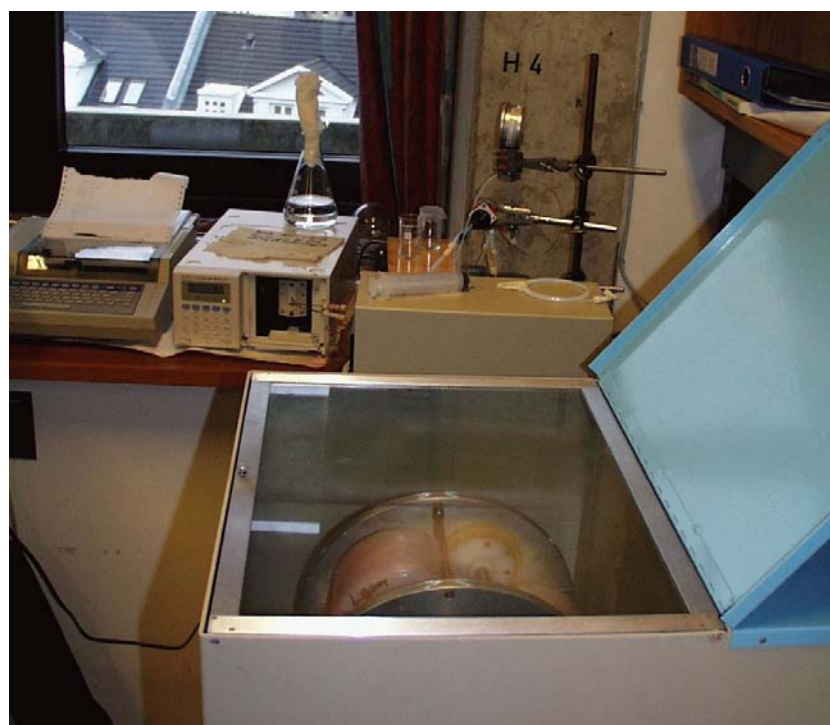


# Hovedfagsoppgave i organisk kjemi: Analysemetoder anvendt på antocyaner

Jan Idar Hjelle  
Kjemisk Institutt, Universitetet i Bergen

4. desember 2001





**Forord:**

Jeg begynte på hovedfaget i januar 2000, og alt arbeidet er i all helhet utført ved Kjemisk Institutt, Universitetet i Bergen.

Jeg benytter denne anledningen til å aller først takke veilederen min, professor Øyvind M. Andersen, for all den faglige veiledningen, inspirasjon, støtte og oppmuntring han har gitt meg gjennom arbeidet. Jeg har satt stor pris på tiden jeg har vært her, og alt jeg vært med på. Alt i alt har det vært et lærerikt og spennende studie.

Medstudenter på antocyangruppen og ellers fortjener også en stor takk for samarbeidet gjennom en fin tid ved instituttet. Til slutt en takk til familie og venner for all den støtte og hjelp jeg har fått underveis.

Bergen, November 2001

Jan Idar Hjelle

(Bildet på forsiden er for øvrig tatt fra laboratoriet ved Kjemisk Institutt, og viser HSCCC-instrumentet i bruk. Instrumentet ble brukt i oppgaven til separasjon av pigmenter.)

# Innhold

<b>1</b>	<b>Motivasjon</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Sammendrag</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Flavonoider</b>	<b>11</b>
3.1	Kjemiske strukturer . . . . .	11
3.2	Antocyaner . . . . .	15
3.3	Biosyntese . . . . .	16
3.4	Nedbryting av antocyaner . . . . .	18
3.5	Antocyaner og andre flavonoiders funksjon i naturen . . . . .	18
3.6	Antocyaner i næringsmiddelindustri og medisin . . . . .	20
<b>4</b>	<b>Anvendte metoder</b>	<b>21</b>
4.1	Ekstraksjon fra plantematerialet . . . . .	21
4.2	Kromatografiske metoder . . . . .	22
4.2.1	Historikk . . . . .	22
4.2.2	Generelt om ulike typer kromatografiske teknikker . . . . .	23
4.2.3	Fordelingskromatografi (LLC, Liquid/Liquid Chromatography) . . . . .	23
4.2.4	Motstrømskromatografi, HSCCC . . . . .	25
4.2.5	Adsorbsjonskromatografi . . . . .	26
4.2.6	Tynnskikt-kromatografi . . . . .	27
4.2.7	Høytrykks væske-kromatografi (HPLC) . . . . .	28
4.3	Spektroskopiske metoder . . . . .	31
4.3.1	Spektroskopi med UV og synlig lys . . . . .	32
4.3.2	NMR, Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy . . . . .	32
4.3.3	$^1\text{H}$ -spekter . . . . .	33
4.3.4	2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC . . . . .	33
4.3.5	2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC . . . . .	33
4.3.6	2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY . . . . .	34
4.3.7	2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ TOCSY . . . . .	34
4.3.8	2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY . . . . .	34
4.3.9	2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ROESY . . . . .	35
4.3.10	2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC-TOCSY . . . . .	35
4.4	Statistiske metoder . . . . .	35
4.4.1	Fullt faktorforsøk . . . . .	35
<b>5</b>	<b>Ekspimentelle prosedyrer</b>	<b>38</b>
5.1	Ekstraksjon og filtrering av pigmenter fra svarthyll . . . . .	38
5.2	Partisjonering mot etylacetat . . . . .	38
5.3	Rengjøring med Amberlite XAD-7 kolonne . . . . .	38
5.4	Ekstraksjon, filtrering og rensing av pigmenter fra solbær . . . . .	39

5.5	Ekstraksjon, filtrering og rensing av pigmenter fra blåbær og jordbær . . . . .	39
5.6	Analytisk HPLC . . . . .	39
5.7	HSCCC i analytisk skala . . . . .	39
5.8	HSCCC i preparativ skala . . . . .	39
5.9	HSCCC etter lagring av antocyaner i sur løsning . . . . .	40
5.10	NMR analyse av cyanidin-3-glukosid . . . . .	40
5.11	Undersøkelse av hvordan temperatur innvirker på hydrolyse av utvalgte antocyaner . . . . .	40
5.12	Generell TLC-analyse med FHW som løsemiddel . . . . .	41
5.13	Hydrolyse av utvalgte antocyaner i stor skala . . . . .	41
5.14	Forsøk på ekstraksjon av hydrolyserte antocyaner . . . . .	41
5.15	Undersøkelse av UV-absorbans av antocyaner . . . . .	41
5.16	Undersøkelse av mulige løsemidler for hydrolyse av antocyaner . . . . .	42
5.17	Fullt faktorforsøk for undersøkelse av betingelser for syrehydrolyse . . . . .	42
5.18	Utvinning av aglykon fra hydrolyseløsning . . . . .	43
5.19	Delvis hydrolyse av antocyan fra solbær . . . . .	43
5.20	HSCCC-analyse av delvis hydrolysert antocyan . . . . .	43
5.21	Undersøkelse av løselighet av aglykon . . . . .	44
<b>6</b>	<b>Resultater</b>	<b>45</b>
6.1	Opparbeidelse av pigmenter fra svarthyll . . . . .	45
6.2	HSCCC-analyse av ekstrakt fra svarthyll . . . . .	45
6.3	NMR-analyse av cyanidin-3-glukosid . . . . .	49
6.3.1	<sup>13</sup> C-spekteret . . . . .	49
6.3.2	<sup>1</sup> H-spekteret . . . . .	50
6.3.3	HSQC-spekteret, undersøkelsen av aglykon-regionen . . . . .	51
6.3.4	HMBC-spekteret, undersøkelse av aglykon-regionen . . . . .	53
6.3.5	ROESY-spekteret . . . . .	54
6.3.6	TOCSY-spekteret . . . . .	55
6.3.7	HSQC-spekteret, undersøkelse av sukker-regionen . . . . .	56
6.3.8	Sammendrag av NMR-analysen . . . . .	57
6.4	Undersøkelse av hvordan temperatur innvirker på hydrolyse av utvalgte antocyaner . . . . .	58
6.5	Hydrolyse av utvalgte antocyaner i stor skala . . . . .	60
6.6	Forsøk på ekstraksjon av antocyanidiner etter hydrolyse . . . . .	60
6.7	Undersøkelse av absorbans-spektre av antocyaner . . . . .	61
6.8	Undersøkelse av mulige løsemidler for hydrolyse av antocyaner . . . . .	62
6.9	Fullt faktorforsøk, undersøkelse av betingelser for syrehydrolyse av antocyan . . . . .	63
6.9.1	Beregninger fra fullt faktorforsøk . . . . .	65
6.9.2	Visuell vurdering av kromatogrammene fra HPLC . . . . .	65
6.9.3	Effekten av lagring av aglykoner . . . . .	66

6.10	Delvis hydrolyse av pigmenter fra solbær . . . . .	72
6.11	Undersøkelse av løselighet av aglykoner i tofasesystemer . . . . .	72
6.12	Konklusjon . . . . .	74
<b>7</b>	<b>Appendix</b>	<b>75</b>
7.1	Om kromatografi . . . . .	75
7.1.1	Separasjon . . . . .	75
7.1.2	Båndspredning . . . . .	76
7.1.3	Ladningskapasitet og overladning . . . . .	78
7.2	Om spektroskopi . . . . .	78
7.2.1	UV/Synlig spekter . . . . .	78
7.2.2	Kjernemagnetisk resonans (NMR) . . . . .	79

## 1 Motivasjon

De mest utbredte vannløselige pigmentene som finnes i naturen kalles flavonoider. Disse fordeler seg over 12 ulike klasser, og utgjør i dag tusenvis av ulike forbindelser. Strukturene til forbindelsene bestemmes av type aglykon (grunnstruktur), glykosylering og eventuell acylering av aglykonet. Kombinasjoner av disse byggesteinene vil gi opphav til svært mange forbindelser med ulike egenskaper.

Blant klassene av flavonoider skiller antocyaner seg ut, og denne gruppen har de seneste tiårene blitt viet ekstra oppmerksomhet. Antocyaner er pigment som er ansvarlig for mesteparten av de røde, fiolette og blå farger som finnes i planteriket. I tillegg til å spille en viktig rolle i samspillet insekt/dyr og planter og plantenes muligheter for bestøvning og reproduserbarhet [1], er antocyaner også interessant fordi disse pigmentene har spesielle egenskaper både som tilsetningsstoffer i mat og innen medisin. Enkelte studier har vist en sammenheng mellom inntak av flavonoider og risiko for enkelte typer av kreft og hjerte-kar sykdommer [2], [3], [4]. Videre forskning på pigmentenes effekter er avhengig av basiskunnskaper om kjemien til flavonoidene.

Oppgaven handler om gamle og nye metoder for opparbeiding og isolering av aglykoner (antocyanidiner) fra forskjellige kilder. Tidligere arbeider har vært basert på J.B. Harborne sin metode med vandig syrehydrolyse og med bruk av amyl alkohol som ekstraksjons- og lagringsmedium [5]. Hans arbeide var rettet mot en rent kvalitativ analyse, og han skriver selv hvor vanskelige det er å holde antocyanidiner stabile:

'Although the anthocyanins which have sugars attached to them are sap soluble and reasonably stable, the aglycones (anthocyanidins) produced on acid hydrolysis are insoluble in water, unstable to light and are rapidly destroyed by alkali.'

Det er blitt spekulert i at aglykoner bringes lettere gjennom cellemembraner i forhold til deres glukosider, antocyanene. Derfor ser jeg det som viktig å støtte opp om videre forskning på aglykoner ved å undersøke nye metoder for produksjon, analyse og stabilisering av disse forbindelsene.

I dette arbeidet er det brukt kromatografiske teknikker som væske/væske motstrøms kromatografi (HSCCC/CCC), tynnskikt (TLC), adsorpsjon og høytrykk væskekromatografi (HPLC). I tillegg er spektroskopiske teknikker som UV/synlig og kjernemagnetisk resonans (NMR) blitt brukt.

## 2 Sammendrag

Arbeidet begynte med å opparbeide og rengjøre antocyaner fra svarthyll (*Sambucus nigra*). I dette arbeidet ble pigmentene ekstrahert ut fra bær og renses bl.a. ved bruk av XAD-7. High Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC) har betydelige fordeler i analysearbeidet, siden man kan få

isolert relativt store mengder av rene forbindelser, men siden teknikken er i svært liten grad brukt til analyse av antocyaner, ble det naturlig å undersøke hvordan den kunne anvendes på pigmentene fra svarthyll. Senere ble et av pigmentene (cyanidin-3-glukosid) fra svarthyll underøkt i NMR for å få en fullstendig strukturbestemmelse.

Et delmål var å undersøke om HSCCC var egnet til å undersøke aglykoner av antocyaner direkte, og til dette arbeidet ble det opparbeidet pigmenter fra blåbær (*Vaccinium myrtillus*) og jordbær (*Fragaria ananassa*) ved ekstraksjon. Disse plantene ble valgt, da en blanding av disse ville ha de seks aglykonene (delfinidin, cyanidin, petunidin, malvinidin, pelargonidin og peonidin) tilstede. Videre ble en syrehydrolyse av prøven utprøvd, og det viste seg at pigmentene ikke tålte miljøet under og etter syrehydrolysen. En ny teknikk var nødvendig for å holde pigmentene intakte frem til en eventuell isolasjon kunne forekomme.

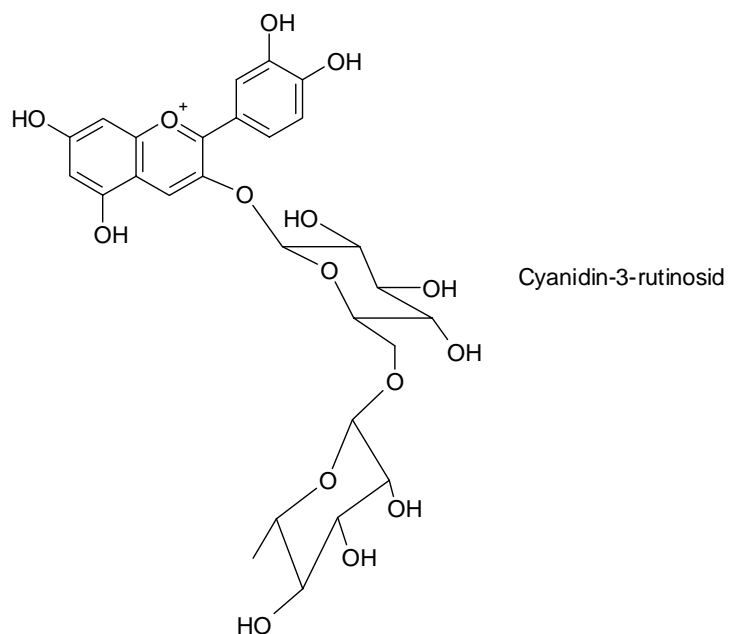
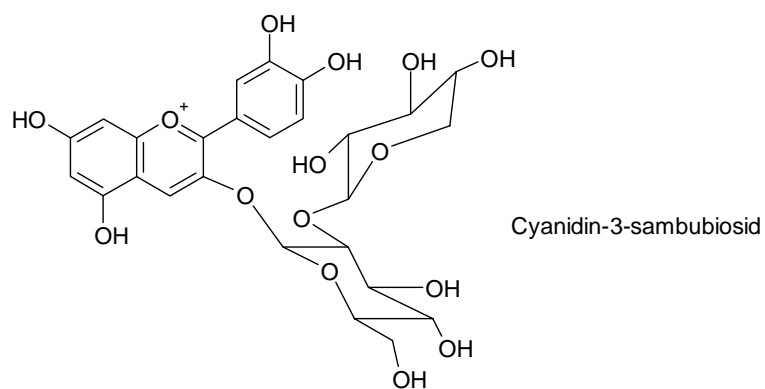
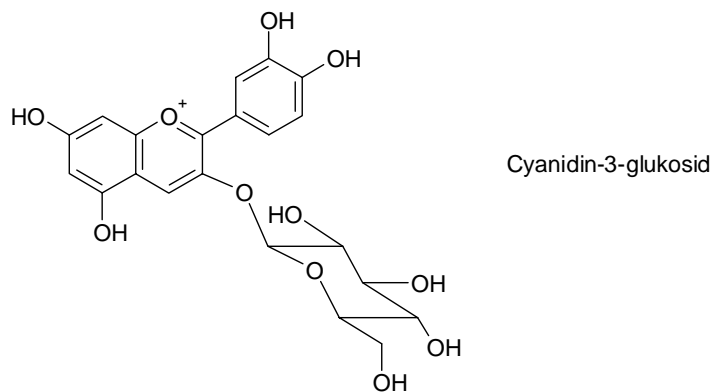
Pigment fra solbær (*Ribes nigrum*) ble utsatt for et relativt mildt hydrolysemiljø for å unngå en fullstendig reaksjon. Resultatet var en løsning som både inneholdt de originale antocyanene, samt aglykonene som ble dannet i hydrolysen. Denne blandingen ble injisert på HSCCC i det håp at instrumentet ville klare å separere antocyanene fra aglykonene. Da dette ikke lyktes, begynte arbeidet med å finne andre tofasesystemer til bruk i HSCCC som var bedre egnet. Det viste seg å være vanskelig å erstatte bruken av t-butylmetyleter/butanol/acetoneitril/vann som tofasesystem i instrumentet. Dette systemet kan brukes i analyse av enten aglykoner og antocyaner, avhengig av hvilken retning man kjører kolonnen. Andre løsemidler som ble undersøkt hadde ikke den ønskede evnen til å løse aglykonene.

Cyanidin-3-glukosid fra svarthyll (*Sambucus nigra*) ble undersøkt hydrolysert ved forskjellige temperaturer for å finne de mest skånsomme betingelsene. Men det var fremdeles vanskelig å bevare pigmentene etter hydrolysen, og man antok det var aglykonets sårbarhet ovenfor vannets nukleofile angrep på karbonet i 2-posisjonen i aglykonet. Man trengte et medium med mindre vann for å bevare aglykonet etter hydrolyse, og for enkelhets skyld var det også ønskelig at hydrolysen også kunne utføres i dette mediumet.

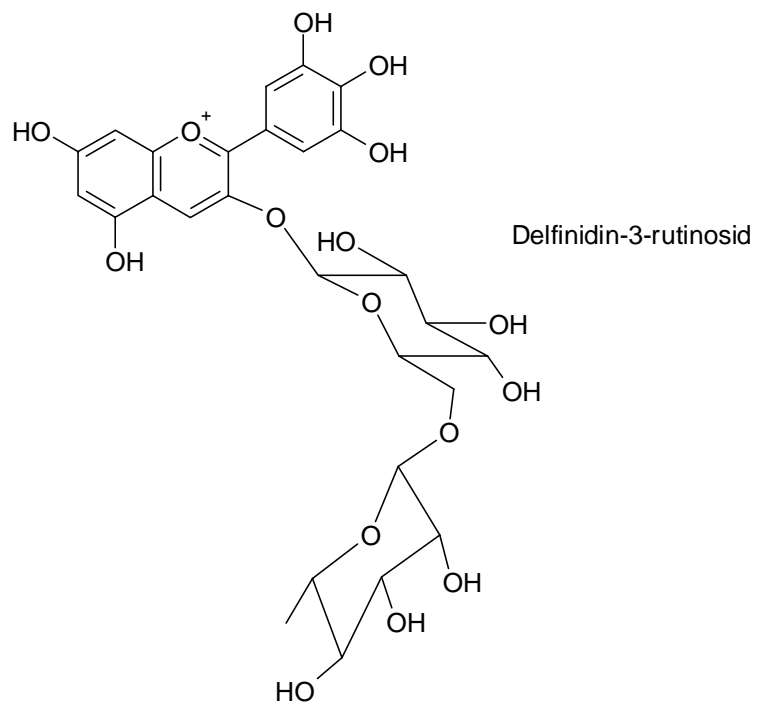
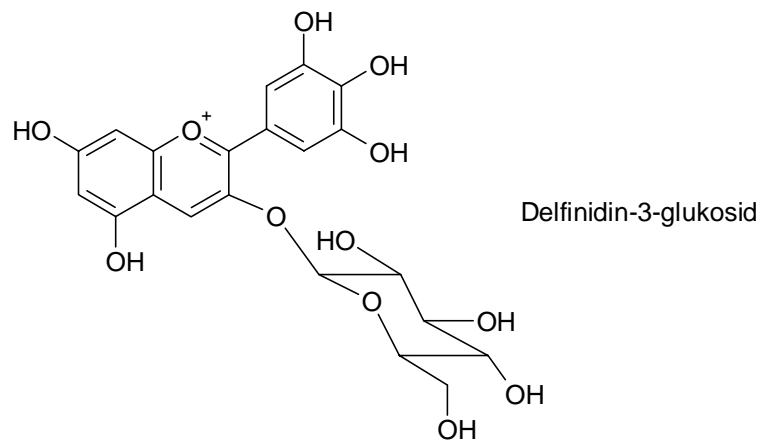
For å undersøke løsemidlenes effekt på hydrolysemiljø ble det utprøvd en rekke forskjellige tester av ulike løsemidler med forskjellige mengder og typer syrer. Man kom frem til at en blanding med 60:40 av absolutt etanol og konsentrert fosforsyre var meget egnet. Denne blandingen inneholdt nok vann til at hydrolysen kunne skje, men var likevel hygroskopisk nok til at vann ble hindret i å angripe aglykonet. Videre viste det seg at dette mediumet også var egnet til lengre tids lagring av aglykonet ved kjøling og lufttette beholdere. Aglykonet kunne også hentes ut fra løsningen ved direkte applikasjon på XAD-7 materiale.



Pigmentene omtalt i oppgaven:



Figur 1: De tre cyanidinene nevnt i oppgaven: cyanidin-3-glukosid, cyanidin-3-sambubiosid og cyanidin-3-rutinosid.



Figur 2: De to delfinidinene i oppgaven: delfinidin-3-glukosid og delfinidin-3-rutinosid.

### 3 Flavonoider

Man antar at omtrent to prosent av alt karbon dannet i fotosyntese i planter, eller nærmere en milliard tonn materiale per år, blir dannet i form av flavonoider og beslektede forbindelser [6]. De utgjør en stor gruppe av naturlige fenoler [7], og det er derfor viktig at kjemikere, biokjemikere, biologer og andre forskere vet hvordan man kan gjenkjenne, isolere og identifisere disse pigmentene[8]. Flavonoider finnes i alle grønne planter med unntak av alger (*Phyceae*) og lav (*Anthocerotales*), og da i alle deler av organismen: blomst, frø, pollen, blader, stilk/stamme, bark, rotsystem, nektar og frukter (bær).

**Antocyaner:** Utbredelse: Røde og blå blomster, samt frukter og bær. Noe også funnet i blader og andre plantedeler. Karakteristiske egenskaper: Vannløselig, sterk farge ved  $\lambda_{max}$  515-545 nm.

**Flavonoler:** Utbredelse: Svakt gulfargede pigmenter funnet i blader, blomster og frukt. Karakteristiske egenskaper:  $\lambda_{max}$  350-386 nm.

**Flavoner:** Utbredelse: som flavonolene. Karakteristiske egenskaper:  $\lambda_{max}$  330-350 nm.

**Flavononer:** Utbredelse: Fargeløs, finnes i blader og frukter, spesielt sitrusfrukter. Karakteristiske egenskaper: Gir intens rød farge med Mg/HCl; bitter smak.

**Chalconer og Auroner:** Utbredelse: Funnet i gule plantedeler. Karakteristiske egenskaper:  $\lambda_{max}$  370-410 nm.

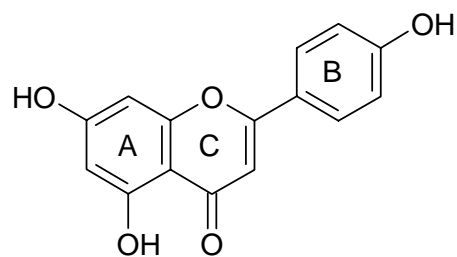
**Isoflavoner:** Utbredelse: Fargeløs, ofte funnet i rotsystemer.

#### 3.1 Kjemiske strukturer

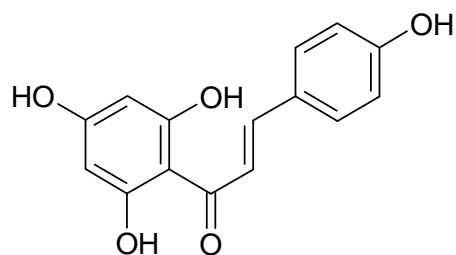
Karakterisering av flavonoidene foregår etter følgende mønster: først ser man på grunnskjelettet (aglykonet), og karakteriserer så etter oksidasjonsmønsteret på C-ringene (se figur 3) og innenfor hver klasse skiller man etter hydroksyleringer og annen substitusjon.

- 1. Strukturell klasse (flavon, flavonol, antocyan, etc.).
- 2. Hydroksylering/metoksylering.
- 3. Annen substitusjon (glukosylering, acylering).
- 4. Grad av polymerisering (monomer, dimer, oligomer).

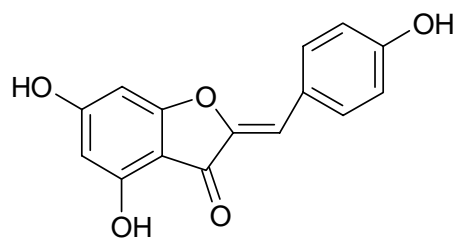
Felles for flavonoidene er at de er bygd opp av et aglykon med 15 C-atomer, arrangert i en C6-C3-C6-konfigurasjon.



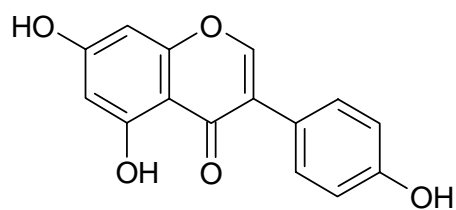
Figur 3: Struktur av generelt flavon



Figur 4: Struktur av chalcon

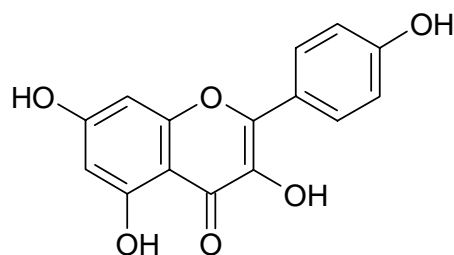


Figur 5: Struktur av auron

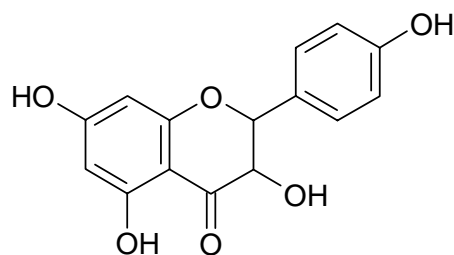


Figur 6: Struktur av isoflavon

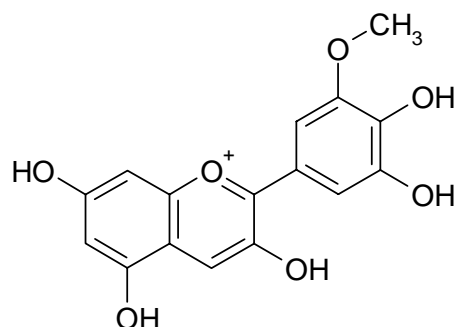
C3-enheten (C-ring) kan også forekomme som åpen kjede (som i chalconer, figur 4) eller som en femring som i auroner (figur 5). B-ringene kan også ha ulike plasseringer på C-ringene. Hos flavonene er B-ringene bundet til karbonet i 2-posisjonen, mens den hos isoflavonene (figur 6) er bundet til karbonet i 3-posisjonen. Flavonoidene kan også karakteriseres ut fra oksidasjonsmønsteret



Figur 7: Struktur av flavonol



Figur 8: Struktur av dihydroflavonol



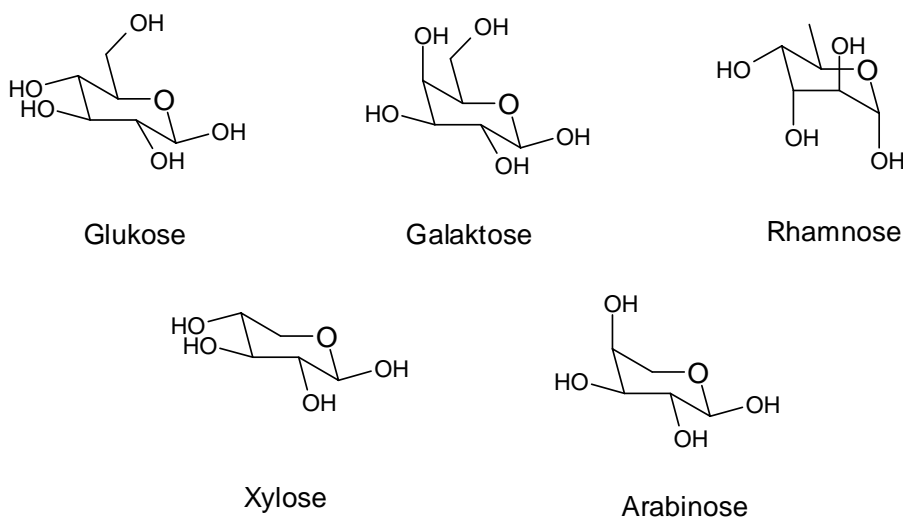
Figur 9: Struktur av et flavonoid med substituent. Her: petunidin

på C-ringen. For eksempel vil flavonolene (figur 7) ha konjugasjon, mens dihydroflavonolene (figur 8) ikke har noen konjugasjon på C-ringen. I tillegg til hydroksyl, kan man også ha metoksy og metylgrupper som substituent på aglykonet. Petunidin (figur 9), som er et antocyan, har både -OH og -OMe som substitutenter.

Flavonoidene forekommer stort sett i naturen med en eller flere enheter med sukker bundet til seg og da som regel som O-glykosider. Dette betyr at et eller flere suktermolekyler er knyttet til aglykonet ved å eliminere vann mellom hydroksylgruppene på aglykonet og sukkeret. Man får da en C-O-C binding mellom aglykonet og sukkeret, en binding som er syrelabil. Det betyr at økt syrestyrke eller temperaturøkning kan gi avspaltning av sukkergrupper

gjennom syrehydrolyse. Ellers er effekten av glykosyleringen at flavonoidet blir mindre reaktivt, og mer vannløselig.

Selv om man i teorien kan få glykosylering av alle hydroksylgruppene på aglykonet, viser det seg i praksis at noen grupper har større sjanse enn andre. For eksempel vil hydroksylgruppen i 7-posisjon hos flavoner, isoflavoner og dihydroflavoner ha størst sjanse for glykosylering, mens det for flavonoler og dihydroflavonoler gjelder for 3-og 7-posisjon, og for antocyaner i 3-og 5-posisjon [7]. Det sukkeret som er hyppigst bundet til flavonoider er glukose, men galaktose, rhamnose, xylose og arabinose er heller ikke uvanlige.

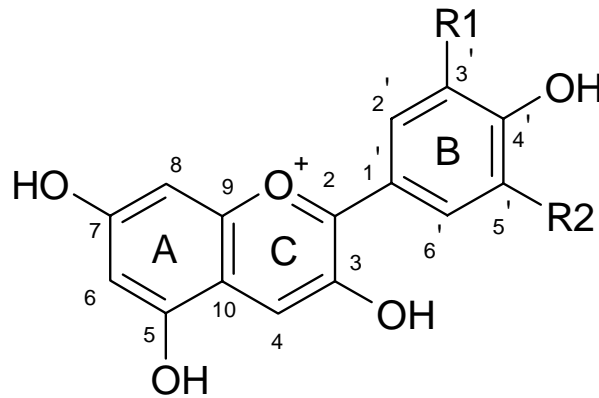


Figur 10: De viktigste sukkerenhetene hos flavonoider

Blant de mer sjeldne sukrene er allose, mannose, fruktose og apiose. Flere sukre kan også binde seg til hverandre slik at man får di-, tri- eller tetrasakkarider, men her er disakkaridene de vanligste. For eksempel er sophorose (2-O-β-D-glukosyl-β-D-glukose) bygget opp av to glukose-enheter, mens neohesperidose (2-O-α-L-rhamnosyl-β-D-glukose) består av en rhamnose og en glukose-enhet.

Sukkeret kan også være bundet direkte til aglykonet med en C-C-binding (flavonoid-C-glukosid), men dette er mindre vanlig. Frem til 1981 var sukkergruppene på C-glukosid bare funnet i 6-og 8-posisjonene til flavonoidene [9]. I tillegg kan flavonoid-O-glukosider ha en eller flere av hydroksylgruppene på sukkeret substituert med en organisk syre, for eksempel malonsyre, eddiksyre og p-hydroksybenzosyre [7].

### 3.2 Antocyaner



Figur 11: Eksempel på antocyan aglykon med skjelett-nummerering

Antocyaner er en av mange undergrupper av flavonoidene. Disse vannløselige pigmentene er ansvarlige for mesteparten av rød, fiolett og blå farge som finnes i planter [10]. Navnet 'antocyan' kommer av gresk *anthos* som betyr 'blomst' og *kyanos* som betyr blått. Dette skyldes at de aller fleste antocyaner er svært kraftig farget [11]. Disse pigmentene er karakteristiske for høyerestående planter, og forekommer bare unntaksvis i andre organismer. De største mengdene av disse pigmentene finner man i frukt, bær og blomster. For eksempel skyldes fargen i blåbær, solbær og skallet i epler hovedsaklig antocyaner. I tillegg kan man også finne antocyaner i bladverk, stengel eller rot, og i enkelte tilfeller også i pollen og yngle-knopper, der de gir en sterk farge [12].

Tabell 1: De mest vanlige antocyanidinene funnet i planter. (Se figur 11 for posisjon til gruppene  $R_1$  og  $R_2$ .)

Aglykon	$R_1$	$R_2$	$\lambda_{max}$	$\lambda_{max}$ (som 3-glc)	Farge
Pelargonidin	H	H	520nm	506nm	Orange
Cyanidin	OH	H	535nm	523nm	Rød
Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H	537nm	525nm	Orange/rød
Delfinidin	OH	OH	546nm	534nm	Blå/fiolett
Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH	548nm	536nm	Fiolett
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	550nm	538nm	Fiolett

Pigmentene omtales gjerne som antocyanin eller antocyanidin, avhengig om det er knyttet substituenten til aglykonet eller ikke. Fordi antocyanidinene kan være glykosylert og acylert av forskjellige sukkerer og syrer, er antallet antocyaniner mange ganger flere (600 forskjellige) enn tilsvarende tall for antocyanidiner (20 forskjellige). De mest vanlige antocyanidinene er

oppsummert i tabell 1 på forrige side. (Merk:  $\lambda_{max}$  for pigmentene er oppgitt som omtrentlige verdier, og er svært avhengig av løsemiddel og pH i løsningen [13], [14].)

Glykosylering og acyleringsmønsteret for antocyaner er stort sett det samme som for resten av flavonoidene (avsnitt 3.1). Likevel finnes det eksempler på svært komplekse antocyaner sammensatt av aglykon, flere sukkere og flere syrer.

### 3.3 Biosyntese

Man tenker seg at biosyntesen av flavonoidene foregår i tre trinn:

1. Dannelse av basis-skjelettet (C6-C3-C6).
2. Syntetisering av de ulike flavonoidklassene.
3. Modifisering av flavonoidene (addisjon av sukker, syrer og metoksygrupper).

#### 1) Dannelse av basis-skjelettet:

Teorien om dannelsen av basisskjelettet er fremkommet ut fra en rekke eksperimentelle forsøk, deriblant sammenligning med nært beslektede kjemiske strukturer. Hovedbidragene har likevel kommet fra studier der man bruker merkede atomer ( $^{14}\text{C}$ ) slik at man kan se hvor i strukturen disse befinner seg, og derfor si noe om synteseveien [15].

A-ringen i flavonoidene blir dannet ved 'hode-til-hale' kondensasjon av acetyl-CoA med tre molekyler av malonyl-CoA. Den resterende C6-C3-enheten stammer fra *p*-kumar-syre, fremkommet av shikiminsyre via fenylalanin. Man tenker seg nå et hypotetisk C15-intermediat som så går over til et chalcon. Se for øvrig figur 12.

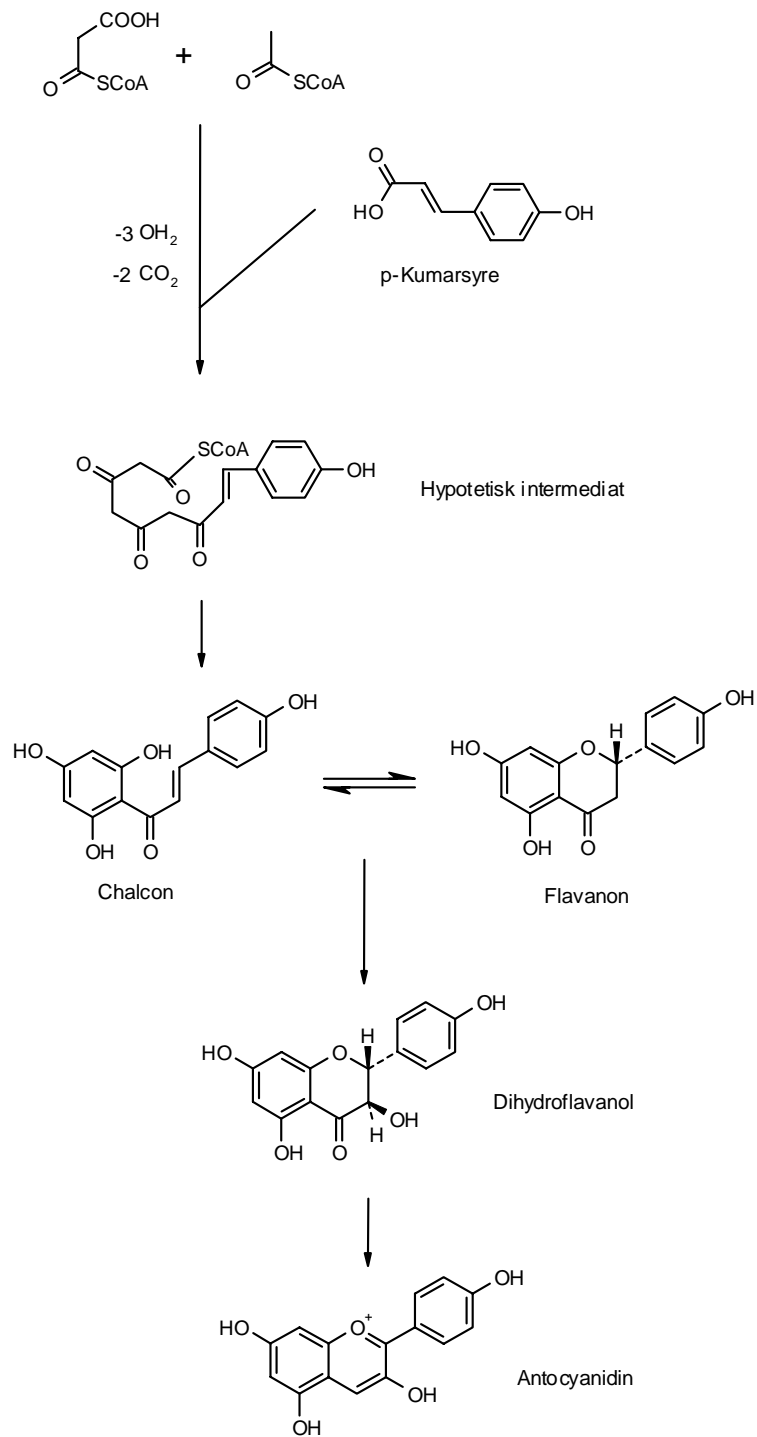
#### 2) Syntetisering av de ulike flavonoidklassene:

Fra chalconet fører en rekke forskjellige ruter til formasjon av andre flavonoider. Figur 12 viser veien fra chalcon til antocyanidin.

#### 3) Videre modifisering av flavonoidene:

Videre modifisering av aglykonene kan nå skje. Innføring av flere hydroksylgrupper på aglykonet, metylering av hydroksylgrupper eller av flavonoidkjernen, metylering av orto-dihydroksylgrupper og dimerisering (som gir biflavonoider). Men de viktigste modifikasjonene som skjer av flavonoider er likevel glykosidering av hydroksylgrupper (som gir flavonoid-O-glykosider) eller flavonoidkjernen (som gir flavonoid-C-glykosider) og acylering av sukkergrupper.





Figur 12: Biosyntese av antocyan

### 3.4 Nedbryting av antocyaner

Antocyaner er mest stabile i flavyllium-formen, og kan finnes kun i denne formen ved pH 1-2. Ved høyere pH-verdier vil pigmentet begynne å reagere med hydroksyl-ioner og/eller vann, og danne en rekke produkter, derav mange som enten har en annen farge eller ikke er farget i det hele. Se figur 13.

### 3.5 Antocyaner og andre flavonoiders funksjon i naturen

Et gitt flavonoid i naturen kan tjene flere funksjoner avhengig blant annet av miljøet planten er utsatt for og hvilket stadium av vekst og utvikling planten befinner seg. Blomster og planter generelt som inneholder betydelige

Tabell 2: Flavonoiders plassering og funksjon i planter

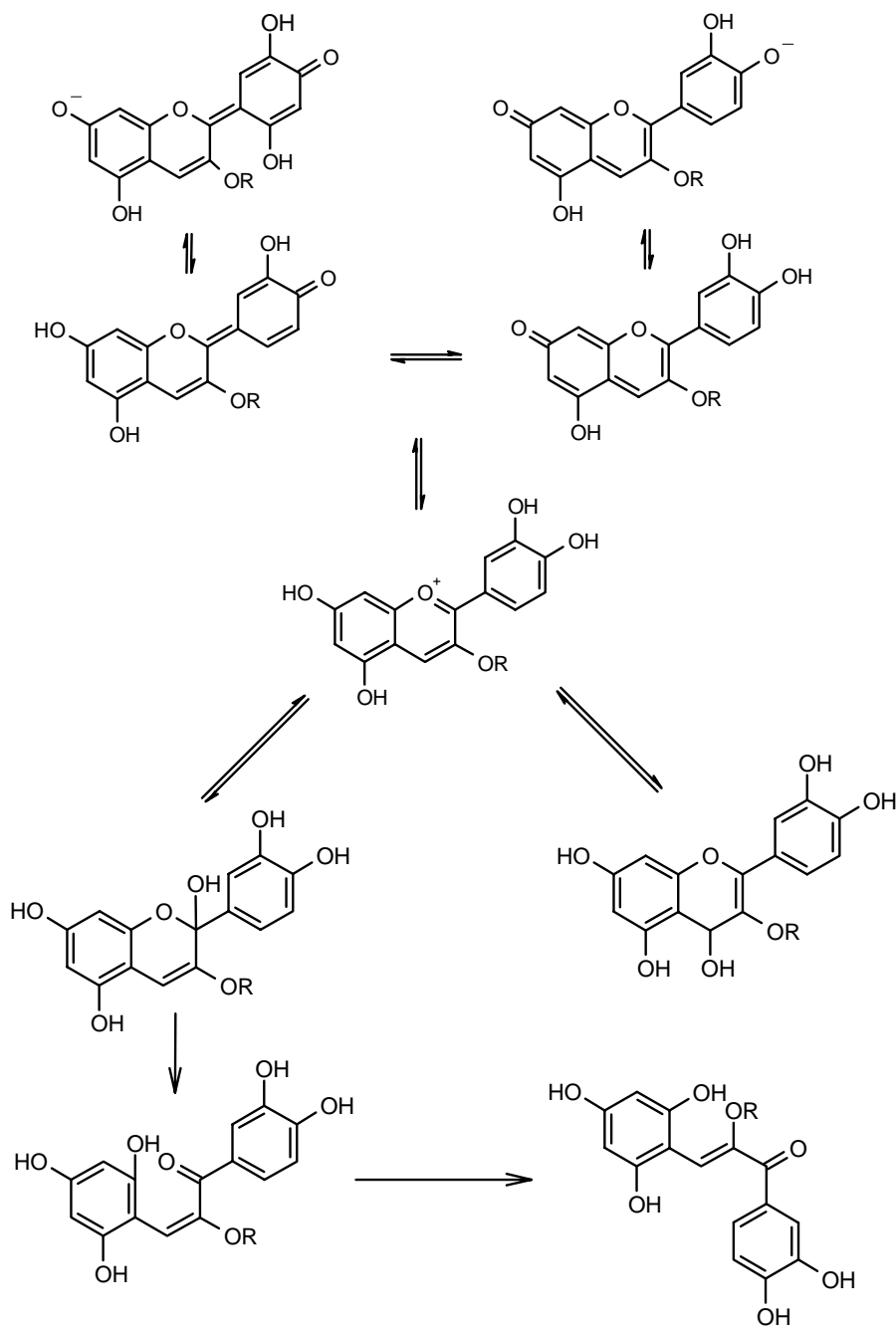
Plantedel	Funksjon
Blomst	Synlig cyanfarge
	Synlig gul farge
	UV farger
Frukt	Synlig cyanfarge
	Synlig gul farge
Blader	UV-beskyttelse
	Beskytte mot planteetere (statisk og indusert)
	Beskytte mot mikrober (statisk og indusert)
	Allelopatiske effekter

mengder antocyaner vil blant annet på grunn av sine sterke farger tiltrekke seg insekter og dyr som kan bestøve eller spre frø. Dermed blir fargene et redskap som hjelper planten med å føre arten videre.

Antocyaner har også andre funksjoner [16]. Anti-mikrobielle egenskaper av disse pigmentene er velkjente og det har vist seg at antocyanet i bomullsblader, cyanidin-3-glukosid, ved lav konsentrasjon er en effektiv vekst-inhibitor til tobakklarven [17]. Det har også kommet frem at isoflavoner har egenskaper som hindrer fremvekst av sopp.

Det er sjelden at antocyanene i blomster forekommer i fri form. I ren tilstand vil nemlig et antocyan løst i en buffer med pH 4,5 (pH i saften i en gjennomsnitts plantecelle) ha svært lite farge. Dette skyldes at flavyllium kation kromoforen blir utsatt for nukleofil addisjon av vann med påfølgende tap av farge. Av den grunn følger det at antocyanene må være beskyttet *in vivo* mot nukleofile angrep. Dette problemet kan løses med kopigmentering med andre flavonoider og chelatering med metallioner [12].

En annen mekanisme for stabilisering av antocyaner er binding til dikarboksylier (for eksempel malonsyre, oksalsyre). *In vitro* studier har vist at malonylering av antocyaner har en betydelig beskyttende effekt mot foto-oksidativ degradering. Det er også mulig med stabilisering ved selv-assosiering



Figur 13: Eksempel på likevektsformer av cyanidin-derivat

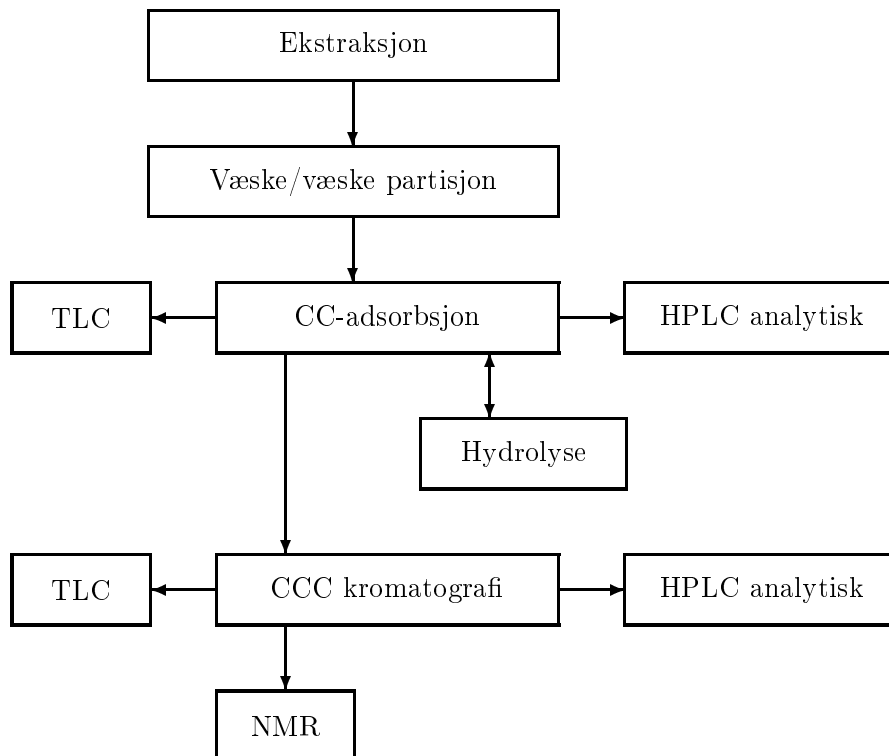
for enkelte antocyaner (for eksempel malvidin glykosider) der andre beskyttende faktorer ikke er tilstede [17].

### 3.6 Antocyaner i næringsmiddelindustri og medisin

På grunn av sine sterke farger og dokumenterte effekter med hensyn til helse [11],[18], er antocyaner viet stor oppmerksomhet innenfor næringsmiddelindustrien. I tillegg til at farger gir varene et friskt og tiltrekkende ytre, benyttes også antocyaner i næringsmidler som erstating for syntetiske fargestoffer. Et problem som fargestoff i mat og drikke er i midlertid antocyanenes mangel på stabilitet ovenfor lys og endringer i pH. Av den grunn vil de under lagring og bearbeidelse av råmaterialet gjennomgå forandringer. Resultater er fargetap og eventuelt bunnfall. For eksempel vil pigmenter som forekommer i rødlig form ved pH lavere enn 3, få en mer blålig farge eller miste fargen helt når pH stiger. For å unngå dette, kan antocyanet stabiliseres ved reaksjon med karbonylforbindelser, for eksempel acetaldehyd. Alternativt kan man benytte acylerte antocyaner som er mer stabile overfor lys enn bare glykosidene. Det direkte forholdet mellom antocyaninnhold og modning av frukt blir ofte brukt som kvalitetskriterium. Særlig godt undersøkt er sammenhengen mellom fargeforandringer og antocyaninnholdet under produksjon og lagring av viner [19].

Men antocyaner er mer enn bare farger, og også innenfor medisinsk forskning vet man å utnytte deres egenskaper. For eksempel er det påvist en positiv sammenheng mellom helning av brannsåar og antocyaninnholdet i de anvendte farmasøytiske preparatene [19].

## 4 Anvendte metoder



Figur 14: Flyttdiagram for min analyse av antocyaner og aglykoner, en rask oppsummering av teknikker brukt i isolerings-og identifikasjonsarbeidet.

### 4.1 Ekstraksjon fra plantematerialet

Flavonoider er vannløselige, og derfor velger vi å bruke polare løsemidler for ekstraksjon fra plantematerialet. En mindre mengde syre blir også tilsatt for å holde pigmentene stabile. Metanol har vist seg å være svært effektivt som løsemiddel, og meget lett å dampe bort ved bruk av rotavapor.

Som regel må man utføre ekstraksjonen flere ganger for å få hentet ut pigmentene fra materialet, og når hver ekstraksjons-prosedyre tar omtrent et døgn, kan dette arbeidet ta flere dager. I mitt arbeide, ble tilstrekkelige mengder pigmenter hentet ut etter to eller tre ekstraksjoner.

Ekstraktene kan slås sammen, men må filtreres i glassull før videre arbeid, da partikler fra materialet er uønsket senere i prosessen. Til slutt dampes ekstraktet inn på rotavapor til et svært lite volum. Vannbadet i rotavapor

må holdes på maksimalt 28-30°C for å minimere nedbryting av pigmentene. Siden metanol har et langt lavere kokepunkt enn vann, og vil derfor fordampe først fra løsningen.

## 4.2 Kromatografiske metoder

Kromatografi er et samlebegrep på separasjonsmetoder som baserer seg på det prinsipp at stoffene som skal separeres fordeler seg ulikt mellom 2 faser. Det finnes mange ulike typer kromatografi, flere av dem er behandlet i denne oppgaven. Man kan grovt sett dele inn i to typer kromatografi:

- Gass kromatografi, der mobilfasen er en inert gass, vanligvis helium.
- Væske kromatografi, der mobilfasen er en væske.

### 4.2.1 Historikk

Den russiske vitenskapsmannen Michael Semenovich Tswett (1872-1919) regnes som oppfinner av kolonnekromatografien. I hele sitt liv som forsker dreide hans aktivitet rundt metoder for separasjon av plantepigmenter, og i hans hovedoppgave fra 1901 var det han oppdaget fenomenet om selektiv desorpsjon på papir:

'...Jeg kunne tydelig se ringer av forskjellig farge da jeg filtrerte petroleums eter ekstrakter av blader gjennom svensk papir.'

Ikke overraskende skrev han 10 år senere i forordet til sitt *Magnus Opus* at:

'...Kilden til min kromatografiske metode ligger i mitt arbeid fra 1901.'

I sitt påfølgende verk utviklet han denne adsorpsjonsteknikken som han tre år senere kalte *kromatografi* (chroma = farge, grafi = skrive).

Til tross for store oppdagelser kom Tswett relativt dårlig overens med samtidens vitenskapsmenn. Flere av datidens ledende forskere mente nemlig at Tswetts arbeid lå utenfor de rammene en kjemiker skulle arbeide innenfor. Men den kanskje største grunnen til at de ikke ville anerkjenne hans arbeid var at dersom resultatene hans stemte, ville det bevise at prominente vestlige forskere tok feil i sine ideer og teorier om naturstoffpigmenter.

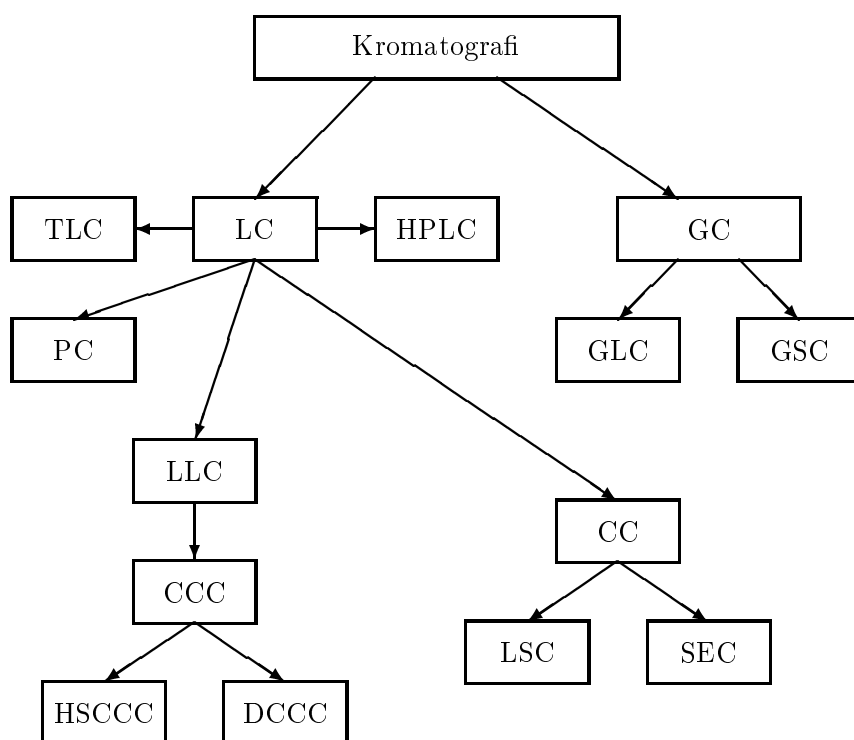
Etter Tswetts død begynte arbeidet hans å bli mer akseptert, og mot slutten av 20-årene begynte utviklingen innenfor kromatografi å skyte fart [20].

En av de som først tok til orde og uttrykte den betydning kromatografien kom til å få, var Paul Karrer, nobelprisvinner i kjemi 1937, da han i et foredrag i 1947 i Congress of the International Union of Pure and Applied Chemistry uttalte:

'No other discovery has exerted as great an influence and widened the field of investigation of the organic chemist as much as Tswett's chromatographic adsorption analysis.'

#### 4.2.2 Generelt om ulike typer kromatografiske teknikker

Som tidligere nevnt, finnes det mange ulike typer og teknikker innen kromatografi. I mitt eksperimentelle arbeid ble det brukt fordelingskromatografi (væske/væske partisjon), adsorpsjonskromatografi (Amberlite XAD-7), tynn-skikt-kromatografi (to ulike systemer), høytrykk væskrokromatografi (analytisk skala) og motstrømskromatografi (preparativ og analytisk skala).



Figur 15: Generell oversikt over ulike typer kromatografiske teknikker

#### 4.2.3 Fordelingskromatografi (LLC, Liquid/Liquid Chromatography)

For å skille forbindelser i en løsning kan man utnytte stoffenes ulike evne til å løse seg i to væskefaser. Dette er en velkjent separasjonsmetode og kan for

eksempel utføres ved hjelp av skilletrakt.

To løsemidler som er innbyrdes uløselige i hverandre (for eksempel vann og heksan, eller vann og etylacetat) kan helles i en skilletrakt og danne et tofasesystem. Ved å tilsette en blanding bestående av polare og upolare forbindelser vil disse fordele seg i de respektive fasene etter prinsippet om at 'like løser like'. De to fasene kan lett separeres i skilletrakten.

Dette er imidlertid bare en grovseparering av stoffene. Fordelingen mellom de to fasene vil nemlig være bestemt av stoffenes relative løselighet i de to fasene. Om man kaller fasene 1 og 2, og forutsetter at likevekten er innstilt, er partisjonskonstanten for fordelingen gitt ved forholdet mellom stoffets konsentrasjoner i de to fasene:

$$K_D^0 = \frac{C_1}{C_2} = \frac{n_1/V_1}{n_2/V_2} \quad (1)$$

Dersom partisjonskonstanten for den ene forbindelsen er mye større enn 1, mens for den andre er mye lavere for 1, vil dette være en velegnet måte å skille de to stoffene. Om forskjellene i likevektskonstantene er mindre, kan man oppnå et bedre resultat ved å gjenta prosessen flere ganger. Dette gjøres ved at de to løsningene hver for seg overføres til nye skilletrakter og tilsettes rent løsemiddel av den motsatte fasen. Etter at dette er gjort flere ganger, kan man slå sammen like faser og sitte igjen med temmelig rene, men sterkt fortynnede løsninger av de to forbindelsene.

Eksempler på metoder som benytter seg av prinsippet som væske/væske partisjon for separasjon av antocyaner eller andre flavonoider er de forskjellige motstrømsteknikkene som DCCC (Droplet Counter Current Chromatography) [21], CPC (Centrifugal Partition Chromatography) [22] og HSCCC (High Speed Counter Current Chromatography), se kap. 4.2.4.

### **Partisjon av flavonoider med heksan**

Et konsentrert, vandig flavonoid ekstrakt overføres til en skilletrakt og tilsettes heksan til volumforholdet vann/heksan er omtrent 50/50. Ced å riste skilletrakten vil de mindre polare stoffene (hovedsaklig klorofyller, lipider og karotenoider) som opprinnelig var i ekstraktet løse seg i heksanfasen (upolar fase), mens flavonoidene forblir i vannfasen (polar fase). De to fasene separeres, vannfasen tilsettes ny heksan og prosessen gjentar seg selv til heksanlaget ikke lenger er farget. Vannfasen overføres til rundkolbe, og eventuelle rester av heksan fjernes (for eksempel ved inndamping på rotavapor).

### **Partisjon av antocyaner med etylacetat**

Ved bruk av metoden med vann/heksan kan man klare å grovskille flavonoidene fra andre stoffer som finnes i blandingen. I midlertid krever ekstraktene ytterligere rensing, der antocyanene skilles fra de øvrige flavonoidene. Sammenlignet med den totale mengden av stoffer i et planteekstrakt utgjør antocyaner en relativt liten del. Uønskede stoffer (andre flavonoider, klorofyller, samt



fenoliske forbindelser og rester av karotenoider) som ofte også har samme retensjon i de kromatografiske systemer som ellers brukes, kan fjernes ved væske/væske partisjon med etylacetat [23]. Dette gjøres ved å ekstrahere med vann/etylacetat i 50/50 volumforhold. Etter samme prosedyre som for heksan/vann, får man at nedre fase (vandig fase) inneholder antocyanene, mens pigmenter som karotenoider og klorofyller nå befinner seg i øvre fase (etylacetat). Enkelte glukosiderte flavonoider kan løse seg i etylacetat-fasen, og derfor må denne fasen tas vare på, dersom disse forbindelsene er av interesse. Metanol er løselig i både etylacetat og vann, og derfor må mest mulig metanol fjernes før partisjonering. Dersom for mye metanol er til stede i løsningen, kan det i verste fall forhindre dannelsen av tofasesystemet. Dersom ekstraktet blir dampet inn til nesten tørrhet, og deretter løst i små mengder destillert vann, kan man regne med at det kun er små rester av metanol til stede, og effekten av disse ikke er merkbare.

Før CC-kolonne adsorpsjon som er neste steg i renseprosessen, bør løsningene konsentreres mest mulig. Løsningen med antocyanene bør dampes inn noe på rotavapor, både for å fjerne rester av etylacetat og for å gjøre volumet mindre. Om flavonoidene skal analyseres, bør løsningen dampes inn til tørrhet før de løses på nytt i destillert vann, eventuelt tilsettes syre (TFA eller HCl).

Denne metoden ble svært mye brukt i mitt arbeide, siden jeg var spesielt interessert i å få antocyanene separert fra de andre flavonoidene. Partisjonering med heksan ble prøvd, men ikke brukt i noen særlig utstrekning.

#### 4.2.4 Motstrømskromatografi, HSCCC

Dette er metoder som er utviklet videre fra prinsippet om fordeling mellom to uløselige væskefaser. Her har man systemer der de to fasene strømmer gjennom hverandre, noe som gir svært bedre interaksjon mellom de to fasene, og dermed øker antall teoretiske plater og dermed separasjonsevnen betraktelig. Systemet som jeg brukte, HSCCC, består av en kolonne med teflonrør viklet på spoler montert i en sentrifuge. Før bruk, ble kolonnen fylt med stasjonær fase, og mobilfase ble gjort klar ved pumpen, og sentrifugen ble startet. Prøven ble injisert sammen med mobilfase, og på grunn av sentrifugalkreftene, ble mobil fase presset gjennom stasjonær fase til motsatt ende av kolonnen. En DAD-detektor koblet til en plotter brukes til å måle absorbans på eluatet, slik at et kromatogram tegnes.

Fordeler med HSCCC i forhold til andre metoder, er blant annet at man kan gjøre separasjon både i svært stor skala (over ett gram), på forholdsvis kort tid (10 timer), og med bruk av lite løsningsmiddel. Andre alternativer for storskala separasjon av forbindelser har ulemper. Kolonne med Sephadex tar 3-4 dager for en gangs bruk, og preparativ HPLC klarer bare noen milligram prøve om gangen, og bruker svært mye løsningsmiddel.

Som nevnt brukes to væskefaser i HSCCC. Hvilken fase som blir stasj-

onær, og hvilken som blir mobil, bestemmes først og fremst av hvilke løsemidler man bruker, men også av hvilken ende av kolonnen man pumper fra, og hvilket stoff man vil analysere. Ved vanlig bruk, kjører man instrumentet i *descending mode*, der man bruker øvre fase (lettste fase) som stasjonær fase, og pumper fra den enden av kolonnen som kalles 'head'. Denne innstillingen fungerer best for polare forbindelser. Dersom man bruker den nedre og tyngste fasen som stasjonær fase, og pumper fra 'tail' enden av kolonnen, kalles det *ascending mode*, og denne metoden brukes mest for å analysere mer upolare forbindelser.

Tofasesystemet som vanligvis blir brukt for analyse av antocyaner, består av t-butyl-metyler/n-butanol/acetoneitril/vann i forholdet 2:2:1:5, og surgjort med 40 $\mu$ l TFA (trifluoro eddiksyre) per liter totalt løsemiddel. Den vandige fasen vil være tyngst, og dermed være mobil fase i normal modus operandi.

Instrumentet er vanligvis utstyrt med en preparativ kolonne på 850ml, og i denne tilstanden kan mellom 300mg til 2g tørr prøve injiseres. Dersom den analytiske kolonnen på 120ml er montert, bør mengden tørr prøve avgrenses til omtrent 20mg.

#### 4.2.5 Adsorbsjonskromatografi

Etter rengjøring av råekstrakter ved partisjonering med etylacetat, har man fremdeles mange polare, ikke-aromatiske forbindelser som sukker og frie syrer til stede i ekstraktet. Slike forbindelser fjernes på en kolonne med Amberlite XAD-7. Dette kolonnematerialet er en svakt polar resin av akrylester med stor overflate (450m<sup>2</sup>/g). Separasjon skjer ved adsorbsjonsprinsippet, der vårt aromatiske pigment-molekyl adsorberes til materialet, og løsrives ved hydrofobisk og polar interaksjon.

Det vandige flavonoid-ekstraktet applikeres forsiktig på kolonnen. Innholdet av metanol bør være lavt, siden man kan risikere at de aromatiske forbindelsene elueres for fort gjennom kolonnen, og vaskes ut sammen med de ikke-aromatiske forbindelsene.

Polare ikke-fenoliske forbindelser, sukker og syrer, kan nå elueres ut ved å vaske kolonnen med destillert vann. Foreløpig forblir flavonoidene adsorbent på kolonnematerialet. Man kan se at på det applikerte materialet at fargen skifter fra rødlig farge i surt miljø, til mer lilla og blå farge etter hvert som pH stiger. Når vannet som kommer ut av kolonnen har nøytral pH-verdi, kan antocyanene/flavonoidene elueres ut ved å vaske med metanol (for antocyaner: metanol tilsatt litt syre, mellom 0,05 og 1 prosent TFA eller HCl). Kolonnematerialet blir vasket med metanol til det er fargeløst, og eluatet dampes inn til tørrhet på rotavapor.

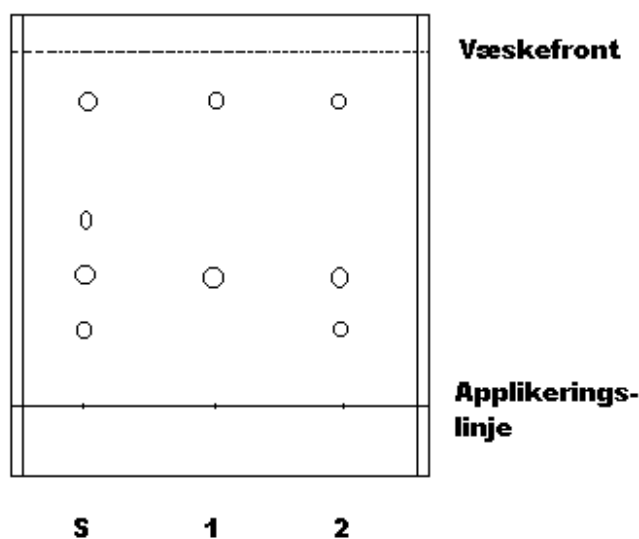
#### 4.2.6 Tynnskiktskromatografi

I TLC (Thin Layer Chromatography) er mobilfasen en væske mens stasjonær-fasen (vanligvis silika eller cellulose) ligger som et tynt lag på en flat, vanligvis rektangulær plate av glass, plast eller metall.

TLC er en enkel, men effektiv og svært nyttig kromatografisk teknikk, og kvalitativ og semikvantitative separasjoner kan utføres uten bruk av instrumentering. Teknikken benyttes på antocyaner som er fargede forbindelser, men kan også brukes på fargeløse substanser. Disse sistnevnte kan etter kromatograferingen observeres under UV-lampe (for eksempel flavonoler) eventuelt etter påføring av  $NH_3(g)$  eller et egnet sprayreagens (Naturstoffreagenz A). Fordi flere prøver kan applikeres på samme plate er teknikken både praktisk og tidsbesparende. Sammen med en eller flere standardprøver kan dermed TLC brukes til å sjekke renhet av ulike fraksjoner under opparbeidelse av prøvemateriale på en rask måte (kokromatografering).

Et mål på et stoffs retensjon på en TLC-plate måles i  $R_f$ -verdier:

$$R_f = \frac{\text{Stoffets vandringslengde}}{\text{Mobilfasens vandringslengde}} \quad (2)$$



Figur 16: Typisk eksempel på en TLC-plate

#### TLC-systemer brukt i oppgaven

TLC ble i denne oppgaven benyttet både som analytisk verktøy i identifiseringsprosessen under opparbeidelsen av rene pigmenter, og til ko-kromatografering

mot kjente standardforbindelser til entydig identitetbestemmelse. For antocyanene har FHW (maursyre-saltsyre-vann) 10:1:3 v/v [24] vært brukt mest, men også andre systemer som BAW (butanol-acetonitril-vann) har vært prøvd.

### Praktisk bruk av TLC

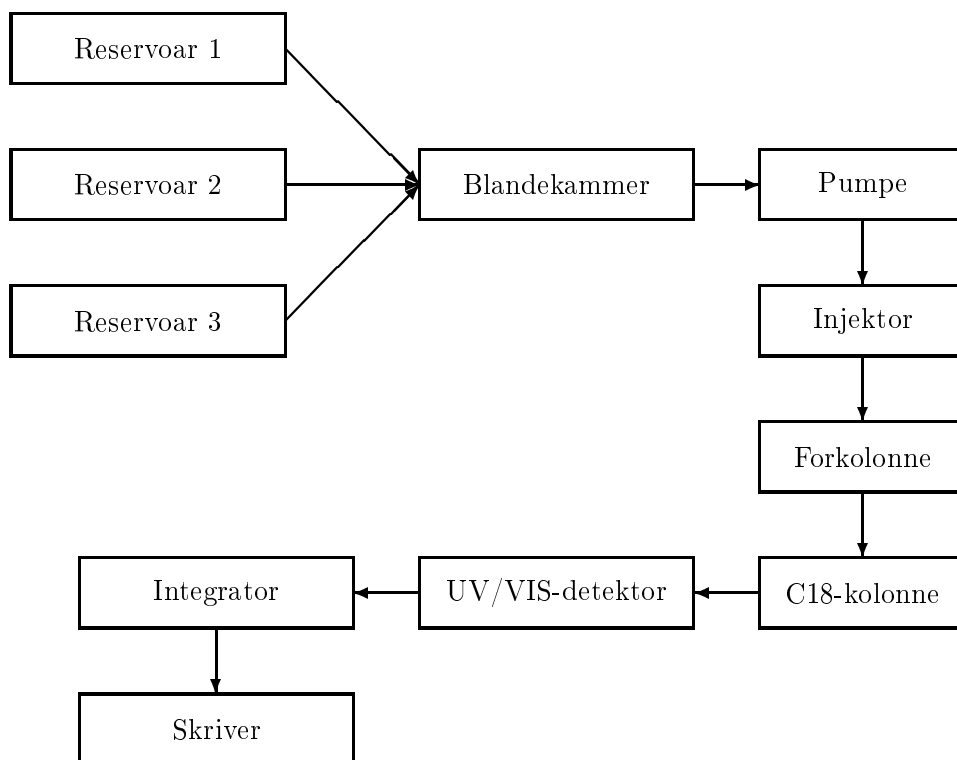
For å unngå såkalt 'smiling-effekt' skraper man av noen millimeter av stasjonærfasen på hver side av vertikalretningen (se figur 16 på forrige side). På denne måten unngår man ujevn eluering, da væskefronten ellers ville vandret raskere langs kanten av platen. Deretter applikeres prøvene på applikasjonslinjen ca. 1cm fra nedre kant, enten som små runde flekker eller som horisontale streker (3-4 flekker ved siden av hverandre).

Platen settes så oppi et kar eller en tank som er belagt med trekkpapir på innvendige flater. Trekkpapiret må være gjennomtrukket med mobilfase før tanken er klar til bruk. Det er viktig å passe på at væsknivået i tanken er lavere enn applikeringspunktene på TLC-platen. For å unngå fordamping av mobilfase under kromatograferingen legges et lokk over tanken. På grunn av kapillærkrefter vil nå mobilfasen trekkes oppover TLC-platen og prøvene som kromatograferes vil i ulik grad følge mobilfasen. Vandringslengden avgjøres av stoffenes spesifikke interaksjoner med henholdsvis stasjonærfasen og mobilfasen. Ved bruk av FHW 10:1:3, kan det ta mellom 3 og 4 timer for mobilfasen å nå toppen av en TLC-plate på 20cm.

### 4.2.7 Høytrykks væskrokromatografi (HPLC)

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) er separasjon ved bruk av kolonne og høyt trykk. Man skiller mellom analytisk og preparativ skala, og disse stiller ulike krav til utstyret som benyttes. Som det fremgår av navnet, brukes analytisk HPLC til å undersøke hvor mange, og eventuelt hvilke, forbindelser løsningen inneholder. Her kreves normalt bare små mengder løsning og materiale for å få et godt kromatogram. Vanlig injeksjonsmengde på vårt instrument er 10-15 $\mu$ l. For preparativ HPLC benyttes en betydelig større kolonne med større ladningskapasitet for å kunne separere større mengder stoff. Det blir her stilt mindre krav til nøyaktighet enn for analytisk separasjon. I denne oppgaven er det bare brukt analytisk HPLC.

For å få best mulig separasjon benytter man en gradient på mobilfasen. Dette betyr at man varierer sammensetningen av mobilfasen under kjøring. Dette gjøres ved hjelp av en styringsenhet (PC) tilkoblet HPLC-apparatet, og denne programmeres slik at man hele tiden har skreddersydde og helst optimale betingelser for separasjon [25]. Figur 17 viser enhetene i HPLC-systemet. For å unngå luft i systemet, bruker man ofte å degasse mobilfasen med helium. Eventuelt kan man lede løsemidlet gjennom en vakuumboks for å oppnå samme effekt. Degassing skjer i så fall mellom blandekammer og pumpe.



Figur 17: Skjematisk oversikt over HPLC-systemet brukt i oppgaven

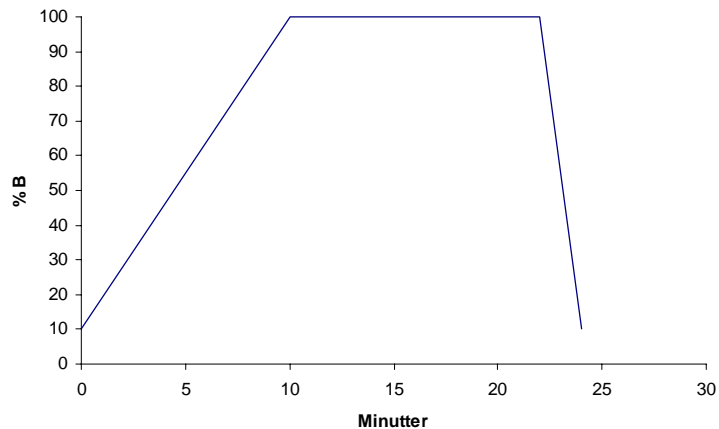
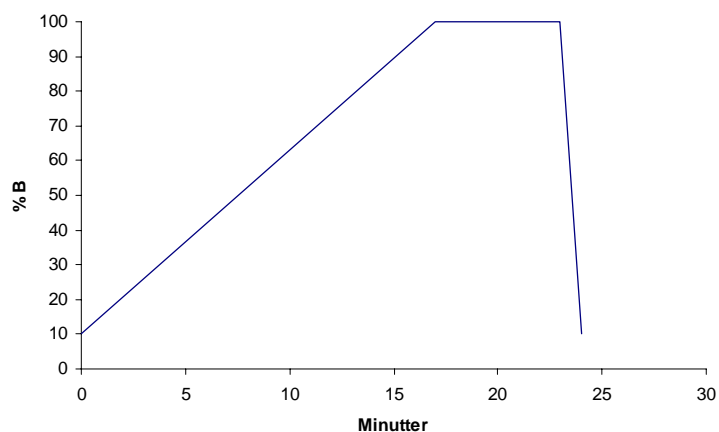
Ellers er forkolonne utelukkende brukt i min oppgave. Denne har en mye grovere partikkelstørrelse (for eksempel  $40\mu m$ ) enn partiklene i hovedkolonnen. (for eksempel  $3\mu m$ ). Forkolonnen fungerer da som et filter som fanger opp urenheter i prøven, og reduserer dermed forurensingen av hovedkolonnen.

### HPLC-systemer brukt i oppgaven

Løsemiddelsystemet som blir brukt i i vår HPLC består av to polare løsninger med følgende sammensetning:

**Løsning A:** H<sub>2</sub>O:HCOOH i forholdet 9:0,5 (v/v)

**Løsning B:** MeOH:HCOOH:H<sub>2</sub>O i forholdet 5:0,5:4 (v/v)



Figur 18: Øverst: HPLC-gradient program for analyse av antocyaner i de ulike prøvene. Nederst: HPLC-gradient program for analyse av aglykoner. Figur viser mengden av løsning B (metanol-maursyre-vann) pumpet inn i systemet. Resterende prosentandel er løsning A (maursyre-vann).

Disse to løsningene blir brukt i gradient program, der man starter med mye av løsning A, for så gradvis gå over til løsning B. Dette betyr at de mest polare forbindelsene kommer først ut av kolonnen, og de mer upolare

forbindelsene frem mot slutten av kromatogrammet. Det første gradientprogrammet jeg brukte (se figur 18), var godt egnet til å undersøke antocyaner, og det gav god separasjon for disse. Når jeg så skulle undersøke aglykonene av antocyaner, og da spesielt i blandinger med både antocyaner og aglykoner, måtte jeg finne et annet gradient program. I det siste programmet økes mengden av løsning B ganske fort, og dermed kommer de upolare aglykonene fortere ut.

### **Praktisk bruk av HPLC**

Pigmentene i prøven blir løst i et egnet løsemiddel, gjerne metanol eller vann. Prøven blir injisert i en sløyfe, der man ved å vri en hendel kobler sløyfen sammen med løsemiddel-ledningen som går fra blandekammeret for reservoarene til kolonnen. I kolonnen separeres pigmentene og disse når detektoren der absorbans av UV eller synlig lys blir målt ved flere bølgelengder ved hjelp av en DAD (Diode Array Detector). Denne detektoren måler absorbans som en funksjon av bølgelengde og tid samtidig. Dette vil si at vi kan få hentet ut komplette absorbansspekter av hver forbindelse hvis den er representert som en enkelt topp i kromatogrammet. Data fra detektor blir sendt til en datamaskin for behandling og tolkning. Kromatogrammer og absorpsjons-spektra [26] kan så skrives ut.

### **Instrumentell utrustning:**

Instrumentet: Hewlett-Packard 1050  
Programvare: Hewlett-Packard Chemstation  
Detektor: Diode Array Detektor (DAD)  
Kolonnen: ODS Hypersil  $5\mu$  250mmx3mm  
(med 1cm forkolonne)  
Injiseringmengde:  $12\mu$ l

Fordelene med dette instrumentet er at det er en rask og lett reproducerbar metode der man trenger liten prøvemengde (vanlig injeksjonsvolum er i området 10-15 $\mu$ l). Ved å kjøre kjente standarder og deretter sammenligne kromatogram og spektrere til en prøve, kan man få god informasjon om sammensetningen av flavonoidene.

### **4.3 Spektroskopiske metoder**

Historisk sett blir spektroskopi referert til som vitenskapen der (synlig) lys løses opp i dets komponenter (som i et prisme), og lager et spektra som er et plott av bølgelengde/frekvens mot strålings-intensitet eller absorbans. I moderne tid har spektroskopi fått en bredere mening der det inkluderer studier ikke bare med synlig lys, men med andre typer elektromagnetisk stråling som røntgen, UV, IR, mikrobølger og radiobølger [14].

Spektroskopiske metoder benyttet i denne oppgaven er UV-synlig spektroskopi og NMR (kjernemagnetisk resonans).

#### 4.3.1 Spektroskopi med UV og synlig lys

UV/synlig lys absorpsjons spektroskopi er en metode der man måler en prøves absorpsjon av UV-stråling eller synlig lys ved gitte bølgelengder. Molekylær absorpsjon av UV/lys involverer en overføring av elektroner fra en orbital med lav energi til en orbital med høyere energi. For at molekylet skal absorbere strålingen, må den tilførte energien være eksakt den samme som energidifferansen mellom de to orbitalene.

UV-synlig absorpsjons spektroskopi kan brukes til å bestemme hydroksyleringsmønster og type flavonoid. Generelt absorberer flavonoid i to regioner, band I 300-550nm og band II 240-285nm. Aromatisk acylering gir en ekstra absorpsjon i aromat-regionen (280-320nm). Spektre tatt i forskjellige løsemidler og ved ulike pH-verdier, gir store forskjeller i spektrene, der både spektrenes form og verdier som  $\lambda_{max}$  kan variere mye.

#### 4.3.2 NMR, Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy

NMR-fenomenet ble oppdaget i 1946 for første gang. I de påfølgende tiårene er NMR blitt en uvurderlig analysemetode for kjemikere, biologer, fysikere og medisinerere [27], [28].

NMR er et fenomen som oppstår når kjernen av bestemte atomer blir plassert i et magnetisk felt, og så påvirket av et annet oscillerende magnetisk felt. Ikke alle kjerner blir påvirket av disse feltene, og kravet for å nettopp bli påvirket er at kjernen må ha et magnetisk spinn ulik null. Spinn kan forklares som et lite magnetisk felt skapt av kjernen, på grunn av ladninger i bevegelse.

Når et atom med spinn kommer under påvirkning av et ytre magnetisk felt, vil spinnnet legge seg enten *med* det ytre feltet (som to magneter som ligger N-S-N-S), eller *mot* det (som N-S-S-N). I likevekt vil de aller fleste kjernene innta det laveste energinivået (N-S-N-S), og vi har en Boltzmann distribusjon.

Når vi så bestråler atomene med en RF-puls, vil atomene absorbere energi, slik at kjerner i det laveste energinivået kan innta det høyere nivået. Boltzmann-distribusjonen blir da forstyrret. Energien som blir absorbert tilsvarer eksakt differansen mellom energinivåene. Denne differansen er avhengig av styrken på RF-pulsen og miljøet til kjernen. For eksempel vil hydrogen (et proton) i nærvær av elektronegative grupper (oksygen) ha et annet miljø enn hydrogen i nærvær av karbon og andre hydrogenener. De vil derfor absorbere litt forskjellige energimengder, og vil på den måten få et litt forskjellig kjemisk skift i et NMR-spekter [29].

Den enkleste typen NMR eksperiment er endimensjonale metoder som



har en frekvensakse og en intensitetsakse. Todimensjonale metoder har to frekvensakser, og intensiteten blir vist i en tredje dimensjon. Det er også blitt utviklet eksperimenter med enda flere dimensjoner.

#### **Instrumentell utrustning:**

Bruker DRX-600 FT-NMR instrument, der opptakene blir gjort ved 600,13MHz for  $^1\text{H}$ , og 150,9MHz for  $^{13}\text{C}$ .  
Prosesseringsprogram er XWIN-NMR.

Det er lagt lite vekt på identifikasjonsarbeidet i denne oppgaven. En NMR-analyse av cyanidin-3-glukosid ble utført for å vise arbeids-stien fra ekstrakt via HSCCC til NMR. For mer detaljert informasjon om hver type NMR-eksperiment, se referanse [30].

#### **4.3.3 $^1\text{H}$ -spekter**

Alle protoner i molekylet vises i et proton NMR-spekter. Vi kan her få informasjon fra skiftverdier, koblingskonstanter og splittingsmønster. Spekteret blir her delt inn i tre regioner.

Aromat-regionen er fra 9-6 ppm, og det er her vi finner signalene til proton tilhørende aglykonet og eventuelle aromatiske syrer.

Anomer-regionen er fra 6-4 ppm, og i denne regionen kan vi få et bilde av hvor mange sukkere som er festet til forbindelsen.

Sukker-regionen er fra 4 ppm og nedover. I denne regionen kan det være svært mange overlappende signaler hvis molekylet har flere sukker-enheter, og det kan i første omgang være svært vanskelig å uttale seg ut fra signalene i dette området.

#### **4.3.4 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC**

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) er et eksperiment som korrelerer  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$  gjennom heteronukleært enbindings skalare koblinger ( $^1J_{CH}$ ). Vi har derfor skift til protoner på x-aksen og skift til  $^{13}\text{C}$  på y-aksen, og krysstopper på kjemiske skift til protoner som er direkte bundet til det aktuelle karbonet. Eksperimentet er svært nyttig til anordning av karbonverdier når kjemisk skift til protonet er kjent, for eksempel fra COSY-eksperiment. Det også brukt mye til anordning av sukker-regionen.

#### **4.3.5 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC**

HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) er et eksperiment der man korrelerer skiftene til  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$  gjennom flerbindings heteronukleære skalare koblinger ( $^nJ_{CH}$  der  $n=2$  eller  $n=3$ ). Dette betyr at vi i spekteret har skiftene til proton langs x-aksen, og skiftene til  $^{13}\text{C}$  langs y-aksen. I spekteret

finner vi kryssstopper mellom protoner og karboner som er i knytt sammen over en, to eller tre bindinger.

HMBC er nøkkeleksperimentet i anordning av flavonoider. Dette eksperimentet kan brukes til anordning av aglykonet og bestemme tilknytningspunkter. Ved hjelp av kryssstopper fra proton på aglykonet kan mesteparten av aglykonet anordnes. Tilknytningspunktet på aglykonet finner man ved å lete etter kryssstopper fra karbon/proton i sukker-regionen til karbon/proton i aglykonet. Eller mer spesifikt: kryssstopper mellom *downfield* karbon (aglykonet) og *upfield* proton indikerer tilknytningspunktet.

Enbindings-korrelasjoner kan også finnes i et HMBC-spekter. Disse vises som dubletter i 2D-spekteret, korresponderende til posisjonen av  $^{13}\text{C}$  satellittene i  $^1\text{H}$ -spekteret med en separasjon i området  $^1J_{CH} \cong 130\text{-}150\text{Hz}$ . Enbindingskorrelasjonene er lette å identifisere og er derfor et godt verktøy i anordningsarbeidet.

#### 4.3.6 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY

COSY (COrrelation SpectroscopY) korrelerer proton resonanser som er bundet sammen gjennom skalarkoblinger. Dette betyr at begge aksene viser samme protonskift, og kryssstopper viser hvilke proton som er koblet til hverandre. I et COSY spekter finner vi en diagonal, og krysstoppene er plassert symmetrisk rundt denne diagonalen.

COSY-eksperimentet brukes i anordning av sukker i analyse av antocyaner. Man kan her starte på skiftverdien til anomeren, og gjøre en *sequential walk*, det vil si at man i teorien går fra anomer H-1, finne krysstopp til H-2, videre fra H-2 og krysstopp til H-3. På denne måten kan man teoretisk finne alle kjemiske skift til protonene til hele sukkeret. Ofte har pigmentene flere enheter med sukker, og da kan det være vanskelig å komme frem til en fullstendig anordning bare fra COSY, men i kombinasjon med andre eksperimenter vil det være mulig.

#### 4.3.7 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ TOCSY

TOCSY (TOtal COrrelation SpectroscopY) er et eksperiment som korrelerer alle proton i samme spinnsystem på samme tid. Selv om enkelte koblinger mangler, vil TOCSY eksperimentet vise hele spinnsystemet.

TOCSY blir brukt til anordning av sukker. Det viser alle proton i samme spinnsystem, og følgelig alle proton i hver enhet av sukker. Når det kjemiske skiftet til det anomere signal er kjent, kan de resterende skiftverdiene til sukkeret finnes som korrelasjoner til det første skiftet.

#### 4.3.8 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY

NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) er et eksperiment som måler NOE-effekter i molekylet. NOE-effekter er kryssrelaksasjon mellom

protoner som er nær hverandre i rom. Det blir derfor i dette spekteret, som har proton kjemiske skift på begge aksene, krysstopper der proton kryssrelakserer hverandre. Vi får altså et eksperiment som viser hvilke protoner som ligger nær hverandre i rommet. Eksperimentet er blitt brukt til bestemming av tilknytningspunkt. Korrelasjoner mellom anomere signal og aglykon indikerer hvilken i posisjon sukkeret er plassert.

#### 4.3.9 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ROESY

ROESY (Rotational nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) viser også signaler fra protoner som er nær hverandre i rom, men ikke koblet gjennom kjemiske bindinger. ROESY er spesielt nyttig i tilfeller der NOESY-signalene er svake. Som i NOESY, får man en diagonal og krysstopper. Krysstoppene viser ROE-effekter mellom to protoner, og dermed at de er plassert nær hverandre i rommet. Også i dette eksperimentet er det lett å se tilknytningspunktet mellom aglykon og sukker.

#### 4.3.10 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC-TOCSY

HSQC-TOCSY er et eksperiment som korrelerer kjemiske skift til proton og karbon gjennom enbindings heteronukleære skalarkoblinger (HSQC) og kjemiske skift til protoner i samme spinnsystem (TOCSY). Sagt på en annen måte, er krysstoppene i dette spekteret arrangert i rekker der hvert kjemisk skift til  $^{13}\text{C}$  vises ved  $^1\text{H}$ -skiftet til det direkte bundet protonet og alle andre protoner i samme spinnsystem. Eksperimentet er godt egnet til anordning av sukker.

### 4.4 Statistiske metoder

#### 4.4.1 Fullt faktorforsøk

Eksperimentell design og optimering er verktøy som brukes for systematisk undersøkelse av forholdene rundt forsøk. Det er åpenbart at dersom forsøk blir utført med tilfeldig valgte verdier, får man også tilfeldige resultater. Derfor er det viktig å planlegge eksperimentene, slik at de inneholder den informasjonen man er ute etter.

Først må man bestemme seg for hva som egentlig er målsetningen for eksperimentet, hva som egentlig er målet: Hva er kjent på forhånd? Hva er ukjent? Hva vil vil undersøke? Til slutt må man komme frem til mer konkrete problemstillinger: Hvilke eksperimentelle variabler kan undersøkes? Hvilke responser kan måles?

Det er en rimelig antagelse at resultatet av eksperimentet avhenger av hvordan det blir utført. Dette betyr at resultatet kan bli beskrevet som funksjon av de eksperimentelle variablene.

$$y = f(x) \tag{3}$$

Tabell 3: Forsøks-oppstilling med to variabler

Experiment nr	$x_1$	$x_2$
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+

Tabell 4: Forsøks-oppstilling med tre variabler

Experiment nr	$x_1$	$x_2$	$x_3$
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Denne funksjonen kan tilnærmes ulike typer polynom, og gi en god beskrivelse av sammenhengen mellom de eksperimentelle variablene og responsen innenfor et begrenset eksperimentelt område.

Den enklaste polynom-modellen forutsetter bare lineære sammenhenger mellom variabler og respons. En *lineær modell* med to variabler er beskrevet i ligningen under:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + rest \quad (4)$$

Neste nivå i modellen beskriver samspillseffekter mellom variablene, og dette gir oss en *andre ordens interaksjons-modell*, her med to variabler:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + rest \quad (5)$$

Neste trinn er å bestemme hvilke variabler man vil undersøke i eksperimentene. Antall variabler bør holdes til et minimum, da man vil få  $2^k$  antall forsøk for  $k$  antall variabler. Hver variabel får en høy og en lav verdi for å få frem den lineære sammenhengen mellom responsen og variabelen. I skjemaene blir den lave verdien angitt som '-' og den høye blir angitt som '+'. Den faktiske verdien til variabelen er ikke tatt med. For å undersøke og beregne alle effekter, også samspillseffekter, tegner man en *modell-matrise*, der man fører en kolonne for hver respektiv effekt. Her føres også den målte responsen i en egen kolonne. Tabell 5 er for et system med tre variabler: Denne tabellen brukes til å beregne effektene av variablene. Først blir middelverdien  $b_0$  funnet ved å finne gjennomsnittet av responsene:

$$b_0 = \frac{R1 + R2 + R3 + R4 + R5 + R6 + R7 + R8}{8} \quad (6)$$

Tabell 5: Modell-matrise med tre variabler

Eksp. nr.	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_{12}$	$x_{13}$	$x_{23}$	$x_{123}$	Respons
1	-	-	-	+	+	+	-	R1
2	+	-	-	-	-	+	+	R2
3	-	+	-	-	+	-	+	R3
4	+	+	-	+	-	-	-	R4
5	-	-	+	+	-	-	+	R5
6	+	-	+	-	+	-	-	R6
7	-	+	+	-	-	+	-	R7
8	+	+	+	+	+	+	+	R8

Beregning av *hovedeffektene*,  $b_1$ ,  $b_2$  og  $b_3$  beregnes ved å anvende verditegnet i kolonnen, slik at man enten adderer eller subtraherer verdien for responsen:

$$b_1 = \frac{-R1 + R2 - R3 + R4 - R5 + R6 - R7 + R8}{8} \quad (7)$$

Beregning av samspillseffektene,  $b_{12}$ ,  $b_{23}$ ,  $b_{13}$  og  $b_{123}$ , blir utført på samme måte som for hovedeffektene:

$$b_{12} = \frac{R1 - R2 - R3 + R4 + R5 - R6 - R7 + R8}{8} \quad (8)$$

Effektene for variablene settes deretter inn i modellen som beskriver responsens avhengighet av de ulike variablene:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{23}x_2x_3 + b_{13}x_1x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (9)$$

Modellen over beskriver nå hvordan responsen  $y$  påvirkes av de ulike eksperimentelle variablene, samt samspillseffekter av disse.

## 5 Eksperimentelle prosedyrer

I denne delen blir prosedyrene forklart detaljert. Det er blitt utført ekstraksjoner og rensing av antocyaner fra ulike kilder. Disse pigmentene blir analysert på HPLC, HSCCC og NMR. Videre er betingelser for syrehydrolyse og stabilitet blitt undersøkt.

### 5.1 Ekstraksjon og filtrering av pigmenter fra svarthyll

500 gram bær fra svarthyll ble ekstrahert med 1000 ml metanol tilsatt salt-syre (HCl) til 1 volumprosent og satt i kjøleskap over natten. Dagen etter ble all væske tappet av, og nye 1000ml surgjort metanol ble tilsatt, og blandingen ble på nytt satt i kjøleskap over natten. Ekstraktene ble slått sammen, filtrert gjennom glassull, og dampet inn til omtrent 200ml på rotavapor.

### 5.2 Partisjonering mot etylacetat

Ekstraktet har en omtrentlig volum av 300ml. Derfor blir porsjoner på 300ml etylacetat brukt. Det vandige ekstraktet og etylacetat blir blandet i en skilletrakt av passelig størrelse (en 1000ml skilletrakt i mitt tilfelle). Blandingene ble rystet kraftig for at fasene skulle blandes skikkelig. Den ble så holdt rolig til de to fasene ble dannet på nytt. Første gang ble toppfasen (etylacetat) farget kraftig med nyanser i grønt og brunt. (Grønnfargen antas å komme fra klorofyll.) Toppfasen ble så fjernet, en porsjon med etylacetat ble tilsatt, prosedyren ovenfor ble gjentatt.

Fargen på toppfasen avtok tydelig fra partisjon til partisjon. Etter den fjerde gangen var etylacetat-fasen nær fargeløs. Så ble etylacetaten partisjonert mot lik mengde destillert vann to ganger, for å hente ut eventuelle flavonoider som ble løst i etylacetat. Vannfasene ble slått sammen og dampet inn til et volum på omtrent 50ml på rotavapor. Fasene med etylacetat ble ikke tatt vare på i min analyse.

### 5.3 Rengjøring med Amberlite XAD-7 kolonne

Kolonnen ble preparert ved å vaske gjennom med destillert vann. Dette gir kolonnen en nøytral pH-verdi, samt at man vasker ut rester av metanol og andre polare forbindelser. Ekstraktet har nå et volum på omtrent 50ml, og skal helst være løst i surgjort vann. Prøven ble påført kolonnen forsiktig ved å la løsningen renne ned langs en glass-stav. Når prøven hadde festet seg i kolonnematerialet, ble kolonnen vasket med totalt fem liter destillert vann, før vannet som ble vasket ut hadde pH i området 6-7.

Da ble kolonnen vasket med surgjort metanol (en volumprosent HCl) til all farge var samlet opp. Løsningen ble dampet inn under vakuüm til tørrhet i rotavapor.

#### **5.4 Ekstraksjon, filtrering og rensing av pigmenter fra solbær**

500g solbær ble ekstrahert med surgjort metanol på identisk metode som for svarthyll, kap. 5.1. Ekstraktet ble filtrert i glassull, partisjonert med etylacetat, og rensert i kolonne med XAD-7 (som beskrevet i kap. 5.3). Til slutt ble ekstraktet dampet inn til tørrhet.

#### **5.5 Ekstraksjon, filtrering og rensing av pigmenter fra blåbær og jordbær**

250 gram jordbær og 250 gram blåbær ble ekstrahert med 1000 ml metanol tilsatt saltsyre (HCl) til 1 volumprosent og satt i kjøleskap over natten. Dagen etter ble all væske tappet av, og nye 1000ml surgjort metanol ble tilsatt, og blandingen ble satt på nytt satt i kjøleskap over natten. Etter at det andre ekstraktet ble tappet av, ble det tilsatt 1000ml metanol med 10 volumprosent HCl, og blandingen ble på nytt satt i kjøleskap natten over. De tre ekstraktene ble slått sammen, filtrert gjennom glassull, og dampet inn til omtrent 200ml på rotavapor.

Denne blandingen ble videre partisjonert med etylacetat, men ikke rensert i kolonne med XAD-7 (kap. 5.3). Jeg var da klar over et noe høyt innhold av sukker i løsningen.

#### **5.6 Analytisk HPLC**

Små mengder (mindre enn en spatelspiss) av prøvematerialet ble løst i omtrent 1ml analytisk grad metanol. Med sprøyte ble det injisert  $12\mu\text{l}$  på instrumentet. Gradientprogrammet ble kjørt, og kromatogram ble tatt opp på 280nm, 320nm, 360nm og 520nm, som er typiske bølgelengder som flavonoider absorberer.

#### **5.7 HSCCC i analytisk skala**

En midre mengde (omtrent 100mg) av tørt antocyan fra svarthyll ble løst i 0,5ml i like mengder av de to fasene som brukes i HSCCC-instrumentet. Analytisk kolonne (120ml) ble fylt med upolar fase som stasjonær fase, slik at instrumentet ble kjørt i 'head to tail' retning. Flythastighet av mobil fase ble holdt på 1ml/min, og sentrifugalhastighet ble holdt på 1200rpm. Detektor tok opp absorbans ved 520nm, og fraksjoner ble tatt når pigmenter ble eluert ut fra kolonnen.

#### **5.8 HSCCC i preparativ skala**

En større mengde (omtrent 2,0 gram) av tørt antocyan fra svarthyll ble løst i 40ml i like mengder av de to fasene som brukes i HSCCC-instrumentet.

Preparativ kolonne (850ml) ble fylt med upolar fase som stasjonær fase, slik at instrumentet ble kjørt i 'head to tail' retning. Flythastighet ble holdt på 5ml/min, og sentrifugalhastighet ble holdt på 1000rpm. Detektor tok opp absorpsjons ved 520nm, og fraksjoner ble tatt når pigmenter ble eluert ut fra kolonnen.

### 5.9 HSCCC etter lagring av antocyaner i sur løsning

Antocyaner fra svarthyll ble lagret i surgjort løsning av metanol (en volumprosent HCl i metanol) i 10 uker i kaldt miljø. Etter lagring ble løsningen dampet inn til tørrhet på rotavapor, og 1,0 gram løst i 40ml i like mengder av de to fasene i HSCCC-instrumentet. Analysen på HSCCC ble utført som standard ved preparativ skala.

### 5.10 NMR analyse av cyanidin-3-glukosid

Pigmentet fra det lagrede ekstraktet fra svarthyll viste seg å inneholde forholdsvis rent cyanidin-3-glukosid. Pigmentet ble rensset på kolonne fylt med XAD-7, og dampet inn til tørrhet på rotavapor. Det ble så løst i små mengder metanol og overført til mindre prøveglass der prøven kunne dampes inn fullstendig under nitrogengass.

NMR-rør og alle pipetter ble grundig rengjort ved vasking med destillert vann og aceton. Rørene ble lagt i varmeskap som holder omtrent 100°C i minimum en time før bruk. Prøven ble tørket i eksikator med vakuumpumpe for at mest mulig vann ble fjernet.

Deutert metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ble valgt som løsemiddel, på grunn av antocyanets gode løselighet i metanol. Pigmentet ble løst til mettet tilstand i 300 $\mu\text{l}$  løsemiddel, og overført til NMR-røret. Dette ble så satt kork på, og forseglet for å hindre avdamping av løsemiddel.

Røret ble senket ned i NMR-instrumentet, og følgende spekter ble tatt opp: vanlig  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  med proton dekobling, gs-DQF-COSY, TOCSY, ROESY, HSQC, HMBC og HSQC-TOCSY.

### 5.11 Undersøkelse av hvordan temperatur innvirker på hydrolyse av utvalgte antocyaner

0,1 gram tørt pigment-ekstrakt fra jordbær og blåbær ble løst i 5ml vandig 2M HCl. Prøver ble tatt med kapillær-rør fra denne løsningen og røret ble forseglet med gassflamme i hver ende. Totalt syv rør med innhold ble laget, og seks av disse ble satt i varmeskap ved 95°C i 5, 10, 20, 40, 80 og 160 minutter. Innholdet i de syv rørene ble analysert på TLC.



### 5.12 Generell TLC-analyse med FHW som løsemiddel

Kapillær-rør med hydrolysat ble applikert på TLC-plate med 0,1mm cellulose som stasjonærfase. Platene ble senket ned i et kar med FHW (maursyre-saltsyre-vann) i forholdet 10:1:3. Etter 3-4 timer hadde de applikerte pigmentene vandret nok til at man kunne skille godt mellom ikke hydrolyserte antocyaner, og de rene aglykonene.  $R_f$  verdier kunne så avleses.

### 5.13 Hydrolyse av utvalgte antocyaner i stor skala

2,0 gram tørt ekstrakt fra blåbær og jordbær blir løst i 150ml vandig 2M HCl, og overført til et 250ml begerglass. Denne ble satt i varmeskap i 95-100°C i 60 minutter. Etter behandlingen i varmeskap ble løsningen forsiktig kjølt ned til romtemperatur, og videre lagret i kjøleskap.

Løsningen var tydelig mer tyktflytende (som sannsynligvis skyldes væsketap under varmebehandlingen), og et brunsvart materiale var felt ut fra løsningen. Skulle man bedømme ut fra lukten av løsningen, kunne man anta bunnfallet var karamellisert sukker. Noen definitiv test ble midlertid ikke utført. Bunnfallet ble filtrert fra ved hjelp av glassull.

### 5.14 Forsøk på ekstraksjon av hydrolyserte antocyaner

Prøver av hydrolyse-løsningen ble tatt med kapillær-rør, og analysert på TLC-plate. Små porsjoner på omtrent 20ml ble tatt fra hydrolyseblandingen, og følgende ekstraksjonsmedier ble utprøvd:

- Ekstraksjon med etylacetat i forholdet 1:1 med hydrolyseløsningen.
- Ekstraksjon med butanol/dietyleter i forskjellige innbyrdes forhold.
- Ekstraksjon med propanol/etylacetat i forholdet 2:3:5 med hydrolyse-løsning.
- Ekstraksjon med isopropanol/etylacetat i forholdet 2:3:5 med hydrolyseløsning.

Det ble tatt tester på TLC-plater flere ganger daglig, for å overvåke nivået av aglykon i hydrolyseløsningen. Etter tre døgn var det ikke lenger mulig å påvise aglykoner i løsningen.

### 5.15 Undersøkelse av UV-absorbans av antocyaner

Det ble laget fire løsninger på 5ml hver av antocyanet cyanidin-3-glukosid fra svarthyll i omtrent pH-nøytral metanol. Konsentrasjonen i løsningene var 0,168mg/ml, 0,126mg/ml, 0,084mg/ml og 0,042mg/ml. Disse løsningene ble overført til kvartskvyetter, og analysert i et UV-spektrofotometer. Absorbans

ved 530nm ble avlest, og sammenlignet for de fire løsningene. Tallene ble plottet i figur 32 og viser sammenhengen mellom konsentrasjon og absorbans.

Under arbeidet viste det seg at UV-spektrofotometeret som ble brukt, ikke klarte å måle absorbans ved de to høyeste konsentrasjonene. Derfor måtte tynnere kyvetter tas i bruk (0,1cm tykkelse mot normalt 1,0cm), og absorbans måtte regnes om for å kompensere for kyvettestørrelsen.

### **5.16 Undersøkelse av mulige løsemidler for hydrolyse av antocyaner**

Antocyanet cyanidin-3-glukosid ble veid inn og løst i fire forskjellige systemer:

1. Vandig løsning med 2M HCl. Dette var et kjent løsemiddel som jeg ville vurdere de andre parallellene ut fra.
2. n-Butanol med 2M HCl. Dette er et løsemiddel som inneholder lite vann, alkoholen har et forholdsvis høyt kokepunkt, og løsemiddelet er generelt mindre polart enn vann-HCl-blandingen.
3. Absolutt etanol med 3M  $H_3PO_4$ , et løsemiddel som ble valgt ut fra antagelser om at det ville være lett å fjerne løsemidlet etter hydrolysen, samt at dette systemet blir holdt så fritt for vann som mulig.
4. Teknisk etanol med sur ionebytter. I dette løsemidlet blir det prøvd et alternativ til syre, og dermed også bidrar dette til å senke innholdet av vann. Teknisk etanol ble valgt for å gi systemet en liten vannmengde som er nødvendig i hydrolysen.

Antocyanet ble løst i løsemidlene, slik at alle parallellene holdt 3,3mg/ml av pigmentet. Hver parallell bestod av totalt 20ml løsning, og ble overført til prøveglass med skrukork.

Glassene ble satt i varmeskap ved 95°C i 60 minutter. Umiddelbart etter varmebehandlingen ble det tatt opp UV-spekter og utført TLC-analyse av alle de fire parallellene. For å få egnet konsentrasjon til UV-analysen, måtte hydrolyse-løsningen fortynnes 25 ganger. Dette ble gjort ved å ta ut 0,2ml og fortynne til 5,0ml. De ufortynnede hydrolyseløsningene ble så satt i kjøleskap for å unngå unødvendig degradering av aglykonet.

Det ble så tatt nye UV-spektra etter 4 timer, etter 24 timer, og etter 72 timer. Totalt fire spektra fra hver parallell, for å vise eventuell degradering av aglykonet i hydrolyseløsningen ved lav temperatur.

### **5.17 Fullt faktorforsøk for undersøkelse av betingelser for syrehydrolyse**

Etanol-fosforsyre ble ansett å være et løsemiddel som var godt egnet til hydrolyse av antocyanene. Derfor ble det utført et fullt faktorforsøk der jeg

undersøkte nærmere virkningen av variabler som temperatur, tid og syrekonsentrasjon.

Det ble laget åtte paralleller, som hver bestod av cyanidin-3-glukosid tilsvarende 0,07mg/ml. Det ble laget to forskjellige løsemidler, med henholdsvis 3 og 6M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. De åtte parallellene ble så utsatt for forskjellige hydrolysemiljøer som følger i tabell 6.

Tabell 6: Variablene brukt i faktorforsøket

Variabel	Lav verdi	Høy verdi
Temperatur (X <sub>1</sub> )	90°C	150°C
Tid (X <sub>2</sub> )	50 minutter	100 minutter
Syrekonsentrasjon (X <sub>3</sub> )	3M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	6M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

Etter endt hydrolyse ble 15μl av løsningen injisert på analytisk HPLC, og arealet av toppen som tilsvarer aglykonet ble avlest og vurdert. Prøveglassene ble lagret i kjøleskap, og ny analyse på HPLC ble utført en uke senere, for å se nærmere på stabilitet under lagring.

### 5.18 Utvinning av aglykon fra hydrolyseløsning

En mindre kolonne med Amberlite XAD-7 ble klargjort. Denne var omtrent 25cm lang, og med en halv liter kolonnemateriale over et filter av glassull. Den ble så fylt og skylt med destillert vann. Hydrolyseløsningen ble så forsiktig applikert på kolonnen, og det ble så forsiktig tappet av destillert vann. Pigmentet ble bundet til kolonnematerialet, men på grunn av den store mengden etanol i løsningen, ble små mengder av pigmentet skylt ut. Det ble så tappet gjennom 3-4 liter destillert vann til vannet som kom ut hadde en pH i området 6-7. Så ble det tappet gjennom surgjort metanol (en volumprosent HCl), og alt pigmentet ble samlet opp og tørket inn til tørrhet på rotavapor. Kolonnen ble til slutt skylt med 2-3 liter destillert vann.

### 5.19 Delvis hydrolyse av antocyan fra solbær

0,1 gram ekstrakt av solbær ble først løst i 20ml metanol. 15μl ble injisert på HPLC. Så ble 0,5 gram pigment løst i 50ml 3M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> og overført til et 150ml varmebestandig glass med skrukork. Det ble satt i varmeskap ved 95-100°C i 30 minutter. Etter varmebehandlingen ble prøven kjølt ned til romtemperatur. 15μl ble injisert på analytisk HPLC. Resten av løsningen ble dampet inn over vakuum til tørrhet på rotavapor.

### 5.20 HSCCC-analyse av delvis hydrolysert antocyan

HSCCC-instrumentet ble klargjort, og den preparative kolonnen (850ml) ble fylt med polar fase som stasjonær fase, slik at instrumentet ble kjørt i 'tail

to head' retning. 0,5 gram delvis hydrolysert antocyan fra solbær ble løst i 40ml i like mengder av de to fasene i instrumentet. Flythastighet ble holdt på 5ml/min, og sentrifugalhastighet ble holdt på 1000rpm. Detektor tok opp absorbanse ved 520nm, og fraksjoner ble tatt når pigmentet ble eluert ut fra kolonnen.

### 5.21 Undersøkelse av løselighet av aglykon

En rekke tofasesystemer ble undersøkt, om hvorvidt det var mulig å analysere rent aglykon på HSCCC. Tofasesystemene ble laget på forhånd i 10ml prøveglass, slik at hver fase var omtrent 4ml. En spatelspiss, ikke mer enn 0,1g rent cyanidin (fra svarthyll) ble forsøkt løst i løsningene. De følgende tofasesystemene ble undersøkt:

- Heksan-diklormetan-acetonitril (5:1:4)
- Heksan-etylacetat-metanol-vann (5:1:5:1)
- Kloroform-metanol-vann (2:2:1)
- Heksan-iseddik-vann (6:5:1)
- Petroleumseter-butanol-iseddik (4:3:1)
- Metanol-petroleumseter (1:1)
- t-butylmetyleter-butanol-acetonitril-vann (2:2:1:5)

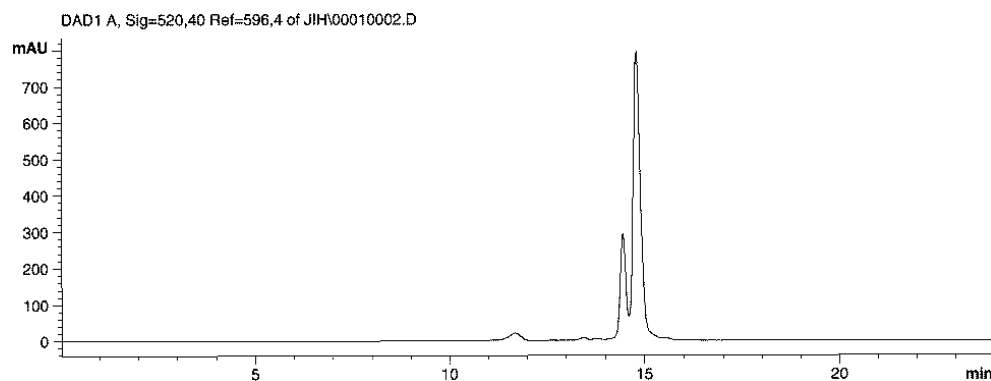
Resultatet ble bedømt rent kvalitativt, ved å se på fargen av løsningen, om hvorvidt pigmentet var løst i en eller begge fasene.

## 6 Resultater

Innledningsvis ble antocyaner fra svarthyll isolert og identifisert. Fordeler med High Speed Counter-Current Chromatography er at man kan få isolert relativt store mengder av rene forbindelser, men siden HSCCC i svært liten grad er brukt til separasjon av antocyaner, ble det naturlig å undersøke hvordan teknikken kunne anvendes på pigmentene i svarthyll. Cyanidin-3-glukosid isolert fra svarthyll ble brukt i videre eksperimenter, der betingelser for hydrolyse, lagring og gjenvinning av aglykoner ble undersøkt.

### 6.1 Opparbeidelse av pigmenter fra svarthyll

Etter rengjøring med etylacetat og XAD-kolonne, ble ekstraktet undersøkt med HPLC (prosedyren beskrevet i kap. 5.6). Analysen viste at det var hovedsaklig to antocyaner tilstede, det ene eluert ved 14,4 minutter (23 prosent av innholdet), og det andre eluert ved 14,8 minutter (77 prosent av innholdet). Det er for øvrig spor av et tredje pigment i ekstraktet (ved 12,7 minutter), men i svært små mengder. Ellers er det lite forurensinger i ekstraktet.

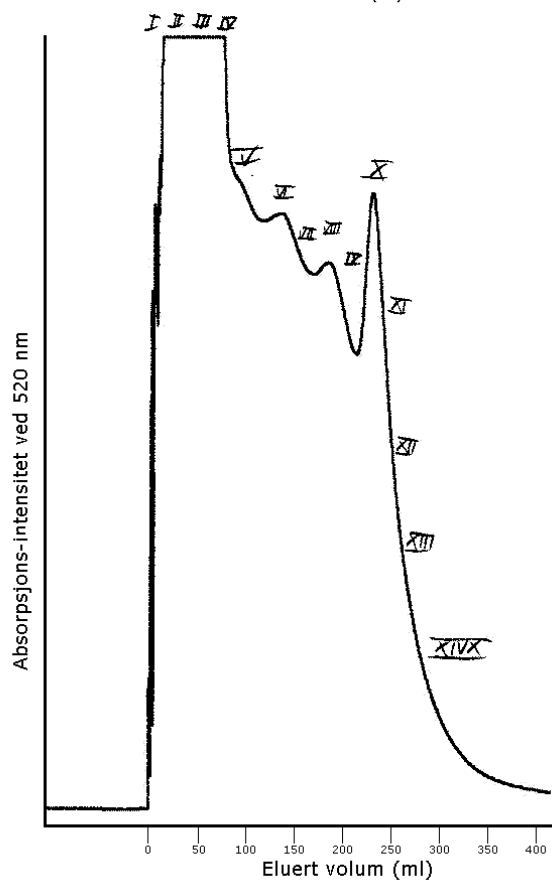
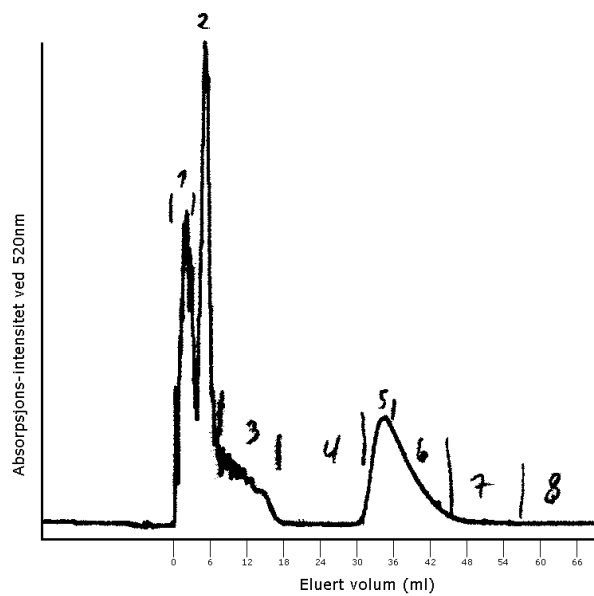


Figur 19: HPLC-analyse av ekstrakt fra svarthyll (*Sambucus nigra*)

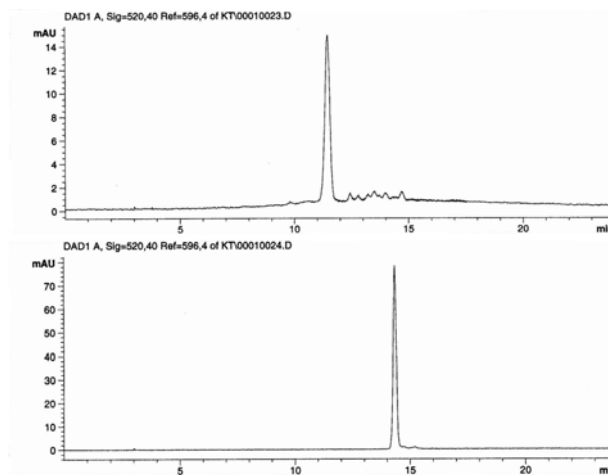
### 6.2 HSCCC-analyse av ekstrakt fra svarthyll

Det tørkede, rensede ekstraktet av pigment fra svarthyll ble analysert på HSCCC med både analytisk og preparativ kolonne (beskrevet i kapitlene 5.7 og 5.8).

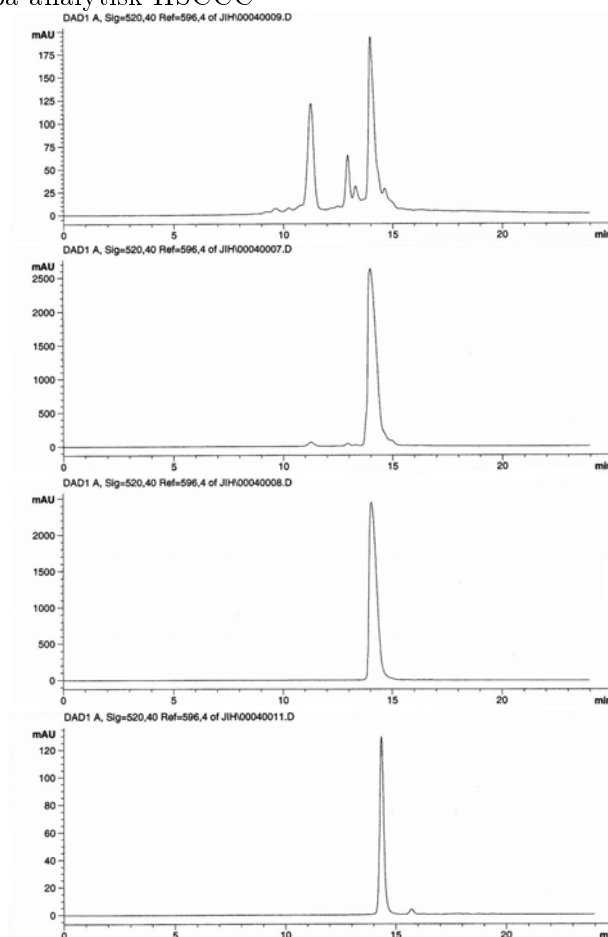
Kromatogrammet for den analytiske analysen (figur 20, øverst) viser et forholdsvis god separasjon av de to pigmentene i ekstraktet. Det ble tatt fraksjoner på omtrent 5 minutter for begge kolonner. En del av disse fraksjonene ble analysert på HPLC for å identifisere pigmentet og vise renheten. HPLC-kromatogrammene øverst i figur 22 viser fraksjonene 1 og 3. I fraksjon 1, ser vi et pigment bli eluert ved 11,5 minutter, ellers en rekke små topper



Figur 20: Kromatogram fra HSCCC-analyse av svarthyll (øverst: analytisk, nederst: preparativ)



Figur 21: HPLC-analyse av fraksjonene 1(øverst) og 3(nederst) fra analysen av svarthyll på analytisk HSCCC



Figur 22: HPLC-analyse av fraksjonene 2, 3, 4 og 14 (øverst til nederst) fra analysen av svarthyll på preparativ HSCCC

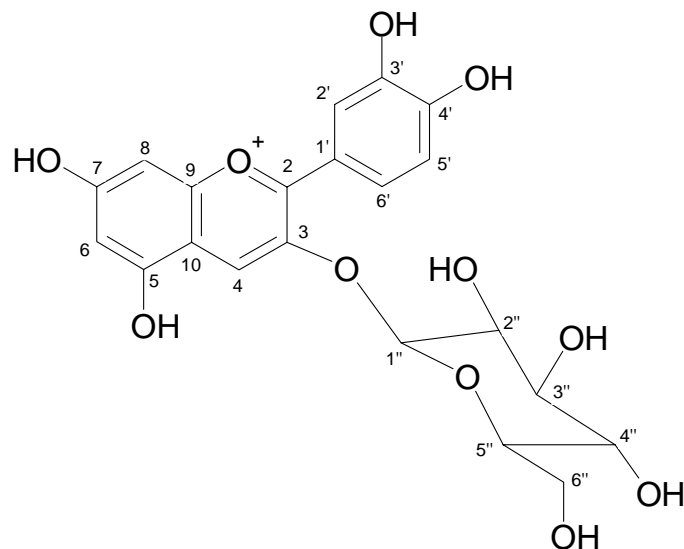
frem til 15 minutter. Kromatogrammet for fraksjon 3 viser at pigmentet eluert ved 14,4 minutter er svært rent. Alle de påfølgende fraksjonene (4 til 8) var identiske med fraksjon 3, alle inneholdt kun et pigment eluert ved 14,4 minutter ved analytisk HPLC.

Kromatogrammet for den preparative analysen (figur 20, nederst) viser en langt dårligere separasjon av de to pigmentene. Det virker som om systemet ikke er i stand til å separere så store mengder pigment. Fraksjoner på 1 minutt hver ble også her analysert på HPLC. (Se nederste fire kromatogrammene i figur 22)

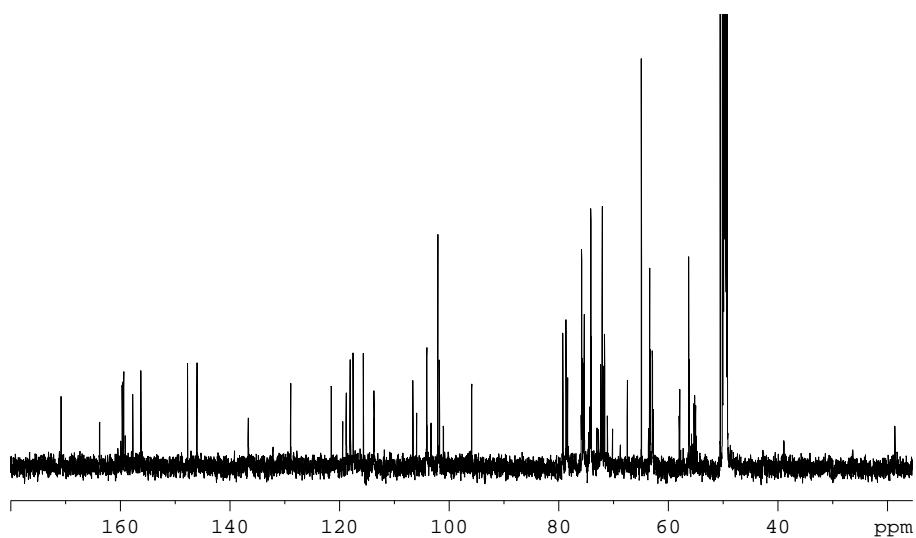
Kromatogrammet for fraksjon 2 viser en komplisert blanding av noe som ser ut til å være tre pigmenter, eluert ved henholdsvis 11,2 13 og 14,1 minutter. I tillegg ser man mindre topper ved 13,3 og 14,8 minutter. I kromatogram for fraksjon 3 er innholdet av pigmentet ved 14,1 minutter blitt svært stort. Små topper ved 11,2 og 13 minutter kan fremdeles bli sett. Sammenligner vi skalaen på y-aksen i fraksjon 2 og 3, ser vi at det bare er pigmentet ved 14,1 minutter som er blitt 15 ganger mer konsentrert mellom de to fraksjonene, de andre pigmentene er omtrent i samme konsentrasjon i de to fraksjonene. I kromatogrammet for fraksjon 4, ser vi at pigmentet ved 14,1 minutter er svært rent. De påfølgende fraksjonene frem til 13 er identiske, de inneholder store mengder av pigmentet ved 14,1 minutter, og ikke målbare mengder av andre. Kromatogrammet for fraksjon 14 viser en liten topp for et pigment ved 15,7 minutter som ikke er blitt observert i mine prøver tidligere. Fraksjonene 4 til 13 ble slått sammen, siden HPLC viste at innholdet av pigmenter var identisk.



### 6.3 NMR-analyse av cyanidin-3-glukosid



Figur 23: Struktur av cyanidin-3-glukosid, med posisjoner



Figur 24: <sup>13</sup>C-spekter av cyanidin-3-glukosid

#### 6.3.1 <sup>13</sup>C-spekteret

Karbon-spekteret er ved første øyekast vanskelig å tolke (se figur 24). Spektret inneholder veldig mange signaler, og det viste seg at flere av disse ikke

var reelle for denne prøven. Det kan tenkes at prøven ble tilsatt for lite TFA, og dermed at pigmentet gjennomgår likevektsreaksjoner (se figur 13) i det nær nøytrale miljøet i løsningen. Dette kan forklare hvorfor det i området 80-60ppm i karbon-spekteret var signaler inndelt i grupper på tre. Dette tyder på at likevektstilstander er tilstede i løsningen.

### 6.3.2 $^1\text{H}$ -spekteret

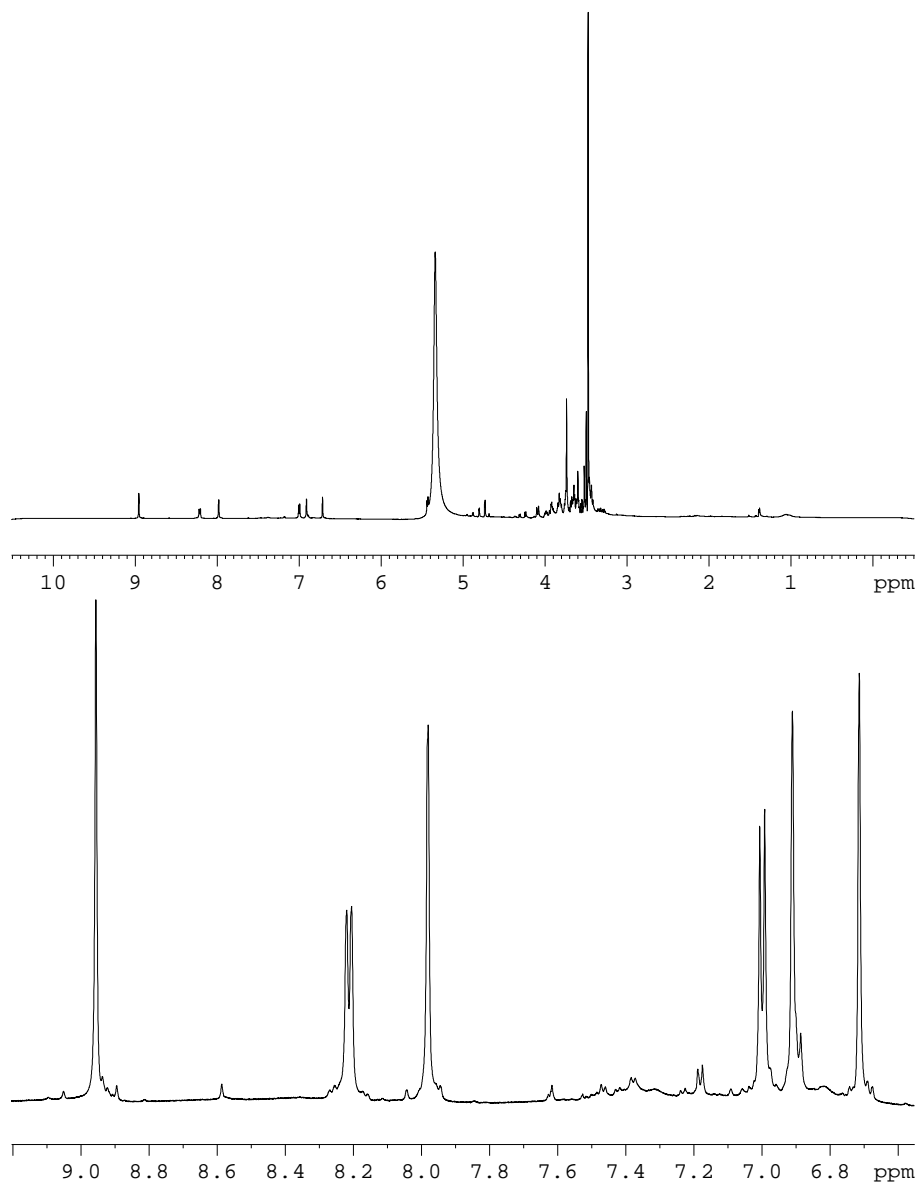
Proton-spekteret ble undersøkt, og man begynte med aglykon-delen (fra omtrent 6,5 til 9,0 ppm). (Se figur 25.) Her ble det observert 6 signaler, som tilsvarer de seks protonene i aglykonet. (Protonene i OH-gruppene var byttet ut med deuterium fra metanolen, og gav følgelig ikke noe utslag.) Ellers kan man se at prøven fremdeles inneholdt vann. Spesielt i sukker-området sees enkelte resonanser som ikke er reelle for denne prøven. For eksempel skulle ikke signalene mellom 4,5 og 5,0 ppm normalt finnes.

Tabell 7: Signaler i  $^1\text{H}$ -spekteret

Kjemisk skift	Form	Koblingskonstant
8,95 ppm	Singlett	
8,20 ppm	Dobbel dublett	8,5, 1,3
7,95 ppm	Dublett	1,3
7,00 ppm	Dublett	8,5
6,90 ppm	Dublett	1,9
6,70 ppm	Dublett	1,9

Det er tydelig at de tre signalene signalene ved 7,00, 7,95 og 8,20 ppm hører sammen. Signalene ved 7,00 og 7,95 ppm er begge dubletter, med henholdsvis koblingskonstantene 8,5 og 1,3 Hz. Signalet ved 8,20 ppm er en dobbel dublett, og med begge de to overnevnte koblingskonstantene. Derfor kobles signalene 7,00 og 8,20 ppm med hverandre, og 7,95 og 8,20 ppm med hverandre. Dette er et ABX-system, der koblingen 7,00-8,20 tydeligvis er en *orto*-kobling, og koblingen 7,95-8,20 er en *meta*-kobling. Dette kan stemme med B-ringen i aglykonet, dersom 5'-posisjonen er usubstituert, som ved f.eks. pelargonidin, cyanidin eller peonidin. Pelargonidin er imidlertid utelukket, siden man i det tilfellet ville observert signaler fra et hydrogen i 3'-posisjonen i spekteret. Og siden man også mangler signaler fra en  $\text{OCH}_3$ -gruppe i 3'-posisjon (som man ville hatt ved peonidin), har jeg klare indikasjoner på at det nettopp er spekteret av cyanidin vi ser.

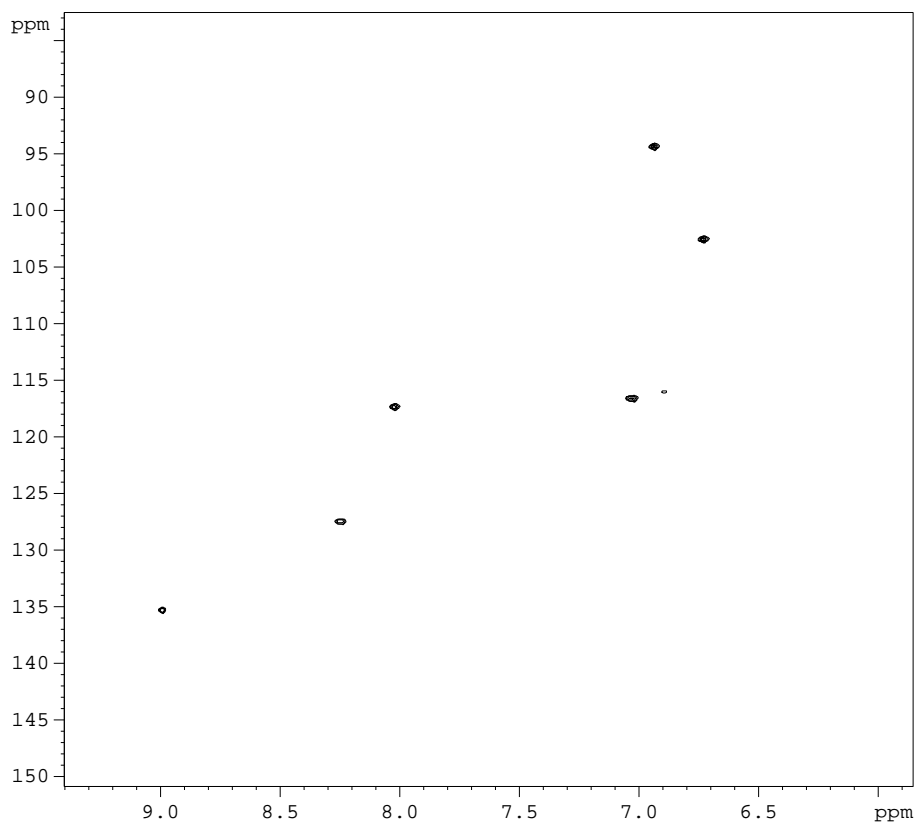
Videre ser vi at signalene ved 6,90 og 6,70 ppm kobler med hverandre. med koblingskonstanten 1,9 Hz. Dette tyder på å også være et ABX-system. Til slutt ser vi en kraftig singlett ved 8,95.



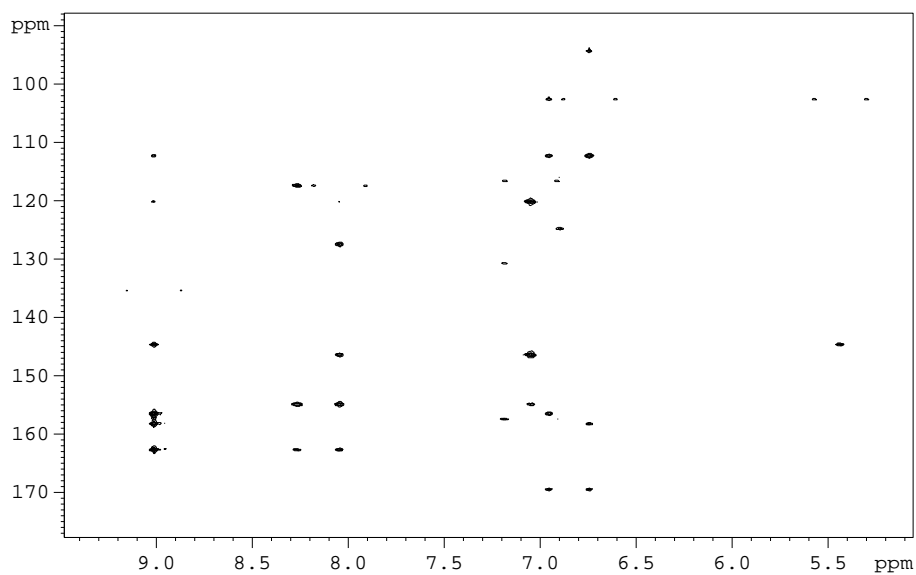
Figur 25: Øverst:  $^1\text{H-NMR}$  spekter av cyanidin-3-glukosid. Nederst: utsnitt fra  $^1\text{H}$ -spekter fra aglykon-regionen (6,7 til 9,1 ppm).

### 6.3.3 HSQC-spekteret, undersøkelsen av aglykon-regionen

HSQC-spekteret (se figur 26) ble brukt til å finne verdiene for karbonene der hydrogen var bundet. Man fant hydrogenskiftet langs x-aksen, og tilsvarende skift for karbon langs y-aksen.



Figur 26: HSQC-spekter, aglykon-regionen



Figur 27: HMBC-spekter av aglykon-regionen i cyanidin-3-glukosid

Tabell 8: Korresponderende skiftverdier for karbon og hydrogen

<b>Protonskift</b>	<b>Avlest karbonskift</b>
8,95 ppm	135,2 ppm
8,20 ppm	128,0 ppm
7,95 ppm	107,6 ppm
7,00 ppm	106,9 ppm
6,90 ppm	94,0 ppm
6,70 ppm	102,0 ppm

#### 6.3.4 HMBC-spekteret, undersøkelse av aglykon-regionen

HMBC-spekteret (se figur 27) gav oss, sammen med ROESY, nok informasjon til å strukturbestemme aglykondelen av antocyanet. HMBC-eksperimentet viser koblingene mellom proton og karbon gjennom flere bindinger. Enbindingskoblinger ( $^1J_{CH}$ ) vises som svake dubletter i spekteret, mens flerbindingskoblinger ( $^2J_{CH}$ ,  $^3J_{CH}$ ) vises som singletter. Bare i visse tilfeller kan man se koblinger over 4 bindinger.

8,95-protonet viste syv koblinger, derav kunne man se på det kjemiske skift at fire av signalene (145,4, 157,0, 159,0 og 163,0 ppm) var karboner bundet til oksygen. Signalet ved 135,2 ppm var en dublett ( $^1J_{CH}$ ) og de to siste signalene ved 112,5 og 120,5 ppm hadde betydelig lavere kjemisk skift. Disse to siste karbonene hadde ingen enbindingskoblinger, og var da kvartenære. Sammenligner vi med  $^1H$ -spekteret, ser vi at protonet på 8,95 ppm er en singlett, sammen med signalene på 6,90 og 6,70 ppm. Disse tre signalene stemmer med posisjonene 4, 6 og 8 på aglykonet. Siden bare protonet i 4-posisjon kan ha koblinger til fire karboner bundet til oksygen, har vi bekreftet at dets kjemiske skift må være 8,95 ppm. Det eneste kvartenære karbon som både protonene 4, 6 og 8 kobler til, er karbonet i 10-posisjon. Dette har kjemisk skift 112,5 ppm. Videre har det siste kvartenære karbonet ikke koblinger til protonene 6 eller 8, som plasserer det i den andre delen av molekylet. Det eneste alternativet er karbonet i 1'-posisjon. Dette har kjemisk skift 120,5 ppm.

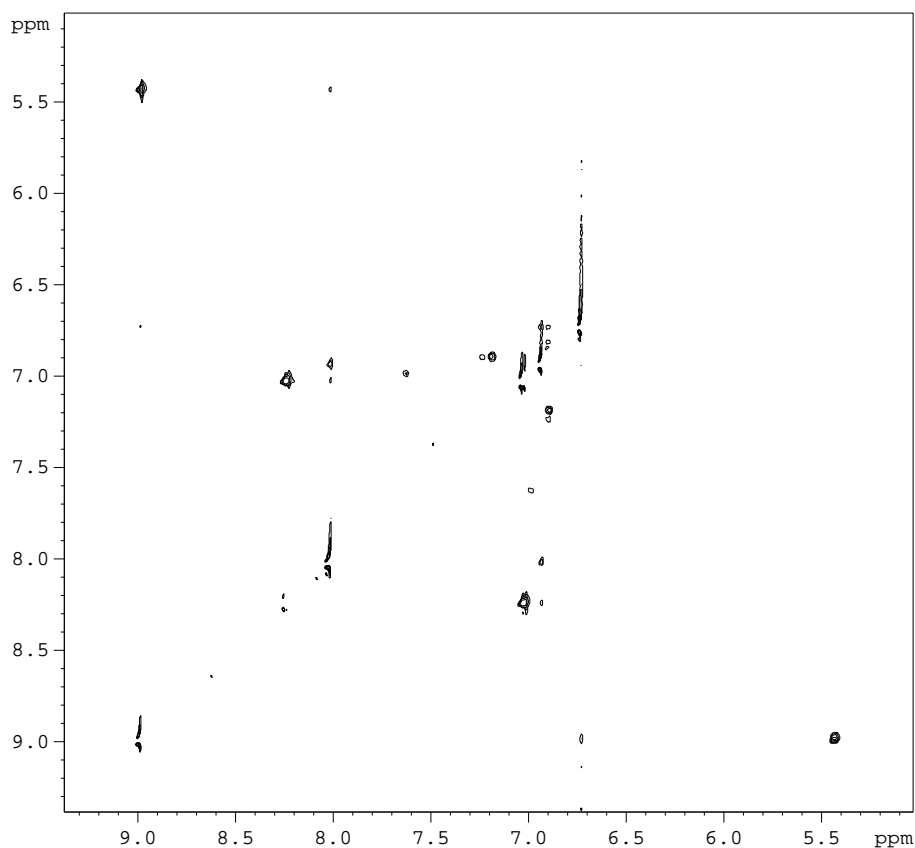
De to protonene i 6-og 8-posisjon har mange like signaler, men med visse forskjeller. 8-protonet kobler ikke med 5-karbonet, og 6-protonet kobler ikke med 9-karbonet. Og ved å sammenligne deres kjemiske skift, kan vi fastsette identiteten deres. 8-protonet har et miljø som trekker skiftet nedover, mens 6-protonet, som ligger mellom to hydroksyl-grupper, trekkes oppover. Derfor kan vi fastsette 8-protonet til 6,90 ppm og 6-protonet til 6,70 ppm. Og siden de to protonene kobler til hvert sitt karbon bundet til oksygen, vil det følge at vi vet de kjemiske skiftene til karbonene i 9-og 5-posisjon (henholdsvis 157,0 og 159,0 ppm). Ellers kobler de to protonene til et felles karbon bundet til oksygen, og da vet vi også skiftet til karbonet i 7-posisjon.

Om vi nå undersøker signalene fra 1'-karbonet, ser vi at det, i tillegg til

koblingen til 9-protonet, kobler til tre nye protoner, nemlig de i 2', 5' og 6'-posisjon. Ut fra  $^1\text{H}$ -spekteret, har vi to dubletter og en dobbel dublett. Det er klart at 2' og 5' ikke har mulighet til å koble med hverandre, mens 6' kan koble med begge, og da med en 4-bindingskobling til 2', noe som forklarer formen på  $^1\text{H}$ -signalet. Derfor vet vi det kjemiske skift til 6'-protonet (8,20 ppm). Dette blir også bekreftet ved at 6' ikke kobler med et av de oksygenbundne karbonene, mens de 2'-og 5'-protonene kobler med begge. Derfor har vi også bekreftet de kjemiske skiftene til karbonene 3' og 4' også, henholdsvis 146,5 og 155,0 ppm.

### 6.3.5 ROESY-spekteret

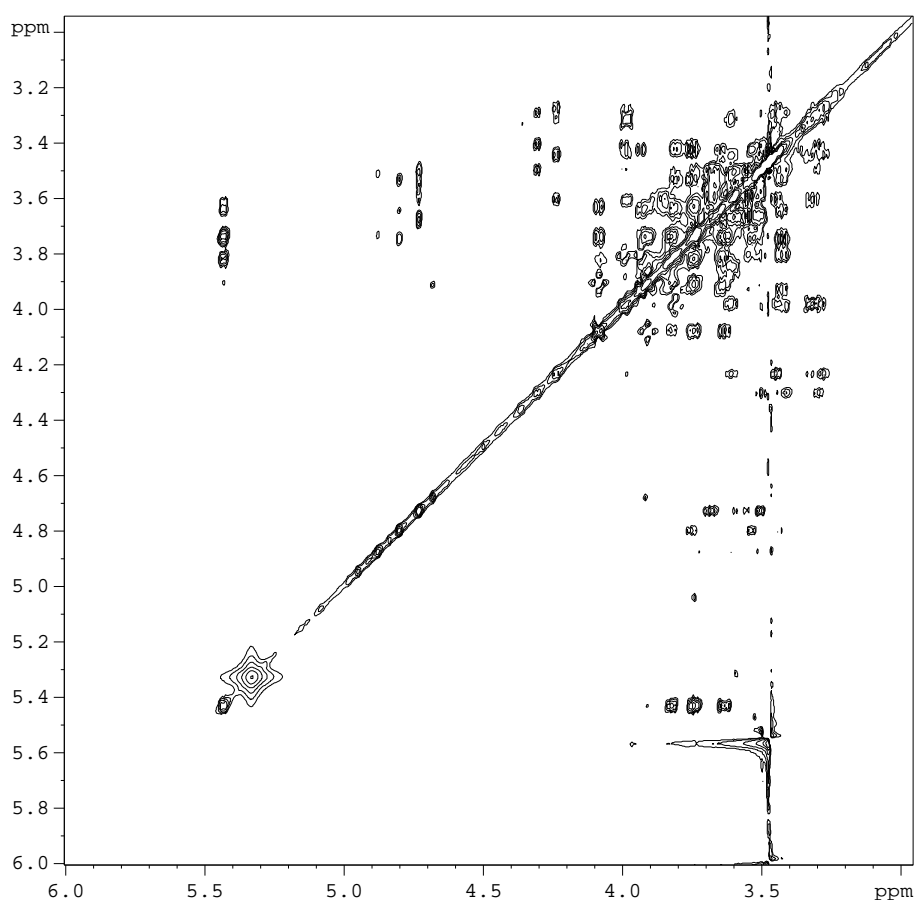
ROESY-eksperimentet (figur 28) viste en tydelig NOE-effekt mellom 5'-og 6'-protonene, noe som gjør oss i stand til å skille mellom signalene fra 2' og 5'. Det var også et tydelig signal ved 5,45 ppm og 8,95 ppm, noe som bekrefter posisjonen til sukkergruppen i 3-posisjon. (NOE-effekt mellom 4-protonet og 1"-protonet i sukkergruppen).



Figur 28: ROESY-spekter av aglykon-regionen

### 6.3.6 TOCSY-spekteret

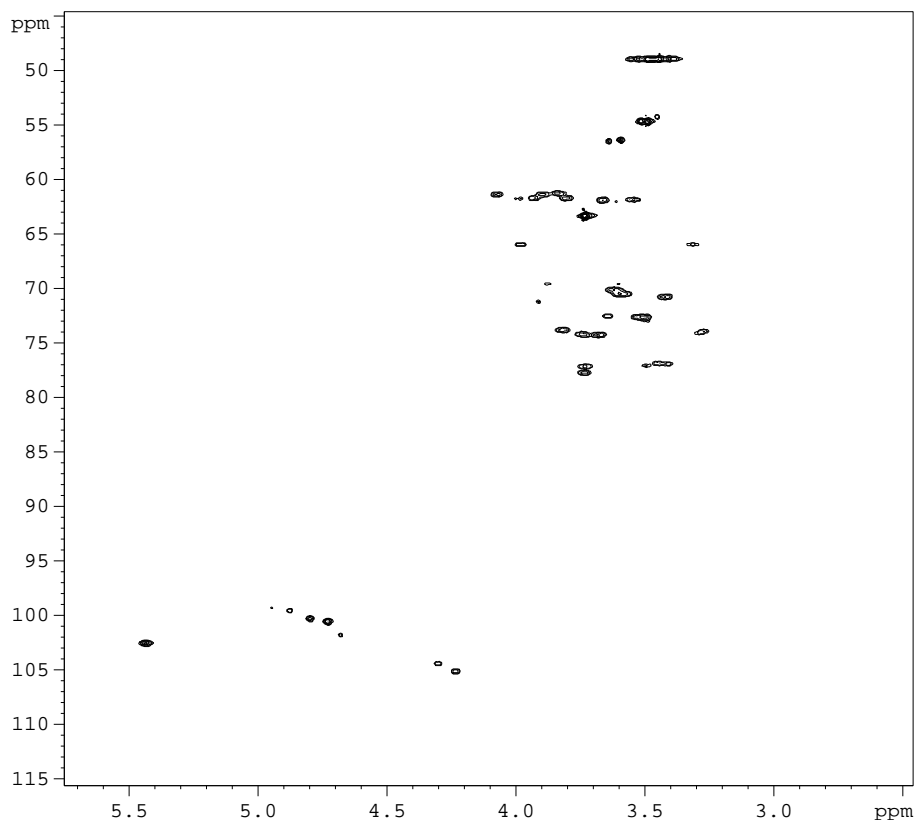
TOCSY-spekteret (figur 29) ble undersøkt for å finne skiftverdiene til protonene i sukkeret. Man gikk ut fra 'anomer'-signalet ved 5,45ppm, og lette etter koblinger til denne. Her ble det avlest følgende verdier: 3,60ppm, 3,64ppm, 3,74ppm, 3,82ppm og 3,92ppm. Det sistnevnte signalet var svært svakt, og det kunne tenkes at dette kunne være koblingen til hydrogenet i 6''-posisjon. Når man så gikk ut fra signalet ved 3,92ppm, kunne man se en 2-bindingskobling til et signal ved 4,07 ppm. Da har jeg funnet de to protonene i 6''-posisjon, de har forskjellig skift-verdier på grunn av deres prokirale posisjon.



Figur 29: TOCSY-spekter av sukker-regionen

### 6.3.7 HSQC-spekteret, undersøkelse av sukker-regionen

HSQC-spekteret (figur 30) ble undersøkt igjen, denne gang for å finne skiftverdiene til karbonene i sukker-delen. Her ble antagelsen om signalene ved 4,07ppm og 3,92ppm bekreftet: begge protonene var bundet til samme karbon.



Figur 30: HSQC-spekter av sukker-regionen

Tabell 9: Korresponderende skiftverdier for karbon og hydrogen

<b>Protonskift</b>	<b>Avlest karbonskift</b>
5,45 ppm	102,5 ppm
4,07 ppm	61,6 ppm
3,92 ppm	61,6 ppm
3,82 ppm	73,8 ppm
3,74 ppm	77,9 ppm
3,65 ppm	72,6 ppm
3,60 ppm	70,2 ppm



### 6.3.8 Sammendrag av NMR-analysen

Ut fra spektrene, og da spesielt  $^1\text{H}$ -spekteret og HMBC-spekteret, lot det seg gjøre å strukturbestemme aglykondelen i molekylet. Sukker-delen av molekylet var som nevnt noe forurenset, og var noe vanskeligere å få en klar strukturbestemmelse av. Men cyanidin-3-glukosid er et pigment som er blitt undersøkt tidligere, og mine verdier (tabell 10) tilsvarer verdier ved tidligere arbeider [31].

Tabell 10: Skiftverdier til protoner og karboner i cyanidin-3-glukosid

Posisjon	Protonets kj. skift	Karbonets kj. skift
Cyanidin		
2		163,0 ppm
3		145,4 ppm
4	8,95 ppm	135,2 ppm
5		159,0 ppm
6	6,70 ppm	102,0 ppm
7		170,0 ppm
8	6,90 ppm	94,0 ppm
9		157,0 ppm
10		112,5 ppm
1'		120,5 ppm
2'	7,95 ppm	107,6 ppm
3'		146,5 ppm
4'		155,0 ppm
5'	7,00 ppm	106,9 ppm
6'	8,20 ppm	128,0 ppm
O- $\beta$ -Glukopyranosid		
1''	5,45 ppm	102,5 ppm
2''	3,82 ppm	73,8 ppm
3''	3,65 ppm	72,6 ppm
4''	3,60 ppm	70,2 ppm
5''	3,74 ppm	77,9 ppm
6A''	4,07 ppm	61,6 ppm
6B''	3,92 ppm	61,6 ppm

## 6.4 Undersøkelse av hvordan temperatur innvirker på hydrolyse av utvalgte antocyaner

Som forklart i kap. 5.11, ble syv kapillær-rør fylt med en løsning av antocyaner fra jordbær og solbær. Første parallell ble ikke hydrolysert, og skulle fungere som referanse ved undersøkelse på TLC-plate.

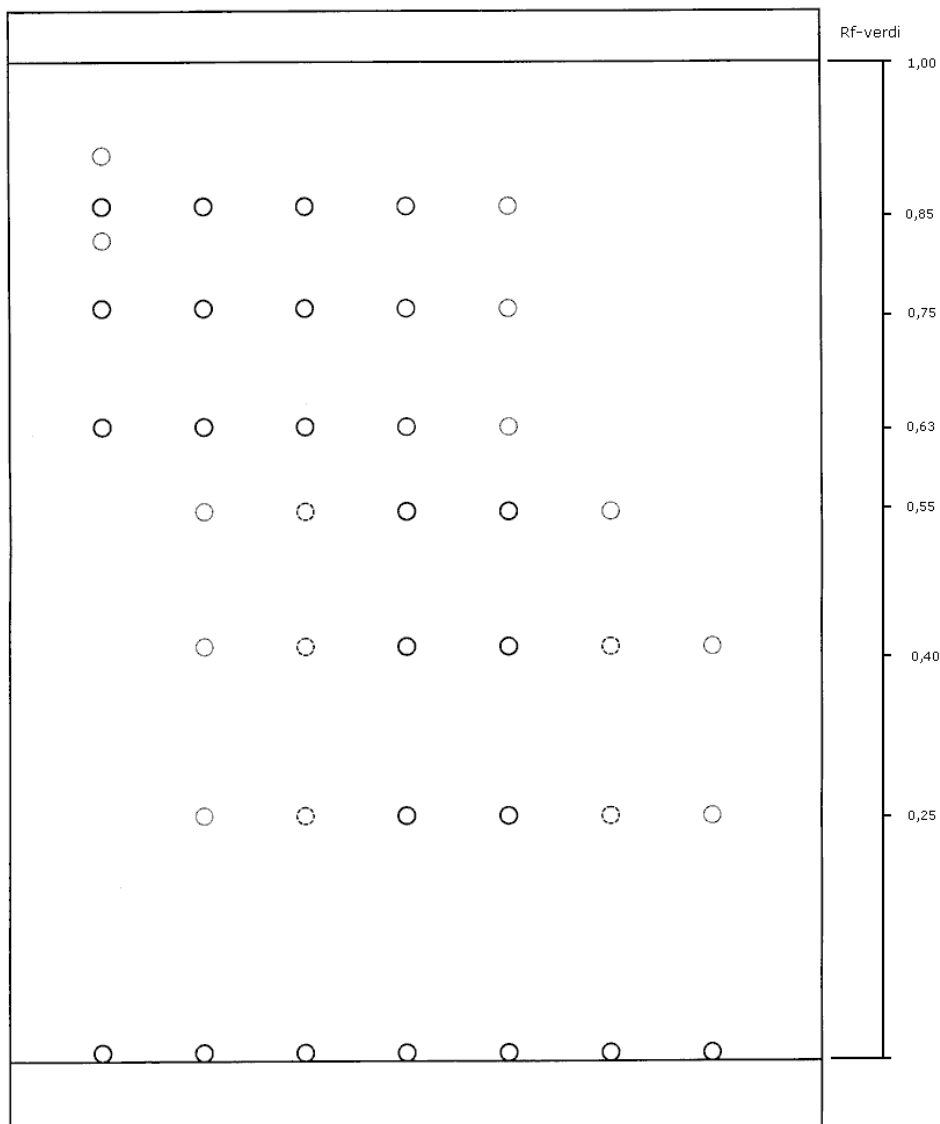
Tabell 11: De syv parallellene ved undersøkelse av hydrolysetid

Parallell nr.	Hydrolysetid
1	Ingen hydrolyse
2	5 minutter
3	10 minutter
4	20 minutter
5	40 minutter
6	80 minutter
7	160 minutter

De syv kapillær-rørene ble applikert på TLC-platen, og satt i et kar med FHW (10:1:3). I dette systemet vandrer de polare pigmentene fortere og lengre enn de upolare. Dette betyr at aglykonene vil komme kortest på platen, monoglukosider noe lenger, og di- og triglukosider vil komme lengst. Enkelte pigmenter var vanskelig å påvise på TLC-platen, noe som skyldes at enkelte pigmenter var kun til stede i små mengder. Figur 31 viser en idealisert skisse av TLC-platen, samt avleste  $R_f$ -verdier. Man sammenlignet verdier med tidligere analyser [24] for å identifisere pigmentene.

Parallell 1 (ikke hydrolysert) inneholdt ingen aglykoner som forventet, bare tydelige spor av monoglukosider og enkelte diglukosider. Parallell 2 (5 minutter) og 3 (10 minutter) inneholdt bare svake spor av aglykoner. Parallell 4 (20 minutter) inneholdt mye aglykoner, men også mye av de ikke hydrolyserte antocyanene. Parallell 5 (40 minutter) hadde svært mye av aglykonene, og bare mindre rester av de ikke hydrolyserte antocyanene. Parallell 6 (80 minutter) inneholdt bare aglykoner, men i noe mindre mengder. Parallell 7 (160 minutter) inneholdt bare svake spor av aglykoner, og ingen spor av de ikke hydrolyserte antocyanene.

Dersom målet er å få hydrolysert alle spor av pigmenter i prøven, og samtidig ta vare på aglykonene dannet, ender man opp med en hydrolysetid på omtrent 60 minutter, 2M saltsyre og en temperatur på 95°C.



Figur 31: Idealisert skisse av TLC-plate for undersøkelsen av hvordan tid og temperatur påvirker betingelser for hydrolyse. Parallellene er påført platen fra 1 til 7 i stigende rekkefølge fra venstre. Parallellene har økende eksponering for varme som følger: 1) Ingen oppvarming, 2) 5 minutter, 3) 10 minutter, 4) 20 minutter, 5) 40 minutter, 6) 80 minutter, og 7) 160 minutter.  $R_f$ -verdier avlest fra platen tegnet inn på skala. Verdiene fra dette forsøket tilsvarer verdier for tidligere undersøkelser [24]. Delfinidin ved 0,25, petunidin og cyanidin ved 0,40, malvidin, peonidin og pelargonidin ved 0,55. Delfinidin-3-glukosid ved 0,63. 3-glukosider av petunidin og cyanidin ved 0,75. 3-glukosider av malvidin og pelargonidin, samt 3-rutinosider av delfinidin og cyanidin i området 0,75 til 0,90.

## 6.5 Hydrolyse av utvalgte antocyaner i stor skala

Som beskrevet i kap. 5.13, ble løsningen med antocyanene fra jordbær og solbær overført til en åpen kolbe, og tilsatt saltsyre til 2M HCl. Denne blandingen fikk så stå i varmeskap ved 95-100°C i 60 minutter. Etter filtrering i glassull, ble en liten prøve satt på TLC-plate. Denne testen viste at det var store mengder aglykon tilstede i løsningen, og en svært liten mengde ikke hydrolisert antocyan tilstede. Det mest påfallende var en stor brunsvart flekk på TLC-platen, med  $R_f$ -verdi omtrent 0,85. Løsningen luktet også karamellisert sukker, og det er mulig at denne flekken var nettopp dette. Ingen videre tester ble utført.

## 6.6 Forsøk på ekstraksjon av antocyanidiner etter hydrolyse

Forskjellige metoder (beskrevet i kap. 5.14) for å utvinne aglykonene ut fra hydrolyseløsningen ble utprøvd.

Partisjonering med etylacetat ble forsøkt, fordi eventuelle aglykon ville løst seg i den mer upolare etylacetat-fasen. Det viste seg å være vanskelig å skille de to fasene, da begge var farget rødbrunt. I tillegg ble det utfelt et brun-svart materiale. Prøver tatt fra begge faser ble undersøkt på TLC, og det viste seg at metoden ikke var særlig god. Det var altfor lite aglykoner i fasen med etylacetat, og å utføre ekstraksjonen 5-10 ganger ble ikke ansett som særlig praktisk. Spesielt med tanke på at løsningen med aglykon ble utsatt for varme og fiendtlige omgivelser i lengre tidsperioder.

Ekstrahering med andre løsemidler ble også utprøvd. Butanol og di-etyleter var mulige ekstraksjonsmedier, men ble forkastet da jeg ikke klarte å få ekstrahert særlige mengder av aglykon fra løsningen.

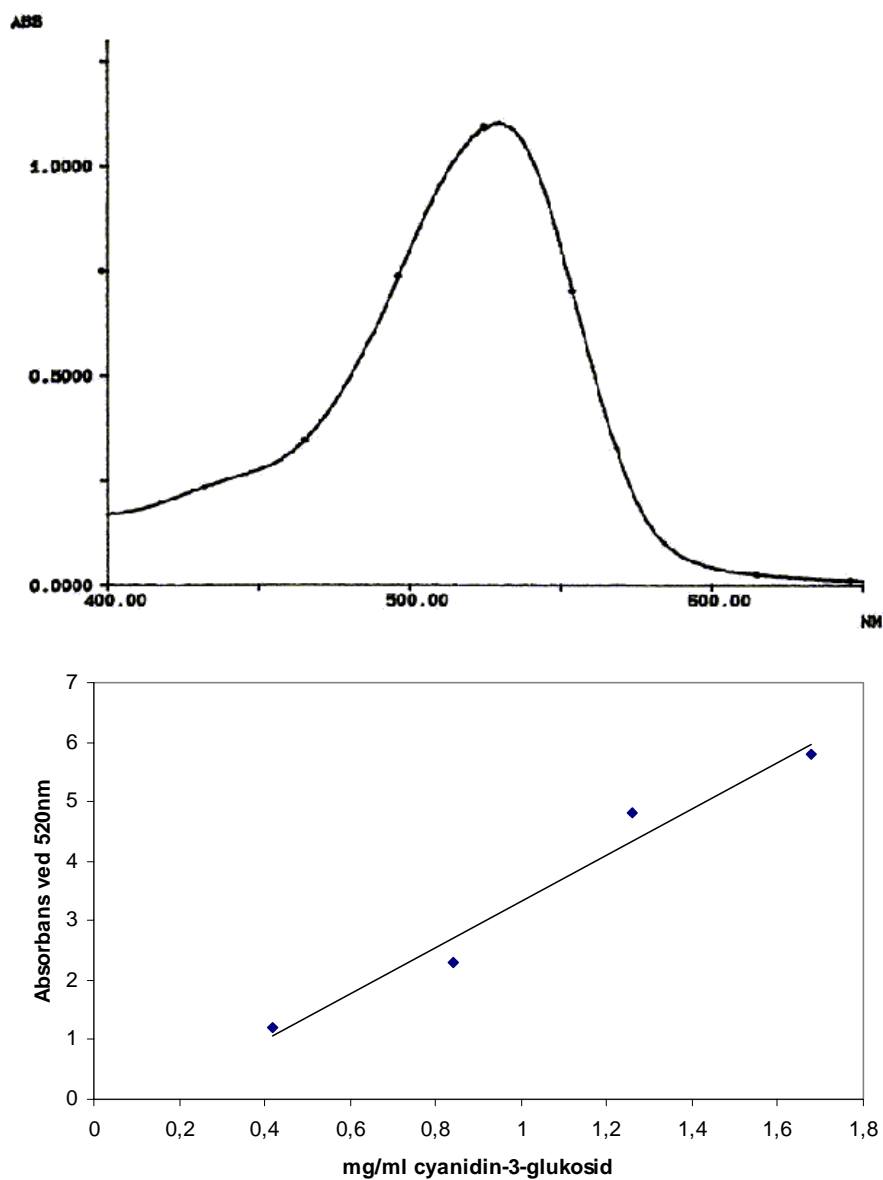
Propanol og isopropanol danner som kjent ikke noe tofasesystem med vann, men i blanding med etylacetat syntes de å være et alternativ til de enkle systemene utprøvd tidligere. En blanding av 2:3:5 med henholdsvis isopropanol, etylacetat og hydrolyseløsning var faktisk vellykket. Denne metoden var i stand til å hente ut aglykonene ut fra den vandige hydrolyseløsningen langt mer effektivt enn rent etylacetat.

Jeg ble på dette tidspunktet klar over at mengden aglykoner i den lagrede hydrolyseløsningen begynte å synke. Tre dager etter varmebehandlingen, var det ikke lenger mulig å påvise aglykoner på TLC-tester.

Det virker som om pigmentene ikke tåler miljøet under og etter syrehydrolysen. Jeg konkluderer med at en ny teknikk er nødvendig for å holde pigmentene intakte frem til en eventuell isolasjon kan forekomme. Da man vet at antocyaner og spesielt aglykoner er sårbare overfor vannets nukleofile angrep på karbonet i 2-posisjon, trenger man et medium med mindre vann for å bevare pigmentene. For enkelhets skyld er det også ønskelig at hydrolysen også kan utføres i dette mediumet.

## 6.7 Undersøkelse av absorbans-spektre av antocyaner

UV/VIS-spektre ble tatt av cyanidin-3-glukosid ved forskjellige konsentrasjoner: 0,186mg/ml, 0,126mg/ml, 0,084mg/ml og 0,042mg/ml. Absorbans ved 530nm ble avlest og plottet mot konsentrasjon (se figur 32).



Figur 32: Øverst: Absorpsjons-spekter av cyanidin-3-glukosid. Nederst: absorbans ved 520nm avhengig av konsentrasjon

Vi ser det er en lineær sammenheng mellom absorbans i UV-spekteret og

konsentrasjon av pigmentet vårt, om enn på et noe svakt statistisk grunnlag. Usikkerheten i målingene viser seg å være store, noe som kan skyldes både fortynnings-arbeidet, usikkerhet i instrumentet og bruken av kyvetter med mindre tykkelse underveis.

Det som ble oppnådd her, var å finne et område i konsentrasjon der UV/VIS-spektrofotometeret fungerer, og da helst uten å måtte ty til tynnere kyvetter for å få avlest absorpsjonskurver. Skal man dømme fra mine resultater, bør konsentrasjon av antocyaner holdes lavere enn 1mg/ml for å få gode resultater ved bruk av vårt instrument.

## 6.8 Undersøkelse av mulige løsemidler for hydrolyse av antocyaner

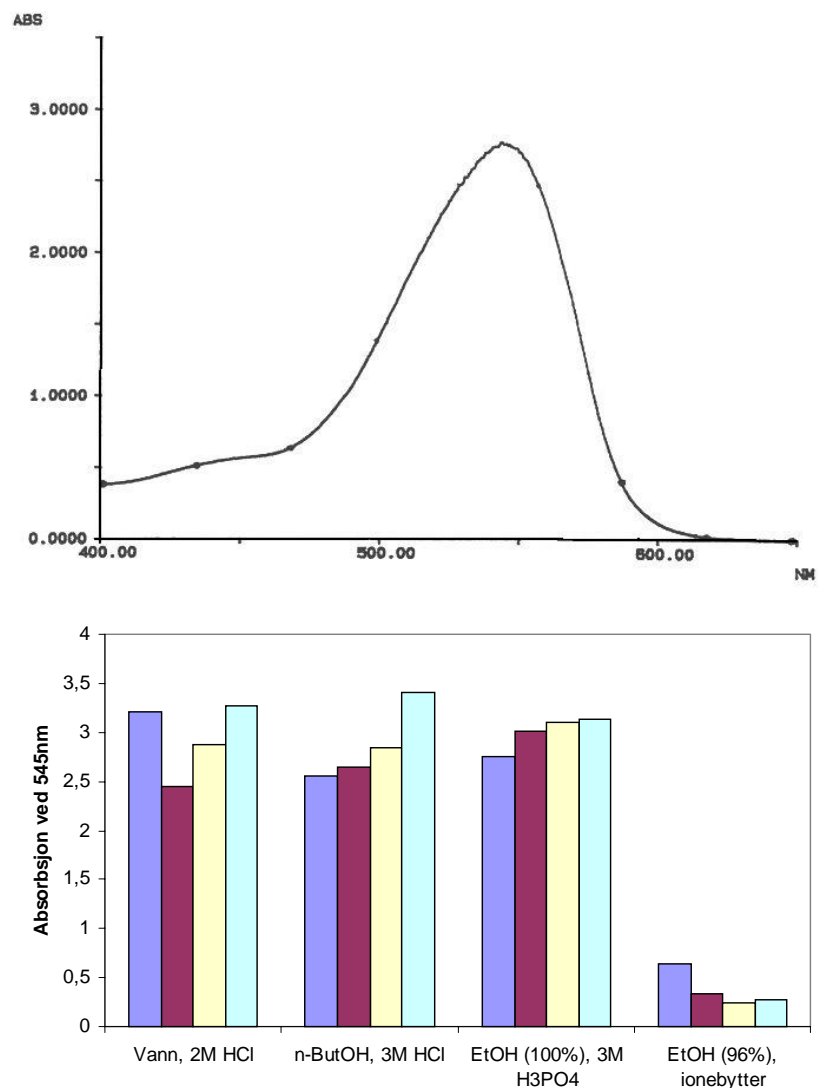
I dette eksperimentet ble fire løsemidler og miljøer undersøkt, for å finne det mest egnede for hydrolyse av antocyaner. Konsentrasjon av antocyan ble holdt på 3,3mg/ml under hydrolyse, og fortynnet 25 ganger før absorpsjonsspektre kunne tas. Dette ble gjort for å holde oss innenfor deteksjonsgrensene til spektrofotometeret.

Dersom man sammenligner spektrene i figurene 33 og 32, ser man en viss forskjell i  $\lambda_{max}$ . Der absorpsjonsmaksimum lå ved 530nm for cyanidin-3-glukosid, er den omtrent 545nm for aglykonet cyanidin i dette eksperimentet. Grunnen til dette *bathokromiske skiftet* er i hovedsak at forbindelsen har et annen substituent, samt et skifte av løsemiddel.

Om vi nå sammenligner de fire løsemidlene i eksperimentet, ser vi lett at å erstatte syre med en sur ionebytter ikke er en særlig god løsning. Man kunne se med det blotte øye at pigmentet ble adsorbent inn i ionebyttermaterialet, noe som forklarer de lave verdiene ved måling av UV-absorpsjon (figur 33). Når en liten mengde syre ble forsøkt tilsatt løsningen, ble noe av pigmentene frigjort fra materialet.

De tre andre løsemidlene viser ikke bare gode vilkår for hydrolyse, men også for lagring av aglykonene dannet i hydrolysen. En viss økning av absorpsjon i spektrene ble observert etterhvert, noe som kan skyldes feil ved fortynningsarbeidet, feil ved opptak av spektre, eller eventuelt at reaksjonen mellom antocyan og syre fortsatt foregår i løsningen. Dette er spesielt tydelig ved bruk av n-butanol/saltsyre som løsemiddel.

Skal man tvinges til å velge mellom disse tre løsemidlene, vil jeg først eliminere bruken av n-butanol/saltsyre som hydrolysemiljø. Denne alkoholen vil være betydelig vanskeligere å få fjernet fra løsningen ved inndamping, siden n-butanol har et høyt kokepunkt (over 117°C ved atmosfærisk trykk). Etanol vil ha det laveste kokepunktet (omtrent 78°C). Vann bør også elimineres dersom man skal ta hensyn til at vann kan angripe aglykonet, selv om dette forekommer i liten grad ved lave pH-verdier. I tillegg er vann også vanskeligere å fjerne ved inndamping på rotavapor, da det koker ved 100°C ved atmosfærisk trykk.



Figur 33: Øverst: Absorpsjons-spekter av cyanidin. Nederst: de fire løsemidlene, målt etter 0, 4, 24 og 72 timer

Valgt ut fra rent praktiske hensyn, vil nok etanol/fosforsyre være et miljø som må undersøkes nærmere, siden det både egner seg til hydrolyse, og også enkelt kan fjernes senere i prosessen.

## 6.9 Fullt faktorforsøk, undersøkelse av betingelser for syrehydrolyse av antocyan

Siden etanol/fosforsyre ble ansett å være et egnet løsemiddel til hydrolyse av antocyaner. Derfor ble det utført et fullt faktorforsøk, der variabler som

temperatur, tid og syrekonsentrasjon ble undersøkt nærmere.

Det ble laget åtte paralleller, som hver bestod av cyanidin-3-glukosid tilsvarende 0,07mg/ml. Det ble laget to forskjellige løsemidler, men henholdsvis 3 og 6M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . De åtte parallellene ble så utsatt for forskjellige hydrolysemiljøer som følger i tabell 12.

Tabell 12: Variablene brukt i faktorforsøket

Variabel	Lav verdi	Høy verdi
Temperatur ( $X_1$ )	90°C	150°C
Tid ( $X_2$ )	50 minutter	100 minutter
Syrekonsentrasjon ( $X_3$ )	3M $\text{H}_3\text{PO}_4$	6M $\text{H}_3\text{PO}_4$

Tabell 13: Resultat faktorforsøket

	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_1X_2$	$X_1X_3$	$X_2X_3$	$X_1X_2X_3$	Produkt
1	-	-	-	+	+	+	-	1759
2	-	-	+	+	-	-	+	2749
3	-	+	-	-	+	-	+	2014
4	-	+	+	-	-	+	-	2419
5	+	-	-	-	-	+	+	2447
6	+	-	+	-	+	-	-	2790
7	+	+	-	+	-	-	-	2046
8	+	+	+	+	+	+	+	1226

Etter endt hydrolyse, ble  $15\mu\text{l}$  av løsningen injisert på analytisk HPLC, og arealet av toppen som tilsvarer aglykonet ble avlest. Utvalgte prøver ble undersøkt på nytt etter tre dager og etter en uke, for å undersøke løsemidlets evner som lagringsmedium.



### 6.9.1 Beregninger fra fullt faktorforsøk

$b_0 =$	2195
Hovedeffekter:	
$b_1 =$	-40,25
$b_2 =$	-268,75
$b_3 =$	101
Samspillseffekter:	
$b_{12} =$	-250
$b_{13} =$	-247,75
$b_{23} =$	-204,75
$b_{123} =$	-58,5

Variablene ble beregnet ut fra tabell 13, og kom frem til følgende konklusjon: Det kan virke som om responskurven er krummet, og vi har samspillseffekter som virker annerledes enn først antatt. Syre ser ut til å ha en jevnt over positiv effekt ( $b_3$ ), og kan antas å virke stabiliserende på aglykonet. Varmetid ser ut til å virke svært negativt ( $b_2$ ), mens effekten av temperatur ser ut til å variere noe.

### 6.9.2 Visuell vurdering av kromatogrammene fra HPLC

(Figurene 34 og 35 viser de nevnte kromatogrammene.)

Kromatogram 1 (- - -): Helt klart ikke fullstendig hydrolyse, siden man ser en stor rest av cyanidin-3-glukosid tilstede.

Dette miljøet kan være egnet dersom man ikke ønsker en fullstendig hydrolyse, og vil ha både aglykon og antocyan til stede i løsningen samtidig.

Kromatogram 2 (- - +): Tegn på nær fullstendig hydrolyse, siden det bare er en liten rest igjen av toppen for antocyanet.

Svært mye aglykon dannet i forhold til parallell 1.

Kromatogram 3 (- + -): Tegn på nær fullstendig hydrolyse, også her en liten rest igjen av toppen for antocyanet.

Litt mindre aglykon i forhold til parallell 2, men mer enn i parallell 1.

Kromatogram 4 (- + +): Fullstendig hydrolyse.

Ikke målbare mengder av antocyanet tilstede, mye aglykon dannet.

Kromatogram 5 (+ - -): Nær fullstendig hydrolyse, bare en antydning av antocyanet tilstede i løsningen.

Mye aglykon dannet.

Kromatogram 6 (+ - +): Nær fullstendig hydrolyse, bare en antydning av antocyanet tilstede i løsningen.

Svært mye aglykon dannet.

Kromatogram 7 (+ + -): Fullstendig hydrolyse, ingen rest av antocyanet igjen i løsningen.

Mengen av aglykon i løsningen er tilfredsstillende.

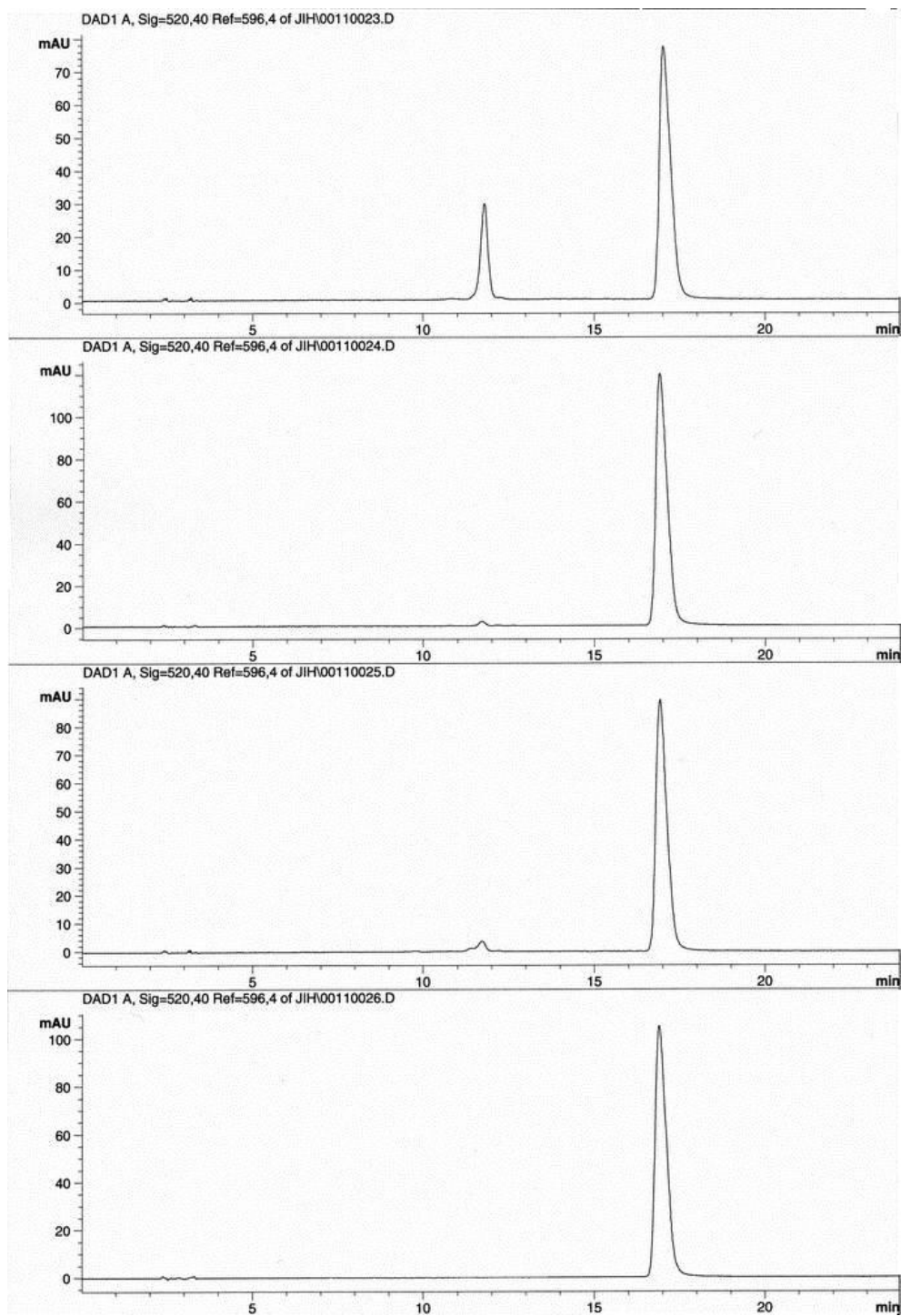
Kromatogram 8 (+ + +): Fullstendig hydrolyse, ingen rest av antocyanet igjen i løsningen, men innholdet av aglykonet er også lavt.

Det kan virke som om dette miljøet er svært aggressivt for de dannede aglykonene.

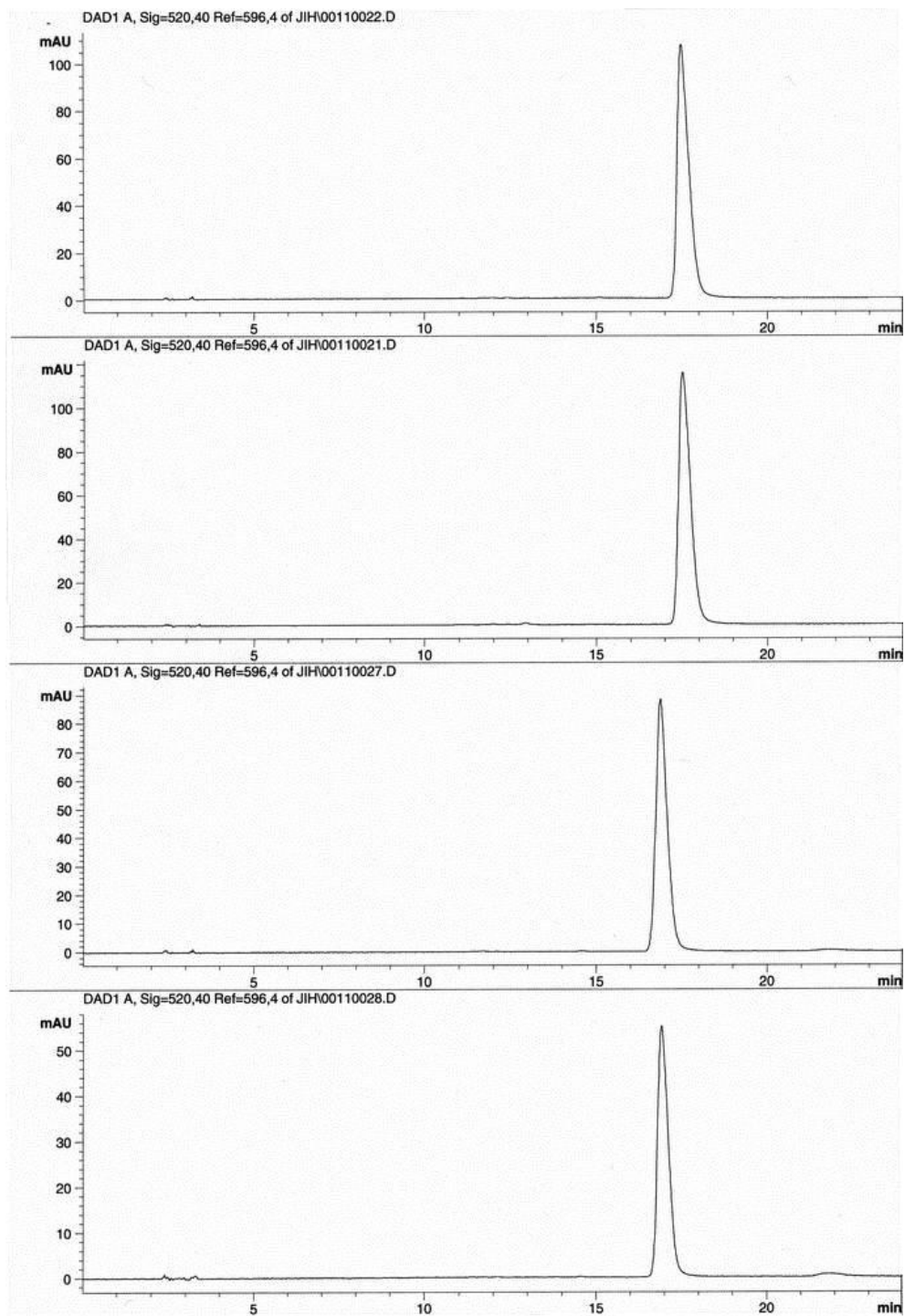
### 6.9.3 Effekten av lagring av aglykoner

Parallellene 4 og 5 ble valgt ut, fordi disse hadde svært likt innhold av aglykon og liten rest av antocyanet. Det som i hovedsak skilte disse to parallellene fra hverandre, var løsemidlet. Parallell 4 hadde svak syre (3M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), mens parallell 5 hadde sterk syre (6M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Det ble injisert  $15\mu\text{l}$  på HPLC fra hver av de to løsningene etter tre og syv dager. Ved å sammenligne kromatogrammene, kan man se hvordan syremengden påvirker lagringsevnen.

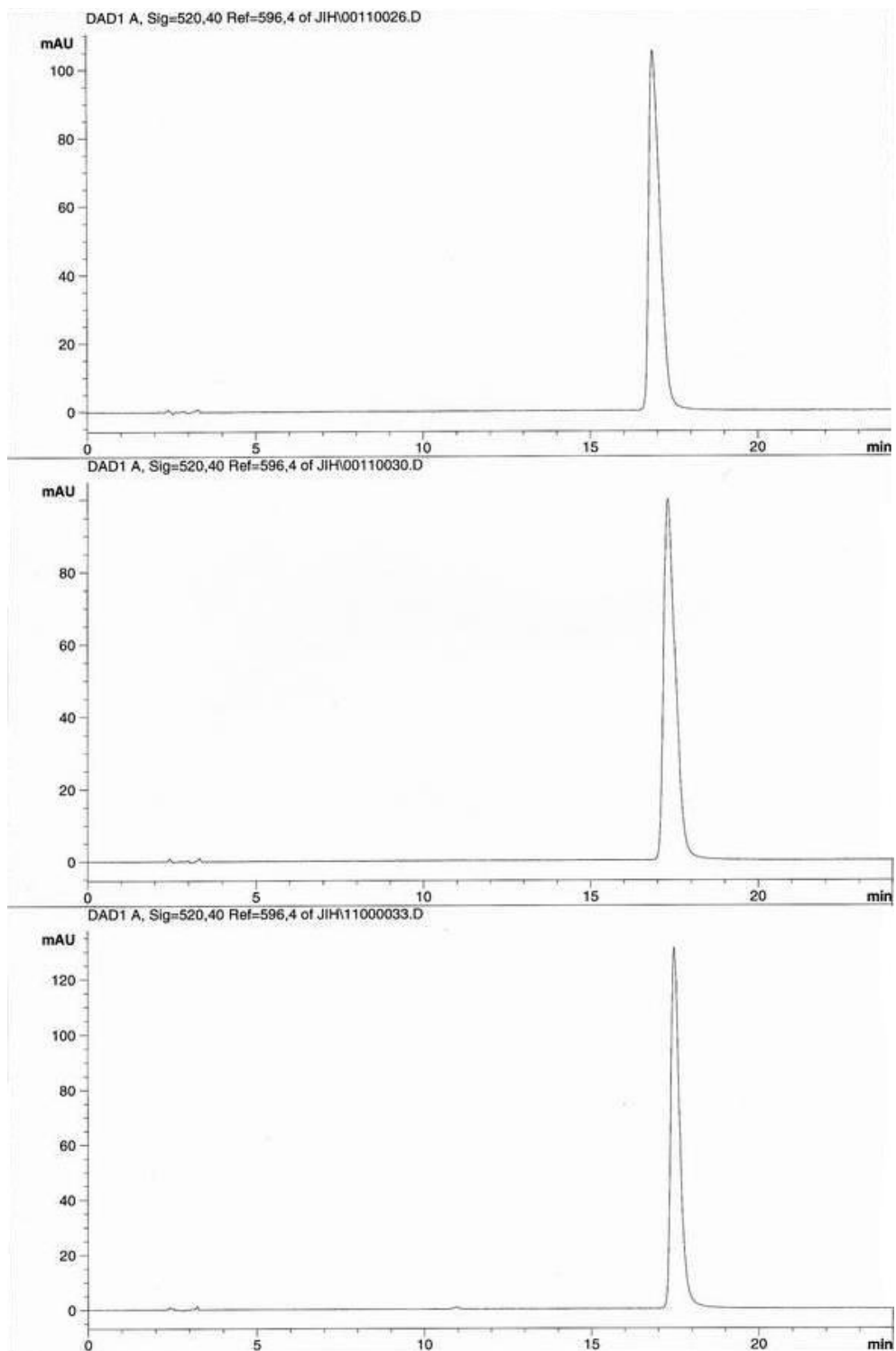
Av disse (se figurene 36 og 37) kan vi se at begge løsningsmidlene fungerer bra ved lagring av aglykoner. I parallell 5 ser vi en liten nedgang i mengden av aglykon etter tre dager, og ingen videre nedgang etter syv dager. I parallell 4 ser vi at mengden aglykon er stabilisert. Vi kan anta fra dette at pigmentet holder seg i den mest stabile tilstanden, flavyllium-formen (sentral struktur i figur 13), og at den hygroskopiske fosforsyren binder til seg vann før det angriper aglykonet. Løsemidlet viser seg å være meget egnet til lagring av aglykoner.



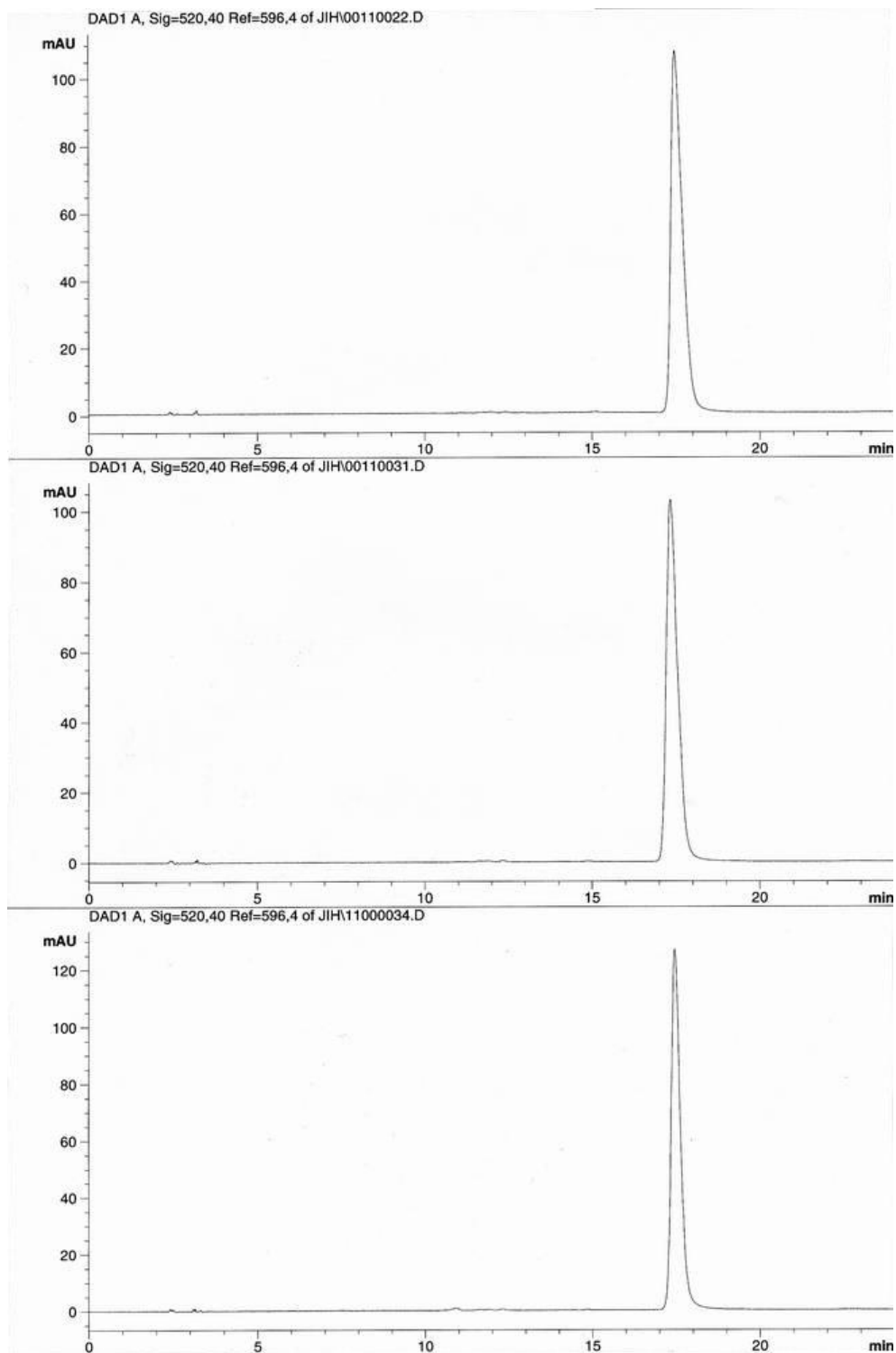
Figur 34: HPLC-kromatogrammene for parallellene 1 til 4 fra faktorforsøket. Disse fire parallellene er alle utsatt for lav temperatur ( $90^{\circ}\text{C}$ ), de to øverste kun over 50 minutter, og de to nederste over 100 minutter. Øverste og nest nederste parallell er løst i 3M syre, nest øverste og helt nederste er løst i 6M syre.



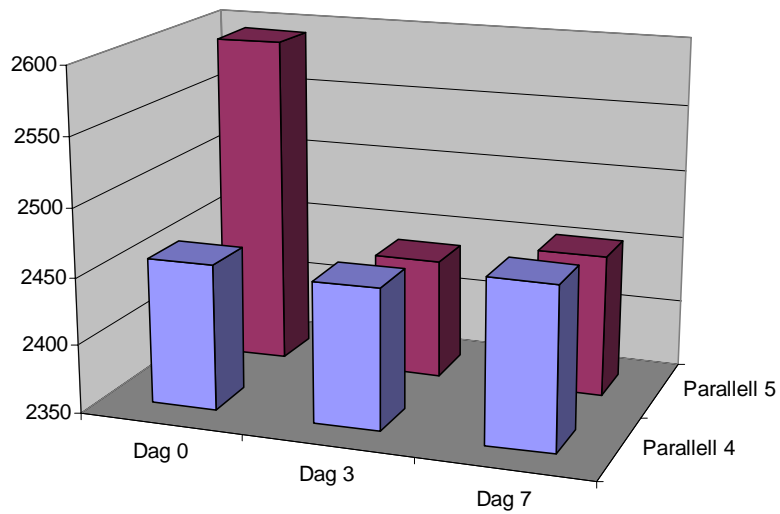
Figur 35: HPLC-kromatogrammene for parallellene 5 til 8 fra faktorforsøket. Disse fire parallellene er alle utsatt for høy temperatur (150°C), de to øverste kun over 50 minutter, og de to nederste over 100 minutter. Øverste og nest nederste parallell er løst i 3M syre, nest øverste og helt nederste er løst i 6M syre.



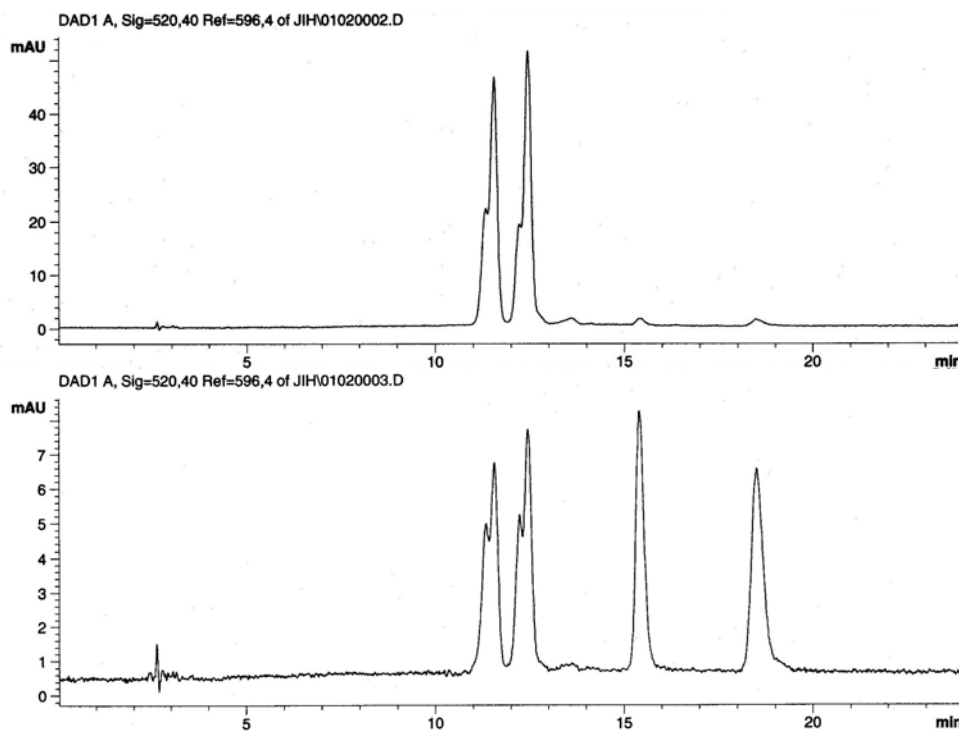
Figur 36: HPLC-kromatogram for parallell 4 fra faktorforsøket. Kromatogrammene er tatt øyeblikkelig (øverst), og etter 3 og 7 dager (midten og nederst).



Figur 37: HPLC-kromatogram for parallell 5 fra faktorforsøket. Kromatogrammene er tatt øyeblikkelig (øverst), og etter 3 og 7 dager (midten og nederst).



Figur 38: Søylediagram som viser nedgangen i mengde aglykon i parallellene 4 og 5 fra faktorforsøket. Verdi på vertikal akse er arealet av toppene i kromatogrammene (figur 36 og 37).



Figur 39: HPLC av solbærekstrakt, over: før syrehydrolyse, nederst: etter syrehydrolyse.

## 6.10 Delvis hydrolyse av pigmenter fra solbær

HPLC-kromatogram tatt fra råekstrakt viser tilstedeværelsen av de følgende fire pigmentene: cyanidin-3-glukosid, cyanidin-3-rutinosid, delphinidin-3-glukosid og delphinidin-3-rutinosid [32]. Ved en delvis hydrolyse, vil man frigjøre to de to aglykonene cyanidin og delphinidin til løsningen. Ser man på kromatogrammene (se figur 39 på forrige side), ser man at 30 minutter i 95-100°C og ved 3M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> er en egnet metode til å få drive frem en delvis hydrolyse av antocyaner.

## 6.11 Undersøkelse av løselighet av aglykoner i tofasesystemer

Et nytt tofasesystem var ønsket for HSCCC-instrumentet, for å kunne analysere aglykoner bedre. Det var ønskelig å ha den ene fasen svært upolar, og den andre svakt polar. På denne måten ville man kunne brukt den svakt polare fasen som mobil fase, og fått en viss retensjon i den upolare stasjonære fasen. For å oppnå dette, må aglykonet være løsbart i begge faser, men ha en klar preferanse i den ene fasen, da naturlig nok den mest polare. I tillegg ville det være en fordel å også unngå bruk av vann, på grunn av vannets evne til å reagere med pigmentene ved romtemperatur og nær nøytral pH.

### Heksan-diklormetan-acetonitril (5:1:4)

Dette systemet var ikke i stand til å løse aglykon. Ingen farge på noen av fasene, pigmentet ble værende udissosiert som fast masse. Acetonitril ble byttet ut med metanol, og da ble alt pigment løst i metanol-fasen. Et svært selektivt system som ikke egner seg til HSCCC.

### Heksan-etylacetat-metanol-vann (5:1:5:1)

Pigment løste seg i fasen med metanol-vann, ingenting i fasen med heksan-etylacetat. Et altfor selektivt system, ikke egnet til HSCCC.

### Kloroform-metanol-vann (2:2:1)

Samme problemer som ved systemet over. Alt pigment løst i metanol-vann, den andre fasen har ingen evne til å løse pigmentene.

### Heksan-iseddik-vann (6:5:1)

Systemet var altfor selektivt, aglykon ble kun løst i den polare eddik/vann fasen. Den upolare fasen med heksan var helt klar.

### Petroleumseter-butanol-iseddik (4:3:1)

Dette systemet var ikke i stand til å løse målbare mengder av aglykon. Pigment ble værende udissosiert som fast masse.



### **Metanol-petroleumseter (1:1)**

Alt av pigmenter ble løst i metanol, ingen spor av farge i fasen med eter.

### **t-butylmetyleter-butanol-acetonitril-vann (2:2:1:5)**

Dette systemet løser aglykoner svært godt i upolar (eter-acetonitril) fase, små spor av farge i den vandige fasen. Når ikke hydrolysert antocyan ble tilsatt, ble det motsatte observert: antocyan løste seg nesten utelukkende i den vandige fasen, i liten grad i den upolare fasen. Dette systemet er fra tidligere vært brukt som 'standard' tofasesystem innen HSCCC, og mine tester viser at det er, om enn ikke ideelt, egnet til analyse av antocyaner og aglykoner. Siden de to fasene er svært selektive i løsningssevne for henholdsvis aglykoner og antocyaner, vil man ikke kunne klare å analysere de to pigmentene samtidig, kun en av gangen. Et av pigmentene vil bli værende i den stasjonære fasen.

## 6.12 Konklusjon

Totalt sett har jeg nå vist en fullendt og fungerende analysevei fra ekstraksjon fra plantematerialet til identifikasjon av isolerte pigmenter ved strukturbestemmelse på NMR. Det er i arbeidet lagt spesielt vekt på behandling av pigmenter ved syrehydrolyse og isolasjon av antocyaner eller aglykoner på HSCCC.

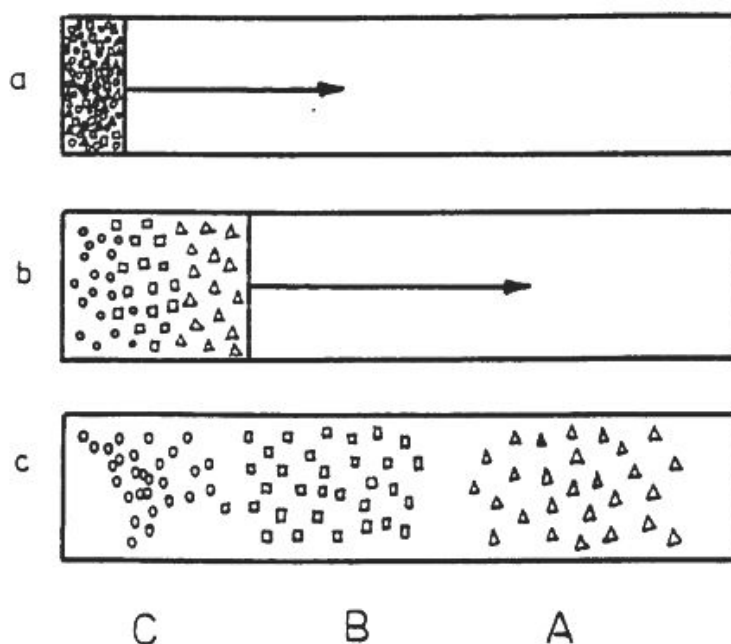
1. En prøve med pigmenter fra planten svarthyll (*Sambucus nigra*) er blitt analysert på HSCCC. Det ble isolert et pigment, og dette ble til slutt analysert på NMR for å få en fullstendig strukturbestemmelse.
2. Videre har jeg undersøkt HSCCC-instrumentet, og forsøkt å finne løsemiddelsystemer som kan brukes i videre analyse av våre plantepigmenter. Det har vist seg vanskelig å erstatte tofasesystemet med t-Butylmetyler/Butanol/Acetonitril/vann. Andre løsemidler hadde ikke den ønskede evnen til å løse aglykoner. Dette løsemiddelsystemet kan brukes i analyse av enten aglykoner eller antocyaner, avhengig av hvilken retning man kjører kolonnen.
3. Jeg har funnet flere fungerende metoder for produksjon av aglykoner gjennom syrehydrolyse av antocyaner. Både løsninger basert på vann, butanol og etanol klarer å drive frem syrehydrolysen. Videre undersøkelser viser at det etanol-baserte løsemidlet er lett å fjerne etter bruk ved rensing gjennom kolonne med XAD-7. Videre er fosforsyre så kraftig hygroskopisk at de dannede aglykonene er stabilisert i flere dager. Derfor konkluderer jeg med at etanol/fosforsyre fungerer ypperlig som hydrolyse-og lagringsmedium for antocyaner og aglykoner.

## 7 Appendix

### 7.1 Om kromatografi

#### 7.1.1 Separasjon

Hensikten med kromatografi er å skille forbindelser fra hverandre ved å la dem vandre gjennom et kromatografisk system. Man søker derfor et system og betingelser som gir best mulig *separasjon*. Figur 40 illustrerer be-



Figur 40: Søylekromatografisk separasjon av stoffene A, B og C, ved tidene a(start), b(underveis) og c(fullført). (Figur hentet fra Lærebok i Kromatografi[26].

grepet separasjon. En trekomponent blanding bestående av stoffene A, B og C separeres fra hverandre i et kromatografisk system på grunn av deres ulike affinitet for enten mobil eller stasjonær fase. Ved tidspunktet *a* har blandingen nettopp blitt applikert, ved tidspunkt *b* har mobilfasen begynt å bevege seg, og dermed begynt å trekke stoffene med seg, og ved tidspunkt *c* er stoffene helt separert fra hverandre. Man legger merke til følgende karakteristiske egenskaper ved en kromatografisk separasjon:

- Stoffene beveger seg med forskjellig hastighet gjennom systemet.
- For hvert av stoffene får man en spredning langs søylen; dette kalles *båndspredning*. For å få vellykket separasjon bør denne båndspredningen

være minst mulig.

Som et kvantitativt mål for separasjon bruker man *oppløsningsevne* eller *separasjon* (eng. resolution). Oppløsningsevnen er gitt ved  $R_s$  og er for to forbindelser definert som differansen i retensjonstid dividert på den gjennomsnittlige båndbredden:

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2}(t_{w1} + t_{w2})} \quad (10)$$

For å få best mulig separasjon bør  $R_s$  være så stor som mulig.

For å kunne kontrollere og styre en separasjon må man vite hvordan  $R_s$  varierer med endringer i de eksperimentelle kromatografiske parametrene.

$$R_s = \frac{1}{4}(\alpha - 1) \sqrt{(N)} \left( \frac{k}{1+k} \right) \quad (11)$$

Ligningen over regnes som fundamental innen kromatografien og gjelder kun for overlappende bånd (bånd som ikke er separert fra hverandre). Ligningen kan brukes til å forstå hvordan en separasjon kan forbedres ved å variere tre kromatografiske parametre,  $\alpha$ ,  $N$  og  $k$ .

Det første leddet ( $\alpha - 1$ ) gir et mål for separasjonens *selektivitet*.  $\alpha$  kalles separasjonsfaktor og sier noe om hvor godt det ene båndet er retardert i forhold til det andre.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (12)$$

(der  $k_2 > k_1$ .)

Økende verdier for  $\alpha$  gir økende avstand mellom båndene og bedre separasjon. For  $\alpha=1$  har båndene samme retensjon og dermed ingen separasjon.  $\alpha$  kan endres ved å variere stasjonær og/eller mobil fase, men sier ingenting om hvor i kromatogrammet toppene blir eluert eller hvor brede disse blir.

Det neste leddet, ( $\sqrt{N}$ ) sier at oppløsningsevnen er proporsjonal med kvadratroten av platetallet for separasjonen, og at oppløsningsevnen bedres ved å gjøre toppene smalere.  $N$  kan styres ved lengden av kolonnen, hva slags stasjonærfase som er brukt, og ved hastighet av mobilfasen.

Det siste leddet ( $\frac{k}{1+k}$ ) retensjonen av det ikke separerte båndparet i kromatogrammet, der  $k$  er den gjennomsnittlige retensjonsfaktoren for de to båndene.

### 7.1.2 Båndspredning

Båndspredning vil si en spredning av et stoffs molekyler i elueringsretningen. Når en prøve blir applikert på en kolonne, vil det være som et smalt bånd på toppen av søylen, men etter som det vandrer gjennom søylen vil det gradvis bli bredere. Vi får dermed et bånd der noen molekyler i stoffet har vandret lengre enn andre. Dette skjer fordi et stoffs molekyler beveger seg med

individuelle og stadig varierende hastigheter gjennom det kromatografiske systemet.

Som mål for båndspredningen bruker man vanligvis *platetallet*  $N$ :

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{t_W} \right)^2 \quad (13)$$

Eventuelt kan denne også skrives som:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{t_W 0,5} \right)^2 \quad (14)$$

$N$  er et mål for søylens *effektivitet*, søylens evne til å gi smale bånd for stoffene som skal separeres. Etersom  $N$  er konstant ser vi at økt retensjonstid vil gi økt båndbredde. Dersom  $t_R$  er veldig stor, kan toppen i kromatogrammet bli så lave at de kan være vanskelige å skille fra baselinjen.

Platetallet for søylen er proporsjonalt med søylens lengde:

$$H = \frac{L}{N} \quad (15)$$

Platshøyden er et uttrykk for den lengde av søylen som opptas av en teoretisk plate.  $H$  bør være så liten som mulig, og er et resultat av forskjellige prosesser som gir båndspredning. Den totale båndspredningen uttrykt ved  $H$  vil være summen av båndspredningene fra de ulike prosessene.

$$H = H_L + H_E + H_M + H_{SM} + H_S \quad (16)$$

der  $H_L$  er Longitudinal diffusjon,

$H_E$  er Eddy diffusjon,

$H_M$  er Massetransport i mobilfase,

$H_{SM}$  er Massetransport i stillestående mobilfase,

$H_S$  er Massetransport i stasjonær fase.

Longitudinal diffusjon ( $H_L$ ): Tendensen til at stoff vil diffundere i systemet fra et område med høy konsentrasjon til et område med lavere konsentrasjon. Dermed vil båndspredningen skje begge veier, både oppover og nedover i systemet.

Eddy diffusjon ( $H_E$ ): Hvert molekyl passerer ulik veilengde i kolonnen som følge av steriske hindringer i form av partikler i stasjonær fasen.

Massetransport i mobil fase ( $H_M$ ): Lokale variasjoner i mobilfasens hastighet. Mobilfase som er i kontakt med stasjonær fase vil bevege seg mer langsomt enn mobilfase i sentrum av strømmen. Som et resultat vil også stoffmolekyler som følger ulik strøm få ulik hastighet gjennom systemet, og således gi båndspredning.

Massetransport i stillestående mobil fase ( $H_{SM}$ ): Dersom man har porøse partikler i den stasjonære fasen vil den mobile fase som er kommet inn i porene være stillestående. Stoffmolekylene beveger seg inn og ut av disse porene ved diffusjon. Noen molekyler vil da bare diffundere et kort stykke inn i porene før de vender tilbake til den eksterne mobile fasen. Andre tilbringer lengre tid i porene før de vandrer videre. Resultatet blir båndspredning.

Massetransport i stasjonær fase ( $H_S$ ): Stoffmolekyler vil bli retardert av stasjonærfasen i ulik grad. Noen molekyler vil diffundere lenger inn i stasjonærfase enn andre molekyler og vil dermed bevege seg over en kortere strekning enn andre molekyler i løsningen [26], [33].

### 7.1.3 Ladningskapasitet og overladning

Alle kromatografiske systemer har en grense for hvor mye stoff som kan applikeres på systemet. Dersom for store mengder stoff blir applikert vil resultatet bli at stoffene elueres uten å bli separert. Man har da *overladning*. Grensen for hvor mye stoff som kan applikeres på et system per gang, og fremdeles oppnå separasjon, kalles systemets *ladningskapasitet*.

## 7.2 Om spektroskopi

### 7.2.1 UV/Synlig spekter

Når et molekyl absorberer ultrafiolett eller synlig stråling skjer det elektronoverganger i de elektroniske energinivåene i molekylet. Dette skjer ved at elektroner som befinner seg i grunntilstanden (relaksasjonstilstanden) tilføres energi og overføres til et høyere energinivå. Dette kalles eksitasjon.

Energien til de ulike energinivåene i atomet er kvantifisert. Det vil si at det kun finnes helt bestemte nivåer elektronene kan befinne seg på, og at det dermed bare finnes energi (stråling) med en bestemt mengde energi som kan eksitere elektronene. For å eksitere et elektron fra en energitilstand  $E_1$  til  $E_2$  skjer dette over et energi-intervall  $\Delta E$ . For at denne overgangen skal være mulig, kreves energi med en bestemt bølgelengde  $\lambda$ :

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda} \quad (17)$$

der  $h$  er planck's konstant ( $6,6 * 10^{-34}$  Js)  
 $c$  er lysfarten ( $3 * 10^8$  m/s)

Absorpsjon ved forskjellige bølgelengder tilsvarer altså ulike energi-overganger, og intensiteten er proporsjonal med antall molekyler som blir eksitert og sannsynligheten for en slik eksitasjon. Imidlertid er det ikke 'hele molekylet' man ser ut fra slike spektre, snarere identifiserbare grupper i

molekylet. Disse kalles kromoforer, fra gresk *chromophoros* som betyr fargebærer. Dermed kan UV/synlig absorpsjon være med og si noe om strukturelle forhold i molekylet [34].

### 7.2.2 Kjernemagnetisk resonans (NMR)

Atomenes kjerne danner det fysiske grunnlaget for NMR, og teknikken kan bare brukes på prøver som inneholder atomer med spinnkvantetall ( $I$ ) som er større enn 0. Vanlig hydrogen ( $^1\text{H}$ ), for eksempel, har  $I=\frac{1}{2}$ , og vil kunne observeres i NMR. Men for alle atomene med et jamt antall nøytroner og protoner ha spinnkvantetall 0, og vil ikke kunne observeres ved hjelp av NMR. Dette vil gjelde for den vanligste isotopen av karbon,  $^{12}\text{C}$ . Heldigvis har karbon en isotop,  $^{13}\text{C}$  med  $I=\frac{1}{2}$ . Denne isotopen forekommer imidlertid bare som 1,06 prosent av naturlig forekommende karbon, noe som gjør at prøveløsningen må være særlig konsentrert for å få akseptable karbon NMR-spektre.

Orienteringen av  $^1\text{H}$ -og  $^{13}\text{C}$ -kjerner er tilfeldig, men plassert i et magnetisk felt vil disse kjernene innta to mulige orienteringer: parallell eller anti-parallel i forhold til den eksterne magneten. Disse to orienteringene vil ha ulikt energinivå, og kjerner som innretter seg parallellt med det ytre magnetfeltet har lavest energi, mens kjerner som retter seg mot feltet ligger på et høyere energinivå.

Energiforskjellen mellom de to nivåene,  $\Delta E = E_\beta - E_\alpha$ , avhenger av to variabler:

- Styrken til det eksterne feltet,  $B_0$
- Det kjernemagnetiske momentet  $\mu$  til hver kjerne.

Dersom kjernene utsettes for elektromagnetisk stråling med frekvens  $\nu$ , slik at

$$\Delta E = h\nu \quad (18)$$

(der  $h$  er Planck's konstant) vil kjerner i  $\alpha$  absorbere den tilførte energien og overføres til et høyere energinivå,  $\beta$ .

Jo sterkere det eksterne magnetfeltet  $B_0$  er, jo større er energiforskjellen  $\Delta E$ . I tillegg vil energidifferansen avhenge av hva slags kjerner som undersøkes, og disse kjernes plassering i molekylet. Grunnen til dette er at hver kjerne bli påvirket av magnetfeltet til nabo-atomet. Kjerner som oppholder seg i samme magnetiske miljø vil ha samme  $\Delta E$  mellom spinn-orienteringene. Disse energidifferansene blir målt, og man kan på denne måten få informasjon om plassering av atomene i molekylet. Kjernemagnetisk resonans er derfor den spektroskopiske teknikken som er best egnet til strukturbestemmelse av molekyler i løsninger.

## Referanser

- [1] J. Bruneton. *Pharmacognosy Phytochemistry Medical Plants*. Lavoisier, 1995.
- [2] C.A. Rice-Evans L. Packer. *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker, 1998.
- [3] H. Bohm H. Boeing J. Hempel B. Raab A. Kroke. Flavanols, flavones and anthocyanins as native antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zetschrift fur Ernährungswissenschaft*, 37:147–163, 1998.
- [4] K.A. Steinmetz J.D. Potter. Vegetables, fruit and cancer prevention: A review. *Jornal of the American dietetic association*, 96:1027–1039, 1996.
- [5] J.B. Harborne. *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*. Academic Press Limited, 1967.
- [6] J. Mann R.S. Davidson J.B. Hobbs D.V. Banthorpe J.B. Harborne. *Natural products*. Longman, 1994.
- [7] K.R. Markham. Techniques of flavanoid identification, 1982. Biological techniques series.
- [8] J.B. Harborne. *A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall Ltd., London, 1973.
- [9] J.B. Harborne. *The flavanoids: Advances in research since 1980*. Chapman and Hall Ltd., London, 1988.
- [10] J.B. Harborne. *The flavanoids: Advances of research since 1986*. Chapman and Hall Ltd., London, 1993. S. 441-471.
- [11] G. Mazza E. Miniati. *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*. CRC Press, 1993.
- [12] Ø.M. Andersen. Naturens palett 1. *Naturen*, (3):89–93, 1987.
- [13] D. Strack V. Wray. *Methods in plant biochemistry*. Academic Press Limited, 1989. S. 325-352.
- [14] D.H. Williams L. Flemming. *Spectroscopic methods in organic chemistry*. McGraw-Hill, 1995.
- [15] J.R.L. Walker. *The biology of plant phenolics*. Edward Arnold (Publishers) Ltd., 1975.



- [16] J.C. Walker. Disease resistance to onion smudge. *Journal of Agricultural Research*, 34:1019–1023, 1923.
- [17] Cody Middleton Harborne. *Progress in clinical and biological research Vol. 213*. Alan R. Liss Inc., New York, 1986.
- [18] P. Bridle C. Timberlake. *Food chemistry* 58, 1997. S. 103.
- [19] Ø.M. Andersen. Naturens palett 2. *Naturen*, 5:190–194, 1987.
- [20] L.S. Ettre. *Chromatographia*, nr. 5-6, 1996. S. 343-351.
- [21] G.W. Francis Ø.M. Andersen. Droplet counter-current chromatography of anthocyanins. *Journal of Chromatography*, (283):445–448, 1984.
- [22] J.H. Renault Å. Thépenier M. Zéches-Hanrot. *Journal of chromatography*, a 763, 1997. S. 345-352.
- [23] Ø.M. Andersen. *Chemical studies of anthocyanins in plants*. Department of Chemistry, University of Bergen, 1988.
- [24] Ø.M. Andersen G.W. Francis. Simultaneous analysis of anthocyanins and anthocyanidins on cellulose thin layers. *Journal of Chemistry*, (318):450–454, 1985.
- [25] Ø.M. Andersen. High performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins with diode-array detector. In *XVth International conference: Groupe polyphenols (9-11 july. 1990 Strasbourg, France)*, pages 240–243, 1990.
- [26] Greibrokk Lundanes Rasmussen. *Kromatografi*. Universitetsforlaget, 3 edition, 1994.
- [27] H. Friebolin. *Basic One-and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. Wiley-VCH, 1998.
- [28] J.K.M. Sanders B.K. Hunter. *Modern NMR Spectroscopy*. Oxford University Press, 1993.
- [29] J.P. Hornak. Nmr-main. Webside: <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm>.
- [30] N.Å. Frøystein. *Practical NMR Spectroscopy, kursmanual*. Kjemisk Institutt, Universitetet i Bergen, 2000.
- [31] Ø.M. Andersen D.W. Aksnes W. Nerdal O.P. Johansen. Structure elucidation of cyanidine-3-sambubioside and assignments of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nmr resonances through two-dimensional shift-correlated nmr techniques. *Phytochemical analysis*, 2:175–183, 1991.

- [32] B.V Chandler K.A. Harper. Aust. j. chem. 15, 1961. S. 114-120.
- [33] H.T. Hove. *Kompendium i kromatografi*. Kjemisk Institutt, Universitetet i Bergen, 3 edition, 1991.
- [34] W. Kemp. *Organic spectroscopy*. Macmillan Press Ltd., 3 edition, 1991.