus* med FHW og BAW som mobilfase. **1:** solbær, **2:** pigment 1, **3:** pigment 2, **4:** blandingsfraksjon pigment 1 og 2.

Avsetningene av de rene pigmentene hadde en høyere konsentrasjon enn avsetningene av solbær og blandingsfraksjonen. Siden solbær fungerte som referanse, er verdiene fra blandingsfraksjonen mest korrekte i forhold til denne, og derfor brukt videre i analysen.

Solbær inneholder 15 identifiserte antocyaner hvorav fire utgjør 97 %: Delfinidin 3-glukosid, cyanidin 3-glukosid, delfinidin 3-rutinosid og cyanidin 3-rutinosid.³⁸ Rekkefølgen er gitt med stigende R_f -verdi i FHW.²⁸

Tabell 3.1.4.1: R_f -verdier fra TLC av antocyaner i *Callistemon citrinus*.

Forbindelse	R_f FHW	R_f BAW
Solbær		
df 3-glc	0,13	0,36
cy 3-glc	0,24	0,30
df 3-rut	0,33	0,23
cy 3-rut	0,49	0,17
<i>C. citrinus</i>		
pigment 1	0,52	0,22
pigment 2	0,26	0,28

Ved bruk av FHW har pigment 1 en betydelig høyere R_f -verdi enn pigment 2. Siden økende antall sukkerenheter gir økt vandringslengde, og dermed også økt R_f -verdi, ser det ut til at pigment 1 har et høyere antall sukkerenheter enn pigment 2. Ved bruk av BAW derimot har pigment 2 den høyeste R_f -verdien. Ved bruk av denne mobilfasen vil R_f -verdien generelt avta med økende antall sukkerenheter, noe som kan stemme overens med at pigment 1 har flere sukkerenheter.

Pigment 2 ser ut til å retarderes noenlunde likt som cyanidin 3-glukosid i solbær, mens pigment 1 ligger mer i området til cyanidin 3-rutinosid.

For å kunne bestemme de to pigmentene i *Callistemon citrinus* var det nødvendig med NMR-analyse.

3.2 Strukturbestemmelse med NMR

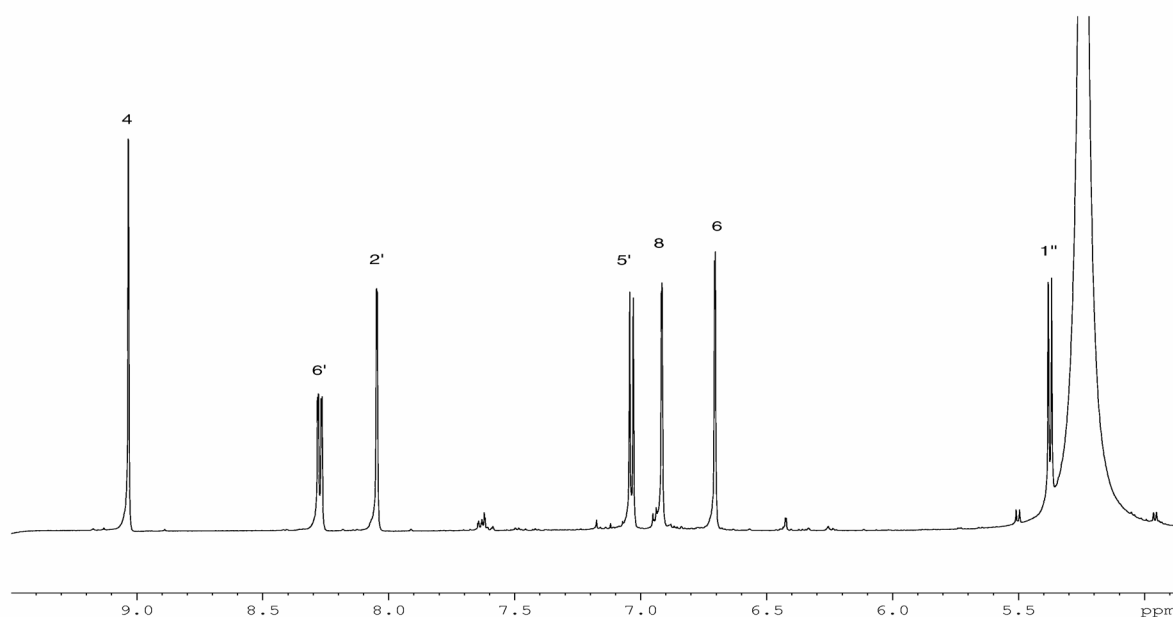
Det ble utført ulike 1D og 2D NMR-eksperiment for å oppnå en fullstendig identifisering av begge de isolerte pigmentene i *Callistemon citrinus*. For pigment 1 ble det tatt opp ^1H -, HSQC-, HMBC-, COSY- og TOCSY-spektre. På pigment 2 ble de samme eksperimentene utført, med unntak av TOCSY som viste seg å være unødvendig for identifiseringen av pigment 2.

3.2.1 Pigment 2; cyanidin 3-O- β -glukopyranosid

Aromatregionen

I aromatregionen av protonspekteret (figur 3.2.1.1) er det seks signaler. De vanligste antocyanidinene (figur 1.2.1.1) har alle tre protoner på A- og C-ringene, H4, H6 og H8. Siden UV/synlig-spektroskopi ikke viste noe tegn på aromatisk acylering, kan en anta at de tre resterende signalene skyldes de aromatiske protonene på B-ringene.

Pelargonidin har fire protoner på B-ringene, som på grunn av symmetri bare gir opphav til to signaler, og kan derfor utelukkes. Delfinidin og malvidin har også begge symmetri i B-ringene, ved at delfinidin har hydroksygrupper i 3'- og 5'-posisjon, mens malvidin har metoksygrupper. De to protonene på B-ringene deres gir dermed bare opphav til ett signal i aromatregionen og kan også utelukkes. Petunidin har også to protoner direkte knyttet til B-ringene, men det er ingen symmetri til stede. De vises dermed som to signaler og petunidin kan utelukkes. Nå gjenstår bare peonidin og cyanidin som aktuelle aglykoner. Disse har begge tre protoner knyttet direkte til B-ringene. Peonidin har dessuten en metoksygruppe i 3'-posisjon. Denne vil gi opphav til et signal med skiftverdi rundt 4,0 ppm i et protonspekter.³⁹ I protonspekteret til pigment 2 er det noen signaler i dette området, men ingen sterke nok til å kunne skyldes tre protoner i en metoksygruppe. Aglykonet må dermed være cyanidin. Dette stemmer overens med at cyanidin vil gi totalt seks signaler i aromatregionen av et protonspekter. Med dette som utgangspunkt er det mulig å tilordne de ulike signalene.



Figur 3.2.1.1: Aromatregion og anomert område av ^1H -spekter av pigment 2 i *Callistemon citrinus* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25 °C. Signalene er merket med protonidentiteter.

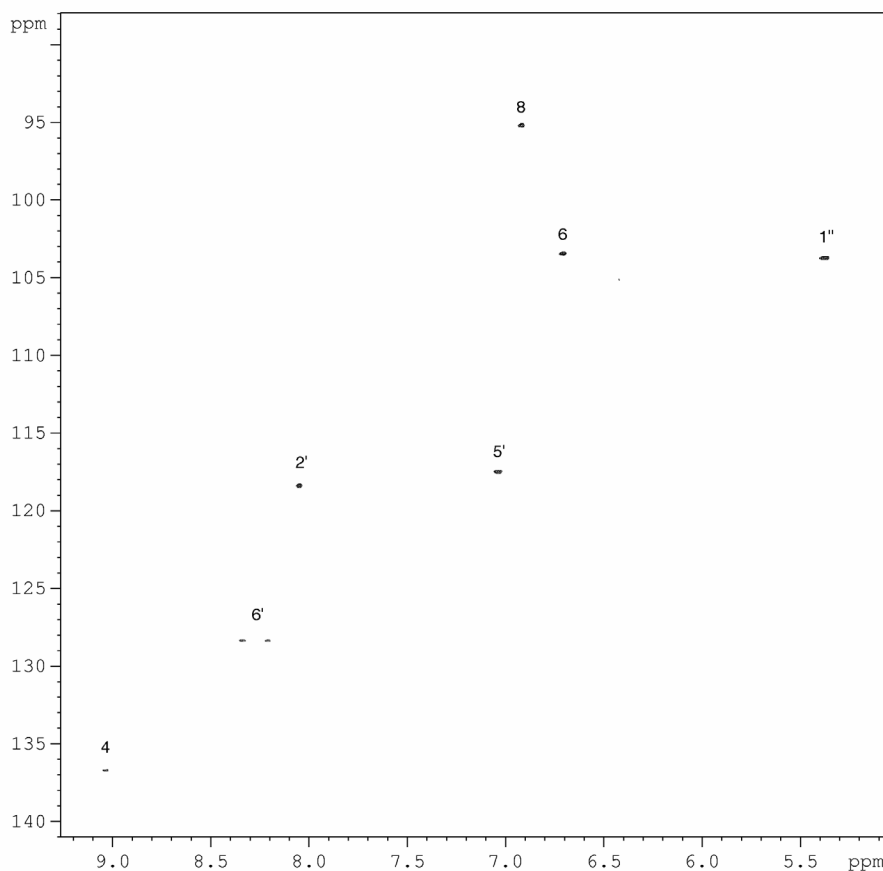
H4 er det eneste protonet som ikke kobler med noe annet proton. Dette må dermed være singletten på 9,03 ppm.

Den doble dubletten på 8,27 må skyldes et proton som kobler med to andre proton. H6' kobler både til H5' og til H2'. Signalet på 8,27 ppm er altså H6'.

H6' har en ortokobling til H5' og en metakobling til H2'. I et aromatisk system vil protoner i orto-, meta- og paraposisjoner koble med hverandre med koblingskonstanter på henholdsvis 6-9 Hz, 1-3 Hz og 0-1 Hz.³⁶ Den ene splittingen til H6' er på 8,7 Hz og ligger innenfor intervallet for orto-kobling. Signalet på 7,04 ppm har også en koblingskonstant på 8,7 Hz og må dermed være H5'.

Den andre koblingskonstanten til H6' er på 2,3 Hz. Denne verdien finner en igjen på splittingen til signalet på 8,05 ppm, som da må være H2'.

De to resterende signalene på 6,92 ppm og 6,70 ppm har begge en koblingskonstant på 1,6 Hz. Disse kobler altså med hverandre og må være H8 og H6. Vanligvis vil H6 ha lavest proton skiftverdi, men høyest karbon skiftverdi av disse to.^{40, 41} Det er derfor nødvendig å bruke HSQC-spekteret for helt sikkert å tilordne disse to signalene. I HSQC-spekteret (figur 3.2.1.2.) kan en se at signalet med lavest proton skiftverdi (6,70 ppm) virkelig har høyest karbon skiftverdi (103,42 ppm), noe som bekrefter at det er H6.



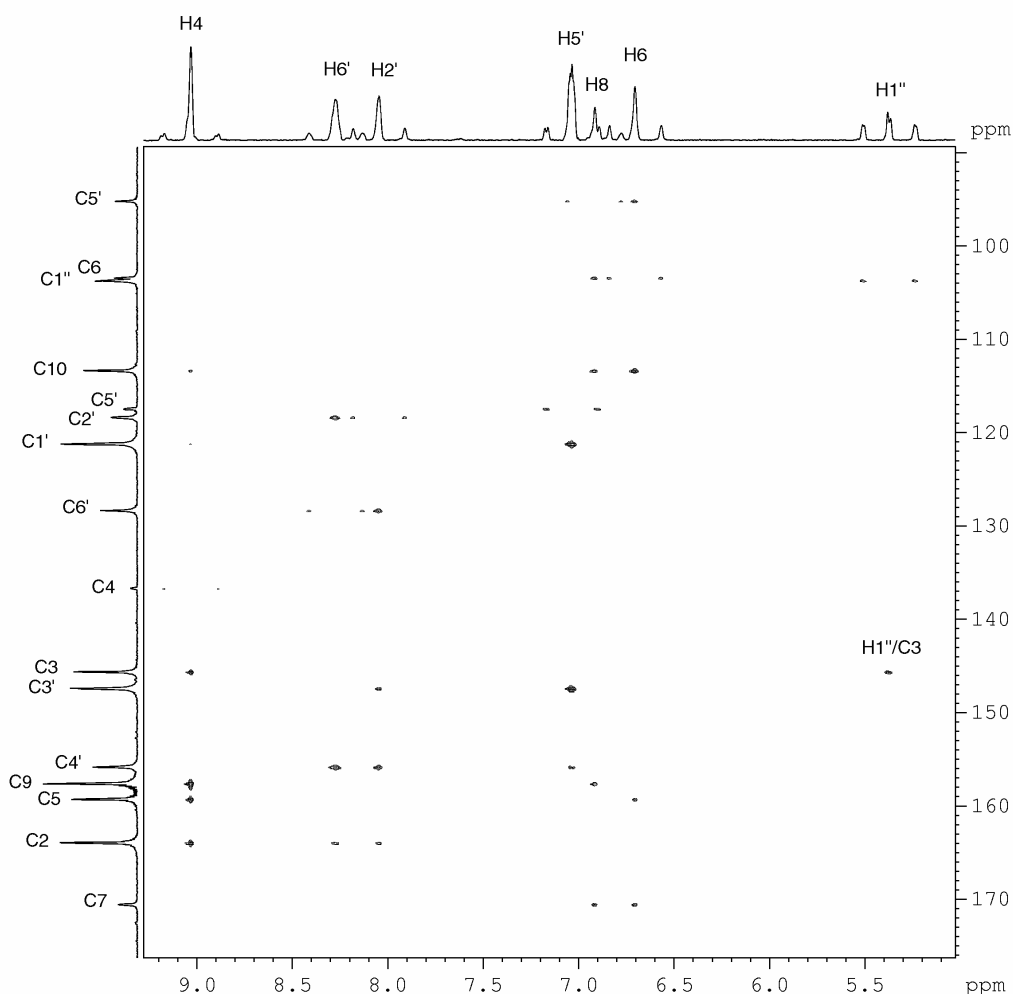
Figur 3.2.1.2: Aromatergion og anomert område av HSQC-spekter av pigment 2 i *Callistemon* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C.

Protontilordningen kan så brukes til å lese av tilhørende karbon skiftverdier fra krysstopperne i HSQC-spekteret (figur 3.2.1.2). De tilordnete signalene merkes så av i HMBC-spekteret. Siden en her ikke ^{13}C -dekobler vises enbindingskoblinger som splittede krysstopper i HMBC-spekteret og kan slik lett skilles fra de andre krysstopperne.³⁷ Alt dette brukes som utgangspunkt for å identifisere de kvarternære karbonene.

I HMBC-spekteret vil en hovedsakelig forvente å se 3-bindingkoblinger. Det vil dessuten være en del krysstopper på grunn av 2-bindingkoblinger, men disse kan bli for svake til at de vises. Noen 4-bindingkoblinger, som fra H4 til C8 og til C1', vil også kunne vises. Forventede koblingene ved cyanidin er gitt i tabell 3.2.1.1.

Tabell 3.2.1.1 Forventede koblinger i HMBC-spekter av cyanidin.

Proton	$^2J_{\text{CH}}$		$^3J_{\text{CH}}$			$^4J_{\text{CH}}$	
H4	C3	C10	C2	C5	C9	C1'	C8
H6'	C1'	C5'	C2	C2'	C4'		
H2'	C1'	C3'	C2	C4'	C6'		
H5'	C4'	C6'	C1'	C3'			
H8	C7	C9	C6	C10			
H6	C5	C7	C8	C10			



Figur 3.2.1.3: Utvider aromatergion av HMBC-spekter av pigment 2 i *Callistemon citrinus* løst CD_3OD - CF_3COOD (19:1) ved 25 °C.

Starter med å se på krysstopperne til H4 i HMBC-spekteret (figur 3.2.1.3). Dette protonet har mulighet til å koble med tre ulike kvarternære karbon som ikke er direkte knyttet til oksygen, C1', C10 og C8. Siden nærhet til oksygen gir en *downfield* effekt, vil C1', C10 og C8 ha relativt lave skiftverdier i forhold til de andre kvarternære karbonatomene i aglykonet. C8 er allerede identifisert fra HSQC, men det er ingen krysstopp mellom den og H4. Dette skyldes nok at det er en 4-bindingskobling, og at den dermed blir for svak. H4 kobler da bare med to uidentifiserte karbon på lave skiftverdier, 113,39 ppm og 121,21 ppm, som må skyldes C10 og C1'. Karbonatomet med lavest karbonskiftverdi kobler videre til H6 og H8. Dette må derfor være C10. Karbonatomet på 121,21 ppm kobler med H5', noe som bekrefter at det er C1'.

Tar så utgangspunkt i H6 og H8, som er identifisert tidligere. De skal begge koble med C7 og C10. Det er bare to karbon skiftverdier der begge disse protonene kobler til samme karbon, og det er 113,39 ppm og 170,53 ppm. Det første er allerede identifisert til C10, og signalet på 170,53 ppm må derfor skyldes C7. Dette stemmer godt overens med at C7 er bundet direkte til et oksygen, og derfor vil ha en betydelig høyere skiftverdi enn C10.

H6 kobler med nok et signal, på 159,30 ppm. Dette må da være C5.

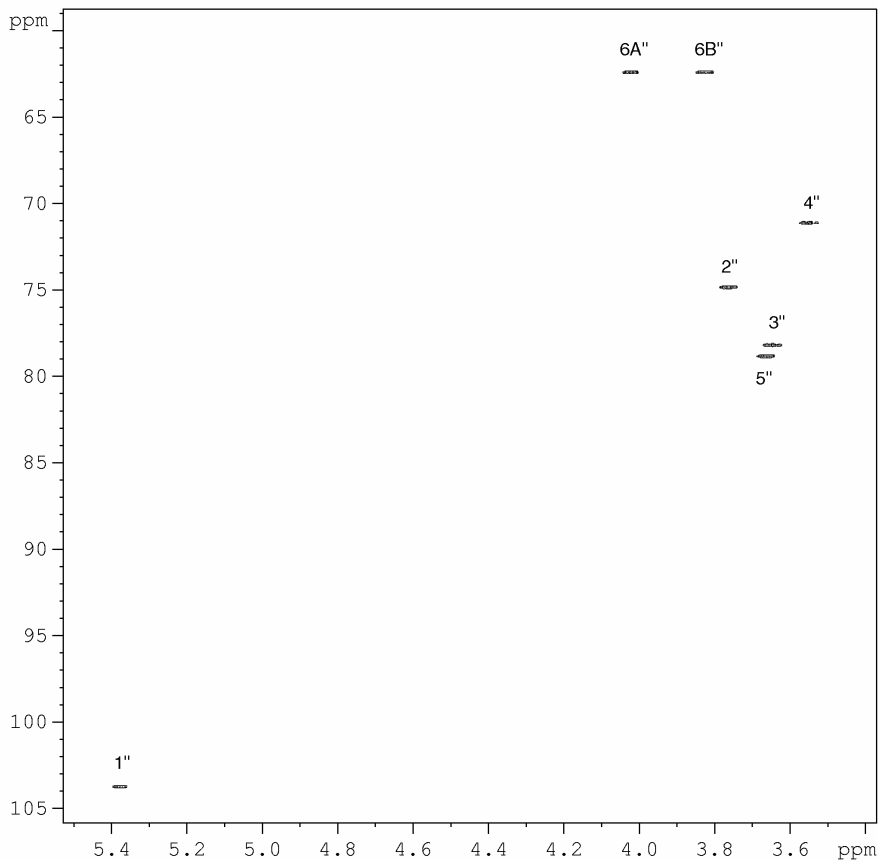
H8 kobler også med nok et signal, på 157,64 ppm, som må være C9.

Fire av seks krysstopper til H4 er nå identifisert. De to siste må da skyldes C2 og C3. Karbonet med høyest skiftverdi av disse kobler i tillegg til H2' og til H6'. C3 vil normalt ikke koble med protoner på B-ringene, og krysstoppen på 163,95 ppm må skyldes kobling mellom H4 og C2. Det gjenværende signalet på 145,65 ppm kommer da av C3.

Nå mangler det bare å identifisere to karbon på B-ringene, C3' og C4'. Begge disse kobler både med H2' og med H5', men bare C4' kobler med H6'. Siden alle krysstopperne til H6' er identifisert unntatt en på 155,83 ppm, må denne skyldes C4'. Den siste krysstoppen til H2' og til H5' ligger på 147,40 ppm og gir skiftverdien da til C3'.

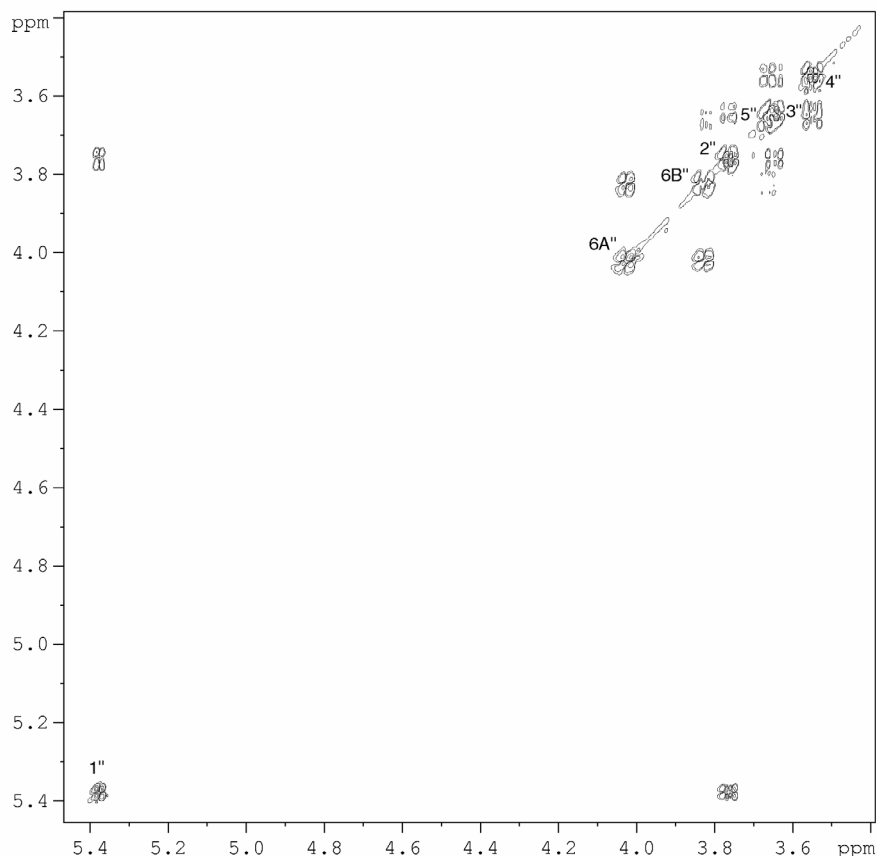
Sukkerregionen

Figur 3.2.1.4 viser sukkerregionen av HSQC-spekteret. Det er her totalt 7 signal. Signalet med proton skiftverdi 5,37 ppm og karbonskiftverdi 103,72 ppm ligger betydelig mer *downfield* enn de andre signalene. Dette er karakteristisk for anomere protoner og signalet er altså H1''.



Figur 3.2.1.4: Sukkerregionen av HSQC-spekter til pigment 2 i *Callistemon citrinus* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C.

Det er to protoner (på 3,82 ppm og 4,02 ppm) som ser ut til å ha samme karbon skiftverdi (62,42 ppm). Disse utgjør da en CH₂-gruppe. Dette betyr at sukkeret har seks karbonatomer og er dermed en heksose. For å identifisere hvilken heksose der er, er det nødvendig å tilordne de ulike signalene. Til dette er COSY et nyttig eksperiment. Etter tilordning med COSY er de nøyaktige skiftverdiene lest av i protonspekteret og korrigert. Det er disse verdiene som er oppgitt i det videre resonnementet.



Figur 3.2.1.5: Sukkerregionen av COSY-spekter av pigment 2 i *Callistemon citrinus* løst $\text{CD}_3\text{OD-CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25 °C.

Figur 3.2.1.5 viser sukkerregionen i COSY-spekteret. Tilordningen av signalene utføres ved å starte med det anomere protonet på 5,38 ppm. Dette kobler til et proton på 3,76 ppm, som da må være H2''. H2'' kobler videre til ett signal på 3,65 som gir skiftverdien til H3''. Dette protonet kobler videre til et proton på 3,55 som er H4''. H4'' kobler i tillegg til et annet proton, på 3,66 ppm. Dette må da være H5''. H5'' kobler videre til et proton på 3,82 ppm, som kobler videre til et proton på 4,02 ppm. Disse to protonene ble tidligere antatt å være del av en CH_2 -gruppe og utgjør da henholdsvis H6B'' og H6A''.

Ved å ta utgangspunkt i figur 1.2.1.2, som viser de vanligste monoglykosidene funnet i antocyaner, ser en at det bare er to heksoser med CH_2 -grupper, nemlig glukose og galaktose. Forskjellen mellom glukose og galaktose ligger i posisjonen til OH og dermed også H på C4. Hos glukose er H4 aksial, mens den hos galaktose er ekvatorial. For å avgjøre hvilket sukker dette er kan en derfor se på $^3J_{\text{HH}}$ for H4. Hos galaktose kobler H4 ekvatorial-aksial med H3 og med H5. Dette vil gi opphav til koblingskonstanter i rundt 3 Hz.⁴² Hos glukose derimot vil H4 koble aksial-aksial med H3 og med H5. Dette vil føre til en betydelig høyere koblingskonstant, rundt 9 Hz.⁴³ $^3J_{\text{HH}}$ for sukkerets H4'' er her 9,4 Hz, en typisk koblingskonstant for diaksial kobling, altså glukose.

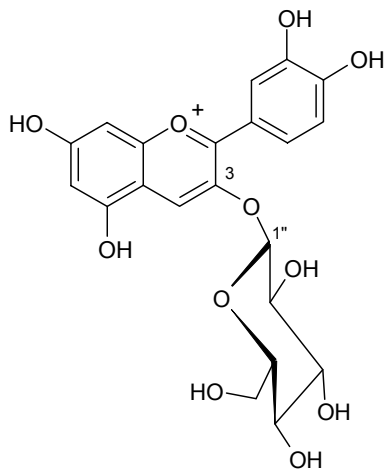
For å få bekreftet dette kan en se på karbon skiftverdiene. Galaktose vil generelt ha lavere karbon skiftverdier enn glukose, spesielt for C2 og C3.⁴⁴ Verdiene fra dette sukkeret stemmer overens med litteraturverdier for glukose.⁴⁰ De avleste koblingskonstantene gitt i tabell 3.2.1.1 bekrefter også at det er glukose.^{40,44}

Sammensetningen

Det eneste som nå mangler i en fullstendig strukturoppklaring er selve sammensetningen av antocyanet. Aglykonet er identifisert til cyanidin og sukkeret til glukose. I HMBC-spekteret (figur 3.2.1.3) kan en se at det anomere protonet (på 5,38 ppm) har en kryssstopp inn på et karbon på 145,65 ppm. Denne skiftverdien er tilordnet C3 og viser at sukkeret er knyttet i 3-posisjon på aglykonet.

Selve konfigurasjonen til sukkeret kan en bestemme ut fra koblingskonstanten til det anomere protonet. En ekvatorial-aksial kobling mellom H1'' og H2'' vil tilsvare en α -konfigurasjon og gi en koblingskonstant i området 4-5 Hz.⁴⁵ Aksial-aksial kobling derimot gir β -konfigurasjon og en høyere koblingskonstant, rundt 7-8 Hz.⁴² J_{HH} for H1'' er her 7,8 Hz og sukkeret har dermed β -konfigurasjon. Antocyanet er altså cyanidin 3- O - β -glukopyranosid. NMR-analysen stemmer overens med litteraturverdier på samme pigment.^{41, 44}

Strukturen til molekylet er vist i figur 3.2.1.6. Verdier fra NMR-analysen er gitt i tabell 3.2.1.2.



Figur 3.2.1.6 Pigment 2 i *Callistemon citrinus*, cyanidin 3- O - β -glukopyranosid.

Tabell 3.2.1.2: NMR-data for pigment 2 i *Callistemon citrinus* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C.

	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplisitet	J (Hz)	Hentet fra*
cyanidin					
2	163,95				HMBC
3	145,65				HMBC
4	136,69	9,03	s		HSQC, 1H
5	159,30				HMBC
6	103,42	6,70	d	1,6	HSQC, 1H
7	170,53				HMBC
8	95,20	6,92	d	1,6	HSQC, 1H
9	157,64				HMBC
10	113,39				HMBC
1'	121,21				HMBC
2'	118,34	8,05	d	2,3	HSQC, 1H
3'	147,40				HMBC
4'	155,83				HMBC
5'	117,45	7,04	d	8,7	HSQC, 1H
6'	128,33	8,27	dd	2,3 og 8,7	HSQC, 1H
3-O- β -glukopyranosid					
1''	103,72	5,38	d	7,8	HSQC, 1H
2''	74,50	3,76	dd	7,8 og 9,1	HSQC, 1H
3''	78,20	3,65	t*	9,1	HSQC, 1H
4''	71,12	3,55	t*	9,4	HSQC, 1H
5''	78,84	3,66	m	1,9 og 5,8 og 9,7	HSQC, 1H
6A''	62,42	4,02	dd	1,9 og 12,3	HSQC, 1H
6B''	62,42	3,82	dd	5,8 og 12,3	HSQC, 1H

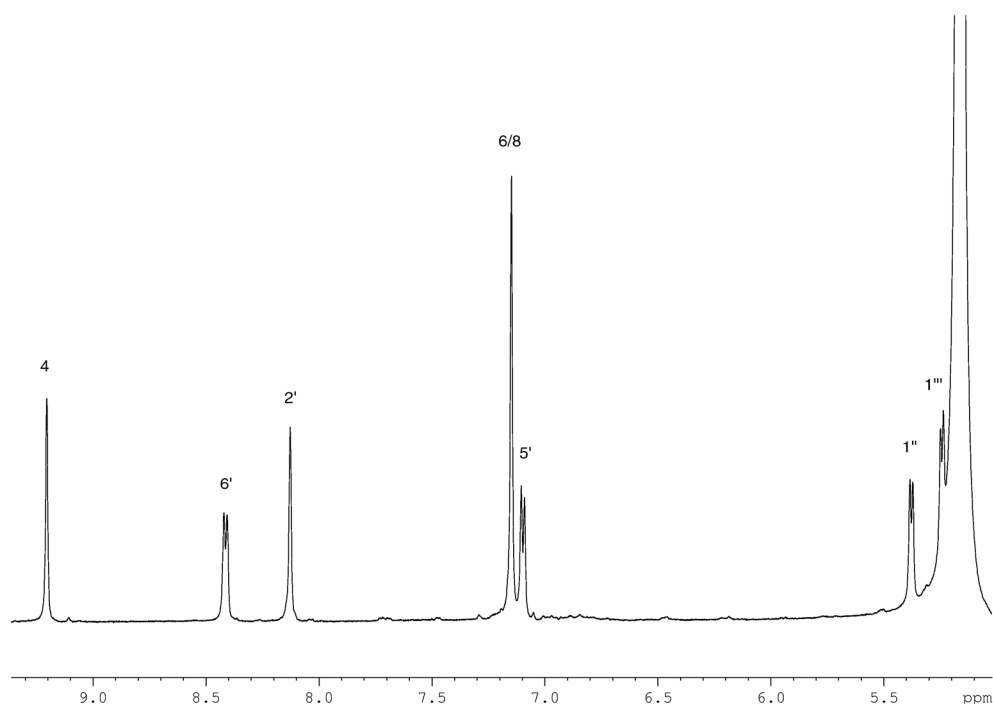
* Alle koblingskonstantene er hentet fra ¹H-spekter.

** Dårlig oppløst dobbel dublett som ser ut som en triplett.

3.2.2 Pigment 1: Cyanidin 3,5-di-O- β -glukopyranosid

Aromatregion og anomere signal

Figur 3.2.2.1 viser aromatregionen av protonspekteret til pigment 1 i tillegg til det anomere området. Det er fem signal i aromatregionen. Siden det ikke ble påvist noe aromatisk acylering i UV/synlig-spektroskopi, kan en anta at alle signalene skyldes de aromatiske protonene på aglykonet. Intensiteten av signalene er noe varierende og det ble derfor utført en integrasjon. Resultatet av denne er vist i tabell 3.2.2.1.



Figur 3.2.2.1: Aromatregion og anomert område av ^1H -spekter av pigment 1 i *Callistemon citrinus* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25 °C. Signalene er merket med protonidentiteter.

Tabell 3.2.2.1: Verdier fra protonspekter av pigment 1 i *Callistemon citrinus* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25 °C.

^1H δ (ppm)	Integralverdi	Multiplisitet	J (Hz)
9,20	1	s	
8,41	1	d	8,6
8,13	1	s	
7,14	2	s	
7,10	1	d	8,6

Ut fra tabell 3.2.2.1 kan en se at de fem signalene i aromatregionen av protonspekteret utgjør totalt seks protoner. Av de seks vanligste aglykonene (figur 1.2.1.1) er det bare cyanidin og peonidin som har seks protoner. Disse skiller ved at cyanidin har en hydroksygruppe i 3'-posisjon mens peonidin har en metoksygruppe i samme posisjon. Da det ikke finnes noe

metoksysignal rundt 4,0 i protonspekteret til pigmentet 1, kan peonidin utelukkes. Pigmentet ser altså ut til å være et cyanidinderivat. For å bekrefte dette anordnes de ulike signalene.

H4 kan lett identifiseres i protonspekteret ved at den har en karakteristisk høy verdi, her på 9,20 ppm.

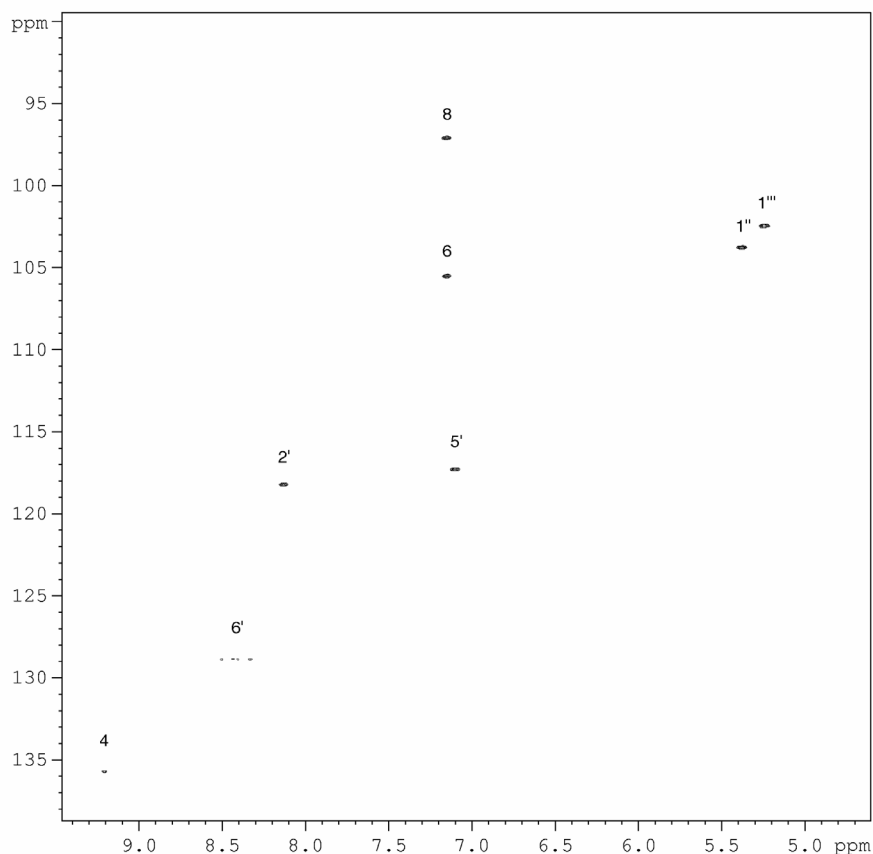
Det neste signalet ligger på 8,41 ppm og er en dublett med koblingskonstant på 8,6 Hz. Den samme koblingskonstanten finnes i signalet på 7,10 ppm. Disse to protonene kobler altså med hverandre. Størrelsen på koblingskonstanten indikerer at det er en orto-kobling og signalene må da skyldes H6' og H5'. I cyanidin vil H6' ligge mest *downfield* av disse signalene og er dermed signalet med skiftverdi 8,41 ppm.^{40, 41}

Det er nå to uidentifiserte signal igjen, hvorav det ene er en singlett på 7,14 ppm. Denne har en integralverdi som tilsvarer to protoner og består altså av to overlappende signal. Det er tre gjenværende aktuelle protoner, H2', H6 og H8. H6 og H8 vil ha noenlunde de samme skiftverdiene. Dersom det er et sukker i 5-posisjon kan det føre til en ulik *downfield* forskyvning av disse signalene.⁴⁶ Antagelig er det det som har skjedd her og singletten på 7,14 ppm skyldes en overlapping av H6 og H8.

Det siste signalet ligger på 8,13 ppm og må da være H2'.

Figur 3.2.2.1 viser også området som er karakteristisk for anomere protoner. Det er her to signaler, et på 5,38 ppm og et på 5,24 ppm. Det ser altså ut til at det er to sukkerenheter i antocyanet.

Proton skiftverdiene merkes så av i HSQC-spekteret (figur 3.2.2.2) for å lese av de tilsvarende karbon skiftverdiene. For protonsignalet som ble identifisert som en overlapping av H6 og H8 kan en se at det er to tydelige krysstopper inn på karbonaksen. Det har vist seg at C6 normalt har høyere skiftverdi en C8⁴¹, noe som nok også er tilfelle her.



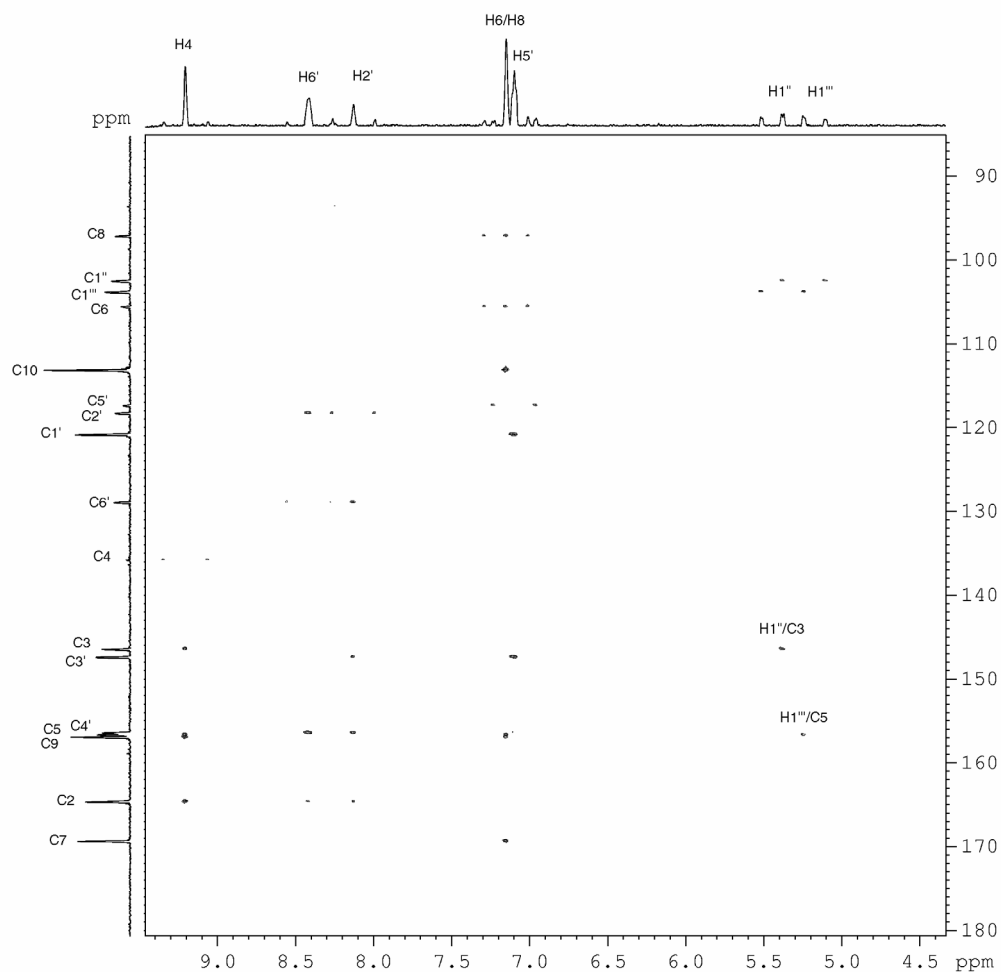
Figur 3.2.2.2: Aromatregionen og anomert område av HSQC-spekter til pigment 1 i *Callistemon citrinus* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25°C .

De avleste karbon skiftverdiene merkes så av på HMBC-spekteret (figur 3.2.2.3) sammen med skiftverdiene for identifiserte proton. Dette brukes så til å identifisere de kvarternære karbonene i aglykonet.

I HMBC-spekteret vises hovedsakelig 3-bindingskoblinger og en del 2-bindingskoblinger. I tillegg kan noen 4-bindingskoblinger vises, men dette er svært avhengig av kvaliteten på prøven. Ved cyanidin vil en forvente å finne koblingene gitt i tabell 3.2.2.1.

Tabell 3.2.2.1 Forventede koblinger i HMBC-spekter av cyanidin.

Proton	$^2J_{\text{CH}}$		$^3J_{\text{CH}}$			$^4J_{\text{CH}}$	
H4	C3	C10	C2	C5	C9	C1'	C8
H6'	C1'	C5'	C2	C2'	C4'		
H2'	C1'	C3'	C2	C4'	C6'		
H5'	C4'	C6'	C1'	C3'			
H8	C7	C9	C6	C10			
H6	C5	C7	C8	C10			



Figur 3.2.2.3: Aromatregionen av HMBC-spekter til pigment 1 i *Callistemon citrinus* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25 °C.

Starter med å finne C2. Dette karbonet vil kunne koble til H6', H2' og H4, som alle er identifisert tidligere. Det eneste signalet som gjør det ligger på 164,71 ppm, og må derfor være C2.

Et annet karbon som er lett å identifisere er C7. Det vil bare koble med H6 og med H8 og må derfor være krysstoppen på 169,39 ppm.

Av protonene på aglykonet vil C3 bare kunne koble med H4. Siden alle de andre karbonene som kobler til H4 også kobler med andre protoner, må krysstoppen på 146,43 ppm skyldes C3. C3 har i tillegg en krysstopp inn på sukkerregionen, ved 5,38 ppm. Dette er det anomere protonet H1'' og det er altså knyttet et sukker i 3-posisjon på aglykonet.

C4' kan koble over tre bindinger til H6' og til H2'. Dessuten vil det også kunne koble til H5'. Karbonet på 156,35 ppm kobler som eneste signal med alle disse tre, og er altså C4'.

C3' vil bare koble med H2' og H5', og må derfor være signalet på 147,34 ppm.

På H5' er nå den ene krysstoppen identifisert. H5' vil i tillegg kunne koble til C1' med en 3-bindingkobling, som burde være ganske sterk. Signalet på 120,79 ppm som gir opphav til

den andre krysstoppen til H5' må da skyldes C1'. Dette stemmer overens med at C1' ikke er direkte knyttet til noe oksygen og derfor vil ligge mer *upfield* enn de fleste andre signalene fra kvarternære karbon.

Et annet kvarternært karbonsignal som burde ha relativt lave skiftverdier er C10. Heller ikke dette karbonet er direkte bundet til noe oksygen. C10 kan koble med H6, H8 og med H4. Det laveste karbonsignalet som H6 og H8 kobler med ligger på 113,08 ppm og er fremdeles uidentifisert. Dette er derfor antagelig C10. Dette karbonet kobler derimot ikke med H4, men det er godt mulig at denne krysstoppen ikke vises fordi det er en 2-bindingskobling.

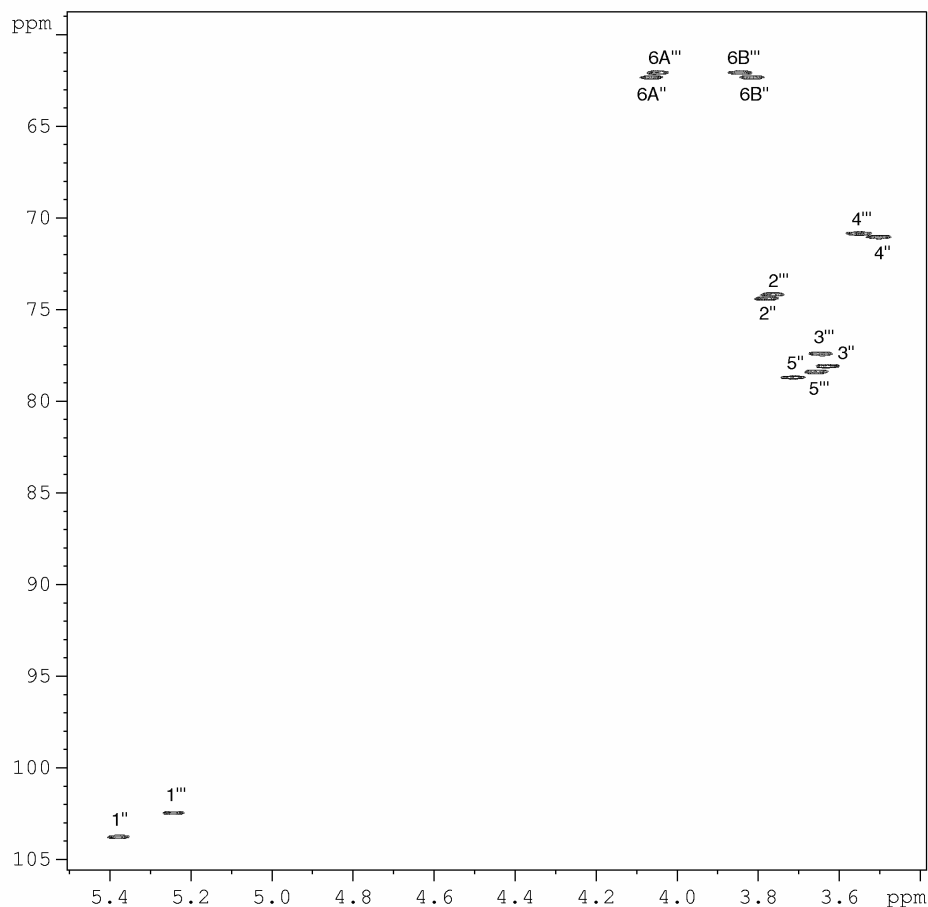
De to gjenværende krysstoppene til H4 ligger i området rundt 156 ppm. Signalene ligger på 156,57 ppm og 156,87 ppm, og må skyldes de to siste karbonene som enda ikke er tilordnet, C5 og C9. Normalt vil en kunne skille disse to karbonene ut fra om de kobler til H6 eller til H8, men siden disse to protonsignalene her overlapper, må en se på noe annet.

Signalet på 156,57 ppm kobler til det anomere protonet på den sukkerenheten som enda ikke er plassert (H1'''). Siden C9 ikke kan ha noe sukker knyttet til seg, må signalet skyldes C5. Dermed er også antagelsen om at det er et sukker i 5-posisjon, som forskyver H6 og H8 oppå hverandre, bekreftet. C9 blir da signalet som ligger på 156,87 ppm.

De kjemiske skiftverdiene stemmer overens med litteraturverdier på cyanidin.⁴¹

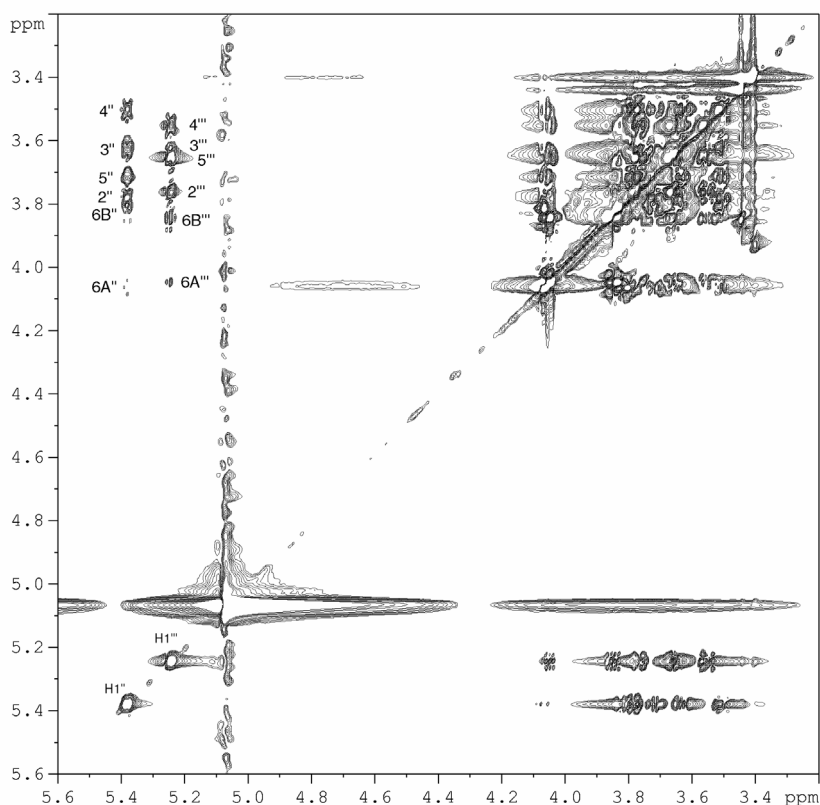
Sukkerregionen

Det er 14 signal i sukkerregionen til HSQC-spekteret (figur 3.2.2.4). Signalene ser ut til å gruppere seg noenlunde parvis. Dette kan tyde på at det er to ganske like sukkerenheter. Signalene på 5,38 ppm og 5,24 ppm er allerede identifisert som de anomere protonene H1'' og H1'''. Protonsignalene på 4,06 ppm og 3,82 ppm ser ut til å ha samme karbonskiftverdi, nemlig 62,30 ppm. Det samme gjelder for signalene på 4,04 ppm og 3,84 ppm, med karbonskiftverdi 62,05 ppm. Disse utgjør da antagelig hver en CH₂-gruppe.



Figur 3.2.2.4: Sukkerregion av HSQC-spekter til pigment 1 i *Callistemon citrinus* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C.

Siden det er flere sukkerenheter, brukes først TOCSY til å bestemme hvilke signal som hører til hvilken sukkerenhet. I TOCSY (figur 3.2.2.5) vises alle protonene som er del av samme spinsystem. Ved å ta utgangspunkt i skiftverdien til H1'' kan en dermed lese av skiftverdiene til de protonene som hører til den samme sukkerenheten. Tilsvarende gjøres for H1''''. Resultatet av denne inndelingen er vist i tabell 3.2.2.3.



Figur 3.2.2.5: Aromatregionen av TOCSY-spekter til pigment 1 i *Callistemon citrinus* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C.

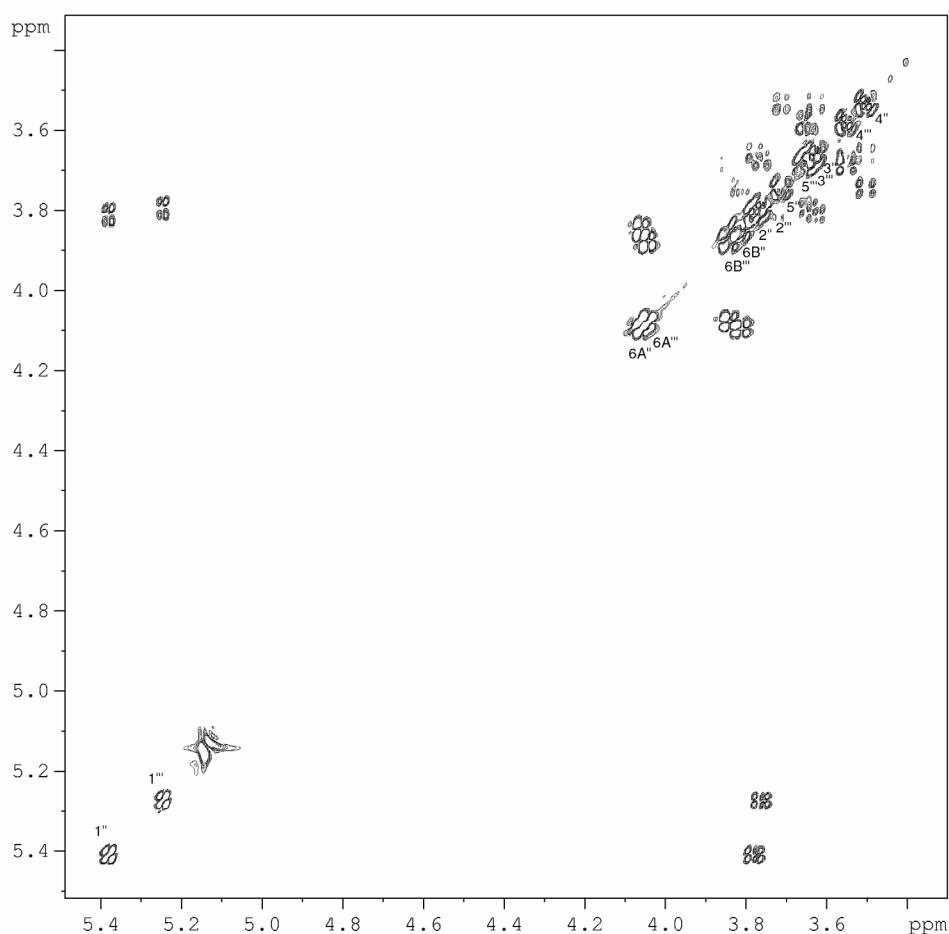
Tabell 3.2.2.3: Inndeling av protonsignaler ved bruk av TOCSY.

δ ¹ H sukker 1 (ppm)	δ ¹ H sukker 2 (ppm)
5,38	5,24
4,06	4,04
3,82	3,84
3,78	3,76
3,71	3,65
3,63	3,64
3,50	3,55

For tilordning av signalene brukes COSY-spekteret (figur 3.2.2.6). Starter med anomeren på 5,38 ppm. Denne kobler med et proton på 3,78 ppm, som gir skiftverdien til H2''. H2'' har en krysstopp til et signal på 3,63 ppm, som må være H3''. H3'' kobler til et proton på 3,50 ppm som da er H4''. H4'' kobler videre til et proton med skiftverdi 3,71 ppm som gir H5''. H5'' kobler videre til et proton 3,82 som igjen kobler til et proton på 4,06 ppm. Dette er de samme skiftverdiene til de protonene som tidligere ble antatt å være del av en CH₂-gruppe. Disse utgjør da henholdsvis H6B'' og H6A''.

Tilsvarende gjøres for det andre sukkeret ved å ta utgangspunkt i anomeren på 5,24 ppm. Denne kobler til H2''' på 3,76 ppm. H2''' kobler videre til H3''' med skiftverdi 3,64 ppm. H3''' kobler videre til H4''' på 3,55 ppm, som igjen kobler videre til H5''' på 3,65 ppm. H5''' kobler til et signal på 3,84 ppm, som igjen kobler videre til et signal på 4,04 ppm. Disse to skiftverdiene tilhører da henholdsvis H6B''' og H6A'''.

Karbon skiftverdiene til begge sukkerene kan nå leses av fra HSQC-spekteret. Verdiene er gitt i tabell 3.2.2.4.



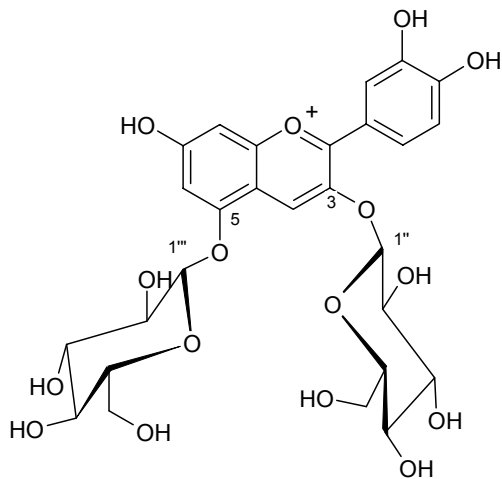
Figur 3.2.2.6: Aromatregionen av COSY-spekter til pigment 1 i *Callistemon citrinus* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25 °C.

Det er altså to sukre der begge har syv protoner, men bare seks karbonatomer. De må da begge være heksoser med hver en CH_2 -gruppe. Av de vanligste monosakkaridene vist i figur 1.2.1.2 er det bare glukose og galaktose som oppfyller disse kravene. $^3J_{\text{HH}}$ for $\text{H4}''$ er 9,2 Hz og for $\text{H4}'''$ er den 9,1 Hz. Begge disse verdiene skyldes den karakteristiske aksial-aksial koblingen fra $\text{H4}''$ til $\text{H3}''$ og til $\text{H5}''$ som en finner i glukose. Karbon skiftverdiene kan nå leses av fra krysstoplene i HSQC-spekteret (figur 3.2.2.4). De avleste skiftverdiene, gitt i tabell 3.2.2.4, stemmer overens med litteraturverdier for glukose.^{41,44} De stemmer også svært godt overens med verdiene fra glukoseenheten identifisert i avsnitt 3.2.1.

Sammensetningen

Det er nå bekreftet at antocyanet er et cyanidinderivat med to sukre som begge er glukoser. I HMBC-spekteret ble det påvist kryssstopper mellom H1'' og C3 og mellom H1''' og C5. Det er altså sukre i 3- og 5-posisjon på aglykonet. Konfigurasjonen til sukkerene bestemmes ut fra koblingskonstanten til anomerer. $^3J_{HH}$ for H1'' er 7,4 Hz mens den for H1''' er 7,6 Hz, som er typiske verdier for β -konfigurasjon. Antocyanet blir da cyanidin 3,5 di- O - β -glukopyranosid.

Strukturen til pigmentet er vist i figur 3.2.2.7.



Figur 3.2.2.7: Pigment 1 i *Callistemon citrinus*, cyanidin 3,5-di- O - β -glukopyranosid.

Tabell 3.2.2.4: NMR-data for pigment 1 i *Callistemon citrinus* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C.

	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplisitet	J (Hz)	Hentet fra*
Cyanidin					
2	164,71				HMBC
3	146,43				HMBC
4	135,79	9,20	s		HSQC, ¹ H
5	156,57				HMBC
6	105,50	7,14	s		HSQC, ¹ H
7	169,39				HMBC
8	97,09	7,14	s		HSQC, ¹ H
9	156,87				HMBC
10	113,08				HMBC
1'	120,79				HMBC
2'	118,22	8,13	s		HSQC, ¹ H
3'	147,34				HMBC
4'	156,35				HMBC
5'	117,31	7,10	d	8,6	HSQC, ¹ H
6'	128,86	8,41	d	8,6	HSQC, ¹ H
3-O-β-glukopyranosid					
1''	103,75	5,38	d	7,4	HSQC, ¹ H
2''	74,40	3,78	m	9,1	HSQC, COSY
3''	78,08	3,63	m	9,1	HSQC, COSY
4''	71,03	3,50	t	9,2	HSQC, COSY
5''	78,70	3,71	m	6,5 og 9,0	HSQC, COSY
6A''	62,30	4,06	m	6,0	HSQC, COSY
6B''	62,30	3,82	m	5,5 og 11.6	HSQC, COSY
5-O-β-glukopyranosid					
1'''	102,43	5,24	d	7,6	HSQC, ¹ H
2'''	74,17	3,76	m	9,2	HSQC, COSY
3'''	77,40	3,64	m	9,5	HSQC, COSY
4'''	70,82	3,55	t	9,1	HSQC, COSY
5'''	78,39	3,65	m	9,2	HSQC, COSY
6A'''	62,05	4,04	m	11,0	HSQC, COSY
6B'''	62,05	3,84	m	5,0	HSQC, COSY

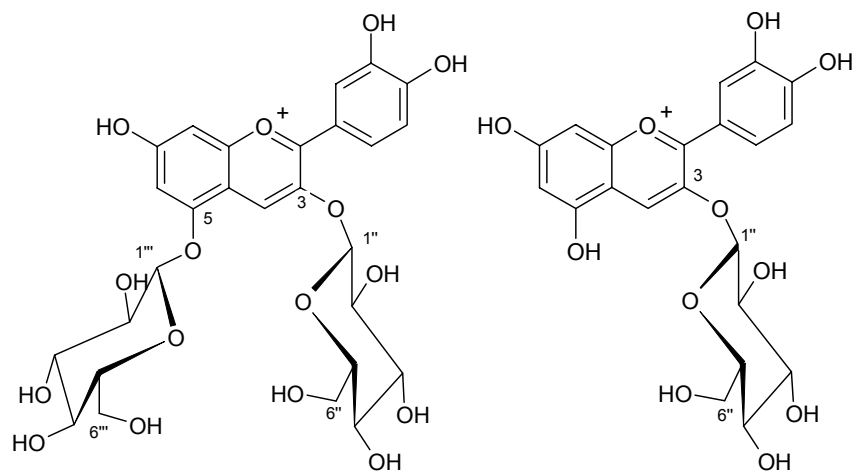
*Alle koblingskonstanter er hentet fra protonspekter. Mange av signalene i sukkerregionene var overlappende.

3.3 Oppsummering

Blomstene til *Callistemon citrinus* ble ekstrahert med metanol tilsatt TFA og rensset med et tofasesystem, bestående av etylacetat og vann, og med Amberlite XAD-7-kolonne. Separasjonen av pigmentene ble utført på Sephadex LH-20-kolonne. Til identifiseringen av pigmentene ble det benyttet TLC, HPLC, UV/synlig-spektroskopi og NMR.

Det ble identifisert to pigmenter i *Callistemon citrinus*, cyanidin 3,5-di-*O*- β -glukopyranosid (1) og cyanidin 3-*O*- β -glukopyranosid (2). Strukturen til disse er vist i figur 3.3.1.

I tidligere arbeid på antocyaninnholdet av *Callistemon citrinus* er det funnet pelargonidin 3,5-diglukosid, cyanidin 3,5-diglukosid³ og cyanidin 3-glukosid². Disse arbeidene er derimot ikke basert på NMR.



Figur 3.3.1: Strukturen til pigment (1) 3,5-di-*O*- β -glukopyranosid og (2) cyanidin 3-*O*- β -glukopyranosid.

Kapittel 4 - Resultater og diskusjon - *Phyllanthus ovalifolia*

Det er tidligere utført et arbeid på antocyaninnholdet i *Phyllanthus ovalifolia*. Arbeidet baserte seg på hydrolyse og analyse med HPLC og UV/synlig-spektroskopi. Konklusjonen ble at bærene inneholder cyanidin- og delphinidinderivater, men nøyaktig hvilke var det ikke mulig å angi.⁵

Kapittelet er delt inn i tre hoveddeler. Kapittel 4.1 tar for seg isolasjon og analyse av antocyanene i bærene til *Phyllanthus ovalifolia*. I kapittel 4.2 identifiseres to av pigmentene ved bruk av HPLC og UV/synlig-spektroskopi, mens kapittel 4.3 tar for seg strukturoppklaring av de to siste pigmentene med NMR-analyse. Til slutt er det gitt en kort oppsummering av hele kapittelet.

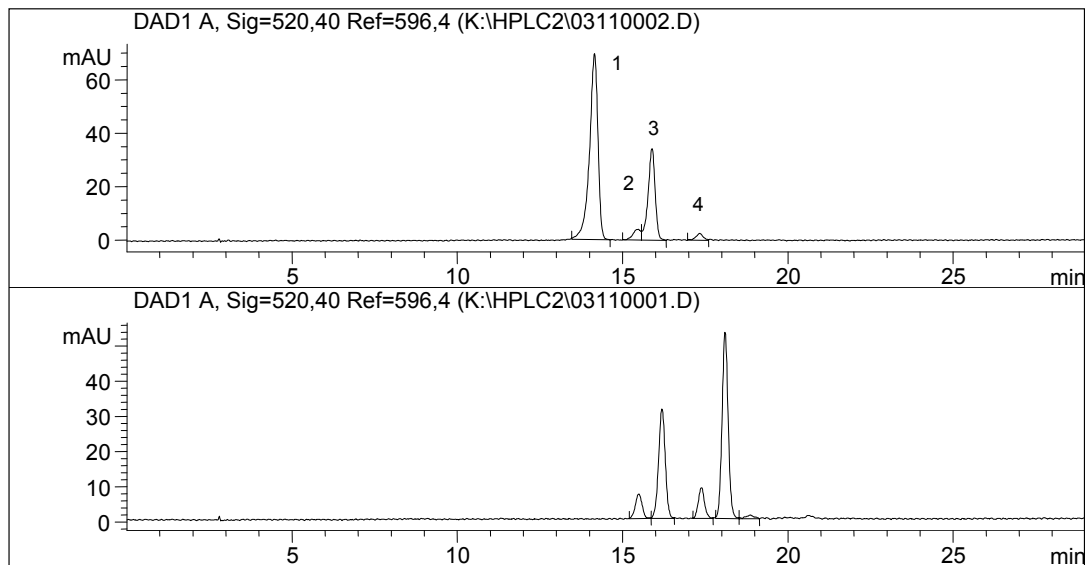
4.1 Isolasjon og analyse

Det ble plukket 75,46 gram bær av planten *Phyllanthus ovalifolia* i Uganda oktober 2002. Blomstene ble ekstrahert med metanol tilsatt TFA og deretter rensset ved hjelp av etylacetat og Amberlite XAD-7-kolonne. Dette ble gjort ved Makerere University i Uganda. Det videre arbeidet ble utført ved Universitetet i Bergen. Dette inkluderer bruk av Sephadex LH-20-kolonne, HPLC, TLC og NMR. Detaljert beskrivelse av metoder og prosedyrer er gitt i kapittel 2.

Siden planten ikke var tilgjengelig ved Universitetet i Bergen, var det heller ikke mulig å få et rækstrakt. Det som refereres til som rækstrakt utover i dette kapittelet er ekstraktet etter rensing med etylacetat og Amberlite XAD-7-kolonne.

4.1.1 Analyse av rækstrakt

Det ble kjørt en HPLC-profil av rækstraktet for å få en indikasjon på hvor mange og hvilke antocyaner ekstraktet inneholdt. Som referanse ble det benyttet et ekstrakt av solbær. I solbær er det fire identifiserte pigmenter som utgjør største delen av antocyaninnholdet; delphinidin 3-glukosid, delphinidin 3-rutinosid, cyanidin 3-glukosid, og cyanidin 3-rutinosid.³⁸ Rekkefølgen av pigmentene er gitt med økende retensjonstid på HPLC.¹



Figur 4.1.1.1: HPLC-kromatogram av råekstrakt av *Phyllanthus ovalifolia* (øverste vindu) og solbær (nederste vindu) detektert ved 520 + 20 nm.

Ut fra kromatogrammet ved 520 ± 20 nm (figur 4.1.1.1, øverste vindu) ser det ut til å være fire pigmenter i ekstraktet, hvorav to i betydelig større mengde enn de to andre. De to midterste toppene er ikke helt separerte, mens de andre er tydelig adskilte. Pigmentene er nummerert fra 1 til 4 ut fra rekkefølgen de ble retardert.

Det nederste vinduet i figur 4.1.1.1 viser solbærreferansen. Valg av referanse viste seg å være svært nyttig, da pigment 2 i *Phyllanthus ovalifolia* har omtrent lik retensjonstid som delfinidin 3-glukosid i solbær. Pigment 4 har nesten identisk retensjonstid med et annet pigment i solbær, cyanidin 3-glukosid.

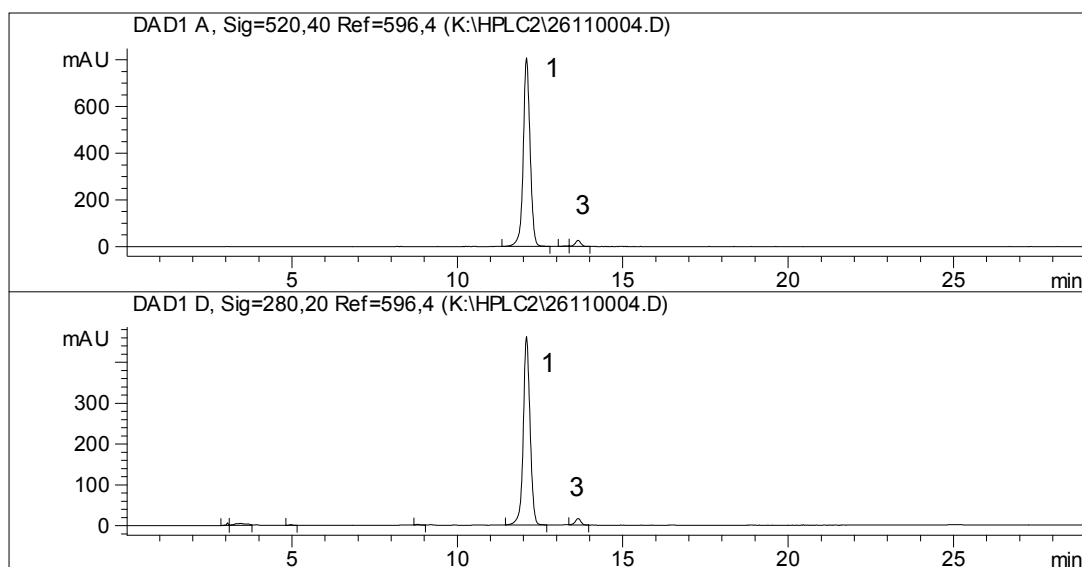
4.1.2 Isolering med Sephadex-kolonne

Det ble benyttet en Sephadex LH-20-kolonne for å isolere de ulike pigmentene i ekstraktet. Det dannet seg et bredt bånd og to tydelige smalere bånd. Det brede båndet hadde en klar rødlig farge. Det midterste smale båndet var lyserødt, mens det øverste smale båndet var mer dyprosa.



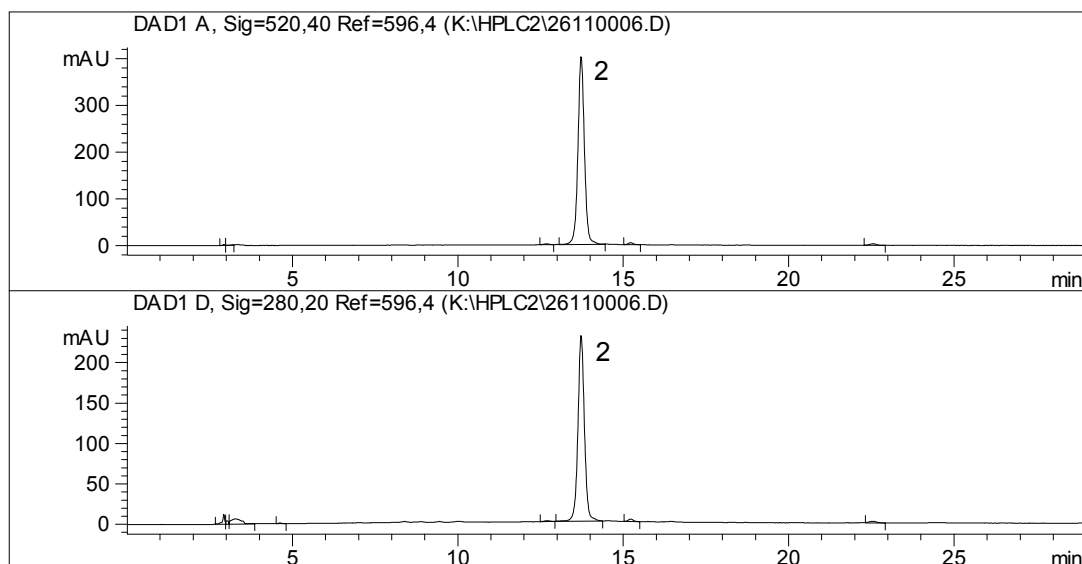
Figur 4.1.2.1: Sephadex LH-20-kolonne med antocyaner fra *Phyllanthus ovalifolia*.

Det brede båndet ble delt inn i flere fraksjoner, under antagelse at det besto av mer enn ett pigment. Det ble kjørt HPLC på alle de ulike fraksjonene. Det viste seg at de smale båndene hver ga en topp i kromatogrammet, mens det brede båndet ga to ulike topper. HPLC-profilen til den mest konsentrerte fraksjonen til hver av de fire toppene er vist i figur 4.1.2.2 til 4.1.2.5.



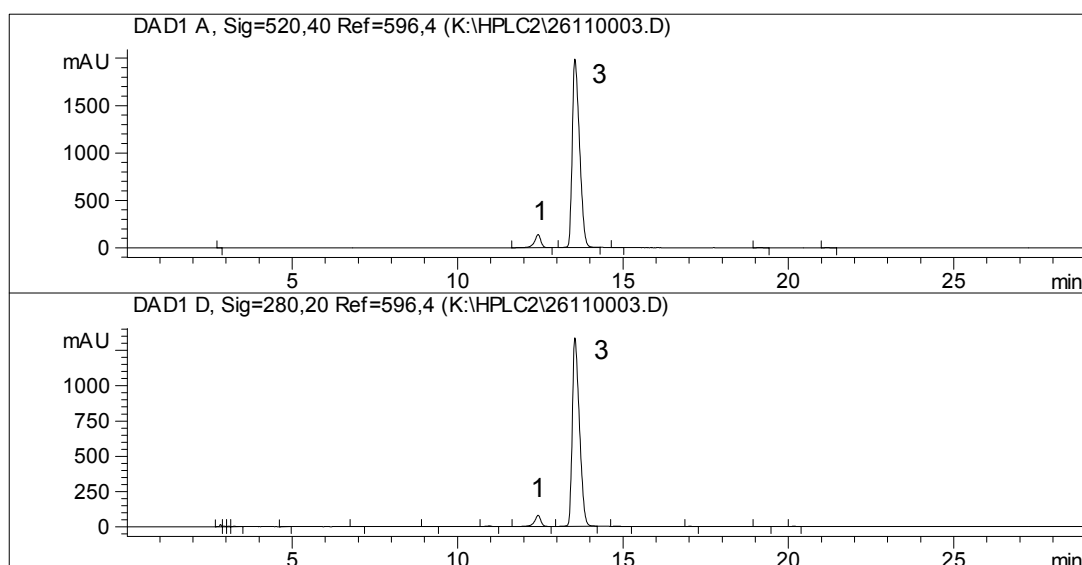
Figur 4.1.2.2: HPLC-kromatogram av pigment 1 detektert ved 520 ± 20 nm (øverste vindu) og ved 280 ± 10 nm (nederste vindu) etter rensing med Sephadex LH-20-kolonne.

Pigment 1 og 3 utgjorde det brede båndet på Sephadex LH-20-kolonnen. I kromatogrammet ved 520 ± 20 nm (figur 4.1.2.2, øverste vindu) ser det ut til å være litt av pigment 3 i fraksjonen til pigment 1. Det er likevel så lite at det ikke gir noen problemer ved videre analyse. I kromatogrammet ved 280 ± 10 nm (figur 4.1.2.2, nederste vindu) ser en det samme, mye av pigment 1 og litt av pigment 3, ellers omtrent ingenting. Dette vinduet viser at fraksjonen er omtrent helt fri for andre aromatisk forbindelser, noe som gjør den videre analysen betydelig enklere og mer presis.



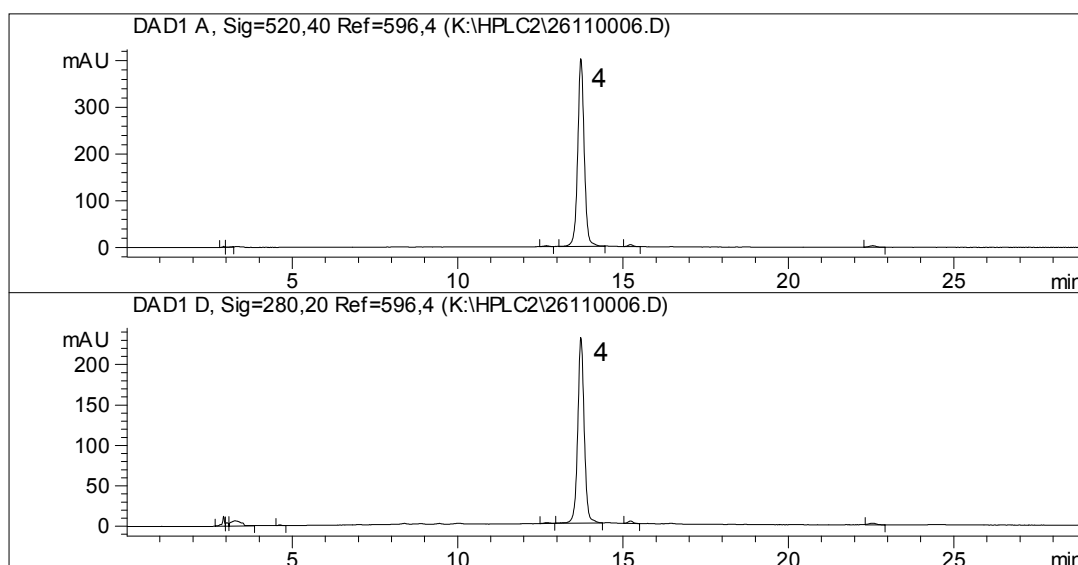
Figur 4.1.2.3: HPLC-kromatogram av pigment 2 detektert ved 520 ± 20 nm og 280 ± 10 nm etter rensing med Sephadex LH-20-kolonne.

Figur 4.1.2.3 viser fraksjonen til pigment 2. Dette er bånd nummer to, altså det lyserøde båndet i midten av kolonnen på figur 4.1.2.1. Fraksjonen er omtrent helt ren både ved 520 ± 20 nm (øverste vindu) og ved 280 ± 10 nm (nederste vindu).



Figur 4.1.2.4: HPLC-kromatogram av pigment 3 detektert ved 520 ± 20 nm og 280 ± 10 nm etter rensing med Sephadex LH-20-kolonne.

Figur 4.1.2.4 viser fraksjonen til pigment 3. Både ved 520 ± 20 nm (øverste vindu) og ved 280 ± 10 nm (nederste vindu) er det spor av pigment 1, men ellers omtrent ingen andre forbindelser. Pigment 3 utgjorde den øverste delen av det brede båndet og det er derfor ikke overraskende at det er litt av pigment 1 i det, siden dette pigmentet utgjorde den nederste delen av det samme båndet. Det er likevel ikke snakk om store mengder relativt til pigment 3, så det burde ikke gi problemer i den videre analysen.



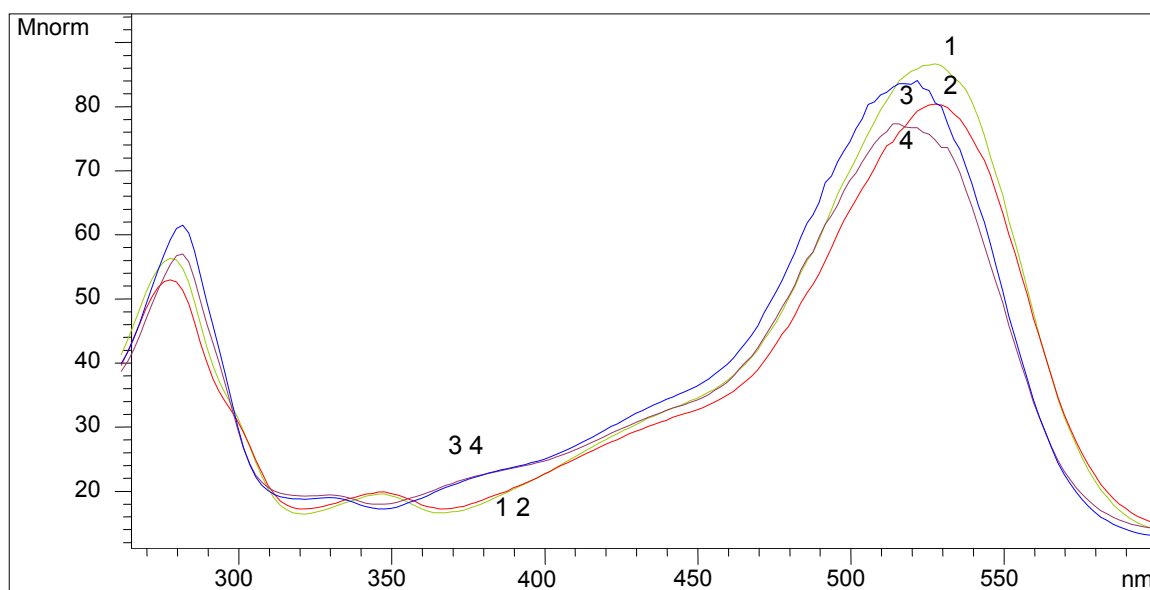
Figur 4.1.2.5 HPLC-kromatogram av pigment 4 detektert ved 520 ± 20 nm og 280 ± 10 nm etter rensing med Sephadex LH-20-kolonne

Figur 4.1.2.5 viser fraksjonen til pigment 4. Dette var det siste bandet som kom ut av Sephadex LH-20-kolonnen. Fraksjonen ser ut til å være ren ved 520 ± 20 nm (øverste vindu), men ved 280 ± 10 nm (nederste vindu) er det noen forbindelser med lav retensjonstid. Det er her snakk om veldig små stoffmengder, som ikke skal kunne gi problemer i det videre arbeidet.

Alle fire fraksjonene ser altså ut til å være rene nok til å kunne brukes til videre analyse.

4.1.3 UV/synlig-spektre av pigmentene

Under HPLC-analysen ble det tatt opp UV/synlig-spektre av pigmentene *on-line*.



Figur 4.1.3.1 UV/synlig-spektre av de fire pigmentene i *Phyllanthus ovalifolia* detektert under *on-line* HPLC-analyse.

UV/synlig-spektre til de fire pigmentene er vist i figur 4.1.3.1. Pigment 1 og pigment 2 har tilnærmet lik absorbans både i UV-området og i det synlige området. Tilsvarende gjelder for pigment 3 og 4.

Tabell 4.1.3.1: Verdier fra HPLC-analyse av pigmentene i *Phyllanthus ovalifolia*

Pigment	t_R (min)	UV_{max} (nm)	Vis_{max} (nm)	$A_{440}/A_{vis-max}$ (%)
1	12,09	278	528	27
2	13,73	278	528	26
3	13,55	282	522	31
4	14,76	282	520	30

Fraksjonene ble kjørt på HPLC i rekkefølgen de kom ut av kolonnen, som viste seg å være pigment 3, pigment 1, pigment 4 og til slutt pigment 2. Benevnelsene pigment 1 til 4 er satt etter forbindelsenes retensjon på HPLC i råekstraktet, hvor pigment 1 har lavest retensjonstid. Retensjonstidene i tabell 4.1.3.1 er derimot ikke lenger økende med økende pigmentnummer. Her har pigment 3 lavere retensjonstid enn pigment 2. Dette skyldes nok bare en liten endring i eksperimentbetingelsene. Tallbetegnelsen av pigmentene kan fremdeles anses som korrekt, da både råekstrakt og solbærstandarden ble brukt til sammenligning.

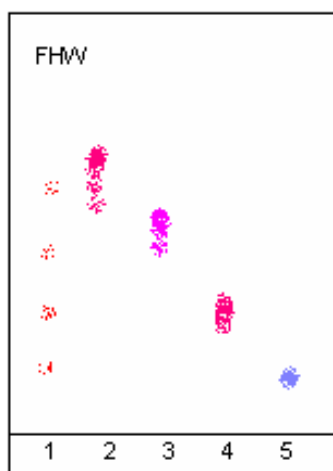
Pigment 1 og pigment 2 absorberer maksimalt synlig lys ved 528 nm. Dette er en vanlig verdi for delfinidin-, malvidin- og petunidinderivater.²⁸ Pigment 3 og 4 ligger derimot lavere, i intervallet 520-522 nm, som er vanlig for cyanidin- og peonidin derivater²⁸.

Ut fra absorbansen i UV-regionen ser det ikke ut til at noen av de fire pigmentene har aromatisk acylering.

Alle fire pigmentene har en $A_{440}/A_{\text{vis-max}}$ -ratio som ligger godt innenfor intervallet for 3-substitusjon^{1,5} og det ser ikke ut til at noen av pigmentene har substitusjon i flere posisjoner.

4.1.4 Tynnskikt-kromatografi (TLC)

Det ble kjørt TLC på de ulike forbindelsene. Solbær ble brukt som referanse og FHW som mobilfase.



Figur 4.1.4.1: TLC av pigmentene i *Phyllanthus Ovalifolia* med FHW som mobilfase. 1: solbær, 2: pigment 3, 3: pigment 1, 4: pigment 4, 5: pigment 2

Tabell 4.1.4.1: R_f -verdier fra TLC av antocyanene i *Phyllanthus ovalifolia*.

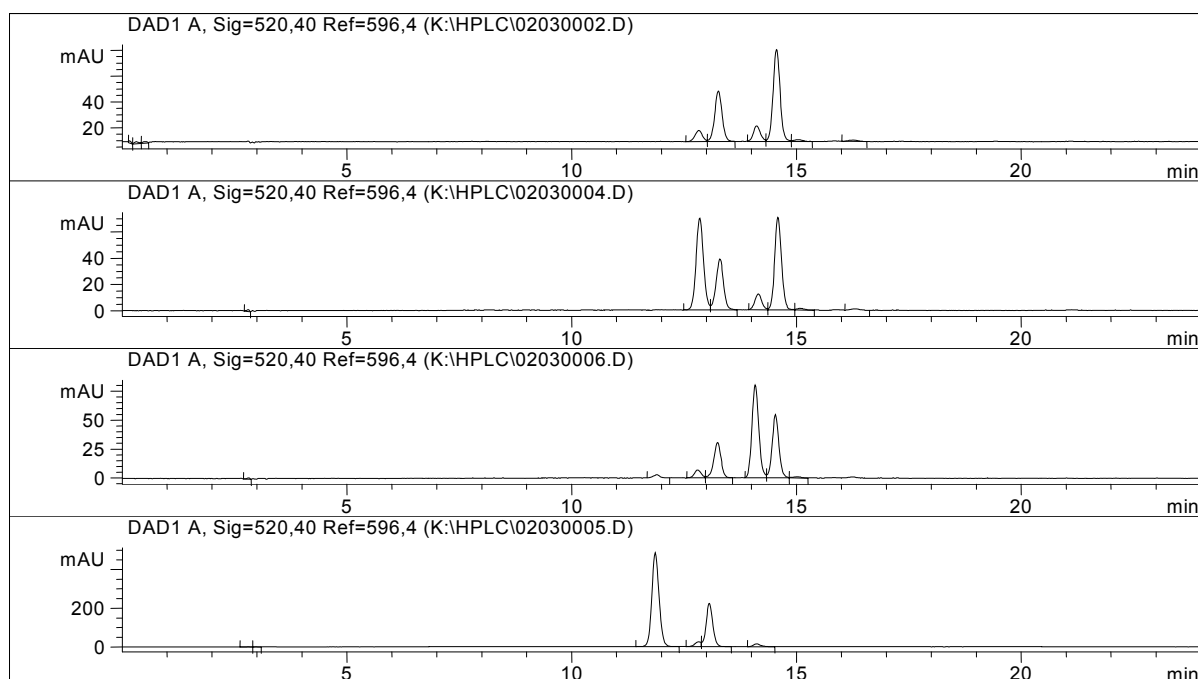
Forbindelse	R_f FHW
<i>Solbær</i>	
cy 3-rut	0,56
dp 3-rut	0,41
cy 3-glu	0,28
dp 3-glu	0,16
<i>P. ovalifolia</i>	
pigment 1	0,49
pigment 2	0,16
pigment 3	0,59
pigment 4	0,29

Figur 4.1.4.1 og tabell 4.1.4.1 viser at pigment 4 kokromatograferer med cyanidin 3-glukosid i solbær, mens pigment 2 kokromatograferer med delphinidin 3-glukosid, også i solbær.

Pigment 1 og 3 har betydelig høyere R_f -verdier enn pigment 2 og 4. Dersom antagelsene om pigment 2 og 4 stemmer, har disse hver en sukkerenhet knyttet til aglykonet. At R_f -verdiene til pigment 1 og 3 er høyere kan da tyde på at disse har to eller flere sukkerenheter.

4.2 Identifisering med HPLC og UV/synlig-spektroskopi (pigment 2 og 4)

Fra HPLC-kromatogrammene og TLC ser det ut til at pigment 2 er delfinidin 3-glukosid og at pigment 4 er cyanidin 3-glukosid. Begge disse pigmentene finnes i solbær. For å bekrefte at dette stemmer ble det utført følgende eksperiment på HPLC: Først ble en ren solbærprøve kjørt. Deretter ble litt av pigment 2 tilsatt solbærprøven og kjørt. Denne prøven er benevnt blandingsprøve A. Tilsvarende ble gjort for pigment 4, og prøven er kalt blandingsprøve B. Til slutt ble et råkstrakt av *Phyllanthus ovalifolia* kjørt. Resultatet av dette eksperimentet er vist i figur 4.2.1.



Figur 4.2.1: HPLC-kromatogram detektert ved 520 ± 20 nm av solbær (vindu 1), solbær tilsatt pigment 2 (vindu 2), solbær tilsatt pigment 4 (vindu 3) og råkstrakt av *Phyllanthus ovalifolia* (vindu 4).

Tabell 4.2.1: Verdier fra HPLC-analyse av solbær og pigment 2 og pigment 4 i *Phyllanthus ovalifolia*.

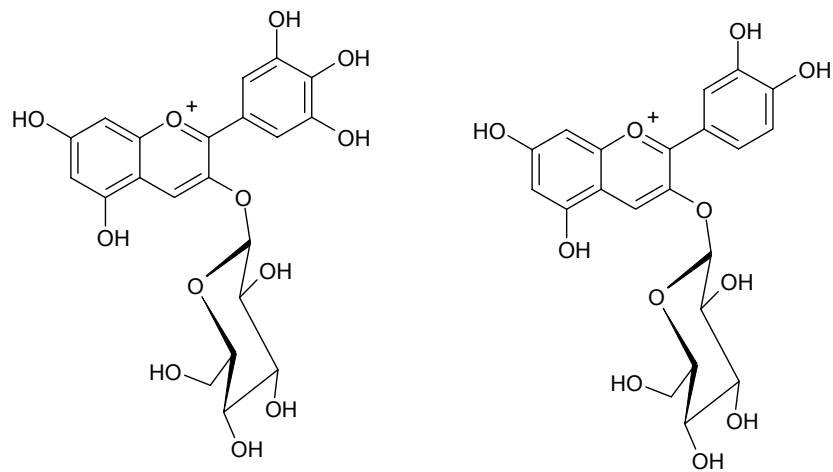
Forbindelse	R _t	UV _{max} (nm)	Vis _{max} (nm)
pigment 2	13,61	278	528
dp 3-glu	13,55	278	529
pigment 4	15,17	282	516
cy 3-glu	15,11	280	519

Dersom pigment 2 virkelig er det antatte delfinidin 3-glukosid burde den relative mengden av dette antocyanet i blandingsprøve A (vindu 2 figur 4.2.1) økt i forhold til relativ mengde delfinidin 3-glukosid i ren solbær (vindu 1 figur 4.1.5.1). Dette var også tilfelle.

Resultatet av blandingsprøve B (vindu 3 figur 4.2.1) var at toppen som tilsvarer cyanidin 3-glukosid fikk økt intensitet relativt i forhold til mengde cyanidin 3-glukosid i ren solbær.

Dette bekrefter at pigment 2 er delfinidin 3-glukosid og at pigment 4 er cyanidin 3-glukosid. UV/synlig-spektrene til pigment 2 og 4 stemmer også godt overens med spektre fra de to tilsvarende forbindelsene i solbærstandarden.

Pigment 2 og 4 i *Phyllanthus ovalifolia* er vist i figur 4.2.2.



Figur 4.2.2: To av pigmentene i *Phyllanthus ovalifolia*; delphinidin 3-glukosid (2) og cyanidin 3-glukosid (4). Sukkerene er vist i β -konfigurasjon.

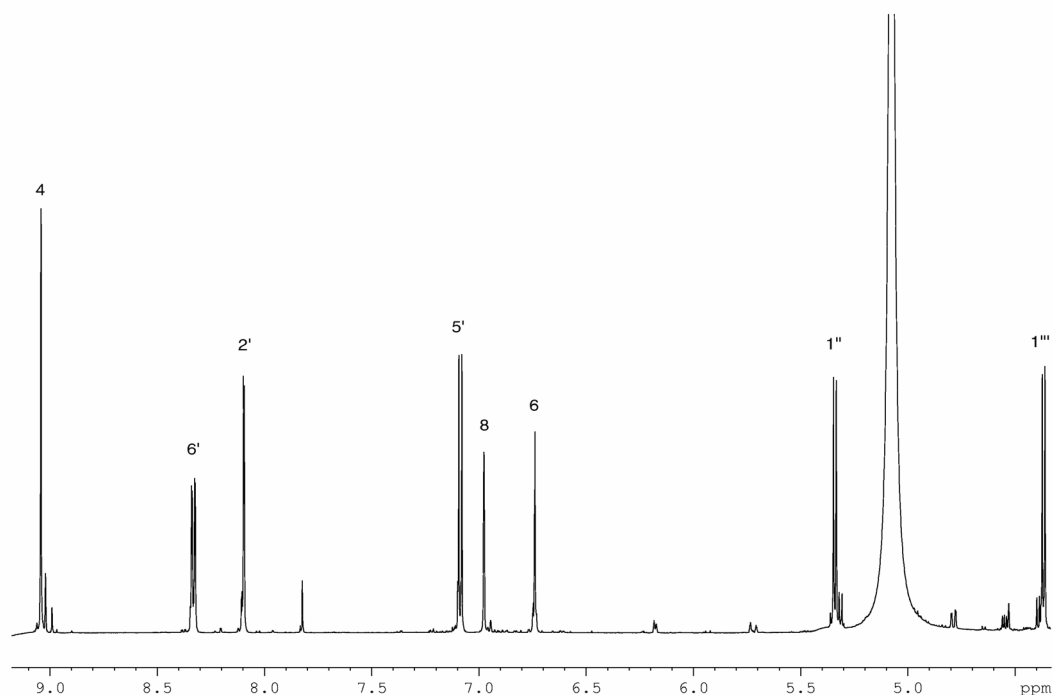
4.3 Strukturbestemmelse med NMR (pigment 1 og 3)

Følgende 1D og 2D NMR-eksperiment ble utført for å oppnå en fullstendig identifisering av pigmentene: ^1H , HSQC, HMBC og COSY. I tillegg ble det utført et TOCSY-eksperiment på pigment 3 til hjelp i tilordningen.

4.3.1 Pigment 3; cyanidin 3-(6''-*O*- β -glukopyranosyl-*O*- β -glukopyranosid)

I aromatregionen av protonspekteret (figur 4.3.1.1) er det totalt seks signal. UV/synligspektroskopi viste ingen tegn på aromatisk acylering. Disse signalene må dermed skyldes seks protoner på aglykonet. Av de seks vanligste aglykonene (figur 1.2.1.1) er det da bare cyanidin og peonidin som er aktuelle. Begge disse vil gi opphav til seks aromatiske signal på grunn av tre protoner på B-ringene i tillegg til tre protoner på A- og C-ringene. B-ringene i peonidin er substituert med en metoksygruppe i 3'-posisjon. Dersom pigment 3 er et peonidinderivat skal denne metoksygruppen gi opphav til et tydelig signal rundt 4,0 ppm i protonspekteret.³⁹ Et slikt signal finnes ikke for dette pigmentet. Aglykonet kan altså heller ikke være peonidin og er da antagelig cyanidin.

Ved hjelp av skiftverdier og koblingskonstanter er det mulig å anordne signalene i aromatregionen.



Figur 4.3.1.1 Aromatregion og anomert område i ^1H NMR-spekter av pigment 3 i *Phyllanthus ovalifolia* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25 °C. Signalene er merket med protonidentiteter.

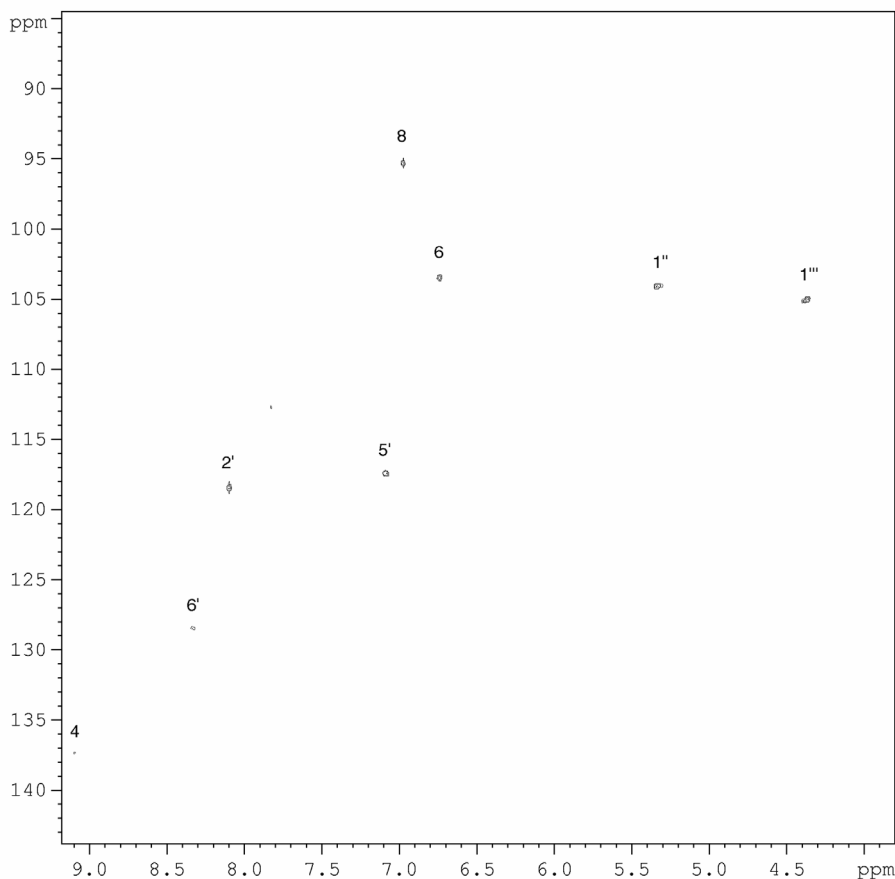
Signalet på 9,04 ppm har den karakteristisk høye verdien for H4.

På 8,33 ppm ligger en dobbel dublett. Dette er da et proton som kobler med to andre proton. Det eneste protonet i cyanidin som har mulighet til dette er H6'. H6' kan koble både til H5'

og til H2'. Splittingen til H6' er her på 8,7 Hz og 2,3 Hz. Siden koblingen mellom H6' og H5' er en orto-kobling vil denne ha betydelig større koblingskonstant enn meta-koblingen mellom H6' og H2'. Splittingen på 8,7 Hz skyldes dermed at H6' kobler til H5', mens splittingen på 2,3 Hz skyldes kobling mellom H6' og H2'. Skiftverdiene til H5' og H2' kan da leses av ved å finne signaler med tilsvarende koblingskonstanter. Siden signalet på 7,09 ppm har en splitting på 8,7 Hz er dette H5', mens signalet på 8,10 ppm med en splitting på 2,3 Hz er H2'.

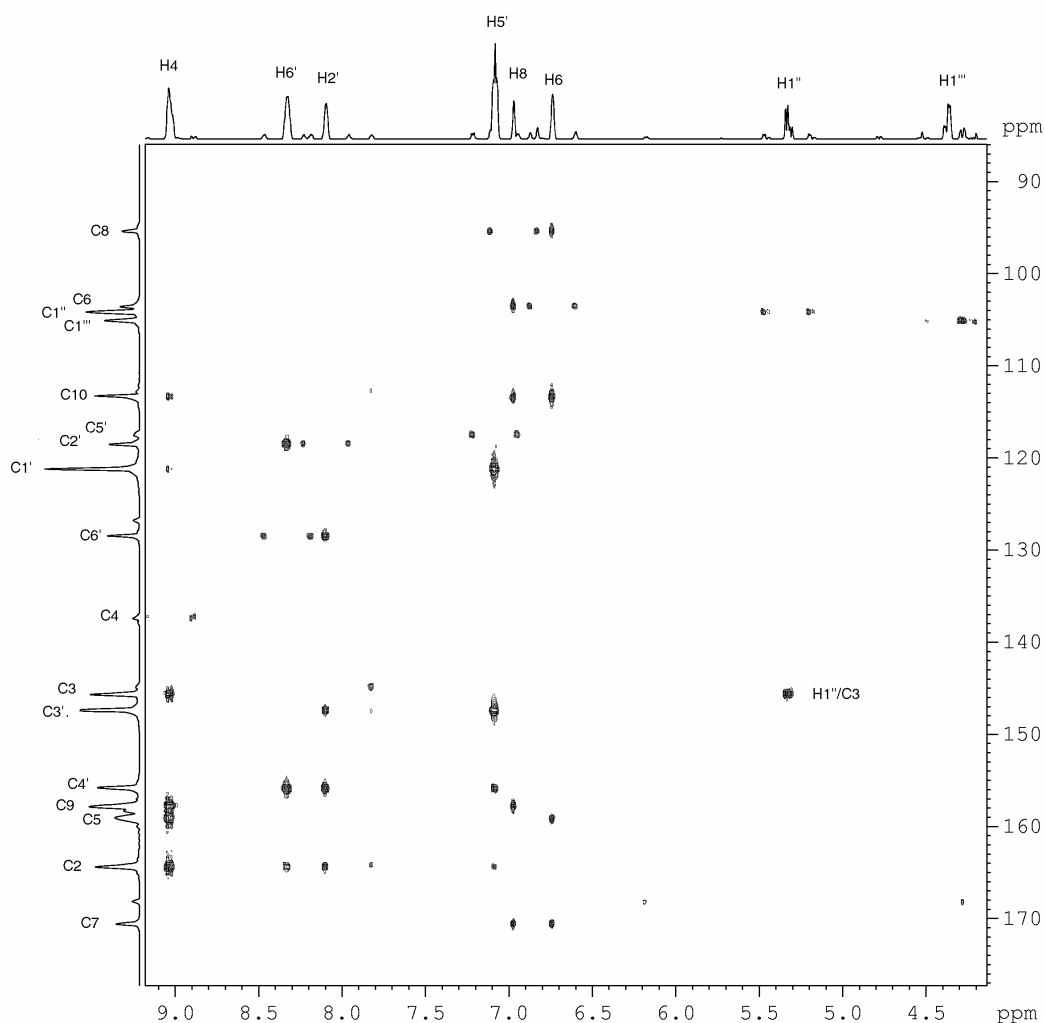
Nå gjenstår to signaler, som må komme av H6 og H8. I antocyaner vil vanligvis H8 ha en høyere proton skiftverdi enn H6, mens C8 vil ha en lavere karbon skiftverdi enn C6.^{40, 41} Utifra dette skal signalet på 6,98 ppm være H8, mens signalet på 6,74 ppm er H6. HSQC-spekteret (figur 4.3.1.2) viser at krysstoppen med proton skiftverdi 6,98 har en lavere karbon skiftverdi (95,34 ppm) enn krysstoppen med proton skiftverdi 6,74 (karbon skiftverdi 103,54 ppm). Dette bekrefter tilordningen av H8 og H6.

Nå kan HSQC-spekteret (figur 4.3.1.2) brukes til å lese av karbon skiftverdier til krysstoppene med de nå tilordnete protonene. De avleste verdiene er gitt i tabell 4.3.1.4.



Figur 4.3.1.2 Aromatregion og anomert område av HSQC-spekter til pigment 3 i *Phyllanthus ovalifolia* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C.

Til anordningen av de kvarternære karbonene brukes HMBC-spekteret (figur 4.3.1.3). Forventede koblinger i HMBC ved cyanidin er gitt i tabell 4.3.1.1.



Figur 4.3.1.3 HMBC NMR-spekter av pigment 3 i *Phyllanthus ovalifolia* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25 °C.

Tabell 4.3.1.1 Forventede koblinger i HMBC-spekter ved cyanidin.

Proton	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$^4J_{\text{CH}}$
H4	C3	C10	C2
H6'	C1'	C5'	C2
H2'	C1'	C3'	C2
H5'	C4'	C6'	C1'
H8	C7	C9	C6
H6	C5	C7	C8

Starter med å se på krysstopperne til H4. HMBC-spekteret viser at H4 kobler med seks ulike karbon. To av disse ligger relativt langt *upfield*, i området rundt 115 ppm, noe som tyder på at de ikke er direkte knyttet til noe oksygen. Det er bare tre slike karbon som H4 kan koble til, C1', C10 og C8. C8 er allerede er identifisert, men den har ingen krysstopper til H4. Dette skyldes nok at det er en 4-bindingkobling, og at disse lett kan bli for svake til å vises. De to gjenværende krysstopperne må da komme av koblinger til C1' og til C10. Signalet på 121,31

ppm kobler videre til H2' og til H5' og må dermed være C1'. Signalet på 113,39 ppm kobler til H8 og til H6, noe som bekrefter at det er C10.

I tillegg til C10 har H6 og H8 enda ett karbon som de begge kan koble til, nemlig C7. Siden den eneste karbon skiftverdien de nå har en felles uidentifisert krysstopp på er 170,55 ppm, må denne tilhøre C7.

H6 forventes i tillegg å koble med C5. Den eneste gjenværende uidentifisert krysstoppen til H6 ligger på 159,12 ppm og gir dermed skiftverdien til C5.

Tilsvarende forventes H8 å koble med C9. Også H8 har nå bare en uidentifisert krysstopp. Denne ligger på 157,87 ppm og gir skiftverdien til C9.

Fire av de seks krysstoppene til H4 er nå identifisert. De gjenværende ligger på 164,43 ppm og 145,72 ppm og må skyldes C2 og C3. Karbonet på 164,43 ppm har i tillegg krysstopper til H2', H5' og til H6'. Det er for mange bindinger mellom C3 og protonene på B-ringen til at disse vil gi opphav til krysstopper. Krysstoppen på 164,43 ppm må derfor skyldes C2. Det er ganske uvanlig å se korrelasjoner mellom C2 og H5', men en sjelden gang gir de opphav til en synlig krysstopp, noe som er tilfelle her. Den gjenværende krysstoppen på 145,72 ppm skyldes da C3.

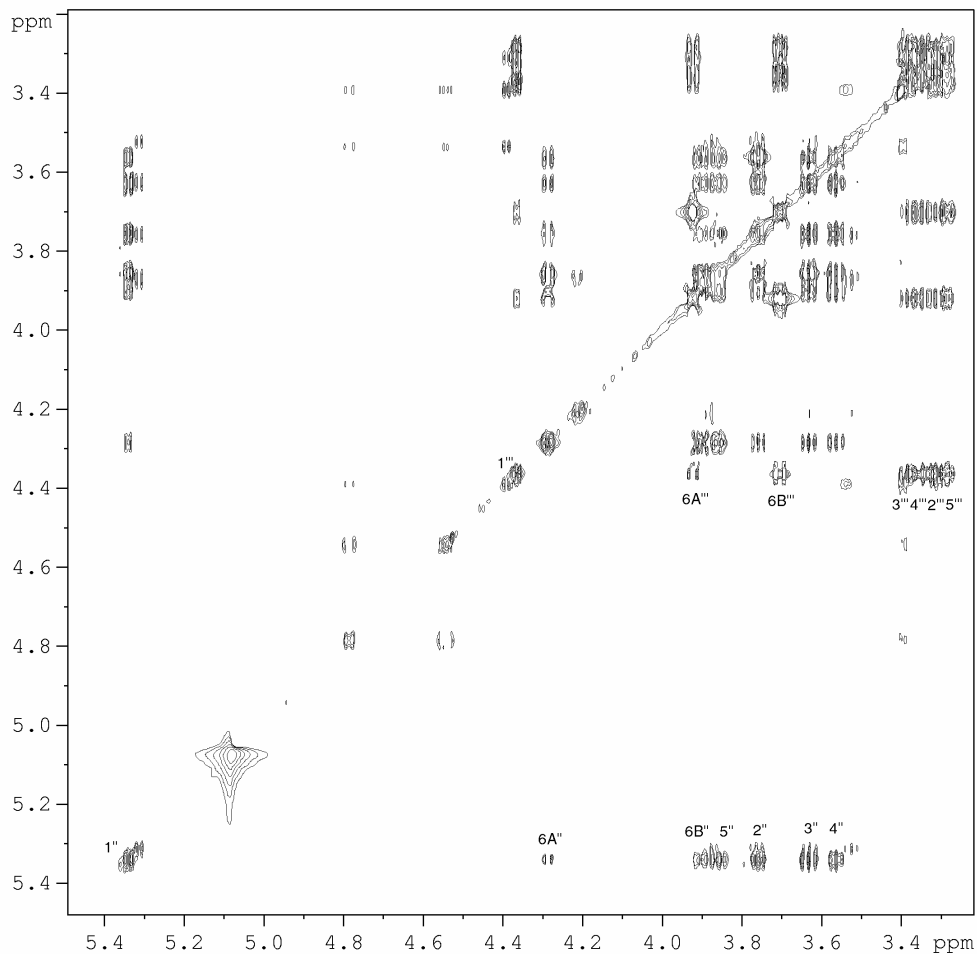
Nå er det bare C3' og C4' som mangler tilordning. Begge disse kobler både med H2' og med H5', men C4' vil i tillegg koble med H6'. Det er bare en uidentifisert krysstopp til H6' og denne ligger på 155,84 ppm. Dette må da være karbon skiftverdien til C4'. Det siste signalet som gir opphav til krysstopper til både H2' og H5' ligger på 147,36 ppm og er dermed C3'.

Alle karbon og proton skiftverdier til atomene i aglykonet er nå tilordnet og de stemmer overens med litteraturverdier for cyanidin.⁴⁴ De stemmer også godt overens med kjemiske skiftverdiene funnet for cyanidinderivatene i kapittel 3.2.1. og 3.2.2.

Sukkerenhetene

Anomere protoner finnes vanligvis i området 4-6 ppm i protonspekteret. I protonspekteret (figur 4.3.1.1) er det to signal som ser ut til å være aktuelle, ett på 5,34 ppm (H1'') og ett på 4,37 ppm (H1'''). Anomere protoner med skiftverdier såpass *upfield* som H1''' er vanligvis del av frie sukre eller sukkerenheter som er knyttet til en annen sukkerenhet. Sukkerenheten med tilhørende anomert proton H1''' er altså mest sannsynlig ikke knyttet direkte til aglykonet.

Siden det her er flere sukkerenheter er det praktisk å starte med et TOCSY-spekter (figur 4.3.1.4). Ved å ta utgangspunkt i skiftverdien til H1'' kan en lese av skiftverdiene til protonene som hører til samme spinsystem. Tilsvarende gjøres med H1'''. Nå har en skiftverdiene til protonene separert etter sukkerenhet de hører til. Inndelingen er vist i tabell 4.3.1.2. Dette er til stor hjelp ved tilordningen av signalene med COSY, siden noen av krysstoppene i dette spekteret overlapper noe.



Figur 4.3.1.4: TOCSY-spekter av pigment 3 i *Phyllanthus ovalifolia* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25 °C. Protonidentiteter er merket av etter tilordning med COSY.

Tabell 4.3.1.2: Inndeling av protonsignaler ved bruk av TOCSY.

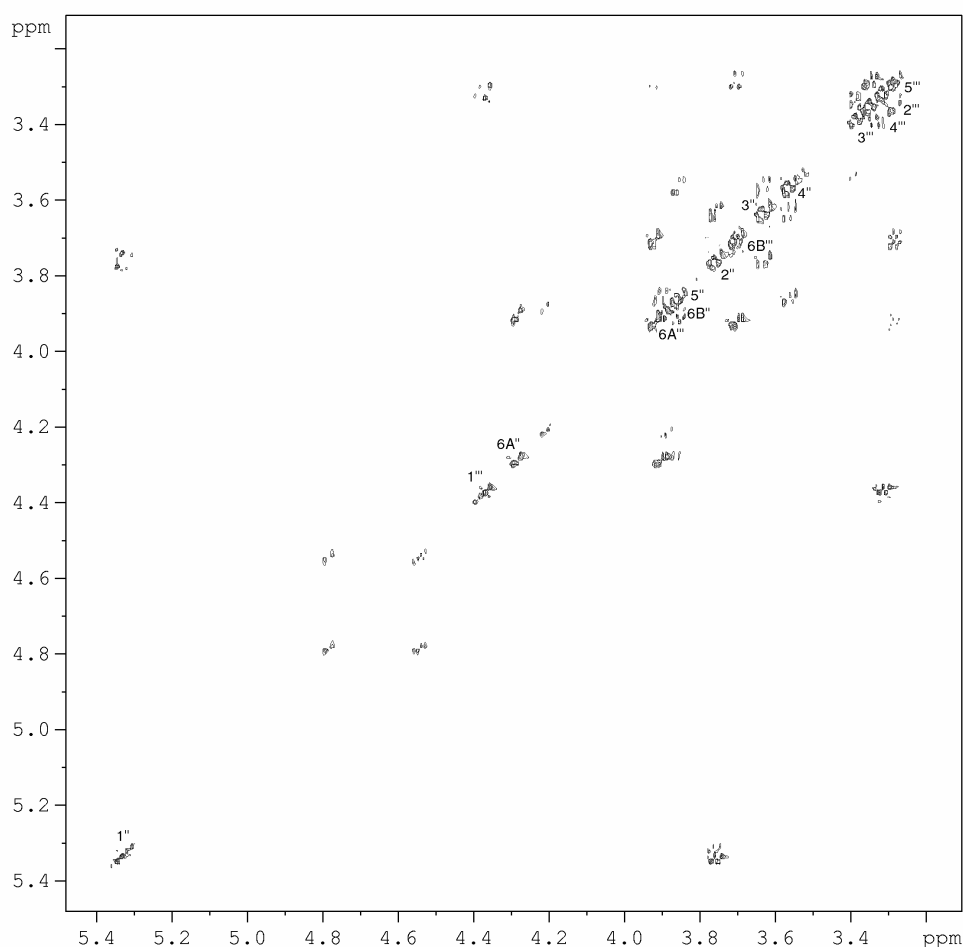
δ ^1H sukker 1 (ppm)	δ ^1H sukker 2 (ppm)
5,34	4,37
4,28	3,92
3,89	3,70
3,86	3,38
3,76	3,35
3,63	3,31
3,56	3,28

Ut fra TOCSY-spekteret ser det ut til at hver sukkerenhet har syv protoner. Dette stemmer overens med at det 14 protonsignal i sukkerregionen av HSQC-spekterert (figur 4.3.1.5). Disse 14 signalene ser bare ut til å ha 12 karbon skiftverdier, da ett par protoner på hver av sukkerenhetene får samme skiftverdi. Med andre ord ser det ut til å være to heksosier med hver en CH_2 -gruppe. Tilordningen i COSY utføres med dette som bakgrunn.

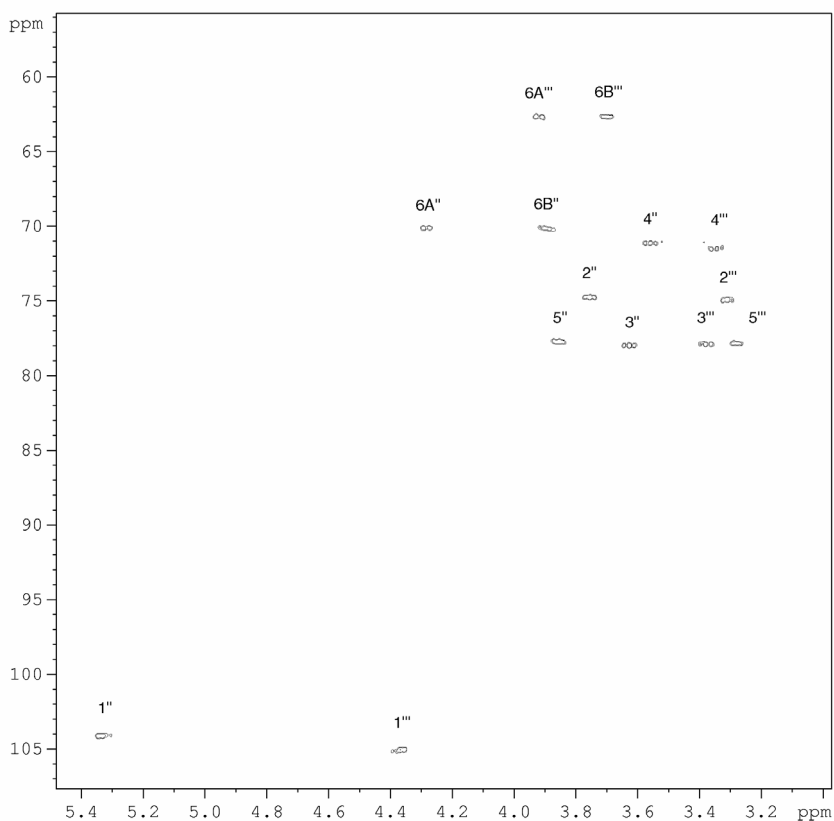
I COSY-spekteret (figur 4.3.1.4) kan en ta utgangspunkt i $\text{H1}''$ som ligger på 5,34 ppm. Dette protonet har en krysstopp til et proton på 3,76 ppm, som må være $\text{H2}''$. $\text{H2}''$ kobler videre til

et signal på 3,63 ppm som da er H3^{''}. Dette protonet kobler videre til et signal på 3,56 ppm som gir skiftverdien til H4^{''}. H4^{''} kobler i tillegg til et annet signal, på 3,86 ppm. Dette må da være H5^{''}. H5^{''} kobler videre til et signal på 3,89 ppm. Dette må skyldes et av protonene på C6^{''}. Dette kobler videre til et signal på 4,28 ppm, som skyldes det andre protonet på C6^{''}. H6A^{''} blir da på 4,28 ppm og H6B^{''} på 3,89 ppm.

Tilsvarende oppnøsting av protonidentiteter gjøres for den andre sukkerenheten ved å ta utgangspunkt i H1^{'''} på 4,37 ppm. Denne kobler til H2^{'''} på 3,31 ppm, som kobler videre til H3^{'''} på 3,38 ppm. H3^{'''} kobler til H4^{'''} på 3,35 ppm, mens H4^{'''} kobler videre til H5^{'''} på 3,28 ppm. H5^{'''} kobler til et signal på 3,70 ppm. Dette kobler videre til et signal på 3,92 ppm. Disse to verdiene gir de kjemiske skiftene til henholdsvis H6B^{'''} og H6A^{'''}.



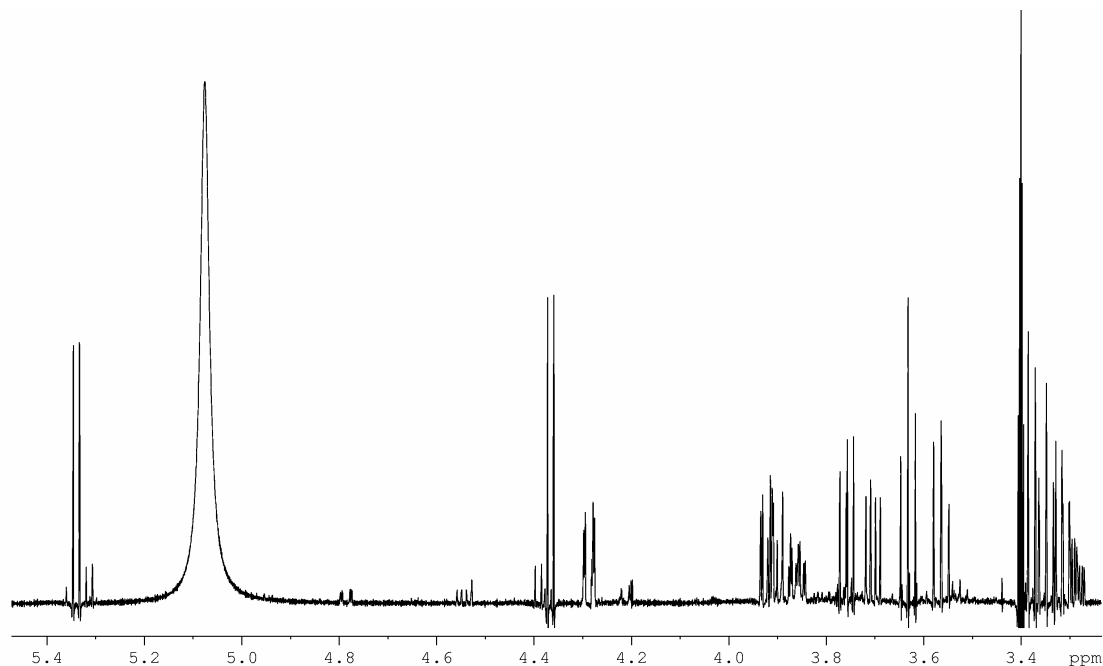
Figur 4.3.1.4: COSY-spekter av pigment 3 i *Phyllanthus ovalifolia* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C



Figur 4.3.1.5 HSQC-spekter av pigment 3 i *Phyllanthus ovalifolia* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C. Signalene er merket med protonidentiteter

I sukkerregionen i HSQC-spekteret (figur 4.3.1.5) er det totalt 14 krysstopper. Ved å bruke de identifiserte protonene fra COSY kan karbon skiftverdiene til hvert signal leses av.

Etter å ha justert prosesseringsparametrene for å bedre oppløsningen, er signalene i sukkerregionen i protonspekteret godt nok separerte til at koblingskonstanter kan leses av. Disse kan benyttes i bestemmelsen av sukkerenhetene. Den vanligste sukkerenheten hos antocyaner er β -glukose. Alle hydroksygruppene sitter i ekvatorielle posisjoner hos β -glukose og protonene kobler dermed aksial-aksial med hverandre. CH₂-gruppen i 6-posisjon er eneste unntak. Ved β -glukose vil en forvente å finne koblingskonstantene gitt i tabell 4.3.1.4.^{40, 43} Den første kolonnen viser identitetene til protonene på en glukose. De neste kolonnene viser hvilke protoner hver av disse forventes å koble med og omtrentlige koblingskonstanter. Figur 4.3.1.6 viser sukkerregionen til pigmentet.



Figur 4.3.1.6: Sukkerregionen av ^1H -spekter til pigment 3 i *Phyllanthus ovalifolia* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25°C . Prosessparameterene er justert til å gi maksimal oppløsning.

Tabell 4.3.1.3: Forventede koblinger ved β -glukopyranose.^{40, 43}

Protonidentitet	Forventet kobling (koblingskonstant)		
H1''	H2'' (7-8 Hz)		
H2''	H1'' (7-8 Hz)	H3'' (9-10 Hz)	
H3''	H2'' (9-10 Hz)	H4'' (9-10 Hz)	
H4''	H3'' (9-10 Hz)	H5'' (9-10 Hz)	
H5''	H4'' (9-10 Hz)	H6A'' (~2,2 Hz)	H6B'' (5-6 Hz)
H6A''	H5'' (~2,2 Hz)	H6B'' (~12Hz)	
H6B''	H5'' (5-7 Hz)	H6A'' (~12 Hz)	

Verdiene i tabell 4.3.1.3. kan nå sammenlignes med splittingene i sukkerregionen til pigmentet for å avgjøre om sukkerenhetene er glukoser. Starter med å se på anomeren på den første sukkerenheten, H1''. Denne har en koblingskonstant på 7,7 Hz. Dette må skyldes koblingen til H2''. Dette stemmer overens med oppgitt intervall på 7-8 Hz i tabellen. H2'' er en dobbel dublett, hvor den ene koblingskonstanten faktisk er 7,7 Hz og dermed koblingen til H1''. H2'' har enda en koblingskonstant, denne på 9,1 Hz. Samme verdi finner en i tripletten som utgjør H3'' siden også disse protonene kobler med hverandre. H4'' er en dobbel dublett med koblingskonstantene 9,2 Hz og 9,5 Hz. En må kunne si at 9,2 Hz er nærme nok 9,1 Hz til at denne beskriver koblingen fra H4'' tilbake til H3''. Koblingen på 9,5 Hz må da skyldes korrelasjonen mellom H4'' og H5''. Faktisk er denne koblingskonstanten å finne hos H5''. I tillegg har H5'' splittinger på 1,9 Hz og på 6,8 Hz. Den minste av disse kan skyldes en kobling til H6A'' og den største til H6B''. H6A'' og H6B'' har faktisk koblinger på henholdsvis 2,0 Hz og 6,7 Hz. I tillegg har begge disse signalene en splitting på 11,5 Hz, som kommer av koblingene til hverandre.

Sammenligning av disse verdiene med koblingskonstantene for glukose gitt i tabell 4.3.1.4 viser at de stemmer svært godt overens. Tilsvarende avlesning av koblingskonstanter gjøres så for den andre sukkerenheten. Resultatet av dette er gitt i tabell 4.3.1.4. Også disse verdiene er veldig like de en ville forventet i en glukose. Begge sukkerenhetene er dermed glukoser.

Karbon skiftverdiene kan nå leses av fra HSQC-spekteret. De avleste verdiene er gitt i tabell 4.3.1.4.

Sammensetningen

I HMBC-spekteret (figur 4.3.1.2) har H1'' en krysstopp til et signal på 145,72 ppm. Dette er tidligere tilordnet å være C3. Med andre ord, sukkerenheten med anomert proton H1'' er knyttet i 3-posisjon til aglykonet.

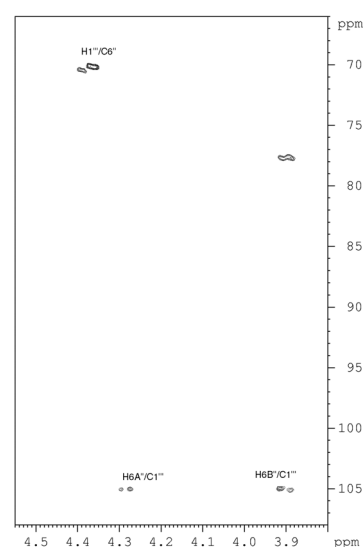
H1''' har ingen korrelasjon inn på karbon i aglykonet, men ser ut til å ha krysstopper inn på sukkerkarboner. Figur 4.3.1.7 viser et utsnitt av HMBC-spekteret der det er krysstopper mellom de to sukkerenhetene. Her kan en tydelig se at det er en krysstopp mellom H1''' og C6''. I tillegg vises krysstopper fra C1''' til H6A'' og til H6B''. Det er altså korrelasjoner mellom 6-posisjonen i sukkerenhet nummer en og det anomere senteret i sukkerenhet nummer to. Dette viser at sukkerenhet nummer to (med anomer H1''') er knyttet i 6''-posisjon på sukkerenhet nummer en.

I tillegg ligger C6'' uvanlig langt *downfield* (70,16 ppm) til å skulle være i en terminal glukose. Denne forskyvningen bekrefter at sukkerenhet nummer en har en substituent i 6''-posisjon. Et disakkarid bestående av to glukoser knyttet sammen i denne posisjonen benevnes gentiobiose.

Konfigurasjonen til sukkerenhetene kan bestemmes ut fra koblingskonstantene til de anomere protonene. H1'' vil koble over tre bindinger til protonet i 2''-posisjon, som hos glukoser er i aksial posisjon. I sukke med β -konfigurasjon er også H1'' aksial, noe som hos glukose gir opphav til en koblingskonstant rundt 7-8 Hz.⁴² H1'' har her en splitting på 7,7 Hz og er dermed innenfor dette intervallet. $^3J_{HH}$ for H1''' er på 7,6 Hz og begge sukkerene er som antatt tidligere β -glukoser.

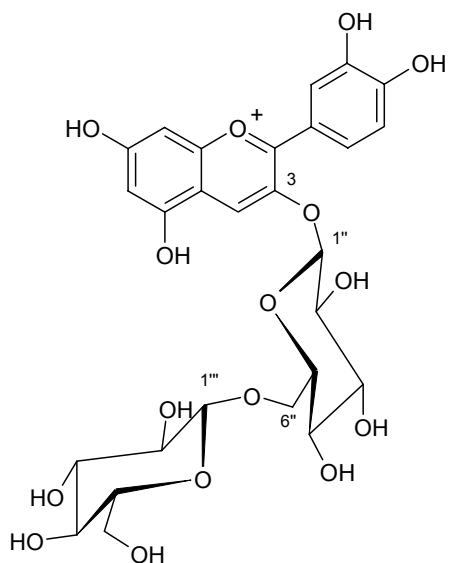
Antocyanet er nå bestemt til å være et cyanidinderivat med to glukoser i β -konfigurasjon. Den ene sukkerenheten (med anomer H1'') er knyttet i 3-posisjon på aglykonet, mens den andre sukkerenheten (med anomer H1''') er knyttet til den første i 6''-posisjon. Antocyanet er dermed cyanidin 3-(6''-*O*- β -glukopyranosyl-*O*- β -glukopyranosid).

Proton skiftverdiene stemmer godt overens med litteraturverdier på samme forbindelse.⁴⁷



Figur 4.3.2.7 HMBC NMR-spekter av pigment 3 i *Phyllanthus ovalifolia* løst i deuterert metanol og TFA. Utsnitt viser tilknytningspunktet til sukkerenhet nummer to.

Verdier fra NMR-analysen er gitt i tabell 4.3.2.2. Strukturen til pigmentet er vist i figur 4.3.1.8.



Figur 4.3.1.8: Stukturen til pigment 1 i *Phyllanthus ovalifolia*, cyanidin 3-(6''-O- β -glukopyranosyl-O- β -glukopyranosid).

Tabell 4.3.1.4: NMR-data for pigment 3 i *Pyllanthus ovalifolia* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C.

	13C (ppm)	1H (ppm)	Multiplisitet	J (Hz)	Hentet fra*
Cyanidin					
2	164,43				HMBC
3	145,72				HMBC
4	137,30	9,04	s		HSQC, ¹ H
5	159,12				HMBC
6	103,54	6,74	s		HSQC, ¹ H
7	170,55				HMBC
8	95,34	6,98	s		HSQC, ¹ H
9	157,87				HMBC
10	113,39				HMBC
1'	121,31				HMBC
2'	118,46	8,10	d	2,3	HSQC, ¹ H
3'	147,36				HMBC
4'	155,84				HMBC
5'	117,45	7,09	d	8,7	HMBC
6'	128,46	8,33	dd	2,3 og 8,7	HSQC, ¹ H
3-O-β-glukopyranosyl					
1''	104,17	5,34	d	7,7	HSQC, ¹ H
2''	74,78	3,76	dd	7,7 og 9,1	HSQC, COSY
3''	78,00	3,63	t*	9,1	HSQC, COSY
4''	71,16	3,56	dd	9,2 og 9,5	HSQC, COSY
5''	77,76	3,86	m	1,9 og 6,8 og 9,5	HSQC, COSY
6A''	70,16	4,28	dd	2,0 og 11,5	HSQC, COSY
6B''	70,16	3,89	m	6,7 og 11,5	HSQC, COSY
6''-O-β-glukopyranosid					
1'''	105,16	4,37	d	7,6	HSQC, ¹ H
2'''	74,92	3,31	dd	7,7 og 8,8	HSQC, COSY
3'''	77,92	3,38	t*	8,7	HSQC, COSY
4'''	71,53	3,35	dd	8,7 og 8,8	HSQC, COSY
5'''	77,91	3,28	m	2,1 og 5,6 og 8,8	HSQC, COSY
6A'''	62,69	3,92	m	2,3 og 12,0	HSQC, COSY
6B'''	62,69	3,70	dd	6,0 og 12,1	HSQC, COSY

*Alle koblingskonstanter er hentet fra 1D protonspekter.

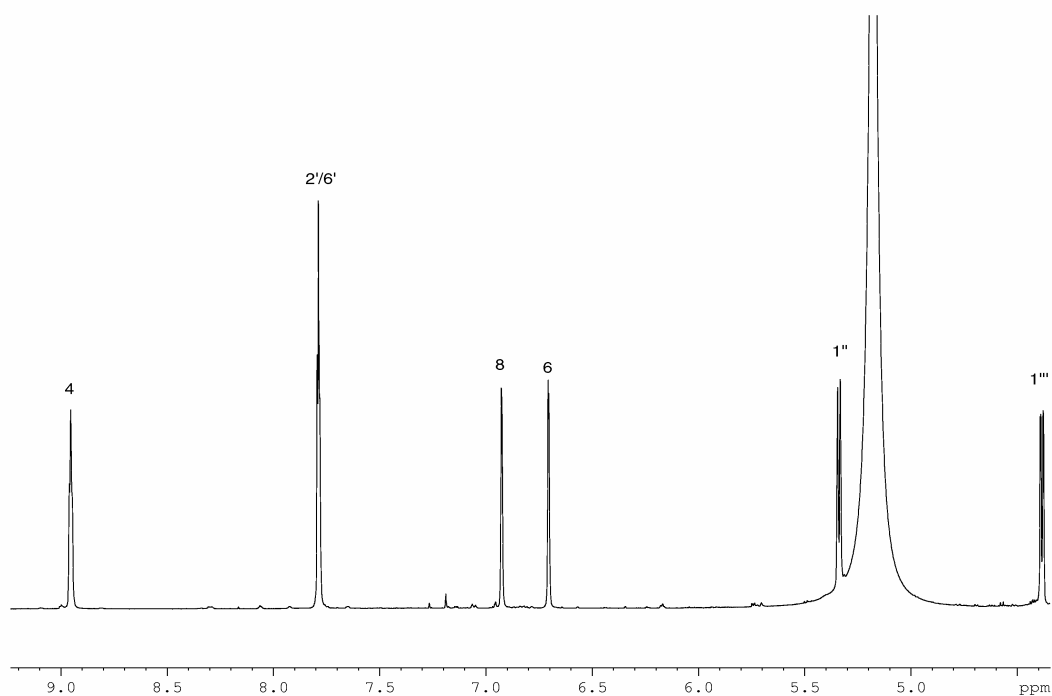
** Dårlig oppløst dobbel dublett som ser ut som en triplett.

4.3.2 Pigment 1; delfinidin 3-(6''-O- β -glukopyranosyl-O- β -glukopyranosid)

Aromatregion og anomere signal

UV/synlig-spektroskopi viste ingen tegn på aromatisk acylering og alle signalene i aromatregionen kan derfor antas å komme fra aglykonet. I protonspekteret (figur 4.3.2.1) er det fire signal i aromatregionen. Petunidin, pelargonidin, cyanidin og peonidin kan derfor utelukkes. Av de vanligste antocyanene står det da mellom malvidin og delfinidin. De har begge bare to protoner på B-ringene, som på grunn av symmetri vil gi ett signal. I tillegg til de tre protonene fra A- og C-ringene gir derfor begge disse aglykonene opphav til fire aromatiske protonsignal. Malvidin skiller seg fra delfinidin ved at den har metoksygrupper på B-ringene. Ved malvidin forventer en derfor å finne det karakteristiske metoksysignalet med proton skiftverdi rundt 4,0 ppm.³⁹ I protonspekteret finnes det signal i det aktuelle området, men ingen sterke nok til å kunne skyldes seks protoner fra malvidins to metoksygrupper. Aglykonet kan altså ikke være malvidin og er dermed delfinidin.

Ved hjelp av integrering og skiftverdier kan signalene i aromatregionen anordnes.



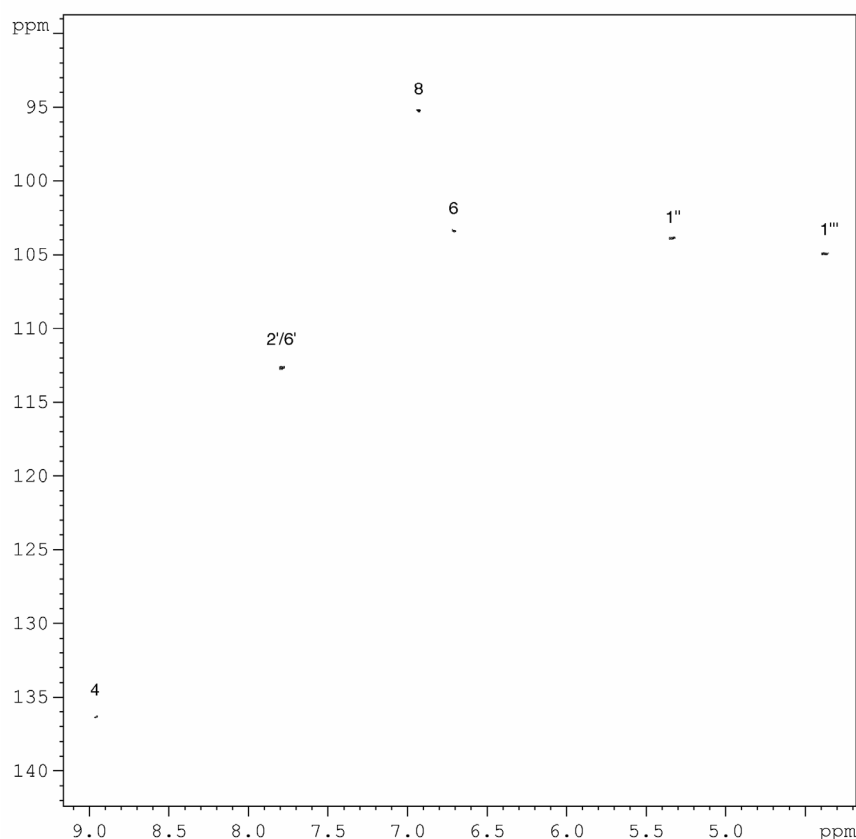
Figur 4.3.2.1: Aromatregion og anomert område av ^1H -spekter av pigment 1 i *Phyllanthus ovalifolia* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25 °C. Signalene er merket med protonidentiteter.

Signalet på 8,95 ppm ligger mest *downfield* av alle signalene og må være H4. Dette protonet gir alltid opphav til et signal med en karakteristisk høy skiftverdi.

Signalet på 7,79 ppm har en integralverdi lik to protoner. På grunn av symmetrien i B-ringene hos delfinidin vil H6' og H2' få samme skiftverdi. Siden dette er det eneste signalet med integralverdi lik to, må det altså skyldes H6' og H2'.

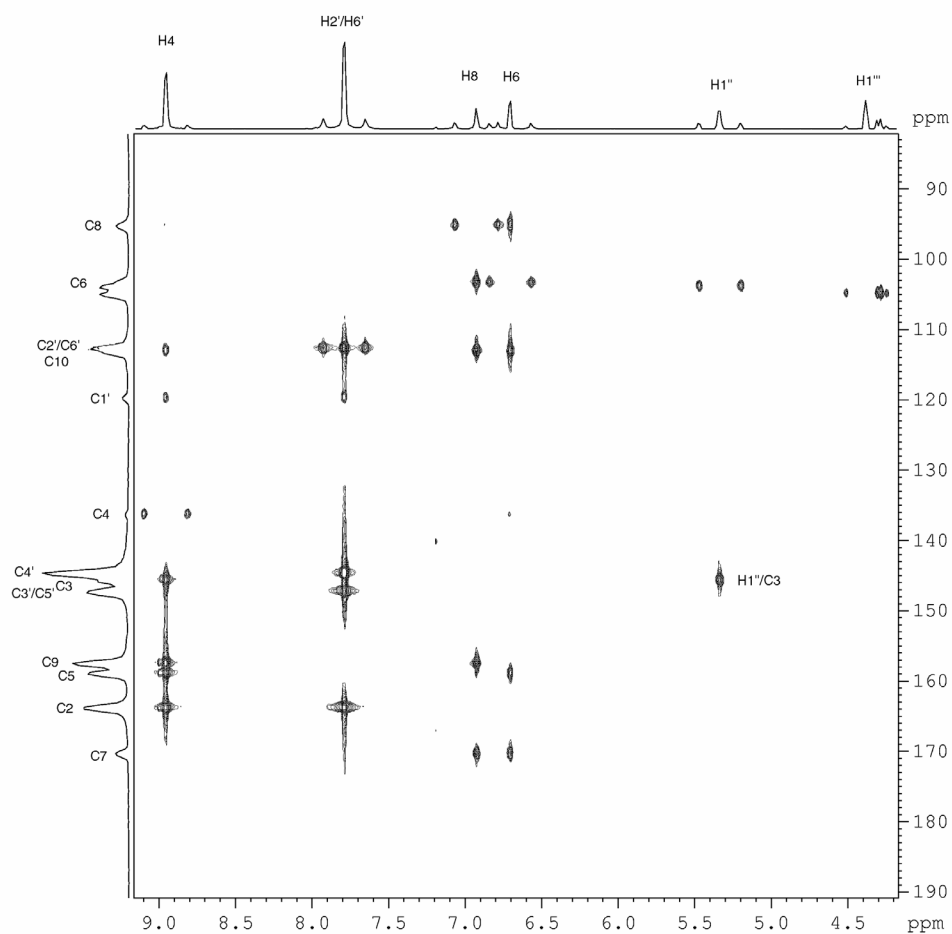
De to gjenværende signalene skyldes da H6 og H8. H6 har vanligvis lavere proton skiftverdi enn H8, mens C6 har høyere karbon skiftverdi enn C8.^{40, 41} Signalet på 6,71 ppm er da H6 og signalet på 6,93 ppm er H8. Skiftverdiene for C6 og C8 er henholdsvis 103,42 ppm og 95,25 ppm, avlest fra HSQC. Dette styrker tilordningen av disse to signalene.

HSQC-spekteret (figur 4.3.2.2) kan så brukes til å lese av karbon skiftverdiene fra krysstopkene til de anordnete protonene. C2' og C6' vil falle sammen til samme skiftverdi (112,76 ppm) på grunn av symmetri. De avleste verdiene er gitt i tabell 4.3.2.2.



Figur 4.3.2.2: Aromatregion og anomert område av HSQC-spekter til pigment 1 i *Phyllanthus ovalifolia* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C. Signalene er merket med protonidentiteter.

HMBC-spekteret (figur 4.3.2.3) kan nå brukes til å identifisere de kvarternære karbonene. Tabell 4.3.2.1 viser koblingene forventede koblinger i et HMBC-spekter av delfinidin.



Figur 4.3.2.3: Aromatregion og anomert område av HMBC-spekter til pigment 1 i *Phyllanthus ovalifolia* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25 °C.

Tabell 4.3.2.1 Forventede koblinger i HMBC-spekter av delfinidin.

Proton	$^2J_{\text{CH}}$		$^3J_{\text{CH}}$		$^4J_{\text{CH}}$	
H4	C3	C10	C2	C5	C9	C1' C8
H2'	C1'	C3'	C2	C4'	C6'	
H6'	C1'	C5'	C2	C2'	C4'	
H8	C7	C9	C6	C10		
H6	C5	C7	C8	C10		

Starter med H4. Dette protonet har en krysstopp inn på skiftverdien som ble tilordnet C8 (95,25 ppm), mens den ikke har noen krysstopp til C6 (103,42 ppm). Dette er med på å styrke tilordningen av disse to signalene.

H4 forventes i tillegg å koble til to kvarternære karbon som ikke er direkte knyttet til oksygen, C1' og C10. Disse bør derfor ha mer *upfield* skiftverdier enn de resterende kvarternære karbonatomene. H4 har to krysstopper som ligger relativt langt *upfield* (113,00 ppm og 119,70 ppm), som da skyldes disse to karbonene. For å finne ut hvilket av dem som er hvilket, kan en se på hva de kobler med videre. For C10 vil en forvente å finne krysstopper på grunn

av trebindingskobling til H6 og til H8. Signalet på 113,00 ppm har dette. Signalet på 119,70 ppm derimot kobler hverken med H6 eller H8. Derimot har det en krysstopp til H2'/H6'. C10 vil ikke kunne koble med noen av disse to protonene, mens det stemmer godt overens med at signalet på 119,70 ppm er C1'.

Tar så videre utgangspunkt i H6 og H8, som begge skal koble med C7 og C10. Det er nå bare to karbonsignaler som kobler til begge disse protonene, og de er på 113,00 ppm og 170,21 ppm. Det første er allerede identifisert til C10. Signalet på 170,21 ppm må derfor komme av C7. Dette stemmer godt overens med at C7 er bundet direkte til et oksygen og derfor vil ha en betydelig høyere skiftverdi enn C10.

H6 har nå bare en uidentifisert krysstopp (158,86 ppm). Denne må skyldes 2-bindingkoblingen til C5.

H8 har også bare en uidentifisert krysstopp igjen, som er på 157,40 ppm. Denne må da komme av C9.

På 163,83 ppm er det et karbonsignal som kobler til H4 og til enten H2', H6' eller begge (siden disse to protonene bare gir ett signal). C2 forventes å koble med både H4, H2' og H6'. Det eneste andre karbonet som kan koble med både H4 og enten H2', H6' eller begge er C1'. Dette er allerede identifisert til å være på 119,70 ppm og signalet på 163,83 ppm er derfor C2.

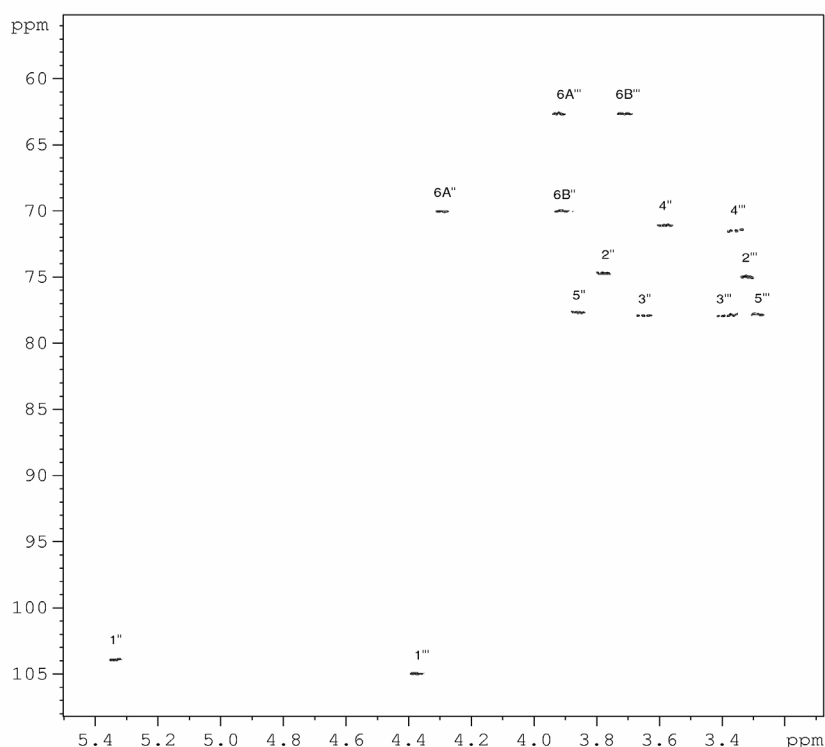
Nå er seks av de syv krysstoppene til H4 identifisert. Det siste signalet ligger på 145,55 ppm. Det er bare C4, C3' og C5' som fremdeles ikke er tilordnet noen skiftverdier. Ingen av de tre først nevnte karbonene kan ha noen observerbar flerbindingkobling til H4, og signalet på 145,55 ppm er derfor C3. C3 har i tillegg en krysstopp til et proton på 5,34 ppm. Dette er en karakteristisk verdi for anomere protoner, og betyr at det er et sukker i 3-posisjon.

Det er nå tre uidentifiserte karbon, C4', C3' og C5'. Alle disse er forventet å koble til enten H2' eller H6'. H2'/H6'-signalet har fremdeles to uidentifiserte krysstopper som må komme av koblinger til C3'/C5' og til C4'. C3' og C5' er totalt symmetriske, og vil derfor bare gi en skiftverdi. C4' vil koble over tre bindinger til H2'/H6', mens C3'/C5' kobler over to. Krysstoppen mellom C4' og H2'/H6' bør dermed bli den sterkeste av disse to. Krysstoppen på 144,65 ppm, som er den sterkeste, gir da karbon skiftverdien til C4', mens 147,23 ppm er skiftverdien til C3' og til C5'.

Nå er alle karboner og protoner i aglykonet anordnet. Skiftverdiene stemmer overens med litteraturverdier for delfinidinderivat.⁴²

Sukkerregionen

Protonspekteret viste et anomert signal på 5,34 ppm (H1''). Karbon skiftverdien til dette leses av i HSQC-spekteret (figur 4.3.2.4) til 103,94 ppm. I samme området er det en krysstopp til, med proton skiftverdi 4,38 ppm og karbon skiftverdi 104,97 ppm, noe som indikerer at det er to sukkerenheter. Dette anomere protonet (H1''') har en veldig lav proton skiftverdi, og kobler heller ikke med noen av de tilordnete karbonene på aglykonet i HMBC-spekteret. En forklaring på dette kan være at sukkerenheten med anomer H1''' er knyttet til sukkerenheten med anomer H1'', og slik gir et disakkarid.



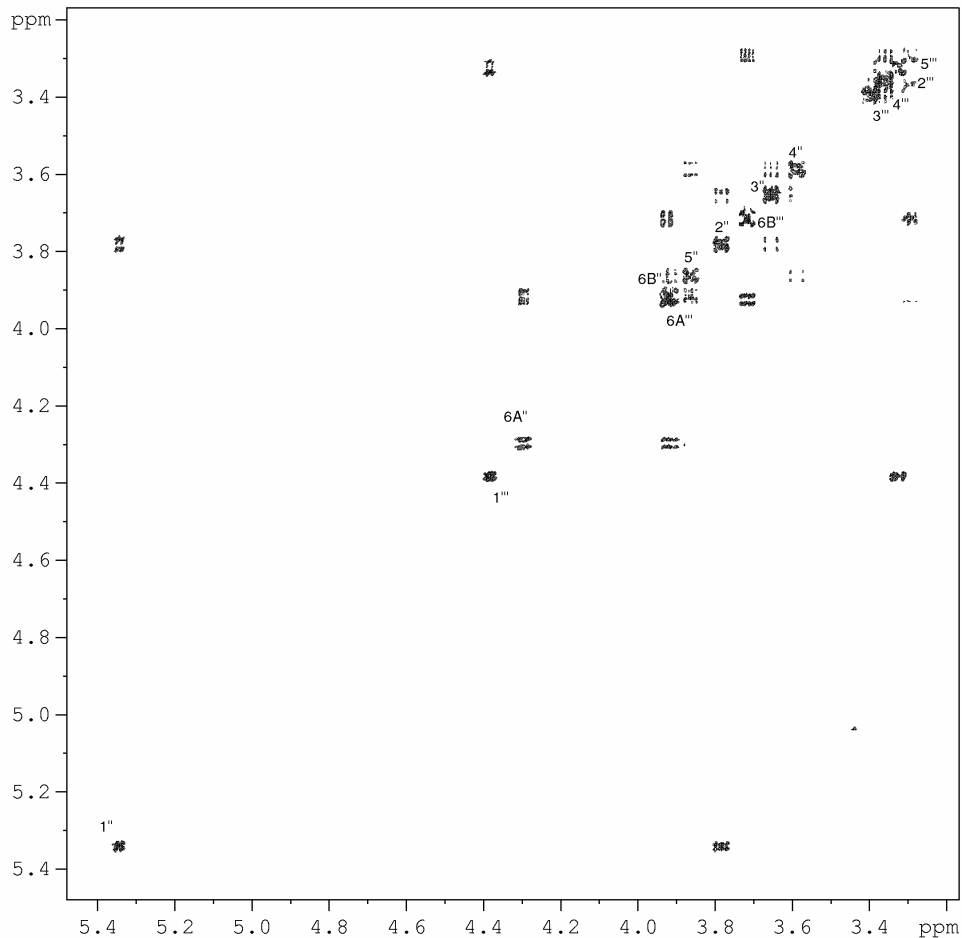
Figur 4.3.2.4: Sukkerregionen av HSQC-spekter av pigment 1 i *Phyllanthus ovalifolia* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C.

I aromatreionen av HSQC-spekteret er det totalt 14 protonsignaler med 12 karbon skiftverdier, inklusiv de anomere. Dette tyder på at det er to heksoser. To av karbonene har hver to protoner knyttet til seg (karbon skiftverdi 70,02 ppm og 62,68 ppm), noe en tydelig kan se i figur 4.3.2.4.

Siden H1'' og H1''' allerede er tilordnet, kan disse benyttes til å nøste opp de resterende sukkerprotonene fra COSY-spekteret (figur 4.3.2.5). Ved å ta utgangspunkt i H1'' på 5,34 ppm kan en finne en krysstopp til H2'' på 3,78 ppm. H2'' kobler videre til et signal på 3,65 ppm, som gir skiftverdien til H3''. H3'' kobler til H4'' på 3,89 ppm, som kobler til H5'' på 3,59 ppm. H5'' kobler til et signal på 3,91 ppm som igjen kobler videre til et på 4,30 ppm. Disse to signalene er henholdsvis H6B'' og H6A''.

H1''' på 4,38 ppm kobler til H2''' på 3,32 ppm. H2''' kobler videre til H3''' på 3,38 ppm, som kobler videre til H4''' på 3,36 ppm. H4''' har en krysstopp til H5''' på 3,29 ppm. H5'''

kobler til et signal på 3,71 ppm, som kobler videre til et signal på 3,92 ppm. Disse gir skiftverdiene til henholdsvis H6B''' og H6A'''.



Figur 4.3.2.5: Sukkerregionen av COSY-spekter av pigment 1 i *Phyllanthus ovalifolia* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C.

HSQC-spekteret (figur 4.3.2.4) kan så brukes til å lese av sukkerets karbon skiftverdier.

Begge sukkerenhetene er heksosere med hver en metylengruppe. Ut fra de vanligste monoglykosidene gitt i figur 1.2.1.2 er det bare glukopyranose og galaktopyranose som tilfredsstill disse kriteriene. Her er $^3J_{HH}$ for H4'' 9,4 Hz og for H4''' 9,0 Hz og 9,4 Hz, og dermed typiske verdier for aksial-aksial kobling ved glukosere.⁴³ Også de resterende koblingskonstantene, gitt i tabell 4.3.2.2, stemmer overens med at det er to glukoseenheter.^{40,44}

Sammensetningen

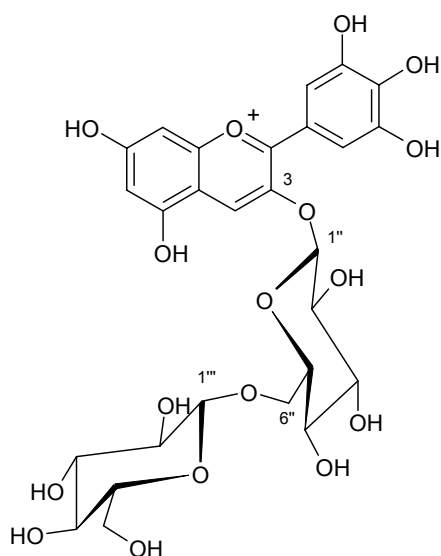
Konfigurasjonen til sukkerenhetene er enda ikke bestemt. Denne leses ut fra koblingskonstanten til det anomere protonet. En ekvatorial-aksial kobling mellom H1'' og H2'' vil tilsvare en α -konfigurasjon av glukosen og gi en koblingskonstant i området 2-5 Hz.⁴⁵ Aksial-aksial kobling derimot gir β -konfigurasjon og en høyere koblingskonstant, rundt 7-8 Hz.⁴² $^3J_{HH}$ for H1'' og for H1''' er her 7,7 Hz og begge sukkerenhetene har dermed β -konfigurasjon.

Aglykonet er nå identifisert til delfinidin og begge sukkerenhetene til β -glukopyranoser. Det eneste som mangler i en fullstendig strukturoppklaring er selve sammensetningen av de ulike delene. HMBC-spekteret viste at den ene sukkerenheten er knyttet til aglykonet i 3-posisjon, mens tilknytningspunktet til det andre sukkerenheten mangler. Det er ingen kryssopper mellom H1''' og karbonatomer på aglykonet. En mulig forklaring på dette er som nevnt at denne sukkerenheten er knyttet til sukkerenheten som nå er anordnet til 3-posisjon på aglykonet. Ut fra HSQC-spekteret (figur 4.3.2.4) kan en se at C6'' har fått en betydelig mer *downfield* skiftverdi enn forventet (70,02 ppm) ved en terminal glukose. Dette kan skje dersom det er substitusjon i dette punktet. HMBC-spekteret viser dessuten korrelasjoner mellom C6'' og H1''' og mellom C1''' og H6A'' og H6B''. Sukkerenhet nummer to anordnes derfor å være knyttet til sukkerenhet nummer en i 6''-posisjon og gir dermed disakkaridet gentiobiose.

Proton skiftverdiene stemmer overens med litteraturverdier på samme sukker.⁴⁷ Sammenligning med proton og karbon skiftverdier for identifisert gentiobiosid i avsnitt 4.3.1 bekrefter tilordningen.

Antocyanet er nå bestemt til å være delfinidin 3-(6''-O- β -glukopyranosyl-O- β -glukopyranosid).

Verdier fra NMR-analysen er gitt i tabell 4.3.2.2. Figur 4.3.2.6 viser strukturen til pigmentet.



Figur 4.3.2.6: Strukturen til pigment 1 i *Phyllanthus ovalifolia*; delfinidin 3-(6''-O- β -glukopyranosyl-O- β -glukopyranosid).

Tabell 4.3.2.2: NMR-verdier for pigment 1 i *Pyllanthus ovalifolia* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C.

	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplisitet	J (Hz)	Hentet fra*
Delfinidin					
2	163,83				HSQC
3	145,55				HMBC
4	136,37	8,95	s		HSQC, ¹ H
5	158,86				HMBC
6	103,42	6,71	s		HSQC, ¹ H
7	170,21				HMBC
8	95,25	6,93	s		HSQC, ¹ H
9	157,40				HMBC
10	113,00				HMBC
1'	119,70				HMBC
2'/6'	112,71	7,79	s		HSQC, ¹ H
3'/5'	147,23				HMBC
4'	144,65				HMBC
3-O-β-glukopyranosid					
1''	103,94	5,34	d	7,7	HSQC, ¹ H
2''	74,73	3,78	dd	7,7 og 9,2	HSQC, ¹ H
3''	77,93	3,65	dd	9,0 og 9,2	HSQC, ¹ H
4''	71,07	3,59	t**	9,4	HSQC, ¹ H
5''	77,70	3,86	m	1,8 og 6,4 og 9,5	HSQC, ¹ H
6A''	70,02	4,30	d	1,7 og 11,4	HSQC, ¹ H
6B''	70,02	3,91	m	5,8 og 11,6	HSQC, ¹ H
6''-O-β-glukopyranosyl					
1'''	104,97	4,38	d	7,7	HSQC, ¹ H
2'''	74,93	3,32	t**	7,7 og 9,4	HSQC, ¹ H
3'''	77,97	3,38	m	9,0 og 9,4	HSQC, ¹ H
4'''	71,52	3,36	dd	9,0 og 9,4	HSQC, ¹ H
5'''	77,84	3,29	m	2,0 og 5,9 og 9,0	HSQC, ¹ H
6A'''	62,68	3,92	dd	1,8 og 11,7	HSQC, ¹ H
6B'''	62,68	3,71	dd	5,9 og 11,7	HSQC, ¹ H

*Alle koblingskonstantene er hentet fra 1D protonspekter.

** Dårlig oppløst dobbel dublett som ser ut som en triplett.

4.4 Oppsummering

Antocyanene i de blå bærene til *Phyllanthus ovalifolia* ble ekstrahert med metanol tilsatt TFA. Ekstraktet ble rensert med etylacetat og Amberlite XAD-7-kolonne. Separasjonen av pigmentene ble utført på Sephadex LH-20-kolonne, mens det til analysen ble brukt TLC, HPLC, UV/synlig-spektroskopi og NMR.

Det ble identifisert fire pigmenter i bærene: delfinidin 3-(6''-*O*- β -glukopyranosyl-*O*- β -glukopyranosid) (**1**), delfinidin 3-glukosid (**2**), cyanidin 3-(6''-*O*- β -glukopyranosyl-*O*- β -glukopyranosid) (**3**) og cyanidin 3-glukosid (**4**).

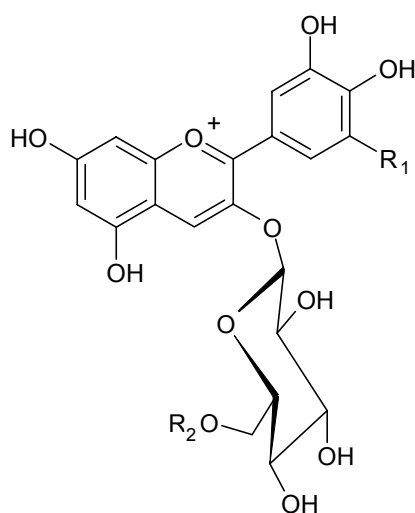
Pigment 1 og 2 hadde omtrent samme absorpsjonsområde i UV/synlig-området. Likheten skyldes at begge disse pigmentene er delfinidinderivater med substitusjon i 3-posisjon. Tilsvarende hadde pigment 3 og 4 omtrent identiske absorpsjonsverdier. Disse pigmentene er begge cyanidinderivater med substitusjon i 3-posisjon.

Til identifisering av pigment 2 og 4 ble det benyttet TLC, HPLC og UV/synlig-spektroskopi. Da disse teknikken ikke gir nøyaktig informasjon om konfigurasjoner, er det ikke mulig å si noe sikkert om sukkerene er i α - eller β -konfigurasjon. Pigment 1 og 3 derimot ble bestemt med NMR og det er mulig å oppgi nøyaktig struktur.

I *Phyllanthus ovalifolia*, tilhørende familien *Euphorbiaceae*, utgjør cyanidin 3-gentiobiosid og delfinidin 3-gentiobiosid hovedmengden av antocyaninnholdet. Det er ikke tidligere påvist antocyaner med gentiobiose i denne familien, men de er funnet i en rekke andre familier, blant annet i surbær av rosefamilien (*Rosaceae*)⁴⁸, i yamsrot (*Dioscoreaceae*)⁴³, druefamilien (*Vitaceae*)⁴⁹ og i gress (*Poaceae*)⁴⁷. Etter omfattende litteratursøk viser det seg derimot at ved identifisering av antocyaner med gentiobioser er det svært få arbeid som er basert på NMR-analyse. De fleste har benyttet teknikker som ikke gir tilstrekkelig informasjon om tilknytningspunkt mellom sukkerenhetene. Mangelen på gentiobioser påvist med NMR i forhold til mengden påvist i eldre arbeid, kan tyde på at sukkeret er mer sjeldent enn i utgangspunktet antatt.

Et tidligere arbeid på antocyaninnholdet *Phyllanthus ovalifolia* indikerer at planten inneholder delfinidin- og cyanidinderivater.⁵ Her var det altså mulig å bestemme hvilke.

Strukturen til de fire pigmentene er vist i figur 4.4.1.



Pigment	R ₁	R ₂
1	OH	glu
2	OH	H
3	H	glu
4	H	H

Figur 4.4.1: Antocyaner identifisert i *Phyllanthus ovalifolia*.

Kapittel 5 – Resultater og diskusjon - *Jacaranda mimosifolia*

Det er tidligere utført arbeid med å identifisere antocyanene i *Jacaranda mimosifolia* som fastslår at planten bare inneholder delfinidin 3,5-diglukosid.⁴ Nyere arbeid basert på ¹H NMR-analyser indikerer derimot at planten inneholder et malvidin glykosid og malvidin 3,5-diglukopyranosid, hvorav det siste utgjør hovedpigmentet.⁵

Kapittelet er delt inn i to hoveddeler. Kapittel 5.1 omhandler isolasjon og analyse av antocyanene i *Jacaranda mimosifolia* ved bruk av ulike kromatografiske teknikker og UV/synlig-spektroskopi. Kapittel 5.2 tar for seg strukturoppklaring av hovedpigmentet ved en kombinasjon av MS- og NMR-analyser. Til slutt er det gitt en kort oppsummering i kapittel 5.3.

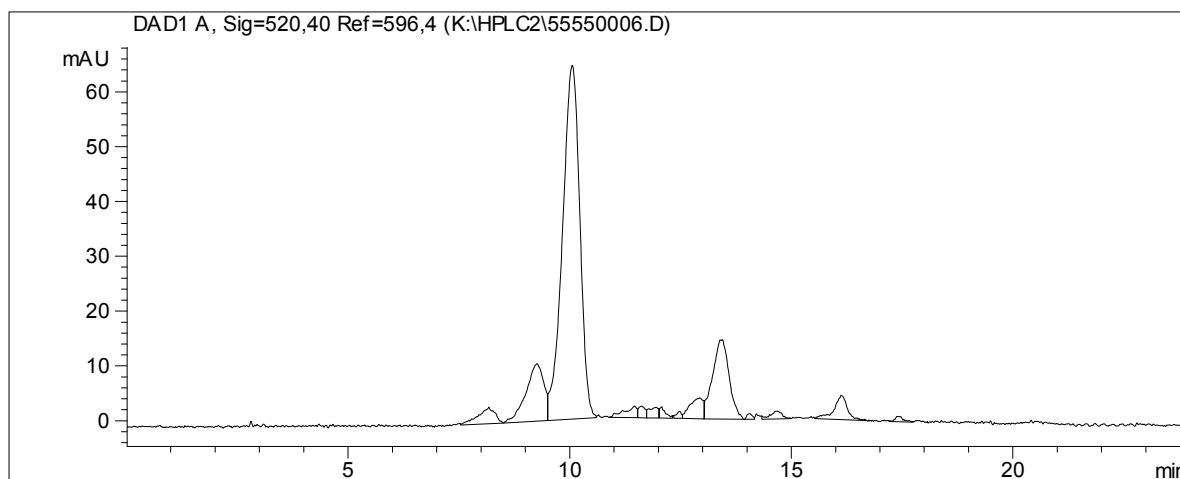
5.1 Isolasjon og analyse

Det ble plukket 214,83 gram blomster av *Jacaranda mimosifolia* fra universitetsområdet ved Makerere University i Uganda oktober 2002. Blomstene ble ekstrahert med metanol tilsatt TFA og deretter rensed ved hjelp av etylacetat og Amberlite XAD-7-kolonne. Dette ble utført ved Makerere University. Det resterende arbeidet ble utført ved Universitetet i Bergen. Dette inkluderer bruk av Sephadex LH-20-kolonne, Toyopearl HW-40F-kolonne, HPLC, UV/synlig-spektroskopi og NMR. I tillegg utførte Håvard S. Nateland (Polyphenols AS) MS-analyser. Detaljert beskrivelse av metoder og prosedyrer er gitt i kapittel 2.

Siden planten ikke var tilgjengelig ved Universitetet i Bergen, var det ikke mulig å få et råekstrakt. Det som refereres til som råekstrakt utover i dette kapittelet er planteekstraktet etter rensing med etylacetat og Amberlite XAD-7-kolonne.

5.1.1 Analyse av råekstrakt

Det ble kjørt en HPLC-profil av råekstraktet for å få en indikasjon på sammensetningen. Kromatogrammet ved 520 ± 20 nm viser at planten inneholder en rekke antocyaner (figur 5.1.1.1). Dersom toppen rundt 10,0 minutt består av ett antocyan, utgjør dette hovedpigmentet.



Figur 5.1.1.1: HPLC-kromatogram av råekstrakt av *Jacaranda mimosifolia* detektert ved 520 ± 20 nm.

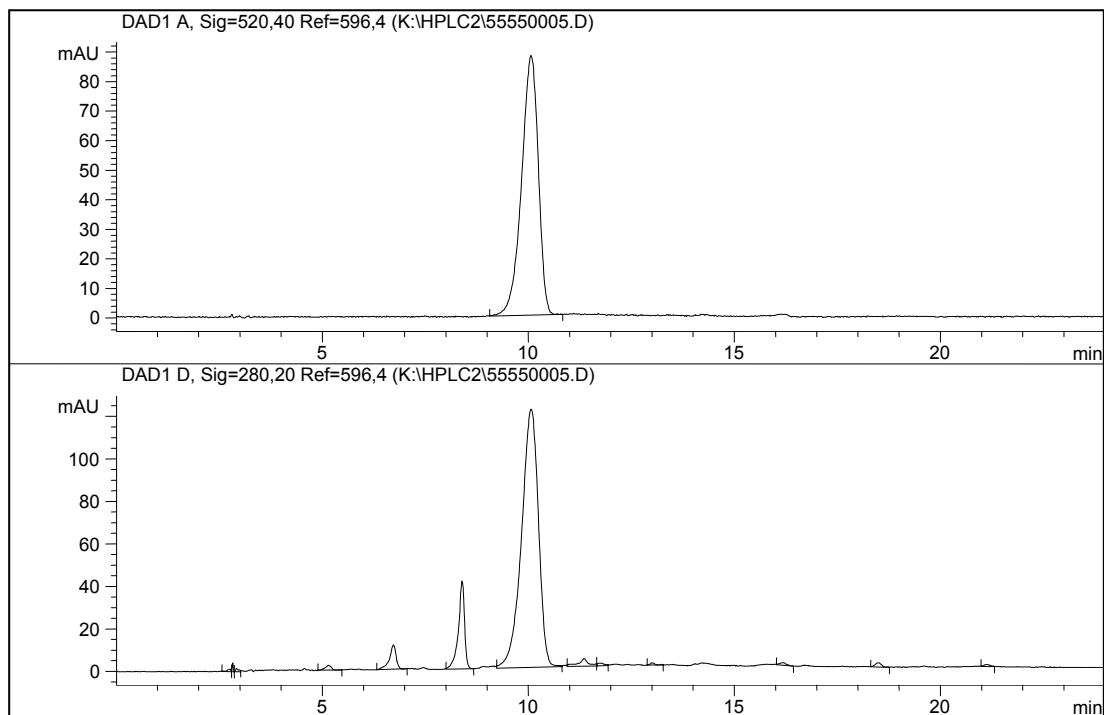
5.1.2 Fraksjonering med Sephadex-kolonne

Ekstraktet ble applisert på en Sephadex LH-20-kolonne i forsøk på å separere pigmentene (figur 5.1.2.1). Det dannet seg et bredt bånd, som var noe svakere på midten, og en rekke smale bånd. Det ble samlet opp totalt 15 fraksjoner.



Figur 5.1.2.1: Separasjon av antocyaner i *Jacaranda mimosifolia* på Sephadex LH-20-kolonne.

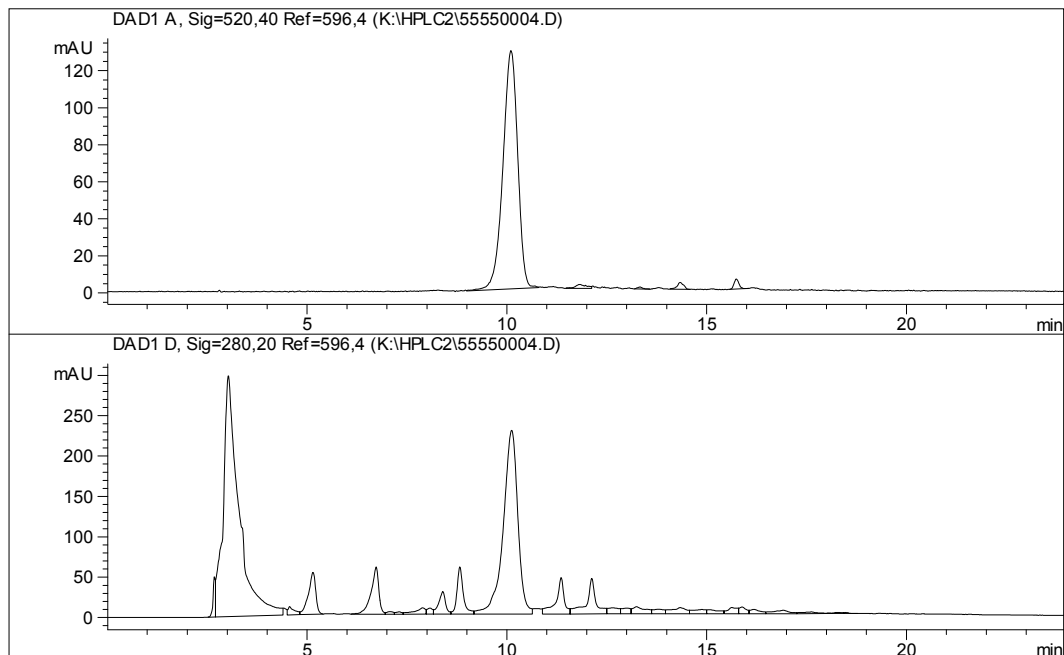
Ut fra retensjonstider og UV/synlig-spektre så fraksjon 3 og 4 ut til å inneholde samme forbindelse. Disse to fraksjonene ble derfor slått sammen og kjørt en ny HPLC-profil på. Kromatogrammet av denne er vist i figur 5.1.2.2. Øverste vindu viser opptak ved 520 ± 20 nm. Det er her bare en topp. Sammenlignet med retensjonstidene til forbindelsene i råekstraktet ser dette ut til å være hovedpigmentet i planten. Det nederste vinduet, detektert ved 280 ± 10 nm, sier en del om renheten til prøven. Her vil de fleste aromatiske forbindelser absorbere. Om de så ikke har maksimal absorbans i denne regionen, vil de i alle fall ha noe absorbans. Alifatiske forbindelser derimot vil ikke vises. Dessuten kan andre aromatiske forbindelser ha samme retensjon som et antocyan og slik skjules i denne toppen. I kromatogrammet ved 280 ± 10 nm til denne prøven vises noen minorkomponenter av aromatiske forbindelser, men ellers ser det ut til at antocyanet er hovedforbindelsen.



Figur: 5.1.2.2: HPLC-kromatogram detektert ved 520 ± 20 nm (øverste vindu) og 280 ± 10 nm (nederste vindu) av fraksjon 3 og 4 til *Jacaranda mimosifolia* etter separasjon på Sephadex LH-20-kolonne.

5.1.3 Rensing av hovedpigment på Toyopearl-kolonne

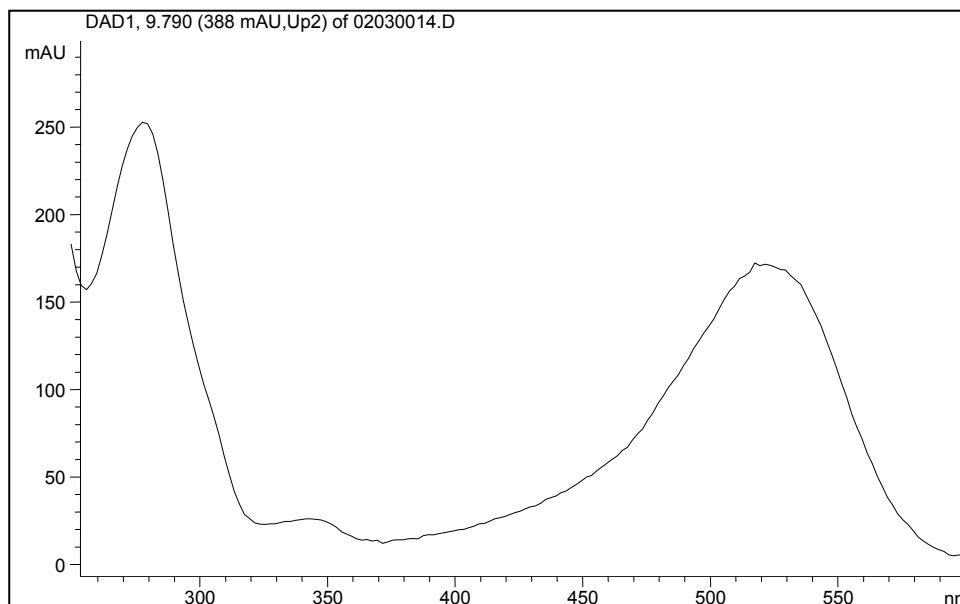
NMR-dataene (se kapittel 5.2.2) ga sterke indikasjoner på at prøven likevel inneholdt en god del andre forbindelser. Prøven ble derfor rensset på en Toyopearl HW-40F-kolonne i forsøk på å skille ut bare antocyanet. Et bredt mørkerosa bånd gikk gjennom hele kolonnen. Kromatogrammet av prøven etter denne rensingen er vist figur i 5.1.3.1. Øverste vindu, detektert ved 520 ± 20 nm, viser fremdeles en tydelig forekomst av hovedpigmentet. Nederste vindu, detektert ved 280 ± 10 nm, viser at prøven i stedet for å ha blitt reinere nå inneholder enda flere forbindelser. Forklaringen på dette er mest sannsynlig at Toyopearl HW-40F-kolonnen ikke var helt rein i utgangspunktet.



Figur 5.1.3.1: HPLC-kromatogram detektert ved 520 ± 20 nm (øverste vindu) og 280 ± 10 nm (nederste vindu) av hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* etter rensing med Toyopearl HW-40F-kolonne.

5.1.4 UV/synlig-spekter av hovedpigmentet

Under HPLC-analysen ble det tatt opp UV/synlig-spektre *on-line*. Figur 5.1.4.1 viser absorbansen til hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* etter bruk av Sephadex LH-20-kolonne, men før rensing på Toyopearl HW-40F-kolonone. Verdier fra analysen er gitt i tabell 5.1.4.1.

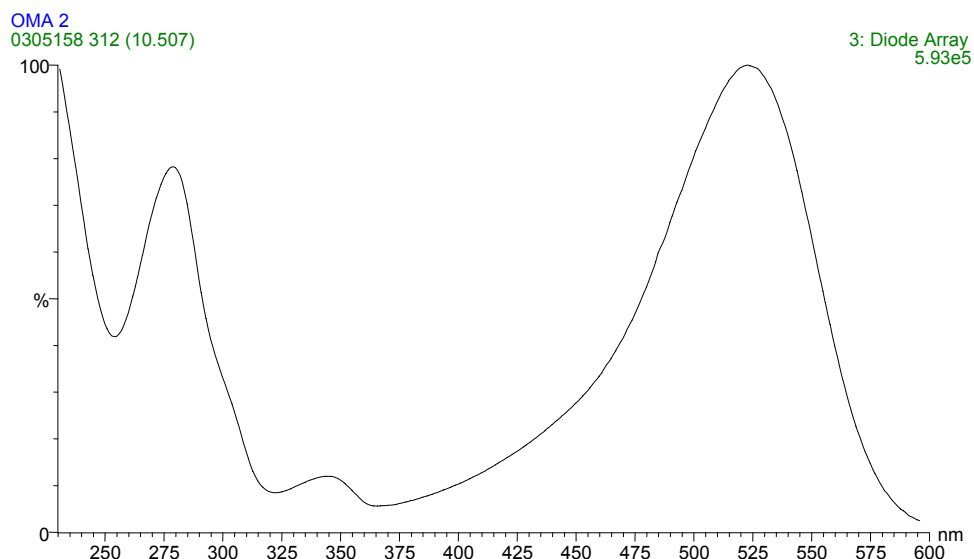


Figur 5.1.4.1: UV/synlig-spekter av hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* detektert *on-line* under HPLC-analyse (gradient 1).

Hovedpigmentet ga opphav til nøyaktig samme UV/synlig-spekter også etter rensing på Toyopearl HW-40F-kolonne. Det samme gjaldt for UV/synlig-spekteret tatt fra hovedpigmentet i råekstraktet. Alle disse kjøringen ble utført med gradient 1 (se kapittel 2.3.5).

Antocyanet absorberer maksimalt synlig lys på 525 nm, noe som tyder på at det er et delfinidin-, malvidin- eller petunidinderivat²⁸. Absorpsjonsmønsteret i UV-regionen tyder på at det ikke er noen acylering av aromatiske kannelsyrer. Intensiteten ved λ_{UV-max} derimot er uvanlig høy til at det ikke skal være noen aromatiske syrer. Denne kan tyde på at det er hydroksybenzosyrer til stede. Disse vil kunne absorbere ved samme bølgelengde som antocyanet og slik gi en økning i A_{UV-max} .

Det ble i tillegg kjørt LC-MS av pigmentet. Også under denne analysen ble det tatt opp UV/synlig-spekter *on-line*. Det ble benyttet en annen gradient, gradient 3 (se kapittel 2.4.3). UV/synlig-spekteret er vist i figur 5.1.4.2. Verdier fra analysen er gitt i tabell 5.1.4.1.



Figur 5.1.4.2: UV/synlig-spekter av hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* detektert *on-line* under LC-MS-analyse (gradient 3).

Både λ_{\max} i det synlige området (523 nm) og i UV-regionen (279 nm) er omtrent den samme ved bruk av gradient 3 som ved gradient 1. Det er derimot en stor forskjell i intensiteten til absorbansen. Ved gradient 1 er absorbans av synlig lys betydelig lavere enn absorbansen av lys i UV-regionen. Ved gradient 3 er det direkte motsatt. Det skyldes nok at gradientene er ulike. Mens gradient 1 var besto av varierende mengder metanol og vann tilsatt metansyre, var gradient 3 satt sammen av varierende mengder acetonitril og vann tilsatt TFA. Det er da godt mulig at prøven inneholdt frie hydroksybenzosyrer eller andre forbindelser som retarderes likt med antocyanet i gradient 1, mens de retarderes forskjellig fra antocyanet i gradient 3 og dermed ikke gir utslag i UV/synlig-spekteret fra denne.

$A_{440}/A_{\text{vis-max}}$ er på 23 % og 24% ved bruk av henholdsvis gradient 1 og 3. Dette er vanligvis verdier funnet ved antocyaner med 3-substitusjon.^{5, 28}

Tabell 5.1.4.1: Verdier fra HPLC-analyse av hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia*. Verdiene er gitt for to ulike gradienter (G1 og G3).

Forbindelse	T_R (min)	UV_{\max} (nm)	Vis_{\max} (nm)	$A_{440}/A_{\text{vis-max}}$ (%)
Hovedp. G1	10,07	278	525	23 %
Hovedp. G3	10,51	279	523	24%

Antocyanet ble videre analysert med MS og NMR.

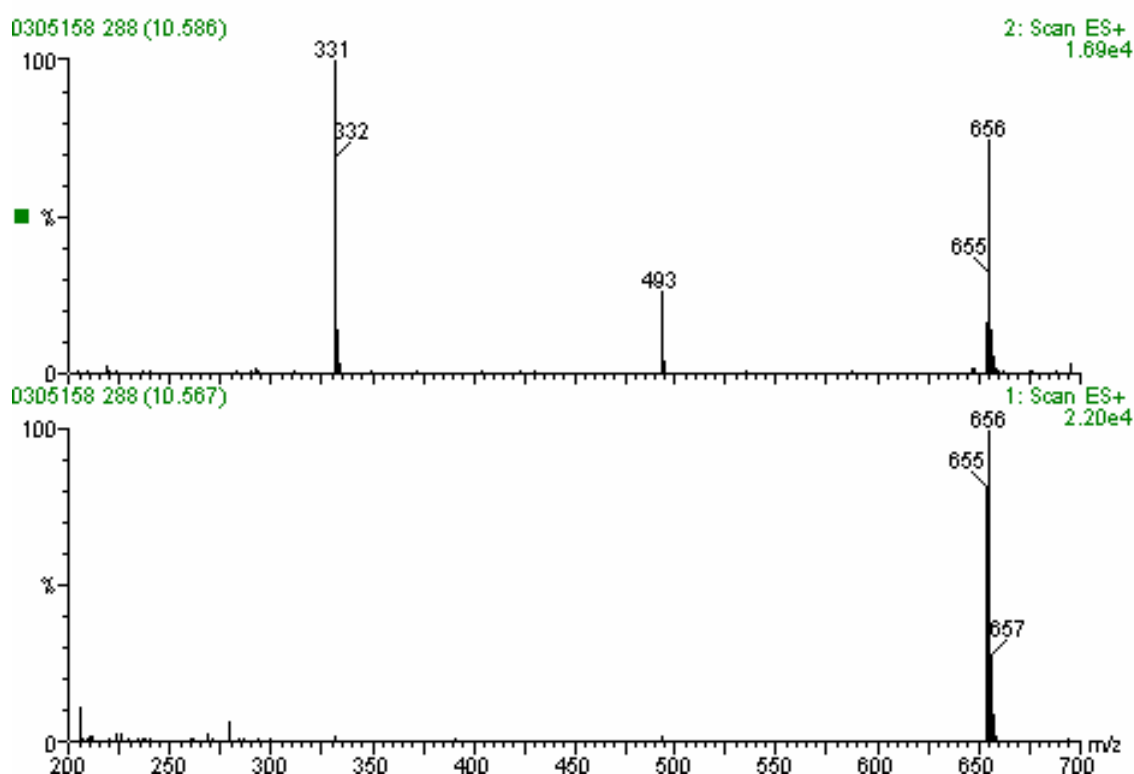
5.2 Strukturbestemmelse med MS og NMR

Det ble utført en rekke NMR-eksperiment på prøven etter separasjon på Sephadex LH-20-kolonne. Spektrene viste en mengde uvanlige signal spesielt i aromatregionen. Til hjelp i oppklaringen ble det derfor benyttet massespektrometri.

5.2.1 Massespektrometri

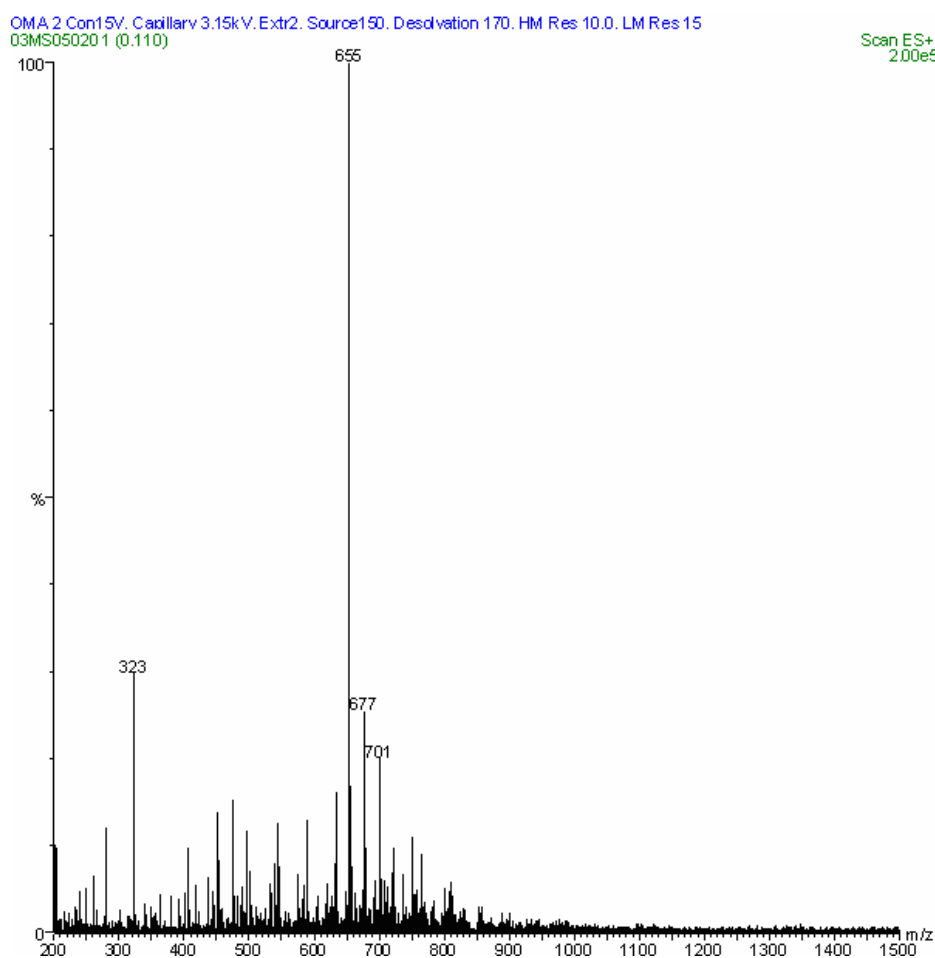
Det ble utført LC-MS på hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* både før og etter rensing med Toyopearl HW-40F-kolonne. Ved LC-MS er det mulig å få massespektre av hver enkelt topp i kromatogrammet. Figur 5.2.1.1 viser massespekteret av antocyanet i prøven før rensing på Toyopearl HW-40F-kolonne ved 20V (nederste vindu) og 50V (øverste vindu).

Av de seks vanligste aglykonene er det bare verdien for malvidin som her vises. Denne ligger på 331 amu. Malvidin med en $C_6H_{12}O_6$ -sukkerenhet vil gi 493 amu, en masse som også finnes i spekteret. Ved to slike sukkerenheter blir massen 655 amu. Også denne massen er tydelig i spekteret. Antocyanet ser altså ut til å være satt sammen av malvidin og to heksosor med molekylformel $C_6H_{12}O_6$. MS av forbindelsen i prøven rensert på Toyopearl HW-40F-kolonne ga de samme enhetene.



Figur 5.2.1.1: Massespekter fra LC-MS av hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* ved 20V (nederste vindu) og 50V (øverste vindu).

Det ble også utført MS av hele prøven (direct inlet) for å detektere masseenheter opp til 1500 m/z (figur 5.2.1.2). Det ble heller ikke her detektert noen forbindelse som kan være et molekylærion med syre. Dette styrker begrunnelsen til de varierende UV/synlig-spektrene i kapittel 5.1.4: Hydroksybenzoesyrer som ikke er del av antocyanet vil kunne retarderes identisk med antocyanet. Dermed vil de i HPLC-kromatogrammet skjules i antocyan-toppen, samtidig som de vil gi en økt absorpsjon i området som er karakteristisk for hydroksybenzoesyrer (ved bruk av gradient 1). Siden masser under 200 m/z ikke ble detektert i MS-analysen, er det ikke mulig å utelukke tilstedeværelsen av slike frie hydroksybenzoesyrer eller eventuelt andre aromatiske forbindelser med lav molekylmasse.



Figur 5.2.1.2: MS (direct inlet) av hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia*.

5.2.2 Strukturbestemmelse med NMR; malvidin 3,7-di-*O*- β -glukopyranosid

Det ble utført ^1H -, HSQC-, HMBC-, COSY- og TOCSY-eksperiment på hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia*. Disse ble utført på prøven etter bruk av Sephadex LH-20-kolonne, men før Toyopearl HW-40F. Prøven ble forsøkt rensset på Toyopearl HW-40F-kolonne. Konsentrasjonen av antocyanet ble betydelig svakere etter dette i tillegg til at kolonnen antagelig ikke var ren. Spektrene var derfor verken spesielt gode eller pålitelige. Siden det i mellomtiden var kommet mye informasjon fra MS, var det mulig å struktruoppklare pigmentet fra NMR-spektrene på prøven før rensing på Toyopearl HW-40F-kolonne.

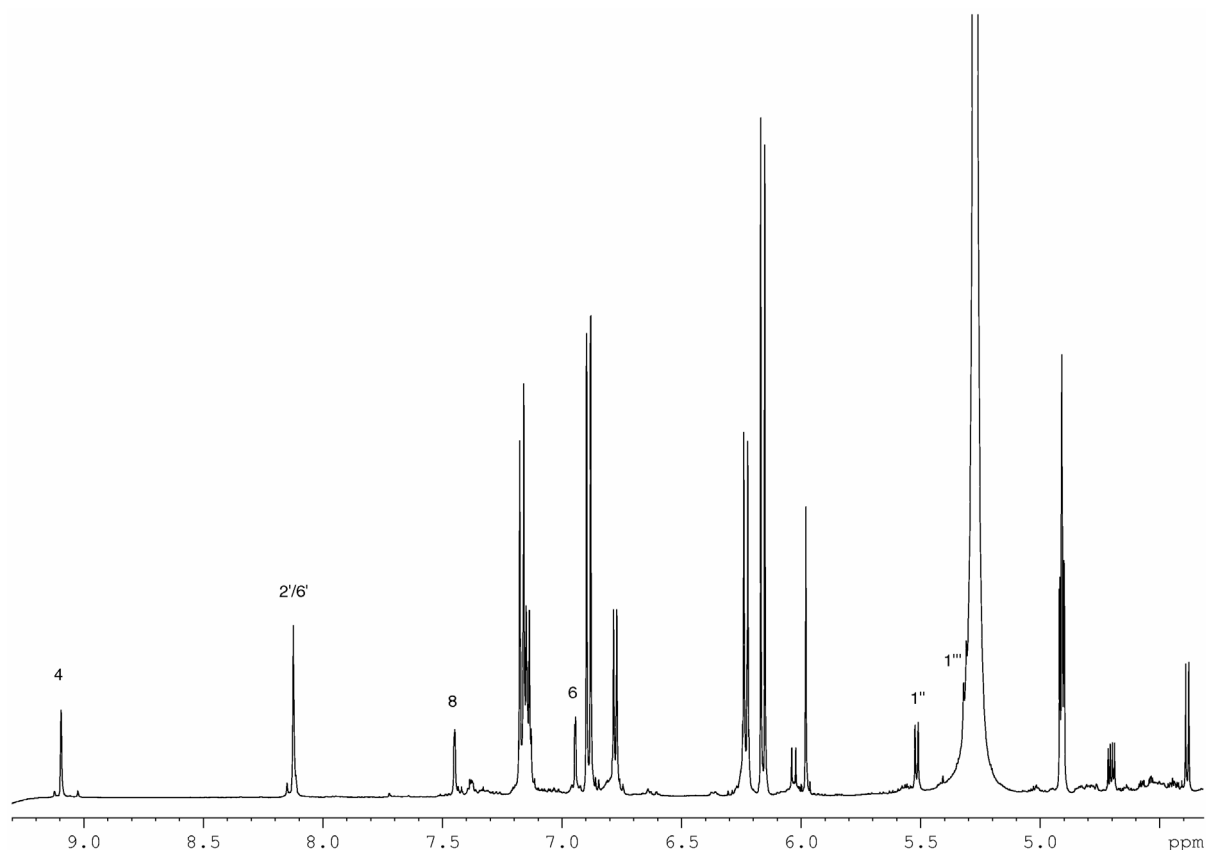
Alle spektrene i dette kapittelet er dermed fra prøven før rensing med Toyopearl HW-40F-kolonne.

Aromatregionen og anomere signal

Figur 5.2.2.1 viser aromatregion og anomert område av protonspekteret til hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia*. Ut fra antall signal er det tydelig at det er mer enn bare protoner fra aglykonet i aromatregionen. Flere av disse signalene har dessuten integralverdier og koblingskonstanter som bekreftet dette. Verdiene for de aktuelle aglykonsignalene er gitt i tabell 5.2.2.1.

På 4,09 ppm er det et karakteristisk metoksysignal med tilhørende karbon skiftverdi 57,35 ppm (avlest fra HSQC-spekter). Av de vanligste seks aglykonene er det da bare peonidin, petunidin og malvidin som er aktuelle. Peonidin har metoksygruppe i 3'-posisjon og et hydrogen i 5'-posisjon. B-ringen vil da gi opphav til tre aromatiske protonsignal, fra H2', H5' og H6'. Petunidin har også metoksygruppe i 3'-posisjon, men det har en hydroksygruppe i 5'-posisjon. B-ringen til petunidin vil dermed gi opphav til to signaler, fra H2' og H6'. Malvidin har metoksygrupper i både 3'- og 5'-posisjon. B-ringen blir dermed symmetrisk og H2' og H6' gir bare opphav til ett signal. I tillegg til protonene på B-ringen vil H4, H6 og H8 fra A- og C-ringene vises. MS-data bekrefter at aglykonet er malvidin. Med utgangspunkt i dette kan signalene fra aglykonet anordnes.

Singletten på 9,10 ppm har den karakteristisk høye skiftverdien for H4. Integralene kalibreres i forhold til at denne utgjør et proton. Neste signal er en singlett på 8,12 ppm. Denne integreres til to protoner og er mest sannsynlig H2' og H6' som faller sammen til et signal på grunn av symmetri. Signalene på 7,45 ppm og 6,94 ppm er singletter som hver utgjør et proton. Karbon skiftverdiene til disse kan leses av til henholdsvis 96,18 ppm og 104,06 ppm fra HSQC-spekteret (figur 5.2.2.2). Signalet på 7,45 ppm må da komme av H8, siden C8 vil ha betydelig lavere karbon skiftverdi enn C6.⁴⁰ Signalet på 6,94 ppm skyldes da H6.



Figur 5.2.2.1: Aromatregion og anomert område i ^1H -spekter av hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25 °C.

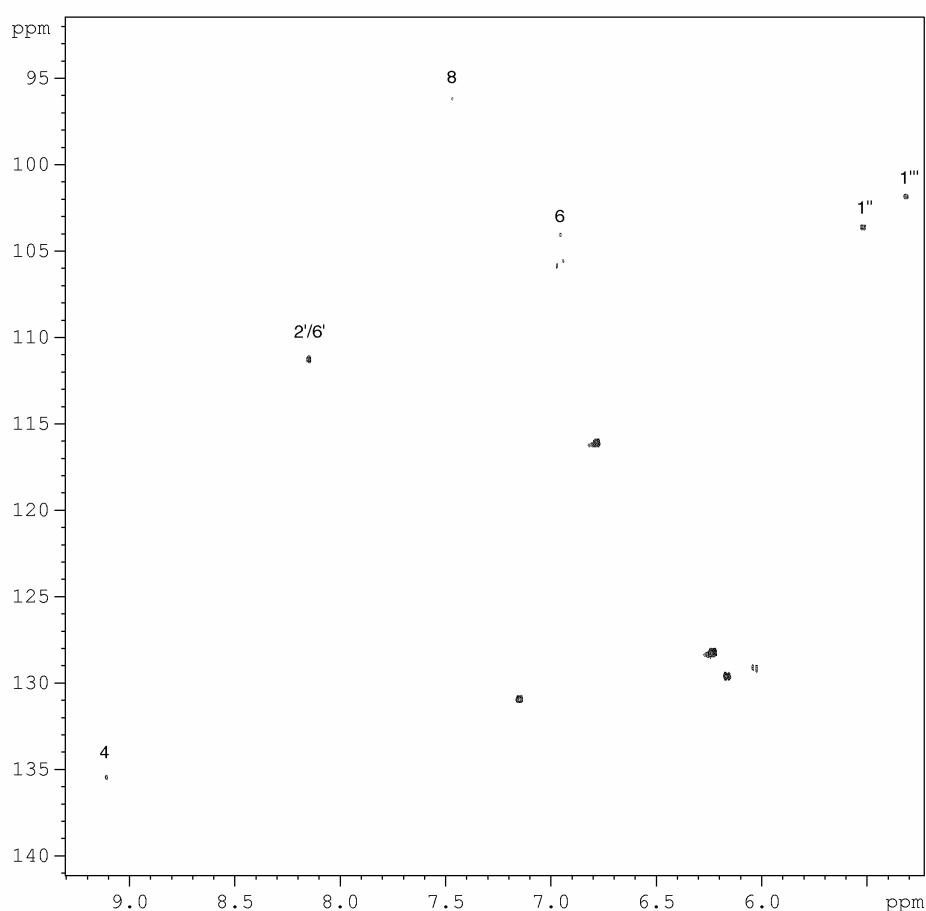
Tabell 5.2.2.1: Verdier fra utsnitt av ^1H -spekter av hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia*, løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25 °C.

^1H	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplisitet	Koblingskonstant (Hz)	Integralverdi
4	9,10	s		1
2'/6'	8,12	s		2,1
8	7,45	s		1,1
6	6,94	d	1,9	1,1
1''	5,52	d	7,7	1,5
1'''	5,31	d	7,4	I vanntopp
	4,38	d	7,8	1,7

I tillegg er det tre protoner som ut fra koblingskonstanter ser ut til å være anomere. $\text{H1}''$ på 5,52 ppm med en splitting på 7,8 Hz og $\text{H1}'''$ på 5,32 ppm med en splitting på 7,2 Hz har begge karakteristiske skiftverdier for sukkerenheter knyttet til aglykon. $\text{H1}'''$ er noe skjult i vanntoppen. Signalet på 4,38 ppm med en koblingskonstant på 7,7 Hz ligger derimot relativt langt *upfield* og er enten et fritt sukker eller knyttet til en av de andre sukkerenhetene. Siden MS bare viste to sukkerenheter som del av molekylærionet er det mest sannsynlig ikke del av antocyanet. Dette kan bekreftes ved å lese av de tilhørende proton skiftverdiene fra COSY og identifisere karbon skiftverdiene fra HSQC. Disse er merket av i CAPT-spekteret med F (figur 5.2.2.7). Her kan en tydelig se at intensiteten av signalene til dette sukkeret er mye sterkere enn resten av antocyanet i prøven. Sukkeret med anomer på 4,38 ppm er altså ikke del av antocyanet og signalene kan lukes ut i den videre analysen.

I protonspekteret er det to dubletter på 7,14 ppm og 6,78 ppm som kobler med hverandre med 8,6 Hz. Signalformen og koblingskonstanten er typisk for *p*-hydroksybenzoesyre. Skiftverdiene derimot stemmer ikke helt overens med samme syre knyttet til et antocyan.⁵⁰ Siden substitusjon i stor grad kan påvirke de kjemiske skiftverdiene, vil en ved en fri *p*-hydroksybenzoesyre ikke forvente de samme proton skiftverdiene som ved en tilsvarende syre knyttet til en sukkerenhet på et antocyan. Siden MS viste at det ikke var noen acylering, mens UV-spekteret (fra gradient 1) indikerte at aromatiske syrer var til stede, styrker dette teorien om frie hydroksybenzoesyrer i prøven. Integralverdier bekrefter at de ikke er del av antocyanet og kan sammen med det frie sukkeret overses i den videre strukturoppklaringen.

Ut fra HSQC-spekteret (figur 5.2.2.2) kan nå karbon skiftverdiene til de to anomere og til de ikke-kvarternære karbonene på aglykonet leses av.

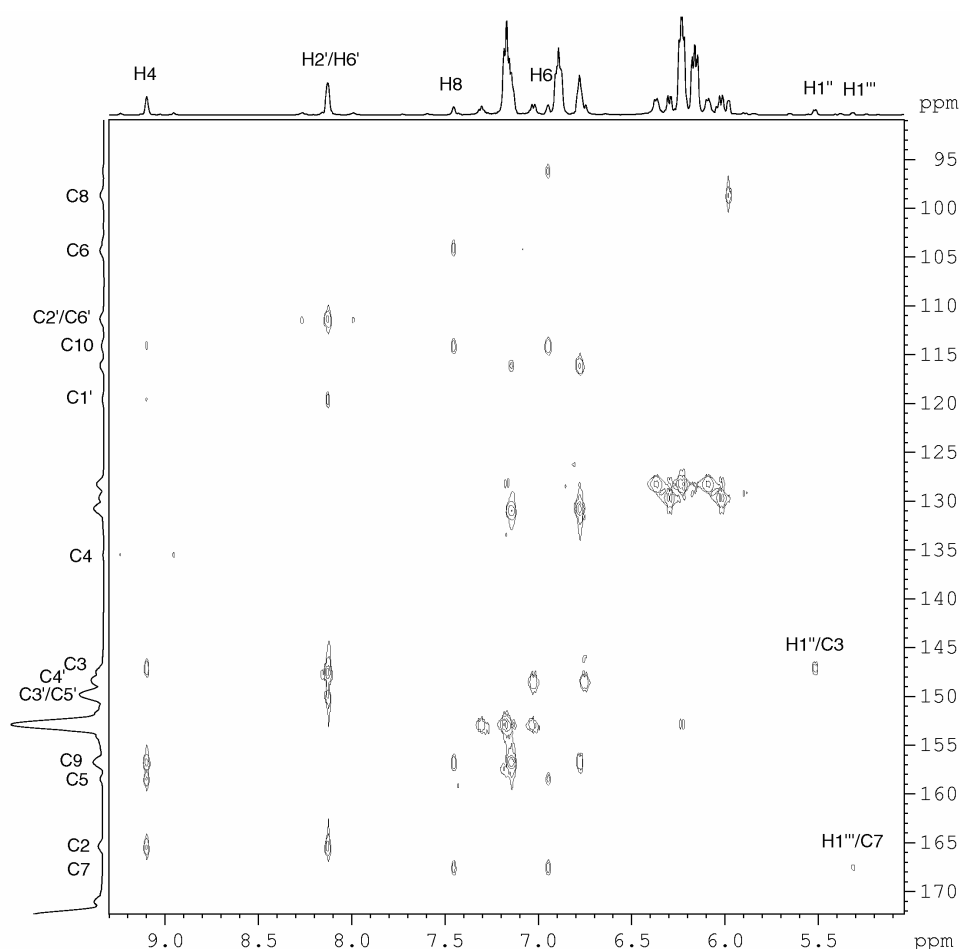


Figur 5.2.2.2: Aromatregion og anomert område i HSQC-spekter av hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C.

For å tilordne de kvarternære karbonene i aglykonet brukes HMBC-spekteret (figur 5.2.2.3). Forventede koblinger ved malvidin er gitt i tabell 5.2.2.2.

Tabell 5.2.2.2: Forventede koblinger i HMBC-spekter ved malvidin.

Proton	$^2J_{CH}$		$^3J_{CH}$		$^4J_{CH}$		
H4	C3	C10	C2	C5	C9	C1'	C8
H2'	C1'	C3'	C2	C4'	C6'		
H6'	C1'	C5'	C2	C2'	C4'		
H8	C7	C9	C6	C10			
H6	C5	C7	C8	C10			

**Figur 5.2.2.3:** Aromatregion og anomert område i HMBC-spekter av hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* løst i CD_3OD-CF_3COOD (19:1) ved 25 °C.

Starter med å se på H6 og H8. Disse protonene har to felles krysstopper, på 114,06 ppm og 167,45 ppm. Både H6 og H8 kan koble til C7 og til C10. At C10 er en av de få kvarternære karbonatomene i aglykonet som ikke er direkte knyttet til noe oksygen fører til at dette signalet ligger betydelig mer *upfield* enn resten. Krysstoppen på 114,06 ppm gir altså skiftverdien til C10, mens krysstoppen på 167,45 ppm kommer av korrelasjon til C7.

H8 kan i tillegg koble til C6 og til C9. Siden C6 allerede er identifisert er det mulig å sjekke om H8 har en krysstopp inn på skiftverdien til C6 (104,06 ppm), noe som også er tilfelle. Den siste krysstoppen til H8 ligger på 156,73 ppm og må da skyldes korrelasjon til C9.

H6 har fremdeles to krysstopper som ikke er bestemt. Den ene går som forventet inn på C8 (96,18 ppm), mens den andre ligger på 158,35 ppm. H6 kan koble over to bindinger til C5 og det er nok denne korrelasjonen som gir opphav til krysstoppen på 158,35 ppm.

Nå er alle krysstopperne til H6 og til H8 bestemt. Ved så å sammenligne krysstopperne til H4 med de til H2'/H6' ser en at også disse har to felles krysstopper med de samme skiftverdiene, 119,65 ppm og 165,47 ppm. Tabell 5.2.2.2 angir at de eneste karbonene både H4 og H2'/H6' kan koble til er C2 og C1'. C1' er ikke direkte knyttet til noe oksygen, noe C2 derimot er. Skiftverdien til C1' vil derfor være mest *upfield* av disse, her 119,65 ppm, mens skiftverdien til C2 blir 165,47 ppm.

H4 har nå bare en uidentifisert krysstoppp, på 147,09 ppm. Siden alle andre karbon som H4 kobler til unntatt C3 nå kan elimineres fra tabell 5.2.2.2, må denne skiftverdien tilhøre dette karbonet.

De eneste kvarternære karbonene som nå ikke er tilordnet er C3', C4' og C5'. På grunn av symmetri i B-ringen vil C3' og C5' få samme skiftverdi. Både C4' og C3'/C5' vil koble til H2'/H6'. Mens C4' kobler over tre bindinger, vil C3'/C5' kobler over to bindinger. Den ene krysstoppen vil altså skyldes en trebindingskobling og den andre en mindre tobindingskobling. De to uidentifiserte krysstopperne til H2'/H6' ligger på 147,45 ppm og 149,84 ppm. Ut fra intensiteten på disse gir de skiftverdiene til henholdsvis C4' og C3'/C5'. Signalet som nå er tilordnet C3'/C5' har dessuten en krysstoppp inn på 4,09 ppm, som er den tidligere avleste skiftverdien for metoksysignalet. At metoksygruppene i malvidins 3'- og 5'-posisjon kobler med C3'/C5' bekrefter tilordningen av signalene.

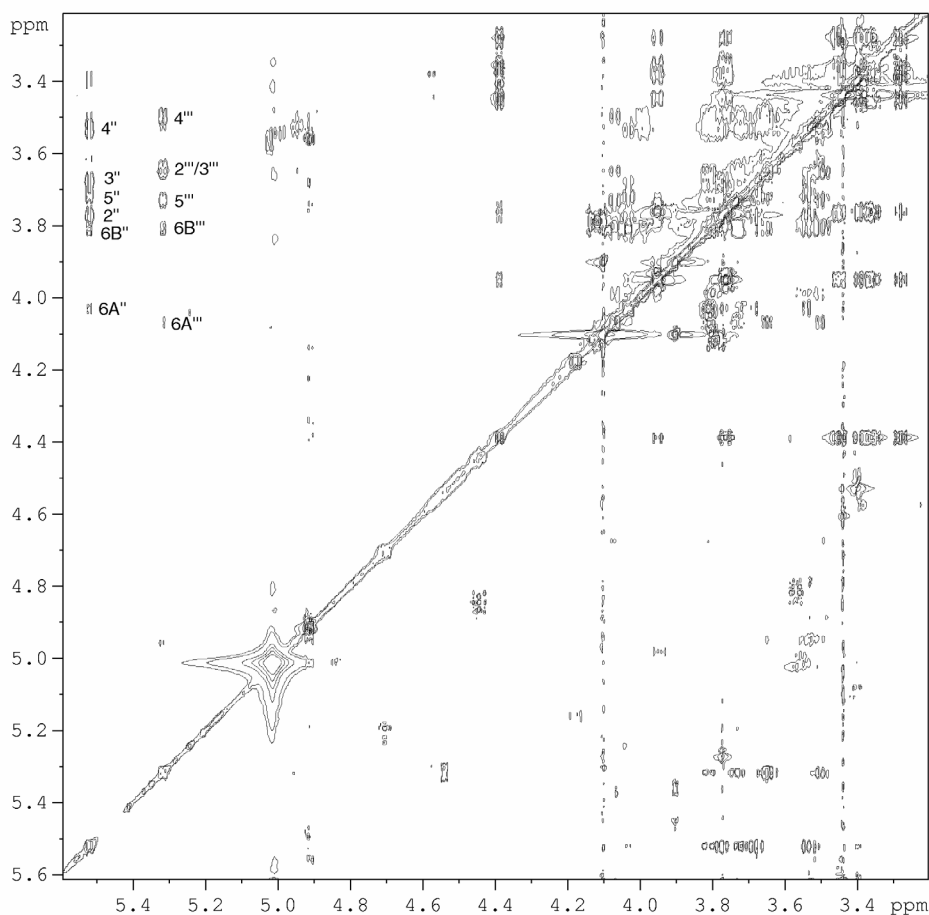
De kjemiske skiftverdiene stemmer overens med litteraturverdier for malvidinderivater.⁵¹

Sukkerregionen

Det er allerede identifisert to anomere signal på 5,52 ppm (H1'') og 5,32 ppm (H1'''). For å finne skiftverdiene til protonene til hver av disse to sukkerenhetene kan TOCSY benyttes (figur 5.2.2.4). Ved å ta utgangspunkt i hver av de anomere protonene kan skiftverdiene til protonene som er del av samme spinsystem leses av. Resultatet av denne inndelingen er vist i tabell 5.2.2.3. Noen av signalene er overlappende og det er derfor tatt hensyn til intensiteten av krysstopperne.

Tabell 5.2.2.3: Inndeling av protonsignaler fra TOCSY-spekter.

δ ¹ H sukkerenhet 1 (ppm)	δ ¹ H sukkerenhet 2 (ppm)
5,52	5,32
4,03	4,07
3,82	3,81
3,77	3,73
3,72	3,65
3,68	3,65
3,53	3,51



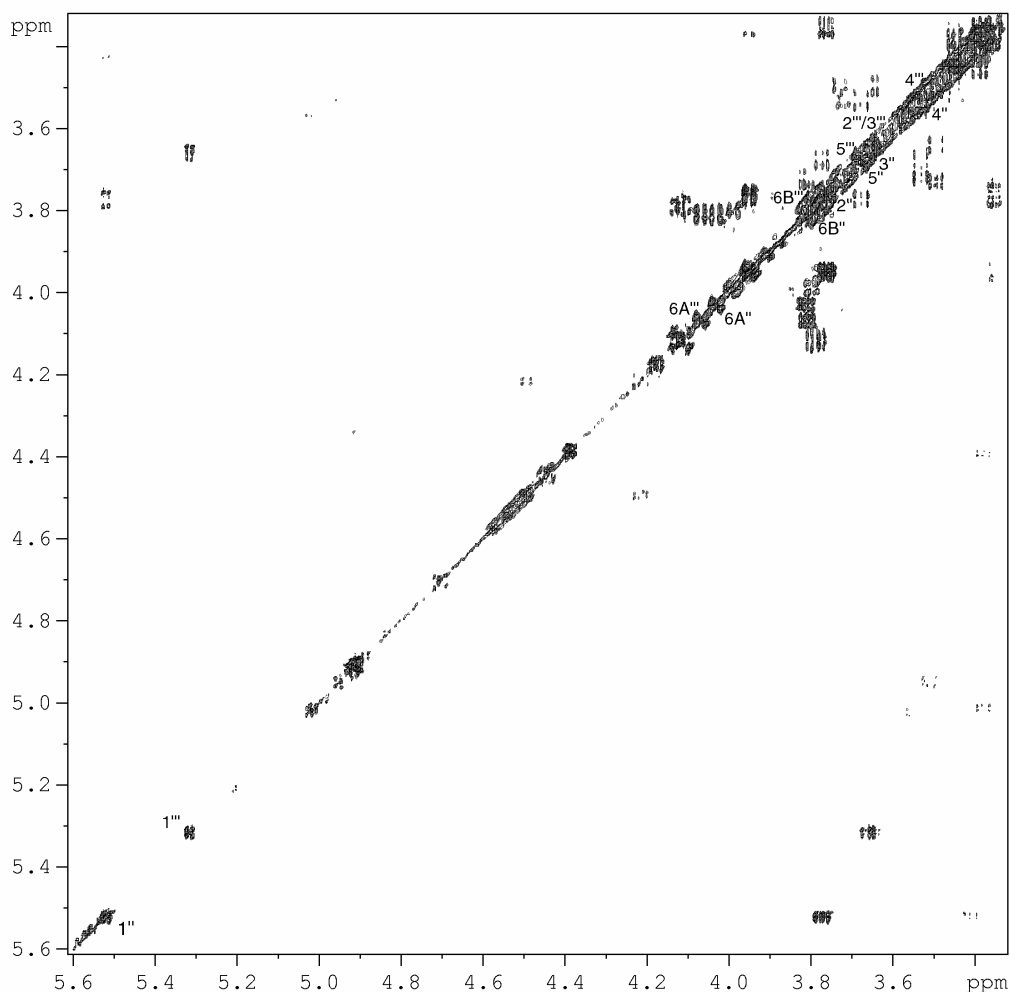
Figur 5.2.2.4: Sukkerregionen i TOCSY-spekter av hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25°C .

MS-analysen antydnet at begge sukkerenhetene er heksosere med molekylformel $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. TOCSY-spekteret viser derimot bare syv protoner i hver av sukkerene. Dette skyldes at i NMR-analyser hvor en benytter deuterert løsemiddel vil protonene i hydroksygruppene raskt byttes ut med deuterium og derfor ikke vises i spektrene.³⁶

Protonsignalene kan nå tilordnes ut fra COSY-spekteret (figur 5.2.2.5). Starter med $\text{H1}''$ på 5,52 ppm. Denne har en krysstopp inn på 3,77 ppm, som gir skiftverdien for $\text{H2}''$. $\text{H2}''$ kobler videre til $\text{H3}''$ på 3,68 ppm, som igjen kobler videre til $\text{H4}''$ på 3,52 ppm. $\text{H4}''$ kobler videre til et signal på 3,72, som gir skiftverdien for $\text{H5}''$. $\text{H5}''$ kobler til et signal på 3,82 ppm, som kobler videre til et signal på 4,03 ppm. HSQC-spekteret (figur 5.2.2.6) viser at disse to signalene har samme karbon skiftverdi (62,32 ppm) og utgjør dermed henholdsvis $\text{H6B}''$ og $\text{H6A}''$.

Ved så å starte med anomeren på 5,32 ppm kan protonene i den andre sukkerenheten anordnes. $\text{H1}'''$ kobler til $\text{H2}'''$ på 3,65 ppm. Denne skiftverdien ga en sterk topp i TOCSY-spekteret og ser ut til å gi skiftverdien til to protoner. For med sikkerhet å kunne si hvilke to, er det nødvendig å gå over til motsatt ende av protonrekken, altså starte med protonene i sukkerets 6-posisjon. TOCSY-spekteret ga en krysstopp på 4,07 ppm som angir skiftverdien til $\text{H6A}'''$. I COSY-spekteret kobler denne til $\text{H6B}'''$ på 3,81 ppm. $\text{H6B}'''$ kobler til $\text{H5}'''$ på 3,73 ppm, som kobler videre til $\text{H4}'''$ på 3,50 ppm. $\text{H4}'''$ kobler til $\text{H3}'''$ på 3,65 ppm. Dette er samme skiftverdi som ble tilordnet $\text{H2}'''$. $\text{H2}'''$ og $\text{H3}'''$ overlapper altså og er grunnen til

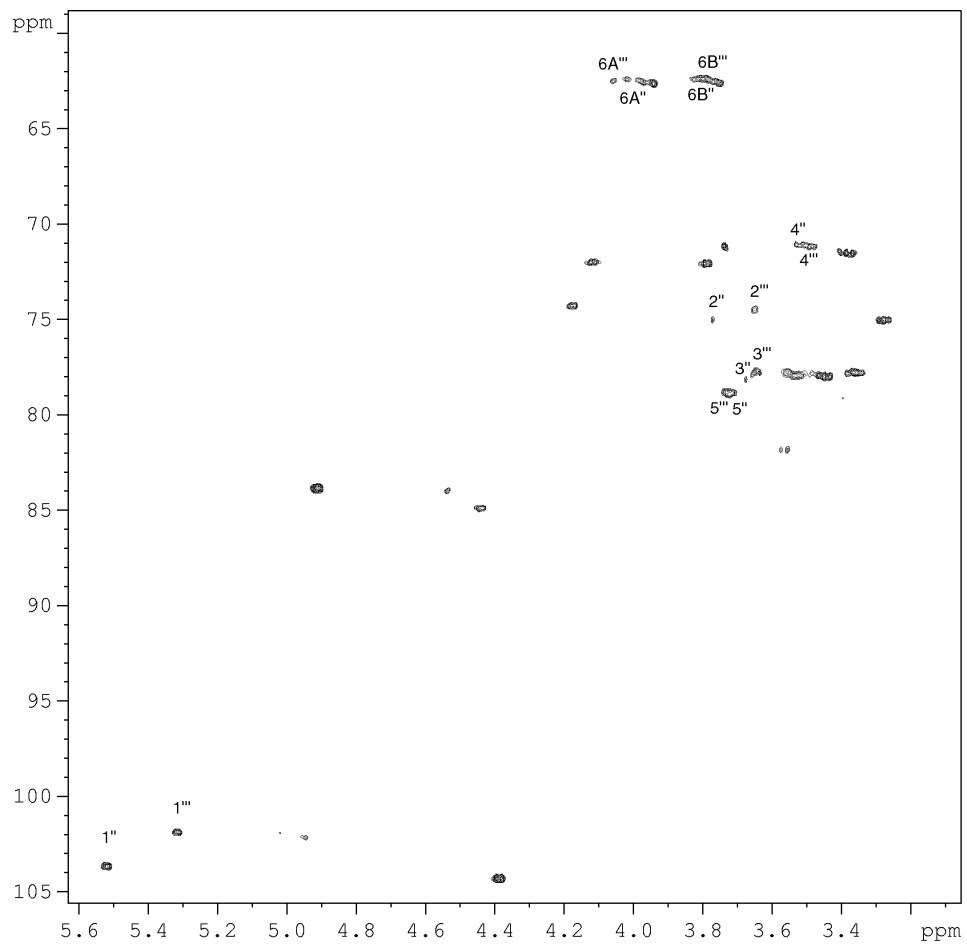
at krysstoppen på 3,65 ppm i TOCSY-spekteret ble betydelig sterkere enn de andre krysstoppene.



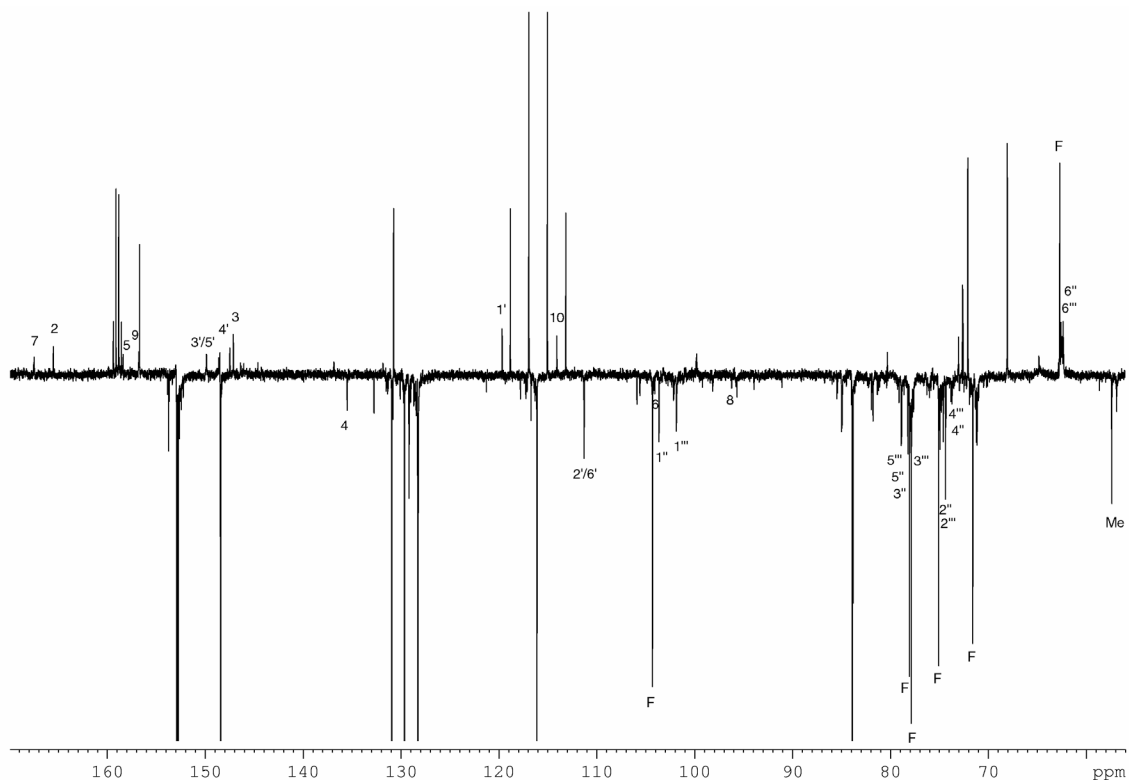
Figur 5.2.2.5: Sukkerregionen i COSY-spekter av hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25 °C.

Karbon skiftverdien til hver av signalene kan nå leses av fra HSQC-spekteret (figur 5.2.2.6). På skiftverdien til H_2'' (3,77 ppm), er det to krysstopper inn på karbonaksen, på 72,06 ppm og 74,93 ppm. For å kunne bestemme hvilke av disse som gir C_2'' er det nødvendig å se på CAPT-spekteret (figur 5.2.2.7). I CAPT-spekteret er metin- og metylgrupper faset ned, mens kvarternære karbon og metylengrupper er faset opp. Signalet på 72,06 ppm er faset opp, mens signalet på 74,93 er faset ned. Det er altså bare det siste signalet som kan være den aktuelle metingruppen, og 74,93 ppm er den korrekte skiftverdien for C_2'' .

H_5'' og H_5''' overlappen nesten totalt med karbon skiftverdi rundt 78,85 ppm. CAPT-spekteret viser to signal i dette området, et på 78,83 ppm og et 78,86 ppm. Begge signalene er faset ned og har omtrent samme intensitet. Det er ikke mulig å avgjøre hvilken av skiftverdiene som tilhører C_5'' og hvilken C_5''' . De resterende skiftverdiene er lest av fra HSQC-spekteret, korrigert i forhold til de mer nøyaktige CAPT-verdiene, og oppgitt i tabell 5.2.2.3.



Figur 5.2.2.6: Sukkerregionen i HSQC-spekter av hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C.



Figur 5.2.2.7: CAPT-spekter av hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (19:1) ved 25 °C. Det frie sukkeret er merket med F. Metoksygruppen i 3'/5'-posisjon er merket med Me. Anordningen av C5'' og C5''' kan være reversert.

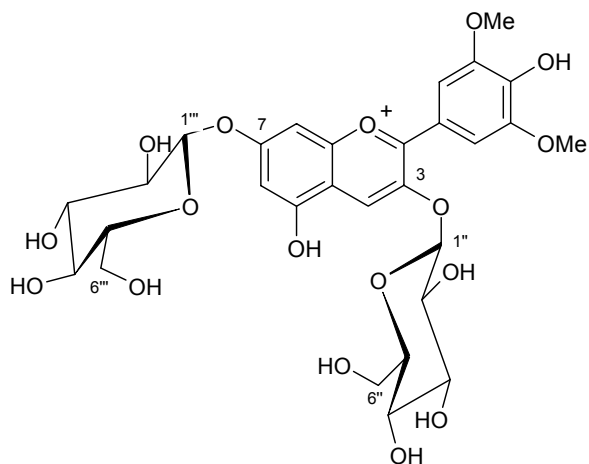
Begge sukkerene er heksosere med syv protoner hver. To av disse protonene er knyttet i sukkerenes 6-posisjon. Det er stor overlapping av signaler i sukkerregionen, både av sukkerenhetene til antocyanet og av andre elementer i prøven. Det er derfor bare svært få koblingkonsanter som kan leses av. Identiteten til sukkerene må da bestemmes ut fra de kjemiske skiftverdiene. Av de vanligste monosakkaridene hos antocyaner er det bare glukose og galaktose som er heksosere med syv protoner. Galaktose vil generelt ha noe lavere karbon skiftverdier enn glukose, spesielt på C2 og C3.⁴⁴ Begge sukkerene i dette pigmentet har skiftverdier som stemmer overens med litteraturverdier for glukose.^{41, 44} De stemmer også svært godt overens med de kjemiske skiftverdiene fra glukoseenhetene identifisert i kapittel 3.2.1 og 3.2.2.

Sammensetningen

Antocyanet er nå bestemt til å være et malvidinderivat med to glukoseenheter. Siden proton skiftverdiene til begge de anomere protonene er bestemt kan disse brukes til å lese av tilknytningspunkt fra HMBC-spekteret. I HMBC-spekteret (figur 5.2.2.3) kan en tydelig se en krysstopp fra det anomere protonet på 5,52 ppm og inn på karbon skiftverdien som er tilordnet C3, 147,09 ppm. Anomeren på 5,32 ppm har også en krysstopp inn på et karbon på aglykonet, C7 på 167,45 ppm. Sukkeret med anomer H1'' er altså knyttet i 3-posisjon på aglykonet, mens sukkeret med anomer H1''' er knyttet i 7-posisjon.

Konfigurasjonen til sukkerene er enda ikke bestemt. H1'' og H1''' har splittings på henholdsvis 7,8 Hz og 7,2 Hz. Disse er typiske koblingskonstanter ved β -glukoser.⁴² Begge sukkerene har altså β -konfigurasjon.

Hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* er nå identifisert som malvidin 3,7-di-*O*- β -glukopyranosid. Strukturen til pigmentet er vist i figur 5.2.2.8. Verdiene fra NMR-analysen er gitt i tabell 5.2.2.3.



Figur 5.2.2.8: Hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia*, malvidin 3,7-di-*O*- β -glukopyranosid.

Tabell 5.2.2.3: NMR-data av hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* løst i CD₃OD-CF₃COOD (19:1) ved 25 °C.

	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Fase i CAPT*	$\delta^1\text{H}$ (ppm)
Malvidin			
2	165,47	↑	
3	147,09	↑	
4	135,44	↓	9,10
5	158,35	↑	
6	104,06	↓	6,94
7	167,45	↑	
8	96,18	↓	7,45
9	156,73	↑	
10	114,06	↑	
1'	119,65	↑	
2'/6'	111,28	↓	8,12
3'/5'	149,84	↑	
4'	147,45	↑	
3'/5'-OCH ₃	57,35	↓	4,09
3-O-β-glukopyranosid			
1''	103,61	↓	5,52
2''	74,93	↓	3,77
3''	77,75	↓	3,68
4''	71,11	↓	3,52
5''	78,83**	↓	3,72
6A''	62,32	↑	4,03
6B''	62,32	↑	3,82
7-O-β-glukopyranosid			
1'''	101,84	↓	5,32
2'''	74,54	↓	3,65
3'''	77,89	↓	3,65
4'''	71,20	↓	3,50
5'''	78,86**	↓	3,73
6A'''	62,55	↑	4,07
6B'''	62,55	↑	3,81

* Kvarternære og metylengrupper er faset opp, metin- og metylgrupper er faset ned.

** Tilordning kan være reversert

Alle karbon skiftverdier er hentet fra CAPT-spekter. Proton skiftverdiene for aglykon og anomere protoner er hentet fra ¹H-spekter, mens de resterende sukkerprotonene er avlest fra TOCSY.

Koblingskonstanter til anomere protoner og protoner på aglykonet er gitt i tabell 5.2.2.1. Av de resterende protonene på sukkerenhetene kan følgende splittinger leses av: (6A'' 2,2 Hz), (6B'' 6,1 Hz og 12,4 Hz), (6A''' 1,9Hz og 12,2 Hz), (6B''' 6,4 Hz og 12,2 Hz).

5.3 Oppsummering

Antocyanene i *Jacaranda mimosifolia* ble ekstrahert fra de blå blomstene med metanol tilsatt TFA. Ekstraktet ble rensert med etylacetat og Amberlite XAD-7-kolonne og fraksjonert på Sephadex LH-20-kolonne. Fraksjonene som inneholdt hovedpigmentet ble videre analysert med HPLC, UV/synlig-spektroskopi og NMR. Da prøven viste seg å inneholde en del andre forbindelser, ble antocyanet forsøkt skilt ut på Toyopearl HW-40F-kolonne, men uten at dette lyktes. Til hjelp med å identifisere enhetene i antocyanet ble det derfor benyttet MS. Strukturoppklaringen av hovedpigmentet til malvidin 3,7-di-*O*- β -glukopyranosid ble til slutt oppnådd ved en kombinasjon av MS- og NMR-data.

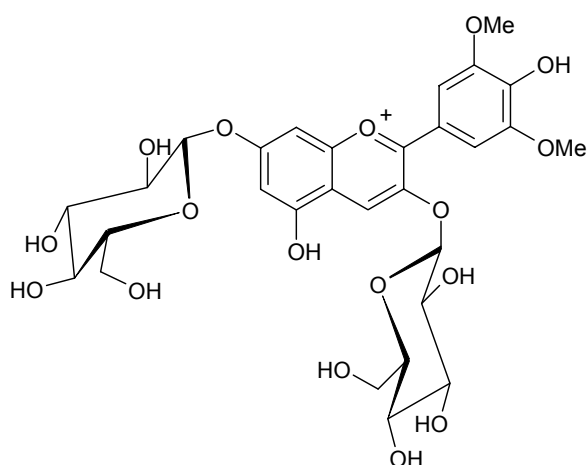
Det er tidligere utført arbeid som konkluderer med at *Jacaranda mimosifolia* bare inneholder delfinidin 3,5-diglukosid.⁴ Et nyere arbeid viser derimot at planten inneholder et malvidin glykosid og malvidin 3,5-diglukopyranosid, hvorav den siste forbindelsen utgjør hovedpigmentet. Denne analysen er basert på TLC og ¹H NMR-spektroskopi og forfatteren påpeker at identiteten til sukkerenhetene og deres tilknytningspunkter ikke kan angis med sikkerhet.⁵

Ved utvidet bruk av NMR-teknikker og MS var det i denne oppgaven mulig å bestemme sukkerene til β -glukopyranoser og deres tilknytningspunkt til 3- og 7-posisjon på malvidinaglykonet.

UV/synlig-spektroskopi ga en $A_{440}/A_{\text{vis-max}}$ -ratio på 23% og 24% ved bruk av henholdsvis gradient 1 og 3. Dette kan tyde på at 3,7-substituerte antocyaner har en $A_{440}/A_{\text{vis-max}}$ -ratio innenfor intervallet tidligere forbeholdt 3-substituerte antocyaner.

Blomstene til *Jacaranda mimosifolia* har en klar blå farge. Da antocyanene ble ekstrahert fra plantematerialet var løsningen betydelig mer rødlig. NMR-spektrene viste dessuten en rekke andre forbindelser i prøven. Det er derfor godt mulig at antocyanene foreligger som del av komplekser i planten for å kunne gi den blå fargen. Slike komplekser vil lett kunne gå i stykker ved ekstraksjon og bearbeidelse av ekstrakter og er derfor ofte vanskelige å detektere.

Strukturen til det identifiserte hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia* er vist i figur 5.3.1.



Figur 5.3.1: Strukturen til hovedpigmentet i *Jacaranda mimosifolia*, malvidin 3,7-di-*O*- β -glukopyranosid.

Litteraturliste

- 1 Andersen Ø.M. Naturens palett 2. Om antocyaner, deres funksjon, anvendelse og analyse. Naturen nr. 5 (1987)
- 2 Lowry J.B. Anthocyanins of the *Melastomataceae*, *Myrtaceae* and some allied families. *Phytochemistry* 15, 513-516 (1976)
- 3 Tandon S.P., Tiwari K.P., Tripathi K.C. Flower pigments of *Callistemon lanceolatus*. *Naturwissenschaften* 57, 394 (1970)
- 4 Fernandez M.E. Anthocyanins from flowers of *Jacaranda mimosifolia* and *Jacaranda semiserrata*. *Anales de la Asociacion Quimica Argentina* 56, 135-137 (1968)
- 5 Kamusiime H.K. Anthocyanins from flowers and berries of some tropical plants. Hovedfagsoppgave ved Makerere University (1995)
- 6 Coultate T.P. Food. The Chemistry of Its Components. Kap. 6. Athenaeum Press Ltd. (1996)
- 7 Andersen Ø. M. Naturens palett 1. – Hvordan får blomster røde, blå eller fiolette farger? Naturen nr. 3 (1987)
- 8 Ège S.N. Organic Chemistry Structure and Reactivity. Kap. 17. D. C. Heath and Company (1994)
- 9 Cordell G.A. Introduction to alkaloides a biogenetic approach. Kap 8. John Wiley & Sons (1981)
- 10 Bohm B.A. Introduction to flavonoids. Kap 1. Harwood Academic Publishers (1998)
- 11 Torssell K. B. G. Natural Product Chemistry. Kap. 5. Kristianstads Boktryckeri AB (1997)
- 12 Andersen Ø.M. Encyclopedia of Life Sciences. Anthocyanins. Macmillan Reference Ltd (1999)
- 13 Harborne J.B. Natural Products. Kap 6. (Mann J., Davidson R.S., Hobbs J.B., Banthorpe D.V., Harborne J.B.) Longman Group UK Ltd (1994)
- 14 Strack D., Wray V. The Flavonoids. Advances in research since 1986. Kap 1. (ed. Harborne J.B.) Chapman & Hall (1993)
- 15 Andersen Ø.M. Muntlig overlevering (2002-2003)
- 16 Andersen Ø.M. How easy is it nowadays to analyse anhocyanins? Polyphenols 2000, XXth International Coference of Polyphenols, 49-59 (2000)
- 17 Mazza G., Minati E. Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. Kap 1. CRC Press (1993)
- 18 Markham K.R., Gould K.S., Winefield C.S., Mitchell K.A., Bloor S.J., Boase M.R. Anthocyanic vacuolar inclusions – their nature and significance i flower colouration. *Phytochemistry* 55, 327-336 (2000)
- 19 Leirvåg A. Å sette farge på forskningen. UiB-Magasinet 2/95 (1995)
- 20 Morcombe M.K., Australia's Western Wildflowers. Landfall Press (1968)
- 21 Nettside. Australian National Botanic Gardens. URL: www.anbg.gov.au/callistemon
- 22 Byamukama R. Muntlig overlevering (2002-2003)
- 23 Nettside. Plantadviser. URL: <http://www.plantadviser.com/plants/callicitr.shtml>
- 24 Nettside. The Families of Flowering Plants. URL: <http://biodiversity.uno.edu/delta/angio/www/euphorbi.htm>

- 25 Katende A.B., Birnie A., Tengnas B. Useful trees and shrubs for Uganda. Majestic Printing Works (1995)
- 26 Hallè F., Oldeman R.A.A., Tomlinson P.B. Tropical Trees and Forests. Kap 3. Springer Verlag (1978)
- 27 Noad T.C., Birnie A., Trees of Kenya. General Printers (1989)
- 28 Andersen Ø. M. Chemical studies of anthocyanins in plants. Doktoravhandling ved Universitetet i Bergen (1988)
- 29 Nordstrand S. Analyse av fargestoffer fra moltebær og *Salvia*-blomster. Hovedfagsoppgave ved Universitetet i Bergen (2002)
- 30 Rasmussen K.E. Kromatografi. Kap 1. (Greibrokk T., Lundanes E., Rasmussen K.E.) Universitetsforlaget (1998)
- 31 Frøytlog, C., Slimestad, R., Andersen, Ø.M. Combination of chromatographic techniques for the preparative isolation of anthocyanins – applied on blackcurrant (*Ribes nigrum*) fruits, Journal of Chromatography A 825, 89-95 (1998)
- 32 Andersen Ø. M., Francis G.W. Handbook of Thin-Layer Chromatography. Kap 22. (ed. Sherma J., Fried B.) Marcel Dekker, Inc (1996)
- 33 Harborne J. B., Grayer R. J. The Flavonoids. Kap 1. (ed. Harborne J.B.) Chapman & Hall Ltd (1988)
- 34 Giske N.H. Fargestoffer i krossved og andre arter av kaprifolfamilien (*Caprifoliaceae*). Hovedfagsoppgave ved Universitetet i Bergen (2000)
- 35 Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. Fundamentals of Analytical Chemistry. Kap 22. Saunders College Publishing (1996)
- 36 Williams D. H., Fleming I. Spectroscopic Methods in Organic Chemistry. Kap 3 og 5. KcGraw-Hill (1995)
- 37 Frøystein N.Å. Practical NMR Spectroscopy. Kursmanual i K304 ved Universitetet i Bergen (2002)
- 38 Slimestad R., Solheim H. Anthocyanins from black currants (*Ribes nigrum L.*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 3228-3231 (2002)
- 39 Mitchell K.A., Markham K.R., Boase M.R. Pigment chemistry and colour of *Pelargonium* Flowers, Phytochemistry 47, 355-361 (1998)
- 40 Fossen T., Andersen Ø.M. Cyanidin 3-(2'',3''-digalloylglucoside) from red leaves of *Acer platanoides*. Phytochemistry 52, 1697-1700 (1999)
- 41 Narayan M.S., Venkataraman L.V. Characterisation of anthocyanins derived from carrot (*Daucus carota*) cell culture. Food Chemistry 70, 361-363 (2000)
- 42 Fossen T., Andersen Ø.M. Acylated anthocyanins from leaves of the water lily *Nymphaea x Marliacea*, Phytochemistry 46, 353-357 (1997)
- 43 Shoyama Y., Nishioka I., Herath W., Uemoto S., Fujieda K., Okubo H. Two acylated anthocyanins from *Dioscorea alata*. Phytochemistry 29, 2999-3001 (1990)
- 44 Slimestad R., Andersen Ø.M. Cyanidin 3-(2-glucosylgalactoside) and other anthocyanins from fruits of *Cornus suecica*. Phytochemistry 49, 2163-2166 (1998)
- 45 Slimestad R., Aaberg A., Andersen Ø.M. Acylated anthocyanins from petunia flowers. Phytochemistry 50, 1081-1086 (1999)
- 46 Fossen T., Andersen Ø.M. Anthocyanins from tubers and shoots of the purple potato, *Solanum tuberosum*. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 75, 360-363 (2000)

- 47 Fossen T., Slimestad R., Øvstedal D. O. Andersen Ø. M. Anthocyanins of grasses. *Biochemical Systematics and Ecology* 30, 855-864 (2002)
- 48 Weinges K., Schick H., Schilling G., Irgartinger H, Oeser T. Composition of an anthocyanin concentrate from *Aronia melanocarpa* Elliot – X-ray Analysis of tetraacetyl parasorboside. *European Journal of Organic Chemistry*, 189-192 (1998)
- 49 Ishikura N., Shibata M. Cayratinin a new anthocyanin from the pericarp of *Cayratia japonica*, *Bot. Mag. Tokyo* 83, 179-183 (1970)
- 50 Saito N., Toki K., Suga A. Honda T. Acylated pelargonidin 3,7-glycosides from red flowers of *Delphinium hybridum*. *Phytochemistry* 49, 881-886 (1998)
- 51 Andersen Ø.M., Viksund R.I., Pedersen A.T., Malvidin 3-(acetylglucoside)-5-glucoside and other anthocyanins from flowers of *Geranium sylvaticum*. *Phytochemistry* 38, 1513-1517 (1995)