

# Syntese av crocin-derivater

Tina Beate Bjørk

Master i lærerutdanning med realfag  
Oppgaven levert: Mai 2008  
Hovedveileder: Vassilia Partali, CHEM



## Forord

Etter fem år i Trondheim har jeg mange og takke, spesielt alle som har vært til stor hjelp og støtte under prosessen med denne oppgaven dette halvåret. Jeg vil først og fremst rette en stor takk til min veileder Professor Vassilia Partali og min biveileder Hans-Richard Sliwka for all støtte og motivasjon de har gitt meg. Christer L. Øpstad fortjener en stor takk for å alltid stille opp og for å ha vist stor tålmodighet med alle mine spørsmål, store som små. Jeg vil også takke Eugenia-Mariana Sandru for hjelp med CD-spektrofotometeret og for mange fine samtaler. Catrine Ahlen ved SINTEF fortjener en stor takk for sin behjelpelighet med dyrking og identifisering av mikroorganismen.

Siste men ikke minst vil jeg takke de som står meg nærmest, venner, familie og min kjære, for all støtte og moro gjennom hele studietiden.

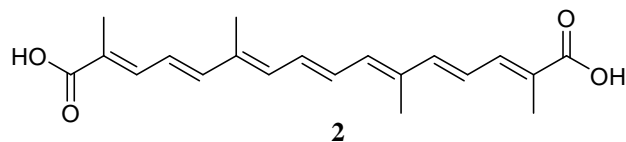
Trondheim 30. mai 2008

Tina Beate Bjørk

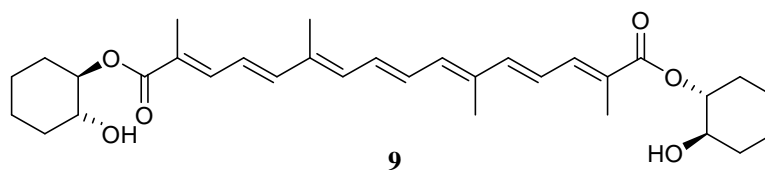


## Sammendrag

Crocetin (**2**) ble syntetisert ved hydrolyse av crocin (**1**) med basen KOH. I tillegg ble crocetin dannet ved mikrobiell hydrolyse med *Cladosporium cladosporioides*.



Crocetin (*1R, 2R*)-2-hydroksy-sykleheksan diester (**9**) ble syntetisert med koblingsreagensen PyClOP sammen med basene DMAP og DIEA.





## Forkortelser

CD	circular dichroism
DCC	disykloheksylkarbodiimid
DIEA	n-etyldiisopropylamin
DMAP	4-dimetylaminopyridin
DMF	dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoksid
PyCloP	klorotripyrrolidinofosfatiumheksafluorfosfat
RT	romtemperatur
THF	tetrahydrofuran
TLC	tynnsjiktskromatografi
TMS	tetrametylsilan

## Symboler

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	absorpsjons koeffisient
$R_f$	retensjonsfaktor
$\lambda$	bølgelengde
$\lambda_{\text{max}}$	absorpsjonsmaksimum





## Innhold

1. Innledning.....	1
1.1 Mål for oppgaven .....	1
1.2 Generelt om karotenoider.....	1
1.3 Hydrofile karotenoider .....	8
1.4 Circular dichroism (CD-spektroskopi).....	13
2. Syntese og diskusjon .....	14
2.1 Syntese av crocetin (2) (8,8'-diapokaroten- 8,8' disyre) .....	14
2.2 Syntese av crocetin ( <i>1R</i> , <i>2R</i> )-2-hydroksy-sykloheksan diester (9) .....	18
2.3 Forsøk på syntese av bis-( <i>1R</i> , <i>2R</i> )-sykloheksan dicrocetin diester (10) .....	22
2.4 Forsøk på syntese av ( <i>1R</i> , <i>2R</i> )-sykloheksan dicrocetin- monoester (11).....	23
3. Karakterisering av utgangsstoff .....	24
3.1 Karakterisering av ( <i>1R</i> , <i>2R</i> )-sykloheksandiol .....	24
3.2 Karakterisering av crocin (1).....	25
4 Eksperimentelt.....	27
4.1 Generelle metoder og instrumenter .....	27
4.2 Synteser .....	29
5. Reaksjonsmekanisme med PyCloP .....	33
6. Mikrobiell hydrolyse av crocin .....	34
6.1 Innledning.....	34
6.2 Enzymatisk syntese .....	35
6.3 Sopp.....	36
6.4 Resultat og fremgangsmåte .....	39
6.5 Videre arbeid .....	42
X. Vedlegg .....	I



# 1. Innledning

## 1.1 Mål for oppgaven

I denne oppgaven skulle det tas utgangspunkt i den vannløselige karotenoiden crocin (**1**), som i første steg skulle hydrolyseres til crocetin (**2**). Crocetin og (*1R,2R*)-sykloheksandiol skulle så forestres slik at bis-(*1R, 2R*)-sykloheksan dicrocetin diester (**10**) dannes. Dette skulle gjøres i to trinn, med crocetin (*1R, 2R*)-2-hydroksy-sykloheksan diester (**9**) som mellomprodukt. Forbindelse **10** skulle da brukes som et modellmolekyl i kiraloptiske studier.

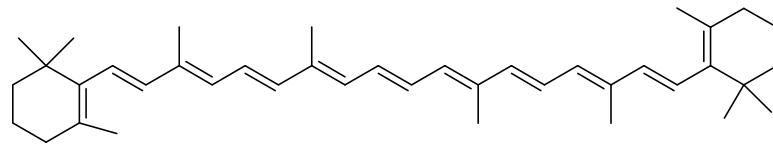
## 1.2 Generelt om karotenoider

Karotenoidene er en av de viktigste naturlige pigmentene i naturen, og man finner dem både i planteriket og dyreriket.<sup>1,2</sup> Det er derimot bare planter, enkelte bakterier og alger som kan produsere dem. Dyr av høyere orden må få karotenoidene gjennom dietten. I løpet av et år regner man med at det produseres 100 millioner tonn karotenoider i naturen. I dag kjenner vi til cirka 750 ulike karotenoider.<sup>3</sup> Karotenoidene tilhører gruppen terpener, og de fleste har 40 karbonatomer.

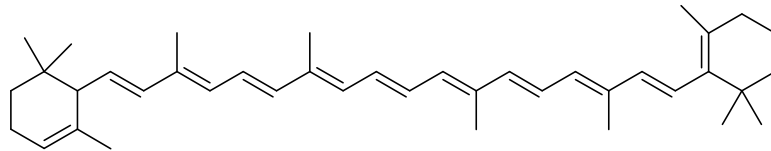
### 1.2.1 Litt historikk

På begynnelsen av 1900-tallet ble prosedyrer for separasjon og rensing av karoten, lykopen, lutein, fucoxantin og bixin utviklet av Tswett og Willstätter.<sup>1</sup> Twett utviklet kolonnekromatografi da han skulle separere klorofyll og karotenoidgruppene fra blader. Etter hvert ble også den empiriske formelen for flere karotenoider bestemt. Antall naturlige karotenoider som var kjent steg fra 15 til 80 i årene 1933 – 1948. I 1950 ble den første karotenoiden,  $\beta$ -karoten, syntetisert. Interessen for å syntetisere nettopp  $\beta, \beta$ -karoten kom fra dets provitamin A-aktivitet.

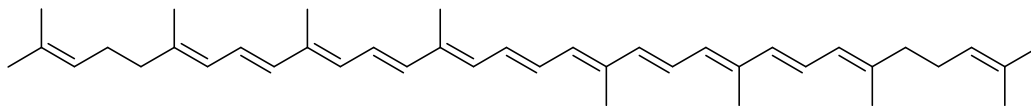
Retningslinjene som man i dag følger når en karotenoide skal navnesettes ble bestemt i Trondheim i 1966 av en underkomité utnevnt av IUPAC.<sup>4</sup> De ble godkjent av IUPAC i 1974.



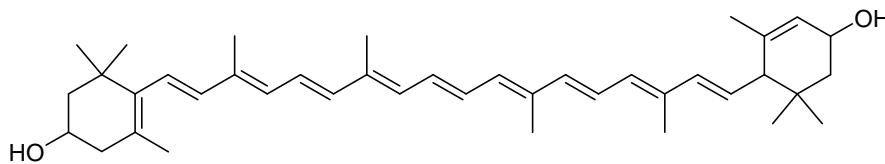
$\beta,\beta$ -karoten



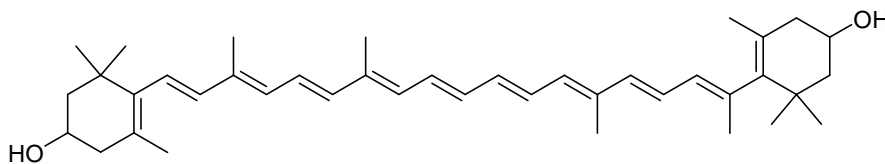
$\alpha,\beta$ -karoten



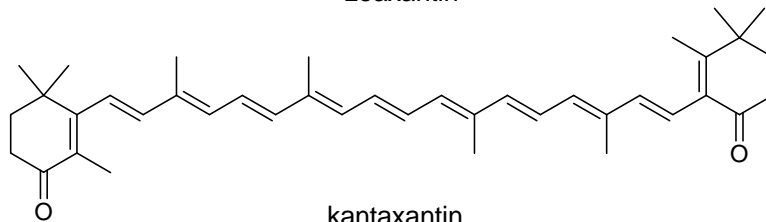
lykopen



lutein



zeaxantin



kantaxantin

*Figur 1.2.1 Noen vanlige karotenoider.*

### 1.2.2 Antioksidant effekt

Antioksidanter er molekyler som uskadeliggjør frie radikaler ved at de donerer et elektron, samtidig som de fortsatt er stabile.<sup>5</sup> Et fritt radikal er et ustabil høyt reaktivt og energirikt molekyl som har uparede elektroner. Frie radikaler dannes i kroppen både som følge av den normale metabolismen og sykdom.<sup>6</sup> Også miljøforurensing er en kilde til frie radikaler som kan tas opp av levende organismer. Når balansen mellom oksidanter og antioksidanter skyves mot oksidantsiden kan det dannes reaktive oksygenstoffer. Disse kan bidra til økt aldring og kroniske sykdommer som kreft eller hjertelidelser. Viktige antioksidanter er vitamin C, vitamin E og karotenoider som  $\beta$ , $\beta$ -karoten, lykopen, lutein og zeaxantin.<sup>5</sup>

Karotenoider kan virke som antioksidanter ved at de bryter ned de frie radikalene og quencher singlet oksygen. Karotenoider er livsviktige for fotosyntetiserende organismer. De fungerer som lysabsorberede molekyler samt gir beskyttelse mot fotodestruksjon.<sup>7</sup>

### 1.2.3 Quenching av singlet oksygen

Planter benytter sollys som energikilde til å omgjøre uorganisk karbonkilder til organiske forbindelser, som for eksempel glukose. For at plantene skal kunne utnytte sollyset på denne måten har de kjemiske komponenter, sensitatorer, som er følsomme for sollys. Eksempler på disse er klorofyll, porfyrin, bilirubin og riboflavin.<sup>8,9</sup> Disse molekylene gjennomgår en eksitasjon når de blir bestrålt av sollyset. Sensitatorene eksiterer til første eksitasjonsnivå ( $^1\text{SENS}$ ) og gjennomgår deretter en overgang til en stabil triplett tilstand ( $^3\text{SENS}$ ), se 1.

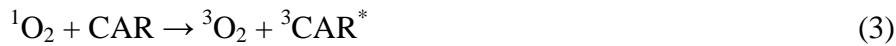


Energien til de eksiterte sensitatorene kan overføres til andre molekyler. Triplett tilstanden hos sensitatorene kan for eksempel reagere med triplett oksygen ( $^3\text{O}_2$ ), og danne singlet oksygen ( $^1\text{O}_2$ ), se 2.



Singlet oksygen er farlig for cellene siden de kan forstyrre proteiner, enzymer og DNA-molekyler. Karotenoidene er viktige i beskyttelsen av celler og organismer mot skader

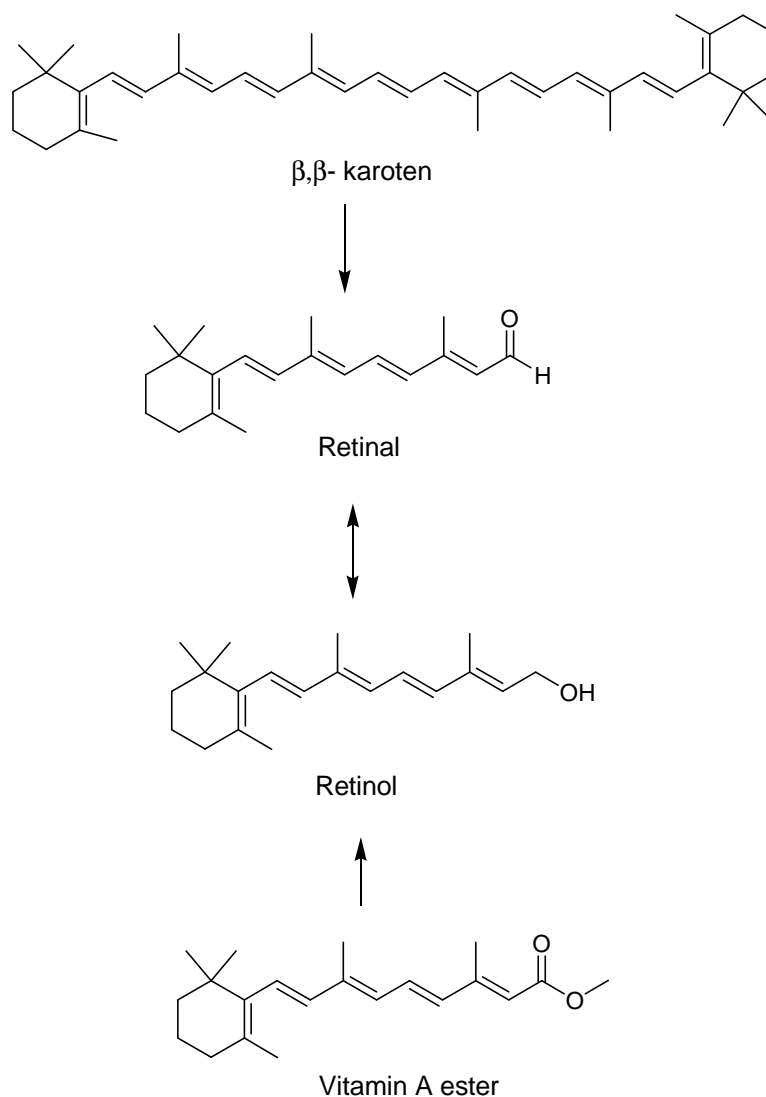
forårsaket av  $^1\text{O}_2$ .<sup>8,9</sup>  $^1\text{O}_2$  kan bli deaktivert av karotenoider på to ulike måter; kjemisk eller ved en energioverføringsreaksjon (fysikalsk quenching). Det er den sistnevnte som er mest vanlig, der energioverføringen av eksitert energi skjer fra  $^1\text{O}_2$  til karotonoiden. Oksygenet vil da gå over i grunntilstand, se 3. Karotenoiden kan deretter miste energien i form av varme til omgivelsene og dermed returnere til grunntilstand, se 4.<sup>8</sup>



Quenchingen skjer ved interaksjoner, som rotasjon og vibrering, mellom karotenoiden og løsningsen den befinner seg i.<sup>9</sup> Man kan si at karotenoiden virker som en katalysator. Et molekyl  $\beta,\beta$ -karoten kan quenche opp til 1000  $^1\text{O}_2$ . Grunnen til at karotenoidene forbrukes, selv om de fungerer som en katalysator i den fysikalske quenchingen, er på grunn av den lille delen av kjemisk quenching som også foregår.<sup>10</sup> Kjemisk quenching er bare 5 prosent så rask som fysikalsk quenching.<sup>11</sup> Det har vært eksempler på at karotenoider, som  $\beta,\beta$ -karoten, også kan quenche triplette sensitatorer.<sup>9</sup> Flere studier har også vist at når antall dobbeltbindinger i karotenoiden øker vil ofte hastigheten av quenchingen øke. Altså karotenoider med lengre polyenkjede er mer effektive antioksidanter enn de med kortere. Også lipidradikaler i biologiske membraner og peroksyldradikaler kan bli quenched av karotenoider.<sup>11</sup>

### 1.2.4 Provitamin A aktivitet

Vitamin A er en viktig antioksidant og viktig for immunforsvaret. Vitamin A er også viktig for synet, da det medvirker i produksjonen av nerveimpulsene. Noen karotenoider kan omdannes til vitamin A ved to ulike mekanismer.<sup>12</sup> Enten ved kløyving på midten eller ved kløyving på siden. Når  $\beta,\beta$ -karoten blir kløyd på midten dannes det to ekvivalenter av retinal, mens ved kløyving på sidene dannes andre  $\beta$ -apo-karotener. Det er ca 50 karotenoider som har provitamin A aktivitet.<sup>11</sup> Figur 1.2.2 viser hvordan vitamin A (retinol ester) og provitamin A karotenoidene blir omdannet til noen av de biologisk aktive formene av vitamin A.



Figur 1.2.2 Reaksjonsforløpet i dannelsen av aktive Vitamin A komponenter fra vitamin A estere og  $\beta$ -karoten.

### 1.2.5 Forekomst hos mennesker

Det er 40 ulike karotenoider tilstede i dietten vår, men 90% av karotenoidbeholdningen i kroppen består av  $\alpha, \beta$ - og  $\beta, \beta$ -karoten,  $\beta$ -cryptoxantin, lykopen og lutein.<sup>13</sup> Karotenoidene kan forekomme både i *cis*- og *trans*-form, men det er *trans*-formen som er mest stabil og vanligst. Man vet lite om den biologiske effekten av isomeriseringen.

Karotenoider blir tatt opp i fordøyelsessystemet ved at de innsluttes i miceller dannet av fett og galle. I kroppen lagres karotenoidene i leveren og i fettvev.<sup>11</sup>

### 1.2.6 Helseeffekter

En diett med stort inntak av frukt og grønnsaker vil redusere risikoen for å utvikle ulike kroniske sykdommer. Det er mulig at årsaken til dette er at antioksidanter fra frukt og grønnsaker vil kunne motvirke skader fra de frie radikalene, som produseres i kroppen.<sup>6</sup>  $\beta,\beta$ -karoten er en av karotenoidene som har fått mye oppmerksomhet i den forbindelse, på grunn av dets provitamin A aktivitet og store forekomst i mange matvarer.<sup>14</sup> I 1981 ble det gjort studier som viste at økt inntak av  $\beta,\beta$ -karoten gjennom kostholdet var proporsjonal med blod- og vevinnholdet av  $\beta,\beta$ -karoten.<sup>15</sup> Det viste seg at dette ikke gjaldt vitamin A på grunn av homeostatisk regulering av blodkonsentrasjonen av vitamin A. Det var allerede klart at både vitamin A og  $\beta,\beta$ -karoten hadde forebyggende effekt på utviklingen av kreft. Denne studien viste dermed at det var nettopp  $\beta,\beta$ -karoten man måtte øke inntaket av for å oppnå forebyggingen mot kreft. Slike oppdagelser gjorde det klart at man måtte forske mer på karotenoiders helseeffekt.

Ulike studier har vist at karotenoider kan forebygge kreft og hjertesykdommer.<sup>9,12,16</sup> Det er vist at et høyt innhold av karotenoider i serumet, vil gi en lavere risiko for å utvikle enkelte hjertesykdommer. Det er gjort mye forskning på ulike karotenoiders helseeffekt, blant annet lykopen og  $\beta,\beta$ -karoten.

Et økt inntak av lykopen gir lavere risiko for å utvikle kreft. Lykopeninnholdet i serumet hos kreftsyke personer var signifikant lavere enn hos friske.<sup>13</sup> Også hjertekarsykdommer og osteoporose kan forebygges av lykopen. I tillegg kan økt inntak av lykopen også gi bedre sædkvalitet.

Karotenoider beskytter klorofyll mot oksidasjon.<sup>12</sup> Noen mener derfor at  $\beta,\beta$ -karoten kan være med å behandle enkelte hudkrefttyper etter den samme mekanismen som i planter. Behandling med  $\beta,\beta$ -karoten har vist seg å øke oksidasjonsbeskyttelsen hos pasienter med cystisk fibrose. Lavt innhold av  $\beta,\beta$ -karoten i plasmaet gir økt risiko for å utvikle lungekreft. Andre helseeffekt er gjennom ”gap junction” kommunikasjon, regulering av cellevekst, modulering av genuttrykk, immunrespons og i modulering av fase I og fase II i stoffmetabolske enzymer.<sup>13</sup>



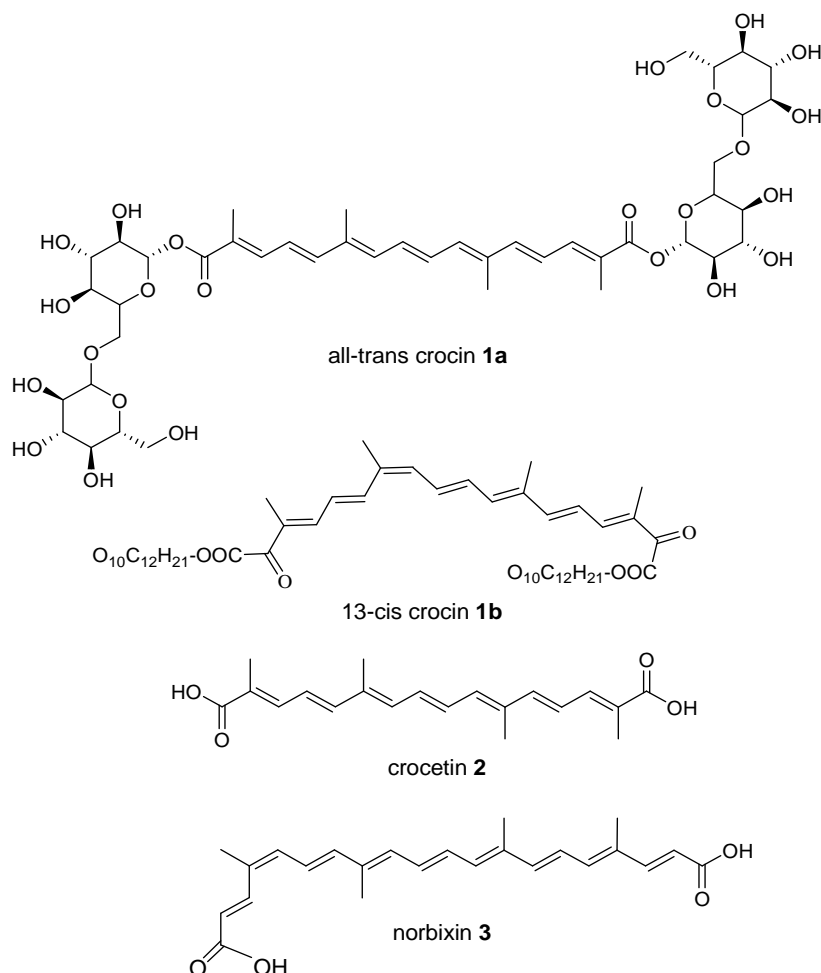
Det gjenstår ennå mye før man vet nøyaktig hvordan og i hvilken grad karotenoider forebygger kroniske sykdommer.<sup>15</sup> Det anbefales å spise mer frukt og grønnsaker for å øke inntaket av karotenoider, men det frarådes at inntaket skal komme fra kosttilskudd. Dersom man får mer sikre bevis på karotenoiders positive helseeffekt håper man at det skal føre til et økt inntak av frukt og grønnsaker. Selv om det er klart av karotenoider gir en positiv helseeffekt regnes de ikke som et essensielt næringsstoff og har ikke noe offentlig anbefalt dose.<sup>13</sup>

### **1.2.7 Bruk**

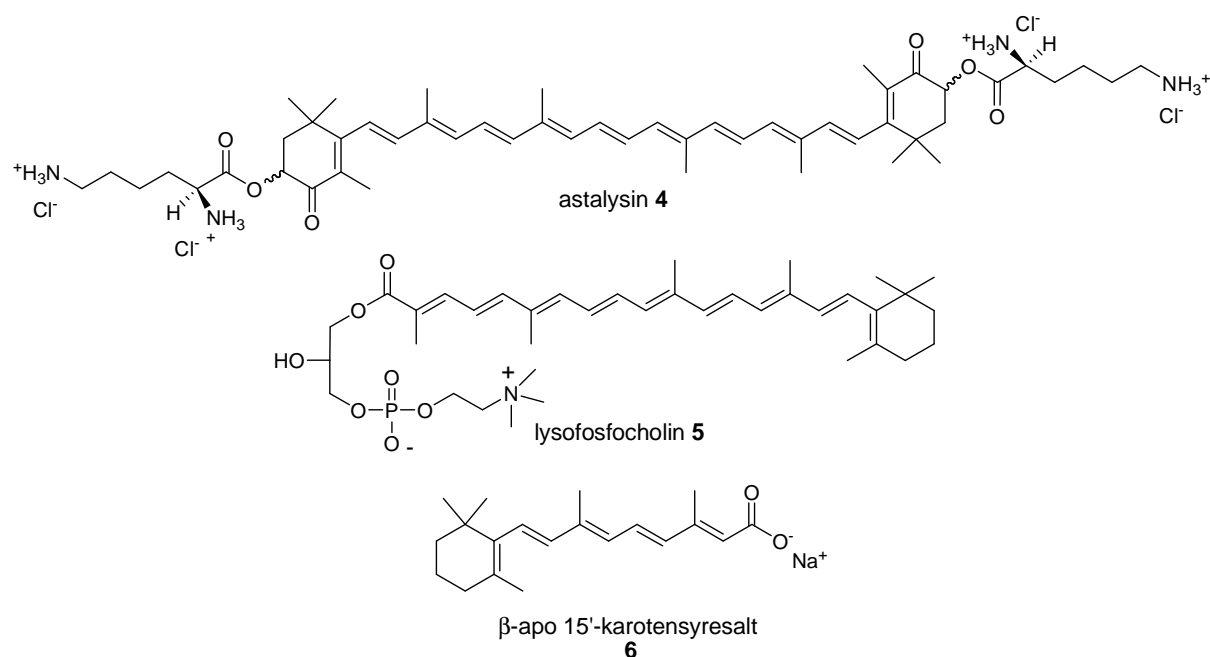
De vanligste pigmentene i mat er karotenoider, antocyanins, porfyrins og klorofyll.<sup>17</sup> Karotenoidene er ansvarlig for de gule, oransje og røde fargene man finner naturlig i mat. Både naturlige og syntetiske karotenoidene brukes i dag som fargestoff innen matindustrien. Dyrekjøtt og dyreprodukter farges indirekte ved å tilsette karotenoider i dyreforet. Safran, med karotenoidkomponenten crocin, har blitt brukt til å gi gul farge til mat i århundrer. Fettholdig mat som margarin, oljer og smør har blitt farget av  $\beta,\beta$ -karoten. En annen viktig årsak til at man tilsetter karotenoider til matvarer er for å forlenge holdbarheten ved at skadelig singlet oksygen brytes ned av karotenoidene.<sup>9</sup> Andre viktige bruksområder for karotenoider er innen farmasien, til farging av tabletter, og kosmetikkindustrien.<sup>17</sup>

### 1.3 Hydrofile karotenoider

En hydrofil karotenoid defineres som en svært umettet forbindelse med karakteristiske hydrofile grupper.<sup>18</sup> Av de 750 kjente naturlige karotenoidene er nesten alle hydrofobe. Noen få disyrer, sukkerestere og sulfater er hydrofile.<sup>3</sup> Den eneste naturlige karotenoiden som er regnet som helt vannløselig er crocin (**1**) som er en disukkerester av den svært umetta disyren crocetin (**2**). Den syntetiske karotenoiden astalysin (**4**) er også svært vannløselig. Crocetin, norbixin (**3**) og noen syntetiske karotenoider er ikke regnet som vannløslige, men de viser dispersjonsevne i vann.<sup>19</sup>



Figur 1.3.1 Naturlige hydrofile karotenoider.

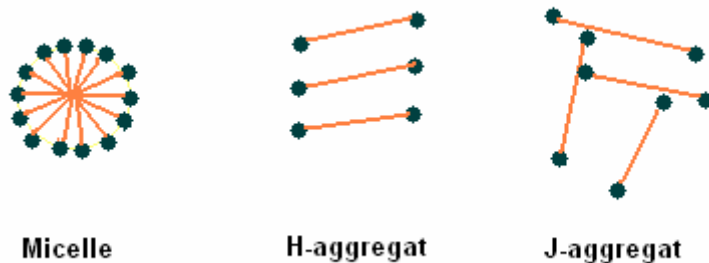


Figur 1.3.2 Syntetiske hydrofile karotenoider.

### 1.3.1 Egenskaper i vann

Hydrofile karotenoider oppfører seg som amfifile forbindelser i vann; de beveger seg opp til overflaten der den hydrofile gruppen holder seg i vannfasen, mens den hydrofobe kjeden holder seg utenfor vannfasen (i lufta).<sup>18</sup> Dette fører til at vannets overflateegenskaper blir lik løsninger av hydrokarboner, som har lavere overflatespenning enn vann. Når hele vannoverflaten er dekket med karotenoider vil de gjenværende karotenoidene danne aggregater, der den hydrofile delen er ytterst og den hydrofobe delen vender innover. Aggregater defineres i denne sammenhengen som samlinger av karotenoider i vann og er i størrelsesorden en mellomting mellom enkle molekyler og krystaller. Karotenoidaggregater ble først observert i 1931, da vann ble tilsatt en løsning med  $\alpha,\beta$ - og  $\beta,\beta$ -karoten i aceton.<sup>19</sup> Når karotenoidene er løst i polare løsningsmidler, som for eksempel aceton, metanol og etanol, viser de fleste tre topper i et absorpsjonsspekter i det synlige området (420-480).<sup>20</sup> Når man tilsetter vann til løsningen vil det ofte skje en forandring i spekteret på grunn av karotenoidenes aggregatdanning. Ut fra forandringen man observerer i absorpsjonsspekteret kan man få en indikasjon på hvordan karotenoidene orienterer seg som aggregater. Karotenoidene som har hydrofile funksjonelle grupper på begge sidene kan ikke danne miceller (rund form), for eksempel crocin (**1**) og astalysin (**4**), men opptrer med mer kompleks morfologi. Hydrofile karotenoider kan aggregere på to ulike måter i tillegg til micelledanning;

horisontal "card-pack"-orientering danner H-aggregater, mens "head-to-tail" orientering danner J-aggregater, se figur 1.3.3.<sup>21,22</sup> De fleste karotenoidene orienterer seg på begge måtene i ulik grad. Karotenoider som viser et blått skift i UV-spekteret foreligger ofte som H-aggregater, mens de som viser et rødt skift ofte foreligger som J-aggregater.<sup>19</sup>



Figur 1.3.3 Ulike aggregeringsmåter hos karotenoider.

Vannløselige karotenoider som foreligger som monomerer reagerer umiddelbart i vannløsning, mens karotenoider som har dannet aggregater i vannfasen ikke er reaktive før aggregatene er oppløst.<sup>18</sup> Karotenoider som selv-aggregerer i vann og er stabile vil kunne brukes til å farge vannholdige matvarer og leskedrikker.

### 1.3.2 Syntese av hydrofile karotenoider

Det har blitt utviklet flere metoder til farging av mat og drikkevarer med karotenoider.<sup>18</sup> Karotenoider har for eksempel blitt koblet sammen med makromolekyler som polyetylen glykol, dextran, lignin, albumin og gelatin.<sup>19</sup> Et eksempel på dette er farging av laksens kjøtt ved å tilsette et astraxantin-cyclodextrin-kompleks i foret. For å kunne bruke karotenoider som fargestoff må partikkelstørrelsen på aggregatene være mindre enn 1  $\mu\text{m}$ . Det er derfor utviklet teknikker, som for eksempel mikronisering, for å klare dette.

Siden de fleste karotenoidene ikke har funksjonelle grupper som er hydrofile, arbeider mange med å syntetisere karotenoider der de fester på slike grupper. Langt i fra alle karotenoider med hydrofile funksjonelle grupper som har blitt syntetisert har vist seg å være hydrofile. Salter av enoliserte  $\beta$ -diketoner og diosfenoler er vannløselige til en viss grad. Etter hvert som slike hydrofile karotenoider blir syntetisert vil bruksområdene til karotenoidene kunne utvides både innen industrier som medisin, mat, dyrefor og kosmetikk.

Før de nye modifiserte hydrofile karotenoidene kan tas i bruk må deres biologiske funksjon kartlegges.<sup>18</sup> Så langt er det bare en hydrofil modifisert karotenoide som er blitt godkjent.

### 1.3.3 Safran – kilde til den eneste virkelige vannløselige karotenoiden

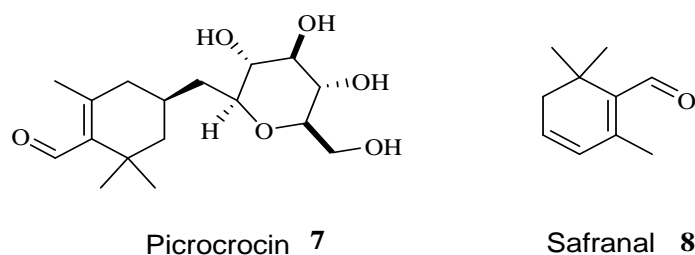
Safran finner man i blomsten *Crocus sativus* L. og frukten *Gardenia jasminoides* E.<sup>23</sup>

Kommersiell safran kommer fra det røde arret hos *Crocus sativus* L, som også omtalles som safrankrokus.<sup>24</sup> *Crocus sativus* L tilhører irisfamilien og blir dyrket i land som Hellas, India, Iran, Kina, Tyrkia, Mexico og Egypt. Årlig blir 50 tonn safran utvinnet fra blomsten, med verdi på 50 millioner \$. Hovedgrunnen til den høye prisen er at dyrkingen og innhøstingen skjer for hånd. For å produsere 1 kilogram safran kreves det 150 000 – 200 000 safrankrokus og innhøstingen krever over 400 arbeidstimer.<sup>25</sup>



Figur 1.3.4 *Crocus sativus* L.<sup>26,27</sup>

Safran har fra gammelt av og frem til i dag blitt brukt som krydder, til matfarging, til parfyme og til og med som blekk.<sup>24</sup> I tillegg har safran blitt brukt innen folkemedisinen, og blir også i dag ansett for å kunne gi en helseeffekt på ulike sykdommer. Alle disse bruksområdene for safran skyldes de ulike komponentene man finner i safran. Den sterke fargen skyldes de ulike crocetinglykosidene (crocin), den bitre smaken skyldes picrocrocin (7) og lukten skyldes stort sett safranal (8), se figur 1.3.5.<sup>23,24</sup>



Figur 1.3.5 De viktigste komponentene i safran i tillegg til crocin (1).

Safran fra *Crocus sativus* L. og *Gardenia jasminoides* E. inneholder de samme komponentene, men det som utgjør forskjellen er mengdeforholdene mellom de ulike komponentene. Skal man identifisere sammensetningen av safran må man benytte seg av flere ulike separasjons- og deteksjonemetoder.<sup>23</sup> De ulike komponentene foreligger både på *cis* og *trans*-form, se figur 1.3.1. For hvert *trans*-crocin fins det en korresponderende *cis*-isomer.<sup>28</sup> Studier av de ulike isomerene er interessante siden man tror at den biologiske aktiviteten til disse molekylene skjer når molekylet foreligger som en overgangstilstand mellom *trans*- og *cis*-formen (1a og 1b).

Crocin har antioksidant aktivitet, radikal scavenging egenskaper, virker som oksygen quencher, motvirker kreftcellevekst, leddbetennelse og neurodegenerative sykdom.<sup>23</sup> Ingen av de andre crocetinsukkeresterne er like biologisk aktive. Crocin løser seg i vann til en monomer løsning. Ved høye konsentrasjoner vil molekylene danne nanometer små aggregater. Crocetin kan utvinnes av crocin ved hydrolyse med enten base eller syre.<sup>29,30</sup> Crocetin mister mye av løseligheten i vann som crocin innehar. Crocetin har derfor ikke kunnet bli brukt til farging av mat og drikker slik som crocin, men andre bruksområder har blitt utviklet. På grunn av dets positive påvirkning av hudens kollagenproduksjon og immunsystem blir crocetin brukt i kosmetikkindustrien. Crocetin vil også kunne brukes i forebyggingen av lungekreft på grunn av egenskaper som hindrer unormal cellevekst.<sup>31</sup> Tilstedeværelse av crocetin øker oksygentransporten i plasma.<sup>32</sup> Økning av oksygendiffusjon er en egenskap som ikke bare kan utnyttes i medisinske formål, men også i kommersielle og industrielle sammenhenger.

## 1.4 Circular dichroism (CD-spektroskopi)

Enantiomerer er kirale molekyler som er speilbilde av hverandre.<sup>33</sup> Den eneste måten å skille dem på er ved å utsette dem for et kiralt miljø. Kirale molekyler i en løsning vil absorbere venstre-vent og høyre-vent sirkulært polarisert lys ulikt.<sup>34</sup> CD-spektroskopi er et mål på dette som en funksjon av bølgelengde, som regel i det synlige og ultrafiolette området.<sup>34,35</sup> For at en karotenoide skal kunne gi utslag i et CD-spekter må polyenkjeden bli forstyrret av den kirale delen på molekylet.<sup>34</sup> CD-spekteret viser målt absorbanse av venstresirkulært polarisert lys minus absorbert høyresirkulært polarisert lys.

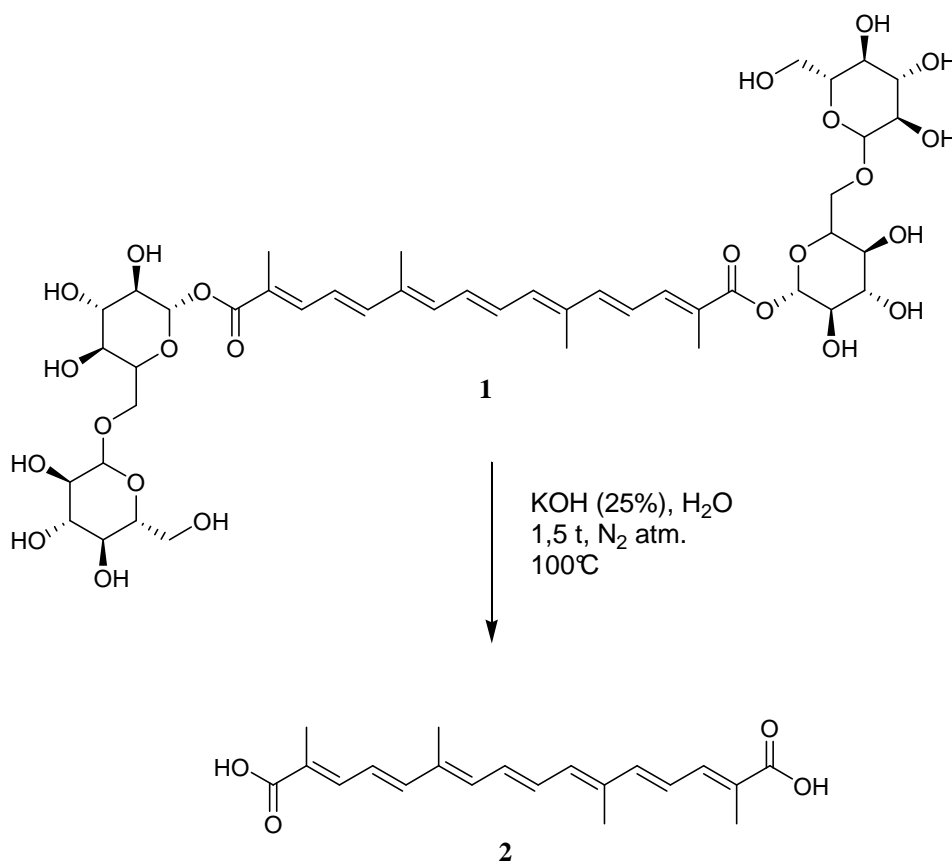
$$\Delta A = A_{\text{venstre}} - A_{\text{høyre}} \quad (5)$$

Viktige variabler som man må huske på når man skal analysere CD-spektrere er løsningens temperatur og molekylets konfigurasjon. CD-spektroskopi kan brukes til å bestemme konfigurasjonene hos enkelte karotenoider, sammenligne to løsninger som inneholder samme karotenoide for så å se om de er identiske eller enantiomere og man kan bestemme enantiomerisk renhet av et stoff.

## 2. Syntese og diskusjon

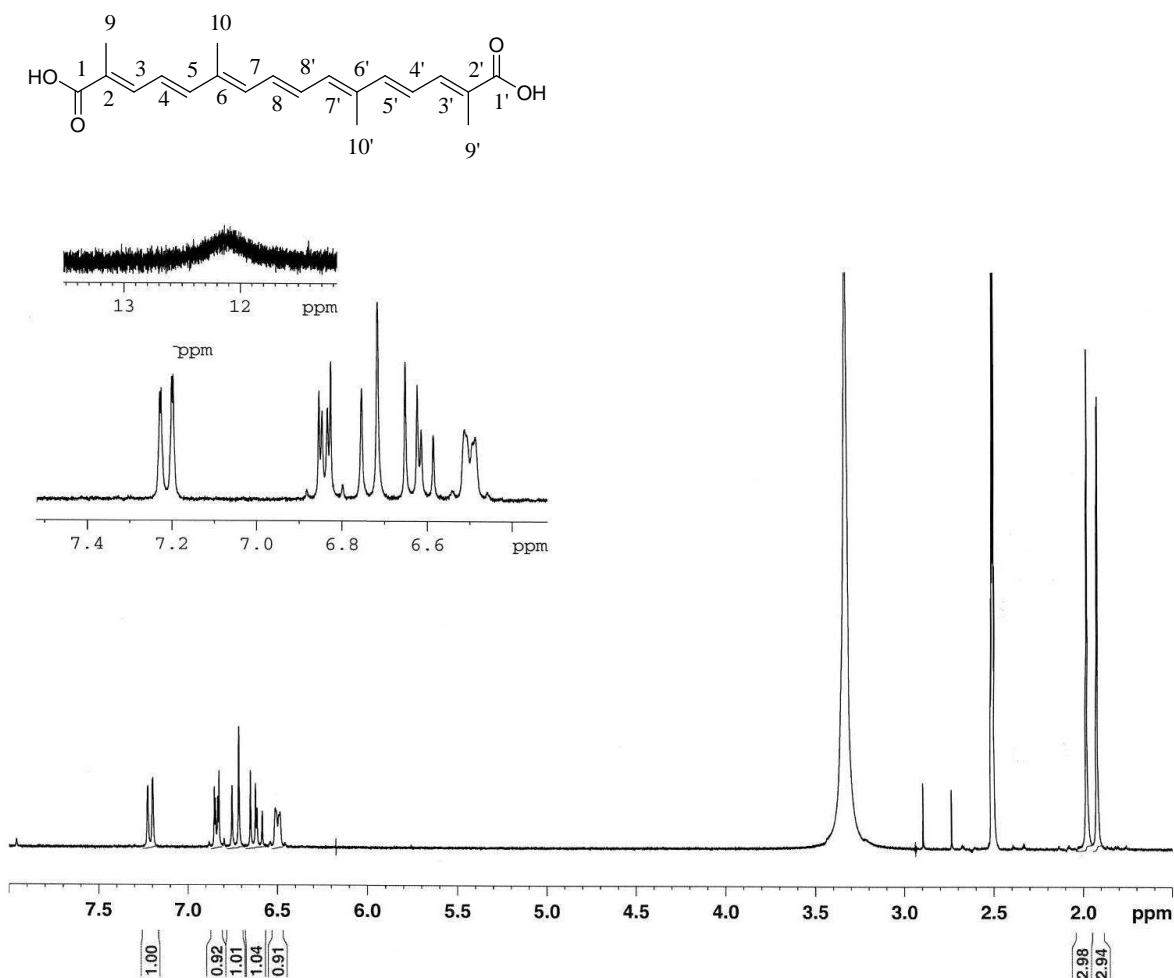
### 2.1 Syntese av crocetin (2) (8,8'-diapokaroten- 8,8'-disyre)

Crocetin (2) dannes ved hydrolysering av crocin (1) med alkalibaser.<sup>30</sup> Siden crocin er svært polart måtte hydrolyseringen skje i et polart løsningsmiddel. Det ble forsøkt med etylenglykol og vann som løsningsmidler. Ved hydrolyse i etylenglykol ble det dannet mono- og diestere mellom løsningsmidlet og crocetin (X.3.1), hydrolysen måtte derfor gjentas i butanol. Vann er derfor et mer effektivt løsningsmiddel, siden hydrolysen blir gjort i ett trinn. Etter hydrolysen ble det tilsatt svovelsyre. Crocetin begynner å danne aggregater og små krystaller når pH blir lavere enn 7,5, dermed felte crocetin ut av løsningen.<sup>32</sup> Løsningen måtte filtreres for å samle opp suspensjonen, en pasteaktig masse, som inneholder en blanding av crocetin, lipider og dekomponeringsprodukter som polyfenoler og sukkermolekyler fra crocin.<sup>30</sup> For at crocetin skulle kunne brukes videre måtte det renses ved omkrysstallisering av en metta løsning i DMF.



Figur 2.1.1 Syntese av crocetin (2).

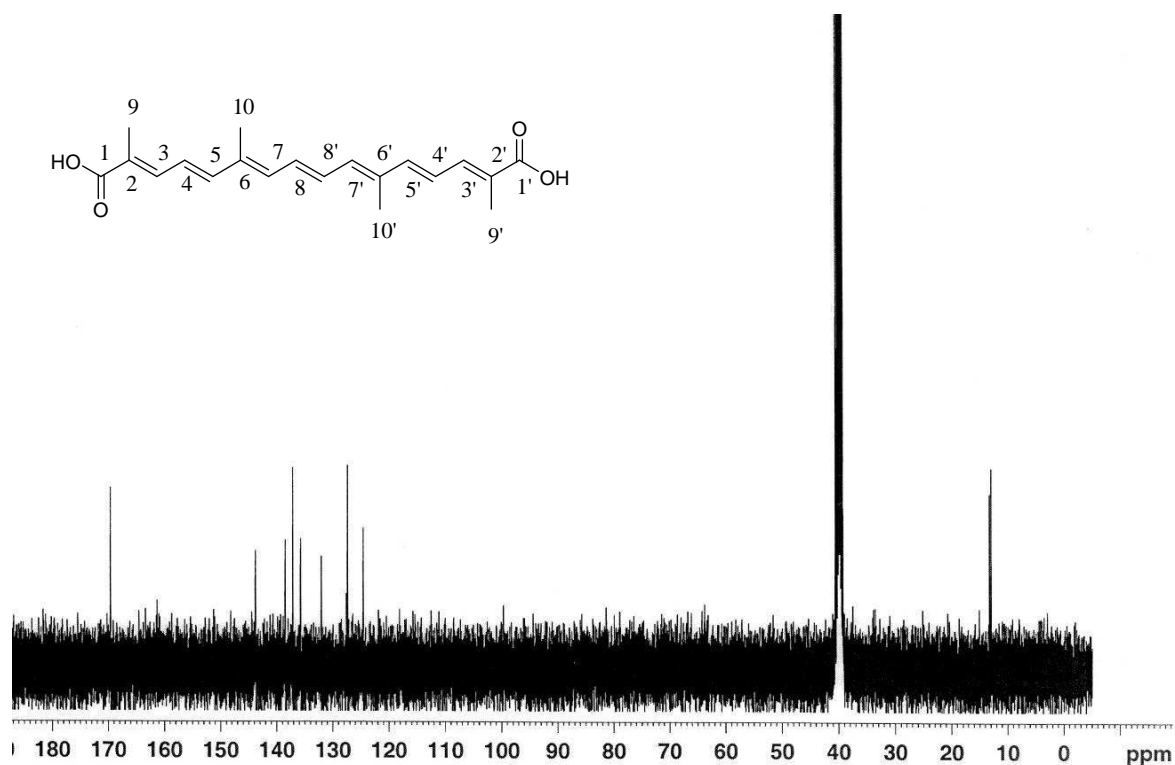




Figur 2.1.2  $^1\text{H-NMR}$ -spekter av crocetin (2) i DMSO.

Tabell 2.1.1, Resultat av  $^1\text{H-NMR}$ -analyse av crocetin (2) (TMS, DMSO).

Posisjon	Proton-skift (ppm)
OH	12.1 (bs, 2H)
C-3 og C-3'	7.21 (d, 2H)
C-4 og C-4'	6.62 (t, 2H)
C-5 og C-5'	6.74 (d, 2H)
C-7 og C-7'	6.85 (d, 2H)
C-8 og C-8'	6.5 (d, 2H)
C-9 og C-9'	1.98 (s, 6H)
C-10 og C-10'	1.92 (s, 6H)



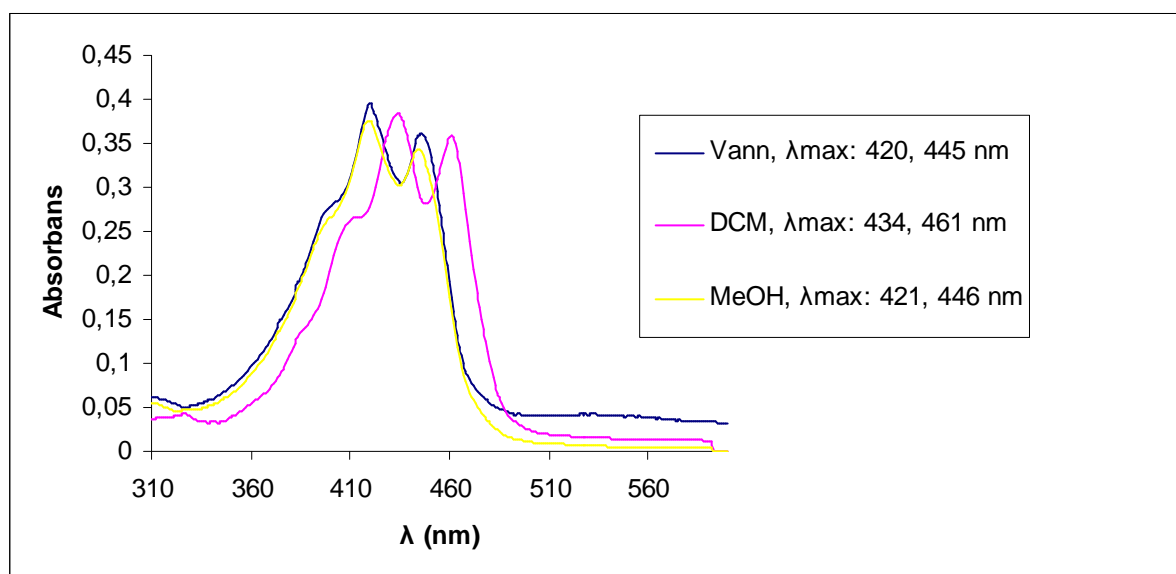
Figur 2.1.3  $^{13}\text{C}$ -NMR-spekter av crocetin (2) i DMSO.

Tabell 2.1.2 Resultat av  $^{13}\text{C}$ -NMR analyse av crocetin (2) (TMS, DMSO).

Posisjon	Karbon-skift (ppm)
C-1 og C-1'	169.6 (2C)
C-2, C-2', C-8 og C-8'	132.07 og 137.09 (4C)
C-3 og C-3'	138.47 (2C)
C-4, C-4', C-5, C-5', C-6, C-6', C-7 og C-7'	143.76, 135.73, 127.37 og 124.54 (8C)
C-9 og C-9'	13.21 (2C)
C-10 og C-10'	12.96 (2C)

Tabell 2.1.3 Karakteristiske absorpsjonsbånd fra infrarød spektroskopi av crocetin (**2**)<sup>34,36</sup>

	Bølgenummer $\text{cm}^{-1}$	Intensitet
OH strekk	3050-2400	Svak, bred
=C-H strekk	3029	Svak (Overlapper med OH)
C-H strekk (metyl)	2918 og 2848	Svak (overlappende med OH)
C=O strekk	1654	Sterk
C=C-C=C strekk	1581	Medium
OH bøy	1427	Medium
C-O stekk	1266 og 1234 (dublett)	Sterk
=C-H ut av plan bøy	958	Sterk
OH ut av plan bøy	934	Medium

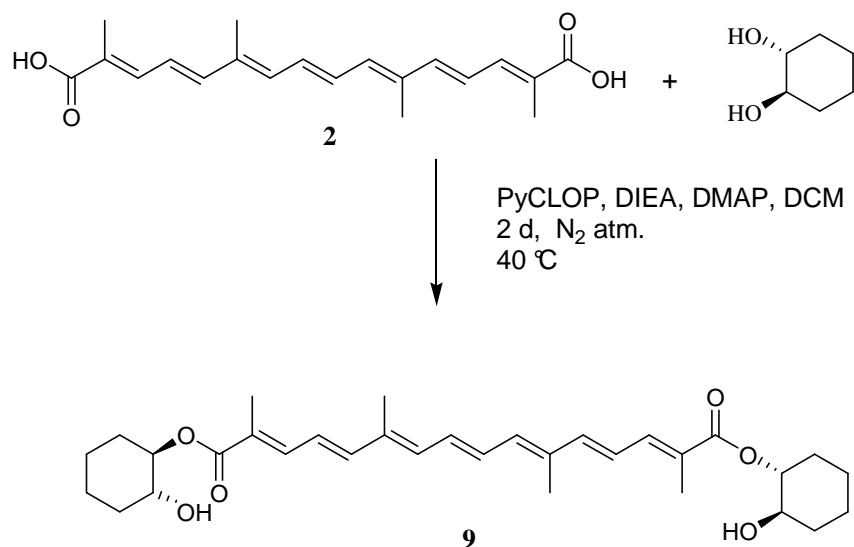
Figur 2.1.4 UV/Vis spekter av crocetin (**2**) i vann, DCM og MeOH.

Crocetin løst i vann viser ingen tegn til aggregatdanning siden finstruktur er til stede og absorpsjonsmaksima er tilnærmet lik crocetin løst i metanol, figur 2.1.4. Grunnen til at man ikke observerer aggregatdanning kan være lav konsentrasjonen. Siden crocetin er lite løselig i vann er det usikkert om konsentrasjonen vil bli høy nok til at aggregatdannelse vil oppstå. Videre undersøkelser vil kunne avklare dette.

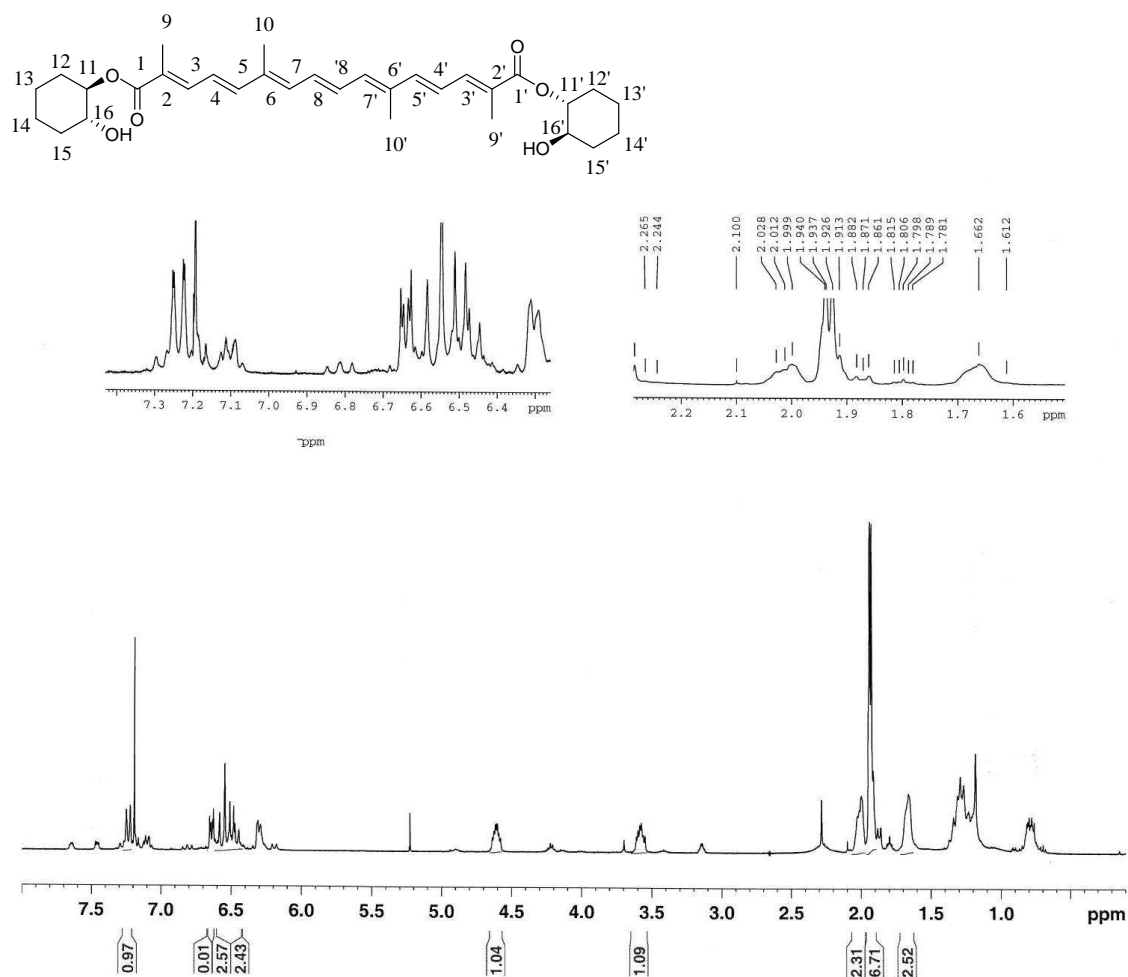
## 2.2 Syntese av crocetin (1*R*, 2*R*)-2-hydroksy-sykloheksan diester (9)

Fremgangsmåten som ble valgt ved syntetiseringen av forbindelse **9** var å bruke en koblingsreagens til å esterifisere (1*R*,2*R*)-sykloheksandiol og crocetin. DCC ble først forsøkt benyttet med DMAP som katalytisk base. Denne syntesemetoden gav tre produkter. MS-analyse av disse tre forbindelsene tydet på at crocetin var forestret, men hos hovedproduktet var den gjenværende hydroksylgruppen på sykloheksandioldelen blitt eliminert (X.3.2).

Koblingsreagensen PyCloP ble så benyttet sammen med basene DMAP og DIEA, til å utføre forestringen. DCM ble benyttet som løsningsmiddel. PyCloP er en vanlig koblingsreagens som brukes mye innen peptidkjemien når nukleofilen er sterkt hindret.<sup>37</sup> Denne reaksjonen vil være analog til koblingen av aminosyrer. Syntesen ble først utført ved romtemperatur, men da tok det 6 dager før reaksjonen var fullført, derfor ble reaksjonsblandingen refluxert. Det ble først observert flekker på TLC som var mer upolar enn produktet, men disse forsvant etter hvert som produktet ble dannet. Det kan tenkes at disse forbindelsene er intermediater. Forbindelse **9** var hovedproduktet.



Figur 2.2.1. Syntese av **9**.

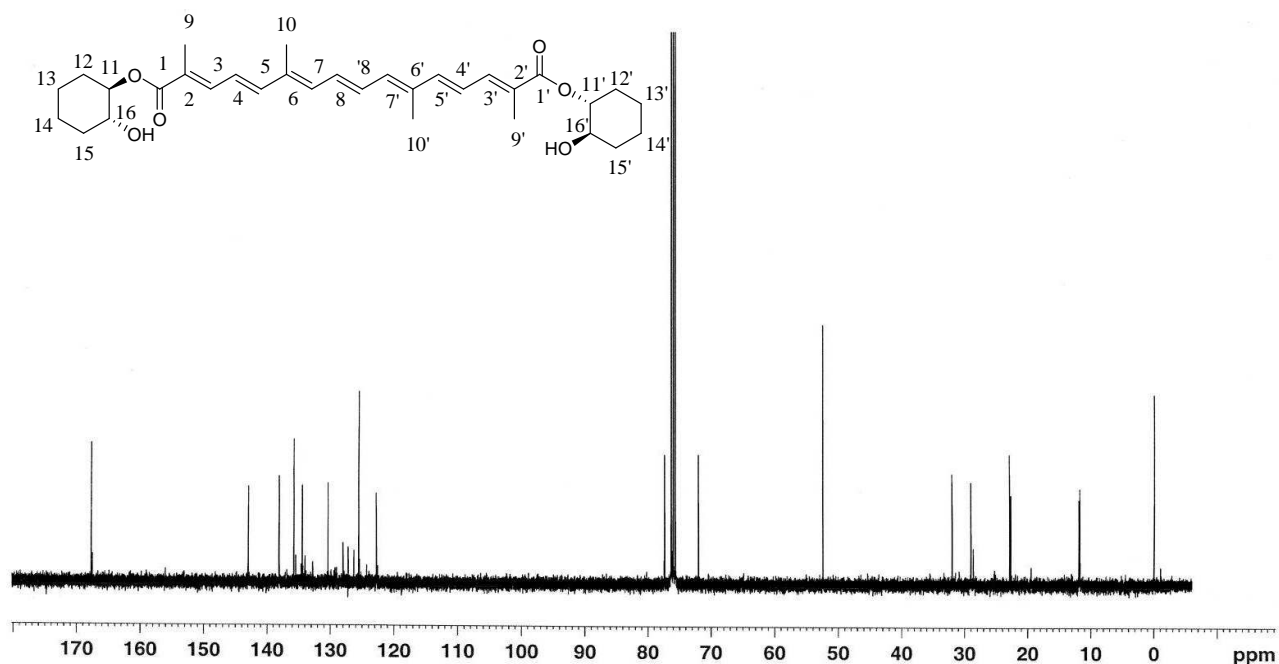


Figur 2.2.2  $^1\text{H-NMR}$ -spekter av **9** i  $\text{CDCl}_3$ .

Tabell 2.2.1, Resultat av  $^1\text{H-NMR}$ -analyse av **9** (TMS,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posisjon	Proton-skift (ppm)
C-3 og C-3'	7.25 (d, 2H)
C-4 , C-4' , C-5 og C-5'	6.5 (m, 4H)
C-7 og C-7'	6.65 (d, 2H)
C-8 og C-8'	6.3 (d, 2H)
C-9, C-9' , C-10 og C-10'	1.9 (2s, 12H)
C-11 og C-11'	4.6 (m, 2H)
C-12, C-12' , C-15 og C-15'	2.0 og 1.65 (2q, 8H)
C-13, C-13' , C-14 og C-14'	1.6, 1.8-2.1 (skjult, 8H)
C-16 og C-16'	3.55 (m, 2H)

I COSY (X.2.1) ser man en kobling mellom karotenoid-delen og den alifatiske delen; mellom protonene i posisjon C-3 og C-11. Protonene i posisjon C-11 og C-16 er tydelig multiplerter,  $\delta$  4,6 og 3,55, og i COSY (X.2.1) kan man se at begge disse protonene kobler til protoner i posisjon C-12 ( $\delta$  2,0) og C-15 ( $\delta$  1,65). Disse toppene er multiplerter, men det er vanskelig å se på grunn av dårlig oppløsning. Man ser at toppen ved  $\delta$  2,0 har flere skiftverdier og en form som kan minne om en kvartett. Protonene i posisjon C-13 og C-14 ligger nesten helt skjult bak metylgruppens topper ( $\delta$  1,9) og den ene metylentoppen ( $\delta$  1,65). Fra HSQC (X.2.3) kan man se at det er i dette området toppene for protonene ligger. Man ser også at integreringen til toppene som ligger her er høyere enn de skal være, noe som er en indikasjon på at det ligger andre topper skjult bak.



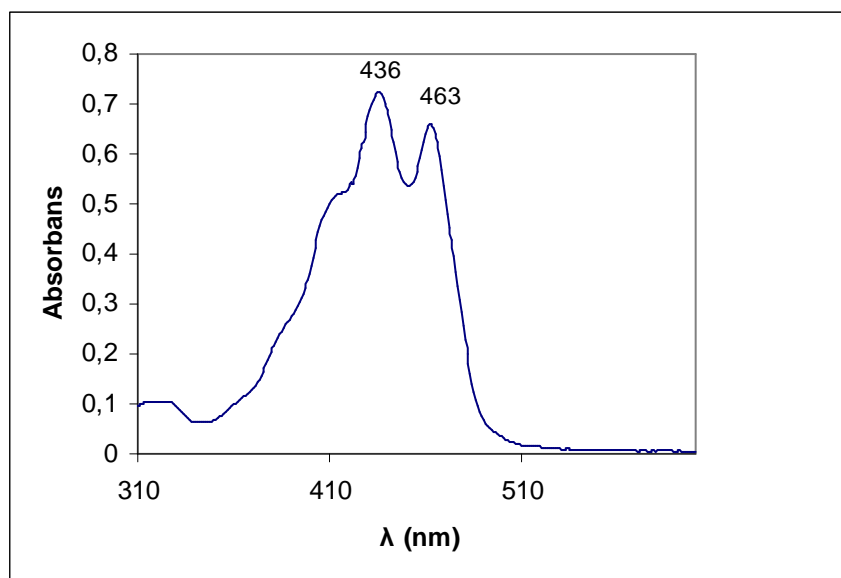
Figur 2.2.3.  $^{13}\text{C}$ -NMR-spekter av **9** i  $\text{CDCl}_3$ .

Tabell 2.2.2 Resultat av  $^{13}\text{C}$ -NMR-analyse av **9** (TMS,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posisjon	Karbon skift (ppm)
C-1 og C-1'	167.65 (2C)
C-2, C-2', C-6 og C-6'	135.75 og 134.44 (4C)
C-3, 3', 4, 4', 5, 5', 7, 7', 8 og 8'	142.96, 138.12, 130.38, 125.42 og 122.77 (10C)
C-9, C-9', C-10 og C-10'	11.82 (4C)
C-11, C-11'	77.41 (2C)
C-12, C-12', C-15 og C-15'	32.04 og 29.07 (4C)
C-13, C-13', C-14 og C-14'	22.92 og 22.75 (4C)
C-16 og C-16'	72.00 (2C)

Tabell 2.2.3 Karakteristiske absorpsjonsbånd fra infrarød spektroskopi av **9**.<sup>34,36</sup>

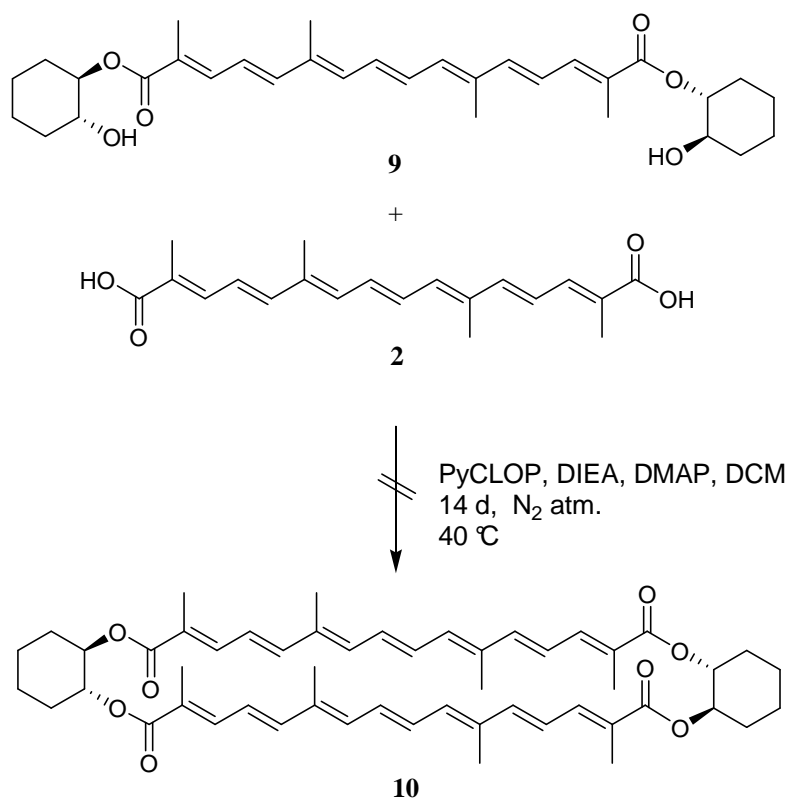
	Bølgenummer $\text{cm}^{-1}$	Intensitet
OH strekk	3337	Medium, bred
=C-H strekk	3081 og 3050	Svak
C-H strekk (metyl/metylen)	2940 og 2855	Svak
C=O strekk	1689	Medium
C=C-C=C strekk	1646	Sterk
OH bøy	1442 og 1391	Medium
C-O stekk	1067 og 1217	Sterk
=C-H ut av plan bøy	811	Sterk

Figur 2.2.4 UV/Vis spekter av **9** i DCM.

CD-spektroskopimålingene av forbindelse **9** viste ingen tegn til kiral forstyrrelse av polyenkjeden (X.2.4). CD-spekteret hadde noen forstyrrelser i området 195-230 nm, men de samme utslagene oppsto også i CD-spekteret for (1*R*,2*R*)-sykloheksandiol. Disse forstyrrelsene kan skyldes at gitteret som ble brukt var beregnet på lys med bølglengde <250.

### 2.3 Forsøk på syntese av *bis*-(1*R*, 2*R*)-sykloheksan dicrocetin diester (**10**)

Siden **9** er sterisk hindret ble det også i denne syntesen valgt å bruke PyCloP som koblingsreagens.<sup>37</sup> Reaksjonene ble overvåket daglig i 14 dager, men forbindelse **10** ble ikke dannet. Grunnen til dette kan være crocetins lave løselighet i DCM og/eller for lav temperatur under reaksjonen. Dersom syntesen hadde blitt utført i et mer polart løsningsmiddel, med høyere kokepunkt enn DCM, ville muligens **10** blitt dannet.



Figur 2.3.1 Forsøk på syntese av **10**.



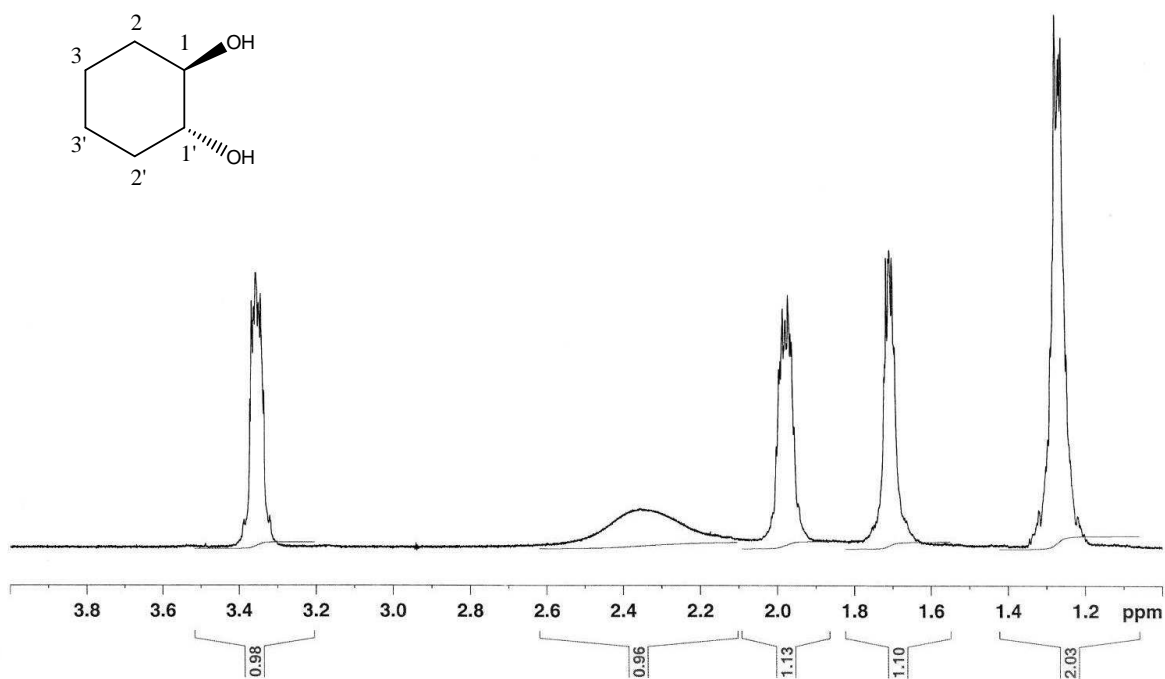


### 3. Karakterisering av utgangsstoff

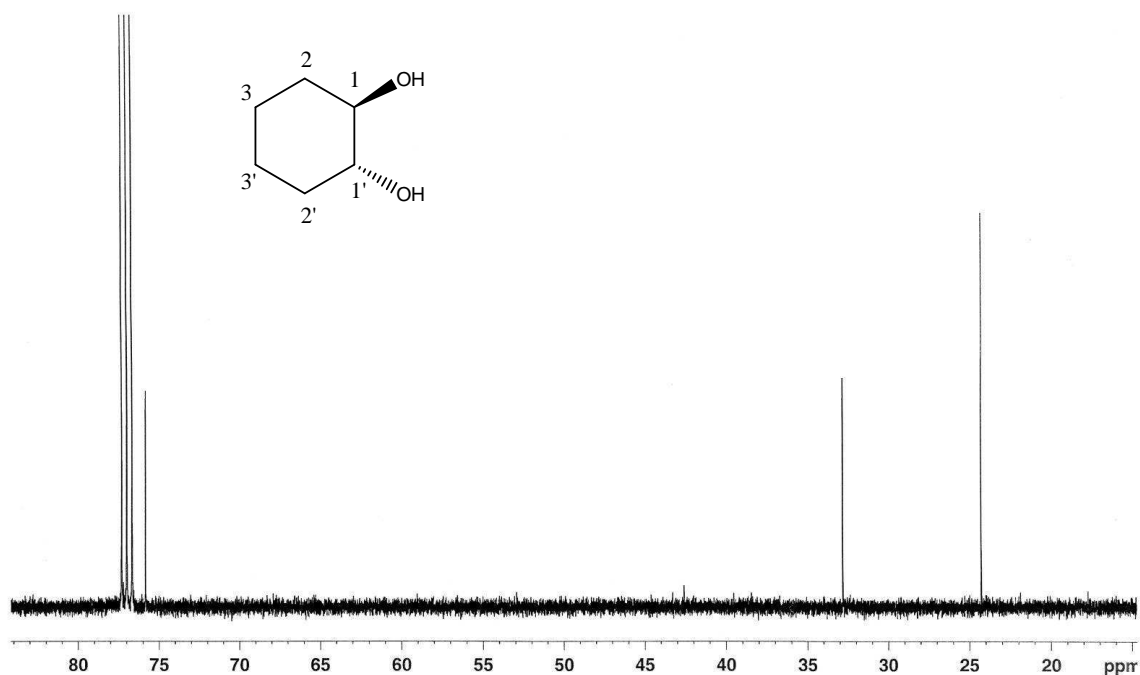
#### 3.1 Karakterisering av (1R,2R)-sykloheksandiol

Tabell 3.1.1 Resultat av  $^1\text{H-NMR}$  og  $^{13}\text{C}$  analyse av (1R,2R)-sykloheksandiol (TMS,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posisjon	Proton-skift	Karbon-Skift
OH	2,35 (bs, 2H)	-
C-1 og C-1'	3,39 (m, 2H)	76
C-2 og C-2'	1,98 og 1,7 (m, 4H)	33
C-3 og C-3'	1,25 (m, 4H)	24

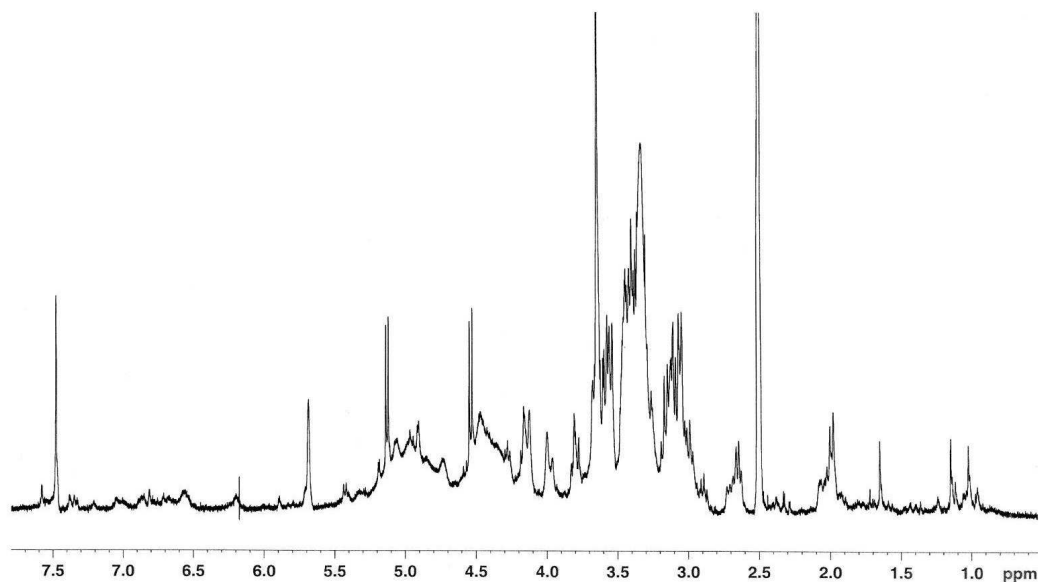


Figur 3.1.1  $^1\text{H-NMR}$ -spekter av (1R,2R)-sykloheksandiol i  $\text{CDCl}_3$



Figur 3.1.2  $^{13}\text{C}$ -NMR-spekter av (1R,2R)-sykloheksandiol i  $\text{CDCl}_3$ .

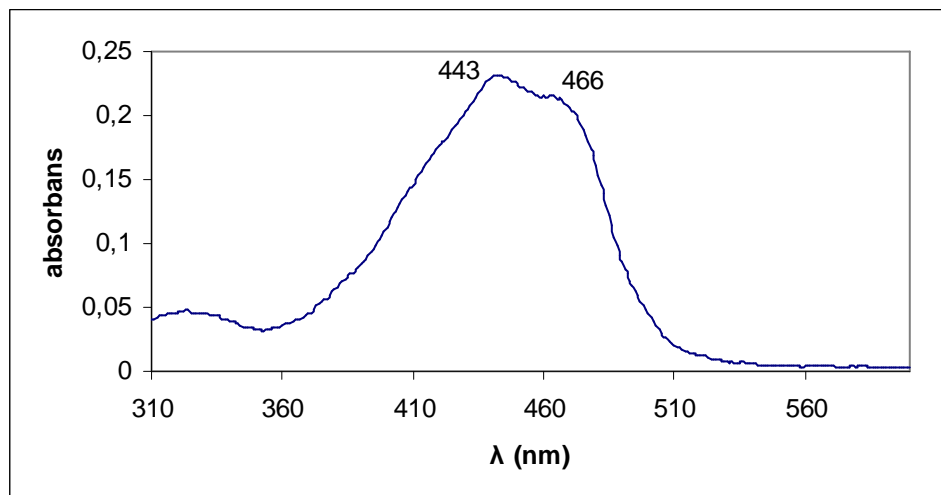
### 3.2 Karakterisering av crocin (1)



Figur 3.2.1  $^1\text{H}$ -NMR-spekter av crocin (1) i DMSO.

$^1\text{H}$ -NMR-spekteret av crocin er svært kompleks og er derfor ikke analysert fullt ut. Man ser svake signaler av polyenkjeden i området  $\delta$  7.5-6.5. Ved  $\delta$  1.9-2.0 ser man signal av

metylgruppene fra polyenkjeden.<sup>28</sup> Man ser at crocin som ble brukt som utgangsstoff inneholder forurensninger når man sammenligner  $^1\text{H-NMR}$ -spekteret med  $^1\text{H-NMR}$  analyser annen litteratur. Ved hjelp av UV/Vis ble renheten bestemt til 5 %.



Figur 3.2.2 UV/Vis av crocin (**I**) i vann

## 4 Eksperimentelt

### 4.1 Generelle metoder og instrumenter

#### 4.1.1 Tørking av løsningsmidler

DCM ble tørket over molekylærsiv, Unio Carbide pellets 4 Å.  
THF ble destillert før bruk.

#### 4.1.2 Renseprosesser

##### Flashkromatografi

Flash kromatografi ble benyttet når mengden råproduktet oversteg 50 mg. Det ble benyttet silicagel 60, 0,040-0,063 mm, fra Merck. Eluenten er spesifisert ved syntesen.

##### Preparativ tynnsjiktskromatografi (TLC)

Tynnsjiktsplater, silicagel 60 F<sub>254</sub> 0,2 mm filmtykkelse fra Merck, ble benyttet når mengden råprodukt var mindre enn 50 mg. Eluenten er spesifisert ved syntesen.

##### Filterering

Filtetpapir fra Schleicher & Schull ble benyttet til filtrasjon. Hvitt bånd ble benyttet til filtrasjon av store krystaller (589<sup>2</sup>), mens blått bånd (589<sup>3</sup>) ble benyttet ved små krystaller.

#### 4.1.3 Instrumenter til karakterisering og kvantitative bestemmelser

##### Tynnsjiktskromatografi (TLC)

Tynnsjiktsplater, silicagel 60 F<sub>254</sub> 0,2 mm filmtykkelse fra Merck, ble benyttet til å overvåke de ulike syntesene. Eluenten er spesifisert ved hver enkelt syntese.

Retensjonsverdien for de ulike forbindelsene er beregnet ut fra formel 6.<sup>38</sup>

$$R_f = L_s/L_{mf} \quad (6)$$

der  $L_s$  er stoffets vandringslengde og  $L_{mf}$  er mobilfasens vandringslengde.

##### UV-Vis-spektrofotometer

UV- spektrene ble tatt opp på et Thermo Spectronic Heλios UV-spektrofotometer. UV-spektrene ble benyttet til kvalitativ og kvantitativ karakterisering av de ulike forbindelsene.

Kvalitative bestemmelser kan utføres med UV/Vis siden karotenoider følger Beers Lov; absorpsjonen er lineær proporsjonal med konsentrasjonen av løsningsmediet med karotenoider.<sup>34</sup> For å regne ut mengde stoff ut fra UV-Vis må man vite den spesifikke absorpsjonskoeffisienten for stoffet,  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ .<sup>39</sup> Dersom den ikke er kjent kan den regnes ut dersom man vet  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  for et annet stoff med samme kromofor, formel 7.

$$E_{1\text{cm}}^{1\%}(\text{A}) = E_{1\text{cm}}^{1\%}(\text{B}) \times \text{molvekt}(\text{B}) / \text{molvekt}(\text{A}) \quad (7)$$

Mengden karotenoider (X) kan man da regne ut fra formel 8.

$$X = 10 \times \text{vol.} \times f \times A / E_{1\text{cm}}^{1\%} \quad (8)$$

der vol. er volum, f er fortynningsfaktoren og A er absorpsjonen.

Formel 7 og 8 er benyttet for å regne ut renhet av crocin (**1**) som ble benyttet.

### **Massespektrometer (MS)**

Massespektrometeret som ble benyttet var av typen MS 902.

### **Kjernemagnetisk resonans spektroskopi (NMR)**

NMR-spektrene ble tatt opp på instrumentene Bruker DPX 300 MHz og Bruker DPX 400 MHz. Det deuturerte løsningsmiddelet som ble benyttet er spesifisert ved hver syntese. TMS er brukt som intern referanse.

### **Infrarødt lys spektroskopi (IR)**

IR-spekterne ble tatt opp på et Thermo Nicolet FT-IR-Nexus spektrofotometer.

### **Circular dichroism spektroskopi (CD)**

CD-spektrene ble tatt opp på et Olis DSM 1000 CD spektrofotometer.

## 4.2 Synteser

### 4.2.1 Crocetin (crocetin- 8,8'-Diapocaroten-8,8'-dioic syre) (2)

#### Metode 1

Crocin (Digentiobiosyl 8,8'-diapocarotene-8,8'-dioate) (1,9875 g, 2,1 mMol) ble tilsatt kaliumhydroksid løst i metanol (10 ml, 25 %) og etylenglykol (300 ml). Løsningen ble refluxert ved 100 °C i 1,5 time under N<sub>2</sub>-atmosfære. Svovelsyre (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25%, 20 ml) ble tilsatt og løsningen fikk stå i 5 minutter før destillert vann ble tilsatt (100 ml). Løsningen ble rørt i 30 minutter før produktet ble ekstrahert over i DCM i flere omganger. Volumet av løsningsmiddelet ble redusert. Den organiske fasen ble vasket med destillert vann i 3 repetisjoner. Løsningen ble tørket over NaSO<sub>4</sub> og løsemidlet ble fjernet ved redusert trykk. På TLC ble det observert biprodukt som ble identifisert til å være mono- og diestere av etylenglykol og disyren, se <sup>1</sup>H-NMR (X.3.1). Hydrolysen ble derfor gjentatt.

Produktblandingen ble tilsatt kaliumhydroksid løst i metanol (10 ml, 25%) og 1-butanol (150 ml). Løsningen ble refluxert ved 110 °C i 1 time under N<sub>2</sub>-atmosfære og løsningsmidlet ble fjernet. Det ble tilsatt H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25%, 20 ml) og deretter destillert vann (100 ml) etter 5 minutter. Løsningen ble rørt i 30 minutter før produktet ble ekstrahert over i DCM. Den organiske fasen ble vasket med destillert vann i 3 omganger og deretter tørket over NaSO<sub>4</sub> og løsemidlet ble fjernet ved redusert trykk. På TLC ble det observert at biproduktet ikke lenger var tilstede.

Produktet ble ikke rensert derfor er det vanskelig å si noe om utbytte.

#### Metode 2

Crocin (5 %) ble veid opp (1,956g, tilsvarende 0,098 g, 0,1 mMol ren crocin) og løst i destillert vann (200 ml) og tilsatt kaliumhydroksid løst i vann (8 ml, 30 %). Løsningen ble refluxert ved 100 °C i 1,5 time under N<sub>2</sub>-atmosfære. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25%, 16 ml) ble tilsatt og crocetin felte ut. Løsningen fikk stå i cirka en time før suspensjonen ble filtrert ut med filterpapir (blått bånd) tre ganger til all suspensjonen var samlet opp.

### Rensing:

Suspensjonen ble løst i DMF og varmet opp til 80 °C med reflux i 30 minutter. Løsningen ble avkjølt og plassert i fryseren over natt. Det utkrystalliserte crocetin ble filtrert og vasket med kald etanol (96%) og tørket på vakuumpumpen over natt.

Utbytte: 22 mg (67%)

$R_f = 0,27$  (Toulen/Aceton/Metanol, 6:1:1)

UV/VIS: Løst i MeOH:  $\lambda_{\max} = 420$  og  $445$  nm

Løst i vann:  $\lambda_{\max} = 421$  og  $446$  nm

Løst i DCM:  $\lambda_{\max} = 434$  og  $461$  nm

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 400,13 MHz):  $\delta$  7.21 (d, 2H, C-3,3'), 6.85 (d, 2H, C-7,7'), 6.74 (d, 2H, C-5,5), 6.62 (t, 2H, C-4,4'), 6.5 (d, 2H, C-8,8'), 1.98 (s, 6H, C-9,9'), 1.92 (s, 6H, C-10,10'), se figure 2.1.2

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO, 100,6 MHz):  $\delta$  169.6 (2C, C1,1'), 132.07, 137.09 (4C, C-2,2',8,8'), 138.47 (2C C-3,3'), 143.76, 135.73, 127.37, 124.54 (8C, C-4,4',5,5',6,6',7,7'), 13.21 (2C, C-9,9'), 12.96 (2C, C-10,10'), se figur 2.1.3

## 4.2.2 Syntese av crocetin (*1R,2R*)-2-hydroksy- sykloheksan diester (9)

### Metode 1

En blanding av crocetin (46 mg, 0,14 mMol), DCC (87 mg, ), (*1R, 2R*)-sykloheksandiol (67 mg, 0,58 mMol) og DMAP (4,0 mg, 0,033 mMol) og DCM (10ml) ble satt på røring i 1 døgn ved RT under  $\text{N}_2$ -atmosfære. Det ble så tilsatt  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (25%, 5ml). Løsningen ble deretter ekstrahert med vann og tørket over vannfri  $\text{NaSO}_4$ . Separasjon av de ulike fraksjonene ble utført ved hjelp av flashkromatografi med heksan/acetone gradient. Ønsket produkt var ikke hovedprodukt.

### Metode 2

En blanding av crocetin (0,0385 gram, 0,117 mMol), (*1R, 2R*)-sykloheksandiol (0,040 gram, 0,344 mMol), PyCloP (0,156 gram, 0,70 mMol), DIEA (0,7 gram, 0,542 mMol), DMAP (0,007 gram, 0,057 mMol) og tørr DCM (20 ml) ble refluxert ved 40°C under  $\text{N}_2$ -atmosfære i 2 døgn. Det ble så tilsatt  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (25%, 5ml). Løsningen ble deretter ekstrahert med vann og



tørket over vannfri NaSO<sub>4</sub>. Separasjon av de ulike fraksjonene ble utført ved hjelp av flash kromatografi med toulen/acetone gradient.

Ubytte: 11 mg (18 %)

R<sub>f</sub> = 0,39 (Toulene/Acetone/Metanol, 6:1:1)

UV/Vis i DCM λ<sub>max</sub> = 436 og 463 nm

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400,13 MHz): δ 7.25 (d, 2H, C-3,3'), 6.65 (d, 2H, C-7,7'), 6.5 (m, 6H, C-4,4',5,5'), 6.3 (d, 2H, C-8,8'), 4.6 (m, 2H, C-11,11'), 3.55 (m, 2H, C-16,16'), 2.0, 1.65 (2q, 8H, C-12,12',15,15'), 2.1-1.8, 1.6 (skjult, 8H), se figur 2.2.2

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100,6 MHz): 167.65 (2C, C-1.1'), 135.75, 134.44 (4C, C-2,2',6,6'), 142.96, 138.12, 130.38, 125.42, 122.77 (10C, C-3,3',4,4',5,5',7,7',8,8'), 77.41 (2C, C-11,11'), 72.00 (2C, C-16,16'), 32.04, 29.07 (4C, C-12,12',15,15'), 22.92, 22.75 (4C, C-13,13',14,14'), 11.82 (4C, C-9,9',10,10'), se figur 2.2.3

#### 4.2.3 Syntese av bis-(1*R*, 2*R*)-sykloheksan dicrocetin diester (10)

En blanding av **9** (7 mg, 0,013 mMol), crocetin (11 mg, 0,034 mMol), PyCloP (25 mg, 0,059 mMol), DIEA (0,14 mMol), DMAP (2 mg, 0,016 mMol) og tørr DCM (10 ml) ble refluksert ved 40 °C under N<sub>2</sub>-atmosfære i 14 dager. Syntesen ble overvåket med TLC daglig. Ønskelige produkt ble ikke dannet.

#### 4.2.4 Syntese av (1*R*, 2*R*)-sykloheksan dicrocetin monoester (11)

##### Metode 1

En blanding av crocetin (30 mg, 0,092 mMol), (1*R*, 2*R*)-sykloheksandiol (5 mg, 0,043 mMol), PyCloP (60 mg, 0,14 mMol), DIEA (30 mg, 0,23 mMol), DMAP (2,5 mg, 0,02 mMol) og tørr DCM (20 ml) ble refluksert ved 40 °C under N<sub>2</sub>-atmosfære i 7 dager. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 ml, 20 %) ble tilsatt og løsningen og deretter ekstrahert med vann i 3 omganger og tørket over vannfri NaSO<sub>4</sub>. Separasjonen av de ulike produktene ble utført med preparativ TLC med toulene, acetone og metanol (6:1:1) som eluent. Forbindelse **9** var blitt dannet, men ikke det ønskede produktet.

### Metode 2

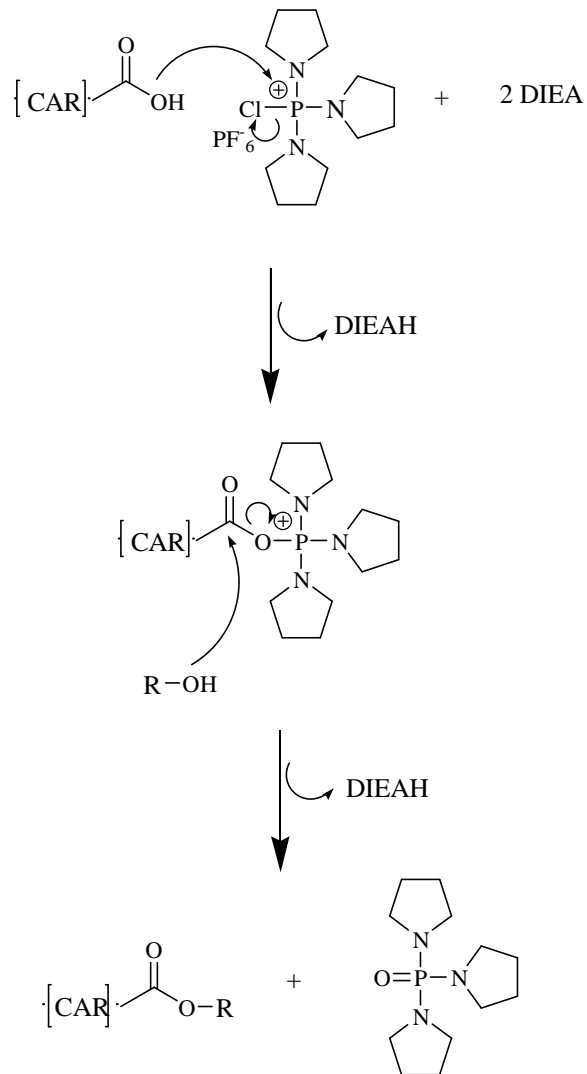
En blanding av crocetin ( 20 mg, 0,061 mMol), (*1R, 2R*)-sykloheksandiol ( 2,3 mg, 0,02 mMol), PyCloP ( 37 mg, 0,088 mMol), DIEA ( 8 mg, 0,062 mMol), DMAP ( 1,7 mg, 0,014 mMol) og tørr THF (20 ml) ble refluxert ved 40 °C under N<sub>2</sub>-atmosfære i 5 dager. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3 ml, 20 %) ble tilsatt. Løsningsmiddelet ble dampet bort og blandingen ble løst i DCM og løsningen ble deretter ekstrahert med vann i 3 omganger og tørket over vannfri NaSO<sub>4</sub>. Separasjonen av de ulike produktene ble utført med preparativ TLC med kloroform og metanol (9:1) som eluent. Ønsket produkt ble ikke dannet.

Forbindelsen som var blitt dannet og forsøkt karakterisert hadde:

R<sub>f</sub> = 0,68 (Kloroform/Metanol, 9:1)

UV/Vis i DCM  $\lambda_{\text{max}} = 428$  og 453 nm

## 5. Reaksjonsmekanisme med PyCloP



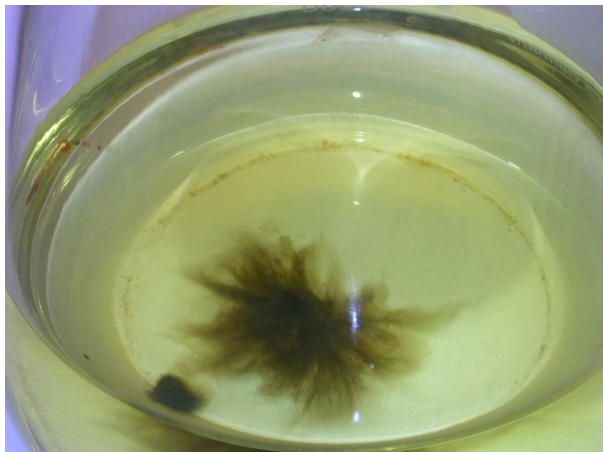
## 6. Mikrobiell hydrolyse av crocin

### 6.1 Innledning

En vannløsning av crocin ble oppbevart ved 4 °C i et par uker. Ved en tilfeldighet ble det etter hvert oppdaget at en mikroorganisme hadde begynt å vokse i løsningen, figur 6.1.1.

Mikroorganismen ble identifisert, ved hjelp av mikroskop og molekylære ITS typing (internal transcribed spacer) ved det Karolinska Universitet i Stockholm. Mikroorganismen ble identifisert som arten *Cladosporium cladosporioides*. Løsningen ble undersøkt med TLC, og det tydet på at det var dannet crocetin i løsningen.

Crocetin blir vanligvis fremstilt ved kjemisk hydrolyse med syre eller en alkalibase.<sup>30</sup> En mindre vanlig fremgangsmåte å produsere crocetin på er ved å utføre hydrolysen ved hjelp av et spesielt enzym.<sup>40</sup> Dette kan muligens sees i sammenheng med soppens hydrolyse av crocin.



Figur 6.1.1. Opphavskulturen.

## 6.2 Enzymatisk syntese

Mange synteser innen organisk kjemi utføres ved hjelp av enzymer, og det er flere fordeler ved bruk av disse framfor kjemikaler; de er effektive katalysatorer, miljøvennlige, virker ved milde betingelser, er selektive og kan katalysere en rekke reaksjoner.<sup>41</sup> Enzymene deles inn i seks grupper etter hvilke reaksjonstyper de katalyserer. Enzymatiske reaksjoner kan utføres både med isolerte enzymer eller hele celledsystemer, alt etter reaksjonstype, betingelser og skala.

Hydrolyse av ester- og amidbindinger kan enkelt gjøres ved enzymkatalyserte reaksjoner.<sup>41</sup> De vanligste enzymene som brukes er protease, esterase og lipase. Mekanismen ligner veldig på den kjemiske hydrolysingen med base. I det aktive setet på enzymet er det en nukleofil gruppe som angriper karbonylgruppen på esteren. Den nukleofile gruppen kan være hydroksylgruppen i serin, karboksylgruppen i aspartansyre eller tioldelen i cystein. I tillegg til bruk av isolerte enzymer kan også hele mikrobielle celler benyttes til dette formålet. Både bakterier, gjærsopp og sopp har vist gode resultater. Bruk av hele mikrobielle celler gjør reaksjonen mer kompleks, men det har vist seg at reaksjonene kan være mer selektive.

### 6.2.1 Enzymatiske synteser med karotenoider

Fra naturens side produseres karotenoidene ved enzymatiske reaksjoner i de ulike organismene.<sup>42</sup> Karotenoider har også blitt syntetisert ved hjelp av enzymer "in vitro". Både naturlige karotenoider og syntetiske karotenoider har blitt syntetisert enzymatisk.

Enzymatiske synteser med karotenoider kan utføres med isolert enzym eller med hele cellekulturer. Majoriteten av karotenoider er hydrofobe, noe som vanskeliggjør det å utføre syntesene i vann. Når enzymatiske reaksjoner utføres i et organisk løsningsmiddel kan ofte den katalytiske aktiviteten avta.<sup>41</sup>

Den naturlige karotenoiden astaxantin, som blant annet finnes i laks, har blitt syntetisert ved hjelp av gjærrellekulturer (*Xanthophyllomyces dendrorhous*).<sup>43</sup> *E. Coli* er også brukt i enzymatisk syntetisering av karotenoider.<sup>42</sup> Ved å overføre gener til *E. Coli*, som gir opphav til modifiserte enzymer, kan nye karotenoider produseres. En slik ny karotenoid er dihydroksydiketo karotenoiden fillipsiaxantin, som har en dyp mørkelilla farge. Isolert enzym

har også blitt brukt til å lage syntetiske og naturidentiske karotenoider. Enzymet  $\beta,\beta$ -karoten 15, 15'-monooksygenase kløyver  $\beta,\beta$ -karoten regioselektivt i naturen.<sup>44</sup> Enzymet har blitt isolert fra slimhinnen i kyllingtarm. Et annen eksempel på enzymatiske reaksjoner med isolert enzym er syntetiseringen av karotenoidglyserider, som ikke finnes naturlig, med lipase fra *Candida Antartica*.<sup>45</sup> Enzymatisk hydrolysering av karotenoidestere har også blitt utført.<sup>46,47</sup> Et eksempel på dette er hydrolysering av astaxantindiestere til monoesteren og fritt astaxantin.

Enzymatiske reaksjoner med karotenoider er ikke en metode med utstrakt bruk.<sup>45</sup> De siste årene er derimot metoden tatt i bruk i større grad.<sup>42</sup> Ved å modifisere eksisterende enzymer fra den naturlige karotenoidsynteseveien til å akseptere nye substrater kan ukjente karotenoider syntetiseres. Denne utvidelsen av karotenoid-veien med modifiserte enzymer kan gi opphav til flere hundre nye karotenoider.

### **6.3 Sopp**

Sopp defineres som en eukaryot heterotrof organisme som utvikler forgrenede filamenter og reprodukerer seg ved hjelp av sporer.<sup>48</sup>

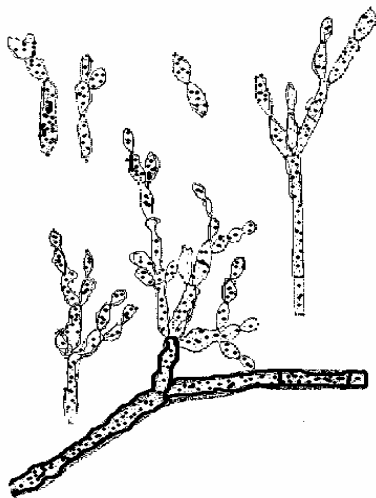
#### **6.3.1 *Cladosporium cladosporioides***

*Cladosporium cladosporioides* hører til i klassen Deuteromycetes.<sup>49</sup> Det som kjennetegner denne klassen er deres reproduksjon, som foregår ved aseksuelle sporer, conidia.<sup>50</sup> Disse soppene mangler altså en seksuell fase i livssyklusen, og av den grunn omtales de ofte som ufullstendige sopp. Det finnes om lag 17000 ulike arter innenfor denne klassen. De fleste er terrestriske, men finnes også i vandig miljø. Med så mange arter samlet i gruppen er det stort mangfold i egenskaper mellom artene. De fleste livnærer seg på dødt organisk materiale eller parasitter på planter. Enkelte av soppene i denne gruppen er parasitter for mennesker og dyr, fordi de produserer giftstoffer i mat som kan være kreftfremkallende. Det finnes også arter som har positive egenskaper, og disse kan utnyttes i jordbruk, skogsdrift, industri og medisin.

Deuteromycetesartene dekomponerer organiske materiale, og er en ønsket organisme i jordbruket fordi de kan resirkulere næringsstoffer.<sup>50</sup> Innen medisinen brukes enkelte arter kommersielt i produksjon av antibiotika, enzymer og andre kjemiske forbindelser. De spiller også en svært viktig rolle i fermenteringsindustrien. I foredling og farging av mat benyttes også slekter innen deuteromycete.

Deuteromycetes har som regel skillevegger i mycelet som er perforert slik at strømming av cytoplasma og immigrering av cellekjerner kan skje fritt fra celle til celle.<sup>50</sup> De aller fleste reproducerer seg ved hjelp av aseksuelle sporer, kalt conidia, som produseres ved tuppen eller på siden av spesielle celler, conidiosporer. Sporene kan både forekomme som enkle sporer eller samlinger av mange celler som sammen kan danne ulike former for ”fruktlegemer”. Sporene som produseres kan forekomme hver for seg, flere etter hverandre eller i små dråper av slim. De kan være encellede, tocellede eller flercellede.

*Cladosporium cladosporioides* tilhører familien Dematiaceae, der hyfene og conidia har en mørk farge. Det hender at bare enten hyfene eller conidia er mørke. I celleveggen kan det være forekomst av melanin og karotenoider som gir farge.<sup>51</sup> Disse soppene har ikke noe organiserte ”fruktlegemer”.<sup>50</sup> De aller fleste soppene i denne familien livnærer seg på dødt organisk materiale, men det finnes noen planteparasitter og noen få menneske- og dyreparasitter. Dette gjelder også for arten *Cladosporium cladosporioides*.<sup>49</sup> Den har olivengrønn til brunaktig farge og har både små og større conidiosporer. Den er en svært utbredt muggsopp, og man finner den både i luft og jord. *Cladosporium cladosporioides* er en av de vanligste mikroorganismer man finner kontaminert i flaskevann, noe som viser hvor utbredt den er.<sup>52</sup> Ved vannlekkasjer kan store mengder *Cladosporium cladosporioides* oppstå, noe som kan føre til allergiske reaksjoner hos mennesker, som hypersensitivitet og respiratoriske sykdommer (for eksempel astma).<sup>53</sup> Hudsykdommen *phaeohyphomycosis* oppstår når *Cladosporium cladosporioides* innvaderer huden med hyfe- og gjærliknende celler.<sup>54</sup>



Figur 6.3.1 Skisse av *Cladosporium cladosporioides*.

### 6.3.2 Hydrolyse

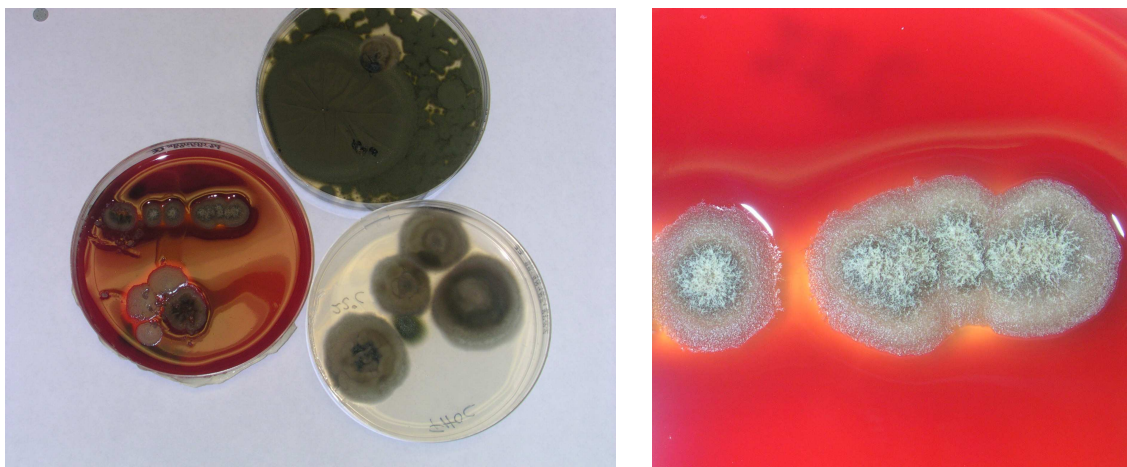
I enkelte arter fra familien dematiaceous har man funnet enzymer som hydrolyserer alifatiske epoxider.<sup>55</sup> Disse enzymene har vist seg å være enantioselektive og er derfor interessante når det kommer til rasemiske løsninger av epoxider. I underklassen hyfomycetidae finnes det arter som produserer hydrolytiske enzymer. Eksempler på dette finner man i en del vannlevende arter som bryter ned planterester ved hjelp av disse enzymene.<sup>56</sup> De har enzymer som bryter ned de viktige plantekomponentene cellulose, pektin, protein og lignin.

*Cladosporium cladosporioides* har flere hydrolytiske enzymer med svært høy aktivitet.<sup>57</sup> Et eksempel på dette er enzymet invertase (*E.C. 3.2.1.26* –  $\beta$ -D-fructofuranosidase) som katalyserer hydrolyse av sukkrose til invert sukker, en ekvivalent mengde glukose og fruktose.<sup>58</sup> Denne hydrolysen kan også gjøres med syre, men denne reaksjonene krever lav pH og høy temperatur slik at produktet får en uønsket mørk farge. Det har derfor blitt utviklet en teknologi der nettopp *Cladosporium cladosporioides* blir brukt i produksjonen, noe som gir lave kostnader og gode resultater. De optimale forholdet for enzymet er en temperatur på 70 °C og pH 6.



## 6.4 Resultat og fremgangsmåte

For å være sikker på at det var mikroorganismen som hadde utført reaksjonene måtte man forsikre seg om at den var ren. *Cladosporium cladosporioides* fra crocin-løsningen ble derfor dyrket ved SINTEFs immunologilaboratorie ved St. Olavs hospital i to uker. Der den ble forsøkt dyrket på ulike medium, både ved 22 °C og 37 °C. Soppen lot seg dyrke på flere av voksmediene, se tabell 6.4.1, men bare ved 22 °C. Soppen som var dyrket frem kunne ansees som ren, og videre undersøkelser kunne utføres.



Figur 6.4.1. *Cladosporium cladosporioides* etter dyrking.

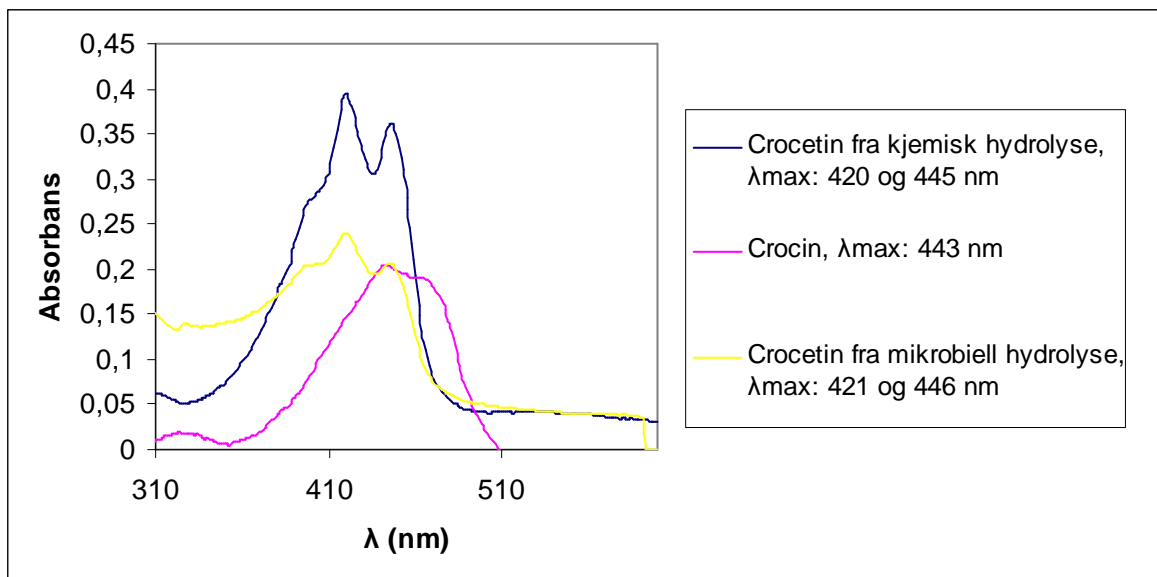
Tabell 6.4.1. De ulike vekstmediene *Cladosporium cladosporioides* ble forsøkt dyrket på.

Vekstmedium (agar)	Vekst
Potet glukose	Ja
Blod	Ja
Mycoplasma	Nei
Sabouraud glukose	Ja



Man ser både en svak hypsokromisk effekt da  $\lambda_{\max}$  går mot en lavere verdi og en tydelig hypokromisk effekt (blått skift) da absorbansen minker, se figur 6.4.3.<sup>34</sup> Det at  $\lambda_{\max}$  minker er en indikasjon på dannelsen av crocetin, som har lavere absorpsjonsmaksimum enn crocin. Minkende absorbans kan muligens også indikere dannelsen av crocetin, men en slik kraftig nedgang kan ikke skyldes det alene. Andre faktorer kan ha forårsaket dette, som dekomponering på grunn av oksygen og lys. Selv om løsningene hadde stått i mørket ble de eksponert for lys daglig da UV/Vis målingene ble utført. Prøvene ble oppbevart ved vanlig atmosfære, altså med tilgang på oksygen. Muligens ville dekomponeringen vært mindre dersom tilgangen på oksygen hadde vært lavere. Alle tre parallellene viste samme utvikling i UV/Vis.

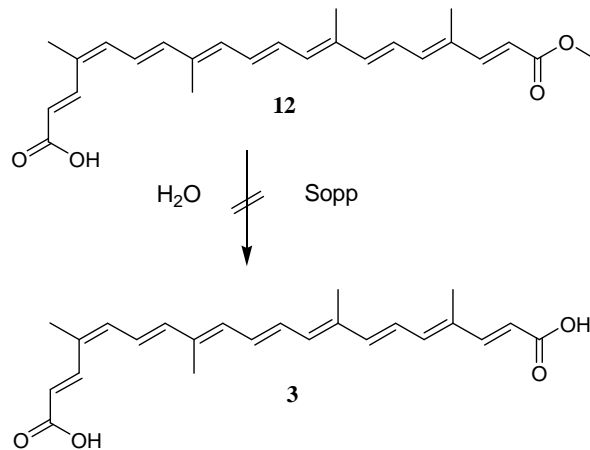
Den nye forbindelsen som var blitt dannet i crocinløsningen ble rensert ved hjelp av preparativ TLC og ble analysert med UV/Vis. Dette ble gjort etter at løsningen hadde stått i 14 dager.



Figur 6.4.4. UV/Vis spekter av crocetin 9 syntetisert av soppen, løst i vann.

Crocetin dannet ved mikrobiell hydrolyse av crocin har identisk absorpsjonsmaksimum som kjemisk hydrolysert crocetin, figur 6.4.4. I forhold til utgangsstoffet, crocin, viser mikrobielt hydrolysert crocetin et blått skift og finstruktur som man ikke ser hos crocin. Skiftet mot en lavere  $\lambda_{\max}$  samsvarer med målingene i figur 6.4.3.

Det ble også undersøkt om *Cladosporium cladosporioides* kunne hydrolysere bixin til norbixin. Dette viste seg å ikke være tilfelle, 6.4.5.



Figur 6.4.5 Forsøk på mikrobiell hydrolyse av bixin (**12**).

## 6.5 Videre arbeid

Selv om resultatene som man har fått gjennom UV/Vis tyder på at *Cladosporium cladosporioides* hydrolyserer crocin til crocetin burde det gjøres flere analyser før dette kan fastslås. Analyser som burde gjøres av forbindelsen er NMR, IR og MS. NMR og IR krever en større mengde stoff enn det man isolerte gjennom disse forsøkene. Skal man klare å isolere en større mengde burde forholdene optimaliseres: temperatur, voksmedium, pH og atmosfære.

For eventuelle videre studier ville det ha vært interessant å prøve å isolere enzymet og utføre hydrolysen ”in vitro” for så å sammenligne effektiviteten mot kjemisk hydrolyse. Før dette kan gjøres må enzymet identifiseres og de optimale forholdene for hydrolysen må kartlegges.

---

## Referanser

1. Isler O. *Carotenoids* (Ed.: O. Isler). 1971.
2. Weedon BCL. *Carotenoids* (Ed.: O. Isler). 1971.
3. Naess SN, Elgsaeter A, Foss BJ, Li B, Sliwka HR, Partali V, Meloe TB, Naqvi KR. Hydrophilic carotenoids: surface properties and aggregation of crocin as a biosurfactant. *Helvetica Chimica Acta*. 2006;89:45-53.
4. Nomenclature of carotenoids. (Recommendations 1974) *Biochemical Journal*. 1975;151:5-7.
5. Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*. 2001;36:703-725.
6. Yeum KJ, Aldini G, Chung HY, Krinsky NI, Russell RM. The activities of antioxidant nutrients in human plasma depend on the localization of attacking radical species. *Journal of Nutrition*. 2003;133:2688-2691.
7. Cogdell RJ, Frank HA. How carotenoids function in photosynthetic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Bioenergetics*. 1987;895:63-79.
8. Viljanen K, Sundberg S, Ohshima T, Heinonen M. Carotenoids as antioxidants to prevent photooxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2002;104:353-359.
9. Yanishlieva NV, Aitzetmüller K, Raneva VG.  $\beta$ -Carotene and lipid oxidation. *Fett/Lipid*. 1998;100:444-462.
10. Krinsky NI. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology & Medicine*. 1989;7:617-635.
11. Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999;26:746-761.
12. Thurnham DI. Carotenoids: functions and fallacies. *Proceedings of the Nutrition Society*. 1994;53:77-87.
13. Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*. 2007;55:207-216.
14. Ben-Dor A, Steiner M, Gheber L, Danilenko M, Dubi N, Linnewiel K, Zick A, Sharoni Y, Levy J. Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2005;4:177-186.
15. Cooper DA. Carotenoids in health and disease: Recent scientific evaluations, research recommendations and the consumer. *Journal of Nutrition*. 2004;134:221S-224S.
16. Burton GW, Ingold KU.  $\beta$ -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*. 1984;224:569-573.

17. Bauernfeind JC, Brubacher GB, Kläui HM et al. *Carotenoids (Ed.: O. Isler)*. 1971; Birkhäuser, Basel.
18. Sliwka H-R, Partal V, Lockwood SF. *Carotenoids: physical, chemical and biological function and properties*. 2008; CRC Press. i trykk
19. Foss BJ. *Synthesis and Physical Properties of Hydrophilic Carotenoid Derivatives*. 2005. Trondheim, NTNU.
20. Hager A. Formation of maxima in the absorbance spectrum of carotenoids in the 370 nm region; consequences for the interpretation of certain action spectra. *Planta*. 1970;91:38-53.
21. Mori Y, Yamano K, Hashimoto H. Bistable aggregate of all-*trans*-astaxanthin in an aqueous solution. *Chemical Physics Letters*. 1996;254:84-88.
22. Ruban AV, Horton P, Young AJ. Aggregation of higher plant xanthophylls: differences in absorption spectra and in the dependency on solvent polarity. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*. 1993;21:229-234.
23. Carmona M, Zalacain A, Sanchez AM, Novella JL, Alonso GL. Crocetin Esters, Picrocrocetin and Its Related Compounds Present in *Crocus sativus* Stigmas and *Gardenia jasminoides* Fruits. Tentative Identification of Seven New Compounds by LC-ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54:973-979.
24. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Experimental Biology and Medicine*. 2002;227:20-25.
25. Chen Sa, Wang X, Zhao B, Yuan X, Wang Y. Production of crocin using *Crocus sativus* callus by two-stage culture system. *Biotechnology Letters*. 2003;25:1235-1238.
26. Bilde av *Crocus sativus*. <http://www.pflanzen-bild.de/giftpflanzen.php?intStart=118> . 2008. Lastet ned mai 2008.
27. Bilde av *Crocus sativus*. [http://en.wikipedia.org/wiki/Crocus\\_sativus](http://en.wikipedia.org/wiki/Crocus_sativus) . 2008. Lastet ned mai 2008.
28. Assimiadis MK, Tarantilis PA, Polissiou MG. UV-Vis, FT-Raman, and <sup>1</sup>H NMR spectroscopies of cis-trans carotenoid from saffron (*Crocus sativus*). *Applied Spectroscopy*. 1998;52:519-522.
29. Pfister S, Meyer P, Steck A, Pfander H. Isolation and Structure Elucidation of Carotenoid-Glycosyl Esters in *Gardenia* Fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and Saffron (*Crocus sativus* Linne). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996;44:2612-2615.
30. Takahashi M, Harada K. Method for the purification of crocetin. Riken Vitamin Co., Ltd. Japan. 2004; WO [2004078695].
31. Magesh V, Singh JPV, Selvendiran K, Ekambaram G, Sakthisekaran D. Antitumour activity of crocetin in accordance to tumor incidence, antioxidant status, drug

- metabolizing enzymes and histopathological studies. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2006;287:127-135.
32. Giaccio M. Crocetin from saffron: An active component of an ancient spice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004;44:155-172.
  33. Solomons T, Fryhle C. *Organic Chemistry*. 2004; New Jersey: Wiley.
  34. Britton G. *Carotenoids Volume 1B: Spectroscopy*. 1995; Basel: Birkhäuser.
  35. Lawetz V, Hutchinson DA. Theory of circular dichroism. *Canadian Journal of Chemistry*. 1969;47:577-579.
  36. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *Spectrometric identification of organic compounds*. 2005; New York: Wiley.
  37. Coste J, Frerot E, Jouin P. Coupling N-Methylated Amino Acids Using PyBroP and PyCloP Halogenophosphonium Salts: Mechanism and Fields of Application. *Journal of Organic Chemistry*. 1994;59:2437-2446.
  38. Greibrokk T, Lundanes E, Rasmussen KE. *Kromatografi*. 2005; Universitetsforlaget.
  39. Davis EH. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. 1976; London: Academic Press.
  40. Nosaka N, Myano N, Asano M. Crocetin enzymic preparation from crocin. Taishoo Tekunosu Kk, Japan. 1993; JP[07018194].
  41. Faber K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 2005; Berlin, Springer.
  42. Wang F, Jiang JG, Chen Q. Progress on molecular breeding and metabolic engineering of biosynthesis pathways of C30, C35, C40, C45, C50 carotenoids. *Biotechnology Advances*. 2007;25:211-222.
  43. Parajo JC, Santos V, Vazquez M, Cruz JM. Production of carotenoids by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymic hydrolyzates of prehydrolyzed wood. *Food Chemistry*. 1997;60:347-355.
  44. Woggon WD. Oxidative cleavage of carotenoids catalyzed by enzyme models and beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *Pure and Applied Chemistry*. 2002;74:1397-1408.
  45. Partali V, Kvittingen L, Sliwka HR, Anthonsen T. Stable, highly unsaturated glycerides - enzymic synthesis with a carotenoic acid. *Angewandte Chemie, International Edition in English*. 1996;35:329-330.
  46. Flachmann R, Schopfer C, Sauer M, Klebsattel M. Enzymic hydrolysis of carotenoids esters. Sungene GmbH & Co.Kгаа, Germany. 2003; WO[2004022765].
  47. Partali V, Sliwka HR, Anthonsen T, Liaaen-Jensen S. Enzymic resolution of zeaxanthin. *Biocatalysis*. 1992;6:145-149.

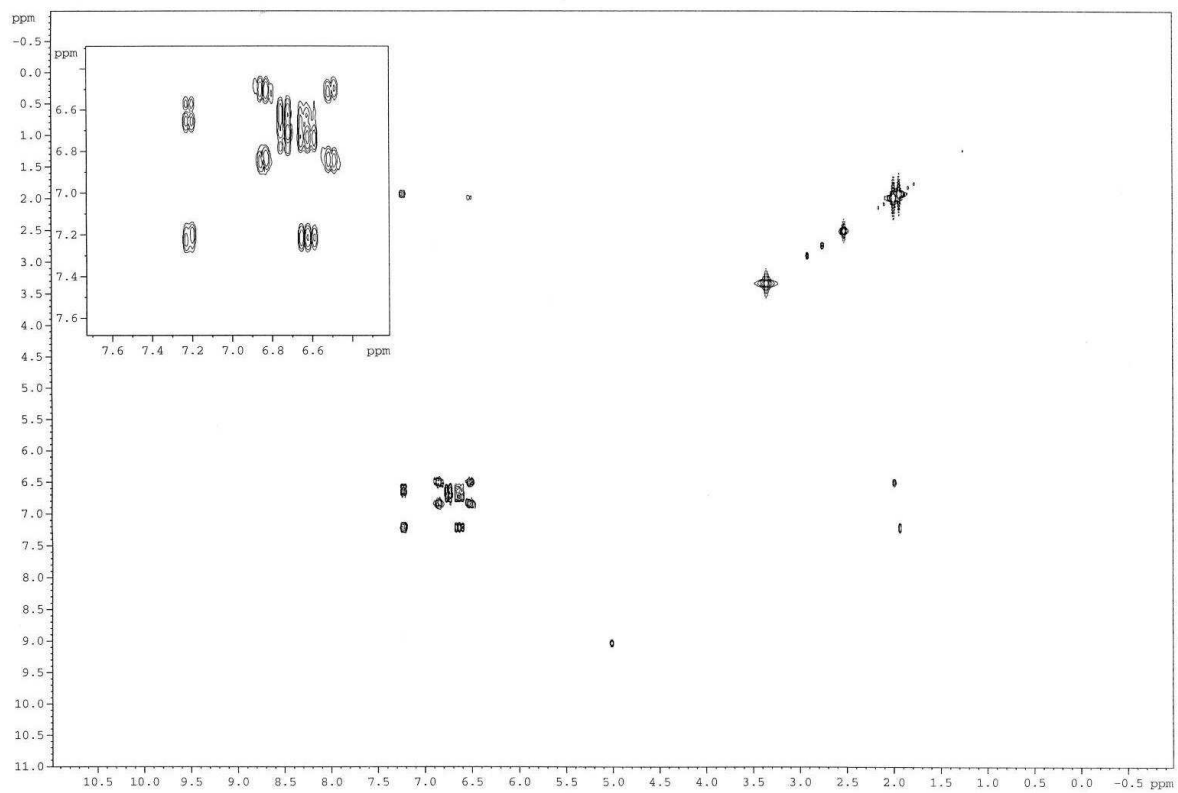
48. Sharma PD. *Fungi and Allied Organisms*. 2005; Delhi, India: Alpha Science International Ltd.
49. Ellis MB. *Dematiaceous hyphomycetes*. 1971; Surrey: Commonwealth Mycological Institute.
50. Sumbali Geeta. *The Fungi*. 2005; Jammu, India: Alpha Science International Ltd.
51. Schnitzler N, Peltroche-Llacsahuanga H, Bestier N, Zundorf J, Lutticken R, Haase G. Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala* (*Wangiella*) *dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. *Infection and Immunity*. 1999;67:94-101.
52. Huang CC, Lung SM, Peng JS. Identification of floating microorganisms in bottled mineral water and contamination caused by equipment and the environment. *Taiwan Nongye Huaxue Yu Shipin Kexue*. 2000;38:361-366.
53. Makkonen K, Viitala KI, Parkkila S, Niemela O. Serum IgG and IgE antibodies against mold-derived antigens in patients with symptoms of hypersensitivity. *Clinica Chimica Acta*. 2001;305:89-98.
54. Vieira MR, Milheiro A, Pacheco FA. Phaeohyphomycosis due to *Cladosporium cladosporioides*. *Medical Mycology*. 2001;39:135-137.
55. Grogan G, Roberts SM, Willetts AJ. Novel aliphatic epoxide hydrolase activities from dematiaceous fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 1996;141:239-243.
56. Zemek J, Marvanova L, Kuniak L, Kadlecikova B. Hydrolytic enzymes in aquatic hyphomycetes. *Folia Microbiologica*. 1985;30:363-372.
57. Nabrdalik M. Enzymatic activity of moulds occurring in human environment. *Mikologia Lekarska*. 2007;14:195-200.
58. Santana de Almeida AC, Costa de Araujo L, Costa AM, Moraes de Abreu CA, Lima MAGdA, Palha MdLAPF. Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2005;8:54-62.



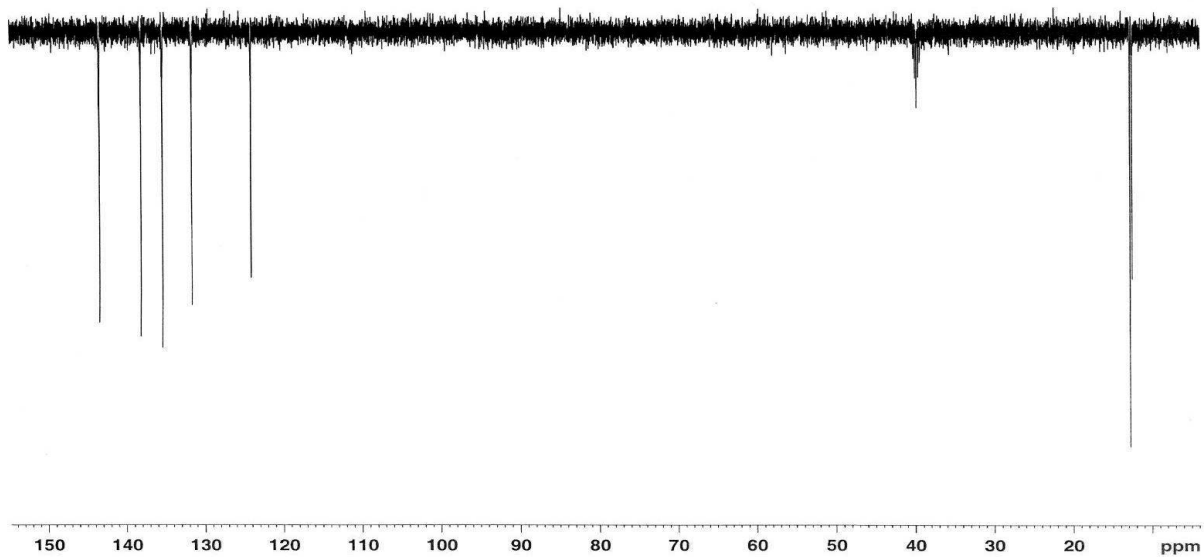
**X. Vedlegg**

X.1 NMR- og IR-spekter av crocetin (2).....	s. II
X.2 NMR-, IR- og CD-spekter av forbindelse 9.....	s. V
X.3 Spekter av biprodukt.....	s. IX

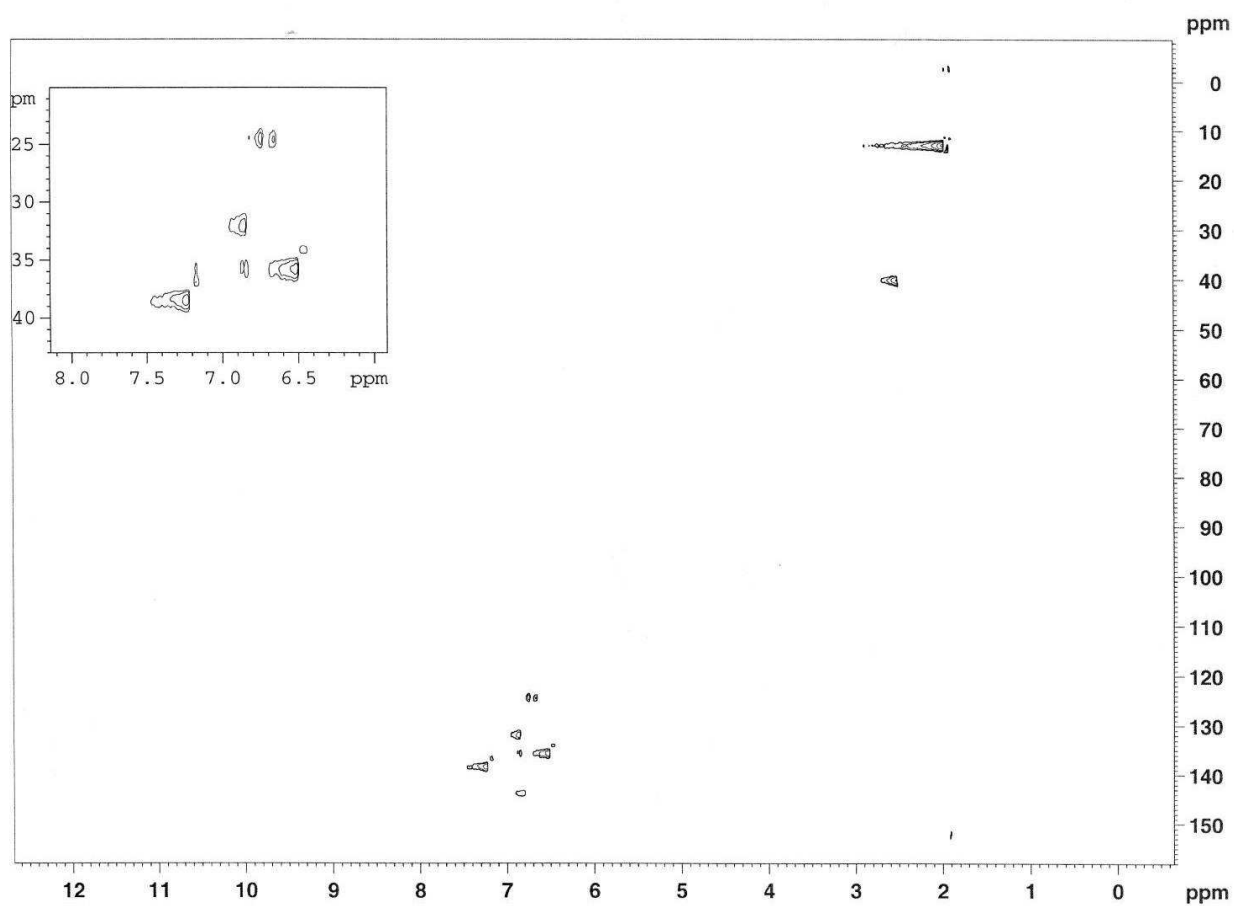
## X.1 NMR- og IR-spekter av crocetin (2)



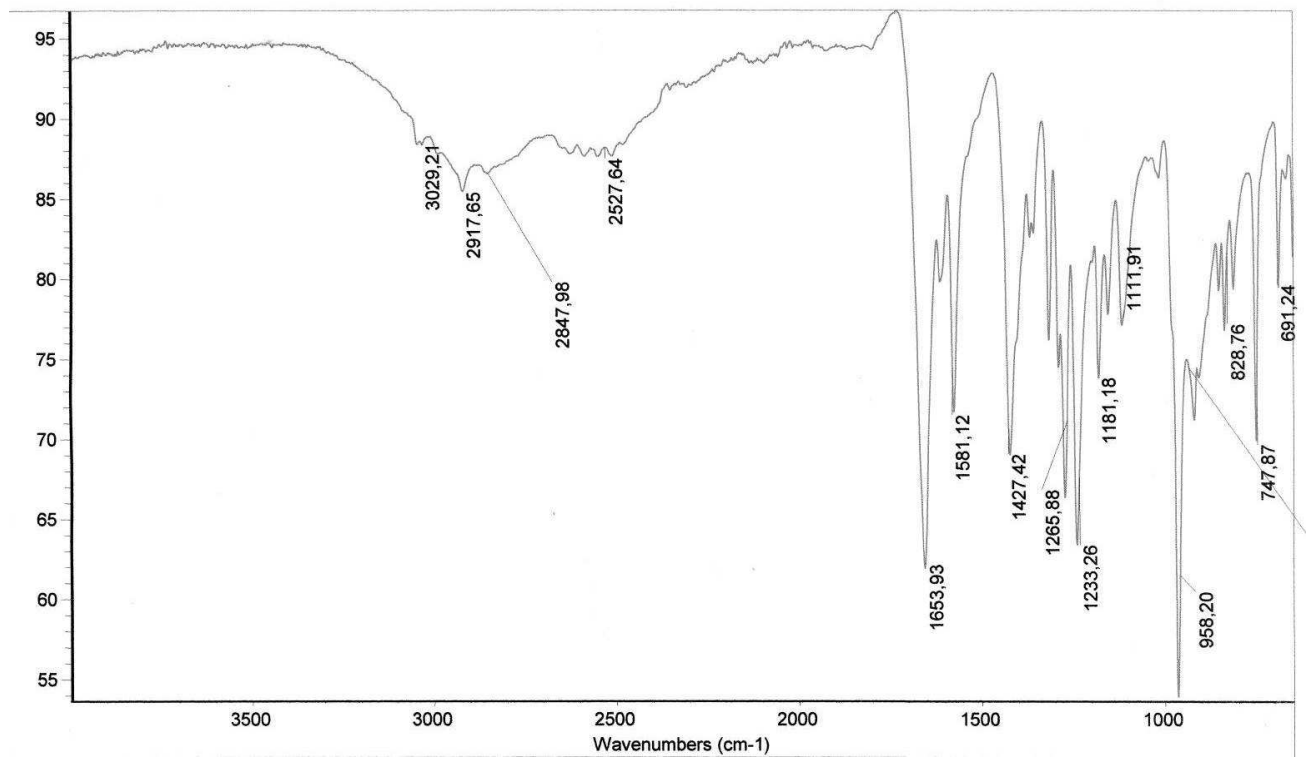
Figur X.1.1 Cosy av crocetin (2) i DMSO.



Figur X.1.2 DEPT<sup>135</sup> av crocetin (2) i DMSO.

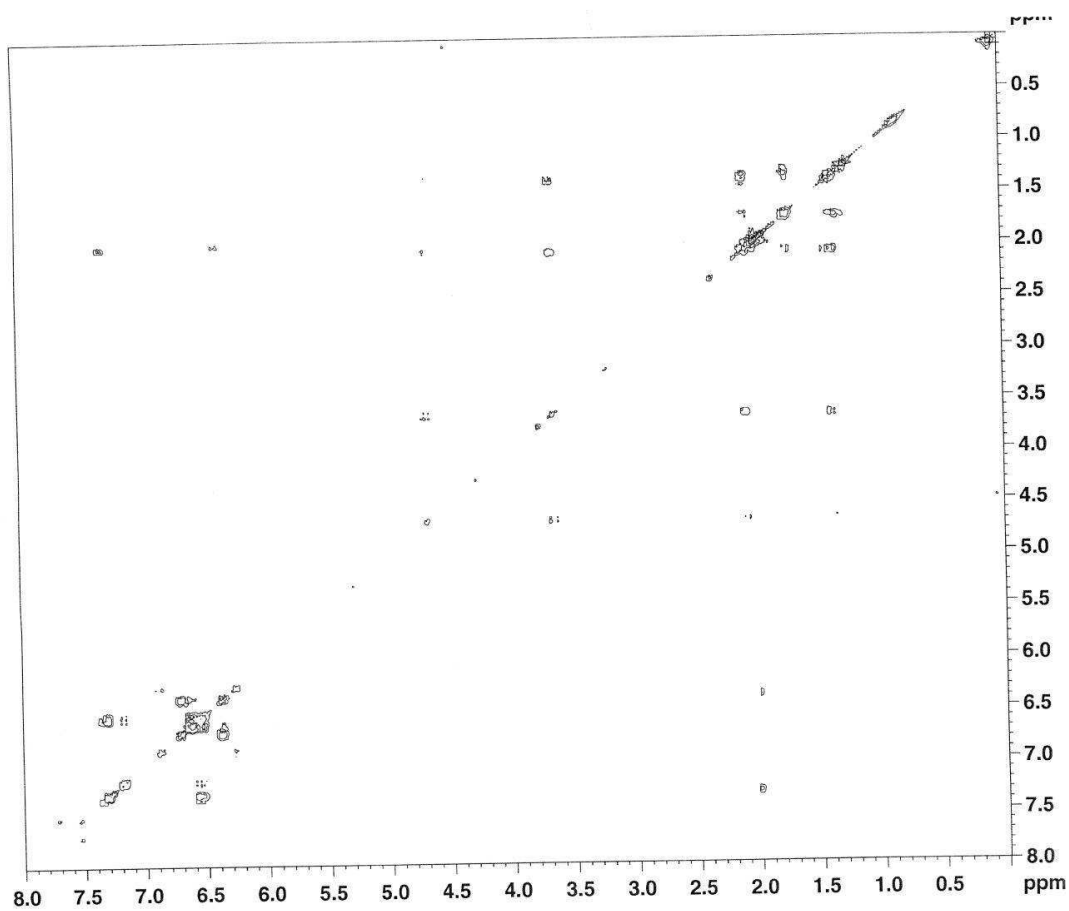


Figur X.1.3 HSQC av crocetin (2) DMSO.

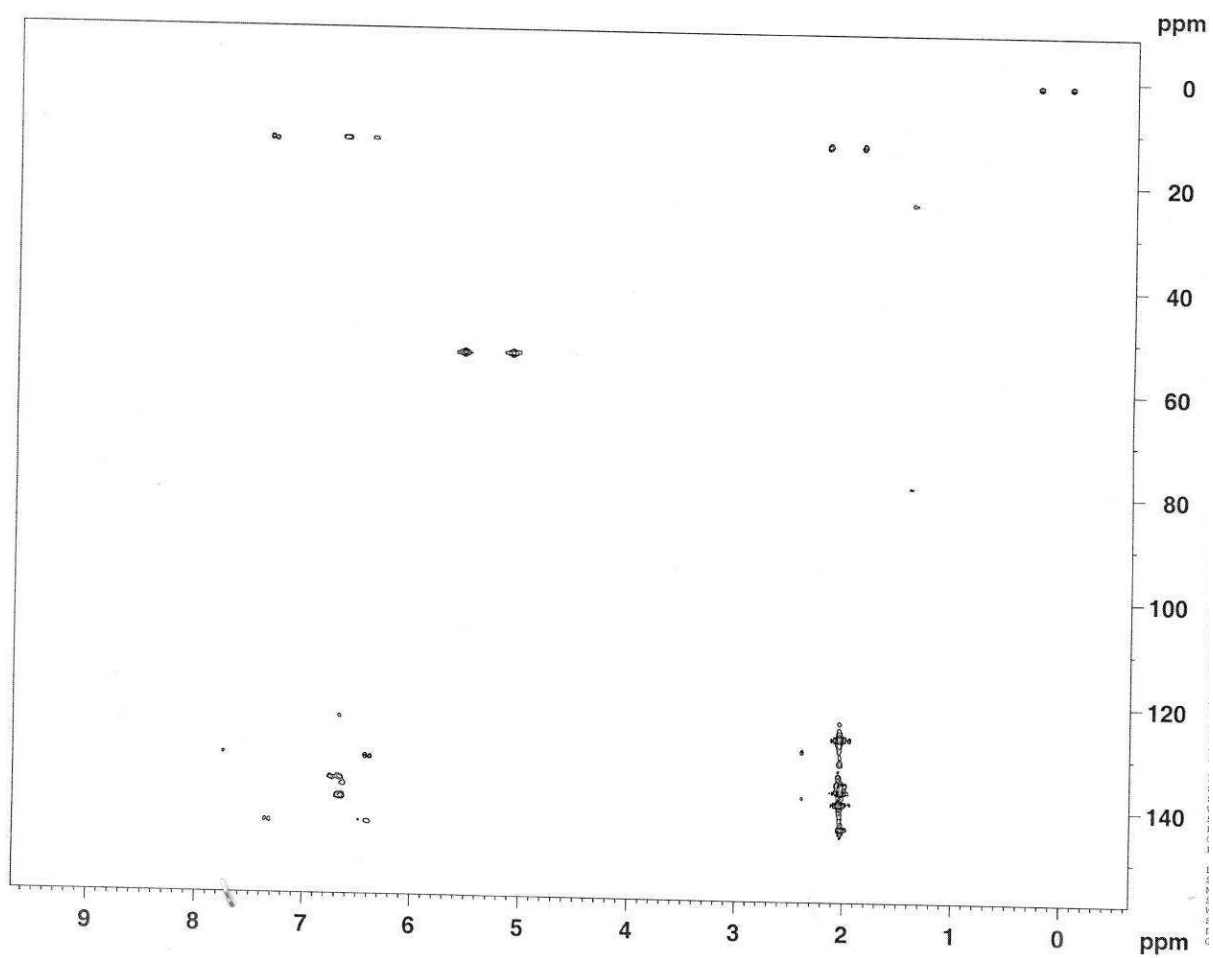


Figur X.1.4 IR-spekter av crocetin (2).

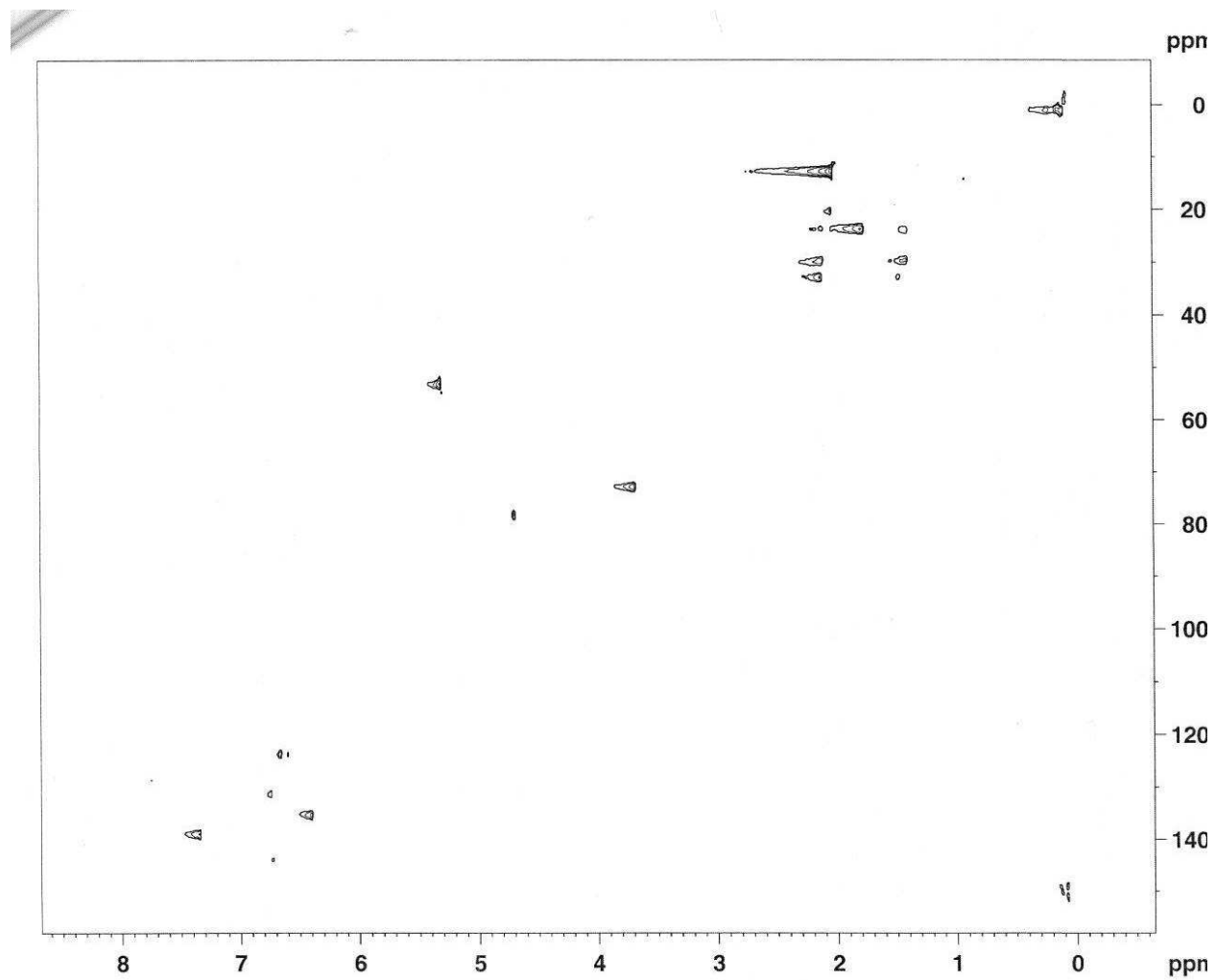
## X.2 NMR-, IR- og CD-spekter av forbindelse 9



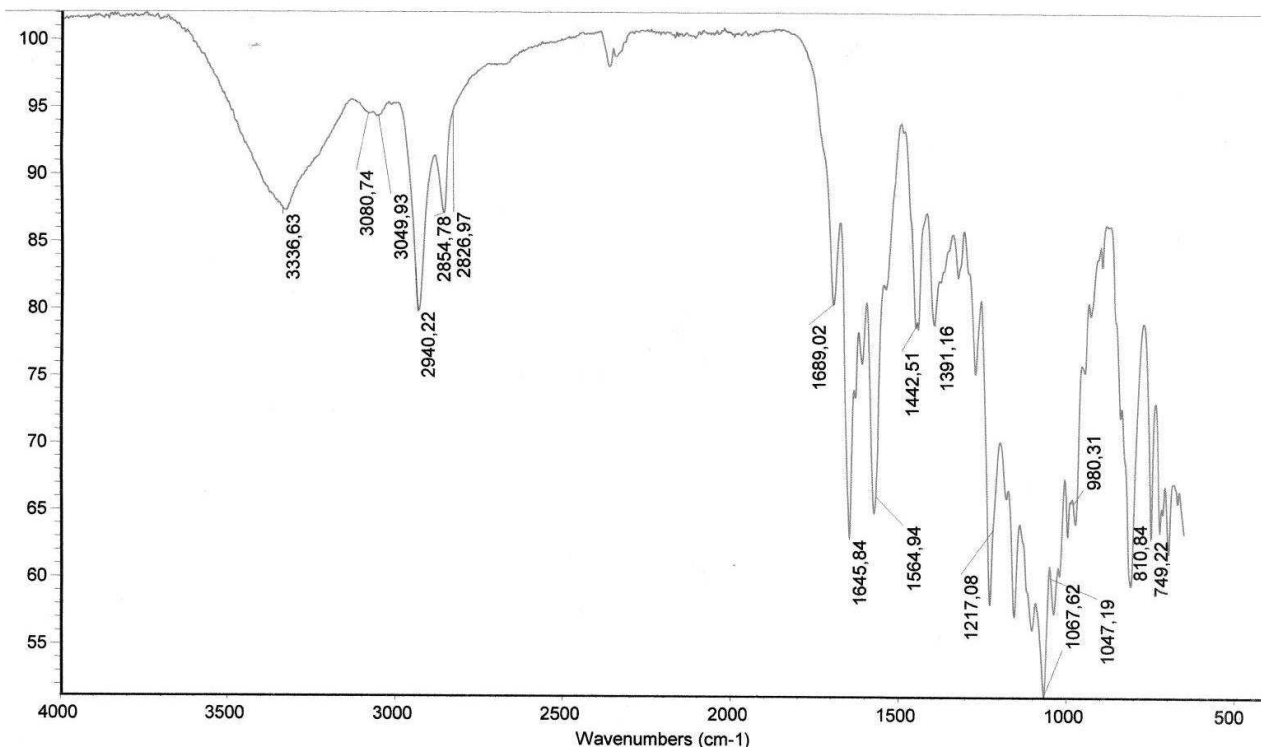
Figur X.2.1 COSY av forbindelse 9 i  $CDCl_3$ .



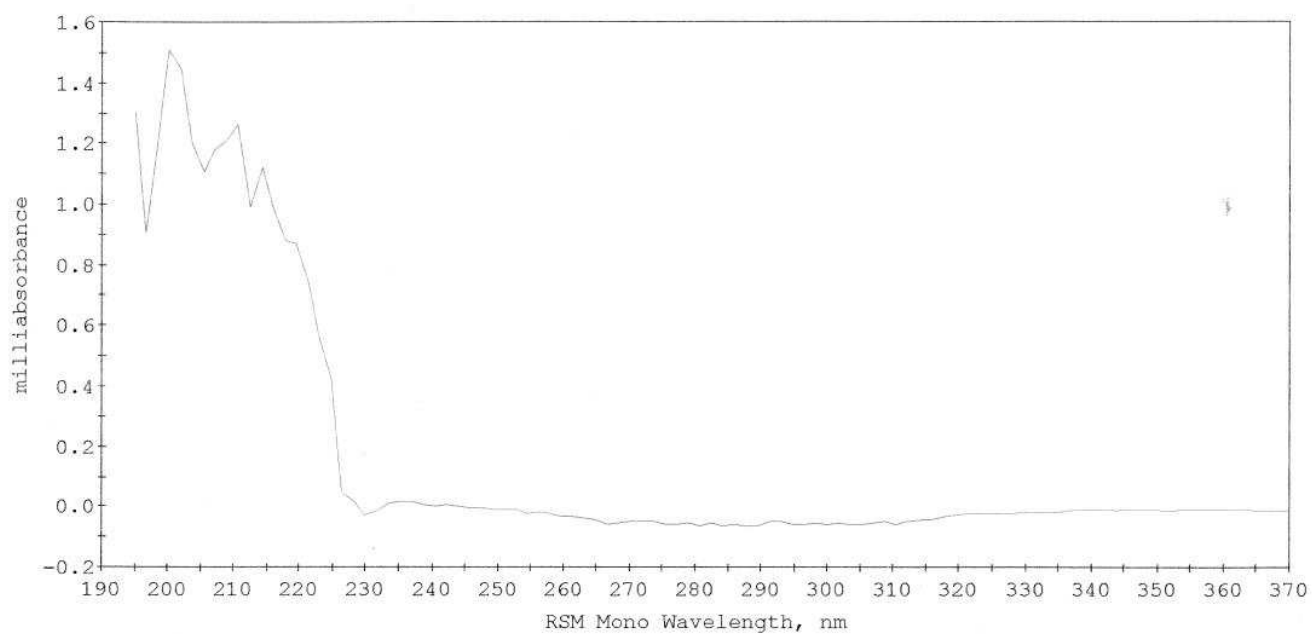
Figur X.2.2 HMBC av forbindelse **9**, i  $\text{CDCl}_3$ .



Figur X.2.3 HSQC-spekter av forbindelse 9, i  $\text{CDCl}_3$ .



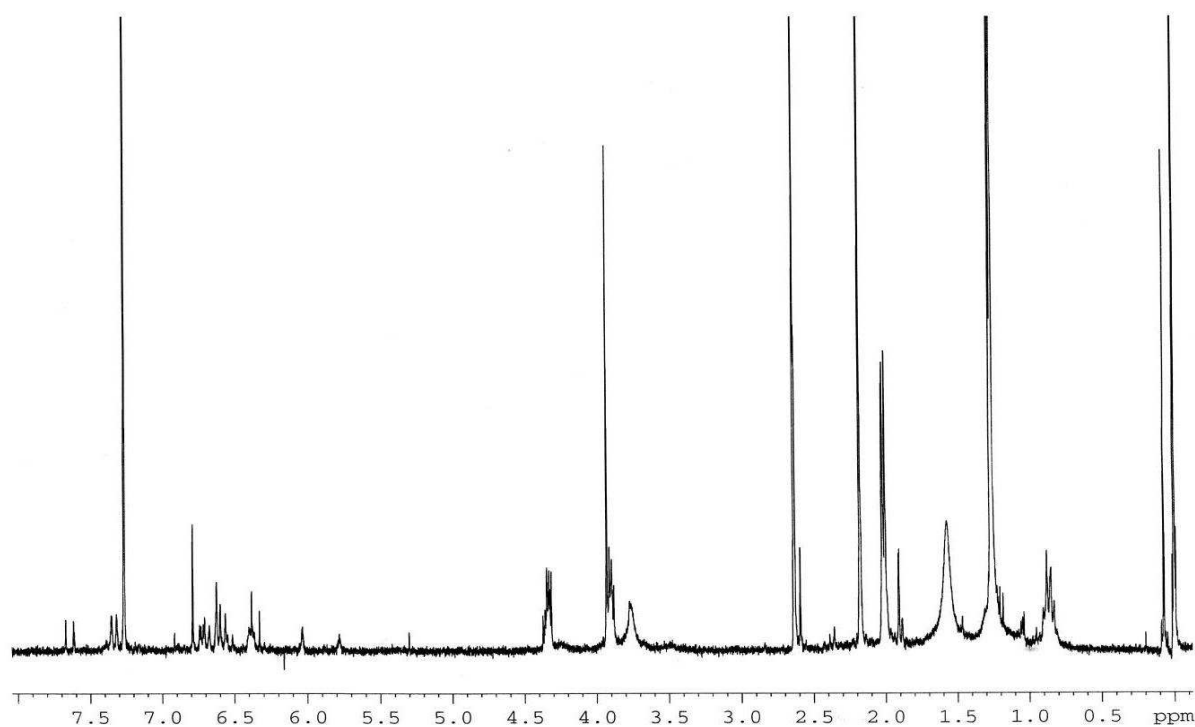
Figur X.2.4 IR-spekter av forbindelse 9.



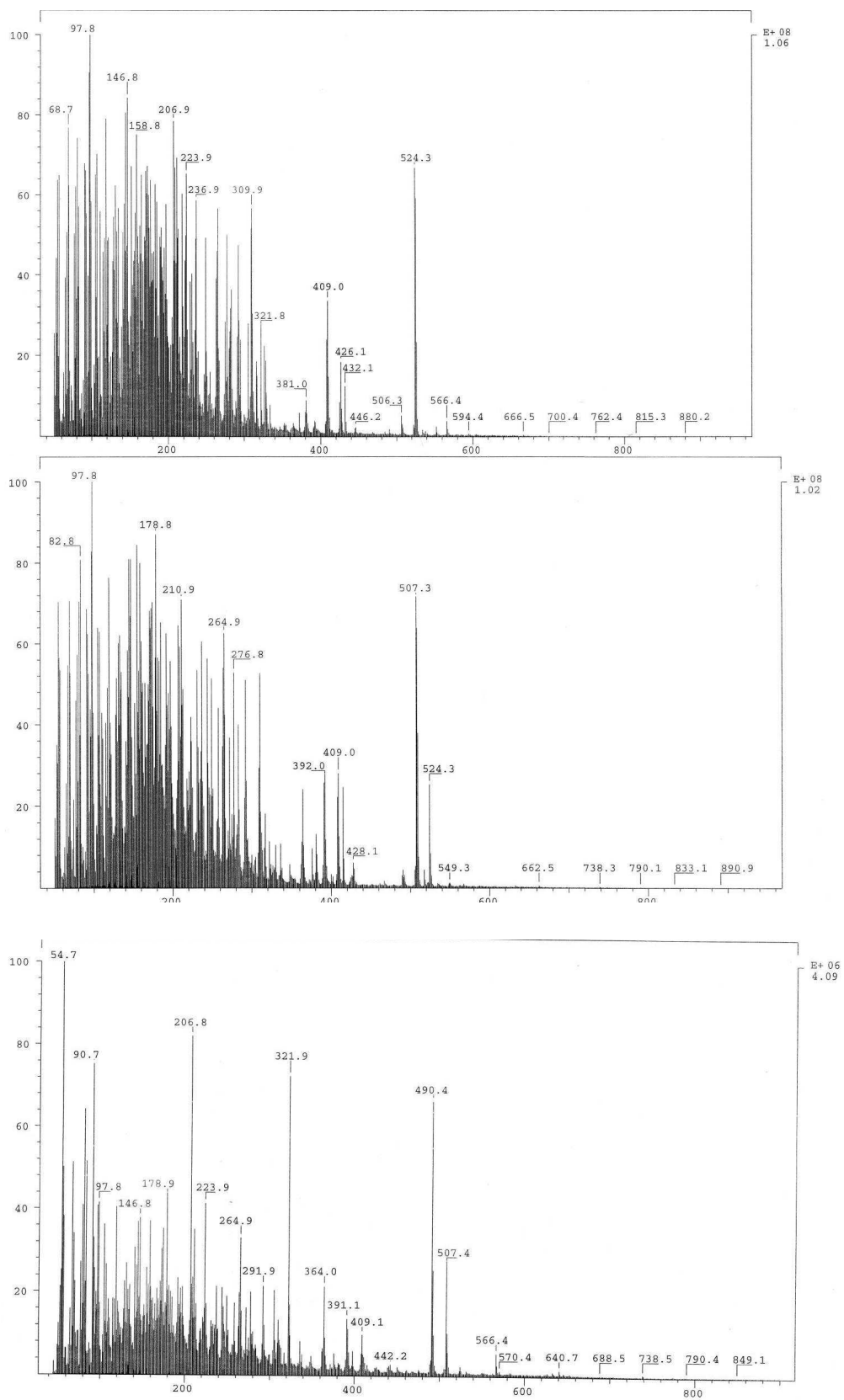
Figur X.2.4 CD-spekter av forbindelse 9



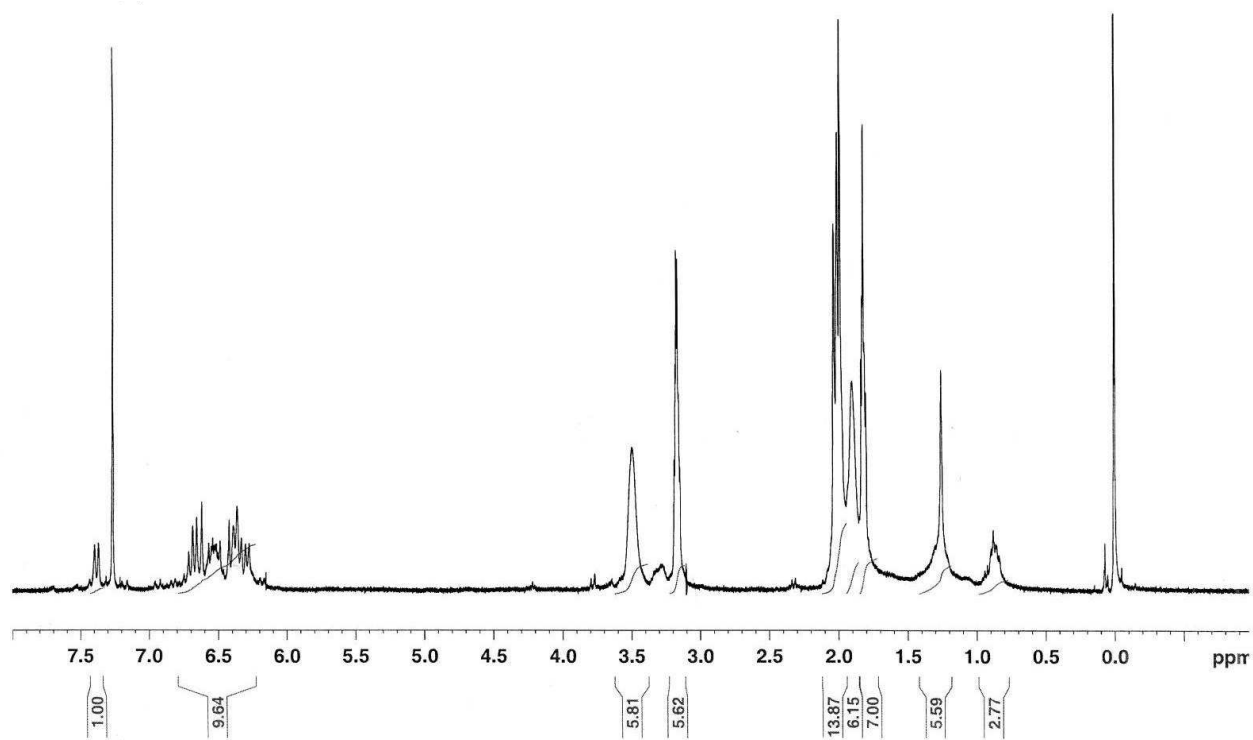
### X.3 Spekter av biprodukt



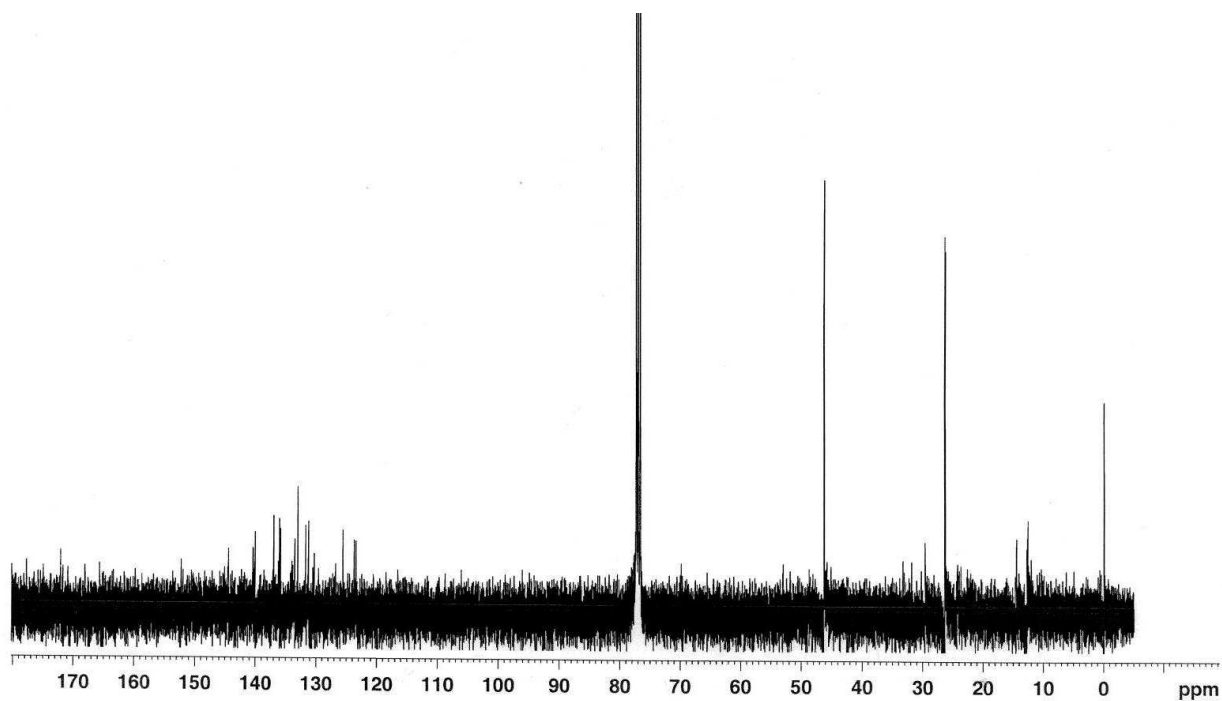
Figur X.3.1  $^1\text{H}$ -NMR spekter av crocetin **2** forestret med etylenglykol, metylengruppene på etylenglykol sees ved  $\delta$  4.3 og 3.9



Figur X.3.2 MS-spekter av de tre produktene etter forestring av crocetin med DCC



Figur X.3.3  $^1\text{H-NMR}$ -spekter av ukjent forbindelse ved forsøk på syntese av **II**.



Figur X.3.4  $^{13}\text{C-NMR}$ -spekter av ukjent forbindelse ved forsøk på syntese av **II**.