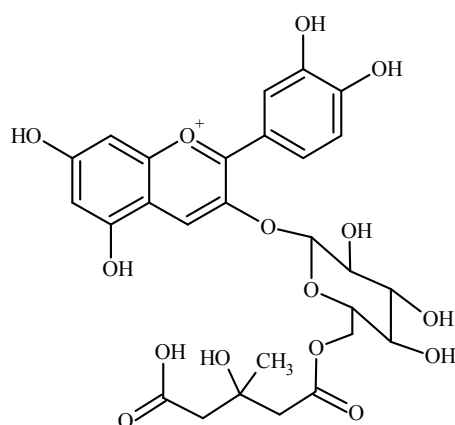


MASTEROPPGAVE I ORGANISK KJEMI

Analyse av antocyaner i bjørnebær (*Rubus fruticosus*)



Kjersti Hasle Enerstvedt



Kjemisk institutt
Universitetet i Bergen

2010

Forord

Arbeidet i denne masteroppgaven ble påbegynt våren 2009, og ble utført ved kjemisk institutt, Universitetet i Bergen.

Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder, Øyvind M. Andersen, for utmerket veiledning gjennom hele arbeidet med masteroppgaven. Jeg vil også takke min biveileder, Monica Jordheim, for både svært god veiledning og uvurderlig hjelp til det eksperimentelle arbeidet.

I tillegg vil jeg også takke Atle Aaberg og Terje Lygre for bistand ved henholdsvis NMR og MS-analyse, Svein A. Mjøs for hjelp i forbindelse med kvantitativ analyse og Unn Rognerud ved Tveit Gaard for ulike bjørnebærkultivarer.

Ellers vil jeg rette en stor takk til Irene Skaar for alltid å være tilgjengelig for både faglige spørsmål og koselige kaffepauser, og mine andre venner på fakultetet for å gjøre hverdagene litt lysere.

Til slutt vil jeg takke familie, venner og samboer for all støtte og for å ha gjort meg oppmerksom på det finnes et liv også utenfor realfagbygget.

SAMMENDRAG

Tema for denne oppgaven er analyse av antocyaner i bjørnebær. Antocyaner er naturlige pigmenter som gir opphav til farger varierende fra oransje og rød til fiolette og blå i blomster, frukt og andre planter (Melo et al. 2009). Bjørnebær (*Rubus fruticosus*) er med sin mørke, karakteristiske farge kjent for å være en rik kilde til antocyaner (Giusti & Jing 2007), og målene i oppgaven har vært å bestemme identitet og mengde til antocyanene i utvalgte bjørnebær- og bringebærkultivarer.

Opgaven er i hovedsak tredelt, hvorav første del omhandler isolasjon og strukturbestemmelse av et nytt pigment i bjørnebær, som tidligere har blitt feilbestemt (Stintzing et al. 2002; Wu & Prior 2005; Ogawa et al. 2008). Bjørnebær ble ekstrahert med metanol tilsatt TFA, og ekstraktet ble videre rensset på en Amberlite XAD-7 kolonne. Ulike kromatografiske teknikker ble benyttet for separasjon av pigmentene. Det ukjente pigmentet ble isolert ved hjelp av preparativ HPLC, og ble identifisert som cyanidin 3-*O*- β -(6''-(3-hydroksey-3-metylglutaryl)glukopyranosid) ved hjelp av 1D og 2D NMR-spektroskopiske teknikker samt høyoppløselig LC-MS. Dette pigmentet ble identifisert for aller første gang.

I andre del av oppgaven ble ulike bjørnebær- og bringebærkultivarer analysert ved hjelp av analytisk HPLC med UV-synlig detektor og høyoppløselig LC-MS for å undersøke kvalitativt innhold av antocyaner. Bjørnebær- og bringebærkultivarene har forskjellig innhold av antocyaner. Bjørnebærkultivarene inneholder cyanidin 3-*O*- β -glukopyranosid, cyanidin 3-*O*- β -rutinosid, cyanidin 3-*O*- β -xylosid, cyanidin 3-*O*- β -(6''-malonyl-glukopyranosid) og cyanidin 3-*O*- β -(6''-(3-hydroksey-3-metylglutaryl)glukopyranosid), mens bringebærkultivarene inneholder hovedsakelig cyanidin 3-*O*- β -sophorosid og cyanidin 3-*O*- β -(2-glukosylrutinosid) i tillegg til cyanidin 3-*O*- β -glukopyranosid og cyanidin 3-*O*- β -rutinosid. I den ene bjørnebærkultivaren var det også tre andre pigmenter til stede, som ikke ble fullstendig identifisert.

Siste del av oppgaven omhandler det kvantitative innholdet av antocyaner i bjørnebær- og bringebærkultivarer. Som forventet hadde bjørnebærkultivarene inkludert en hybrid et betydelig høyere totalinnhold av antocyaner enn bringebærkultivarene, selv om det også var individuelle forskjeller mellom kultivarene.

Endelig var det viktig å undersøke i hvilken grad ekstraksjonstid og antall ekstraksjoner påvirker mengdebestemmelsen. Forsøkene viste at ved å ekstrahere inntil tre ganger økte mengdeinnholdet med opptil 80 % sammenlignet med én enkelt ekstraksjon, mens økt ekstraksjonstid hadde liten eller ingen effekt.

INNHALDSFORTEGNELSE

Forord.....	iii
SAMMENDRAG.....	v
1 INTRODUKSJON.....	1
1.1 Flavonoider.....	1
1.2 Antocyaner.....	2
1.2.1 Struktur.....	2
1.2.2 Kjemiske egenskaper – farge og stabilitet.....	4
1.2.3 Biosyntese.....	8
1.2.4 Naturlig forekomst og funksjon.....	9
1.2.5 Menneskers nytte av antocyaner.....	9
1.3 <i>Rubus fruticosus</i>	10
1.4 Motivasjon og målsetning.....	13
1.4.1 Målsetninger.....	14
2 METODER OG EKSPERIMENTELLE PROSEDYRER.....	15
2.1 Plantemateriale.....	16
2.2 Ekstraksjon.....	17
2.3 Kromatografiske metoder.....	17
2.3.1 Amberlite XAD-7.....	18
2.3.2 Toyopearl HW-40F.....	19
2.3.3 Sephadex LH-20.....	19
2.3.4 High Performance Liquid Chromatography.....	20
2.4 Spektroskopiske analysemetoder.....	25
2.4.1 UV-synlig spektroskopi.....	25
2.4.2 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy – NMR.....	27
2.4.3 Massespektrometri – MS.....	29
Kvantitativ bestemmelse.....	32
2.5.1 Analyseserier – prosedyre for opparbeiding.....	32
2.5.2 Standardisering.....	34
3 IDENTIFIKASJON AV PIGMENT 5 : cyanidin 3- <i>O</i> - β -(6''-(3-hydroksy-3-metylglutaryl)glukopyranosid).....	37
3.1 Isolasjon og analyse.....	38

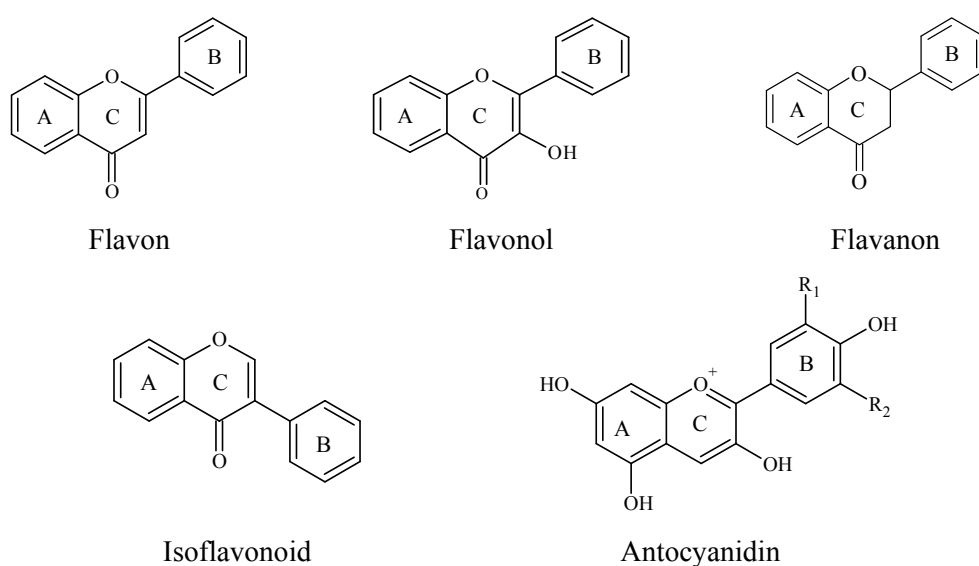
3.1.1	Analyse av råekstrakt.....	38
3.1.2	Isolasjon ved hjelp av Toyopearl HW-40F kolonne.....	38
3.1.3	Isolasjon ved hjelp av Sephadex LH-20 kolonne og preparativ HPLC.....	39
3.1.4	Isolasjon ved hjelp av preparativ HPLC.....	41
3.2	UV-synlig spektroskopi.....	43
3.3	Strukturbestemmelse av pigment 5 ved hjelp av NMR.....	44
3.3.1	Aromatregion.....	44
3.3.2	Sukkerregion.....	49
3.3.3	Alifatisk syre.....	51
3.4	MS-analyse av pigment 5.....	55
3.5	Konklusjon.....	56
4	IDENTIFIKASJON AV ANTOCYANER I ULIKE KULTIVARER AV BJØRNEBÆR OG BRINGEBÆR.....	57
4.1	Analytisk HPLC.....	57
4.2	LC-MS.....	62
4.3	Konklusjon.....	65
5	KVANTITATIV BESTEMMELSE AV ANTOCYANER I BJØRNEBÆR- OG BRINGEBÆRKULTIVARER.....	67
5.1	Analyseserier.....	67
5.2	Kvantitativt innhold av antocyaner i bjørnebær og bringebær.....	68
5.2.1	Relativ distribusjon av antocyaner i bjørnebær- og bringebærkultivarer.....	68
5.2.2	Absolutte mengder av antocyaner i bjørnebær- og bringebærkultivarer.....	70
5.3	Faktorer som påvirker bestemmelse av absolutte mengder.....	72
5.4	Konklusjon.....	78
	REFERANSER.....	79
	APPENDIKS.....	87

1 INTRODUKSJON

1.1 Flavonoider

Flavonoider er fenoliske fargeforbindelser som gir opphav til et vidt spekter av farger, fra gult og oransje til rødt og blått i en rekke planter (Samuelsson 2004; Sivam 2008). Det finnes også fargeløse flavonoider som likevel bidrar til farge ved å fungere som kopigmenter sammen med andre pigmenter, og mange absorberer UV-stråling som oppfattes av blant annet insekter (Bruneton 1999).

Strukturen til flavonoidene er hovedsakelig basert på et $C_6-C_3-C_6$ grunnkjelett med to aromatiske ringer, A og B, knyttet sammen av en 3-karbon bro som vanligvis danner en ring (C) (Schwinn & Davies 2004). Over 8000 flavonoider har blitt isolert fra planter (Andersen & Jordheim 2006), og disse kan deles inn i tolv hovedgrupper. De fem vanligste gruppene inkluderer flavoner, flavonoler, antocyaner, flavanoner og isoflavonoider (figur 1.1.1), og disse står for rundt 80 % av de kjente flavonoider (Samuelsson 2004). Gruppene er forskjellige med hensyn til varierende grad av oksidasjon og substitusjonsmønster på C-ringen. Innenfor disse gruppene finnes det videre forskjellige forbindelser med ulike substituenten på A- og B-ringen (Schwinn & Davies 2004; Jordheim 2007). De fleste flavonoider eksisterer som glykosider, og sukkerenheten(e) kan også ha en eller flere syreenheter knyttet til seg (Andersen & Francis 2004).



Figur 1.1.1. De fem vanligste hovedgrupper av flavonoider

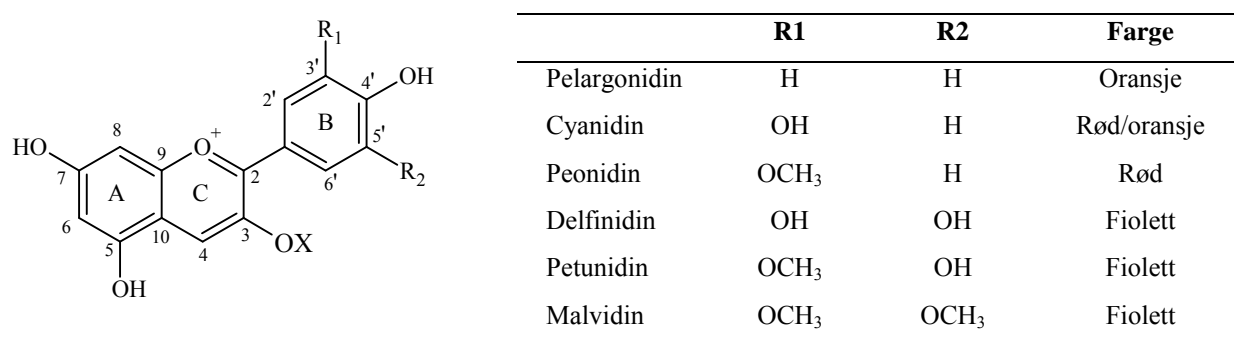
Flere studier har vist at fenoliske forbindelser kan ha helsefremmende effekter, som følge av sterk antioksidant effekt (Giusti & Wallace 2009). Det har blant annet blitt rapportert om anti-inflammatorisk, anti-karsinogen og anti-mikrobisk aktivitet (Harborne & Williams 2000; Samuelsson 2004; Giusti & Wallace 2009).

1.2 Antocyaner

Antocyaner er den mest utbredte undergruppen av flavonoider, og finnes blant annet i mange blomster og bær. Selve navnet antocyan stammer fra de greske ordene ”anthos” (blomst) og ”kyanos” (blå), og ble opprinnelig brukt til å beskrive pigmentene i blå kornblomster. Antocyaner kan imidlertid variere i farge fra oransje til rød, lilla eller mørk blå (Strack & Wray 1989; Jackman & Smith 1996; Melo et al. 2009). Antocyaner forekommer først og fremst i frukt, bær og blomster, men de er også til stede i noen planters bladverk, stengler eller røtter (Strack & Wray 1989; Melo et al. 2009).

1.2.1 Struktur

Antocyaner består av aglykon og én eller flere sukkerenheter. I tillegg er ofte sukkerenhetene acylert med en aromatisk eller alifatisk syre. Det finnes over 30 identifiserte aglykon, men de seks vanligste og mest utbredte er: delphinidin, cyanidin, petunidin, pelargonidin, peonidin og malvidin (Andersen & Jordheim 2006). Disse har i hovedsak samme struktur, men har ulik grad av hydroksylering og metoksylering i 3' og 5' posisjonen på B-ringene. Strukturen til de seks vanligste aglykon er vist i figur 1.2.1. Hvert aglykon kan gi opphav til mange forskjellige antocyaner, som varierer i antall og type sukkerenheter og grad av acylering med alifatiske eller aromatiske syrer, og det har hittil blitt rapportert om over 600 antocyaner (Andersen & Jordheim 2006).

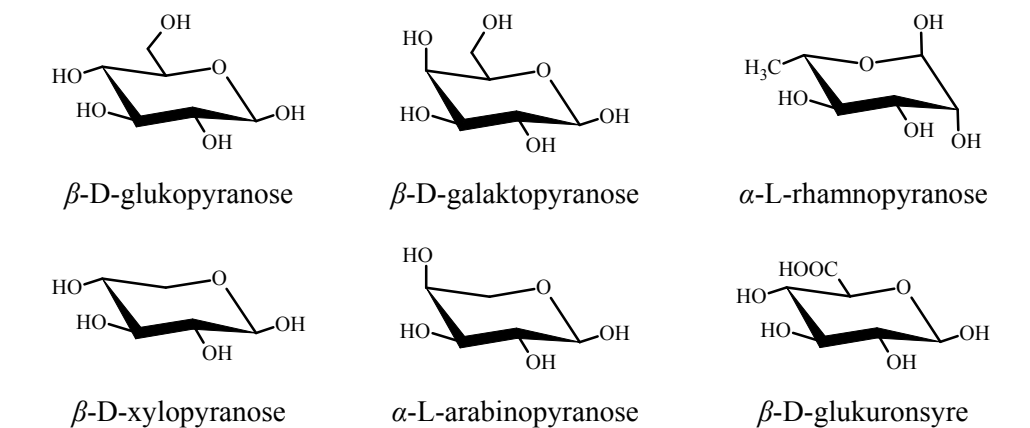


Figur 1.2.1. Basisstruktur aglykon (flavylium kation)

Sukkerenheter

Som nevnt, har antocyaner alltid minst én eller flere sukkerenheter knyttet til seg. Sukkerenhetene øker løseligheten i vann, og bidrar til å stabilisere antocyanene (Andersen 1987; Harborne & Williams 2000; Melo et al. 2009). De fleste antocyaner har én eller flere sukkerenheter knyttet til hydroksylgruppen i 3-posisjon, men glykosylering i 5, 7, 5', 3' og 4'-posisjonene forekommer også (Andersen 2003; Andersen & Jordheim 2006). 3-glykosider og 3,5-diglykosider er de vanligste typene glykosidenheter (Strack & Wray 1989; Bruneton 1999).

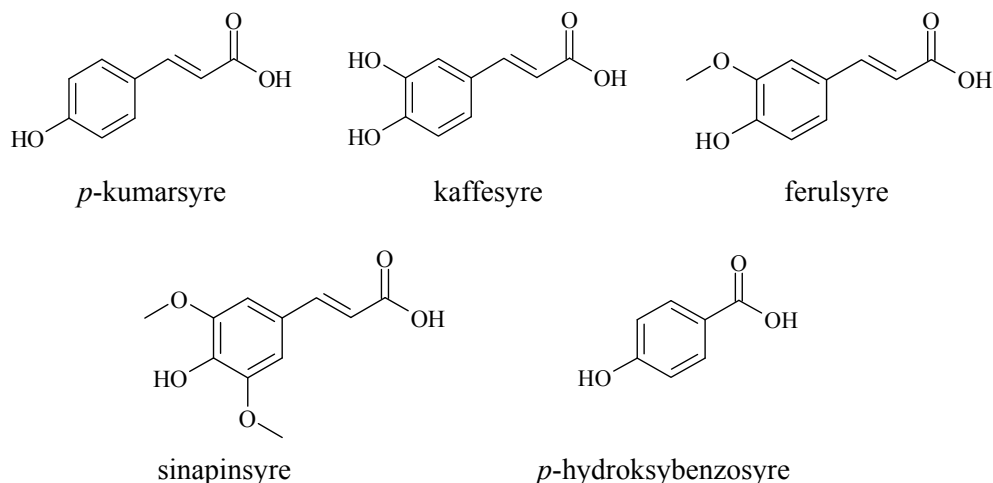
Glukose er den vanligste sukkerenheten i antocyaner, men også rhamnose, galaktose, xylose og arabinose forekommer ofte (Strack & Wray 1989; Andersen & Jordheim 2006). De vanligste monoglykosidene som forekommer i antocyaner er vist i figur 1.2.2.



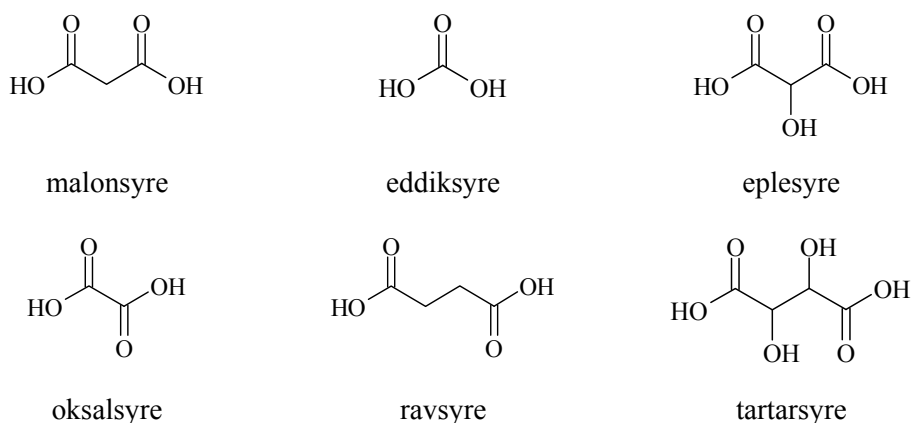
Figur 1.2.2. Strukturen til noen av de vanligste monosakkarider i antocyaner

Acylering

Over 65 % av de identifiserte antocyanene har én eller flere syreenheter knyttet til glykosidene (Andersen & Jordheim 2006). Antocyanene kan være acylert med både alifatiske og aromatiske syrer. Noen av de vanligste aromatiske syrene inkluderer *p*-kumarsyre, kaffesyre, ferulsyre, sinapinsyre og *p*-hydroksybenzoesyre. Blant de alifatiske syregruppene er malonsyre mest utbredt, men edikksyre, eplesyre, oksalsyre, ravsyre og tartarsyre forekommer også (Andersen & Jordheim 2006). Acylering, hovedsakelig med aromatiske syrer, kan ha en stabiliserende effekt på antocyanet som følge av intra- og intermolekylær kopigmentering (Jackman & Smith 1996; Giusti & Wallace 2009). De vanligste aromatiske og alifatiske syregruppene vises i henholdsvis figur 1.2.3 og 1.2.4.



Figur 1.2.3. Vanlige aromatiske syregrupper i antocyaner



Figur 1.2.4. Vanlige alifatiske syregrupper i antocyaner

1.2.2 Kjemiske egenskaper – farge og stabilitet

Antocyaner forekommer i flere forskjellige farger, noe som blant annet kommer av ulike strukturer, pH-betingelser, intra- og intermolekylær kopigmentering og metallkompleksring (Giusti & Wallace 2009; Melo et al. 2009). I tillegg kan faktorer som konsentrasjon, løsemiddel og temperatur også påvirke fargen (Giusti & Wallace 2009).

Struktur

Når $\text{pH} = 1$ forekommer antocyanene i sin mest stabile likevektsform, flavylium kation, og fargen bestemmes av aglykonets struktur. (Giusti & Wallace 2009). Fargene kan variere fra oransje (pelargonidin) til rød (peonidin) og fiolett (delfinidin) som følge av ulik grad av hydroksylering og metoksylering i 3'- og 5'-posisjonen. Både metoksy- og hydroksygrupper fører til et batokromisk skift, det vil si en forskyvelse av absorpsjonsmaksimum mot høyere

bølgelengder (Jackman & Smith 1996; Giusti & Wallace 2009). I tillegg kan glykosylering bidra til å gi en mer rødlig farge, på grunn av hypsokromisk skift (skift mot kortere bølgelengder) og stabilisering av antocyanidinet, mens acylering av sukkerenhetene kan føre til både batokromisk og hyperkromisk (økning i intensitet) skift. (Giusti & Wallace 2009).

pH

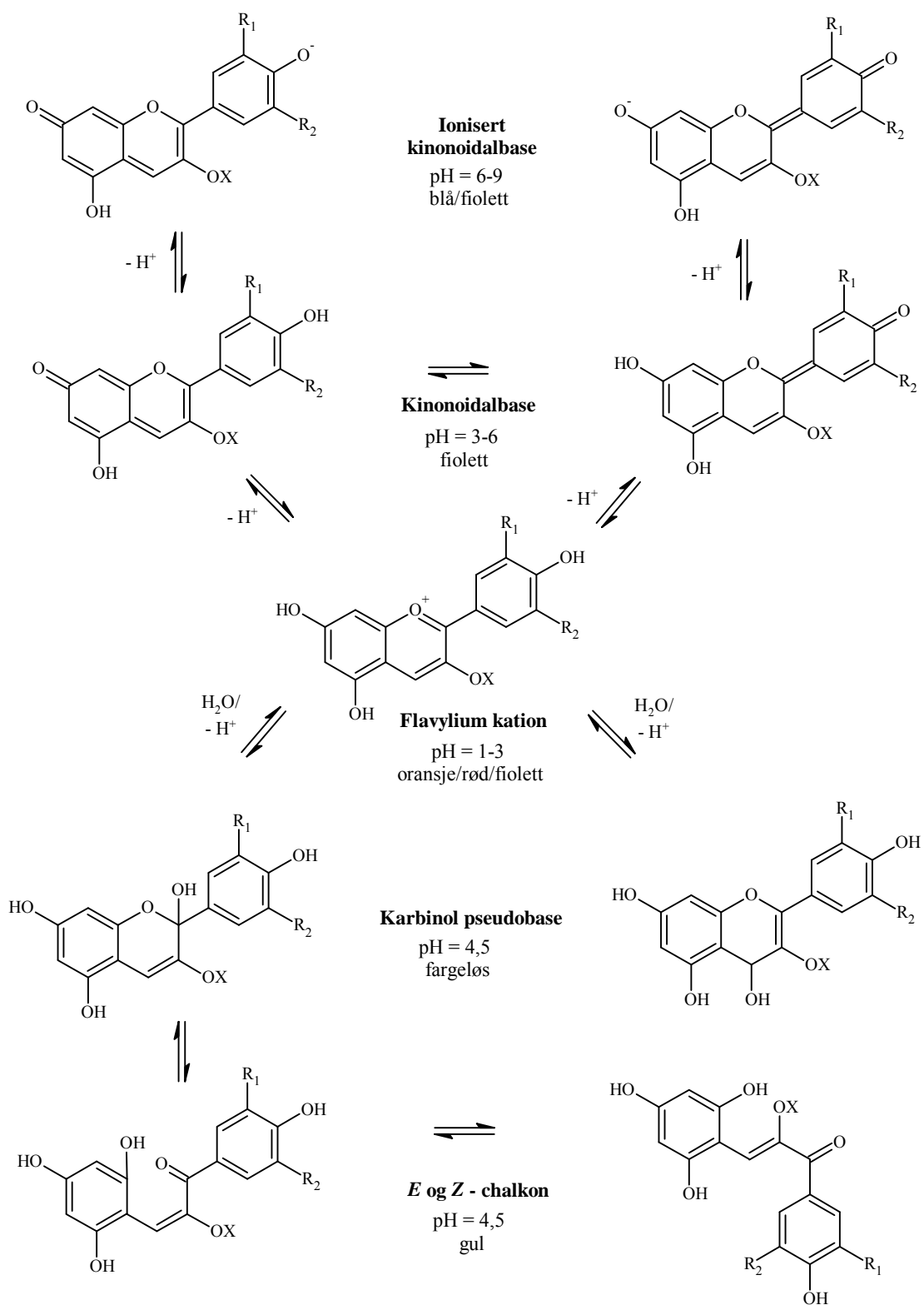
Antocyaner foreligger på flere likevektsformer med ulike farger og stabilitet. Som nevnt er flavyliumformen dominerende ved pH lavere enn 3, og fargen varierer fra oransje/rød til fiolett. Når pH økes kan flere reaksjoner finne sted (figur 1.2.5). Deprotonering av flavylium kationet gir opphav til ulike kinonoidalbaser med fiolett farge. Ytterligere deprotonering fører til et kinonoidalalanion med en mer blålig farge. Den andre reaksjonen innebærer hydrering av kationet og fører til dannelse av fargeløse karbinol pseudobaser. Disse kan videre undergå ringåpning og danne *E*- og *Z*-chalkoner med gul farge (Pina 1998; Andersen 2003; Giusti & Wallace 2009).

I svakt sure og nøytrale løsninger (pH 5-7) vil fargeintensiteten til antocyanene avta, som følge av at flavyliumformen omdannes til fargeløse karbinolbaser og fiolette kinonoidalbaser. I basiske løsninger (pH 8-9) vil kinonoidalbasen være dominerende med fiolett/blå farge. Ved ytterligere økning i pH, vil fargen bli svakere igjen. (Fossen et al. 1998; Pina 1998; Cabrita et al. 2000)

Kopigmentering, metallkompleksring og selvassosiasjon

I planter er antocyanene lokalisert i cellevakuolene, hvor pH vanligvis varierer fra 4-6 (Andersen 2003). I dette pH-området er det forventet at antocyanene vil foreligge som fargeløse karbinol pseudobaser, noe som likevel ikke er tilfelle. Dette betyr at det må være andre faktorer til stede, som er med på stabilisere antocyanene i disse pH-omgivelsene. Inter- og intramolekylær kopigmentering, metallkompleksring og selvassosiasjon er noen av de faktorene som bidrar til å stabilisere og øke fargeintensiteten i antocyaner (Giusti & Wallace 2009; Melo et al. 2009).

Intermolekylær kopigmentering defineres som en interaksjon mellom antocyan og et fargeløst kopigment, som oftest andre flavonoider, og forekommer ofte i antocyaner som ikke er acylerte, i motsetning til intramolekylær kopigmentering (Jackman & Smith 1996).



Figur 1.2.5: Eksempler på likevektsformer ved ulike pH-betingelser

Det antas at komplekset holdes sammen ved hjelp av intermolekylære krefter som hydrogenbinding, hydrofobiske og/eller elektrostatiske interaksjoner (Giusti & Wallace 2009).

Intermolekylær kopigmentering virker stabiliserende på antocyaner, og vil i tillegg medvirke til en mer blålig farge og økt fargeintensitet (Mazza & Miniati 1993; Schwinn & Davies 2004).

I *intramolekylær kopigmentering* er kopigmentet kovalent bundet til antocyanet via syregrupper, og forekommer hovedsakelig i acylerte antocyaner. På grunn av de sterke kovalente bindingene regnes intramolekylær kopigmentering for å ha en høyere stabiliserende effekt på antocyaner (Giusti & Wallace 2009).

Konsentrasjonen til antocyanene påvirker fargen i den grad at høy konsentrasjon gir en mer intens farge, nærmest blåsvart i noen tilfeller, mens fortynnede løsninger av antocyaner ofte har en mer lyserød/fiolett farge (Andersen 1987). I tillegg kan antocyaner selv fungere som kopigmenter ved høye konsentrasjoner. Dette fenomenet kalles *selvassosiasjon*, og vil føre til økt fargeintensitet (Strack & Wray 1989; Mazza & Miniati 1993; Jackman & Smith 1996; Andersen 2003; Andersen & Jordheim 2006).

I noen få tilfeller kan sterkt positive metallion danne kompleks med antocyaner, og muligens bidra til å forsterke interaksjonen mellom pigment og kopigment. Kelatdannelse forutsetter at det er to frie hydroksylgrupper på B-ringen på aglykonet, og det er derfor kun cyanidin, delphinidin og petunidin som danner kompleks med metallion (Andersen 1987; Giusti & Wallace 2009). De vanligste metall som forekommer i kompleks med antocyaner er aluminium (Al), magnesium (Mg), tinn (Sn), kopper (Cu), jern (Fe) og kalium (K) (Giusti & Wallace 2009). *Metallkompleksring* kan føre til både batokromisk og hyperkromisk skift (Andersen & Jordheim 2006).

Temperatur, lys og oksygen

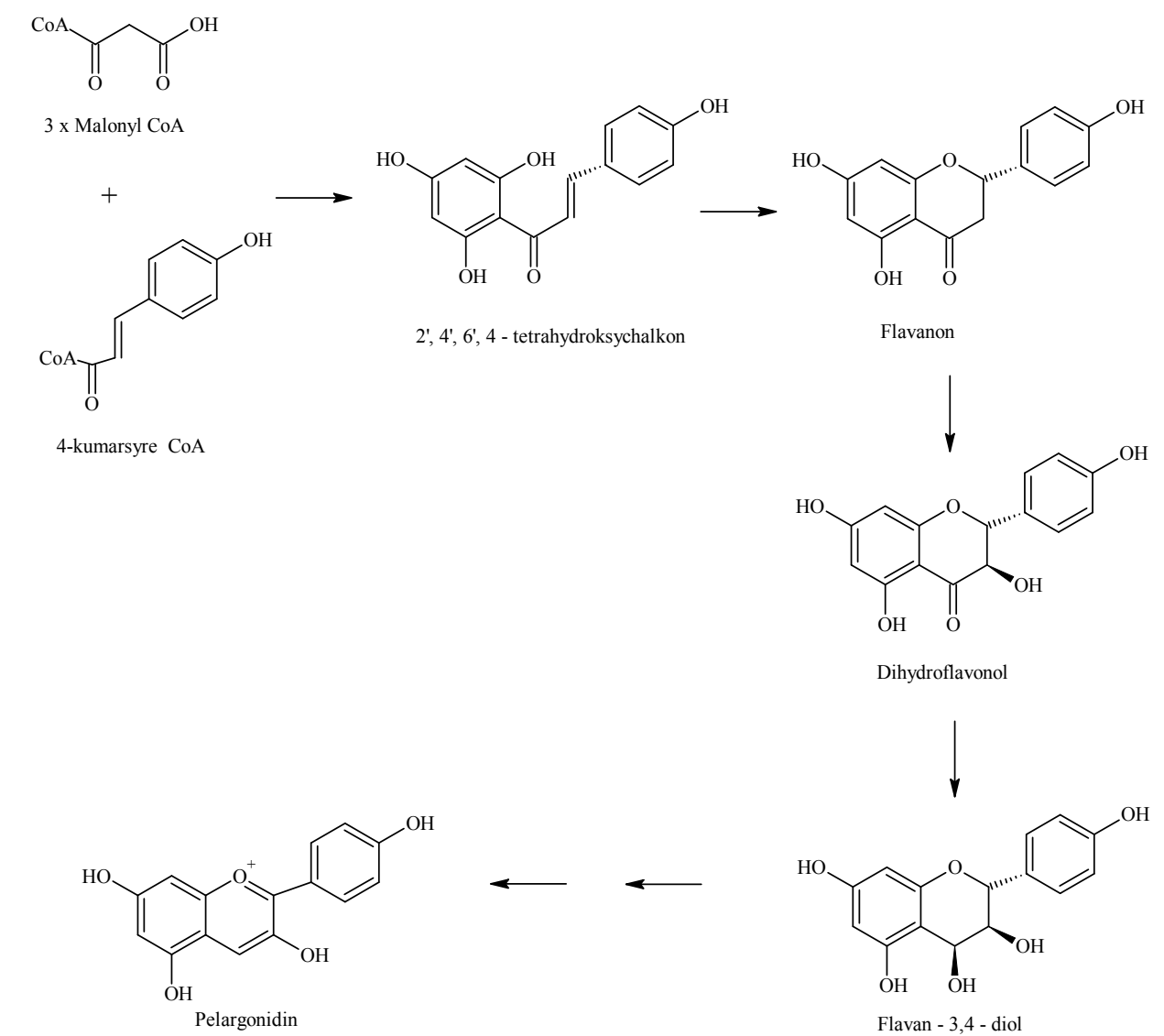
Andre faktorer som påvirker antocyanenes stabilitet er temperatur, lys og oksygen. Økt temperatur fører til degradering av antocyanet, hydrolyse av glykosidbindingen medfører tap av sukkerenheten. Generelt vil strukturelle faktorer som øker stabilitet mot pH-endringer også gi økt stabilitet mot temperaturøkning. Eksponering for lys etter ekstraksjon vil også føre til degradering, i likhet med temperaturøkning. Acylerte antocyaner viser høyere stabilitet mot både temperaturøkning og lyseksponering. I tillegg kan antocyaner bli utsatt for oksidasjon, dersom det er oksygen eller askorbinsyre til stede (Giusti & Wallace 2009).

For å redusere risiko for degradering, bør antocyaner derfor oppbevares på et kaldt og mørkt sted, for eksempel i et fryseskap, med minst mulig oksygen til stede.

1.2.3 Biosyntese

Flavonoider biosyntetiseres via shikimisyre- og acylpolymalonatveien. Shikimisyre gir opphav til C_6C_3 -enheten (B- og deler av C-ringen), mens A-ringen stammer fra tre acetatenheter (Andersen 1987).

Kondensasjon av kumarsyre-CoA med tre malonsyre-CoA-molekyl fører til dannelse av 2', 4', 6', 4-tetrahydroksychalkon. Chalkonet omdannes til et flavanon, som videre kan gi opphav til en rekke ulike produkter, deriblant flavan-3,4-diol, som er forløperen til antocyaner (Strack & Wray 1994; Bruneton 1999; Davies & Schwinn 2006). De viktigste hovedtrekk i biosyntese av antocyanidiner er vist i figur 1.2.6.



Figur 1.2.6. Hovedtrekk i biosyntese av pelargonidin

1.2.4 Naturlig forekomst og funksjon

Antocyaner forekommer først og fremst i frukt, bær og blomster, og i noe mindre grad i plantens blader, stengel, rot og bark. Antocyanene befinner seg som oftest i cellevakuolene i epidermis, det vil si i skallet til bærene. I noen planter, som for eksempel jordbær og solbær, kan de også være lokalisert i hele frukten (Melo et al. 2009). I senere år er det vist at antocyaner også er lokalisert i såkalte AVI – Anthocyanic vacuolar inclusions (Andersen & Jordheim 2006).

Funksjonen til antocyaner i planter er først og fremst knyttet til pollineringsprosessen, hvor de kraftige fargene bidrar til å tiltrekke seg insekter og dyr som kan spre plantenes frø (Andersen 1987; Strack & Wray 1989; Harborne & Williams 2000). Akkumulering av antocyaner i planter når de utsettes for stressfaktorer, kan tyde på at antocyanene deltar i plantenes forsvar mot virus- og bakterieinfeksjoner, ernæringsmangel, UV-B-stråling samt temperatur- og pH-endringer (Andersen 1987; Jackman & Smith 1996; Harborne & Williams 2000; Davies 2004; Lila 2004; Gould & Lister 2006).

1.2.5 Menneskers nytte av antocyaner

Interessen for antocyaner er stor, både med tanke på at de kan brukes som naturlig fargetilsetning i mat, men også fordi de har vist å inneha gunstige helseeffekter. Antocyaner blir eksempelvis benyttet som fargetilsetning i blant annet syltetøy og fruktjuice (Jackman & Smith 1996).

Bruken av antocyaner som fargetilsetning i mat og drikke er imidlertid begrenset, blant annet grunnet manglende stabilitet knyttet til temperatur, pH og lys, men også fordi det ofte er vanskelig og tidkrevende å rense antocyaner. En annen begrensning er at antocyaner kan reagere med svoveldioksid, som er et mye brukt konserveringsmiddel i mat (Strack & Wray 1989).

Reaktive oksygenforbindelser og frie radikaler antas å være medvirkende årsaker til mange degenerative sykdommer, som kreft, multippel sklerose, Parkinsons sykdom, Alzheimers, inflammasjon, artritt og aterosklerose (Giusti & Jing 2007; Melo et al. 2009). Antocyaner regnes for å være sterke antioksidanter, og kan dermed bidra til å forebygge de ovenfornevnte sykdommene. Det har blitt påvist en høy korrelasjon mellom antocyaninnhold og

antioksidanteffekt i utvalgte frukt og bær (Jakobek et al. 2009). Antioksidanteffekten til antocyaner påvirkes blant annet av antall hydroksygrupper på B-ringen. Delfinidin regnes derfor for å ha høyest antioksidantaktivitet blant de vanligste antocyanaglykon, etterfulgt av cyanidin, malvidin, og pelargonidin.

Antocyaner har en dokumentert medisinsk effekt på synet, særlig nattesynet, og har blitt brukt i behandling av øyesykdommer og for å forbedre synsskarphet. Flere studier har vist at antocyaner også beskytter mot nevrologiske sykdommer, særlig degenerative lidelser relatert til høy alder og kan redusere risiko for hjerte- og karsykdommer (Lila 2004). I tillegg viser studier at antocyaner kan forebygge ulike former for kreft, samt redusere veksten til tumor/svulster (Kanga et al. 2003).

1.3 *Rubus fruticosus*

Rubus er en planteslekt som tilhører rosefamilien Rosaceae og som består av mange ulike arter. Blant noen av de vanligste artene finner vi bjørnebær (*Rubus fruticosus*), røde og svarte bringebær (*Rubus idaeus* og *Rubus occidentalis*) og moltebær (*Rubus chamaemorus*), i tillegg til en rekke hybrider, for eksempel loganbær (*Rubus loganobaccus*), som er en krysning mellom bringebær og bjørnebær (Rieger 2006). Innenfor hver art finnes det et stort antall ulike kultivarer, som kan klassifiseres av vekstmønster; plantene kan være høyreist, delvis høyreist eller ha krypende greiner som vokser langs bakken. I tillegg finnes det varianter med og uten torner (Podlech 1991; Rieger 2006; Hjelmstad 2009).

Utbredelse

Bjørnebær har opphav i Asia, Europa, samt Nord- og Søramerika, mens bringebær opprinnelig var utbredt i Asia og Nordamerika. I dag finner man imidlertid bjørnebær og bringebær i de fleste verdensdeler, og på grunn av varierende oppvekstbetingelser, vil det være forskjeller mellom planter fra de ulike regionene (Rieger 2006).

Botanisk beskrivelse

Bjørnebær og bringebær er begge buskvekster med hvite og lyserosa blomster og grønne, sagtannede blad. Den mest åpenbare forskjellen mellom bjørnebær og bringebær er fargen på bærene; bjørnebærene kan bli blåsvarte, mens bringebær er røde. Bærene består av mange små steinfrukter som er satt sammen rundt en bærtapp. Hos bjørnebær følger bærtappen med bæret

når det plukkes, mens bringebær får en hul åpning ved plukking (Podlech 1991; Rieger 2006). En annen forskjell mellom bjørnebær og bringebær er at bringebærene er hårete (Rieger 2006). De fleste bjørnebær og bringebær er selvpollinerende i tillegg til krysspollinering, det vil si at de kan danne spiredyktige frø uten bestøvning, noe som medfører at det lett kan oppstå mindre arter og kryssninger som er vanskelig å skille fra hverandre (Dickerson 2000; Rieger 2006; Hjelmstad 2009).

Anvendelse

I Europa har bjørnebærplanten blitt brukt i over 2000 år, som mat og til medisinske formål. Både blader og blomst inneholder garvestoffer, som har en sammentrekkende effekt, og har blant annet blitt brukt til å lindre infeksjoner i munn og svelg, samt ved utslett og sår (Podlech 1991; Hjelmstad 2009). Bjørnebærbusken kan bli svært stor og tornete, og har av den grunn også hatt som formål å holde unna plyndrere og inntrengere (Rieger 2006).

Antocyaninnhold i bjørnebær og bringebær

Bringebær og bjørnebær regnes for å være rike kilder til antocyaner, spesielt bjørnebær med tanke på den karakteristisk mørke fargen. Innholdet kan variere med ulike kultivarer, så vel som oppvekstvilkår og sesong (Giusti & Jing 2007).

Tidligere studier har vist at bjørnebær hovedsakelig inneholder fem cyanidin-baserte antocyaner; cyanidin 3-glukosid, cyanidin 3-rutinosid, cyanidin 3-xylosid, cyanidin 3-(6''-malonyl)glukosid og cyanidin 3-dioksalyglukosid, hvorav cyanidin 3-glukosid er det dominerende pigment. (Stintzing et al. 2002; Maatta-Riihinen et al. 2004; Siriwoharn et al. 2004; Fan-Chiang & Wrolstad 2005; Wu & Prior 2005; Howard & Hager 2007; Ogawa et al. 2008; Jakobek et al. 2009).

Andre antocyaner man har funnet i bjørnebær inkluderer cyanidin 3-arabinosid (Dugo et al. 2001; Wu & Prior 2005; Howard & Hager 2007; Ogawa et al. 2008), cyanidin 3-(3''-malonyl)glukosid (Wu & Prior 2005), malvidin-3-glukosid (Dugo et al. 2001; Howard & Hager 2007), pelargonidin-3-glukosid (Dugo et al. 2001; Wu & Prior 2005; Howard & Hager 2007) og peonidin-3-glukosid (Wu & Prior 2005; Howard & Hager 2007).

I bringebær er det vanlig å finne cyanidin 3-sophorosid, cyanidin 3-(2-glukosylrutinosid), cyanidin 3-glukosid og cyanidin 3-rutinosid (Maatta-Riihinen et al. 2004; Wu & Prior 2005; Howard & Hager 2007; Ogawa et al. 2008; Zhang et al. 2008).

Det har også blitt rapportert om mindre mengder cyanidin 3-sambubiosid-5-rhamnosid og cyanidin 3-sophorosid-5-rhamnosid (Wu & Prior 2005; Howard & Hager 2007; Ogawa et al. 2008), pelargonidin- 3-glukosid (Maatta-Riihinen et al. 2004; Wu & Prior 2005; Howard & Hager 2007; Ogawa et al. 2008) og pelargonidin-3-rutinosid (Maatta-Riihinen et al. 2004; Wu & Prior 2005; Howard & Hager 2007).

I tillegg har man også funnet cyanidin 3,5-diglukosid, cyanidin 3-sambubiosid, pelargonidin-3-sophorosid, cyanidin 3-xylosylglukosid og pelargonidin-3-(2-glukosylrutinosid) (Howard & Hager 2007). Identifikasjonen i alle nevnte studier er hovedsakelig basert på data fra HPLC-UV og LC-MS, samt sammenligning med data fra andre studier.

1.4 Motivasjon og målsetning

Tema for denne oppgaven er analyse av antocyaner i bjørnebær. Bjørnebær er kjent for å ha et høyt innhold av antocyaner og er en naturlig del av vårt kosthold, og dermed også en viktig kilde til antocyaner. I senere tid er det særlig interesse knyttet til antocyaners funksjon som antioksidanter, som potensielt kan bidra til å forebygge og behandle ulike sykdommer hos mennesker. Hvorvidt og i hvilken grad antocyaner har en positiv helseeffekt, avhenger blant annet av mengde antocyaner som inntas og absorberes i kroppen. I tillegg er stabiliteten til de individuelle antocyaner også svært avgjørende for en potensiell helsemessig effekt, da betingelsene i menneskekroppen (eksempelvis temperatur og pH) er annerledes enn i planten. Stabiliteten til antocyaner er som tidligere nevnt avhengig av strukturen. Type aglykon, sukkersubstituent og hvorvidt sukkerenhetene er acylert med alifatisk eller aromatisk syre, har betydning for stabiliteten til antocyanet. Det er derfor viktig å kjenne til både identiteten og kvantitativt innhold av antocyaner i bjørnebær.

Som tidligere nevnt er det hovedsakelig fem antocyaner som er fremtredende i bjørnebær, og identiteten til fire av disse er godt kjent fra tidligere studier (Maatta-Riihinen et al. 2004; Siriwoharn et al. 2004; Fan-Chiang & Wrolstad 2005; Wu & Prior 2005; Howard & Hager 2007; Ogawa et al. 2008; Jakobek et al. 2009). Det femte pigmentet har blitt identifisert som cyanidin 3-(6-dioksalsyre)glukosid av Stintzing et al. (2002) ved hjelp av lavoppløselig LC-MS, men det har foreløpig ikke blitt utført NMR-spektroskopi for endelig strukturoppklaring. Dette pigmentet har også blitt rapportert i andre studier (Wu & Prior 2005; Ogawa et al. 2008), hovedsakelig basert på LC-MS data og samsvar med resultatene i studien til Stintzing et al. (2002). Innledende forsøk utført hos antocyangruppen ved Kjemisk institutt, Universitetet i Bergen, antyder at dette kan være en feilbestemmelse. I oppgaven vil derfor et av målene være å isolere og karakterisere dette pigmentet, heretter kalt pigment **5**, ved hjelp av HPLC (UV-synlig detektor), høyoppløselig LC-MS og NMR-spektroskopi.

Det var ønskelig å se på utbredelsen av pigment **5** i ulike bjørnebærkultivarer, og seks bjørnebærkultivarer ble analysert ved hjelp av HPLC med UV-synlig detektor og høyoppløselig LC-MS. Det var også interessant å undersøke om pigment **5** forekommer i andre bær i slekten *Rubus*, for eksempel bringebær, og tre ulike bringebærkultivarer samt én hybrid ble derfor inkludert i analysen. Utvalget av bærsorter var begrenset av tilgjengeligheten på markedet.

Tredje og siste delmål i oppgaven var å bestemme det kvantitative innhold av antocyaner i de ulike bjørnebær- og bringebærkultivarene, hovedsakelig med fokus på relative forskjeller i total mengde blant kultivarene. Tidligere kvantitative studier har rapportert om svært varierende totalinnhold av antocyaner i bjørnebær, fra 100 til 300 mg/100 g bær (cyanidin 3-glukosid ekvivalenter) hos de fleste studiene (Torre & Baritt 1977; Wang & Lin 2000; Cho et al. 2004; Siriwoharn et al. 2004; Wu et al. 2006; Pantelidis et al. 2007) og opptil 800 mg/100 g i én studie (Dai et al. 2009). Noe av variasjonen i rapportert mengdeinnhold kan forklares av at det har blitt benyttet ulike bjørnebærkultivarer høstet fra forskjellige steder. I tillegg kan modningsgraden til bærene variere, noe som også vil kunne påvirke mengdebestemmelsen. Noe kan også kunne skyldes at det har blitt benyttet ulike metoder for ekstraksjon og analyse i de forskjellige studiene. I oppgaven vil det derfor også fokuseres på i hvilken grad ekstraksjonstid og antall ekstraksjoner påvirker bestemmelse av total mengde.

1.4.1 Målsetninger

Målene med oppgaven kan oppsummeres som følger:

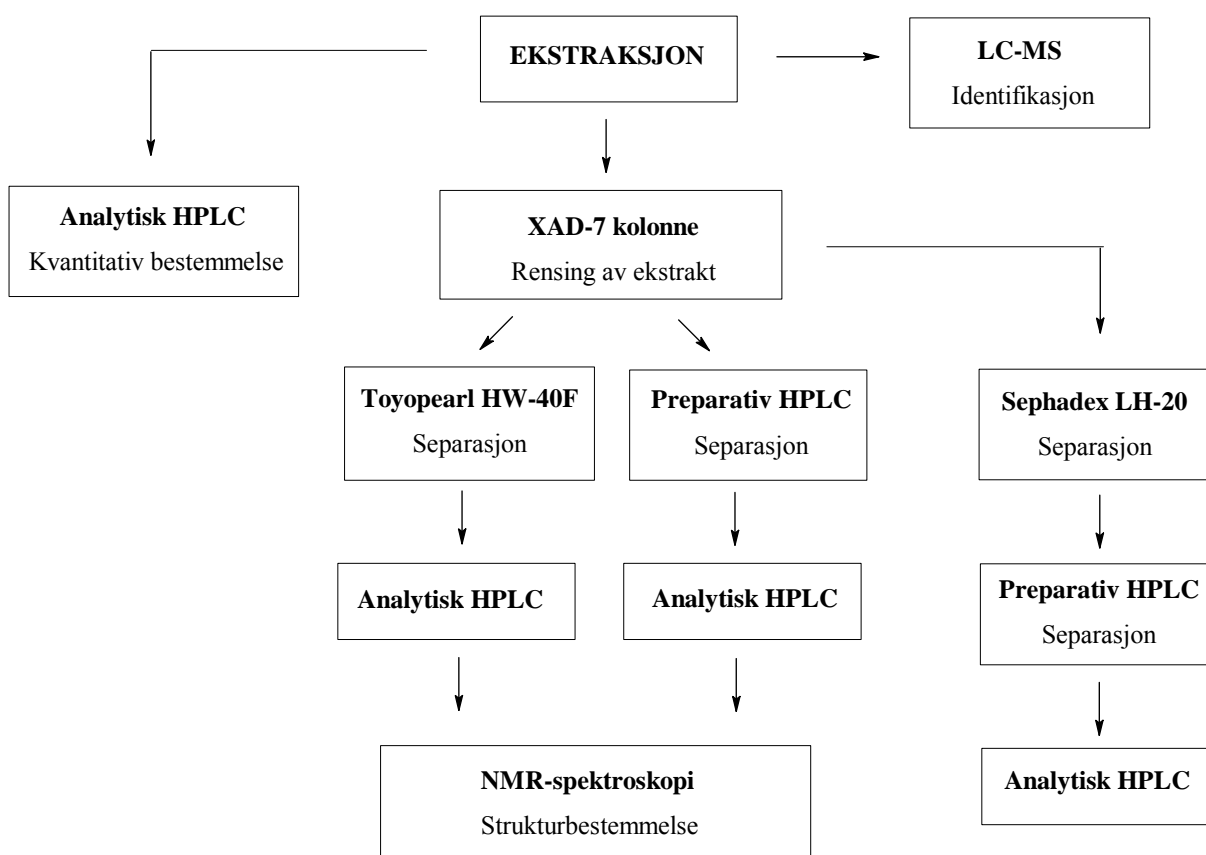
1. Isolere og karakterisere pigment **5** i bjørnebær ved hjelp av NMR-spektroskopi og høyoppløselig LC-MS.
2. Identifisere pigmenter i ulike bjørnebær- og bringebærkultivarer ved hjelp av HPLC med UV-synlig deteksjon og høyoppløselig LC-MS
3. Kvantitativ bestemmelse av antocyaner i bjørnebær
 - a. Bestemme relative forskjeller i absolutte mengder mellom bjørnebær- og bringebærkultivarer
 - b. Bestemme betydningen av faktorer, som ekstraksjonstid og antall ekstraksjoner, for mengdebestemmelse, og ved hjelp av disse faktorene gi en indikasjon på reell totalmengde av antocyaner i bjørnebær.

2 METODER OG EKSPERIMENTELLE PROSEDYRER

Dette kapitlet omhandler de ulike kromatografiske og spektroskopiske metodene som har blitt benyttet i dette prosjektet. Som nevnt innledningsvis er målet med oppgaven tredelt. I første del er målet å isolere og identifisere ett pigment i bjørnebær, som hittil ikke har blitt tilstrekkelig karakterisert. Plantematerialet ble først ekstrahert med et egnet ekstraksjonsmiddel. Videre ble ulike kolonner benyttet for rensing og separasjon av antocyanene. HPLC, UV-synlig spektroskopi, LC-MS og NMR-spektroskopi ble benyttet i identifikasjon og karakterisering av pigmentet.

I andre del blir analytisk HPLC og LC-MS brukt for å identifisere pigmentene i flere ulike kultivarer av både bjørnebær og bringebær.

Siste del av oppgaven fokuserer på kvantitativ bestemmelse av antocyaner i de ulike bjørnebær- og bringebærkultivarene. Til dette ble HPLC med UV-synlig detektor benyttet. Det kvantitative arbeidet er beskrevet i avsnitt 2.5. En grov oversikt over det eksperimentelle arbeidet er vist i figur 2.1.



Figur 2.1.1. Flyttdiagram – oversikt over det eksperimentelle arbeidet som har blitt utført

2.1 Plantemateriale

Plantematerialet som skal ekstraheres kan være ferskt, frosset, tørket/frysetørket eller pulverisert (Andersen & Francis 2004; Marston & Hostettmann 2006). Det anbefales imidlertid å benytte tørket og/eller frosset materiale, da flavonoider brytes ned av enzymer når plantematerialet er ferskt eller utørket (Marston & Hostettmann 2006).

Til isolasjon og strukturoppklaring av det ukjente pigment i del 1 ble det benyttet ville bjørnebær fra Foldøy, Ryfylke. Bærene ble veid inn frosne tilstand, og påfølgende ekstraksjon, separasjons- og isolasjonsarbeid, samt analyse av pigmentet i bjørnebær er beskrevet i avsnitt 2.2-2.4.

Det ble benyttet totalt ti ulike kultivarer, inklusive viltvoksende bjørnebær som ble brukt i første del, til både kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av antocyaner i bjørnebær og bringebær. Følgende bjørnebærkultivarer ble analysert:

- Ville bær, heretter kalt "bjørnebær" (B), fra Foldøy i Ryfylke (Norge)
- Tupi, opprinnelig fra Mexico, kjøpt inn i fersk tilstand i dagligvare i London (UK)
- Loch Ness (LN), dyrket i UK, kjøpt inn i fersk tilstand i London (UK)
- Bedford Giant (BG), frosne, fra Tveit Gaard i Hordaland (Norge)
- En kultivar av ukjent identitet, i oppgaven kalt "kultivar" (K), fra Foldøy i Ryfylke (Norge)
- Frosne bær av merket "Norrek" (N), kjøpt i dagligvarebutikk. Det ble det opplyst at bærene var en blanding av kultivarene Chester og Hull fra Kina, ettersom det ikke skilles mellom sortene ved innfrysing og pakking.
- Tai, som er en hybrid av bjørnebær og bringebær, frosne, fra Tveit Gaard.

Tre bringebærkultivarer ble benyttet i oppgaven:

- Driscoll Maravilla (DM), fra Portugal, kjøpt inn i fersk tilstand i dagligvarebutikk i Norge.
- Tulameen (TM) fra Portugal, kjøpt inn i fersk tilstand i dagligvarebutikk i Norge.
- Glen Ampel (GA), frosne bær, fra Rogaland

Alle bjørnebær- og bringebærkultivarer ble oppbevart i fryseboks, ved -20 °C, og ble veid inn og ekstrahert i frosne tilstand. Det eksperimentelle arbeidet i den kvantitative bestemmelsen er beskrevet i avsnitt 2.5.

2.2 Ekstraksjon

Et av de mest brukte ekstraksjonsmiddel i arbeid med antocyaner er metanol, som er både effektiv og lett å fjerne på grunn av sitt lave kokepunkt. Som tidligere nevnt er antocyaner ustabile i nøytrale og basiske løsninger, og det vil derfor være nødvendig å benytte et surt ekstraksjonsmiddel slik at antocyanene foreligger på den gunstige flavyliumkationformen. Det er derfor vanlig å tilsette små mengder syre til ekstraksjonsmiddelet. Bruk av mineralsyre, som saltsyre, kan medføre at glykosider og særlig alifatiske syreenheter knyttet til antocyanene faller av, og bør derfor unngås (Macheix et al. 1990; Rodriguez-Saona & Wrolstad 2005). I stedet kan man bruke svake organiske syrer, som maursyre og eddiksyre. Trifluoreddiksyre (TFA) er også svært velegnet, da den med sitt lave kokepunkt (72,4 °C) lett lar seg fjerne under vakuüm (Strack & Wray 1989; Strack & Wray 1994; Jackman & Smith 1996; Marston & Hostettmann 2006; Takeoka & Dao 2008). Det er vanlig å gjenta ekstraksjoner flere ganger, men tre ekstraksjoner er som oftest nok (Andersen & Francis 2004; Rodriguez-Saona & Wrolstad 2005). Ekstraktet inneholder ofte forurensinger/andre uønskede forbindelser, da ekstraksjonsmiddelet ikke er spesifikt kun for antocyaner, og det er som regel nødvendig med rensing av ekstraktet (Rodriguez-Saona & Wrolstad 2005).

Prosedyre

Det ble i denne studien benyttet frosne bær (B) som plantemateriale. For å unngå for store volum ved avdamping, ble bærene ekstrahert med minst mulig løsemiddel. Det ble brukt teknisk metanol med 0,5 % TFA til ekstraksjonen, og det ble foretatt flere ekstraksjoner med ulik varighet. Løsningen med bærene ble oppbevart i kjøleskap, før ekstraktet ble filtrert gjennom glassull for å fjerne planterester. Det samlede råekstraktet på omtrent 3 L ble dampet inn til tørrhet under vakuüm ved 26-28 °C ved hjelp av rotavapor (Büche R-205 og R-124). Det tørre stoffet ble videre oppbevart mørkt ved -20 °C for å hindre nedbrytning.

2.3 Kromatografiske metoder

Kromatografi er en svært viktig separasjonsmetode i organisk analyse. Kromatografisystemet består av en stasjonær fase og en mobil fase, og separasjonen skjer ved at ulike stoffer fordeler seg ulikt mellom stasjonær- og mobilfase.

Den mobile fasen fører med seg forbindelsene i prøven gjennom den stasjonære fasen. Forbindelser som har størst interaksjon med den stasjonære fasen retarderes i større grad enn

forbindelser med liten affinitet til stasjonærfasen. Fordelingen mellom de ulike fasene påvirkes av de kjemiske og fysiske egenskapene til forbindelsene i prøven, samt egenskapene til stasjonærfase og mobilfase. I tillegg vil faktorer som trykk, temperatur og kolonnens lengde og diameter ha betydning for separasjon av stoffene (Greibrokk et al. 2005).

Stasjonærfasen består som regel av et fast materiale, mens den mobile fasen kan være en væske eller gass. I analyse av antocyaner foretrekkes væskekromatografi fremfor gasskromatografi, fordi det de er svært lite flyktige og termisk labile (Fossen & Andersen 2006; Marston & Hostettmann 2006). Noen av de viktigste separasjonsprinsippene innen væskekromatografi er adsorpsjon, fordeling, eksklusjon og ionebytting.

I dette arbeidet har det blitt benyttet konvensjonell kolonnekromatografi med ulike materialer (Amberlite XAD-7, Toyopearl HW-40F og Sephadex LH-20) samt analytisk og preparativ HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

2.3.1 Amberlite XAD-7

XAD-7 er en svakt polar resin av akrylester, som benyttes i adsorpsjonskromatografi.

I adsorpsjonskromatografi benyttes et finfordelt, fast adsorpsjonsmiddel som stasjonærfase og en væske eller en gass som mobilfase. Forbindelser i prøven med ulik affinitet til stasjonærfasen vil bevege seg gjennom kolonnen med forskjellig hastighet, slik at man oppnår separasjon av stoffene. Stoffenes affinitet til adsorpsjonsmiddelet skyldes intermolekylære krefter som dispersjon, dipol, hydrogenbindinger samt svake kovalente bindinger (Wibetoe ; Greibrokk et al. 2005)

XAD-7 adsorberer aromatiske forbindelser, mens polare alifatiske forbindelser, som sukker og syregrupper, vaskes ut av kolonnen med destillert vann. Kolonnematerialet egner seg derfor svært godt til rensing av antocyaner og andre flavonoider.

Prosedyre

Råekstraktet ble løst i minst mulig vann (destillert), og tilsatt jevnt på overflaten av en XAD-7-kolonne. Denne kolonnen hadde en diameter på ca 6 cm og en høyde på rundt 75 cm. Vann ble benyttet til å vaske ut frie sukker og syregrupper, mens pH-verdien til eluatet ble testet med jevne mellomrom. pH-verdien var nøytral i starten og mens sukkergruppene ble vasket ut, og deretter sur mens syregruppene forlot kolonnen. Vaskingen var ferdig når pH ble nøytral igjen,

og eluering kunne begynne. Metanol ble brukt som eluent, og det ble samlet opp fire fraksjoner med klar rødfarge med et totalvolum på omtrent 2 L. Disse ble slått sammen til én fraksjon og dampet inn til tørrhet ved hjelp av rotavapor, og videre frysetørket (Savant RVT100 frysetørker) i ca 2,5 timer. Det tørre stoffet ble oppbevart ved -20 °C i fryseskap.

2.3.2 Toyopearl HW-40F

Toyopearl kolonnemateriale separerer forbindelser hovedsakelig etter størrelse, og blir brukt i eksklusjonskromatografi. I eksklusjonskromatografi består stasjonærfasen av et porøst materiale med en bestemt porestørrelse, og forbindelsene i prøven separeres etter molekylstørrelse. Molekyler som er større enn porene vil passere gjennom kolonnen med mobilfasen, mens molekyler som er små nok vil diffundere inn og ut av porene, slik at de bruker lengre tid gjennom kolonnen (Wibetoe ; Greibrokk et al. 2005; Harris 2007). Toyopearl HW-40F kan gi bedre separasjon av pigmenter med tilnærmet lik struktur, som cyanidin 3-glukosid og cyanidin 3-rutinosid (som består av både en rhamnosyl- og glukoseenhet) sammenlignet med Sephadex LH-20. Dette skyldes at Toyopearl kolonnematerialet har mindre partikkelstørrelse og en høyere grad av gelfiltrering enn Sephadex-materiale som i tillegg er polart (Frøytlog et al. 1998).

Prosedyre

Ca 1 g XAD-renset ekstrakt (fra avsnitt 2.2.1) løses i minst mulig volum 80:20 destillert vann med MeOH og 0,5 % TFA og appliseres en Toyopearl HW-40F kolonne (3 × 80 cm). Det ble benyttet både isokratisk og gradienteluering. Ved begynnelsen av elueringen ble det benyttet destillert vann med 20 % MeOH og 0,5 % TFA. Etter hvert som båndene ble separert, ble løsemiddelstyrken gradvis endret til 40 % metanol for å øke elueringshastigheten. Det ble samlet opp totalt 70 fraksjoner med et totalvolum på ca 7 L. Hver av fraksjonene ble konsentrert på rotavapor og dampet inn til tørrhet ved hjelp av nitrogen. Fraksjonene ble oppbevart i fryseskap ved -20 °C inntil HPLC-analyse.

2.3.3 Sephadex LH-20

Sephadex LH-20 er en dekstranbasert resin gel som benyttes i eksklusjonskromatografi, men mekanismer som adsorpsjon og fordeling er også til stede, spesielt overfor aromatiske forbindelser (Wibetoe ; Greibrokk et al. 2005). Sephadex LH-20 regnes for å være et egnet

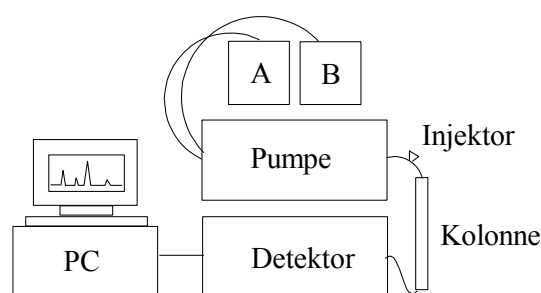
kolonnemateriale for separasjon og rensing av individuelle antocyaner (Strack & Wray 1989; Andersen & Francis 2004).

Prosedyre

Prosedyren er den samme som for Toyopearl HW-40F kolonnen. Ca 6 g frysetørket XAD-renset ekstrakt ble løst i eluent og tilsatt en Sephadex LH-20 kolonne (10 × 80 cm). Det ble benyttet destillert vann med 20 % metanol og 0,5 % TFA som eluent, og løsemiddelstyrken ble økt til 40 % metanol etter båndseparasjon. Totalt ble 75 fraksjoner med et totalvolum på ~50 L samlet opp, og disse ble dampet inn til tørrhet ved hjelp av rotavapor og nitrogen, og deretter lagret i fryseskap (-20 °C).

2.3.4 High Performance Liquid Chromatography

High performance liquid chromatography (HPLC) er en instrumentell kromatografisk metode, som er mye brukt på grunn av svært høy effektivitet og følsomhet. Figur 2.3.1 viser en grov skisse over hovedkomponentene i et HPLC-instrument.



Figur 2.3.1. Hovedkomponentene i HPLC

Mobilfasen (A + B) pumpes gjennom kolonnen med et høyt trykk (~100-130 bar). Prøven injiseres og føres gjennom kolonnen sammen med mobilfasen. Forbindelsene i prøven separeres i kolonnen på bakgrunn av ulike egenskaper og detekteres idet de kommer ut av kolonnen av en detektor, som videre er koblet til et datasystem.

Fordelene med HPLC er at det benyttes små kolonner med svært tettpakket kolonnemateriale, noe som muliggjør en god separasjon med høy oppløsning på kort tid. Alle separasjonsprinsipper kan benyttes (adsorpsjon, fordeling, ionebytting og eksklusjon), kolonnene kan variere i størrelse og pakkemateriale (Wibetoe ; Harris 2007), noe som gjør HPLC til en universell analysemetode. I tillegg er HPLC svært egnet til enkel og rask kvantifisering (Andersen & Francis 2004; Durst & Wrolstad 2005).

I analyse av flavonoider benyttes omvendt fase, det vil si at stasjonærfasen består av et upolart materiale, vanligvis C-18, mens blandinger av vann-metanol eller vann-acetonitril tilsatt små mengder svak syre (TFA) brukes som mobilfase (Strack & Wray 1989; Andersen & Francis 2004; Takeoka & Dao 2008).

Både isokratisk og gradienteluering benyttes i HPLC-analyse. Ved isokratisk eluering holdes mobilfasens sammensetning konstant, mens ved gradienteluering endres sammensetningen underveis. Gradienteluering er fordelaktig når man ønsker å separere nesten identiske forbindelser med tilnærmet lik retensjon (Harris 2007). I denne analysen ble det benyttet gradienteluering, hvor man startet med en polar mobilfase som gradvis ble mindre polar under elueringen.

UV-synlig med diode-array deteksjon (DAD) er den mest brukte detektoren i analyse av flavonoider (Sivam 2008). UV-synlig detektor er svært følsom sammenlignet med andre detektorer, og er selektiv for forbindelser som absorberer lys ved bølgelengder over 190 nm, noe som gjør den svært godt egnet i analyse av antocyaner. I tillegg kan den benyttes både ved isokratisk og gradienteluering (Harris 2007). Detektoren er basert på måling av absorbert lys, i henhold til Lambert-Beers lov:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon c l$$

hvor A er absorbans, I_0 og I er lysintensiteten henholdsvis før og etter lyset sendes gjennom prøven, ϵ er molar absorptivitet (L/mol cm), c er konsentrasjonen av forbindelsen i prøven (L/mol cm), og l er lysvei i cm (Greibrokk et al. 2005; Harris 2007; Pavia 2009).

Detektoren som ble benyttet i denne studien var av typen diode-array detektor (DAD), hvor polykromatisk hvitt lys, vanligvis fra en deuteriumlampe, sendes gjennom cellen, og som deretter splittes opp i enkelte bølgelengder. En rekke av fotodioder måler intensiteten til hver av de enkelte bølgelengdene samtidig, og på denne måten kan et fullt spektrum bli tatt opp på få millisekunder (Greibrokk et al. 2005).

Kromatogrammet viser retensjonstid og absorbans til de ulike pigmentene i prøven. I analyse av antocyaner er det vanlig å bruke fire vindu tatt opp ved ulike bølgelengder:

A: 520 ± 20 nm B: 360 ± 10 nm C: 320 ± 10 nm D: 280 ± 10 nm

Antocyaner har absorpsjonsmaksimum rundt 520 nm og det er derfor naturlig å velge dette området til A-vindu. De fleste andre aromatiske forbindelser har absorpsjonsmaksimum rundt 280 nm, og D-vinduet velges for dette området for å se om det også er andre flavonoider tilstede.

Separasjon av antocyaner

HPLC regnes som den best egnede metoden for nøyaktig bestemmelse av sammensetning og konsentrasjon av flavonoider i en bestemt prøve (Andersen & Francis 2004). Identifikasjon baseres på retensjonstid og UV-synlig spektrum til de ulike forbindelsene. Retensjonstiden påvirkes først og fremst av polariteten til forbindelsen. Hydroksylering fører til kortere retensjonstider, mens metoksylering vil øke retensjonstiden. Økt glykosylering gir generelt kortere retensjonstid, mens acylering derimot øker retensjonstiden (Strack & Wray 1989; Durst & Wrolstad 2005). Normalt eluerer de ulike antocyanene i rekkefølgen; delfinidin < cyanidin < petunidin < pelargonidin < peonidin og malvidin.

Retensjonstiden minker med økende antall sukkerenheter, og følgelig vil triglykosider vanligvis elueres før diglykosider, som videre elueres før monoglykosider. Likevel finnes det unntak, eksempelvis har 3-rutinosider lengre retensjonstid enn de tilsvarende 3-glukosidene (Strack & Wray 1989; Durst & Wrolstad 2005). Heksoser elueres vanligvis før pentose på grunn av høyere polaritet (Durst & Wrolstad 2005). Elueringsrekkefølgen for glykosider er vanligvis: 3,7-diglykosider < 3,5-diglykosider < 3-sophorosider < 3-galaktosider < 3-lathyrosider < 3-sambubiosider < 3-glukosider < 3-arabinosider < 3-rutinosider < 3-rhamnosider (Durst & Wrolstad 2005; Jordheim 2007).

Acylerte antocyaner har lengre retensjonstid enn tilsvarende ikke-acylerte antocyaner (Strack & Wray 1989; Jordheim 2007; Takeoka & Dao 2008).

UV-synlig spektrene inneholder også mye informasjon som kan bidra til identifikasjon. Dette er omtalt nærmere i avsnitt 2.4.1. HPLC kan deles inn i preparativ og analytisk skala, og i dette arbeidet har begge metodene blitt brukt.

Preparativ HPLC – prosedyre

I preparativ HPLC blir fraksjonene samlet opp for videre separasjon eller analyse, og benyttes hovedsakelig for å rense og isolere forbindelser i prøven. I denne studien har preparativ HPLC blitt anvendt på XAD-renset materiale og fraksjoner renset ved hjelp av Sephadex LH-20.

Instrument: Gilson HPLC-system og UltiMate 3000-detektor
 Programvare: Chromeleon
 Kolonne: GRACE Econosphere C18 10 µm, 250 x 22 mm
 Injeksjonsvolum: 500-1000 µl
 Flow: 15,0 ml/min
 Trykk: rundt 100 bar ved start av hver kjøring
 Mobilfase A: H₂O med 0,5 % TFA
 Mobilfase B: Acetonitril med 0,5 % TFA

Gradientprogram 1:	Tid (min)	% A	% B
	0-14	90	10
	14-18	90-84	10-16
	18-22	84-82	16-18
	22-26	82-78	18-22
	26-31	78-72	22-28
	31-32	72-60	28-40
	32-40	60	40
	40-43	60-90	40-10

Gradientprogram 2:	Tid (min)	% A	% B
	0-14	90	10
	14-18	90-84	10-16
	18-22	84-82	16-18
	22-24	82-80	18-20
	24-26	80-79	20-21
	26-27	79-78	21-22
	27-31	78-72	22-28
	31-32	72-60	28-40
	32-40	60	40
	40-43	60-90	40-10

Prøvene ble løst i minst mulig volum 80:20 vann og metanol med 0,5 % TFA. Det ble injisert ca 500-1000 µl av prøveløsningen i hver kjøring ved hjelp av manuell injektor. Løsemiddelgradient 1 ble benyttet i separasjonen av prøven fra Sephadex LH-20-kolonnen, mens både gradient 1 og 2 ble brukt for separasjon av det XAD-rensede ekstraktet. Detektoren

viser UV-absorpsjonen til forbindelsene i prøven idet de forlater kolonnen, og fraksjoner av ønskede forbindelser kan samles opp.

Analytisk HPLC – prosedyre

Analytisk HPLC benyttes hovedsakelig til å fastslå identitet, mengde og renhet til forbindelsene i en prøve. I dette arbeidet har analytisk HPLC blitt brukt til å undersøke sammensetning av råekstrakt, opprensede fraksjoner fra Toyopearl HW-40F og Sephadex LH.20 kolonnekromatografi, samt preparativ HPLC. Analytisk HPLC har også blitt benyttet til kvantitativ bestemmelse av pigmenter i ulike bjørnebær- og bringebærkultivarer.

Instrument:	Hewlett-Packard – 1050 HPLC-system med 1050-DAD (diode-array-detektor)
Programvare:	HP-Chemstation
Kolonne:	ODS Hypersil 5 μ m, 250 x 4,6 mm
Injeksjonsvolum:	20 μ l
Flow:	1,0 ml/min
Trykk:	rundt 100 bar ved start av hver kjøring
Mobilfase A:	H ₂ O med 0,5 % TFA
Mobilfase B:	Acetonitril med 0,5 % TFA

Gradientprogram 1:	Tid (min)	% A	% B
	0-10	90-86	10-14
	10-14	86	14
	14-18	86-84	14-16
	18-22	84-82	16-18
	22-26	82-78	18-23
	26-31	78-72	22-28
	31-32	72-60	28-40
	32-40	60	40
	40-43	60-90	40-10
	43-46	90	10

Prøvene ble løst i små mengder metanol tilsatt 0,5 % TFA, og filtrert gjennom 0,45 μ m Millipore membran. 20 μ l av prøveløsningen ble injisert på HPLC ved hjelp av automatinjektor. Ulike standarder med kjente forbindelser ble analysert sammen med prøvene, og injisert med jevne mellomrom dersom det var mange prøver på samme dag, for å korrigere eventuelle variasjoner i retensjonstidene.

2.4 Spektroskopiske analysemetoder

2.4.1 UV-synlig spektroskopi

I dette arbeidet ble UV-synlig spektrum tatt opp med diode-array ved online HPLC, som beskrevet i avsnitt 2.2.4.

UV-synlig spektroskopi baseres på at noen atomer og molekyler kan absorbere elektromagnetisk stråling i det ultrafiolette/synlige området, fra 190-800 nm. Når et molekyl utsettes for stråling, absorberes strålingen ved at et elektron eksiteres til et høyere energinivå. Energien til den absorberte strålingen tilsvarer energiforskjellen mellom grunntilstanden og den eksiterte tilstanden. Elektrontransisjoner forekommer som oftest mellom høyest okkuperte orbital (HOMO) og lavest uokkuperte orbital (LUMO) (Pavia 2009).

Polyaromatiske og sterkt konjugerte forbindelser har ofte liten energiforskjell mellom LUMO og HOMO, og absorberer derfor stråling ved lengre bølgelengder (Pavia 2009).

Flavonoider har som regel to absorpsjonsmaksimum, henholdsvis ved 300-560 nm (bånd I) og 240-280 nm (bånd II). Intensitet og bølgelengde varierer med flavonoidstrukturen. Antocyaner har vanligvis et intenst bånd i det synlige området, rundt 500-550 nm, og et mindre intenst bånd ved 270-280 nm (Strack & Wray 1989). UV-synlig spektroskopi kan gi informasjon om type aglykon, sukkerenhetenes knytestepunkt og hvorvidt antocyanene er acylert med aromatiske syrer.

Aglykon

Hydroksylering/metoksylering, samt glykosylering og acylering av antocyanene påvirker absorpsjonsmaksimum i ulik grad. Metoksy- og hydroksygrupper er elektrondonerende, og vil føre til et batokromisk skift, og dermed bidra til å gi antocyanene en mer blålig farge (Jackman & Smith 1996; Fossen & Andersen 2006; Pavia 2009). Pelargonidin, med kun proton i 3' og 5'-posisjonen på B-ringen, har absorpsjonsmaksimum ved 520 nm mens cyanidin, med hydroksyl i 3'-posisjon, absorberer ved 535. Absorpsjonsmaksimum (bånd I) for delphinidin, peonidin, petunidin og malvidin er henholdsvis 545, 532, 543 og 542 nm (alle verdier er målt med MeOH 0,01 % HCl som løsemiddel) (Melo et al. 2009), og de tilsvarende verdiene til monoglykosidene er vanligvis 10-15 nm lavere (Strack & Wray 1989).

Glykosidenheter

Glykosylering i 3', 4' eller 5'-posisjon på B-ringen fører til λ_{\max} ved kortere bølgelengder (hypsykromisk skift) sammenlignet med de korresponderende 3-glykosidene, mens glykosylering i 5 eller 7-posisjonen på A-ringen kan føre til et batokromisk skift (Fossen & Andersen 2006).

Det er også mulig å skille mellom 3-glykosider og 3,5-diglykosider ved å måle $A_{440}/A_{\text{vis max}}$. Antocyaner med kun 3-glykosylering har normalt en $A_{440}/A_{\text{vis max}}$ -verdi rundt 20-30 %, mens de tilsvarende 3,5-diglykosidene har omtrent halve verdien (10-20 %) (Strack & Wray 1989; Giusti & Wrolstad 2005; Jordheim 2007). Gjennomsnittlige $A_{440}/A_{\text{vis max}}$ verdier for 3-glykosider og 3,5-diglykosider for pelargonidin, cyanidin og delphinidin er gitt i tabell 2.4.1.

Tabell 2.4.1 $A_{440}/A_{\text{vis max}}$ verdier (%) for 3-glykosider og 3,5-diglykosider

	$A_{440}/A_{\text{vis max}}$		$A_{440}/A_{\text{vis max}}$
<i>Pg -3-glykosid</i>	39 %	<i>Pg -3,5-diglykosid</i>	20 %
<i>Cy -3-glykosid</i>	23 %	<i>Cy -3,5-diglykosid</i>	12 %
<i>Dp -3-glykosid</i>	18 %	<i>Dp -3,5-diglykosid</i>	10 %

Acylering

Alifatiske syreenheter påvirker ikke UV-synlig absorpsjonen til antocyaner i særlig grad. Derimot kan acylering med aromatiske syrer gi batokromisk skift, som et resultat av intra- og intermolekylær kopigmentering (Fossen & Andersen 2006). $A_{\text{UV}}/A_{\text{vis max}}$ forholdet kan brukes til å bestemme hvorvidt pigmentet er acylert med aromatiske syrer. Antocyaner som er acylert med én aromatisk syre har typisk $A_{\text{UV}}/A_{\text{vis max}}$ -verdier rundt 5-7 %, mens verdier i området 8-11 % indikerer at det er to aromatiske syreenheter til stede (Durst & Wrolstad 2005).

Kvantifisering

Det er sjelden andre forbindelser som absorberer UV-synlig stråling i samme område som antocyaner (465-550 nm), og ved å måle absorbansen ved λ_{\max} kan konsentrasjon av antocyaner beregnes ved hjelp av Beers lov. Det må imidlertid tas i betraktning at selvassosiasjon og kopigmentering kan forårsake avvik i Beers lov, noe som medfører unøyaktig estimering av konsentrasjon. Fortynning kan delvis motvirke denne effekten, da kopigmentering og særlig selvassosiasjon øker med økende konsentrasjon (Strack & Wray 1989; Jackman & Smith 1996).

Standardforbindelser med kjente konsentrasjoner kan brukes til kvantifisering av individuelle topper. Selv om ulike forbindelser har forskjellig molar absorptivitet, er det likevel akseptert praksis å bruke kun én standardforbindelse til kvantifisering av alle topper, vanligvis cyanidin 3-glukosid (Durst & Wrolstad 2005).

Det er også vanlig å benytte en kalibreringskurve for kvantifisering. Ulike konsentrasjoner av en ren standard analyseres, og absorbansen ved 520 ± 20 nm plottes mot de ulike konsentrasjonene. Man får dermed en kalibreringskurve med en ligning som uttrykker forholdet mellom konsentrasjon og absorbans. Ved hjelp av kalibreringskurven kan konsentrasjonen til analytten estimeres fra målt absorbans (Andersen & Francis 2004).

2.4.2 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy – NMR

NMR-spektroskopi er en metode som blir brukt for å bestemme strukturen til molekyler. Prinsippet for NMR-spektroskopi baseres på at atomkjerner med odde antall protoner og nøytroner, eksempelvis ^1H , ^{13}C og ^{19}F , spinner rundt sin egen akse slik at de genererer en magnetisk dipol. NMR baserer seg på hvordan disse kjernene oppfører seg i magnetfelt. Når molekylene utsettes for et magnetfelt, vil kjernene orientere seg med eller mot feltet. Dersom det sendes inn RF-stråling med energi identisk med kjernenes rotasjonsfrekvens, kan energien absorberes og kjernene eksiteres til et høyere energinivå. Dette kalles resonans. Kjernene skjermes av elektronene rundt dem, og forskjell i elektrontetthet medfører at ulike protoner har ulik resonansfrekvens. NMR-spektroskopi kan dermed gi informasjon om type kjerner, kjernenes omgivelser og stereokjemi (Pavia 2009).

NMR-spektroskopi er det viktigste analyseverktøyet for strukturoppklaring av flavonoider (Andersen & Francis 2004; Fossen & Andersen 2006), men det er også noen svakheter knyttet til metoden. Blant annet stilles det høye krav til prøvens renhet (> 80 % renhet anbefales), stabilitet og mengde/konsentrasjon. For proton NMR er det nødvendig med minst 0,2 mg prøve, mens karbon-NMR og 2D NMR teknikker krever vanligvis ti ganger så stor prøvemengde, på grunn av svært lav forekomst av isotopen ^{13}C (1,108 %) samt liten magnetogyrisk konstant (Andersen & Francis 2004; Andersen & Fossen 2005).

De vanligste løsemidlene i NMR-analyse av flavonoider er heksadeuterodimetylsulfoksid (DMSO-*d*6) og tetradeuterometanol (CD_3OD). I tillegg tilsettes deuterert syre, for å beholde antocyanene på flavyliumformen. (Andersen & Francis 2004; Fossen & Andersen 2006).

Identifikasjon av antocyanstruktur baseres hovedsakelig på kjemiske skiftverdier og koblingskonstanter (J) hentet fra 1D proton- og karbonspektre, kombinert med koblinger som observeres som krysstopper i 2D-spektrene (Andersen & Francis 2004; Andersen & Fossen 2005)

Prosedyre

I denne studien ble NMR-spektroskopi utført på fraksjoner både fra toyopearl-kolonnen og preparativ HPLC. Prøvene ble løst i deuterert MeOH tilsatt 5 % deuterert TFA og overført til NMR-rør for analyse.

NMR-instrumentet som ble benyttet var et Bruker 600 MHz-instrument. 1D proton og CAPT-spekter, samt 2D COSY, TOCSY, HSQC og HMBC-spekter ble tatt opp. Programmet TOPSPIN 1.3 ble brukt for prosessering.

1D spekter

1D Protonspekter gir informasjon om kjemiske skiftverdier, koblingskonstanter (J_{HH}) og integrasjonsdata. Protonspekter blir hovedsakelig brukt til å bestemme antall og type protoner, og er nyttig for å bestemme aglykonets identitet. I arbeid med antocyaner er det kun alifatiske og aromatiske proton som tas hensyn til, hydroksylprotonene vises ikke i spekteret på grunn av rask utskiftning av de sure protonene med deuterium (Pavia 2009).

Det er vanligvis ikke nok informasjon fra protonspekter, så karbon (CAPT) og 2D eksperiment er nødvendig for endelig strukturoppklaring (Fossen & Andersen 2006). I CAPT-spekteret (Carbon Attached Proton Test) får karbon med jevnt antall protoner knyttet til seg, CH_2 og kvarternære karbon, positivt signal, mens karbon med odde antall proton, CH og CH_3 , får negativ signalverdi (Williams & Fleming 2008). CAPT-spekteret er nyttig til å bestemme nøyaktige kjemiske skiftverdier (Jordheim 2007).

To-dimensjonal (2D) NMR

COSY (COrrrelation SpectroscopY)

2D homonukleær $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY spektre viser $^2J_{\text{HH}}$, $^3J_{\text{HH}}$ og $^4J_{\text{HH}}$ -koblinger mellom protoner. I COSY-spekteret ligger protonverdiene langs en diagonal linje fra venstre (nederst) til høyre (øverst), og krysstopper lokalisert symmetrisk på hver side av diagonalen viser hvilke proton som kobler med hverandre (Jordheim 2007; Pavia 2009). I arbeid med flavonoider benyttes COSY-spekteret til å tilordne protoner i glykosidenhetene. (Fossen & Andersen 2006)

TOCSY (Total Correlation SpetroscopY)

2D homonukleær $^1\text{H} - ^1\text{H}$ TOCSY-eksperiment blir brukt til å finne kjemiske skiftverdier til proton som tilhører samme spinnsystem. TOCSY er spesielt godt egnet til å identifisere sukkerenheter, da hver sukkerenhet utgjør et diskret spinnsystem som er separert fra aglykon og andre enheter på grunn av oksygenatomet (Fossen & Andersen 2006). Dermed kan de individuelle protonene på de ulike sukkerenhetene identifiseres, og ved hjelp av COSY-spekteret kan protonsignalene tilordnes.

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

2D heteronukleær $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC eksperiment viser 1J -koblinger mellom karbon og proton. Spekteret viser kun koblinger mellom karbon og proton som er direkte knyttet til hverandre. Kvarternære karbon, som ikke har proton knyttet til seg, vises altså ikke. Protonsignal som har blitt tilordnet ved hjelp av 1D og 2D-spektre, kan således benyttes til å tilordne de korresponderende karbonsignalene. (Fossen & Andersen 2006)

HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

HMBC viser hovedsakelig 2J og 3J -koblinger mellom karbon og proton. Noen ganger vises 1J -koblinger, men vil da sees som en symmetrisk dublett. 4J -korrelasjoner kan også forekomme. Ved hjelp av HMBC-spekteret kan også kvarternære karbon bestemmes, og sammensetningen av de ulike enhetene kan identifiseres, så vel som knytningspunkt mellom aglykon, sukker- og syreenheter. (Fossen & Andersen 2006).

2.4.3 Massespektrometri – MS

Massespektrometri brukes til å finne nøyaktig masse til atom, molekyler (molekylærion) og fragmenter til molekyler (Harris 2007). Molekyler i gassfase ioniseres i massespektrometeret, ionene akselereres av et elektrisk felt og separeres deretter i analysatoren med hensyn til

masse-per-ladning ratio, m/z , før de når detektoren. Ladningen, z , er vanligvis 1, og m/z er derfor som oftest identisk med massen til ionet (Harris 2007).

Ionisering kan skje på ulike måter. Konvensjonelle metoder som elektronionisering (EI) og kjemisk ionisering (CI) krever at molekylene som skal analyseres er i gassfase, og egner seg derfor ikke for lite flyktige molekyler, som i tilfellet med flavonoider. Flyktigheten kan økes ved hjelp av derivatisering, imidlertid kan derivatisering gjøre tolkningen av fragmenteringsmønsteret mer komplisert (Marston & Hostettmann 2006). I arbeid med flavonoider er det vanlig å benytte elektrospray-ionisering (ESI). Fordelen med ESI er at molekylene som skal analyseres må være i løsning, noe som muliggjør direkte kobling med HPLC. Løsningen med analytten blir spredt til fine aerosoler ved hjelp av elektrosprayen. Løsemiddelet dampes deretter av og ionene blir ført gjennom masseanalysatoren på vanlig måte. ESI-MS er en ”myk” ioniseringsmetode som hovedsakelig danner molekylærion (Marston & Hostettmann 2006; Harris 2007; Takeoka & Dao 2008). Det finnes flere typer analysatorer, og i dette arbeidet har det blitt brukt en høyt oppløselig time-of-flight (TOF) analysator.

Massespektrometri er en selektiv metode, da hver enkelt forbindelse ofte har et særegent fragmenteringsmønster. Dette medfører at man kan skille mellom ulike forbindelser med samme molekylmasse. Samtidig er metoden svært sensitiv, noe som gjør den godt egnet til analyse av flavonoider. Kun små mengder har vært nødvendig for å kunne bestemme nøyaktig molekylmasse i tillegg til strukturell informasjon om aglykon, glykosidheter og eventuelle syreenheter. (Fossen & Andersen 2006). Særlig er høy-oppløselig MS nyttig for identifikasjon av molekyler, da metoden kan skille mellom ulike molekyl og/eller fragmenter som i utgangspunktet har samme nominelle masse (Strack & Wray 1989).

Metoden har imidlertid enkelte begrensninger i forhold til nøyaktig strukturoppklaring. Blant annet er det ikke alltid mulig å identifisere knytningspunkt til glykosid- og syreenheter, og det er heller ikke mulig å skille mellom forbindelser med ulik stereokjemi (Sivam 2008; Takeoka & Dao 2008)

Prosedyre

Analysen ble utført av Terje Lygre, avdelingsingeniør ved Kjemisk institutt (UiB). Høyoppløselig LC-MS (ESI⁺/TOF) ble utført på fire bjørnebær- og bringebærkultivarer i dette arbeidet ved hjelp av et JEOL AccuTOF JMS-T100LC instrument i kombinasjon med Agilent

Technologies 1200 Series HPLC-system. Det ble benyttet en Zorbax SB-C18 kolonne (1,8 μm , 50 mm x 2,1 mm) og et løsemiddelsystem bestående av vann med 0,5 % TFA (A) og acetonitril med 0,5 % TFA (B), med følgende gradient:

Gradient	Tid (min)	% A	% B
	0-1,25	90-78	10-22
	1,25-5	78-70	22-30
	5-7	70	30
	7-8	70-60	30-40
	8-14	60	40
	14-15	60-90	40-10

Kalibrering av MS-spektre

Cyanidin 3-glukosid ble brukt som indre standard. Korreksjonsfaktor ble beregnet ut fra forholdet mellom eksakt (449,1084 g/mol) og observert (449,1743 m/z) masse av cyanidin 3-glukosid (indre standard):

$$F = m_{\text{eks(IS)}} / m_{\text{obs(IS)}}$$

Korreksjonsfaktoren ble brukt til å finne korrigert masse for de andre toppene, og avvik mellom eksakt og korrigert masse ble beregnet i ppm.

$$m_{\text{korr}} = m_{\text{obs}} \cdot F$$

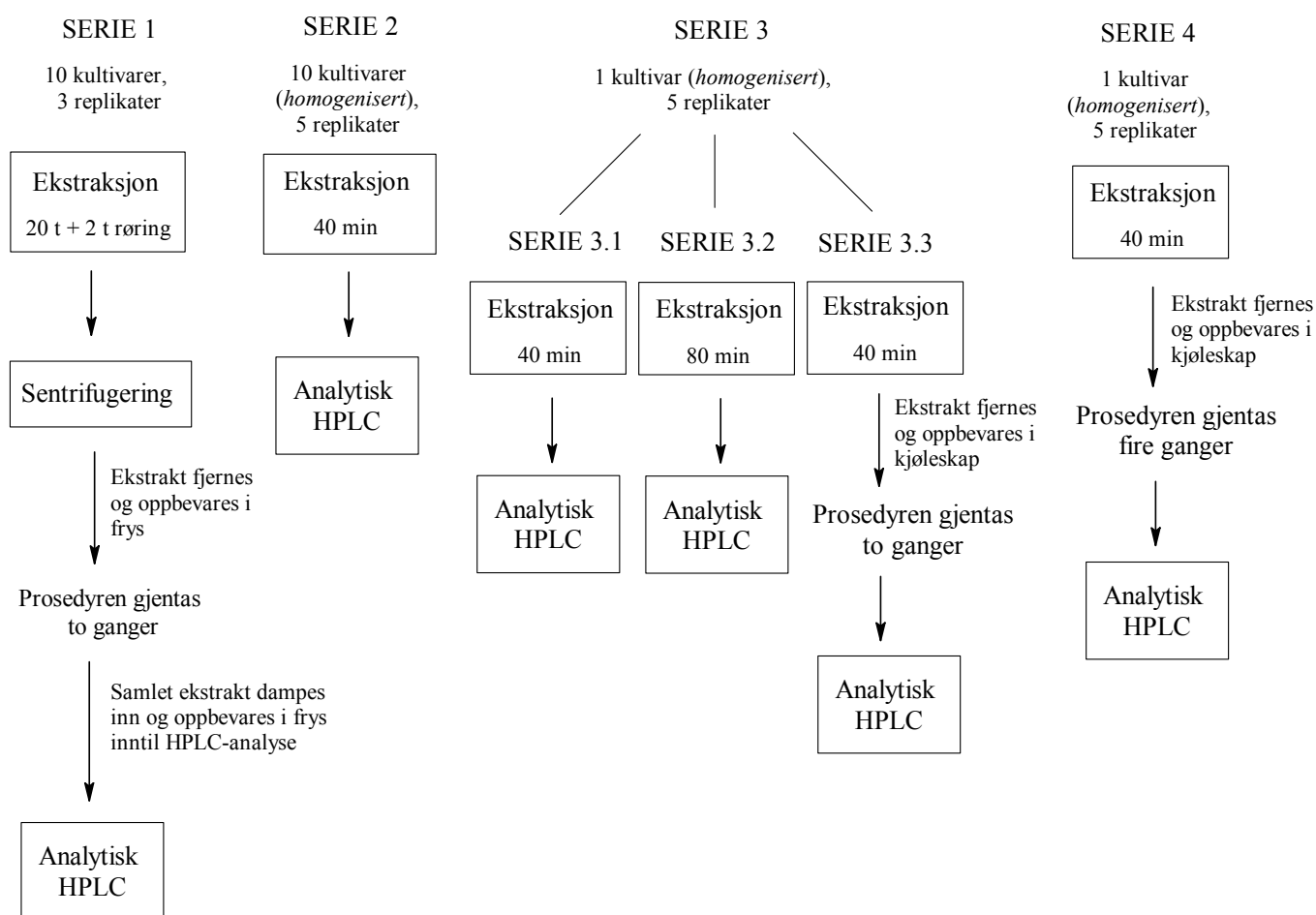
$$\text{Avvik (ppm)} = (m_{\text{korr}} - m_{\text{eks}}) / m_{\text{korr}} \cdot 10^6$$

Kvantitativ bestemmelse

Det ble utført fire ulike analyseserier for bestemmelse av relative og absolutte mengder av antocyaner i de ulike kultivarene ved bruk av analytisk HPLC, samt for å vurdere hvorvidt ekstraksjonstid og antall ekstraksjoner påvirker mengdebestemmelsen. Kalibreringskurve ble brukt til kvantifisering, og ”inter-day” standarder ble analysert sammen med prøvene for å ta hensyn til variasjoner i metoden.

2.5.1 Analyseserier – prosedyre for opparbeiding

I serie 1 og 2 ble analysen utført på alle bjørnebær- og bringebærkultivarer, mens i serie 3 og 4 ble kun én type bjørnebær (B) analysert. Det ble brukt en analysevekt med 5 desimaler (METTLER TOLEDO AX205 Delta Range) for nøyaktig innveining av standarder og bær. En oversikt over analyseseriene er gitt i figur 2.5.1.



Figur 2.5.1. Oversikt over de kvantitative analyseseriene

Serie 1

Ca 5-10 g frosne bær ble veid inn nøyaktig, og ekstrahert med 5 ml MeOH tilsatt 0,5 % TFA. Glasset med bærene ble satt på røring i 2 timer, deretter ble det satt i kjøleskapet i 20 timer. Blandingen ble så sentrifugert ved 3000g i 5 min, før sentrifugatet ble fjernet og lagret i et glass med kork i fryseboks ved -20 °C. Denne prosedyren ble gjentatt tre ganger. Etter siste ekstraksjon ble blandingen sentrifugert to ganger (Heraeus Labofuge 200), og sentrifugatet ble ekstrahert mellom hver sentrifugering. Det samlede sentrifugatet ble filtrert gjennom glassull, dampet inn ved hjelp av rotavapor og nitrogen, og ble lagret i fryseboks ved -20 °C.

Hver prøve ble løst i 5 ml MeOH tilsatt 0,5 % TFA og filtrert gjennom 0,45 µm Millipore membran før HPLC-analyse. Tre replikater av prøve ble laget i stand, og hver replikat ble injisert tre ganger på HPLC, for å ta hensyn til eventuelle instrumentelle feil.

Serie 2

40-70 g frosne bær ble blandet i en blender til en homogen masse, og porsjoner på 5-10 g ble veid inn nøyaktig (i frossen tilstand). Prøvene ble ekstrahert med tilsvarende mengde løsemiddel (MeOH + 0,5 % TFA) i 40 min, og filtrert gjennom 0,45 µm Millipore membran før påfølgende injeksjon på analytisk HPLC. Prosedyren ble utført på fem replikater av hver prøve.

Serie 3

I serie 3 ble kun én type bjørnebær analysert. Ca 100 g frosne bær ble homogenisert som i serie 2. Det ble gjort tre ulike forsøk, hvor faktorer som ekstraksjonstid og antall ekstraksjoner varierte, og i alle forsøkene ble det benyttet fem replikater.

Forsøk 1: Prøver på 5-10 g ble veid inn og ekstrahert med tilsvarende mengde MeOH + 0,5 % TFA i 40 min, før filtrering gjennom 0,45 µm Millipore membran og injeksjon på analytisk HPLC.

Forsøk 2: Prosedyren i forsøk 1 gjentas, men ekstraksjonstiden ble doblet (80 min).

Forsøk 3: Prosedyren i forsøk 1 gjentas, men det ble gjort tre ekstraksjoner på 40 min, før filtrering og HPLC-analyse av det samlede ekstraktet.

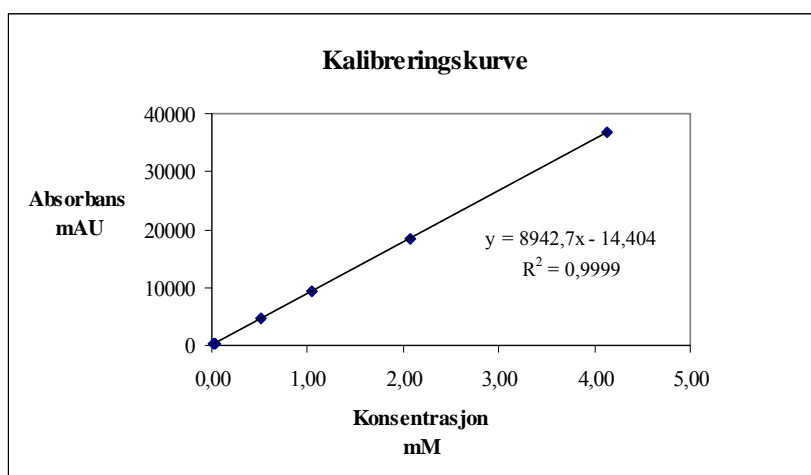
Serie 4

I denne serien ble det benyttet samme bær og fremgangsmåte som i serie 3 (3-1), men antall ekstraksjoner ble økt fra tre til fem ekstraksjoner (på 40 min hver).

2.5.2 Standardisering

Det ble brukt kalibreringskurve for standardisering av prøvene i analyseseriene. Det ble laget i stand fem løsninger med ulike konsentrasjoner av en standardforbindelse. Hver prøve ble injisert tre ganger på analytisk HPLC. Cyanidin 3-glukosid med ca 95 % renhet (bestemt ved NMR-analyse) ble brukt som standardforbindelse. Ideelt skulle man brukt standardforbindelser av alle pigmentene i prøven for nøyaktig kvantifisering, ettersom ulike pigmenter har forskjellig molar absorptivitet. I arbeid med antocyaner er det imidlertid vanlig å benytte kun én standardforbindelse, som oftest cyanidin 3-glukosid. Dette ble gjort også i denne studien, og konsentrasjon til de ulike pigmentene ble beregnet under forutsetning av at de ulike pigmentene hadde identisk molar absorptivitet som cyanidin 3-glukosid.

UV-synlig absorpsjonen til standardløsningene ble plottet mot konsentrasjonen, og en tilpasset linje til punktene ble beregnet ved hjelp av minste kvadraters metode (utført i Excel). Opprinnelig ga dette en lineær linje med ligningen: $y = 8370,2x + 500,11$, hvor konsentrasjonen (x) av pigmentene beregnes ved å sette inn målt absorbans for y. Det viste seg senere at pigmentene i noen av prøvene var for lite konsentrerte og hadde absorpsjonsverdier som var lavere enn målepunktene i kalibreringskurven. I tillegg ville konstantleddet føre til at pigmenter med absorpsjon under 500 mAU (absorpsjonsenheter) får negative konsentrasjonsverdier, til tross for at de har høyere absorpsjon enn den minst konsentrerte av standardløsningene som kalibreringskurven er basert på. Dette ville medføre direkte feil, og en ny kalibreringskurve basert på seks standardløsninger med kjent konsentrasjon ble laget. De nye målepunktene ga en tilpasset lineær linje med ligningen: $y = 8942,7x - 14,404$ (vist i figur 2.5.2).



Figur 2.5.2 kalibreringskurve basert på seks standardløsninger (cyanidin 3-glukosid) med kjente konsentrasjoner

Absolutte mengder (i mg/g bær) ble beregnet på grunnlag av innveide mengder, molarmasser til de aktuelle pigment og fortyninger:

$$m_x \text{ (mg/g)} = [X] \cdot V_{\text{løsemiddel}} \cdot M_m / m_{\text{innveid}}$$

For pigmenter med overlappende areal, ble mengder beregnet ved å bruke gjennomsnittet av molarmassene til de aktuelle pigmentene. Konsentrasjoner og mengder oppgis som gjennomsnitt av replikatene, og standardavvik ble beregnet ved hjelp av formelen:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

hvor x_i er hver enkelt verdi, \bar{x} er gjennomsnittet, og n er antall målinger.

Et signifikansnivå på 5 % ble valgt, og uparet student t-test ble utført for å avgjøre hvorvidt det er signifikante forskjeller mellom resultatene i de ulike analyseseriene.

Inter-day standard

Kalibreringskurven ble laget på et annet tidspunkt enn når de ulike analyseseriene ble kjørt. For å ta hensyn variasjoner som kan oppstå når prøver analyseres på forskjellige tidspunkt (timer, dager, uker), ble det laget i stand ”inter-day” (ID) standardløsninger med kjente konsentrasjoner. Cyanidin 3-glukosid (ca 95 % ren, bestemt ved NMR) ble veid inn nøyaktig, løst i metanol med 0,5 % TFA og fordelt på ti små drammeglass med lokk. Hver av disse ble dampet inn til tørrhet og lagret i fryseboks inntil HPLC-analyse. ID-standardene ble analysert sammen med prøvene i de ulike analyseseriene, og ble injisert mellom hver tiende prøve dersom mange prøver ble analysert fortløpende.

Cyanidin 3-glukosid standard

Til den første kalibreringskurven og ID-standardløsningene i serie 1 og 2 ble det brukt cyanidin 3-glukosid, isolert av Monica Jordheim, post doc. ved Kjemisk institutt (Universitetet i Bergen). Etter hvert ble denne brukt opp, og ny standard ble opparbeidet til den nye kalibreringskurven og nye ID-standardløsninger (brukt i serie 3 og 4). Fraksjoner fra Sephadex LH-20 som inneholdt cyanidin 3-glukosid ble slått sammen og frysetørket i 4 timer. Det ble tatt opp et ^1H NMR-spekter av opparbeidet standard, for å sjekke renhet. Protonspekteret er gitt i appendiks (A5).

3 IDENTIFIKASJON AV PIGMENT 5: cyanidin 3-*O*- β -(6''-(3-hydroksey-3-metylglutaryl)glukopyranosid)

Dette kapitlet omhandler isolasjon og strukturbestemmelse av pigment 5 i bjørnebær, som tidligere har blitt identifisert som cyanidin 3-*O*- β -(6''-dioksalyglukopyranosid) (Stintzing et al. 2002; Wu & Prior 2005; Ogawa et al. 2008). Som nevnt i introduksjonen er det mistanke om at dette pigmentet har blitt feilbestemt, og målet i denne studien er først og fremst å bestemme identiteten til pigment 5.

Det ble benyttet flere kromatografiske separasjonsteknikker for isolasjon av pigment 5. XAD-kolonnekromatografi ble utført på rækstraktet for å vaske bort frie sukker- og syregrupper. Deler av det XAD-rensede ekstraktet ble applisert på en Toyopearl kolonne for isolasjon av pigment 5. Det ble utført NMR-spektroskopi av en fraksjon som inneholdt en blanding av pigment 5 og 1, men dette ga ikke tilfredsstillende NMR-spektre på grunn av overlappende signal fra andre forbindelser. Det ble derfor forsøkt å isolere pigment 5 ved hjelp av preparativ HPLC utført på XAD-renset ekstrakt. Den reneste fraksjonen av pigment 5 ble analysert ved hjelp av NMR-spektroskopi. 1D og 2D spektrene ga en sikker identifikasjon av pigment 5. Høyopløselig LC-MS, som ble utført på rækstraktet av bjørnebær, kunne bekrefte identiteten til pigmentet.

For isolering av pigment 5 i større skala, ble XAD-renset ekstrakt applisert på en Sephadex-kolonne for separasjon, etterfulgt av rensing ved hjelp av preparativ HPLC. Pigment 5 ble følgelig isolert med høy grad av renhet.

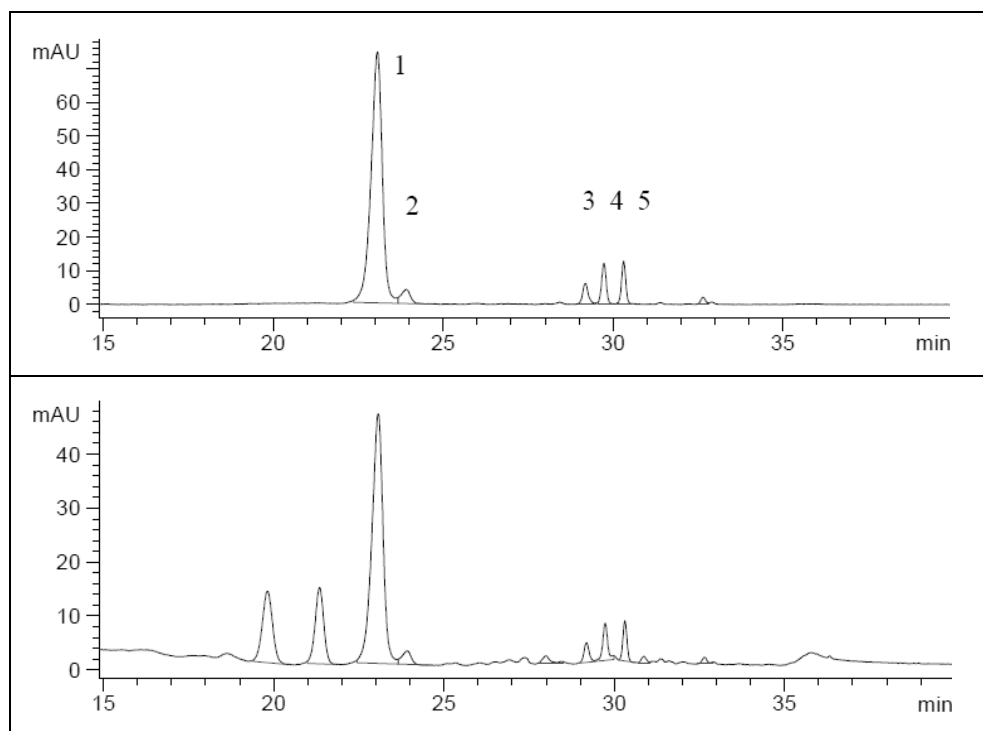
For en oversiktlig beskrivelse av det utførte arbeidet, henvises det til figur 2.2.1 i kapittel 2. En mer detaljert beskrivelse av analyseresultatene er beskrevet i avsnitt 3.1, 3.2, 3.3 og 3.4.

3.1 Isolasjon og analyse

3.1.1 Analyse av råekstrakt

Omtrent 875 g viltvoksende bjørnebær (B) ble ekstrahert gjentatte ganger med metanol tilsatt 0,5 % TFA. Det samlede ekstraktet ble filtrert og dampet inn til tørrhet på rotavapor. Råekstraktet ble analysert ved hjelp av HPLC for å få oversikt over sammensetningen. Kromatogrammet av råekstraktet (figur 3.1.1) viser hovedsakelig 5 topper detektert ved 520 ± 20 nm. Kromatogrammet tatt opp ved 280 ± 10 nm viser at det også er andre forbindelser til stede, og det er derfor ønskelig å rense ekstraktet før videre analyse.

Det samlede ekstraktet av bjørnebær ble applisert på en XAD-7 kolonne, for å vaske bort frie syre- og sukkergrupper, som beskrevet i avsnitt 2.2.1.



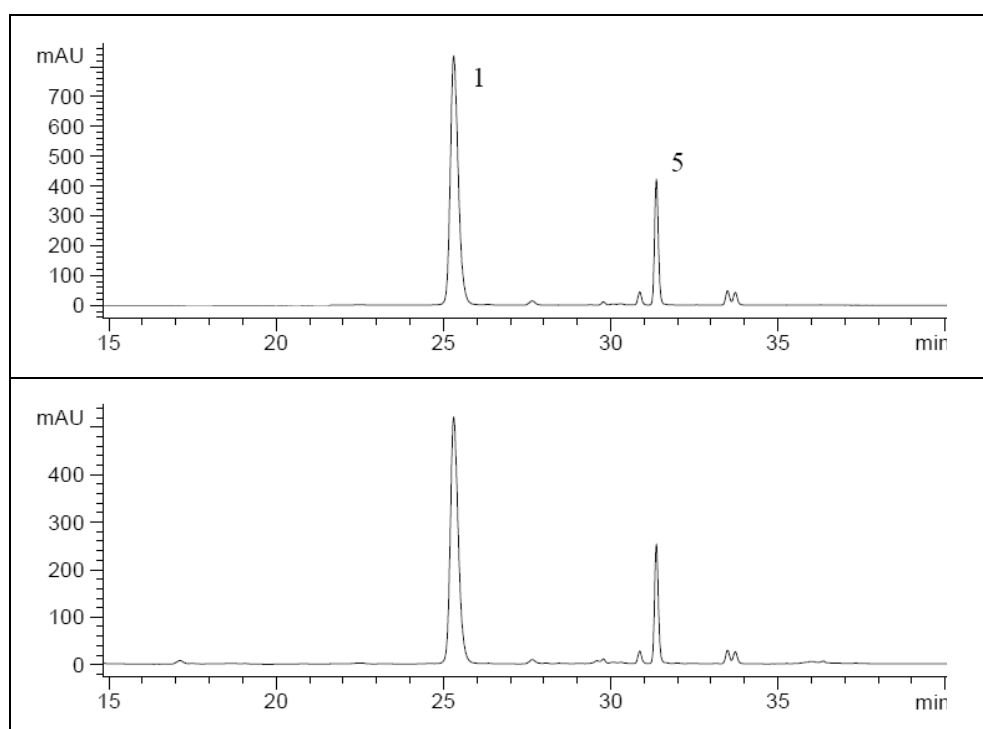
Figur 3.1.1. HPLC-kromatogram antocyaner i råekstrakt fra bjørnebær (B), detektert ved 520 ± 20 nm (øverst) og 280 ± 10 nm (nederst)

3.1.2 Isolasjon ved hjelp av Toyopearl HW-40F kolonne

Det XAD-rensede ekstraktet ble applisert en Toyopearl HW-40F kolonne for separasjon av pigmentene. Det ble etter hvert dannet totalt 5 bånd, hvorav de to første hadde intens farge,

mens de tre andre var svakere i farge. Flere fraksjoner av hvert bånd ble samlet opp, og analysert ved hjelp av analytisk HPLC.

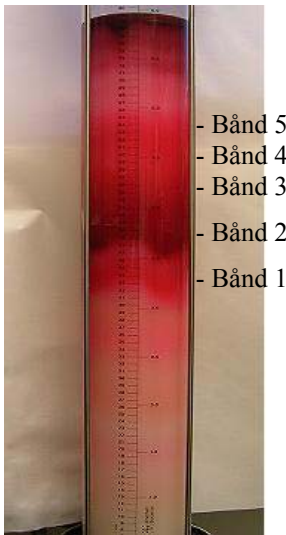
Det første båndet inneholdt pigment **2**, mens fraksjoner av det andre båndet inneholdt pigment **1**, men også blandinger av **1**, **3**, **4** og **5**. En av fraksjonene inneholdt en blanding av pigmentene **1** og **5** med få eller ingen andre forbindelser, verken i 520- eller 280-vinduet (figur 3.1.2). De tre siste båndene inneholdt kun spormengder av de fem pigmentene. Fraksjonene som inneholdt blanding av pigment **1** og **5** ble slått sammen og dampet inn for videre analyse.



Figur 3.1.2. HPLC-kromatogram av pigment **1** og **5** i bjørnebær (B) detektert ved 520 ± 20 nm (øverst) og 280 ± 10 nm (nederst) etter separasjon på Toyopearl HW-40F

3.1.3 Isolasjon ved hjelp av Sephadex LH-20 kolonne og preparativ HPLC

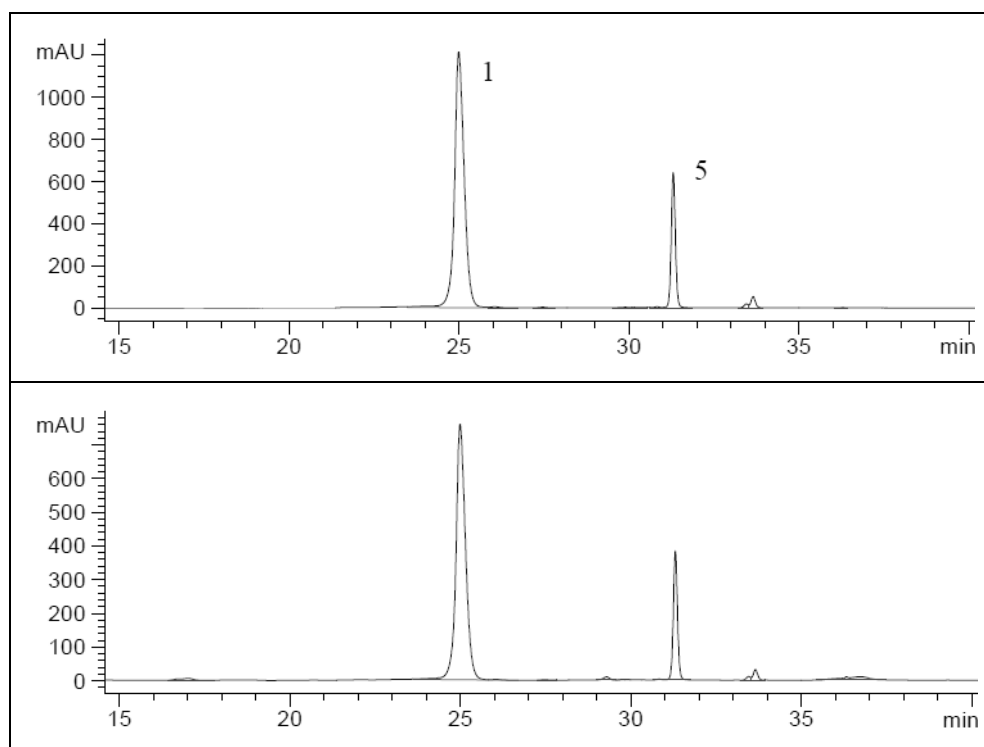
Det var ønskelig å isolere antocyan **5** i større skala, og resten av det XAD-rensede ekstraktet (ca 6 g) ble satt på en Sephadex LH-20 kolonne. Det ble observert hovedsakelig 5 bånd, hvorav to var dominerende i størrelse og intensitet. Figur 3.1.3 viser et bilde av Sephadex-kolonnen, hvor de to hovedbåndene kan sees tydelig, mens de tre andre (bånd 3-5) ikke er godt nok separert på bildet. I tillegg var det antydninger til tre bånd med lav intensitet, så vidt synlige på bildet, før hovedbåndene.



Figur 3.1.3. Separasjon på Sephadex LH-20 kolonne

Det ble samlet opp totalt 75 fraksjoner, som ble dampet inn til tørrhet og senere analysert ved hjelp av HPLC. Fraksjoner med samme sammensetning, i både 520 og 280-vindu, ble slått sammen.

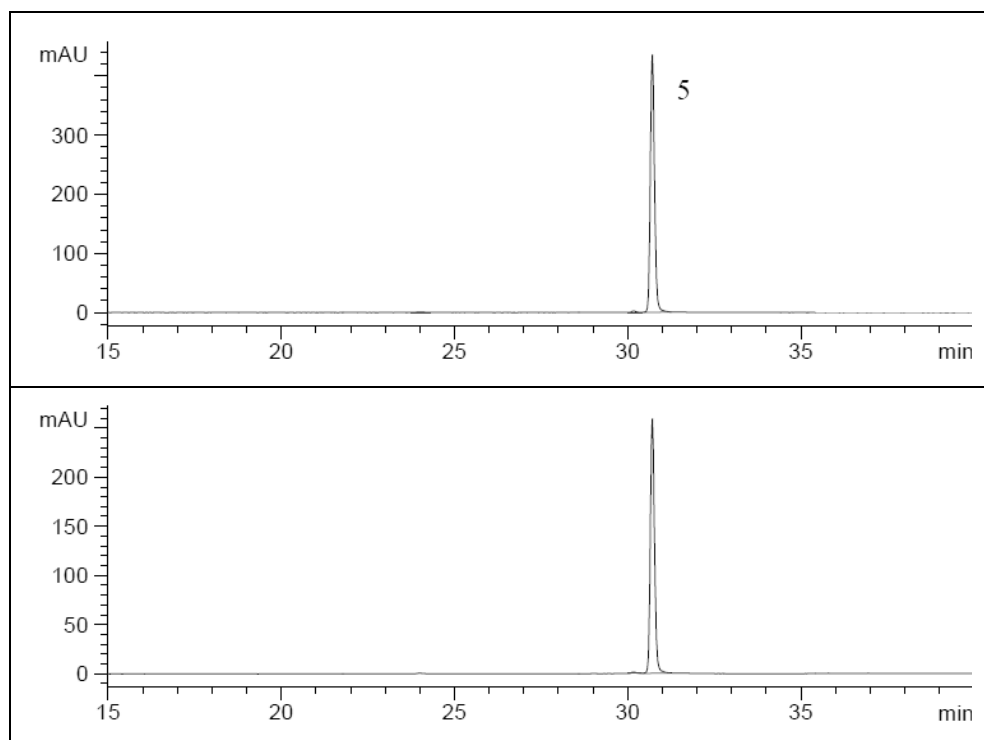
Fraksjonene som ble tatt av hovedbånd 1 inneholdt pigment **2**. Fraksjoner av bånd 2 inneholdt hovedsakelig antocyan **1**, alene og i blandinger med antocyan **3**, **4** og **5**. Fraksjoner som hadde samme relative innhold ble slått sammen. Fraksjoner som ble samlet opp av de tre siste båndene, samt de tre første prebåndene inneholdt kun spormengder av de fem antocyanene. Figur 3.1.4 viser kromatogram av en av fraksjonene som inneholdt størst mengde av pigment **5**, sammen med pigment **1**



Figur 3.1.4. HPLC-kromatogram av pigment **1** og **5** i bjørnebær (B) detektert ved 520 ± 20 nm (øverst) og 280 ± 10 nm (nederst) etter separasjon på Sephadex LH-20

Tre fraksjoner, som inneholdt pigment **1** og **5**, ble slått sammen og applisert preparativ HPLC for videre separasjon. Det ble foretatt tre injeksjoner på $500\text{-}1000 \mu\text{l}$, og fraksjoner ble samlet opp fortløpende og analysert ved hjelp av analytisk HPLC for bestemmelse av renhet. Kromatogrammet i figur 3.1.5 viser at isolasjonen av pigment **5** ved hjelp av preparativ HPLC

var vellykket. Fraksjoner med samme renhet av **5** ble slått sammen, dampet inn til tørrhet og satt i frys.

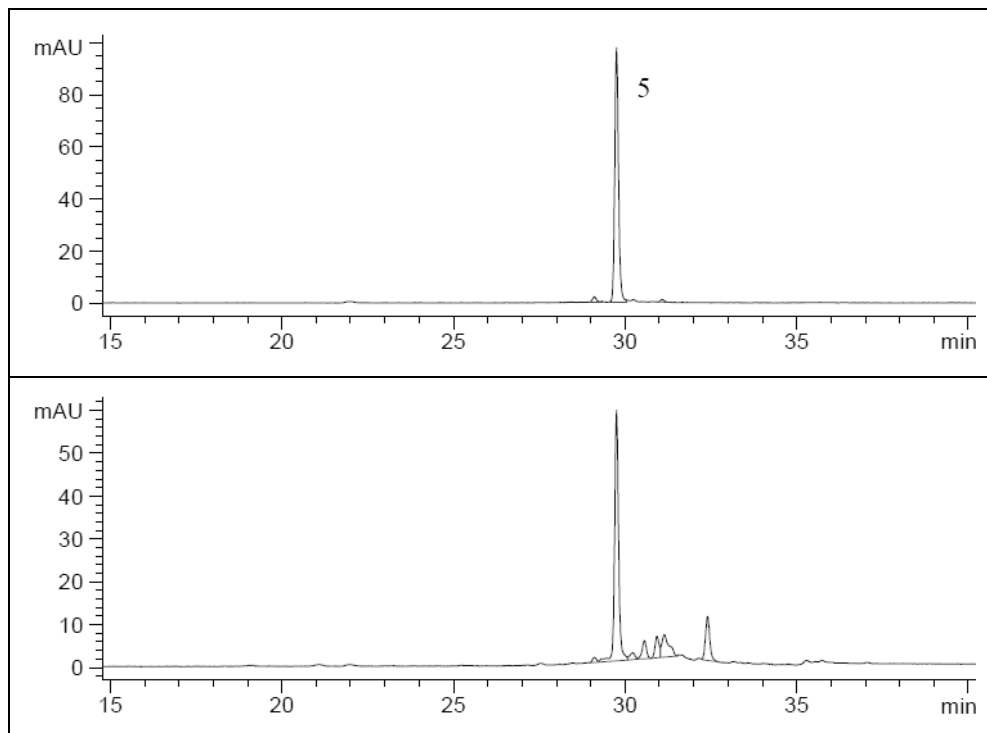


Figur 3.1.5. HPLC-kromatogram av pigment **5** i bjørnebær (B) detektert ved 520 ± 20 nm (øverst) og 280 ± 10 nm (nederst) etter separasjon på Sephadex LH-20 og deretter preparativ HPLC

3.1.4 Isolasjon ved hjelp av preparativ HPLC

Det var ikke mulig å isolere pigment **5** på Toyopearl HW-40F kolonnen, ettersom separasjonen av de ulike forbindelsene ikke var god nok. Det ble derfor gjort et forsøk på å isolere **5** ved hjelp av preparativ HPLC.

Omtrent 100 mg XAD-renset ekstrakt ble løst i eluent og injisert tre ganger på preparativ HPLC. UV-absorpsjonen til de eluerende pigmentene ble observert underveis, og fraksjoner ble samlet opp etter hvert som de kom ut av kolonnen. Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet og analysert ved hjelp av HPLC. To fraksjoner som inneholdt **5**, ble slått sammen. Kromatogrammet av den sammenslåtte fraksjonen detektert ved 520 ± 20 nm (figur 3.1.6) viser at det er ingen andre pigmenter som absorberer ved 520 nm til stede, mens kromatogrammet detektert ved 280 ± 10 nm viser at det også er små mengder av andre forbindelser til stede i prøven.



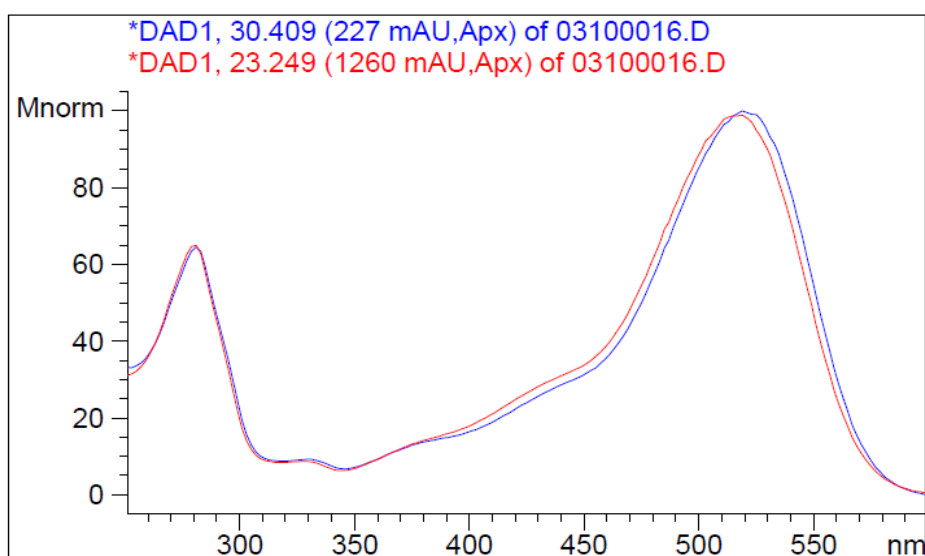
Figur 3.1.6. HPLC-kromatogram av pigment **5** i bjørnebær (B) detektert ved 520 ± 20 nm (øverst) og 280 ± 10 nm (nederst) etter separasjon på preparativ HPLC

3.2 UV-synlig spektroskopi

UV-synlig spektre av alle forbindelsene i råekstraktet til bjørnebær ble tatt opp ”on-line” under HPLC-analysen. Figur 3.2.1 viser UV-synlig spektre av pigment **1** og **5**. Hovedpigmentet, **1**, identifiseres som cyanidin 3-glukosid, basert på sammenligning av retensjonstid med standardforbindelse samt data fra andre studier (Stintzing et al. 2002; Maatta-Riihinen et al. 2004; Fan-Chiang & Wrolstad 2005; Wu & Prior 2005; Howard & Hager 2007; Ogawa et al. 2008; Jakobek et al. 2009)

Pigment **5** har absorpsjonsmaksimum på 519 nm, som indikerer et cyanidin eller peonidin-aglykon, og et $A_{440}/A_{\text{vis-max}}$ -forhold på 28 % tyder på at antocyanet er 3-glykosylert (Strack & Wray 1989).

Tidligere studier har antydnet at pigment **5** er et cyanidin 3-glukosid-derivat (Fan-Chiang & Wrolstad 2005), noe som er i samsvar med UV-synlig data til forbindelsen i dette arbeidet.



Figur 3.2.1. UV-synlig spektre av pigmentene **1** (rød) og **5** (blå) i bjørnebær

3.3 Strukturbestemmelse av pigment 5 ved hjelp av NMR

Det ble utført NMR-spektroskopi av én fraksjon fra Toyopearl-kolonnen, som inneholdt antocyan **1** (cyanidin 3-glukosid) og **5** i en blanding (figur 3.1.2). NMR-spektrene som ble tatt opp av denne fraksjonen var ikke gode nok til å fastslå nøyaktig identitet, hovedsakelig på grunn av den lave konsentrasjonen til pigment **5** og forstyrrende signal fra pigment **1**.

Det ble derfor utført preparativ HPLC for å oppnå en bedre separasjon og isolasjon av pigment **5**, og det ble utført NMR-analyse av sammenslåtte fraksjoner fra preparativ HPLC, som kun inneholdt pigment **5** (figur 3.1.6). Spektrene av denne fraksjonen hadde en høyere renhet, og har videre blitt brukt til å bestemme identiteten til **5**.

3.3.1 Aromatregion

Protonspekteret (figur 3.3.1) viser seks hovedsignal i aromatregionen og ett signal i anomert område. De seks vanligste antocyaner har to proton på A-ringen og ett proton på C-ringen, mens antall proton på B-ringen varierer (se figur 1.2.1 i kapittel 1). Petunidin og malvidin har metoksy- og/eller hydroksygrupper i 3' og 5'-posisjonene, og har dermed to protoner på B-ringen. Totalt har disse kun fem protoner, og kan altså utelukkes. Det samme gjelder delfinidin, som har hydroksygrupper i 3' og 5'-posisjonene. I dette tilfellet vil imidlertid de to protonene på B-ringen gi opphav til kun ett protonsignal på grunn av symmetri. Pelargonidin har kun én hydroksygruppe på C4', og har dermed fire protoner på B-ringen. Disse er symmetriske og gir opphav til to protonsignal, og pelargonidin kan også utelukkes. Dermed gjenstår peonidin og cyanidin, som har henholdsvis en metoksy- og hydroksygruppe på C3'. Metoksygruppen i peonidin ville gitt opphav til en sterk singlett rundt 4 ppm i protonspekteret (Mitchell et al. 1998; Košir & Kidrič 2001; Andersen & Fossen 2005). Det kan sees noen småtopper i dette området, men ingen singlett som er sterk nok til å kunne komme fra de tre protonene i metoksygruppen. Cyanidin står derfor igjen som mest sannsynlige alternativ.

Typiske verdier for koblingskonstanter i aromatiske forbindelser er 7-10 Hz for *orto*-kobling (3J), 1-3 Hz for *meta*-kobling (4J) og 0-1 Hz for *para*-kobling (5J) (Pavia et al, 2001).

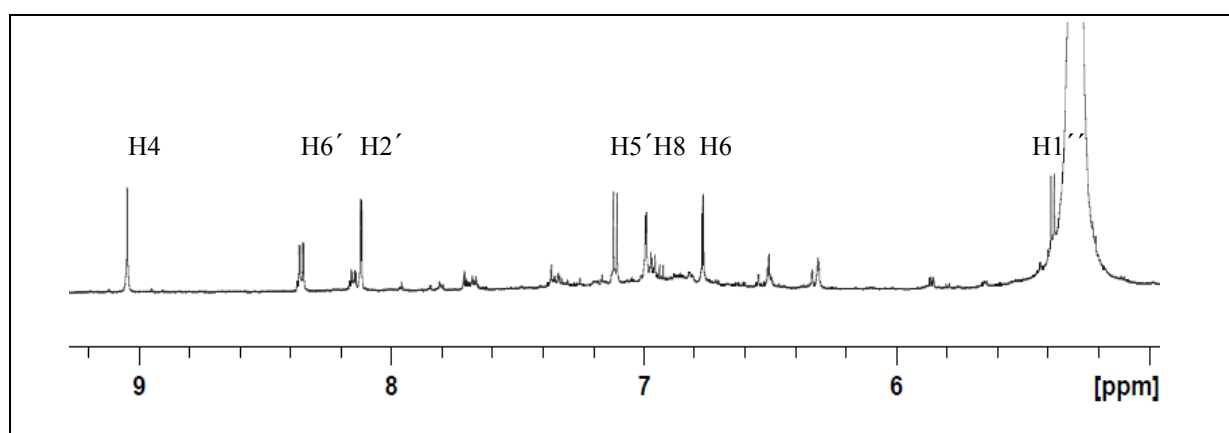
H8 kobler med H6 som er i *metaposisjon* på A-ringen, som gir en splitting med koblingskonstant på 1-3 Hz for begge protonsignal. I tillegg vil det være en W-kobling mellom H8 og H4 som skyldes *long range* (5J) kobling, med en koblingskonstant på ~1 Hz. Signalet ved 6,99 ppm er en dobbel dublett med koblingskonstanter på henholdsvis 1,93 og 0,77 Hz, og

dette tyder på at signalet tilhører H8. Dubletten ved 6,76 ppm har en koblingskonstant på 1,94 ppm, og kan dermed tilordnes H6. På grunn av 5J kobling med H8, skal H4-signalet gi opphav til en dublett. Imidlertid er koblingskonstanten svært liten, og det er ikke alltid denne splittingen observeres. Dermed kan singletten ved 9,05 ppm i protonspekteret tilordnes H4.

De to signalene ved 7,11 ppm og 8,36 ppm har koblingskonstanter på 8,73 Hz, noe som er typisk for *ortho*-kobling. Signalet ved 8,36 ppm er en dobbel dublett og kobler til dubletten ved 8,12 ppm med en koblingskonstant på 2,41 Hz, noe som tilsvarer *meta*-kobling. Følgelig kan dubletten ved 8,12 ppm tilordnes H2', og signalene ved 7,11 ppm og 8,36 ppm tilhører henholdsvis H5' og H6'. Spektrale data for ^1H er gitt i tabell 3.3.1.

Tabell 3.3.1. Kjemisk skift-verdier, signaltype og koblinger i aromatisk og anomer region

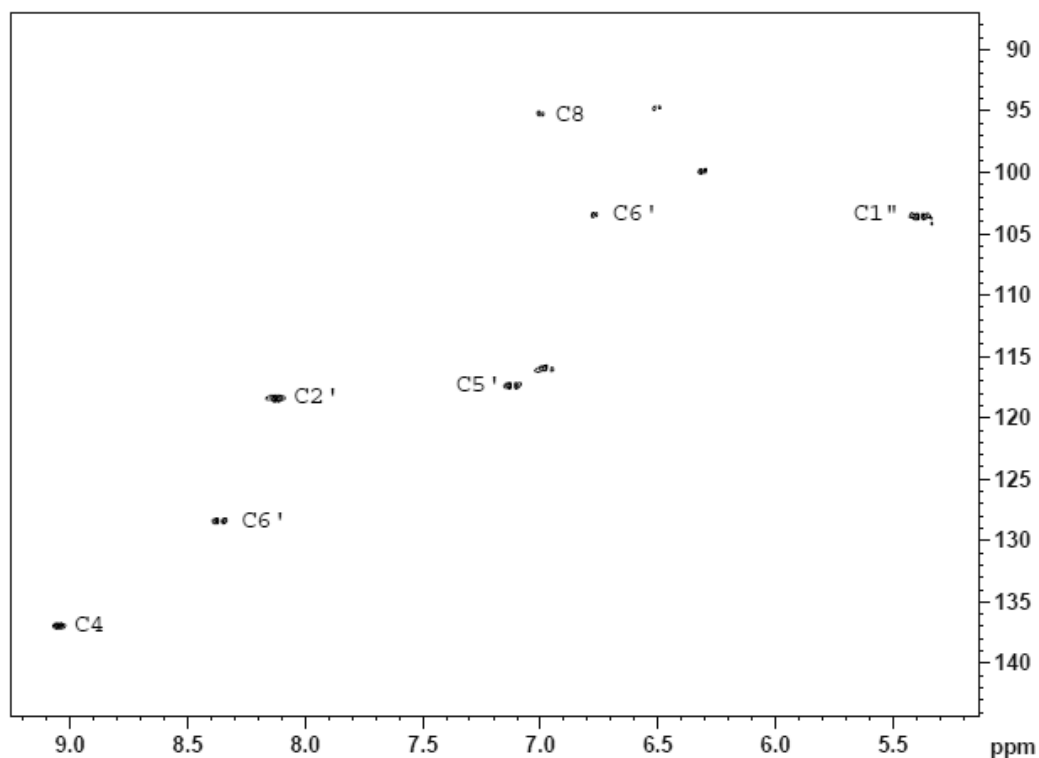
Kjemisk skift ^1H (ppm)	Signaltype	Koblingskonstant, J (Hz)
9,05	<i>d</i>	-
8,36	<i>dd</i>	8,73 , 2,41
8,12	<i>d</i>	2,41
7,11	<i>d</i>	8,73
6,99	<i>dd</i>	1,93, 0,77
6,76	<i>d</i>	1,94
5,38	<i>d</i>	7,81



Figur 3.3.1. ^1H NMR-spekter av pigment **5** løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (95:5) ved 25 °C. Spekteret viser aromatregionen.

HSQC-spekteret (figur 3.3.2) viser $^1J_{\text{CH}}$ koblinger mellom proton og karbon, og karbonatomene som er direkte bundet til de seks aglykon-protonene kan identifiseres. Ved å ta

utgangspunkt i de kjemiske skiftverdiene til de identifiserte protonene, kan skiftverdiene til de tilhørende karbonatomene direkte leses av. Eksempelvis kan det observeres en kobling mellom protonsignalet ved 9,05 ppm og et karbonsignal ved 136,9 ppm i HSQC-spekteret. Protonsignalet ved 9,05 ppm er funnet å tilhøre H4, og man kan dermed tilordne karbonsignalet til C4. Dette gjentas for de andre protonsignalene, og følgelig kan C4, C6', C2', C5', C8 og C6 identifiseres.

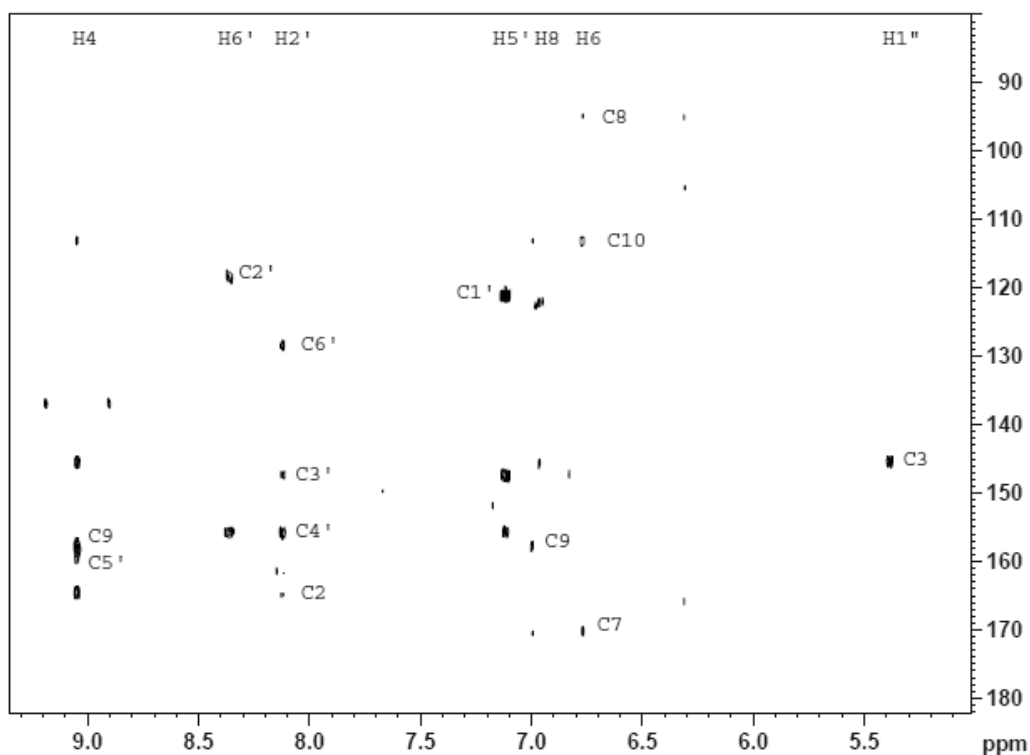


Figur 3.3.2. HSQC-spekter av pigment **5** løst i CD₃OD-CF₃COOD (95:5) ved 25 °C. Spekteret viser aromatisk region.

HMBC-spekteret (figur 3.3.3) viser flerbindingskoblinger mellom karbon og proton, først og fremst $^2J_{CH}$ og $^3J_{CH}$, men $^1J_{CH}$ og $^4J_{CH}$ koblinger kan også forekomme. Ved hjelp av HMBC-spekteret kan karbonatomer som ikke er tilknyttet til proton også tilordnes.

H4 vil i hovedsak koble til C2, C3, C5, C10 og C9. I HMBC-spekteret kan det i tillegg observeres en 1J kobling mellom H4 og dets tilhørende karbon. 1J koblingskonstanter er større enn for 2J og 3J , og splittingen ved $^1J_{CH}$ koblinger er derfor større.

En av krysstoppene til H4 skiller seg ut ved at den har lavere karbonskiftverdi enn de fire andre krysstoppene. I tillegg kan det sees at dette signalet også gir krysstopp med H6 og H8.



Figur 3.3.3. HMBC-spekter pigment **5** løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (95:5) ved 25 °C. Spekteret viser aromatreionen.

C10 er det eneste karbon som ikke er direkte tilknyttet et oksygenatom, noe som gjør at det kan forventes at dette signalet har lavere karbonskiftverdi enn de andre signalene, og det er også det eneste karbon som vil koble med H6 og H8. Følgelig må signalet ved 113,1 ppm tilhøre C10.

H6 og H8 skal begge koble med både C10 og C7. I spekteret har disse to protonene to felles krysstopper; en ved 113,1 ppm, som allerede er identifisert som C10, og en ved 170,3 ppm. Det sistnevnte signalet kan derfor tilordnes C7. Signalet har en mye høyere skiftverdi enn C10, da C7 er direkte knyttet til et oksygenatom.

H6 kobler med to andre karbon; C8 og C5. C8 er allerede identifisert ved hjelp av HSQC-spekteret og det er derfor sannsynlig at den svake krysstoppen ved 159,1 ppm skyldes kobling med C5. Dette signalet kobler også med H4, noe som bekrefter at det er C5. H8 kobler med nok et signal, på 157,9 ppm. Dette karbon gir også en krysstopp med H4, og må være C9.

H4 har kun to krysstopper igjen som ennå ikke er identifisert. Disse må tilhøre C3 og C2. Karbonsignalet lengst downfield, ved 164,7 ppm, gir også krysstopper med H6' (svært svak) og H2', og tilhører C2. Krysstoppen ved 145,5 ppm skyldes dermed C3. Dette signalet kobler også med H1'', noe som stadfester at sukkermolekylet er i 3-posisjonen på aglykonet.

H6' har to sterke krysstopper, og det er nærliggende å tro at disse tilhører C2' og C4' fremfor C1' og C5', da $^3J_{CH}$ koblinger gir sterkere signal i HMBC enn $^2J_{CH}$ koblinger. Krysstoppen ved 118,5 ppm tilhører C2', som ble identifisert ved hjelp av HSQC-spekteret. Signalet ved 155,9 ppm, som også kobler med H2' og H5', kan tilhøre enten C4' eller C1'. C1' har ingen oksygenatom direkte knyttet til seg, og det er derfor lite sannsynlig at signalet vil ha en så høy skiftverdi. I tillegg vil $^3J_{CH}$ koblingen til C4' være tydeligere, og signalet må dermed tilhøre C4'.

H2' har totalt fire krysstopper, hvorav to er identifisert som C4' og C2'. Av de to resterende signalene, skyldes det ene C6' ved 103,5 ppm, som ble funnet i HSQC-spekteret. Karbonsignalet ved 147,3 ppm kobler både med H2' og H5', og må tilhøre C3'. For H5' er nå alle utenom én krysstopp tilordnet, og det gjenstående signalet ved 121,3 ppm skyldes C1'. På grunn av for svake signal, vises ikke $^2J_{CH}$ koblingene mellom C1' og H6' og H2'.

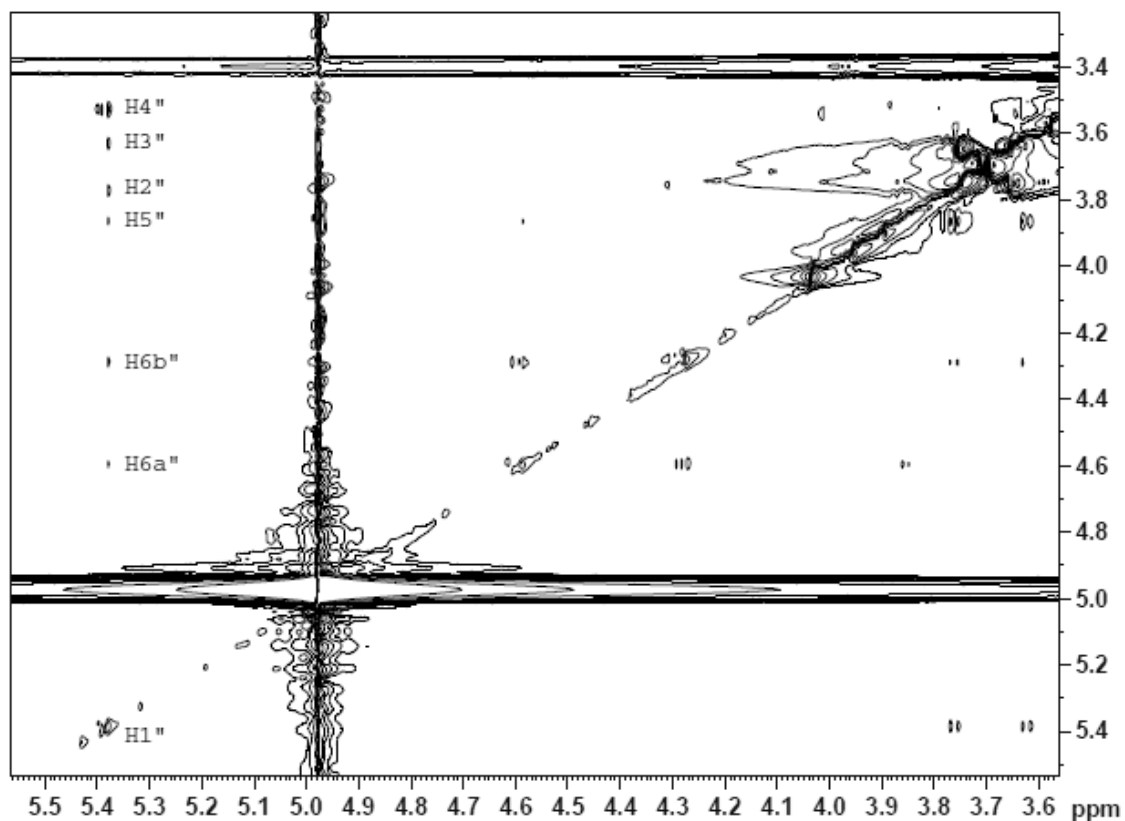
Tabell 3.3.2 viser en oversikt over observerte koblinger i HMBC-spekteret i aromatisk region. De kjemiske skiftverdier til 1H og ^{13}C (vist i tabell 3.3.3) er i overenstemmelse med cyanidin med et sukker i 3-posisjon (Andersen & Fossen 2005; Jordheim et al. 2006).

Tabell 3.3.2. Observerte krysstopper i HMBC-spekteret (aromatisk og anomer region) til pigment 5

1H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
4	C3, C10	C2, C5, C9
6'		C2', C4'
2'	C3'	C4', C6', C2
5'	C4',	C1', C3'
8	C7, C9	C10
6	C5, C7	C8, C10
1''		C3

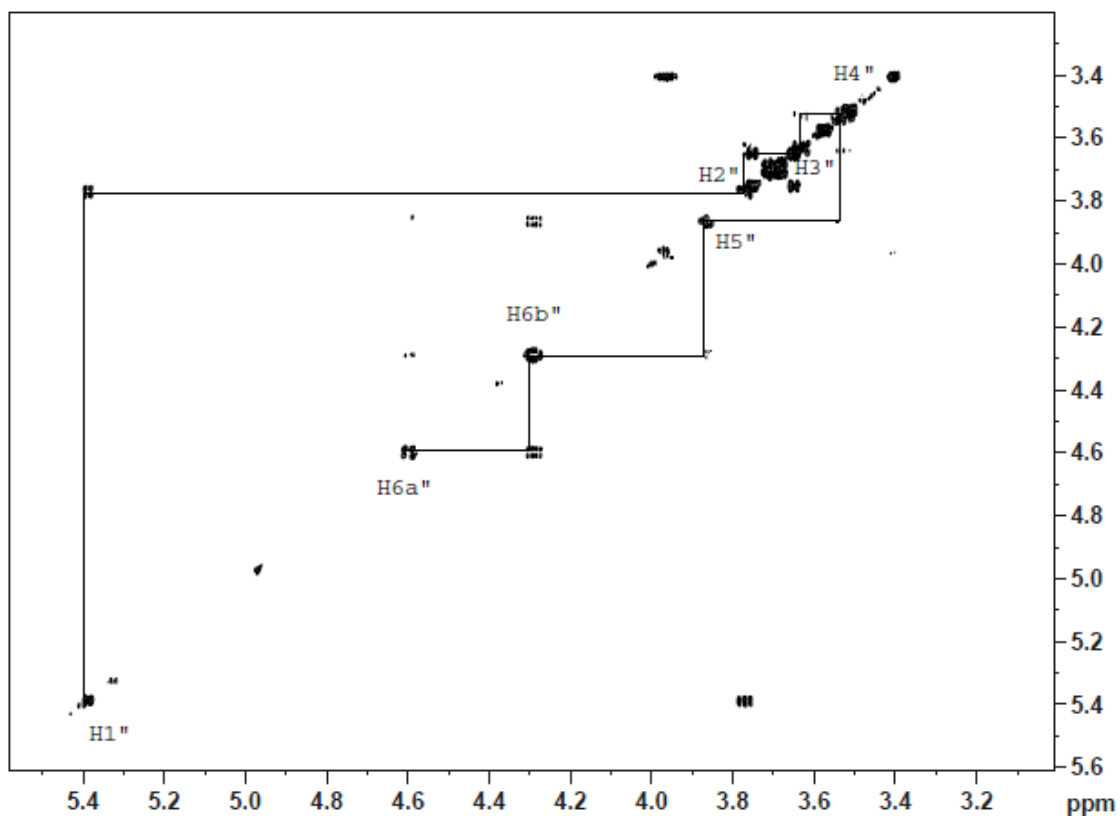
3.3.2 Sukkerregion

TOCSY-spekteret (figur 3.3.4) viser alle protonsignal som tilhører samme spinnsystem, det vil si de proton som sitter på samme sukkerenhet. TOCSY-spekteret viser totalt sju protonsignal som tilhører samme spinnsystem, og ved hjelp av COSY-spekteret kan hvert av disse signalene tilordnes et bestemt proton.



Figur 3.3.4. TOCSY-spekter av pigment **5** løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (95:5) ved 25 °C. Spekteret viser sukkerregionen.

I COSY-spekteret (figur 3.3.5) ligger protonsignalene langs en diagonal linje i 2D spekteret, og krysstopperne for proton som kobler med hverandre befinner seg utenfor denne diagonalaksen. Helt nederst til venstre ved 5,38 ppm befinner signalet til det anomere protonet $\text{H1}''$ seg. Dette signalet har en krysstopp ved 3,76 ppm, som tilhører $\text{H2}''$. $\text{H2}''$ kobler også med $\text{H3}''$ ved 3,63 ppm, som videre kobler med $\text{H4}''$ ved 3,53 ppm. $\text{H4}''$ har også en krysstopp ved 3,87 ppm, som må tilhøre $\text{H5}''$. Dette protonet har to krysstopper til, ved 4,29 ppm og 4,60 ppm. Disse to signalene kobler også med hverandre, noe som tyder på at disse utgjør en CH_2 -gruppe, og kan tilordnes henholdsvis $\text{H6b}''$ og $\text{H6a}''$.

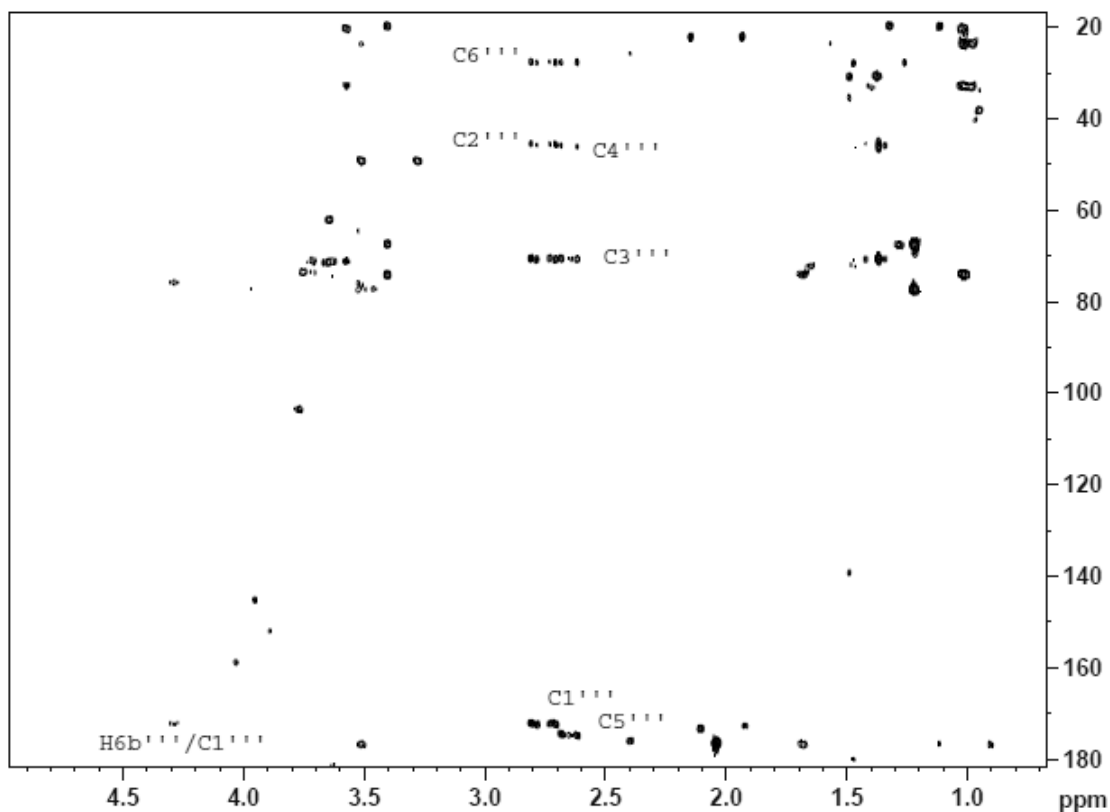


Figur 3.3.5. COSY-spekter av pigment **5** løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (95:5) ved 25 °C. Spekteret viser sukkerregionen.

De tilsvarende karbonverdiene finnes ved å ta utgangspunkt i HSQC-spekteret. De to protonene ved 4,29 ppm og 4,60 ppm kobler til samme karbon i HSQC-spekteret, noe som bekrefter at det dreier seg om en CH_2 -gruppe. Dermed kan det fastslås at sukkerenheten er en heksose med to protoner på $\text{C6}''$. Av de vanligste sukkerenhetene som finnes i antocyaner, er det kun to heksosor med en CH_2 -enhet; galaktose og glukose. Forskjellen mellom disse to er posisjonen til protonet på $\text{C4}''$. Hos galaktose er $\text{H4}''$ i ekvatorial posisjon, mens hos glukose er $\text{H4}''$ i aksial posisjon, noe som medfører forskjellige verdier for koblingskonstanten i galaktose og glukose (Pavia 2009). Det var ikke mulig å få en presis bestemmelse av koblingskonstanten til $\text{H4}''$, ettersom oppløsningen ikke var god nok, men det er også mulig å skille mellom glukose og galaktose på grunnlag av kjemiske skiftverdier. De kjemiske skiftverdiene for både proton og karbon i pigment **5** var i overensstemmelse med en glukoseenhet (Jordheim et al. 2006). De noe høyere skiftverdiene til $\text{C6}''$, $\text{H6a}''$ og $\text{H6b}''$ tyder på at det sitter en syreenhet i 6-posisjonen (Jordheim et al. 2007).

3.3.3 Alifatisk syre

I HMBC-spekteret (figur 3.3.6) kan man se at H6a'' og H6b'' kobler med et karbon ved 172,5 ppm. HSQC-spekteret viser ingen koblinger til proton, noe som tyder på kvarternært karbon, og den høye skiftverdien antyder at det dreier seg om en karbonylgruppe, sannsynligvis en syreenhet.



Figur 3.3.6. HMBC-spekter av pigment **5** løst i CD₃OD-CF₃COOD (95:5) ved 25 °C. Spekteret viser alifatisk region.

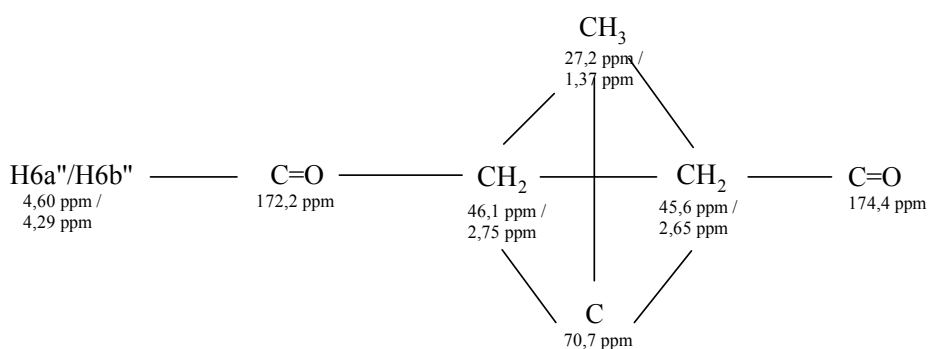
Karbonsignalet kobler videre med to proton ved 2,75 ppm i HMBC-spekteret. Begge protonene kobler til samme karbon ved 46,1 ppm i HSQC-spekteret, noe som tyder på at protonene er en del av en CH₂-gruppe. Protonene kobler også til tre andre karbonsignaler i HMBC-spekteret, ved 70,7 ppm, 45,6 ppm og 27,2 ppm.

Karbonet ved 70,7 ppm viser ingen koblinger i HSQC-spekteret, og er derfor kvarternært. Skiftverdien indikerer at det er bundet til et elektronegativt atom, for eksempel et halogen eller en hydroksygruppe.

Karbonsignalet ved 27,2 ppm viser en $^1J_{CH}$ kobling til et proton ved 1,37 ppm i både HMBC- og HSQC-spekteret. Skiftverdiene er typiske for alifatiske karbon og proton, og det er

sannsynlig at det dreier seg om en metylgruppe. Protonsignalet ved 1,37 ppm kobler også med tre andre karbon; ved 45,6 ppm, 46,1 ppm og 70,7 ppm.

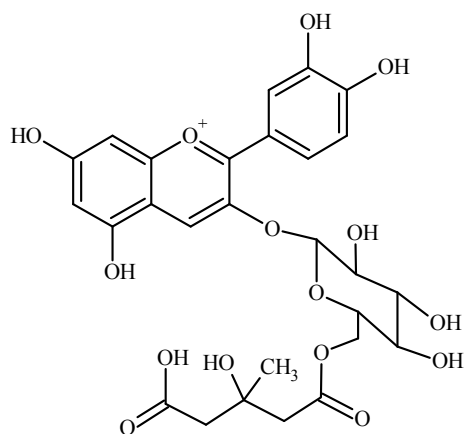
Signalet ved 45,6 ppm kobler med to proton ved 2,65 ppm i HMBC-spekteret, som utgjør en CH₂-gruppe. Disse protonene kobler, i likhet med protonene ved 2,75 ppm, med karbonsignalene ved 27,2 ppm, 46,1 ppm og 70,7 ppm. I tillegg kobler de med et karbon med kjemisk skift på 174,4 ppm. Skiftverdien tyder på at det er en karbonylgruppe i en ester eller syre. Da karbonet ikke kobler med en metylgruppe, er det rimelig å anta at det er en syreenhet, bestående av totalt seks karbonatomer knyttet til 6-posisjonen på sukkeret. Koblinger mellom de ulike gruppene er vist i figuren under.



Figur 3.3.7. $^2J/^3J$ koblinger mellom karbon og proton i syreenheten til pigment **5**

Protonene i metylgruppen kobler ikke med noen av karbonylgruppene, noe som betyr at det er minst 4 bindinger mellom dem. Det er heller ingen kobling mellom protonene i CH₂-gruppen ved 2,75 ppm og karbonylgruppen ved 174,4 ppm. Dermed må det være minst 3 bindinger mellom karbonet ved 46,1 ppm og karbonylgruppen ved 174,4 ppm. Det samme gjelder for protonene i CH₂-gruppen ved 2,65 ppm og karbonylgruppen ved 172,2 ppm. Dette medfører at det kvarternære karbon må være plassert mellom CH₂-gruppene, som er knyttet til hver sin karbonylgruppe. Videre må CH₃-gruppen være bundet til det kvarternære karbon for å unngå kobling med karbonylgruppene. Det høye skiftet til det kvarternære karbon skyldes mest sannsynlig tilknytning til en hydroksygruppe.

Dette betyr at pigment **5** har blitt identifisert som cyanidin 3-*O*- β -(6''-(3-hydroksy-3-metylglutaryl)glukopyranosid), vist i figur 3.3.8. Kjemiske skiftverdier til ¹H og ¹³C for aglykon, sukker- og syreenhet er gitt i tabell 3.3.3.



Figur 3.3.8. Strukturen til cyanidin 3-*O*- β -(6''-(3-hydroksey-3-metylglutaryl)glukopyranosid) (**5**)

Stintzing et al. (2002) har i sin studie antydnet at pigment **5** inneholdt en dioksyrenhet, hovedsakelig basert på LC-MS data. NMR-spektrene i denne studien viser at dette ikke er tilfelle. Dersom det hadde vært en dioksyrenhet knyttet til glukose, kunne man forvente en kobling mellom protonene på C6'' og en karbonverdi rundt 170-175 ppm i HMBC-spekteret, noe som riktignok stemmer overens spekteret i denne oppgaven. Dette karbonet kobler imidlertid også med alifatiske proton ved 2,75 ppm, noe som ikke ville være mulig for dioksyrenheten, på grunn av manglende proton. Det kan dermed utelukkes at identiteten til antocyan **5** er cyanidin 3-*O*- β -(6''-dioksylylglukopyranosid) (struktur er vist i appendiks, A2).

Tabell 3.3.3. Kjemiske skiftverdier (i ppm) for ^1H og ^{13}C i aglykon, sukker- og syreenhet

	^1H	^{13}C
<i>Aglykon</i>		
2	-	164,7
3	-	145,5
4	9,05	136,9
5	-	159,1
6	6,76	103,5
7	-	170,3
8	6,99	95,3
9	-	157,9
10	-	113,1
1'	-	121,3
2'	8,12	118,5
3'	-	147,3
4'	-	155,9
5'	7,11	117,4
6'	8,36	128,5
<i>3-O-β-glukopyranosid</i>		
1''	5,38	103,6
2''	3,76	74,7
3''	3,63	73,6
4''	3,53	71,3
5''	3,86	76,0
6A''	4,60	64,5
6B''	4,29	64,5
<i>6''-O-acyl</i>		
1'''	-	172,5
2'''	2,75	46,1
3'''	-	70,7
4'''	2,65	45,6
5'''	-	174,4
6'''	1,37	27,2

3.4 MS-analyse av pigment 5

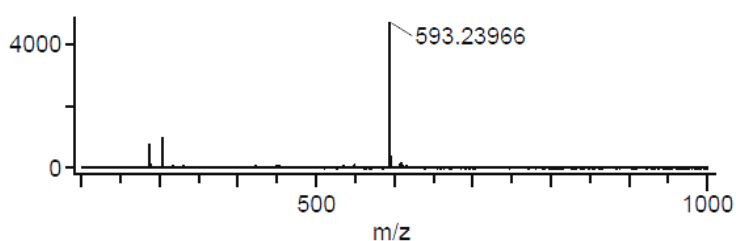
Det ble tatt opp MS-spekter for pigment **5** i rækstraktet til bjørnebær (figur 3.4.1). Observerte LC-MS m/z-verdier, sammenlignet med eksakt masse til de mulige pigmentene er gitt i tabell 3.4.1. Cyanidin 3-glukosid ble valgt til indre standard, og ble brukt til å kalibrere de observerte m/z-verdiene. Avvik mellom korrigert m/z-verdi og eksakt masse til det aktuelle pigment ble målt i ppm. For å sikre høy grad av nøyaktighet, ble avviksgrensen satt til 5 ppm.

Tabell 3.4.1. LC-MS data for pigment **5** i bjørnebær

Observert masse m/z	Mulig identitet	Eksakt masse	Avvik ppm
593,1527	Cyanidin 3- <i>O</i> - β -(6"- dioksalyglukopyranosid)	593,0779	126,1
593,1527	Cyanidin 3- <i>O</i> - β -(6"-(3-hydroksy-3- metylglutaryl)glukopyranosid)	593,1507	3,4

Pigment **5** har i tidligere arbeid blitt identifisert som cyanidin 3-*O*- β -(6"-dioksalyglukopyranosid) (Stintzing et al. 2002; Wu & Prior 2005; Ogawa et al. 2008). Avviket mellom eksakt masse for denne forbindelsen (593,0779 g/mol) og observert MS-verdi (593,1527 m/z) for pigment **5** er 126 ppm, noe som er et særdeles stort avvik. Det er derfor svært lite sannsynlig at det dreier seg om denne forbindelsen.

Derimot er det stor overensstemmelse mellom observert m/z-verdi og eksakt masse til cyanidin 3-*O*- β -(6"-(3-hydroksy-3-metylglutaryl)glukopyranosid), som ble identifisert ved hjelp av NMR-spektrosopi. Avvik fra eksakt verdi er 3,4 ppm, som er godt innenfor den valgte grensen på 5 ppm. MS-spekteret bekrefter dermed identiteten til cyanidin 3-*O*- β -(6"-(3-hydroksy-3-metylglutaryl)glukopyranosid) (**5**).



Figur 3.4.1. Høyoppløselig MS-spekter av pigment **5** (cyanidin 3-*O*- β -(6"-(3-hydroksy-3-metylglutaryl)glukopyranosid)) i bjørnebær

3.5 Konklusjon

Målet med denne studien har vært å isolere og identifisere et ukjent pigment i bjørnebær, som tidligere har vært feilbestemt (Stintzing et al. 2002; Wu & Prior 2005; Ogawa et al. 2008)

Stintzing et al (2002) konkluderte i deres studie med at identiteten til pigment **5** var cyanidin 3-*O*- β -(6"-dioksalyglukopyranosid), hovedsakelig basert på lavoppløselige LC-MS data. Lavoppløselig MS-analyse gir imidlertid ikke nok informasjon til å gi en sikker identifikasjon, og NMR-spektroskopi er som oftest nødvendig for en fullstendig strukturoppklaring. Data fra både NMR og høyoppløselig LC-MS i denne studien beviser at identiteten til pigment **5** *ikke* er cyanidin 3-*O*- β -(6"-dioksalyglukopyranosid), men cyanidin 3-*O*- β -(6"-(3-hydroksey-3-metylglutaryl)glukopyranosid). Dette pigmentet har ikke blitt rapportert i noe plantemateriale tidligere.

4 IDENTIFIKASJON AV ANTOCYANER I ULIKE KULTIVARER AV BJØRNEBÆR OG BRINGEBÆR

Kapittelet omhandler identifikasjon av antocyaner i ulike bjørnebær- og bringebærkultivarer. Totalt 7 bjørnebær og 3 bringebærkultivarer ble analysert ved hjelp av analytisk HPLC med UV-synlig detektor. Noen utvalgte prøver av disse ble videre analysert ved hjelp av høyopløselig LC-MS for identifikasjon av de ulike antocyanene.

4.1 Analytisk HPLC

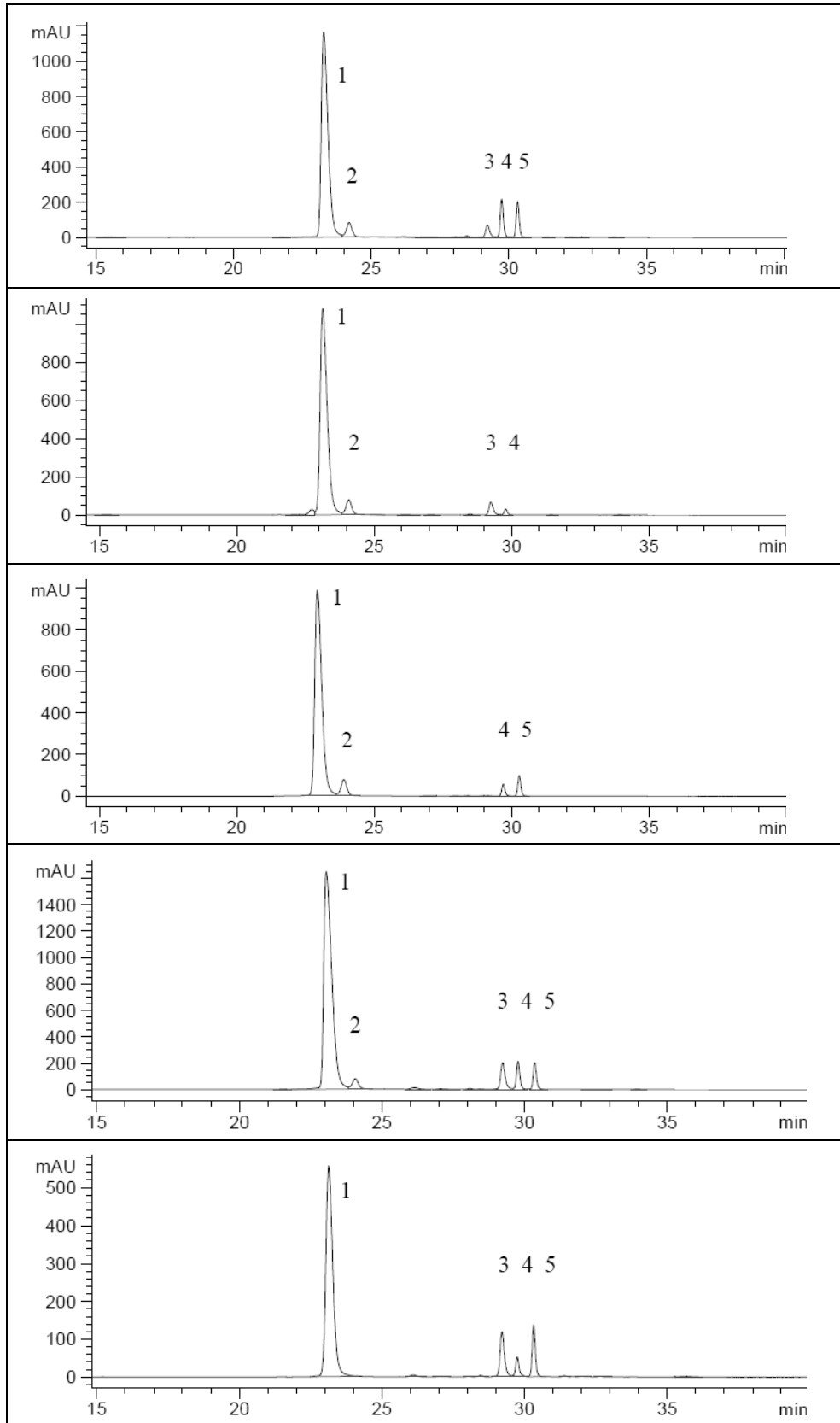
Bærene ble veid inn, ekstrahert med metanol med 0,5 % TFA før injeksjon på HPLC-instrumentet. En standardforbindelse, cyanidin 3-glukosid, ble analysert sammen med bærene. HPLC-profilene til de ulike kultivarene ble sammenlignet med hverandre, med hensyn på retensjonstider og UV-synlig absorpsjon. Et raskt overblikk over HPLC-profilene viser at bjørnebærene og bringebærene skiller seg ut fra hverandre med hensyn til innhold. Bjørnebærkultivaren Bedford Giant (BG) utmerker seg, og har fellestrekk med både bringebær- og bjørnebærkultivarene, i tillegg til tre andre pigmenter som ikke forekommer i noen av de andre undersøkte bærene.

Bjørnebær

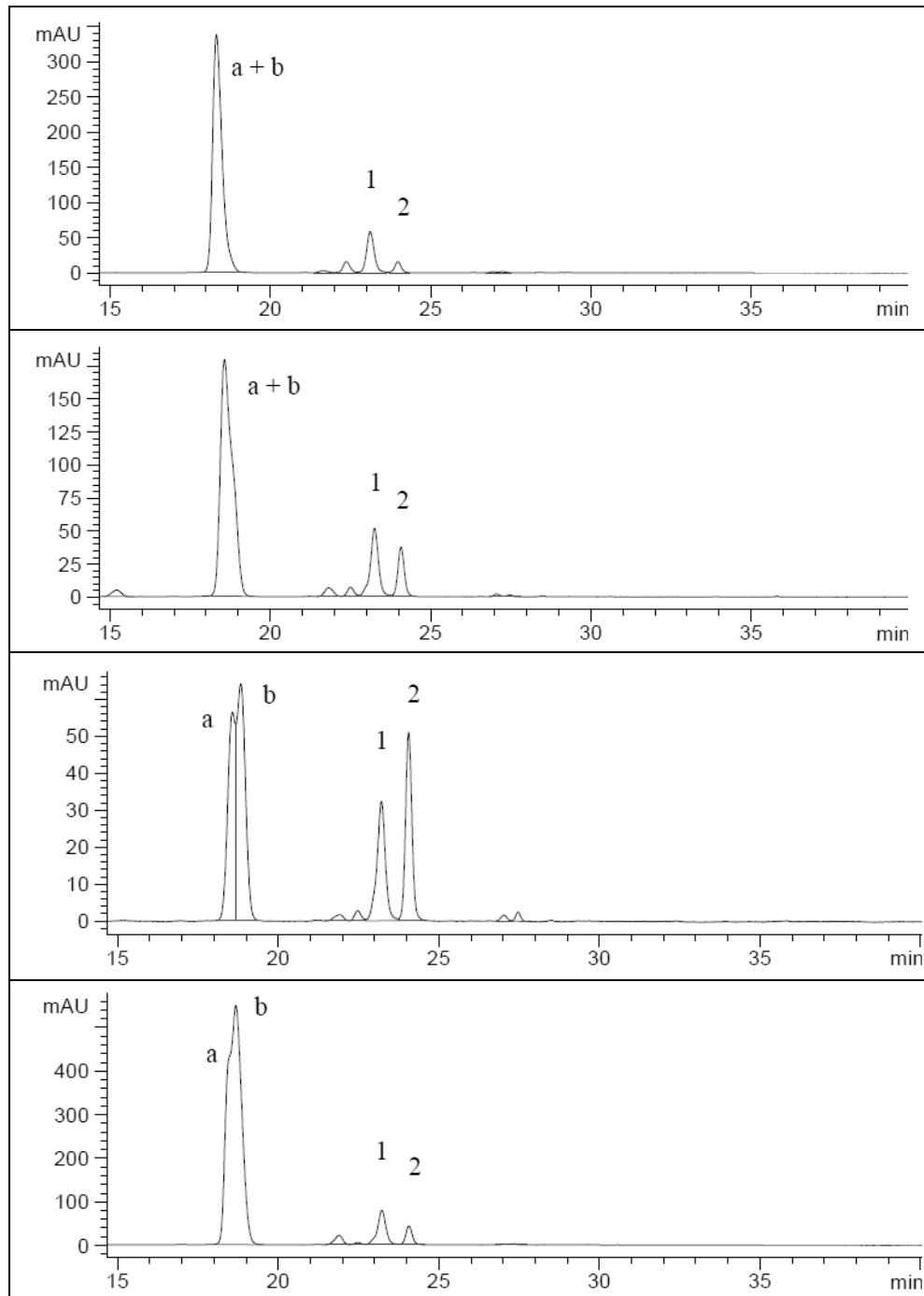
Kromatogrammene i figur 4.1.1. viser at viltvoksende bjørnebær og bjørnebærkultivarene Loch Ness (LN), Tupi, Kultivar (K) og Norrek (N) hovedsakelig inneholder antocyanene **1**, **2**, **3**, **4** og **5**. Bjørnebærene LN, Tupi og N inneholder kun fire av disse, og mangler henholdsvis **5**, **3**, og **2**.

Bringebær

Kromatogrammene (figur 4.1.2.) til bringebærkultivarene, inkludert hybridene Tai, viser totalt 4 toppen. To av disse, heretter kalt **a** og **b**, har overlappende retensjonstider, og de to toppene ser nesten ut som en enkelt topp. Bringebærkultivarene inneholder i tillegg **1** og **2**.



Figur 4.1.1. HPLC-kromatogram av bjørnebærkultivarer detektert ved 520 ± 20 nm. Fra øverst: ville bjørnebær (B), Loch Ness (LN), Tupi, Kultivar (K) og Norrek (N).

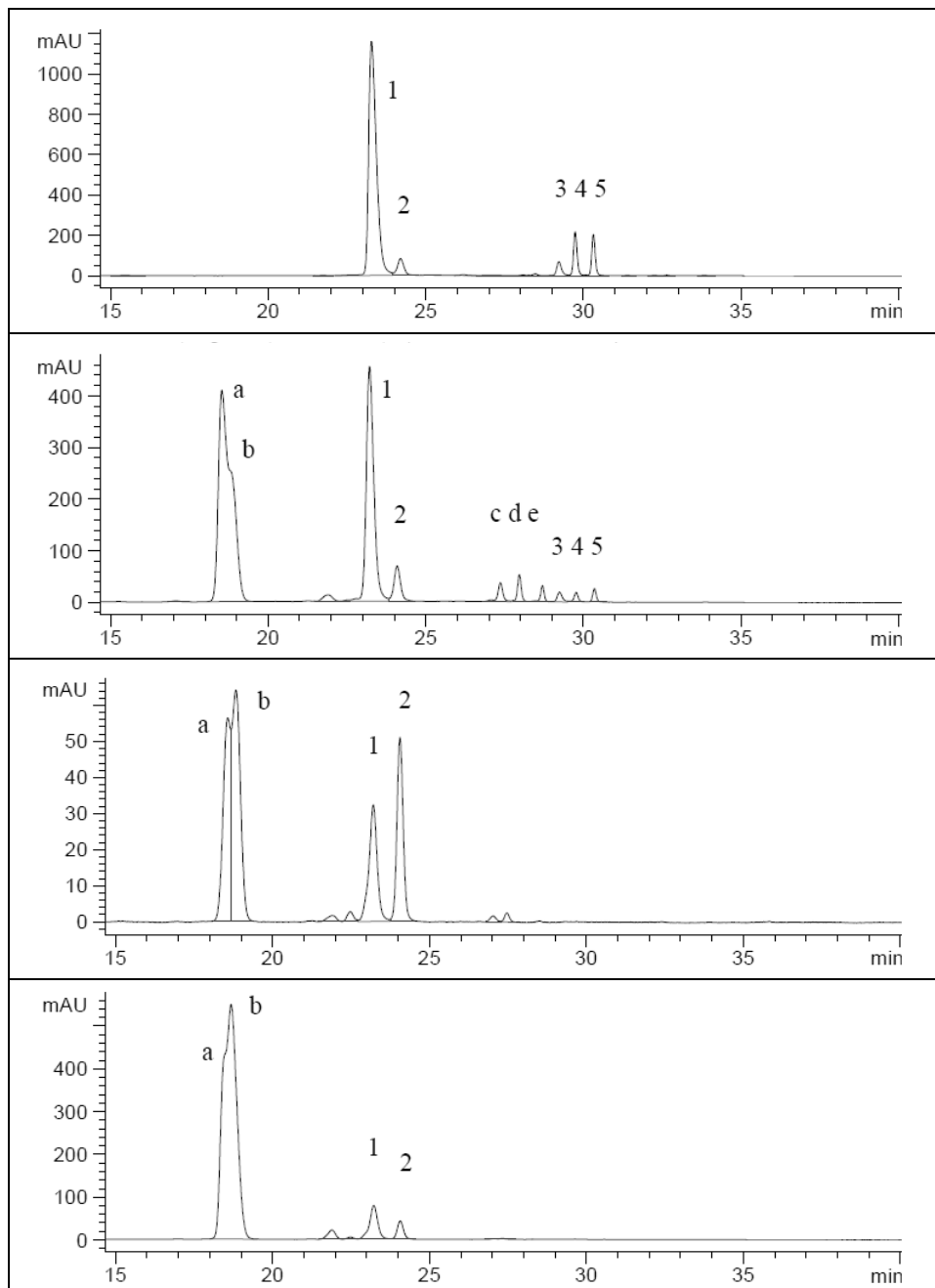


Figur 4.1.2. HPLC- kromatogram av bringebærkultivarene detektert ved 520 ± 20 nm. Fra øverst: Tulameen (TM), Glen Ampel (GA), Driscoll Maravilla (DM) og hybriden Tai.

Sammenligning av antocyaner i bjørnebær, bringebær og hybrid

Figur 4.1.3. viser profilen til bjørnebær (B) sammenlignet med profilene til Bedford Giant (BG), bringebær (DM) og hybriden Tai. Typisk for bringebærkultivarene er pigmentene *a* og *b*, mens *3*, *4* og *5* kun forekommer i bjørnebærkultivarene. Pigment *1* og *2* er til stede i både bringebær og bjørnebær. BG inneholder pigmentene *a* og *b*, som er typiske for bringebær, samt

pigment **3**, **4** og **5** som ellers kun forekommer i bjørnebær. Dette *kan* tyde på at BG er en hybrid av bringebær og bjørnebær. I tillegg inneholder BG tre andre pigmenter (*c*, *d* og *e*) som ikke er til stede i noen av de andre undersøkte bærene.



Figur 4.1.3. HPLC-kromatogram av utvalgte kultivarer detektert ved 520 ± 20 nm. Fra øverst: bjørnebær (B), Bedford Giant (BG), DM og Tai.

UV-synlig spektra av alle pigmenter funnet i bjørnebær og bringebær (appendiks, A3) har samme form som UV-synlig spekteret til standardforbindelsen cyanidin 3-glukosid. Pigmentene viser et absorpsjonsmaksimum på 516-521 nm og $A_{440}/A_{\text{vis-max}}$ -forhold på 28-32 %

(tabell 4.1.1.), som er typiske verdier for cyanidin eller peonidin med glykosider i 3-posisjonen (Strack & Wray 1989).

Tabell 4.1.1. Retensjonstid og UV-synlig data til antocyanene i undersøkte bjørnebær- og bringebærkultivarer

	t_R (min)	UV_{max} (nm)	Vis_{max} (nm)	A₄₄₀/A_{vis-max} (%)
<i>a + b</i>	18,53	281	516	32
1	23,22	281	517	31
2	24,09	281	519	31
<i>c</i>	27,37	281	521	31
<i>d</i>	27,97	281	519	32
<i>e</i>	28,70	281	519	29
3	29,24	281	519	29
4	29,77	281	519	29
5	30,35	281	519	28

4.2 LC-MS

Noen utvalgte kultivarer ble analysert ved hjelp av LC-MS for å bestemme identiteten til de ulike pigmentene. Sammenligning av HPLC-profiler med hensyn på retensjonstider viser at bjørnebærkultivarene (med unntak av BG) inneholder de samme pigmentene, og kun en type bjørnebær blir analysert ved hjelp av LC-MS. Den samme antagelsen kan gjøres for bringebær. I tillegg ble hybridene Tai og bjørnebærkultivaren BG analysert.

Identiteten til pigment **1** (cyanidin 3-glukosid) er kjent og kunne derfor benyttes til å beregne korreksjonsfaktor (som beskrevet i metode) på grunnlag av forholdet mellom eksakt (beregnet) og observert masse. Korreksjonsfaktoren ble videre brukt til å finne korrigert masse for de andre toppene, og avvik mellom eksakt og korrigert masse ble beregnet i ppm.

Alle LC-MS data er gitt i tabell 4.2.1, med identifiserte antocyan og tilhørende eksakte masser for sammenligning. En avviksgrense på 5 ppm ble valgt for å sørge for en mest mulig sikker identifikasjon. De fleste verdiene ligger innenfor den valgte grensen på 5 ppm. Strukturene til pigmentene som ble identifisert ved hjelp av LC-MS er vist i figur 4.2.1 og er også gitt i appendiks (A2). MS-spektre til alle de identifiserte pigmentene finnes i appendiks (A4).

Bjørnebærkultivarer

Det ble funnet fem pigmenter i bjørnebær, hvorav fire i tidligere studier har blitt identifisert som cyanidin 3-glukosid (**1**), cyanidin 3-rutinosid (**2**), cyanidin 3-xylosid (**3**) og cyanidin 3-(6"-malonyl-glukosid) (**4**) (Stintzing et al. 2002; Maatta-Riihinen et al. 2004; Fan-Chiang & Wrolstad 2005; Wu & Prior 2005; Howard & Hager 2007; Ogawa et al. 2008; Jakobek et al. 2009). Høyopløselig MS-data i denne studien var i samsvar med disse funnene (tabell 4.1.2.).

Som tidligere nevnt har pigment **5** blitt feilaktig identifisert som cyanidin 3-(6"-dioksalyglukopyranosid) av Stintzing et al. (2002). I denne studien ble pigment **5** identifisert som cyanidin 3-(6"-(3-hydrokso-3-metylglutaryl)glukopyranosid) ved hjelp av NMR-spektroskopi og høyopløselig MS-data.

Bringebær og hybrid (Tai)

I bringebærkultivaren DM og hybridene Tai ble det funnet cyanidin 3-sophorosid (**a**) og cyanidin 3-(2-glukosylrutinosid) (**b**), i tillegg til cyanidin 3-glukosid (**1**) og cyanidin 3-rutinosid (**2**), noe som er i samsvar med funn gjort i andre studier (Maatta-Riihinen et al. 2004;

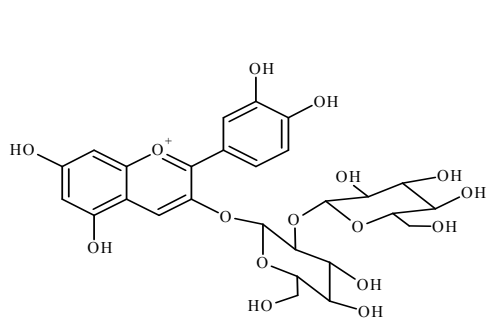
Wu & Prior 2005; Howard & Hager 2007; Ogawa et al. 2008; Zhang et al. 2008). MS-data for pigment **b** viste et molekylerion på 757,2170 m/z og fragmentene 611 m/z (M-146), som tilsvarer tap av rhamnosyl, og 287 m/z (M-146-162-162), som skyldes tap av rhamnosyl-enheten etterfulgt av to glykosyl-enheter. Disse m/z-verdiene stemmer også for cyanidin 3-sophorosid-5-rhamnosid, som i flere studier har blitt identifisert i bringebær (Wu & Prior 2005; Howard & Hager 2007; Ogawa et al. 2008), men det kunne da forventes å se et fragment på 433 m/z, som skyldtes tap av sophorosyl-enheten. Da dette ikke er tilfelle i denne studien, kan det slås fast at pigment **b** etter all sannsynlighet er cyanidin 3-(2-glukosylrutinosid).

Bedford Giant

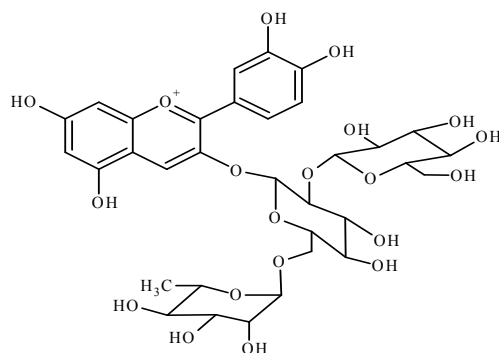
Cyanidin 3-sophorosid (**a**), cyanidin 3-(2-glukosylrutinosid) (**b**), cyanidin 3-glukosid (**1**) og cyanidin 3-rutinosid (**2**) og cyanidin 3-(6''-(3-hydroksey-3-metylglutaryl)glukopyranosid) (**5**), ble også identifisert i kultivaren BG. I tillegg var det et ion med 581,1541 m/z til stede, som ble foreløpig identifisert som cyanidin 3-sambubiosid (**c**, **d** eller **e**), hovedsakelig basert på data fra tidligere studier (Howard & Hager 2007).

Tabell 4.2.1. LC-MS data for pigmentene funnet i bjørnebær- og bringebærkultivarer

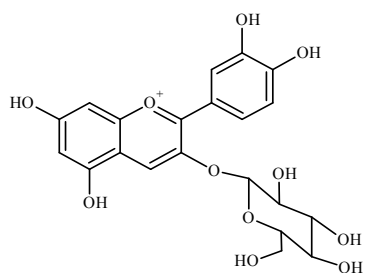
	LC-MS data		Mulig identitet	Eksakt masse	Avvik (ppm)
	[M] ⁺	Fragment			
a	611,1600	287	Cyanidin 3- <i>O</i> - β -sophorosid	611,1612	1,9
b	757,2170	611, 287	Cyanidin 3- <i>O</i> - β -(2-glukosylrutinosid)	757,2191	2,8
1	449,1084	287	Cyanidin 3- <i>O</i> - β -glukopyranosid	449,1084	0
2	595,1675	–	Cyanidin 3- <i>O</i> - β -rutinosid	595,1663	1,9
c/d/e?	581,1541	287	Cyanidin 3- <i>O</i> - β -sambubiosid	581,1507	5,9
3	419,0994	287	Cyanidin 3- <i>O</i> - β -xylosid	419,0978	3,7
4	535,1108	–	Cyanidin 3- <i>O</i> - β -(6''-malonyl-glukopyranosid)	535,1088	3,8
5	593,1527	287	Cyanidin 3- <i>O</i> - β -(6''-(3-hydroksey-3-metylglutaryl)glukopyranosid)	593,1507	3,4



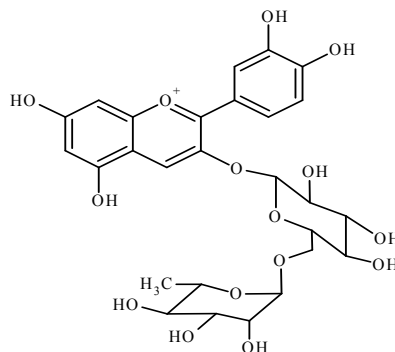
Cyanidin 3-*O*- β -sophorosid



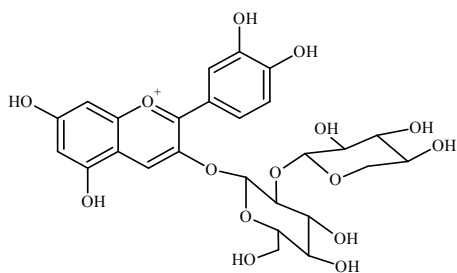
Cyanidin 3-*O*- β -(2-glukosylrutinosid)



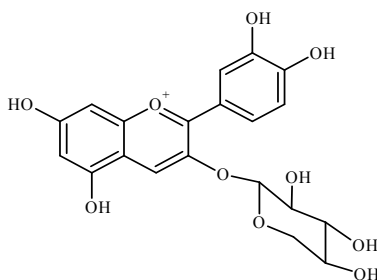
Cyanidin 3-*O*- β -glukopyranosid



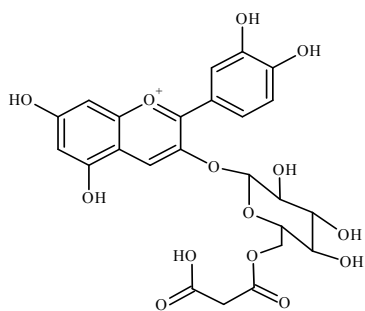
Cyanidin 3-*O*- β -rutinosid



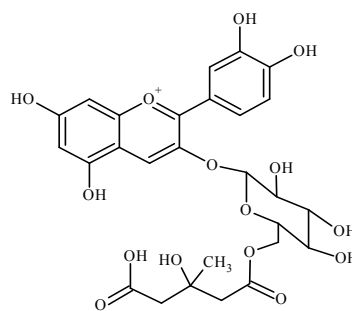
Cyanidin 3-*O*- β -sambubiosid



Cyanidin 3-*O*- β -xylosid



Cyanidin 3-*O*- β -(6''-malonyl-glukopyranosid)



Cyanidin 3-*O*- β -(6''-(3-hydroksey-3-metylglutaryl)glukopyranosid)

Figur 4.2.1. Strukturer til identifiserte antocyaner i undersøkte bjørnebær- og bringebærkultivarer

4.3 Konklusjon

Ulike bjørnebær og bringebærkultivarer har blitt analysert ved analytisk HPLC med UV-synlig detektor og høyoppløselig LC-MS, for å sammenligne kvalitativt innhold av antocyaner.

Bjørnebær- og bringebærkultivarene har forskjellig innhold av antocyaner. Mens bjørnebærkultivarene inneholder pigmentene **1-5**, er det pigmentene **a**, **b**, **1** og **2** som dominerer i bringebærkultivarene. Tai, som er en hybrid, har samme antocyaninnhold som bringebærkultivarene. Bjørnebærkultivaren BG, inneholder samme pigment som forekommer i både bjørnebær (**1-5**) og bringebær (**a** og **b**), i tillegg til tre andre pigment, **c**, **d** og **e**, som ikke er til stede i noen av de andre undersøkte bærene.

Ved hjelp av høyoppløselig LC-MS ble følgende pigment identifisert: Cyanidin 3-sophorosid (**a**), cyanidin 3-(2-glukosylrutinosid) (**b**), cyanidin 3-glukosid (**1**), cyanidin 3-rutinosid (**2**), cyanidin 3-xylosid (**3**), cyanidin 3-(6"-malonyl-glukosid) (**4**) og cyanidin 3-(6"-(3-hydroksy-3-metylglutaryl)glukosid) (**5**). I tillegg var det et pigment i BG som foreløpig ble identifisert som cyanidin 3-sambubiosid, og som kunne tenkes å være et av de tre ukjente pigmentene (**c**, **d** eller **e**).

5 KVANTITATIV BESTEMMELSE AV ANTOCYANER I BJØRNEBÆR- OG BRINGEBÆRKULTIVARER

Dette kapitlet omhandler det kvantitative innholdet av de ulike antocyanene i ulike bjørnebær- og bringebærkultivarer. Kvantitativ bestemmelse av antocyaner er krevende blant annet på grunn av pigmentenes lave stabilitet, spesielt i løsning. Det ble derfor utført flere ulike analyseserier, med fokus på faktorer som ekstraksjonstid og antall ekstraksjoner, og hvordan disse kan påvirke den kvantitative bestemmelsen. Kalibreringskurve ble benyttet som kvantifiseringsmetode. En nærmere drøfting av usikkerhet og presisjon knyttet til kvantitativ metode er gitt i appendiks (A6).

5.1 Analyserier

Det har i denne studien blitt benyttet flere forskjellige analysemetoder for bestemmelse av kvantitativ innhold, se figur 2.5.1 i kapittel 2. I de to første analyseseriene var målet å gi en indikasjon på det kvantitative innholdet av antocyaner i ti bjørnebær- og bringebærkultivarer, samt å undersøke relative forskjeller mellom de ulike kultivarene. I serie 3 og 4 var intensjonen å undersøke i hvilken grad ekstraksjonstid og antall ekstraksjoner har betydning for den totale mengden.

I den første analyseserien (serie 1) ble det foretatt tre ekstraksjoner over tre døgn, med røring og sentrifugering mellom ekstraksjonene. Det totale ekstraktet ble dampet inn til tørrhet og lagret i frys før analyse ved hjelp av HPLC.

I andre serie (serie 2) ble det kun foretatt én enkelt ekstraksjon på 40 minutter, før direkte injeksjon på HPLC.

I serie 3 ble det gjort tre delforsøk; det ene var identisk med prosedyren i serie 2. I andre delforsøk ble ekstraksjonstiden økt til 80 min, mens antall ekstraksjoner ble økt til 3 i det tredje delforsøket.

Til slutt ble det gjort en fjerde serie, hvor det ble utført fem ekstraksjoner på hver 40 min.

I alle serier ble kalibreringskurve brukt til å bestemme absolutt mengde. Relative mengder (%) av individuelle pigment ble beregnet direkte fra arealene til toppene. Konsentrasjoner og mengder av pigmentene ble beregnet som beskrevet i metodekapittelet, avsnitt 2.5.

5.2 Kvantitativt innhold av antocyaner i bjørnebær og bringebær

Relativ mengde har blitt bestemt for alle pigmenter i de undersøkte bærene. Antocyanene **a** og **b** har omtrent samme retensjonstid, og gir opphav til én enkelt topp i kromatogrammet. Absolutt mengde av disse har derfor blitt bestemt sammen i blanding. Det ble tatt utgangspunkt i det totale arealet til de to pigmentene og gjennomsnittet av molarmassene til **a** og **b** ble videre brukt til å beregne totalmengden. Absolutt mengde har også blitt bestemt for antocyan **1**, **2**, **3**, **4** og **5**. Pigmentene **c**, **d** og **e**, som utgjør ca 5 % av det totale antocyaninnholdet i kultivaren BG, har ikke blitt tilstrekkelig identifisert. Absolutt mengde av disse kunne derfor ikke bli bestemt.

5.2.1 Relativ distribusjon av antocyaner i bjørnebær- og bringebærkultivarer

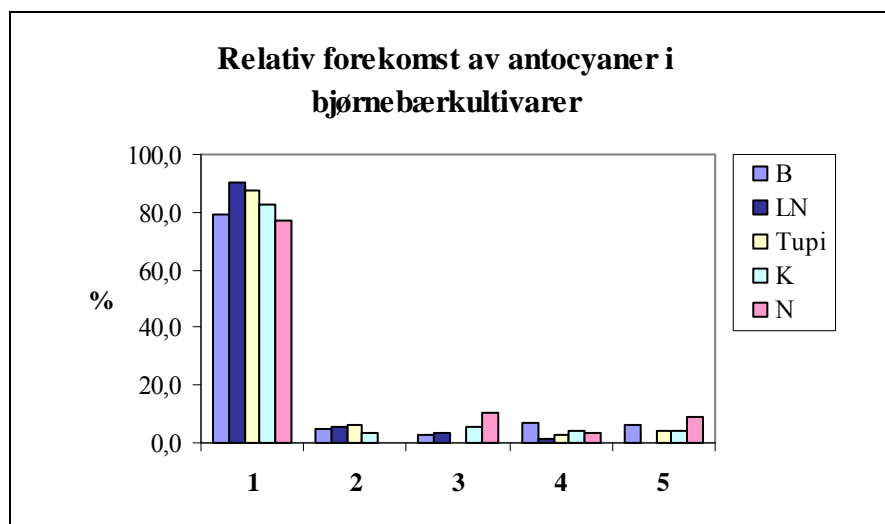
Cyanidin 3-glukosid (**1**) er det dominerende pigment i bjørnebærkultivarene, med forekomst som varierer fra 77 til 90 % (tabell 5.2.1 og figur 5.2.1). De relative mengdene av de fire andre pigmentene varierer noe innad i kultivarene, men er generelt mye lavere sammenlignet med pigment **1**, med verdier stort sett under 10 %.

I bringebærkultivarene og hybridene Tai er det hovedsakelig **a** (cyanidin 3-sophorosid) og **b** (cyanidin 3-(2-glukosylrutinosid) som dominerer, med lavere forekomster av **1** og **2** (cyanidin 3-rutinosid). Av tabell 5.2.1 og figur 5.2.2. kan det sees at Driscoll Maravilla (DM) skiller seg ut, med lavere forekomst av pigment **a** og **b** sammenlignet med de andre kultivarene. I tillegg har DM mer enn dobbelt så høy forekomst av pigment **2** enn noen av de andre bringebærene.

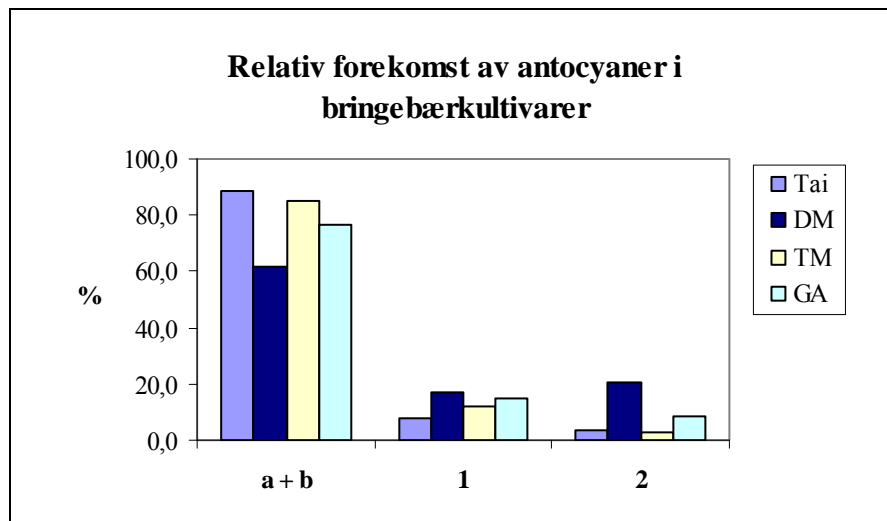
Bjørnebærkultivaren BG inneholder flere individuelle antocyaner enn de andre bjørnebær og bringebærkultivarene, og har derfor også et annet relativt innhold enn det som sees i de andre bærene. BG har i likhet med bringebær et høyest relativt innhold av **a** og **b**, men har også et høyt innhold av **1**. De andre pigmentene forekommer i mindre mengder < 5 %.

Tabell 5.2.1. Relativ forekomst av antocyaner i ulike kultivarer av bjørnebær og bringebær i *serie 2* (n=5). Mengdene er beregnet fra areal i serie 2 og er oppgitt i prosent (%) med standardavvik.

	<i>a + b</i>	1	2	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	3	4	5
<i>B</i>	-	78,9 ± 0,2	4,8 ± 0,1	-	-	-	3,01 ± 0,01	7,0 ± 0,1	6,3 ± 0,2
<i>LN</i>	-	90,0 ± 0,1	5,5 ± 0,1	-	-	-	3,41 ± 0,01	1,19 ± 0,01	-
<i>Tupi</i>	-	87,7 ± 0,22	5,9 ± 0,2	-	-	-	-	2,4 ± 0,06	3,89 ± 0,03
<i>K</i>	-	82,6 ± 0,10	3,14 ± 0,03	-	-	-	5,70 ± 0,01	4,5 ± 0,03	4,1 ± 0,04
<i>N</i>	-	77,0 ± 0,13	-	-	-	-	10,44 ± 0,09	3,73 ± 0,05	8,8 ± 0,15
<i>BG</i>	53,4 ± 0,3	34,4 ± 0,2	4,51 ± 0,02	1,77 ± 0,01	2,00 ± 0,02	1,18 ± 0,04	1,0 ± 0,05	0,77 ± 0,04	0,95 ± 0,03
<i>Tai</i>	89,0 ± 0,2	7,8 ± 0,1	3,22 ± 0,05	-	-	-	-	-	-
<i>DM</i>	62,0 ± 0,2	17,4 ± 0,1	20,7 ± 0,1	-	-	-	-	-	-
<i>TM</i>	85,4 ± 0,5	11,9 ± 0,4	2,7 ± 0,1	-	-	-	-	-	-
<i>GA</i>	76,8 ± 0,3	14,7 ± 0,2	8,5 ± 0,1	-	-	-	-	-	-



Figur 5.2.1. Relativ forekomst (%) av antocyan 1-5 i bjørnebærkultivarer (beregnet fra areal-serie 2)



Figur 5.2.2. Relativ forekomst (%) av antocyan $a+b$, 1 og 2 i bringebær og hybrid (beregnet fra areal i serie 2)

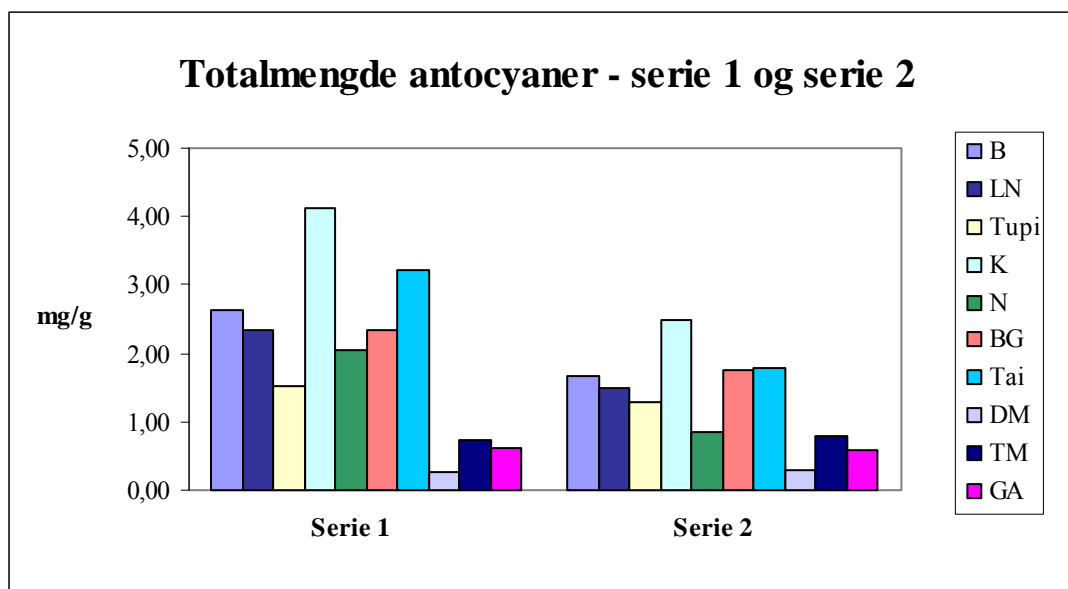
5.2.2 Absolutte mengder av antocyaner i bjørnebær- og bringebærkultivarer

Tabell 5.2.2 viser individuelle og totale mengder av antocyaner i alle undersøkte bær i serie 1 beregnet ved hjelp av kalibreringskurve. Tilsvarende mengder i serie 2 er gitt i tabell 5.2.3.

Av figur 5.2.3, som viser totale mengder av antocyaner i bjørnebær og bringebær i serie 1 og 2, kommer det tydelig frem at bjørnebærkultivarene generelt har et mye høyere antocyaninnhold enn bringebær, noe som ikke er overraskende med tanke på den mørke og intense fargen på bjørnebær. I kapittel 4 (figur 4.1.2) kom det frem at hybridene Tai hadde likheter med bringebærkultivarene med hensyn til kvalitativt antocyaninnhold. Når det gjelder kvantitativt antocyaninnhold, derimot, har Tai et totalinnhold tilsvarende det som forekommer blant bjørnebærkultivarene. Det observeres også individuelle forskjeller innad bjørnebærkultivarene. Disse forskjellene *kan* blant annet skyldes ulik modning ved høstingstidspunktet, og uten å kjenne til modningsgraden til samtlige undersøkte bær kan det ikke trekkes noen konklusjoner om mengdeforskjeller i de ulike kultivarene.

Mengdene i serie 1 er betydelig høyere enn mengdene fra serie 2. Sett bort fra de mindre konsentrerte prøvene (bringebærkultivarene), hvor det er ingen eller svært små forskjeller, er verdiene fra serie 1 gjennomsnittlig over 70 % høyere enn i serie 2. I noen tilfeller (N og Tai) er mengdene omtrent dobbelt så store i serie 1 sammenlignet med serie 2. Dette tyder på at valg av metodikk *kan* ha betydning for mengdebestemmelsen, noe som medfører at de absolutte mengdene som har blitt bestemt i disse seriene kanskje ikke er reelle. De relative

forskjellene i absolutte mengder mellom kultivarene vil derimot være gjeldende, noe som kommer godt frem i figur 5.2.3, hvor de samme trendene er til stede i både serie 1 og 2. Dette betyr at de relative forskjellene i absolutte mengder ikke påvirkes av metodikken som har blitt brukt, og er derfor representative.



Figur 5.2.3. Totalinnhold av antocyaner (mg/g) i undersøkte bær i serie 1 og serie 2.

Tabell 5.2.2. Beregnet mengde av antocyan *a+b* og 1-5 i undersøkte bjørnebær- og bringebærkultivarer – serie 1 (n=3). Mengder er oppgitt i mg/g fersk vekt med standardavvik.

	<i>a+b</i>	1	2	3	4	5	Total
<i>B</i>	-	1,95 ^a ± 0,16	0,16 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,21 ± 0,05	0,23 ± 0,07	2,62 ± 0,33
<i>LN</i>	-	2,08 ^a ± 0,28	0,14 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,03 ± 0,01	-	2,34 ± 0,33
<i>Tupi</i>	-	1,32 ^a ± 0,19	0,11 ± 0,03	-	0,037 ± 0,003	0,07 ± 0,02	1,53 ± 0,22
<i>K</i>	-	3,26 ^a ± 0,27	0,18 ± 0,03	0,29 ± 0,04	0,19 ± 0,03	0,19 ± 0,02	4,12 ± 0,38
<i>N</i>	-	1,73 ^a ± 0,36	-	0,12 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,14 ± 0,05	2,05 ± 0,36
<i>BG</i>	1,53 ^a ± 0,12	0,62 ± 0,12	0,12 ± 0,02	0,018 ± 0,004	0,021 ± 0,002	0,031 ± 0,003	2,35 ± 0,20
<i>Tai</i>	2,94 ^a ± 0,38	0,19 ± 0,02	0,10 ± 0,01	-	-	-	3,23 ± 0,40
<i>DM</i>	0,16 ± 0,03	0,038 ± 0,002	0,06 ± 0,01	-	-	-	0,26 ± 0,03
<i>TM</i>	0,63 ± 0,09	0,07 ± 0,01	0,020 ± 0,003	-	-	-	0,72 ± 0,11
<i>GA</i>	0,47 ± 0,02	0,071 ± 0,005	0,050 ± 0,004	-	-	-	0,60 ± 0,01

^a Pigmentkonsentrasjoner som er høyere enn målepunktene for kalibreringskurven

Tabell 5.2.3. Beregnet mengde av antocyan *a+b* og 1-5 i undersøkte bjørnebær- og bringebærkultivarer – serie 2. Mengder er oppgitt i mg/g fersk vekt med standardavvik.

	<i>a+b</i>	1	2	3	4	5	Total
<i>B</i>	-	1,24 ± 0,07	0,10 ± 0,01	0,045 ± 0,002	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	1,65 ± 0,09
<i>LN</i>	-	1,31 ± 0,08	0,11 ± 0,01	0,047 ± 0,003	0,022 ± 0,001	-	1,48 ± 0,09
<i>Tupi</i>	-	1,08 ± 0,03	0,098 ± 0,004	-	0,037 ± 0,002	0,064 ± 0,002	1,28 ± 0,03
<i>K</i>	-	1,99 ± 0,08	0,102 ± 0,004	0,129 ± 0,005	0,13 ± 0,005	0,131 ± 0,005	2,49 ± 0,1
<i>N</i>	-	0,64 ± 0,01	-	0,082 ± 0,002	0,038 ± 0,001	0,097 ± 0,002	0,86 ± 0,02
<i>BG</i>	1,13 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,084 ± 0,002	0,013 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,019 ± 0,001	1,74 ± 0,04
<i>Tai</i>	1,63 ± 0,05	0,095 ± 0,005	0,052 ± 0,002	-	-	-	1,78 ± 0,06
<i>DM</i>	0,20 ± 0,01	0,037 ± 0,001	0,058 ± 0,002	-	-	-	0,29 ± 0,01
<i>TM</i>	0,69 ± 0,02	0,064 ± 0,002	0,020 ± 0,001	-	-	-	0,78 ± 0,02
<i>GA</i>	0,47 ± 0,01	0,060 ± 0,001	0,046 ± 0,001	-	-	-	0,58 ± 0,01

Standardavvikene i serie 1 er uakseptabelt store, med varierende relative standardavvik opptil 40 %, noe som kan skyldes naturlig variasjon i bærene (ulik påvirkning fra sol, temperatur, modenhet ved høsting etc.) og/eller dårlig presisjon i opparbeidelsen. Mengdene beregnet i serie 2 har lavere standardavvik. De relative standardavvikene varierer her fra 2-7 %, hvorav de fleste er under 5 %, noe som tyder på at presisjonen er god og at resultatene er reproducerbare. I serie 2 ble det brukt minst mulig opparbeidelse for å redusere tap av stoff underveis, og bærene ble blandet sammen til en tilnærmet homogen masse i blender for å minimalisere naturlig variasjon.

5.3 Faktorer som påvirker bestemmelse av absolutte mengder

Resultatene fra serie 1 og 2 indikerer at ekstraksjonstid og/eller antall ekstraksjoner er faktorer som i stor grad påvirker bestemmelsen av absolutte mengder i bjørnebær og bringebær. Det ble derfor gjort en tredje analyseserie hvor betydningen av disse faktorene ble undersøkt nærmere.

I serie 3-1 ble det benyttet samme metode som i serie 2; én enkelt ekstraksjon i 40 min, før filtrering og HPLC-analyse. I likhet med bærene i serie 2, ble det laget en homogen blanding av bærene i serie 3-1, men i motsetning til analyseserie 2, ble det i denne analysen kun benyttet én type bjørnebær. I begge serier ble det benyttet ville bjørnebær høstet fra samme sted, men det ble laget en ny homogen blanding av nye bær i serie 3-1, og det kunne derfor tenkes at det

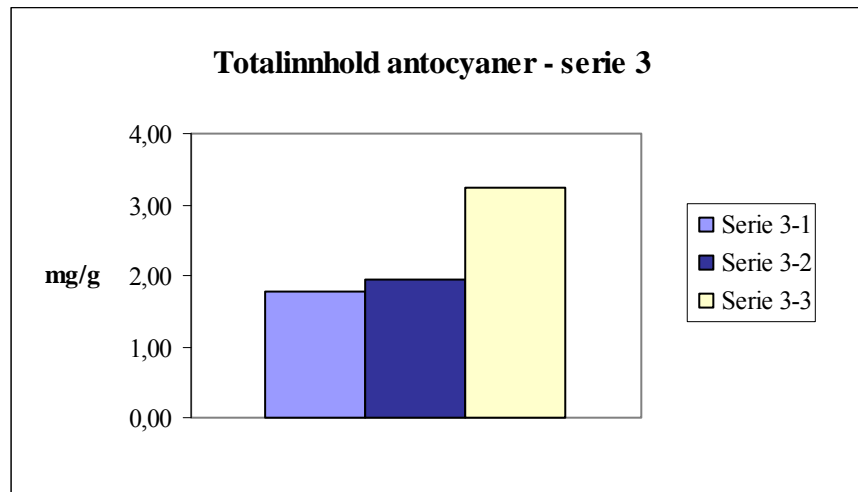
ville være forskjeller i mengdene på grunn av naturlig variasjon i de høstede bærene. Totalinnholdet i serie 3-1 (tabell 5.3.1) er noe høyere enn i serie 2, og det skyldes hovedsakelig at bærene i serie 3-1 har større mengde av pigment **1**, mens mengdene av pigment **2-5** er nesten identiske i begge serier. Hva som er årsaken til dette, er uklart, men det kan blant annet skyldes naturlig variasjon i bærene.

I serie 3-2 ble ekstraksjonstiden økt til det dobbelte, 80 min, for å undersøke hvorvidt det er sammenheng mellom ekstraksjonstid og ekstrahert mengde. Mengdene fra serie 3-2 er ca 8 % høyere enn de tilsvarende mengdene i serie 3-1, men denne forskjellen er ikke stor nok til å kunne gi noen konklusjon (se appendiks, A6).

Serie 3-3 er nesten lik serie 3-1, men her ble ekstraksjonen på 40 min gjentatt tre ganger før filtrering og HPLC-analyse. Figur 5.3.1 viser en oversikt over totalinnhold av antocyaner i bjørnebær i serie 3-1, 3-2 og 3-3. Totalmengden i serie 3-3 er rundt 80 % høyere enn totalmengdene i serie 3-1, noe som betyr at å øke antall ekstraksjoner har mye å si for mengdebestemmelsen.

Tabell 5.3.1. Beregnet mengde av antocyan **1-5** i bjørnebær (B) – serie 3.
Mengder er oppgitt i mg/g fersk vekt med standardavvik.

	1	2	3	4	5	Total
<i>Serie 3-1</i>	1,37 ± 0,07	0,102 ± 0,004	0,054 ± 0,003	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	1,79 ± 0,09
<i>Serie 3-2</i>	1,50 ± 0,06	0,108 ± 0,003	0,060 ± 0,002	0,142 ± 0,004	0,129 ± 0,004	1,94 ± 0,08
<i>Serie 3-3</i>	2,49 ± 0,08	0,183 ± 0,002	0,101 ± 0,003	0,243 ± 0,002	0,216 ± 0,004	3,24 ± 0,08



Figur 5.3.1. Sammenligning av totalinnhold (mg/g) i bjørnebær (B) i ulike analyseserier

Serie 3-3 kan sammenlignes med serie 1, hvor det også ble foretatt tre ekstraksjoner. Forskjellene i opparbeidelse er likevel store; i serie 3-3 ble det gjort ekstraksjoner på 40 min før filtrering og direkte injeksjon på HPLC, mens i serie 1 ble ekstraksjonen utført med to timer røring etterfulgt av 20 timer i kjøleskap. Mellom hver ekstraksjon ble bærene med ekstraksjonsmiddelet sentrifugert før ekstraktet ble samlet opp. Det samlede ekstraktet ble dampet inn og lagret i frys inntil HPLC-analyse. I tillegg må det nevnes at bærene ble homogenisert i blender i serie 3, noe som ikke ble gjort i serie 1.

Fra tabellene 5.2.2 og 5.3.1 kan det sees at det er stor forskjell i beregnede mengder i serie 1 og 3-3. Totalmengden i serie 3-3 er over 20 % høyere enn totalmengde (i B) i serie 1. Dette betyr at økt ekstraksjonstid, røring under ekstraksjon og/eller sentrifugering ikke ser ut til å gi betydelig utslag i bestemmelse av absolutt mengde. Tvert imot er mengdene i serie 1 lavere, noe som kan skyldes tap av stoff underveis i prosedyren, og/eller at degradering av pigmenter har begynt å dominere fremfor økt ekstrahert mengde. Særlig kritisk er sannsynligvis trinnet i serie 1 hvor ekstraktet ble dampet inn til tørrhet.

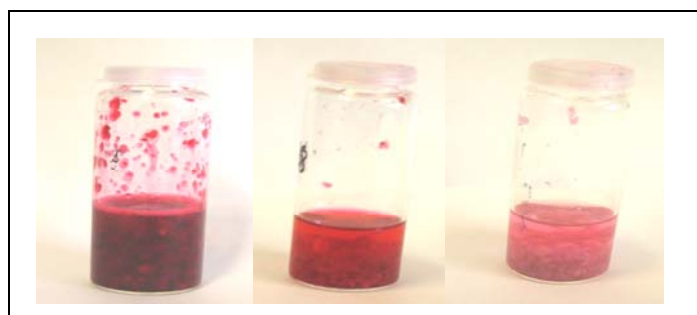
Med utgangspunkt i de ulike forsøkene i serie 3 og de tidligere data fra serie 1 og 2, kan det slås fast følgende:

1. Ved å øke ekstraksjonstid fra 40 min til 80 min, kan det observeres en liten økning i totalmengde, men det er uavklart hvorvidt denne økningen er reell.
2. Ved å øke antall ekstraksjoner fra 1 til 3, økes totalmengden med over 80 %. Antall ekstraksjoner har altså stor betydning for mengdebestemmelsen.
3. Bruk av røring under ekstraksjon eller sentrifugering mellom ekstraksjonene har ikke vist seg å øke ekstrahert mengde.

Da antall ekstraksjoner har vist seg å være særdeles vesentlig for den totale mengdebestemmelsen, kan det være interessant å gjøre en ny analyseserie med ytterligere ekstraksjoner for å få et mer realistisk bilde på det faktiske antocyaninnhold.

Serie 4

Forsøkene i serie 4 var identiske med delforsøk 3-3, men i denne serien ble det foretatt to ekstraksjoner til, det vil si totalt fem ekstraksjoner. Etter tredje ekstraksjonen var fargen på ekstraktet svakt rødfarget, og den ble enda svakere for hver påfølgende ekstraksjon. Etter femte ekstraksjon var fargen på ekstraktet lyserosa, og bærene var nesten hvite (figur 5.3.2).

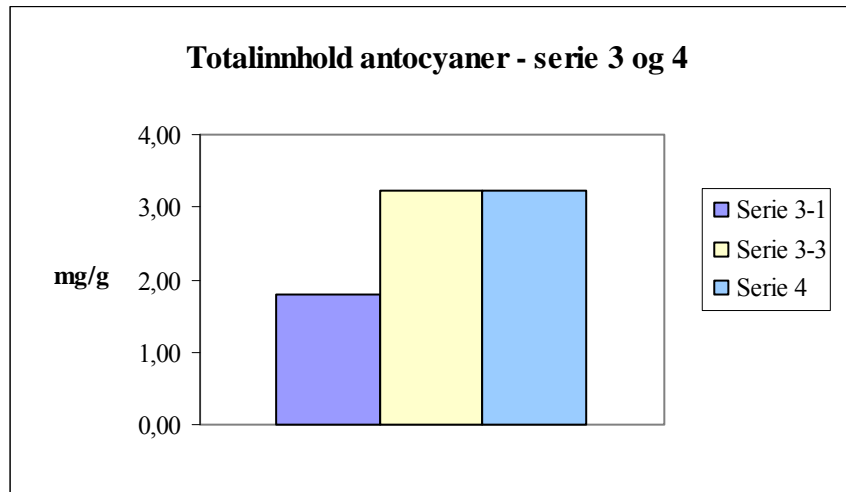


Figur 5.3.2. Farge på bær + ekstrakt etter første (t.v.), tredje (midten) og femte ekstraksjon (t.h.)

Mengder beregnet fra kalibreringskurve i serie 4 er gitt i tabell 5.3.2. Totalmengden i serie 4 er omtrent den samme som i serie 3-3 (figur 5.3.3). Det oppnås ingen økning i totalmengde ved å endre antall ekstraksjoner fra tre til fem. Tvert imot er totalmengden noe lavere (~1 %) etter fem ekstraksjoner, men dette er ikke en signifikant forskjell og kan tilskrives tilfeldig variasjon. Det er altså ikke noe å hente på å ekstrahere utover tre ganger. Dessuten vil antocyaner degradere, dersom de blir stående i løsning over tid, noe som medfører en feilkilde i forbindelse med bestemmelse av totalmengde. Degradering forekommer under ekstraksjon helt fra starten (Petersson et al. 2010), så ekstraksjonstid og antall ekstraksjoner bør derfor begrenses til et minimum for å unngå for mye degradering.

Tabell 5.3.2. Beregnet mengde av antocyan **1-5** i bjørnebær (B) i serie 4.
Mengder er oppgitt i mg/g fersk vekt med standardavvik.

	1	2	3	4	5	Total
<i>Serie 4</i>	2,48	0,18	0,100	0,24	0,22	3,21
	± 0,10	± 0,01	± 0,004	± 0,01	± 0,01	± 0,14



Figur 5.3.3. Sammenligning av totalinnhold (mg/g) i bjørnebær (B) i ulike analyseserier.

I litteraturen har det blitt rapportert om følgende mengder i bjørnebær: 134-172 mg/100g (Wang & Lin 2000), 245 mg/100 g (Wu et al. 2006), 126-152 mg/100g (Pantelidis et al. 2007), 131-256 mg/100 g (Siriwoharn et al. 2004), 131-155 mg/100g (Torre & Baritt 1977), og 114-242 mg/100 g (Cho et al. 2004) og 451-795 mg/100g (Dai et al. 2009). Verdiene er oppgitt som cyanidin 3-glukosid-ekvivalenter i ulike varianter og kultivarer av bjørnebær (fersk vekt), med unntak av i studien til Wang & Lin (2000), hvor mengder er oppgitt som gallussyre-ekvivalenter. Tilsvarende totalinnhold av antocyaner i bjørnebær (B) funnet i denne studien er 324 mg/100 g bær.

Av nevnte studier har Cho, Howard et al. (2004), Dai, Gupte et al. (2009) og Siriwoharn, Wrolstad et al. (2004) benyttet tre ekstraksjoner i sine kvantitative bestemmelser. I studien til Wu, Beecher et al. (2006) har det blitt brukt to ekstraksjoner. I de resterende studiene har kun én enkelt ekstraksjon blitt foretatt, eller det fremkommer ikke i beskrivelsen av prosedyren hvorvidt flere ekstraksjoner har blitt utført eller ei. I studiene hvor det opplyses om to eller flere ekstraksjoner er de bestemte mengdene høyere, fra 242 mg/100g opp til 795 mg/100g, sammenlignet med de andre studiene, hvor høyeste mengder rapportert var < 173 mg/100g. Det er derfor rimelig å anta at det i disse studiene har blitt utført kun én ekstraksjon, når det ikke opplyses om noe annet.

Direkte sammenligning kompliseres imidlertid av flere årsaker:

- De ulike studiene har blant annet benyttet ulike metoder for ekstraksjon og analyse. Ulike forskningsgrupper har ofte utviklet egne metoder som er tilpasset tilgjengelig utstyr og måleinstrument.
- Det har blitt benyttet ulike kultivarer av bjørnebær i de nevnte studier, noe som kan forklare noen av forskjellene i totalmengder. Også tilstanden til bærene kan ha stor betydning. Det er for eksempel vanlig å benytte frysetørket og knust materiale, mens i dette prosjektet ble det brukt frosne bær som ble knust og homogenisert i blender. Til sist må det også tas hensyn til at det kan ha vært stor variasjon i modningsgraden til bærene som har blitt undersøkt. Er for eksempel bærene som skal sammenlignes høstet på samme stadium av modning? Generelt øker innholdet av antocyaner med modningsgrad til frukten/bærene (Wang & Lin 2000; Siriwoharn et al. 2004). Sammensetningen av de individuelle antocyanene varierer også med modningsgrad. Eksempelvis ble det observert økt mengde av cyanidin 3-glukosid (**1**) og cyanidin 3-xylosid (**3**) under modning, mens konsentrasjonen av de tre andre pigmentene (**2**, **4** og **5**) ble mindre (Siriwoharn et al. 2004).

Likevel er det påfallende at totalmengden bestemt ved tre ekstraksjoner i denne studien er over dobbelt så høy som mengdene bestemt i studier hvor kun én enkelt ekstraksjon har blitt benyttet. Dette er med på å bekrefte hvor viktig det er å ta hensyn til betydningen av antall ekstraksjoner ved kvantitativ bestemmelse av antocyaner i bær.

5.4 Konklusjon

Hensikten med den kvantitative bestemmelsen har ikke vært å bestemme eksakte mengder av antocyaner i bjørnebær, men heller å gi en indikasjon på et omtrentlig innhold av antocyaner og i tillegg se på relative mengdeforskjeller i ulike bjørnebær- og bringebærkultivarer.

Generelt hadde bjørnebærkultivarene et mye høyere innhold av antocyaner enn bringebærkultivarene. Det ble også observert forskjeller i totalmengder innad kultivarene, særlig skilte bjørnebærkultivaren K seg ut, med omtrent 60 % høyere totalmengde enn de andre bjørnebærkultivarene.

Et av målene i denne studien var å undersøke i hvilken grad ekstraksjonstid og antall ekstraksjoner har betydning for den kvantitative bestemmelsen av antocyaner i bjørnebær.

Forsøkene viser at antall ekstraksjoner har stor betydning for den totale mengde som blir ekstrahert ut av bærene. Ved å ekstrahere tre ganger i stedet for én, ble verdien nesten doblet. Derimot oppnås ingen vesentlig forskjell ved å ekstrahere materialet ytterligere to ganger. Dette tyder på at det ikke er nødvendig med mer enn tre ekstraksjoner. Det ble observert en liten økning i total mengde ved dobling av ekstraksjonstiden, men forskjellen er for liten til å kunne avgjøre hvorvidt den økte ekstraksjonstiden har reell betydning for mengdebestemmelsen. Imidlertid er det gunstig med kortest mulig ekstraksjonstid og minst mulig opparbeidelse, for å minimalisere degradering av antocyaner.

Det vil selvsagt være andre faktorer som også påvirker mengdebestemmelsen i ulik grad, som ikke har blitt undersøkt i denne studien. På grunn av antocyaners lave stabilitet, er det svært vanskelig å oppnå gode og pålitelige kvantitative data. I tillegg er det vanskelig å standardisere prøver. Med hensyn til bjørnebærvarianter er det derfor ønskelig med videre forskning hvor også degraderingsrate av ulike pigment og faktorer som modningsgrad av bærene tas i betraktning.

REFERANSER

- Andersen, Ø. & T. Fossen (2005). Characterization of Anthocyanins by NMR. Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components. R. E. Wrolstad et al. New Jersey, Wiley.
- Andersen, Ø. M. (1987). Naturens palett 1. – Hvordan får blomster røde, blå eller fiolette farger? Naturen **3**.
- Andersen, Ø. M. (1987). Naturens palett 2. Om antocyaner, deres funksjon, anvendelse og analyse. Naturen **5**.
- Andersen, Ø. M. (2003). Anthocyanins. Encyclopedia of life sciences. New York, MacMilan Publishers.
- Andersen, Ø. M. & G. W. Francis (2004). Techniques of pigment identification. Plant pigments and their manipulation. K. M. Davies. Oxford, Blackwell Publishers.
- Andersen, Ø. M. & M. Jordheim (2006). The Anthocyanins. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. Ø. M. Andersen & K. R. Markham. Boca Raton, Fla., CRC Taylor & Francis.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosy: phytochemistry medicinal plants. London, Intercept.
- Cabrita, L., et al. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. Food Chemistry **68**: 101-107.
- Cho, M. J., et al. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. J Sci Food Agric **84**: 1771-1782.
- Dai, J., et al. (2009). A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. Food and Chemical Toxicology **47**: 837-847.

Davies, K. M. (2004). An introduction to plant pigments in biology and commerce. Plant pigments and their manipulation. K. M. Davies. Oxford, Blackwell Publishers.

Davies, K. M. & K. E. Schwinn (2006). Molecular Biology and Biotechnology of Flavonoid Biosynthesis. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. Ø. M. Andersen & K. R. Markham. Boca Raton, Fla., CRC Taylor & Francis.

Dickerson, G. W. (2000). Blackberry Production in New Mexico. College of Agriculture, Consumer and Environmental Sciences New Mexico State University. from http://aces.nmsu.edu/pubs/_h/h-325.html.

Dugo, P., et al. (2001). Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore high-performance liquid chromatography with electrospray ionization detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**: 3987-3992.

Durst, R. W. & R. E. Wrolstad (2005). Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components. R. E. Wrolstad et al. New Jersey, Wiley.

Fan-Chiang, H.-J. & R. E. Wrolstad (2005). Anthocyanin pigment composition of blackberries. Journal of Food Science **70**: 198-202.

Fossen, T. & Ø. M. Andersen (2006). Spectroscopic Techniques Applied to Flavonoids Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. Ø. M. Andersen & K. R. Markham. Boca Raton, Fla., CRC Taylor & Francis

Fossen, T., et al. (1998). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. Food Chemistry **63**: 435-440.

Frøytlog, C., et al. (1998). Combination of chromatographic techniques for the preparative isolation of anthocyanins – applied on blackcurrant (*Ribes nigrum*) fruits. Journal of Chromatography A **825**: 89-95.

Giusti, M. M. & P. Jing (2007). Natural pigments of berry fruit: Functionality and application. Berry fruit: value-added products for health promotion. Y. Zhao. Boca Raton, Fl, CRC Press.

Giusti, M. M. & T. C. Wallace (2009). Flavonoids as Natural Pigments. Handbook of Natural Colorants. T. Bechtold & R. Mussak. Chichester, Wiley.

Giusti, M. M. & R. E. Wrolstad (2005). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components. R. E. Wrolstad et al. New Jersey, Wiley.

Gould, K. S. & C. Lister (2006). Flavonoid Functions in Plants. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. Ø. M. Andersen & K. R. Markham. Boca Raton, Fla., CRC Taylor & Francis.

Greibrokk, T., et al. (2005). Kromatografi: separasjon og deteksjon. Oslo, Pensumtjeneste.

Harborne, J. B. & C. A. Williams (2000). Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry **55**: 481-504

Harris, D. C. (2007). Quantitative chemical analysis. New York, Freeman.

Hjelmstad, R. (2009). Bjørnebær. Urtekildens planteleksikon from http://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/rubu_fru.htm.

Howard, L. R. & T. J. Hager (2007). Berry fruit phytochemicals. Berry fruit: value-added products for health promotion. Y. Zhao. Boca Raton, Fl, CRC Press.

Jackman, R. L. & J. L. Smith (1996). Anthocyanins and betalains. Natural food colorants. G. A. F. Hendry & J. D. Houghton. Glasgow, Blackie Academic & Professional.

Jakobek, L., et al. (2009). Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of Rubus and Prunus International Journal of Food Science and Technology **44**: 860-868.

Jordheim, M. (2007). Isolation, identification and properties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms, Department of Chemistry, University of Bergen.

Jordheim, M., et al. (2006). Characterization of Hemiacetal Forms of Anthocyanidin-3-*O*- β -Glycopyranosides. Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**: 9340-9346.

Jordheim, M., et al. (2007). Anthocyanins in Berries of Ribes Including Gooseberry Cultivars with a High Content of Acylated Pigments. Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**: 5529-5535.

Kanga, S.-Y., et al. (2003). Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in ApcMin mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. Cancer Letters **194**: 13-19.

Košir, I. J. & J. Kidrič (2001). Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. Analytica Chimica Acta **458** 77-84.

Lila, M. A. (2004). Plant pigments and human health. Plant pigments and their manipulation. K. M. Davies. Oxford, Blackwell Publishers.

Maatta-Riihinen, K. R., et al. (2004). Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). J Agric Food Chem **52**: 6178-6187.

Maatta-Riihinen, K. R., et al. (2004). Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**: 6178-6187.

Macheix, J.-J., et al. (1990). Fruit phenolics. Boca Raton, Fla., CRC Press.

Marston, A. & K. Hostettmann (2006). Separation and Quantification of Flavonoids Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. Ø. M. Andersen & K. R. Markham. Boca Raton, Fla., CRC Taylor & Francis.

Mazza, G. & E. Miniati (1993). Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. Boca Raton, Fla., CRC Press.

Melo, M. J., et al. (2009). Anthocyanins: Nature's Glamorous Palette. Handbook of Natural Colorants. T. Bechtold & R. Mussak. Chichester, Wiley.

Mitchell, K. A., et al. (1998). Pigment chemistry and colour of Pelargonium Flowers. Phytochemistry **47**: 355-361.

Ogawa, K., et al. (2008). Anthocyanin composition and antioxidant activity of the Crowberry (*Empetrum nigrum*) and other berries. Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**: 4457-4462.

Pantelidis, G. E., et al. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. Food Chemistry **102**: 777-783.

Pavia, D. L. (2009). Introduction to spectroscopy. Belmont, Calif., Brooks/Cole.

Petersson, E. V., et al. (2010). Pressurized Hot Water Extraction of anthocyanins from red onion: A study on extraction and degradation rates. Analytica Chimica Acta **663**: 27-32.

Pina, F. (1998). Thermodynamics and kinetics of flavylium salts. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions **94**: 2109-2116.

Podlech, D. (1991). Legeplanter: 315 arter i farger. Oslo, Bokklubben.

Rieger, M. (2006). Blackberries and Raspberries (*Rubus spp.*). The University of Georgia. from <http://www.uga.edu/fruit/rubus.html>.

Rodriguez-Saona, L. E. & R. E. Wrolstad (2005). Extraction, Isolation and Purification of Anthocyanins. Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components. R. E. Wrolstad et al. New Jersey, Wiley.

Samuelsson, G. (2004). Drugs of natural origin: a textbook of pharmacognosy. Stockholm, Apotekarsocieteten.

Schwinn, K. E. & K. M. Davies (2004). Flavonoids. Plant pigments and their manipulation. K. M. Davies. Oxford, Blackwell Publishers.

Siriwoharn, T., et al. (2004). Influence of Cultivar, Maturity, and Sampling on Blackberry (Rubus L. Hybrids) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**: 8021-8030.

Sivam, G. (2008). Analysis of Flavonoids. Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals. W. J. Hurst, CRC Press.

Stintzing, F. C., et al. (2002). A novel zwitterionic anthocyanin from evergreen blackberry (Rubus laciniatus Willd.). Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**: 396-399.

Strack, D. & V. Wray (1989). Anthocyanins. Plant phenolics. J. B. Harborne. London, Academic Press.

Strack, D. & V. Wray (1994). The Anthocyanins. The Flavonoids: advances in research since 1986. J. B. Harborne. London, Chapman & Hall.

Takeoka, G. & L. Dao (2008). Anthocyanins. Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals. W. J. Hurst, CRC Press.

Torre, L. C. & B. H. Baritt (1977). Quantitative evaluation of Rubus fruit anthocyanin pigments. Journal of Food Science **42**: 488-490.

Wang, S. Y. & H.-S. Lin (2000). Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**: 140-146.

Wibetoe, G. Kromatografi. Store Norske Leksikon. from <http://www.snl.no/kromatografi>.

Williams, D. H. & I. Fleming (2008). Spectroscopic methods in organic chemistry. London, McGraw-Hill.

Wu, X., et al. (2006). Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**: 4069-4075.

Wu, X. & R. L. Prior (2005). Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**: 2589-2599.

Wu, X. & R. L. Prior (2005). Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. J Agric Food Chem **53**: 2589-2599.

Zhang, Y., et al. (2008). Isolation, identification, and color characterization of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-sophoroside from red raspberries. European Food Research and Technology **226**: 395-403.

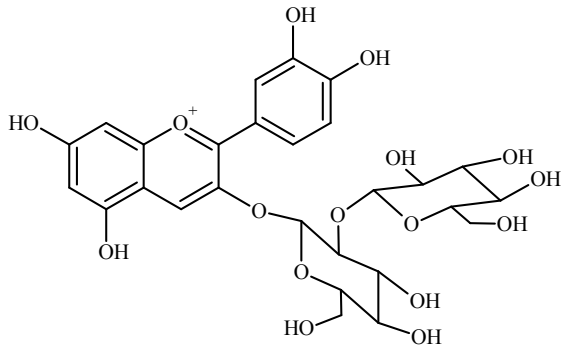
APPENDIKS

- A1** Kjemikalieliste
- A2** Struktur av pigmentene i oppgaven
- A3** UV-synlig spektre av pigmentene i oppgaven
- A4** MS-spekter av pigmentene i oppgaven
- A5** NMR-spekter av cyanidin 3-glukosid standard
- A6** Usikkerhet og presisjon i kvantitativ analyse

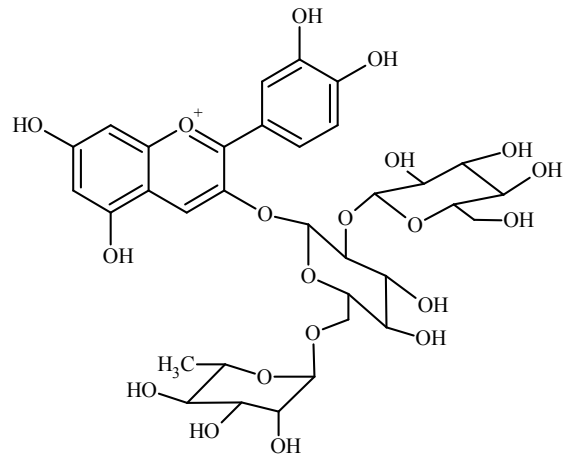
A1: Kjemikalieliste

	Formel	Kvalitet	Anvendelse	Produsent
Acetonitril	CH ₃ CN	99,8 %	HPLC	Sigma-Aldrich
Metanol	CH ₃ OH	Teknisk	Ekstraksjon (avsnitt 2.1), XAD	
Metanol	CH ₃ OH	99,9 %	HPLC, ekstraksjon (avsnitt 2.5), Sephadex, Toyopearl	Sigma-Aldrich
<i>d</i> -metanol	CD ₃ OD	99,8 %	NMR	Sigma-Aldrich
TFA	CF ₃ COOH	99 %	Ekstraksjon, alle kolonner, HPLC	Sigma-Aldrich
<i>d</i> -TFA	CF ₃ COOD	99,1 %	NMR	Sigma-Aldrich
Vann	H ₂ O	destillert	XAD, Sephadex, Toyopearl	
Vann	H ₂ O	MilliQ	HPLC	

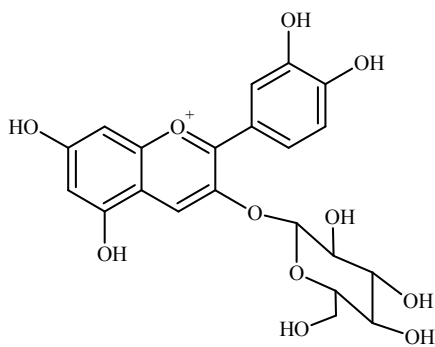
A2: Struktur av alle pigment i oppgaven



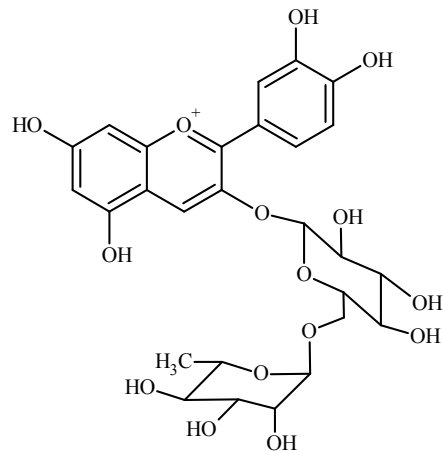
Cyanidin 3-*O*- β -sophorosid



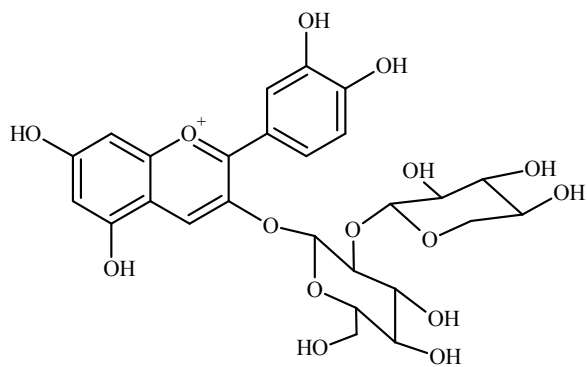
Cyanidin 3-*O*- β -(2-glukosylrutinosid)



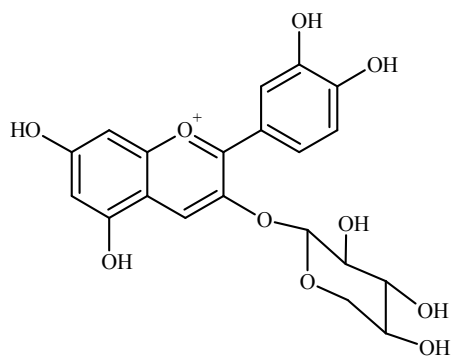
Cyanidin 3-*O*- β -glukopyranosid



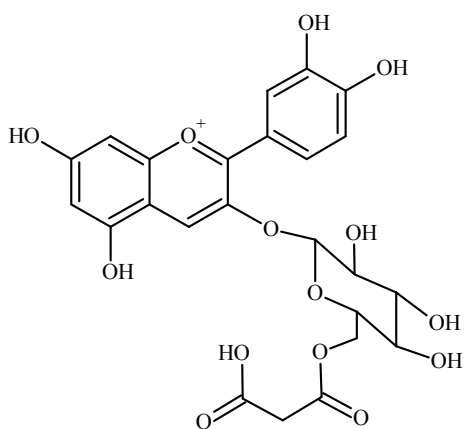
Cyanidin 3-*O*- β -(6'-*O*- α -rhamnosylglukopyranosid)



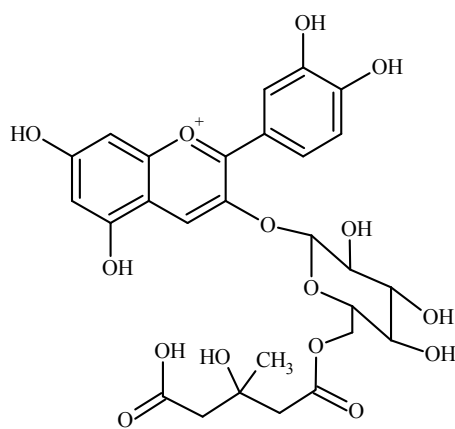
Cyanidin 3-*O*- β -sambubiosid



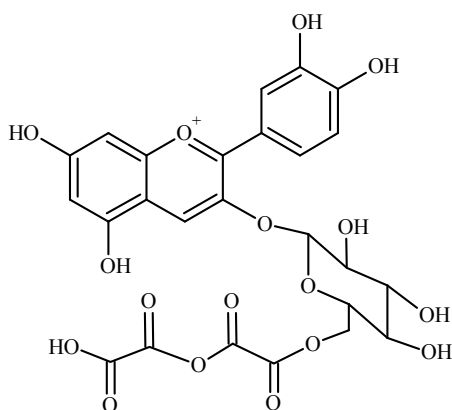
Cyanidin 3-*O*- β -xylosid



Cyanidin 3-*O*- β -(6''-malonyl-glukopyranosid)



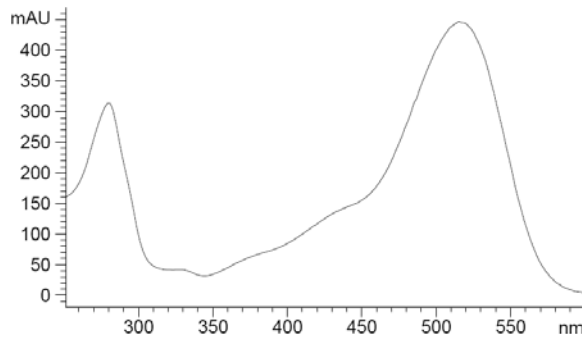
Cyanidin 3-*O*- β -(6''-(3-hydroksey-3-metylglutaryl)glukopyranosid)



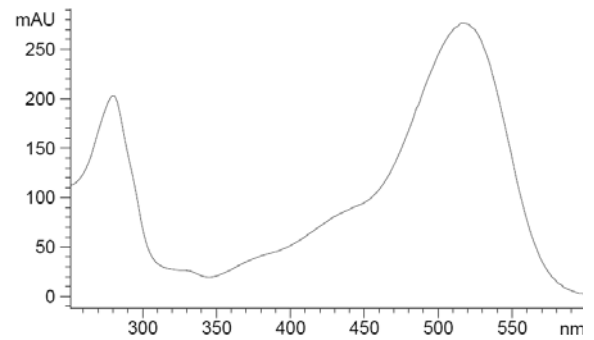
Pigment foreslått av Stintzing, Stintzing et al (2002):

Cyanidin 3-*O*- β -(6''-dioksalyl-glukopyranosid)

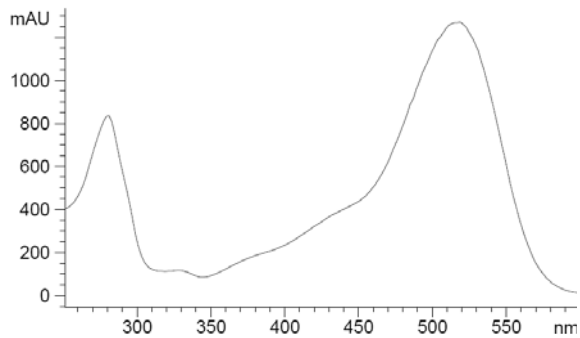
A3: UV-synlig spektre av pigmentene i oppgaven



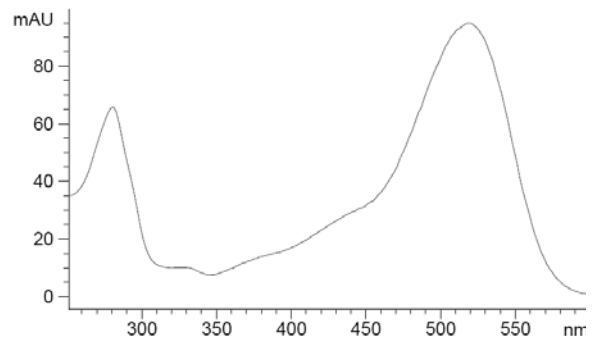
Cyanidin 3-sophorosid (*a*)



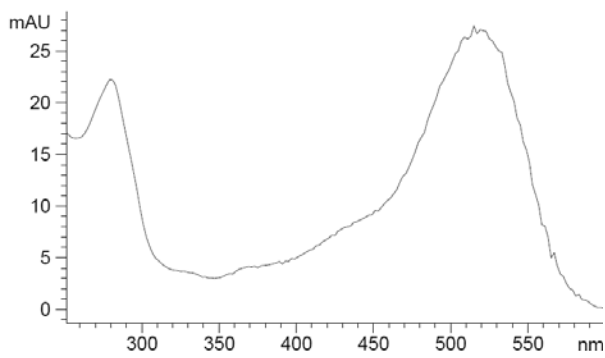
Cyanidin 3-(2-glukosyl)rutinosid (*b*)



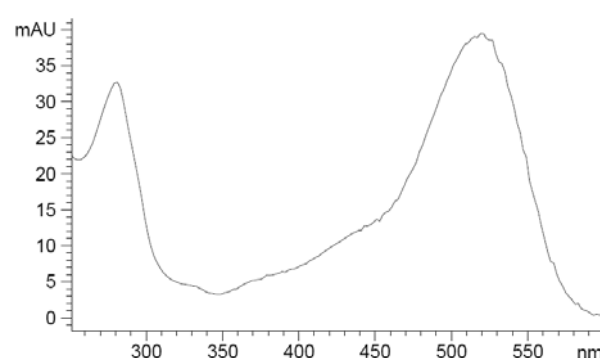
Cyanidin 3-glukosid (1)



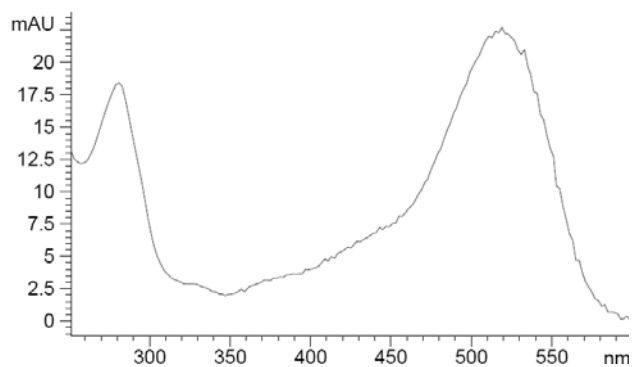
Cyanidin 3-rutinosid (2)



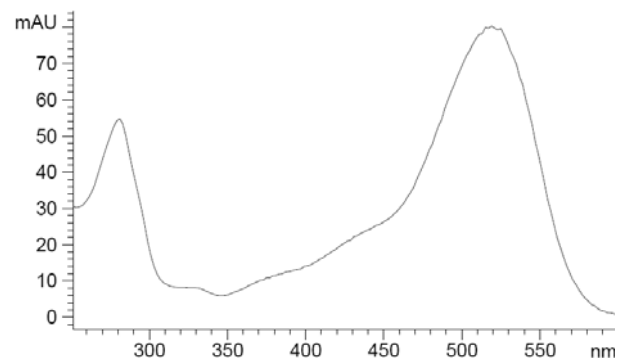
Ukjent (*c*)



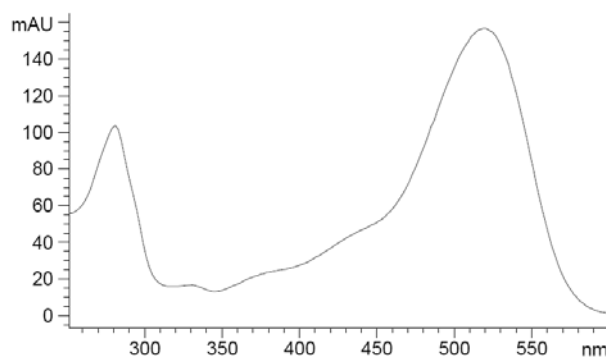
Ukjent (*d*)



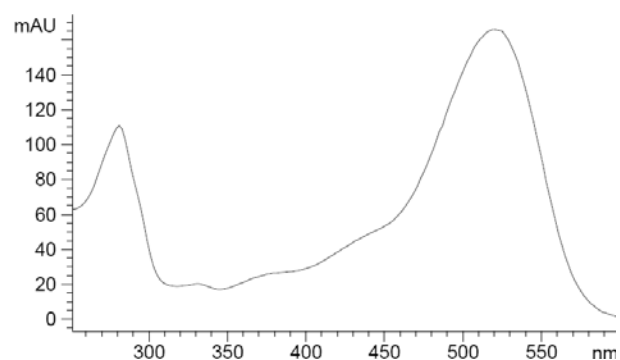
Ukjent (e)



Cyanidin 3-xylosid (3)

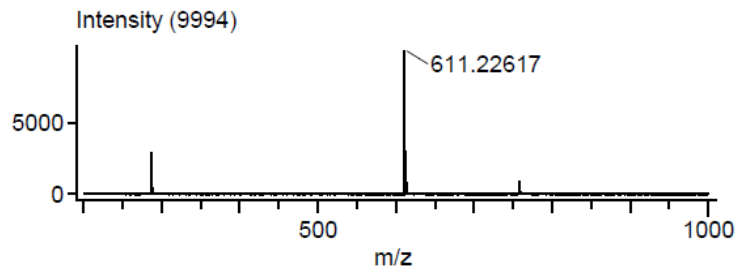


Cyanidin 3-(6''-malonyl)glukosid (4)

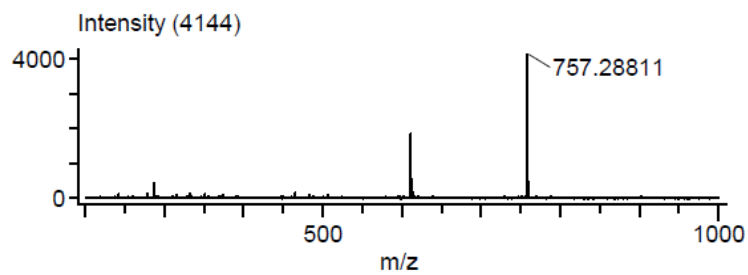


Cyanidin 3-(6''-(3-hydroksy-3-metylglutaryl)glukopyranosid) (5)

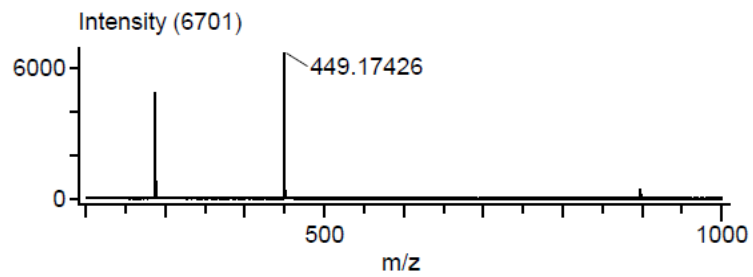
A4: MS-spekter av pigmentene i oppgaven



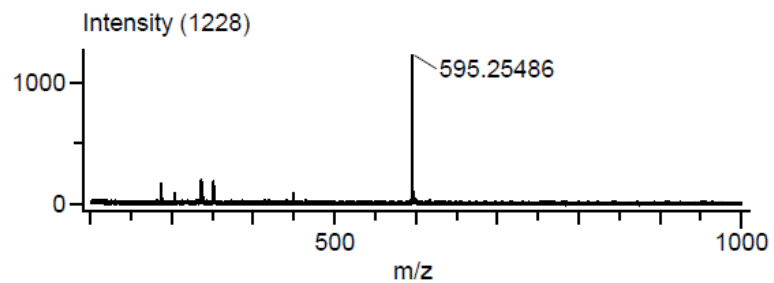
Cyanidin 3-sophorosid (*a*)



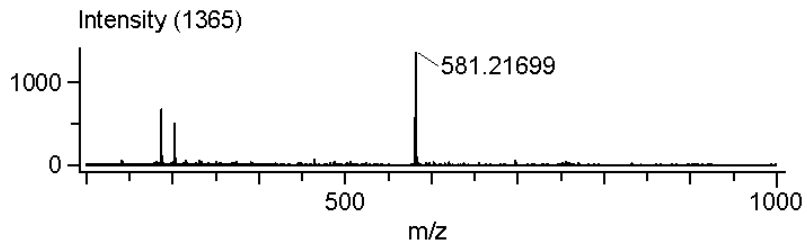
Cyanidin 3-(2-glukosyl)rutinosid (*b*)



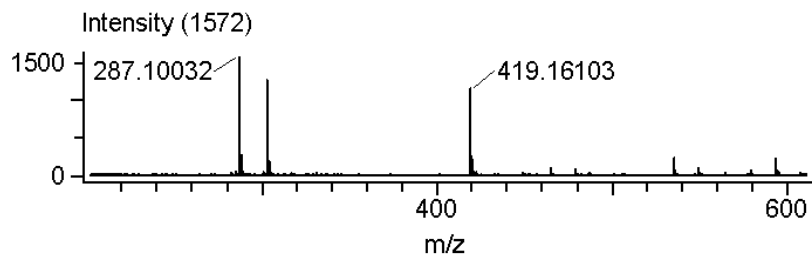
Cyanidin 3-glukosid (**1**)



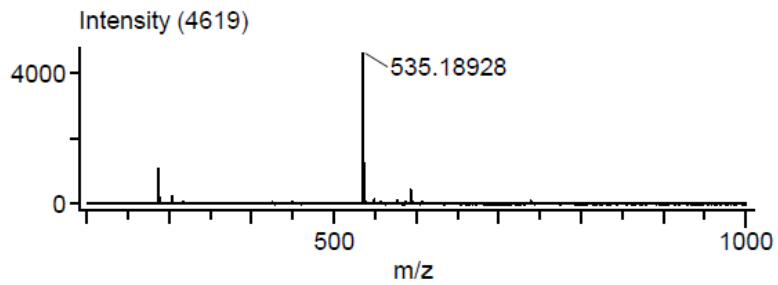
Cyanidin 3-rutinosid (**2**)



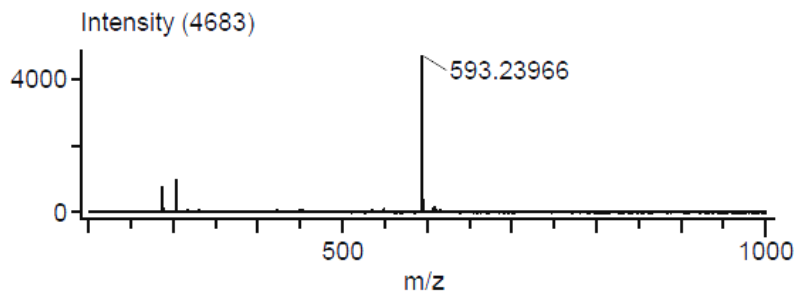
Cyanidin 3-sambubiosid (*c*, *d* eller *e*)



Cyanidin 3-xylosid (**3**)

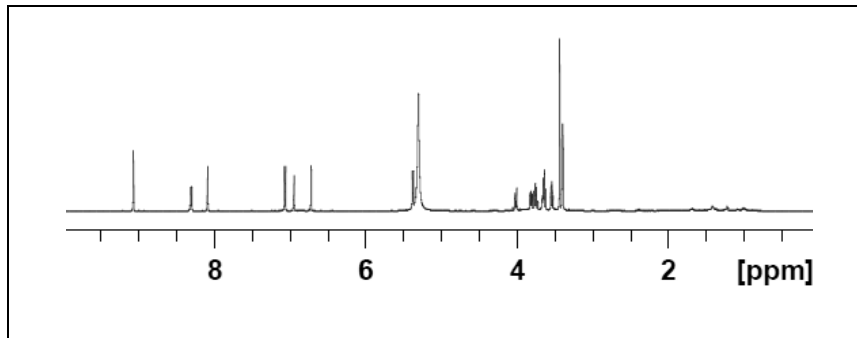


Cyanidin 3-(6''-malonyl)glukosid (**4**)



Cyanidin 3-(6''-(3-hydroksey-3-metylgutaryl)glukopyranosid (**5**)

A5: NMR-spekter av cyanidin 3-glukosid standard



^1H NMR-spekter av cyanidin 3-glukosid løst i $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CF}_3\text{COOD}$ (95:5) ved $25\text{ }^\circ\text{C}$.

A6: Kvantitativ metode – usikkerhet og presisjon

En av utfordringene ved kvantitativ analyse av antocyaner, er deres særdeles lave stabilitet i løsning. Det må derfor tilstrebes at antocyanene har kortest mulig oppholdstid i løsning før HPLC-analyse, noe som har medført at ulike analyseserier, og sågar ulike prøver innad analyseseriene, har blitt analysert på ulike tidspunkt (dager, uker). Dette skaper en feilkilde, når det antas at responsen til pigmentene i de ulike prøvene er uendret uavhengig av analysetidspunkt. I tillegg forekommer antocyaner på forskjellige likevektsformer med varierende eller manglende UV-synlig absorpsjon, noe som kompliserer den kvantitative bestemmelsen ytterligere.

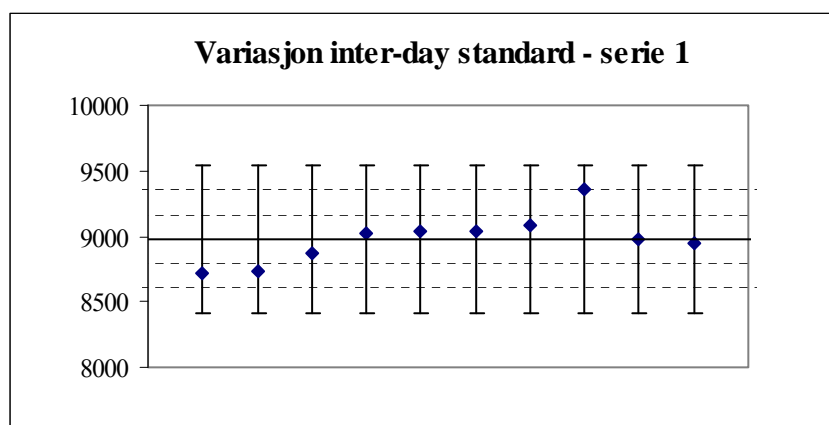
To kalibreringskurver har blitt tillaget i forbindelse med denne studien, men kun én av disse ble benyttet til beregning av resultatene i tabellene 5.2.2, 5.2.3, 5.3.1 og 5.3.2, grunnet et bredere gyldighetsområde basert på seks målepunkt. Når det gjelder den første kalibreringskurven kunne den ikke brukes til kvantifisering av pigmentene som var tilstede i mindre mengder, men ble regnet for å være gyldig for pigmenter med høyere konsentrasjon, hovedsakelig pigment **1**. Mengder av pigment **1** (i serie 2, 3 og 4) ble derfor beregnet ved hjelp av den første kalibreringskurven, for å undersøke hvorvidt det er forskjell mellom kalibreringskurvene. Student t-test ($p = 0,05$) utført på beregnede verdier fra begge kalibreringskurver viste ingen signifikante forskjeller mellom kalibreringskurvene når det gjaldt mengdebestemmelse av dette bestemte pigmentet. I den første serien var noen av prøvene for konsentrerte, noe som førte til at pigment **1** i disse prøvene hadde for høy konsentrasjon i forhold til målingene som kalibreringskurven er basert på. Mengder av dette pigmentet ble beregnet ved ekstrapolering av kalibreringskurven, og disse verdiene er derfor mindre pålitelige.

Variasjon i respons

Responsen til inter-day (ID) standardløsningene ble plottet i den rekkefølge de ble analysert, og responsen til ID-standardene i de ulike seriene er vist i figur A6-1, A6-2 og A6-3. Den rette linjen viser gjennomsnittlig respons av alle punktene, og de stiplede linjene og de markerte hakene til hvert punkt over/under gjennomsnittet viser henholdsvis første, andre og tredje standardavvik fra gjennomsnittet.

I første serie ble det brukt én ID-standard som ble injisert tre ganger mellom hver tiende prøve. Responsen til standarden er plottet i kronologisk rekkefølge, hvor hvert punkt representerer

gjennomsnittlig respons basert på tre injeksjoner. Siden det er samme standard som injiseres gjentatte ganger over tid i serie 1, blir variasjonen et mål på presisjonen til instrumentrespons og injeksjonsvolum. Det relative standardavviket er på ca 2 %. Av figur A6-1 kan det observeres en svak økning i de åtte første punktene, noe som kan tyde på systematisk drift.



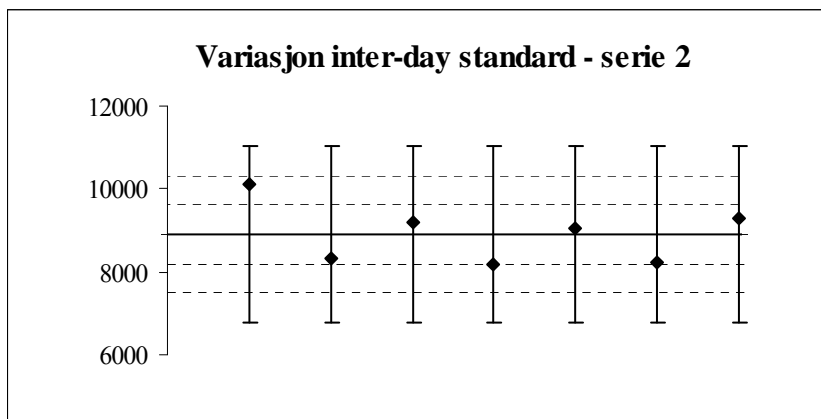
Figur A6-1. Variasjon i respons til én ID-standard over tid – serie 1

I serie 2 ble de ulike kultivarene analysert på forskjellige tidspunkt, og det ble derfor benyttet individuelle standarder, som ble injisert kun én gang, for hver HPLC-analyse. Alle ID-standardene, inkludert den som ble brukt i serie 1, stammer fra samme standardløsning med kjent konsentrasjon, men ble dampet inn individuelt og lagret i frys inntil videre analyse. Hver av disse ble løst i samme volum på den aktuelle analysedagen, og skulle teoretisk sett ha eksakt lik konsentrasjon. Imidlertid vil det være usikkerhet både knyttet til mikropipetten som ble brukt, samt eventuell manglende presisjon i selve utførelsen av pipetteringen. I tillegg har ID-standardene vært oppbevart i frys over lengre tid, og noe forandring i mengde, som følge av pigmentets lave stabilitet og ulike likevektsformer, kan ikke utelukkes. Som forventet er derfor variasjonen mellom de individuelle ID-standardene brukt i serie 2 (figur A6-2) større sammenlignet med variasjonen i serie 1, hvor én ID-standard ble injisert flere ganger.

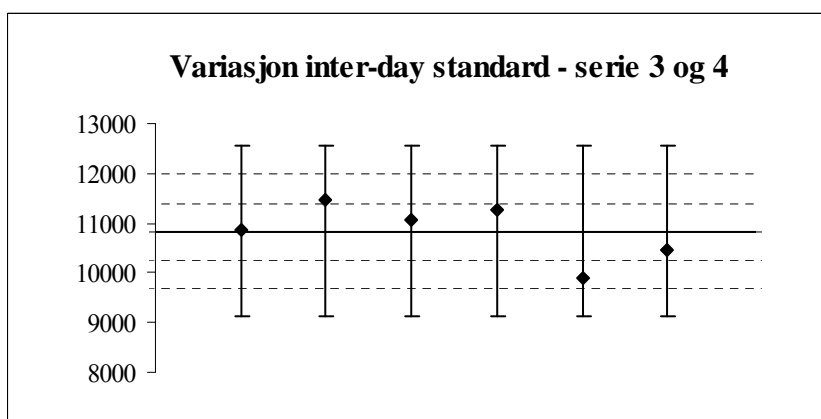
I serie 3 og 4 ble det også benyttet individuelle ID-standarder, og av samme årsaker forventes det en variasjon i lik størrelsesorden som hos ID-standardene i serie 2. Til analysene i serie 3 og 4 ble det imidlertid opparbeidet en ny standardforbindelse (cyanidin 3-glukosid), og av figur A6-2 og A6-3 kan det sees at den nye standardforbindelsen har en høyere respons enn den forrige som ble brukt i serie 1 og 2, noe som *kan* tyde en høyere grad av renhet.

Variasjonen i respons til ID-standardene brukt i både serie 3 og 4 er et mål på metodens presisjon, det vil si at usikkerhet knyttet til prosedyre (innveiling, pipettering, fortykning) så vel som instrumentets usikkerhet i forhold til respons og injeksjon inkluderes. Relativt

standardavvik beregnes til å være 8 % i serie 2 og 5 % i serie 3 og 4. Dette betyr at metoden har en variasjon på opptil 8 %, noe som medfører at relative forskjeller innad og mellom analyseserier på mindre eller lik 8 % kan tilskrives tilfeldige feil. For å avgjøre hvorvidt en slik forskjell er reell eller skyldes metodens variasjon, er det nødvendig med flere analyseserier.



Figur A6-2. Variasjon i respons til individuelle ID-standarder brukt i serie 2



Figur A6-3. Variasjon i respons til individuelle ID-standarder brukt i serie 3 og 4