

# KEMIAN KEVÄT '23

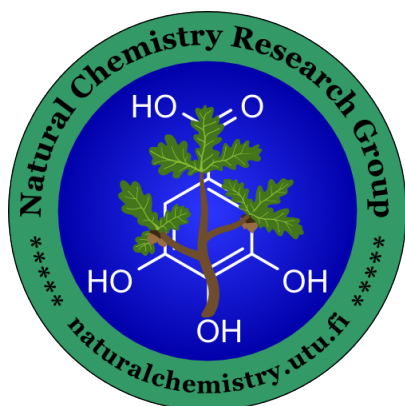
**KYLLÄ KESTÄÄ**

LuK- ja FM-seminaari 18.-21.4.



TURUN  
YLIOPISTO

# LUONNONYHDISTEKEMIAN TUTKIMUSRYHMÄ



## BIOANALYTIKKAA LUONNONYHDISTEILLÄ: ASIAANTUNTIJUUTTA, AMMATTITAITOA JA TYÖELÄMÄVALMIUKSIA

Prof. Juha-Pekka Salminen

*Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä,  
Lääkekehityksen kemian linja, Kemian laitos, 20014 Turun yliopisto  
s-posti: [j-p.salminen@utu.fi](mailto:j-p.salminen@utu.fi)*

Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä toimii kolmella toisiaan saumattomasti tukevalla rintamalla: (1) **tuhtimukseen perustuva opetus**, (2) **kilpailun rahoituksen tukema huippututkimus**, ja (3) **aktiivinen yhteiskunnallinen vuorovaikutus**. Näitä tehtäviä ei ole syytä laittaa arvojärjestykseen, mutta tietenkin tutkimus on yliopistossa kaiken keskiössä. Ilman ajankohtaista huippututkimusta ei voi olla tutkimukseen perustuvaa, nykyaikaisia työelämävaatimuksia tukevaa opetusta. Yhteiskunta tarvitsee myös enenevässä määrin tuekseen tutkittua tietoa, jota opiskelijoiden tuleekin oppia opintojensa aikana viestimään, korkeatasoisen tutkimuksen teon ohella. Yllä mainittu kolmirintama on hyvin kiinteä kokonaisuus, jossa kaikki osa-alueet tukevat saumattomasti toisiaan, antaen samalla opiskelijoille hyvän mahdollisuuden akateemisen asiantuntijuuden ja monialaisen osaamistaustan vankistamiseen.



**Kuva 1.** Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmän (NCRG, [Natural Chemistry Research Group](#)) tutkimuksen, opetuksen, yhteiskunnallisen vaikuttamisen ja miksei vapaa-ajankin käännteitä voi parhaiten seurata ryhmän [Instagram-tilin](#) kautta (yllä joitakin otteita). Ryhmässämme on tällä hetkellä 20 LuK- ja FM-opiskelijaa, 10 väitöskirjatutkijaa ja viisi väitellyttä tutkijaa/opettajaa.

### TUTKIMUKSEEN PERUSTUVAN OPETUKSEMME TAVOITTEET

On toivottavaa, että opiskelija oppii yliopisto-opintojensa aikana sellaisia taitoja, joista on hänelle merkittävää hyötyä työelämään siirryttäessä. Taitojen olisi hyvä kertyä sellaisella alalla, jolla **opiskelijan oma mielenkiinto ja motivaatio on huipussaan**. Tällöin jokaiselle opiskelijalle on mahdollista rakentaa sellainen teoriaopintojen ja käytännön laboratoriotöiden yhdistelmä, jonka kautta opiskelija voi **saavuttaa parhaan mahdollisen asiantuntemuksen**, josta on hyötyä myös opintojen jälkeen. Me luonnonyhdistekemian tutkimusryhmässä tuemme opiskelijan

asiantuntijuuden kehittymistä seuraavilla toisiaan täydentävillä tasoilla: (1) *akateeminen asiantuntijuus*, (2) *analytiikan asiantuntijuus* ja (3) *monialaisuuden asiantuntijuus*.

**Akateeminen asiantuntijuus.** Tämän tulee olla yksi kaikkein tärkeimpiä yliopisto-opiskelijan opintojen aikana saavuttamista asiantuntijuuden tasoista. *Maailma tarvitsee kipeästi viheliäisten ongelmien ratkaisuja ja niihin ratkaisijoita.* Luonnonyhdistekemian opetuksen näkökulmista tämä tarkoittaa, että isossa kuvassa seuraavien komponenttien on oltava osa kokonaispakettina tarjoamaamme luento- ja laboratoriotyökokonaisuutta: *relevantin tiedon etsiminen, oikean tiedon erottaminen vääristyneestä totuudesta, analyttinen ja looginen tiedon prosessointi, uuden luotettavan tiedon tuottaminen ja siitä ymmärrettävästi tiedottaminen.* Opiskelija pitää mielestämme altistaa tälle ilmapiirille toistuvasti. Opintojen loppua kohden omaloitteisesta ongelmanratkaisusta tulee toivottavasti onnistumisia tuottava, ja myös ruokkiva, tapa toimia. Tämä antaa myös mahdollisuuden työllistyä hyvin laajalla rintamalla erilaisiin asiantuntijatehtäviin.

**Analytiikan asiantuntijuus.** Lähes kaikki opetus- ja tutkimustoimintamme käsittelee analytiikkaa, sen eri tasoilla. *Analyttinen ajattelutapa ja analyttinen tapa toimia laboratoriossa* ovat oma maailmansa, joka luonnonyhdistekemian opiskelijan on hyvä omaksua opintojen kuluessa. Esimerkiksi *tarkka ja toistettava, kvantitatiivinen analyysi herkillä analyysilaitteilla* on tavoite, johon ei ole edes mahdollisuutta pyrkiä, ellei kaikki laboratoriossa tapahtuva toiminta ole hyvin tarkkaan määriteltujen pelisääntöjen mukaista. Voi sanoa, että puhtaus on puoli ruokaa ja

tarkkuudesta tulee tehdä tavoite. Kemiassa on kiva kokeilla ja kikkailla, mutta analytiikan aateliin pääsee vain pitävien protokollien puristuksessa.

**Monialaisuus on nykypäivää.** Yhden asian osaaminen ei ole nykyaikana se juttu. Mutta toisaalta: edes *yhden asian todellinen ja syvälinen hallinta* on kuitenkin paljon kunnioitettavampi tavoite, kuin *kaiken osaaminen pintapuolisesti*. Isojen globaalien haasteiden kuten *ilmastonmuutoksen ja luontokadon hillitsemisen* ja tutkitun tiedon tuottaminen yhteiskunnallisen päätöksenteon tueksi vaatii todellisten, oman

---

*”Puhtaus on puoli ruokaa ja tarkkuudesta tulee tehdä tavoite. Laadukkaan analytiikan aateliin pääsee vain pitävien protokollien ja pelisääntöjen puristuksessa.”*

---

alansa asiantuntijoiden muodostaman monialaisen verkoston työpanosta. Luonnontieteet ovat tässä työssä keskiössä, yhteistyössä muiden tieteenalojen kanssa. Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmässä opiskelijalle tarjotaan mahdollisuus altistaa, huippuanalytiikkaan perehtymisen ja syventymisen ohella, erilaisiin *biologiaa, biodiversiteettiä, biolääketiedettä, eläinlääketiedettä, markkinointia ja kaupallista hyödynnettävyyttä* lähellä oleviin hankkeisiin. Monialainen toiminta vaatii oman asenneilmaston, johon voi olla hyvä päästä tutustumaan jo ennen työelämään siirtymistä.

**Tavoiteltavia ja tyypillisiä työtehtäviä luonnonyhdistekemistille.** Luonnonyhdistekemisteille on olemassa tiettyjä analytiikan herkkutehtäviä. Tällaisia tehtäviä ovat esimerkiksi

rikoskemisti, tullikemisti, tutkimus- ja kehitystehtävät lääketieteellisyydessä, tai laitevalmistajien asiantuntijatehtävät, joissa ratkotaan asiakkaan analytiikan ongelmat! *Muita tyypillisiä tehtäviä ovat laadunvarmistuskemisti, LC-MS/MS asiantuntija tai yleisemmin ottaen analytiikan asiantuntija.*

---

*”Analytiikan herkkutehtäviä ovat mm. rikoskemisti, tullikemisti, tutkimus- ja kehitystehtävät lääketieteellisyydessä, tai laitevalmistajien asiantuntijatehtävät, joissa ratkotaan asiakkaan analytiikan ongelmat!”*

---

Viime aikoina opiskelijoita ovat työllistäneet mm. Bayer, Orion, Wallac, Radiometer, Neste, Kemira, Fortum, Algol ja Tulli (Kuva 2).

Koska opiskelijamme voivat altistua myös monialaiseen tutkimusympäristöömme, on **luonnon ja ympäristön tutkimukseen keskittyneet tutkimuslaitokset**, kuten esimerkiksi Luonnonvarakeskus, yksi hyvin mielenkiintoinen ja merkittävä luonnonyhdistekemistien työllistäjätaho. Luonnollisesti **osa lahjakkaimmista opiskelijoistamme jatkaa aina väitöskirjaprojektiin asti** ja siihen pyrimme tarjoamaan mahdollisuuden 1-2 opiskelijalle vuosittain.



**Kuva 2.** Luonnonyhdistekemialta valmistuvat kemistit työllistyvät tyypillisesti erilaisiin analytiikan asiantuntijatehtäviin (esim. Bayer, Orion, Wallac, Radiometer, Neste, Kemira, Fortum, Algol, Tulli ja Luonnonvarakeskus). Osa valmistuneista jatkaa väitöskirjatutkijana joko ryhmässämme, tai muissa analytiikan osaamista arvostavissa tutkimusyksiköissä. Myös ulkomaille työllistyminen on nykyään todella hyvä vaihtoehto: esim. Erika Alander (vas., Janssen Biologics, Hollanti) ja Eerik Piirtola (kesk., University of Victoria, Kanada).

## HUIPPUTUTKIMUS TUKEE OPISKELIJAN TYÖLLISTYMISTAVOITTEITA

Luonnonyhdistekemian tutkimusprojektikonaisuuksissa uppoudutaan tyypillisesti seuraavan kaltaisiin tutkimushaasteisiin: (1) *analyttisten menetelmien kehittäminen, käyttö ja jatkokehittäminen*, (2) *harvinaisten biomolekyylien puhdistaminen, karakterisointi, bioaktiivisuus ja vuorovaikutustutkimukset*, (3) *laboratorioautomaation kehittäminen näytteenkäsittelyssä, kvantitatiivisessa analytiikassa ja datan käsittelyssä*.

*”Analytiikan kehittämistarpeet lähitulevaisuudessa: (1) Kasvikunnan tuntemattoman kemiallisen monimuotoisuuden tehokkaampi detektointi. (2) Harvinaisten biomolekyylien uudet detektiomenetelmät ja spesifinen kvantitointi. (3) Potentiaalisten uusien antibioottien detektointi, kvantitointi ja aktiivisuus.”*

**Analyttiset menetelmät keskiössä.** Voi varmasti sanoa, että luonnonyhdistekemiassa kaikki ajatellaan analytiikan kautta. Analytiikan tasoja on sitten tarpeen mukaan runsaasti erilaisia ja mahdolliset puuttuvat tasot on tehty täydennettäväksi. Mikään ei ole nautinnollisempaa, kuin uusien, aiemmin näkymättömien yhdisteiden detektointi itsekehityillä menetelmillä! Tutkimuspuolellamme löytyy **aina uutta analyttistä**

*kehittävää, etenkin erilaisiin kromatografisiin, massaspektrometriisiin ja kuoppaleyteknisiin menetelmiin liittyen.* Laajempien hankekokonaisuuksien rinnalla kulkee luonnollisesti myös pienempiä, kokonaisuutta tukevia rinnakkaislinjoja, joihin on mahdollista räätälöidä projektikonaisuuksia analytiikasta kiinnostuneille opiskelijoille (Kuva 3).



**Kuva 3.** Tänä vuonna luonnonyhdistekemian tutkimusryhmässä on 16 Kemia-kevät -tapahtumassa esiintyvää LuK- ja FM-opiskelijaa: Annika Karhula, Alisa Mäntylä, Hilla Nieminen, Janina Aso, Sofia Rihko, Arttu Kortelainen, Jaakko Huitti, Maritta Airola, Netta Kangasniemi, Nea Tammi, Ville Koponen, Joonas Anttila, Tommi Lehto, Santeri Savila ja Rebecca Vesamaa.

**Harvinaisten biomolekyylien tutkiminen ja laaja hyödyntäminen.** Tarkan analytiikan avulla voimme löytää kasvukunnasta jatkuvasti uusia, kiinnostavia yhdisteitä, jotka voivat olla muiden saavuttamattomissa. Yhdisteitä, joita kemisti ei pysty valmistamaan, mutta joita kemisti haluaisi pystyä tutkimaan ja käyttämään.

Harvinaisten biomolekyylien tutkiminen ja hyödyntäminen ovat aivan ryhmämme tutkimuskeskiössä. Tässä tutkimuslinjassa on elintärkeää pystyä puhdistamaan ja tunnistamaan kymmeniä toisiaan rakenteellisesti muistuttavia yhdisteitä. Vain siten on mahdollista saavuttaa yleistettäviä ja tarkkoja rakenne/aktiivisuustuloksia.

*Kemistään ei sinällään kiinnosta se, että jokin yhdiste on aktiivinen. Kemisti haluaa tietää, miten aktiivisesta yhdisteestä saadaan se kaikkein aktiivisin, eli siis paras teho irti!* Aktiivisuuden perusteet pitäisi pystyä mallintamaan ja mallien pitäisi olla mahdollisimman yksinkertaisia. Vain siten arvokkaita aktiivisuustuloksia voidaan hyödyntää laajasti!

Kaikki nämä vuorovaikutustutkimukset puskevat toinen toistaan eteenpäin, kunhan akateeminen ja analyttinen tarkkuus ja tulosten yleistettävyys ovat aina kaiken tekemisen keskiössä. *Aktiivisuustulosten saumaton linkittäminen tarkan analytiikan tuella saataviin kvantitatiivisiin tuloksiin kasvukunnan biomolekyyleistä, voi siivittää tutkimusta kohti yhä parempien ja tehokkaammin hyödynnettävien yhdisteiden löytämistä*, jopa aiemmin kemiallisesti tuntemattomista kasvilajeista ja –suvuista.

**Laboratorioautomaation kehittäminen on nykypäivää.** Luonnonyhdistekemistin DNA:ssa hyvin syvällä on näyteenvalmistusmenetelmien, yhdisteiden puhdistusmenetelmien, analyysimenetelmien ja datankäsittelymenetelmien kehittäminen ja mahdollisimman pitkälle viety automatisointi. *Pipetointirobottien, automaattisten näyteenkäsittelijöiden ja ohjelmoitavien fraktiokeräimien tehokas käyttö on omiaan myös parantamaan tutkimuksen toistettavuutta, mikä ei ole ollenkaan vähäpätöinen asia.*

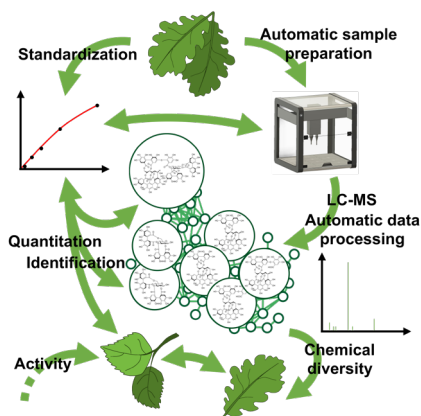
---

*”On palkitsevaa huomata, miten harvinaisten, luonnosta peräisin olevien biomolekyylien avulla voidaan hillitä MRSA-bakteerin kasvua, parantaa antibioottien tehoa, ja jonain päivänä ehkä jopa korvata osa tehottomista antibiooteista.”*

---

Tällä hetkellä ja lähitulevaisuudessa laboratorioautomaation kehityslinjat vankistavat ja etenkin tehostavat seuraavia tutkimuslinjoja: (1) *yhdisteryhmäspesifisten detektiomenetelmien jatkokehittäminen*, (2) *yhdistekirjaston kokoaminen harvinaisille biomolekyyleille*, (3) *kvantitatiivisten kalibraatio-suorien luominen kymmenille yhdisteryhmille ja useille sadoille yhdisteille*, (4) *yhdisteiden tunnistusmenetelmien kehittäminen*, (5) *datankäsittelyn automatisointi*, sekä (6) *kasvikemiallista dataa ja yhdisteiden kemiallisia ominaisuuksia esittelevän open-access tietokannan luominen*.

*”Automatisointi ja digitalisaatio ovat kiinteä osa modernia kemiallista tutkimusta, etenkin luonnonyhdistekemian analytiikka-alueella. Kukapa ei haluaisi tehdä korkealuokkaista analytiikkaa entistä nopeammin, helpommin, pienemmillä ainemäärillä ja vieläpä halvemmalla?”*



**Kuva 4.** Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmässä laboratorioautomaatioon panostaminen on hyvin oleellinen osa niin kvalitatiivista kuin kvantitatiivista tutkimusta. Automaation avulla on mahdollista nopeuttaa ja helpottaa monia analytiikan työvaiheita, mutta siitä ei saa tulla itse tarkoitusta eli se on hyvä renki, mutta huono isäntä!

## TUTKITULLA TIEDOLLA VAIKUTTAMINEN ON OSA AKATEEMISTA VASTUUTA

Tutkimusryhmien kolmas perustoiminto opetuksen ja tutkimuksen rinnalla jää usein vieraaksi niin opiskelijoille kuin suurimmalle osaa tutkimusryhmiäkin. Aika ja energia eivät ehkä enää tahdo riittää omien tutkimustulosten ymmärrettäväksi tekemiseen, vaikka se olisi nimenomaan kemian alalla todella tärkeää. *Liian usein kemia ja kemianteollisuus on nähty monien merkittävien ympäristöongelmien syynä*, puhutaan sitten ravintoketjussa akkumuloituvista pestisideistä, stratosfääriin otsonikadosta tai vesistöekologiaan vaikuttavista lääkeainejäämistä. *Kemian on korkea aika alkaa tarjota vastauksia* nykyisiin globaaleihin haasteisiin ja nämä vastaukset pitää pystyä artikuloimaan ymmärrettävästi, jotta niitä voitaisiin jatkossa käyttää päätöksenteon tukena. *Tässä työssä tulevaisuuden kemistit ja muut monitieteisyyttä tukevat luonnontieteilijät, ovat avainasemassa.* On muutoksen aika.

Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä aloitti kesäkuussa 2021 *tiedetiedotushankkeen nimeltä Luonnollista kemiaa*. Hankkeen tavoitteena on maksimoida erilaisten kohderyhmien (lapset, nuoret, aikuiset) tietoisuus ja kiinnostuminen kasvien kemiasta ja bioanalytiikasta. Sen vuoksi *hanke tuottaa runsaasti erilaista sisältöä niin nuoremmille kuin vartuneemmillekin tieteen ystäville* (Kuva 5).

Tällä hetkellä hankkeen viikoittain tuottama materiaali on kaikkien saatavilla etenkin [YouTuben](#), mutta myös Instagramin (@ncrg\_utu ja #luonnollistakemiaa), Twitterin (@jiipeesalminen ja #luonnollistakemiaa), TikTokin (@ncrg\_utu) tai [SoundCloudin](#) kautta.

*Tiedevideoiden ja podcast-jaksojen* julkaisemisen lisäksi hanke on jalkautunut voimakkaasti Turun yliopiston kasvitieteelliselle puutarhalle *kansainvälisesti täysin uuden konseptin avulla*. Puutarhalla vuosittain käyvät yli 100 000 vierailijaa saavat mahdollisuuden tutustua kasvilajien kemiaan uusien kasvikiemiakylttien ja niihin linkitettyjen lajivideoiden avulla. Samalla kun jatkamme paikallista tiedeyhteistyötämme, vahvistamme sitä edelleen myös muiden kansainvälisesti arvostettujen kasvitieteellisten puutarhojen kanssa. Tätä kautta voimme tehdä niin *LuK-harjoitustöistä kuin FM-tutkimuksista entistä kiinnostavampia ja kemiallisesti monipuolisempia!* Hyvin harkitusta tiedeyhteistyöstä hyötyvät kaikki, eikä siitä ole pelkkää vaivaa!

*”Tutkimuksen vaikuttavuudelle on eduksi, jos se linkittyy viheliäisiin globaaleihin ilmiöihin kuten antibioottiresistenssiin, ilmastomuutokseen, luontokatoon tai ympäristön kemikalisoitumiseen. Nämä ovat luonnonyhdistekemian tutkimusryhmän kannalta relevantteja pitkäaikavälin linkityksiä.”*



Kuva 5. [Luonnollista kemiaa](#) tiede- ja tiedetiedotushankkeesta on toistaiseksi julkaistu 90 [tiedevideota](#) tai [podcast-jaksoa](#) 22 kk aikana. Videot on jaettu hanketta esitteleviin (1), kasvikiemiaan keskittyviin (2), kasvitieteellisen puutarhan lajeista kertoviin (3,6), suomalaisista lajeista kertoviin (4,7) ja laboratoriotyövaiheista kertoviin videoihin (8). Lisäksi podcast-jaksoissa (5) on käyty läpi laajasti erilaisia kiinnostavia kasvikiemiateemoja. Videoiden ja podcastien väribrändäys kertoo katsojalle kunkin jaksoson tematiikan.

Seuraa tutkimus-, opetus- ja vuorovaikutustoimintamme kehittymistä alla näkyvien kanavien kautta. *Tervetuloa keskustelemaan koska tahansa näistä aiheista kanssamme!* Olet myös tervetullut Luonnollista kemiaa -hankkeen 2-vuotissyntäreille kasvitieteelliselle puutarhalle; kalenteriin kannattaa merkitä alustavasti tiistai 20.6.2023 🎉.





## Sydänglykosidien massaspektrometrinen 3D-kuvantaminen

Annika Karhula

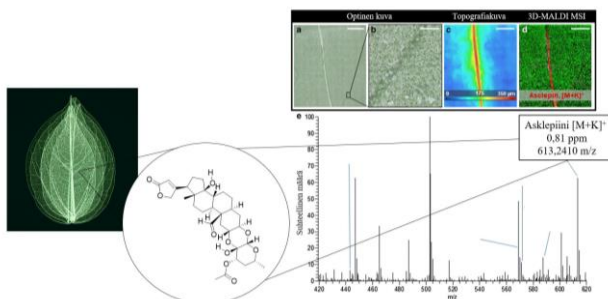
Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto



anmatk@utu.fi

Sydänglykosidit ovat luonnosta löytyvä sekä maailmanlaajuisesti käytetty lääkeaineryhmä sydämen vajaatoiminnan ja rytmihäiriöiden hoidossa. Sydänglykosidit koostuvat steroideihin luokiteltavasta geniinosasta, johon on tyypillisesti liittynyt yksi tai useampi sokeriosa. Geniinosan päässä olevan viisiatomisen laktonirenkaan kanssa geniiniosa luokitellaan kardenolidiksi, kuten esimerkiksi *Asclepias curassavica* löytyvä asklepiini (kuva 1). Lääkeaineryhmänä sydänglykosidit ovat suurenuslasin alla turvallisuuden ja tehokkuuden takia, mutta siitä huolimatta ne ovat erittäin lupaava tutkimuskohde esimerkiksi syövän läkehoidossa.[1]

Sydänglykosidien massaspektrometrinen 3D-kuvantaminen on varteenotettava tekniikka, kun halutaan tehostaa tunnettujen tai uusien sydänglykosidien löytämistä ja eristämistä kasveista. Kuvasta 1 nähdään, miten korkean massatarkkuuden omaavalla 3D-MALDI tekniikalla voidaan tunnistaa ja paikantaa asklepiinin sijainti suoraan natiivissa kasvilla. 3D-pinnan MALDI-massaspektrometrikuvantaminen tulee helpottamaan molekulaarisen tiedon selvittämistä kasvin solutasolla merkittävästi.[2] Tekniikan isoista edistysaskeleista huolimatta on parannettava edelleen näytteen valmistelua, matriisin valintaa ja käyttöä, spatiaalista resoluutiota sekä instrumenttien spesifisyyttä ja herkkyyttä laadun takaamiseksi.



**Kuva 1.** Kasvin lehdestä löydetyn asklepiinin kemiallinen rakenne ja sen kuvantaminen. **a** Lehtipinnan mikroskooppikuva. **b** Mikroskooppikuvan kahdeksankertainen suurennos, joka näyttää laserablaatiokohdat lehtipinnalla. **c** Lehtipinnan topografiakuva näyttää korkeusvaihtelun sinisen (0 μm) ja punaisen (350 μm) välillä. **d** Punavihreässä 3D-MALDI MSI kuvassa punaisella asklepiini ( $m/z$  613,2410,  $[M+K]^+$ ). **e** Asklepiini merkitty massaspekttrille massa-alueella  $m/z$  420–620. Mukailtu lähteestä [2].

### Viitteet

- [1] Botelho. A., Pierezan. F., Soto-Blanco. B., & Melo. M. *A review of cardiac glycosides: Structure, toxicokinetics, clinical signs, diagnosis and antineoplastic potential.* Toxicon. 158, 63 (2019)
- [2] Dreisbach, D., Petschenka, G., Spengler, B. & Bhandari. D. *3D-surface MALDI mass spectrometry imaging for visualising plant defensive cardiac glycosides in *Asclepias curassavica*.* Anal. Bioanal. Chem. 413, 2125 (2021)



## Ellagitanniinien antiviraaliset rakenteet ja ominaisuudet

Emmi Tuomi

Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto



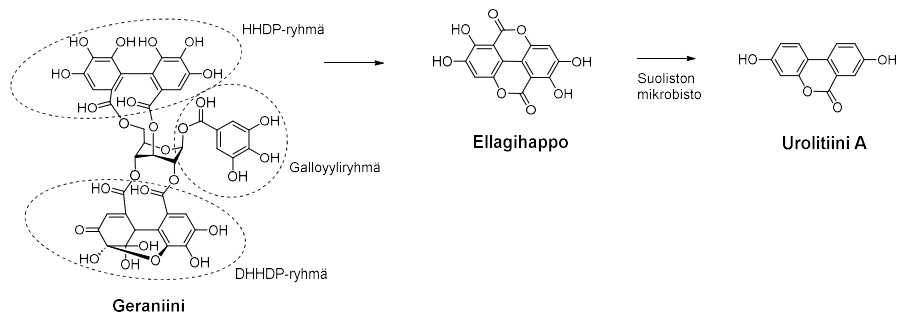
emmtuo@utu.fi

Suurimpaan osaan virustaudeista ei ole toimivaa lääkettä, ja virukset voivat mutatoitua ja muuttua resistenteiksi olemassa oleville viruslääkkeille. Ellagitanniineilla on todettu olevan antiviraalista aktiivisuutta, ja ne ovat uusien viruslääkkeiden potentiaalisia kandidaatteja.

Ellagitanniinien antiviraalista mekanismia tai ominaisuutta ei tunneta täysin, mutta *in vitro* tehdyt rakenneaktiivisuustutkimukset ovat paljastaneet, mitkä rakenteen osat ellagitanniineissa vaikuttavat niiden antiviraaliseen aktiivisuuteen. Rakenteita ovat esimerkiksi funktionaaliset ryhmät, kuten galloyyliryhmät, heksahydroksidifenooyliryhmät (HHDP-ryhmät) ja dehydroheksahydroksidifenooyliryhmät (DHHDP-ryhmät). Aktiivisuuteen vaikuttavat ryhmien lukumäärä ja luonne. Toisiinsa kiinnittyneiden monomeerien määrän eli oligomeerisyyden lisääntyessä funktionaalisten ryhmien määrä lisääntyy ja antiviraalinen aktiivisuus kasvaa.[1]

Rakenteiden ominaisuudet, kuten stabiilius, vaikuttavat aktiivisuuteen. Esimerkiksi geraniini on stabiili verenkierrossa, mutta oraalisesti nautittuna suoliston mikrobit metaboloivat sen urolitiineiksi (kaavio 1) [2], kuten urolitiini A:ksi, jolla on todettu antiviraalista aktiivisuutta [3].

Ellagitanniinien antiviraalisten rakenteiden ja ominaisuuksien tutkiminen on painottunut ellagitanniinien spesifiseen sitoutumiseen virusten proteiineihin ja/tai DNA:han/RNA:han. On kuitenkin todettu, että vaipallisiin viruksiin (viruksiin, joiden ympärillä on kaksoislipidikerros) tehoavat epäspesifiset lähestymistavat, kuten tunkeutuminen lipidikalvoon ja vaikuttaminen kalvon juoksevuteen [4]. Ellagitanniinien lipofiilisyyttä on tutkittu antibakteerisena ominaisuutena, mutta ei vielä antiviraalisena ominaisuutena.



**Kaavio 1.** Ellagitanniini geraniinin metaboloituminen ellagihapon kautta urolitiini A:ksi.

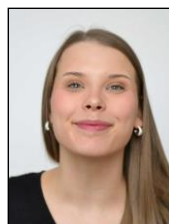
### Viitteet

- [1] Takechi, M., Tanaka, Y., Takehara, M., Nonaka, G.-I. ja Nishioka, I., *Phytochemistry*, **1985**, *24*, 2245–2250.
- [2] Abdul Ahmad, S. A., Palanisamy, U. D., Khoo, J. J., Dhanoa, A. ja Hassan, S. S., *Virol. J.*, **2019**, *16*, 26.
- [3] Wang, S., Qiao, J., Chen, Y., Tian, L. ja Sun, X., *Arch Virol.*, **2022**, *167*, 1989–1997.
- [4] Lin, L.-T., Chen T.-Y., Lin, S.-C., Chung, C.-Y., Lin, T.-C., Wang, G.-H., Anderson, R., Lin, C.-C. ja Richardson C.D., *BMC Microbiol.*, **2013**, *13*, 187.

## Uusien antibioottien valmistaminen mikrobivuorovaikutusten avulla

Hilla Nieminen

Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto

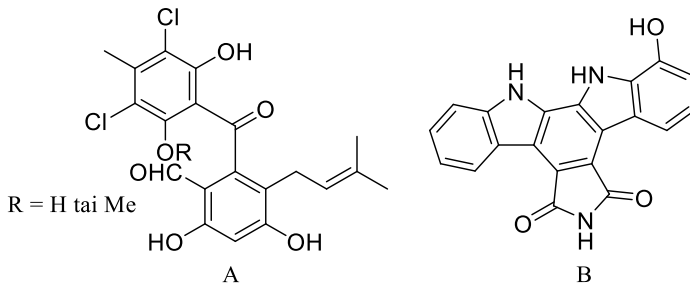


hianie@utu.fi

Antibioottiresistenssillä kuvataan mikrobin kykyä vastustaa antibioottivalmisteiden antimikrobisia yhdisteitä eli mikrobille haitallisia, kasvua estäviä tai jopa tappavia tekijöitä. Resistenssiä syntyy mikrobikannoissa tapahtuvista patogeenien eli taudinaiheuttajien mutaatioista sekä antibioottien käytöstä johtuvasta valintapaineesta, joka antaa kilpailuedun mutaatioille [1].

Erikoistuneet metaboliitit ovat yhdisteitä, joita muodostuu esimerkiksi kasvien kasvuun ja kehitykseen yhdistettävän primäärimetabolian ulkopuolella. Myös sienet ja mikrobit tuottavat erikoistuneita metaboliitteja [2,3]. Erikoistuneita metaboliitteja käytetään tartuntatautien hoidossa, sillä osa niistä on erittäin spesifisiä kohdesolulle omien korkean biologisen aktiivisuuden.

Yhtenä potentiaalisena keinona modernien antibioottien valmistukseen pidetään kahden tai useamman mikrobipopulaation yhteisviljelyä (eng. *co-culturing*) samalla maljalla tai muulla kasvatusalustalla. Mikrobit reagoivat toisiinsa maljalla tuottaen metaboliaa häiritseviä aineenvaihduntatuotteita, joita voidaan hyödyntää lääkeaineiden valmistuksessa. Tämä tarjoaa edistyneemmän vaihtoehdon perinteiselle tavalle eli aineenvaihduntatuotteiden eristämiseksi yhden mikrobipopulaation laboratorioviljelmistä. Muun muassa pestalonia ja arkyriaflaviini E:tä (Kuva 1) voidaan valmistaa tiettyjen mikrobipopulaatioiden yhteisviljelyä hyödyntäen [4].



**Kuva 1:** Pestalonin (A) ja arkyriaflaviini E (B) ovat lääkeaineyhdisteitä, joita voidaan tuottaa mikrobien yhteisviljelyn avulla [4].

### Viitteet

- [1] Bell, B.G., Schellevis, F., Stobberingh, E., Goossens, H. ja Pringle, M., *BMC Infect Dis* **2014**, *14*, 13.
- [2] Katz, L. ja Baltz, R.H., *J Ind Microbiol Biotechnol* **2016**, *43*, 155–176.
- [3] Davies, J., *Journal of Antibiotics* **2013**, *66*, 361–364.
- [4] Zhang, C. ja Straight, P.D., *Curr Opin Microbiol* **2019**, *51*, 64–71.

## Parkkihapon käyttö antimikrobiaalisena aineena tai sen osana

Janina Aso

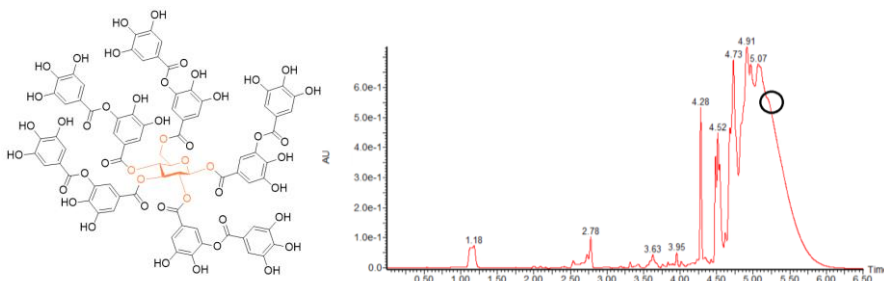
Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto



jalaso@utu.fi

Parkkihappo on tunnettu hyvien antimikrobiaalisten ominaisuutensa johdosta ja on siksi soveltuva lääketieteellisiin sovelluksiin, joissa tätä ominaisuutta voisi hyödyntää. Parkkihappo koostuu polyfenoleista, eli se on seos galloyyyliglukooseja, joissa on keskellä glukoosiyksikkö ja ympärillä siihen esteröityneenä vaihteleva määrä galloyyliryhmiä. Usein sen rakennetta kuitenkin kuvataan dekalgalloyyyliglukoosilla (kuva 1), joka on vain yksi parkkihapon yhdisteistä.

Uusien antimikrobiaalisten aineiden tarve maailmalla on suuri esimerkiksi alati pahentuvan antibiootiresistenssin takia. Parkkihapon antimikrobiaalisuutta on tutkittu sekä yksinään että yhdistettynä muiden aineiden kanssa. Esimerkiksi bakteeriselluloosaan tai antimikrobiaaliseen kitosaaniin yhdistettynä parkkihappoa voidaan käyttää biofilmin muodostumisen estämisessä ja haavojen parantamisessa. [1] Biofilmi tarkoittaa limamatriisin suojaamaa bakteeriyhdyskuntaa tai mikrobirakennetta, jonka infektoihiin eivät tavalliset antibiootit tehoa [2]. Parkkihapon antibakteeriset ominaisuudet perustuvat aineen kulkemiseen bakteerin soluseinän läpi solukalvoon ja tämän bakteerisolun aineenvaihdunnan häiritsemiseen, joka johtaa solun tuhoutumiseen. Parkkihapon on myös todettu tuhoavan bakteerin soluseinää ja yleisesti vähentävän biofilmin syntymistä. [3]



**Kuva 1.** Vasemmalla dekalgalloyyyliglukoosin (DGG) rakennekaava. Keskellä oleva glukoosiyksikkö on korostettu. Oikealla parkkihapon UHPLC-kromatogrammi, josta ympyröity DGG. Parkkihappo koostuu suurimmaksi osaksi muista galloyyyliglukooseista.

### Viitteet

- [1] Zhang, Z., Sun, Y., Zheng, Y., He, W., Yang, Y., Xie, Y., Feng, Z., Qiao, K., Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2020, 106, 110249.
- [2] Hiltunen, A., Dissertationes Scholae Doctoralis Ad Sanitatem Investigandam Universitatis Helsinkiensis. 2021, 42.
- [3] Kaczmarek, B., Materials. 2020, 13, 87-100.

## Molekyylimuottipolymeerejä hyödyntävän kiinteäfaasiuuton käyttö biomarkkerianalytiikassa

Sofia Rihko

Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto

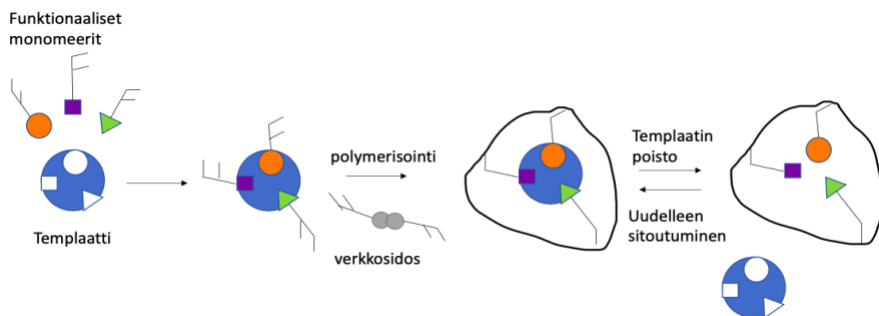


scrihk@utu.fi

Molekyylimuottipolymeerit (engl. molecularly imprinted polymers) eli MIPit (kuva 1) ovat räätälöityjä kemiallisia reseptoreita. Ne tunnistavat ja sitovat kohdemolekyylejä suurella affiniteetilla ja selektiivisyydellä. MIPejä on tutkittu laajasti 1990-luvulta saakka muun muassa kemiallisten epäpuhtauksien talteenottoa ja uuttamista varten, immunomäärityksessä ja sensoreiden valmistuksessa. [1]

MIPien tärkein käyttökohte analyttisessä kemiassa on kiinteäfaasiuutto eli SPE (engl. solid phase extraction). SPE:tä käytetään rutiinomaisesti analyttisessä kemiassa näytteiden puhdistamiseen ennen kromatografista analyysiä. Jotta kohdemolekyly saadaan tehokkaammin erotettua liuoksessa olevista epäpuhtauksista, voidaan SPE-materiaaliin syntetisoida sitä varten vasta-ainejäljitelmiä, kuten MIPejä, jotka sitoutuvat selektiivisesti juuri kohdemolekyyliin. [2] MIP-pohjaiset näytteenvalmistuskäytännöt hyödyntävätkin viimeaikaisia kehityksiä templaatin suunnittelussa [3].

Biomarkkereiden matala konsentraatio ja biologinen monimuotoisuus hankaloittavat sairauksien kliinistä diagnosointia. MIP-SPE:tä onkin käytetty onnistuneesti monien biomarkkerien analytiikassa tärkeänä osana niiden näytteenvalmistusmenetelmiä. Selektiivisyytensä vuoksi MIP-SPE tarjoaa ympäristöystävällisen valmistelumenetelmän biomarkkereille. [3]



**Kuva 1.** Molekyylimuottipolymeerin synteesi

### Viitteet

[1] Haupt, K., Medina Rangel, P. X. ja Bui, B. T. S. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 9554.

[2] Lasáková, M. ja Jandera, P. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 799.

[3] Silva, M. S., Tavares, A. P. M., de Faria, H. D., Sales, M. G. F. ja Figueiredo, E. C. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2022**, *52*, 933.

## Vinka-alkaloidien kvantitatiivinen bioanalyyssi LC-MS/MS menetelmillä

Arttu Kortelainen

Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto



aekort@utu.fi

Vinka-alkaloidit ovat isoja, monimutkaisia ja tyypipitoisia lääkeaineina käytettyjä yhdisteitä, joita nykylääketieteessä käytetään erilaisten syöpäsairauksien kemoterapiassa. Vinka-alkaloidit vinkristiini ja vinblastiini ovat luonnossa punatalvion (*Catharanthus roseus*, ent. *Vinca rosea*) tuottamia yhdisteitä [1]. Vinorelbiini on vinblastiinista semi-synteettisesti muokkaamalla valmistettu vinka-alkaloidijohdannainen. Kaikki lääkeaineina käytetyt vinka-alkaloidit ovat siis eristetty punatalvion biomateriaalista tai synteettisesti muokattuja eristettyjä molekyyliä [2].

Turvallisen ja tehokkaan kemoterapian varmistamiseksi on tunnettava potilaan veriplasman lääkeainepitoisuus, jotta lääkkeen annostelu voidaan säätää optimaaliseksi. Vinka-alkaloidien kvantitatiivisessa tutkimuksessa hyväksi havaituksi menetelmäkokonaisuudeksi on noussut näytteen esikäsittely yhdistettynä nestekromatografiaan (LC) ja tandemmassaspektrometriaan (MS/MS). Jokainen näistä kolmesta vaiheesta vaikuttaa suoraan tai epäsuorasti toisiin vaiheisiin ja jokainen vaihe voidaan toteuttaa monella eri tapaa. Kvantitatiivisessa analyysissä suunnitellaan tutkitulle yhdisteelle soveltuva menetelmä mahdollisimman tarkan ja todenmukaisen kvantitatiivisen tuloksen saamiseksi [2]. Kuvassa 1. havainnollistetaan, miten kemoterapialla hoidetun potilaan veriplasmanäytteestä saadaan esikäsittelyllä sekä nestekromatografista ja tandemmassaspektrometrillä koostuvalla analyysilaitteistolla tieto lääkeainepitoisuudesta veressä, jolloin kemoterapian lääkeannostusta voidaan muuttaa.

Tämä tutkielma käy läpi erilaisia tapoja tehdä kvantitatiivista analyysiä nestekromatografista ja tandemmassaspektrometrillä muodostuvalla analyysilaitteistolla. Tarkastellaan esivalmistelua, kromatografiaa ja havaitsemista sekä näiden erilaisia toteutustapoja. Perehdytään myös tutkittaviin vinka-alkaloideihin sekä menetelmien haasteisiin.



**Kuva 1.** Kvantitatiivisessa bioanalyyssissä selvitetään kemoterapiassa potilaan veriplasman sitoutuneiden vinka-alkaloidien määrä LC-MS/MS menetelmillä.

### Viitteet

- [1] Moudi, M., Go, R., Yong, C., Yien, S., & Nazre, M. (2013). Vinca Alkaloids. In *International Journal of Preventive Medicine* (Vol. 4, Issue 11). [www.ijpm.ir](http://www.ijpm.ir)
- [2] Damen, C. W. N., Rosing, H., Schellens, J. H. M., & Beijnen, J. H. (2010). High-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry for the quantitative analysis of vinca-alkaloids in biological matrices: A concise survey from the literature. In *Biomedical Chromatography* (Vol. 24, Issue 1, pp. 83–90). <https://doi.org/10.1002/bmc.1271>

## Kemiallisen monimuotoisuuden määrittäminen LC-MS/MS-tekniikoilla

Jaakko Huitti

Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto

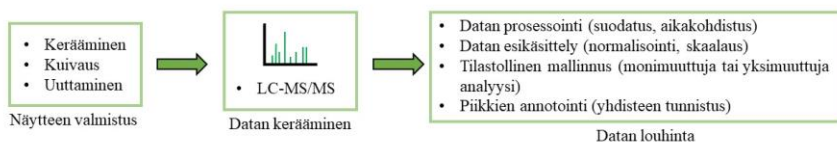


javhui@utu.fi

Yksittäiset kasvit tuottavat laajan joukon erikoistuneita metaboliitteja omaksi puolustukseen esimerkiksi patogeeneja ja herbivoreja vastaan. Ihminen on oppinut hyödyntämään näitä aineita mm. lääkeaineina, väriaineina ja aromiaineina [1]. Kasvien kemiallinen monimuotoisuus tunnetaan kuitenkin huonosti, koska yksi kasvilaji voi tuottaa useita tuhansia erilaisia erikoistuneita metaboliitteja. Niiden analysoinnissa on kaksi erityistä haastetta: (1) miten kaikki yhdisteet saadaan detektoitua ja (2) miten detektoidut yhdisteet saadaan karakterisoitua ja siten monimuotoisuuden koko kirjo selvitettyä.

Erikoistuneet metaboliitit eroavat paljon kemiallisten ominaisuuksiensa, kuten polaarisuuden, varauksen ja koon suhteen, mikä aiheuttaa haastetta niiden yhtäaikaisessa analysoimisessa. Massaspektrometria (MS) on yksi yleisimmistä käytetyistä analysointimenetelmistä, ja sitä edeltää usein kromatografinen erotus, haihtumattomien erikoistuneiden metaboliittien kohdalla useimmiten nestekromatografia (LC). Nestekromatografian avulla saadaan kasvatettua massaspektrometrisesti havaittavien yhdisteiden määrää mm. paremman erottumisen ja pienemmän matriisivaikutuksen kautta. Ultrakorkeanerotuskyvyn nestekromatografia (UHPLC) on edelleen mahdollistanut yhdisteiden entistä paremman erottelun huomattavasti lyhyemmillä analyysiajoilla.

Erikoistuneiden metaboliittien analysoinnissa ionisaatiotekniikkana käytetään usein sähkösumutus-ionisaatiota (ESI). Sen etuja ovat pehmeä ionisaatio, jolloin vältytään massiiviselta fragmentaatiolta ja saadaan molekyyli-ionit hyvin näkyviin. ESI:llä voidaan analysoida näytteitä sekä positiivisella että negatiivisella polarisaatiolla, mikä kasvattaa havaittavien yhdisteiden lukumäärää. Lisäksi ESI:llä havaitaan useasti varattuja ioneja, mikä mahdollistaa myös suurkokoisten yhdisteiden analysoinnin. Erikoistuneiden metaboliittien tarkat molekyyylimassat saadaan selville korkean resoluution massaspektrometrilla (HRMS), kuten Orbitrapilla. HRMS mittaa ionin  $m/z$ -arvot neljästä kuuteen desimaalin tarkkuudella ja antaa analysoitaville yhdisteille alkuainekoostumuksen. Näillä tiedoilla voidaan päätellä yhdisteiden rakenteita ja erottaa toisistaan rakenteet, joilla on sama nimellismassa, mutta eri tarkka molekyyylimassa (kuva 1) [2].



**Kuva 1.** Kemiallisen monimuotoisuuden määrittämisen päätyövaiheet

### Viitteet

- [1] Aharoni, A. ja Galili, G. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *2*, 239–244.  
 [2] Xiao, J.F., Zhou, B. ja Ressom, H.W. *TrAC*, **2012**, *32*, 1–14.



## LOTUS-tietokanta ja sen hyödyntäminen luonnonyhdistealan tiikassa

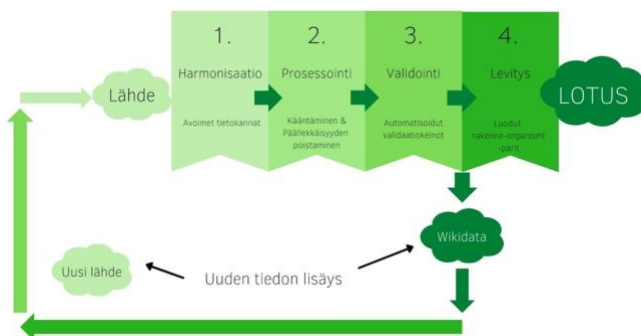
Marta Airola

Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto



mjairo@utu.fi

Luonnonyhdisteet ovat kasvien tuottamia erikoistuneita metaboliitteja, joilla on kasville erilaisia hyötykohteita, kuten puolustautuminen hyönteisiä vastaan. Ihminen on oppinut hyödyntämään kasvien tuottamia erikoistuneita metaboliitteja mm. lääketieteellisyydessä, mutta uusia yhdisteitä on vielä lukematon määrä löytämistä ja tutkimista vailla. Tätä varten on kehitetty kaikille avoin tietokanta nimeltään LOTUS, jonka avulla voidaan tutkia kasviyhdisteitä evolutiivisen historian näkökannalta. Vuonna 2022 julkaistu LOTUS on integratiivinen tietokanta, joka yhdistää luonnonyhdisteiden rakenteellisen analyysin ja kasvitaksonomian yhdelle hakualustalle [1]. Ennen LOTUS-tietokantaa luonnonyhdisteitä käsittelevät julkiset tietokannat ja kasvien sukutieto ovat olleet lukuisilla erillisillä alustoilla tehden tiedon yhdistämisestä aikaa vievää. Tietokannan luonti on monivaiheinen luotettavuuden takaamiseksi ja tietokannan seulentaprosessi on eritelty kaaviossa 1. Tietokantaan tuleva uusi tieto lisätään osaksi tietokantaa neljän eri seulentaprosessin jälkeen. Avointien tietokantojen data harmonisoidaan yhdelle alustalle, minkä jälkeen tieto prosessoidaan siten, ettei siinä ole turhaa päällekkäisyyttä ja niin, että tieto on kaikki samalla kielellä. Tämän jälkeen prosessoitu data validoidaan automatisoiduilla mekanismeilla ja levitetään LOTUS-alustoille. LOTUS-tietokannan tärkein käyttökohde on tuntemattomien yhdisteiden tunnistaminen analytiikan tehostamiseksi. Luonnonyhdisteet ovat olleet jo kauan merkittävässä roolissa uusien lääkeaineiden kehityksessä ja uutta tutkimusta tehdään koko ajan. LOTUS-tietokannan avulla tutkimuksen alkuvaiheen tutkimusta pystytään keskittämään oikeaan suuntaan näin mahdollisesti nopeuttaen tutkimusta.



Kaavio 1. LOTUS-tietokannan uuden tiedon validointiprosessi [1].

Viitteet:

[1] Rutz A, Sorokina M, Galgonek J, Mietchen D, Willighagen E, Gaudry A, et al. The LOTUS initiative for open knowledge management in natural products research. *Elife*. 2022;11:e70780.

## Flavan-3-olien ja proantosyanidiinien hapettumisreaktiot uusien yhdisteiden lähteenä

Netta Kangasniemi

Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto

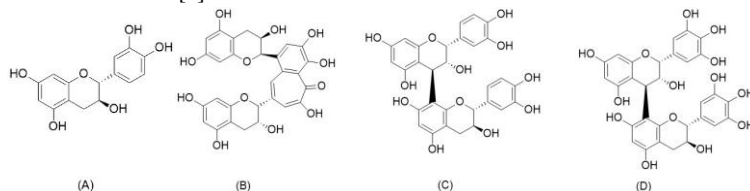


nkakan@utu.fi

Flavan-3-olit ovat flavonoidien alaluokka ja ne koostuvat kaksi bentseenirengasta sisältävästä  $C_6C_3C_6$ -rakenneesta (kuva 1). Proantosyanidiinit eli kondensoituneet tanniinit ovat kahdesta tai useammasta flavan-3-oliksikestä muodostuneita oligomeerejä ja polymeerejä. Yleisimmät proantosyanidiinit koostuvat prosyaniidiiniyksiköistä (PC) ja prodelfinidiiniyksiköistä (PD) sekä niiden yhdistelmistä. Lisäksi flavan-3-olien erityyppinen kiinnittyminen toisiinsa mahdollistaa A- ja B-tyyppisten proantosyanidiinien muodostumisen.

Proantosyanidiineja ja flavan-3-oleja esiintyy merkittävästi ihmisen ruokavaliossa ja niillä on useita terveysvaikutuksia. Osa proantosyanidiineista hapettuu herkästi esimerkiksi pH:n tai entsyymien vaikutuksesta muodostaen uusia yhdisteitä, jolloin myös niiden bioaktiivisuus voi muuttua. Tutkielmassa perehdytään flavan-3-olien ja proantosyanidiinien hapettumisreaktioissa muodostuviin uusiin yhdistysiin. Flavan-3-olien kohdalla käsitellään sekä entsyymaattinen että kemiallinen hapettuminen.

Flavan-3-olien hapettuessa *o*-difenoleista muodostuu osittain pysymättömiä *o*-kinoni-intermediaatteja, jotka voivat muodostaa edelleen dimeerejä. Eräs muodostuva dimeeri on mustasta teestä löytyvä yhdiste teaflaviini [1]. Proantosyanidiinien hapettumalähteen vaikuttaa olosuhteiden (pH, lämpötila) lisäksi niiden rakenne. Erityisesti PD-ryhmät ovat alttiita hapettumiselle [2]. Proantosyanidiinien hapetusreaktioissa esimerkiksi B-tyypin proantosyanidiineista voi muodostua A-tyypin proantosyanidiineja muun muassa radikaalireaktiolla [3].



**Kuva 1.** Monomeerisen flavan-3-olin eli katekiinin (A), flavan-3-olien hapettumisessa muodostuvan teaflaviinin (B) sekä flavan-3-oleista muodostuneiden dimeeristen prosyaniidiini B1:n (C) ja prodelfinidiini B1:n (D) rakenteet.

### Viitteet

- [1] Takino, Y., Ferretti, A., Flanagan, V., Gianturco, M. ja Vogel, M., *Tetrahedron Lett.* **1965**, *45*, 4019–4025.
- [2] Imran, I., Karonen, M., Salminen, J.-P. ja Engström, M.T., *ACS Omega*, **2021**, *6*, 4726–4739.
- [3] Kondo, K., Kurihara, M., Fukuhara, K., Tanaka, T., Suzuki, T., Miyata, N. ja Toyoda, M., *Pergamon Tetrahedron Letters*, **2000**, *41*, 485–488.

## Punaviini-inspiroitujen flavan-3-oleja sisältävien oligomeerien synteesi

Nea Tammi

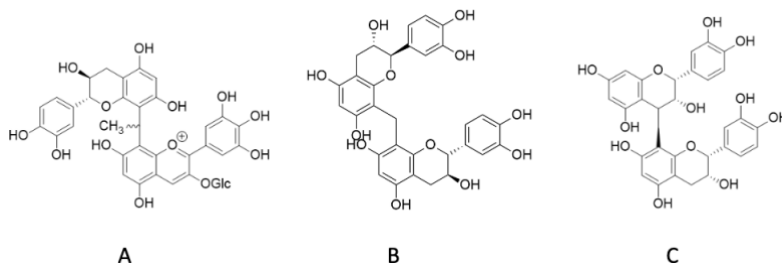
Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto



njtamm@utu.fi

Fenolisilla yhdisteillä on väri- ja makuominaisuksiensa takia tärkeä rooli viinin laatua tarkasteltaessa. Punaviinin proantosyanidiinit ovat flavan-3-oli-yksiköistä, kuten katekiinista ja epikatekiinista, muodostuneita oligomeereja ja polymeereja. Viiniin ne ovat siirtyneet rypäleistä ja niiden siemenistä viininvalmistuksen yhteydessä [1]. Proantosyanidiinit vaikuttavat mm. viinin makuun ja väristabiiliisuuteen. Viinin happamissa olosuhteissa proantosyanidiinit reagoivat viinin väriaineiden eli antosyaanien kanssa muodostaen uusia oligomeerisia ja polymeerisia hybridiyhdisteitä stabiloiden tätä kautta antosyaaneja. Näistä yksinkertaisempia, kuten dimeerejä (kuva 1), on pystytty eristämään punaviinistä rakenteellista tunnistamista varten, ja lisäksi niitä on onnistuttu valmistamaan synteettisesti.

Saman tyyppisiä, punaviinikemian inspiroimia, flavan-3-oleja sisältäviä oligomeereja voidaan valmistaa synteettisesti aldehydien kondensaatioreaktiolla. Lähtöaineina käytetään usein katekiinia tai epikatekiinia, joiden annetaan reagoida erilaisten aldehydien kanssa happamissa olosuhteissa. Sovellusmielessä erityisen mielenkiintoista on tutkia luontaisten proantosyanidiinien ja niiden synteettisten johdannaisten bioaktiivisuuseroja. Esimerkiksi metyyli-linkityksen omaavalla synteettisellä dimeerillä (kuva 1B) on merkittävästi korkeampi antioksidanttiaktiivisuus kuin sitä vastaavalla luonnollisella C-C -linkityksen omaavalla dimeerillä (kuva 1C). Syntetisoiduissa proantosyanidiinijohdannaisissa yhdisteen linkkeriyksikkö, kuten metyyli- tai etyyli-linkitys sekä sen kiinnittymiskohta vaikuttavat merkittävästi yhdisteen bioaktiivisuuteen [2].



**Kuva 1.** Flavan-3-oleja voidaan linkittää synteettisesti antosyaaneihin (A) tai toisiinsa (B) erilaisilla aldehydeillä. Kasveista eristetyistä oligomeereista (C) ei löydy vastaavia linkkereitä, vaan flavan-3-olit ovat liittyneet toisiinsa C-C -sidoksin.

### Viitteet

[1] Weber, F. ja Winterhalter, P., *Food Res. Int.*, **2014**, *65*, 69–76.

[2] Es-Safi, N. E., Fulcrand, H., Cheynier, V. ja Moutounet, M., *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *5*, 2088–2095.

## Parkkihapon käyttöön liittyvät haasteet ja niiden ratkaisut

Ville Koponen

Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto

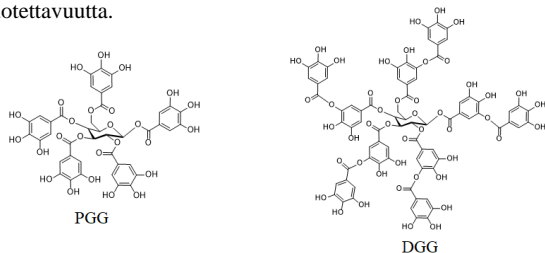


ville.a.koponen@utu.fi

Kaupallinen parkkihappo on seos hydrolysoituvia tanniineja. Tanniinit ovat kasvien erikoistuneita metaboliitteja, joita kasvit käyttävät osana kemiallista puolustustaan. Tanniinit ovat hyviä antioksidantteja. Lisäksi niillä on antibakteriaalisia ominaisuuksia ja hyvä kyky sitoutua proteiineihin [1]. Tanniineja on vaikea eristää suuria määriä edullisesti ja toistettavasti, minkä vuoksi niiden hyödyntämiseen on etsitty vaihtoehtoisia tapoja. Kaupallisesti saatavan parkkihapon hyödyntäminen on yksi eniten käytetyistä tavoista.

Runsaan fenolisten ryhmien määrän vuoksi parkkihapolla on paljon hyviä ominaisuuksia. Fenolisten ryhmien kautta parkkihappo kykenee muodostamaan vetysidoksia muiden molekyylien kanssa ja vuorovaikuttamaan niiden avulla. Toinen tärkeä vuorovaikutustapa on koordinaatiosidosten muodostaminen fenolisten hydroksyyliyhdistelmien vapaiden elektroniparien ja metalli-ionin välillä [2]. Tässä tutkielmassa tutustutaan parkkihapon käyttöön nahan parkitsemisessa, kalvoteknologiassa ja lääketieteellisissä sovelluksissa.

Parkkihapon käytöstä ja tutkimuksesta haasteellista tekee se, ettei kaupallisella parkkihapolla ole yksikäsitteistä rakennetta. Kirjallisuudessa parkkihapon rakenne yleensä kuitenkin esitetään dekalloyyyliglukoosin (kuva 1) muodossa. Koska kaupallinen parkkihappo on seos, eikä yksittäinen yhdiste, aiheuttaa se ongelmia parkkihapon tutkimukseen liittyen ja tulosten toistettavuuden kannalta. Tässä tutkielmassa ratkaisuksi ehdotetaan pentagalloyyyliglukoosin (PGG:n) ja dekalloyyyliglukoosin (DGG:n) synteesiä sekä metanolyysin ja erilaisten puhdistustekniikoiden avulla tehtyä puhtasaineiden valmistusta. Näin käytettävän yhdisteen rakenne olisi tarkasti tiedossa ja se parantaisi parkkihapon käyttöön liittyvän tutkimuksen luotettavuutta.



**Kuva 1.** Pentagalloyyyliglukoosin (PGG) ja dekalloyyyliglukoosin (DGG) rakenteet.

### Viitteet

[1] Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. ja Pouységu, L. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2011**, 3, 586–621.

[2] Yan, W., Shi, M., Dong, C., Liu, L. ja Gao, C. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2020**, 284.

## Ellagitanniinien ja lipidien välisten vuorovaikutusten tutkiminen $^{31}\text{P}$ -NMR-spektroskopiolla

Joona Anttila<sup>1\*</sup>, Petri Tähtinen<sup>2</sup>, Maarit Karonen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto

<sup>2</sup>Bio-organisen kemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto



jjantt@utu.fi

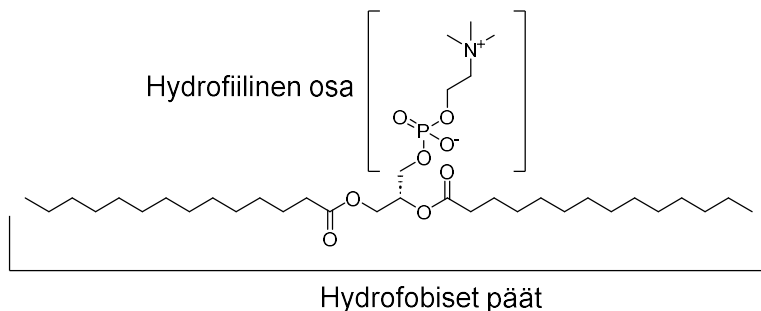
### Abstrakti

Pro gradu -tutkielmassani tutkin fosforin ydinmagneettisen resonanssispektroskopian ( $^{31}\text{P}$ -NMR) avulla ellagitanniinien ja lipidirakenteiden välisiä vuorovaikutuksia. Ellagitanniinit ovat bioaktiivisia, erikoistuneita metaboliitteja, joilla kasvit muun muassa puolustavat itseään erilaisia mikrobiologisia patogeenejä vastaan. Ellagitanniinien bioaktiivisten ominaisuuksien vuoksi niiden joukosta etsitään esimerkiksi uusia antibiootteja ja loislääkkeitä. Työssäni mallinnetaan bakteerin solukalvoa keinoeläinten lipidikalvorakenteiden avulla ja tutkitaan eri ellagitanniinien vaikutuksia näihin rakenteisiin. Ellagitanniinien välisten rakenteellisten erojen perusteella voidaan löytää rakenteita, jotka läpäisevät ja vuorovaikuttavat lipidimembraanien kanssa.

### Johdanto

Ellagitanniinit ovat kasveissa esiintyviä hydrolysoitaviin tanniineihin kuuluvia polyfenolisia metaboliitteja. Niillä on runsaasti hyödyllisiä ominaisuuksia, kuten antiviraalisia ja tulehdusta hillitseviä vaikutuksia. Ne hillitsevät useiden haitallisten mikrobien kasvua ja käsillä olevan antibioottiresistenssiongelman vuoksi ellagitanniineista toivotaan täydentäviä vaihtoehtoja esimerkiksi tuotantoeläinten antibiooteille [1]. Yksi selittävä tekijä ellagitanniinien havaituille bioaktiivisuuksille saattaa olla niiden kyky tunkeutua mikrobien lipidikalvoihin samalla vuorovaikuttaen niiden kanssa.

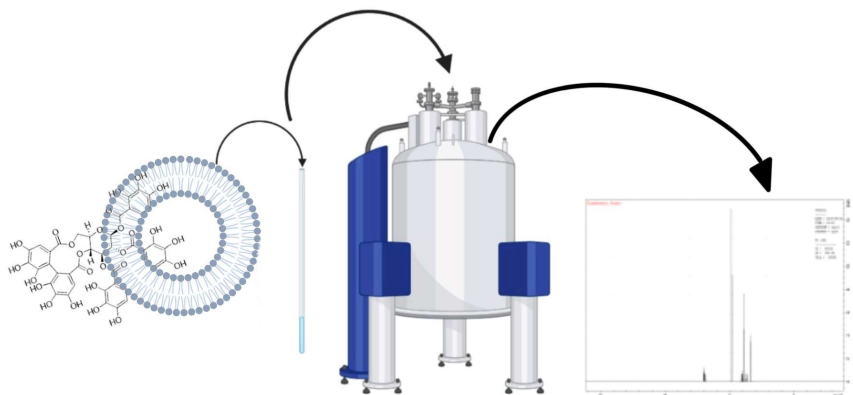
$^{31}\text{P}$ -NMR-spektroskopia on menetelmä, jota voidaan käyttää fosforia sisältävien yhdisteiden ja kemiallisten rakenteiden sekä niiden vuorovaikutusten tutkimiseen.  $^{31}\text{P}$ -NMR antaa tietoa yhdisteen erilaisten fosforiatomien lukumäärästä ja sijainnista molekyyllisessä sekä niiden ympäristöstä. Sen avulla voidaan saada tietoa ellagitanniinien ja lipidien hydrofiilisen fosfaattipään (kuva 1) välisistä vuorovaikutuksista. Lipidin fosfaattiryhmä reagoi herkästi muutoksiin vesi-lipidi-pinnoissa ja siksi  $^{31}\text{P}$ -NMR-spektroskopiaa onkin hyödynnetty useissa erilaisissa biologisten solukalvojen ja muunlaisten kaksoislipidikalvojen tutkimuksissa [2].



**Kuva 1.** Työssä käytettävän 1,2-dimyristoyyli-sn-glysero-3-fosfokoliinin (DMPC) rakenne.

## Materiaalit ja menetelmät

Työssä käytettäviä mallilipideitä ovat 1,2-dimyristoyyli-sn-glysero-3-fosfokoliini (DMPC, kuva 1) sekä kaupallinen *Escherichia coli* –bakteerista eristetty fosfolipidifraktio. Tutkitut ellagitanniinit ovat tellimagrandiini I ja II, kasuariktiini, sanguiini H-6 ja lambertianiini sekä vertailuyhdisteenä toimiva pentagalloyyyliglukoosi. Ellagitanniinit puhdistetaan korkean erotuskyvyn nestekromatografialla eri kasviuutteista. Vuorovaikutuksia tutkitaan Bruker Avance III 400 MHz –NMR-laitteistolla (kuva 2), jossa käytetään erityisesti emulsiomaisille ja puolikiinteille näytteille sopivaa HR-MAS-näytepäättä (high resolution magic angle spinning probe).



**Kuva 2.** Havainnekuva vuorovaikutusmittauksista: malliellagitanniini, yksikerroksinen lipidikaksoiskalvo, NMR-laitteisto sekä NMR-spektri.

## Tulokset ja johtopäätökset

Aiemmissa tutkimuksissa tärkeimmät rakenteelliset piirteet, jotka vaikuttavat ellagitanniinien vuorovaikutukseen lipidikaksoiskerrostun kanssa, ovat olleet molekyylin koko ja rakenteellinen joustavuus [3]. Uusien tulosten oletetaan tukevan aiempia havaintoja. Kemian kevääseen kannattaa tulla kuulemaan ja näkemään, millaisia vuorovaikutuksia eri ellagitanniinien ja fosfolipidien välillä havaitaan  $^{31}\text{P}$ -NMR:llä.

## Viitteet

- [1] Huang, Q., Liu, X., Zhao, G., Hu, T. ja Wang, Y., *Anim. Nutr.* **2018**, *4*, 137–150.
- [2] Jacobsen, N., *NMR spectroscopy explained: simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology*, 1. painos, Wiley-Interscience, Yhdysvallat, 2007, s. 30–38
- [3] Virtanen, V., Räikkönen, S., Puljula, E. ja Karonen, M., *Molecules* **2021**, *26*, 373

# KORKEAN SUORITUSKYVYN MENETELMÄN LUONTI LUONNONYHDISTEIDEN ANTIMIKROBIAKTIIVISUUDEN SELVITTÄMISEKSI

Tommi Lehto<sup>1\*</sup>, Sauli Haataja<sup>2</sup> ja Juha-Pekka Salminen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto

<sup>2</sup>Biolääketieteen laitos, Turun yliopisto



toleht@utu.fi

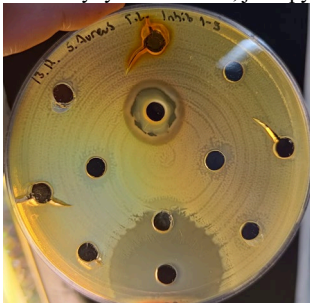
## Abstrakti

Antibioottiresistenssi on maailmanlaajuinen ongelma ja vaikka antibioottien teho Suomessa on edelleen hyvä, on maailmanlaajuisesti tilanne pahenemassa. Kamppailaksemme tätä vastaan on tärkeää tutkia ja löytää uusia yhdisteitä, jotka voisivat joko toimia itse antibiootteina tai voisivat toimia apureina nykyisten antibioottien tehokkuuden lisäämiseksi. On siis tärkeää, että luodaan korkean suorituskyvyn menetelmiä tämän tutkimiseksi, jotta datan keruu toimisi nopeasti ja tehokkaasti. Kasvikunta sisältää monia potentiaalisia yhdisteitä, joiden antibiootikapasiteettia ei vielä tunneta, jonka vuoksi sieltä löytyvät yhdisteet soveltuvat erinomaisesti menetelmän luomiseen, käyttöön ja kehittämiseen. Työn tarkoituksena oli luoda edellä mainittu menetelmä, jossa omistettiin. Menetelmää kehitettiin vaihe vaiheelta, luoden aluksi referenssimenetelmä, jonka jälkeen kehitettiin varsinainen korkean suorituskyvyn menetelmä.

## Johdanto

Antibioottiresistenssillä tarkoitetaan bakteerin kykyä vastustaa antibioottia. Tästä seuraa, ettei kyseistä antibioottia voida enää käyttää resistenttien bakteerien infektioiden ja tautien hoitoon. Tällä hetkellä Euroopassa kuolee noin 500 000 ihmistä vuosittain antibioottiresistenssin bakteerien aiheuttamiin infektioiden [1]. Antimikrobiherkkyyttä testataan pääosin kahdella tavalla, kiekkodiffuusiolla sekä kasvatusliuoksen laimennusmenetelmällä. Kiekkodiffuusiossa inhibiittori diffundoituu kasvatusmaljan agariin, johon on ympätty bakteeriliuosta. Inhibiitio todetaan bakteerikasvun estövyöhykkeenä (Kuva 1). Kasvatusliuoksen laimennusmenetelmässä yhdisteestä tehdään laimennossarja ja lisätään suoraan bakteeriliuokseen ja näin voidaan selvittää sen inhibitioon vaadittava minimikonsentraatio [2].

Työn tarkoituksena oli tutkia luonnonyhdisteiden antimikrobipotentiaaleja useilla eri kliinisesti merkittävillä bakteerikannoilla. Aluksi luotiin kiekkodiffuusiomenetelmää muokkaamalla niin sanottu kuoppadiffuusiomenetelmä (Kuva 1), joka toimi referenssimenetelmänä osoittaen luotettavasti ja toistettavasti, inhiboiko tutkittava yhdiste bakteeria vai ei. Etu kiekkodiffuusiosta oli, että inhibiittoria voidaan aplikoida enemmän kuoppaan kuin suodatinpaperille. Tämän jälkeen kehitettiin kuoppalevylle soveltuva kasvatusliuoksen laimennusmenetelmään perustuva korkean suorituskyvyn menetelmä, jolla pystytään yhdellä analyysikerralla tarkistamaan 90 kombinaatiota.



**Kuva 1.** Esimerkki kuoppadiffuusiosta. Perustuu diffuusiosta, kuten kiekkodiffuusiomenetelmä. Kirkas vyöhyke kertoo inhibitiosta ja sen määrää mitataan vyöhykkeen säteen avulla.

## Materiaalit ja menetelmät

Uutta analyysimenetelmää luodessa on tärkeää tunnistaa ja huomioida menetelmän heikkoudet ja yrittää muokata menetelmää niin että välttää mahdolliset riskit. Referenssimenetelmää luodessa kokeiltiin erilaisten puskuriliuosten vaikutusta ympäröivällä bakteeri-

puskuriliuosta maljalle ja laskemalla kahden tunnin jälkeen pesäkkeiden lukumäärä. Lisäksi verrattiin agardiffuusiokokkeen tekemistä käyttäen joko suodatinpaperi-kiekkoja tai agar-geeliin tehtyjä kuoppia inhibiittorin annostelemiseen. Kuoppiin oli mahdollista lisätä suurempia inhibiittorimääriä.

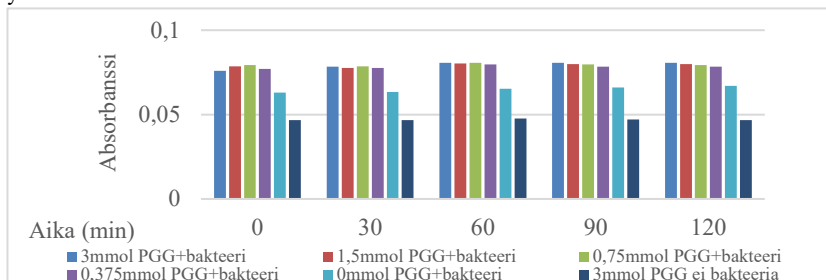
Kun referenssimenetelmän tulokset olivat toistettavia, siirryttiin 96-kuoppalevy menetelmän luomiseen. Pohjana käytettiin kasvatusliuoksen laimennusmenetelmää, jonka olosuhteita pyrittiin muokkaamaan edullisiksi. Muun muassa testattiin erilaisten liuottimien vaikutusta inhibitioon, syntykö bakteerien ja suurikoisten polyfenolien kanssa absorbanssimittauksiin vaikuttavia komplekseja (Kuva 2). Näistä kokeista päädyttiin liuottamaan tutkittavat yhdisteet 5 % dimetyylisulfoksidi (DMSO)-liuokseen.

## Tulokset ja johtopäätökset

Referenssimenetelmää säädettäessä haluttiin maksimoida inhibiittorin määrä, jotta inhibiittorin antama renkaan koko saatiin mahdollisimman suureksi. Tämän vuoksi siirryttiin käyttämään kuoppia suodatinpaperista tehtyjen kiekkojen sijasta, sillä näin saimme yli kymmenkertaistettua inhibiittorin määrän yhdellä maljalla, kun kiekon imukapasiteetti ei ollut rajoitteena.

Ennen bakteerin ympäystä maljalle, päätettiin ne pestä PBS-puskurilla ja pesun jälkeen bakteeriliuos laimennettiin samaan puskuriiin. Kuitenkin oli tärkeää todeta, ettei puskuriliuoksella ollut vaikutusta inhibitioon. Puskurikokeen jälkeen todettiin, että HEPES (4-(2-hydroksietyyli) -1-piperatsiini-etaani-rikkihappo) -puskurilla oli pienin vaikutus inhibitioon, jolloin päädyttiin tekemään bakteerien käsittely jatkossa HEPES-puskurilla.

Kun referenssimenetelmä oli luotu, keskityttiin kuoppalevy menetelmän luomiseen. Menetelmä perustuu kuoppalevyltä luettavan kasvatusliuoksessa tapahtuvan absorbanssin muutoksen seurantaan. Kompleksinmuodostuskokeella varmistettiin, että tutkittavat yhdisteet eivät muodosta liukenemattomia komplekseja bakteerin kanssa. Testiyhdisteenä käytettiin pentagalloyyliglukoosia (PGG) sen suuren kompleksinmuodostuskyvyn vuoksi. Huomattiin, että PGG ei muodostanut komplekseja bakteerin kanssa missään testatussa pitoisuudessa kahden tunnin mittauksen aikana (Kuva 2.), josta voitiin päätellä, että lopullisen menetelmän tuottamat tulokset ovat luotettavia eivätkä johdu testattavan yhdisteen kompleksinmuodostuskyvystä. Toisella kokeella kokeiltiin liuottimen vaikutusta, jossa huomattiin 5 % DMSO:n inhiboivan bakteerin kasvua vähiten. Lopuksi tarkoituksena olisi kokeilla kuinka menetelmä toimii, kun käytetään erilaisista kasveista uutettuja yhdisteitä inhibiittoreina.



**Kuva 2.** Kompleksinmuodostuskokeen tulokset. Kuvaajassa on esitetty pentagalloyyliglukoosin (PGG) ja *Staphylococcus aureus* -bakteeri- liuoksen antama absorbanssi ajan funktiona. Tuloksista huomataan, että absorbanssit ovat taustan luokkaa eivätkä muutu ajan funktiona eli bakteerin ja testattavan yhdisteen välillä ei synny varsinaista mittausta haittaavia komplekseja.

### Viiitteet

- [1] T. Mestrovic et al., *Lancet Public Heal.*, **2022**, vol. 7, nro. 11, s. 897–913  
 [2] J. H. Jorgensen ja M. J. Ferraro, *Medical Microbiology*, **2009**, vol. 7750, s. 1749–1755



## Tanniini-kuitu-vuorovaikutusten tutkiminen kiinteän olomuodon NMR-spektroskopialla

Santeri Savila\* ja Maarit Karonen

Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto



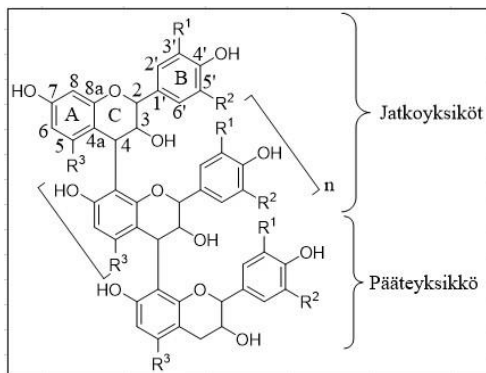
satasav@utu.fi

### Abstrakti

Polyfenolit, proteiinit ja polysakkaridit ovat elävissä organismeissa erillään toisistaan eivätkä reagoi keskenään. Kudosvaurioita sattuen erillaiset solunsisäiset yhdisteet saattavat päästä kosketuksiin ja voi syntyä uusia rakenteita ja biologisia toimintoja vuorovaikutuksen kautta. Vuorovaikutustutkimuksia on tehty korkean resoluution MAS (magic angle spinning) –tekniikalla ydinmagneettisella resonanssispektroskopialla eli HR-MAS-NMR:lla vielä vähän. Tässä työssä keskityttiin tanniinien vuorovaikutuksiin bakteeriselluloosan kanssa.

### Johdanto

NMR mahdollistaa yhdisteiden analyysin nestemäisessä, kiinteässä kuin myös geelissä tai puolikiinteässä olomuodossa oleville näytteille. NMR kuuluu käytetyimpiin spektroskooppisiin menetelmiin, joista vain massaspektrometriaa ja fluoresenssispektroskopiaa käytetään enemmän. HR-MAS-NMR yhdistää kiinteän olomuodon ja perinteisen liuoksessa olevien näytteiden analyysiin käytettyjen NMR-tekniikoiden hyödyt. HR-MAS-NMR:lla voidaan analysoida heterogeenisiä sekä geelimäisiä näytteitä [1].



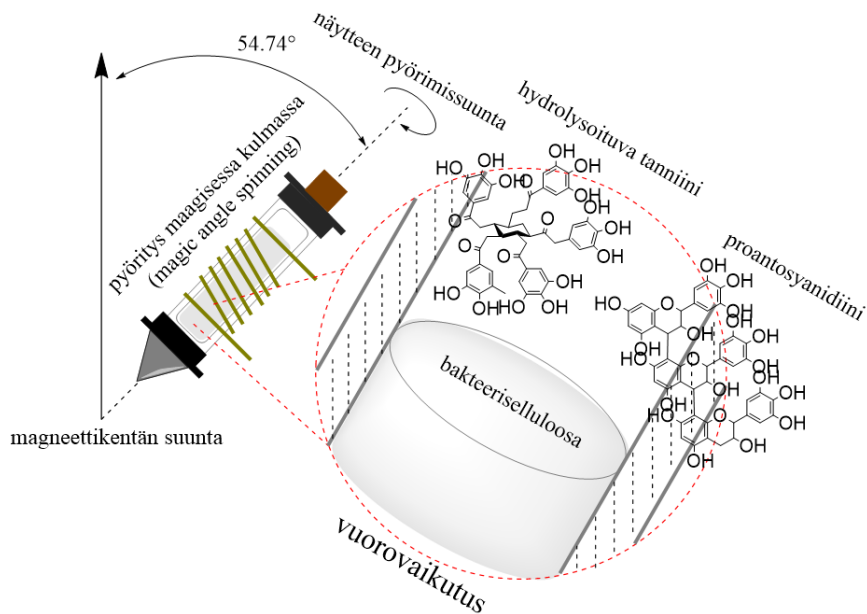
Hydrolysoituvat tanniinit ovat gallushappo-johdannaisia, gallotanniineja ja ellagitanniineja. Proantosyanidiinit taas ovat flavan-3-olien oligo- ja polymeerejä (kuva 1). Työn tarkoituksena oli selvittää kuinka valitut tanniinit vuorovaikuttavat mallikuituaineen kanssa HR-MAS-NMR tekniikkaa hyödyntäen (kuva 2). Ennen vuorovaikutusmittauksia selvitettiin valittujen mallitanniinien rakenteet ja kuitumalliaineena toimivan bakteeriselluloosan rakenteen oikeellisuus.

**Kuva 1.** Esimerkki proantosyanidiinin rakenteesta, jolla on C-C-kytkentä C4→C8 ja R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> sekä R<sup>3</sup> voivat olla H tai OH.

### Materiaalit ja menetelmät

Fourier-muunnos-infrapuna (FTIR) -spektrometriä käytettiin bakteeriselluloosan rakenteen oikeellisuuden varmistamiseen. Nata-de-Cocosta valmistetun bakteeriselluloosan puhtauden varmistavat piikit 3440 cm<sup>-1</sup>, 2926 cm<sup>-1</sup>, 1400 cm<sup>-1</sup>, 1300 cm<sup>-1</sup>, 1163 cm<sup>-1</sup> ja 1040 cm<sup>-1</sup> kohdassa. Mallitanniinien rakenteet selvitettiin 600 MHz:in Bruker Avance-III spektrometrillä mittaamalla <sup>1</sup>H- ja <sup>13</sup>C-spektrit sekä useita erilaisia 2D-spektrejä. Korkean resoluution orbitrap-massaspektrometriin sähkösumutus-ionisaatiolähteellä (ESI) yhdistetyllä UHPLC:lla määritettiin proantosyanidiinifraktioiden koostumus. Lisäksi näille näytteille mitattiin kiinteän olomuodon <sup>13</sup>C-

spektrit. Vuorovaikutusmittauksissa käytettiin Bruker Avance-III spektrometria, jossa oli erityisesti emulsiomaisille näytteille sopiva HR-MAS-probe [2].



**Kuva 2.** Havainnollistus korkean resoluution maagisessa kulmassa pyöritystä hyödyntävien NMR-tekniikoiden käytöstä tanniini-kuitu-vuorovaikutustutkimuksissa.

### Tulokset ja johtopäätökset

Mallitanniinit valittiin niin, että ne edustivat laajalti erilaisia tanniinirakenteita. Yksittäiset hydrolysoituvat tanniinit ja monomeeriset flavan-3-olit karakterisoitiin NMR:llä, mutta proantotsyaniidifraktioiden karakterisointi oli haastavampaa. Massaspektrometriset mittaukset osoittivat, että käytetyissä PA-fraktioissa oli 1) prodelfinidiinirikas fraktio, jonka monomeeriset yksiköt ovat B-tyyppin sidoksilla kiinni toisissaan, 2) prosyaniidirikas fraktio, joka sisälsi A- ja B-tyyppin sidoksia, 3) prodelfinidiinirikas fraktio, joka sisälsi galloyloituneita rakenteita ja B-tyyppin sidoksia, sekä 4) prosyaniidiini/prodelfinidiini-seos B-tyyppin sidoksin. MS/MS-mittauksen tulokset olivat NMR-spektrien tulkintojen kanssa yhtäpitävät.

Vuorovaikutusmittausten perusteella näyttää siltä, että korkea prodelfinidiinien osuus kokonaisproantotsyaniidimäärästä sekä korkea polymerisaatioaste parantaisivat vuorovaikutusta kuitumalliineen kanssa. Vuorovaikutusta heikentäisivät taas korkea prosyaniidiniinien osuus kokonaisproantotsyaniidimäärästä sekä matala polymerisaatioaste. Lisäksi A-sidos rakenteessa heikentää vuorovaikutusta bakteeriselluloosan kanssa, sillä rakenteesta tulee vähemmän joustava. Rakenteellisen joustavuuden on havaittu olevan merkittävää myös muissa tanniini-makromolekyli-vuorovaikutuksissa.

### Viitteet

- [1] Santos, A., Fonseca, F. Liao, L., Alcantara, G. ja Barison, A. *TrAC*, **2015**, 73, 10-18.  
 [2] Virtanen, V., Räikkönen, S., Puljula ja E. Karonen, M. *Molecules*, **2021**, 26, 373.

## UHPLC-MS/MS-menetelmän kehittämisen sydänglykosidien yhdisteryhmäkohtaiseen tunnistamiseen

Rebecca Vesamaa<sup>1\*</sup>, Ville Fock<sup>1</sup>, Niko Luntamo<sup>1</sup> ja Juha-Pekka Salminen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Kemian laitos, Turun yliopisto



hrvesa@utu.fi

### Abstrakti

Sydänglykosidit ovat kasvien ja eläinten tuottamia sydämen toimintaan vaikuttavia yhdisteitä. Niiden analysointiin on olemassa UHPLC-MS-menetelmiä, mutta laajamittaiseen seulomiseen soveltuvaa menetelmää ei aikaisemmin ole kehitetty. Tässä työssä kehitettiin sydänglykosidien ryhmäkohtaiseen tunnistamiseen sopiva usean reaktion seuranta -menetelmä (MRM) UHPLC-MS/MS-laitteistolle. Menetelmän luotettavuus varmistettiin sydänglykosidistandardeilla, ja menetelmän toimivuutta sekä tunnistuksen oikeellisuutta testattiin muilla steroidirunkeisilla yhdisteillä.

### Johdanto

Sydänglykosidit (engl. cardiac glycosides) ovat kasvien ja eläinten tuottamia erikoistuneita metaboliitteja. Esimerkiksi rohtosormustinkukka (*Digitalis purpurea*) ja oleanteri (*Nerium oleander*) tunnetaan runsaasti sydänglykosideja tuottavina kasveina. Nimensä mukaisesti sydänglykosideja käytetään sydänlääkkeinä, mutta niille etsitään myös muita käyttökohteita [1].

Sydänglykosidit kuuluvat triterpeeneihin ja ne koostuvat kahdesta osasta: geniinistä sekä sokeriosasta. Geniinosalla on rengasrakenteista koostuva steroidirunko, jonka C17-asemassa on substituenttina viisi- tai kuusiatominen tyydyttymätön laktonirenkas. Viisiatomisen laktonirenkaan sisältäviä geniinejä kutsutaan kardenolideiksi ja kuusiatomisen sisältäviä bufadienolideiksi. Sokeriosa on kiinni geniiniin C3-asemassa ja se voi sisältää 1–5 erilaista tai samanlaista sokeriyksikköä [1].

Tämän työn tarkoituksena oli kehittää sydänglykosidien ryhmäspesifiseen tunnistamiseen ja kvantitointiin soveltuva MRM-menetelmä (kuva 1) Watersin Xevo UPLC-MS/MS-kolmoiskvadrupolilaitteistolle. Työssä analysoitiin kattavasti erilaisia sydänglykosideja ja etsittiin mahdollisimman monelle erityyppiselle geniinille yhteisiä ioneja, joita fragmentoitiin edelleen. Sopivimmat prekursori-tuoteioniparit eli siirtymät valittiin menetelmään, jota voidaan hyödyntää tunnettujen ja tieteelle tuntemattomien sydänglykosidien nopeaan ja helppoon seulomiseen kasviuutteista.

### Materiaalit ja menetelmät

Menetelmä kehitettiin Watersin Acquity UPLC:stä ja Xevo TQ kolmoiskvadrupoli -massaspektrometristä (Waters Corp., Milford, MA, USA) koostuvalle laitteistolle. Käytössä oli Acquity UPLC® BEH-fenyyliloloni (Waters Corp., Wexford, Irlanti), jonka pituus oli 100 mm, Ø 2,1 mm ja partikkelikoko 1,7 µm. Näytteet analysoitiin 13,5 min gradientteluutiomenetelmällä, jossa asetonitriliin pitoisuus kasvoi 7 min aikana 15 %:sta 90 %:iin. Gradientin toisena ajoliuoksena oli 0,1 % muurahaishapon vesiliuos.

MRM-menetelmää varten laitteistolla mitattiin täysskannausmassaspektrit (full scan MS) viidestä kaupallisesta sydänglykosidista (digitoksiini, digoksiini, odorosidi A, oubaiini ja 2'4'-di-O-asetyylineriifoliini), jotka hankittiin Sigma-Aldrichilta (St. Louis, MO, USA). Alustava mittaus tehtiin positiivisella ja negatiivisella ionisaatiolla kolmella eri kartiojännitteellä (20, 40 ja 60 V). Prekursori-ionien valinta ja kartiojännitteen (CV) optimointi tehtiin mittaamalla massaspektrit

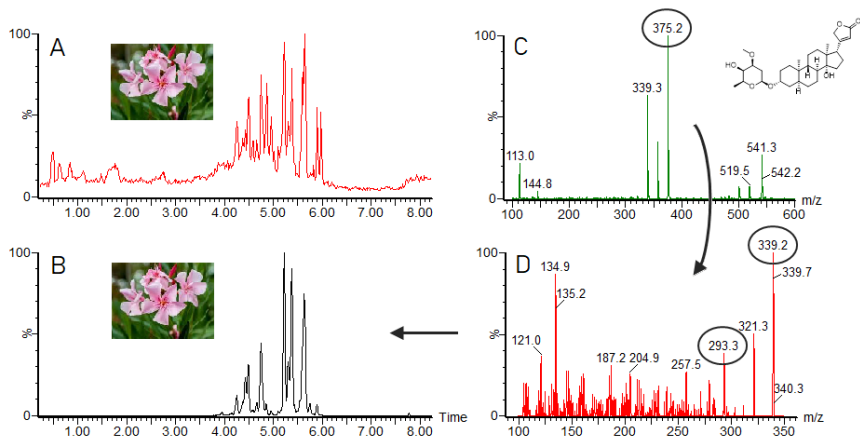
positiivisella ionisaatiolla kahdeksalla eri kartiojännitteellä 5–40 V. Tuoteionien valinta ja törmäysenergioiden (CE) optimointi tehtiin fragmentoimalla valitut prekursori-ionit kymmenellä eri törmäysenergialla 5–50 eV. Vastaavat mittaukset tehtiin myös sydänglykosideja sisältävien kasvien (mm. *Nerium oleander*, *Digitalis grandiflora*) kiinteäfaasiuuttofraktioille, joiden massaspektreistä tunnistettiin sydänglykosidit niille tunnusomaisten fragmentaatioarjojen sekä adduktien muodostumisen perusteella [2]. Menetelmään valittiin kullekin geniinityypille vähintään yksi kvalitatiivinen siirtymä sekä yksi kvantitatiivinen siirtymä.

Menetelmälle määritettiin kaupallisten puhdasaineiden avulla havaitsemisraja (LOD), määritysraja (LOQ), lineaarinen alue ja toistettavuus.

### Tulokset ja johtopäätökset

Geniinit ja niiden muodostamat fragmentaatioarjat havaittiin paremmin positiivisella kuin negatiivisella ionisaatiolla, joten positiivinen ionisaatio valittiin MRM-menetelmän ionisaatiomenetelmäksi. Prekursoreiksi valittiin ioneja geniinien fragmentaatioarjoista, koska ne ovat sydänglykosidien fragmentaatiolle tunnusomainen ja selkeästi havaittava piirre.

Siirtymiin valittiin pääasiassa tuoteioni, joka oli muodostunut, kun prekursori-ionista oli lohjennut 1–2 hydroksyyli ryhmää, sillä nämä olivat yleisiä. Lisäksi valittiin yksi tai kaksi pienempää ionia, joiden  $m/z$ -arvot vaihtelivat sydänglykosidin rakenteesta riippuen. Sekä prekursori-ionien optimaalisissa kartiojännitteissä että tuoteionien optimaalisissa törmäysenergioissa oli jonkin verran hajontaa, joten joillekin prekursoreille valittiin kaksi kartiojännitettä ja fragmenteille kaksi törmäysenergiaa, jotta menetelmästä saatiin kattavampi. Kehitetyllä MRM-menetelmällä onnistuttiin havaitsemaan oleanterin lehtien uutteesta yli 15 eri sydänglykosidia.



**Kuva 1.** Kasviuutteesta mitattu kokonaisionikromatogrammi (TIC) (A) sekä samasta näytteestä ryhmäkohtaisella MRM-menetelmällä mitattu TIC (B), jonka perusteella voidaan helposti erottaa sydänglykosidit muista yhdisteryhmistä. Sydänglykosideista mitatuista massaspektreistä (C) valittiin prekursori-ionit, joita fragmentoitiin edelleen (D). Sopivimmat prekursori-tuoteioniparit valittiin MRM-menetelmään.

### Viiitteet

[1] Bejček J., Jurásek M., Spiwok V ja Rimpelová S., *Toxins* **2021** *13*, 344.

[2] Singh Y., Nimoriya R., Rawat P., Mishra DK., Kanojija S., *J Am Soc Mass Spectrom* **2021**, *32*, 1205–1214.

## CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* ANTIPARASITIC ACTIVITIES OF PLANT EXTRACTS CONTAINING NATURAL AND MODIFIED PROANTHOCYANIDINS

Iqbal Bin Imran

Natural Chemistry Research Group, Department of Chemistry,  
University of Turku



Iqbal.imran@utu.fi

**Research Director:** Prof. Juha-Pekka Salminen

**Supervisor(s):** Prof. Juha-Pekka Salminen, Doc. Maarit Karonen and Dr. Marica Engström

**Funding:** University of Turku, Biofuture strategy

**Estimated time of PhD dissertation:** 4/2023

### Main aims of the PhD research

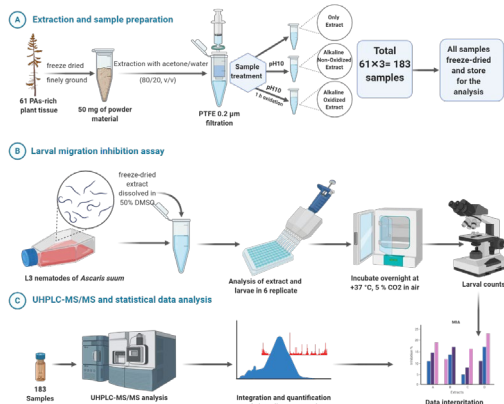
With my PhD project, I aim (1) to know how and why plant proanthocyanidins (PAs) are modified under alkaline conditions, (2) to characterize the PA oxidation products by high-resolution mass spectrometry, and (3) to know the *in vitro* antiparasitic bioactivity of the oxidized and non-oxidized PA-rich plant extracts.

PAs are plant specialized metabolites that are increasingly considered responsible for many positive effects on ruminant nutrition and health. There are many underexploited PA sources available, for example, from the side streams of the wood industry. These tannins do not, as such, have optimal structures and stabilities for desired bioactivities, but their value could be increased by chemically modifying the original structures to produce new types of molecules with enhanced properties. My research provides a thorough investigation of one possible modification route, the oxidation of natural PAs and the following change in *in vitro* antiparasitic activity. I studied the susceptibility of PAs from various plant sources (300 plant samples) to oxidation under alkaline conditions by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem and high-resolution mass spectrometry. In addition, I studied the *in vitro* antiparasitic activities of both original and oxidized PA-rich samples against *Ascaris suum* nematodes.

### Main results so far

In my first paper, I oxidized different PA containing plant extracts under alkaline conditions to produce new types of PAs. Initially, 300 plant samples were collected from the botanical garden of the University of Turku, Finland. Based on the preliminary screening, 102 plant samples had PA rich oligomers and polymers. From these plants, both the original and oxidized extracts were analyzed by UPLC connected to Waters XEVO TQ triple quadrupole mass spectrometer. The results indicated different stabilities and modification routes for different types of PAs. The study was published in *ACS Omega* in 2021. I further studied these samples by ThermoScientific QExactive Orbitrap to characterize the modified tannin structures in more detail. A manuscript of this study was published in *Molecules* in February 2021.

In addition, I studied the *in vitro* antiparasitic effects of both oxidized and non-oxidized extracts against *Ascaris suum* nematodes during my research visit to the University of Copenhagen, Denmark (Figure 1). These results showed a significant difference between the oxidized and the non-oxidized samples, the oxidized sample typically having a higher inhibition value. This suggests that the oxidation of some PAs increases their antiparasitic activity.



**Figure 1.** Experimental design and analysis procedure: (A) sample extraction and preparation for the analysis, (B) the procedure of larval migration inhibition activity measurement, and (C) UHPLC-DAD-QqQ-MS/MS analysis of the non-oxidized and oxidized samples and their data interpretation.

### The significance of my research for the research group and the whole research field

My work is part of the ModiFeed project, and this research entity is part of the Biofuture strategy of the University of Turku. ModiFeed and my PhD work builds on the knowledge of the Natural Chemistry Research Group and produces several new types of tannin mixtures from natural sources. This was accompanied by the state-of-the-art chemical analysis and anthelmintic assays done in Finland and Denmark. When combined with the resources and aims of OptiFeed, another NCRG project, ModiFeed and my work have the potential to achieve much more significant results than when operating alone.

### Papers to be included in the PhD thesis

1. Iqbal Bin Imran, Maarit Karonen, Juha-Pekka Salminen, and Marica T. Engström. *ACS Omega* 2021, 6, 7, 4726-4739, DOI: 10.1021/acsomega.0c05515.
2. Maarit Karonen, Iqbal Bin Imran, Marica T. Engström, and Juha-Pekka Salminen. *Molecules* 2021, 26 (7), 1873. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/7/1873>
3. Iqbal Bin Imran, Marica T. Engström, Maarit Karonen, Andrew R. Williams and Juha-Pekka Salminen. (Manuscript accepted in *Experimental Parasitology* in February 2023)

## FAST AND SENSITIVE UHPLC-MS/MS-BASED TECHNIQUES FOR EARLY DIAGNOSTICS OF LYME BORRELIOSIS AND NEUROBORRELIOSIS

Ilari Kuukkanen

Natural Chemistry Research Group, Department of Chemistry,  
University of Turku



ilari.j.kuukkanen@utu.fi

**Research Director:** Prof. Juha-Pekka Salminen

**Supervisor(s):** Doc. Maarit Karonen and Assoc. Prof. Jukka Hytönen

**Funding:** Sakari Alhopuro Foundation

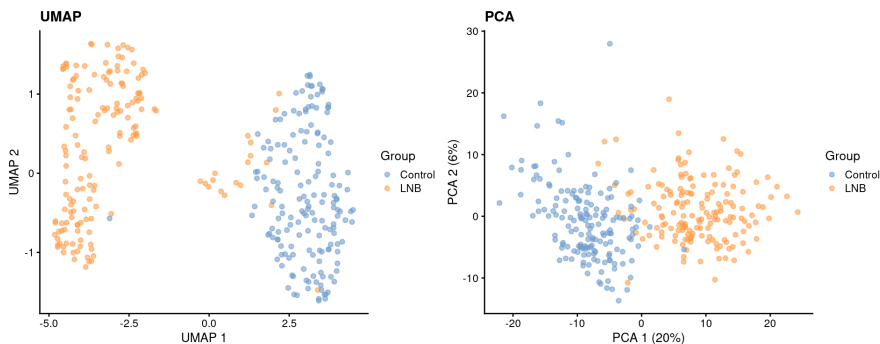
**Estimated time of PhD dissertation:** 2025

### Main aims of the PhD research

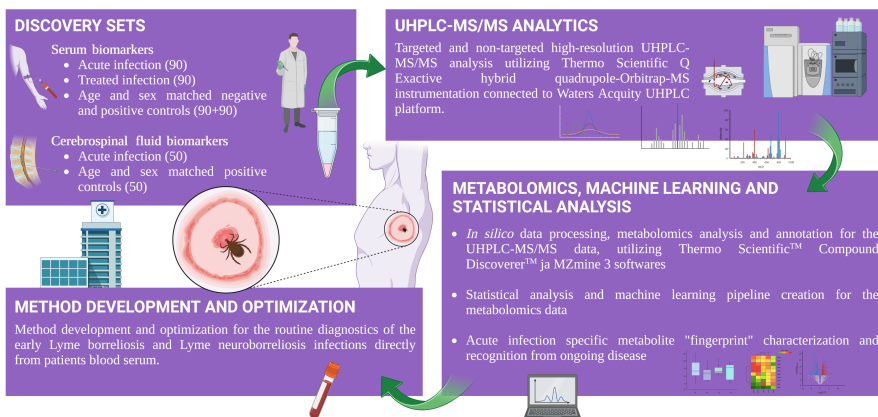
Lyme borreliosis (LB) is an infectious disease caused by members of the spirochete bacterial group *Borrelia burgdorferi* sensu lato and is spread by ticks from the genus *Ixodes*, being the most notable tick-transmitted infectious disease in the world. Lyme neuroborreliosis (LNB) is manifestation of untreated disseminated LB infection that has spread to the central nervous system. Due to high incidence and complex grave nature of the LB/LNB infection, the development of a new kind of faster, more straight forward and sensitive diagnostic method is crucial. At the moment, diagnostics of the early LB infection is based only on a clinical examination, because the infection specific antibodies take several weeks to develop. Disseminated LB can be diagnosed from the patient's blood sample but the diagnosis of the LNB requires a sample of cerebrospinal fluid (CSF) via invasive lumbar puncture. My PhD research aims to design a metabolomics based analytical method, utilizing ultrahigh-resolution liquid chromatography integrated with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS), focusing on small molecular weight metabolites (<1500 Da), specific biomarkers and metabolic routes, that are being affected by the LB/LNB infection. Based on this analytical method, we aim to develop a routine diagnostic platform for the LB/LNB infection. The platform strives also to identify treated infection from the ongoing one and to diagnose the LNB patients directly from the blood serum without the CSF samples.

### Main results so far

MS-based metabolite profiling is able to separate LB patients from the healthy control group, but studies concerning the LNB diagnostics via metabolite profiling are lacking. Our preliminary UHPLC-MS/MS analyzes from the human blood serum samples (negative control vs. positive control vs. acute LNB vs. treated LNB) from Clinical Microbiology Laboratory of Turku University Hospital have shown an analogous difference between the healthy control group and LNB groups as seen in Figure 1. Remarkably the infection seems to modify host metabolism in such a way that the treated LNB patients, 12 months after the diagnosis and antibiotic treatment, can still be separated from the healthy control group, but not so clearly from the acute infection. The UHPLC-MS/MS analyses are made using UHPLC-Orbitrap-MS/MS instrument that will gather the high-resolution, accurate-mass full scan data from both negative and positive ionization modes. The data also contains the critical MS/MS information obtained by the TopN technique that selects the most intensive ions in a scan cycle to MS/MS analyses and fragmentation. The development of the non-targeted UHPLC-MS/MS method is its final stages. Statistical analyzes from a discovery human blood serum samples are ongoing and we are also implementing machine methods for the data. The CSF samples have also been analyzed. The overall project cycle is presented in Figure 2.



**Figure 1.** Uniform manifold approximation and projection (UMAP) and principal component analysis (PCA) plots created from the discovery set of human patient blood serum samples that were analyzed via ultrahigh-resolution liquid chromatography integrated with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Lyme neuroborreliosis (LNB) group's serum samples are marked as orange dots and healthy controls as blue dots.



**Figure 2.** Planned project life cycle.

### The significance of my research for the research group and the whole research field

Heavily based on metabolomics, UHPLC-MS/MS analytics and methodology, my research is in the core of strong analytical expertise that Natural Chemistry Research Group is well-known. Also, this research is made in tight co-operation with Institute of Biomedicine at University of Turku as a true interdisciplinary study. When successful, this research will make LB and LNB diagnostics more streamlined, so patient's treatment can start as quickly as possible, simultaneously lowering the health care costs and creating a base for a commercial kit for the LB and LNB infection testing.

### Papers to be included in the PhD thesis

My PhD started at the beginning of 2022. There are no publications yet to be included in the PhD thesis.



## NOVEL MASS SPECTROMETRIC TOOLS REVEAL NEW FUNDAMENTAL POLYPHENOLIC PATTERNS IN RED WINES

Juuso Laitila

Natural Chemistry Research Group,  
Department of Chemistry, University of Turku



juerlai@utu.fi

**Research Director:** Prof. Juha-Pekka Salminen

**Supervisors:** Prof. Juha-Pekka Salminen, Dr. Petri Tähtinen and Dr. Maarit Karonen

**Funding:** Doctoral Programme in Physical and Chemical Sciences

**Estimated time of PhD dissertation:** 12/2023

### Main aims of the PhD research

Red wines have been extensively studied during the past decades, but the complexity of the wine matrix has ensured that the detailed polyphenolic composition of wines has largely remained as an uncharted territory. I aim to develop new analytical tools for the detection of various types of complex oligomeric adducts (Fig. 1A–C) consisting of proanthocyanidins, i.e., the wine tannins, and anthocyanins, which are naturally occurring polyphenolic pigments in grape skins. The method will be used to screen hundreds of red wines to study the compositions and functions of the oligomeric adducts in red wines. Additionally, I plan to prepare completely new types of proanthocyanidin adducts via hemisynthesis by utilizing the same chemical reactivity of proanthocyanidins that leads to the formation of the oligomeric adducts in red wines.

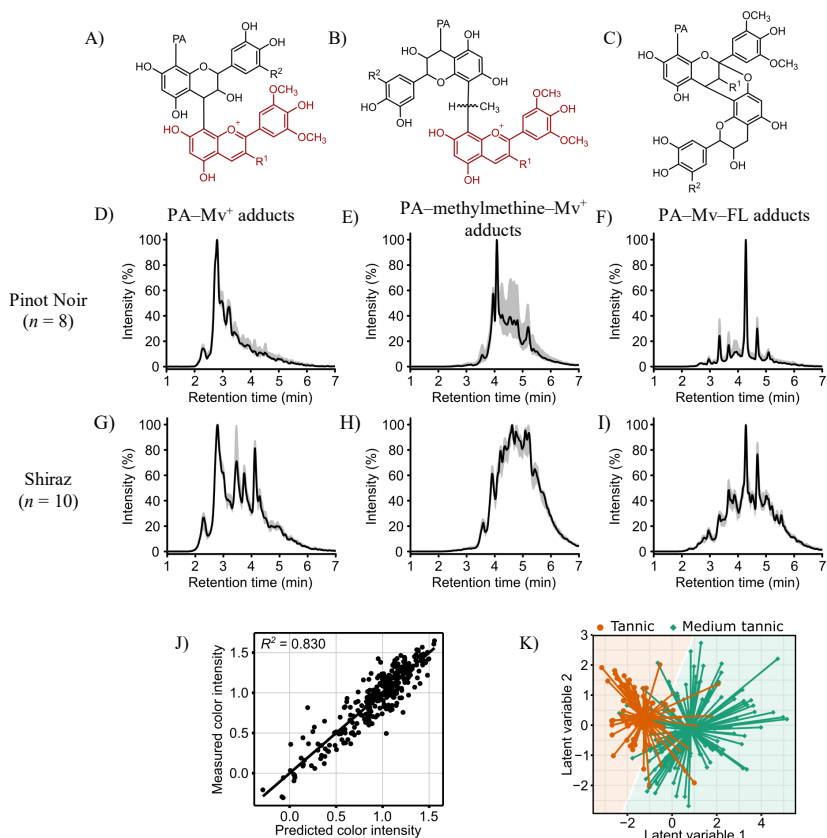
### Main results so far

An ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method was developed for the rapid analysis of anthocyanins and anthocyanin adducts in red wines [1]. The method produces two-dimensional (2D) chromatographic fingerprints (e.g., Fig. 1D–I), which provide both quantitative and qualitative information about the targeted compound groups. Importantly, the method exceeds previous methods in analytical accuracy regarding the oligomeric adducts.

A new protocol was developed to visualize and summarize the qualitative data [3]. In Figure 1D–I, the protocol made it possible to summarize chromatographic information from 162 individual chromatograms into only six quantile fingerprints. The compositions of all three oligomeric adducts were noticeably different between the Pinot Noir and Shiraz wines (Fig. 1D–I) but there was generally only little compositional variation within the wine types. Overall, the adduct composition was remarkably similar between many common wine types (e.g., Shiraz, Merlot and Cabernet Sauvignon) but there were still quantitative differences between these wine types [3].

In a large wine set consisting of 317 commercial red wines, the color intensity of the wines was largely explained by the oligomeric pigments (Fig. 1A–B) [2]. While the concentrations explained most of the variation in the color intensity, the sizes of the oligomeric pigments explained a smaller, but a unique and distinctive part of the color intensity. The perceived tannicity was estimated by expert panelists at Alko Inc. and the wines were categorized to medium tannic and tannic wines. The features related to the composition and structures of the proanthocyanidins and proanthocyanidin-containing adducts were more important in separating the two tannicity groups than the concentrations [4].

A synthesis strategy was developed to synthesize ten aldehyde-linked dimers of (+)-catechin and (–)-epicatechin. The biological activities of the synthetic oligomers will be compared to their naturally existing counterparts, i.e. procyanidin dimers and trimers.



**Figure 1.** Structures of PA-Mv<sup>+</sup>, PA-methylmethine-Mv<sup>+</sup> and PA-Mv-FL adducts (A–C) and their two-dimensional fingerprints in 1–2-year-old Pinot Noir and Shiraz red wines (D–I). Scatter plot of the measured and predicted color intensities in 317 commercial red wines (J) and separation of medium tannic and tannic wines based on their proanthocyanidin profiles (K).

### The significance of my research for the research group and the whole research field

The analytical accuracy regarding the oligomeric adducts made it possible to arrive at precise conclusions about the formation, composition, evolution and color contribution of the oligomeric adducts in red wines. Typically, only a fraction of the true molecular complexity of red wines is considered because of analytical limitations. From the research group's point of view, all published papers are an integral part of the core functions of the research group. Namely, establishing structure–activity relationships of polyphenols and the development and utilization of novel analytical tools to study the fascinating polymeric polyphenols originating from the nature.

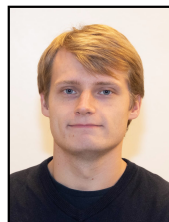
### Papers to be included in the PhD thesis

1. Laitila, J.E., Suvanto, J., Salminen, J.-P. Food Chem. 2019, 294, 138–151.
2. Laitila, J.E., Salminen, J.-P. J. Agric. Food Chem. 2020, 68, 3576–3584.
3. Laitila, J.E. Food Chem. 2021, 340, 127905.
4. Laitila, J.E, Salminen, J.-P. Food Chem. (manuscript)

## QUANTITATIVE PROFILING OF THE CHEMICAL DIVERSITY IN THE PLANT KINGDOM

Niko Luntamo

Natural Chemistry Research Group, Department of Chemistry,  
University of Turku



nitalu@utu.fi

**Research Director:** Prof. Juha-Pekka Salminen

**Supervisor(s):** Dr. Marica Engström, Prof. Juha-Pekka Salminen

**Funding:** Department of Chemistry, Doctoral Programme in Physical and Chemical Sciences,  
Doctoral Programme in Exact Sciences, Finnish Cultural Foundation

**Estimated time of PhD dissertation:** 2024

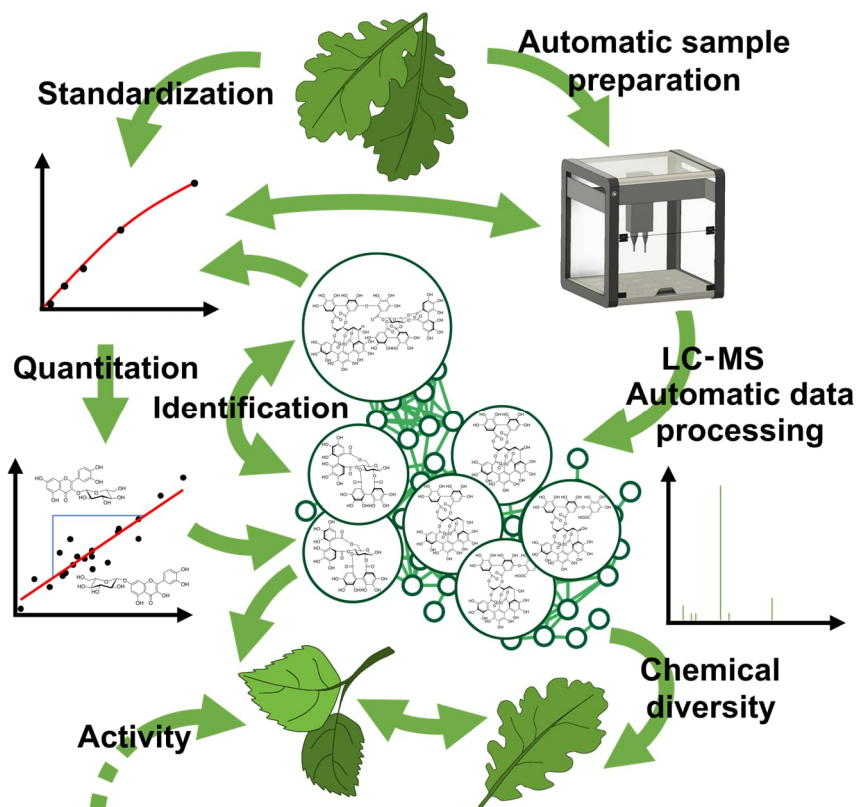
### Main aims of the PhD research

There are at least thousands of specialized metabolites in the plant kingdom. The most widely distributed group of metabolites are the polyphenols. These can be found in every plant species, often at high levels and they play key roles in plant defense. It has been shown that these compounds have many types of relevant bioactivities that can be used to benefit human and animal health, and the environment as well. These activities include, e.g., oxidative activity, protein precipitation, protein covalent stabilization, antimethanogenic, anthelmintic and antimicrobial activities. Plants also produce for instance alkaloids, glucosinolates, cyanogenic glycosides and terpenes but the actual chemical diversity of the plant kingdom is still uncharted, not to mention quantitative knowledge of individual metabolites. Therefore, the aim of my PhD research is to create fast and accurate analytical platform that utilizes ultra-high performance liquid chromatography (Waters Acquity UHPLC), triple quadrupole (Waters Xevo TQ) and high-resolution mass spectrometry (Thermo Orbitrap QExactive). The platform can be used for qualitative and quantitative analysis of hundreds or even thousands of individual specialized metabolites when it is combined with automatic data processing tools, such as MZmine 2, GNPS and MS2LDA. Eventually, quantitative compound or compound group specific and qualitative chemical diversity of different species can be defined and decisions can be done how the incidence of metabolite groups and more specifically individual metabolites are linked to the plant tree of life.

### Main results so far

UHPLC-MS analysis platform for accurate quantitation and method for determination of the chemical diversity count have already been developed. Also, fast and simple metabolite purification protocol was created to be able to purify at least 1 mg of hundreds of individual compounds from selected plant species and the accumulation of standard compounds has started. Thus, we can create our own calibration curves for all purified compounds from various metabolite groups and perform as accurate mass spectrometric quantitation as possible. The pool of standard compounds is further increased by utilizing chromatographically pure compounds in plant extracts and fractions. For these, calibration curves are adjusted to correct concentration using structurally similar model compounds.

We already have successfully introduced pipetting robot (Opentrons OT-2), which will release work input from laboratory work to time-consuming data management and result processing. Altogether, automatic data processing enables accumulation and handling of great amount of data drawing unique picture of the chemical diversity of the plant kingdom.



**Figure 1.** Qualitative information is combined with absolute quantitation data produced with compound specific standards giving possibility to find chemical linkages in the plant tree of life.

### The significance of my research for the research group and the whole research field

My PhD research is strongly linked to Natural Chemistry Research Group's effort to understand chemistry behind the evolution of plants and how certain metabolites or metabolite groups are linked to it. On the other hand, loss of biodiversity also causes loss of chemical diversity, which can be charted with quantitative data to be produced in this study. Fundamental quantitative compound specific data have not earlier been available, since most past studies have focused on a few species and many compounds, or many species, but only a few compounds. Moreover, single quantitative platform with individual quantitation curves is utilized to all samples thus making the whole data set fully comparable between all the samples included. The accurate data will be made openly available, thus widely promoting all fields of science interested in plants.

Luonnollista kemiaa project and The UTU Botanical Garden's plant exhibition are also supplemented with chemical diversity information from this data. This will hopefully increase knowledge and understanding of the general audience of this biodiversity challenge and its links to plant chemistry.

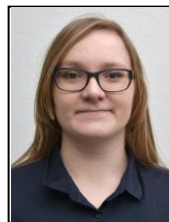
### Papers to be included in the PhD thesis

There are no publications yet to be included in the PhD thesis.

## INTERACTIONS BETWEEN TANNINS AND ANTHELMINTICS – MOLECULAR ASPECTS AND MECHANISMS

Mimosa Sillanpää

Natural Chemistry Research Group, Department of Chemistry,  
University of Turku



mamsil@utu.fi

**Research Director:** Prof. Juha-Pekka Salminen

**Supervisor(s):** Doc. Maarit Karonen, Doc. Petri Tähtinen and Dr. Marica Engström

**Funding:** LipidET project funded by the Academy of Finland (2017–2021, decision 310549), Doctoral Programme in Physical and Chemical Sciences (PCS), Doctoral Programme in Exact Sciences (EXACTUS), University of Turku Joint Research Grant Fund, Department of Chemistry

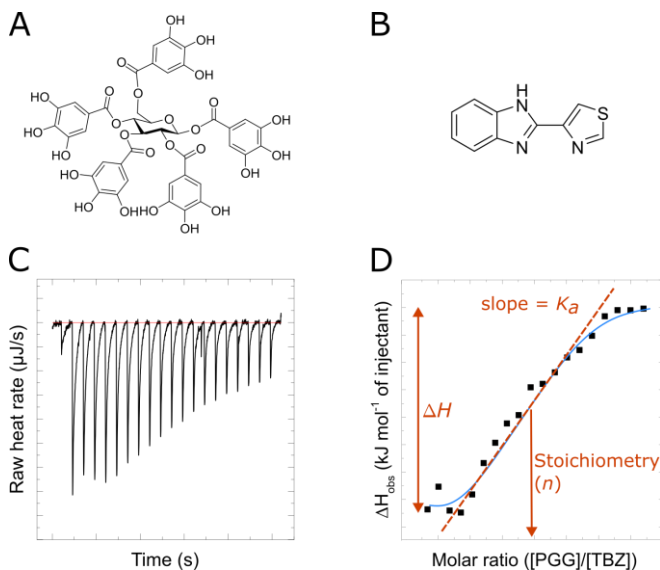
**Estimated time of PhD dissertation:** 2024

### Main aims of the PhD research

Tannins are a large group of specialized plant metabolites that are known to have many benefits in the ruminant forage, such as improved milk production, reduced methane emissions and anthelmintic effects. The correct utilization of tannins would therefore be a sustainable way to improve both the economy of ruminant production and the health of the animals. The anthelmintic effects of tannins could be especially powerful against multiresistant nematode strains, and the current research target is to use them as complementary nutraceuticals combined with commercial anthelmintics. However, there are only few studies on tannin-anthelmintic interactions, and recent researches indicate that using anthelmintics combined with a tannin-rich diet could have either positive or negative short- and long-term consequences on animal health. Therefore, the deeper understanding of this interaction is critical when a tannin-rich diet and oral commercial anthelmintics are combined. In my PhD work, I study the interactions between tannins and anthelmintics to expand our knowledge on this topic. The work consists of chemical analyses using purified tannins to study how the structural features and physico-chemical properties of tannins affect the interaction strength and mechanisms.

### Main results so far

So far, I have purified the tannins needed for the interaction studies, developed a suitable method to analyze these interactions via isothermal titration calorimetry (ITC), and performed measurements for my first research article [1]. ITC is a powerful technique to study the thermodynamics of different interactions, and thereby, to determine the corresponding binding constant ( $K_a$ ), the enthalpy of binding ( $\Delta H$ ) and the stoichiometry or the number of the binding sites ( $n$ ) (Figure 1). In a typical ITC measurement, a ligand solution is titrated into a macromolecule solution in the sample cell. The instrument detects the reaction heat caused by the ligand-macromolecule interaction by measuring the temperature difference between the sample cell and the reference cell. The temperature difference is then compensated by cooling or heating the sample cell to match the temperature of the reference cell, depending on if the reaction in question is exothermic or endothermic. ITC is a quantitative method, and the measurement is not disturbed by possible precipitation that might occur due to interactions between the tannin and the anthelmintic. The results indicate that HTs interact with the chosen commercial anthelmintic, as shown for pentagalloylglucose in figure 1, and the strength of the interaction is dependent on the structural characteristics of HTs.



**Figure 1.** An example of data obtained by titrating pentagalloylglucose (PGG, A) into thiabendazole (TBZ, B). The isotherm (C) is first integrated, and the molar heat of injection vs. the molar ratio graph (D) is obtained. From this plot, the thermodynamic parameters of the interaction such as enthalpy ( $\Delta H$ ), binding affinity ( $K_a$ ), and binding stoichiometry ( $n$ ) can be determined.

### The significance of my research for the research group and the whole research field

Our research group has previously demonstrated many types of structure-activity patterns linked with tannins and their interactions with various species and stages of ruminant nematodes. These positive effects of tannins to ruminants have also been confirmed by other research groups *in vivo*. This research is a continuation for the previous studies and the knowledge gained from my PhD work is an important step towards either partially replacing the use of commercial anthelmintics with tannin-rich plants, or to use these complementarily in a safe and economically feasible way. The research area is still quite unknown with only few published studies, so this work will expand our knowledge on this subject and it will also have an effect on the agricultural and veterinary world along with its scientific impact. The use of purified and well-characterized tannins will result in novel insights on the molecular aspects of the interaction in question and will pave the way for more efficient and safe use of anthelmintics and tannin-containing plants.

### Papers to be included in the PhD thesis

1. Sillanpää, M., Engström, M. T., Tähtinen, P., Karonen, M., **2023**, manuscript under preparation.

## BERRY PROANTHOCYANIDINS: BIOSYNTHESIS AND BIOTECHNOLOGICAL CULTIVATION

Jussi Suvanto

Natural Chemistry Research Group, Department of Chemistry,  
University of Turku



josuva@utu.fi

**Research Director:** Prof. Juha-Pekka Salminen

**Supervisors:** Prof. Juha-Pekka Salminen, Doc. Maarit Karonen and Doc. Petri Tähtinen

**Funding:** NCRG Research Services, Kemian Päivien Säätiö

**Estimated time of PhD dissertation:** 2024

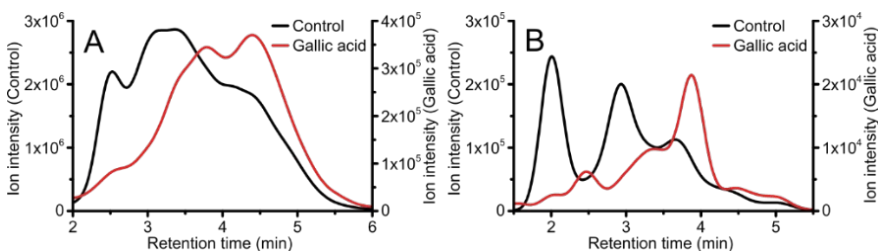
### Main aims of the PhD research

My project aims to (1) study the content of specialized metabolites in cell suspension cultures of a wide variety of Nordic plant species, (2) find different ways of modifying the polyphenolic profiles of these unique cell suspension cultures, and (3) study the biosynthesis of proanthocyanidins (PAs) in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in both the berry during its development and other plant parts.

### Main results so far

The results for Goal 1 were published in 2017.[1] The study, which included 12 plant species, showed a considerable variability in both the profiles and quantities of specialized metabolites in the different cell suspension cultures; some cell cultures were very similar in their polyphenolic profiles when compared to wild plants, while some differed greatly. *V. myrtillus*, for example, was PA-rich and contained both A- and B-type PAs in a mixture resembling its natural counterpart, whereas rowan (*Sorbus aucuparia*) produced mainly galloyl glucoses and ellagitannins, neither of which are found in the plant in nature.

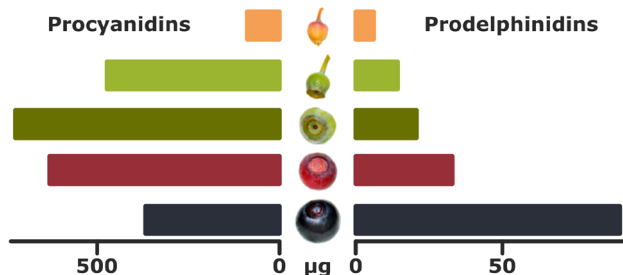
In Goal 2, various compounds of the polyphenol biosynthesis pathway, elicitors, and hormones were fed in the cell cultures introduced in Goal 1 to study how they modulate the polyphenolic profile of these cell cultures.[2] A couple of different main effects were observed: while in some cell cultures derived from *Rubus* species the most significant change was seen in the chromatographic profiles of the procyanidins and prodelphinidins (Figure 1), a different set of cell cultures produced such galloyl glucoses that are seldom, if ever, found in plants.



**Figure 1.** The changes in the chromatographic profiles of procyanidins (A) and prodelphinidins (B) when a *Rubus arcticus* cell suspension culture was subjected to gallic acid.

The article studying the PA biosynthesis in *V. myrtillus* (Goal 3) was published in 2020.[3] In this study, the profiles and concentrations of PAs and their immediate biosynthetic precursors, flavan-

3-ols, were studied and linked with the expression of flavonoid pathway biosynthetic genes. While soluble procyanidins behaved during berry ripening as has been reported for the total PAs of some other *Vaccinium* species, prodelphinidins showed a curious behaviour in which their concentration and degree of polymerization only peaked in the ripe berry (Figure 2). Moreover, it was found out that total amount of PAs, ie. the sum total of both soluble and cell-wall-bound insoluble PAs, reaches its maximum in mid-ripening, suggesting that they are not recycled and are merely transported to the cell wall during fruit maturation, thus rendering them insoluble when the need for a feeding deterrent in the berry is diminished.



**Figure 2.** The accumulation of soluble procyanidins and prodelphinidins in *V. myrtillus*.

### The significance of my research for the research group and the whole research field

The cell cultures provide an excellent base for biosynthetic studies on plant secondary metabolites. When the cell cultures are optimized for e.g. the productions of polyphenols, they can be later accumulated into large-scale batch cultures at VTT for further testing by the industry collaborators to be potentially used in the future as e.g. ingredients of cosmetics products.

Previously, some *Vaccinium* berries have been studied for their PA metabolism, but the methods have lacked the accuracy to find the patterns now observed. Owing to the use of several complementary analysis methods, these findings provide new insight into how PAs are accumulated and transported in plant cells during fruit maturation.

### Papers to be included in the PhD thesis

1. Suvanto, J., Nohynek, L., Seppänen-Laakso, T., Rischer, H., Salminen, J.-P., Puupponen-Pimiä, R. *Planta* 2017, 246, 227–241.
2. Suvanto, J., Nohynek, L., Rischer, H., Puupponen-Pimiä, R., Salminen, J.-P. Modulating the Polyphenolic Profile of Berry-derived Cell Cultures Using Their Biosynthesis Pathway Precursors. Manuscript in preparation.
3. Suvanto, J., Karppinen, K., Riihinen, K., Jaakola, L., Salminen, J.-P. *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 7378–7386.



## DISTRIBUTION OF THE DIVERSITY OF PLANT POLYPHENOLS ACROSS THE PLANT PHYLOGENY AND ITS EFFECTS ON PLANT DEFENSIVE PROPERTIES

Suvi Vanhakylä

Natural Chemistry Research Group, Department of Chemistry,  
University of Turku



smhvanl@utu.fi

**Research Director:** Prof. Juha-Pekka Salminen

**Supervisor(s):** Prof. Juha-Pekka Salminen, Doc. Maarit Karonen, Prof. Ilari Sääksjärvi and Dr. Simon Segar

**Funding** Finnish Cultural Foundation, Department of Chemistry, Väisälä Fund

**Estimated time of PhD dissertation:** 2024

### Main aims of the PhD research

Currently the distribution of plants' polyphenol-based defensive chemistry within plant phylogeny is known relatively poorly, even though tannins are among the most common group of plants' specialized metabolites. Their high prevalence and variability make them an excellent tool for studying the evolution of plant defenses.

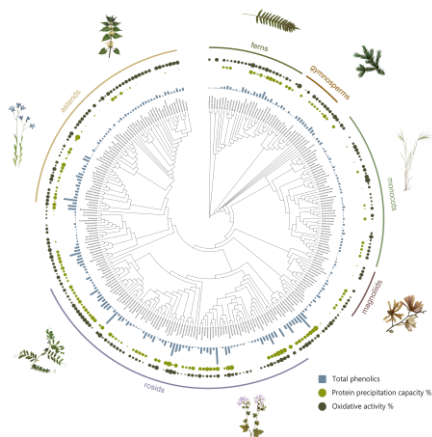
In my PhD project I aim to (1) examine plant polyphenol-based defensive chemistry in thousands of plant species across the phylogeny of land plants, (2) search links between specific metabolite types and functional activities, (3) draw conclusions about where in the plant phylogeny the crucial steps of different biosynthetic pathways of defense chemistry evolved and (4) study the chemical diversity within plant populations and their seasonal variation during several years. This can be accomplished by linking the cutting-edge methods in chemistry with the latest knowledge of plant phylogeny and targeted experiments with selected plant species.

### Main results so far

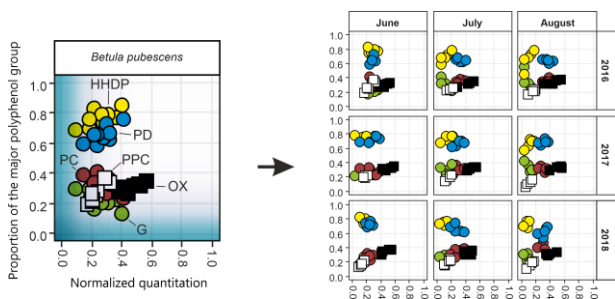
The data set contains over 10000 samples from 3500 plant species from 270 plant families, which covers the main branches of the vascular plant phylogeny. All the collected species are screened with UPLC-MS/MS for their composition of major groups of polar polyphenols. Every plant sample was also measured for two bioactivities; protein precipitation capacity and oxidative activity, which are the two key defense properties of phenolics against insect herbivores. The first results of the distribution of total phenolic content and the two bioactivities across the plant phylogeny at the family level are shown in Figure 1.

To build a better understanding of the patterns of variation of different chemical fingerprints I have studied seasonal variation and differences between individuals in plant populations. Plant species have been chosen on the basis of their unique polyphenol fingerprints. Selected populations were sampled three times over three seasons.

A new multidimensional fingerprint visualization method will be published [1, 2] to illustrate the relative quantities and proportions of significant polyphenol groups and their linkage to the bioactivities (Figure 2.). These fingerprints make it possible to easily search essential similarities and differences between plant species, and perhaps even genera and families. The results reveal, that some of the species show considerable variation in specific compound groups or activities and most of the species had relatively constant fingerprint maps even across seasons.



**Figure 1.** Distribution of total phenolics, oxidative activity and protein precipitation capacity across the phylogenetic tree of 270 plant families.



**Figure 2.** Examples of a species-specific and seasonal fingerprint maps. Only the most significant polyphenol groups affecting the protein precipitation capacity (PPC) and the oxidative activity (OX) are shown; galloyl (G) and hexahydroxydiphenoyl (HHDP) derivatives and procyanidins (PC) and prodelphinidins (PD).

### The significance of my research for the research group and the whole research field

My PhD project is based on the Natural Chemistry Research Group’s extensive plant collections and analyzes since 2011. With my background in ecology and evolutionary biology I’m able to link the chemical data to phylogenetic relationships of vascular plants and their effects on herbivory. This multidisciplinary approach will significantly increase the knowledge of the distribution, variation and significance of different types of chemical defenses in the plant kingdom. My research will undoubtedly produce important data for any chemist or biologist, who aims to focus on the most polyphenol-rich plant families or biologically most active clades in their research.

### Papers to be included in the PhD thesis

1. Vanhakylä, S., Salminen, J.-P., 2023, Mass spectrometric fingerprint mapping reveals species-specific differences in plant polyphenols. Manuscript in preparation.
2. Vanhakylä, S., Salminen, J.-P., 2023, Seasonal fingerprint maps of plant polyphenols and related bioactivities. Manuscript in preparation.

## HYDROPHOBICITY AND LIPID INTERACTIONS OF HYDROLYSABLE TANNINS

Valtteri Virtanen

Natural Chemistry Research Group, Department of Chemistry,  
University of Turku



vtjvir@utu.fi

**Research Director:** Prof. Juha-Pekka Salminen

**Supervisor(s):** Doc. Maarit Karonen and Doc. Petri Tähtinen

**Funding:** LipidET project funded by the Academy of Finland (2017–2021, decision 310549), Doctoral Programme in Physical and Chemical Sciences, Doctoral Programme in Exact Sciences.

**Estimated time of PhD dissertation:** 8/2023

### Main aims of the PhD research

Hydrolysable tannins (HT) are plant specialized metabolites, which have been shown to possess many nutritionally and pharmacologically beneficial activities such as oxidative activity, protein precipitation capacity and anthelmintic activity. However, the aptitude of HTs to interact with lipid vesicles is far less studied, even though the affinity of HTs to interact with lipids in part dictates their transportation in biological systems and their capacity to act as antimicrobial agents. Main aims of my project are (I) studying the hydrophobicity of tens of different HTs, (II-III) finding which HT structural features are the most crucial in HT-lipid interactions and (IV) evaluating the antimicrobial effects of HTs by combining bacterial batch culture studies with NMR metabolomics and DNA sequencing.

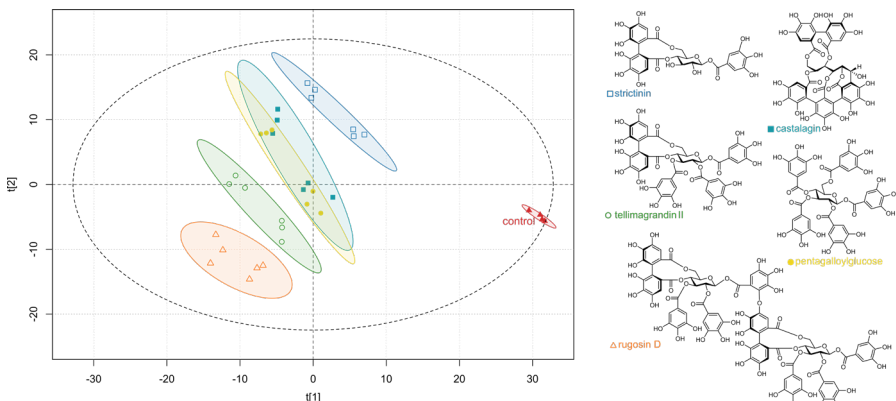
### Main results so far

The partition coefficients ( $\log P$ ) of 47 purified and characterized HTs were measured to determine which structural features have the largest effect to the hydrophobicity of HTs [1]. In general, galloyl glucoses (GGs) and gallotannins (GTs) were found to be more hydrophobic than ellagitannins (ETs) of similar size. However, the variability in hydrophobicity within ETs is larger than within GGs or GTs. The most notable structural features affecting the hydrophobicity of HTs were the number of free galloyl groups, conformation of the polyol glucose, overall flexibility of the structure and molecular weight. The knowledge gained in my first research article about the hydrophobicities of HTs also laid the foundation for the next parts of my PhD project where I studied the lipid interactions of a select group of HTs first with nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and subsequently with isothermal titration calorimetry (ITC). The selection of HTs studied with these techniques was primarily done based on their determined hydrophobicity.

The selected HTs consisted of 12 ETs and pentagalloylglucose. Their interactions with the lipids of a commercial lipid extract of *E. coli* were determined with high-resolution magic angle spinning (HR-MAS) NMR spectroscopy [2]. More specifically, nuclear Overhauser effect was utilized to measure the cross relaxation rates between the tannin and lipid protons. Additionally, the shifting of lipid signals in  $^1\text{H-NMR}$  spectra of the tannin-lipid mixture due to ring current effect were also observed. Clear structural similarities were observed amongst the tannins that showed measurable interaction with the *E. coli* lipid extract. All the active tannins had a glucopyranose core, and furthermore, the general flexibility of the tannin structure and the abundance of free galloyl groups seemed to be the most important structural features determining the magnitude of the observed lipid interactions. It was also shown that dimeric and even trimeric ETs could penetrate to the lipid bilayer if their structure was flexible and hydrophobic enough. Following the above observations,

we selected an even wider group of HT structures and measured with isothermal titration calorimetry (ITC) the thermodynamics of the interactions these tannins had with lipid vesicles prepared from the *E. coli* lipid extract [3]. Similar structural features proved dominant in the ITC study as were earlier reported in the NMR spectroscopic study, *i.e.* flexibility and hydrophobicity of the HT structure increased the amount of heat released from the lipid-interaction.

Finally, we studied the bacterial metabolome changes of *E. coli* and *S. aureus* cultures after different HT treatments *in vitro* with an NMR metabolomics approach [4]. There were notable differences in the metabolite profiles after different tannin treatments that were linked to the inhibition efficiencies of these different tannin structures. Figure 1 displays a PCA score plot of the processed spectral data of *E. coli* cultures 24 hours after different HT treatments with group separations illustrating the differences in the tannin treatments.



**Figure 1.** PCA score plot from the NMR metabolomics data of *E. coli* culture samples treated with different hydrolysable tannins after 24 hours of incubation.

### The significance of my research for the research group and the whole research field

HTs have beneficial effects for animal nutrition and health but the activities can be highly specific depending, for example, on the different structural features and physico-chemical properties of HTs or the macromolecules present or the chemical conditions. That is why further information is required in order to understand the modes and mechanisms of their actions. As the mechanisms of action become unfold, we can start to design practical implementations, such as the use of HTs or HT-rich forages as natural *in vivo* feed additives and utilizing HTs as antimicrobial agents, from which there already are promising *in vitro* studies.

My project has uncovered novel insights about HT-lipid interactions and the hydrophobic properties of a more comprehensive set of HTs than previously available anywhere in the literature. This in itself is already a significant addition to all that we already know about the bioactivities and structure-activity relationships of tannins and hydrolysable tannins more specifically and this knowledge can be used in future practical implementations.

### Papers to be included in the PhD thesis

1. Virtanen, V., Karonen, M. *Molecules.*, **2020**, 25, 3691.
2. Virtanen, V., Rääkkönen, S., Puljula, E., Karonen, M., *Molecules.* **2021**, 26, 373.
3. Virtanen, V., Green, R. J., Karonen, M., *Molecules.* **2022**, 27, 3204.
4. Virtanen, V., Puljula, E., Walton, G., Woodward, M.J., Karonen, M., *Metabolites.* **2023**. 13, 320.