

Fytokjemisk undersøkelse av Spansk kjærvel

Myrrhis odorata (L.) Scop

Masteroppgave i Farmasi

Tasbih Ghassan Mohammed Hindi



Senter for farmasi og kjemisk institutt

Universitet i Bergen

Mai 2022

Fytokjemisk undersøkelse av Spansk kjørvel

Myrrhis odorata (L.) Scop

Masteroppgave i farmasi

Tasbih Ghassan Mohammed Hindi

Veiledere

Professor Torgils Fossen

Førsteamanuensis Heidi Lie Andersen

Sammendrag

Spansk kjørvel har vært brukt i gamle tider som krydder, mat og medisin; i tillegg har den vært brukt i veterinærmedisin (8). Mange av dagens eksisterende medikamenter har utgangspunkt i naturprodukter. Forskning på tradisjonelt brukte planter innen folkemedisin er av stor interesse i forbindelse med oppdagelse av nye legemidler. Det er utført noe forskning på spansk kjørvels innholdsstoffer, men det er spesielt søkelys på eteriske oljer av planten. Hovedkomponenten i den eteriske oljen er anethol, men flere andre flyktige stoffer er også blitt identifisert. Det har også blitt isolert noen få flavonoider og kumariner fra planten. Målet med dette masterprosjektet er å isolere og bestemme strukturen av naturstoffer fra den overjordiske delen av *Myrrhis odorata*.

Det ble samlet inn 2.4 kg med plantemateriale fra lokaliteter i nærheten av Fana folkehøyskole i Bergen. Plantematerialet ble først ekstraherte med metanol, hvor råekstraktet ble konsentrert opp før videre opparbeidelse. For å skille stoffene etter deres polare og upolare egenskaper ble vandige råekstraktet ekstrahert ved hjelp av væske-væske ekstraksjon, først med petroleumseter og så med etylacetat. Det resulterte i en petroleumseterfase, etylacetatfase og vannfase. Petroleumseterfase ble kastet ettersom den består for det meste av oppløst klorofyll og andre lipofile forbindelser. Etylacetatfasen og vannfasen ble konsentrert opp for videre arbeid. Fasen ble videre isolert og rensert i fraksjoner ved hjelp av flere kromatografiske metoder som Amberlite XAD-7 kolonnekromatografi, Sephadex LH-20 kolonnekromatografi og preparativ HPLC. For å bestemme innholdet av fraksjoner og partisjoner av fraksjonene, og for å se hvilke fraksjoner som så rene ut for strukturbestemmelse ble de analysert ved hjelp av analytisk UHPLC. Strukturene av de isolerte stoffene ble bestemt ved hjelp av ulike 1D og 2D NMR eksperimenter. Høyoppløselig MS-analyse ble brukt for å bekrefte riktig identifikasjon av særlig nye naturstoffer.

Det ble totalt isolert 14 naturstoffer fra *Myrrhis odorata* i dette masterprosjektet, hvorav 12 naturprodukter som er strukturbestemt og som ikke tidligere har blitt isolert fra planten: apigenin 7-O-(6''O-malonyl- β -glukopyranosid) (2), luteolin 7-O-(6''O-malonyl- β -glukopyranosid) (4), 2-metyl-5-hydroksey-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydrokseybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5), 2-metyl-5-hydroksey-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydrokseybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6), *E*-sinapinsyre 4-O- β -glukopyranosid (7), *E*-p-kumarsyre 4-O- β -glukopyranosid (8), klorogensyre (9), undulatosid A (10), 6'-

malonylundulosid A (**11**), metylmalonylundulosid A (**12**), 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**) og 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**). Av de isolerte stoffene er det 4 naturprodukter som er isolert for første gang. Det gjelder kromenderivater; 2-metyl-5-hydroksey-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydrokseybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (**5**), 2-metyl-5-hydroksey-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydrokseybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (**6**), 6'-malonylundulosid A (**11**) og metylmalonylundulosid A (**12**). Luteolin 7-O- β -glukopyranosid (**1**) og apigenin 7-O- β -glukopyranosid (**3**) er tidligere blitt funnet i *Myrrhis odorata*, og undulosid A (**10**) er tidligere blitt funnet i Apiaceae.

Christina Vik i forskningsgruppen ledet av Prof. Lars Herfindal har testet cytotoxisk aktivitet av 2-metyl-5-hydroksey-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydrokseybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (**5**), undulosid A (**10**), 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**) og 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**) overfor leukemiceller (MOLM-13 celler) og friske rotnyreceller (NRK celler). Resultatene tyder på at alle naturproduktene, bortsett fra undulosid A (**10**), hadde selektiv cytotoxisk aktivitet mot leukemiceller (MOLM-13 celler).

Forord

Jeg ønsker først og fremst å rette en stor takk til Torgils Fossen for en fantastisk veiledning, rådgivning og oppfølging under dette masterprosjektet. Spesielt takk til Fossen for hans hjelp og støtte under strukturoppklaring. Det ville vært utfordrende og kanskje umulig å fullføre denne oppgaven uten hans uvurderlige hjelp. Føler jeg har vært heldig som fikk skrive denne oppgaven under oppfølging av en så dyktig fagperson i dette feltet. I tillegg vil jeg også takke min biveileder Heidi Lie Andersen for hjelp med plukking og oppsamling av plantematerialet i sommerferien. Ønsker også å rette en stor takk til hun for hjelpen med den botaniske delen, gjennomlesning og gode innspill til oppgaveskriving. En spesiell takk rettes også mot Christina Berge Vik for gjennomføring av biologisk testing av naturstoffer.

Jeg vil også takke Marit Bøe Vaage for tilfredsstillende opplæring og hjelp i bruk av UHPLC- og preparativ HPLC-instrumentene. Takk til Bjarte Holmelid for massespektrometrianalyse av utvalgte prøver. Jeg vil takke alle andre ansatte ved kjemisk institutt for hyggelige oppmuntrende ord. Videre vil jeg si at jeg er takknemlig for å bli kjent med Markus Jerspersen Waage og Vebjørn Mikkelsen, og ønsker å rette takk for at de gjordet dette masteråret mer spennende.

Til slutt vil jeg takke min familie, spesielt mamma og pappa, for uvurderlig støtte og barnepass gjennom mastergradsåret. Spesielt skal jeg takke mannen min for oppmuntring til å fortsette og fullføre drømmen min. Takk til datteren min som har ventet meg tålmodig etter lange lab- og studiedager.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	3
Forord	5
1. Forkortelser	8
2. Hensikt	10
3. Introduksjon	10
3.1 Botanisk bakgrunn og habitat	11
3.2 Tradisjonell bruk	12
3.3 Tidligere studier av planten	12
3.4 Utvalgte grupper naturstoffer	15
3.4.1 Polyketider	15
3.4.2 Shikimatveien	16
3.4.3 Fenylpropener	16
3.4.4 Flavonoider	17
3.4.5 Kumariner	19
3.4.6 Terpener	20
3.5 Tidligere identifiserte innholdsstoffer	21
4. Eksperimentell teori	24
4.1 Materialet	24
4.1.1 Kjemikalier	24
4.1.2 Apparater og instrumenter	25
4.2 Metoder	26
4.2.1 Fast stoff-væske ekstraksjon.....	26
4.2.2 Oppkonsentrering med rotavapor	28
4.2.3 Væske-væske ekstraksjon.....	30
4.2.4 Separasjons- og kromatografiske metoder	32
4.2.4.1 Adsorpsjonskolonnekromatografi.....	33
4.2.4.2 Eksklusjonskromatografi	35
4.2.4.3 Preparativ høytrykksvæskrokromatografi (HPLC)	38
4.2.5 Identifikasjonsmetoder	42
4.2.5.1 Analytisk væskrokromatografi (UHPLC)	42
4.2.5.2 Kjernemagnetisk resonans (NMR)	44
4.2.5.2.1 1D ¹ H NMR og 1D ¹³ C NMR (CAPT (Compensated Attached Proton Test)).....	50
4.2.5.2.2 2D ¹ H- ¹ H Correlation spectroscopy (COSY)	50
4.2.5.2.3 2D ¹ H- ¹³ C HSQC (Heteronuclear Signal Quantum Coherence).....	51
4.2.5.2.4 2D ¹ H- ¹³ C HSQC-TOCSY ((Heteronuclear Signal Quantum Coherence- Total Correlation Spectroscopy).....	51
4.2.5.2.5 1D selektiv ¹ H TOCSY (Total Correlation Spectroscopy).....	51
4.2.5.2.6 2D ¹ H- ¹ H ROSEY (Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy)	52
4.2.5.2.7 2D ¹ H- ¹³ C HMBC (Heteronuclear Single-Quantum Coherence)	52
4.2.5.2.8 2D ¹ H- ¹³ C H2BC (Heteronuclear 2-Bond Correlation).....	53
4.2.5.2.9 2D ¹ H- ¹³ C 1,1-ADEQUATE (Abundance Double-QUAntum Transfer Experiment).....	53
4.2.5.3 Massespektrometri (MS).....	54
5. Resultater – Eksperimentelt arbeid	55
5.1 Plantematerialet	55
5.2 Fast stoff-væske ekstraksjon	55

5.3	Oppkonsentrering med rotavapor	56
5.4	Analytisk UHPLC	56
5.5	Væske-væske ekstraksjon	57
5.6	Separasjon ved hjelp av Amberlite XAD-7 kolonnekromatografi	59
5.6.1	Separasjon av vannfasen.....	59
5.6.2	Separasjon av etylacetatfasen	60
5.7	Analytisk UHPLC	62
5.8	Videre separasjon ved hjelp av Sephadex LH-20 kolonnekromatografi	63
5.8.1	Fraksjon VM1.....	64
5.8.2	Fraksjon VM2.....	65
5.8.3	Fraksjon VM3+4.....	66
5.8.4	Fraksjon VM2S45+46	68
5.8.5	Fraksjon EM3-5	70
5.8.6	Fraksjon EV5-8.....	72
5.9	Videre separasjon av utvalgte fraksjoner ved hjelp av preparativ HPLC	76
5.9.1	Fraksjon VM2S21-23	77
5.9.2	Fraksjon VM2S39-41	77
5.9.3	Fraksjon EV5-8LS23-26.....	77
5.10	NMR av utvalgte fraksjoner	78
5.11	HRMS av nye naturstoffer	79
6.	Analytiske resultater og diskusjon	79
6.1	Bestemmelse av strukturer til isolerte forbindelser	79
6.1.1	LUTEOLIN 7-O- β -GLUKOPYRANOSID og APIGENIN 7-O-(6''-O-MALONYL- β -GLUKOPYRANOSID)	79
6.1.2	APIGENIN 7-O- β -GLUKOPYRANOSID.....	95
6.1.3	LUTEOLIN 7-O-(6''-O-MALONYL- β -GLUKOPYRANOSID)	105
6.1.4	Nytt naturstoff: 2-METYL-5-HYDROKSY-7-METOKSYKROMEN-6-(3'-METYL-4'-HYDROKSYBUTYL-(4'-O-(6''-O-MALONYL- β -GLUKOPYRANOSID)).....	114
6.1.5	Nytt naturstoff: 2-METYL-5-HYDROKSY-7-METOKSYKROMEN-6-(3'-METYL-4'-HYDROKSYBUTYL-(4'-O- β -GLUKOPYRANOSID)	133
6.1.6	E-SINAPINSYRE 4-O- β -GLUKOPYRANOSID	147
6.1.7	E-KUMARSYRE 4-O- β -GLUKOPYRANOSID	157
6.1.8	KLOROGENSYRE	166
6.1.9	UNDULATOSID A.....	178
6.1.10	Nytt naturstoff: 6'-MALONYLUNDULATOSID	187
6.1.11	Nytt naturstoff: METYLMALONYLUNDULATOSID A	197
6.1.12	1,3-DIKAFFEOYLKINASYRE.....	206
6.1.13	1,3-DIKAFFEOYL-5-MALONYLKINASYRE	218
7.	Cytotoksisk aktivitet mot leukemiceller og NRK-celler	230
8.	Konklusjon	232
8.1	Videre arbeid	233
9.	Referanser	236
10.	Vedlegg	243
10.1	Vedlegg 1 – Flytskjemaer.....	243
10.2	Vedlegg 2 – UHPLC-kromatogrammer	247
10.3	Vedlegg 3 – NMR-spektre.....	256

1. Forkortelser

Forkortelser og symboler	Fullstendig betydning
1D	Endimensjonal
2D	Todimensjonal
B ₀	Ytre påført magnetfelt
br	Bred
C	Karbon
CAPT	Compensated Attached Proton Test
COSY	CORrelation SpectroscopY
C _q	Kvarternært karbon
d	Dublett
dd	Dobbel dublett
ddd	Dobbel dobbel dublett
‘d’	Semidublett
DMSO	Dimetylsulfoksid
DMSO-D ₆	Heksadeuterert dimetylsulfoksid
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
dt	Dobbel triplett
ESI	ElektroSpray Ionisering
FID	Fritt induksjonsforfall (free induction decay)
FT	Fouriertransformasjon
g	Gram
H	Hydrogen
H ₂ BC	Heteronuclear 2-Bond Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performace Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HSQC-TOCSY	Heteronuclear Single Quantum Coherence- Total Correlation SpectroscopY
Hz	Hertz
<i>I</i>	Spinn
<i>J</i>	Koblingskonstant
K	Kelvin

m	Multipllett
[MH] ⁺	Positivt ladet molekylærion
ml	Milliliter
MS	Massespektrometri
<i>m/z</i>	Masse-ladning ratio
NaOH	Natriumhydroksid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
nm	Nanometer
N ₂	Nitrogengass
ppm	Parts per million
ROESY	Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
s	Singlett
t	Tripllett
TFA	Trifluoreddiksyre
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
UHPLC	Ultra High Performace Liquid Chromatography
UV	Ultrafiolett
μl	Mikroliter
δ	Kjemisk skift

2. Hensikt

Oppgavens formål er isolering og karakterisering av nye og kjente naturstoffer i planten Spansk kjørvel, *Myrrhis odorata* (L.) Scop. Naturstoffer skal isoleres ved hjelp av ulike metoder som blant annet inkluderer ekstrahering, partisjonering av rækstrakt og separasjon ved hjelp av en kombinasjon av flere kromatografiske teknikker. Videre skal de isolerte forbindelsenes strukturer bestemmes ved ulike 1D og 2D NMR eksperimenter og høyresolusjons massespektroskopi. Deretter skal samarbeidspartner teste utvalgte spesielt interessante forbindelsers antileukemiaktivitet, antiviral aktivitet (Covid-19) og neuroprotektiv effekt. Isolerte naturstoffer skal testes på MOLM-13 celler, MVA-11 og OCI-AML3. I tillegg skal naturstoffer bli testet på normale celler NRK-celler og H9C2 celler. Når det gjelder testing av anti-COVID-19 aktivitet vil de utvalgte naturstoffene bli testet både på pseudovirus og på de mest aktuelle mutantene av SARS CoV-2 viruset.

3. Introduksjon

Taksonomisk klassifisering av Spansk kjørvel (9)

Rike: Planteriket Plantae

Rekke: Dekkfrøete planter Magnoliophyta

Klasse: Tofrøbladete planter Eudicots

Orden: Skjermplanteordenen Apiales

Familie: Skjermplantefamilien Apiaceae Lindl

Slekt: Spanskjørvelslekta *Myrrhis* Mill.

Art: *Myrrhis odorata* (L.) Scop.

Synonymer: *Lindera odorata* (L.) Asch., *Selinum myrrhis* E. H. L. Krause, *Chaerophyllum odoratum* (L.) Crantz, *Scandix odorata* L., *Myrrhis sulcata* Lag (11).

Engelske navn: Sweet chervil, great chervil, european sweet cicely, sweet cicely, smooth cicely, smoother cicely, british myrrh, cow chervil, sweet-fern, shepherd's needle, sweet bracken (8).

Norske navn: Spansk kjørvel, aniskjørvel, hagemyrre, søtekrydd (8).



Figur 1: Bilde av spansk kjørvel tatt av Rolv Hjelmstad (8)

3.1 Botanisk bakgrunn og habitat

Spansk kjørvel er en flerårig, mykt håret plante med en tykk, pælet og hulet stengel. Planten kan bli høyere enn én meter. Bladene på planten ligner på bregner, hvor bladene er store, myke, lysegrønne, trekantete, flikete og har tannet kant. Knuste blader eller de umodne fruktene lukter kraftig anis. I mai/juni blomstrer planten og har små hvite blomster i skjærmer (8).

Spansk kjørvels opprinnelsessted er fjellområder i Mellom- og Sør-Europa (8). I Norge finnes ofte spansk kjørvel i gamle hager ved gammel bebyggelse, der den tilknyttet til herregårdsanlegg, prestegårder eller embedsmannsgårder. Fra gamle dager var den utbredt i Hordaland og rundt Oslofjorden. I Bergen finnes spansk kjørvel ved gamle klostereiendommer som Domkirken og på Store Milde. Planten trives godt og sprer seg raskt

på steder som er fuktige og som har god jord (54). Planten sprer seg og konkurrerer ut andre arter i Norge, og er derfor definert som en fremmedart med svært høy risiko for å bli invasiv i norsk natur (8).

3.2 Tradisjonell bruk

Spansk kjørvel er blant plantene som klostrene og munkene anbefalte bøndene å dyrke ved gårdene, til anvendelse både som matplante, medisin og som dyrefor (54). Alle plantedeler som blader, røttene og frøene ble brukt som krydder, mat og medisin. Planten ble brukt som blant annet appetittvekkende, styrkende for fordøyelsen, mot tarmgass, høyt blodtrykk, urindrivende, lett avføringsvirkning og anemi og mange andre lidelser. I gamle tider ble planten kalt for effektiv «blodrensner». Friske og knuste blader ble brukt på smertefulle områder som forårsaket av gikt og revmatisme. Rot og blad har vært brukt som et styrkemiddel for eldre. Planten ble også brukt mot en rekke lungeproblemer som hoste, astma og kortpustethet. Enkelte ganger har tørkede blad blitt røykt som tobakk da det ble sagt den dagen at den fremmer opphosting av slim. Rot- og frøekstrakt ble brukt i behandling av sår hals og brystsmerte, samt blæreproblemer. Det ble laget en salve av roten og som ble brukt til å påsmøre på alle typer sår. Under middelalderen ble roten brukt i beskyttelse mot pest da den har antiseptisk effekt. I tillegg ble rot avkok brukt i behandling av hunde- og slangebitt. (8).

Spansk kjørvel bladene har en smak av anis, og ble derfor brukt som friske da de mister aromaen under tørkeprosessen. Bladene ble brukt i salater, kylling- og fiskeretter, supper og fruktdesserter. Små klippede blader ble brukt som søtningmiddel av diabetespasienter eller andre mennesker som ønsker mindre inntak av sukker (8).

Spansk kjørvel ble også brukt i veterinærmedisin for økning av melkeproduksjon hos dyr (8).

3.3 Tidligere studier av planten

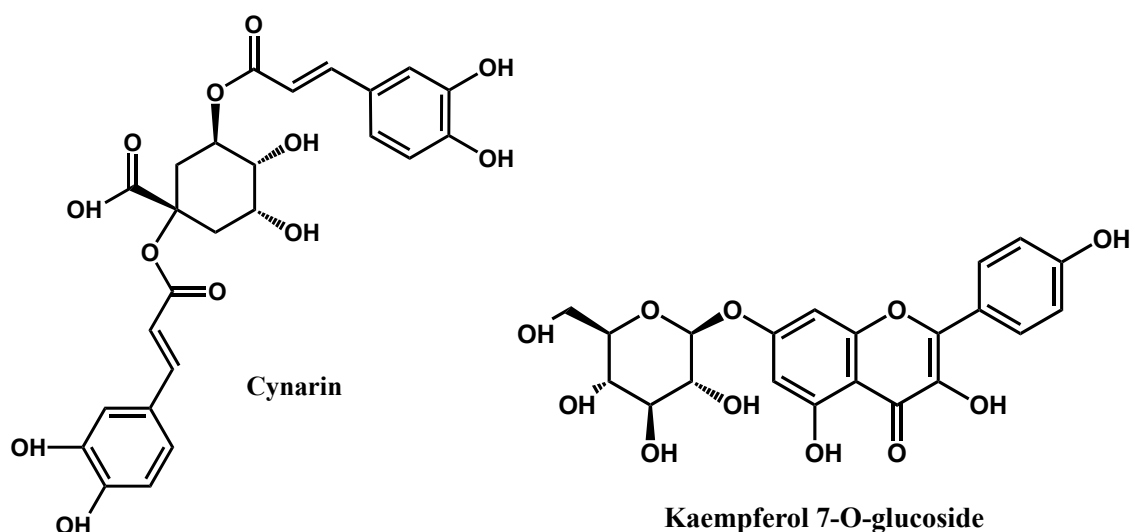
Rancic *et al.* (2005) isolerte essensielle oljer fra spansk kjørvel og evaluerte deres antimikrobielle aktivitet (52). *Myrrhis odorata* var plukket fra Prokletije, Serbia og Montenegro i blomstringsperioden i juli, 2001. Essensielle olje og deres sammensetning ble undersøkt ved hjelp av analytisk GC/FID og GC/MS. Test mot mikroorganismer inkluderte *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas tolaasti*, *Salmonella*

enteritidis, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* og *Staphylococcus epidermidis*. Bifonazol ble brukt som positiv kontroll for *Candida albicans*, og streptomycin for bakteriearter. Soppartene som ble brukt i test mot antifungal aktivitet var *Aspergillus niger*, *A. Flavus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium fulniculosum* og *Trichoderma viride*. *p*-cymene var hovedkomponent i *Myrrhis odorata* olje. Høyest volum av oljen fra *Myrrhis odorata* viste aktivitet mot alle brukte mikroorganismer i denne studien, i mindre volumer hadde olje aktivitet mot *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* og *Staphylococcus epidermidis*. *Myrrhis odorata* viste også best antifungal aktivitet blant de andre plantene som var brukt i denne studien. Det er på grunn av innholdet av *p*-cymene i oljen fra *Myrrhis odorata* som er aromatisk monoterpen (52).

Dobraval'skytė *et al.* (2013) gjort på spansk kjørvel ser på dens essensielle oljekompensasjon ved ulike vekstområder i Litauen og Frankrike, og skal sammenlignes med andre tilgjengelig litteratur (12). Gjennomsnittlig temperatur og nedbørsmengde er høyere i Frankrike enn i Litauen. Sammensetningen av essensiell olje fra planten ble analysert ved hjelp av gasskromatografi utstyrt med en flammeioniseringsdetektor og elektronisk trykk kontroll injektor, og gasskromatografi massespektrometer. Det ble oppdaget tjue og tjueseks forskjellige komponenter i spansk kjørvel dyrket i henholdsvis Litauen og Frankrike. *Cis*-tujon, pinokarveol, karvakrol og α -bergamotene er relativt flyktige forbindelser som ble funnet i spansk kjørvel oljeekstraktet i Frankrike, og ikke i Litauen. Flyktige forbindelser som ble funnet i spansk kjørvel tilhører gruppene; fenyylpropanoider, terpenoider, alkoholer og aldehyder. Spansk kjørvel inneholder mest av fenyylpropanoider, etterfulgt av terpenoier. Oksygenerte monoterpenoier har blitt kun funnet i franskdyrket spansk kjørvel. Høyere prosentinnhold av hydrokarbon seskviterpenoier ble funnet i spansk kjørvel fra Litauen enn den fra Frankrike, mens det var likt innhold av oksygenerte seskviterpenoier. Studien viser også at essensielle oljer fra spansk kjørvel inneholder mer av hydrokarbon seskviterpenoier enn hydrokarbon monoterpenoier. Parent seskviterpenoier er biosyntetisert fra geranyl difosfat ved kondensering med isopentenyl difosfat. Hovedkomponentene funnet i eteriske oljer av spansk kjørvel i begge regionene er (*E*)-anetol, metyleugenol og (*E*)-nerolidol. Disse komponentene har anisliggende lukt og finnes blant annet også i stjerneanis (*Illicium verum*), fennikel (*Foeniculum vulgare*) og en pepperart (*Piper clausenianum*) (12). Studien viser at forskjellige kjemotyper og forskjellig prosentinnhold av komponentene i essensiell olje i forskjellige regioner (12). Det er normalt fordi kjemisk polymorfisme er karakteristisk for arter i

umbelliferae familien. I tillegg avhenger forskjellene av klimaforskjeller og genotype. Disse parameterne påvirker både totalt innhold av essensielle olje og deres sammensetning (12).

Ferrer (2016) har sett på antioksidative egenskaper til bi-produktene etter at de flyktigste komponentene i den eteriske oljen var blitt fjernet fra spansk kjørvel ekstraktet (13). Spansk kjørvel har blitt høstet fra Litauen og Sør-Frankrike. Flyktig olje har blitt fjernet ved vanndampdestillasjon, og resten av luktstoffene ble separert i fast og flytende fraksjoner. Fast fraksjon ble tørket ved 30 grader Celsius og ekstrahert med aceton, metanol og etanol. Ekstraktene ble analysert på et HPLC instrument utstyrt med både UV-detektor og DPPH radikalscaveningsdetektor, i tillegg til med LC-MS. Studien viser at ekstraktet isolert med polare løsemidler har sterk antioksidativ effekt, hovedsakelig på grunn av tilstedeværelse fenoliske komponenter som kaempferol-7-O-glukosid og cynarin. Disse forbindelsene ble her detektert i spansk kjørvel for første gang (13). Den ene forbindelsen er dominerende i etanolekstraktene av plantematerialet både fra Litauen og Frankrike, mens den andre er dominerende i vannekstraktet fra fransk planteekstrakt. Kaempferol-7-O-glukosid er en flavonol og har tidligere blitt funnet i mange forskjellige planter, inkludert kinesisk sarsaparilla (*Smilax china*). Denne forbindelsen induserer stopp av G2/M fase av cellesyklusen, og induserer også apoptose på HeLa celler i en p53-uavhengig måte. Cynarin er en ester dannet av kinasyre og to kaffesyreenheter. Forbindelsen ble tidligere funnet i artisjokk og har blitt rapportert for sin biologiske aktivitet som inkluderer diuretisk, koleretisk og hepatoprotektiv aktivitet. Cynarin er sannsynligvis en av forbindelsene som gir spansk kjørvel den søte smaken (13).



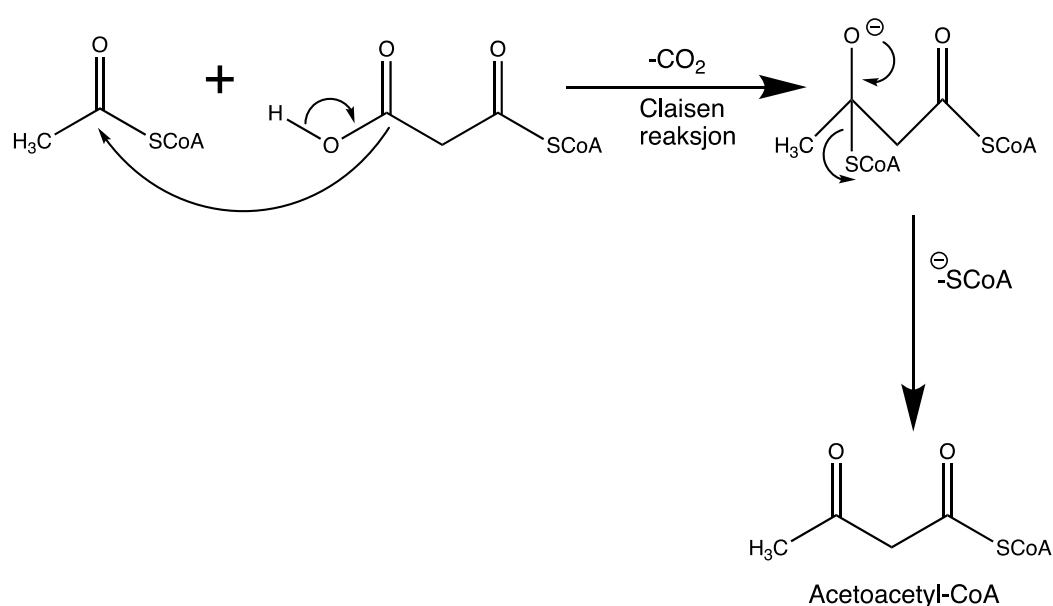
Figur 2: Struktur av cynarin og kaempferol-7-O-glukosid (13).

3.4 Utvalgte grupper naturstoffer

Naturstoffer er av stor interesse innenfor legemiddelkemi ettersom det er mange legemidler som er isolert fra planter eller er inspirert av strukturene til naturstoffer. Dette avsnittet handler om den kjemiske bakgrunnen til noen biosyntetiske forløpere for mange stoffer som fins i mange planter, også *Myrrhis odorata*. Det er for å få en bedre forståelse av mangfoldet av forbindelsene som fins i planter.

3.4.1 Polyketider

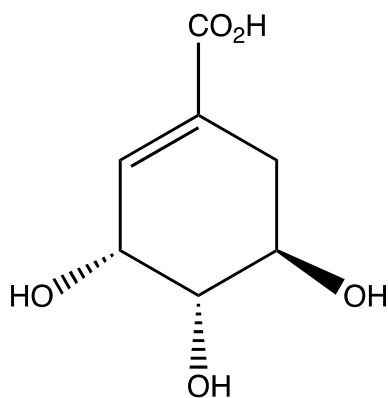
Polyketider er omfattende gruppe naturstoffer som inkluderer mange viktige terapeutiske komponenter som antibiotika klassene makrolider og tetracykliner, fettsyrer og aromatiske forbindelser. Polyketider er metabolitter og derivater av acetat (C_2) biosyntesevei og finnes i alle organismer i form av forskjellige fettsyrer og glyserider. Bakterier spesielt av slekten *Streptomyces* gir opphav til et rikt utvalg av strukturelle variasjoner av polyketider, hvorav et betydelig antall forbindelser med signifikant antibiotika aktivitet. Biosyntesen av disse komponentene begynner med en kondenseringsreaksjon mellom malonyl-CoA og acetyl-CoA, noe som resulterer i dannelsen av polyketid acetoacetyl-CoA. I claisenreaksjon avspaltes CO_2 ; i tillegg dannes $HSCoA$. Produktet acetoacetyl-CoA kan kondenseres videre med flere malonyl-CoA for å forlenge kjeden, eller også for å danne sykliske komponenter (49 s. 63-64).



Figur 3: Biosyntese av polyketider (49 s. 64).

3.4.2 Shikimatveien

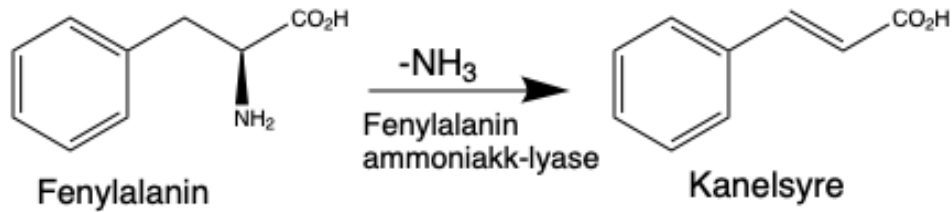
Shikimisyre/shikimat er en viktig forløper for flere aromatiske naturprodukter og aromatiske aminosyrer som blant annet fenylalanin, tyrosin, tryptofan, andre enkle aromatiske syrer som er vanlige i naturen og aromatiske aldehyder og benzaldehyder. Det er flere grupper av naturstoffer som dannes fra aminosyren fenylalanin. Det gjelder spesielt fenylpropener, lignaner, kumariner og flavonoider. Disse naturstoffgruppene har en felles grunnstruktur som består av en aromatisk 6-karbon ring (C₆-enhet) som er koblet til en 3-karbon kjede (C₃-enhet). Det er flere mulige reaksjoner som denne 9-karbonenheten kan undergå slik som oksidasjon, reduksjon, metylering, glykosylering, acylering og dimerisering. Dette gir mulighet for stor strukturell variasjon av flere forskjellige biologisk aktive forbindelser med strukturell kompleksitet med tilstedeværelse av kiralitet og funksjonalitet (49 s. 70).



Figur 4: Struktur av shikimisyre.

3.4.3 Fenylpropener

Fenylpropener er blant de enkleste shikimisyre deriverte naturprodukter. Fenylpropener består av en umettet 3-karbonkjede koblet til en aromatisk ring. De biosyntetiseres fra shikimatmetabolitten fenylalanin ved at fenylalanin oksideres ved hjelp av enzymet fenylalanin ammoniakk lyase, noe som resulterer i dannelse av kanelsyre (figur 5). Det blir avspaltet ammoniakk under denne reaksjonen. Kanelsyre kan deretter undergå flere reaksjoner for å danne mange andre fenylpropener som for eksempel lignaner, kumariner og flavonoider (49 s. 70-71).

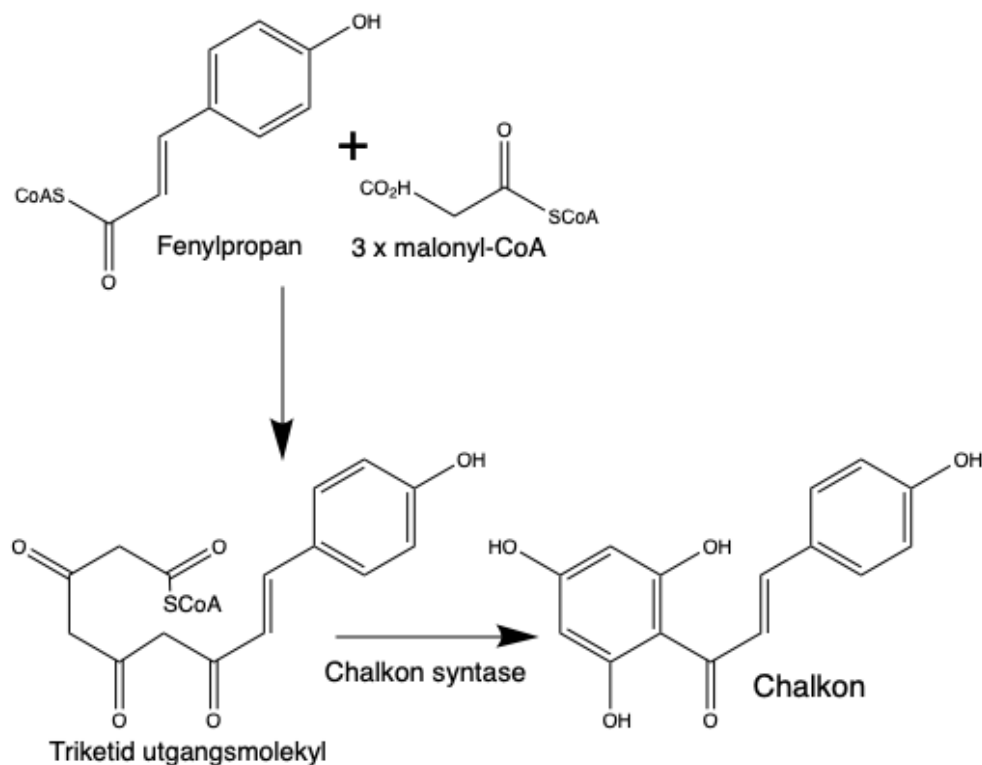


Figur 5: Syntese av kanelsyre (49 s. 71).

Fenylpropener er vanlige komponenter i krydder med sterke aromaer. Mange fenylpropener har bredte antimikrobielle egenskaper med virkning mot bakterier og gjærsopp. Det er en del fenylpropener som kan medføre til inflammasjon (49 s. 71).

3.4.4 Flavonoider

Flavonoider er naturstoffer med blandet biosyntese og består av enhetsderivater fra både shikimisyre- og polyketid biosynteseveier. Flavonoider er derivert fra en C₆-C₃ (fenylpropan) synteseenhet fra shikimisyre biosynteseveien via fenylalanin. Videre kobles til enda en C₆-enhet som er derivert fra polyketid biosynteseveien. Polyketid fragmentet dannes av tre malonyl-CoA molekyler som kombineres med C₆-C₃-enhet som en CoA tioester for å danne et triketid utgangsmolekyl. Triketid utgangsmolekyl benyttes i dannelsen av en rekke forskjellige stoffer. Triketid utgangsmolekylet undergår syklisering katalysert av chalcon syntase enzymet for å danne chalconstruktur. Videre strukturell modifikasjon av denne chalconstrukturen gir opphav til en rekke flavonoider i planter, blant annet flavoner, flavonoler, flavanoler og antocyaner (4 s. 75, 66).



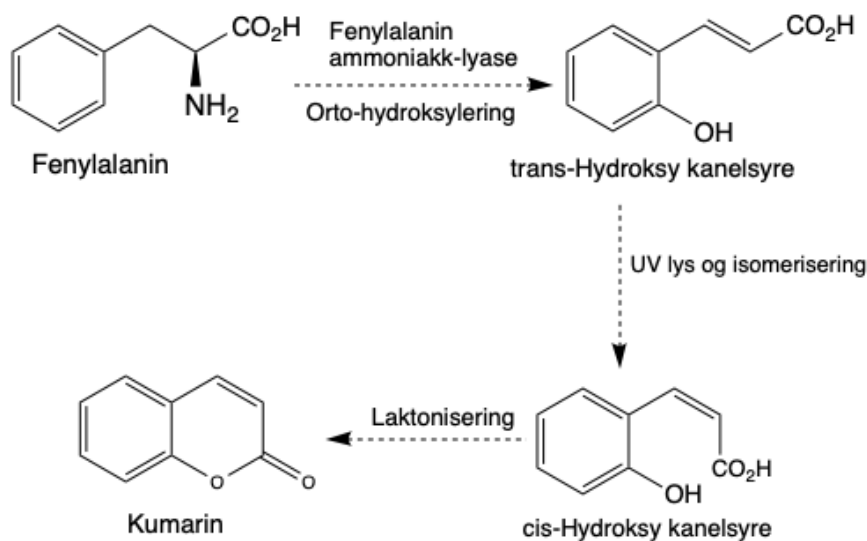
Figur 6: Biosyntese av chalkon som er forløper for andre typer flavonoider (49 s. 76).

Flavonoider som gir plantene farge, spesielt gul-oransje farge. Antocyaner er universalfargestoffer for planter og er ansvarlige for rød-blå og av og til oransje farger i plantene. På bakgrunn av at flavonoider har omfattende kromoforer absorberer de elektromagnetisk stråling i UV/Synlig lys området av det elektromagnetiske spektrum. I tillegg spiller flavonoider en viktig rolle i pollineringsprosessen for planter ved at de kan tiltrekke insekter. Det er vist at flavonoider har sterke antioksidantive egenskaper, noe som er karakteristisk for mange av disse aromatiske polyfenoliske forbindelsene. Mange sykdommer slik som kreft og hjerteproblemer blir verre ved tilstedeværelse av fri radikaler som superoksid og hydroksyl. Flavonoider har radikal scavenger effekt, noe som settes i forbindelse med deres positive helseeffekt som er blitt indikert for mange sykdomstilstander. Forskning har også vist at flavonoider har mange flere biologiske aktiviteter slik som anti-inflammatoriske, anti-kreft aktivitet og anti-viral effekt mot flere forskjellige typer virus, inkludert HIV-1 og influensa A virus (4 s. 75, 66). Forskning viser også at blant annet kakao og ekstrakter av kakaobønner har mange helseeffekter overfor kardiovaskulære sykdommer og høyt blodtrykk (51).

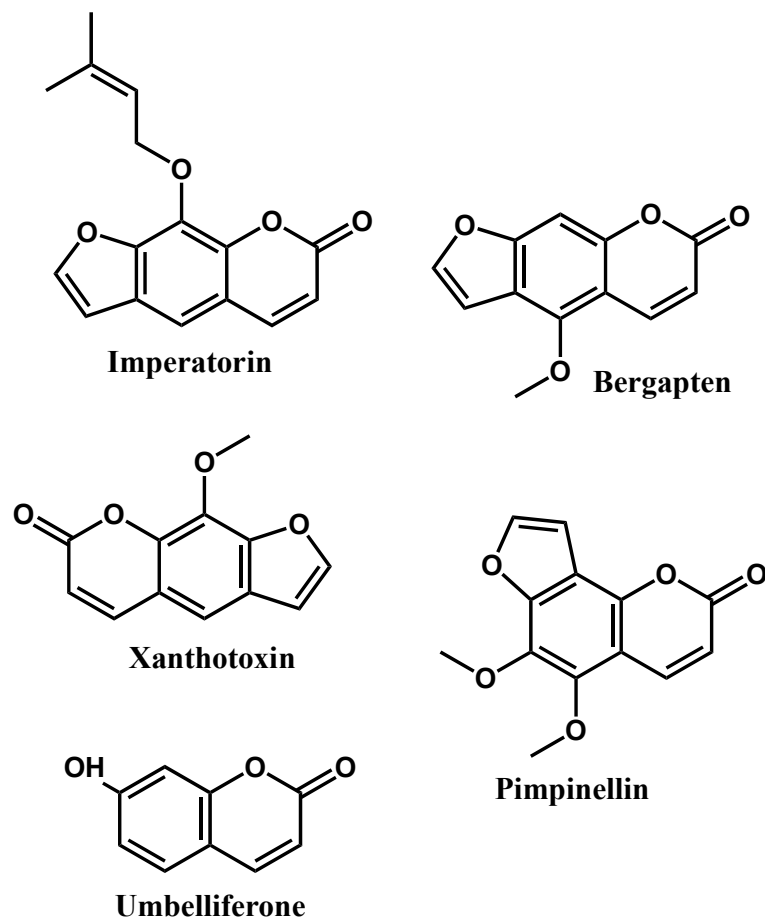
Kaempferol-7-*O*-glukosid hører til gruppen flavonoler (13), mens luteolin-7-*O*-glukosid og apigenin-7-*O*-glukosid tilhører gruppen flavoner. Disse flavonoidene har blitt tidligere isolert fra *Myrrhis odorata* (14 og 37).

3.4.5 Kumariner

Kumariner er derivater av shikimisyre metabolitter som dannes når fenylalanin blir deaminert og hydroksylert til trans-hydroksykanelsyre. Dobbelbindingen blir fort konvertert til cis-form av lys-katalysert isomerisering, noe som går at syre- og hydroksyl gruppen blir n r hverandre i avstand. Mellom disse gruppene skjer en laktoniserings reaksjon, og standard kumarin dannes (49 s. 73). Kumariner er ofte tidligere blitt funnet i skjermplantefamilien, og fra frukter og røtter av *Myrrhis odorata* har fem kumariner blitt isolert av Sawicka (1999) ved hjelp av kromatografiske metoder (53). Strukturene til disse kumarinene; imperatorin, bergapten, xanthotoxin, pimpinellin og umbelliferone er vist i figur 8.



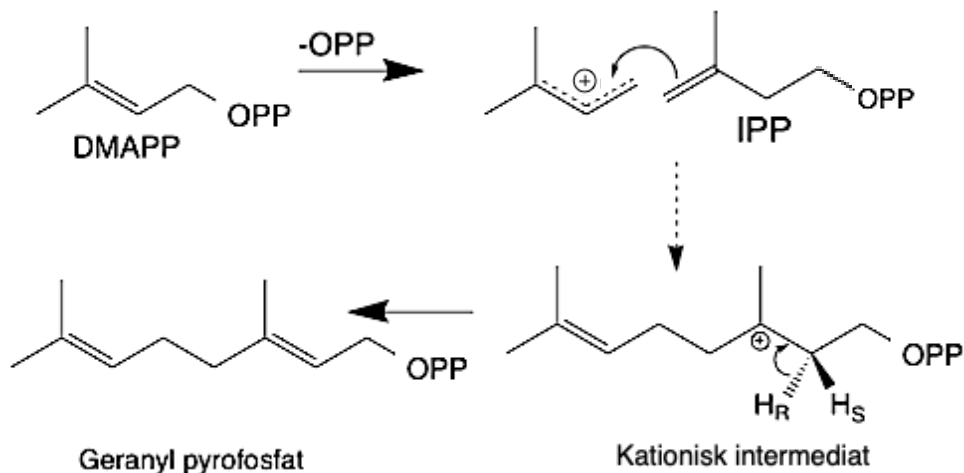
Figur 7: Biosyntese av kumariner (49 s. 73)



Figur 8: Strukturer av kumariner isolert fra *Myrrhis odorata* (53).

3.4.6 Terpener

Terpener har en omfattende utbredelse i naturen og finnes i de fleste arter, også i mennesker. I planter er monoterpener ansvarlige for blant annet å gi planter deres særskilte lukt. Disse dannes etter en reaksjon mellom to C5-enheter (dimetylallyl pyrofosfat (DMAPP) og isopentyl pyrofosfat (IPP)). Produktet av denne reaksjon vil alltid ha strukturelle enheter på fem karbonatomer, som for eksempel monoterpener (C₁₀), seskviterpener (C₁₅), diterpener (C₂₀), tripterpener (C₃₀) og tetraterpener (C₄₀) (49 s. 78). *Myrrhis odorata* inneholder mange forskjellige terpener, spesielt monoterpener og seskviterpener (12).



Figur 9: Dannelse av startmolekyl som er utgangspunkt for biosyntesen av terpen (49 s. 79).

Monoterpen har vanligvis karakteristiske lukter og smaker, og har ofte utstrakt bruk innenfor matproduksjon og kosmetisk industri. I planter har monoterpen forskjellige funksjoner slik som å tiltrekke insekter for å hjelpe med pollinering. Andre monoterpen har bredspektrum antimikrobiell aktivitet for å beskytte planten mot bakterier eller sopp slik som for thymol (49 s. 78 og 80). Seskviterpen har mange likhet med monoterpen slik som at de ofte har karakteristisk lukt, og noen har brede antimikrobielle og insektdrepende egenskaper (49 s. 78 og 80). Det viktigste antimalariamiddelet i verden, artemisinin, som ble isolert fra medisiplanten *Artemisia annua* av farmasøyten Youyou Tu og hennes forskningsgruppe, er et seskviterpen lakton peroksid (67). Oppdagelsen førte til at Tu, som tilhører fagfeltet farmakognosi, fikk Nobelprisen i medisin i 2015, som den eneste farmasøyt som har oppnådd dette noensinne.

3.5 Tidligere identifiserte innholdsstoffer

En viktig del av mastergradsprosjektet var å lage en oversikt over samtlige naturstoffer som er blitt rapportert fra spansk kjørvel. Tabell gir en oversikt over tidligere identifisert stoffer fra *Myrrhis odorata*. Som det fremgår av tabell 1 er det gjort mest forskning på plantens innhold av flyktige stoffer. Det finnes imidlertid også litteratur som viser at planten inneholder flavonoider, kumariner og kaffesyre-derivater. Tilstedeværelsen av luteolin 7-*O*-glukosid og apigenin 7-*O*-glukosid, som er flavoner, har blitt rapportert av Cisowski (1985) (37).

Kaempferol-7-*O*-glukosid tilhører flavonoidgruppen flavonoler, mens cynarin er kinasyre som er forestret med to kaffesyre-enheter. Disse har blitt identifisert fra bladene til planten av Ferrer (2016) (13). Fra plantens frukter og røtter har kumarinene imperatorin, bergapten, xanthotoxin, pimpinellin og umbelliferone blitt identifisert av Sawicka (1999) (53).

Dermed er det veldig høy sannsynlighet for at mange flere naturstoffer med potensiale som legemiddelkandidater ikke er funnet i planten enda. Derfor er det åpenbart et betydelig potensial for å oppdage nye naturstoffer i planten.

Tabell 1: Forbindelser tidligere isolert fra *Myrrhis odorata*

Forbindelse	Del av planten	Strukturbestemt ved	Referanse
Luteolin 7- <i>O</i> -glukosid	Overjordisk deler og fukter	-	14, 37
Apigenin 7- <i>O</i> -glukosid	Overjordisk deler og fukter	-	37
Kaempferol-7- <i>O</i> -glukosid	Blad	HPLC, LC-MS	13
Cynarin	Blad	HPLC, LC-MS	13
Bergapten	Frukter og røtter	LC, TLC, HPLC	53
Imperatorin	Frukter og røtter	LC, TLC, HPLC	53
Pimpinellin	Frukter og røtter	LC, TLC, HPLC	53
Umbelliferone	Frukter og røtter	LC, TLC, HPLC	53
Xanthitixin	Frukter og røtter	LC, TLC, HPLC	53
Myrcene	Blad	GC-standard, MS	15
Limonene	Blad	GC-standard, MS	15, 12
γ -Terpinene	Blad	GC-standard, MS	15, 12
(E)- β -ocimene	Blad	MS	15, 12
<i>p</i> -Cymene	Blad	GC-standard, MS	15, 12
Terpinolene	Blad	GC-standard, MS	15
Menthone	Blad	GC-standard, MS	15
β -bourbonene	Blad	MS	15
β -caryophyllene	Blad	GC-standard, MS	15, 12
Menthol	Blad	GC-standard, MS	15
α -humulene	Blad	MS	15
Methyl chavicol	Blad	GC-standard, MS	15
γ -muurolene	Blad	MS	15

Germacrene-D	Blad	MS	15, 12
α -farnesene	Blad	GC-standard, MS	15, 12
(Z)-Anethole	Blad	MS	15
δ -cadinene	Blad	MS	15
Methyl dodecanoate	Blad	GC-standard, MS	15
(E)-Anethole	Blad	GC-standard, MS	15, 12
Geranyl propionate	Blad	MS	15
Neophytadiene	Blad	MS	15
Caryophyllene oxide	Blad	MS	15
Anisaldehyde	Blad	MS	15
Nerolidol	Blad	MS	15
Germacrene D-4-ol	Blad	MS	15
Spathulenol	Blad	MS	15, 12
ι -cadinol	Blad	MS	15
1-hexadecene	Blad	MS	15
α -cadinol	Blad	MS	15
Myristicin	Blad	MS	15
Tricosane	Blad	GC-standard, MS	15
1-heptadecene	Blad	GC-standard, MS	15
Tetracosane	Blad	GC-standard, MS	15
Pentacosane	Blad	GC-standard, MS	15
Phytol	Blad	GC-standard, MS	15, 12
Heptacosane	Blad	GC-standard, MS	15
Octacosane	Blad	GC-standard, MS	15
Nonacosane	Blad	GC-standard, MS	15
1-eicosene	Blad	GC-standard, MS	15
α -Pinene	Blad	GC-FID, GC-MS	12
β -Myrcene	Blad	GC-FID, GC-MS	12
cis-Thujone	Blad	GC-FID, GC-MS	12
Nonanal	Blad	GC-FID, GC-MS	12
Camphor	Blad	GC-FID, GC-MS	12
iso-Menthone	Blad	GC-FID, GC-MS	12
Pinocarveol	Blad	GC-FID, GC-MS	12
Carvacrol	Blad	GC-FID, GC-MS	12

Estragole	Blad	GC-FID, GC-MS	12
<i>p</i> -Anisaldehyde	Blad	GC-FID, GC-MS	12
Methyleugenol	Blad	GC-FID, GC-MS	12
α -Bergamotene	Blad	GC-FID, GC-MS	12
β -Bisabolene	Blad	GC-FID, GC-MS	12
E-Nerolidol	Blad	GC-FID, GC-MS	12
Hexadecanol	Blad	GC-FID, GC-MS	12
Phenylpropanoider	Blad	GC-FID, GC-MS	12
Oleinic acid	Frukt	-	64

4. Eksperimentell teori

4.1 Materialet

4.1.1 Kjemikalier

Tabell 2: Oversikt over kjemikalier brukt i arbeid med *Myrrhis odorata*

Kjemikalier	Produsent	Produksjonssted
Acetonitril (HPLC-kvalitet)	Sigma-Aldrich	Saint Louis, Missouri, USA
Destillert vann	Kjemisk institutt, UiB	Bergen, Norge
Deuterert dimetylsulfoksid (DMSO-D ₆)	Eurisotop	Saint-Aubin, Frankrike
Dimetylsulfoksid	Merck	Darmstadt, Tyskland
Etanol teknisk	VWR Chemicals	Pennsylvania, USA
Etylacetat (HPLC-kvalitet)	Sigma-Aldrich	Saint Louis, Missouri, USA
Metanol (HPLC kvalitet)	Sigma-Aldrich	Saint Louis, Missouri, USA
Natriumhydroksid	Merck	Darmstadt, Tyskland
Nitrogengass	-	-
Petroleumseter	Sigma-Aldrich	Saint Louis, Missouri, USA
Superdestillert vann	Kjemisk institutt, UiB	Bergen, Norge
Trifluoreddiksyre	Sigma-Aldrich	Saint Louis, Missouri, USA

4.1.2 Apparater og instrumenter

Tabell 3: Oversikt over utstyr brukt i arbeid med *Myrrhis odorata*

Utstyr	Type	Produsent	Produksjonssted
Automatpipette	Finnpipette 10 µl og 100 µl	Thermo Fisher Scientific	Sunnyvale, California, USA
Analytisk UHPLC	Agilent 1290 analytisk UHPLC instrument	Agilent	Santa Clara, California, USA
Analytisk UHPLC kolonne	Zorbax Eclipse Plus C18 kolonne, 2.1x 50 mm, 1.8 µm	Agilent	Santa Clara, California, USA
Kolonnemateriale	XAD-7 Amberlite	-	-
Kolonnemateriale	Sephadex LH-20	-	-
Massespektrometer	JEOL JMS T100LC tilkoblet Agilent 1260 serie LC modul. UV-Vis DA detektor	JEOL	Musashino, Akishima, Tokyo, Japan
NMR-instrument	NMR 850 MHz instrument	Bruker	Fällanden, Sveits
NMR-rør	Norell Sample Vault Series 5 mm x 103.5 mm	Sigma-Aldrich	Saint Louis, Missouri, USA
Pasteurpipetter	2 mL	VWR-Chemicals	Radnor, Pennsylvania, USA
pH-papir	-	Merck Kommanditgesellschaft auf Aktien (KGaA)	Darmstadt, Tyskland
Preparativ HPLC instrument	Ultimate 3000 HPLC instrument	Dionex (Thermo Fisher Scientific)	Sunnyvale, California, USA
Preparativ HPLC kolonne	Ascentis C18 kolonne 25 cm x 21.2 mm, 5 µm	Supelco Ascentis	St. Louis, Missouri, USA

Rotavapor	BUCHI rotavapor R-205 BUCHI rotavapor RE 120	BUCHI	Flawil, Sveits
Sprøyte	BD plastipak 2 ml	Becton Dickinson	Melsungen, Tyskland
Sprøytefilter	0.45 µm millipore membranfilter	Whatman	Maidstone, England
Vakuumpumpe	PC 3001 Vario	Vacuubrand	Wertheim, Tyskland
Varmebad	BUCHI Varmebad B-490 BUCHI Varmebad B-491	BUCHI	Flawil, Sveits
Vekt	College2440	Mettler - Toledo	Greifensee, Zürich, Sveits
Vekt	Pioneer PA214C	Ohaus	Parsipanny, New Jersey, USA

4.2 Metoder

4.2.1 Fast stoff-væske ekstraksjon

Det aller første steget i analyse av innholdsstoffene av plantemateriale er ekstraksjon (1, s. 723). Fast stoff-væske ekstraksjon er en gammel metode for å isolere substanser fra en plante (2, s. 102). Maserasjon er den enkleste metoden for ekstraksjon, og er godt egnet for å gi et ekstrakt av faste prøver, både i stor og liten skala. Ved enkel maserasjonsmetode blandes plantematerialet med passende løsemiddel i forholdet 1:5 eller 1:10. Ekstraksjon skjer ved romtemperatur i flere dager. Videre blir ekstraktet skilt fra plantematerialet ved filtrering og prosessen repeteres med nytt løsemiddel. Igjen, blir ekstraktet separert fra plantematerialet ved filtrering (3, s. 50). Effektiv ekstraksjon avhenger av størrelsen på plantematerialet, hvor små partikler har større overflateareal og dermed bedre ekstraksjonseffektivitet. I tillegg kan bruk av ikke passende ekstraksjonsmetode som for eksempel varme medføre til degradering av naturstoffer og tap av biologisk aktivitet. Valget av løsningsmiddel for ekstraksjon spiller en viktig rolle for en god ekstraksjon (4, s. 106, 107). Ekstraksjon trenger absolutt ikke å ligne

på tradisjonell bruk av planten. For eksempel viste erfaringene fra arbeidet til Youyou Tu og hennes forskningsgruppe at ekstrahering av artemisinin fungerte best når plantematerialet ble ekstrahert med et organisk løsemiddel, noe som ga mye høyere utbytte av det aktive prinsippet i planten (artemisinin) enn hva som ble oppnådd med en tradisjonell vandig ekstraheringsprosess, som de opprinnelig benyttet (68). Feil valg av løsningsmiddel kan medføre tap av aktive komponenter (4, s. 106, 107). En suksessfull ekstraksjon krever løsningsmiddel med en rekke egenskaper som lav toksisitet, lett å avdampe ved lav temperatur, fremmer god absorpsjon av ekstraktet, og lav tendens til å få ekstraktet til å kompleksere eller dissosiere (1, s. 724). Metanol er godt egnet som løsningsmiddel i dette trinnet ettersom den har relativt lav toksisitet og er lett å avdampe. I tillegg har metanol en polar gruppe (OH) og en upolar gruppe (metyl), noe som gir den mulighet for å ekstrahere både polar og upolare forbindelser fra plantematerialet (5).

Kjemikalier

- Metanol HPLC-kvalitet

Utstyr

- Begerglass
- Parafilm
- Glassull
- Glasstrakt

Fremgangsmåte

- 2,4 kg frosne plantematerialet ble kuttet i mindre biter for å ha større overflateareal
- Plantematerialet ble overført til begerglass
- Plantematerialet i begerglass ble dekket med metanol av HPLC-kvalitet
- Begerglass med plantematerialet og metanol ble dekket med parafilm, og ekstrahering foregikk i 48 timer.
- Første del av planteekstraktet ble filtrert over i en erlenmeyerkolbe med glasstrakt og gjennom glassull
- Ny metanol ble fylt over plantematerialet for ny ekstraksjonsrunde som foregikk i 72 timer.
- Planteekstraktet fra andre ekstraksjon ble filtrert, og rester av plantematerialet ble deretter tørket og kastet.



Figur 10: Bilde viser ekstrahering av spansk kjørvel i metanol. Bilden er tatt av forfatteren selv.

4.2.2 Oppkonsentrering med rotavapor

Etter ekstraksjon er det nødvendig å oppkonsentrere ekstraktet. Dette trengs for å oppnå mindre volum som er mer håndterbart både med tanke på analysering, renhet og høyere konsentrasjon av naturstoffer i ekstraktet, i tillegg til at tofaseekstraheringen av det konsentrerte vannekstraktet, med henholdsvis petroleumeter og etylacetat, kun fungerer når all metanol er fjernet fra råekstraktet. For oppkonsentrering av råekstraktet kan rotavapor brukes.

Rotavaporsystemet som er vist i bilden nedenfor består av avdampingskolbe med ekstrakt koblet til en kondenser. Avdampingskolben roterer i et vannbad på 25-30 grader Celsius. Rotering av kolben når systemet er under vakuomet øker overflatearealet til ekstraktet og dermed økt varmeoverføring (6, s. 14). Kjølevæsken (etanol) sirkuleres i kondensatoren, hvor løsemidlet fjernes fra råekstraktet og samles opp i en oppsamlingskolbe. Vakuumpumpen som er tilkoblet til rotavaporen danner vakuomet i systemet. Vakuomet reduserer trykket og kokepunktet, og gjør at avdampning av råekstraktet ved lav temperatur mulig (6, s.14). Da er

det mindre risiko for degradering av naturstoffene i spansk kjørvel ekstraktet. Flyktige substanser har høyere damptrykk ved romtemperatur enn ikke-flyktige substanser, og dermed fordampes flyktige substanser raskere (7, s. 419). Metanol er et flyktig løsemiddel, og ble derfor brukt som egnet løsemiddel til ekstrahering av substanser fra spansk kjørvel.



Figur 11: Rotavaporsystemet som ble brukt til å kondensere ekstrakt fra spansk kjørvel. Bilde inneholder kjøleanlegg, vakuumpumpe og rotavapor med vannbad, oppsamlingskolbe og avdampingskolbe med ekstrakt.

Kjemikalier

- Metanolekstraktet

Utstyr

- Rotavapor med tilhørende vannbad
- Oppsamlingskolbe
- Avdampingskolbe
- Vakuumpumpe
- Kjøleanlegg med teknisk etanol
- Smørefett
- Festeklemmer

Fremgangsmåte

- Vannbadet settes til temperatur på 28 grader Celsius
- Rotavaporkolbe fylles med råekstraktet
- Fest rotavaporkolbe med en klemme og senk kolben ned i vannbad
- Skru igjen ventil for å få dannelse av vakuum, og sett på vakuum
- Pass på at ekstraktet ikke koker over
- Metanol i råekstraktet avdampes til det er et konsentrert vandig ekstrakt
- Fraksjoner med rene isolerte naturstoffer inndampes til tørrhet.

4.2.3 Væske-væske ekstraksjon

Konsentrert vandig ekstrakt inneholder forskjellige forbindelser, og er dermed viktig å skille disse forbindelsene fra hverandre. Derfor er væske-væske ekstraksjon neste steget i prøveoppbeidelse. Væske-væske ekstraksjonsmetoden baserer seg på «likt løser likt». Det vil si at forbindelser i ekstraktet skal fordele seg mellom to ikke blandbare væsker. Disse væskene er en vandig løsning og et organisk løsemiddel som ikke er blandbart i vann. Det er egenskapen organiske forbindelsene har som gjør at de fordeler seg i den fasen de er mest løselig i (10, s. 275).

Væske-væske ekstraksjon gjøres ved å blande begge fasene i en skilletrakt. Det er viktig å sette på korken, og åpne og lukke stoppekranen flere ganger for å unngå oppbygning av trykk ved fase-blanding. Det er viktig at man sikrer god blanding av fasene. Mens skilletrakten festes til holdestativet, vil det oppstå et faseskille, hvor fasen med høyest tetthet legger seg nederst i skilletrakten. Vanligvis er den vandige fasen er fasen med høyest tetthet, men det avhenger av tettheten til det andre valgte løsemiddel. Derfor er det viktig å sjekke tettheten til organiske løsemiddelet som man har valgt. Etter faseparasjon kan fasen som er tyngst og er nederst tappes ut i bunnen av skilletrakten (10, s. 283-284).



Figur 12: Skilletrakt med faseskille mellom oppkonsentrert planteekstraktet og petroleumeter. Petroleumeterfasen er øverst. Bilde er tatt av forfatteren selv og viser prinsippet bak 2-fase ekstraksjon.

Egenskaper til løsningsmiddel spiller en sentral rolle for en vellykket ekstraksjon. Slike egenskaper er som oppløselighet, tetthet og viskositet. Løsemiddel med lav viskositet kan lett rystes med vann og blir ofte foretrukket som ekstraksjonsmiddel. Løsemiddel med lavere tetthet enn vann vil befinne seg oppå vannfasen etter ekstraksjon. Løsemiddel med lavt kokepunkt gjør at inndamping av løsemidlet går fortere (10, s. 281). I dette prosjektet ekstraheres konsentrert vandig ekstrakt to ganger med petroleumeter (a) og to ganger med etylacetat (b). Både vannfasen og etylacetatfasen ble videre opparbeidet i dette prosjektet.

Kjemikalier

- Petroleumeter
- Etylacetat

Utstyr

- Skilletrakt med propp
- Holdestativ og klemmer
- Glasstrakt
- Begerglass/erlenmeyerkolber
- Glassull

Fremgangsmåte

- Konsentrert vandig ekstraktet filtreres gjennom glassull
- Filtrert ekstrakt overføres til en skilletrakt
- Vandig ekstrakt tilsettes med petroleumseter (a) i volumforholdet 50:50
- Skilletrakten vendes opp og ned flere ganger for å få en god blanding av begge fasene, og proppen tas av jevnlig for å unngå høy trykk i skilletrakten
- Skilletrakten festes til et holdestativ og lar faseseparasjon oppnås
- Fasene skilles fra hverandre og faseskille kastes. Vannfasen tilbakeføres til skilletrakten og prosedyren med ekstrahering med petroleumseter gjentas.
- Fasene skilles fra hverandre og faseskille kastes. Vannfasen tilbakeføres til skilletrakten og deretter blir prosedyren beskrevet ovenfor gjentatt med etylacetat som ekstraheringsmiddel (b).
- Vannfasen og etylacetatfasen avdampes på rotavapor til mer håndbartvolum for videre separasjon

4.2.4 Separasjons- og kromatografiske metoder

Etter at ekstraktet har blitt oppkonsentrert og avdampet av metanol, består det av en rekke forskjellige naturstoffer. Derfor er kromatografiske metoder for separering og isolering av rene naturstoffer de neste stegene i isolasjonsprosessen, og prosedyren er beskrevet i detalj under i dette kapitlet.

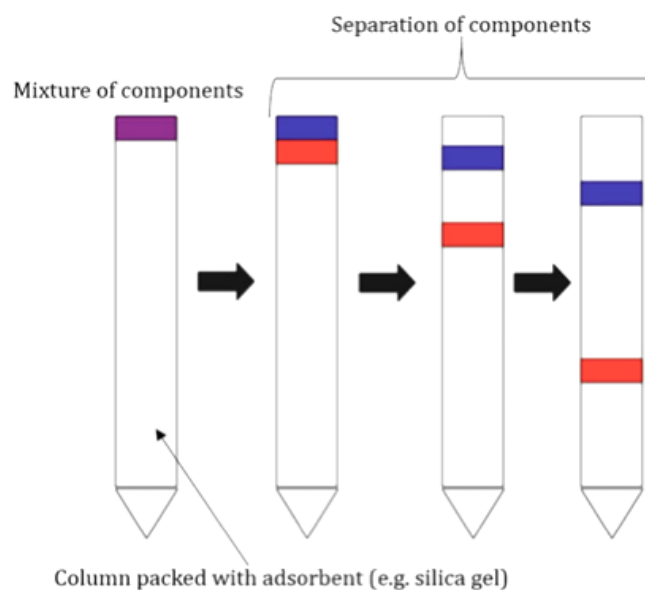
Kromatografi

Kromatografisk separasjonsmetode går ut på at forbindelser separeres ved at en benytter en mobilfase (væske eller gass) for å transportere stoffer over en stasjonærfase (væske eller fast stoff) som ligger i ro. Stasjonærfasen består oftest av faste partikler som er tett pakket i et rør og kalles for en kolonne. Mobilfasen som er den bevegelige fasen, renner gjennom kolonnen

med en bestemt hastighet. Den stasjonære fasen har forskjellig grad av interaksjon med forbindelsene i ekstraktet som skal separeres. Derfor vil forbindelsene bli transportert med forskjellig hastighet gjennom kolonnen og vil kommet ut og bli separert på forskjellig tidspunkt. Altså kromatografiske separasjonsmetoder skiller stoffene fra hverandre ved at stoffene transporteres av mobilfasen med forskjellig hastighet gjennom kolonnen, hvor den stasjonære fasen bremser opp eller retarderer stoffene (10, s. 139-140).

4.2.4.1 Adsorpsjonskolonnekromatografi

Adsorpsjonskromatografi går ut på at den stasjonære fasen består av faste finfordelte partikler, mens den mobile fasen er en væske. Prinsippet bak metoden er at ekstraktet blir applikert på toppen av kolonnen til den stasjonære fasen. De forskjellige forbindelsene i ekstraktet (den mobile fasen) beveger seg gjennom kolonnen avhengig av deres grad av affinitet til adsorpsjonsmiddel (den stasjonære fasen). Forbindelser som har lav adsorpsjon og mindre affinitet til den stasjonære fasen vil bevege seg raskere enn forbindelser med høyere adsorpsjon og mer affinitet til den stasjonære fasen. Dermed vil forbindelse som beveger seg med høyest hastighet elueres først. Med andre ord en god separasjon avhenger av at forbindelsene har forskjellig affinitetsgrad til adsorpsjonsmidlet og at det er en reversibel interaksjon mellom forbindelsene og adsorpsjonsmidlet. Dette er avhengig av forbindelsens egenskaper og egenskapene til den mobile fasen og den stasjonære fasen (10 s. 149, 16 s. 167-168, 17 s. 25).



Figur 13: Bilde viser prinsippet bak adsorpsjonskolonnekromatografi hentet fra boken *Essentials of Pharmaceutical Analysis* (16 s. 168).

Amberlite XAD-7 kolonne

Amberlite XAD-7 er et moderat polart resin, akrylester. Porestørrelse, polaritet og overflatearealet påvirker forbindelses kapasitet til å binde seg til amberlite-polymerene. Amberlite-polymerene kan adsorberer molekyler som har molekylvekt inntil 60000 Da. Altså stoffmolekyl må kunne komme gjennom stasjonærfasens porer til den adsorberte overflaten. Amberlite XAD-7 kolonnen adsorberer effektivt aromatiske forbindelser til kolonnematerialet når vann blir brukt som mobilfase, mens polare alifatiske forbindelser som sukkere og alifatiske organiske syrer blir eluert fra kolonnen. Når mobilfasen deretter endres til metanol, blir også de aromatiske forbindelsene i prøven eluert fra kolonnen. Med andre ord kan amberlite-polymerene brukes for adsorpsjon av polare stoffer fra ikke-vandige løsninger eller for adsorpsjon av polare stoffer fra upolare løsemidler (18).

I dette prosjektet benyttes amberlite XAD-7 kolonnekromatografi for å rense både vannfasen og etylacetatfasen fra væske-væske ekstraksjon. Destillert vann ble først brukt for å eluere polare alifatiske forbindelser som for eksempel monosakkarider, oligosakkarider og polysakkarider og alifatiske organiske syrer. Deretter brukes metanol HPLC kvalitet for å eluere de aromatiske forbindelsene i prøven fra kolonnen.

Kjemikalier

- Destillert vann
- Metanol HPLC-kvalitet

Utstyr

- Amberlite XAD-7 kolonnemateriale pakket i en glasskolonne
- Kolonnestativ med festeklemmer
- Erlenmeyerkolber/begerglass til oppsamling av fraksjoner

Fremgangsmåte



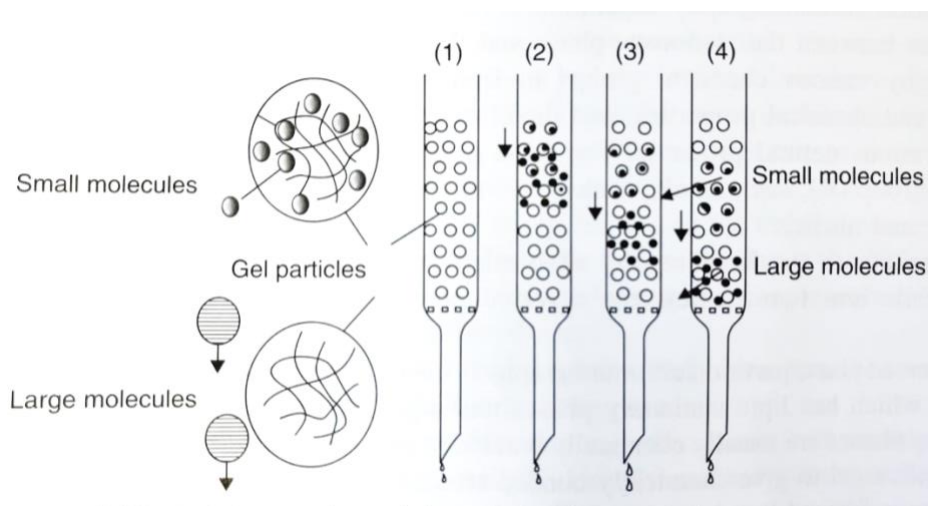
- Vannfasen (a) og etylacetatfasen (b) oppkonsentreres på rotavapor til henholdsvis ca 350 ml.
- Amberlite XAD-7 kolonnen vaskes med to liter destillert vann.
- Væskefronten i amberlite XAD-7 kolonnen senkes ned til kolonnematerialet akkurat har blitt tørt.
- Vannfasen (a) appliseres på kolonnematerialet.
- Væskefronten senkes igjen ned forsiktig til kolonnematerialet har blitt akkurat tørt.
- Kolonnen med applikert fase står i 15 minutter. Dette for at forbindelsene i fasen skal kunne feste seg skikkelig til kolonnematerialet.
- Kolonnen elueres med fem liter destillert vann som mobilfase.
- Fargete fraksjoner som kommer ut ved eluering med destillert vann oppsamles fortløpende.
- De aromatiske forbindelsene i applisert fase elueres fra kolonnen ved å bruke passende mengde av metanol som mobilfase, og fraksjoner blir samlet opp fortløpende.
- Prøver av alle fraksjoner blir deretter analysert på UHPLC
- Til slutt vaskes amberlite XAD-7 kolonne med 0.1M NaOH løsning før kolonnematerialet vaskes med passende mengde metanol og deretter destillert vann

Figur 14: Bilde er tatt av forfatteren selv den 17. september 2021 og viser amberlite XAD-7 kolonnekromatografi.

4.2.4.2 Eksklusjonskromatografi

Eksklusjonskromatografi er en type kromatografi som skiller stoffer etter molekylstørrelse kombinert med adsorpsjon (interaksjon med stasjonærfase) (10 s. 164, 17 s. 80). Materialet som benyttes som stasjonærfase er en ikke-adsorberende porøse pakkematerialet, hvor porene har kontrollerte forskjellige størrelser. Stasjonærfasen trenger først å bli senket ned i en væske for å danne en matriks. Når forbindelsene transporteres gjennom kolonnen, vil forbindelsene med stor molekylstørrelse ha kortere elueringsvei enn små molekyler siden de ikke kommer inn i mange av porene i kolonnematerialet og elueres derfor tidligere enn små

molekyler. Forbindelsene med minst molekylstørrelse vil kunne transporteres inn i også de minste porene og får dermed lengre vandringslengde gjennom kolonnen og blir derfor eluert etter tilsvarende større molekyler. De største molekylene blir dermed i mindre grad retardert enn små molekyler (19 s. 124, 10 s. 164-165).



Figur 15: Bilde viser prinsippet bak eksklusjonskromatografi (19, s. 124).

Sephadex LH-20 kolonne

Sephadex LH-20 gel er en pakkematerialet som ble brukt som den stasjonære fasen i eksklusjonskromatografi. Sephadex LH-20 gelen består av 13-hydroksypropylert Sephadex G-25. Den er kryssbundet for å gi et tredimensjonalt nettverk av polysakkarid. Denne type gel kan gi en god kromatografisk selektivitet fordi den har både hydrofile og lipofile egenskaper. Denne kromatografigelen er spesielt god for separering av naturprodukter som flavonoider, kromener, alkaloider, kumariner, lipider, steroider, terpenoider og lavmolekylære peptider, og har høy selektivitet for aromatiske forbindelser. Sephadex LH-20 kan benyttes for blandinger av vann og organiske løsningsmidler eller organiske løsningsmidler alene, og i pH område 2-10 (17 s. 89, 20). Kolonnematerialet er stabil i mange løsemidler slik at løsemiddelgradienten kan tilpasses til enkelte prøver for å få en god separasjon. Dette kolonnematerialet er godt nok for å separere forbindelser som har lignende struktur, stereoisomerer og naturprodukter som er nært beslektede (21).

Den mobile fasen består av en gradient av forskjellige mengder av superdestillert vann og metanol, hvor TFA mengden er konstant (0.1%). Tabellen under viser gradient med blandingsforholdet av både metanol og superdestillert vann som mobilfase som benyttes

under Sephadex LH-20 eksklusjonskromatografi. Gradienteluering går ut på at mobilfasesammensetningen endres underveis i analysen. I begynnelsen brukes en svak sammensetning med høyt vanninnhold og lavt innhold av organiske løsemidler (metanol) slik at de minst retarderte forbindelsene får god nok tid for å separeres. Videre kan mobilfasesstyrken øke, det vil si at prosentvist innhold av metanol i mobilfasen økes, basert på forbindelsens retensjon underveis og kan økes kontinuerlig slik at alle forbindelsene elueres fra kolonnen (10 s. 173). Ved å bruke gradienteluering kan man kontrollere selektivitet og retensjon til forbindelsene slik at man kan ytterligere forbedre separasjonen av stoffene i prøven som er applikert på kolonnen (22 s. 3 og 143).

Tabell 4. Løsemiddelgradient benyttet ved Sephadex LH-20 kolonnekromatografi. Volum benyttet for hver løsemiddelsammensetning ble spesialtilpasset mobiliteten til stoffene i prøvene som ble separert på Sephadex LH-20 kolonnen og er beskrevet nedenfor

Gradient	Metanol (%)	Superdestillert vann (%)	TFA (%)
1	20	80	0.1
2	50	50	0.1
3	70	30	0.1
4	100	0	0.1

I denne studien brukes Sephadex LH-20 eksklusjonskromatografi for å finseparere forbindelser fra hverandre på bakgrunn av forbindelsenes molekylære egenskaper, molekylstørrelse og polaritet. Sephadex LH-20 kolonnematerialet består av porøse partikler med kontrollerte størrelser på porene og partiklene har en sfærisk form.

Ved Sephadex LH-20 kolonnekromatografi isoleres rene naturstoffer i tillegg til fraksjoner som er rene nok til å kunne bli videre opparbeidet med andre metoder som preparativ HPLC.

Kjemikalier

- Superdestillert vann
- Metanol, HPLC kvalitet
- Trifluoreddiksyre (TFA)

Utstyr

- Glasskolonne pakket med Sephadex LH-20 kolonnematerialet
- Kolonnestativ med tilhørende klemmer
- Dramsglass (60 ml) til oppsamling av fraksjoner

Fremgangsmåte

- Amberlite XAD-7 fraksjonene som skal videre separeres med Sephadex LH-20 kolonne oppkonsentreres til riktig volum (opptil 20-50 ml) på rotavapor. Fraksjonene som separeres i liten Sephadex LH-20 kolonne oppkonsentreres til 20 ml, mens de som separeres i stor Sephadex LH-20 kolonne oppkonsentreres til 50 ml
- Oppkonsentrert fraksjon appliseres forsiktig langs glasskolonnen med en pipette for at prøven skal jevnt fordeles på kolonnematerialet
- Forbindelsene i prøvene separeres ved å benytte mobilfasegradient bestående av forskjellig blandingsforhold mellom metanol og superdestillert vann, mens TFA mengden er konstant (tabell 4). Volumet som brukes som mobilfasegradient er forskjellig og avhenger av hvordan stoffene har interaksjon med Sephadex LH-20 kolonnematerialet
- Fraksjoner oppsamles i dramsglass (60 mL) fortløpende
- Etter at samtlige forbindelser i prøven er blitt eluert fra kolonnen vaskes Sephadex LH-20 kolonnen med 2-8 L 0.2 NaOH løsning, og deretter med metanol (HPLC-kvalitet) og superdestillert vann blanding i volumforholdet 50:50 før den ekvibreres med mobilfasesammensetning 80:20 (v/v), som normalt er startbetingelsene for kromatograferingen på Sephadex LH-20 kolonnen.
- Prøver av alle fraksjoner blir analysert ved hjelp av UHPLC.

4.2.4.3 Preparativ høytrykksvæskekromatografi (HPLC)

I væskekromatografi kan det være mange forskjellige separasjonsprinsipper som for eksempel normalfasekromatografi, omvendt-fase-kromatografi, absorpsjonskromatografi og eksklusjonskromatografi. I dette prosjektet benyttes omvendt fase kromatografi i HPLC separasjon både i analytisk og preparativ skala. I omvendt fase kromatografi er mobilfasen som regel en vandig løsning som også inneholder organisk løsemiddel og er mer polar enn stasjonærfasen. Som mobilfasen brukes vanligvis en vandig løsning blandet med en organisk

komponent eksempelvis metanol eller acetonitril. Stasjonærfasen er porøse partikler som har hydrofobe funksjonelle grupper på overflaten. Som stasjonær fase brukes ofte en modifisert silika der OH-protonet i silanolgruppene i silika er blitt erstattet med en trialkylsilylgruppe med langkjedede alkylgrupper, substituerte alkylgrupper eller andre hydrokarboner som er bundet til silisium. Når forbindelsene introduseres til kolonnen med mobilfasen, vil stoffene fordele seg mellom stasjonærfasens overflate og mobilfasen. Hydrofobe funksjonelle grupper på overflaten interagerer med forbindelser med upolare interaksjoner. Forbindelser vil interagere med den stasjonære fasen og den mobile fasen i forskjellig grad, og dermed transporteres med forskjellig hastighet gjennom kolonnen. En suksessfull separasjon er da avhengig av egenskapene til forbindelsene, stasjonærfase og mobilfase (10 s. 147-149 og 163, 17 s. 49).

Engelsk navn på HPLC er High Performance Liquid Chromatography og forkortes til HPLC. Høytrykks væskekromatografi brukes mye i isolering av aktive prinsipper i legemidler i farmasøytiske preparater og separasjon og isolering av molekyler i biologisk materiale. Metoden går ut på at den mobile fasen er en væske som blir pumpet gjennom en HPLC-kolonne, som er pakket med stasjonærfase materialet og som retarderer forbindelsene, under høyt trykk. Forbindelsene injiseres via en injektorloop som deretter settes i forbindelse med strømmen av mobilfase fra mobilfasereservoarene til kolonnen. Forbindelsene som separeres og elueres fra den preparative HPLC-kolonnen, detekteres med en detektor som i de fleste tilfeller er en UV-detektor (10 s. 167-168 og 181).

UV-detektoren er en av de viktigste HPLC-detektorene som brukes for prøver i forbindelse med drug discovery, og i produksjon av legemidler. UV-detektorene er selektive for forbindelser som er UV-absorberende ved bølgelengder over 190 nm, og er godt egnet til gradienteluering. Prinsippet bak UV-detektoren er at mobilfasen fra kolonnen gjennomstrømmer en flow-celle som blir bestrålet av UV-stråling med en bestemt bølgelengde. Stråling som blir sluppet gjennom flow-cellen blir detektert av en lysmåler. For å få en god følsomhet på deteksjon blir stoffene detektert ved en bølgelengde som gir maksimalt absorbans for forbindelsene som skal separeres (10 s. 173-174).

Separasjon av forbindelsene skjer ved at den mobile fasen pumpes med konstant hastighet gjennom kolonnen. Væskeshastighet gjennom kolonnen er vanligvis 14 ml/min. Når

mobilfasen pumpes gjennom kolonne, gir pakkematerialet i kolonnen et mottrykk på 30-300 bar. Pumpen som benyttes skal klare å pumpe mobilfase (væskeform) med konstant hastighet mot et høyt trykk. Størrelse og form på partiklene i kolonnen påvirker mottrykket som er viktig for å presse mobilfasen gjennom. Små, runde og like store partikler er best for effektiv separasjon. Vanlig partikkelstørrelse på pakkematerialet i kolonnen er 3-10 μm (10 s. 167 og 170).

Prøven oppløses i en liten mengde av DMSO og blir injisert i HPLC kolonnen via en injektor. Det tilsettes 0.1% trifluoreddiksyre (TFA) til mobilfasen for å surgjøre mobilfasen. TFA er egnet fordi den er flyktig og kan avdampes etterpå for å få rein prøve (19 s. 130-131). Andre løsemidler som brukes til preparativ HPLC bør være flyktige for å få rene prøver og dermed bedre separasjon. For eksempel acetonitril, vann og metanol. HPLC prøvene filtreres gjennom et 0.45 μm membranfilter for å få fjernet partikler som kan tette kolonne eller ventiler.

I denne oppgaven benyttes en metode for isolering ved hjelp av preparativ HPLC som har en varighet på 45 minutter og gradienteluering av løsemidlene A og B, med stigende grad av mobilfase (B) i prosent over tid (se tabellen under). Flow ble satt til 14 ml/min.

Tabell 5. Metode brukt for separasjon ved hjelp av preparativ HPLC

Tid (minutter)	Andel av acetonitril i gradientløsning (%)
0	10
5	12
15	25
25	40
35	40
40	10
45	10

Kjemikalier

- Mobilfasekomponent A: superdestillert vann med 0.1% (v/v) TFA
- Mobilfasekomponent B: acetonitril (HPLC-kvalitet) med 0.1% (v/v) TFA
- Metanol (HPLC-kvalitet) og superdestillert vann i volumforholdet 70:30 for å vaske kolonnen

- Metanol (HPLC-kvalitet) for å vaske ventilinjektor
- DMSO for å løse opp prøven som skal separeres

Utstyr

- Dramsglass i forskjellig størrelse (30-60 mL) for oppsamling av fraksjoner fra preparativ HPLC
- Injeksjonssprøyte for å injisere prøve med
- 1 mL sprøyte med 0.45 µm membranfilter for å filtrere gjennom prøven
- Ultimate 3000 HPLC instrument, Gilson 32 pumpe og Ultimate 3000 detektor med forskjellig bølgelengde
- Preparativ HPLC-kolonne; Supelco Ascentis C18, 25 cm x 21.2 mm med partikkelstørrelse 5 µm

Fremgangsmåte

- Mobilfase (A og B) tillages. Løsning A består av en blanding av superdestillert vann og 0.1% TFA, mens løsning B består av acetonitril (HPLC-kvalitet) tilsatt 0.1% TFA. Til vasking tillages en blanding av superdestillert vann og metanol (HPLC-kvalitet) 70:30 (v/v)
- Mobilfaseløsning (A og B), samt vaskeløsningen blir behandlet med ultralyd før de blir koblet til HPLC-instrumentet for å fjerne oppløst luft fordi det kan gi detektorproblemer.
- Løsning A og B tilkobles HPLC-instrument
- Instrumentet purges først med 100% løsning A i 5 minutter, og så med 100% løsning B i 5 minutter til
- Kolonnen kondisjoneres i 20 minutter med mobilfase i forholdet 90% av løsning A og 10% av løsning B, som er startbetingelsene for HPLC separasjonen.
- Tørket prøvematerialet løses opp i liten mengde DMSO (300-600 µl) og filtreres gjennom 0.45 µm membranfilter for å unngå tetting av kolonnen
- Prøveløsning (100 µl) trekkes opp i injeksjonssprøyte og injiseres i injektor.
- Injektorloop kobles til strømmen av mobilfase fra mobilfasereservoarer til kolonne sånn at prøven transporteres til kolonnen, der all separasjon finner sted.

- Preparativ HPLC separasjon finner deretter sted ved gradienteluering med stigende konsentrasjon av løsning B (figur for løsemiddelgradient) og med konstant flow hastighet for mobilfasen gjennom kolonnen (14 ml/min).
- Fraksjonsoppsamling skjer kontinuerlig på bakgrunn av observerte topper i kromatogrammet detektert ved 280 nm, som utvikles under HPLC-separasjonen. Detektorbølglengden ble satt til 280 nm fordi mange aromatiske forbindelser, inkludert naturstoffene i prøvene som skulle separeres, absorberer ved denne bølglengden, noe som ble bekreftet ved UHPLC-analyse av prøven før separasjon på preparativ HPLC.
- Når separasjonen er ferdig renses kolonnen med vaskeløsning (superdestillert vann og metanol (HPLC-kvalitet) 70:30 (v/v)). Injeksjonsventil renses med ren metanol.
- Oppsamlede fraksjoner analyseres videre på analytisk UHPLC for å sjekke renheten.

4.2.5 Identifikasjonsmetoder

4.2.5.1 Analytisk væskrokromatografi (UHPLC)

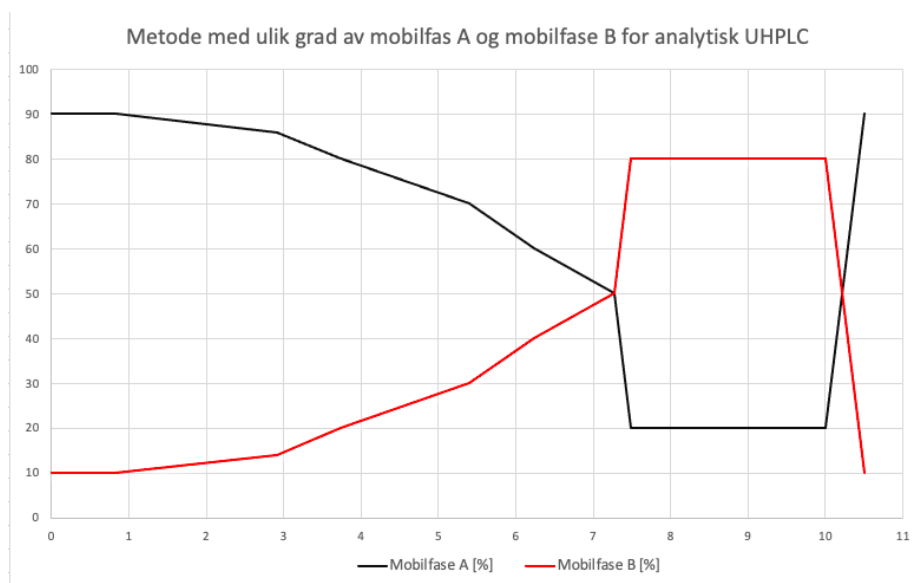
Væskrokromatografi kan benyttes preparativt og analytisk. Ved analytisk UHPLC oppsamles ikke fraksjoner som er klare for videre opparbeidelse, men at det blir tatt ut HPLC prøver av fraksjoner for å analysere om hver enkelt fraksjon består av en eneste forbindelse eller om den inneholder flere forbindelser. Altså analytisk UHPLC brukes etter at fraksjonen har vært gjennom andre separasjonsmetoder på forhånd i håp om at det blir separert rene forbindelser som er klare for identifikasjonstrinnet, og for å identifisere egenskapene til forbindelsene i en fraksjon (23 s. 10). UHPLC benyttes også til å analysere sammensetningen i komplekse prøver som råekstrakter og partisjonerte ekstrakter.

Prinsippet bak analytisk UHPLC er det samme som prinsippet for preparativ væskrokromatografi (se seksjon 4.2.4.3). Ved preparativ HPLC benyttes kolonne som er større enn kolonnen til UHPLC. Den typiske preparativ HPLC-kolonnen er et 25 cm lang med indre diameter 2.3 cm, og med partikler på 5 μm . I analytisk UHPLC brukes korte kolonner som vanligvis er 3-5 cm i lengde og er pakket med 3 μm partikler. UHPLC-kolonnen har en indre diameter på 2.1 mm. Dermed kan korte kolonner gi god separasjon på kortere tid enn lengre kolonner. En kolonne på 3 cm kan ofte kunne separere forbindelsene i prøven på 1-2 minutter (10 s. 171-172). I tillegg til at UHPLC kolonnen bruker kortere tid, bruker den også mindre

mobilfase og dermed reduseres forbruket av løsningsmidler. Dette gjorde at analytisk UHPLC ble brukt i stor grad i dette prosjektet.

HPLC-prøvene som skal analyseres plasseres i autoinjektoren og prøvene injiseres i en rekkefølge som er programmert og etter bestemte tidsintervaller. Prosessen kontrolleres fra dataprogrammet til HPLC-apparatet slik at prøvene analyseres fortløpende og uten tilsyn (10 s.179).

I dette prosjektet ble Agilent Technologies dataprogrammet med tilhørende UHPLC-apparat brukt. Flow ble satt til 0.300 ml/min og maksimalt trykk til 1100 bar ble benyttet som metode for analytisk UHPLC. Figuren nedover viser metode brukt for UHPLC med ulik grad av både mobilfase A og B. For UHPLC ble kromatogrammene tatt ved forskjellig bølgelengde; 215 ± 10 nm, 280 ± 10 nm, 360 ± 10 nm og 520 ± 20 nm.



Figur 16: Metode brukt for analytisk UHPLC.

Kjemikalier

- Løsning A: superdestillert vann med 0.1% TFA
- Løsning B: acetonitril (HPLC-kvalitet) med 0.1% TFA
- Metanol (HPLC-kvalitet) med superdestillert vann (70:30 (v/v)) for å vaske kolonne og apparatet

Utstyr

- Agilent 1290 UHPLC instrument (UHPLC-kolonne: Zorbax Eclipse Plus C18 kolonne, 50 mm x 2.1 mm, 1,8 μm partikkelstørrelse)
- UV-synlig multidiode detektor
- 1 ml plastsprøyte med tilhørende 0.45 μm membranfilter
- Sigma-Aldrich HPLC-glass og tilhørende skrukork
- Glasspipette med pipette smøkk
- Målesylinder og pipette

Fremgangsmåte

- 1 ml av hver fraksjon som skal analyseres filtreres gjennom 0.45 μm membranfilter og blir overført til HPLC-glass ved bruk av plastsprøyte.
- Mobilfase A, mobilfase B og vaskeløsning tillages ved å bruke målesylinder og pipette.
- Både mobilfasene A og B, samt vaskeløsning tilkobles UHPLC-instrumentet.
- Prøvene settes i autosampleren
- Instrumentet purges med 0% B i 5 minutter og så med 100% B i ytterligere 5 minutter. Kolonnen kondisjoneres med startbetingelser (90% A og 10% B) i omtrent 15 minutter til trykket stabiliserer seg.
- Prøvesekvens settes i gang med valgt metode for løsemiddelgradient (figur 16) og detektor koblet til datasystemet registrerer absorbans av alt som til enhver tid går gjennom detektoren, noe som gir opphav til toppene i kromatogrammet til prøvene. Kromatogrammene tas opp basert på absorbansen ved ulike bølgelengdeintervaller; 215 ± 10 nm, 280 ± 10 nm, 360 ± 10 nm og 520 ± 20 nm.
- Kolonnen vaskes med vaskeløsning (metanol-superdestillert vann 70:30 (v/v)) helt på slutten når alle prøvene er ferdig analysert

4.2.5.2 Kjernemagnetisk resonans (NMR)

Kjernemagnetisk resonans (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) fenomenet ble observert i 1946 for første gang av E. M. Purcell og hans forskningsgruppe ved Harvard universitet, og F. Bloch og hans forskningsgruppe ved Stanford universitet uavhengig av hverandre. Dette gjorde at de ble tildelt Nobelprisen i fysikk i 1952 for at de gjorde det mulig å bruke en metode som kartlegger strukturen av ukjente molekyler. NMR er en svært viktig

spektroskopisk metode for å bestemme strukturen til molekyler. Siden NMR spektroskopi har blitt utviklet blir metoden svært mye brukt i organisk kjemi, farmasi, fysikk og medisin (24 s. 62, 25 s. 1).

Kjernemagnetisk resonans (NMR) baserer seg på å undersøke NMR-aktive isotoper, hvor ^1H og ^{13}C kjerner er noen av de mest anvendte innen strukturbestemmelse av små og middels store molekyler, i tillegg til makromolekyler. NMR gir opplysninger om antall magnetiske ulike atomer det er av kjernen som blir analysert, og om deres respektive miljø som disse atomkjernene eksisterer i. Atomkjerner er ladete partikler og atomkjerner som har oddetall masse og/eller oddetall atomnummer har en egenskap som kalles for kjernespin, hvor det medfører at atomkjernen spinner rundt med kvantisert spinnvinkelmoment og magnetisk moment, μ . Ved fravær av et ytre magnetisk felt vil orienteringen til atomkjernespinne være tilfeldig. Når prøven plasseres i et sterkt magnetfelt vil det imidlertid kun være to spinnorienteringer, nemlig med eller mot feltretningen til det pålagte ytre magnetfeltet. I NMR er det kun atomkjerner med oddetall kjernepartikler (protoner + nøytroner) og/eller oddetall atomnummer som blir oppdaget. For eksempel har karbon isotopen ^{12}C et partall kjernepartikler og har derfor ikke spinnegenskaper og kan dermed ikke observeres i NMR. Dermed vil effektiviteten til NMR være avhengig av type isotopkjerner som kan bli observert. Dette gjør også at sensitiviteten til de ulike atomkjerner er ulik og avhenger av den naturlige forekomsten av hver enkelt isotop. Sensiviteten til ulike atomkjerner i NMR avhenger av naturlig forekomst av den aktuelle NMR-aktive kjernen, i tillegg til kjernens magnetogyriske konstant (25 s.1-2, 26 s. 215).

Tilstedeværelse av et magnetisk felt gjør at atomkjernene spinner med eller mot det tilførte magnetisk felt. Det ytre magnetiske feltet gjør at atomkjerner spinner i $2I + 1$ spinntilstander, hvor I betegner spinn når spinnkvantetallet er $1/2$. Atomkjerner med oddetallmassenummer har spinn på $1/2$, eller $3/2$, eller $5/2$, ..., osv. De viktigste atomkjernene i organisk kjemi er ^1H , ^{13}C og ^{15}N , som alle har spinn på $1/2$ og derfor har to spinntilstander $+1/2$ og $-1/2$. Ved at atomkjernen tilføres et ytre magnetfelt, er spinntilstanden $+1/2$ orientert med feltretningen til det tilførte ytre magnetiske feltet og er derfor lav energetisk tilstand. For spinntilstanden $-1/2$ er atomkjernen orientert antiparallell til det tilførte ytre magnetfeltet og har derfor høyere energetisk tilstand. Atomkjernen vil rotere rundt sin egen akse med sin frekvens kalt Larmor frekvens, ω . Larmor frekvensen er direkte proporsjonel med styrken til det påførte ytre magnetfeltet (24 s. 62, 26 s. 215-223).

Kjernemagnetisk resonans skjer når atomkjerner med kjernespin som er parallelt med det påførte ytre magnetfelt absorberer elektromagnetisk stråling i form av radiobølger og dermed endrer orientering av deres spinnstilling til å være mot feltretningen til det ytre påførte magnetfeltet. For at absorpsjon av energi skal kunne skje så må den tilførte energien være lik energiforskjellen mellom begge spinnstillingene som er involvert. I tillegg må frekvensen til den elektromagnetiske stråling være lik Larmor frekvensen. Energiforskjellen er en funksjon av styrken til påført magnetisk felt, B_0 , og kan formuleres som følgende (25 s. 7, 26 s. 217-220);

$$\Delta E = f(B_0)$$

hvor ΔE er energiforskjellen mellom nivåene og er unik for hver type nuklide fordi hver nuklide har forskjellig masse og kjerneladning, og har derfor forskjellig forhold mellom magnetisk moment og vinkelmoment. Dette forholdet kalles for magnetogyrisk ratio, γ , og er en konstant for hver type nuklide. Magnetogyrisk ratio kan bli benyttet for å vurdere hvordan forandringer i det tilførte magnetiske feltet vil påvirke forskjellen mellom energinivåene. Dette forholdet kan også benyttes for å finne ut frekvensen til radiopuls, ν , som trengs for å få til «flipping» av spinn for den nukliden som skal undersøkes. Denne frekvensen kan formuleres som følgende (25 s. 7, 26 s. 217-220);

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$

Ettersom frekvensen vil medføre orientering av spinnretning til kjernen, noe som skjer fordi kjernen har en ladning, vil den ladete kjernen danne et oscillerende elektrisk felt. Dette vil kunne skje bare hvis radiofrekvensen har samme frekvens som det oscillerende elektriske feltet. Videre kan dette forklares som at atomkjernen er i resonans med det påførte elektromagnetiske feltet (25 s. 7, 26 s. 217-220).

Observasjon av signalene i NMR skjer når det er forskjellige populasjoner med forskjellig energinivå. Når det tilføres et ytre magnetisk felt, så vil det være et overskudd av atomkjerner i det laveste energinivået som er det mest stabile. Det lille overskuddet av kjernen gjør det mulig å observere resonans. Derfor er et lite overskudd av kjerner i lavere spinnstilling viktig i NMR-spektroskopi. Når forskjellen mellom energinivåene mellom de to populasjonene som

er involvert øker, øker overskuddet noe, og dette skjer når det ytre magnetisk feltet øker. Derfor lages nye og moderne NMR-instrumenter med noe høyere styrke av magnetisk felt enn gamle instrumenter. Dette øker sensitiviteten til instrumentet, også signalresonans øker fordi flere kjerner kan transmitteres ved høyere frekvens (26 s. 221).

NMR-instrumentets hovedkomponenter er en magnet, prøveholder, prøve, transmitter og mottaker, og en datamaskin. Prøven blir plassert i senter av magneten i prøveholder og blir utsatt for en puls med magnetisk stråling. Pulsen eksiterer kjernene slik at de skifter orientering. Når pulsen stopper, går alle kjernene tilbake til sin faktiske orientering og det avgis stråling med forskjellig frekvens fordi ett molekyl består av forskjellige kjerner. Dette er noe som kalles for fritt induksjonsforfall (Free Induction Decay, FID). Intensiteten går ned med tiden når alle kjernene går tilbake til sin opprinnelige posisjon. FID blir bearbeidet av datamaskin og som benytter en matematisk operasjon som kalles for Fouriertransformasjon (Fourier transform, FT). FT gir et spekter av frekvens fra FID til de forskjellige atomkjernene i prøven. Spekteret inneholder topper fra tilfeldig støy og reelle signaler fra kjernene i prøven. For å minske støy og øke signalstyrken til kjernene, sendes nye puls til prøven slik at nye signal styrker tidligere signaler. Dette gjør at signalene til kjernene i prøven forsterkes og støyet vil kanselleres ved å ta flere FID for en analyseprøve. Hvor mange ganger FID skal man kjøre på en prøve er avhengig av styrken på magneten og stoffkonsentrasjon i prøven. Flere FID scans kreves ofte for å få et NMR-spekter av god kvalitet siden signalene, som er reelle, akkumuleres og øker i styrke, mens støy, som er tilfeldig, kanselleres. Dermed får vi et bedre signal til støyforhold i NMR-spekteret ved akkumulering av flere scans (25 s. 15 og 18-21, 26 s.226-227, 27).

Ettersom det finnes NMR-spektrometre med magneter med forskjellig feltstyrke, vil atomkjerner resonere ved forskjellige absolutte frekvenser i Hz. Derfor brukes for standardisering og sammenlignbarhet en enhetsløs kjemisk skift skala der enheten til skalaen er ppm istedenfor en frekvensskala. Kjemisk skift skala er ikke avhengig av det ytre magnetiske feltet. Atomkjerner vil dermed få samme kjemiske skiftverdi selv om det er ulike magneter som brukes. Det kjemiske skiftet rapporteres i delta (δ) (parts per million, ppm). Vanligvis kalibreres spekteret mot enten signalet til TMS, som utgjør nullpunktet i ppm skalaen, eller til frekvensen av restløsemiddelsignalet relativt til TMS (25 s. 24-25, 26 s. 222-224). I denne oppgaven løses prøvene i heksadeuterert dimetylsulfoksid (DMSO- D_6), hvor henholdsvis signalene til restløsemiddelet (DMSO- D_5H) og løsemiddelsignalet (DMSO- D_6)

brukes som kalibreringsreferanse for å kalibrere henholdsvis ^1H og ^{13}C NMR-spektrene. DMSO- D_6 regnes som det nærmeste vi kommer et universalløsemiddel for organiske molekyler i NMR-spektroskopi.

NMR-spektroskopi er en god måte for å bestemme strukturen til forbindelser fordi atomkjerner av samme type i et molekyl, for eksempel ^1H , nødvendigvis ikke observeres ved samme kjemiske skift. Dette fordi atomkjernene i et molekyl har forskjellig omgivelse og er omgitt av elektroner. Da vil atomkjernene eksistere i forskjellig elektromagnetisk miljø. Dermed vil kjerner i et molekyl ha resonans ved en gitt frekvens avhengig av omgivelsene som omgir dem som blant annet andre kjerner og funksjonelle grupper. Kjerner blir skjermet av elektroner som omgir dem, og vil derfor ha forskjellig «shielding» avhengig av det ytre magnetiske feltet, elektrontetthet som omgir dem og andre faktorer (26 s.222). Dersom en kerne er observert nær et elektronegativt element i molekylet, vil det elektronegative elementet tiltrekke elektroner og elektrontettheten vil da bli redusert rundt atomkjerner vi observerer, og dermed vil kjemisk skift øke for denne atomkjernen på grunn av den lavere elektrontettheten rundt atomkjernen. Denne effekten er sterkere dersom det er flere elektronegative substituenten og vil minske med avstand som er mer enn eller lik tre karbon-karbon bindinger (26 s. 234). Hybridisering av C-atomer har også betydning for kjemiske skift. For eksempel vil hydrogenatomer som sitter på sp^3 -karbon ha lavere kjemisk skift enn hydrogenatomer som sitter på sp^2 -karbon. Dette er på grunn av at elektrontettheten rundt protonkjernen blir mindre med økende grad av s-karakter for karbonatomet. Hydrogenatomer som sitter på sp^3 -karbon og som er koblet til et heteroatom ($-\text{O}-\text{CH}_2-$, og så videre) eller til et umettet karbon ($-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-$) faller ikke i den region, men vil ha høyere kjemisk skift (26 s. 236). Magnetisk anisotropi er en annen egenskap som forekommer i molekyler som har et umettet-system med π elektroner som for eksempel benzen og andre aromatiske systemer og forbindelser med multiple bindinger som dobbeltbindinger og trippelbindinger. For aromatiske ringer får vi økt deshielding for H-atomene som ligger i periferien av ringen. Dersom hydrogenene hadde vært i midten av ringen så ville de ha hatt økning i shielding. Geometrien av det magnetiske anisotropiske feltet avhenger av hvor gruppene og elektronene er plassert (26 s.238-240).

Hovedparametere som benyttes for å tolke NMR-spekter er det kjemisk skiftet, integraler, spinn-spinn splitting og koblingskonstantene. Det kjemiske skiftet ble tidligere i dette avsnittet omtalt om og skal derfor ikke forklares nærmere.

I 1D ^1H NMR-spekteret er arealene til hvert signal proporsjonalt med antall hydrogenatomer som gir opphav til dette signalet. NMR-spektroskopi gir oss derved mulighet til å integrere området under signalet. Forholdet mellom integralene vil fortelle om relativt antall hydrogenatomer i molekylet og hvor mange hydrogenatomer hvert signal tilsvarer (26 s.231-232).

Spinn-spinn splitting forteller at hver protonkjerne som blir observert vil kunne «føle» antallet hydrogenatomer som er tilknyttet nabokarbonatomene til det karbonatomet hydrogenet sitter på. Dette medfører at resonanstopper til denne kjernen vil splittes i antall linjer som kan regnes ut ved å benytte (n+1)- regelen, hvis koblingskonstantene til de andre atomene er like store. (n+1)- regelen forteller at antall topper vil være én mer enn antall hydrogenatomer på nabo karbonatomene. For eksempel så vil det være en triplett (tre linjer) hvis kjernen har to hydrogenatomer på nabokarbonatomet, og så videre (26 s.241).

Koblingskonstanten, J, er et mål på hvor sterkt en kjerne påvirkes av naboens spinntilstander. Koblingskonstanten er uavhengig av magnetisk felt og oppgis i Hertz (Hz). J brukes for å måle avstanden mellom multipllett toppene, noe som hjelper til i analyse av NMR-spekter og for å avgjøre hvilke protoner som er nær hverandre ettersom en splitting vil ha samme J hvis signalene kobler med hverandre. Koblingskonstanten er avhengig av elektronfordelingen rundt de to kjernene som er koblet med hverandre. J blir mindre når det er flere bindinger mellom hydrogenatomene. Ettersom J varierer avhengig av elektronfordeling, substituent, atomhybridisering og så videre, brukes J verdiene som en slags referanse for å vurdere og forklare hvorfor koblingene får disse verdiene (25 s. 85-86, 26 s. 248-251, 27).

I denne oppgaven benyttes endimensjonale (1D) og todimensjonale (2D) NMR-eksperimenter i analyse av forbindelsene som blir isolert fra spansk kjørvel. De neste avsnittene skal beskrive eksperimentene som brukes i strukturbestemmelse av de isolerte naturstoffene. Endimensjonale eksperimenter informerer om de forskjellige kjemisk skiftverdiene for atomkjerner, samt benyttes til integrering og til bestemmelse av koblingskonstanter for ^1H . Todimensjonale eksperimenter derimot brukes til å bestemme molekylstrukturene til de isolerte stoffene, i tillegg til å oppnå fullstendig anordning av ^1H og ^{13}C signalene i NMR-spektrene, siden signaler som overlapper med hverandre i 1D NMR-spekter ofte er separert i 2D NMR-spekter.

4.2.5.2.1 1D ^1H NMR og 1D ^{13}C NMR (CAPT (Compensated Attached Proton Test))

1D ^1H NMR

Målet med 1D ^1H NMR eksperimentet er å gi informasjon om de ulike ^1H typene i spekteret, samt kartlegge deres kjemiske skiftverdier, spinn-spinn koblingskonstanter og integraler (27 s. 44). Man vet hvilke type proton det er og hvor mange er det av hver type. Dette eksperimentet gir signaler hvor arealet til hvert signal er proporsjonale med antallet protoner som er opphav til signalet. Dermed kan arealet til hvert signal bestemmes ved integrasjon slik at vi på denne måten kan vite antallet hydrogenatomer som gir opphav til signalet (26 s. 231-232). I tillegg vil dette eksperimentet gi informasjon om hvilke atomer som kobler med hverandre. Dette følger spinn-spinn splittings fenomenet, som er tidligere nevnt, og man får bestemt koblingskonstantene.

1D ^{13}C NMR (CAPT (Compensated Attached Proton Test))

Målet med 1D ^{13}C CAPT NMR eksperimentet er å ta opp karbonspekter med broad-band decoupling av CH-koblinger for å gjøre spekteret enklere, og gi informasjon om de kjemiske skift verdiene til C-atomene i molekylet (27 s. 49). 1D ^{13}C CAPT (compensated attached proton test) spekteret gir også informasjon om antallet H-atomer som er koblet til hvert karbonatom ved at karbonatomer med partall hydrogensubstituenten (C_q og CH_2) peker oppover, mens signaler med oddetall hydrogensubstituenten (CH og CH_3) peker nedover (25 s.206-207).

De kjemiske skiftverdiene for hydrogenatomene (^1H) observeres vanligvis i området 0-14 ppm, mens for karbonatomer (^{13}C) observeres de kjemiske skiftverdiene ofte i området 0-220 ppm (26 s. 291). Både 1D ^1H spekteret og 1D ^{13}C spekteret kan enkelt kalibreres nøyaktig, der de bestemt kalibreringsverdiene (i Hz) deretter kan benyttes til kalibrering av todimensjonale NMR-spektre med hydrogen- og karbon-dimensjoner. Restløsemiddelsignalet DMSO- D_5H som observeres i 1D ^1H NMR-spektrene kalibreres til 2.49 ppm, mens løsemiddelsignalet for DMSO- D_6 kalibreres til 39.6 ppm i 1D ^{13}C NMR-spektrene.

4.2.5.2.2 2D ^1H - ^1H Correlation spectroscopy (COSY)

COSY spektrum er et todimensjonal NMR-spekter, hvor frekvensene (kjemisk skift) til proton er plottet langs begge aksene og er korrelert til hverandre. COSY spektrum er et kvadratisk

symmetrisk spekter som har diagonaltopper og krysstopper. Diagonaltopper er toppene langs diagonalen og er de samme signalene som i 1D ^1H NMR spekteret. Krysstopperne er toppene som er symmetrisk om diagonalen. Krysstopperne viser hvilke protoner som korrelerer med hverandre gjennom skalarkoblinger. Disse krysstopperne viser to koordinater som viser kjemisk skiftene til begge protonene som korrelerer med hverandre. I et slikt spekter er det mulig å anordne protoner som kobler med hverandre i et spinnsystem (24 s. 131-133, 25 s. 263-265).

4.2.5.2.3 2D ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Signal Quantum Coherence)

^1H - ^{13}C HSQC spektrum er et 2D spekter som viser korrelasjon mellom hydrogenatomer og karbonatomer som er direkte tilknyttet til hverandre. Kjemisk skiftverdier for ^1H er plottet langs horisontale akse, mens kjemisk skiftverdier for ^{13}C er plottet langs vertikale akse. Krysstopperne i spekteret viser korrelasjon mellom protonatomet som er koblet til tilhørende karbonatomet (19 s. 161). HSQC eksperimentet benytter direkte observasjon av den sensitive atomkjernen (^1H -atomet) til å styrke signalene til den lite sensitive atomkjernen som er av interesse (29 s. 226). Det som er spesielt med dette eksperimentet er at det er mulig å utføre eksperimentet selv når det er lite prøve på relativt kort tid (25 s. 271). Eksperimentet er svært nyttig for anordning av ^1H og ^{13}C signaler, siden flere signaler som overlapper i 1D NMR-spektrene er godt separerte i 2D ^1H - ^{13}C HSQC spekteret.

4.2.5.2.4 2D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY ((Heteronuclear Signal Quantum Coherence- Total Correlation Spectroscopy)

2D HSQC-TOCSY ble utført som beskrevet i Fossen *et al.* (2007) (75). I dette eksperimentet observerer vi krysstopper fra det kjemiske skiftet til et hydrogenatom i et spinnsystem og til samtlige ^1H og ^{13}C kjemiske skift for hele spinnsystemet. Spesielt nyttige er unike kjemiske skiftverdier i spinnsystem, det vil si et proton kjemisk skiftverdi som ikke overlapper med noen andre kjemiske skiftverdier i NMR-spekteret (75).

4.2.5.2.5 1D selektiv ^1H TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)

1D selektiv TOCSY ble utført som beskrevet i Fossen *et al.* (2000) (76). I dette selektive TOCSY-eksperimentet får vi 1D ^1H NMR-spektre av kun ett bestemt spinnsystem, som for eksempel hydrogenatomene i en og samme sukkerenhet. Eksperimentet er spesielt nyttig for å

kunne bestemme ^1H - ^1H koblingskonstanter for identifikasjon av sukkere i naturprodukter med flere sukkerenheter som har mange overlappende signaler i det vanlige 1D ^1H NMR-spekteret. En forutsetning for å lykkes med 1D selektiv TOCSY eksperimentet er at det finnes en unik kjemisk skiftverdi for ett av hydrogenatomene i spinnsystemet som ikke overlapper med noen andre kjemiske skiftverdier i NMR-spekteret (76).

4.2.5.2.6 2D ^1H - ^1H ROSEY (Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy)

ROSEY eksperimentet er også kalt for CAMELSPIN eksperimentet (30), hvor overføring av magnetisering skjer via dipol-dipol interaksjon istedenfor overføring via skalarkobling som er det vanlig for andre 2D eksperimenter. ROSEY eksperimentet viser korrelasjon mellom hydrogenatomer som er nær hverandre i rom, men som kan være lokalisert langt fra hverandre i antall bindinger. Diagonale topper og ROE krysstopper i ROSEY-spekteret har alltid motsatt fortegn fordi de ikke blir påvirket av korrelasjonstid, mens exchange-topper mellom analoge signaler av to former som er i likevekt med hverandre som følge av kjemisk eller konformasjonell likevekt har samme fortegne som diagonalen i ROESY-spekteret. ROSEY eksperimentet har ingen begrensninger med hensyn til molekylstørrelsen til forbindelsene som analyseres (25 s. 284-288). Dette eksperimentet har god sensitivitet og er spesielt nyttig i strukturoppklaring av molekyler som inngår i kjemisk eller konformasjonell likevekt (31).

4.2.5.2.7 2D ^1H - ^{13}C HMBC (Heteronuclear Single-Quantum Coherence)

I HMBC eksperimentet er det mulig å observere korrelasjon mellom proton og karbon som er adskilt av to-tre bindinger. I noen tilfeller kan dette eksperimentet vise koblinger i konjugerte systemer gjennom fire-fem bindinger. Direkte enbindingskoblinger er undertrykket i dette eksperimentet, men kan i en del tilfeller likevel observeres som dubletter der senteret til dubletten er lik protonfrekvensen til krysstoppen. Intensitet til flerbindingskrysstopperne er avhengig av koblingskonstantene (32). HMBC eksperimentet er svært brukbart eksperiment til å oppnå fullstendig oppklaring av tilknytningspunktet mellom ulike strukturelle enheter i molekyler, som for eksempel sukkerenheter, aglykon og syregrupper, samt anordning av C_q (kvarternære karbon) i naturstoffer og fullstendig anordning av ^{13}C signaler i organiske molekyler (25 s. 370).

4.2.5.2.8 2D ^1H - ^{13}C H2BC (Heteronuclear 2-Bond Correlation)

H2BC eksperimentet er et HSQC-type eksperiment som viser korrelasjoner mellom to bindinger. Denne metoden skiller seg fra HMBC eksperiment ved at H2BC kun viser signal for protonerte karbon gjennom tobindingskorrelasjon. $^2\text{J}_{\text{CH}}$ korrelasjoner er av og til svake i HMBC-spekteret. I tillegg kan det i et HMBC-spekter i noen tilfeller være utfordrende å skille mellom krysstopper som er resultat av $^2\text{J}_{\text{CH}}$ og hvilke krysstopper som er resultat av $^3\text{J}_{\text{CH}}$. Dermed er den bred-spektra koherens overføring uavhengig av de forskjellige koblingskonstantene for proton og karbon, og H2BC eksperimentet tar kun hensyn til J_{HH} . Det er en fordel å kombinere H2BC-spekter og HSQC-spekter fordi da denne kombinasjon gir en korrelasjonsoversikt over to- og tre-bindingsskorrelasjoner i molekylet som strukturbestemmes (33). H2BC er spesielt nyttig for strukturbestemmelse av molekyler med en eller flere alifatiske grupper, og da spesielt sukkerenheter, ettersom det muliggjør å få en fullstendig anordning av proton- og karbon kjemiske skiftverdier for de ulike sukkerenhetene (34). Ettersom H2BC eksperimentet er type av HSQC-eksperiment, vil det ikke være mulig å observere kvarternære karbonatomer (C_q), og kun tobindingskorrelasjoner mellom proton og nabokarbonatomer vil forekomme i H2BC-spekteret.

4.2.5.2.9 2D ^1H - ^{13}C 1,1-ADEQUATE (Abundance Double-QUAntum Transfer Experiment)

2D ^1H - ^{13}C 1,1-ADEQUATE eksperimentet detekterer karbon-karbon bindinger ved å benytte seg av observert proton. Dette eksperimentet er basert på en $^1\text{J}_{\text{CH}}$ magnetiseringsoverføring, samt at $^1\text{J}_{\text{CC}}$ koblingsvei utvikles underveis. Dette resulterer i en multiplett forenkling, hvor det fremkommer av en homonukleær dekoblingsteknikk av det observerte protonet (35). Siden dette eksperimentet baserer seg på observasjon av protoner for å visualisere koblinger mellom karbonmolekyler, vil det være mulig å benyttes på analyseprøver som har relativt lave konsentrasjoner, selv om eksperimentet er vesentlig mindre sensitivt enn HMBC og H2BC. Dette er av stor betydning spesielt siden ^{13}C kjernen har lav naturlig forekomst sammenlignet med ^1H kjernen. 2D ^1H - ^{13}C 1,1-ADEQUATE eksperimentet er også svært nyttig når det kombineres med HMBC og HSQC da denne kombinasjonen vil kunne gi en fullstendig strukturbestemmelse av organiske forbindelser. Koblinger mellom to C_q er umulig å oppdage (bortsett fra i det svært insensitive 2D ^{13}C - ^{13}C INADEQUATE eksperimentet), men mulig å oppdage et C_q som er tilkoblet til en $-\text{CH}_n$ -del (28 s. 585 og 593).

Kjemikalier

- Deuterert DMSO-D₆ (99.96% D), 0.75 mL per ampulle
- Metanol (HPLC-kvalitet)

Utstyr

- NMR rør (55 mm) med lokk
- Glasspipette og smokk
- Dramsglass, 10 mL
- Bruker Biospin 850 MHz NMR-instrument utstyrt med cryomagnet og en ¹H-¹³C-¹⁵N trippelresonans kryoprobe.

Fremgangsmåte

- Prøven som skal analyseres inndampes til tørrhet på rotavapor.
- Prøven løses opp med 1-2 mL metanol og overføres til dramsglass. Prøven tørkes under N₂-gass til det er helt tørt.
- Prøven plasseres i eksikator i minst to døgn.
- Prøven løses deretter opp med en ampulle deuterert DMSO-D₆ og overføres til et NMR-rør ved å bruke glasspipette og pipettesmokk før den analyseres i NMR-instrumentet.

4.2.5.3 Massespektrometri (MS)

Massespektrometri er en analytisk metode som spiller en viktig rolle i oppdagelse av nye naturstoffer som kan benyttes som legemidler (10). Denne metoden brukes sammen med andre metoder, blant annet NMR, for å bestemme strukturen til organiske forbindelser. Metoden måler molekylmassen til forbindelsene som analyseres ved å omdanne dem til ioner med ladning (19 s. 165). Elektronsprayionisering (ESI) er en av de viktigste ioniseringsteknikkene innen massespektrometri, hvor ioniseringen foregår under atmosfærisk trykk. Når ESI brukes, føres analyseprøven inn i massespektrometeret i en væskestrøm, hvor væsken som er flyktig passerer gjennom et trangt kapillærrør. Videre forstøves væsken ved å benytte nitrogen for å danne aerosol som er sammensatt av små dråper. Ved utgangen til kapillærrøret finnes det en sylindrisk elektrode, og et potensial imellom. Potensialet fører til at de små dråpene får elektrisk ladning, og væsken vil fordampe. Analyttmolekylene beholder ladningen sin og dyttes inn i masseanalysatoren av elektrisk spenning (10 s. 257-258).

Massespektrometri kan benyttes i kombinasjon med væskekromatografi (LC-MS) for å separere forbindelsene ved at de passerer gjennom en kromatografisk kolonne før de hver for seg elueres fra kolonnen og deretter introduseres inn i massespektrometeret og ioniseres. Massespektrometeret benyttes i hele separasjonstiden som en avansert detektor (10 s. 264).

Massespekteret hvor resultatene fra massespektrometri fremstilles viser ioner som en funksjon av masse/ladning (m/z). Resultatene vises i et stolpediagram hvor intensiteten er plottet i y-aksen, mens m/z er plottet i x-aksen. Massespektrere spiller en viktig rolle i identifisering av organiske forbindelser fordi hver enkelt forbindelse har eget massespekter. Høyoppløselig massespektrometri gir oss både molekylvekten og atomsammensetningen til forbindelsene som analyseres og er derfor svært viktig i strukturoppklaring av nye naturstoffer (10 s. 241). I dette mastergradsprosjektet ble det kun benyttet høyoppløselig massespektrometri (HRMS) og kombinasjonen LC-HRMS.

5. Resultater – Eksperimentelt arbeid

5.1 Plantematerialet

Det ble høstet både stengel og blad (overjordisk del) av planten spansk kjørvel av Heidi Lie Andersen fra lokaliteter i nærheten av Fana folkehøyskole i Bergen sommeren 2021. Høstet plantematerialet ble oppbevart i fryseren frem til masterprosjektet begynte august 2021. Total mengde av plantematerialet som ble brukt i dette prosjektet er 2.4 kg. Prosjektet begynte med å kutte plantematerialet i relativt små biter før ekstraksjon med metanol begynte.

5.2 Fast stoff-væske ekstraksjon

Oppkuttet plantematerialet ble overført til 5 L begerglass og ekstrahert med metanol (HPLC-kvalitet), som beskrevet under 4.2.1. Begerglass ble tildekket med parafilm og plantematerialet ble i første omgang ekstrahert i 2 døgn. Ekstraktet ble videre filtrert gjennom glassull i glasstrakt og oppsamlet i en passende erlenmeyerkolbe. Deretter ble plantematerialet igjen ekstrahert med ny metanol, og ny ekstraksjonsrunde gikk i ytterligere 4 døgn. 10 L metanol av HPLC-kvalitet ble totalt brukt i begge ekstraksjonsrundene. Råekstraktet fra begge ekstraksjonsrundene ble kombinert og oppbevart i kjøleskapet for videre arbeid. Etter ekstraksjon hadde plantematerialet mistet sin grønne fargen og ble mer grålig, mens ekstraktet

hadde en veldig mørk grønn farge. Plantematerialet ble lagt i avtrekksskap for tørking før det ble kastet.

Det ble bestemt at plantematerialet skulle ekstraheres med metanol fordi metanol har en polar del (OH gruppe) og en upolar del (metylgruppe), noe som betyr at metanol vil ekstrahere både polare og upolare forbindelser fra plantematerialet.



Figur 17: Filtrert metanolekstrakt etter første ekstraksjonsrunde, samt ny ekstraksjonsrunde av plantematerialet med ny metanol (HPLC-kvalitet).

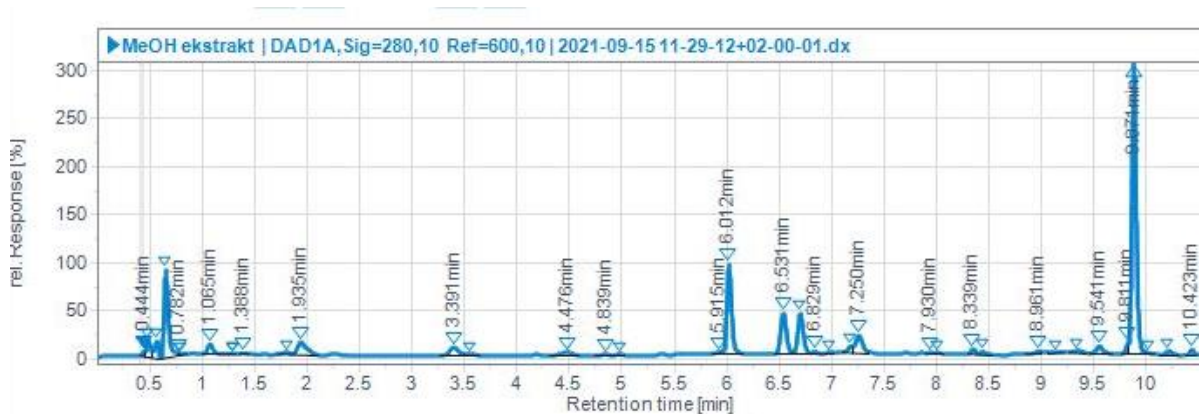
5.3 Oppkonsentrering med rotavapor

Det metanoliske råekstraktet ble oppkonsentrert under vakuum på rotavapor til et vandig konsentrert råekstrakt med volum på omtrent 650 mL, som forklart under seksjon 4.2.2. Det konsentrerte råekstraktet ble dekket med parafilm og oppbevart i kjøleskapet inntil neste opparbeidelse. Vanninnholdet i ekstraktet kommer fra det ferske plantematerialet.

5.4 Analytisk UHPLC

Det ble tatt ut en HPLC-prøve av råekstraktet til analyse på analytisk UHPLC instrumentet allerede før oppkonsentrering. Det er for å ha et kromatogram som viser alt av innhold av forbindelser i plantematerialet. Ekstraktet ble filtrert over et HPLC prøveglass gjennom et sprøytefilter som har 0.45 μm porestørrelse. Det er for å sikre at prøven er tom for partikler som kan være skadelig for HPLC systemet. Analyse av råekstraktprøven ble gjort som

forklart i seksjon 4.2.5.1. Råekstraktet ble analysert ved 215 ± 10 nm, 280 ± 10 nm, 360 ± 10 nm og 520 ± 20 nm. Metoden som ble brukt for å undersøke det metanoliske råekstraktet på Agilent 1260 analytisk UHPLC instrument er vist i seksjon 4.2.5.1. Kromatogrammet av det metanoliske råekstraktet viser at plantematerialet inneholder forskjellige typer UV-absorberende stoffer med ulik retensjonstid.

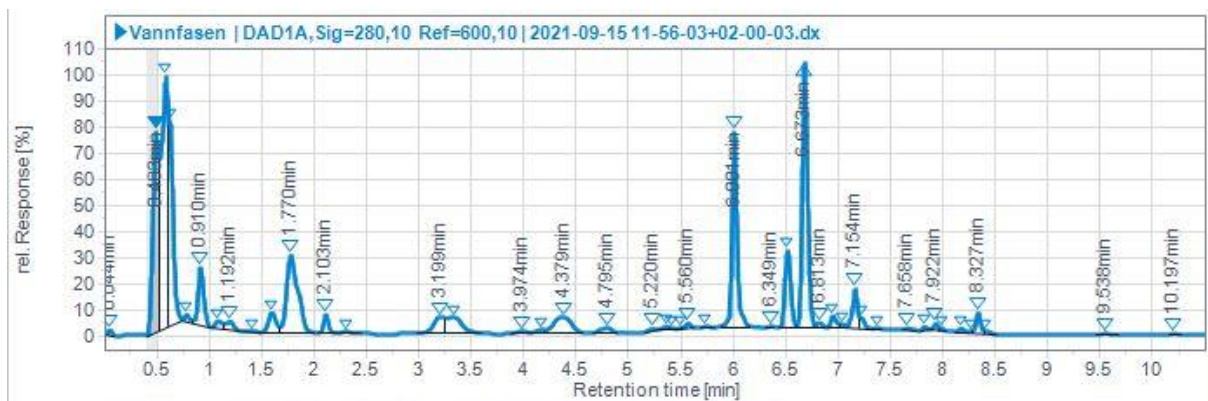


Figur 18: UHPLC-kromatogram av metanolisk råekstraktet detektert ved 280 ± 10 nm.

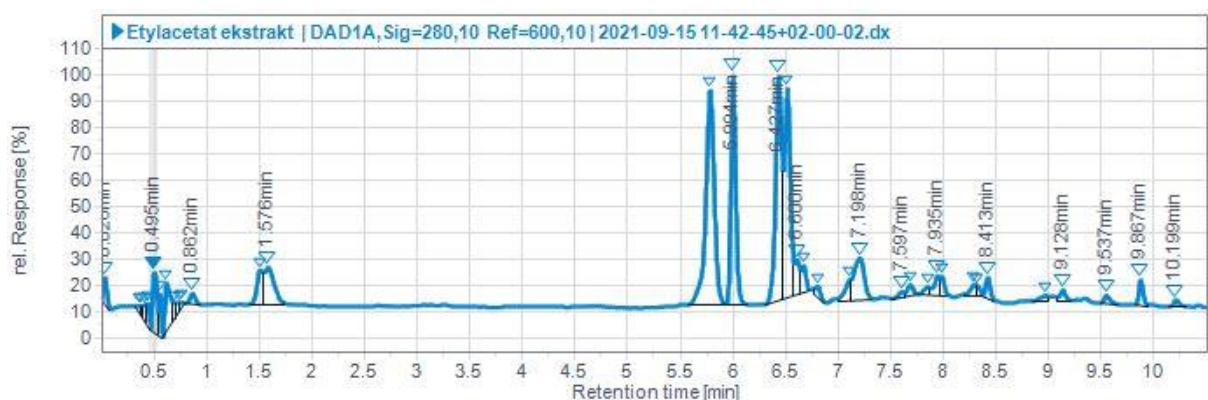
5.5 Væske-væske ekstraksjon

Det vandige oppkonsentrerte råekstraktet ble ekstrahert to ganger med petroleumseter (a) og deretter to ganger med etylacetat (b) ifølge prosedyren beskrevet i seksjon 4.2.3. De to forskjellige løsningsmidler har forskjellig polaritet og vil dermed skille ut stoffer med ulik grad av polaritet. Hele det oppkonsentrerte ekstraktet ble filtrert gjennom glassull i trakt og overført til en skilletrakt med et volum på 2 L. Det vandige råekstraktet hadde et volum på 650 mL. For ekstraksjon med både løsningsmiddel (a) og (b) ble det tilsatt samme volum av det organiske løsemiddelet som det var av det vandige råekstraktet, altså i omtrent 50/50 v/v forhold mellom de forskjellige fasene. Detaljert beskrivelse av fremgangsmåte for væske-væske ekstraksjon er beskrevet i seksjon 4.2.3. Når prosessen var ferdig, satt man dermed igjen med tre forskjellige faser; petroleumseterfase, etylacetatfase og vannfase. Etter ekstraksjon med petroleumseter hadde petroleumseterfasen fått noe svakt gul farge, noe som tyder på at det er svært få aromatiske forbindelser i råekstraktet som er løselige i petroleumseter. Etter ekstraksjon med etylacetat hadde både etylacetatfase og vannfase fått sterk farge. Dette betyr at de fleste forbindelsene er mye mer løselige i det vandige ekstraktet.

Petroleumseterfasen ble ikke med i videre opparbeidelse i dette prosjektet, og har dermed blitt stående til avdamping i romtemperatur i avtrekksskapet. Etylacetatfasen og vannfasen ble konsentrert opp på rotavapor for videre opparbeidelse på Amberlite XAD-7 kolonnekromatografi. Oppkonsentrering ble utført etter prosedyren beskrevet i seksjon 4.2.2. Etylacetatfasen og vannfasen ble oppkonsentrert til ca. 350 mL. Begge fasene ble dekket med parafilm og oppbevart i kjøleskapet til neste steg. Det ble tatt ut en prøve av både etylacetatfasen og vannfasen allerede før oppkonsentrering til analytisk UHPLC. Metode for analytisk UHPLC er beskrevet og grafisk fremstilt i seksjon 4.2.5.1.



Figur 19: UHPLC-kromatogram av vannfasen detektert ved 280 ± 10 nm.



Figur 20: UHPLC-kromatogram av etylacetatfasen detektert ved 280 ± 10 nm.

Av UHPLC-kromatogrammet til etylacetatfasen kan man se at de fleste forbindelser har relativt lang retensjonstid. Det er som forventet ettersom stoffene i denne fasen ofte er mindre polare enn stoffene i vannfasen. Sammenlignet med etylacetatfasen inneholder vannfasen stoffer med kortere retensjonstid. Det er forventet fordi stoffer som er mest polare blir igjen i vannfasen.

5.6 Separasjon ved hjelp av Amberlite XAD-7 kolonnekromatografi

5.6.1 Separasjon av vannfasen

Oppkonsentrert vannfasen ble først separert ved hjelp av Amberlite XAD-7 kolonnekromatografi som detaljert beskrevet i seksjon 4.2.4.1. Først ble kolonnen sjekket om den var klar til bruk ved å kontrollere pH ved bruk av pH-papir, pH-en skal være rundt 5.5. Det er for å kontrollere om det var resterende lut etter tidligere vasking av kolonnen. Kolonnen ble vasket med ytterligere 1 L destillert vann før den var klar til applikasjon. Før applikasjon ble væsken i XAD-7 kolonnen tappet ut til toppen av materialet var akkurat tørt. Hanen ble stengt og vannfasen ble forsiktig applisert til kolonnematerialet. Hanen ble åpnet igjen for å tappe ut vannfasen til den akkurat nådde overflaten til materialet i kolonnen. Videre ble hanen stengt igjen i 10-15 minutter etter applikasjon slik at naturstoffene får lengre tid til å bli adsorbent til kolonnematerialet. Deretter begynte eluering med først destillert vann og så med metanol. Vannfasen ble først eluert med totalt fem liter destillert vann, og så med fem liter metanol av HPLC-kvalitet. De fargede fraksjonene ble samlet opp fordi det tydet på at forbindelsene begynte å elueres. Fra vannfasen ble det totalt samlet opp fem vandige fraksjoner som hadde varierende grad av svak gulfarging. Disse fraksjonene ble konserverte med 10% metanol (v/v) for å unngå bakterievekst under oppbevaring for mulig videre arbeid. Hver av disse fraksjonene hadde volum på ca 800 mL. Etter eluering med destillert vann, ble hele væsken i kolonnen tappet ut før eluering med metanol (HPLC-kvalitet) begynte.

Det ble totalt samlet opp syv fraksjoner fra vannfasen eluert med metanol, hvor hver fraksjon hadde volum på ca. 500 mL. Fraksjonene som ble oppsamlet under vanneluering hadde svakt gulfarge. Polare alifatiske organiske forbindelser som aminosyrer og sukkerer, inkludert monosakkarider, oligosakkarider og polysakkarider, som er lite interessante for denne oppgaven blir skilt ut. Etter eluering med vann, hadde toppen av kolonnematerialet fortsatt ganske mørk farge. Det tydet på at de aromatiske forbindelsene i ekstraktet fortsatt var adsorbent til kolonnemateriale etter elueringen med 5 L vann, og disse ble derfor eluert med metanol. Fraksjon VM1 og VM2 var sterkt farget, men resten av fraksjonene sekvensielt fikk en stadig lysere gulfarge inntil siste fraksjon var tilnærmet fargeløs. Etter eluering med omtrent fire liter med metanol, ble fargen på kolonnematerialet nesten slik som i starten. Kolonnematerialet var noe svakt grønnfarget, noe som trolig kommer av rester av adsorbent klorofyll.

Tabell 6: Vandige fraksjoner og metanolfraksjoner samlet opp fra Amberlite XAD-7 kolonnekromatografisk separasjon av vannfasen

Løsemiddel	Fraksjon	Volum [mL]	Farge	Videre arbeid
Super destillert vann				
	VV1	800	Svakt gul	
	VV2	800	Svakt gul	
	VV3	800	Svakt gul	
	VV4	800	Svakt gul	
	VV5	800	Svakt gul	
Metanol (HPLC-kvalitet)				
	VM1	500	Svakt gul	Separert på liten Sephadex LH-20 kolonne
	VM2	500	Gul/oransje	Separert på stor Sephadex LH-20 kolonne
	VM3	500	Mørk oransje	Kombineres med VM4. Separert på liten Sephadex LH-20 kolonne
	VM4	500	Gul	Kombineres med VM3. Separert på liten Sephadex LH-20 kolonne
	VM5	500	Gul	
	VM6	500	Svakt gul	
	VM7	500	Svakt gul	

5.6.2 Separasjon av etylacetatfasen

Den oppkonsentrerte etylacetatfasen ble separert ved hjelp av Amberlite XAD-7 kolonne som beskrevet i seksjon 4.2.4. Etylacetatfasen ble først eluert med fem liter destillert vann og så med seks liter metanol av HPLC-kvalitet. Det ble totalt samlet opp 9 vandige fraksjoner og 12 metanolfraksjoner. Tabellen under viser oversikt over vannfraksjoner og metanolfraksjoner etter separering av etylacetatfasen.

Under oppbevaring av etylacetatfasen i kjøleskapet frem til dette separasjonstrinnet, fikk etylacetatfasen utfelling, noe som i teorien kunne være et helt rent stoff eller eventuelt en selektert blanding av et begrenset utvalg av naturstoffer. Etter applisering av etylacetatfasen på kolonnen, ble utfellingen løst med metanol for å få med alt før den ble overført til et dramsglass og tørket under nitrogengass. Videre ble prøven oppbevart i eksikator i minst to døgn før den ble løst opp med en ampulle deuterert DMSO for analyse ved hjelp av NMR.

Tabell 7: Vandige fraksjoner og metanolfraksjoner samlet opp fra Amberlite XAD-7 kolonnekromatografisk separasjon av etylacetatfasen

Løsemiddel	Fraksjon	Volum [mL]	Farge	Videre arbeid
Super destillert vann				
	EV1	300	Lys gult	
	EV2	500	Gult	
	EV3	500	Gult	
	EV4	500	Lys gult	
	EV5	500	Lys gult	Kombineres med EV6, 7 og 8 Separert på liten Sephadex kolonne
	EV6	500	Svakt lys gult	Kombineres med EV5, 7 og 8 Separert på liten Sephadex kolonne
	EV7	500	Svakt lys gult	Kombineres med EV5, 6 og 8 Separert på liten Sephadex kolonne
	EV8	500	Blank	Kombineres med EV5, 6 og 7. Separert på liten Sephadex kolonne
	EV9	500	Blank	

**Metanol (HPLC-
kvalitet)**

EM1	500	Gult	
EM2	400	Grønnbrunt	
EM3	300	Mørkt gult	Kombineres med EM4 og 5 Separert på stor Sephadex kolonne
EM4	400	Gult	Kombineres med EM3 og 5 Separert på stor Sephadex kolonne
EM5	400	Gult	Kombineres med EM3 og 4 Separert på stor Sephadex kolonne
EM6	400	Lys gult	
EM7	500	Lys gult	
EM8	500	Lys gult	
EM9	600	Lys gult	
EM10	600	Lys gult	
EM11	600	Svakt lys gult	
EM12	600	Svakt lys gult	

5.7 Analytisk UHPLC

Alle fraksjoner fra Amberlite XAD-7 kolonnekromatografi ble analysert ved hjelp av analytisk UHPLC for å se på profilen til stoffene i fraksjonene og for å vurdere hvilke fraksjoner som virket interessante for videre rensing ved hjelp av Sephadex LH-20 kolonnekromatografi. Fraksjonene som ikke viste interessante UV-absorberende forbindelser eller fraksjoner med lave konsentrasjoner og som ikke kan kombineres ble kastet. Prosessen for analytisk UHPLC analyse følger prosedyren som beskrevet i seksjon 4.2.5.1. Analytisk UHPLC ble benyttet fordi metoden går relativt raskt når det er så mange prøver og det er mindre forbruk av løsemidler enn ved bruk av ordinære HPLC-instrumenter.

På bakgrunn av kromatogrammene fra analytisk UHPLC ble det bestemt at det skulle jobbes videre med fraksjonene VM1, VM2 og VM3+VM4 fra vannfasen. Fraksjonene VM5-VM7 har ikke blitt videre opparbeidet ettersom de viste lave konsentrasjoner av UV-absorberende stoffer, samt at UV-absorpsjonen kommer fra de samme stoffene som er sett i tidligere fraksjoner. VV1-VV5 fraksjonene ble også forkastet ettersom de ikke hadde interessante UV-absorberende naturstoffer.

Fra etylacetatfasen ble det bestemt at det skulle jobbes videre med EM3-EM5 og EV5-EV8 ettersom disse fraksjonene har vist interessante UV-absorpsjonsprofil. De andre fraksjoner viste lave konsentrasjoner av UV-absorberende naturstoffer og ble det enighet om å ikke jobbes videre med.

5.8 Videre separasjon ved hjelp av Sephadex LH-20 kolonnekromatografi

Fraksjonene VM1, VM2 og VM3+VM4 ble oppkonsentrert på rotavapor. VM1 og VM3+VM4 ble avdampet til ca. 25 mL under vakum på rotavapor, mens VM2 ble avdampet til ca. 50 mL. Avdampete fraksjoner ble dekket med parafilm og oppbevart i kjøleskapet for videre arbeid. Det ble bestemt at fraksjon VM1 og VM3+4 skulle separeres ved bruk av liten Sephadex LH-20 kolonne fordi disse fraksjonene viste lite kompleksitet og kan sannsynligvis bli isolert i den lille kolonne. Det er viktig med tanke på en god og tilstrekkelig separering av stoffene i fraksjonen. Den lille kolonnen var 50 cm lang og hadde en diameter på 3.5 cm. Kolonnematerialet hadde høyde på kolonnematerialet 33 cm. For fraksjon VM2 ble det bestemt å bli separert ved hjelp av stor Sephadex LH-20 kolonne. Denne kolonnen var 100 cm høyt og hadde en diameter på 5 cm. Kolonnematerialet var 66 cm i lengden.

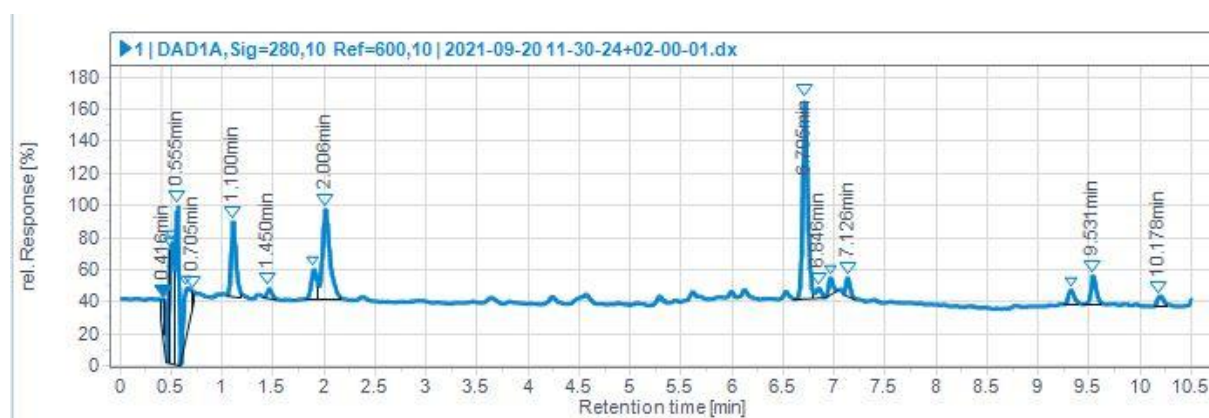
Separasjonsmetoden fulgte prosedyren beskrevet i seksjon 4.2.4.2.

Fra etylacetatfasen ble det bestemt at kombinasjon av fraksjonene EM3-5 skulle videre separeres ved hjelp av stor Sephadex LH-20 kolonne, mens kombinasjon av fraksjonene EV5-8 skulle videre separeres ved hjelp av liten Sephadex LH-20 kolonne. Detaljert prosedyre for separasjon med Sephadex LH-20 kolonne er vist i seksjon 4.2.4.2. EM3-5 ble avdampet under vakum på rotavapor til et volum på ca. 50 mL, mens EV5-8 ble avdampet til et volum på ca. 25 mL. Beskrivelsen for oppkonsentrering er beskrevet i seksjon 4.2.2.

Etter separasjon ble alle fraksjonene analysert med analytisk UHPLC for å bestemme hvilke fraksjoner som skulle analyseres med NMR eller LC-MS, og hvilke som kunne videre separeres med preparativ HPLC, eller eventuelt med den lille Sephadex LH-20 kolonnen.

5.8.1 Fraksjon VM1

Det ble bestemt at fraksjon VM1 skulle separeres på lille Sephadex LH-20 kolonne (50 x 3.5 cm). Det var flere forbindelser i denne fraksjonen, men det var spesielt de tre hovedtoppene med retensjonstid 1.10 minutter, 2.01 minutter og 6.71 minutter som man er spesielt interessert i å separere. Fraksjonen ble oppkonsentrert til passende volum (25 mL) til applikasjon på den lille kolonnen. Fraksjonen ble dekket med parafilm og oppbevart i kjøleskapet frem til dagen den skulle separeres på Sephadex LH-20 kolonnen. Fraksjonen ble applisert i henhold til metoden forklart nøyere i seksjon 4.2.4.2.



Figur 21: UHPLC-kromatogram av fraksjon VM1 ved 280 ± 10 nm.

Tabell 8: Volum av mobilfasegradient som ble brukt til separering av fraksjon VM1 på den lille Sephadex LH-20 kolonnen

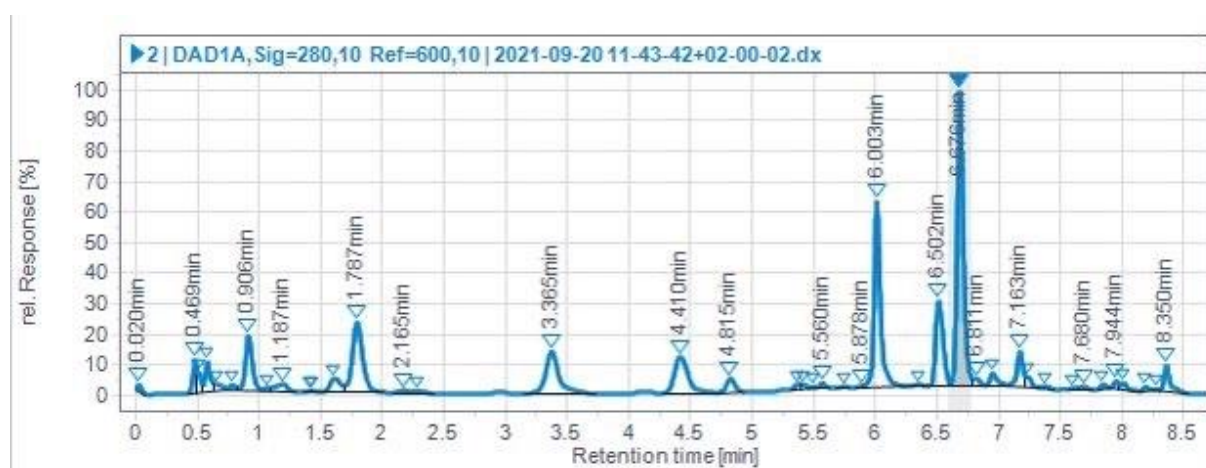
Metanol [%]	Superdestillert vann [%]	TFA [%]	Volum [mL]
20	80	0.1	800
50	50	0.1	600
70	30	0.1	600
100	0	0.1	1200

Det ble samlet inn 52 fraksjoner totalt fra separasjon av fraksjon VM1 på lille Sephadex LH-20 kolonnen. Det ble tatt ut prøver av alle oppsamlede fraksjoner for analyse på analytisk UHPLC. Metoden for analysen er beskrevet i seksjon 4.2.5.1. På bakgrunn av UHPLC

resultatene ble det bestemt at det skulle lages 4 prøver til analyse ved hjelp av NMR. Se flytskjema 3, vedlegg 1 for å få nærmere informasjon om hvilke fraksjoner som ble analysert ved hjelp av NMR.

5.8.2 Fraksjon VM2

Fraksjon VM2 fra separasjon av vannfasen på XAD-7 kolonnen hadde spennende UHPLC kromatogram. Kromatogrammet viste noe kompleksitet, men hadde to hovedtopper ved retensjonstid 6.00 min og 6.68 min. Derfor ble det besluttet at denne fraksjonen skulle videre separeres ved hjelp av stor Sephadex LH-20 kolonne (100 x 5 cm). Fraksjonen ble konsentrert opp på rotavapor til et volum på 50 mL, som beskrevet i seksjon 4.2.2, og ble oppbevart i kjøleskapet frem til videre opparbeidelse. VM2 fraksjonen ble applisert på Sephadex LH-20 kolonnen etter samme metoden som er forklart i seksjon 4.2.4.2.



Figur 22: UHPLC-kromatogram av fraksjon VM2 ved 280 + 10 nm.

Tabell 9: Volum av mobilfasegradient som ble brukt til eluering av fraksjon VM2 på stor Sephadex LH-20 kolonne

Metanol [%]	Superdestillert vann [%]	TFA [%]	Volum [mL]
20	80	0.1	2130
50	50	0.1	2000
70	30	0.1	2000
100	0	0.1	5000

Ved hjelp av stor Sephadex LH-20 kolonne ble det samlet opp 165 fraksjoner fra fraksjon VM2. Alle fraksjoner ble analysert ved hjelp av analytisk UHPLC som forklart i seksjon 4.2.5.1. På bakgrunn av kromatogrammene fra analytisk UHPLC ble det besluttet at det skulle lages ni prøver til analyse ved hjelp av NMR, fem prøver til analyse ved hjelp av MS, to prøver skulle isoleres videre ved hjelp av preparativ HPLC og en prøve skulle videre separeres ved hjelp av liten Sephadex LH-20 kolonnekromatografi. Tabellen under viser en oversikt over fraksjoner som ble valgt til NMR-analysen og fraksjoner til videre opprensing på preparativ HPLC og på den lille Sephadex LH-20 kolonnen.

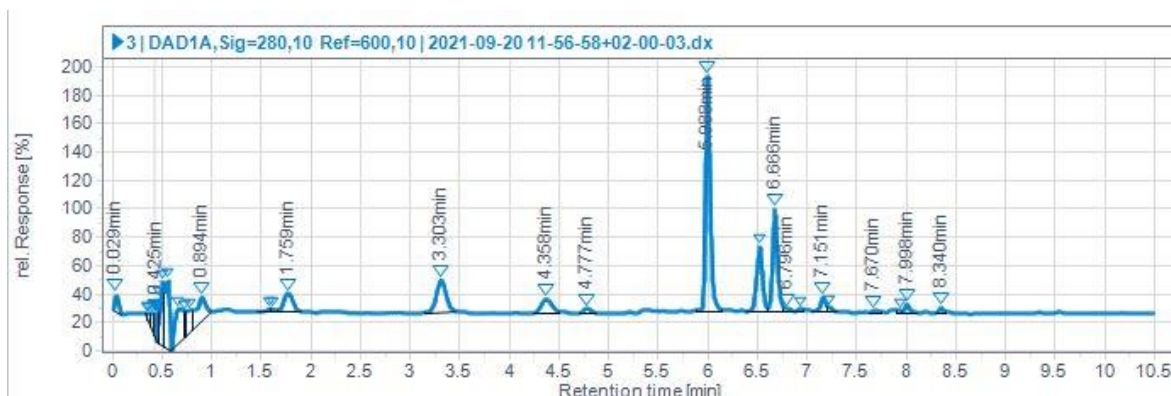
Tabell 10. Oversikt over videre arbeid med fraksjoner fra Sephadex LH-20 separasjon av XAD-7 fraksjon VM2 etter opprensing ved hjelp av Sephadex LH-20 kolonnekromatografi

Fraksjon	Videre arbeid
VM2S21-23	Separasjon ved hjelp av preparativ HPLC (se 5.9.1)
VM2S27	HRMS
VM2S28+29	NMR
VM2S39-41	Separasjon ved hjelp av preparativ HPLC (se 5.9.2)
VM2S45+46	Separasjon ved hjelp av liten Sephadex LH-20 kolonne (se 5.8.4)
VM2S47	NMR og HRMS
VM2S62-68	NMR og HRMS
VM2S83+84	NMR
VM2S88+89	NMR
VM2S95-100	NMR
VM2S141-142	NMR
VM2S150+151	NMR og HRMS
VM2S154-156	NMR og HRMS

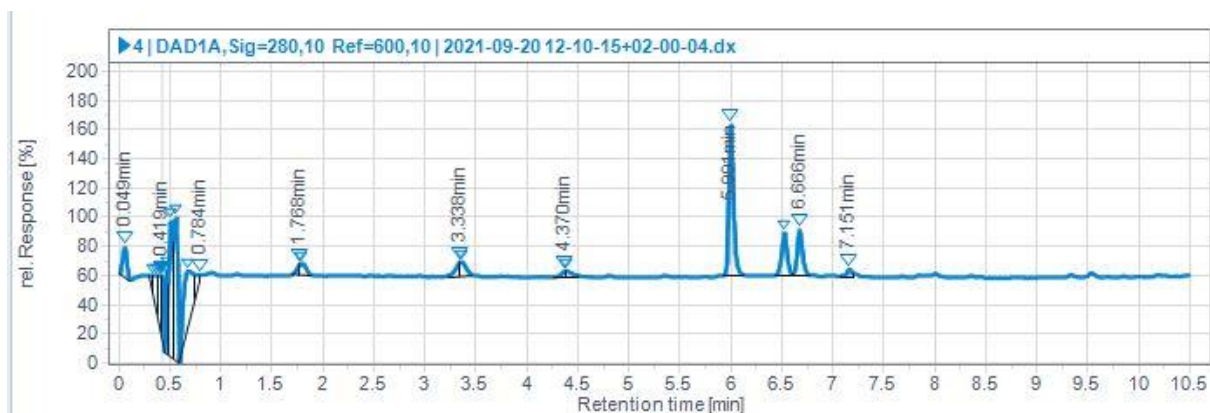
5.8.3 Fraksjon VM3+4

På bakgrunn av UHPLC kromatogrammene ble det besluttet at fraksjon VM3 skulle kombineres med fraksjon VM4 før separasjon av de kombinerte fraksjonene på den lille sephadex LH-20 kolonnen (50 x 3.5 cm). VM4 viste seg å inneholde de samme forbindelsene som fantes i fraksjon VM3, men i noe lavere konsentrasjon. Det gjelder spesielt forbindelser ved retensjonstid 5.00 minutter og 6.67 minutter. Det er også flere andre forbindelser i begge

fraksjonene, men i lave konsentrasjoner. Etter at VM3 og VM4 ble kombinert, ble de oppkonsentrert til ca. 25 mL i henhold til prosedyren forklart i seksjon 4.2.2. Konsentratet ble oppbevart i kjøleskapet. Under oppbevaring av konsentrert fraksjon, fikk man en utfelling. Det ble besluttet at utfellingen skulle analyseres ved hjelp av NMR. Metoden for applikasjon på den lille Sephadex LH-20 kolonnen ble utført i henhold til prosedyren forklart i kapittel 4.2.4.2.



Figur 23: UHPLC-kromatogram av fraksjon VM3 ved 280 ± 10 nm.



Figur 24: UHPLC-kromatogram av fraksjon VM4 ved 280 ± 10 nm.

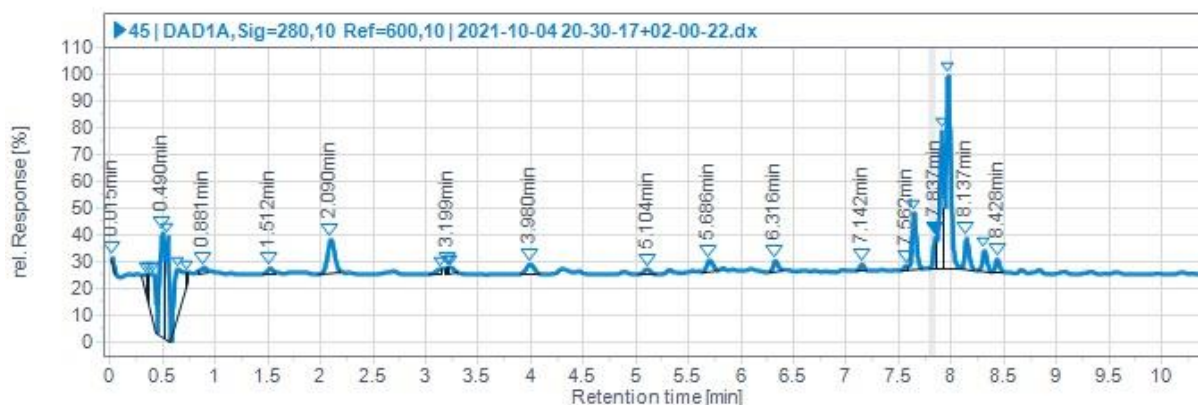
Tabell 11: Volum av mobilfasegradient som ble brukt til separering av fraksjon VM3+4 på den lille Sephadex LH-20 kolonnen

Metanol [%]	Superdestillert vann [%]	TFA [%]	Volum [mL]
20	80	0.1	600
50	50	0.1	600
70	30	0.1	600
100	0	0.1	900

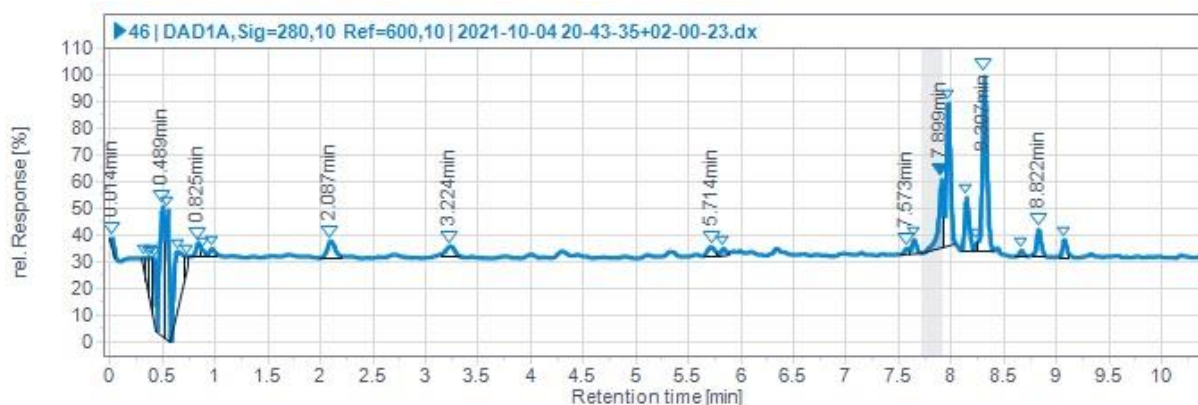
Det ble totalt samlet 44 fraksjoner fra separasjon av kombinasjonen VM3+4 ved hjelp av den lille Sephadex LH-20 kolonnen. Det ble utført analytisk UHPLC av alle 44 fraksjonene som forklart i seksjon 4.2.5.1. På bakgrunn av UHPLC-kromatogrammene ble det bestemt at det skulle lages fem NMR-prøver til analyse ved hjelp av 850 MHz NMR. Se flytskjema 4, vedlegg 1 for oversikt over hvilke fraksjoner det gjelder.

5.8.4 Fraksjon VM2S45+46

Fraksjon VM2 ble isolert ved hjelp av stor Sephadex LH-20 kolonnen. Fraksjon nummer 45 og 46, heretter betegnet som fraksjon VM2S45+46 fra denne separasjonen, ble bestemt på bakgrunn av UHPLC-kromatogrammene å bli videre opprenset ved hjelp av den lille Sephadex LH-20 kolonnen (50 x 3.5 cm) i henhold til metoden beskrevet i seksjon 4.2.4.2. VM2S45+46 ble oppkonsentrert til et volum på omtrent 25 mL før applikasjon på den lille Sephadex LH-20 kolonnen som forklart i seksjon 4.2.2.

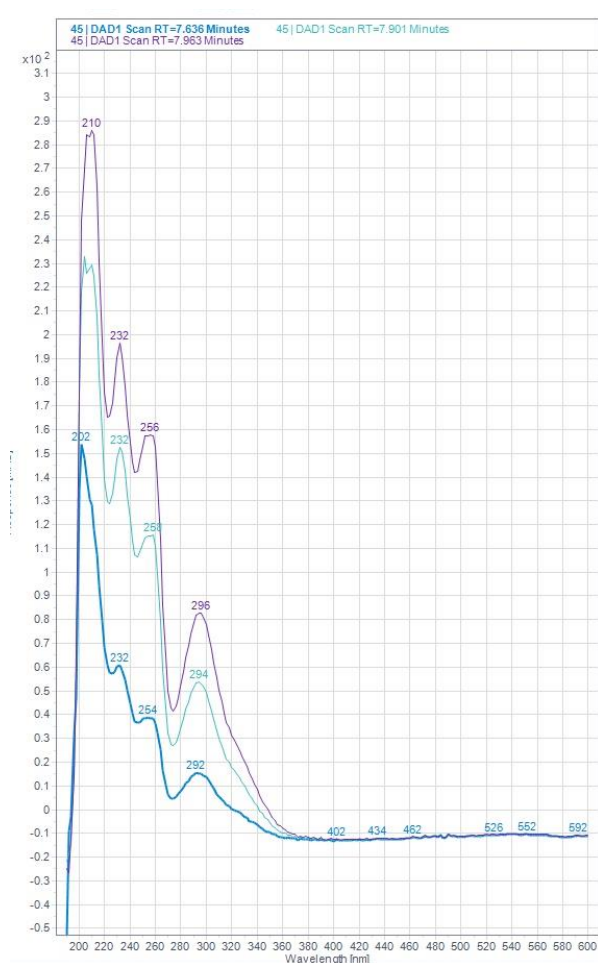


Figur 25: UHPLC-kromatogram av fraksjon VM2S45 ved 280 ± 10 nm.

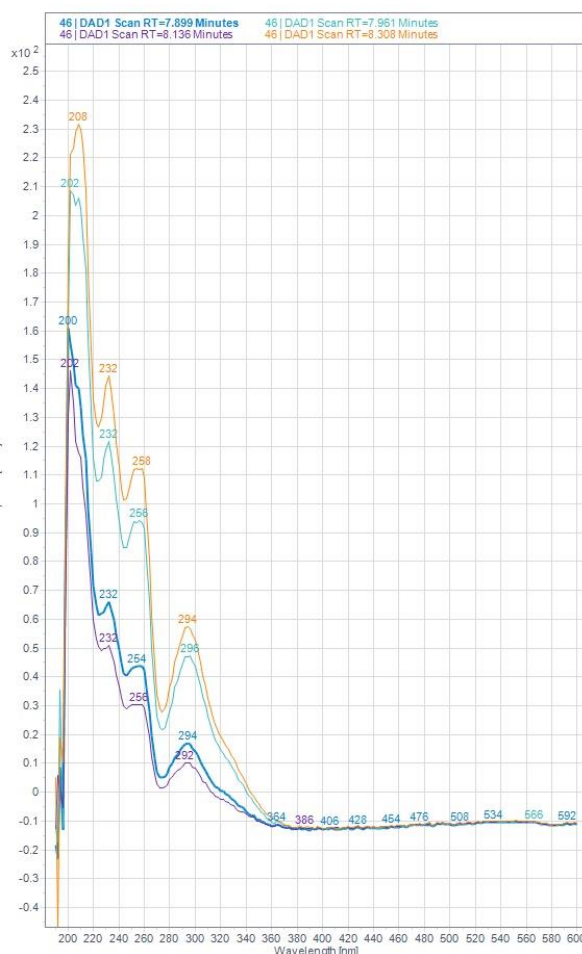


Figur 26: UHPLC-kromatogram av fraksjon VM2S46 ved 280 ± 10 nm.

UHPLC- kromatogrammene til begge fraksjonene ovenfor viser noe kompleksitet, men relativt store likhetstrekk med hensyn til innholdsstoffer i disse fraksjonene. Det ble derfor besluttet at disse fraksjonen skulle kombinere og bli isolert ved hjelp den lille Sephadex LH-20 kolonnen og ikke ved hjelp av preparativ HPLC. Grunnen til dette er fordi de interessante naturstoffene i retensjonstid-område 7.5-8.5 minutter har relativt lik retensjonstid, noe som kan være utfordrende og utgjøre en betydelig fare for å miste disse stoffene under isolering ved hjelp av preparativ HPLC. UV-spektrene av forbindelser i begge fraksjonene vist i figurene nedenfor er typisk for kromener (77).



Figur 27: UV-spektre av forbindelsene i fraksjon VM2S45 med retensjonstid 7.64 minutter (mørkeblå), 7.90 minutter (lyseblå) og 7.96 minutter (lille)



Figur 28: UV-spektre av forbindelsene i fraksjon VM2S46 med retensjonstid 7.90 minutter (mørkeblå), 7.96 minutter (lyseblå), 8.14 minutter (lille) og 8.31 minutter (oransje)

Under opprensing av VM2S45+46 med mobilfasesammensetning av metanol og superdestillert vann (20:80 v/v) var tilsynelatende samtlige forbindelser i prøven eluert etter

omtrent 500 mL forbrukt mobilfase og det var ingen synlige bånd igjen på kolonnen. Eluering med denne mobilfasesammensetningen fortsatte til det totalt var benyttet 1050 mL mobilfase. Det ble besluttet å ta UHPLC-prøver av alle de første 15 oppsamlede fraksjoner før man kunne gå videre med de neste mobilfasegradientene. Basert på kromatogrammene viste ingen av de oppsamlede fraksjoner UV-absorberende stoffer. Derfor fortsatte elueringen for å prøve å isolere de interessante kromenene som var blitt observert ved UHPLC analyse av fraksjonen før separering på lille Sephadex-kolonnen.

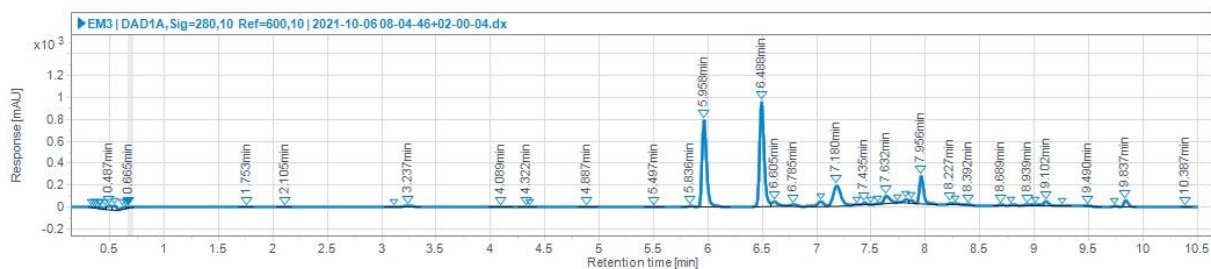
Tabell 12: Volum av mobilfasegradient som ble brukt til kromatografisk separasjon av fraksjon VM2S45+46 på den lille Sephadex LH-20 kolonnen

Metanol [%]	Superdestillert vann [%]	TFA [%]	Volum [mL]
20	80	0.1	1050
50	50	0.1	600
70	30	0.1	400
100	0	0.1	400

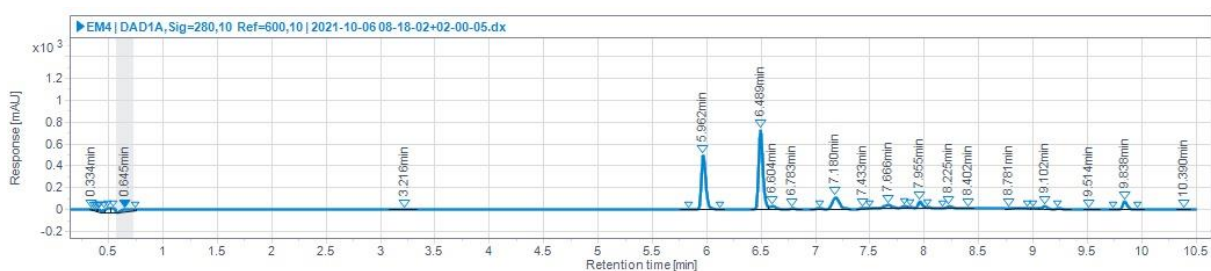
Det ble totalt samlet opp 38 fraksjoner fra separasjonen av fraksjon VM2S45+46 på den lille Sephadex LH-20 kolonnen. Alle oppsamlede fraksjoner ble analysert ved hjelp av analytisk UHPLC som beskrevet i seksjon 4.2.5.1. Basert på UHPLC resultatene ble det besluttet at en av fraksjonene (fraksjon VM2S45+46LS24) skulle analyseres ved hjelp av NMR. For oversikt se flytskjema 2, vedlegg 1. Det var i utgangspunktet en målsetning å isolere flere stoffer fra fraksjonen, men mye tyder på at stoffene har blitt svært fortynnet under opprensningen på den lille Sephadex LH-20 kolonnen.

5.8.5 Fraksjon EM3-5

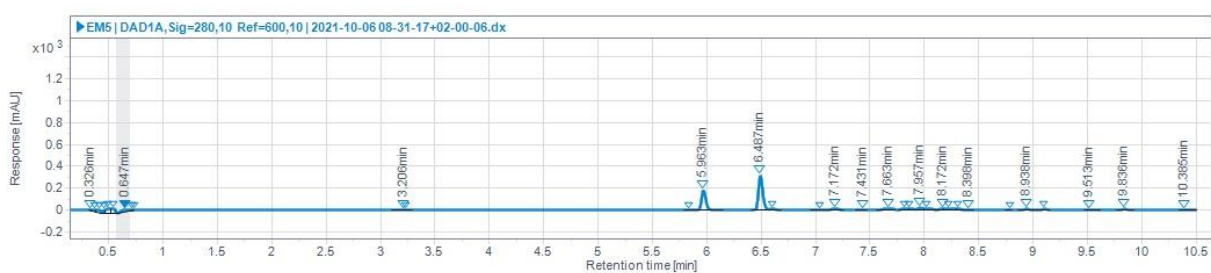
På bakgrunn av kromatogrammene ble det bestemt at en kombinasjon av fraksjonene EM3, EM4 og EM5 skulle separeres ved hjelp av stor Sephadex LH-20 kolonne (100 x 5 cm) i henhold til metoden beskrevet under 4.2.4.2. Kombinasjonen EM3-5 ble følgelig konsentrert opp på rotavapor under vakuüm til et volum på omtrent 50 mL, som forklart i kapittel 4.2.2.



Figur 29: UHPLC-kromatogram av fraksjon EM3 ved 280 ± 10 nm.



Figur 30: UHPLC-kromatogram av fraksjon EM4 ved 280 ± 10 nm.



Figur 31: UHPLC-kromatogram av fraksjon EM5 ved 280 ± 10 nm.

UHPLC-kromatogrammene til fraksjonene EM3, EM4 og EM5 vist ovenfor viser to hovedtopper med retensjonstider omtrent 5.9 minutter og 6.5 minutter. Det er disse to hovedtoppene man spesielt ønsket å isolere, men kromatogrammene viser også en kompleks sammensetning av forskjellige naturstoffer i lavere konsentrasjoner.

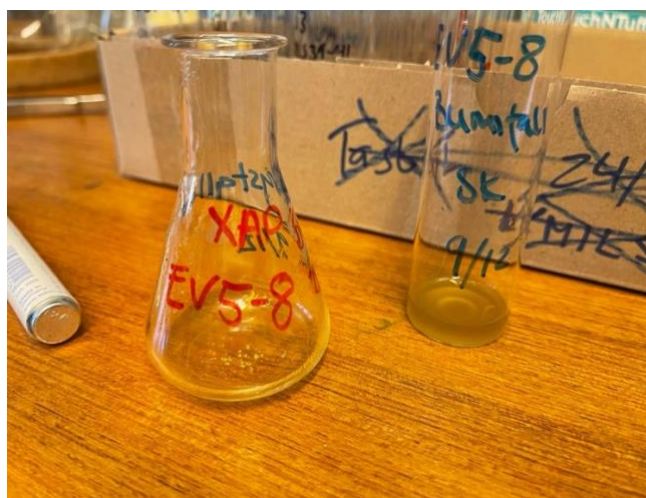
Tabell 13: Volum av mobilfasegradient som ble brukt til eluering av fraksjon EM3-5 på stor Sephadex LH-20 kolonne

Metanol [%]	Superdestillert vann [%]	TFA [%]	Volum [mL]
20	80	0.1	1400
50	50	0.1	800
70	30	0.1	1900

Det ble totalt samlet inn 85 fraksjoner fra separasjon ved hjelp av Sephadex LH-20 kolonnen. Alle disse fraksjonene ble analysert ved hjelp av analytisk UHPLC. Ut fra UHPLC-kromatogrammene ble det bestemt at det skulle lages 5 prøver til analyse ved hjelp av NMR, hvor du kan finne oversikt over hvilke fraksjoner det gjelder i flytskjema 5, vedlegg 1.

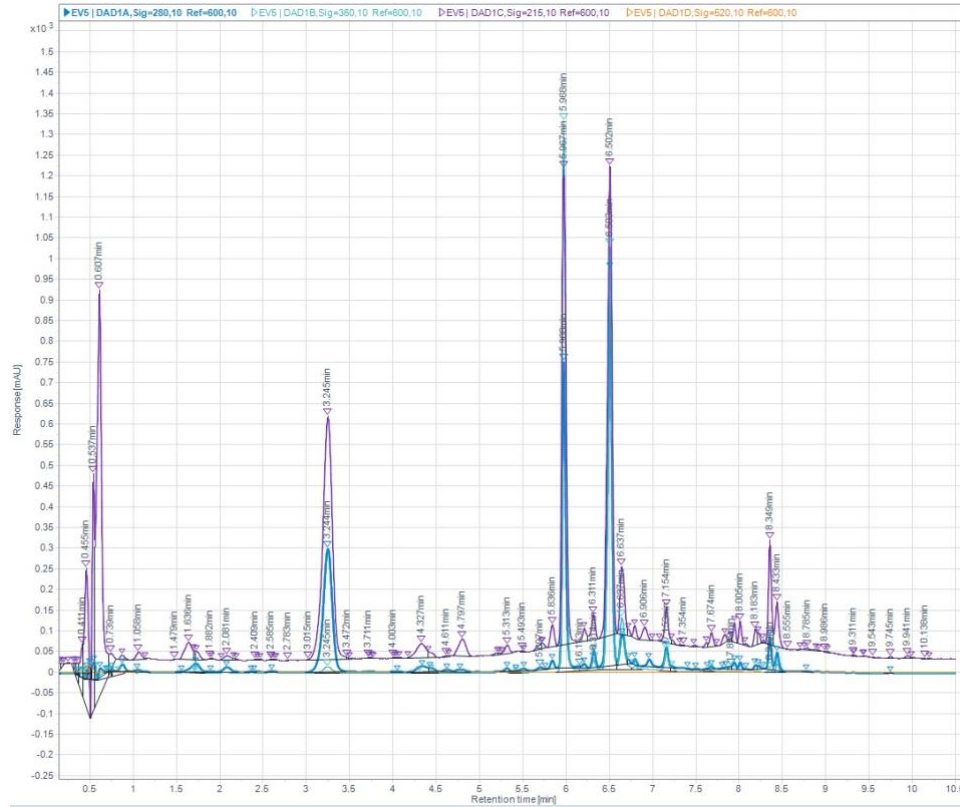
5.8.6 Fraksjon EV5-8

UHPLC-kromatogrammene til fraksjonene EV5-8 viste stor likhet, utfra hvilket grunnlag det ble bestemt at de skulle kombineres før videre isolering på den lille Sephadex-kolonnen. Kombinerte fraksjoner ble konsentrert opp til et volum på omtrent 25 mL i henhold til prosedyren forklart i kapittel 4.2.2. Under oppbevaring av konsentratet i kjøleskapet, ble det observert utfelling i den kombinerte oppkonsentrerte fraksjonen. Konsentratet hadde både grumsete utfelling og fine krystaller. Klart konsentrat løsning ble isolert fra utfelt stoff ved hjelp av en pipette for applikasjon på den lille Sephadex LH-20 kolonnen (50 x 3.5 cm) og separasjon ble utført i henhold til metoden forklart under 4.2.4.2. Resten av løsningen, det vil si den delen av løsningen der det ble observert kolloidal utfelling, ble pipettert over i et dramsglass og det ble laget en prøve til analyse på NMR. De gule krystallene ble også analysert på NMR. Bildet nedenfor viser erlenmeyerkolben til venstre med de observerte gule krystallene, mens til høyre ser man dramsglasset med løsning med kolloidal utfelling, isolert fra konsentrert fraksjon EV5-8.

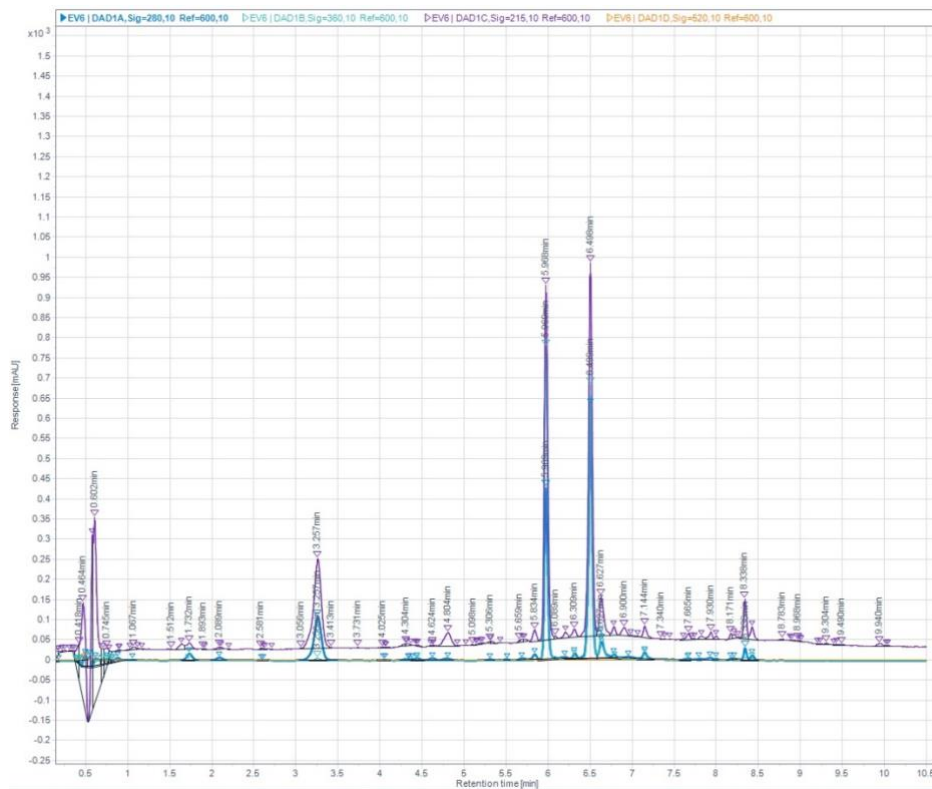


Figur 32: Krystaller isolert fra bunnfallet fra den kombinerte fraksjonen EV5-8 etter isolering ved hjelp av XAD-7 kolonnekromatografi.

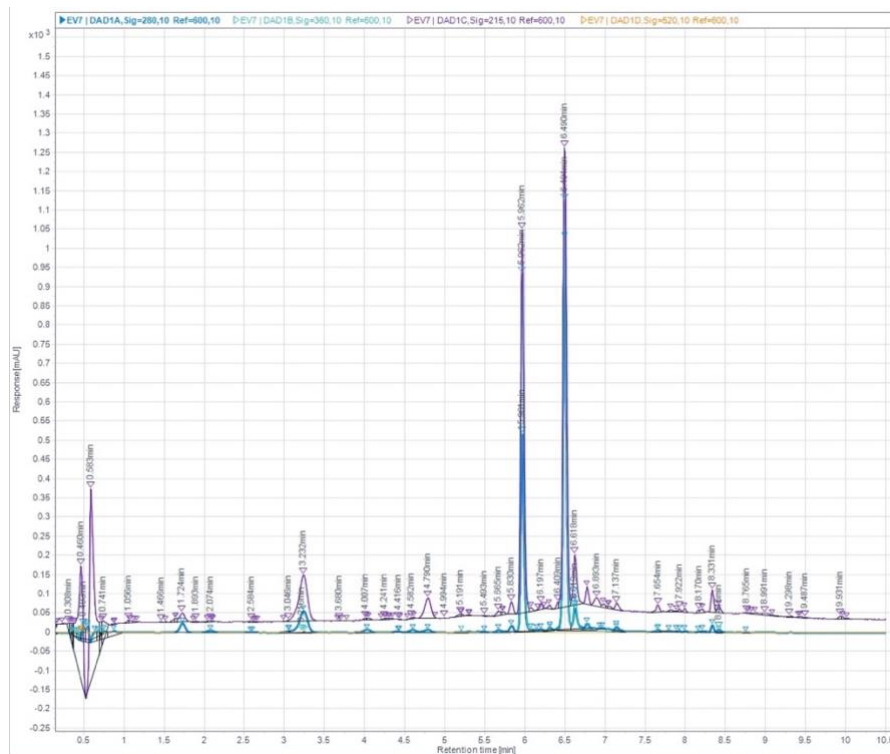
Kromatogrammene nedenfor viser at fraksjonene inneholder de samme forbindelsene. Det gjelder spesielt hovedkomponentene med retensjonstider ved 3.2 minutter, 5.1 minutter og 6.5 minutter. Fraksjonene inneholdt også andre forbindelser med lavere konsentrasjoner.



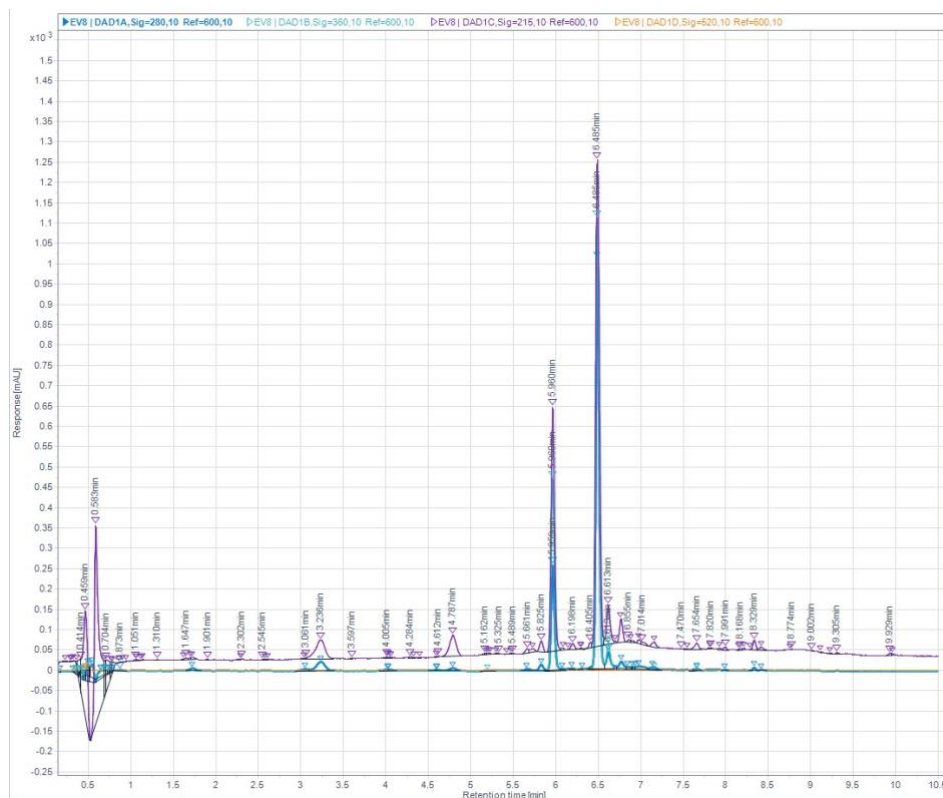
Figur 33: UHPLC-kromatogram av fraksjon EV5 ved 280 ± 10 nm (DAD1A), 360 ± 10 nm (DAD1B), 215 ± 10 nm (DAD1C) og 510 ± 20 nm (DAD1D).



Figur 34: UHPLC-kromatogram av fraksjon EV6 ved 280 ± 10 nm (DAD1A), 360 ± 10 nm (DAD1B), 215 ± 10 nm (DAD1C) og 510 ± 20 nm (DAD1D).



Figur 35: UHPLC-kromatogram av fraksjon EV7 ved 280 ± 10 nm (DAD1A), 360 ± 10 nm (DAD1B), 215 ± 10 nm (DAD1C) og 510 ± 20 nm (DAD1D).



Figur 36: UHPLC-kromatogram av fraksjon EV8 ved 280 ± 10 nm (DAD1A), 360 ± 10 nm (DAD1B), 215 ± 10 nm (DAD1C) og 510 ± 20 nm (DAD1D).

Tabell 14: Volum av mobilfasegradient som ble brukt til separasjon av fraksjon EV5-8 på den lille Sephadex LH-20 kolonnen

Metanol [%]	Superdestillert vann [%]	TFA [%]	Volum [mL]
20	80	0.1	400
50	50	0.1	400
70	30	0.1	400
100	0	0.1	700

Det ble samlet opp 30 fraksjoner totalt etter separasjon av EV5-8 ved hjelp av den lille Sephadex LH-20 kolonnen. Alle fraksjonene ble analysert ved hjelp av analytisk UHPLC. Utfra resultatene ble det besluttet at det skulle lages 2 prøver som tydeligvis er rene for å analyseres på NMR, og en prøve skulle videre renses ved hjelp av preparativ HPLC. For oversikt over fraksjonene se flytskjema 5, vedlegg 1.

5.9 Videre separasjon av utvalgte fraksjoner ved hjelp av preparativ HPLC

De fleste fraksjoner som skulle separeres på preparativ HPLC inneholdt 2-3 naturstoffer med relativt forskjellige retensjonstider, som man hovedsakelig ønsket å isolere. I denne oppgaven ble det bestemt at tre prøver skulle videre separeres ved hjelp av preparativ HPLC, og det gjelder fraksjon VM2S21-23, VM2S39-41 og fraksjon EV5-8LS23-26. Fraksjon VM2S58-60 var også opprinnelig tiltenkt å bli opprenset ved hjelp av preparativ HPLC. Etter nærmere vurdering av stoffenes UV-spekter og retensjonstid, viste det seg at hovedtoppen fins i rein form i den etterfølgende Sephadex-fraksjonen VM2S62-68, som skulle bli analysert ved hjelp av NMR. Derfor ble det besluttet at det ikke var nødvendig med videre separasjon av fraksjon VM2S58-60.

Alle prøver som skulle opprenses videre ved hjelp av preparativ HPLC ble først dampet inn til tørrhet på rotavapor som forklart i seksjon 4.2.2. Deretter ble prøven løst opp med metanol og overført til et dramsglass før den ble dampet inn med nitrogengass. Prøven ble videre løst opp med 200-600 µl DMSO for separasjon på preparativ HPLC. Oppløsningsvolumet var i vesentlig grad avhengig av hvor godt prøven løste seg i DMSO, og det spilte også en rolle å redusere antall injeksjoner som skulle bli utført på preparativ HPLC per prøve til et minimum. Vanlig injeksjonsvolum var på 100 µl for alle prøver. Fraksjoner ble fortløpende oppsamlet under separasjon på preparativ HPLC basert på observert kromatogram som ble utviklet online i løpet av separasjonen. Kromatogrammet blir vist på instruments PC-skjerm under separasjon. Detaljert teori og beskrivelse av prosedyren benyttet ved separasjon ved hjelp av preparativ HPLC finnes i kapittel 4.2.4.3. Både mobilfase A (superdestillert vann + 0.1% (v/v) TFA) og mobilfase B (acetonitril (HPLC-kvalitet) + 0.1% (v/v) TFA) ble først degasset i et ultralydbad før de ble benyttet. Pumpe og lampen ble slått på og kolonnen ble koblet på. Pumpe og slangene ble klargjort ved å koble til de degassete løsningsmidlene A og B og ved å purge først med løsemiddel B og deretter med løsemiddel A i 10 minutter. Kolonnen ble gjort klar ved at løsningsmidlene ble pumpet gjennom 15-20 minutter i volumforhold tilsvarende prosedyrenes startbetingelser (90% A og 10% B). Trykket skulle typisk stabiliseres ved omtrent 110-120 bar. 100 µl av prøven ble injisert ved å bruke en sprøyte. Oppsamling av fraksjoner ble gjort fortløpende når hovedtoppene begynte å vises på dataskjermen. Ny injeksjon ble deretter utført inntil hele prøven var blitt separert. Etter preparativ HPLC blir alle fraksjoner undersøkt ved hjelp av analytisk UHPLC i henhold til prosedyren og metoden forklart i kapittel 4.2.5.1. På bakgrunn av kromatogrammene blir det besluttet om fraksjoner

skal kombineres eller brukes hver for seg. Fraksjoner med samme innholdsstoff ble kombinert basert på lik retensjonstid og likt UV-spekter.

5.9.1 Fraksjon VM2S21-23

Fraksjon VM2S21-23 ble løst opp i 600 mikroliter DMSO, hvor et volum på 200 mikroliter av prøven ble injisert for hver injeksjon. Dette resulterte i totalt 3 injeksjoner og det ble samlet inn 51 fraksjoner. Alle fraksjoner ble analysert ved hjelp av analytisk UHPLC. Utfra kromatogrammene ble det besluttet at tre fraksjoner skal slåes sammen og analyseres videre ved hjelp av NMR. Fraksjonen ble videre kalt VM2S21-23P3+22+37. For oversikt se flytskjema 2, vedlegg 1.

5.9.2 Fraksjon VM2S39-41

For fraksjon VM2S39-41 var man interessert i å isolere minst tre naturstoffer etter opprensing ved hjelp av stor Sephadex LH-20 kolonne. Fraksjonen ble løst i 300 mikroliter DMSO. Et volum på 100 mikroliter prøveløsning ble injisert per injeksjon, noe som resulterte i totalt tre injeksjoner. Det ble totalt samlet inn 67 fraksjoner. Under oppsamling viste kromatogrammet på dataskjermen flere små topper som ble innsamlet fortløpende for hver separasjon, noe som er til fordel når man skal slå sammen flere like fraksjoner. Alle fraksjoner ble analysert ved hjelp av analytisk UHPLC, som forklart i seksjon 4.2.5.1. På bakgrunn av UHPLC-kromatogrammene ble rene fraksjoner slått sammen dersom stoffene hadde likt retensjonstid og UV-spekter. Utfra UHPLC-kromatogrammene ble det besluttet at det skulle lages syv prøver til analyse ved hjelp av NMR. Disse fraksjonene ble videre kalt VM2S39-41P4+32, VM2S39-41P11+47, VM2S39-41P16, VM2S39-41P33, VM2S39-41P40, VM2S39-41P41 og VM2S39-41P18+56. For oversikt, se flytskjema 3, vedlegg 1.

5.9.3 Fraksjon EV5-8LS23-26

Ut fra UHPLC-kromatogrammene til fraksjonene EV5-8LS23-26 var man interessert i å isolere to rene naturstoffer. Kombinerte fraksjoner ble dampet inn til tørrhet før den ble løst opp i 200 mikroliter DMSO. Det ble injisert 100 mikroliter prøveløsning, noe som resulterte i to injeksjoner totalt. Til sammen ble det samlet opp 40 fraksjoner. Det ble tatt HPLC-prøve av alle fraksjoner og de ble analysert i henhold til metoden forklart i kapittel 4.2.5.1. Basert på

UHPLC-kromatogrammene fremgikk det at det var blitt isolert tre rene naturstoffer, som skulle videre analyseres ved hjelp av NMR. Fraksjonene ble videre kalt EV5-8LS23-26P5+24-28, EV5-8LS23-26P7+30-31 og EV5-8LS23-26P9+31. Under oppbevaring av fraksjonene EV5-8LS23-26P5+24-28 og EV5-8LS23-26P7+30-31 i kjøleskapet frem til neste opparbeidelsessteget, fikk de utfelling. Utfellingene ble isolert fra resten av løsningen ved hjelp av glasspipette og pipettesmokk, og det ble laget NMR-prøver både av utfellingene og av gjenværende løsninger av disse fraksjonene.



Figur 37: Utkrystallisert bunnfall fra fraksjonene EV5-8LS23-26P5+24-28 som var blitt isolert fra preparativ HPLC.

5.10 NMR av utvalgte fraksjoner

Enkelte fraksjoner så ut til å være rene eller tilnærmet rene basert på deres UHPLC-kromatogrammer og ble derfor besluttet å bli undersøkt ved hjelp av NMR. Fraksjoner som skulle analyseres ved hjelp av NMR ble dampet inn til tørrhet på rotavapor i henhold til metoden beskrevet i kapittel 4.2.2. Deretter ble fraksjonene løst i metanol i et passende volum, ofte 2-4 mL, avhengig av hvor godt løselig stoffene var i metanol. Videre ble prøvene overført til dramsglass, som er veid inn på forhånd, før prøvene ble dampet inn til tørrhet under nitrogengass. Så ble fraksjonene oppbevart i eksikator i minst ett døgn for å sikre at det er ingen vannrester i NMR-prøven. Tilstedeværelse av betydelige mengder vann gir et sterkt signal i NMR-spektrene, noe som kan forringe kvaliteten til NMR-spektrene. De tørkede prøvene ble deretter løst opp i 0.75 mL heksadeuterert DMSO-D₆ og overført til NMR-rør (5 mm). Deretter tok professor Torgils Fossen flere NMR-eksperimenter av prøvene avhengig av prøvenes kvalitet og kompleksiteten til forbindelsenes struktur. NMR-eksperimentene ble tatt

opp ved hjelp av et Bruker 850 MHz NMR-instrument utstyrt med en ^1H - ^{13}C - ^{15}N trippel resonans kryogen prøveholder. Teorien bak de ulike NMR-eksperimenter som ble benyttet i denne oppgaven er beskrevet i kapittel 4.2.5.2. Resultatene er nøye forklart i kapittel 6.1.

5.11 HRMS av nye naturstoffer

Prøver som var nye naturstoffer eller potensielt kunne være nye naturstoffer ble analysert ved hjelp av høyopløselig massespektrometri (MS). MS-analysene ble utført av Dr. Bjarte Holmelid ved Kjemisk institutt ved Universitet i Bergen (UiB). Prøvene som ble brukt til MS-analysen var ofte NMR-prøvene. Derfor ble disse prøvene analysert ved hjelp av LC-HRMS for å fjerne deuterert DMSO som var til stede fra NMR-analysen. Prøvene ble fortynnet med metanol til konsentrasjon var på 50 mikrogram/mL før de ble undersøkt ved hjelp av MS. Høyopløselig massespektrometri ble utført på fraksjon VM2S27, som inneholdt samme stoff som fraksjon VM2S28+29. Det ble i tillegg tatt høyopløselige massespektre av fraksjonene VM2S62-68, VM2S150+151, VM2S154-156, VM2S39-41P18+56, VM2S39-41P11+47, EM3-5S39-40 og VM2S47

6. Analytiske resultater og diskusjon

6.1 Bestemmelse av strukturer til isolerte forbindelser

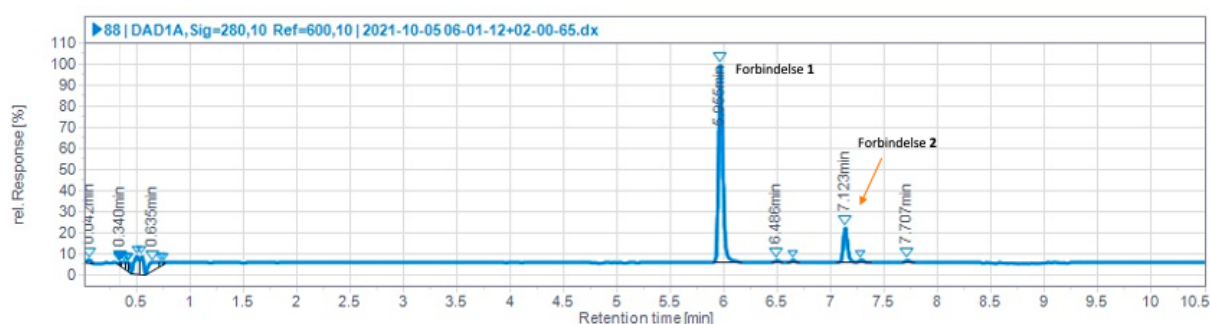
6.1.1 LUTEOLIN 7-*O*- β -GLUKOPYRANOSID og APIGENIN 7-*O*-(6''-*O*-MALONYL- β -GLUKOPYRANOSID)

Det ble tatt 1D ^1H -NMR, 1D ^{13}C CAPT, 2D ^1H - ^{13}C HMBC, 2D ^1H - ^{13}C HSQC, 2D ^1H - ^1H COSY, 2D ^1H - ^{13}C H2BC og 1D selektiv TOCSY NMR-eksperimenter av den kombinerte fraksjonen VM2S88+89. Prøven er ikke helt rein, og UHPLC kromatogrammet, figur 38, samt NMR spektrene viste at prøven bestod av en hovedkomponent og et lite antall av minor komponenter. På grunn av konsentrasjonsforskjell på majorkomponent og minorkomponent er det mulig å bestemme hva som tilhører hva. Analyse av NMR-spektrene viste at majorkomponent var luteolin 7-*O*- β -glukopyranosid (**1**), mens minorkomponent var apigenin 7-*O*-(6''-*O*-malonyl- β -glukopyranosid) (**2**). Det ble isolert 36.6 milligram av tørt prøvemateriale fra den kombinerte fraksjonen VM2S88+89 som bestod av både forbindelse (**1**) og (**2**). Luteolin 7-*O*- β -glukopyranosid er en tidligere kjent forbindelse i *Myrrhis odorata*, hvor stoffet ble identifisert i planten av Cisowski (1985) allerede for mer enn tre tiår siden

(37). Ved litteratursøk i Scifinder ble det fastslått at forbindelse (2) ikke tidligere er funnet i *Myrrhis odorata* eller i skjermplantefamilien, men samme molekyl uten malonyl-gruppen har tidligere blitt identifisert i planten (37).

Ved litteratursøk finner en at forbindelse (1) har blitt biologisk testet og viste seg å ha blant annet anti-inflammatoriske og cytotoksiske effekter (43). Basert på søk i Scifinder viser det seg at den biologiske aktiviteten til forbindelse (2) ikke har blitt studert.

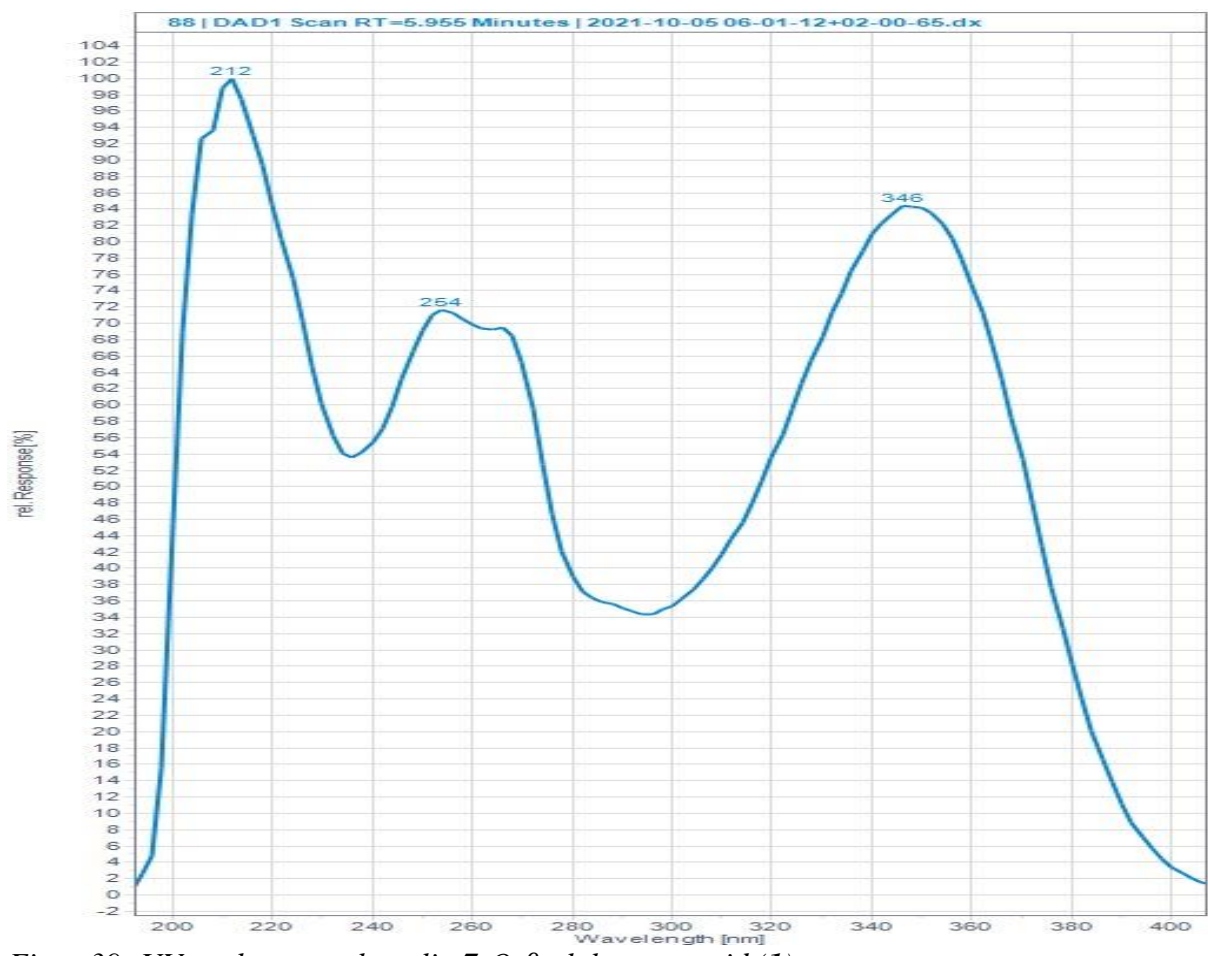
UHPLC-kromatogrammet av fraksjon VM2S88, vist i figur 38, viser at forbindelse (1) hadde en retensjonstid på 5.96 minutter. UV-spekteret til forbindelse (1), vist i figur 39, viser at den har UV-max absorpsjon ved 212 nm, 254 nm og 346 nm, noe som indikerer at forbindelsen er et flavon eller en flavonol (69). Kromatogrammet viser en mindre komponent (Forbindelse 2) i lavere intensitet enn major komponent med en retensjonstid på 7.12 minutter. Forbindelse (2) har UV-max absorpsjon ved 204 nm, 268 nm og 336 nm (figur 40) noe som indikerer at forbindelsen er et flavon eller en flavonol (69).



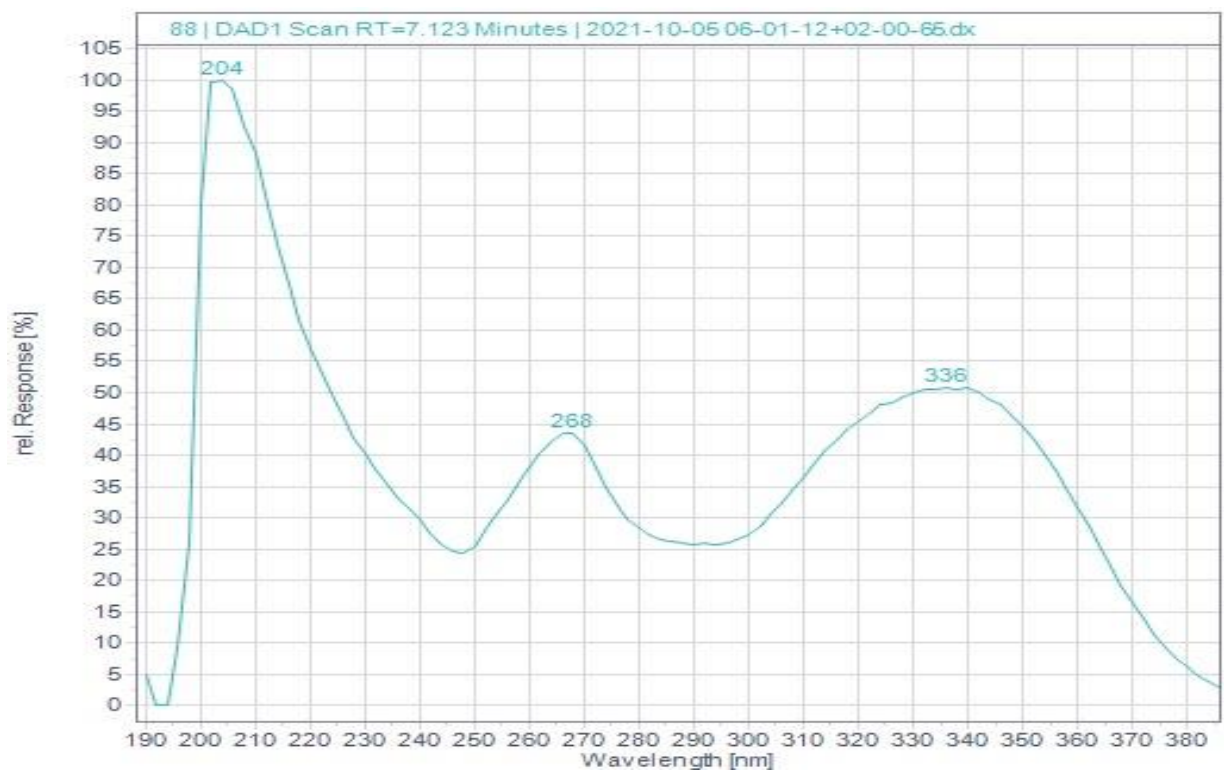
Figur 38: UHPLC-kromatogram av luteolin 7-O- β -glukopyranosid (1) og apigenin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (2) i fraksjon VM2S88 detektert ved 280 ± 10 nm

Det tilsvarende kromatogrammet til fraksjon VM2S89 er vist i vedlegg 2, s. 247.

Forbindelse (1) ble også isolert fra fraksjonene VM3+4LS28+29, EV5-8LS23-26P5+24-28 og EV5-8LS23-26P5+24-28 bunnfall ved hjelp av den lille Sephadex LH-20 kolonnen, fra fraksjon EM3-5S69-71 ved hjelp av stor Sephadex LH-20 kolonne, og fra bunnfallet til etylacetatfasen. Det ble totalt isolert 141.4 mg tørt prøvemateriale av forbindelse (1) fra disse fraksjonene, inkludert isolert mengde av forbindelsen fra fraksjon VM2S88+89.

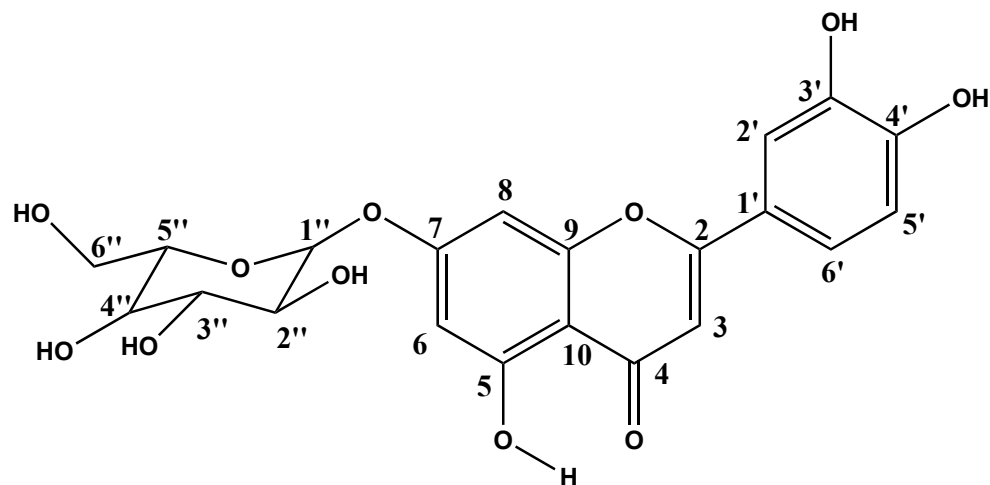


Figur 39: UV-spektrum av luteolin 7-O- β -glukopyranosid (1).

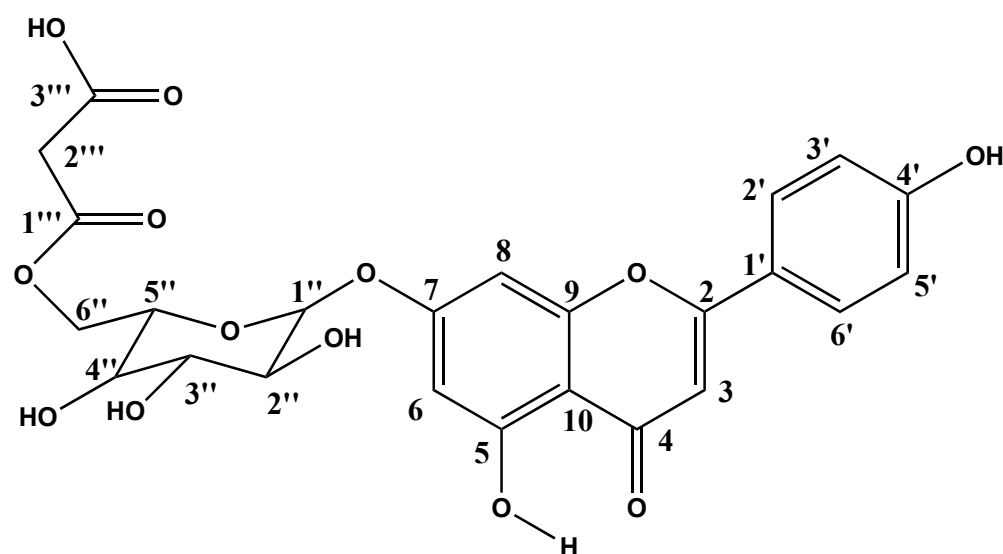


Figur 40: UV-spektrum av apigenin 7-O-(6'-O-malonyl- β -glukopyranosid) (2).

Forbindelse (1) har den uniisotopiske molekylvekten 448.1006 g/mol og molekylformelen $C_{21}H_{20}O_{11}$. Forbindelse (2) har molekylvekten 518.1060 g/mol og molekylformelen $C_{24}H_{22}O_{11}$. Molekylstrukturene til forbindelse (1) og (2) vises i figurene 41 og 42.



Figur 41: Struktur av luteolin 7-O- β -glukopyranosid (1) med nummerering



Figur 42: Struktur av apigenin 7-O-(6'-O-malonyl- β -glukopyranosid) (2) med nummerering

De kjemiske skiftverdiene (δ) til ^1H og ^{13}C , samt koblingskonstantene (Hz) til forbindelse (1) er vist i tabell 15. Resultatene stemmer godt overens med verdier i referanselitteratur (38). Det ble observert 16 forskjellige kjemiske skiftverdier for hydrogen, og 21 ulike kjemiske skiftverdier for karbon (tabell 15). Som følge av de observerte downfield kjemiske skiftverdiene til $\text{C}3'$ (δ 145.89) og $\text{C}4'$ (δ 150.02) ble det anordnet oksygen substituerer i begge disse posisjonene. Til forskjell fra luteolin, er luteolin 7-O- β -glukopyranosid koblet til

et suktermolekyl i syv-posisjon, og er derfor et glukosid av flavonet luteolin. Ved hjelp av 2D ^1H - ^{13}C HMBC-spekteret bekrefter de observerte krysstoppe tilknytningspunktene mellom de forskjellige enhetene i molekylet. Det viser krysstoppet mellom H1'' (5.07 ppm) og C7 (163.05 ppm) og bekrefter at suktermolekylet er tilknyttet til luteolin i 7-posisjon. 2D ^1H - ^{13}C HSQC spekteret ble brukt for å anordne koblingen mellom hydrogenatomer og sine karbonatomer. 2D ^1H - ^{13}C H2BC spekteret var spesielt nyttig for fullstendig anordning av spesielt ^1H og ^{13}C signalene til sukkerenheten.

Tabell 15: ^1H og ^{13}C NMR kjemisk skiftverdier (ppm) og koblingskonstanter (Hz) av luteolin 7-O- β -glukopyranosid (1) major komponent i fraksjon VM2S88+89 isolert fra *Myrrhis odorata* i DMSO- D_6 ved 298K.

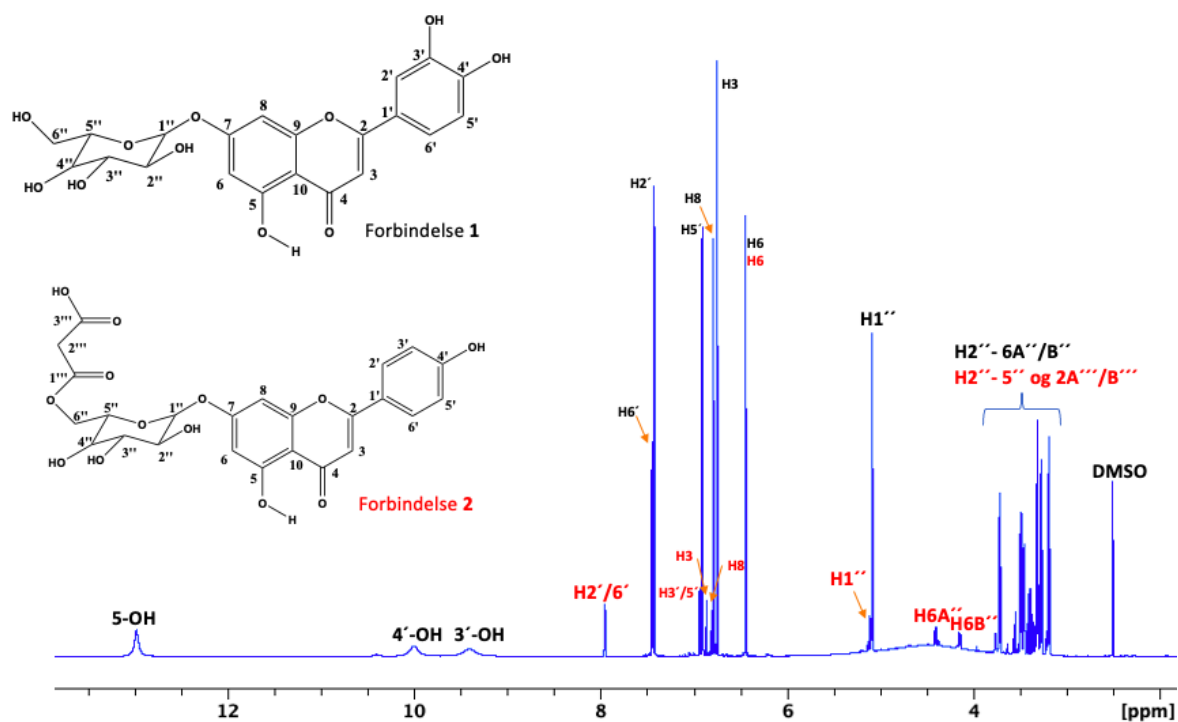
	δ ^1H 1	δ ^{13}C 1
2		164.58
3	6.74 s	103.28
4		182.00
5		161.24
6	6.43 d 2.2	99.64
7		163.05
8	6.78 d 2.2	94.82
9		157.05
10		105.45
1'		121.50
2'	7.41 d 2.3	113.68
3'		145.89
4'		150.02
5'	6.90 d 8.3	116.09
6'	7.44 dd 8.3, 2.3	119.27
5-OH	12.97 s	
3'-OH	9.40 s	
4'-OH	10.00 s	
7-O- β -glucoside		
1''	5.07 d 7.7	99.99
2''	3.26 dd 9.1, 7.7	73.23
3''	3.30 t 9.1	76.50
4''	3.18 dd 9.7, 9.1	69.65
5''	3.44 ddd 9.7, 6.0, 2.1	77.27
6A''	3.71 dd 12.0, 2.1	60.72
6B''	3.48 dd 12.0, 6.0	

For forbindelse (2) ble det observert kjemisk skiftverdier og koblingsmønster som er typisk for apigenin aglykon, en glukoseenhet og en malonylenhet (tabell 16). Den anomere koblingskonstanten på 7.7 Hz viser at glukoseenheten er i β -konfigurasjon. Det ble bestemt at suktermolekylet er i 7-posisjon til apigenin ved hjelp av krysstoppen mellom H1'' (5.10 ppm)

og C7 (162.77 ppm) observert i HMBC-spekteret (figur 52). Som følge av kjemisk skiftverdi til C4' (161.45 ppm) ble det bestemt at dette aromatiske kvarternære karbonatomet var tilknyttet oksygen. Det er observert at H2'/6' (7.95 ppm) og H3'/5' (6.93 ppm) gir opphav til to semidubletter med en koblingskonstant på 8.8 Hz, noe som skyldes symmetrien i denne delen av molekylet. Gjennom koblingskonstanter kan man se at det er et vanlig spinnsystem for B-ring i flavonoider og betyr at B-ringen er symmetrisk disubstituert. De to karbonylkarbon som hører til malonylgruppen, nemlig C1''' (166.93 ppm) og C3''' (167.90) viser typisk kjemisk skiftverdier for estergrupper og syregrupper. Krysstoppen mellom H6A'' og H6B'' og C1''' i HMBC spekteret (figur 53) bekrefter at malonylenheten er tilknyttet glukoseenheten i 6''-posisjon. Dermed ble forbindelse (2) identifisert som apigenin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid). De observerte kjemiske skiftverdiene for forbindelse (2) stemmer godt overens med tilsvarende kjemiske skiftverdier fra litteraturen (39).

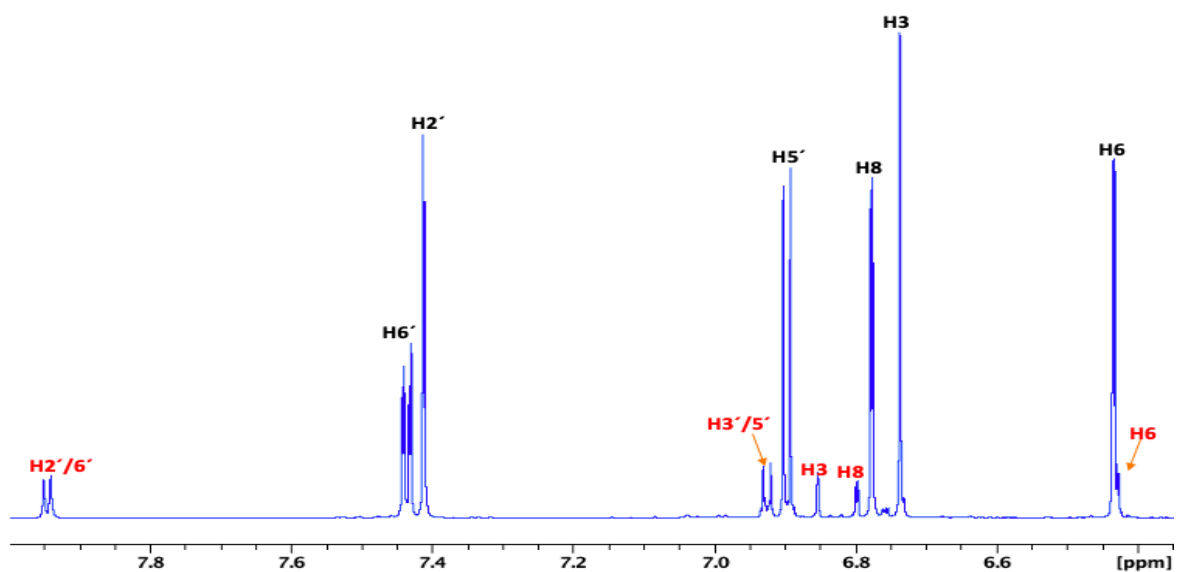
Tabell 16: ^1H og ^{13}C NMR kjemisk skift verider (ppm) og koblingskonstanter (Hz) av apigenin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (2) minor komponent i fraksjon VM2S88+89 isolert fra *Myrrhis odorata* i DMSO- D_6 ved 298K.

	δ ^1H 2	δ ^{13}C 2
2		164.44
3	6.85 s	103.22
4		182.13
5		161.20
6	6.43 d 2.2	99.70
7		162.77
8	6.80 d 2.2	94.82
9		157.08
10		105.56
1'		121.14
2'/6'	7.95 'd' 8.8	128.70
3'/5'	6.93 'd' 8.8	116.11
4'		161.45
7-O- β -glucoside		
1''	5.10 d 7.7	99.72
2''	3.29 m	73.10
3''	3.33 m	76.26
4''	3.20 dd 9.8, 8.8	69.68
5''	3.75 ddd 9.8, 7.0, 2.2	73.94
6A''	4.39 dd 12.0, 2.2	64.19
6B''	4.13 dd 12.0, 7.0	
6''-O-malonyl		
1'''		166.93
2A'''	3.40 d 15.8	41.45
2B'''	3.35 d 15.8	
3'''		167.90

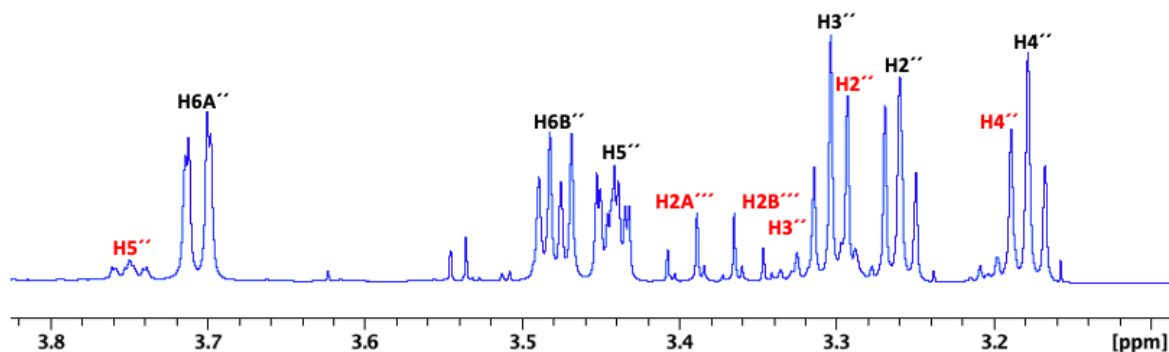


Figur 43: 1D ¹H NMR spekter med anordning av signaler tilhørende luteolin 7-O-β-glukopyranosid (1) med svart skrift og apigenin 7-O-(6''-O-malonyl-β-glukopyranosid) (2) vist med rød skrift.

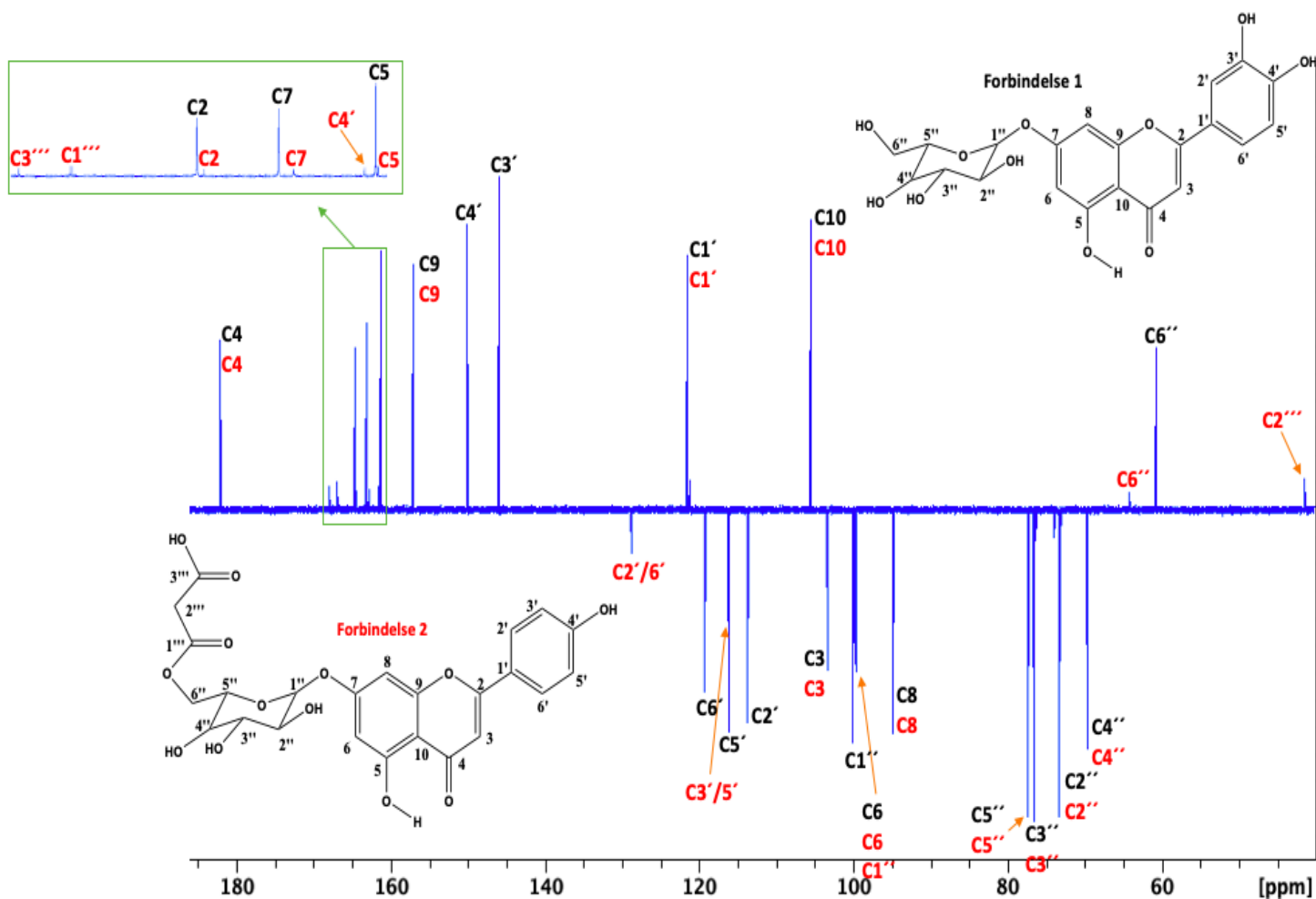
Mer oversiktlig anordning av den aromatiske regionen og sukkerregionen for forbindelse (1) og (2) er vist i figur 44-45.



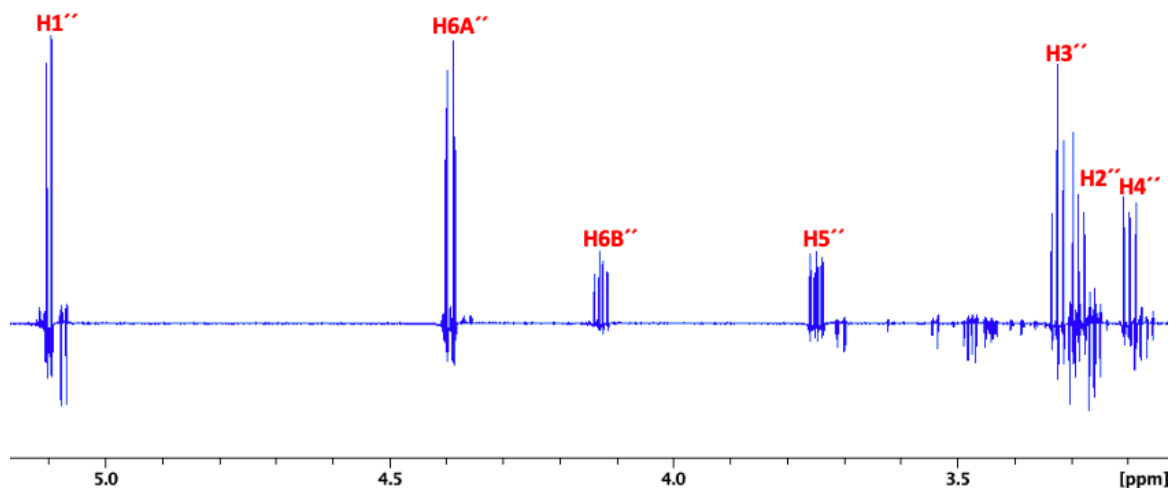
Figur 44: Ekspandert aromatisk region i 1D ¹H NMR spekteret med anordning av luteolin 7-O-β-glukopyranosid (1) med svart skrift og apigenin 7-O-(6''-O-malonyl-β-glukopyranosid) (2) med rød skrift.



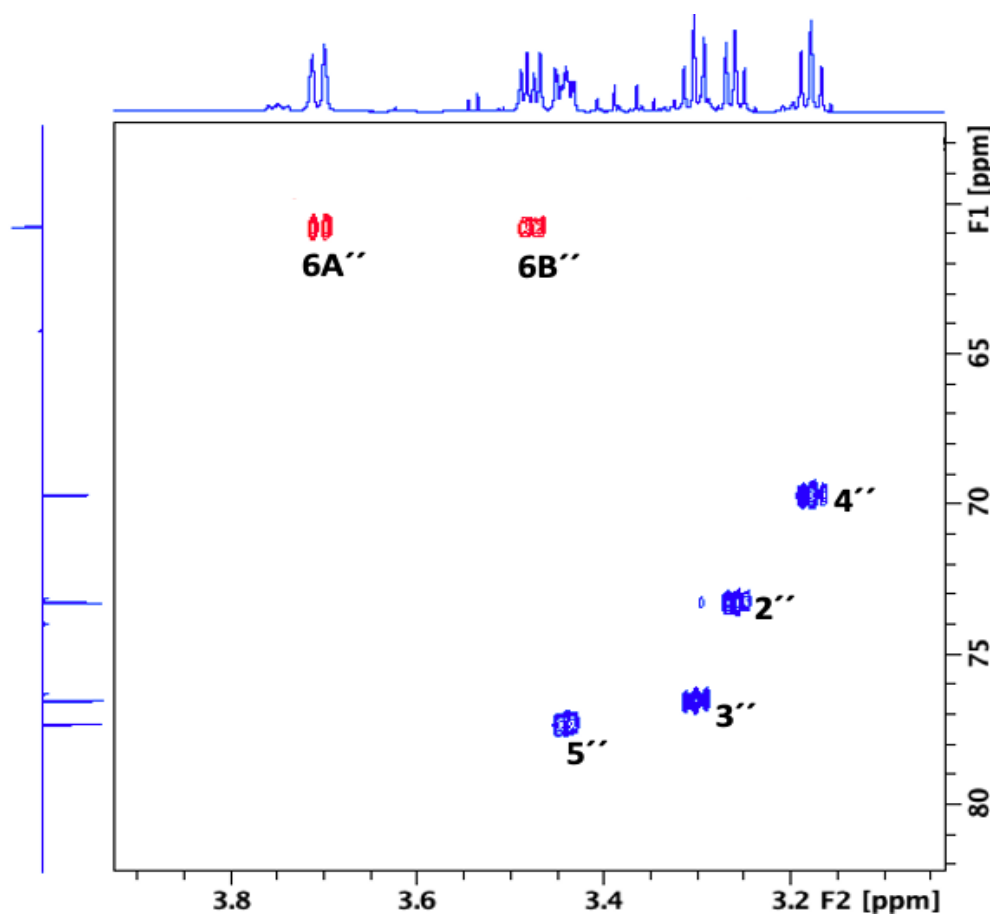
Figur 45: Ekspandert sukkerregion i 1D ^1H NMR spekteret med anordning av luteolin 7-O- β -glukopyranosid (1) med svart skrift og apigenin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (2) med rød skrift.



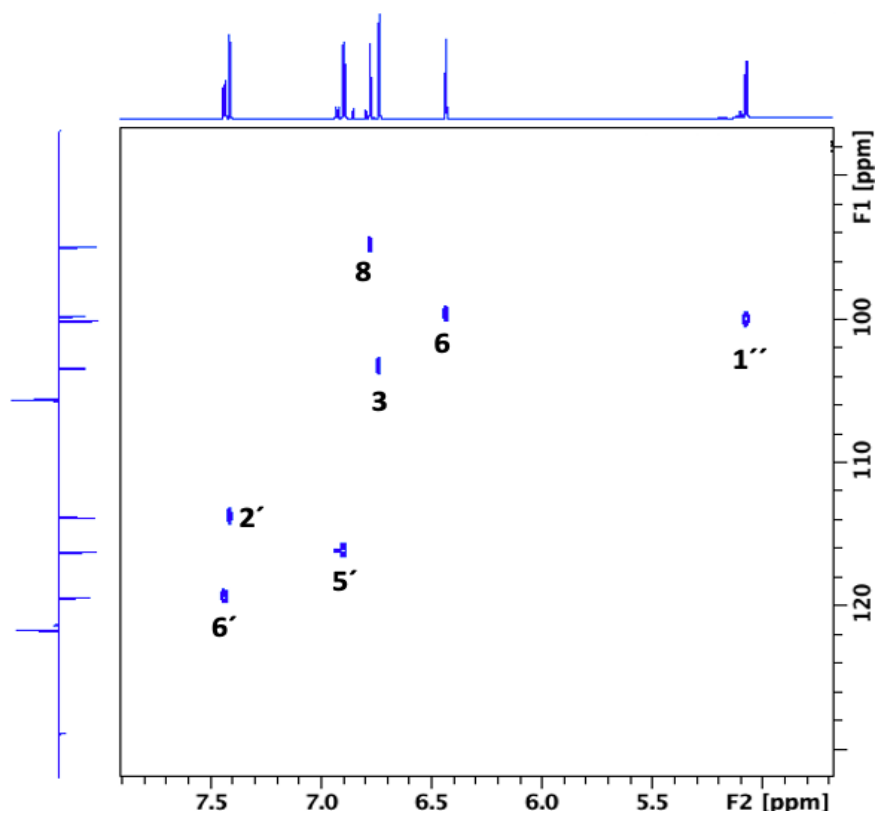
Figur 46: 1D ^{13}C CAPT NMR spekteret med fullstendig anordning av luteolin 7-O- β -glukopyranosid (1) med svart skrift og apigenin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (2) med rød skrift.



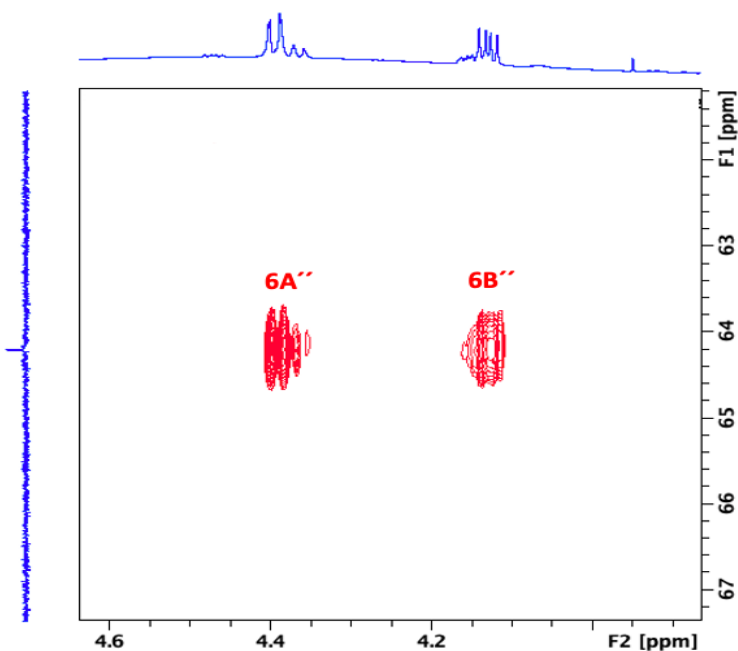
Figur 47: Ekspandert sukkerregion av 1D TOCSY NMR spekteret av apigenin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (**2**) som var til hjelp for å kunne identifisere sukkerenheten som β -glukopyranosyl ved at koblingskonstantene i sukkerenheten kunne bestemmes fra dette NMR-spekteret.



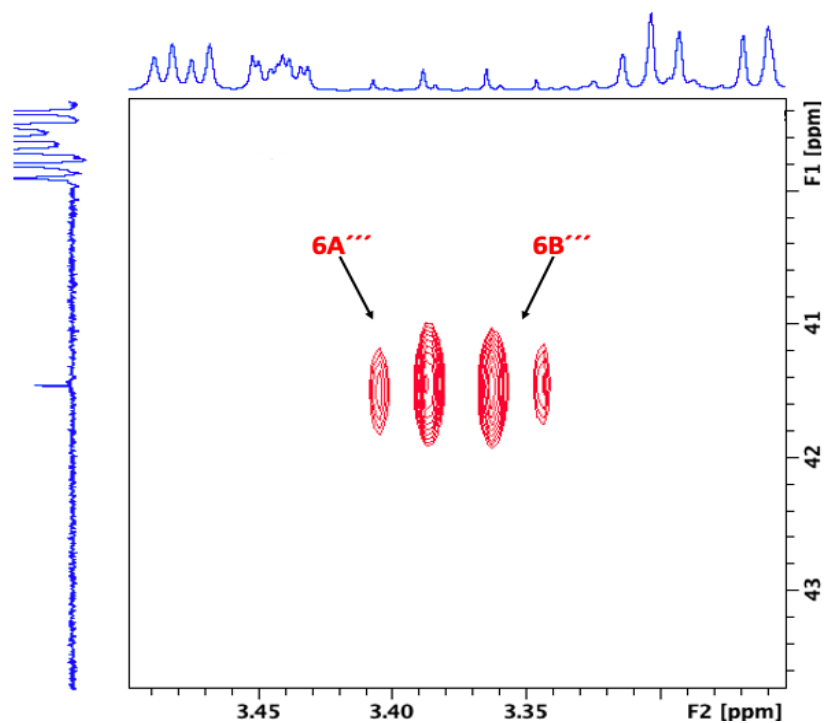
Figur 48: Ekspandert anordnet sukkerregion i 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av luteolin 7-O- β -glukopyranosid (**1**).



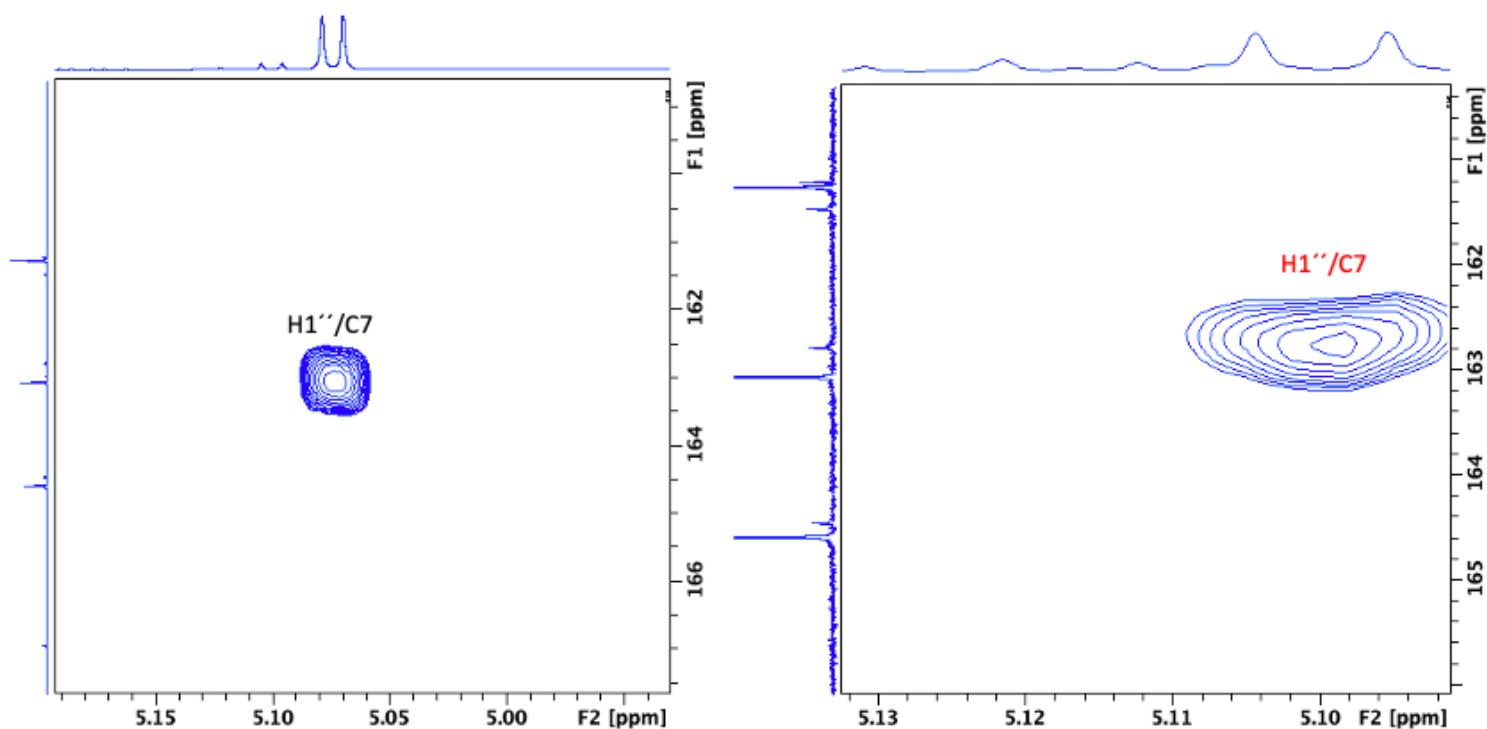
Figur 49: Ekspandert anordnet aromatregion av $2D$ 1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av luteolin 7-O- β -glukopyranosid (1).



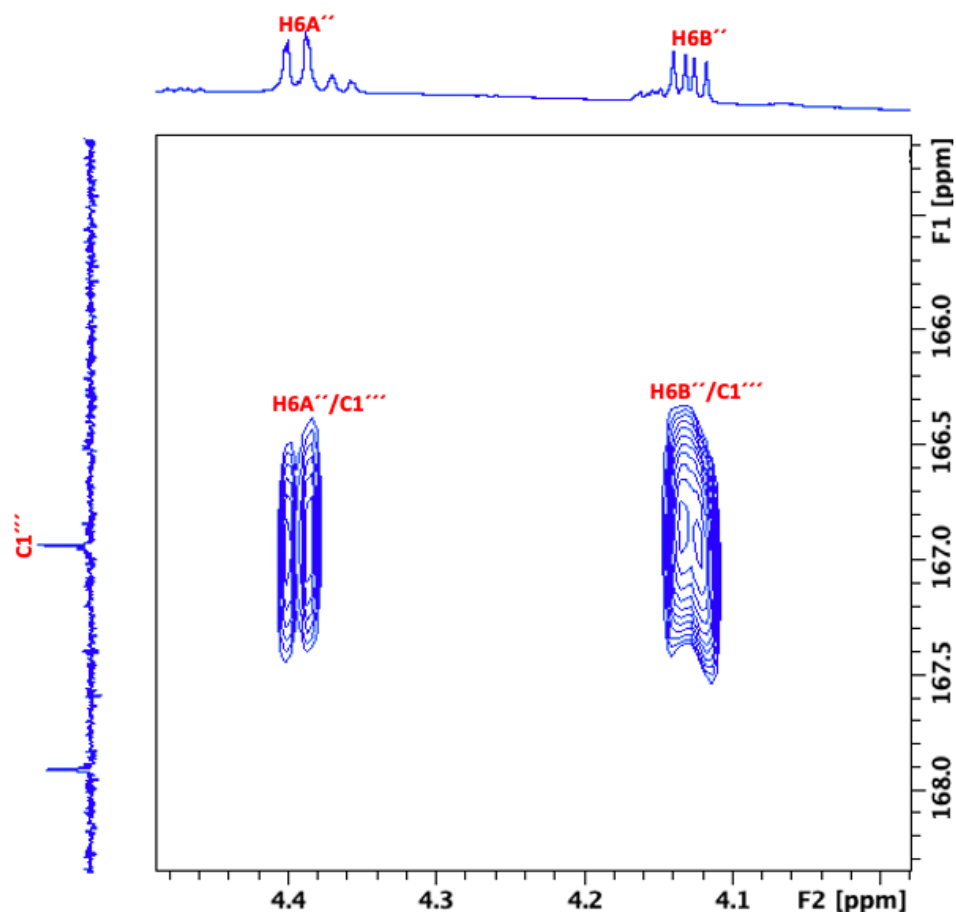
Figur 50: Ekspandert region av $2D$ 1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret som viser signaler for apigenin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (2). De observerte downfield kjemiske skiftverdiene for H6A'', H6B'' og C6'' indikerer at malonylgruppen er tilknyttet 6''-posisjon.



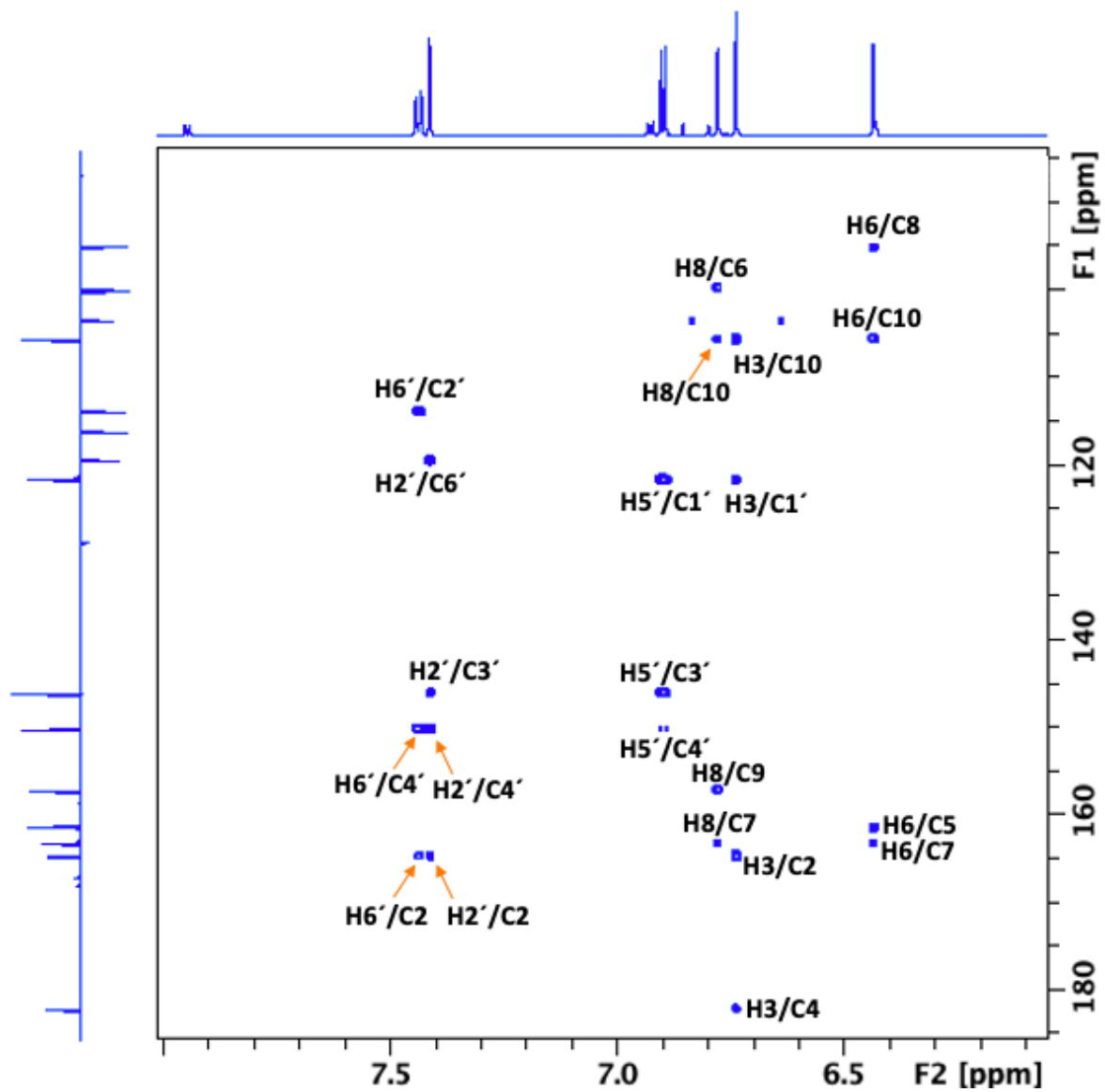
Figur 51: Ekspandert anordnet region av 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av apigenin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) som viser signalene for CH_2 -gruppen til malonylenheten til (2).



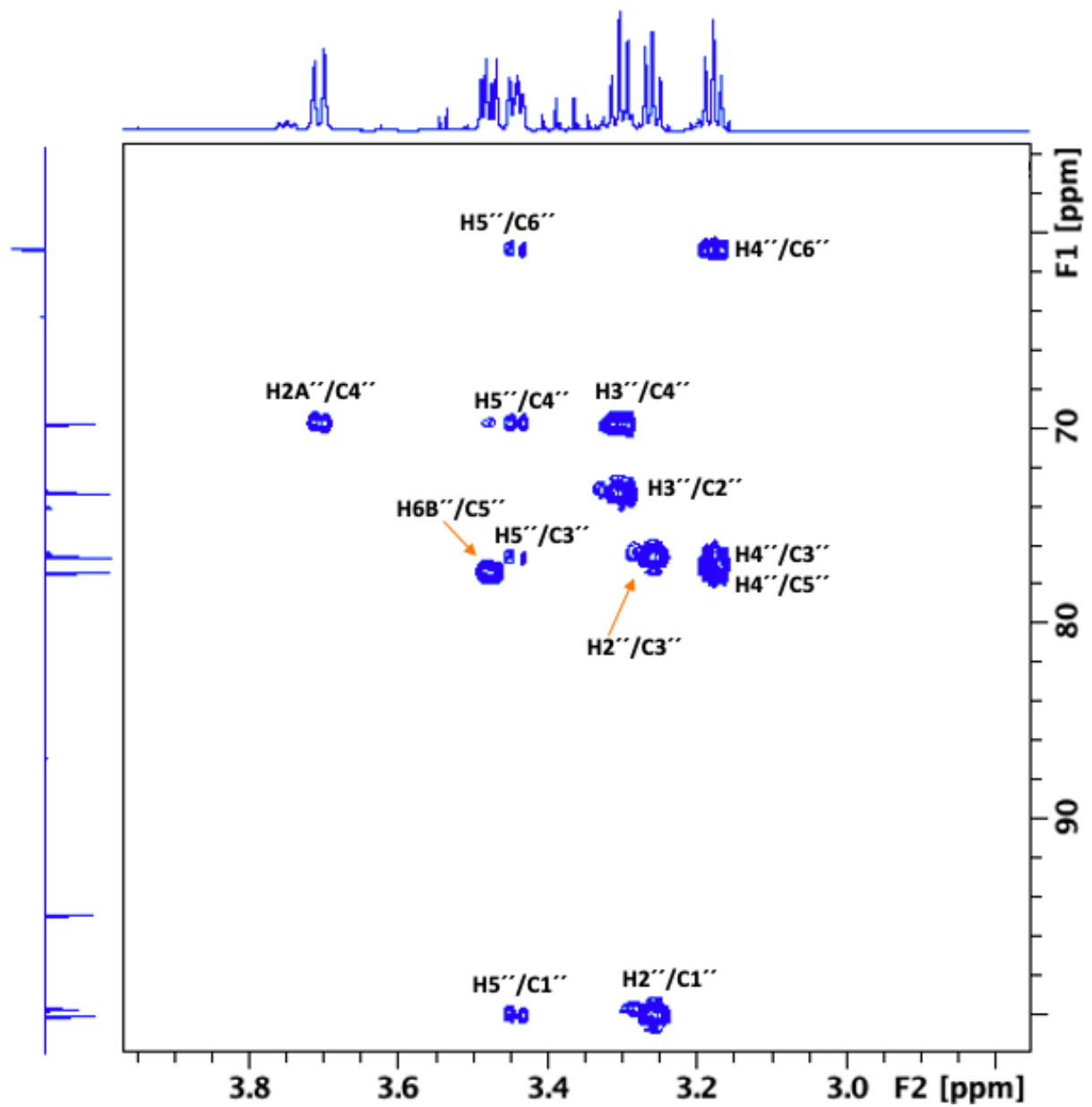
Figur 52: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret som viser krysstoppen $\text{H1}''/\text{C7}$ for luteolin 7-O- β -glukopyranosid (1) til venstre og krysstoppen $\text{H1}''/\text{C7}$ for apigenin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (2) til høyre, noe som bekrefter at sukkerenhetene til begge disse flavonene er tilknyttet aglykonet i 7-posisjon.



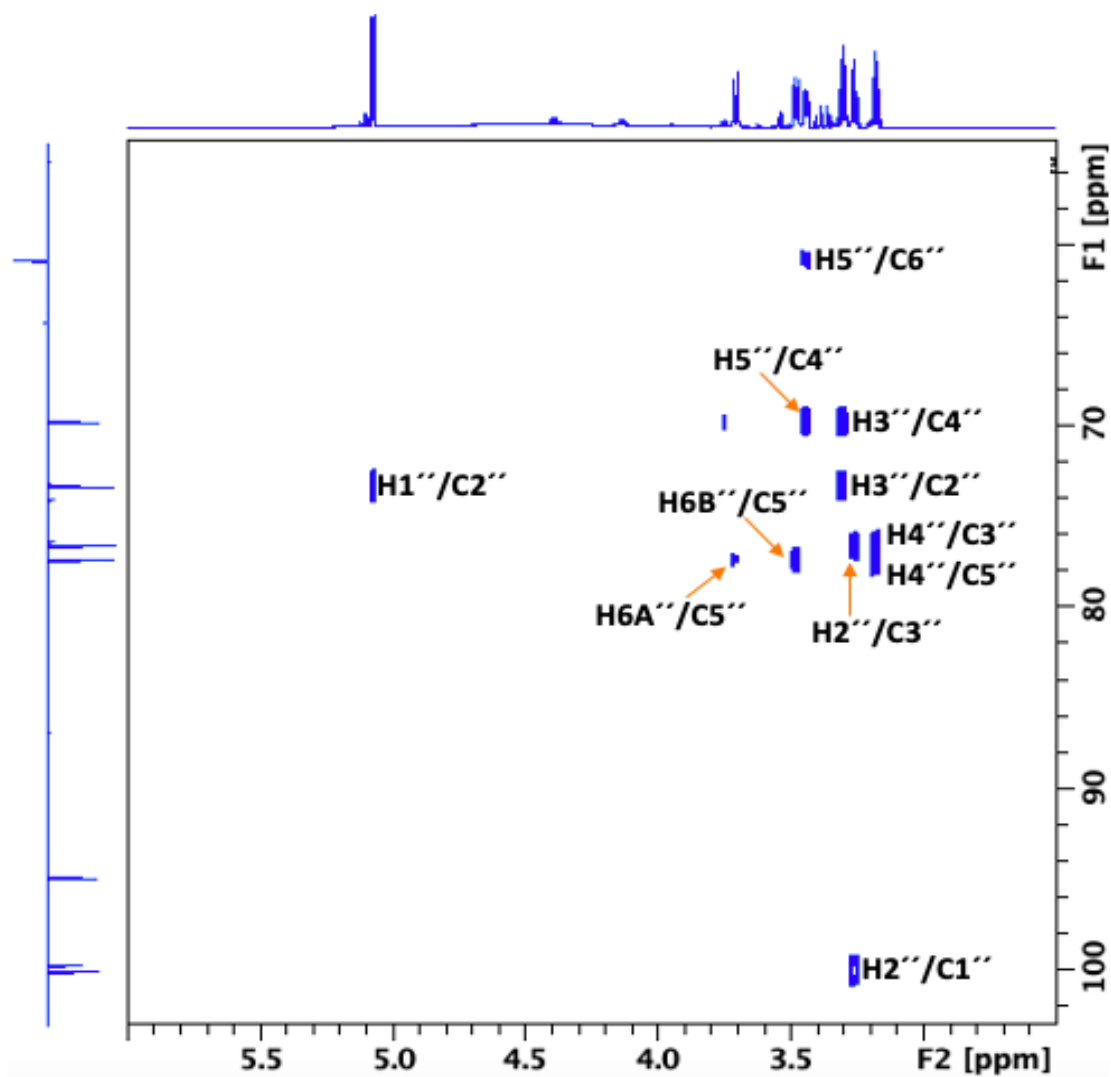
Figur 53: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret som viser krysstoppen mellom $\text{H6A}''/\text{6B}''$ og $\text{C1}'''$ for apigenin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (2) og som dermed bekrefter at malonylgruppen er tilknyttet glukosylenheten i 6''-posisjon.



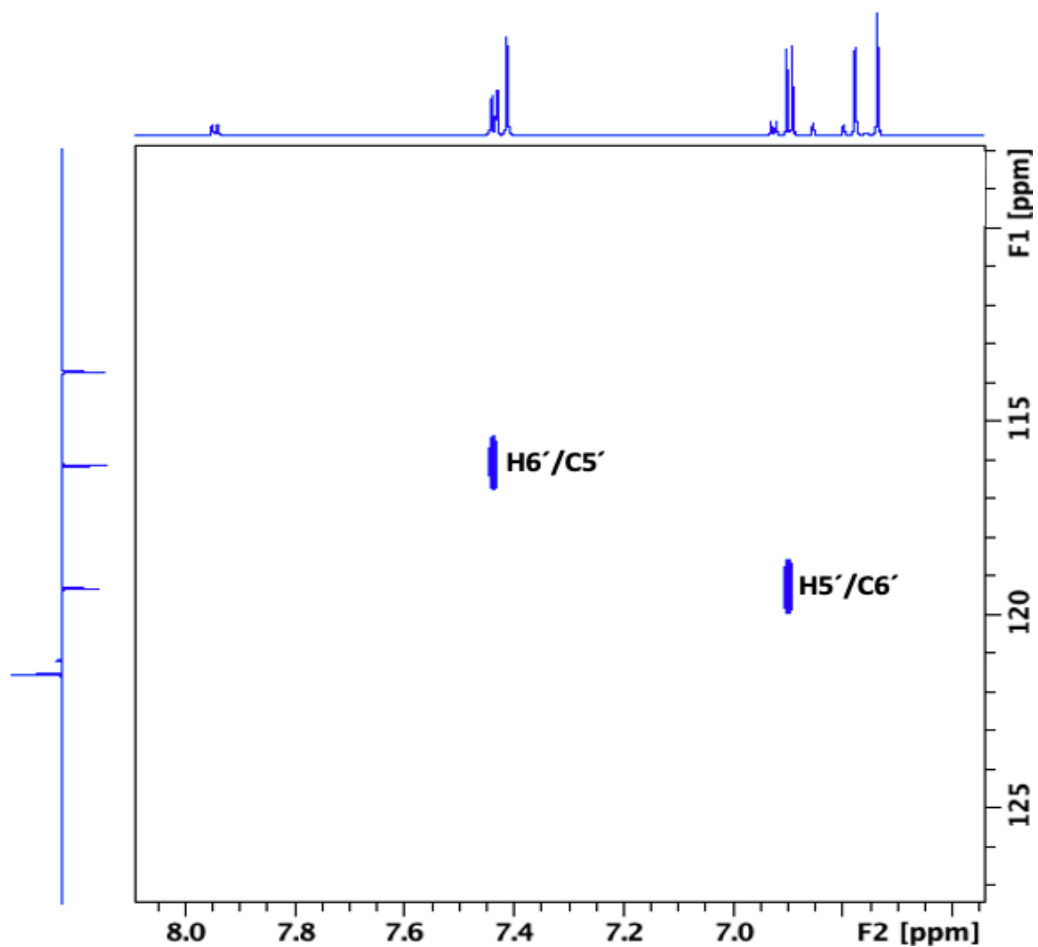
Figur 54: Ekspandert region av $2\text{D } ^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC NMR spekteret som viser kryssstopper i den aromatiske regionen for luteolin 7- O - β -glukopyranosid (**1**). Disse krysstoppene var spesielt viktige for å kunne fullstendig anordne samtlige ^{13}C kjemiske skiftverdier for luteolin 7- O - β -glukopyranosid (**1**).



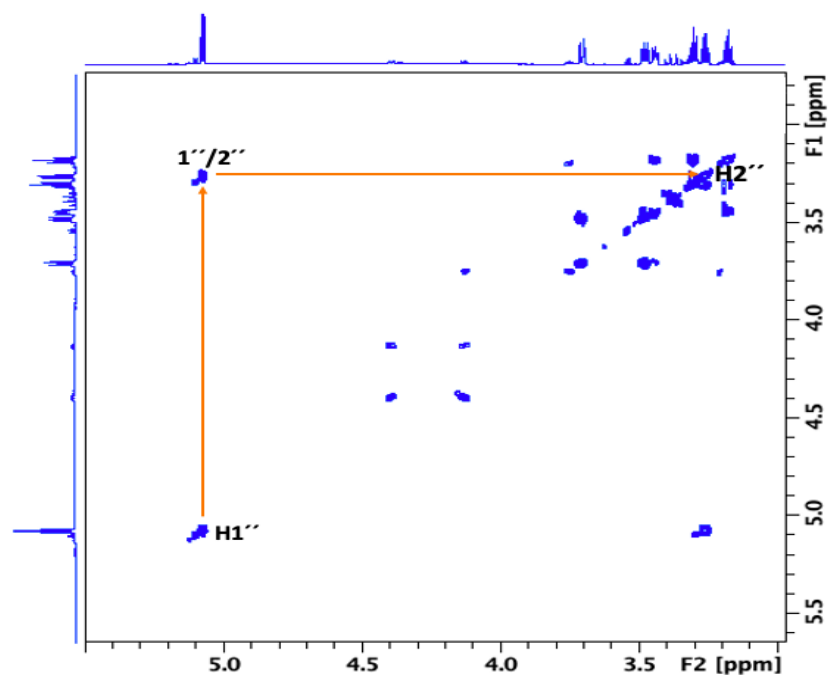
Figur 55: Ekspandert sukkerregion av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av luteolin 7-O- β -glukopyranosid (**1**).



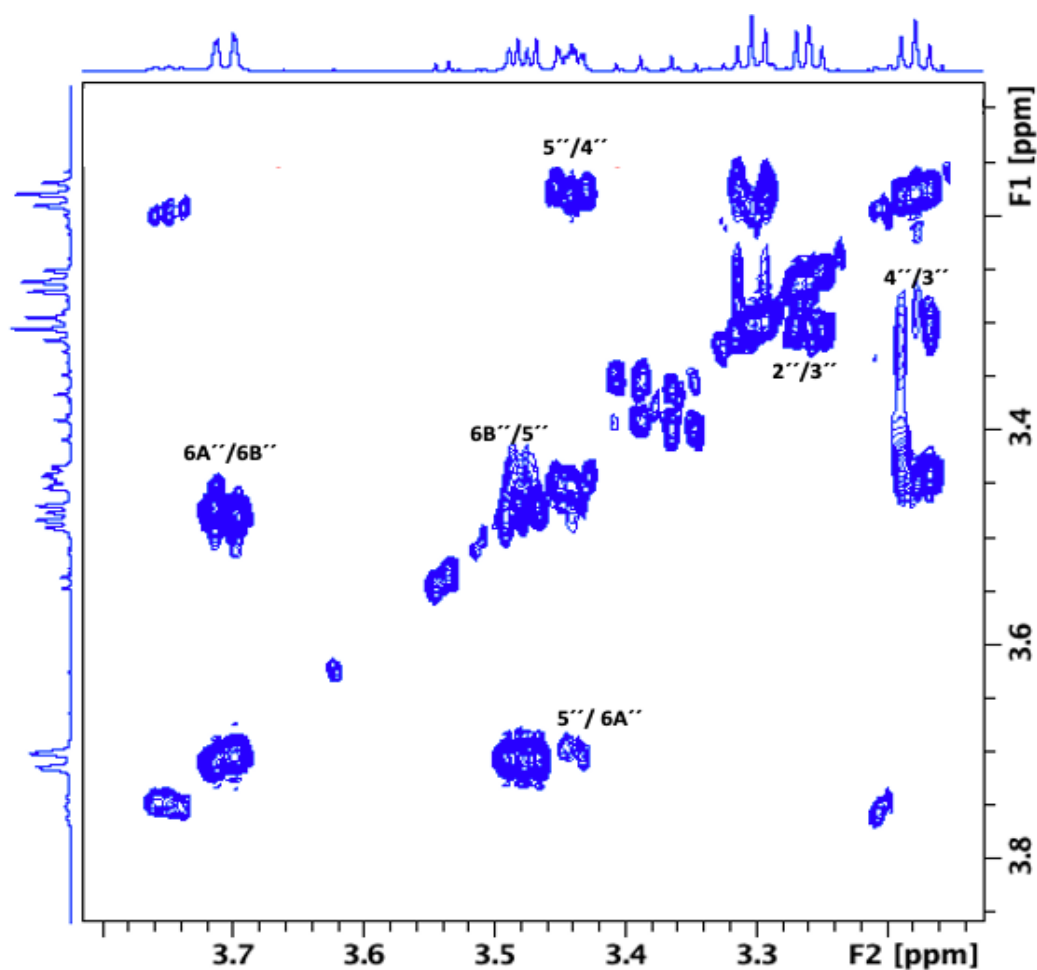
Figur 56: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekteret som viser tobindingskorrelasjoner i glukose av luteolin 7-O- β -glukopyranosid (**1**) som var viktige for fullstendig anordning av samtlige ^1H og ^{13}C kjemiske skiftverdier for glukosylenheten.



Figur 57: Ekspandert aromatregion av 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekteret av luteolin 7-O- β -glukopyranosid (**1**).



Figur 58: Ekspandert sukkerregion av 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekteret av luteolin 7-O- β -glukopyranosid (**1**).



Figur 59: Ekspandert sukkerregion av 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekteret av luteolin 7- O - β -glukopyranosid (**1**).

6.1.2 APIGENING 7- O - β -GLUKOPYRANOSID

Apigenin 7- O - β -gluopyranosid (**3**) ble isolert fra fraksjon VM2S83+84, VM3+4LS26, EM3-5S61-64, EV5-8LS22 ved hjelp av Sephadex LH-20 kolonnekromatografi og fra fraksjon EV5-8LS23-26P7+30-31 og bunnfallet fra EV5-8LS23-26P7+30-31 ved hjelp av preparativ HPLC. Utfra NMR-spektrene og kromatogrammene vises at fraksjonene EM3-5S61-64, EV5-8LS23-26P7+30-31 og bunnfallet fra EV5-8LS23-26P7+30-31 er renere enn fraksjon VM2S83+84 som har vært brukt til strukturbestemmelse av forbindelse (**3**). De anordnede NMR-spektrene til fraksjon EM3-5S61-64 er vist nedenfor (figur 63-72). Det ble isolert 44.7 milligram av forbindelsen fra den kombinerte fraksjonen EM3-5S61-64. Det ble totalt isolert 123.8 mg fra samtlige av de ovenfor nevnte fraksjonene. Fullstendige NMR-spektre foreligger i vedlegg 3, s. 257-261.

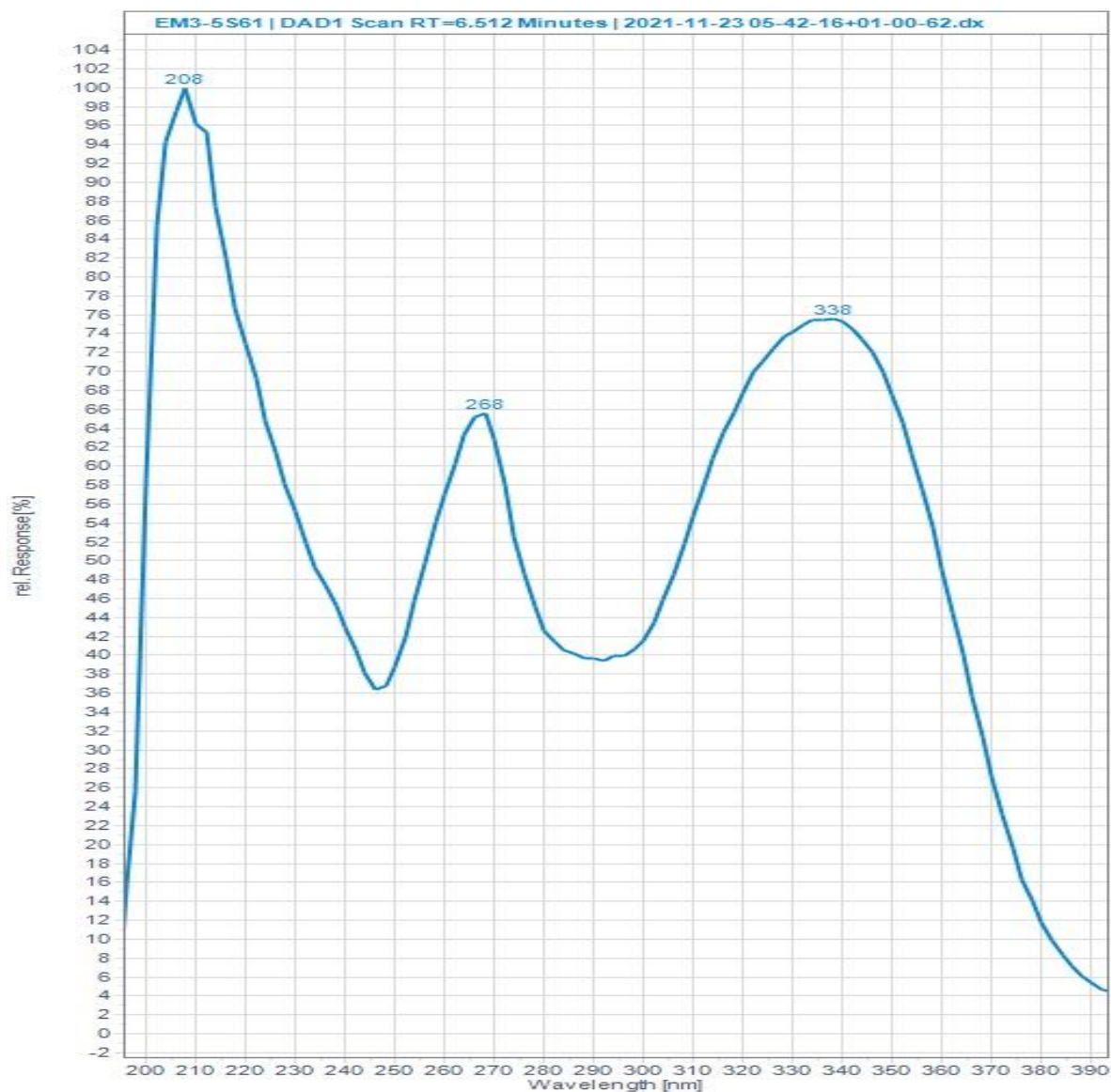
Basert på søk i Scifinder om biologisk aktivitet til forbindelse (3) finner en at den har moderat anti-hyperglykemisk aktivitet (44). Apigenin 7-*O*- β -gluopyranosid har også vist blant annet anti-oksidative, anti-inflammatoriske og neuroprotektive egenskaper (45).

UHPLC-kromatogrammet og UV-absorpsjonsspekteret til fraksjon EM3-5S61 er vist i figurene 60-61. Forbindelsen har retensjonstid på 6.51 minutter og UV-maksabsorpsjon ved 208 nm, 268 nm og 338 nm. Denne forbindelsen er tidligere funnet i *Myrrhis odorata* av Cisowski (1985) (37).

UHPLC-kromatogrammene til fraksjonene EM3-5S62, EM3-5S63 og EM3-5S64 er vist i vedlegg 2, s. 246-247.

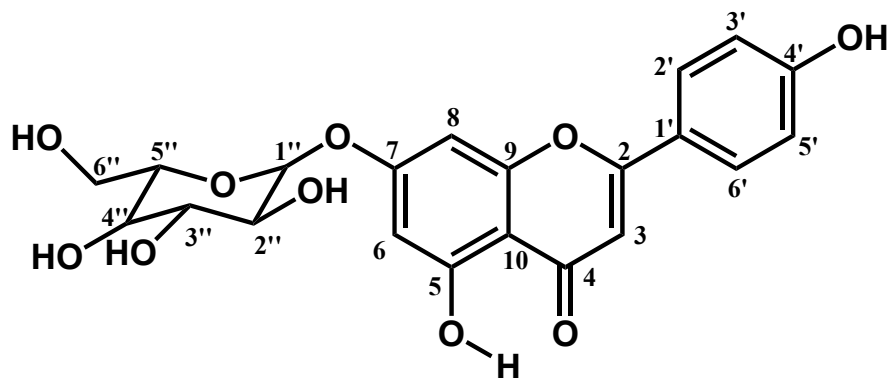


Figur 60: UHPLC-kromatogram av apigenin 7-*O*- β -gluopyranosid (3) i fraksjon EM3-5S61 detektert ved 280 ± 10 nm.



Figur 61: UV-spektrum av apigenin 7-O-β-gluopyranosid (3).

Molekylstrukturen til forbindelse (3) er vist i figur 62. Forbindelse (3) er et flavon med uniisotopisk molekylvekt 432.1056 g/mol og strukturformel $C_{21}H_{20}O_{10}$.

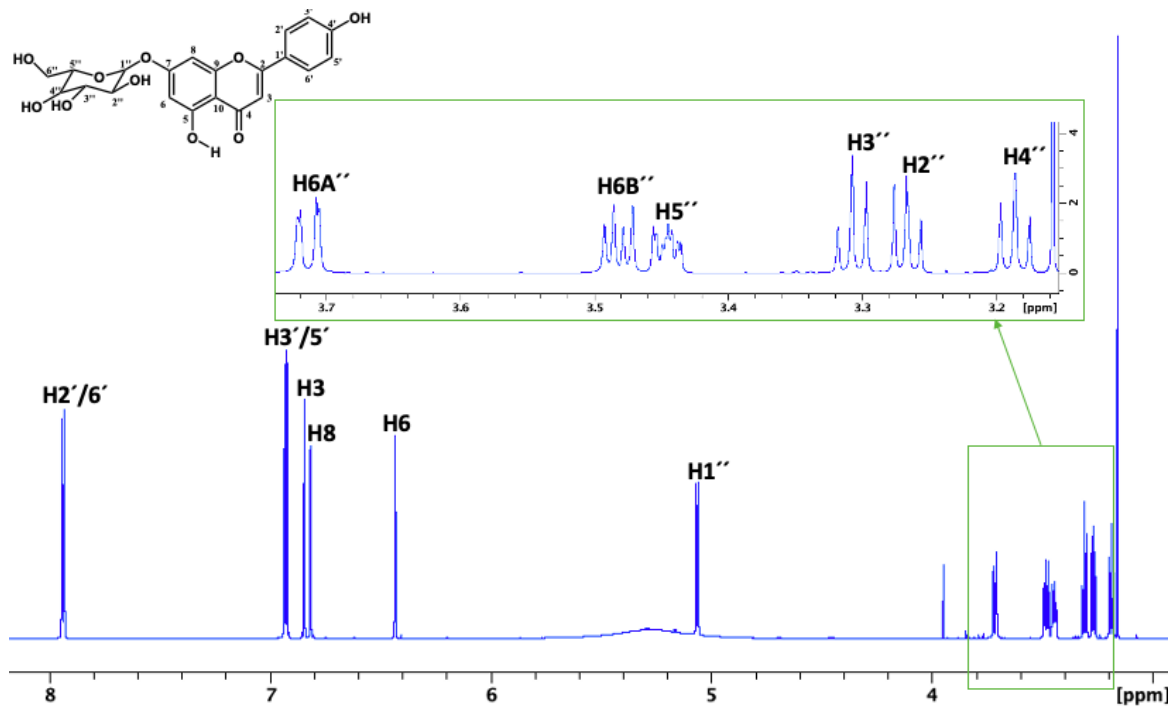


Figur 62: Struktur av apigenin 7-O-β-glukopyranosid (3) med nummerering.

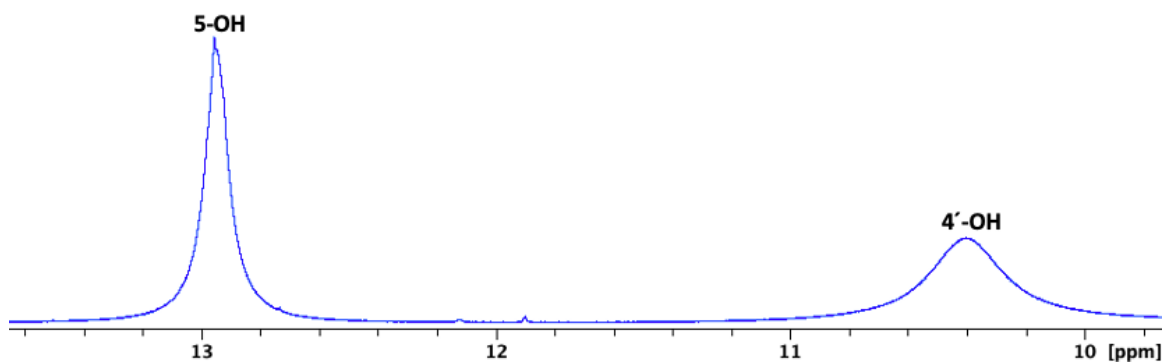
Det ble tatt 1D ¹H-NMR, 1D ¹³C CAPT, 2D ¹H-¹³C HMBC, 2D ¹H-¹³C HSQC, 2D ¹H-¹H COSY og 2D ¹H-¹³C H2BC spektrere av forbindelse (3). Tabell 17 viser fullstendig anordnede ¹H og ¹³C kjemiske skiftverdier, samt koblingskonstantene (Hz) til forbindelse (3). NMR-dataene for forbindelse (3) stemmer godt overens med referanselitteratur (39). Anordnede NMR-spektrere er vist i figur 63-72. Det observerte 4H AA'XX'-systemet bestående av to 2H semidubletter observert ved 7.95 ppm (H2' og H6', 'd' 8.8 Hz) og ved 6.93 ppm (H3' og H5', 'd' 8.8 Hz) bekrefter det symmetrisk disubstituerte substitusjonsmønsteret til B-ringen til forbindelse (3). Det observerte downfield kjemiske skiftet for C4' (161.47 ppm) viser at dette aromatiske karbonatomet er tilknyttet oksygen. HMBC spekteret (figur 68) viser kryssstopp mellom H1'' (5.06 ppm) og C7 (163.05) og bekrefter dermed at sukkermolekylet er tilknyttet i 7-posisjon til apigenin.

Tabell 17: ¹H og ¹³C NMR kjemiske skiftverdier (ppm) og koblingskonstanter (Hz) av apigenin 7-O-β-glukopyranosid (3) fraksjon EM3-5S61-64 isolert fra *Myrrhis odorata* i DMSO-D₆ ved 298K.

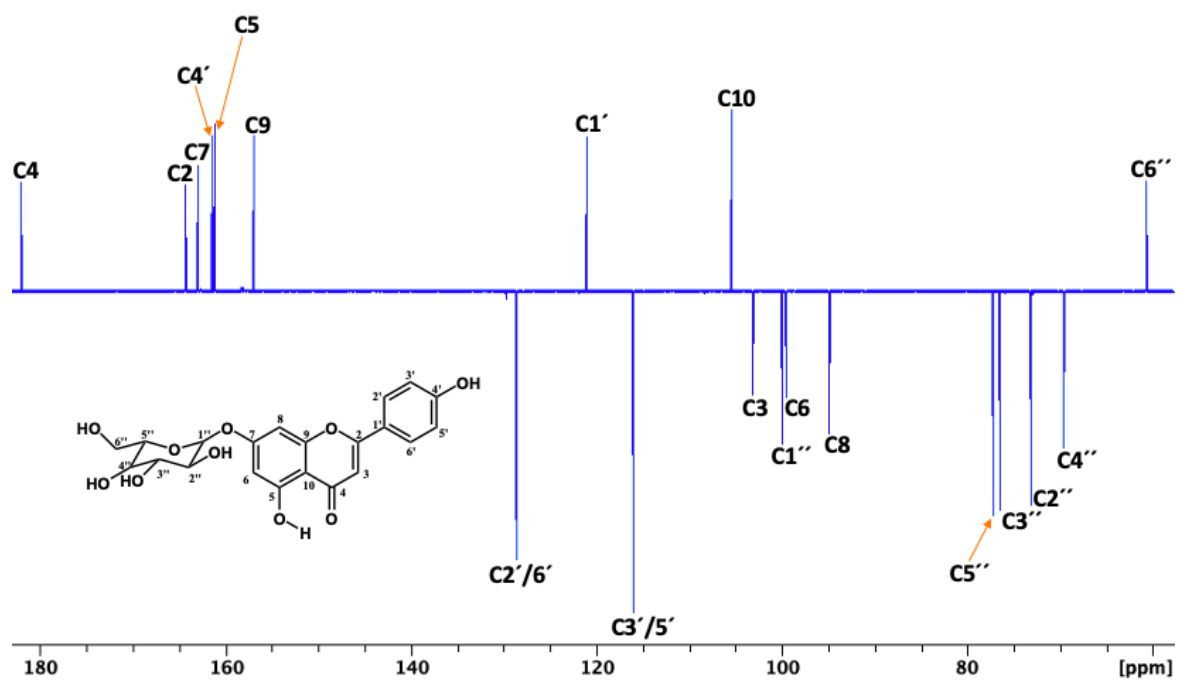
	δ ¹ H 3	δ ¹³ C 3
2		164.35
3	6.86 s	103.19
4		182.09
5		161.20
6	6.44 d 2.2	99.60
7		163.05
8	6.82 d 2.2	94.93
9		157.03
10		105.42
1'		121.11
2'/6'	7.95 'd' 8.8	128.70
3'/5'	6.93 'd' 8.8	116.09
4'		161.47
5-OH	12.96 s	
4'-OH	10.41 s	
7-O-β-glucoside		
1''	5.06 d 7.7	99.99
2''	3.25 dd 8.9, 7.7	73.19
3''	3.29 t 8.9	76.53
4''	3.17 dd 9.6, 8.9	69.63
5''	3.44 ddd 9.6, 5.9, 2.1	77.27
6A''	3.70 dd 11.9, 2.1	60.68
6B''	3.47 dd 11.9, 5.9	



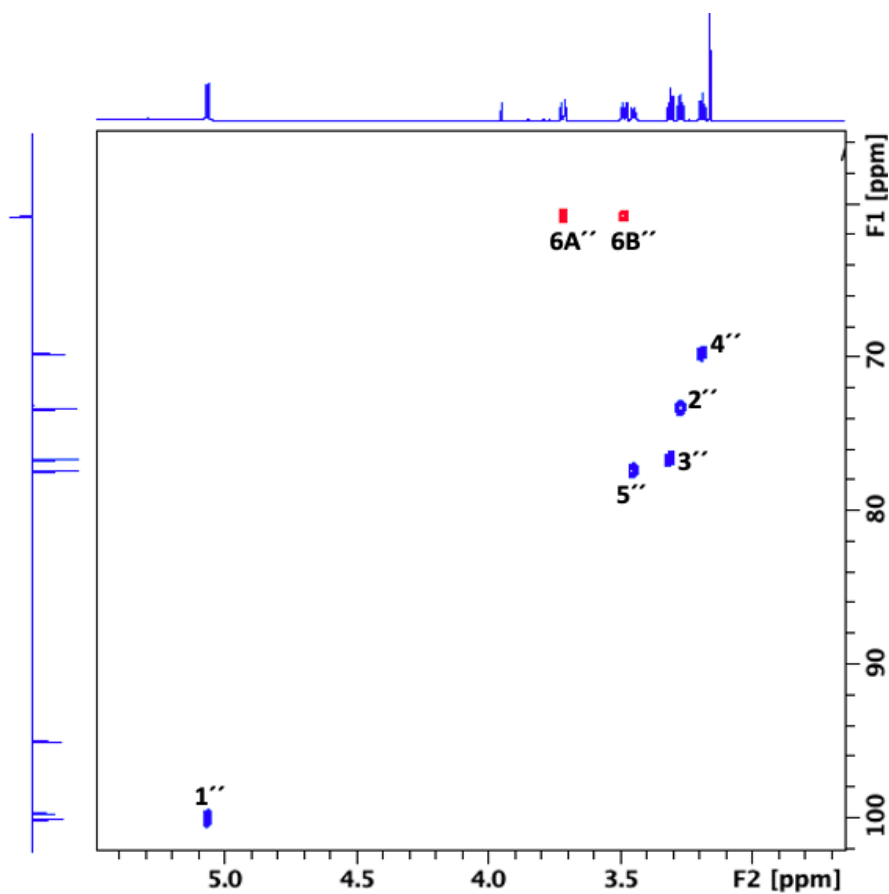
Figur 63: Ekspandert region av 1D ^1H NMR spekteret av apigenin 7-O- β -glukopyranosid (3) med anordning av aromatregion og sukkerregion.



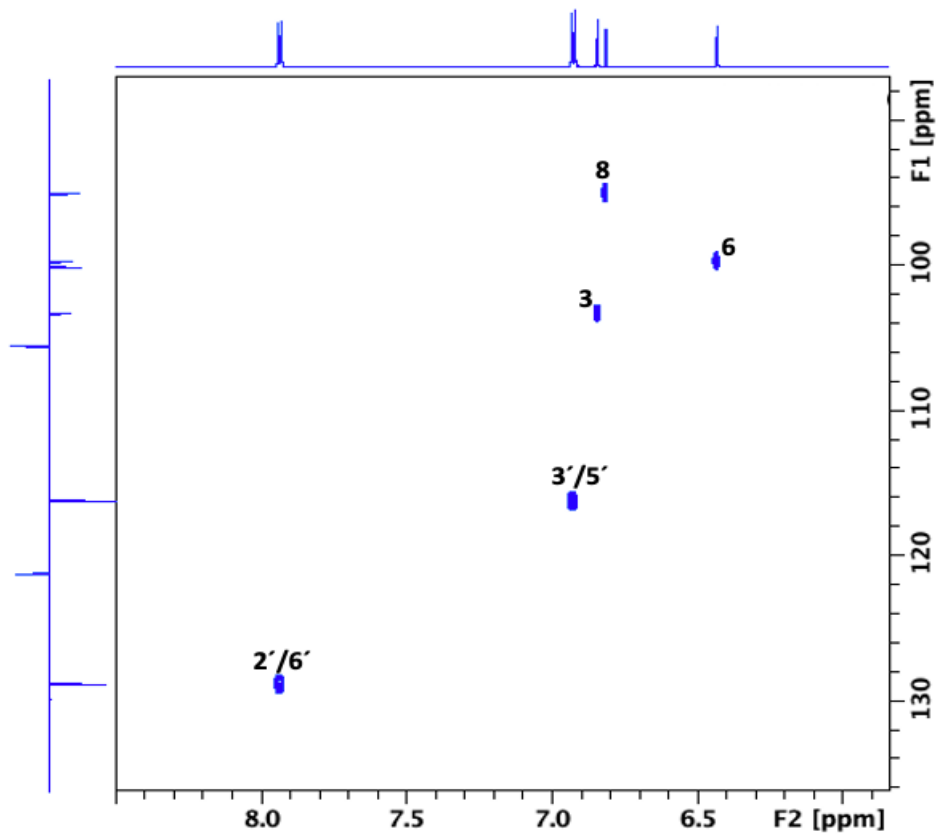
Figur 64: Ekspandert region av 1D ^1H NMR spekter med anordning av de fenoliske OH-gruppene til apigenin 7-O- β -glukopyranosid (3).



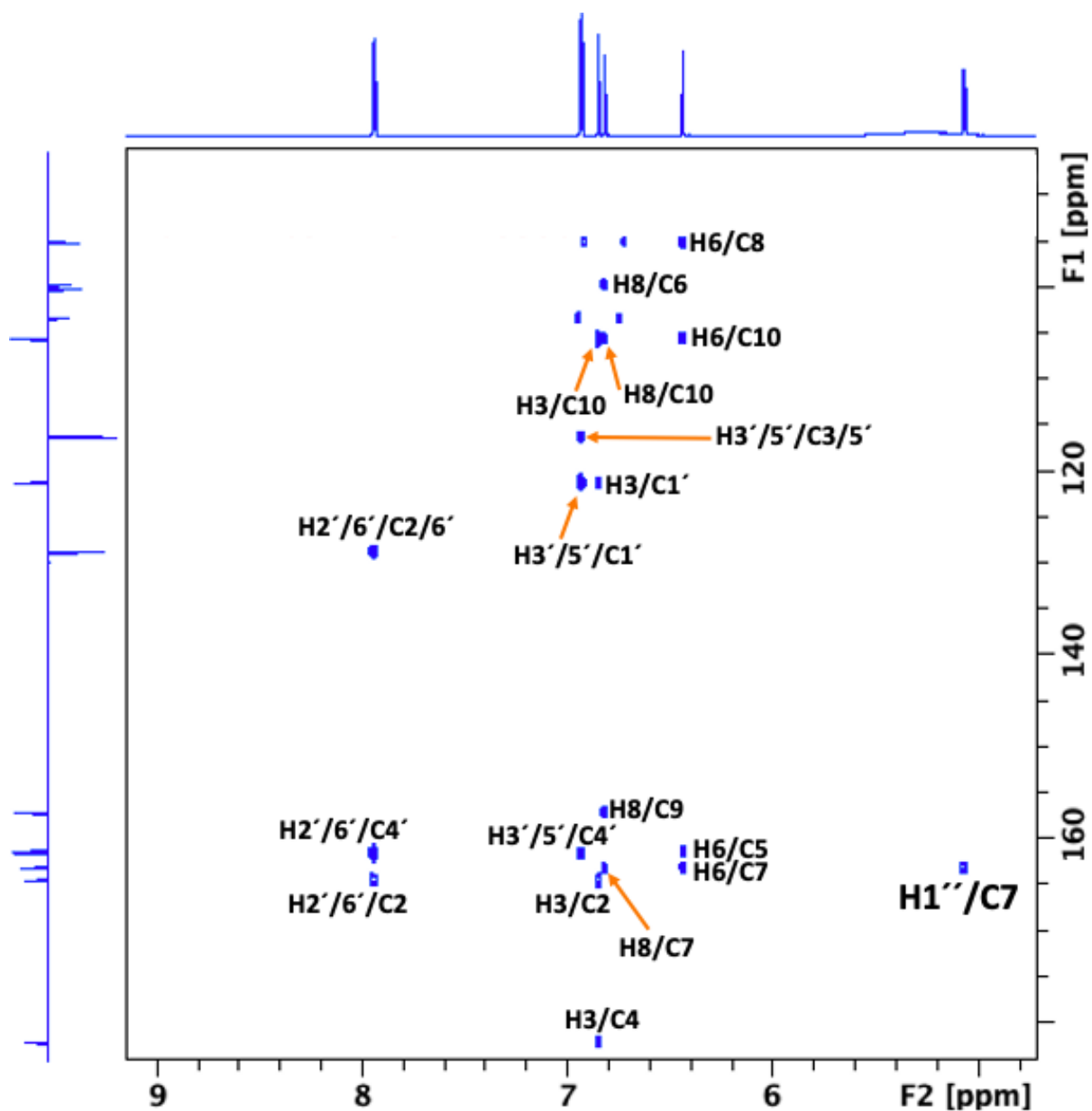
Figur 65: 1D ^{13}C CAPT NMR spekter med fullstendig anordning av apigenin 7-O- β -glukopyranosid (3).



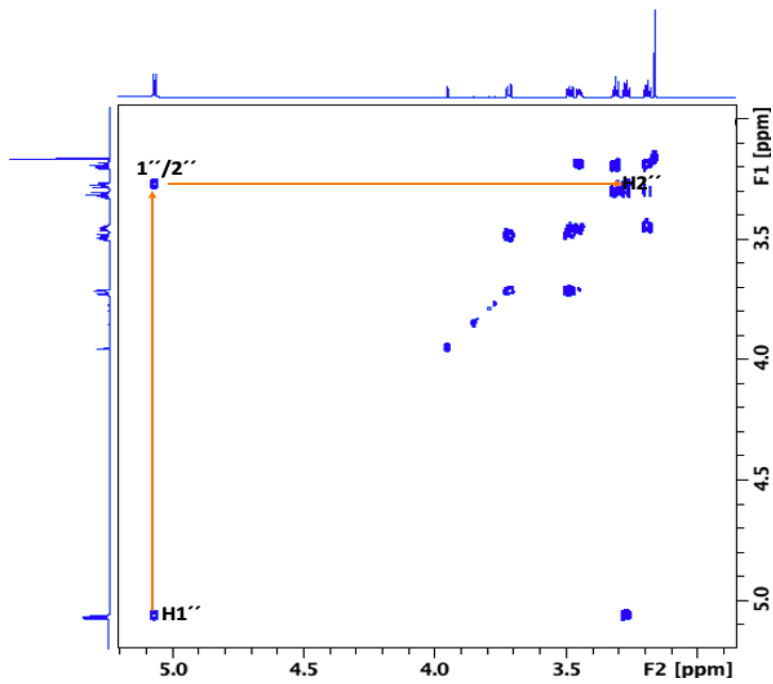
Figur 66: Ekspandert anordnet sukkerregion av 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av apigenin 7-O- β -glukopyranosid (3).



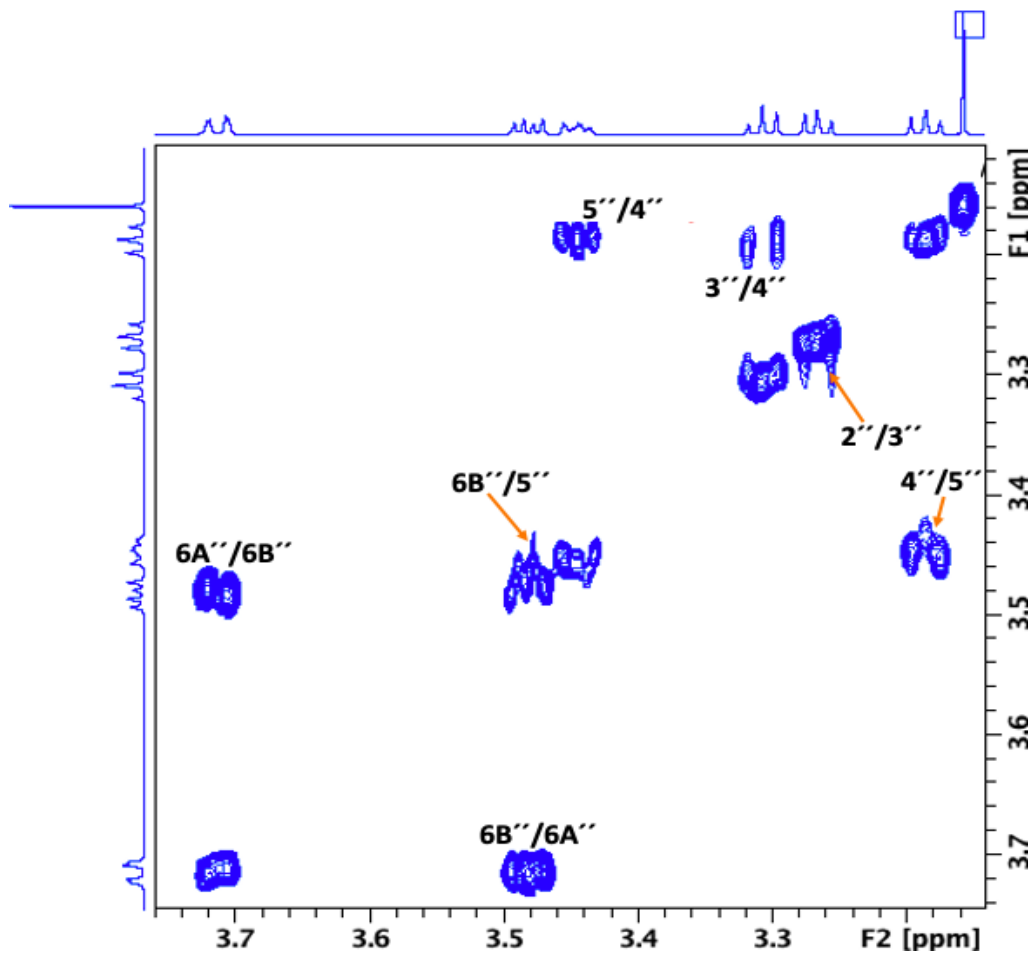
Figur 67: Ekspandert anordnet aromatisk region av 2D ¹H-¹³C HSQC NMR spekteret av apigenin 7-O-β-glukopyranosid (3).



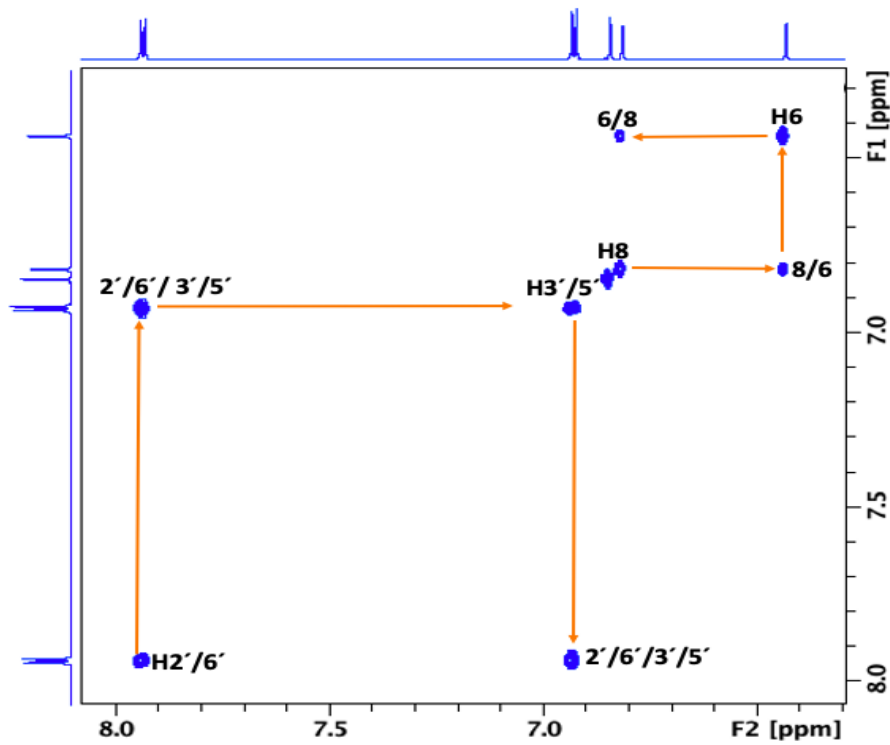
Figur 68: Ekspandert aromatisk region i 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av apigenin 7-O- β -glukopyranosid (3) som viser hvordan molekylet henger sammen, samt krysstoppen mellom $\text{H1}''$ (5.06 ppm) og C7 (163.05 ppm) som bekrefter at sukkerenhet er festet til apigenin aglykon i 7-posisjon.



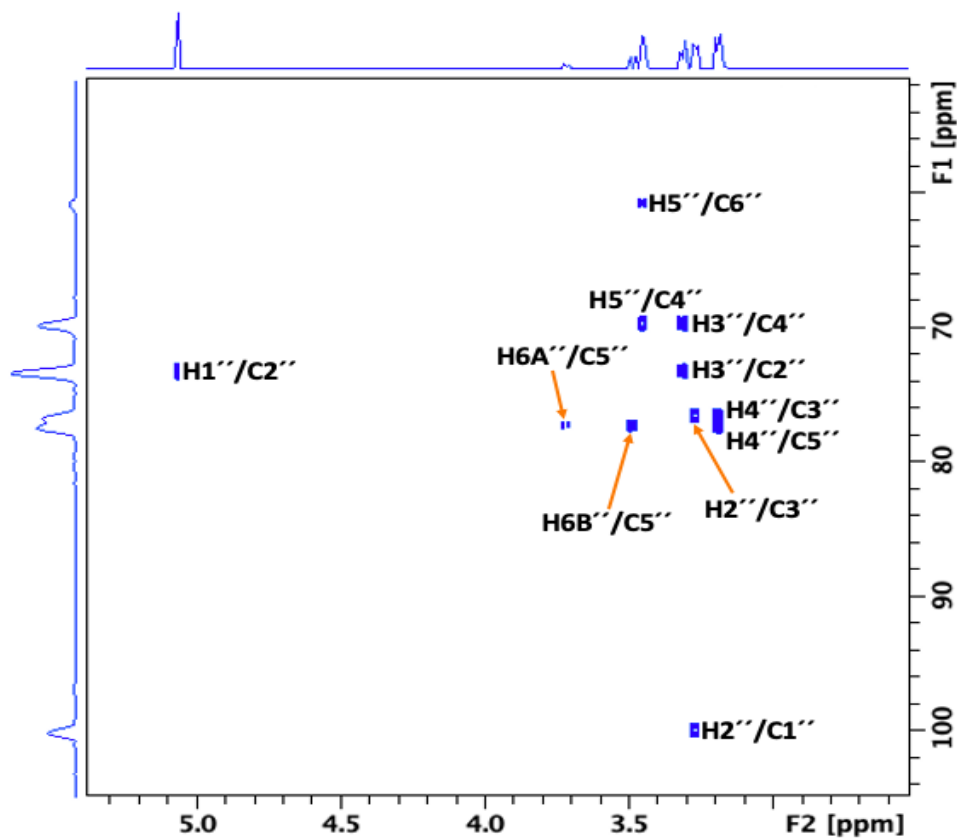
Figur 69: Ekspandert sukkerregion av 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekteret av apigenin 7-O- β -glukopyranosid (3).



Figur 70: Ekspandert sukkerregion av 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekteret av apigenin 7-O- β -glukopyranosid (3).



Figur 71: Ekspandert region av 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekteret av apigenin 7-O- β -glukopyranosid (3).

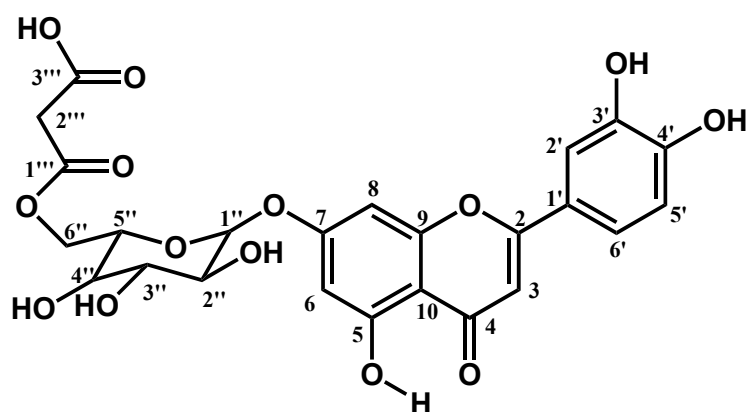


Figur 72: Ekspandert sukkerregion av 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekteret av apigenin 7-O- β -glukopyranosid (3).

6.1.3 LUTEOLIN 7-O-(6''-O-MALONYL- β -GLUKOPYRANOSID)

Luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (**4**) ble isolert i fraksjon VM2S95-100 ved hjelp av stor Sephadex LH-20 kolonne. Det ble isolert 81.7 milligram av forbindelsen. Luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) er ikke tidligere blitt funnet i *Myrrhis odorata*. Forbindelsen uten malonyl-gruppen, har tidligere blitt funnet av Cisowski (1985) (37). Grunnen til at luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) ikke tidligere er blitt identifisert i *Myrrhis odorata* kan skyldes at bindingen mellom malonylgruppen og aglykonet er labil, noe som medfører at malonylerte flavonoider deacyleres under isolasjonsprosessen (70). Litteratursøk i Scifinder viste at det kun foreligger data av begrenset omfang med hensyn til studier av biologisk aktivitet til forbindelse (**4**). Kim (2019) har imidlertid evaluert biologisk aktivitet til forbindelse (**4**) sammenlignet med forbindelse (**1**) som potensielt legemiddel mot artritt og som autoimmunn behandling (46).

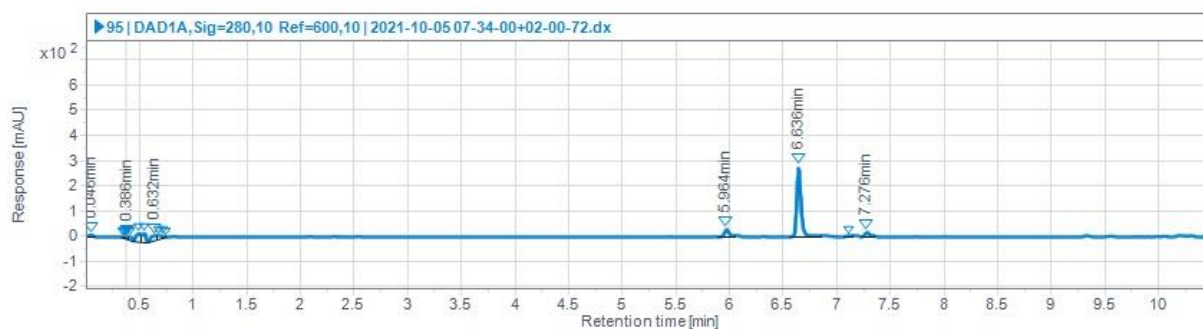
Strukturformel til luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (**4**) er vist i figur 73. UHPLC-kromatogrammet og UV-spekteret til forbindelse (**4**), vist i figur 74-75, viser at forbindelsen har retensjonstid på 6.64 minutter og maks UV-absorpsjon ved 208 nm, 254 nm og 346 nm. NMR-data og observerte kjemisk skiftverdier og koblingskonstanter for (**4**) (tabell 18) stemmer godt med referanseverdier for lignende molekyl, uten malonylsyre-delen (38) med unntak av de kjemiske skiftverdiene i sukkerenheten som er påvirket av substitusjonen av malonylgruppen i 6''-posisjon, noe som først og fremst gjelder H6A'', H6B'', C6'', H5'' og C5'' (tabell 18). Anordnete NMR-spektre av forbindelse (**4**) er vist i figur 76-87.



Figur 73: Struktur av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (**4**) med nummerering.

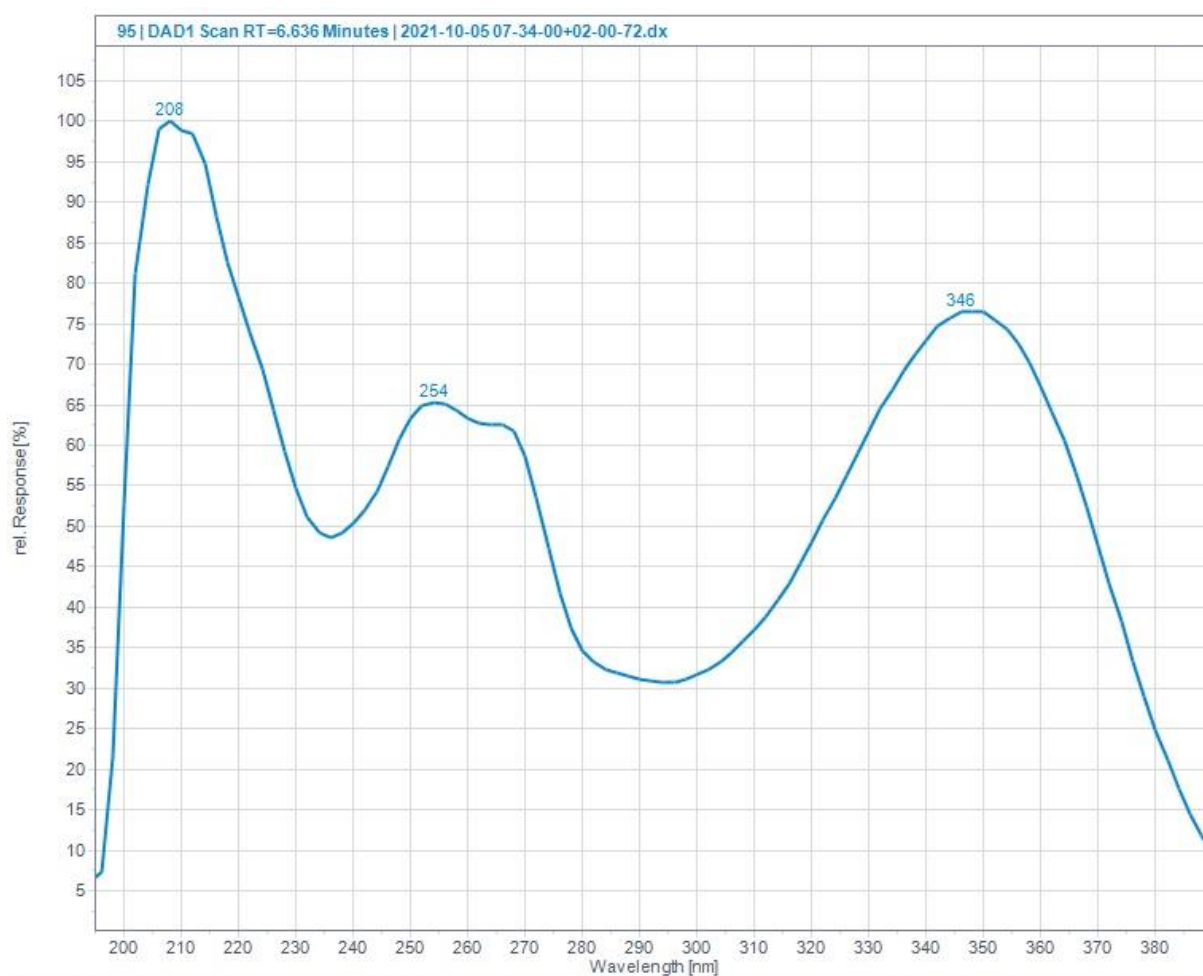
Uniisotopisk molekylvekt: 534.1010 g/mol

Strukturformel: C₂₄H₂₂O₁₄



Figur 74: UHPLC-kromatogram av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (**4**) i fraksjon VM2S95 detektert ved 280 ± 10 nm.

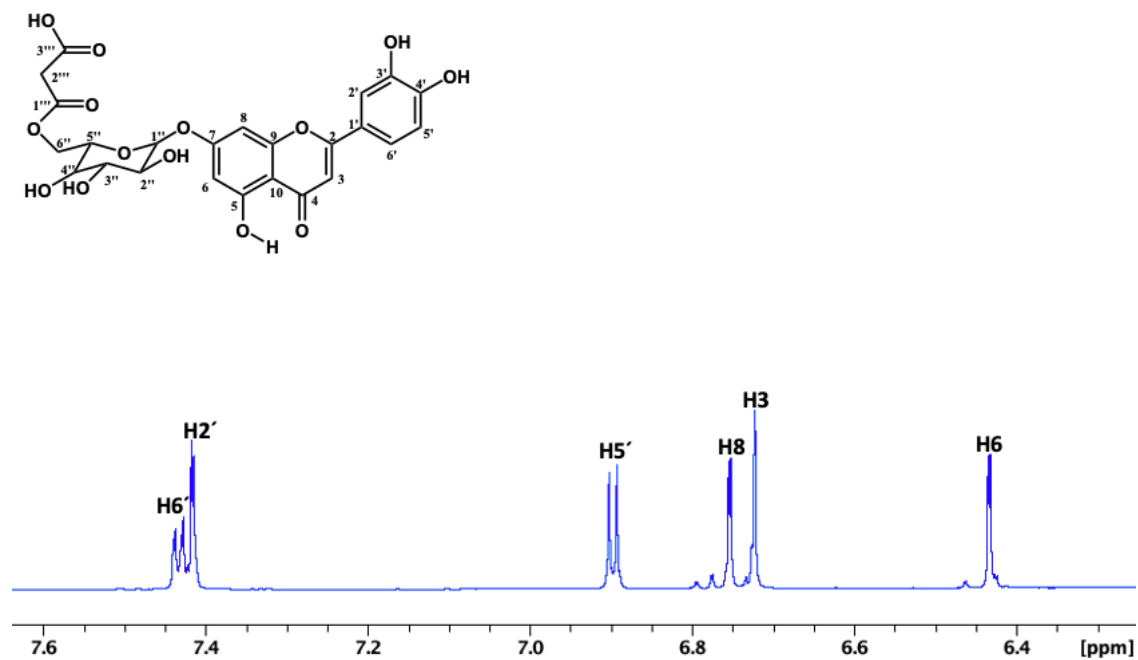
UHPLC-kromatogrammene til fraksjonene VM2S96, VM2S97, VM2S98, VM2S99 og VM2S100 er vedlagt i vedlegg 2, figur 275-279.



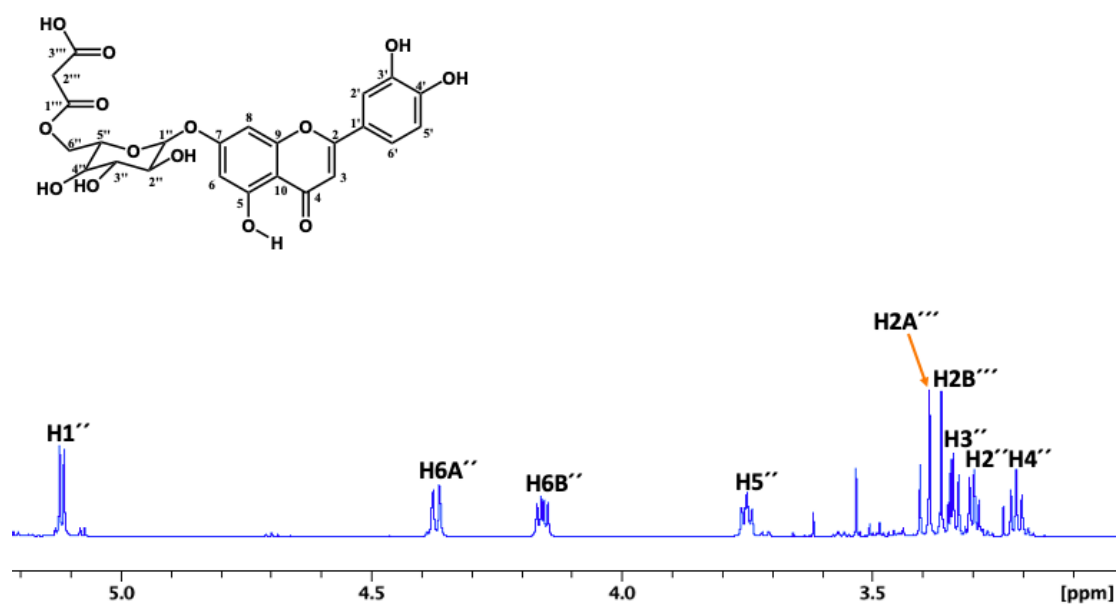
Figur 75: UV-spektrum av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (**4**).

Tabell 18: ^1H og ^{13}C NMR kjemisk skift verdier (ppm) og koblingskonstanter (Hz) av luteolin 7-*O*-(6''-*O*-malonyl- β -glukopyranosid) (4) Fraksjon VM2S95-100 isolert fra *Myrrhis odorata* i DMSO- D_6 ved 298K.

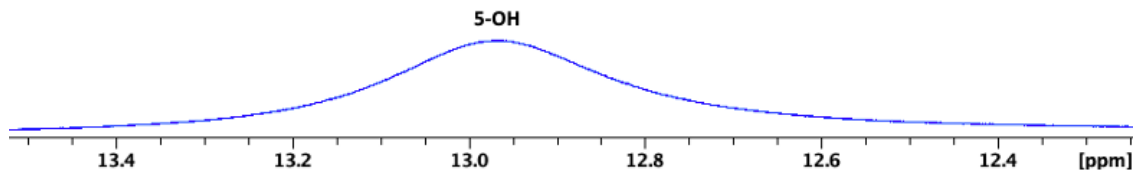
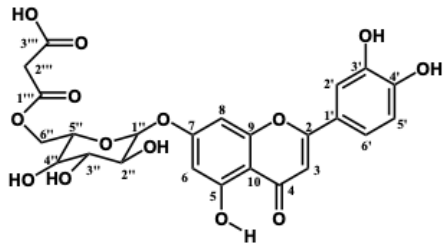
	δ ^1H 4	δ ^{13}C 4
2		164.70
3	6.72 s	103.32
4		182.09
5		161.33
6	6.43 d 2.2	99.68
7		162.82
8	6.75 d 2.2	94.87
9		157.13
10		105.62
1'		121.58
2'	7.42 d 2.4	113.75
3'		145.96
4'		150.08
5'	6.90 d 8.3	116.16
6'	7.43 dd 8.3, 2.4	119.30
5-OH	12.97 s	
7- <i>O</i> - β -glucoside		
1''	5.12 d 7.7	99.78
2''	3.30 dd 9.0, 7.7	73.18
3''	3.34 dd 9.0, 8.8	76.33
4''	3.21 dd 9.8, 8.8	69.75
5''	3.75 ddd 9.8, 6.9, 2.2	73.97
6A''	4.37 dd 12.0, 2.2	64.23
6B''	4.16 dd 12.0, 6.9	
6''- <i>O</i> -malonyl		
1'''		167.02
2A'''	3.40 d 15.9	41.50
2B'''	3.35 d 15.9	
3'''		167.97



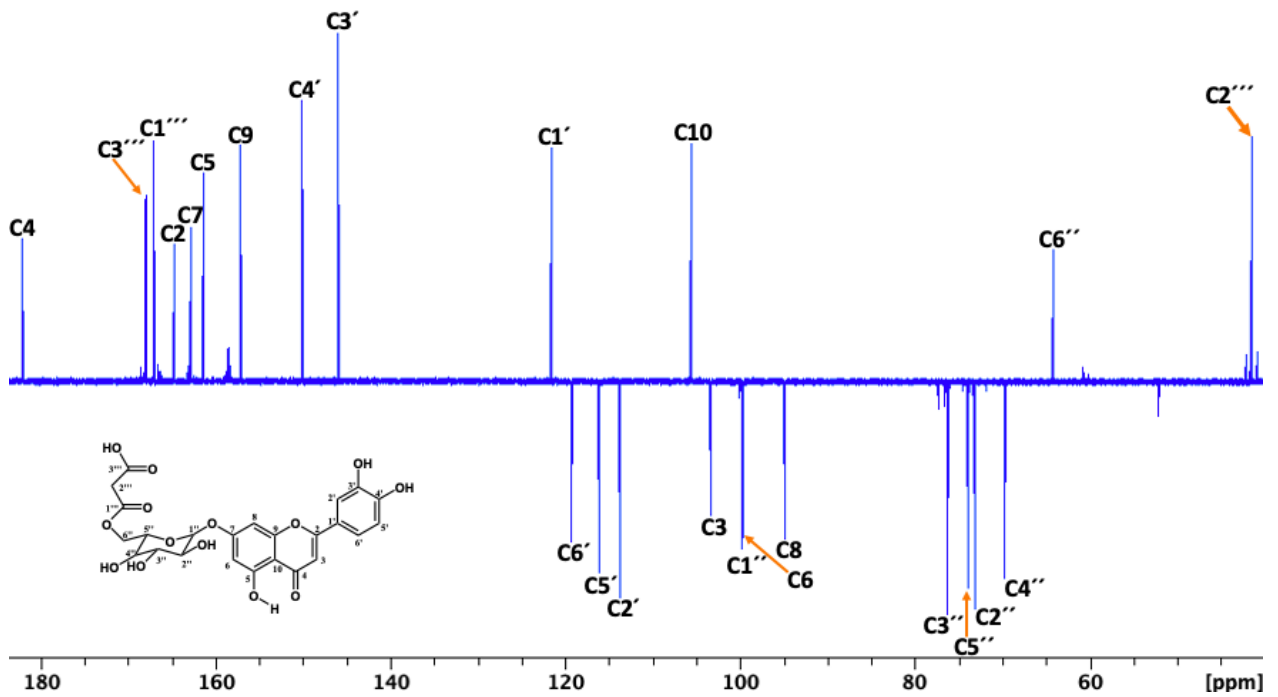
Figur 76: Ekspandert aromatisk region i 1D ¹H NMR spekteret av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl-β-glukopyranosid) (4).



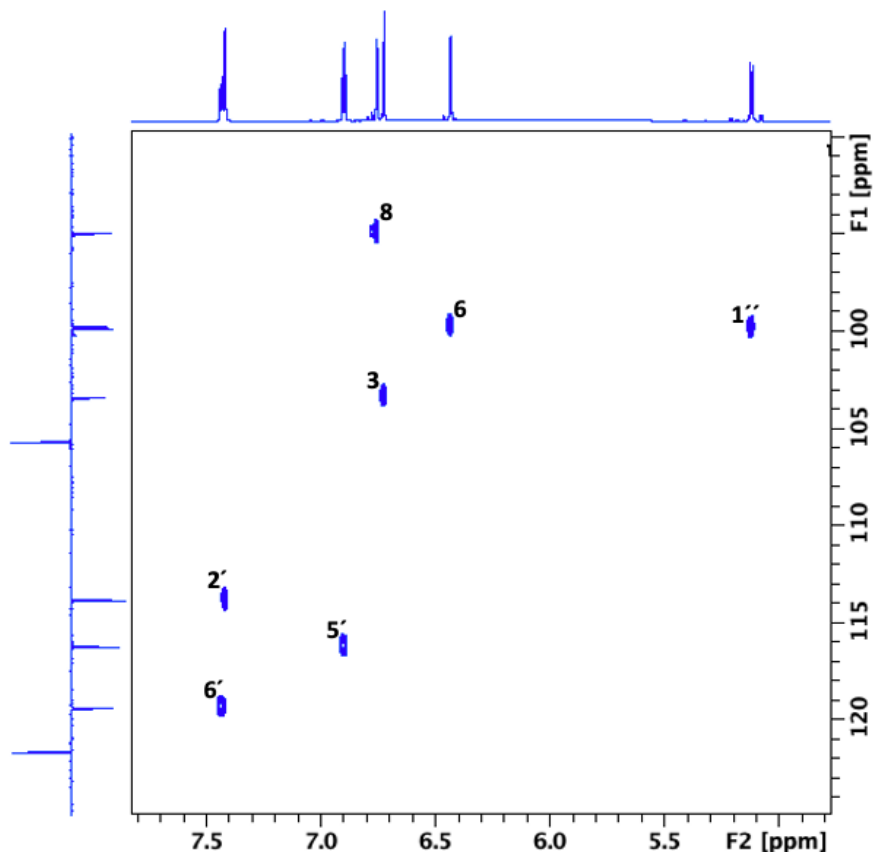
Figur 77: Ekspandert alifatisk sukkerregion i 1D ¹H NMR spekteret av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl-β-glukopyranosid) (4).



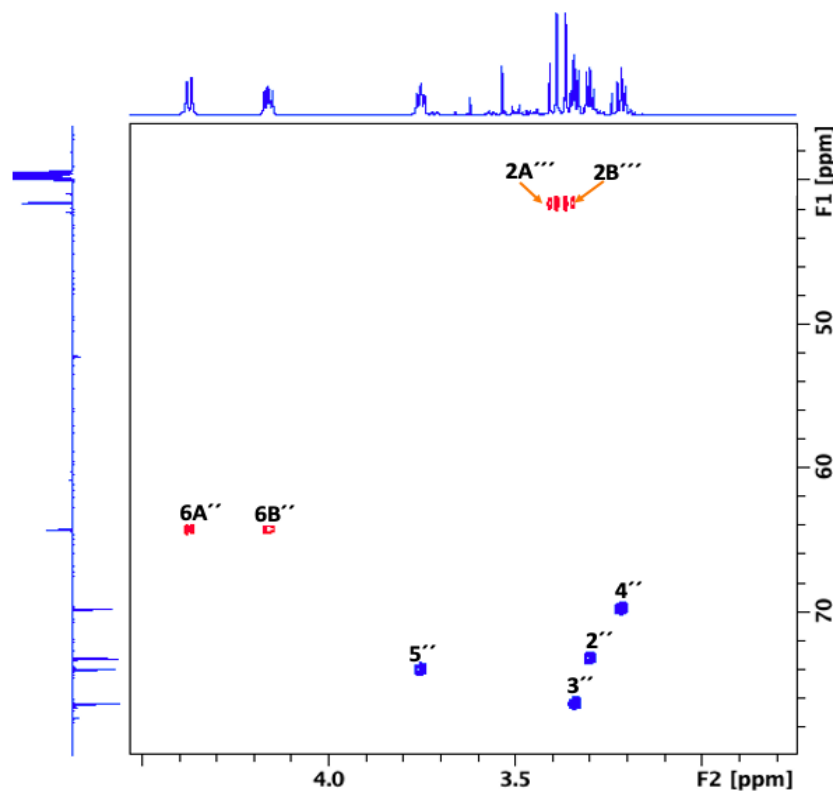
Figur 78: Ekspandert region i 1D ^1H NMR spekter av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) som viser det karakteristiske 5-OH signalet (4).



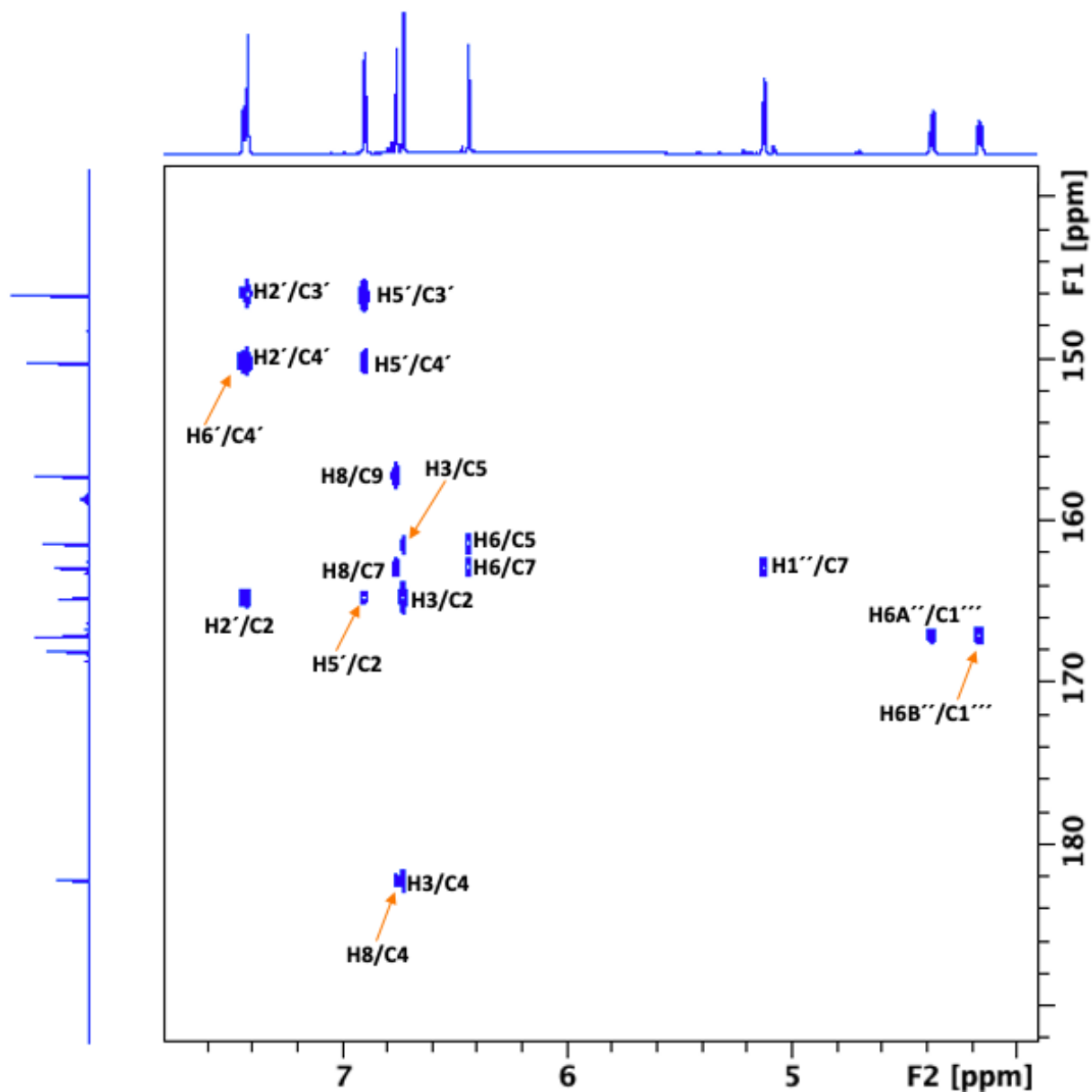
Figur 79: 1D ^{13}C CAPT NMR spekter med fullstendig anordning av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (4).



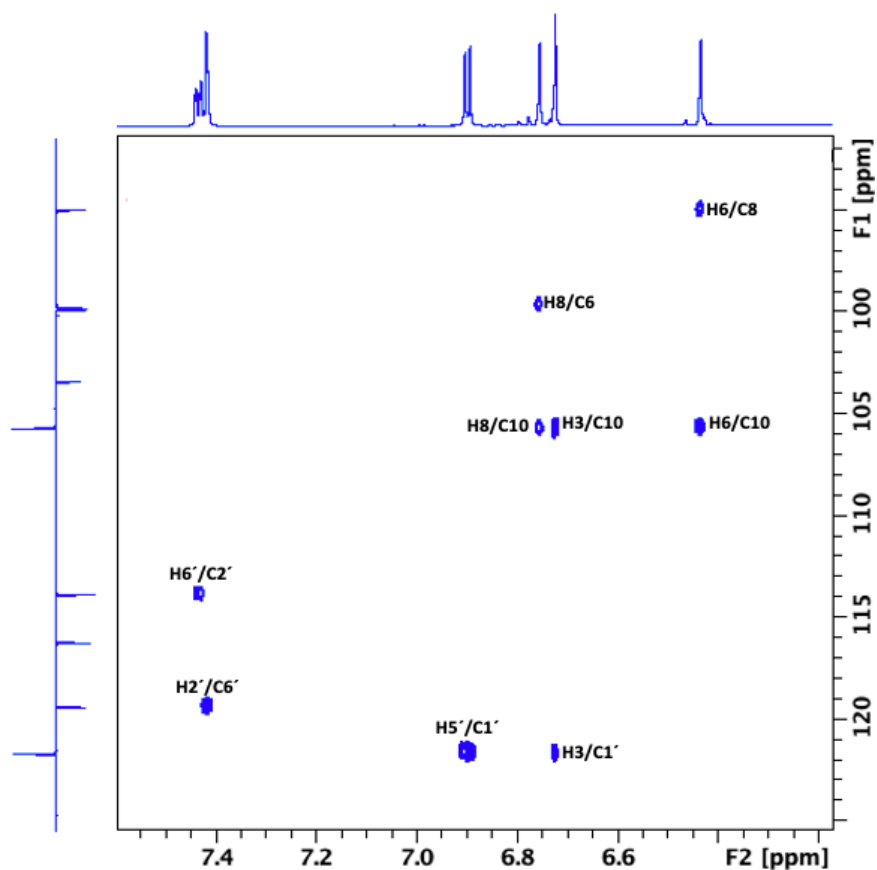
Figur 80: Ekspandert aromatregion av 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (4).



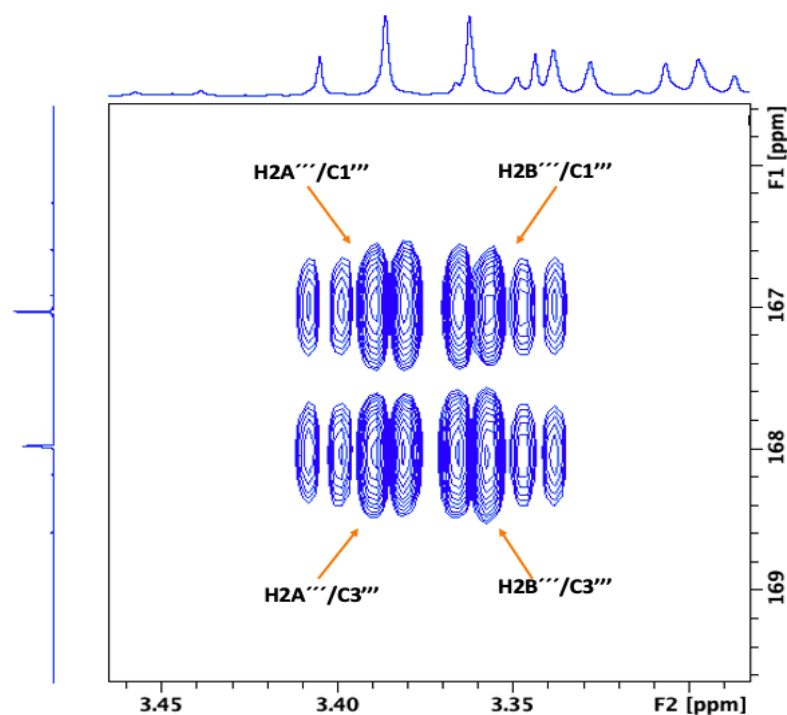
Figur 81: Ekspandert sukkerregion i 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (4).



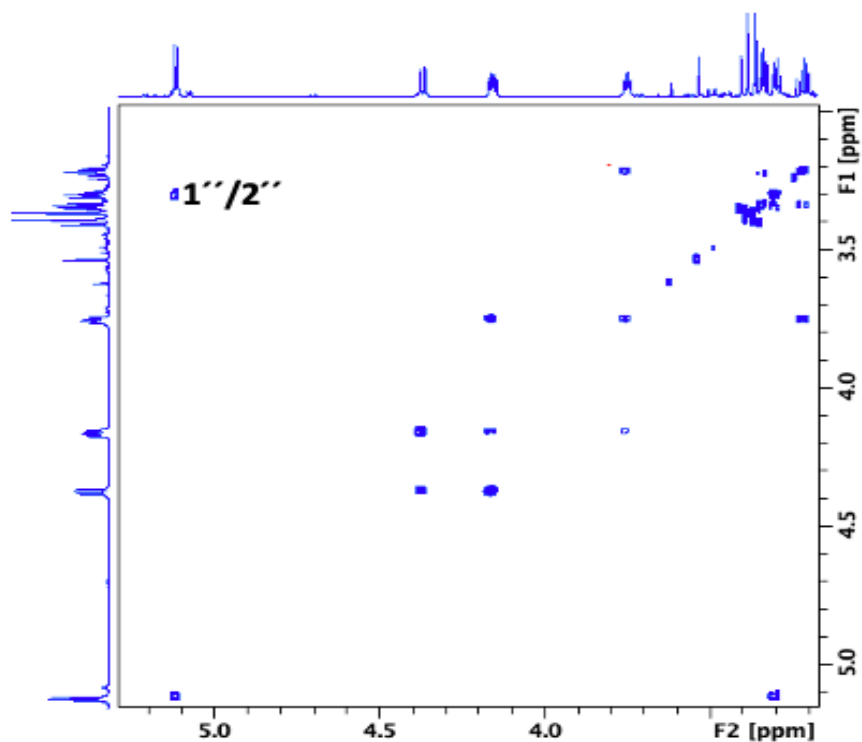
Figur 82: Ekspandert aromatisk region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret som viser viktige krysstopper for anordning av samtlige aromatiske karbonatomer for luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (**4**), samt krysstoppen $\text{H1}''/\text{C7}$ som bekrefter at glukose er tilknyttet til luteolin i 7-posisjon og krysstoppene mellom $\text{H6A}''/\text{B}''$ og $\text{C1}'''$ som bekrefter at esterbindingen i malonylenheten er plassert i 6''-posisjon på sukkerenheten.



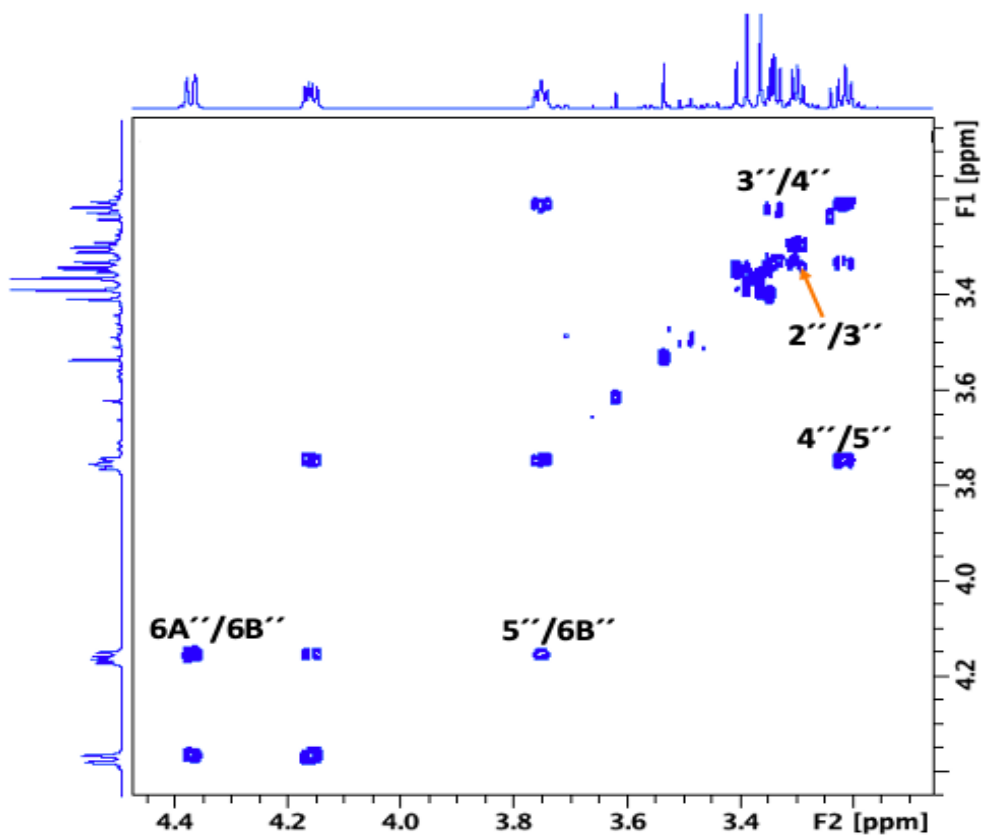
Figur 83: Ekspandert aromatisk region av $2D$ 1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (4).



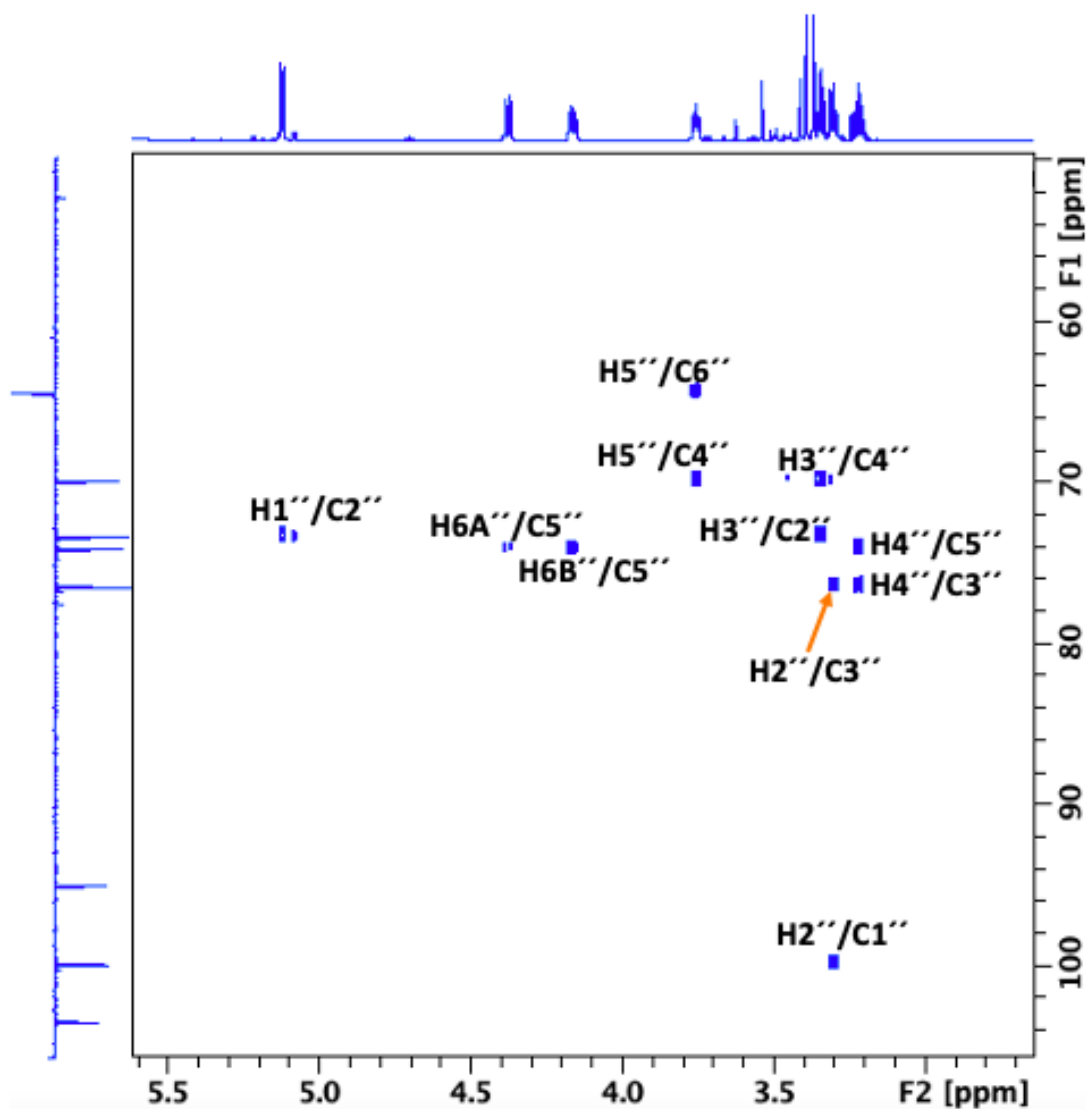
Figur 84: Ekspandert region av $2D$ 1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret som viser kryssstopper mellom H2A'''/2B''' og C1''' og C3''' i malonylsyre-enhet av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (4).



Figur 85: Ekspandert region av $2D$ ^1H - ^1H COSY NMR spekteret av luteolin 7- O -(6''- O -malonyl- β -glukopyranosid) (4).



Figur 86: Ekspandert sukkerregion av $2D$ ^1H - ^1H COSY NMR spekteret av luteolin 7- O -(6''- O -malonyl- β -glukopyranosid) (4).



Figur 87: Ekspandert sukkerregion av 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekteret av luteolin 7-*O*-(6''-*O*-malonyl- β -glukopyranosid) (**4**).

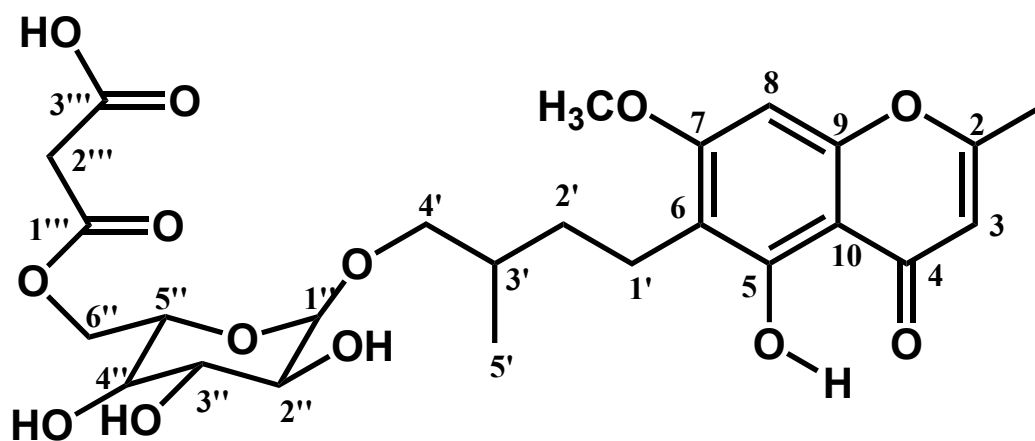
6.1.4 Nytt naturstoff: 2-METYL-5-HYDROKSY-7-METOKSYKROMEN-6-(3'-METYL-4'-HYDROKSYBUTYL-(4'-*O*-(6''-*O*-MALONYL- β -GLUKOPYRANOSID))

2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-*O*-(6''-*O*-malonyl- β -glukopyranosid)) (**5**) (figur 88) ble isolert fra fraksjon VM2S47 ved hjelp av stor Sephadex LH-20 kolonnekromatografi. UHPLC-kromatogrammet og UV-spekteret til 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-*O*-(6''-*O*-malonyl- β -glukopyranosid)) (**5**) er vist i figur 89-90. Kromatogrammet og NMR-spektrene viser at prøven ikke er helt ren og at det også er til stede noen minor forbindelser, men i vesentlig lavere konsentrasjoner enn hovedkomponenten. Ved hjelp av flere 1D og 2D NMR eksperimenter ble det bestemt at forbindelse (**5**) er et nytt naturstoff, nærmere bestemt det nye

prenylerte kromenonet 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid))). Søk i Scifinder bekrefter at forbindelsen ikke er kjent fra før. Molekylstrukturen til 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5) er vist i figur 88.

Molekylstrukturen ble bekreftet ved hjelp av høyopløselig MS (figur 91). Molekylærionet $[MH]^+$ ved m/z 541.19268 som korresponderer til $C_{25}H_{33}O_{13}$ (beregnet masse: 541.19211; $\delta = 1.04$ ppm) observert i det høyopløselige ESI massespekteret med positiv ionisering bekrefter identifikasjonen av forbindelse (5) som det nye prenylerte kromenonet 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid))).

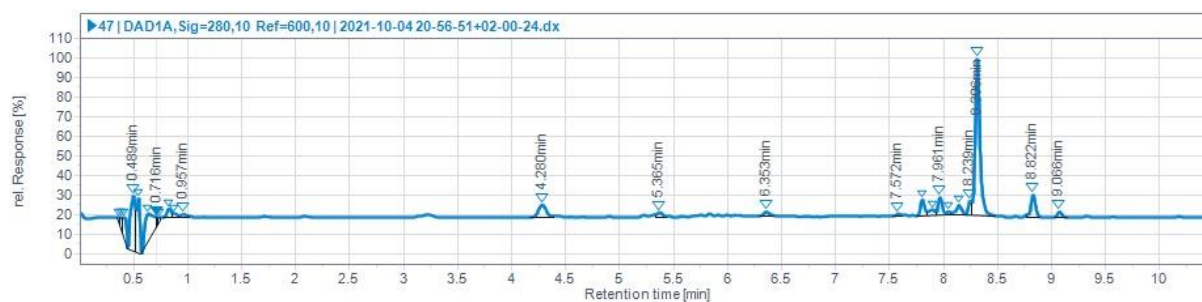
Kromenoner og kromener er heterosykliske forbindelser, og denne kjernestrukturen kommer fra polyketid biosyntese, mens isobutylsubstituenten er derivert fra isoprenoid biosyntesen (49, 78). Mange kromen-derivater har blitt testet med hensyn til biologisk aktivitet, hvor de har vist en rekke gode og nyttige biologiske effekter. Mange har vist blant annet antiinflammatorisk effekt og signifikante antioksidanteffekter (40), i tillegg til at de kan være effektive tyrosinase inhibitorer (71). Kromenoner danner også en grunnskjelett til en rekke syntetiske og naturlige molekyler som har forskjellige farmasøytiske og biologiske aktivitet som for eksempel anti-vaskulær, antitumor, anti-mikrobiell, anti-spasmolytisk, anti-koagulant, anti-HIV og smertestillende aktivitet og så videre (78).



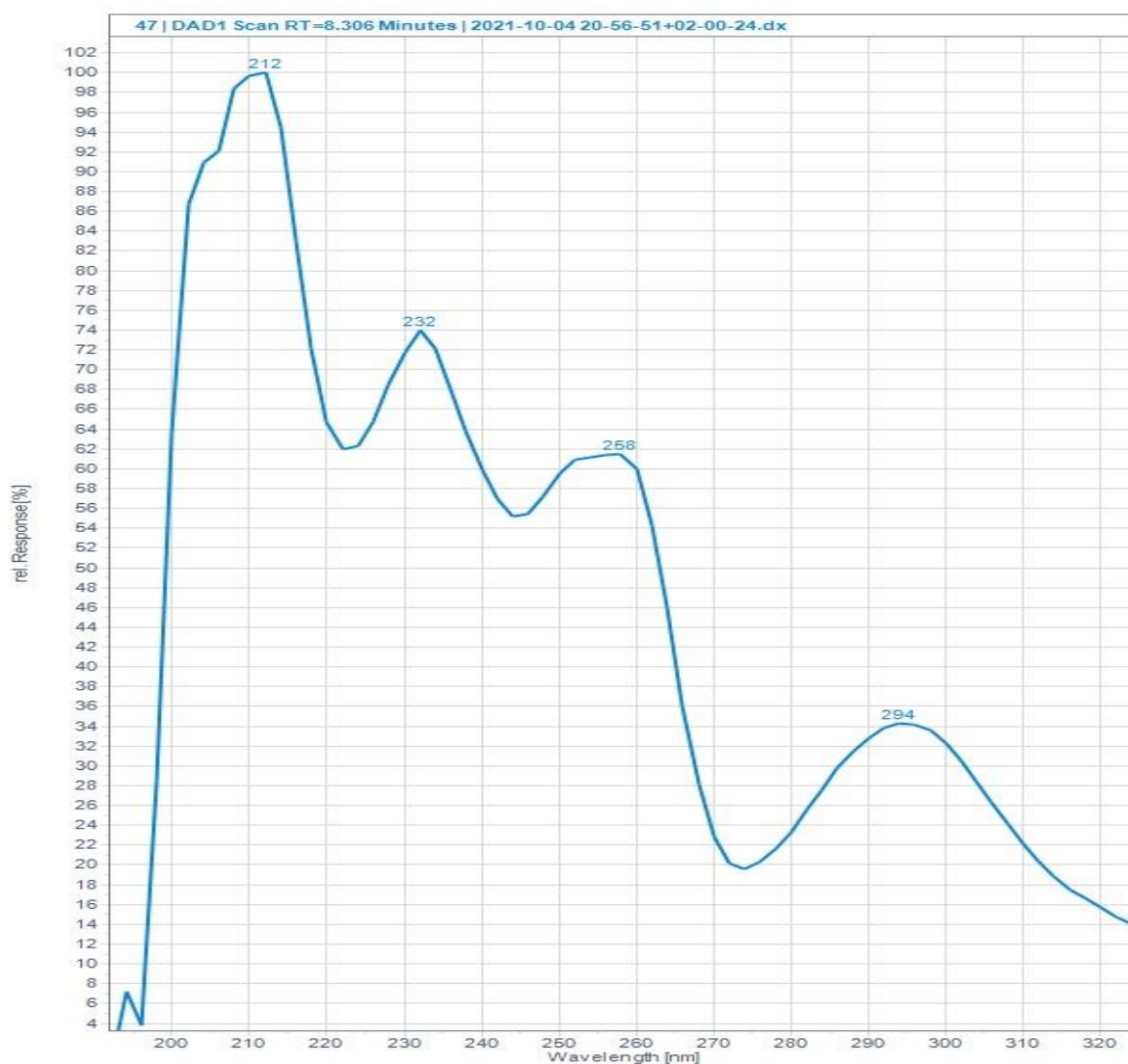
Figur 88: Struktur av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5) med nummerering.

Strukturformel: $C_{25}H_{32}O_{13}$

Uniisotopisk molekylvekt: 540.1843 g/mo



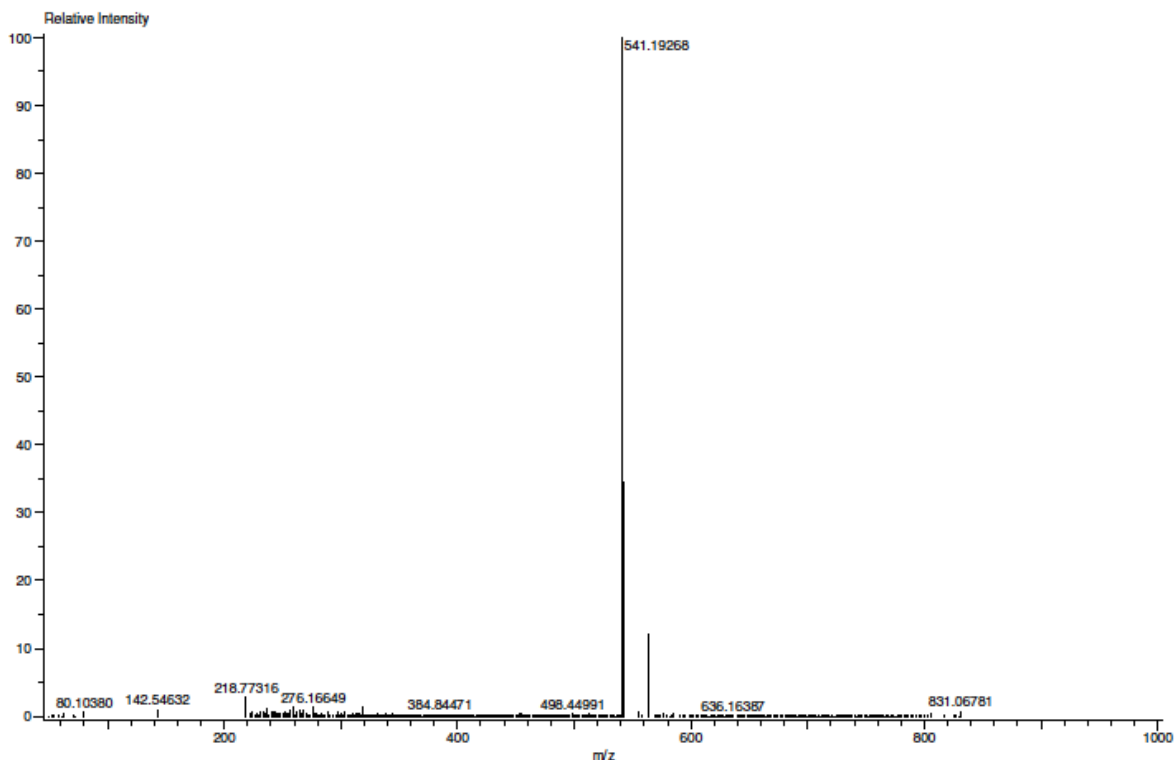
Figur 89: UHPLC-kromatogram til fraksjon VM2S47 detektert ved 280 ± 10 nm, hvor 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5) har retensjonstid på 8.31 minutter.



Figur 90: UV-spektrum av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5), hvor forbindelsen har maks UV-absorpsjon ved 212 nm, 232 nm, 258 nm og 294 nm.

Acq. Data Name: TFossen_291021_VM2S 47_ESI+_LC
 Internal Sample Id:
 Ionization Mode: ESI+
 MS Calibration Name: PEG_ESI+_ 1000
 Reduction History: Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[5.0%]];Average[MS[1] 11.589..11.660];1.0*Average[MS[1] 11.798..11.869];Correct Base[5.0%]
 Experiment Date/Time: 11/3/2021 12:20:55

Spec. Record Interval: 0.4[s]
 Ring Lens Volt: 10[V]
 Time of Maximum: 11.621[min]
 Operator Name: Accutof



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	¹² C	¹ H	¹⁴ N	¹⁶ O	Unsaturation Number
541.19268	1383281.05	541.19211	1.04	¹² C ₂₅ ¹ H ₃₃ ¹⁶ O ₁₃	25	33		13	9.5

Figur 91: ESI-massespekter med positiv ioniseringsmodus av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl-β-glukopyranosid)) (5) i fraksjon VM2S47.

Strukturen til 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl-β-glukopyranosid)) (5) ble bestemt ved hjelp av en kombinasjon av flere forskjellige 1D og 2D NMR-eksperimenter. Det ble tatt 1D ¹H-NMR, 1D ¹³C CAPT, 2D ¹H-¹³C HMBC, 2D ¹H-¹³C HSQC, 2D ¹H-¹³C HSQC-TOCSY, 2D ¹H-¹H COSY, 2D ¹H-¹H ROESY og 2D ¹H-¹³C H2BC spektre av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl-β-glukopyranosid)) (5). Det ble observert to hydrogen kjemisk skift i aromatregionen i proton-spekteret (figur 93), som ble anordnet som H3 og H8 til andre aromatiske karbonatomer i molekylet basert på observasjon i HMBC spekteret (figur 104) og deres enbindingskorrelasjoner til henholdsvis C3 og C8 i HSQC-spekteret (figur 95). Det ble videre observert et 3H signal med kjemisk skiftverdi 2.36 ppm som ble identifisert som metylgruppen tilknyttet 2-posisjon av kromenon aglykonet. Den opptrer som dublett med koblingskonstant 1.0 Hz, på grunn av en firebindingskobling til H3.

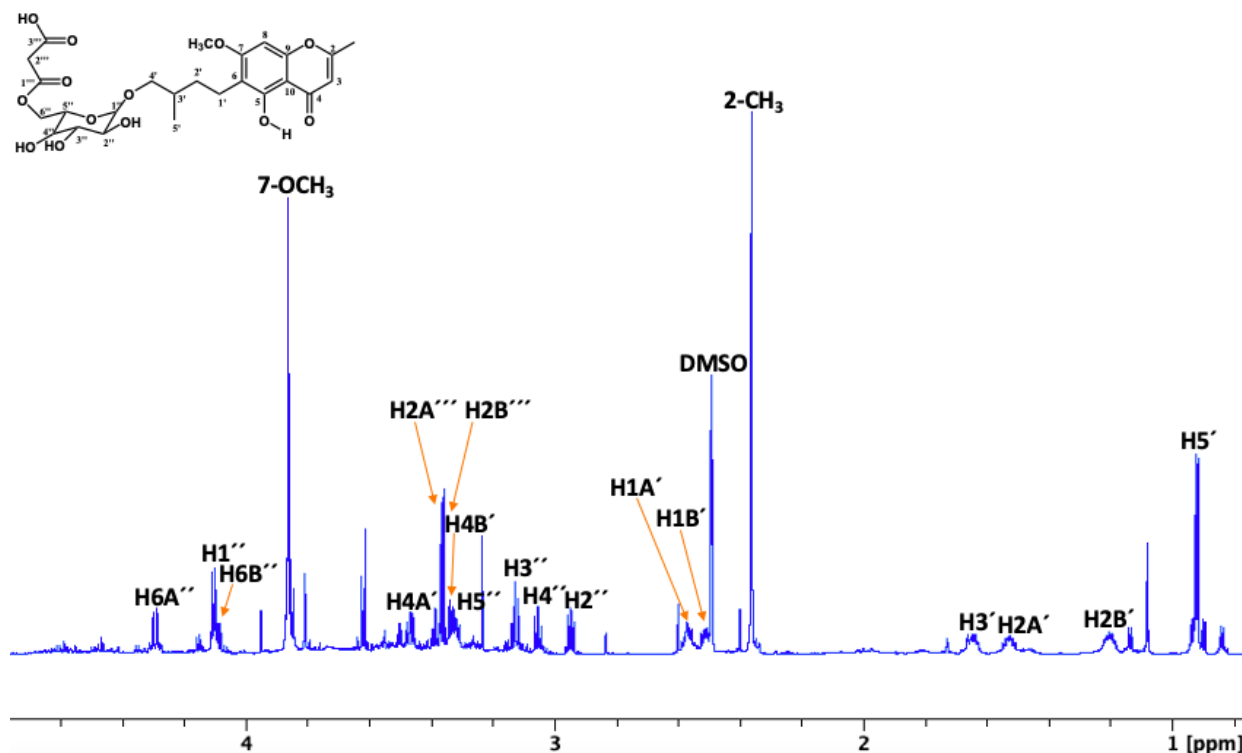
På grunn av firebindingskobling til 2-metylgruppen observeres H3 som en kvartett i 1D ¹H NMR-spekteret. Krysstoppen observert ved δ 2.36/167.83 (2-CH₃/C2) mellom protonene i metylgruppen og C2 bekrefter at metylgruppen er tilknyttet C2 (figur 105).

Krysstoppen observert i HMBC spekteret (figur 105) mellom 7-OCH₃ (3.86 ppm) og C7 (163.03) bekrefter at metoksygruppen er i 7-posisjon til aglykonet.

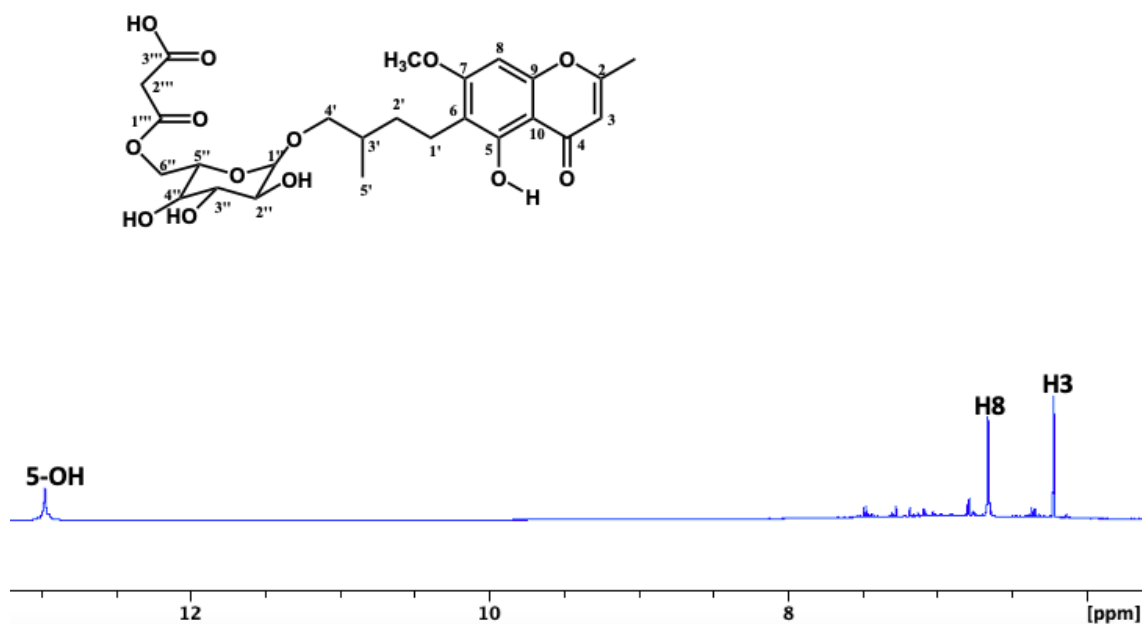
En isobutylenhet direkte tilknyttet kromenon aglykonet ble identifisert i 2D HSQC-TOCSY spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl-β-glukopyranosid))). Signalene tilhørende isobutylenheten ble anordnet ved hjelp av 2D H2BC og 2D COSY spektrene av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl-β-glukopyranosid))). Krysstoppen ved δ 2.57/112.7 (H1A'/C6), δ 2.57/163.0 (H1A'/C7), δ 2.57/157.7 (H1A'/C5), δ 2.51/112.7 (H1B/C6), δ 2.51/163.0 (H1B'/C7), δ 2.51/157.7 (H1B'/C5), δ 1.53/112.7 (H2A'/C6) og δ 1.20/112.7 (H2B'/C6) observert i HMBC spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl-β-glukopyranosid))) (figur 99-100) bekrefter at isobutylgruppen er tilknyttet kromenon aglykonet i 6-posisjon. Observert signal for H1'' ved 4.10 ppm tilhørende glukosylsubstituenten til 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl-β-glukopyranosid))) med koblingskonstant på 7.9 Hz bekrefter at glukoseenheten er i β-konfigurasjon. Krysstoppen mellom C1'' (103.0 ppm) og H4A' (3.47 ppm) og H4B' (3.33 ppm) observert i HMBC-spekteret (figur 101) bekrefter at glukose-enheten er tilknyttet isobutylenheten i 4'-posisjon. C1''' har kjemisk skift på 166.99 ppm som er typisk for karbonyl i estergrupper. Krysstoppen i HMBC (figur 103) mellom C1''' (166.99 ppm) og H6A'' (4.29 ppm) og H6B'' (4.09 ppm) bekrefter at malonylgruppen er tilknyttet glukoseenheten i 6''-posisjon.

Tabell 19: ^1H og ^{13}C NMR kjemisk skift verdier (ppm) og koblingskonstanter (Hz) av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5) Fraksjon VM2S47 isolert fra *Myrrhis odorata* i DMSO- D_6 ved 298K.

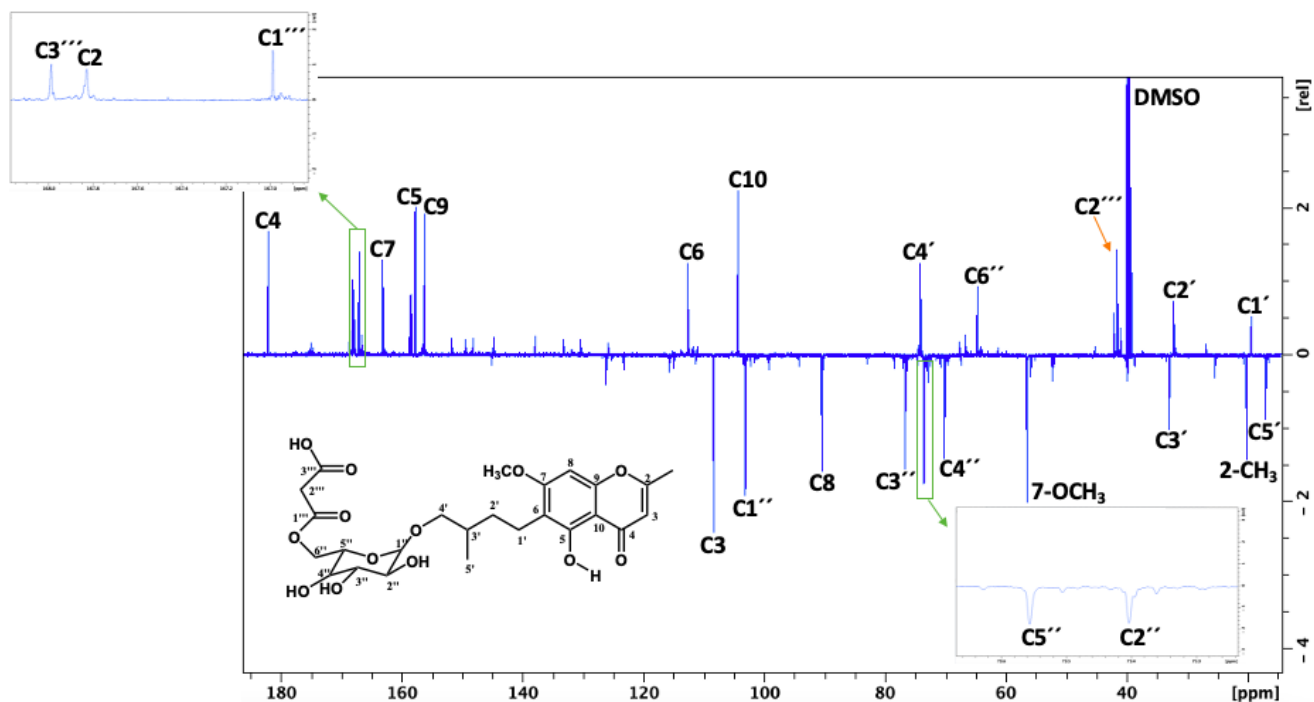
	δ ^1H 5	δ ^{13}C 5
2		167.83
3	6.21 q 1.0	108.32
4		182.07
5		157.69
6		112.67
7		163.03
8	6.66	90.31
9		156.14
10		104.23
2- CH_3	2.36 d 1.0	19.99
7- OCH_3	3.86 s	56.43
5-OH	12.98 s	
6-C-isobutyl		
1A'	2.57 m	19.34
1B'	2.51 m	
2A'	1.53 m	32.16
2B'	1.20 m	
3'	1.64 m	33.02
4A'	3.47 dd 9.7, 7.4	74.13
4B'	3.33 m	
5'	0.92 d 6.7	16.97
4'-O- β -glucoside		
1''	4.10 d 7.9	103.00
2''	2.95 dd 8.9, 7.9	73.40
3''	3.13 t 8.9	76.59
4''	3.05 dd 9.7, 8.9	70.09
5''	3.32 ddd 9.7, 6.8, 2.1	73.56
6A''	4.29 dd 11.9, 2.1	64.60
6B''	4.09 dd 11.9, 6.8	
6''-O-malonyl		
1'''		166.99
2A'''	3.38 d 15.9	41.52
2B'''	3.35 d 15.9	
3'''		167.99



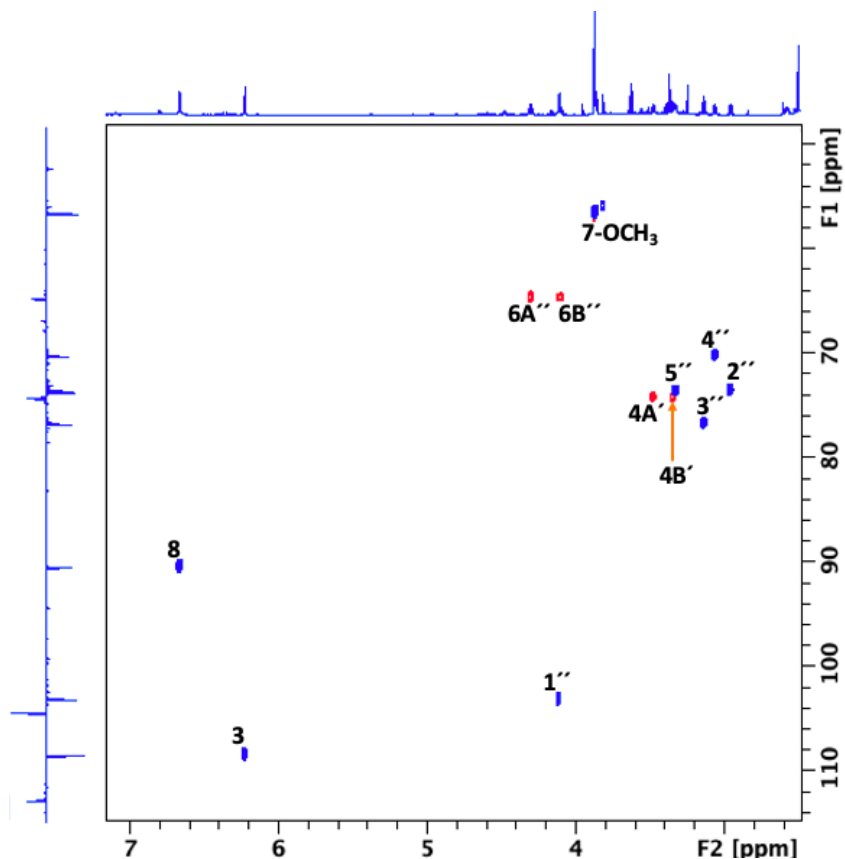
Figur 92: Ekspandert region av 1D ^1H NMR spekter med anordning av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5).



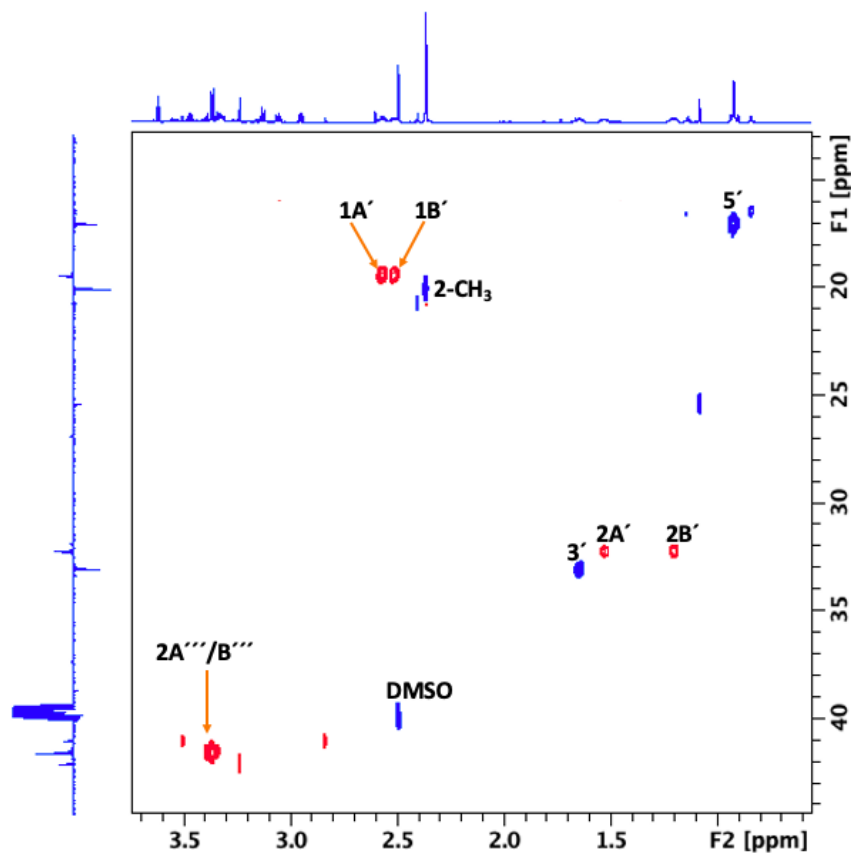
Figur 93: Ekspandert aromatregion i 1D ^1H NMR spekteret med anordning av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5).



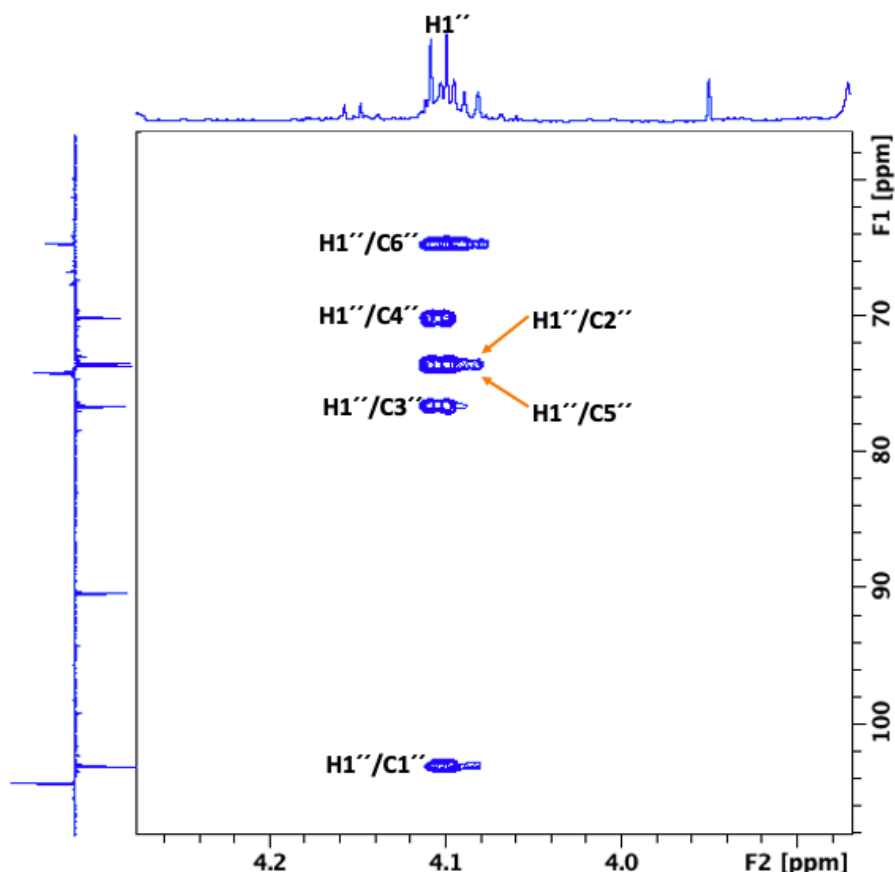
Figur 94: 1D ^{13}C CAPT NMR spekter med fullstendig anordning av ^{13}C signalene til 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5).



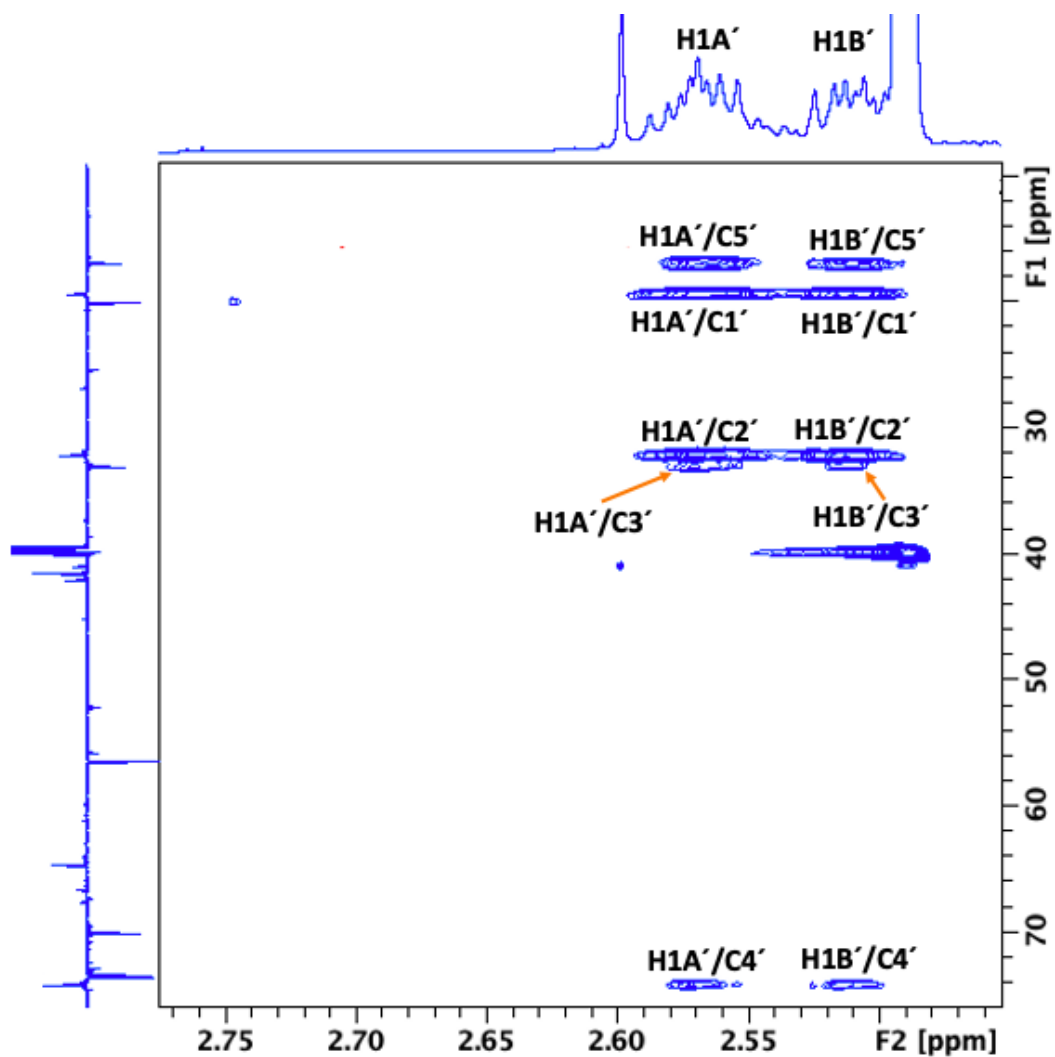
Figur 95: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5).



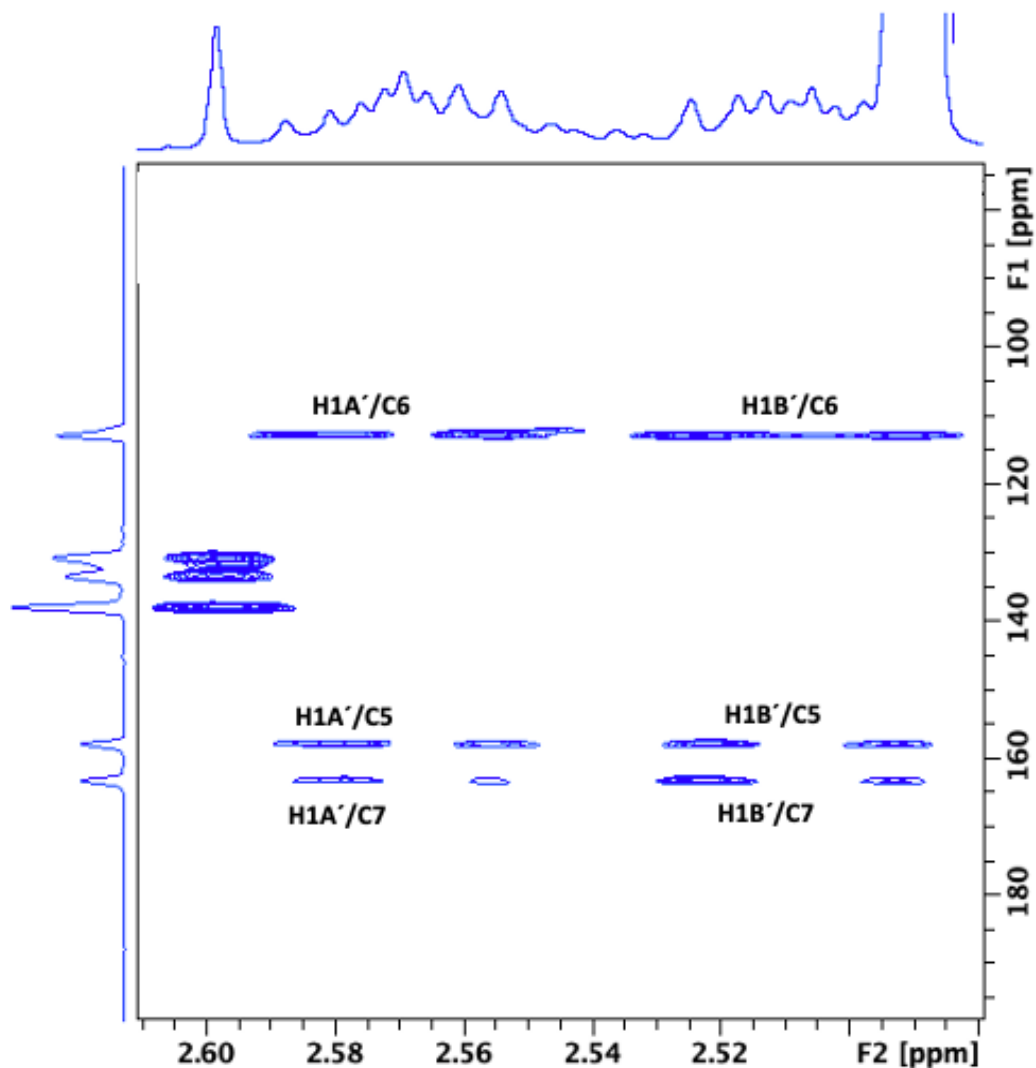
Figur 96: Ekspandert alifatisk region av 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5).



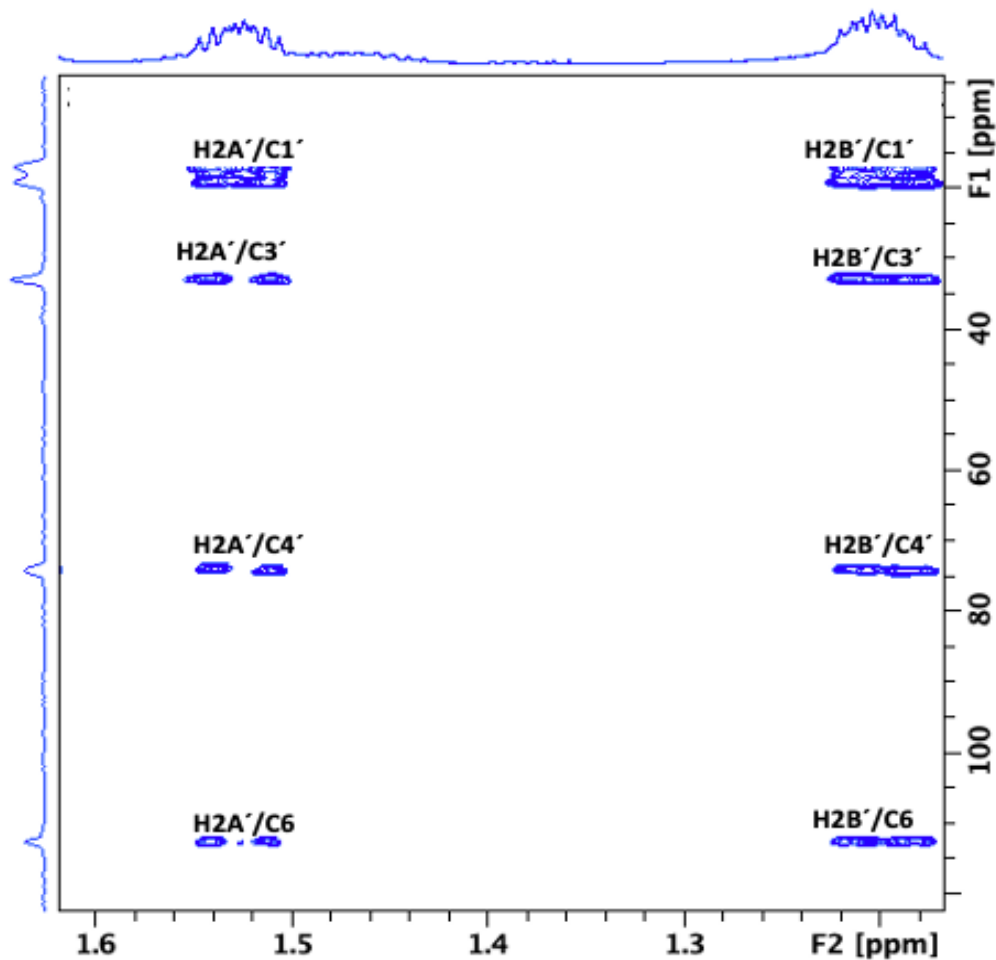
Figur 97: Ekspandert sukkerregion i 1D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksey-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydrokseybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5). Ekspansjon av spekteret viser hele spinnsystemet til glukosylsubstituenten.



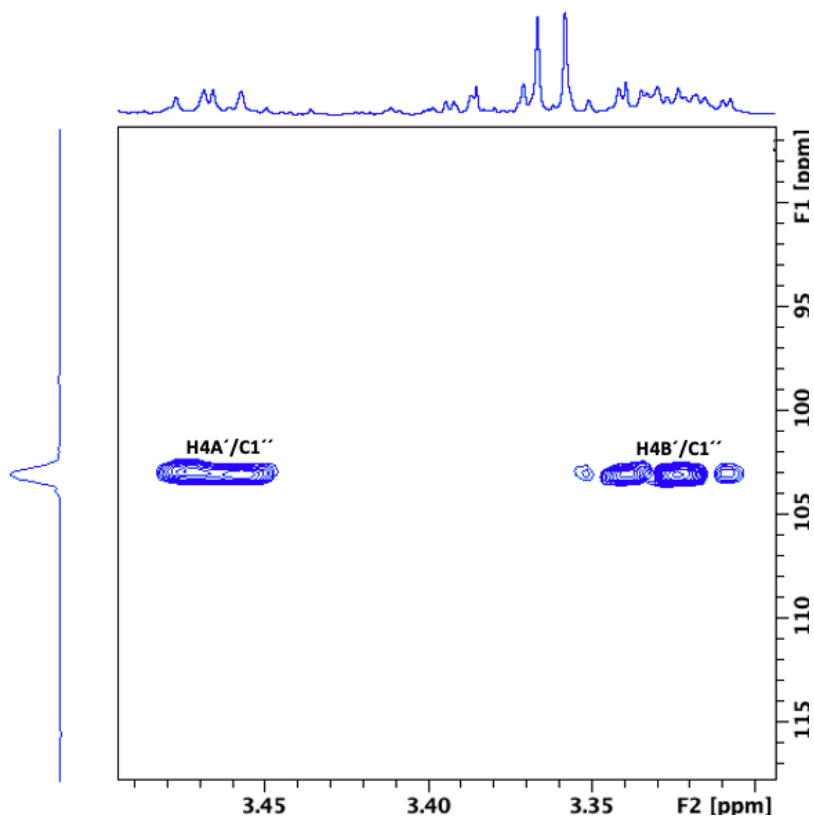
Figur 98: Ekspandert alifatisk region i 1D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY NMR spekter av 2-metyl-5-hydroksey-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydrokseybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5). Ekspansjon av spekteret viser hele spinnsystemet til isobutylgruppen i molekylet. Eksperimentet var spesielt nyttig for å anordne karbonatomene til isobutyl-enheten.



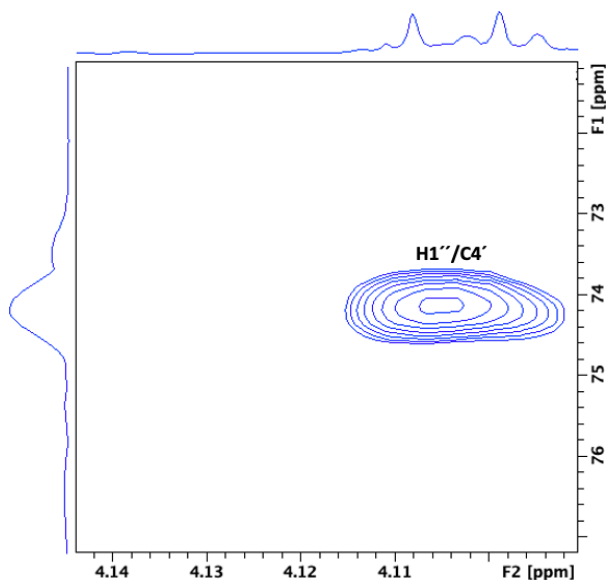
Figur 99: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter som viser viktige kryssstopper mellom H1A'/H1B' i isobutyl-enheten og C6, C5 og C7 i kromenon aglykonet til 2-metyl-5-hydroksey-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydrokseybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5). Dette bekrefter at isobutylsubstituenten er plassert i 6-posisjon av kromenon aglykonet.



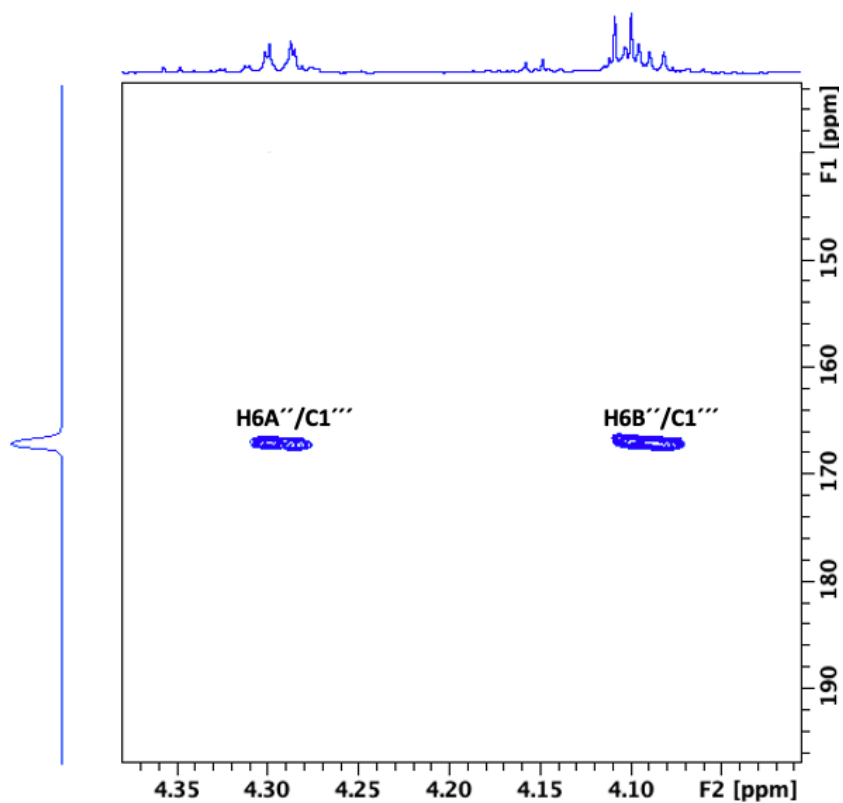
Figur 100: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5) som viser viktige krysstopper for H2A' og H2B' tilhørende isobutylgruppen. Krysstoppene observert mellom H2A' og C6 og H2B' og C6 bekrefter at isobutylgruppen er tilknyttet kromenon aglykonet i 6-posisjon.



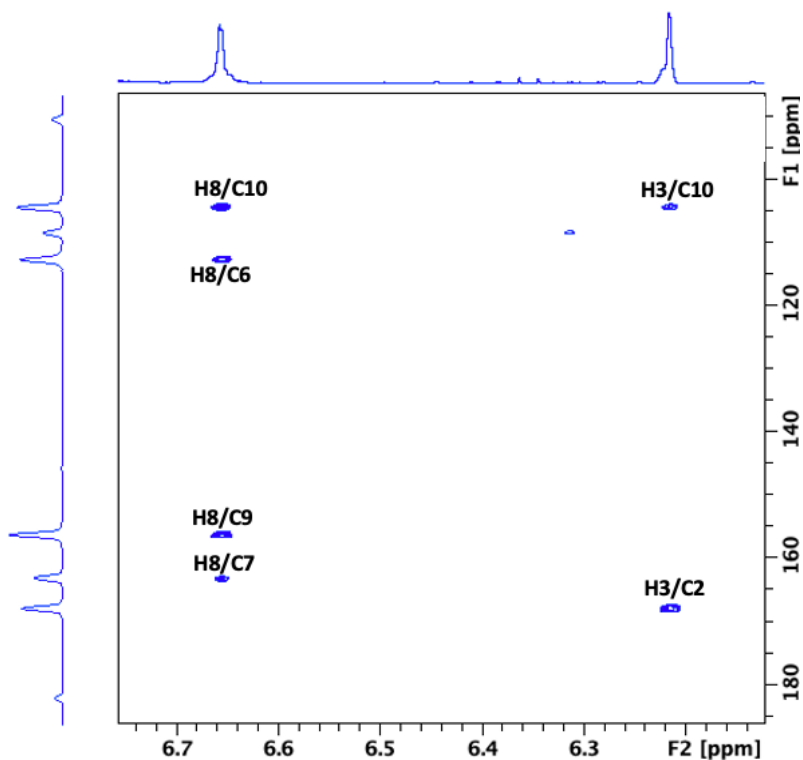
Figur 101: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5) som viser krysstoppe mellom H4A' og H4B' og C1'' (5). Disse krysstoppe bekrefter at glukosylsubstituenten er tilknyttet isobutylgruppen i 4'-posisjon.



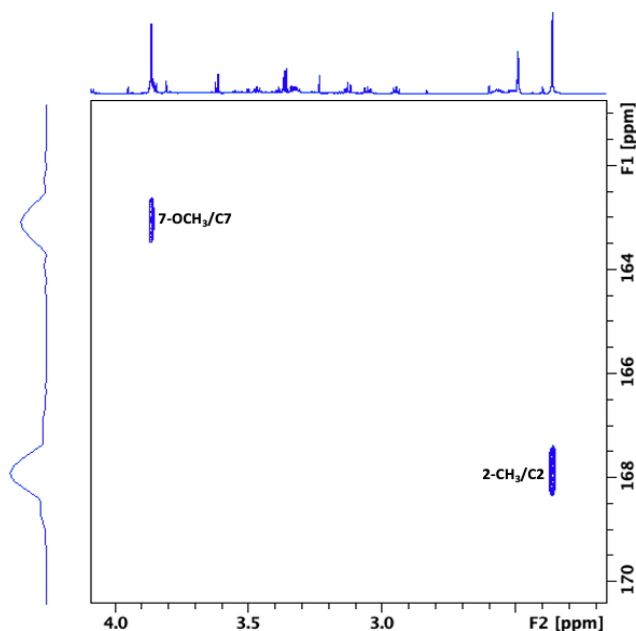
Figur 102: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5) som viser krysstoppen mellom H1'' og C4', noe som bekrefter at glukosylsubstituenten er tilknyttet isobutylgruppen i 4'-posisjon.



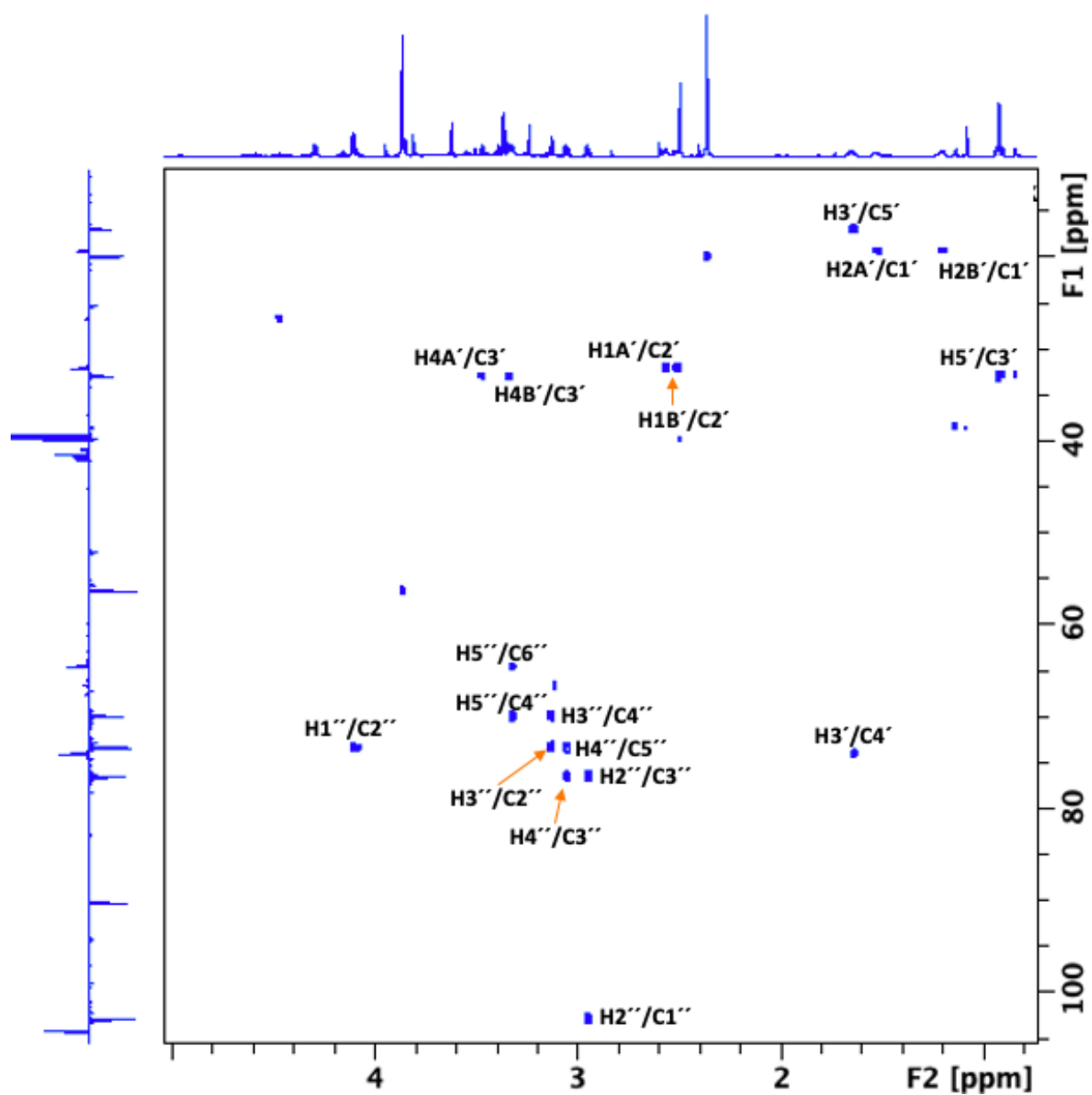
Figur 103: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksey-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydrokseybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5) som viser krysstopperne mellom H6A'' og H6B'' tilhørende glukosylenheten og C1''' tilhørende malonylenheten. Disse krysstoppen bekrefter at malonylenheten er tilknyttet glukosylenheten i 6''-posisjon.



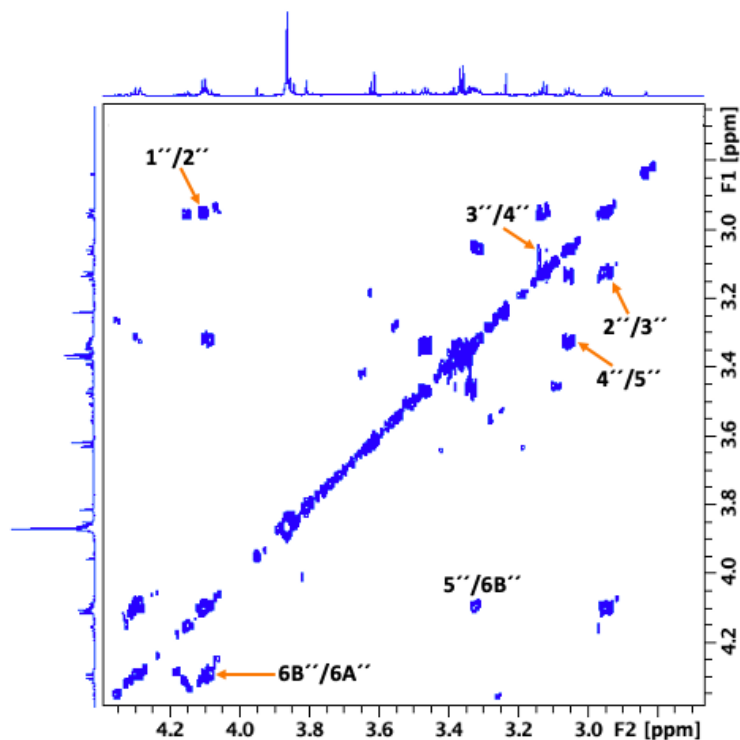
Figur 104: Ekspandert aromatregion av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5) som viser viktige kryssstopper for anordning av signaler i kromenon aglykonet (5).



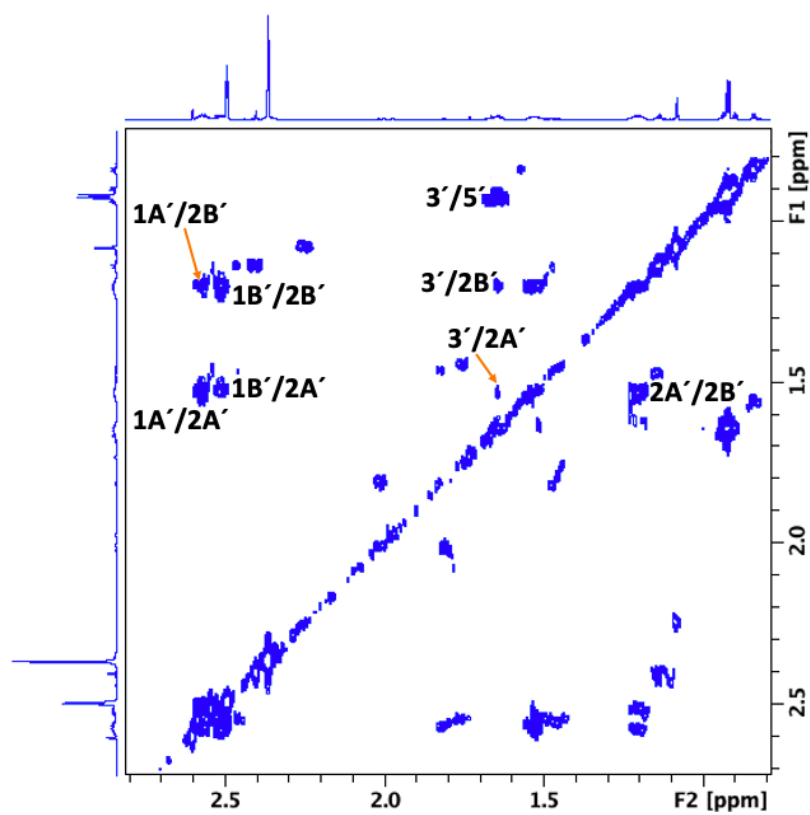
Figur 105: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5) som bekrefter posisjonen av metoksygruppen i 7-posisjon og metylgruppen i 2-posisjon av kromenon aglykonet.



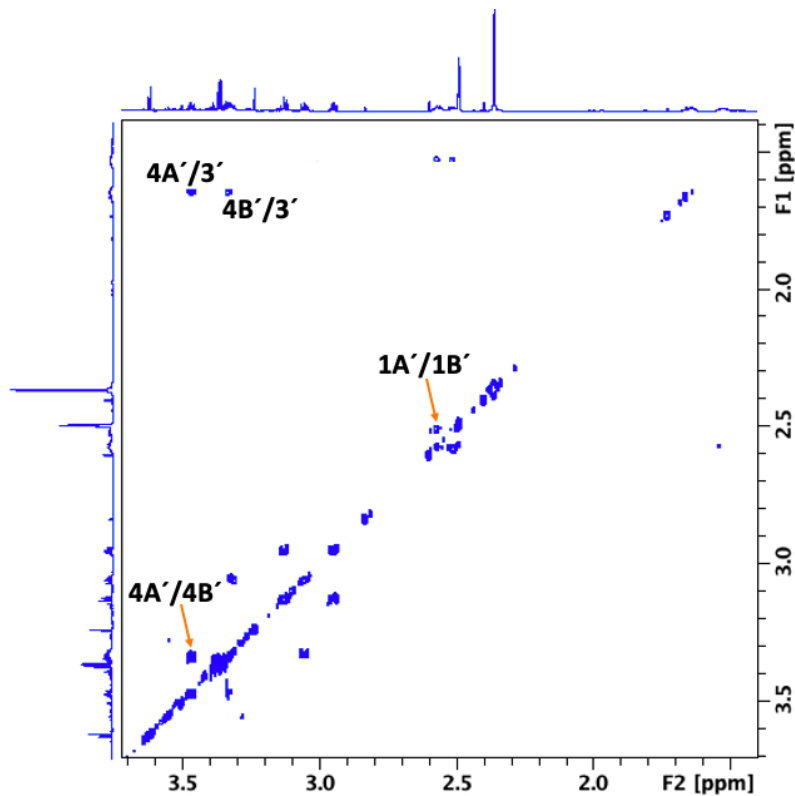
Figur 106: Ekspandert alifatisk region av 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksey-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5).



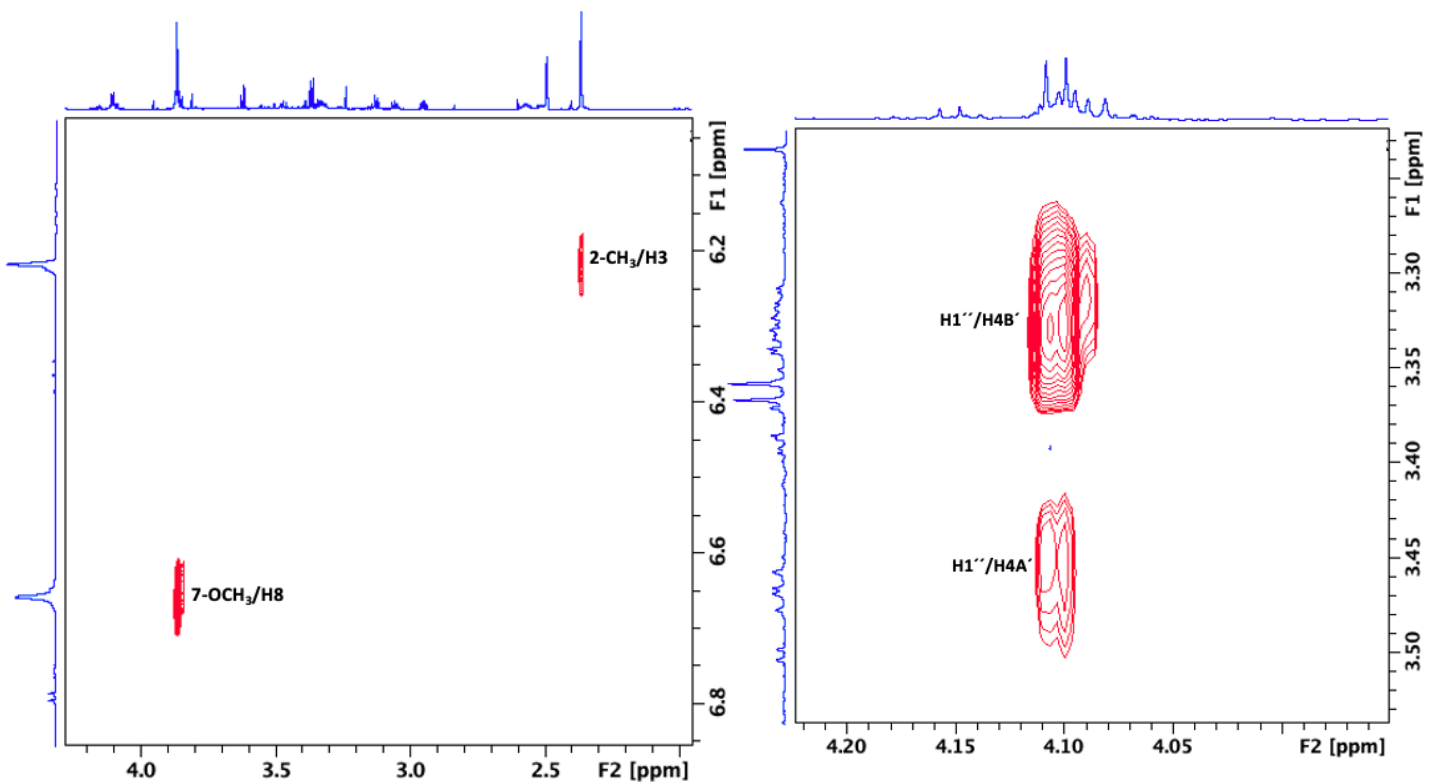
Figur 107: Ekspandert sukkerregion av 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5).



Figur 108: Ekspandert region av 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5) som viser korrelasjonstopper for anordning av signalene i isobutyleneheten.



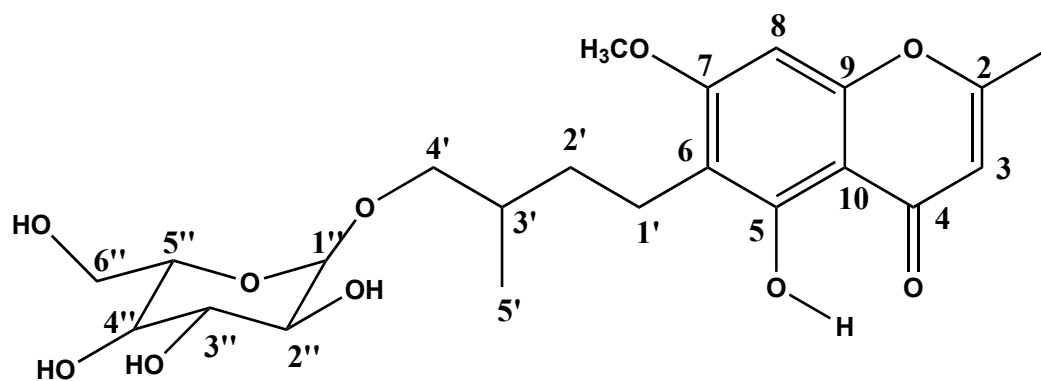
Figur 109: Ekspandert region av 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5) som viser korrelasjonstopper for anordning av signalene i isobutyleneheten.



Figur 110: Ekspanderte regioner av 2D ^1H - ^1H ROESY NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5). Ekspansjon til venstre viser krysstoppen mellom metylgruppen og H3, og metoksygruppen og H8, noe som bekrefter at de er tilknyttet kromenon aglykonet i henholdsvis 2-posisjon og 7-posisjon. Ekspansjonen til høyre viser krysstoppen mellom H1'' og H4A' og H4B' og bekrefter dermed at glukoseenheten er tilknyttet til isobutylgruppen i 4'-posisjon.

6.1.5 Nytt naturstoff: 2-METYL-5-HYDROKSY-7-METOKSYKROMEN-6-(3'-METYL-4'-HYDROKSYBUTYL-(4'-O- β -GLUKOPYRANOSID))

2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6) ble isolert etter opprensing ved hjelp av stor Sephadex LH-20 kolonne fra fraksjon EM3-5S39+40. Eksperimentelle NMR-data til forbindelse (6) (tabell 20) i sammenligning med NMR-data til forbindelse (5) (tabell 19) viser at de er veldig like, med unntak av at (6) ikke har en malonylsubstituent. Forbindelse (6) ble identifisert som 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) ved hjelp av en kombinasjon av flere 1D og 2D NMR eksperimenter og høyoppløselig MS. UHPLC-kromatogrammet og UV-spekteret, figur 113-114, viser at forbindelsen har retensjonstid på 7.97 minutter og maks UV-absorpsjon på 208 nm, 232 nm, 258 nm og 294 nm. Det ble isolert 34.9 milligram av tørt prøvemateriale. Ved litteratursøk i Scifinder ble det funnet at forbindelsen ikke er kjent fra før. Molekylstrukturen til 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6) er vist i figur 111. Det ble tatt høyresolusjonsmassespekter som bekreftet strukturen av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6) (figur 112).

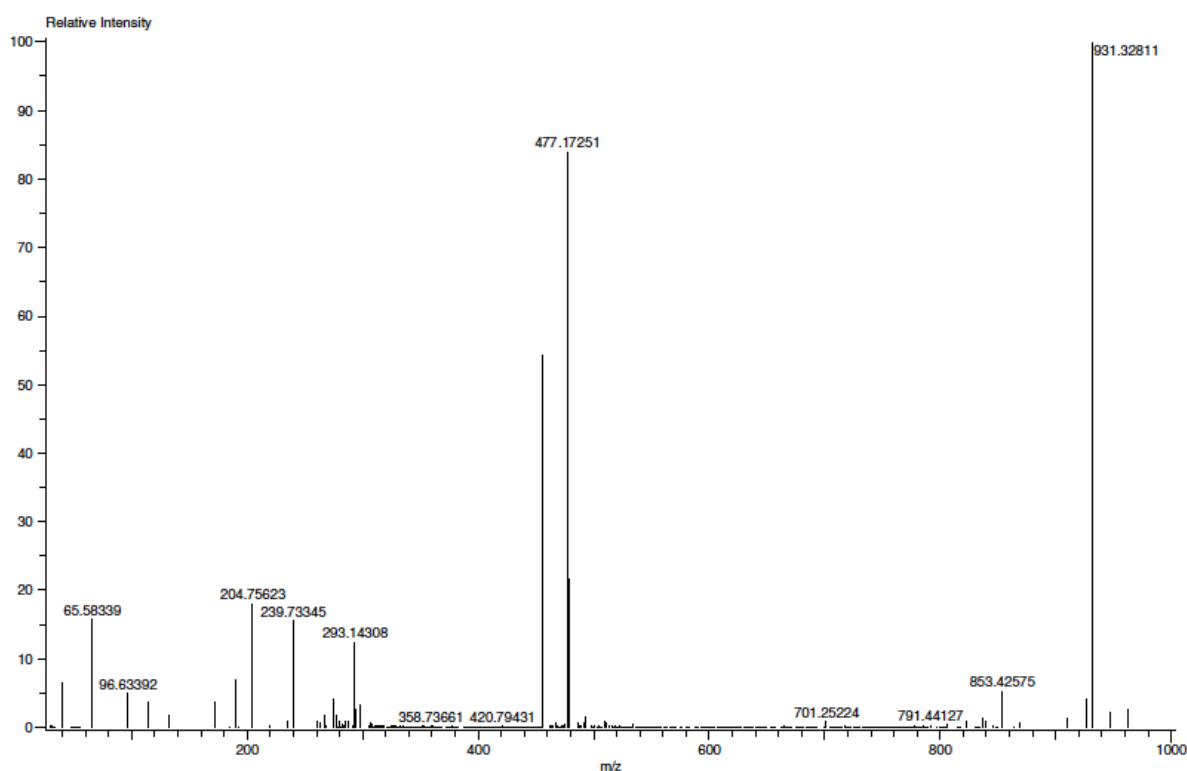


Figur 111: Struktur av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6) med nummerering.

Strukturformel: C₂₂H₃₀O₁₀

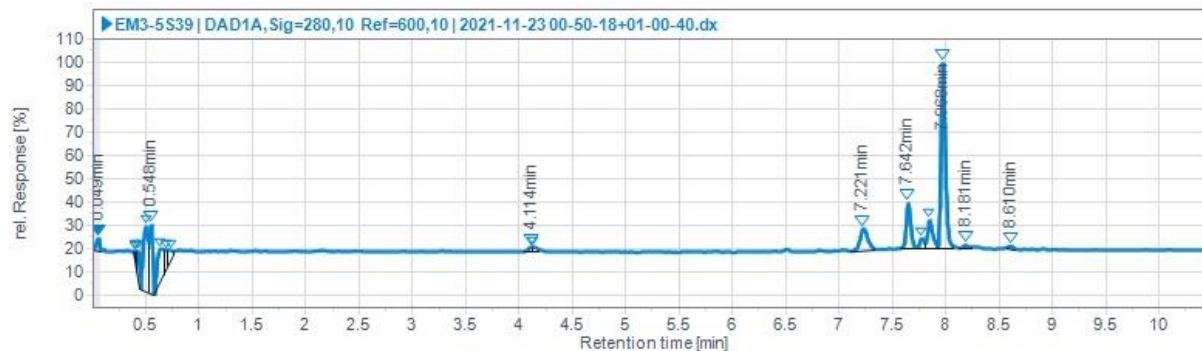
Uniisotopisk molekylvekt: 454.1839 g/mol

Acq. Data Name: TasbihH_050522_EM 3-5 S39-40_ESI+_LC
 Internal Sample Id:
 Ionization Mode: ESI+ Orifice1 Volt Sweep: 28V
 MS Calibration Name: PEG_ESI+_1000 Acquired m/z Range: 30.0..1000.0
 Reduction History: Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[5.0%];Average[MS[1] 11.030..11.063]-1.0*Average[MS[1] 11.727..12.295];Correct Base[5.0%]
 Experiment Date/Time: 5/5/2022 13:01:26 Spec. Record Interval: 0.6[s]
 Ring Lens Volt: 13[V]
 Time of Maximum: 11.045[min]
 Operator Name: Accutof

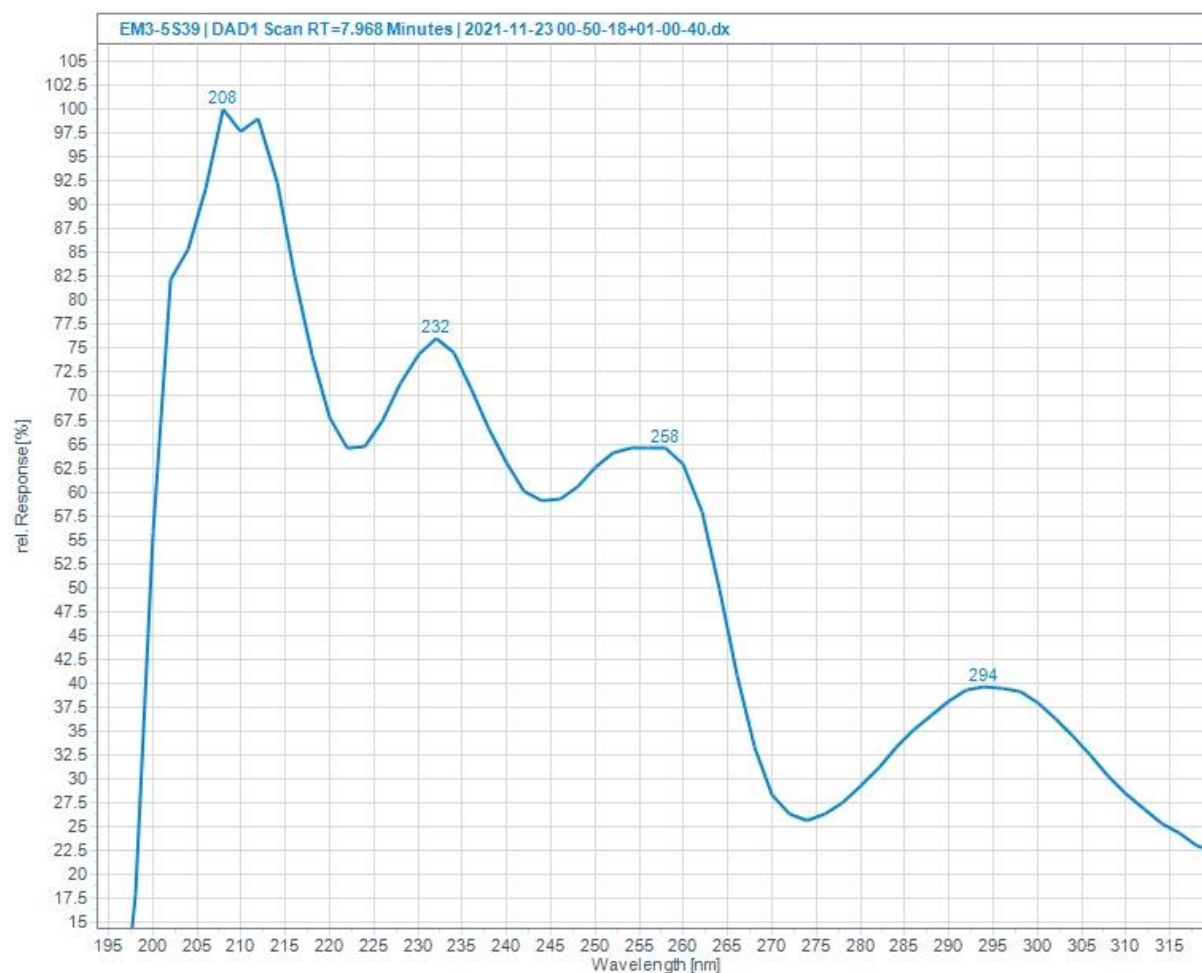


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	¹² C	¹ H	¹⁶ O	Unsaturation Number
455.19217	328917.91	455.19172	0.99	¹² C ₂₂ ¹ H ₃₁ ¹⁶ O ₁₀	22	31	10	7.5

Figur 112: ESI-massespekter med positiv ioniseringsmodus av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6) i fraksjon EM3-5S39-40.



Figur 113: UHPLC-kromatogram til fraksjon EM3-5S39 detektert ved 280 ± 10 nm, hvor 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6) har retensjonstid på 7.97 minutter.



Figur 114: UV-spektrum av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6).

Det ble tatt 1D ^1H -NMR, 1D ^{13}C CAPT, 2D ^1H - ^{13}C HMBC, 2D ^1H - ^{13}C HSQC, 2D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY, 2D ^1H - ^{13}C H2BC, 2D ^1H - ^1H COSY og 2D ^1H - ^1H ROESY av fraksjon EM3-5S39+40 for å bestemme strukturen av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-*O*- β -glukopyranosid) (6).

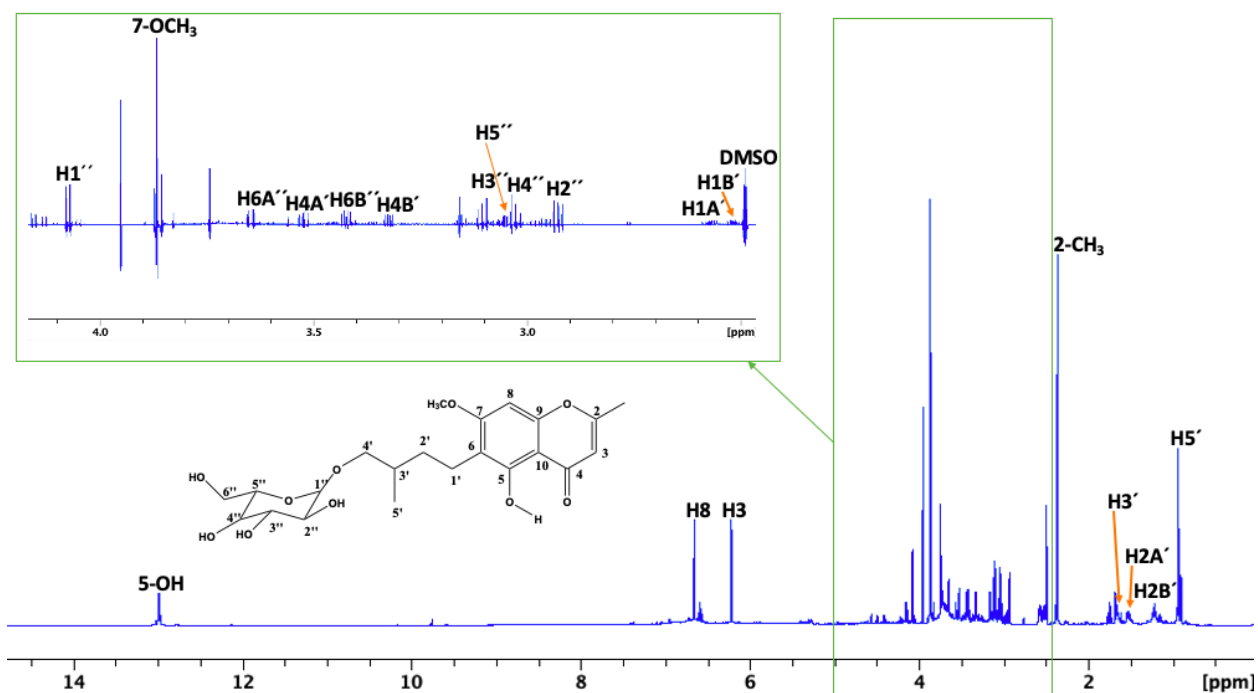
Det ble observert 20 hydrogensignaler og 22 karbonsignaler ved hjelp av NMR (tabell 20). H3 ved 6.21 ppm opptrer som kvartet, på grunn av firebindingskoblingen til 2-CH₃. H3 har kobling på 0.9 Hz til 2-CH₃. 2-CH₃ har krysstopp til C2 (167.82 ppm) observert i HMBC-spekteret (figur 126). Signalet ved 3.87 ppm opptrer som singlet og korrelerer i HSQC-spekteret (figur 118) til karbonkjemisk skift ved 56.43 ppm, noe som samsvarer med en metoksygruppe. Krysstoppen mellom 7-OCH₃ (3.87 ppm) og C7 (163.01 ppm) observert i HMBC-spekteret (figur 126) bekrefter at metoksygruppen sitter i 7-posisjon.

Det er observert 7 hydrogensignaler mellom 2.93-4.07 ppm og 6 karbonsignaler mellom 61.17-102.99 ppm som korresponderer til glukose (tabell 20). Ved hjelp av krysstopper mellom H1'' (4.07 ppm) og C4' (73.98 ppm), og mellom H4A' (3.52) og H4B' (3.32) og C1'' (102.99) observert i HMBC-spekteret (figur 124) ble det bestemt at sukkerenheten er tilknyttet i 4'-posisjon av isobutylgruppen. Isobutylgruppen gir 8 hydrogensignaler i den alifatiske regionen (3.52-0.94 ppm) og 5 karbonsignaler i område 17.02-73.98 ppm (tabell 20). Kjemisk skiftverdi for C4' (73.98 ppm) bekrefter at C4' er tilknyttet oksygen. Krysstopperne ved δ 2.57/112.7 (H1A'/C6), δ 2.57/163.0 (H1A'/C7), δ 2.57/157.7 (H1A'/C5), δ 2.51/112.7 (H1B/C6), δ 2.51/163.0 (H1B'/C7), δ 2.51/157.7 (H1B'/C5), δ 1.53/112.7 (H2A'/C6) og δ 1.22/112.7 (H2B'/C6) observert i HMBC-spekteret (figur 122-123) av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-*O*- β -glukopyranosid) bekrefter at isobutylgruppen er tilknyttet kromenon aglykonet i 6-posisjon.

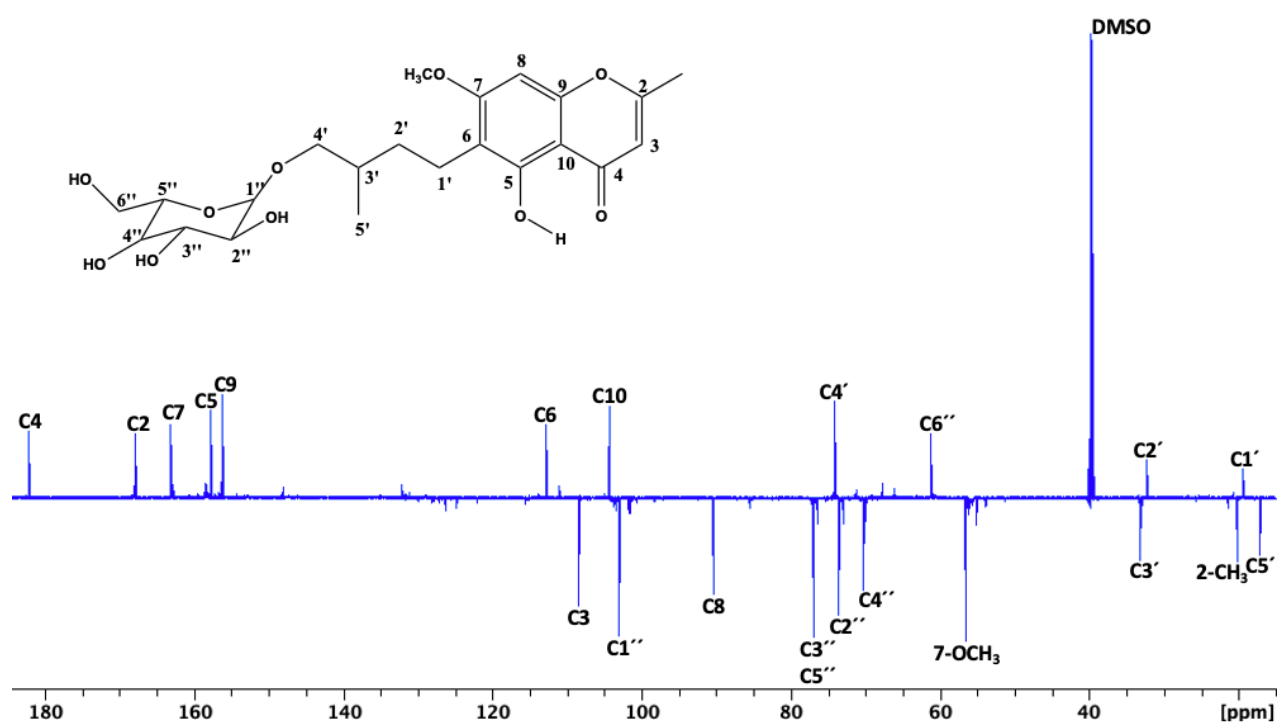
Observerte signal for H1'' ved 4.07 ppm tilhørende glukosylsubstituenten til 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-*O*- β -glukopyranosid) med koblingskonstant på 7.8 Hz bekrefter at glukoseenheten er i β -konfigurasjon. Krysstoppen mellom H4A' (3.52 ppm) og H4B' (3.32 ppm) og C1'' (103.0 ppm) observert i HMBC-spekteret (figur 124) bekrefter at glukose-enheten er tilknyttet isobutyleenheten i 4'-posisjon. Basert på disse dataene, samt ved hjelp av korrelasjoner vist i HMBC, H2BC og HSQC spektre blir strukturen til forbindelse (6) bestemt til å være 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-*O*- β -glukopyranosid).

Tabell 20: ^1H og ^{13}C NMR kjemisk skift verdier (ppm) og koblingskonstanter (Hz) av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6) fraksjon EM3-5S39-40 isolert fra *Myrrhis odorata* i DMSO- D_6 ved 298K.

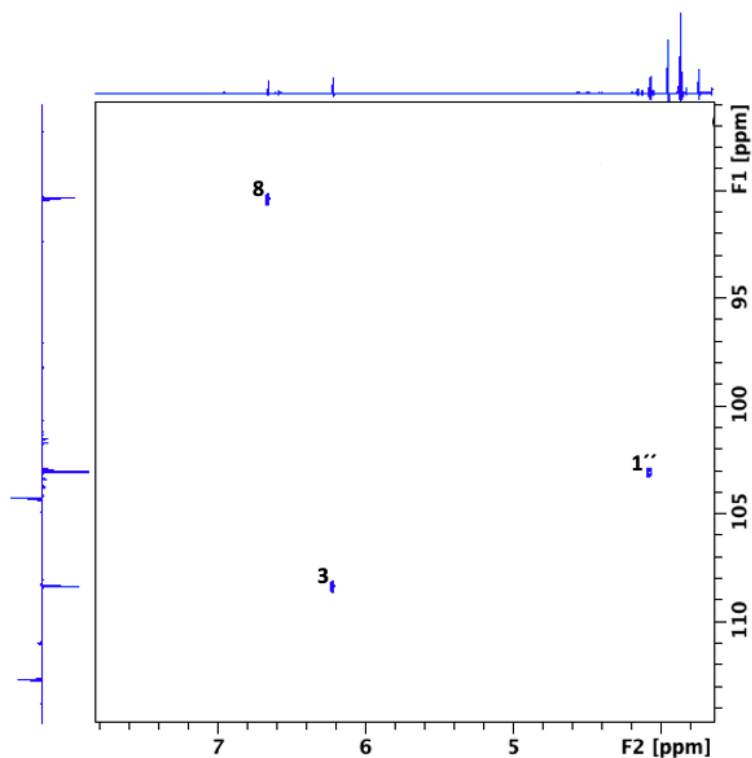
	δ ^1H 6	δ ^{13}C 6
2		167.82
3	6.21 q 0.9	108.31
4		182.06
5		157.67
6		112.65
7		163.01
8	6.65 s	90.30
9		156.12
10		104.22
2-CH ₃	2.36 d 0.9	19.98
7-OCH ₃	3.87 s	56.43
5-OH	12.98 s	
6-C-isobutyl		
1A'	2.57 ddd 13.0, 9.9, 5.6	19.35
1B'	2.51 ddd 13.0, 9.9, 6.2	
2A'	1.53 dddd 13.5, 9.9, 6.2, 5.4	32.24
2B'	1.22 dddd 13.5, 9.9, 8.1, 5.6	
3'	1.65 m	33.03
4A'	3.52 dd 9.6, 7.5	73.98
4B'	3.32 dd 9.6, 5.6	
5'	0.94 d 6.7	17.02
4'-O- β -glucoside		
1''	4.07 d 7.8	102.99
2''	2.93 dd 8.7, 7.8	73.55
3''	3.11 t 8.7	76.91
4''	3.03 dd 9.7, 8.7	70.18
5''	3.06 ddd 9.7, 5.7, 2.1	76.90
6A''	3.65 dd 11.8, 2.1	61.17
6B''	3.42 dd 11.8, 5.7	



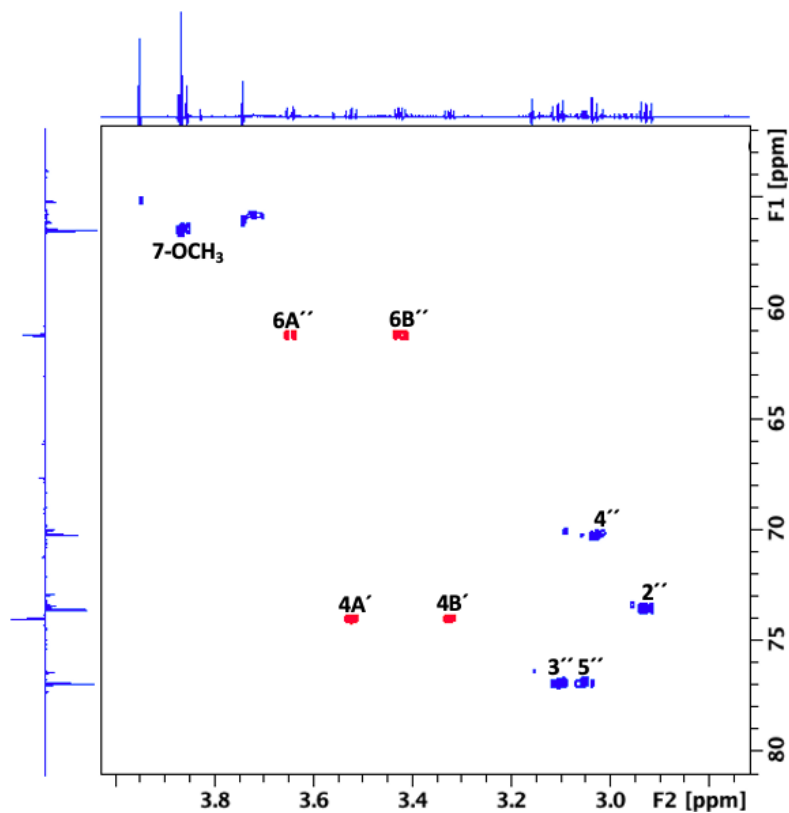
Figur 115: 1D ^1H NMR spekter med fullstendig anordning av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6).



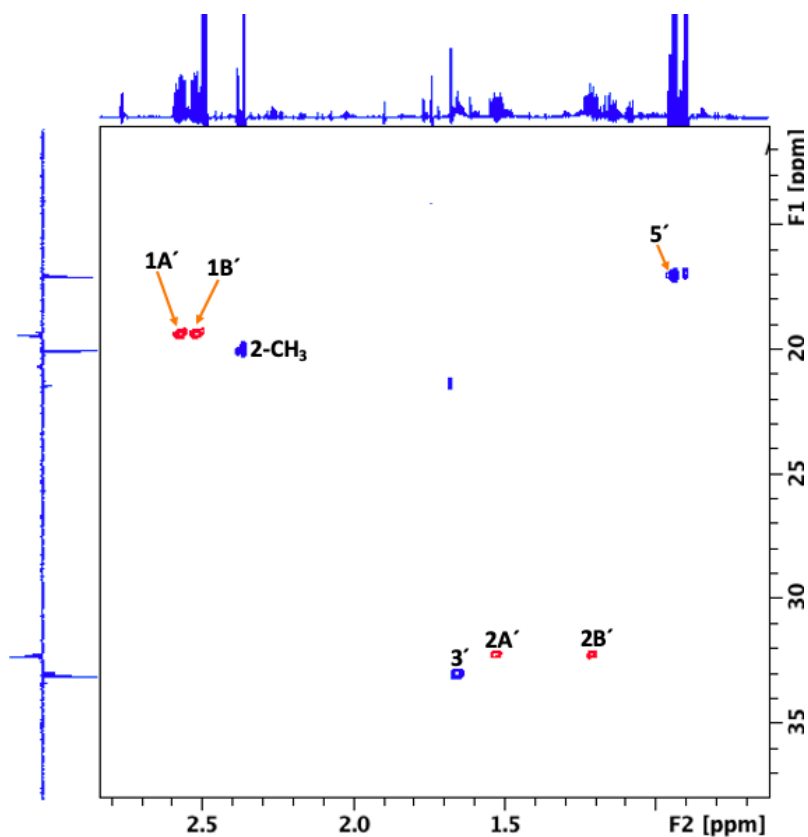
Figur 116: 1D ^{13}C CAPT NMR spekter med anordning av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6).



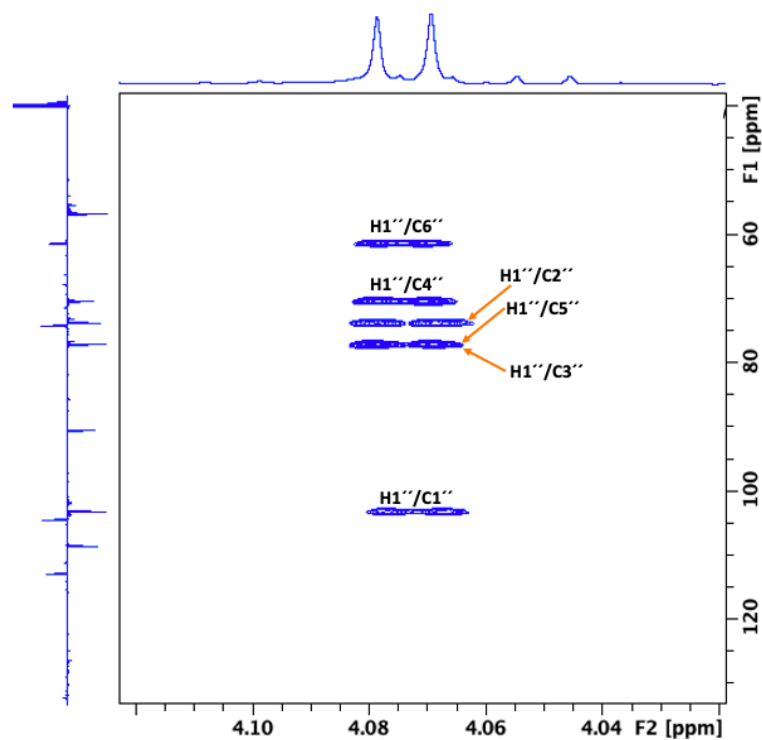
Figur 117: Ekspandert aromatisk region av 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (**6**).



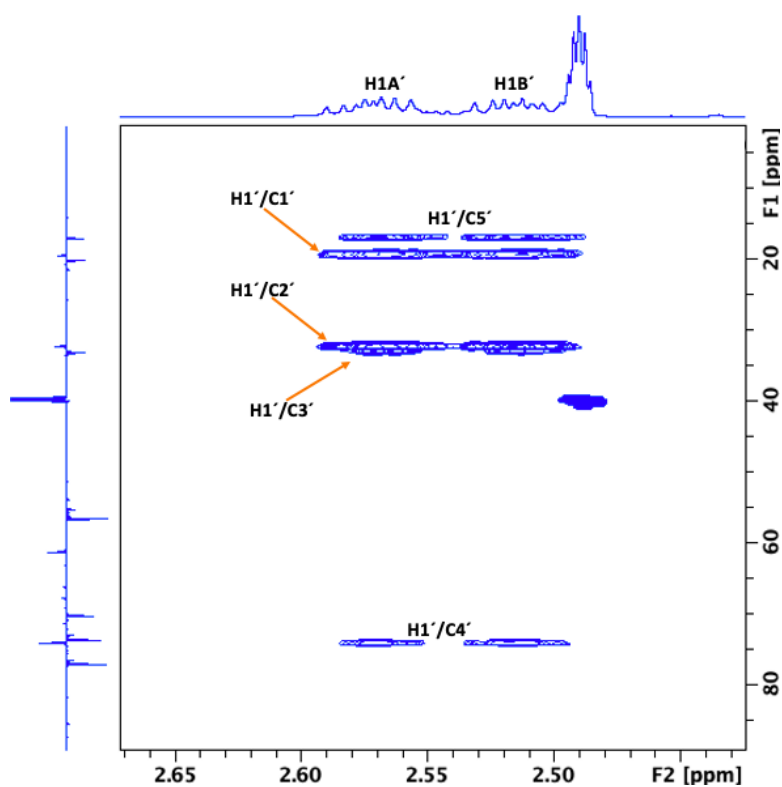
Figur 118: Ekspandert alifatisk region av 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (**6**).



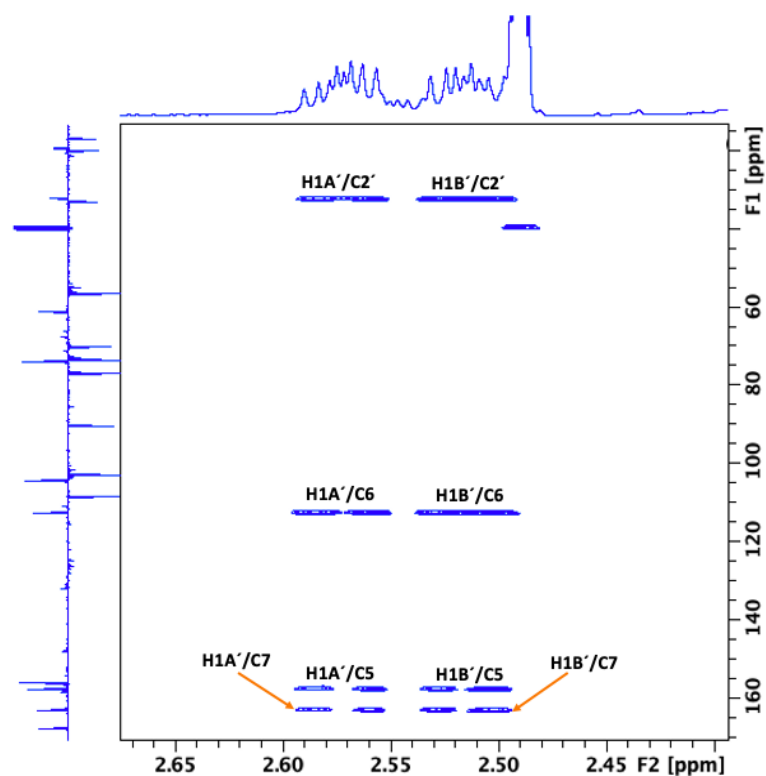
Figur 119: Ekspandert alifatisk region av 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (**6**).



Figur 120: Ekspandert alifatisk region av 1D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (**6**). Ekspansjon viser hele spinnsystemet til glukose-enheten sett fra $\text{H1}''$.

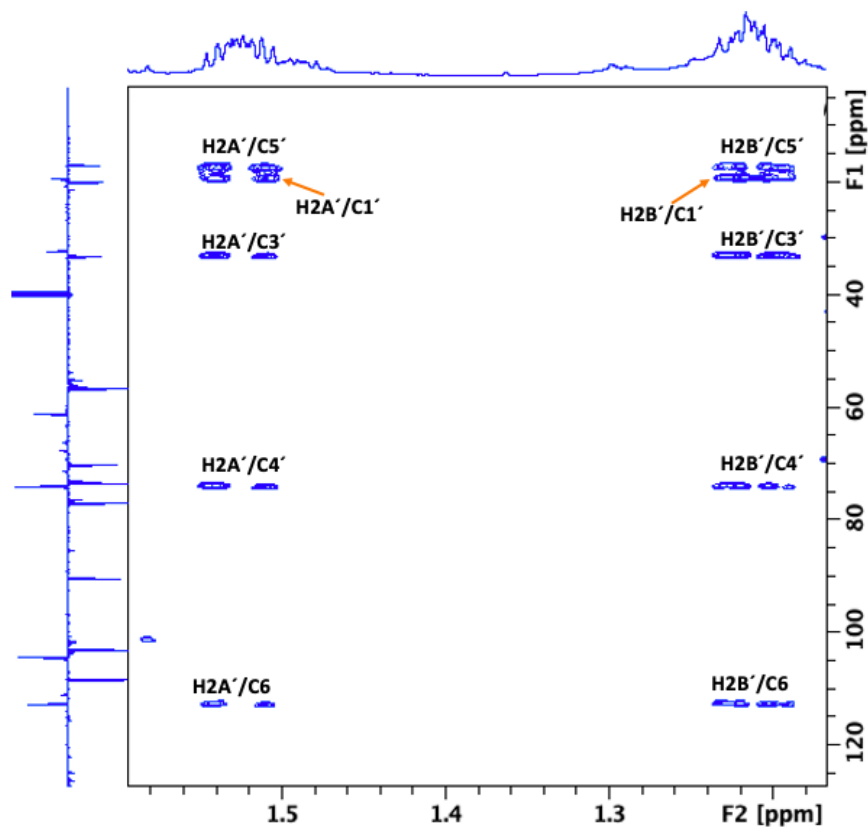


Figur 121: Ekspandert alifatisk region av 1D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksey-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydrokseybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6). Ekspansjon viser spinnsystemet til isobutyl-enheten sett fra H1A'/H1B'.

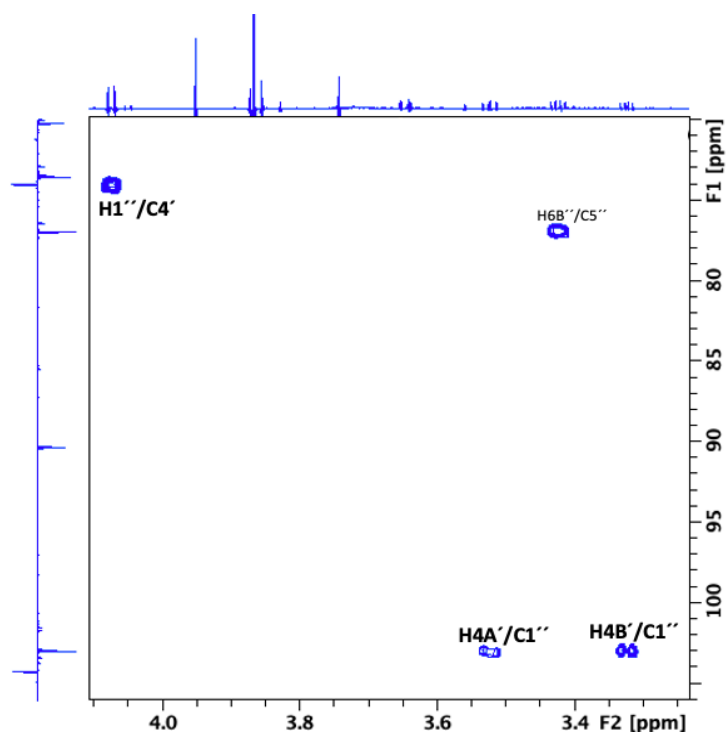


Figur 122: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksey-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydrokseybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6). Den viser

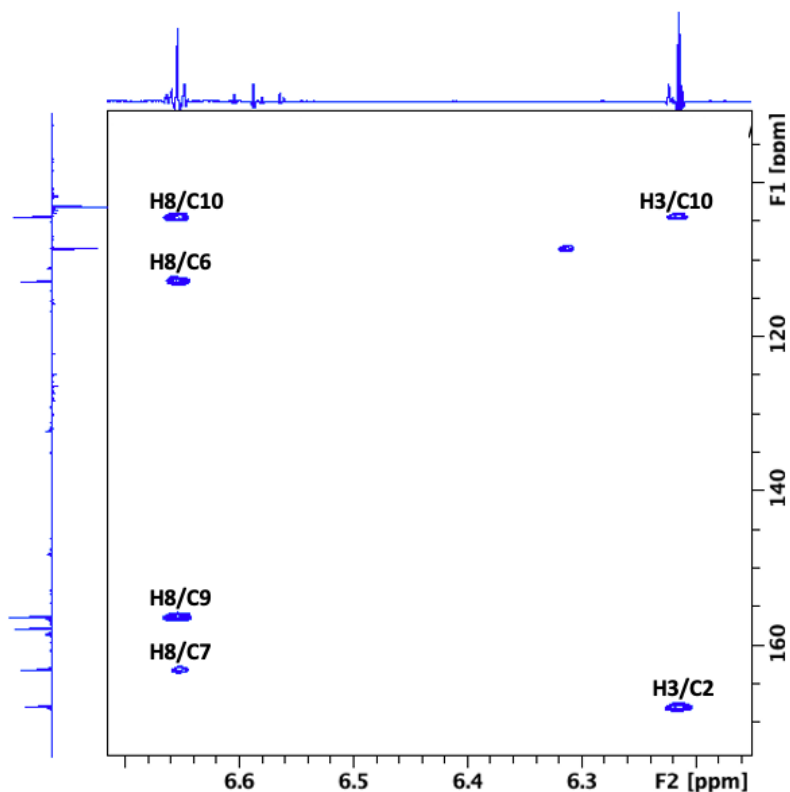
korrelasjoner fra H1A' og H1B' til karbonatomer som er to eller tre bindinger fra disse hydrogenatomene, inkludert viktige krysstopper til kromenon aglykon som viser at isobutyl-enheten er tilknyttet kromenon-enheten av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) i 6-posisjon (**6**).



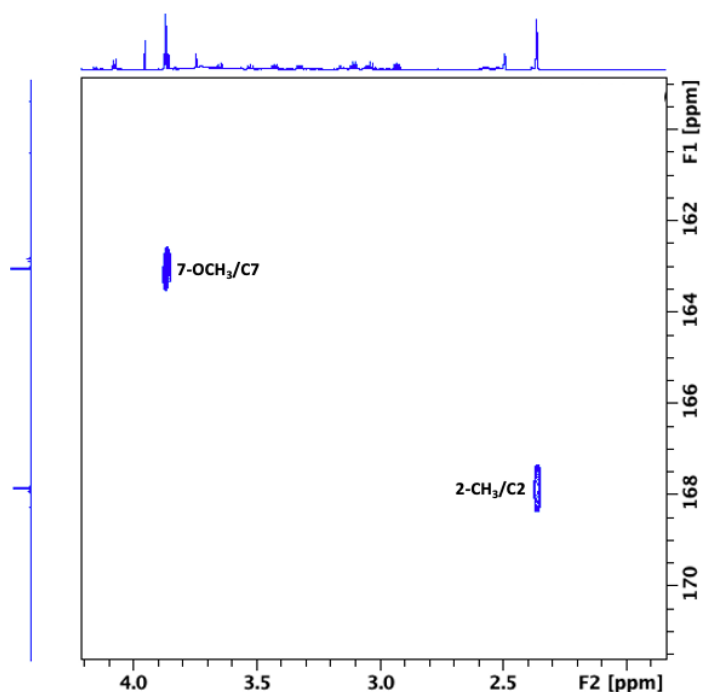
Figur 123: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (**6**).



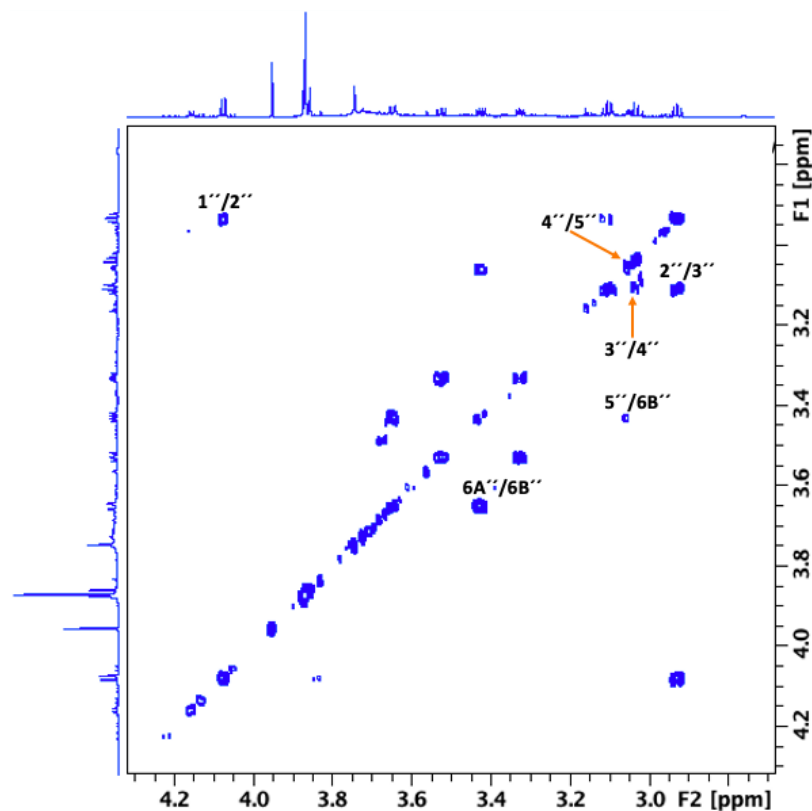
Figur 124: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (**6**). Krysstoppene mellom $\text{H1}''/\text{C4}'$ og $\text{H4A}'/\text{H4B}'/\text{C1}''$ bekrefter at glukoseenheten er tilknyttet isobutylenheten i 4'-posisjon.



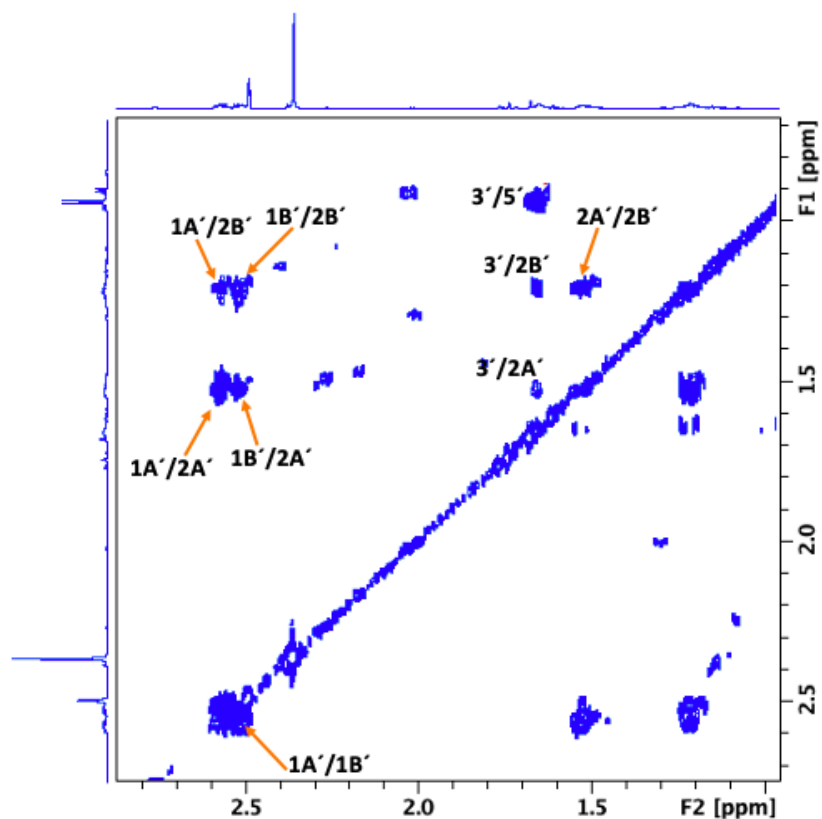
Figur 125: Ekspandert aromatisk region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (**6**).



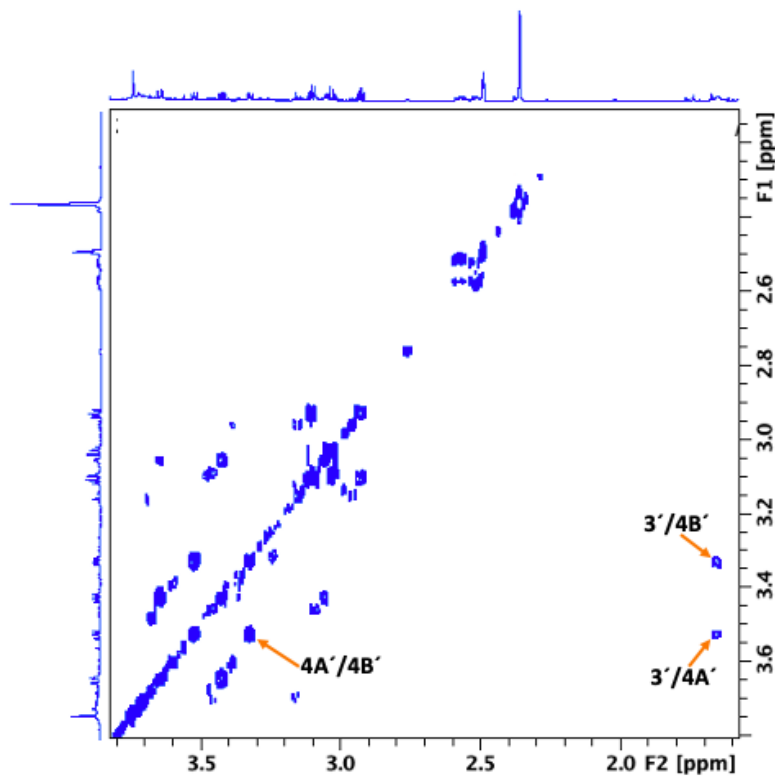
Figur 126: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (**6**). De observerte krysstoppene 7-OCH₃/C7 og 2-CH₃/C2 bekrefter posisjonen av metoksygruppen i 7-posisjon og metylgruppen i 2-posisjon.



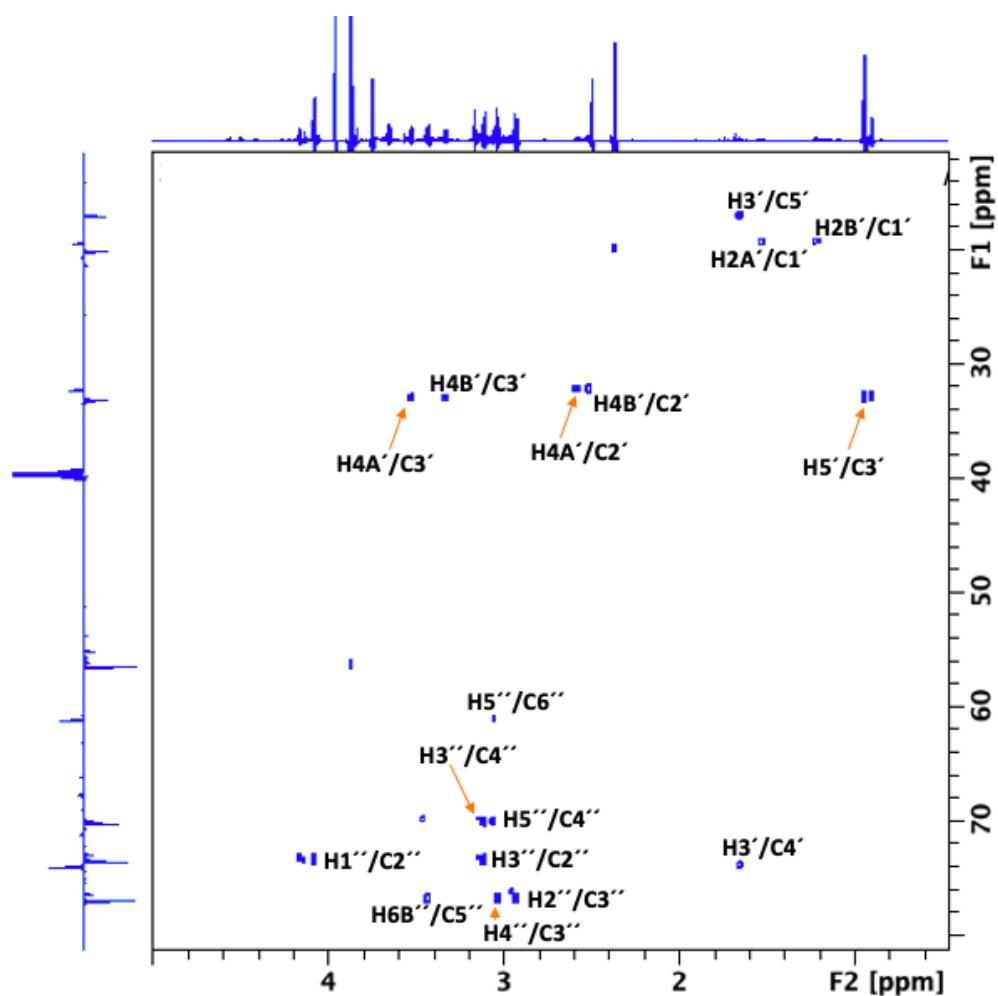
Figur 127: Ekspandert sukkerregion av 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (**6**).



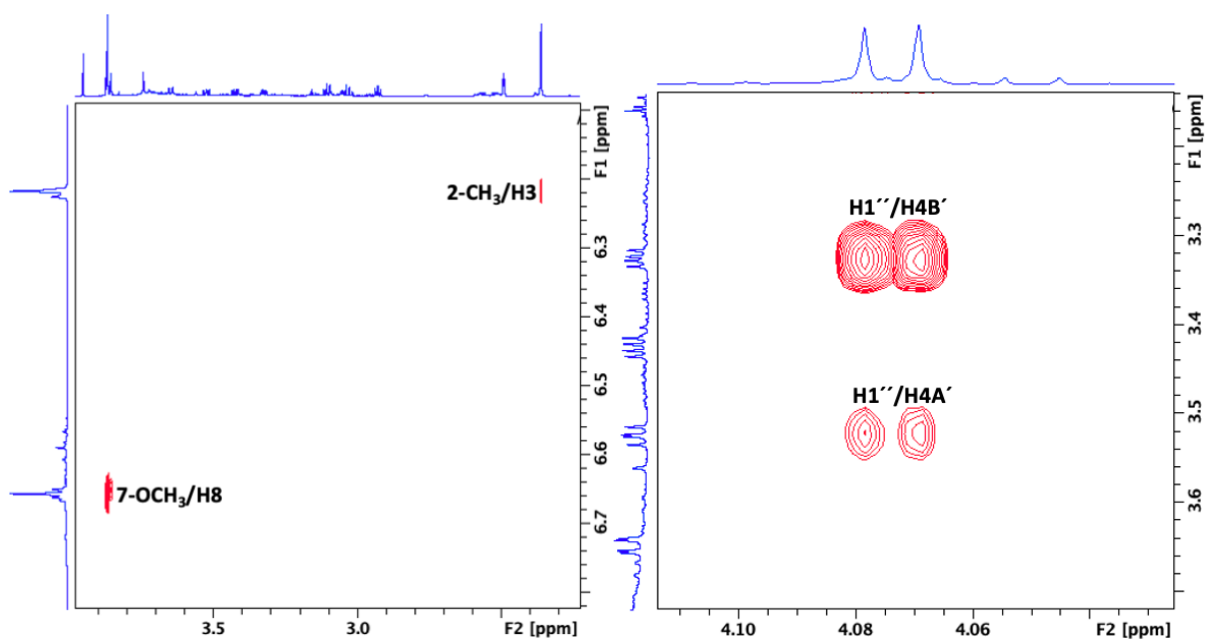
Figur 128: Ekspandert isobutyl-enhet region av $2D^1H-^1H$ COSY NMR spekter av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (**6**).



Figur 129: Ekspandert isobutyl-enhet region av $2D^1H-^1H$ COSY NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (**6**).



Figur 130: Ekspandert alifatisk region av 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekteret av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6). Ekspansjon viser tobindingskorrelasjoner i sukkerenhet og i isobutyl-enhet.



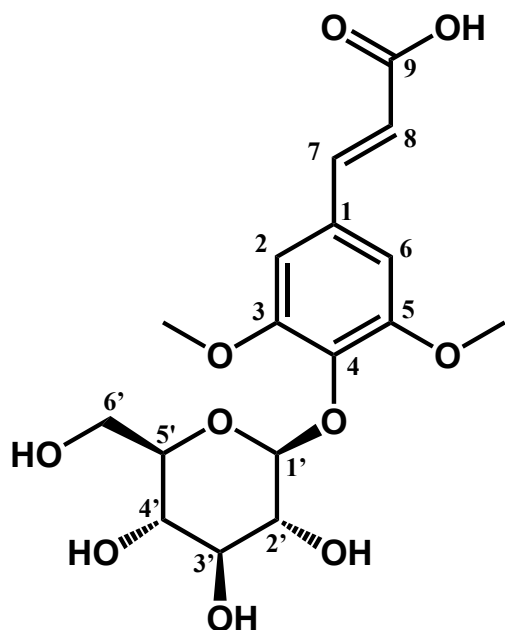
Figur 131: Ekspanderte regioner av 2D ^1H - ^1H ROESY NMR spekteret av 2-metyl-5-

hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6).
Ekspansjon til venstre viser krysstoppen mellom 2-CH₃/H3 og 7-OCH₃/H8. Ekspansjon til høyre viser krysstoppen mellom H1'' og H4A'/4B'.

6.1.6 E-SINAPINSYRE 4-O- β -GLUKOPYRANOSID

Forbindelse (7) ble funnet i to NMR-prøver. Forbindelsen ble isolert etter opprensing ved hjelp av den lille Sephadex LH-20 kolonnen fra fraksjon VM1LS8+9. Den har også blitt isolert i en ren prøve ved hjelp av preparativ HPLC i fraksjon VM2S21-23P3+22+37. NMR-spektre for sistnevnte fraksjon blir benyttet for strukturbestemmelse og fullstendig anordning av ¹H og ¹³C kjemiske skift for forbindelsen i oppgaven. Original 1D og 2D NMR-spektrene for fraksjon VM1LS8+9 er vedlagt i vedlegg 3 (figur 337-342). Den kombinerte fraksjonen VM1LS8+9 bestod av 10.7 milligram av tørt materiale etter tørking i eksikator, mens fraksjon VM2S21-23P3+22+37 bestod av 10.2 milligram av tørt materialet. NMR analyse viste at forbindelse (7) er E-sinapinsyre 4-O- β -glukopyranosid. Eksperimentelle verdiene for ¹H og ¹³C kjemisk skift verdier til forbindelsen er vist i tabell 21. Basert på litteratursøk i Scifinder finner en at forbindelse (7) ikke har blitt isolert fra *Myrrhis odorata* tidligere. De eksperimentelle kjemisk skiftverdiene for forbindelse (7) stemmer godt overens med litteraturverdier (41).

Strukturen til forbindelse (7) er vist i figur 132. UHPLC-kromatogrammet av fraksjon VM2S21-23P3 er vist i figur 133, og UV-spekteret av forbindelsen er vist i figur 134. UHPLC-kromatogrammene til VM2S21-23P22 og VM2S21-23P37 er vedlagt i vedlegg 2, figur 280-281. Kromatogrammet viser at forbindelse (7) har en retensjonstid på 1.56 minutter og UV- maksabsorpsjon ved 208 nm, 226 nm og 300 nm.



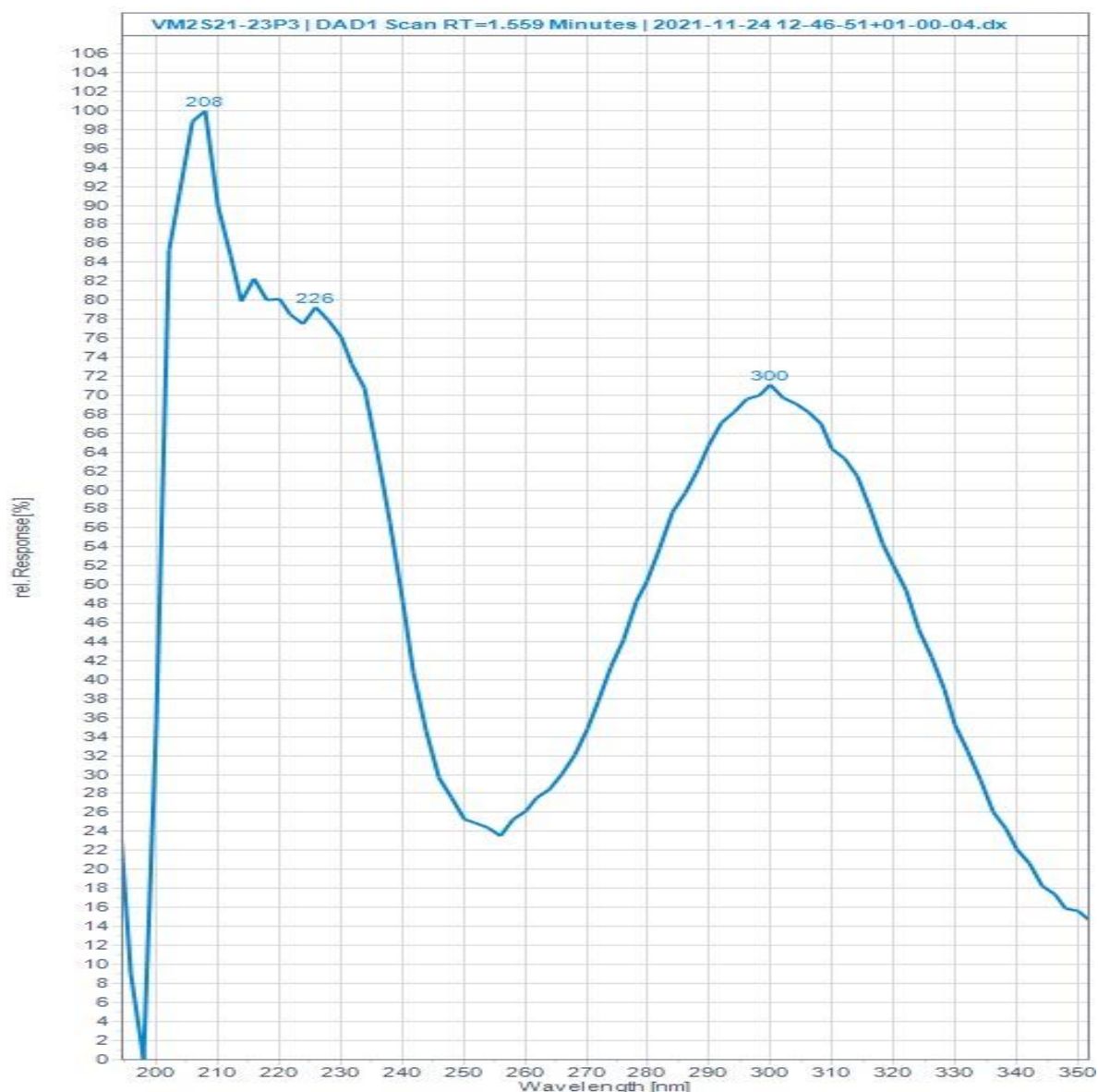
Figur 132: Struktur av *E*-sinapinsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (7) med nummerering.

Strukturformel: C₁₇H₂₂O₁₀

Uniisotopisk molekylvekt: 386.1213 g/mol



Figur 133: UHPLC-kromatogram av *E*-sinapinsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (7) i fraksjon VM2S21-23P3 detektert ved 280 ± 10 nm.



Figur 134: UV-spektrum av *E*-sinapinsyre 4-*O*-β-glukopyranosid (7).

Det ble tatt 1D ^1H -NMR, 1D ^{13}C CAPT, 2D ^1H - ^{13}C HMBC, 2D ^1H - ^{13}C HSQC, 2D ^1H - ^1H COSY og 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spektre av *E*-sinapinsyre 4-*O*-β-glukopyranosid (7). Det er observert ett proton signal ved 7.02 ppm som opptrer som singlet, som betyr at det er ingen hydrogenkjerner på nabokarbonatomene. Krysstoppen i HMBC-spekteret (figur 138) fra H2/6 (7.02 ppm) til C1 (129.7 ppm) og C4 (136.2 ppm) var nyttige i anordning av ^{13}C signalene til forbindelsen. Observert signal ved 3.79 s/56.5 ppm i HSQC spekteret (figur 141) er et typisk signal for metoksygrupper. Signalet ved 3.79 ppm ble integrert til 6H i 1D ^1H NMR-spekteret (figur 135), noe som indikerer tilstedeværelse av to ekvivalente metoksygrupper. Krysstoppen ved δ 3.79/152.8 (3,5-OCH₃/C3,5) observert i HMBC spekteret (figur 138), viste at metoksygruppe var tilknyttet i 3- og 5-posisjon.

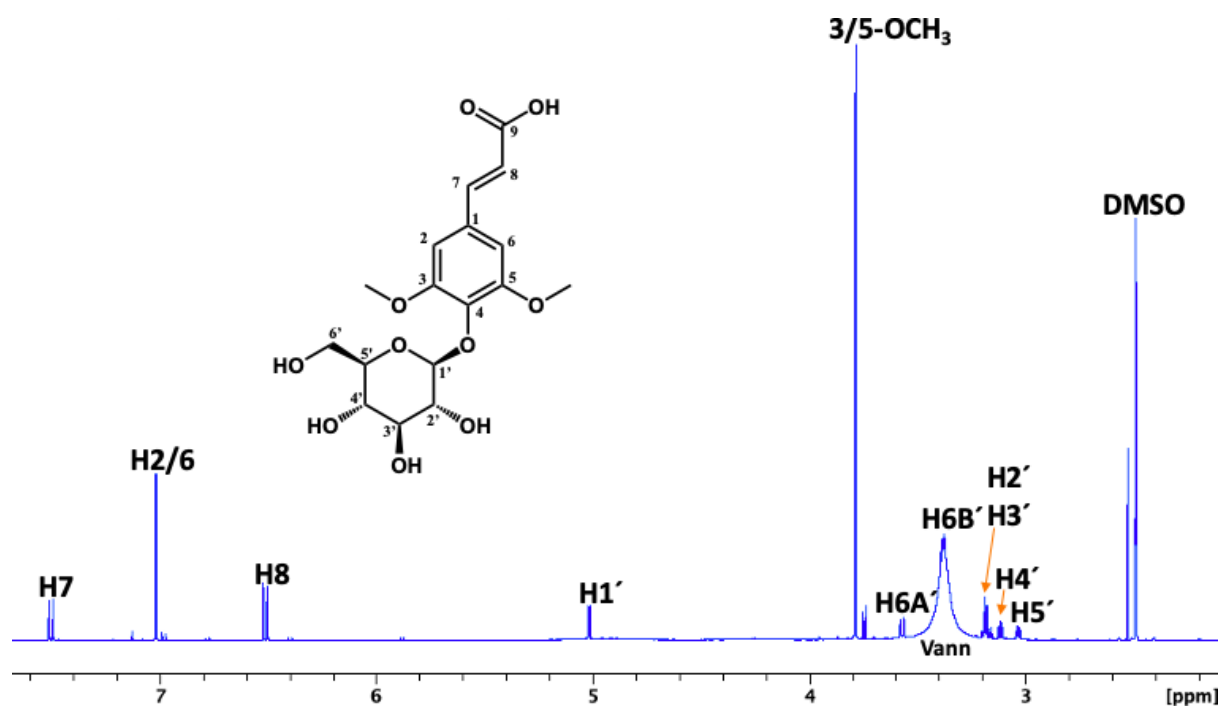
Det er observert to hydrogensignaler med kjemisk skiftverdi 7.50 ppm (d) og 6.51 ppm (d) som er typisk proton kjemisk skiftverdier for en dobbeltbinding i en (*E*)-konfigurasjon, siden de har stor kobling til hverandre på 15.9 Hz. Basert på deres koblingsmønster og ved hjelp av HSQC-spekteret ble disse anordnet til C7 (144.16 ppm) og C8 (118.45 ppm) (figur 140).

Den høye kjemiske skiftverdien på 167.81 ppm er typisk for karbonylkarbon i en karboksylsyregruppe. Hydrogensignalet på 12.41 ppm opptrer som bred singlet, noe som er typisk for syregrupper.

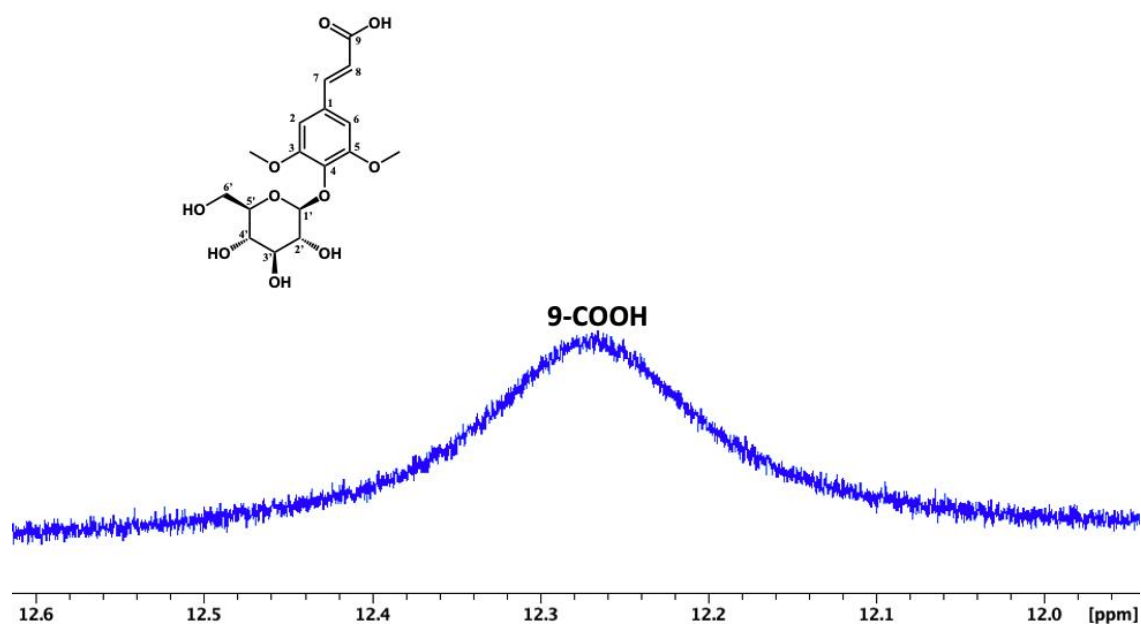
Det er observert 7 hydrogensignaler med kjemisk skiftverdier mellom 3.03 ppm og 5.02 ppm, som er typisk området for et suktermolekyl (tabell 21), hvor samtlige ¹H og deres tilhørende karbonatomer ble anordnet ved hjelp av korrelasjoner observert i HSQC-spekteret, H2BC-spekteret og COSY-spekteret. H1' ved 5.02 ppm får sitt downfield kjemisk skift på grunn av at C1' (102.26) er koblet til to O-atomer i molekylstrukturen (figur 132). H1' opptrer som dublett i protonspekteret fordi det er kun ett hydrogenatom koblet på nabokarbonatomet (C2'). Koblingskonstanten observert for H1' (7.4 Hz) bekreftet at glukoseenheten er i β-konfigurasjon. Krysstoppen observert i HMBC-spekteret mellom H1' ved 5.02 ppm og C4 ved 136.2 ppm bekrefter at glukoseenheten er tilknyttet sinapinsyrens aromatring i 4-posisjon.

Tabell 21: ¹H og ¹³C kjemisk skift verdier (ppm) og koblingskonstanter (Hz) av *E*-sinapinsyre 4-*O*-β-glukopyranosid (7) fraksjon VM2S21-23P3+22+37 isolert fra *Myrrhis odorata* i DMSO-D₆ ved 298K.

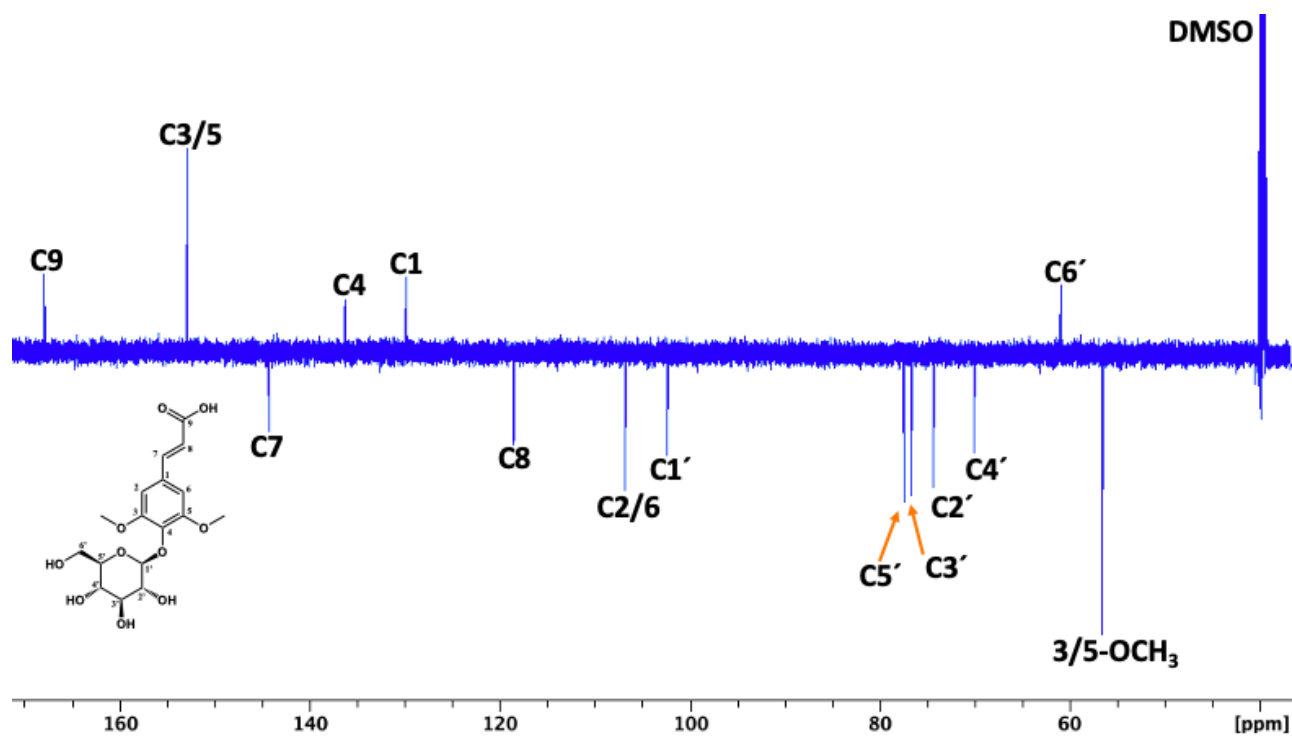
	δ ¹ H 7	δ ¹³ C 7
1		129.71
2/6	7.02 s	106.69
3/5		152.81
4		136.19
7	7.50 d 15.9	144.16
8	6.51 d 15.9	118.45
9		167.81
3/5-di-OCH ₃	3.79 s	56.54
9-COOH	12.27 s (br)	
4- <i>O</i> -β-glukopyranosid		
1'	5.02 d 7.4	102.26
2'	3.19 m	74.24
3'	3.18 m	76.67
4'	3.12 dd 9.7, 8.9	69.98
5'	3.03 ddd 9.7, 5.7, 2.2	77.40
6A'	3.57 dd 11.8, 2.2	60.90
6B'	3.38 dd 11.8, 5.7	



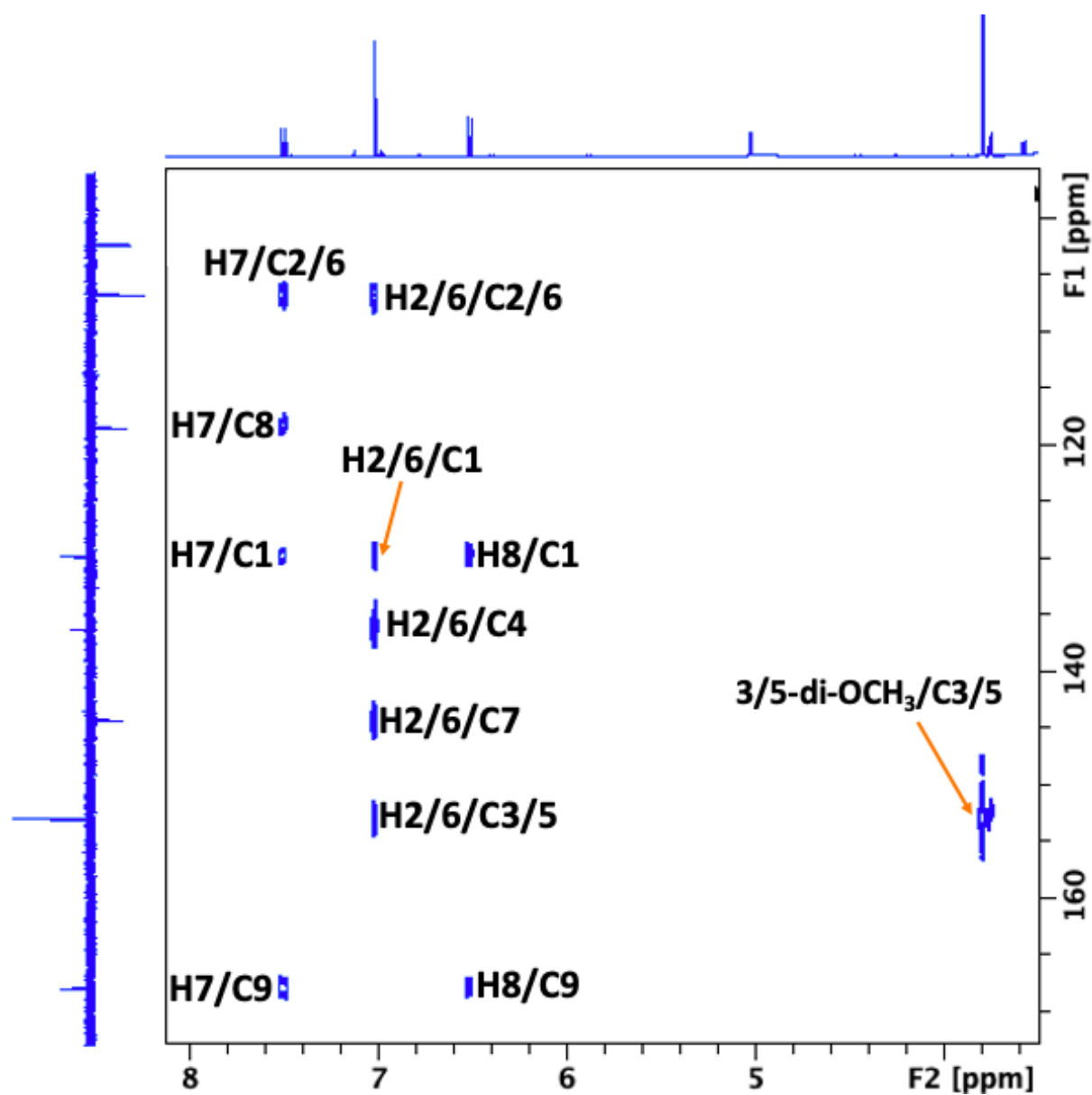
Figur 135: Ekspandert region $1D$ 1H NMR spekteret med anordning av signalene til *E*-sinapinsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (7). Signalet ved 2.53 ppm (DMSO- H_6) stammer fra at prøven ble løst i vanlig DMSO før separasjon ved hjelp av preparativ HPLC.



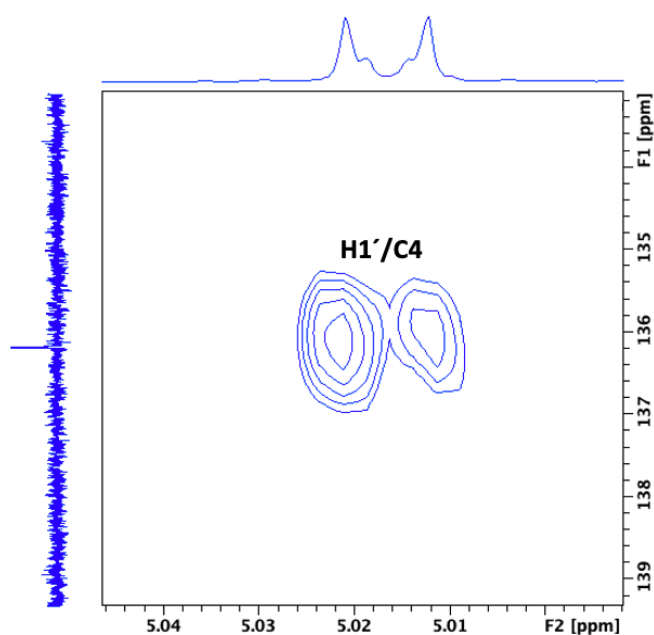
Figur 136: Ekspandert region $1D$ 1H NMR spekter med anordning av *E*-sinapinsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (7).



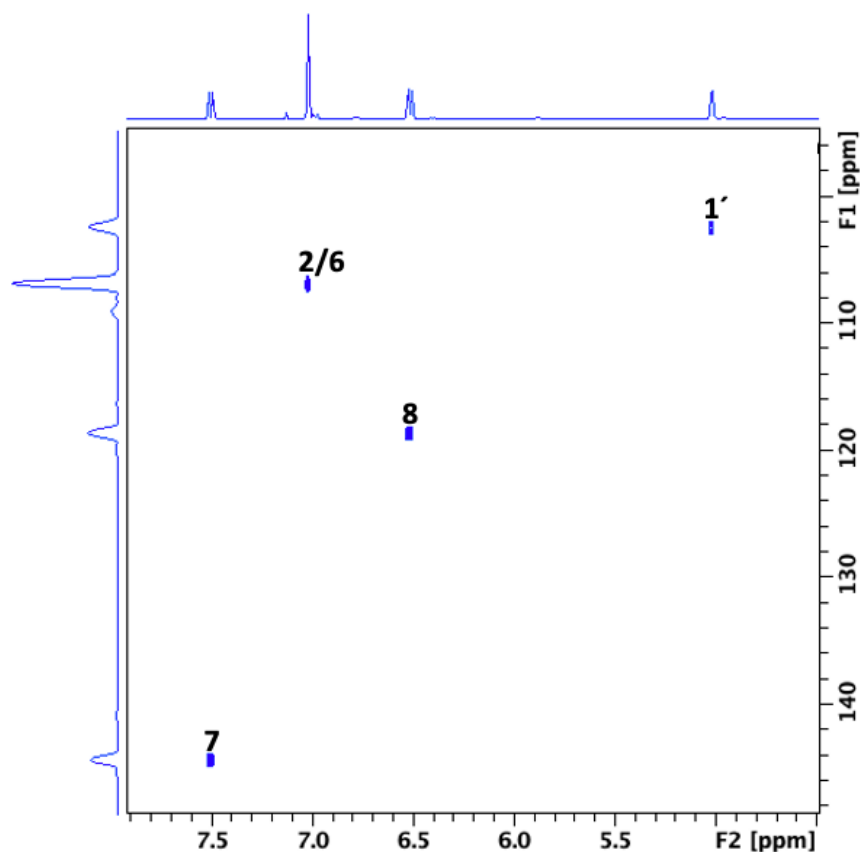
Figur 137: 1D ¹³C CAPT NMR spekter med fullstendig anordning av *E*-sinapinsyre 4-*O*-β-glukopyranosid (7).



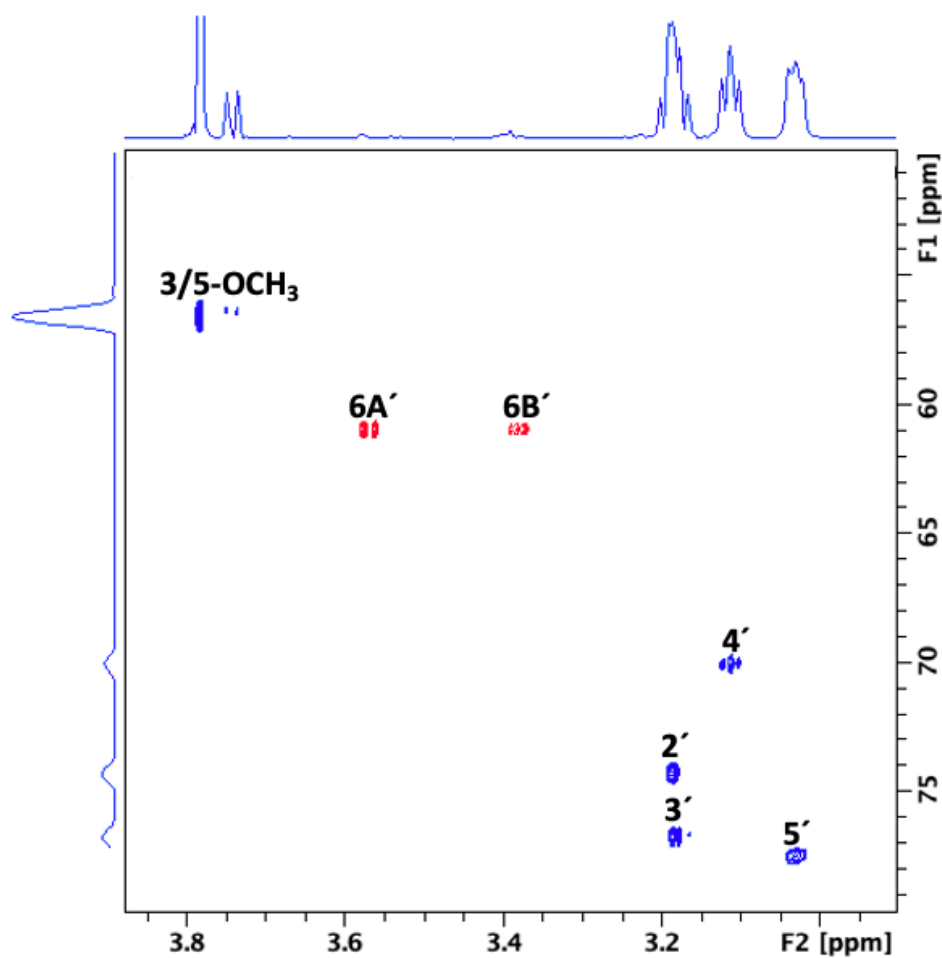
Figur 138: Ekspandert aromatisk region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av *E*-sinapinsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (7) som viser hvordan molekylet henger sammen.



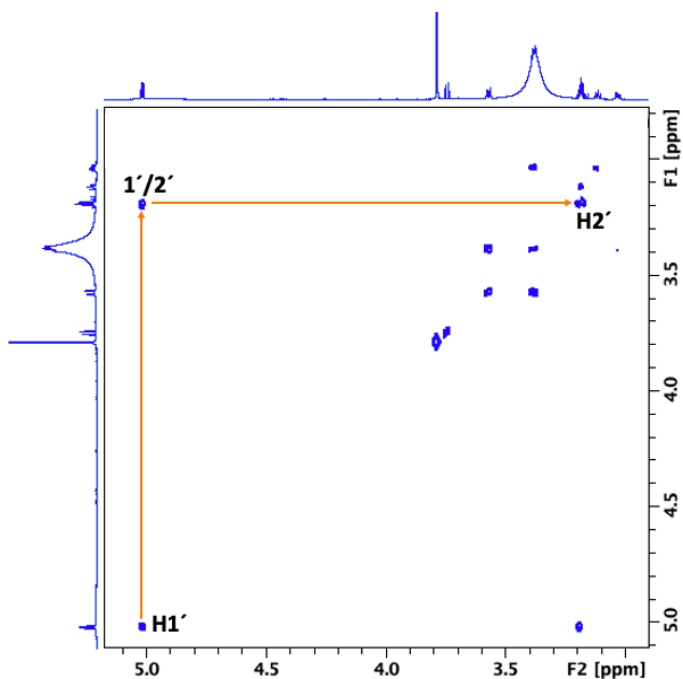
Figur 139: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av *E*-sinapinsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (7). Ekspansjon viser krysstoppen mellom $\text{H1}'$ (5.02 ppm) og C4 (136.2 ppm) som bekrefter at glukoseenheten er festet til sinapinsyrens aromatring i 4-posisjon.



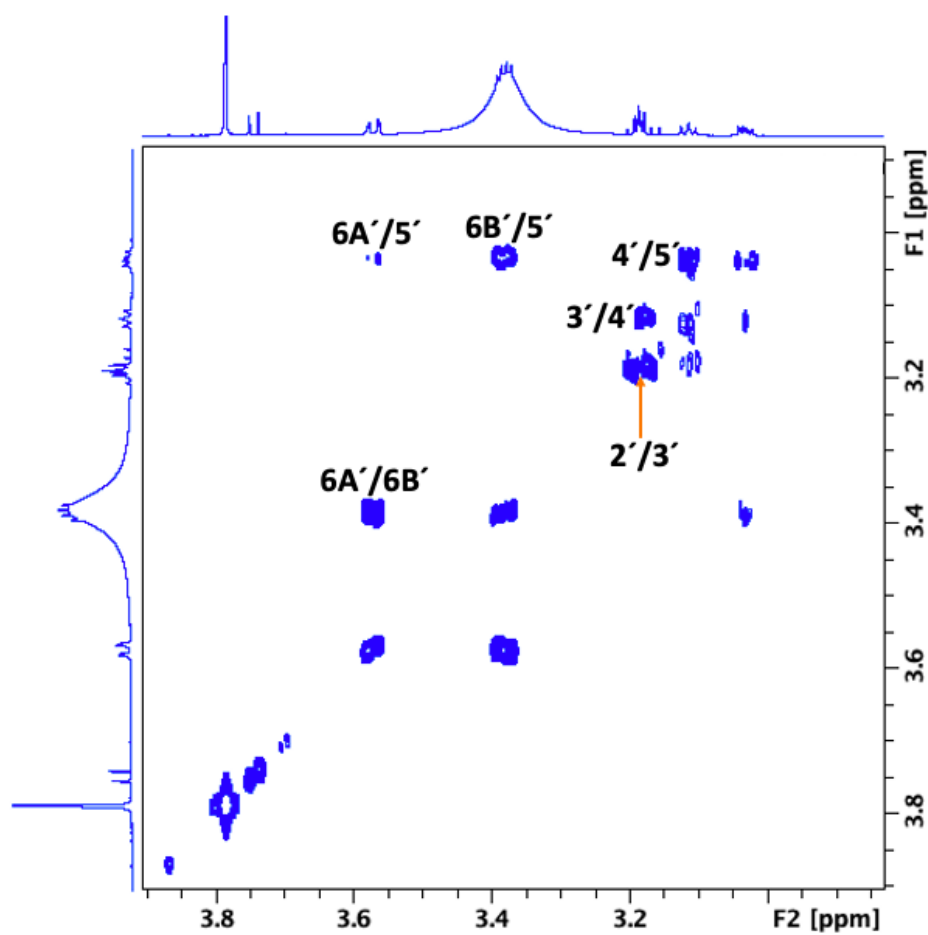
Figur 140: Ekspandert aromatisk region i 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av *E*-sinapinsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (7). Den ekspanderte regionen viser også signalet for anomeren ($\text{H1}'/\text{C1}'$) til glukoseenheten.



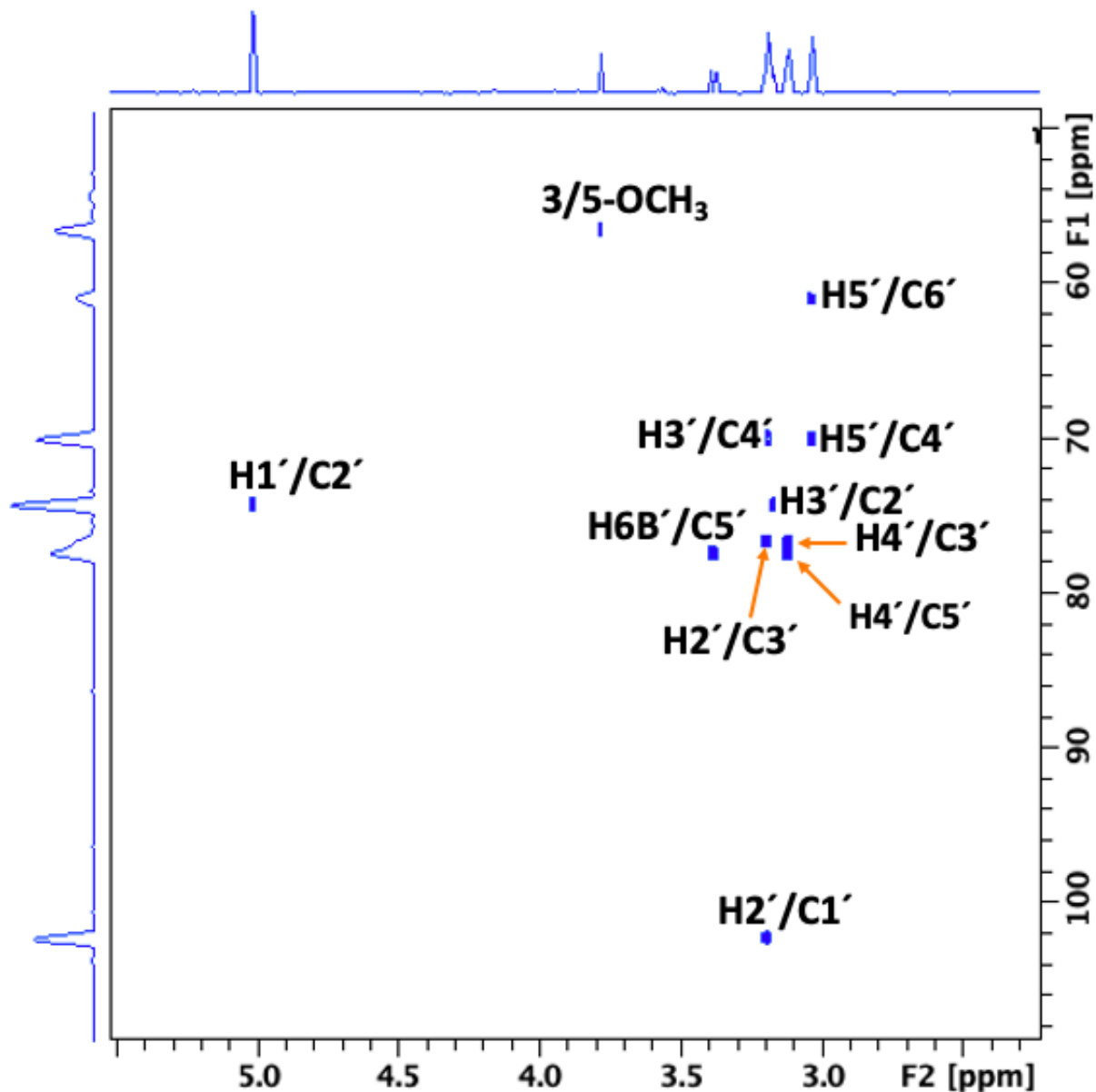
Figur 141: Ekspandert alifatisk region i 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av *E*-sinapinsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (7).



Figur 142: Ekspandert sukkerregion av 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekteret av *E*-sinapinsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (7).



Figur 143: Ekspandert sukkerregion av $2D^1H-^1H$ COSY NMR spekteret av *E*-sinapinsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (7).

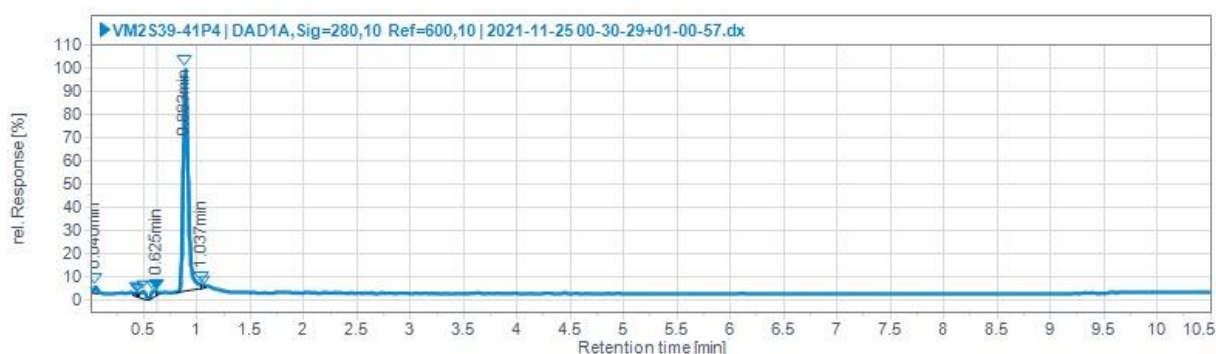


Figur 144: Ekspandert sukkerregion av $2D^1H-^{13}C$ H2BC NMR spekteret av *E*-sinapinsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (7). Ekspansjon viser tobindingskorrelasjoner i sukkerenhet av forbindelse (7).

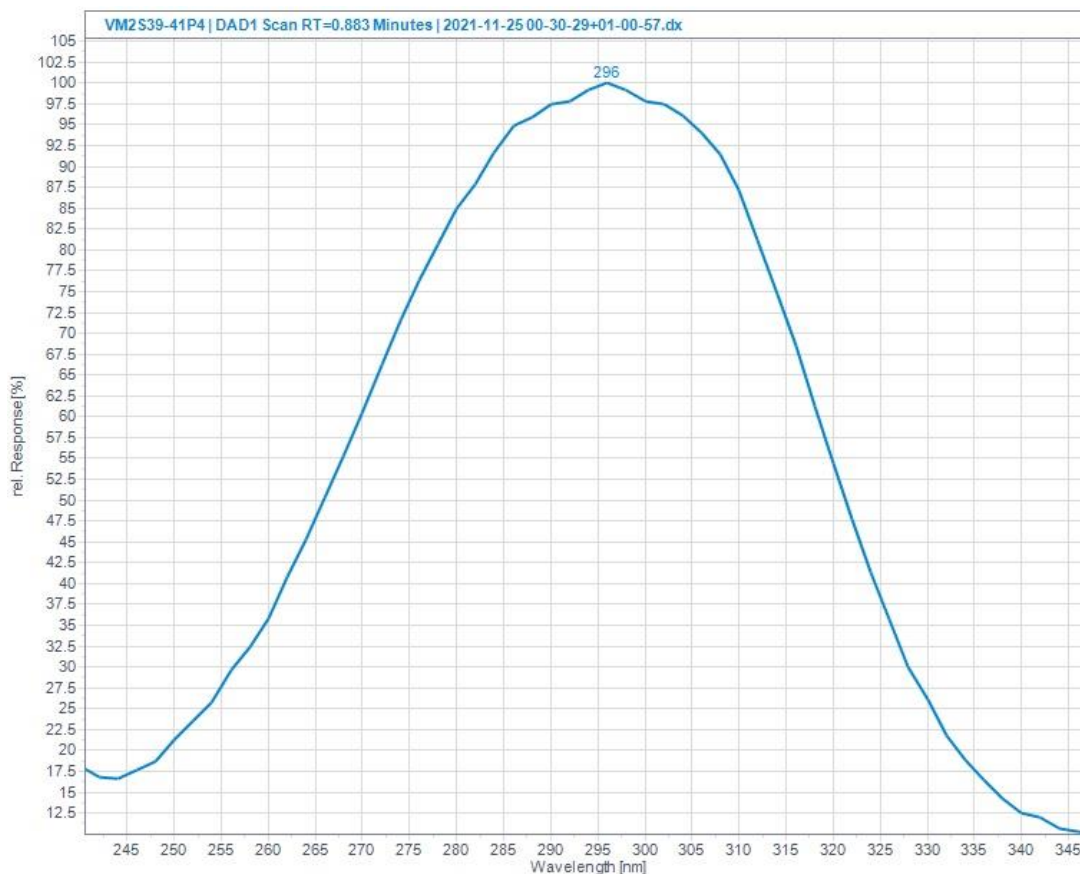
6.1.7 *E*-KUMARSYRE 4-*O*- β -GLUKOPYRANOSID

Det ble isolert 6.3 milligram av forbindelse (8) fra fraksjon VM1LS13+14 etter separasjon ved hjelp av den lille Sephadex LH-20 kolonnen. Det ble også isolert 3.5 milligram av forbindelse (8) i renere form fra fraksjon VM2S39-41P4+31 ved hjelp av preparativ HPLC. Basert på eksperimentelle NMR-data ble funnet at forbindelse (8) var *E*-kumarsyre 4-*O*- β -glukopyranosid. NMR-spektrene av VM1LS13+14 ble benyttet for å bestemme strukturen av forbindelse (8). UHPLC-kromatogrammet og NMR-spektrene til VM1LS13+14 viser at

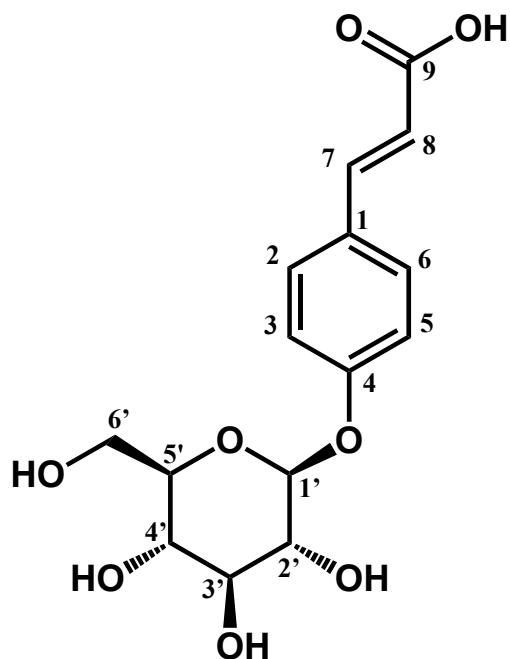
prøven også inneholder noen minor forbindelser, men i mye lavere konsentrasjon enn hovedforbindelsen. Siden VM2S39-41P4+31 er renere og NMR-signalene for denne fraksjonen er bedre, benyttes dens NMR-spektrene til å anordne ^1H og ^{13}C kjemiske skiftverdier til forbindelse (8). Originale NMR-spektrene er vedlagt i vedlegg 3, figur 347-351. UHPLC-kromatogrammet og UV-spekteret til forbindelse (8) er vist i figur 145-146. Kromatogrammet viser at *E*-kumarsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (8) har retensjonstid på 0.88 minutter og maks UV-absorpsjon på 296 nm.



Figur 145: UHPLC-kromatogram av *E*-kumarsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (8) i fraksjon VM2S39-41P4 detektert ved 280 ± 10 nm.



Figur 146: UV-spektrum av *E*-kumarsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (8).



Figur 147: Struktur av *E*-kumarsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (**8**) med nummerering.

Strukturformel: C₁₅H₁₈O₈

Uniisotopisk molekylvekt: 326.1002 g/mol

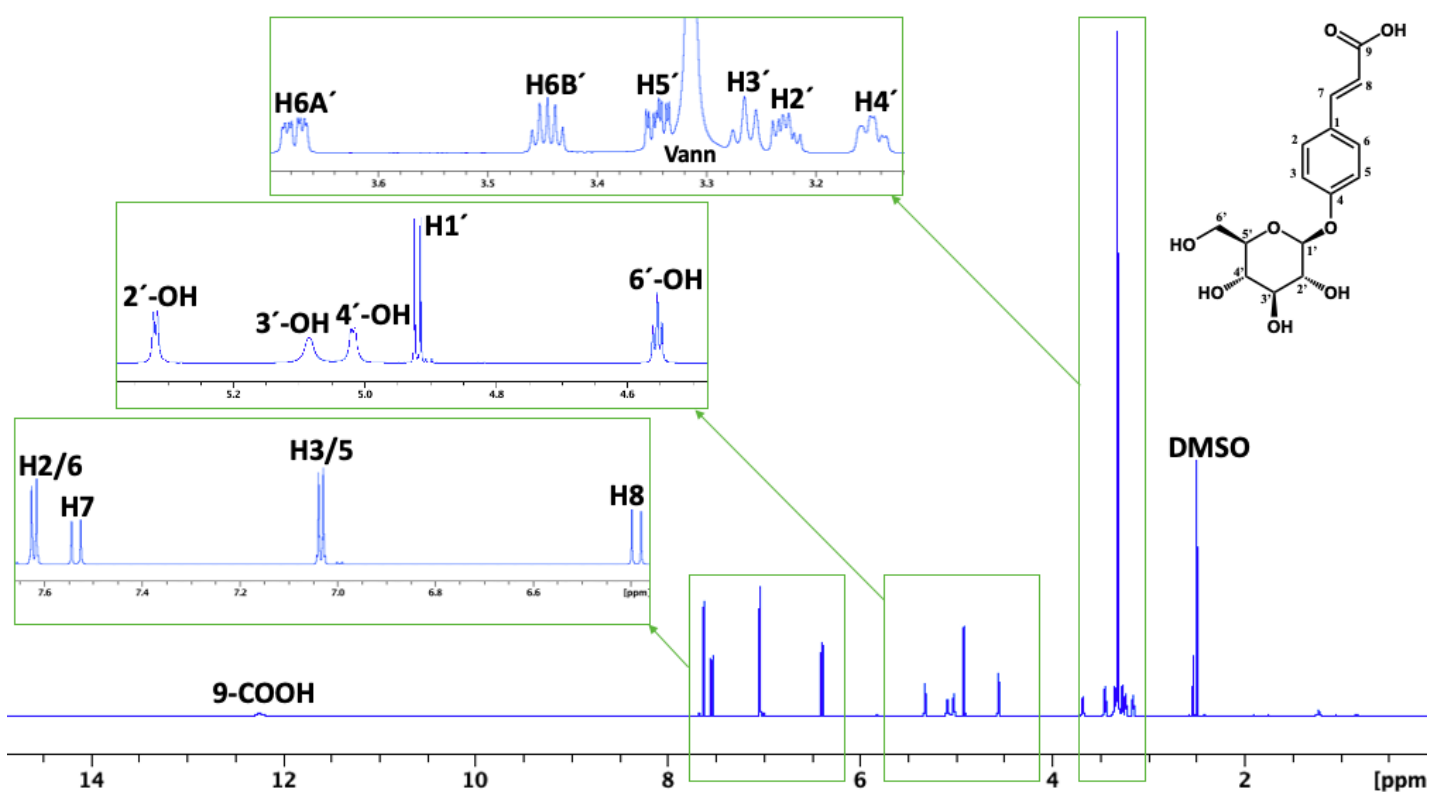
En rekke litteratursøk i Scifinder viste at forbindelse (**8**) ikke tidligere har blitt isolert fra *Myrrhis odorata* eller fra skjermplantefamilien fra før av. Eksperimentelle NMR-data vist i tabell 22 stemmer godt overens med referanselitteratur (41). Til sammenligning av NMR-data til forbindelse (**7**) og (**8**) viste de store likheter, med unntak av substituentene i 3- og 5- posisjon (**8**).

Det ble tatt 1D ¹H-NMR, 1D ¹³C CAPT, 2D ¹H-¹³C HMBC, 2D ¹H-¹³C HSQC, 2D ¹H-¹H COSY og 2D ¹H-¹³C H2BC NMR spektre for å bestemme strukturen av *E*-kumarsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (**8**). Det er fire hydrogensignaler i protonspekteret som er i aromatregionen mellom 6.39-7.62 ppm (tabell 22 og figur 148). Det er observert et AA'XX' spinnsystem med to semidubletter ved 7.62 ppm (H2/6) og 7.03 ppm (H3/5) som har stor kobling med hverandre med en koblingskonstant på 8.9 Hz. Det er også observert et 2H spinnsystem mellom H7 ved 7.54 ppm og H8 ved 6.39 ppm som kobler med hverandre med koblingskonstant på 15.9 Hz. Den store koblingskonstanten (15.9 Hz) indikerer at dobbeltbindinger har en (*E*)-konfigurasjon. For C9 er det observert et signal på 167.84 ppm (¹³C) som er typisk for karboksylsyrer. C9 har krysstopp til dobbeltbindingshydrogenatomene H7 (7.54 ppm) og H8 (6.39 ppm) i HMBC spekteret (figur 150). I tillegg er det observert

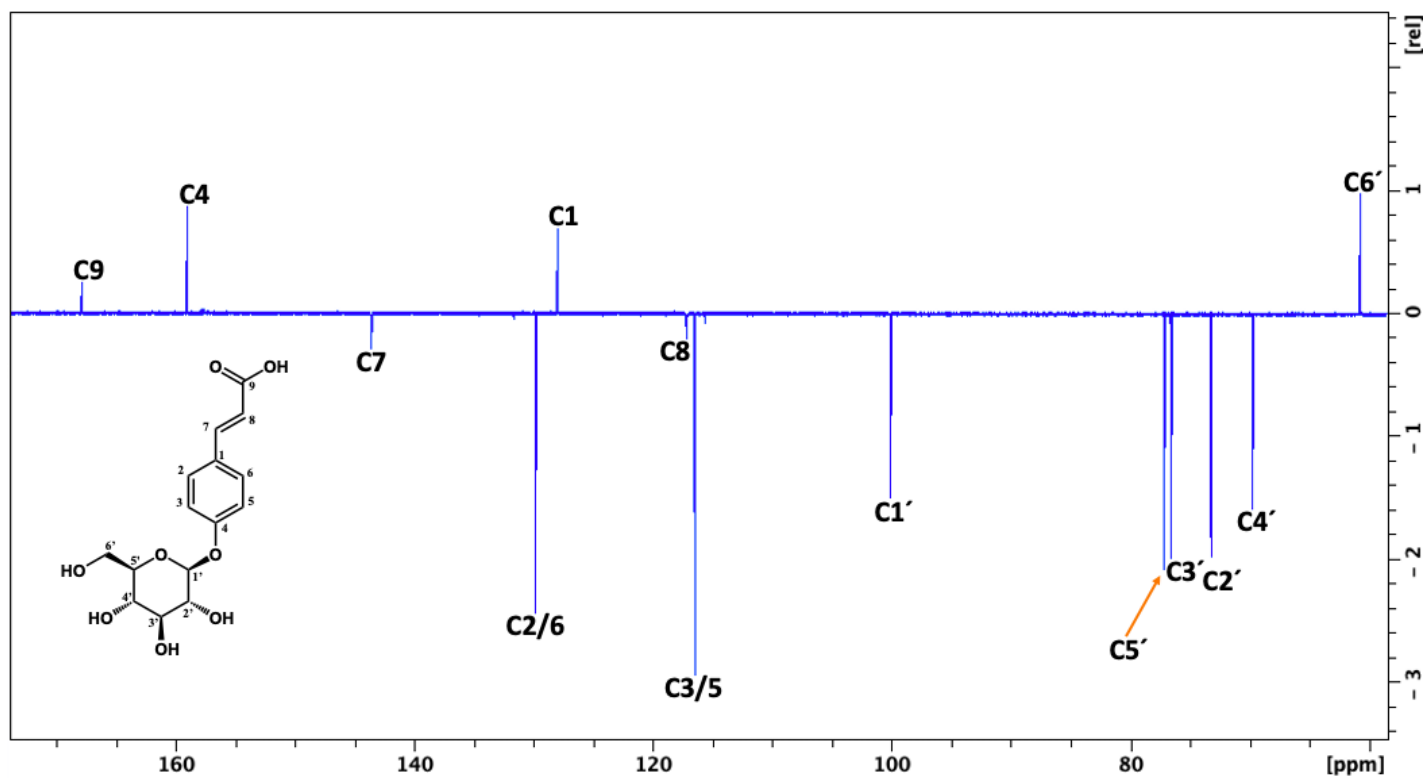
krysstopp mellom H1' ved 4.92 og C4 ved 159.03 ppm, noe som bekrefter at glukosylenheten er tilknyttet aromatringsen i 4-posisjon. Krysstopper observert i COSY-spekteret (figur 153-154), samt korrelasjoner observert i HSQC-spekteret (figur 151-152) var spesielt nyttig for å anordne signalene til glukoseenheten. Flere av tobindingskorrelasjoner i sukkerenheten ble bekreftet ved hjelp av H2BC-spekteret (figur 156).

Tabell 22: ^1H og ^{13}C NMR kjemisk skift verdier (ppm) og koblingskonstanter (Hz) av *E*-kumarsyre 4-O- β -glukopyranosid (8) fraksjon VM2S39-41P4+32 isolert fra *Myrrhis odorata* i DMSO- D_6 ved 298K.

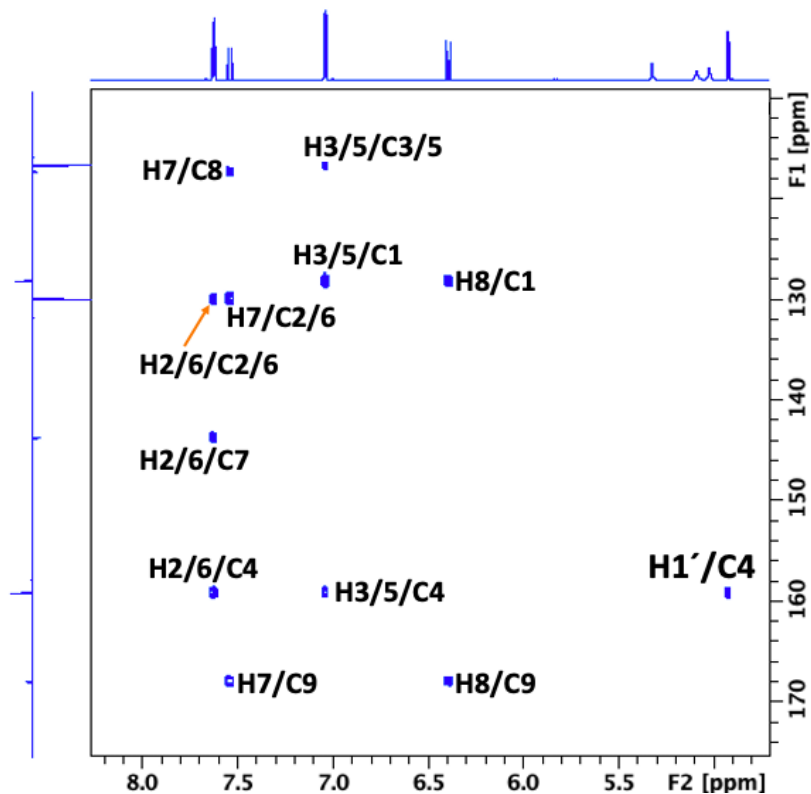
	δ ^1H 8	δ ^{13}C 8
1		128.00
2/6	7.62 'd' 8.9	129.83
3/5	7.03 'd' 8.9	116.51
4		159.03
7	7.54 d 15.9	143.66
8	6.39 d 15.9	117.13
9		167.84
3/5-di-OCH ₃		
9-COOH	12.24 s (br)	
4-O- β -glukopyranosid		
1'	4.92 d 7.6	100.08
2'	3.23 dd 8.9, 7.6	73.26
3'	3.27 t 8.9	76.64
4'	3.15 dd 9.7, 8.9	69.74
5'	3.34 ddd 9.7, 5.8, 2.2	77.17
6A'	3.68 dd 12.0, 2.2	60.73
6B'	3.45 dd 12.0, 5.8	
2'-OH	5.32 d 5.1	
3'-OH	5.08 s (br)	
4'-OH	5.02 d	
6'-OH	4.55 t 5.8	



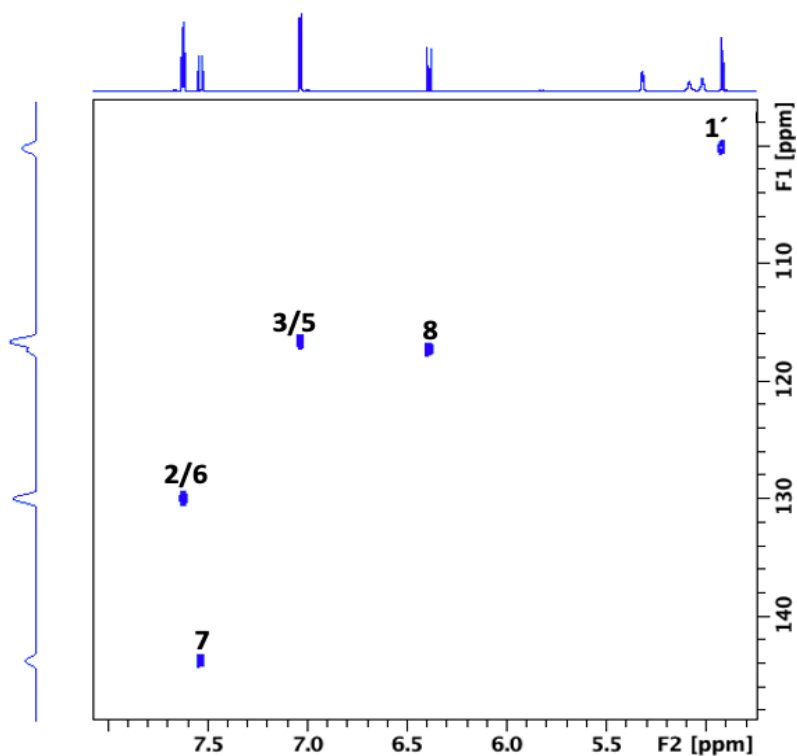
Figur 148: $1\text{D } ^1\text{H}$ NMR spekter med fullstendig anordning av signalene til E-kumarsyre 4-O- β -glukopyranosid (8).



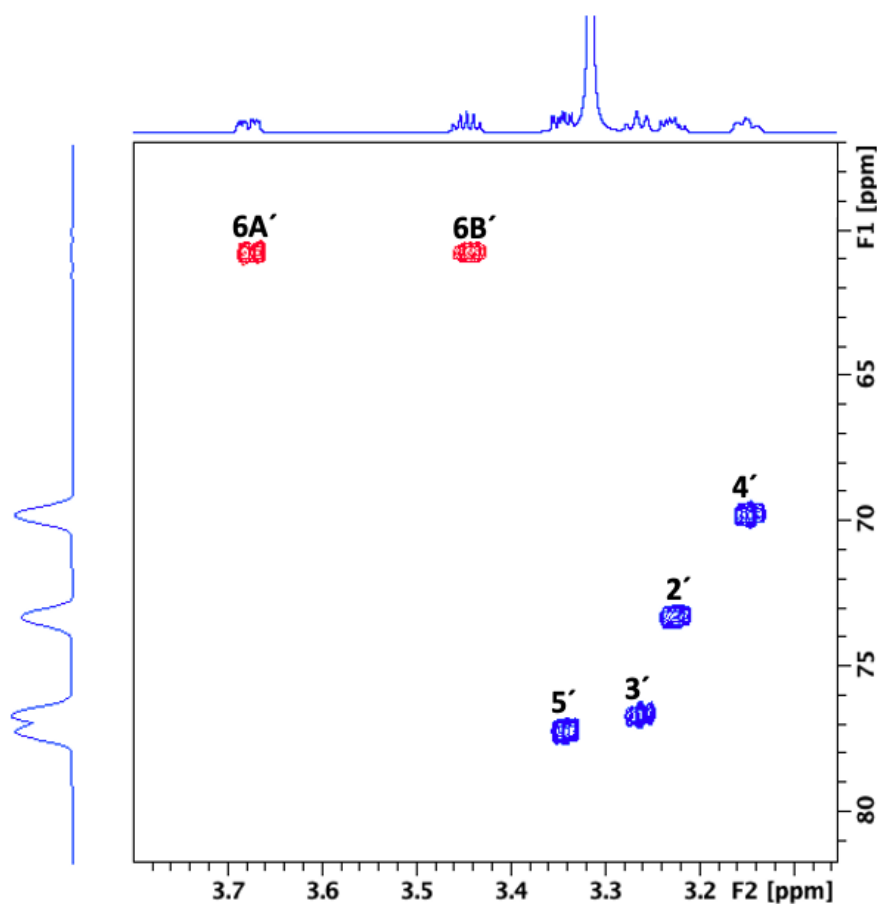
Figur 149: $1\text{D } ^{13}\text{C}$ CAPT NMR spekter med fullstendig anordning av signalene til E-kumarsyre 4-O- β -glukopyranosid (8).



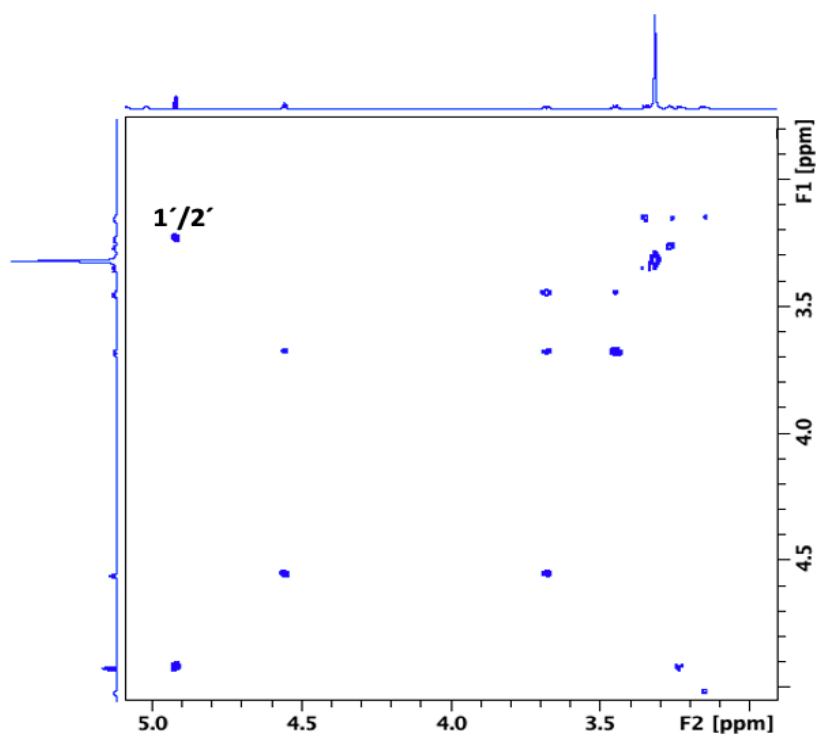
Figur 150: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av *E*-kumarsyre 4- O - β -glukopyranosid (8), som blant annet viser krysstoppen $\text{H1}'/\text{C4}$ som bekrefter at glukose er festet til kumarsyre i 4-posisjon.



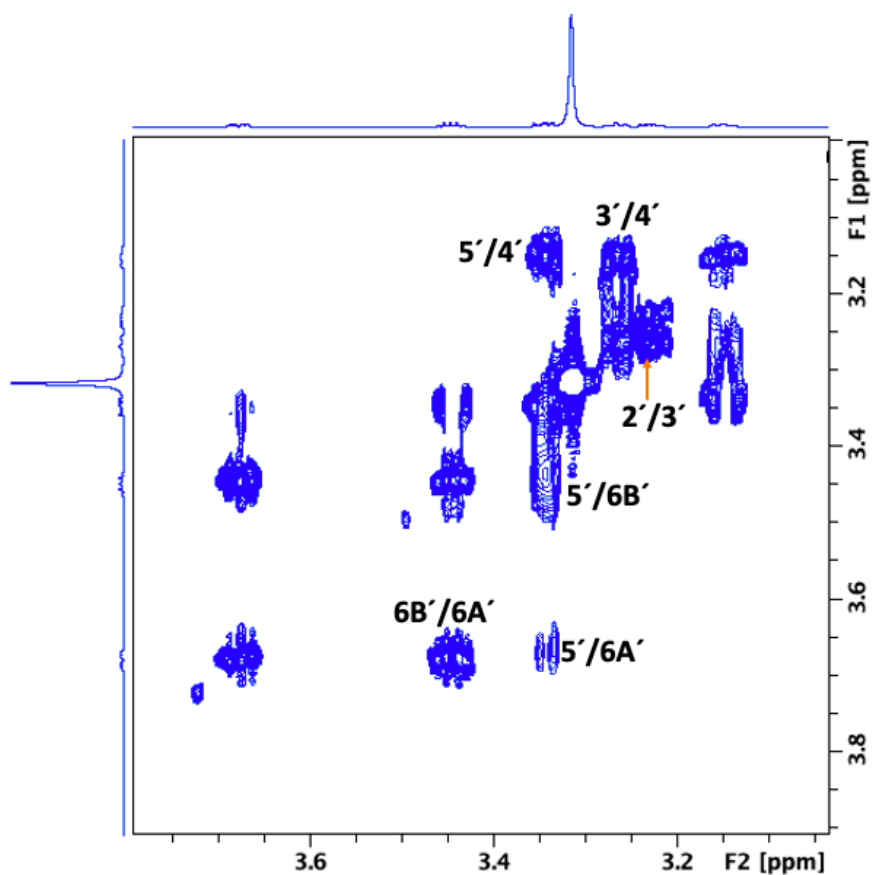
Figur 151: Ekspandert aromatisk region i 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av *E*-kumarsyre 4- O - β -glukopyranosid (8).



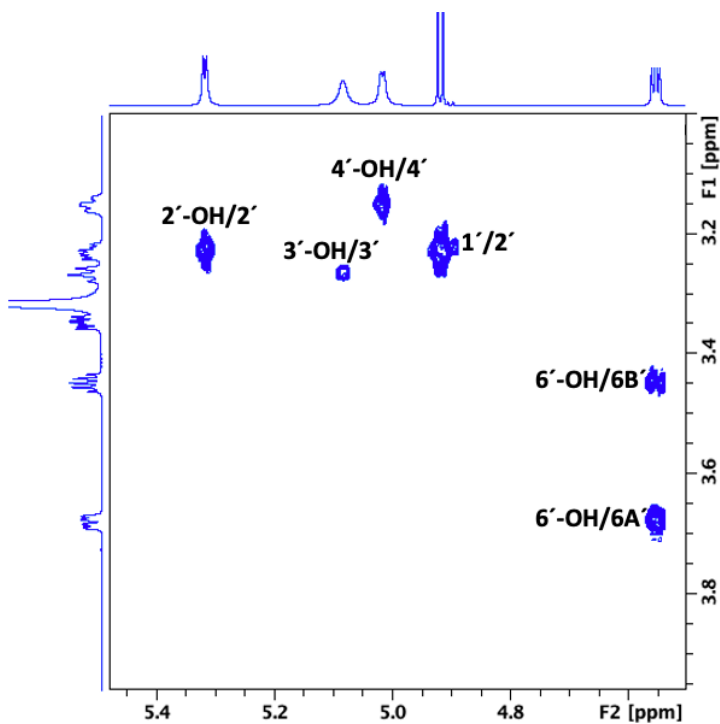
Figur 152: Ekspandert sukkerregion i 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av *E*-kumarsyre 4- β -glukopyranosid (8).



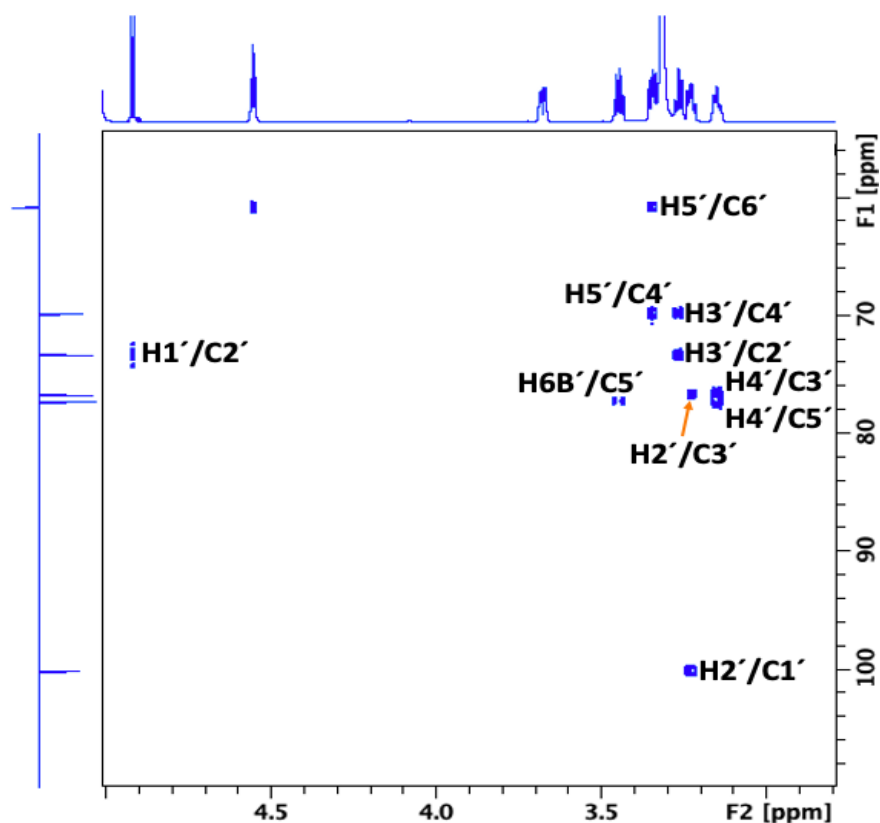
Figur 153: Ekspandert sukkerregion av 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekteret av *E*-kumarsyre 4- β -glukopyranosid (8).



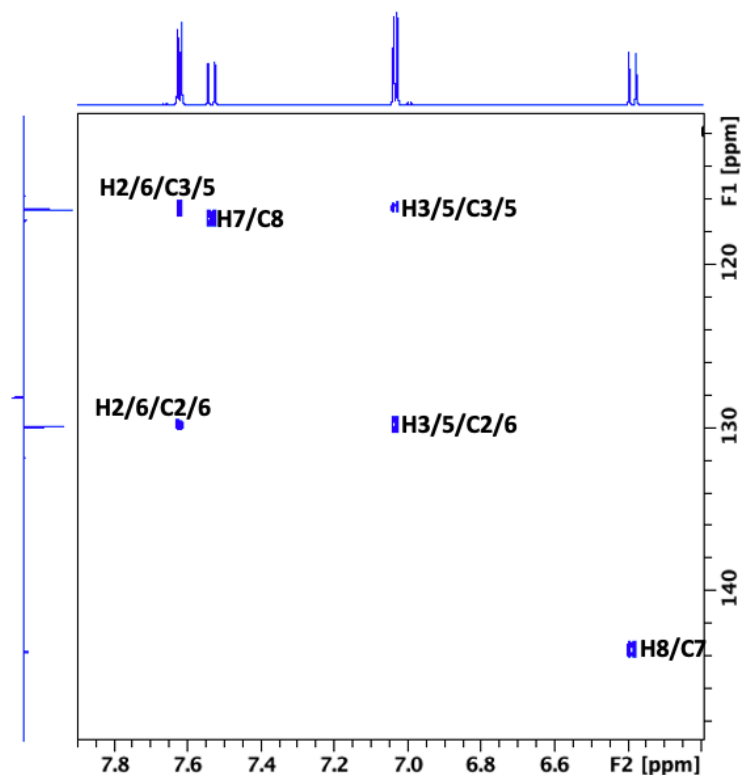
Figur 154: Ekspandert sukkerregion av $2D^1H-^1H$ COSY NMR spekteret av *E*-kumarsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (8). I denne ekspansjonen måtte gå på litt lavere kontur nivå for å kunne vise korrelasjoner mellom $H5'$ og $H6A'/B'$.



Figur 155: Ekspandert sukkerregion av $2D^1H-^1H$ COSY NMR spekteret av *E*-kumarsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (8).



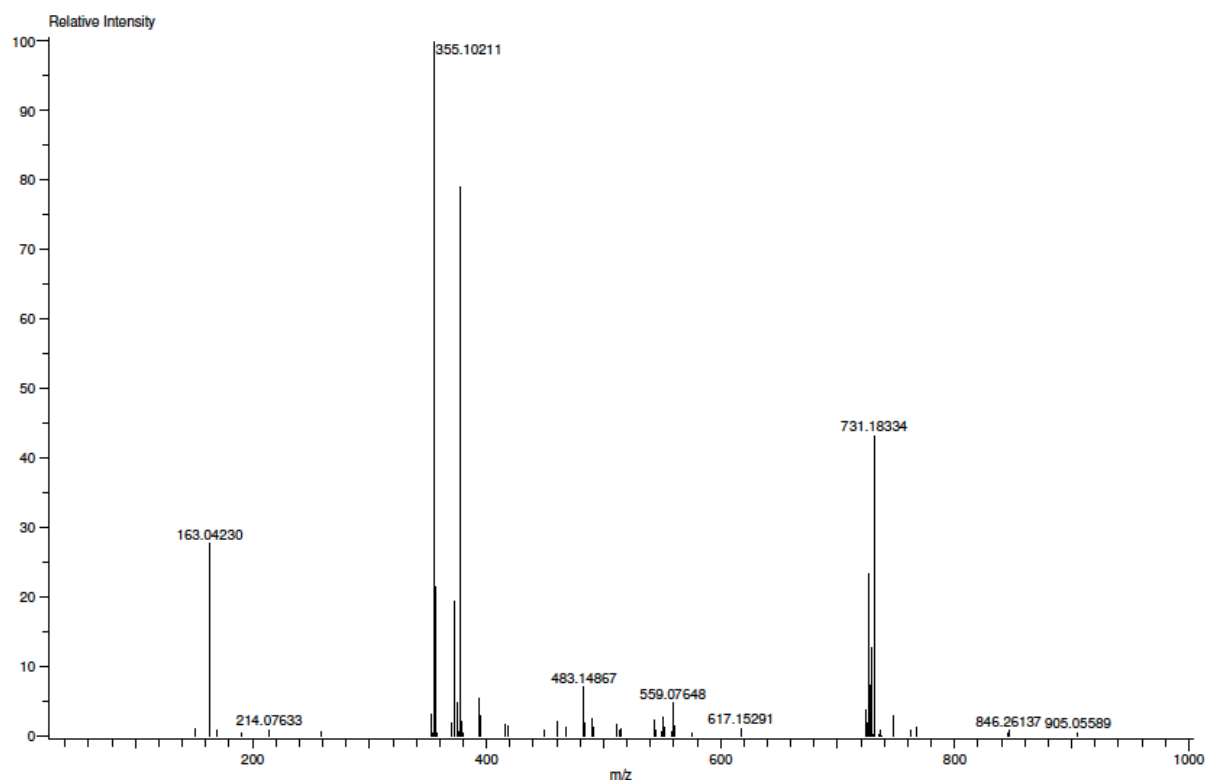
Figur 156: Ekspandert sukker region av $2D^1H-^{13}C$ H2BC NMR spekteret av *E*-kumarsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (8).



Figur 157: Ekspandert region av $2D^1H-^{13}C$ H2BC NMR spekteret av *E*-kumarsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (8) som viser tobindingskorrelasjoner i den aromatiske delen av molekylet.

6.1.8 KLOGROGENSYRE

Det ble isolert 35.6 milligram av forbindelse (9) fra den kombinerte fraksjonen VM2S62-68 etter separasjon ved hjelp av stor Sephadex LH-20 kolonnekromatografi. Det ble også isolert 8.5 milligram fra fraksjon VM3+4LS21 og 13.9 milligram fra fraksjon VM1LS24+25 av forbindelse (9) ved hjelp av den lille Sephadex LH-20 kolonnen. Det ble tatt 1D ¹H-NMR, 1D ¹³C CAPT, 2D ¹H-¹³C HMBC, 2D ¹H-¹³C HSQC, 2D ¹H-¹H COSY, 2D ¹H-¹H ROESY, 2D 1,1-ADEQUATE og 2D ¹H-¹³C H2BC NMR spektre for å bestemme strukturen av forbindelse (9) som viste seg å være klorogensyre. Det er NMR-spektrene av fraksjon VM2S62-68 som skal brukes til anordning av forbindelsen. For å bekrefte antatt struktur av forbindelse (9) ble høyoppløselig massespekter med positiv ionisering tatt av VM2S62-68. Molekylærionet [MH]⁺ ved m/z 355.10211 som ble observert i det høyoppløselige massespekteret og som korresponderer til C₁₆H₁₉O₉ (beregnet masse: 355.10291; δ = -2.24 ppm) bekrefter riktig identifikasjon av forbindelsen.



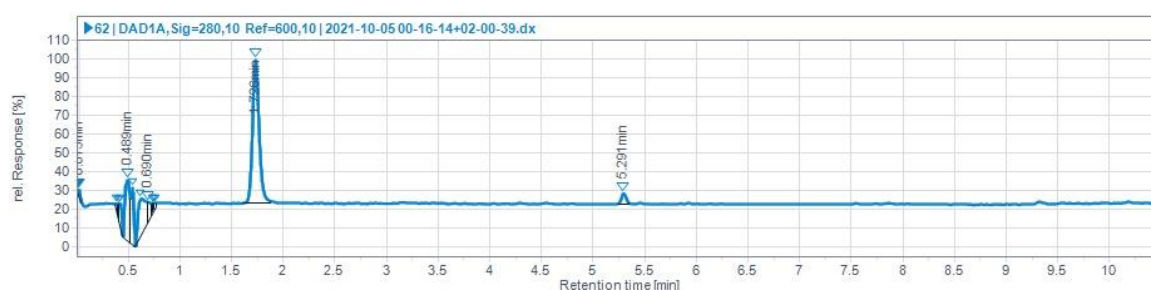
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	¹² C	¹ H	²³ Na	¹⁶ O	Unsaturation Number
355.10211	15313.15	355.10291	-2.24	¹² C ₁₆ ¹ H ₁₉ ¹⁶ O ₉	16	19		9	7.5

Figur 158: HRMS-ESI spekter med positiv ionisering av forbindelse (9) i fraksjon VM2S62-68

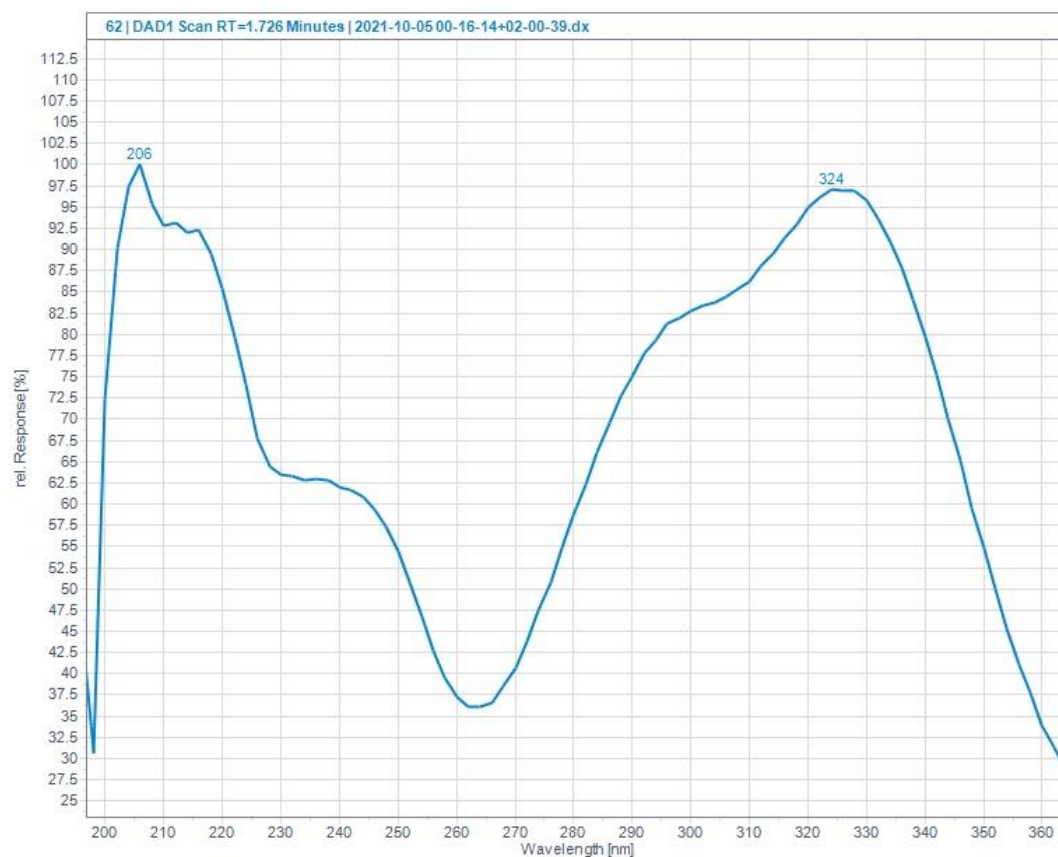
UHPLC-kromatogrammet til fraksjon VM2S62 og UV-spekteret av forbindelsen er vist i figur 159-160. UHPLC-kromatogrammet viser at forbindelsen har retensjonstid på 1.73

minutter og maks absorpsjon ved 206 nm og 324 nm. Kromatogrammene til de andre fraksjonene som forbindelsen ble isolert fra er vedlagt i vedlegg 2, figur 285-293. UHPLC-kromatogrammet og NMR-spektrene viser noen signaler for en minor komponent, men i mye lavere konsentrasjon enn hovedforbindelsen.

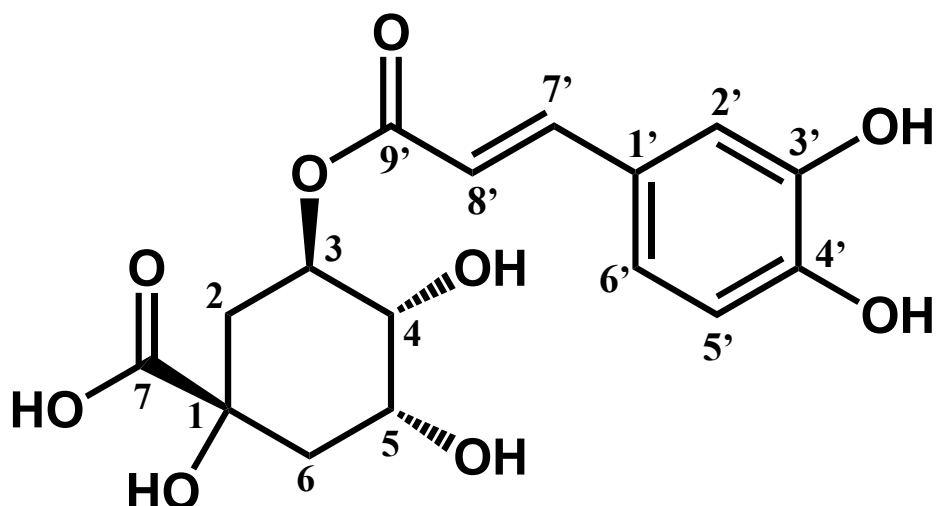
Omfattende søk blant annet i Scifinder og Web of Science viste at klorogensyre ikke har blitt isolert fra *Myrrhis odorata* eller fra skjermplantefamilien tidligere. Basert på søk i Scifinder og Web of Science ble det funnet flere artikler som rapporterer at klorogensyre er en signifikant antioksidant og har antibakterielle egenskaper (47 og 48).



Figur 159: UHPLC-kromatogram av klorogensyre (9) i fraksjon VM2S62 detektert ved 280 ± 10 nm.



Figur 160: UV-spektrum av klorogensyre (9).



Figur 161: Struktur av klorogensyre (9) med nummerering.

Strukturformel: $C_{16}H_{18}O_9$

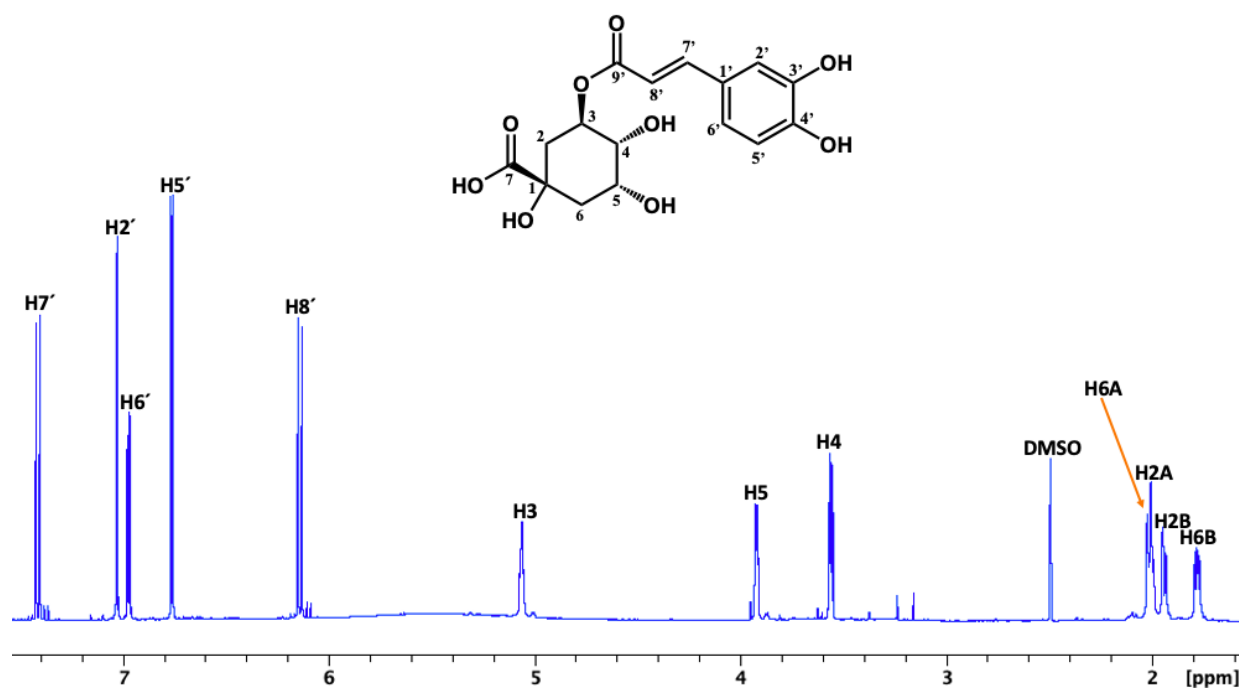
Uniisotopisk molekylvekt: 354.0951 g/mol

Oversikt over de kjemiske skiftverdiene til 1H og ^{13}C for klorogensyre (9), samt koblingskonstantene (Hz) er vist i tabell 23. De eksperimentelle NMR-data stemmer godt overens med de kjemiske skiftverdiene som tidligere er funnet for klorogensyre (42).

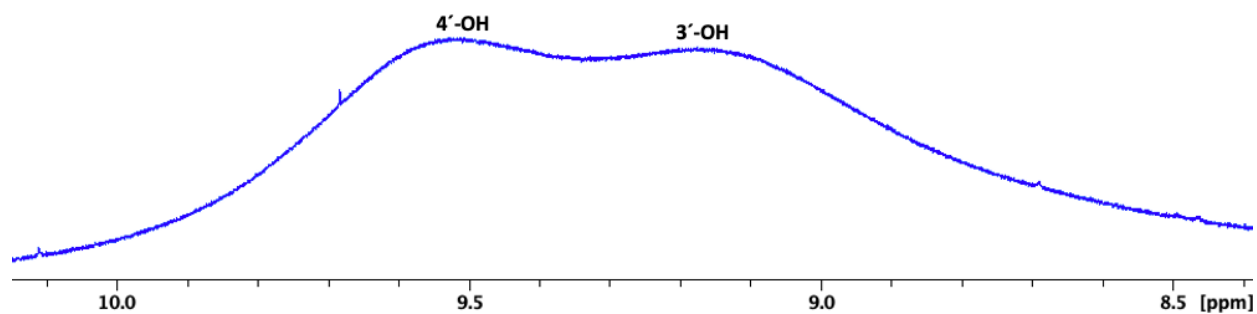
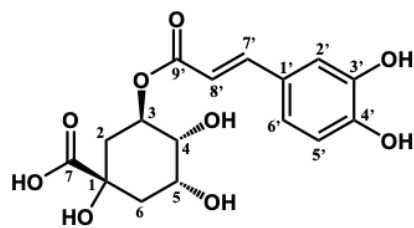
Det ble observert 5 hydrogensignaler i aromatregionen mellom 6.14-7.41 ppm i protonspekteret (figur 162), hvorav et 3H ABX system bestående av $H_{2'}$, $H_{5'}$ og $H_{6'}$ som ved hjelp av HSQC spekteret (figur 169) ble anordnet til $C_{2'}$, $C_{5'}$ og $C_{6'}$. Hydrogensignalene i protonspekteret ved 7.41 ppm ($H_{7'}$) og 6.14 ppm ($H_{8'}$) er typisk for dobbeltbindingshydrogenatomer som er i (*E*)-konfigurasjon basert på deres store kobling til hverandre på 15.8 Hz. I tillegg ble det observert 7 hydrogensignaler i den alifatiske regionen mellom 1.78-5.06 ppm i protonspekteret tilhørende kinasyreeneheten i molekylet (figur 162 og tabell 23). Krysstoppen ved δ 5.06/165.8 ($H_3/C_{9'}$) i HMBC spekteret (figur 166) bekrefter at kaffeoyleneheten er tilknyttet kinasyreeneheten i 3-posisjon.

Tabell 23: ^1H og ^{13}C NMR kjemisk skift verdier (ppm) og koblingskonstanter (Hz) av klorogensyre (**9**) fraksjon VM2S62-68 isolert fra *Myrrhis odorata* i DMSO- D_6 at 298K.

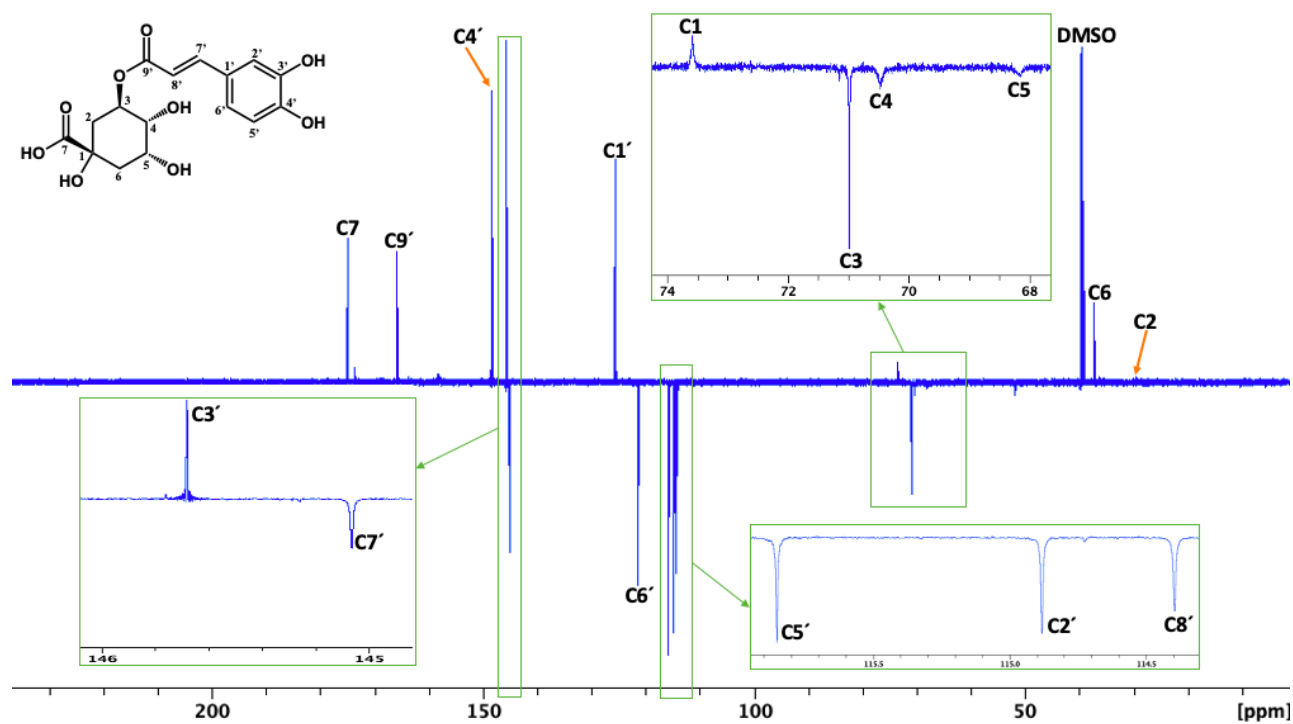
	δ ^1H 9	δ ^{13}C 9
1		73.58
2A	2.00 dd 13.9, 7.6	36.36
2B	1.94 dd 13.9, 4.1	
3	5.06 m	70.98
4	3.56 dd 7.0, 3.1	70.47
5	3.92 ddd, 7.5, 3.8, 3.1	68.16
6A	2.01 dd 13.3, 3.8	37.31
6B	1,78 dd 13.3, 7.5	
7		175.04
1- <i>O-Z</i> -kaffeoyl		
1'		125.71
2'	7.03 d 2.1	114.88
3'		145.46
4'		148.46
5'	6.76 d 8.2	115.85
6'	6.97 dd 8.2, 2.1	121.47
7'	7.41 d 15.8	145.06
8'	6.14 d 15.8	114.40
9'		165.84
3'-OH	9.15 s	
4'-OH	9.51 s	



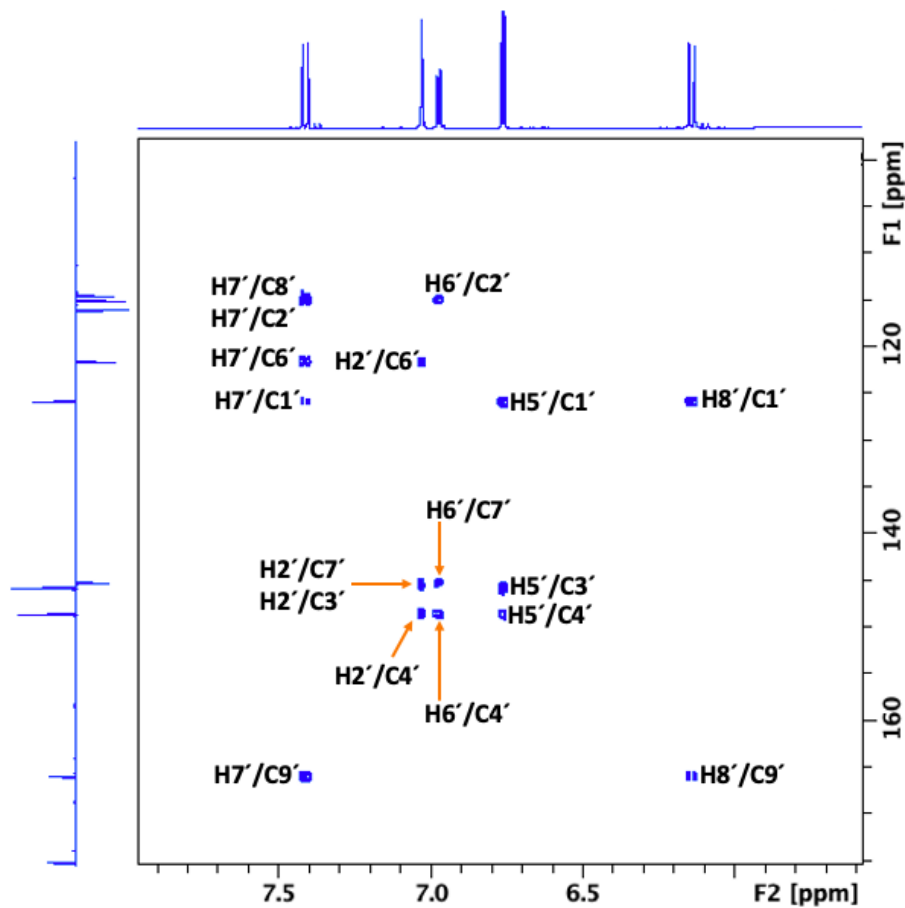
Figur 162: Ekspandert region av 1D ^1H NMR spekteret med anordning av signalene for klorogensyre (**9**).



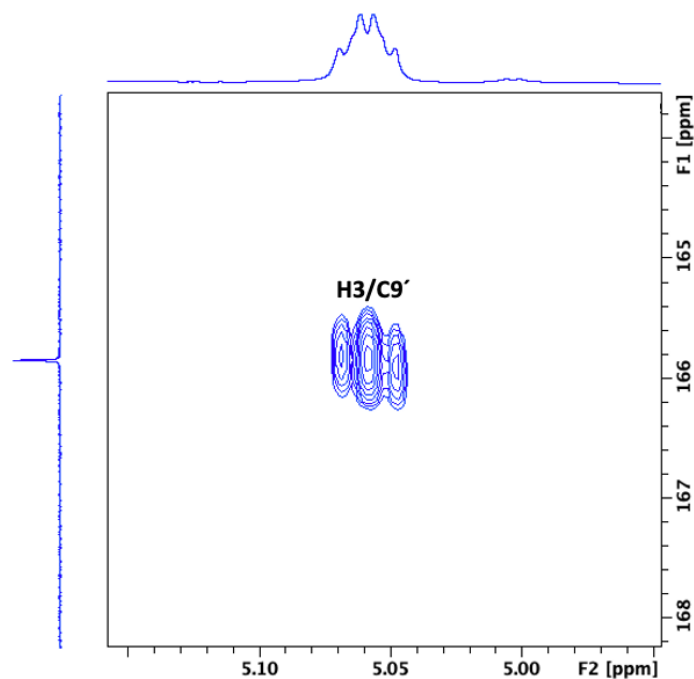
Figur 163: Ekspandert region av $1\text{D } ^1\text{H}$ NMR spekter med anordning av signalene til de fenoliske hydroksylgruppene til klorogensyre (9).



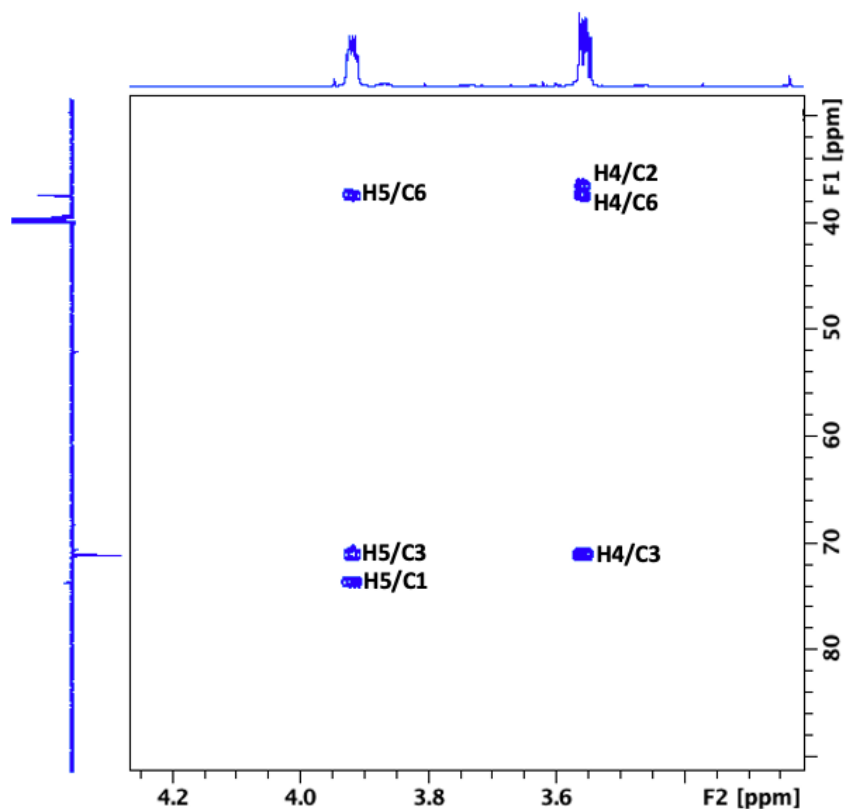
Figur 164: $1\text{D } ^{13}\text{C}$ CAPT NMR spekter med fullstendig anordning av signalene til klorogensyre (9).



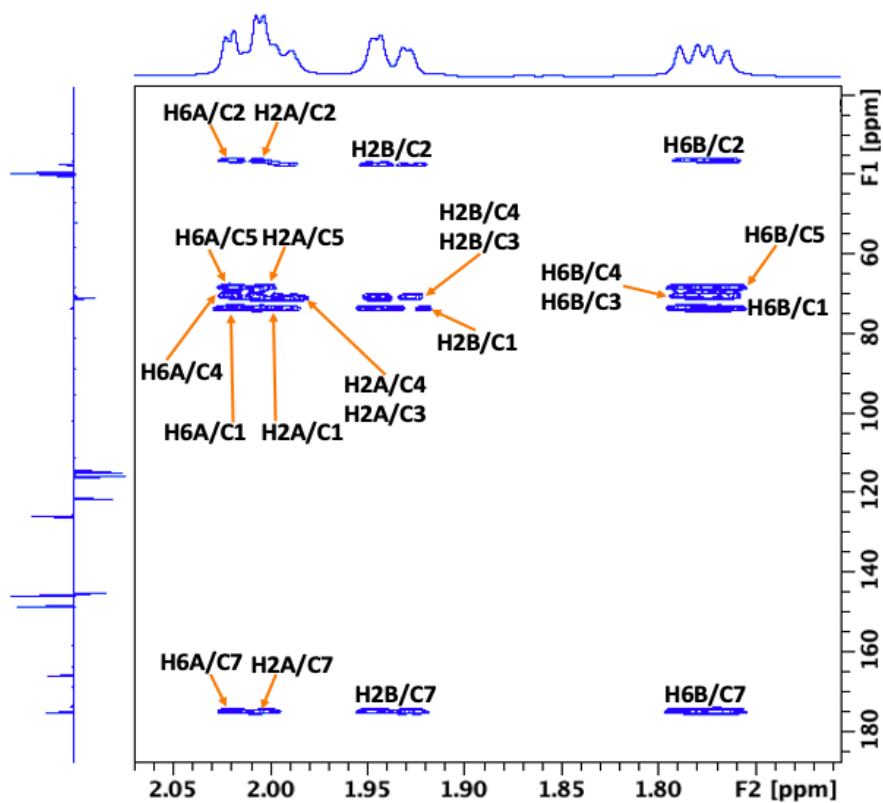
Figur 165: Ekspandert aromatisk region av $2D$ 1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av klorogensyre (9).



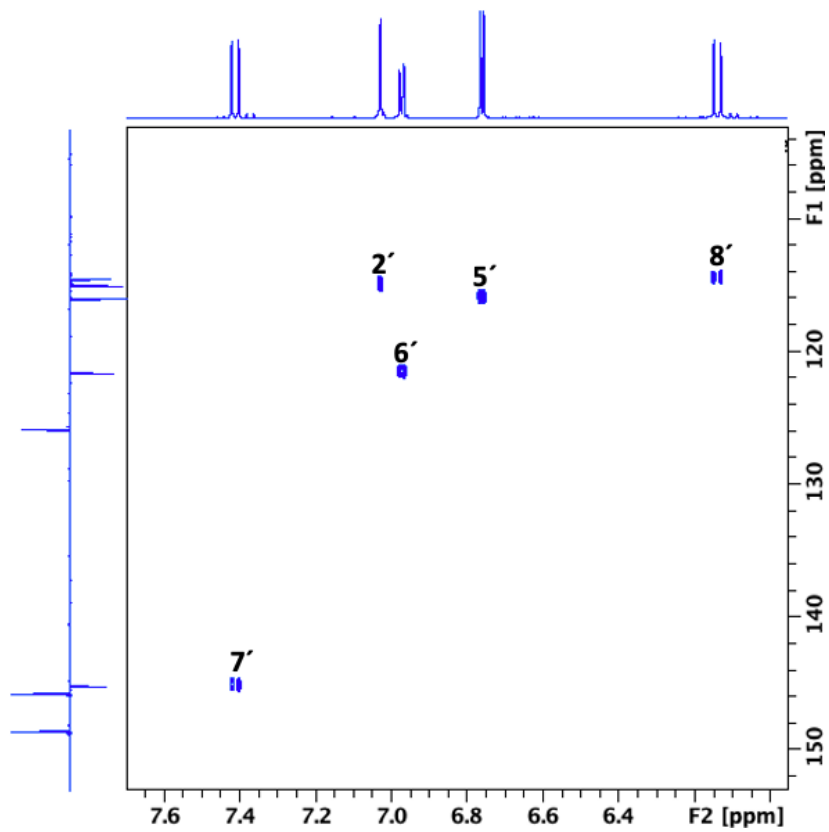
Figur 166: Ekspandert region av $2D$ 1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av klorogensyre (9). Ekspansjon viser viktig krysstopp mellom H3 (5.06 ppm) og C9' (165.84 ppm) som bekrefter at kaffesyreenheten er tilknyttet kinasyreenheten i 3-posisjon.



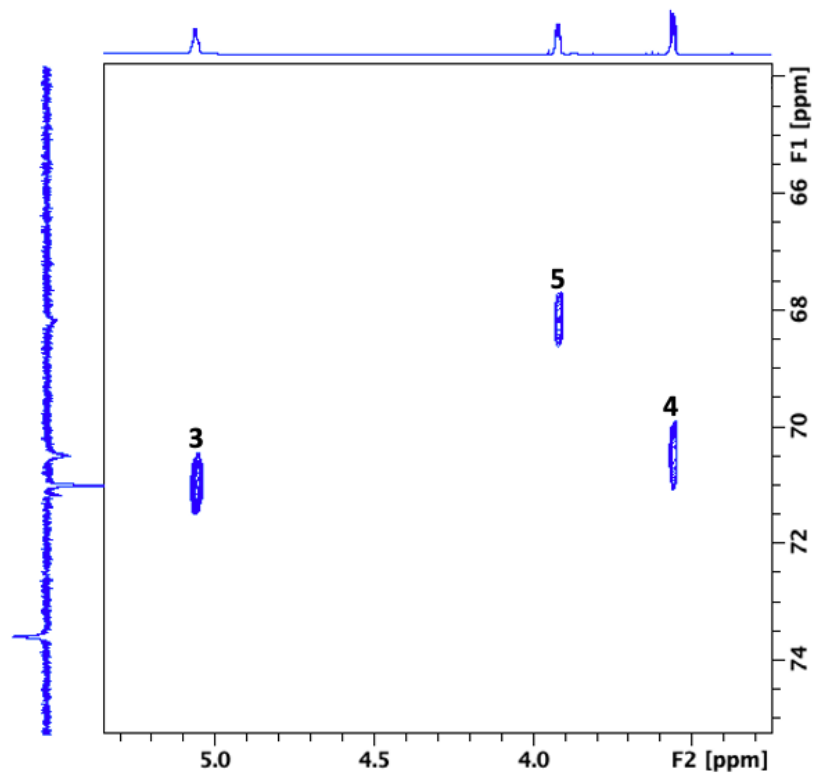
Figur 167: Ekspandert alifatisk region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av klorogensyre (9).



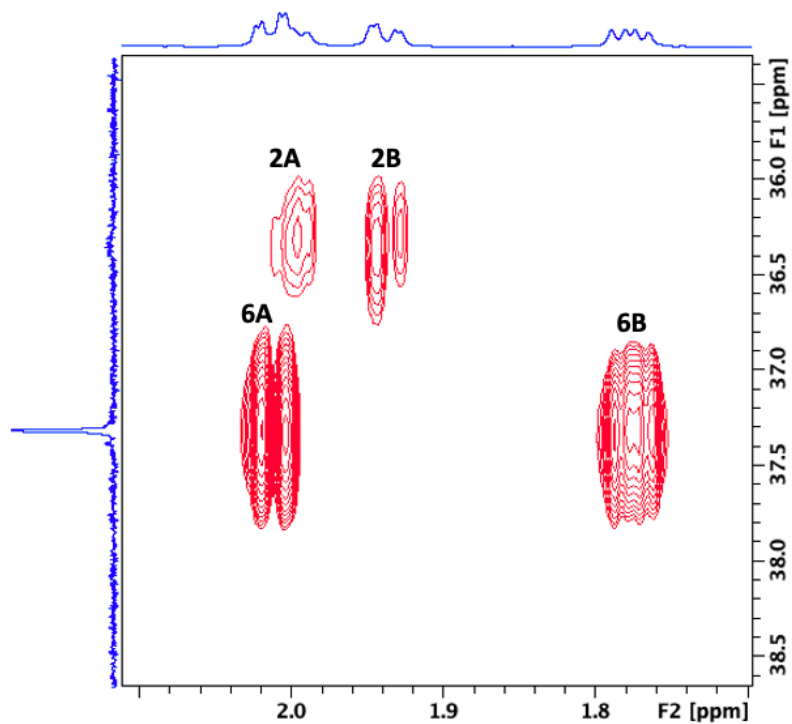
Figur 168: Ekspandert alifatisk region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av klorogensyre (9).



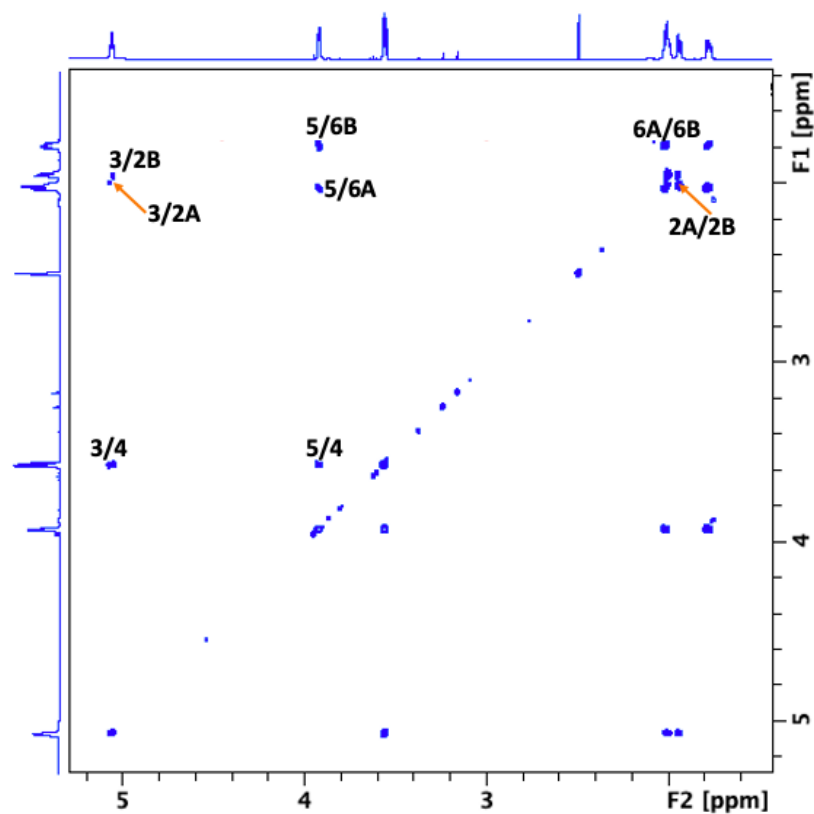
Figur 169: Ekspandert aromatisk region i 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av klorogensyre (9).



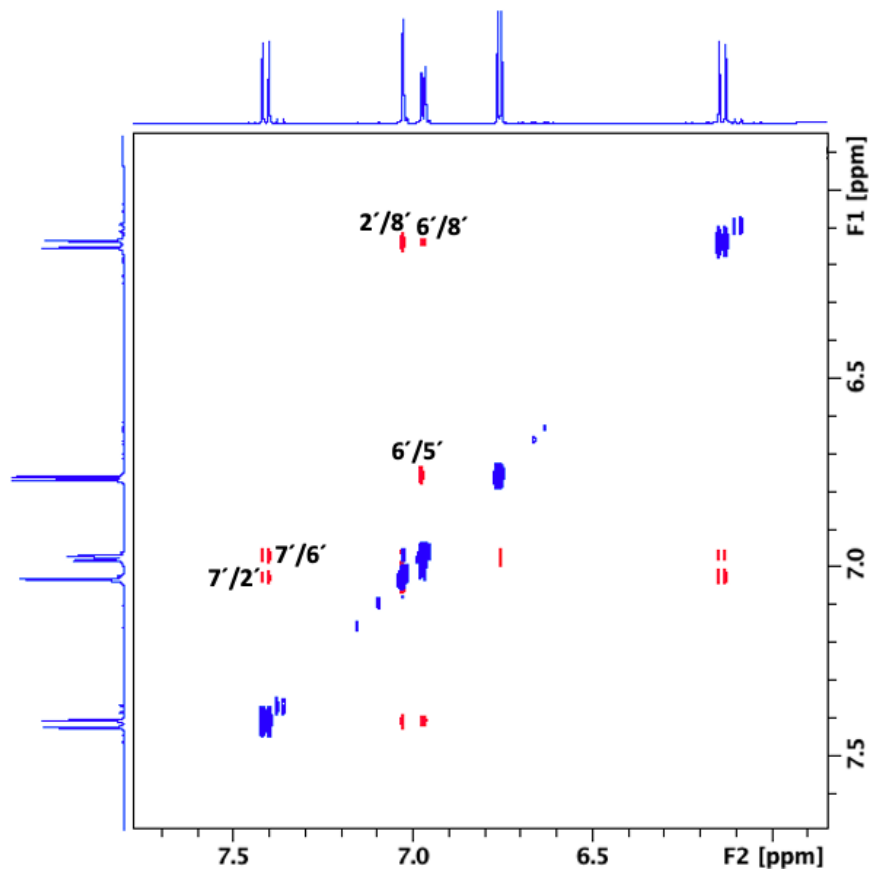
Figur 170: Ekspandert alifatisk region i 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av klorogensyre (9).



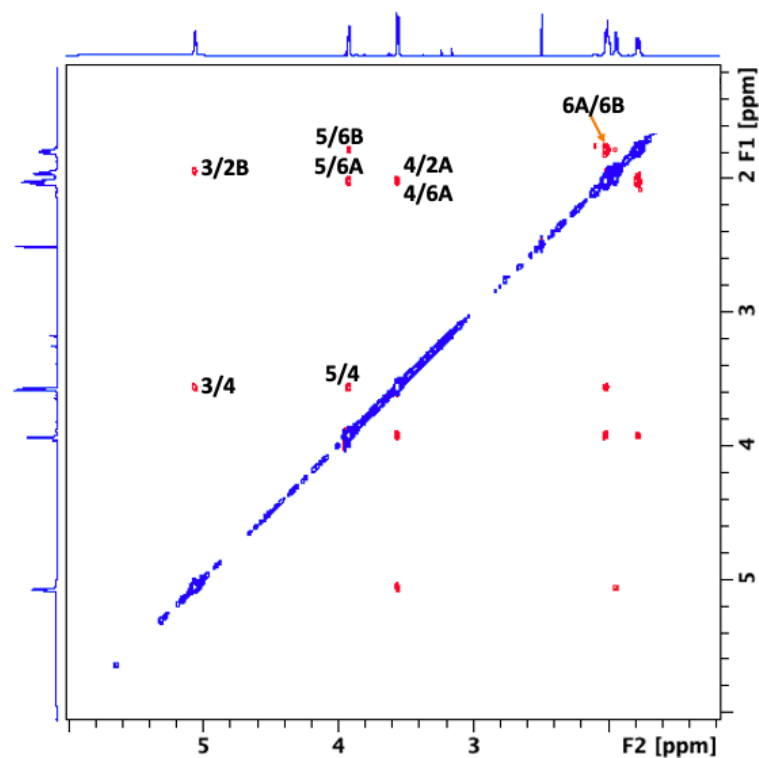
Figur 171: Ekspandert alifatisk region i 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av klorogensyre (9).



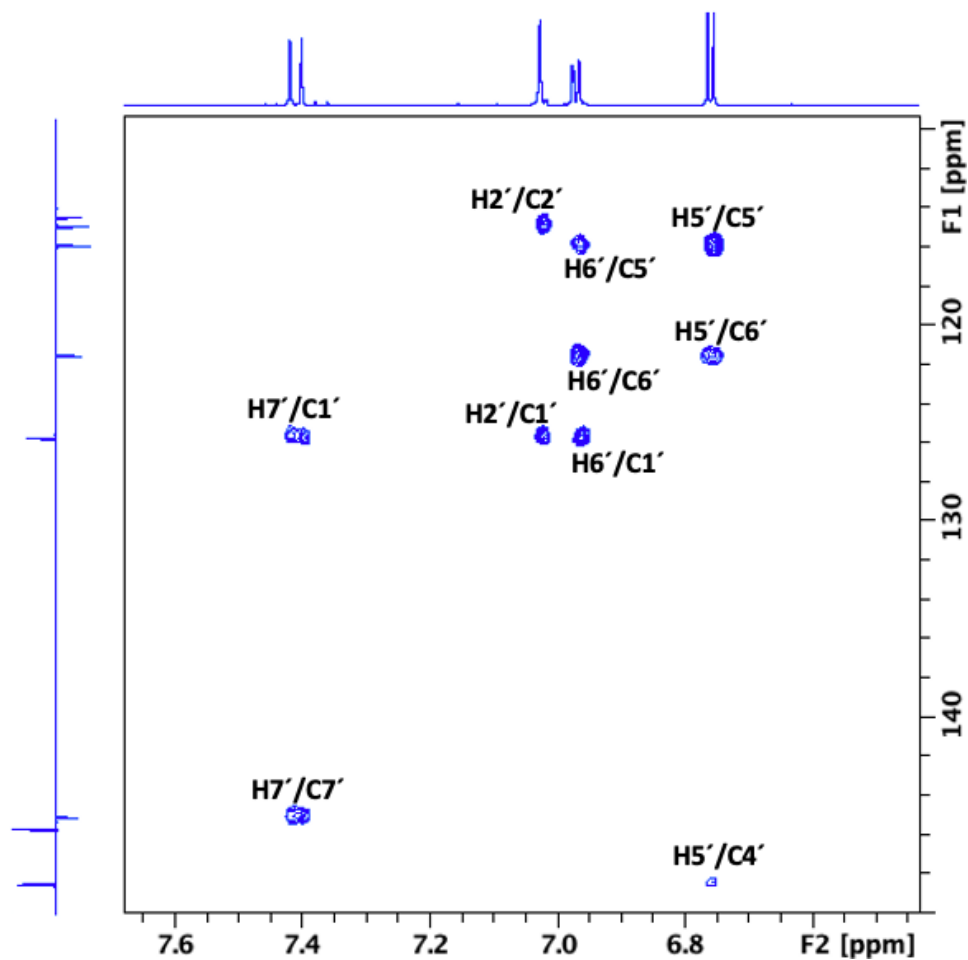
Figur 172: Ekspandert alifatisk region av 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekteret av klorogensyre (9).



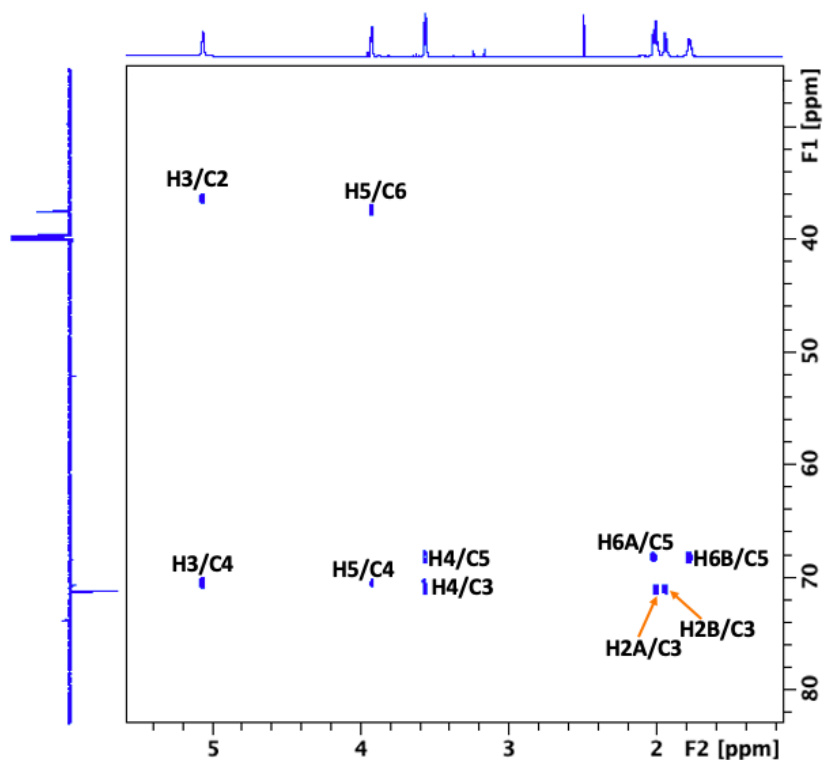
Figur 173: Ekspandert region av 2D ^1H - ^1H ROESY NMR spekteret av klorogensyre (9). Ekspansjon viser korrelasjoner for signaler som er i romlig nærhet av hverandre.



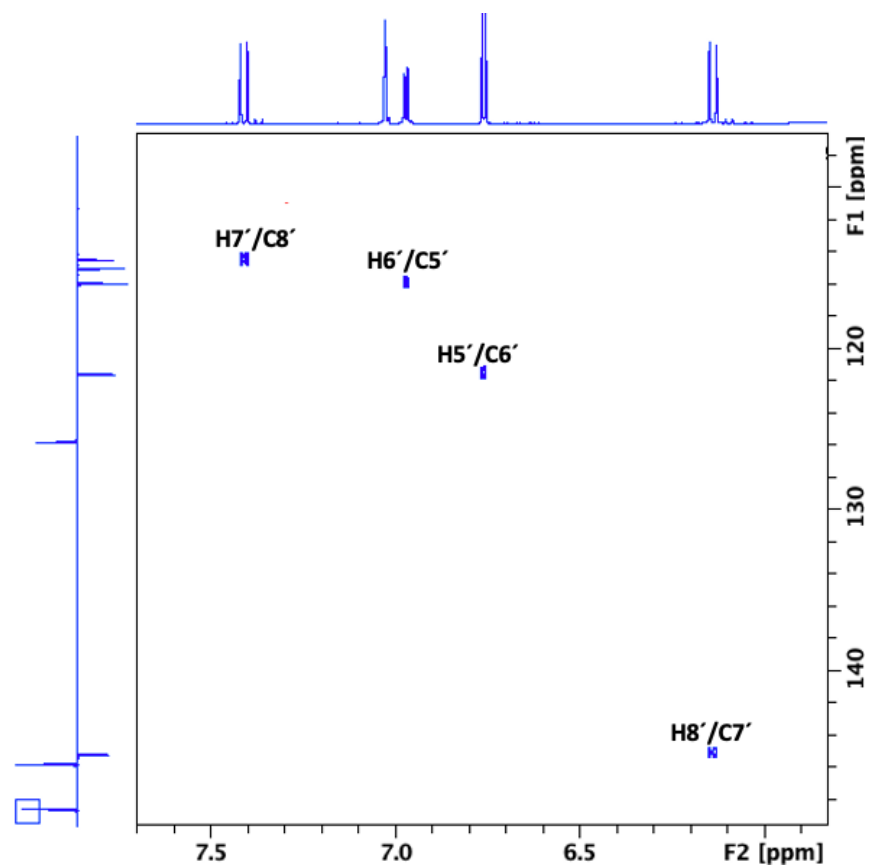
Figur 174: Ekspandert region av 2D ^1H - ^1H ROESY NMR spekteret av klorogensyre (9).



Figur 175: Ekspandert region i 2D ^1H - ^{13}C 1,1-ADEQUATE NMR spekteret av klorogensyre (9). Ekspansjon viser tobindingskorrelasjoner og er spesielt nyttig for å vise korrelasjoner mellom et proton og et hvilket som helst nabokarbonatom, noe som betyr at også kvarternære karbonatomer er detekterbare i dette eksperimentet.



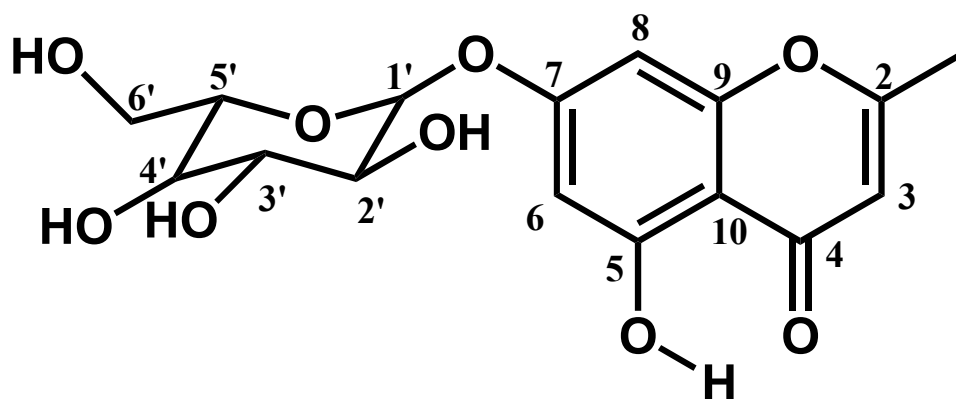
Figur 176: Ekspandert alifatisk region av $2D^1H-^{13}C$ H2BC NMR spekteret av klorogensyre (9).



Figur 177: Ekspandert aromatisk region av $2D^1H-^{13}C$ H2BC NMR spekteret av klorogensyre (9).

6.1.9 UNDULATOSID A

Forbindelse (**10**) ble isolert fra den kombinerte fraksjonen VM2S28+29 ved hjelp av stor Sephadex LH-20 kolonne. Den ble også isolert etter preparativ HPLC fra fraksjon VM2S39-41P40 og etter isolering ved hjelp av den lille Sephadex LH-20 kolonnen fra fraksjon VM3+4LS10+11 og EV5-8LS11+12. Det ble tatt 1D ^1H -NMR, 1D ^{13}C CAPT, 2D ^1H - ^{13}C HMBC, 2D ^1H - ^{13}C HSQC, 2D ^1H - ^1H COSY, 2D ^1H - ^1H ROESY, 2D 1,1-ADEQUATE og 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spektre for å bestemme strukturen til forbindelse (**10**) som viste seg å være undulatosid A. Det ble isolert 33.1 milligram av forbindelsen fra VM2S28+29. Den kombinerte fraksjonen VM2S28+29 ble benyttet for å bestemme strukturen av forbindelsen og spektrene for denne prøven er benyttet til strukturbestemmelsen som er presentert i denne oppgaven. Figur 178 viser molekylstrukturen til undulatosid A. Molekylformel til forbindelsen er $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ og uniisotopisk molekylvekten er 354.0951 g/mol. Molekylstrukturen ble bekreftet ved hjelp av høyoppløselig MS-analyse, hvor fraksjon VM2S27 ble brukt til MS-analysen. Molekylærionet $[\text{MH}]^+$ observert ved m/z 355.10255 som korresponderer til $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_9$ (beregnet masse: 355.10291; $\delta = -1.00$ ppm) observert i HR ESI massespekteret med positiv ioniseringsmodus bekreftet identifikasjonen av (**10**) som undulatosid A.

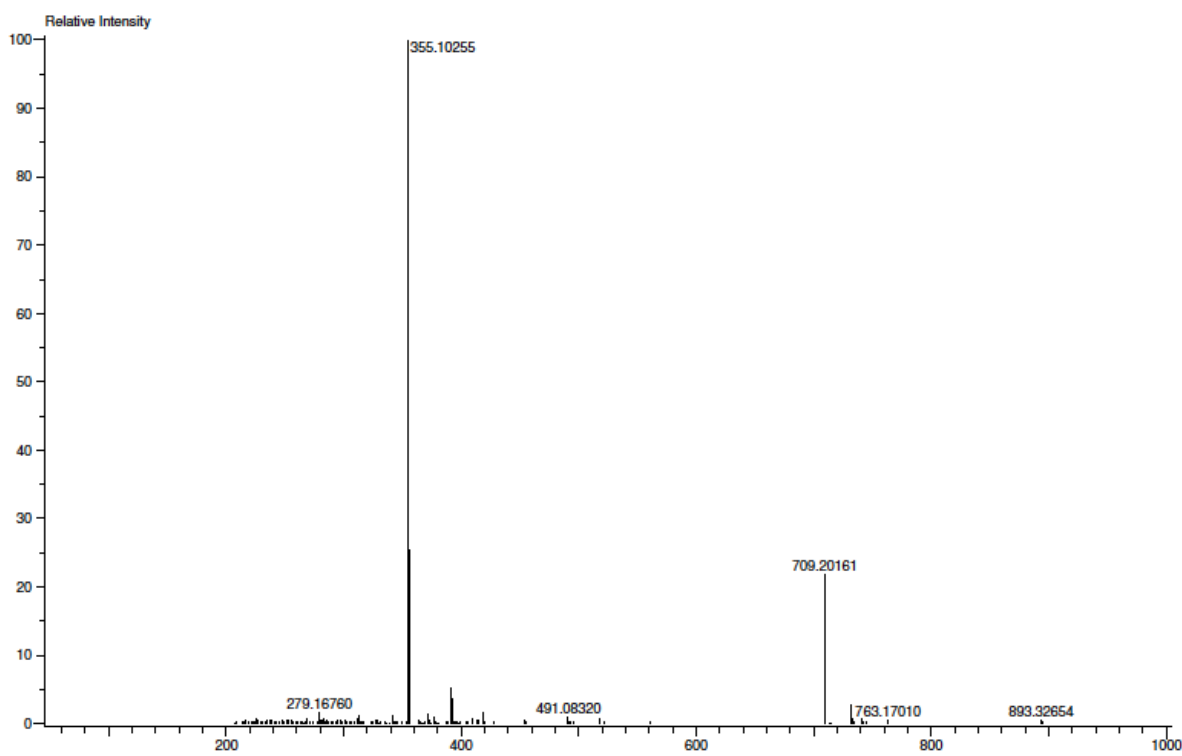


Figur 178: Struktur av undulatosid A (**10**) med nummerering.

Acq. Data Name: TFossen_291021_VM2S 27_ESI+_LC
 Internal Sample Id:
 Ionization Mode: ESI+
 MS Calibration Name: PEG_ESI+_1000
 Reduction History: Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[5.0%]];Correct Base[5.0%];Average[MS[1] 7.868..8.901]
 Experiment Date/Time: 11/3/2021 12:52:19

Orifice1 Volt Sweep: 20V
 Acquired m/z Range: 50.0..1000.0

Spec. Record Interval: 0.4[s]
 Ring Lens Volt: 10[V]
 Time of Maximum: 8.779[min]
 Operator Name: Accutof

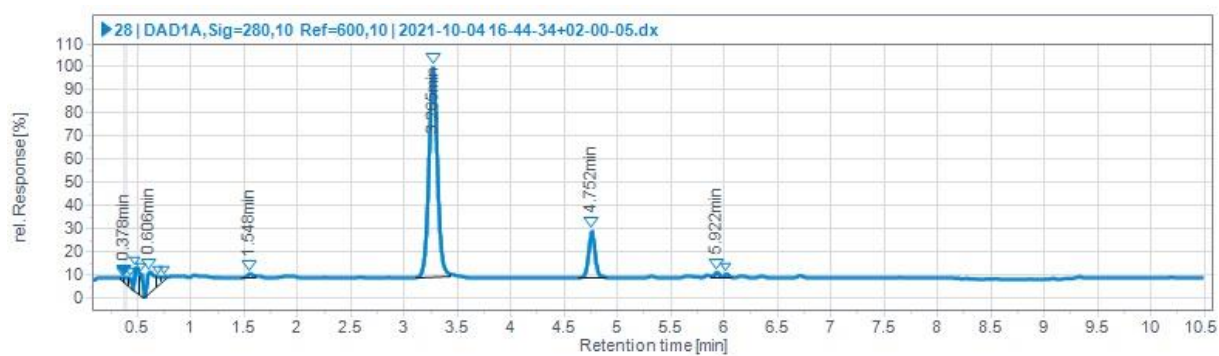


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	¹² C	¹ H	¹⁴ N	¹⁶ O	Unsaturation Number
355.10255	159060.76	355.10291	-1.00	¹² C ₁₆ ¹ H ₁₉ ¹⁶ O ₉	16	19		9	7.5

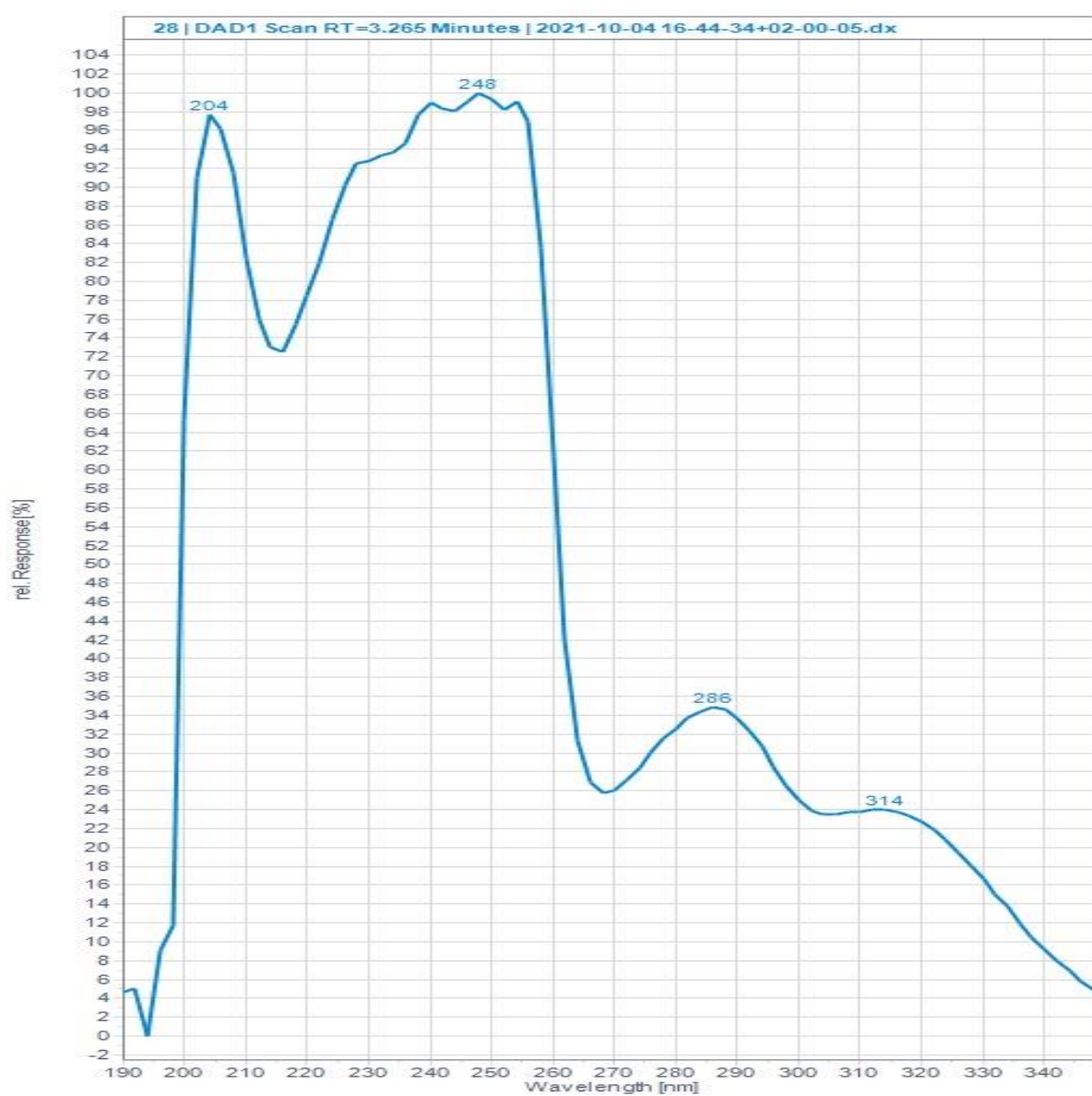
Figur 179: HR ESI MS med positiv ionisering av undulatosid A (**10**) i fraksjon VM2S27.

Ved søk i Scifinder ble det fastslått at strukturen er kjent fra før, men undulatosid A har ikke tidligere blitt isolert fra *Myrrhis odorata*. Undulatosid A ser ut til å være spesifikk for skjermplantefamilien, der forbindelsen blant annet er blitt isolert fra *Peucedanum austriacum*, *Ammi visnaga* og *Cnidium monnieri*. Undulatosid A (**10**) har vist å ha potensiell anti-inflammatorisk aktivitet ved å inhibere produksjon av proinflammatoriske cytokiner som interleukin 1 β (65).

UHPLC-kromatogrammet og UV-spekteret til undulatosid A (**10**) er vist i figur 180-181. Forbindelsen har retensjonstid på 3.27 minutter og maks UV-absorpsjon ved 204 nm, 248 nm, 286 nm og 314 nm. I UHPLC-kromatogrammet er det synlig noen topper som hører til minor komponenter, men som er i mye lavere konsentrasjon enn hovedforbindelsen (**10**). Kromatogrammet til VM2S29 er vedlagt i vedlegg 2, figur 295.



Figur 180: UHPLC-Kromatogram av forbindelse (10) i fraksjon VM2S28 detektert ved 280 ± 10 nm



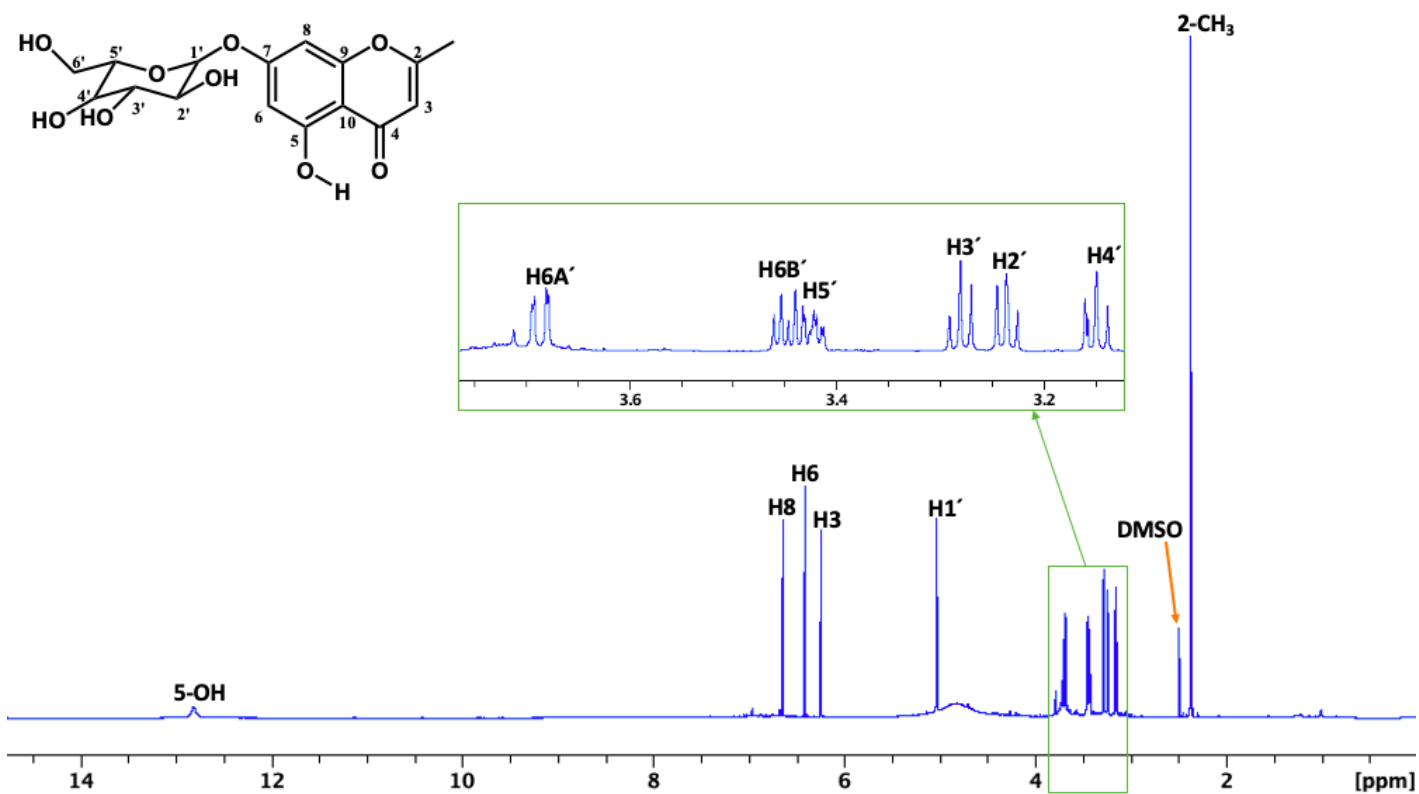
Figur 181: UV-spektrum av undulatosid A (10).

Tabell 24 viser de kjemisk skiftverdier ^1H og ^{13}C , samt koblingskonstanter for undulatosid A (**10**) i DMSO- D_6 ved 298K.

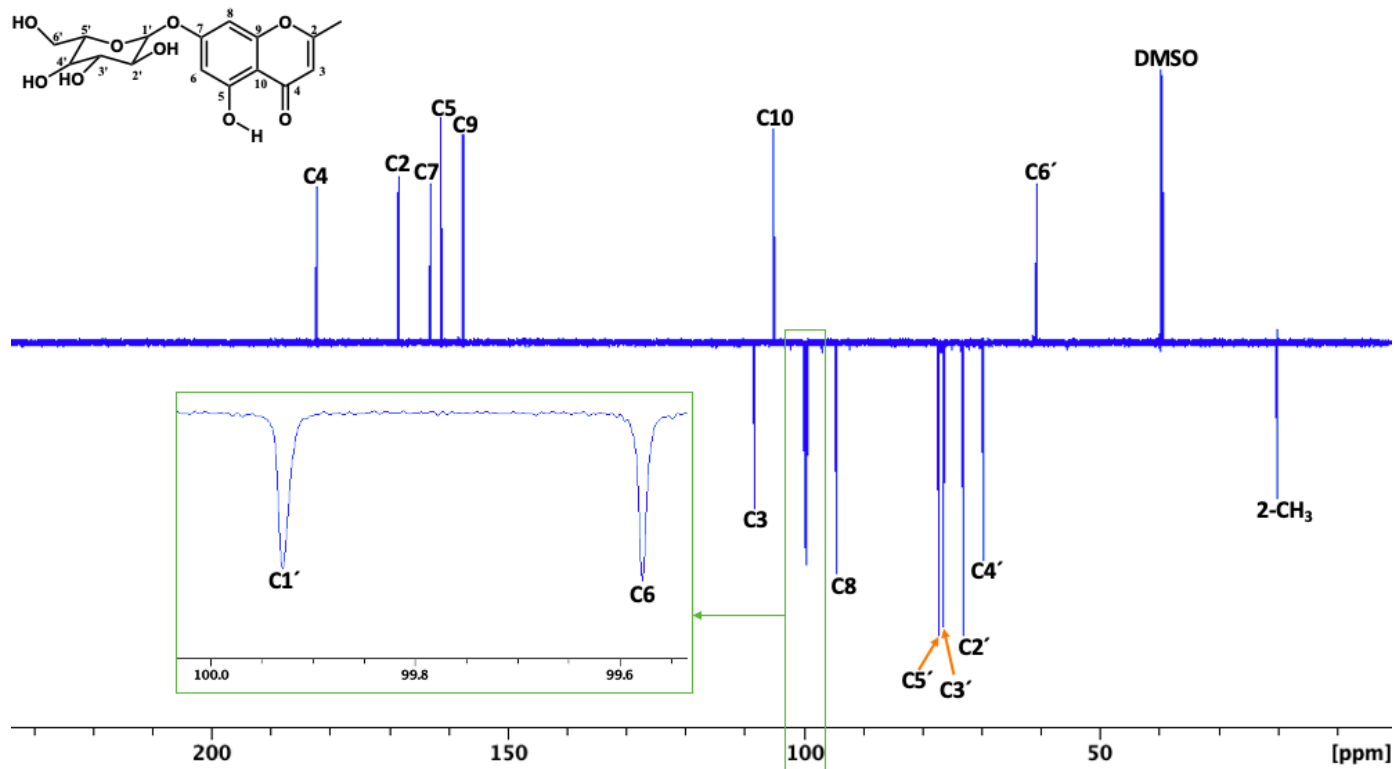
Det ble identifisert 12 hydrogensignaler i protonspekteret (figur 182). Kromenon-enheten har tilknyttet 3 hydrogenatomer (H3, H6 og H8). H6 og H8 har en liten firebindingskobling på 2.2 Hz til hverandre, hvor HMBC-spekteret (figur 184) viser at de har en krysstopp til hverandres karbonatomer og til C10. Metylgruppen med kjemisk skift 2.37 ppm ble ved hjelp av HMBC-spekteret (figur 185) anordnet til å være tilknyttet C2. Signalet for metylgruppen ble observert som en dublett med koblingskonstant på 1.0 Hz på grunn av firebindingskoblingen til H3. H3 opptrer som kvartet og krysstoppen mellom metylgruppen og C3 observert i HMBC-spekteret (figur 185) bekrefter posisjonen av metylgruppen i 2-posisjon. De 7 hydrogensignalene i kjemisk skiftområdet mellom 5.03-3.15 ppm, som viste store aksial-aksial koblingskonstanter, og 6 karbonsignaler i kjemisk skiftområdet mellom 99.93-60.74 ppm samsvarer godt med en glukoseenhet i β -konfigurasjon (tabell 24). Den anomeriske koblingskonstanten på 7.7 Hz bekreftet at glukose-enheten foreligger i β -konfigurasjon. Krysstoppen mellom H1' (5.03 ppm) og C7 (163.0 ppm) observert i HMBC-spekteret (figur 184) bekreftet at glukoseenheten er tilknyttet kromenon-enheten i 7-posisjon.

Tabell 24: ^1H og ^{13}C NMR kjemisk skift verdier (ppm) og koblingskonstanter (Hz) av Undulatosid A (10**) Fraksjon VM2S28+29 isolert fra *Myrrhis Odorata* i DMSO- D_6 ved 298K.**

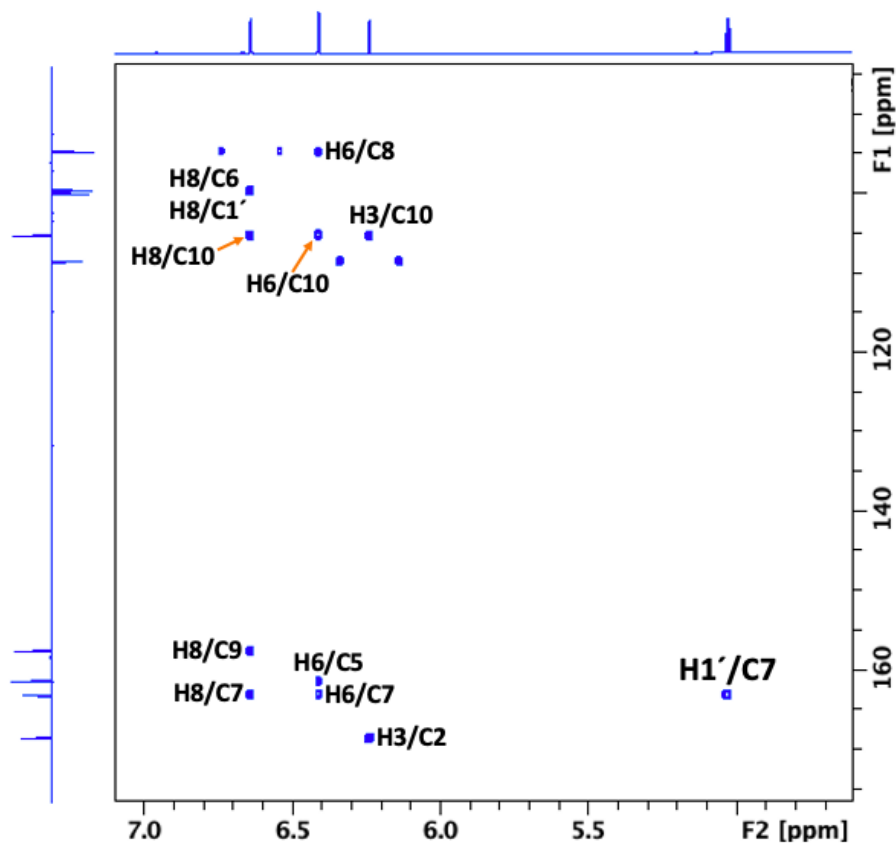
	δ ^1H 10	δ ^{13}C 10
2		168.48
3	6.24 q 1.0	108.41
4		182.11
5		161.26
6	6.41 d 2.2	99.58
7		163.00
8	6.64 d 2.2	94.59
9		157.52
10		105.17
2- CH_3	2.37 d 1.0	20.11
5-OH	12.81 s (br)	
7-O- β -glucoside		
1'	5.03 d 7.7	99.93
2'	3.24 dd 9.0, 7.7	73.17
3'	3.28 t 9.0	76.45
4'	3.15 dd 9.7, 9.0	69.66
5'	3.42 ddd 9.7, 6.0, 2.0	77.23
6A'	3.69 dd 11.7, 2.0	60.74
6B'	3.45 dd 11.7, 6.0	



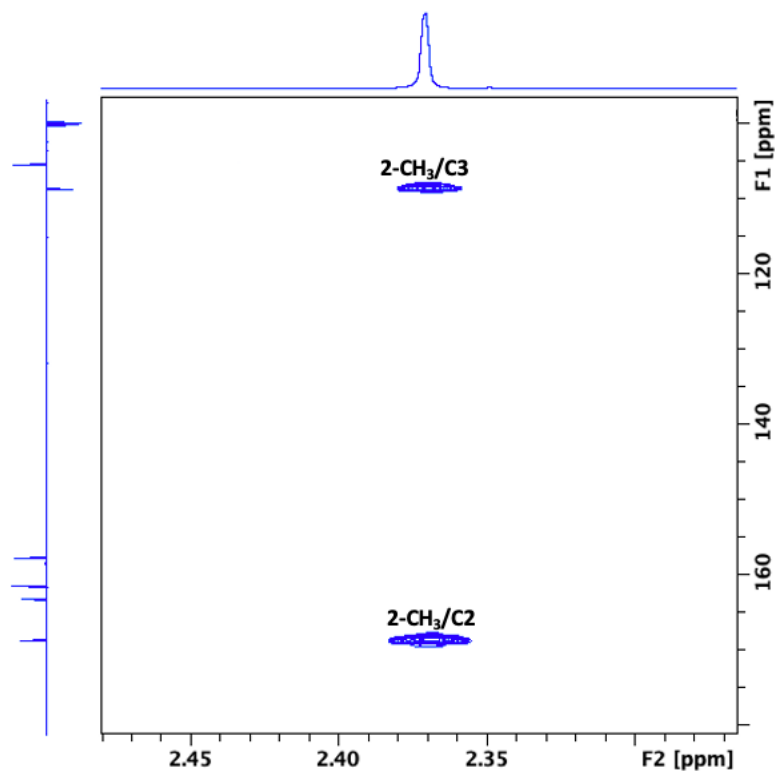
Figur 182: $1D^1H$ NMR spekter med fullstendig anordning av signalene til undulatosid A (10).



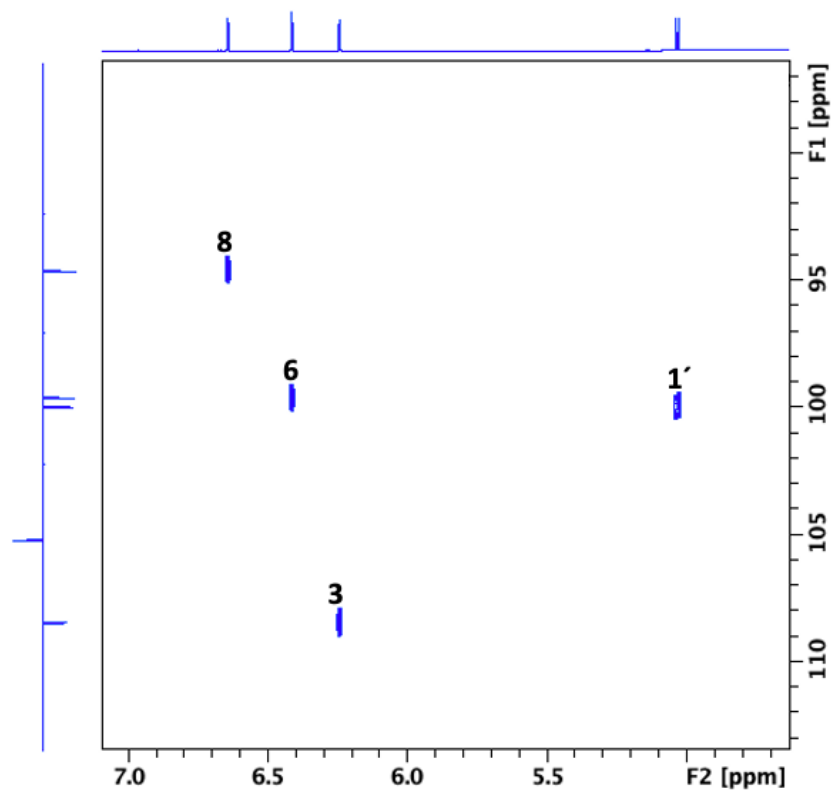
Figur 183: $1D^{13}C$ CAPT NMR spekter med fullstendig anordning av signalene til undulatosid A (10).



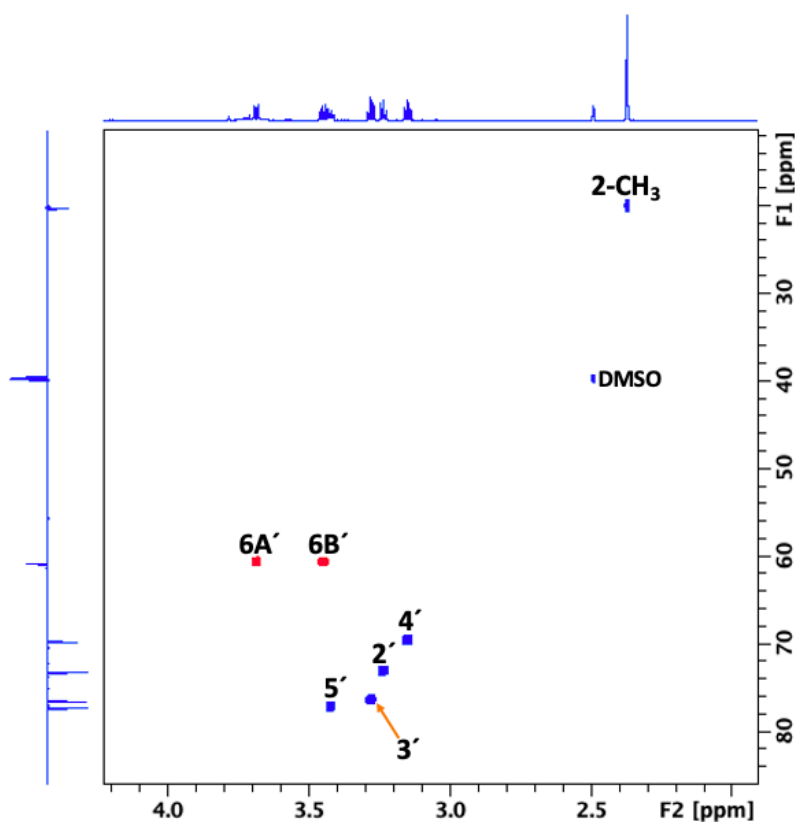
Figur 184: Ekspandert aromatisk region av $2D$ 1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av undulatosid A (**10**). Krysstoppen mellom $H1'$ (5.03 ppm) og $C7$ (163.0 ppm) bekrefter at glukose-enheten er tilknyttet kromonenheten i 7-posisjon.



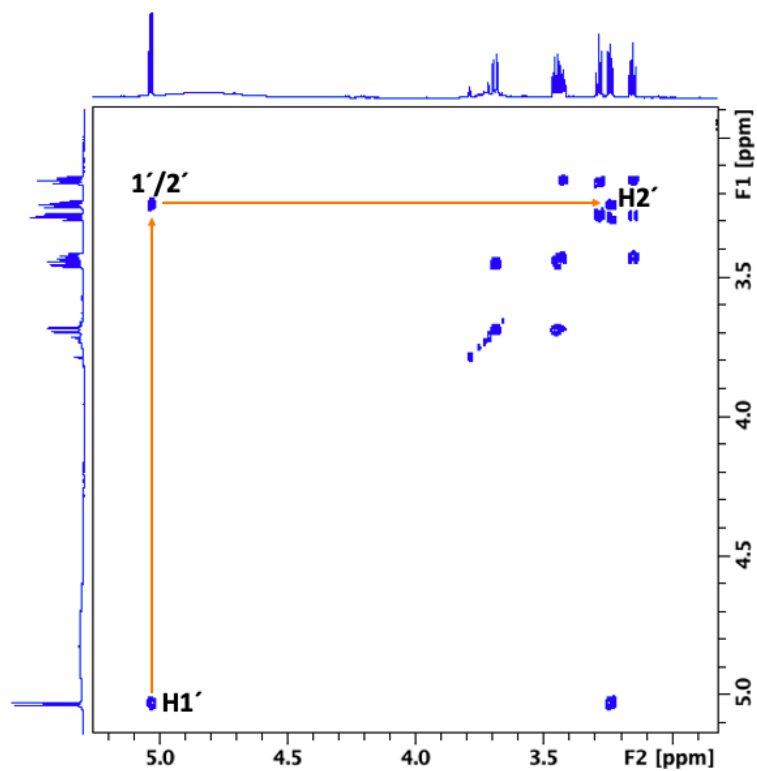
Figur 185: Ekspandert region av $2D$ 1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av undulatosid A (**10**).



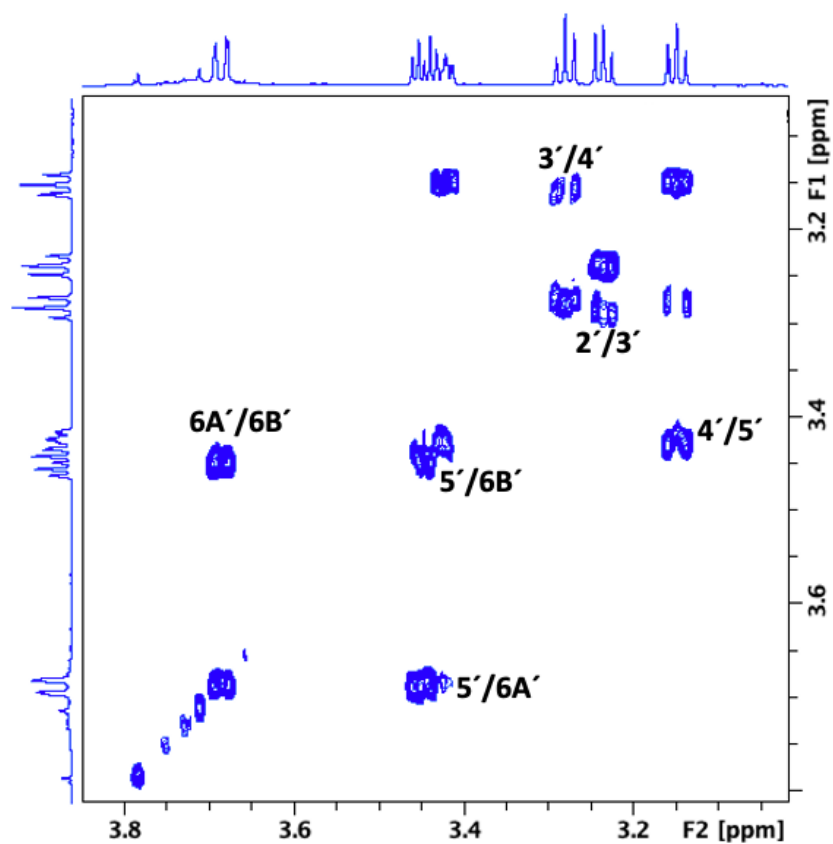
Figur 186: Ekspandert aromatisk region i 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av undulatosid A (10).



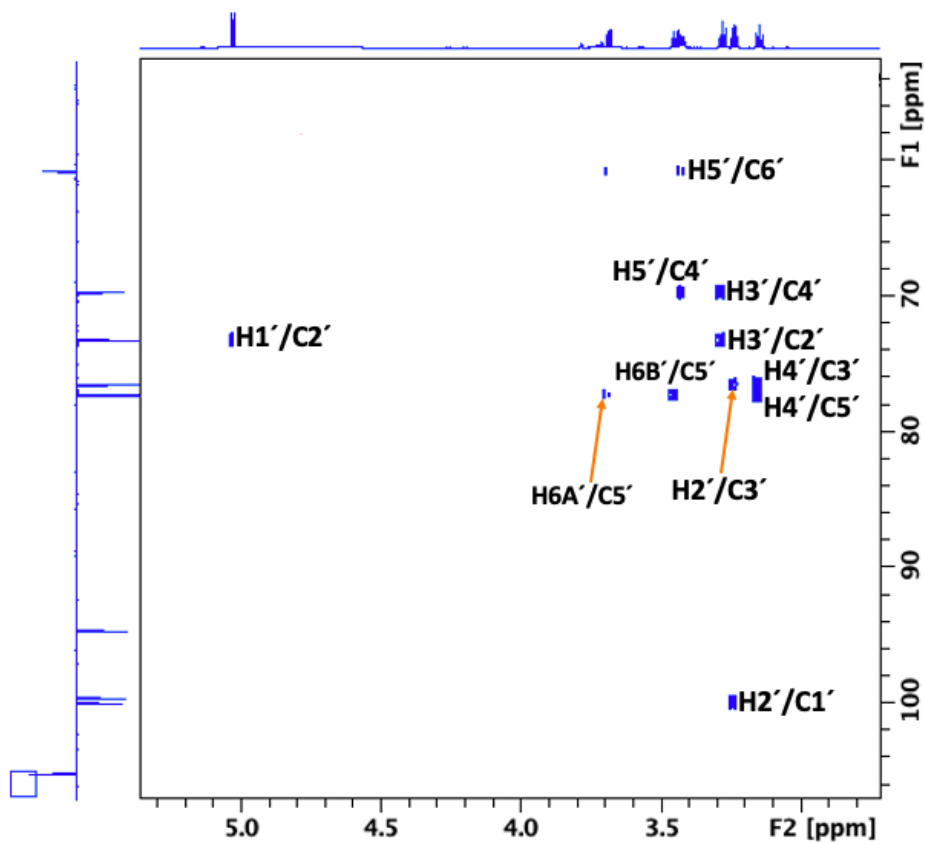
Figur 187: Ekspandert sukker region i 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av undulatosid A (10)



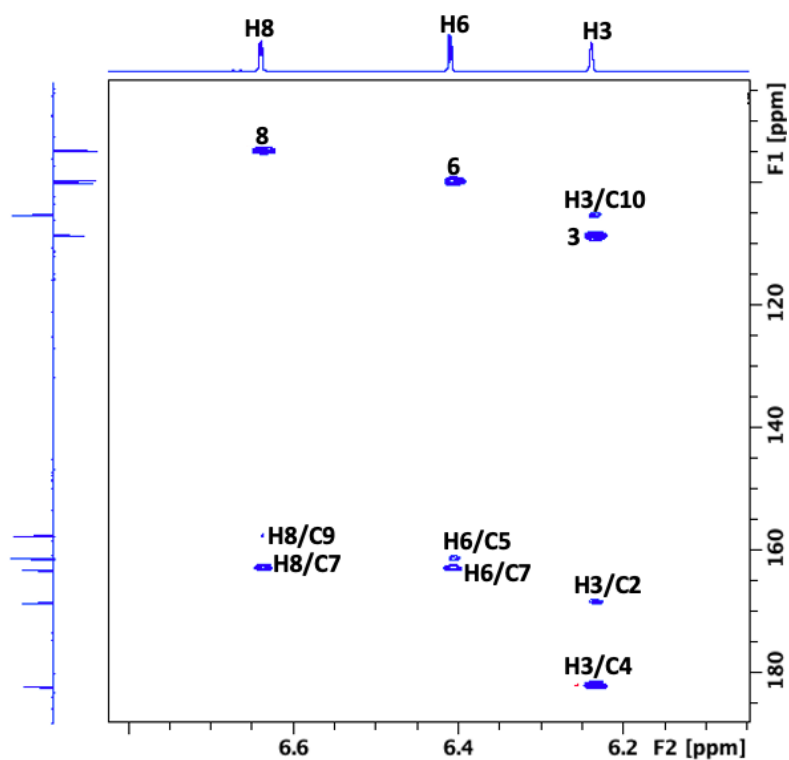
Figur 188: Ekspandert sukkerregion av $2D$ 1H - 1H COSY NMR spekteret av undulatosid A (10).



Figur 189: Ekspandert sukkerregion av $2D$ 1H - 1H COSY NMR spekteret av undulatosid A (10)



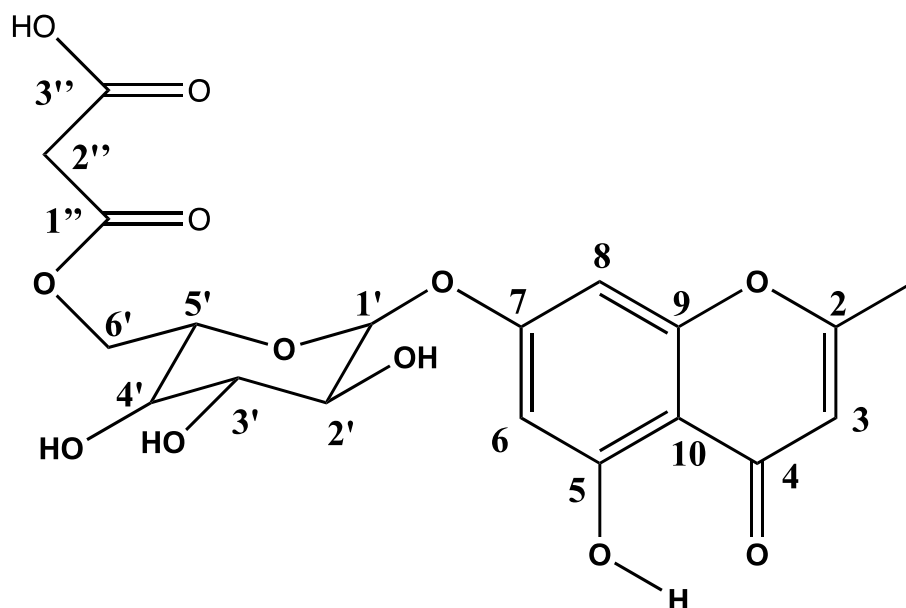
Figur 190: Ekspandert sukkerregion av 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekteret av undulatosid A (10).



Figur 200: Ekspandert region i 2D ^1H - ^{13}C 1,1-ADEQUATE NMR spekteret av undulatosid A (10).

6.1.10 Nytt naturstoff: 6'-MALONYLUNDULATOSID

Det ble utført 1D ^1H -NMR, 1D ^{13}C CAPT, 1D ^1H selektiv TOCSY, 2D ^1H - ^{13}C HMBC, 2D ^1H - ^{13}C HSQC og 2D ^1H - ^1H COSY NMR eksperimenter for å bestemme strukturen av forbindelse (**11**) som viste seg å være 6'-malonylundulatosid A. Det ble isolert 2.3 milligram av forbindelsen fra fraksjon VM2S39-41P11+47 ved hjelp av preparativ HPLC. NMR-data for forbindelsen (tabell 25) ble sammenlignet med NMR-data til forbindelse (**10**) (tabell 24), som viste store likheter bortsett fra signalene fra malonyl-enheten til (**11**) som ikke ble observert for forbindelse (**10**). Molekylstrukturen til 6'-malonylundulatosid A (**11**) er vist i figur 201. Basert på omfattende litteratursøk i Scifinder kunne det konkluderes med at forbindelsen ikke er kjent fra før og følgelig er et nytt naturstoff. Det ble tatt høyresolusjonsmassespekter som bekreftet strukturen av forbindelsen (figur 202). Den eksakte massen til pseudomolekylærionet til 6'-malonylundulatosid A (**11**) [MH^+], ble bestemt til å være 441.10380 som korresponderer til $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}_{12}$ (beregnet masse: 441.10330; $\delta = 1.12$ ppm).



Figur 201: Struktur av 6'-malonylundulatosid A (**11**) med nummerering.

Strukturformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$

uniisotopisk molekylvekt: 440.0955 g/mol

Acq. Data Name: TasbihH_050522_VM2S39-41P11+47_ESI+_LC

Internal Sample Id:

Ionization Mode: ESI+

MS Calibration Name: PEG_ESI+_1000

Reduction History: Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[5.0%]];Average(MS[1] 7.738..7.868)-1.0*Average(MS[1] 6.723..8.919);Correct Base[5.0%]

Experiment Date/Time: 5/5/2022 11:56:51

Orifice1 Volt Sweep: 28V

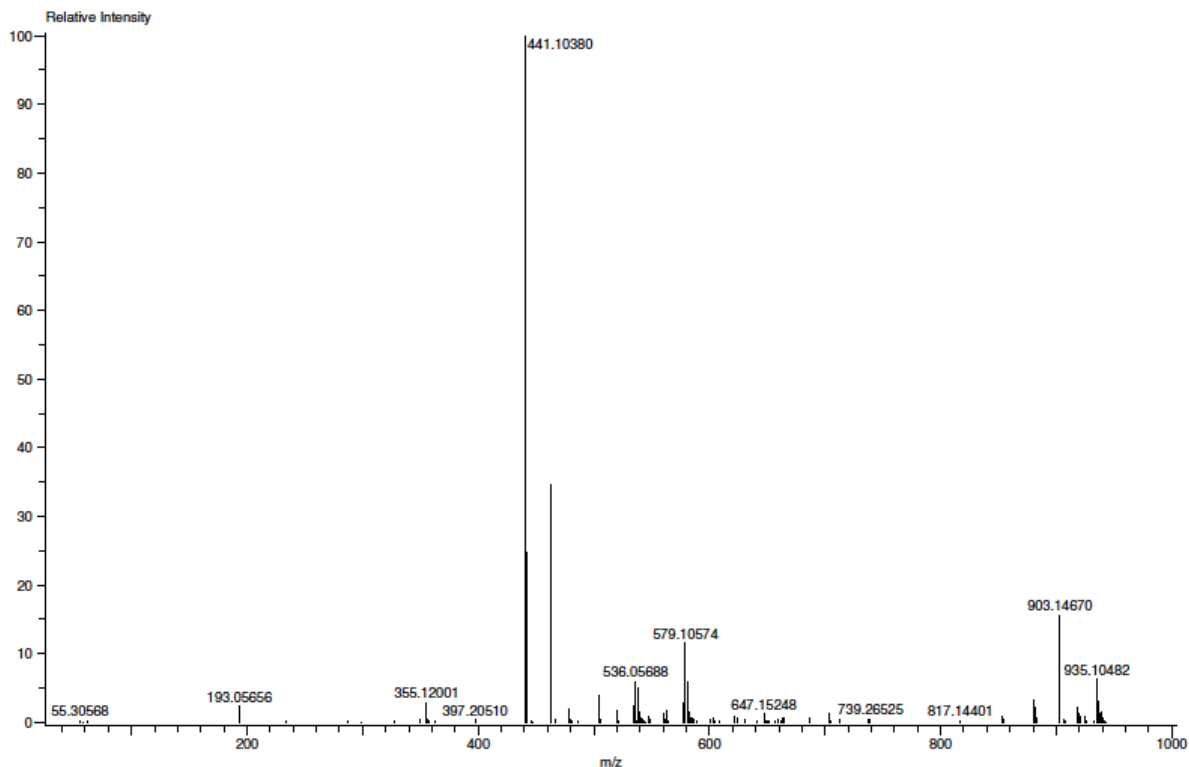
Acquired m/z Range: 30.0..1000.0

Spec. Record Interval: 0.6[s]

Ring Lens Volt: 13[V]

Time of Maximum: 0.000[min]

Operator Name: Accutof



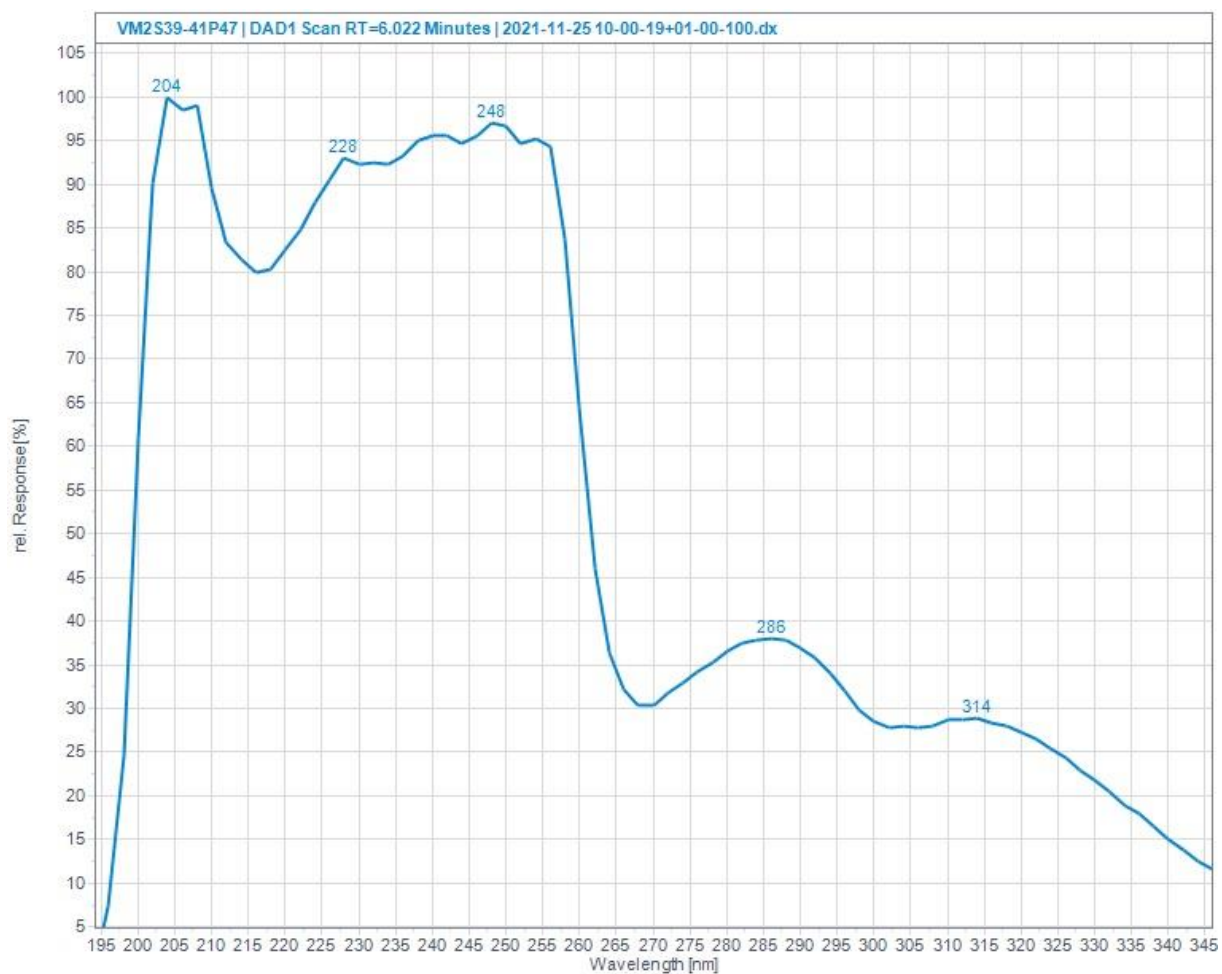
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	¹² C	¹ H	²³ Na	¹⁶ O	Unsaturation Number
441.10380	70915.15	441.10330	1.12	¹² C ₁₉ ¹ H ₂₁ ¹⁶ O ₁₂	19	21		12	9.5

Figur 202: ESI HRMS med positiv ionisering av 6'-malonylundulosid A (**II**) i fraksjon VM2S39-41P11+47.

UHPLC-kromatogrammet og UV-spekter til fraksjon VM2S39-41P47 er vist i figur 203-204. Kromatogrammet til fraksjon VM2S39-41P11 er vedlagt i vedlegg 2, figur 296.



Figur 203: UHPLC-kromatogram av 6'-malnylundulosid A (**II**) i fraksjon VM2S39-41P47 detektert ved 280 ± 10 nm. UHPLC-kromatogrammet viser at forbindelsen har retensjonstid på 6.02 minutter.

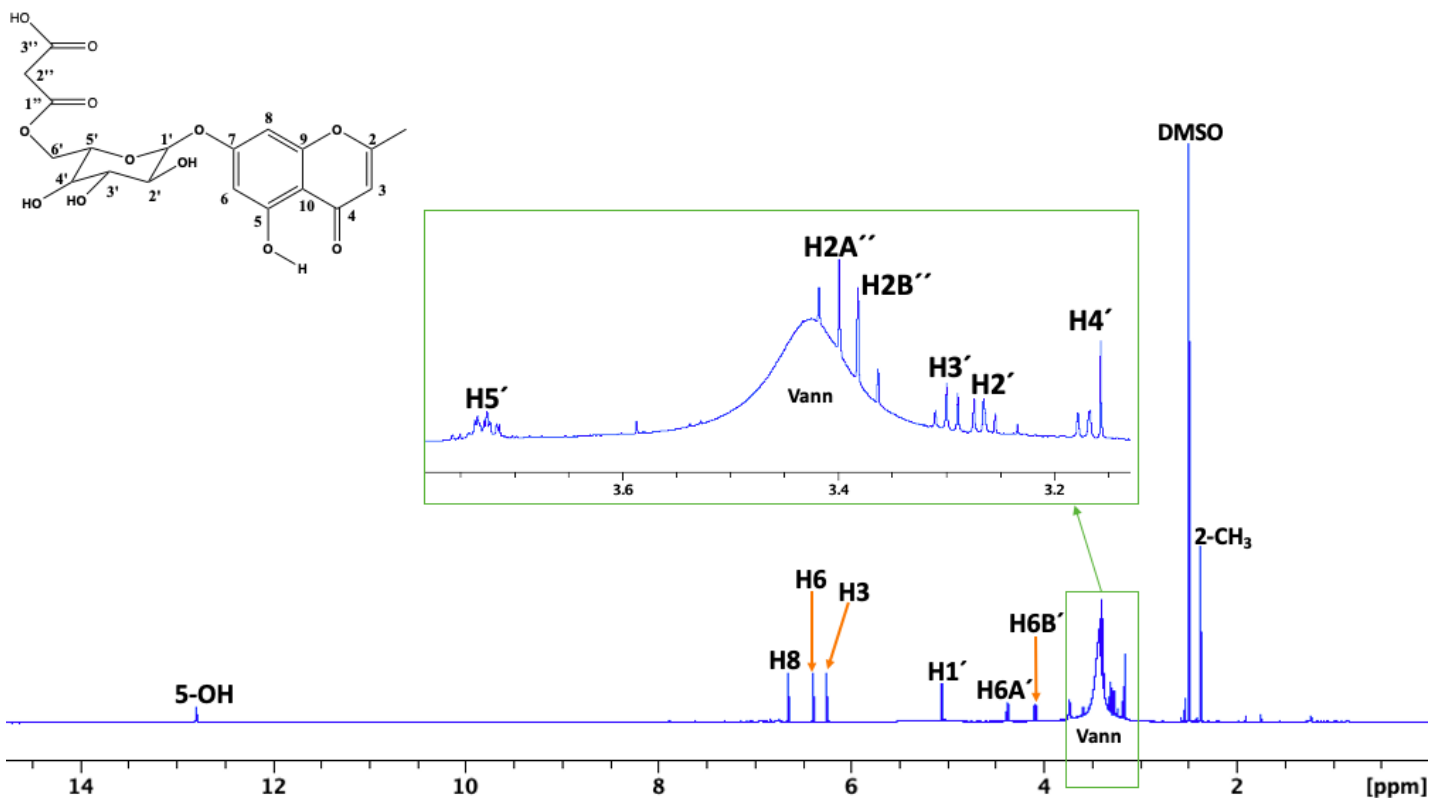


Figur 204: UV-spektrum av 6'-malonylundulatosid A (**11**) som har maks UV-absorpsjon ved 204 nm, 228 nm, 246 nm, 286 nm og 314 nm.

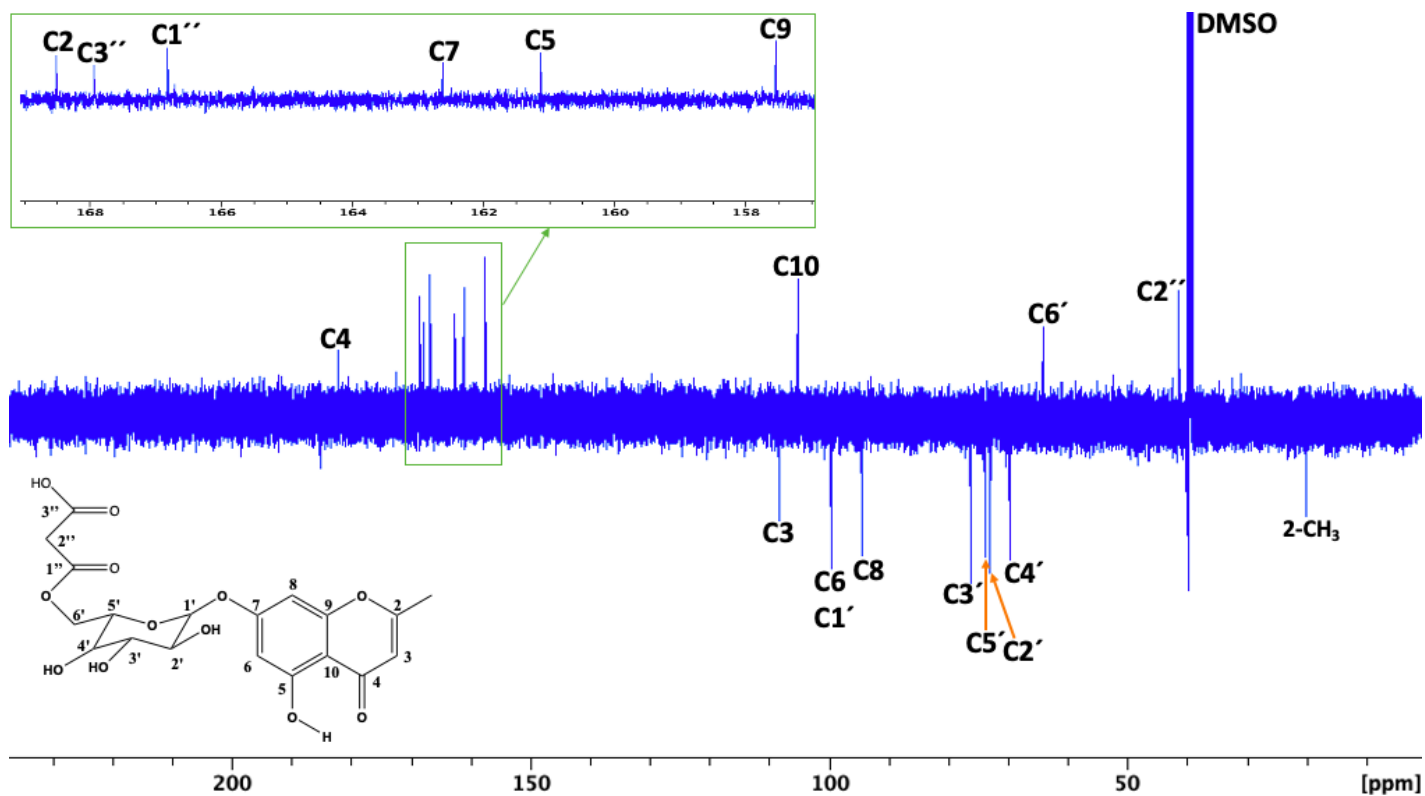
De eksperimentelle kjemisk skiftverdiene for ^1H og ^{13}C , samt koblingskonstantene (Hz) til forbindelse (**11**) er vist i tabell 25. Krysstoppen mellom $\text{H}1'$ ved 5.06 ppm og $\text{C}7$ ved 162.6 ppm observert i HMBC-spekteret (figur 208) bekrefter at glukose-enheten er tilknyttet kromenon aglykonet i 7-posisjon. Krysstoppen mellom $\text{H}6\text{A}'$ (4.37 ppm) og $\text{C}1''$ (166.8 ppm) og mellom $\text{H}6\text{B}'$ (4.09 ppm) og $\text{C}1''$ (166.8 ppm) i HMBC-spekteret (figur 209) bekrefter at malonyl-enheten er tilknyttet glukose-enheten i 6'-posisjon.

Tabell 25: ^1H og ^{13}C NMR kjemisk skift verdier (ppm) og koblingskonstanter (Hz) av 6'-malonylundulosid A (11) Fraksjon VM2S39-41P11+47 isolert fra *Myrrhis Odorata* i DMSO- D_6 ved 298K.

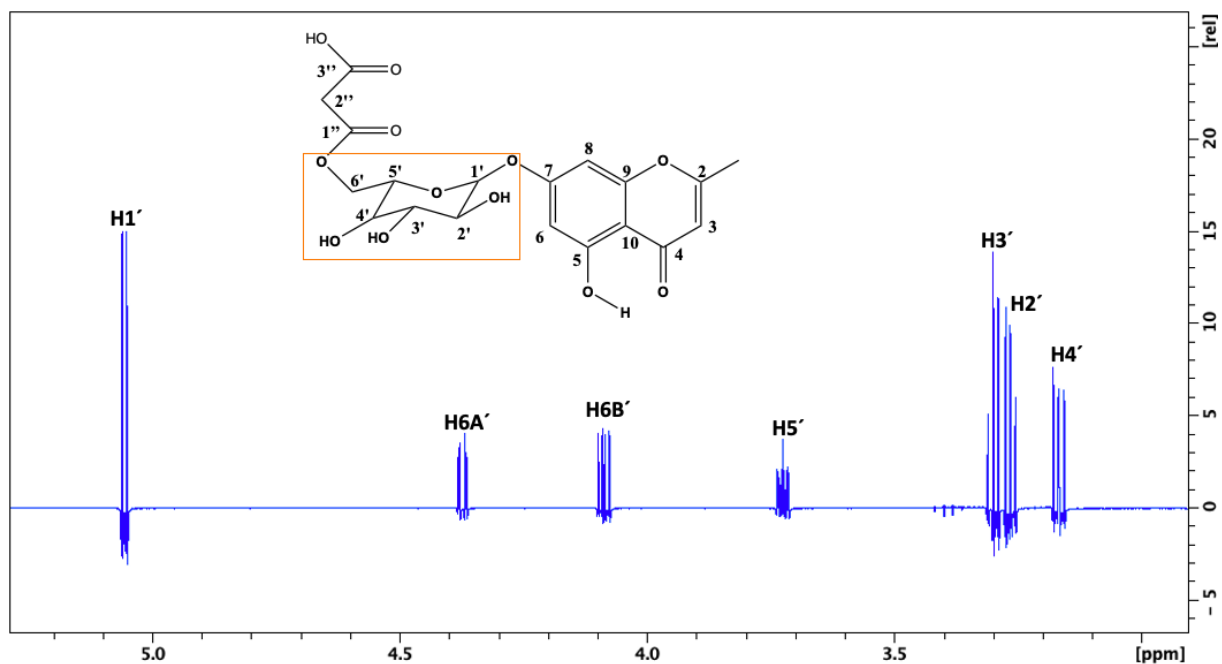
	Δ ^1H 11	δ ^{13}C 11
2		168.51
3	6.25 q 1.1	108.39
4		182.12
5		161.13
6	6.39 d 2.2	99.61
7		162.62
8	6.65 d 2.2	94.55
9		157.54
10		105.24
2- CH_3	2.37 d 1.1	19.99
5-OH	12.79 s	
7-O- β -glucoside		
1'	5.06 d 7.7	99.63
2'	3.26 dd 8.9, 7.7	73.04
3'	3.30 t 8.9	76.27
4'	3.17 dd 9.8, 8.9	69.75
5'	3.72 ddd 9.8, 7.4, 2.2	73.82
6A'	4.37 dd 11.9, 2.2	64.17
6B'	4.09 dd 11.9, 7.4	
6'-O-malonyl		
1''		166.82
2A''	3.41 d 16.0	41.36
2B''	3.37 d 16.0	
3''		167.94



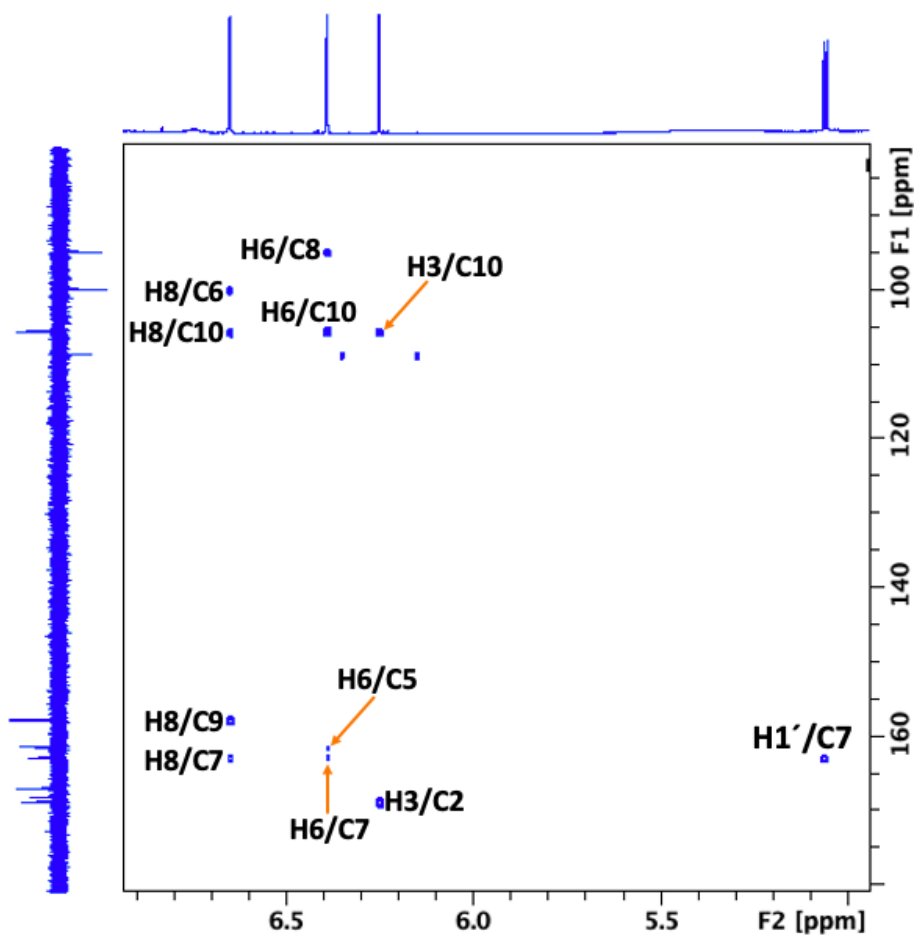
Figur 205: $1D$ 1H NMR spekter med fullstendig anordning av signalene til 6'-malonylundulatosid A (**II**).



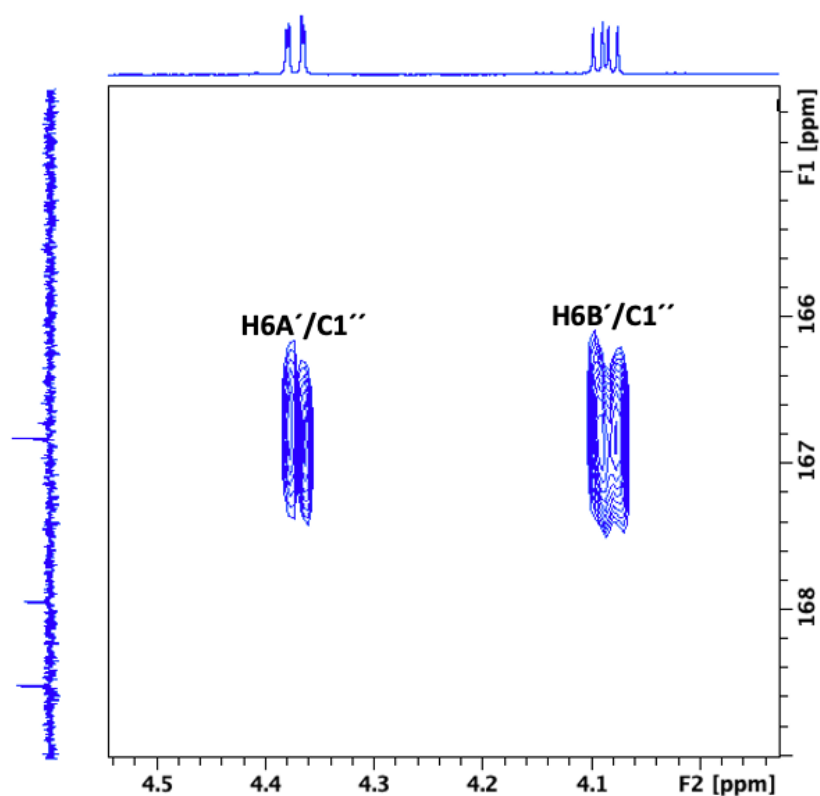
Figur 206: $1D$ ^{13}C CAPT NMR spekter med fullstendig anordning av signalene til 6'-malonylundulatosid A (**II**).



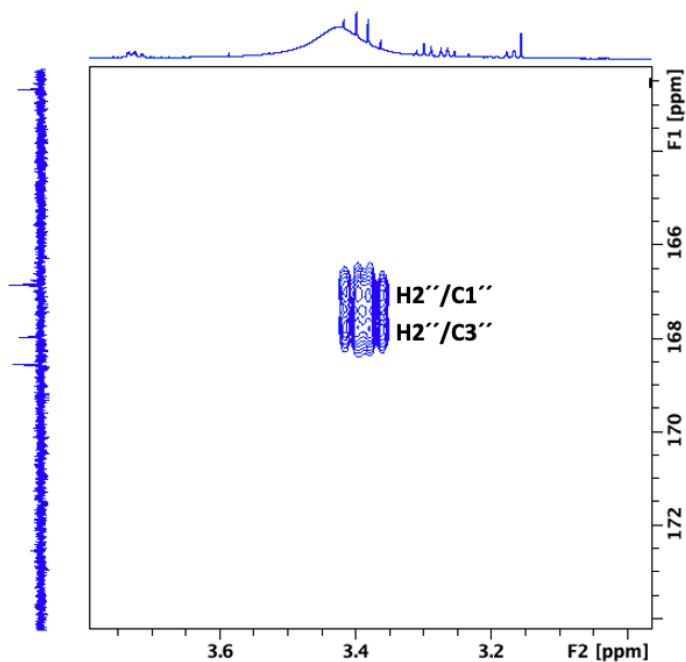
Figur 207: $1\text{D } ^1\text{H}$ selektiv TOCSY NMR spekter av glukoseenheten til 6'-malonylundulosid A (II).



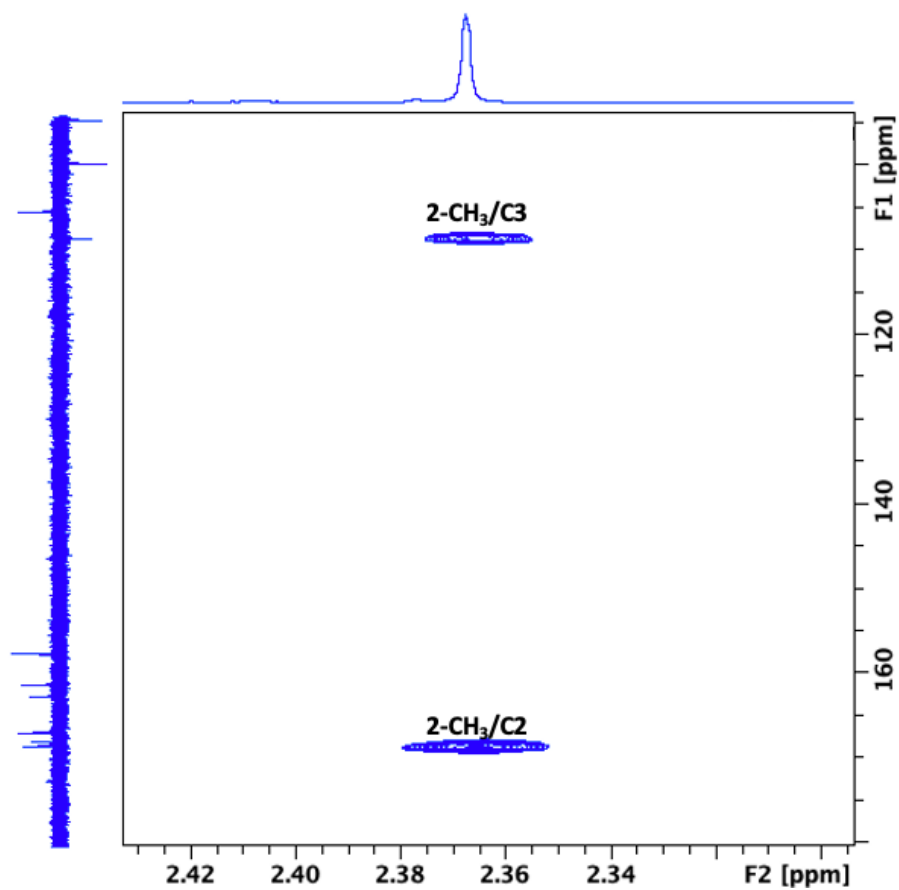
Figur208: Ekspandert aromatisk region av $2\text{D } ^1\text{H}$ - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 6'-malonylundulosid A (II). Legg spesielt merke til krysstoppen $\text{H1}'/\text{C7}$ som bekrefter at glukoseenheten er tilknyttet kromenon aglykon i 7-posisjon.



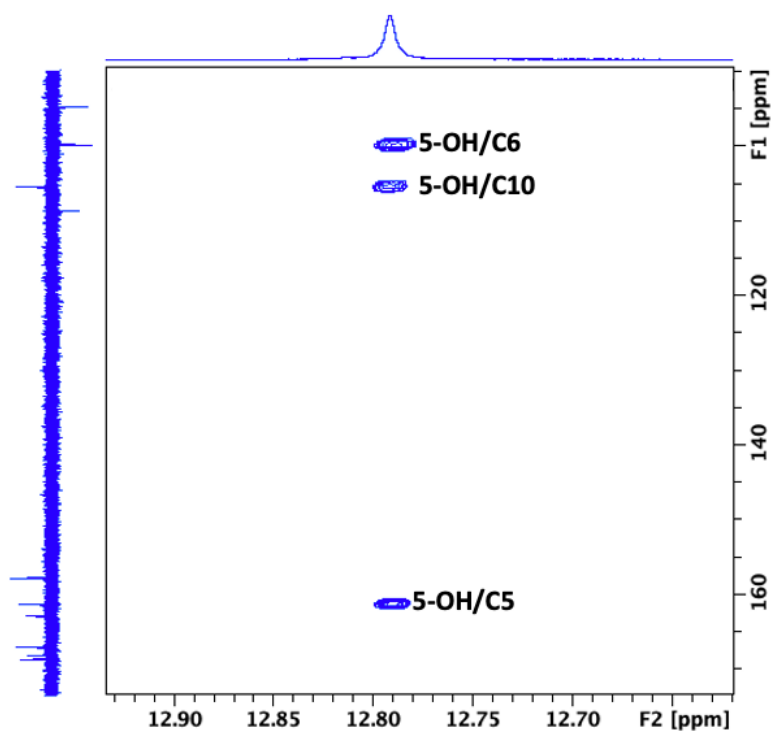
Figur 209: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 6'-malonylundulosid A (II) som viser krysstoplene mellom $\text{H6A}'$ og $\text{C1}''$ og $\text{H6B}'$ og $\text{C1}''$ som bekrefter at malonylenheten er knyttet til sukkerenhet i 6'-posisjon.



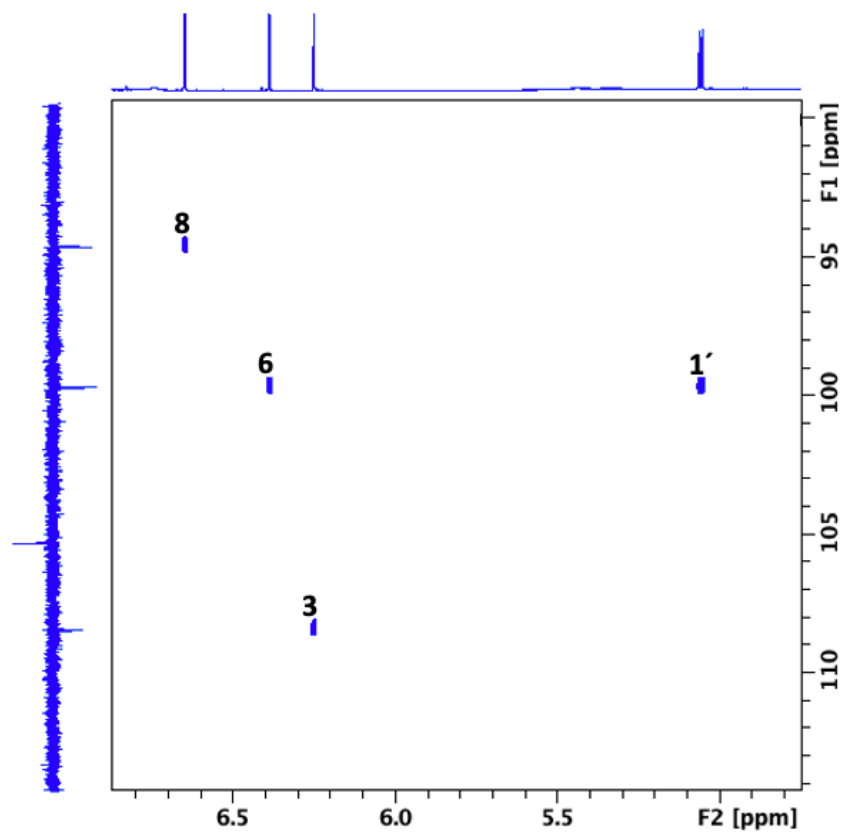
Figur 210: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 6'-malonylundulosid A (II) som viser korrelasjoner mellom CH_2 -gruppen i malonylenheten og karbonylkarbonatomene i malonylenheten.



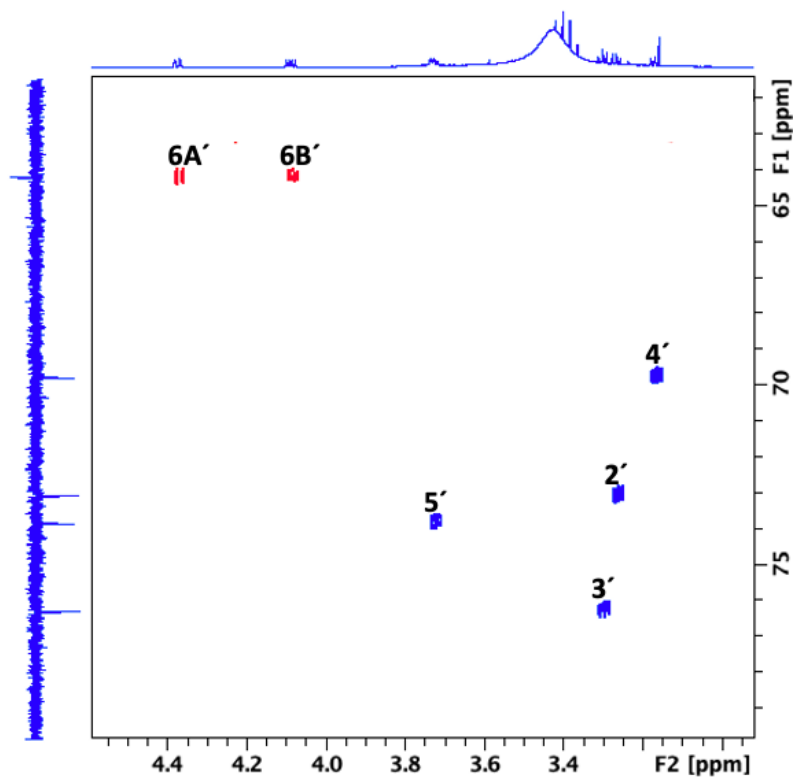
Figur 211: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 6'-malonylundulosid A (II).



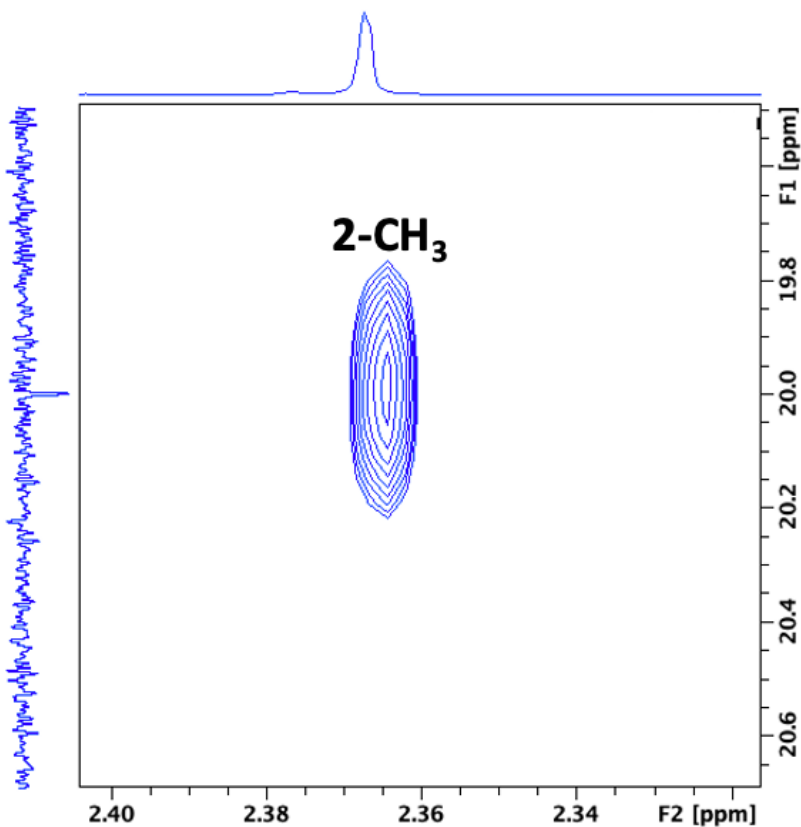
Figur 212: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 6'-malonylundulosid A (II).



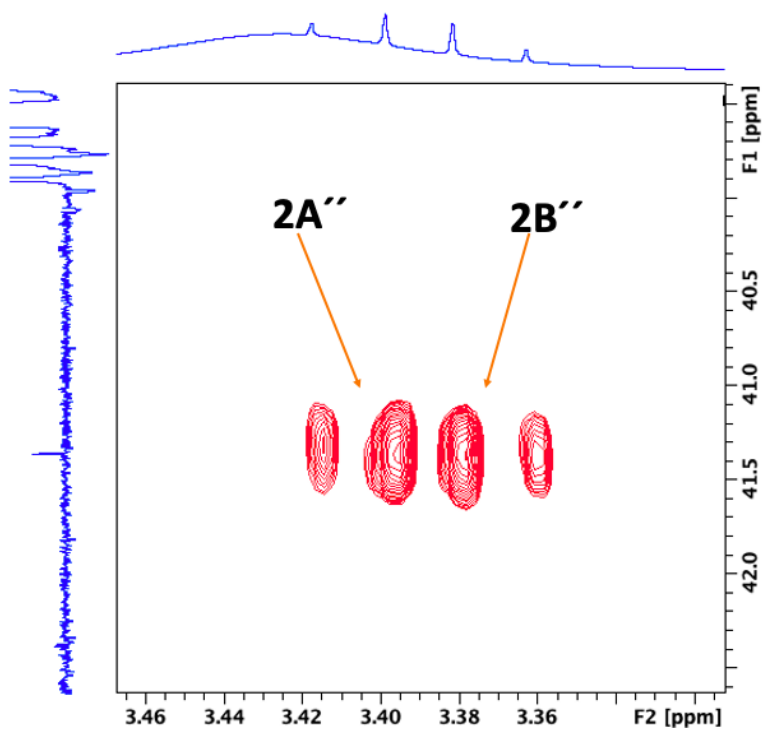
Figur 213: Ekspandert aromatisk region av $2D$ 1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 6'-malonylundulatosid A (II).



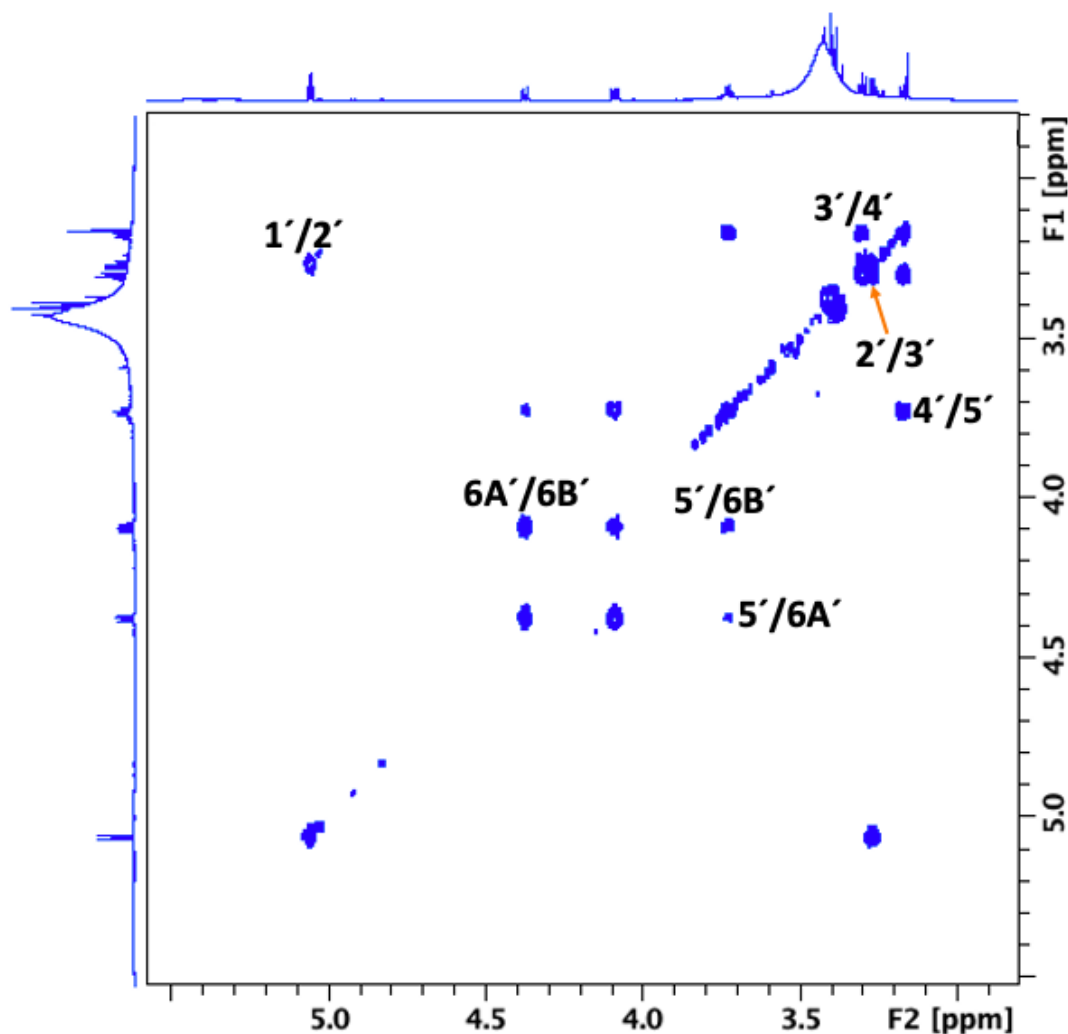
Figur 214: Ekspandert sukkerregion av $2D$ 1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 6'-malonylundulatosid A (II).



Figur 215: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 6'-malonylundulatosid A (II).



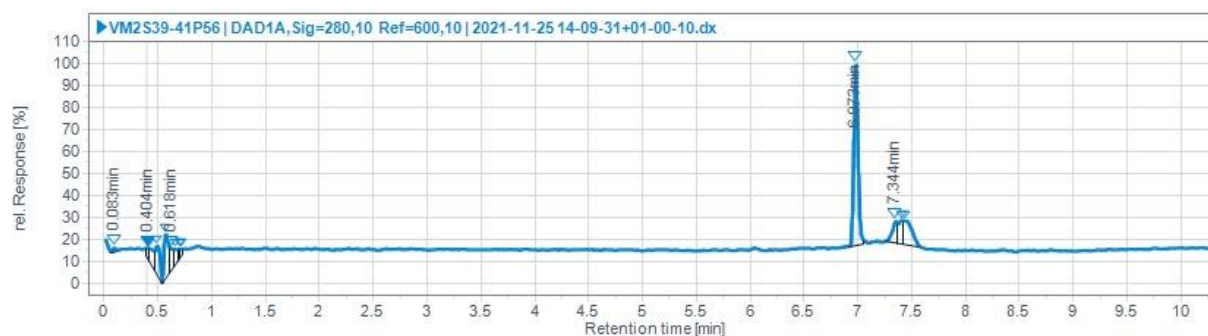
Figur 216: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 6'-malonylundulatosid A (II).



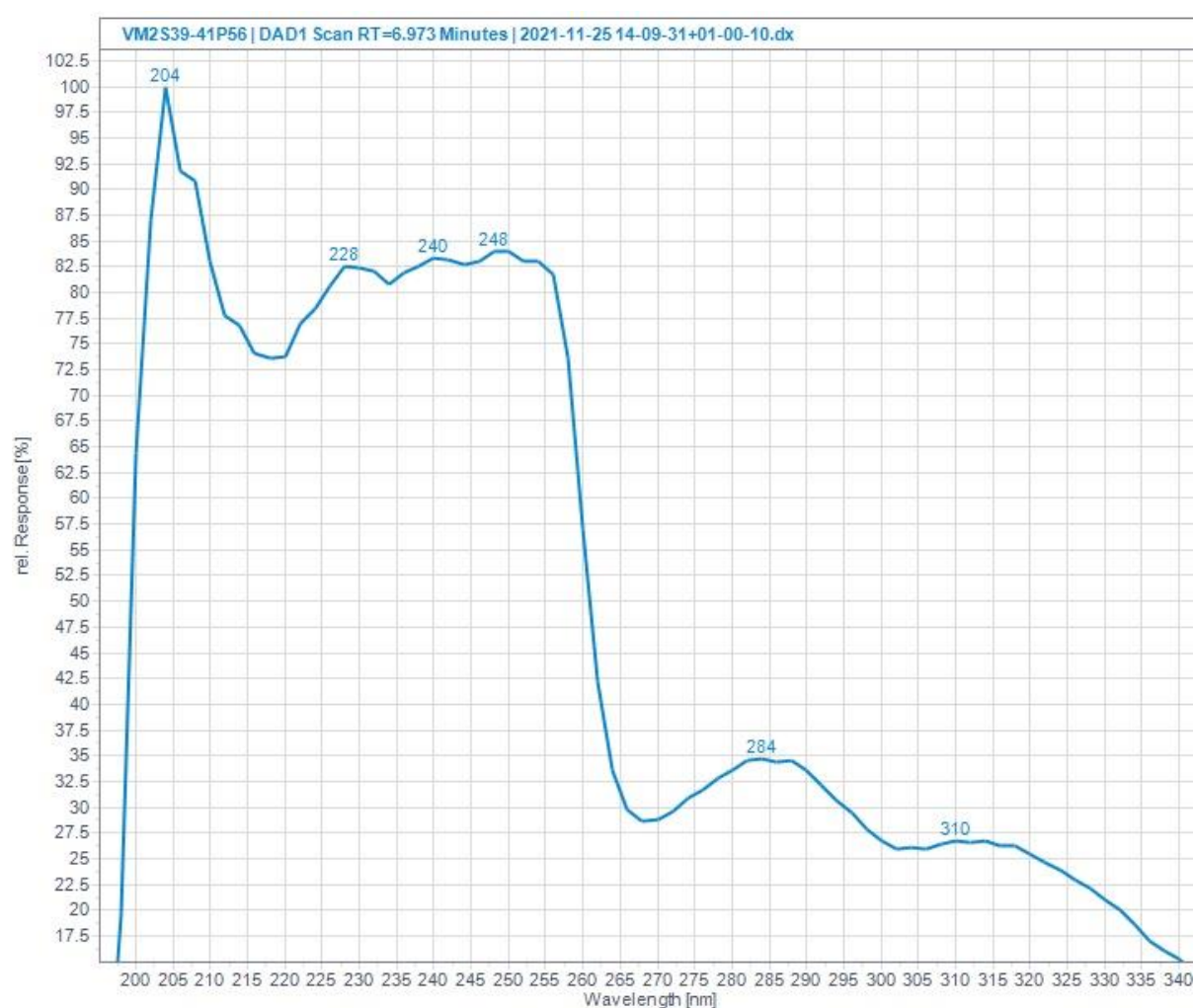
Figur 217: Ekspandert sukkerregion av 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekteret av 6'-malonylundulatosid A (**11**).

6.1.11 Nytt naturstoff: METYLMALONYLUNDULATOSID A

Det ble utført 1D ^1H -NMR, 1D ^{13}C CAPT, 2D ^1H - ^{13}C HMBC, 2D ^1H - ^{13}C HSQC, 2D ^1H - ^1H COSY og 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR eksperimenter for å bestemme strukturen til forbindelse (**12**) som viste seg å være metylmalonylundulatosid A. Forbindelse (**12**) ble isolert fra den kombinerte fraksjonen VM2S39-41P18+56 etter opprensing ved hjelp av preparativ HPLC. Figur 218 viser UHPLC-kromatogrammet av fraksjon VM2S39-41P56 detektert ved 280 ± 10 nm og figur 219 viser UV-spektrum for metylmalonylundulatosid A (**12**). Forbindelsen har retensjonstid 6.97 minutter og maks UV-absorpsjon ved 204 nm, 228 nm, 240 nm, 248 nm, 284 nm og 310 nm. Det ble isolert 1.6 milligram av forbindelse (**12**).



Figur 218: UHPLC-kromatogram av metylmalonylundulosid A (**12**) i fraksjon VM2S39-41P56 detektert ved 280 ± 10 nm.



Figur 219: UV-spektrum av metylmalonylundulosid A (**12**).

Strukturen til metylmalonylundulosid A er vist i figur 220. Forbindelsen har strukturformel $C_{20}H_{22}O_{12}$ og uniisotopisk molekylvekten er 454.1111 g/mol. Det ble tatt høyresolusjonsmassespekter av forbindelse (**12**) (figur 221) som bekreftet strukturen til forbindelsen.

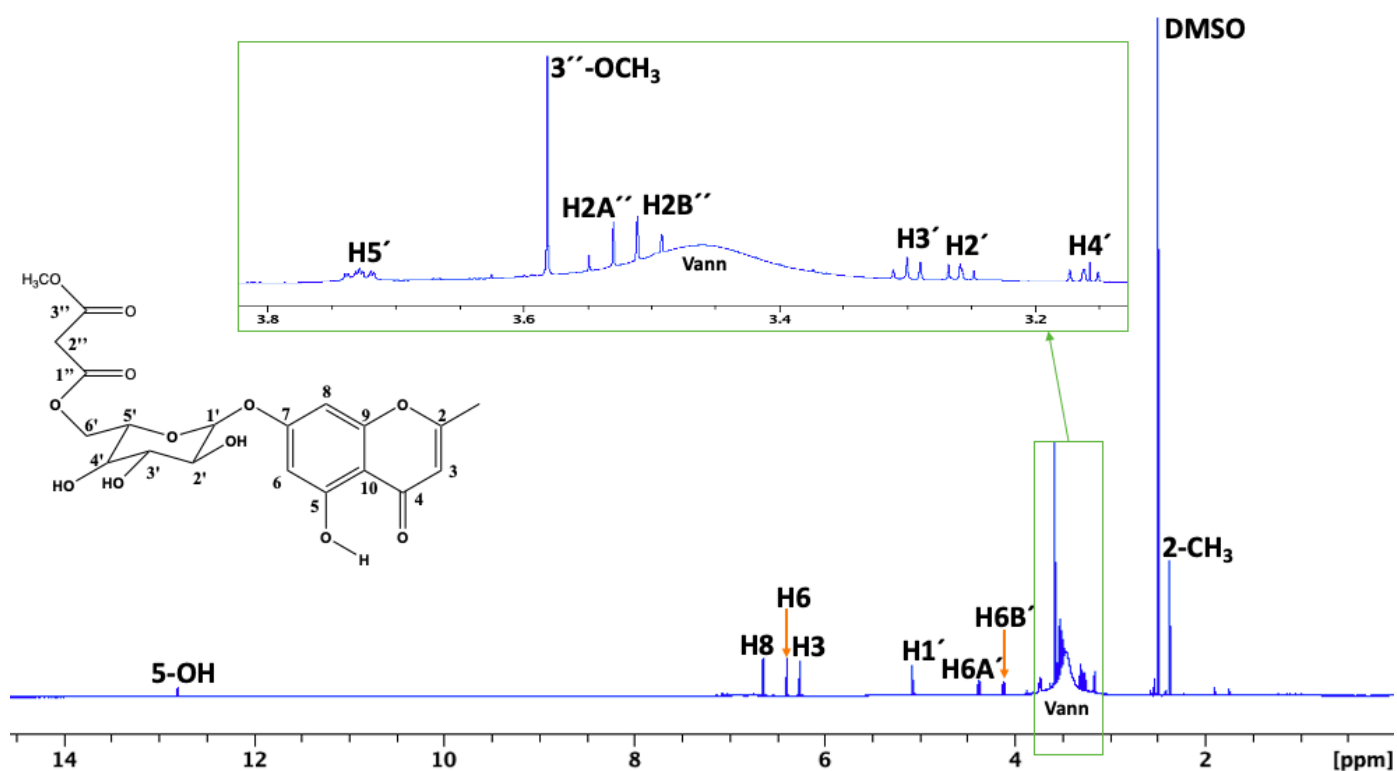
viste det seg at (**12**) er en metylert variant av forbindelse (**11**), der den frie karboksylsyregruppen i malonylenheten mest sannsynlig har blitt metylert under isolasjonsprosessen, der forbindelsen eksponeres for metanol og TFA.

Metylmalonylundulosid A har ikke tidligere blitt identifisert, noe som er forventet siden den ikke-metylert varianten heller ikke er kjent fra før. NMR-data for forbindelse (**12**) stemmer godt overens med NMR-data for forbindelse (**11**) for hele molekylet bortsett fra for malonylenheten, der signalene er påvirket av at den terminale karboksylsyregruppen er blitt metylert (**12**) (tabell 26).

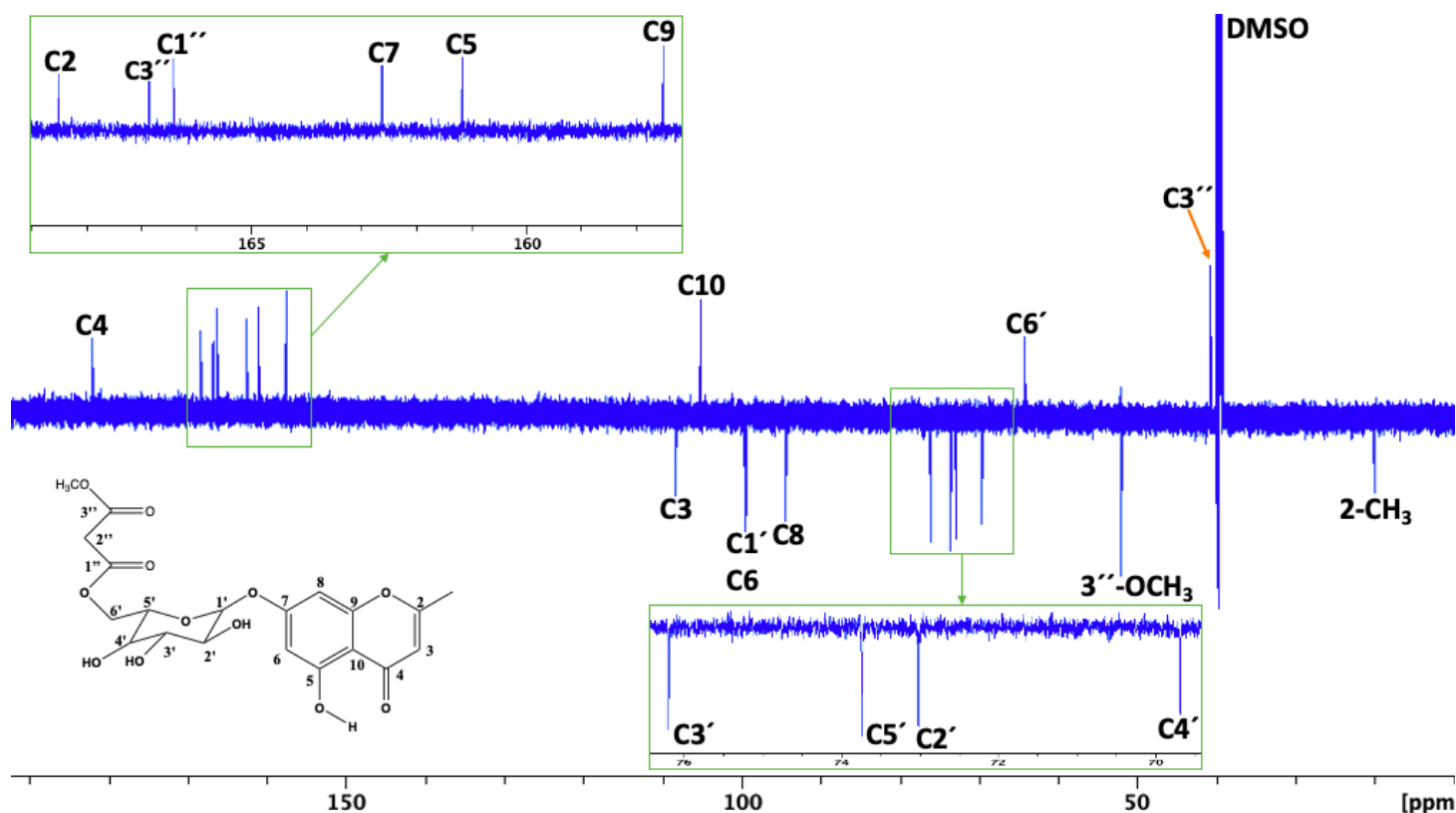
Figur 222-232 viser anordnede NMR-spektre for metylmalonylundulosid A (**12**).

Tabell 26: ^1H og ^{13}C NMR kjemisk skiftverdier (ppm) og koblingskonstanter (Hz) av metylmalonylundulosid A (12**) fraksjon VM2S39-41P18+56 isolert fra *Myrrhis Odorata* i DMSO- D_6 ved 298K.**

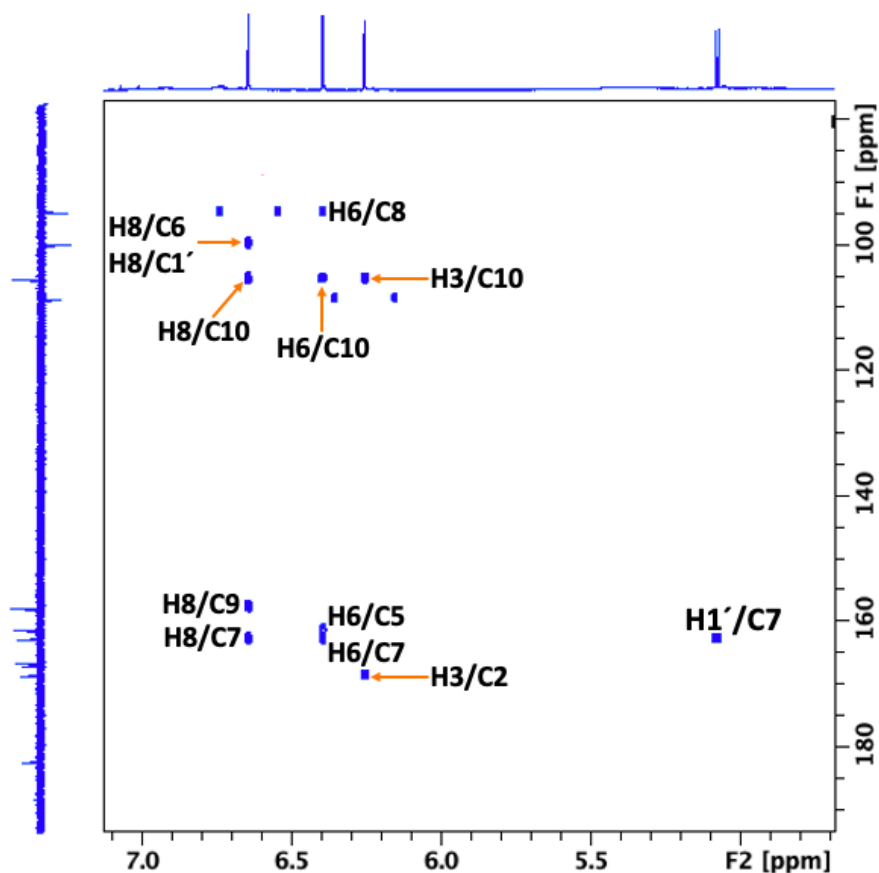
	δ ^1H 12	δ ^{13}C 12
2		168.50
3	6.25 q 1.0	108.38
4		182.10
5		161.17
6	6.39 d 2.2	99.56
7		162.63
8	6.64 d 2.2	94.53
9		157.51
10		105.21
2- CH_3	2.37 d 1.0	19.99
5-OH	12.80 s	
7-O- β - glucoside		
1'	5.08 d 7.7	99.51
2'	3.26 dd 8.9, 7.7	73.02
3'	3.30 t 8.9	76.20
4'	3.16 dd 9.8, 8.9	69.69
5'	3.73 ddd 9.8, 7.2, 2.2	73.74
6A'	4.37 dd 12.0, 2.2	64.30
6B'	4.11 dd 12.0, 7.2	
6'-O- malonyl		
1''		166.41
2A''	3.54 d 16.2	40.80
2B''	3.50 d 16.2	
3''		166.86
3''- OCH_3	3.58 s	52.14



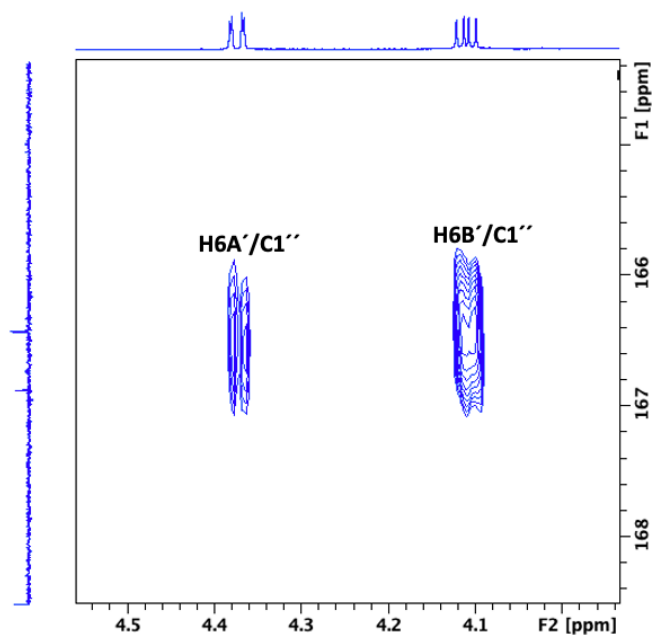
Figur 222: 1D ^1H NMR spekter med fullstendig anordning av signalene til metylmalonylundulosid A (**12**).



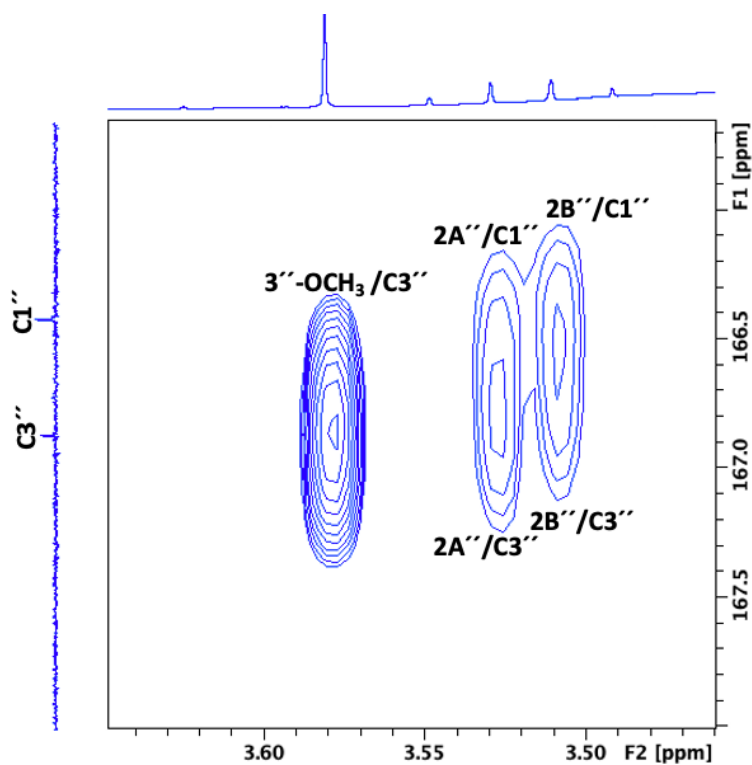
Figur 223: 1D ^{13}C CAPT NMR spekter med fullstendig anordning av signalene til metylmalonylundulosid A (**12**).



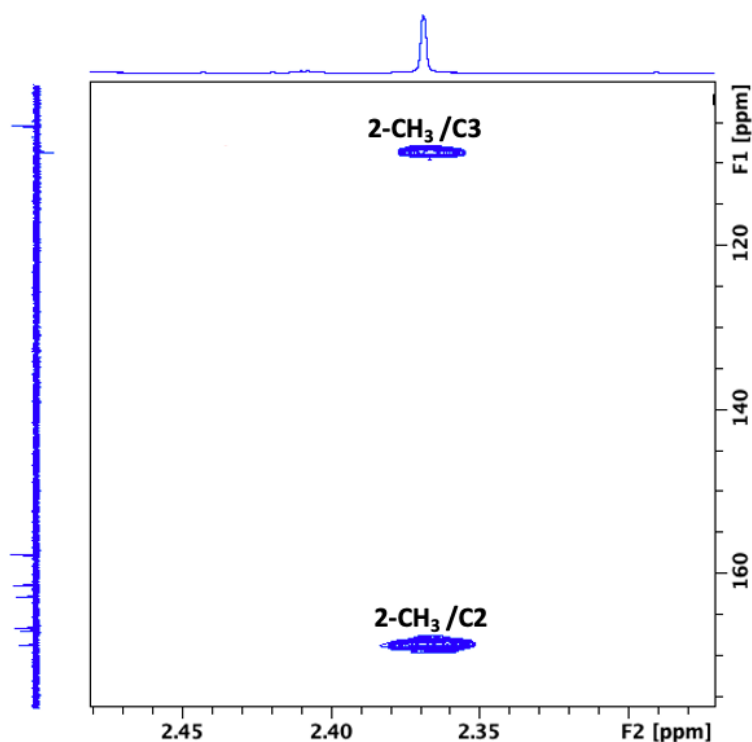
Figur 224: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av metylmalonylundulosid A (**12**). Ekspansjon viser krysstoppen mellom $\text{H1}'$ (5.08 ppm) og C7 (162.6 ppm) som bekrefter at sukkerenheten er tilknyttet til kromenon-enheten i 7-posisjon.



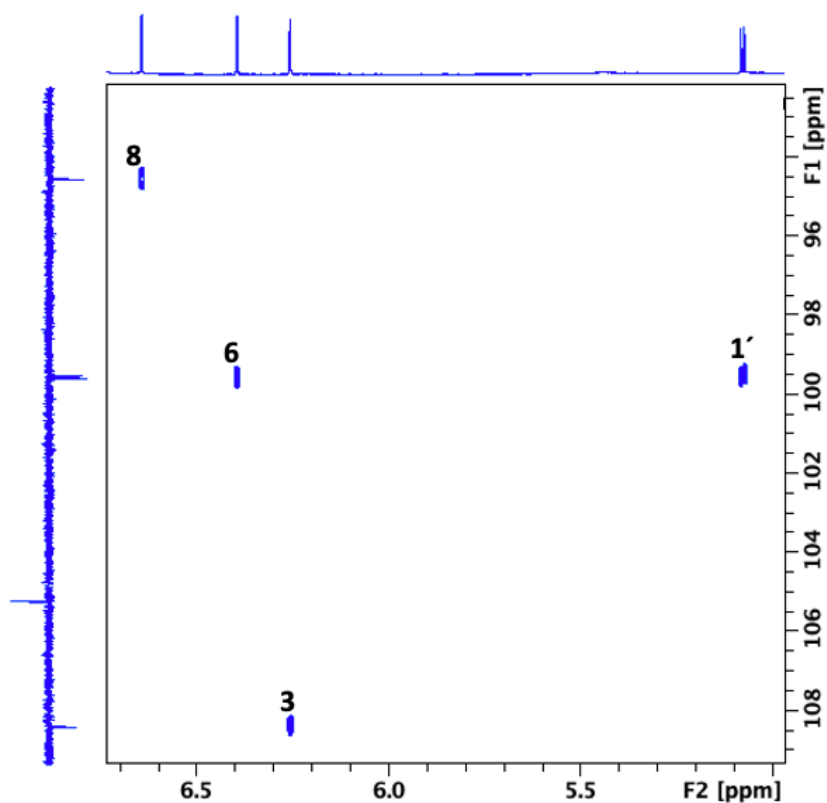
Figur 225: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av metylmalonylundulosid A (**12**) som viser krysstoppene mellom $\text{H6A}'$ og $\text{C1}''$ og $\text{H6B}'$ og $\text{C1}''$ som bekrefter at malonylsyre-enheten er tilknyttet sukkerenheten i 6'-posisjon.



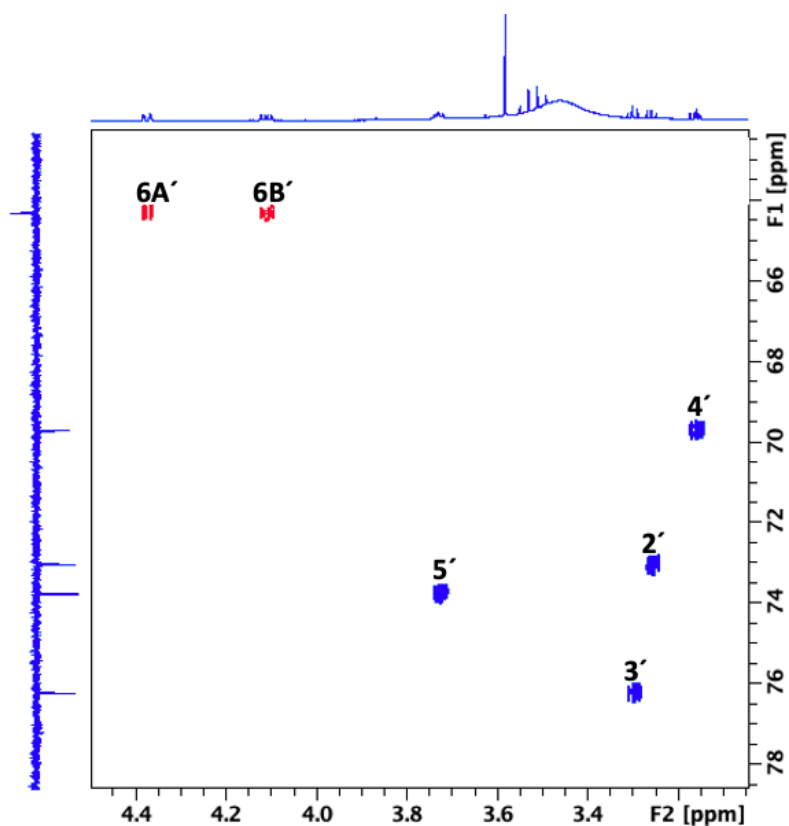
Figur 226: Ekspandert region av $2D^1H-^{13}C$ HMBC NMR spekteret av metylmalonylundulosid A (**12**).



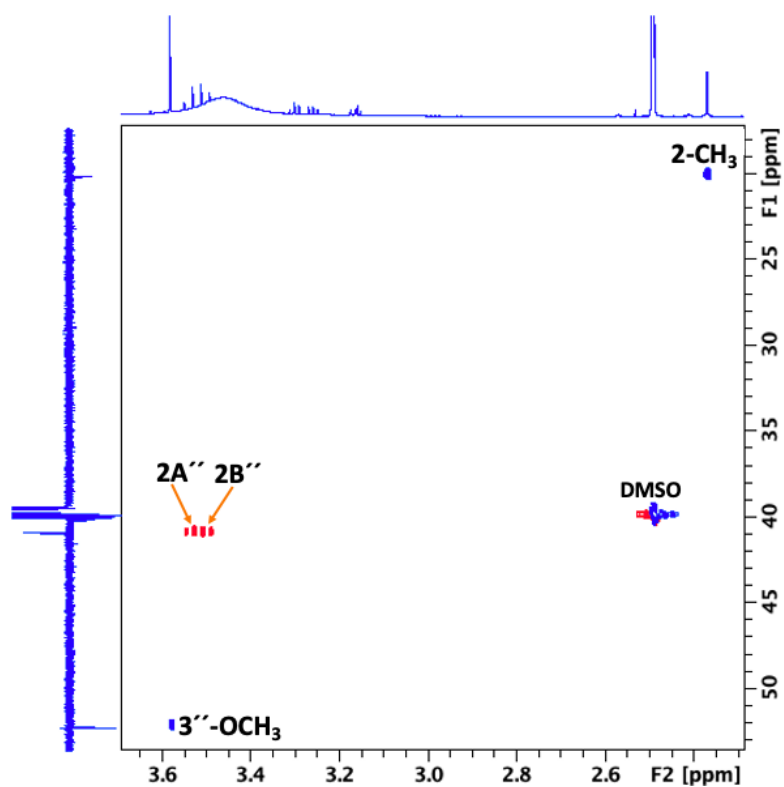
Figur 227: Ekspandert region av $2D^1H-^{13}C$ HMBC NMR spekteret av metylmalonylundulosid A (**12**).



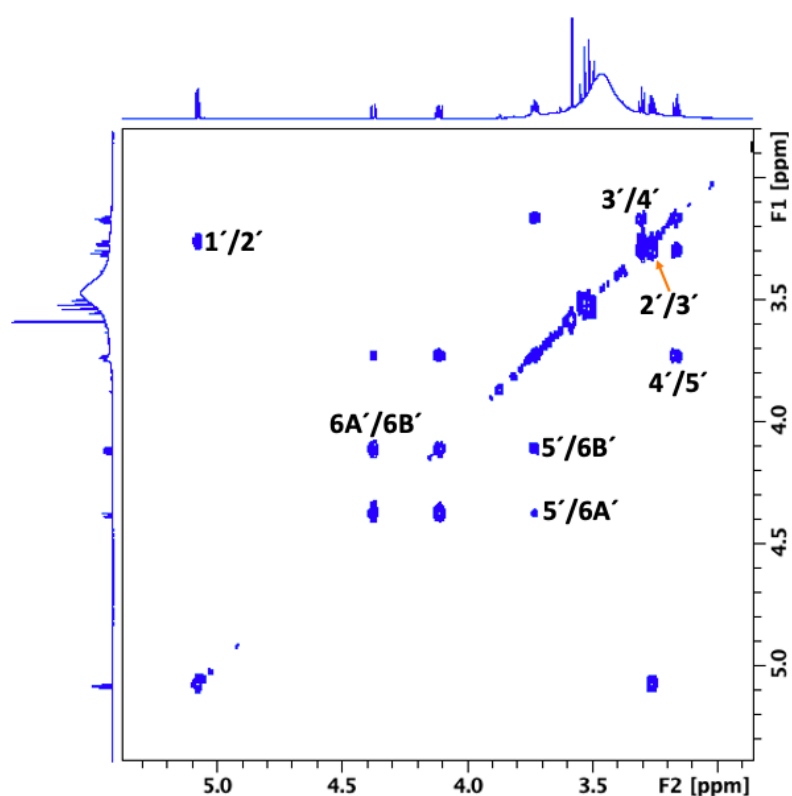
Figur 228: Ekspandert aromatisk region i $2D$ 1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av metylmalonylundulosid A (**12**).



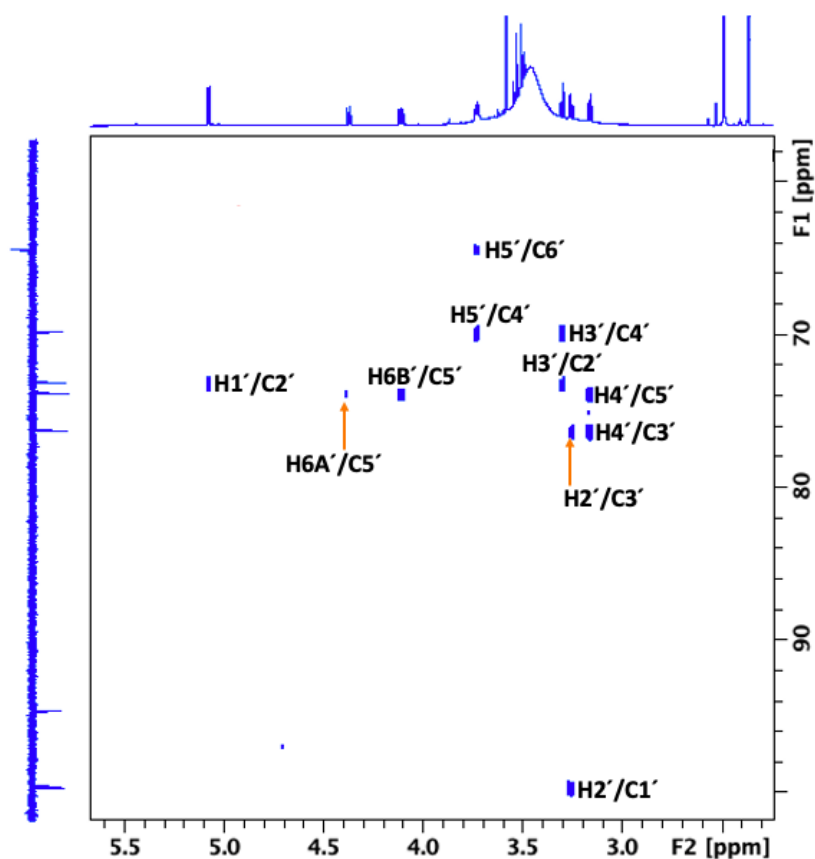
Figur 229: Ekspandert sukkerregion i $2D$ 1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av metylmalonylundulosid A (**12**).



Figur 230: Ekspandert region i $2D$ 1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av metylmalonylundulosid A (12).



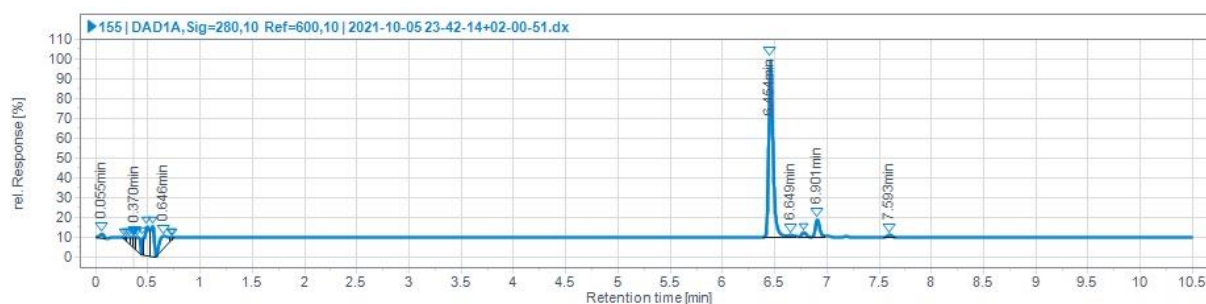
Figur 231: Ekspandert sukkerregion av $2D$ 1H - 1H COSY NMR spekteret av metylmalonylundulosid A (12).



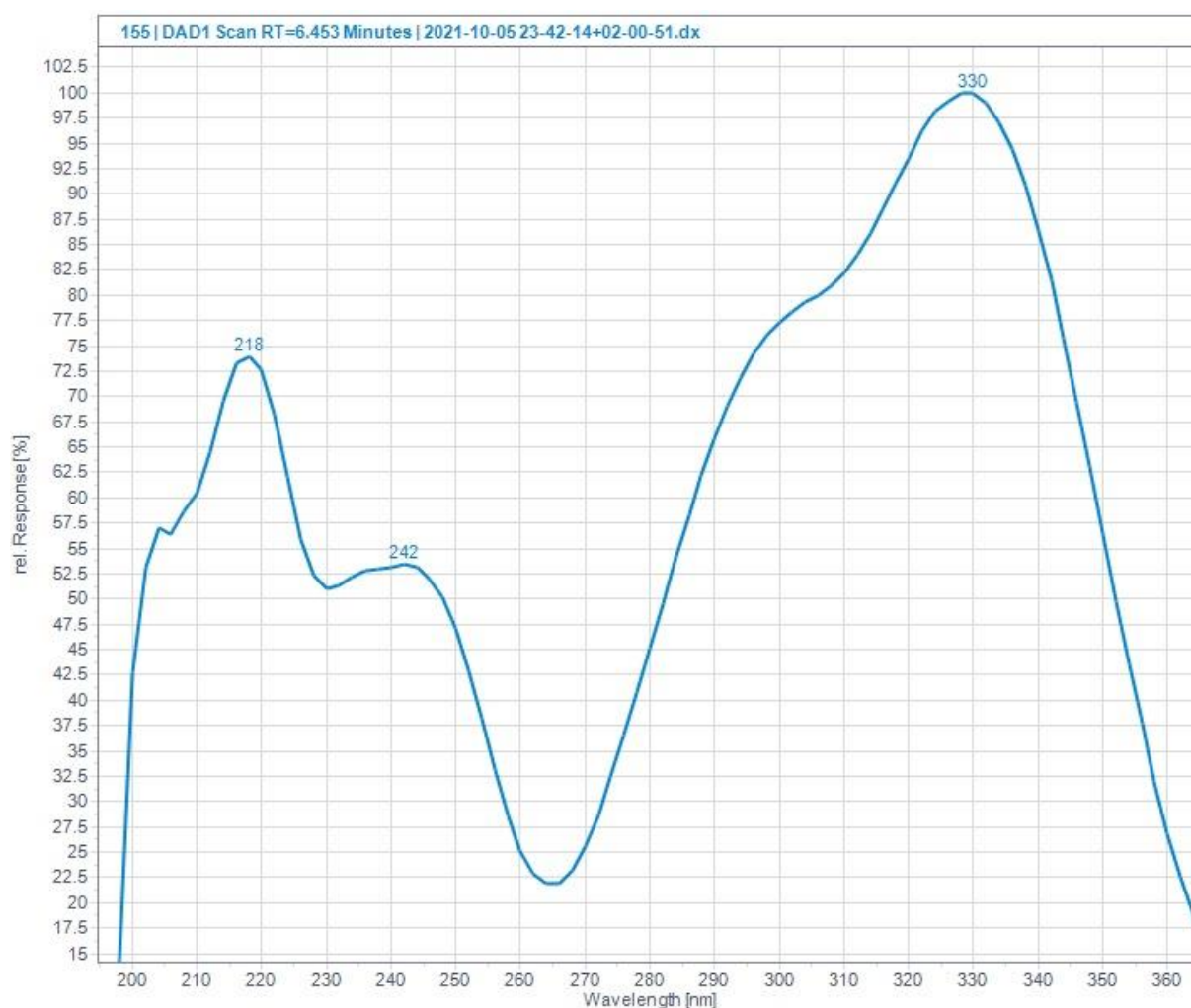
Figur 232: Ekspandert sukkerregion av 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekteret av metylmalonylundulosid A (**12**).

6.1.12 1,3-DIKAFFEOYLKINASYRE

Det ble isolert 24.7 milligram av forbindelse (**13**). Forbindelsen ble isolert fra den kombinerte fraksjonen VM2S154-156 ved hjelp av stor Sephadex LH-20 kolonne. Det ble tatt 1D ^1H -NMR, 1D ^{13}C CAPT, 2D ^1H - ^{13}C HMBC, 2D ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY, 2D ^1H - ^1H COSY, 2D ^1H - ^1H ROESY, 2D 1,1-ADEQUATE og 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR eksperimenter for å bestemme strukturen til forbindelse (**13**) som viste seg å være 1,3-dikaffeoylkinasyre. Figur 233-234 viser UHPLC-kromatogrammet og UV-spektrum av forbindelse (**13**). Forbindelsen har retensjonstid på 6.45 minutter, og maks UV-absorpsjon ved 218 nm, 242 nm og 330 nm. Prøven er ikke helt ren, og kromatogrammet og NMR-spektrene viser små topper fra minor forbindelser i prøven.



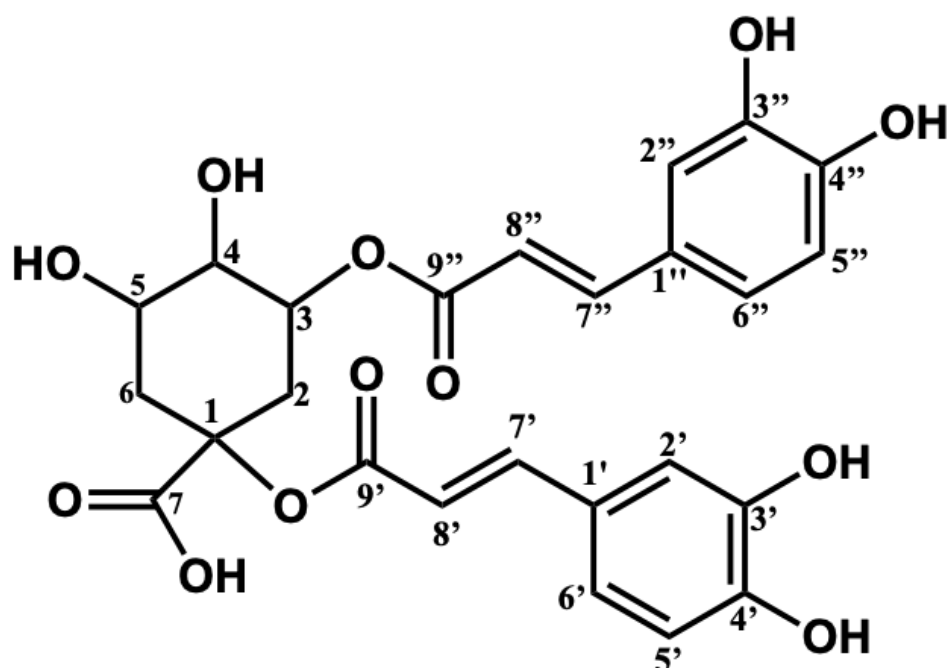
Figur 233: UHPLC-kromatogram av 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**) i fraksjon VM2S155 detektert ved 280 ± 10 nm.



Figur 234: UV-spektrum av 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**).

Basert på omfattende litteratursøk i Scifinder viste det seg at forbindelsen ikke er isolert fra *Myrrhis odorata* tidligere, men den er ellers kjent i en rekke andre planter som blant annet i *Inula ensifolia* (59). Strukturen til 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**) er vist i figur 235. Eksperimentelle NMR-data for 1,3-dikaffeoylkinasyre (tabell 27) stemmer godt overens med

referanselitteratur (60) (61). 1,3-dikaffeoylkinasyre har vist å ha sterke antioksidative egenskaper (62).



Figur 235: Struktur av 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**) med nummerering.

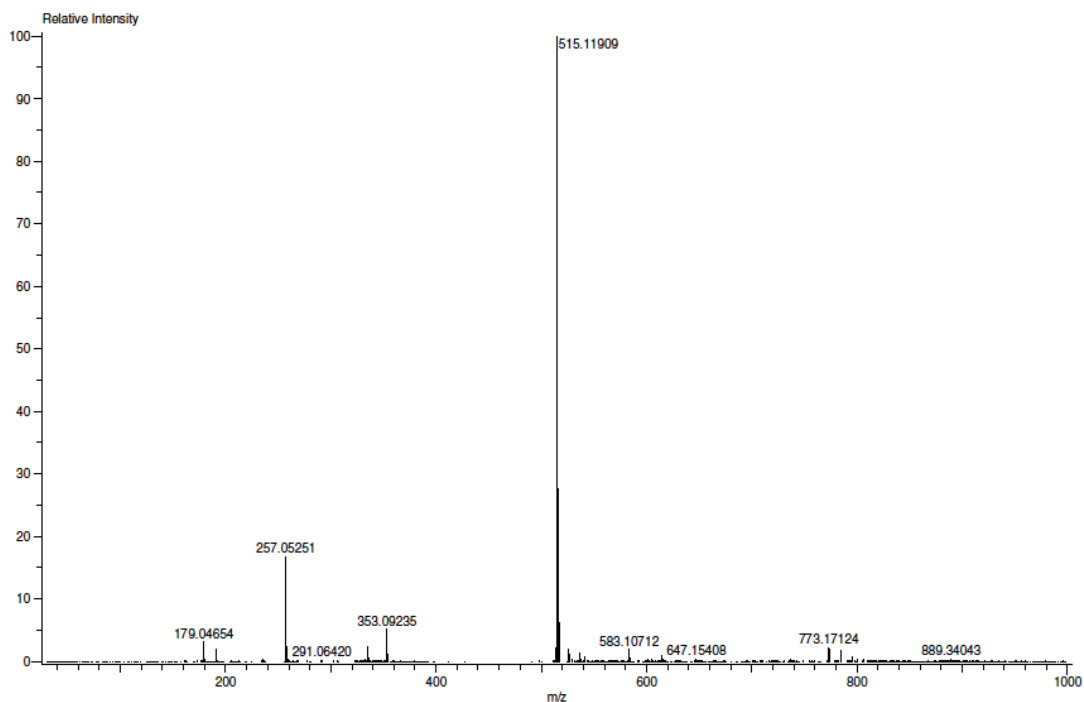
Strukturformel: $C_{25}H_{24}O_{12}$

Uniisotopisk molekylvekt: 516.1268 g/mol

Molekylstrukturen til forbindelsen som er bestemt utfra en rekke NMR-eksperimenter, ble bekreftet ved hjelp av høyopløselig MS. Molekylærionet [M-H] ved m/z 515.11909 som korresponderer til $C_{25}H_{23}O_{12}$ (beregnet masse: 515.11895; $\delta = 0.28$ ppm) observert i det høyopløselig ESI-MS med negativ ionisering bekrefter riktig identifikasjon av 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**).

Acq. Data Name: TFossen_010422_VM2S 154-156_ESI_LC
 Internal Sample Id:
 Ionization Mode: ESI- Orifice1 Volt Sweep: -22V
 MS Calibration Name: TFANA_ESI_1000_BH280916 Acquired m/z Range: 30.0..1000.0
 Reduction History: Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area],Correct Base[5.0%]];Average(MS[1] 7.807..7.888)-1.0*Average(MS[1] 8.840..9.035);Correct Base[5.0%]
 Experiment Date/Time: 4/1/2022 11:36:18

Spec. Record Interval: 0.6[s]
 Ring Lens Volt: -10[V]
 Time of Maximum: 7.851[min]
 Operator Name: Accutof



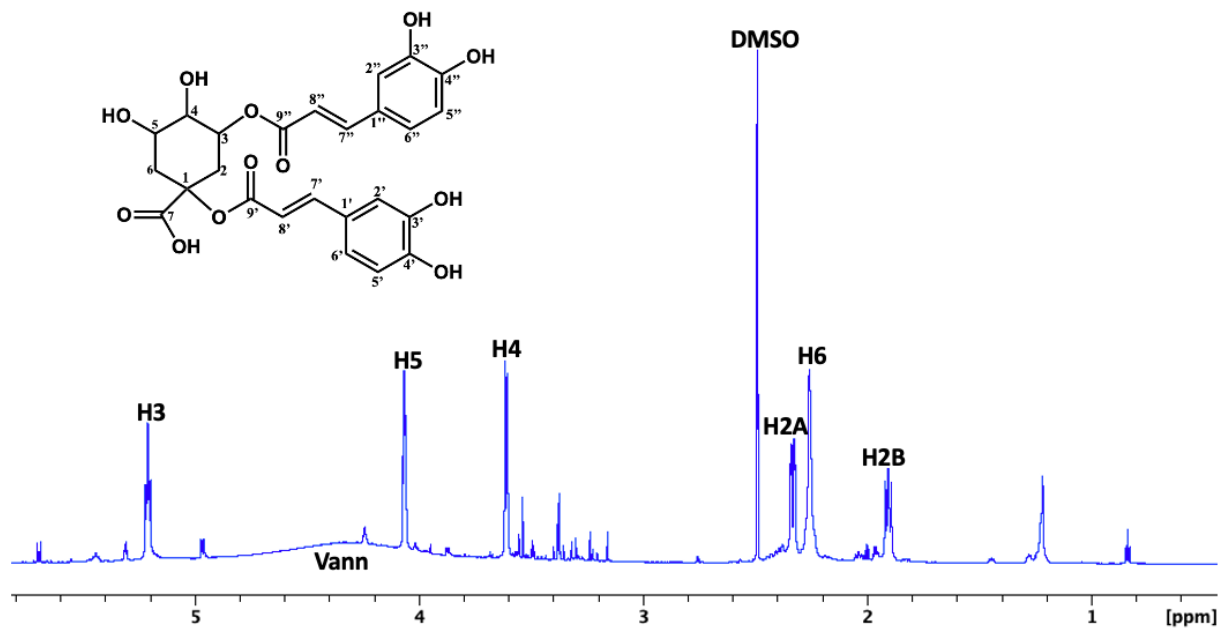
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	¹² C	¹ H	¹⁶ O	Unsaturation Number
515.11909	549711.01	515.11895	0.28	¹² C ₂₅ ¹ H ₂₃ ¹⁶ O ₁₂	25	23	12	14.5

Figur 236: ESI MS med negativ ionisering av 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**) i fraksjon VM2S154-156.

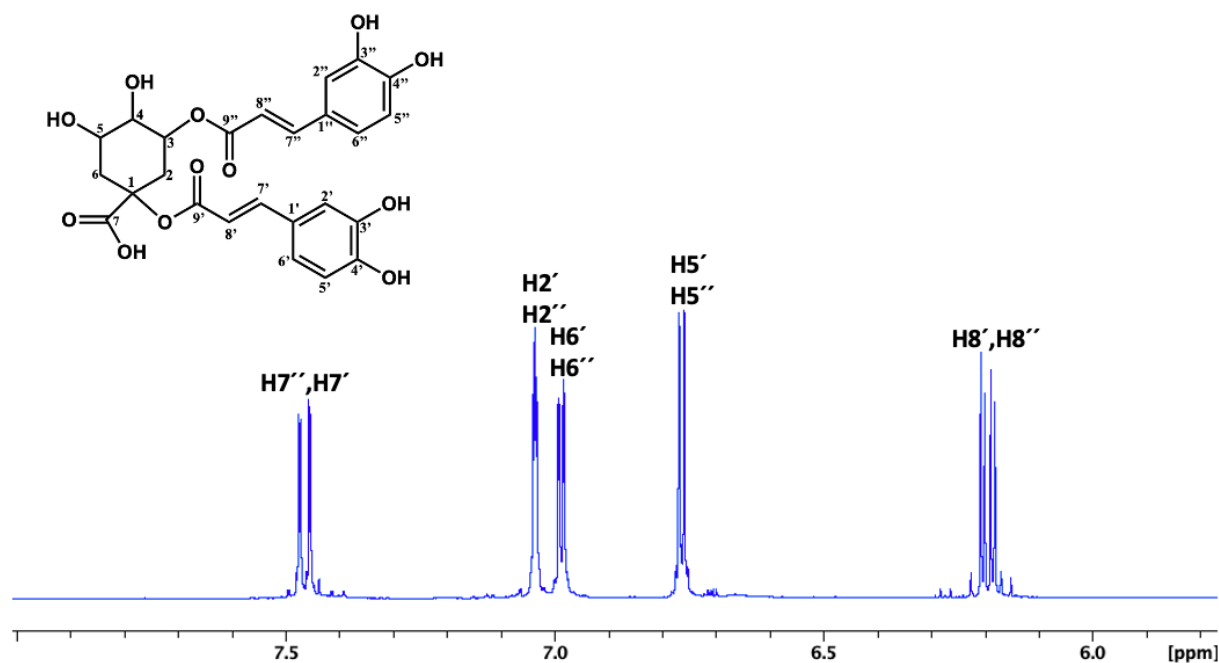
Tabell 27 viser de kjemisk skiftverdier ¹H og ¹³C, samt koblingskonstanter for 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**) i DMSO-D₆ ved 298K. Det ble observert 21 hydrogensignaler i protonspekteret og 25 karbonsignaler i karbonspekteret (tabell 27). Kaffeoyl-enhetene er knyttet til henholdsvis 1- og 3- posisjon på kinasyre-enheten. Kaffeoyl-enheten i 3-posisjon er bekreftet i HMBC-spekteret (figur 242). ROSEY-spekter viser også at H7'' og H3 er nær hverandre i rom (figur 249). Den andre kaffeoyl-enheten er plassert i 1-posisjon av molekylet ettersom C1 har downfield kjemisk skiftverdi i sammenligning med klorogensyre (**9**) (tabell 27 og tabell 23) som kun har kaffeoyl-enhet i 3-posisjon. I tillegg ser man ingen effekt av substitusjon på noen andre hydrogen. Forbindelsen har et relativt komplekst protonspekter, spesielt i aromatregionen, da det er to like substituenten som er tilkoblet kinasyre-delen (figur 238). Flere av de kjemiske skiftverdiene for kaffeoyl-enhetene er ikke helt identiske da de befinner seg i forskjellige kjemisk miljø (tabell 27). Det er observert brede signaler i spesielt karbonspekteret, noe som er typisk for klorogensyrederivater (**73**).

Tabell 27: ^1H og ^{13}C NMR kjemisk skift verdier (ppm) og koblingskonstanter (Hz) for 1,3-dikaffeoylkinasyre (13) Fraksjon VM2S154-156 isolert fra *Myrrhis Odorata* i DMSO- D_6 ved 298K

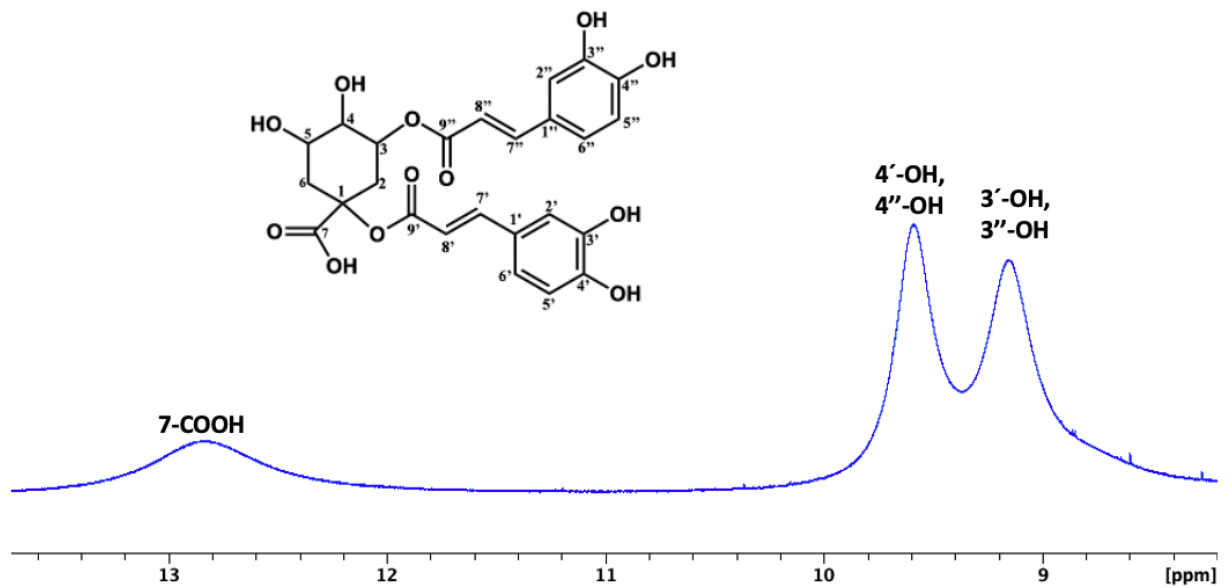
	δ ^1H 13	δ ^{13}C 13
1		79.23
2A	2.33 dd 13.6, 4.1	35.73
2B	1.91 dd 13.6, 8.9	
3	5.21 dt 8.2, 4.1	70.03
4	3.61 dd 8.0, 3.1	70.87
5	4.07 ddd, 8.1, 4.8, 3.1	67.44
6	2.26 m	34.18
7		172.57
7-COOH	12.84 s (br)	
1-O-Z-kaffeoyl		
1'		125.57
2'	7.04 d 2.1	114.94
3'		145.70
4'		148.55
5'	6.77 d 8.2	115.93
6'	6.99 dd 8.2, 2.1	121.47
7'	7.46 d 15.8	145.30
8'	6.20 d 15.8	114.30
9'		165.37
3'-OH	9.15 s	
4'-OH	9.59 s	
3-O-Z-kaffeoyl		
1''		125.67
2''	7.04 d 2.1	114.91
3''		145.68
4''		148.50
5''	6.76 d 8.2	115.86
6''	6.99 dd 8.2, 2.1	121.41
7''	7.47 d 15.8	145.60
8''	6.19 d 15.8	114.28
3''-OH	9.15 s	166.06
4''-OH	9.59 s	



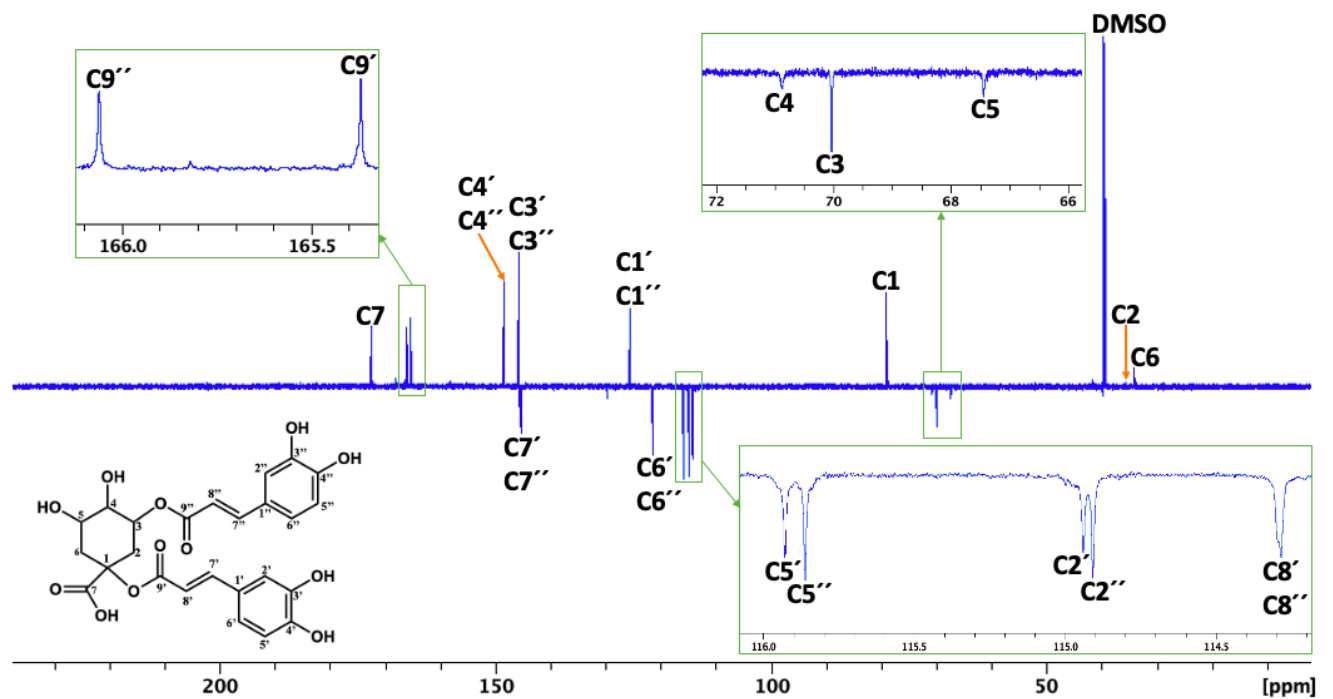
Figur 237: Ekspandert alifatisk region av $1D$ 1H NMR spekter med anordning av signaler for kinasyre-enheten av 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**).



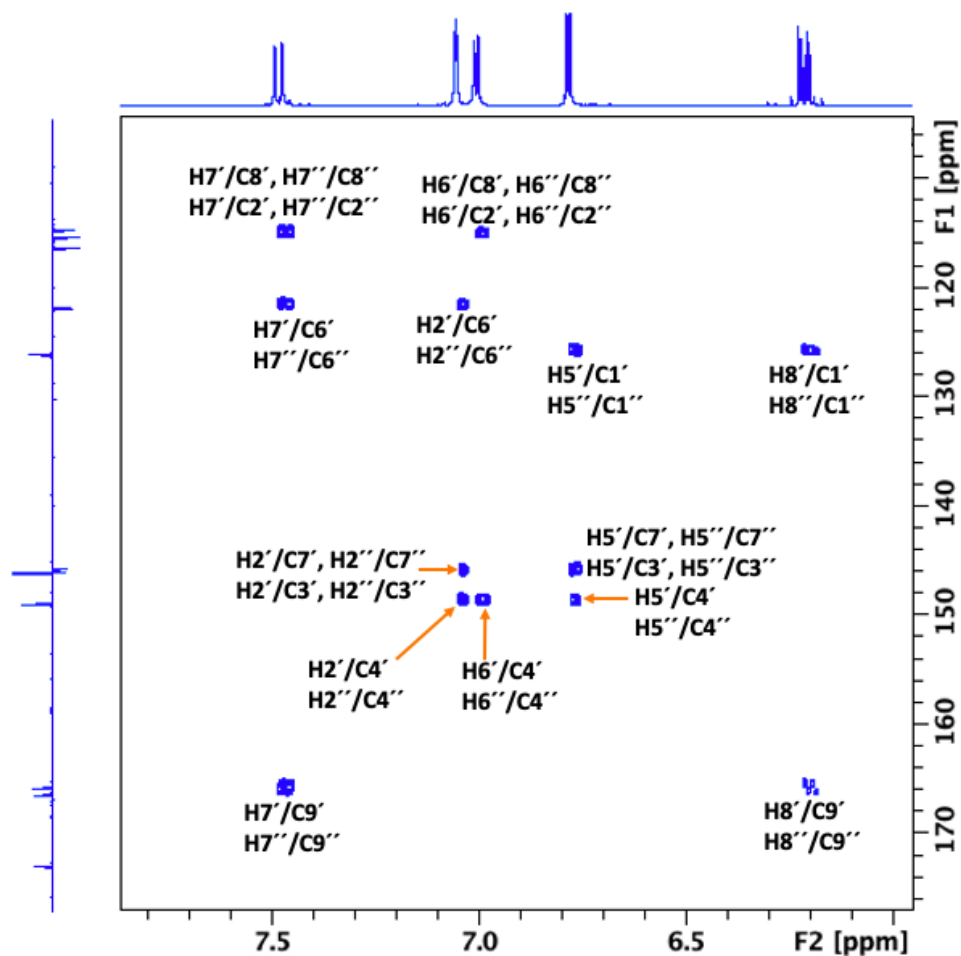
Figur 238: Ekspandert aromatisk region i $1D$ 1H NMR spekter med anordning av aromatiske og olefiniske signaler for kaffeoyl-enhetene i 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**).



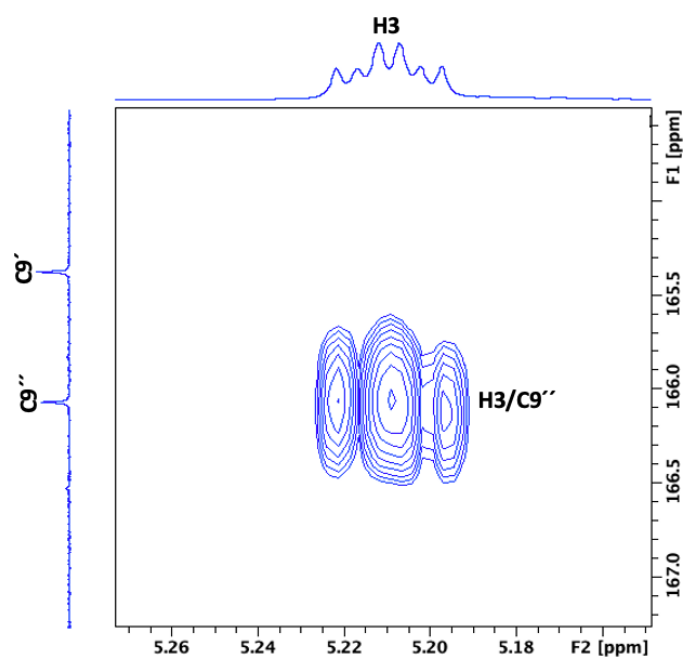
Figur 239: Ekspandert region av $1D$ 1H NMR spekter med anordning av OH-grupper til 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**).



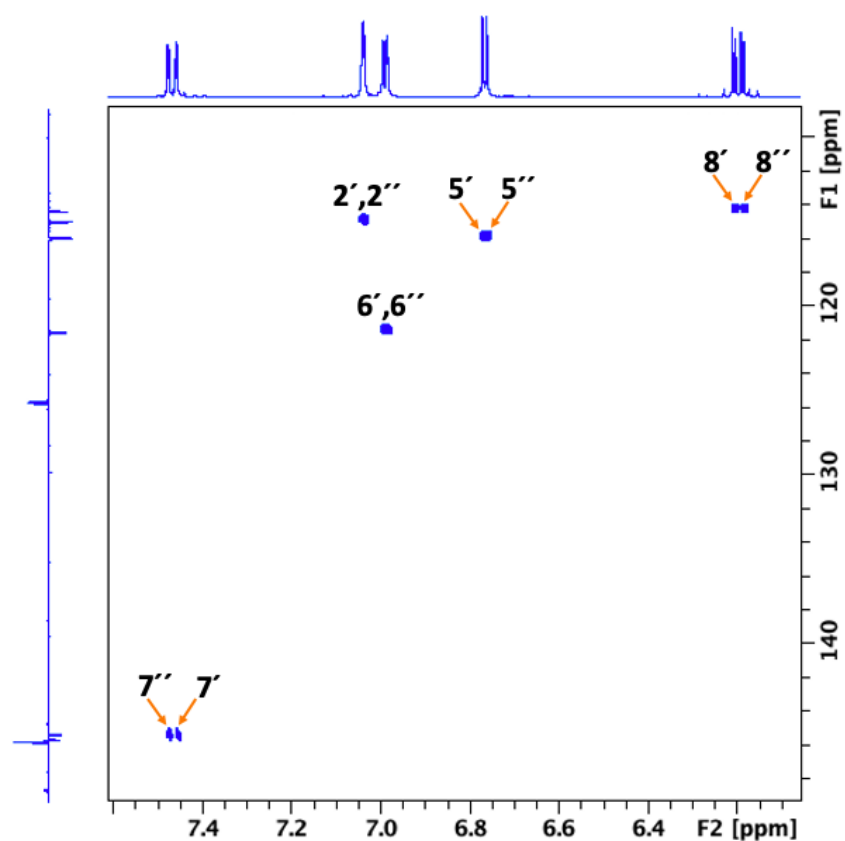
Figur 240: $1D$ ^{13}C CAPT NMR spekter med fullstendig anordning av signalene til 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**).



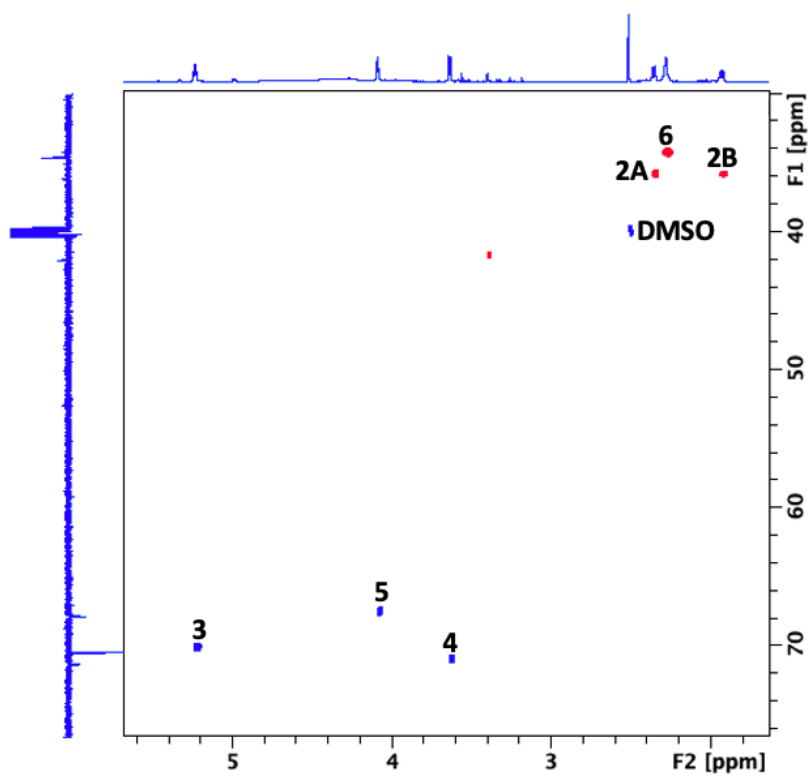
Figur 241: Ekspandert aromatisk region av $2D$ 1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 1,3-dikaffeoylkinase (13).



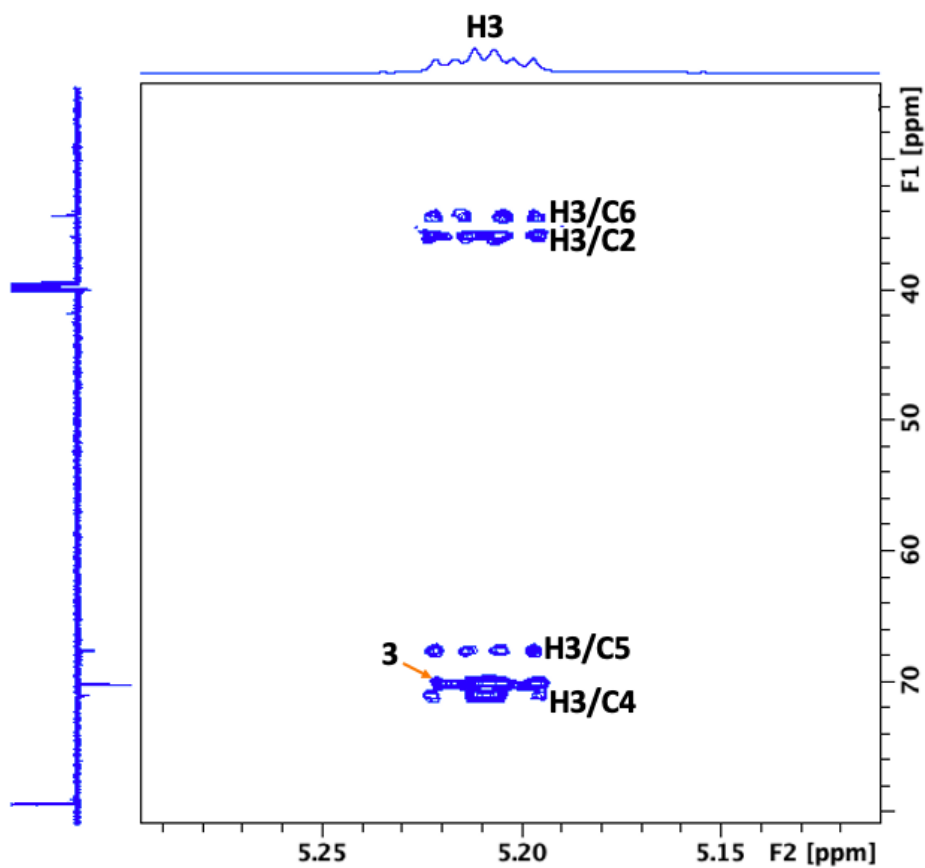
Figur 242: Ekspandert region av $2D$ 1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 1,3-dikaffeoylkinase (13) som bekrefter kaffeoyl-enheten i 3-posisjon.



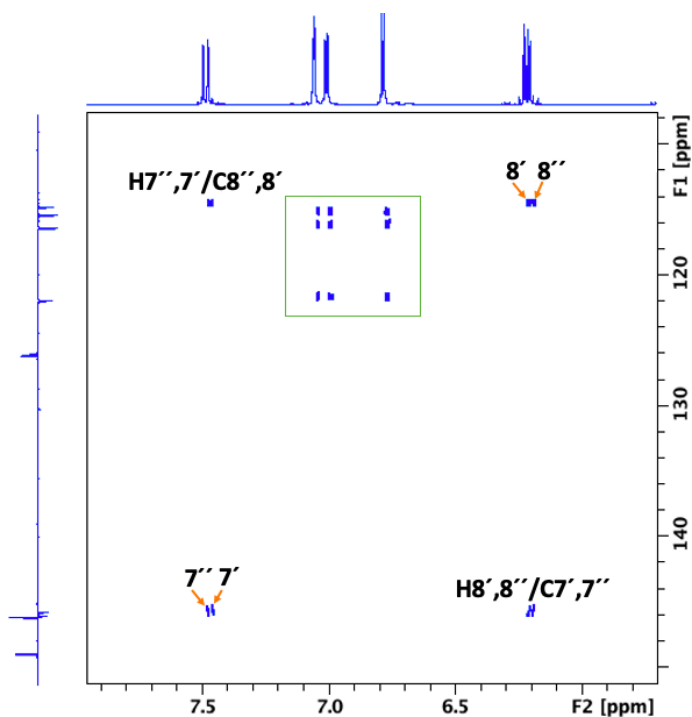
Figur 243: Ekspandert aromatisk region i $2D$ 1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**).



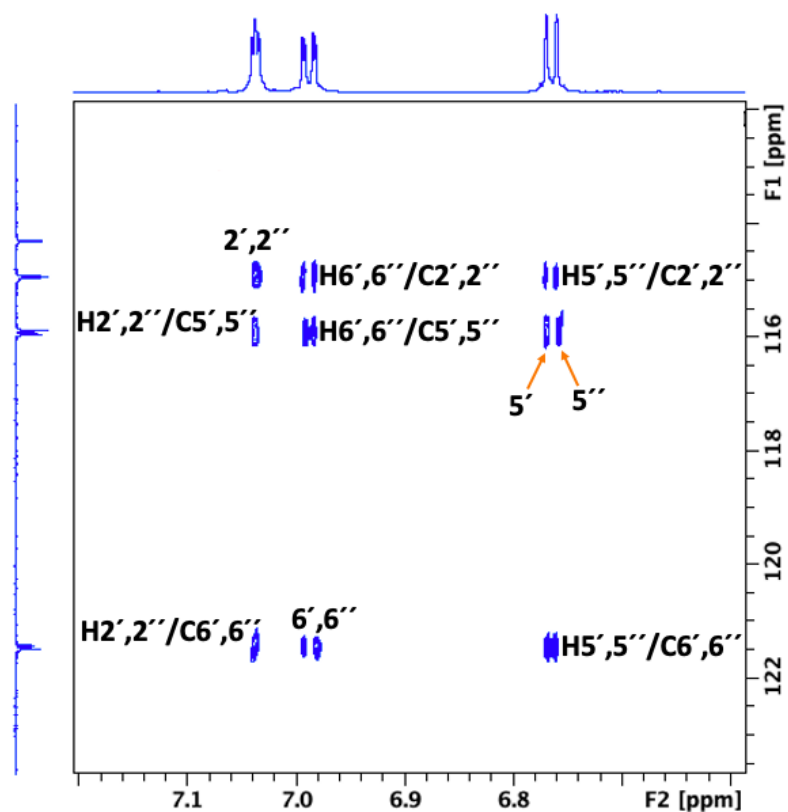
Figur 244: Ekspandert alifatisk region i $2D$ 1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**).



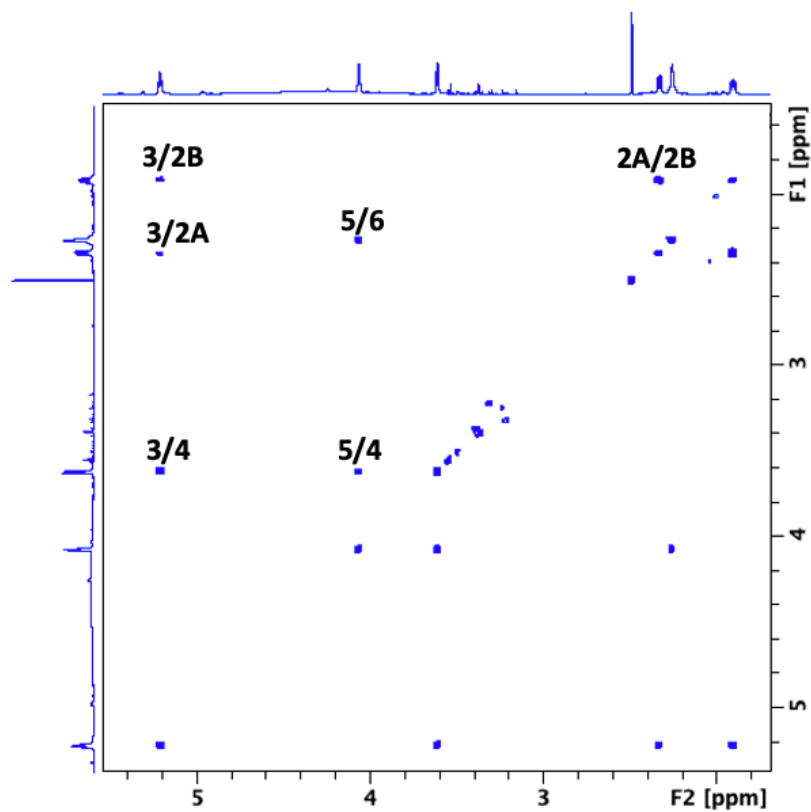
Figur 245: Ekspandert region i 1D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY NMR spekteret av 1,3-dikaffeoylkinase (13). Denne ekspansjon viser hele spinnsystemet til kinase-delen sett fra H3.



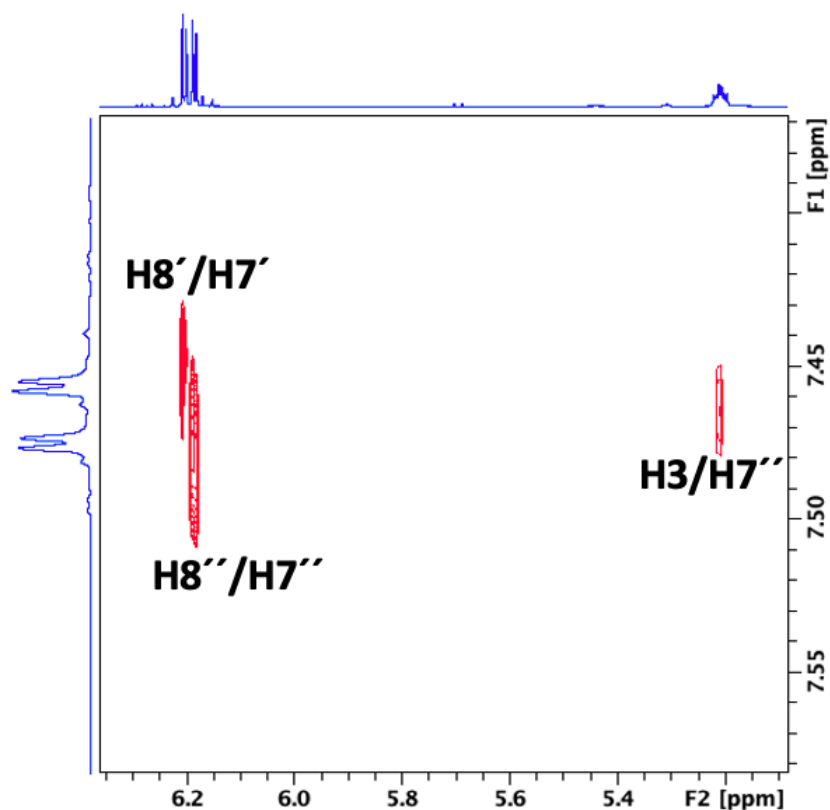
Figur 246: Ekspandert region av 1D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY NMR spekteret av 1,3-dikaffeoylkinase (13).



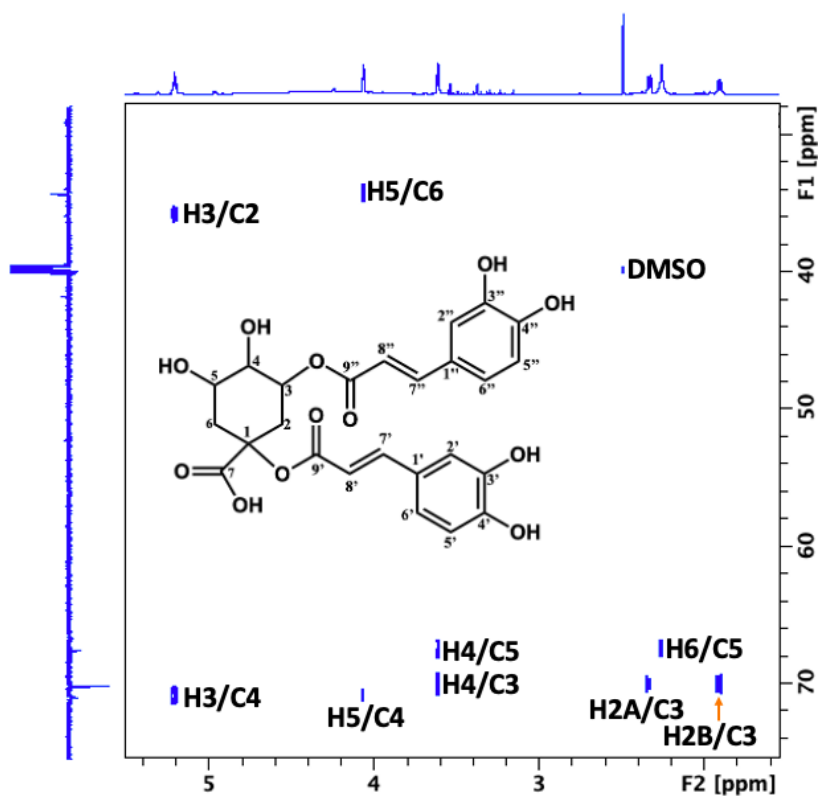
Figur 247: Ekspandert region av 1D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY NMR spekteret av 1,3-dikaffeoylkinase (13).



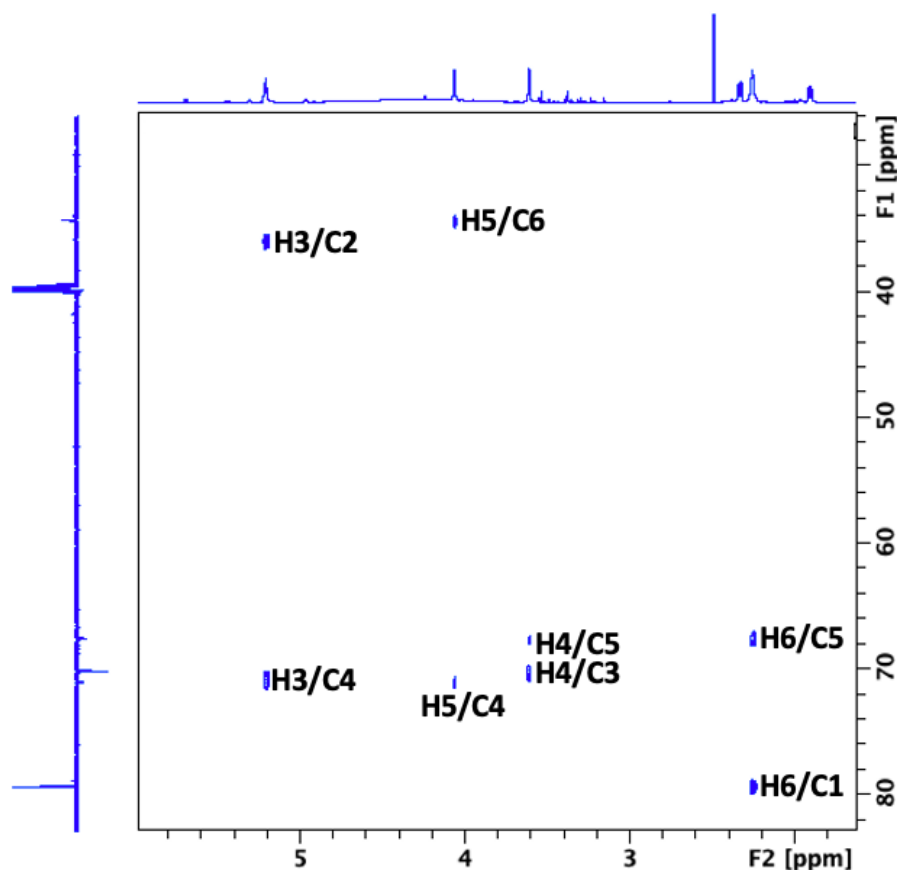
Figur 248: Ekspandert kinasyreregion av 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekteret av 1,3-dikaffeoylkinase (13).



Figur 249: Ekspandert region av 2D ^1H - ^1H ROESY NMR spekteret av 1,3-dikaffeoylkinase (13). Ekspansjon viser blant annet at H3 og H7'' er nær hverandre i rom.



Figur 250: Ekspandert kinasyreregion av 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekteret av 1,3-dikaffeoylkinase (13).

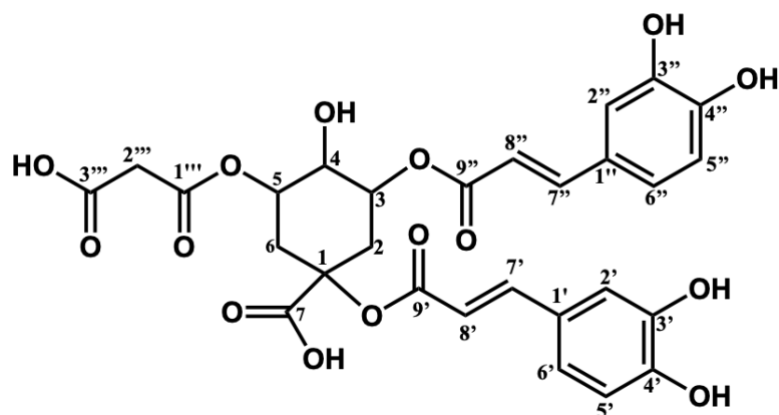


Figur 251: Ekspandert region i 2D ^1H - ^{13}C 1,1-ADEQUATE NMR spekteret av 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**).

6.1.13 1,3-DIKAFFEOYL-5-MALONYLKINASYRE

Det ble isolert 22.4 milligram av forbindelse (**14**) fra den kombinerte fraksjonen VM2S150-151 ved hjelp av stor Sephadex LH-20 kolonne, og 6.2 milligram fra fraksjon VM3+4LS37 ved hjelp av den lille Sephadex LH-20 kolonnen. Det ble tatt 1D ^1H -NMR, 1D ^{13}C CAPT, 2D ^1H - ^{13}C HMBC, 2D ^1H - ^{13}C HSQC og 2D ^1H - ^1H COSY NMR eksperimenter for å bestemme strukturen av forbindelse (**14**) som viste seg å være 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre. Strukturen til forbindelsen er vist i figur 252. Molekylstrukturen ble bekreftet ved hjelp av høyoppløselig ESI-MS analyse med negativ ioniseringsmodus. Den eksakte massen til forbindelsen på 601.11975 samsvarer godt med molekylstrukturen som ble bestemt ved hjelp av NMR ($\delta = 0.67$ ppm). Litteratursøk viste at forbindelsen ikke tidligere er blitt isolert fra planten, men den har blitt isolert fra *Glechomae Herba* av *Glechomae longituba* (63). Det er ingen eksisterende NMR-data for forbindelsen i tidligere litteratur. Sammenligning av NMR-data for 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (tabell 28) med NMR-data for den strukturelt nært beslektede forbindelsen 1,3-dikaffeoylkinasyre (**13**) (tabell 27) viste at stoffene er meget like,

med unntak av malonylsyre-delen tilknyttet 5-posisjon av kinasyre-enheten av (**14**), som ikke finnes i forbindelse (**13**). Basert på litteratursøk ser det ut til at det ikke er blitt utført noe særlig forskning på den biologiske aktiviteten til 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**). Imidlertid har det strukturelt beslektede bisykliske laktonet 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinid vist seg å være moderat cytotoxisk overfor leukemiceller og NRK celler (74).



Figur 252: Struktur av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**) med nummerering.

Strukturformel: $C_{28}H_{26}O_{15}$

Uniisotopisk molekylvekt: 602.1272 g/mol

Acq. Data Name: TFossen_040422_VM2S 150-151_ESI_LC

Internal Sample Id:

Ionization Mode: ESI-

MS Calibration Name: TFANA_ESI- 1000_BH280916

Reduction History: Determine m/z[Peak Detect[Centroid,50,Area];Correct Base[5.0%]];Average[MS[1] 7.600..7.690]-1.0*Average[MS[1] 5.885..5.986];Correct Base[5.0%]

Experiment Date/Time: 4/4/2022 12:43:53

Orifice1 Volt Sweep: -25V

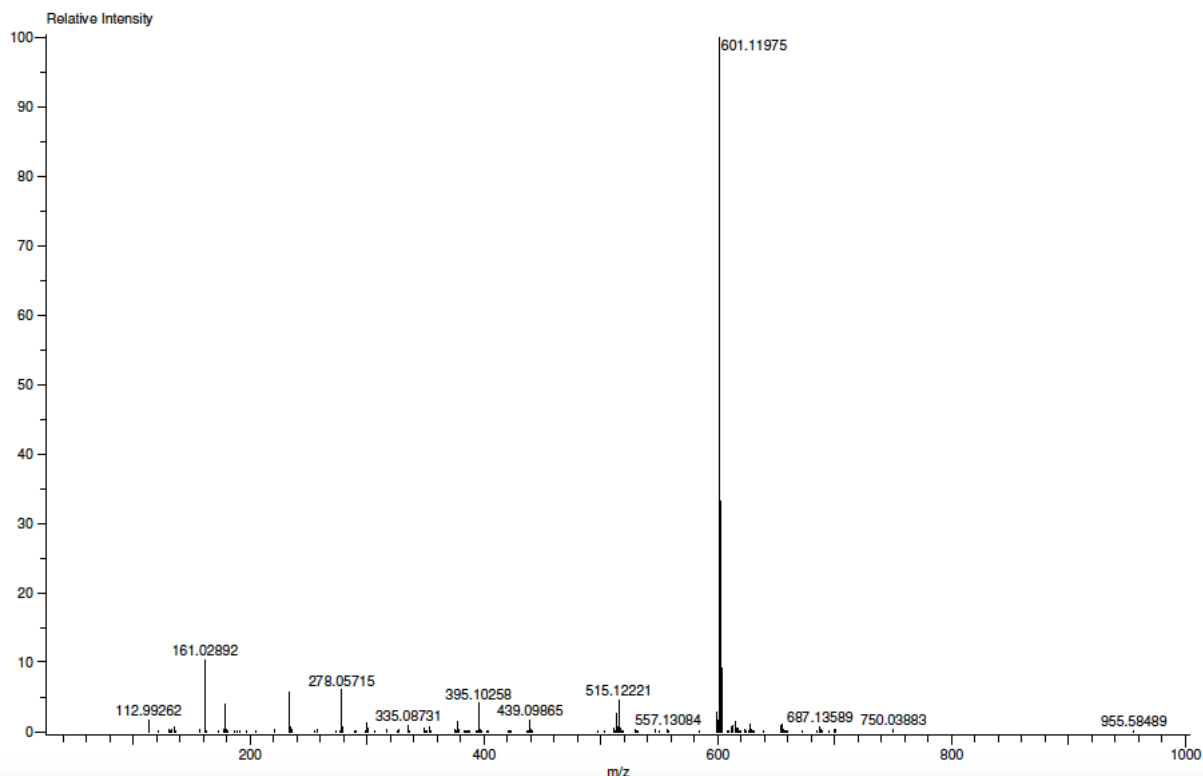
Acquired m/z Range: 30.0..1000.0

Spec. Record Interval: 0.6[s]

Ring Lens Volt: -12[V]

Time of Maximum: 7.653[min]

Operator Name: Accutof



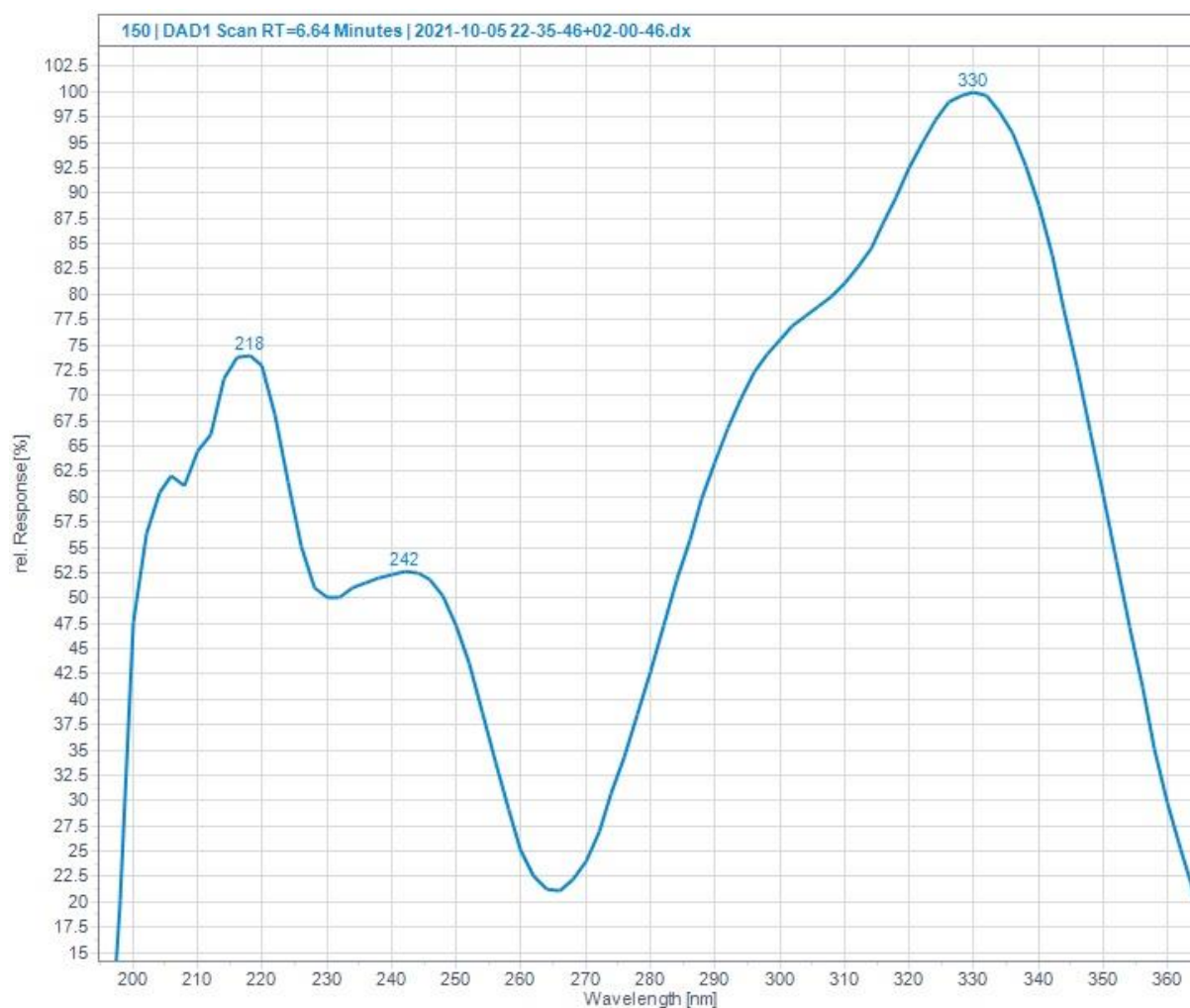
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	¹² C	¹ H	¹⁶ O	Unsaturation Number
601.11975	154973.90	601.11934	0.67	¹² C ₂₈ ¹ H ₂₅ ¹⁶ O ₁₅	28	25	15	16.5

Figur 253: Høyoppløselig ESI MS med negativ ionisering av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**) i fraksjon VM2S150-151.

UHPLC-kromatogrammet og UV-spekteret til 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**) er vist i figur 254-255. Forbindelsen har retensjonstid på 6.64 minutter og UV-maks absorpsjon ved 218 nm, 242 nm og 330 nm. UHPLC-kromatogrammet til fraksjon VM2S151 og VM3+4LS37 er vedlagt i vedlegg 2, figur 300-301.



Figur 254: UHPLC-kromatogram av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**) i fraksjon VM2S150 detektert ved 280 ± 10 nm.

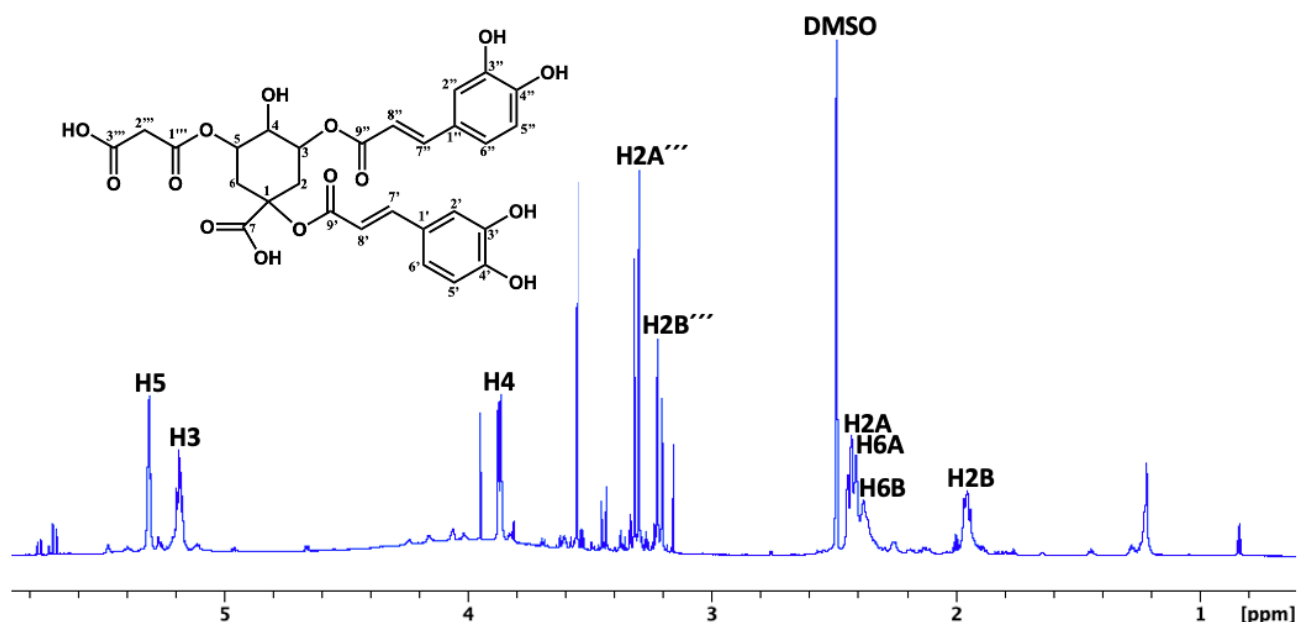


Figur 255: UV-spektrum av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**).

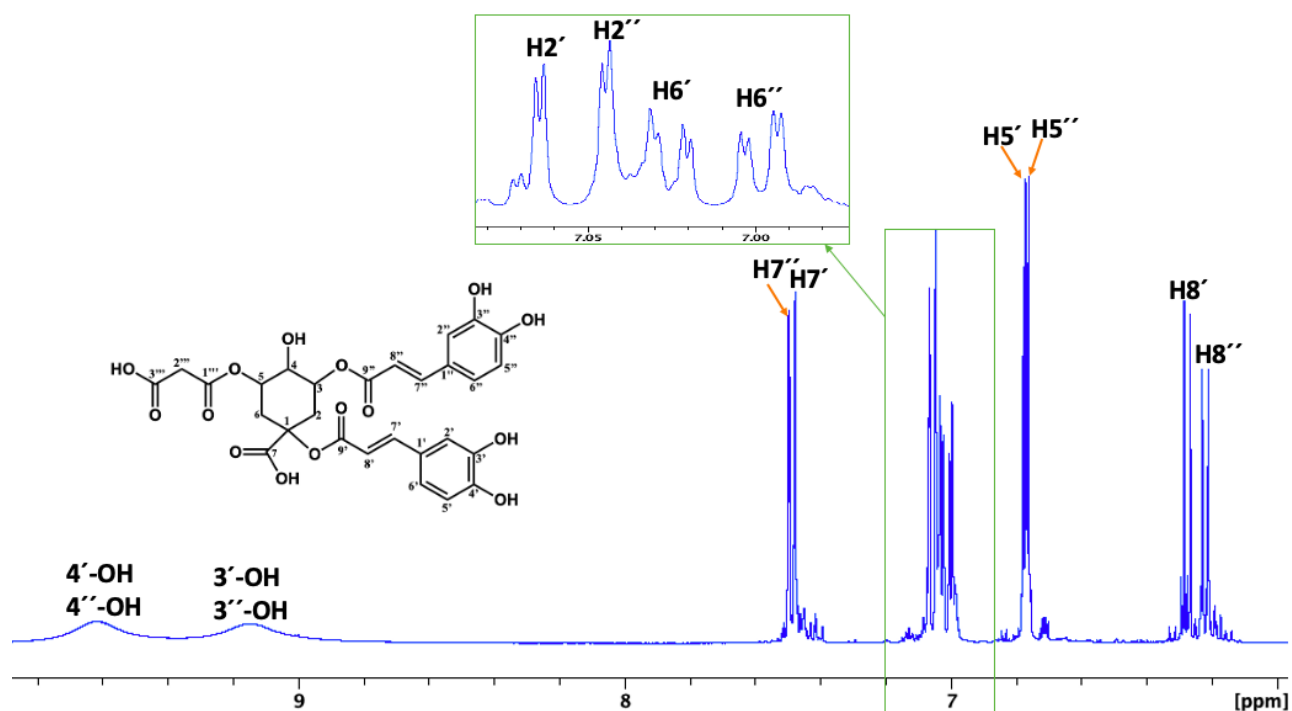
Tabell 28: ^1H og ^{13}C NMR kjemisk skift verdier (ppm) og koblingskonstanter (Hz) av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**) Fraksjon VM2S150+151 isolert fra *Myrrhis odorata* i DMSO- D_6 ved 298K

	δ ^1H 14	δ ^{13}C 14
1		78.70
2A	2.43 ddd 14.0, 4.4, 1.2	35.60
2B	1.95 m	
3	5.18 dt 9.0, 4.3	69.75
4	3.87 dd 8.8, 3.6	68.60
5	5.31 dd, 8.8, 4.3	71.86
6A	2.41 m	31.72
6B	2.38 m	
7		171.97
7-COOH	12.97 s (br)	
1-O-Z-kaffeoyl		
1'		125.48
2'	7.06 d 2.2	115.24
3'		145.69
4'		148.71
5'	6.77 d 8.3	115.90

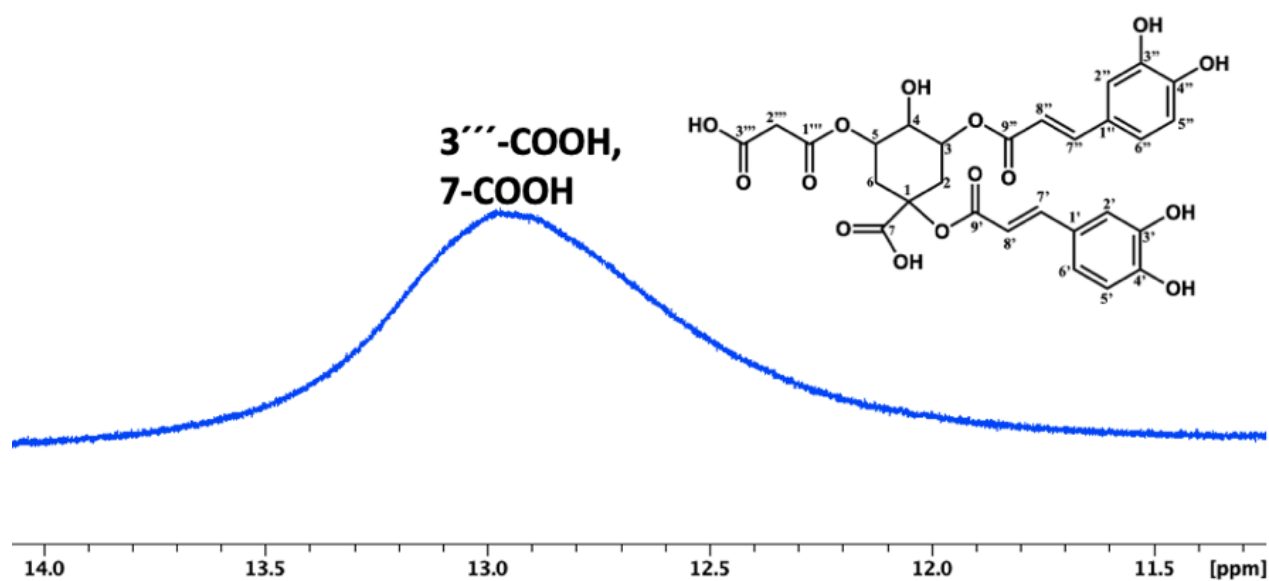
6'	7.03 dd 2.2, 8.3	121.51
7'	7.48 d 15.8	146.15
8'	6.27 d 15.8	113.78
9'		165.31
3'-OH	9.15 s	
4'-OH	9.62 s	
3-O-Z-kaffeoyl		
1''		125.59
2''	7.04 d 2.2	114.96
3''		145.68
4''		148.57
5''	6.76 d 8.3	115.87
6''	7.00 dd 2.2, 8.3	121.51
7''	7.49 d 15.8	145.54
8''	6.22 d 15.8	114.03
9''		166.03
3''-OH	9.15 s (br)	
4''-OH	9.62 s (br)	
5-O-malonyl		
1'''		166.53
2A'''	3.31 d 15.9	41.64
2B'''	3.21 d 15.9	
3'''		167.83
3'''-OH	12.97 s (br)	



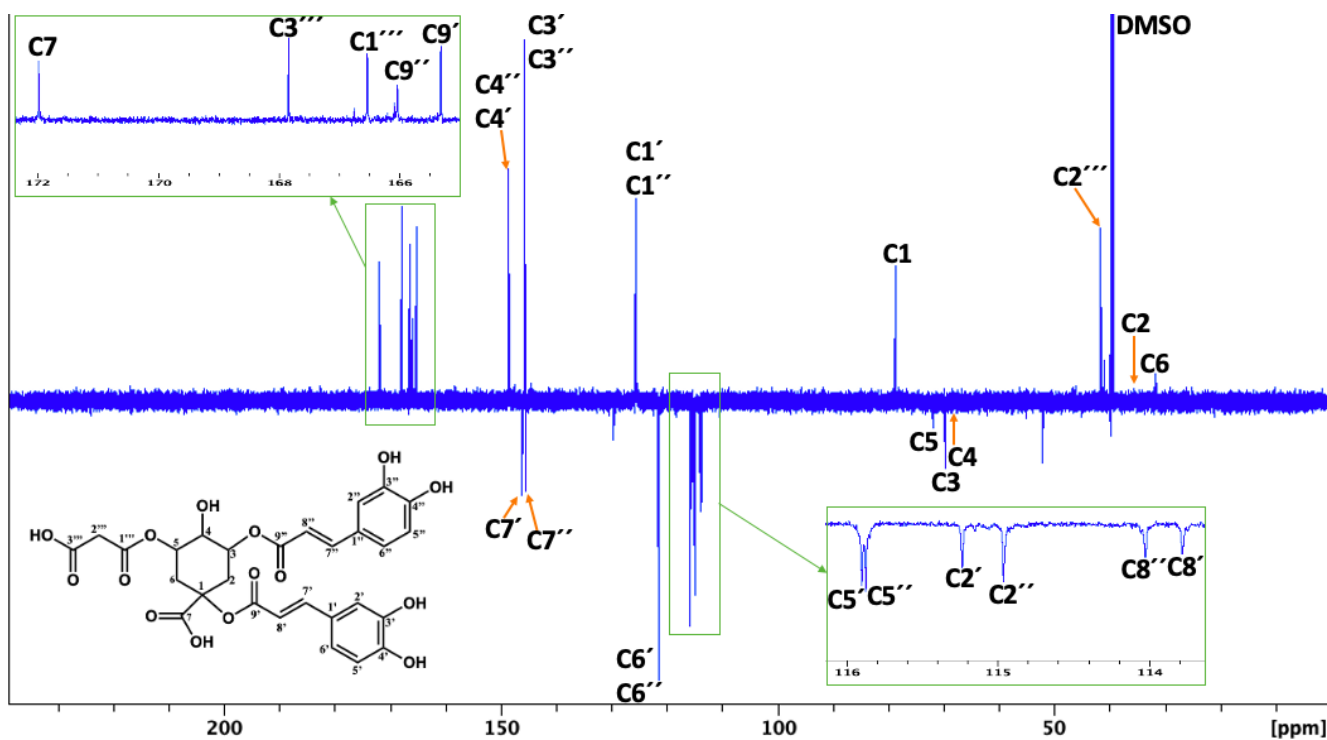
Figur 256: Ekspandert region av 1D ¹H NMR spekter med anordning av signalene til 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinase (**14**).



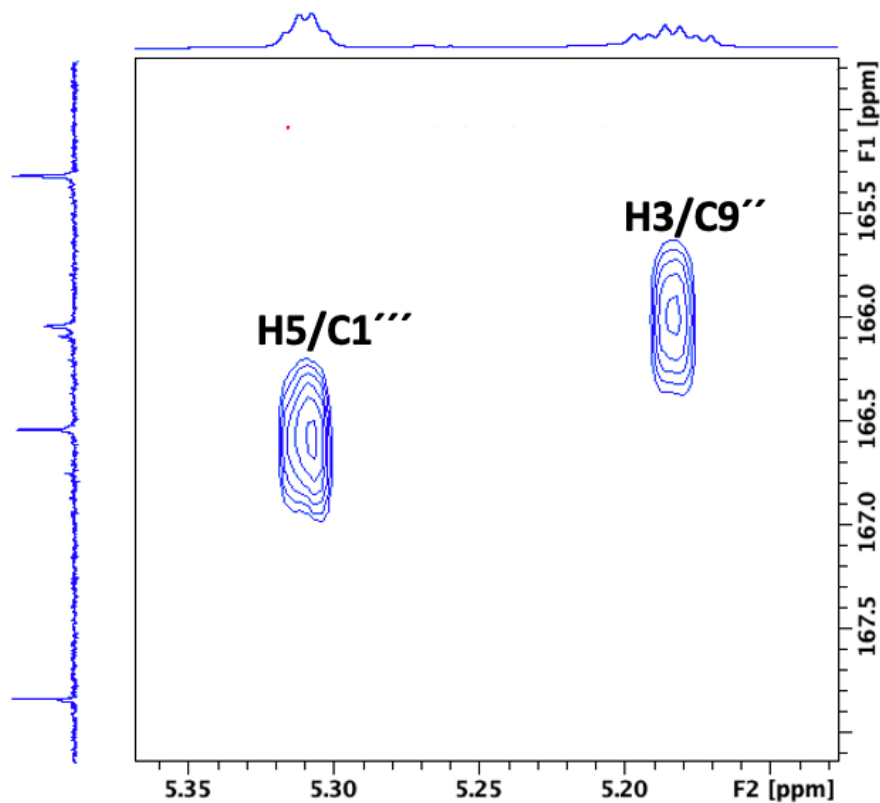
Figur 257: Ekspandert region av 1D ^1H NMR spekter med anordning av signalene til 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasylsyre (**14**).



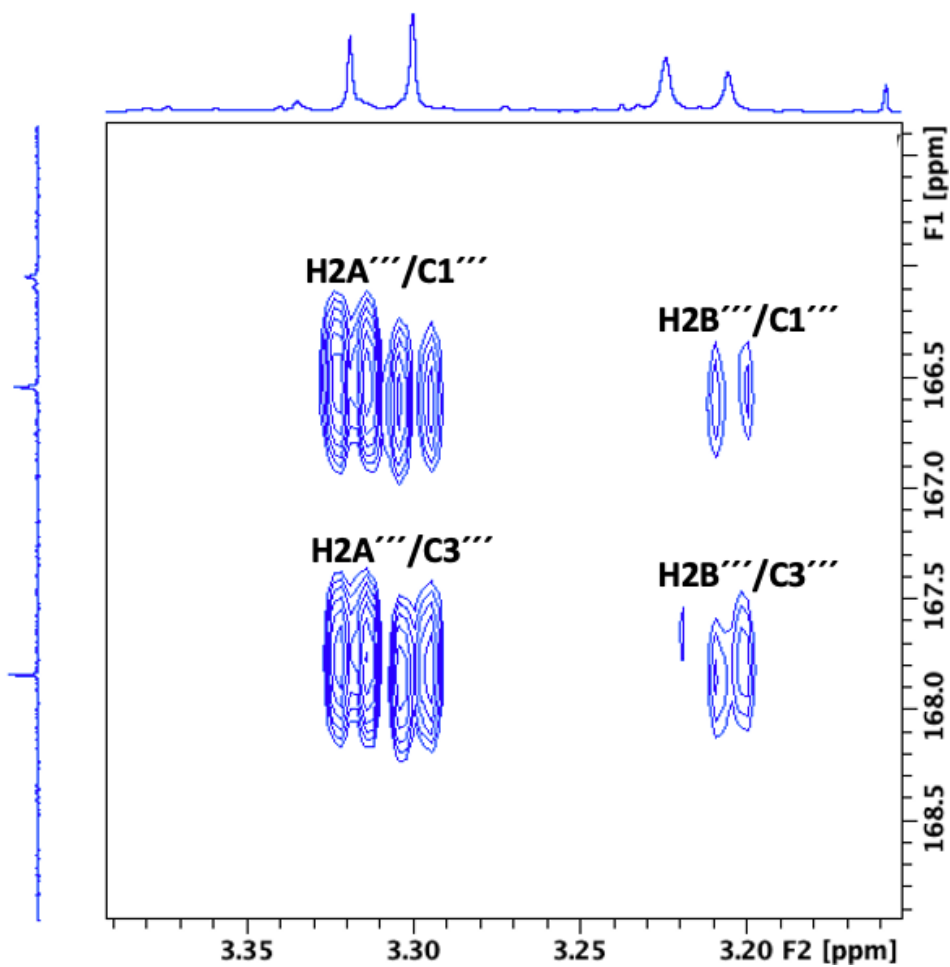
Figur 258: Ekspandert region av 1D ^1H NMR spekter med anordning av OH-protonene til karboksylsyreresyregruppene til 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasylsyre (**14**).



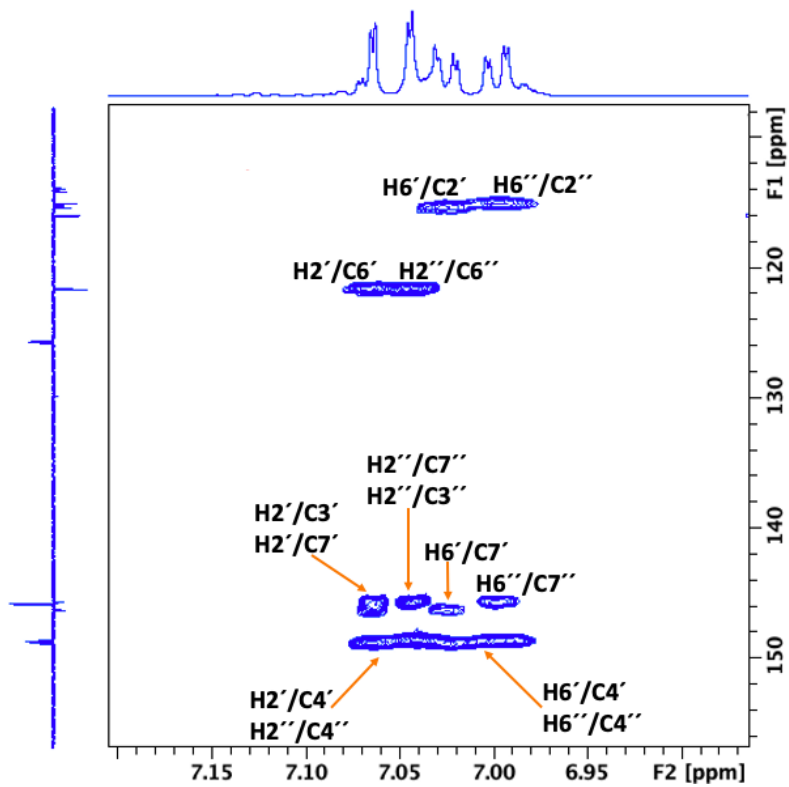
Figur 259: 1D ^{13}C CAPT NMR spekter med fullstendig anordning av signalene til 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**).



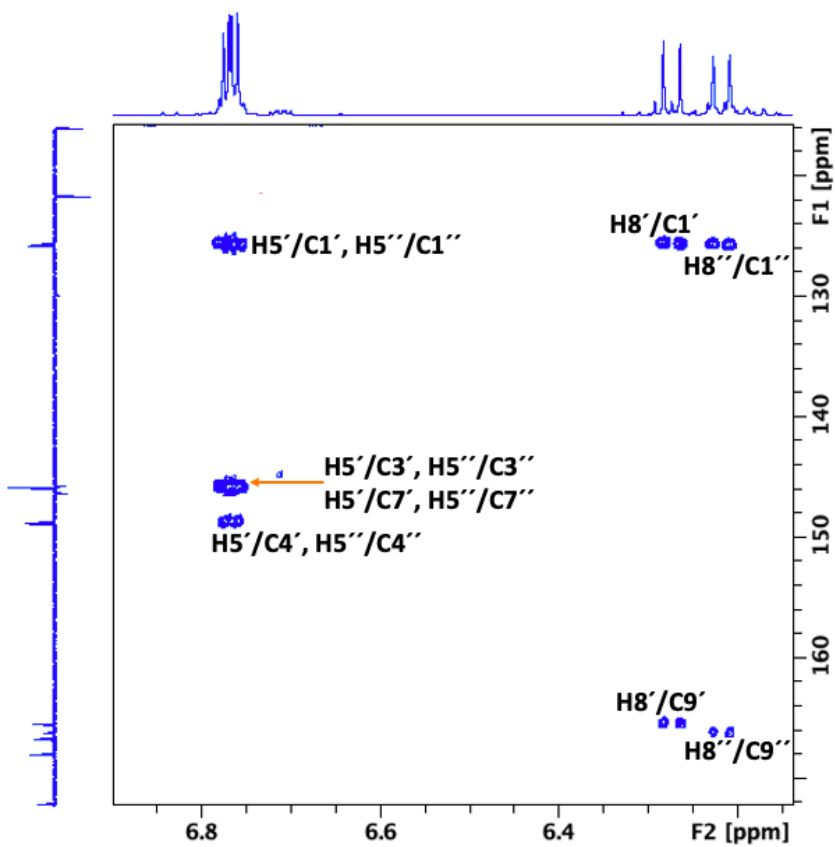
Figur 260: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**) som bekrefter den ene kaffeoyl-enheten sitter i 3-posisjon, og malonyl-enheten sitter i 5-posisjon.



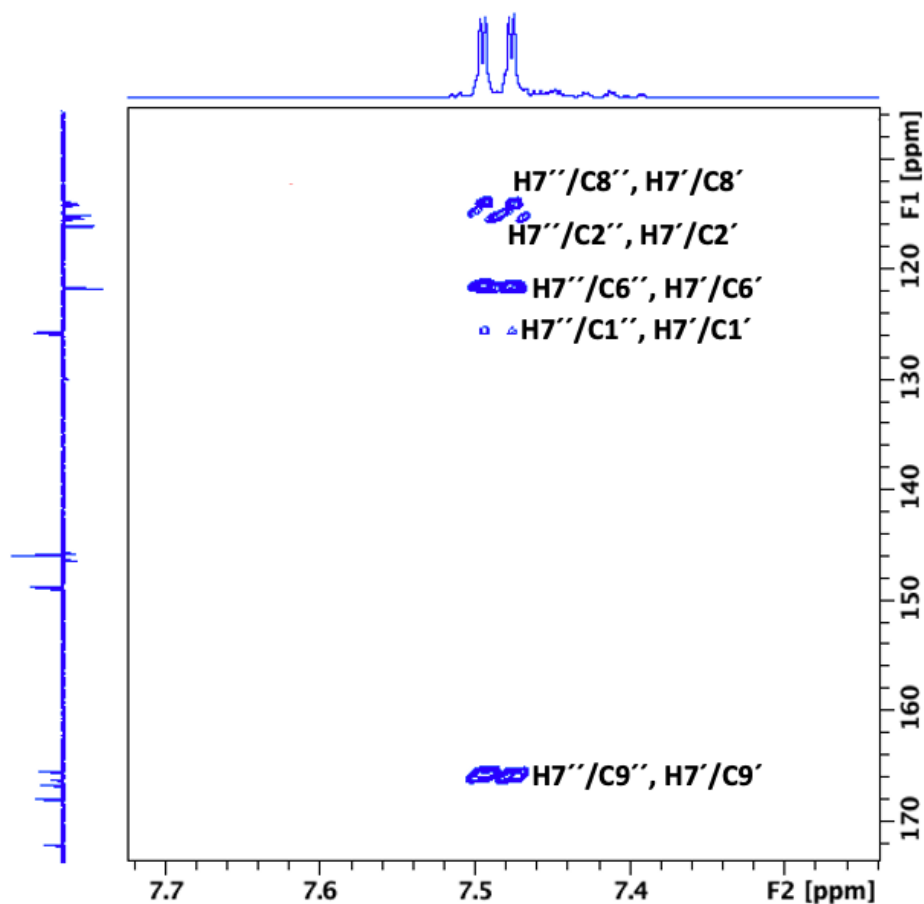
Figur 261: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**) som viser kryssstoppene mellom $\text{H2A}'''/\text{2B}'''$ og $\text{C1}'''$ og $\text{C3}'''$ i malonyl-enheten.



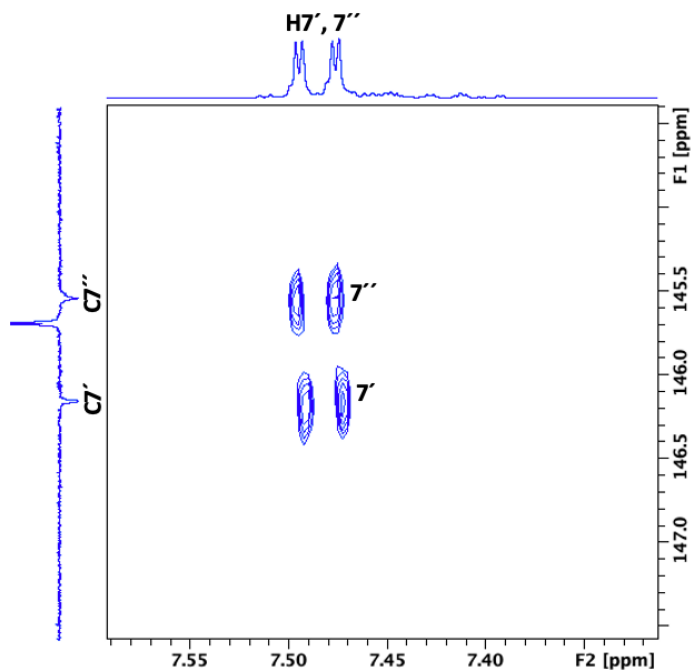
Figur 262: Ekspandert aromatisk region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinase (14).



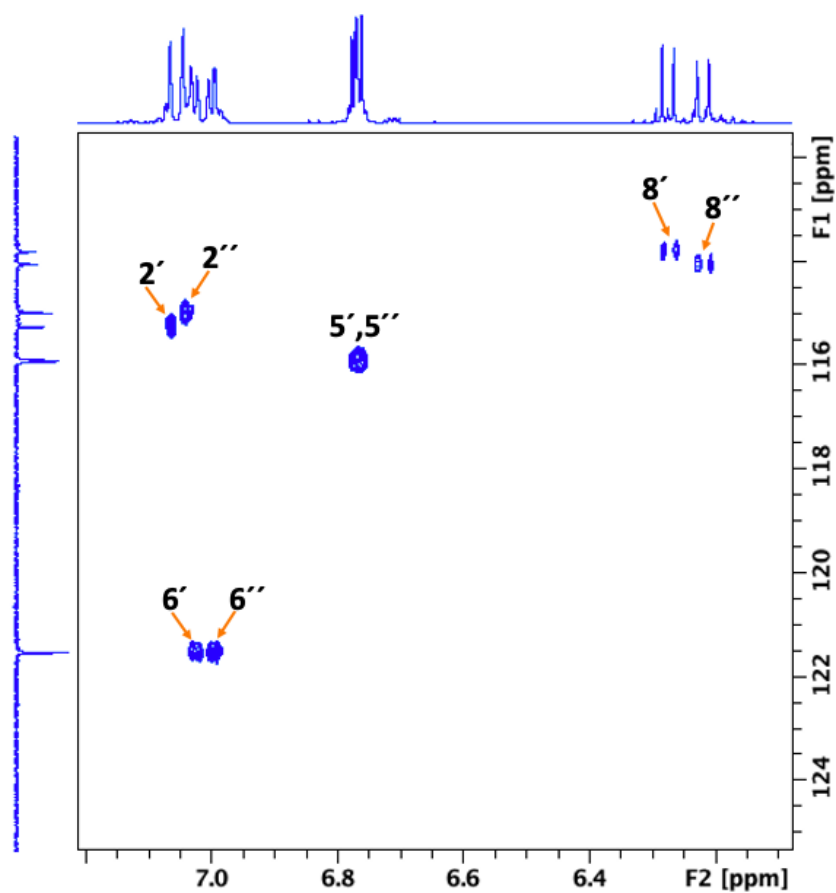
Figur 263: Ekspandert aromatisk region av 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinase (14).



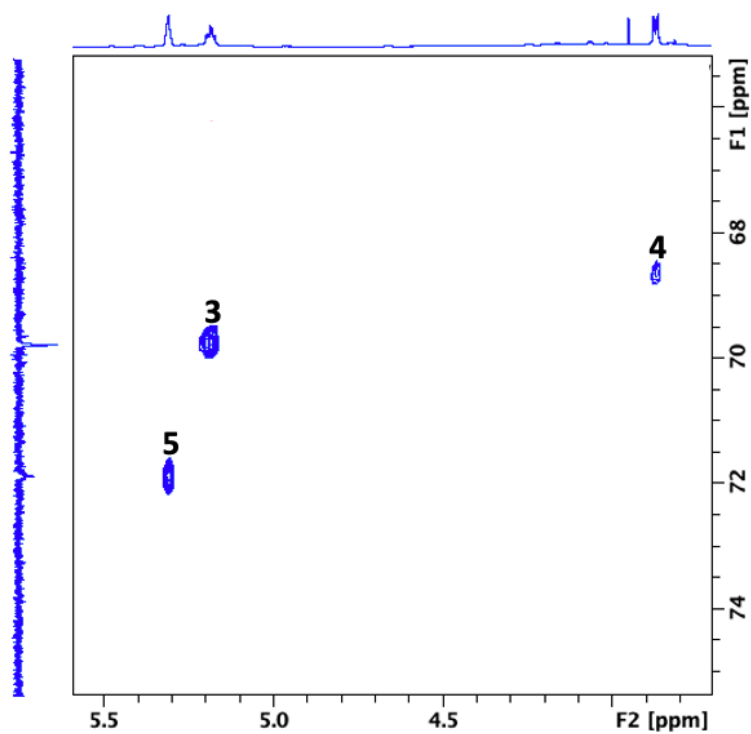
Figur 264: Ekspandert aromatisk region av $2D$ 1H - ^{13}C HMBC NMR spekteret av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**).



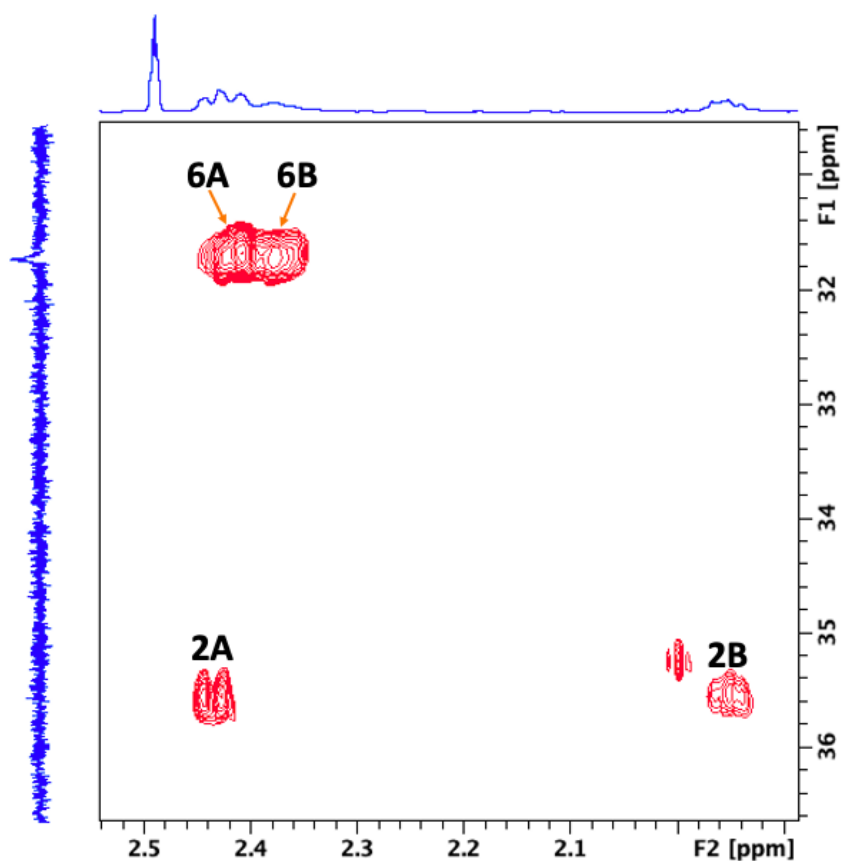
Figur 265: Ekspandert aromatisk region av $2D$ 1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**).



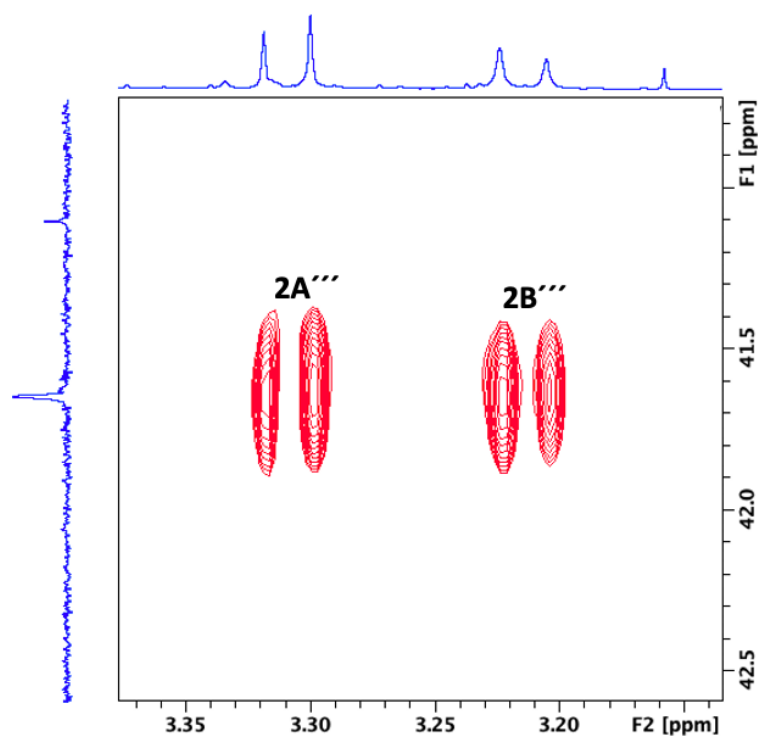
Figur 266: Ekspandert aromatisk region av $2D$ 1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**).



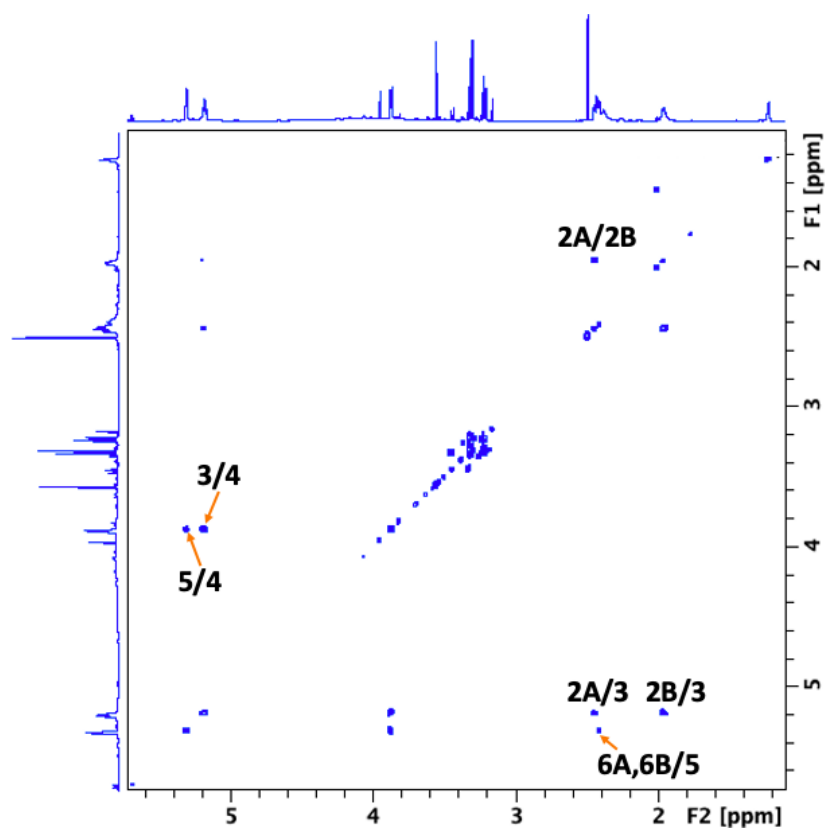
Figur 267: Ekspandert kinasyre-region av $2D$ 1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (**14**).



Figur 268: Ekspandert alifatisk region av 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinase (**14**).



Figur 269: Ekspandert region av 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekteret av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinase som viser signalene for CH_2 -gruppen i malonylenheten (**14**).



Figur 270: Ekspandert alifatisk region av 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekteret av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinase (**14**).

7. Cytotoksisk aktivitet mot leukemiceller og NRK-celler

Cytotoksisk aktivitet av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-*O*-(6''-*O*-malonyl- β -glukopyranosid)) (**5**), klorogensyre (**9**) undulatosid A (**10**), 1,3-dikaffeoylkinase (**13**) og 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinase (**14**) overfor leukemiceller (MOLM-13 celler) og friske celler (NRK-celler) ble undersøkt av samarbeidspartner ledet av Prof. Lars Herfindal, og utført av Christina Berge Vik. Resultatene ble rapportert som EC_{50} , som betegner stoffkonsentrasjonen som er nødvendig for å drepe 50% av cellene etter en gitt tid (55).

Akutt myeloid leukemi (AML) er en type blodkreft, hvor ikke modne blodceller i benmargen (myeloblaster) deler seg ukontrollert og fortrenger den normale produksjon av røde blodceller, hvite blodceller og blodplater (58). MOLM-13 cellelinjen er isolert fra det perifere blodet til en 20 år gammel mann med akutt myeloid leukemi (AML) og etter initial myelodysplastisk syndrom (MDS) (56). NRK-celler er friske nyreepitelceller fra brunrotte

(*Rattus norvegicus*) (57), som brukes som kontrollceller for å teste om hvorvidt de undersøkte forbindelsene har selektiv cytotoxisk aktivitet overfor leukemiceller sammenlignet med friske normale celler. MOLM-13 celler og NRK celler inkuberes i en løsning av utvalgte stoffer med kjent konsentrasjon i 24 timer og 72 timer. Forsøkene er beskrevet i detalj i mastergradsoppgaven til Vik, Christina (2022): Investigation of the antileukemic activity of natural products from selected Norwegian and African plants, Klinisk Institutt 2, Universitet i Bergen (72) som utførte samtlige av disse forsøkene. Tabell 29 viser EC₅₀ resultatene for MOLM-13 celler og NRK celler fra analysen av de utvalgte naturproduktene. Basert på den store differansen mellom EC₅₀ for MOLM-13 celler og for NRK celler tyder det på at forbindelsene (5), (9), (13) og (14) spesielt etter 72 timers eksponering har selektiv cytotoxiskitet mot leukemiceller sammenlignet med friske celler. Dette indikerer at forbindelsene kan ha potensiale som legemiddelkandidater i behandling av leukemi.

Tabell 29: EC₅₀ verdier (µM) for utvalgte naturprodukter overfor MOLM-13 celler og NRK celler. EC₅₀ verdier representerer gjennomsnittet mellom to paralleller ± maksimum- og minimums-verdier for hver parallell.

Forbindelse	EC ₅₀ -verdier (µM) MOLM-13		EC ₅₀ -verdier (µM) NRK	
	24 timer	72 timer	24 timer	72 timer
Forbindelse (5)	152.19 ± 3.11	123.85 ± 32.30	311.97 ± 0.55	298.37 ± 23.34
Undulatosid A (10)	n.d.*	n.d.*	n.d.**	n.d.**
1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (14)	n.d.**	111.69 ± 0.84	n.d.**	293.03 ± 67.37
1,3-dikaffeoylkinasyre (13)	n.d.**	190.71 ± 22.88	n.d.**	590.50 ± 29.56
Klorogensyre (9)	n.d.**	213.94 ± 29.31	n.d.**	1628.58 ± 27.84

n.d* betyr at EC-50 er ikke oppnådd, og dermed ikke estimert.

n.d.** betyr at eksperimentet ble ikke utført.

8. Konklusjon

I denne masteroppgaven ble det totalt isolert 14 naturstoffer fra den overjordiske delen av planten *Myrrhis odorata*. Plantematerialet ble ekstrahert med metanol (HPLC-kvalitet), etterfulgt av væske-væske ekstrahering med petroleumeter og etylacetat. Det resulterte i tre fraksjoner; vannfraksjon, etylacetatfraksjon og petroleumeterfraksjon, hvorav vannfasen og etylacetatfasen ble videre opparbeidet. Etter ekstrahering ble det benyttet flere avanserte kromatografiske metoder, som kolonnekromatografi og preparativ HPLC, noe som resulterte i at 14 rene naturstoffer, hvorav fire nye ble isolert og karakterisert. Naturstoffene ble strukturbestemt ved bruk av en kombinasjon av flere 1D og 2D NMR-spektroskopiske metoder og høyresolusjon massespektrometri.

Det ble isolert fire helt nye naturstoffer, hvor forbindelsene 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5) og 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6) ble isolerte ved hjelp av Sephadex LH-20 kolonnekromatografi og forbindelsene 6'-malonylundulosid A (11) og metylmalonylundulosid A (12) ble isolert ved hjelp av preparativ HPLC.

Mange av de isolerte stoffene er ikke kjent i spansk kjørvel tidligere, i tillegg til stoffene som er helt nye. Det ble også isolert undulosid A (10) som er et kjent naturstoff i skjermplantefamilien. Forbindelsen ble isolert fra blant annet *P. austriacum*, men har ikke blitt isolert fra *Myrrhis odorata* tidligere. Det ble isolert flavonoider som er tidligere kjent fra planten, og det gjelder luteolin-7-O- β -glukopyranosid (1) og apigenin-7-O- β -glukopyranosid (3). Flere kanelsyrederivater ble isolert for første gang i *Myrrhis odorata*, og det gjelder forbindelsene (*E*)-sinapinsyre 4-O- β -glukopyranosid (7), (*E*)-kumarsyre 4-O- β -glukopyranosid (8) og klorogensyre (9). I tillegg ble det isolert 1,3-dikaffeoylkinasyre (13) og 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (14) for første gang i planten. Forbindelsene (5), (9), (10), (13) og (14) ble testet mot leukemi av Christina Berge Vik i forskningsgruppen til Prof. Lars Herfindal. Resultatene viste at alle naturstoffene, med unntak av forbindelse (10), hadde signifikant og selektiv antileukemiaktivitet, noe som kan indikere potensiale som legemiddelkandidater i fremtidig behandling av leukemi.

Tabell 30: Oversikt over naturprodukter isolert og strukturbestemt i dette prosjektet, og om stoffene er funnet før i *Myrrhis odorata* eller Apiaceae Lindl

Nye naturstoffer
1. 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5)
2. 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6)
3. 6'-malonylundulosid A (11)
4. Metylmalonylundulosid A (12)
Naturstoffer som ikke funnet i <i>Myrrhis odorata</i> eller Apiaceae tidligere
5. Klorogensyre (9)
6. 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (14)
7. 1,3-dikaffeoylkinasyre (13)
8. E-sinapinsyre 4-O- β -glukopyranosid (7)
9. E-kumarsyre 4-O- β -glukopyranosid (8)
10. Luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glucopyranoside) (4)
11. Apigenin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (2)
Naturstoffer funnet i andre arter i Apiaceae tidligere
12. Undulosid A (10)
Naturstoffer funnet i <i>Myrrhis odorata</i> tidligere
13. Apigenin 7-O- β -glucopyranoside (3)
14. Luteolin 7-O- β -glucopyranoside (1)

8.1 Videre arbeid

Hensikten med denne oppgaven var å isolere et bredt utvalg av naturstoffer fra *Myrrhis odorata*. Det ble isolert og strukturbestemt flere naturstoffer i dette masterprosjektet. Samtlige naturstoffer kommer til å bli testes for antiviral aktivitet, spesielt mot SARS CoV-2 som er årsaken til pågående COVID 19 pandemi. Denne dimensjonen av arbeidet er av signifikant interesse. Forskningsgruppen vår vil i nær fremtid i multidisiplinært samarbeid undersøke potensialet for de isolerte naturstoffene i dette prosjektet som inhibitorer av virus entry, viral replikasjon og viral release av SARS CoV-2, med henblikk på å utvikle nye effektive medikamenter i behandling av COVID-19 pasienter. I tillegg vil de isolerte naturstoffene bli testet med hensyn til cytotoxisk aktivitet overfor leukemiceller og normale celler med den

målsetning å utvikle nye kreftlegemidler. Cytotoksisk aktivitet av 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid)) (5), klorogensyre (9), undulatosid A (10), 1,3-dikaffeoylkinasyre (13) og 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyre (14) mot leukemiceller og normale friske celler (NRK celler) er blitt utført av forskningsgruppen ledet av Prof. Lars Herfindal. Resultatene viste at flertallet av de undersøkte naturstoffene viste selektiv cytotoxiskitet mot leukemiceller (MOLM-celler) sammenlignet med friske celler. I nær fremtid kommer samtlige isolerte naturstoffer fra dette mastergradsprosjektet til å bli teste med hensyn til cytotoxisk aktivitet overfor leukemiceller og normale celler som referanse for å undersøke deres potensiale som aktive prinsipper i fremtidige kreftlegemidler. Det vil også i denne sammenheng være nødvendig med mer omfattende biologisk testing med lengre varighet, samt dyreforsøk for å kunne fastslå potensialet av naturstoffene som strukturelle utgangspunkt for fremtidige kreftlegemidler. I denne sammenheng bør det også utføres forskning på deres metabolisering, toksisitet og eventuelle interaksjoner med andre legemidler. Flere av de isolerte stoffene i denne oppgaven som har strukturelle likhetstegn med forbindelser som tidligere har vist signifikant anti-leukemi aktivitet kan mulig resultere i nye farmakologisk interessante funn. Dette gjelder blant annet de i dette prosjektet nyoppgadete kromenonderivatene som 2-metyl-5-hydroksy-7-metoksykromen-6-(3'-metyl-4'-hydroksybutyl-(4'-O- β -glukopyranosid) (6), 6'-malonylundulatosid A (11) og metylmalonylundulatosid A (12). Det kan lede til funn av nye mulige medikamenter, eller forbindelser som kan benyttes som lead-molekyler for oppdagelse av virkestoffer i fremtidige medisiner.

De nye chirale naturstoffene trenger å bli analysert med CD-spektroskopi, som er en metode for å bestemme stereokjemien til kirale organiske forbindelser. Dette vil bli prioritert og utført i svært nær fremtid.

Etter personlig kommunikasjon med Dorentina Osmani som er stipendiat i forskningsgruppen vår og tester naturstoffenes anti Covid-19 aktivitet har hun informert om at testresultatene fra en kromenon-derivat, som tidligere har blitt isolert av en masterstudent i forskningsgruppen vår (77), har vist seg å være en inhibitor av SARS CoV-2 virus entry. Dette indikerer at kromenon-derivatene isolert i dette masterprosjektet kan ha potensiale i medisinsk forskning for å utvikle nye medikamenter i behandling av COVID-19 pasienter og følgelig vil potensialet til spesielt de nye naturstoffene som ble oppdaget i dette mastergradsprosjektet, og

som vi følgelig har eksklusiv internasjonal tilgang til i verden, som inhibitorer av SARS CoV-2 virus entry, viral replikasjon og virus release derfor blir undersøkt i nær fremtid.

9. Referanser

1. Alamgir ANM. Methods of Qualitative and Quantitative Analysis of Plant Constituents. Cham: Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 721-804.
2. Chémat F, Strube J. Green extraction of natural products: theory and practice. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag; 2015.
3. Samuelsson G. Drugs of natural origin: a textbook of pharmacognosy. 5th rev. ed. ed. Stockholm: Apotekarsocieteten; 2004.
4. Heinrich M. Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. 2nd. ed. ed. Edinburgh: Elsevier, Churchill Livingstone; 2012.
5. Sigma-Aldrich Sikkerhetsdatablad i henhold til Forhordning (EF) nr. 1907/2006. 1-23 pp. [Internett] [oppdatert: 02. Juni 2021] Tilgjengelig fra: https://app.econline.com/documents/msds/1002356/20269296_286_b0e352ede0fff5fbb4b2dcbd6052f2a0.pdf
6. Portman CF, Samuel & Ziolk, Thomas & Müller, Jörg & Kleinhans, Sabine & Arpagaus, Cordin og Schönenberger, Gerhard. The Laboratory Assistant 2007. [Hentet: 9. september 2021] Tilgjengelig fra: <https://www.yumpu.com/en/document/read/12142986/the-laboratory-assistant-buchi>
7. Ballinger JT, Shugar GJ. Chemical technicians' ready reference handbook. 5 utgave. New York: McGraw-Hill; 2011.
8. Rolv.no. Urtekildens planteleksikon. Spansk kjørvel *Myrrhis odorata* [Internett] [Oppdatert 17-10.2020; hentet 16. september 2021]. Tilgjengelig fra: https://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/myrr_odo.htm
9. Artsdatablad. Spansk kjørvel *Myrrhis odorata* (L.) Scop [Internett] [Hentet 16. september 2021] Tilgjengelig fra: <https://www.artsdatabanken.no/taxon/Myrrhis%20odorata/100343>
10. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Legemiddelanalyse. Bergen: Fagbokforl.; 2004.
11. Catalogue of Life. World Plants. Species Details: *Myrrhis odorata* (L.) Scop. [Internet]. [Hentet 7. September 2021] Tilgjengelig fra: <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/45DGC>
12. Dobravalskytė D, Venskutonis PR, Zebib B, Merah O, Talou T. Essential oil composition of *Myrrhis odorata* (L.) Scop. Leaves grown in Lithuania and France. The Journal of essential oil research. 2013;25(1):44-8.

13. Ferrer DB. Bioactive compounds and antioxidant properties of Myrrhis odorata deodorized residue leaves extracts from Lithuania and France origins. Shriganganagar2016. P. 43-8.
14. Harborne JB, Harborne JB, Williams CA. Flavonoid patterns in the fruits of the umbelliferae. Oxford1972. P. 1741-50.
15. Uusitalo JS, Uusitalo JS, Jalonen JE, Aflatuni A, Luoma SL. Essential Leaf Oil Composition of Myrrhis odorata (L.) Scop. Grown in Finland. [Wheaton, IL] :1999. p. 423-5.
16. Akash MSH, Rehman K. Essentials of Pharmaceutical Analysis. Singapore: Singapore: Springer Singapore Pte. Limited; 2020.
17. Greibrokk T, Karlsen J, Rasmussen KE, Lundanes E. Kromatografi: separasjon og deteksjon. 3. utg. Ed. Oslo: Universitetsforlaget; 1994.
18. Sigma-Aldrich. Amberlite XAD Polymeric Resins Sigma Prod. Nos. XAD-4, XAD-7, XAD-16, 1-0337,1-0393, and 1-0379 [Internet]. Saint Louis, Missouri 63103 USA: Sigma Aldrich; 1998 [oppdatert 20. Mars 1998; Hentet 2021 16. 23 september]. Tilgjengelig fra: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/xad7pis.pdf
19. Liu W. J. H. Traditional herbal medicine research methods: identification, analysis, bioassay, and pharmaceutical and clinical studies. Hoboken, N.J: Wiley; 2011.
20. Sciences Cl. Sephadex LH-20 resin for organic solvents USA: Cytiva; 2021 [Hentet 23 september 2021] Tilgjengelig fra: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/chromatography/resins/size->
21. Bio-Sciences GH. Sephadex LH-20 Uppsala, Sverige2007 [Hentet: 27. september 2021] Tilgjengelig fra: <http://www.prep-hplc.com/Uploads/ueditor/file/20190725/5d3966e6e085f.pdf>
22. Jandera P, Jandera P, Churáček J. Gradient elution in column liquid chromatography: theory and practice. Amsterdam: Elsevier; 1985.
23. Helmut Schulenberg-Schell, Andreas Tei, Florian Rieck og Ronald Guilliet. Principles and Practical Aspects of Preparative Liquid Chromatography A Primer USA: Agilent Technologies; 2019 [Hentet 28. September 2021] Tilgjengelig fra: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/primer-preparative-liquid-chromatography-5994-1016EN-agilent.pdf>
24. Williams DH, Fleming I. Spectroscopic methods in organic chemistry. 6th ed. Ed. London: McGraw-Hill; 2008.

25. Friebolin H. Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy. 5th completely rev. and enl. Ed. Ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2011.
26. Pavia DL. Introduction to spectroscopy. 5th ed. Ed. Stamford, Conn: Cengage Learning; 2015.
27. Pedersen B. Kjernemagnetisk resonans (NMR). [Internett]. Oslo: Store Norske Leksikon; 2017 [Oppdatert: 27. november 2017; hentet 7. oktober 2021] Tilgjengelig fra: [https://snl.no/kjernemagnetisk_resonans_\(NMR\)](https://snl.no/kjernemagnetisk_resonans_(NMR))
28. Berger S, Braun S, Kalinowski H-O. 200 and more NMR experiments: a practical course. 3rd ed. ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2004.
29. Pochapsky TC, Pochapsky SS. NMR for physical and biological scientists. New York: Taylor & Francis; 2007.
30. Bax A, Davis DG. Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy. Journal of magnetic resonance (1969). 1985;63(1):207-13.
31. The Hebrew University of Jerusalem NMR Lab. ¹H-¹H ROESY. [Internett] Israel: The Hebrew University of Jerusalem; [Hentet 19. Oktober 2021] Tilgjengelig fra: <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/2d/roesy/roesy.html>
32. Columbia Uo. HSQC and HMBC New York, USA: Columbia university; 2021
33. Nyberg NT, Duus JØ, Sørensen OW. Editing of H2BC NMR spectra. Magnetic Resonance in Chemistry. 2005;43(12):971-4.
34. Petersen BO, Vinogradov E, Kay W, Würtz P, Nyberg NT, Duus JØ, Sørensen OW. H2BC: a new technique for NMR analysis of complex carbohydrates. Carbohydrate Research. 2006;341(4):550-6.
35. Saurí J, Bermel W, Buevich AV, Sherer EC, Joyce LA, Sharaf MHM, Schiff Jr PL, Parella T, Williamson RT, Martin GE. Homodecoupled 1,1- and 1,n-ADEQUATE: Pivotal NMR Experiments for the Structure Revision of Cryptospirolepine. Angewandte Chemie International Edition. 2015;54(35):10160-4.
36. Bain AD, Hughes DW, Anand CK, Nie Z, Robertson VJ. Problems, artifacts and solutions in the INADEQUATE NMR experiment. Magnetic Resonance in Chemistry. 2010:n/a-n/a.
37. Cisowski W. Flavonoid compounds in Myrrhis odorata (L.) Scop. Poznań, Poland :1985. p. 13-9.
38. Chiruvella KK. Phytochemical and antimicrobial studies of methyl angolensate and luteolin-7-O-glucoside isolated from callus cultures of Soymida febrifuga. Monterey Park, CA :2007. p. 269-78.

39. Nawwar MAM, Nawwar MAM, El-Mousallamy AMD, Barakat HH, Buddrus J, Linscheid M. Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. Oxford 1989. p. 3201-6.
40. Costa M, Dias TA, Brito A, Proença F. Biological importance of structurally diversified chromenes. [Amsterdam] :2016. p. 487-507.
41. Yao H, Duan J, Zhang C, Li Y, Liu C. Coumaric Acid Glucosides from the Chinese Fern *Polypodium hastatum*. London :2016. p. 669-71.
42. Li Y, Li K, Duan J, Zhang C, Yao H. A Novel Heterodimer of Coumaric Acid Glucosides from the Chinese Fern *Polypodium hastatum*. London :2018. p. 1041-3.
43. Fan S-h, Wang Y-y, Lu J, Zheng Y-l, Wu D-m, Li M-q, Hu B, Zhang Z-f, Cheng W, Shan Q, Sarkar D. Luteoloside Suppresses Proliferation and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Cells by Inhibition of NLRP3 Inflammasome. *PLoS One*. 2014;9(2):e89961-e.
44. Cui J, Zeng S, Zhang C. Anti-hyperglycaemic effects of Burdock (*Arctium lappa* L.) leaf flavonoids through inhibiting α -amylase and α -glucosidase. [Oxford] :2022. p. 541-51.
45. Hadrich F, Chamkha M, Sayadi S. Protective effect of olive leaves phenolic compounds against neurodegenerative disorders: Promising alternative for Alzheimer and Parkinson diseases modulation. Exeter: 2022. p. 112752.
46. Kim CS, inventor; Chosun University, Industry-Academic Cooperation Foundation, assignee. Composition comprising luteolin 7-O-(6"-malonyl glucoside) derived from *Anthriscus sylvestris* leaf as active ingredient for preventing or treating arthritis and autoimmune disease. Republic of Korea patent KR2000714. 2019. [Hentet 26.03.2022] Tilgjengelig fra: CAplus
47. Zheng Y, Liu J, Cao ML, Deng JM, Kou J. Extrication process of chlorogenic acid in Crofton weed and antibacterial mechanism of chlorogenic acid on *Escherichia coli*. *J Environ Biol*. 2016;37(5):1049-55.
48. Kono Y, Kashine S, Yoneyama T, Sakamoto Y, Matsui Y, Shibata H. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998;62(1):22-7.
49. Heinrich M. Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2004.

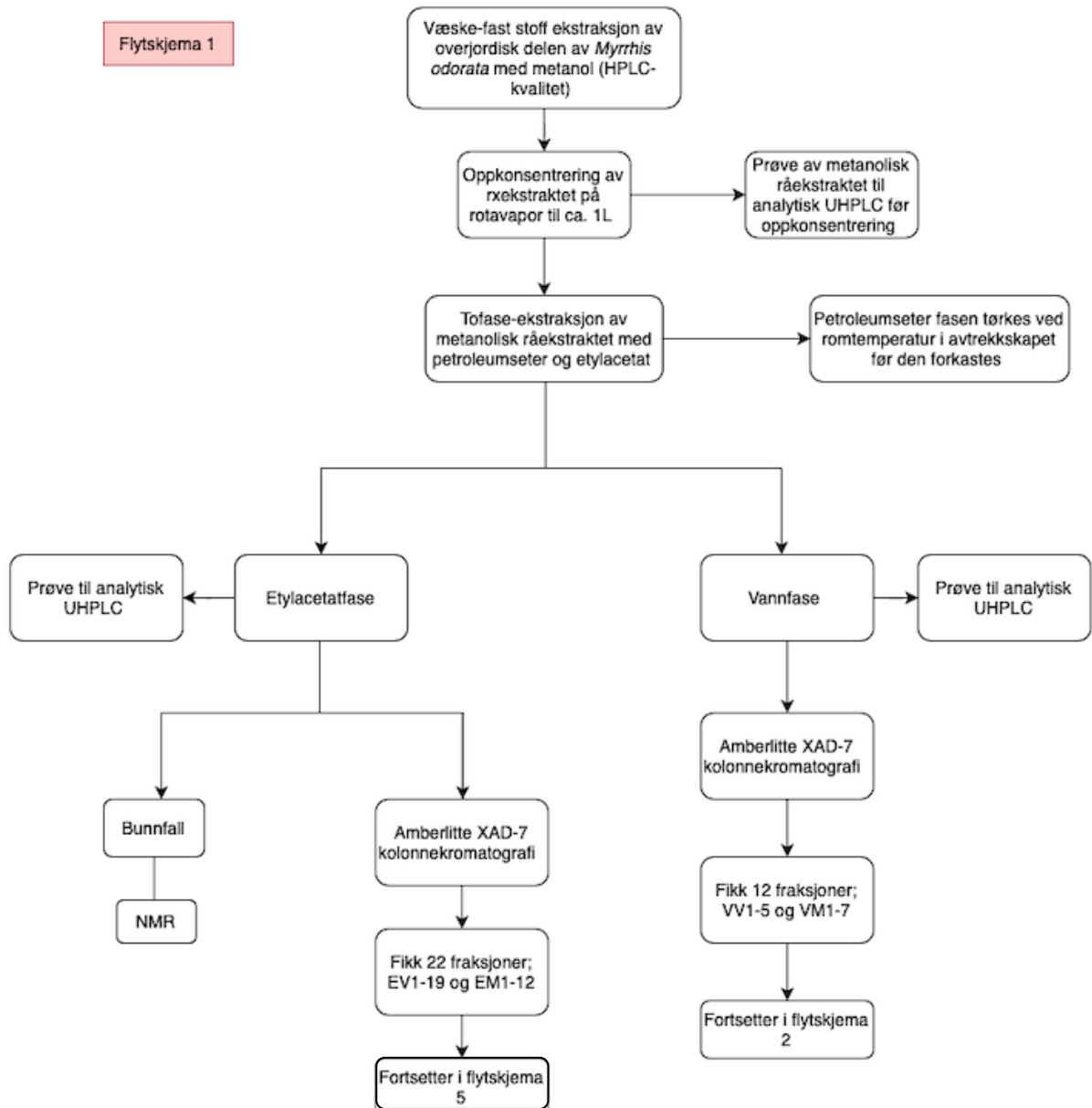
50. Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomas-Barberan FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods Hum Nutr.* 2004;59(3):113-22.
51. Abbas M, Saeed F, Anjum FM, Afzaal M, Tufail T, Bashir MS, Ishtiaq A, Hussain S, Suleria HAR. Natural polyphenols: An overview. *International journal of food properties.* 2017;20(8):1689-99.
52. Rančić A, Soković M, Vukojević J, Simić A, Marin P, Duletić-Lausević S, Djoković D. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils of *Myrrhis odorata* (L.) Scop, *Hypericum perforatum* L and *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. [Wheaton, IL] :2005. p. 341-5.
53. Sawicka W. The study on coumarin compounds in the fruits and roots of *Myrrhis odorata* (L.) Scop. Poznań, Poland :1999. p. 18-22.
54. Det Norske arboret Milde, Universitetet i Bergen Arboretet og Botanisk hage, Universitetsmuseet i Bergen Arboretet og de botaniske hager, Universitetsmuseet i Bergen Universitetshagene. Årringen 2018. Årringen: årsskrift for Arboretet og Botanisk hage, Milde, Universitetet i Bergen. 2019
55. UiO- institutt for biovitenskap. EC50. [Internett] Oslo. [Oppdatert 04. Februar 2011, Hentet 6. april 2022]: Tilgjengelig fra:
<https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/e/ec50.html>
56. DSMZ. MOLM-13 ACC 554.: DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH.; [Hentet 6. April 2022] Tilgjengelig fra:
<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-554>
57. ATCC. NRK (ATCC®CRL-6509™). ATCC.; [Hentet: 6. April 2022] Tilgjengelig fra: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-6509.aspx>
58. Blodkreftforeningen.no. Akutt myelogen leukemi (AML) [Internett]. Anders Waage. [oppdatert juni 2017; hentet 7. april 2022] Tilgjengelig fra:
<https://www.blodkreftforeningen.no/akutt-myelogen-leukemi-aml/>
59. Stojakowska A, Malarz J, Zubek S, Turnau K, Kisiel W. Terpenoids and phenolics from *Inula ensifolia*. [Oxford ; New York, NY] :2010. p. 232-5.
60. Merfort I. Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. *Phytochemistry* (Oxford). 1992;31(6):2111-3.
61. Lee SY, Moon E, Kim SY, Lee KR. Quinic acid derivatives from *Pimpinella brachycarpa* exert anti-neuroinflammatory activity in lipopolysaccharide-induced microglia. [Oxford] ; [New York] :2013. p. 2140-4.

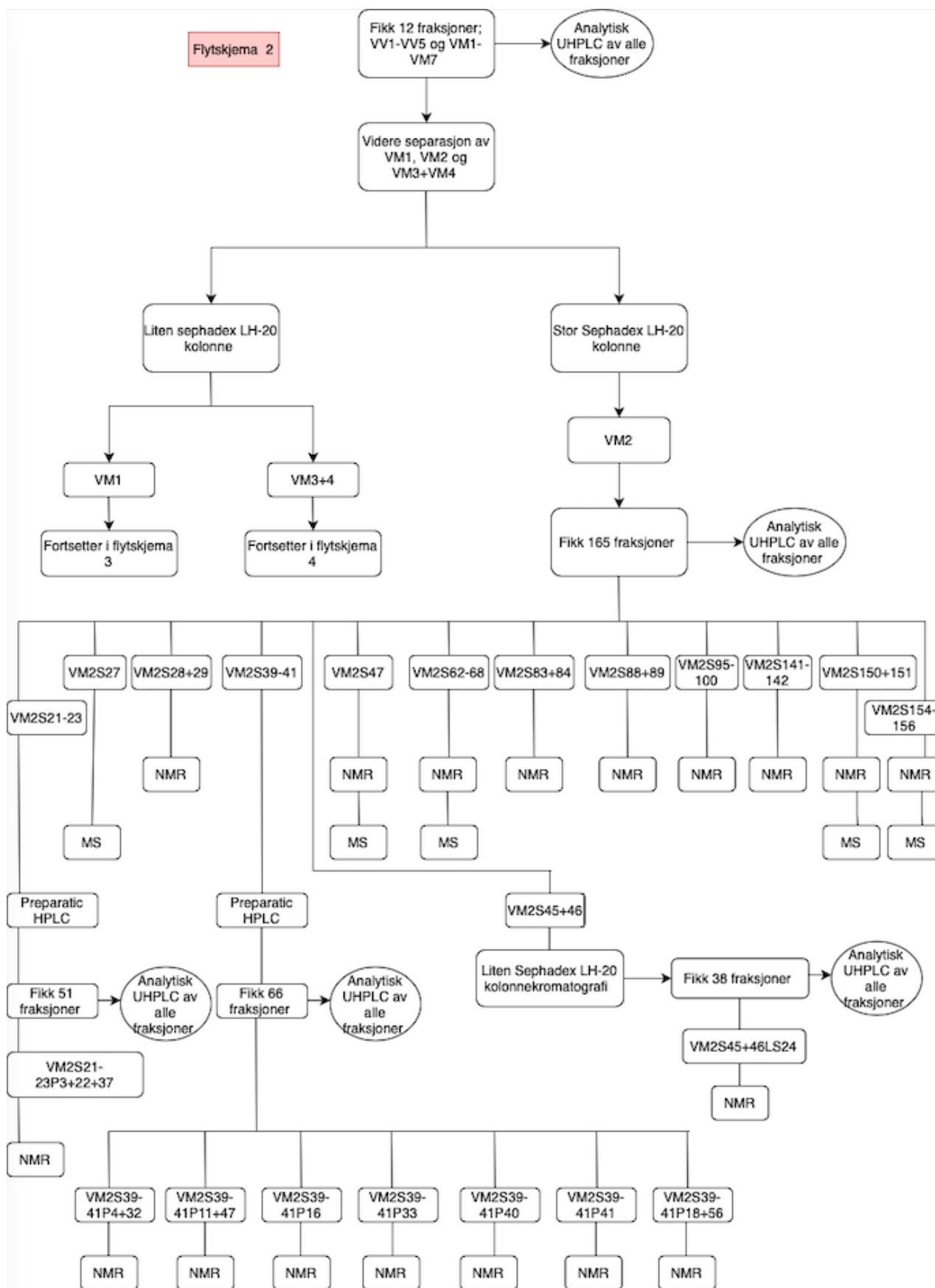
62. Danino O, Gottlieb HE, Grossman S, Bergman M. Antioxidant activity of 1,3-dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. *Food research international*. 2009;42(9):1273-80.
63. Luo Y, Wen Q, Yang S, Feng Y, Tan T. Chemical composition and anti-complement activity of *Glechomae Herba* collected in different months. [London] :2020. p. e4762.
64. Cisowski W. Raw plant material rich in oils, EFAs, and oleinic acid. Poznań, Poland: 1995. p. 170-7.
65. Pereira LCO, Abreu LS, Silva JPre, Machado FSVL, Queiroga CS, Do Espirito-Santo RF, Agnelo-Silva DFD, Villarreal CF, Agra MDF, Scotti MT, Costa VCDO, Tavares JF, Silva MSD. Bioactive Compounds from the Aerial Parts of *Evolvulus linarioides*. Columbus, Ohio2020. p. 1515-23.
66. Andersen ØM, Markham KR. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. Boca Raton, Fla: CRC Taylor & Francis; 2006.
67. Nobelprize. YU YOUYOU Nobel Prize in Physiology or Medicine in 2015 [Internett]. [Hentet 3. mai 2022] Tilgjengelig fra: <https://www.nobelprize.org/womenwhochangedscience/stories/tu-youyou>
68. Fossen T. *Farmasøyt fant malariakur i tusenår gamle resepter*. Bergen: Universitet i bergen, Senter for farmasi; 15. mars 2016 [Hentet 3. mai 2022] Tilgjengelig fra: <https://www.uib.no/farmasi/96685/farmasøyt-fant-malariakur-i-tusenår-gamle-resepter>
69. Markham, K.R. *Techniques of Flavonoid Identification*. London. Acedemic Press. 1982. 113 s.
70. Fossen T, Andersen OM, Øvstedal DO, Pedersen AT, Raknes A. Characteristic anthocyanin pattern from onions and other *Allium* spp. *Journal of food science*. 1996;61(4):703-706.
71. Nguyen MTT, Le TH, Nguyen HX, Dang PH, Do TNV, Abe M, Takagi R, Nguyen NT. Artocarmins G–M, Prenylated 4-Chromenones from the Stems of *Artocarpus rigida* and Their Tyrosinase Inhibitory Activities. *J Nat Prod*. 2017;80(12):3172-8.
72. Vik, C: Investigation of the antileukemic activity of natural products from selected Norwegian and African plants, MSc thesis, Klinisk Institutt 2, Universitet i Bergen; 2022
73. Nguyen, C: *fyto kjemisk undersøkelse av Kamilleblomsten *Matricaria chamomilla**, MSc thesis. Kjemisk Institutt, Universitet i Bergen; 2021

74. Slimestad R, Rathe BA, Aesoy R, Diaz AEC, Herfindal L, Fossen T. A novel bicyclic lactone and other polyphenols from the commercially important vegetable *Anthriscus cerefolium*. *Scientific reports* 12, 7805 (2022)
75. Fossen T, Rayyan S, Holmberg MH, Nimitz M, Andersen ØM. Covalent anthocyanin–flavone dimer from leaves of *Oxalis triangularis*. *Phytochemistry*. 2007;68(5):652-62.
76. Fossen T, Slimestad R, Øvstedal DO, Andersen ØM. Covalent anthocyanin–flavonol complexes from flowers of chive, *Allium schoenoprasum*. *Phytochemistry*. 2000;54(3):317-23.
77. Chanpirom, S: Phytochemical investigation of *Peucedanum ostruthium* (L.) W.D.J.Koch. MSc thesis. Kjemisk institutt, Universitet i Bergen; 2020
78. Swamy MK. *Plant-derived Bioactives: Chemistry and Mode of Action*. Singapore: Springer Singapore: Imprint: Springer; 2020.

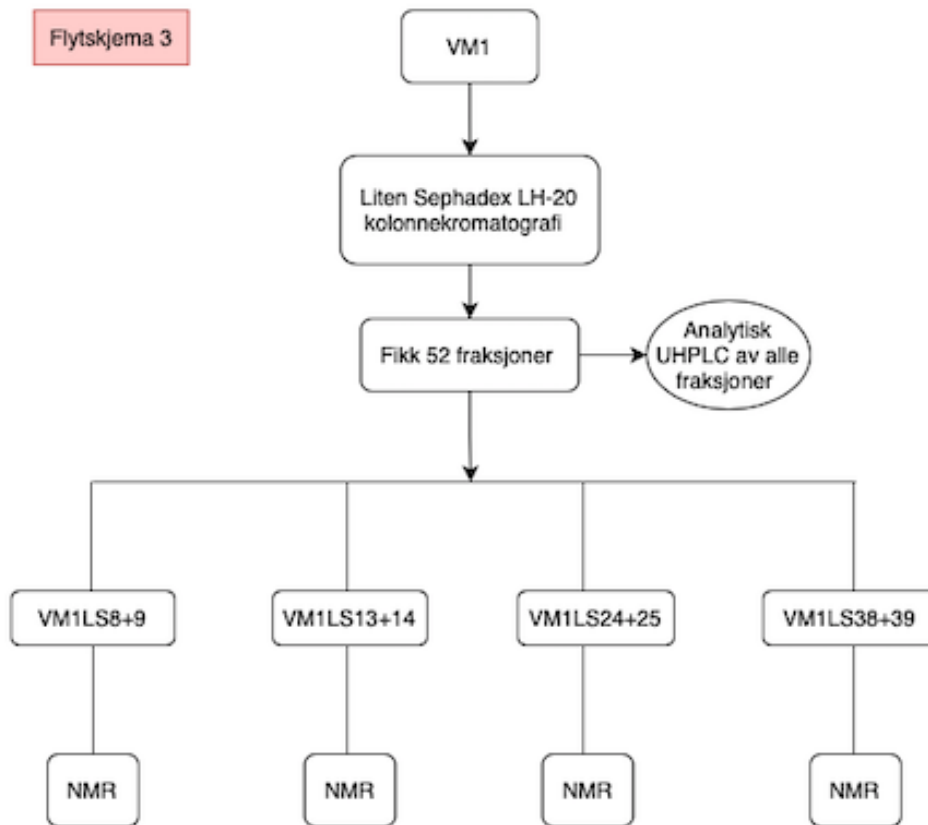
10. Vedlegg

10.1 Vedlegg 1 – Flytskjemaer

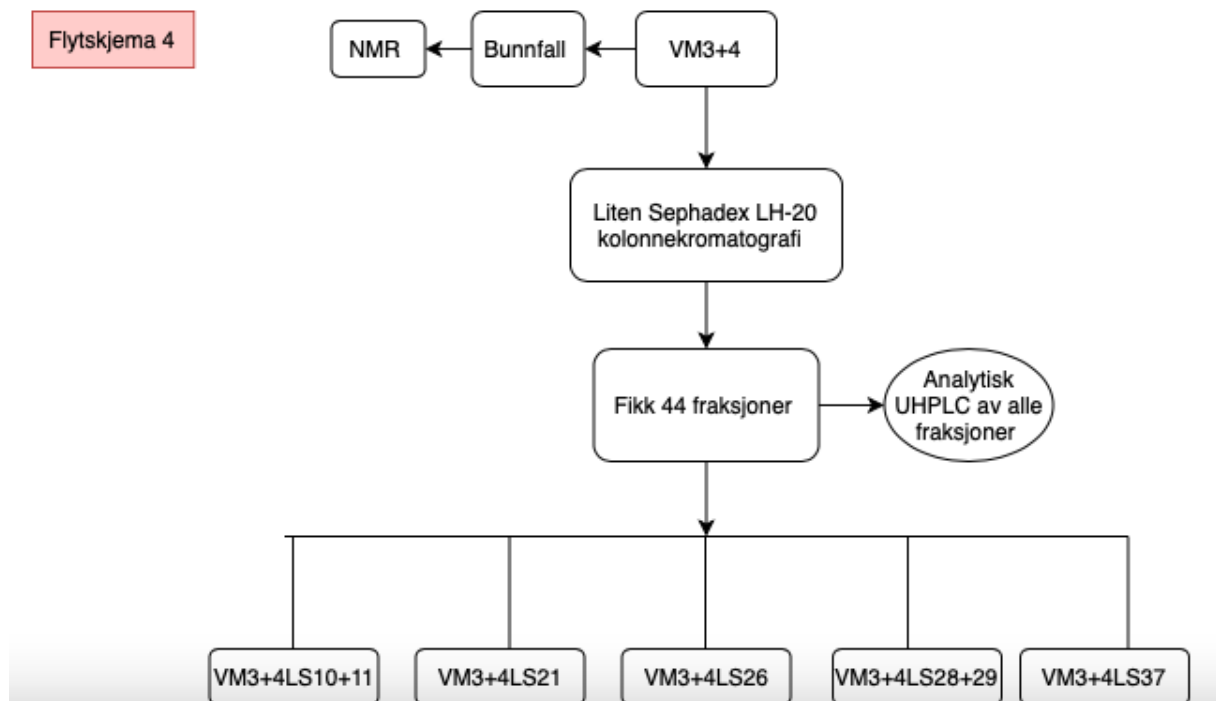


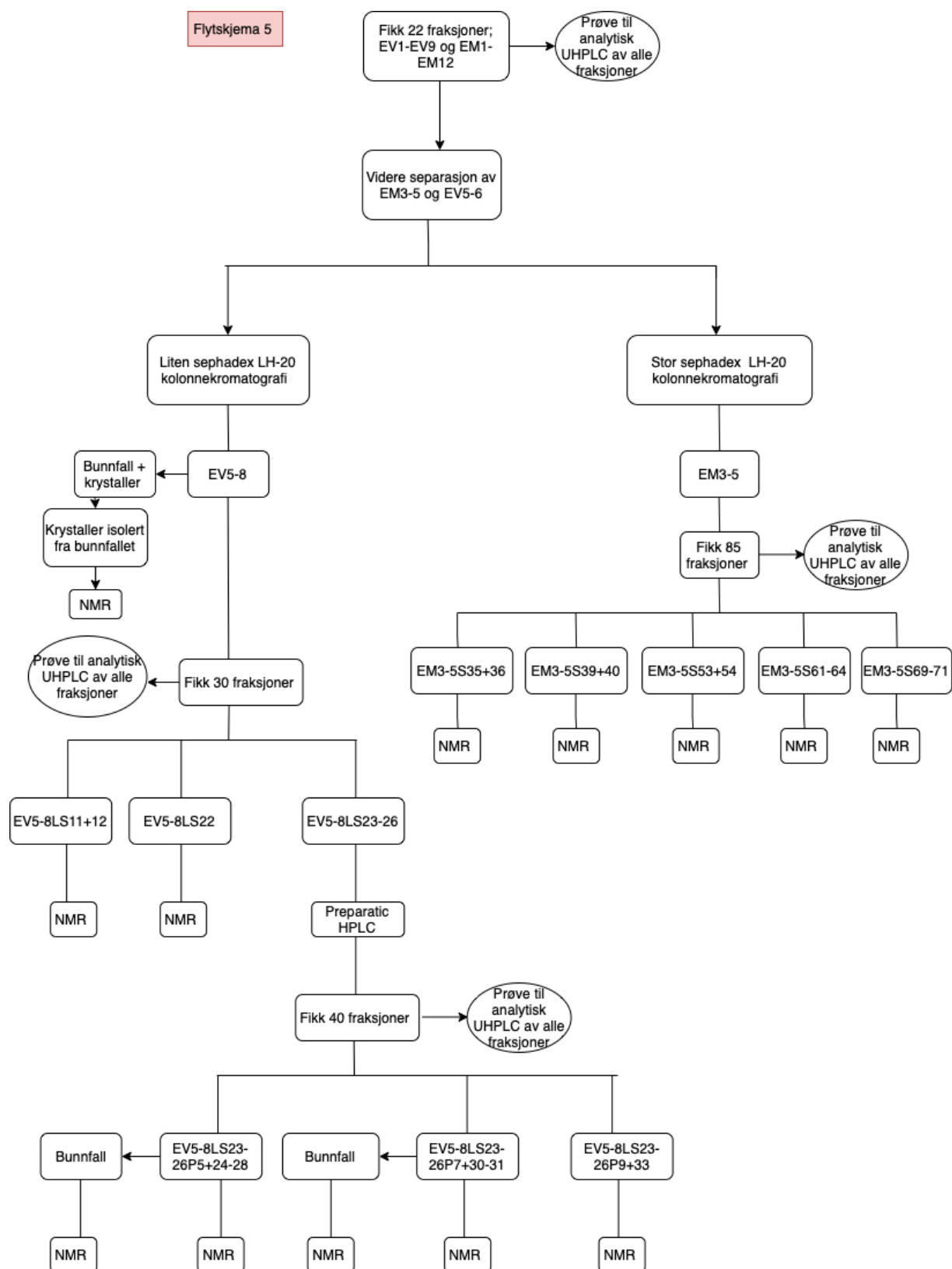


Flytskjema 3

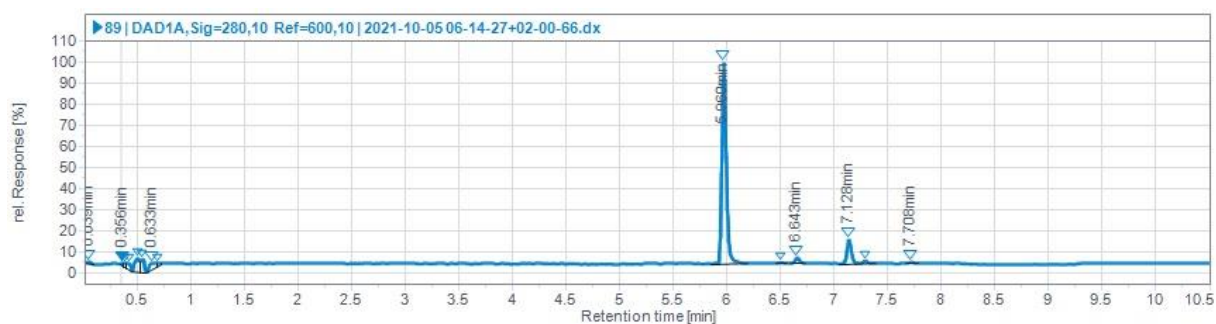


Flytskjema 4





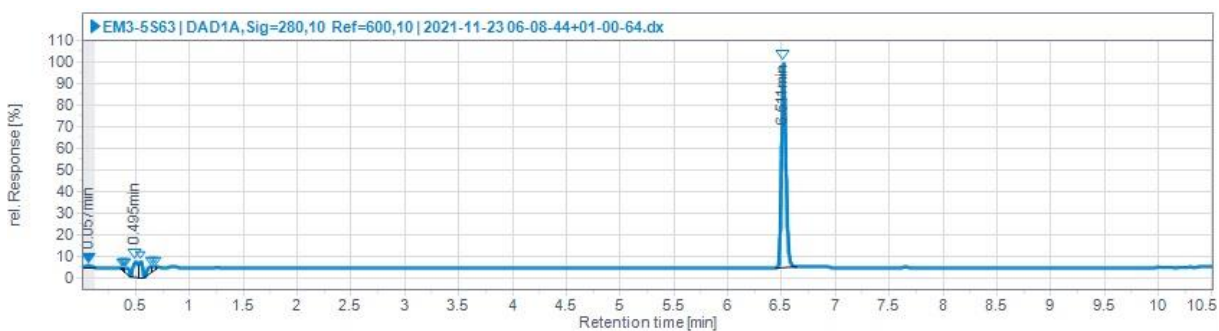
10.2 Vedlegg 2 – UHPLC-kromatogrammer



Figur 271: UHPLC-kromatogram av luteolin 7-O- β -glukopyranosid (1) og apigenin 7-O-(6''O-malonyl- β -glukopyranosid) (2) i fraksjon VM2S89 detektert ved 280 ± 10 nm



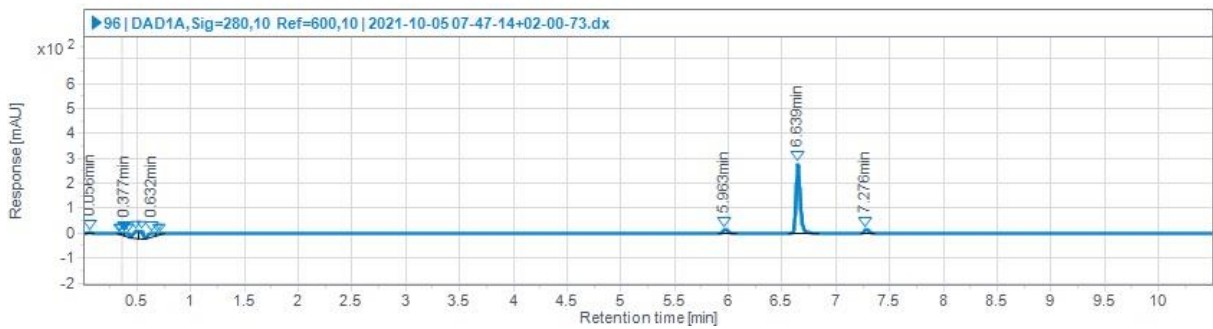
Figur 272: UHPLC-kromatogram av apigenin 7-O- β -glukopyranosid (3) i fraksjon EM3-5S62 detektert ved 280 ± 10 nm



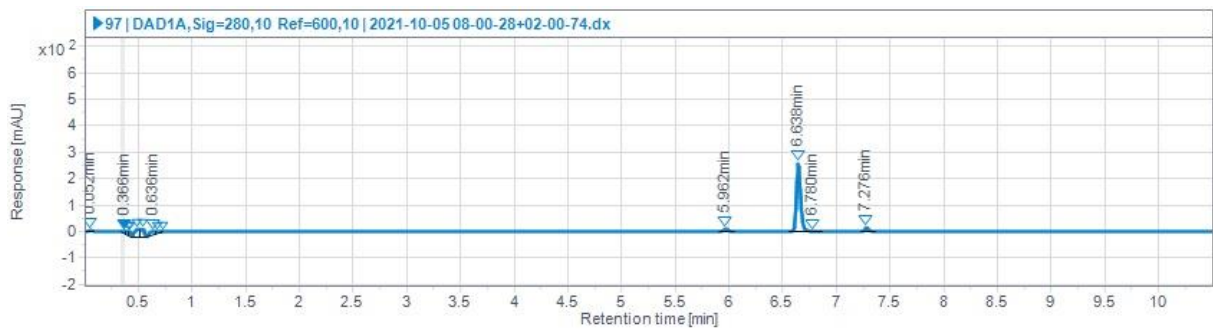
Figur 273: UHPLC-kromatogram av apigenin 7-O- β -glukopyranosid (3) i fraksjon EM3-5S63 detektert ved 280 ± 10 nm



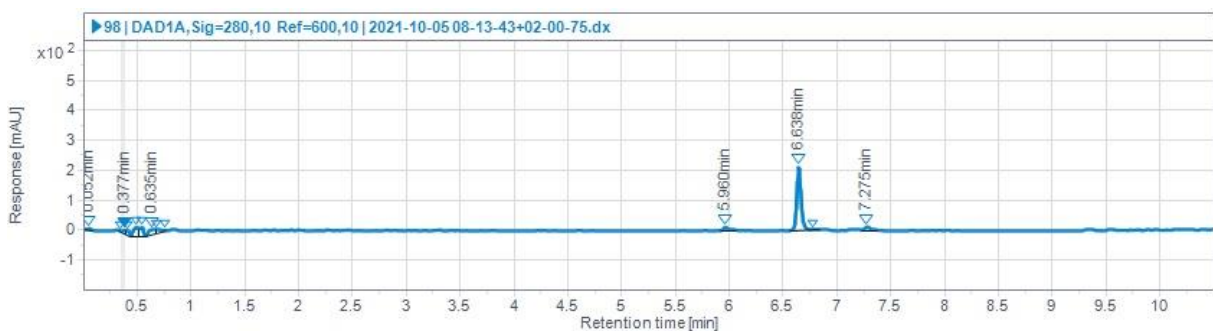
Figur 274: UHPLC-kromatogram av apigenin 7-O- β -glukopyranosid (**3**) i fraksjon EM3-5S64 detektert ved 280 ± 10 nm



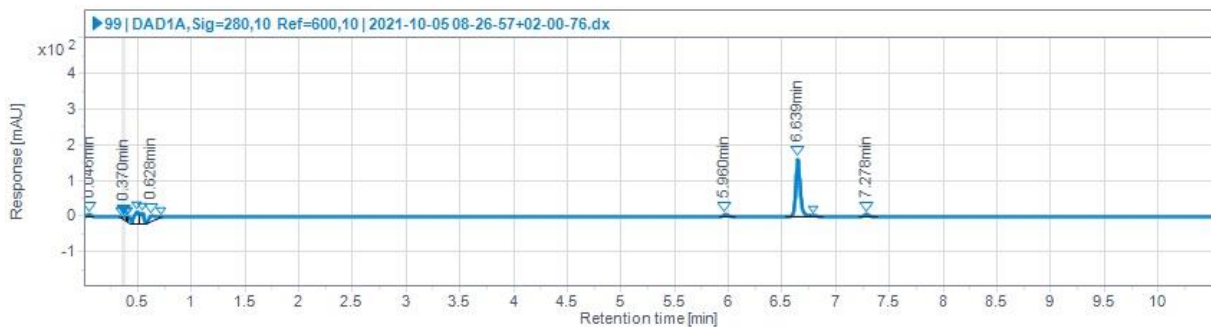
Figur 275: UHPLC-kromatogram av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (**4**) i fraksjon VM2S96 detektert ved 280 ± 10 nm.



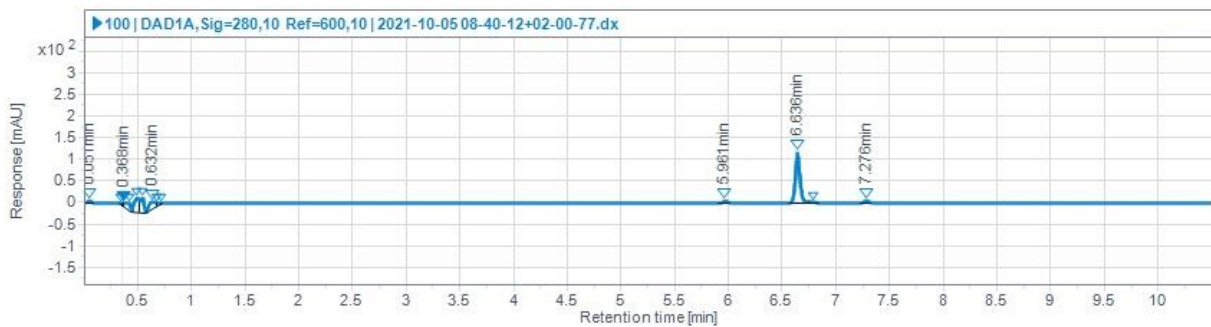
Figur 276: UHPLC-kromatogram av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (**4**) i fraksjon VM2S97 detektert ved 280 ± 10 nm.



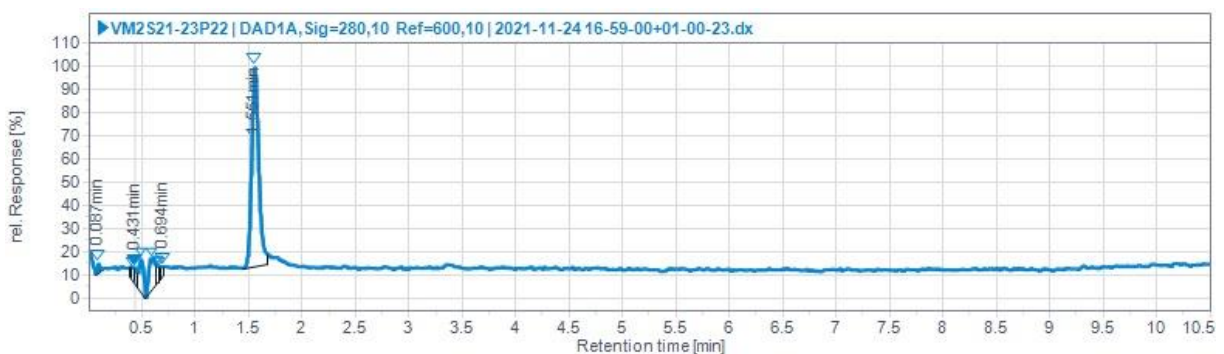
Figur 277: UHPLC-kromatogram av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (**4**) i fraksjon VM2S98 detektert ved 280 ± 10 nm.



Figur 278: UHPLC-kromatogram av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (**4**) i fraksjon VM2S99 detektert ved 280 ± 10 nm.



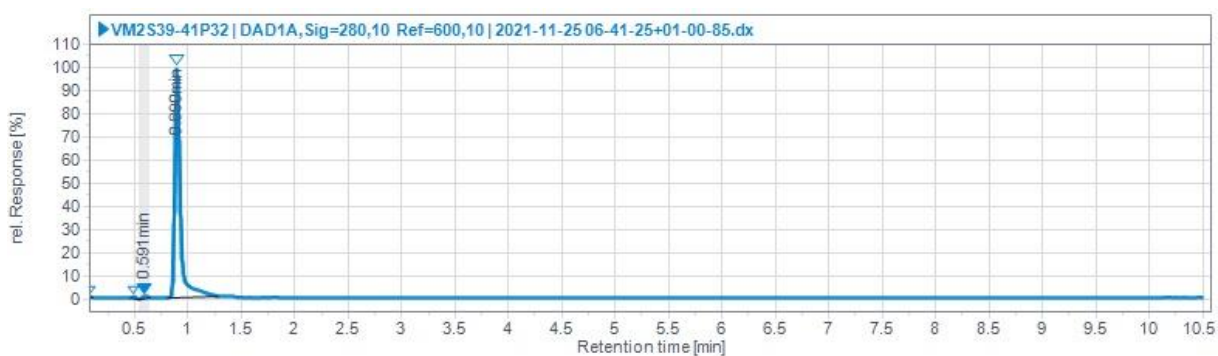
Figur 279: UHPLC-kromatogram av luteolin 7-O-(6''-O-malonyl- β -glukopyranosid) (**4**) i fraksjon VM2S100 detektert ved 280 ± 10 nm.



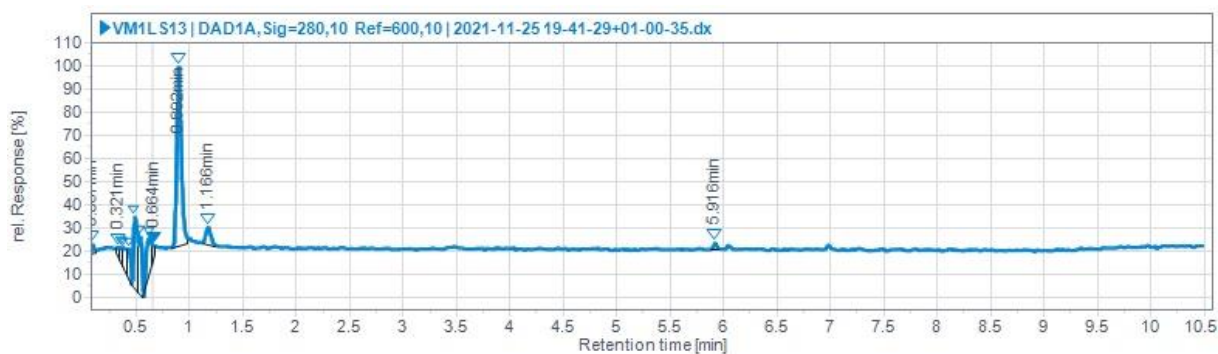
Figur 280: UHPLC-kromatogram av *E*-sinapinsyre 4-O- β -glukopyranosid (**7**) i fraksjon VM2S21-23P22 detektert ved 280 ± 10 nm.



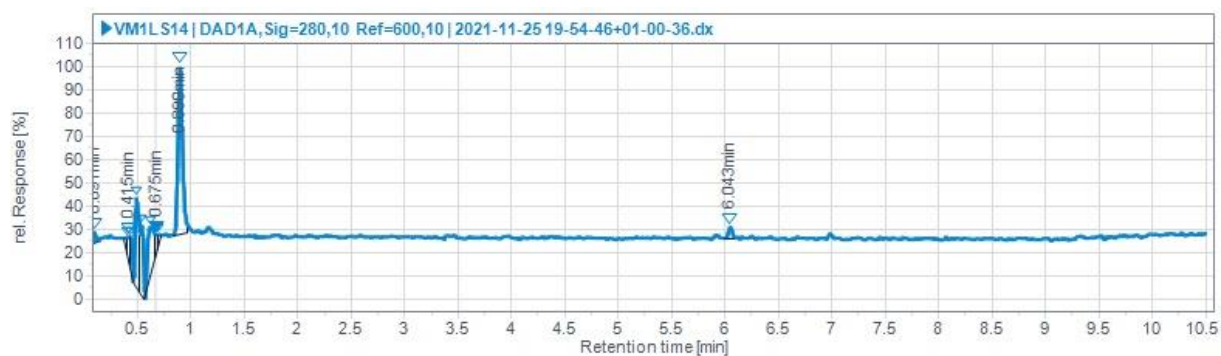
Figur 281: UHPLC-kromatogram av *E*-sinapinsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (**7**) i fraksjon VM2S21-23P37 detektert ved 280 ± 10 nm.



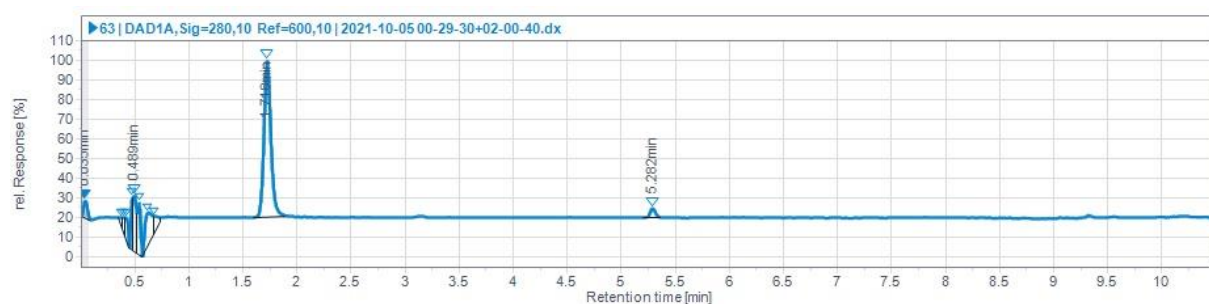
Figur 282: UHPLC-kromatogram av *E*-kumarsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (**8**) i fraksjon VM2S39-41P32 detektert ved 280 ± 10 nm.



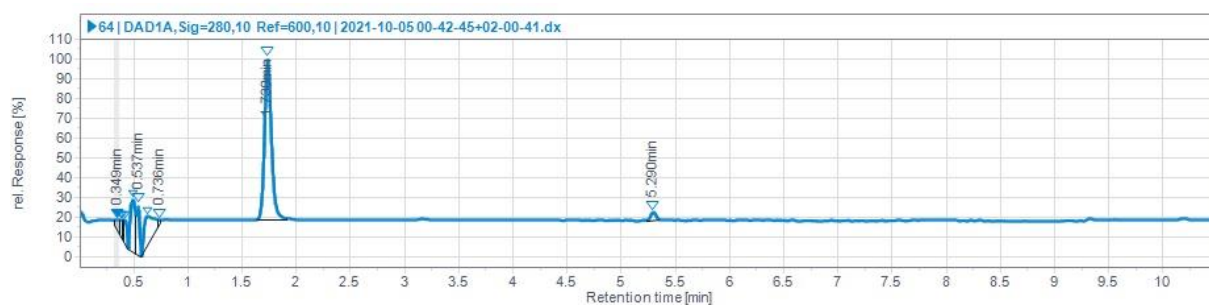
Figur 283: UHPLC-kromatogram av *E*-kumarsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (**8**) i fraksjon VM1LS13 detektert ved 280 ± 10 nm.



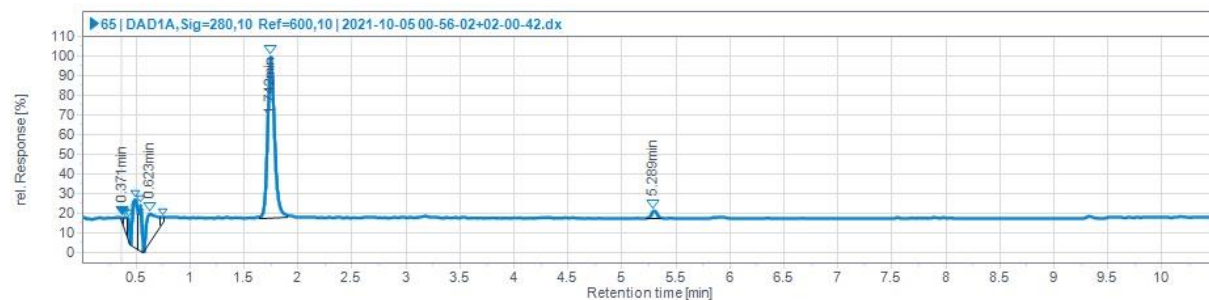
Figur 284: UHPLC-kromatogram av *E*-kumarsyre 4-*O*- β -glukopyranosid (**8**) i fraksjon VM1LS14 detektert ved 280 ± 10 nm.



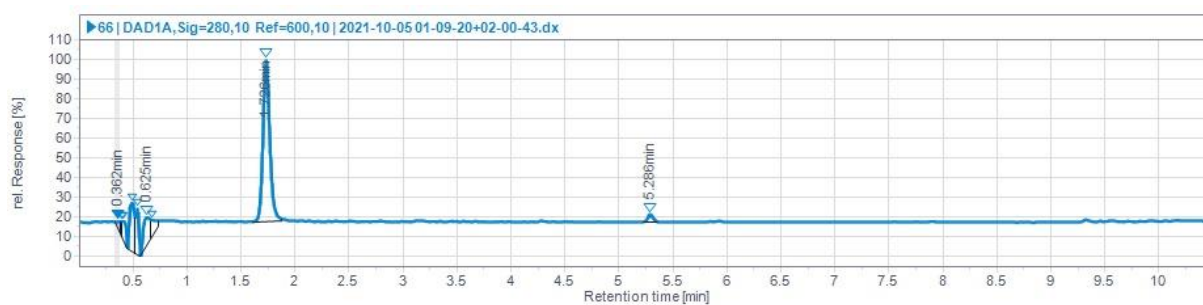
Figur 285: UHPLC-kromatogram av klorogensyre (**9**) i fraksjon VM2S63 detektert ved 280 ± 10 nm.



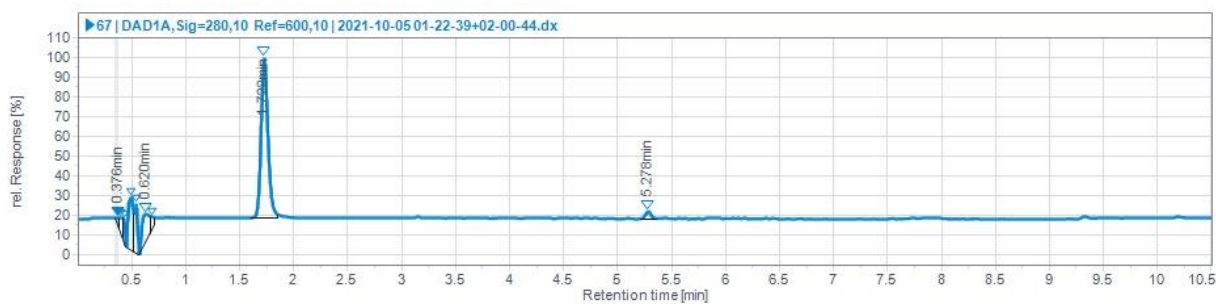
Figur 286: UHPLC-kromatogram av klorogensyre (**9**) i fraksjon VM2S64 detektert ved 280 ± 10 nm.



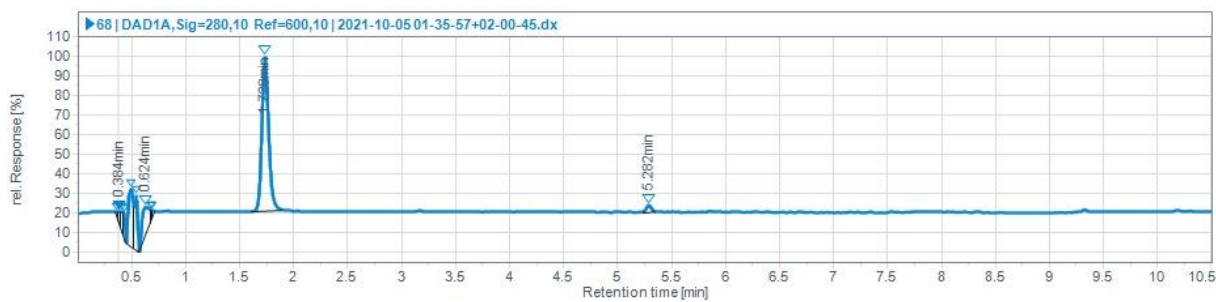
Figur 287: UHPLC-kromatogram av klorogensyre (9) i fraksjon VM2S65 detektert ved 280 ± 10 nm.



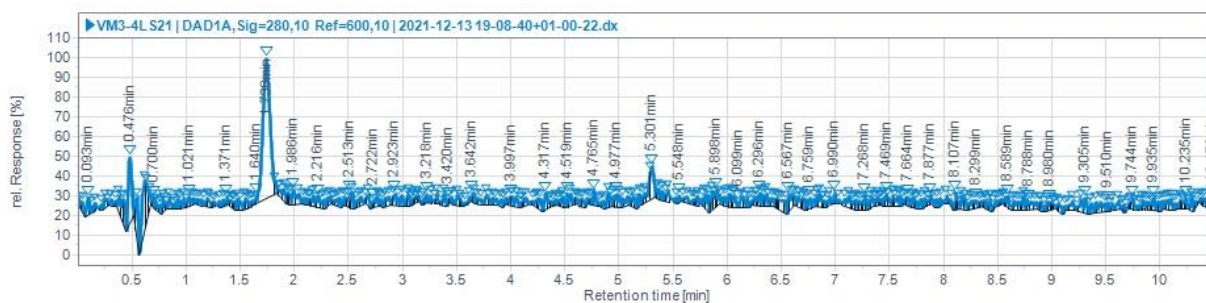
Figur 288: UHPLC-kromatogram av klorogensyre (9) i fraksjon VM2S66 detektert ved 280 ± 10 nm.



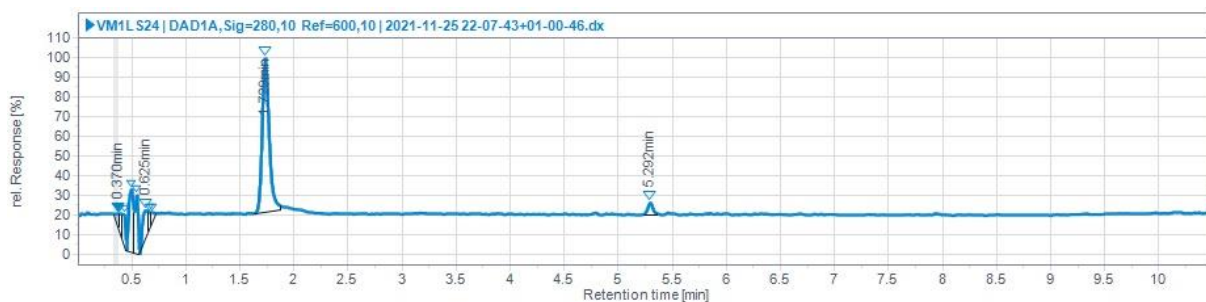
Figur 289: UHPLC-kromatogram av klorogensyre (9) i fraksjon VM2S67 detektert ved 280 ± 10 nm.



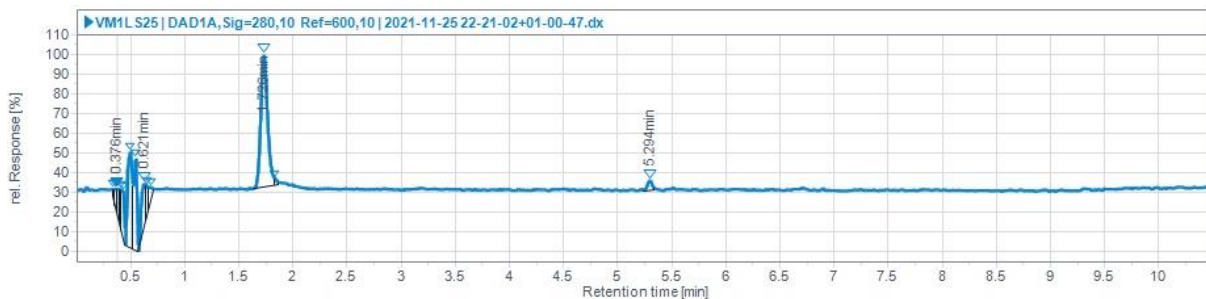
Figur 290: UHPLC-kromatogram av klorogensyre (9) i fraksjon VM2S68 detektert ved 280 ± 10 nm.



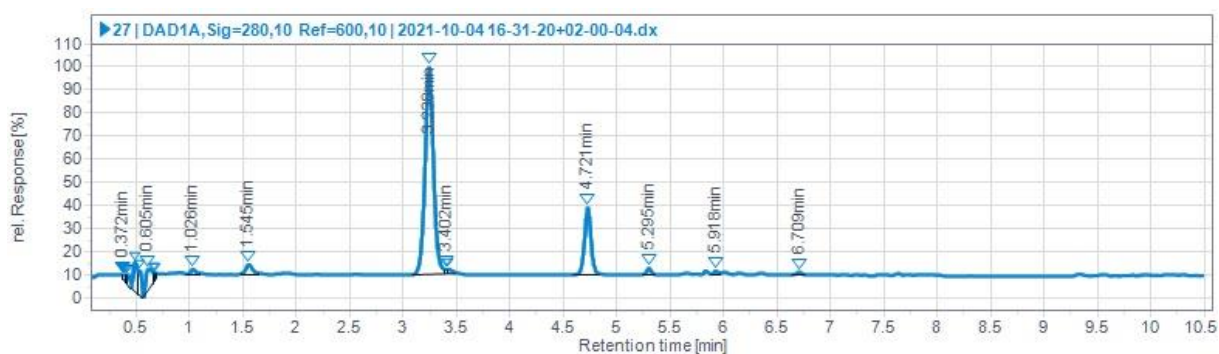
Figur 291: UHPLC-kromatogram av klorogensyre (9) i fraksjon VM3+4LS21 detektert ved 280 ± 10 nm.



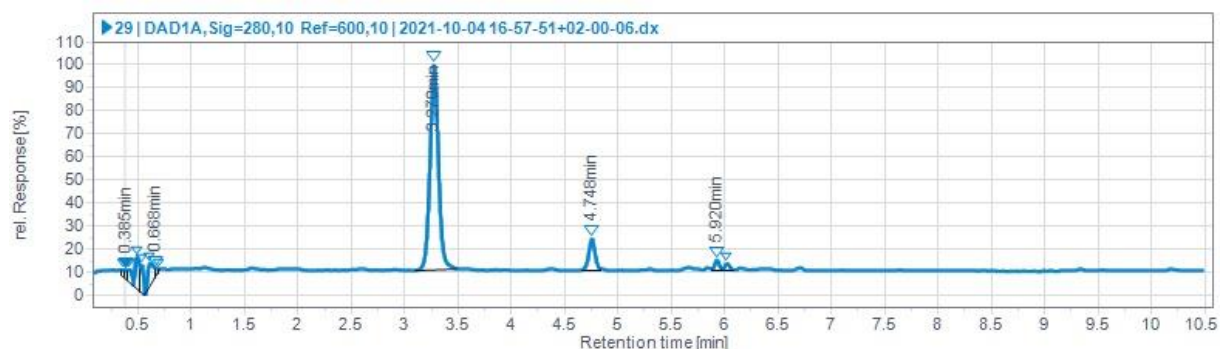
Figur 292: UHPLC-kromatogram av klorogensyre (9) i fraksjon VM1LS24 detektert ved 280 ± 10 nm.



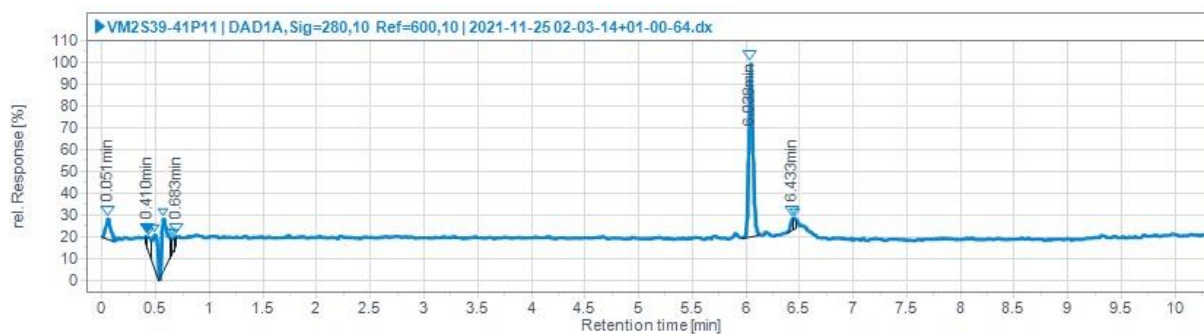
Figur 293: UHPLC-kromatogram av klorogensyre (9) i fraksjon VM1LS25 detektert ved 280 ± 10 nm.



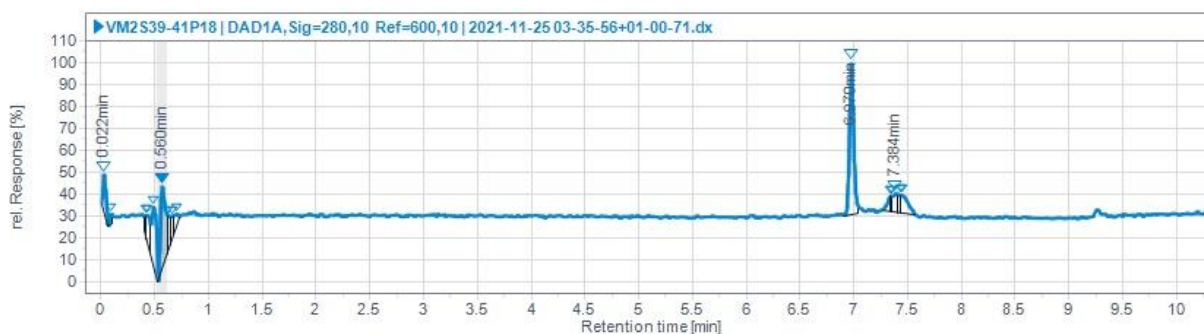
Figur 294: UHPLC-kromatogram av undulatosid A (**10**) i fraksjon VM2S27 detektert ved 280 ± 10 nm.



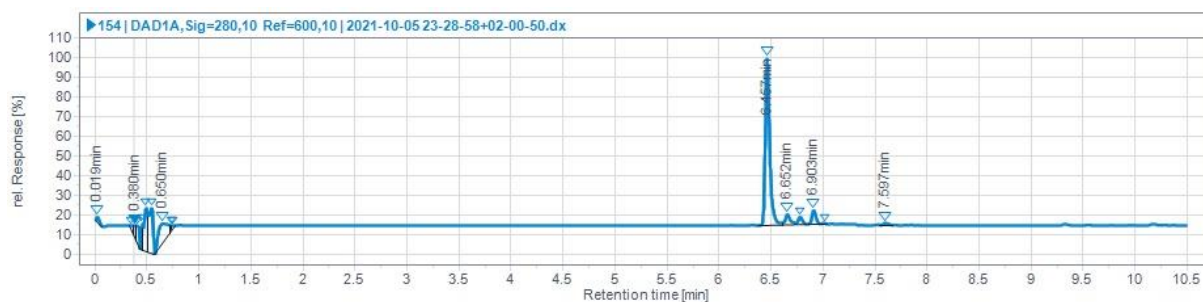
Figur 295: UHPLC-kromatogram av undulatosid A (**10**) i fraksjon VM2S29 detektert ved 280 ± 10 nm.



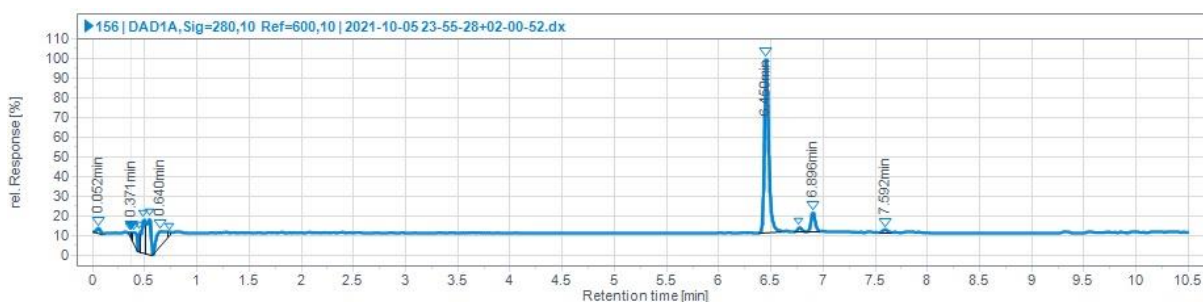
Figur 296: UHPLC-kromatogram av 6'-malonylundulatosid A (**11**) i fraksjon VM2S39-41P11 detektert ved 280 ± 10 nm.



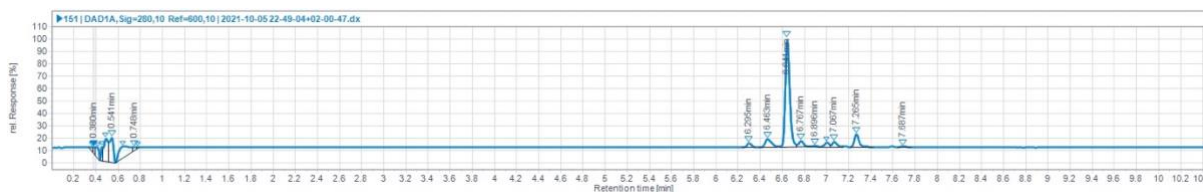
Figur 297: UHPLC-kromatogram av metylmalonylundulatosid A (**12**) i fraksjon VM2S39-41P18 detektert ved 280 ± 10 nm.



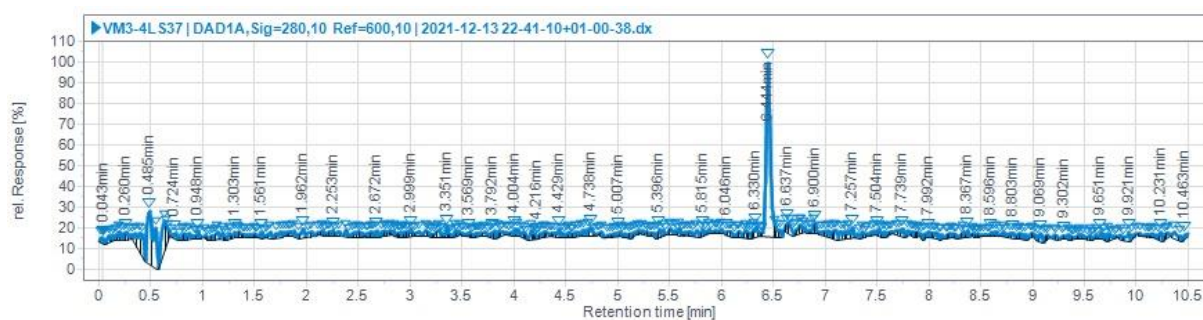
Figur 298: UHPLC-kromatogram av 1,3-dikaffeoylkinasyr (13) i fraksjon VM2S154 detektert ved 280 ± 10 nm.



Figur 299: UHPLC-kromatogram av 1,3-dikaffeoylkinasyr (13) i fraksjon VM2S156 detektert ved 280 ± 10 nm.

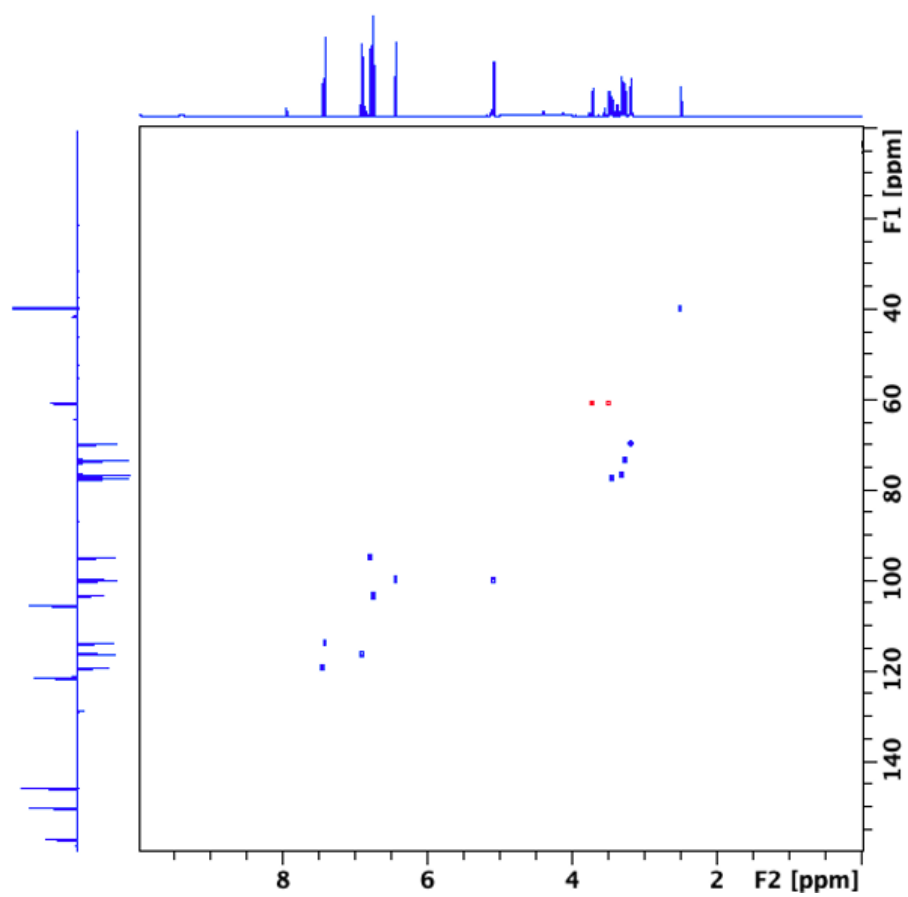


Figur 300: UHPLC-kromatogram av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyr (14) i fraksjon VM2S151 detektert ved 280 ± 10 nm.

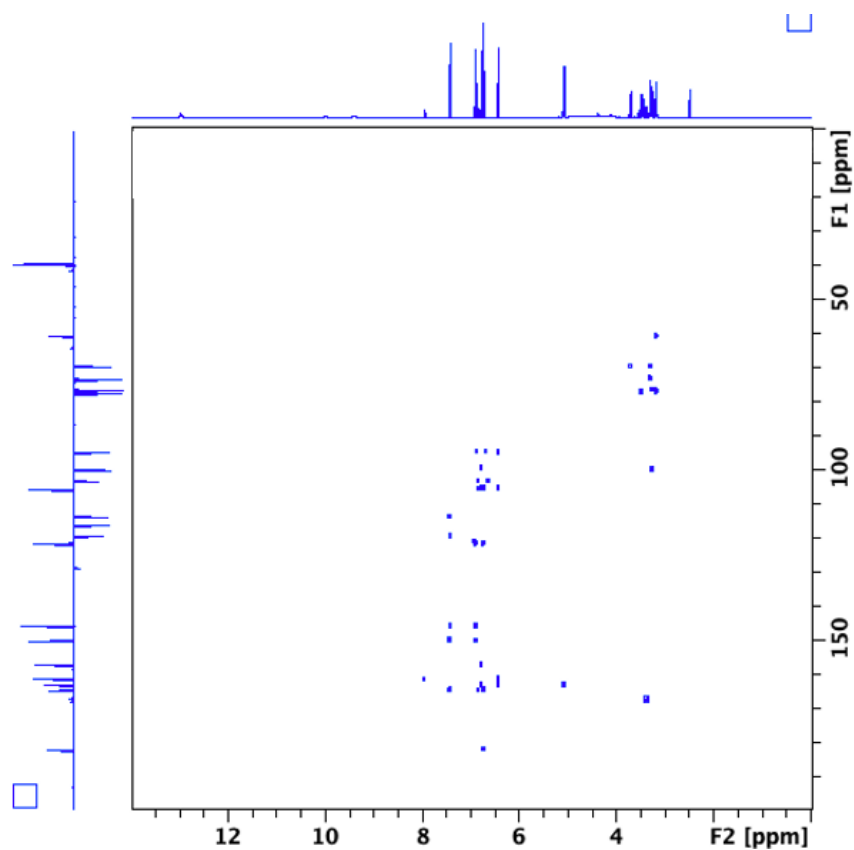


Figur 301: UHPLC-kromatogram av 1,3-dikaffeoyl-5-malonylkinasyr (14) i fraksjon VM3+4LS37 detektert ved 280 ± 10 nm.

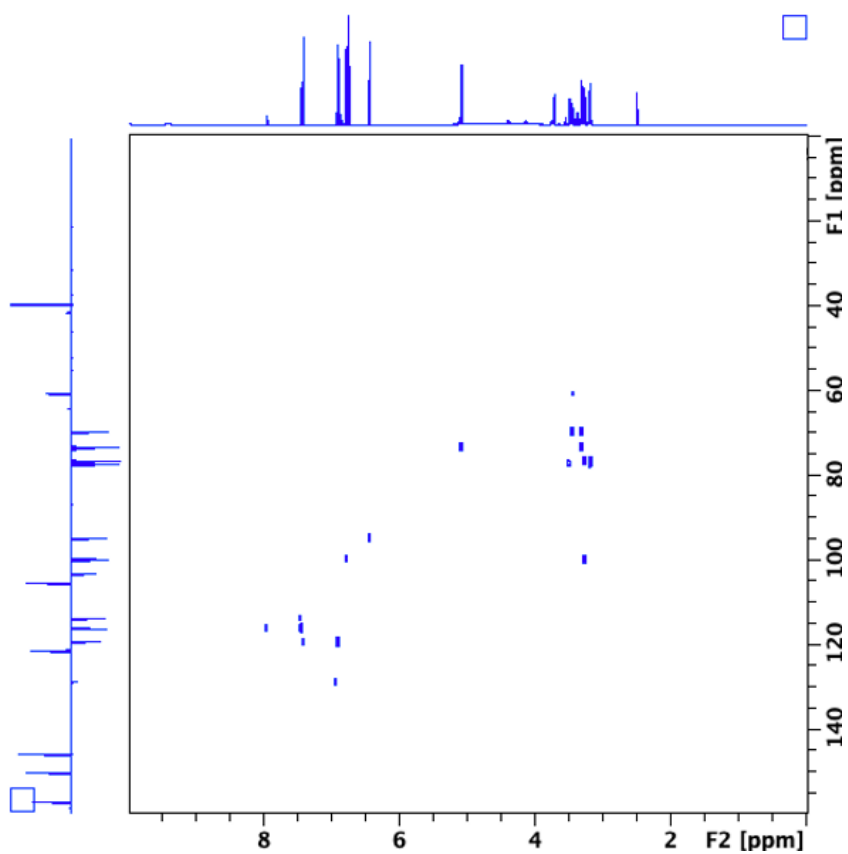
10.3 Vedlegg 3 – NMR-spektre



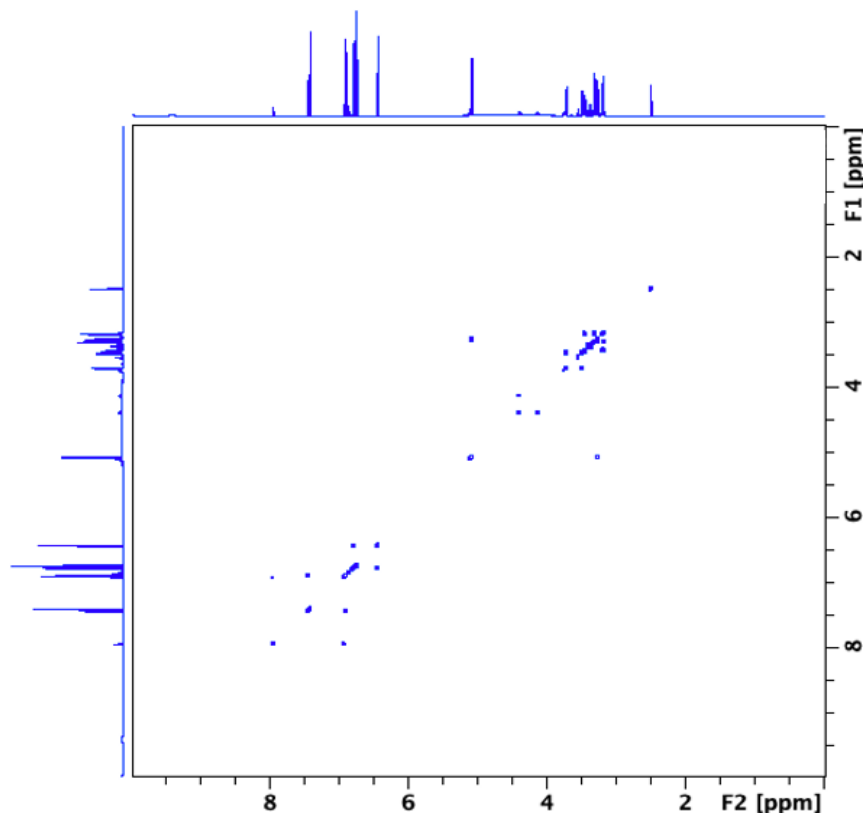
Figur 302: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon VM2S88+89



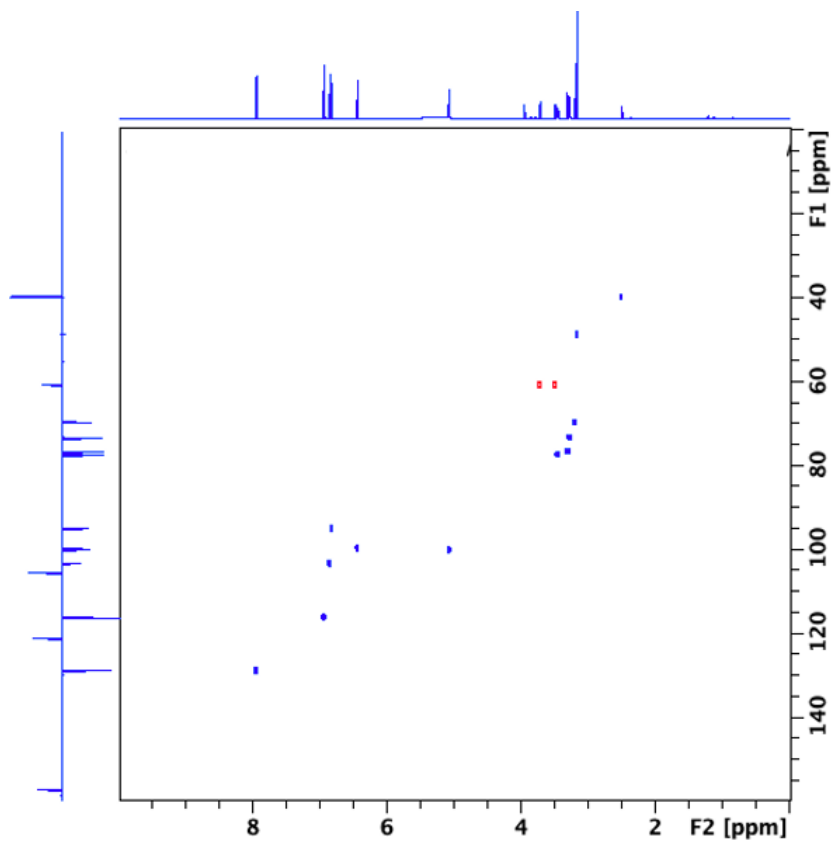
Figur 303: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon VM2S88+89



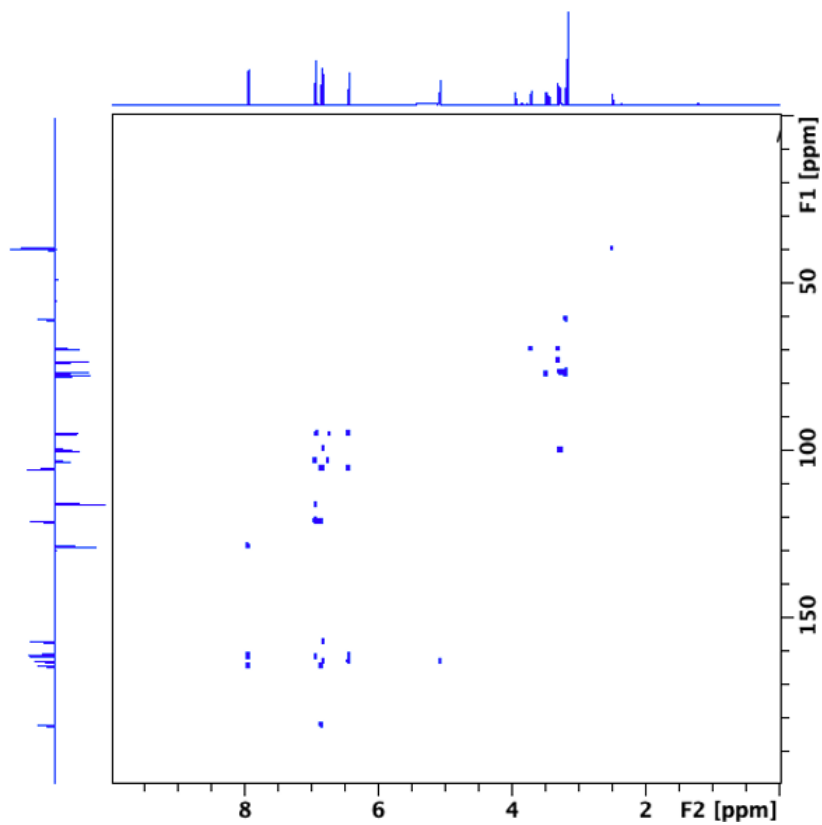
Figur 304: Hele 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekter av fraksjon VM2S88+89



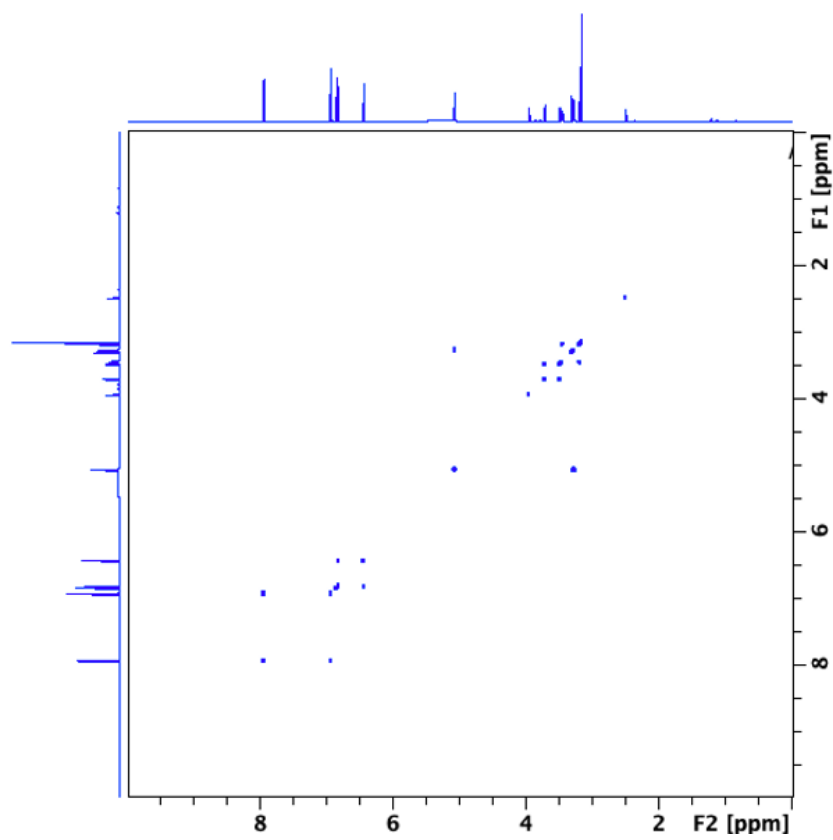
Figur 305: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon VM2S88+89



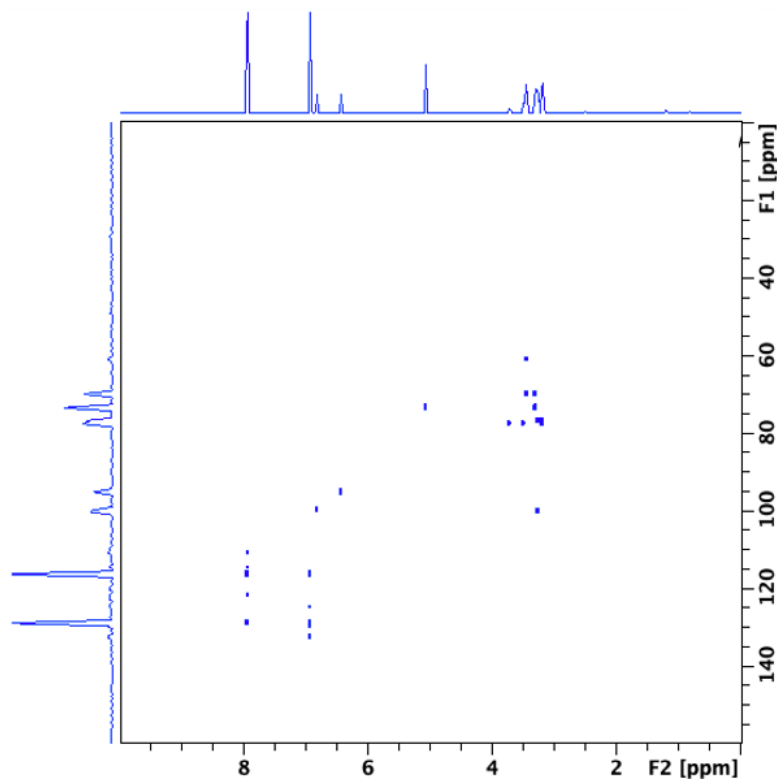
Figur 306: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon EM3-5S61-64



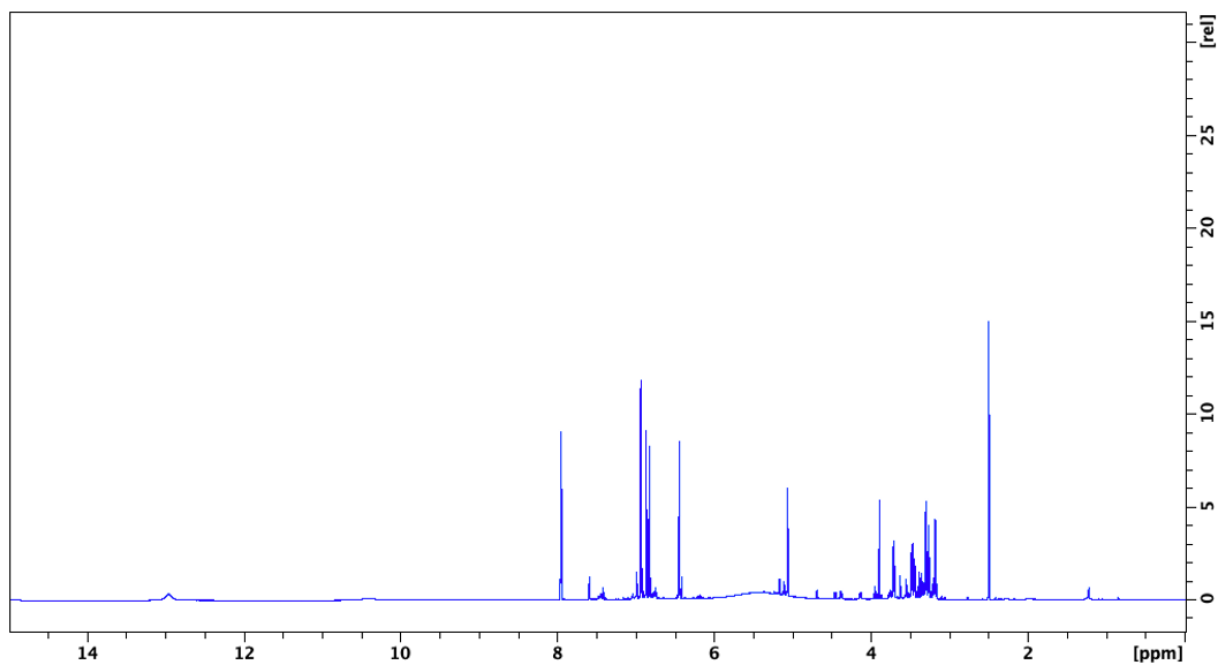
Figur 307: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon EM3-5S61-64



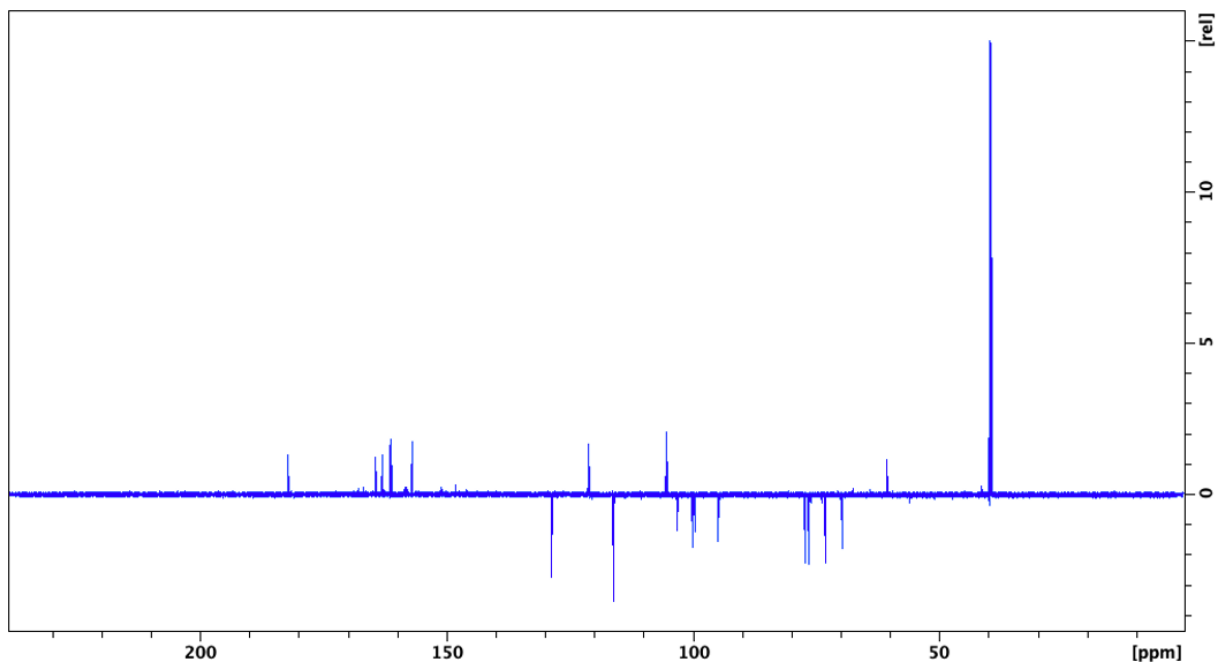
Figur 308: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon EM3-5S61-64



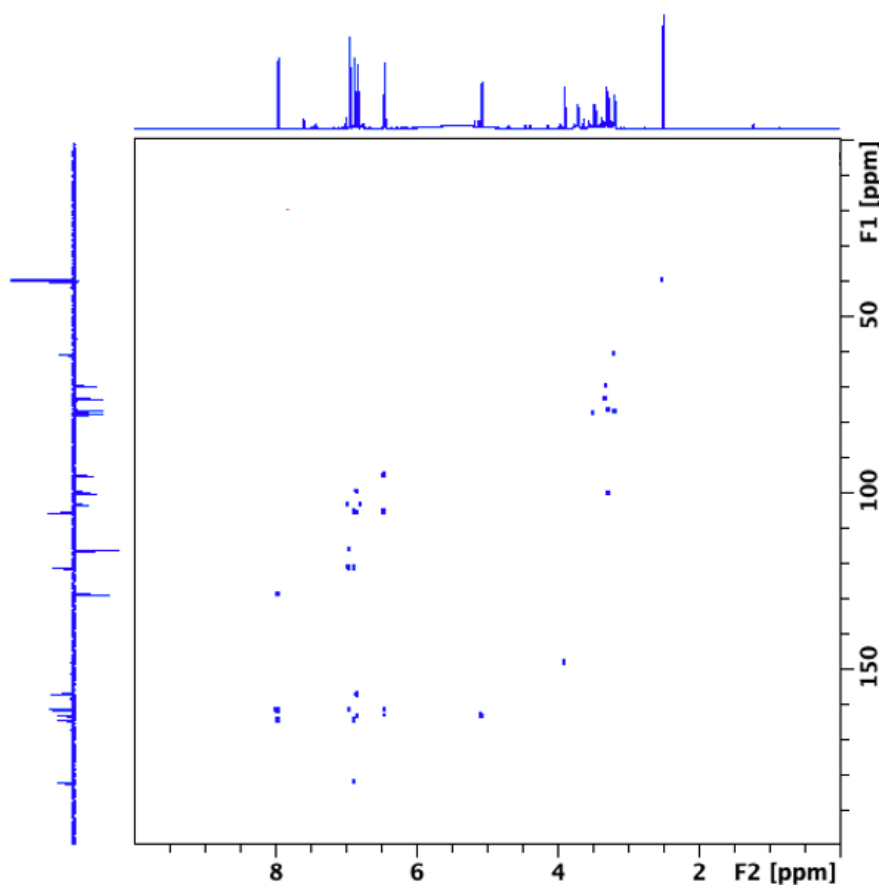
Figur 309: Hele 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekter av fraksjon EM3-5S61-64



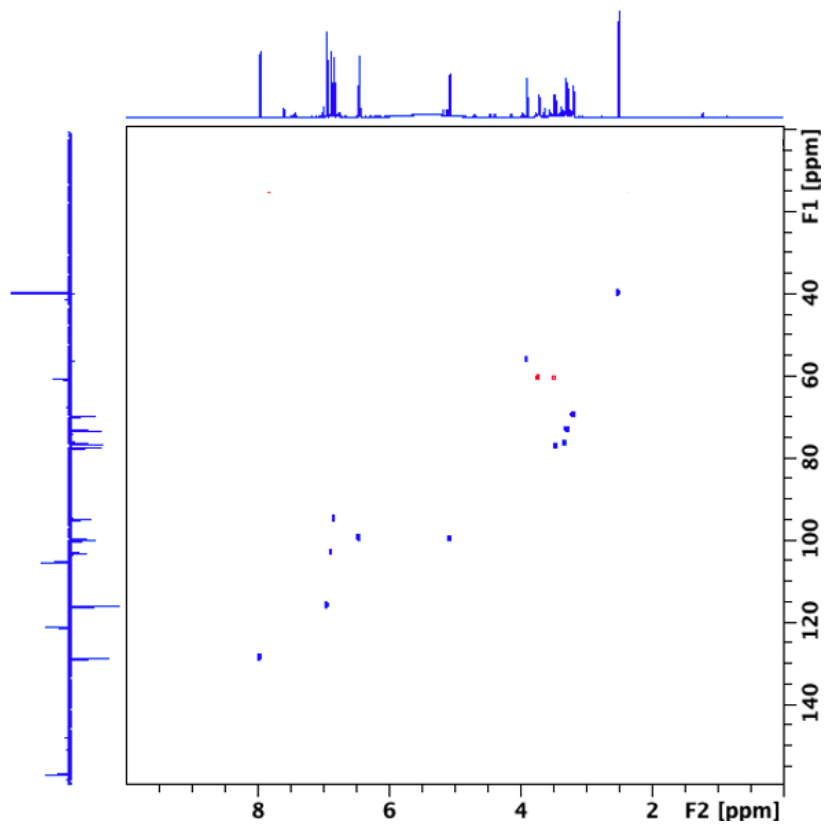
Figur 310: Hele 1D ^1H NMR spekter av fraksjon VM2S83+84



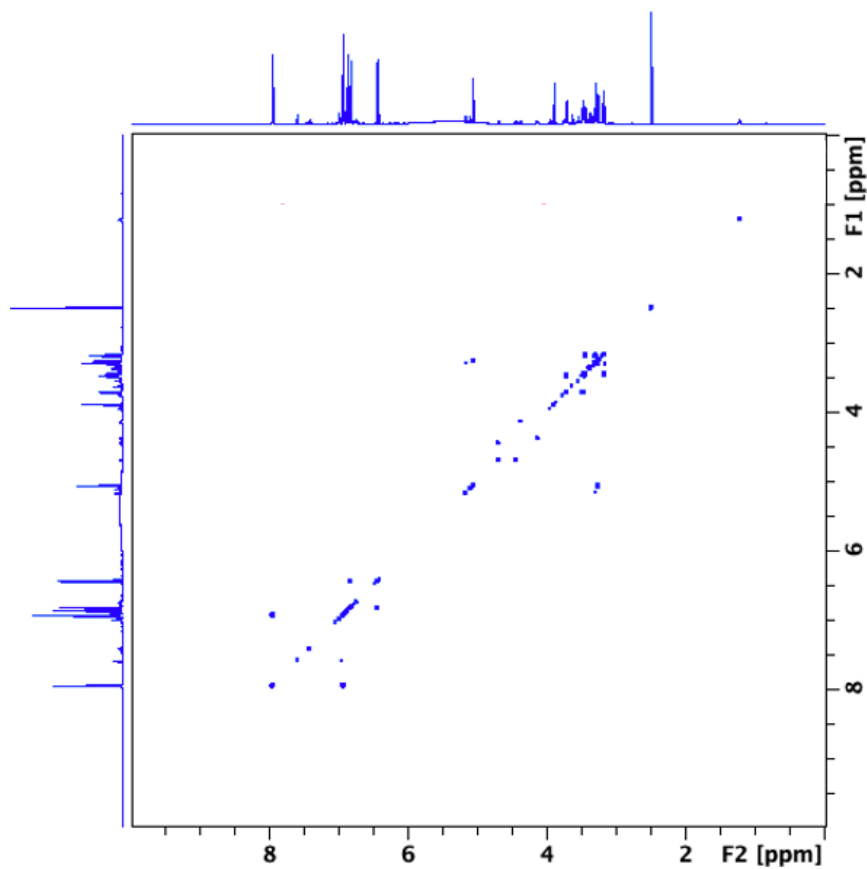
Figur 311: Hele 1D ^{13}C CAPT NMR spekter av fraksjon VM2S83+84



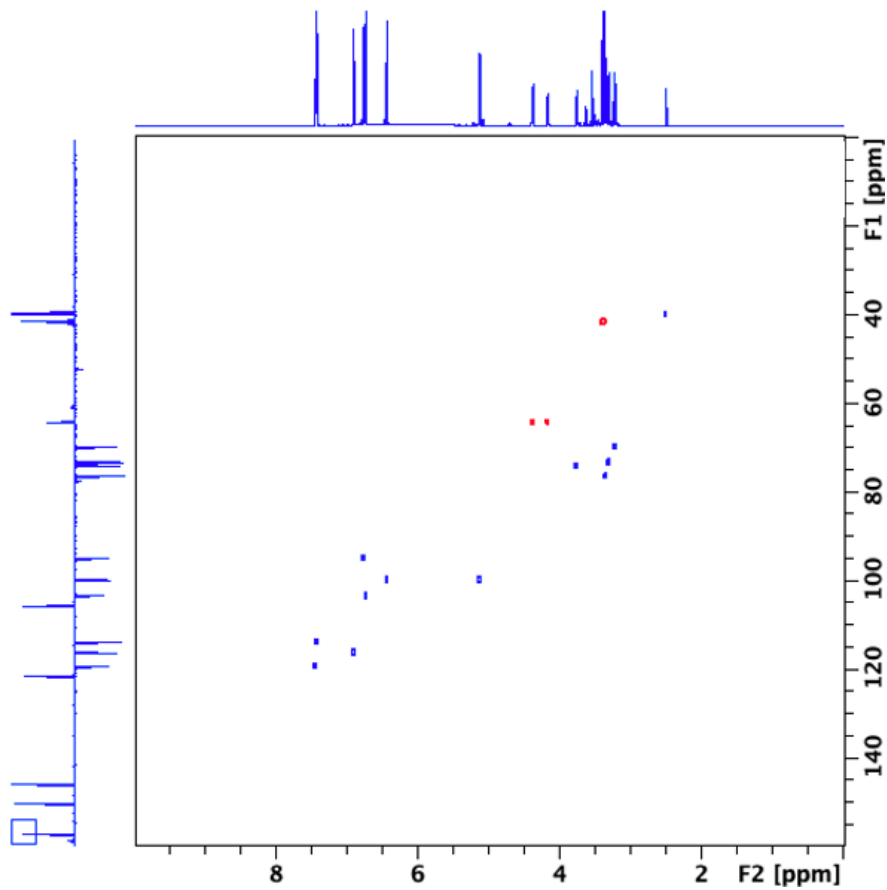
Figur 312: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon VM2S83+84



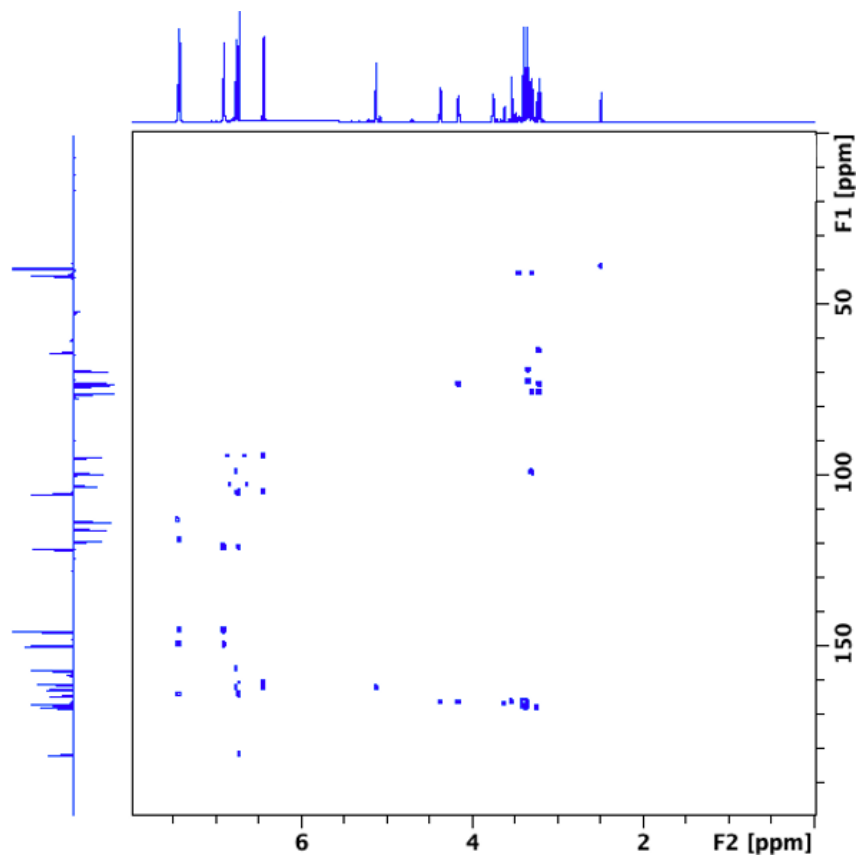
Figur 313: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon VM2S83+84



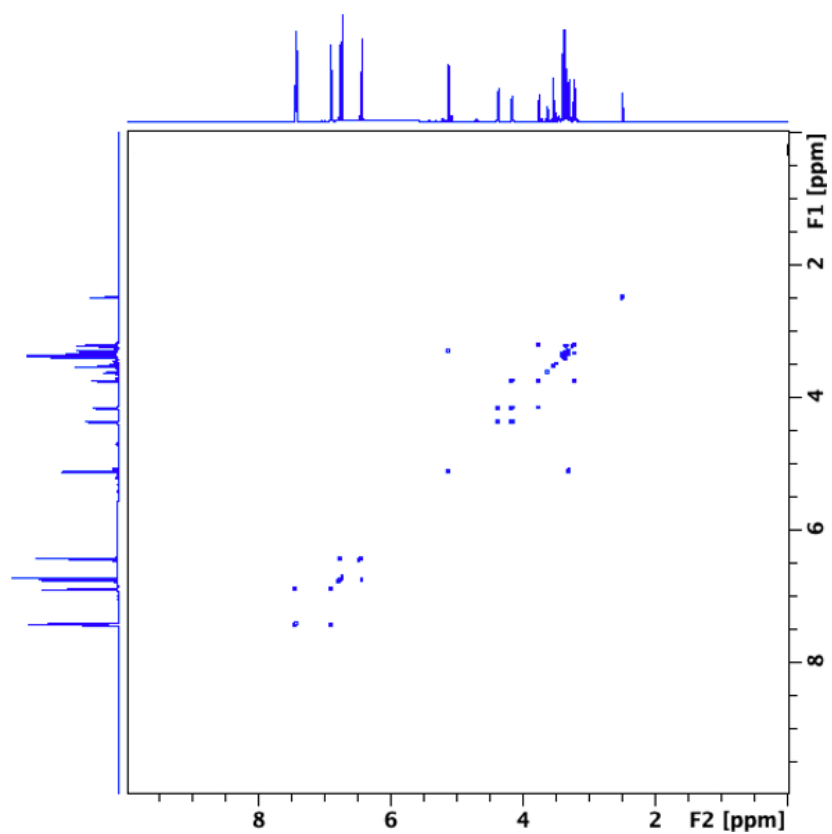
Figur 314: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon VM2S83+84



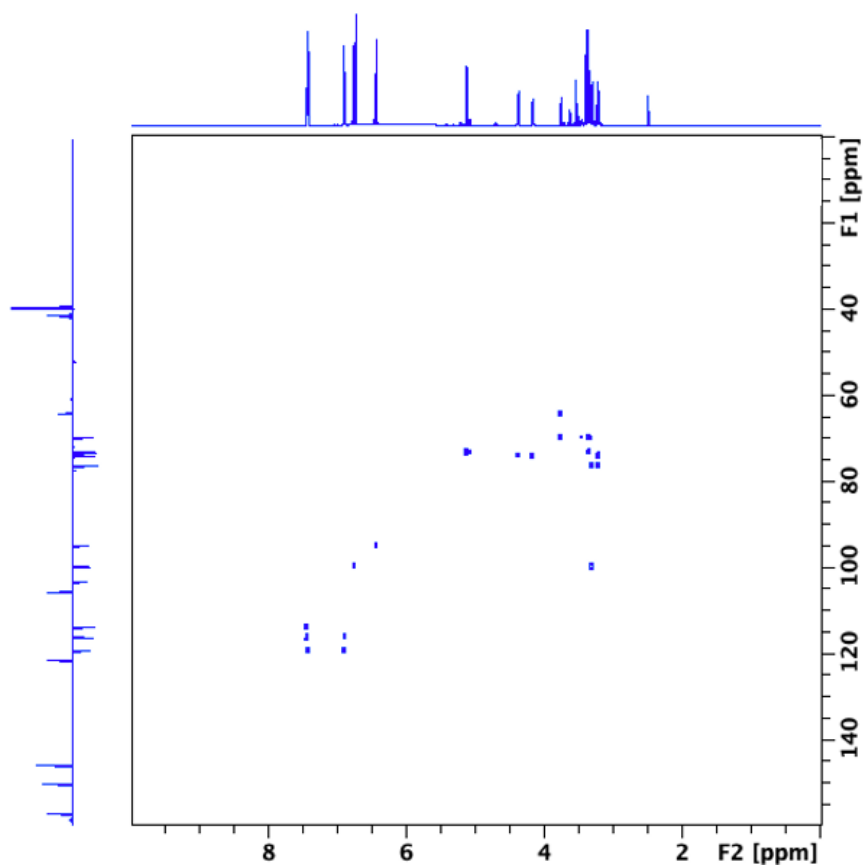
Figur 315: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon VM2S95-100



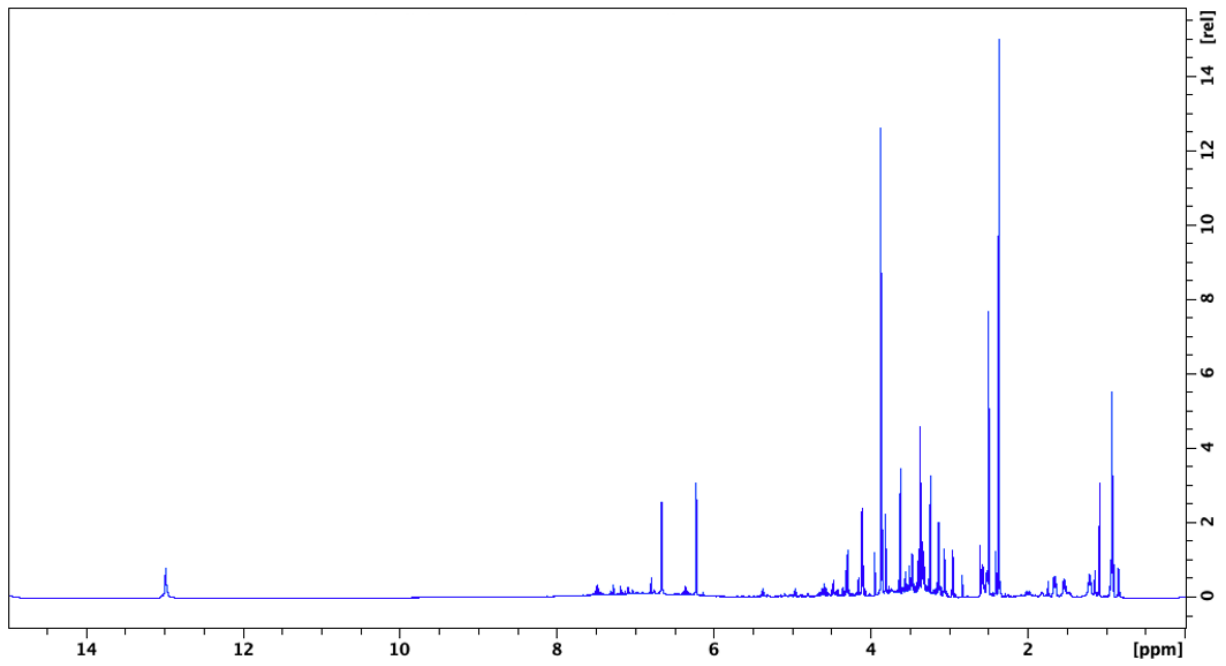
Figur 316: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon VM2S95-100



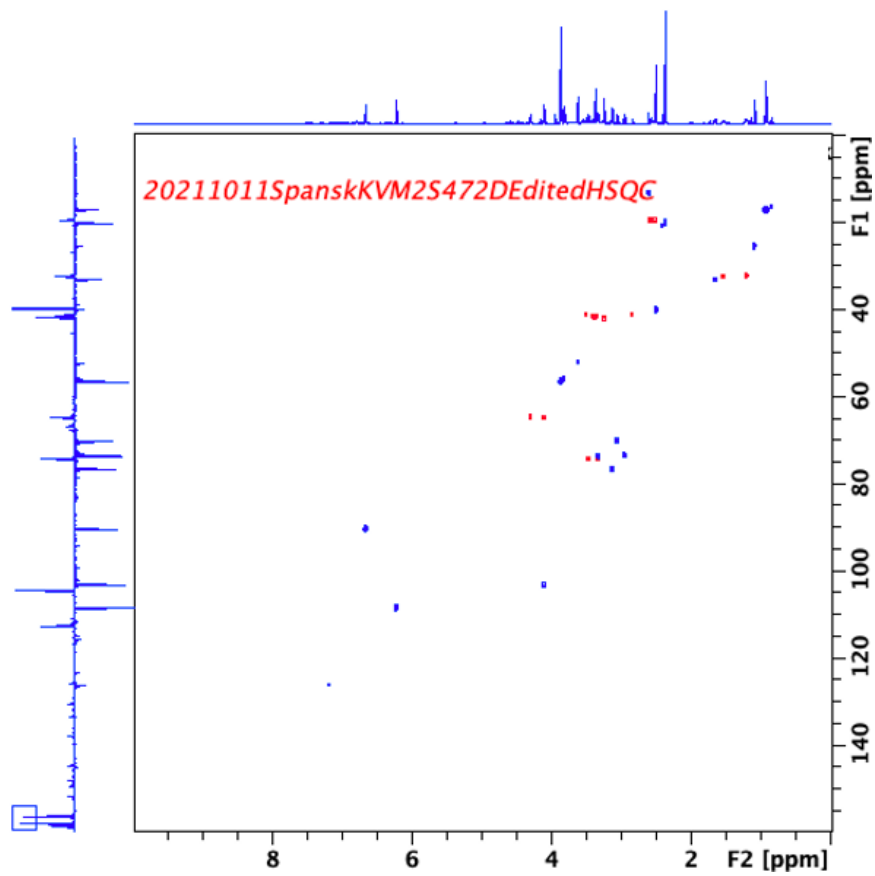
Figur 317: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon VM2S95-100



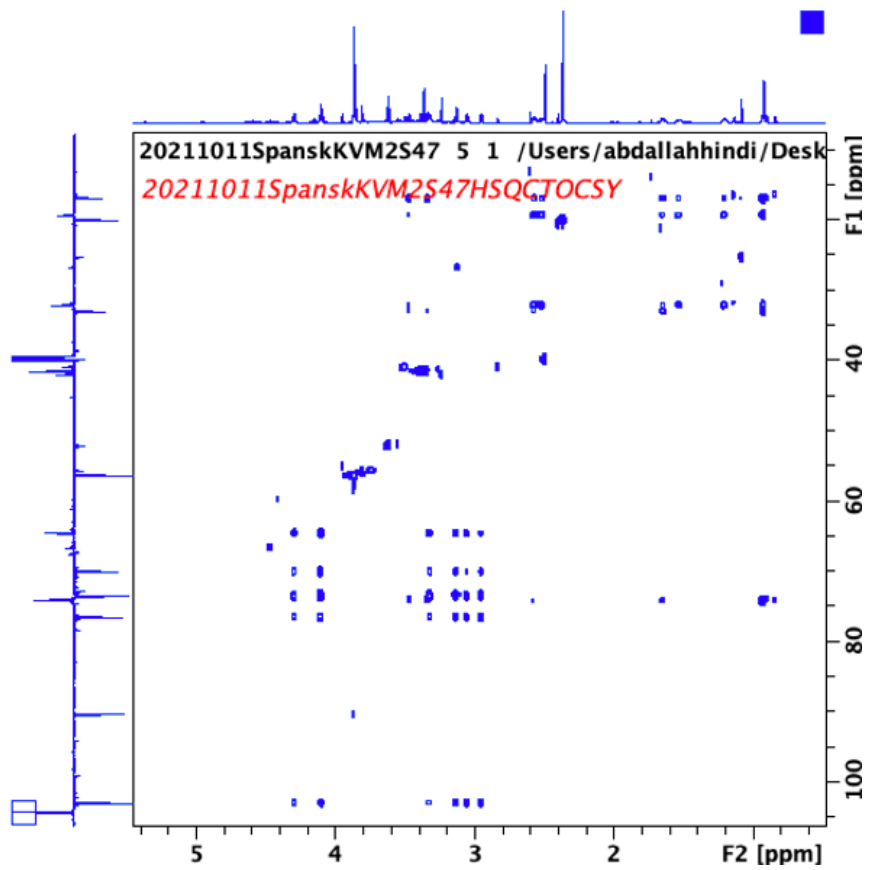
Figur 318: Hele 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekter av fraksjon VM2S95-100



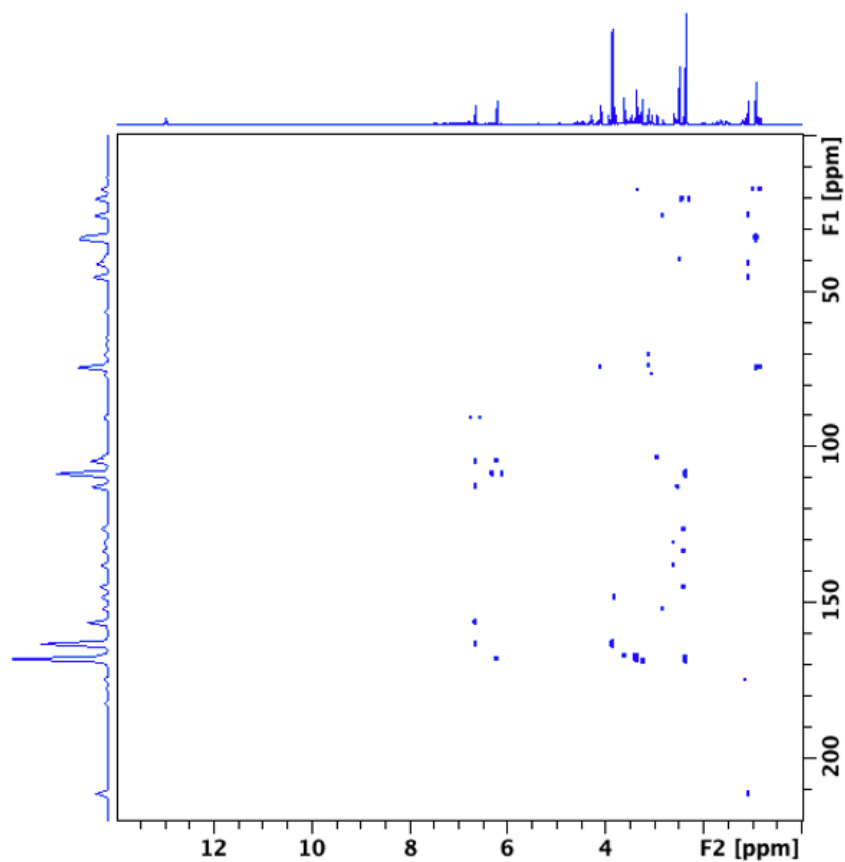
Figur 319: Hele 1D ^1H NMR spekter av fraksjon VM2S47



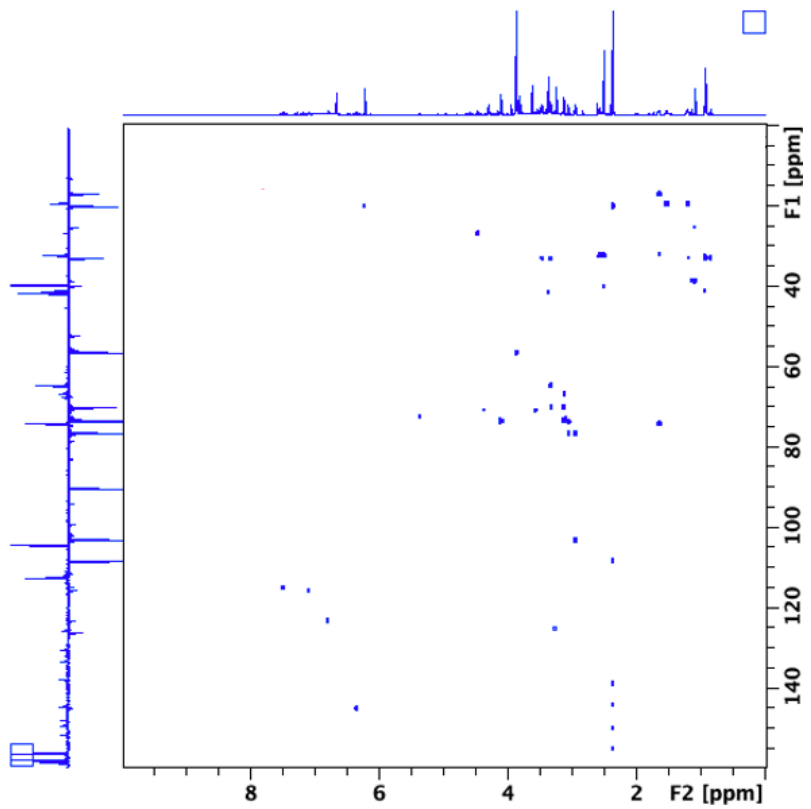
Figur 320: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon VM2S47



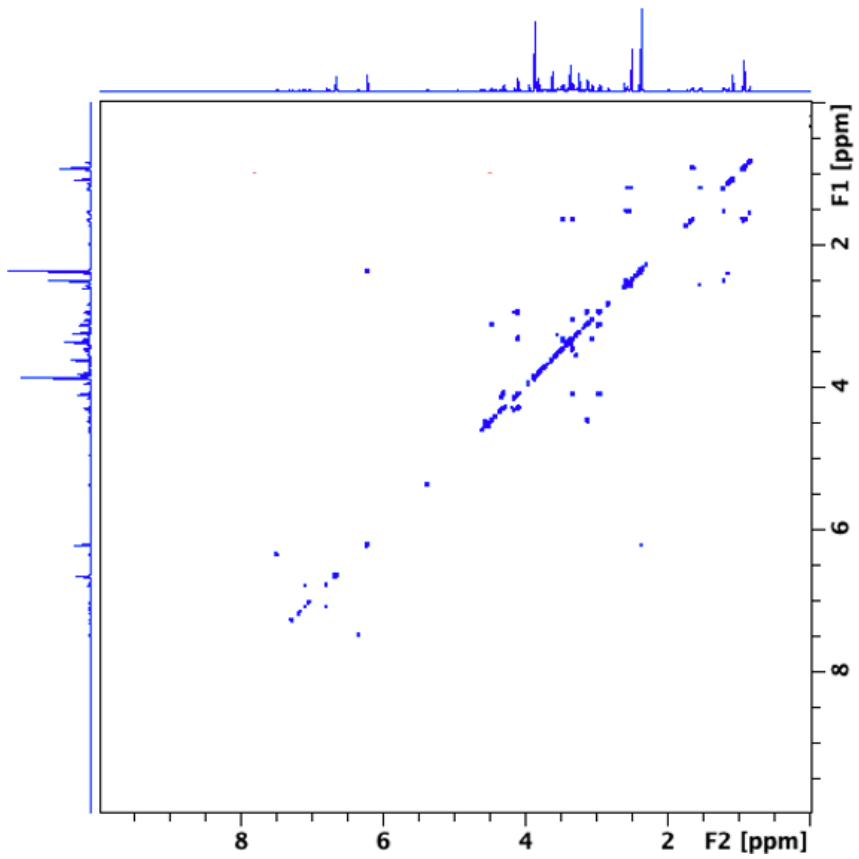
Figur 321: Ekspandert region i 1D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY NMR spekter av fraksjon VM2S47



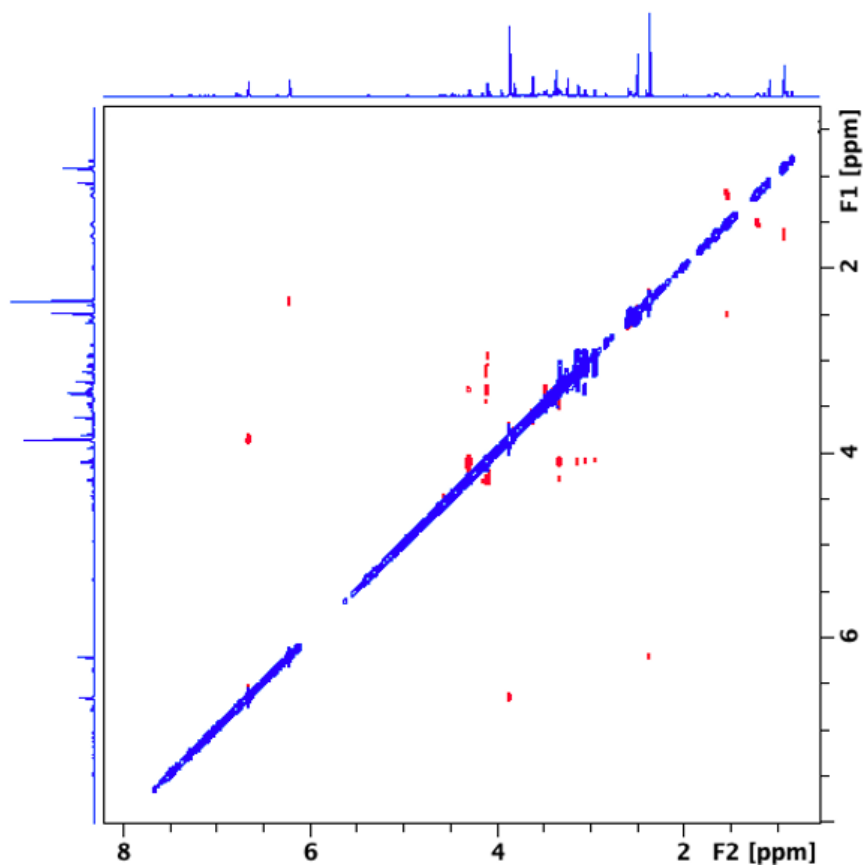
Figur 322: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon VM2S47



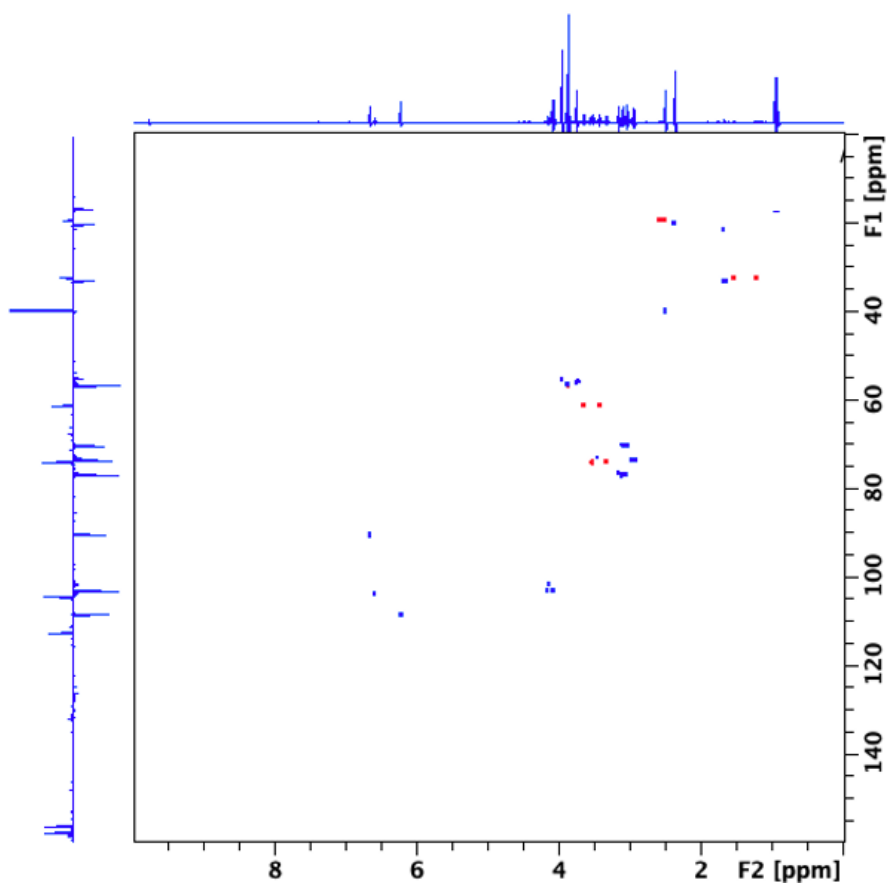
Figur 323: Hele 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekter av fraksjon VM2S47



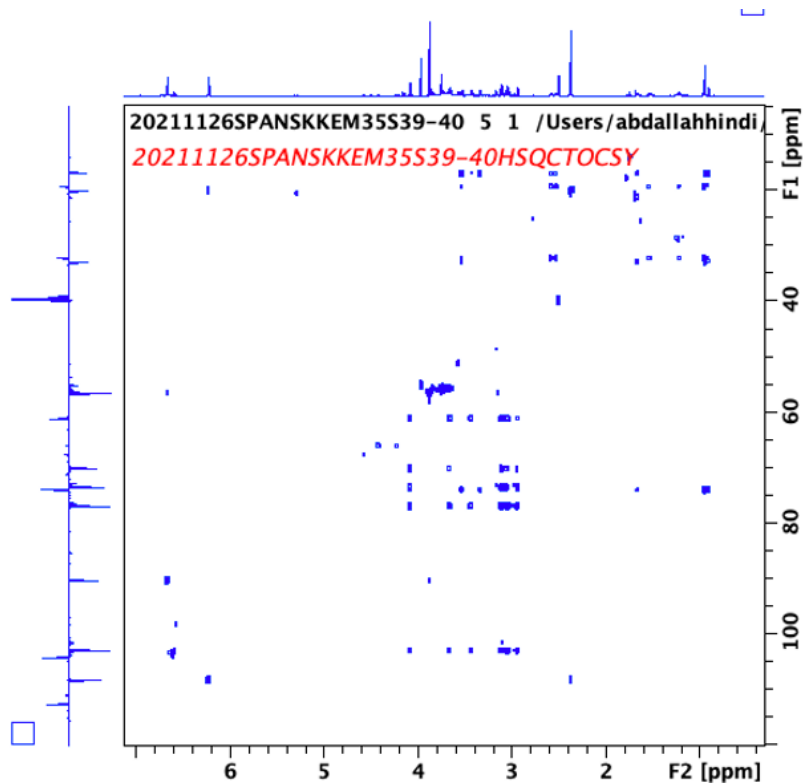
Figur 324: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon VM2S47



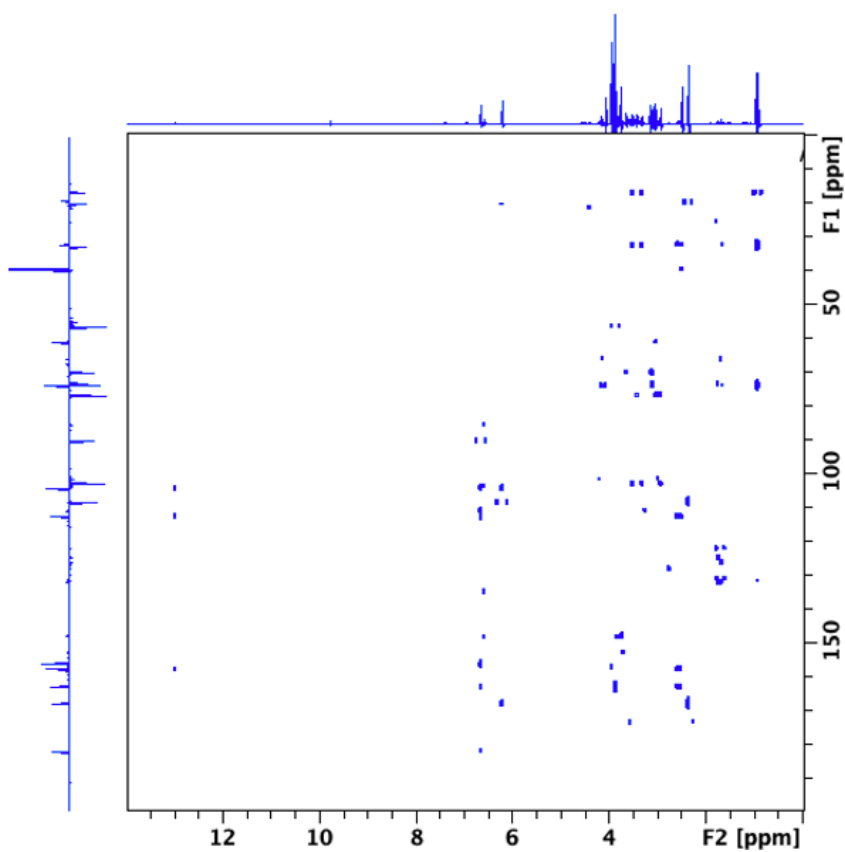
Figur 325: Hele 2D ^1H - ^1H ROESY NMR spekter av fraksjon VM2S47



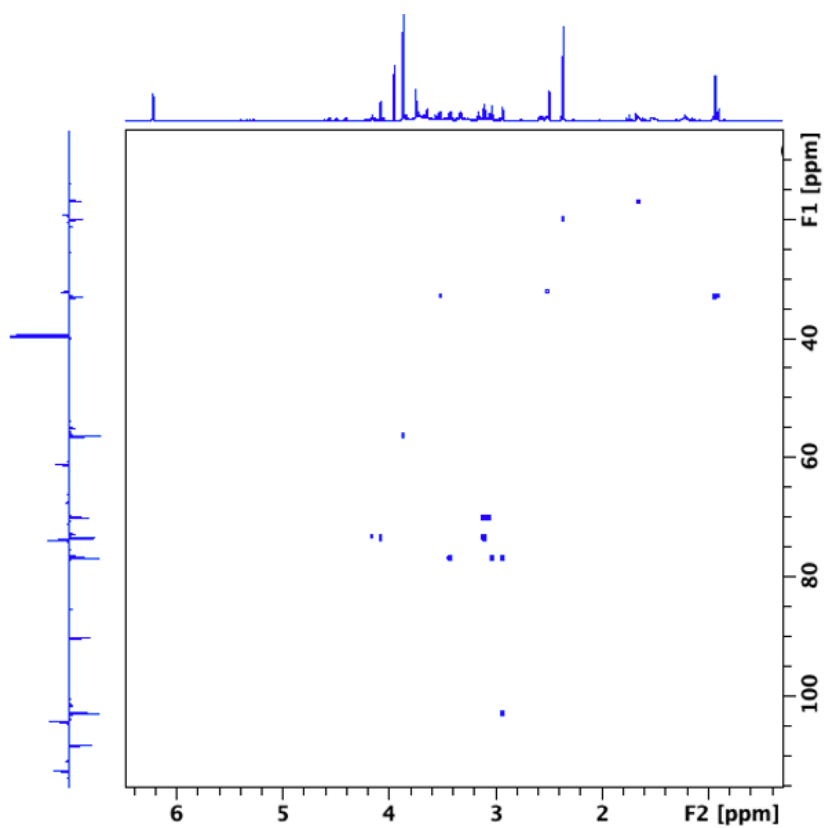
Figur 326: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon EM3-5S39+40



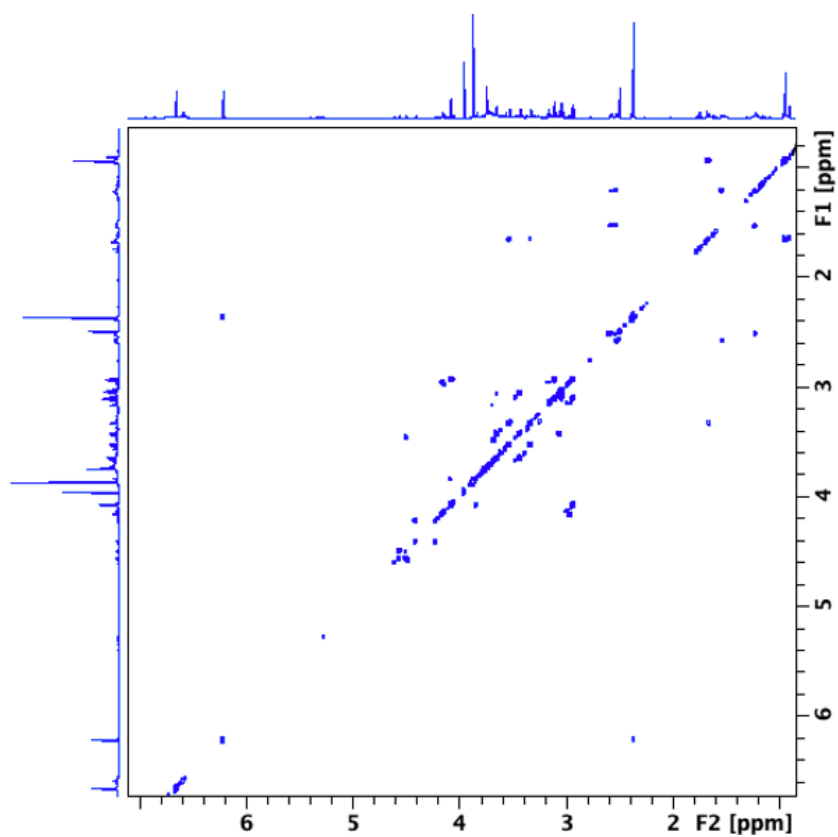
Figur 327: Ekspandert region i 1D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY NMR spekter av fraksjon EM3-5S39+40



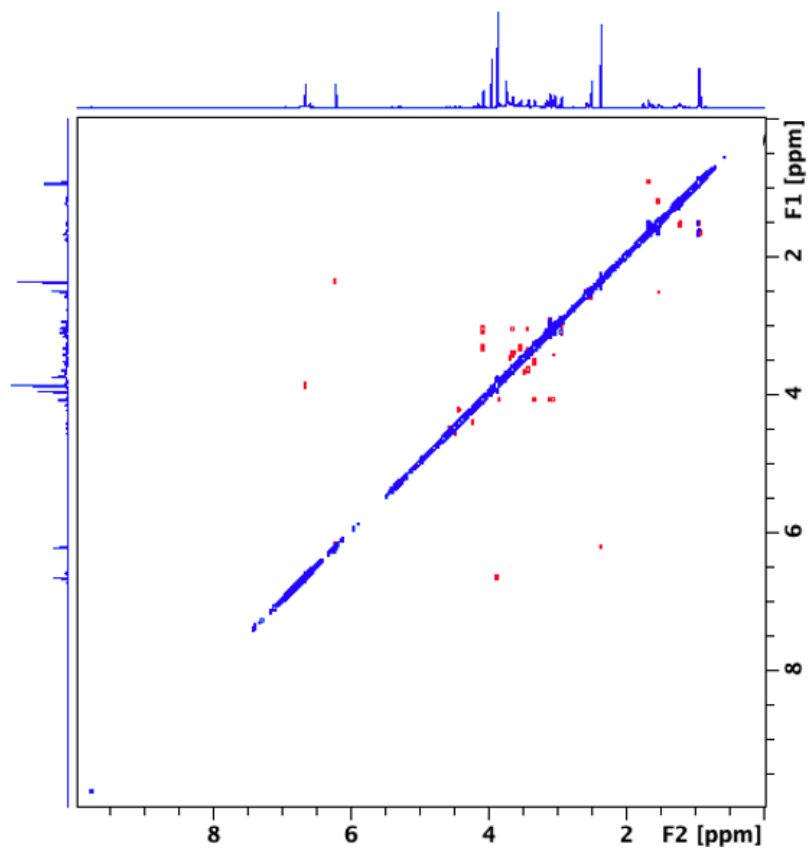
Figur 328: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon EM3-5S39+40



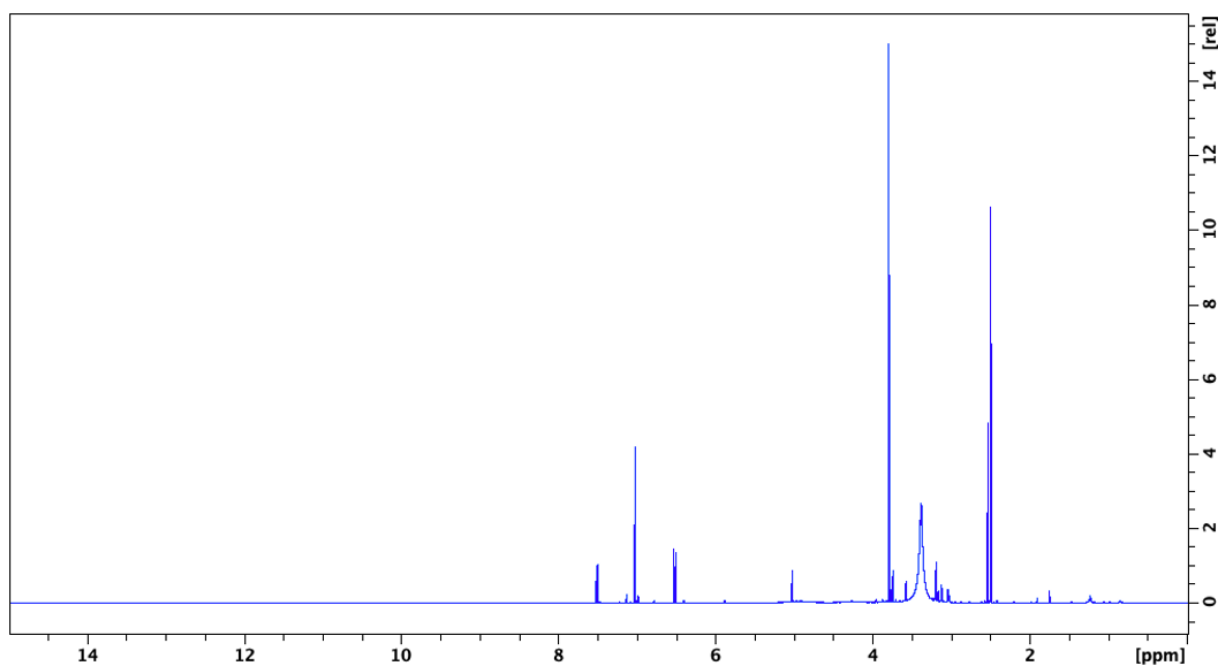
Figur 329: Hele 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekter av fraksjon EM3-5S39+40



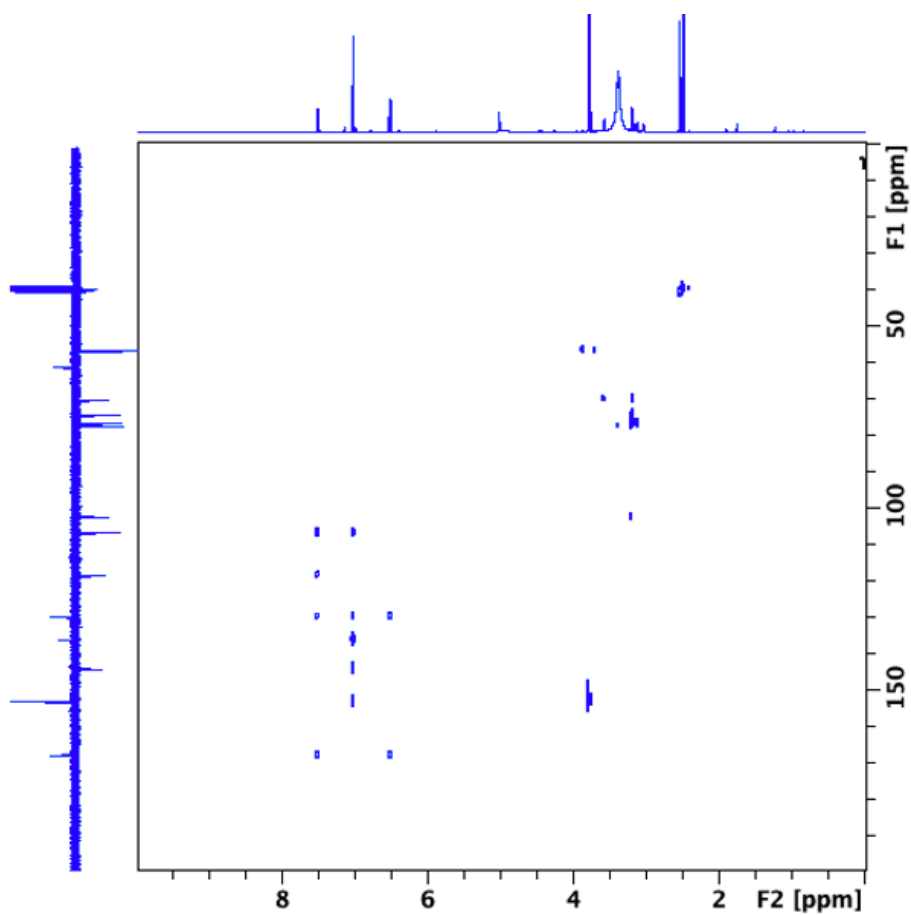
Figur 330: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon EM3-5S39+40



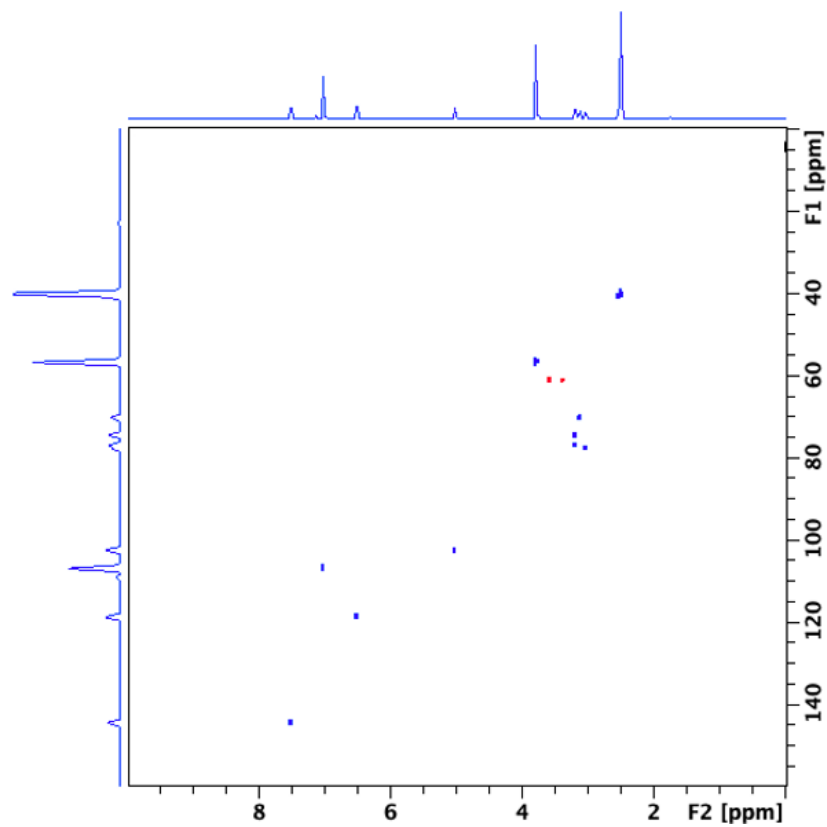
Figur 331: Hele 2D ¹H-¹H ROESY NMR spekter av fraksjon EM3-5S39+40



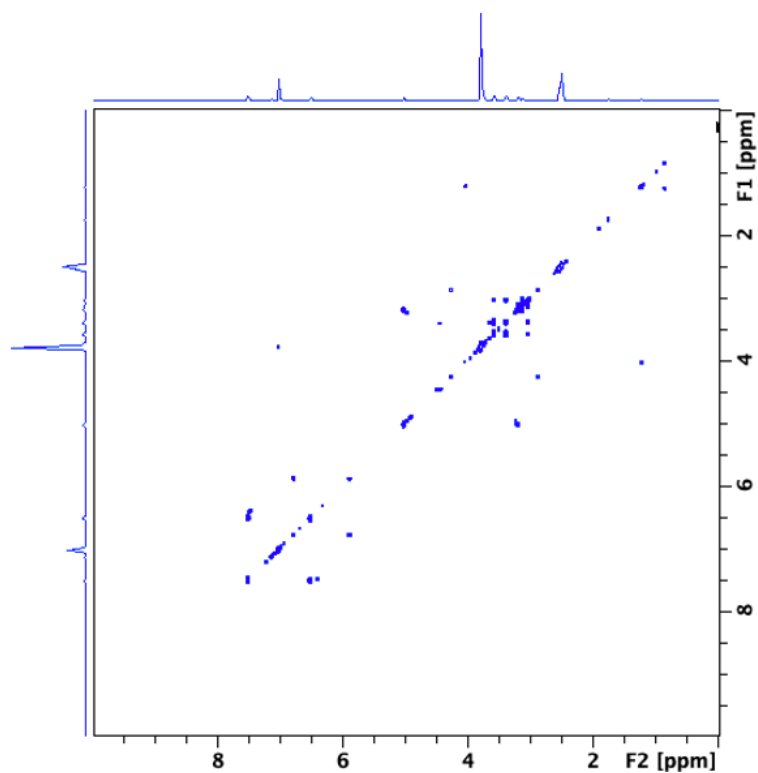
Figur 332: Hele 1D ¹H NMR spekter av fraksjon VM2S21-23P3+22+37



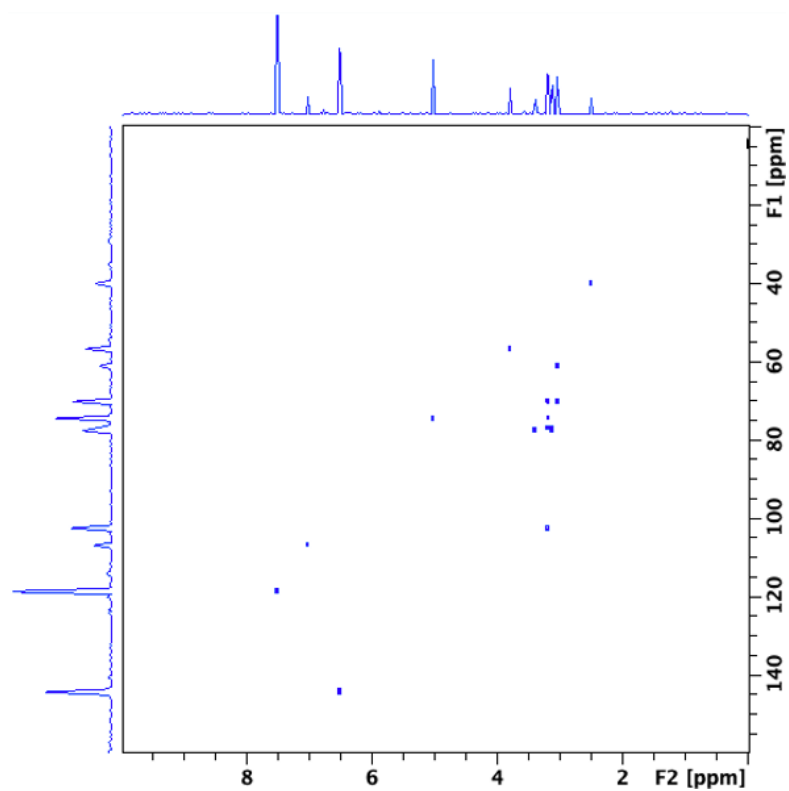
Figur 333: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon VM2S21-23P3+22+37



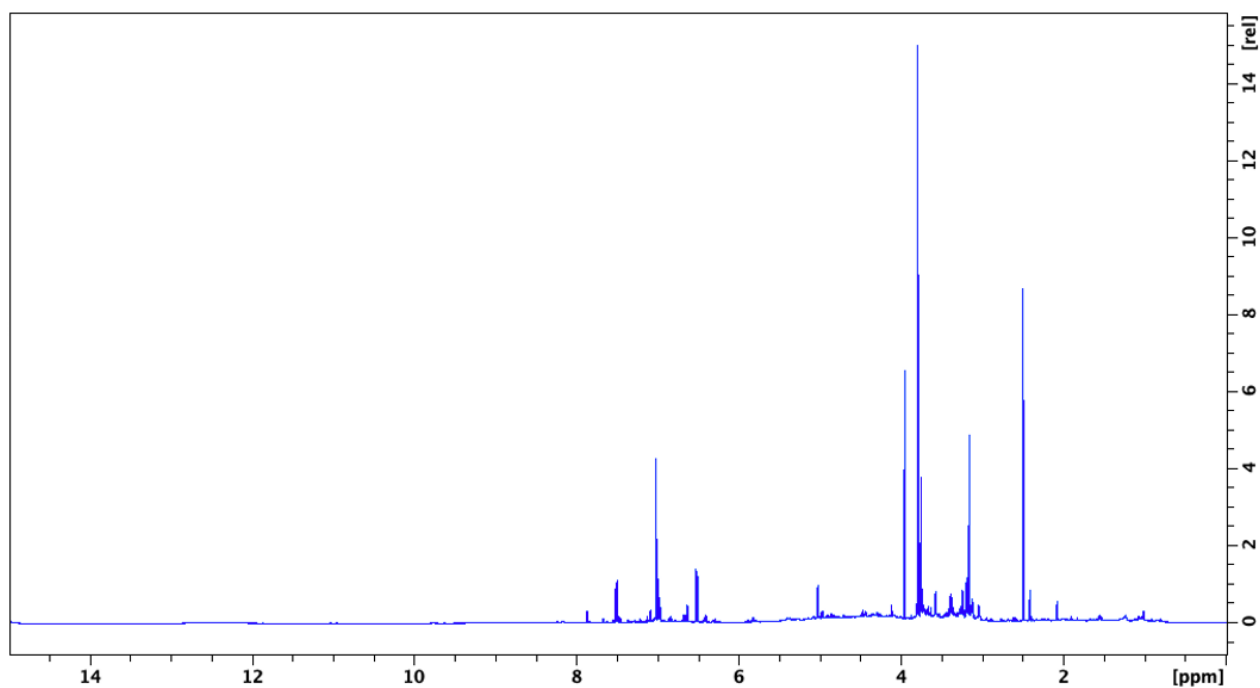
Figur 334: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon VM2S21-23P3+22+37



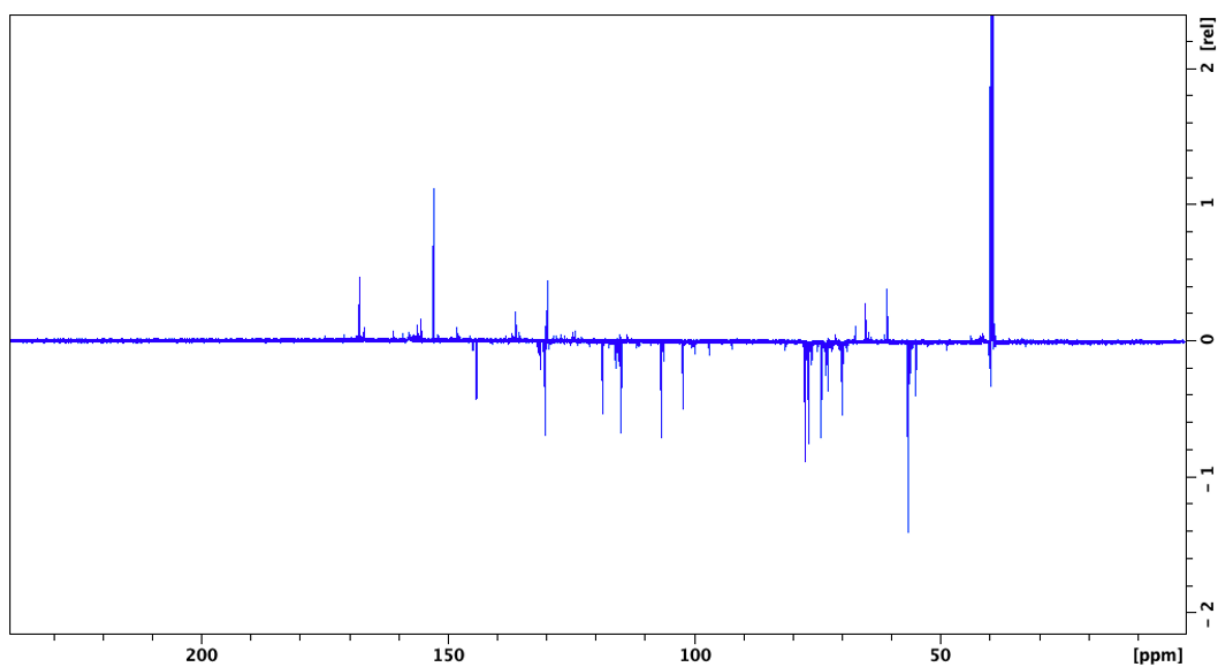
Figur 335: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon VM2S21-23P3+22+37



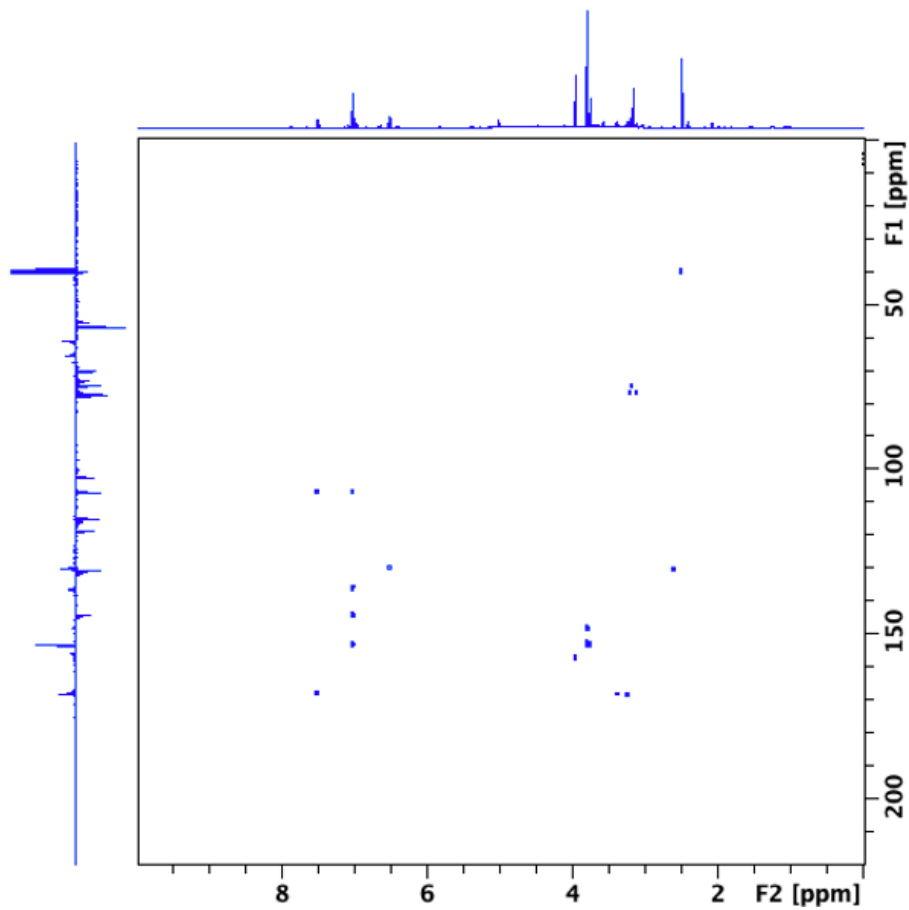
Figur 336: Hele 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekter av fraksjon VM2S21-23P3+22+37



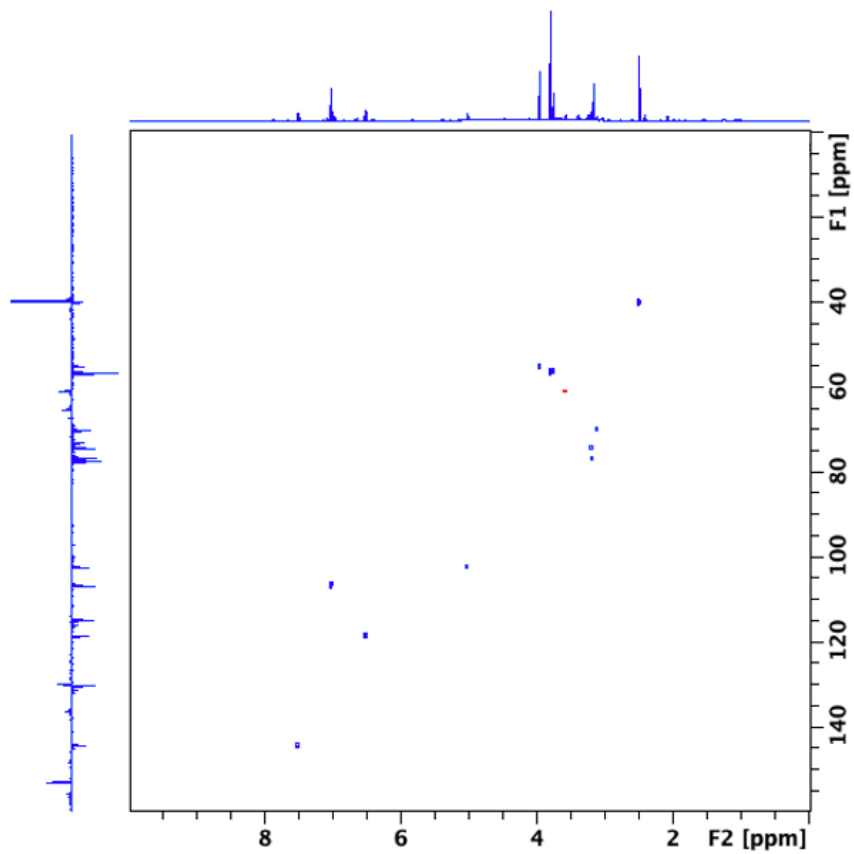
Figur 337: Hele 1D ^1H NMR spekter av fraksjon VM1LS8+9



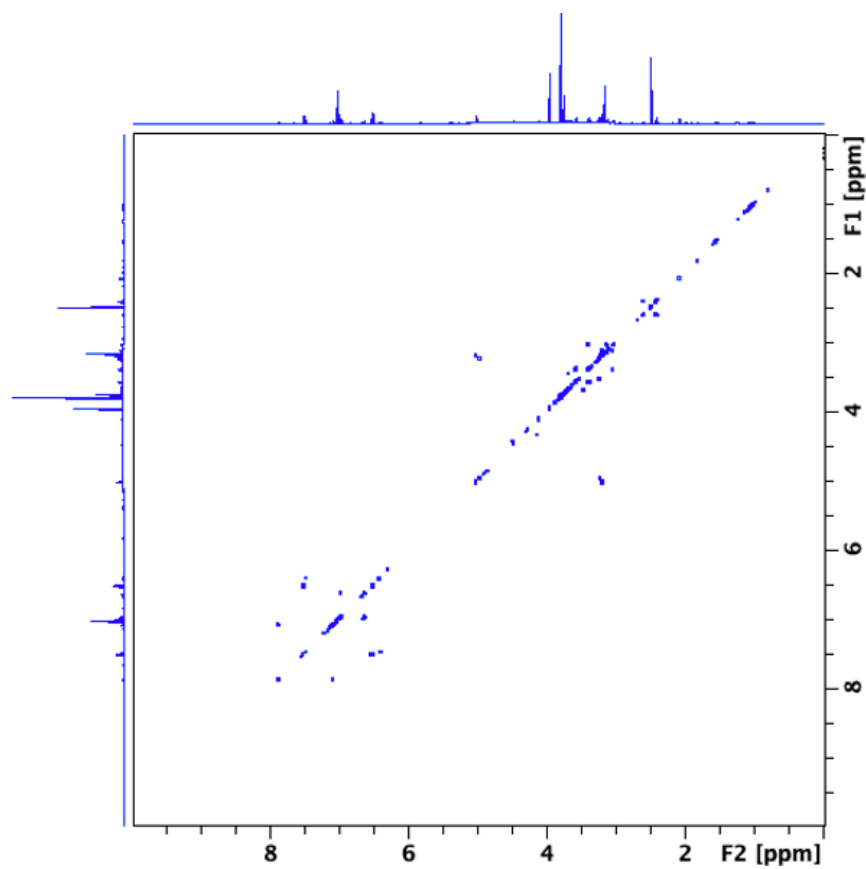
Figur 338: Hele 1D ^{13}C CAPT NMR spekter av fraksjon VM1LS8+9



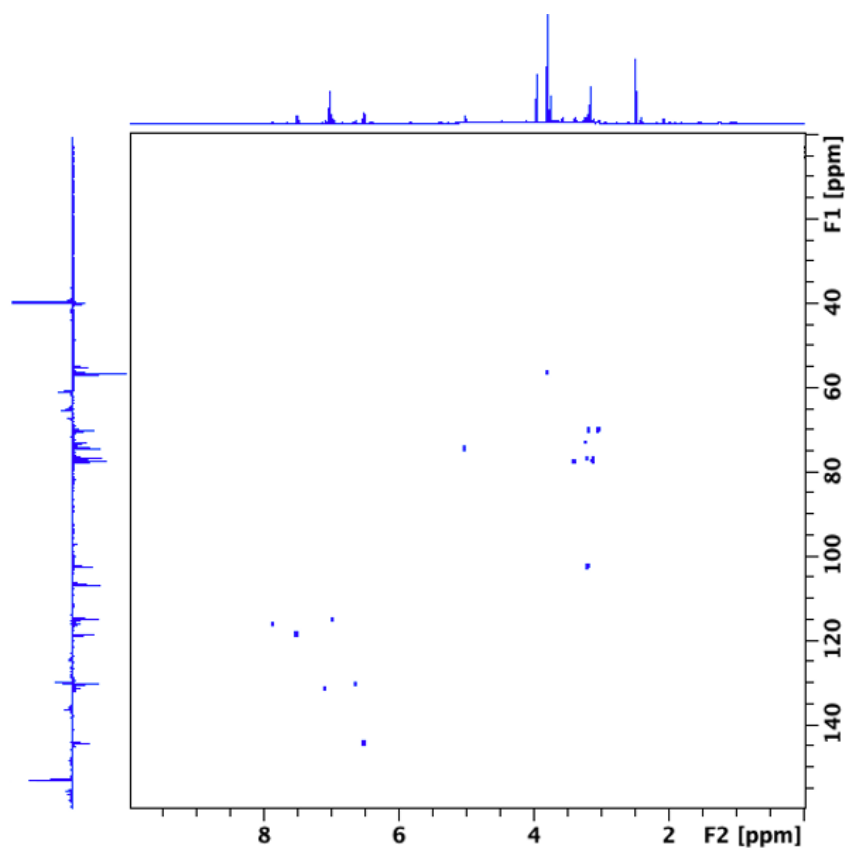
Figur 339: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon VMILS8+9. Må gå i lavere kontur for å kunne vise krysstoppen mellom $\text{H1}'$ (5.02 ppm) og C4 (136.19 ppm) fordi denne krysstoppen er lav i intensitet, samt bredt signal.



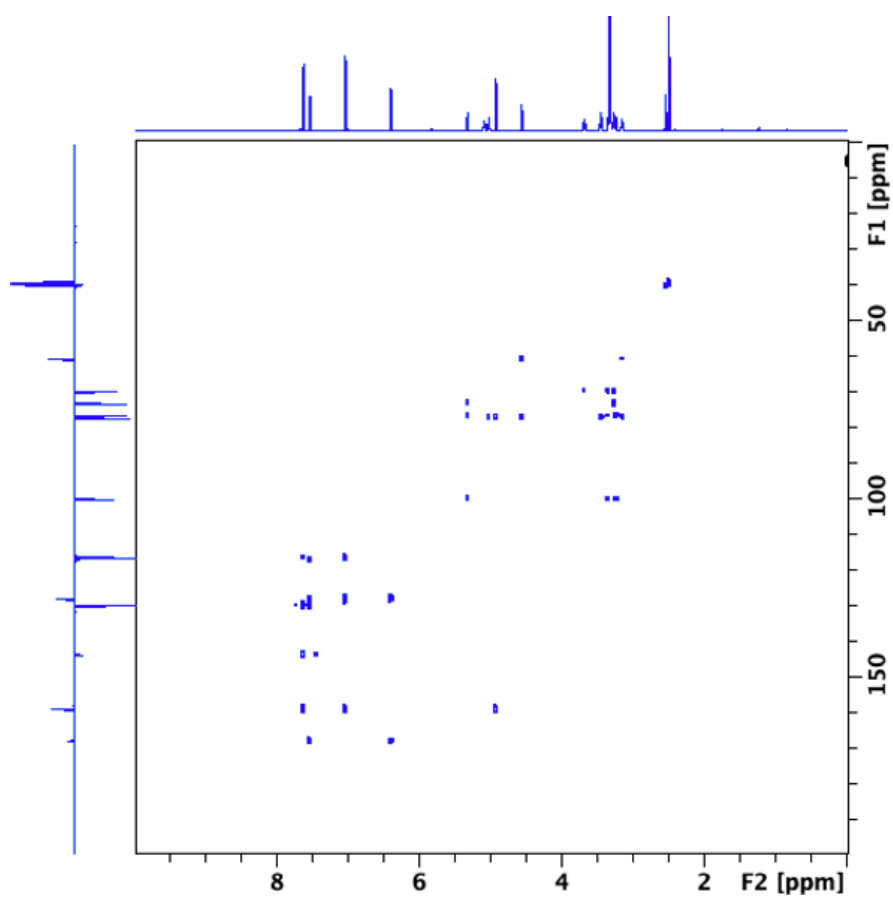
Figur 340: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon VMILS8+9



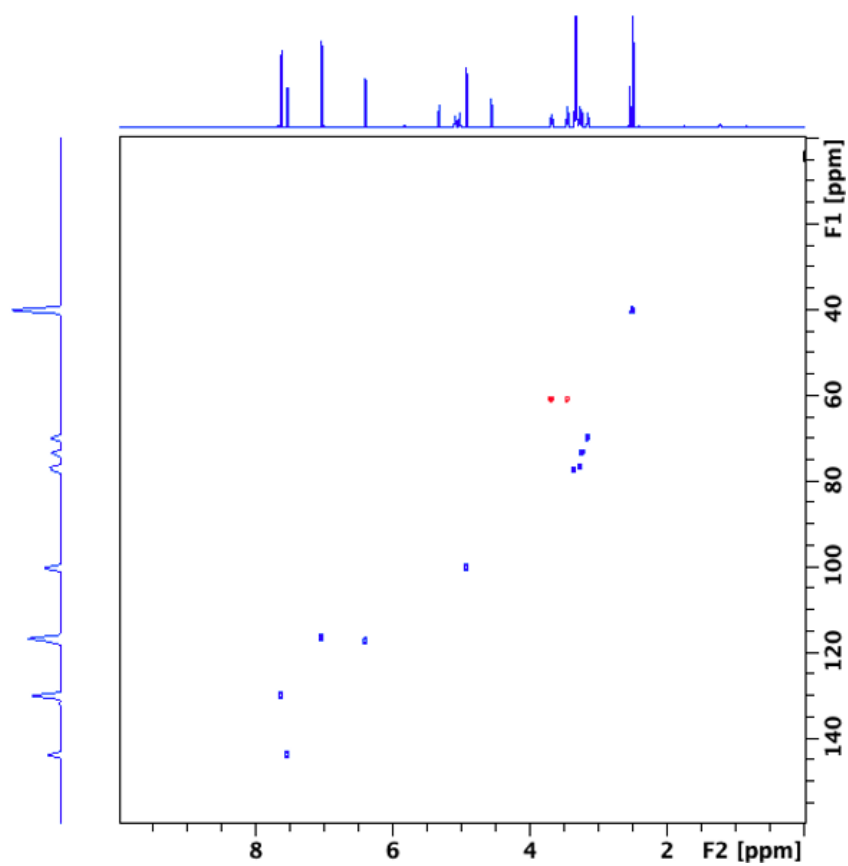
Figur 341: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon VMILS8+9



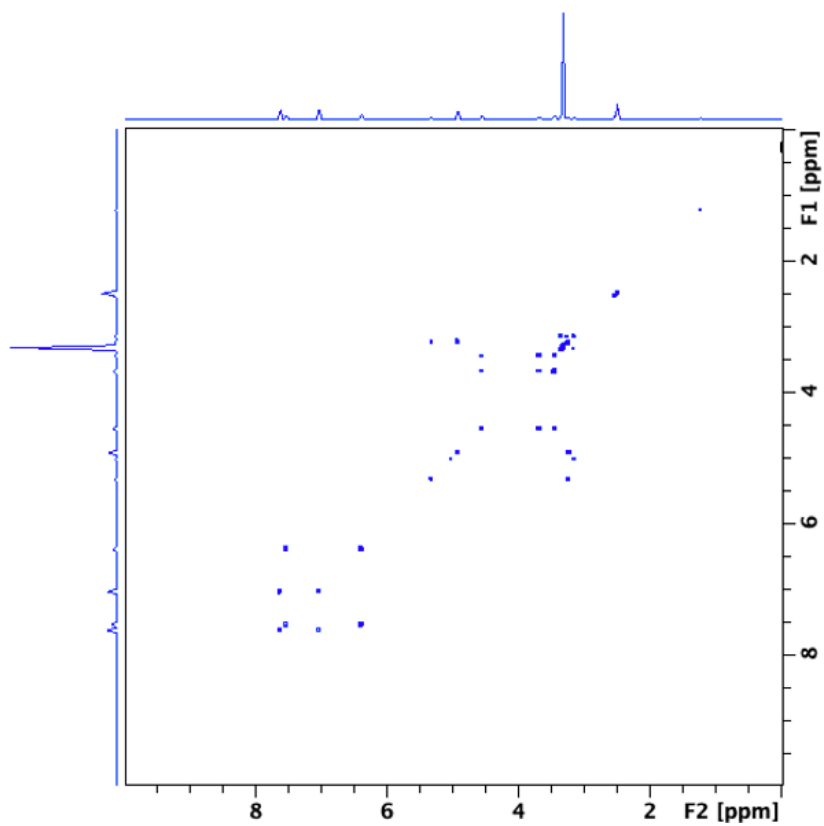
Figur 342: Hele 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekter av fraksjon VMILS8+9



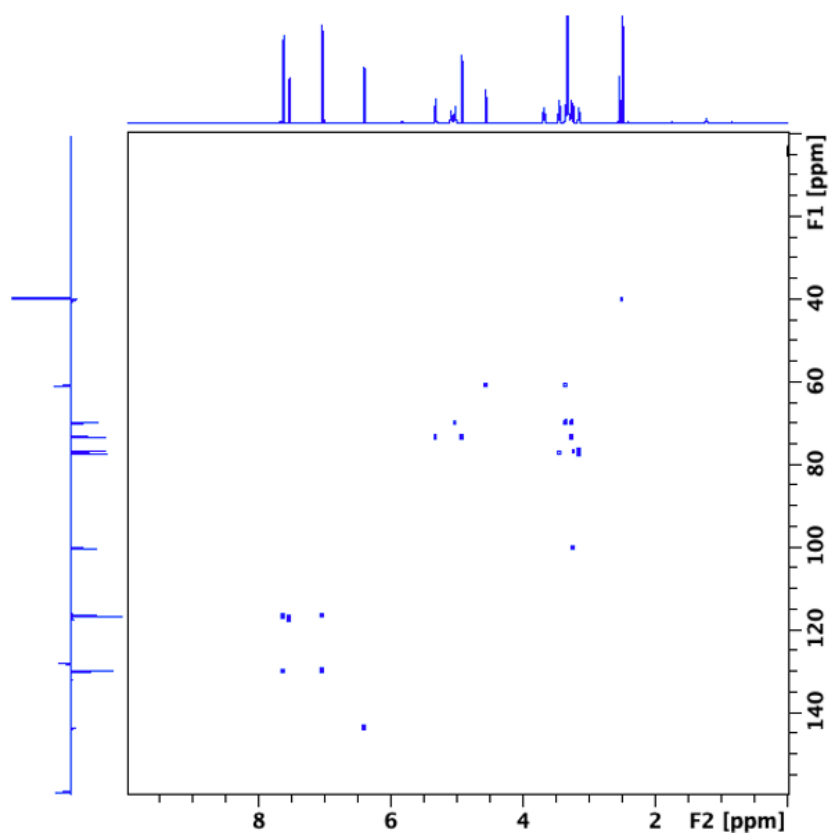
Figur 343: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon VM2S39-41P4+32



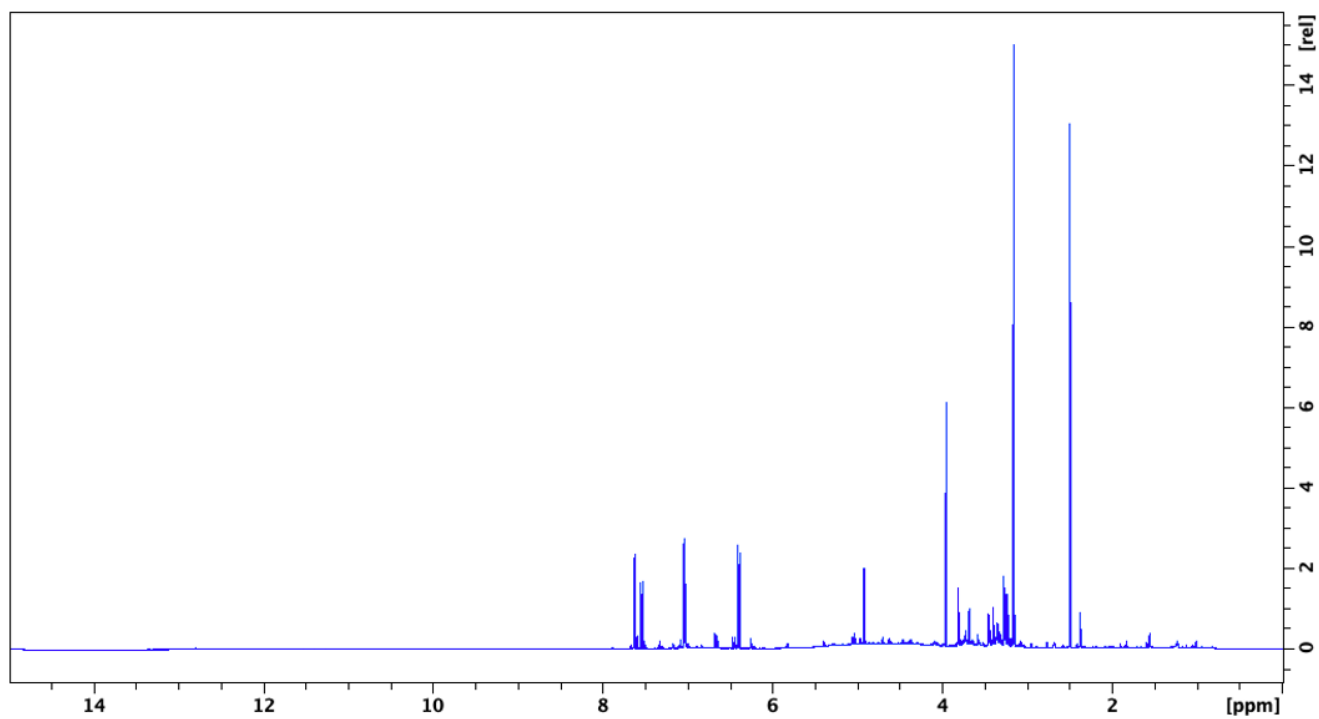
Figur 344: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon VM2S39-41P4+32



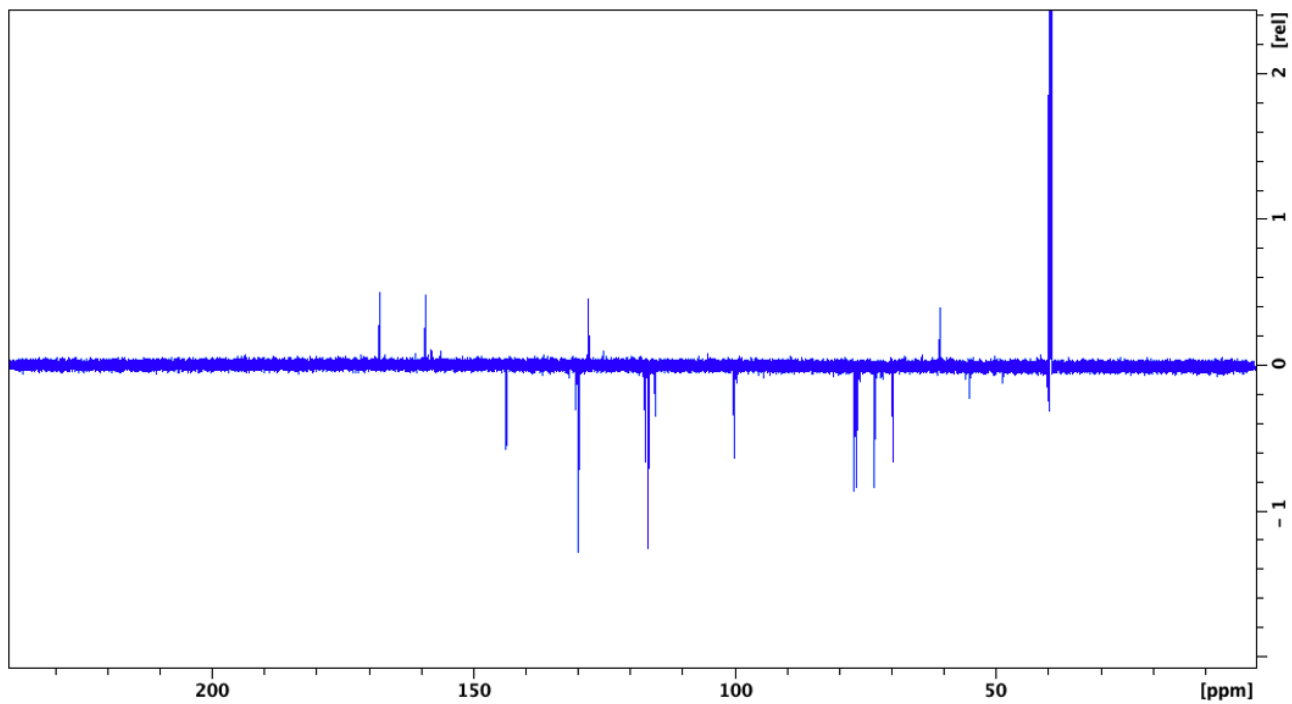
Figur 345: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon VM2S39-41P4+32



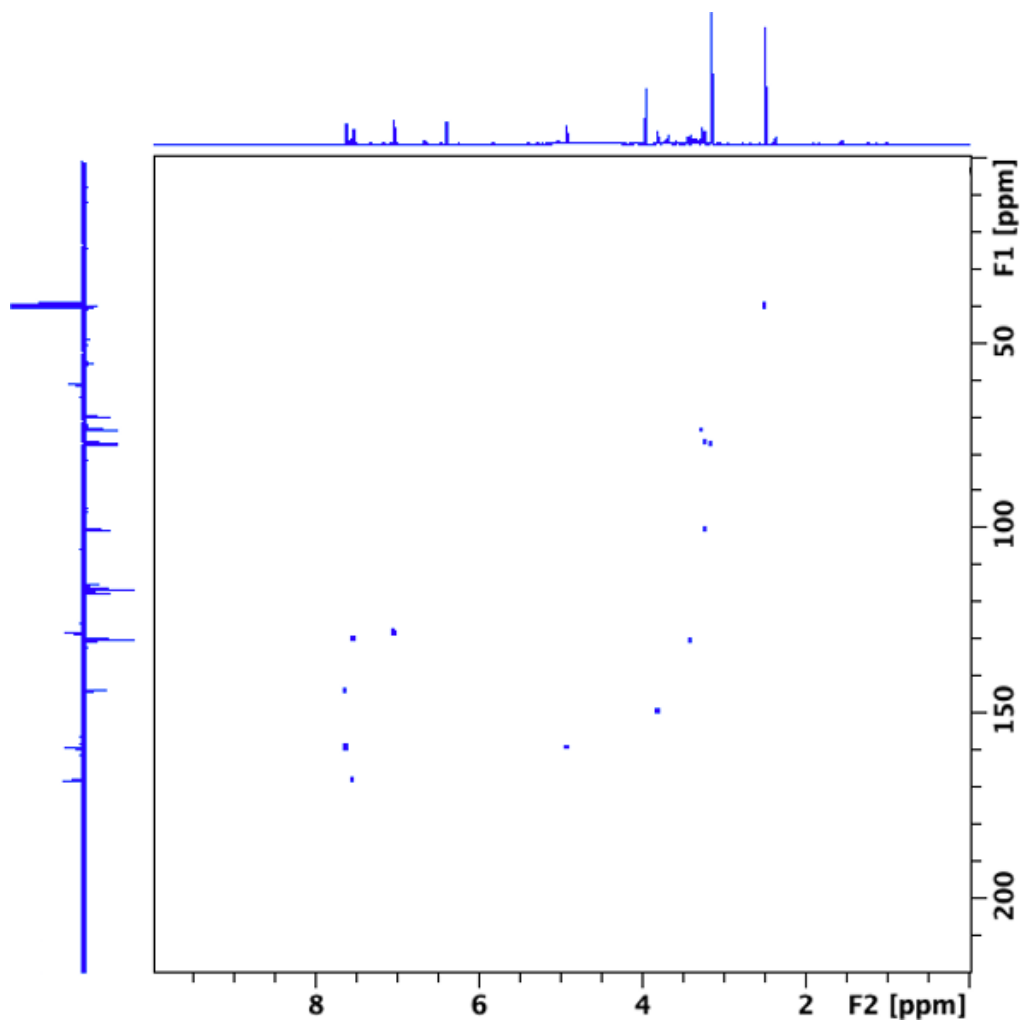
Figur 346: Hele 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekter av fraksjon VM2S39-41P4+32



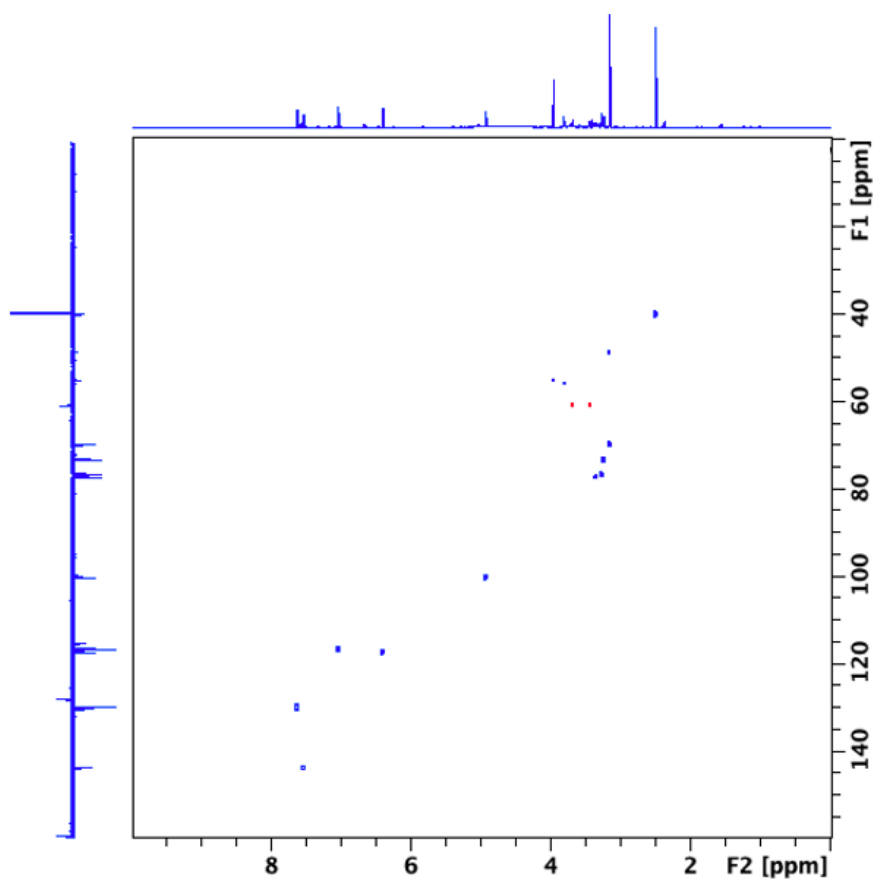
Figur 347: Hele 1D ^1H NMR spekter av fraksjon VM1LS13+14



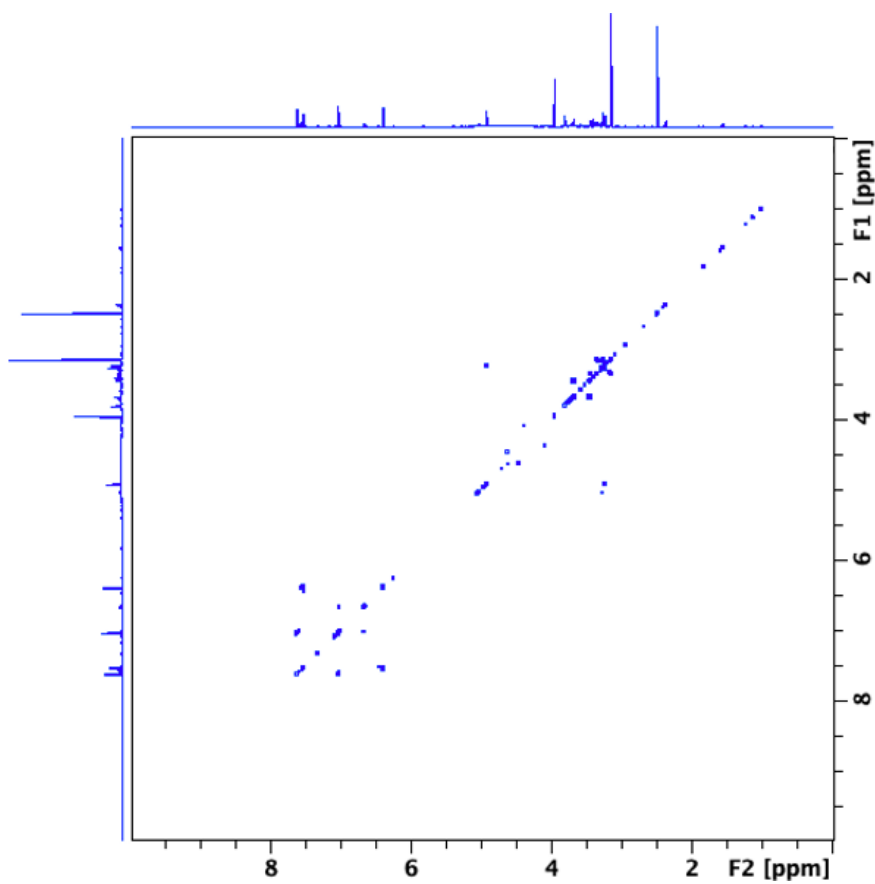
Figur 348: Hele 1D ^{13}C CAPT NMR spekter av fraksjon VM1LS13+14



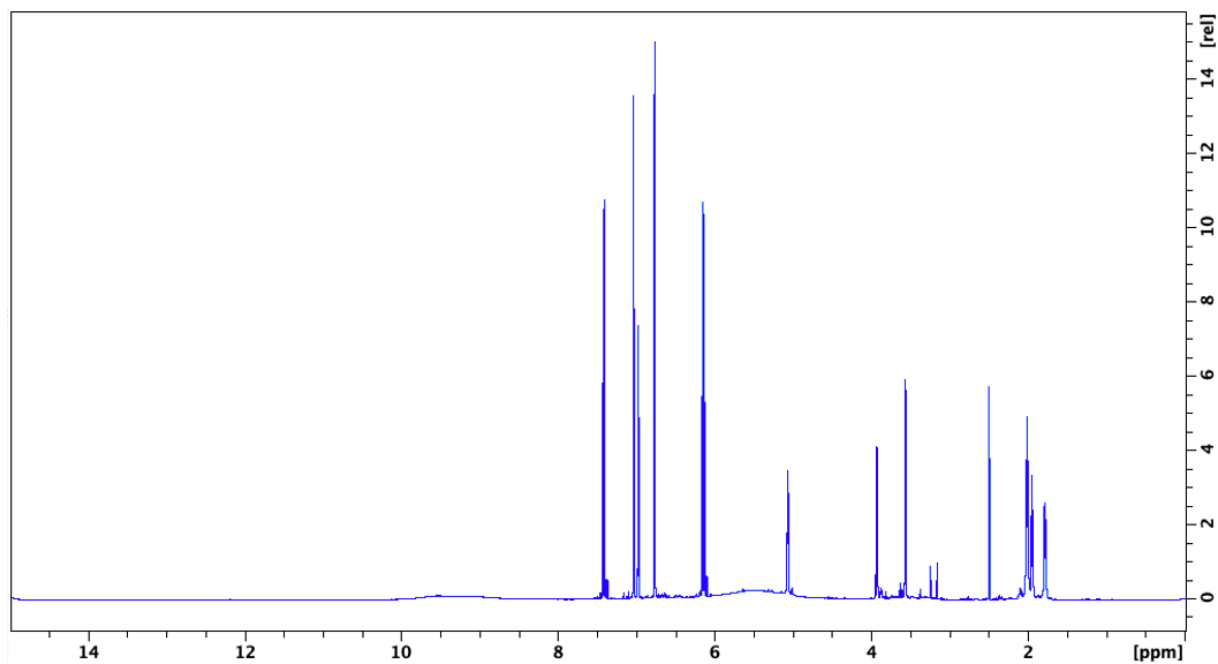
Figur 349: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon VM1LS13+14



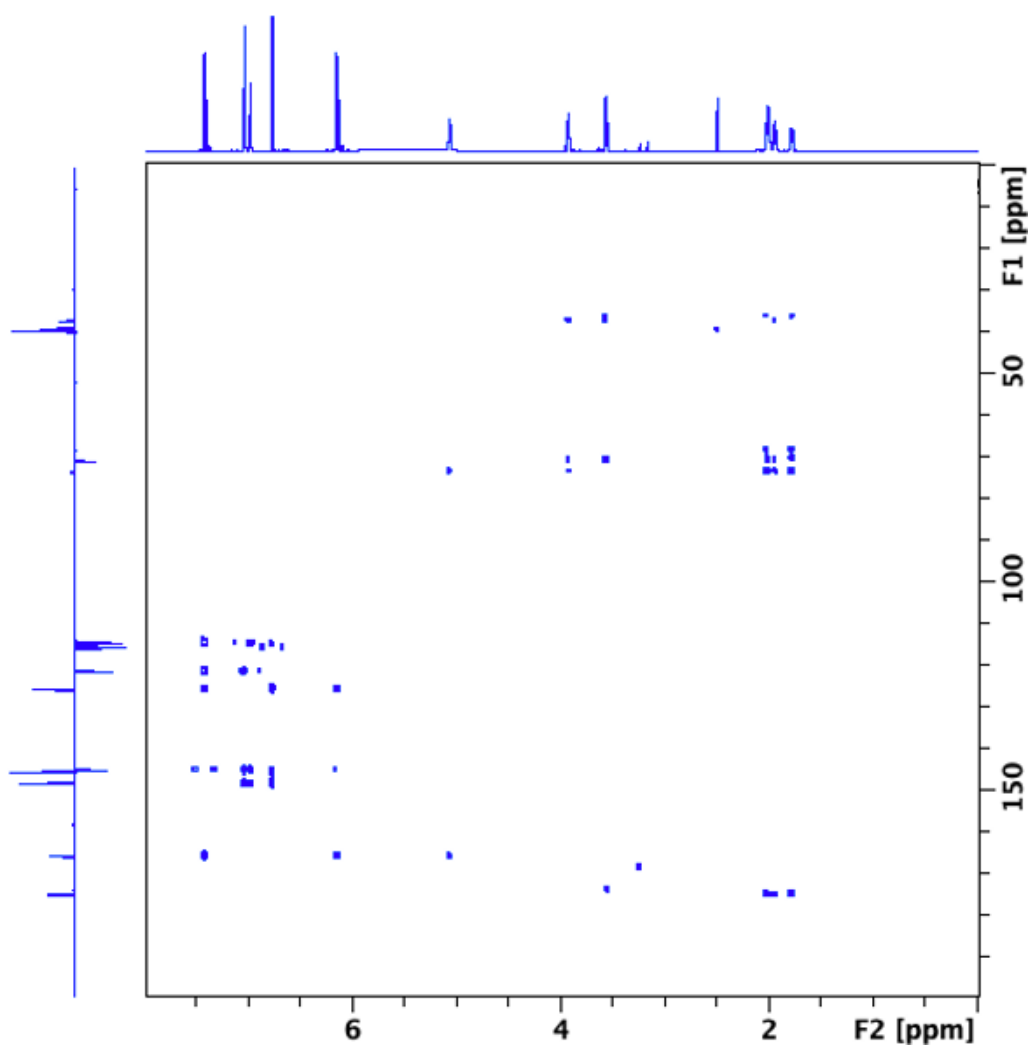
Figur 350: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon VMILS13+14



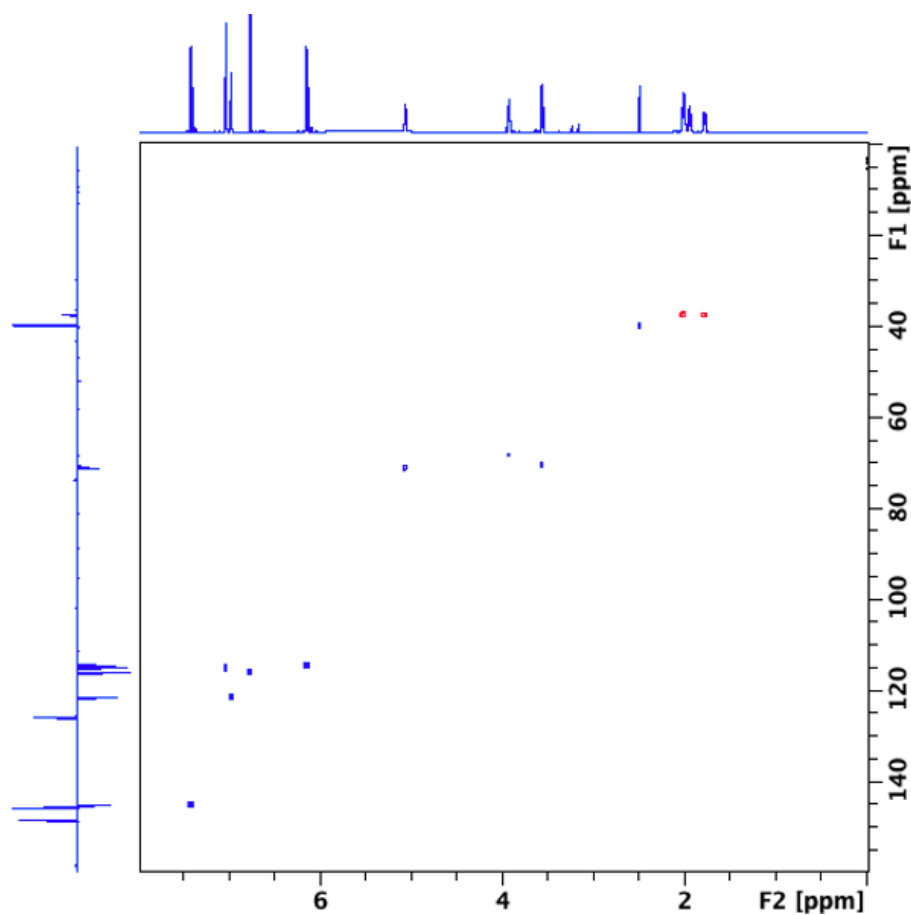
Figur 351: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon VMILS13+14



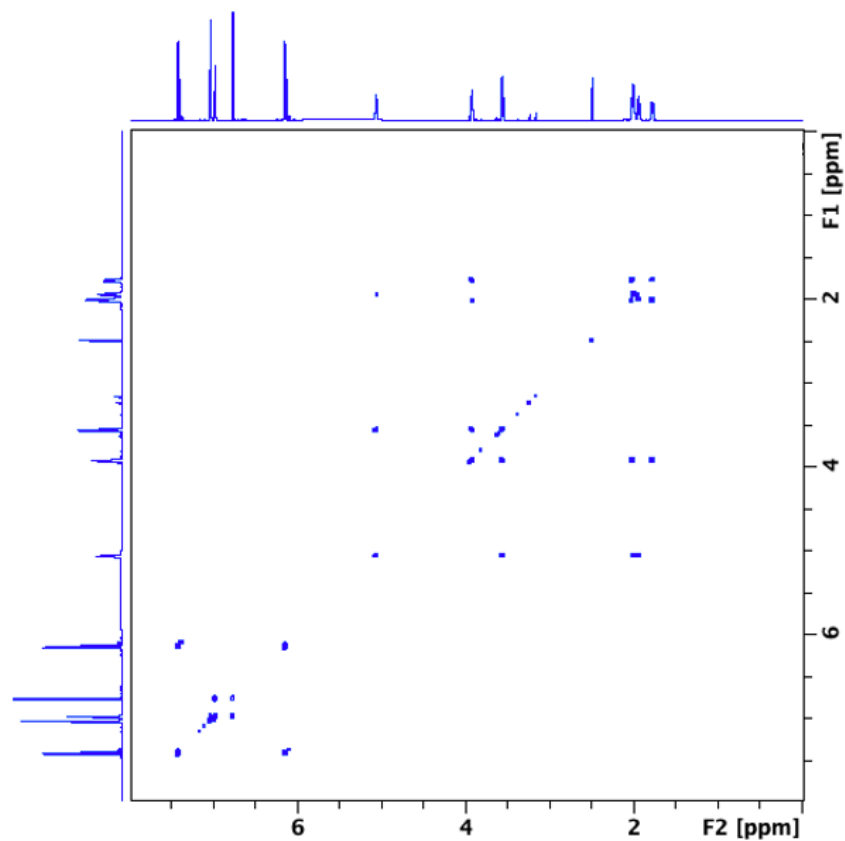
Figur 352: Hele 1D ^1H NMR spekter av fraksjon VM2S62-68



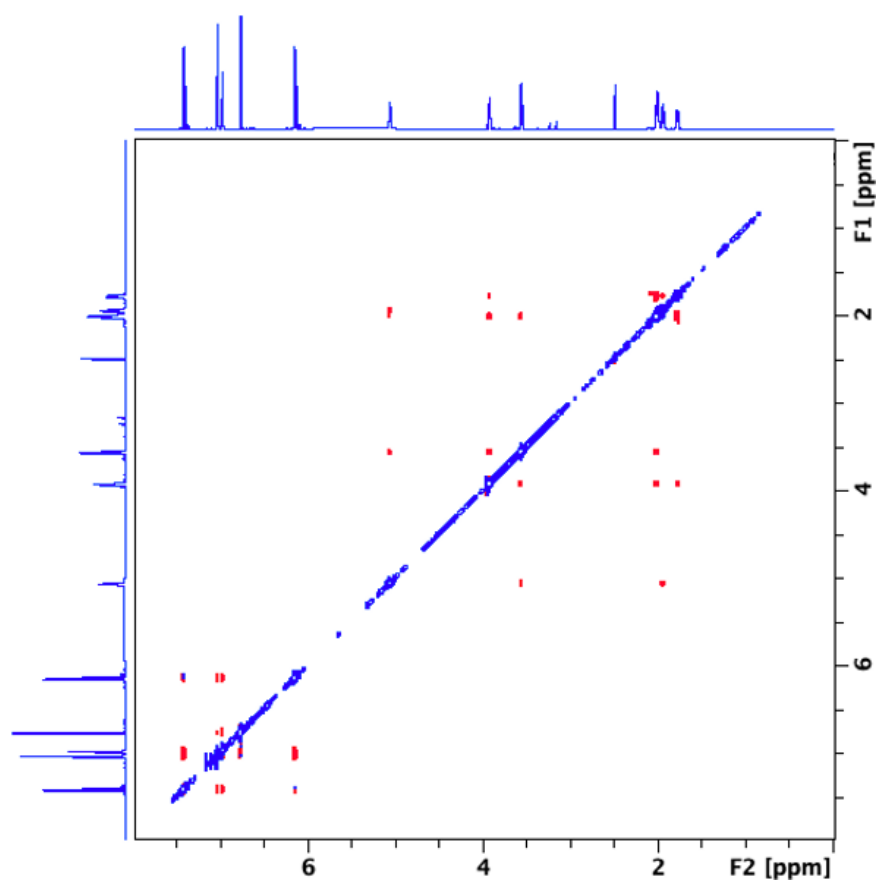
Figur 353: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon VM2S62-68



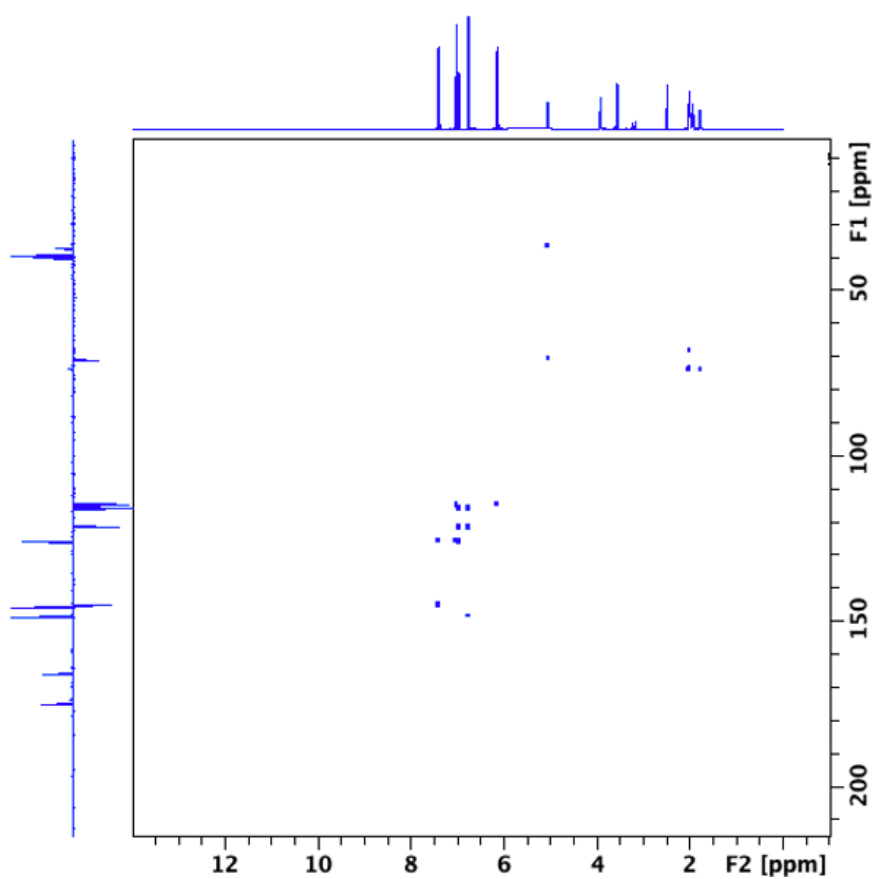
Figur 354: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon VM2S62-68



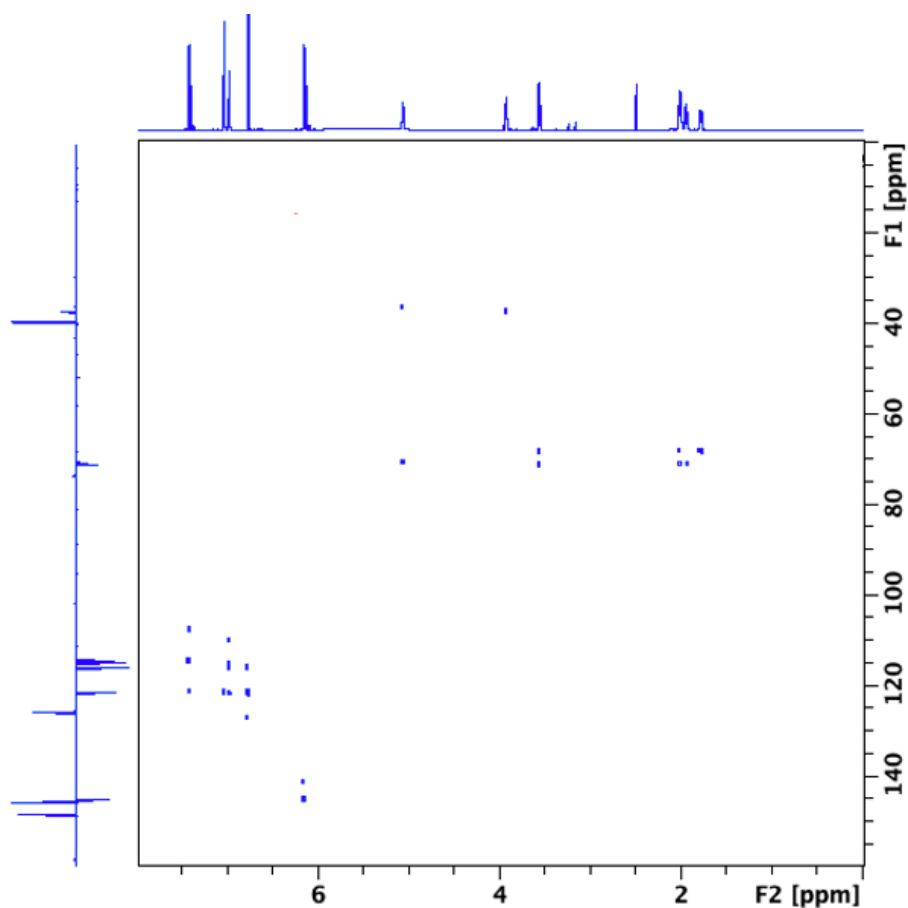
Figur 355: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon VM2S62-68



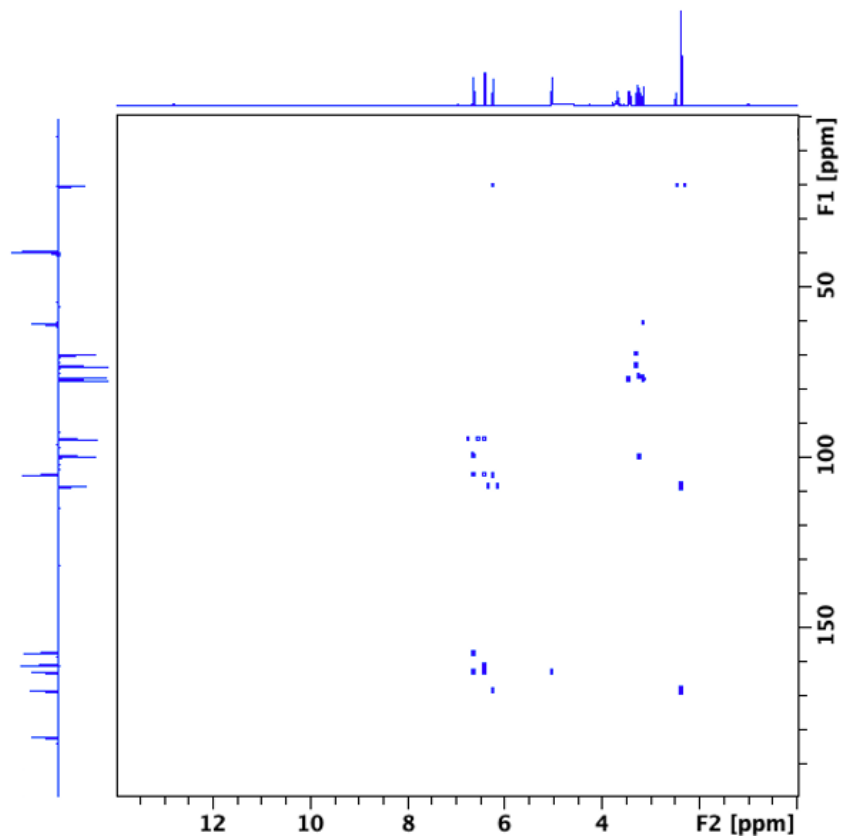
Figur 356: Hele 2D ^1H - ^1H ROESY NMR spekter av fraksjon VM2S62-68



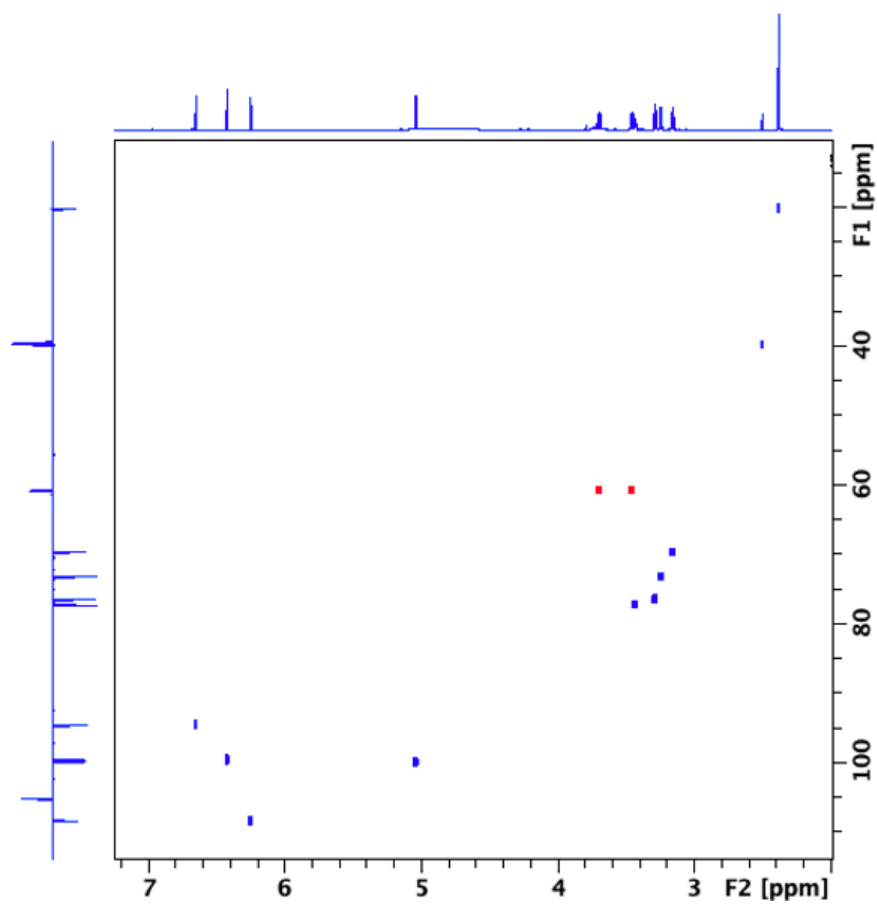
Figur 357: Hele 2D ^1H - ^{13}C 1,1-ADEQUATE NMR spekter av fraksjon VM2S62-68



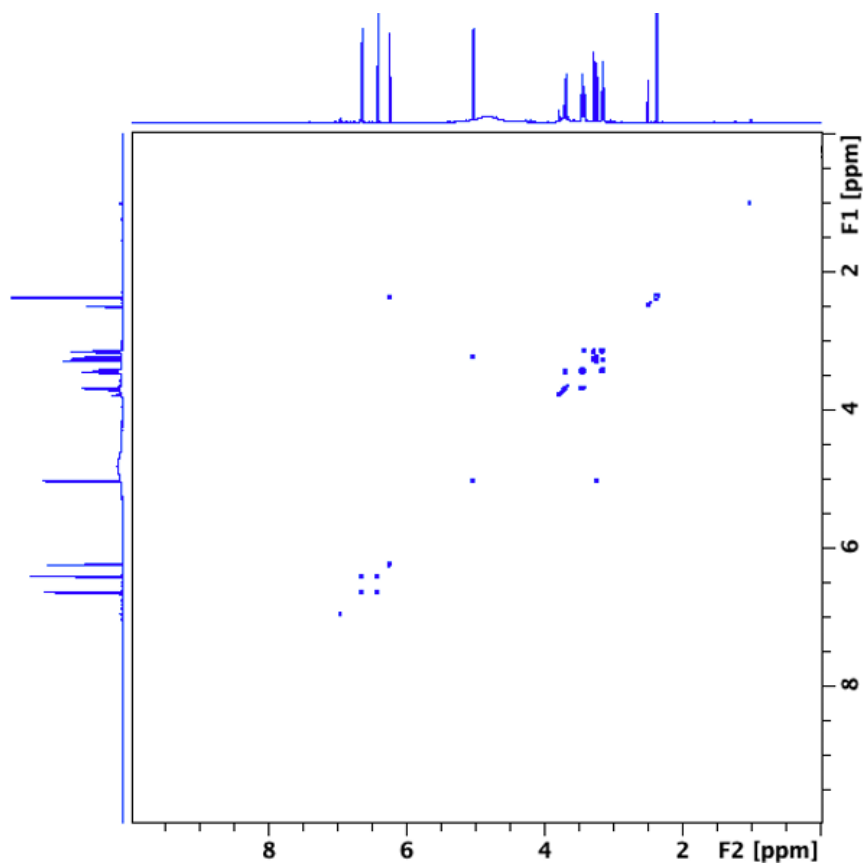
Figur 358: Hele 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekter av fraksjon VM2S62-68



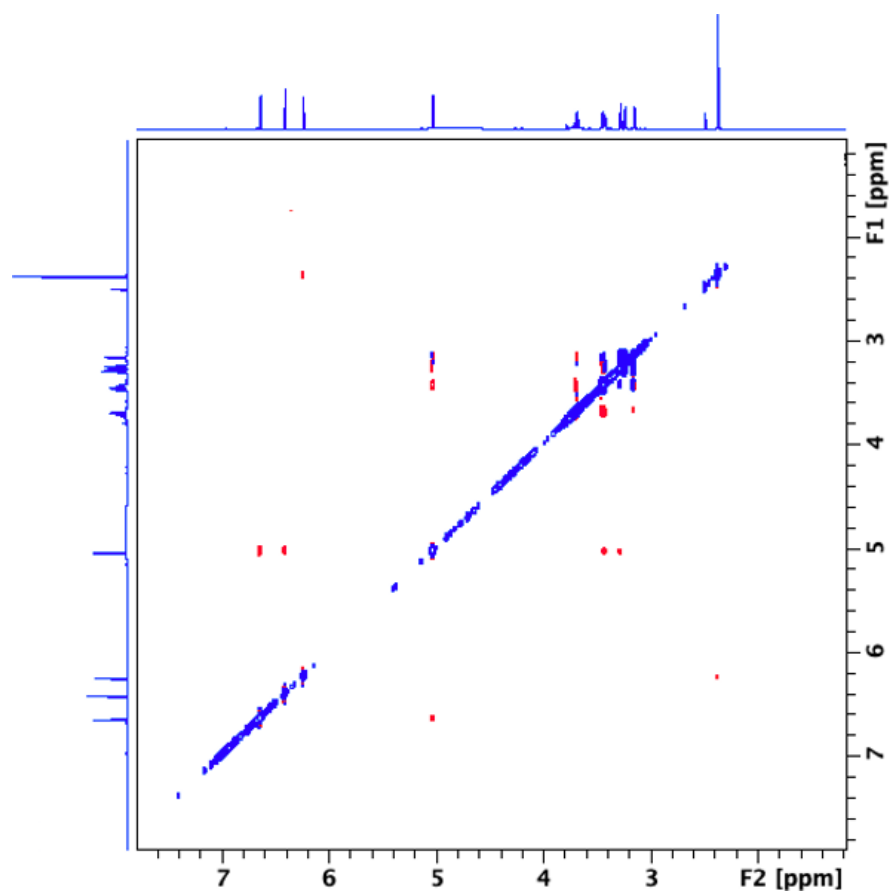
Figur 359: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon VM2S28+29



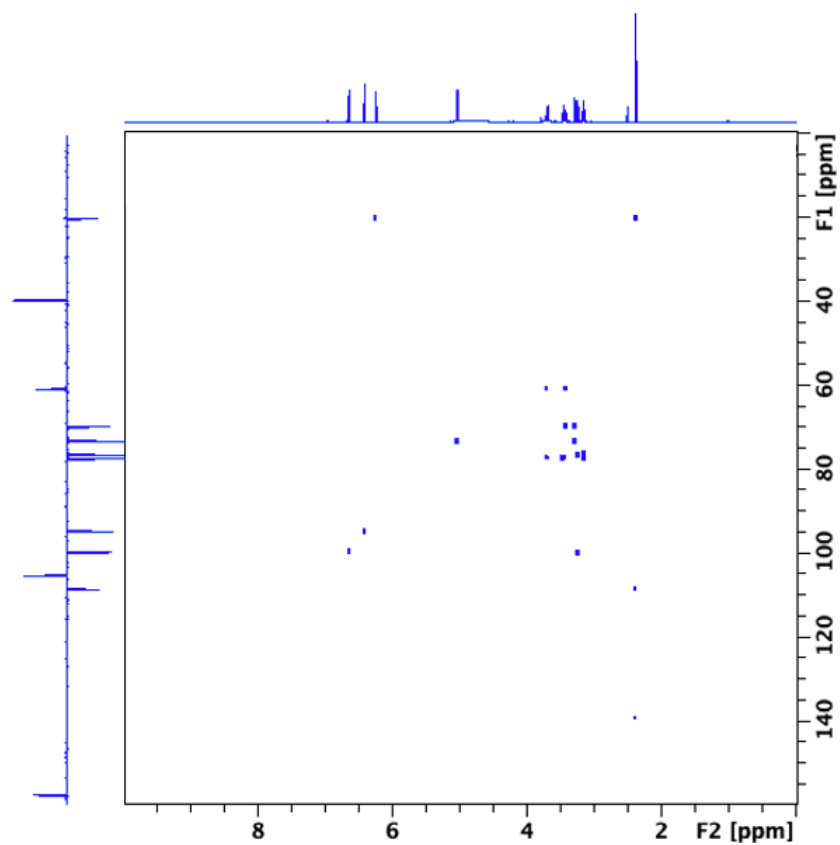
Figur 360: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon VM2S28+29



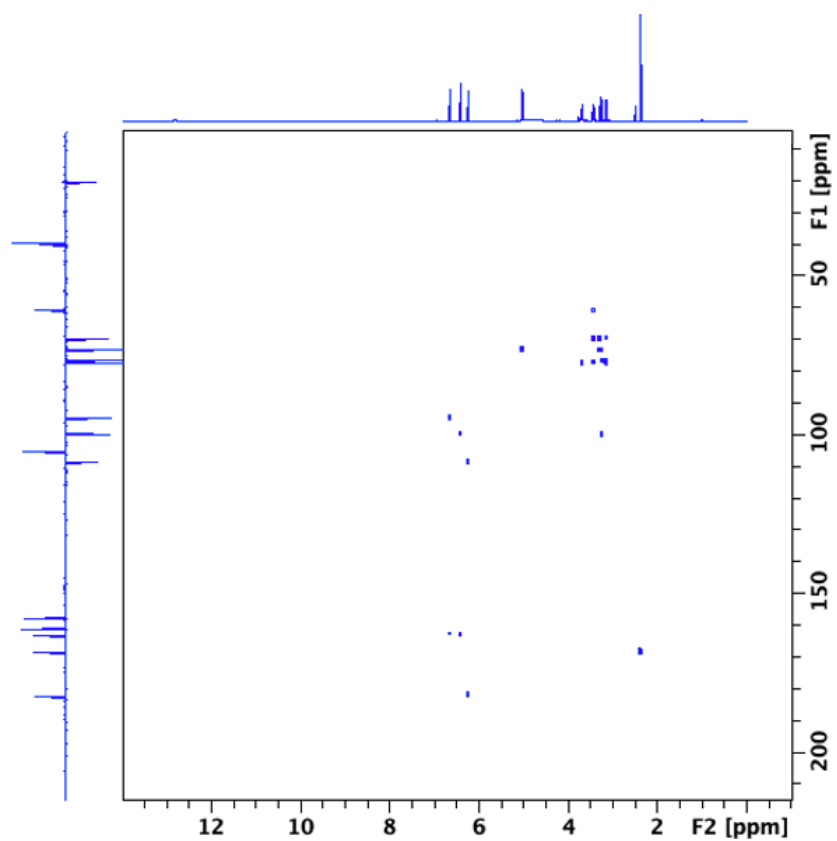
Figur 361: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon VM2S28+29



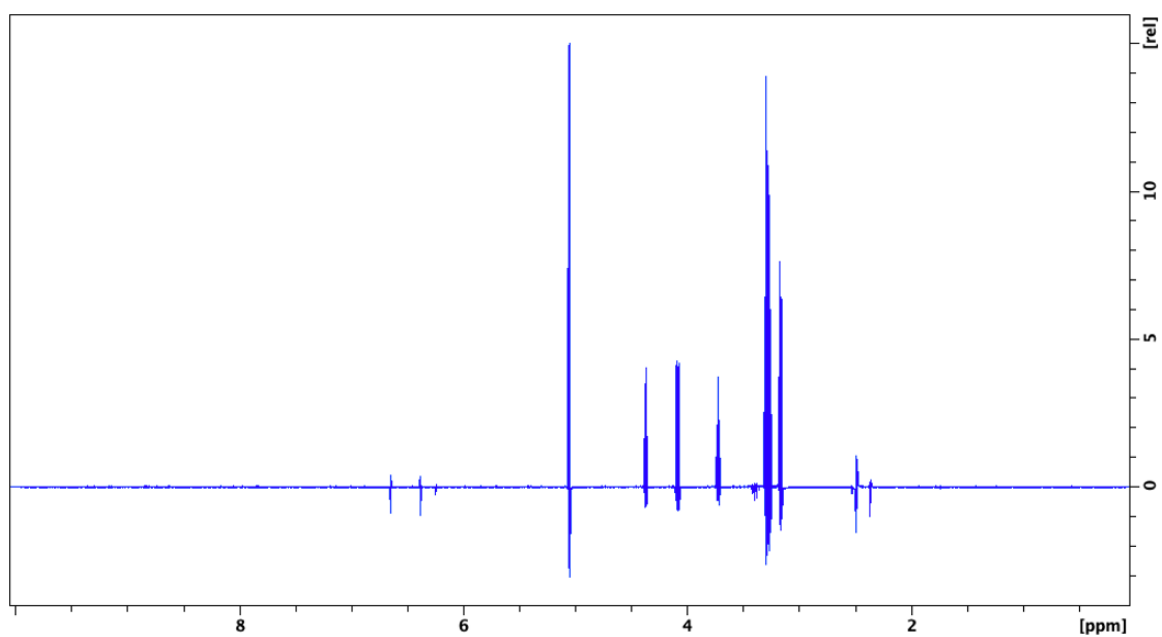
Figur 362: Hele 2D ^1H - ^1H ROESY NMR spekter av fraksjon VM2S28+29



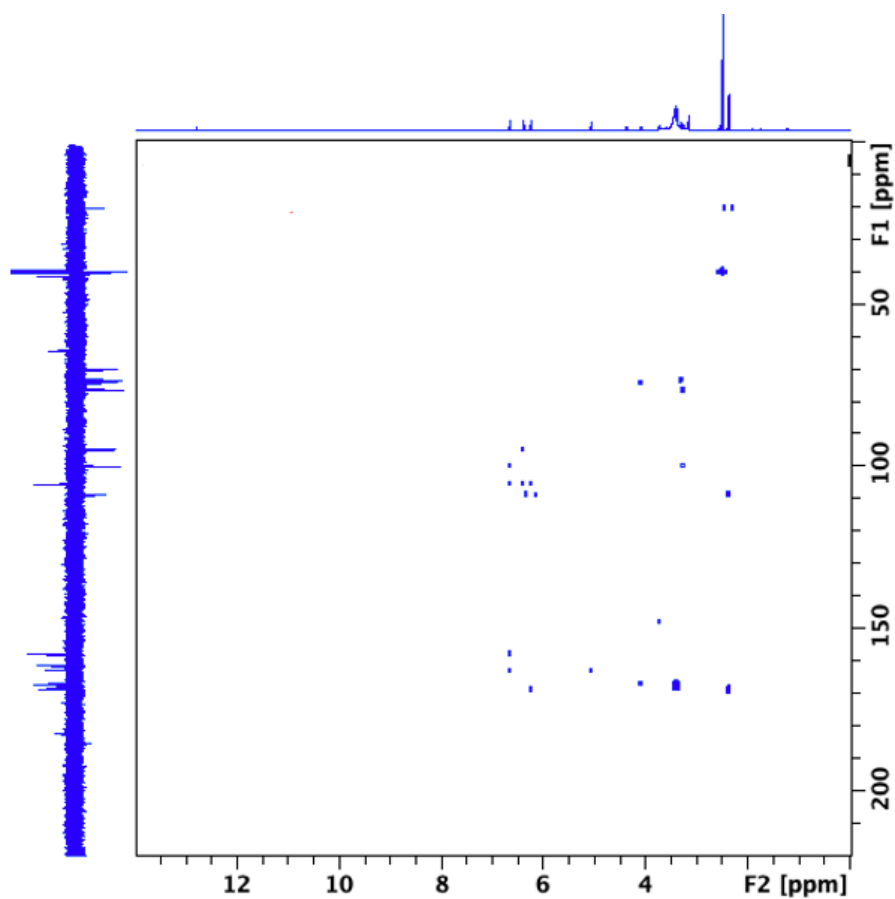
Figur 363: Hele 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekter av fraksjon VM2S28+29



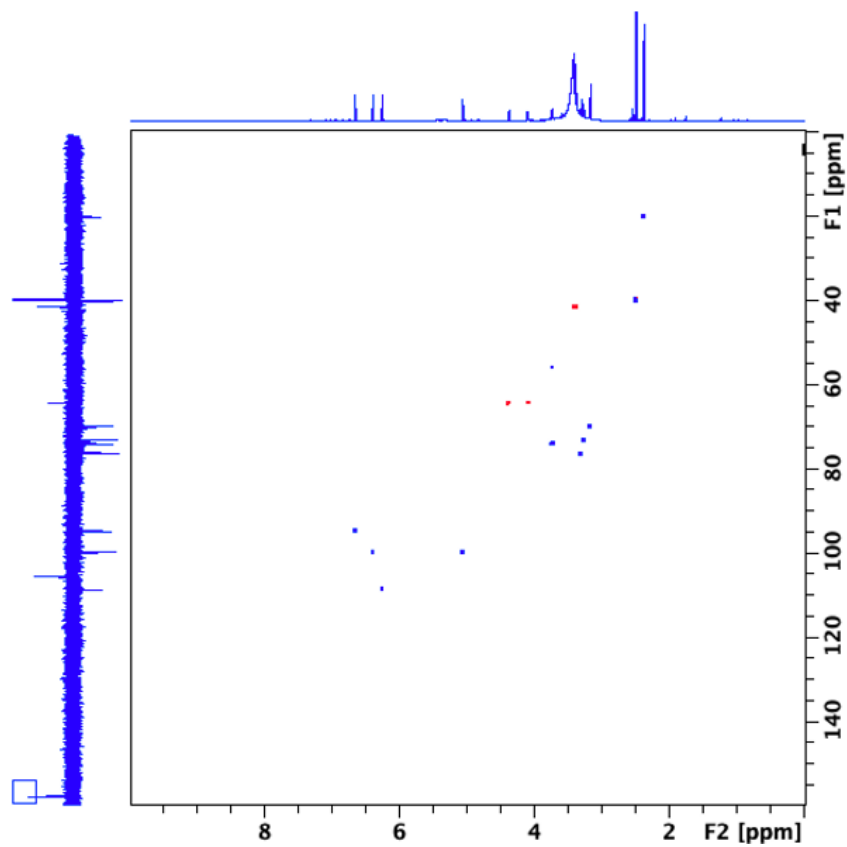
Figur 364: Hele 2D ^1H - ^{13}C 1,1-ADEQUATE NMR spekter av fraksjon VM2S28+29



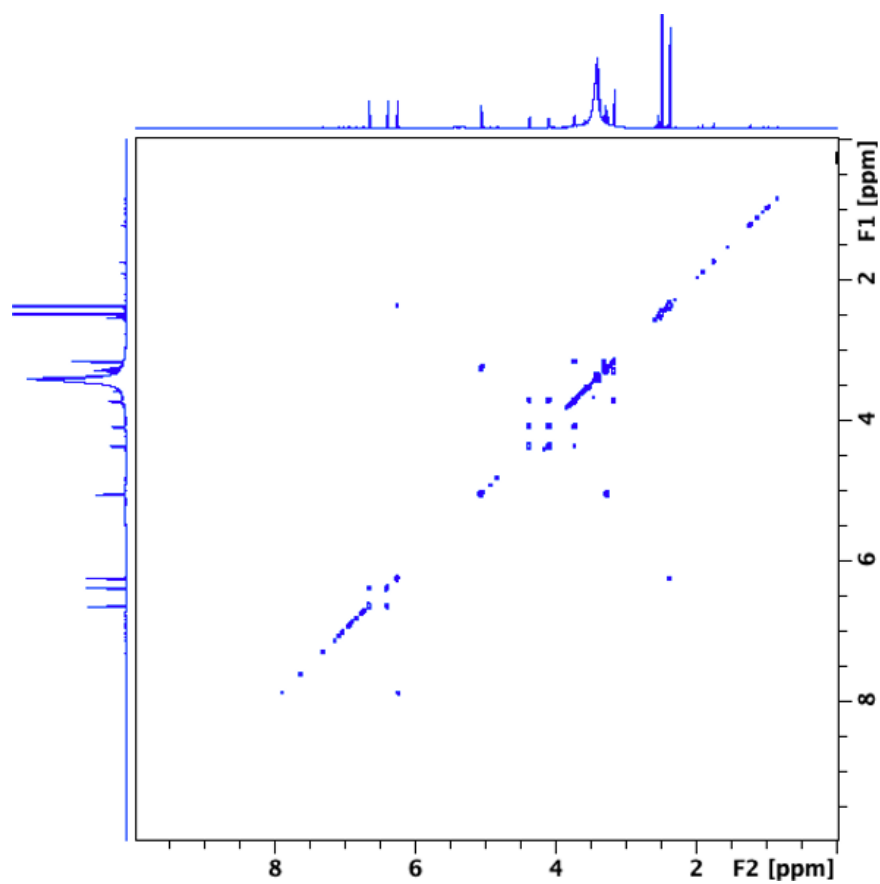
Figur 365: Hele 1D TOCSY NMR spekter av fraksjon VM2S39-41P11+47



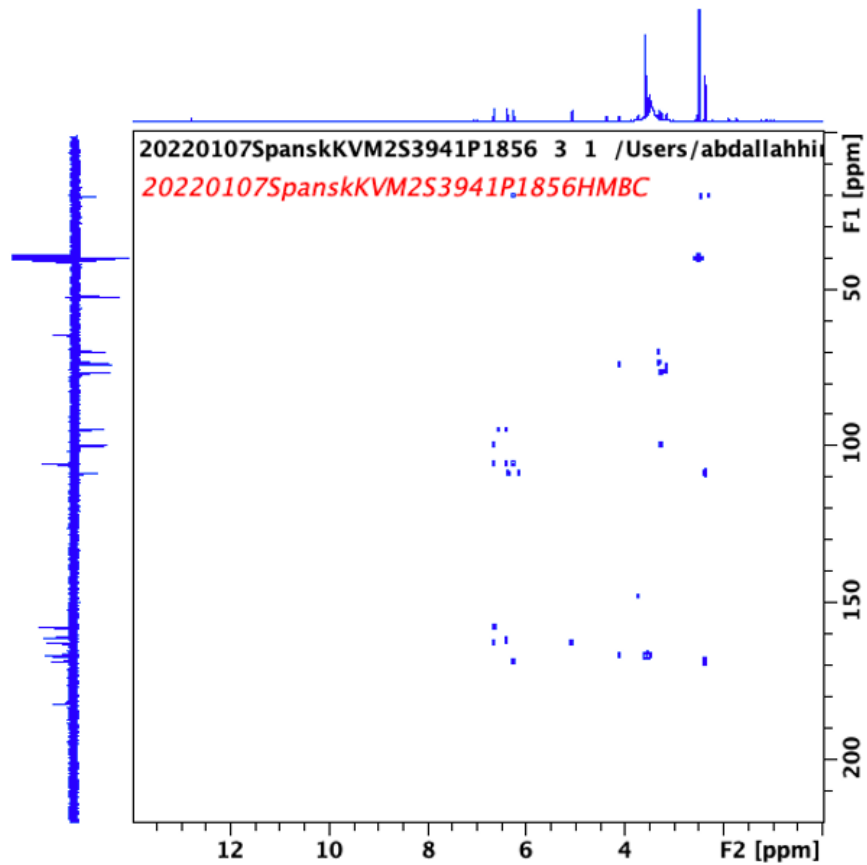
Figur 366: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon VM2S39-41P11+47



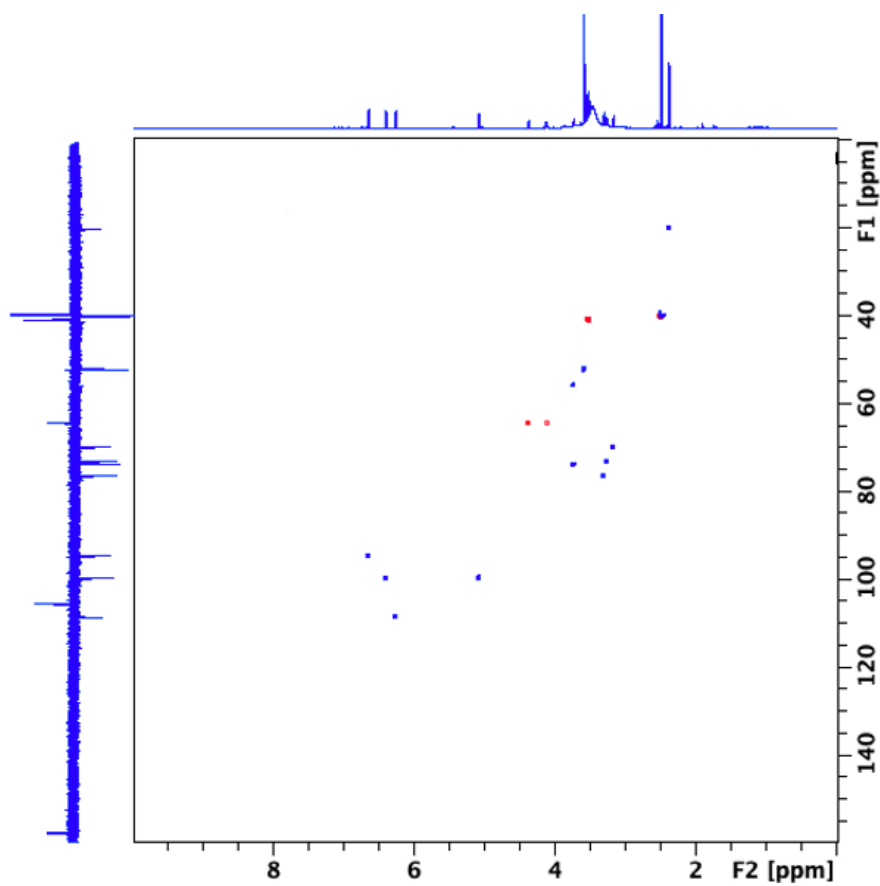
Figur 367: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon VM2S39-41P11+47



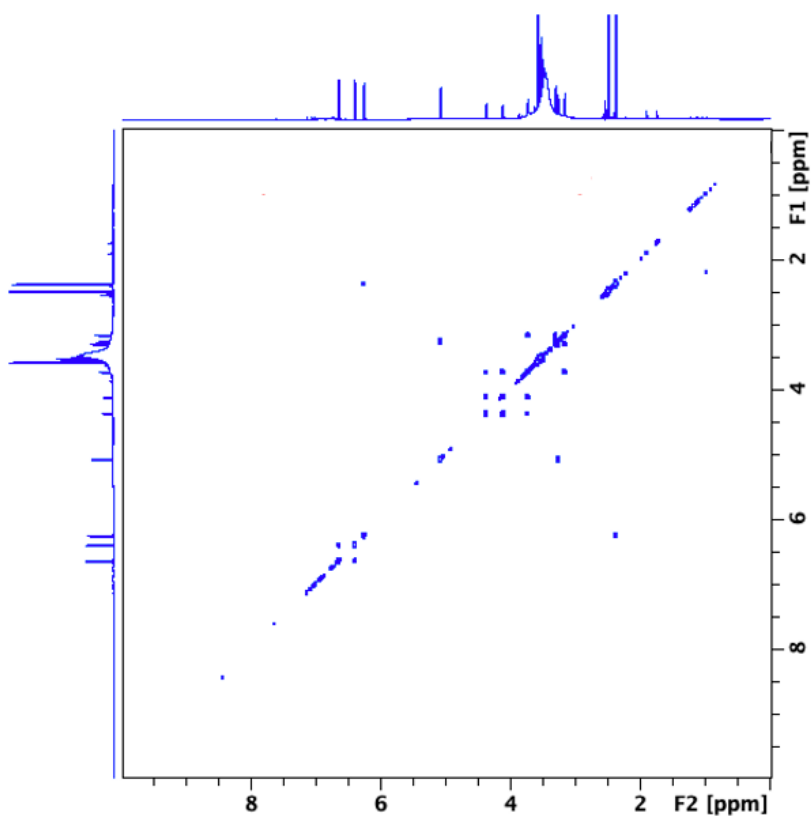
Figur 368: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon VM2S39-41P11+47



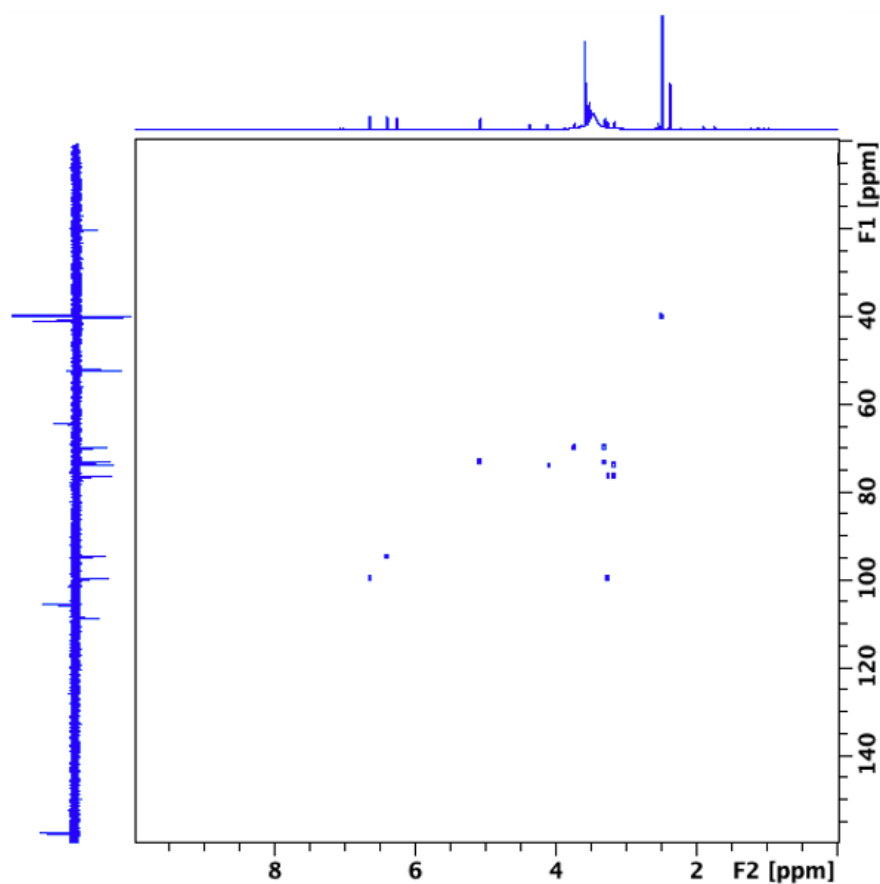
Figur 369: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon VM2S39-41P18+56



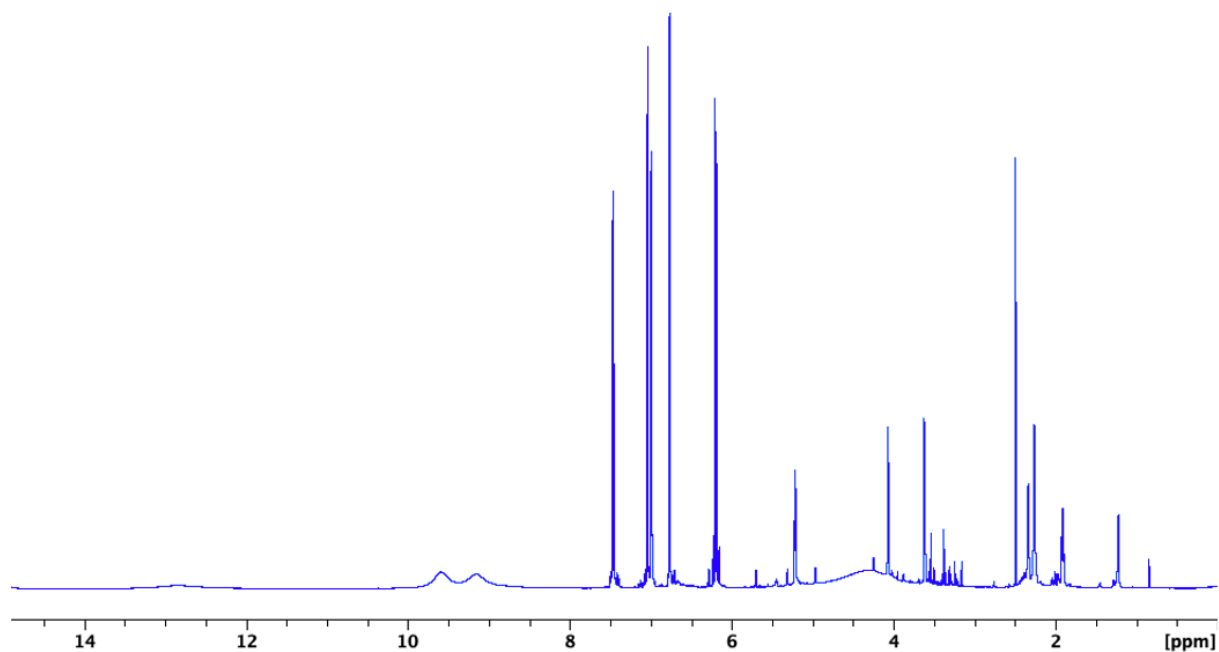
Figur 370: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon VM2S39-41P18+56



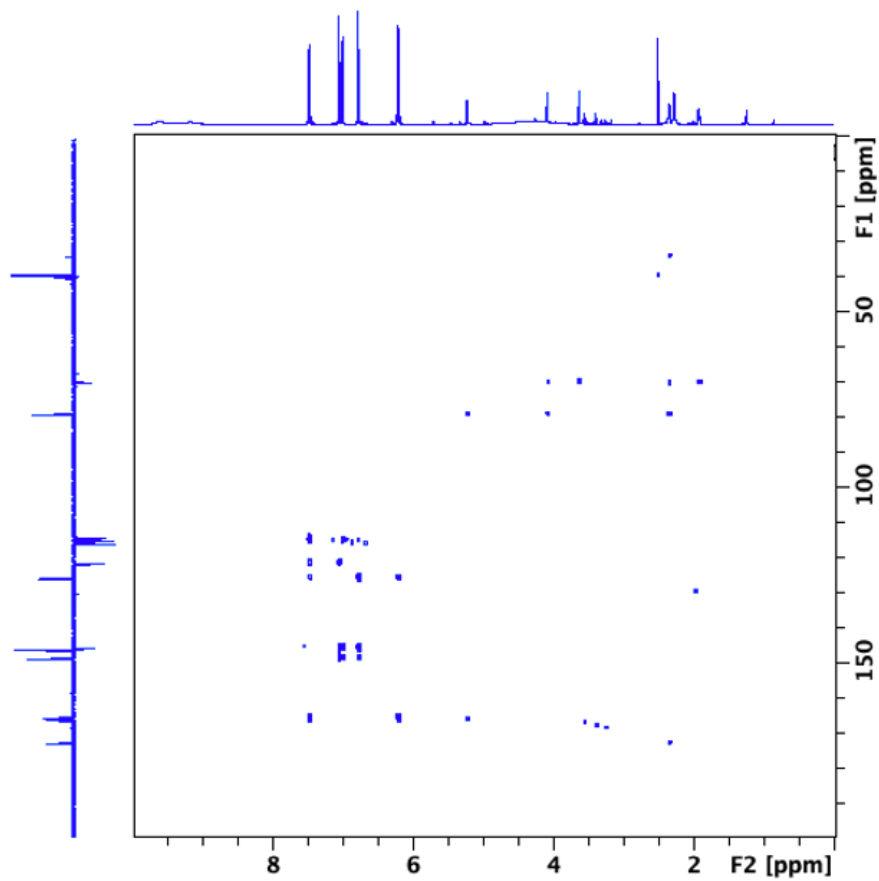
Figur 371: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon VM2S39-41P18+56



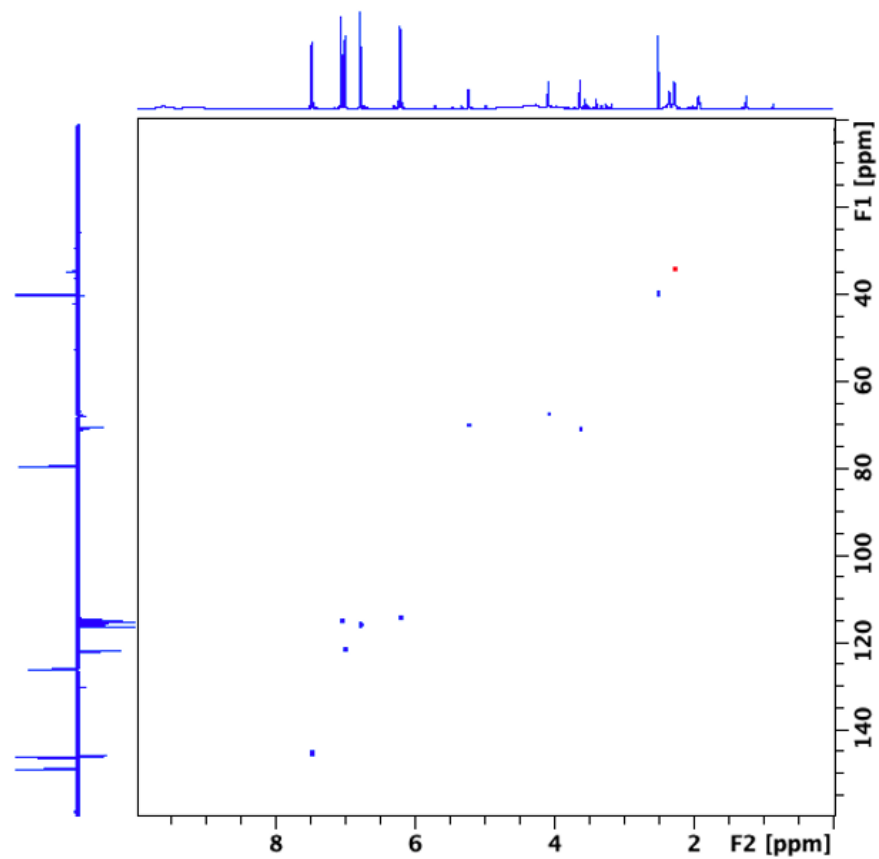
Figur 372: Hele 2D ¹H-¹³C H₂BC NMR spekter av fraksjon VM2S39-41P18+56



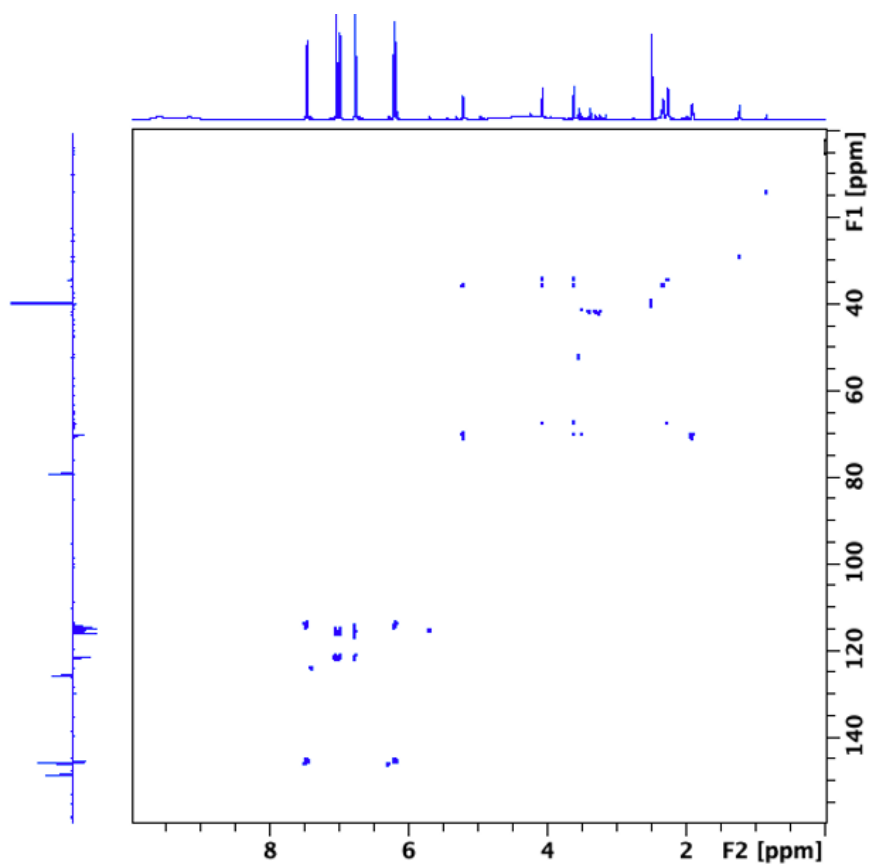
Figur 373: Hele 1D ¹H NMR spekter av fraksjon VM2S154-156



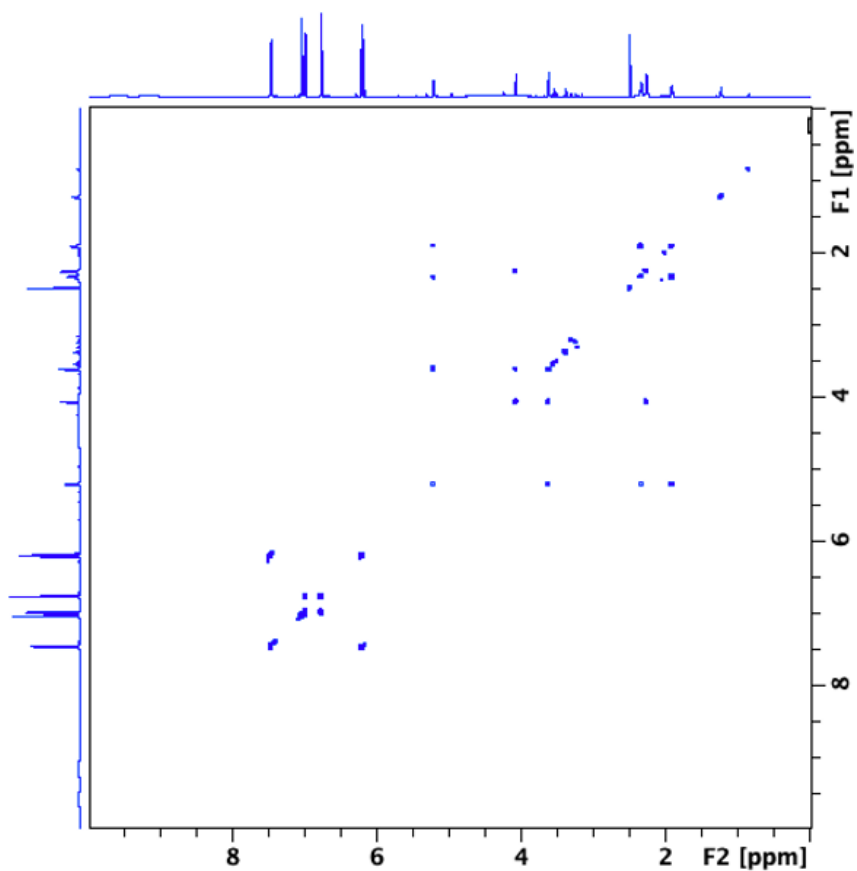
Figur 374: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon VM2S154-156



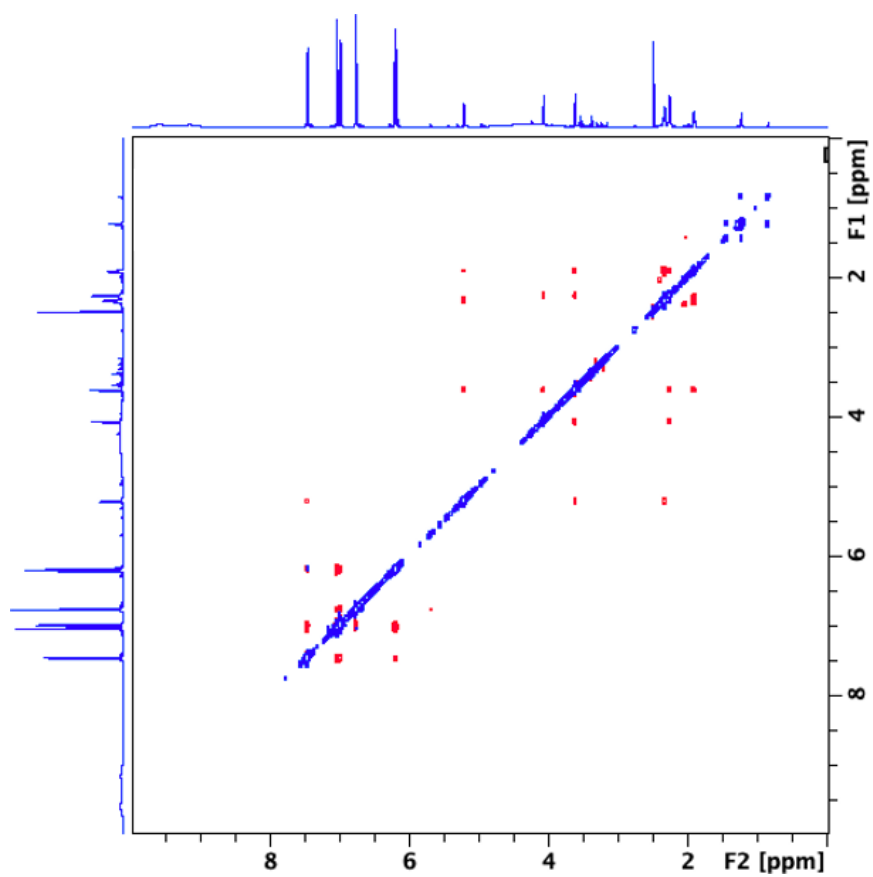
Figur 375: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon VM2S154-156



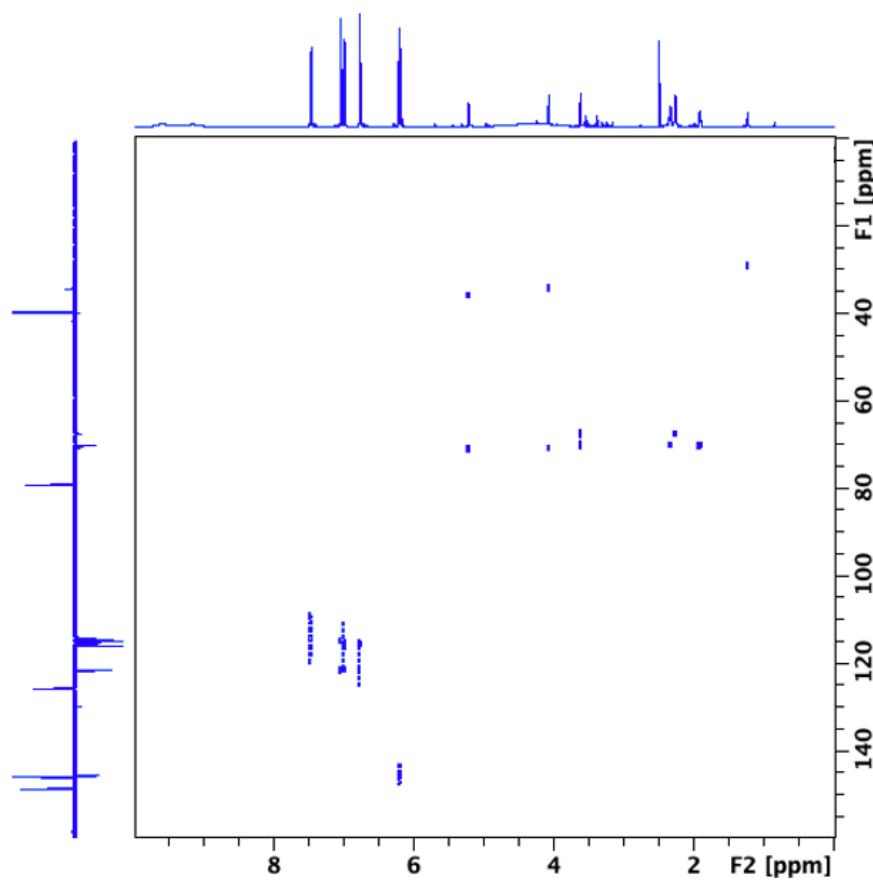
Figur 376: Hele 1D ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY NMR spekter av fraksjon VM2S154-156



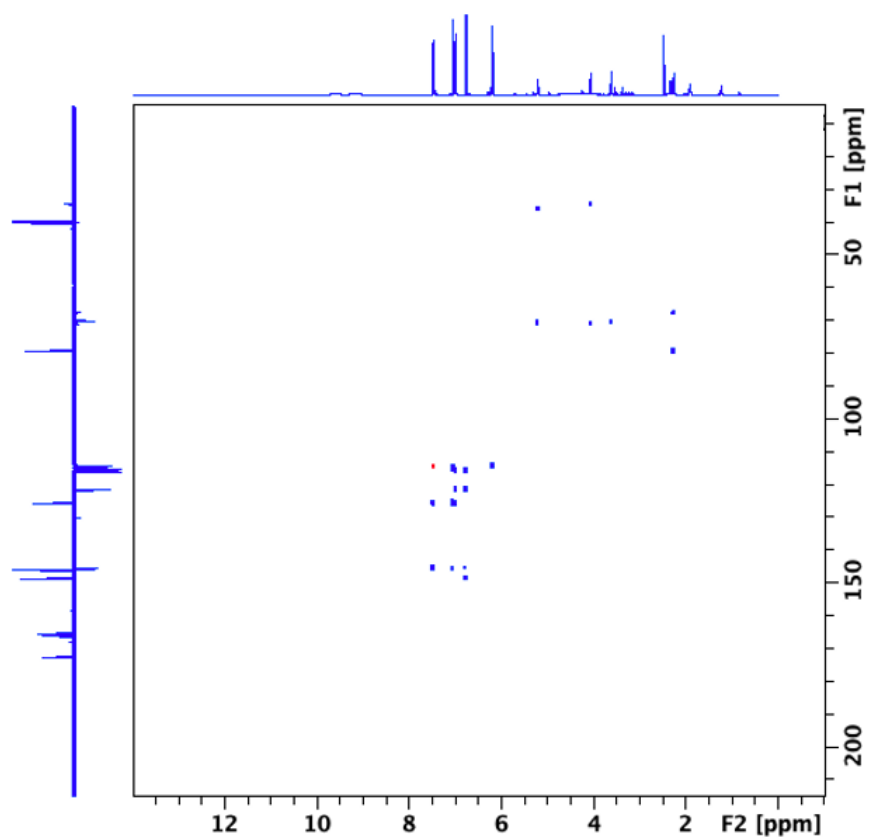
Figur 377: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon VM2S154-156



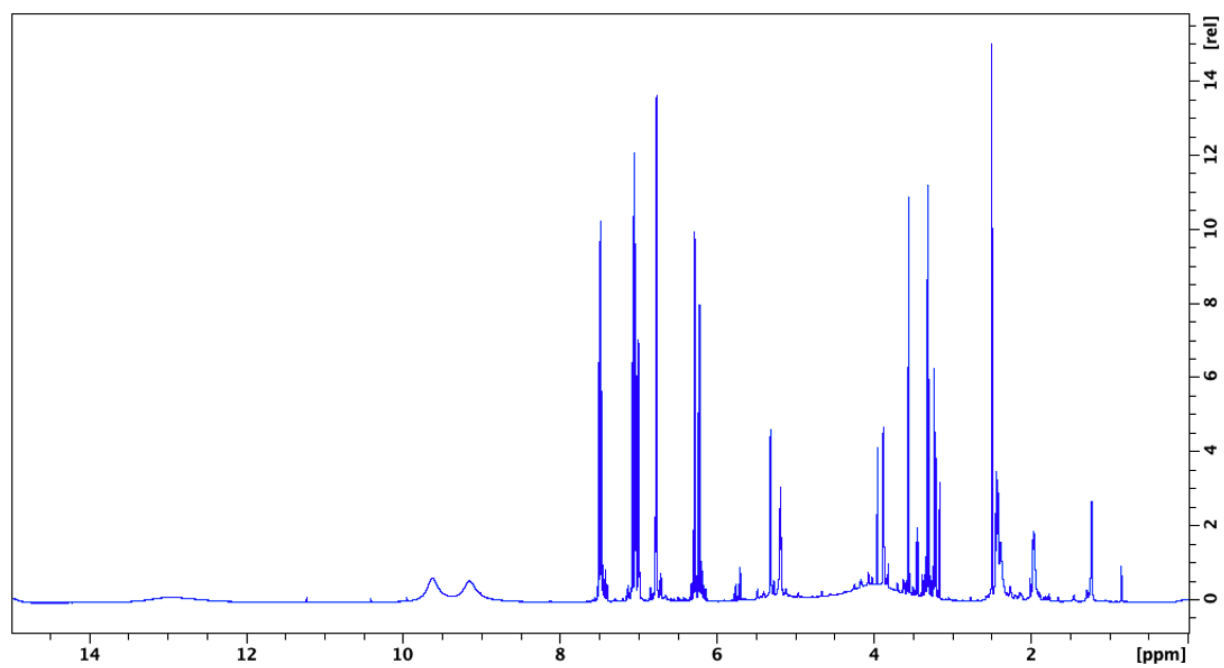
Figur 378: Hele 2D ^1H - ^1H ROESY NMR spekter av fraksjon VM2S154-156



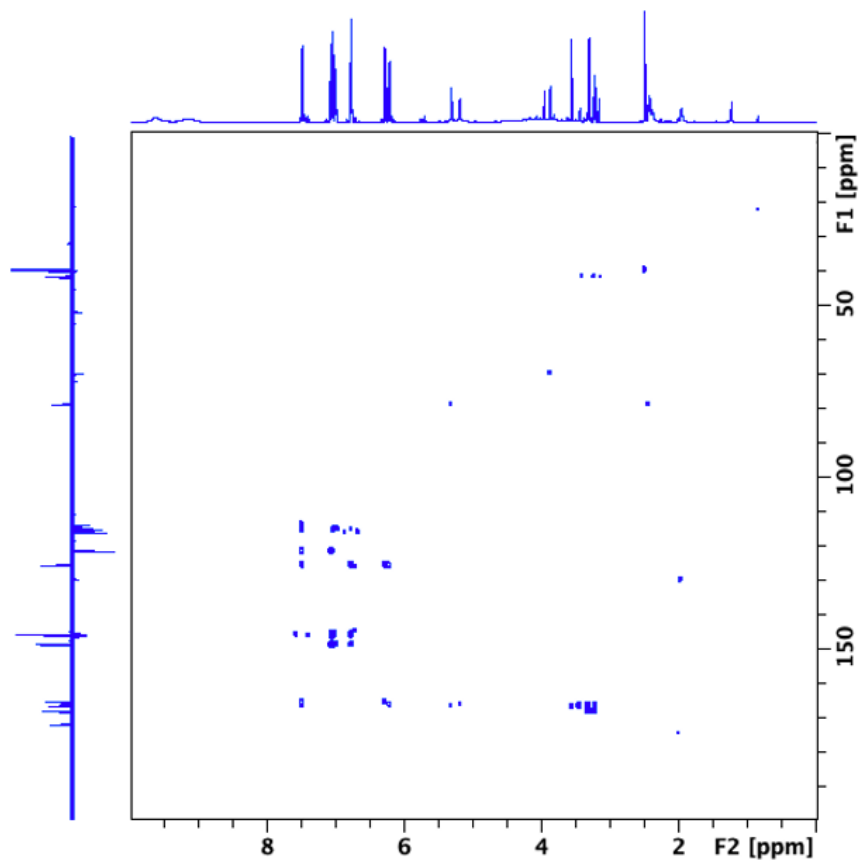
Figur 379: Hele 2D ^1H - ^{13}C H2BC NMR spekter av fraksjon VM2S154-156



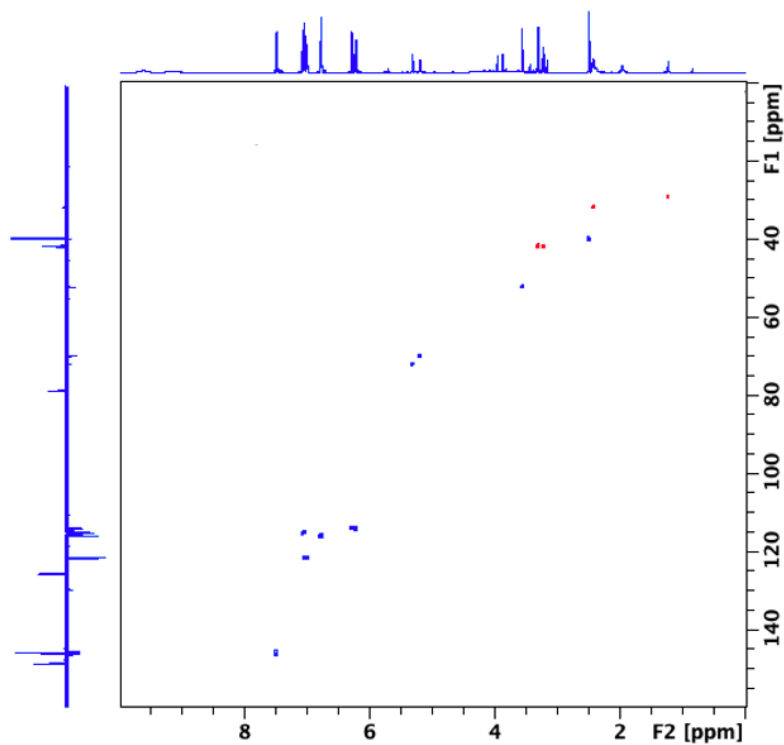
Figur 380: Hele 2D ^1H - ^{13}C 1,1-ADEQUATE NMR spekter av fraksjon VM2S154-156



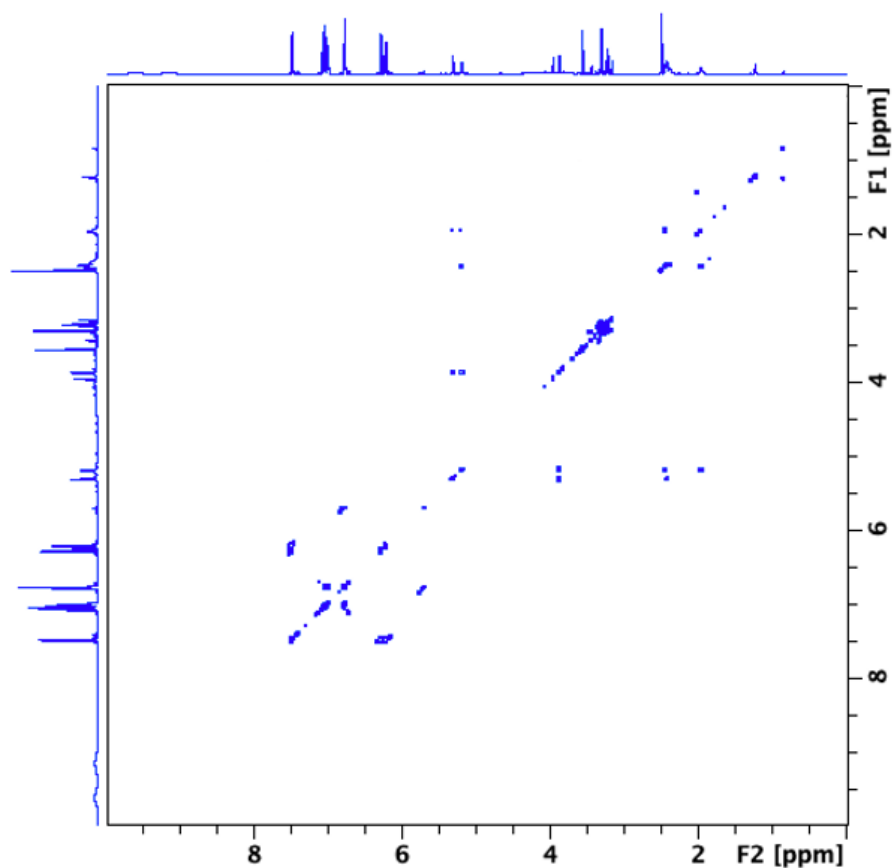
Figur 381: Hele 1D ^1H NMR spekter av fraksjon VM2S150-151



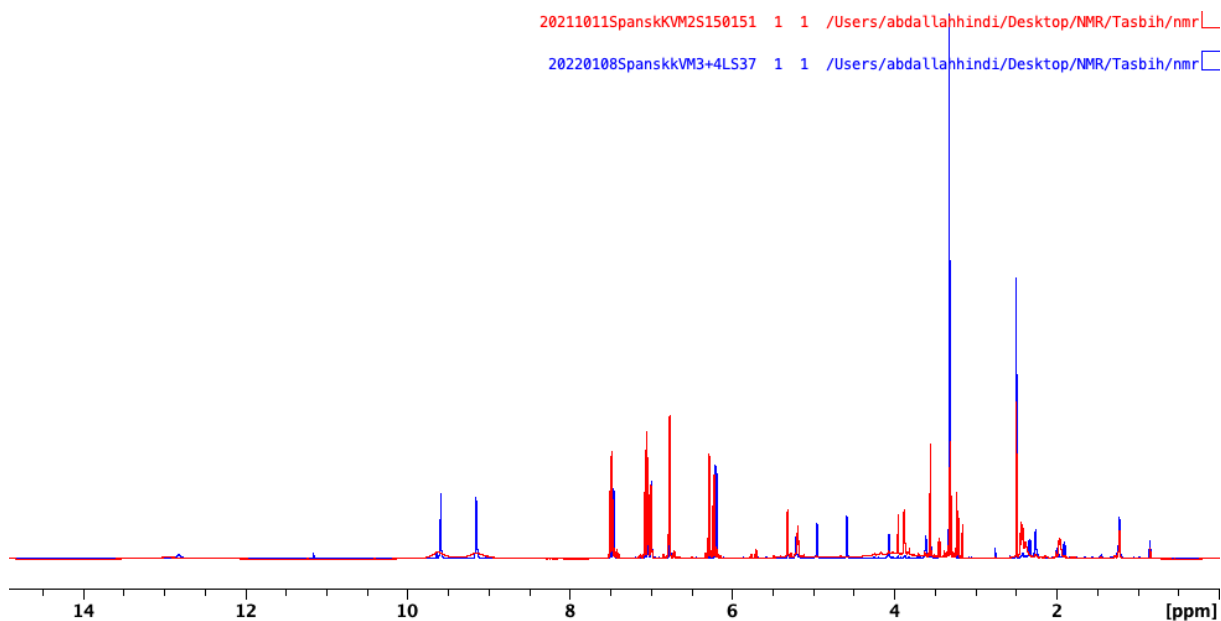
Figur 382: Hele 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR spekter av fraksjon VM2S150-151



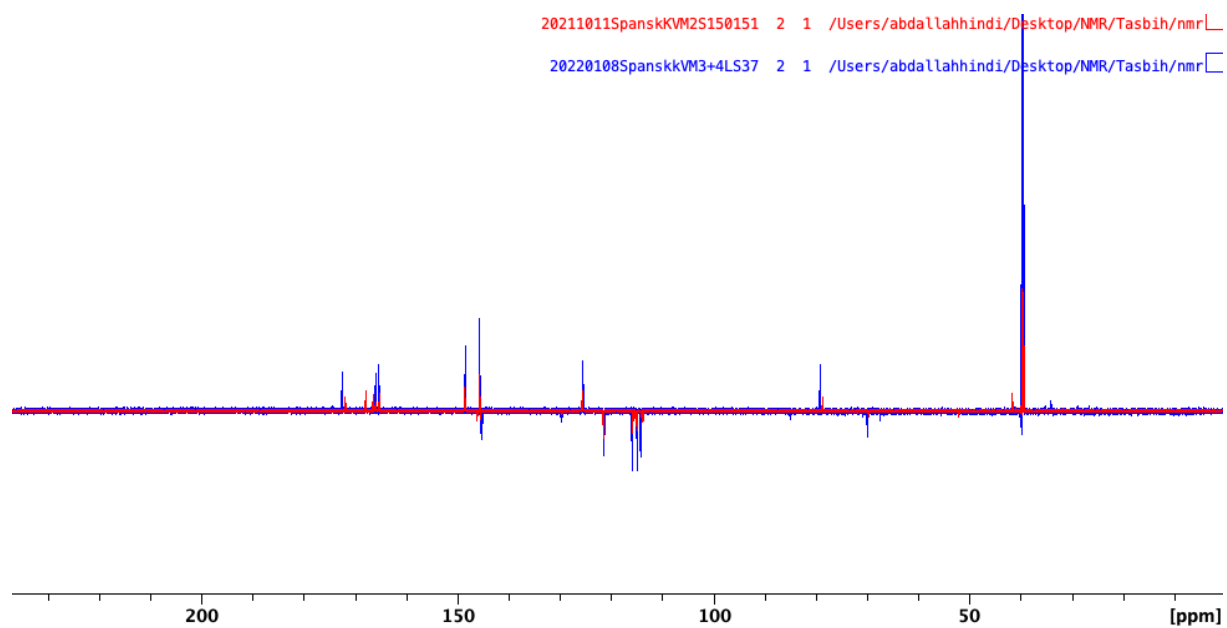
Figur 383: Hele 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR spekter av fraksjon VM2S150-151



Figur 384: Hele 2D ^1H - ^1H COSY NMR spekter av fraksjon VM2S150-151



Figur 385: Hele 1D ^1H NMR spekter av fraksjon VM3+4LS37 (blå) i sammenligning med fraksjon VM2S150+151 (rød)



Figur 386: Hele 1D ^{13}C CAPT NMR spekter av fraksjon VM3+4LS37 (blå) i sammenligning med fraksjon VM2S150+151 (rød)