
Hovedfagsoppgave i farmakognosi for graden cand. pharm.

**Isolering og karakterisering av stoff med
antioksidanteffekt fra den maliske planten**

Diospyros abyssinica

DEL I



Kristin Odlo

Avdeling for farmakognosi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

2003

**Isolering og karakterisering av stoff med
antioksidanteffekt fra den maliske planten**

Diospyros abyssinica

DEL I

Hovedfagsoppgave i farmakognosi

Utført ved

Avdeling for farmakognosi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Av Kristin Odlo

Veiledere

Professor Berit Smestad Paulsen

Professor Karl Egil Malterud

Doktor Drissa Diallo

Oslo, november 2003

Forord

Denne hovedfagsoppgaven ble utført ved avdeling for farmakognosi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, i tidsrommet oktober 2002 til november 2003.

Dette heftet utgjør del I av hovedfagsoppgaven. Det inneholder selve hovedfagsavhandlingen, mens del II inneholder vedleggene til del I av oppgaven.

Først vil jeg takke Karl E. Malterud for humørfyllt, god og ikke minst velvillig veiledning gjennom arbeidet med hovedfagsoppgaven. Jeg vil også rette en takk til Berit Smestad Paulsen for god støtte underveis. Som engasjerte veiledere har dere bidratt til et lærerikt hovedfagsår!

Ellers vil jeg takke:

Helle Wangensteen for mange gode råd og tips underveis.

Drissa Diallo og Ababacar Maiga for all hjelp og veiledning ved gjennomføringen av feltarbeidet i Mali.

Reisefølget mitt i Mali, Anne-Marthe Ringerud og Kari Inngjerdingen, for at de gjorde turen til en flott opplevelse.

De andre hovedfagsstudentene på avdelingen for godt kameratskap og hyggelige stunder på kontoret.

Min samboer Morten som har støttet meg hele året og som tok godt imot meg da jeg kom hjem fra Mali.

Til slutt vil jeg takke alle ansatte ved avdeling C for at de har tatt godt vare på meg og vært hjelpsomme gjennom et hyggelig hovedfagsår!

Oslo, 10. november 2003

Kristin Odlo

Kristin Odlo

Innholdsfortegnelse

1	Sammendrag.....	1
2	Forkortelser.....	2
3	Hensikt med oppgaven.....	4
4	Bakgrunn.....	5
4.1	<i>Diospyros abyssinica</i>	5
4.1.1	Botaniske forhold.....	5
4.1.2	Tidligere funn.....	5
4.2	Etnofarmakologi.....	6
4.3	Tradisjonell medisin i Mali.....	7
4.4	Antioksidanter og frie radikaler.....	8
4.4.1	Antioksidanter.....	8
4.4.2	Frie radikaler og reaktive oksygenspecies.....	8
4.4.3	Dannelse av frie radikaler og reaktive oksygenspecies.....	9
4.4.4	Antioksidantforsvar.....	10
4.4.5	Oksidativt stress.....	11
4.4.6	Lipidperoksidering.....	11
4.4.7	Patologisk betydning.....	13
4.4.7.1	Aterosklerose.....	13
4.4.7.2	Kreft.....	13
4.4.7.3	Reumatoid artritt.....	14
4.4.7.4	Ischemisk reperfusjonsskade.....	14
4.5	Arakidonsyremetabolisme og 15-lipoksygenase.....	15
5	Eksperimentelt.....	18
5.1	Materialer.....	18
5.1.1	Kjemikalier.....	18
5.1.2	Apparatur.....	20
5.2	Metoder.....	23
5.2.1	Metodeprinsipper.....	24
5.2.1.1	Separasjonsmetoder.....	24
5.2.1.1.1	Kolonnekromatografi uten bruk av trykk.....	24
5.2.1.1.2	Mellomtrykksvæskekromatografi.....	25
5.2.1.1.3	Høytrykksvæskekromatografi.....	26
5.2.1.1.4	Preparativ tynnsjiktskromatografi.....	27
5.2.1.1.5	Sentrifugalt akselerert tynnsjiktskromatografi.....	27
5.2.1.2	Identifikasjonsmetoder.....	28
5.2.1.2.1	Analytisk tynnsjiktskromatografi.....	28
5.2.1.2.2	DPPH-spraying.....	29
5.2.1.2.3	NMR-spektroskopi.....	30
5.2.1.2.4	Metanolyse.....	32
5.2.1.2.5	Acetylering.....	34
5.2.1.2.6	Massespektrometri.....	34
5.2.1.3	Metoder for måling av biologisk aktivitet.....	34
5.2.1.3.1	Radikalscavenging (DPPH-test).....	34
5.2.1.3.2	Hemming av 15-lipoksygenase (15-LO test).....	36

5.2.2	Praktisk utførelse.....	38
5.2.2.1	Utgangsmateriale.....	38
5.2.2.2	Råekstrakt	38
5.2.2.3	Fraksjonering av A4.....	39
5.2.2.4	Fraksjonering av B5	40
5.2.2.5	Videre arbeid med fraksjon C6.....	40
5.2.2.6	Videre arbeid med fraksjonene C9 og C11.....	42
5.2.2.7	Fraksjonering av C9	42
5.2.2.8	Første fraksjonering av D5	42
5.2.2.9	Videre arbeid med fraksjonene D1, D2 og E3	43
5.2.2.10	Fraksjonering av E3	43
5.2.2.11	Fraksjonering av E5.....	44
5.2.2.12	Videre arbeid med fraksjon E5.1.....	44
5.2.2.13	Videre arbeid med fraksjon E5.2	44
5.2.2.14	Fraksjonering av E5.2.1.1.....	45
5.2.2.15	Fraksjonering av E7	45
5.2.2.16	Fraksjonering av E7.2.....	46
5.2.2.17	Andre fraksjonering av D5.....	46
5.2.2.18	Fraksjonering av F1, F3 og F4.....	47
5.2.2.19	Fraksjonering av G3.....	48
5.2.2.20	Fraksjonering av D7.....	48
5.2.2.21	Fraksjonering av H3.....	49
5.2.2.22	Fraksjonering av H5.....	49
5.2.2.23	Fraksjonering av I2.....	50
5.2.2.24	Fraksjonering av I3.....	50
5.2.2.25	Kvantifisering av bergenin i planten.....	51
5.2.3	Etnofarmakologiske studier	52
5.2.3.1	Feltarbeid i Mali	52
5.2.3.1.1	Dioila.....	53
5.2.3.1.2	Bandiagara.....	55
5.2.3.2	Fytokjemisk screening.....	55
5.2.3.2.1	Cyanogene glykosider	55
5.2.3.2.2	Kumariner.....	56
5.2.3.2.3	Karotenoider	56
5.2.3.2.4	Alkaloider	56
5.2.3.2.5	Saponiner	57
5.2.3.2.6	Steroler og triterpener	57
5.2.3.2.7	Hjerteglykosider	57
5.2.3.2.8	Vanninnhold.....	58
5.2.3.2.9	Mineralinnhold.....	58
5.2.3.2.10	Andre screeningtester	59
6	Resultat og diskusjon.....	60
6.1	Råekstrakt.....	60
6.2	Fraksjonering av A4.....	62
6.3	Fraksjonering av B5.....	63

6.4	Videre arbeid med fraksjon C6	66
6.5	Videre arbeid med fraksjon C9 og C11	68
6.6	Fraksjonering av C9	68
6.7	Første fraksjonering av D5	70
6.8	Videre arbeid med fraksjonene D1, D2 og E3	71
6.9	Fraksjonering av E3	71
6.10	Fraksjonering av E5	71
6.11	Videre arbeid med fraksjon E5.1	72
6.12	Videre arbeid med fraksjon E5.2	72
6.13	Fraksjonering av E5.2.1.1	72
6.14	Fraksjonering av E7	74
6.15	Fraksjonering av E7.2	75
6.16	Andre fraksjonering av D5	76
6.17	Fraksjonering av F1, F3 og F4	78
6.18	Fraksjonering av G3	79
6.19	Fraksjonering av D7	79
6.20	Fraksjonering av H3	80
6.21	Fraksjonering av H5	81
6.22	Fraksjonering av I2	82
6.23	Fraksjonering av I3	82
6.24	Kvantifisering av bergenin i planten	83
6.25	Isolerte forbindelser	84
6.25.1	Bergenin	84
6.25.2	Astilbin	87
6.25.3	Neoastilbin	90
6.25.4	Neoisoastilbin	93
6.25.5	Ampelopsin-3-rhamnosid	94
6.25.6	Neoampelopsin-3-rhamnosid	96
6.26	Etnofarmakologiske studier	98
6.26.1	Feltarbeid i Mali	98
6.26.1.1	Dioïla	98
6.26.1.2	Bandiagara	100
6.26.2	Fytokjemisk screening	101
7	Konklusjon	102
7.1	Forslag til videre arbeid	102
8	Litteraturliste	104

1 Sammendrag

Rotbark fra *Diospyros abyssinica* ble ekstrahert suksessivt med petroleumseter, diklormetan, kloroform, metanol, 80% etanol, vann 50°C og vann 100°C. Disse utgjorde råekstraktene. Renstoff ble isolert fra metanolekstraktet ved normal- og omvendt fase kolonnekromatografi (MPLC og preparativ HPLC), sentrifugalt akselerert tynnsjiktskromatografi og preparativ tynnsjiktskromatografi. De isolerte forbindelsene ble strukturoppklart ved ¹H-, ¹³C-, APT-, COSY-, HETCOR- og HOM2DJ-NMR-spektroskopi, samt ved hjelp av massespektrometri.

Ingen av de isolerte og identifiserte forbindelsene bergenin, astilbin, neoastilbin, neoisoastilbin, ampelopsin-3-rhamnosid og neoampelopsin-3-rhamnosid var tidligere beskrevet i planten. Neoampelopsin-3-rhamnosid var ikke beskrevet tidligere.

Råekstraktene, enkelte mellomfraksjoner og de isolerte forbindelsene, med unntak av neoisoastilbin, ble testet for radikalscavengeraktivitet overfor radikalet 1,1-difenylicrylhydrazyl. I tillegg ble de testet for hemming av 15-lipoksygenase (15-LO) fra soyabønner med linolsyre som substrat.

Innholdet av bergenin i plantematerialet ble kvantifisert ved HPLC og funnet å være $4,29 \pm 0,23\%$.

De polare råekstraktene viste seg å ha høyere radikalscavengeraktivitet enn de upolare ekstraktene. Metanol- og 80% etanolekstraktene hadde høyest aktivitet med hensyn på hemming av 15-LO. Alle renstoffene, med unntak av bergenin, viste signifikant aktivitet som radikalscavengere. Alle de isolerte forbindelsene viste også signifikant aktivitet som hemmere av 15-LO.

Feltarbeid i Mali ble utført over en 5-ukers periode i november og desember 2002. Under feltarbeidet ble totalt 68 healere fra 11 ulike landsbyer intervjuet. 22 av de 68 healerne brukte planten medisinsk. I ett av de to områdene der feltarbeidet ble utført ble ikke planten benyttet fordi den ikke vokser i det området. Planten ble brukt for å behandle en rekke lidelser. Hovedindikasjonene var mageproblemer, malaria, tannhygiene, tannverk, sårbehandling og ulike typer smerter. Den plantedelen som ble brukt oftest var blad, og da gjerne i form av et dekokt.

2 Forkortelser

Forkortelse	Fullstendig betegnelse
α	Alfaposisjon, indikerer at hydroksylgruppen ved C-1 peker oppover
ADP	Adenosindifosfat
AMP	Adenosinmonofosfat
APT	Attached proton test
β	Betaposisjon, indikerer at hydroksylgruppen ved C-1 peker nedover
ATP	Adenosintrifosfat
<i>C. glutinosum</i>	<i>Combretum glutinosum</i>
CA-TLC	Sentrifugalt akselerert tynnsjiktskromatografi
$CDCl_3$	Deuterokloroform
CD_3OD	Deuterometanol
COSY	Korrelasjonspektroskopi
COX	Syklooksygenase
D	D-sukker, hvis hydroksylgruppe ved det kirale karbonet lengst fra karbonylgruppen peker mot høyre når molekylet er tegnet i Fischer projeksjon
<i>D. abyssinica</i>	<i>Diospyros abyssinica</i>
DMSO	Dimetylsulfoksid
DMSO- d_6	Heksadeuterodimetylsulfoksid
DMT	Département de Médecine Traditionelle
DPPH	1,1-Difenyl-2-picrylhydrazyl
EI	Electron impact ionisering
ES	Elektrospray ionisering
GC	Gasskromatografi
GSH	Redusert glutation
GSSG	Oksidert glutation
HETCOR	Heterokorrelasjonspektroskopi
HMDS	Heksametyldisilasan
HOM2DJ	Homonukleær todimensjonal J-korrelert spektroskopi
HPETE	Hydroperoksyekosatetraensyre
HPLC	Høytrykksvæskeskromatografi
HPODE	Hydroperoksy-(9Z, 11E)-oktadiensyre
IC ₅₀	Konsentrasjonen som gir 50% radikalscavenging eller 50% hemming av 15-lipoksygenase
INRSP	Institut National de Recherche en Santé Publique
<i>L. velutina</i>	<i>Lansea velutina</i>
LDL	Low-density lipoprotein
LO	Lipoksygenase
MPLC	Mellomtrykksvæskeskromatografi
MS	Massespektrometri
NMR	Nukleær magnetisk resonans

NS	Ikke-signifikant
P	Statistisk signifikans
PTLC	Preparativ tynnsjikt-kromatografi
ROS	Reaktive oksygenspecies
rpm	Rotasjoner per minutt
<i>S. kunthianum</i>	<i>Stereospermum kunthianum</i>
SD	Standardavvik
SOD	Superoksid dismutase
TLC	Tynnsjikt-kromatografi
TMCS	Trimetylklorsilan
TMS	Tetrametylsilan
UV	Ultrafiolett

3 Hensikt med oppgaven

Frie radikaler og reaktive oksygenspecies inngår i en rekke patologiske tilstander, og det er derfor av interesse å finne stoff med antioksidative egenskaper som kan virke inn på disse tilstandene.

Hensikten med oppgaven var å isolere og identifisere antioksidanter fra den maliske planten *Diospyros abyssinica*. Radikalscavengereffekten skulle testes ved å undersøke effekten på 1,1-difenylpicrylhydrazyl (DPPH), mens enzymhemmingsaktiviteten skulle testes ved å undersøke effekten på 15-lipoksygenase (15-LO).

I tillegg var det et mål å samle inn informasjon om medisinsk bruk av planten under feltarbeid i Mali.

4 Bakgrunn

4.1 *Diospyros abyssinica*

Diospyros abyssinica (Hiern) F. White hører til i familien Ebenaceae. Fullstendig systematikk for planten er gitt under (Cronquist 1981):

Rike:	Plantae (planteriket)
Underrike:	Tracheobionta (karplanter)
Divisjon:	Magnoliophyta (blomsterplanter, dekkfrøet)
Klasse:	Magnoliopsida (tofrøbladet)
Underklasse:	Dilleniidae
Orden:	Ebenales
Familie:	Ebenaceae (ibenholtfamilien)
Slekt:	<i>Diospyros</i>
Art:	<i>abyssinica</i>

I Mali er de vanligste folkelige navnene på planten Kôforonto og Baforonto, dette er på språket bambara og betyr elvens papir.

4.1.1 Botaniske forhold

D. abyssinica er et tre som er 17-35 meter høyt (Figur 1 og 2). Det har en slank, rett stamme, og er vidt forekommende i Afrika. Veden er gul med svarte streker og inn mot midten kan den være helt svart. Veden er middels hard (Burkill 1994). I Mali finnes planten i den sørlige delen, spesielt i Sikasso-området (Diallo 2000).

4.1.2 Tidligere funn

I 1998 ble slekten *Diospyros* studert med hensyn på farmakologi og kjemotaksonomi (Mallavadhani et al. 1998). Dette omfattet den tradisjonelle bruken av 12 arter, den farmakologiske aktiviteten til 14 arter, den farmakologiske aktiviteten til isolerte forbindelser fra slekten, samt kjemotaksonomien til artene. Slekten *Diospyros* brukes mye i tradisjonell medisin, men det er gjort få studier med hensyn på tradisjonell bruk av *D. abyssinica* (Diallo 2000). I Ghana brukes planten medisinsk, der er det barken og røttene som brukes (Burkill 1994). I Mali brukes dekokt av blader eller røtter mot trøske, rotbarken brukes mot dermatitt, utflod, inflammasjon og feber, og grenene brukes til å rense tennene (Diallo 2000).



Figur 1. Bilde av *D. abyssinica* og forfatteren.



Figur 2. Bilde av *D. abyssinica*.

D. abyssinica har blitt screenet ved Département de Médecine Traditionnelle (DMT) i Mali, og det ble da funnet at planten har antifungal, larvicid, antioksidant og radikalfangende aktivitet. Metanolekstrakt av bladene hadde larvicid og radikalfangende aktivitet. Diklormetaneekstrakt av bladene hadde larvicid aktivitet, mens diklormetaneekstrakt av røttene hadde antifungal aktivitet. Metanolekstrakt av røttene hadde antioksidant, radikalfangende og antifungal aktivitet. Diklormetaneekstraktet av røttene ble undersøkt videre og tre forbindelser ble identifisert; lupeol, betulin og β -sitosterol (Diallo 2000). Triterpenene lupeol, betulin, betulinsyre, og naftakinonene diospyrin og isodiospyrin har tidligere blitt funnet i stammebarken til planten (Zhong et al. 1984). Lupeol, betulin og betulinsyre er vist å være aktive mot Walker-Carcinoma-256 tumorsystemet. I tillegg er det vist at betulin og betulinsyre har antiinflammatorisk aktivitet. Dessuten har betulinsyre vist seg å hemme vekst av P-388 leukemi, og den har svært selektiv aktivitet mot humant melanom. Det er vist at β -sitosterol trolig hverken hemmer syklooksygenase (COX) eller 15-LO (Breu et al. 1992). Derimot er det vist at forbindelsen hemmer aggregasjon av blodplater (Saeed et al. 1993). For diospyrin er det vist at den kan hemme vekst av tumorer hos mus, samt at den har aktivitet mot en type protozo. Isodiospyrin har vist cytotoxisk aktivitet mot tarmkreft og lymfocytisk leukemi (Mallavadhani et al. 1998).

4.2 Etnofarmakologi

Etnofarmakologi er et fagområde som omfatter observasjon, identifikasjon, beskrivelse og eksperimentell undersøkelse av bruk, ingredienser og effekter av lokale medisinplanter i tradisjonell bruk i ulike samfunn (Holmstedt og Bruhn 1983). Dette innebærer samarbeid mellom ulike fagfelt som botanikk, antropologi, kjemi og

farmakologi. Målet med etnofarmakologi er å evaluere og verifisere den farmakologiske aktiviteten til tradisjonelle preparater. Denne informasjonen kan brukes til å identifisere effektive etnomedisinske preparater og danne grunnlag for å finne farmakologisk aktive forbindelser som kan danne utgangspunkt for nye legemidler. En sentral målsetning er å sørge for at lokalbefolkningen får nytte av resultatene. Dette kan gjøres blant annet ved at de som praktiserer tradisjonell medisin får tilbakemeldinger om resultatene, slik at behandlingen som de gir til sine pasienter kan forbedres (Waller 1993).

En rekke av nåtidens viktige legemidler stammer fra høyere planter, og har blitt oppdaget fordi enkelte kulturer tradisjonelt har brukt disse mot bestemte sykdommer. Eksempler er opiat, kinin, salicylater, digitalis og vinkristin (Cox og Balick 1994).

4.3 Tradisjonell medisin i Mali

Mali er det nest største landet i Vest-Afrika med mer enn 1,2 millioner km² landområde (Figur 3) og et innbyggertall på ca. 10 millioner. Landet er uten kystlinje, og kan deles inn i klimatiske soner med økende nedbør fra Sahara i nord via Sahel-sonen til Sudan-sonen i sør (Fitzpatrick et al. 2002).



Figur 3. Kart over Vest-Afrika.

BNP per innbygger er ca. USD 277, og Mali er dermed blant de fem fattigste landene i verden (Fitzpatrick et al. 2002). Forventet levealder er kun 48,6 år. Denne helsesituasjonen skyldes forekomsten av infeksjonssykdommer, parasitter og feilernæring, i tillegg til at landet har mangel på helsepersonell, medisiner og medisinsk utstyr (Diallo et al. 1996; Diallo og Paulsen 2000). Grunnet den helsemessige og

økonomiske situasjonen bruker 80% av befolkningen tradisjonell medisin. Institut de Phytothérapie ble opprettet i 1968 for å fremme bruken av tradisjonell medisin, fremme organiseringen av det tradisjonelle helsesystemet og fremme produksjonen av medisiner fra lokale ressurser. Instituttet heter i dag Département de Médecine Traditionnelle (DMT) og er en del av Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP) (Diallo et al. 1996). DMT utfører en rekke oppgaver. En av disse er å få tradisjonelle healere og selgere av medisinplanter til å registrere seg og danne lokale foreninger. Dette bidrar til å sikre en tryggere omsetning av medisinplanter og bedrer kvaliteten på medisinplanteproduktene. Undersøkelser av maliske medisinplanter ved opprettelse av et herbarium og etnobotaniske undersøkelser utføres også, og på enkelte av disse plantene utføres det samtidig fytokjemiske, farmakologiske og kliniske tester. I tillegg utarbeider DMT forbedrede tradisjonelle preparater bestående av medisinplanter, og disse distribueres via apotekene i Mali (Diallo et al. 1996; Diallo og Paulsen 2000).

4.4 Antioksidanter og frie radikaler

4.4.1 Antioksidanter

En antioksidant er enhver substans som, når den er tilstede ved lave konsentrasjoner sammenlignet med konsentrasjonen til det oksiderbare substratet, signifikant forsinket eller hemmer oksidasjonen av det nevnte substratet (Halliwell et al. 1995; Halliwell og Gutteridge 1999). Oksiderbare substrater inkluderer proteiner, lipider, karbohydrater og DNA (Halliwell et al. 1995). Antioksidanter er nødvendig fordi oksygen er giftig, og de motvirker dets skadelige effekter. Dette er et paradoks da oksygen også er livsnødvendig. En liten andel av det oksygenet som vi puster inn brukes til å danne såkalte reaktive oksygenspecies (ROS) (Halliwell 1997). En antioksidant kan virke ved for eksempel å hemme genereringen av ROS, direkte fange opp frie radikaler eller ved å øke nivået av endogent antioksidantforsvar (Halliwell et al. 1995; Kerr et al. 1996).

4.4.2 Frie radikaler og reaktive oksygenspecies

Et fritt radikal er definert som et molekyl med ett eller flere uparrede elektroner som har evnen til å eksistere som et uavhengig molekyl (Cestaro et al. 1997; Halliwell og Gutteridge 1999). På grunn av den unike kjemiske strukturen er frie radikaler vanligvis ustabile, de har kort halveringstid og er svært reaktive (Ansari 1996). Eksempler på frie radikaler er superoksidet ($O_2^{\cdot-}$) og hydroksylradikalet ($\cdot OH$). ROS omfatter både oksygensentrerte radikaler og ikke-radikal derivater av oksygen. Eksempler er hydrogenperoksid (H_2O_2), singlett oksygen (1O_2) og hypoklorsyre ($HOCl$) (Halliwell 1994a; Ansari 1996). ROS deltar selektivt i genereringen av frie radikaler (Kerr et al. 1996).

4.4.3 Dannelse av frie radikaler og reaktive oksygenspecies

Frie radikaler kan dannes ved normale biokjemiske reaksjoner i kroppen (endogent) eller som følge av faktorer i miljøet (eksogent). I elektrontransportkjeden skjer en reduksjon av molekylært oksygen til vann katalysert av cytokrom oksidase. I reaksjonen dannes superoksid som et naturlig intermediat (Kerr et al. 1996; Bjørneboe 1999). Superoksid dannes også av fagocytiske celler og hjelper dem å inaktivere virus og bakterier. I tillegg dannes det sammen med hydrogenperoksid ved autooksidasjonsreaksjoner, ved at blant annet katekolaminer reagerer direkte med oksygen (Halliwell 1994b; Halliwell 1994a). Superoksid er ikke spesielt reaktivt (Halliwell 1997), men det kan reagere med nitrogenoksid ($\text{NO}\cdot$). Sistnevnte syntetiseres fra arginin, og er en vasodilaterende substans og fungerer som neurotransmitter. Et overskudd av nitrogenoksid kan være cytotoxisk. Når superoksid reagerer med nitrogenoksid fjernes effekten av nitrogenoksid og dette medfører vasokonstriksjon. Produktet som dannes er peroksynitritt (ONOO^-). Denne substansen kan medvirke til direkte biologisk skade ved å oksidere -SH grupper. I tillegg kan den ved fysiologisk pH protoneres og dekomponere til giftige produkter, blant annet nitrogendioksid (NO_2), hydroksylradikal og nitroniumion (NO_2^+) (Halliwell 1994b; Halliwell 1994a).

Det meste av superoksidet som dannes *in vivo* undergår trolig en ikke-enzymatisk eller superoksid dismutase (SOD)-katalysert dismutasereaksjon. Dette genererer hydrogenperoksid. Hydrogenperoksid, som er et ikke-radikal, genereres i tillegg av flere oksidase enzymer, blant annet xantin oksidase. Der dannes det sammen med superoksid. Nivået av dette enzymet øker ofte når vev utsettes for ischemisk skade og reperfusjonsskade. Hydrogenperoksid er lite reaktivt ved lave konsentrasjoner, men ved høyere konsentrasjoner kan det angripe bestemte cellulære mål og på den måten interferere med cellens metabolisme. Superoksid og hydrogenperoksid kan reagere ved en metallion-katalysert reaksjon (Fenton-reaksjonen) som fører til dannelsen av hydroksylradikalet (Halliwell 1994b; Halliwell 1994a).

Hydroksylradikalet er spesielt reaktivt. Det kan angripe alle slags biologiske molekyler og på den måten starte en fri radikal kjedereaksjon (Cestaro et al. 1997). Derfor er det viktig at kroppens metallioner er bundet til transport- eller lagerproteiner.

Hydroksylradikalet dannes også når levende organismer utsettes for ioniserende stråling fordi dette medfører at O-H bindingen i vann splittes (Halliwell 1994b; Halliwell 1994a). Ioniserende stråling er et eksempel på en eksogen kilde for frie radikaler. Andre eksempler er ultrafiolett lys (UV), legemidler og sigarettøyking (Singh og Niaz 1996; Bjørneboe 1999).

ROS kan gi permanent celledød ved å reagere med DNA, proteiner og flerumettede lipider, og disse skadene kan i noen tilfeller føre til celledød (Knight 1995; Ansari 1996; Cestaro et al. 1997).

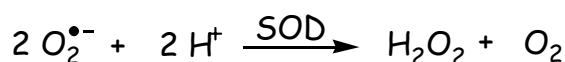
4.4.4 Antioksidantforsvar

Kroppen har utviklet en rekke forsvarsmekanismer på grunn av skadene som ROS kan medføre. Forsvarsmekanismene skal hindre at ROS skal kunne utøve vesentlig skade. Antioksidantforsvaret består av enzymer som fjerner ulike radikaler, radikalfangere som kan bryte kjedereaksjoner av frie radikaler og danne nye og mindre reaktive radikaler som hindrer at kjedereaksjonen fortsetter, substanser som kompleksbinder metallioner slik at de ikke kan inngå i oksidasjonsprosesser og katalysere autooksidasjonsreaksjoner, samt systemer som reparerer radikalmediert skade (Halliwell 1994b; Halliwell 1994a; Ansari 1996). Nedenfor er det gitt eksempler på de ulike forsvarsmekanismene.

Enzymer som fjerner radikaler;

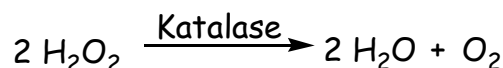
- SOD

Fjerner superoksid ved å omdanne det til hydrogenperoksid.



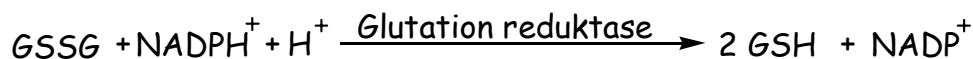
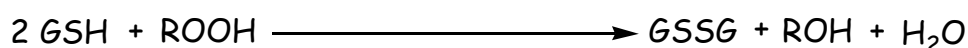
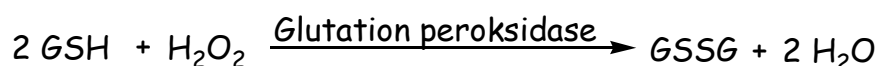
- Katalase

Omdanner hydrogenperoksid til vann og oksygen.



- Glutation peroksidase

Fjerner hydrogenperoksid ved å forbruke det til å oksidere redusert glutatation (GSH) til oksidert glutatation (GSSG). Glutation reduktase regenererer GSH fra GSSG med NADPH som kilde for reduserende evne.



Glutation peroksidase kan også ødelegge lipidperoksider (ROOH) ved å omdanne dem til alkoholer (ROH), noe katalase ikke kan.

Radikalfangere;

- Glutation

Kan virke direkte radikalfangende.

- Vitamin E (α -tokoferol)

Hemmer lipidperoksidering ved å fange peroksyldradikaler som er intermediater i kjedereaksjonen. Regenereres trolig ved reaksjon med vitamin C ved overflaten

av membraner og lipoproteiner eller ved reaksjon med ubiquinol inne i membraner og lipoproteiner.

- Vitamin C (askorbinsyre)
Kan virke direkte radikalfangende. Regenererer trolig vitamin E.
- Urinsyre
Kan virke direkte radikalfangende.

Substanser som kompleksbinder metallioner;

- Ferritin
Lagringsform av jern.
- Transferrin
Plasma jern-transportprotein.
- Lactoferrin
Jern-bindende protein.
- Caeruloplasmin
Transportform av kobber.
- Haptoglobin
Binder jern.
- Albumin
Kan virke direkte radikalfangende og kan binde kobberioner.

Reparasjonssystemer som trår i kraft etter en radikalmediert skade vil blant annet reparere oksidativt skadet DNA og fjerne peroksiderte fettsyrer fra membranlipider (Mathiesen 1996).

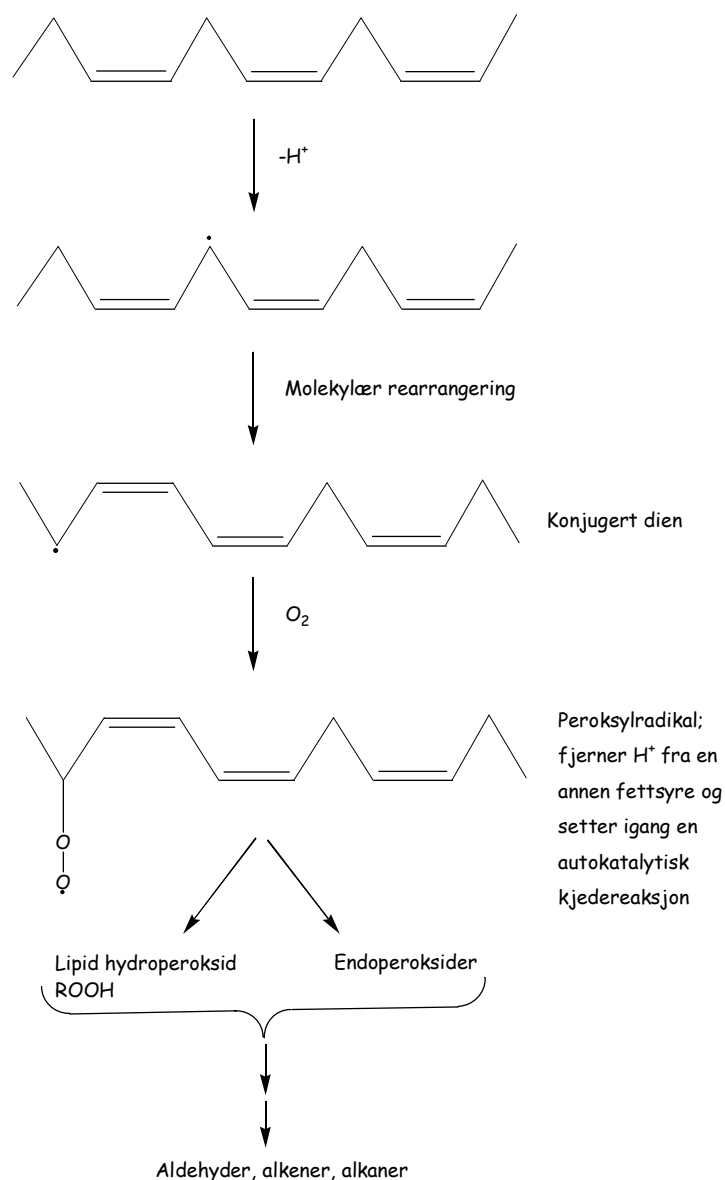
4.4.5 Oksidativt stress

Vanligvis er det en balanse mellom produksjonen av ROS og antioksidantforsvaret. Oksidativt stress oppstår når kroppens forsvarsmekanismer ikke lenger kan kontrollere produksjonen av frie radikaler og ROS (Ansari 1996; Kerr et al. 1996). Oksidativt stress kan skyldes et lavt nivå av antioksidanter eller en overproduksjon av ROS. Celler kan tolerere mildt oksidativt stress, som ofte resulterer i en oppregulering av syntesen av antioksidantforsvarssystemet i et forsøk på å gjenopprette balansen. Alvorlig oksidativt stress kan derimot føre til alvorlig forstyrrelse av cellemetabolismen, inkludert DNA trådbrudd, økning i intracellulært fritt kalsium, skade på iontransportører i membraner og/eller andre spesifikke proteiner, samt peroksidering av lipider. Dette kan medføre celledød og celledød (Halliwell 1994a).

4.4.6 Lipidperoksidering

Biologiske membraner inneholder en stor mengde flerumettede fettsyrer i form av fosfolipider. På grunn av sine dobbeltbindinger kan flerumettede lipider lett peroksideres. Lipidperoksidering er definert som oksidativ degradering av flerumettede fettsyrer (Halliwell og Gutteridge 1999). Denne prosessen er som nevnt tidligere en fri radikal kjedereaksjon.

Lipidperoksidering i biologiske membraner kan skje via en enzymatisk eller en ikke-enzymatisk reaksjon. Enzymatisk lipidperoksidering innebærer en kontrollert peroksidering av fettsyresubstrat til stereospesifikke hydroperoksider og endoperoksider, som har en rekke biologiske funksjoner. Denne reaksjonen katalyseres av enzymene syklooksigenase og flere lipoksygenaser (se avsnitt 4.5 Arakidonsyremetabolisme og 15-lipoksygenase). Ikke-enzymatisk peroksidering av fettsyrer kan forårsakes av ROS, metallioner og av hydroperoksider (Mathiesen 1992).



Figur 4. Peroksidering av en fettsyre med tre dobbeltbindinger (Sæther 1999).

Ikke-enzymatisk peroksidering initieres ved at et radikal som er reaktivt nok fjerner et hydrogenatom fra en metylengruppe mellom to dobbeltbindinger i fettsyrens sidekjede og dermed starter en kjedereaksjon (Figur 4). Dermed dannes et lipidradikal (R[•]) som stabiliseres ved molekylær omleiring til et konjugert dien. Lipidradikalet kan deretter reagere med molekylært oksygen slik at det dannes et peroksyldradikal (ROO[•]). Dette radikalet kan deretter angripe en ny fettsyrekjede og videreføre kjedereaksjonen ved

at et nytt peroksyldradikal dannes, samt at det dannes et lipidhydroperoksid (ROOH). Hydroperoksider kan danne sykliske peroksider og sykliske endoperoksider (Halliwell og Gutteridge 1999). Disse kan fragmentere og gi opphav til forbindelser som malondialdehyd. Noen forbindelser av denne aldehyd-typen, for eksempel 4-hydroksey-2-nonenal, er svært toksiske fordi karbonylgruppene kan reagere spontant med aminogrupper i membranproteiner og fosfolipider og danne stabile kovalente bindinger (Cestaro et al. 1997).

4.4.7 Patologisk betydning

Vevsskade fører vanligvis til økt produksjon av ROS og oksidativt stress. Derfor spiller oksidativ skade en viktig rolle ved sykdom. Det er vanligvis et sekundært fenomen, altså en konsekvens av, og ikke en årsak til, sykdommen. Oksidativ skade kan dermed bidra til å forverre en sykdomstilstand (Halliwell 1994a).

4.4.7.1 Aterosklerose

Kardiovaskulær sykdom er en viktig årsak til mange dødsfall, og mange former for kardiovaskulær sykdom har sammenheng med aterosklerose (Halliwell og Gutteridge 1999). Det er flere indisier på at frie radikaler og lipidperoksidering spiller en rolle i utviklingen av aterosklerose (Kleinveld et al. 1992; Halliwell 1995; Knight 1995; Westhuyzen 1997).

Ved skade på endotelet i åreveggen vil monocytter fra blodet migrere inn i veggen. Disse monocyttene utvikles til makrofager som produserer superoksid og hydrogenperoksid som medfører lokalisert oksidativt stress. I tillegg vil makrofagene skille ut faktorer som stimulerer til proliferasjon av glatte muskelceller. Makrofager har low-density lipoprotein (LDL)-reseptorer som gjør at LDL kan tas opp, men dersom LDL er blitt oksidert gjenkjennes de av såkalte scavenger-reseptorer som tar opp LDL mer effektivt. I motsetning til LDL-reseptorene nedreguleres ikke scavenger-reseptorene. Dette medfører en opphopning av oksidert LDL i makrofagene, slik at disse etter hvert omdannes til skumceller. Skumcellene er forstadiet til dannelsen av fettstreker og aterosklerotiske plakk, som er indikasjon på aterosklerose. Tilstedeværelsen av plakk fører til at årene blir trangere slik at blodtilførselen til et område av et organ som for eksempel hjertet eller hjernen blir redusert. Hjerneslag eller hjerteinfarkt oppstår når en åre til henholdsvis hjernen eller hjertet blir fullstendig blokkert. Dette skjer vanligvis ved at en trombe dannes i området med plakk. Ved ruptur av en aterosklerotisk lesjon kan årer som for eksempel kransarterier tilstoppes (Knight 1995; Westhuyzen 1997; Halliwell og Gutteridge 1999).

4.4.7.2 Kreft

Utvikling av kreft skyldes skader på genomet. Kjemiske, fysiske og inflammatoriske prosesser som kan indusere skader på genomet er nært knyttet til frie radikaler. De

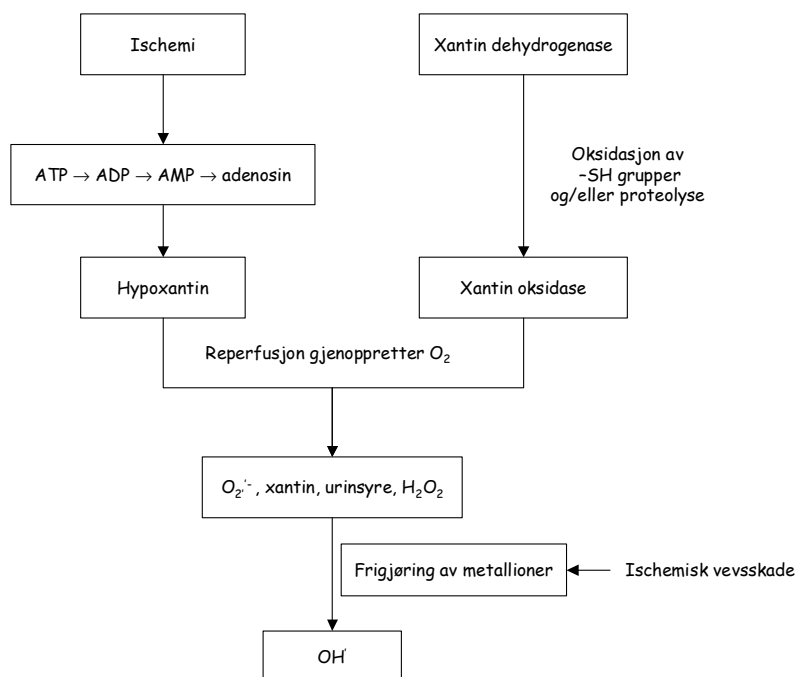
frie radikalene kan gi genomisk skade ved å skape permanente endringer i DNA-sekvensen som følge av punktmutasjoner, rearrangering av gener eller som følge av at sekvenser blir fjernet eller lagt til (Knight 1995). Ribose, som inngår i RNA, er følsomt for oksidativ skade (Halliwell og Gutteridge 1999). Kreft utvikles når disse skadene ikke rettes opp av reparasjonssystemer (Kerr et al. 1996).

4.4.7.3 Reumatoid artritt

Reumatoid artritt karakteriseres av kronisk betennelse i leddene. Muligens skyldes sykdommen en vedvarende cellemediert immunrespons til et ukjent antigen (Halliwell og Gutteridge 1999). Den inflammatoriske responsen induseres av immunkomplekser som stimulerer aktiveringen av neutrofiler med påfølgende produksjon av superoksid. SOD omdanner superoksidet til hydrogenperoksid. Det meste av hydrogenperoksidet inaktiveres av glutation peroksidase og katalase, men det resterende hydrogenperoksidet omdannes til hydroksylradikaler i en jern- eller kobberkatalysert reaksjon. Dette er særegent for reumatoid artritt da jernnivået i synovialvæsken vanligvis er forhøyet. Dette medfører at hyaluronsyre, proteoglykaner, elastin og kollagen i leddene degraderes (Knight 1995).

4.4.7.4 Ischemisk reperfusjonsskade

Mangel på oksygentilførsel til en del av et vev (ischemi) i hjertet eller hjernen er den vanligste dødsårsaken i den vestlige verden. Aterosklerose er vanligvis den underliggende årsaken (Halliwell og Gutteridge 1999). Akutt ischemi medfører mindre strukturelle skader, mens de mer alvorlige skadene synes å inntreffe ved reperfusjon av vevet (Knight 1995). Ved ischemi skjer det metabolske forandringer i vevet (Figur 5) på grunn av mangel på oksygen. pH i vevet reduseres, adenosintrifosfat (ATP)-nivået faller og adenosinmonofosfat (AMP) degraderes slik at hypoxantin akkumuleres. I tillegg frigjøres metallioner (Halliwell og Gutteridge 1999). Ved redusert blodtilførsel vil i tillegg enzymet xantin dehydrogenase, som katalyserer dannelsen av urinsyre fra xantin og hypoxantin, raskt omdannes til xantin oksidase. Ved reperfusjon katalyserer dette enzymet også dannelsen av urinsyre fra akkumulert hypoxantin, men fører da også til produksjon av superoksid. Etter at superoksid er dannet, omdannes det vanligvis raskt til hydrogenperoksid av SOD. Hydrogenperoksidet omdannes deretter til vann, enten i nærvær av glutation, glutation peroksidase eller katalase. I nærvær av metallioner derimot, omdannes hydrogenperoksid raskt til det svært reaktive hydroksylradikalet (Knight 1995). På denne måten kan reperfusjon føre til skade som følge av oksidativt stress.

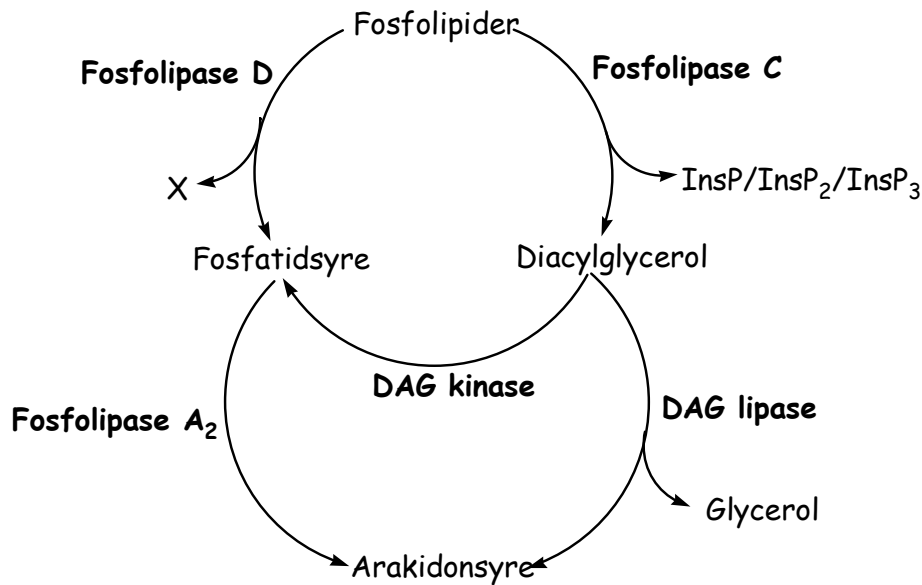


Figur 5. Mulig mekanisme for vevsskade ved reperfusjon av ischemisk vev (Halliwell og Gutteridge 1999).

4.5 Arakidonsyremetabolisme og 15-lipoksygenase

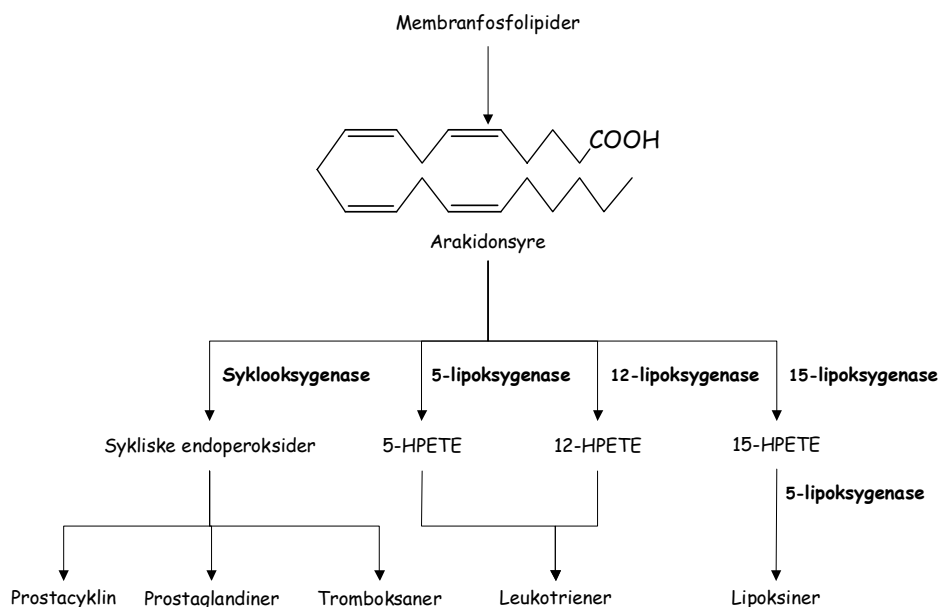
Eikosanoider er derivater av C_{20} -flerumettede fettsyrer som består av flere grupper av biologisk aktive forbindelser som prostaglandiner, tromboksaner, leukotriener, lipoksiner, hydroperoksyeikosatetraensyre (HPETE) og hydroksyeikosatetraensyre (HETE) (Samuelsson 1999). De deltar i en rekke fysiologiske prosesser og anses for å være blant de viktigste mediatorene i inflammasjonsprosessen (Rang et al. 1999).

Det initielle og hastighetsbestemmende trinnet i eikosanoidsyntesen er frigjøring av arakidonsyre fra fosfolipider (Figur 6). Dette kan skje på tre måter; (1) ved hjelp av fosfolipase A_2 , (2) ved hjelp av fosfolipase C etterfulgt av diacylglycerol lipase, eller (3) ved hjelp av fosfolipase D etterfulgt av fosfolipase A_2 .



Figur 6. Frigjøring av arakidonsyre fra fosfolipider via to-trinnsprosesser. InsP = inositolfosfat, DAG = diacylglycerol (Rang et al. 1999).

Den frie arakidonsyren kan metaboliseres via ulike reaksjonsveier (Figur 7). Omdanning til prostaglandiner, prostacyclin 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). Syklooksygenaser og lipoksygenaser medvirker til enzymatisk lipidperoksidering (Mathiesen 1992).



Figur 7. Arakidonsyremetabolismen (Rang et al. 1999).

Mange ulike stimuli kan føre til frigjøring av arakidonsyre, og disse avhenger av celletype. I blodplater er det trombin, i fibroblaster er det bradykinin og i mastceller er det antigen-antistoff reaksjoner som fører til at arakidonsyre frigjøres (Rang et al. 1999).

COX har en endoperoksid syntase aktivitet som først oksygenerer arakidonsyre, etterfulgt av syklisering slik at det dannes et syklisk endoperoksid, PGG_2 (prostaglandin G_2). I tillegg har den en peroksidase aktivitet som omdanner det sykliske endoperoksidet til et annet syklisk endoperoksid, PGH_2 (prostaglandin H_2). Denne forbindelsen fungerer som forløper for prostaglandinene og tromboksanene (Rang et al. 1999).

5-LO er den viktigste av lipoksygenasene, og er det første enzymet i biosyntesen av leukotrienene. 5-LO adderer et oksygenmolekyl, som danner en hydroperoksygruppe ved C-5 i arakidonsyren, og man får dannet 5-HPETE. Denne forbindelsen fungerer som forløper for leukotrienene. 12-LO og 15-LO fører til dannelsen av henholdsvis 12-HPETE og 15-HPETE ved reaksjon med arakidonsyre (Rang et al. 1999). 5-, 12- og 15-HPETE er lipidhydroperoksider, og det er derfor mulig at de kan gi opphav til skadelige frie radikaler som lipidperoksyd (Lyckander og Malterud 1990).

Arakidonsyremetabolismen antas å kunne spille en rolle ved aterosklerose. 15-LO har, i motsetning til andre lipoksygenaser, vist seg å kunne oksidere LDL, i tillegg til at 15-HPETE har vist seg å hemme syntesen av det vasodilaterende og antiaggregerende prostacyclin (El Tahir og Williams 1980; Lyckander og Malterud 1992; Sendobry et al. 1997; Westhuyzen 1997; Terao 1999). I dyreforsøk er 15-LO hemmere uten antioksidanteffekt vist å kunne hemme ateroskleroseutvikling (Sendobry et al. 1997).

5 Eksperimentelt

5.1 Materialer

5.1.1 Kjemikalier

d-Aceton (C_3D_6O)	Aldrich, Milwaukee, WI, USA
Aceton, p.a.	Prolabo, Fontenay S/Bois, Frankrike
Aceton purum	A/S Chemi-Teknik, Bryn, Oslo
Acetonitril, for HPLC	Prolabo, Fontenay S/Bois, Frankrike
Bergenin monohydrat	Sigma, St. Louis, MO, USA
Borsyre, p.a.	Merck, Darmstadt, Tyskland
Diaion HP20	Supelco, Bellafonte, PA, USA
1,1-Difenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH	Sigma, St. Louis, MO, USA
Diklormetan, p.a.	Merck, Darmstadt, Tyskland
Dimetylsulfoksid, p.a.	Aldrich, Milwaukee, WI, USA
<i>Diospyros abyssinica</i> , rotbark	Département de Médecine Traditionelle, Samlet inn i Blendio, Mali
Eddiksyre, p.a.	Prolabo, Fontenay S/Bois, Frankrike
Eddiksyreanhydrid, p.a.	Merck, Darmstadt, Tyskland
Etanol	Arcus Produkter AS, Haslevangen, Oslo
Eter (dietyleter), p.a.	Merck, Darmstadt, Tyskland
Etylacetat	Prolabo, Fontenay S/Bois, Frankrike
Heksadeuterodimetylsulfoksid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Tyskland
Heksametyldisilazan	Sigma, St. Louis, MO, USA
n-Heksan, p.a.	Merck, Darmstadt, Tyskland

Kiselgel 60 (0,040-0,063 mm)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kiselgel 60 PF ₂₅₄ med gips	Merck, Darmstadt, Tyskland
d-Kloroform (CDCl ₃)	Aldrich, Milwaukee, WI, USA
Kloroform	Prolabo, Fontenay S/Bois, Frankrike
LiChroprep® RP-18 25-40 µm	Merck, Darmstadt, Tyskland
Linolsyre	Sigma, St. Louis, MO, USA
Lipoksidase (15-lipoksygenase)	Sigma, St. Louis, MO, USA
D-Mannitol	Sigma, St. Louis, MO, USA
Maursyre 98-100 %, p.a.	Merck, Darmstadt, Tyskland
d-Metanol (CD ₃ OD)	Aldrich, Milwaukee, WI, USA
Metanol, p.a.	Prolabo, Fontenay S/Bois, Frankrike
Metanol purum	A/S Chemi-Teknik, Bryn, Oslo
Metanol, vannfri	Prolabo, Fontenay S/Bois, Frankrike
1-Metylimidazol	Fluka Chemika, Buchs, Sveits
Natriumhydroksid, p.a.	Prolabo, Fontenay S/Bois, Frankrike
Nitrogen (N ₂)-gass	AGA Progas A/S, Oslo
Pyridin, vannfri	Merck, Darmstadt, Tyskland
Quercetin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Saltsyre, p.a.	Prolabo, Fontenay S/Bois, Frankrike
Sephadex LH-20	Pharmacia Biotech, Uppsala, Sverige
Tetrametylsilan	Sigma, St. Louis, MO, USA
Trifluoreddiksyre, til syntese	Merck/Schuchardt, Hohenbrunn, Tyskland

Trimetylklorosilan	Aldrich, Milwaukee, WI, USA
d-Vann (D ₂ O)	Aldrich, Milwaukee, WI, USA
Vann, destillert	Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

5.1.2 Apparatur

Analytisk tynnsjikt-kromatografi Kiselgel 60 F ₂₅₄ , 0,2 mm, aluminiumsplater RP-18 F _{254S} , aluminiumsplater	Merck, Darmstadt, Tyskland Merck, Darmstadt, Tyskland
Automatpipetter Finnpiquette SMI Micropettor 50 µl med kapillærrør (syrevasket) Transferpettor 100 µl og 200 µl med kapillærrør (syrevasket)	Labsystems, Helsinki, Finland SMI, Emeryville, CA, USA Brand, Main, Tyskland
Eksikator P ₂ O ₅ -evakuert vakuumeksikator	Glaswerk Wertheim, Wertheim, Tyskland
Opprensning Sprøyte, 5 ml C18 Sep-Pak kolonne	B.Braun Medical Ltd, Gauteng, Sør-Afrika Waters Chromatography Division, Millipore Corporation, MA, USA
Filter Filter til filtrering av vandige løsninger Type HA 0,45 µm Filter til filtrering av organiske løsninger Type GVHP 0,22 µm	Millipore Corporation, Bedford, MA, USA Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
Gasskromatografi Gasskromatograf: GC 6000 Vega Series 2 Programmeringsenhet: ICU 600 Integrator: C-R6A Chromatopac Detektor: Flammeionisasjonsdetektor (FID)	Carlo Erba Instruments, Milano, Italia Shimadzu, Kyoto, Japan

Injektor: Splitt:splittless Kolonne: DB-5 Fused silica kolonne	J&W Scientific, San Jose, CA, USA
Høytrykksvæskekromatografi Varian Prostar Pumpe modell 210 UV/VIS detektor modell 320 Kolonneovn modell 510 Analytisk kolonne: Chrompack HPLC column Microsorb-MV 100-5 C18 250 x 4,6 mm, 5 µm med forkolonne: Chrompack HPLC column ChromGuard HPLC column Reversed Phase 50 x 3 mm Preparativ kolonne: Chrompack HPLC column Dynamax HPLC column Microsorb 60-8 C18 250 x 21,4 mm, 8 µm med forkolonne: Chrompack HPLC column Dynamax HPLC Guard column Microsorb Guard-8 C18 50 x 21,4 mm	Varian Analytical Instruments, Walnut Creek, CA, USA Varian Analytical Instruments, Walnut Creek, CA, USA Varian Analytical Instruments, Walnut Creek, CA, USA
Kolonnekromatografi Aldrich med og uten glassinterfilter	Aldrich, Steinheim, Tyskland
Kyvetter Kvartskyvetter	Starna, Essex, England
Magnetrører IKA Colorsquid IKA Combimag RCH	IKA Labortechnik, Staufen, Tyskland IKA Werk, Staufen, Tyskland
Mellomtrykksvæskekromatografi Büchi 2,5 x 50 cm Med forkolonne Büchi 681 Chromatography Pump	Büchi Laboratoriums-Technik AG, Flawil, Sveits Büchi Laboratoriums-Technik AG, Flawil, Sveits

Massespektrometri Micromass ProSpecQ	Micromass UK, Manchester, England
Multipipetter Modell 8100	Nichiryo, Tokyo, Japan
NMR-spektroskopi Varian Gemini-200	Varian, Palo Alto, CA, USA
Oljevakuumpumpe Edwards E-Lab 2	Edwards High Vacuum International, Sussex, England
pH-meter Ross pH Electrodes Modell 420A	Orion, Beverly, MA, USA
Preparativ tynnsjiktskromatografi Kisegel 60F ₂₅₄ , 0,25 mm, glassplater, med konsentreringssone	Merck, Darmstadt, Tyskland
Rotavapor Büchi Rotavapor-R	Büchi, Flawil, Sveits
Sentrifugalt akselerert tynnsjiktskromatografi Chromatotron, 7924 T	Harrison Research, Palo Alto, CA, USA
Sprayapparat TLC sprayer	Camag, MuttENZ, Sveits
Supelcorør Supelcorør (syrevaskede) med teflonbelagt skrukork	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Ultralydbad Bransonic 220	Branson Ultrasonics Corp, Geneve, Sveits
UV-apparat UV-spektrofotometer: Shimadzu UV 160A Temperaturregulator: Shimadzu CPS-controller Kvetteteholder: Shimadzu CPS 240A	Shimadzu, Kyoto, Japan Shimadzu, Kyoto, Japan Shimadzu, Kyoto, Japan
UV-lampe Model UVSL-58 (254 og 366 nm)	Ultra Violet Products, San Gabriel, CA, USA

Vakuumpumpe MP 101Z	Ilmvac, Ilmenau, Tyskland
Varmeblokk koblet til et oppsett for avdamping med nitrogengass Reacti-Vap III Reacti-Therm III Heating Module	Pierce, Rockford, Il, USA Pierce, Rockford, Il, USA
Varmemantel Electromantle 250 ml	Electrothermal London, England
Varmeskap Heraeus Function Line	Heraeus Instruments, Hanau, Tyskland
Vekt Mettler Toledo PB3002 Portable Advanced Sartorius BP221S Sartorius Analytic A200S	Mettler, Nänikon, Sveits Ohaus, Florham Park, NJ, USA Sartorius, Göttingen, Tyskland Sartorius, Göttingen, Tyskland
Vortexmikser MS2 Minishaker	IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA

5.2 Metoder

Fraksjoneringsmetodene som ble valgt var basert på målet om å isolere forbindelser fra *D. abyssinica* med antioksidanteffekt. Betingelsene for kolonnekromatografi og preparativ kromatografi ble optimalisert ved først å undersøke fraksjonene ved analytisk tynnsjikt-kromatografi (TLC) for å finne mobilfaser som separerte stoffene best mulig. Analytisk TLC med DPPH-spraying ble også brukt for å bestemme hvilke fraksjoner som inneholdt de samme komponentene, og som dermed kunne kombineres. Sammenslåtte fraksjoner ble inndampet til tørrhet på rotavapor og oljevakuumpumpe og veid. ^1H - og ^{13}C -NMR-spektra ble tatt opp for de fleste fraksjonene. NMR-spektrene indikerte sammensetningen av de ulike fraksjonene. Fraksjonene ble undersøkt for antioksidantaktivitet ved testing av deres radikalfangende aktivitet (DPPH) og deres evne til å hemme 15-LO. Fraksjonene med høy vekt og høy antioksidantaktivitet ble ytterligere fraksjonert og undersøkt videre.

5.2.1 Metodeprinsipper

5.2.1.1 Separasjonsmetoder

5.2.1.1.1 Kolonnekromatografi uten bruk av trykk

Prinsipp

Kolonnekromatografi er en teknikk som brukes for å separere stoff i blanding. 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 de vil dermed kunne separeres (Greibrokk et al. 1998). Valg av elueringsmiddel gjøres ut fra hvilke stoff som skal separeres. Ofte benyttes en blanding av flere løsningsmidler som mobilfase, og elueringen kan enten skje isokratisk eller med en gradient. Det finnes en rekke ulike kolonnematerialer som kan brukes ved enkel kolonnekromatografi uten bruk av trykk:

- Diaion HP20

Diaion HP20 er et polymert pakkemateriale som består av polystyren-divinylbenzen. Kolonnen egner seg best til grovseparasjon da partikkelstørrelsen til pakkematerialet er veldig stor. Materialet er en omvendt fase polymer som er svært porøs (Hostettmann 1998). Diaion HP20 har evne til å danne hydrofobe interaksjoner med analytter, og er godt egnet til separering av polare forbindelser. Ved bruk av dette kolonnematerialet har de mest polare komponentene minst retensjon og elueres ut først (Greibrokk et al. 1998).

- 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. Hydroksypropylgruppene er bundet til glukoseenhetene i dekstrankjedene via eterbindinger. Dette medfører at gelen har både hydrofile og lipofile egenskaper (Pharmacia Fine Chemicals AB uten årstall). Prinsippet for separasjon av forbindelser med dette pakkematerialet kalles eksklusjonskromatografi. Dette innebærer at stoff separeres etter deres molekylstørrelse. Stasjonærfasen er et porøst pakkemateriale med en gitt porestørrelse. Molekyler som er for store til å passere gjennom porene blir ført med mobilfasen mellom partiklene og elueres ut først, deretter kommer mindre molekyler, 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 forbindelser (Greibrokk et al. 1998). Disse egenskapene varierer med ulike eluenter.

- Omvendt fase C_{18} -bundet silika

Omvendt fase C_{18} -bundet silika er et kolonnemateriale som brukes til omvendt fase kromatografi. Ved omvendt fase kromatografi anvendes en ikke-polar stasjonærfase og en polar mobilfase. Stasjonærfasen i dette tilfellet er en modifisert silika som har bundet $C_{18}H_{37}$ -grupper til overflaten. De viktigste interaksjonene som finner

sted mellom forbindelsene i prøven og stasjonærfasen er av typen van der Waalske krefter, relativt svake krefter som øker med molekylstørrelsen. Polare interaksjoner er av liten betydning på grunn av det vandige systemet som motvirker slike interaksjoner. Det er i hovedsak størrelsen på den upolare delen av molekylet som har noen effekt på retensjonen. Dette medfører at de mest polare komponentene har minst retensjon og elueres ut først (Greibrokk et al. 1998).

Løsninger og reagenser

Et løsningsmiddel ble brukt for å løse prøven og ulike løsningsmidler som egnet seg ble brukt til eluering av prøven.

Utførelse

Før selve kromatograferingen kunne starte måtte kolonnen pakkes. Dette ble gjort ved at kolonnematerialet ble rørt ut i den ønskede starteluenten. Enkelte pakkematerialer må svulle, og for disse var det viktig at dette skjedde før man pakket kolonnen. Etter at det ble laget en slurry av pakkematerialet, og det eventuelt hadde svellet, ble blandingen overført til en kolonne av ønsket størrelse. Deretter ble kolonnen skylt gjennom med litt av starteluenten.

Prøven som ble ønsket separert ble løst i et lite volum av egnet løsningsmiddel, og applisert på kolonnen. Deretter ble komponentene eluert ut ved hjelp av egnede elueringsmidler, og fraksjoner med passende fraksjonsvolumer ble samlet opp. Til slutt ble kolonnen vasket med et egnet løsningsmiddel for skylle ut eventuelle rester.

5.2.1.1.2 Mellomtrykksvæskekromatografi

Prinsipp

Prinsippet for mellomtrykksvæskekromatografi (MPLC) er ganske likt som for kolonnekromatografi uten bruk av trykk, men på grunn av liten kornstørrelse i pakkematerialet er det nødvendig med en pumpe for å oppnå høy nok flythastighet av mobilfasen. MPLC-kolonnen tåler et trykk på inntil 40 bar (Hostettmann 1998).

- **Silika**

Silika er et polart, surt absorpsjonsmiddel som har silanolgrupper (Si-OH) og siloxangrupper (Si-O-Si) på overflaten. Det er silanolgruppene som gjør overflaten svakt sur, og som kan danne hydrofile interaksjoner med andre stoff. Dette medfører at kolonnematerialet vil retardere polare stoff mest, slik at disse elueres ut sist (Greibrokk et al. 1998).

- **Omvendt fase C₁₈-bundet silika**

Prinsippet for bruk av omvendt fase C₁₈-bundet silikamateriale er beskrevet under avsnitt 5.2.1.1.1 Kolonnekromatografi uten bruk av trykk.

Løsninger og reagenser

Et løsningsmiddel ble brukt for å løse prøven, og løsningsmidler som egnet seg ble brukt til eluering av prøven.

Utførelse

Før selve kromatograferingen kunne starte måtte kolonnen pakkes. Dette ble gjort ved tørrpakking under trykk. Kolonnematerialet ble overført til kolonnen, deretter ble det koblet nitrogengass til (10 bar) slik at materialet ble pakket tett. Etter at trykket var utlignet kunne kolonnen kondisjoneres med starteluent.

Prøven som ble ønsket separert ble løst i et lite volum av egnet løsningsmiddel og applisert på kolonnen ved hjelp av en prøve-loop. Deretter ble komponentene eluert ut ved hjelp av egnede elueringsmidler og fraksjoner med passende fraksjonsvolumer ble samlet opp. Til slutt ble kolonnen vasket med et egnet løsningsmiddel for å få ut eventuelle rester.

5.2.1.1.3 Høytrykksvæskrokromatografi**Prinsipp**

Prinsippet for høytrykksvæskrokromatografi (HPLC) er ganske likt som for kolonnekromatografi uten bruk av trykk, med unntak av at kromatograferingen utføres ved et trykk på 100-300 bar. Det høye trykket skyldes de fysiske egenskapene til kolonnen, og det er derfor nødvendig med en pumpe for å få en høy nok flythastighet av mobilfasen. Det finnes mange ulike kolonnematerialer til bruk ved HPLC, blant annet normal fase silika, omvendt fase C₂-, C₈- og C₁₈-bundet silika. Vanligvis benyttes omvendt fase C₁₈-bundet silika. Prinsippet for separasjon på en C₁₈-kolonne er beskrevet under avsnitt 5.2.1.1.1 Kolonnekromatografi uten bruk av trykk. I tillegg skiller HPLC seg ut ved at det er koblet en detektor til kolonnen, vanligvis en UV-detektor (Greibrokk et al. 1998). HPLC kan brukes både analytisk og preparativt.

Løsninger og reagenser

Et løsningsmiddel ble brukt for å løse prøven og egnede løsningsmidler (vanligvis av HPLC-kvalitet) ble brukt til eluering av prøven.

Utførelse

Før applikasjon av prøven måtte kolonnen mettes med starteluent. Dette ble gjort ved å pumpe gjennom starteluenten i 15 minutter. Deretter ble prøven som ble ønsket undersøkt eller separert applisert på kolonnen ved injeksjon i loopen. Ved videre eluering med passende elueringsmidler ble komponentene i prøven separert. Ved analytisk HPLC ble det tatt opp et kromatogram, mens det ved preparativ HPLC også ble samlet opp fraksjoner.

5.2.1.1.4 Preparativ tynnsjiktskromatografi

Prinsipp

Preparativ tynnsjiktskromatografi (PTLC) er en metode som følger de samme prinsippene som analytisk TLC. Dette er beskrevet under avsnitt 5.2.1.2.1 Analytisk tynnsjiktskromatografi.

Løsninger og reagenser

Løsningsmidler ble brukt for å løse prøvene, og blandinger av løsningsmidler ble brukt for å utvikle platene, eksempelvis metanol, etylacetat, eddiksyre og vann.

Utførelse

Den ønskede mobilfasen ble overført til et tynnsjiktskar. Deretter ble prøven som ble ønsket separert applisert på en tynnsjiktsplate med konsentreringssone bestående av inaktivert silika ved hjelp av en pipette. Løsningen ble påført som et horisontalt sjikt i konsentreringssonen. Prøvestørrelsen varierte fra 10-30 mg per plate. Deretter ble tynnsjiktsplaten(e) satt i karet for utvikling. Platene ble tatt ut før mobilfasefronten nådde toppen av platen, og fronten ble avmerket. Etter fordamping av mobilfasen ble de separerte komponentene detektert visuelt ved at platen ble betraktet under UV-lys, både kortbølget (254 nm) og langbølget (366 nm). Båndene ble avmerket og skrapet av platene. Stoffene ble ekstrahert fra silikamaterialet med aceton ved at silikamaterialet stod dekket med aceton i minst én time. Deretter ble blandingen filtrert på glassinterfilter med sug. Silika-avskrapet ble vasket to ganger med aceton og filtrert. Til slutt ble løsningen inndampet på rotavapor, eventuelt etterfulgt av 10 minutter på oljevakuumpumpe, og deretter ble stoffet veid.

5.2.1.1.5 Sentrifugalt akselerert tynnsjiktskromatografi

Prinsipp

Sentrifugalt akselerert tynnsjiktskromatografi (CA-TLC) er i prinsippet klassisk PTLC med en akselerert flyt av mobilfase som dannes på grunn av sentrifugalkraften. Dette oppnås ved hjelp av en kromatotron; et apparat med en sirkulær glassplate som er dekket med silikagel blandet med gips for å hindre at det tynne laget med silika sprekker. Glassplaten roteres ved 800 rpm mens eluenten påføres nær midten av platen (der det ikke er silikagel). Mobilfasen passerer gjennom stasjonærfasen under påvirkning av sentrifugalkraften. Prøven appliseres på samme måte som mobilfasen etter at platen er mettet med mobilfase. Deretter fortsetter kromatograferingen til prøven er samlet opp via et lite rør i utkanten av kammeret som holder glassplaten. Applikasjon av prøve med påfølgende kromatografering fører til at det dannes konsentriske bånd av komponenter på platen. Kammeret som holder glassplaten er dekket av en plate av UV-gjennomskinnelig plast. Dette gjør at man kan observere fargeløse, men UV-aktive komponenter ved bestråling med en UV-lampe. Dermed kan man samle opp fraksjoner basert på visuell deteksjon. En stabil flyt av nitrogen passerer gjennom kammeret for å hindre kondensasjon av eluenten, og for å hindre oksidasjon av prøven (Hostettmann 1998).

Generelt kan 50-500 mg prøve appliseres og separeres på en glassplate med et 2 mm tykt lag av silika så fremt R_f -verdien for blandingen på en analytisk TLC-plate ligger mellom 0,2 og 0,5 (Hostettmann 1998).

Løsninger og reagenser

Til støping av silikagel på glassplate ble det brukt kieselgel 60 PF₂₅₄ med gips og kaldt destillert vann. Til kromatotronfraksjoneringen ble det brukt løsningsmidler for å løse prøven og blandinger av løsningsmidler ble brukt for å kromatografere platene, samt nitrogengass.

Utførelse

Før kromatotronen kunne brukes måtte det støpes en plate med et lag av silikagel. Dette ble gjort ved å blande 65 g kieselgel 60 PF₂₅₄ med gips og 130 ml kaldt destillert vann. Blandingen ble ristet til den var homogen og ble deretter overført på platen slik at det ble dannet et jevnt dekkende lag uten luftbobler. Blandingen ble hindret i å renne ut over kanten ved at hele omkretsen av platen ble dekket med limbånd. Dette ble fjernet etter at platen har stått i ro i en time. Deretter ble platen satt i varmeskap ved 60-70°C over natten. Etter avkjøling ble overflaten skrapet jevn, samt at silikagelen ble skrapet av i midten og langs ytterkanten av platen.

Den støpte platen ble montert i kromatotronen og kromatotronkammeret ble fylt med nitrogengass. Deretter ble platen rotert mens den ble fuktet med mobilfase fra et reservoar. Når platen var helt fuktet ble prøven som var løst i et lite volum mobilfase applisert, deretter startet separasjonen ved at mobilfase ble tilført. Fraksjoner ble samlet opp fra kromatotronen basert på visuell deteksjon av bånd på glassplaten ved hjelp av synlig lys og/eller ved hjelp av en UV-lampe.

5.2.1.2 Identifikasjonsmetoder

5.2.1.2.1 Analytisk tynnsjiktskromatografi

Prinsipp

Tynnsjiktskromatografi (TLC) er en metode der mobilfasen er en væske og stasjonærfasen ligger som et tynt sjikt på en flat plate av glass, plast eller metall. Flere prøver og eventuelt standarder kan påsettes samme plate og separeres samtidig med samme mobilfase. Det finnes ulike stasjonærfaser, men silika er mest brukt (Greibrokk et al. 1998).

Prøver og standarder løses i et løsningsmiddel og påsettes som flekker på en linje langs den ene sidekanten av platen. Løsningsmiddelet dampes av, og platen settes med påsetningskanten ned i et kar som inneholder mobilfasen og vanligvis en mett atmosfære av denne. 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, og komponentene i prøvene vil bli transportert med forskjellig hastighet og bli separert. Når mobilfasen

nærmer seg øvre platekant, tas platen ut av karet og mobilfasen avdampes. Deretter kan komponentene detekteres enten visuelt eller instrumentelt (Greibrokk et al. 1998).

Vandringen til et stoff ved TLC beskrives med dets retardasjonsfaktor, R_f , som er definert som:

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

L_s : stoffets vandringsavstand fra startsonens senter til flekkens senterpunkt

L_{ef} : avstanden fra startlinjen til mobilfasefronten

Løsninger og reagenser

Løsningsmidler ble brukt for å løse prøvene og blandinger av løsningsmidler ble brukt for å utvikle platene, eksempelvis metanol, etylacetat, eddiksyre og vann.

Utførelse

Den ønskede mobilfase ble laget og overført til utviklingskaret. Deretter ble de prøvene som ble ønsket undersøkt applisert på tynnsjiktspalten ved hjelp av et kapillærrør. Prøvestørrelsen varierte fra 10-30 μ l. Deretter ble tynnsjiktspalten(e) satt i karet for utvikling. Platene ble tatt ut før mobilfasefronten nådde toppen av platen, og fronten ble avmerket. Etter fordamping av mobilfasen ble komponentene detektert visuelt ved at platen(e) ble betraktet under UV-lys, både kortbølget (254 nm) og langbølget (366 nm). Deretter ble platene eventuelt sprayet med DPPH-reagens.

5.2.1.2.2 DPPH-spraying

Prinsipp

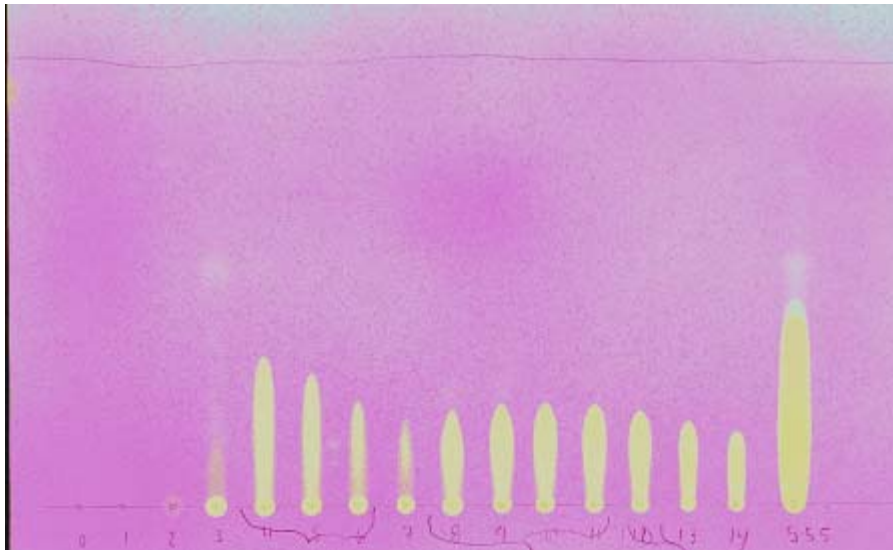
Prinsippet for DPPH-spraying er det samme som for DPPH-testen. Dette er beskrevet under avsnitt 5.2.1.3.1 Radikalscavenging (DPPH-test). Ved spraying av prøver påsatt tynnsjiktspalter, enten som flekker eller som utviklede prøver, vil stoff med radikalfangende evne kunne detekteres visuelt ved at det dannes gule flekker mot lilla bakgrunn (Figur 8) (Glavind og Holmer 1966).

Løsninger og reagenser

DPPH-reagens: DPPH løst i metanol (ca. 0,4 mg/ml) som gir en så konsentrert løsning at tynnsjiktspalten farges jevnt lilla.

Utførelse

Etter at prøver som ble ønsket undersøkt var applisert på en tynnsjiktspalte og eventuelt utviklet og tørket, ble DPPH-reagens sprayet på platen. Deretter ble resultatet avlest visuelt etter noen få minutter.



Figur 8. Eksempel på en tynnsjiktplate sprayet med DPPH-reagens. De gule flekkene indikerer radikalfangende stoff.

5.2.1.2.3 NMR-spektroskopi

Prinsipp

NMR (nukleær magnetisk resonans)-spektroskopi er en teknikk som brukes til strukturbestemmelse. Teknikken gir et bilde av organiske molekylers grunnstruktur av hydrogen- og karbonatomer.

Atomkjerner som inneholder et odde antall protoner og/eller nøytroner har et spinn og er magnetisk aktive. Eksempler på slike kjerner er ^1H og ^{13}C . Disse kjernene har spinn lik $\frac{1}{2}$ og stiller seg enten med ($+\frac{1}{2}$) eller mot ($-\frac{1}{2}$) et ytre magnetfelt H_0 (Fox 1997). Vanligvis er de magnetiske momentvektorene til kjernene tilfeldig orientert, men når en kjerne plasseres i et sterkt magnetfelt tvinges den magnetiske momentvektoren til hver kjerne til å stille seg enten med eller mot det ytre magnetfeltet. Det krever mer energi for en kjerne å stille seg mot det ytre feltet enn med det ytre magnetfeltet, derfor krever det energi å endre spinntilstanden fra $+\frac{1}{2}$ til $-\frac{1}{2}$. Når kjernene blir tilført en kombinasjon av ytre magnetfelt og radiofrekvensstråling som er lik energidifferansen mellom de to spinntilstandene, absorberer kjernen i den lavere ($+\frac{1}{2}$) spinntilstanden energi og endrer spinntilstand til den høyere, stilt mot magnetfeltet. Det er dette energiopptaket, eller den energien som kjernene emitterer når magnetfeltet fjernes, som måles og som gir opphav til et spektrum med strukturinformasjon (Johnson 1999).

Hver type av ikke-ekvivalente ^1H - eller ^{13}C -kjerner gir opphav til ulike signaler, mens kjemisk identiske atomer er representert ved samme signal. Kjernens kjemiske skift (den eksakte posisjonen) avhenger av den enkelte kjernens kjemiske natur. Dette oppgis vanligvis i ppm (parts per million) relativt til referansesubstansen tetrametylsilan (TMS). Signalet til TMS ligger per definisjon på 0 ppm. Andre signaler forekommer normalt ved lavere felt enn dette. For ^1H -NMR-spektrene ligger signalene generelt i området fra 1-12 ppm, mens de for ^{13}C -NMR-spektrene ligger i området 0-250 ppm.

Generelt gir elektronegative substituentter, aromatiske karboner og protoner lave kjemiske skift (signaler til venstre i spekteret), mens atomer av alifatiske opphav gir høye kjemiske skift (signaler til høyre i spekteret) (Fox 1997).

Antallet signaler i et ^1H -NMR-spektrum gir informasjon om antallet ulike protoner, mens det kjemiske skiftet til hvert signal er relatert til de ulike protonenes kjemiske natur. I tillegg er integralet av hvert signal proporsjonalt med det antall protoner som bidrar til signalet. Naboprotoners magnetiske felt kan påvirke hverandre og gi opphav til multiplerter (spinn-spinn splitting). Som en hovedregel gjelder det at en ^1H -kjerne med n identiske naboprotoner gir opphav til $(n + 1)$ signaler. Denne regelen gjelder imidlertid ikke for kjerner med liten forskjell i kjemisk skift (høyere ordens spektra). Avstanden mellom signalene kalles koblingskonstanten, J . Generelt gjelder det at dess nærmere protonene ligger, dess større er splittingen (Fox 1997).

Et ^{13}C -NMR-spektrum gir informasjon om antallet ulike karbonatomer basert på antallet signaler, og det kjemiske skiftet til hvert signal gir informasjon om de ulike karbonenes kjemiske natur. Ved opptak av ^{13}C -NMR-spektra ser man ikke multiplerter fordi disse som oftest er protondekoblet (Fox 1997).

I tillegg til de mest brukte ^1H -NMR- og ^{13}C -NMR-spektrene, finnes det en hel del andre spektra som kan gi mer strukturinformasjon (Williams 1987):

- COSY-spektrum (proton-proton korrelasjonsspektroskopi)
COSY-spektra gir informasjon om koblinger mellom ulike protoner. Signalene merkes av langs to akser, hvilket gir en speilbildeeffekt langs et diagonalt mønster. Signaler utenfor denne diagonalen viser koblingene.
- HETCOR-spektrum (proton-karbon korrelasjonsspektroskopi)
HETCOR-spektra gir informasjon om hvilke protonatomer som er koblet til hvilke karbonatomer ved at proton- og karbonsignalene merkes av langs hver sin akse. Kvaternære karbonatomer er ikke protonbundet, og sees derfor ikke i disse spektrene.
- HOM2DJ-spektrum (homonukleær todimensjonal J-korrelert spektroskopi)
HOM2DJ-spektra gir informasjon om hvilke signaler de ulike protonene gir opphav til (singletter, dubletter, multiplerter) og hvor stor koblingskonstanten mellom disse er. Protonenes kjemiske skift er avmerket langs den ene akse, mens koblingskonstanten er avmerket langs den andre akse.
- APT-spektrum (attached proton test)
APT-spektra gir en indikasjon på de ulike karbonatomenes kjemiske natur ved at signalene for kvaternære og sekundære karboner er positive (peker oppover), mens de primære og tertiære karbonatomene har negative signaler (peker nedover). Alle signalene kommer ved deres naturlige kjemiske skift.

Løsninger og reagenser

Tetrametylsilan ble brukt som referansesubstans og deutererte løsningsmidler, eksempelvis deuterert kloroform, metanol og vann, ble brukt for å løse prøvene.

Utførelse

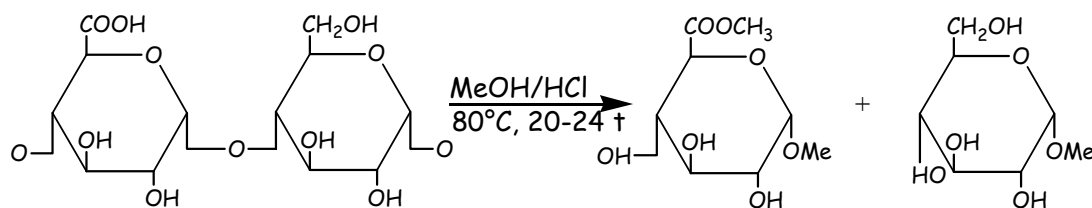
En mengde (vanligvis 10-100 mg) av prøven som ble ønsket undersøkt ble løst i ca. 1 ml deuterert løsningsmiddel tilsatt ca. 1% TMS. Løsningsmiddelet ble valgt ut fra løseligheten til prøven. Deretter ble prøveløsningen overført til et NMR-rør. Prøven ble til slutt analysert på NMR-spektrometeret.

5.2.1.2.4 Metanolyse

Prinsipp

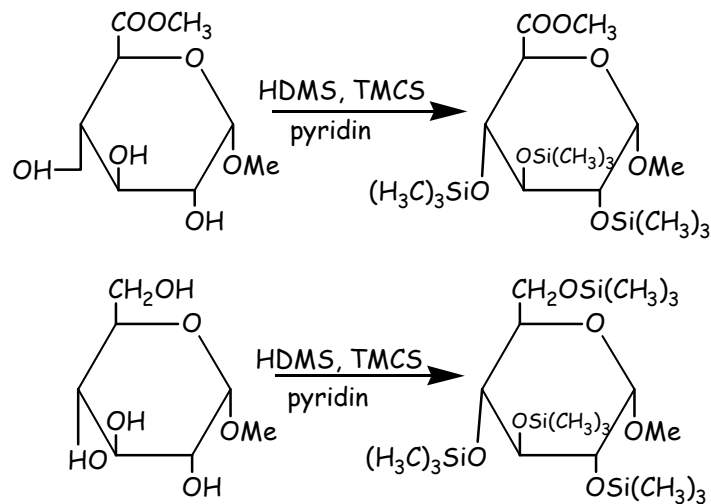
Metanolyse brukes for å bryte glykosidbindinger, slik at man kan bestemme hvilken type monosakkarid som spaltes av et glykosid ved hjelp av gasskromatografi (GC). TMS-derivatisering er et nødvendig mellomtrinn for å danne flyktige termisk stabile derivater av metylglykosidene og metylesterene.

I et vannfritt miljø av 4 M HCl i metanol vil glykosidbindinger brytes, og det vil dannes metylglykosider. I tillegg vil det av uronsyrene bli dannet metylestere (Figur 9) (Chambers og Clamp 1971).



Figur 9. Metanolyse av en glykosidbinding mellom et surt og et nøytralt monosakkarid i en polysakkaridkjede. Det dannes metylglykosid og metylester (Sogn 1998).

Hensikten med TMS-derivatisering er som nevnt å lage flyktige termisk stabile derivater av metylglykosidene og metylesterene slik at de kan separeres på en GC-kolonne. Dette er nødvendig fordi metylglykosider med og uten metylestergrupper er lite flyktige og har polare funksjonelle grupper som gjør dem lite egnet for gasskromatografisk analyse. Ved TMS-derivatisering reagerer de frie hydroksylgruppene med heksametyldisilasan (HMDS) og trimetylklorosilan (TMCS) til pertrimetylsilyleter, og metylglykosidene blir dermed flyktige og kan enkelt skiller på en GC-kolonne. I tillegg unngås uønskede kolonneinteraksjoner som adsorpsjon og haledannelse. Pyridin anvendes som løsningsmiddel og katalysator (Figur 10) (Sweeley et al. 1963).



Figur 10. Reaksjon mellom metylglykosid med og uten metylestergruppe med TMS-reagens (Sogn 1998).

Ved GC introduseres prøven i den oppvarmede injektoren der den fordampes, og prøven bringes deretter med bæregassen til kolonnen. Stoffene vandrer gjennom kolonnen med en hastighet som bestemmes av flyktigheten til stoffene og deres løselighet i stasjonærfasen, i tillegg til temperaturen. Hvert monosakkarid gir et karakteristisk mønster av toppe etter at det har innstilt seg en likevekt mellom pyranose-, furanose-, α -, β - og åpen kjedeform. Mønsteret som dannes kan benyttes både til kvalitative og kvantitative bestemmelser. Kvantitative analyser utføres med en intern standard som blant annet korrigerer for variasjoner i injisert mengde. Retensjonstidene for intern standard og monosakkaridene i prøven er sammenlignbare. Arealforholdene og standardkurver benyttes for å bestemme mengden av sukker i prøven (Sweeley et al. 1963; Greibrokk et al. 1998).

Løsninger og reagenser

4M HCl i metanol, 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mannitol i 1M HCl i metanol og vannfri metanol ble brukt til metanolyse.

TMS-reagens: 1 ml TMCS, 2 ml
HMDS og 5 ml pyridin.

Utførelse

Beskrivelse av utførelse av metanolyse, TMS-derivatisering og GC er gitt i avsnitt 5.2.2.5 Videre arbeid med fraksjon C6. Betingelsene for GC er gitt under:

Flyt:	gjennom kolonnen:	1,8 ml/min
	splitt flyt:	~11 ml/min
	splittforhold:	1 : 6
Injiseringvolum:		1 μl
Injektortemperatur:		260°C
Detektortemperatur:		310°C
Temperaturprogram:		1°C/min 6°C/min
		140°C →→ 170°C →→ 250°C

5.2.1.2.5 Acetylering

Prinsipp

Acetylering av hydroksylgrupper i et molekyl kan benyttes til å bestemme antallet hydroksylgrupper i molekylet ved å undersøke det acetylerede produktet ved hjelp av NMR-spektroskopi (Faix et al. 1994).

Løsninger og reagenser

Eddiksyreanhydrid, 1-metylimidazol, destillert vann, diklormetan og metanol ble brukt til acetylering.

Utførelse

Beskrivelse av utførelse av acetylering er gitt i avsnitt 5.2.2.5 Videre arbeid med fraksjon C6.

5.2.1.2.6 Massespektrometri

Prinsipp

Massespektrometri (MS) med "electron impact" ionisering (EI) baserer seg på å bombardere molekyler med elektroner av høy energi slik at elektroner fjernes fra molekylet. Dette resulterer i dannelsen av et kationradikal. Kationradikaler er svært reaktive forbindelser som lett brytes ned i mindre kationiske fragmenter.

Massespektrometeret måler størrelsen og relativ forekomst av disse fragmentene, og plotter informasjonen i form av et massespektrum. Massespekteret kan brukes til å identifisere en forbindelse ved å sammenligne det med en standard, bestemme den eksakte molekylvekten, eller bestemme strukturen til forbindelsen ved å analysere fragmenteringsmønsteret (Fox 1997).

Løsninger og reagenser

Analysen ble utført ved Kjemisk Institutt ved Universitetet i Oslo. Derfor foreligger ikke data om løsninger og reagenser.

Utførelse

Utførelsen er ikke beskrevet her da analysen i sin helhet ble utført ved Kjemisk Institutt ved Universitetet i Oslo.

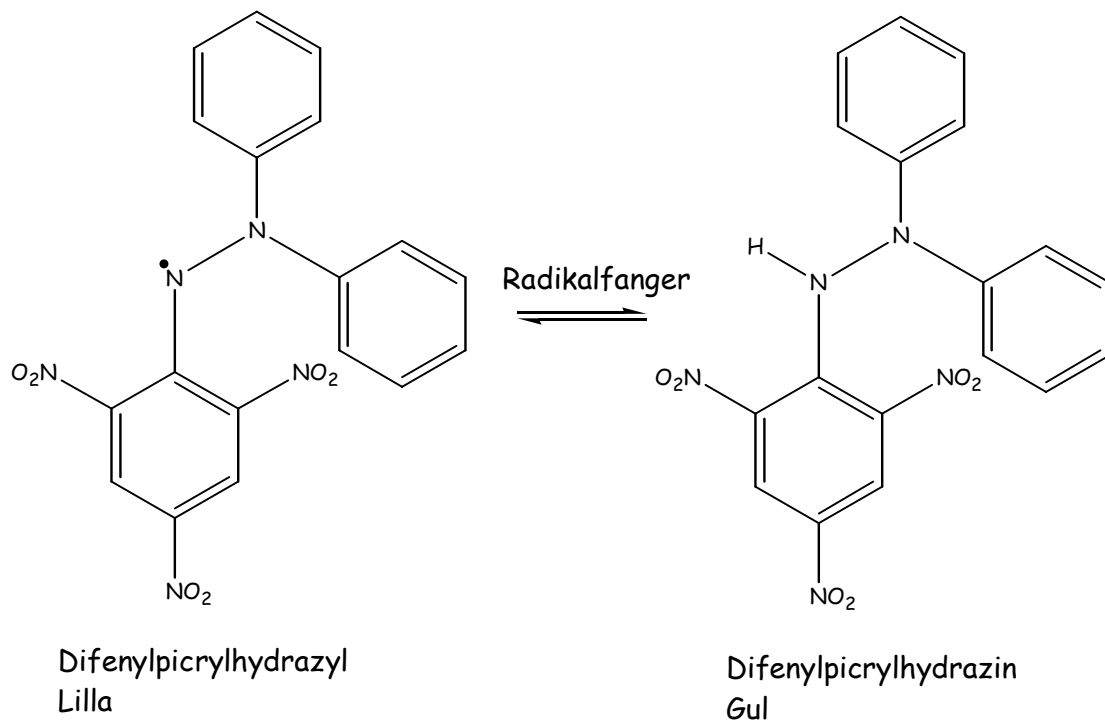
5.2.1.3 Metoder for måling av biologisk aktivitet

5.2.1.3.1 Radikalscavenging (DPPH-test)

Prinsipp

1,1-Difenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) er et stabilt radikal som holder seg godt i løsning. På grunn av det uparrede elektronet har DPPH-radikalet et sterkt absorpsjonsbånd ved 517 nm, og løsningen har en dyp lilla farge (Blois 1958). Ved reaksjon med en radikalscavenger vil løsningen miste den dyp lilla fargen og bli svak gul (Figur 11). Dette

skyldes dannelsen av 1,1-difeny-2-picrylhydrazin (DPPH-H) som er en forbindelse med kun svak absorpsjon ved 517 nm.



Figur 11. Omdannelse av DPPH som skjer ved radikalscavenging (Sæther 1999).

Reduksjon i absorpsjon er relatert til mengde og aktivitet av radikalscavenger (Blois 1958; Glavind 1963; Glavind og Holmer 1966; Malterud et al. 1993). På grunn av DPPH-radikalets sterke absorpsjon ved 517 nm kan det anvendes løsninger med lav konsentrasjon, og Beer-Lamberts lov gjelder over hele det aktuelle området. Absorpsjonen er da proporsjonal med konsentrasjonen av radikalet (Blois 1958). Aktiviteten en forbindelse har som radikalscavenger kan dermed måles ved å måle nedgangen i absorpsjon over et gitt tidsrom. På grunn av prøveløsningens fortykning ved tilsetning til DPPH-løsningen korrigeres startabsorpsjonen ved å multiplisere den med 0,983 (=2,95/3). DPPH-scavenging kan dermed beregnes i prosent etter følgende formel (Malterud et al. 1993):

$$100 \times \left(\frac{(A_{\text{start}} \times 0,983) - A_{\text{slutt}}}{A_{\text{start}} \times 0,983} \right)$$

A_{start} : Absorpsjon før tilsetning av prøveløsning.

A_{slutt} : Absorpsjon i kvetteløsningen etter endt måletid.

Løsninger og reagenser

DPPH-løsning: 1,1-Difeny-2-picrylhydrazyl løst i metanol med en konsentrasjon (ca. 0,04 mg/ml) som gir en absorpsjon på ca. 1,00 ved 517 nm.

Metanol ble brukt til blindprøve.

Utførelse

Spektrofotometeret ble nullstilt med en blindprøve bestående av metanol. DPPH ble løst i metanol, med en konsentrasjon slik at løsnings absorbans ved 517 nm var ca. 1,00. Prøveløsninger av de ulike fraksjonene ble laget i dimetylsulfoksid (DMSO). Konsentrasjonen til prøveløsningene ble valgt ut fra forventet aktivitet for den enkelte fraksjon basert på TLC. Absorbans ble målt i 2,95 ml DPPH-løsning før tilsetning av prøve ved 517 nm. Prøveløsning (50 µl) ble tilsatt, deretter ble løsningen omrørt med plastspatel. 30 sekunder etter tilsetning av prøve startet registreringen av absorbansen. Absorbansen ble målt hvert 60. sekund, altså 6 målinger i totalt 5 minutter. Det ble utført tre paralleller for hver prøve.

I tilfeller med høy egenabsorbans av prøveløsning ble absorbansen ved 517 nm målt for blankprøve for å måle egenabsorbans. Blankprøvene bestod av 2,95 ml metanol og 50 µl prøveløsning av en fraksjon.

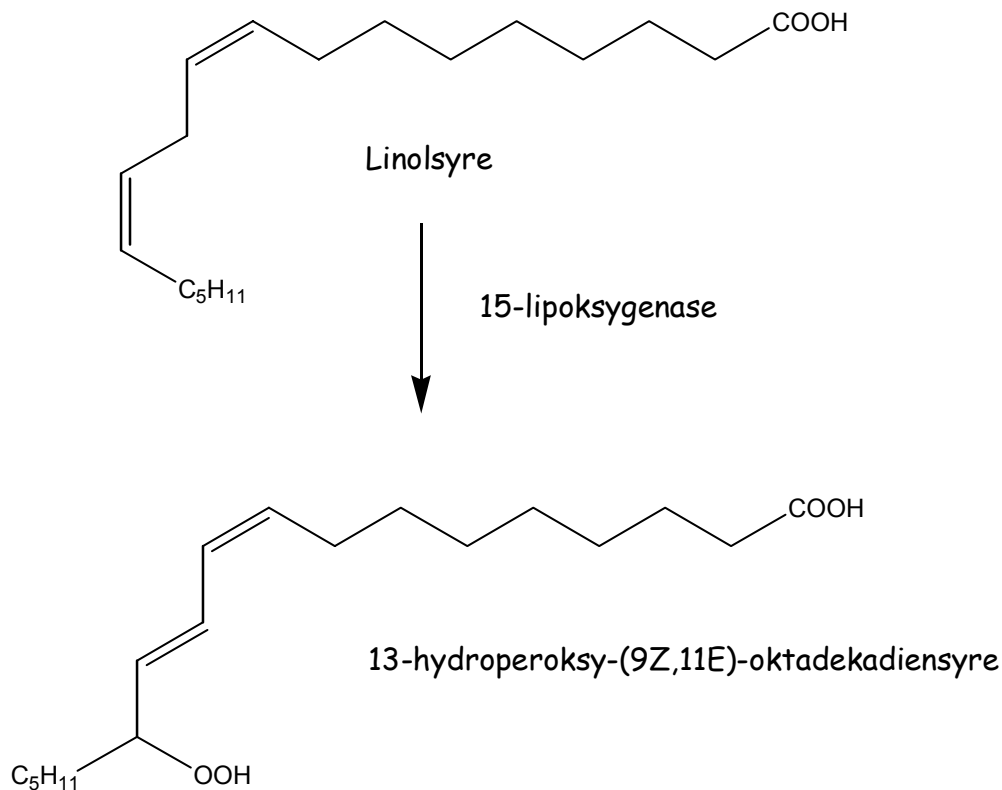
I mange tilfeller vil scavengingreaksjonen ikke være fullstendig etter 5 minutter, men fordi raskt reagerende radikalscavengere trolig vil være av større fysiologisk betydning enn langsomt reagerende radikalscavengere, og fordi tidligere forsøk har vist at korrelasjonen mellom resultater etter 5 minutter og 30 minutter i de aller fleste tilfeller er god (Malterud, personlig meddelelse), ble denne måletiden benyttet.

5.2.1.3.2 Hemming av 15-lipoksygenase (15-LO test)**Prinsipp**

Enzymet 15-lipoksygenase peroksidierer arakidonsyre til 15-HPETE, som omdannes videre til andre eikosanoider. I denne testen benyttes 15-LO fra soyabønner. Denne er ikke identisk med mammalsk 15-LO, men det er en forholdsvis god korrelasjon mellom inhiberingsverdiene til de to enzymene. Soyabønnelipoksygenase kan derfor brukes som testenzym for å identifisere hemmere av mammalsk 15-LO (Langner og Bekemeier 1987; Gleason et al. 1995). Dessuten er 15-LO fra soyabønner billig og lett tilgjengelig (Lyckander og Malterud 1992). Enzymløsningen oppbevares på is under forsøket for å forsinke løsnings tap av aktivitet ved oksidativ denaturering (Lyckander og Malterud 1996). Enzymaktiviteten reduseres lineært som en funksjon av løsnings lagringstid. Det kan korrigeres for dette ved beregninger og derfor måles aktiviteten med jevne mellomrom under hele forsøket.

Linolsyre brukes som substrat for 15-LO i stedet for arakidonsyre fordi den er billigere og mer stabil. Hemming av peroksidering av linolsyre er ikke forskjellig fra hemming av peroksidering av arakidonsyre. Linolsyre er derfor en god modellsubstans ved testing av ulike stoffs hemmingseffekt på 15-lipoksygenasens peroksidering av arakidonsyre (Lyckander og Malterud 1992).

Linolsyre har en 1,4-dienstruktur og danner ved peroksidering 13-hydroperoksy-(9Z, 11E)-oktadiensyre (13-HPODE) (Lyckander og Malterud 1996) (Figur 12).



Figur 12. Reaksjon mellom linolsyre og 15-LO (Sæther 1999).

HPODE har to konjugerte dobbeltbindinger noe som medfører at forbindelsen absorberer UV-stråling ved 230-235 nm. Linolsyren har ikke denne egenskapen. Ved peroksidering av linolsyre vil derfor absorbansen ved 234 nm øke proporsjonalt med konsentrasjonen av dannet dien. Hemming av peroksideringen, altså hemming av enzymet 15-LO, vil derfor føre til at denne absorbansøkningen blir mindre (Gutteridge 1986; Gutteridge og Halliwell 1990). Ved å måle økningen i absorbans for prøver tilsatt testsubstans (potensielle hemmere av 15-LO) og prøver uten hemmere over en periode fra 30 til 90 sekunder etter enzymtilsatt, kan man beregne prosentvis enzymhemming ut fra følgende formel (Lyckander og Malterud 1992):

$$100 \times ((A_b - A_h) / A_b)$$

A_b : enzymaktivitet (absorbansøkning per tidsenhet) uten hemmer.

A_h : enzymaktivitet med hemmer.

For å løse linolsyre anvendes det en borsyrebuffer med pH 9.00. Linolsyre har en pK_a -verdi lik 4,77 (Aylward og Findlay 1998) og derfor er hovedandelen linolsyre ionisert ved pH 9.00. Dette er med på å bidra til bedre løselighet. Dette medfører at man får en klar løsning, hvilket er nødvendig for å kunne måle riktig absorbans (Haining og Axelrod 1958).

For at 15-LO skal kunne peroksidere linolsyre, må det være små mengder av lipidperoksid tilstede på forhånd. Dette kan oppnås ved autooksidasjon før forsøket.

Dersom dette ikke er tilfelle får peroksidierungsreaksjonen en induksjonsperiode på flere minutter, og det blir vanskelig å oppnå reproducerbare resultater (Haining og Axelrod 1958). For å unngå dette ble det benyttet linolsyre fra en ampulle som ble oppbevart åpen ved romtemperatur i ca. 1 døgn før den ble brukt til enzymforsøk. Dermed hadde linolsyren tilgang på luft slik at autooksidasjonen allerede hadde funnet sted før forsøket startet.

Løsninger og reagenser

- A: Borsyrebuffer, 0,2 M, pH 9.00, innstilt med natriumhydroksid.
- B: Substratløsning ble laget ved å blande 50 µl linolsyre og 150 µl etanol. A ble tilsatt ad 50 ml. 15 ml av denne løsningen ble tilsatt 225 ml A. Løsningen ble laget rett før bruk.
- C: Enzymløsning ble laget ved å løse 15-LO i A, til en konsentrasjon som tilsvarte en absorbansøkning på 0,3-0,5 AU/min ved 234 nm. Enzymkonsentrasjonen bør være ca. 10 000 enheter/ml. Løsningen ble laget rett før bruk og ble oppbevart på is under hele forsøket.

Utførelse

Prøveløsninger av de ulike fraksjonene ble laget i DMSO. Forsøket ble utført ved romtemperatur, unntatt løsning C som ble oppbevart på is. Spektrofotometeret ble nullstilt med en blindprøve bestående av; 0,95 ml A, 2,00 ml B og 0,05 ml DMSO. Løsningen ble blandet ved omrøring med plastspatel. Det ble benyttet kvartskvetter. Det ble tatt en måleserie med blankprøver à tre paralleller før og etter hver tredje måleserie med prøver à tre paralleller for å kontrollere at enzymaktiviteten holdt seg stabil. Blankprøvene bestod av; 0,90 ml A, 2,00 ml B og 0,05 ml DMSO. Etter omrøring ble det tilsatt 0,05 ml C, med påfølgende omrøring. Prøvene bestod av; 0,90 ml A, 2,00 ml B og 0,05 ml prøveløsning. Etter omrøring ble det tilsatt 0,05 ml C, med påfølgende omrøring. Både for blankprøvene og for prøvene ble økningen i absorbans registrert fra 30 til 90 sekunder etter tilsetning av henholdsvis DMSO og prøveløsning. Absorbansøkningen mellom 30 sekunder og 90 sekunder etter enzymtilsats ble målt.

5.2.2 Praktisk utførelse

5.2.2.1 Utgangsmateriale

Anvendt droge var rotbark av den maliske planten *Diospyros abyssinica*. Den ble samlet inn i Blendio, Mali i februar 2002. Plantematerialet ble identifisert ved DMT i Bamako, Mali, deretter ble det lufttørket og findelt. Det foreligger herbarieeksemplar av planten ved DMT.

5.2.2.2 Råekstrakt

Væskekstraksjon

Ekstraksjon av plantematerialet ble foretatt ved DMT (Maiga et al. under utarbeidelse). Det findelte plantematerialet ble ekstrahert i et Soxhlet-apparat suksessivt med ti

ganger mengden av plantematerialet (v/w) for hvert løsningsmiddel (petroleumseter, diklormetan, kloroform, metanol og 80% etanol). Hver gang ble plantematerialet ekstrahert med løsningsmiddel til det ikke ble ekstrahert mer farget materiale. Det resterende plantematerialet etter ekstraksjon ble tørket og deretter rørt ut i 2 l destillert vann og varmet til 50°C i 3 timer. Deretter ble det resterende plantematerialet tørket og ekstrahert ved koking i 2 l destillert vann i 3 timer.

Petroleumseter- (ekstrakt A1), diklormetan- (ekstrakt A2) og kloroformekstraktene (ekstrakt A3) ble tørket ved romtemperatur. Metanol- (ekstrakt A4), 80% etanol- (ekstrakt A5) og de vandige ekstraktene (ekstrakt A6 og A7) ble inndampet på rotavapor og frysetørket.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra og ^{13}C -NMR-spektra av alle råekstraktene med unntak av for de vandige ekstraktene som det bare ble tatt ^1H -NMR-spektra av (NMR-spektrum C.1-C.5).

Bioassay

Assay for radikalscavenging (DPPH-testen) (Tabell 5) og for hemming av 15-LO (15-LO testen) (Tabell 6) ble utført for alle råekstraktene (Maiga et al. under utarbeidelse).

5.2.2.3 Fraksjonering av A4

Flytskjema for fraksjonering av metanolekstraktet er vist i del A av del II av hovedfagsoppgaven.

Kolonnekromatografi uten bruk av trykk

Av ekstrakt A4 ble 38,76 g løst i 100 ml metanol og kromatografert på en Diaion HP20 kolonne (430 x 55 mm) (Tabell B.1). Destillert vann, 50% og 100% metanol ble benyttet som elueringsmidler. Fraksjoner med varierende fraksjonsstørrelser ble samlet opp; hovedsakelig fraksjoner på 250 ml. Gjenværende stoff på kolonnen ble skylt ut med 1,5 l metanol. I alt ble det samlet 20 fraksjoner.

Analytisk TLC

Fraksjonene 0-19 ble undersøkt ved normal fase analytisk TLC (kiselgel 60 F₂₅₄).

Mobilfase:	Etylacetat	80
	Metanol	20
	Eddiksyre	1

Platene ble sprayet med DPPH-løsning. Fraksjoner som så ut til å inneholde de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor. Dette ga fraksjonene B1-B8 (Tabell B.1).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av alle fraksjonene unntatt fraksjon B1 (NMR-spektrum C.6, C.8 og C.10). Det ble tatt ^{13}C -NMR-spektra av alle fraksjonene unntatt fraksjonene B1 og B8 (NMR-spektrum C.7, C.9 og C.11).

Bioassay

DPPH-testen og 15-LO testen ble utført for alle fraksjonene unntatt fraksjon B1 (Tabell B.2 og B.3). Fraksjonene ble testet i konsentrasjoner på 166,7 $\mu\text{g/ml}$, 83,3 $\mu\text{g/ml}$, 41,7 $\mu\text{g/ml}$ og 20,8 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.2.4 Fraksjonering av B5

Kolonnekromatografi uten bruk av trykk

Av fraksjon B5 ble 12,82 g løst i 4 ml metanol og kromatografert på en Sephadex LH-20 kolonne (290 x 38 mm) (Tabell B.4). 50% og 100% metanol ble benyttet som elueringsmidler. Fraksjoner med varierende fraksjonsstørrelser ble samlet opp; hovedsakelig fraksjoner på 100 ml. Gjenværende stoff på kolonnen ble skylt ut med 0,95 l metanol. I alt ble det samlet 30 fraksjoner.

Analytisk TLC

Fraksjonene 0-28 ble undersøkt ved normal fase analytisk TLC (kiselgel 60 F₂₅₄).

Mobilfase:	Etylacetat	80
	Metanol	20
	Eddiksyre	1

Platene ble sprayet med DPPH-løsning. Fraksjoner som så ut til å inneholde de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor. Før inndamping av fraksjonene 2 og 3 ble det oppdaget krystallinsk utfelling i løsningene. Krystallene ble filtrert fra og ble egne fraksjoner. Dette ga fraksjonene C1-C13, der utfellingene utgjorde fraksjonene C4 og C6 (Tabell B.4).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av alle fraksjonene (NMR-spektrum C.12, C.14, C.15, C.17 og C.19). Det ble tatt ^{13}C -NMR-spektra av alle fraksjonene unntatt fraksjonene C1, C3, C4, C5 og C7 (NMR-spektrum C.13, C.16, C.18 og C.20).

Bioassay

DPPH-testen og 15-LO testen ble utført for alle fraksjonene (Tabell B.5 og B.6). Fraksjonene ble testet i varierende grad i konsentrasjoner på 83,3 $\mu\text{g/ml}$, 41,7 $\mu\text{g/ml}$, 20,8 $\mu\text{g/ml}$, 10,4 $\mu\text{g/ml}$, 5,2 $\mu\text{g/ml}$ og 2,6 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.2.5 Videre arbeid med fraksjon C6

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -, ^{13}C -, COSY-, HETCOR-, HOM2DJ- og APT-NMR-spektra av fraksjon C6 (NMR-spektrum C.19-C.25).

Metanolyse

Av fraksjon C6 ble 1 mg veid inn i et syrevasket Supelcorør. Prøven ble tørket i evakuert vakuumeksikator i 24 timer ved romtemperatur. Deretter ble 1 ml 4 M HCl i metanol tilsatt prøven. Mannitol (100 µl, 1,0 µg/µl) ble tilsatt som intern standard. Prøven ble satt i varmeskap (80°C) i 20-24 timer. Etter 15 minutter ble korken skrudd til. Deretter ble prøven tørket under N₂-gass ved 40°C til tørrhet. Vannfri metanol (200 µl) ble tilsatt, og deretter ble prøven tørket under N₂-gass på nytt. Sistnevnte trinn ble gjentatt totalt 3 ganger. Prøven ble så satt til tørking i P₂O₅-evakuert vakuumeksikator i 1 time før TMS-derivatisering.

Prøven ble tilsatt 200 µl TMS-reagens, og blandet godt. Etter henstand i ½ time ved romtemperatur ble 1,0 µl injisert på GC. Hele GC-programmet tok ca. 60 minutter.

Acetylering

Av fraksjon C6 ble 30,3 mg veid inn i et reagensrør. Prøven ble tilsatt 2 ml eddiksyreanhydrid og 200 µl 1-metylimidazol som katalysator. Løsningen ble sonikert for å løse krystaller, blandet godt på vortexmikser og satt til henstand i 10 minutter. Overskudd av eddiksyreanhydrid ble ødelagt ved tilsetning av 10 ml destillert vann. Løsningen ble blandet godt på vortexmikser, og satt til henstand i 10 minutter. Produktet ble ekstrahert fra løsningen med 3 x 5 ml diklormetan. Etter tilsetning av diklormetan ble løsningene blandet på vortexmikser (30 sekunder) og satt til henstand for å separere fasene. De nederste fasene ble samlet, og vasket med 2 x 5 ml vann ved samme prosedyre. Diklormetanfasene ble inndampet til tørrhet på rotavapor og veid. Dette ga fraksjon C6-acetylerert (Tabell B.7).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-, ¹³C-, COSY-, HETCOR- og APT-NMR-spektra av fraksjon C6-acetylerert (NMR-spektrum C.26-C.30).

PTLC

Av fraksjon C6-acetylerert ble 44,7 mg løst i kloroform og påsatt på to normal fase preparative tynnsjiktplater med konsentreringssoner (kiselgel 60F₂₅₄).

Mobilfase: Kloroform 80
Etylacetat 20

Båndet til komponenten i fraksjonen ble først detektert visuelt ved bestråling med UV-lys (254 nm og 366 nm), for deretter å bli avmerket og skrapet av platene. Stoffet ble ekstrahert fra silikamaterialet med aceton, deretter ble silikaavskrapet filtrert fra. Løsningen ble inndampet på rotavapor og veid. Dette ga fraksjon C6.1-acetylerert (Tabell B.8).

MS

Det ble utført MS med EI for fraksjon C6 (Massespektrum D.1).

5.2.2.6 Videre arbeid med fraksjonene C9 og C11

Analytisk TLC

Fraksjonene C9 og C11 ble undersøkt ved analytisk TLC, både normal fase (kiselgel F 60₂₅₄) og omvendt fase (RP-18 F_{254s}).

Mobilfase normal fase TLC:	Etylacetat	90
	Metanol	10
	Eddiksyre	1
Mobilfase omvendt fase TLC:	Metanol	100
	Eddiksyre	1

Platene ble sprayet med DPPH-løsning.

5.2.2.7 Fraksjonering av C9

Kolonnekromatografi uten bruk av trykk

Av fraksjon C9 ble 4,5 g løst i 2 ml metanol og kromatografert på en Sephadex LH-20 kolonne (320 x 30 mm) (Tabell B.9). 50%, 70%, 100% metanol og aceton ble benyttet som elueringsmidler. Hovedsakelig ble fraksjoner med et fraksjonsvolum på 50 ml samlet opp. Gjenværende stoff på kolonnen ble skylt ut med 0,2 l aceton. I alt ble det samlet 41 fraksjoner.

Analytisk TLC

Fraksjonene 0-40 ble undersøkt ved normal fase analytisk TLC (kiselgel 60 F₂₅₄).

Mobilfase:	Etylacetat	80
	Metanol	20
	Eddiksyre	1

Platene ble sprayet med DPPH-løsning. Fraksjoner som så ut til å inneholde de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor. Dette ga fraksjonene D1-D11 (Tabell B.9).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektra av alle fraksjonene unntatt fraksjon D11 (NMR-spektrum C.31, C.32, C.34, C.36 og C.38). Det ble tatt ¹³C-NMR-spektra av fraksjonene D3-D8 (NMR-spektrum C.33, C.35 og C.37).

5.2.2.8 Første fraksjonering av D5

CA-TLC

Av fraksjon D5 ble 248,5 mg løst i 1 ml mobilfase og fraksjonert ved CA-TLC med stasjonærfase bestående av gipsholdig kiselgel 60 PF₂₅₄ med 2 mm sjikttykkelse (Tabell B.10).

Mobilfase:	Etylacetat	100
	Eddiksyre	1

Separasjonen ble fulgt visuelt med UV-bestråling (254 nm) og fraksjonene ble delvis delt etter dette. Fraksjoner med et fraksjonsvolum på ca. 10 ml ble samlet opp. I alt ble det samlet 15 fraksjoner.

Analytisk TLC

Fraksjonene 0-14 ble undersøkt ved normal fase analytisk TLC (kiselgel 60 F₂₅₄).

Mobilfase: Etylacetat 100
Eddiksyre 1

Platene ble sprayet med DPPH-løsning. Fraksjoner som så ut til å inneholde de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor. Dette ga fraksjonene E1-E7 (Tabell B.10).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H- og ¹³C-NMR-spektra av fraksjonene E3, E5, E6 og E7 (NMR-spektrum C.39-C44).

5.2.2.9 Videre arbeid med fraksjonene D1, D2 og E3

Analytisk TLC

Fraksjonene D1, D2 og E3 ble undersøkt mot fraksjon C6 ved normal fase analytisk TLC (kiselgel 60 F₂₅₄).

Mobilfase: Etylacetat 80
Metanol 20
Eddiksyre 1

Platene ble sprayet med DPPH-løsning.

5.2.2.10 Fraksjonering av E3

PTLC

Av fraksjon E3 ble 20,6 mg løst i metanol og påsatt på to normal fase preparative tynnsjiktplater med konsentreringssoner (kiselgel 60F₂₅₄).

Mobil fase: Etylacetat 90
Metanol 10
Eddiksyre 1

Båndet til komponenten i fraksjonen ble først detektert visuelt ved bestråling med UV-lys (254 nm og 366 nm), for deretter å bli avmerket og skrapet av platene. Stoffet ble ekstrahert fra silikamaterialet med aceton, deretter ble silikaavskallet filtrert fra. Løsningen ble inndampet på rotavapor og veid. Dette ga fraksjon E3.1 (Tabell B.11).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H- og ¹³C-NMR-spektra av fraksjon E3.1 (NMR-spektrum C.45 og C.46).

5.2.2.11 Fraksjonering av E5

PTLC

Av fraksjon E5 ble 58,2 mg løst i aceton og påsatt på tre normal fase preparative tynnsjiktspalter med konsentreringssoner (kiselgel 60F₂₅₄).

Mobilfase: Etylacetat 95
Metanol 5
Eddiksyre 1

Båndet til komponentene i fraksjonen ble først detektert visuelt ved bestråling med UV-lys (254 nm og 366 nm), for deretter å bli avmerket og skrapet av platene. Bånd med lik farge og samme R_f-verdi ble slått sammen. Stoffene ble ekstrahert fra silikamaterialet med aceton, deretter ble silikaavskrapene filtrert fra. Løsningene ble inndampet på rotavapor og veid. Dette ga fraksjonene E5.1 og E5.2 (Tabell B.12).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektra av begge fraksjonene (NMR-spektrum C.47 og C.48), og det ble tatt ¹³C-NMR-spektrum av fraksjon E5.2 (NMR-spektrum C.49).

5.2.2.12 Videre arbeid med fraksjon E5.1

Opprensning

Fraksjon E5.1 ble løst i 1 ml metanol og injisert med en sprøyte gjennom en Sep-Pak kolonne (C₁₈-bundet silika). Deretter ble kolonnen skylt med litt metanol. Dette ga fraksjon E5.1.1.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektrum av fraksjon E5.1.1 (NMR-spektrum C.50).

5.2.2.13 Videre arbeid med fraksjon E5.2

Opprensning

Fraksjon E5.2 ble vasket med heksan 3 x 1 ml. Dette ga fraksjon E5.2.1.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektrum av fraksjonen (NMR-spektrum C.51).

Opprensning

Fraksjon E5.2.1 ble vasket med eter 3 x 1 ml. Dette ga fraksjon E5.2.1.1.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H- og ¹³C-NMR-spektra av fraksjon E5.2.1.1 (NMR-spektrum C.52 og C.53).

5.2.2.14 Fraksjonering av E5.2.1.1

Preparativ HPLC

Først ble 10 mg av fraksjon E5.2.1.1 fraksjonert ved preparativ HPLC på en omvendt fase C₁₈-bundet silikakolonne. Flythastigheten på den mobile fasen var 20 ml/min, kolonnetemperaturen var romtemperatur og deteksjonen ble foretatt ved 254 nm. Mobilfasen bestod av vann tilsatt 0,05% trifluoreddiksyre (A) og metanol (B). Gradientsystemet er vist i Tabell 1. Hovedtoppene ble samlet opp. Dette ga fraksjonene E5.2.1.1.1a og E5.2.1.1.2a (Tabell B.13). Deretter ble 2 x 10 mg av fraksjon E5.2.1.1 fraksjonert på samme måte. Dette ga fraksjonene E5.2.1.1.1b og E5.2.1.1.2b (Tabell B.14). Til sist ble fraksjon E5.2.1.1.1b fraksjonert på samme måte. Dette ga fraksjon E5.2.1.1.1b.1 (Tabell B.15).

Tabell 1. Gradientsystem for preparativ HPLC.

Tid (min)	% A	% B	Flyt (ml/min)
0	90	10	20
30	10	90	20
40	90	10	20
55	90	10	20

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektra av fraksjonene E5.2.1.1.1a, E5.2.1.1.1b.1 og E5.2.1.1.2b (NMR-spektrum C.54 og C.56), og ¹³C-NMR-spektrum av fraksjon E5.2.1.1.1b.1 (NMR-spektrum C.55).

MS

Det ble utført MS med ES for fraksjon E5.2.1.1.1a (Massespektrum D.2) og fraksjon E5.2.1.1.2b (Massespektrum D.3).

Bioassay

DPPH-testen og 15-LO testen ble utført for fraksjon E5.2.1.1.1b.1 i konsentrasjoner på 83,3 µM, 41,7 µM og 20,8 µM (Tabell B.16 og B.17). Quercetin ble brukt som positiv kontroll i 15-LO testen.

5.2.2.15 Fraksjonering av E7

PTLC

Av fraksjon E7 ble 79,8 mg løst i aceton og påsatt på fem normal fase preparative tynnsjiktplater med konsentreringssoner (kiselgel 60F₂₅₄).

Mobilfase: Etylacetat 95
 Metanol 5
 Eddiksyre 1

Båndene til komponentene i fraksjonen ble først detektert visuelt ved bestråling med UV-lys (254 nm og 366 nm), for deretter å bli avmerket og skrapet av platene. Bånd med

lik farge og samme Rf-verdi ble slått sammen. Stoffene ble ekstrahert fra silikamaterialet med aceton, deretter ble silikaavskrapene filtrert fra. Løsningene ble inndampet på rotavapor og veid. Dette ga fraksjonene E7.1 og E7.2 (Tabell B.18).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra og ^{13}C -NMR-spektra av fraksjonene E7.1 og E7.2 (NMR-spektrum C.57-C.60).

5.2.2.16 Fraksjonering av E7.2

Preparativ HPLC

Først ble 2 x 10 mg av fraksjon E7.2 fraksjonert ved preparativ HPLC på en omvendt fase C_{18} -bundet silikakolonne på samme måte som er beskrevet i avsnitt 5.2.2.14 Fraksjonering av E5.2.1.1. Hovedtoppene ble samlet opp. Dette ga fraksjonene E7.2.1 og E7.2.2 (Tabell B.19). Deretter ble fraksjon E7.2.1 fraksjonert på samme måte. Dette ga fraksjon E7.2.1.1 (Tabell B.20). Til sist ble fraksjon E7.2.2 fraksjonert på samme måte. Dette ga fraksjon E7.2.2.1 (Tabell B.21).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av fraksjonene E7.2.1, E7.2.2 og E7.2.1.1 (NMR-spektrum C.61), og ^{13}C -NMR-spektra av fraksjonene E7.2.1 og E7.2.1.1 (NMR-spektrum C.62).

Bioassay

DPPH-testen ble utført for fraksjon E7.2.1.1 i konsentrasjoner på 83,3 μM , 41,7 μM , 20,8 μM og 10,4 μM (Tabell B.22), mens 15-LO testen ble utført i konsentrasjoner på 83,3 μM , 41,7 μM og 20,8 μM (Tabell B.23). Quercetin ble brukt som positiv kontroll i 15-LO testen.

5.2.2.17 Andre fraksjonering av D5

MPLC

Av fraksjon D5 ble 1,3563 g løst i 30 ml etylacetat, filtrert på papirfilter og deretter kromatografert på en MPLC-kolonne med silika (500 x 25 mm) (Tabell B.24). Etylacetat, etylacetat - eddiksyre (100:1), etylacetat - metanol - eddiksyre (80:20:1) og aceton ble benyttet som elueringsmidler. Fraksjoner med et fraksjonsvolum på 60 ml ble samlet opp i begynnelsen, deretter ble det samlet opp fraksjoner med et fraksjonsvolum på 30 ml. I alt ble det samlet 91 fraksjoner.

Analytisk TLC

Fraksjonene 1-91 ble undersøkt ved normal fase analytisk TLC (kiselgel 60 F₂₅₄).

Mobilfase:	Etylacetat	90
	Metanol	10
	Eddiksyre	1

Utvalgte fraksjoner ble undersøkt ved normal fase analytisk TLC (kiselgel 60 F₂₅₄) med mobilfase:

Etylacetat	100
Maursyre	11
Eddiksyre	11
Vann	27

Platene ble sprayet med DPPH-løsning. Fraksjoner som så ut til å inneholde de samme komponentene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor. Dette ga fraksjonene F1-F9 (Tabell B.24).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H- og ¹³C-NMR-spektra av alle fraksjonene unntatt fraksjon F9 (NMR-spektrum C.65-C.70). Ved istandlagning av NMR-prøvene ble fraksjonene F1 og F4 slått sammen ved en feiltagelse, og det ble dermed tatt NMR-spektra av denne blandingen (NMR-spektrum C.63 og C.64).

Analytisk HPLC

Fraksjonene F2, F5, F6, F7 og F8 (1 µg) ble undersøkt ved analytisk HPLC på en omvendt fase C₁₈-bundet silikakolonne. Flythastigheten på den mobile fasen var 1 ml/min, kolonnetemperaturen var 25°C og deteksjonen ble foretatt ved 254 nm. Mobilfasen bestod av vann tilsatt 0,05% trifluoreddiksyre (A) og acetonitril (B). Gradientsystemet er vist i Tabell 2.

Tabell 2. Gradientsystem for HPLC av fraksjonene F2, F5, F6, F7 og F8.

Tid (min)	% A	% B	Flyt (ml/min)
0	90	10	1
30	10	90	1
40	90	10	1
55	90	10	1

5.2.2.18 Fraksjonering av F1, F3 og F4

MPLC

Av de sammenslåtte fraksjonene F1, F3 og F4 ble 0,1786 g løst i 8 ml metanol - vann (1:1) og kromatografert på en MPLC-kolonne med omvendt fase silika (400 x 25 mm) (Tabell B.25). 25%, 40% og 100% metanol ble benyttet som elueringsmidler.

Hovedsakelig ble fraksjoner med et fraksjonsvolum på 20 ml samlet opp. I alt ble det samlet 78 fraksjoner.

DPPH spraying

Fraksjonene 0-77 ble undersøkt ved at de ble applisert på en tynnslåttplate. Deretter ble platene sprayet med DPPH-løsning. Fraksjoner som så ut til å ha lik aktivitet ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor. Dette ga fraksjonene G1-G6 (Tabell B.25).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av alle fraksjonene unntatt fraksjonene G1 og G5 (NMR-spektrum C.71, C.73 og C.75), og ^{13}C -NMR-spektra av fraksjonene G2-G4 (NMR-spektrum C.72 og C.74).

Analytisk HPLC

Fraksjon G3 (1 μg) ble undersøkt ved analytisk HPLC på en omvendt fase C_{18} -bundet silikakolonne på samme måte som beskrevet i avsnitt 5.2.2.17 Andre fraksjonering av D5.

5.2.2.19 Fraksjonering av G3**Preparativ HPLC**

Først ble 10 mg av fraksjon G3 fraksjonert ved preparativ HPLC på en omvendt fase C_{18} -bundet silikakolonne på samme måte som er gitt i avsnitt 5.2.2.14 Fraksjonering av E5.2.1.1. Hovedtoppen ble samlet opp. Dette ga fraksjon G3.1 (Tabell B.26). Deretter ble 4 x 10 mg av fraksjon G3 fraksjonert på samme måte. Hovedtoppen ble samlet opp i tre ulike fraksjoner; de to sidene og hoveddelen av toppen. Dette ga fraksjonene G3.1a, G3.1b og G3.1c (Tabell B.27). Deretter ble 3 x 10 mg av fraksjon G3.1b fraksjonert på samme måte. Hovedtoppen ble samlet opp på samme måte i tre ulike fraksjoner. Dette ga fraksjonene G3.1b.1, G3.1b.2 og G3.1b.3 (Tabell B.28). Til sist ble 10 mg av fraksjon G3.1b.1 fraksjonert på samme måte. Hovedtoppen ble samlet opp på samme måte i tre ulike fraksjoner. Dette ga fraksjonene G3.1b.1a, G3.1b.1b og G3.1b.1c (Tabell B.29).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av fraksjonene G3.1, G3.1b.1 og G3.1b.1a (NMR-spektrum C.76 og C.77).

5.2.2.20 Fraksjonering av D7**MPLC**

Av fraksjon D7 ble 1,0 g løst i 15 ml metanol og kromatografert på en MPLC-kolonne med omvendt fase silika (400 x 25 mm) (Tabell B.30). 20%, 40%, 60%, 80% og 100% metanol ble benyttet som elueringsmidler. Hovedsakelig ble fraksjoner med et fraksjonsvolum på 20 ml samlet opp. I alt ble det samlet 114 fraksjoner.

DPPH spraying

Fraksjonene 0-113 ble undersøkt ved at de ble applisert på en tynnsjiktplate. Deretter ble platene sprayet med DPPH-løsning. Fraksjoner som så ut til å ha lik aktivitet ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor. Dette ga fraksjonene H1-H9 (Tabell B.30).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H - og ^{13}C -NMR-spektra av fraksjonene H2-H6 (NMR-spektrum C.78-C81, C.85-C.88, C.92 og C.93). I tillegg ble det tatt COSY-, HETCOR- og APT-NMR-spektra av fraksjonene H3 og H5 (NMR-spektrum C.82-C.84 og C.89-C.91).

Analytisk HPLC

Fraksjonene H3 og H5 ble undersøkt ved analytisk HPLC på en omvendt fase C_{18} -bundet silikakolonne på samme måte som beskrevet i avsnitt 5.2.2.17 Andre fraksjonering av D5.

5.2.2.21 Fraksjonering av H3**Kolonnekromatografi uten bruk av trykk**

Av fraksjon H3 ble 0,3464 g løst i 1-2 ml metanol og kromatografert på en kolonne med omvendt fase silika (290 x 25 mm) (Tabell B.31). 40%, 100% metanol og aceton ble benyttet som elueringsmidler. Hovedsakelig ble fraksjoner med et fraksjonsvolum på ca. 5 ml ble samlet opp. Gjenværende stoff på kolonnen ble skylt ut med 0,2 l metanol og 0,05 l aceton. I alt ble det samlet 53 fraksjoner.

DPPH spraying

Fraksjonene 0-52 ble undersøkt ved at de ble applisert på en tynnslipplate. Deretter ble platene sprayet med DPPH-løsning.

Analytisk HPLC

Noen av fraksjonene 0-52 ble undersøkt ved analytisk HPLC på en omvendt fase C_{18} -bundet silikakolonne på samme måte som beskrevet i avsnitt 5.2.2.17 Andre fraksjonering av D5. Fraksjoner som så ut til å ha lik DPPH-aktivitet og lignende sammensetning basert på HPLC ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor. Dette ga fraksjonene I1-I5 (Tabell B.31).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av alle fraksjonene unntatt fraksjon I1 (NMR-spektrum C.94, C.96 og C.98), og ^{13}C -NMR-spektra av fraksjonene I2-I4 (NMR-spektrum C.95).

5.2.2.22 Fraksjonering av H5**Preparativ HPLC**

Først ble 10 mg av fraksjon H5 fraksjonert på en omvendt fase C_{18} -bundet silikakolonne på samme måte som er gitt i avsnitt 5.2.2.14 Fraksjonering av E5.2.1.1. Hovedtoppen ble samlet opp. Dette ga fraksjon H5.1a (Tabell B.32). Deretter ble 2 x 10 mg av fraksjon H5 fraksjonert på samme måte. Hovedtoppen ble samlet opp. Dette ga fraksjon H5.1b (Tabell B.33). Til sist ble fraksjon H5.1b fraksjonert på samme måte. Dette ga fraksjon H5.1b.1 (Tabell B.34).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av fraksjonene H5.1 og H5.1b.1 og ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon H5.1b.1 (NMR-spektrum C.99 og C.100).

MS

Det ble utført MS med ES for fraksjon H5.1b.1 (Massespektrum D.4).

Bioassay

DPPH-testen og 15-LO testen ble utført for fraksjon H5.1b.1 i konsentrasjoner på 83,3 μM , 41,7 μM og 20,8 μM (Tabell B.35 og B.36). Quercetin ble brukt som positiv kontroll i 15-LO testen.

5.2.2.23 Fraksjonering av I2**Preparativ HPLC**

Av fraksjon I2 ble 20 mg fraksjonert ved preparativ HPLC på en omvendt fase C_{18} -bundet silikakolonne på samme måte som beskrevet i avsnitt 5.2.2.14 Fraksjonering av E5.2.1.1. Hovedtoppen ble samlet opp. Dette ga fraksjon I2.1 (Tabell B.37).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H - og ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon I2.1 (NMR-spektrum C.101 og C.102).

MS

Det ble utført MS med ES for fraksjon I2.1 (Massespektrum D.5).

Bioassay

DPPH-testen ble utført for fraksjon I2.1 i konsentrasjoner på 83,3 μM , 41,7 μM , 20,8 μM og 10,4 μM (Tabell B.38), mens 15-LO testen ble utført i konsentrasjoner på 83,3 μM , 41,7 μM , 20,8 μM (Tabell B.39). Quercetin ble brukt som positiv kontroll i 15-LO testen.

5.2.2.24 Fraksjonering av I3**Preparativ HPLC**

Av fraksjon I3 ble 10 mg fraksjonert på en omvendt fase C_{18} -bundet silikakolonne på samme måte som beskrevet i avsnitt 5.2.2.14 Fraksjonering av E5.2.1.1. Hovedtoppen ble samlet opp. Dette ga fraksjon I3.1 (Tabell B.40).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektrum av fraksjon I3.1 (NMR-spektrum C.103).

5.2.2.25 Kvantifisering av bergenin i planten

Innholdet av bergenin i plantematerialet ble bestemt ved å benytte en modifisert versjon av en HPLC-metode beskrevet av Reddy et al (Reddy et al. 1999). Først ble det laget en standardkurve for bergenin monohydrat ved å injisere løsninger (20 µl) med konsentrasjonene 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml og 100 µg/ml med tre paralleller av hver konsentrasjon. En omvendt fase C₁₈-bundet silikakolonne ble brukt i systemet. Flythastigheten på den mobile fasen var 1 ml/min, kolonnetemperaturen var 25°C og monitoreringen ble foretatt ved 254 nm. Analysetiden var 40 minutter. Mobilfasen bestod av vann tilsatt 0,05% trifluoreddiksyre (A) og acetonitril (B). Gradientsystemet er vist i Tabell 3.

Tabell 3. Gradientsystem for standardløsninger av bergenin.

Tid (min)	% A	% B	Flyt (ml/min)
0	95	5	1
20	80	20	1
25	95	5	1
40	95	5	1

Standardkurven ble laget ved at arealet under kurven for bergenintoppen ble satt som funksjon av konsentrasjonen.

Deretter ble det laget to paralleller med råekstrakt av plantematerialet. Det ble veid opp 1,0047 g for råekstrakt-1 og 1,0022 g for råekstrakt-2. Hvert av disse ble tilsatt 50 ml metanol i en rundkolbe og satt til koking på varmemantel med tilbakeløp i 30 minutter. Etter avkjøling ble løsningene filtrert på papirfilter. Drogerestene ble på nytt satt til koking sammen med papirfilteret i 50 ml metanol i 30 minutter. Etter avkjøling ble løsningene filtrert på nytt og filtratet ble kombinert med det første filtratet. Volumet av de to filtratene ble korrigert med metanol til 100 ml. Deretter ble drogerestene satt til koking en siste gang sammen med papirfiltrene i 50 ml metanol i 30 minutter. Etter avkjøling ble løsningene filtrert for siste gang, men dette tredje filtratet ble ikke kombinert med de to første. Volumet av det tredje filtratet ble korrigert med metanol til 50 ml.

Det tredje filtratet av råekstrakt-1 ble injisert på det samme HPLC-systemet som det som ble brukt for standardløsningene. Deretter ble det samlede første og andre filtratet av råekstrakt-1 injisert på det samme systemet.

Deretter ble de tre filtratene kombinert, og utgjorde da et samlet volum på 150 ml. Av hvert ekstrakt ble 100 µl fortynnet med 900 µl metanol. De fortynnede prøvene av råekstrakt-1 og råekstrakt-2 ble deretter injisert på HPLC-systemet med like parametre som for standardløsningene, med unntak av at det ble gjort en endring i gradienten på slutten for å vaske ut alt ekstraktet av kolonnen. Dette bidro til at analysetiden ble 60 minutter. Gradientsystemet er vist i Tabell 4.

Tabell 4. Gradientsystem for råekstrakt.

Tid (min)	% A	% B	Flyt (ml/min)
0	95	5	1
20	80	20	1
25	10	90	1
40	10	90	1
45	95	5	1
60	95	5	1

For råekstrakt-1 ble det utført tre paralleller 48 timer etter tillaging av ekstraktet og tre paralleller 72 timer etter tillaging av ekstraktet. For råekstrakt-2 ble det utført tre paralleller 72 timer etter tillaging av ekstraktet. På bakgrunn av standardkurven ble innholdet av bergenin i plantematerialet beregnet.

Til slutt ble det laget et nytt ekstrakt, råekstrakt-3, på samme måte som de forrige. Det ble veid opp 1,0007 g for råekstrakt-3. Denne gangen ble alle tre filtratene kombinert. Fortynnede prøver av råekstrakt-3 ble injisert på det samme HPLC-systemet samme dag som ekstraktet ble laget. På bakgrunn av standardkurven ble innholdet av bergenin i plantematerialet beregnet.

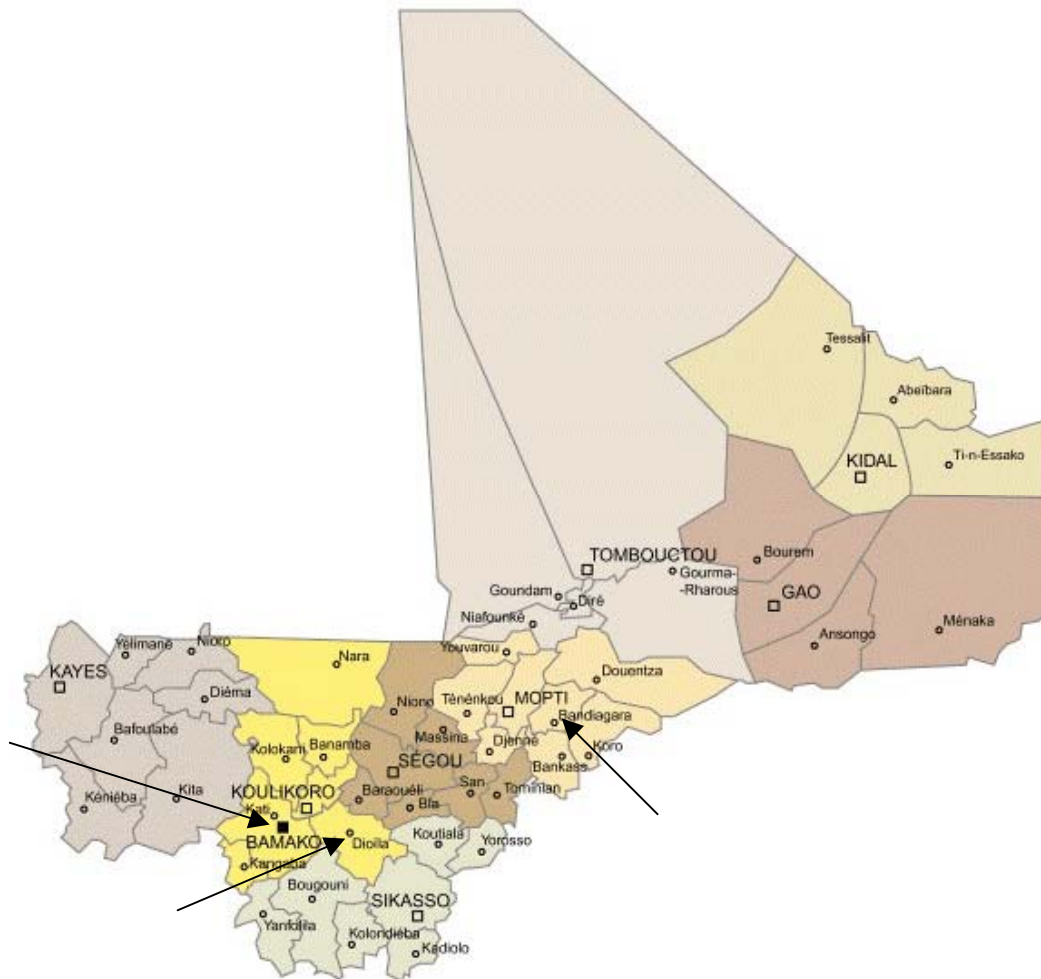
5.2.3 Etnofarmakologiske studier

5.2.3.1 Feltarbeid i Mali

Feltarbeidet ble utført over en 5-ukers periode i november og desember 2002. Målet med arbeidet var å samle inn informasjon om bruk av planter ved sårbehandling og om bruk av plantene *Combretum glutinosum*, *Stereospermum kunthianum*, *Lannea velutina* og *Diospyros abyssinica*. Plantene ble valgt ut fordi de benyttes som medisinplanter. Arbeidet ble utført på ulike steder (Figur 13):

- Ved DMT i Bamako i det sør-vestlige Mali
- I Dioila i det sørlige Mali
- I Bandiagara i det østlige Mali

Ved DMT bestod arbeidet av enkle screeningundersøkelser av rotbark fra *D. abyssinica*. I Dioila og Bandiagara bestod arbeidet av intervjuer med tradisjonelle healere. Temaet for intervjuene var sår og sårbehandling, samt medisinsk bruk av *C. glutinosum*, *S. kunthianum*, *L. velutina* og *D. abyssinica*. Først ble healerne spurt om hvilke planter de benyttet til behandling av sår og om hvordan disse ble brukt. Deretter ble de spurt om de kjente til noen av plantene vi var spesielt interessert i (nevnt over) og/eller om de brukte disse medisinsk. Ved eventuell bruk av plantene, ble de til sist bedt om å fortelle om indikasjonen og bruksmåten for de nevnte plantene.



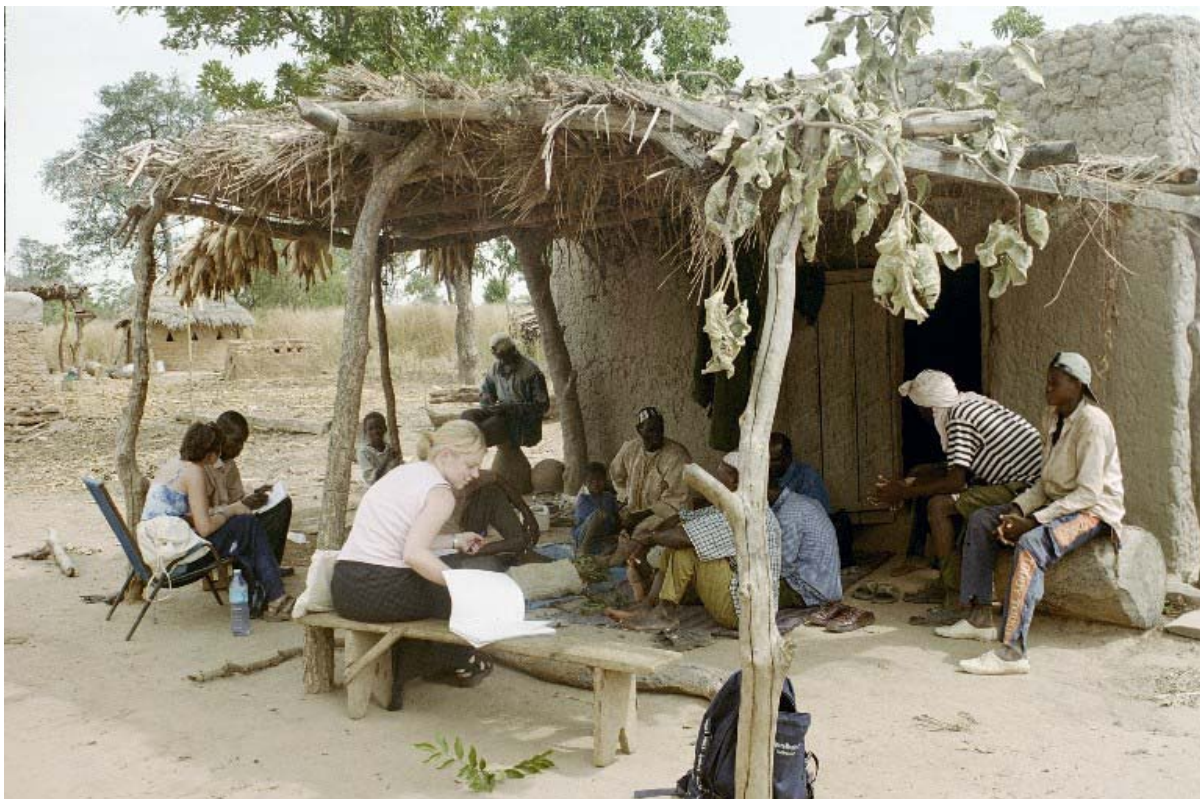
Figur 13. Kart over Mali.

5.2.3.1.1 *Dioula*

Første del av feltarbeidet ble utført i Dioula. Healerintervjuene ble foretatt i tidsrommet 14.11.2002 til 20.11.2002. Totalt 50 healere fra seks ulike landsbyer ble intervjuet. Med på reisen var tre personer fra DMT; Ababacar Maiga, Seydou Dembelé og Faguibi Sidibé, i tillegg til to lokalkjente personer; Adama Konaté og Souleyman Togola.



Figur 14. Bilde fra healerintervju i Dioila-området.



Figur 15. Bilde fra healerintervju i Dioila-området.

5.2.3.1.2 *Bandiagara*

Andre del av feltarbeidet ble utført i Bandiagara. Healerintervjuene ble foretatt i tidsrommet 29.11.2002 til 01.12.2002. Totalt 18 healere fra fem ulike landsbyer ble intervjuet. INRSP har et forskningssenter i Bandiagara og dette ble brukt som base. Med på reisen var Ababacar Maiga og Seydou Dembelé. Det var i tillegg nødvendig med en tolk i dette området, Akouni Dougnon, fordi det brukes mange ulike lokale dialekter der.

5.2.3.2 Fytokjemisk screening

Screeningundersøkelser av rotbarken til *D. abyssinica* ble utført ved DMT (Paris og Moyse 1976). En tekniker ved navn Sanogo Fagnan hjalp til med utføringen av disse undersøkelsene, som forøvrig foretas rutinemessig for alle planter som undersøkes ved DMT.



Figur 16. Bilde fra laboratoriet ved DMT.

5.2.3.2.1 *Cyanogene glykosider*

Droge (1 g) ble veid inn i et reagensrør. Toluen - vann (1:1) (10 ml) ble tilsatt, deretter ble blandingen ristet. Den øverste delen av reagensrøret ble rensset med en kompress, deretter ble et papir (gult) fuktet med Guignardreagens og festet i toppen av røret.

Røret ble satt til henstand i 10 minutter. Rød farge på papiret indikerte tilstedeværelse av cyanogene glykosider.

5.2.3.2.2 Kumariner

Først ble det laget et ekstrakt: Droge (1 g) ble veid inn i en erlenmeyerkolbe og tilsatt 20 ml etyleter. Kolben ble dekket til, omrystet og satt til henstand ved romtemperatur i 24 timer. Deretter ble blandingen filtrert og det ble tilsatt eter ad 20 ml.

Filtratet (5 ml) ble inndampet til tørrhet ved 110°C i varmeovn. Deretter ble det tilsatt 2 ml varmt vann og rørt godt i løsningen. Løsningen ble fordelt i to reagensrør. I det ene røret ble det tilsatt 0,5 ml 25 % ammoniakk (NH₄OH). Løsningen ble blandet godt før eventuell fluorescens ble observert visuelt under UV-lys ved 366 nm. Det andre røret fungerte som blankprøve. En intens fluorescens i prøverøret indikerte tilstedeværelse av kumariner.

5.2.3.2.3 Karotenoider

Eterekstraktet som ble laget ved test for tilstedeværelse av kumariner (5 ml) (5.2.3.2.2 Kumariner) ble inndampet til tørrhet ved 110°C i varmeovn. Residuet ble tilsatt 2-3 dråper av en blanding av antimonklorid og kloroform (SbCl₃ + CHCl₃). Fargeforandring fra blå til rød løsning indikerte tilstedeværelse av karotenoider.

5.2.3.2.4 Alkaloider

Bouchardat-Mayer-Dragendorff reaksjon:

Droge (10 g) ble veid inn i en erlenmeyerkolbe 1 og tilsatt 50 ml 10% svovelsyre (H₂SO₄). Deretter ble 3 g droge veid inn i en erlenmeyerkolbe 2 og tilsatt 30 ml 10% svovelsyre (H₂SO₄). Blandingene ble satt til henstand i 24 timer for macerasjon.

Maceratene ble filtrert, og det ble skylt etter med vann ad henholdsvis 50 og 30 ml. Dette ga filtrat 1 (50 ml) og filtrat 2 (30 ml). To reagensrør ble merket D og M, og tilsatt 1 ml filtrat 1. Det samme ble gjentatt for filtrat 2, destillert vann (blankprøve) og stryknin (positiv kontroll). Dette ga til sammen åtte reagensrør. De fire rørene merket D ble tilsatt 5 dråper Dragendorff reagens (vandig kaliumjodbismutat), og de fire rørene merket M ble tilsatt 5 dråper Mayer reagens (vandig kalium merkurijodid). Rørene ble satt til henstand i 10 minutter. Eventuelle utfellinger ble detektert visuelt og indikerte tilstedeværelsen av alkaloider. Mengde utfelling ble vurdert for kvantitativ bestemmelse.

Bekreftelsestest:

Av filtrat 1 ble 25 ml overført til skilletrakt og pH ble justert til pH 8-9 med ammoniakk (NH₄OH). Deretter ble det ekstrahert med 3 x 25 ml kloroform. Den organiske fasen ble samlet opp og tørket med vannfri natriumsulfat. Blandingene ble

filtrert og filtratet ble fordelt i to begerglass. Deretter ble de inndampet til tørrhet i varmeovn.

Ett av begerglassene ble tilsatt 1 ml salpetersyre (HNO_3) og inndampet til tørrhet. Etter avkjøling ble det tilsatt 10 ml aceton og 5 dråper 5% etanolisk kaliumhydroksid (KOH). Lilla farge som detekteres visuelt indikerte tilstedeværelse av estere av tropasyre og tropanol (Vitali-Morin reaksjon).

Det andre begerglasset ble tilsatt 2 ml 10% saltsyre (HCl) og løsningen ble fordelt i to reagensrør. Det ble tilsatt henholdsvis 5 dråper Dragendorff reagens og 5 dråper Mayer reagens til de to reagensrørene. Eventuell utfelling som indikerte tilstedeværelse av alkaloider ble detektert visuelt.

5.2.3.2.5 Saponiner

Droge (1 g) ble tilsatt 100 ml destillert vann i en erlenmeyerkolbe. Deretter ble blandingen satt til koking på varmemantel i 15 minutter. Dekoktet ble filtrert på bomull, og etter avkjøling ble det skylt etter med destillert vann ad 100 ml. En serie på ti reagensrør ble nummerert fra 1-10 og tilsatt 1, 2, 10 ml dekokt. Deretter ble rørene tilsatt destillert vann ad 10 ml. Hvert rør ble ristet i 15 sekunder, 2 rist per sekund. Etterpå ble rørene satt til henstand ved romtemperatur i 15 minutter. Høyden på skummet i hvert rør ble avlest. Røret der høyden på skummet var 1 cm, indikerte verdien av skumindeksen. På denne måten kvantifiserte testen saponiner på bakgrunn av deres evne til å danne skum i løsning.

$$\text{Skum indeks} = 1000/\text{rørnummer}$$

5.2.3.2.6 Steroler og triterpener

Eterekstraktet som ble laget ved test for tilstedeværelse av kumariner (10 ml) (5.2.3.2.2 Kumariner) ble inndampet til tørrhet ved 110°C i varmeovn. Deretter ble det tilsatt 1 ml kloroform og 1 ml eddiksyreanhydrid. Løsningen ble fordelt i to reagensrør. Det ene røret fungerte som prøve og det andre fungerte som blankprøve. Prøverøret ble tilsatt 1 ml konsentrert svovelsyre i bunnen av røret ved hjelp av en pipette. En rødbrun eller fiolett ring i kontaktsonen mellom de to fasene i reagensrøret indikerte tilstedeværelse av steroler og triterpener.

5.2.3.2.7 Hjerteglykosider

Droge (1 g) ble veid inn i et reagensrør, 10 ml 60% etanol og 5 ml 10% blyacetat ble tilsatt. Deretter ble røret lukket ved hjelp av en kork og omrystet. Reagensrøret ble deretter satt på vannbad i 10 minutter. Løsningen ble filtrert gjennom bomull som var fuktet med vann. Filtratet ble ristet med 10 ml kloroform i skilletrakt. Den organiske fasen ble fordelt i tre reagensrør; B, K og R og dampet inn til tørrhet på vannbad. Deretter ble residuene i alle rørene tilsatt 0,4 ml isopropanol. Rør B ble tilsatt 1 ml

Baljet reagens, rør K ble tilsatt 1 ml Kedde reagens og rør R ble tilsatt 1 ml Raymond Marthout reagens. Alle rør ble deretter tilsatt 4 dråper 5% etanolisk kaliumhydroksid (Bornträger reaksjon). Eventuell fargeforandring i rørene ble detektert visuelt etter 15 minutter. Oransjefarget løsning i rør B, rødfarget løsning i rør K og fiolett farget løsning i rør R indikererte tilstedeværelse av hjerteglykosider.

5.2.3.2.8 Vanninnhold

Tørketap:

Droge (1-2 g) ble veid inn i en tarert beholder. Deretter ble prøven tørket ved 110°C i 24 timer. Etter avkjøling ble beholderen med prøven veid på nytt. Forskjellen i vekt tilsvarte vanninnholdet og ble regnet ut etter følgende formel:

$$\text{Vanninnhold} = m_1 - m_2$$

m_1 = initiell vekt av beholder med droge

m_2 = sluttvekt av beholder med prøve

$$\% \text{ vanninnhold} = (\text{vanninnhold} / \text{innveid mengde droge}) \times 100\%$$

Volumetrisk metode:

Toluen (100 ml) ble overført til en rundkolbe. Vann (1 ml) ble tilsatt og blandingen ble satt til koking på varmemantel i 1 time. Deretter ble blandingen avkjølt i 30 minutter. Volumet av det fordampede vannet som hadde samlet seg i oppsamlingskolben ble målt. Deretter ble 5 g droge tilsatt og blandingen ble satt til koking i 1 time. Deretter ble den avkjølt før volumet av det fordampede vannet ble avlest på nytt. Vanninnholdet ble regnet ut etter følgende formel:

$$\% \text{ vanninnhold} = ((V_2 - V_1) / m) \times 100\%$$

V_1 = initielt volum av fordampet vann

V_2 = sluttvolum av fordampet vann

m = innveid mengde droge

5.2.3.2.9 Mineralinnhold

Droge (2 g) ble veid inn i en tarert kvartsbeholder. Deretter ble prøven satt til henstand i forbrenningsovn ved 800°C til det bare var hvit aske igjen i beholderen (5 timer). Etter avkjøling i eksikator ble beholderen med prøve veid. Totalt mineralinnhold ble regnet ut etter følgende formel:

$$\% \text{ mineralinnhold} = ((m_2 - m_1) / M) \times 100\%$$

M = vekt innveid droge (g)

m_1 = vekt av beholder (tara) (g)

m_2 = vekt av beholder med droge/aske etter forbrenning (g)

5.2.3.2.10 Andre screeningtester

I tillegg til testene som er nevnt over ble det utført flere screeningtester på plantematerialet. Metodene for disse er ikke beskrevet da testene i sin helhet ble utført av laboranter ved DMT.

6 Resultat og diskusjon

6.1 Råekstrakt

Væskeekstraksjon

Suksessiv ekstraksjon med petroleumseter, diklormetan, kloroform, metanol og 80% etanol ga fem ekstrakt (ekstrakt A1-A5). Påfølgende ekstraksjon med vann 50°C og 100°C ga to ekstrakt (ekstrakt A6 og A7).

Den suksessive ekstraksjonen av plantematerialet medførte at dets innholdsstoff ble fordelt mellom løsningsmidler av ulik polaritet. De upolare forbindelsene ble ekstrahert over i petroleumseter, diklormetan og kloroform, mens de polare forbindelsene ble ekstrahert over i metanol, 80% etanol, vann 50°C og vann 100°C. Dette medførte en grovfraksjonering av innholdstoffene i plantematerialet.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret til det upolare diklormetaneekstraktet (ekstrakt A2) (NMR-spektrum C.1) viste at det inneholdt en del fett, som vises som signaler rundt 1,28 ppm som er karakteristisk for alkankjeder. Fettet var hovedsakelig mettet da man ellers ville forventet å finne signaler karakteristisk for olefiniske protoner rundt 5,4 ppm. I tillegg hadde spekteret utslag i aromat- og olefinområdet som ligger på 5-8 ppm. Ekstrakt A2 inneholdt også en del terpenoider, disse kjennetegnes ved singletter i området 0,6-1,8 ppm. Disse skyldes metylgruppene i terpenoidene. ¹³C-NMR-spekteret til ekstraktet (NMR-spektrum C.2) bekreftet de funnene som ble gjort i protonspekteret. ¹H- og ¹³C-NMR-spektrene til kloroform (ekstrakt A3) og til petroleumseter (ekstrakt A1) viste at de inneholdt mye av det samme som ekstrakt A2, men ekstrakt A1 så ut til å inneholde mer terpenoider enn de to andre ekstraktene.

¹H-NMR-spekteret til etanolekstraktet (ekstrakt A5) (NMR-spektrum C.3) indikerte innhold av karbohydrater basert på signaler i området 3,2-4,2 ppm, samt at karbohydratenes anomerprotoner gir signaler i området 4,5-5,5 ppm. Ekstraktet ga få fett- og terpenoidsignaler. Signalet på 3,92 ppm tydet på en aromatisk metoksygruppe. I tillegg hadde spekteret tydelige signaler i aromat- og olefinområdet. ¹³C-NMR-spekteret til ekstraktet bekreftet de funnene som ble gjort i protonspekteret (NMR-spektrum C.4). ¹H- og ¹³C-NMR-spektrene til metanolekstraktet (ekstrakt A4) viste at dette ekstraktet lignet etanolekstraktet.

¹H-NMR-spekteret til vann 50°C-ekstraktet (ekstrakt A6) (NMR-spektrum C.5) viste at ekstraktet hovedsakelig inneholdt karbohydrater. I tillegg hadde spekteret noen svake aromatiske signaler. Tilsvarende gjaldt også for vann 100°C-ekstraktet (ekstrakt A7), men i tillegg hadde dette spekteret signaler i alifatområdet. Dette tydet på at ekstraktet inneholdt fett.

Bioassay

De polare ekstraktene viste seg å ha høyere radikalscavengeraktivitet enn de upolare ekstraktene. 80% etanol- og metanolekstraktet viste høyest radikalfangende evne, med IC_{50} -verdier på henholdsvis $16 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ og $16,6 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$ (Tabell 5). Med hensyn på hemming av 15-LO viste også her 80% etanol- og metanolekstraktet høyest aktivitet, med IC_{50} -verdier på henholdsvis $21 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ og $16 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ (Tabell 6). I dette tilfellet var det ikke et klart skille mellom polare og upolare ekstrakter, og det er tydelig at planten inneholder lipofile enzymhemmere da diklormetaneekstraktet viste høy aktivitet i 15-LO testen.

Tabell 5. Radikalscavengeraktivitet til rækstraktene av *D. abyssinica* (Maiga et al. under utarbeidelse).

Ekstrakt	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	SD
A1 (petroleumseter)	>167	-
A2 (diklormetan)	>167	-
A3 (kloroform)	>167	-
A4 (metanol)	16,6	0,4
A5 (80% etanol)	16	2
A6 (vann 50°C)	29	2
A7 (vann 100°C)	21	2

Tabell 6. Hemming av 15-LO til rækstraktene av *D. abyssinica* (Maiga et al. under utarbeidelse).

Ekstrakt	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	SD
A1 (petroleumseter)	62	4
A2 (diklormetan)	27	3
A3 (kloroform)	44	2
A4 (metanol)	16	1
A5 (80% etanol)	21	2
A6 (vann 50°C)	105	7
A7 (vann 100°C)	86	7

På bakgrunn av at metanolekstraktet (ekstrakt A5) hadde høy DPPH-scavengeraktivitet og høy aktivitet med hensyn på hemming av 15-LO ble dette ekstraktet valgt ut til videre arbeid. Dette ble støttet av NMR-spektrene som viste tydelige signaler i aromat- og olefinområdet. Dette kunne skyldes innhold av fenoliske forbindelser, og disse har ofte antioksidantaktivitet (Halliwell og Gutteridge 1999).

6.2 Fraksjonering av A4

Kolonnekromatografi uten bruk av trykk

Ekstrakt A4 ble kromatografert over Diaion HP20. Fra Diaion-kolonnen ble det samlet opp 20 fraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene B1-B8 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying. Samlet utbytte fra Diaion HP20 kolonnen var 38,4 g (99,1%) av påsatte ekstrakt A4 (Tabell B.1).

Ved bruk av Diaion HP20 som kolonnemateriale ble de mer polare forbindelsene i prøven eluert ut først. De påfølgende fraksjonene inneholdt stoff som hadde en gradvis reduksjon i polaritet.

Analytisk TLC

Analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying viste innhold av radikalscavengere i alle fraksjonene unntatt B1.

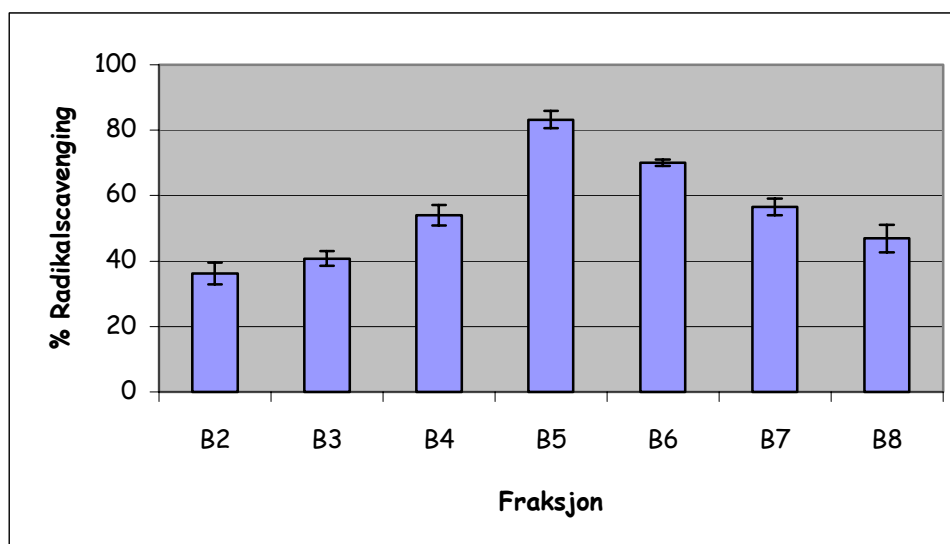
NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spektrene til fraksjonene B2 (NMR-spektrum C.6) og B3 viste innhold av hovedsakelig karbohydrater. Dette ble understøttet av ¹³C-NMR-spektrene (NMR-spektrum C.7).

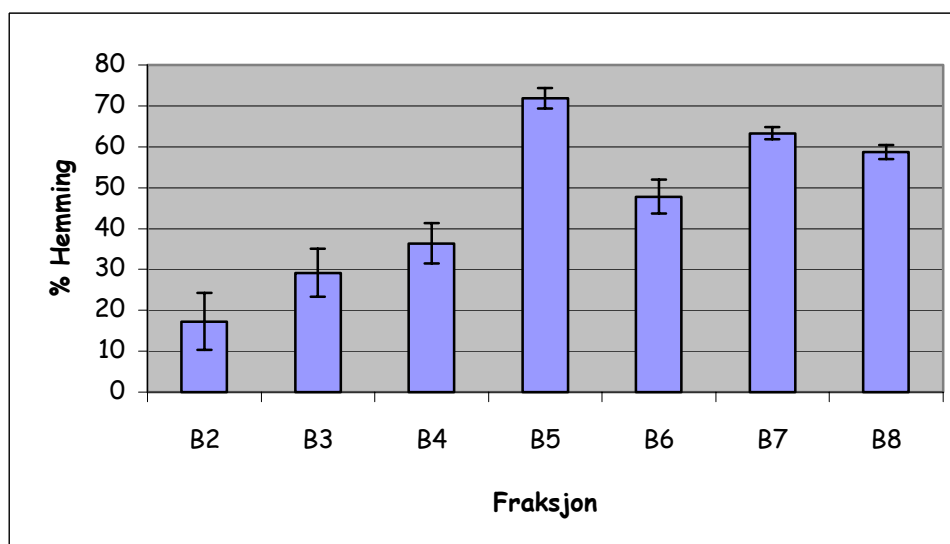
På bakgrunn av ¹H- og ¹³C-NMR-spektrene til fraksjon B4 (NMR-spektrum C.8 og C.9) var det trolig at også denne fraksjonen inneholdt en del karbohydrater. I tillegg hadde spektrene tydelige signaler i aromat- og olefinområdet, samt mindre utslag i alifatområdet. Fraksjonene B5-B7 lignet fraksjon B4 ut fra NMR-spektrene, men de inneholdt mindre karbohydrater, samt at de ikke inneholdt fett, da de manglet signaler i området 20-40 ppm i karbonspektrene (NMR-spektrum C.10 og C.11). I tillegg manglet de det normale signalet for C₆ i karbohydrater som ligger i området 60-65 ppm. I stedet hadde spektrene et signal ved 18 ppm som er forenlig med et 6-deoksysukker. ¹H-NMR-spekteret til fraksjon B8 viste at denne fraksjonen også lignet på fraksjonene B4-B7, med unntak av at den i tillegg så ut til å inneholde litt terpenoider.

Bioassay

Fraksjonene B4-B7 viste høyest radikalfangende evne, med IC₅₀-verdier på under 20,8 µg/ml (Tabell B.2 og Figur 17). Derimot var det fraksjonene B5, B7 og B8 som hadde høyest aktivitet med hensyn på hemming av 15-LO, også her med IC₅₀-verdier på under 20,8 µg/ml (Tabell B.3 og Figur 18). Samtlige 15-LO hemmingsverdier var signifikante på 5% nivå (P<0,05).



Figur 17. Radikalscavenging ved 20,8 $\mu\text{g/ml}$ for fraksjonene B2-B8.



Figur 18. Hemming av 15-LO ved 20,8 $\mu\text{g/ml}$ for fraksjonene B2-B8.

Av alle fraksjonene veide fraksjon B5 mest (Tabell B.1). I tillegg var denne fraksjonen en av de mest aktive i bioassayene. I henhold til de tydelige signalene i aromat- og olefinområdet i NMR-spektrene inneholdt fraksjonen trolig fenoliske forbindelser. Derfor ble denne fraksjonen valgt ut til videre fraksjonering.

6.3 Fraksjonering av B5

Kolonnekromatografi uten bruk av trykk

Fraksjon B5 ble kromatografert over Sephadex LH-20. Fra Sephadex-kolonnen ble det samlet opp 30 fraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene C1-C13 på bakgrunn av utfellingsreaksjoner og analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying. Samlet utbytte var 10,93 g (85,3%) av påsatte fraksjon B5 (Tabell B.4).

Ved bruk av Sephadex LH-20 som kolonnemateriale er elueringsrekkefølgen noe utforutsigbar på grunn av at det skjer en separasjon basert dels på eksklusjonskromatografi og dels ved adsorpsjon av aromatiske forbindelser. I dette tilfellet ble karbohydrater eluert ut først. De påfølgende fraksjonene inneholdt en gradvis økende andel av aromatiske forbindelser.

Analytisk TLC

Analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying viste innhold av radikalscavengere i alle fraksjonene unntatt fraksjon C1.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret til fraksjon C1 (NMR-spektrum C.12) viste hovedsakelig innhold av karbohydrater. I tillegg hadde spekteret noen alifatiske signaler og noen signaler i aromat- og olefinområdet. ¹H-NMR-spekteret til fraksjon C2 viste at den lignet fraksjon C1, men unntak av at spekteret ikke hadde signaler i alifatområdet. ¹³C-NMR-spekteret understøttet dette (NMR-spektrum C.13).

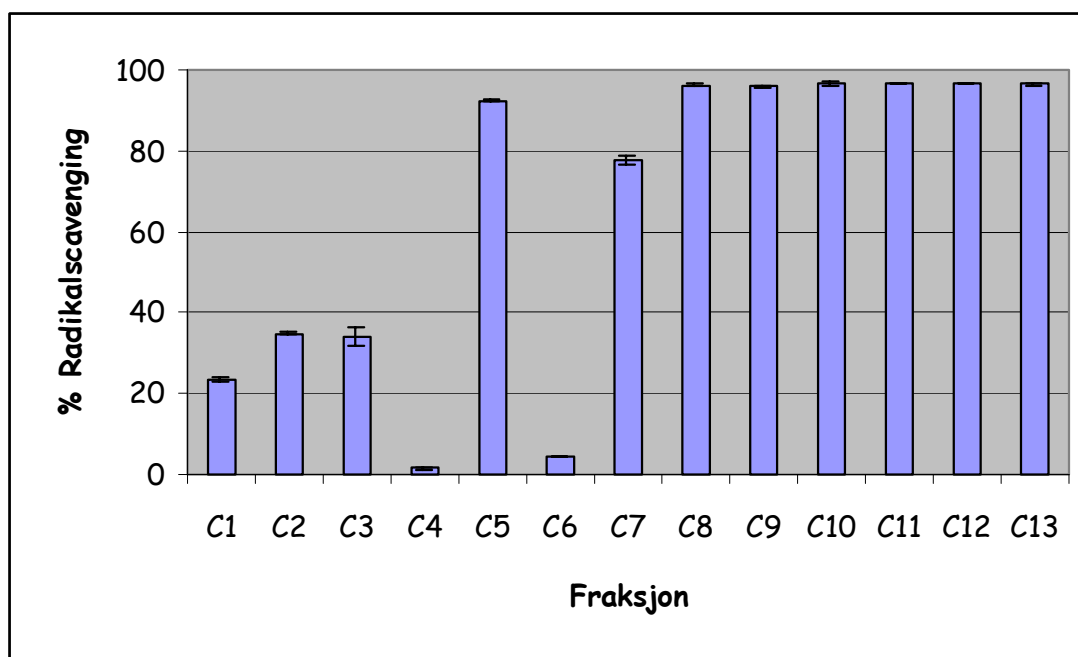
¹H-NMR-spekteret til fraksjon C3 (NMR-spektrum C.14) viste noen signaler i karbohydratområdet, samt et mulig signal for en aromatisk metoksygruppe og noen utslag i aromat- og olefinområdet. Spektrene til fraksjonene C4-C7 viste at de lignet fraksjon C3 i innhold.

¹H-NMR-spekteret til fraksjon C8 (NMR-spektrum C.15) hadde en rekke aromatsignaler, samt noen karbohydratsignaler som ikke var tilstede i de tidligere fraksjonene. I tillegg hadde det signaler i alifatområdet som kunne skyldes et 6-deoksysukker. Karbonspekteret understøttet disse funnene (NMR-spektrum C.16). På bakgrunn av NMR-spektrene til fraksjonene C9 og C10 var det trolig at disse lignet fraksjon C8.

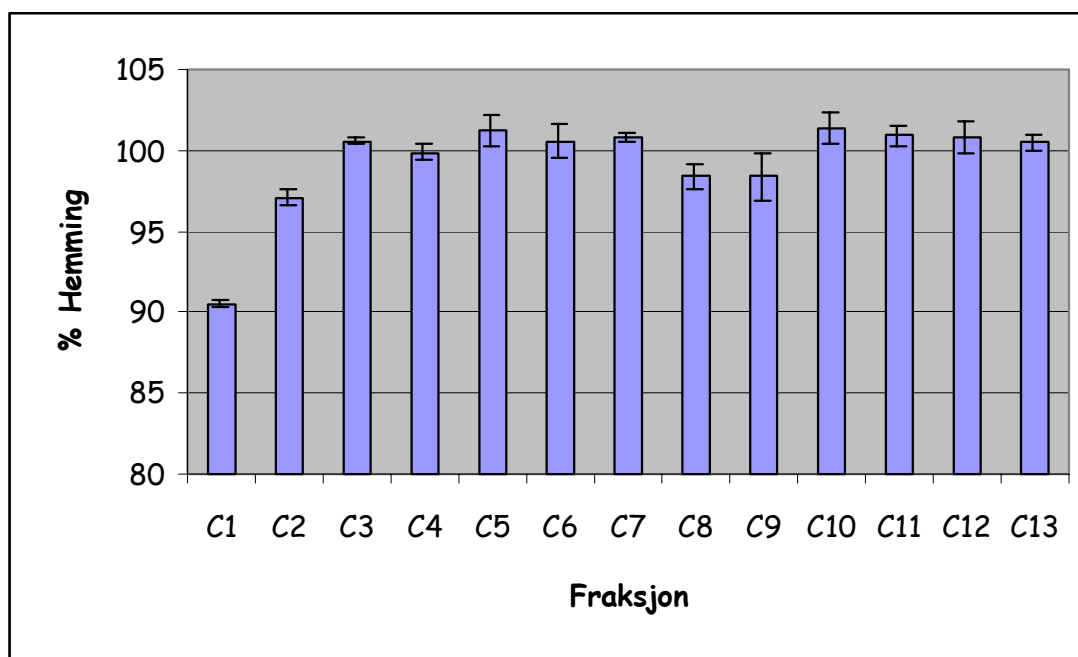
¹H-NMR-spekteret til fraksjon C11 (NMR-spektrum C.17) viste brede signaler i aromatområdet. Dette kan være en indikasjon på innhold av proanthocyanidiner. Karbonspekteret viste også klare utslag i aromatområdet (NMR-spektrum C.18). Fraksjonene C12 og C13 lignet på fraksjon C11.

Bioassay

Fraksjonene C9-C13 viste høyest radikalfangende evne, med IC₅₀-verdier på under 5,4 µg/ml (Tabell B.5). Fraksjonene C1-C4 og C6 hadde lavest radikalfangende evne, med IC₅₀-verdier på over 83,3 µg/ml. Ved en konsentrasjon på 83,3 µg/ml hadde fraksjonene C4 og C6 lavest radikalfangende evne (Figur 19). Ved samme konsentrasjon ga alle fraksjonene over 90% hemming av 15-LO (Figur 20). Samtlige 15-LO hemmingsverdier var signifikante på 5% nivå (P<0,05). IC₅₀-verdier ble bestemt for fraksjonene C6, C9 og C11 (Tabell B.6). Alle disse fraksjonene hadde IC₅₀-verdier under 17,1 µg/ml.



Figur 19. Radikalscavenging ved 83,3 µg/ml for fraksjonene C1-C13.



Figur 20. Hemming av 15-LO ved 83,3 µg/ml for fraksjonene C1-C13.

Fraksjonene C4 og C6 felte ut som hvite krystaller ved inndamping av fraksjonene som ble samlet opp fra Sephadex LH-20 kolonnen. Fraksjon C6 var større enn fraksjon C4. Ved en konsentrasjon på 83,3 µg/ml hadde fraksjon C6 en radikalfangende evne på bare $4,4 \pm 0,1\%$. Derimot hadde den en svært lav IC_{50} -verdi med hensyn på hemming av 15-LO; $9,8 \pm 0,6$ µg/ml. NMR-spektrene tydet på en fenolisk forbindelse. På bakgrunn av dette ble fraksjon C6 valgt ut til videre arbeid.

Fraksjon C9 veide mest av alle fraksjonene (Tabell B.4). Denne fraksjonen var svært aktiv i begge bioassayene, noe fraksjon C11 også var. NMR-spektrene tydet også her på fenoliske forbindelser. Derfor ble også fraksjonene C9 og C11 valgt ut til videre arbeid.

6.4 Videre arbeid med fraksjon C6

NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spekteret til fraksjon C6 løst i deuterometanol (NMR-spektrum C.19) tydet på en forbindelse med et aromatisk proton (7,07 ppm) og en aromatisk metoksygruppe (3,90 ppm). Signalene i karbohydratområdet (3,3-4,2 ppm) stammet trolig fra C₂-C₅ i et sukermolekyl. Dubletten ved 4,97 ppm med en koblingskonstant lik 10,3 Hz ble trolig forårsaket av anomerprotonet i sukkeret. I tillegg til dette spekteret ble det også tatt et ^1H -NMR-spekter til fraksjon C6 løst i heksadeuterodimetylsulfoksid (DMSO-d₆) (NMR-spektrum C.21). Dette ble gjort fordi spekteret til fraksjon C6 løst i deuterometanol tydet på en forbindelse med en høy grad av hydroksylering. Et protonspekter av fraksjonen løst i DMSO-d₆ ga en pekepinn på antallet hydroksylgrupper i forbindelsen fordi dette også viser hydroksylsignaler. Hydroksylgrupper i sukkerdelen av molekylet var trolig opphavet til signalene i området 4,8-5,8 ppm, mens signalene ved 8,4 ppm og 9,8 ppm trolig skyldtes fenoliske hydroksylgrupper.

^{13}C -NMR-spekteret understøttet funnene i protonspektrene (NMR-spektrum C.20). I tillegg kunne man anta at den mulige metoksygruppen var substituert i begge naboposisjonene da signalet for dette trolig lå på 60,9 ppm. Vanligvis ligger signaler for aromatiske metoksygrupper med minst en usubstituert naboposisjon under 60 ppm (Malterud og Anthonsen 1987). Signalet ved 62,6 ppm skyldtes trolig C₆ i sukkerdelen, mens signalene i området 71,8-82,9 trolig skyldtes C₂-C₅. Signalet ved 111,0 ppm var muligens forårsaket av et protonert aromatkarbon, mens signalene i området 117,2-152,1 ppm trolig skyldtes substituerte aromatkarboner. Trolig var signalene ved 117,2 ppm og 119,3 ppm forårsaket av karbonsubstituerte aromatkarboner, mens signalene i området 142,1-152,1 ppm trolig skyldtes oksygensubstituerte aromatkarboner. Signalet ved 166,6 ppm var trolig forårsaket av en karbonylgruppe.

De funnene som er nevnt over ble understøttet av APT-, HOM2DJ-, COSY- og HETCOR-spektrene. APT-spekteret (NMR-spektrum C.22) viste hvilke karbonatomer som var primære, sekundære, tertiære eller kvaternære (CH og CH₃ gir negative signaler, C og CH₂ positive). HOM2DJ-spekteret (NMR-spektrum C.23) viste at signalet ved 4,9 ppm var en dublett. COSY-spekteret (NMR-spektrum C.24) viste at signalet ved 4,9 ppm koblet med signalet ved 4,0 ppm. HETCOR-spekteret (NMR-spektrum C.25) viste at protonet ved 7,07 ppm satt på karbonatomet ved 111,0 ppm. I tillegg viste det at anomerprotonet ved 4,91 ppm satt på karbonatomet ved 74,2 ppm. Dette tydet på at stoffet kunne være et C-glykosid. Protonene ved 3,3-4,2 ppm satt på karbonatomene ved 71,8-83,0 ppm.

Metanolyse

Det ble foretatt metanolyse av fraksjon C6 for å spalte glykosidet, slik at monosakkaridet i forbindelsen kunne bestemmes. GC-kromatogrammet etter metanolyse viste at forsøket ikke hadde hatt ønsket effekt. Ingen monosakkarider hadde blitt spaltet av. Dette kunne skyldes at forbindelsen var et C-glykosid. Ved metanolyse er det de mer vanlige O-glykosidene som spaltes.

Acetylering

Acetylering av forbindelsen etterfulgt av NMR-spektroskopi ble foretatt for å bestemme antallet frie hydroksylgrupper i forbindelsen. Dette er en mer spesifikk metode for å bestemme antallet frie hydroksylgrupper enn ved bare å ta et $^1\text{H-NMR}$ -spektrum av prøven løst i DMSO-d_6 . Dette ga fraksjon C6-acetylerert (Tabell B.7).

NMR-spektroskopi

Tidligere spektra og NMR-spektrene til fraksjon C6-acetylerert (NMR-spektrum C.26-C30) tydet på at forbindelsen inneholdt fem acetylgrupper da $^1\text{H-NMR}$ -spekteret viste fem singletter i området 2,07-2,35 ppm. Altså hadde forbindelsen fem frie hydroksylgrupper. Ellers samsvarte spektrene med de som ble tatt før acetylering, med unntak av at protonene som var antatt å være i sukkerdelen var spredt over et større område; 3,7-5,6 ppm.

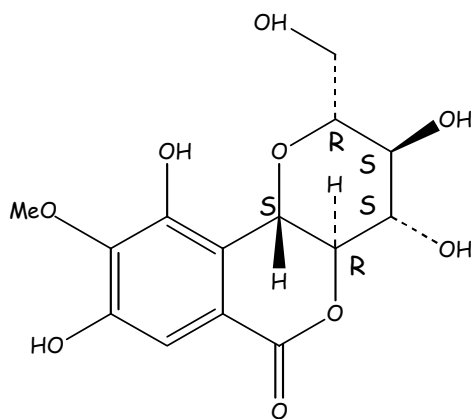
PTLC

PTLC av fraksjon C6-acetylerert ga et utbytte på 45,7 mg (102,2%). Dette ga fraksjon C6.1-acetylerert (Tabell B.8).

MS

MS av fraksjon C6 (Massespektrum D.1) viste at forbindelsen hadde en molekylvekt lik 328.

Delvis strukturformel for forbindelsen i fraksjon C6 ble funnet ut fra spektraldataene. Dette ble brukt som utgangspunkt for søk i SciFinder. Dette førte til at bergenin ble funnet som mulig struktur (Figur 21). Det viste seg at spektraldata oppgitt i litteraturen og observerte data stemte overens. Dette er vist i avsnitt 6.25.1 Bergenin. Det at metanolysen ikke førte til avspaltning av et monosakkarid var forenlig med denne strukturen da bergenin er et C-glykosid. Strukturen var også forenlig med resultatet av acetyleringen og massespektrometrien, da forbindelsen har fem frie hydroksylgrupper og en molekylvekt lik 328,27.



Figur 21. Strukturformel for bergenin.

6.5 Videre arbeid med fraksjon C9 og C11

Analytisk TLC

Analytisk TLC av fraksjonene C9 og C11 viste at fraksjonene ikke inneholdt de samme forbindelsene, da R_f -verdiene for de ulike stoffene i fraksjonene var forskjellige. Derimot var alle stoffene radikalscavengere.

Da det ble klart at fraksjonene C9 og C11 trolig inneholdt ulike forbindelser ble fraksjon C9 valgt ut til videre arbeid da den veide mest (Tabell B.4).

6.6 Fraksjonering av C9

Kolonnekromatografi uten bruk av trykk

Fraksjon C9 ble kromatografert over Sephadex LH-20. Fra Sephadex-kolonnen ble det samlet opp 41 fraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene D1-D11 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying. Samlet utbytte var 4,38 g (97,3%) av påsatte fraksjon C9 (Tabell B.9).

Ved bruk av Sephadex LH-20 som kolonnemateriale er elueringsrekkefølgen som nevnt tidligere noe utforutsigbar på grunn av at det skjer en separasjon basert dels på eksklusjonskromatografi og dels ved adsorpsjon av aromatiske forbindelser. I dette tilfellet ble bergenin og antatte proantocyanidiner eluert ut først. De påfølgende fraksjonene inneholdt trolig en økende andel av flavonoider, mens de siste fraksjonene så ut til å inneholde karbohydrater og fett.

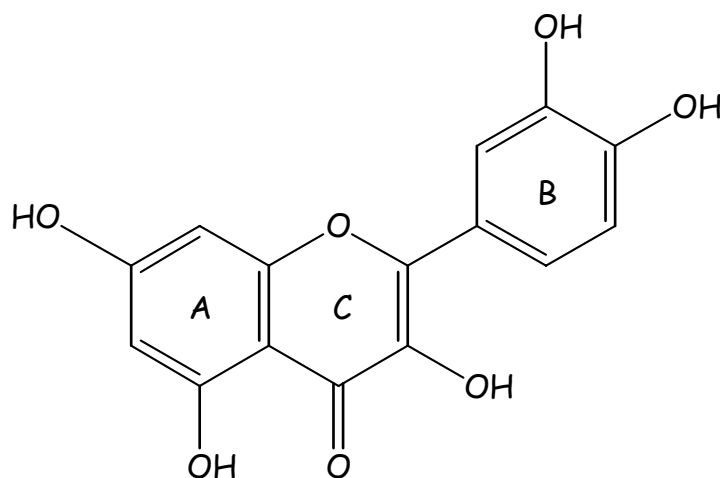
Analytisk TLC

Analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying viste innhold av radikalscavengere i alle fraksjonene med unntak av fraksjonene D1, D3, D9 og D11.

NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spekteret til fraksjon D1 (NMR-spektrum C.31) viste at fraksjonen hovedsakelig inneholdt bergenin og noe karbohydrater, samt at spekteret hadde

signaler som kunne tyde på et 6-deoksysukker. I tillegg hadde det brede signaler i aromatområdet som kunne tyde på små mengder av proanthocyanidiner. Fraksjon D2 inneholdt hovedsakelig bergenin.



Figur 22. Eksempel på et flavonoid (Quercetin, et flavonol).

Fraksjon D3 inneholdt også bergenin, men i tillegg hadde NMR-spektrene signaler som kunne tyde på innhold av flavonoider. ^1H -NMR-spekteret (NMR-spektrum C.32) hadde signaler rundt 6 ppm som kunne stamme fra protoner på A-ringene, og det hadde signaler i området 6,5-7 ppm som kunne stamme fra protoner på B-ringene. Disse funnene ble styrket av at ^{13}C -NMR-spekteret (NMR-spektrum C.33) hadde signaler ved 163 ppm som kunne skyldes oksygensubstituerte karbonatomer i A-ringene, samt signaler ved 146 ppm som kunne skyldes oksygensubstituerte karbonatomer i B-ringene. Som fraksjon D2 inneholdt også denne fraksjonen karbohydrater og trolig et 6-deoksysukker.

Fraksjonene D4-D7 lignet fraksjon D3, men med en gradvis reduksjon i innhold av bergenin. Fraksjon D7 inneholdt trolig ikke bergenin (NMR-spektrum C.34 og C.35).

NMR-spektrene til fraksjon D8 viste at fraksjonen inneholdt en kompleks blanding av stoff (NMR-spektrum C.36 og C.37). Trolig inneholdt også denne fraksjonen flavonoider.

Fraksjonene D9 og D10 hadde NMR-spektra som skilte seg fra de øvrige ved at de ikke hadde signaler i aromat- og olefinområdet, men de hadde signaler i alifat- og karbohydratområdet (NMR-spektrum C.38). De inneholdt trolig karbohydrater, fett og et 6-deoksysukker.

Fraksjonene D1 og D2 inneholdt i henhold til NMR-spektrene hovedsakelig bergenin, derfor ble de valgt ut til videre arbeid for å verifisere dette. Dette stemte godt med at disse fraksjonene ikke inneholdt radikalscavengere. De fraksjonene som veide mest var fraksjonene D5 og D7 (Tabell B.9). Disse fraksjonene inneholdt ikke bergenin, men andre fenoliske forbindelser ut fra NMR-spektrene. Derfor ble disse valgt ut til videre arbeid.

6.7 Første fraksjonering av D5

CA-TLC

Fraksjon D5 ble kromatografert ved CA-TLC. Fra kromatotronen ble det samlet opp 15 fraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene E1-E7 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying. Samlet utbytte var 178,6 mg (71,9%) av påsatte fraksjon D5 (Tabell B.10).

Kromatotronplaten består av et lag av silika. Dette separerer hovedsakelig på grunnlag av polaritet, slik at de mest polare forbindelsene elueres ut til sist. I dette tilfellet ble bergenin eluert ut først, mens flavonoidglykosider trolig ble eluert ut til sist.

Analytisk TLC

Analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying viste innhold av radikalscavengere i alle fraksjonene med unntak av fraksjon E1.

NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spekteret til fraksjon E3 viste hovedsakelig innhold av bergenin og beslektede substanser (NMR-spektrum C.39). Karbonspekteret understøttet dette funnet (NMR-spektrum C.40).

^1H -NMR-spekteret til fraksjon E5 hadde signalmønstre som var observert tidligere (NMR-spektrum C.41). Rundt 7 ppm forkom signaler som trolig skyldtes protoner på aromaringen, det vil si oksygenert B-ring, mens det ved 6,0 ppm var signaler som trolig skyldtes protoner på en A-ring med substituenten i 5- og 7-stilling. I tillegg viste spekteret innhold av karbohydrater og et 6-deoksysukker. Disse funnene indikerte at fraksjonen kunne inneholde flavonoider, og dermed kunne signalene i området 95-100 ppm i ^{13}C -NMR-spekteret skyldes usubstituerte karbonatomer i A-ringene, mens signalene i området 115-130 ppm kunne skyldes usubstituerte og karbonsubstituerte aromatomer i resten av molekylet (NMR-spektrum C.42). Signalene rundt 145 ppm kunne være forårsaket av nabostående oksygenerte karbonatomer på B-ringene, signalene i området 163-167 ppm kunne skyldes oksygenerte karbonatomer på A-ringene. Signalet ved 195 ppm kunne være forårsaket av en karbonyl. Fraksjon E6 lignet på fraksjon E5.

NMR-spektrene til fraksjon E7 viste at også denne fraksjonen lignet på fraksjon E5, men de hadde et nytt fremtredende signal for et nytt aromatproton, mens de to andre aromatprotonsignalene ble svekket (NMR-spektrum C.43 og C.44).

Fraksjonene E3, E5 og E7 var de fraksjonene som veide mest (Tabell B.10) og alle inneholdt radikalfangende forbindelser. Ut fra NMR-spektrene inneholdt de trolig fenoliske forbindelser. De ble derfor valgt ut til videre arbeid.

6.8 Videre arbeid med fraksjonene D1, D2 og E3

Analytisk TLC

Fraksjonene D1, D2 og E3 ble sammenlignet med fraksjon C3 (bergenin) ved analytisk TLC. Ved å sammenligne R_f-verdiene, samt på grunnlag av DPPH-spraying, ble det funnet at fraksjonene D1 og D2 trolig inneholdt bergenin, mens fraksjon E3 inneholdt et stoff som i motsetning til bergenin hadde radikalfangende evne.

På bakgrunn av at det ble funnet et radikalfangende stoff forskjellig fra bergenin i fraksjon E3, ble denne fraksjonen valgt ut til videre arbeid.

6.9 Fraksjonering av E3

PTLC

PTLC av fraksjon E3 ga et utbytte på 10 mg (48,5%). Dette ga fraksjon E3.1 (Tabell B.11).

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret til fraksjon E3.1 viste innhold av bergenin (NMR-spektrum C.45). I tillegg hadde det ekstrasignaler i aromat- og metoksyloområdet. Dette kunne indikere at fraksjonen inneholdt substanser som lignet bergenin. Karbonspekteret styrket hypotesen ved at det hadde flere signaler i karbonyloområdet (NMR-spektrum C.46).

Fraksjon E3 ble forsøkt separert ved hjelp av PTLC, men NMR-spektrene viste at dette ikke lyktes. Fraksjonen var interessant fordi den trolig inneholdt bergeninlignende substanser med radikalfangende effekt.

6.10 Fraksjonering av E5

PTLC

PTLC av fraksjon E5 ga et utbytte på 36,8 mg (63,2%). Dette ga fraksjonene E5.1 og E5.2 (Tabell B.12) som veide henholdsvis 4,4 mg og 32,4 mg.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret til fraksjon E5.1 viste at den hovedsakelig inneholdt en kompleks blanding av stoff og en del fett (NMR-spektrum C.47). Fraksjon E5.2 inneholdt i stor grad det samme som fraksjon E5, altså trolig flavonoider (NMR-spektrum C.48 og C.49).

Separasjonen av fraksjon E5 ved PTLC førte trolig til at fraksjonen ble noe renere. Begge fraksjonene ble valgt ut til videre arbeid for om mulig å kunne fastslå hva de inneholdt.

6.11 Videre arbeid med fraksjon E5.1

Opprensning

Fraksjon E5.1 ble forsøkt rensset ved injisere fraksjonen gjennom en Sep-Pak kolonne. Dette ga fraksjon E5.1.1.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret til fraksjon E5.1.1 viste at fraksjonen fortsatt inneholdt en kompleks blanding av stoff (NMR-spektrum C.50).

Opprensningen av fraksjon E5.1.1 var ikke vellykket, og det ble besluttet å ikke arbeide videre med fraksjonen da den sannsynligvis bestod av en kompleks blanding av forbindelser og prøvemengden var svært liten.

6.12 Videre arbeid med fraksjon E5.2

Opprensning

Fraksjon E5.2 ble forsøkt rensset ved å vaske den med heksan. Dette ga fraksjon E5.2.1.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret til fraksjon E5.2.1 viste at fraksjonen lignet fraksjon E5.2 (NMR-spektrum C.51). Dette innebar at den trolig inneholdt flavonoider. ¹H-NMR-spekteret hadde to like store dubletter ved henholdsvis 5,07 ppm og 4,57 ppm. De hadde begge en koblingskonstant lik 10,6 Hz, og det kunne se ut som om de koblet med hverandre.

Opprensning

Fraksjon E5.2.1 ble forsøkt rensset ved å vaske den med eter. Dette ga fraksjon E5.2.1.1.

NMR-spektroskopi

NMR-spektrene for fraksjon E5.2.1.1 viste at fraksjonen lignet på fraksjon E5.2.1 (NMR-spektrum C.52 og C.53).

Fraksjon E5.2 ble vasket med heksan og dermed ble en del lipofile bestanddeler trolig ekstrahert ut. Den påfølgende vasken med eter bidro trolig også til å rense fraksjonen. Den var likevel ikke helt ren, og derfor ble det besluttet å arbeide videre med fraksjonen.

6.13 Fraksjonering av E5.2.1.1

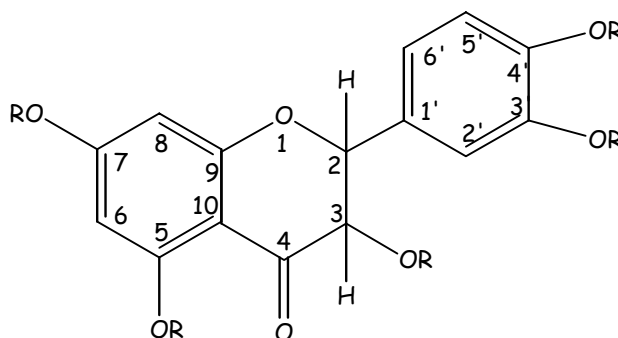
Preparativ HPLC

Den første preparative HPLC-fraksjoneringen av fraksjon E5.2.1.1 ga et utbytte på 4,9 mg (49,0%). Dette ga fraksjonene E5.2.1.1.1a og E5.2.1.1.2a, som veide henholdsvis 4,9 mg og 0 mg (Tabell B.13). Den andre preparative HPLC-fraksjoneringen av fraksjon E5.2.1.1 ga et utbytte på 12,4 mg (62,0%). Dette ga fraksjonene E5.2.1.1.1b og E5.2.1.1.2b, som veide henholdsvis 10,2 mg og 2,2 mg (Tabell B.14). Preparativ HPLC av

fraksjon E5.2.1.1.1b ga et utbytte på 7,6 mg (74,5%) (Tabell B.15). Dette ga fraksjon E5.2.1.1.1b.1.

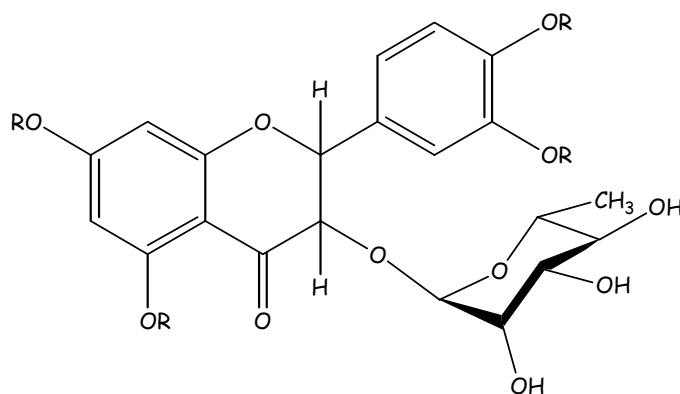
NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spektrene til fraksjonene E5.2.1.1.1a og E5.2.1.1.1b.1 var viktige for strukturoppklaringen av stoffene i disse fraksjonene (NMR-spektrum C.54). Det forelå to dubletter ved henholdsvis 4,57 og 5,07 ppm med koblingskonstanter lik ca. 10,6 Hz. Disse ble trolig forårsaket av to nabostående karbonatomer med ett hydrogen på hver. Ut fra posisjonen i spekteret var det trolig at karbonatomene var oksygensubstituerte. Dette indikerte at fraksjonen kunne inneholde et 3-oksygenerert flavanontype flavonoid. Den store koblingskonstanten tydet på at diedervinkelen $\text{H-C}_2\text{-C}_3\text{-H}$ var 0° eller 180° . I tillegg hadde spekteret et signal som kunne være to dubletter ved ca. 5,9 ppm som trolig skyldtes metastående A-ring protoner, hvilket betydde at A-ringene antagelig var oksygenerert i 5- og 7-stilling. Dernest var signalet ved ca. 7,0 ppm forekommende i flere tilfeller. Dette ble trolig forårsaket av B-ring protoner. På grunn av mengdeforholdet (2:3) mellom signalene for A- og B-ringene hadde forbindelsen trolig 3 B-ringprotoner, og basert på vanlig oksygensubstitusjonsmønster ville det være hydrogen i 2'-, 5'- og 6'-stilling, mens 3'- og 4'-stilling var oksygenerert. Karbonspekteret understøttet disse funnene (NMR-spektrum C.55). Dette ga en foreløpig struktur (Figur 23).



Figur 23. Foreløpig strukturformel for innholdsstoffet i fraksjon E5.2.1.1.1b.1.

Basert på den foreløpige strukturen og det faktum at fraksjonen så ut til å inneholde et 6-deoksyssukker ble det foretatt søk i SciFinder. Søket ble innsnevret ved å anta at 6-deoksyssukkeret var det som er vanligst å finne blant flavonoidglykosider, nemlig rhamnose, samt at dette satt i 3-posisjon (Harborne og Baxter 1999) (Figur 24). Dette førte til en rekke treff. Ett av treffene hadde NMR-data som stemte overens med spektraldataene for de to fraksjonene. Dette er vist i avsnitt 6.25.2 Astilbin. Tre andre treff hadde svært like NMR-spektra. Disse var isomere av forbindelsen i fraksjon E5.2.1.1.1b.1. NMR-dataene stemte overens med forbindelsen astilbin hvis isomere er neoastilbin, isoastilbin og neoisoastilbin. Disse forbindelsene er flavonoidglykosider som er oksygenerert i 3'- og 4'-stilling.



Figur 24. Foreløpig strukturformel for innholdsstoffet i fraksjon E5.2.1.1.b.1 som ligner et flavonoidglykosid.

$^1\text{H-NMR}$ -spekteret til fraksjon E5.2.1.1.2b hadde mange fellestrekk med spekteret for astilbin (NMR-spektrum C.56). Forskjellen var at koblingskonstanten for signalene for H-2 og H-3 var liten (2,4 Hz). Grunnen til dette var at diedervinkelen for de to nabostående karbonatomene var forskjellig fra 0° eller 180° . En sammenligning med NMR-data for isomere av astilbin viste at spektraldataene stemte overens for forbindelsen neoastilbin. Dette er vist i avsnitt 6.25.4 Neoastilbin.

MS

MS av fraksjon E5.2.1.1.a viste et observert pseudomolekylion lik 473 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), hvilket tilsvarte at forbindelsen hadde en molekylvekt lik 450 (Massespektrum D.2). Dette var i overenskomst med astilbin som har en molekylvekt lik 450,39. MS av fraksjon E5.2.1.1.2b ga det samme resultatet, hvilket tilsvarte at forbindelsen hadde en molekylvekt lik 450 (Massespektrum D.3). Dette var i overenskomst med neoastilbin som har en molekylvekt lik 450,39.

Bioassay

I DPPH-testen fikk fraksjon E5.2.1.1.b.1 en IC_{50} -verdi på $29,1 \pm 1,2 \mu\text{M}$ (Tabell B.16). I 15-LO testen var ikke konsentrasjonen av fraksjonen høy nok til å beregne en IC_{50} -verdi, men ved $83,3 \mu\text{M}$ ga fraksjonen en hemming av 15-LO på $40 \pm 0,9\%$ (Tabell B.17). Quercetin ($\text{IC}_{50} 38 \pm 2 \mu\text{M}$) ble brukt som positiv kontroll i 15-LO testen. Samtlige 15-LO hemmingsverdier var signifikante på 5% nivå ($P < 0,05$).

6.14 Fraksjonering av E7

PTLC

PTLC av fraksjon E7 ga et utbytte på 37,8 mg (47,4%). Dette ga fraksjonene E7.1 og E7.2 (Tabell B.18), som veide henholdsvis 16,1 mg og 21,7 mg.

NMR-spektroskopi

$^1\text{H-NMR}$ -spekteret til fraksjon E7.1 viste at fraksjonen inneholdt flere stoff i blanding da det var flere sett med signaler i aromatområdet (NMR-spektrum C.57). Det var sannsynligvis minst to stoff som var nær beslektet. Den inneholdt trolig et 6-

deoksysukker. Spekteret hadde dubletter ved 5,07 ppm og 4,57 ppm slik som fraksjon E5.2.1.1b.1, men i tillegg hadde det et nytt sett med dubletter. Trolig koblet dublettene med hverandre. Da koblingskonstanten var stor (10,6 Hz) var trolig diedervinkelen 0° eller 180° slik som i forbindelsen i fraksjon E5.2.1.1b.1; astilbin. Karbonspekteret understøttet disse funnene (NMR-spektrum C.58).

Fraksjon E7.2 lignet fraksjon E7.1 i henhold til NMR-spektrene, men den hadde et nytt aromatprotonmønster (NMR-spektrum C.59 og C.60). ^1H -NMR-spekteret viste en ny singlett ved 6,51 ppm. De andre singlettene i aromatområdet var mindre enn i fraksjon E7.1.

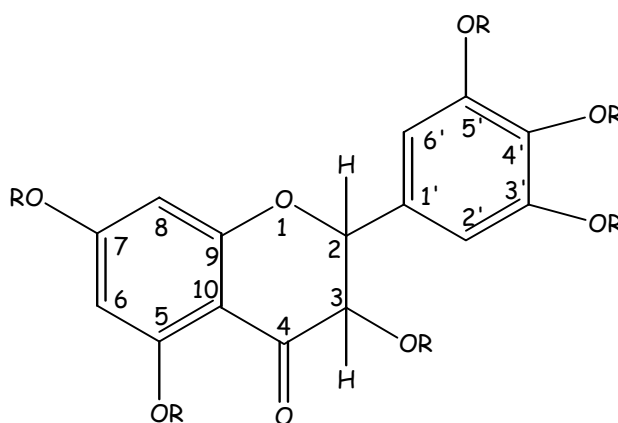
Separasjonen ved hjelp av PTLC ga tydeligvis en delvis separasjon av noe som kunne være en blanding av nærstående flavonoider, men ingen av fraksjonene ble rene. Derfor ble disse valgt ut for videre separasjon for om mulig å isolere noen av forbindelsene.

6.15 Fraksjonering av E7.2

Preparativ HPLC av fraksjon E7.2 ga et utbytte på 20,7 mg (103,5%). Dette ga fraksjonene E7.2.1 og E7.2.2 (Tabell B.19), som veide henholdsvis 13,1 mg og 7,6 mg. Preparativ HPLC av fraksjon E7.2.1 ga et utbytte på 3,6 mg (27,5%). Dette ga fraksjon E7.2.1.1 (Tabell B.20). Preparativ HPLC av fraksjon E7.2.2 ga et utbytte på 2,0 mg (26,3%). Dette ga fraksjon E7.2.2.1 (Tabell B.21).

NMR-spektroskopi

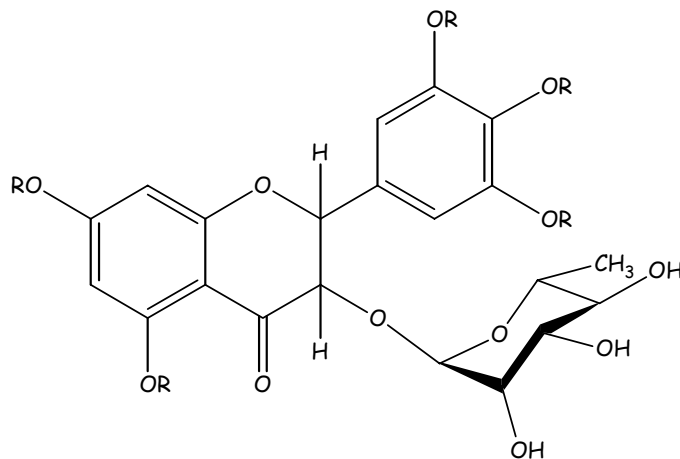
Mange av signalene i ^1H -NMR-spektrene til fraksjonene E7.2.1 og E7.2.1.1 lignet de som ble funnet for fraksjon E5.2.1.1b.1 (NMR-spektrum C.61). Unntaket var en to-proton singlett ved 6,6 ppm. Denne skyldtes trolig to identiske B-ringprotoner, ved at B-ringen i dette tilfellet var oksygenert i 3'-, 4'- og 5'-stilling (Figur 25).



Figur 25. Foreløpig strukturformel for innholdstoffet i fraksjon E7.2.1.1.

Karbonspekteret understøttet disse funnene (NMR-spektrum C.62). Basert på den foreløpige strukturen og det faktum at fraksjonen så ut til å inneholde et 6-deoksysukker ble det foretatt søk i SciFinder på samme måte som for fraksjon

E5.2.1.1b.1 (Figur 26). Dette førte til en rekke treff. Ett av treffene hadde NMR-data som stemte overens med spektraldataene for fraksjon E7.2.1.1. Dette er vist i avsnitt 6.25.5 Ampelopsin-3-rhamnosid. Forbindelsen var ampelopsin-3-rhamnosid, et flavonoidglykosid som er oksygenert i 3'-, 4'- og 5'-stilling.



Figur 26. Foreløpig strukturformel for innholdsstoffene i en rekke fraksjoner som ser ut til å være flavonoidglykosider.

$^1\text{H-NMR}$ -spekteret til fraksjon E7.2.2 viste at fraksjonen inneholdt en blanding av astilbintype flavonoidglykosider.

Bioassay

I DPPH-testen fikk fraksjon E7.2.1.1 en IC_{50} -verdi på $11,5 \pm 0,8 \mu\text{M}$ (Tabell B.22), mens den i 15-LO testen fikk en IC_{50} -verdi på $64 \pm 5 \mu\text{M}$ (Tabell B.23). Quercetin ($\text{IC}_{50} 38 \pm 2 \mu\text{M}$) ble brukt som positiv kontroll i 15-LO testen. Samtlige 15-LO hemmingsverdier var signifikante på 5% nivå ($P < 0,05$) med unntak av for konsentrasjon $20,8 \mu\text{M}$ for fraksjon E7.2.1.1.

6.16 Andre fraksjonering av D5

MPLC

Fraksjon D5 ble kromatografert over silika. Fra silikakolonnen ble det samlet opp 91 fraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene F1-F9 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying. Samlet utbytte var 1112,5 mg (82,0%) av påsatte fraksjon D5 (Tabell B.24).

Analytisk TLC

Analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying viste innhold av radikalscavengere i alle fraksjonene med unntak av fraksjonene F1, F4, F5 og F9.

NMR-spektroskopi

$^1\text{H-NMR}$ -spekteret til fraksjon F1+F4 viste at fraksjonen trolig inneholdt en blanding av flere flavonoider (NMR-spektrum C.63). Dette skyldtes flere signalmønstre i

aromatområdet. Karbonspekteret understøttet dette ved at det var flere karbonylsignaler i området 170 ppm (NMR-spektrum C.64). Spektrene viste også at fraksjonen trolig inneholdt et 6-deoksysukker. Fraksjon F2 lignet fraksjon F1+F4, men spektrene viste at den også inneholdt litt bergenin (NMR-spektrum C.65 og C.66). Signalene ved 6,9-7,1 ppm skyldtes trolig B-ring protoner, mens signalene ved 6,0 ppm trolig skyldtes A-ring protonene. I området 4,7-5,2 ppm hadde spekteret to dubletter, disse ble trolig forårsaket av to nabostående karbonatomer med ett hydrogen på hver som observert tidligere. Ut fra posisjonen i spekteret var det trolig at disse var oksygensubstituerte. Fraksjon F3 lignet fraksjon F2.

Fraksjon F5 lignet også på fraksjon F2 ut fra NMR-spektrene, men den hadde et endret signalmønster i aromatområdet med signal ved 6,6 ppm (NMR-spektrum C.67 og C.68). Dette kunne tyde på innhold av en forbindelse som lignet ampelopsin-3-rhamnosid. Signalene i området 6,9-7,1 ppm, som trolig representerer astilbintype flavonoidglykosider, var redusert. Mønsteret ved antatte 6-deoksyprotoner indikerte en kompleks blanding. Fraksjon F6 lignet fraksjon F5. Fraksjon F7 lignet fraksjon F6, men i denne fraksjonen var ett signalmønster i aromatområdet borte (NMR-spektrum C.69 og C.70). Fraksjon F8 lignet fraksjon F7.

Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble utført for fraksjonene F2, F5, F6, F7 og F8 for å undersøke deres sammensetning. Ved å se på hovedtoppene i spektrene for de ulike fraksjonene ble det klart at alle fraksjonene bestod av flere nært beslektede stoff med liten forskjell i retensjonstid (Tabell 7). Hver fraksjon så ut til å inneholde minst to hovedforbindelser, men det varierte hvilke forbindelser som dominerte i de ulike fraksjonene. Til sammen inneholdt fraksjonene trolig seks hovedforbindelser. Alle fraksjonene inneholdt spormengder av stoff med andre retensjonstider enn hovedforbindelsene.

Tabell 7. Oversikt over hovedforbindelsene i fraksjonene F2, F5, F6, F7 og F8 med relative retensjonstider ved analytisk HPLC. Gradering av innhold er gitt i parentes.

Fraksjon	Stoff 1, Relativ retensjons- tid (min)	Stoff 2, Relativ retensjons- tid (min)	Stoff 3, Relativ retensjons- tid (min)	Stoff 4, Relativ retensjons- tid (min)	Stoff 5, Relativ retensjons- tid (min)	Stoff 6, Relativ retensjons- tid (min)
F2	-	6,91 (2)	-	7,95 (4)	8,08 (1)	8,73 (3)
F5	6,49 (1)	6,87 (2)	7,18 (3)	7,91 (5)	8,13 (4)	-
F6	6,49 (2)	6,87 (1)	7,18 (3)	-	8,14 (4)	-
F7	6,49 (2)	6,83 (1)	7,18 (3)	-	8,13 (4)	-
F8	-	6,83 (2)	7,17 (1)	-	-	-

NMR-spektrene og HPLC-resultatene viste at forbindelsene i den opprinnelige prøven var separert i en viss grad, men det var tydelig at disse stoffene var nær beslektet og dermed vanskelig å separere. Fordi fraksjon F1+F4 og fraksjon F3 lignet på hverandre i innhold basert på NMR-spektrene ble disse slått sammen og valgt ut for videre arbeid for om mulig å separere innholdsstoffene bedre.

6.17 Fraksjonering av F1, F3 og F4

MPLC

De sammenslåtte fraksjonene F1, F3 og F4 ble kromatografert over omvendt fase silika. Fra omvendt fase silikakolonnen ble det samlet opp 78 fraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene G1-G6 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying. Samlet utbytte var 189,4 mg (106,0%) av påsatte prøve (Tabell B.25). Det store utbyttet skyldtes trolig at noe av kolonnematerialet hadde blitt løst og kommet med i fraksjonene.

DPPH-spraying

Applikasjon av fraksjoner på tynnsjiktspalter etterfulgt av DPPH-spraying viste innhold av radikalscavengere i alle fraksjonene med unntak av fraksjon G1.

NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spekteret til fraksjon G2 viste at fraksjonen trolig inneholdt en blanding av flavonoidglykosider av ampelopsin-3-rhamnosid typen da det hadde flere sett signaler for deoksysukkeret og en singlett ved 6,6 ppm (NMR-spektrum C.71). I tillegg inneholdt fraksjonen trolig bergenin. Karbonspekteret understøttet disse funnene (NMR-spektrum C.72). Protonspekteret til fraksjon G3 hadde ikke en singlett ved 6,6 ppm, og inneholdt dermed trolig flavonoidglykosider av astilbintypen (NMR-spektrum C.73). Karbonspekteret understøttet disse funnene (NMR-spektrum C.74). Det samme gjaldt for fraksjon G4. Fraksjon G6 inneholdt derimot hovedsakelig karbohydrat og fett (NMR-spektrum C.75).

Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble utført for å undersøke sammensetningen av fraksjon G3. Denne kunne dermed sammenlignes med fraksjonene F2, F5, F6, F7 og F8. Kromatogrammet viste at fraksjonen inneholdt tre hovedforbindelser (Tabell 8). Alle disse forbindelsene var også tilstede i varierende grad i fraksjonene F2, F5, F6, F7 og F8.

Tabell 8. Oversikt over hovedforbindelsene i fraksjon G3 med relative retensjonstider relatert til forbindelsene i fraksjonene F2, F5, F6, F7 og F8. Gradering av innhold er gitt i parentes.

Fraksjon	Stoff 1, Relativ retensjons- tid (min)	Stoff 2, Relativ retensjons- tid (min)	Stoff 3, Relativ retensjons- tid (min)	Stoff 4, Relativ retensjons- tid (min)	Stoff 5, Relativ retensjons- tid (min)	Stoff 6, Relativ retensjons- tid (min)
G3	-	-	7,16 (3)	7,89 (1)	8,11 (2)	-

NMR-spektrene viste at forbindelsene i den opprinnelige prøven var separert i astilbintype flavonoidglykosider og flavonoidglykosider av ampelopsin-3-rhamnosidtypen, men det var tydelig at stoffene i de resulterende fraksjonene var nær beslektet og dermed vanskelig å separere.

6.18 Fraksjonering av G3

Preparativ HPLC

Den første preparative HPLC-fraksjoneringen av fraksjon G3 ga et utbytte på 6,4 mg (64,0%). Dette ga fraksjon G3.1 (Tabell B.26). Den andre preparative HPLC-fraksjoneringen av fraksjon G3 ga et utbytte på 37,9 mg (94,8%). Dette ga fraksjonene G3.1a, G3.1b og G3.1c (Tabell B.27). Preparativ HPLC av fraksjon G3.1b ga et utbytte på 24,6 mg (82,0%). Dette ga fraksjonene G3.1b.1, G3.1b.2 og G3.1b.3 (Tabell B.28). Preparativ HPLC av fraksjon G3.1b.1 ga et utbytte på 4,1 mg (41,0%). Dette ga fraksjonene G3.1b.1a, G3.1b.1b og G3.1b.1c (Tabell B.29).

NMR-spektroskopi

NMR-spekterne til fraksjonene etter preparativ HPLC av fraksjon G3 hadde signaler som er karakteristisk for astilbintype flavonoidglykosider (NMR-spektrum C.76 og C.77). Basert på mønsteret ved signalet for 6-deoksysukkeret og ved signalet for karbonylkarbonatomer var det trolig at fraksjonene inneholdt en blanding av to ulike astilbinisomere. Ved flere opprensninger på HPLC-kolonnen ble en av isomerene mer dominerende, men forbindelsen ble ikke helt ren.

6.19 Fraksjonering av D7

MPLC

Fraksjon D7 ble kromatografert over omvendt fase silika. Fra omvendt fase silikakolonnen ble det samlet opp 114 fraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene H1-H9 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying. Samlet utbytte var 675,4 mg (67,5%) av påsatte fraksjon D7 (Tabell B.30).

DPPH-spraying

Analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying viste innhold av radikalscavengere i alle fraksjonene med unntak av fraksjonene H1 og H9.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret til fraksjon H2 viste at fraksjonen inneholdt en blanding av de ulike typene flavonoidglykosider som er nevnt tidligere, dette ble understøttet av at spekteret hadde flere signaler for 6-deoksysukker (NMR-spektrum C.78). Karbonspekteret understøttet disse funnene (NMR-spektrum C.79).

¹H-NMR-spekteret til fraksjon H3 viste at denne fraksjonen i all hovedsak inneholdt ett stoff av ampelopsin-3-rhamnosid typen. Det hadde den karakteristiske singletten ved 6,6 ppm og hovedsakelig ett signal for 6-deoksysukkeret (NMR-spektrum C.80). ¹³C-, COSY-, HETCOR- og APT-NMR-spektrene understøttet disse funnene (NMR-spektrum C.81-C.84).

For fraksjon H4 viste NMR-spektrene at fraksjonen inneholdt en blanding av de ulike flavonoidglykosidene samt noe bergenin (NMR-spektrum C.85 og C.86).

¹H-NMR-spekteret til fraksjon H5 viste at denne fraksjonen i all hovedsak inneholdt ett stoff av astilbintypen da spekteret manglet den karakteristiske singletten ved 6,6 ppm, men hadde signaler rundt 7,0 ppm (NMR-spektrum C.87). Det var hovedsakelig ett signal for deoksysukkeret. Karbon-, COSY-, HETCOR- og APT-NMR-spektrene understøttet disse funnene (NMR-spektrum C.88-C.91).

¹H-NMR-spekteret til fraksjon H6 viste at fraksjonen inneholdt en blanding av astilbintype flavonoidglykosider da den hadde signaler rundt 7,0 ppm og hadde flere signaler for deoksysukkeret (NMR-spektrum C.92). Karbonspekteret støttet dette ved at det hadde flere doble signaler (NMR-spektrum C.93).

Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble utført for å undersøke sammensetningen av fraksjonene H3 og H5. Denne kunne dermed sammenlignes med fraksjonene F2, F5, F6, F7, F8 og G3. Kromatogrammene viste at fraksjon H3 inneholdt én hovedforbindelse med en relativ retensjonstid på 6,74 minutter mens fraksjon H5 inneholdt én hovedforbindelse med en relativ retensjonstid på 8,05 minutter. Forbindelsen i fraksjon H3 hadde en relativ retensjonstid som indikerte at den kunne være det som ble kalt stoff 2 i de andre fraksjonene som ble undersøkt ved analytisk HPLC selv om retensjonstiden ikke var identisk. Forbindelsen i fraksjon H5 kunne i henhold til retensjonstiden være det som ble kalt stoff 5 i de andre fraksjonene.

NMR-spektrene og HPLC-resultatene viste at forbindelsene i den opprinnelige prøven var separert i astilbintype flavonoidglykosider og flavonoidglykosider av ampelopsin-3-rhamnosidtypen, og det var tydelig at to av de nært beslektede stoffene hadde blitt separert fra resten.

6.20 Fraksjonering av H3

Kolonnekromatografi uten bruk av trykk

Fraksjon H3 ble kromatografert over omvendt fase silika. Fra omvendt fase silikakolonnen ble det samlet opp 53 fraksjoner. Disse ble slått sammen til fraksjonene I1-I5 på bakgrunn av analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying og analytisk HPLC. Samlet utbytte var 268,1 mg (77,4%) av påsatte fraksjon H3 (Tabell B.31).

DPPH-spraying

Analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying viste innhold av radikalscavengere i alle fraksjonene med unntak av fraksjonene I1 og I5.

Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble utført for utvalgte av de samlede fraksjonene fra omvendt fase silikakolonnen for å se på sammensetningen til de ulike fraksjonene og dermed bedømme hvilke fraksjoner som kunne slås sammen.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret til fraksjon I2 viste at fraksjonen i all hovedsak inneholdt én forbindelse av ampelopsin-3-rhamnosid typen (NMR-spektrum C.94). Karbonspekteret understøttet dette funnet (NMR-spektrum C.95). Fraksjon I3 lignet fraksjon I2, men den var mindre ren da spekteret hadde flere signaler for deoksyukkeret. Fraksjon I4 lignet også fraksjonene I2 og I3, men spekteret hadde i tillegg et signal ved 1,25 ppm (NMR-spektrum C.96). Det var nærliggende å tro at dette var fri rhamnose, men det stemte ikke med ¹H-NMR-spekteret til fri rhamnose (NMR-spektrum C.97).

Fraksjon I5 inneholdt i henhold til ¹H-NMR-spekteret rester av flavonoidglykosider av ampelopsin-3-rhamnosid typen, samt lipider/fett (NMR-spektrum C.98).

NMR-spektrene viste at flavonoidglykosidet av ampelopsin-3-rhamnosid typen i den opprinnelige prøven hadde blitt rensert opp, og at forurensninger var samlet i fraksjon I5.

6.21 Fraksjonering av H5

Preparativ HPLC

Den første preparative HPLC-fraksjoneringen av fraksjon H5 ga et utbytte på 6,0 mg (60,0%). Dette ga fraksjon H5.1a (Tabell B.32). Den andre preparative HPLC-fraksjoneringen av fraksjon H5 ga et utbytte på 24,7 mg (123,5%). Dette ga fraksjon H5.1b (Tabell B.33). Preparativ HPLC av fraksjon H5.1b ga et utbytte på 10,3 mg (41,7%). Dette ga fraksjon H5.1b.1 (Tabell B.34).

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spektrene til fraksjonene H5.1a og H5.1b.1 hadde signalene som er karakteristiske for et astilbintype flavonoidglykosid (NMR-spektrum C.99). Karbonspekteret understøttet disse funnene (NMR-spektrum C.100). Ved sammenligning med NMR-data i litteraturen ble det funnet at fraksjonene inneholdt neoastilbin, en isomer av astilbin. Dette er vist i avsnitt 6.25.3 Neoastilbin. Protonene på C₂ og C₃ (H-2 og H-3) i astilbin og neoastilbin har en stor koblingskonstant og dette indikerer som tidligere nevnt at diedervinkelen er 0° eller 180°. Dette tilsvarer 2R, 3R-konfigurasjon for astilbin og 2S, 3S-konfigurasjon for neoastilbin. De to andre isomerene har mindre koblingskonstanter og dermed 2R, 3S- (neoisoastilbin) eller 2S, 3R-konfigurasjon (isoastilbin). Det som gjør det mulig å skille astilbin og isoastilbin fra neoastilbin og neoisoastilbin ved hjelp av NMR-spektroskopi er signalet for H-5". For astilbin og isoastilbin ligger dette ved ca. 4,25 ppm, men for neoastilbin er skiftposisjonen lavere på grunn av at protonet er sterkt shieldet (De Britto et al. 1995).

MS

MS av fraksjon H5.1b.1 viste et observert pseudomolekylion lik 473 ([M+Na]⁺), hvilket tilsvarte at forbindelsen hadde en molekylvekt lik 450 (Massespektrum D.4). Dette var i overenskomst med neoastilbin som har en molekylvekt lik 450,39.

Bioassay

I DPPH-testen fikk fraksjon H5.1b.1 en IC_{50} -verdi på $26 \pm 1 \mu\text{M}$ (Tabell B.35), mens den i 15-LO testen fikk en IC_{50} -verdi på $79 \pm 3 \mu\text{M}$ (Tabell B.36). Quercetin (IC_{50} $38 \pm 2 \mu\text{M}$) ble brukt som positiv kontroll i 15-LO testen. Samtlige 15-LO hemmingsverdier var signifikante på 5% nivå ($P < 0,05$) med unntak av for konsentrasjon $20,8 \mu\text{M}$ for fraksjon H5.1b.1.

6.22 Fraksjonering av I2**Preparativ HPLC**

Preparativ HPLC av fraksjon I2 ga et utbytte på 20 mg (100%). Dette ga fraksjon I2.1 (Tabell B.37).

NMR-spektroskopi

NMR-spektrene til fraksjon I2.1 viste klare likheter med spektraldataene for ampelopsin-3-rhamnosid (NMR-spektrum C.101 og C.102), men med forskjeller i signalene for H-2, H-3 og H-5" på samme måte som mellom astilbin og neoastilbin. Dette er vist i avsnitt 6.25.6 Neoampelopsin-3-rhamnosid. Altså inneholdt trolig fraksjon I2.1 ampelopsin-3-rhamnosid med 2S, 3S-konfigurasjon, altså neoampelopsin-3-rhamnosid.

MS

MS av fraksjon I2.1 viste et observert pseudomolekylion lik 489 ($[M+Na]^+$), hvilket tilsvarte at forbindelsen har en molekylvekt lik 466 (Massespektrum D.5). Dette var i overenskomst med neoampelopsin-3-rhamnosid som har en molekylvekt lik 466,39.

Bioassay

I DPPH-testen fikk fraksjon I2.1 en IC_{50} -verdi på $12,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (Tabell B.38), mens den i 15-LO testen fikk en IC_{50} -verdi på $71 \pm 5 \mu\text{M}$ (Tabell B.39). Quercetin (IC_{50} $38 \pm 2 \mu\text{M}$) ble brukt som positiv kontroll i 15-LO testen. Samtlige 15-LO hemmingsverdier var signifikante på 5% nivå ($P < 0,05$).

6.23 Fraksjonering av I3**Preparativ HPLC**

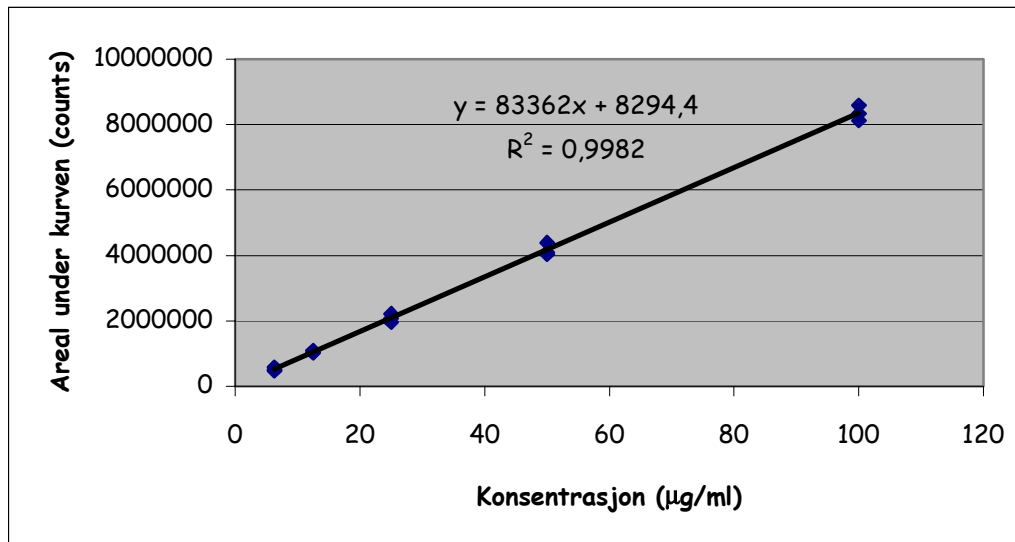
Preparativ HPLC av fraksjon I3 ga et utbytte på 9,7 mg (97,0%). Dette ga fraksjon I3.1 (Tabell B.40).

NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spekteret til fraksjon I3.1 viste at også denne fraksjonen inneholdt neoampelopsin-3-rhamnosid (NMR-spektrum C.103).

6.24 Kvantifisering av bergenin i planten

Standardkurven for bergenin monohydrat ble satt opp på bakgrunn av kromatogram av standardløsninger der forbindelsen har en relativ retensjonstid på 11,0 minutter (HPLC-kromatogram E.1). Standardkurven er gitt i Figur 27. Denne ble brukt for å beregne innholdet av bergenin i råekstraktene.



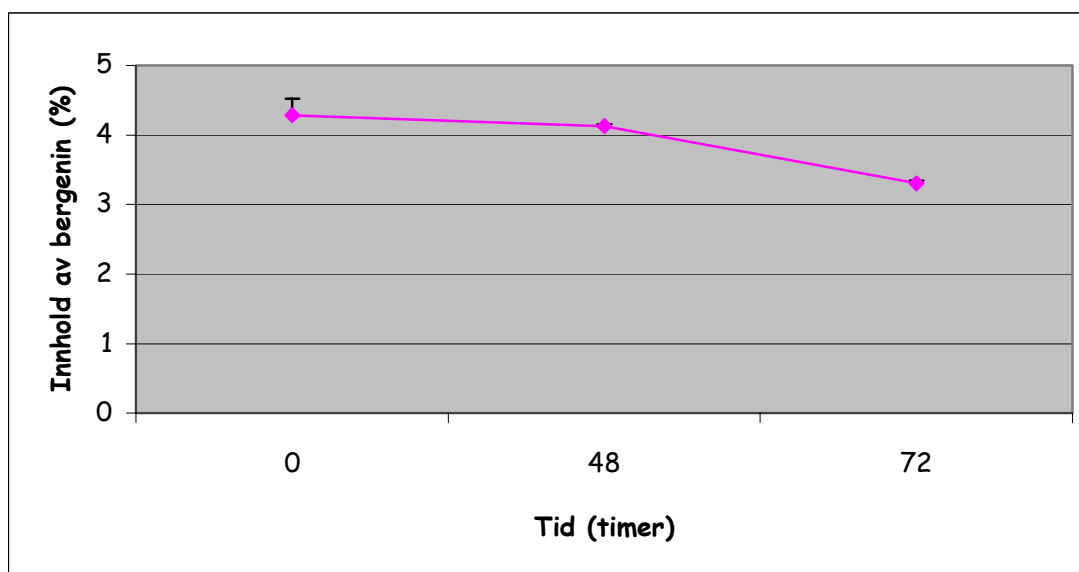
Figur 27. Standardkurve for bergenin.

Først ble filtrat 1 og 2 av råekstrakt-1 slått sammen og undersøkt på HPLC. Deretter ble filtrat 3 av råekstrakt-1 undersøkt for seg (Tabell 9). Dette ble gjort for å fastslå hvor mye bergenin som ble ekstrahert ut ved den tredje ekstraksjonen i forhold til de to første. Resultatene er presentert i Tabell 9. Denne viser at mengden bergenin i filtrat 3 utgjorde 16,0% av innholdet i filtrat 1 og 2. Derfor ble det bestemt at tre ekstraksjoner av plantematerialet var nødvendig for å sikre og få med alt bergenet i kvantifiseringsforsøket. Kromatogrammene til råekstraktene viste at bergenin trolig er hovedsubstansen i ekstraktene (HPLC-kromatogram E.2).

Tabell 9. Mengde bergenin i filtratene etter ekstraksjon av råekstrakt-1.

Prøve	Mengde bergenin (mg)
Råekstrakt 1, filtrat 1 og 2	3,52
Råekstrakt 1, filtrat 3	0,56

Resultatene fra kvantifiseringsforsøket er gitt i Tabell 10. Disse viser at innholdet av bergenin i råekstraktene reduseres over tid (Figur 28).



Figur 28. Innhold av bergenin i råekstrakt over tid.

For å undersøke om rent bergenin monohydrat ble nedbrutt i metanol over tid, ble en prøve satt i romtemperatur i 16 døgn. Deretter ble det tatt NMR-spektroskopi av prøven. Denne viste at ren bergenin ikke hadde blitt brutt ned. Det er derfor trolig at det er andre forbindelser i råekstraktet som medvirker til at bergenin brytes ned.

Tabell 10. Oversikt over resultat fra kvantifisering av bergenin i *D. abyssinica*.

Parallell	Bergenininnhold i råekstrakt-1 Etter 48 timer	Bergenininnhold i råekstrakt-1 etter 72 timer	Bergenininnhold i råekstrakt-2 Etter 72 timer	Bergenininnhold i råekstrakt-3 etter 0 timer
1	4,12	3,32	3,49	4,02
2	4,16	3,33	3,62	4,46
3	4,12	3,26	3,35	4,37
Gjennomsnitt	4,13	3,31	3,49	4,29
SD	0,02	0,04	0,13	0,23

Kvantifiseringsforsøket viser at gjennomsnittlig innhold av bergenin i rotbarken til *D. abyssinica* er $4,29 \pm 0,23\%$. Dette kan brukes til standardisering av plantematerialet.

6.25 Isolerte forbindelser

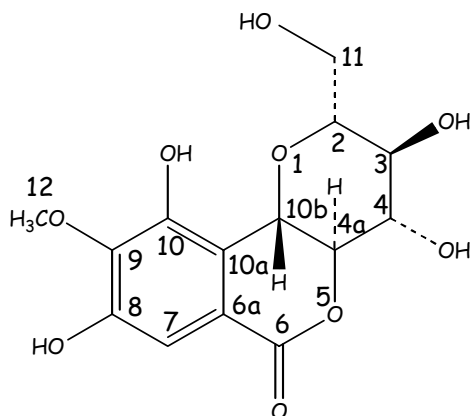
6.25.1 Bergenin

Bergenin er et dihydroisokumarin karakterisert av en β -D-glukosylenhet C-bundet til en hydroksylert fenyلكarboksylysyre orto til karboksylgruppen. I tillegg er karboksylgruppen esterifisert med C-2 hydroksylgruppen i glukosylenheten slik at det

danner en laktonring (Piacente et al. 1996). Bergenin er ikke rapportert funnet i *D. abyssinica* tidligere, men forbindelsen har blitt funnet i en rekke andre planter.

NMR-spektroskopi

NMR-dataene som ble funnet for fraksjon C6 løst i DMSO- d_6 (NMR-spektrum C.21) og fraksjon C6-acetyleret løst i $CDCl_3$ (NMR-spektrum C.26) ble sammenlignet med data funnet i litteraturen der bergenin var løst i $CDCl_3$ -DMSO- d_6 (1 : 1) (Ramaiah et al. 1979). Sammenligningen viste en klar overenstemmelse mellom disse (Tabell 11, Tabell 12).



Figur 29. Strukturformel for bergenin med nummerering av karbonatomer.

Tabell 11. Sammenligning av observerte NMR-data med data funnet i litteraturen for bergenin (Ramaiah et al. 1979).

H/C nummer	δ (ppm)		Antall H	Koblingskonstant, J (Hz)		Signaltype
	Litt. Data	Observ. data		Litt. data	Observ. Data	
2, 3, 4, 4a, 11	3,1-4,1	3,2-4,0	6	-	-	-
10b	4,89	4,96	1	10	10,4	d
7	7,02	7,00	1	-	-	s
OH	3,1-4,1, 5,5	4,8-5,7	5/3	-	-	flere br s
OH	-	8,4	1	-	-	br s
OH	-	9,8	1	-	-	br s
OCH ₃	3,82	3,78	3	-	-	s

Tabell 12. Sammenligning av observerte NMR-data med data funnet i litteraturen for bergenin pentaacetat (Ramaiah et al. 1979).

H/C nummer	δ (ppm)		Antall H	Koblingskonstant, J (Hz)		Signaltype
	Litt. Data	Observ. data		Litt. data	Observ. Data	
11	4,31	4,30	2	13, 2	12, 2	dd
	4,11	4,14	1	13, 4	13, 4	dd
2	3,79	3,83	1	-	-	m
3	5,09	5,12	1	10	10	†
4	5,47	5,48	1	10	9	†
4a	4,32	4,36	1	10	10	†
10b	4,81	4,82	1	10	11	D
7	7,75	7,77	1	-	-	S
OAc	2,3	2,34	6	-	-	S
	2,07	2,10	6	-	-	S
	2,03	2,07	3	-	-	S
OCH ₃	3,86	3,91	3	-	-	S

MS

MS av fraksjon C6 viste at forbindelsen har en molekylvekt lik 328 (Massespektrum D.1). Dette er i overenskomst med bergenin som har en molekylvekt lik 328,27.

Bioassay

Det ble vist at bergenin har liten radikalfangende evne (Tabell 13). Dette er rapportert tidligere (Yokozawa et al. 1998; Sumino et al. 2002; Takahashi et al. 2003).

Tabell 13. Radikalscavengeraktivitet til fraksjon C6.

Fraksjon	Konsentrasjon (µg/ml)	% Radikalscavenging	SD	IC ₅₀ (µg/ml)
C6	83,3	4,4	0,1	>83

Dessuten ble det vist at bergenin har høy 15-LO hemmende aktivitet. Dette er ikke rapportert tidligere. Isolert bergenin (fraksjon C6) ga en IC₅₀-verdi på $9,8 \pm 0,6$ µg/ml, noe som tilsvarer $28,3 \pm 1,7$ µM (Tabell 14). Bergenin monohydrat kjøpt fra Sigma ga en IC₅₀-verdi på 28 ± 2 µM (Tabell 15). Altså stemmer disse resultatene godt overens. Ved testing av innkjøpt bergenin ble quercetin (IC₅₀ 37 ± 5 µM) brukt som positiv kontroll. Samtlige 15-LO hemmingsverdier var signifikante på 5% nivå (P<0,05).

Tabell 14. Hemming av 15-LO til isolert bergenin (fraksjon C6).

Fraksjon	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	% Hemming	SD	P<	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
C6	83,3	100,6	1,0	0,001	9,8 \pm 0,6
	41,7	99,1	0,7	0,001	
	20,8	86,6	1,9	0,001	
	10,4	52,7	2,4	0,001	
	5,2	21,6	5,7	0,005	

Tabell 15. Hemming av 15-LO til kjøpt bergenin monohydrat.

Fraksjon	Konsentrasjon (μM)	% Hemming	SD	P<	IC ₅₀ (μM)
Bergenin monohydrat	166,6	100,3	0,9	0,001	28 \pm 2
	83,3	94,1	0,2	0,001	
	41,7	70	1,9	0,001	
	20,8	36,1	4,2	0,001	
	10,4	21,4	4,5	0,001	
	5,2	10,7	7,3	0,025	
Quercetin	83,3	93,8	0,4	0,001	37 \pm 5
	41,7	47,8	3,7	0,001	
	20,8	29,8	3,9	0,001	

Biologisk aktivitet

Det er rapportert at bergenin har anti-HIV aktivitet (Piacente et al. 1996), lipidsenkende effekt (Jahromi et al. 1992), antikoagulant effekt (Madusolumuo og Okoye 1995), antiarrrytisk effekt (Pu et al. 2002), leverbeskyttende effekt (Kim et al. 2000; Lim et al. 2000), beskyttende effekt på mageslimhinnen (Goel et al. 1997), antitussiv effekt (Peigen 1981) og antiinflammatorisk effekt (Swarnalakshmi et al. 1984).

6.25.2 Astilbin

Astilbin er et dihydroflavonolglykosid der sukkerdelen består av rhamnose. Astilbin har 2R, 3R-konfigurasjon. Astilbin er ikke rapportert funnet i *D. abyssinica* tidligere, men forbindelsen har blitt funnet i en rekke andre planter.

Det har blitt vist at bruk av varme under ekstraksjon kan føre til isomerisering av astilbin (Tominaga og Yoshimura 1960). For å undersøke om dette var tilfellet for metanolekstraktet av *D. abyssinica* ble det laget et ekstrakt uten bruk av varmebehandling. Dette ble gjort ved å blande litt plantemateriale med metanol. Blandingen ble satt på magnetrører ved romtemperatur i noen døgn. Deretter ble 100 μl injisert på HPLC under de betingelsene som beskrevet i avsnitt 5.2.2.17 Andre fraksjonering av D5. Kromatogrammet viste at de samme toppene som ble funnet ved analytisk HPLC i de ulike fraksjonene også er tilstede i dette ekstraktet sammen med

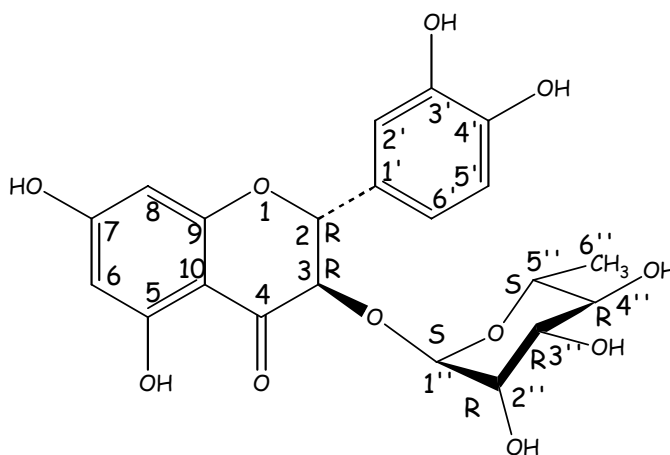
bergenin (HPLC-kromatogram E.3) (Tabell 16). Dette betyr at isomerene finnes naturlig i plantematerialet.

Tabell 16. Relativ retensjonstid til de dominerende forbindelsene i rækstraktet som ble laget uten bruk av varmebehandling.

Fraksjon	Stoff 1, Relativ retensjons- tid (min)	Stoff 2, Relativ retensjons- tid (min)	Stoff 3, Relativ retensjons- tid (min)	Stoff 4, Relativ retensjons- tid (min)	Stoff 5, Relativ retensjons- tid (min)	Stoff 6, Relativ retensjons- tid (min)
Rækstrakt	6,49 (1)	6,85 (2)	7,19 (5)	7,92 (4)	8,14 (6)	8,70 (3)

NMR-spektroskopi

NMR-dataene som ble funnet for fraksjon E5.2.1.1.b.1 løst i CD₃OD (NMR-spektrum C.54 og C.55) ble sammenlignet med data funnet i litteraturen der astilbin var løst i CD₃OD (Artavia et al. 1995). Det synes å være en konstant forskjell på ca. 0,11 ppm mellom egne data og Artavias. Det er imidlertid god overensstemmelse mellom egne data og tidligere funne verdier for autentisk astilbin (Malterud, upublisert) (Tabell 17 og Tabell 18).



Figur 30. Strukturformel for astilbin med nummerering av karbonatomer.

Tabell 17. Sammenligning av observerte ^1H -NMR-data med data funnet i litteraturen for astilbin (Artavia et al. 1995).

H/C nummer	δ (ppm)		Antall H	Koblingskonstant, J (Hz)		Signaltype
	Litt. data	Observ. data		Litt. data	Observ. data	
2'	6,84	6,95	1	1,6	1,5	d
5', 6'	6,71	6,82	2	-	-	m
6	5,79	5,91	1	2,3	2,4	d
8	5,77	5,89	1	2,3	2,0	d
2	4,93	5,07	1	10,8	10,6	d
3	4,45	4,57	1	10,7	10,6	d
5"	4,14	4,25	1	12,4 , 6,2	9,5 , 6,2	dq
1"	3,93	4,05	1	1,4	1,6	d
3"	3,56	3,66	1	9,6 , 3,3	9,5 , 3,3	dd
2"	3,43	3,54	1	3,3 , 1,7	3,2 , 1,6	dd
4"	3,19	3,30	1	9,9 , 9,3	9,5 , 9,5	t
6"	1,07	1,18	3	6,2	6,2	d

Tabell 18. Sammenligning av observerte ^{13}C -NMR-data med data funnet i litteraturen for astilbin (Artavia et al. 1995).

H/C nummer	δ (ppm)	
	Litt. data	Observ. Data
4	195,94	195,92
7	168,51	168,53
5	165,42	165,48
9	165,03	164,06
4'	147,30	147,35
3'	146,46	146,52
1'	129,15	129,16
6'	120,48	120,47
5'	116,31	116,32
2'	115,47	115,48
10	102,45	102,16
6	97,37	97,38
8	96,25	96,26
2	83,88	84,00
3	78,52	78,60
1"	102,8	102,16
2"	71,72	71,83
3"	72,11	72,21
4"	73,77	73,85
5"	70,46	70,55
6"	17,83	17,93

MS

MS av fraksjon E5.2.1.1.1a viste at forbindelsen har en molekylvekt lik 450 (Massespektrum D.2). Dette er i overenskomst med astilbin som har en molekylvekt lik 450,39.

Bioassay

Det ble vist at astilbin har radikalfangende evne med en IC_{50} -verdi lik $29,1 \pm 1,2 \mu\text{M}$ (Tabell B.16). Det er også tidligere vist at astilbin har radikalfangende evne (Yoshiki et al. 1995; Yoshiki et al. 1996; Braca et al. 2002). I tillegg ble det vist at forbindelsen har en moderat 15-LO hemmende aktivitet. Dette er ikke tidligere rapportert. IC_{50} -verdien ble ikke bestemt, men ved en konsentrasjon lik $83,3 \mu\text{M}$ ga astilbin $40 \pm 0,9\%$ hemming av 15-LO (Tabell B.17). Quercetin ($IC_{50} 38 \pm 2 \mu\text{M}$) ble brukt som positiv kontroll i 15-LO testen.

Biologisk aktivitet

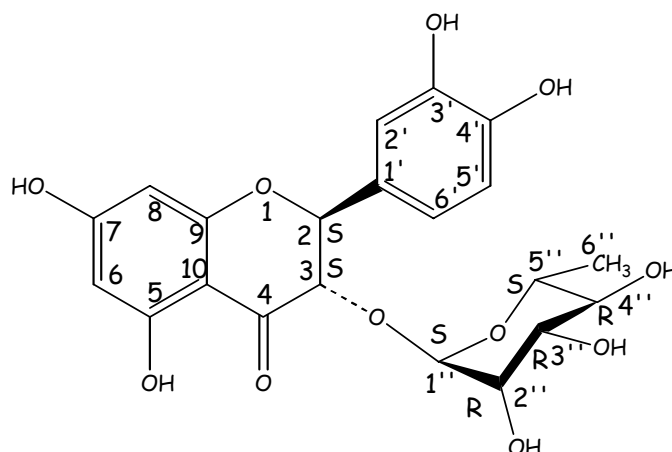
Det har blitt rapportert at astilbin har en rekke biologiske aktiviteter. Blant annet hemmer den linse aldose reduktase (Haraguchi et al. 1996; Haraguchi et al. 1997), kasein kinase II (Ishibashi et al. 1999), cAMP fosfodiesterase (Nikaido et al. 1989), lipase (Tamura et al. 2003), matriks metalloprotease (Akisawa et al. 2002) og stilben oksidase (Goetz et al. 1999). I tillegg har forbindelsen vist antioksidantaktivitet, leverbeskyttende effekt (Closa et al. 1997; Xu et al. 1999), brusksbeskyttende effekt (Watanabe et al. 1995), og den kan hemme larvevekst (Elliger et al. 1980). Den kan øke noradrenalin-indusert lipolyse (Han et al. 1998), forbedre blærefunksjon (Kawashima et al. 2003) og trolig hemme forsinket type hypersensitivitetsreaksjoner (Cai et al. 2003). Te av blader fra *Engelhardtia chrysolepis* inneholder astilbin og dens isomere. Det er vist at teen og/eller astilbin og eventuelt dens isomere har antioksidant aktivitet, suppressiv aktivitet på generering av aktive oksygenspecies, hemmende effekt på lipidperoksidering, antiallergisk og antiinflammatorisk aktivitet, antitumor-fremmende aktivitet, beskytter mot oksidativ hemolyse av humane røde blodceller og reduserer lipidnivåer (Mizutani et al. 1997).

6.25.3 Neoastilbin

Neoastilbin er en stereoisomer av astilbin med 2S, 3S-konfigurasjon. Neoastilbin er ikke rapportert funnet i *D. abyssinica* tidligere, og det foreligger bare få tidligere funn av denne forbindelsen.

NMR-spektroskopi

NMR-dataene som ble funnet for fraksjon H5.1b.1 løst i CD_3OD (NMR-spektrum C.99 og C.100) ble sammenlignet med data funnet i litteraturen der neoastilbin var løst i $DMSO-d_6$ for 1H -NMR-spekteret og CD_3OD for ^{13}C -NMR-spekteret (De Britto et al. 1995). Sammenligningen viste en overenstemmelse mellom disse (Tabell 19 og Tabell 20). Signalet for H-5" som er sterkt shieldet ($\delta 2,30$ ppm) er karakteristisk for 2S, 3S-isomeren i motsetning til 2R, 2R-isomeren astilbin.



Figur 31. Strukturformel for neoastilbin med nummerering av karbonatomer.

Tabell 19. Sammenligning av observerte $^1\text{H-NMR}$ -data med data funnet i litteraturen for neoastilbin (De Britto et al. 1995).

H/C nummer	δ (ppm)		Antall H	Koblingskonstant, J (Hz)		Signaltype
	Litt. data	Observ. data		Litt. data	Observ. data	
2'	6,91	6,97	1	-	-	br s/s
5', 6'	6,70-6,75	6,80	2	-	-	-
8	5,88	5,92	1	2,1	2,2	d
6	5,83	5,89	1	2,1	2,2	d
2	5,08	4,99	1	11,0	11,2	d
1''	4,96	5,16	1	1,2	1,5	d
3	4,70	4,64	1	11,0	11,4	d
2''	3,78	4,01	1	3,1, 1,2	3,1, 1,6	dd
3''	3,16	3,39	1	9,2, 3,1	9,7, 3,3	dd
4''	3,04	3,19	1	9,2	9,5	†
5''	2,28	2,30	1	9,2, 6,4	9,3, 6,2	dq
6''	0,80	0,90	3	6,4	6,2	d

Tabell 20. Sammenligning av observerte ^{13}C -NMR-data med data funnet i litteraturen for neoastilbin (De Britto et al. 1995).

H/C nummer	δ (ppm)	
	Litt. data	Observ. data
4	197,6	197,6
7	168,9	168,7
5	165,4	165,4
9	164,3	164,3
4'	147,4	147,5
3'	146,7	146,6
1'	130,0	129,9
6'	121,0	120,9
2'	116,3	116,3
5'	115,5	115,5
10	102,1	102,1
6	97,5	97,4
8	96,3	96,3
2	83,7	83,7
3	76,9	76,9
1"	102,8	102,8
2"	71,9	72,0
3"	72,0	72,0
4"	73,5	73,5
5"	70,4	70,3
6"	17,9	18,0

MS

MS av fraksjon H5.1b.1 viste at forbindelsen har en molekylvekt lik 450 (Massespektrum D.4). Dette er i overenskomst med neoastilbin som har en molekylvekt lik 450,39.

Bioassay

Det ble vist at neoastilbin har radikalfangende evne med en IC_{50} -verdi lik $26,0 \pm 1,0 \mu\text{M}$ (Tabell B.35). Det har tidligere kun blitt rapportert at te av blader fra *Engelhardtia chrysolepis* som inneholder neoastilbin har antioksidantaktivitet. Det ble også vist at forbindelsen har evne til å hemme 15-LO med en IC_{50} -verdi lik $79 \pm 3 \mu\text{M}$ (Tabell B.36). Dette er ikke rapportert tidligere. Quercetin ($\text{IC}_{50} 38 \pm 2 \mu\text{M}$) ble brukt som positiv kontroll i 15-LO testen.

Biologisk aktivitet

Det har blitt rapportert at neoastilbin hemmer linse aldose reduktase (Haraguchi et al. 1996) og kasein kinase II (Ishibashi et al. 1999).

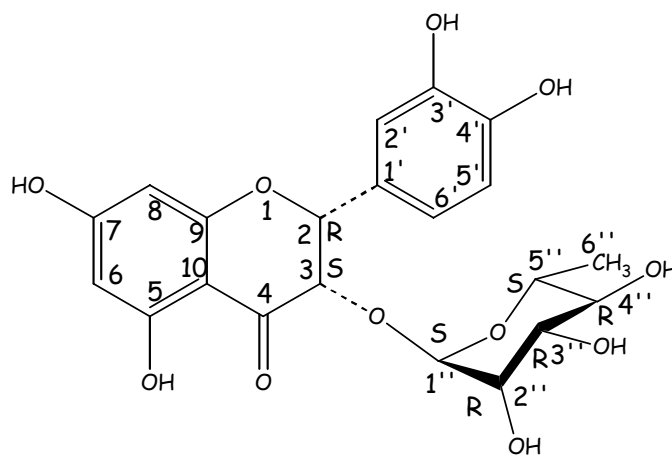
Te av blader fra *Engelhardtia chrysolepis* inneholder astilbin og dens isomere. For beskrivelse av biologiske effekter av denne teen se under avsnitt 6.25.2 Astilbin.

6.25.4 Neoisostilbin

Neoisostilbin er en stereoisomer av astilbin med 2R, 3S-konfigurasjon. Neoisostilbin er ikke rapportert funnet i *D. abyssinica* tidligere, og i likhet med neoastilbin er dette en sjelden forbindelse i naturen.

NMR-spektroskopi

NMR-dataene som ble funnet for fraksjon E5.2.1.1.2b løst i CD₃OD (NMR-spektrum C.56) ble sammenlignet med data funnet i litteraturen der neoistilbin var løst i DMSO-*d*₆ (De Britto et al. 1995). Sammenligningen viste en overenstemmelse mellom disse (Tabell 21). Den sterke shieldingen av H-5'' (δ 2,45 ppm) tyder på at slik shielding er korrelert med 3S-stereokjemi.



Figur 32. Strukturformel for neoistilbin med nummerering av karbonatomer.

Tabell 21. Sammenligning av observerte ¹H-NMR-data med data funnet i litteraturen for neoistilbin (De Britto et al. 1995).

H/C nummer	δ (ppm)		Antall H	Koblingskonstant, J (Hz)		Signaltype
	Litt. data	Observ. Data		Litt. data	Observ. data	
2'	6,86	6,94	1	-	-	br s/s
5', 6'	6,70-6,75	6,82	2	-	-	-
8	5,92	5,97	1	2,0	2,2	d
6	5,88	5,92	1	2,0	2,2	d
2	5,52	5,42	1	2,4	2,4	d
1''	4,78	4,96	1	1,2	1,5	d
3	4,20	4,19	1	2,4	2,4	d
2''	3,48	3,67	1	3,1, 1,2	3,2, 1,6	dd
3''	3,42	3,45	1	9,4, 3,1	9,7, 3,3	dd
4''	3,05	3,32	1	9,4	9,3	†
5''	2,45	2,47	1	9,4, 6,1	9,7, 5,9	dq
6''	0,85	0,93	3	6,1	6,2	d

MS

MS av fraksjon E5.2.1.1.2b viste at forbindelsen har en molekylvekt lik 450 (Massespektrum D.3). Dette er i overenskomst med neoastilbin som har en molekylvekt lik 450,39.

Bioassay

Neoastilbin ble ikke isolert i tilstrekkelig mengde til å utføre bioassay.

Biologisk aktivitet

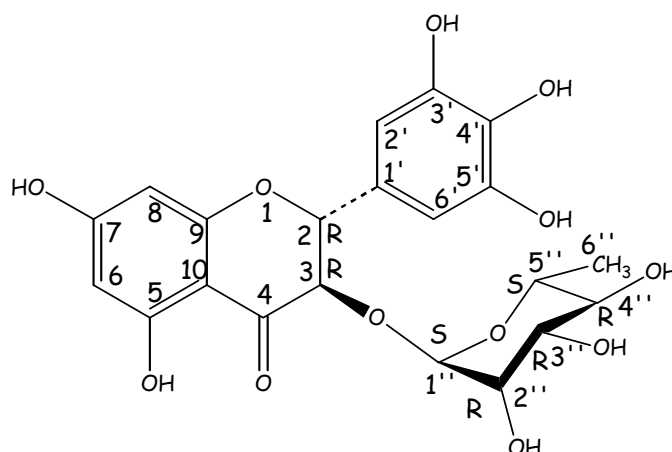
Te av blader fra *Engelhardtia chrysolepis* inneholder astilbin og dens isomere. For beskrivelse av biologiske effekter av denne teen se under avsnitt 6.25.2 Astilbin.

6.25.5 Ampelopsin-3-rhamnosid

Ampelopsin-3-rhamnosid er som astilbin og dens isomere et dihydroflavonolglykosid der sukkerenheten består av rhamnose. Det som skiller den fra astilbin og dens isomere er en hydroksylgruppe ved C-5'. Som astilbin har ampelopsin-3-rhamnosid 2R, 3R-konfigurasjon. Ampelopsin-3-rhamnosid er ikke rapportert funnet i *D. abyssinica* tidligere, og er tidligere rapportert i kun fire planter.

NMR-spektroskopi

NMR-dataene som ble funnet for fraksjon E7.2.1.1 løst i CD₃OD (NMR-spektrum C.61 og C.62) ble sammenlignet med data funnet i litteraturen der ampelopsin-3-rhamnosid var løst i CD₃OD for ¹H-NMR-spekteret (Gellért et al. 1981), samt en sammenligning med ¹³C-NMR-data for ampelopsin løst i DMSO-*d*₆ (Agrawal 1989). ¹³C-NMR-data for ampelopsin-3-rhamnosid er ikke publisert tidligere. Sammenligningen viste en overenstemmelse mellom disse (Tabell 22 og Tabell 23).



Figur 33. Strukturformel for ampelopsin-3-rhamnosid med nummerering av karbonatomer.

Tabell 22. Sammenligning av observerte ^1H -NMR-data med data funnet i litteraturen for ampelopsin-3-rhamnosid (Gellért et al. 1981).

H/C nummer	δ (ppm)		Antall H	Koblingskonstant, J (Hz)		Signaltype
	Litt. data	Observ. data		Litt. data	Observ. data	
2', 6'	6,65	6,52	2	-	-	s
6, 8	6,05	5,91	2	-	-	s
2	ca. 5,1	5,1	1	-	-	d
3	4,65	4,60	1	11	11,2	d
1''	3,7	4,10	1	1,5	1,5	d
2'', 3'', 4'', 5''	3,3-3,6	3,3-3,5	4	-	-	m
6''	1,35	1,18	3	6	6,2	d

Tabell 23. Sammenligning av observerte ^{13}C -NMR-data for ampelopsin-3-rhamnosid med data funnet i litteraturen for ampelopsin (Agrawal 1989). Signaler i sukkerdelen av molekylet (1''-6'') er tilordnet ut fra sammenligning med astilbin.

H/C nummer	δ (ppm)	
	Litt. data	Observ. data
4	197,5	195,8
7	166,7	168,5
9	163,3	165,5
5	162,4	164,0
3'	145,6	147,0
5'	145,6	147,0
4'	133,4	133,5
1'	127,1	128,4
6'	106,9	108,1
2'	106,9	107,6
10	100,4	102,1
8	95,9	97,3
6	94,9	96,3
2	83,2	84,1
3	71,6	78,5
1''	-	102,1
2''	-	71,8
3''	-	72,2
4''	-	73,9
5''	-	70,5
6''	-	17,9

Bioassay

Det ble vist at ampelopsin-3-rhamnosid har radikalfangende evne med en IC_{50} -verdi lik $11,5 \pm 0,8 \mu\text{M}$ (Tabell B.22). Dette er ikke rapportert tidligere. I tillegg ble det vist at forbindelsen har evne til å hemme 15-LO med en IC_{50} -verdi lik $64 \pm 5 \mu\text{M}$ (Tabell B.23).

Dette er heller ikke rapportert tidligere. Quercetin ($IC_{50} 38 \pm 2 \mu M$) ble brukt som positiv kontroll i 15-LO testen.

Biologisk aktivitet

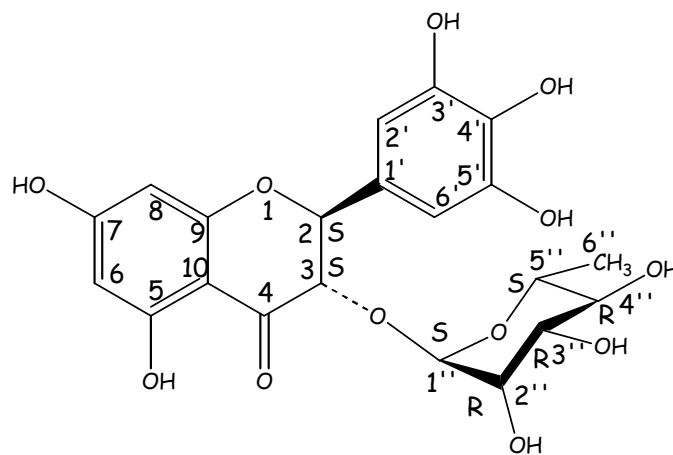
Det foreligger ingen rapporter om biologisk aktivitet av ampelopsin-3-rhamnosid.

6.25.6 Neoampelopsin-3-rhamnosid

Neoampelopsin-3-rhamnosid er en stereoisomer av ampelopsin-3-rhamnosid med 2S, 3S-konfigurasjon. Forbindelsen er ikke tidligere beskrevet, og er dermed et nytt naturstoff.

NMR-spektroskopi

NMR-dataene som ble funnet for fraksjon I2.1 løst i CD_3OD (NMR-spektrum C.101 og C.102) ble sammenlignet med data funnet i litteraturen der ampelopsin-3-rhamnosid var løst i CD_3OD for 1H -NMR-spekteret (Gellért et al. 1981), samt en sammenligning med ^{13}C -NMR-data for ampelopsin løst i $DMSO-d_6$ (Agrawal 1989). Sammenligningen synliggjør forskjellene mellom ampelopsin-3-rhamnosid og neoampelopsin-3-rhamnosid (Tabell 24 og Tabell 25). Den store koblingskonstanten for H-3 (10,4 Hz) tyder på 2S, 3S- eller 2R, 3R-stereokjemi. Ampelopsin-3-rhamnosid er 2R, 3R-isomeren, følgelig antas stoffet i fraksjon I2.1 å være 2S, 3S-isomeren. Dette bestyrkes av signalet ved 2,42 ppm, som antas å skyldes H-5'' i en forbindelse med 3S-stereokjemi.



Figur 34. Strukturformel for neoampelopsin-3-rhamnosid med nummerering av karbonatomer.

Tabell 24. Sammenligning av observerte ^1H -NMR-data for neoampelopsin-3-rhamnosid med data funnet i litteraturen for ampelopsin-3-rhamnosid (Gellért et al. 1981).

H/C nummer	δ (ppm)		Antall H	Koblingskonstant, J (Hz)		Signaltype
	Litt. data	Observ. data		Litt. data	Observ. data	
2', 6'	6,65	6,51	2	-	-	s
6, 8	6,05	5,91	2	-	-	s
2	ca. 5,1	5,0	1	-	-	d
3	4,65	4,53	1	11	10,4	d
1"	3,7	4,01	1	1,5	1,6	d
2", 3", 4" (5")	3,3-3,6	3,2-3,5	3 (4)	-	-	m
5"	-	2,42	1	-	9,3, 6,0	dq
6"	1,35	0,94	3	6	6,2	d

Tabell 25. Sammenligning av observerte ^{13}C -NMR-data for neoampelopsin-3-rhamnosid med data funnet i litteraturen for ampelopsin (Agrawal 1989). Signaler i sukkerdelen av molekylet (1"-6") er tilordnet ut fra sammenligning med neoastilbin.

H/C nummer	δ (ppm)	
	Litt. data	Observ. data
4	197,5	197,4
7	166,7	168,6
9	163,3	165,4
5	162,4	164,2
3'	145,6	147,0
5'	145,6	147,0
4'	133,4	142,6
1'	127,1	129,1
6'	106,9	108,1
2'	106,9	124,6
10	100,4	102,0
8	95,9	97,4
6	94,9	96,3
2	83,2	83,8
3	71,6	78,4
1"	-	102,7
2"	-	70,4
3"	-	72,0
4"	-	73,5
5"	-	70,4
6"	-	17,9

MS

MS av fraksjon I2.1 viste at forbindelsen har en molekylvekt lik 466 (Massespektrum D.5). Dette er i overenskomst med neoampelopsin-3-rhamnosid som har en molekylvekt lik 466,39.

Bioassay

Det ble vist at neoampelopsin-3-rhamnosid har radikalfangende evne med en IC_{50} -verdi lik $12,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (Tabell B.38). I tillegg ble det vist at forbindelsen har evne til å hemme 15-LO med en IC_{50} -verdi lik $71 \pm 5 \mu\text{M}$ (Tabell B.39). Dette er ikke rapportert tidligere. Quercetin ($IC_{50} 38 \pm 2 \mu\text{M}$) ble brukt som positiv kontroll i 15-LO testen.

Biologisk aktivitet

Det foreligger ingen rapporter om biologisk aktivitet av neoampelopsin-3-rhamnosid da forbindelsen ikke er beskrevet tidligere.

6.26 Etnofarmakologiske studier**6.26.1 Feltarbeid i Mali**

I Tabell 26 er resultatene av healerintervjuene oppsummert. Her er kun de healerne som anvendte *D. abyssinica* inkludert. Dette utgjorde 22 av totalt 68 healere.

6.26.1.1 Dioïla

Under feltarbeidet i Dioïla-området ble totalt 50 healere fra seks ulike landsbyer intervjuet. 22 av de 50 healerne brukte planten medisinsk, og i hver landsby var det minst én healer som brukte planten. Planten ble brukt for å behandle en rekke lidelser. Hovedindikasjonene var mageproblemer, malaria, tannhygiene, tannverk, sårbehandling og ulike typer smerter. Den plantedelen som ble brukt oftest var blad, og da gjerne i form av et dekokt.

Tabell 26. Oversikt over innsamlet informasjon om *Diospyros abyssinica* fra healerintervjuene i Dioïla-området.

LANDSBY	HEALERENS NAVN OG PRAKSIS	PLANTEDEL	INDIKASJON	BRUK
Dioïla	N'kio Ballo dit Baba > 3 pasienter/dag > 10 års praksis	Stammebark	Forstoppelse	Blandes med <i>Zingiber officinalis</i> , og knuses. Pulveret spises 3 ganger daglig
	Fanta Diarra Dakité	Blad	Støl og stivhet	Dekokt brukes til å ta bad 3 ganger daglig
	Mamadou Dembélé (49 år) > 4 pasienter/måned > 10 års praksis	Bark	Tannverk	Knuser salt og chilipepper, dette brennes og røyken inhaleres. Lager dekokt av bladene, og bruker dette

Resultat og diskusjon

		Blad Røtter	Knesmerter Ryggsmerter	som munnskylling Dekokt masseres inn Dekokt brukes til dampbad av ryggen, deretter vaskes ryggen med vann
	Fatoumata Diarra (70 år) > 10 pasienter/dag > 40 års praksis	Blader eller Røtter	Malaria	Dekokt drikkes og brukes til å ta bad
	Daba Mariko > 10 pasienter/dag > 20 års praksis	Røtter Blader	Dysenteri Sinusitt	Dekokt drikkes 1 gang daglig Dekokt brukes til dampbad av hode
	Bandji Bourama Samaké > 10 pasienter/måned > 20 års praksis	Bark Blader	Diaré Tretthet	Pulveriseres og macereres Drikkes Dekokt drikkes og brukes til bad 2 ganger daglig
	Ba Kadia Sidibé > 10 års praksis	Blader eller bark	Magesmerter, malaria	Dekokt drikkes og brukes til bad 2 ganger daglig
	Bodje N'Golo Sidibé (56 år) > 10 pasienter/dag > 20 års praksis	Grener Røtter	Dysenteri Innvollsorm Magesmerter hos kvinner	Små grener tygges, og saften svelges Røtter blandes sammen med røtter av <i>Fagara zanthoxyloides</i> , lager pulver som spises Blander røttene sammen med røtter av <i>Fagara zanthoxyloides</i> , lager dekokt som drikkes 2 ganger daglig i 2 måneder
	Karim Sidibé > 4 pasienter/dag > 5 års praksis	Blad	Malaria	Dekokt drikkes og brukes til bad 2 ganger daglig
	Moussa Sidibé > 11 pasienter/dag > 10 års praksis	Bark Grener Blader	Gamle sår som skyldes onde ånder, kalles bonida Munnsår Anemi Leddsmerter Ribbensmerter Halsinfeksjon (stafylokokker)	Barken karboniseres, og appliseres 2 ganger daglig Brukes som børste Dekokt drikkes og brukes til bad og dampbad 3 ganger daglig Dekokt av bladene masseres inn Blader blandes med gui av <i>Bauhinia reticulata</i> , lager dekokt. Brukes til dampbad og massasje av ribben Blader blandes med blader fra <i>Ximenia americana</i> , lager dekokt som inhaleres
Djondougou	Benikè Traoré Mange års praksis	Grener	Rensing av tenner	Tar av barken av grenen. Gnir grenen langs tennene

				og tygger på den.
Falakono	Mi Dagnoko > 20 pasienter/dag	Stammebark	Sår; alle typer Flatulens	Såret vaskes med dekokt av stammebark i fire dager Drikker dekokt av stammebark 1-3 ganger daglig
Korokoro	Barou Doumbia > 10 pasienter/dag > 20 års praksis	Blader	Malaria	Dekokt (evnt. sammen med <i>Vernonia colorata</i>) drikkes og brukes til bad
	Molobali Mariko > 6 pasienter/dag > 7 års praksis	Bark Røtter	Alvorlig kløe, byller Magesmerter	Bark knuses, tilsettes KOH, pomade lages Smøres inn Dekokt drikkes 2 ganger daglig
Ŋnizana	Drissa Sangare, (ca. 60 år) > 4 pasienter/dag	Grener	Rensing av tenner	Tar barken av grenen. Ŋnir grenen langs tennene og tygger på den
Sirimanbougou	Sidi Konaté (60 år) > 5 pasienter/dag > 20 års praksis	Bark og blader	Gastrointestinal sykdom hos barn, dvs. grønn avføring	Dekokt drikkes og brukes til bad
	Sirima Konaté (60 år) > 4 pasienter/dag > 10 års praksis	Blader	Hekser	Dekokt drikkes og brukes til bad
Diadougoutigilla	Fanto Diabaté (35 år) > 10 pasienter/dag > 14 års praksis	Bark	Beskyttelse mot hekser	Bark tørkes, knuses og tilsettes vann
Zanbougou	Bakari Bagayogo (38 år) > 5 pasienter/uke > 7 års praksis	Blader	Agitasjon og angst Tannverk	Dekokt drikkes og brukes til bad hver kveld Dekokt gurgles
	Yiribah Diarra (68 år) > 4 pasienter/dag > 40 års praksis	Grener	Rensing av tenner	Tar av barken av grenen. Ŋnir grenen langs tennene og tygger på den
	Issa Fomba 1-5 pasienter/dag > 10 års praksis	Blader	Alle ukjente sykdommer	Dekokt drikkes og brukes til bad
	Dounamba Traoré > 10 pasienter/dag > 20 års praksis	Blader	Agitasjon og angst	Tilsetter en vannplante, og lager dekokt Drikkes og brukes til bad

6.26.1.2 Bandiagara

Under feltarbeidet i Bandiagara-området ble totalt 18 healere fra fem ulike landsbyer intervjuet. De første intervjuene i området gjorde det klart at healerne ikke kjente til planten. Ved et besøk hos forstvesenet i Bandiagara ble det konkludert med at planten ikke vokser i området, og dermed kjente naturlig nok ikke healerne til medisinsk bruk av planten. Dette er grunnen til at det ikke foreligger noe informasjon om bruk av planten i Bandiagara-området.

6.26.2 Fytokjemisk screening

Resultatene fra screeningundersøkelsene som ble utført ved DMT er gitt i Tabell 27.

Tabell 27. Resultat fra screeningundersøkelsene av *D. abyssinica*.

Screeningtest	Resultat	Kommentar
Cyanogene glykosider	-	
% Vannløselige substanser i 1 g droge	14,4	
Kumariner	+++	
Karotenoider	-	
Antrakinonderivater	+++ + +	Frie C-glykosider O-glykosider
Flavonoider	+++++	
Alkaloider	- - -	Frie baser Salt Pupillutvidende solanace-alkaloider
Saponiner	++++ 333,3	Skum Skumindeks
Tanniner	++++ ++++	Kondenserte Hydrolyserbare
Reduserende substanser	++++	
Mono- og oligosakkarider	++++	
Polyuronider (mucilage)	++	
Steroler og triterpener	+++++ ++++	Triterpenglykosider Steroider
Hjerteglykosider	+++	
% Vanninnhold	6,46 % 6 %	Tørketap Volumetrisk metode
% Mineralinnhold	6,89 % 12,12 % 9,77 %	Forasket totaldroge Askeandel løselig i 10% saltsyre 50% svovelsyre
Anthocyaner	+	
Leukoanthocyaner (trolig proantocyanidiner)	++++	
Tetrahydrokannabinoler	-	

7 Konklusjon

Rotbarken til *D. abyssinica* inneholder en rekke stoff som har radikalscavenger- og 15-LO hemmende aktivitet. Forbindelsene som ble isolert fra metanolekstraktet til rotbarken av planten var isokumarinet bergenin og flavonoidglykosidene astilbin, neoastilbin, neoisoastilbin, ampelopsin-3-rhamnosid og neoampelopsin-3-rhamnosid. De isolerte forbindelsene er ikke rapportert i planten tidligere.

Alle de isolerte forbindelsene viser både signifikant radikalscavengeraktivitet og signifikant hemming av 15-LO, med unntak av bergenin og neoisoastilbin. Bergenin har svært svak radikalfangende evne, men viser signifikant hemming av 15-LO. Neoisoastilbin ble ikke isolert i tilstrekkelige mengder til å utføre bioassay. Det er tydelig at trioksygenering i B-ringen fører til kraftigere radikalscavenging enn dioksygenering.

For bergenin, astilbin, neoastilbin og ampelopsin-3-rhamnosid har 15-LO hemmingsaktiviteten ikke blitt rapportert tidligere. For ampelopsin-3-rhamnosid er heller ikke radikalscavengeraktiviteten rapportert tidligere. I tillegg til radikalscavengeraktivitet og evne til å hemme 15-LO har de isolerte forbindelsene en rekke biologiske aktiviteter som blant annet har gitt opphav til patenter.

Neoampelopsin-3-rhamnosid er et nytt naturstoff som heller ikke har blitt beskrevet som en syntetisert forbindelse. Neoastilbin, neoisoastilbin og ampelopsin-3-rhamnosid er svært sjeldne naturlig forekommende forbindelser, mens bergenin og astilbin har blitt funnet i en rekke planter.

Innholdet av bergenin i plantematerialet ble kvantifisert og funnet å være $4,29 \pm 0,23\%$. Dette kan brukes til standardisering av plantematerialet.

Under feltarbeidet i Mali ble det avdekket at *D. abyssinica* ikke ble brukt i Bandiagara-området fordi den ikke vokste der. I Dioila viste det seg at bruksområdet for medisinplanten var svært variert. Hovedindikasjonene var mageproblemer, malaria, tannhygiene, tannverk, sårbehandling og ulike typer smerter. Den plantedelen som ble brukt oftest var blad. Disse ble gjerne brukt i form av et dekokt.

D. abyssinica inneholder flere bioaktive substanser som kan bidra til plantens eventuelle helende egenskaper. Dette kan muligens forklare den utstrakte medisinske bruken av planten i Mali.

7.1 Forslag til videre arbeid

Det er mange interessante fraksjoner som det absolutt bør arbeides videre med for om mulig å fastslå om det er andre stoff i rotbarken av planten som kan bidra til plantens egenskaper, og dermed forklare dens tradisjonelle medisinske bruk.

Det ville vært interessant å undersøke om 80% etanolekstraktet inneholder det samme som metanolekstraktet. Dessuten ville det vært interessant å undersøke noen av de lipofile råekstraktene da disse trolig inneholder andre stoff enn de hydrofile råekstraktene. Blant disse er diklormetaneekstraktet spesielt interessant da det trolig inneholder lipofile enzymhemmere.

Det er også en rekke mellomfraksjoner som er aktuelle for videre arbeid. Fraksjonene B7 og B8 viste høy aktivitet både med hensyn på radikalscavenging og hemming av 15-LO og er dermed av interesse. Fraksjonene C11, C12 og C13 inneholder trolig proanthocyanidiner. Det ville være spennende å undersøke aktiviteten deres i bioassayene. Spesielt interessante er fraksjonene C3, C5 og C7, altså fraksjonene som ligger rundt de fraksjonene som inneholder bergenin. Bioassayene viste at disse fraksjonene hadde høy aktivitet med hensyn på radikalscavenging og hemming av 15-LO, mens bergenin kun har høy aktivitet med hensyn på hemming av 15-LO. Dette indikerer tilstedeværelsen av en potent radikalscavenger som trolig ligner bergenin ut fra NMR-spektrene til fraksjonene. Det samme kan være tilfellet for fraksjon E3.1, og det gjør også denne fraksjonen interessant.

Bioassaymetodene er *in vitro* forsøk og kan dermed bare gi en indikasjon på om forbindelsene har effekt *in vivo*. For å finne ut om resultatene kan ha medisinsk betydning er det derfor nødvendig med videre undersøkelser.

8 Litteraturliste

Agrawal, P. K. (1989). Carbon-13 NMR of flavonoids. Amsterdam, Elsevier.

Akisawa, T., M. Miyakoshi og K. Mizutani (2002). "Flavanone derivatives as matrix metalloprotease inhibitors." Japansk patent (JP 2002173424).

Ansari, K. U. (1996). "Free Radical Induced Diseases." Journal of the Indian Medical Association **94**: 238-239.

Artavia, D., M. Barrios og O. Castro (1995). "A flavanonol rhamnoside from *Hymenaea courbaril* leaves." Fitoterapia **66**: 91-92.

Aylward, G. H. og T. J. V. Findlay (1998). SI Chemical Data. 4. utgave. Brisbane, Jacaranda Wiley Ltd.

Bjørneboe, G.-E. A. (1999). Vitamin E og andre antioksidanter. Mat og medisin. Red: C. A. Drevon og G.-E. A. Bjørneboe. Kristiansand, Høyskoleforlaget AS: 247-269.

Blois, M. S. (1958). "Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical." Nature(181): 1199-1200.

Braca, A., C. Sortino, M. Politi, I. Morelli og J. Mendez (2002). "Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*." Journal of Ethnopharmacology **79**: 379-381.

Breu, W., M. Hagenlocher, K. Redl, G. Tittel, F. Stadler og H. Wagner (1992). "Antiphlogistische Wirkung eines mit hyperkritischem Kohlendioxid gewonnenen Sabalfrucht-Extraktes." Arzneimittel-Forschung **42**: 547-551.

Burkill, H. M. (1994). The useful plants of West Tropical Africa. 2. utgave. Kew, Royal Botanic Gardens.

Cai, Y., T. Chen og Q. Xu (2003). "Astilbin suppresses delayed-type hypersensitivity by inhibiting lymphocyte migration." Journal of Pharmacy and Pharmacology **55**: 691-696.

Cestaro, B., A. Giuliani, F. Fabris og C. Scarafioti (1997). "Free radicals, atherosclerosis, ageing and related dysmetabolic pathologies: biochemical and molecular aspects." European Journal of Cancer Prevention **6**(Suppl 1): S25-S30.

Chambers, R. E. og J. R. Clamp (1971). "An Assessment of Methanolysis and Other Factors Used in the Analysis of Carbohydrate-Containing Materials." Biochemical Journal **125**: 1009-1018.

Closa, D., M. Torres, G. Hotter, G. Bioque, O. S. Leon, E. Gelpi og J. Rosello-Catafau (1997). "Prostanoids and free radicals in Cl₄C-induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin." Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids **56**: 331-334.

Cox, P. A. og M. J. Balick (1994). "The Ethnobotanical Approach to Drug Discovery." Scientific American **270**(6): 60-65.

Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. New York, Columbia University Press.

De Britto, J., V. S. Manickam, S. Gopalakrishnan, T. Ushioda og N. Tanaka (1995). "Determination of Aglycon Chirality in Dihydroflavonol 3-O- α -L-Rhamnosides by ¹H-NMR Spectroscopy." Chemical & Pharmaceutical Bulletin **43**: 338-339.

Diallo, D. (2000). Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and Phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (Mimosaceae), *Trichilia emetica* (Meliaceae). Lausanne, Université de Lausanne.

Diallo, D. og B. S. Paulsen (2000). Pharmaceutical research and traditional practitioners in Mali: Experiences with benefit sharing. Responding to bioprospecting : From biodiversity in the South to medicines in the North. Red: H. Svarstad og S. S. Dhillion. Oslo, Spartacus Forlag AS: 133-145.

Diallo, D., B. S. Paulsen og B. Hveem (1996). Production of traditional medicine: preparations accepted as medicines in Mali. Chemistry, Biological and Pharmacological properties of African Medicinal Plants. Red: K. Hostettmann, F. Chinyanganya, M. Maillard og J. L. Wolfender. Zimbabwe, University of Zimbabwe Publications: 235-241.

El Tahir, K. E. H. og K. I. Williams (1980). "Factors affecting prostacyclin formation by the rat pregnant myometrium." British Journal of Pharmacology **71**: 641-649.

Elliger, C. A., B. C. Chan og A. C. Waiss, Jr. (1980). "Flavonoids as Larval Growth Inhibitors. Structural factors governing toxicity." Naturwissenschaften **67**: 358-360.

Faix, O., D. S. Argyropoulos, D. Robert og V. Neirinck (1994). "Determination of hydroxyl groups in lignins evaluation of ^1H -, ^{13}C -, ^{31}P -NMR, FTIR and wet chemical methods." Holzforschung **48**: 387-394.

Fitzpatrick, M., A. Burke, G. Campbell, B. Carmichael, M. Fletcher, F. L. Gordon, A. Ham, A. Karafin, K. Wildman og I. Young (2002). West Africa. 5. utgave. Victoria, Lonely Planet Publications Pty Ltd.

Fox, M. A. (1997). Organic Chemistry. 2. utgave. Sudbury, Jones and Bartlett Publishers.

Gellért, M., K. Szendrei og J. Reisch (1981). "Dihydromyricetin 3-O-rhamnoside from leaves of *Catha edulis*." Phytochemistry **20**: 1759-1760.

Glavind, J. (1963). "Antioxidants in Animal Tissue." Acta Chemica Scandinavica **17**: 1635-1640.

Glavind, J. og G. Holmer (1966). "Thin-Layer Chromatographic Determination of Antioxidants by the Stable Free Radical α,α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl." Journal of the American Oil Chemists' Society **44**: 539-542.

Gleason, M. M., C. J. Rojas, K. S. Learn, M. H. Perrone og G. E. Bilder (1995). "Characterization and inhibition of 15-lipoxygenase in human monocytes: comparison with soybean 15-lipoxygenase." American Journal of Physiology **37**: C1301-C1307.

Goel, R. K., R. N. Maiti, M. Manickam og A. B. Ray (1997). "Antiulcer activity of naturally occurring pyrano- coumarin and isocoumarins and their effect on prostanoïd synthesis using human colonic mucosa." Indian Journal of Experimental Biology **35**: 1080-1083.

Goetz, G., A. Fkyerat, N. Metais, M. Kunz, R. Tabacchi, R. Pezet og V. Pont (1999). "Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolic inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase." Phytochemistry **52**: 759-767.

Greibrokk, T., E. Lundanes og K. E. Rasmussen (1998). Kromatografi : Separasjon og deteksjon. Oslo, Universitetsforlaget.

Gutteridge, J. M. C. (1986). "Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation." Free Radical Research Communications **1**: 173-184.

Gutteridge, J. M. C. og B. Halliwell (1990). "The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems." Trends in Biochemical Sciences **15**: 129-135.

Haining, J. L. og B. Axelrod (1958). "Induction period in the lipoxidase-catalyzed oxidation of linoleic acid and its abolition by substrate peroxide." Journal of Biological Chemistry **232**: 193-202.

Halliwell, B. (1994a). "Free Radicals and Antioxidants: A Personal View." Nutrition Reviews **52**: 253-265.

Halliwell, B. (1994b). "Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?" Lancet **344**: 721-724.

Halliwell, B. (1995). "Oxidation of low-density lipoproteins: questions of initiation, propagation, and the effect of antioxidants." American Journal of Clinical Nutrition **61**(Suppl 3): 670S-677S.

Halliwell, B. (1997). "Antioxidants and Human Disease: A General Introduction." Nutrition Reviews **55**: S44-S52.

Halliwell, B., R. Aeschbach, J. Löliger og O. I. Aruoma (1995). "The Characterization of Antioxidants." Food and Chemical Toxicology **33**: 601-617.

Halliwell, B. og J. M. C. Gutteridge (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. 3. utgave. Oxford, Oxford University Press.

Han, L.-K., H. Ninomiya, M. Taniguchi, K. Baba, Y. Kimura og H. Okuda (1998). "Norepinephrine-Augmenting Lipolytic Effectors from *Astilbe thunbergii* Rhizomes." Journal of Natural Products **61**: 1006-1011.

Haraguchi, H., I. Ohmi, A. Fukuda, Y. Tamura, K. Mizutani, O. Tanaka og W.-H. Chou (1997). "Inhibition of Aldose Reductase and Sorbitol Accumulation by Astilbin and Taxifolin Dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **61**: 651-654.

Haraguchi, H., I. Ohmi, H. Masuda, Y. Tamura, K. Mizutani, O. Tanaka og W. H. Chou (1996). "Inhibition of aldose reductase by dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis* and effects on other enzymes." Experientia **52**: 564-567.

Harborne, J. B. og H. Baxter (1999). The Handbook of Natural Flavonoids. Chichester, Wiley.

Holmstedt, B. og J. G. Bruhn (1983). "Ethnopharmacology - a challenge." Journal of Ethnopharmacology **8**: 251-256.

Hostettmann, K. (1998). Preparative chromatography techniques : applications in natural product isolation. 2. utgave. Berlin, Springer.

Ishibashi, M., H. Oda, M. Mitamura, E. Okuyama, K. Komiyama, K. Kawaguchi, T. Watanabe, S. De Mello Alves, T. Maekawa og K. Ohtsuki (1999). "Casein kinase II inhibitors isolated from two Brazilian plants *Hymenaea parvifolia* and *Wulffia baccata*." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **9**: 2157-2160.

Jahromi, M. A. F., J. P. N. Chansouria og A. B. Ray (1992). "Hypolipidaemic Activity in Rats of Bergenin, the Major Constituent of *Flueggea microcarpa*." Phytotherapy Research **6**: 180-183.

Johnson, A. W. (1999). Invitation to Organic Chemistry. Sudbury, Jones and Bartlett Publishers.

Kawashima, Y., K. Mizutani og R. M. Levin (2003). "Engelhardtia chrysolepis extracts or dihydroflavonols and glycosides for improving bladder function or treating urinary disturbance and food and drink containing them." Europeisk patentsøknad (EP 1 283 048 A1).

Kerr, M. E., C. M. Bender og E. J. Monti (1996). "An introduction to oxygen free radicals." Heart and Lung **25**: 200-211.

Kim, H. S., H. K. Lim, M. W. Chung og Y. C. Kim (2000). "Antihepatotoxic activity of bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated hepatocytes." Journal of Ethnopharmacology **69**: 79-83.

Kleinveld, H. A., H. L. M. Hak-Lemmers, A. F. H. Stalenhoef og P. N. M. Demacker (1992). "Improved Measurement of Low-Density-Lipoprotein Susceptibility to

Copper-Induced Oxidation: Application of a Short Procedure for Isolating Low-Density Lipoprotein." Clinical Chemistry **38**: 2066-2072.

Knight, J. A. (1995). "Diseases Related to Oxygen-derived Free Radicals." Annals of Clinical and Laboratory Science **25**: 111-121.

Langner, A. og H. Bekemeier (1987). "Vergleich der Wirksamkeit von Lipoxygenaseinhibitoren an Sojabohnen- und Kaninchenretikulozytenlipoxygenase." Pharmazie **42**: 351.

Lim, H. K., H. S. Kim, M. W. Chung og Y. Choong Kim (2000). "Protective effects of Bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus*, on D-galactosamine-intoxicated rat hepatocytes." Journal of Ethnopharmacology **70**: 69-72.

Lyckander, I. M. og K. E. Malterud (1990). Lipoxygenase Inhibiting Flavonoids from *Orthosiphon spicatus*. Flavonoids in Biology and Medicine III. Red: N. P. Das. Singapore, National University of Singapore: 469-474.

Lyckander, I. M. og K. E. Malterud (1992). "Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* as inhibitors of 15-lipoxygenase." Acta Pharmaceutica Nordica **4**: 159-166.

Lyckander, I. M. og K. E. Malterud (1996). "Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* prevent oxidative inactivation of 15-lipoxygenase." Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids **54**: 239-246.

Madusolumuo, M. A. og Z. S. C. Okoye (1995). "Anticoagulant properties of bergenin from *Sacoglottis gabonensis* stem bark extract." Medical Science Research **23**: 443-444.

Maiga, A., B. S. Paulsen og K. E. Malterud (under utarbeidelse). "Antioxidants and Lipoxygenase Inhibitors in African Medicinal Plants."

Mallavadhani, U. V., A. K. Panda og Y. R. Rao (1998). "Pharmacology and chemotaxonomy of *Diospyros*." Phytochemistry **49**: 901-951.

Malterud, K. E. og T. Anthonsen (1987). "Carbon-13 NMR Studies on Partially *O*-Methylated Phenols: Spin-Lattice Relaxation Time Measurements as a Tool for Signal Assignments." Acta Chemica Scandinavica B **41**: 6-12.

Malterud, K. E., T. L. Farbrot, A. E. Huse og R. B. Sund (1993). "Antioxidant and Radical Scavenging Effects of Anthraquinones and Anthrones." Pharmacology **47**(S1): 77-85.

Mathiesen, L. (1992). Hemmende effekter av flavonoider fra pors (*Myrica gale*) på lipidperoksydering in vitro. Oslo, Universitetet i Oslo.

Mathiesen, L. (1996). C-Methylated Dihydrochalcones and Chalcones from the Fruits of *Myrica gale* L. : Antioxidant, Radical Scavenging and Uncoupling Activities. Oslo, Universitetet i Oslo.

Mizutani, K., T. Kambara, H. Masuda, Y. Tamura, O. Tanaka, H. Tokuda, H. Nishino og M. Kozuka (1997). "Antitumor-Promoting Activities of Dihydroflavonols from Kohki Tea, the Leaves of *Engelhardtia chrysolepis*." Food Factors for Cancer Prevention, [International Conference on Food Factors: Chemistry and Cancer Prevention], Hamamatsu, Japan, Dec., 1995: 607-612.

Nikaido, T., T. Ohmoto, T. Kinoshita, U. Sankawa, F. Delle Monache, B. Botta, T. Tomimori, Y. Miyaichi, Y. Shirataki, I. Yokoe og M. Komatsu (1989). "Inhibition of Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate Phosphodiesterase by Flavonoids. III." Chemical & Pharmaceutical Bulletin **37**: 1392-1395.

Paris, R. R. og H. Moyse (1976). Précis de matière médicale. 2. utgave. Paris, Masson.

Peigen, X. (1981). Traditional Experience of Chinese Herb Medicine Its Application in Drug Research and New Drug Searching. Natural Products as Medicinal Agents. Red: J. L. Beal og E. Reinhard. Stuttgart, Hippokrates Verlag.

Pharmacia Fine Chemicals AB (uten årstall). Sephadex LH-20 chromatography in organic solvents. Uppsala, Pharmacia Fine Chemicals AB.

Piacente, S., C. Pizza, N. De Tommasi og N. Mahmood (1996). "Constituents of *Ardisia japonica* and Their in Vitro Anti-HIV Activity." Journal of Natural Products **59**: 565-569.

Pu, H.-L., X. Huang, J.-H. Zhao og A. Hong (2002). "Bergenin is the Antiarrhythmic Principle of *Fluggea virosa*." Planta Medica **68**: 372-374.

Ramaiah, P. A., L. R. Row, D. S. Reddy, A. S. R. Anjaneyulu, R. S. Ward og A. Pelter (1979). "Isolation and Characterization of Bergenin Derivatives from

Macaranga peltata." Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry: 2313-2316.

Rang, H. P., M. M. Dale og J. M. Ritter (1999). Pharmacology. 4. utgave. Edinburgh, Churchill Livingstone.

Reddy, U. D. C., A. S. Chawla, M. Deepak, D. Singh og S. S. Handa (1999). "High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Bergenin and (+)-Afzelechin from Different Parts of Paashaanbhed (*Bergenia ligulata* Yeo)." Phytochemical Analysis **10**: 44-47.

Saeed, S. A., S. Farnaz, R. U. Simjee og A. Malik (1993). "Triterpenes and B-sitosterol from piper betle: isolation, antiplatelet and anti-inflammatory effects." Biochemical Society Transactions **21**: 462S.

Samuelsson, G. (1999). Drugs of Natural Origin. 4. utgave. Stockholm, Apotekarsocieteten.

Sendobry, S. M., J. A. Cornicelli, K. Welch, T. Bocan, B. Tait, B. K. Trivedi, N. Colbry, R. D. Dyer, S. J. Feinmark og A. Daugherty (1997). "Attenuation of diet-induced atherosclerosis in rabbits with a highly selective 15-lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties." British Journal of Pharmacology **120**: 1199-1206.

Singh, R. B. og M. A. Niaz (1996). "Antioxidants, oxidants and free radical stress in cardiovascular disease." Journal of the Association of Physicians of India **44**: 43-48.

Sogn, C. (1998). Polysakkarider fra *Vernonia kotschyana* rot. Etnobotanikk, kjemi og biologisk aktivitet. Oslo, Universitetet i Oslo.

Sumino, M., T. Sekine, N. Ruangrunsi, K. Igarashi og F. Ikegami (2002). "Ardisiphenols and Other Antioxidant Principles from the Fruits of *Ardisia colorata*." Chemical & Pharmaceutical Bulletin **50**: 1484-1487.

Swarnalakshmi, T., M. G. Sethuraman, N. Sulochana og R. Arivudainambi (1984). "A note on the antiinflammatory activity of bergenin." Current Science **53**: 917.

Sweeley, C. C., R. Bentley, M. Makita og W. W. Wells (1963). "Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances." Journal of the American Chemical Society **85**: 2497-2507.

Sæther, P. A. (1999). Radikalscavengere og antioksidanter fra rogneved. Oslo, Universitetet i Oslo.

Takahashi, H., M. Kosaka, Y. Watanabe, K. Nakade og Y. Fukuyama (2003). "Synthesis and Neuroprotective Activity of Bergenin Derivatives with Antioxidant Activity." Bioorganic & Medicinal Chemistry **11**: 1781-1788.

Tamura, K., T. Sogabe og M. Miyagoshi (2003). "Dihydroflavonols from Ampelopsis and Engelhardtia extracts as lipase inhibitors." Japansk patent (JP 2003012536).

Terao, J. (1999). Dietary Flavonoids as Plasma Antioxidants on Lipid Peroxidation: Significance of Metabolic Conversion. Antioxidant food supplements in human health. Red: L. Packer, M. Hiramatsu og T. Yoshikawa. London, Academic Press: 255-268.

Tominaga, T. og K. Yoshimura (1960). "Studies on the Constituents of the Bark of *Engelhardtia formosana*. X. Constituents of the Hot Alcoholic Extract." Yakugaku Zasshi **80**: 1345-1347.

Waller, D. P. (1993). "Methods in ethnopharmacology." Journal of Ethnopharmacology **38**: 189-195.

Watanabe, K., K. Niimura og K. Umekawa (1995). "Pharmaceutical compositions containing flavonoids as chondroprotective agents." Europeisk patentsøknad (EP 0 633 022 A2).

Westhuyzen, J. (1997). "The Oxidation Hypothesis of Atherosclerosis: An Update." Annals of Clinical and Laboratory Science **27**: 1-10.

Williams, D. H. (1987). Spectroscopic methods in organic chemistry. 4. utgave. London, McGraw-Hill Book Company Limited.

Xu, Q., F. Wu, J. Cao, T. Chen, J. Jiang, I. Saiki og A. Koda (1999). "Astilbin selectively induces dysfunction of liver-infiltrating cells - novel protection from liver damage." European Journal of Pharmacology **377**: 93-100.

Yokozawa, T., C. P. Chen, E. Dong, T. Tanaka, G.-I. Nonaka og I. Nishioka (1998). "Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical." Biochemical Pharmacology **56**: 213-222.

Yoshiki, Y., K. Igarashi og K. Okubo (1996). Chemiluminescence of phenolic compounds in the presence of active oxygen species and acetaldehyde. Agri-Food Quality. Red: G. R. Fenwick, C. Hedley, R. L. Richards og S. Khokhar. Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 364-367.

Yoshiki, Y., K. Okubo, M. Onuma og K. Igarashi (1995). "Chemiluminescence of benzoic and cinnamic acids, and flavonoids in the presence of aldehyde and hydrogen peroxide or hydroxyl radical by Fenton reaction." Phytochemistry **39**: 225-229.

Zhong, S. M., P. G. Waterman og J. A. D. Jeffreys (1984). "Naphthoquinones and triterpenes from African *Diospyros* species." Phytochemistry **23**: 1067-1072.

