

Del I. Kjemiske og biokjemiske studier av den maliske medisinplanten *Terminalia macroptera*

Del II. Etnofarmakologiske studier i Mali

Anh Thu Pham



Masteroppgave

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-vitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2009

Mastergradsoppgave for graden Master i Farmasi

**Del I. Kjemiske og biokjemiske studier av den
maliske medisinplanten *Terminalia macroptera***

Del II. Etnofarmakologiske studier i Mali

Anh Thu Pham



Utført ved

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2009

Veiledere

Professor Karl Egil Malterud

Professor Berit Smestad Paulsen

Professor Drissa Diallo

Forord

Jeg ønsker først og fremst å rette en spesiell takk til Karl Egil Malterud for en god veiledning og all hjelpen jeg har fått under arbeidet med hovedoppgaven. Veiledningen har vært av faglig dyktighet samt at det har vært inspirerende.

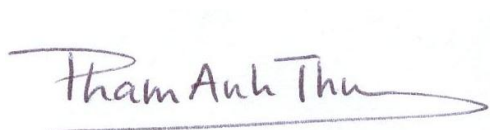
Videre fortjener Berit Smestad Paulsen, Drissa Diallo og Adiaratou Togola oppmerksomhet da de har vært en stor hjelp med de etnofarmakologiske studiene i Mali. Opplevelsen i Mali ville ikke vært den samme uten de ovennevnte.

Ellers vil jeg takke reisefølget mitt i Mali, Christina Dvergsnes og Ingvild Austarheim for godt selskap og en fantastisk minnerik tur.

Foruten dette vil jeg rette en stor takk til Anh Thu Huynh Nu og Toan Minh Vo, for korrekturlesing og uvurderlig støtte under en hektisk tid. I tillegg fortjener Monica Cheung oppmerksomhet for å være svært behjelpelig med tekniske problemer.

Til slutt vil jeg takke alle involverte ved avdelingen for en kjempe innsats og hyggelige samtaler gjennom hele hovedsfagsåret.

Oslo, 13. mai 2009

A handwritten signature in dark ink, reading "Pham Anh Thu". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke extending to the right.

Anh Thu Pham

Innhold

INNHold.....	I
1. SAMMENDRAG.....	VII
2. FORKORTELSER	IX
3. HENSIKT MED OPPGAVEN	X
4. BAKGRUNN.....	1
4.1 <i>TERMINALIA MACROPTERA</i>	1
4.1.1 <i>Taksonomisk klassifisering</i>	1
4.1.2 <i>Lokale navn</i>	1
4.1.3 <i>Botaniske forhold</i>	2
4.1.4 <i>Habitat</i>	5
4.1.5 <i>Tradisjonell bruk</i>	5
4.1.6 <i>Tidligere funn/forskning</i>	6
4.2 ANTIOKSIDANTER OG FRIE RADIKALER.....	11
4.2.1 <i>Antioksidanter</i>	11
4.2.2 <i>Frie radikaler og reaktive oksygen species (ROS)</i>	11
4.2.3 <i>Dannelse av frie radikaler og ROS</i>	11
4.2.4 <i>Antioksidantforsvar</i>	11
4.2.5 <i>Oksidativt stress</i>	12
4.2.6 <i>Lipidperoksidering</i>	12
4.2.7 <i>Patologisk betydning</i>	12
4.3 ARAKIDONSYREMETABOLISME OG 15-LIPOKSYGENASE.....	13
5. EKSPERIMENTELT	14
5.1 MATERIALER	14
5.1.1 <i>Kjemikalier</i>	14
5.1.2 <i>Apparatur</i>	15
5.2 METODER	16
5.2.1 <i>Generelle metoder</i>	16
5.2.2 <i>Separasjonsmetoder</i>	19
5.2.3 <i>Identifikasjonsmetoder</i>	28
5.2.4 <i>Metoder for måling av biologisk aktivitet</i>	38
5.3 EKSPERIMENTELL UTFØRELSE	45

5.3.1	<i>Plantemateriale</i>	45
5.3.2	<i>Ekstraksjon av plantemateriale</i>	46
5.3.3	<i>Fraksjonering av diklormetanr�ekstraktet</i>	47
5.3.4	<i>Fraksjonering av metanolråekstraktet</i>	48
5.3.5	<i>Fraksjonering av butanol-fasen av metanolråekstraktet</i>	50
5.3.6	<i>Fraksjonering av etylacetat-fasen av metanolråekstraktet</i>	51
5.3.7	<i>Videre separasjon av fraksjon B3</i>	53
5.3.8	<i>Videre separasjon av fraksjon B7</i>	54
5.3.9	<i>Videre separasjon av fraksjon B7.5</i>	56
5.3.10	<i>Videre separasjon av fraksjon B10</i>	57
5.3.11	<i>Videre separasjon av fraksjon E4</i>	59
5.3.12	<i>Videre separasjon av fraksjon E4.2 – E4.4</i>	60
5.3.13	<i>Videre separasjon av fraksjon E5</i>	62
5.3.14	<i>Videre separasjon av fraksjon E8</i>	64
5.3.15	<i>Videre separasjon av fraksjon E8.1 – E8.3</i>	65
5.3.16	<i>Videre separasjon av fraksjon E8.1-3B – E8.1-3D</i>	66
6.	RESULTATER OG DISKUSJON	67
6.1	EKSTRAKSJON AV PLANTEMATERIALE	67
6.1.1	<i>Utbytte av råekstrakt</i>	67
6.1.2	<i>NMR-spektroskopi</i>	68
6.1.3	<i>Bioassay</i>	68
6.1.4	<i>Videre arbeid</i>	70
6.2	FRAKSJONERING AV DIKLORMETANR�EKSTRAKTET	71
6.2.1	<i>VersaFlash kolonneseparasjon</i>	71
6.2.2	<i>NMR-spektroskopi</i>	72
6.3	FRAKSJONERING AV METANOLRÅEKSTRAKTET	73
6.3.1	<i>V�eske-v�eske ekstraksjon</i>	73
6.3.2	<i>NMR-spektroskopi</i>	74
6.3.3	<i>Bioassay</i>	75
6.3.4	<i>Videre arbeid</i>	78
6.4	FRAKSJONERING AV BUTANOL-FASEN AV METANOLRÅEKSTRAKTET	78
6.4.1	<i>Sephadex LH-20 kolonneseparasjon</i>	78
6.4.2	<i>NMR-spektroskopi</i>	79
6.4.3	<i>Bioassay</i>	81
6.4.4	<i>Videre arbeid</i>	81

6.5	FRAKSJONERING AV ETYLACETAT-FASEN AV METANOLRÅEKSTRAKTET	82
6.5.1	<i>Sephadex LH-20 kolonneseparasjon</i>	82
6.5.2	<i>NMR-spektroskopi</i>	83
6.5.3	<i>Bioassay</i>	84
6.5.4	<i>Videre arbeid</i>	85
6.6	VIDERE SEPARASJON AV FRAKSJON B3.....	85
6.6.1	<i>VersaFlash kolonneseparasjon</i>	85
6.6.2	<i>NMR-spektroskopi</i>	86
6.6.3	<i>Shikimisyre</i>	87
6.6.4	<i>Bioassay</i>	88
6.7	VIDERE SEPARASJON AV FRAKSJON B7.....	89
6.7.1	<i>VersaFlash kolonneseparasjon</i>	89
6.7.2	<i>NMR-spektroskopi</i>	90
6.7.3	<i>Videre arbeid</i>	91
6.8	VIDERE SEPARASJON AV FRAKSJON B7.5.....	91
6.8.1	<i>UV-spektroskopi</i>	91
6.8.2	<i>Preparativ HPLC</i>	92
6.8.3	<i>NMR-spektroskopi</i>	93
6.8.4	<i>Rutin</i>	94
6.8.5	<i>Narcissin</i>	95
6.8.6	<i>Bioassay</i>	96
6.9	VIDERE SEPARASJON AV FRAKSJON B10.....	98
6.9.1	<i>VersaFlash kolonneseparasjon</i>	98
6.9.2	<i>NMR-spektroskopi</i>	98
6.9.3	<i>Corilagin</i>	99
6.9.4	<i>Bioassay</i>	100
6.10	VIDERE SEPARASJON AV FRAKSJON E4	101
6.10.1	<i>VersaFlash kolonnekromatografi</i>	101
6.10.2	<i>NMR-spektroskopi</i>	102
6.10.3	<i>Videre arbeid</i>	102
6.11	VIDERE SEPARASJON AV FRAKSJON E4.2 – E4.4	102
6.11.1	<i>MCI gel CHP20P kolonnekromatografi</i>	102
6.11.2	<i>NMR-spektroskopi</i>	103
6.11.3	<i>Chebulinsyre trimetylester</i>	104
6.11.4	<i>Bioassay</i>	104

6.12	VIDERE SEPARASJON AV FRAKSJON E5	106
6.12.1	<i>VersaFlash kolonnekromatografi</i>	106
6.12.2	<i>NMR-spektroskopi</i>	106
6.12.3	<i>Metylgallat</i>	107
6.12.4	<i>Bioassay</i>	108
6.13	VIDERE SEPARASJON AV FRAKSJON E8	109
6.13.1	<i>VersaFlash kolonnekromatografi</i>	109
6.13.2	<i>NMR-spektroskopi</i>	110
6.13.3	<i>Videre arbeid</i>	111
6.14	VIDERE SEPARASJON AV FRAKSJON E8.1 – E8.3	111
6.14.1	<i>MCI gel CHP20P kolonneseparasjon</i>	111
6.14.2	<i>NMR-spektroskopi</i>	112
6.14.3	<i>Videre arbeid</i>	112
6.15	VIDERE SEPARASJON AV FRAKSJON E8.1-3B – E8.1-3D	112
6.15.1	<i>MCI gel CHP20P kolonneseparasjon</i>	112
6.15.2	<i>NMR-spektroskopi</i>	113
7.	ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER.....	115
7.1	ETNOFARMAKOLOGI.....	115
7.2	MALI.....	116
7.3	TRADISJONELL MEDISIN I MALI	117
7.3.1	<i>Improved Traditional Medicines (ITM)</i>	118
7.4	FELTARBEID	119
7.4.1	<i>Intervjuer i Siby-området</i>	120
7.4.2	<i>Intervjuer i Bandiagara-området</i>	125
7.4.3	<i>Intervjuer i Dioila-området</i>	126
7.5	FORKLARINGER TIL TABELLENE.....	133
7.6	FORKLARING AV MEDISINSKE TERMER	134
7.7	OPPSUMMERING AV RESULTATER FRA HEALERINTERVJUER.....	134
8.	KONKLUSJON.....	139
8.1	FORSLAG TIL VIDERE ARBEID.....	140
9.	VEDLEGG.....	141
9.1	FLYTSKJEMA.....	141
9.1.1	<i>Flytskjema 1</i>	141
9.1.2	<i>Flytskjema 2</i>	142

9.1.3	<i>Flytskjema 3</i>	143
9.1.4	<i>Flytskjema 4</i>	144
9.1.5	<i>Flytskjema 5</i>	145
9.1.6	<i>Flytskjema 6</i>	145
9.1.7	<i>Flytskjema 7</i>	146
9.2	NMR-SPEKTRA.....	147
KILDELISTE.....		162

1. Sammendrag

Blader fra den vest-afrikanske planten *Terminalia macroptera* ble ekstrahert suksessivt med diklormetan og metanol. Disse utgjorde råekstraktene, som var utgangspunkt for videre separasjon og fraksjonering ved hjelp av væske-væske ekstraksjon, kolonnekromatografi og tynnsjiktskromatografi. De isolerte forbindelsene ble strukturoppklart ved ^1H -, ^{13}C -, APT- og COSY NMR-spektroskopi.

Shikimisyre, flavonoidglykosidene rutin og narcissin, og ellagitanninet corilagin ble isolert fra butanol-fasen av metanolråekstraktet. Fra etylacetat-fasen av metanolråekstraktet ble metylgallat og chebulinsyre trimetylester identifisert og strukturoppklart. Chebulinsyre trimetylester er ikke rapportert i litteraturen tidligere og er derfor et nytt stoff. De tidligere kjente stoffene er ikke tidligere rapportert i blader *T. macroptera*.

Råekstraktene, utvalgte mellomfraksjoner og de isolerte forbindelsene ble testet for radikalscavengeraktivitet overfor radikalet DPPH. I tillegg ble de testet for hemming av xantin oksidase (XO) fra kumelk med hypoxantin som substrat. 15-lipoksygenasehemming ble utført på butanol- og etylacetat-fasen av metanolråekstraktet.

De semipolare råekstraktene viste seg å ha høyere radikalscavengeraktivitet enn de polare ekstraktene. Etylacetat- og butanol-fasen av metanolråekstraktet hadde høyest aktivitet, mens det upolare diklormetanråekstraktet var tilnærmet inaktivt. Den samme trenden ble sett ved xantin oksidasehemming. Alle renstoffene unntatt shikimisyre viste radikalscavengende aktivitet.

I den etnofarmakologiske studien beskrevet i del 2, ble totalt 78 healere fra tre forskjellige geografiske områder intervjuet om sin bruk av planten *Terminalia macroptera*. 86 % av healerne brukte planten i sin praksis, og de hyppigst nevnte indikasjonsområdene var sår, infeksjoner, smerte, hoste og tuberkulose. Rot og stammebark var de mest anvendte plantedelene, men dette varierte i forhold til ulike geografiske områder. Plantematerialet ble ofte

tilbredt i form av et dekokt, som i de fleste tilfeller skulle drikkes, brukes til dampbad eller appliseres lokalt på de områdene som skulle behandles.

2. Forkortelser

Forkortelse	Fullstendig betegnelse
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
APT	Attached Proton Test
BuOH	Butanol
CA	Chemical Abstract
COSY	Correlation Spectroscopy
COX	Cyklooksygenase
DMT	Department of Traditional Medicine
DMSO	Dimetylsulfoksid
EtOAc	Etylacetat
HETCOR	Heteronuclear shift Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
H	Hydrogen
HETE	Hydroksyeikosatetraensyrer
OH	Hydroksylgruppe
HPETE	Hydroperoksyekosatetraensyrer
ITM	Improved Traditional Medicines
C	Karbon
Kons.	Konsentrasjon
IC50	Konsentrasjonen som gir 50 % radikalscavenging eller 50 % hemming
LO	Lipoksygenase
LDL	Low Density Lipoprotein
Me	Metylgruppe
MeOH	Metanol
INRSP	National Institute for Research in Public Health
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NO	Nitrogen
NMR	Nukleær Magnetisk Resonans
ppm	parts per million
ROS	Reaktive Oksygen Species
RP	Reverse Phase
Si-OH	Silanol
SD	Standardavvik
<i>T. macroptera</i>	<i>Terminalia macroptera</i>
TMS	Tetrametylsilan
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	Ultrafiolett
XO	Xantin oksidase

3. Hensikt med oppgaven

Hensikten med oppgaven var å isolere og identifisere aktuelle innholdsstoffer i den maliske planten *Terminalia macroptera* og studere effekter av planteekstrakter og isolerte renstoffer i utvalgte bioaktivitetstester. I tillegg skulle det samles inn informasjon om medisinsk bruk av planten under feltarbeid i Mali.

Del I

Kjemiske og biokjemiske studier av
den maliske medisinsplanter

Terminalia macroptera

4. Bakgrunn

4.1 *Terminalia macroptera*

4.1.1 Taksonomisk klassifisering

Terminalia macroptera Guill. & Perr. tilhører familien Combretaceae. Fullstendig systematikk for planten er gitt under (ITIS 1999; Tropicos 2009)

Rike:	Plantae (planteriket)
Subrike:	Tracheophyta (karplanter)
Divisjon:	Magnoliophyta (blomsterplanter, dekkfrøet)
Klasse:	Magnoliopsida (tofrøbladet)
Subklasse:	Rosidae (roseplanter)
Orden:	Myrtales
Familie:	Combretaceae
Slekt:	<i>Terminalia</i>
Art:	<i>Macroptera</i>

Synonym: *Terminalia chevalieri* Diels (Arbonnier 2004), *Terminalia suberosa* Chev., *Terminalia adamauensis* Engl., *Terminalia elliotii* Engl. og Diels, *Terminalia dawei* Rolfe (Maydell 1990).

4.1.2 Lokale navn

- **Fransk:** Badamier du Senegal.
- **Mali:** Bosokugo, woloba, wolo, horo, uolo musso, kulahi, bodévi, bodeyi, mango figué (Aluka 1985).
- **Guinea-Bissau:** Bodé (Silva et al. 1996)

4.1.3 Botaniske forhold

Terminalia macroptera er et tre som kan bli opptil 20 meter høyt, men er vanligvis noe lavere, ca. 10-12 meter. Det har tykk trestamme, opptil 1 meter i diameter. Barken er brunsort med dype sprekker og risper og er brun på yttersiden og mer eller mindre oransje under. Stammen er glatt og grå-brun, med bark som blir korkaktig ved aldring. Bladene er vekselstilte, spiralformede, 15-35 cm lange og 6-16 cm brede, og er vanligvis stilkløse og hårløse, snever omvendt eggformet eller elliptisk (2,5-3,5 ganger lenger enn bredden). Bladet er mer eller mindre læraktig, svakt tilspisset på toppen og smalt i starten, med to kjertler på starten av midtribben på den nedre overflaten. Bladstilken er vanligvis kort, høyst 1,8 cm lang. Nervene er fjærformet, med 20-25 par av sidenerver, og bortimot vinkelrett med midtribben. Blomstring skjer under andre halvdel av tørketiden, ofte rett etter at de første bladene er å se på treet. Dette medfører en pigg-liknende, 8-20 cm lang aksillær klase (raceme), som er hårløs til dunhåret. Blomstene er kronløse og begeret er fem-lappet. Blomsten er gul-hvit og mer eller mindre dunhåret ved basen. Frukten er hårløs. Det er en avlang til elliptisk vingefrukt som er omtrent 2,5 ganger lenger enn bredden, 8-10 cm lang og 2,5-4 cm på tvers. Den har en separat vinge rundt frøet, stump-beskåret på toppen og kileformet ved basen. Moden frukt er brun og henger lenge på treet. Frøene er spindelformet (Arbonnier 2004).



Figur 4-1: Bilde av T. macroptera fotografert av forfatter ved DMT, Bamako, Mali november 2008



Figur 4-2: Bilde av T. macroptera blad fotografert av forfatteren

4.1.4 Habitat

T. macroptera er et tre som forekommer i store deler av vest-afrika, fra Senegal til Kamerun, og så langt som inn til Sudan. Det er ganske alminnelig og vokser spredt i naturen. Treet er varmekjært og trives i Guineanske og Sudan-Guineanske savanner (Arbonnier 2004). Gjerne i relativt fuktige områder, som i lavlandet hvor vannet er dårlig uttappet etter regntida, hvilket gir en leireaktig konsistens på jorda.

4.1.5 Tradisjonell bruk

T. macroptera er en plante med flere ulike anvendelsesområder i områdene hvor den vokser. I Mali er bomullsstoff, farget gult eller okergult med *T. macroptera* og *Anogeissus leiocarpa*, brukt til å kle nyomskjærte gutter og jenter på grunn av dets antimikrobielle aktivitet (Grubben 2004). Det er også rapportert om tømmerbruk, og bruk som ved og trekull (Maydell 1990; Arbonnier 2004).

Som medisinplante brukes *T. macroptera* ved mange ulike indikasjoner, blant annet brukes dekokt av rot mot infeksjonssykdommer i mange vest-afrikanske land. Medisinplanten er å finne i store marked i Guinea-Bissau, og er rapportert av alle forespurte tradisjonelle healere å være et effektivt anti-infeksjonsmiddel (Silva et al. 2002). Vanlige infeksjonssykdommer hvor *T. macroptera* brukes er hepatitt, gonoré og andre kjønnsykdommer (Silva et al. 2000). I følge etnobotaniske studier utført i Senegal og Burkina Faso, er *T. macroptera* (bark og rot) blant de medisinplantene som benyttes i behandling av malaria (Sanon et al. 2003; Benoit-Vical et al. 2008).

Dekokt av blader brukes til behandling av hepatitt, ringorm og hudsykdommer (Maydell 1990). I tillegg brukes bladene ved gastritt, kolikk og høyt blodtrykk, feber, brennkopper, spedalskhet og tuberkulose (Arbonnier 2004). Røttene brukes som styrkedrikk og blodstillende, som diuretika og afrodisiakum. Tretthet, depresjon, hoste, gulsott, syfilis, stivhet, urinveisinfeksjon, albuminuri, epilepsi og sterilitet er andre indikasjoner som er oppgitt. Rotbarken skal være hemostatisk og helende, som benyttes ved sår, slangebitt,

4. BAKGRUNN

konjunktivitt, diaré og dysenteri, samt hemorroider. Stammebarken brukes mot kolikk, gingivitt og tannrâte (Arbonnier 2004).

4.1.6 Tidligere funn/forskning

Terminalia macroptera er en plante som først ble vitenskapelig forsket på for omtrent 20-30 år siden. Det har derfor blitt gjort forholdsvis lite arbeid på planten. Blomstene ble først studert, men i de senere år har det blitt forsket på både rot, bark og blader. Noen innholdsstoffer er identifisert og strukturoppklart, og biologisk effekt er påvist, men flere studier kreves.

4.1.6.1 Identifiserte innholdsstoffer

Under følger en oversikt over forbindelser som er tidligere isolert fra *T. macroptera*, gruppert etter kjemisk stoffgruppe de tilhører. I tillegg er det angitt hvilken del av planten forbindelsen har blitt isolert fra.

Kjemisk stoffgruppe	Forbindelse	Plantedel	Kilde
Mono-C-Glucosyl flavonoider	Orientin	Blomst	(Nongonierma et al. 1987)
	Isoorientin	Blomst	(Nongonierma et al. 1987)
		Blad	(Silva et al. 2002)
	Vitexin	Blomst	(Nongonierma et al. 1988)
	Isovitexin	Blomst	(Nongonierma et al. 1988)
Triterpener	Arjungenin	Bark	(Conrad et al. 1998)
	Sericsyre	Bark	(Conrad et al. 1998)
	Arjunsyre	Bark	(Conrad et al. 1998)
	Terminolsyre	Bark	(Conrad et al. 1998)
	Arjunglykosid 1	Bark	(Conrad et al. 1998)

	Sericosid	Bark	(Conrad et al. 1998)
Triterpenestere	23-galloylarjunolsyre	Bark	(Conrad et al. 1998)
	23-galloylarjunolsyre 28-O- β - D-glykopyranosyl ester	Bark	(Conrad et al. 1998)
	24-deoksysericosid	Bark	(Conrad et al. 2001)
	Chebulosid II	Bark	(Conrad et al. 2001)
Ellagitanniner og byggesteiner	Ellagsyre	Rot	(Silva et al. 2000)
		Blad	(Conrad et al. 2001)
	Gallesyre	Rot	(Silva et al. 2000)
		Blad	(Conrad et al. 2001)
	Punicalagin	Rot	(Silva et al. 2000)
		Blad	(Silva et al. 2002)
	Punicacortein C	Bark	(Conrad et al. 2001)
	Terchebulin	Rot	(Silva et al. 2000)
	Terflavin A	Rot	(Silva et al. 2000)
		Blad	(Conrad et al. 2001)
		Bark	(Conrad et al. 2001)
	Terflavin B	Bark	(Conrad et al. 2001)
	3,3'-di-O-metylellagsyre	Rot	(Silva et al. 2000)
	3,3',4,4'-tetra-O-metylellagsyre	Rot	(Silva et al. 2000)
3,3',4,4'-tri-O-metylellagsyre	Bark	(Conrad et al. 2001)	
2-O-galloyl-punicalin	Bark	(Conrad et al. 2001)	
Hydrolyserbare tanniner	Isoterchebulin	Bark	(Conrad et al. 2001)
	4,6-(S)-O-isoterchebuloyl- D-glukose	Bark	(Conrad et al. 2001)
	Chebulaginsyre	Blad	(Conrad et al. 2001)
	Chebulininsyre	Blad	(Conrad et al. 2001)

4. BAKGRUNN

	2,3-O-(S)-heksahydroksy- difenoyl-D-glukose	Bark	(Conrad et al. 2001)
Flavonoid	Quercetin	Blad	(Conrad et al. 2001)
Kaffeolester	Klorogensyre	Blad	(Conrad et al. 2001)
Fenolisk glykosid	Vaniljesyre 4-O- β -D- (6'-O-galloyl) glykopyranosid	Bark	(Conrad et al. 2001)

4.1.6.2 Biologisk aktivitet

Antibakteriell aktivitet

Enteropatoogene mikroorganismer er årsak til mange tarmsykdommer, som er en betydelig helsetrussel i mange afrikanske land. I Guinea-Bissau og andre vest-afrikanske land benyttes medisinerplanter som *T. macroptera* til behandling av diaré, dysenteri og andre infeksjonssykdommer.

Etanolekstrakt av *T. macroptera* avbarket rot viste antibakteriell aktivitet overfor stammer av *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae* og *Campylobacter* sp. Ekstraktets aktivitet mot *Campylobacter* stammene ble sammenlignet med en rekke antibiotika. Aktiviteten viste seg å være lik co-trimoxazol, høyere enn sulfametoxazol, men lavere enn tetracyclin, erytromycin, ampicillin og streptomycin (Silva et al. 1997).

Triterpenestere isolert fra *T. macroptera* rot viste i bioassay å ha en antibakteriell aktivitet overfor *Bacillus subtilis* og *Pseudomonas fluorescens* (Conrad et al. 1998).

Tanniner isolert fra *T. macroptera* bark viste også i bioassay å ha en antibakteriell aktivitet overfor *Bacillus subtilis* (Conrad et al. 2001).

I tillegg viste 3,3',4'-tri-O-metyllagsyre, 24-deoksysericosid og chebulosid II, isolert fra *T. macroptera* bark, å ha antibakteriell aktivitet overfor *Bacillus subtilis* (Conrad et al. 2001).

Anthelmintisk aktivitet

Triperpener isolert fra *T. macroptera* bark er vist i bioassay å være aktiv i hemming av rundormen *Caenorhabditis elegans* (Conrad et al. 1998).

Det hydrolyserbare tanninet isoterchebulin, isolert fra *T. macroptera* bark, viste seg å ha hemningsaktivitet mot *Caenorhabditis elegans* (Conrad et al. 2001; Kraus et al. 2002).

Hemolytisk aktivitet

Triperpener isolert fra *T. macroptera* bark er vist i bioassay å gi en hemolytisk aktivitet overfor fersk blod av gris (Conrad et al. 1998).

24-deoksysericosid og chebulosid II isolert fra *T. macroptera* bark har vist hemolytiske egenskaper (Conrad et al. 2001).

Antiplasmodial aktivitet

Malaria er en endemisk sykdom som rammer mange millioner mennesker årlig, spesielt utviklingslandene. Hvert år dør 2-3 millioner mennesker som følge av infeksjonssykdommen, som forårsakes av protozoparasittene i familien *Plasmodium*. *T. macroptera* er en av de nevnte medisinplantene som benyttes av tradisjonelle healere i Burkina Faso mot nettopp dette.

Vandig ekstrakt av *T. macroptera* viste in vitro antiplasmodial aktivitet mot en klorokin-resistent stamme av *Plasmodium falciparum*, med en IC₅₀-verdi på 1 µg/ml. Det spekuleres om det er saponiner som er de aktive forbindelsene ansvarlig for denne effekten (Sanon et al. 2003).

Molluskicid aktivitet

Det hydrolyserbare tanninet isoterchebulin, isolert fra *T. macroptera* bark viste seg å ha hemningsaktivitet mot sneglen *Biomphalaria glabrata* (Conrad et al. 2001; Kraus et al. 2002). Denne sneglen er mellomvert for *Schistosoma*-arter, som gir schistosomiasis.

Cytotoksisk aktivitet

Tanninene 2,3-O-(S)-heksahydroksydifenoyl-D-glucose og puniacortein C isolert fra *T. macroptera* bark var toksisk mot cellelinje 5637 (human primær blære carcinoma) (Conrad et al. 2001).

Antifungal aktivitet

Triperpener isolert fra *T. macroptera* bark er vist i bioassay å ha en antifungal aktivitet overfor *Cladosporium cucumerinum* (Conrad et al. 1998)

Hydroetanolekstrakt av *T. macroptera* blad, stammebark og rot, uavhengig av hverandre, viste antifungal aktivitet overfor ulike stammer av gjærsopp og filamentøs sopp, da spesielt av typen dermatofytter (Batawila et al. 2005).

Anti-Neisseria gonorrhoeae aktivitet

Neisseria gonorrhoeae er en bakterie som forårsaker gonoré-infeksjon. På grunn av høy frekvens av infeksjonen og økende antimikrobiell resistens, spesielt mot penicillin og tetracyclin, er dette et stort helseproblem i Afrika. Rot av *T. macroptera* har tradisjonelt blitt brukt til å behandle gonoré.

Både etanolekstrakt av *T. macroptera* rot (Silva et al. 1997) og etanolekstrakt av *T. macroptera* blad viste in vitro aktivitet mot stammer av *N. gonorrhoeae*. (Silva et al. 2002).

4.2 Antioksidanter og frie radikaler

4.2.1 Antioksidanter

En antioksidant er enhver substans som forsinker eller signifikant hindrer oksidasjonen av et oksiderbart substrat når antioksidanten foreligger i vesentlig lavere konsentrasjon enn det oksiderbare substratet (Halliwell 2005). Eksempler på oksiderbare substrater er karbohydrater, fettsyrer, proteiner og DNA. Antioksidantenes funksjon er å beskytte kroppen mot frie radikaler og skadelige oksygenforbindelser. Dette gjøres for eksempel ved å hemme genereringen av ROS, direkte fange opp frie radikaler eller ved å øke nivået av endogent antioksidantforsvar (Halliwell et al. 1995).

4.2.2 Frie radikaler og reaktive oksygen species (ROS)

Et fritt radikal er et atom med ett eller flere uparede elektroner som har evnen til å eksistere uavhengig. Radikalenes unike kjemiske struktur medfører at de vanligvis er ustabile, har kort halveringstid og er svært reaktive (Halliwell 2005).

Reaktive oksygen species (ROS) omfatter både oksygensentrerte radikaler og ikke-radikale derivater av oksygen.

4.2.3 Dannelse av frie radikaler og ROS

Frie radikaler og andre oksygenforbindelser kan dannes som et resultat av en normal oksidativ metabolisme. I tillegg til at de gir skadelige virkninger, er de også viktige signalmolekyler og har betydning i kroppens forsvar mot blant annet bakterielle infeksjoner.

4.2.4 Antioksidantforsvar

På grunn av skadene som ROS kan medføre, har kroppen utviklet en rekke forsvarsmekanismer. Antioksidantforsvaret, som utgjøres av en rekke enzymatiske og ikke-enzymatiske komponenter, kan forebygge dannelse av frie radikaler, nøytralisere eller fjerne

dem, reparere oksidative skader eller kompleksbinde metallioner slik at de ikke katalyserer autooksidasjonsreaksjoner (Halliwell og Gutteridge 2007).

4.2.5 Oksidativt stress

Oksidativt stress oppstår når kroppens antioksidantforsvar ikke lenger klarer å fjerne frie radikaler og ROS. Dette kan skyldes et lavt nivå av antioksidanter eller en overproduksjon av ROS (Halliwell og Gutteridge 2007).

4.2.6 Lipidperoksidering

Lipidperoksidering er definert som oksidativ degradering av flerumettede fettsyrer (Halliwell og Gutteridge 2007). Lipidperoksidering kan enten skje enzymatisk eller ikke-enzymatisk.

Enzymatisk lipidperoksidering fungerer som en kontrollert peroksidering av fettsyresubstrat til stereospesifikke hydroperoksider og endoperoksider.

Ikke-enzymatisk lipidperoksidering begynner med at et fritt radikal fjerner et hydrogenatom fra en metylengruppe mellom to dobbeltbindinger i en fettsyrekjede, og det dannes et fettsyre radikal. Dette kan så addere oksygen og danne et peroksyldradikal, som igjen vil reagere videre.

4.2.7 Patologisk betydning

Oksidativ skade har betydning ved sykdom da vevsskade fører vanligvis til økt produksjon av ROS og oksidativt stress. Sykdommer som ofte assosieres med oksidativt stress er aterosklerose, kreft, reumatoid artritt, Alzheimers sykdom m.m. Det er imidlertid uklart om oksidativt stress er årsak til at sykdom oppstår (Halliwell 2005; Thomson 2007).

4.3 Arakidonsyremetabolisme og 15-lipoksygenase

Eikosanoider er derivater av C20- flerumettede fettsyrer som stammer fra arakidonsyre (5Z, 8Z, 11Z 14Z-eikosatetraensyre) og består av prostaglandiner, tromboksaner, prostacykliner, leukotriener, lipoksiner, hydroperoksyeikosatetraensyrer (HPETE) og hydroksyeikosatetraensyrer (HETE) (Samuelsson 2004). De deltar i en rekke fysiologiske prosesser og anses for å være blant de viktigste mediatorene i inflammasjonsprosessen (Rang et al. 1999).

Eikosanoidene er ikke lagret i vev, men dannes ved at arakidonsyre frigis fra fosfolipider i cellemembranen og reagerer videre i flere enzymkatalyserte reaksjoner. Frisetting av arakidonsyre kan skje på tre måter:

- Ved hjelp av fosfolipase A2
- Ved hjelp av fosfolipase C etterfulgt av diacylglycerol lipase
- Ved hjelp av fosfolipase D etterfulgt av fosfolipase A2

Denne frigjøringen skjer som en reaksjon på ulike stimuli og er avhengig av celletype (Rang et al. 1999).

Den frie arakidonsyren blir så omdannet videre via ulike enzymer til de forskjellige eikosanoidene. Omdanning til prostaglandiner, prostacyklin og tromboksaner skjer ved hjelp av COX-1 eller COX-2, mens omdanning til leukotriener og lipoksiner skjer via ulike lipoksygenaser (5-LO, 12-LO eller 15-LO) (Rang et al. 1999).

5-LO er den viktigste av lipoksygenasene, og er det første enzymet i biosyntesen av leukotrienene. 15-LO har evnen til å kunne oksidere forestrede fettsyrer i biologiske membraner og i LDL, dette er et viktig trinn i dannelsen av aterosklerotiske lesjoner. Forskning har vist at 15-LO kan spille en viktig rolle i utviklingen av sykdommer som cancer, psoriasis og aterosklerose (Schneider og Bucar 2005).

5. Eksperimentelt

5.1 Materialer

5.1.1 Kjemikalier

Oversikt over kjemikalier	Produsent
Aceton purum	Chemi-Teknik AS, Oslo, Norge
Aceton-d6	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Boratbuffer (0,2 M natriumborat, pH 9)	Farmasøytisk Institutt Oslo, Norge
1-butanol	Fluka Chemie, Buchs, Sveits
n-butylacetat	BDH Chemicals Ltd. Poole, England
Cerium (IV) sulfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Destillert vann	Farmasøytisk Institutt Oslo, Norge
DPPH (difenylpikrylhydrazyl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Diklormetan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Tyskland
d-Kloroform (CDCl ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
d-Metanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
di-Natrium-hydrogenfosfat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Eddiksyre	VWR International, Oslo, Norge
Etylacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Gallesyre	Avdeling for farmasøytisk kjemi
Hypoxantin (6-Hydroxypurine)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumdihydrogenfosfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Linolsyre	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Lipoxidase type 1-B fra soyabønne	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MCI gel CHP20P	Supelco, Bellefonte, USA
Metanol HiPerSolv Chromanorm for HPLC	VWR Prolabo, Darmstadt, Tyskland
Metanol purum	Chemi-Teknik AS, Oslo, Norge
N ₂ -gass	AGA, Oslo, Norge
Rutin	Avdeling for farmasøytisk kjemi
Sephadex LH20	Pharmacia Biotech, Uppsala, Sverige
Svovelsyre 98 %	VWR International, Frankrike
Tetrametylsilan (TMS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Tungtvann (D ₂ O)	Aldrich, Milwaukee, USA
Xanthine Oxidase fra kumelk	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

5.1.2 Apparatur

Apparatur	Produsent
<i>Analytisk tynnsjiktskromatografi (TLC)</i>	
Kiesel gel 60 F254, aluminiumsplater	Merck, Darmstadt, Tyskland
Silika gel 60 F254, glassplater	Merck, Darmstadt, Tyskland
RP-18 F254 S. aluminiumsplater	Merck, Darmstadt, Tyskland
End-to-end pipetter, 10 µl	Modulohm, Herlev, Danmark
Elueringskar, glass	Camag, Muttenz, Sveits
TLC-sprayer GW-1	Merck, Darmstadt, Tyskland
<i>Automatpipetter</i>	
Finnpipette	Labsystems, Helsinki, Finland
Nichiryo modell 8100	Nichiryo, Tokyo, Japan
Transferpettor	Brand, Wertheim, Tyskland
<i>Filter</i>	
Whatman, diverse størrelser	Whatman, Maidstone, England
Whatman faseseparasjonspapir	Whatman, Maidstone, England
Millex sprøytefilter	Millipore, MA, USA
<i>HLPC</i>	
Varian Prostar Pumpe modell 210	
Detektor Prep 9 x 1 mm Preparativ kolonne: Varian dynamax 250 x 21,4 mm microsorb mv 60-8 C18 Varian 1002 TLL 2,5 ml sprøyte	Varian, Walnut Creek, CA, USA
<i>Kolonnekromatografi</i>	
VersaFlash kolonneholder	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Buchi 681 kromatografi pumpe	Buchi, Flawil, Sveits
Versapak silikakolonne	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Versapak C18 kolonne	Supelco, Bellefonte, PA, USA
The FMI LAB PUMP modell RP-G150	Fluid Metering Inc. New York, USA
<i>Magnettrører</i>	
RCT Basic	Janke & Kunkel, Staufen, Tyskland
<i>NMR</i>	

5. EKSPERIMENTELT

Varian Gemini 200	Varian, Palo Alto, CA, USA
Bruker DPX 300	Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Tyskland

Oljepumpe

Edwards E-Lab 2	Edwards High Vacuum Int., Sussex, England
-----------------	---

Rotavapor

Rotavapor- R med varmebad W-240	Büchi, Flawil, Sveits
Ilmvac 400171 vakuumpumpe	Ilmvac, Ilmenau, Tyskland

Ultralydbad

Bransonic 220	Branson Ultrasonics Corp., Geneve, Sveits
---------------	---

UV-spektroskopi

UV-spektrofotometer:	
Biochrom Libra S32 PC	Biochrom, Cambridge, England
Shimadzu UV 160A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Kyvetteholder:	
Shimadzu CPS-240A	
UV-lampe:	
Model UVSL-58 (254 og 366 nm)	Ultra Violet Products, San Gabriel, CA, USA
Kyvetter:	
Kvartskvytter	Starna, Essex, England

Varmeskap

Varmeovn Heracus	Heracus, Hahau, Tyskland
------------------	--------------------------

Vekt

Mettler PM4800 DeltaRange	Mettler-Toledo, Greifensee, Sveits
Sartorius model A200S	Sartorius, Göttingen, Tyskland
Sartorius model BP221S	Sartorius, Göttingen, Tyskland

5.2 Metoder

5.2.1 Generelle metoder

5.2.1.1 Vannkvalitet

Destillert vann ble benyttet til alle metoder.

5.2.1.2 Innveiging

Analysevekt eller overskålsvekt ble benyttet avhengig av mengde som skal veies.

5.2.1.3 Ekstraksjon med organiske løsemidler - Soxhlet

Prinsipp

Organisk ekstraksjon ble utført ved hjelp av Soxhletprinsippet, med heverteffekt. Det vil si at væske blir flyttet fra et høyereliggende reservoar til et lavereliggende reservoar uten behov for en pumpe. Det organiske løsemiddelet varmes opp i det lavtliggende reservoaret, fordampes, og kondenserer ved hjelp av en kjøler ned i det høytliggende reservoaret, som tømmer seg når hevertrøret er fullt. På denne måten kan dette systemet med plantematerialet i ei papphylse og det organiske løsemiddelet gå av seg selv uten videre behov for å skifte ut løsemiddelet (Glæserud 2008).

Reagenser

Diklormetan

Metanol

Utstyr

Soxhlet

Stor rundkolbe (5 L)

Varmemantel

Papphylse

Glassull

Kjøler med slanger koblet til en kran med kaldt springvann

Prosedyre

1. Papphylse fylles med pulverisert plantemateriale og settes i Soxhletapparatet.

5. EKSPERIMENTELT

2. Glassull legges på toppen av plantematerialet for å unngå at det flyter ut av papphylsen.
3. Soxhleten fylles med diklormetan slik at den blir full og tømmer seg. Deretter etterfylles ekstra diklormetan slik at systemet ikke går tørt (til sammen ca. 3,5 L).
4. Varmen slås av når løsemiddelet mister farge og ikke ekstraherer ut flere upolare stoffer.
5. Samme prosedyre gjentas med metanol (til sammen ca. 4 L) som løsemiddel.
6. Råekstraktene dampes inn til tørrhet med rotavapor og oljepumpe.
7. Gjenværende plantemateriale ble brukt til polysakkarid studier.



Figur 5-1: Ekstraksjon med organisk løsemiddel ved hjelp av Soxhlet-oppsett.

5.2.1.4 Inndamping

Prinsipp

Etter gjennomføring av hver separasjon ble løsningsmiddelet i de ulike fraksjoner dampet inn til tørrhet ved hjelp av en rotavapor. Denne bruker varme, rotasjon og vakuum til å dampe av løsningsmiddelet.

Utstyr

Rotavapor med vakuumpumpe og vannbad.

Prosedyre

Løsninger ble dampet inn på rotavapor ved 40-60 °C under vakuum.

5.2.1.5 Fjerning av løsemiddelrester

De siste løsemiddelrestene i ekstrakter, fraksjoner og krystaller ble fjernet ved hjelp av en oljevakuumpumpe (5-20 minutter).

5.2.1.6 Filtrering

Sprøyte-drevet filter, glassinterfilter eller filterpapir ble brukt avhengig av hvilken separasjonsmetode som anvendes.

5.2.2 Separasjonsmetoder

5.2.2.1 Væske-væske ekstraksjon

Prinsipp

Væske-væske ekstraksjon er en viktig metode for å separere eller isolere stoffer fra en væske. Metoden baserer seg på stoffers fordeling mellom to ikke-blandbare væsker. Den ene væsken er vanligvis en vandig løsning og den andre væsken er et organisk løsemiddel som ikke er blandbart med vann.

5. EKSPERIMENTELT

Når en vandig løsning som inneholder et organisk stoff A, rystes med et organisk løsemiddel, vil det raskt innstille seg en likevekt som kan beskrives av ligningen:



hvor A(aq) og A(org) beskriver hvordan A fordeles mellom vandig og organisk fase (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004). For å ekstrahere et stoff fra en vandig løsning benyttes et organisk løsemiddel med tilstrekkelig løsemiddelstyrke til å løse stoffet og med tilfredsstillende selektivitet til at uønskede komponenter i prøven ikke blir ekstrahert med. Den generelle regelen om at likt løser likt bør følges ved valg av løsemiddel. Har man et organisk stoff som er upolart, bør man bruke et upolart løsemiddel, og et polart løsemiddel for polare stoffer. I tillegg er tetthet og viskositet to faktorer som har betydning for den praktiske gjennomføringen av ekstraksjonen.

Reagenser

Destillert vann

Etylacetat

1-butanol

Utstyr

Skilletrakt

Stativ

Filter

Prosedyre

1. Råekstrakt ble suspendert i destillert vann og overført til skilletrakt.
2. Suspensjonen ble ekstrahert med løsninger av økende polaritet.
3. Etter hver tilsetning ble skilletrakten snudd opp ned flere ganger.
4. Etter faseseparasjon filtreres den organiske fasen over i forhåndsveide rundkolber.

5. Den organiske fasen dampes inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Etter ferdig separasjon dampes vannfasen inn på tilsvarende måte.

5.2.2.2 Kolonnekromatografi uten bruk av trykk

Prinsipp

Kolonnekromatografi er en teknikk som benyttes for å separere stoffer i blanding. Kolonnen inneholder en finfordelt stasjonær fase. Når en prøve appliseres på kolonnen og elueres med et passende elueringsmiddel, vil de ulike forbindelsene i prøven vandre nedover kolonnen med forskjellig hastighet på grunn av ulik grad av interaksjon med kolonnematerialet og eluenten, og de vil kunne separeres (Odlo 2003). Valg av elueringsmiddel gjøres ut fra hvilket stoff som skal separeres. Ofte benyttes en blanding av flere løsningsmidler som mobilfase, og elueringen kan enten skje isokratisk (samme mobilfase hele tiden) eller med en gradient (endring av mobilfasesammensetning underveis).

Sephadex LH-20

Sephadex LH-20 består av hydroksypropylert Sephadex G-25, som er en dekstran gel som lages ved tverrbinding av dekstrankjeder. Dette resulterer i et tredimensjonalt polysakkaridnettverk. Hydroksylpropylgruppene er bundet til glukoseenhetene i dekstrankjedene via eterbindinger (Pharmacia 1975). Dette medfører at gelen har både hydrofile og lipofile egenskaper. Prinsippet for separasjon av forbindelser med dette pakkematerialet kalles eksklusjonskromatografi. Dette innebærer at stoff separeres etter deres molekylstørrelse, forutsatt at det ikke er interaksjon mellom stoffene og stasjonærfasen. Stasjonærfasen består av porøse partikler med kontrollert porestørrelse (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004). Molekyler som er for store til å passere gjennom porene blir derfor ført gjennom kolonnen på utsiden av partiklene, med samme hastighet som mobilfasen, uten at stoffene separeres. Deretter kommer mindre molekyler, som har lengre vei gjennom kolonnen via porene, og til sist elueres de minste molekylene ut. I tillegg til dette spiller andre separasjonsprinsipper inn, blant annet fordi materialet har sterkt adsorptive egenskaper overfor aromatiske og sykliske forbindelser. (Pharmacia 1975). Disse egenskapene varierer med ulike eluenter.

5. EKSPERIMENTELT

Reagenser

Destillert vann

Metanol

Aceton

Utstyr

Sephadex LH-20 gel

Kolonne med ca. 800 ml volum (Indre diameter: 4,5 cm, høyde: 50 cm)

Stativ

Prøveglass

Prosedyre

1. Kolonnematriksen røres ut i ønsket starteluent og legges til svelling slik at det dannes en tykk slurry.
2. Kolonne monteres vertikalt på stativ.
3. Slurry-blandingen overføres til kolonnen. Det er viktig å påse at det ikke forekommer ujevnheter i pakkingen for å unngå ujevn strøm gjennom kolonnen.
4. Kolonnen skylles med starteluenten.
5. Ca. 30 g prøve løses i egnet løsemiddel/løsemiddelblanding (her: metanol:vann (25:75)) og appliseres på kolonnen. Prøven helles langs veggen på kolonnen, slik at den legger seg jevnt over kolonnematriksen.
6. Komponentene elueres ut ved hjelp av elueringsmidler med økende løsemiddelstyrke.
7. Fraksjonene samles opp med 60 ml i hvert prøveglass.
8. Kolonnen vaskes med egnet løsningsmiddel for å skylle ut eventuelle rester.



Figur 5-2: Bilde av Sephadex LH-20 med forfatteren.

MCI GEL® CHP20P

MCI gel CHP20P er en polyaromatisk adsorbent resin designet for biofarmasøytiske separasjoner, og brukes ofte for aromatiske forbindelser, peptider, steroider, desalting etc. Den separerer etter omvendt fase prinsippet beskrevet under avsnitt 5.2.2.3 Kolonnekromatografi med forhøyet trykk – VersaFlash s. 24. Kolonnematriksen består av styren og divinylbenzen, og partikkelstørrelsen er 75-150 μm (Supelco 2007).

Reagenser

Destillert vann

Metanol

Eddiksyre

Utstyr

MCI GEL® CHP20P

Kolonne med ca. 120 ml volum (Indre diameter: 2,5 cm høyde: 24 cm)

Glassull

Pumpe

Stativ

Prøveglass

Prosedyre

1. Kolonne monteres vertikalt på stativ.
2. Kolonnematriksen overføres til kolonnen. Det er viktig å påse at det ikke forekommer ujevnheter i pakkingen for å unngå ujevn strøm gjennom kolonnen.
3. Kolonnematerialet gjennomfuktes med starteluenten.
4. Prøven løses i egnet løsemiddel/løsemiddelblanding og appliseres på kolonnen. Prøven helles langs veggen på kolonnen, slik at den legger seg jevnt over kolonnematriksen.
5. Glassull legges på toppen av kolonnematriksen for å unngå virvling.
6. Komponentene elueres ut ved hjelp av elueringsmidler med økende løsemiddelstyrke.
7. Fraksjonene samles opp med 10-30 ml i hvert prøveglass.
8. Kolonnen vaskes med egnet løsningsmiddel for å skylle ut eventuelle rester.

5.2.2.3 Kolonnekromatografi med forhøyet trykk – VersaFlash

Prinsipp

Prinsippet for VersaFlash kolonnekromatografi er ganske likt som for kolonnekromatografi uten bruk av trykk, men på grunn av liten kornstørrelse i pakkematerialet er kolonnen koblet til en pumpe for å oppnå høy nok flythastighet av mobilfasen. I VersaFlash kolonnekromatografi benytter man seg av ferdigpakke VersaPak kolonner med polar eller upolar stasjonærfase. Prøveløsning blir applisert på kolonnen ved hjelp av en pumpe, og elueres med en passende mobilfase. Dersom retensjonen på stasjonærfasen er tilstrekkelig forskjellig, kan stoffer i prøveløsningen separeres og komme ut av kolonnen på forskjellige

tidspunkter. De ulike fraksjoner samles opp etter hvert som mobilfasen kommer ut fra kolonnen.

De to mest brukte kolonnematerialer:

- Normalfase-silika

Silika kalles også silikagel, kiselgel og porøst glass (Greibrokk et al. 1994), og er den viktigste stasjonærfasen i normalfasekromatografi. På overflaten av silika finnes silanolgrupper (Si-OH), som gjør overflaten svakt sur og polar. Det er disse som er de aktive gruppene ansvarlig for adsorpsjonsegenskapene. Når mobilfase strømmer gjennom silika, vil den fylle opp hele volumet mellom partiklene og hele porevolumet inni partiklene. På grunn av det porøse materialet som gir et stort overflateareal vil dette gi en enorm kontaktflate til mobilfasen. Dermed vil stoffmolekyler som transporteres av mobilfasen, eksponeres kraftig for de aktive gruppene på overflaten (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004). Stoffer vil adsorberes til silika primært via hydrogenbinding hvor overflatehydroksylene vanligvis vil være protondonorer. På grunn av den svakt sure overflaten vil aminer og andre baser bli sterkt adsorbert og dermed bli igjen på kolonnen lengst (Greibrokk et al. 1994). I normalfasekromatografi er mobilfasene organiske løsemidler.

- Omvendtfase C₁₈-bundet silika

I omvendtfase-kromatografi er det C₁₈ -materialer som er mest brukt som stasjonærfase. Denne typen stasjonærfase består av en hydrokarbonkjede med 18 karbonatomer, og er den mest hydrofobe fasen. De viktigste interaksjonene som finner sted mellom stoffer i prøven og stasjonærfasen, er av typen van der Waals-krefter, som er relativt svake krefter som øker med molekylstørrelsen. Polare interaksjoner er av liten betydning på grunn av det vandige system som motvirker slike interaksjoner (Greibrokk et al. 1994). Dette innebærer at det i hovedsak er størrelsen på den upolare del av molekylet som har noen effekt på retensjonen, noe som medfører at de mest polare stoffene vil få minst retensjon, og vil dermed komme først ut av kolonnen. Mobilfasen er typisk en blanding av vann og en organisk modifikator som er blandbar med vann, som for eksempel metanol.

5. EKSPERIMENTELT

Reagenser

Destillert vann

Metanol (ved normalfasekromatografi)

Diklormetan (ved omvendt-fase-kromatografi)

Etylacetat (ved omvendt-fase-kromatografi)

Aceton (til vasking av kolonnen)

Utstyr

VersaFlash-apparat med tilhørende utstyr

Versapak silikakolonne

Versapak C₁₈-kolonne

Prøveglass

Prosedyre

1. Kolonnen kondisjoneres med tre kolonnevolum (180 ml) av den første mobilfasen.
2. Prøven løses i et lite volum med egnet løsemiddel.
3. Prøveløsning filtreres for å fjerne partikler.
4. Prøveløsningen appliseres på kolonne.
5. Det elueres med mobilfase med økende løsemiddelstyrke i forhold til kolonnematerialet.
6. Fraksjoner samles opp i prøveglass (30 ml).
7. Kolonnen vaskes med aceton.

5.2.2.4 Høytrykksvæskekromatografi - HPLC

Prinsipp

Væskekromatografi (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) baserer seg på samme prinsipp som for kolonnekromatografi uten bruk av trykk, og med forhøyet trykk som VersaFlash. Metodene baserer seg på at mobilfase som er en væske, presses gjennom en kolonne pakket med et materiale som retarderer stoffene i prøveløsningen (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004). Det som skiller HPLC fra metoder som VersaFlash, er at den blir utført ved et mye høyere trykk på grunn av kolonnens fysiske egenskaper. En typisk HPLC-kolonne er et 10-25 cm langt stålrør pakket med stasjonærfase av 5 µm partikler. Små, runde og like store partikler er nødvendig for å få god separasjon, men vil medføre et mottrykk på 30-300 bar (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004). Pumpa må derfor være i stand til å pumpe mobilfasen med konstant hastighet mot et slikt høyt mottrykk. I tillegg blir stoffer som mobilfase bringer ut av en HPLC-kolonne, detektert med en detektor. UV-detektoren er det vanligste.

Separasjonsprinsippet er som regel enten normalfasekromatografi eller omvendtfasekromatografi, med henholdsvis normalfase-silika eller C₂-, C₈- og C₁₈-bundet silika som kolonnemateriale. Vanligst benyttes C₁₈-bundet silika. Prinsippet for separasjon på en C₁₈-kolonne er beskrevet under avsnitt 5.2.2.3 Kolonnekromatografi med forhøyet trykk – VersaFlash, s. 24. HPLC kan brukes både analytisk eller preparativt.

Reagenser

Destillert vann

Metanol av HPLC-kvalitet

Utstyr

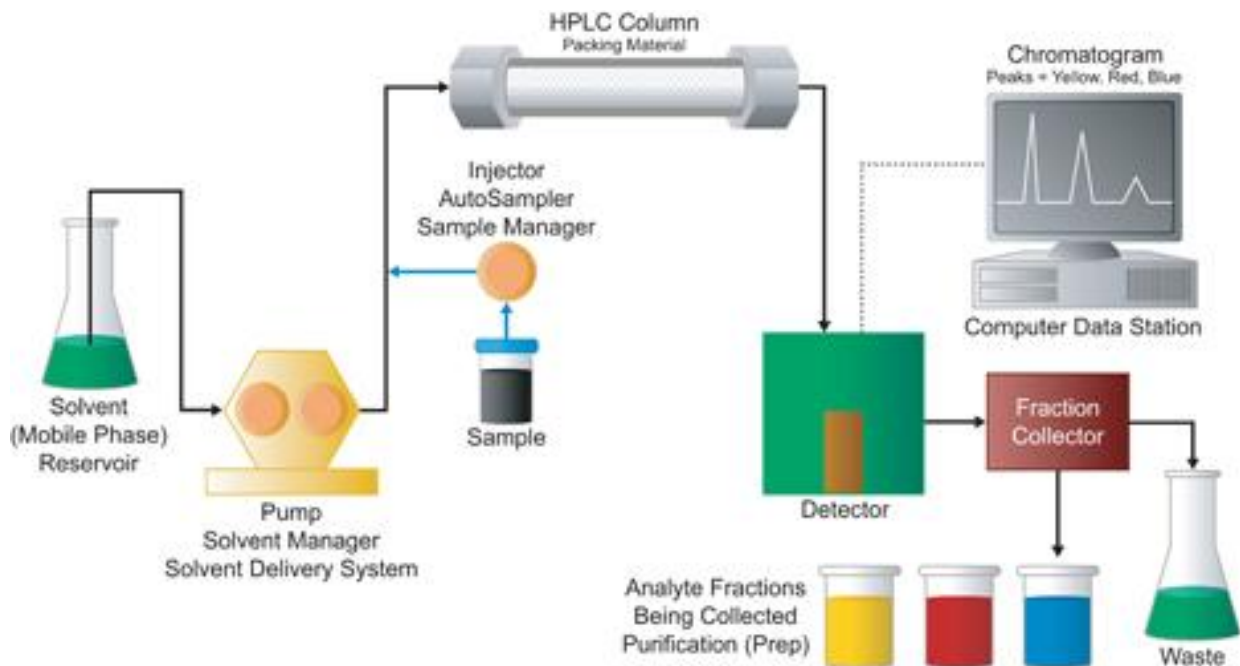
HPLC-apparat med tilhørende utstyr

Sprøyte-drevet filter

Prøveglass

Prosedyre for preparativ HPLC

1. Kolonnen kondisjoneres med egnet mobilfase i 30 minutter.
2. Prøven løses i egnet løsemiddel.
3. Prøveløsningen filtreres gjennom et spøyte-drevet filter for å fjerne partikler som potensielt kan tilstoppe kolonnen.
4. 1 ml av prøveløsningen injiseres via injeksjonsloopen.
5. Det elueres med mobilfase med økende løsemiddelstyrke i forhold til kolonnematerialet (gradienteluering).
6. Fraksjoner samles i prøveglass basert på detektorresponsen.



Figur 5-3: Preparativ HPLC system (Waters 2009).

5.2.3 Identifikasjonsmetoder

5.2.3.1 Analytisk tynnsjiktchromatografi (TLC)

Prinsipp

Tynnsjiktchromatografi (TLC) er en væskechromatografisk separasjonsmetode hvor stasjonærfasen er spredt som et tynt lag utover en plate av glass, plast eller metall (Greibrokk

et al. 1994). Prøvene løses i et egnet flyktig løsemiddel, og settes som flekker på platen parallelt med den ene kanten. Løsemiddelet dampes av og platen settes med påsetningskanten ned i et kar som inneholder mobilfasen og vanligvis en mettet atmosfære av den (tett lokk). Nivået av mobilfasen må være lavere enn avstanden mellom platekanten og de påsatte flekkene. Når platen kommer i kontakt med mobilfasen vil mobilfasen trekkes oppover platen ved hjelp av kapillærkrefter. Komponentene i prøvene vil dermed transporteres med forskjellig hastighet og bli separert. Når mobilfasen nærmer seg øvre platekant, tas platen ut av karet, væskefronten avmerkes og mobilfasen fordamper. De ulike stoffene detekteres enten visuelt eller instrumentelt (Greibrokk et al. 1994). Fargede stoffer er umiddelbart synlige, og stoffer som absorberer UV-lys eller som fluorescerer, kan påvises ved å bestråle platen med lys fra en UV-lampe. Platen kan også sprayes med reagenser, som reagerer med stoffene og danner fargede forbindelser (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004). Et eksempel på slikt reagens, er ceric reagens, som er beskrevet under avsnitt 5.2.3.3 Ceric-spraying s. 32.

Vandringen til et stoff ved TLC beskrives med dets retardasjonsfaktor, R_f -verdi, som kan defineres som:

$$R_f = L_s/L_{mf}$$

hvor L_s er stoffets vandringsavstand fra startsonens senter (startlinjen) til flekkens senterpunkt, og L_{mf} er avstanden fra startlinjen til mobilfasefronten.

TLC regnes å være den enkleste av de kromatografiske teknikkene, da separasjoner kan utføres uten bruk av instrumentering. Normalfasekromatografi med silika som stasjonærfase og organiske løsemidler som mobilfaser er vanligst, men omvendtfase-kromatografi med vandige mobilfaser benyttes også (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

Reagenser

Destillert vann

Metanol

Diklormetan

Etylacetat

Utstyr

TLC-plate

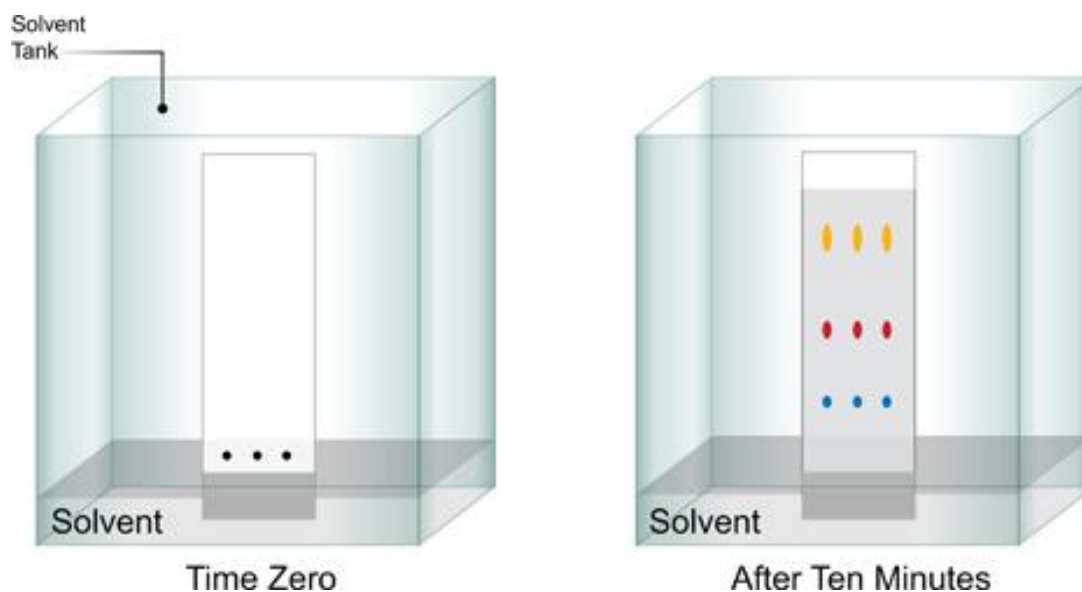
Mikropipette

Elueringskar med tett lokk

UV-lys

Prosedyre

1. Ønsket mobilfase lages og overføres til elueringskar. Lokk settes på i 10-15 minutter for å sikre en mett atmosfære av mobilfase i karet.
2. TLC-platen avmerkes med blyant for hvor prøvene skal appliseres (ca. 2 cm fra kanten, med minimumsavstand på 1 cm mellom hver prøve).
3. Mikropipetter (10 µl) brukes til påsetting av prøveløsninger på avmerkede punkter.
4. Løsningsmidler avdampes ved lufttørking, og settes i elueringskaret med prøvekanten nederst.
5. TLC-platen tas ut av karet før mobilfasen når toppen av platen, og mobilfasefronten merkes av med blyant.
6. Mobilfasen avdampes ved lufttørking eller med hårføner.
7. Avdampet TLC-plate bestråles med UV-lys ved 254 nm (kortbølget) og 366 nm (langbølget), og flekker avmerkes med blyant.
8. Om nødvendig sprayes platen med et påvisningsreagens, se avsnitt 5.2.3.2 - 5.2.3.3 s. 31-32.



Figur 5-4: TLC-plate i elueringskar ved start (t.v.) og etter 10 minutter (t.h.) (Waters 2009).

5.2.3.2 DPPH-spraying

Prinsipp

Prinsippet for DPPH-spraying er det samme som for DPPH-testen. Dette er beskrevet under avsnitt 5.2.4.1 DPPH-scavenging s. 38. Prøveløsninger som er applisert på TLC-plater, vil kunne danne gule flekker mot lilla bakgrunn dersom de har radikalfangende evne. Dette kan detekteres visuelt, se Figur 5-5 s. 32.

Reagenser

DPPH-pulver

Metanol

Utstyr

Erlenmeyer-kolbe

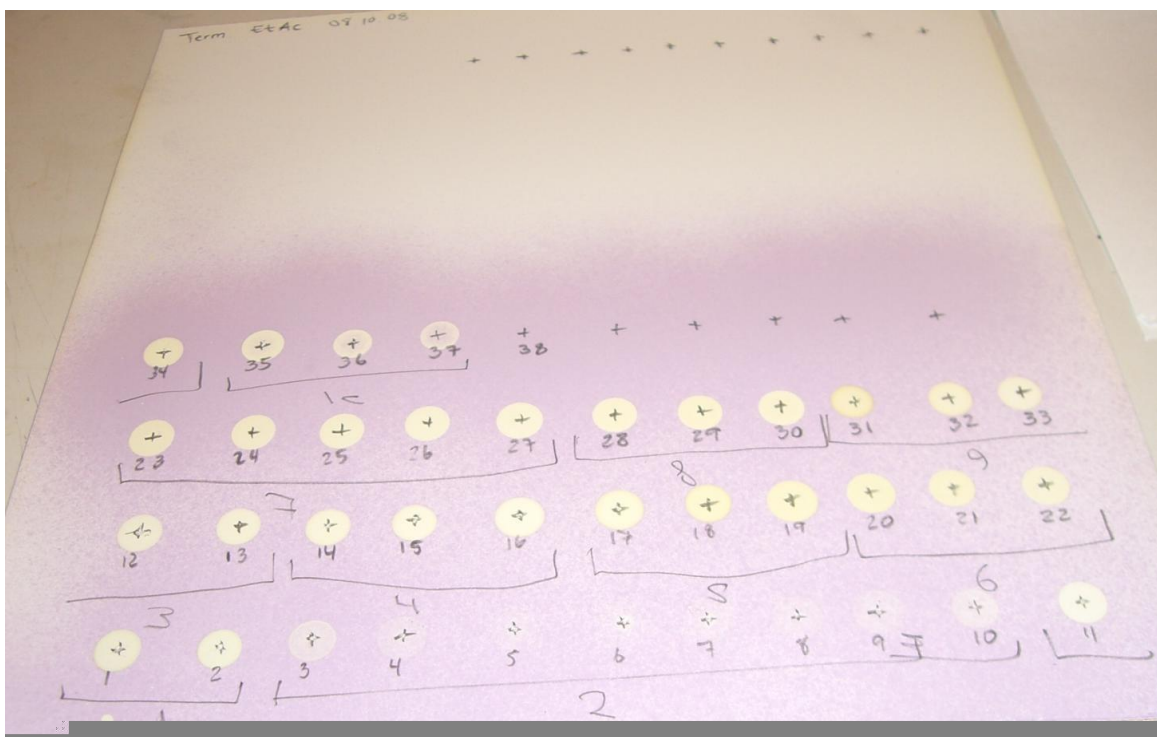
Sprayboks

Magnetrører

Magnet

Prosedyre

1. DPPH-pulver løses i metanol i en erlenmeyerkolbe og blandes ved hjelp av magnet og magnetrører.
2. DPPH-løsningen overføres til sprayboks.
3. Ferdigutviklede TLC-plater sprayes med DPPH-løsningen. Den konsentrerte DPPH-løsningen gjør at TLC-platen farges jevnt lilla.
4. Resultatet avleses visuelt etter noen få minutter.



Figur 5-5: Eksempel på en TLC-plate sprayet med DPPH-løsning. De gule flekkene indikerer radikalfangende stoffer.

5.2.3.3 Ceric-spraying

Prinsipp

Ceric reagens består av svovelsyre og cerium(IV)sulfat. Ved reaksjon med organiske forbindelser vil det dannes fargede dekomponeringsprodukter ettersom cerium(IV)-ionet er sterkt oksiderende under sure betingelser. Metoden brukes til å avgjøre hvilke fraksjoner som skal slås sammen etter fraksjonering med VersaFlash kolonnekromatografi.

Reagens

Ceric reagens: Cerium(IV)sulfat 1 %, løst i 10 % vandig svovelsyre.

Utstyr

Sprayboks

Prosedyre

1. Ferdigutviklede TLC-plater sprayes med Ceric-reagens.
2. TLC-platen legges i varmeskap i 10-15 minutter ved 100 °C.
3. Resultatet avleses visuelt og flekker merkes av med blyant.

5.2.3.4 NMR-spektroskopi**Prinsipp**

NMR (Nuclear Magnetic Resonance), eller kjernemagnetisk resonans som det heter på norsk, er en spektroskopisk metode hvor absorpsjonen av radiofrekvens energien til hydrogen- og karbonatomer i et magnetisk felt gir oss verdifull informasjon om deres molekulære sammensetning. Dette utnytter vi til strukturbestemmelse av ukjente organiske forbindelser.

Kjerner av hydrogen (^1H) og karbon (^{13}C) og andre isotoper som er NMR-aktive oppfører seg som om de er små magneter som spinner rundt sin egen akse. Ved fravær av et eksternt magnetfelt vil de magnetiske kjernene ha en tilfeldig orientert spinn. Utsettes forbindelser med kjerner som ^1H og ^{13}C for et eksternt magnetfelt vil kjernens magnetiske momentvektor få en bestemt orientering. Momentvektoren vil da enten innrette seg med (α -spinnorientering) eller mot (β -spinnorientering) det eksterne magnetfeltet. De to ulike retningene har ikke samme energi. α -spinnorienteringen er lavere i energi enn β -spinnorienteringen, og energi kreves for å flippe over til den høyere energitilstanden. Et NMR-spektrometer vil forsyne denne energien til kjernen i form av elektromagnetisk stråling, og kjernen vil kunne absorbere energi gjennom en prosess som kalles magnetisk resonans. Denne absorpsjonen av energi vil ikke inntreffe med mindre momentvektorens rotasjonshastighet om feltretninger og frekvensen til den elektromagnetiske strålingen er

5. EKSPERIMENTELT

identisk. Forskjellige kjerner har ulik rotasjonshastighet. Hastigheten avhenger av feltstyrken i det eksterne magnetfeltet.

Antall signaler i et ^1H NMR-spekter korresponderer til antall unike sett av protoner. Fordi hydrogen-kjerner i et gitt molekyl er omgitt av elektronskyer av ulik tetthet, vil kjernene absorbere energi ved ulik magnetisk feltstyrke. Dermed forekommer signaler for disse protonene ved forskjellige posisjoner i NMR-spekteret. Posisjonen til signalene i spekteret kalles kjemisk skift. Den reelle feltstyrken til et kjemisk skift (hvor absorpsjon inntreffer) er sterkt avhengig av det magnetiske miljøet til hvert proton. Det er to faktorer som påvirker det magnetiske miljøet til et proton. Den ene er det magnetiske feltet som dannes av elektroner som sirkulerer rundt kjernen, og den andre er det lokale magnetiske feltet som dannes på grunn av nærliggende elektroner et annet sted i molekylet (Solomons og Fryhle 2004). Elektroner er som kjent ladede partikler, noe som medfører at de genererer et lite magnetfelt som kalles et induert felt. Dette induerte magnetfeltet motvirker det eksterne magnetfeltet, og vi sier derfor at elektronene skjermer protonet. Et proton som er sterkt skjermet av elektroner vil dermed ikke absorbere ved samme frekvens som et proton som er mindre skjermet, det vil absorbere ved lavere frekvens. Elektrontettheten rundt et proton er i stor grad avhengig av tilstedeværelsen eller fraværet av elektronegative grupper. Elektronegative grupper som halogener, aromater og oksygen vil trekke til seg elektroner fra protonet, slik at det blir deskjermet (og gir signal til venstre i spekteret). Det motsatte vil gjelde for elektropositive grupper (Williams og Fleming 1989).

I et NMR-spekter vises påført magnetfeltstyrke fra venstre til høyre. Høyere frekvenser er til venstre i spekteret, og disse absorpsjonene (signalene) sies å være downfield. Disse får en høyere ppm-verdi og kommer ved et lavere magnetfelt. Det motsatte gjelder for signaler til høyre i spekteret, de sies å være upfield (Hansen 2008). Spektrumet måles i delta (δ) skala i enheter av parts per million (ppm). Signalet ved δ 0 kommer fra tetrametylsilan (TMS), en standard som tilsettes prøven for kalibrering av kjemisk skift skalaen. Kjemisk skift er en relativ term og spektra fra ulike instrumenter med forskjellig magnetstyrke kan dermed sammenlignes. ^1H NMR spektre gir vanligvis signal i området $\delta = 0\text{-}15$ ppm og ^{13}C NMR spektre i området $0\text{-}220$ ppm.

Arealet under hver topp/signal korresponderer til det relative antall av hydrogenatomer i hvert unike magnetisk miljø for hvert molekyl. NMR-spektrometeret måler arealene automatisk og plotter integralkurver over hvert signal. Høyden av integralkurvene er proporsjonal med arealet under signalet.

Et annet fenomen som gir oss informasjon om strukturen til en forbindelse, er signalsplitting. På grunn av signalsplitting, kan et signal bestå av flere topper. To topper kalles en dublett, tre topper en triplett, fire topper en kvartett, og multipllett betegnes ved mer fire topper.

Signalsplitt kommer av magnetfeltet fra protoner som tilhører nærliggende karboner. Hvis en ^1H -kjerne har n ^1H naboer med annet kjemisk skift, splittes NMR signalet i $(n + 1)$ topper. Et signal som er delt i flere topper, har også en koblingskonstant (J), som er avstanden mellom toppene. Koblingskonstanten måles i Hertz (Hz) og ligger vanligvis mellom 0-18 (Solomons og Fryhle 2004). For kjerner som kobler med hverandre og ligger nær hverandre i spekteret, skjer kobling etter mer kompliserte regler ("høyere ordens kobling").

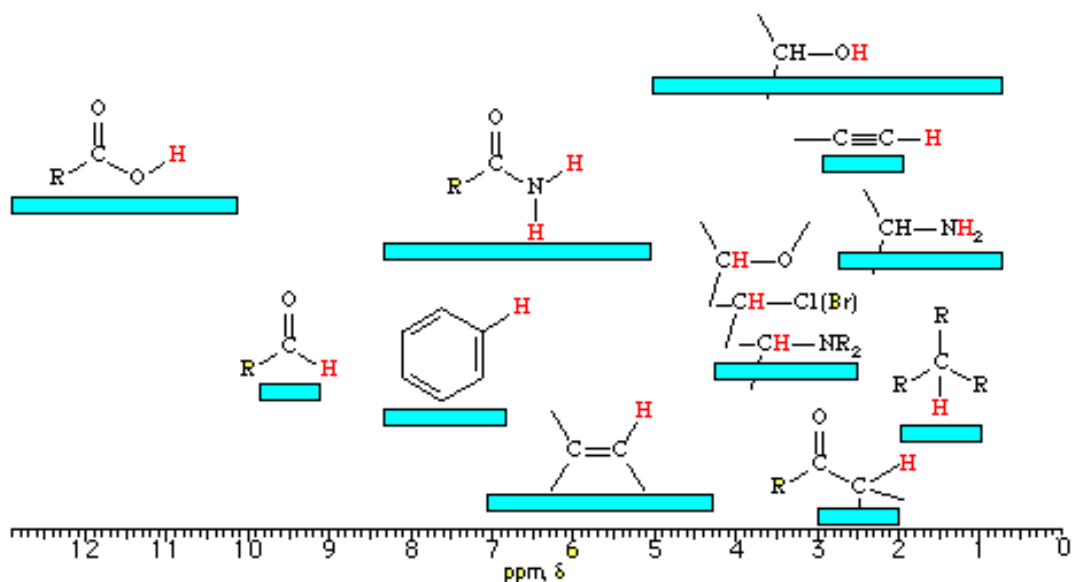
APT (Attached Proton Test) er en type spektrum som gir indikasjon på de ulike karbonatomenes kjemiske natur ved at signalene for sekundære og kvartærnære karboner peker oppover, det vil si gir positive signaler, mens signalene for primære og tertiære karbonatomer har negative signaler og vil peke nedover. Alle signalene kommer ved karbonatomenes naturlige kjemiske skift.

^1H NMR og ^{13}C NMR er eksempler på 1-dimensjonell (1-D) NMR spektroskopi. Det finnes også teknikker for 2-dimensjonell (2-D) NMR, noen vanlige går under akronymene COSY og HETCOR, og er svært nyttige metoder til oppklaring av bindingsmønsteret i et molekyl.

COSY (Correlation Spectroscopy) er proton-proton korrelasjonsspektroskopi. Det gir informasjon om hvilke protoner som kobler med hverandre uten at vi trenger å identifisere koblingskonstanter (Hansen 2008). I spekteret vil vi se protonenes kjemiske skift langs diagonalen. To protoner som kobler med hverandre vil gi en krysstopp (spesiell kontur) langs x-aksen og y-aksen vinkelrett på signalene til de to protonene.

5. EKSPERIMENTELT

HETCOR (Heteronuclear shift Correlation) kobler informasjon fra to forskjellige kjerner, ^1H NMR informasjon kobles med informasjon fra ^{13}C NMR. Spektrene ligger på hver sin akse, og krysstopper indikerer hvilke hydrogenener som er koblet til hvilke karboner og vice versa (Solomons og Fryhle 2004).



Figur 5-6: ^1H NMR approksimativ kjemisk skift verdi

Reagenser

Deuterert kloroform

Deuterert metanol

Deuterert aceton

TMS (standard)

Tungtvann (D_2O)

Utstyr

NMR-spektrometer

NMR-rør

Propp

Prosedyre

1. En liten mengde (vanligvis 10-50 mg) prøve løses i egnet deuterert løsningsmiddel (ca. 1 ml) tilsatt omtrent 1 % TMS.
2. Ferdig oppløst prøve overføres til NMR-rør og propp settes på.
3. Prøven analyseres ved hjelp av NMR-spektrometer.

5.2.3.5 UV-spektroskopi**Prinsipp**

Ved UV-synlig lys spektroskopi benyttes elektromagnetisk stråling i bølgelengdeområdet 200 nm til 800 nm. Dersom det sendes elektromagnetisk stråling mot molekyler i løsning, vil man observere at intensiteten til strålingen svekkes ved passasje gjennom prøveløsningen. Når strålingen svekkes, sier man at molekylene (stoffet) absorberer elektromagnetisk stråling. Ved noen bølgelengder vil man få en kraftig absorpsjon, mens absorpsjonen vil være mindre ved andre bølgelengder. Bølgelengden hvor stoffet har maksimal absorpsjon, kalles absorpsjonsmaksimum. Dette kan vi observere i et absorpsjonsspektrum.

Molekyler er normalt til stede i sin laveste energitilstand, som kalles grunntilstanden. Når molekyler absorberer elektromagnetisk stråling, tar de kortvaring opp energi fra strålingen, og det dannes et eksitert molekyl med høyere energi. Energien som tas opp, kan bevirke følgende i molekylene:

- overføre et elektron til en orbital med høyere energi
- øke vibrasjonene i molekylet
- øke bindingsrotasjonene i molekylet

Et bestemt molekyl vil ha et stort antall mulige kombinasjoner av disse, og hver kombinasjon tilsvarer en helt bestemt energimengde. Det betyr at hver mulig kombinasjon vil absorbere ved én bestemt bølgelengde. Spektre av molekyler består i prinsippet av et stort antall forskjellige absorpsjonslinjer som ligger meget tett inntil hverandre. Disse vil i praksis flyte sammen, og vi får et kontinuerlig spektrum. Slike spektre er karakteristiske for molekyllære

5. EKSPERIMENTELT

forbindelser, og det vil dermed være mulig å si noe om hvilke bindinger og kjemiske grupper som er tilstede basert på hvor i spekteret det absorberer stråling.

I valget av et egnet løsningsmiddel er det viktig å ta hensyn til prøvens løselighet i løsningsmiddelet. Eventuelle bunnfall må filtreres bort for å unngå interferens med UV-strålingen. I tillegg er det viktig at løsningsmiddelet ikke absorberer lys i bølglengdeområdet som skal benyttes i absorbanmålingene, og at det ikke reagerer med analytten eller katalyserer nedbrytningsreaksjoner (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

Reagenser

Metanol

Utstyr

UV-spektrofotometer

Prøveholder (kvartskyvette)

Plastspatel

Prosedyre

1. Spektrofotometeret innstilles ved bølglengdeområdet 230-600 nm.
2. Prøven løses i metanol i passende konsentrasjon og overføres til kvartskyvetten.
3. Blindprøve bestående av 3 ml metanol plasseres i blindprøvebeholder.
4. Absorbansmålinger startes umiddelbart.

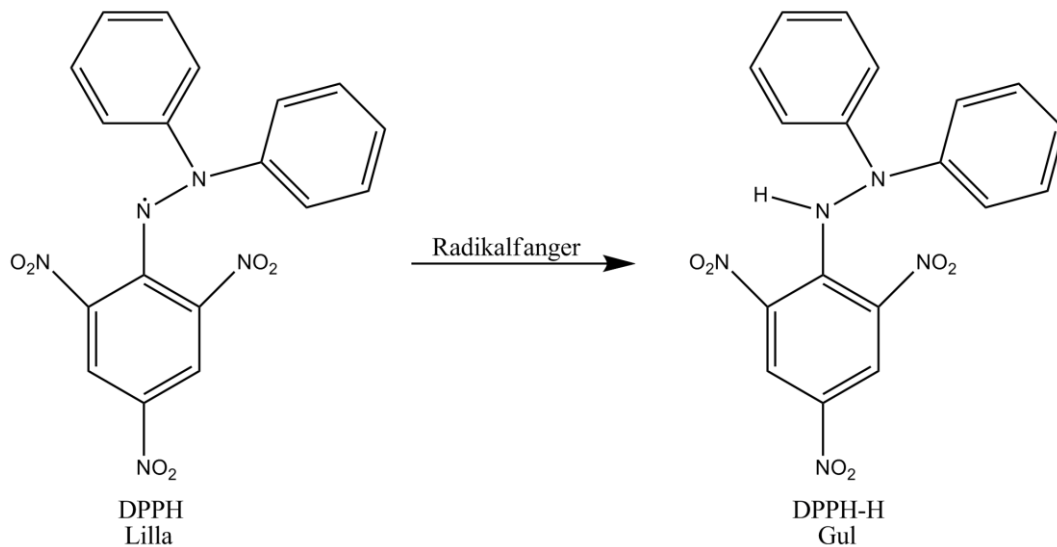
5.2.4 Metoder for måling av biologisk aktivitet

5.2.4.1 DPPH-scavenging

Prinsipp

DPPH-scavenging er en metode som brukes til bestemmelse av antioksidanteffekten til en forbindelse. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) er et stabilt fritt radikal som på grunn av

dets uparede elektron har sterk absorpsjon ved 517 nm. I løsningsmedium har radikalet en mørk fiolett farge. Ved reaksjon med en radikalscavenger vil det uparede elektronet bli parett og dette gjør at absorpsjonen reduseres. Fargen skifter da fra fiolett til gul (Malterud et al. 1993). Se Figur 5-7.



Figur 5-7: Omdannelse av DPPH til DPPH-H ved hjelp av en radikalfanger

Dette kan utnyttes til å undersøke om en forbindelse/prøve har radikalscavengereffekt. Absorpsjonen måles ved 517 nm før og etter tilsetning av prøven til DPPH. Ved radikalscavengereffekt vil vi se en nedgang i absorpsjon. Nedgangen i absorpsjon er relatert til mengde og aktivitet av radikalscavenger. Dette kan også detekteres visuelt, da DPPH-løsningen forandres fra lilla til gul. Prosent radikalscavenging kan beregnes ved hjelp av formelen:

$$100 \times (A_0 - A_t) / (A_0 - A_p)$$

hvor A_0 er startabsorpsjon (korrigert for egenabsorpsjon av testsubstans og fortynning), A_t er sluttabsorpsjon etter reaksjon med testabsorpsjon og A_p er egenabsorpsjon av sluttproduktet diphenylpicrylhydrazin. Ofte settes A_p til 0 (Malterud 2008).

Reagenser

Metanol

5. EKSPERIMENTELT

DPPH-pulver

DMSO

Utstyr

UV-spektrofotometer

Kyvetter

Plastspatel

Magnet

Magnetrører

Prosedyre

1. DPPH-pulver løses i metanol (ca. 0,04 mg/ml) i en erlenmeyerkolbe og blandes ved hjelp av magnet og magnetrører. Løsningen skal gi en konsentrasjon som gir en absorbans på ca. 1 ved 517 nm.
2. Prøver som skal testes løses i dimetylsulfoksid (DMSO) i ønsket konsentrasjon. Quercetin løses i DMSO og brukes som positiv kontroll.
3. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve bestående av ca. 3 ml metanol.
4. Startabsorbans måles i 2,95 ml DPPH-løsning (3 paralleller) før tilsetning av prøve ved 517 nm.
5. 50 µl av prøveløsningen tilsettes i hver parallell, og omrøres med plastspatel.
6. Registrering av absorbans startes 30 sekunder etter tilsetning av prøve, og absorbansen måles hvert 60. sekund i totalt 5 minutter.

5.2.4.2 15-Lipoksygenasehemming

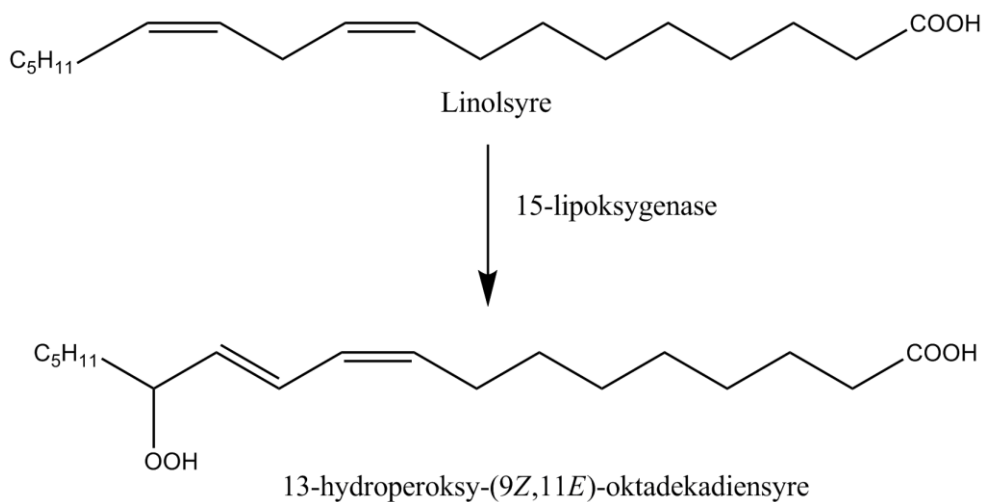
Prinsipp

Lipoksygenaser er enzymer i arakidonsyremetabolismen som katalyserer peroksidering av flerumettede fettsyrer på en selektiv måte (Malterud 1998). Hemming av 15-lipoksygenase er av stor interesse, ettersom enzymet inngår i oksidering av LDL (low density lipoprotein).

Denne prosessen antas å være et viktig trinn i forbindelse med utvikling av aterosklerose (Lyckander og Malterud 1996).

Metoden er basert på den 15-lipoksygenase (15-LO) katalyserte reaksjonen mellom oksygen og en flerumettet fettsyre med 1,4-dien-type struktur med dobbeltbinding i posisjon 6 fra metylenden, se Figur 5-8. Linolsyre har en 1,4-dienstruktur, og er dermed egnet som substrat. Linolsyre brukes i stedet for arakidonsyre, da den er billigere og mer stabil. Fordi hemmingsverdier med disse to substratene ser ut til å være sammenlignbare, er linolsyre en god modellsubstans ved testing av stoffers hemmingseffekt på 15-LO peroksidering av arakidonsyre (Malterud 1998).

Målingen av enzymaktivitet er basert på dannelsen av konjugerte dobbeltbindinger i lipoksygeneringsreaksjonen, noe som fører til økt absorbans ved 234 nm (Malterud 1998). Mengde produkt som dannes kan følges spektroskopisk ved å måle A_{234} . Det vil derfor være mulig å måle hemming av 15-LO ved å måle hvor mye absorbansøkningen reduseres i forhold til en blankprøve ved tilsetning av prøveløsning.



Figur 5-8: Peroksidering av linolsyre ved 15-LO

Prosent enzymhemming kan beregnes etter følgende formel:

$$100 \times (A_2 - A_1) / A_2$$

5. EKSPERIMENTELT

der A_1 og A_2 er absorbansøkning per tidsenhet med og uten testsubstans tilsatt (Malterud 2008).

Reagenser

A: Boratbuffer: 0,2 M, pH = 9,00, lagd av borsyre og natriumhydroksid.

B: Substratløsning: 50 μ l linolsyre og 150 μ l etanol blandes, og A tilsettes til 50 ml.

B1: Bruksferdig substratløsning bestående av 15 ml B og 225 ml A lages rett før bruk.

C: Enzymløsning: 15-LO løses i A til en konsentrasjon på ca. 10 000 enheter/ml. Løsningen lages rett før bruk og oppbevares på is under hele forsøket.

DMSO

Utstyr

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Plastspatel

Prosedyre

1. Prøver som skal testes løses i DMSO i ønsket konsentrasjon.
2. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve bestående av 0,95 ml A, 2,00 ml B1 og 0,05 ml DMSO. Løsningen blandes godt med plastspatel, og kyvetten blir stående i blindprøveholderen under hele forsøket.
3. Blankprøver bestående av 0,90 ml A, 2,00 ml B1 og 0,05 ml DMSO (3 paralleller) omrøres godt med plastspatel. 0,05 ml C tilsettes med påfølgende omrøring. Absorbansøkning måles i perioden 30-90 sekunder etter tilsetting av C ved 234 nm.
4. Testløsning bestående av 0,90 ml A, 2,00 ml B1 og 0,05 ml prøveløsning (3 paralleller) omrøres godt med plastspatel. 0,05 ml C tilsettes med påfølgende omrøring. Absorbansøkning måles i perioden 30-90 sekunder etter tilsetting av C ved 234 nm.

5. Punkt 3 gjentas etter hver tredje måleserie med testløsninger. Dette gjøres for å sikre at enzymaktiviteten holder seg stabil under forsøket.

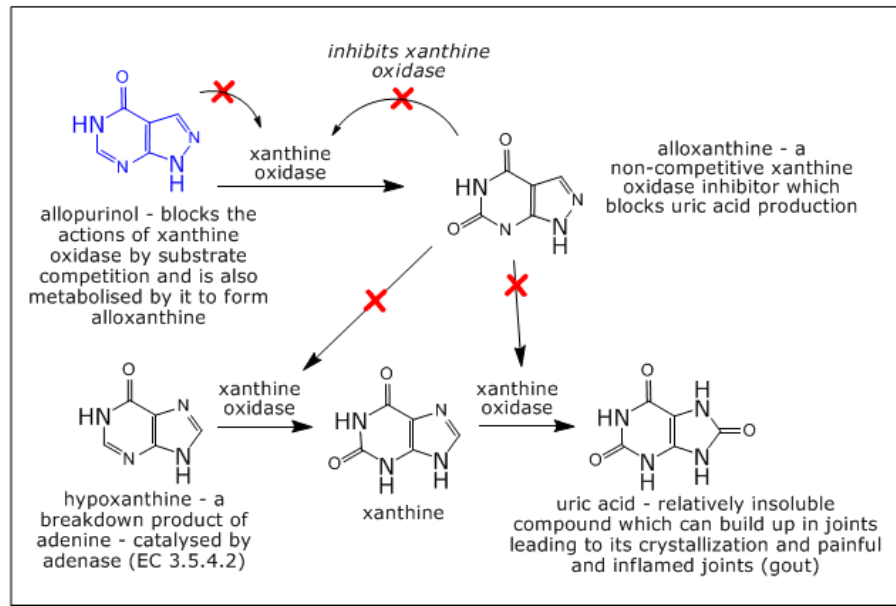
5.2.4.3 Xantin oksidasehemming

Prinsipp

Xantin oksidase (XO) er et enzym som oksiderer hypoxantin til xantin, med urinsyre som sluttprodukt. Akkumulert urinsyre forårsaker hyperurikemi og er assosiert med gikt (Noro et al. 1983) og nyrestein (Akowuah et al. 2006). I tillegg er XO en viktig biologisk kilde til superoksid radikaler. Superoksid radikaler kan gi opphav til andre reaktive oksygenspecies (ROS), for eksempel $\text{OH}\bullet$, som er i stand til å initiere lipidperoksidering ved å fjerne allyliske protoner fra flerumettede fettsyrer. Denne prosessen fører til lipidperoksideringsprodukter, som er ansvarlig for cellulære skader som et resultat av oksidativ stress (Akowuah et al. 2006). Dessuten er superoksid anion radikalet generert av XO involvert i forskjellige patologiske tilstander som hepatitt, inflammasjon, iskemisk reperfusjon, carcinogenese og aldring (Nguyen et al. 2004).

Hemming av XO-aktivitet kan derfor være betydningsfullt i hindring av oksidativ stress mekanismer som er relatert til degenerative sykdommer, samt at det kan være fordelaktig i terapeutisk behandling av gikt og andre inflammasjonssykdommer. Det finnes i dag et legemiddel, allopurinol, som er en hemmer av urinsyreproduksjonen gjennom hemming av XO. Allopurinol brukes klinisk mot urinsyregikt, men på grunn av uønskede bivirkninger og allergiske reaksjoner er det ønskelig med alternativer med økt terapeutisk effekt og mindre bivirkninger (Nguyen et al. 2004).

5. EKSPERIMENTELT



Figur 5-9: Allopurinol mekanisme. Andre XO-hemmere kan tenkes å hemme enzymet ved lignende mekanismer (Kanji 2009)

Testen ble utført spektrofotometrisk ved 290 nm i henhold til metoden beskrevet av Noro *et al.* (Noro *et al.* 1983) med modifikasjoner.

Prosent enzymhemming kan beregnes etter følgende formel:

$$100 \times (A_2 - A_1) / A_2$$

der A_1 og A_2 er absorbanøkning per tidsenhet med og uten testsubstans tilsatt (Malterud 2008).

Reagenser

A: Natriumkaliumfosfatbuffer: 0,05 M, pH = 7,5, lagd av kaliumdihydrogenfosfat (KH_2PO_4) og natriumhydrogenfosfat (Na_2HPO_4)

B: Substratløsning: 10 mg hypoxantin løses i 500 ml destillert vann..

C: Enzymløsning: XO løses i A til en konsentrasjon på ca. 1,8 enheter/ml. Løsningen lages rett før bruk og oppbevares på is under hele forsøket.

DMSO

Utstyr

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Plastspatel

Prosedyre

1. Prøver som skal testes løses i DMSO i ønsket konsentrasjon. Quercetin løses i DMSO i passende konsentrasjon og brukes som positiv kontroll.
2. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve bestående av 1,85 ml A, 0,05 ml DMSO, 1,0 ml destillert vann og 0,1 ml C. Løsningen blandes godt med plastspatel, og kyvetten blir stående i blindprøveholderen under hele forsøket.
3. Blankprøver bestående av 1,85 ml A, 0,1 ml C og 0,05 ml DMSO (3 paralleller) omrøres godt med plastspatel. 1,0 ml B tilsettes med påfølgende omrøring. Absorbansøkning måles 30 sekunder etter tilsetning av B ved 290 nm, og absorbansen måles hvert 30. sekund i 5 minutter. Dette gjøres for å sikre at enzymaktiviteten holder seg stabil under forsøket.
4. Testløsning bestående av 1,85 ml A, 0,1 ml C og 0,05 ml prøveløsning (3 paralleller) omrøres godt med plastspatel. 1,0 ml B tilsettes med påfølgende omrøring. Absorbansøkning måles 30 sekunder etter tilsetning av B ved 290 nm, og absorbansen måles hvert 30. sekund i 5 minutter.
5. Punkt 3 gjentas etter hver tredje måleserie med testløsninger.

5.3 Eksperimentell utførelse

5.3.1 Plantemateriale

Anvendt droge var blader av den maliske planten *Terminalia macroptera*. Den ble samlet inn fra DMTs botaniske hage i Bamako, Mali den 7. desember 2007. Plantematerialet ble også

identifisert ved DMT, deretter lufttørket og findelt. Herbarieeksemplar av planten foreligger ved DMT.

5.3.2 Ekstraksjon av plantemateriale

5.3.2.1 Ekstraksjon med organiske løsemidler

Bladene (1116 g) av *T. macroptera* ble ekstrahert som beskrevet i avsnitt 5.2.1.3 Ekstraksjon med organiske løsemidler - Soxhlet s. 17. Fordi det ikke var plass til alt plantemateriale i en papphylse, ble det delt opp i tre batcher på 430 g, 426 g og 260 g. Disse ble først ekstrahert med diklormetan (til sammen ca. 3,5 L). Det tok 14,5 timer, 14 timer og 10,5 timer, respektivt, før plantematerialet sluttet å avgi mer farge. De samme batchene med plantemateriale ble deretter ekstrahert med metanol (til sammen ca. 4 L). Dette tok adskillig lenger tid, fra 17 timer til nesten 26 timer før løsemiddelet ble fargeløst. Etter ekstraheringen ble diklormetanløsningen og metanolløsningen dampet inn hver for seg på rotavapor og oljepumpe.

5.3.2.2 NMR-spektroskopi

Både diklormetanrækstraktet og metanolrækstraktet ble analysert ved hjelp av ^1H NMR og ^{13}C NMR. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert kloroform og deuterert metanol, respektivt. TMS ble tilsatt som intern standard. NMR-spektra av begge rækstraktene er gjengitt i vedleggsdelen, s. 147-148.

5.3.2.3 Bioassay

Metanol- og diklormetanrækstraktene ble testet for radikalscavenging (DPPH-testen) ved forskjellige konsentrasjoner.

Test for xantin oksidase hemming ble kun utført på metanolrækstraktet, da diklormetanrækstraktet ikke lot seg løse i egnet løsemiddel (DMSO). Rækstraktet ble testet ved konsentrasjonene 166,7 $\mu\text{g/ml}$, 83,3 $\mu\text{g/ml}$ og 41,7 $\mu\text{g/ml}$.

Resultater av samtlige bioassayforsøk er gitt i Tabell 6-2 og Tabell 6-3 s. 69-70.

5.3.3 Fraksjonering av diklormetanrækstraktet

Flytskjema for fraksjoneringen av diklormetanrækstraktet er vist i vedleggsdelen av masteroppgaven, Flytskjema 2 s. 142.

5.3.3.1 VersaFlash kolonne-separasjon

Ved kolonne-separasjon ble et brukt en silikakolonne (40x150mm), altså normalfase separasjon. Kolonnen ble først kondisjonert med diklormetan (ca. 3 kolonnevolum). Diklormetanrækstraktet (ca. 2 g) ble løst i 10 ml diklormetan. Løsningen ble deretter filtrert før applisering på kolonne. Som mobilfase ble det benyttet diklormetan, diklormetan:etylacetat (90:10), diklormetan:etylacetat (70:30), diklormetan:etylacetat (40:60), etylacetat og aceton. Det ble i alt samlet 71 fraksjoner. Oversikt over hvilke mobilfaser som ble benyttet ved ulike kolonnefraksjoner er gjengitt i Tabell 5-1.

Tabell 5-1: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av diklormetanrækstraktet

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1 – 16	Diklormetan	ca. 480 ml
17 – 28	Diklormetan:etylacetat (90:10)	ca. 500 ml
29 – 37	Diklormetan:etylacetat (70:30)	ca. 300 ml
38 – 49	Diklormetan:etylacetat (40:60)	ca. 350 ml
50 – 61	Etylacetat	ca. 600 ml
62 – 71	Aceton (vask)	ca. 700 ml

Fraksjonsvolum:

Fraksjon 1 – 49 = 30 ml

Fraksjon 50 – 71 = ca. 60 ml

5.3.3.2 Analytisk TLC

Alle fraksjonene ble applisert på normalfase silika TLC-plater og eluert med mobilfaser med samme løsemiddel-blandingsforhold som de ble eluert med ved kolonne-separasjon, se Tabell

5. EKSPERIMENTELT

5-1 s. 47, unntatt aceton-fraksjonene 62-71, de ble eluert med etylacetat. Etter endt utvikling og tørking ble platene betraktet i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med ceric reagens. De fraksjonene som så ut til å inneholde de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Se Tabell 5-2.

Tabell 5-2: Sammenslåing av diklormetanrækstrakt-fraksjoner

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1 – 3	D1
4 – 8	D2
9 – 11	D3
12 – 14	D4
15 – 17	D5
18 – 19	D6
20 – 21	D7
22 – 24	D8
25 – 29	D9
30 – 36	D10
37 – 39	D11
40 – 43	D12
44 – 49	D13
50 – 59	D14
60 – 61	D15
62 - 63	D16
64 – 71	D17

5.3.3.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR-spektra av alle fraksjonene. I tillegg ble det tatt ^{13}C NMR-spektra for fraksjon D1, D3 og D10. Av fraksjon D1 ble det tatt COSY- og APT-spekter også. Deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard ble brukt som løsningsmiddel til alle fraksjoner, unntatt fraksjon D15 som var kloroformuløselig og ble løst i deuterert aceton tilsatt TMS.

5.3.4 Fraksjonering av metanolrækstraktet

Flytskjema for fraksjoneringen av metanolrækstraktet og videre arbeid med fraksjonene er vist i vedleggsdelen av masteroppgaven, Flytskjema 1 s.141 og Flytskjema 3-7 s. 143-146.

5.3.4.1 Væske-væske ekstraksjon

Av metanolrækstraktet ble 387,28 g suspendert i 2 x 0,5 liter destillert vann og overført til en skilletrakt. Suspensjonen ble ekstrahert med løsninger av økende polaritet som vist i skjemaet under:

<u>Løsemiddel</u>	<u>Mengde</u>
Etylacetat	2 x 250 ml
1-Butanol	2 x 500 ml

Etter hver tilsetning av løsemiddel ble skilletrakten snudd opp ned flere ganger, og ristet forsiktig (kraftig risting kan føre til dannelse av emulsjon). Da fasene hadde separert seg ble den organiske fasen tappet av og filtrert over i forhåndsveide rundkolber, og deretter dampet inn til tørrhet ved hjelp av rotavapor og oljepumpe. Både etylacetatfasen (EtOAc) og butanolfasen (BuOH) ble filtrert gjennom Whatman 1 PS faseseparasjonsfilter før inndamping.

Den vandige resten (ca. 1 L) som var igjen etter siste ekstraksjon med butanol ble også dampet inn til tørrhet på samme måte som de andre fasene. Grunnet problemer med overkoking og voldsom skumming ble bare en liten del av den vandige fasen dampet inn til tørrhet.

5.3.4.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR-spektra og ^{13}C NMR-spektra av alle fraksjonene. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert aceton tilsatt TMS som intern standard til EtOAc-fasen av metanolrækstraktet, mens deuterert metanol tilsatt TMS ble brukt til BuOH-fasen og den vandige fasen av metanolrækstraktet. Samtlige NMR-spektra er vist i vedleggsdelen, s.149-151.

5.3.4.3 Bioassay

Alle fraksjonene ble testet for radikalscavenging (DPPH-test). De ble testet i konsentrasjoner fra 166,7 $\mu\text{g/ml}$ og ned til 2,6 $\mu\text{g/ml}$.

5. EKSPERIMENTELT

15-LO testen ble kun utført på etylacetat- og butanolfasen av metanolrækstraktet. Grunnet apparaturfeil var det ikke mulig å gjennomføre testen senere i arbeidet. Det ble testet i konsentrasjonene 41,7 µg/ml, 20,8 µg/ml, 10,4 µg/ml og 5,2 µg/ml.

Test for xantin oksidase hemming ble utført på alle fraksjonene. Det ble testet ved konsentrasjonene 166,7 µg/ml, 83,3 µg/ml, 41,7 µg/ml og 20,8 µg/ml.

Resultater av samtlige bioassayforsøk er gitt i Tabell 6-7 til Tabell 6-9 s. 75-77.

5.3.5 Fraksjonering av butanol-fasen av metanolrækstraktet

Flytskjema for fraksjoneringen av BuOH-fasen av metanolrækstraktet og videre arbeid med fraksjonene er vist i vedleggsdelen av masteroppgaven, Flytskjema 4-5 s. 144-145.

5.3.5.1 Sephadex LH-20 kolonneseparasjon

Av butanolfasen av metanolrækstraktet ble 28,6 g løst i ca. 45 ml metanol:vann (25:75) og kromatografert på Sephadex LH-20 kolonne (45x380mm). Mobilfaser var av ulike blandingsforhold av metanol-vann. Starteluenten var metanol:vann (25:75), og det ble benyttet gradienteluering, med økende mengde metanol, se Tabell 5-3. Det ble samlet 53 fraksjoner à 60 ml, fraksjon 54 var på ca. 650 ml.

Tabell 5-3: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av BuOH-fasen av metanolrækstraktet

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1 – 11	Metanol:vann (25:75)	ca. 660 ml
12 – 25	Metanol:vann (50:50)	ca. 840 ml
26 – 54	Metanol	ca. 2330 ml

5.3.5.2 Analytisk TLC

Samtlige fraksjoner ble applisert på normalfase silika TLC-plater for å se hvilke fraksjoner som kunne slås sammen. Platene ble utviklet med metanol:vann (50:50). Etter utvikling og tørking ble platene betraktet i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med DPPH-løsning.

Fraksjoner som inneholdt de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga fraksjonene B1 – B15, se Tabell 5-4.

Tabell 5-4: Sammenslåing av BuOH-fraksjonene av metanolrækstraktet

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1 – 3	B1
4 – 7	B2
8 – 11	B3
12 – 13	B4
14 – 15	B5
16 – 22	B6
23 – 25	B7
26 – 28	B8
29 – 32	B9
33 – 36	B10
37 – 40	B11
41 – 44	B12
45 – 48	B13
49 – 53	B14
54 (vask)	B15

5.3.5.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR-spektra av alle fraksjonene. ^{13}C NMR-spektra ble tatt for fraksjon B2 – B15. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol tilsatt TMS som intern standard.

5.3.5.4 Bioassay

Fraksjonene B1, B9, B10 ble testet for radikalscavenging (DPPH-test). De ble testet i konsentrasjoner fra 166,7 $\mu\text{g/ml}$ og helt ned til 2,6 $\mu\text{g/ml}$. Resultatene er gitt i Tabell 6-10 s. 81.

5.3.6 Fraksjonering av etylacetat-fasen av metanolrækstraktet

Flytskjema for fraksjoneringen av EtOAc-fasen av metanolrækstraktet og videre arbeid med fraksjonene er vist i vedleggsdelen av masteroppgaven, Flytskjema 3 s. 143, Flytskjema 6-7 s. 145-146.

5.3.6.1 Sephadex LH-20 kolonneseparasjon

Av etylacetatfasen av metanolrækstraktet ble 30 g løst i ca. 35 ml metanol:vann (25:75) og kromatografert på Sephadex LH-20 kolonne (45x360mm). Som mobilfase ble det benyttet metanol:vann (25:75), metanol:vann (50:50), metanol og aceton:vann (70:30). Det ble i alt samlet 38 fraksjoner à 60 ml. Oversikt over hvilke mobilfaser som ble benyttet ved ulike kolonnefraksjoner er gjengitt i Tabell 5-5.

Tabell 5-5: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av EtOAc-fasen av metanolrækstraktet

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1 – 10	Metanol:vann (25:75)	ca. 600 ml
11 – 16	Metanol:vann (50:50)	ca. 360 ml
17 – 27	Metanol	ca. 660 ml
28 – 38	Aceton:vann (70:30)	ca. 540 ml

5.3.6.2 Analytisk TLC

Alle fraksjoner ble applisert på normalfase silika TLC-plater for å se hvilke fraksjoner som kunne slås sammen. Mobilfase var metanol:vann (50:50). Etter endt utvikling og tørking ble platene betraktet i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med DPPH-løsning. Fraksjoner som inneholdt de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga fraksjonene E1 – E10, se Tabell 5-6.

Tabell 5-6: Sammenslåing av EtOAc-fraksjonene av metanolrækstraktet

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1 – 2	E1
3 – 10	E2
11 – 13	E3
14 – 16	E4
17 – 19	E5
20 – 22	E6
23 – 27	E7
28 – 30	E8
31 – 34	E9
35 – 38	E10

5.3.6.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR-spektra av alle fraksjonene. ^{13}C NMR-spektra ble tatt for fraksjon E2 – E9. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol tilsatt TMS som intern standard til fraksjon E1 – E3 og E10, og deuterert aceton tilsatt TMS ble brukt til fraksjon E4-E9.

5.3.6.4 Bioassay

Fraksjonene E2, E4, E6, E7 og E8 ble testet for radikalscavenging (DPPH-test). De ble testet i konsentrasjoner fra 166,7 $\mu\text{g/ml}$ og helt ned til 2,6 $\mu\text{g/ml}$. Resultatene er gitt i Tabell 6-11 s. 84.

5.3.7 Videre separasjon av fraksjon B3

5.3.7.1 VersaFlash kolonne separasjon

Fraksjon B3 (1,11 g) ble løst i litt metanol:vann (30:70) og kromatografert på en C_{18} kolonne (40x150mm), altså omvendtfase. Kolonnen ble først kondisjonert med starteluenten (ca. 3 kolonnevolum). Som mobilfase ble det benyttet metanol:vann (10:90), metanol:vann (20:80), metanol:vann (50:50), metanol og aceton. Det ble i alt samlet 29 fraksjoner à 30 ml. Oversikt over hvilke mobilfaser som ble benyttet ved ulike kolonnefraksjoner er gjengitt i Tabell 5-7.

Tabell 5-7: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon B3

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1 – 9	Metanol:vann (10:90)	ca. 270 ml
10 – 15	Metanol:vann (20:80)	ca. 180 ml
16 – 19	Metanol:vann (50:50)	ca. 120 ml
20 – 24	Metanol	ca. 150 ml
25 – 29	Aceton (vask)	ca. 150 ml

5.3.7.2 Analytisk TLC

For å fastslå hvilke fraksjoner som inneholdt de samme forbindelsene og dermed kunne slås sammen ble alle fraksjonene applisert på omvendtfase TLC-plater og utviklet med metanol:vann (50:50). Etter endt utvikling ble TLC-platene tørket og betraktet i kort- og

langbølget UV-lys, deretter sprayet med DPPH-løsning. Fraksjonene ble slått sammen og dampet inn på bakgrunn av TLC-platene. Dette ga fraksjonene B3.1 – B3.8, se Tabell 5-8.

Tabell 5-8: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av B3

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1 – 9	B3.1
10 – 15	B3.2
16	B3.3
17	B3.4
18 – 23	B3.5
24 – 25	B3.6
26	B3.7
27 – 29	B3.8

5.3.7.3 NMR-spektroskopi

Alle fraksjonene ble analysert ved hjelp av ^1H NMR-spektroskopi. Fraksjon B3.1, B3.4 og B3.5 ble i tillegg analysert ved hjelp av ^{13}C NMR-spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert aceton tilsatt TMS som intern standard til fraksjon B3.1 – B3.7, mens deuterert kloroform tilsatt TMS ble brukt til fraksjon E3.8. ^1H NMR- og ^{13}C NMR-spekter av fraksjon B3.1 er vist i vedleggsdelen s. 154.

5.3.7.4 Bioassay

Fraksjon B3.1 ble testet for radikalscavenging (DPPH-test). Det ble testet ved konsentrasjonene 166,6 $\mu\text{g/ml}$, 83,3 $\mu\text{g/ml}$, 41,7 $\mu\text{g/ml}$ og 20,8 $\mu\text{g/ml}$.

Fraksjon B3.1 ble også testet for xantin oksidase hemmingsaktivitet. Det ble testet ved konsentrasjon 166,7 $\mu\text{g/ml}$.

Resultatene er gitt i Tabell 6-12 og Tabell 6-13 s. 88-89.

5.3.8 Videre separasjon av fraksjon B7

Flytskjema for separasjon av fraksjon B7 og videre arbeid med fraksjonene er vist i vedleggsdelen av masteroppgaven, Flytskjema 5 s. 145.

5.3.8.1 VersaFlash kolonneseparasjon

Fraksjon B7 (0,31 g) ble løst i litt metanol:vann (40:60) og kromatografert på en C₁₈ kolonne (40x150mm) som beskrevet i avsnitt 5.3.7.1 s. 53. Som mobilfase ble det benyttet metanol:vann (30:70), metanol:vann (50:50), metanol:vann (70:30), metanol og aceton. Det ble i alt samlet 46 fraksjoner à 30 ml. Oversikt over ulike mobilfaser som ble benyttet ved ulike kolonnefraksjoner er gjengitt i Tabell 5-9.

Tabell 5-9: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av B7

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1 – 17	Metanol:vann (30:70)	ca. 510 ml
18 – 29	Metanol:vann (50:50)	ca. 360 ml
30 – 34	Metanol:vann (70:30)	ca. 150 ml
35 – 40	Metanol	ca. 180 ml
41 – 46	Aceton (vask)	ca. 180 ml

5.3.8.2 Analytisk TLC

Alle fraksjonene ble applisert på omvendtfase TLC-plater for å se hvilke fraksjoner som kunne slås sammen. Mobilfase var metanol:vann (50:50). Etter endt utvikling og tørking ble platene betraktet i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med DPPH-løsning. Ved å se på platene etter spraying kunne fraksjonene slås sammen, se Tabell 5-10.

Tabell 5-10: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av B7

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1 – 4	B7.1
5 - 14	B7.2
15 - 16	B7.3
17 - 19	B7.4
20 - 24	B7.5
25 - 29	B7.6
30	B7.7
31	B7.8
32 - 33	B7.9
34 -35	B7.10
36 - 41	B7.11
42 - 46	B7.12

5.3.8.3 NMR-Spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR-spektra av fraksjon B7.2 – B7.12 og ^{13}C NMR-spektra av B7.5 og B7.12. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol tilsatt TMS som intern standard til fraksjon B7.2 – B7.11. Deuterert kloroform tilsatt TMS ble brukt til å løse fraksjon B7.12.

5.3.9 Videre separasjon av fraksjon B7.5

5.3.9.1 UV-spektroskopi

Det ble tatt opp UV-spekter for fraksjon B7.5. Metanol ble brukt både som løsningsmiddel og blindprøve. UV-spekteret er vist under avsnitt 6.8.1, Figur 6-12 s. 92.

5.3.9.2 Preparativ HPLC

Fraksjon B7.5 ble løst i 2 ml metanol:vann (50:50) og filtrert gjennom Millex filter. 1 ml av løsningen ble så injisert på en C18 preparativ HPLC kolonne. Mobilfasehastigheten var 20 ml/min og deteksjon ble foretatt ved 256 nm. Som mobilfase ble det brukt metanol og vann, og det ble benyttet gradientsystem, se Tabell 5-11. Samme prosedyre ble utført to ganger (andre gang også 1 ml). For hver stor topp som ble detektert, ble det samlet opp fraksjoner som ble dampet inn på rotavapor og oljepumpe. Det ble i alt samlet 7 fraksjoner av ulik volum. Disse ble kalt B7.5A – B7.5G. Kromatogrammet med absorbanstoppene ved 256 nm er gjengitt i Figur 6-13 s. 92.

Tabell 5-11: Gradientsystem for preparativ HPLC av fraksjon B7.5

Tid (min)	% A (vann)	% B (metanol)
0 – 20	70	30
20 – 30	50	50
31 – 40	40	60

5.3.9.3 NMR-spektroskopi

Alle fraksjonene ble analysert ved hjelp av ^1H NMR-spektroskopi. Fraksjon B7.5B, B7.5E og B7.5F ble også analysert ved hjelp av ^{13}C NMR-spektroskopi. Deuterert metanol tilsatt

TMS ble brukt som løsemiddel til samtlige fraksjoner. NMR-spektra av fraksjon B7.5B og B7.5E er vist i vedleggsdelen s. 155-156.

5.3.9.4 Bioassay

Fraksjon B7.5B og B7.5E ble testet for radikalscavenging (DPPH-test). Det ble testet ved forskjellige konsentrasjoner mellom 83,3 μM og 10,4 μM (disse fraksjonene var da identifisert som rutin og narcissin).

Test for xantin oksidase hemming ble også utført på de samme fraksjonene som nevnt over. Det ble testet ved konsentrasjonene 83,3 μM og 41,7 μM .

Oversikt over resultatene er gitt i Tabell 6-14 og Tabell 6-15 s. 97.

5.3.10 Videre separasjon av fraksjon B10

5.3.10.1 VersaFlash kolonne separasjon

Fraksjon B10 (3,22 g) ble løst i litt metanol:vann (30:70) og kromatografert på en C_{18} kolonne (40x150mm) som beskrevet i avsnitt 5.3.7.1 s 53. Som mobilfase ble det benyttet metanol:vann (10:90), metanol:vann (20:80), metanol:vann (50:50), metanol og aceton. Det ble i alt samlet 30 fraksjoner à 30 ml. Oversikt over hvilke mobilfaser som ble benyttet ved ulike kolonnefraksjoner er gjengitt i Tabell 5-12.

Tabell 5-12: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon B10

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1 – 9	Metanol:vann (10:90)	ca. 270 ml
10 – 16	Metanol:vann (20:80)	ca. 210 ml
17 – 24	Metanol:vann (50:50)	ca. 240 ml
25 – 28	Metanol	ca. 120 ml
29 – 30	Aceton (vask)	ca. 60 ml

5.3.10.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene 2, 10, 18 og 25, som representerer fronten til de ulike mobilfaser tolket på grunnlag av fargeintensitet på fraksjonene, samt utgangsløsningen, ble applisert på en omvendtfase TLC-plate for å se hvilke fraksjoner som kunne slås sammen. Det ble eluert med metanol:vann (50:50). Etter endt utvikling og tørking ble platen betraktet i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med DPPH-løsning. Fraksjoner som inneholdt de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga fraksjonene B10.1 – B10.6, se Tabell 5-13.

Tabell 5-13: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av B10

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1 – 9	B10.1
10 – 12	B10.2
13 – 16	B10.3
17 – 24	B10.4
25 – 28	B10.5
29 – 30	B10.6

5.3.10.3 NMR-spektroskopi

Alle fraksjonene ble analysert ved hjelp av ^1H NMR-spektroskopi. Fraksjon B10.2 ble også analysert ved hjelp av ^{13}C NMR-spektroskopi. Deuterert metanol tilsatt TMS som intern standard ble brukt som løsemiddel til samtlige fraksjoner. NMR-spektra av fraksjon B10.1 er gjengitt i vedleggsdelen s. 157.

5.3.10.4 Bioassay

Fraksjon B10.1 ble testet for radikalscavenging (DPPH-test). Det ble testet ved konsentrasjonene 83,3 $\mu\text{g/ml}$, 20,8 $\mu\text{g/ml}$, 5,2 $\mu\text{g/ml}$ og 2,6 $\mu\text{g/ml}$.

Test for xantin oksidase hemming ble også utført på fraksjon B10.1. Det ble testet ved konsentrasjonene 166,7 $\mu\text{g/ml}$, 83,3 $\mu\text{g/ml}$ og 41,7 $\mu\text{g/ml}$.

Resultatene er gitt i Tabell 6-16 og Tabell 6-17 s. 100.

5.3.11 Videre separasjon av fraksjon E4

Flytskjema for separasjon av fraksjon E4 og videre arbeid med fraksjonene er vist i vedleggsdelen av masteroppgaven, Flytskjema 6 s. 145.

5.3.11.1 VersaFlash kolonne-separasjon

Fraksjon E4 (2,29 g) ble løst i litt metanol:vann (40:60) og kromatografert på en C₁₈ kolonne (40x150mm) som beskrevet i avsnitt 5.3.7.1 s. 53. Som mobilfase ble det benyttet metanol:vann (20:80), metanol:vann (50:50), metanol:vann (70:30), metanol og aceton. Det ble i alt samlet 26 fraksjoner à 30 ml. Oversikt over ulike mobilfaser som ble benyttet ved ulike kolonnefraksjoner er gjengitt i Tabell 5-14.

Tabell 5-14: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon E4

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1 - 7	Metanol:vann (20:80)	ca. 210 ml
8 - 11	Metanol:vann (50:50)	ca. 120 ml
12 - 18	Metanol:vann (70:30)	ca. 210 ml
19 - 23	Metanol	ca. 150 ml
24 - 26	Aceton (vask)	ca. 90 ml

5.3.11.2 Analytisk TLC

For å fastslå hvilke fraksjoner som inneholdt de samme forbindelsene og dermed kunne slås sammen ble alle fraksjonene applisert på omvendtfase TLC-plater og utviklet med metanol:vann (50:50). Etter endt utvikling ble TLC-platene tørket og betraktet i kort- og langbølget UV-lys, deretter sprayet med DPPH-løsning. Fraksjonene ble slått sammen på bakgrunn av TLC-platene. Dette ga fraksjonene E4.1 - E4.9, se Tabell 5-15 s. 60.

Tabell 5-15: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av E4

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1 – 2	E4.1
3 – 7	E4.2
8 – 9	E4.3
10 – 11	E4.4
12 – 13	E4.5
14 – 18	E4.6
19 – 20	E4.7
21 – 23	E4.8
24 – 26	E4.9

5.3.11.3 NMR-spektroskopi

Alle fraksjonene ble analysert ved hjelp av ^1H NMR-spektroskopi. Fraksjon E4.2 – E4.4 og E4.9 ble også analysert ved hjelp av ^{13}C NMR-spektroskopi. Deuterert metanol tilsatt TMS ble brukt som løsemiddel til fraksjon E4.1 – E4.9. I tillegg ble en prøve av fraksjon E4.9 løst i deuterert kloroform, og spektrum ble opptatt før og etter rysting med tungtvann.

5.3.12 Videre separasjon av fraksjon E4.2 – E4.4

Fraksjon E4.2, E4.3 og E4.4 så ut til å inneholde de samme forbindelsene etter sammenligning av NMR-spektra og ble derfor slått sammen til videre separasjon.

5.3.12.1 MCI gel CHP20P kolonne-separasjon

Fraksjon E4.2 – E4.4 (til sammen 1,87 g) ble løst i litt metanol:vann (50:50) og kromatografert på en MCI gel CHP20P kolonne (25x240mm), altså omvendtfase. Kolonnen ble først kondisjonert med starteluenten (ca. 3 kolonnevolum). Som mobilfase ble det prøvd ut med destillert vann, metanol:vann (10:90), metanol:vann (16:84), metanol:vann (30:70), metanol:vann (50:50) og metanol. Det viste seg at metanol-vann-blandingene hadde for svak løsemiddelstyrke, og ren metanol måtte til før det kom noe gjennom kolonnen. Det ble i alt samlet 13 fraksjoner à 30 ml. Oversikt over hvilke mobilfaser som ble prøvd ut er gjengitt i Tabell 5-16 s. 61.

Tabell 5-16: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av E4.2 - E4.4

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
0	Destillert vann	ca. 25 ml
0	Metanol:vann (10:90)	ca. 100 ml
0	Metanol:vann (16:84)	ca. 60 ml
0	Metanol:vann (30:70)	ca. 50 ml
0	Metanol:vann (50:50)	ca. 50 ml
1 – 13	Metanol	ca. 200 ml

5.3.12.2 Analytisk TLC

For å finne hvilke fraksjoner som inneholdt de samme forbindelsene og dermed kunne slå sammen ble prøver av alle fraksjonene applisert på omvendtfase TLC-plater og utviklet med metanol:vann (40:60). Etter endt utvikling ble TLC-platene tørket og betraktet i kort- og langbølget UV-lys. Fraksjonene ble slått sammen på bakgrunn av TLC-platene. Dette ga fraksjonene E4.2-4A – E4.2-4C, se Tabell 5-17.

Tabell 5-17: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av E4.2 - E4.4

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1 – 8	0
9 – 11	E4.2-4A
12	E4.2-4B
13	E4.2-4C

5.3.12.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR-spektra og ^{13}C NMR-spektra av alle fraksjonene. I tillegg ble det tatt COSY- og HETCOR-spektra av fraksjon E4.2-4B og E4.2-4C. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol tilsatt TMS som intern standard til alle fraksjonene.

5.3.12.4 Bioassay

Fraksjon E4.2-4A ble testet for radikalscavenging (DPPH-test). Det ble testet ved konsentrasjonene 20,8 $\mu\text{g/ml}$, 5,2 $\mu\text{g/ml}$ og 2,6 $\mu\text{g/ml}$.

Test for xantin oksidase hemming ble også utført på fraksjon E4.2-4A. Det ble testet ved konsentrasjonene 166,7 $\mu\text{g/ml}$ og 83,3 $\mu\text{g/ml}$.

Resultatene er gitt i Tabell 6-18 og Tabell 6-19 s. 105.

5.3.13 Videre separasjon av fraksjon E5

5.3.13.1 VersaFlash kolonne-separasjon

Fraksjon E5 (2,76 g) ble løst i ca. 5 ml metanol:vann (40:60) og kromatografert på en C₁₈ kolonne (40x150mm) som beskrevet i avsnitt 5.3.7.1 s. 53. Som mobilfase ble det benyttet metanol:vann (30:70), metanol:vann (50:50), metanol:vann (70:30), metanol, aceton og etylacetat. Det ble i alt samlet 26 fraksjoner à 30 ml. Oversikt over ulike mobilfaser som ble benyttet ved ulike kolonnefraksjoner er gjengitt i Tabell 5-18.

Tabell 5-18: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon E5

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1 – 8	Metanol:vann (30:70)	ca. 240 ml
9 – 13	Metanol:vann (50:50)	ca. 150 ml
14 – 17	Metanol:vann (70:30)	ca. 120 ml
18 – 22	Metanol	ca. 150 ml
23 – 25	Aceton (vask)	ca. 90 ml
26	Etylacetat (vask)	ca. 150 ml

5.3.13.2 Analytisk TLC

Alle fraksjoner ble applisert på omvendtfase TLC-plater for å se hvilke fraksjoner som kunne slås sammen. Platen ble utviklet med metanol:vann (50:50). Etter endt utvikling og tørking ble platene betraktet i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med DPPH-løsning. Fraksjoner som inneholdt de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga fraksjonene E5.1 – E5.12, se Tabell 5-19 s. 63.

Tabell 5-19: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av fraksjon E5

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1 -3	E5.1
4	E5.2
5 – 8	E5.3
9 – 10	E5.4
11	E5.5
12	E5.6
13	E5.7
14 – 17	E5.8
18	E5.9
19	E5.10
20 - 25	E5.11
26	E5.12

5.3.13.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR-spektra av fraksjon E5.1 – E5.10 og ^{13}C NMR-spektra ble kun tatt for fraksjon E5.2. Deuterert metanol tilsatt TMS ble brukt som løsningsmiddel til samtlige fraksjoner. Spektra av fraksjon E5.2 er gjengitt i NMR-spektrum 27-28 s. 160.

5.3.13.4 Bioassay

Fraksjon E5.2 ble testet for radikalscavenging (DPPH-test). Det ble testet ved konsentrasjonene 83,3 μM , 41,7 μM , 20,8 μM og 10,4 μM (denne fraksjonen ble senere identifisert som metylgallat).

Test for xantin oksidase hemming ble også utført på fraksjon E5.2. Det ble testet ved konsentrasjonene 83,3 μM og 10,4 μM .

Resultatene er gitt i Tabell 6-20 og Tabell 6-21 s. 108-109.

5.3.14 Videre separasjon av fraksjon E8

5.3.14.1 VersaFlash kolonneseparasjon

Fraksjon E8 (4,51 g) ble løst i litt metanol:vann (40:60) og kromatografert på en C₁₈ kolonne (40x150mm) som beskrevet i avsnitt 5.3.7.1 s.53. Som mobilfase ble det benyttet metanol:vann (20:80), metanol:vann (50:50), metanol:vann (70:30), metanol og aceton. Det ble i alt samlet 25 fraksjoner à 30 ml. Mobilfaser som ble brukt ved ulike kolonnefraksjoner er gitt i Tabell 5-20.

Tabell 5-20: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon E8

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1 - 10	Metanol:vann (20:80)	ca. 300 ml
11 - 15	Metanol:vann (50:50)	ca. 150 ml
16 - 19	Metanol:vann (70:30)	ca. 120 ml
20 - 22	Metanol	ca. 90 ml
23 - 25	Aceton (vask)	ca. 90 ml

5.3.14.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene 3, 11, 17, 20 og 23, som representerer fronten til de ulike mobilfaser tolket på grunnlag av fargeintensitet på fraksjonene, samt utgangsløsningen, ble applisert på en omvendtfase TLC-plate for å se hvilke fraksjoner som kunne slås sammen. Mobilfase var metanol:vann (50:50). Etter endt utvikling og tørking ble platen betraktet i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med DPPH-løsning. Fraksjonene ble slått sammen på bakgrunn av TLC-platen. Dette ga fraksjonene E8.1 – E8.7, se Tabell 5-21.

Tabell 5-21: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av fraksjon E8

Kolonnefraksjon	Fraksjon
2 – 4	E8.1
5 - 7	E8.2
8 – 10	E8.3
11 – 15	E8.4
16 – 19	E8.5
20 – 22	E8.6
23 – 25	E8.7

5.3.14.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av alle fraksjonene. I tillegg ble ^{13}C -NMR-spektra tatt for fraksjon E8.2 og E8.4. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol tilsatt TMS som intern standard til fraksjon E8.1 – E8.6, og deuterert kloroform tilsatt TMS ble brukt til fraksjon E8.7.

5.3.15 Videre separasjon av fraksjon E8.1 – E8.3

5.3.15.1 MCI gel CHP20P kolonneseparasjon

Fraksjon E8.1 – E8.3 (til sammen 2,17 g) ble løst i litt metanol:vann (50:50) og kromatografert på en MCI gel CHP20P kolonne (25x240mm) som beskrevet i avsnitt 5.3.12.1 s. 60. Ren metanol ble brukt som mobilfase (ca. 150 ml). Det ble i alt samlet 7 fraksjoner à 15 ml.

5.3.15.2 Analytisk TLC

Alle fraksjonene ble applisert på omvendtfase TLC-plater for å se hvilke fraksjoner som kunne slås sammen. Det ble eluert med metanol:vann (50:50). Etter endt utvikling og tørking ble platene betraktet i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med DPPH-løsning.

Fraksjonene som inneholdt de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn. Dette ga fraksjonene E8.1-3A – E8.1-3E, se Tabell 5-22.

Tabell 5-22: Nye fraksjoner etter fraksjonering av E8.1 - E8.3

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1	E8.1-3A
2	E8.1-3B
3	E8.1-3C
4	E8.1-3D
5	E8.1-3E
6 -7	0

5.3.15.3 NMR-spektroskopi

Alle fraksjonene ble analysert ved hjelp av ^1H NMR-spektroskopi. ^{13}C NMR-spekter ble tatt for fraksjon E8.1-3D. Deuterert metanol tilsatt TMS som intern standard ble brukt som løsemiddel til samtlige fraksjoner.

5.3.16 Videre separasjon av fraksjon E8.1-3B – E8.1-3D

5.3.16.1 MCI gel CHP20P

Fraksjon E8.1-3B – E8.1-3D (til sammen 1,81 g) ble løst i litt metanol:vann (50:50) og kromatografert enda en gang på MCI gel CHP20P kolonne (25x240mm) som beskrevet i avsnitt 5.3.12.1 s. 60. Som mobilfase ble det denne gang benyttet metanol:vann:eddiksyre (49,5:49,5:1) og metanol:vann:eddiksyre (69,5:29,5:1). Det ble i alt samlet 12 fraksjoner av varierende volum, fra 5-10 ml.

5.3.16.2 Analytisk TLC

Samtlige fraksjoner ble applisert på en omvendtfase TLC-plate for å se hvilke fraksjoner som kunne slås sammen. Det ble utviklet med metanol:vann:eddiksyre (49,5:49,5:1). Etter utvikling og tørking ble platene betraktet i kort- og langbølget UV-lys. På bakgrunn av dette ble fraksjonene slått sammen. Dette ga fraksjonene E8.1-3.B-D1 – E8.1-3.B-D4, se Tabell 5-23.

Tabell 5-23: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av E8.1-3B - E8.1-3D

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1	E8.1-3.B-D1
2 -6	E8.1-3.B-D2
7	E8.1-3.B-D3
8 – 12	E8.1-3.B-D4

5.3.16.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR-spektra av alle fraksjonene. ^{13}C NMR-spektra ble tatt for fraksjon E8.1-3.B-D2. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert metanol tilsatt TMS som intern standard til alle fraksjonene. ^1H NMR-spekter av fraksjon E8.1-3.B-D3 er gjengitt på s. 161.

6. Resultater og diskusjon

6.1 Ekstraksjon av plantemateriale

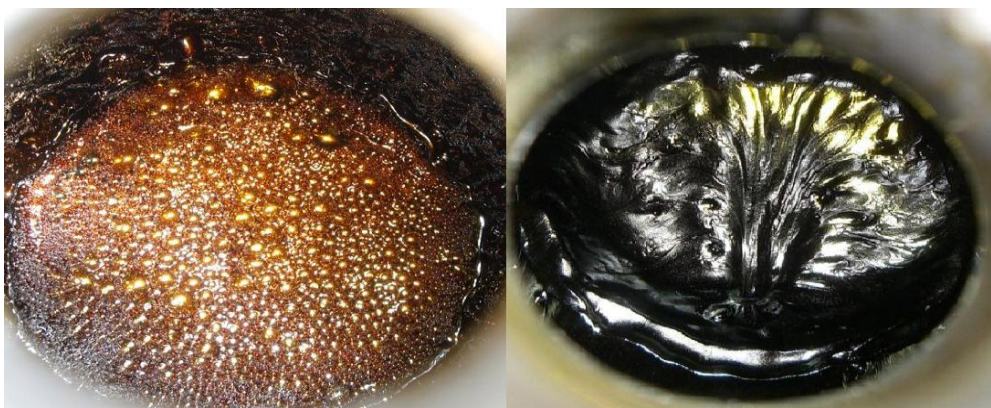
6.1.1 Utbytte av råekstrakt

Ekstraksjon av blader fra *T. macroptera* med henholdsvis diklormetan og metanol ga to råekstrakter med ulik farge og konsistens (Figur 6-1). Utbytte av ekstraktene er vist i Tabell 6-1

Tabell 6-1: Utbytte av råekstraktene

	Vekt av droge (g)	Vekt av råekstrakt (g)	Utbytte (%)
Diklormetan	1116	59,8	5,36
Metanol	1116	397,6	35,63
Totalt	1116	457,4	40,98

Tallene viser at ekstraksjon med metanol ga størst utbytte, nesten syv ganger større utbytte enn med diklormetan. Det ble ekstrahert med samme prosedyre for begge løsemidlene, men ekstraksjon med metanol tok adskillig lenger tid, nesten dobbelt så lang tid som det tok for diklormetan. Dette henger nok sammen med at det var mye mer som løste seg i metanol enn i diklormetan, derfor den store forskjellen i ekstraksjonsutbytte for de to løsemidlene.



Figur 6-1: Metanolråekstrakt (t.v.) og diklormetanråekstrakt (t.h.)

6.1.2 NMR-spektroskopi

Diklormetanrækstrakt

^1H NMR-spekteret til det upolare diklormetanrækstrakt (NMR-spektrum 1 s. 147) viser at ekstraktet består stort sett av fett som viste signaler rundt 0,88 ppm (CH_3) og 1,26 ppm (CH_2), som er karakteristisk for alkankjeder. I tillegg hadde spekteret et signal ved 5,13 ppm, som sannsynligvis tilhører vinylliske protoner fra umettet fett. Signalene ved 2,17, 5,29 og 7,26 ppm antas å komme fra aceton, diklormetan og kloroform, respektivt.

^{13}C NMR-spekteret (NMR-spektrum 2 s. 147) viste signaler i området 20-40 ppm som er typisk for alifatiske karboner. Rækstraktet hadde tre signaler ved 76-78 ppm, som antas å komme fra deuterert kloroform. I tillegg hadde spekteret to signaler ved 125-135 ppm som tyder på et alken. Disse funnene ser ut til å stemme godt overens med det som ble funnet ved ^1H NMR.

Metanolrækstrakt

^1H NMR-spekteret av metanolrækstraktet (NMR-spektrum 3 s. 148) hadde et signal ved 1,29 ppm som kan være fett. I tillegg hadde spekteret mange signaler i området 3,0-4,6 ppm, som er typisk for karbohydrater. I aromat- og olefinområdet ved 5,2-8 ppm, var det også mange signaler. Signalene ved 3,35 og 4,88 ppm antas å vise henholdsvis metanol og vann.

^{13}C NMR-spekteret (NMR-spektrum 4 s. 148) ser ut til å bekrefte det som ble sett og tolket ved ^1H NMR, med hoveddelen av signalene fra ca. 60 til 80 ppm (karbohydratsignaler).

6.1.3 Bioassay

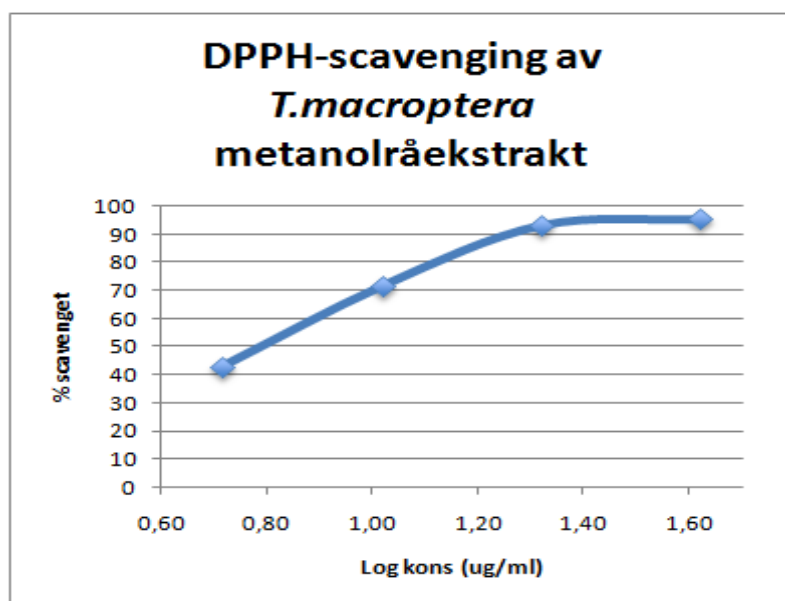
DPPH-scavenging

Assay for radikalscavenging (DPPH-test) ble utført på både metanol- og diklormetanrækstraktet. I tillegg ble testen utført på quercetin (positiv kontroll). IC_{50} -verdien til quercetin ble i testen målt å være $3,0 \pm 0,2$ $\mu\text{g/ml}$. Resultatene er vist i Tabell 6-2 s. 69.

Tabell 6-2: DPPH-test på råekstraktene (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Ekstrakt	Kons. mg/ml	Kons. i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Log kons.	Scavengingakt. (%)	SD	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Diklormetanr�ekstrakt	10	166,7	2,22	< 0		Inaktiv
	1,25	20,8	1,32	-0,8	0,3	
Metanolr�ekstrakt	10	166,7	2,22	95,2	0,4	$6,2 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$
	5	83,3	1,92	95,3	0,2	
	2,5	41,7	1,62	95,4	0,1	
	1,25	20,8	1,32	93,2	1,3	
	0,625	10,4	1,02	71,6	1,7	
	0,3125	5,2	0,72	43	2,5	

Diklormetanr ekstraktet var inaktiv som radikalscavenger ved høyest målte konsentrasjon, mens metanolråekstraktet viste seg   ha meget høy radikalscavenger aktivitet med en IC_{50} -verdi på $6,2 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$. Radikalscavenger aktiviteten er doseavhengig, se grafisk fremstilling av resultatet, Figur 6-2.

**Figur 6-2: Radikalfangende aktivitet av metanolr ekstrakt****XO-hemming**

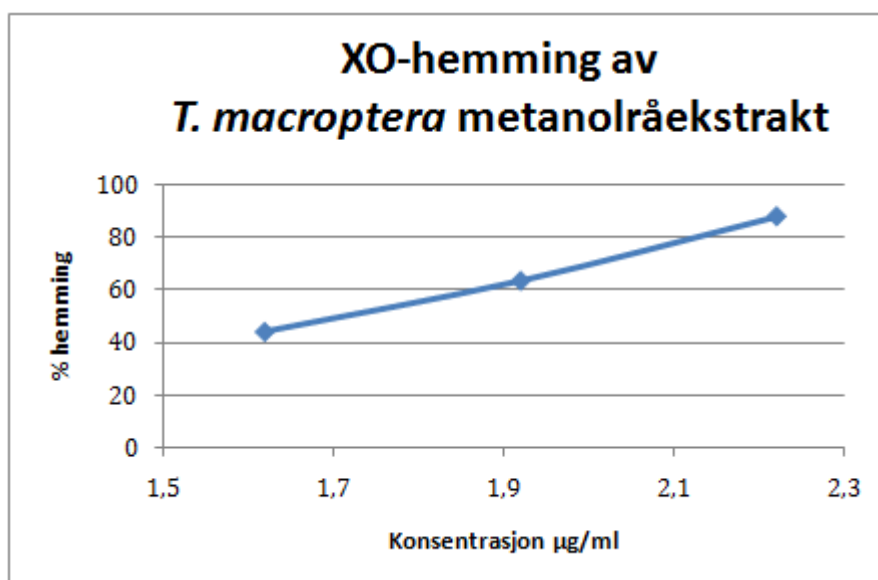
Xantin oksidasehemming ble kun testet på metanolråekstraktet, da diklormetanr ekstraktet ikke lot seg løse i et løsemiddel som er blandbart med test-reagensene. Quercetin ble også testet her, som en positiv kontroll ($IC_{50} = 0,6 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$). Resultatene er vist i Tabell 6-3 s.

70.

Tabell 6-3: XO-test på metanolrækstraktet (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik

Kons. mg/ml	Kons. i kyvette (µg/ml)	Log kons.	Hemming (%)	SD	IC ₅₀ (µg/ml)
10	166,7	2,22	87,8	7,0	52 ± 5 µg/ml
5	83,3	1,92	63,3	2,1	
2,5	41,7	1,62	43,9	2,6	

Rækstraktet ga en konsentrasjonsavhengig hemming av XO-aktiviteten, med en IC₅₀-verdi på 52 ± 5 µg/ml. Dette er konsentrasjonen av rækstraktet som gir 50 % hemming av xantin oksidase. Hemmingen er konsentrasjonsavhengig, men mye svakere enn hemmingsaktiviteten av den positive kontrollen quercetin. Figur 6-3 viser resultatene grafisk.

**Figur 6-3: Grad av enzymhemming**

6.1.4 Videre arbeid

Basert på NMR-data som gir antydning til at diklormetanrækstraktet inneholder mest fett, mens spektra av metanolrækstraktet viste mange signaler i aromat- og olefinområdet, ble videre arbeid med metanolrækstraktet sett på som mer interessant. I tillegg ble det lagt vekt på at metanolrækstraktet viste høy radikalfangeraktivitet, i motsetning til diklormetanrækstraktet, som kom ut som en inaktiv radikalfanger etter en DPPH-test. Ut fra dette ble metanolrækstraktet gitt førsteprioritet for videre arbeid, selv om diklormetanrækstraktet også ble opprenset kromatografisk.

6.2 Fraksjonering av diklormetanrækstraktet

6.2.1 VersaFlash kolonne-separasjon

Diklormetanrækstraktet ble separert og fraksjonert på en normalfase silikakolonne. De mest upolare forbindelsene ble eluert ut først, mens de påfølgende fraksjonene inneholdt stoff som hadde en gradvis økning i polaritet. Det ble i alt samlet 71 kolonnefraksjoner, som basert på analytisk TLC og ceric-spraying ble slått sammen til 17 fraksjoner, D1 – D17. Det ble applisert 2 g på kolonnen, og det samlede utbyttet kom da på 1,8 g (90 %). Dette tapet kan skyldes at en del av stoffene satt fast i kolonnen. Mesteparten av stoffene i ekstraktet kom i fraksjon D1, se Tabell 6-4.

Tabell 6-4: Diklormetanrækstrakt fraksjoner. Utbyttet er beregnet i % av totalt påsatt mengde, 2 g.

Fraksjon	Vekt (g)	Utbytte (%)
D1	0,77	38,5
D2	0,15	7,5
D3	0,03	1,5
D4	0,03	1,5
D5	0,02	1,0
D6	0,19	9,5
D7	0,10	5,0
D8	0,05	2,5
D9	0,06	3,0
D10	0,08	4,0
D11	0,04	2,0
D12	0,03	1,5
D13	0,07	3,5
D14	0,05	2,5
D15	0,02	1,0
D16	0,05	2,5
D17	0,06	3
D1 - D17	1,8	90

6.2.2 NMR-spektroskopi

Alle fraksjonene ble analysert med ^1H NMR-spektroskopi, og det ble tatt ^{13}C NMR-spektra for fraksjon D1, D3 og D10, da det var disse som så mest interessante ut. Av disse var det fraksjon D1 som så mest interessant ut, med rene og fine signaler med lite støy og forurensninger, samt at dette var den desidert største fraksjonen (Tabell 6-4 s. 71). Det ble derfor det tatt APT- og COSY-spekter (NMR-spektrum 13-14 s.153) i tillegg for nærmere utredning. Fraksjon D2 – D10 var mindre og NMR-data tyder på at fraksjonene er blandinger, trolig av terpenoider. Det kunne vært interessant å arbeide videre med disse fraksjonene, men tiden tillot ikke at disse ble undersøkt ytterligere.

Nærmere undersøkelser av fraksjon D1 tyder på at dette kan være et polyisopren. ^1H NMR-spekteret (NMR-spektrum 11 s. 152) viste to sterke signaler ved 1,68 ppm og 2,04 ppm som trolig tilhører CH_3 og CH_2 , respektivt. Ved 5,1 ppm var det også et signal, som sannsynligvis kommer fra et olefinproton. ^{13}C NMR-spekteret (NMR-spektrum 12 s. 152) bekreftet de funnene som ble gjort i protonspekteret, det var tre signaler for karboner mellom 23-32 ppm (alifatområdet) og to signaler i olefinområdet (125-135 ppm). Det viser seg at våre ^{13}C NMR-data stemmer med litteratordata for *cis*-polyisopren, da signaler for *trans*-polyisopren mangler i våre spektra (Tanaka et al. 1995), se Tabell 6-5.

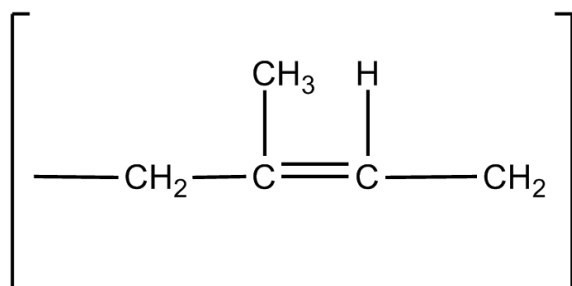
Tabell 6-5: Sammenligning av ^1H NMR-verdier for fraksjon D1 og *cis*-isopren

Karbon	<i>cis</i> -isopren (Tanaka et al. 1995)	Fraksjon D1 (NMR-spektrum 12)
CH_3	23,41	23,47
CH_2	26,51	26,44
CH_2	32,51	32,27
CH	125,16	124,98
C	135,24	135,15

Tilordning av signaler er gjort ut fra APT-spekteret, se NMR-spektrum 14 s. 153.

Ved hjelp av disse funnene og påfølgende sammenligning med NMR-spektrum i litteraturen (Stone et al. 1967; Tanaka og Takagi 1979), kan det beregnes at fraksjon D1 er et *cis*-polyisopren med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad på ca. 25. Dette er beregnet ut fra integral av signaler ved 1,60 ppm (endemetylgrupper), 1,68 ppm (metylgrupper i

polyisoprenkjeden) og 5,1 (olefinprotoner). Det ble i tillegg observert at stoffet ble uløselig ved henstand, og det utviklet seg til å ha en gummiaktig konsistens. Derfor kan det tenkes at stoffet polymeriseres videre ved henstand.



Figur 6-4: *cis-isopren enhet*

6.3 Fraksjonering av metanolrækstraktet

6.3.1 Væske-væske ekstraksjon

Metanolrækstraktet, 387,28 g, ble grovseparert videre ved væske-væske ekstraksjon ved hjelp av to løsningsmidler av ulik polaritet. De mest upolare stoffene ble ekstrahert over i etylacetat-fasen, mens de mest polare stoffene ble værende igjen i vannfasen. Stoffer med mellomliggende polaritet ble fordelt i butanol-fasen. Butanol-fasen av rækstraktet var klart den største fraksjonen, som stod for nesten halvparten av det totale utbyttet (315,95 g, 81,58 % av rækstraktet), se Tabell 6-6. Utbyttet av vannfasen er estimert. På grunn av vanskeligheter med overkoking og kraftig skumming, ble kun en liten del av vannfasen dampet inn til tørrhet. Dette kommer muligens av at vannfasen inneholdt mye overflateaktive stoffer.

Tabell 6-6: *Faser av metanolrækstraktet med ulik polaritet. Utbyttet er beregnet i % av mengde suspendert rækstrakt, 387,28 g*

	Vekt (g)	Utbytte (%)
Etylacetat-fase	85,35	22,04
Butanol-fase	155,6	40,18
Vann-fase	75,0	19,37
Totalt	315,95	81,58

6.3.2 NMR-spektroskopi

Butanol-fasen av metanolrækstraktet

^1H NMR-spekteret (NMR-spektrum 5 s. 149) til butanol-fasen så ut til å inneholde mange interessante signaler i aromat- og olefinområdet ved 5,4-7,5 ppm. Mønsteret er ikke typisk for flavonoider. Ekstraktet viste også en del signaler i området 3,2-4,3 ppm, som kan antas å komme fra karbohydrater. I tillegg hadde spekteret noen signaler i området 2-2,8 ppm som kan se ut som doble dubletter. Spekteret hadde også en del signaler som trolig stammer fra løsningsmidlet, butanol. Disse signalene kom ved 0,9 ppm, 1,5 ppm og 3,5 ppm. Signalet ved 4,99 ppm skyldes vannprotoner.

^{13}C NMR-spekteret (NMR-spektrum 6 s. 149) hadde mange signaler i området 65-110 ppm, dette tyder på at det kan inneholde karbohydrater. Spekteret viste også en del signaler i aromat- og olefinområdet (110-170 ppm). Mellom 166 og 170 ppm er det tre tydelige signaler som tyder på tre karbonylgrupper. I tillegg er det fire signaler ved 14,24 ppm, 19,9 ppm, 35,56 ppm og 62,63 ppm, som sannsynligvis stammer fra de fire karbonene i butanol. Signalene mellom 48 og 50 ppm skyldes metanol. De nevnte funnene ser ut til å stemme godt overens med det som var funnet i ^1H NMR-spekteret. Grunnen til at det var signaler fra butanol, metanol og vann i spektrene er ufullstendig inndamping av løsningsmidlene etter ekstraheringen.

Etylacetat-fasen av metanolrækstraktet

^1H NMR og ^{13}C NMR-spektrene (NMR-spektrum 7-8 s. 150) til etylacetat-fasen viste signaler i områdene for aromatiske og olefiniske forbindelser, i likhet med butanol-fasen. Det er også mange signaler ved området for karbonyler (165-174 ppm). Et kraftig signal ved 145 ppm kan tyde på et oksygenert aromatisk karbon. I tillegg hadde spektrene signaler i området 3,43-4 ppm (^1H NMR) og 62-79 ppm (^{13}C NMR) som kan tyde på karbohydrater. Spektrene hadde også en del signaler som stammer fra løsningsmidlet etylacetat, som i ^1H NMR-spekteret ga utslag ved 1,2 ppm, 1,98 ppm og 4,07 ppm. I ^{13}C NMR-spekteret var de ved 14,4 ppm, 20,8 ppm, 60,58 ppm. Signalene ved 29-31 ppm og 207,26 ppm i ^{13}C NMR-spekteret skyldes acetonrester.

Vann-fasen av metanolråekstraktet

B ade ^1H - og ^{13}C NMR-spektrene (NMR-spektrum 9-10 s. 151) til vannfasen viser at det er lite signaler for aromater, og at det for det meste består av karbohydrater. Signalene i ^1H NMR-spekteret ved 2,17 ppm samt de ved 3,31-3,33 ppm og 4,9 ppm er sannsynligvis rester av løsningsmidler (aceton, metanol og vann).

6.3.3 Bioassay**DPPH-scavenging**

Assay for radikalscavenging (DPPH-test) ble utført på samtlige faser av metanolråekstraktet. Quercetin ($\text{IC}_{50} = 3,0 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$) ble brukt som positiv kontroll. Resultatene er vist i Tabell 6-7.

Tabell 6-7: DPPH-test på ulike faser av metanolråekstraktet (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Ekstrakt	Kons. mg/ml	Kons. i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Log kons.	Scavengingakt. (%)	SD	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Butanol-fase	1,25	20,8	1,32	92,5	0,9	$6,5 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$
	0,625	10,4	1,02	70,4	2,6	
	0,3125	5,2	0,72	40,8	2,5	
Etylacetat-fase	1,25	20,8	1,32	95,3	0,1	$3,7 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$
	0,625	10,4	1,02	91,6	0,2	
	0,3125	5,2	0,72	64,1	3,4	
	0,15625	2,6	0,42	35,9	2	
Vann-fase	10	166,7	2,22	93,5	1,1	$12,4 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$
	1,25	20,8	1,32	69,7	0,6	
	0,625	10,4	1,02	43,5	1,9	

Tallene fra tabellen viser at samtlige faser av metanolråekstraktet er potente radikalscavengere, og at aktiviteten er konsentrasjonsavhengig. Etylacetat-fasen hadde høyest grad av radikalfangeraktivitet, en konsentrasjon på $3,7 \mu\text{g/ml}$ var nok til   redusere 50 % av radikalaktivitet. Den mest polare fasen (vann) hadde lavere radikalfangeraktivitet enn de mindre polare organiske fasene, butanol- og etylacetatfasen. Sammenlignet med scavengingaktiviteten til metanolråekstraktet (Tabell 6-2 s. 69), er butanol-fasen og vannfasen svakere radikalscavengere, mens etylacetat-fasen er sterkere. Dette kan komme av at

etylacetat-fasen inneholder stoffer som har sterk evne til å fange radikaler, eller det kan være synergistiske effekter mellom flere stoffer.

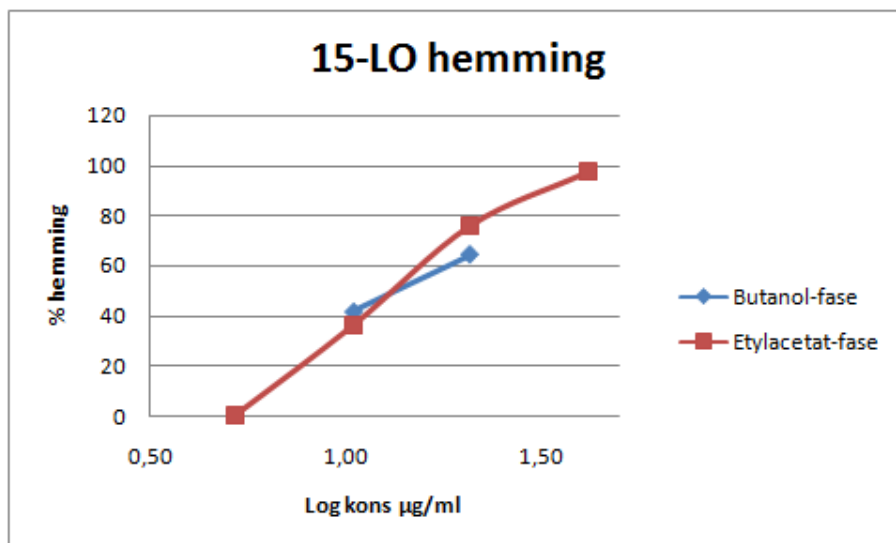
15-LO hemming

15-lipoksygenasehemming ble testet på butanol-fasen og etylacetat-fasen av metanolrækstraktet ved forskjellige konsentrasjoner, se Tabell 6-8.

Tabell 6-8: 15-LO test på butanol- og etylacetatfasen av metanolrækstraktet (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

<i>Ekstrakt</i>	<i>Kons. mg/ml</i>	<i>Kons. i kyvette (µg/ml)</i>	<i>Log kons.</i>	<i>Hemming (%)</i>	<i>SD</i>	<i>IC₅₀ (µg/ml)</i>
Butanol-fase	1,25	20,8	1,32	64,5	2,0	13,4 ± 2 µg/ml
	0,625	10,4	1,02	41,5	2,5	
Etylacetat-fase	2,5	41,7	1,62	97,2	1,7	13,0 ± 2,0 µg/ml
	1,25	20,8	1,32	75,9	4,0	
	0,625	10,4	1,02	36,1	11,6	
	0,3125	5,2	0,72	0,4		

Tabellen viser at ekstraktene ga en konsentrasjonsavhengig inhibering av 15-LO aktiviteten. IC₅₀-verdiene til disse to ekstraktene er nesten like. Alt i alt gir begge fasene en relativ høy hemmingsaktivitet. Det hadde vært interessant i videre arbeid å teste om denne effekten kan tilskrives noen spesifikke fraksjoner, men grunnet defekt apparatur var det ikke mulig å teste flere ekstrakter og fraksjoner senere i arbeidet. Figur 6-5 s. 77 gir en grafisk fremstilling av de to ulike fasers grad av enzymhemming. Det var ikke nødvendig å måle butanol-fasen ved flere konsentrasjoner, da de målte konsentrasjonene var nok til finne IC₅₀-verdien.



Figur 6-5: Grad av enzymhemming

XO-hemming

Alle fraksjonene ble testet for xantin oksidasehemming ved ulike fraksjoner, for å komme fram til en IC_{50} -verdi for hver fase, se Tabell 6-9. Quercetin ($IC_{50} = 0,6 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$) ble brukt som positiv kontroll.

Tabell 6-9: XO-hemming av ulike faser av metanolråekstraktet (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Ekstrakt	Kons. mg/ml	Kons. i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Log kons.	Hemming (%)	SD	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Butanol-fase	5	83,3	1,92	60,4	4,8	$64 \pm 8 \mu\text{g/ml}$
	2,5	41,7	1,62	32,2	5,4	
	1,25	20,8	1,32	9,1	1,1	
Etylacetat-fase	10	166,7	2,22	100,0	-	$26 \pm 3 \mu\text{g/ml}$
	2,5	41,7	1,62	62,1	3,8	
	1,25	20,8	1,32	43,8	1,9	
Vann-fase	10	166,7	2,22	53,8	2,8	$146 \pm 15 \mu\text{g/ml}$
	5	83,3	1,92	34,3	1,9	

Ut i fra tabellen kan vi se at samtlige faser av metanolråekstraktet gir en konsentrasjonsavhengig hemming av XO-aktiviteten. Det er tydelig store forskjeller i hemmingsaktivitet mellom de ulike fasene, og det ser ut til at aktiviteten reduseres med  okende polaritet. Vannfasen som er den mest polare fasen ga lavest aktivitet, mens den mest upolare fasen, etylacetat, ga h oyest aktivitet, med IC_{50} -verdier p a $146 \pm 15 \mu\text{g/ml}$ og $26 \pm 3 \mu\text{g/ml}$, respektivt. Butanol-fasen faller midt p a treet med sine mellomliggende

polaritetsegenskaper og en IC_{50} -verdi på $64 \pm 8 \mu\text{g/ml}$. Sammenlignet med enzymhemningsaktiviteten til metanolrækstraktet (Tabell 6-3 s.70), er det bare etylacetat-fasen som hadde høyere hemningsaktivitet enn moderekstraktet. Hemningsaktiviteten til butanol-fasen ligger nær aktiviteten til rækstraktet, men er noe lavere. Det kan derfor se ut som mesteparten av de stoffene som bidrar til aktiviteten av metanolrækstraktet, finnes i etylacetat-fasen.

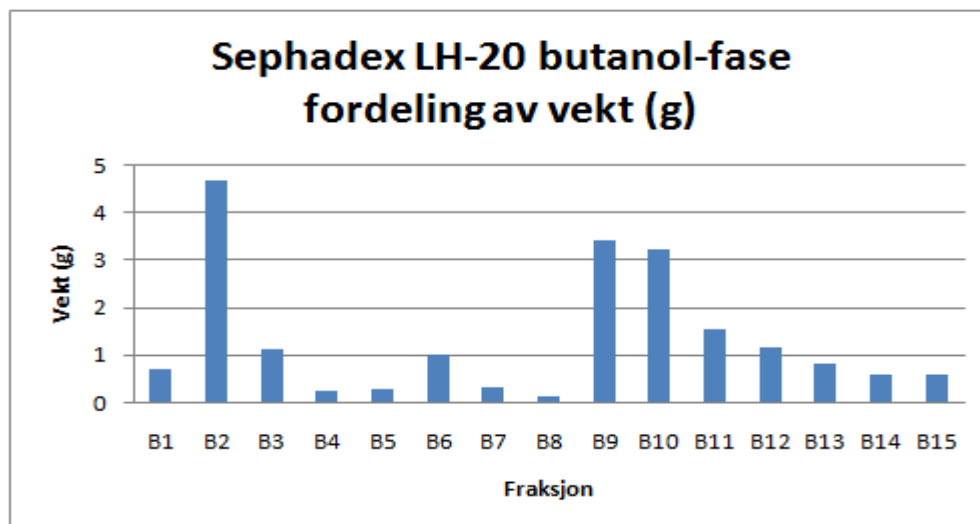
6.3.4 Videre arbeid

Ut i fra resultatene fra bioassay (DPPH-test, 15-LO hemming og XO-hemming), synes det å være slik at det er etylacetat- og butanol-fasen av metanolrækstraktet som er mest potente i de testene vi har gjennomført. Etylacetat-fasen ser ut til å være litt mer potent enn moderekstraktet, og butanol-fasen noe mindre potent. Dette kan se ut til å stemme godt overens med NMR-data (avsnitt 6.3.2 s. 74), ettersom NMR-spektra av vann-fasen så ut til å inneholde mest karbohydrater og lite aromater og olefiner. Det motsatte gjaldt NMR-spektra av etylacetat- og butanol-fasen, med mindre signaler for karbohydrater og mange signaler for i aromat- og olefinområdet. Dette kan skyldes innhold av fenoliske forbindelser og det er nettopp slike forbindelser som ofte har antioksidantaktivitet (Casetta et al. 2005). På basis av dette ble det fokusert mest på etylacetat-fasen og butanol-fasen i videre opprensning av ekstraktene. I tillegg ble det også tatt i betraktning at utbyttet av disse to fasene var størst (Tabell 6-6 s. 73).

6.4 Fraksjonering av butanol-fasen av metanolrækstraktet

6.4.1 Sephadex LH-20 kolonneseparasjon

Butanol-fasen av metanolrækstraktet ble separert og kromatografert på en Sephadex LH-20 kolonne. Det ble samlet 54 fraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying, ble slått sammen til fraksjonene B1 – B15. Det ble applisert 28,6 g og det samlede utbyttet var 19,6 g (69 %). Figur 6-6 viser utbytte av fraksjoneringen grafisk.



Figur 6-6: Utbytte av fraksjoner fra butanol-fasen av metanolrækstraktet

Bruk av Sephadex LH-20 som kolonnemateriale kan gi en lite forutsigbar elueringsrekkefølge på grunn av at separasjonsprinsippet er basert delvis på eksklusjonskromatografi og delvis ved adsorpsjon av aromatiske forbindelser. Her ble karbohydrater eluert ut først, mens de påfølgende fraksjonene inneholdt aromatiske forbindelser.

De største fraksjonene var B2, B9 og B10. Fraksjon B2 var eluert med 25 % metanol og fraksjon B9 – B10 ble eluert med ren metanol. Fraksjonene i mellom (fraksjon B4 – B8) ble eluert med 50 % metanol, og var de minste fraksjonene. Dette kan komme av høyt innhold av polare stoffer eller store molekyler som for eksempel karbohydrater, som derfor ble eluert ut først. I de senere fraksjonene var det trolig en del og aromatiske stoffer som stod for store deler av utbyttet.

6.4.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H - og ^{13}C NMR-spektra av alle fraksjonene, unntatt B1 hvor det ble kun tatt ^1H NMR-spektrum. Det var spektrene til fraksjon B2, B3, B7, B9 og B10 som så mest interessante ut. Fraksjon B1 inneholdt stort sett karbohydrater.

^1H NMR-spektra av fraksjon B2 og B3 så ganske like ut, og de hadde en del likhetstrekk med det opprinnelige ekstraktet (butanol-fasen av metanolrækstraktet), bare renere.

Spektrene viste signaler i karbohydratområdet, samt noen signaler i aromat- og olefinområdet. I tillegg var de interessante signalene, som på moderekstraktets spekter lå mellom 2-3 ppm, også å se her. Det ser ut som disse signalene er større i fraksjon B3 enn i B2. ^{13}C NMR-spektra understøttet disse funnene, samt at det i tillegg er mulig å se et signal for karbonyl ved 170 ppm og to signaler i aromat- og olefinområdet (131 ppm og 138 ppm).

Fraksjon B4 hadde noen av de samme signalene som var sett i fraksjon B2 og B3, men tillegg var det en del andre signaler, spesielt i alifatområdet (14-32 ppm). B5 så ut til å være lik B4, men med flere signaler i karbohydratområdet og to signaler for karbonyler ved 166-168 ppm.

Fraksjon B6 hadde interessante spektrale med mange signaler i karbonylområdet (167-174 ppm) og aromat- og olefinområdet. I tillegg var det signaler for karbohydrater og litt alifat.

Spektra av fraksjon B7 og B8 viste hovedsakelig innhold av karbohydrater, men i tillegg var det en del signaler i aromat- og olefinområdet som kan tyde på at det er flavonoider. I ^1H NMR-spekteret kan to signaler mellom 6,19 og 6,38 komme fra metakoblede protoner i posisjon 6 og 8 i et flavonoid.

NMR-spektra av fraksjon B9 og B10 så også veldig like ut, men B10 så ut til å inneholde mindre forurensninger. Det var hovedsakelig signaler i karbohydrat-, og aromat- og olefinområdet. ^{13}C NMR-spektra gir indikasjon på at det er tre karbonyler til stede (167-170 ppm).

Fraksjon B11 hadde de samme signalene som var å se i fraksjon B9 og B10, men i tillegg så det ut til å være noen nye signaler i aromat- og olefinområdet. Fraksjon B12 viste også mange lignende signaler som var å se i spektrene til fraksjon B9 og B10, men adskillig flere signaler i karbonyl- og aromat- og olefinområdet. Dette tyder på at denne fraksjonen inneholder et eller flere stoffer som er nært beslektet med det som er i fraksjon B9 og B10.

Spektra av fraksjon B13 og B14 lignet på spektra av fraksjon B12. Fraksjon B15 hadde mange signaler i aromatområdet i tillegg til signaler i alifatområdet.

6.4.3 Bioassay

DPPH-scavenging

Det største og mest interessante fraksjonene ut i fra NMR-data ble testet for radikalscavenging ved ulike konsentrasjoner for å finne IC_{50} -verdien. Quercetin ($IC_{50} = 3,0 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$) ble brukt som positiv kontroll. Resultatene er vist i Tabell 6-10.

Tabell 6-10: DPPH-test på fraksjon B2, B9 og B10 (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Fraksjon	Kons. mg/ml	Kons. i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Log kons.	Scavengingakt. (%)	SD	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
B2	10	166,7	2,22	13,8	8,6	$> 166,7 \mu\text{g/ml}$
B9	1,25	20,8	1,32	94,6	1,0	$3,1 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$
	0,625	10,4	1,02	92,3	0,8	
	0,3125	5,2	0,72	68,6	5,5	
	0,15625	2,6	0,42	44,4	2,4	
B10	1,25	20,8	1,32	94,2	1,2	$4,9 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$
	0,3125	5,2	0,72	51,9	2,6	
	0,15625	2,6	0,42	26,7	1,4	

Fraksjonene B9 og B10 viste høyest radikalfangende evne, med IC_{50} -verdier på henholdsvis $3,1 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$ og $4,9 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$. Dette er meget høy radikalfangende aktivitet.

Sammenlignet med utgangsfraksjonen (se Tabell 6-7 s. 75), som allerede har vist høy scavengeraktivitet, viser disse fraksjonene enda høyere aktivitet. Dette tyder på at det er stoffer i disse fraksjonene som har medvirket eller stått for den høye aktiviteten hos butanol-fasen av metanolrækstraktet. Fraksjon B2 var nesten inaktiv ved den høyeste målte konsentrasjonen, derfor ble ikke IC_{50} -verdi for denne fraksjonen funnet.

6.4.4 Videre arbeid

På bakgrunn av NMR-data og bioassay, ser det ut til at fraksjon B9 og B10 var veldig like, både med tanke på spektra og radikalfangende evne. Dette tyder på at det er samme stoff i

begge fraksjonene. Fordi fraksjon B10 så ut til å være minst forurenset og var en forholdsvis stor fraksjon (> 3 g), ble fraksjon B10 valgt ut til videre arbeid.

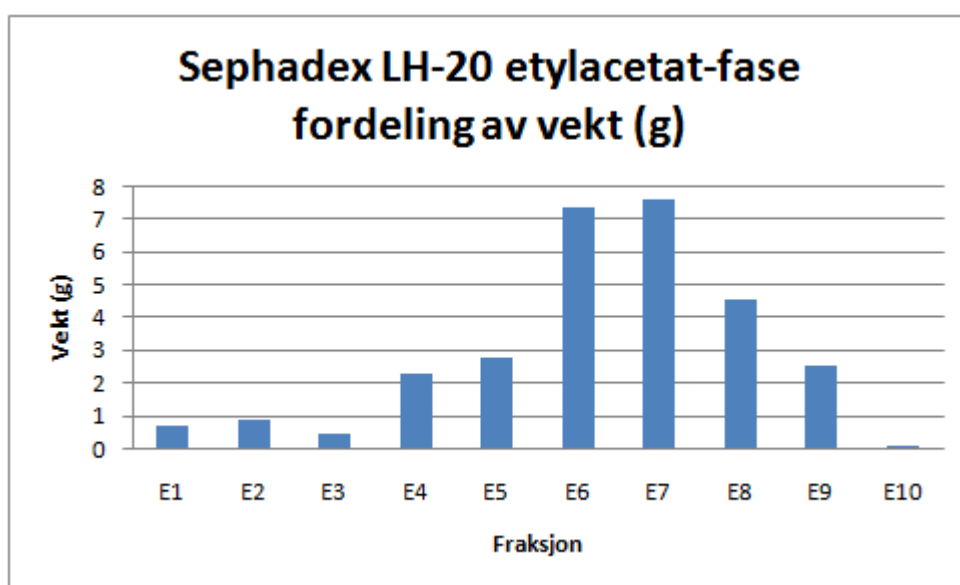
Fraksjon B2 var tilnærmet inaktiv i DPPH-testen, men den var likevel interessant fordi enkle signaler i NMR-data indikerte at det er hovedsakelig et stoff. Fraksjon B3 ble valgt ut til videre arbeid i stedet for B2 ettersom NMR-spektrene lignet, men B3 så ut til å være renere.

I tillegg ble fraksjon B7 valgt ut til videre separasjon på grunn av interessante signaler i aromat- og olefinområdet som kunne stamme fra flavonoider.

6.5 Fraksjonering av etylacetat-fasen av metanolrækstraktet

6.5.1 Sephadex LH-20 kolonne-separasjon

Etylacetat-fasen av metanolrækstraktet ble kromatografert over Sephadex LH-20. Fra Sephadex-kolonnen ble det samlet opp 38 fraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene E1 – E10 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying. Samlet utbytte var 29 g (97 %) av påsatt mengde (30 g). Figur 6-7 viser utbytte av fraksjoneringen grafisk.



Figur 6-7: Utbytte av fraksjoner fra etylacetat-fasen av metanolrækstraktet

Fraksjonen E6 og E7 var størst, til sammen stod de for halvparten av det totale utbyttet. Fraksjon E8 var også ganske stor. Alle disse ble eluert med ren metanol. Dette tyder på at etylacetat-fasen hovedsakelig består av semipolare stoffer.

6.5.2 NMR-spektroskopi

Alle fraksjoner ble analysert ved hjelp av ^1H - NMR-spektroskopi. ^{13}C NMR-spektra ble i tillegg tatt av fraksjonene E2 – E9.

Fraksjon E1 og E2 så ut til å inneholde mest fett (0,8 – 1,7 ppm) og løsemidler (metanol og vann). ^{13}C NMR-spekteret til fraksjon E2 viste i tillegg tre svake signaler for karbonyler ved 170-176 ppm og to signaler ved 130,7 ppm og 138,7 ppm som trolig kommer fra en aromat eller olefin. Med tillegg av tre signaler mellom 67-72 ppm lignet dette på spektra av fraksjon B3 (ble valgt ut til videre arbeid, se avsnitt 6.6 Videre separasjon av fraksjon B3 s. 85), men at denne fraksjonen var noe mindre ren.

NMR-spektrene til fraksjon E3 var uklare på grunn av forurensninger og støy. Men det så ut til å være en kompleks blanding av stort sett fett og karbohydrater, og lite aromat.

^1H NMR-spekteret til fraksjon E4 tydet på en forbindelse med et aromatisk proton (7,14 ppm) og noen metoksylder (3,5-3,7 ppm). I tillegg var det en del interessante signaler mellom 2,1 og 3,0 ppm som foreløpig ser ut som multipler. ^{13}C NMR-spekteret viste signaler for karbonyler (163-175 ppm), oksygenerte- og ikke-oksygenerte aromatkarboner (109-145 ppm), oksygenert alifatisk karbon (77 ppm) og metoksyler (51-53 ppm).

Fraksjon E5 hadde et enkelt signalmønster, med et signal for protoner på metylgruppe ved 3,81 ppm og noen signaler i aromatområdet, ved 7,1 ppm og 5,3 ppm. Karbonspekteret understøttet dette.

Fraksjon E6-E8 så ut til å være svært like, de hadde signaler i karbonylområdet, aromatområdet og i karbohydratområdet. Dette signalmønsteret er tidligere sett for fraksjon B9 og B10. Signalene for karbohydrater så ut til å være gradvis svakere i fraksjon E7 og E8.

6. RESULTATER OG DISKUSJON

Dette ble observert i både ^1H - og ^{13}C NMR-spektrene. Lignende signalmønster i fraksjonene E6-E8 tyder på at de inneholder nært beslektede forbindelser.

NMR-data for fraksjon E9 og E10 viste at disse er komplekse blandinger av flere stoffer som kunne vært interessant å gå videre med. Det var både signaler i alifat- og aromatområdet samt lite karbohydrater.

6.5.3 Bioassay

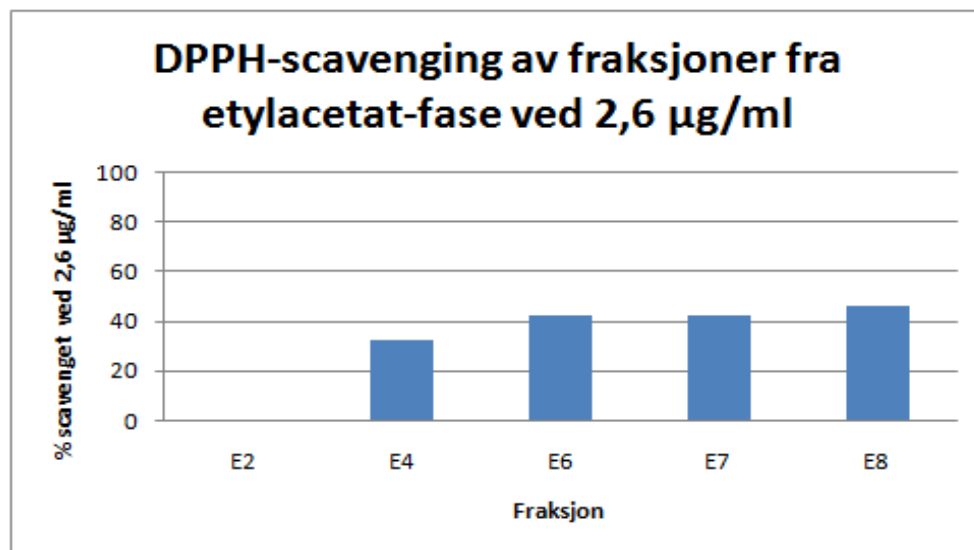
DPPH-scavenging

De største fraksjonene og de fraksjonene som hadde mest interessante NMR-spektre ble valgt ut til DPPH-test. Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($\text{IC}_{50} = 3,0 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$). Resultatene er vist i Tabell 6-11 og Figur 6-8 s. 85.

Tabell 6-11: DPPH-test på fraksjon E2, E4 og E6-E8 (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Fraksjon	Kons. mg/ml	Kons. i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Log kons.	Scavengingakt. (%)	SD	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
E2	10	166,7	2,22	31,4	0,9	$> 166,7 \mu\text{g/ml}$
E4	1,25	20,8	1,32	93,9	0,3	$4,7 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$
	0,3125	5,2	0,72	53,5	1,4	
	0,15625	2,6	0,42	31,7	0,9	
E6	1,25	20,8	1,32	94,3	1	$3,2 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$
	0,3125	5,2	0,72	68,5	4,3	
	0,15625	2,6	0,42	42,2	1,5	
E7	1,25	20,8	1,32	94,8	0,8	$3,1 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$
	0,3125	5,2	0,72	74,4	1,1	
	0,15625	2,6	0,42	41,9	3,8	
E8	0,3125	5,2	0,72	77,6	2,9	$2,9 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$
	0,15625	2,6	0,42	45,7	1,3	

Av de testede fraksjonene var det de senere fraksjonene E6 – E9 som hadde høyest radikalfangende evne, med IC_{50} -verdier mellom $3,2 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ og $2,9 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$. E4 lå like etter med en IC_{50} -verdi på $4,7 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$. Selv om det er svært lite som skiller disse verdiene, så ser det ut som det er den siste blant disse fraksjonene, fraksjon E8, som hadde høyest aktivitet. E2 hadde lav aktivitet ved høyeste målte konsentrasjon.



Figur 6-8: Radikalfangende evne til fraksjon E2, E4 og E6-E8 ved 2,6 µg/ml

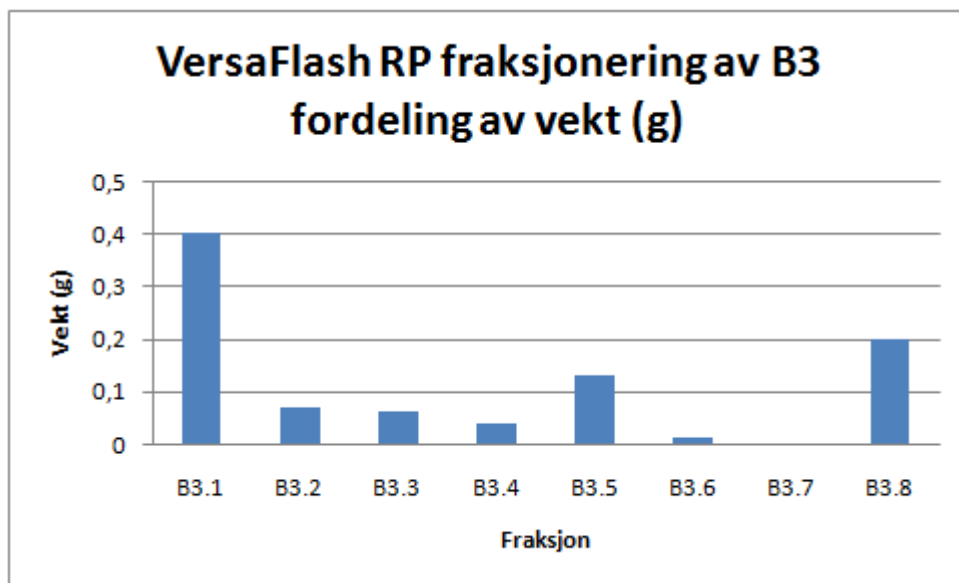
6.5.4 Videre arbeid

For videre arbeid ble de fraksjonene som så ut til å innholde få stoffer, altså relativt rene, og/eller med stor vekt eller som virket spesielt interessante, prioritert til videre fraksjonering. Fraksjon E4, E5 og E8 valgt ut til videre opprensing på grunnlag av dette, og fordi de viste høy radikalscavenger aktivitet i DPPH-testen. Fraksjon E3, E9 og E10 var også interessante, men ble mindre prioritert på grunn av kompliserte spektra som indikerte komplekse blandinger.

6.6 Videre separasjon av fraksjon B3

6.6.1 VersaFlash kolonneseparasjon

Fraksjon B3 ble kromatografert på en omvendtfase C₁₈ kolonne. Det ble samlet opp 29 kolonnefraksjoner, som ved hjelp av analytisk TLC og DPPH-spraying ble slått sammen til fraksjonene B3.1 – B3.8. Utbyttet etter separasjonen ble 0,91 g (81,9 %), se Figur 6-9 s. 86.



Figur 6-9: Utbytte av fraksjoner fra B3

Fraksjon B3.1 var den største fraksjonen. Grunnen til at fraksjon B3.8 er stor kan være fordi det ble benyttet en kraftig mobilfase, som sannsynligvis har rensset ut forurensninger av kolonnen, og muligens noe av stasjonærfasen, da denne fraksjonen kom ut av kolonnen.

6.6.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR-spektra av alle fraksjonene og ^{13}C NMR-spektra av fraksjon B3.1, B3.4 og B3.5.

^1H - og ^{13}C NMR-spektra av fraksjon B3.1 (NMR-spektrum 15-16 s. 154) har mange likhetstrekk med utgangsfraksjonen B3, bare renere. Signalene som tidligere var å se ved 0,8-1,7 ppm er nå blitt rensset vekk. Karbonspekteret viste et signal for en karboksylgruppe ved 168,7 ppm, to signaler for olefiniske karboner ved 130,0 ppm og 138,3 ppm, tre signaler for oksygensubstituerte alifatiske karbonatomer mellom 66,6-72,1 ppm og et signal for alifatisk karbon ved 31,3 ppm. Protonspekteret understøttet disse funnene. Det viste seg at NMR-data av fraksjonen stemte overens med litteraturdata for shikimisyre (Zhang et al. 2004).

^1H NMR-spekter av fraksjon B3.2 viste for det meste signaler for karbohydrater og andre forurensninger.

Fraksjon B3.3 – B3.5 hadde interessante signaler i karbohydrat-, aromat- og alifatområdet, men på grunn av lite stoffmengde ble det ikke gått videre med disse fraksjonene.

Fraksjon B3.6 – B3.8 inneholdt for det meste fett og var derfor uinteressante for videre arbeid.

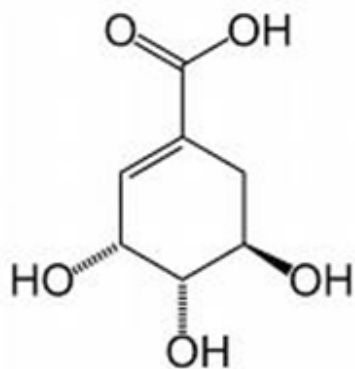
6.6.3 Shikimisyre

Shikimisyre, mer kjent som dets anioniske form shikimat, er et viktig biokjemisk intermediat i planter og mikroorganismer. Navnet kommer fra den japanske blomsten *shikimi* (*Illicium religiosum*), hvor den ble isolert første gang. Shikimisyre er en forløper til mange stoffer, som for eksempel aromatiske aminosyrer, indol og indolderivater, tanniner, flavonoider, alkaloider og andre aromatiske metabolitter (Wikipedia 2009). Shikimisyre dannes i svært mange planter, men det er uvanlig at det finnes i større mengder.

Søk i tilgjengelige akademiske databaser viste at shikimisyre er blitt isolert i andre *Terminalia*-arter (Zhang et al. 2001), men er ikke blitt isolert fra planten *Terminalia macroptera* tidligere. Isoleringen av forbindelsen i denne oppgaven er dermed det første beskrevne fra denne planten.

I en in vitro modell ble shikimisyre (alene eller i kombinasjon med quercetin) testet for immunmodulerende aktivitet. Det viste seg at shikimisyre alene var ikke i stand til å modulere det medfødte immunsystemet, mens kombinasjon av shikimisyre og quercetin viste immunmodulerende aktivitet, selv i små doser (Bertelli et al. 2008).

Isolert shikimisyre fra *Picrorhiza kurroa* frø har blitt testet for hemmingsaktivitet av lipidperoksidering og cyklooksygenase (COX)-hemming. Det ble ikke påvist særlig høy hemmingsaktivitet på de nevnte testene. Shikimisyre forsinket aktiviteten til COX-1 og COX-2, men hemmingsaktiviteten var av lav grad og så ikke ut til å være selektiv overfor noen av enzymene (Zhang et al. 2004).



Figur 6-10: Molekylstruktur for shikimisyre

Molekylvekt: 174,15 g/mol

Strukturformel: C₇H₁₀O₅

CA indeksnavn: 1-Cycloheksen-1-karboksylyse, 3,4,5-trihydroksey-, (3R,4S,5R)-

6.6.4 Bioassay

DPPH-scavenging

Fraksjon B3.1 (shikimisyre) ble testet for radikalscavenging aktivitet (DPPH-test) ved fire konsentrasjoner, se Tabell 6-12.

Tabell 6-12: DPPH-test på fraksjon B3.1 (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Kons. mg/ml	Kons. i kyvette (µg/ml)	Log kons.	Scavengingakt. (%)	SD	IC ₅₀ (µg/ml)
10	166,7	2,22	66,7	7,4	92 ± 8 µg/ml
5	83,3	1,92	47,4	0,7	
2,5	41,7	1,62	38,0	2,0	
1,25	20,8	1,32	26,8	0,6	

En IC₅₀-verdi på 92,8 µg/ml ± 8 µg/ml tilsvarer en konsentrasjon på 529 ± 46 µM beregnet ut fra molekylvekten, 174. Dette er en lav radikalscavenging evne i forhold til quercetin (IC₅₀ = 3,0 ± 0,2 µg/ml / 9,4 ± 0,6 µM), som ble brukt som positiv kontroll i DPPH-testen. Det er ikke funnet rapportert tidligere undersøkelser av shikimisyre som DPPH-scavenger.

XO-hemming

Fraksjon B3.1 (shikimisyre) ble testet for xantin oksidasehemming ved 166,7 µg/ml. Se Tabell 6-13.

Tabell 6-13: XO-test på fraksjon B3.1 (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

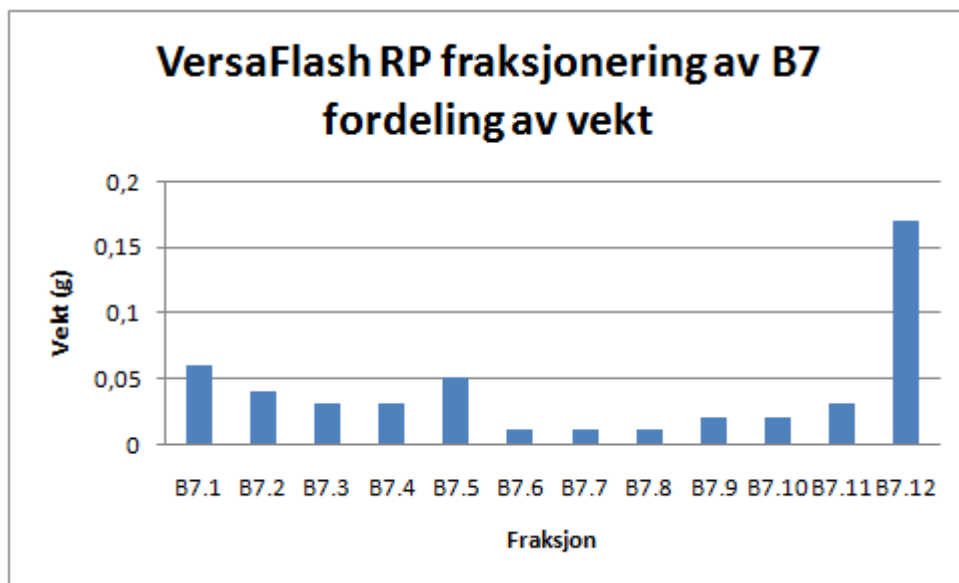
<i>Kons.</i> <i>mg/ml</i>	<i>Kons. i</i> <i>kyvette (µg/ml)</i>	<i>Log</i> <i>kons.</i>	<i>Hemming</i> <i>(%)</i>	<i>SD</i>	<i>IC₅₀</i> <i>(µg/ml)</i>
10	166,7	2,22	9,5	3,7	> 166,7 µg/ml

Ettersom fraksjonen ikke viste mer enn $9,5 \pm 3,7$ % hemming ved høyeste målte konsentrasjon, ble det ikke målt ved lavere konsentrasjoner. Eksakt IC_{50} -verdi ble ikke funnet, men vi kan si at IC_{50} -verdien må være større enn 166,7 µg/ml eller 958 µM. Quercetin ($IC_{50} = 0,6 \pm 0,1$ µg/ml / $1,9 \pm 0,4$ µM) ble brukt som positiv kontroll. Dette viser at shikimisyre er tilnærmet inaktiv som hemmer av xantin oksidase. Heller ikke her ser det ut til å foreligge tidligere undersøkelser.

6.7 Videre separasjon av fraksjon B7

6.7.1 VersaFlash kolonne-separasjon

Fraksjon B7 ble separert og fraksjonert på en omvendtfase kolonne. Det ble samlet 46 fraksjoner. På bakgrunn av analytisk TLC og DPPH-spraying ble disse slått sammen til fraksjonene B7.1 – B7.12. Utbyttet etter separasjonen var 0,48 g (155 %). Grunnen til at utbyttet ble over 100 % kan muligens være at den siste mobilfasen som ble pumpet gjennom kolonnen var aceton. Aceton har så kraftig løsemiddelstyrke at den kan ha eluert ut stoffer som satt igjen i kolonnen fra tidligere bruk, og muligens noe stasjonærfase. Det høye utbyttet kan også skyldes at fraksjonene ikke var helt tørre ved innveiling, det kan ha vært løsemiddelrester som har bidratt til ekstra tyngde. Utbytte av fraksjonene er vist grafisk i Figur 6-11 s. 90.



Figur 6-11: Utbytte av fraksjoner fra B7

Ut fra stolpediagrammet kan man se at den siste fraksjonen, fraksjon B7.12, er mye større enn de andre fraksjonene. Denne alene står for nesten 55 % av den påsatte mengden. Det er også denne fraksjonen som ble eluert med acetone. Dermed er det mest sannsynlig at denne fraksjonen består hovedsakelig av stasjonærfase og forurensninger. Hvis vi hadde sett bort fra denne fraksjonen, hadde det totale utbyttet av de resterende fraksjonene vært 0,31 g (100 %), og da hadde fraksjon B7.1 og B7.5 vært de to største fraksjonene.

6.7.2 NMR-spektroskopi

Alle fraksjoner av B7 ble analysert ved ^1H NMR-spektroskopi. I tillegg ble det tatt ^{13}C NMR-spektra av fraksjon B7.4 og B7.12. Ut i fra NMR-spektrene var det fraksjon B7.5 som hadde de mest interessante signalene. Det hadde et signalmønster i aromat- og olefinområdet (6,18-7,92 ppm) som kunne tyde på innhold av flavonoider. Signalene i karbohydratområdet (3,2-3,9 ppm) stammet trolig fra H2-H5 i et suktermolekyl. Singletten ved 3,94 ppm tydet på en forbindelse med aromatisk metoksy. ^{13}C NMR-spektrene understøttet funnene i ^1H NMR-spektrene. Fraksjon B7.4 lignet på fraksjon B7.5, men det var mindre stoff og var trolig en blanding av flere forbindelser.

Fraksjon B7.2 var liten og hadde mest uinteressante signaler i fett- og karbohydratområdet, mens fraksjon B7.3 hadde mer interessante signaler i aromatområdet, men her var det også liten stoffmengde.

Fra fraksjon B7.6 og utover var det for meste små fraksjoner med uinteressante signaler. Fraksjon B7.12 inneholdt bare stasjonærfase fra C₁₈-kolonne.

6.7.3 Videre arbeid

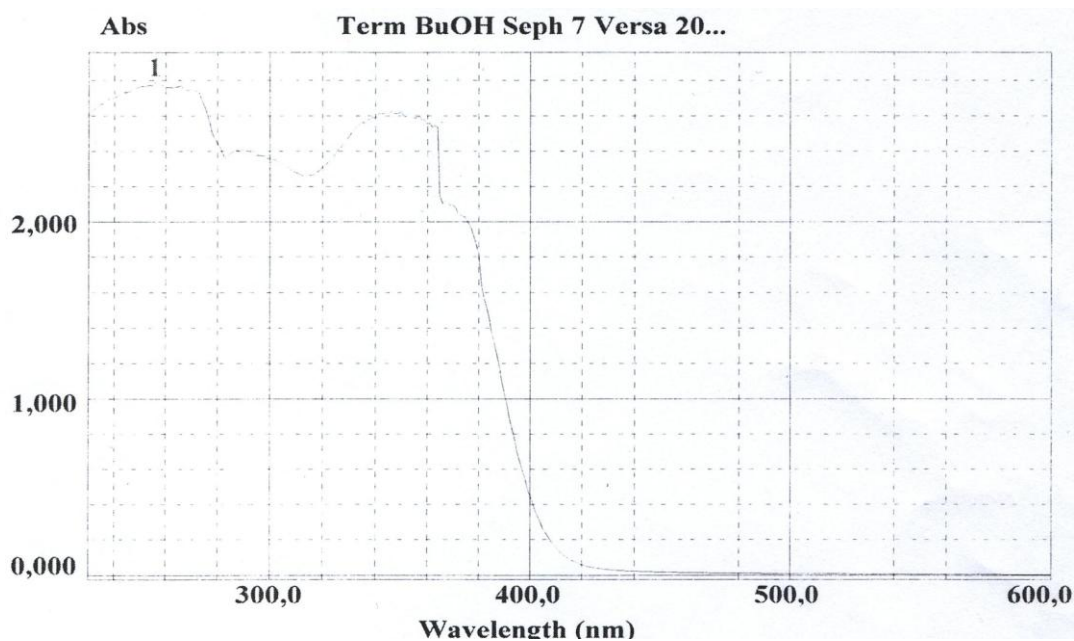
Basert på NMR-spektroskopi ble fraksjon B7.5 valgt ut til videre separasjon og fraksjonering. De resterende fraksjonene var enten for små og/eller uinteressante.

6.8 Videre separasjon av fraksjon B7.5

6.8.1 UV-spektroskopi

UV-spektroskopi brukes i praksis til å påvise konjugerte dobbeltbindinger som gir absorpsjon over 200 nm. Jo flere dobbeltbindinger i konjugasjon, jo høyere blir bølgelengden (Solomons og Fryhle 2004). UV-spektret til fraksjon B7.5 viste et absorpsjonsmaksimum ved 256 nm (Figur 6-12 s. 92). Dette tyder på at det er stoffer i fraksjon B7.5 som inneholder konjugerte dobbeltbindinger som kunne absorbere UV-lys med bølgelengder over 200 nm.

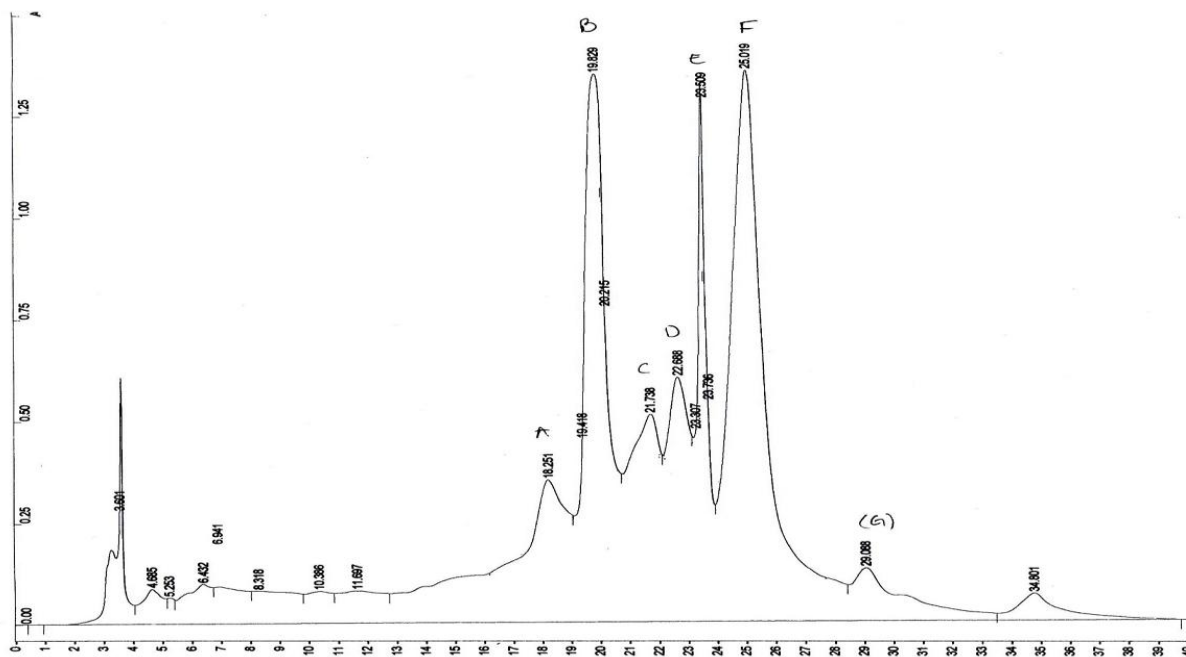
I preparativ HPLC er det viktig å vite hvor stoffene i en prøve absorberer UV-lys. Dette er for å kunne detektere forbindelser som blir eluert ut av kolonnen ved en bølgelengde hvor stoffene i fraksjonen absorberer sterkt. Dette er grunnen til at UV-spektroskopi ble utført.



Figur 6-12: UV-spekter av fraksjon B7.5

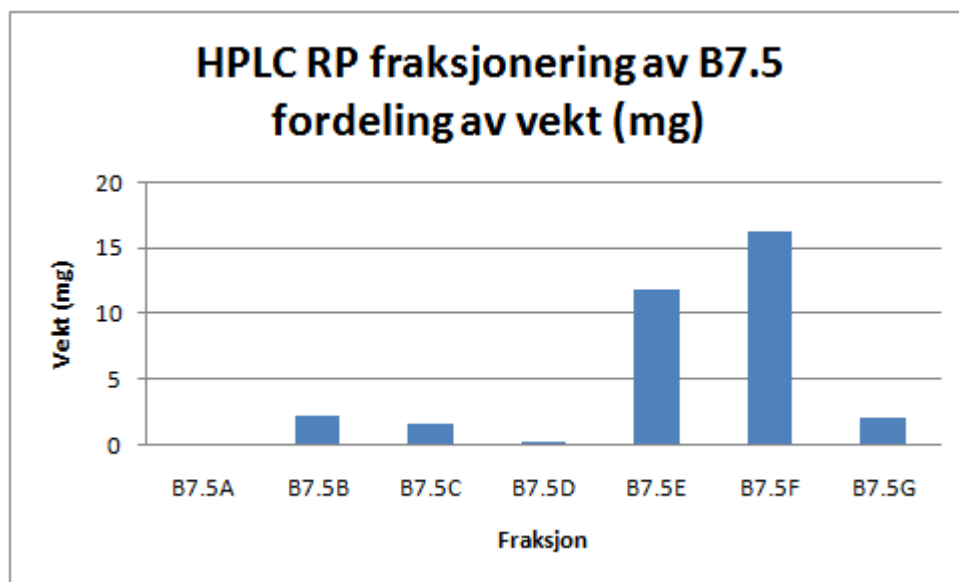
6.8.2 Preparativ HPLC

Fraksjon B7.5 ble separert og fraksjonert på en omvendtfase kolonne. På bakgrunn av absorbans registrert i kromatogrammet (Figur 6-13) ble det samlet 7 fraksjoner, B7.5A – B7.5G.



Figur 6-13: HPLC-kromatogram av fraksjon B7.5

Det samlede utbyttet ble 33,8 mg (10,9 %). Grunnen til det store tapet er usikkert. Ufullstendig eluering synes som en mulig forklaring, at en del av stoffene kan ha sittet igjen i kolonnen. Det kan også spille inn at ved så små stoffmengder kan veieusikkerheten være relativt stor. Fraksjon B7.5E og B7.5F var størst, se Figur 6-14.



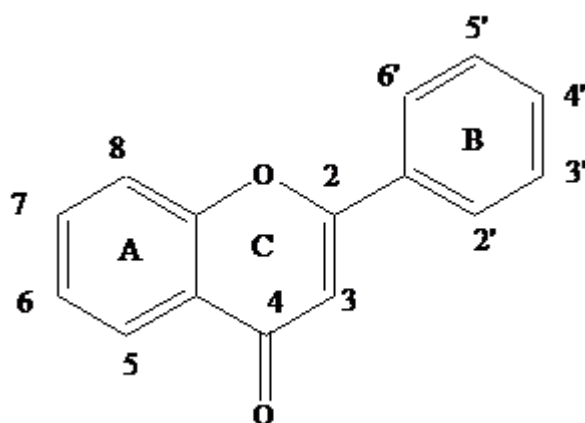
Figur 6-14: Utbytte av fraksjoner fra B7.5

6.8.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR-spektra av alle fraksjonene, og ^{13}C NMR-spektra av fraksjon B7.5B, B7.5E og B7.5F. Spektra av disse tre fraksjonene hadde mange like signaler, og lignet på spektra av utgangsfraksjonen B7.5, men spektrene var nå renere og hadde mindre forurensninger. NMR-spektra av fraksjon B7.5A og B7.5C viste at disse var tomme fraksjoner med kun signaler for løsemidler og fett. Spektra av fraksjon B7.5D og B7.5G viste små spor etter karbohydrater.

Delvis strukturformel for forbindelsen i fraksjon B7.5B ble funnet ut fra spektraldataene (NMR-spektrum 17-18 s. 155). Dette ble brukt som utgangspunkt for søk i SciFinder. Dette førte til at rutin ble funnet som mulig struktur (Figur 6-16 s. 95). Det viste seg at spektraldata oppgitt i litteraturen og observerte data stemte overens (Han et al. 2004).

NMR-data for fraksjon B7.5E og B7.5F lignet på NMR-data for fraksjon B7.5B, men i tillegg var det et signal for en metoksygruppe ved 3.95 ppm og 56,8 ppm på ^1H - og ^{13}C NMR-spektra, respektivt (NMR-spektrum 19 s. 156). Det ble derfor tatt mistanke om at dette er en forbindelse som ligner på rutin, men med en metoksygruppe i tillegg. Sammenligning med litteraturdata (Lee et al. 2003) bekreftet at denne forbindelsen var narcissin, som er rutin 3'-metyleter (se Figur 6-15 og Figur 6-17 s. 96).



Figur 6-15: Generell struktur på flavonoider med nummerering

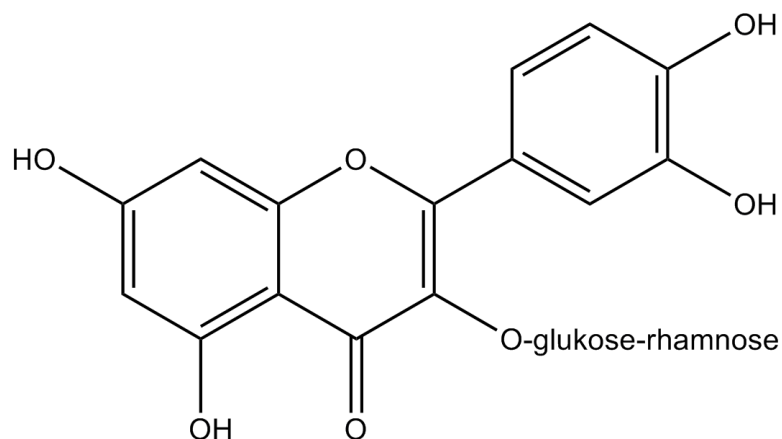
To stoffer som er rapportert i blomster av *T. macroptera* er angitt som isorhamnetin 3-glukorhamnosid og quercetin 3-glukorhamnosid (Nongonierma et al. 1990). Disse stoffene er bare delvis karakterisert, og det kan derfor være usikkert om de er narcissin og rutin.

6.8.4 Rutin

Rutin, også kalt rutosid, er 3-rhamnoglukosid av 5,7,3',4'-tetrahydroksyflavonol (quercetin). Rutin er en polyfenolisk forbindelse som klassifiseres som flavonoidglykosid som er å finne i bokhvete (*Fagopyrum esculentum* Moench) og en rekke andre planter. Rutin er noen ganger en komponent i multivitaminpreparater på grunn av dets påståtte såkalte vitamin-P effekt (Samuelsson 2004). Denne virkningen antas å virke ved å hemme økningen av kapillærskader i blodkarene assosiert med blødningstilstander eller hypertensjon hos mennesker (Kreft et al. 1999).

I tillegg til å være en moderat DPPH-radikalscavenger, er rutin rapportert å være veksthemmer av inflammatoriske mediatorer (Fang et al. 2008), og inhibere

lipopolysakkarid-indusert NO produksjon i primære peritoneale makrofager (Shen et al. 2002).



Figur 6-16: Molekylstruktur for rutin

Molekylvekt: 610,52 g/mol

Strukturformel: $C_{27}H_{30}O_{16}$

CA indeksnavn: 4H-1-Benzopyran-4-one, 3-[[6-O-(6-deoksy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glukopyranosyl]oxy] 2-(3,4-dihydroksyfenyl)-5,7-dihydroksy-

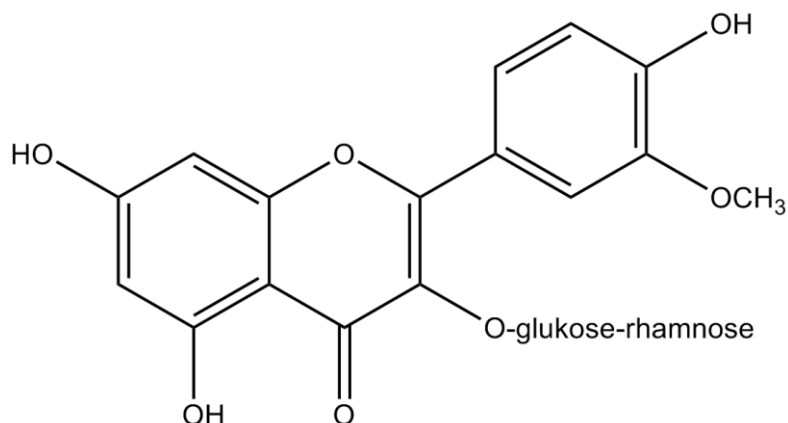
6.8.5 Narcissin

Narcissin er rutin 3' metyleter, og er som rutin et flavonoidglykosid.

Narcissin er rapportert å hemme vasopressin-indusert hjerte iskemi hos rotter. I isolert aorta remser fra kanin viste narcissin non-kompetitiv hemming av KCl- og noradrenalin-induserte kontraksjoner. Dette kan muligens utbyttes i behandling av hjertesykdommer og hypertensjon (Chen et al. 1988).

I en studie viste narcissin anti-inflammatorisk aktivitet hos rotter og hadde hypertensive effekter hos katter, sannsynligvis mediert av dets adrenalinlignende aktivitet. Det ble også vist å ha lav toksisitet (Aminoc og Vakhabov 1992).

Isolert narcissin fra *Teloxys graveolens* viste selektiv antiprotozoal aktivitet overfor *Entamoeba histolytica* ($IC_{50} = 17,2 \mu\text{g/ml}$) (Calzada et al. 2003).



Figur 6-17: Molekylstruktur for narcissin

Molekylvekt: 624,17 g/mol

Strukturformel: $C_{28}H_{32}O_{16}$

CA indeksnavn: 4H-1-Benzopyran-4-one, 3-[[6-O-(6-deoksy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glukopyranosyl]oxy]-5,7-dihydrokso-2-(4-hydrokso-3-metoksofenyl)-

6.8.6 Bioassay

DPPH-scavenging

De isolerte forbindelsene rutin og narcissin ble testet for DPPH-scavenging ved forskjellige konsentrasjoner. På grunn av for liten stoffmengde av fraksjon B7.5B (rutin), ble det benyttet kommersiell rutin (preparat ved Avdeling for farmasøytisk kjemi; uviss opprinnelse) ved utførelsen av testen. Resultatene er vist i Tabell 6-14 s. 97.

Tabell 6-14: DPPH-test på rutin og fraksjon B7.5E (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Stoff	Kons. mM	Kons. i kyvette (μM)	Log kons.	Scavengingakt. (%)	SD	IC_{50} (μM)
Rutin	2,5	41,7	1,62	84,7	2,7	$22 \pm 2 \mu\text{M}$
	1,25	20,8	1,32	48,1	4,7	
	0,625	10,4	1,02	28,4	2,4	
Narcissin (B7.5E)	5	83,3	1,92	29,8	1,7	$> 83,3 \mu\text{M}$
	2,5	41,7	1,62	15,1	0,1	
	0,625	10,4	1,02	3,7	0,7	

Rutin hadde en IC_{50} -verdi på $13,4 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ på vekt basis. For narcissin var $IC_{50} > 52 \mu\text{g/ml}$. Sammenlignet med positiv kontroll (quercetin, $IC_{50} = 9,4 \pm 0,6 \mu\text{M} / 3,0 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$), var det ingen av stoffene som hadde like høy radikalfangende evne. Narcissin hadde for lav aktivitet ved høyeste målte konsentrasjon, derfor var det ikke mulig å beregne en IC_{50} -verdi. Dette viser at en 3', 4'-dihydroksystruktur er nødvendig for høy scavengeraktivitet. Narcissin (isorhamnetin rutinosid) er tidligere rapportert å være en radikalscavenger (Hyun et al. 2006).

XO-hemming

Rutin og narcissin ble også testet for xantin oksidasehemming ved to konsentrasjoner, se Tabell 6-15. Det ble brukt kommersiell rutin i denne testen av samme grunn som nevnt over. Quercetin ($IC_{50} = 1,9 \pm 0,4 \mu\text{M} / 0,6 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$) ble brukt som positiv kontroll.

Tabell 6-15: XO-test på rutin og fraksjon B7.5E (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

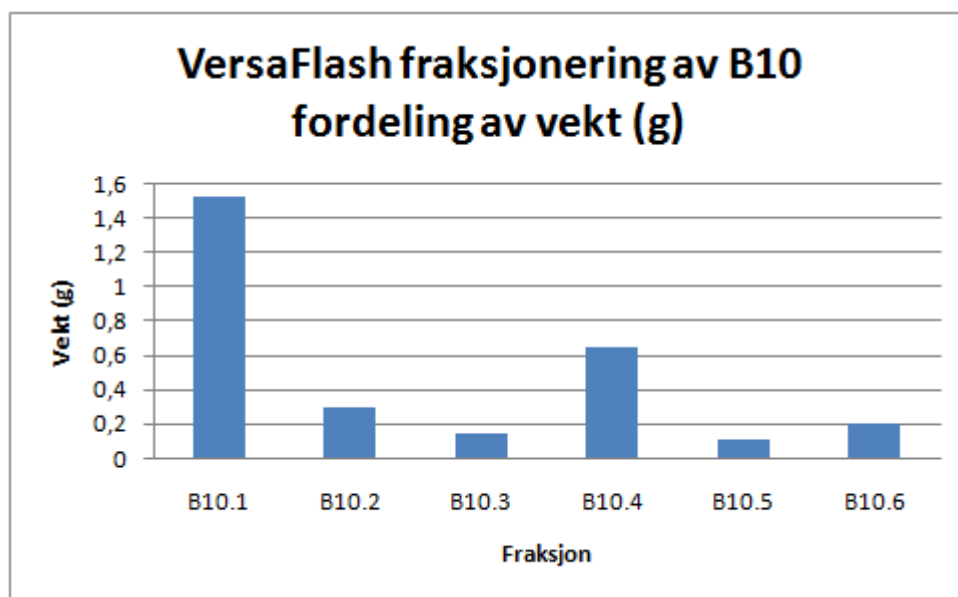
Stoff	Kons. mM	Kons. i kyvette (μM)	Log kons.	Hemming (%)	SD	IC_{50} (μM)
Rutin	5	83,3	1,92	60,0	1,9	ca. $40 \mu\text{M}$
	2,5	41,7	1,62	52,6	2,6	
Narcissin	5	83,3	1,92	13,5	3,7	$> 83,3 \mu\text{M}$

På grunn av mangel på XO-enzym var det ikke mulig å måle hemmingsaktiviteten til rutin ved lavere konsentrasjoner. Det ble derfor ikke funnet IC_{50} -verdi, verken for rutin eller narcissin. Narcissin var nesten inaktiv ved høyeste målte konsentrasjon ($IC_{50} > 52 \mu\text{g/ml}$ på vekt basis), mens rutin hadde moderat aktivitet (IC_{50} ca. $24,4 \mu\text{g/ml}$ på vekt basis). Dette viser at XO-hemming også svekkes ved metylering av 3'-OH. Både narcissin og rutin er tidligere blitt testet for XO-hemming (Hayashi et al. 1988; Choi et al. 2002).

6.9 Videre separasjon av fraksjon B10

6.9.1 VersaFlash kolonneseparasjon

Fraksjon B10 ble kromatografert på en omvendtfase C₁₈ kolonne. Det ble i alt samlet 30 fraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene B10.1 – B10.6 på bakgrunn av analytisk TLC og DPPH-spraying. Det samlede utbyttet av fraksjoneringen ble 2,89 g (90 %). Se Figur 6-18 for grafisk fremstilling av utbyttet.



Figur 6-18: Utbytte av fraksjoner fra B10

Det er tydelig at fraksjon B10.1 er den største fraksjonen. Alene står den for mer enn halvparten av det totale utbyttet.

6.9.2 NMR-spektroskopi

Alle fraksjonene ble analysert ved hjelp av ¹H NMR-spektroskopi. Fraksjon B10.2 ble også analysert ved hjelp av ¹³C NMR-spektroskopi.

Fraksjon B10.1 og B10.2 bestod i hovedsak av ett stoff. NMR-spektra tydet på en kompleks struktur med signaler fra karbohydrat, usubstituerte aromatkarboner, O- og C-substituerte aromatkarboner, og tre karboksylgrupper (NMR-spektrum 21-22 s. 157). Ut fra sammenligning med litteraturdata ble stoffet identifisert som corilagin (Chung et al. 2003).

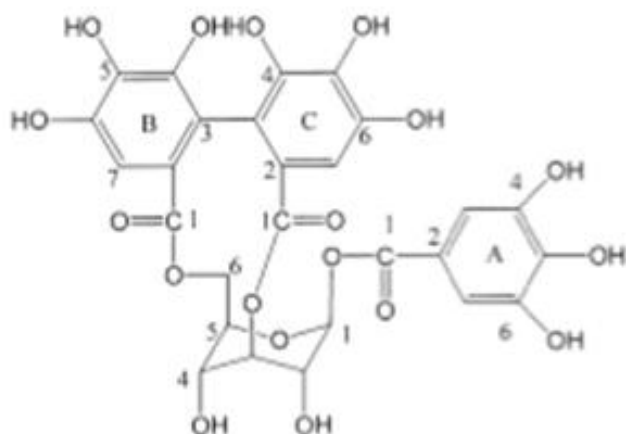
Fraksjon B10.3 og B10.4 hadde også de samme signalene som fraksjon B10.1 og B10.2, men så ut til å være mer forurenset.

Fraksjon B10.5 så ut til å inneholde mest fett mens fraksjon B10.6 bestod av utvasket stasjonærfase fra kolonnen.

6.9.3 Corilagin

Corilagin er klassifisert som et hydrolyserbart tannin (ellagtannin) som fins i en rekke planter. Corilagin tidligere isolert fra planter i *Terminalia*-familien, deriblant *T. catappa* L. (Tanaka et al. 1986), men søk i tilgjengelige akademiske databaser viste at corilagin ikke er blitt isolert fra *T. macroptera* tidligere.

I tillegg til at corilagin er vist å være en sterk radikalscavenger (Chung et al. 2003), er det også rapportert en rekke andre effekter, som for eksempel anti-inflammatorisk (Zhao et al. 2008), anti-HIV (Lim et al. 1997), hepatitt C virus hemmer (Wang et al. 2005), antifungal (Kolodziej et al. 1999), kardiovaskulære effekter (Guo og Huang 2007) og synergisme med antibiotika (oxacillin) mot methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*, MRSA (Shimizu et al. 2001).



Figur 6-19: Molekylstruktur for corilagin (Chung et al. 2003)

Molekylvekt: 636,1 g/mol

6. RESULTATER OG DISKUSJON

Strukturformel: C₂₇H₂₄O₁₈

CA indeksnavn: [(2S,3R,4S,5R,6R)-3,5-dihydroksey-2-(3,4,5-trihydrokseybenzoyl)oxy-6-[(3,4,5-trihydrokseybenzoyl)oxymetyl]oxan-4-yl] 3,4,5-trihydrokseybenzoat

6.9.4 Bioassay

DPPH-scavenging

Fraksjon B10.1 (corilagin) ble testet for radikalscavenging aktivitet (DPPH-test) ved fire konsentrasjoner, se Tabell 6-16. Quercetin (IC₅₀ = 3,0 ± 0,2 µg/ml / 9,4 ± 0,6 µM) ble brukt som positiv kontroll.

Tabell 6-16: DPPH-test på fraksjon B10.1 (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Kons. mg/ml	Kons. i kyvette (µg/ml)	Log kons.	Scavengingakt. (%)	SD	IC ₅₀ (µg/ml)
5	83,3	1,92	95,4	2,7	2,7 ± 0,3 µg/ml
1,25	20,8	1,32	95,7	0,5	
0,3125	5,2	0,72	80,3	4,1	
0,15625	2,6	0,42	48,0	4,6	

En IC₅₀-verdi på 2,7 µg/ml ± 0,3 µg/ml tilsvarer en konsentrasjon på 4,3 ± 0,5 µM beregnet ut fra molekylvekten. Dette tilsier at corilagin er en kraftigere radikalscavenger enn quercetin på molarbasis, og omtrent like sterke på vektbasis. Corilagin har tidligere blitt testet for radikalfangende aktivitet og vist seg å være en sterk radikalscavenger (Chung et al. 2003).

XO-hemming

Fraksjon B10.1 (corilagin) ble testet for xantin oksidasehemming ved tre konsentrasjoner. Se Tabell 6-17. Quercetin (IC₅₀ = 0,6 ± 0,1 µg/ml / 1,9 ± 0,4 µM) ble brukt som positiv kontroll.

Tabell 6-17: XO-test på fraksjon B10.1 (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

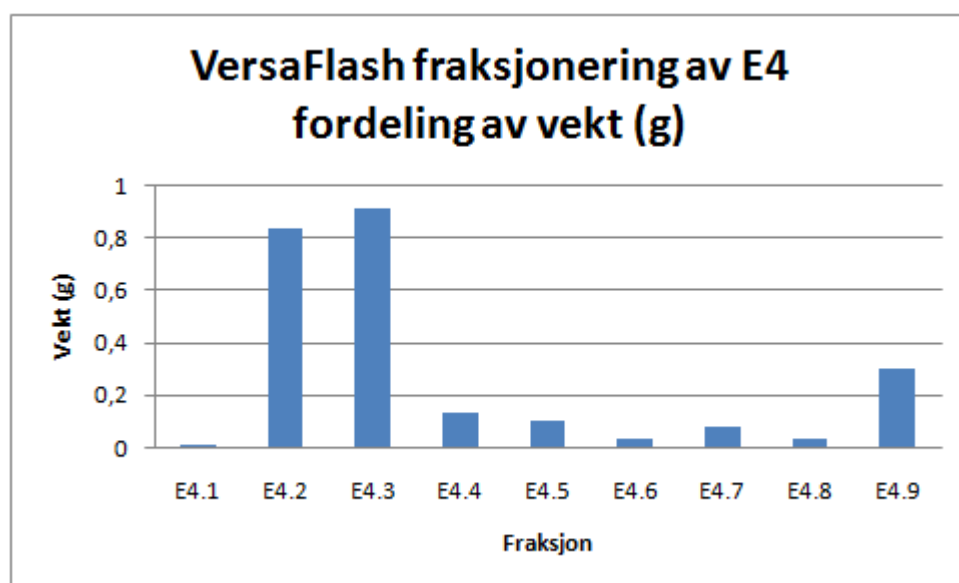
Kons. mg/ml	Kons. i kyvette (µg/ml)	Log kons.	Hemming (%)	SD	IC ₅₀ (µg/ml)
10	166,7	2,22	100		> 83,3 µg/ml
5	83,3	1,92	42,0	4,9	
2,5	41,7	1,62	17,1	4,6	

Testing av corilagin ved 166,7 µg/ml ga 100 % hemming, mens halvering av konsentrasjonen ned til 83,3 µg/ml (131,4 µM) ga kun $42 \pm 4,9$ % hemming. Dette betyr at IC_{50} -verdien må ligge et sted mellom 83,3 µg/ml og 166,7 µg/ml og at corilagin derfor har en moderat hemmingseffekt. Det har tidligere blitt rapportert at corilagin er en XO-hemmer (Duke 1992).

6.10 Videre separasjon av fraksjon E4

6.10.1 VersaFlash kolonnekromatografi

Fraksjon E4 ble kromatografert på en omvendtfase C_{18} kolonne. Det ble samlet opp 26 kolonnefraksjoner, som ved hjelp av analytisk TLC og DPPH-spraying ble slått sammen til fraksjonene E4.1 – E4.9. Utbyttet etter separasjonen ble 2,42 g (106 %), se Figur 6-20.



Figur 6-20: Utbytte av fraksjoner fra E4

Det store utbyttet kommer trolig av samme grunn som nevnt i avsnitt 6.7.1 s. 89, stasjonærfase og forurensninger vasket ut av kolonnen på grunn av kraftig mobilfase. E4.2 og E4.3 er de største fraksjonene, som til sammen tilsvarer 76 % av det totale utbyttet.

6.10.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR-spektra av alle fraksjoner unntatt fraksjon E4.1, da det var for liten stoffmengde av denne fraksjonen. I tillegg ble det tatt ^{13}C NMR-spektra av fraksjon E4.2, E4.3, E4.4 og E4.9.

Fraksjon E4.2 – E4.4 hadde NMR-spektra som tydet på at det i hovedsak innholdt samme stoff. Spektraene hadde interessante signaler for aromat, oksygenerte aromatkarboner, ikke-oksygenerte aromatkarboner, oksygenert alifat, og flere karboksyl- og metoksylylgrupper.

NMR-spektra av fraksjon E4.5 viste de samme signalene som var sett i de tidligere fraksjonene, men her var det i tillegg signaler for karbohydrater og alifater.

Fraksjon E4.6 og E4.7 hadde stort sett bare signaler for karbohydrater og alifater, mens fraksjon E4.8 var ulik og hadde mest signaler i fettområdet. Fraksjon E4.9 så ut til å være utvasket stasjonærfase fra kolonnen, som var sett tidligere.

6.10.3 Videre arbeid

Etttersom NMR-data for fraksjon E4.2 – E4.4 så ut til å inneholde samme stoff samt at det var rikelig mengder av disse fraksjonene, ble disse tre fraksjonene slått sammen for videre separasjon.

De resterende fraksjonene ble ikke undersøkt ytterligere, da de så ut til å inneholde mest fett og karbohydrater samt stasjonærfase fra C_{18} -kolonne.

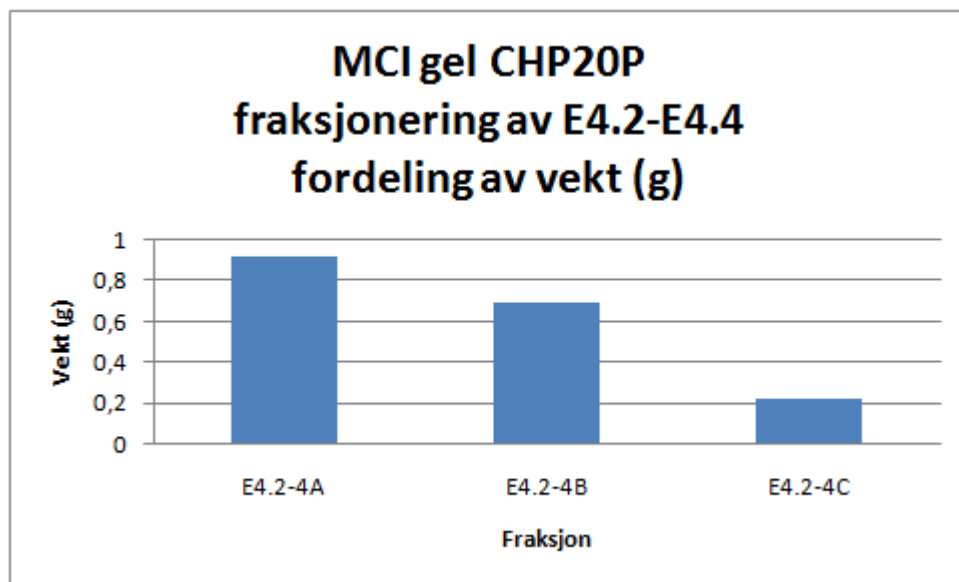
6.11 Videre separasjon av fraksjon E4.2 – E4.4

6.11.1 MCI gel CHP20P kolonnekromatografi

Fraksjon E4.2 – E4.4 ble separert og kromatografert på en MCI gel CHP20P kolonne. Det ble samlet 13 fraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC ble slått sammen til fraksjonene

E4.2-4A – E4.2-4C. Det ble applisert på 1,87 g og det samlede utbyttet var 1,83 g (97,9 %).

Figur 6-21 viser utbytte av fraksjoneringen grafisk.



Figur 6-21: Utbytte av fraksjoner fra E4.2 - E4.4

6.11.2 NMR-spektroskopi

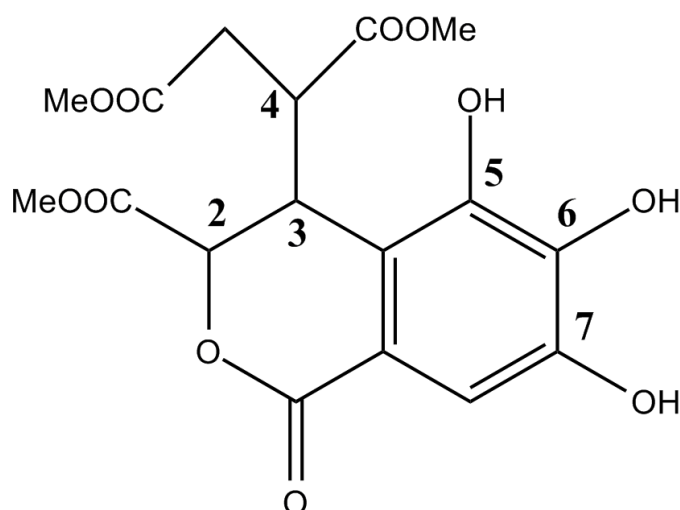
Det ble tatt ^1H NMR-spektra og ^{13}C NMR-spektra av alle fraksjonene. COSY- og HETCOR-spektra ble tatt for fraksjon E4.2-4B og E4.2-4C. NMR-data tydet på at det var samme stoff i alle tre fraksjonene.

Spektrene tydet på en forbindelse med tre karboksylgrupper, en karbonyl i tillegg til disse, og tre metylestergrupper samt en aromatringsring med ett proton og tre hydroksylgrupper. I tillegg var det et komplekst mønster av alifatiske protoner. Det var ikke karbohydrat i molekylet. Ut fra spektraldata og sammenligning med litteraturdata ble det antatt at stoffet er chebulinsyre trimetylester (Yang et al. 2008). Doble signaler i ^{13}C NMR-spektrum for karboner i posisjon 2 og 3 (se Figur 6-22 Molekylstruktur av chebulinsyre trimetylester s. 104) kan skyldes diastereomere av chebulinsyre. Diastereomere av chebulinsyre er rapportert tidligere (Ding et al. 2001).

6.11.3 Chebulinsyre trimetylester

Chebulinsyre trimetylester er ikke beskrevet tidligere, følgelig er det heller ikke blitt utført biologiske tester på stoffet. Imidlertid ble plantematerialet ekstrahert med varm metanol, noe som kan ha gitt forestring av karboksylsyregrupper. Det er tidligere rapportert at chebulinsyre trietylester er isolert fra *Terminalia chebula* ved ekstraksjon med etanol (Yang et al. 2008).

Litteratursøk på chebulinsyre viste at stoffet er tidligere isolert fra flere andre *Terminalia*-arter, men er ikke rapportert for *T. macroptera*.



Figur 6-22: Molekylstruktur av chebulinsyre trimetylester

Molekylvekt: 398 g/mol

Strukturformel: $C_{17}H_{18}O_{11}$

CA indeksnavn: [(3S,4S)-3-karboksy-3,4-dihydro-,5,6,7-trihydrokso-1-oxo-1H-2benzopyran-4-yl]-, (2S)-butansyre trimetylester

6.11.4 Bioassay

DPPH-scavenging

Fraksjon E4.2-4A (chebulinsyre trimetylester) ble testet for radikalscavenging aktivitet (DPPH-test) ved tre konsentrasjoner, se Tabell 6-18 s. 105. Quercetin ($IC_{50} = 3,0 \pm 0,2 \mu\text{g/ml} / 9,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$) ble brukt som positiv kontroll.

Tabell 6-18: DPPH-test på fraksjon E4.2-4A (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Kons. mg/ml	Kons. i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Log kons.	Scavengingakt. (%)	SD	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
1,25	20,8	1,32	96,7	0,7	$4,7 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$
0,3125	5,2	0,72	53,8	2,2	
0,15625	2,6	0,42	30,1	3,4	

$IC_{50} = 4,7 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$. Dette tilsvarer $11,8 \pm 1,0 \mu\text{M}$ på molar basis. Tallene indikerer at chebulinsyre trimetylester er en sterk radikalscavenger, nesten på linje med quercetin. Da chebulinsyre trimetylester er et nytt stoff, trolig dannet under ekstraksjon med metanol, er det følgelig ikke blitt utført bioassay tidligere. Trietylester av chebulinsyre derimot, er tidligere rapportert å være en sterk antioksidant og radikalscavenger (Sun et al. 2008). Chebulinsyre er også rapportert å være en antioksidant (Lee et al. 2007).

XO-hemming

Fraksjon E4.2-4A (chebulinsyre trimetylester) ble testet for xantin oksidasehemming ved to konsentrasjoner, se Tabell 6-19. Quercetin ($IC_{50} = 0,6 \pm 0,1 \mu\text{g/ml} / 1,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$) ble brukt som positiv kontroll.

Tabell 6-19: XO-test på fraksjon E4.2-4A (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

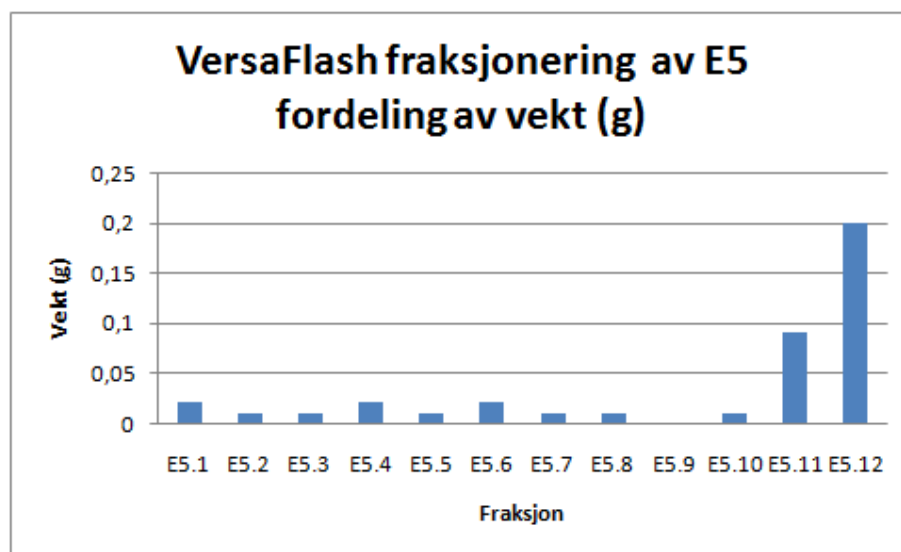
Kons. mg/ml	Kons. i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Log kons.	Hemming (%)	SD	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
10	166,7	2,22	19	6,8	$> 166,7 \mu\text{g/ml}$
5	83,3	1,92	10,1	6,1	

En IC_{50} -verdi for chebulinsyre trimetylester ble ikke funnet, da fraksjonen viste seg å være tilnærmet inaktiv ved høyeste målte konsentrasjon. Det foreligger heller ikke data på chebulinsyre trimetylester som XO-hemmer av samme grunn som nevnt i avsnittet over. Verken chebulinsyre trietylester eller chebulinsyre er tidligere testet for XO-hemmingsaktivitet.

6.12 Videre separasjon av fraksjon E5

6.12.1 VersaFlash kolonnekromatografi

Fraksjon E5 ble kromatografert på en omvendtfase C₁₈ kolonne. I alt ble det samlet opp 26 kolonnefraksjoner, som ved hjelp av analytisk TLC og DPPH-spraying ble slått sammen til fraksjonene E5.1 – E5.12. Utbyttet etter separasjonen ble 0,41 g (15 %), se Figur 6-23.



Figur 6-23: Utbytte av fraksjoner fra E5

Det er usikkert hva som er grunnen til det lave utbyttet. Fraksjon E5.11 og E5.12 var størst, og forklaringen på dette er at disse fraksjonene ble eluert ut med henholdsvis aceton og etylacetat. Dette er kraftige løsemidler, som mest sannsynlig har fått med seg det meste som var igjen i kolonnen, og tatt med seg stasjonærfase i tillegg. Det reelle utbyttet er derfor lavere. En mulig forklaring på det lave utbyttet kan være at noe stoff ble eluert ut allerede før fraksjoner ble samlet opp.

6.12.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H NMR-spektra av fraksjonene E5.1 – E5.10. ¹³C NMR-spektra ble kun tatt for fraksjon E5.2.

Fraksjon E5.1 – E5.3 så ut til å bestå av et hovedstoff. Av disse var fraksjon E5.2 renest. Ut fra NMR-spektrene av fraksjon E5.2 (NMR-spektrum 27-28 s. 160) og sammenligning med litteraturdata (Lee et al. 2008), ble stoffet i fraksjonen identifisert som metylgallat. Det kan virke sannsynlig at metylgallat er et artifakt dannet fra gallesyre under ekstraksjonen fra plantematerialet, analogt med chebulinsyre trimetylester.

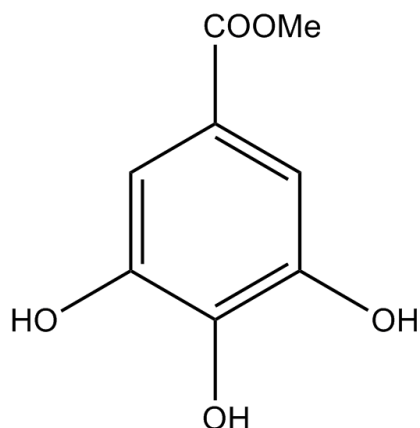
¹H NMR-spektra av fraksjon E5.4 – E5.6 viste for det meste signaler for karbohydrater og aromater. Det samme gjaldt fraksjon E5.7 og E5.8, men i tillegg ble det sett signaler i alifatområdet. På grunn av liten stoffmengde ble ikke spektrene særlig bra, og av samme grunn ble det ikke utført ytterligere arbeid på disse fraksjonene.

Fraksjon E5.9 hadde mest alifatsignaler mens fraksjon E5.10 viste signaler for alifat og karbohydrat. De siste to fraksjonene E5.11 og E5.12 inneholdt stasjonærfase fra kolonnen.

6.12.3 Metylgallat

Metylgallat er metylester av gallesyre som er tidligere rapportert fra flere *Terminalia*-arter, men ikke fra *T. macroptera*. Gallesyre er i midlertidig tidligere isolert fra *T. macroptera* (Silva et al. 2000).

I en studie hvor metylgallat ble isolert fra *Terminalia superba*, ble det også vist at både gallesyre og metylgallat hadde signifikant α -glukosidase hemmingsaktivitet. I dette tilfellet så det ut til at syregruppen var mer viktig for aktivitet enn estergruppen, da gallesyre viste en hemmingsaktivitet som var dobbel så sterk som metylgallat (Wansi et al. 2007).



Figur 6-24: Molekylstruktur av metylgallat

Molekylvekt: 184,15 g/mol

Strukturformel: C₈H₈O₅

CA navn: metyl 3,4,5-trihydroksybenzoat

6.12.4 Bioassay

DPPH-scavenging

Fraksjon E5.2 (metylgallat) ble testet for radikalscavenging aktivitet (DPPH-test) ved fire konsentrasjoner, se Tabell 6-20. I tillegg ble gallesyre (preparat ved Avdeling for farmasøytisk kjemi; uviss opprinnelse) testet for å undersøke om metylering av syregruppen hadde betydning for DPPH-scavengingaktivitet. Quercetin ($IC_{50} = 9,4 \pm 0,6 \mu\text{M} / 3,0 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$) ble brukt som positiv kontroll.

Tabell 6-20: DPPH-test på fraksjon E5.2 (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Stoff	Kons. mM	Kons. i kyvette (μM)	Log kons.	Scavengingakt. (%)	SD	IC_{50} (μM)
Metylgallat	5	83,3	1,92	96,7		$12,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$
	2,5	41,7	1,62	94,8	1,1	
	1,25	20,8	1,32	74,7	2,1	
	0,625	10,4	1,02	43,3	1,1	
Gallesyre	1,25	20,8	1,32	76,3	0,9	$10,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$
	0,625	10,4	1,02	49,3	1,5	

Ut fra IC_{50} -verdiene til gallesyre ($IC_{50} = 1,8 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ på vekt basis) og dens metylester (metylgallat) ($IC_{50} = 2,2 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ på vekt basis), ser det ikke ut til at den frie syregruppen

er nødvendig for scavengingaktivitet. Det liten forskjell i aktivitet mellom de to testede stoffene, og begge viser seg å være sterke radikalscavengere. På vekt basis er IC_{50} -verdiene for begge stoffene lavere enn quercetin. Metylgallat og gallesyre er tidligere rapportert å være DPPH-scavengere (Lee et al. 2008).

XO-hemming

Metylgallat (fraksjon E5.2) ble også testet for xantin oksidasehemming, se Tabell 6-21. På grunn av mangel på xantin oksidase ble ikke gallesyre testet her. Quercetin ($IC_{50} = 1,9 \pm 0,4 \mu\text{M} / 0,6 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$) ble brukt som positiv kontroll.

Tabell 6-21: XO-hemming på fraksjon E5.2 (Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

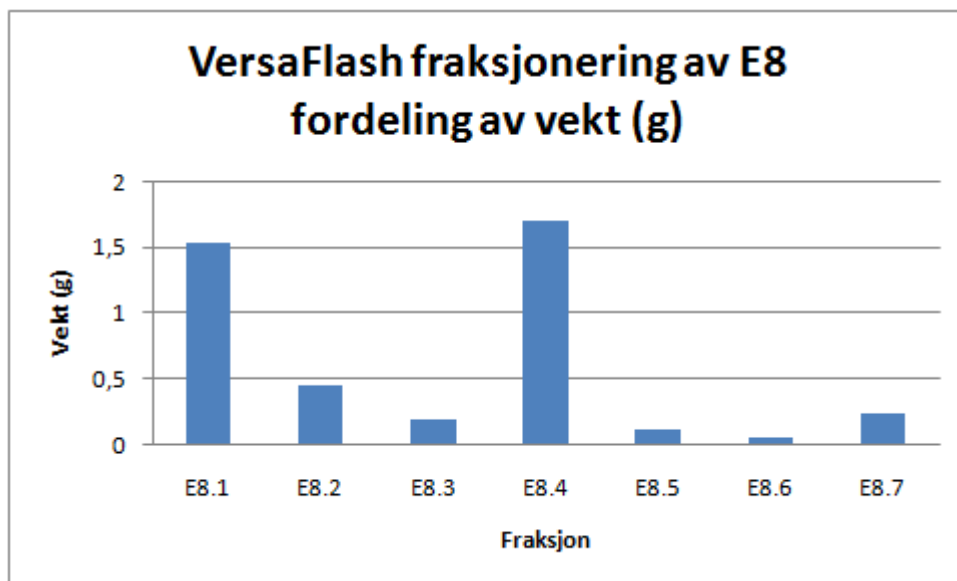
<i>Kons. mM</i>	<i>Kons. i kyvette (μM)</i>	<i>Log kons.</i>	<i>Hemming (%)</i>	<i>SD</i>	<i>IC₅₀ (μM)</i>
5	83,3	1,92	2	3	> 83,3 μM

Ved høyeste målte konsentrasjon var metylgallat ($IC_{50} > 15,3 \mu\text{g/ml}$ på vekt basis) tilnærmet inaktiv som xantin oksidasehemmer. Metylgallat er også tidligere rapportert å være inaktiv som XO-hemmer (Masuoka et al. 2006).

6.13 Videre separasjon av fraksjon E8

6.13.1 VersaFlash kolonnekromatografi

Fraksjon E8 ble separert og fraksjonert på en omvendtfase kolonne. Det ble samlet 25 fraksjoner. På bakgrunn av analytisk TLC og DPPH-spraying ble disse slått sammen til fraksjonene E8.1 – E8.7. Utbyttet etter separasjonen var 0,48 g (155 %), se Figur 6-25 s. 110.



Figur 6-25: Utbytte av fraksjoner fra E8

Fraksjon E8.1 og E8.4 var de to største fraksjonene. Til sammen veide de 3,2 g (71 %) av det totale utbyttet. Fraksjon E8.1 ble eluert med 20 % metanol mens fraksjon E8.4 ble eluert med 50 % metanol. Det ser ut som det som var løselig i hver av de to mobilfasene, kom med i disse to fraksjonene. Fraksjon E8.2 og E8.3 ble også eluert med 20 % metanol, men i synkende mengde i forhold til fraksjon E8.1.

6.13.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av alle fraksjonene. I tillegg ble ^{13}C -NMR-spektra tatt for fraksjon E8.2 og E8.4.

NMR-spektra av fraksjon E8.1 – E8.3 var nesten like. Det var mange signaler i aromatområdet og i karbohydratområdet. ^{13}C NMR-spekteret av fraksjon E8.2 understøttet funnene fra protonspekteret. I tillegg viste det en del signaler for esterkarbonyl mellom 166-175 ppm. Spektra av fraksjon E8.4 hadde også det samme signalmønsteret som ble sett for fraksjon E8.1 – E8.3, men signalene var noe svakere.

Fraksjon E8.5 viste signaler for karbohydrater og aromater, men det så ut til å være lite flavonoider og mye annet. Fraksjon E8.6 var nesten lik fraksjon E8.5, men viste i tillegg signaler i alifatområdet. Stasjonærfase fra C_{18} -kolonne var bestanddelen i fraksjon E8.7.

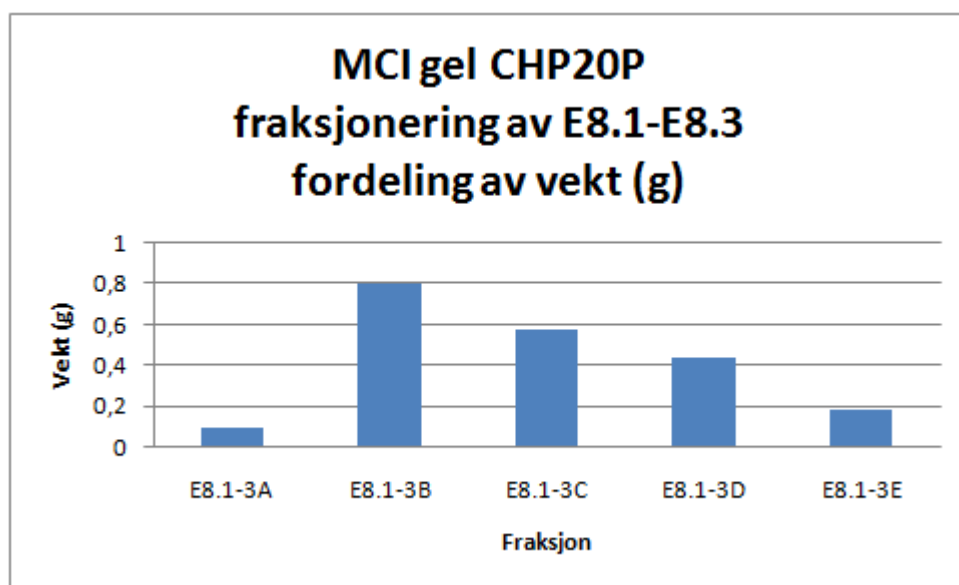
6.13.3 Videre arbeid

Fraksjon E8.1, E8.2 og E8.3 så like ut, og hadde også de mest interessante spektrene. Det ble derfor bestemt å slå sammen disse tre fraksjonene for videre opprensing.

6.14 Videre separasjon av fraksjon E8.1 – E8.3

6.14.1 MCI gel CHP20P kolonneseparasjon

Fraksjon E8.1 – E8.3 ble slått sammen og separert og kromatografert på MCI gel CHP20P kolonne. Det ble samlet 5 fraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC og DPPH-spraying ble dampet inn hver for seg. Dette ga fraksjonene E8.1-3A – E8.1-3E. Det ble applisert 2,17 g og det samlede utbyttet var 2,08 g (96 %). Figur 6-26 viser utbytte av fraksjoneringen grafisk.



Figur 6-26: Utbytte av fraksjoner av E8.1 - E8.3

Fraksjon E8.1-3B var størst, deretter var det en gradvis reduksjon i de neste fraksjonene. Fraksjon E8.1-3A var minst.

6.14.2 NMR-spektroskopi

Alle fraksjonene ble analysert ved hjelp av ^1H NMR-spektroskopi. I tillegg ble ^{13}C NMR-spekter tatt for fraksjon E8.1-3D.

NMR-spektra av samtlige fraksjoner var like, og de lignet på NMR-spektra av utgangsfraksjonen. Det var fortsatt signaler i aromat-, karbohydrat- og karbonylområdet.

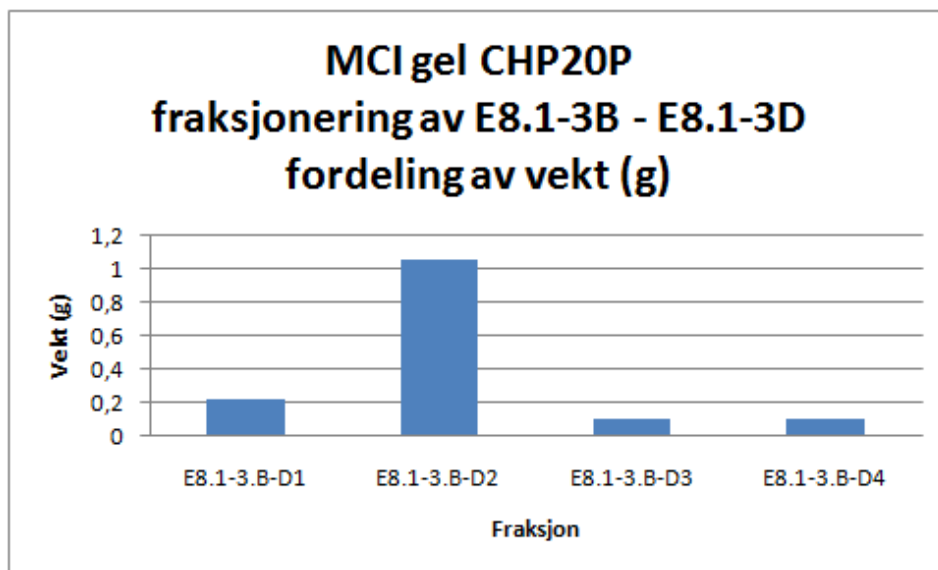
6.14.3 Videre arbeid

Ettersom spektra av samtlige fraksjoner så ut til å være like, var separasjonen ikke vellykket. Ut fra NMR-data var det trolig en kompleks blanding av flere stoffer fortsatt. Forsøk på separasjon ble derfor gjentatt. Fraksjon E8.1-3B, E8.1-3C og E8.1-3D ble slått sammen til videre opprensing.

6.15 Videre separasjon av fraksjon E8.1-3B – E8.1-3D

6.15.1 MCI gel CHP20P kolonneseparasjon

Fraksjon E8.1-3B – E8.1-3D ble separert på en MCI gel CHP20P kolonne. Denne gangen ble det tilsatt 1 % eddiksyre i mobilfase for eventuelt å gi bedre separasjon av fenoliske forbindelser. Det ble samlet 12 fraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC ble slått sammen til fraksjonene E8.1-3.B-D1 – E8.1-3.B-D4. Det samlede utbyttet var 1,46 g (81 %), se Figur 6-27 s. 113



Figur 6-27: Utbytte av fraksjoner fra E8.1-3B - E8.1-3D

Fraksjon E8.1-3.B-D2 var klart den største fraksjonen.

6.15.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H NMR-spektra av alle fraksjonene. ^{13}C NMR-spektra ble tatt for fraksjon E8.1-3.B-D2. ^1H NMR-spekter av fraksjon E8.1-3.B-D3 er gjengitt i vedleggsdelen s. 161.

NMR-spektra tilsa at alle fraksjonene var like, og at de var fortsatt det samme som utgangsfraksjonen. Dette betyr at tilsats av eddiksyre ikke har noen praktisk betydning for separasjonen.

Grunnet tidsmangel var det ikke mulig å forsøke en ny separasjonsmetode, men dette kunne vært interessant og aktuelt for videre arbeid.

Del II

Etnofarmakologiske studier i Mali

7. Etnofarmakologiske studier

7.1 Etnofarmakologi

Etnofarmakologi som et eget forskningsfelt har relativt kort historie. Termen ble først brukt i 1967 i tittelen til en bok om hallusinogener. Etnofarmakologi er i dag definert som et ”tverrfaglig vitenskapelig studium av biologisk aktive stoffer, som er tradisjonelt brukt eller observert av mennesker” (Heinrich og Gibbons 2001). Ettersom etnofarmakologisk forskning består av mange ulike prosesser som identifikasjon, innhøsting, isolering og karakterisering av innholdsstoffer og aktivitetstesting, er det kanskje ikke overraskende at det kreves kompetanse fra forskjellige fagfelter. Et forskningsteam kan for eksempel bestå av en farmakognost, botaniker, kjemiker og farmakologisk, mikrobiologisk eller biokjemisk enhet avhengig av type bioassay (Pieters og Vlietinck 2005). Men det kan også bestå av en rekke andre disipliner i etnofarmakologisk arbeid. En disiplin innen etnofarmakologi er tradisjonell medisin. World Health Organization (WHO) definerer dette som totalsummen av kunnskap, kompetanse og praksis som baserer seg på teorier, tro og erfaringer brukt av innfødte kulturer for å fremme helse, i tillegg til å forebygge, diagnostisere, forbedre eller behandle fysiske og psykiske sykdommer (WHO 2009).

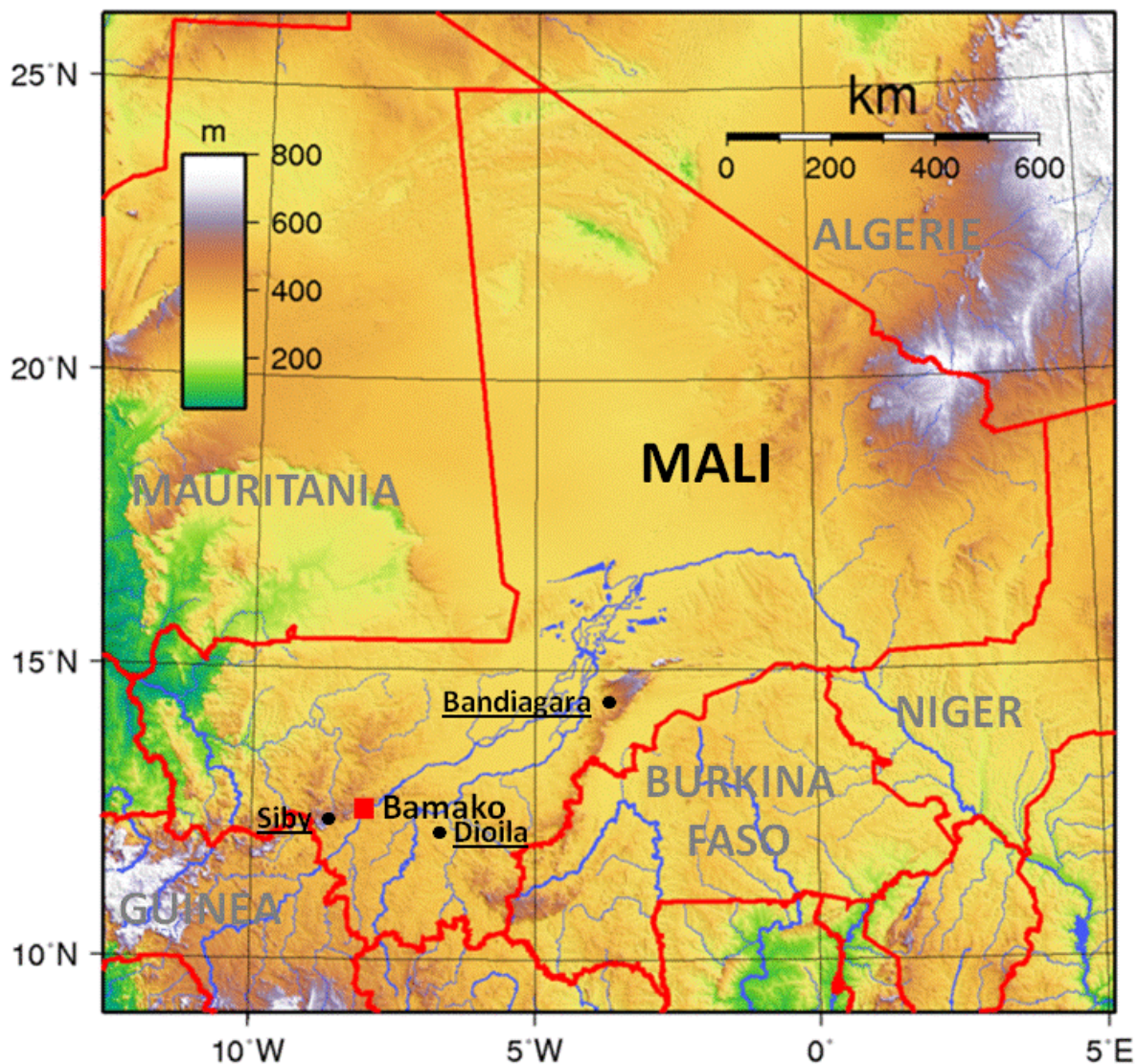
Interessen for tradisjonell medisin har økt stadig med årene. En av grunnene til dette er fordi utviklingen av et nytt legemiddel er svært kostbart og tidkrevende, benyttes tradisjonell medisin som en ”snarvei” til et utgangspunkt for nye legemidler. Noen av de viktigste konvensjonelle medisinene på markedet i dag, kommer opprinnelig fra etnofarmakologisk forskning. Opiater, kinin og digitalisglykosider er eksempler som er verdt å nevne (Heinrich og Gibbons 2001).

7.2 Mali

Mali er et stort land som ligger i vest-afrika, sør for Algeri og øst for Mauritania (Figur 7-1 s. 117). Landet kan deles inn i tre hovedområder: Området i nord som er en del av Sahara-ørkenen, den sentrale regionen som består av Sahel (et tørt slettelandskap som grenser mot ørkenen - såkalt halvørken) og den sydlige delen med fuktig Savanneklima. Det er i denne landsdelen landets to viktigste elver, Senegal og Niger, befinner seg. På begge sidene av elvene er det et smalt belte med fruktbart land. Elven Niger er selve livsnerven i Mali, og de fleste innbyggerne i landet bor langs denne elven og bruker den som drikkevannskilde, matkilde og som viktigste transportvei (Wikipedia 2009).

I følge FN er Mali et av verdens fattigste land. Fordi 65 % av arealet er ørken eller halvørken, er inntektsdistribusjonen svært skjev (CIA 2009). Det har opplevd en viss økonomisk vekst på 1990-tallet (4-5%), men fortsatt (2003) lever over 70 % av befolkningen på mindre enn 1 USD (fattigdomsgrensen) om dagen (Wikipedia 2009). I juli 2009 er befolkningen estimert til å være nesten 12,7 millioner mennesker. Omtrent 48,3 % av innbyggerne er under 15 år, 48,7 % er mellom 15 og 64 år, og kun 3,1 % er eldre enn 65 år. Gjennomsnittsalderen er dermed veldig lav, 15,8 år (CIA 2009).

De dominerende infeksjose sykdommene i Mali er bakteriell og protozoell diaré, hepatitt A, tyfoidfieber, malaria, schistosomiasis og meningokokkmeningitt. På grunn av fattigdom og begrenset medisinske fasiliteter, dårlig ernæring og hygiene, er risikoen for å bli smittet er veldig høy.



Figur 7-1: Kart over Mali. Områdene hvor det ble gjennomført feltarbeid november-desember 2008 er understreket.

7.3 Tradisjonell medisin i Mali

I det vest-afrikanske landet Mali, er den sanitære situasjonen karakterisert av overvekt av parasittiske sykdommer og infeksjoner, samt utilstrekkelig grad av kvalifisert helsepersonell, medisiner og utstyr. For å forbedre helsetilbudet, blir både konvensjonell og tradisjonell medisin brukt blant befolkningen. Tradisjonell medisin er en stor del av kulturen i Mali, og for hele 80 % av befolkningen fungerer det som den primære helseomsorg. Den tradisjonelle medisin innbefatter bruk av stoffer (urter, planter, dyr og mineralelementer), doseringer og praksiser basert på sosio-kulturelle normer og religiøs tro til opplevde erfaringer og

observasjoner. Denne kunnskapen overføres fra generasjon til generasjon i muntlig eller skriftlig form (Inngjerdingen et al. 2004).

Department of Traditional Medicine (DMT) ligger under the National Institute for Research in Public Health (INRSP), som igjen ligger under Helsedepartementet, Mali. Siden 1990-tallet har INRSP og DMT samarbeidet med World Health Organization (WHO) og Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo om forskningen på tradisjonell medisin. En av hovedmålsetningene er å sikre at tradisjonell medisin er komplementær til konvensjonell medisin. Hovedaktivitetene til DMT er registrering av tradisjonelle healere og medisinplanter, i tillegg til forskning og utvikling av såkalte ”improved traditional medicines” (ITM) fra lokale planter (Inngjerdingen et al. 2004). Hittil har DMT utviklet syv ulike ITM, som alle er anerkjent som essensielle legemidler i Mali (Diallo og Paulsen 2000).



Figur 7-2: Produksjonsavdelingen ved DMT. Her fylles og pakkes hostesirupen Balembo.

7.3.1 Improved Traditional Medicines (ITM)

ITM er forbedrede formuleringer av tradisjonell medisin som har vist klinisk effekt uten toksiske skadevirkninger.

1. **Malarial**, *Cassia occidentalis* (62 %), *Lippia chevalierii* (32 %), *Spilanthes oleracea* (6 %), dekokt av blandingen brukes mot malaria. Se Figur 7-3 s. 119.
2. **Gastroседal**, *Vernonia kotschyana*, pulver av roten er brukt mot magesår og gastritt.
3. **Balembo**, *Crossopteryx febrifuga*, sirup av frukten er brukt mot hoste. Det finnes et preparat for voksne og en egen for barn.
4. **Hepatisane**, *Combretum micrathum*, dekokt av bladene brukes mot hepatitt.
5. **Laxa-cassia**, *Cassia italica*, dekokt av bladene brukes ved konstipasjon.
6. **Dysenteral**, *Euphorbia hirta*, dekokt av den overjordiske delen er brukt mot dysenteri.
7. **Psorospermin**, *Psorospermum guineense*, en salve av rot-ekstraktene brukes mot dermatitt.



Figur 7-3: Malarial, en ITM utviklet av DMT for behandling av malaria.

7.4 Feltarbeid

Det ble utført feltarbeid i ulike områder i Mali i perioden 24. november til 13. desember 2008. Det ble i alt intervjuet 78 healere. 24. og 25. November ble 26 healere intervjuet i

Siby-området, 27. og 28. november ble 14 healere intervjuet i to landsbyer i Bandiagara-området og i tidsrommet 10. desember til 13. desember ble det intervjuet 34 healere fra fem ulike landsbyer i Dioila-området.

I alt ble det samlet informasjon om fire forskjellige planter. Healerne ble spurt om indikasjon for bruk, benyttet plantedel, tilberedelse, administrasjon og dosering om følgende planter: *Parkia biglobosa*, *Cola cordifolia*, *Ximenia americana* og *Terminalia macroptera*. Bare resultatene som omhandler sistnevnte plante vil bli presentert her. Healerne ble intervjuet individuelt. Hvert intervju varte 15-20 minutter, og ble gjennomført på det lokale språk, hovedsakelig bambara. Deretter ble det oversatt til engelsk av tolk og intervjuer Adiaratou Togola, Ph.D. I forkant av intervjuene, ble healerne informert om hvorfor intervjuene ble gjennomført, og hva dataene ble brukt til. Det var opp til hver enkelt healer å bestemme om de ville delta eller ikke. Blant alle som ble spurt, var det kun én healer som ikke ville delta. Grunnen til dette, kan være fordi det ansees som verdifull informasjon, på lik linje med en ”forretningshemmelighet”, som kan potensielt bli misbrukt av utenforstående. Etter hvert intervju, mottok hver healer 2000 CFA (26,8 Kr) og en pose med cola-nøtter (*Cola nitida*) som en del av tradisjonen. Resultatene er fra intervjuene er oppsummert i Tabell 7-1, Tabell 7-2 og Tabell 7-3.

7.4.1 Intervjuer i Siby-området

I Siby-området, sørvest for Bamako, ble 26 healere, 18 menn og 8 kvinner, fra fem ulike landsbyer intervjuet 24. og 25. november 2008. Av alle healerne som ble intervjuet, benyttet 22 av 26 *T. macroptera* i sin praksis. Med på reisen var to personer fra DMT; Adiaratou Togola, Ph.D. og botanikeren N’Golo Ballo. Adiaratou Togola, Ph.D. var både intervjuer og tolk. N’ Golo Ballo var med for å sikre at det samme plante vi snakket om. Det var 12 ulike anvendelsesområder. De hyppigst nevnte var sår (8), hoste og tuberkulose (6), og diaré og dysenteri (3). I dette området var det roten som var den mest anvendte plantedelen. Resultatene fra healerintervjuene er presentert i Tabell 7-1 s. 121.

Tabell 7-1: Oversikt over resultater fra healerintervjuer i Siby-området.

Healers navn, alder og kjønn	Landsby	Plantens lokalnavn	Indikasjon	Plantedel, tilberedelse, administrasjon og dosering
Modibo Camara 45 år, M	Djissoumana	Woloba	Indre sår	Rot , dekokt (10 min). 4 teglass drikkes 1 x 3 i 4 dager. (½ dose for barn) Kan gjentas ved behov. Ingen bivirkninger.
Koumu Sidibe 50 år, M	Djissoumana	Woloba	Hodepine, migrene	Blader , dekokt av 3 bunter. Vaske hodet sammen Sheabutter såpe 1 x 3 i 2 dager. Kan brukes av gravide.
Sakaba Camara 79 år, M	Djissoumana	Woloba	Sår i munn	Rot , presset rotsaft påføres rensset sår hver morgen før frokost inntil bedring. Kan brukes av alle. Ingen bivirkninger.
			Gingivitt	Samme som ved sår i munn.
Nèguè Coulibaly ca. 80 år, M	Djissoumana	Woloba	Indre sår	Blader og rot , dekokt av lik mengde av begge plantedeler. Vaske kroppen og drikke ca. 1 kopp 1 x 2 inntil bedring. Samme dosering for gravide og barn.
Kouraba Traoré ca, 50 år, K	Djissoumana	Woloba	Smerter i kroppen hos barn	Blader , dekokt av 3 bunter. Vaske kroppen med dekokt, deretter påføre Sheabutter på kroppen og massér 1 x 2 i 2 dager.
Maimona Coulibaly ca. 60 år, K	Djissoumana	Woloba	Smerter i brystet	Blader , dampbad av dekokt på brystet, deretter vaske hele

7. ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER

				kroppen med dekoktet 1 x 2 inntil bedring. Samme for alle. Ingen bivirkninger.
Farima Kone ca. 80 år, K	Djissoumana	Woloba	Gingivitt, tannkjøtt- betennelse	Rot , presset rotsaft påføres såret og skylles med vann 1 x 2 i 3 dager. Samme for alle. Ingen bivirkninger.
Daouda Doumbia 49 år, M	Djissoumana	Woloba	Hoste	Rot eller stammebark , drikke ½ tekopp dekokt 1 x 3 i 4 dager. Rot eller stammebark , tørkes og pulveriseres. 1 ts blandes med suppe eller grøt, spises 1 x 3 i 4 dager. Barn: ½ ts blandes med varmt vann tilsatt sukker. Ingen bivirkninger.
			Tuberkulose	Samme som ved hoste.
Fousseiny Doumbia 26 år, M	Djissoumana	Woloba	Hoste	Stammebark (indre), tørkes og pulveriseres. Deretter tilsette litt salt og spise enten alene eller med mat. Gjentas inntil bedring. Bruke mindre for barn. Ingen bivirkninger.
Nantenè Camara ca. 80 år, K	Djissoumana	Woloba	Diaré	Rotbark (indre), drikke 1 teglass dekokt 1 x 3. Samme for alle. Ingen bivirkninger.
Talamba Camara 29 år, M	Djissoumana	Woloba	Hoste	Stammebark (indre), drikke 1 teglass maserasjon 1 x 1 inntil bedring. Barn: ½ teglass. Ingen bivirkninger.

7. ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER

Sidiki Coulibaly 58 år, M	Djissoumana	Woloba	Inkontinens	Rotbark , tørkes og pulveriseres. ½ teglass pulver i 2-300 ml varmt vann drikkes 1 x 1 rett før leggetid i 3-7 dager.
			Dysenteri	Stammebark , dekokt av 1 håndfull i ½ L vann. Drikke 1 tekopp 1 gang. Kan brukes av barn.
Bakary Traoré 35 år, M	Djissoumana	Woloba	Diaré, dysenteri	Rot , drikke 1 teglass dekokt. Barn: 1 ss dekokt. Ingen bivirkninger.
Bamba Keita 55 år, M	Djissoumana	Woloba	Diabetes	Blader og rot , drikke 1 tekopp dekokt av blandingen 1 x 2 i 5-7 dager. Ingen bivirkninger.
			Diabetisk fotsår	Samme som ved diabetes
			Epilepsi	Blader , dekokt av 3-(4) bunter i nok vann for 1 tekopp. Drikke 1 x 1 i 3-(4) dager.
Fafrémba Doumbia 67 år, M	Djissoumana	Woloba	Indre sår	Rotbark (indre), drikke 1 teglass dekokt 1 x 3 i 3-(4) dager. Barn: ½ teglass. Ingen bivirkninger.
			Sår i munn	Rotbark (indre), presset barksaft blandes med litt vann og brukes til å skylle munnen, 1 x 2 inntil bedring. Ingen bivirkninger.
Famoury Konaté ca. 80 år, M	Kalassa	Woloba	Alopesi	Blader, stammebark og frukt , dekokt brukes til å vaske håret og kroppen 1 x 1 inntil opphør

7. ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER

av håravfall. Kan brukes til barn.

Bobo Camara ca. 80 år	Guena	Woloba	Sår i munn	Rot , skylle munnen med dekokt 1 x 2 inntil bedring. Ingen bivirkninger.
Lamine Coulibay 59 år, M	Djissoumana	Woloba	Indre sår	Rot , dekokt (2-3 timer, til det blir sirup-aktig). Drikke 2 ss 1 x 2 i 1 uke. Barn: 1 ss. Ingen bivirkninger, men bitter smak.
			Feber hos barn	Rot , vaske kroppen med dekokt 1 x 2 i 4 dager.
Lamine Keita 46 år, M	Dogoro	Woloba	Infertilitet hos kvinner	Rotbark (indre), tørkes og pulveriseres. 1 ts tilsettes grøt eller væske og konsumeres 1 x 1 inntil befruktning/graviditet. Ingen bivirkninger.
			Hoste	Små blader , drikke 1 tekopp dekokt 1 x 3 inntil bedring. Barn: 1 ss.
Sekou Coulibaly 72 år, M	Djissoumana	Woloba	Hoste	Stammebark (indre), drikke 1 tekopp maserasjon x 3 i inntil 1 uke. Samme for alle. Ingen bivirkninger.
Nakani Koné ca. 70-80 år, K	Djissoumana	Woloba	Indre sår	Rot , dekokt drikkes inntil bedring. Samme for alle.
Niagalé Camara ca. 56 år, K	Djissoumana	Woloba	Dermatose hos barn	Blader eller rot , dekokt brukes til å vaske kroppen 3-(4) ganger.

7.4.2 Intervjuer i Bandiagara-området

27. og 28. november ble 14 healere intervjuet i to landsbyer i Bandiagara-området. INRSP har et forskningssenter i Bandiagara, så dette ble brukt som base. Med på reisen var Adiaratou Togola, Ph.D. I tillegg var det nødvendig med en tolk, Akouni Dougnon, ettersom det brukes mange ulike dialekter i dette området. I alt var det bare 8 av 14 healere som brukte *T. macroptera* i sin praksis, og i de fleste tilfellene var det *Loranthus*-delen eller stammebarken, da gjerne i form av et dekokt, som ble brukt mot gulsott (5). En oversikt over resultatene fra intervjuene er presentert i Tabell 7-2.

Tabell 7-2: Oversikt over resultater fra healerintervjuer i Bandiagara-området.

Healers navn, alder og kjønn	Landsby	Plantens lokalnavn	Indikasjon	Plantedel, tilberedelse, administrasjon og dosering
Amadou Bossoro Dougnon 58 år, M	Iriguili	Bosokuko	Ubevissthet	Stammebark (ytre), pulveriseres og påføres nesa og huden (utblandet med Sheabutter). Ved bevissthet, skal pulveret blandes med vann.
Kaliba Guindo 84 år, M	Iriguili	Akouko	Gulsott	Stammebark , stammebark av <i>Anogeissus leiocarpus</i> og rotbark av <i>Strophantus sarmentosus</i> blandes. Drikke 3-(4) håndfull dekokt 1 x 2 i 5 dager.
Issa Tapilé 64 år, M	Iriguili	Baskogo	Konjunktivitt	Blader , dekokt, vaske øynene 1 x 2 inntil bedring. Samme for alle.
Antandou Kassogué 70 år, M	Iriguili	Baskugo	Reumatisme	<i>Loranthus</i> -blader, drikke 3 håndfull dekokt 1 x 2, og dampbad av resten inntil bedring.

7. ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER

Ogonidjou Guirou 55 år, M	Banani	Basokugo	Gulsott	<i>Loranthus</i> -blader, drikke 3-(4) håndfull dekokt 1 x 2 i 3-(4) dager. Ingen bivirkninger.
Seydou Guirou 66 år, M	Banani	Bosokugo	Gulsott	<i>Loranthus</i> , dekokt, drikke 3-(4) håndfull 1 x 2 i 3 dager og vaske kroppen med resten.
Seydou Guimbogo 69 år, M	Banani	Bosokugo	Gulsott	<i>Loranthus</i> , dekokt, drikke 3-(4) håndfull 1 x 2 i 3-4 dager og vaske kroppen med resten.
Ana Guirou 38 år, M	Banani	Bosokugo	Gulsott	Stammebark , blande dekokt med grøt og drikke 1 x 3 inntil bedring. Ingen bivirkninger.

7.4.3 Intervjuer i Dioïla-området

Tredje og siste del av feltarbeidet ble utført i Dioïla-området, sørøst for hovedstaden Bamako. Healerintervjuene ble foretatt i tidsrommet 10. desember til 13. desember. Totalt ble 38 healere fra fire ulike landsbyer intervjuet, av disse var det bare én healer som ikke brukte *Terminalia macroptera* i sin praksis. Med på reisen denne gangen, var igjen Adiaratou Togola, Ph.D. og botanikeren N' Golo Ballo, som byttet på å intervjuer healerne, men det var fortsatt Adiaratou Togola, Ph.D. som oversatte til engelsk. I dette området var det 25 ulike bruksområder som ble oppgitt, infeksjoner (9) og smerter (7) var de mest populære. Den hyppigst anvendte plantedelen er stammebark, og da i form av et dekokt. Resultatene er presentert i Tabell 7-3 s. 127.

Tabell 7-3: Oversikt over resultater fra healerintervju i Dioila-området.

Healers navn, alder og kjønn	Landsby	Plantens lokalnavn	Indikasjon	Plantedel, tilberedelse, administrasjon og dosering
Fousseyni Coulibaly 37 år, M	Dioila	Woloba	Dermatitt	Stammebark og rotbark , drikke ½ L dekokt 1 x 2 og vaske kroppen med resten, i 1 måned. Barn: 1 teglass. Ingen bivirkninger.
Gaoussou Fofano 48 år, M	Dioila	Woloba	Mot for tidlig fødsel	<i>Loranthus</i> , tørkes og pulveriseres. 1 håndfull med pulver kokes opp med ¼ L vann og drikkes 1-2 ganger daglig i 3 dager.
			Dysmenoré	Samme som ved mot for tidlig fødsel, bare dampbad av magen i tillegg.
Daouda Sidibé 75 år, M	Dioila	Woloba	Øyekatarr, infeksjon	<i>Loranthus</i> , tørkes og pulveriseres. 1 håndfull pulver blandes ut i 1 L vann og brukes til å vaske øynene 1 x 2 inntil bedring.
Moussa Sidibé 62 år, M	Dioila	Woloba	Kroniske sår	Rot , pulveriseres og appliseres på rensset sår 1 x 2 inntil bedring.
			Hemorroider	Rot , pulver blandes med smør (valgfritt, ingen spesifikk type) og påsmøres 1 x 2 i 3 dager.
			Amenoré	Stammebark , maserasjon over natta. 1 tekopp drikkes 1 x 3 i 3 dager.
			Vaginale	Rot , dekokt brukes til å vaske

7. ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER

			infeksjoner	lokalt og drikke 1 tekopp 1 x 2 inntil bedring.
Kalifa Togola 70 år, M	Dioila	Woloba	Øye- infeksjon	<i>Loranthus</i> , dekokt, vaske øynene 1 x 2 i 3 dager. Samme for alle.
Mohamadou Diarra 76 år, M	Dioila	Woloba	Hoste	Stammebark , dekokt (lenge), 1 teglass drikkes 1 x 2 i 7 dager. Barn: ½ teglass. Ingen bivirkninger.
Mamadou Koniba Mariko 73 år, M	Bancò	Woloba	Høyt blodtrykk	Stammebark og stammebark av <i>Sclerocarya birrea</i> . Drikke 1 teglass dekokt og vaske kroppen 1 x 1 i 15-20 dager.
			Cerebral hemorragi	Stammebark og stammebark av <i>Sclerocarya birrea</i> . Tørkes og pulveriseres. ½ ts konsumeres med mat eller væske 1 x 1 i 15-20 dager.
			Høyt blodtrykk	Samme som ved cerebral hemorragi.
Basamou Sangaré 70 år, M	Bancò	Woloba	Mot kvalme/ oppkast ifb. med graviditet.	<i>Loranthus</i> , dekokt brukes til å vaske kroppen 3 ganger.
Zan Traoré 65 år, M	Bancò	Woloba	Sopp- infeksjon i munn	Rot , dekokt, drikke 1 tekopp 1 x 2 i 1 uke. Barn: ½ tekopp. Ingen bivirkninger.
Adama Fomba 69 år, M	Bancò	Woloba	Gulsott	Rot , presset rotsaft blandes med litt vann. Drikke 3 håndfulle.

7. ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER

Bakary Fomba 65 år, M	Bancò	Woloba	Nevrologiske lidelser, brennende følelse i føttene.	Stammebark og rotbark , dekokt brukes til fotbad 1 x 2 i 5 dager
Mamary Togola 72 år, M	Bancò	Woloba	Malaria	Rot og rot av <i>Blighia Sapida</i> . Drikke 1 tekopp og vaske kroppen 1 x 2 i 3-4 dager. Barn: ½ dose. Ingen bivirkninger.
Sitan Fomba ca. 70 år, F	Bancò	Woloba	Smerter i kroppen	<i>Loranthus</i> , pulver blandes med vann og brukes til å vaske kroppen, i tillegg drikke infusjon av 5 fingre med pulver 1 x 2 inntil bedring.
Awa Fomba ca. 50 år, F	Bancò	Woloba	Menstruasjonsmerter	Stammebark , 1 tekopp dekokt drikkes i tillegg til dampbad av magen 1 x 1 inntil bedring. Ingen bivirkninger, men bitter smak pga. innhold av tanniner.
Tenimba Coulibaly ca. 40 år, F	Bancò	Woloba	Magesmerter	<i>Loranthus</i> , pulver blandes med vann og brukes til å vaske kroppen, og drikke 3 fingre med pulver i infusjon 1 x 2 i 1 uke. Samme for barn. Ingen bivirkninger.
Seydou Mariko 43 år, M	Bancò	Woloba	Vaginal soppinfeksjon	Blader , karboniseres og deles i to: 1) Blandes med salt og spises. 2) Blandes med fett til lokal påsmøring. 1-2 ganger daglig i 2 dager.
Abdoulaye Mariko	Bancò	Woloba	Gulsott	Stammebark og rotbark ,

7. ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER

40 år, M

drikke 2 håndfulle dekokt og vaske kroppen 1 x 2 i 3 dager.

Adama Fomba
36 år, M

Bancò

Woloba

Sopp-
infeksjon i
munn hos
barn

Stammebark, dekokt (veldig konsentrert) brukes til å smøre munnen 1 x 2 i 4 dager.

Nouhoun Mariko
ca. 50 år, M

Bancò

Woloba

Tuberkulose

Blader og stammebark, pulver av begge plantedeler blandes med salt. 1 ts pulver spises 1 x 3 i 3 dager. Barn: ½ ts.

Chaka Mariko
60 år, M

Bancò

Woloba

Smerter i
rygg og
bryst

Stammebark og *Loranthus*, dekokt brukes til å vaske kroppen 1 x 2 i 4 dager.

Youssouf Mariko
38 år, M

Bancò

Woloba

Diabetes

Stammebark og stammebark av *Sclerocarya birrea*. Drikke 1 teglass dekokt 1 x 2 i 2 uker. Barn: ½ teglass.

Madou Foussa Mariko
60 år, M

Bancò

Woloba

Smerter i
rygg og
bryst

Stammebark og *Loranthus*. Dekokt av blandingen brukes til å vaske kroppen 1 x 2 i 4 dager.

Datigue Coulibaly
66 år, M

Beleco

Woloba

Diaré

Rot, 1 teglass dekokt drikkes 1 x 1 inntil bedring. Samme for barn. Bivirkning: konstipasjon ved overdosering.

Fanto Yaya Diabaté
40 år, M
president for

N' Dia
Dougoutiguila

Woloba

Inflammasjon

Rot, karbonisert pulver blandes med fett og påføres lokalt 1 x 2 i 1 uke.

7. ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER

tradisjonelle healere i denne landsbyen.

Paul Diabaté 63 år, M	N' Dia Dougoutiguila	Woloba	Revmatisme	Stammebark og stammebark av <i>Erythrina senegalensis</i> . 1 tekopp dekokt av blandingen drikkes og vaske kroppen 1 x 3 inntil bedring.
Michel Diabaté 52 år, M	N' Dia Dougoutiguila	Woloba	Astma hos barn Smerter i kroppen	Blader fra ungt tre, 75 ml dekokt drikkes 1 x 3 i 5 dager. Stammebark , dekokt brukes til å vaske kroppen, inntil bedring.
Sidiki Diarra 50 år, M	N' Dia Dougoutiguila	Woloba	Smerter i nedre mageregion	Stammebark , dekokt brukes til å lage dampbad til magen, i tillegg drikke så mye dekokt man klarer, inntil bedring. Ingen bivirkninger.
André Dambélé 39 år, M	N' Dia Dougoutiguila	Woloba	Infertilitet hos kvinner	Stammebark , tørkes og pulveriseres, blandes med salt og spises alene eller med mat. Ingen spesifikk mengde.
Boubacar Fomba ca. 83 år, M	N' Dia Dougoutiguila	Woloba	Deformert babyhode	Små blader , presset juice fra ferske blader appliseres hodet 1 x 3, kureret innen 3 dager.
Karim Fomba 34 år, M	N' Dia Dougoutiguila	Woloba	Vaginal infeksjon	Rot , tørkes og pulveriseres. 2 fingre med pulver påføres lokalt 1 x 2 inntil bedring.
Touba Diarra	N' Dia	Woloba	Nattefeber	<i>Loranthus</i> , dekokt brukes til å

7. ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER

54 år, M	Dougoutiguila		hos barn	vaske barnet.
Brehima Samake 72 år, M	Dioila	Woloba	Feber hos barn	Blader , dekokt brukes til å vaske barnet, så mange ganger som mulig.
Mamadou Diarrassouba 55 år, M	Dioila	Woloba	Kroniske sår (utvendige)	Stammebark eller rotbark , pulver påføres såret 1 x 1 i 1 uke.
			Dysmenoré	Stammebark eller rotbark , 1 ts pulver blandes i grøt og spises 1 x 1 i 1-2 uker.
			Syfilis	Samme som ved dysmenoré.
Souleymane Togola 51 år, M	Dioila	Woloba	Tannvekst	Blader , 1 ss dekokt 1 x 1 i 1 uke.
			Mareritt hos barn	Samme som ved tannvekst.
			Smerter i øynene	Blader , dekokt brukes til å vaske lokalt 1 x 2 i 1-2 måneder.
Mamadou Sidibe 55 år, M	Dioila	Woloba	Vaginal infeksjon	Blader , drikke 1 tekopp dekokt og vaske lokalt 1 x 2 i 1 uke.
N' Golo Sidibe 51 år, M	Dioila	Woloba	Infeksjon i øret	Stammebark eller rotbark , dekokt blandes med Shea-butter og appliseres øret, 3 ganger totalt.
Dioba Togola 70 år, F	Dioila	Woloba	Indre sår	Stammebark , pulver blandes med grøt og spises 1 x 2 inntil

bedring.

7.5 Forklaringer til tabellene

- **M:** Mann **K:** Kvinne
- **Loranthus:** Parasittisk plante som vokser på grenene til treaktige planter.
- **Sheabutter:** Naturfett fra frukten til Shea-treet, *Butyrospermum parkii*.
- **Tannin:** Polyfenol fra naturlige planter, som forårsaker tørr og bitter smak i munnen.
- **Dekokt:** Plantematerialet legges i en mengde kaldt vann og varmes til oppkok i en gitt tid.
- **Maserasjon:** Plantematerialet trekkes i en mengde kaldt vann og over lengre tid, ofte over natta.
- **Karbonisert:** Brent plantemateriale, bruker asken av plantematerialet.
- **Dampbad:** Varm dekokt brukes til å lage dampbad, den lokale kroppsdelen plasseres slik at den kommer i kontakt med dampen.
- **Bunt:** En bestemt størrelse på innsamlet og bundet plantemateriale.
- **Håndfull:** Hånden fylles.
- **Antall fingre:** Mål for mengde pulverisert plantemateriale. Indikerer antall fingre brukt som en ”klype”.
- **Teglass:** En bestemt størrelse på et glass (glass nr 8), rommer ca. 75 ml.
- **ts:** teskje
- **ss:** spiseskje
- **3-(4):** 3 for menn og 4 for kvinner.
- **1 x 1:** 1 gang daglig **1 x 2:** 2 ganger daglig **1 x 3:** 3 ganger daglig

7.6 Forklaring av medisinske termer

- **Alopesi:** Hårmangel, håravfall.
- **Amenoré:** Manglende menstruasjon, i mer enn et halvt år.
- **Cerebral hemorragi:** Hjerneblødning, slag.
- **Dermatitt:** Betennelse i huden.
- **Dysenteri:** "Blodgang", akutt smittsom tarmbetennelse med blodig diaré, smerte, feber og svekkelse.
- **Dysmenoré:** Menstruasjonsbesvær, smertefull menstruasjon.
- **Gingivitt:** Tannkjøttbetennelse.
- **Gulsott:** Populær betegnelse på ikterus, som oppstår når gallefargestoffmengden i blodet økes. Dette medfører gulfarging av øyets støtteinne, hud og slimhinner, hudkløe, langsom puls, lys avføring og mørk urin.
- **Konstipasjon:** Forstoppelse.

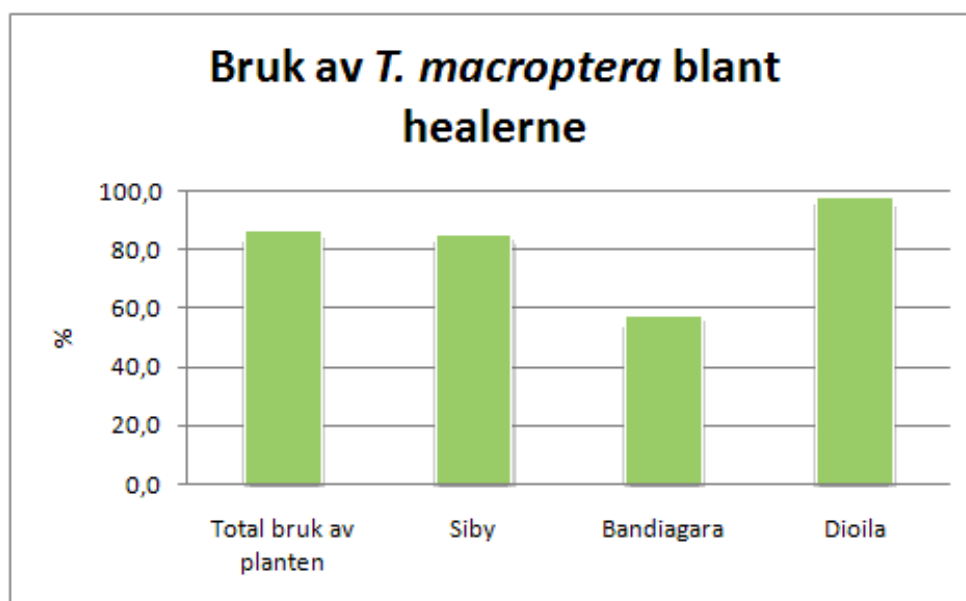
7.7 Oppsummering av resultater fra healerintervjuer

Av totalt 78 healere, brukte 67 healere *Terminalia macroptera* i sin praksis, noen områder hyppigere enn andre (Figur 7-4 s. 135). De fleste kjente til planten, men ble brukt av flere til ikke-medisinske anvendelser, blant annet var dyrefôr og farging av klær nevnt. Avhengig av geografisk område, var "woloba" og "bosokugo" de mest brukte betegnelse på planten. Healerne var mellom 26 og 90 år gamle, så spennet på erfaring og utført praksis er stor.

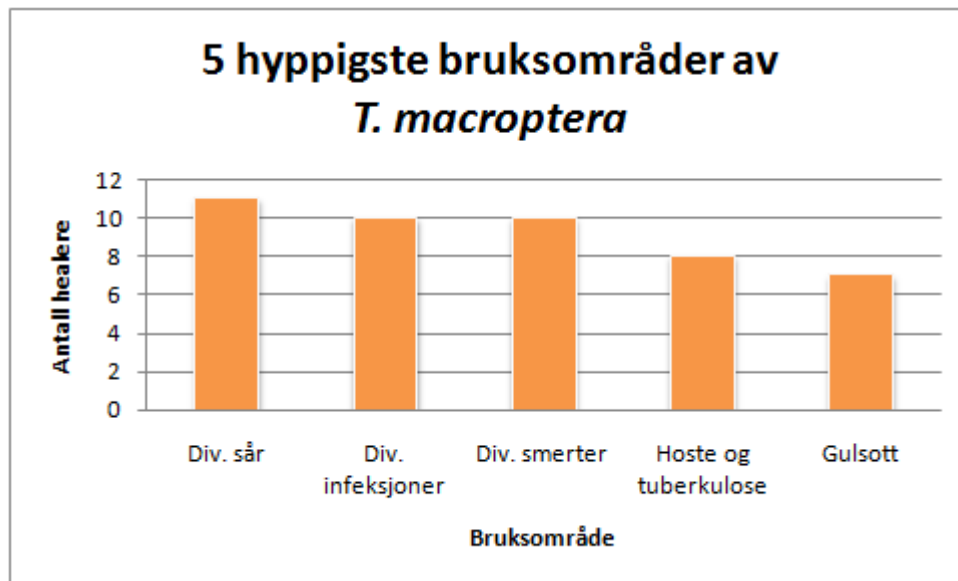
T. macroptera ble brukt mot en rekke lidelser, til sammen ble det oppgitt 31 indikasjoner. De mest anvendte bruksområdene var sår, infeksjoner, smerter, hoste og tuberkulose, og gulsott. Frekvensoversikt vises i Figur 7-5 s. 136. Blant alle healere som ble intervjuet, var bare 15 % kvinner. I Siby-området var det oppsiktsvekkende mange kvinnelige healere, med hele 31 % andel kvinner blant de spurte. Dette er en mye høyere andel enn i Bandiagara- og Dioïla-området, med 0 % og 10 %, respektivt (Figur 7-6 s. 136). Grunnen til dette er blant annet at det er et senter for barn i landsbyen Jisumala i dette distriktet. Det er nemlig slik at kvinnelige healere spesialiserer seg i pediatri.

Stammebark og rot, enten alene eller i kombinasjon med andre plantedeler eller andre planter, var de mest anvendte plantedelene blant healerne. Det ser ut til at geografisk område har noe å si for hvilken plantedel som er mest populær. I Bandiagara-området var det *Loranthus*-delen som var mest anvendt, mens i Siby- og Dioila-området var det henholdsvis roten og stammebarken som var mest brukt (Figur 7-7 s. 137).

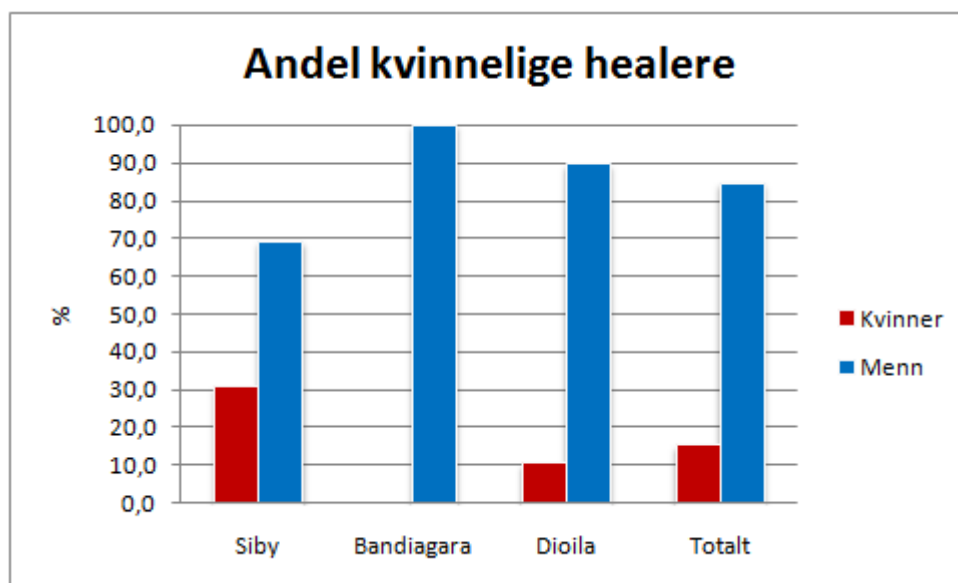
Dekokt av ulike plantedeler var den hyppigst oppgitte tilberedelsesformen. Dette skulle i de fleste tilfeller drikkes, brukes til dampbad eller til vasking av kroppen eller aktuell kroppsdel. Tørket og pulverisert plante ble ofte brukt til påsmøring på kroppen, ved for eksempel ytre sår eller infeksjoner. Det ble da enten påført direkte, eller utblandet med smør/fett, ofte Sheabutter, for mer brukervennlig påføring.



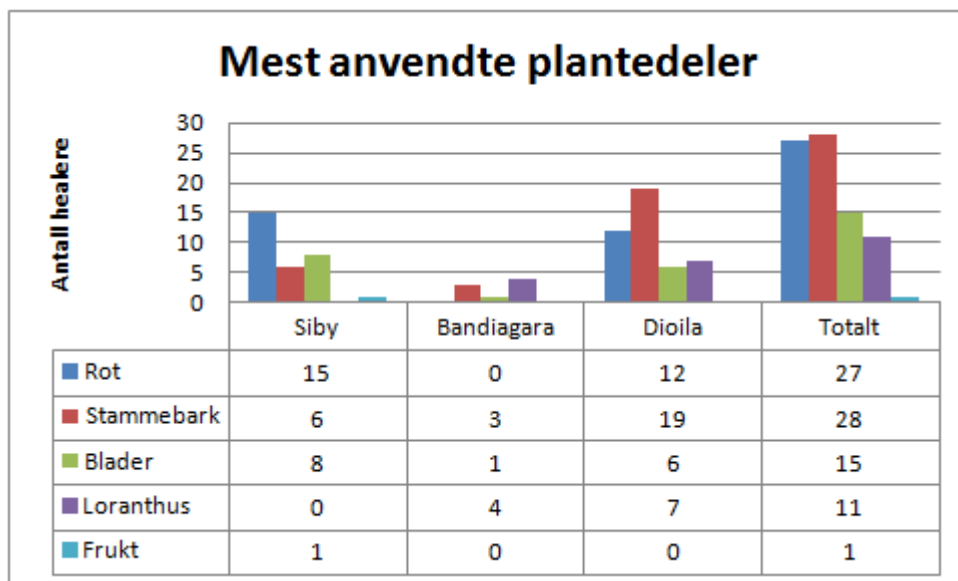
Figur 7-4: Andel healere som brukte *T. macroptera* i sin praksis.



Figur 7-5: De mest anvendte bruksområdene for *T. macroptera*.



Figur 7-6: Andel kvinnelige healere kategorisert etter område.



Figur 7-7: Oversikt over mest anvendte plantedeler. Antall healere som bruker ulike plantedeler stemmer ikke overens med antall healere som har blir intervjuet, dette kommer av at noen healere bruker flere plantedeler.

8. Konklusjon

Metanolrækstraktet av blader til planten *Terminalia macroptera* ser ut til å inneholde flere stoffer med radikalscavenger og 15-LO hemmende egenskaper.

Diklormetanrækstraktet av planten ga ved kromatografi et cis-polyisopren med anslått polymeringsgrad ca. 25. Dette var ustabil, trolig polymeriserte det videre ved henstand etter at det var renfremstilt.

Fra butanol-fasen av metanolrækstraktet ble det isolert fire renstoffer; corilagin, shikimisyre, og flavonolglykosidene rutin og narcissin. To delvis karakteriserte stoffer rapportert i blomster av *T. macroptera* angitt som isorhamnetin 3-glukorhamnosid og quercetin 3-glukorhamnosid kan, med usikkerhet, være narcissin og rutin. Shikimisyre og corilagin er ikke rapportert i planten tidligere.

Etylacetat-fasen av metanolrækstraktet inneholdt chebulinsyre trimetylester og metylgallat, to isolerte stoffer som trolig ble dannet under ekstraksjon med metanol. Chebulinsyre trimetylester er ikke tidligere beskrevet i litteraturen, og for metylgallat er dette den første beskrivelsen av isolering fra denne planten.

Alle isolerte renstoffer viste radikalscavengeraktivitet, noen i høyere grad enn andre. For chebulinsyre trimetylester og shikimisyre er ikke scavengeraktiviteten beskrevet tidligere. Blant de isolerte stoffene var det kun rutin og corilagin som viste seg å være moderate hemmere av xantin oksidase. Det er ukjent om det er noen av de isolerte stoffene som er ansvarlig for den 15-LO hemmende aktiviteten i faser av metanolrækstraktet.

Under feltarbeidet i Mali ble det avdekket at *T. macroptera* ble brukt til svært mange ulike indikasjoner. Noen av disse, som sår, infeksjoner og smerte, er vanligere enn andre. Innsamlet informasjonsmateriale var ikke stort nok til at det kunne trekkes noen konklusjoner, men det fremkom at de mest brukte plantedelene var rot og stammebark. Geografisk område kan ha betydning for ulik anvendelse og bruk.

8.1 Forslag til videre arbeid

Både metanolrækstraktet av blader til *Terminalia macroptera* og renstoffer isolert fra de viste seg å være sterke radikalscavengere. Det kunne derfor vært interessant å undersøke nærmere aktiviteten til fraksjoner som ikke ble testet i denne masteroppgaven. Fraksjon B6, B11 og B12 er gode kandidater med spennende signalmønster i NMR-spektra og relativ stor stoffmengde.

Fraksjonene E8.1-3.B-D1 – E8.1-3.B-D4 ble ikke identifisert og strukturoppklart da gjentatte forsøk på separasjon og fraksjonering ikke var suksessfullt. Det vil være aktuelt å fortsette arbeidet med ytterligere fraksjonering. Ettersom utgangsfraksjonen E8 viste svært kraftig radikalscavengeraktivitet, vil det være av interesse å identifisere stoffet eller stoffene som forårsaker denne kraftige aktiviteten.

Fraksjon E7 er en stor fraksjon med interessante NMR-spektre, som kunne vært interessant å gå videre med. Det har lignende signalmønster som de fraksjonene som ble identifisert som corilagin, og kan derfor være en beslektet forbindelse. I tillegg kunne fraksjon E9 vært aktuell for videre fraksjonering da kompleks spektra tydet på innhold av flere stoffer av aromatisk og alifatisk struktur.

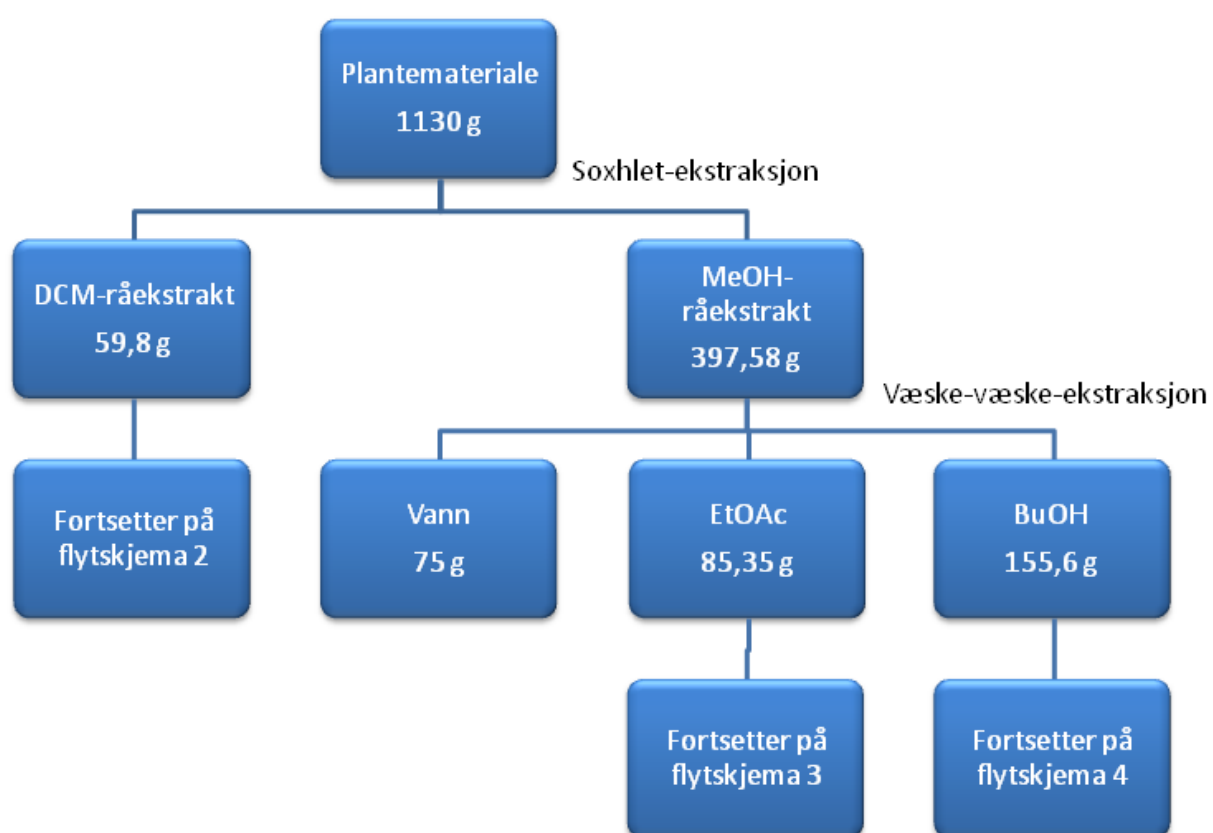
Det ble ikke utført 15-LO test på de isolerte stoffene i denne oppgaven. Dette vil være aktuelt å gjennomføre, da organiske faser av metanolrækstraktet viste høy hemmingsaktivitet.

I denne oppgaven ble det fokusert på metanolrækstraktet. Diklormetanrækstraktet ble ikke arbeidet videre med etter den første fraksjoneringen. Det kunne derfor vært aktuelt å se på struktur og bioaktivitet til komponenter i dette ekstraktet.

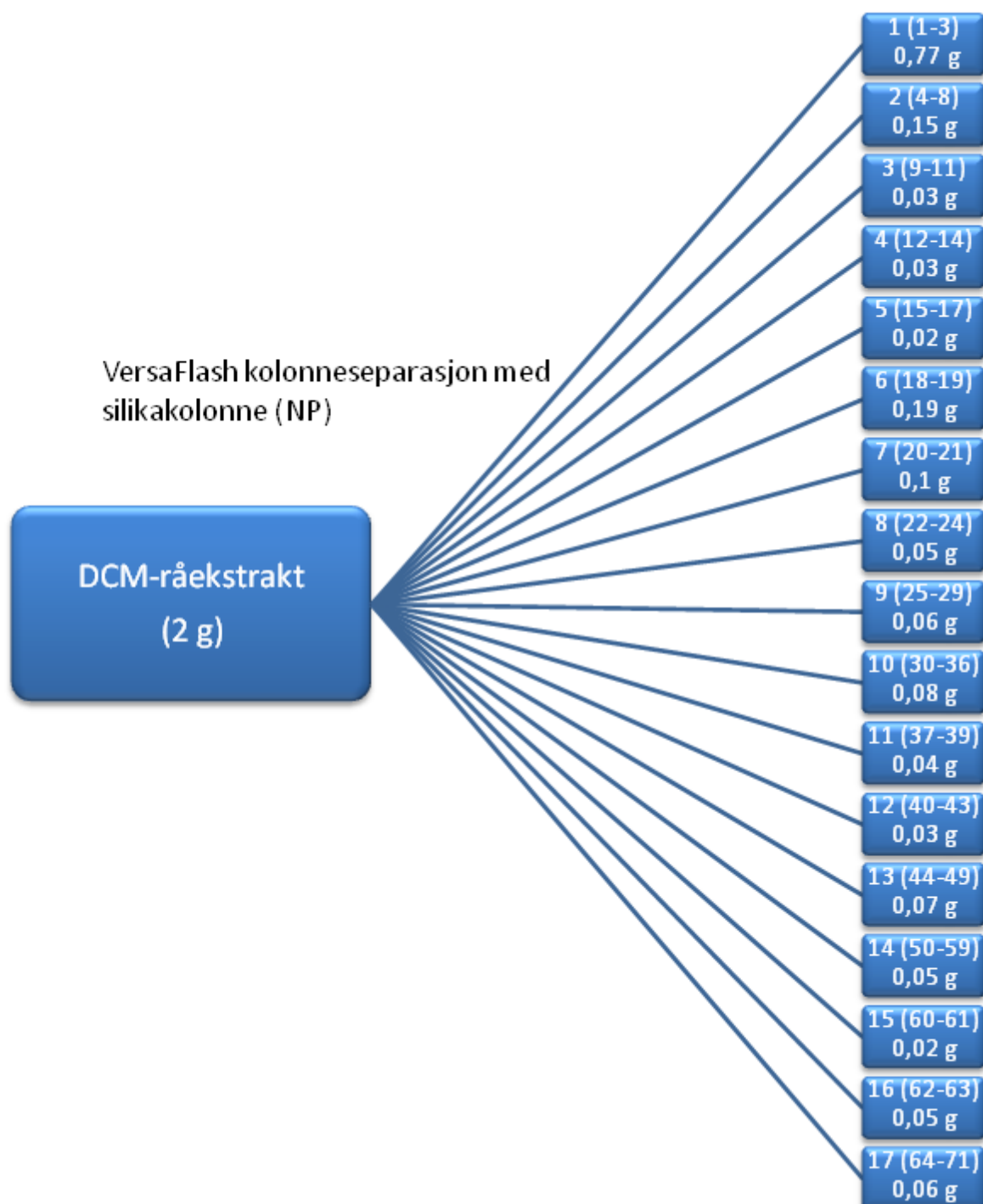
9. Vedlegg

9.1 Flytskjema

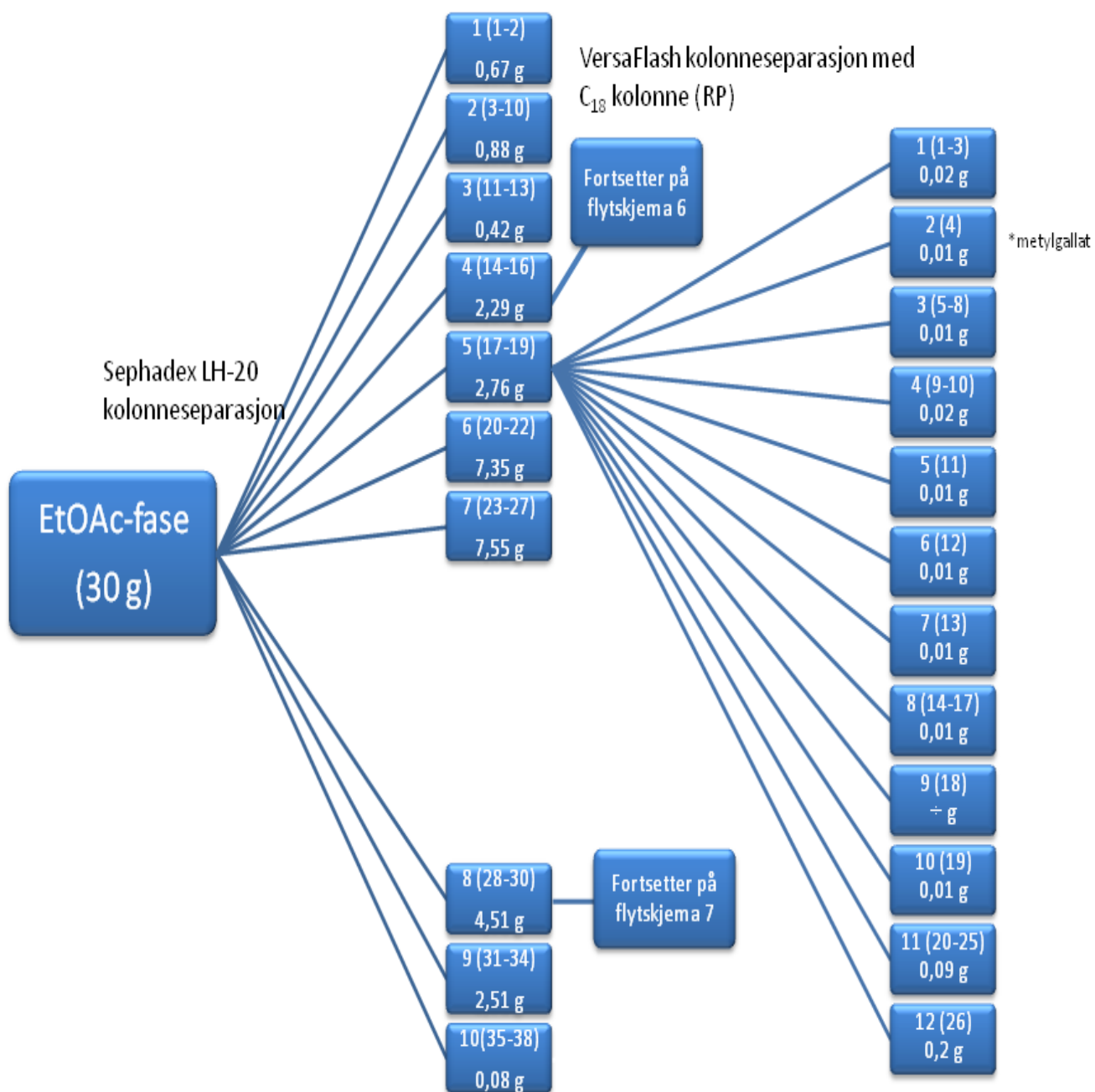
9.1.1 Flytskjema 1



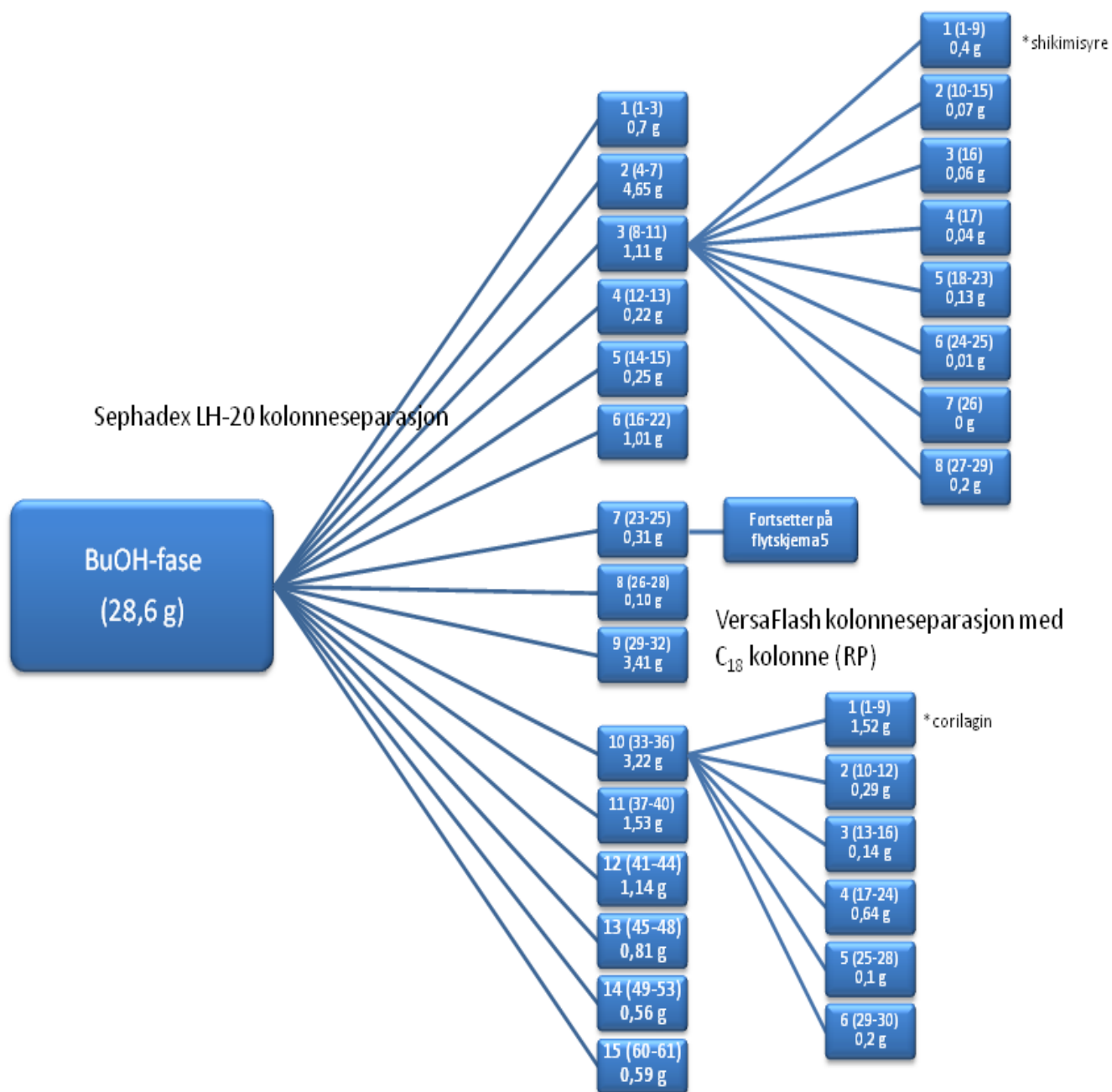
9.1.2 Flytskjema 2



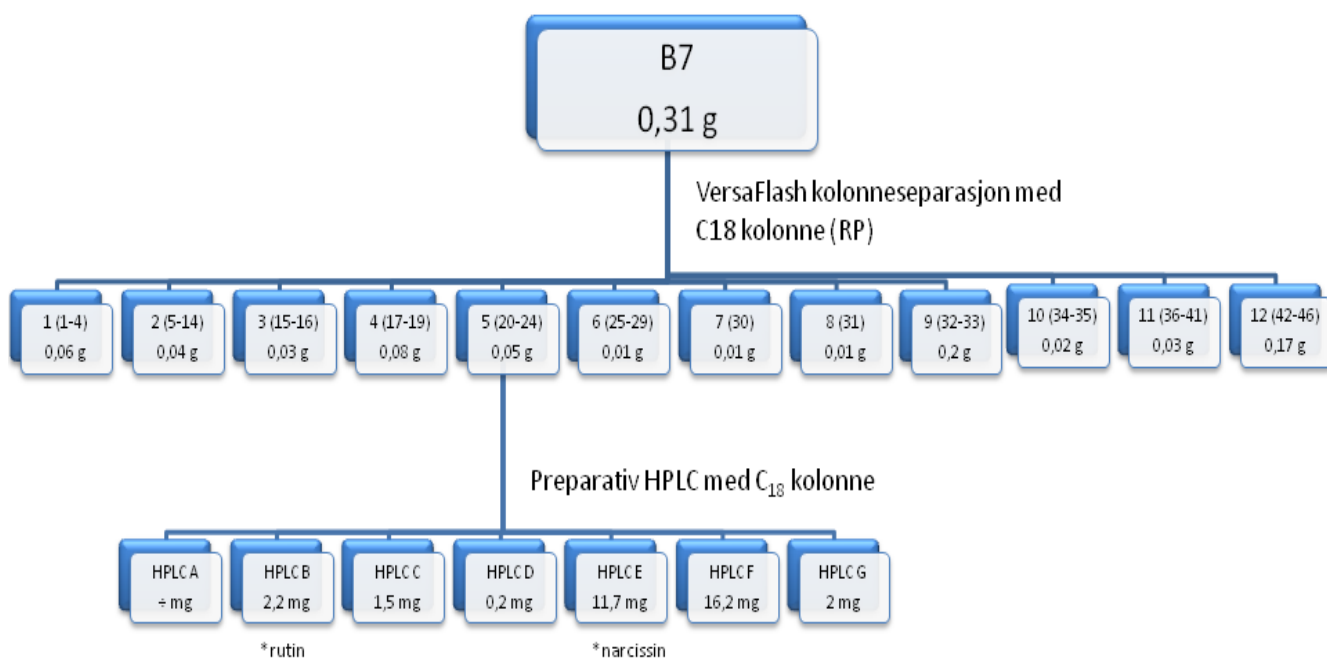
9.1.3 Flytskjema 3



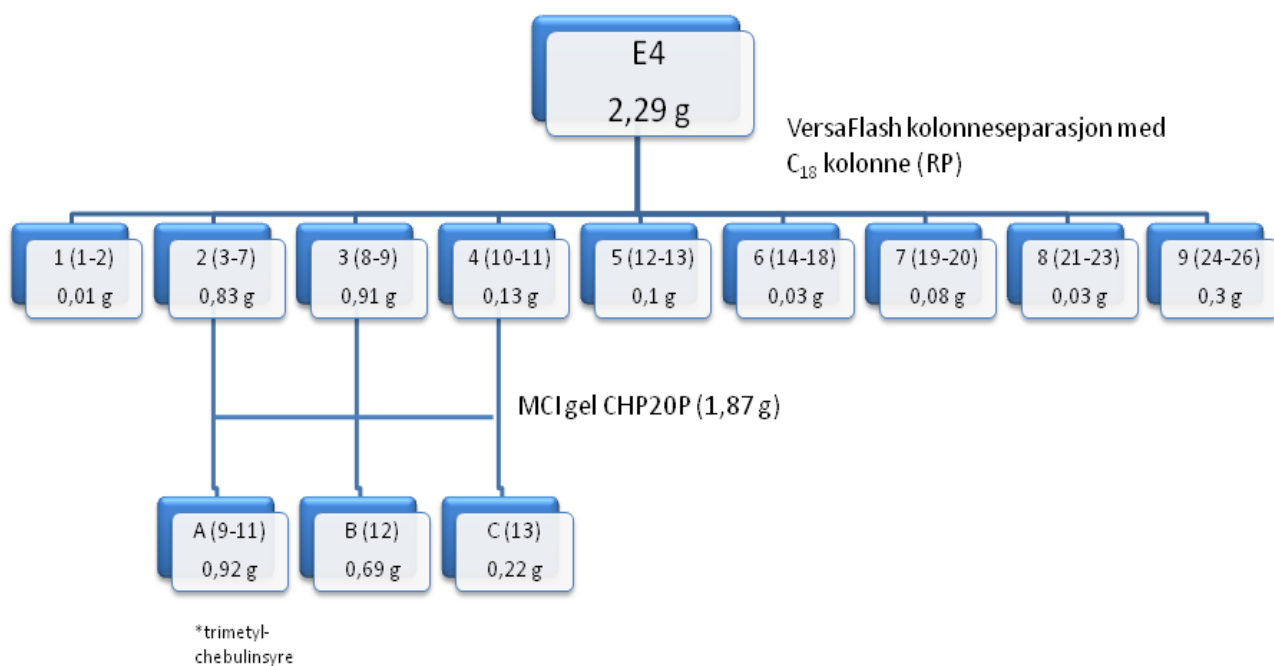
9.1.4 Flytskjema 4



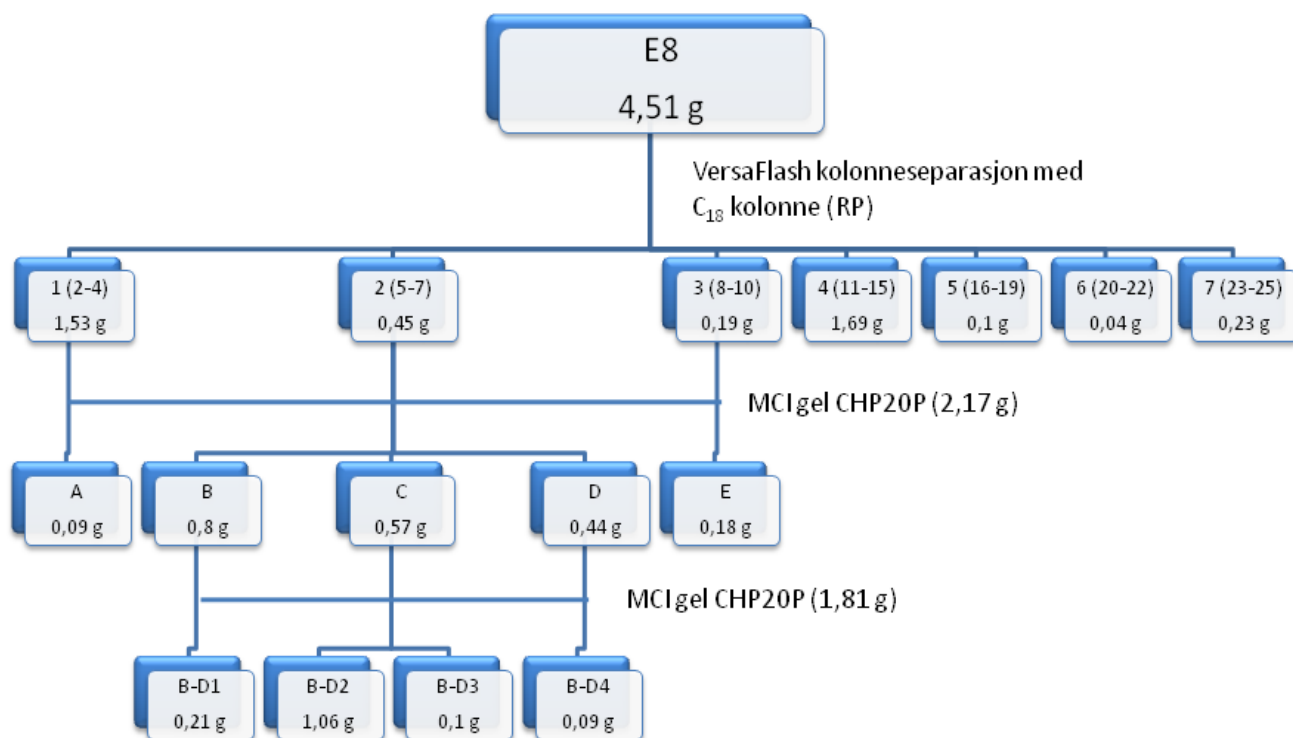
9.1.5 Flytskjema 5



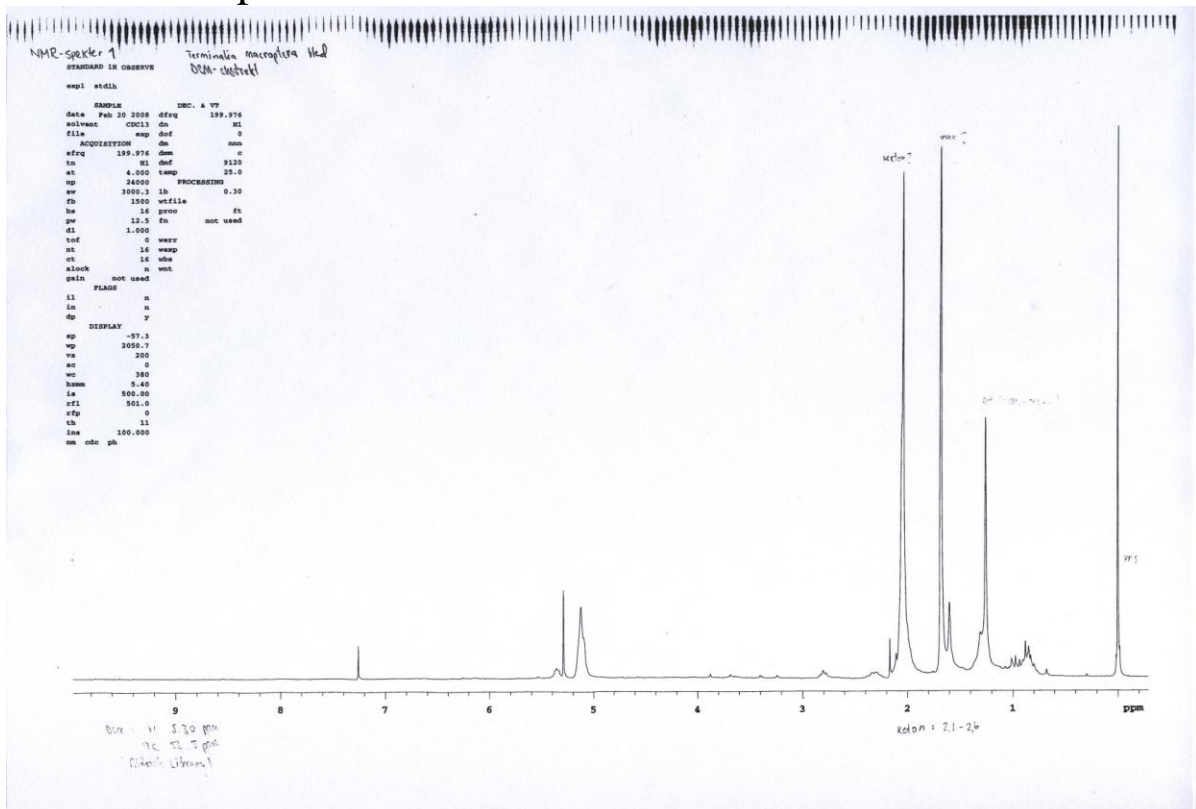
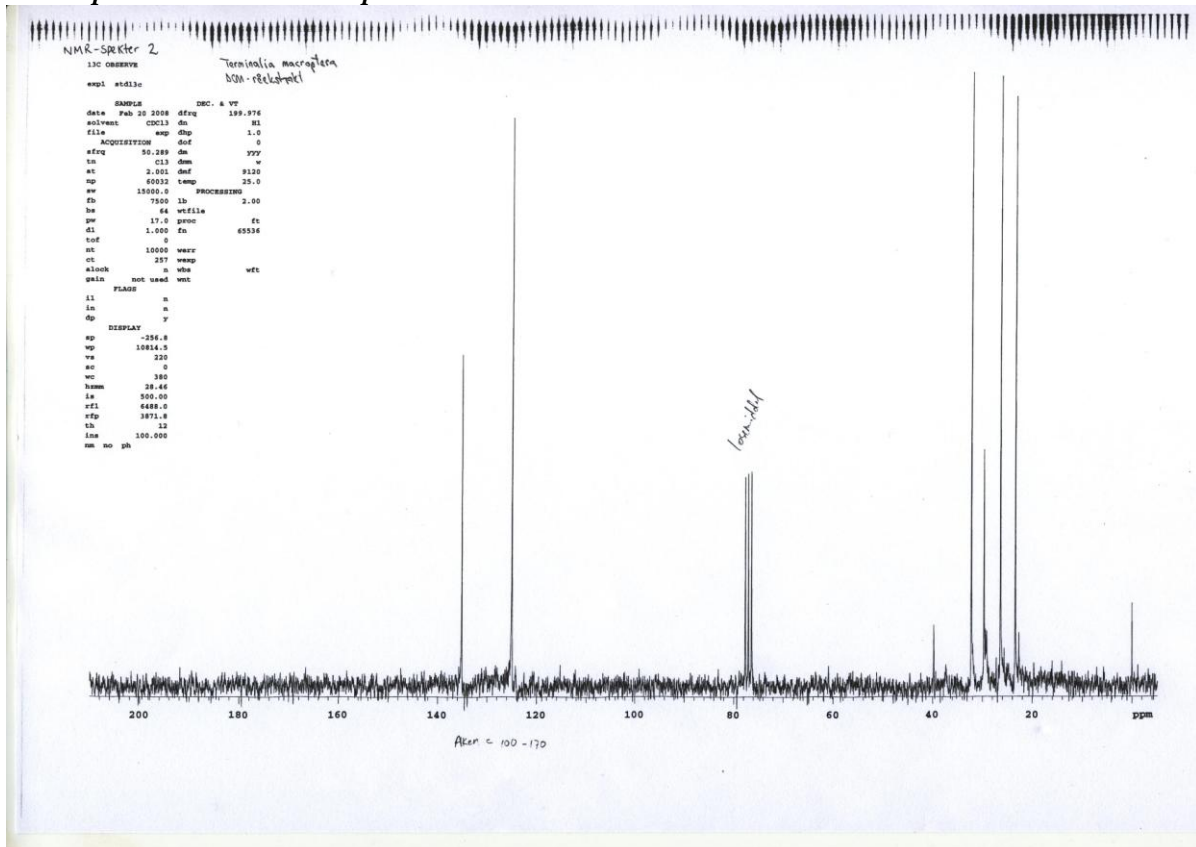
9.1.6 Flytskjema 6



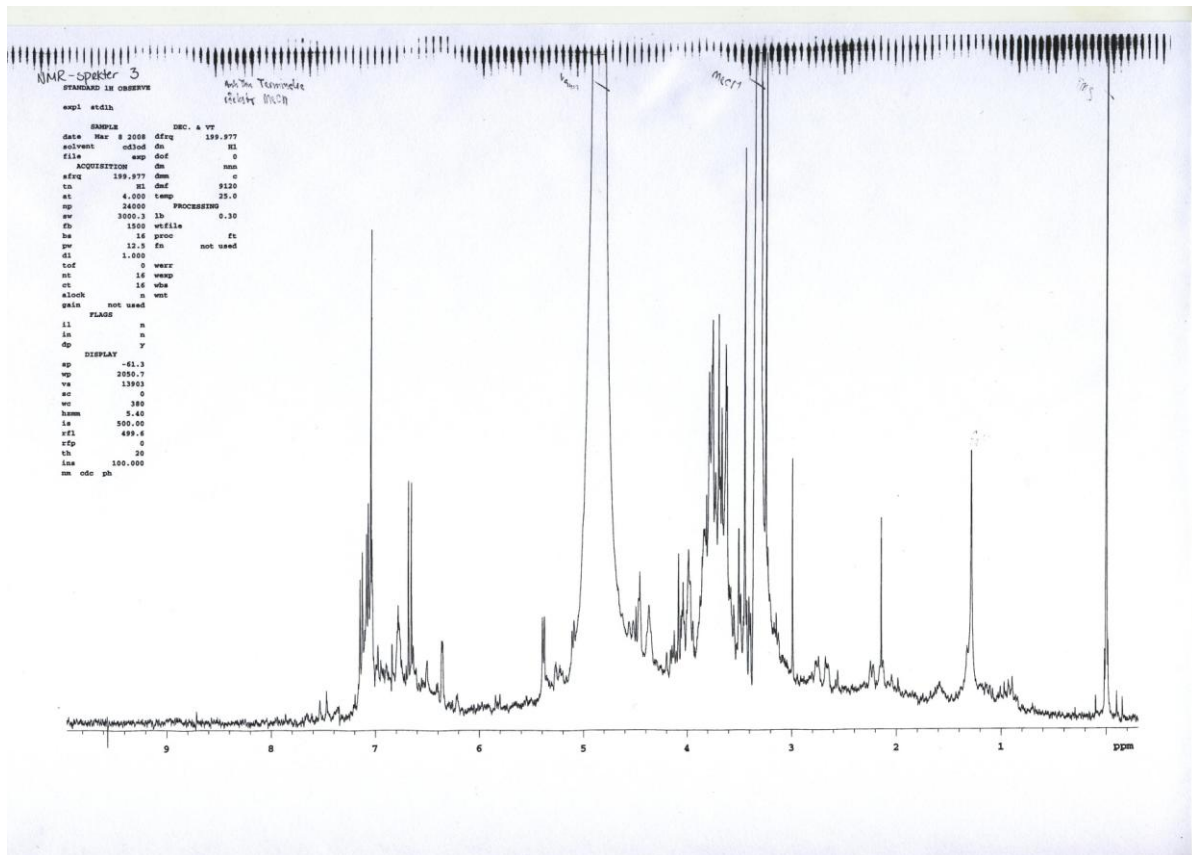
9.1.7 Flytskjema 7



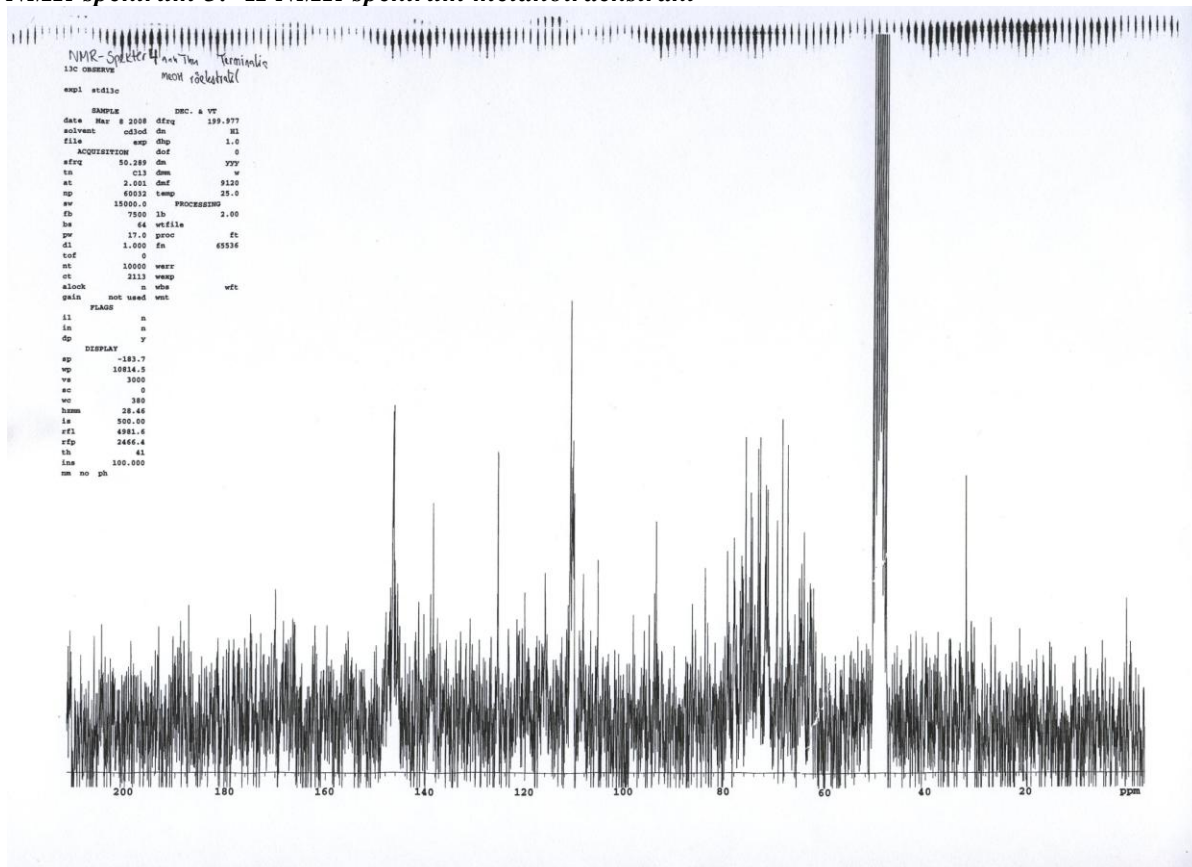
9.2 NMR-spektra

NMR-spektrum 1: ^1H NMR-spektrum diklormetanr ekstraktNMR-spektrum 2: ^{13}C NMR-spektrum diklormetanr ekstrakt

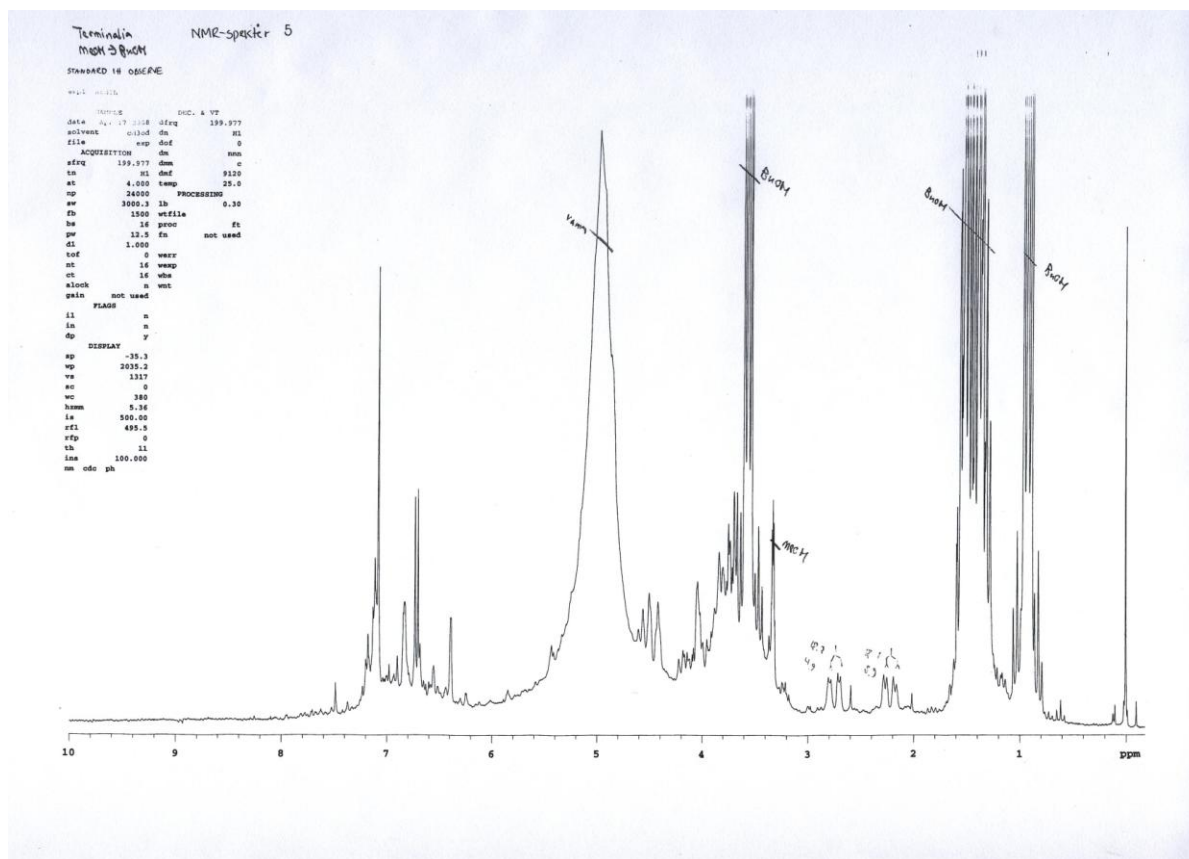
9. VEDLEGG



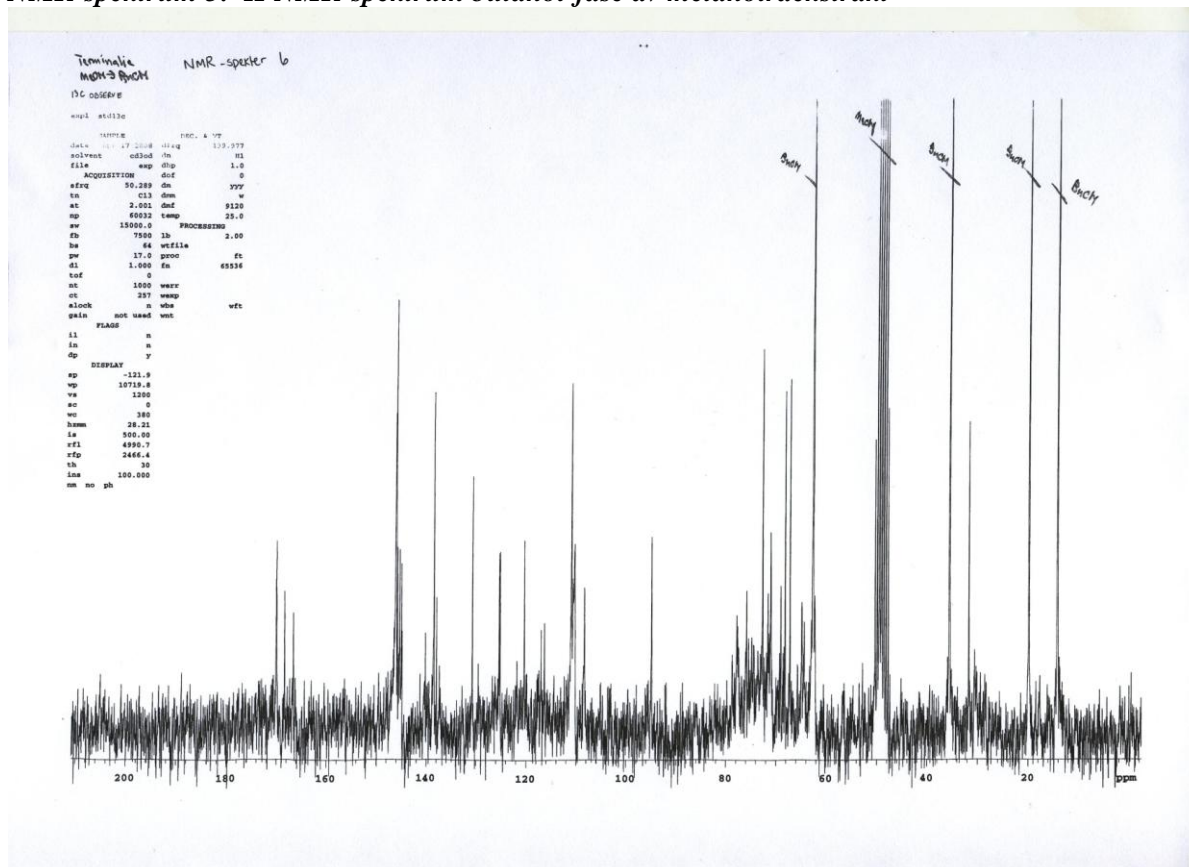
NMR-spektrum 3: ^1H NMR-spektrum metanolr ekstrakt



NMR-spektrum 4: ^{13}C NMR-spektrum metanolr ekstrakt

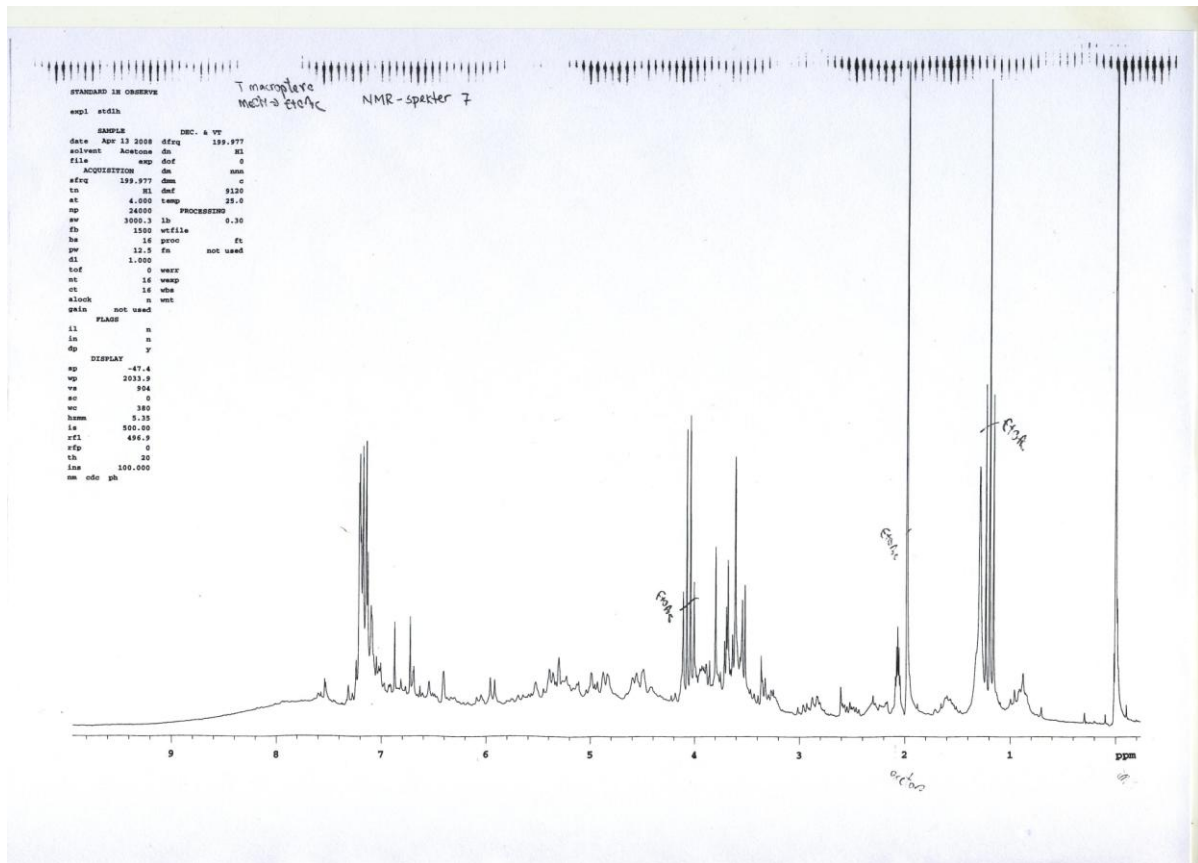


NMR-spektrum 5: ^1H NMR-spektrum butanol-fase av metanolrækstrakt

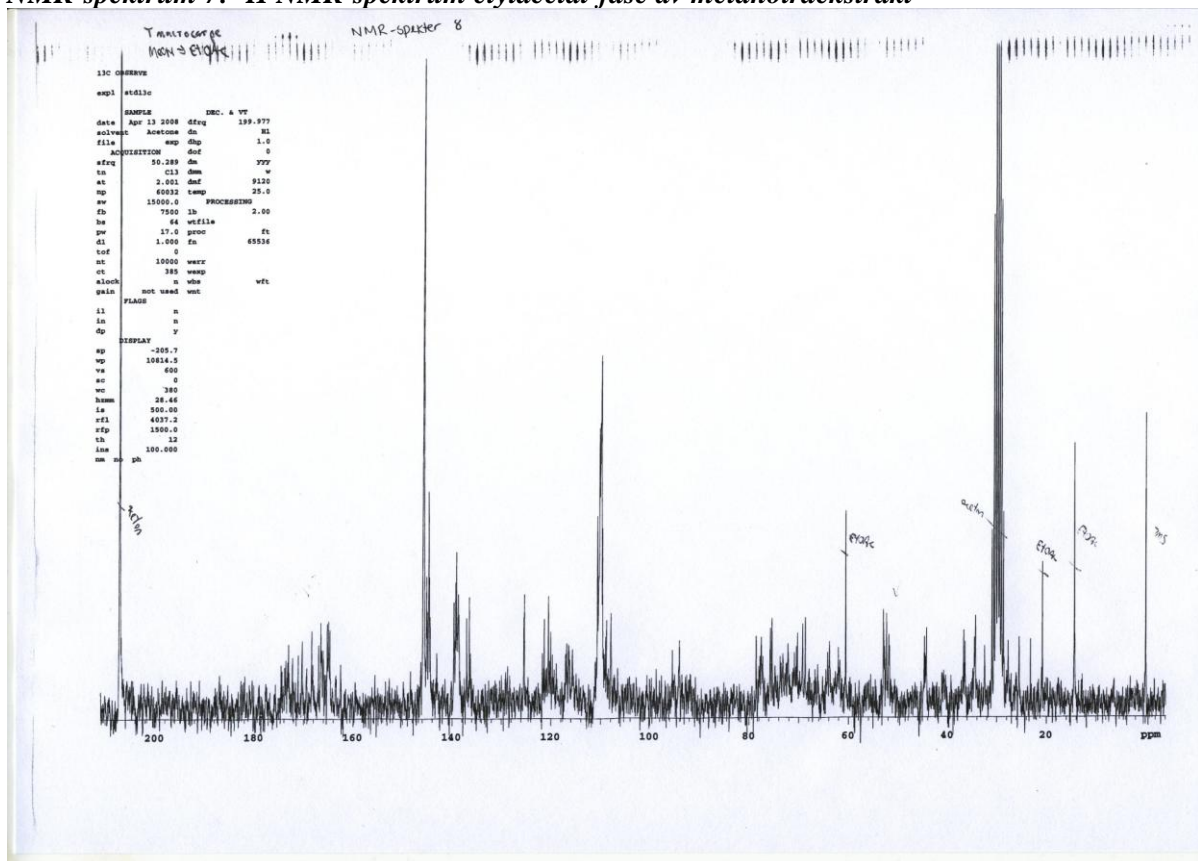


NMR-spektrum 6: ^{13}C NMR-spektrum butanol-fase av metanolrækstrakt

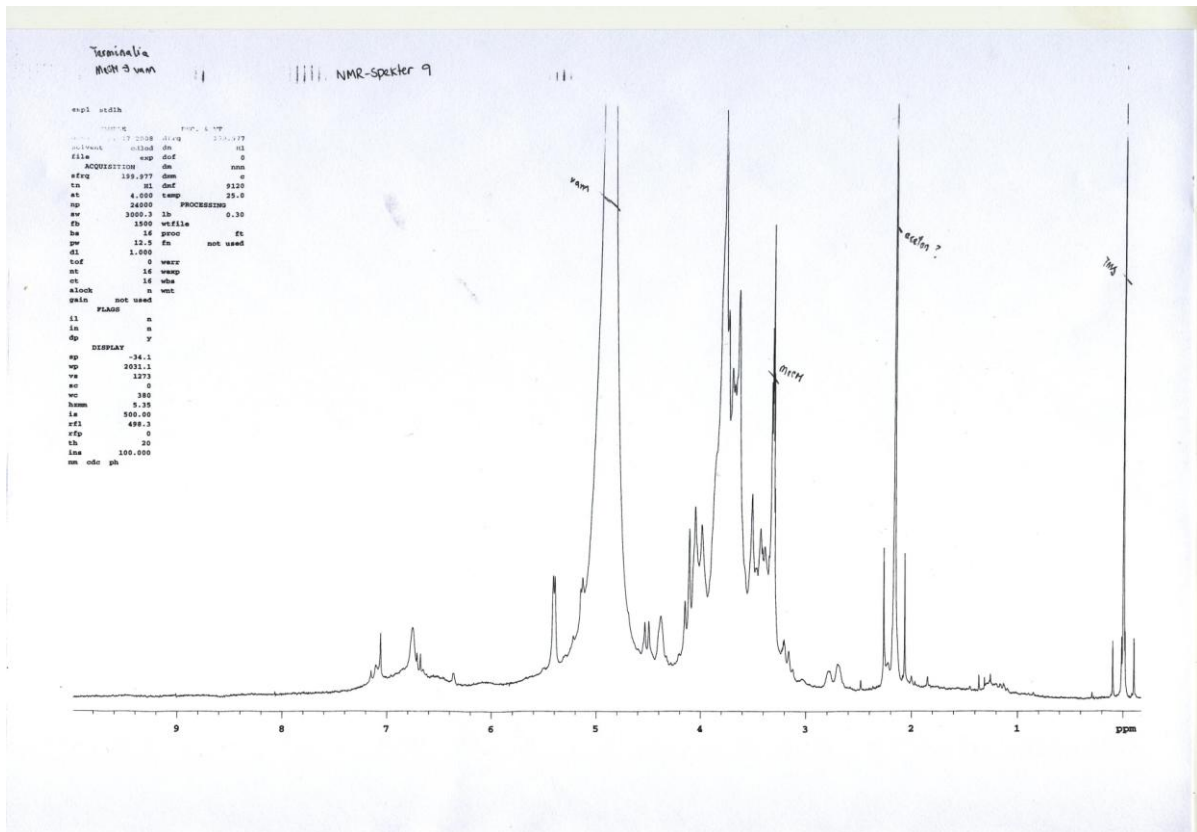
9. VEDLEGG



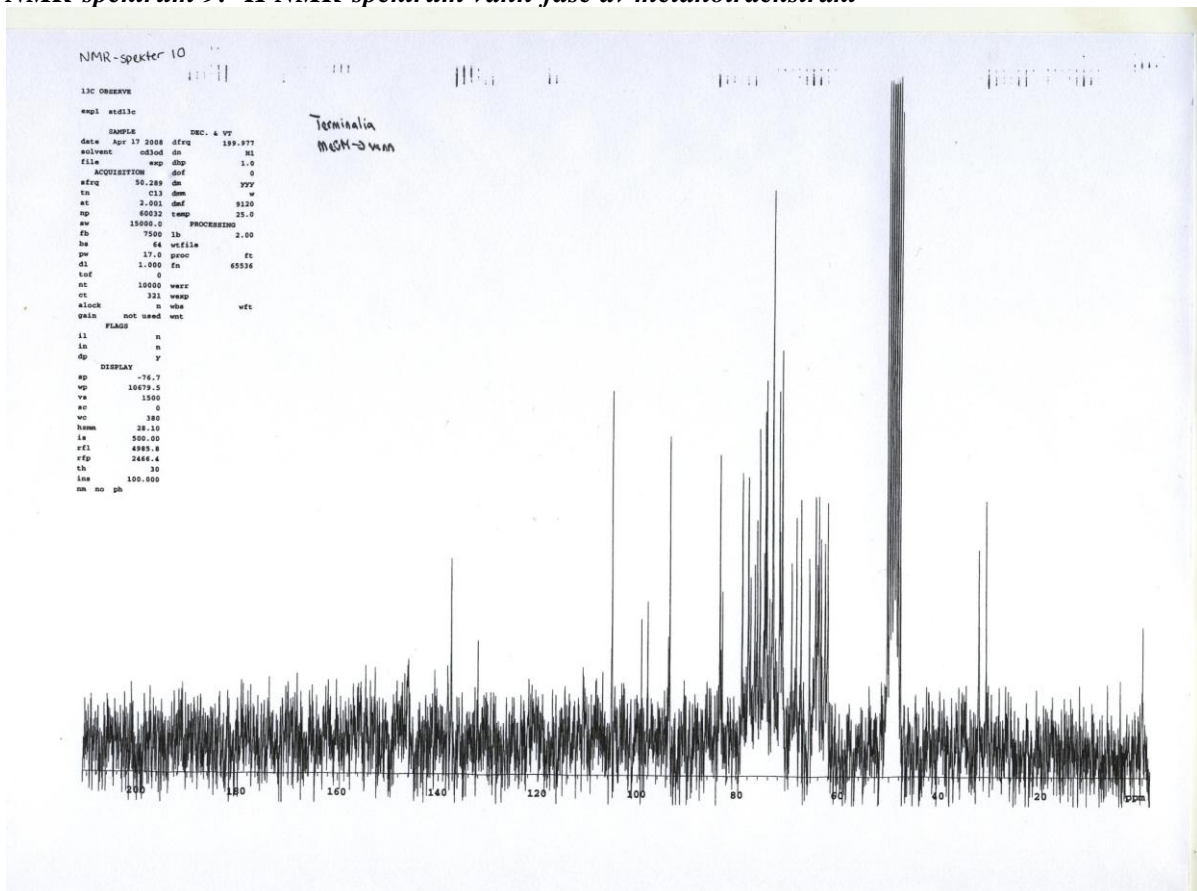
NMR-spektrum 7: ^1H NMR-spektrum etylacetat-fase av metanolrækstrakt



NMR-spektrum 8: ^{13}C NMR-spektrum etylacetat-fase av metanolrækstraktet

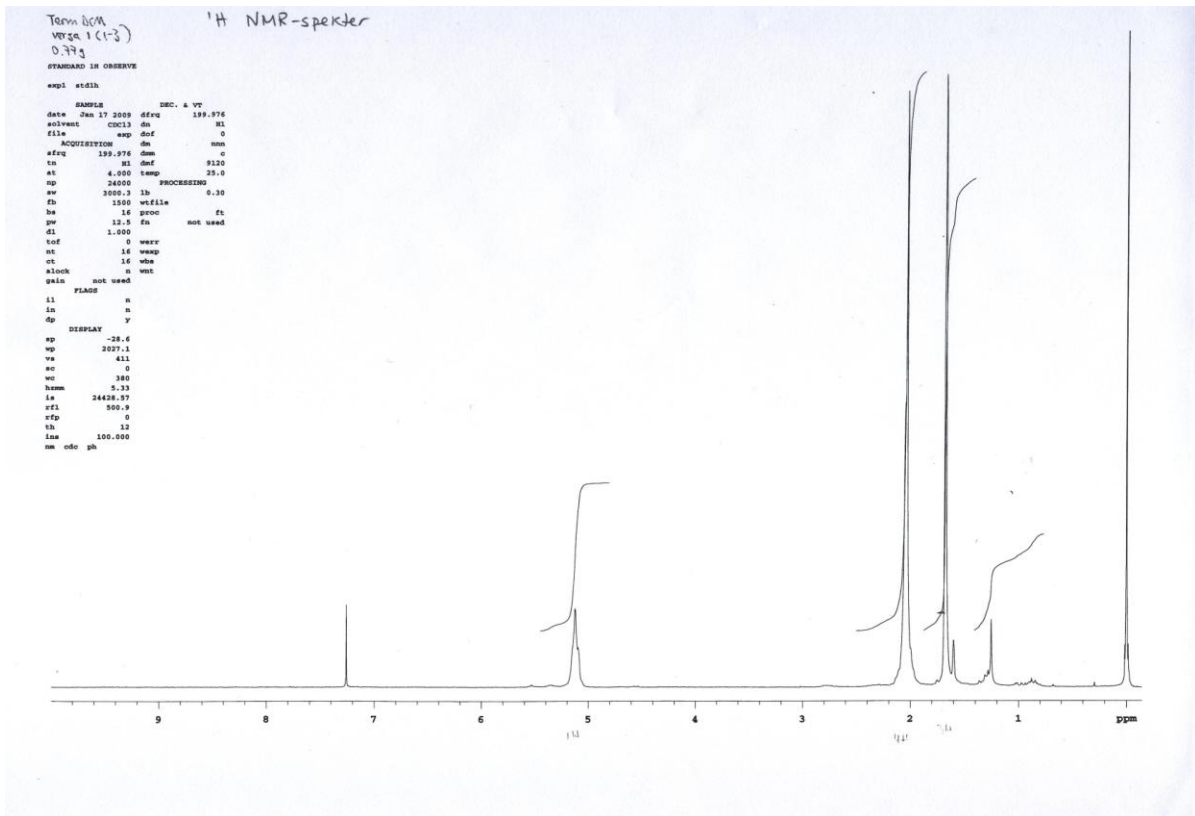


NMR-spektrum 9: ^1H NMR-spektrum vann-fase av metanolrækstrakt

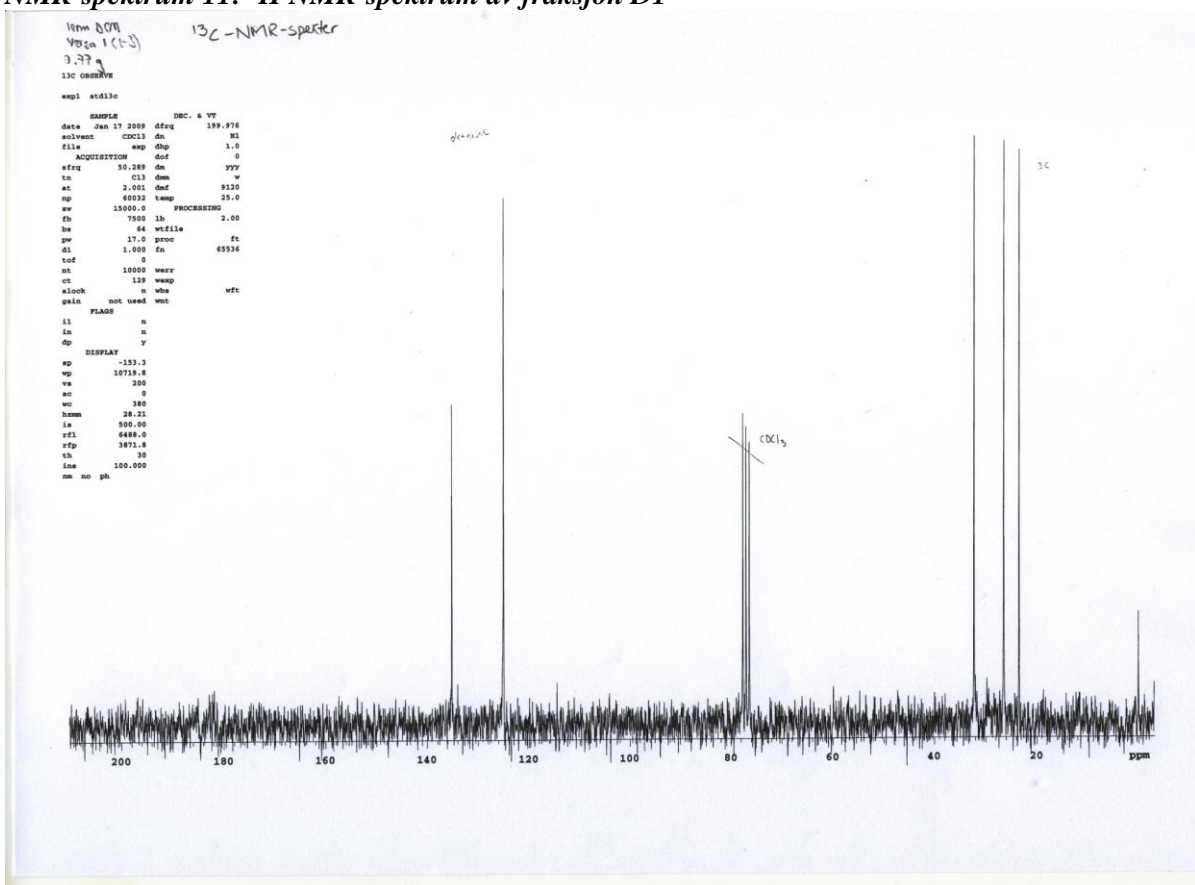


NMR-spektrum 10: ^{13}C NMR-spektrum vann-fase av metanolrækstrakt

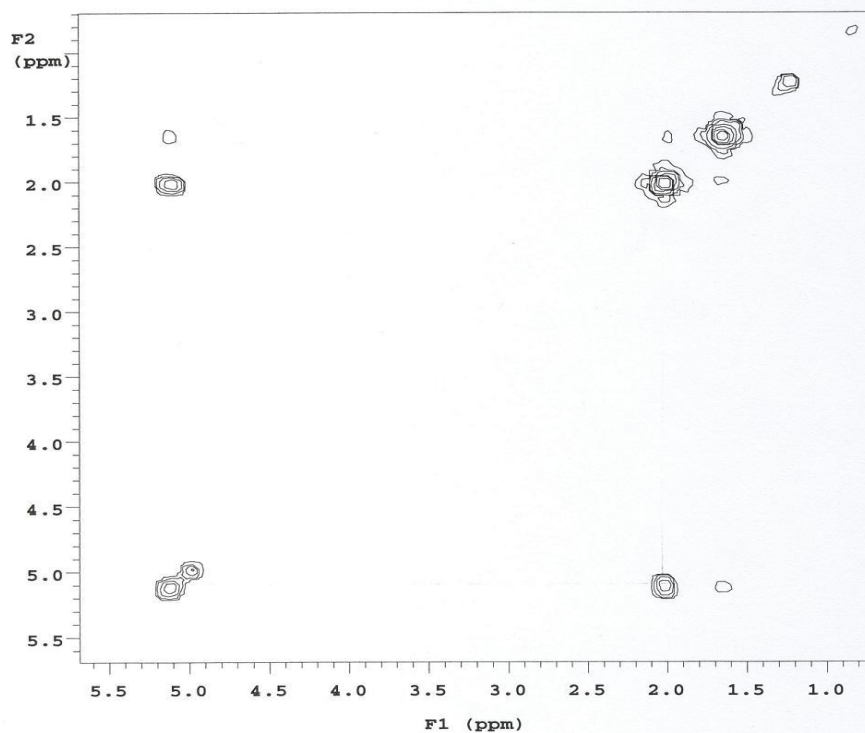
9. VEDLEGG



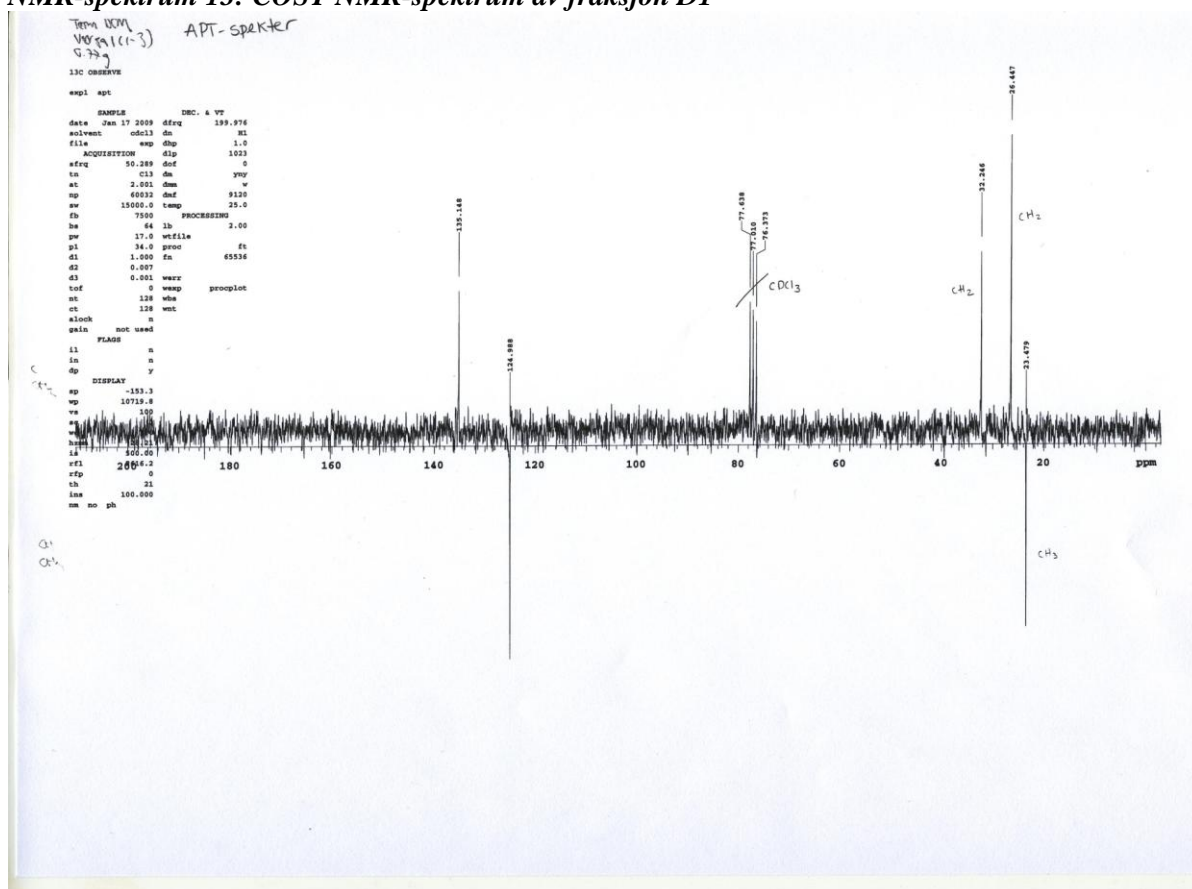
NMR-spektrum 11: ¹H NMR-spektrum av fraksjon D1



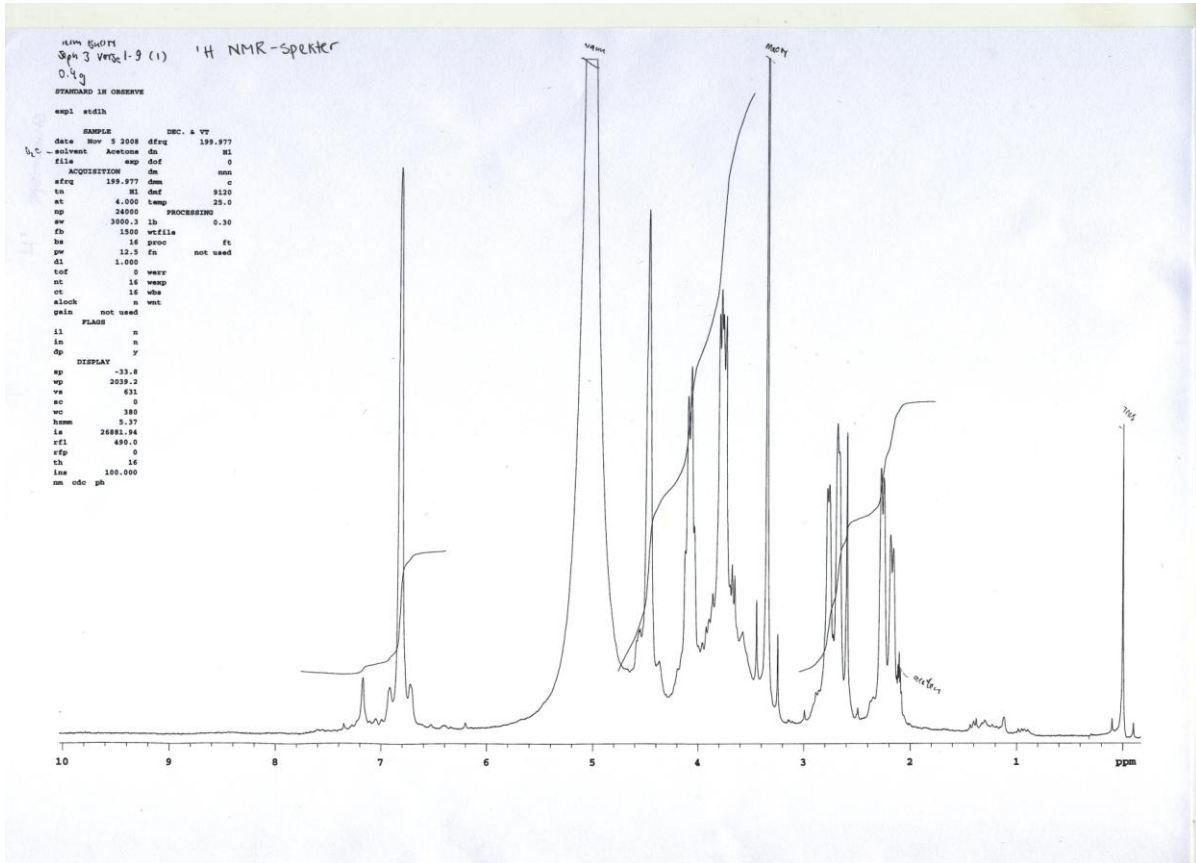
NMR-spektrum 12: ¹³C NMR-spektrum av fraksjon D1



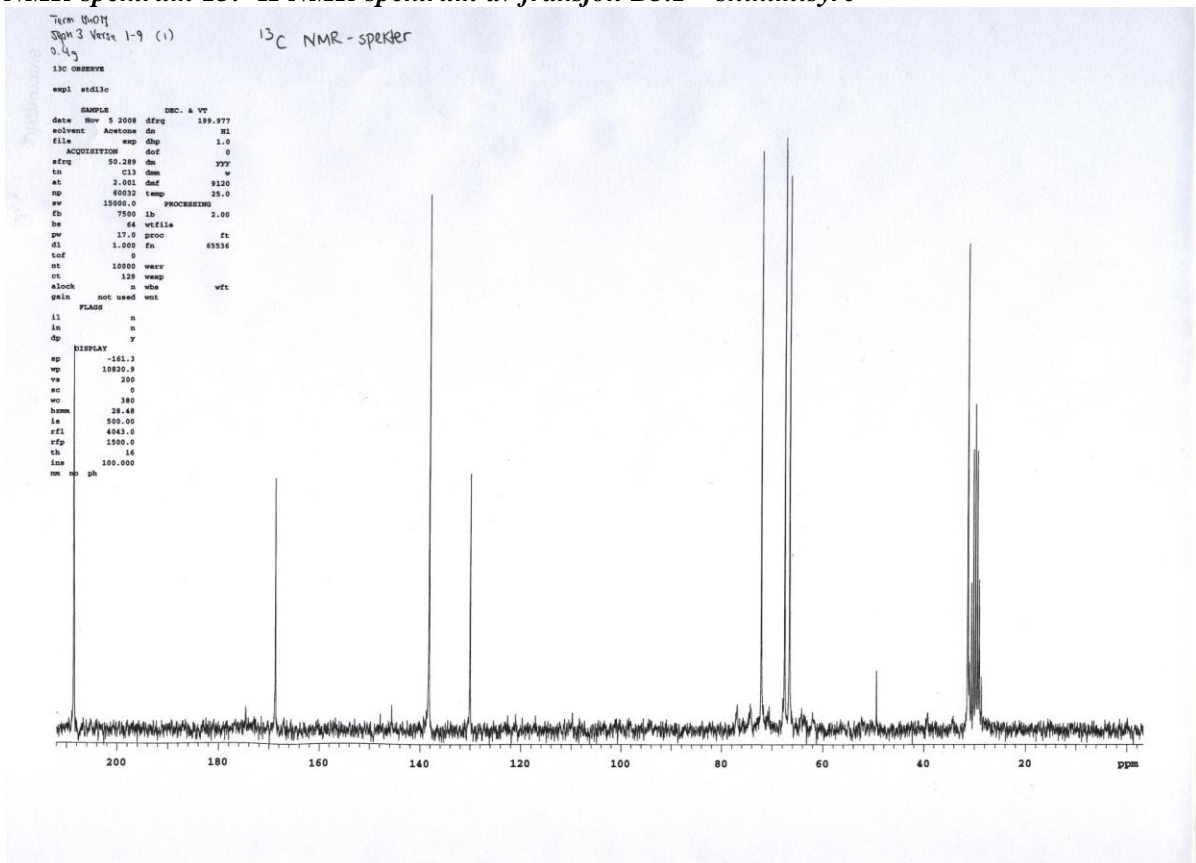
NMR-spektrum 13: COSY NMR-spektrum av fraksjon D1



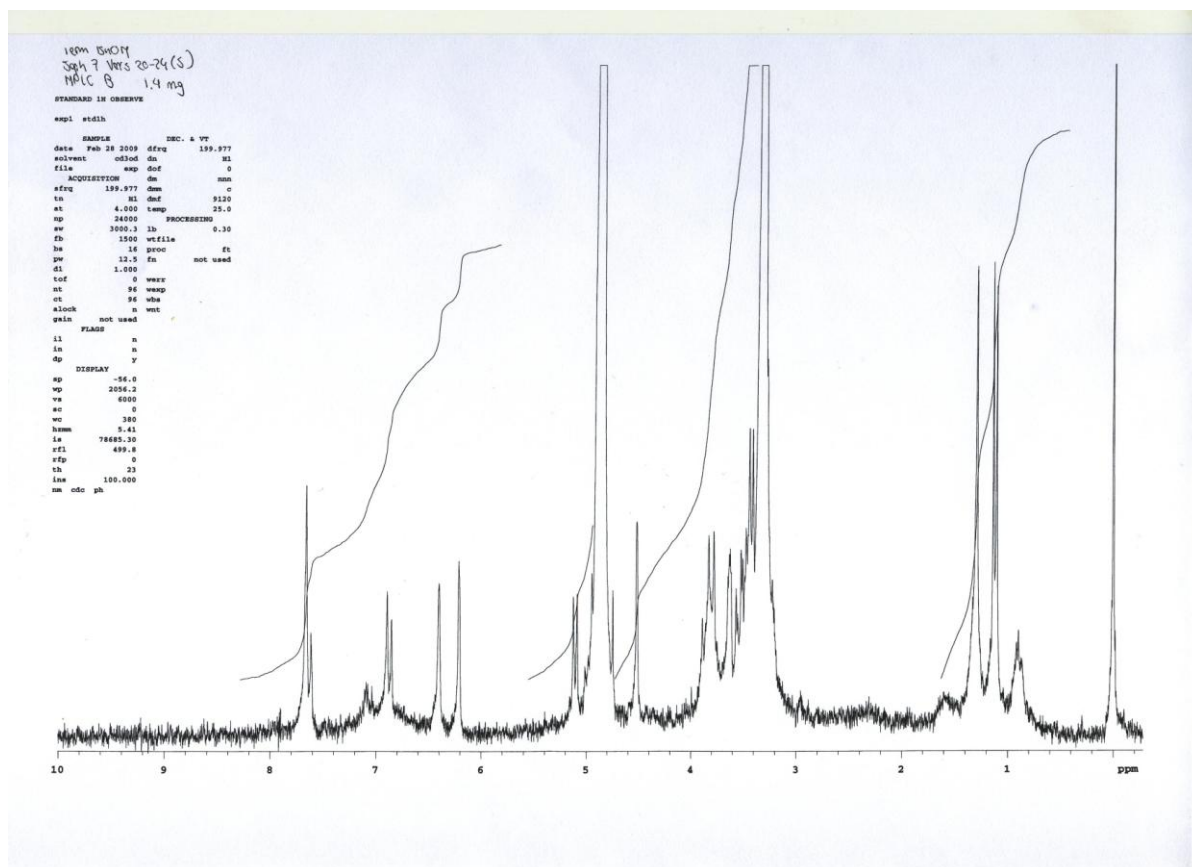
NMR-spektrum 14: APT NMR-spektrum av fraksjon D1



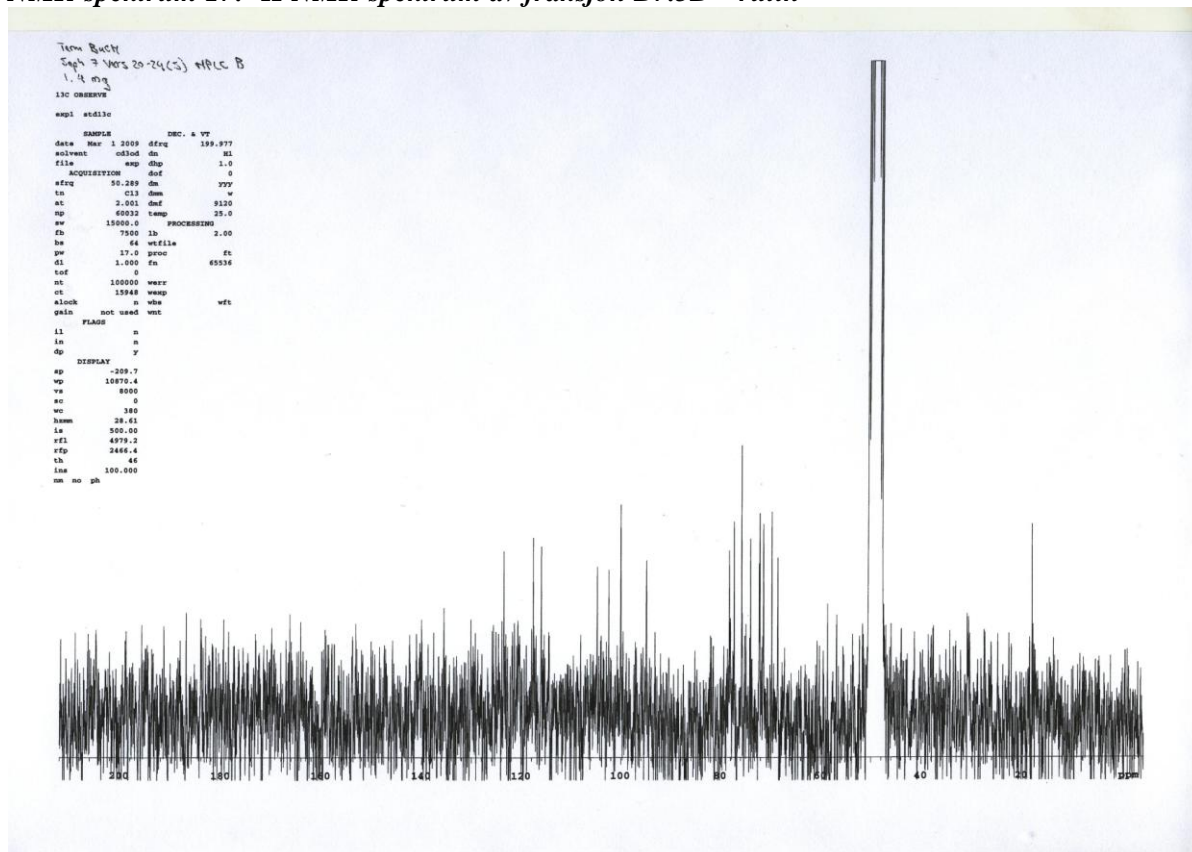
NMR-spektrum 15: ¹H NMR-spektrum av fraksjon B3.1 – shikimisyre



NMR-spektrum 16: ¹³C NMR-spektrum av fraksjon B3.1 – shikimisyre

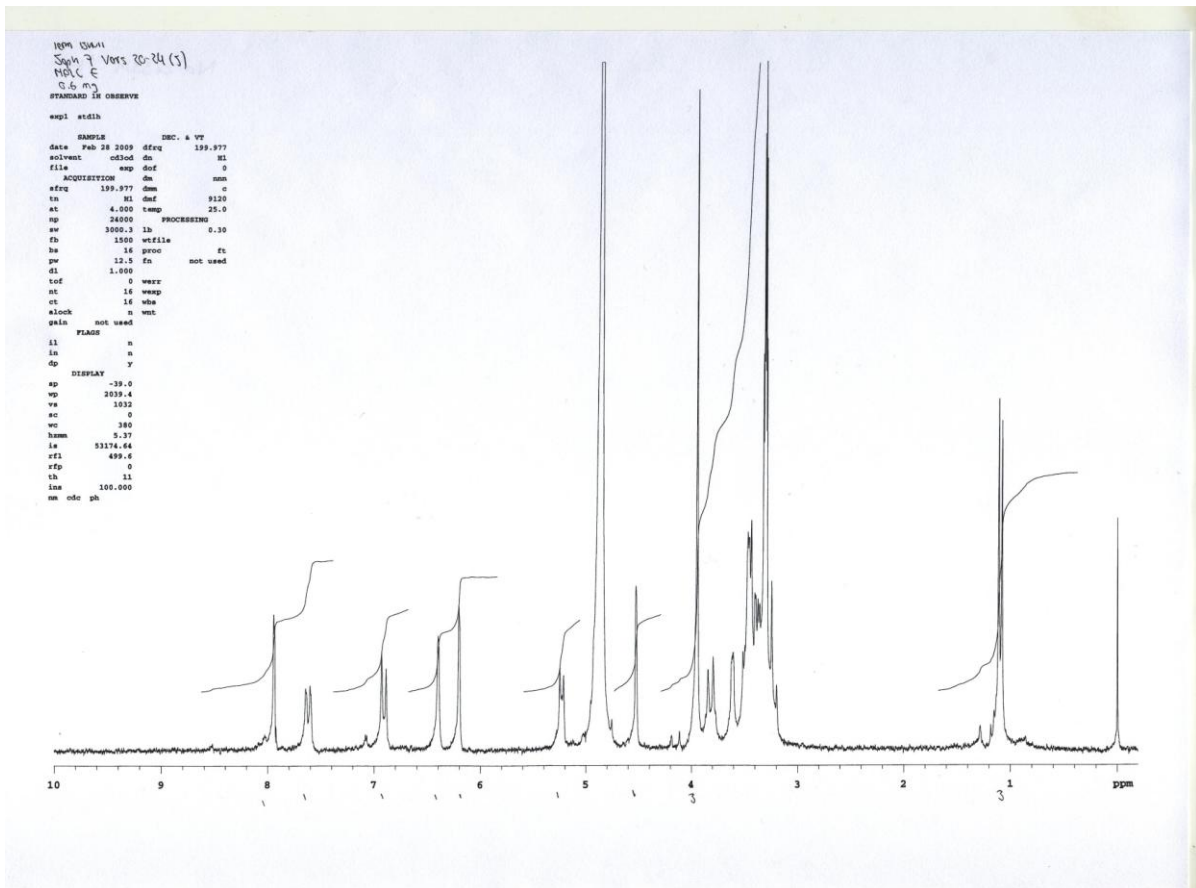


NMR-spektrum 17: ^1H NMR-spektrum av fraksjon B7.5B – rutin

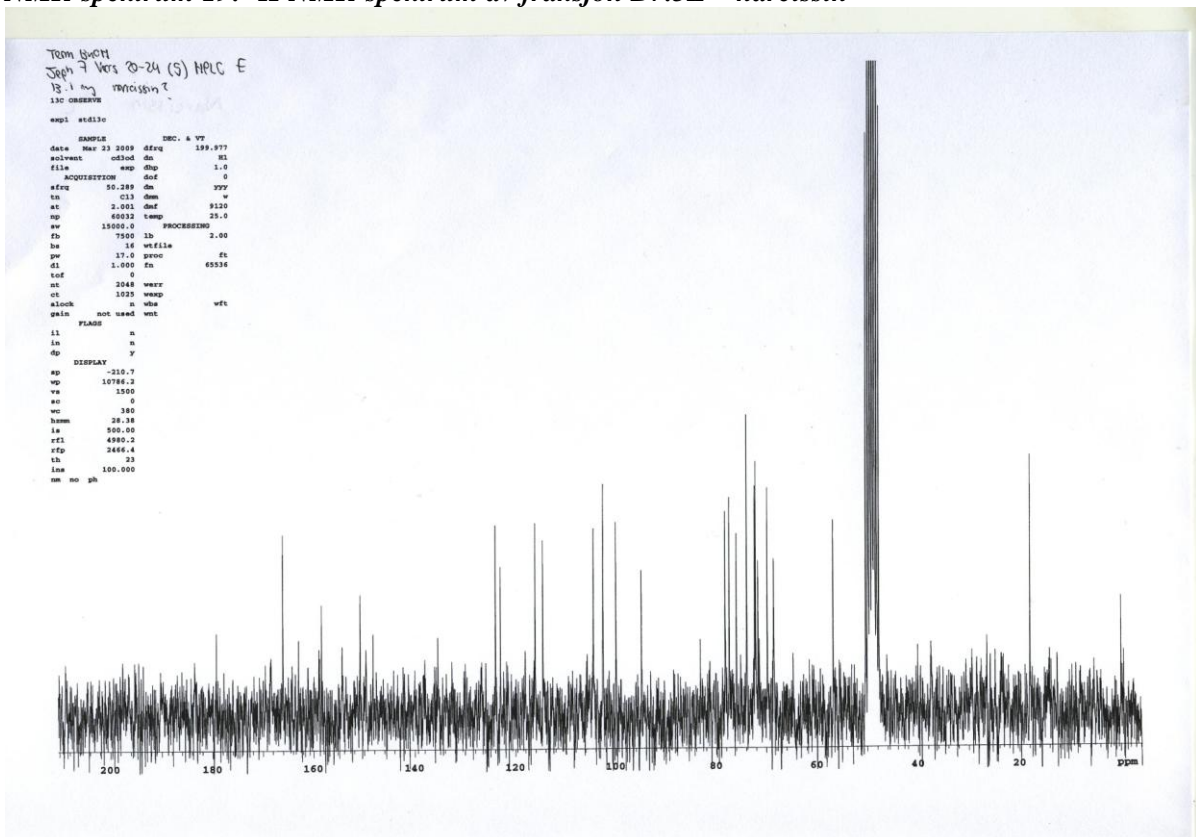


NMR-spektrum 18: ^{13}C NMR-spektrum av fraksjon B7.5B – rutin

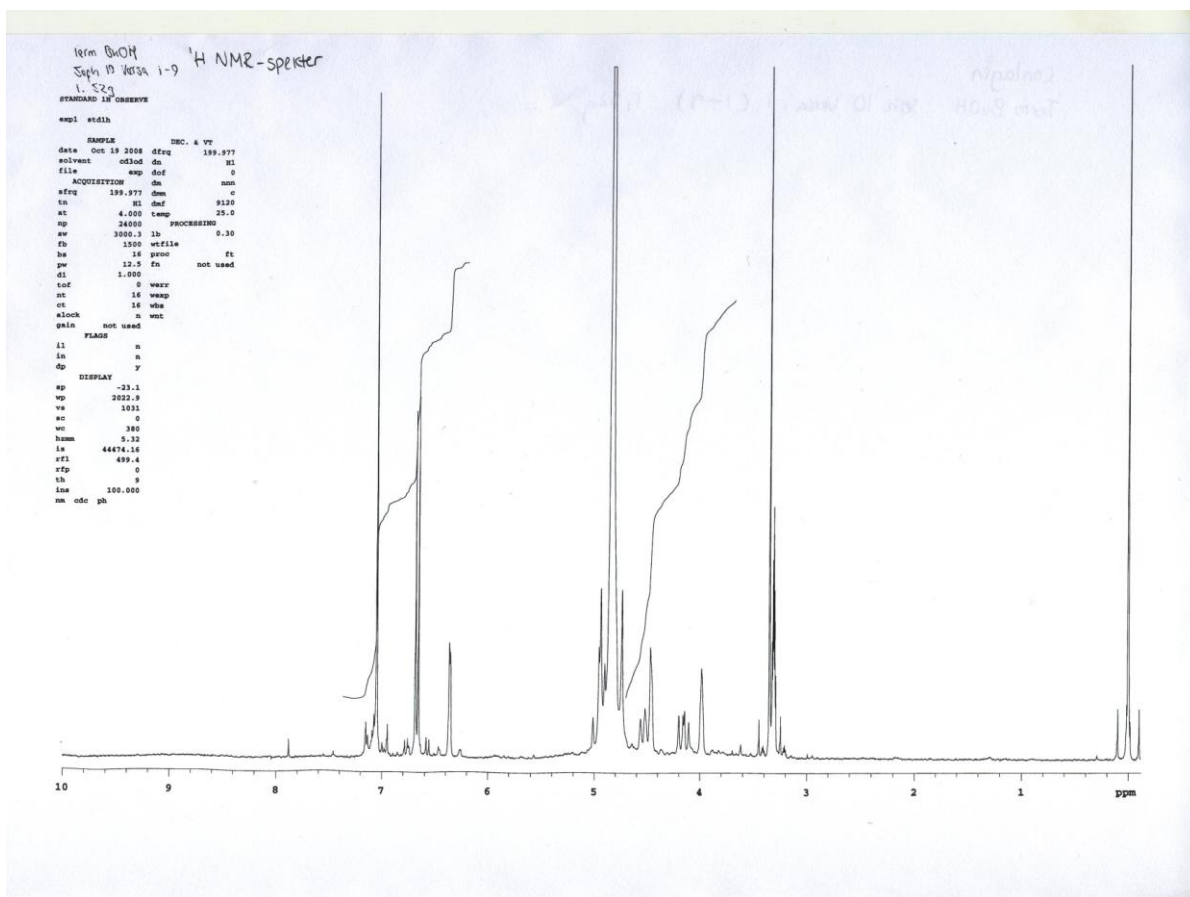
9. VEDLEGG



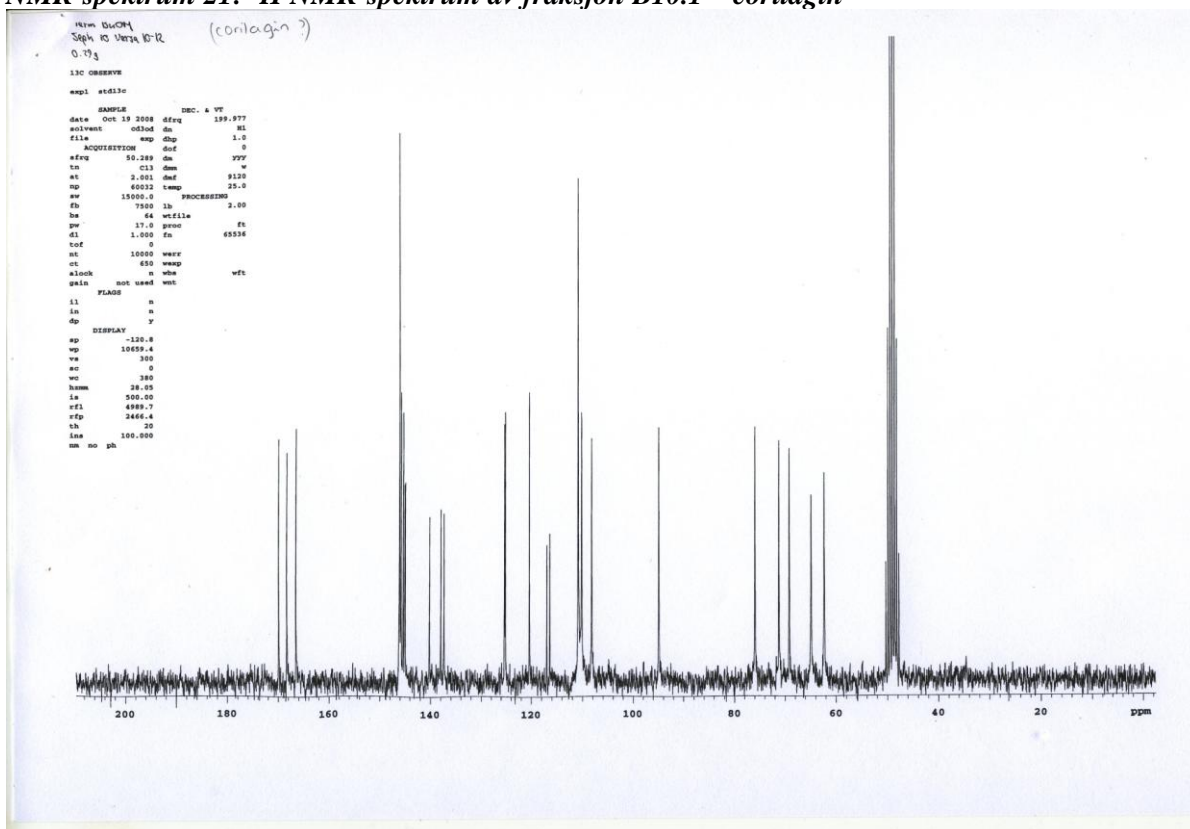
NMR-spektrum 19: ^1H NMR-spektrum av fraksjon B7.5E – narcissin



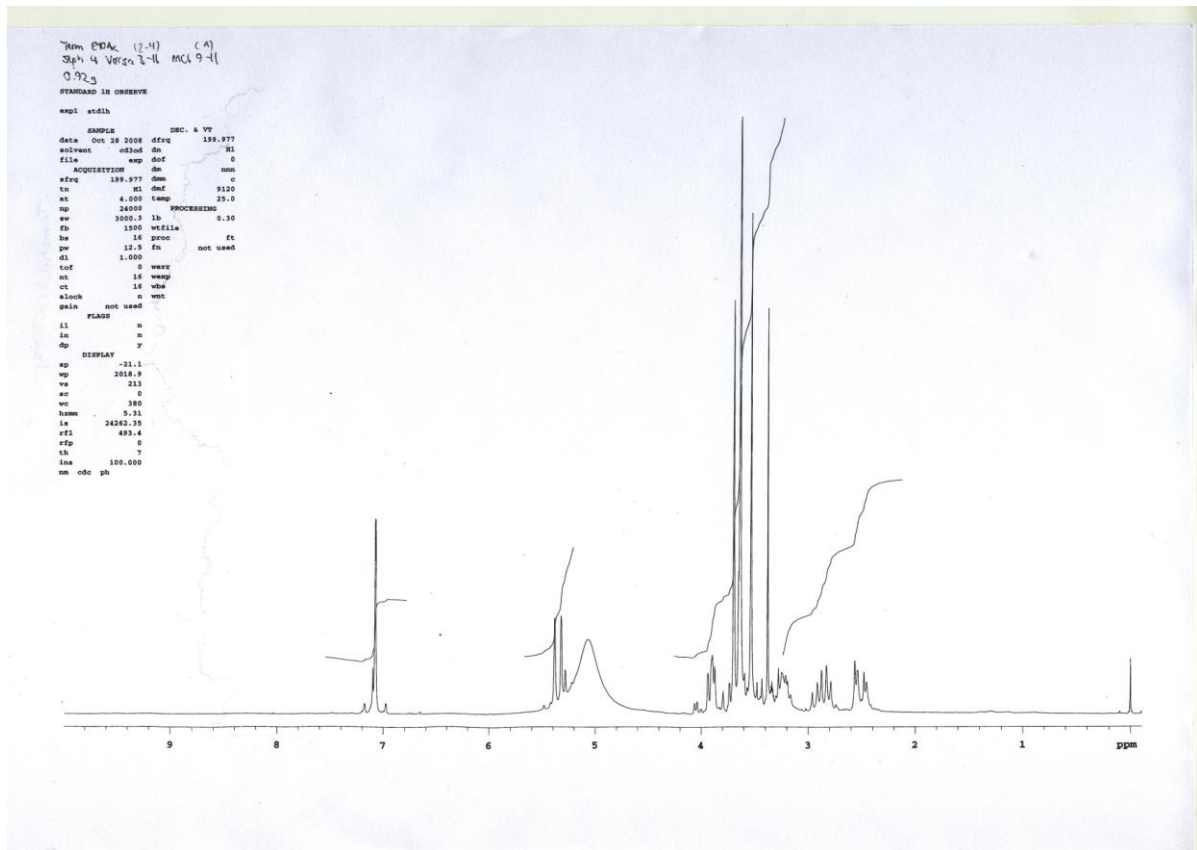
NMR-spektrum 20: ^{13}C NMR-spektrum av fraksjon B7.5E – narcissin



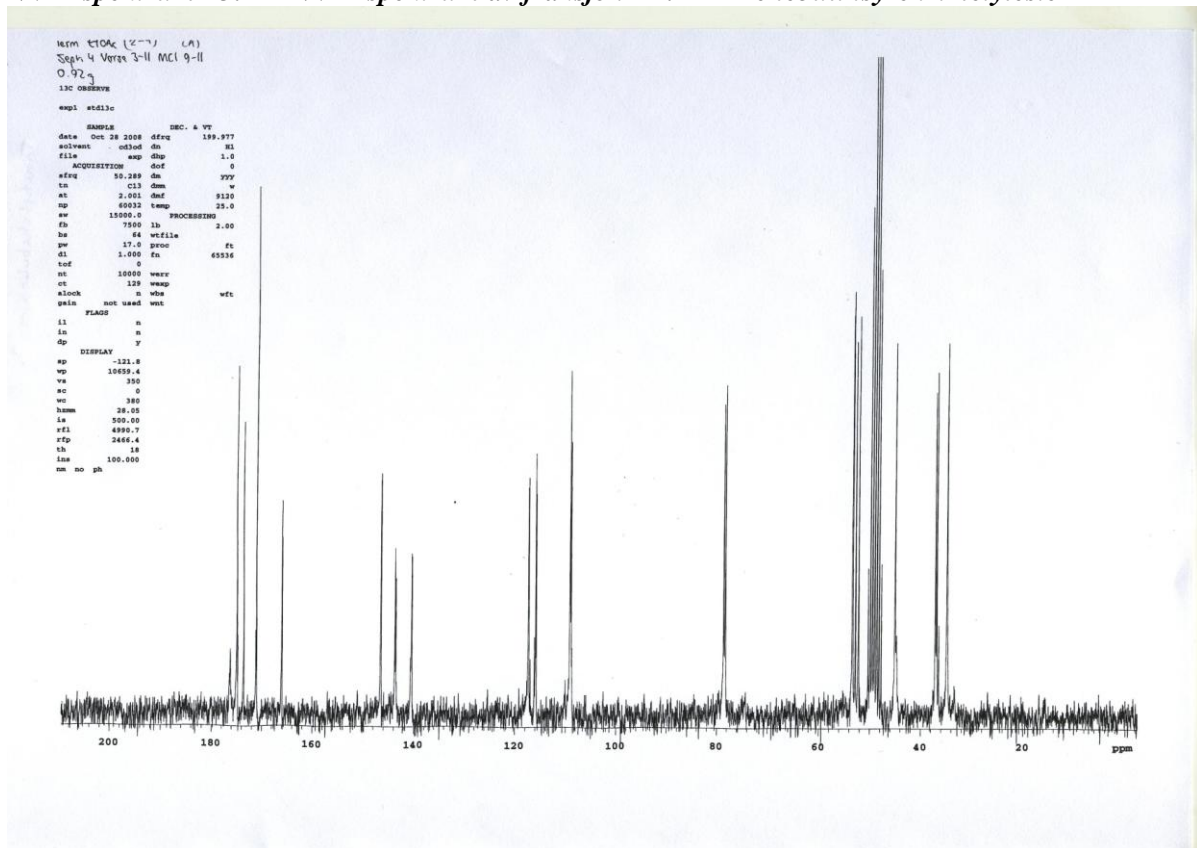
NMR-spektrum 21: ¹H NMR-spektrum av fraksjon B10.1 – corilagin



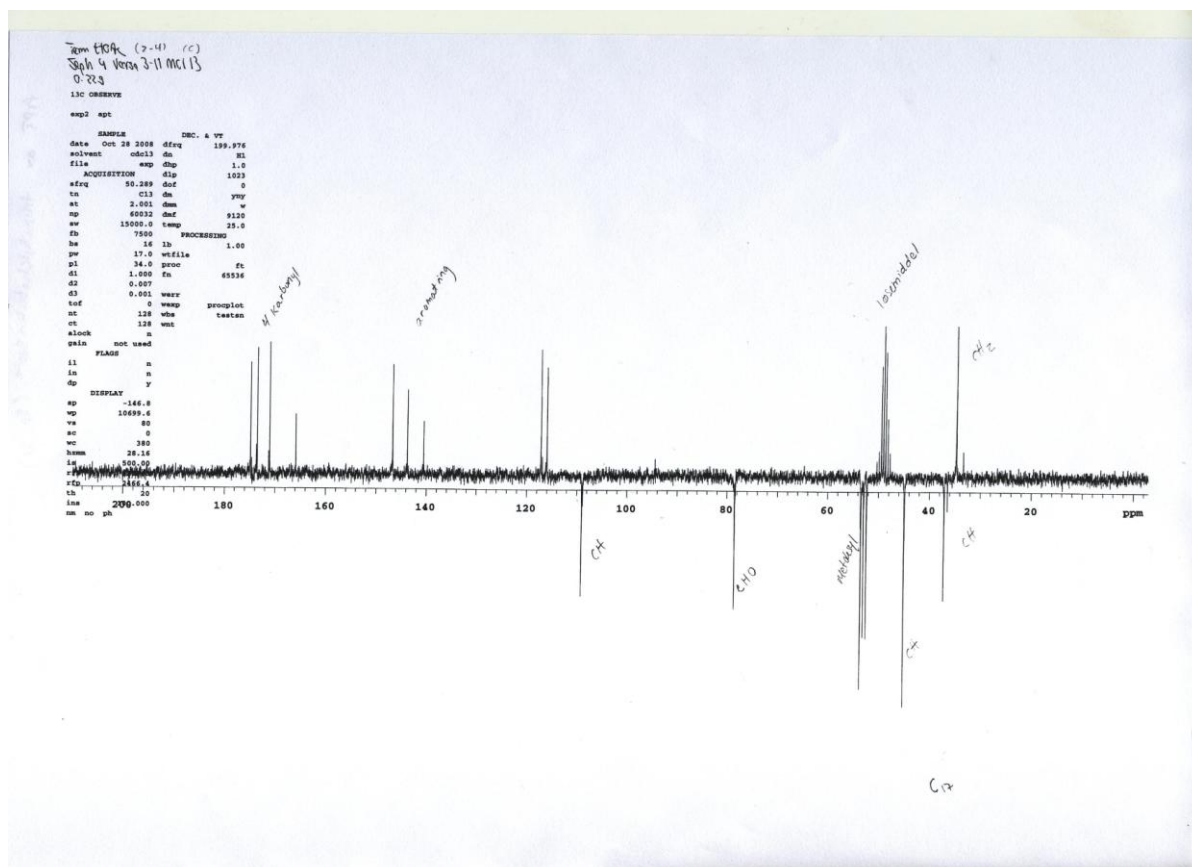
NMR-spektrum 22: ¹³C NMR-spektrum av fraksjon B10.2 – corilagin



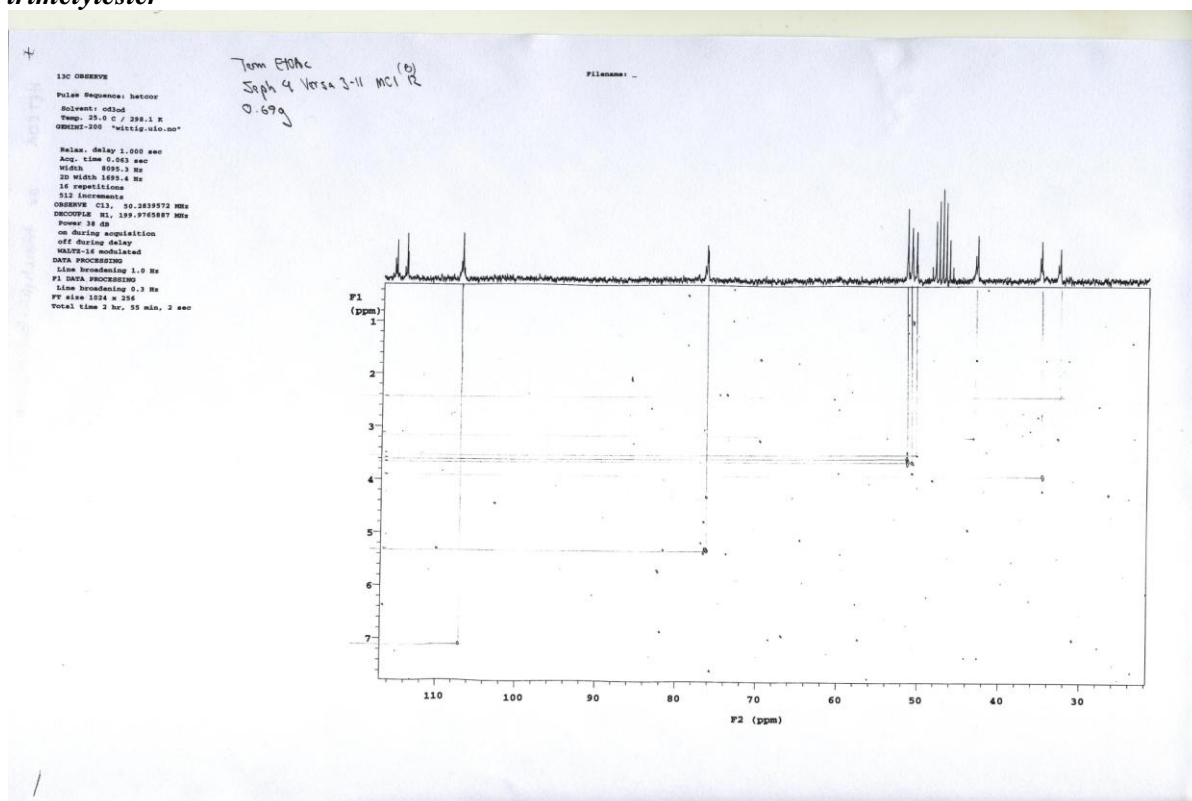
NMR-spektrum 23: ^1H NMR-spektrum av fraksjon E4.2-4A – chebulinsyre trimetylester



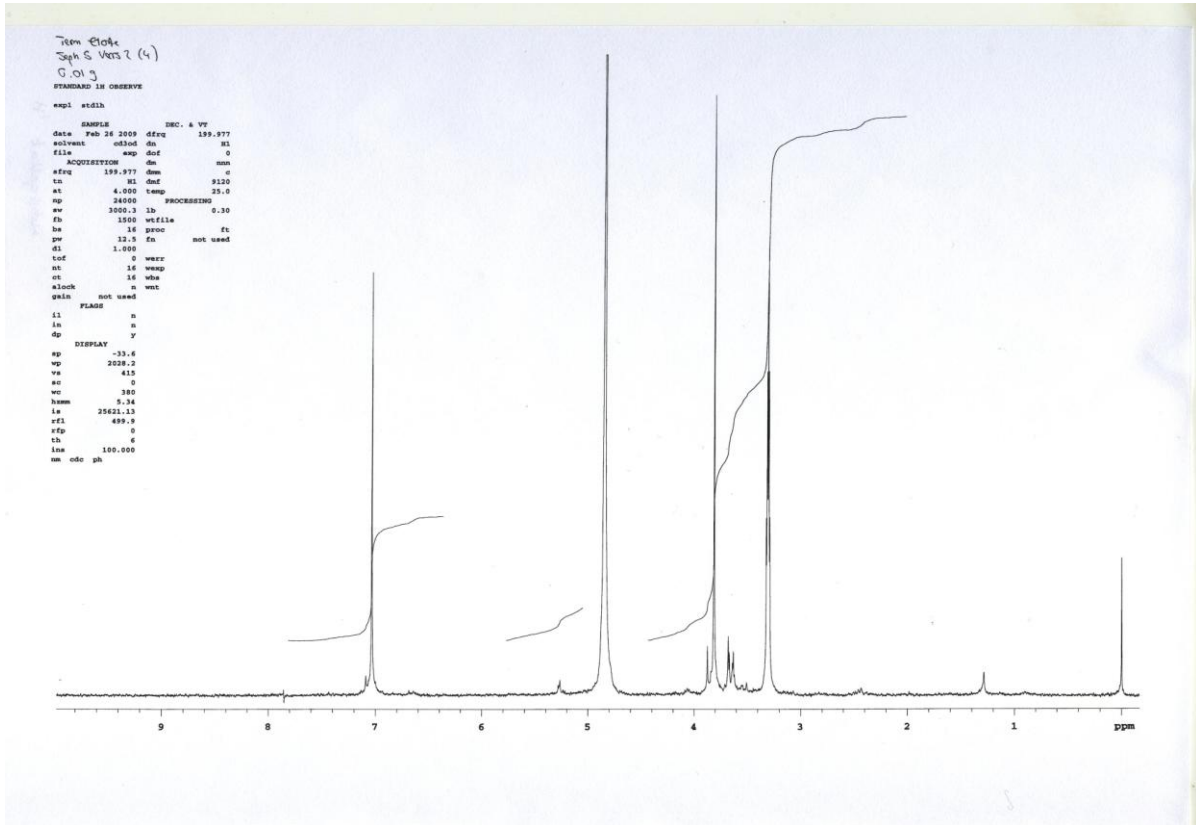
NMR-spektrum 24: ^{13}C NMR-spektrum av fraksjon E4.2-4A – chebulinsyre trimetylester



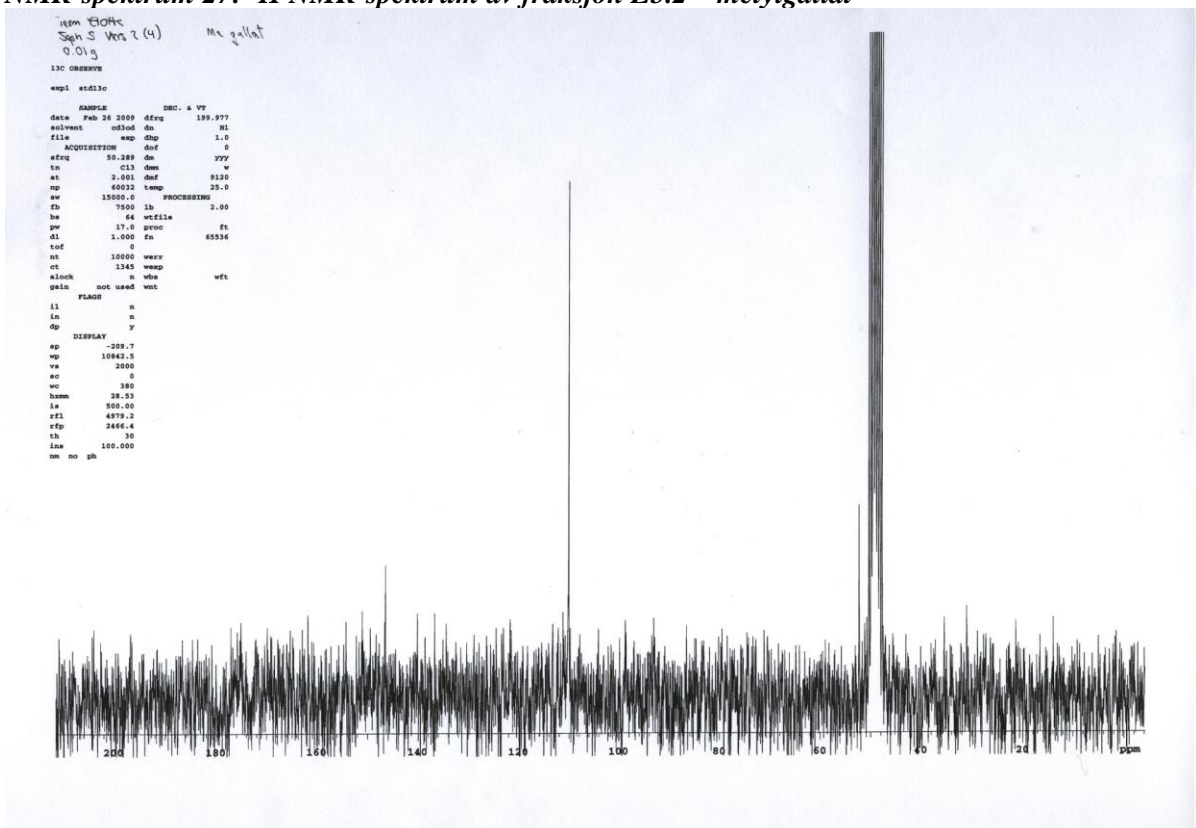
NMR-spektrum 25: APT NMR-spektrum av fraksjon E4.2-4A – chebulinsyre trimetylester



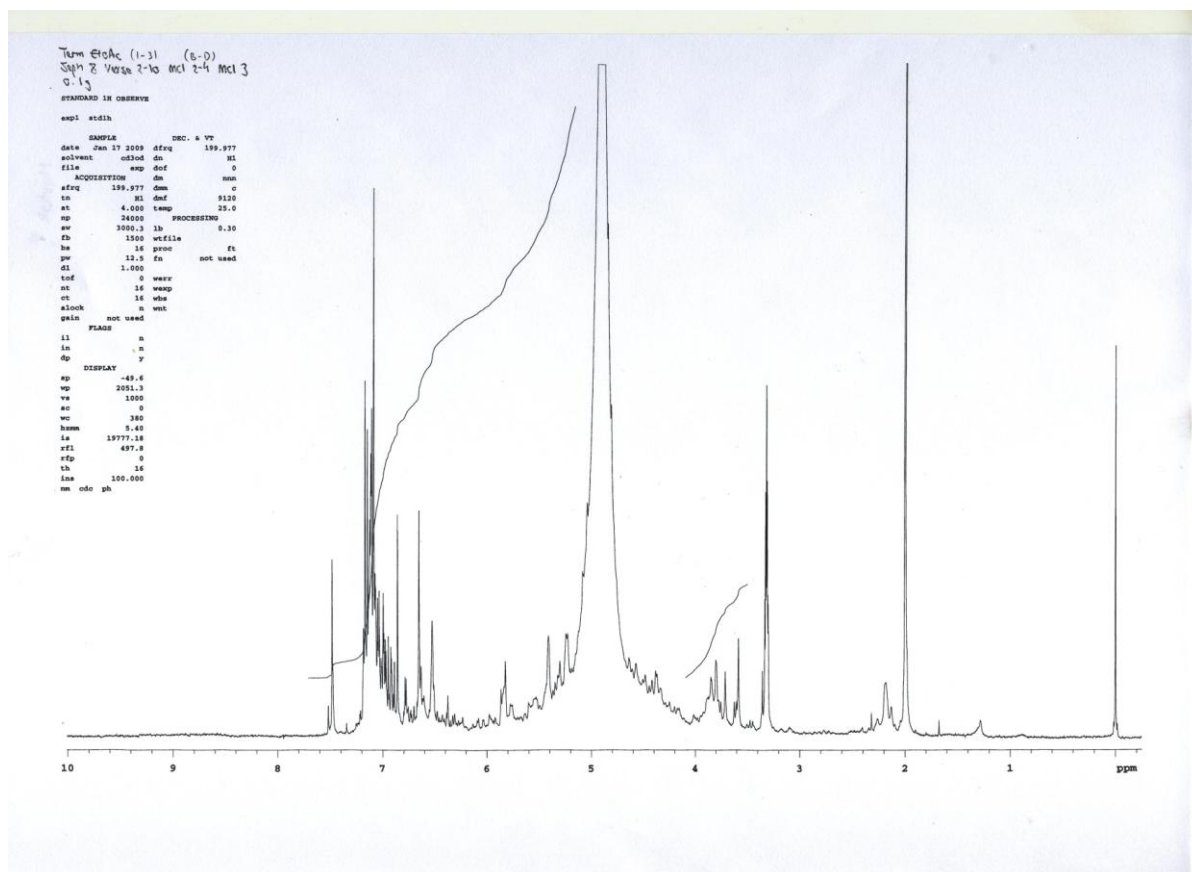
NMR-spektrum 26: HETCOR NMR-spektrum av fraksjon E4.2-4A – chebulinsyre trimetylester



NMR-spektrum 27: ^1H NMR-spektrum av fraksjon E5.2 – metylgallat



NMR-spektrum 28: ^{13}C NMR-spektrum av fraksjon E5.2 – metylgallat



NMR-spektrum 29: ^1H NMR-spektrum av fraksjon E8.1-3.B-D3

Kildeliste

- Akowuah, G. A., Zhari, I., Sadikun, A. og Norhayati, I. (2006). "HPTLC Densitometric Analysis of *Orthosiphon stamineus* Leaf Extracts and Inhibitory Effect on Xanthine Oxidase Activity." Pharmaceutical Biology **44**: 65-70.
- Aluka. (1985). "*Terminalia macroptera* Guill. & Perr. [family COMBRETACEAE]." Aksessert 21.04. 2009, fra <http://www.aluka.org/action/showCompilationPage?doi=10.5555/AL.AP.COMPILOTION.PLANT-NAME-SPECIES.TERMINALIA.MACROPTERA&tab=vern.names>.
- Aminoc, C. D. og Vakhobov, A. A. (1992). "Pharmacology of narcissin." Doklady Akademii Nauk Respubliki Uzbekistan **2**: 41-42 [Chemical Abstracts 119:216771].
- Arbonnier, M. (2004). Trees, shrubs and lianas of West African dry zones. Margraf Publishers GMBH, Weikersheim, Tyskland.
- Batawila, K., Kokou, K., Koumaglo, K., Gbéassor, M., de Foucault, B., Bouchet, P. og Akpagana, K. (2005). "Antifungal activities of five Combretaceae used in Togolese traditional medicine." Fitoterapia **76**: 264-268.
- Benoit-Vical, F., Soh, P. N., Saléry, M., Harguem, L., Poupat, C. og Nongonierma, R. (2008). "Evaluation of Senegalese plants used in malaria treatment: Focus on *Chrozophora senegalensis*." Journal of Ethnopharmacology **116**: 43-48.
- Bertelli, A. A., Mannari, C., Santi, S., Filippi, C., Migliori, M. og Giovannini, L. (2008). "Immunomodulatory activity of shikimic acid and quercetin in comparison with oseltamivir (Tamiflu) in an in vitro model." Journal of medical virology **80**: 741-745.
- Calzada, F., Velázquez, C., Cedillo-Rivera, R. og Esquivel, B. (2003). "Antiprotozoal Activity of the Constituents of *Teloxys graveolens*." Phytotherapy Research **17**: 731-732.
- Casetta, I., Govoni, V. og Garanieri, E. (2005). "Oxidative Stress, Antioxidants and Neurodegenerative Diseases." Current Pharmaceutical Design **11**: 2033-2052.
- Chen, L., Li, Q. og Wang, G. (1988). "The effects of narcissin on myocardial blood provision in animals and isolated rabbit aorta strip contraction. ." Zhongcaoyao **19**: 115-117 [Chemical Abstracts 108:216078].
- Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., Park, S. H. og Kim, S. K. (2002). "Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison." Plant Science **163**: 1161-1168.
- Chung, S.-K., Nam, J.-A., Jeon, S.-Y., Kim, S.-I., Lee, H.-J., Chung, T. H. og Song, K.-S. (2003). "A Prolyl Endopeptidase-Inhibiting Antioxidant from *Phyllanthus ussurensis*." Archives of Pharmacal Research **26**: 1024-1028.
- CIA. (2009). "Central Intelligence Agency - The World Factbook - Mali." Aksessert 16.04. 2009, fra <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/ml.html>.

- Conrad, J., Vogler, B., Klaiber, I., Reeb, S., Guse, J. H., Roos, G. og Kraus, W. (2001). "Vanillic acid 4-O-beta-D-(6'-O-galloyl) glucopyranoside and other constituents from the bark of *Terminalia macroptera* Guill. et Perr." Natural Product Research **15**: 35-42.
- Conrad, J., Vogler, B., Klaiber, I., Roos, G., Walter, U. og Kraus, W. (1998). "Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark." Phytochemistry **48**: 647-650.
- Conrad, J., Vogler, B., Reeb, S., Klaiber, I., Papajewski, S., Roos, G., Vasquez, E., Setzer, M. C. og Kraus, W. (2001). "Isoterchebulin and 4,6-O-Isoterchebuloyl-d-glucose, Novel Hydrolyzable Tannins from *Terminalia macroptera*." Journal of Natural Products **64**: 294-299.
- Diallo, D. og Paulsen, B. S. (2000). Pharmaceutical research and traditional practitioners in Mali: Experiences with benefit sharing. I: Responding to bioprospecting: from biodiversity in the south to medicines in the north. Red, Svarstad, H. og Dhillon, S. S. Spartacus Forlag AS, Oslo, Norge: 133-144.
- Ding, G., Liu, Y., Lu, Y. og Sheng, L. (2001). "Two new isomers of chebulic acid from *Terminalia chebula*." Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao **32**: 333-335.
- Duke, J. A. (1992). Handbook of biologically active phytochemicals and their activities CRC Press, London, England.
- Fang, S.-H., Rao, Y. K. og Tzeng, Y.-M. (2008). "Anti-oxidant and inflammatory mediator's growth inhibitory effects of compounds isolated from *Phyllanthus urinaria*." Journal of Ethnopharmacology **116**: 333-340.
- Glæserud, S. (2008). Immunmodulerende polysakkarider isolert fra en sårhelende plante fra Mali: *Combretum glutinosum*. Etnofarmakologiske studier i Mali. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo. Masteravhandling i farmasi.
- Greibrokk, T., Lundanes, E., Rasmussen, K. E. og Karlsen, J. (1994). Kromatografi: separasjon og deteksjon. Universitetsforlaget, Oslo, Norge.
- Grubben, G. C. M. (2004). Dyes and Tannins. PROTA Foundation, Wageningen, Nederland.
- Guo, A.-X. og Huang, X.-G. (2007). "Corilagin, promising natural product for treating cardiovascular diseases." Hunan Huanjing Shengwu Zhiye Jishu Xueyuan Xuebao **13**: 11-14 [Chemical Abstracts 148:369144].
- Halliwell, B. (2005). "Free Radicals and Other Reactive Species in Disease." Aksessert 30.03. 2009, fra www.els.net.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J. og Aruoma, O. I. (1995). "The characterization of antioxidants." Food and Chemical Toxicology **33**: 601-617.
- Halliwell, B. og Gutteridge, J. M. C. (2007). Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, England.
- Han, J. T., Bang, M. H., Chun, O. K., Kim, D. O., Lee, C. Y. og Baek, N. I. (2004). "Flavonol Glycosides from the Aerial Parts of *Aceriphyllum rossii* and Their Antioxidant Activities." Archives of Pharmacal Research **27**: 390-395.
- Hansen, T. V. (2008). NMR Spektroskopi. Forelesningsnotater i FRM4030, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

- Hayashi, T., Sawa, K., Kawasaki, M., Arisawa, M., Shimizu, M. og Morita, M. (1988). "Inhibition of Cow's Milk Xanthine Oxidase by Flavonoids." Journal of Natural Products **51**: 345-348.
- Heinrich, M. og Gibbons, S. (2001). "Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution." Journal of Pharmacy and Pharmacology **53**: 425-32.
- Hyun, S. K., Jung, Y. J., Chung, H. Y., Jung, H. A. og Choi, J. S. (2006). "Isorhamnetin Glycosides with Free Radical and ONOO- Scavenging Activities from the Stamens of *Nelumbo nucifera*." Archives of Pharmacal Research **29**: 287-292.
- Inngjerdengen, K., Nergård, C. S., Diallo, D., Mounkoro, P. P. og Paulsen, B. S. (2004). "An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland, Mali, West Africa." Journal of Ethnopharmacology **92**: 233-244.
- ITIS. (1999). "ITIS Report, Terminalia L." Aksessert 21.04. 2009, fra http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=27761.
- Kanji. (2009). "The Kanji Foundry Press Illustrated Companion to Pharmacology - Allopurinol." Aksessert 04.05. 2009, fra <http://www.thekanjifoundrypress.com/a.html>.
- Kolodziej, H., Kayser, O., Latte, K. P. og Ferreira, D. (1999). "Evaluation of the antimicrobial potency of tannins and related compounds using the microdilution broth method." Planta Medica **65**: 444-446 [Chemical Abstracts 131:269465].
- Kraus, W., Ngoc, L., Conrad, J., Klaiber, I., Reeb, S. og Vogler, B. (2002). "Investigation of biologically active natural products using online LC-bioassay, LC-NMR, and LC-MS techniques." Phytochemistry Reviews **1**: 409-411.
- Kreft, S., Knapp, M. og Kreft, I. (1999). "Extraction of Rutin from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Seeds and Determination by Capillary Electrophoresis." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**: 4649-4652.
- Lee, E. H., Kim, H. J., Song, Y. S., Jin, C., Lee, K.-T., Cho, J. og Lee, Y. S. (2003). "Constitutents of the Stems and Fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*." Archives of Pharmacal Research **26**: 1018-1023.
- Lee, H. S., Jung, S. H., Yun, B.-S. og Lee, K.-W. (2007). "Isolation of chebulic acid from *Terminalia chebula* Retz. and its antioksidant effect in isolated rat hepatocytes." Archives of Toxicology **81**: 211-218.
- Lee, S. I., Yang, J. H., Baek, N. I., Kim, S. H., Cho, C. H., Park, B. H., Chae, B. S. og Kim, D. K. (2008). "Free radical scavengers from fruits of *Paeonia suffruticosa*." Natural Product Sciences **14**.
- Lim, Y. A., Mei, M. C., Kusumoto, I. T., Miyashiro, H. og Hattori, M. (1997). "HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory Principles from *Chamaesyce hyssopifolia* " Phytotherapy Research **11**: 22-27.
- Lyckander, I. M. og Malterud, K. E. (1996). "Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* prevent oxidative inactivation of 15-lipoxygenase." Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids **54**: 239-246.

- Malterud, K. E. (1998). Procedure for assay of 15-lipoxygenase inhibition. Internt notat, Farmasøytisk Institutt, Seksjon for Farmakognosi, Universitetet i Oslo.
- Malterud, K. E. (2008). Bioassay metoder. Forelesningsnotater i FRM4030, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.
- Malterud, K. E., Farbrot, T. L., Huse, A. E. og Sund, R. B. (1993). "Antioxidant and Radical Scavenging Effects of Anthraquinones and Anthrones." Pharmacology **47**: 77-85.
- Masuoka, N., Nihei, K.-i. og Kubo, I. (2006). "Xanthine oxidase inhibitory activity of alkyl gallates." Molecular Nutrition & Food Research **50**: 725-731.
- Maydell, H.-J. v. (1990). Trees and shrubs of the Sahel: their characteristics and uses. Verlag Josef Margraf, Weikersheim, Tyskland.
- Nguyen, M. T. T., Awale, S., Tezuka, Y., Tran, Q. L., Watanabe, H. og Katoda, S. (2004). "Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Vietnamese Medicinal Plants." Biological & Pharmaceutical Bulletin **27**: 1414-1421.
- Nongonierma, R., Proliac, A. og Raynaud, J. (1987). "2 Mono-C-Glycosyl Flavonoids from Flowers of *Terminalia Macroptera* Guill and Perr (Combretaceae)." Pharmazie **42**: 871-872.
- Nongonierma, R., Proliac, A. og Raynaud, J. (1988). "Vitexin and Isovitexin in *Terminalia-Macroptera-Guill-Et-Perr* Flowers (Combretaceae)." Pharmazie **43**: 293-293.
- Nongonierma, R., Proliac, A. og Raynaud, J. (1990). "O-Glycosyl Flavonoids from the Flowers of *Terminalia-Macroptera* Guill. Et Perr. (Combretaceae)." Pharmaceutica Acta Helvetiae **65**: 233-235.
- Noro, T., Oda, Y., Miyase, T., Ueno, A. og Fukushima, S. (1983). "Inhibitors of Xanthine Oxidase from the Flowers and Buds of *Daphne genkwa*." Chemical & Pharmaceutical Bulletin **31**: 3984-3987.
- Odlo, K. (2003). Isolering og karakterisering av stoff med antioksidanteffekt fra den maliske planten *Diospyros abyssinica*. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo. Cand. Pharm. avhandling.
- Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K. E. (2004). Legemiddelanalyse. Fagbokforlaget, Bergen, Norge.
- Pharmacia (1975). Sephadex LH-20 chromatography in organic solvents. Pharmacia, Uppsala, Sverige.
- Pieters, L. og Vlietinck, A. J. (2005). "Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds?" Journal of Ethnopharmacology **100**: 57-60.
- Rang, H. P., Dale, M. M. og Ritter, J. M. (1999). Pharmacology. Churchill Livingstone, Edinburgh, England.
- Samuelsson, G. (2004). Drugs of natural origin: a textbook of pharmacognosy. Apotekarsocieteten, Stockholm, Sverige.
- Sanon, S., Ollivier, E., Azas, N., Mahiou, V., Gasquet, M., Ouattara, C. T., Nebie, I., Traore, A. S., Esposito, F., Balansard, G., Timon-David, P. og Fumoux, F. (2003). "Ethnobotanical survey and in vitro antiplasmodial activity of plants

- used in traditional medicine in Burkina Faso." Journal of Ethnopharmacology **86**: 143-147.
- Schneider, I. og Bucar, F. (2005). "Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 1: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase/cyclooxygenase." Phytotherapy Research **19**: 81-102.
- Shen, S.-C., Lee, W.-R., Lin, H.-Y., Huang, H.-C., Ko, C.-H., Yang, L.-L. og Chen, Y.-C. (2002). "In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E₂ production." European Journal of Pharmacology **446**: 187-194.
- Shimizu, M., Shiota, S., Mizushima, T., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T. og Tsuchiya, T. (2001). "Marked Potentiation of Activity of B-Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by corilagin." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **45**: 3198-3201.
- Silva, O., Duarte, A., Cabrita, J., Pimentel, M., Diniz, A. og Gomes, E. (1996). "Antimicrobial activity of Guinea-Bissau traditional remedies." Journal of Ethnopharmacology **50**: 55-59.
- Silva, O., Duarte, A., Pimentel, M., Viegas, S., Barroso, H., Machado, J., Pires, I., Cabrita, J. og Gomes, E. (1997). "Antimicrobial activity of *Terminalia macroptera* root." Journal of Ethnopharmacology **57**: 203-207.
- Silva, O., Ferreira, E., Pato, M. V., Canica, M. og Gomes, E. T. (2002). "In vitro anti-*Neisseria gonorrhoeae* activity of *Terminalia macroptera* leaves." FEMS Microbiology Letters **211**: 203-206.
- Silva, O., Ferreira, E., Vaz Pato, M. V. og Gomes, E. T. (1997). "Guinea-Bissau's plants *in vitro* susceptibility studies on *Neisseria gonorrhoeae*." International Journal of Pharmacognosy **35**: 323-328.
- Silva, O., Gomes, E. T., Wolfender, J. L., Marston, A. og Hostettmann, K. (2000). "Application of high performance liquid chromatography coupled with ultraviolet spectroscopy and electrospray mass spectrometry to the characterisation of ellagitannins from *Terminalia macroptera* roots." Pharmaceutical Research **17**: 1396-1401.
- Solomons, T. W. G. og Fryhle, C. B. (2004). Organic chemistry. 8. utgave. Wiley, Hoboken, USA.
- Stone, K. J., Wellburn, A. R., Hemming, F. W. og Pennock, J. F. (1967). "The Characterization of Ficaprenol-10, -11 and -12 from the Leaves of *Ficus elastica*." Biochemical Journal **102**: 325-330.
- Sun, F., Chen, X., Wang, J., Ma, L., Qin, H. og Du, G. (2008). "Triethyl ester of chebulic acid, A strong free radical scavenger from *Terminalia arjuna*." Asian Journal of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics **8**: 232 [abstract].
- Supelco (2007). Chromatography Products for Analysis & Purification. Supelco, Bellefonte, USA.
- Tanaka, T., Nonaka, G.-I. og Nishioka, I. (1986). "Isolation and Characterization of Four New Hydrolyzable Tannins, Terflavins A and B, Tergallagin and

- Tercatain from the Leaves of *Terminalia catappa* L." Chemical & Pharmaceutical Bulletin **34**: 1039-1049.
- Tanaka, Y., Kawahara, S., Aik-Hwee, E., Shiba, K. og Ohya, N. (1995). "Initiation of biosynthesis in *cis* polyisoprenes." Phytochemistry **39**: 779-784.
- Tanaka, Y. og Takagi, M. (1979). "Structural Characterization of Ficaprenol-11 by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance." Biochemical Journal **183**: 163-165.
- Thomson, M. J. (2007). "Atherosclerosis and Oxidant Stress: The End of the Road for Antioxidant Vitamin Treatment?" Cardiovascular Drugs Therapy **21**: 195-210.
- Tropicos. (2009). "*Terminalia macroptera* Guill. & Perr." Aksessert 22.04 2009, fra <http://www.tropicos.org/name/8200096>.
- Wang, Y., Xiaoshen, Y., Zhengquan, L., Wei, Z., Lirong, C. og Xiaojie, X. (2005). "Searching for more effective HCV NS3 protease inhibitors via modification of corilagin." Progress in Natural Science **15**: 896-901.
- Wansi, J. D., Lallemand, M.-C., Chiozem, D. D., Toze, F. A. A., Mbaze, L. M. a., Naharkhan, S., Iqbal, M. C., Tillequin, F., Wandji, J. og Fomum, Z. T. (2007). "[alpha]-Glucosidase inhibitory constituents from stem bark of *Terminalia superba* (Combretaceae)." Phytochemistry **68**: 2096-2100.
- Waters. (2009). "Waters: the science of what's possible. HPLC - High Performance Liquid Chromatography." Aksessert 29.04. 2009, fra http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=it_IT&cid=10048919.
- WHO. (2009). "World Health Organization - Traditional Medicine. Fact sheet N° 134." Aksessert 16.04 2009, fra <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/index.html>.
- Wikipedia. (2009). "Wikipedia - Den frie encyklopedi - Mali." Aksessert 16.04. 2009, fra <http://no.wikipedia.org/wiki/Mali>.
- Wikipedia. (2009). "Wikipedia - The free encyclopedia - Shikimic acid." Aksessert 11.05. 2009, fra http://en.wikipedia.org/wiki/Shikimic_acid.
- Williams, D. H. og Fleming, I. (1989). Spectroscopic methods in organic chemistry. 4. utgave. McGraw-Hill, London, England.
- Yang, J., Sun, F., Li, Z., Du, G. og Qin, H. (2008). "Chemical constituents from *Terminalia chebula* Retz. ." Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa **20**: 450-451.
- Zhang, H., Chen, K., Pei, Y. og Hua, H. (2001). "Research on the chemical constituents of *Terminalia chebula* retz." Shenyang Yaoke Daxue Xuebao **18**: 417-418.
- Zhang, Y., DeWitt, D. L., Murugesan, S. og Nair, M. G. (2004). "Novel Lipid-Peroxidation- and Cyclooxygenase-Inhibitory Tannins from *Picrorhiza kurroa* Seeds." Chemistry and Biodiversity **1**: 426-441.
- Zhao, L., Zhang, S.-L., Tao, J.-Y., Pang, R., Jin, F., Guo, Y.-J., Dong, J.-H., Ye, P., Zhao, H.-Y. og Zheng, G.-H. (2008). "Preliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of Corilagin (beta-1-O-galloyl-3,6-(R)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose) *in vitro*." International Immunopharmacology **8**: 1059-1064.