

Bioaktive forbindelser i  
*Syzygium guineense* blad

Thuy Lan Nguyen



Masteroppgave

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2015





# **Bioaktive forbindelser i *Syzygium guineense* blad**

Av Thuy Lan Nguyen

Utført ved

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Oslo, mai 2015

Veiledere:

Førsteamanuensis Helle Wangenstein

Professor emeritus Karl Egil Malterud

Copyright Thuy Lan Nguyen

2015

Bioaktive forbindelser i *Syzygium guineense* blad

Thuy Lan Nguyen

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo



# Sammendrag

*Syzygium guineense* er et tre som er utbredt i en rekke afrikanske land som Mali, Etiopia, Eritrea, Senegal og Uganda. Treet har et bredt bruksområde innen tradisjonell afrikansk medisin. Blader benyttes for eksempel mot diaré, magesmerter, kolikk, øyeinflammasjon og topikalt på sår, mens bark blant annet brukes for å behandle hoste og andre halsproblemer, i tillegg til behandling mot malaria, beinbrudd og sår.

Med denne oppgaven var hensikten å isolere, strukturoppklare og identifisere biologisk aktive lavmolekylære substanser i planten. Undersøkelse av hvilke substanser som planten inneholder kan bidra til å forklare den tradisjonelle bruken.

Blader fra *S. guineense* ble ekstrahert med diklormetan og metanol. Metanolrækstraktet utgjorde den største fraksjonen og ble fraksjonert ved kolonnekromatografi og preparativ HPLC for å isolere innholdsstoffene i bladene. Åtte forbindelser ble isolert, og de ble strukturoppklart ved hjelp av 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , APT) og 2D (COSY, HSQC og HMBC) NMR-spektroskopi.

To gallotanniner; 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose og 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose og seks flavonoider; gallokatekin, myricetin aglykon og glykosidene myricetin 3-*O*-rhamnosid, myricetin 3-*O*-glukosid, myricetin 3-*O*-glukuronid og 3-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin ble isolert og identifisert.

Rækstraktet, mellomfraksjoner og isolerte forbindelser ble testet for radikalscavenging aktivitet ovenfor radikalet difenylpikrylhydrazyl (DPPH). Det ble utført hemming av det prooksiderende enzymet xantin oksidase (XO) og det peroksiderende enzymet 15-lipoksygenase (15-LOX).

Metanolrækstraktet viste en nokså god radikalscavenger aktivitet,  $\text{IC}_{50}$   $9,8 \pm 1,0$   $\mu\text{g/ml}$ . Ekstraktet viste også noe hemming av 15-LOX ( $\text{IC}_{50}$   $69 \pm 8$   $\mu\text{g/ml}$ ) og XO ( $\text{IC}_{50}$   $73 \pm 6$   $\mu\text{g/ml}$ ).

Av de isolerte forbindelsene var det myricetin 3-*O*-glukosid, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose og 3-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin som hadde høyest radikalscavenger aktivitet med henholdsvis IC<sub>50</sub> 10,8 $\pm$ 1,6  $\mu$ M, 4,9 $\pm$ 1,1  $\mu$ M og 10,6 $\pm$ 3,2  $\mu$ M.

Myricetin og 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose viste seg å være mest potent ved hemming av XO (8,1 $\pm$ 0,7  $\mu$ M og 8,0 $\pm$ 1,4  $\mu$ M), mens myricetin 3-*O*-glukosid og 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose hadde sterkest 15-LOX hemming med henholdsvis IC<sub>50</sub> 42 $\pm$ 4  $\mu$ M og 25 $\pm$ 4  $\mu$ M.

Myricetin 3-*O*-rhamnosid var en moderat DPPH-scavenger (IC<sub>50</sub> 27,6 $\pm$ 2,6  $\mu$ M) og 15-LOX hemmer (138,1 $\pm$ 11  $\mu$ M), men inaktivt som XO-hemmer, og myricetin 3-*O*-glukuronid var en svak DPPH-scavenger (IC<sub>50</sub> 85 $\pm$ 33  $\mu$ M) og var inaktiv som 15-LOX- og XO-hemmer. Gallokatekin viste god aktivitet som radikalscavenger, IC<sub>50</sub> 17,3 $\pm$ 2,9  $\mu$ M, moderat aktivitet som 15-LOX hemmer, IC<sub>50</sub> 112 $\pm$ 4  $\mu$ M, men var inaktivt som XO-hemmer. 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose kunne ikke testes på grunn av for liten mengde isolert.

Ingen av de isolerte forbindelsene er tidligere rapportert i *S. guineense*, men de har derimot blitt rapportert i en rekke andre planter. Noen av disse substansene, som 3-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin og 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose, er sjeldne naturstoffer. Flere av de observerte aktivitetene er ikke rapportert tidligere i litteraturen.

Av de syv isolerte og testede substansene viste fire moderat til høy radikalscavenger aktivitet. Tre av dem ga moderat til god 15-LOX hemming, mens to substanser viste å være nokså gode XO-hemmere. Våre funn har vist at blader fra *S. guineense* inneholder forbindelser som kan bidra til biologiske aktiviteter, og dette kan kanskje forklare noe av den tradisjonelle bruken av medisinplanten.

# Forord

Jeg ønsker først og fremst å rette en stor takk til Helle Wangensteen og Karl Egil Malterud for god veiledning, oppfølging og hjelp under hele masteroppgaven. Deres råd, faglige dyktighet og entusiasme for faget har vært en stor inspirasjonskilde!

Jeg vil med dette også takke de andre masterstudentene på avdelingen for faglig (og ikke faglige) samtaler, og til alle ansatte ved avdelingen for hjelp med tekniske problemer og hyggelige samtaler.

Og sist, men ikke minst, vil jeg takke familien min for hjelp og støtte gjennom hele studietiden.



# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Forkortelser</b> .....	<b>0</b>
<b>2</b>	<b>Hensikt</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b>	<b>Bakgrunn</b> .....	<b>2</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Syzygium guineense</i></b> .....	<b>2</b>
3.1.1	Taksonomisk klassifisering.....	2
3.1.2	Lokale navn .....	2
3.1.3	Botaniske forhold .....	3
3.1.4	Habitat.....	5
3.1.5	Tradisjonell bruk .....	5
3.1.6	Tidligere funn .....	6
<b>3.2</b>	<b>Antioksidanter og frie radikaler</b> .....	<b>10</b>
3.2.1	Antioksidanter .....	10
3.2.2	Frie radikaler og ROS .....	10
3.2.3	Dannelse av frie radikaler og ROS .....	10
3.2.4	Antioksidantforsvar.....	10
3.2.5	Oksidativt stress.....	11
3.2.6	Lipidperoksidering.....	11
<b>3.3</b>	<b>Arakidonsyremetabolisme og 15-lipoksygenase</b> .....	<b>13</b>
<b>3.4</b>	<b>Flavonoider</b> .....	<b>15</b>
<b>3.5</b>	<b>Hydrolyserbare tanniner</b> .....	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>Eksperimentelt</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1</b>	<b>Materialer</b> .....	<b>17</b>
4.1.1	Kjemikalier .....	17
4.1.2	Apparatur.....	18
<b>4.2</b>	<b>Metoder</b> .....	<b>20</b>
4.2.1	Generelle metoder.....	20
4.2.2	Separasjonsmetoder.....	23
4.2.3	Identifikasjonsmetoder.....	30
4.2.4	Metoder for måling av biologisk aktivitet.....	39
<b>4.3</b>	<b>Eksperimentell utførelse</b> .....	<b>50</b>
4.3.1	Plantemateriale .....	50
4.3.2	Ekstraksjon av plantemateriale.....	50
4.3.3	Fraksjonering av MeOH-råekstraktet .....	52
4.3.4	Separasjon av fraksjon D4 .....	53
4.3.5	Separasjon av fraksjon D4S8 .....	55
4.3.6	Separasjon av fraksjon D4S8V1.....	56
4.3.7	Separasjon av fraksjon D4S8V5.....	57
4.3.8	Separasjon av fraksjon D4S8V5V3 .....	58
4.3.9	Separasjon av fraksjon D5 .....	59
4.3.10	Separasjon av fraksjon D5S4.....	61
4.3.11	Separasjon av fraksjon D5S4V4 .....	62
4.3.12	Separasjon av sammenslåingen av fraksjon D5S4V4H5 og D5S4V4H5-2.....	65
4.3.13	Separasjon av fraksjon D5S4V6.....	66
4.3.14	Separasjon av fraksjon D5S5.....	67
4.3.15	Separasjon av fraksjon D5S5V4 .....	68



4.3.16	Separasjon av fraksjon D5S5V4V4 .....	69
4.3.17	Separasjon av fraksjon D5S5V4V4H3 .....	71
4.3.18	Separasjon av fraksjon D5S5V5 .....	73
4.3.19	Separasjon av fraksjon D5S5V6 .....	74
4.3.20	Separasjon av fraksjon D5S6 .....	75
4.3.21	Separasjon av fraksjon D5S6V1 .....	77
4.3.22	Separasjon av fraksjon D5S6V1V2 .....	78
<b>5</b>	<b>Resultater og diskusjon .....</b>	<b>80</b>
<b>5.1</b>	<b>Ekstraksjon av plantemateriale .....</b>	<b>80</b>
5.1.1	Utbytte av råekstrakt .....	80
5.1.2	Analytisk HPLC .....	81
5.1.3	NMR-spektroskopi .....	81
5.1.4	Bioassay .....	82
5.1.5	Videre arbeid .....	85
<b>5.2</b>	<b>Fraksjonering av MeOH-råekstrakt .....</b>	<b>85</b>
5.2.1	Diaion HP-20 kolonne-separasjon .....	85
5.2.2	NMR-spektroskopi .....	86
5.2.3	Bioassay .....	87
5.2.4	Analytisk HPLC .....	91
5.2.5	Videre arbeid .....	92
<b>5.3</b>	<b>Separasjon av fraksjon D4 .....</b>	<b>92</b>
5.3.1	Sephadex LH-20 .....	92
5.3.2	NMR-spektroskopi .....	93
5.3.3	Videre arbeid .....	94
<b>5.4</b>	<b>Separasjon av fraksjon D4S8 .....</b>	<b>94</b>
5.4.1	Versaflash kolonne-separasjon .....	94
5.4.2	NMR-spektroskopi .....	95
5.4.3	Videre arbeid .....	96
<b>5.5</b>	<b>Separasjon av fraksjon D4S8V1 .....</b>	<b>96</b>
5.5.1	Versaflash kolonne-separasjon .....	96
5.5.2	NMR-spektroskopi .....	97
5.5.3	Gallokatekin .....	97
5.5.4	Bioassay .....	99
<b>5.6</b>	<b>Separasjon av fraksjon D4S8V5 .....</b>	<b>101</b>
5.6.1	Versaflash kolonne-separasjon .....	101
5.6.2	NMR-spektroskopi .....	101
5.6.3	Videre arbeid .....	102
<b>5.7</b>	<b>Separasjon av fraksjon D4S8V5V3 .....</b>	<b>103</b>
5.7.1	Preparativ HPLC .....	103
5.7.2	NMR-spektroskopi .....	103
5.7.3	Myricetin 3-O-glukosid .....	104
5.7.4	Bioassay .....	105
<b>5.8</b>	<b>Separasjon av fraksjon D5 .....</b>	<b>107</b>
5.8.1	Sephadex LH-20 kolonne-separasjon .....	107
5.8.2	NMR-spektroskopi .....	108
5.8.3	Videre arbeid .....	108
<b>5.9</b>	<b>Separasjon av fraksjon D5S4 .....</b>	<b>109</b>
5.9.1	Versaflash kolonne-separasjon .....	109
5.9.2	NMR-spektroskopi .....	109
5.9.3	Analytisk HPLC .....	110
5.9.4	Videre arbeid .....	111
<b>5.10</b>	<b>Separasjon av fraksjon D5S4V4 .....</b>	<b>111</b>
5.10.1	Preparativ HPLC .....	111

5.10.2	NMR-spektroskopi.....	113
5.10.3	Myricetin 3- <i>O</i> -rhamnosid .....	113
5.10.4	Bioassay.....	116
5.10.5	Videre arbeid.....	117
<b>5.11</b>	<b>D5S4V4H5 og D5S4V4H5-2.....</b>	<b>117</b>
5.11.1	Preparativ HPLC .....	117
5.11.2	NMR-spektroskopi.....	118
<b>5.12</b>	<b>Separasjon av fraksjon D5S4V6 .....</b>	<b>119</b>
5.12.1	Versaflash kolonnekromatografi.....	119
5.12.2	NMR-spektroskopi.....	120
<b>5.13</b>	<b>Separasjon av fraksjon D5S5 .....</b>	<b>120</b>
5.13.1	Versaflash kolonne-separasjon .....	120
5.13.2	NMR-spektroskopi.....	121
5.13.3	Videre arbeid.....	122
<b>5.14</b>	<b>D5S5V4 .....</b>	<b>122</b>
5.14.1	Versaflash kolonne-separasjon .....	122
5.14.2	NMR-spektroskopi.....	123
5.14.3	3- <i>O</i> - $\beta$ -D-(6''- <i>O</i> -galloylgalaktopyranosyl)-myricetin .....	123
5.14.4	Bioassay.....	126
5.14.5	Videre arbeid.....	128
<b>5.15</b>	<b>Separasjon av fraksjon D5S5V4V4.....</b>	<b>128</b>
5.15.1	Analytisk HPLC.....	128
5.15.2	Preparativ HPLC .....	128
5.15.3	NMR-spektroskopi.....	129
5.15.4	Videre arbeid.....	130
<b>5.16</b>	<b>Separasjon av fraksjon D5S5V4V4H3 .....</b>	<b>130</b>
5.16.1	Analytisk HPLC.....	130
5.16.2	Preparativ HPLC .....	130
5.16.3	NMR-spektroskopi.....	131
5.16.4	Myricetin 3- <i>O</i> -glukuronid.....	131
5.16.5	Bioassay.....	133
<b>5.17</b>	<b>Separasjon av fraksjon D5S5V5 .....</b>	<b>135</b>
5.17.1	Analytisk HPLC.....	135
5.17.2	Preparativ HPLC .....	135
<b>5.18</b>	<b>Separasjon av fraksjon D5S5V6 .....</b>	<b>136</b>
5.18.1	Analytisk HPLC.....	136
5.18.2	Preparativ HPLC .....	136
5.18.3	NMR-spektroskopi.....	137
5.18.4	Myricetin.....	137
5.18.5	Bioassay.....	138
<b>5.19</b>	<b>Separasjon av fraksjon D5S6 .....</b>	<b>140</b>
5.19.1	Versaflash kolonne-separasjon .....	140
5.19.2	NMR-spektroskopi.....	141
5.19.3	Videre arbeid.....	142
<b>5.20</b>	<b>Separasjon av fraksjon D5S6V1 .....</b>	<b>142</b>
5.20.1	Versaflash kolonne-separasjon .....	142
5.20.2	NMR-spektroskopi.....	143
5.20.3	1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -galloyl- $\beta$ -D-glukose .....	143
5.20.4	Bioassay.....	145
5.20.5	Videre arbeid.....	147
<b>5.21</b>	<b>Separasjon av fraksjon D5S6V1V2.....</b>	<b>147</b>
5.21.1	Analytisk HPLC.....	147
5.21.2	Preparativ HPLC .....	148
5.21.3	NMR-spektroskopi.....	148

5.21.4	1,2,3,6-tetra- <i>O</i> -galloyl- $\beta$ -D-glukose .....	149
<b>6</b>	<b>Konklusjon .....</b>	<b>151</b>
<b>7</b>	<b>Forslag til videre arbeid .....</b>	<b>152</b>
<b>8</b>	<b>Vedlegg .....</b>	<b>153</b>
<b>8.1</b>	<b>Flytskjema .....</b>	<b>153</b>
8.1.1	Flytskjema 1 .....	153
8.1.2	Flytskjema 2 .....	153
8.1.3	Flytskjema 3 .....	154
8.1.4	Flytskjema 4 .....	155
8.1.5	Flytskjema 5 .....	156
8.1.6	Flytskjema 6 .....	157
8.1.7	Flytskjema 7 .....	158
8.1.8	Flytskjema 8 .....	158
8.1.9	Flytskjema 9 .....	159
8.1.10	Flytskjema 10 .....	160
8.1.11	Flytskjema 11 .....	161
8.1.12	Flytskjema 12 .....	161
8.1.13	Flytskjema 13 .....	162
8.1.14	Flytskjema 14 .....	163
8.1.15	Flytskjema 15 .....	164
8.1.16	Flytskjema 16 .....	165
<b>8.2</b>	<b>NMR-spektra .....</b>	<b>166</b>
	<b>Litteraturliste .....</b>	<b>179</b>

# 1 Forkortelser

*Tabell 2.1: Oversikt over forkortelser i oppgaven*

Forkortelse	Fullstendig betegnelse
ACN	Acetonitril
MeOH	Metanol
DCM	Diklormetan
C	Karbon
CD <sub>3</sub> OD	Deuterert metanol
DMSO	Dimetylsulfoksid
<i>S. guineense</i>	<i>Syzygium guineense</i>
HPLC	High performance liquid chromatography
TLC	Tynnsjiktskromatografi
NMR	Nukleær magnetisk resonans
ppm	Parts per million
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
ROS	Reaktive oksygen species
LO	Lipoksygenase
XO	Xantin oksidase
TFA	Trifluoreddiksyre
RP	Reverse phase
UV	Ultrafiolett
TMS	Tetrametylsilan
ASE	Accelerated solvent extraction
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl
Kons.	Konsentrasjon
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
t.v.	Til venstre
t.h.	Til høyre
H	Hydrogen
NO	Nitrogenoksid
OH	Hydroksyl

## 2 Hensikt

*Syzygium guineense* er en plante som finnes i en rekke afrikanske land som Mali, Etiopia, Eritrea, Senegal og Uganda. Planten brukes tradisjonelt i behandlingen av ulike sykdommer og lidelser som for eksempel dysenteri, magesmerter, sår og malaria. Hensikten med oppgaven var å isolere, strukturoppklare og identifisere biologisk aktive lavmolekylære substanser i planten. Det var av interesse å utføre biologiske tester (enzymhemming- og radikalscavenging aktivitet) både på råekstrakter, utvalgte delfraksjoner og isolerte rensstoffer, for å kunne sette det i sammenheng med medisinsplantens tradisjonelle bruk.

# 3 Bakgrunn

## 3.1 *Syzygium guineense*

### 3.1.1 Taksonomisk klassifisering

Fullstendig systematikk for planten er beskrevet som følger (USDA 2015):

Rike:	Plantae (planterike)
Subrike:	Tracheobionta (karplanter)
Superdivisjon:	Spermatophyta
Divisjon:	Magnoliophyta (blomsterplanter, dekkfrøet)
Klasse:	Magnolioopsida (tofrøbladet)
Underklasse:	Rosidae
Orden:	Myrtales
Familie:	Myrtaceae
Slekt:	<i>Syzygium</i> (P. Br. ex Gaertn.)
Art:	<i>Guineense</i> Willd. (DC)

Synonymer:

<i>Eugenia guineensis</i> Wild. Baill.ex Laness	(EOL 2015b)
<i>Syzygium guineense</i> Wild. DC	(EOL 2015b)
<i>Calyptranthes guineensis</i> Wild.	(EOL 2015b; Tropicos 2015)
<i>Syzygium fleuryl</i> A. Chev.	(Tropicos 2015)
<i>Memecylon lopezianum</i> A. Chev.	(Maroyi 2008)

### 3.1.2 Lokale navn

*Syzygium guineense* har en rekke forskjellige lokale navn (Maroyi 2008; Orwa et al. 2009):

**Amharisk (Etiopia) :** Dokma

**Engelsk:** Waterpear, waterboom, water berry, snake bean tree, woodland waterberry, mountain waterberry, bi-coloured waterberry

**Fransk:** Kisa d'eau

**Luganda (Uganda):** Kalunginsanvu, mutziti

**Ndebele:** Umdoni

**Shona:** Mukute

**Swahili:** Mzambarau, msambaran, mzambarani

**Tigrigna:** Liham

### 3.1.3 Botaniske forhold

*Syzygium guineense* er et mellomstort eller høyt eviggrønt tre, og kan bli mellom 15-30 m høyt. Barken blant de ulike underartene varierer. Som ung har barken en gråhvit eller sølvspraglet farge med glatt overflate. Etter hvert som treet vokser og eldes, blir barken grov og flassete med en kremet, lysegrå, mørkebrun eller svart farge. Treet har en tykk og kantet stamme med grener som av og til kan henge. Bladene er 5-17,5 cm lange, 1,3-7,5 cm brede og utannet. De er motsatte og smale på begge ender med en elliptisk, eggformet eller lansettform. Noen ganger kan de være bølgeformet og bøyd innover. Stilkene er korte og riflet med mange laterale årer av grågrønn farge. Blomstene (filamenter) er 1,5 cm i diameter og er fastsittende eller nesten fastsittende. De vokser på endene av grenene og er pollenbærere med begerblad og fire kronblader. Disse visner og faller tidlig slik at de kremhvite blomstene blir synlige. Fruktene er ovale eller elliptiske drupes (steinfrukter) på størrelsen 1,2-3,5 cm x 1 x 2,5cm, og vokser i bunter på 20 til 30. Umodne frukter er hvitgrønne mens de modne er skinnende og svartlilla. Frøene er 1,3-1,4 cm i diameter. De er runde og kan være gulaktig til brunaktig i fargen (Orwa et al. 2009).



**Figur 3.1:** Bilde av *S. guineense* blomster (t.v.), blader og frukter (t.h.) (Zenze 2013)



*Figur 3.2: Bilde av S. guineense bark (ungt tre t.v. og gammelt tre t.h.) (Zenze 2013)*



*Figur 3.3: Bilde av S. guineense (Zenze 2013)*



### 3.1.4 Habitat

*S. guineense* forekommer vanligvis i lavlandsregnskoger, fjellregnskoger, skogsterreng og områder i nærheten av elver og sumper. Den finnes også langs bekker og i steingrunnen på høysletta savanner med regn. Treet kan vokse i vann, men trives best i fuktige forhold med jordtyper som er ferske og godt drenerte med høyt grunnvann.

*S. guineense* er utbredt i en rekke afrikanske land som Botswana, Eritrea, Etiopia, Lesotho, Mosambik, Senegal, Somalia, Namibia, Swaziland, Sør-Afrika, Uganda, Zambia, Zimbabwe og Tanzania (Orwa et al. 2009).

### 3.1.5 Tradisjonell bruk

*S. guineense* har et bredt bruksområde innen afrikansk tradisjonell medisin, men kan også være farlig da barken er giftig og dødsfall er rapportert (Maroyi 2008). Ved behandling av epilepsi brukes rot som har stått i vann til å drikke og/eller til bad. En infusjon av roten drikkes for å behandle magesmerter, mens et ekstrakt tas som avføringsmiddel eller anthelmintika. Fruktene brukes til behandling av dysenteri.

Dekokt av bark brukes mot diaré, magesmerter og malaria. Infusjon av barken tas for å behandle hoste og andre halsproblemer, astma og smerter i brystkassen. Pulverisert bark anvendes som anthelmintikum, krampestillende- og avførende middel, eller til behandling av diaré, magesmerter, beinbrudd og sår. I Kamerun benyttes for eksempel barken til behandling av slangebitt. Preparater av kvist eller bark brukes for lammelser.

Dekokt av kvister og blader drikkes eller brukes i form av klyster for lakserende effekt og for å behandle diaré, kolikk og magesmerter. Det anvendes også mot sinnslidelser, amenoré og cerebral malaria ved bruk til bad eller som drikke.

Knuste blader benyttes peroralt til behandling av sinnslidelser og også topikalt på sår og byller. Dekokt av blader brukes mot intestinale parasitter, magesmerter og diaré (klyster som administrasjonsvei). I tillegg brukes dekokt eller pulveriserte blader som tonikum til gravide. Som et liniment anvendes det til bad og masseres inn i områder av forstuinger. Tygging av blader brukes mot magesmerter, mens en drikk av gjennomtygde blader med vann administreres i form av øyedråper mot øyeinflammasjon.

Utenom medisinske egenskaper benyttes *S. guineense* til mye annet. Frukten er spiselig og selges på markedet i Etiopia og Kenya. Man kan også lage eddik og drikker av det og bruke det som smakstilsetning. Barken brukes til garving og farging, mens barkekstraktet noen ganger brukes til herding av jordgulv eller glasering av keramikk. Bladene og fruktene gis som fôr til husdyr, og blomstene er en kilde til nektar for honningbier. I Etiopia benyttes treet for å legge skygge over kaffeplantasjer. Veden brukes til bygging, gulv, møbler, kasser, kjøretøy, verktøy, kjøkkenutstyr, vedfyring og trekull. Da veden er myk brukes den også til å lage buer og ribber til kanoer. I Øst-Afrika har veden blitt brukt til jernbanesviller (Maroyi 2008).

### 3.1.6 Tidligere funn

Det er blitt gjort forholdsvis lite forskning på *S. guineense*. Et søk i databasen, Scifinder, med søkeordet *Syzygium guineense* ga 35 treff (22.mars 2015). Per dags dato er få stoffer blitt isolert, identifisert og strukturopklart. Noen biologiske effekter er dokumentert, men ytterligere forskning på planten trengs.

Ifølge litteraturen inneholder plantedelene (bark, rot og blad) en rekke forskjellige komponenter fra ulike stoffgrupper. Blant disse er sukker, proteiner, lipider, alkaloider, saponiner, steroidterpenoider, hjerteglykosider og tanniner. Alle disse stoffklassene ble funnet i blad, bark og rot. Kumariner ble bare funnet i EtOH/H<sub>2</sub>O-ekstrakt av bark (Pieme et al. 2014). Ellers viser tabell 3.1 en oversikt over forbindelser som tidligere er isolert og identifisert fra *S. guineense*. Forbindelsene er sortert etter kjemisk stoffgruppe, plantedelen de er hentet fra, samt en kildehenvisning.

**Tabell 3.1: Oversikt over identifiserte innholdsstoffer i *S. guineense***

Kjemisk stoffgruppe	Komponent	Plantedel	Kilde
<i>Triterpener</i>	Betulinsyre	Blad	(Djoukeng et al. 2005)
	Oleanolsyre	Blad	(Djoukeng et al. 2005)
	Blanding av 2-hydroksyoleanolsyre og 2-hydroksyursolsyre	Blad	(Djoukeng et al. 2005)
	Blanding av arjunsyre og	Blad	(Djoukeng et al. 2005)

	asiatsyre Blanding av terminolsyre og 6-hydroksyasiatsyre Blanding av arjunsyre 28- $\beta$ - glukopyranosylester og asiatsyre 28- $\beta$ -glukopyranosylester	Blad  Blad	(Djoukeng et al. 2005)  (Djoukeng et al. 2005)
<b><i>Eteriske oljer (sesquiterpener)</i></b>	$\alpha$ -cadinol Epi- $\alpha$ -cadinol Caryophyllenoksid $\beta$ - caryophyllen $\delta$ -cadinen Viridiflorol Cis- calamenen-10-ol Citronellyl pentanoat $\alpha$ -humulen	Blad Blad Blad Blad Blad Blad Blad Blad Blad	(Noudogbessi et al. 2008) (Noudogbessi et al. 2008) (Noudogbessi et al. 2008) (Noudogbessi et al. 2008) (Noudogbessi et al. 2008) (Noudogbessi et al. 2008) (Noudogbessi et al. 2008) (Noudogbessi et al. 2008) (Noudogbessi et al. 2008)
<b><i>Polysakkarider og byggesteiner (mono- sakkarider)</i></b>	Arabinogalaktan type II Blanding av oligosakkarider og pektinstruktur  Arabinose Rhamnose Fukose Xylose Mannose Galaktose Glukose 4- <i>O</i> -metyl glukuronsyre Glukuronsyre Galakturonsyre	Blad Blad  Blad Blad Blad Blad Blad Blad Blad Blad	(Ghildyal et al. 2010) (Ghildyal et al. 2010)  (Ghildyal et al. 2010) (Ghildyal et al. 2010) (Ghildyal et al. 2010) (Ghildyal et al. 2010) (Ghildyal et al. 2010) (Ghildyal et al. 2010) (Ghildyal et al. 2010) (Ghildyal et al. 2010) (Ghildyal et al. 2010)
<b><i>Ellagitanniner</i></b>	Ellagsyre	Bark	(Djoukeng 2007)

Metyl-ellagsyre pentosid	Bark	(Djoukeng 2007)
3- <i>O</i> -metylellagsyre-4'- <i>O</i> - $\alpha$ - rhamnopyranosid	Bark	(Djoukeng 2007)
3- <i>O</i> -metylellagsyre-4'- <i>O</i> - $\alpha$ -2''- <i>O</i> -acetyl-rhamnopyranosid	Bark	(Djoukeng 2007)
3- <i>O</i> -metylellagsyre-4'- <i>O</i> - $\alpha$ -3''- <i>O</i> -acetyl-rhamnopyranosid	Bark	(Djoukeng 2007)

### 3.1.6.1 Biologisk aktivitet

#### *Hemming av kontraksjoner i ileum*

Et metanolekstrakt av bark fra *S. guineense* viste hemmende effekt på kontraksjoner i ileum isolert fra kaniner. Hemmingen i konsentrasjoner fra 0.5-2.0 mg/ml i bad ble vist å være doserelatert, men ikke lineær. Dette kan forklare den tradisjonelle medisinske bruken av planten som et antispasmodikum, men videre studier kreves for å kunne bekrefte og kategorisere den observerte farmakologiske aktiviteten (Malele et al. 1997).

#### *Antihypertensiv aktivitet*

Metanolekstrakt av *S. guineense* blad viste seg å gi en vedvarende hypotensjon i anesteserte rotter. Det diastoliske blodtrykkfallet var større enn det systoliske. Maksimumeffekten ble observert ved 40  $\mu$ g, hvor det systoliske, diastoliske og gjennomsnittet av blodtrykket ble redusert med henholdsvis 23%, 36% og 28%. I isolerte kaninhjarter ga ekstraktet en svakere, men lignende effekt som isoprenalin (Malele et al. 1997).

En annen in vivo studie i rotter av et hydroalkoholisk ekstrakt fra *S. guineense* blad har vist antihypertensiv aktivitet. Den virkelige mekanismen bak er fremdeles uklar, og videre studier kreves (Ayele et al. 2010).

#### *Antibakteriell aktivitet*

*S. guineense* er blant annet mye brukt i tradisjonell medisin mot diaré. Det har derfor blitt undersøkt om et vannløselig tørrekstrakt av planten kan ha effekt på utvalgte bakteriestammer involvert i diaré sykdommer. Ekstraktet viste antibakteriell aktivitet *in vitro* på de Gram-negative bakteriestammene *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* og *Enterobacter aerogenes* (Tsakala et al. 1996).

Triterpener isolert fra *S. guineense* blad har i antibakterielle bioassay vist aktivitet mot bakteriene *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* og *Shigella sonnei* (Djoukeng et al. 2005). Resultatene kan forklare den folkemedisinske bruken mot ulike infeksjonssykdommer. Videre studier av *in vivo* antimikrobiell aktivitet er ønskelig.

### ***Vasodepressor aktivitet***

Et hydroalkoholekstrakt fra *S. guineense* blad har vist vasodepressor aktivitet *in vitro*. Mekanismen bak den blodtrykkssenkende effekten kom sannsynlig av vasodilatasjon av blodårene, men dette er fremdeles uklart og behovet for videre undersøkelser trengs (Ayele et al. 2010).

### ***Antioksidant aktivitet***

Fenoliske substanser i etanolekstrakt og etanol/vannekstrakt fra *S. guineense* blad har vist signifikant scavenger- og antioksidantegenskaper. Metodene benyttet i studien var reduksjon av  $Fe^{3+}$  (FRAP; ferric reducing antioxidant power assay) eller  $Mo^{6+}$  (TAC; total antioxidant capacity) samt scavenging av radikalene DPPH $\cdot$  (difenylpikrylhydrazyl), ABTS $\cdot$  (2,2-Azinobis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonsyre), NO $\cdot$  og OH $\cdot$  (Pieme et al. 2014).

### ***Immunmodulerende aktivitet***

Polysakkarider isolert fra vandig ekstrakt fra *S. guineense* blad viste høy komplementfikserende aktivitet, evne til å stimulere NO frigjøring fra makrofager, oppregulering av CD86 (Cluster of Differentiation) på dendritter, og proliferasjon av B-celler. Polysakkaridene fra planten kan dermed potensielt påvirke inflammatoriske prosesser (Ghildyal et al. 2010).

## 3.2 Antioksidanter og frie radikaler

### 3.2.1 Antioksidanter

En antioksidant er enhver substans som signifikant kan forhindre eller forsinke oksidasjon av et oksiderbart substrat, når det foreligger i en lavere konsentrasjon i forhold til substratet (Halliwell 2005). Eksempler på oksiderbare substrater er proteiner, lipider, urinsyre, karbohydrater og DNA (Halliwell et al. 1995; Halliwell og Gutteridge 2015).

### 3.2.2 Frie radikaler og ROS

Elektroner i atomer og molekyler forekommer vanligvis i par, hvorav hvert par beveger seg innen et definert område (et atomisk eller molekylær orbital). Et fritt radikal er enhver specie med evne til å eksistere uavhengig med ett eller flere uparede elektroner. Det enkleste frie radikalet er hydrogenatomet med ett proton og ett elektron.

Begrepet ROS brukes i biomedisin og refererer til radikal –og ikke-radikal-species som er avledet fra oksygen, men er mer reaktive. Eksempler på disse er ikke-radikalene hydrogenperoksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) og singlett oksygen ( $^1\text{O}_2$ ) og radikalene superoksid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) og hydroksyl ( $\text{HO}^{\cdot}$ ). Alle oksygenradikaler er ROS, men ikke alle ROS er oksygenradikaler, da noen species kan være derivert fra nitrogen og klor. Eksempler på disse er hypoklorsyre ( $\text{HOCl}$ ) og nitrogenoksid ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) (Halliwell 2015; Halliwell og Gutteridge 2015).

### 3.2.3 Dannelse av frie radikaler og ROS

Frie radikaler og andre reaktive species dannes kontinuerlig i kroppen som er resultat av oksidativ metabolisme. Selv om de kan gi skadelige virkninger, er de også viktige signalmolekyler. Blant annet er nitrogenoksid med på å regulere blodtrykket, samtidig som det er involvert i kroppens forsvar mot inflammasjoner og infeksjoner (Halliwell 2015).

### 3.2.4 Antioksidantforsvar

Antioksidantforsvaret i kroppen er et komplisert nettverk som inkluderer både endogene molekyler (naturlige antioksidanter i kroppen) og antioksidanter fra kosten. Dette forsvarssystemet reduserer dannelsen av, og fjerner ROS i kroppen ved å reagere med og

uskadeliggjøre dem, hemme peroksidierungsprosesser og reparere oksidative skader. Siden ROS er inkludert i forsvaret mot patogener og kan virke som signalstoffer i kroppen, bør ikke absolutt alle ROS fjernet (Halliwell 2015).

Eksempler på naturlige antioksidanter i kroppen og kosten (Halliwell 2015; Wangensteen 2014):

#### **Naturlige antioksidanter i kroppen:**

- Superoksid dismutase (SOD) fjerner  $O_2^{\cdot-}$
- Katalase omdanner  $H_2O_2$  til  $O_2$  og  $H_2O$
- Glutation peroksidase fjerner  $H_2O_2$
- Peroksiredoksin fjerner  $H_2O_2$

#### **Antioksidanter fra kosten:**

- Vitamin C scavenger frie radikaler og ROS
- Vitamin E scavenger lipidperoksyler radikaler
- Karotenoider deaktiverer singlett oksygen
- Flavonoider scavenger frie radikaler og ROS

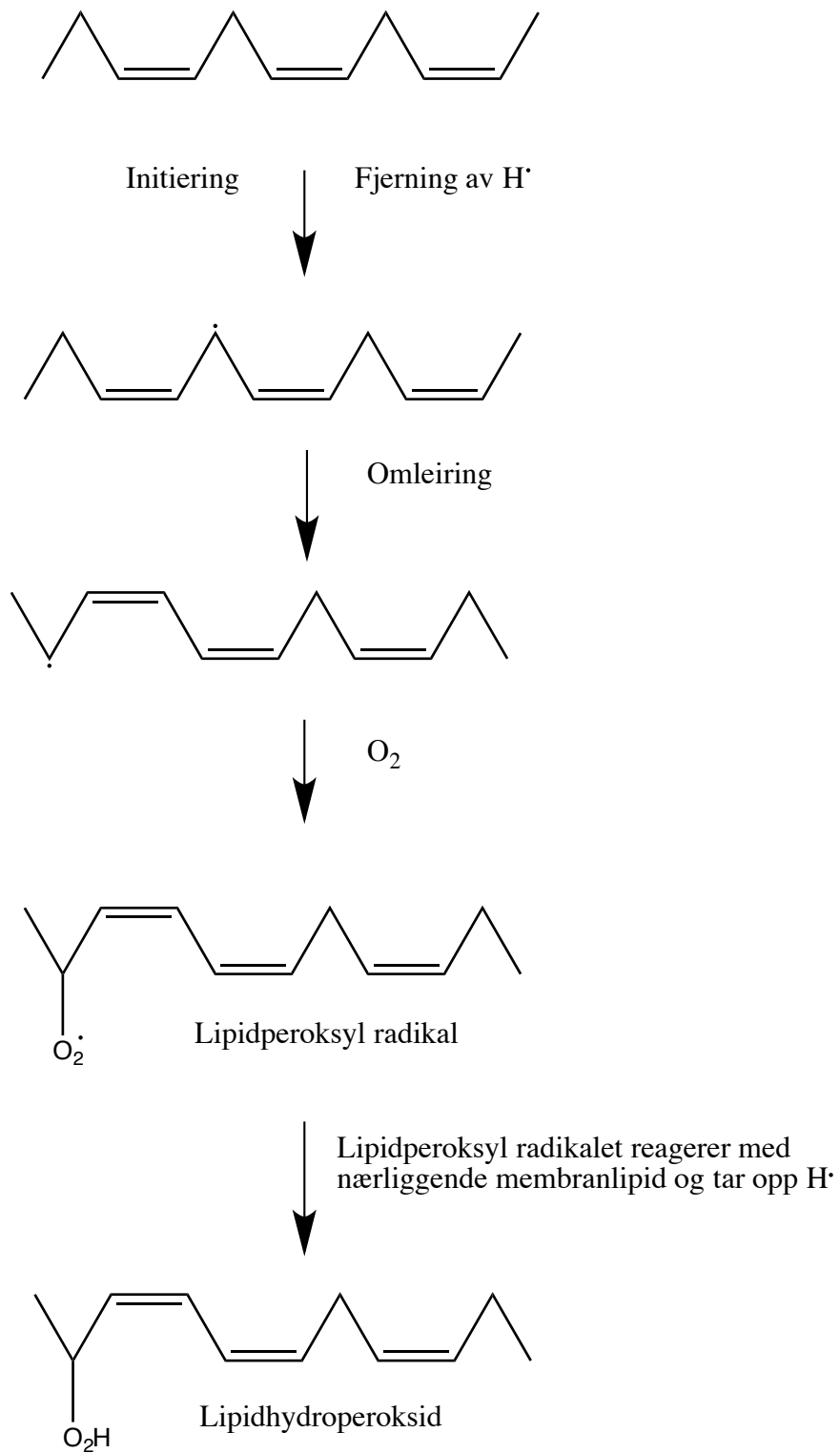
### **3.2.5 Oksidativt stress**

Ved oksidativt stress oppstår det en alvorlig ubalanse mellom produksjon av ROS og antioksidantforsvaret. Dette kan komme av overproduksjon av reaktive species eller lave nivåer av antioksidanter. Oksidativt stress kan blant annet føre til celledød og celledskade, som igjen er involvert i mange sykdommer som for eksempel diabetes, kreft og aterosklerose.

### **3.2.6 Lipidperoksidering**

Ved lipidperoksidering blir flerumettede fettsyrer oksidert og degradert. Lipidperoksidering kan skje på to forskjellige måter: ved enzymatisk eller ikke-enzymatisk reaksjon.

Ved enzymatisk reaksjon katalyserer enzymer (cyklooksygenaser og lipoksygenaser) peroksideringen av flerumettede fettsyrer. En ikke-enzymatisk lipidperoksidering (se figur 4.4) oppstår når en reaktiv species, for eksempel  $OH^{\cdot}$  radikalet, fjerner et  $H^{\cdot}$ -atom fra en metylengruppe i en fettsyresidekjede. Dette fører til dannelsen av et ustabil karbonsentrert radikal som omleires og dannes til et konjugert dien. Når dette reagerer videre med oksygen dannes et peroksyleradikal ( $ROO^{\cdot}$ ), som kan angripe og skade membranproteiner og nærliggende fettsyresidekjeder. Når peroksyleradikalet tar opp et H-atom fra et nærliggende fettsyresidekjede, blir lipidperoksid ( $ROOH$ ) og et nytt ustabil karbonsentrert radikal dannet. Dette fører til kjedereaksjon (Halliwell og Gutteridge 2015; Wangensteen 2014).



**Figur 3.4: Lipidperoksidningskaskade (Wangensteen 2014)**



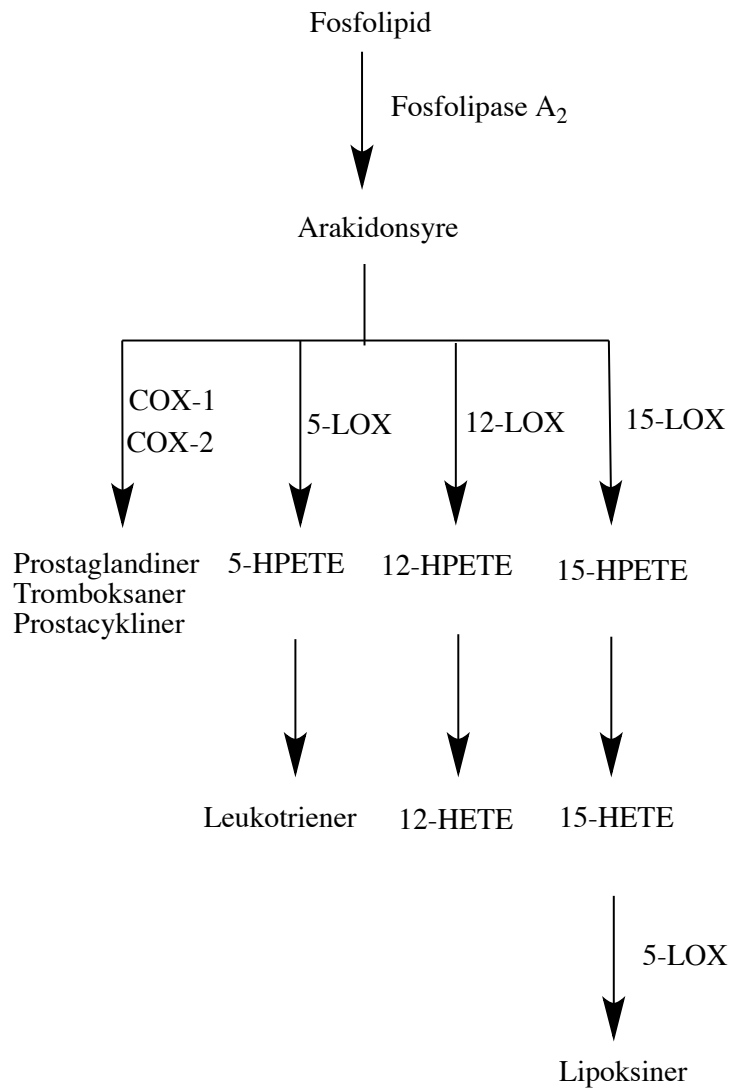
### 3.3 Arakidonsyremetabolisme og 15-lipoksygenase

Arakidonsyre er en flerumettet fettsyre i cellemembranen som frigjøres enten i en ett-trinnsprosess (se figur 3.5) eller en totrinnsprosess. I etttrinnsprosessen blir arakidonsyre spaltet av fra posisjon 2 i glyseroldelen av fosfolipidmolekylet av enzymet fosfolipase A<sub>2</sub>, men i totrinnsprosessen skjer avspaltningen ved hjelp av fosfolipase C og diacylglyserol lipase (Rang et al. 2007). Videre metaboliseres arakidonsyrer til eikosanoider (hovedsakelig tromboksaner, prostaglandiner og leukotriener) via flere ulike reaksjonsveier (Cole et al. 2013):

- Lipoksygenaser (LOX) oksiderer arakidonsyrer til lipoksiner, leukotriener, hepoksiliner, hydroperoksyekosanoider (HPETE) og hydroksyeikosanoider (HETE)
- Cyklooksygenaser (COX) oksiderer arakidonsyrer til prostaglandiner og tromboksaner
- Cytokrom p-450 epoksygenaser (CYP) oksiderer arakidonsyrer til epoksider

Eikosanoider fungerer som signalstoffer og spiller dermed en viktig rolle i mange fysiologiske prosesser i kroppen, særlig ved inflammatoriske reaksjoner (Rang et al. 2007). LOX i mennesker og dyr eksisterer i ulike subtyper som 5-LOX, 12-LOX og 15-LOX. Disse er navngitt ifølge posisjonen til det C-atomet i arakidonsyren de oksiderer og gir henholdsvis metabolittene 5-HPETE (omdannes videre til proinflammatoriske leukotriener), 12-HETE og 15-HPETE (Cole et al. 2013; van Leyen 2013). 15-LOX er interessant fordi den kan oksidere arakidonsyre og linolsyre når de er forestret som fosfolipider, og forårsake direkte lipidperoksidering, som igjen kan føre til aterosklerose (van Leyen 2013). Metabolitter av 15-LOX har også vist å bidra til utvikling av insulinresistens og diabetes (Cole et al. 2013).

Forskning har vist at hemming av enzymet 12/15-LOX kan påvirke og forstyrre flere skadelige reaksjonsveier som fører til iskemisk hjerneskade. Den nøyaktige mekanismen er fremdeles uklar og dermed er det behov for flere studier (van Leyen 2013).

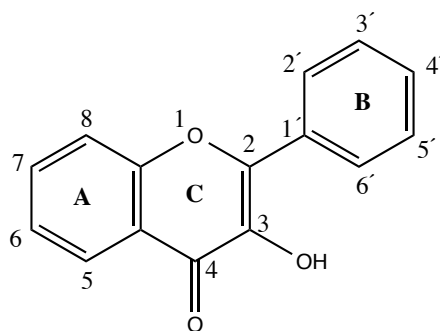


**Figur 3.5: Arakidonsyremetabolisme.** LOX=lipoksygenase, COX=cyklooksygenase, HPETE=hydroperoksyeikosatetraensyre, HETE=hydroksyeikoatetraensyre (Rang et al. 2007)

### 3.4 Flavonoider

Flavonoider er en undergruppe av polyfenoler og finnes i planter, grønnsaker og frukter. Ut fra epidemiologiske studier har det vært foreslått at flavonoider kan gi helsegunstige effekter og forebygge sykdomstilstander som kreft og kardiovaskulære sykdommer. Noen flavonoider har vist en rekke biologiske aktiviteter som for eksempel antioksidant-, antiradikal-, anticancer-, antiinflammatorisk, antiviral og anticarcinogen effekt (Yao et al. 2004).

Flavonoidene deles inn i flere undergrupper som flavanoler, flavoner, flavonoler (se figur 3.6), flavanoner, isoflavoner og anthocyanidiner. Disse inneholder to eller flere aromatiske ringer, hvor hver av de vanligvis bærer på minst en aromatisk OH-gruppe og er koblet til hverandre via en karbon-bro. Denne broen består av tre C-atomer kombinert med et O-atom og to C-atomer fra en av de aromatiske ringene (ring A), for å danne en tredje 6-ring (ring C) (se figur 3.6). Innenfor hver undergruppe av flavonoider karakteriseres og identifiseres de forskjellige flavonoidene ved at de har ulike konjugeringsmønstre og hydroksyleringer i ring B, så vel som ulike konjugeringsmønstre av OH-grupper i ring A og C (Beecher 2003).



**Figur 3.6: Generell flavonolstruktur med nummering (Heim et al. 2002)**

Den gode antioksidant- og radikalfangereffekten skyldes delvis substitusjoner i ring B. Substitusjon ved posisjon 3' og 4' (katekolstruktur) er vist å øke hemmingen av lipidperoksidering, og OH-gruppene har vist mest signifikant scavengereffekt av ROS. OH-gruppene i B-ringene donerer et hydrogen og elektron til radikaler som hydroksyl, peroksyd og peroksynitritt for å stabilisere dem, og i tillegg danne stabile flavonoidradikaler. Substitusjon i A-ringene har vist seg å ha mindre betydning for aktiviteten. C-ringene bidrar til antioksidant aktivitet når en OH-gruppe ved 3-posisjonen er konjugert til B-ringene ved en dobbeltbinding mellom C-2 og C-3. Flavonoidaglykoner har vist sterkere antioksidant effekt enn deres

tilsvarende glykosider. Det er rapportert at antioksidantaktiviteten til flavonolglykosider reduserer med et økende antall glykosidenheter. Posisjonen og strukturen til sukkeret har også vist å spille en viktig rolle (Heim et al. 2002).

Det finnes flere subtyper av LOX som katalyserer lipidperoksidierungsreaksjonen (se avsnitt 3.3 Arakidinsyremetabolisme og 15-lipoksygenase). Hemmingsaktiviteten på de forskjellige enzymene med ulike flavonoider vil derfor være ulik. Foreslåtte mekanismer er at flavonoider hemmer LOX gjennom jernreduksjon eller chelatering (Mladěnka et al. 2010).

XO kan være en kilde til frie radikaler som kan føre til skade i nærliggende vev. Enzymet er også kjent for å være en terapeutisk target for legemidler mot hyperurikemi og urinsyregikt (Lespade og Bercion 2010). Noen flavonoider har vist kompetitiv hemming av XO, men effekten er ikke like god som den kjente XO-hemmeren, allopurinol. XO hemmende aktivitet avhenger blant annet av 2,3-dobbeltbindingen i C-ringen på flavonoidet. OH-grupper i ortoposisjon i B-ringen og ved 3-posisjon i ring C synes ikke å ha noen betydning for hemmingsaktiviteten. Glykosylering av flavonoidene er vist å redusere aktiviteten (Mladěnka et al. 2010). Xantin oxidoreduktase (XOR) er en samlebetegnelse for XO og xantin dehydrogenase (XDH), som er to enzymformer som går over i hverandre (se avsnitt 4.2.4.3 Xantin oksidasehemming). Økt endotel-assosiert XOR er vist å bidra til aterosklerose sammen med vaskulær oksidativ stress og inflammatoriske responser relatert til røyking, hypertensjon, diabetes og hyperkolesterolemi (Battelli et al. 2014).

### **3.5 Hydrolyserbare tanniner**

Hydrolyserbare tanniner er estere av vanligvis et sukker og et antall fenoliske syrer. Når den fenoliske syren er gallesyre, kalles de gallotanniner (Beecher 2003). Det er vist at scavengeraktiviteten til tanniner øker med økt antall galloylgrupper. Antall og posisjon av OH-grupper er også av betydning for effekten. Antiradikal- og antioksidanteffekten kan forklare noen av de biologiske aktivitetene til tanniner. Blant disse er antitumor- og antivirale aktiviteter, og hemming av lipidperoksidering (Yokozawa et al. 1998).

# 4 Eksperimentelt

## 4.1 Materialer

### 4.1.1 Kjemikalier

Kjemikalier	Produsent
Aceton purum	Chemi-Teknik AS, Oslo, Norge
Acetonitril HPLC-kvalitet	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Boratbuffer (0.2 M natriumborat, pH 9)	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Destillert vann	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Ceric (1% cerium(IV)sulfat i 10% svovelsyre	Merck, KGaA, Darmstadt, Tyskland
Deuterert metanol (detanol d <sub>4</sub> eller CD <sub>3</sub> OD)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2,2-Difenyl-1-pikrylhydrazyl	2,2-Difenyl-1-pikrylhydrazyl
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck, KGaA, Darmstadt, Tyskland
Hypoxantin	Sigma-chemical company, St. Louis, USA
Linolsyre	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lipoksygenase (type 1-B fra soyabønne)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Metanol Chromsolv for HPLC	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Metanol HiPerSolv Chromanorm for HPLC	VWR Prolabo, Darmstadt, Tyskland
Natriumkaliumfosfatbuffer (0.05 M, pH 7.5)	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Nitrogengass	AGA, Oslo, Norge
Komprimert luft	AGA, Oslo, Norge
Sephadex LH-20	Pharmacia, Biotech, Uppsala, Sverige
Diaion HP20	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Tetrametylsilan (TMS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Trifluoreddiksyre (TFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Quercetin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xantin oksidase (XO) fra kumelk	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Etanol	Arcus, Oslo, Norge
Kunstig havsalt (Aqua Bio Sal)	
Diklormetan	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

## 4.1.2 Apparatur

Apparatur	Produsent
<i>Oljepumpe</i> Edwards E-Lab	Sussex, England
<i>Rotavapor</i> Varmebad IKA® HB10 Basic Vakuumpumpe IKA® RV10 Basic	Staufen, Tyskland Staufen, Tyskland
<i>Ultralydbad</i> Ultrasonic cleaner	VWR, Leuven, Belgia
<i>UV-lampe</i> Mineralight® lamp modell UVGL-58	Upland, California, USA
<i>Varmeskap</i> Heraeus varmeovn	Hanau, Tyskland
<i>Filter</i> Millex sprøytefilter Acrodisc® Syringe Filters 0.45µm Supor® membrane	Millipore, MA, USA Pall Corporation, MI, USA
<i>Pipetter og pipettespisser</i> Mikropipette 10 µl Finnpipette Digital 1-5 ml Gilson Pipetman-pipette Gilson Pipettespisser Nichiryo modell 8100 Glass pasteur pipette	Herlev, Danmark Labsystems, Helsinki, Finland Middleton, WI, USA Middleton, WI, USA Tokyo, Japan VWR International, Oslo, Norge
<i>Vekt</i> Sartorius BP 221S Sartorius ED224S Sartorius Practum 213-18	Goettingen, Tyskland Goettingen, Tyskland Goettingen, Tyskland
<i>Ekstraksjon</i> ASE 350	Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA

<i>Magnetrorer</i> RCT Basic	Janke & Kunkel, Staufen, Tyskland
<i>NMR-spektroskopi</i> Bruker DPX 300 Bruker AVII 400 Bruker AV 600	Rheinstetten, Tyskland Rheinstetten, Tyskland Rheinstetten, Tyskland
<i>UV-spektroskopi</i> Biochrom Libra S32 PC Kvartskvetter	Cambridge, England Essex, England
<i>Kolonnekromatografi</i> <i>Versaflash</i> Kolonne Versapak C <sub>18</sub> -kolonne 40x150 mm Kolonne Versapak C <sub>18</sub> -kolonne 23x110 mm Kromatografi pumpe Büchi 681 Versaflash stativ  <i>Sephadex og Diaion</i> Kolonne 5,5x46 cm  <i>Analytisk HPLC</i> Elite LaChrome Hitachi Autosampler I-2000 Elite LaChrome Hitachi Diodearray detektor Elite LaChrome Hitachi Kolonne ovn I-2300 Elite LaChrome Hitachi Organizer Elite LaChrome Hitachi Pumpe I-2130 Chromlith RP-18e 100x4.6 mm Kinetex 5u C18 100A 150x4.6 mm  LiChroCART® 250-4 RP-18e 5µm  <i>Preparativ HPLC</i> Varian Prostar detektor Varian Prostar modell 210 Pumpe	Supelco, Bellefonte, PA, USA Supelco, Bellefonte, PA, USA Flawil, Sveits Supelco, Bellefonte, PA, USA      Tokyo, Japan Tokyo, Japan Tokyo, Japan Tokyo, Japan Tokyo, Japan Merck, KGaA, Darmstadt, Tyskland Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA Merck, KGaA, Darmstadt, Tyskland   Palo, Alto, California, USA Palo, Alto, California, USA

Varian Prostar modell 210 Pumpe B Kinetex 5u C18 100A AXIA 150x21,2 mm LiChroCART® 250-10 RP-18e 10µm	Palo, Alto, California, USA Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA Merck, KGaA, Darmstadt, Tyskland
<i>Analytisk tynnsjikt-kromatografi (TLC)</i> Elueringskar, glass TLC-sprayer GW-1 RP-18 F254 S, aluminiumsplater	Camag, Muttenz, Sveits Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland Merck, Darmstadt, Tyskland
<i>Vakuu inndamper</i> miVac Duo concentrator miVac Duo pump miVac pressure controller miVac SpeedTrap	Genevac, Ipswich, England Genevac, Ipswich, England Genevac, Ipswich, England Genevac, Ipswich, England

## 4.2 Metoder

### 4.2.1 Generelle metoder

#### 4.2.1.1 Innveing

Overskålsvekt eller analysevekt ble benyttet avhengig av mengde som ble innveid.

#### 4.2.1.2 Inndamping

Etter gjennomføring av hver separasjon ble løsemidlet i de ulike ekstrakter, fraksjoner og delfraksjoner dampet til tørrhet på rotavapor ved 60 °C under vakuum. Oljevakuumpumpe (5-60 minutter) ble brukt til å fjerne resterende løsemidler fra rundkolber.

Delfraksjoner har også blitt dampet til tørrhet i en vakuum inndamper (miVac vacuum concentrators).

#### 4.2.1.3 Vannkvalitet

Destillert vann (Millipore) ble benyttet til alle metoder.



#### 4.2.1.4 Filtrering

Sprøytefiltre med porestørrelse på 0,45 µm ble benyttet til preparativ og analytisk væskechromatografi (high performance liquid chromatography = HPLC).

#### 4.2.1.5 Ekstraksjon med organiske løsemidler –ASE

##### *Prinsipp*

Organisk ekstraksjon ble utført ved hjelp av Accelerated Solvent Extraction (ASE). ASE er en automatisert ekstraksjonsteknikk som brukes for å oppnå ekstraksjoner på kort tid, i tillegg til lavere forbruk av løsemidler. De to viktigste parameterne som sørger for dette er høy temperatur og høyt trykk (Dionex 2011) .

Høy temperatur: Løsemidlets kapasitet til å løse prøven vil økes i tillegg til diffusjonshastigheten. Med en høy temperatur vil stoffer fjernes fra matriksen lettere, da løsemiddel-matriksinteraksjoner (blant annet van der Waals krefter, hydrogenbindinger, dipolbindinger) brytes lettere. Viskositeten av løsemidlet vil reduseres og matriksen penetreres lettere.

Høyt trykk: Høyt trykk vil gi mulighet for bruk av temperaturer over kokepunktet. Dette er fordelaktig for løsemidler med lave kokepunkter. Det blir også lettere å pumpe løsemidlet gjennom den pakkede matriksen med et høyt trykk. I tillegg vil løsemidlet tvinges inn i porene i matriksen, og det sørges for god kontakt mellom matriks og løsemiddel.



*Figur 4.1: ASE instrument ved FI*

### ***Reagenser***

Metanol

Diklormetan

Aceton

DE (diatomaceous earth, kiselgur)

Nitrogen

Komprimert luft

### ***Utstyr***

Celler med toppkapsel og bunnkapsel

Stempel

Filter

Oppsamlingsflasker med lokk

### ***Prosedyre***

1. Bunnkapsel markeres med B og toppkapsel med T
2. Løsemiddelreservoarene fylles med ønskede løsemidler (her: aceton, metanol og diklormetan)
3. Prøven tillages ved å blandes i forholdet 4:1 (tørket plantemateriale: DE). Vær oppmerksom på å tilsette mer DE ved små mengder av prøven
4. Bunnkapselen skrus på cellen og et filter settes inn. Filteret presses ned til bunnen av cellen ved hjelp av et stempel
5. Ca. 1 skje DE tilsettes cellen før den pakkes med prøven. Prøven, skal ikke pakkes for tett
6. Litt DE tilsettes på toppen av prøven før toppkapselen skrus på
7. Ferdigpakket celle settes i en ledig posisjon på cellebrettet
8. Oppsamlingsflasker settes i ledige posisjoner på oppsamlingsbrettet og to avfallsflasker i posisjon R1 og R2. Sikkerhetsskjermen lukkes
9. Systemet renses minst 3 ganger med aceton før ekstraksjonen settes i gang
10. Det ekstraheres først med diklormetan inntil løsemidlet mister farge, for å ekstrahere ut alle upolare stoffer
11. Samme prosedyre gjentas med metanol etter at systemer vaskes med aceton minst 3 ganger
12. Systemet vaskes til slutt med aceton minst 3 ganger

13. Råekstraktene dampes inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe (se avsnitt 4.2.1.2 Inndamping)

## 4.2.2 Separasjonsmetoder

### 4.2.2.1 Versaflash kolonnekromatografi

#### *Prinsipp*

Kolonnekromatografi er separasjonsmetoder som benyttes til å skille stoffer fra hverandre. I kolonnen vil molekylene separeres ved å fordele seg mellom to faser. Den ene fasen beveger seg (mobilfase), mens den andre fasen holder seg i ro inne i kolonnen (stasjonærfasen) (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004). I Versaflash kolonnekromatografi benyttes det av ferdigpakkede Versapak kolonner hvor stasjonærfasen enten er polar eller upolar.

Prøveløsning appliseres og transporteres med mobilfase gjennom kolonnen ved hjelp av en pumpe. Siden stoffene har ulik grad av affinitet til stasjonærfasen, vil de kunne separeres og komme ut av kolonnen på forskjellige tidspunkter. Oppsamlingen av fraksjoner skjer etter hvert som mobilfasen kommer ut av kolonnen.

De to mest brukte kolonnematerialer er normalfase med silikagel og omvendt-fase med C<sub>18</sub>-materialer (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

Silika (silikagel) er den viktigste stasjonærfasen i normalfasekromatografi og består av et porøst materiale med et stort overflateareal som gir en enorm kontaktflate til mobilfasen. Silanolgruppene (Si-OH) er de aktive gruppene i silika. Disse gjør overflaten polar og svakt sur, og er dermed ansvarlig for adsorpsjonsegenskapene. En blanding av stoffer separeres ved at det oppstår polare interaksjoner mellom de ulike stoffmolekylene og silika i ulik grad. Hydrogenbindingsinteraksjoner er de kraftigste interaksjonene, og aminer og karboksylsyrer gir de sterkeste hydrogenbindingsinteraksjonene. De retarderes derfor sterkt til stasjonærfasen og kommer ut sist fra kolonnen. Mobilfasene i normalfasekromatografi er blandinger av organiske løsemidler. Styrken på mobilfasen bestemmes av polariteten på løsemidlene. Polare løsemidler (sterk mobilfase) kan bryte sterke interaksjoner, mens upolare løsemidler (svak mobilfase) kan bryte svake interaksjoner. Ved å øke polariteten på løsemidler, vil løsemiddelstyrken økes og retensjonen reduseres.

I omvendt-fase kromatografi er silikabasert C<sub>18</sub>-materiale desidert mest brukt som stasjonærfase. Stasjonærfasen består av hydrokarbonkjede med 18 karbonatomer som utgjør den mest hydrofobe fasen. Stoffer i kolonnen retarderes ved hydrofob interaksjon, hvorav de viktigste kreftene er van der Waals-krefter. Disse interaksjonene er relativt svake, men øker med molekylstørrelsen. I en blanding av stoffer vil hydrofobe stoffer, mettede forbindelser og uioniserte forbindelser få lengst retensjonstid, da disse retarderes mest ved å bindes til den stasjonære fasen. Mobilfasen består typisk av en blanding av vann og en organisk modifikator som er blandbar med vann, som for eksempel metanol eller acetonitril. Styrken på mobilfasen styres av hvilken mengde og type av organisk modifikator. Med et økende innhold av organisk modifikator vil mobilfasens styrke øke, og retensjonen avtar (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

### ***Reagenser***

Metanol

Destillert vann

Aceton

### ***Utstyr***

Versapak C<sub>18</sub>-kolonne

Kromatografisk pumpe

Versaflash stativ

Dramsglass

Begerglass

Sprøytefilter

### ***Prosedyre***

1. Kolonnen kondisjoneres med ønsket mobilfase lik 3x kolonnevolum
2. Mobilfasen pumpes ut fra et reservoar og gjennom systemet via pumpen
3. Prøven løses i en liten mengde med egnet løsemiddel (=prøveløsning)
4. Prøveløsningen filtreres for å fjerne partikler, og appliseres på kolonnen
5. Mobilfase med økende løsemiddelstyrke benyttes for å eluere ut alle stoffer
6. Fraksjoner samles opp i dramsglass
7. Kolonnen vaskes med 100% metanol

#### 4.2.2.2 Sephadex LH-20 gelkromatografi

##### *Prinsipp*

Gelkromatografi er en separasjonsmetode innen kolonnekromatografi (se avsnitt 4.2.2.1 Versaflash kolonnekromatografi). Sephadex LH-20 består av hydroksypropylert Sephadex G-25. Denne dekstrangelen formeres ved tverrbinding av dekstrankjeder, som resulterer i et tredimensjonalt polysakkaridnettverk. Hydroksypropylgruppene er via eterbindinger bundet til glukoseenhetene i dekstrankjedene. Hydroksypropylgruppene øker ikke antall hydroksylgrupper, men selve forholdet mellom dette og karbon. Dette gir gelen både hydrofile og lipofile egenskaper (Pharmacia 1975). Sephadex LH-20 sveller i vann, polare organiske løsemidler, blandinger av disse, og vandige løsemiddelblandinger. Prinsippet for Sephadex LH-20 er at stoffer separeres etter molekylstørrelse, forutsatt at det ikke oppstår noen interaksjoner mellom stoffene og stasjonærfasen (Pharmacia 1975). Denne separasjonsmetoden er også kjent som eksklusjonskromatografi. Separasjonen skjer i en mobilfase som stoffene er løselige i. Dermed vil vannløselige stoffer separeres med vandige mobilfaser. Stasjonærfasen er porøs og har en kontrollert porestørrelse. Mobilfasen fyller porene i pakkematerialet og bringer stoffer gjennom kolonnen. Da pakkematerialet er inert vil stoffer som er for store til å vandre inn i porene, bli ekskludert fra disse og dermed transportert gjennom kolonnen på utsiden av partiklene, med samme hastighet som mobilfasen. De små stoffmolekylene transporteres av mobilfasen inn i de minste porene av partiklene. Veien gjennom kolonnen er lengre for disse, og retensjonen blir dermed større (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004). Sephadex LH-20 har i tillegg adsorptive egenskaper ovenfor aromatiske og sykliske forbindelser, som også spiller en rolle i separasjonen av stoffmolekyler (Pharmacia 1975).

##### *Reagenser*

Destillert vann

Metanol

Aceton

##### *Utstyr*

Sephadex LH-20 gel

Stativ

Kolonne

Erlenmeyerkolbe

Glass pasteur pipette

Glassull

Glasstrakt

### ***Prosedyre***

1. Sephadex LH-20 suspenderes og svelles i ønsket starteluent
2. Kolonnen monteres vertikalt på stativet og glassull legges i bunnen av kolonnen
3. Kolonnen fylles med oppsvulget kolonnematriks. Det er viktig å påse at det ikke forekommer ujevnheter eller luft i pakkingen for å oppnå god separasjon
4. Glassull legges på toppen av kolonnematriksen
5. Glasstrakt med elueringsmiddel monteres over kolonnen
6. Kolonnen vaskes med starteluenten
7. Prøven løses i egnet løsemiddel/løsemiddelblanding (= prøveløsning) og appliseres langs veggen på toppen av kolonnen ved en pipette, for å sikre en jevn fordeling over kolonnematriksen
8. Stoffmolekylene elueres ut av kolonnen ved hjelp av elueringsmidler med økende løsemiddelstyrke
9. Fraksjoner samles opp i erlenmeyerkolber
10. Kolonnen vaskes med 100% metanol for å skylle ut eventuelle rester



*Figur 4.2: Sephadex LH-20 kolonne ved FI*

#### **4.2.2.3 Diaion HP-20 kolonnekromatografi**

Diaion HP-20 er en upolar polymer adsorbent resin som består av styren og divinylbenzen. Den polymere adsorbenten benyttes til separasjon av molekyler, hvor prinsippet for metoden er i likhet med omvendt-fase-kromatografi (se avsnitt 4.2.2.1 Versaflash kolonnekromatografi). Partiklene i kolonnematriksen er sfæriske med diameter på 0,5 mm (Sigma-Aldrich 2015).

#### ***Reagenser***

Destillert vann

Metanol

#### ***Utstyr***

Diaion HP-20

Kolonne

Stativ

Erlenmeyerkolbe

Glassull

Glass pasteur pipette

Glasstrakt

### ***Prosedyre***

1. Diaion suspenderes og svelles i ønsket starteluent
2. Kolonnen monteres vertikalt på stativet og glassull legges i bunnen av kolonnen
3. Kolonnen fylles med oppsvulget kolonnematriks. Det er viktig å påse at det ikke forekommer ujevnheter eller luft i pakkingen for å oppnå god separasjon
4. Glassull legges på toppen av kolonnematriksen
5. Glasstrakt med elueringsmiddel monteres over kolonnen
6. Kolonnen vaskes med starteluenten
7. Prøven løses i egnet løsemiddel/løsemiddelblanding (= prøveløsning) og appliseres langs veggen på toppen av kolonnen ved en pipette, for å sikre en jevn fordeling over kolonnematriksen
8. Stoffmolekylene elueres ut av kolonnen ved hjelp av elueringsmidler med økende løsemiddelstyrke
9. Fraksjoner samles opp i erlenmeyerkolber
10. Kolonnen vaskes med 100 % metanol for å skylle ut eventuelle rester

#### **4.2.2.4 Væskekromatografi (HPLC)**

##### ***Prinsipp***

Væskekromatografi er relativt likt Versaflash kolonnekromatografi, men her benyttes det et mye høyere trykk på grunn av kolonnens fysiske egenskaper. Kolonnene er typisk 5-25 cm lange stålrør pakket med stasjonærfase av 3-5  $\mu\text{m}$  partikler. Når mobilfasen pumpes gjennom kolonnen, gir partiklene et mottrykk på 30-300 bar. Pumpen må derfor være i stand til å pumpe væske med konstant hastighet mot et høyt trykk (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

En pumpe suger mobilfase fra et reservoar og presser den gjennom kolonnen som er pakket med silikapartikler med en hydrofil eller hydrofob overflate. Prøveløsningen injiseres via en injektor inn i mobilfasen før kolonnen, og presses dermed gjennom kolonnen ved hjelp av pumpen, slik som for mobilfasen. I kolonnen blir stoffmolekyler retardert og separert.



Stoffene som elueres fra kolonnen, detekteres av en detektor som er koblet til systemet. UV-detektor er den vanligste (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

I metoden er stasjonærfasen i kolonnen pakket for normalfasekromatografi, omvendt-fasekromatografi eller gelkromatografi (se avsnitt 4.2.2.1 Versaflash kolonnekromatografi og avsnitt 4.2.2.2 Gelkromatografi). Mobilfasen består av ett eller flere løsemidler og kan under analysen elueres på to måter, enten ved gradient eluering (styrken på mobilfasen endres under analysen) eller ved isokratisk eluering (mobilfasen har konstant sammensetning under analysen). HPLC kan brukes analytisk eller preparativt. Analytisk HPLC brukes i denne oppgaven for å finne en egnet sammensetning av mobilfase, som videre kan benyttes i preparativ HPLC for å få god separasjon av stoffene. Analytisk HPLC brukes også for å kontrollere renhet av en prøve for å detektere bestemte stoffer ved gitte bølgelengder, eller for kvantifisering (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

### ***Reagenser***

Destillert vann

Metanol av HPLC-kvalitet

Trifluoreddiksyre (TFA)

Acetonitril av HPLC-kvalitet

### ***Utstyr***

Vialer

Dramsglass

Sprøyte og sprøytedrevet filter

HPLC-apparat med tilhørende utstyr

### ***Prosedyre 1***

1. Ved analytisk HPLC benyttes mobilfasen (lik starteluent) til kondisjonering av kolonnen i 20-45 minutter
2. Pumpene suger mobilfasen fra to reservoarer og mobilfasen pumpes med en konstant hastighet gjennom systemet
3. Prøven løses i et lite volum starteluent (=prøveløsning) som gir en konsentrasjon på ca. 0,5 mg/ml

4. Prøveløsningen filtreres over i vialer for å fjerne partikler. Vialene plasseres i autosampleren
5. Injeksjonsvolumet på hver prøveløsning er vanligvis på 20 µl
6. Stoffer i prøveløsningen detekteres av DAD-detektor
7. Kolonnen vaskes med 50 % vandig acetonitril

### ***Prosedyre 2***

1. Ved preparativ HPLC kondisjoneres kolonnen i 20-30 minutter med ønsket mobilfase (lik starteluent)
2. Pumpene suger mobilfasen fra to reservoarer og mobilfasen pumpes med en konstant hastighet gjennom systemet
3. Prøven løses i ønsket starteluent (= prøveløsning) som gir en konsentrasjon på ca. 20 mg/ml (avhenger av hvor mye stoff som injiseres)
4. Prøveløsningen filtreres for å fjerne partikler og ca. 1 ml injiseres via injeksjonsloopen (5 ml loop)
5. Stoffer i prøveløsningen kommer ut av kolonnen og detekteres av detektoren
6. 20 ml fraksjoner samles opp i dramsglass for hvert minutt
7. Kolonnen vaskes i 20 minutter med etanol-vann blanding (varierer avhengig av prøve injisert)

## **4.2.3 Identifikasjonsmetoder**

### **4.2.3.1 Analytisk HPLC**

Prinsipp, reagenser og prosedyre er beskrevet i kap. 4.2.2.4.

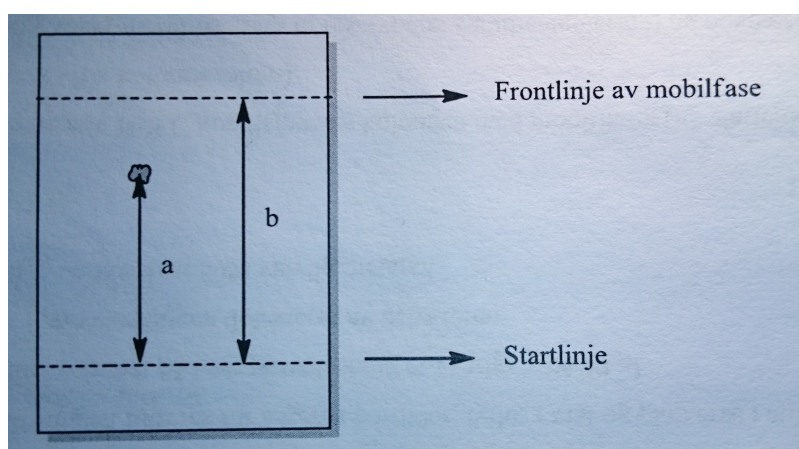
### **4.2.3.2 Analytisk tynnsjiktskromatografi**

#### ***Prinsipp***

Tynnsjiktskromatografi (thin layer chromatography = TLC) er en rask og enkel separasjonsmetode. Stasjonærfasen (vanligvis C<sub>18</sub> eller silika) er spredt som et tynt lag utover en plate av glass, plast eller metall. Prøveløsningene settes på platen som flekker langs en startlinje (ca. 2 cm fra kanten). Løsemidlet dampes av og platene settes i et lukket kar med mobilfase i bunnen av karet. Mobilfasen og prøveløsningen migrerer oppover platen ved hjelp av kapillærkrefter. Når mobilfasen har vandret et stykke oppover platen og nærmer seg den øvre platekanten, tas platen ut av karet og væskefronten merkes av. Mobilfasen

fordamper og stoffenes posisjon på platen synliggjøres. Stoffene påvises på platen ved hjelp av en UV-lampe og/eller fargereagenser (se avsnitt 4.2.3.5 Ceric spraying og avsnitt 4.2.3.6 DPPH-spraying).

Stoffmolekylenes retensjon og hvor langt de vandrer oppover platen avhenger av egenskapen til stoffene og av styrken til mobilfasen. Retensjonen av stoffene på platen angis som retensjonsfaktor,  $R_f$ .  $R_f$ -verdien defineres som  $R_f = a/b$ , hvor  $a$  er avstanden fra startlinjen til midten av flekken, og  $b$  er avstanden mellom startlinjen og frontlinjen av mobilfasen (se figur 4.3).



**Figur 4.3: TLC-plate med parametere til å bestemmelse av  $R_f$ -verdi (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004)**

Stoffer som har sterkest interaksjon med stasjonærfasen, vil retarderes mest, og dermed vandre et kortere stykke oppover platen. Disse får lave  $R_f$ -verdier (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

I TLC består stasjonærfasen av enten silika som i normalfasekromatografi, eller silanisert silika som i omvendt-fase-kromatografi (se avsnitt 4.2.2.1 Versaflash kolonnekromatografi). Sjiktet kan også være tilblandet fluorescensindikatorer som letter påvisningen av stoffene på platen ved UV-stråling. Mobilfaser til TLC er flyktige væsker og består av et organisk løsemiddel eller en blanding av vann og et organisk løsemiddel. Lav løsemiddelstyrke gir sterk retensjon, mens høy løsemiddelstyrke gir liten retensjon (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

## ***Reagenser***

Metanol

Destillert vann

## ***Utstyr***

Elueringskar med tett lokk

Mikropipette

TLC-plate

UV-lampe

Fargereagens

Sprayer

## ***Prosedyre***

1. En passende mobilfase lages og overføres til elueringskar. Lokket settes på i 10-15 minutter for å sikre en mett atmosfære av mobilfase i karet
2. TLC-platen merkes av med blyant for hvor prøvene skal appliseres (ca. 2 cm fra nedre kant med minimum 1 cm avstand mellom hver prøve)
3. Stoffene er som regel allerede løst i mobilfase etter separasjon på kolonne før TLC tas i bruk, men hvis dette ikke er tilfellet, skal prøvene løses i et flyktig løsemiddel
4. Prøveløsningene appliseres på avmerkede punkter på platen med en mikropipette (10  $\mu$ l)
5. Løsningsmidlene dampes av ved lufttørking før TLC-platen settes i elueringskaret med prøvekanten nederst
6. Når mobilfasen nærmer seg toppen av TLC-platen, tas platen ut av elueringskaret, og væskefronten merkes av med blyant
7. Mobilfasen dampes av ved lufttørking eller hårføner
8. Fargede stoffer blir synlige, mens UV-absorberende eller langbølgefluorescerende stoffer påvises med UV-lys ved 254 nm eller 366 nm. Andre stoffer kan påvises ved behandling med fargereagens
9. Ut ifra farge, intensitet og flekkenes størrelse, blir fraksjoner slått sammen

### 4.2.3.3 NMR-spektroskopi

#### *Prinsipp*

NMR-spektroskopi (Nuclear Magnetic Resonance) er en metode som benyttes til strukturoppklaring av organiske forbindelser.

Hydrogen ( $^1\text{H}$ ), karbon ( $^{13}\text{C}$ ) og en rekke andre grunnstoffer har kjerner (protoner) som oppfører seg som om de var magneter, ved at de spinner rundt sin egen akse. Når disse kjernene plasseres i et sterkt magnetfelt, samtidig som de bestråles med elektromagnetisk energi, vil de kunne absorbere den tilførte energien. Prosessen kalles magnetisk resonans. I fravær av et magnetfelt, vil kjernene ha tilfeldige orienteringer. Når disse de utsettes for et ytre magnetfelt, vil de innrette seg i en av to mulige orienteringer i forhold til det ytre magnetfeltet. De vil orientere seg enten med feltet ( $\alpha$ -spinn-tilstand) eller mot feltet ( $\beta$ -spinn-tilstand). Ved  $\alpha$ -spinn-tilstand har kjernene lavere energi enn ved  $\beta$ -spinn-tilstand. For å "flippe" kjerner i  $\alpha$ -spinn-tilstand, slik at de blir stående i den mest energirike  $\beta$ -spinn-tilstanden, er det nødvendig med tilføring av energi. Energien tilføres i form av et roterende elektromagnetisk felt. Når denne energien absorberes, sier man at kjernene er i resonans med den elektromagnetiske strålingen.

For at kjernene skal kunne absorbere energien og "flippes" til den høyere energitilstanden, kreves det et kraftig eksternt magnetfelt og elektromagnetisk bestråling i en spesifikk frekvens. Dette kommer av at ikke alle kjerner absorberer energi ved samme frekvens i et gitt magnetfelt, siden fordelingen og bevegelsene til elektronene rundt kjerneprotonene er forskjellige.

$^1\text{H}$  NMR-spektre viser ulike signaler hvor hvert signal svarer til hvert unike sett av protoner som finnes i et molekyl. Signalene til protonene vil oppstå i ulike posisjoner, og de får ulike kjemiske skift. Elektron tettheten og elektronfordelingen rundt kjernen avgjør det kjemiske skiftet. Små magnetfelt (induserte felt) vil oppstå, da elektroner er ladete partikler. Dette vil motvirke det ytre magnetfeltet og gi protonet en skjermingseffekt (shielding). Protoner med sterk skjermingseffekt, vil kreve mer energi for å kunne "flippes". Protoner som er uskjermet eller har mindre skjermingseffekt (deshielding), er mindre energikrevende (Solomons og Fryhle 2011). Tilstedeværelsen av elektrontiltrekkende og elektrondonerende grupper vil øke elektrontettheten og vice versa. Dette vil påvirke graden av elektrontettheten rundt en kjerne, og dermed også signalenes kjemiske skift.

Resultater fra NMR-spektroskopi kommer til uttrykk gjennom et NMR-spektrum. Her korresponderer antall signaler eller topper med de ulike kjernene av et stoff ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  osv.) i et molekyl. Etter at de ulike kjernene har "flippet" og kommet tilbake til sin opprinnelse energitilstand, avgis det energi. Denne energien blir uttrykket i form av topper i NMR-spektret. Toppene er plassert langs x-aksen (kjemisk skift) i spektret som angis i ppm med symbolet  $\delta$ . Kjerner som absorberer ved lav magnetfeltstyrke, vil komme "downfield" i spektret og kan sees på venstre side. Dette er kjerner som har lav elektrontetthet rundt seg, og er dermed deshielded. Likedan vil protoner med høy elektrontetthet rundt seg (shielded) komme "upfield" og til høyre i spektret. Tetrametylsilan (TMS) er den mest brukte interne standarden og utgjør nullpunktet på  $\delta$ -skalaen (Vik 2014).

$^1\text{H}$  NMR er den mest brukte formen for NMR, etterfulgt av  $^{13}\text{C}$  NMR. I  $^1\text{H}$  NMR vil det uttrykkes signaler i spektrene for alle protoner som befinner seg i unike magnetiske miljøer. Dette vil si at antall signaler reduseres ved symmetri i et molekyl, siden signalene vil oppstå på samme sted. Det er fire egenskaper som er viktige å studere:

- **Signalsplitting:** Signalet fra et gitt proton vil splittes som følge av effekten av magnetfelt assosiert til protoner på nærliggende atomer. Dette vil oppstå når protonene er separert med 3 eller færre  $\sigma$ -bindinger og har ulike kjemiske skift (ikke kjemisk ekvivalente). Et signal splittes i  $n+1$  topper ved  $n$  ekvivalente protoner på nærliggende atomer. En topp kalles singlett, to topper dublett, tre topper triplett og signal med mer enn fire topper benevnes ofte som en multipllett. Signaler som splitter opp hverandre på denne måten sies å koble med hverandre.
- **Integralkurve:** Integralkurven gir uttrykk for størrelsen av arealet under signalet, som forteller oss om det relative antallet H-atomer. Høyden av integralkurvene er proporsjonal med arealene under signalene. Dermed vil forholdet mellom arealene tilsvare forholdet mellom antall H-atomer i hvert signal.
- **Kjemisk skift:** Kjemisk skift-verdier vil gi verdifulle opplysninger om det magnetiske miljøet.
- **Koblingskonstant:** Dersom et signal er splittet i flere topper kaller vi avstanden mellom toppene for koblingskonstanten. Denne verdien måles i Hertz og har benevnningen, J. Koblingskonstanten benyttes for å lettere identifisere komplekse spektre. Ved kobling mellom signaler nær hverandre i spektret (mindre enn ca. fem

ganger koblingskonstanten) kan oppsplittingsmønsteret bli mer komplisert; høyere ordens kobling.

I et  $^{13}\text{C}$  NMR spekter vises vanligvis signalene som enkelttopper. Hver signal representerer et karbon med et unikt elektronisk miljø (Vik 2014).  $\delta$ -skalaen går normalt fra 0 til ca. 220 ppm. Her vil kjemiske skift-verdier også avhenge av elektrontettheten rundt kjernen. Tolkningen av et  $^{13}\text{C}$ -spekter blir forenklet ved å eliminere signalsplitting for  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  kobling ved ”proton noise decoupling” (Solomons og Fryhle 2011).

APT (Attached Proton Test) er en variant av  $^{13}\text{C}$  spektret.  $\text{CH}_2$  og kvaternære karbongrupper gir positive signaler (peker oppover), mens  $\text{CH}$ - og  $\text{CH}_3$ -grupper gir negative signaler (peker nedover) (Lambert og Mazzola 2004). Teknikken kan dermed benyttes for å få en visuell indikasjon på substitusjonsmønsteret til alle karbonatomer i et molekyl.

$^1\text{H}$  NMR, APT og  $^{13}\text{C}$  NMR kalles gjerne 1-dimensjonal NMR spektroskopi. Teknikker som baseres på 2-dimensjonell spektroskopi er blant annet HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), COSY (Correlation Spectroscopy) og HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

COSY er svært nyttig for å identifisere proton-proton-koblinger. I et slikt spekter blir det ordinære 1-dimensjonale  $^1\text{H}$ -spekter vist både langs den vertikale og horisontale aksene. Signaler vises i form av punkter langs en diagonal linje i spektret. To protoner er koblet til hverandre hvis de danner kryssstopper som står vinkelrett på diagonallinjen (Solomons og Fryhle 2011; Vik 2014).

HSQC er en teknikk med et  $^{13}\text{C}$ -spekter vist på den ene aksene og et  $^1\text{H}$ -spekter vist på den andre. Med denne teknikken vil man kunne observere hvilke H-atomer som er bundet til hvilke C-atomer. I spektret er signalene vist som krysspunkter. Ved å følge en rett linje fra punktet til de representative aksene, vil man få indikasjon på at H-atomet som ga opphav til  $^1\text{H}$  NMR signalet er korrelert til C-atomet som ga opphav til  $^{13}\text{C}$  signalet.

Med HMBC kan man observere heteronukleær karbon-proton ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ) koblinger. Denne teknikken er relativt lik HSQC. I HMBC-spektre er  $^{13}\text{C}$ -spekter vist på den ene aksene og et

$^1\text{H}$ -spekter vist på den andre. Det som skiller denne teknikken fra HSQC er at man kan observere long rangekoblinger over 3-4 bindingslengder (Vik 2014).

### ***Reagenser***

TMS (intern standard)

Deuterert metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

### ***Utstyr***

NMR-spektrometer

NMR-rør med lokk

### ***Prosedyre***

1. En liten mengde prøve (normalt 1-50 mg) løses i ca. 1 ml deuterert løsemiddel(=prøveløsningen)
2. Prøveløsningen overføres til NMR-rør (skal fylle omtrent 4 cm opp i røret)
3. Prøven analyseres i NMR-spektrometer

#### **4.2.3.4 UV-spektroskopi**

##### ***Prinsipp***

Ved identifisering av stoffer er det normalt å ta opp et UV-spektrum, hvor absorbansen til stoffene registreres som funksjon av bølgelengde. Forskjellige stoffer har derfor forskjellige UV-spektre. UV-stråling er elektromagnetisk stråling i bølgelengdeområdet 200-400 nm. Når det sendes elektromagnetisk stråling mot en analytt, vil bestemte molekyler i analytten absorbere noe av strålingen, mens resten vil passere tvers gjennom prøven. Intensiteten til strålingen vil dermed svekkes ved passasje gjennom analytten. Svekkelsen av elektromagnetisk stråling vil være kraftig ved noen bølgelengder og gi en kraftig absorpsjon i spektret, mens strålingen ved andre bølgelengder stort sett vil passere uhindret gjennom analytten og få liten absorpsjon.

Molekyler er normalt tilstede i sin grunntilstand (laveste energitilstand). Ved absorpsjon av elektromagnetisk stråling, dannes eksiterte molekyler med høyere energi. Siden eksiterte molekyler er svært ustabile, vil de i løpet av kort tid kvitte seg med overskuddsenergien. Vanligvis sendes denne ut igjen i form av varme eller som elektromagnetisk stråling (fluorescens).



Organiske forbindelser som inneholder dobbelt – eller trippelbindinger, vil gi bidrag til absorbanse i UV-spektroskopi. De krever mindre energi for å eksiteres, siden slike elektroner «sitter mye løsere». UV-lys med bølgelengder over 200 nm inneholder nok energi til å kunne eksitere denne typen elektroner.

Ved UV-spektroskopi er det viktig å velge et egnet løsemiddel som kan øse analytten. Eventuelle bunnfall fra andre stoffer kan føre til spredning av UV-stråling og tilhørende feil på absorbansemålingene. Disse må filtreres bort. I tillegg er det viktig at løsningsmidlet ikke absorberer lys i bølgelengdeområdet som skal benyttes til absorbansemålingene. Det er også viktig å kontrollere at analytten er stabil i løsningsmidlet, det vil si at det verken katalyserer nedbrytningsreaksjoner eller reagerer med selve analytten (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

### ***Reagenser***

Løsemiddel (her: metanol)

### ***Utstyr***

Plastspatel (til omrøring i kyvetten)

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

### ***Prosedyre for UV-analyse av reaksjonsforløp***

1. Spektrofotometeret innstilles ved ønsket bølgelengde
2. En blindprøve plasseres i blindprøveholder
3. Prøven løses i egnet løsemiddel, overføres til kvartskyvettene (vanligvis 3 paralleller), og omrøres
4. Absorbansemålinger startes umiddelbart

#### **4.2.3.5 Ceric-spraying**

##### ***Prinsipp***

Cerium(IV)sulfat har en evne til å oksidere andre stoffer kraftig, særlig under sure betingelser (Omastová et al. 2010). Oksidasjonen medfører forkoksing og fargedannelse. Hvilke stoffer det reagerer med på TLC-plater bestemmer fargen som dannes. Metoden benyttes for å påvise organiske substanser og kan brukes til å avgjøre hvilke fraksjoner som skal slås

sammen etter fraksjonering med kromatografiske metoder som preparativ HPLC, Versaflash, Sephadex eller Diaion.

### ***Reagenser***

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

### ***Utstyr***

TLC-sprayer

Varmeskap

### ***Prosedyre***

1. Ferdigutviklet TLC-plate hvor mobilfasen er dampet bort sprayes jevnt med Ceric-reagens
2. TLC-platen legges i varmeskap i 10-15 minutter ved ca. 106°C. Oppvarmingen i varmeskapet gir en raskere reaksjon
3. Resultatet avleses visuelt og synlige flekker merkes av med blyant

#### **4.2.3.6 DPPH-spraying**

##### ***Prinsipp***

Prinsippet for DPPH-spraying er det samme som for DPPH-testen (se avsnitt 4.2.4.1 DPPH-scavenging. For de prøveløsningene applisert på TLC-platen med stoffer som har radikalscavengereffekt, dannes det gule flekker mot lilla bakgrunn. Dette kan detekteres visuelt (Braca et al. 2002). Denne metoden kan brukes for å bestemme hvilke fraksjoner som slås sammen etter fraksjonering med preparativ HPLC, Versaflash eller Sephadex.

### ***Reagenser***

DPPH

Metanol

### ***Utstyr***

TLC-sprayer

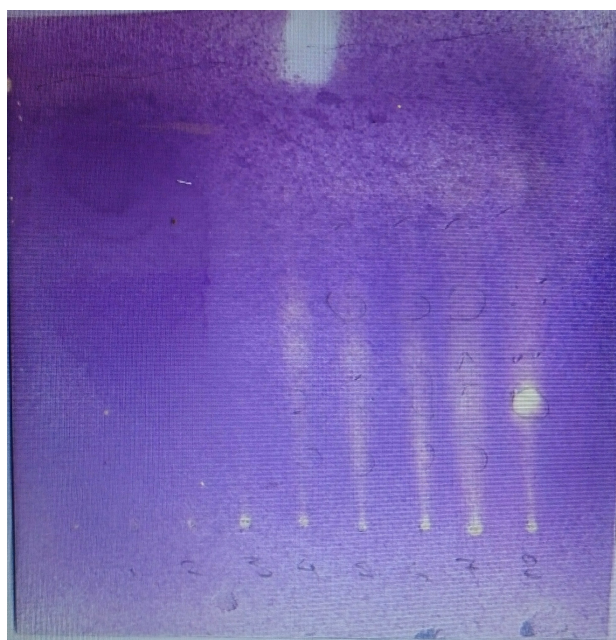
TLC-plate

Magnet og magnetrører

Erlenmeyerkolbe

### *Prosedyre*

1. DPPH løses i metanol i en erlenmeyerkolbe til en konsentrasjon på ca. 40 mg/100 ml ved hjelp av magnet og magnetrører
2. DPPH-løsningen overføres til TLC-sprayer
3. Ferdigutviklet TLC-plate sprayes jevnt med DPPH-løsningen. Den konsentrerte DPPH-løsningen gir en jevn lilla farge på platen
4. Resultatet leses av visuelt etter få minutter



*Figur 4.4: Tynnsjiktplate sprayet med DPPH-løsning*

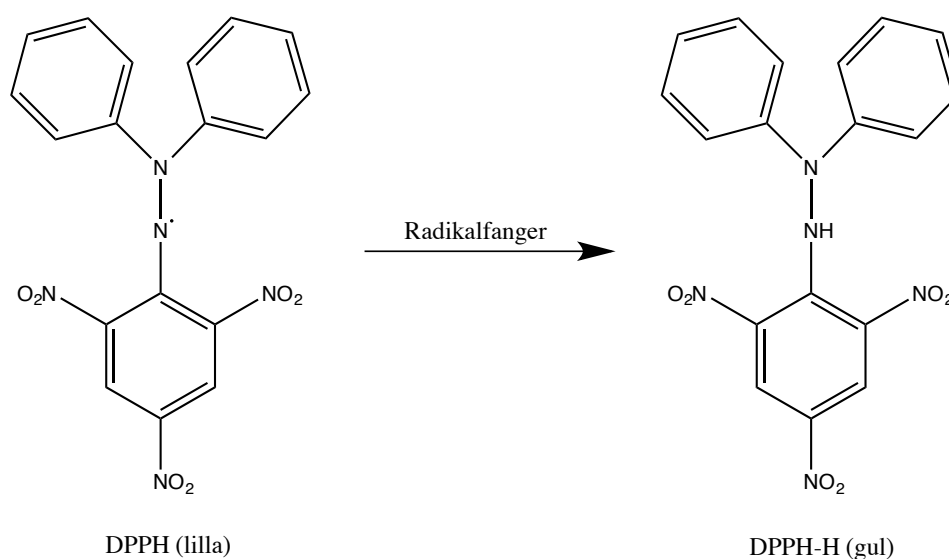
## **4.2.4 Metoder for måling av biologisk aktivitet**

### **4.2.4.1 DPPH-scavenging**

#### *Prinsipp*

DPPH-scavenging er en metode for estimering av radikalscavengeraktiviteten til en forbindelse. Den baserer seg på det stabile og frie radikalet difenylpicrylhydrazyl (DPPH). Det uparede elektronet i DPPH kan delokaliseres og molekylene unngår dimerisering, slik det pleier å være for de fleste andre frie radikaler. Delokaliseringen av det uparede elektronet gir også opphav til en dyp fiolett farge i løsning og viser et sterkt absorpsjonsbånd ved 517 nm (Malterud 2009; Molyneux 2004).

Når en DPPH-løsning blandes med en forbindelse som har radikalscavengereffekt, vil forbindelsen donere et H-atom, som igjen vil gi opphav til den reduserte formen DPPH-H (Figur 4.5). Den reduserte formen (nonradikal) mister fiolett-fargen og går over til en gul farge (fra pikrylgruppen som fremdeles er tilstede). Dette kan detekteres visuelt. Reduksjon i radikalkonsentrasjon vil derfor føre til reduksjon i absorbansverdi ved 517 nm (Malterud 2009; Molyneux 2004). Dette betyr at nedgangen i absorbans er relatert til mengde og aktivitet av radikalscavenger. Quercetin anvendes ofte som positiv kontroll da det er en god scavenger, stabilt og rimelig (Malterud 2009).



**Figur 4.5: Omdannelse av DPPH til DPPH-H(Molyneux 2004)**

Prosent radikalsavenging kan beregnes ved hjelp av følgende formel (Malterud 2009):

$$100 \times ((A_0 \times 2,95/3,00) - A_t) / ((A_0 \times 2,95/3,00) - A_p)$$

$A_0$ : startabsorbans (absorbans før tilsetning av testløsning/positiv kontroll)

$A_t$ : absorbans med testløsning/positiv kontroll etter 5 minutter reaksjonstid

$A_p$ : absorbans etter 5 minutter reaksjonstid hvis alt DPPH er blitt scavengert. Denne verdien settes ofte lik 0

Aktiviteten angis som  $IC_{50}$ , det vil si konsentrasjonen som gir 50 % scavengert.

### ***Reagenser***

Metanol

DPPH

Dimetylsulfoksid (DMSO)

Quercetin

Testsubstans

### ***Utstyr***

UV-spektrofotometer

Kyvetter

Plastspatler

Magnet

Magnetrører

Pipetter og multipipette

Erlenmeyerkolbe

### ***Prosedyre***

1. DPPH-pulver løses i metanol (ca. 0,04 mg/ml) i en erlenmeyerkolbe og blandes ved hjelp av en magnet og magnetrører. Løsningen skal gi en absorbansverdi mellom 0,9-1,1 ved 517 nm
2. Testsubstanser løses i DMSO til ønsket konsentrasjon. Quercetin løses i DMSO eller metanol og brukes som positiv kontroll
3. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve bestående av ca. 3 ml MeOH. Blindprøven skal stå i blindprøveholderen under hele forsøket
4. Startabsorbans måles ved 517 nm i 2,95 ml DPPH-løsning (3 paralleller)
5. Ved tid=0 tilsettes 50 µl av testløsning (ved hjelp av en multipipette) til hver parallell og blandingen omrøres med en plastspatel
6. Absorbansmåling starter 30 sekunder etter tilsetning av testløsning. Absorbansen måles hvert 60. sekund i 5 minutter
7. Innholdet i kyvettene kastes etter hver måling og kyvettene skylles med MeOH (3 ganger)

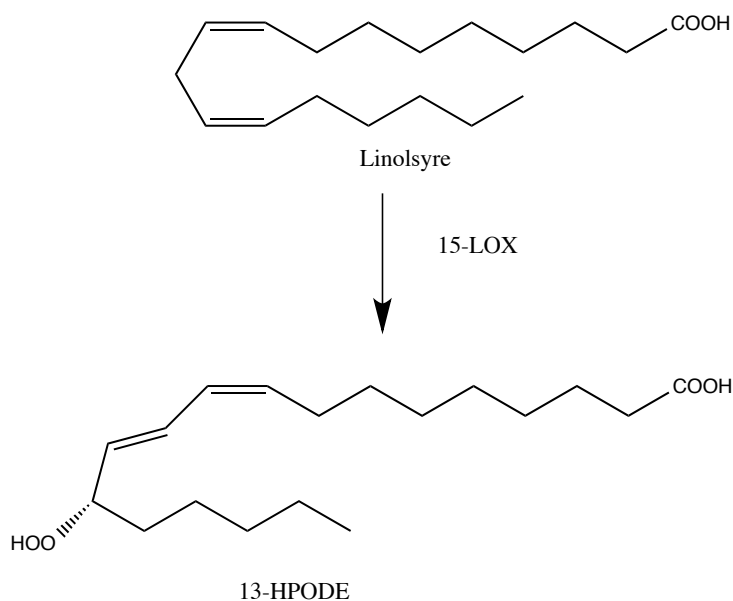
#### 4.2.4.2 15-Lipoksygenasehemming

##### *Prinsipp*

Lipoksygenaser (LOX) er enzymer som selektivt katalyserer peroksidering av flerumettede fettsyrer. Hemming av 15-LOX er av stor interesse på grunn av deres mulige rolle i oksideringen av LDL (low density lipoprotein). Denne prosessen antas å være et viktig trinn i utviklingen av aterosklerose (Lyckander og Malterud 1996).

15-LOX hemming er en metode basert på den 15-LOX katalyserte reaksjonen mellom oksygen og en flerumettet fettsyre med en 1,4-dien-type struktur. Både linolsyre og arakidonsyre har 1,4-dien-type struktur, men linolsyre benyttes fremfor arakidonsyre, da det er rimeligere og mer stabilt (Malterud 1998). Arakidonsyre og linolsyre gir nokså like verdier for enzymhemming (Lyckander og Malterud 1990).

15-LOX finnes både i dyr og planter. I våre forsøk ble 15-LOX isolert fra soyabønner benyttet. Disse enzymene er ikke identiske med de vi finner i dyr, men det er vist at det er en tilstrekkelig korrelasjon mellom verdiene for enzyminhiberingen mellom disse. 15-LOX katalyserer oksidasjonen av linolsyre til 13-HPODE (13-hydroperoksy-(9Z,11E)-oktadekadiensyre) på en effektiv måte (Lapenna et al. 2003). Dannelsen av et konjugert dobbeltbindingssystem fører til en økning i absorbans ved 234 nm. Denne økningen benyttes for å bestemme mengden av reaksjonsproduktet i peroksidierungsreaksjonen (Malterud 1998). Ved tilsetning av en testsubstans som hemmer 15-LOX, vil absorbansøkningen reduseres. Hemmingsgraden av 15-LOX kan dermed bestemmes ved å sammenligne absorbansøkningen i nærvær (med testsubstans) og fravær (blankprøve) av en hemmer.



**Figur 4.6: Peroksidering av linolsyre til 13-HPODE ((Funk og Cyrus 2001)**

Prosent enzymhemming beregnes ved hjelp av følgende formel ((Malterud 1998):

$$\% \text{ hemming} = 100 \times [(dA_1/dt) - (dA_2/dt)] / (dA_1/dt)$$

$dA_1/dt$ : verdi for absorbansøkning ved 234 nm per tidsenhet uten testsubstans tilsatt.

$dA_2/dt$ : verdi for absorbansøkning ved 234 nm per tidsenhet med testsubstans tilsatt.

### **Reagenser**

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

B: Substratløsning. 50  $\mu$ l linolsyre og 150  $\mu$ l etanol blandes, deretter tilsettes 50 ml A til blandingen. 10 ml av blandingen fortynnes med 150 ml A. Denne løsningen (B) lages kort tid før bruk

C: Enzymløsning. 15-Lipoksygenase (15-LO) løses i A til en konsentrasjon på ca. 10 000 enheter/ml (ca. 0,4 AU/min økning). Løsningen lages rett før bruk og oppbevares på is under hele forsøket

D: Testsubstans. Stoff løses i DMSO i ønsket konsentrasjon.

Quercetin (positiv kontroll)

DMSO

## **Utstyr**

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Plastspatel

Pipetter/multipipette

## **Prosedyre**

1. Testsubstanser løses i DMSO til ønsket konsentrasjon
2. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve bestående av 0,95 ml A, 2,00 ml B og 0,05 ml DMSO i en kvartskyvette. Blandingen omrøres godt med plastspatel. Kyvetten skal stå i blindprøveholderen under hele forsøket
3. Blank prøve (uten hemmer): 0,90 ml A, 2,00 ml B og 0,05 ml DMSO blandes i kvartskyvette (3 paralleller). Ved tid=0 tilsettes 0,05 ml C og blandingene omrøres godt med en plastspatel. Absorbans måles ved 234 nm fra 30 til 90 sekunder, etter tilsetningen av C. Økningen i absorbans bør være mellom 0,3-0,5 AU/min. For å kontrollere stabiliteten av enzymaktiviteten, bør dette punktet gjentas etter hver 3.måleserie med testløsninger
4. Testløsning (med hemmer): 0,90 ml A, 2,00 ml B og 0,05 ml D blandes i kvartskyvette (3 paralleller). 0,05 ml C tilsettes ved tid=0 og blandingen omrøres godt med plastspatel. Absorbansøkning måles ved 234 nm fra 30 til 90 sekunder, etter tilsetningen av C.
5. Quercetin brukes som positiv kontroll og testes som under punkt 4, men D byttes ut med quercetinløsning
6. Innholdet i kvartskyvettene kastes etter hver måling, og kyvettene skylles med buffer A

### **4.2.4.3 Xantin oksidasehemming**

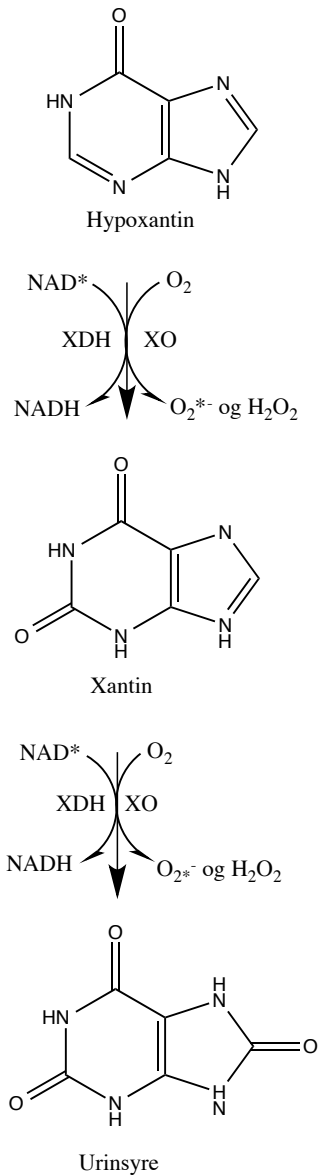
#### **Prinsipp**

Xantin dehydrogenase (XDH) og xantin oksidase (XO) er enzymformer som går over i hverandre, også kjent som xantin oksidoreduktase (XOR). XDH syntetiseres i kroppen og kan omdannes til XO, enten ved oksidering eller proteolyse. Omdannelse av hypoxantin til xantin og videre til urinsyre er en av hovedrollene til XOR. En økt mengde urinsyre i blodet kan medføre hyperurikemi. Dersom urinsyren felles ut i vev, vil det forårsake urinsyregikt (Pacher et al. 2006).



Under degraderingen av hypoxantin og xantin dannes det  $O_2^-$  (superoksid anion radikal).  $O_2^-$  kan gi opphav til en rekke andre reaktive oksygenspecier (ROS). Eksempel på dette er ONOO- (peroksynitritt) som dannes når  $O_2^-$  reagerer med NO. Dette frie radikalet kan videre føre til oksidativ skade på lipider, proteiner og DNA. XO har vist å spille en viktig rolle i ulike former av iskemi og andre typer vevs- og karskader, kronisk hjertesvikt og inflammatoriske sykdommer (Pacher et al. 2006). Superoksid anion radikal kan også disproporsjonere til  $O_2$  og  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  kan videre reagere til andre ROS (Halliwell 2001).

Hemming av XO-aktivitet kan dermed ha betydning for hindring av oksidativ stress mekanismer som er relatert til degenerative sykdommer, samt at det kan være fordelaktig i terapeutisk behandling av inflammasjonssykdommer og gikt. Allopurinol er et legemiddel som hemmer XO kraftig, og dermed også urinsyreproduksjonen. XO vil raskt oksidere legemidlet til den aktive metabolitten oxypurinol (også en hemmer av XO), og urinsyrenivået i blod og urin reduseres. Allopurinol benyttes klinisk mot urinsyregikt, men på grunn av bivirkninger er det ønskelig å utvikle nye og mer effektive legemidler med færre bivirkninger (Pacher et al. 2006).



**Figur 4.7: Degradering av hypoxantin og xantin til urinsyre ((Pacher et al. 2006)**

Prosent enzymhemming beregnes på samme måte som for 15-LOX hemming, med følgende formel:

$$\% \text{ hemming} = 100 \times \frac{[(dA_1/dt) - (dA_2/dt)]}{(dA_1/dt)}$$

$dA_1/dt$ : verdi for absorbansøkning ved 290 nm per tidsenhet uten testsubstans tilsatt.

$dA_2/dt$ : verdi for absorbansøkning ved 290 nm per tidsenhet med testsubstans tilsatt.

### ***Reagenser***

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

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

C: Enzymløsning. XO (xantin oksidase) løses i A til en konsentrasjon på ca. 1,8 enheter/ml.

Løsningen lages rett før bruk og oppbevares på is under hele forsøket

D: Testsubstans

DMSO

Quercetin

Destillert vann

### ***Utstyr***

UV-spektrofotometer

Pipetter/multipipette

Kvartskyvetter

Plastspatel

### ***Prosedyre***

1. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve bestående av 1,85 ml A, 0,05 ml DMSO, 1,0 ml destillert vann og 0,1 ml C. Blandingen omrøres godt med en plastspatel og skal stå i blindprøveholderen under hele forsøket
2. Blank prøve: 1,85 ml A, 0,1 ml C og 0,05 ml DMSO blandes i kvartskyvette (3 paralleller). Deretter tilsettes 1,0 ml B med påfølgende omrøring med plastspatel. Absorbansøkning ved 290 nm måles 30 sekunder etter tilsettingen av B, og absorbansen måles hvert 30. sekund i 5 minutter. Dette punktet gjennomføres etter hvert 3. måleserie med testløsninger for å kontrollere at enzymaktiviteten er stabil
3. Testløsning: 1,85 ml A, 0,1 ml C og 0,05 ml prøveløsning blandes i kvartskyvette (3 paralleller). Deretter tilsettes 1,0 ml B med påfølgende omrøring med plastspatel. Absorbansøkning ved 290 nm måles 30 sekunder etter tilsetting av B, og absorbansen måles hvert 30. sekund i 5 minutter
4. Quercetin brukes som positiv kontroll og skal testes på samme måte som under punkt 3, men her byttes 0,05 ml prøveløsning ut med quercetin
5. Innholdet i kvartskyvettene kastes etter hver måling, og kvettene skylles med destillert vann

#### 4.2.4.4 Rekelarvetest (Brine shrimp lethality assay)

##### ***Prinsipp***

Rekelarvetesten er en testmetode som benyttes for å måle de toksiske egenskapene hos planteekstrakter og isolerte naturstoffer. Målet med testen er å finne LD<sub>50</sub>-verdien hos rekelarver (*Artemia salina*) etter tilsetning av testforbindelsen (Meyer et al. 1982). Denne verdien representerer stoffkonsentrasjonen som gir 50% dødelighet. Testen utføres ved at et kjent antall nyklekkede rekelarver i saltvann blir tilsatt til ulike konsentrasjoner av testsubstans. Antall overlevende rekelarver telles 24 timer etter tilsetning.

Denne metoden er vanlig brukt. Dette kommer av at den er rimelig og rask å utføre, og den krever ikke dyrt eller spesielt utstyr (Meyer et al. 1982). Rekelarvene har en bemerkelsesverdig evne til å tolerere endringer i miljøet sitt, og de er ikke sensitive for store fluktuasjoner i vannets saltinnhold. Optimal temperatur for rekelarvene er rundt 25 °C (romtemperatur), men de tolererer også vanntemperaturer mellom 6-37 °C. Utklekkingen av larvene er et kritisk punkt. Følgende forhold sørger for klekking; temperaturen i vannet bør være rundt 30°C og saltkonsentrasjonen bør ikke være for høy (EOL 2015a).

##### ***Reagenser***

DMSO

Destillert vann

Kunstig havsalt (Aqua-Biosal)

Podofyllotoksin

Rekelarveegg (*Artemia salina*)

##### ***Utstyr***

Reagensglass

Magnetrører

Klekkekammer

Lampe

Sprittusj

Aluminiumsfolie

## ***Prosedyre***

### Dag 1

8. 3,3 % saltvannsløsning lages ved å løse kunstig havsalt i destillert vann. Blandingen kan røres med magnetrører for at saltet skal løses raskere
9. Klekkekammeret fylles med saltvannsløsningen
10. En skillevegg settes omtrent i midten av klekkekammeret med en liten åpning på bunnen
11. En spatelskje rekellarvegg tilsettes på den ene siden av klekkekammeret og dekkes godt med aluminiumsfolie
12. En lampe plasseres over den andre siden av klekkekammeret ved romtemperatur i 2 dager. Rekelarvene vil etter hvert bevege seg mot lyset etter at de har klekket

### Dag 3

1. Prøveløsninger lages. Ekstrakt/testforbindelse løses i DMSO til ønsket konsentrasjon
2. Prøveløsning (50 µl) tilsettes hvert reagensglass. Det lages 3 paralleller for hver konsentrasjon
3. Negativ kontroll: 50 µl DMSO tilsettes i 3 reagensglass (1%)
4. Positiv kontroll: 50 µl podofyllotoksin (50 mg/ml løst i DMSO) tilsettes i 3 reagensglass
5. Alle reagensglass merkes av til 5 ml med sprittusj (strek på glasset)
6. Ca. 4 ml saltvannsløsning tilsettes alle reagensglassene
7. Saltvannsløsning med innhold av 10 levende rekelarver tilsettes til det antallet reagensglass som skal benyttes. Som et hjelpemiddel kan USB mikroskop og mikroplate av porselen benyttes for å telle antall rekelarver, før de overføres til reagensglassene
8. Reagensglassene fylles opp til 5 ml
9. Toppen av reagensglassene dekkes med aluminiumsfolie
10. En lampe settes over reagensglassene i 24 timer under lys ved romtemperatur

### Dag 4

1. Antall døde rekelarver for hvert reagensglass noteres
2. LD<sub>50</sub>-verdien beregnes for hver prøve

## 4.3 Eksperimentell utførelse

### 4.3.1 Plantemateriale

Anvendt droge var blader av planten *Syzygium guineense*. Det ble samlet inn og identifisert av professor Drissa Diallo i Dioila, Mali, den 18.mars 2007. Plantematerialet ble lufttørket og pulverisert i Mali før det ble sendt til Oslo. En prøve av det anvendte plantematerialet foreligger ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

### 4.3.2 Ekstraksjon av plantemateriale

#### 4.3.2.1 Ekstraksjon med organiske løsemidler

Blader (400 g) av *S. guineense* ble ekstrahert som beskrevet i avsnitt 4.2.1.5 Ekstraksjon med organiske løsemidler – ASE s. 23. Plantematerialet ble blandet med 100 g DE (kiselgur) før ekstraksjonen. Med 5 celler fra ASE-instrumentet tilgjengelig, ble plantematerialet med DE delt opp i 3 batcher på ca. 165 g per batch. Hver celle ble dermed fylt med ca. 33 g plantemateriale. Disse ble først ekstrahert med DCM (til sammen ca. 12,5 L). Til hver celle ble 4 oppsamlingsflasker fylt (ca.200-250 ml per flaske), før plantematerialet sluttet å avgi mer farge. De samme batchene ble deretter ekstrahert med MeOH (til sammen ca. 15 L). Hver celle hadde fire oppsamlingsflasker (ca. 250 ml per flaske).

Med DCM og MeOH tok det henholdsvis 20 minutter og 30 minutter per oppsamlingsflaske, det vil si totalt 20 timer for DCM og 30 timer for MeOH. Etter ekstraksjonen ble DCM og MeOH fjernet fra ekstraktene ved inndampning på rotavapor og oljepumpe.

#### 4.3.2.2 Analytisk HPLC

MeOH-råekstraktet og DCM-råekstraktet ble undersøkt med analytisk HPLC. En liten mengde av hvert ekstrakt ble løst i ACN-vann (50:50) til en konsentrasjon på 0,5 mg/ml. Prøveløsningene ble filtrert gjennom et sprøytefilter for å fjerne partikler. En LiChroCART® 250-4 RP-18 (omvendt-fase) kolonne ble benyttet, og deteksjonen ble foretatt ved 254 nm, 280 nm og 360 nm for å detektere interessante stoffer. For eksempel absorberer aromater ved 280 nm og en del flavonoider ved ca. 360 nm.

Mobilfasen bestod av ulike blandingsforhold av mellom ACN-vann. Analysene ble utført ved gradienteluering (se tabell 4.1 og 4.2).

**Tabell 4.1: Gradientsystem for analytisk HPLC av DCM-råekstraktet**

Tid (min)	% vann (A)	% ACN (B)	Flowhastighet (ml/min)
0	98	2	1
20	98	2	1
43	20	80	1
45	98	2	1

**Tabell 4.2: Gradientsystem for analytisk HPLC av MeOH-råekstraktet**

Tid (min)	% vann (A)	% ACN (B)	Flowhastighet (ml/min)
0	98	2	1
30	98	2	1
43	20	80	1
45	98	2	1

#### 4.3.2.3 NMR-spektroskopi

DCM-råekstraktet og MeOH-råekstraktet ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Det ble også tatt  $^1\text{H}$  NMR spektrum av DCM-råekstrakt og MeOH-råekstrakt av blad fra samme plante (*S. guineense*) som forelå ved Farmasøytisk Institutt (FI). Disse to råekstraktene ble framstilt av Anders Rusten. Blader ble kjøpt på Medina-markedet i Bamako, Mali november 2005 (Rusten 2006). Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert kloroform og deuterert MeOH, respektivt. TMS ble tilsatt som intern standard.

For å kunne skille mellom råekstraktene var de navngitt som MeOH- og DCM-råekstrakt gml (gammel) og MeOH- og DCM-råekstrakt Lan, for henholdsvis Anders Rustens og denne oppgavens råekstrakter. NMR-spektra av begge råekstraktene er gjengitt i vedleggsdelen (se vedlegg, NMR-spekter 1-4).

#### 4.3.2.4 Bioassay

Da DCM-råekstraktet ikke lot seg løse i egnet løsemiddel (DMSO) ble 15-lipoksygenasehemming, DPPH-test og XO-hemming bare testet på MeOH-råekstraktet.

Rekelarvetest ble utført på MeOH-råekstraktet. DMSO ble benyttet som løsningsmiddel.

### 4.3.3 Fraksjonering av MeOH-råekstraktet

Flytskjema for fraksjoneringen av MeOH-råekstraktet og videre arbeid med fraksjonene er vist i vedleggsdelen (se vedlegg 8.1.1-8.1.16 for flytskjema 1-16).

#### 4.3.3.1 Diaion HP-20 kolonne separasjon

95 g av MeOH-råekstraktet ble løst i ca. 500 ml MeOH-vann (30:70). En Diaion HP-20 kolonne (460 x 55 mm) ble kondisjonert med MeOH-vann (10:90). MeOH-råekstraktet ble applisert på kolonnen i to omganger (2 x 250 ml), fordi volumet var for stort. Mobilfasen bestod av MeOH og vann i ulike blandingsforhold. Gradienteluering ble benyttet med økende mengde MeOH (se tabell 4.3). Det ble samlet opp 16 kolonnefraksjoner à ca. 250 ml for hver omgang (totalt 32 kolonnefraksjoner).

**Tabell 4.3: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av MeOH-råekstraktet**

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml) ved 1.applisering	Mengde (ml) ved 2.applisering
MeOH-vann (10:90)	1-4	1000	1000
MeOH-vann (50:50)	5-10	1750	1000
MeOH (100%)	11-16	1750	1500

#### 4.3.3.2 Analytisk TLC

Alle kolonnefraksjoner ble applisert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S) for å se hvilke fraksjoner som kunne slås sammen. Kolonnefraksjon 1-8 (fra begge fraksjoneringene i Diaion HP-20 kolonnen) ble utviklet med MeOH-vann (30:70), som mobilfase, mens kolonnefraksjon 9-16 ble utviklet med MeOH-vann (70:30). Etter at TLC-platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort-og langbølget UV-lys og sprayet med ceric-reagens. Kolonnefraksjoner som inneholdt like komponenter ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga hovedfraksjonene D1-D6 (se tabell 4.4).

**Tabell 4.4: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av MeOH-råekstraktet**

Kolonnefraksjon fra begge fraksjoneringer	Fraksjon
1+1	D1
2-6 + 2-6	D2
7+7	D3



8-12 + 8-12	D4
13-14 + 13-14	D5
15-16 + 15-16	D6

#### 4.3.3.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp  $^1\text{H}$  NMR spektra av fraksjon D2-D6. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert MeOH tilsatt TMS som intern standard.

#### 4.3.3.4 Bioassay

Måling av DPPH-scavenging, 15-LOX hemming og XO-hemming ble utført på fraksjon D2-D6 i forskjellige konsentrasjoner. DMSO ble brukt som løsningsmiddel.

#### 4.3.3.5 Analytisk HPLC

For å avgjøre hvilke fraksjoner som kunne inneholde interessante stoffer ble fraksjon D3-D6 analysert ved hjelp av analytisk HPLC. En liten mengde av hver fraksjon ble løst i ACN-vann (50:50) og deretter filtrert med sprøytefilter for å fjerne partikler. Prøveløsningene ble injisert i en Chromolith RP-18e kolonne (100 x 4,6 mm) og deteksjonen ble foretatt ved 254 nm, 280 nm og 330 nm. Det ble benyttet gradienteluering med ACN-vann (se tabell 4.5).

**Tabell 4.5: Gradienteluering for analytisk HPLC av fraksjon D3-D6**

Tid (min)	% vann (A)	% ACN (B)	Flowhastighet (ml/min)
0	95	5	1
2	95	5	1
15	20	80	1
20	20	80	1
21	95	5	1

### 4.3.4 Separasjon av fraksjon D4

#### 4.3.4.1 Sephadex LH-20 kolonne-separasjon

En Sephadex LH-20 kolonne (420 x 45 mm) ble kondisjonert med MeOH-vann (30:70). Fraksjon D4 (12,2 g) ble løst i MeOH-vann (50:50) og applisert på kolonnen. Som mobilfase ble det brukt MeOH og ulike blandingsforhold mellom MeOH og vann. Gradienteluering ble

benyttet med økende mengde MeOH, etterfulgt av en blanding av aceton-vann (se tabell 4.6). Det ble samlet totalt 17 kolonnefraksjoner à 200-250ml.

**Tabell 4.6: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon D4**

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH-vann (30:70)	1-3	540
MeOH-vann (40:60)	4	430
MeOH-vann (50:50)	5-6	300
MeOH-vann (60:40)	7	300
MeOH-vann (70:30)	8-9	300
MeOH (100 %)	10-12	700
Aceton-vann (70:30)	13-17	1200

#### 4.3.4.2 Analytisk TLC

Alle kolonnefraksjoner ble applisert på TLC plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S) som ble utviklet med MeOH-vann (50:50) som mobilfase. Etter at TLC-platene ble ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med DPPH-løsning. Kolonnefraksjonene ble slått sammen på bakgrunn av TLC-resultater og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga hovedfraksjonene D4S1-D4S10 (se tabell 4.7).

**Tabell 4.7: Sammenslåing av D4 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1	D4S1
2	D4S2
3	D4S3
4-6	D4S4
7-9	D4S5
10	D4S6
11	D4S7
12-13	D4S8
14	D4S9
15-17	D4S10

#### 4.3.4.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp  $^1\text{H}$  NMR spektra av alle fraksjonene og  $^{13}\text{C}$  NMR spektra av fraksjon D4S6-D4S10. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert MeOH tilsatt TMS som intern standard.

#### 4.3.5 Separasjon av fraksjon D4S8

##### 4.3.5.1 Versaflash kolonneseparasjon

Fraksjon D4S8 (ca. 600 mg) ble løst i MeOH-vann (60:40) og applisert på en Versapak  $\text{C}_{18}$  kolonne (150 x 40 mm) pakket med  $\text{C}_{18}$ -materiale. Kolonnen ble kondisjonert med starteluenten MeOH-vann (30:70) og deretter gradienteluert med MeOH og vann i ulike blandingsforhold (se tabell 4.8). Til slutt ble kolonnen vasket med 100 % MeOH. Totalt ble det samlet 27 kolonnefraksjoner à ca. 30 ml.

**Tabell 4.8: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon D4S8**

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH-vann (30:70)	1-3	90
MeOH-vann (40:60)	4-7	110
MeOH-vann (50:50)	8-13	200
MeOH-vann (60:40)	14-17	140
MeOH (100%)	18-27	200

##### 4.3.5.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S) og utviklet med MeOH-vann (50:50) som mobilfase. Etter at platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med ceric-reagens. Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 7 hovedfraksjoner (D4S8V1-D4S8V7) på bakgrunn av resultatene fra TLC (se tabell 4.9), og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

**Tabell 4.9: Sammenslåing av D4S8 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-8	D4S8V1
9-10	D4S8V2
11	D4S8V3
12	D4S8V4

13-15	D4S8V5
16-17	D4S8V6
18-27	D4S8V7

#### 4.3.5.3 NMR-spektroskopi

<sup>1</sup>H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene. Deuterert MeOH med TMS som intern standard ble brukt som løsemiddel.

### 4.3.6 Separasjon av fraksjon D4S8V1

#### 4.3.6.1 Versaflash kolonneseparasjon

Fraksjon D4S8V1 (ca. 150 mg) ble løst i MeOH-vann (25:75) og applisert på en Versapak-kolonne (110 x 23 mm) pakket med C<sub>18</sub>-materiale. Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (10:90) og gradienteluert med MeOH og vann i ulike blandingsforhold (se tabell 4.10). Kolonnen ble til slutt vasket med 100 % MeOH. Det ble totalt samlet 37 kolonnefraksjoner à ca. 15 ml og 30 ml.

**Tabell 4.10 Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon D4S8V1**

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH-vann (10:90)	1-4	75
MeOH-vann (12:88)	5-8	75
MeOH-vann (15:85)	9-14	100
MeOH-vann (20:80)	15-21	100
MeOH-vann (25:75)	22-26	85
MeOH-vann (30:70)	27-31	75
MeOH-vann (50:50)	32-33	80
MeOH (100%)	34-37	140

#### 4.3.6.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert og utviklet på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S) på samme måte som tidligere (se avsnitt 4.3.5.2 Analytisk TLC), men her ble det benyttet en annen sammensetning av mobilfase, MeOH-vann (33:67). Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 8 hovedfraksjoner (D4S8V1V1-D4S8V1V8) ut ifra TLC-resultatene (se tabell 4.11) og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

**Tabell 4.11: Sammenslåing av D4S8V1 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-2	D4S8V1V1
3-8	D4S8V1V2
9-10	D4S8V1V3
11-18	D4S8V1V4
19-23	D4S8V1V5
24-27	D4S8V1V6
28-31	D4S8V1V7
32-37	D4S8V1V8

#### 4.3.6.3 NMR-spektroskopi

<sup>1</sup>H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene. Det ble også tatt opp <sup>13</sup>C NMR, COSY og HSQC spektra av fraksjon D4S8V1V2. Som løsningsmiddel ble deuterert MeOH med TMS som intern standard brukt.

#### 4.3.6.4 Bioassay

Fraksjon D4S8V1V2 (identifisert som gallokatekin) ble testet for radikalscavenging (DPPH-test), 15-LOX hemming og XO-hemming ved forskjellige konsentrasjoner. Som løsningsmiddel ble DMSO benyttet.

### 4.3.7 Separasjon av fraksjon D4S8V5

#### 4.3.7.1 Versaflash kolonne separasjon

Fraksjon D4S8V5 (ca. 187 mg) ble løst i MeOH-vann (67:33) og applisert på en C<sub>18</sub>-kolonne (150 x 40 mm). Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (40:60) og gradienteluert med MeOH og vann i ulike blandingsforhold (se tabell 4.12). Det ble samlet 45 kolonnefraksjoner à ca. 30 ml og 60 ml. Kolonnen ble til slutt vasket med 100% MeOH.

**Tabell 4.12: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon D4S8V5**

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH-vann (40:60)	1-13	430
MeOH-vann (45:55)	14-20	200
MeOH-vann (50:50)	21-26	200

MeOH-vann (55:45)	27-33	200
MeOH-vann (60:40)	34-39	200
MeOH-vann (70:30)	40-42	200
MeOH (100%)	43-45	200

#### 4.3.7.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S), og utvikling og påvisning ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 4.3.5.2 Analytisk TLC).

Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 8 hovedfraksjoner (D4S8V5V1-D4S8V5V8) på basis av TLC-resultatene (se tabell 4.13) og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

**Tabell 4.13: Sammenslåing av D4S8V5 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-5	D4S8V5V1
6-10	D4S8V5V2
11-15	D4S8V5V3
16-18	D4S8V5V4
19-22	D4S8V5V5
23-26	D4S8V5V6
27-32	D4S8V5V7
33-44	D4S8V5V8

#### 4.3.7.3 NMR-spektroskopi

<sup>1</sup>H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene. <sup>13</sup>C NMR spektra ble også tatt opp på fraksjon D4S8V5V3-D4S8V5V6.

### 4.3.8 Separasjon av fraksjon D4S8V5V3

#### 4.3.8.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen D4S8V5V3 ble rensert opp ved preparativ HPLC. 22 mg av fraksjonen ble løst i 1,1 ml ACN-vann (50:50). Prøveløsningen ble filtrert og injisert på en C<sub>18</sub>- preparativ HPLC kolonne (150 x 21,2 mm) med C<sub>18</sub>-materiale og detektert ved 280 nm. Flowhastigheten var 20 ml/min der mobilfasen bestod av ulike blandingsforhold av ACN og vann, med 0,1 % TFA tilsatt i hvert løsemiddel. Det ble benyttet gradienteluering (se tabell 4.14). Totalt ble det

samlet inn 3 hovedfraksjoner (D4S8V5V3H1-D4S8V5V3H3) basert på absorbanstopper visualisert i kromatogrammet (se tabell 4.15). Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

**Tabell 4.14: Gradientsystem for preparativ HPLC av fraksjon D4S8V5V3**

Tid (min)	% vann +0,1% TFA (A)	% ACN +0,1% TFA (B)	Flowhastighet (ml/min)
0-7	85	15	20
7-10	85-80	15-20	20
10-15	80-50	20-50	20

**Tabell 4.15: Sammenslåing av D4S8V5V3 kolonnefraksjoner**

Retensjonstid (min)	Fraksjon
0-6.27	D4S8V5V3H1
6.27-9.22	D4S8V5V3H2
9.22-15	D4S8V5V3H3

#### 4.3.8.2 NMR-spektroskopi

<sup>1</sup>H NMR og <sup>13</sup>C NMR ble tatt opp av fraksjon D4S8V5V3H2. Deuterert MeOH med TMS som intern standard ble brukt som løsningsmiddel.

#### 4.3.8.3 Bioassay

Fraksjon D4S8V5V3H2 (identifisert som myricetin-3-*O*-glukosid) ble testet for radikalscavenging (DPPH-test), 15-LOX hemming og XO-hemming ved ulike konsentrasjoner. DMSO ble benyttet som løsningsmiddel.

### 4.3.9 Separasjon av fraksjon D5

#### 4.3.9.1 Sephadex LH-20 kolonne-separasjon

En Sephadex LH-20 kolonne (400 x 40 mm) ble benyttet til kolonne-separasjon. Kolonnematerialet stod i MeOH-vann (30:70) over natten, slik at det ikke var behov for kondisjonering av kolonnen. Fraksjon D5 (ca. 6000 mg) ble løst i 55 ml MeOH-vann (30:70). Deretter ble rester av fraksjonen løst med ca. 5 ml MeOH 100%. Prøveløsningen ble applisert på kolonnen og som mobilfase ble det brukt ulike blandingsforhold av MeOH og vann.

Gradienteluering ble benyttet med økende mengde MeOH, etterfulgt av en blanding av aceton-vann (se tabell 4.16). Det ble samlet totalt 19 kolonnefraksjoner à 60-250 ml.

**Tabell 4.16: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon D5**

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH-vann (30:70)	1-6	530
MeOH-vann (50:50)	7-9	750
MeOH-vann (70:30)	10-11	400
MeOH (100 %)	12-18	1350
Aceton-vann (70:30)	19	400

#### 4.3.9.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på to TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S) som ble utviklet med MeOH-vann (50:50) som mobilfase. Etter at platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort- og langbølget UV-lys. Den ene TLC-platen ble sprayet med ceric-reagens, mens den andre ble sprayet med DPPH-løsning. Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 8 hovedfraksjoner (D5S1-D5S8) på basis av TLC-resultatene (se tabell 4.17), og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

**Tabell 4.17: Sammenslåing av D5 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-2	D5S1
3-4	D5S2
5-7	D5S3
8-10	D5S4
11-12	D5S5
13-14	D5S6
15-18	D5S7
19	D5S8

#### 4.3.9.3 NMR-spektroskopi

<sup>1</sup>H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene. Deuterert MeOH med TMS som intern standard ble brukt som løsningsmiddel.



### 4.3.10 Separasjon av fraksjon D5S4

#### 4.3.10.1 Versaflash kolonne-separasjon

Fraksjon D5S4 (1762 mg) ble løst i MeOH-vann (50:50) og applisert på en Versapak-kolonne (150 x 40 mm) pakket med C<sub>18</sub>-materiale. Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (30:70) og gradientluert med MeOH og vann i ulike blandingsforhold (se tabell 4.18). Totalt ble det samlet 64 kolonnefraksjoner à ca. 20 ml og 28 ml. Kolonnen ble til slutt vasket med 100 % MeOH.

**Tabell 4.18: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon D5S4**

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH-vann (30:70)	1-8	200
MeOH-vann (40:60)	9-13	200
MeOH-vann (50:50)	14-37	600
MeOH-vann (60:40)	38-44	200
MeOH-vann (70:30)	45-51	200
MeOH-vann (80:20)	52-57	200
MeOH (100%)	58-64	300

#### 4.3.10.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S) på samme måte som tidligere (se avsnitt 4.3.5.2 Analytisk TLC). Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 10 hovedfraksjoner (D5S4V1-D5S4V10) på grunnlag av TLC-resultatene (se tabell 4.19), og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

**Tabell 4.19: Sammenslåing av D5S4 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-8	D5S4V1
9-18	D5S4V2
19-23	D5S4V3
24-28	D5S4V4
29-32	D5S4V5
33-37	D5S4V6
38-42	D5S4V7

43-51	D5S4V8
52-57	D5S4V9
58-64	D5S4V10

#### 4.3.10.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp  $^1\text{H}$  NMR spektra av fraksjon D5S4V1-D5S4V10 og  $^{13}\text{C}$  NMR spektra av fraksjon D5S4V1, D5S4V3 og D5S4V4. Det ble også tatt opp HSQC og COSY av fraksjon D5S4V4. Deuterert MeOH med TMS som intern standard ble brukt som løsningsmiddel.

#### 4.3.10.4 Analytisk HPLC

Små mengder av fraksjon D5S4V1-D5S4V8 ble løst i MeOH-vann (50:50) til konsentrasjoner på ca. 0,5 mg/ml og filtrert gjennom et sprøytefilter (Millex) for å fjerne partikler. Prøveløsningene ble injisert på Chromolith RP-18 kolonne (100 x 4,6 mm). Deteksjonen ble foretatt ved 254 nm, 280 nm og 360 nm for å se hvilke fraksjoner som var rene og kunne inneholde interessante stoffer. Mobilfasenes sammensetninger var av MeOH med 0,1 % TFA og vann med 0,1 % TFA i ulike blandingsforhold. Analysetidene varierte fra 20-28 minutter.

De mest interessante fraksjonene (D4S5V3-D5S4V6) ble analysert igjen på analytisk HPLC med løsningsmidlene ACN med 0,1% TFA og vann med 0,1% TFA i stedet. Isokratisk eluering ble benyttet, og mobilfasen var dermed konstant under hele analysen, ACN med 0,1% TFA-vann med 0,1% TFA (15:85). Analysetidene var på 20 minutter.

### 4.3.11 Separasjon av fraksjon D5S4V4

#### 4.3.11.1 Preparativ HPLC

Fraksjon D5S4V4 (50 mg) ble løst i 2,5 ml ACN-vann (50:50). Prøveløsningen ble videre filtrert (Millex) og injisert på en  $\text{C}_{18}$ -preparativ HPLC kolonne (150 x 21,2 mm). Deteksjonen ble foretatt ved bølgelengden 280 nm. Flowhastigheten var på 20 ml/min der mobilfasen bestod av ACN med 0,1 % TFA og vann med 0,1% TFA. Det ble utført isokratisk eluering og sammensetningen av løsningsmidlene var derfor den samme som for analytisk HPLC (se avsnitt 4.3.10.4 Analytisk HPLC).

Injeksjon av prøveløsningen ble foretatt i to omganger, fordi konsentrasjonen skulle være på ca. 20 mg/ml ved hver injeksjon. 1 ml ble injisert ved første eluering og 1,3 ml ved andre eluering. Det ble samlet inn totalt 26 kolonnefraksjoner à ca.20 ml (oppsamling av fraksjon per minutt) fra hver eluering. Fra begge elueringene ble kolonnefraksjoner slått sammen med hverandre og til hovedfraksjoner basert på kromatogrammene fra preparativ HPLC.

Mer av fraksjon D5S4V4 (50 mg) ble senere løst i 2,5 ml ACN-vann (50:50). Samme prosedyre og metode ble utført på nytt, men her ble 1,0 ml injisert ved første eluering og 1,2 ml ved andre eluering. Det ble også samlet inn 26 kolonnefraksjoner à 20 ml som ble slått sammen med hverandre og til hovedfraksjoner basert på kromatogrammene fra preparativ HPLC.

Første eluering med 50 mg ga hovedfraksjonene D5S4V4H1-D5S4V4H20. Alle disse ble dampet inn til tørrhet på rotavapor, oljepumpe og vakuum inndamper (se tabell 4.20). Andre eluering med 50 mg ga hovedfraksjonene D5S4V4H1-2 - D5S4V4H20-2 (se tabell 4.21), men bare fraksjon D5S4V4H1-2 og D5S4V4H5-2 - D5S4V4H9-2 ble dampet inn.

**Tabell 4.20: Sammenslåing av D5S4V4 kolonnefraksjoner fra første eluering**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-7	D5S4V4H1
8	D5S4V4H2
9	D5S4V4H3
10	D5S4V4H4
11	D5S4V4H5
12	D5S4V4H6
13	D5S4V4H7
14	D5S4V4H8
15	D5S4V4H9
16	D5S4V4H10
17	D5S4V4H11
18	D5S4V4H12
19	D5S4V4H13
20	D5S4V4H14

21	D5S4V4H15
22	D5S4V4H16
23	D5S4V4H17
24	D5S4V4H18
25	D5S4V4H19
26	D5S4V4H20

**Tabell 4.21: Sammenslåing av D5S4V4 kolonnefraksjoner fra andre eluering**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-7	D5S4V4H1-2
8	D5S4V4H2-2
9	D5S4V4H3-2
10	D5S4V4H4-2
11	D5S4V4H5-2
12	D5S4V4H6-2
13	D5S4V4H7-2
14	D5S4V4H8-2
15	D5S4V4H9-2
16	D5S4V4H10-2
17	D5S4V4H11-2
18	D5S4V4H12-2
19	D5S4V4H13-2
20	D5S4V4H14-2
21	D5S4V4H15-2
22	D5S4V4H16-2
23	D5S4V4H17-2
24	D5S4V4H18-2
25	D5S4V4H19-2
26	D5S4V4H20-2

#### 4.3.11.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp  $^1\text{H}$  NMR spektra av fraksjon D5S4V4H1-D5S4V4H20 og fraksjon D5S4V4H5-2 – D5S4V4H9-2.  $^{13}\text{C}$  NMR, COSY og HSQC spektra ble også tatt opp av

fraksjon D5S4V4H7. Deuterert MeOH med TMS som intern standard ble brukt som løsningsmiddel.

#### 4.3.11.3 Bioassay

Måling av DPPH-scavenging, 15-LOX hemming og XO-hemming ble utført på fraksjon D5S4V4H7-2 (identifisert som myricetin-3-*O*-rhamnosid) ved ulike konsentrasjoner. DMSO ble benyttet som løsningsmiddel.

### 4.3.12 Separasjon av sammenslåingen av fraksjon D5S4V4H5 og D5S4V4H5-2

#### 4.3.12.1 Preparativ HPLC

På bakgrunn av resultater fra NMR ble fraksjon D5S4V4H5 og D5S4V4H5-2 slått sammen og separert ved preparativ HPLC. Fraksjonene utgjorde totalt ca. 9,9 mg og ble løst i 1 ml ACN-vann (50:50). Prøveløsningen ble videre filtrert (Millex) og injisert i en C<sub>18</sub>-preparativ HPLC kolonne (150 x 21,2 mm). Deteksjonen ble foretatt ved 280 nm. Flowhastigheten var på 20 ml/min, og med isokratisk eluering ble mobilfasen ACN-vann (15:85) benyttet. Det ble samlet totalt 25 kolonnefraksjoner à 20 ml (basert på oppsamling av en fraksjon per minutt). Disse ble slått sammen til 8 hovedfraksjoner (D5S4V4H5H1-D5S4V4H5H8), basert på kromatogrammet fra preparativ HPLC (se tabell 4.22). Alle hovedfraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe unntatt fraksjon D5S4V4H5H8.

**Tabell 4.22: Sammenslåing av D5S4V4H5 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-8	D5S4V4H5H1
9	D5S4V4H5H2
10	D5S4V4H5H3
11	D5S4V4H5H4
12	D5S4V4H5H5
13	D5S4V4H5H6
14-18	D5S4V4H5H7
19-25	D5S4V4H5H8

#### 4.3.12.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp  $^1\text{H}$  NMR spektra av fraksjon D5S4V4H5H1-D5S4V4H5H7. Deuterert MeOH med TMS som intern standard ble benyttet som løsningsmiddel.

#### 4.3.13 Separasjon av fraksjon D5S4V6

##### 4.3.13.1 Versaflash kolonne-separasjon

Fraksjon D5S4V6 (60,3 mg) ble løst i MeOH-vann (60:40) og applisert på en Versapak-kolonne (110 x 23 mm) pakket med  $\text{C}_{18}$ -materiale. Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (30:70) og gradienteluert med MeOH og vann i ulike blandingsforhold (se tabell 4.23). Totalt ble det samlet 25 kolonnefraksjoner à ca.14 ml. Kolonnen ble til slutt vasket med 100 % MeOH.

**Tabell 4.23: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon D5S4V6**

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH-vann (30:70)	1-3	Ca.30
MeOH-vann (40:60)	4-7	50
MeOH-vann (50:50)	8-16	150
MeOH-vann (60:40)	17-19	50
MeOH-vann (70:30)	20-22	50
MeOH (100%)	23-25	50

##### 4.3.13.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S) som ble utviklet på samme måte som tidligere (se avsnitt 4.3.5.2 Analytisk TLC). Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 7 hovedfraksjoner (D5S4V6V1-D5S4V6V7) på basis av TLC-resultatene (se tabell 4.24) og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

**Tabell 4.24: Sammenslåing av D5S4V6 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-9	D5S4V6V1
10	D5S4V6V2
11	D5S4V6V3
12	D5S4V6V4

13	D5S4V6V5
14-15	D5S4V6V6
16-25	D5S4V6V7

#### 4.3.13.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp <sup>1</sup>H NMR spektra av de sammenslåtte fraksjonene (D5S4V6V1-D5S4V6V7). Deuterert MeOH med TMS som intern standard ble brukt.

### 4.3.14 Separasjon av fraksjon D5S5

#### 4.3.14.1 Versaflash kolonne-separasjon

Fraksjon D5S5 (749,5 mg) ble løst i MeOH-vann (50:50) og applisert på en Versapak-kolonne (150 x 40 mm) pakket med C<sub>18</sub>-materiale. Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (30:70) og gradienteluert med ulike sammensetninger av MeOH og vann (se tabell 4.25). Totalt ble det samlet 45 kolonnefraksjoner à ca. 14 ml og 125 ml. Kolonnen ble vasket med 100 % MeOH til slutt.

**Tabell 4.25: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon D5S5**

Mobilfaser	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH-vann (30:70)	1-6	100
MeOH-vann (40:60)	7-11	100
MeOH-vann (50:50)	12-28	300
MeOH-vann (70:30)	29-33	100
MeOH (100%)	34-45	350

#### 4.3.14.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene og utgangsfraksjonen (D5S5) ble applisert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S). Platene med kolonnefraksjonene 1-18, 18-35, og 35-45 med fraksjon D5S5 ble utviklet med henholdsvis MeOH-vann (50:50), (66,7:33,3) og (75:25). Etter at platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort- og langbølget UV-lys, og sprayet med ceric-reagens. Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 8 hovedfraksjoner (D5S5V1-D5S5V8) på bakgrunn av TLC-resultatene (se tabell 4.26) og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

**Tabell 4.26: Sammenslåing av D5S5 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
6-8	D5S5V1
9-13	D5S5V2
14-18	D5S5V3
19-23	D5S5V4
24-29	D5S5V5
30-33	D5S5V6
34-37	D5S5V7
38-45	D5S5V8

#### 4.3.14.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp  $^1\text{H}$  NMR spektra av de sammenslåtte fraksjonene (D5S5V1-D5S5V8). Deuterert MeOH med TMS som intern standard ble benyttet som løsningsmiddel.

#### 4.3.15 Separasjon av fraksjon D5S5V4

##### 4.3.15.1 Versaflash kolonne separasjon

Fraksjon D5S5V4 (ca. 110 mg) ble løst i 7 ml MeOH-vann (50:50) og applisert på en Versapak-kolonne (110 x 23 mm) pakket med  $\text{C}_{18}$ -materiale. Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (30:70) og gradienteluert med ulike sammensetninger av MeOH og vann (se tabell 4.27). Totalt ble det samlet 32 kolonnefraksjoner à ca.15 ml og en sluttfraksjon på 150 ml. Kolonnen ble vasket med 100% MeOH til slutt.

**Tabell 4.27: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon D5S5V4**

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH-vann (30:70)	1-6	100
MeOH-vann (40:60)	7-13	100
MeOH-vann (50:50)	14-19	100
MeOH-vann (60:40)	20-26	100
MeOH-vann (70:30)	27-32	100
MeOH (100%)	33	100



#### 4.3.15.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble analysert på TLC på samme måte som tidligere (se avsnitt 4.3.4.2 Analytisk TLC). Her ble kolonnefraksjonene 1-17 og 17-33 eluert med henholdsvis MeOH-vann (50:50) og (67:33). Kolonnefraksjonene ble slått sammen på bakgrunn av TLC-resultatene og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette ga hovedfraksjonene D5S5V4V1-D5S5V4V6 (se tabell 4.28).

**Tabell 4.28: Sammenslåing av D5S5V4 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-3	D5S5V4V1
4-9	D5S5V4V2
10-11	D5S5V4V3
12-14	D5S5V4V4
15-19	D5S5V4V5
20-33	D5S5V4V6

#### 4.3.15.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp  $^1\text{H}$  NMR spektra av de sammenslåtte fraksjonene (D5S5V4V1-D5S5V4V6), og  $^{13}\text{C}$  NMR spektra av fraksjonene D5S5V4V2 og D5S5V4V4. I tillegg ble det tatt opp COSY, HMBC og HSQC spektra av fraksjon D5S5V4V2. Deuterert MeOH med TMS ble benyttet som løsningsmiddel.

#### 4.3.15.4 Bioassay

Måling av DPPH-scavenging, 15-LOX hemming og XO-hemming ble utført på fraksjon D5S5V4V2 (identifisert som 3-O- $\beta$ -D-(6"-O-galloyl)galaktopyranosyl)-myricetin) ved ulike konsentrasjoner. DMSO ble brukt som løsningsmiddel.

### 4.3.16 Separasjon av fraksjon D5S5V4V4

#### 4.3.16.1 Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble benyttet for å finne ut hvilken mobilfase som egnet seg mest for få god separasjon av stoffer før preparativ HPLC. En liten mengde av D5S5V4V4 ble løst i ACN-vann (50:50) og filtrert gjennom et sprøytefilter (Acrodisc®Syringe Filters 0.45 $\mu\text{m}$ ) for å fjerne partikler. Det ble benyttet en Phenomenex C<sub>18</sub> analytisk HPLC kolonne (150 x 4,6mm)

med en flowhastighet på 1 ml/min. Deteksjonen ble foretatt ved 254 nm, 280 nm og 360 nm. Det ble benyttet gradienteluering med mobilfasen ACN-vann (12:88) - (15:85).

#### 4.3.16.2 Preparativ HPLC

Fraksjon D5S5V4V4 (35,4 mg) ble løst i 1,77 ml ACN-vann (50:50). Prøveløsningen ble filtrert gjennom et sprøytefilter (Acrodisc®Syringe Filters 0.45µm) for å fjerne partikler og injisert på en C<sub>18</sub>- preparativ HPLC kolonne (150 x 21,2 mm). Deteksjonen ble foretatt ved 280 nm fordi de interessante stoffene absorberte ved denne bølgelengden (dette ble observert ved analytisk HPLC). Mobilfasen bestod av ACN og vann, med 0,1% TFA tilsatt hvert løsningsmiddel. Det ble benyttet gradienteluering (se tabell 4.29). Totalt ble det samlet 35 kolonnefraksjoner à ca. 20 ml (ett minutt per fraksjon).

**Tabell 4.29: Gradientsystem for preparativ HPLC av fraksjon D5S5V4V4**

Tid (min)	% vann +0,1% TFA (A)	% ACN +0,1% TFA (B)	Flowhastighet (ml/min)
0-5	88	12	20
10-35	88-85	12-15	20

#### 4.3.16.3 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert og analysert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S) på samme måte som tidligere (se avsnitt 4.3.5.2 Analytisk TLC). Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 7 hovedfraksjoner (D5S5V4V4H1-D5S5V4V4H7) på basis av TLC-resultatene (se tabell 4.30) og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

**Tabell 4.30: Sammenslåing av D5S5V4V4 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-5	D5S5V4V4H1
6-8	D5S5V4V4H2
9-17	D5S5V4V4H3
18-20	D5S5V4V4H4
21-23	D5S5V4V4H5
24-32	D5S5V4V4H6
33-35	D5S5V4V4H7

#### 4.3.16.4 NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp <sup>1</sup>H NMR spektra av de sammenslåtte fraksjonene (D5S5V4V4H1-D5S5V4V4H7). Deuterert MeOH med TMS ble benyttet som løsningsmiddel.

#### 4.3.17 Separasjon av fraksjon D5S5V4V4H3

##### 4.3.17.1 Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble benyttet for å finne ut hvilken mobilfase som egnet seg mest for å oppnå god separasjon av stoffer i preparativ HPLC. En liten mengde av D5S5V4V4H3 ble løst i ACN-vann (50:50) til en konsentrasjon på ca. 0,5 mg/ml. Prøveløsningen ble filtrert gjennom et sprøytefilter (Acrodisc®Syringe Filters 0.45µm) for å fjerne partikler. En Phenomenex C<sub>18</sub> analytisk HPLC kolonne (150 x 4,6 mm) ble brukt med en flowhastighet på 1 ml/min.

Deteksjonen ble foretatt ved 254 nm, 280 nm og 360 nm. Mobilfasen var av ulike blandingsforhold av ACN-vann. Gradienteluering ble benyttet (se tabell 4.31).

**Tabell 4.31: Gradientsystem for analytisk HPLC av fraksjon D5S5V4V4H3**

Tid (min)	% vann (A)	% ACN (B)	Flowhastighet (ml/min)
0-2	98	2	1
2-5	98-88	2-12	1
5-15	88	12	1
15-20	88-80	12-20	1
20-25	80-70	20-30	1
25-30	70-50	30-50	1

##### 4.3.17.2 Preparativ HPLC

Fraksjon D5S5V4V4H3 (5,5 mg) ble løst i 1,1 ml ACN-vann (50:50). Preparativ HPLC ble utført som tidligere (se avsnitt 4.3.16.2 Preparativ HPLC), men her ble en annen gradienteluering benyttet (se tabell 4.32), i tillegg til at deteksjonen ble foretatt ved 278 nm. Gradientelueringen var noe annerledes enn den som ble brukt ved analytisk HPLC (se tabell 4.31).

Denne kromatograferingen ble utført for å rense opp fraksjonene. Kolonnefraksjoner ble samlet opp basert på absorbanstopper som ble detektert underveis i elueringen.

Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 6 hovedfraksjoner (D5S5V4V4H3H1-

D5S5V4V4H3H6) basert på kromatogrammet fra preparativ HPLC (se tabell 4.33). De sammenslåtte fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe utenom fraksjon D5S5V4V4H3H1 og D5S5V4V4H3H6 som ble forkastet.

**Tabell 4.32: Gradientsystem for preparativ HPLC av fraksjon D5S5V4V4H3**

Tid (min)	% vann +0,1% TFA (A)	% ACN +0,1% TFA (B)	Flowhastighet (ml/min)
0-2	98	2	20
2-5	98-88	2-12	20
5-15	88	12	20
15-20	88-82	12-18	20
20-25	82-80	18-20	20
25-26	80-50	20-50	20

**Tabell 4.33: Sammenslåing av D5S5V4V4H3 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon (retensjonstid i min)	Fraksjon
0.00-16.00	D5S5V4V4H3H1
16.00-18.45	D5S5V4V4H3H2
18.45-20.00	D5S5V4V4H3H3
20.00-21.36	D5S5V4V4H3H4
21.36-22.14	D5S5V4V4H3H5
22.14-26.00	D5S5V4V4H3H6

#### 4.3.17.3 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert og analysert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S) på samme måte som tidligere (se avsnitt 4.3.5.2 Analytisk TLC) med en liten endring.

Mobilfasen som ble benyttet her var MeOH-vann (20:80).

#### 4.3.17.4 NMR-spektroskopi

<sup>1</sup>H NMR spektra ble tatt opp av fraksjon D5S5V4V4H3H2-D5S5V4V4H3H5. Det ble også tatt <sup>13</sup>C NMR spektra av fraksjon D5S5V4V4H3H4 og D5S5V4V4H3H5. MeOH med TMS ble benyttet som løsningsmiddel.

#### 4.3.17.5 Bioassay

Måling av DPPH-scavenging, XO-hemming og 15-LOX hemming ble utført på fraksjon D5S5V4V4H3H4 (identifisert som myricetin-3-*O*-glukuronid) i forskjellige konsentrasjoner. DMSO ble benyttet som løsningsmiddel.

### 4.3.18 Separasjon av fraksjon D5S5V5

#### 4.3.18.1 Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble benyttet for å finne ut hvilken mobilfase som egnet seg for å få god separasjon av interessante stoffer i preparativ HPLC. Analysen ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 4.3.17.1 Analytisk HPLC). Mobilfasen bestod av ACN og vann i ulike blandingsforhold med et økende innhold av ACN. Det ble benyttet gradienteluering med ACN-vann (15:85) til (90:10).

#### 4.3.18.2 Preparativ HPLC

Fraksjon D5S5V5 (22 mg) ble løst i 1,1 ml ACN-vann (50:50). Analysen ble utført som tidligere (se avsnitt 4.3.16.2), men her ble et annet gradientsystem benyttet (se tabell 4.34). Det ble totalt samlet 30 kolonnefraksjoner à ca. 20 ml (basert på oppsamling per minutt).

**Tabell 4.34: Gradientsystem for preparativ HPLC av fraksjon D5S5V5**

Tid (min)	% vann +0,1% TFA (A)	% ACN +0,1% TFA (B)	Flowhastighet (ml/min)
0-6	85	15	20
6-10	85-70	15-30	20
10-14	70-50	30-50	20
14-20	50-30	50-70	20
20-30	30-10	70-90	20

#### 4.3.18.3 Analytisk TLC

Fraksjonene fra 4.3.18.2 ble applisert og analysert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S) på samme måte som tidligere (se avsnitt 4.3.5.2 Analytisk TLC) med en liten endring. Kolonnefraksjonene 1-13 ble utviklet med MeOH-vann (30:70), mens kolonnefraksjonene 3,6, 13-26 og 10-13 ble utviklet med MeOH-vann (50:50). Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 5 hovedfraksjoner (D5S5V5H1-D5S5V5H5) basert på TLC-resultatene (se tabell

4.35), og fraksjonene D5S5V5H2-D5S5V5H4 ble dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Fraksjon D5S5V5H1 og D5S5V5H5 ble forkastet.

**Tabell 4.35: Sammenslåing av D5S5V5 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjoner	Fraksjoner
1-9	D5S5V5H1
10	D5S5V5H2
11	D5S5V5H3
12-13	D5S5V5H4
14-30	D5S5V5H5

### 4.3.19 Separasjon av fraksjon D5S5V6

#### 4.3.19.1 Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble benyttet for å finne ut hvilken mobilfase som egnet seg for å få god separasjon av interessante stoffer i preparativ HPLC. Analysen ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 4.3.17.1 Analytisk HPLC). Men her ble isokratisk eluering benyttet med ACN:vann (15:85).

#### 4.3.19.2 Preparativ HPLC

Fraksjon D5S5V6 (ca. 28,1 mg) ble løst i 3,75 ml ACN-vann (50:50). Analysen ble utført som tidligere (se avsnitt 4.3.16.2), men her ble isokratisk eluering benyttet. Mobilfasen benyttet var dermed ACN med 0,1% TFA-vann med 0,1% TFA (15:85). Det ble samlet opp 30 kolonnefraksjoner à ca. 20 ml (oppsamling per minutt).

#### 4.3.19.3 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S) som ble utviklet på samme måte som tidligere (se avsnitt 4.3.5.2 Analytisk TLC). Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 9 hovedfraksjoner (D5S5V6H1-D5S5V6H9) på bakgrunn av TLC-resultatene (se tabell 4.36) og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

**Tabell 4.36: Sammenslåing av D5S5V6 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
2	D5S5V6H1
3	D5S5V6H2
4-10	D5S5V6H3
11	D5S5V6H4
12	D5S5V6H5
13-17	D5S5V6H6
18-20	D5S5V6H7
21-23	D5S5V6H8
24-30	D5S5V6H9

#### **4.3.19.4 NMR-spektroskopi**

<sup>1</sup>H NMR spektra ble tatt opp av fraksjon D5S5V6H1-D5S5V6H9. MeOH med TMS ble benyttet som løsningsmiddel.

#### **4.3.19.5 Bioassay**

Måling av DPPH-scavenging, XO-hemming og 15-LOX hemming ble utført på fraksjon D5S5V6H9 (identifisert som myricetin) i forskjellige konsentrasjoner. DMSO ble benyttet som løsningsmiddel.

### **4.3.20 Separasjon av fraksjon D5S6**

#### **4.3.20.1 Versaflash kolonne-separasjon**

Fraksjon D5S6 (ca. 300 mg) ble løst i 2,5 ml MeOH-vann (80:20). Rester av fraksjonen ble så løst i 0,5 ml 100 % MeOH. Prøveløsningen hadde til slutt et MeOH-vann forhold på 83,3 : 16,7. Prøveløsningen ble applisert på en Versapak-kolonne (110 x 23 mm) pakket med C<sub>18</sub>-materiale. Kolonnen var kondisjonert med MeOH-vann (50:50) og ble gradienteluert med MeOH og vann i ulike blandingsforhold, etterfulgt av aceton-vann (se tabell 4.37). Kolonnen ble til slutt vasket med 100 % MeOH. Det ble totalt samlet 28 kolonnefraksjoner à ca. 14 ml og 70 ml.

**Tabell 4.37: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon D5S6**

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH:vann (50:50)	1-6	80
MeOH:vann (60:40)	7-11	80
MeOH:vann (70:30)	12-15	60
MeOH:vann (80:20)	16-19	50
MeOH (100%)	20-26	100
Aceton:vann (70:30)	27-28	50

#### 4.3.20.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S) som ble utviklet på samme måte som tidligere (se avsnitt 4.3.5.2 Analytisk TLC). Mobilfasen som ble benyttet var MeOH-vann (50:50) og (75:25) for henholdsvis kolonnefraksjon 1-16 og 16-28.

Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 7 hovedfraksjoner (D5S6V1-D5S6V7) på bakgrunn av TLC-resultatene (se tabell 4.38) og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

**Tabell 4.38: Sammen slåing av D5S6 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
2	D5S6V1
3-7	D5S6V2
8-10	D5S6V3
11-15	D5S6V4
16-19	D5S6V5
20-22	D5S6V6
23-28	D5S6V7

#### 4.3.20.3 NMR-spektroskopi

<sup>1</sup>H NMR spektra ble tatt opp av fraksjon D5S6V1-D5S6V7. <sup>13</sup>C NMR spektra ble også tatt opp av fraksjon D5S6V1. MeOH med TMS ble benyttet som løsningsmiddel.



### 4.3.21 Separasjon av fraksjon D5S6V1

#### 4.3.21.1 Versaflash kolonne-separasjon

Fraksjon D5S6V1 (ca. 150 mg) ble løst i 3 ml MeOH-vann (30:70). Prøveløsningen ble applisert på en Versapak-kolonne (110 x 23 mm) pakket med C<sub>18</sub>-materiale som var kondisjonert med MeOH-vann (25:75). Det ble benyttet gradienteluering med MeOH og vann i ulike blandingsforhold (se tabell 4.39). Kolonnen ble til slutt vasket med 100 % MeOH. Det ble totalt samlet 28 kolonnefraksjoner à ca.15 ml.

**Tabell 4.39: Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon D5S6V1**

Mobilfase	Kolonnefraksjon	Mengde (ml)
MeOH:vann (25:75)	1-5	100
MeOH:vann (30:70)	6-8	100
MeOH:vann (40:60)	9-13	100
MeOH:vann (50:50)	14-19	100
MeOH:vann (60:40)	20-23	50
MeOH:vann (70:30)	24-26	50
MeOH (100%)	27-28	50

#### 4.3.21.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S) som ble utviklet på samme måte som tidligere (se avsnitt 4.3.4.2 Analytisk TLC). Mobilfasene som ble benyttet var MeOH-vann (30:70) og (50:50) for henholdsvis kolonnefraksjon 1-14 og 14-18. Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 7 hovedfraksjoner (D5S6V1V1-D5S6V1V7) på grunnlag av TLC-resultatene (se tabell 4.40) og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Kolonnefraksjon 1 ble ikke dampet inn.

**Tabell 4.40: Sammenslåing av D5S6V1 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
2-8	D5S6V1V1
9-10	D5S6V1V2
11-13	D5S6V1V3
14-15	D5S6V1V4
16	D5S6V1V5

17-18	D5S6V1V6
19-20	D5S6V1V7

#### 4.3.21.3 NMR-spektroskopi

<sup>1</sup>H NMR spektra ble tatt opp av fraksjon D5S6V1V1-D5S6V1V7. MeOH med TMS ble benyttet som løsningsmiddel

#### 4.3.21.4 Bioassay

Måling av DPPH-scavenging, XO-hemming og 15-LOX hemming ble utført på fraksjon D5S6V1V3 (identifisert som 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose) i forskjellige konsentrasjoner. DMSO ble benyttet som løsningsmiddel.

### 4.3.22 Separasjon av fraksjon D5S6V1V2

#### 4.3.22.1 Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble benyttet for å finne ut hvilken mobilfase som egnet seg for å få god separasjon og dermed kunne rense og isolere det sannsynlige stoffet, 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose, på preparativ HPLC. Analysen ble utført på samme måte som tidligere (se avsnitt 4.3.17.1). Mobilfasen bestod av ACN-vann med ulike blandingsforhold. Det ble benyttet gradient eluering med ACN-vann (5:95) – (50:50).

#### 4.3.22.2 Preparativ HPLC

Fraksjon D5S6V1V2 (12 mg) ble løst i 1 ml ACN-vann (50:50). Analysen ble utført som tidligere (se avsnitt 4.3.16.2). Mobilfasen bestod av ulike blandingsforhold av ACN og vann (se tabell 4.41). Det ble samlet opp 30 kolonnefraksjoner à ca. 20 ml (en fraksjon per minutt).

**Tabell 4.41: Gradientsystem for preparativ HPLC av fraksjon D5S6V1V2**

Tid (min)	% Vann (A)	% ACN (B)	Flowhastighet (ml(min))
0	95	5	20
30	50	50	20

#### 4.3.22.3 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S) som ble utviklet på samme måte som tidligere (se avsnitt 4.3.5.2 Analytisk TLC). Kolonnefraksjonene 1-15

og 16-30 ble utviklet med MeOH-vann (33,3:66,7), mens kolonnefraksjonene 10-19 ble utviklet med MeOH-vann (50:50). Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 7 hovedfraksjoner (D5S6V1V2H1-D5S6V1V2H7) på bakgrunn av TLC-resultatene (se tabell 4.42) og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

**Tabell 4.42: Sammenslåing av D5S6V1V2 kolonnefraksjoner**

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-9	D5S6V1V2H1
10-12	D5S6V1V2H2
13	D5S6V1V2H3
14	D5S6V1V2H4
15	D5S6V1V2H5
16-18	D5S6V1V2H6
19-30	D5S6V1V2H7

#### 4.3.22.4 NMR-spektroskopi

<sup>1</sup>H NMR spektra ble tatt opp av alle de sammenslåtte fraksjonene utenom fraksjon D5S6V1V2H6 (tom fraksjon). <sup>13</sup>C NMR spektra ble også tatt opp av fraksjon D5S6V1V2H3. MeOH med TMS ble benyttet som løsningsmiddel. 1,2,3,6-tetra- *O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose ble identifisert i fraksjon D5S6V1V2H3.

# 5 Resultater og diskusjon

## 5.1 Ekstraksjon av plantemateriale

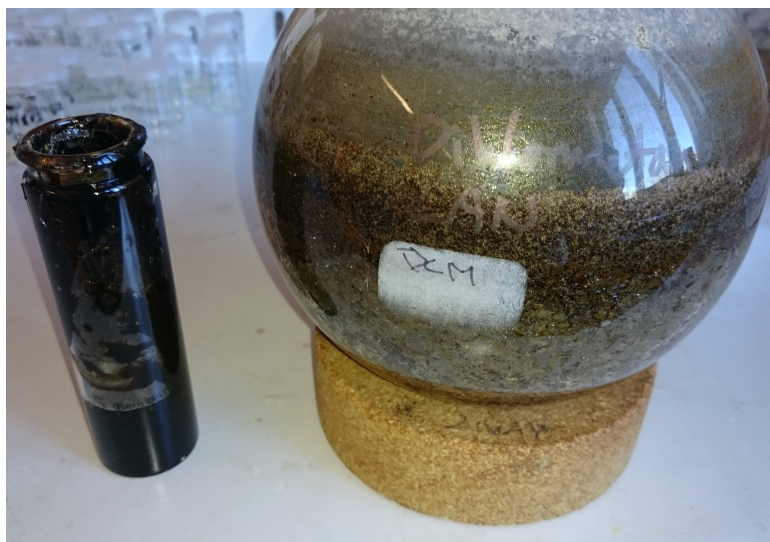
### 5.1.1 Utbytte av råekstrakt

Ekstraksjon av pulveriserte blader fra *S. guineense* med DCM og MeOH ga to råekstrakter med ulik farge og konsistens (se figur 5.1). Utbytte av ekstraktene er vist i tabell 5.1.

**Tabell 5.1: Utbytte av råekstraktene etter ekstraksjon av 400 g plantemateriale**

	Vekt av råekstrakt (g)	Utbytte (%)
DCM	17,2	4,3
MeOH	119,6	29,9
Totalt	136,8	34,2

Tallene fra tabell 5.1 viser at ekstraksjon med MeOH ga størst utbytte, nesten syv ganger større utbytte enn med DCM. Plantematerialet ble ekstrahert med samme prosedyre for begge løsningsmidlene, men ekstraksjon med MeOH tok mye lenger tid (10 timer lenger) enn for DCM. Dette kan ha noe med at det var mye mer som løste seg i MeOH enn i DCM.



**Figur 5.1: MeOH-råekstrakt (t.v.) og DCM-råekstrakt (t.h.)**

### 5.1.2 Analytisk HPLC

Vi var interessert i forbindelser med UV-absorbans i området 254-360 nm da blant annet flavonoider og andre polyfenoler absorberer UV-lys i dette området. I kromatogrammet til DCM-råekstraktet ble det kun observert noen små topper. I kromatogrammet til MeOH-råekstraktet ble det observert flere større topper, noen mindre topper og en veldig stor topp ved retensjonstid lik 31 minutter. Det ble dermed ønskelig å undersøke og separere MeOH-råekstraktet.

### 5.1.3 NMR-spektroskopi

Kjemisk skift-verdiene varierte litt mellom råekstraktene som ble framstilt i denne oppgaven (kalt Lan) og råekstraktene isolert av Anders Rusten ((Rusten 2006). Dette kan henge sammen med at det ble brukt ulike ekstraksjonsmetoder. For DCM-råekstrakt gml ble Soxhlet-metoden benyttet, mens det for denne oppgaven ble benyttet ASE. En annen forklaring kan også være at plantematerialene ble samlet inn på ulike tidspunkter, og sammensetningen av innholdsstoffer i plantene kan derfor ha vært forskjellig.

#### *Diklormetanråekstrakter*

<sup>1</sup>H NMR-spektrene av DCM-råekstrakt gml og DCM-råekstrakt Lan (se vedlegg, NMR-spekter 1 og 2) så ut til å være nokså like. Signalene mellom ca. 0,88 ppm (CH<sub>3</sub>) og 2,49 ppm (CH<sub>2</sub>) fra begge spektrene tydet på at ekstraktene for det meste bestod av alifatiske forbindelser, for eksempel fett, siden dette er karakteristisk område for alkankjeder.

#### *Metanolråekstrakter*

<sup>1</sup>H NMR-spektrene av MeOH-råekstrakt gml og MeOH-råekstrakt Lan (se vedlegg, NMR-spekter 3 og 4) så ut til å være noe ulike. Begge spektrene hadde topper ved 4,87 ppm, 3,31 ppm og ca. 0,00 ppm som var antatt å komme fra henholdsvis vann, deuterert metanol og TMS. Begge spektrene hadde mange signaler i området 3,32-5,41 ppm, som er typisk for karbohydrater. Det var også en god del signaler i aromat- og olefinområdet ved 6,23-7,11 ppm og 6,39-7,09 ppm for MeOH-råekstrakt gml og MeOH-råekstrakt Lan respektivt. Spektret til MeOH-råekstrakt gml hadde en del signaler i området 0,86-2,08 ppm, som tydet på fett og lipofile CH<sub>2</sub>- og CH<sub>3</sub>-kjeder. Dette kom sannsynlig av at ikke alle lipofile forbindelser ble ekstrahert med DCM. Spektret til MeOH-råekstrakt Lan hadde bare ett signal i dette området (ved 1,31 ppm). Dette tydet på at selektiviteten til de to ulike metodene som

ble benyttet til ekstraksjon var ulik, og at ASE-metoden kan ha vært bedre til å ekstrahere og gi renere råekstrakter enn Soxhlet-metoden.

#### 5.1.4 Bioassay

##### *15-LOX hemming*

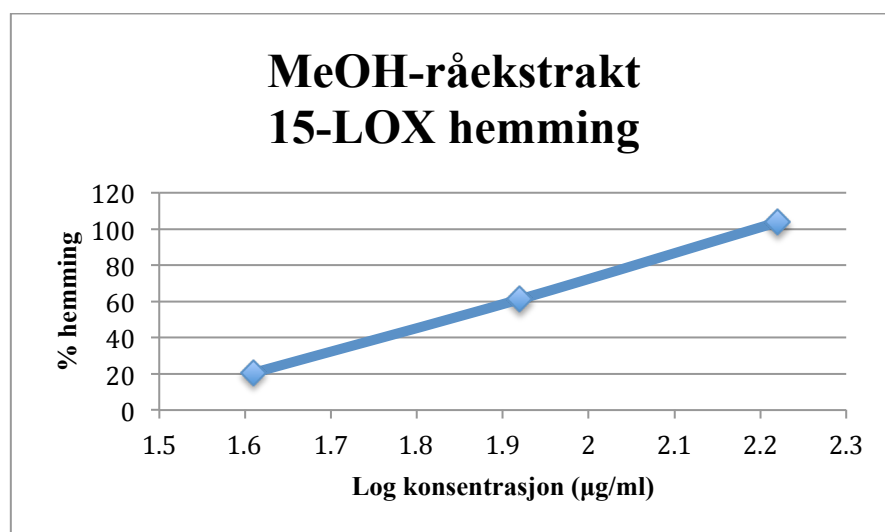
Bestemmelse av 15-LOX hemming ble utført for MeOH-råekstraktet (se tabell 5.2).

Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $IC_{50} = 22 \pm 2 \mu\text{g/ml}$  eller  $72 \pm 7 \mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.2: 15-LOX hemming av MeOH-råekstrakt**

Kons. (mg/ml)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hemming (%)	Standardavvik (%)	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
10	166,7	103,9	0,3	$69 \pm 8$
5	83,3	61,2	6,2	
2,5	41,7	20,6	5,9	

MeOH-råekstraktet ga en konsentrasjonsavhengig hemming av 15-LOX (se figur 5.2). Det var ikke nødvendig å måle ved flere konsentrasjoner, da de målte konsentrasjonene var tilstrekkelig nok til å finne  $IC_{50}$ -verdien.  $IC_{50}$ -verdien var på  $69 \mu\text{g/ml}$ . Råekstraktet ville dermed gi 50 % hemming av 15-LOX ved denne konsentrasjonen. Hemmingsaktiviteten var lavere enn for quercetin.



**Figur 5.2: 15-LOX hemming av MeOH-råekstrakt**

### ***XO-hemming***

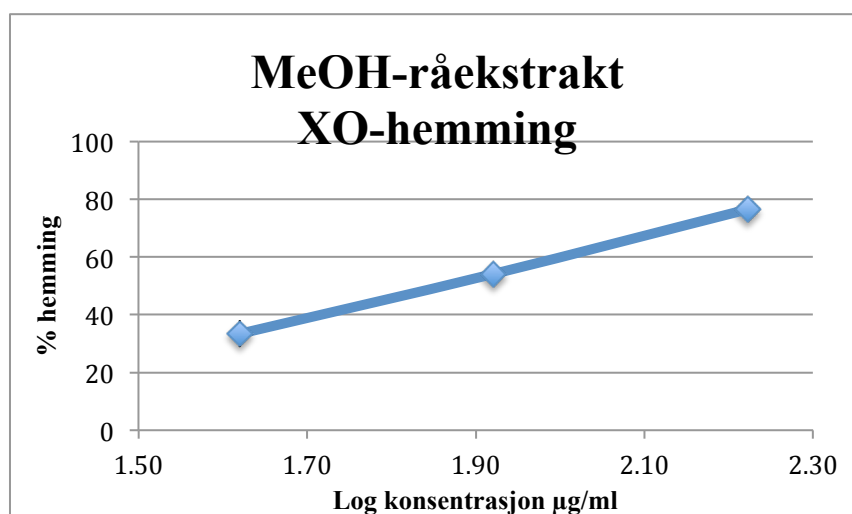
MeOH-råekstraktet ble testet for XO hemming (se tabell 5.3). Quercetin ble benyttet som positiv kontroll ( $IC_{50} = 0,8 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$  eller  $2,8 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ).

***Tabell 5.3: XO-hemming av MeOH-råekstrakt***

Kons. (mg/ml)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hemming (%)	SD (%)	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
10	166,7	76,5	1,3	$73 \pm 6$
5	83,3	54,1	2,1	
2,5	41,7	33,4	4,6	

*(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)*

MeOH-råekstraktet ga en konsentrasjonsavhengig hemming av XO (se figur 5.3) med en  $IC_{50}$ -verdi på  $73 \mu\text{g/ml}$ . Da denne verdien var mye høyere enn for den positive kontrollen, var hemmingsaktiviteten til råekstraktet mye svakere sammenlignet med quercetin.



***Figur 5.3: XO-hemming av MeOH-råekstrakt***

### ***DPPH-test***

Det ble utført DPPH-test på MeOH-råekstraktet (se tabell 5.4). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $IC_{50} = 0,7 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$  eller  $2,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.4: DPPH-test av MeOH-råekstraktet**

Kons. i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
33,3	89,4	1,1	9,8 ± 1,0
16,7	76,2	3,9	
8,3	41,7	5,2	
4,2	22,1	1,7	

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

MeOH-råekstraktet hadde lav radikalscavenger aktivitet. IC<sub>50</sub>-verdien til råekstraktet var en del lavere enn den positive kontrollen, quercetin.

### **Rekelarvetest**

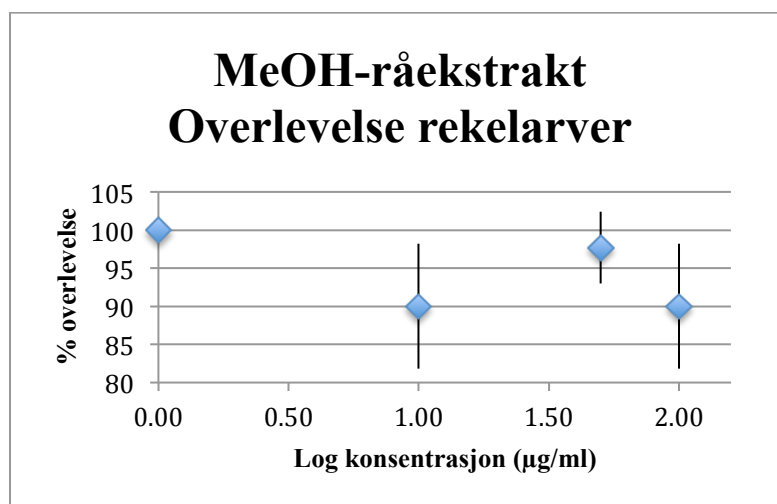
Rekelarvetesten ble utført på MeOH-råekstraktet (se tabell 5.5). Som positiv kontroll ble podofyllotoksin benyttet (LD<sub>50</sub> = 83 ± 21 µg/ml). Selv ved høyeste målte konsentrasjon av ekstraktet overlevde 90% av rekelarvene. Den svake toksiske effekten så ikke ut til å endre seg ved økende konsentrasjon, da 10 µg/ml viste seg å gi lik toksisitet som ved 100 µg/ml, samt høyere toksisitet enn 50 µg/ml. Det så ut til at råekstraktet ga tilfeldig grad av dødelighet og dermed ingen korrelasjon mellom konsentrasjon og overlevelse (se figur 5.4).

**Tabell 5.5: Toksisitet på rekelarver av MeOH-råekstraktet**

Kons. (µg/ml)	Log kons.	% overlevelse	SD	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,0	90	8,2	>>100
50	1,7	97,7	4,7	
10	1,0	90	8,2	
1	0,0	100	0	

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)





*Figur 5.4: Toksisitet på rekellarver av MeOH-råekstraktet (vist som % overlevelse)*

### 5.1.5 Videre arbeid

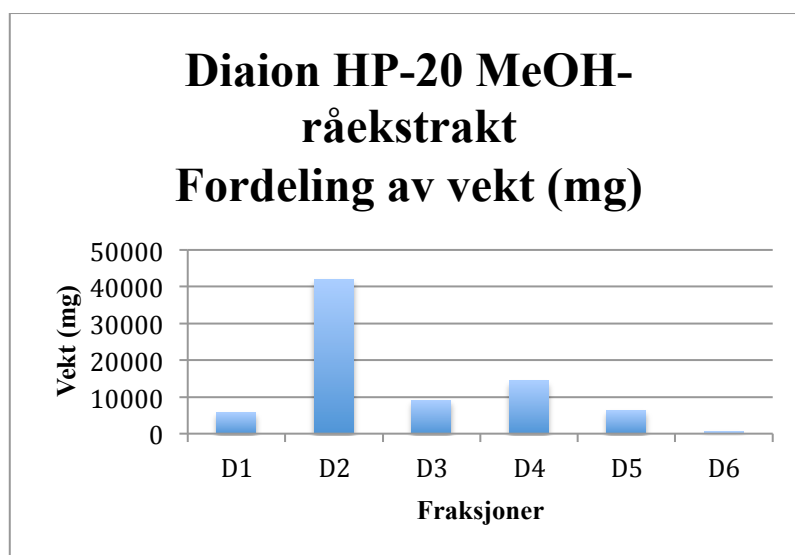
Resultatene fra NMR-spektroskopi og analytisk HPLC indikerte hvilket råekstrakt som kunne være aktuelt å gå videre med.  $^1\text{H}$  NMR-spektret av MeOH-råekstraktet viste å inneholde olefiner og aromater, mens spektret av DCM-råekstraktet tydet på innhold av alifatiske forbindelser, for eksempel fett. I analytisk HPLC viste kromatogrammet til DCM-råekstraktet bare små toppar ved 254 nm, mens kromatogrammet av MeOH-råekstraktet viste flere toppar med en stor topp ved samme bølgelengde. DCM-råekstraktet lot seg ikke løse i DMSO og var vanskelig å løse i MeOH. På grunnlag av resultatene ble det fokusert på videre arbeid og opprensing av MeOH-råekstraktet.

## 5.2 Fraksjonering av MeOH-råekstraktet

### 5.2.1 Diaion HP-20 kolonne-separasjon

MeOH-råekstraktet ble separert på en Diaion HP-20 kolonne. Mobilfasen bestod av en trinnvis gradient av vann med økende innhold av MeOH. Siden kolonnematerialet var upolare polymere resiner (omvendt-fase-kromatografi), ble de mest polare stoffene eluert ut først, etterfulgt av mindre polare stoffer på grunn av økende mengde organisk løsningsmiddel. Kolonnen ble til slutt vasket med 100 % MeOH for å sikre at alle upolare stoffer ble eluert ut av kolonnen.

Det ble totalt samlet 32 kolonnefraksjoner (16 kolonnefraksjoner for hver applisering) som ble slått sammen til hovedfraksjonene D1-D6, basert på resultater fra analytisk TLC med påvisning ved spraying med ceric-reagens. 95 g MeOH-råekstrakt ble applisert og det samlede utbyttet var 78,1 g (82 % av påsatt mengde). Tap av stoff kunne skyldes at noe av det appliserte stoffet ble sittende i kolonnen. Fraksjon D2 utgjorde den største fraksjonen, mens fraksjon D6 nesten var tom (se figur 5.5). Fraksjonene D1 og D2 ble eluert med MeOH-vann (10:90), mens fraksjonene D3 og D4 ble eluert med MeOH-vann (50:50), etterfulgt av fraksjonene D5 og D6 som ble eluert med 100 % MeOH. Siden fraksjonene D1 og D2 kom ut av kolonnen først, inneholdt disse fraksjonene stoffer som var mer polare enn de i fraksjonene D3-D6.



Figur 5.5: Utbytte av hovedfraksjoner fra MeOH-råekstraktet

### 5.2.2 NMR-spektroskopi

Fraksjonene D2-D6 ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR. Fraksjon D1 lot seg ikke løse i egnet løsningsmiddel (deuterert MeOH eller  $\text{D}_2\text{O}$ ).

Fraksjon D2 så ut til å inneholde mest av karbohydrater (3,32-4,13 ppm) og løsemidler (vann og MeOH). Det var ett signal ved 7,09 ppm, som kunne komme fra et aromatisk eller olefinisk proton. To små signaler ved 2,06 ppm og 1,28 ppm tydet på fett.

Spektrene av fraksjon D3, D4 og D5 var noenlunde like. Det var flere signaler for protoner på oksygenert karbon (3,30-4,25 ppm). Sammenlignet med fraksjon D2 viste det seg at spektrene til D3, D4 og D5 hadde flere og større signaler for aromatiske og olefiniske protoner (6,21-7,44 ppm), hvorav fraksjon D4 hadde flest. I dette området viste signalene fra fraksjon D3 og D4 seg å være noe mer kompliserte enn for fraksjon D5. Disse tre fraksjonene hadde også noen signaler for alifatiske protoner (0,89-2,83 ppm). Fraksjon D5 hadde flere og større signaler i dette området i forhold til fraksjon D3 og D4.

<sup>1</sup>H NMR-spektret til fraksjon D6 hadde et par små signaler for aromatiske og olefiniske protoner (6,65-7,61 ppm). Spektret viste en del signaler i området for protoner på oksygenerte karboner (3,30-4,18 ppm), men hadde flest og størst signaler for alifatiske protoner (0,87-2,33 ppm), noe som tydet på mye fett.

Basert på <sup>1</sup>H NMR-spektrene var fraksjon D3-D5 de mest interessante, da spektrene viste flest signaler i aromat- og olefinområdet og for protoner på oksygenert karbon. Dette tydet på at fraksjonene kunne inneholde aromatiske glykosider. Fraksjon D6 var mindre interessant siden det veide veldig lite, i tillegg til at det inneholdt mest av fett.

### 5.2.3 Bioassay

#### *DPPH-test*

DPPH-test ble utført for fraksjon D2-D6 (se tabell 5.6). Fraksjon D1 var uløselig i DMSO og testen ble dermed ikke utført for fraksjonen. Quercetin ble benyttet som positiv kontroll ( $IC_{50} = 0,7 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$  eller  $2,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ).

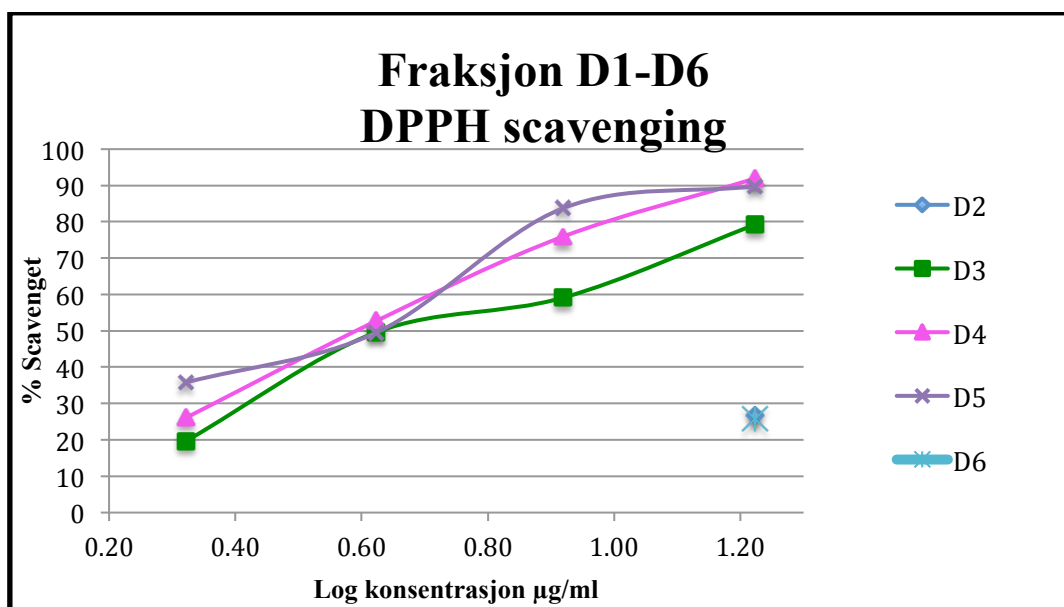
**Tabell 5.6: DPPH-test av fraksjon D2-D6**

Fraksjon	Kons. (mg/ml)	Kons. i kyvette (µg/ml)	Scavengeraktivitet (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
D2	1	16,7	26,7	2,6	> 16,7
D3	1	16,7	79,1	3,8	4,3 ± 1
	0,5	8,3	59,1	2,8	
	0,25	4,2	49,6	0,1	
	0,125	2,1	19,7	5,3	
D4	1	16,7	91,8	1,2	
	0,5	8,3	75,9	6	

	0,25	4,2	52,7	1,3	3,9 ± 0,2
	0,125	2,1	26,1	4,6	
D5	1	16,7	89,7	1,3	4,2 ± 0,3
	0,5	8,3	83,7	2,6	
	0,25	4,2	49,5	1,7	
	0,125	2,1	35,8	1,8	
D6	1	16,7	25,8	2,5	> 16,7

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

Av de testede fraksjonene hadde fraksjon D3, D4 og D5 høyest radikalscavenger aktivitet, hvorav fraksjon D4 viste høyest radikalfangende evne (lavest IC<sub>50</sub>-verdi, se figur 5.6). Denne verdien var lavere enn den positive kontrollen, quercetin. En konsentrasjon på 3,9 µg/ml av fraksjon D4 var nok til å senke konsentrasjonen av DPPH-radikal med 50 %. Fraksjon D2 og D6 hadde lave scavengeraktiviteter ved høyeste målte konsentrasjon.



Figur 5.6: Radikalscavenger aktivitet av fraksjon D2-D6

### 15-LOX hemming

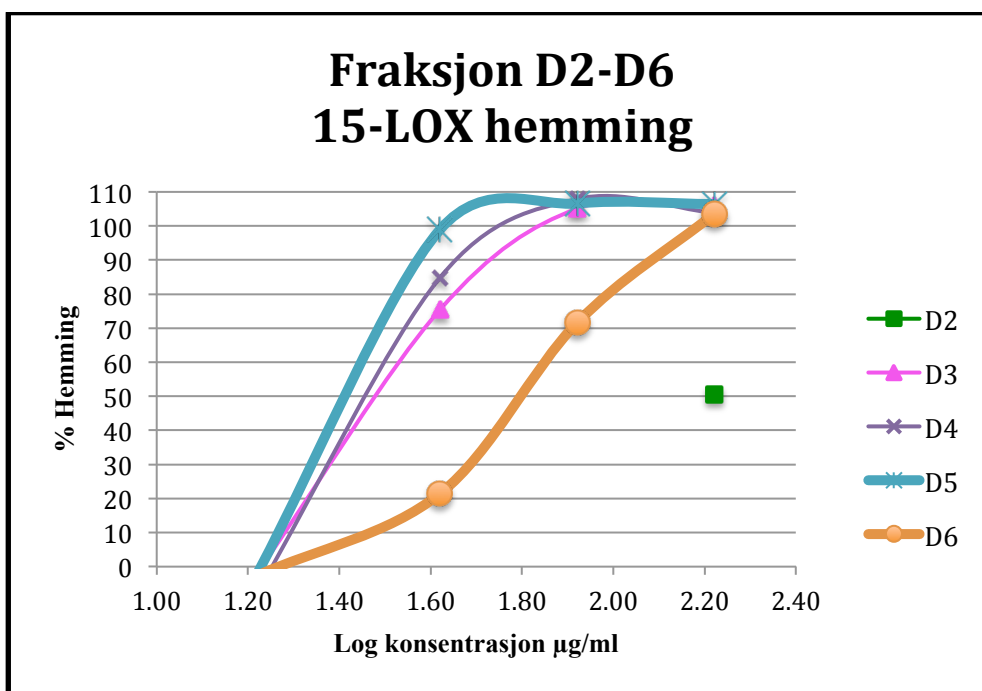
Bestemmelse av 15-LOX hemming ble utført for fraksjon D2-D6 (se tabell 5.7). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC<sub>50</sub> = 32,4 ± 0,7 µg/ml eller 107,3 ± 2,2 µM).

**Tabell 5.7: 15-LOX hemming av fraksjon D2-D6**

Fraksjon	Kons. (mg/ml)	Kons. i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
D2	10	166,7	50,7	3,5	ca. 167
D3	10	166,7	106	0,6	41,7-16,7
	5	83,3	105,1	0,6	
	2,5	41,7	75,4	2,2	
	1	16,7	-1,4	16	
D4	10	166,7	103,8	0,1	41,7-16,7
	5	83,3	107,9	0,8	
	2,5	41,7	84,8	1,7	
	1	16,7	-7	9,6	
D5	10	166,7	106,4	0,9	41,7-16,7
	5	83,3	106,6	0,8	
	2,5	41,7	98,9	0,1	
	1	16,7	-1,4	5,1	
D6	10	166,7	103,7	0,4	62 ± 5
	5	83,3	71,6	5,7	
	2,5	41,7	21,4	5,5	
	1	16,7	-2,5	10	

(Kons. =konsentrasjon, SD=standardavvik)

Tabellen viser at fraksjonene ga en konsentrasjonsavhengig hemming av 15-LOX aktiviteten. Fraksjon D3-D5 fikk IC<sub>50</sub>-verdier et sted mellom 41,7-16,7 µg/ml, fordi konsentrasjonene over og under 50 % enzymhemming gav store forskjeller i prosent hemming. Fraksjon D2 viste lav hemmingsaktivitet ved den høyeste målte konsentrasjon. Å gjenta forsøket med flere konsentrasjoner mellom 16,7 µg/ml og 41,7 µg/ml kunne gitt mer nøyaktige IC<sub>50</sub>-verdier, men siden det dreide seg om delvis opprensede fraksjoner ble det ikke ansett nødvendig. Fraksjon D6 viste høyere hemmingsaktivitet enn fraksjon D2, men lavere enn i forhold til fraksjon D3-D5 (se figur 5.7). Alle fraksjonene hadde lavere hemmingsaktivitet (høyere IC<sub>50</sub>-verdier) enn den positive kontrollen, quercetin.



**Figur 5.7:** 15-LOX hemming av fraksjon D2-D6

#### ***XO-hemming***

Fraksjon D2-D6 ble testet for XO-hemming (se tabell 5.8). Quercetin ble benyttet som positiv kontroll ( $IC_{50} = 0,8 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$  eller  $2,8 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ).

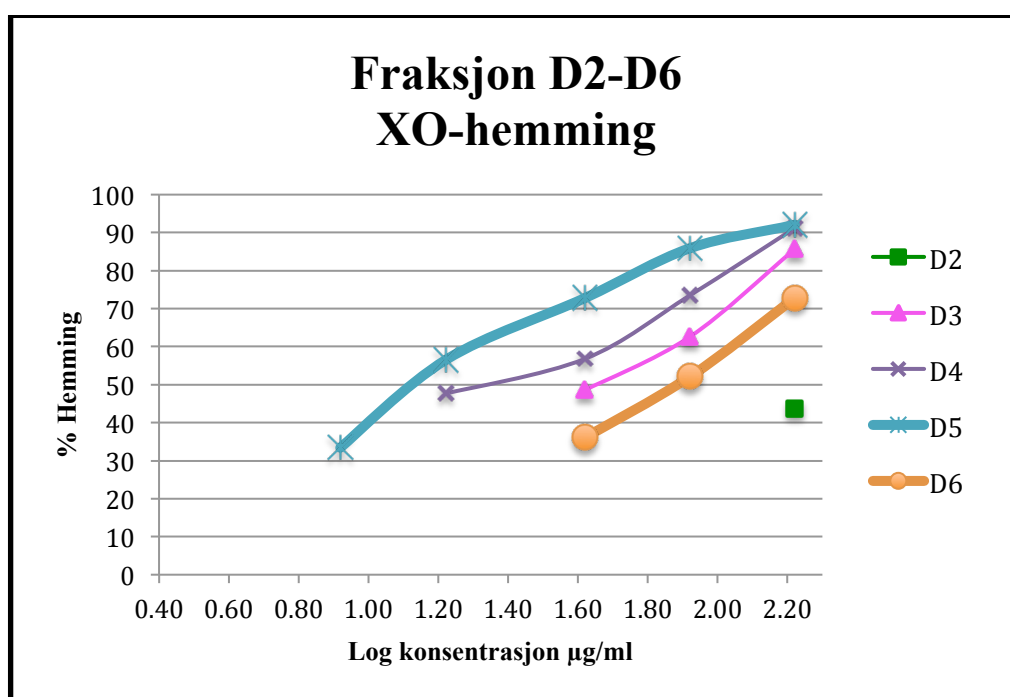
**Tabell 5.8:** XO-hemming av fraksjon D2-D6

Fraksjon	Kons. (mg/ml)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hemming (%)	SD (%)	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
D2	10	166,7	43,8	3,1	> 166,7
D3	10	166,7	85,7	0,4	$45 \pm 7$
	5	83,3	62,6	6,5	
	2,5	41,7	48,6	2,1	
D4	10	166,7	91,2	0,6	$21 \pm 8$
	5	83,3	73,5	1,1	
	2,5	41,7	56,8	4,6	
	1	16,7	47,7	2,6	
D5	10	166,7	92	1,8	$13,7 \pm 1,2$
	5	83,3	85,9	2,3	
	2,5	41,7	72,8	0,2	
	1	16,7	56,6	2,6	
	0,5	8,3	33,4	3,6	

D6	10	166,7	72,8	3,7	76 ± 12
	5	83,3	52,1	3,5	
	2,5	41,7	36,1	4,2	

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

Verdiene i tabell 5.8 viste at fraksjon D4 og D5 hadde høyest grad av hemmingsaktivitet. Fraksjon D3 og D6 viste lavere hemmingsaktivitet, mens fraksjon D2 hadde lav aktivitet ved høyeste målte konsentrasjon (se figur 5.8). Ingen av fraksjonene hadde lavere IC<sub>50</sub>-verdi enn den positive kontrollen, quercetin.



Figur 5.8: XO-hemming av fraksjon D2-D6

### 5.2.4 Analytisk HPLC

Vi var interessert i forbindelser med UV-absorbans ved blant annet 280 nm. Ut fra kromatogrammet kunne fraksjon D4 inneholde aromatiske forbindelser, da det ble observert flere topper ved retensjonstiden 4,5-6,0 minutter i det observerte bølgelengdeområdet. I kromatogrammet til fraksjon D5 ved 280 nm ble det observert en stor topp ved retensjonstiden 5,6 minutter etterfulgt av mange flere topper som kom senere i kromatogrammet.

For å avgjøre hvilke fraksjoner som kunne inneholde interessante stoffer ble fraksjon D3-D6 analysert ved hjelp av analytisk HPLC.

### **5.2.5 Videre arbeid**

Resultatene fra NMR-spektroskopi, bioassay (DPPH-test, 15-LOX hemming og XO-hemming) og analytisk HPLC ga en indikasjon på hvilke fraksjoner som kunne være aktuelle å gå videre med.  $^1\text{H}$  NMR-spektrene viste at fraksjon D4 og D5 var mest interessant, da de inneholdt flere olefiner og aromater i forhold til fraksjon D3. Fraksjon D4 og D5 hadde også høyest scavengeraktivitet og enzymhemmende aktivitet. I analytisk HPLC var kromatogrammene av disse to fraksjonene mest interessante, da de inneholdt flere stoffer som absorberte ved 280 nm. På grunnlag av disse resultatene ble det fokusert på videre separasjon og opprensing av fraksjon D4 og D5.

## **5.3 Separasjon av fraksjon D4**

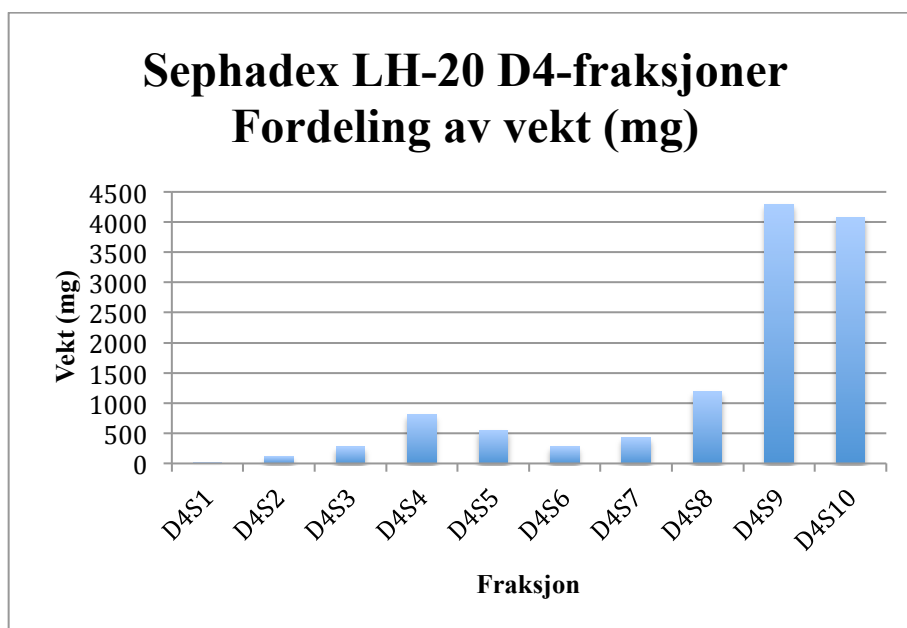
### **5.3.1 Sephadex LH-20**

Fraksjon D4 ble separert og kromatografert på en Sephadex LH-20 kolonne. Da separeringsprinsippet var basert delvis på eksklusjonskromatografi og delvis ved adsorpsjon av aromatiske forbindelser, kunne elueringsrekkefølgen være lite forutsigbar. Ved eksklusjonskromatografi vil de største molekylene bli eluert ut først, mens lavmolekylære blir eluert ut sist.

Fraksjonene ble eluert med MeOH og MeOH-vann i ulike blandingsforhold, etterfulgt av aceton-vann. Fraksjoneringen ga 17 kolonnefraksjoner som ble sammenslått til 10 hovedfraksjoner (D4S1-D4S10) på bakgrunn av resultater fra analytisk TLC med MeOH-vann (50:50) som mobilfase.

Det ble applisert 12,2 g av fraksjon D4 og det samlede utbyttet var 12,04 g (98,7 % av påsatt mengde). Med et så høyt utbytte kan det ha vært mulig at noe kolonnemateriale har blitt eluert ut sammen med prøveløsningen. Fraksjon D4S9 og D4S10 utgjorde de største fraksjonene (se figur 5.9).





Figur 5.9: Utbytte av fraksjoner fra D4

### 5.3.2 NMR-spektroskopi

Alle fraksjoner ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR, unntatt fraksjon D4S1-D4S5 hvor det kun ble tatt  $^1\text{H}$  NMR. Spektrene til fraksjon D4S8 og D4S10 så mest interessant ut. Fraksjon D4S1 inneholdt stort sett fett og karbohydrater.

$^1\text{H}$  NMR-spektrene til fraksjon D4S2 og D4S3 så ganske like ut og inneholdt for det meste fett og karbohydrater. Da disse bare viste noen få signaler i olefin- og aromatområdet, ble de mindre interessante. Fraksjon D4S4 hadde også signaler som fraksjon D4S2 og D4S3 i fett- og karbohydratområdet, men her viste spektret også en god del signaler i olefin- og aromatområdet (5,45-8,06 ppm). Disse signalene var nokså komplekse.

$^1\text{H}$  NMR-spektret til fraksjon D4S5 hadde mindre signaler i fettområdet i forhold til fraksjon D4S2-D4S4, mens signalene i karbohydratområdet så ganske likt ut for disse fraksjonene. Flere signaler i olefin- og aromatområdet ble vist i fraksjon D4S5 i forhold til fraksjon D4S4.  $^1\text{H}$  NMR-spektrene til fraksjon D4S6 og D4S7 hadde en god del signaler i olefin- og aromatområdet, og de så mindre komplekse ut. Begge spektrene viste forholdsvis lavt innhold av fett og karbohydrater.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrene til begge fraksjonene viste også en del signaler i aromat- og olefinområdet (100-170 ppm) og noen signaler i karbohydratområdet (52-99 ppm). Det ble observert flere signaler i begge disse områdene for fraksjon D4S7 i

forhold til fraksjon D4S6. Det ble også observert et par små signaler som indikerte karbonyler (160-180 ppm) for begge fraksjonene.

<sup>1</sup>H NMR-spektret til fraksjon D4S8 så mindre komplisert ut enn de tidligere fraksjonene i aromat- og olefinområdet. Spektret viste også svært lite innhold av fett, men en del signaler i karbohydratområdet (2,49-4,56 ppm). Dette ble også observert i <sup>13</sup>C NMR spektret med en god del signaler fra 50 ppm til 100 ppm. Spektret viste også flere signaler i aromat- og olefinområdet sammenlignet med fraksjon D4S7, i tillegg til flere signaler som indikerte karbonyler (162-180 ppm). Disse resultatene gjorde denne fraksjonen mest interessant.

Fraksjon D4S9 og D4S10 hadde noen likheter, de viste seg å inneholde lite karbohydrater, en god del aromater og olefiner og lite fett. Signalene i aromat- og olefinområdet for fraksjon D4S9 viste å være mer komplisert enn fraksjon D4S8 og D4S10. Dette kunne understøttes av <sup>13</sup>C NMR-spektrene, som viste mye mer kompliserte signaler fra fraksjon D4S9 i forhold til fraksjon D4S10. Begge spektrene hadde signaler som tydet på karbonylgrupper (161-179 ppm). Da fraksjon D4S10 var en stor fraksjon og inneholdt en del aromater og olefiner, var videre separasjon og opprensing av interesse.

### 5.3.3 Videre arbeid

Resultater fra NMR-spektrene tydet på at fraksjon D4S8 var mest interessant, og denne ble dermed prioritert for videre opprensing.

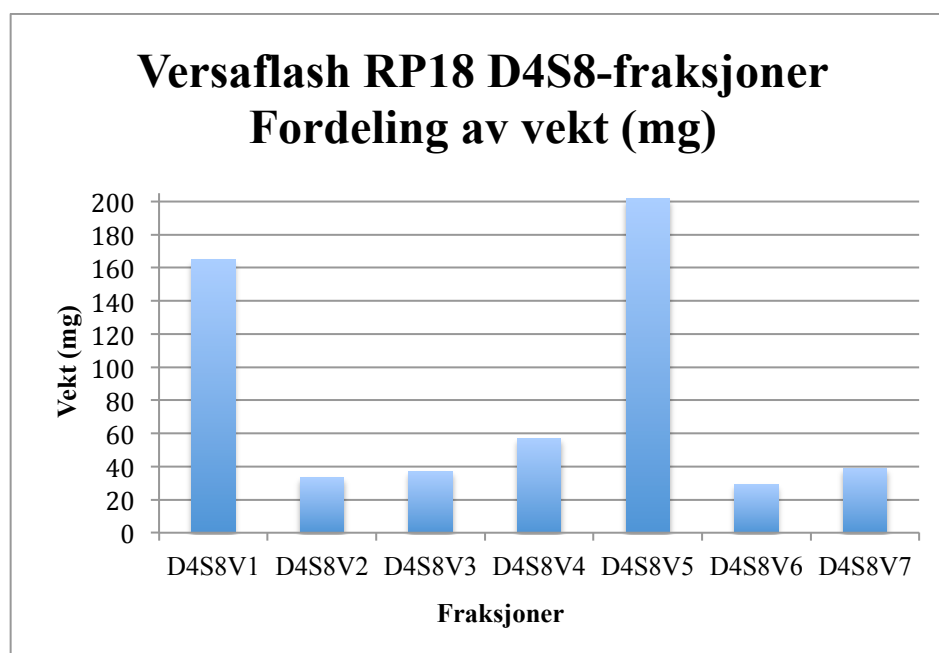
## 5.4 Separasjon av fraksjon D4S8

### 5.4.1 Versaflash kolonneseparasjon

En omvendt-fase C<sub>18</sub>-kolonne ble benyttet ved fraksjonering av fraksjon D4S8. Mobilfasen bestod av en trinnvis gradient av MeOH og vann med økende mengde MeOH. De mest polare stoffene ble eluert ut først, etterfulgt av de mindre polare stoffene på grunn av den økende mengden med organisk løsningsmiddel. Kolonnen ble til slutt vasket med 100 % MeOH for å sørge for at alle stoffene ble eluert ut.

600 mg av D4S8-fraksjonen ble applisert på kolonnen. Totalt 27 kolonnefraksjoner ble samlet opp og slått sammen til 7 hovedfraksjoner (D4S8V1-D4S8V7) på bakgrunn av analytisk TLC med spraying av ceric-reagens. Det samlede utbyttet var 561,9 mg (93,7 % av

påsett mengde). Tap av stoff kunne skyldes at noe stoff ble sittende i kolonnen eller sprøyten som ble brukt til applisering. Fraksjon D4S8V1 og D4S8V5 var de største fraksjonene (se figur 5.10). Fraksjon D4S8V1 ble eluert med MeOH-vann (ca. 30:70) mens fraksjon D4S8V5 ble eluert med MeOH-vann (ca.60:40). Siden Fraksjon D4S8V1 kom ut av kolonnen før D4S8V5, inneholdt denne fraksjonen stoffer som var mer polare enn de i fraksjon D4S8V5.



*Figur 5.10: Utbytte av fraksjoner fra D4S8*

#### 5.4.2 NMR-spektroskopi

Alle fraksjonene ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR. Spektret til fraksjon D4S8V1 tydet på lite karbohydrater. Ingen signaler ble observert for fett. I aromat- og olefinområdet (5,19-7,31 ppm) ble det observert mange signaler. Signaler ved 6,40, 5,85-5,93 og 2,46-2,88 ppm kunne tyde på innhold av katekiner. Da fraksjon D4S8V1 i tillegg var den nest største fraksjonen, var videre separasjon og opprensing av fraksjonen av interesse.

Spektret til fraksjon D4S8V2 tydet på en kompleks blanding. Spektrene til fraksjon D4S8V3-D4S8V6 tydet også på blandede fraksjoner. Det ble observert noen signaler i karbohydratområdet, og en dublett ved 0,95 ppm i D4S8V5 og D4S8V6 som kunne tyde på rhamnose.

Fraksjon D4S8V7 viste å inneholde mye fett, og få signaler ble observert i aromat- og olefinområdet. Komplekse signaler ble observert i karbohydratområdet.

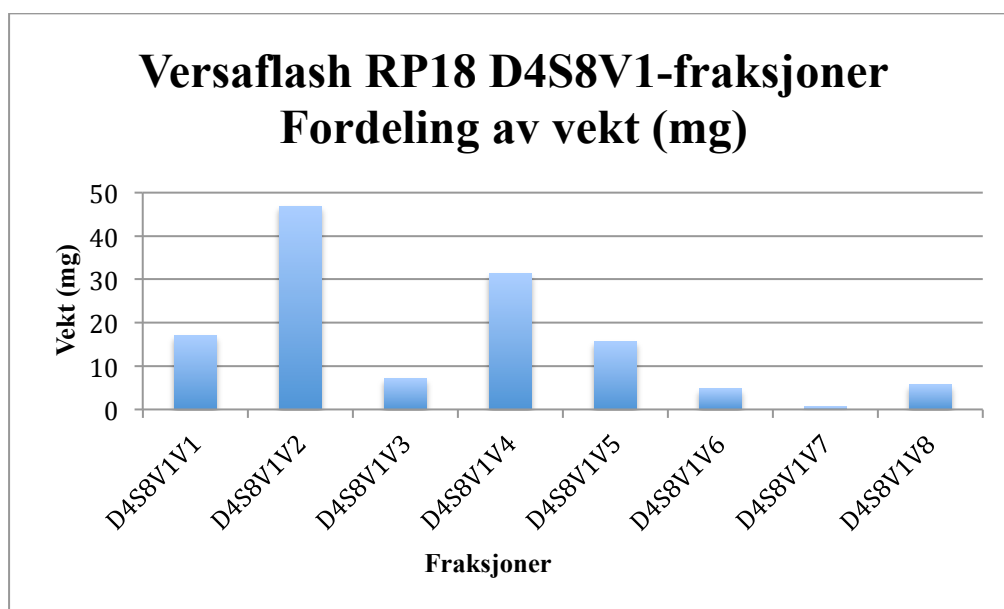
### 5.4.3 Videre arbeid

Resultater fra NMR-spektrene tydet på at fraksjon D4S8V1 var mest interessant, og den ble dermed prioritert for videre opprensing. Fraksjonen inneholdt i tillegg store mengder stoff.

## 5.5 Separasjon av fraksjon D4S8V1

### 5.5.1 Versaflash kolonneseparasjon

En omvendt-fase C<sub>18</sub>-kolonne ble benyttet ved fraksjonering og opprensing av fraksjon D4S8V1. Ca. 150 mg av fraksjonen ble applisert på kolonnen og det ble samlet totalt 37 kolonnefraksjoner. På bakgrunn av analytisk TLC og spraying med ceric-reagens, ble disse kolonnefraksjonene slått sammen til 8 hovedfraksjoner (D4S8V1V1-D4S8V1V8). Det samlede utbyttet var 129,2 mg (86,1 % av påsatt mengde). Fraksjon D4S8V1V2 og D4S8V1V4 var de største fraksjonene (se figur 5.11). Fraksjon D4S8V1V2 ble eluert med MeOH-vann (ca. 10:90) mens fraksjon D4S8V1V4 ble eluert med MeOH-vann (ca. 15:85).



*Figur 5.11: Utbytte av fraksjoner fra D4S8V1*

### 5.5.2 NMR-spektroskopi

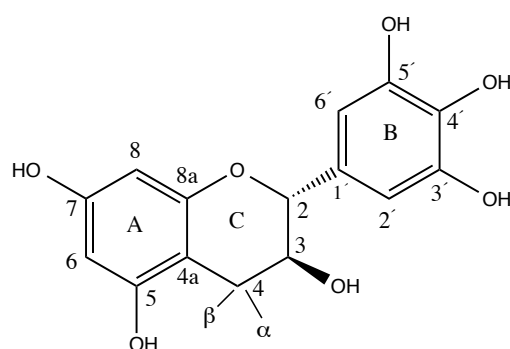
Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR av alle fraksjoner. I tillegg ble det tatt COSY, HSQC og  $^{13}\text{C}$  NMR av fraksjon D4S8V1V2. Fraksjonen ble identifisert som gallokatekin. Identifiseringen var basert på tolkning av spektraldataene og sammenligning med spektraldata i litteraturen.

I spektret til fraksjon D4S8V1V1 ble det observert komplekse signaler i aromat- og olefinområdet og karbohydratområdet. Denne var dermed mindre interessant. Spektret til fraksjon D4S8V1V3 lignet noe på Fraksjon D4S8V1V1. Her var signalene i aromat- og olefinområdet mye mindre kompleks, men fremdeles noe blandet.

Spektrene til fraksjon D4S8V1V4-D4S8V1V8 tydet på komplekse blandinger i karbohydrat og aromat- og olefinområdet, særlig fraksjon D4S8V1V6 som også var svært uren og derfor lite interessant.

### 5.5.3 Gallokatekin

Det ser ikke ut til at gallokatekin er funnet tidligere i *S. guineense*. Dette ble undersøkt i databasen Scifinder. Gallokatekin (se figur 5.12) har en flavanolstruktur og tilhører gruppen katekiner, som igjen går under stoffgruppen flavonoider. Disse finnes naturlig i frukter (epler, jordbær, plommer), grønnsaker, te, kakao og rødvin. De biologiske aktivitetene som er kjent fra tidligere studier inkluderer egenskaper som antioksidant aktivitet, anti-inflammatorisk og antimutagen effekt, så vel som forebyggelse mot kardiovaskulære sykdommer (Mirecka et al. 2013).



**Figur 5.12: Molekylstruktur for gallokatekin**

Tolkning av spektraldata for isolert gallokatekin (se vedlegg, NMR-spekter 5 og 6) er gitt i tabell 5.9 for  $^1\text{H}$  NMR og tabell 5.10 for  $^{13}\text{C}$  NMR. Tilordningen er foretatt ut fra

skiftposisjoner, multiplisitet, COSY–og HSQC-spektrum (se vedlegg, NMR-spekter 7 og 8). Tolkning av COSY–og HSQC-spektrum er gitt i tabell 5.11. Våre spektraldata ble sammenlignet med spektraldata fra litteraturen (Davis et al. 1996). Avvik fra litteraturdata kunne skyldes forskjellige løsemidler (deuterert MeOH i vårt spektrum, deuterert aceton i litteraturen).

**Tabell 5.9:  $^1\text{H}$  NMR spektraldata for gallokatekin**

Posisjon	Observervert	Litteratur (Davis et al. 1996)
2	4,52 (1 H, d J=7,1)	4,5 (J= 7,4)
3	3,96 (1 H, m, J=5,3, 7,4 og 9,6)	4,0 (J=8,2, 5,5, 7,4)
4 $\alpha$	2,82 (1 H, dd, J=5,9 og 16,2)	2,9 (J=16,1, 5,5)
4 $\beta$	2,52 (1 H, dd, J=7,8 og 16,2)	2,5 (J=16,1, 8,2)
6	5,92 (1 H, d, J= 2,3)	6,0 (J=2,3)
8	5,86 (1 H, d, J=2,3)	5,9 (J=2,3)
2', 6'	6,4 (2 H, s)	6,5 (J=0,5)

( $\delta$ -skala gitt i enheten ppm)

**Tabell 5.10:  $^{13}\text{C}$  NMR spektraldata for gallokatekin**

Posisjon	Observervert	Litteratur (Davis et al. 1996)
2	82,9	82,8
3	68,8	68,4
4	28,1	28,5
4a	100,7	100,6
5	157,6	157,2
6	96,3	96,2
7	157,9	157,7
8	95,5	95,5
8a	156,9	156,9
1'	131,6	131,6
2'	107,2	107,3
3'	146,9	146,3
4'	134,0	133,3

( $\delta$ -skala gitt i enheten ppm)

Noen mindre signaler i spektrene tydet på at stoffet ikke var helt rent. For eksempel ble det observert signaler ved 7,10 ppm, 6,59 ppm ( $^1\text{H}$  NMR-spektret) og 110,34 ppm ( $^{13}\text{C}$  NMR-spektret).

**Tabell 5.11: COSY- og HSQC spektraldata for gallokatekin**

COSY (viser koblingen mellom proton og proton)	
5,86/5,92	Kobling mellom proton H-6/H-8
3,96/4,52	Kobling mellom H-2/H-3
3,96/2,82/2,52	Kobling mellom H-3/H-4 $\alpha$ og H-3/H-4 $\beta$
HSQC (viser koblingen mellom karbon og proton)	
6,4/107,2	Kobling mellom H-2' og H-6'/C-2' og C-6'
5,92/96,3	Kobling mellom H-6/C-6
5,86 / 95,5	Kobling mellom H-8/ C-8
4,52/82,9	Kobling mellom H-2/C-2
3,96/68,8	Kobling mellom H-3/C-3
2,82/28,1	Kobling mellom H-4 $\alpha$ /C-4
2,52/28,1	Kobling mellom H-4 $\beta$ /C-4

( $\delta$ -skala gitt i enheten ppm)

#### 5.5.4 Bioassay

Det ble undersøkt i databasen Scifinder om ulike bioassay som har blitt utført på gallokatekin. Det viste seg at en del DPPH-tester har blitt utført, mens 15-LOX hemming og XO-hemming fikk svært få treff i databasen. Dette ga dermed interesse for å utføre disse testene på gallokatekin.

##### **DPPH-test**

Gallokatekin ble testet for radikalscavenging (se tabell 5.12). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $\text{IC}_{50} = 3,6 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$  eller  $11,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.12: DPPH-test på gallokatekin**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{M}$ )	Scavengeraktivitet (%)	SD (%)	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
10	166,7	94,1	0,1	17,3 $\pm$ 2,9
5	83,3	93,9	0,1	
2,5	41,7	93,8	0,2	

1,25	20,8	56,7	5,7
0,625	10,4	31,3	2,6

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

Gallokatekin hadde en litt svakere radikalscavenging aktivitet enn quercetin. Siden IC<sub>50</sub>-verdien var nær verdien til quercetin, en god scavenger, viste resultatene at gallokatekin også er en god scavenger. IC<sub>50</sub>-verdien var 17,3 ± 2,9 µM (på vektbasis 5,3 ± 0,6 µg/ml). Denne verdien stemte noenlunde med tidligere funn (Hsu et al. 2012; Marino et al. 2008).

### **15-LOX hemming**

Det ble utført test for 15-LOX hemming på gallokatekin (se tabell 5.13). Quercetin ble benyttet som positiv kontroll (IC<sub>50</sub> = 21,7 ± 2,2 µg/ml eller 72 ± 7,4 µM).

**Tabell 5.13: 15-LOX hemming på gallokatekin**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette (µM)	Hemming (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> (µM)
10	166,7	81,2	2,5	112 ± 4
5	83,3	26,8	3,1	

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

Gallokatekin hadde en litt svakere hemming av 15-LOX enn quercetin. IC<sub>50</sub>-verdien var 112 ± 4 µM (på vektbasis 34,3 ± 1,3 µg/ml). Det isolerte stoffet viste seg dermed å være en moderat hemmer av 15-LOX. Det er ikke funnet tidligere data for 15-LOX hemming av gallokatekin.

### **XO-hemming**

Gallokatekin ble testet for XO-hemming (se tabell 5.14). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC<sub>50</sub> = 0,8 ± 0,2 µg/ml eller 2,8 ± 0,6 µM).

**Tabell 5.14: XO-hemming på gallokatekin**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette (µM)	Hemming (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> (µM)
10	166,7	-53,3	18	>> 166,7
5	83,3	-55,1	1,4	
2,5	41,7	-1,3	4,7	

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

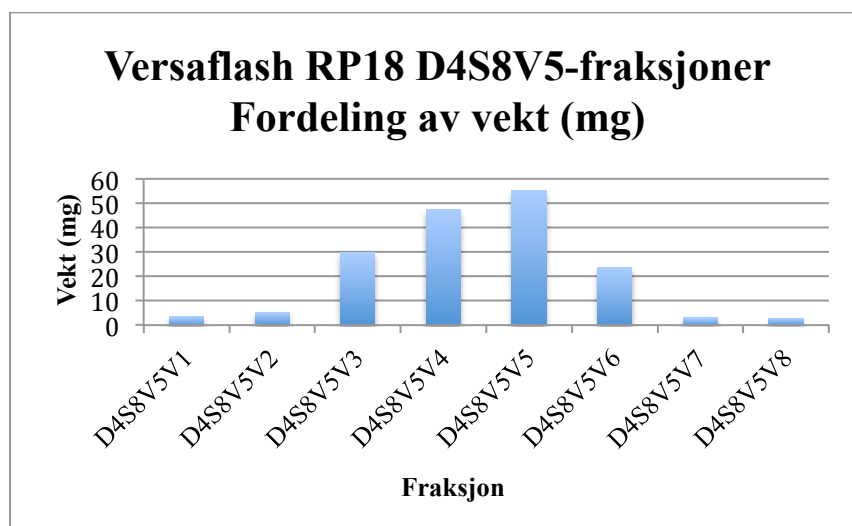


Gallokatekin aktiverte tilsynelatende XO ved høye konsentrasjoner. Det er vanskelig å forklare dette resultatet. En tidligere studie (Cho et al. 1993) viste hemmingsaktivitet på 25,47 % ved måling av gallokatekin i en konsentrasjon på 300 µg/ml. For å kunne sammenligne måtte eventuell videre undersøkelse til, hvor det isolerte stoffet måles i samme konsentrasjon som i tidligere studier. Dette ble ikke utført, men ut ifra våre resultater og tidligere funn, kunne det konkluderes med at gallokatekin ikke ser ut til å hemme XO.

## 5.6 Separasjon av fraksjon D4S8V5

### 5.6.1 Versaflash kolonne separasjon

En omvendt-fase C<sub>18</sub>-kolonne ble brukt ved fraksjonering og opprensing av fraksjon D4S8V5. Ca. 187 mg av fraksjonen ble applisert på kolonnen og det ble samlet totalt 45 kolonnefraksjoner. På bakgrunn av analytisk TLC og spraying med ceric-reagens, ble disse kolonnefraksjonene slått sammen til 8 hovedfraksjoner (D4S8V5V1-D4S8V5V8). Det samlede utbyttet var 170,4 mg (91,1 % av påsatt mengde). Fraksjon D4S8V5V3-D4S8V5V5 var de største fraksjonene (se figur 5.13). Disse ble eluert med MeOH-vann (40:60) til (50:50). Siden fraksjon D4S8V5V3 kom ut av kolonnen før D4S8V5V4 og D4S8V5V5, inneholdt den stoffer som var litt mer polare enn de i de to sistnevnte fraksjonene.



Figur 5.13: Utbytte av fraksjoner fra D4S8V5

### 5.6.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt <sup>1</sup>H NMR av alle fraksjoner. <sup>13</sup>C NMR ble også tatt av fraksjon D4S8V5V3-D4S8V5V6. Fraksjon D4S8V5V3 ble identifisert som myricetin-3-O-glukosid, men den var

litt uren.  $^1\text{H}$  NMR-spektret viste signaler i aromat- og olefinområdet (5,16-7,38 ppm), ingen topper i fettområdet, og en del komplekse signaler i karbohydratområdet (3,31-3,89 ppm).  $^{13}\text{C}$  NMR-spektret viste signaler i aromat- og olefinområdet (94-179 ppm) og et signal fra en karbonyl-C ved 179 ppm. Noen signaler ble observert i karbohydratområdet (62-78 ppm). Spektrene til fraksjon D4S8V5V4 lignet ganske mye på denne fraksjonen, men var mer blandet og uren. Fraksjon D4S8V5V3 virket dermed mest interessant å gå videre med.

$^1\text{H}$  NMR-spektret av fraksjon D4S8V5V1 hadde noen signaler i aromat- og olefinområdet (5,29-7,32 ppm), komplekse signaler i karbohydratområdet (3,29-3,68 ppm) og to topper i alifatområdet. Siden fraksjonen var uren og svært liten, ble den ansett som uinteressant.

$^1\text{H}$  NMR av spektret til fraksjon D4S8V5V2 lignet noe på fraksjon D4S8V5V1, men her var det mer komplekse signaler som viste til en svært blandet fraksjon.

$^1\text{H}$  NMR-spektrene til fraksjon D4S8V5V5 og D4S8V5V6 ble tolket som en blanding av myricetinglykosider. Fraksjon D4S8V5V5 var mer uren enn fraksjon D4S8V5V6. Flere topper ble observert i aromat- og olefinområdet (5,16-7,39 ppm) og karbohydratområdet (3,30-4,24 ppm). En dublett ved 0,97 ppm tydet på et deoksysukker, for eksempel rhamnose.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrene viste også en del støy. Flere signaler ble observert for karbohydrater og en rekke signaler i aromat- og olefinområdet. Et signal ved ca. 179 ppm kunne komme fra en karbonylgruppe i 4-stilling i flavonoider.

$^1\text{H}$  NMR-spektret til fraksjon D4S8V5V7 var uren, viste komplekse signaler i aromat- og olefinområdet, karbohydratområdet og fettområdet, i tillegg til mye støy. Fraksjonen var dermed uinteressant.

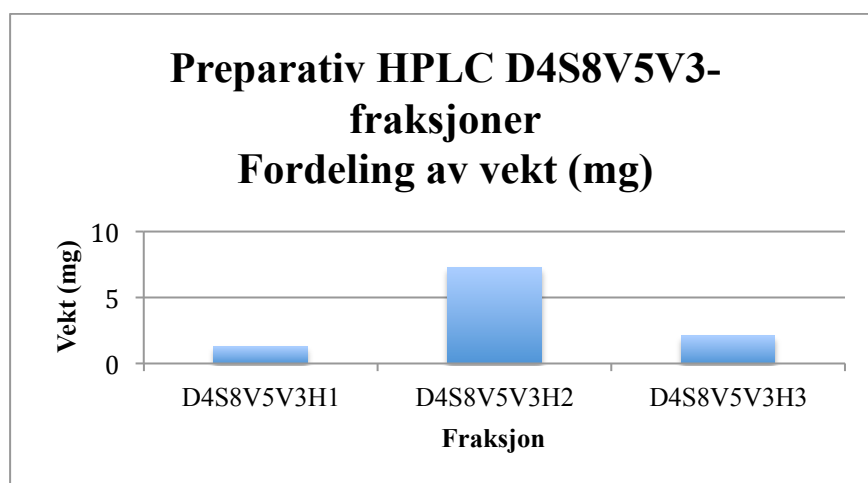
### 5.6.3 Videre arbeid

Resultater fra NMR-spektrene viste at fraksjon D4S8V5V3 var mest interessant da det sannsynligvis inneholdt myricetin 3-*O*-glukosid. Videre separasjon og opprensing av fraksjonen ble dermed prioritert.

## 5.7 Separasjon av fraksjon D4S8V5V3

### 5.7.1 Preparativ HPLC

22 mg av fraksjon D4S8V5V3 ble løst i ACN-vann (50:50) og injisert på C<sub>18</sub>-kolonne. Det ble samlet 3 hovedfraksjoner (D4S8V5V3H1-D4S8V5V3H3) basert på absorbanstopper visualisert under kromatograferingen. Da fraksjon D4S8V5V3 ikke var veldig uren, ble oppsamlingen av fraksjonene fra kolonnen enklere. Fraksjon D4S8V5V3H2 var den største fraksjonen (se figur 5.14) og sannsynlig den med myricetin 3-*O*-glukosid. Det samlede utbyttet var 11 mg (50 % av påsatt mengde). Lavt utbytte kunne skyldes at noe av prøveløsningen ble igjen i sprøyten og sprøytefilteret. Noe stoff kan også ha blitt igjen i kolonnen.



Figur 5.14: Utbytte av fraksjoner fra D4S8V5V3

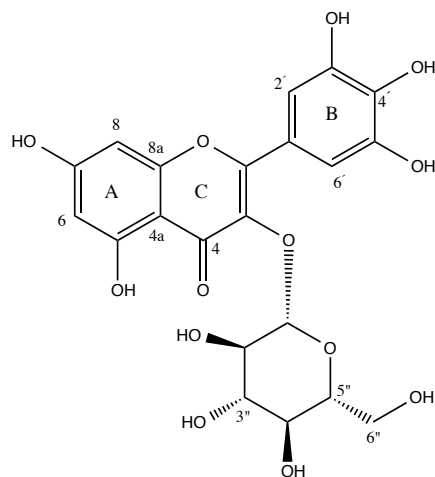
### 5.7.2 NMR-spektroskopi

<sup>1</sup>H NMR og <sup>13</sup>C NMR ble tatt opp av fraksjon D4S8V5V3H2. Fraksjonen ble identifisert som myricetin 3-*O*-glukosid. Identifiseringen var delvis basert på tolkning av spektraldataene. Ved søk i Scifinder og sammenligning med spektraldata i litteraturen, ble den endelige strukturen bestemt.

Det ble ikke tatt opp NMR-spektre av fraksjon D4S8V5V3H1 og D4S8V5V3H3, da de var mye mindre, og separasjonen med preparativ HPLC ble utført for å rense opp stoffet myricetin 3-*O*-glukosid.

### 5.7.3 Myricetin 3-O-glukosid

Flavonolglykosidet myricetin 3-O-glukosid (se figur 5.15) er tidligere rapportert fra mange planter, for eksempel blader av slekten *Corylopsis* (Iwashina et al. 2012). Det har imidlertid ikke blitt rapportert tidligere fra *S. guineense*. Dette ble undersøkt i databasen Scifinder.



**Figur 5.15: Molekylstruktur for myricetin 3-O-glukosid**

Tolkning av spektraldata for isolert myricetin 3-O-glukosid (se vedlegg, NMR-spekter 9 og 10) er gitt i tabell 5.15 og 5.16 med sammenligning av våre spektraldata med referansedata for myricetin 3-O-glukosid (Hilbert et al. 2015; Scharbert et al. 2004).

**Tabell 5.15:  $^1\text{H}$  NMR spektraldata for myricetin 3-O-glukosid**

Posisjon	Observervert	Litteratur (Hilbert et al. 2015)
2' og 6'	7,38 (2 H, s)	7,38 (s)
8	6,40 (1 H, d, 2,1)	6,43 (d, J=2,1)
6	6,20 (1 H, d, J=2,1)	6,19 (d, J=2,1)
1''	5,20 (1 H, d, J=7,3)	5,15 (d, J=7,3)
2''-6''	3,30-3,86 (5 H, flere m)	3,20-3,55 og 3,75 (dd, J=2,2 og 11,9) 3,60 (dd, J= 5,5 og 11,9)

( $\delta$ -skala gitt i enheten ppm)

Andre signaler i  $^1\text{H}$  NMR-spektret tydet på at stoffet ikke var helt rent. For eksempel ble det observert signaler ved 7,22 ppm, 4,61 ppm og et par signaler i alifatområdet (1,14-1,93 ppm).

**Tabell 5.16:**  $^{13}\text{C}$  NMR spektraldata for myricetin 3-O-glukosid

Posisjon	Observert	Litteratur (Scharbert et al. 2004)
6''	61,9	61,4
4''	70,2	70,1
2''	73,3	74,8
3''	75,2	77,3
5''	77,3	77,6
8	94,7	93,9
6	99,9	99,0
1''	102,7	103,6
4a	105,5	104,7
2' og 6'	109,9	109,1
1'	121,7	121,0
3	136,0	136,1
3' og 5''	138,1	137,2
4'	146,4	145,6
8a	158,4	157,7
2	158,7	158,1
5	163,1	162,3
7	166,1	165,3
4	179,5	179,3

( $\delta$ -skala gitt i enheten ppm)

#### 5.7.4 Bioassay

Det ble undersøkt i databasen Scifinder om ulike bioassay som har blitt utført på myricetin 3-O-glukosid. Det viste seg at en del DPPH-tester har blitt utført (31 treff), mens 15-LOX hemming og XO-hemming bare fikk ett treff hver i databasen. Dette ga dermed interesse for å utføre disse testene på det isolerte stoffet.

##### *DPPH-test*

Myricetin 3-O-glukosid ble testet for radikalscavenging (se tabell 5.17). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $\text{IC}_{50} = 3,6 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$  eller  $11,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.17: DPPH-test på myricetin 3-O-glukosid**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{M}$ )	Scavengeraktivitet (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
5	83,3	94,4	0,1	10,8 $\pm$ 1,6
2,5	41,7	94,1	0	
1,25	20,8	94	0,2	
0,625	10,4	47,2	9,8	

(Kons. =konsentrasjon, SD=standardavvik)

IC<sub>50</sub>-verdien for myricetin 3-O-glukosid var 10,8  $\pm$  1,6  $\mu\text{M}$  (på vektbasis 5,3  $\pm$  0,8  $\mu\text{g/ml}$ ).

Denne verdien var litt høyere enn quercetin sin IC<sub>50</sub>-verdi, og stoffet viste seg dermed å være en god radikalscavenger med en litt svakere radikalscavengeraktivitet enn quercetin.

Tidligere funn har vist IC<sub>50</sub>-verdi på 14,8  $\mu\text{M}$  (Hsieh og Chang 2010) og 10,05  $\pm$  0,22  $\mu\text{M}$  (Wan et al. 2012). Disse verdiene stemte godt med våre data.

### **15-LOX hemming**

Det ble utført test for 15-LOX hemming på myricetin 3-O-glukosid (se tabell 5.18).

Quercetin ble benyttet som positiv kontroll (IC<sub>50</sub> = 21,7  $\pm$  2,2  $\mu\text{g/ml}$  eller 72  $\pm$  7,4  $\mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.18: 15-LOX hemming på myricetin 3-O-glukosid**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{M}$ )	Hemming (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
5	83,3	110,6	2,6	42 $\pm$ 4
2,5	41,7	49,7	7,6	
1,25	20,8	20	6,4	

(Kons. =konsentrasjon, SD=standardavvik)

Myricetin 3-O-glukosid hadde en litt sterkere hemming på 15-LOX enn quercetin. IC<sub>50</sub>-verdien var 42  $\pm$  4  $\mu\text{M}$  (på vektbasis 20,1  $\pm$  1,8  $\mu\text{g/ml}$ ). Myricetin 3-O-glukosid viste seg dermed å være en god hemmer av 15-LOX. Det er tidligere rapportert at det isolerte stoffet ikke har vist enzymhemmende aktivitet ved 1000  $\mu\text{M}$  (Robak et al. 1988). Dette stemte ikke med våre resultater.

### **XO-hemming**

Myricetin 3-O-glukosid ble testet for XO-hemming (se tabell 5.19). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC<sub>50</sub> = 0,8  $\pm$  0,2  $\mu\text{g/ml}$  eller 2,8  $\pm$  0,6  $\mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.19: XO-hemming på myricetin 3-O-glukosid**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{M}$ )	Hemming (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
5	83,3	71,9	3,8	37,9 $\pm$ 4
2,5	41,7	55,1	2,9	
1,25	20,8	17,7	3,4	

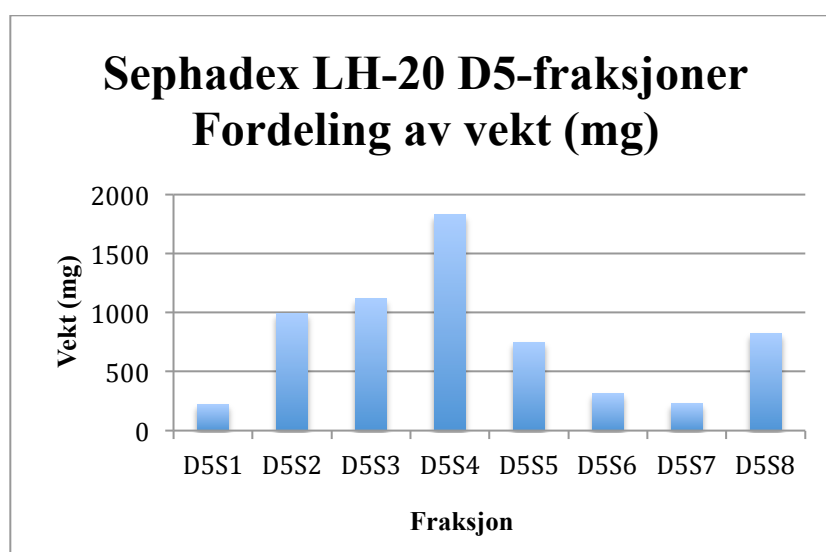
(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

Verdiene i tabellen viste at myricetin 3-O-glukosid var en svak XO-hemmer, da IC<sub>50</sub>-verdien var mye høyere enn for den positive kontrollen, quercetin. Stoffets IC<sub>50</sub>-verdi var 37,9  $\pm$  4  $\mu\text{M}$  (på vektbasis 18,2  $\pm$  1,0  $\mu\text{g/ml}$ ). Denne verdien stemte ikke med tidligere funn, hvor IC<sub>50</sub> = >200  $\mu\text{M}$  (Hsieh og Chang 2010).

## 5.8 Separasjon av fraksjon D5

### 5.8.1 Sephadex LH-20 kolonne-separasjon

Fraksjon D5 ble separert og kromatografert med Sephadex LH-20. Det ble applisert ca. 6 g og det ble samlet totalt 19 kolonnefraksjoner som ble slått sammen til 8 hovedfraksjoner (D5S1-D5S8) på bakgrunn av analytisk TLC og spraying med DPPH- og ceric-reagens. Det samlede utbyttet var 6288 mg (105 % av påsatt mengde). Det store utbyttet kunne skyldes at noe kolonnemateriale også ble eluert ut. Fraksjon D5S2-D5S4 var de største fraksjonene (se figur 5.16). Fraksjonene ble eluert med MeOH-vann (30:70) til (50:50).



**Figur 5.16: Utbytte av fraksjoner fra D5**

### 5.8.2 NMR-spektroskopi

Alle fraksjonene ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR.

Fraksjon D5S1 viste seg å inneholde lipider (0,78-2,24 ppm) og karbohydrater (3,21-3,81 ppm). Spektret til fraksjon D5S2 viste noen svært komplekse signaler i aromat- og olefinområdet (5,33-7,26 ppm), men ellers var det store likheter i forhold til spektret til fraksjon D5S1 i karbohydrat- og lipidområdet. Spektret til fraksjon D5S3 viste det samme som fraksjon D5S2, men her var det flere signaler i aromat- og olefinområdet (5,33-7,85 ppm). Disse signalene var også komplekse.

Spektret til fraksjon D5S4 viste få signaler i lipidområdet (0,69-1,25 ppm) og noen komplekse signaler i karbohydratområdet (3,37-4,26 ppm). Spektret viste også flere signaler i aromat- og olefinområdet (5,15-7,40 ppm). Denne fraksjonen var dermed interessant.

Spektret til fraksjon D5S5 hadde de samme signalene som i fraksjon D5S4, men var mer kompleks i aromat- og olefinområdet. Fraksjon D5S6 sitt spekter inneholdt for det meste aromater, men signalene var svært komplekse. Det ble også observert noen komplekse signaler i karbohydratområdet og et par i lipidområdet. Disse fraksjonene så også interessante ut.

Spekteret til fraksjon D5S7 så ut til å inneholde mye av det samme som i fraksjon D5S6. Fraksjon D4S8 kunne muligens inneholde proanthocyanidiner med svært komplekse signaler i aromat- og olefinområdet. I tillegg var det en del signaler i karbohydratområdet og lipidområdet.

### 5.8.3 Videre arbeid

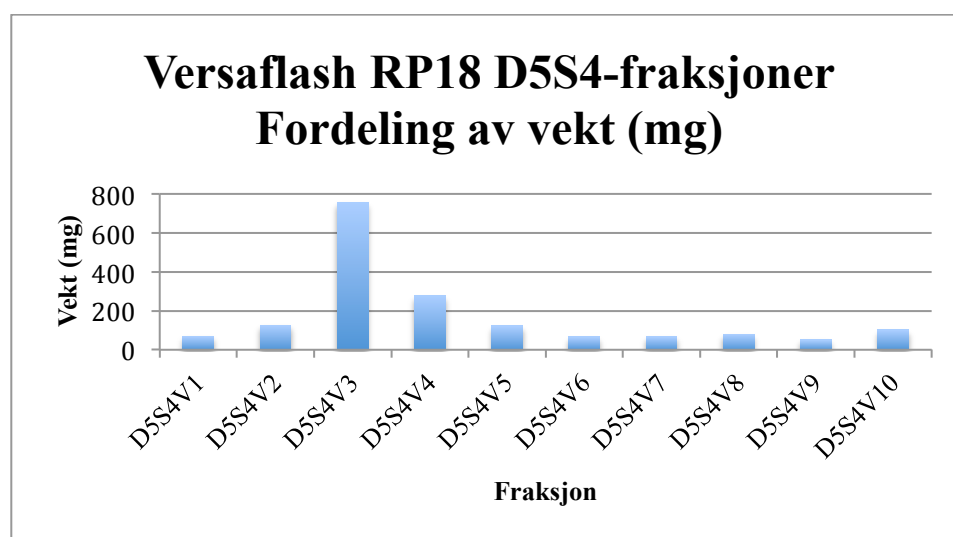
NMR-data tydet på at fraksjon D5S4 og D5S5 var de mest interessante fraksjonene. Disse fraksjonene ble prioritert til videre opprensing.



## 5.9 Separasjon av fraksjon D5S4

### 5.9.1 Versaflash kolonneseparasjon

Fraksjon D5S4 ble applisert på en omvendt-fase kolonne. Det ble samlet opp 64 kolonnefraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC ble slått sammen til 10 hovedfraksjoner (D5S4V1-D5S4V10). 1762 mg ble applisert på kolonnen og det totale utbyttet var 1718 mg (97,5 % av påsatt mengde). Fraksjon D5S4V3 og D5S4V4 var de største fraksjonene (se figur 5.17). Disse to fraksjonene ble eluert ut av kolonnen med MeOH-vann (50:50) og inneholdt sannsynligvis noen av de mest polare stoffene.



Figur 5.17: Utbytte av fraksjoner fra D5S4

### 5.9.2 NMR-spektroskopi

Alle fraksjoner ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR. Det ble også tatt  $^{13}\text{C}$  NMR av fraksjon D5S4V1, D5S4V3 og D5S4V4. COSY og HSQC ble også tatt av den sistnevnte fraksjonen.

$^1\text{H}$  NMR-spektret til fraksjon D5S4V1 viste signaler i det aromatiske og olefiniske området (8,93 ppm og 7,59-7,60 ppm) og ingen signaler i alifat (fett)-området.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektret viste noen signaler i aromat- og olefinområdet (106-135 ppm). Denne fraksjonen var liten og ble vurdert som mindre interessant.

Fraksjon D5S4V2 hadde litt komplekse signaler i ved 3,32-4,36 ppm (protoner på oksygenert karbon) og ved 6,17-8,90 ppm (aromatiske og olefiniske protoner). Fraksjon D5S4V3 så ut til

å inneholde mye av det samme som i forrige fraksjon, men noe mer kompliserte signaler i karbohydratområdet.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektret til fraksjon D5S4V3 viste mange signaler i aromat- og olefinområdet (94-179 ppm) og karbohydratområdet (62-77 ppm).

NMR-spektrene til fraksjon D5S4V4 lignet på spektrene til fraksjon D5S4V3, men var renere. Denne fraksjonen var dermed interessant.

NMR-spektrene til fraksjon D5S4V5-D5S4V7 så ut til å være ganske like. Det ble observert kompliserte signaler i aromat- og olefinområdet (5,11-8,88 ppm) og karbohydratområdet (3,75-4,25 ppm).

Fraksjon D5S4V8 og D5S4V9 viste å inneholde mye likt med kompliserte signaler i aromat- og olefinområdet (5,27-7,46 ppm), karbohydratområdet (3,43-4,38 ppm) og i alifatområdet (0,88-2,29 ppm). Disse fraksjonene var også små og mindre interessante.

Fraksjon D5S4V10 viste kompliserte signaler i karbohydratområdet. Det ble også observert kompliserte signaler i alifatområdet (0,89-2,80 ppm) og ingen signaler i aromat- og olefinområdet. Denne fraksjon var dermed uinteressant.

### **5.9.3 Analytisk HPLC**

Fraksjon D5S4V1-D5S4V8 ble analysert med analytisk HPLC. Fraksjon D5S4V9 og D5S4V10 ble ikke analysert da de var mindre interessante. Vi var interessert i forbindelser med UV-absorbans i området 280 nm til 360 nm. Fraksjonene ble analysert med både MeOH og ACN for å se om MeOH, som har en lavere løsemiddelstyrke, kunne gi bedre separasjon av toppene i kromatogrammene og unngåelse av haledannelse.

Kromatogrammet til fraksjon D5S4V3 hadde flere store topper som lå nære hverandre mellom retensjonstidene 5,3 minutter og 8,8 minutter, hvorav en stor topp ved 8,2 minutter skilte seg ut med et stort areal under toppen. Fraksjon D5S4V4 hadde nesten helt lik kromatogram som fraksjon D5S4V3 med en stor topp som skilte seg ut ved retensjonstiden 8,2 minutter, men det ble samtidig observert en del flere topper som lå inntil hverandre i retensjonstiden fra 6,4 minutter til 10,5 minutter. Kromatogrammet til fraksjon D5S4V5 og D5S4V6 lignet på hverandre. Begge hadde to store topper ved retensjonstidene 8,2 minutter

og 9,1 minutter. Dette tydet på at fraksjonene kunne inneholde andre interessante stoffer enn de fra fraksjon D5S4V3 og D5S4V4. Siden toppene i fraksjon D5S4V6 var større enn de i fraksjon D5S4V5, var videre separasjon av interesse. Kromatogrammet til fraksjon D5S4V7 og D5S4V8 hadde mange signaler som lå inntil hverandre. Separasjon av disse toppene ville bli komplisert, og disse fraksjonene ble derfor ikke prioritert.

Siden fraksjon D5S4V3-D5S4V6 viste å inneholde interessante stoffer, ble de analysert med isokratisk eluering for å undersøke om dette vil bidra til å oppnå bedre separasjon mellom toppene. Ved å sammenligne kromatogrammene viste det seg at fraksjon D5S4V4 var mest interessant, da videre separasjon og opprensing ville bli enklere for denne fraksjonen i forhold til de andre. Det ble observert flere topper i kromatogrammet til de andre fraksjonene, noe som tydet på at de muligens inneholdt flere stoffer.

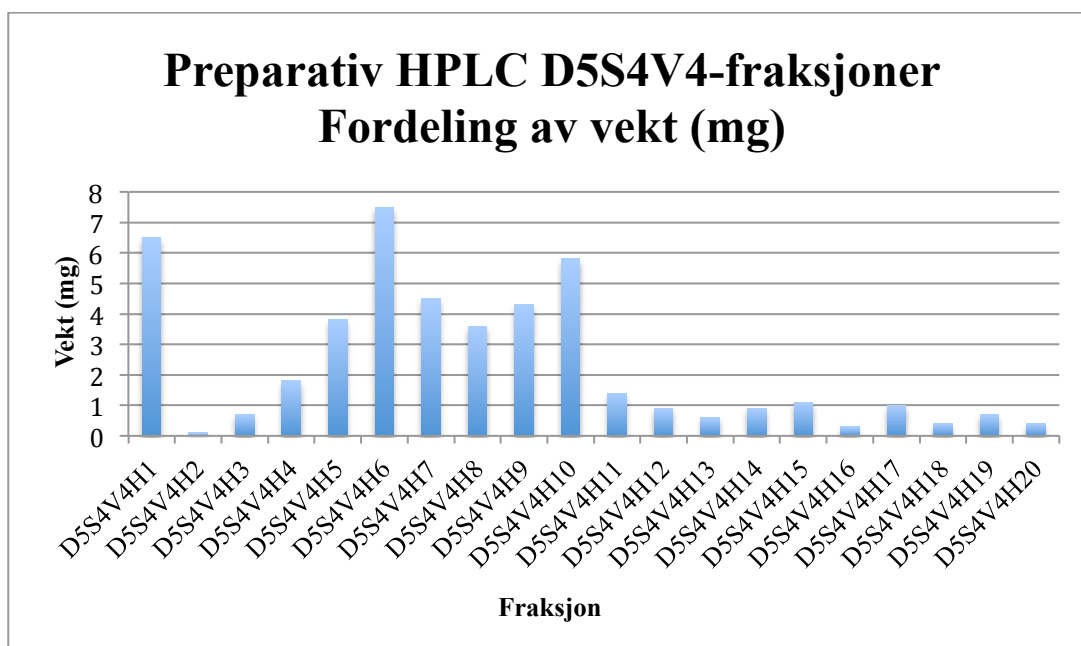
#### **5.9.4 Videre arbeid**

NMR-data og kromatogrammene fra analytisk HPLC tydet på at fraksjonene D5S4V4 og D5S4V6 var mest interessante. Fraksjon D5S4V6 var også interessant. Disse ble dermed prioritert til videre separasjon og opprensing.

## **5.10 Separasjon av fraksjon D5S4V4**

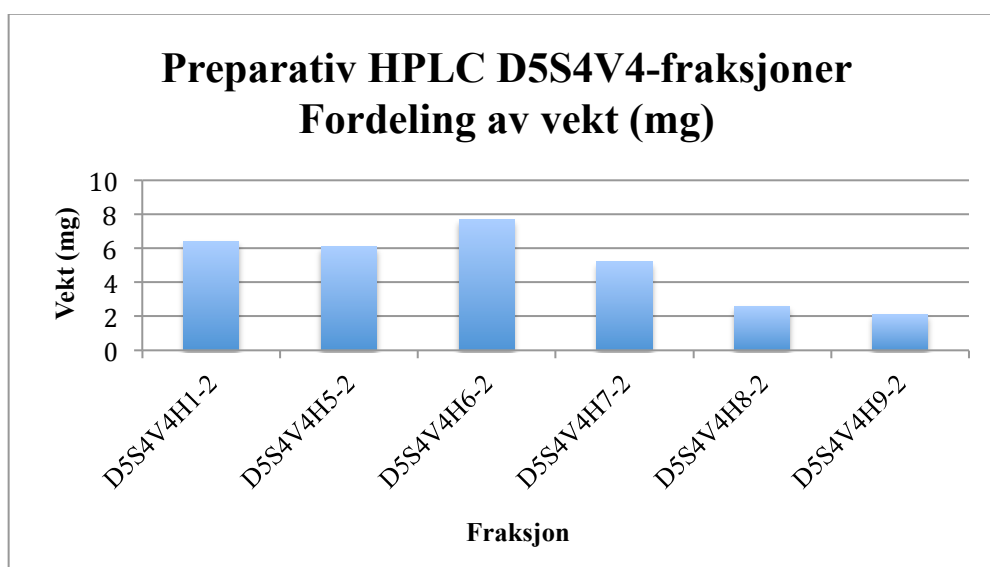
### **5.10.1 Preparativ HPLC**

50 mg av fraksjon D5S4V4 ble løst i ACN-vann (50:50) og injisert på C<sub>18</sub>-kolonne. Prøveløsningen ble injisert i to omganger og det ble samlet inn 26 kolonnefraksjoner per eluering. Disse ble slått sammen til hovedfraksjonene D5S4V4H1-D5S4V4H20. Fraksjon D5S4V4H1, D5S4V4H6, D5S4V4H7 og D5S4V4H10 var de største fraksjonene (se figur 5.18). Siden omvendt fase kromatografi ble benyttet, ble de mer polare stoffene eluert ut først. Dermed ville de senere fraksjonene sannsynligvis inneholde mindre polare stoffer. Det samlede utbytte var 46,3 mg (92,6 % av påsatt mengde).



**Figur 5.18: Utbytte av fraksjoner fra D5S4V4**

Siden separasjonen ga lite mengde stoff i de interessante fraksjonene (vurdert ut fra NMR-spektre), ble fraksjon D5S4V4 (50 mg) separert på nytt med preparativ HPLC. Her ble prøveløsningen også injisert i to omganger. Det ble samlet inn 26 kolonnefraksjoner per eluering. Disse ble slått sammen til hovedfraksjonene D5S4V4H1-2 - D5S4V4H20-2. Fraksjon D5S4V4H1-2 - D5S4V4H7-2 var de største fraksjonene (se figur 5.19). Det samlede utbyttet var 30,1 mg (60,2 % av påsatt mengde), men ikke alle fraksjonene ble dampet og veid inn.



**Figur 5.19: Utbytte av fraksjoner fra D5S4V4**

### 5.10.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR av fraksjon D5S4V4H1-D5S4V4H15 og D5S4V4H5-2 – D5S4V4H9-2.  $^{13}\text{C}$  NMR, COSY og HSQC ble også tatt opp av fraksjon D5S4V4H7.

Fraksjon D5S4V4H7 og D5S4V4H7-2 ble identifisert som myricetin 3-*O*-rhamnosid. Identifiseringen var delvis basert på tolkning av spektraldataene. Her ble  $^{13}\text{C}$  NMR-, COSY- og HSQC-spektret til fraksjon D5S4V4H7 brukt og sammenlignet med data fra første kromatografiske separasjon. Dette kunne vi gjøre på bakgrunn av at samme prøveopparbeidelse og metode ble benyttet i begge elueringene (se avsnitt 4.3.11 Separasjon av fraksjon D5S4V4), og samme stoff ville derfor bli funnet i de parallelle fraksjonene (observert i  $^1\text{H}$  NMR-spektra). Ved søk i Scifinder og ved sammenligning med spektraldata i litteraturen ble den endelige strukturen bestemt.

Spektret til fraksjon D5S4V4H1 inneholdt kompliserte signaler i karbohydrat- og fettområdet. Det ble observert noen få signaler i aromat- og olefinområdet (6,18-7,38 ppm). I spektrene til fraksjon D5S4V4H2-D5S4V4H6 ble det observert noenlunde like signaler i aromat- og olefinområdet (5,10-7,86 ppm), fettområdet (1,22-2,16 ppm) og karbohydratområdet (3,17-3,88 ppm). Disse signalene ble i fraksjon D5S4V4H5 og D5S4V4H6 mye renere.

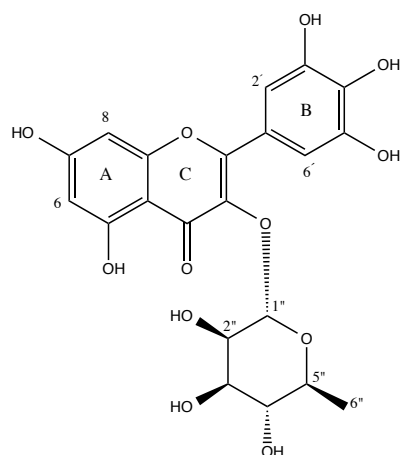
Spektrene til fraksjon D5S4V4H9-D5S4V4H11 viste noe støy og kompliserte signaler i karbohydratområdet, alifatområdet og aromat- og olefinområdet. Fraksjon D5S4V4H12 og D5S4V4H13 viste å inneholde mer støy og uinteressante, kompliserte signaler i karbohydratområdet og alifatområdet. Fraksjon D5S4V4H14 var tom. Spektret til fraksjon D5S4V4H15 viste mye støy og kompliserte signaler i alifat- og karbohydratområdet. Det ble observert noen signaler i aromat- og olefinområdet (6,21-7,75 ppm).

$^1\text{H}$  NMR-spektrene til fraksjon D5S4V4H5-2 – D5S4V4H9-2 inneholdt de samme stoffene som i de tilsvarende fraksjonene som ble eluert første gangen (D5S4V4H5-D5S4V4H9).

### 5.10.3 Myricetin 3-*O*-rhamnosid

Flavonolglykosidet myricetin 3-*O*-rhamnosid (myricitrin, se figur 5.20) er tidligere rapportert i et stort antall planter, for eksempel blader av slekten *Corylopsis* (Iwashina et al. 2012). Det

har imidlertid ikke blitt rapportert tidligere fra *S. guineense*. Dette ble undersøkt i databasen Scifinder.



**Figur 5.20: Molekylstruktur av myricetin 3-O-rhamnosid**

Tolkning av spektraldata for isolert myricetin 3-O-rhamnosid (se vedlegg, NMR-spekter 11 og 12) er gitt i tabell 5.20 og 5.21 med sammenligning av våre spektraldata med referansedata for myricetin 3-O-rhamnosid (Hilbert et al. 2015; Korul’kina et al. 2004). Tolkning av COSY- og HSQC-spektrum er gitt i tabell 5.22 og tilordningen ble foretatt ut fra skiftposisjoner, multiplisitet, COSY- og HSQC-spektrum (se vedlegg, NMR-spekter 13 og 14).

**Tabell 5.20:  $^1\text{H}$  NMR spektraldata for myricetin 3-O-rhamnosid**

Posisjon	Observert	Litteratur (Hilbert et al. 2015)
6'' (rhamnose)	0,95 (3 H, J=6,2)	0,95 (d, J=6,2)
2''-5''	3,30-4,23 (4H, m)	3,30-4,20 (m)
1''	5,32 (1 H, d, J=1,6)	5,32 (d, J=1,6)
6	6,21 (1 H, d, J= 2,4)	6,21 (d, J=2,1)
8	6,37 (1 H, d, J= 2,1)	6,37 (d, J=2,1)
2' og 6'	6,95 (2 H, s)	6,95 (s)

( $\delta$ -skala gitt i enheten ppm)

Andre signaler i spektrene tydet på at stoffet ikke var helt rent. For eksempel ble det observert signaler ved 7,84 ppm, 1,22 ppm og 1,28ppm i  $^1\text{H}$  NMR-spektret.

**Tabell 5.21:  $^{13}\text{C}$  NMR spektraldata for myricetin 3-O-rhamnosid**

Posisjon	Observervert	Litteratur (Korul'kina et al. 2004)
6''(rhamnose)	17,7	17,6
5''	73,4	70,7
2''	72,1	70,5
3''	72,1	70,6
4''	71,9	71,4
8	94,7	93,7
6	99,8	98,8
1''	103,7	102,0
10	105,9	104,1
2' og 6'	109,6	108,1
1'	121,9	119,7
3	136,3	134,4
4'	137,9	136,6
3' og 5'	146,9	145,9
9	158,5	156,6
2	159,5	157,6
5	163,2	161,4
7	165,9	164,5
4	179,7	177,8

( $\delta$ -skala gitt i enheten ppm)

**Tabell 5.22: COSY- og HSQC spektraldata for myricetin 3-O-rhamnosid**

COSY (viser koblingen mellom proton og proton)	
6,21/6,37	Kobling mellom H-6/H-8
5,32/4,23	Kobling mellom H-1''/H-2''
3,30-4,23	Koblinger mellom H-1'' - H-5''
3,30-4,23/0,95	Kobling mellom H-6''(rhamnose) /H-5''
HSQC (viser koblingen mellom karbon og proton)	
6,95/109,95	Kobling mellom H2' og H-6'/C-6' og C-2'
6,37/94,73	Kobling mellom H-8/C-8
6,21/99,84	Kobling mellom H-6/C-6

5,32/103,66	Kobling mellom H-1"/C-1"
3,30-4,23/71,91-73,95	Koblinger mellom H-2"-H-5"/C-2"-C-5"

( $\delta$ -skala gitt i enheten ppm)

## 5.10.4 Bioassay

### DPPH-test

Myricetin 3-*O*-rhamnosid ble testet for radikalscavenging (se tabell 5.23). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $IC_{50} = 3,6 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$  eller  $11,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.23: DPPH-test på myricetin 3-*O*-rhamnosid**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{M}$ )	Scavengeraktivitet (%)	SD (%)	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
10	166,7	81,1	18,2	$27,6 \pm 2,6$
5	83,3	94,4	0,2	
2,5	41,7	83,6	4,6	
1,25	20,8	27,1	9,2	

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

$IC_{50}$ -verdien for myricetin 3-*O*-rhamnosid var  $27,6 \pm 2,6 \mu\text{M}$  (på vektbasis  $12,8 \pm 1,2 \mu\text{g/ml}$ ). Denne verdien var mye høyere enn quercetin sin  $IC_{50}$ -verdi, og stoffet viste seg dermed å være en dårlig radikalscavenger.  $IC_{50}$ -verdien fra vår undersøkelse stemte ikke svært godt med tidligere funn,  $IC_{50}=15,3 \mu\text{M}$  (Hsieh og Chang 2010).

### 15-LOX hemming

Det ble utført 15-LOX hemming på myricetin 3-*O*-rhamnosid (se tabell 5.24). Quercetin ble benyttet som positiv kontroll ( $IC_{50} = 21,7 \pm 2,2 \mu\text{g/ml}$  eller  $72 \pm 7,4 \mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.24: 15-LOX hemming på myricetin 3-*O*-rhamnosid**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{M}$ )	Hemming (%)	SD (%)	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
10	166,7	60,7	3,5	$138,1 \pm 11$
5	83,3	21,2	6,6	

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

Myricetin 3-*O*-hamnosid hadde en svakere hemming på 15-LOX enn quercetin.  $IC_{50}$ -verdien var  $138,1 \pm 11 \mu\text{M}$  (på vektbasis  $64,1 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ ). Det er tidligere rapportert at dette stoffet



ikke har vist noe enzymhemmende aktivitet ved konsentrasjon på 1000  $\mu\text{M}$  (Robak et al. 1988). Kiss et al. (2011) rapporterte imidlertid en  $\text{IC}_{50}$ -verdi på 54  $\mu\text{M}$  (Kiss et al. 2011). Vår verdi ligger mellom disse.

### ***XO-hemming***

Myricetin 3-*O*-rhamnosid ble testet for XO-hemming (se tabell 5.25). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $\text{IC}_{50} = 0,8 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$  eller  $2,8 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.25: XO-hemming på myricetin 3-*O*-rhamnosid**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{M}$ )	Hemming (%)	SD (%)	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
10	166,7	9,8	10,4	>166,7

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

Verdiene i tabellen viste at myricetin 3-*O*-rhamnosid var tilnærmet inaktiv ved høyeste målte konsentrasjon.  $\text{IC}_{50}$ -verdien var større enn 166,7  $\mu\text{M}$  (på vektbasis 77,3  $\mu\text{g/ml}$ ). Dette tydet på at myricetin 3-*O*-rhamnosid er en dårlig XO-hemmer. Denne verdien stemte bra med tidligere funn med  $\text{IC}_{50} = > 200 \mu\text{M}$  (Hsieh og Chang 2010).

## **5.10.5 Videre arbeid**

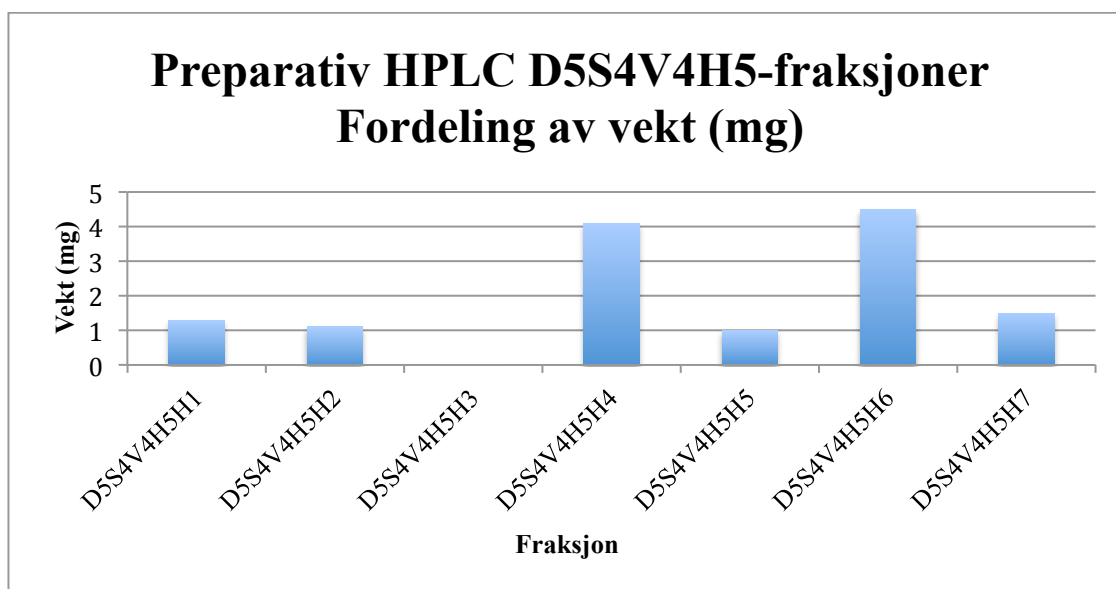
Fraksjon D5S4V4H5 og D5S4V4H5-2 ble slått sammen, og prioritert til videre separering og opprensing siden de muligens kunne inneholde et interessant stoff.

## **5.11 D5S4V4H5 og D5S4V4H5-2**

### **5.11.1 Preparativ HPLC**

NMR-spektrene av fraksjon D5S4V4H5 og D5S4V4H5-2 tydet på at de inneholdt de samme stoffene, og at de muligens kunne inneholde et interessant stoff. 9,9 mg av den sammenslåtte fraksjonen ble løst i ACN-vann (50:50) og injisert på  $\text{C}_{18}$ -kolonne. Det ble samlet inn 25 kolonnefraksjoner som ble slått sammen til 8 hovedfraksjoner (D5S4V4H5H1-D5S4V4H5H8) basert på kromatogrammet fra preparativ HPLC. Fraksjon D5S4V4H5H4 og D5S4V4H5H6 var de største fraksjonene (se figur 5.21). Siden fraksjon D5S4V4H5H4 kom ut av kolonnen først inneholdt den trolig litt mer polare stoffer enn de i fraksjon D5S4V4H5H6, men det kunne tenkes at de inneholdt det samme stoffet, siden hovedfraksjon D5S4V4H5H4-D5S4V4H5H6 tross alt tilsvarte kolonnefraksjon 11-13. Det samlede utbyttet

var 14 mg (136 % av påsatt mengde). Det høye utbyttet kunne skyldes fluktuasjoner under innveining av fraksjonene, eller at egenvekten til rundkolber brukt til inndampingen kunne ha endret litt (blitt tyngre) på grunn av vannrester i glassets porer som ikke rakk å dampe av. Små vannrester i fraksjonene kunne også bidra til avvik i innveiningen av fraksjonene.



*Figur 5.21: Utbytte av fraksjoner av D5S4V4H5*

### 5.11.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR av alle fraksjonene unntatt fraksjon D5S4V4H5H8.

Spektret til fraksjon D5S4V4H5H1 og D5S4V4H5H2 var uinteressante, da de bare viste signaler i alifat/fettområdet (0,87-2,86 ppm) og karbohydratområdet (3,03-3,81 ppm). Disse signalene var kompliserte og det var også en del støy i spektrene. Fraksjon D5S4V4H5H2 viste færre signaler i fettområdet enn fraksjon D5S4V4H5H1.

I spektrene til fraksjon D5S4V4H5H3 og D5S4V4H5H4 ble det observert noenlunde like signaler i aromat- og olefinområdet (6,18-7,77 ppm). Det ble også observert signaler i fettområdet (1,22 ppm, 1,29 ppm og 2,16 ppm) og noen kompliserte signaler i karbohydratområdet (3,11-3,93 ppm). Disse fraksjonene var mindre interessante.

I spektret til fraksjon D5S4V4H5H5 og D5S4V4H5H6 ble det observert signaler i aromat- og olefinområdet som kunne tyde på myricetin 3-*O*-rhamnosid og et annet ukjent stoff (6,20-

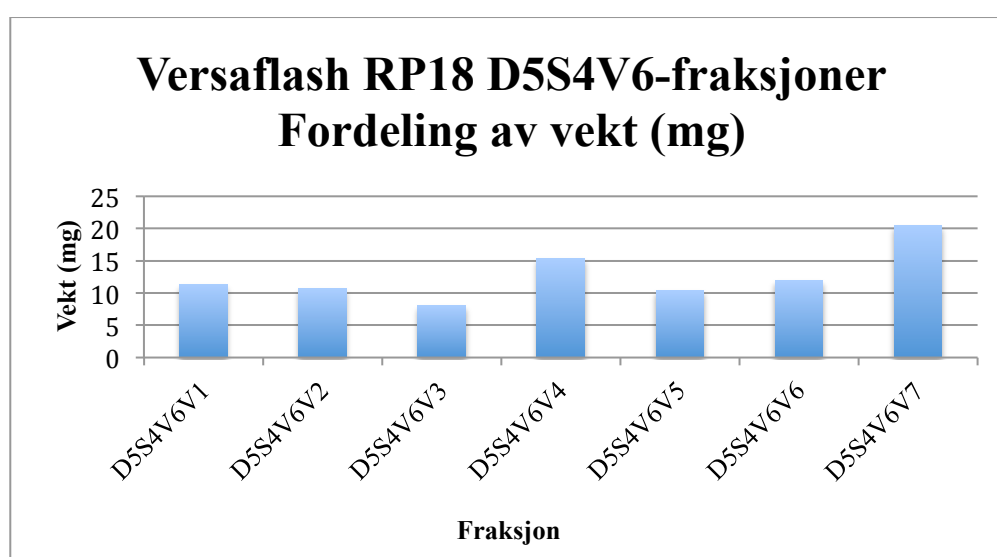
7,31 ppm). Noen kompliserte signaler i karbohydratområdet (3,11-3,83 ppm) og signaler i fettområdet ble også observert (0,95-1,22 ppm). Signalet ved 0,95 ppm kan komme fra metylgruppen i myricetin 3-*O*-rhamnose. Preparativ HPLC hadde allerede blitt utført to ganger, og med liten mengde stoff, ville videre opprensing sannsynlig gi veldig lavt utbytte og videre opprensing ble derfor ikke utført.

Fraksjon D5S4V4H5H7 viste å inneholde det samme som fraksjon D5S4V4H5H6, men hadde flere, i tillegg til noe mer kompliserte signaler i karbohydratområdet (3,03-4,23 ppm). Signalet ved 0,95 ppm tydet på metylgruppen i myricetin 3-*O*-rhamnose. Fordi fraksjonen var så liten, var det ikke interessant med opprensing.

## 5.12 Separasjon av fraksjon D5S4V6

### 5.12.1 Versaflash kolonnekromatografi

Fraksjon D5S4V6 ble applisert på en omvendt-fase kolonne. Det ble samlet opp 25 kolonnefraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC ble slått sammen til 7 hovedfraksjoner (D5S4V6V1-D5S4V6V7). Ca. 60,3 mg ble applisert på kolonnen og det totale utbyttet var 88,4 mg (146,6 % av påsatt mengde). Det høye utbyttet kunne skyldes at fraksjonene ble veid inn rett etter inndampning. Små vannrester i fraksjonene kan ha bidratt til avvik i innveilingen av fraksjonene. Det er også mulig at noe av stasjonærfasen kan ha blitt eluert ut. Fraksjon D5S4V6V4 og D5S4V6V7 var de største fraksjonene (se figur 5.22).



Figur 5.22: Utbytte av fraksjoner fra D5S4V6

### 5.12.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR-spektre av alle fraksjonene. Fraksjon D5S4V6V1-D5S4V6V3 var uinteressante. Med økende fraksjonsnummer viste spektrene signaler som tydet på økt mengde karbohydrater og fett. Fraksjon D5S4V6V3 viste mange kompliserte signaler i aromat- og olefinområdet, mens fraksjon D5S4V6V2 viste færre signaler. Det ble ikke observert signaler i dette området for fraksjon D5S4V6V1.

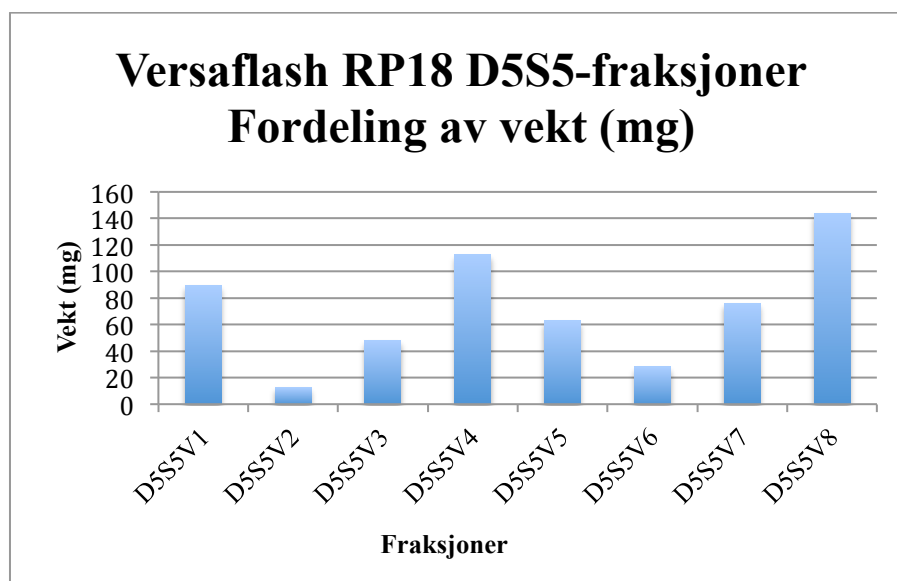
Spektret til fraksjon D5S4V6V4 lignet på fraksjon D5S4V6V3, men spektret hadde renere og mindre kompliserte signaler.

Fraksjon D5S4V6V5-D5S4V6V7 så ut til å inneholde det samme, siden spektrene lignet hverandre. Fraksjon D5S4V6V7 virket noe renere enn D5S4V6V6. Fraksjonene så ut til å inneholde flavonoider med signaler i aromat- og olefinområdet (5,15-8,07 ppm) og karbohydratområdet (3,63-4,22 ppm). Noen signaler ble observert i fettområdet (0,90-1,28 ppm). Disse fraksjonene var interessante.

## 5.13 Separasjon av fraksjon D5S5

### 5.13.1 Versaflash kolonne-separasjon

Fraksjon D5S5 ble applisert på en omvendt-fase kolonne. Det ble samlet opp 45 kolonnefraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC ble slått sammen til 8 hovedfraksjoner (D5S5V1-D5S5V7). 749,5 mg ble applisert på kolonnen og det totale utbyttet var 574,1 mg (76,6 % av påsatt mengde). Noe av prøveløsningen ble igjen i sprøyten som ble brukt til applisering på kolonnen. Stoff som muligens ble igjen i kolonnen kunne også forårsake det lavere utbytte. Fraksjon D5S5V1, D5S5V4 og D5S5V8 var de største fraksjonene (se figur 5.23). Siden den siste fraksjonen ble eluert med 100% MeOH, inneholdt den sannsynligvis stoffer som var mindre polare enn stoffer i fraksjonene som kom før.



*Figur 5.23: Utbytte av fraksjoner av D5S5*

### 5.13.2 NMR-spektroskopi

Alle fraksjoner ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR. Fraksjon D5S5V1 var svært blandet med komplekse signaler ved aromat- og olefinområdet og karbohydratområdet. Et par signaler i fettområdet ble også observert.

Fraksjon D5S5V2 var mindre blandet og tydet på flere flavonoider med mange signaler i aromat- og olefinområdet (5,17-7,55 ppm) og karbohydratområdet (3,65-4,31 ppm).

Fraksjon D5S5V3 var mindre blandet enn forrige fraksjon og viste signaler som muligens indikerte to myricetinderivater (5,17-7,35 ppm). Noen kompliserte signaler ble observert i karbohydratområdet (3,63-4,32 ppm). Spektret til fraksjon D5S5V4 viste mye av de samme signalene som for fraksjon D5S5V3.

Spektrene til fraksjon D5S5V5 og D5S5V6 var de mest interessante. Spektrene lignet hverandre, men fraksjon D5S5V6 var renere. Signaler ved 5,16-7,35 ppm tydet på ett eller to hovedflavonoider i fraksjon D5S5V5. I spektret til fraksjon D5S5V6 viste signalene ved 5,17-7,61 ppm sannsynlighet for ett hovedflavonoid. Denne fraksjonen var dermed mest interessant. Begge fraksjonene viste også signaler i karbohydratområdet (3,30-3,88 ppm).

Fraksjon D5S5V7 var svært blandet med komplekse signaler i aromat- og olefinområdet, karbohydratområdet og fettområdet. Spektret viste flest signaler i aromat- og olefinområdet (5,17-7,49 ppm). Fraksjon D5S5V8 viste bare signaler i fettområdet (0,81 ppm og 1,19 ppm).

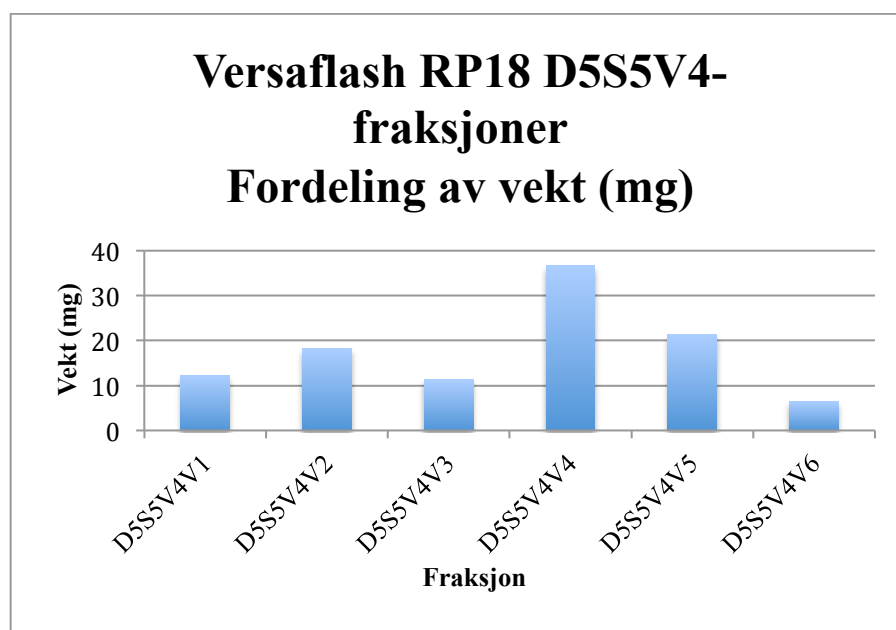
### 5.13.3 Videre arbeid

NMR-data viste at fraksjon D5S5V6 var mest interessant. Fraksjonen var forholdsvis ren og så ut til å inneholde ett stoff. Videre separering, opprensing og identifisering ville dermed bli enklere. Selv om det ikke var den største fraksjonen, var det likevel nok mengde til å fraksjonere videre.

## 5.14 D5S5V4

### 5.14.1 Versaflash kolonne separasjon

Fraksjon D5S5V4 ble applisert på en omvendt-fase kolonne. Det ble samlet opp 33 kolonnefraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC ble slått sammen til 6 hovedfraksjoner (D5S5V4V1-D5S5V4V6). Ca. 110 mg ble applisert på kolonnen og det totale utbyttet var 106,1 mg (96,5 % av påsatt mengde). Fraksjon D5S5V4V2, D5S5V4V4 og D5S5V4V5 var de største fraksjonene (se figur 5.24). De to førstnevnte fraksjonene inneholdt sannsynligvis mer polare stoffer enn fraksjon D5S5V4V5 siden de kom ut av kolonnen først.



Figur 5.24: Utbytte av fraksjoner fra D5S5V4

### 5.14.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR av alle fraksjoner og  $^{13}\text{C}$  NMR av fraksjon D5S5V4V2 og D5S5V4V4. Ved hjelp av COSY, HMBC og HSQC ble fraksjon D5S5V4V2 identifisert som 3-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin. Forbindelsen ble identifisert ved tolkning av spektraldata, og ved søk i Scifinder etter struktur og referanser.

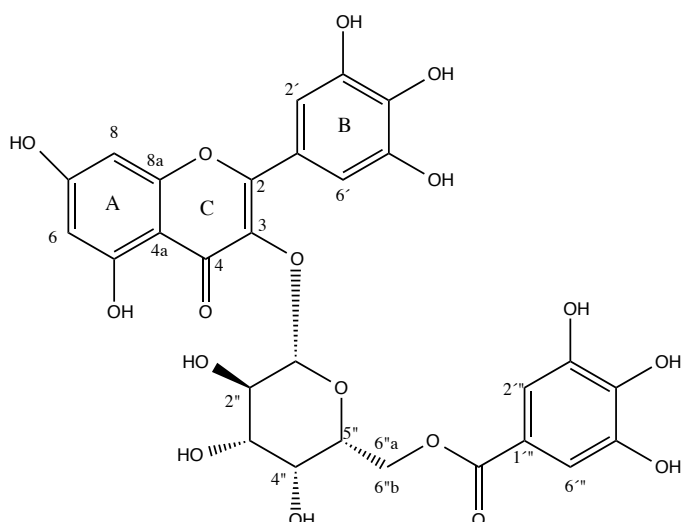
Fraksjon D5S5V4V1 og D5S5V4V5 var blandet med støy og kompliserte signaler i aromat- og olefinområdet, fettområdet og karbohydratområdet.

Fraksjon D5S5V4V3 og D5S5V4V4 viste seg å inneholde de samme stoffene. Signalene tydet på blanding av flavonoider med nokså rene signaler ved 5,10-7,79 ppm. En del signaler ble observert i karbohydratområdet (3,35-4,87 ppm), og en dublett ved 0,96 ppm kan skyldes metylgruppen i rhamnose. Spektret til fraksjon D5S5V4V4 var renere enn spektret til fraksjon D5S5V4V3.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektret til fraksjon D5S5V4V4 viste signaler ved 99,97-179,46 ppm og 63,85-94,87 ppm i henholdsvis aromat- og olefinområdet og karbohydratområdet. Videre arbeid med denne fraksjonen var dermed av interesse.

Fraksjon D5S5V4V6 var uinteressant, med bare en topp i fettområdet.

### 5.14.3 3-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin

3-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin (se figur 5.25) er ikke tidligere rapportert i *S. guineense*. Dette ble undersøkt i databasen Scifinder. Det er et sjeldent flavonoid, tidligere rapportert i mindre enn 20 planter, for eksempel i MeOH-ekstrakt av blader av planten *Pteleopsis suberosa* (De Leo et al. 2006).



**Figur 5.25: Molekylstruktur av 3-O- $\beta$ -D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin**

Tolkning av spektraldata for isolert 3-O- $\beta$ -D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin (se vedlegg, NMR-spekter 15 og 16) er gitt i tabell 5.26 og 5.27 med sammenligning av våre spektraldata med referansedata for 3-O- $\beta$ -D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin (Korul'kina et al. 2004). Tolkning av COSY- og HSQC-spektrene er gitt i tabell 5.28 og tilordningen er foretatt ut fra skiftposisjoner, multiplisitet, COSY- og HSQC-spekter (se vedlegg, NMR-spekter 17 og 18). Avvik fra litteraturdata kan skyldes forskjellige løsningsmidler (CD<sub>3</sub>OD i vårt system, DMSO-d<sub>6</sub> i litteraturdata).

**Tabell 5.26: <sup>1</sup>H NMR spektraldata for 3-O- $\beta$ -D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin**

Posisjon	Observervert	Litteratur (Korul'kina et al. 2004)
1''	5,19 (1 H, d, J=7,9)	5,16 (1 H, d, J=7,8)
2''	3,87 (1H, m)	3,78-3,90 (3H, m)
3''	3,92 (1 H m)	
6''a*	4,26 (1H, dd, J=11,1 og 76,7)	
6''b*	4,32 (1 H, dd, J=11,1 og 6,3)	
4''	3,62 (1 H, dd, J=3,4 og 9,7)	
5''	3,83 (1 H, m)	3,59 (1H,dd, J=3,3)
Gallesyre 2'' og 6''	6,90 (2 H, s)	6,89 (2 H, s)
2' og 6'	7,35 (2 H, s)	7,34 (2 H, s)
6	6,17 (1H, d, J=2,2)	6,15 (1 H, d, J=1,8)
8	6,36 (1 H, d, J=2,2)	6,34 (1H, d, J=1,8)

( $\delta$ -skala gitt i enheten ppm). \* Tilordning kan byttes om



**Tabell 5.27:  $^{13}\text{C}$  NMR spektraldata for 3-O- $\beta$ -D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin**

Posisjon	Observert	Litteratur (Korul'kina et al. 2004)
6''	63,6	62,1
2''	73,2	68,0
3''	70,1	71,2
4''	74,5	72,6
5''	75,0	73,1
8	94,8	94,0
6	100,0	99,6
1''	105,5	102,6
4a	105,5	103,0
2' og 6' *	110,0	108,7
2''' og 6''' *	110,1	108,8
1' *	121,1	118,9
1''' *	121,7	119,7
3	135,8	133,6
4' *	138,2	137,5
4''' *	139,8	139,2
3' og 5' *	146,3	145,7
3''' og 5''' *	146,3	145,8
2	158,3	156,1
8a	158,7	156,6
5	162,8	161,1
7	166,0	165,7
Galloyl C=O	168,0	166,9
4	179,3	177,0

$\delta$ -skala gitt i enheten ppm. \* Tilordning kan byttes om

**Tabell 5.28: COSY- og HSQC spektraldata for 3-O-β-D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin**

COSY (viser koblingen mellom proton og proton)	
6,17/6,36	Kobling mellom H-6/H-8
5,19/3,87	Koblinger mellom H-1''/H-2''
3,92-4,32 / 3,92-4,32 (signalene ligger tett oppå hverandre)	Kobling mellom H-3''/H-4''/H-5/H-6''a/H-6''b
HSQC (viser koblingen mellom karbon og proton)	
7,35/110,0 *	Kobling mellom H-2' og H-6'/C-2' og C-6'
6,90/110,1(gallesyre) *	Kobling mellom H-2''' og H-6'''/C-2''' og C-6'''
6,36/94,8	Kobling mellom H-8/C-8
6,17/100,0	Kobling mellom H-6/C-6
5,19/105,5	Kobling mellom H-1''/C-1''
3,87/73,2	Kobling mellom H-2''/C-2''
3,92/70,1	Kobling mellom H-3''/C-3''
3,62/74,5	Kobling mellom H-4''/C-4''
3,3,83/3,75	Kobling mellom H-5''/C-5''
4,26 /63,3*	Kobling mellom H-6''a/C-6''
4,32/63,3*	Kobling mellom H-6''b/C-6''

δ-skala gitt i enheten ppm. \* Tilordning kan byttes om

#### 5.14.4 Bioassay

##### *DPPH-test*

3-O-β-D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin ble testet for radikalscavenging (se tabell 5.29). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $IC_{50} = 3,6 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$  eller  $11,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.29: DPPH-test på 3-O-β-D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette (μM)	Scavengeraktivitet (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> (μM)
10	166,7	94,4	0,3	10,6 ± 3,2
5	83,3	94,8	0,2	
2,5	41,7	94,4	0,2	
1,25	20,8	89,2	1,3	
0,625	10,4	48,9	14,6	

0,3125	5,2	27,4	4,4	
--------	-----	------	-----	--

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

IC<sub>50</sub>-verdien for 3-*O*-β-D-(6''-*O*-galloylgalaktopyransyl)-myricetin var 10,6 ± 3,2 μM (på vektbasis 6,7 ± 2,0 μg/ml). Denne verdien var nesten dobbelt så stor som quercetin sin IC<sub>50</sub>-verdi, og stoffet viste seg dermed å være en litt dårligere radikalscavenger. Det isolerte stoffet viste å ha konsentrasjonsavhengig scavengeraktivitet. IC<sub>50</sub>-verdien stemte godt med en tidligere rapportert verdi på 12,59 μM (Yoshimura et al. 2008).

### **15-LOX hemming**

Det ble utført 15-LOX hemming på 3-*O*-β-D-(6''-*O*-galloylgalaktopyransyl)-myricetin (se tabell 5.30). Quercetin ble benyttet som positiv kontroll (IC<sub>50</sub> = 21,7 ± 2,2 μg/ml eller 72 ± 7,4 μM).

**Tabell 5.30: 15-LOX hemming på 3-*O*-β-D-(6''-*O*-galloylgalaktopyransyl)-myricetin**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette (μM)	Hemming (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> (μM)
10	166,7	85,3	6,2	75 ± 7
5	83,3	54,3	3,2	
2,5	41,7	27,3	6,1	

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

3-*O*-β-D-(6''-*O*-galloylgalaktopyransyl)-myricetin hadde en IC<sub>50</sub>-verdi på 75 ± 7 μM (på vektbasis 47,1 ± 4,7 μg/ml). På molbasis er det like effektivt som den positive kontroll quercetin, på vektbasis noe svakere. Resultatene fra tabellen viste at det isolerte stoffet ga konsentrasjonsavhengig hemming av 15-LOX. Det ser ikke ut til at 3-*O*-β-D-(6''-*O*-galloylgalaktopyransyl)-myricetin tidligere er rapportert som 15-LOX hemmer.

### **XO-hemming**

3-*O*-β-D-(6''-*O*-galloylgalaktopyransyl)-myricetin ble testet for XO-hemming (se tabell 5.31). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC<sub>50</sub> = 0,8 ± 0,2 μg/ml eller 2,8 ± 0,6 μM).

**Tabell 5.31: XO-hemming på 3-O-β-D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette (μM)	Hemming (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> (μM)
10	166,7	24,7	9	>>166,7

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

Verdiene i tabellen viste at 3-O-β-D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin var tilnærmet inaktiv ved høyeste målte konsentrasjon. IC<sub>50</sub>-verdien var større enn 166,7 μM (på vektbasis 105,4 μg/ml). Dette tydet på at 3-O-β-D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin er en dårlig XO-hemmer. Det er ikke funnet tidligere undersøkelser av XO-hemming av 3-O-β-D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin.

### 5.14.5 Videre arbeid

På bakgrunn av NMR-spektrene så det ut til at fraksjon D5S5V4V4 var mest interessant av de andre fraksjonene fra D5S4V4. Den ble derfor valgt ut til videre opprensing.

## 5.15 Separasjon av fraksjon D5S5V4V4

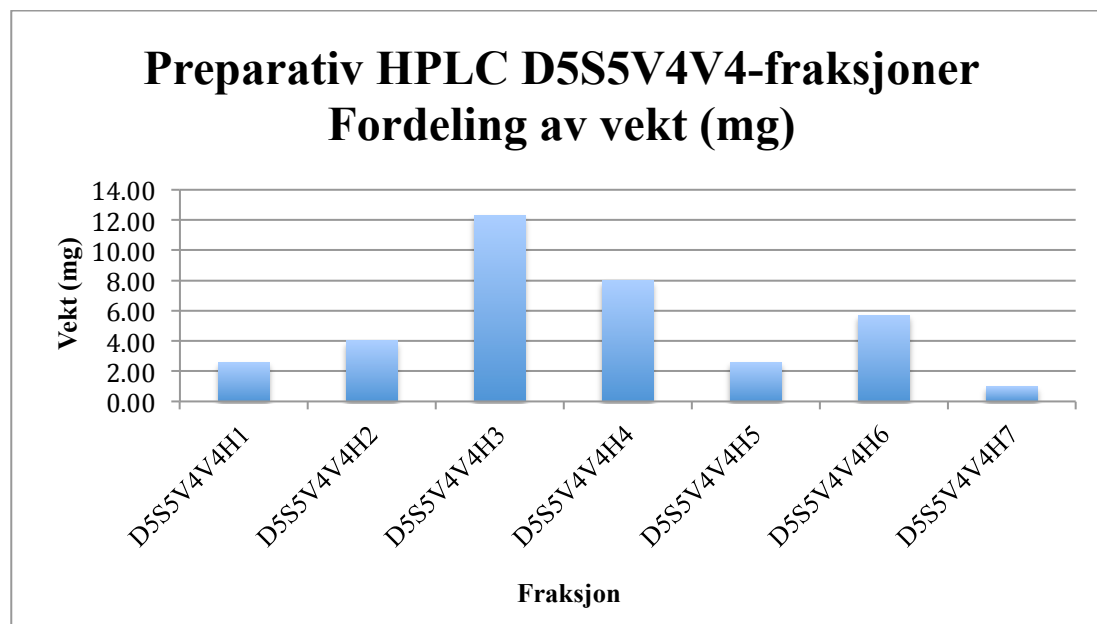
### 5.15.1 Analytisk HPLC

Fraksjon D5S5V4V4 ble analysert på analytisk HPLC for å finne egnet eluering til preparativ HPLC. Kromatogrammet fra analytisk HPLC viste god separasjon av 5 topper, hvorav en stor topp ved retensjonstiden 24,4 minutter tydelig skilte seg ut fra de andre. Siden toppene i kromatogrammet viste god separasjon mellom seg, ble samme gradienteluering benyttet til videre separasjon av fraksjon D5S5V4V4 med preparativ HPLC.

### 5.15.2 Preparativ HPLC

35,4 mg av fraksjon D5S5V4V4 ble løst i ACN-vann (50:50) og injisert på C<sub>18</sub>-kolonne. Det ble samlet totalt 35 kolonnefraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC ble slått sammen til 7 hovedfraksjoner (D5S5V4V4H1-D5S5V4V4H7). Fraksjon D5S5V4V4H3, D5S5V4V4H4 og D5S5V4V4H6 var de største fraksjonene (se figur 5.26). De første fraksjonene inneholdt sannsynligvis mer polare stoffer, siden de kom ut av kolonnen med en mobilfasesammensetning med mindre mengde av organisk løsemiddel (ACN med 0,1 % TFA). Det samlede utbytte var 36,2 mg (102,3 % av påsatt mengde). Siden fraksjonene ble

veid inn rett etter inndamping på rotavapor og oljepumpe, kunne vekten av fraksjonene være litt for stor på grunn av små vannrester i fraksjonene.



**Figur 5.26: Utbytte av fraksjoner fra D5S5V4V4**

### 5.15.3 NMR-spektroskopi

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR av alle fraksjoner. Fraksjon D5S5V4V4H1 så ut til å kunne inneholde 3-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin med signaler ved 5,18-7,38 ppm og 3,30-4,31 ppm. Fraksjonen var ikke ren, i tillegg til at det ble observert noen signaler i fettområdet.

Fraksjon D5S5V4V4H2 så ut som en blanding av flere flavonoider med flere signaler i aromat- og olefinområdet (5,02-7,78 ppm) og karbohydratområdet (3,30-4,85 ppm).

Spektret til fraksjon D5S5V4V4H3 tydet på å inneholde myricetin 3-*O*-glukuronid som hovedkomponent. Det ble observert signaler ved 5,10-7,78 ppm og 3,30-4,85 ppm, i tillegg til to signaler i fettområdet (0,96 ppm og 1,28 ppm). Fraksjon D5S5V4V4H4 viste å inneholde det samme stoffet som i fraksjon D5S5V4V4H3, men dette spektret var litt mindre rent. Det var dermed mest interessant å gå videre med fraksjon D5S5V4V4H3.

Fraksjon D5S5V4V4H5 så ut til å inneholde myricetin 3-*O*-rhamnosid (se figur 5.20).  $^1\text{H}$  NMR-spektret viste signaler ved 6,94 ppm, 6,37 ppm, 6,21 ppm, 5,31 ppm, 3,30-4,21 ppm og

0,95 ppm. Spektret hadde likt spekter som tidligere isolert myricetin 3-*O*-rhamnosid (se avsnitt 5.10.3 og 5.10.4 for myricetin 3-*O*-rhamnosid og bioassay).

Fraksjon D5S5V4V4H6 og D5S5V4V4H7 var uinteressante fraksjoner for videre arbeid.

#### **5.15.4 Videre arbeid**

På bakgrunn av NMR-spektrene så det ut til at fraksjon D5S5V4V4H3 var mest interessant. Fraksjonen ble derfor valgt ut til videre opprensing. Fraksjon D5S5V4V4H5 ble ikke prioritert til opprensing siden myricetin 3-*O*-rhamnosid allerede hadde blitt identifisert i en annen fraksjon tidligere.

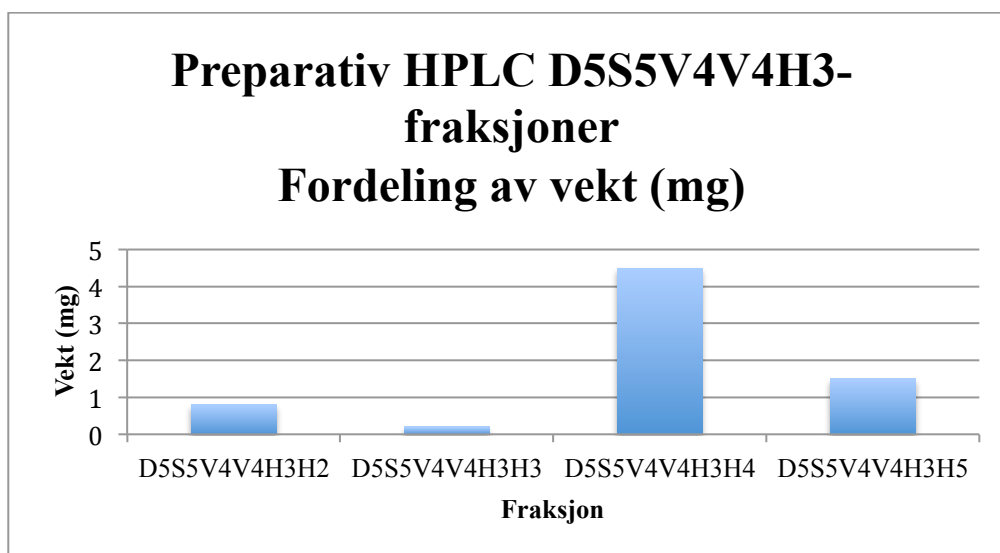
### **5.16 Separasjon av fraksjon D5S5V4V4H3**

#### **5.16.1 Analytisk HPLC**

Fraksjon D5S5V4V4H3 ble analysert på analytisk HPLC for å finne egnet mobilfase til preparativ HPLC. Kromatogrammet fra analytisk HPLC viste god separasjon av 5 topper, hvor en stor topp ved retensjonstiden 16,7 minutter tydelig skilte seg fra de andre små toppene. Siden toppene i kromatogrammet viste god separasjon mellom seg, ble samme gradienteluering benyttet til videre separasjon av fraksjon D5S5V4V4H3 med preparativ HPLC.

#### **5.16.2 Preparativ HPLC**

5,5 mg av fraksjon D5S5V4V4H3 ble løst i ACN-vann (50:50) og injisert på en C<sub>18</sub>-kolonne. Kolonnefraksjoner ble samlet opp basert på absorbanstopper som ble detektert underveis i elueringen, og 6 hovedfraksjoner totalt ble samlet opp (D5S5V4V4H3H1-D5S5V4V4H3H6). Fraksjon D5S5V4V4H3H4 var den største fraksjonen (se figur 5.27). Fraksjon D5S5V4V4H3H1 og D5S5V4V4H3H6 ble forkastet, da kromatogrammet fra HPLC viste at de var helt tomme (ingen topper detektert i kromatogrammet). Det samlede utbyttet var 7 mg (127,3 % av påsatt mengde). Det kan ha vært små vannrester i fraksjonene som førte til avvik i innveiingen.



*Figur 5.27: Utbytte av fraksjoner fra D5S5V4V4H3*

### 5.16.3 NMR-spektroskopi

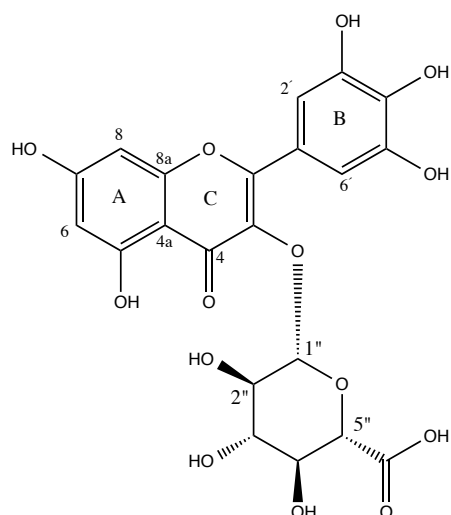
$^1\text{H}$  NMR ble tatt av fraksjon D5S5V4V4H3H2-D5S5V4V4H3H5 og  $^{13}\text{C}$  NMR av fraksjon D5S5V4V4H3H4 og D5S5V4V4H3H5.

Spektrene til fraksjon D5S5V4V4H3H2 og D5S5V4V4H3H3 var tomme med få signaler i fettområdet. Det ble observert mye støy, og disse fraksjonene ble vurdert som uinteressante.

Spektrene til fraksjon D5S5V4V4H3H4 og D5S5V4V4H3H5 viste å ha mange likheter, men den sistnevnte fraksjonen så ut til å ha mindre rent stoff. Fraksjon D5S4V4V4H3H4 ble identifisert som myricetin 3-*O*-glukuronid. Identifiseringen var basert på tolkning av NMR-spektre, og ved sammenligning med litteraturodata.

### 5.16.4 Myricetin 3-*O*-glukuronid

Myricetin 3-*O*-glukuronid (se figur 5.28) er ikke tidligere rapportert i *S. guineense*. Dette ble undersøkt i Scifinder. Dette stoffet er tidligere blitt isolert fra en rekke planter, for eksempel frukter av planten *Diospyros virginiana* L., hvor det har vist antimykotisk og antibakteriell effekt (Rashed et al. 2014).



**Figur 5.28: Molekylstruktur av myricetin 3-O-glukuronid**

Tolkning av spektraldata for isolert myricetin 3-O-glukuronid (se vedlegg, NMR-spekter 19 og 20) er gitt i tabell 5.32 og 5.33 med sammenligning av våre spektraldata med referansedata for myricetin 3-O-glukuronid (Hilbert et al. 2015; Rashed et al. 2014). Ulikheter i skiftverdier kan skyldes ulike løsningsmidler.

**Tabell 5.32:  $^1\text{H}$  NMR spektraldata for myricetin 3-O-glukuronid**

Posisjon	Observervert	Litteratur (Hilbert et al. 2015)
2''-5''	3,42-3,79 (4 H, m)	3,40-3,80 (4 H, m)
1''	5,18 (1 H, d, J=6,6)	5,27 (1 H, d, J=7,3)
6	6,21 (1 H, d, J=2,2)	6,22 (1 H, d, J=2,1)
8	6,40 (1 H, d, J=2,0)	6,42 (1 H, d, J=2,1)
2' og 6'	7,30 (2 H, s)	7,32 (2 H, s)

( $\delta$ -skala gitt i enheten ppm)

**Tabell 5.33:  $^{13}\text{C}$  NMR spektraldata for myricetin 3-O-glukuronid**

Posisjon	Observervert	Litteratur (Rashed et al. 2014)
4''	73,1-74,3	73,4
2''		75,6
5''		78,5
3''		78,3
1''	104,8	104,3
2' og 6'	109,9	108,9



4a		104,8
8a	158,7	158,4
8	99,9	99,6
7	168,2	165,9
6	94,7	94,6
5		162,7
4		177,5
3	136,9	137,6
2		148,3
4'		137,2
3' og 5'	146,6	146,9
6" (C=O)		174,5

( $\delta$ -skala gitt i enheten ppm)

Andre signaler i spektrene tydet på at stoffet ikke var helt rent. For eksempel ble det observert signaler ved 7,22 ppm, 6,89 ppm, 1,29 ppm og 1,99 ppm i  $^1\text{H}$  NMR-spektret. I  $^{13}\text{C}$  NMR-spektret ble det observert flere signaler som tydet på urenheter, og på grunn av lite stoff var signal-støyforholdet dårlig, så en del av toppene i spektret ble trolig ikke detektert.

## 5.16.5 Bioassay

### *DPPH-test*

Myricetin 3-*O*-glukuronid ble testet for radikalscavenging (se tabell 5.34). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $\text{IC}_{50} = 3,6 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$  eller  $11,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.34: DPPH-test på myricetin 3-*O*-glukuronid**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{M}$ )	Scavengeraktivitet (%)	SD (%)	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
5	83,3	49,3	12	85 $\pm$ 33
2,5	41,7	22,2	10,2	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

$\text{IC}_{50}$ -verdien for myricetin 3-*O*-glukuronid var  $85 \pm 33 \mu\text{M}$  (på vektbasis  $42 \pm 16 \mu\text{g/ml}$ ). Denne verdien var mye større enn quercetin sin  $\text{IC}_{50}$ -verdi, og stoffet hadde dermed å være en dårlig radikalscavenger. Det isolerte stoffet viste å ha konsentrasjonsavhengig scavengeraktivitet. En tidligere verdi for DPPH-scavenging av myricetin-*O*-glukuronid er

funnet i litteraturen (Furusawa et al. 2003). Denne verdien,  $IC_{50} = 1,9 \mu\text{M}$ , stemmer svært dårlig med vår verdi. Furusawas verdier for andre substanser avviker imidlertid sterkt fra andre litteraturverdier.

### **15-LOX hemming**

Det ble utført 15-LOX hemming på myricetin 3-*O*-glukuronid (se tabell 5.35). Quercetin ble benyttet som positiv kontroll ( $IC_{50} = 21,7 \pm 2,2 \mu\text{g/ml}$  eller  $72 \pm 7,4 \mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.35: 15-LOX hemming på myricetin 3-*O*-glukuronid**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{M}$ )	Hemming (%)	SD (%)	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
5	83,3	-9,3	7,4	>> 83,3

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

Verdiene i tabellen viste at myricetin 3-*O*-glukuronid var tilnærmet inaktiv ved høyeste målte konsentrasjon.  $IC_{50}$ -verdien var større enn  $83,3 \mu\text{M}$  (på vektbasis  $41,2 \mu\text{g/ml}$ ). Dette tydet på at myricetin 3-*O*-glukuronid er en dårlig hemmer av 15-LOX. Ingen tidligere undersøkelser av 15-LOX hemming av myricetin 3-*O*-glukuronid er funnet.

### **XO-hemming**

Myricetin 3-*O*-glukuronid ble testet for XO-hemming (se tabell 5.36). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $IC_{50} = 0,8 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$  eller  $2,8 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.36: XO-hemming på myricetin 3-*O*-glukuronid**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{M}$ )	Hemming (%)	SD (%)	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
5	83,3	-24,9	17,8	>> 83,3
5	83,3	4	5,2	
2,5	41,7	6,3	5,1	

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

Verdiene i tabellen viste at myricetin 3-*O*-glukuronid var tilnærmet inaktiv ved høyeste målte konsentrasjon. Ut ifra tallene fra tabellen kunne det se ut til at det isolerte stoffet induserte enzymaktiviteten. Dette burde vært undersøkt nærmere, men ble ikke prioritert på grunn av for lite stoff. Det ble foreløpig konkludert at stoffet ikke hadde hemmende effekt på XO.  $IC_{50}$ -verdien kunne ikke beregnes, men var tydeligvis større enn  $83,3 \mu\text{M}$  (på vektbasis  $41,2$

µg/ml). Ingen tidligere studier av hemmingseffekten av myricetin 3-*O*-glukuronid på XO er funnet.

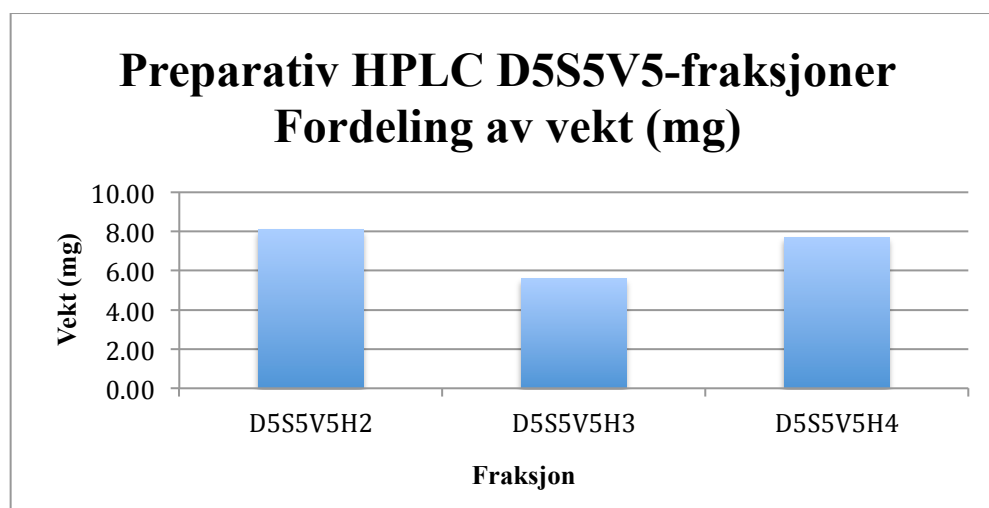
## 5.17 Separasjon av fraksjon D5S5V5

### 5.17.1 Analytisk HPLC

Fraksjon D5S5V5 ble analysert på HPLC for å finne egnet eluering til preparativ HPLC. Kromatogrammet fra analytisk HPLC viste en rekke topper med god separasjon mellom dem. To av toppene var store og skilte seg fra de andre, mindre toppene. Retensjonstidene til disse hovedtoppene var ved 5,8 minutter og 10,5 minutter. Disse toppene inneholdt sannsynligvis mer polare stoffer enn de toppene som kom senere i kromatogrammet.

### 5.17.2 Preparativ HPLC

22 mg av fraksjon D5S5V5 ble løst i ACN-vann (50:50) og injisert på C<sub>18</sub>-kolonne. Det ble samlet totalt 30 kolonnefraksjoner som ble slått sammen til 5 hovedfraksjoner (D5S5V5H1-D5S5V5H5) basert på resultater fra analytisk TLC. Fraksjon D5S5V5H2 var den største fraksjonen (se figur 5.29). Det samlede utbyttet var 21,4 mg (97,3 % av påsatt mengde). Fraksjon D5S5V5H1 og D5S5V5H5 ble forkastet fordi de ikke absorberte ved den anvendte bølgelengden og derfor ble ansett som uinteressante.



Figur 5.29: Utbytte av fraksjoner fra D5S5V5

## 5.18 Separasjon av fraksjon D5S5V6

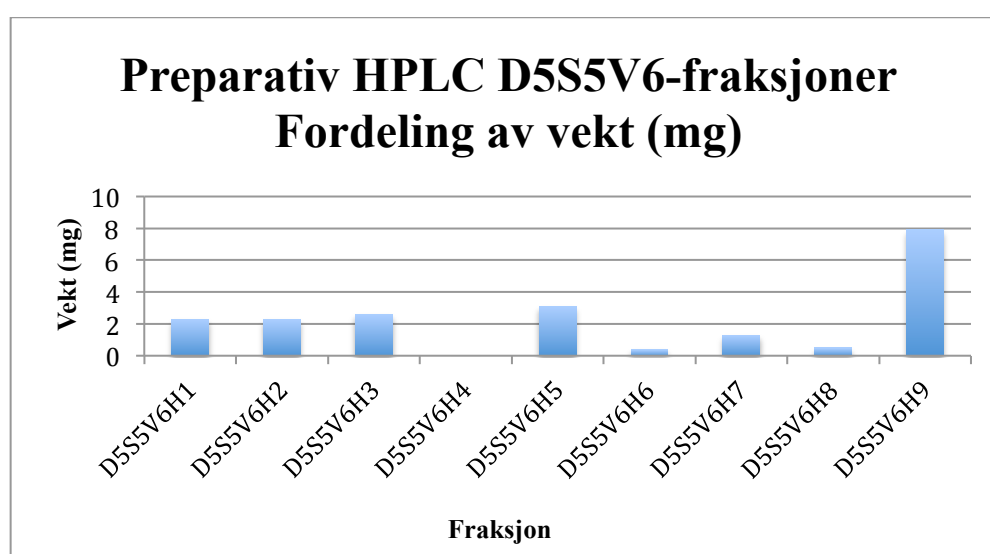
### 5.18.1 Analytisk HPLC

Fraksjon D5S5V6 ble analysert på analytisk HPLC for å finne egnet eluering til preparativ HPLC. Kromatogrammet fra analytisk HPLC viste tre topper ved retensjonstidene 8,5 minutter, 15,8 minutter og 25 minutter. Toppen ved 25 minutter var størst. Dette kunne muligens være hovedstoffet i fraksjonen. Siden toppen kom senere i elueringen, tydet det på et mindre polart stoff i forhold til de toppene som kom tidligere i kromatogrammet. Toppene var ellers godt separert fra hverandre, og samme gradienteluering ble derfor benyttet til preparativ HPLC.

### 5.18.2 Preparativ HPLC

28,1 mg av fraksjon D5S5V6 ble løst i ACN-vann (50:50) og injisert på C<sub>18</sub>-kolonne. Det ble samlet totalt 30 kolonnefraksjoner som ble slått sammen til 9 hovedfraksjoner (D5S5V6H1-D5S5V6H9) basert på resultater fra analytisk TLC. Fraksjon D5S5V6H9 var tydelig den største fraksjonen (se figur 5.30).

Det samlede utbyttet var 20,4 mg (72,6 % av påsatt mengde). Det lave utbyttet kom muligens av at noe stoff ble igjen i kolonnen. I kromatogrammet så det ut til at flere topper kunne detekteres etter 30 minutter (elueringstiden). Ved å bruke 100% ACN kunne det tenkes at mer stoff ville blitt eluert ut av kolonnen og gitt større utbytte.



Figur 5.30: Utbytte av fraksjoner fra D5S5V6

### 5.18.3 NMR-spektroskopi

Fraksjon D5S5V6H1 var svært blandet og hadde kompliserte signaler i aromat- og olefinområdet og karbohydratområdet. Fraksjon D5S5V6H2 og D5S5V6H3 lignet hverandre, men spektret til fraksjon D5S5V6H3 var mer uren. Disse to fraksjonene så ut til å inneholde et ukjent flavonoid med signaler i aromat- og olefinområdet, men siden signalene var små, tydet det på lite innhold av stoffet. Disse fraksjonene veide også svært lite. Fraksjon D5S5V6H4 var tom mens fraksjon D5S5V6H6 for det meste inneholdt fett og urenheter. Disse fraksjonene var uinteressante.

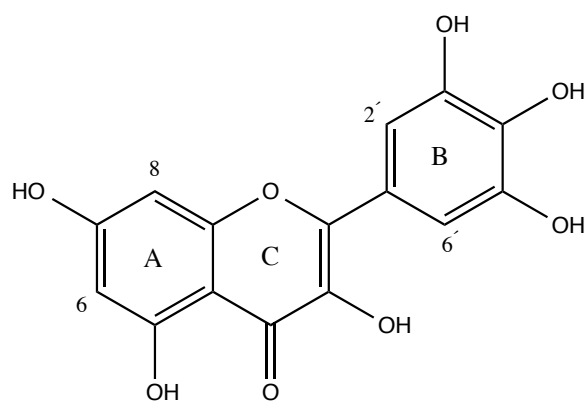
Fraksjon D5S5V6H5 inneholdt muligens et ukjent flavonoid med signaler ved 5,17-7,48 ppm (aromat- og olefinområdet) og 3,30-4,85 ppm (karbohydratområdet). Disse signalene var svært små, noe som tydet på små mengder.

Fraksjon D5S5V6H7 og D5S5V6H8 kunne muligens inneholde myricetin aglykon. Signaler ble observert ved 6,18 ppm, 6,37 ppm og 6,37 ppm.

Spektret til fraksjon D5S5V6H9 var renere enn fraksjon D5S5V6H7, D5S5V6H8 og D5S5V6H9 ble identifisert som myricetin. Identifiseringen var basert på tolkning av NMR-spektret og ved sammenligning med litteraturopplysninger.

### 5.18.4 Myricetin

Det ser ikke ut til at myricetin er funnet tidligere i *S. guineense*. Dette ble undersøkt i databasen Scifinder. Myricetin (se figur 5.31) er et flavonol som finnes i et stort antall planter, blant annet svart te og grønnsaker som gulrot, brokkoli, bønnespirer og blomkål. Tidligere studier har vist at myricetin har høy antioksidant- og radikalscavenging aktivitet (Miean og Mohamed 2001).



**Figur 5.31: Molekylstruktur av myricetin**

Tolkning av spektraldata for isolert myricetin (se vedlegg, NMR-spekter 21) er gitt i tabell 5.37 med sammenligning av våre spektraldata med referansedata for myricetin (Korul'kina et al. 2004).  $^1\text{H}$  NMR spektret ga sikre nok data for å identifisere fraksjonen som myricetin og  $^{13}\text{C}$  NMR ble derfor ikke prioritert.

**Tabell 5.37:  $^1\text{H}$  NMR spektraldata for myricetin**

Posisjon	Observert	Litteratur (Korul'kina et al. 2004)
6	6,18 (1 H, d, J=2,1)	6,17 (1 H, d, J=2,0)
8	6,38 (1 H, d, J=2,2)	6,37 (1 H, d, J=2,0)
2' og 6'	7,34 (2 H, s)	7,34 (2 H, s)

( $\delta$ -skala gitt i enheten ppm)

Mindre signaler i spektret tydet på at stoffet ikke var helt rent. For eksempel ble det observert signaler i alifatområdet som kunne tyde på fett (0,91-1,93 ppm).

### 5.18.5 Bioassay

Det er tidligere gjort en del DPPH-tester på myricetin, og noen studier på 15-LOX hemming og XO-hemming. Dette ble undersøkt i Scifinder.

#### **DPPH-test**

Myricetin ble testet for radikalscavenging (se tabell 5.38). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $\text{IC}_{50} = 3,6 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$  eller  $11,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.38: DPPH-test på myricetin**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{M}$ )	Scavengeraktivitet (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
5	83,3	77,7	14,3	41 $\pm$ 6
2,5	41,7	50,4	5,7	
1,25	20,8	23,1	5,2	

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

IC<sub>50</sub>-verdien for myricetin var 41  $\pm$  6  $\mu\text{M}$  (på vektbasis 13,0  $\pm$  1,9  $\mu\text{g/ml}$ ). Denne verdien var noe høyere enn quercetin sin IC<sub>50</sub>-verdi, og stoffet viste seg dermed ikke å være en så veldig god radikalscavenger. Det isolerte stoffet viste å ha konsentrasjonsavhengig scavengeraktivitet. IC<sub>50</sub>-verdien fra denne undersøkelsen stemte ikke overens med tidligere funn (9,9  $\mu\text{M}$ ) (Hsieh og Chang 2010).

### **15-LOX hemming**

Det ble utført 15-LOX hemming på myricetin (se tabell 5.39). Quercetin ble benyttet som positiv kontroll (IC<sub>50</sub> = 21,7  $\pm$  2,2  $\mu\text{g/ml}$  eller 72  $\pm$  7,4  $\mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.39: 15-LOX hemming på myricetin**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{M}$ )	Hemming (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
5	83,3	7,6	5	> 83,3

(Kons.=konsentrasjon, SD=standardavvik)

Verdiene i tabellen viste at myricetin hadde lav hemmingsaktivitet ved høyeste målte konsentrasjon. IC<sub>50</sub>-verdien måtte være større enn 83,3  $\mu\text{M}$  (på vektbasis 26,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Dette tydet på at myricetin er en dårlig hemmer av 15-LOX. IC<sub>50</sub>-verdien stemte ikke overens med tidligere funn, med en IC<sub>50</sub>-verdi på 73  $\mu\text{M}$  (Robak et al. 1988).

### **XO-hemming myricetin**

Myricetin ble testet for XO-hemming (se tabell 5.40). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC<sub>50</sub> = 0,8  $\pm$  0,2  $\mu\text{g/ml}$  eller 2,8  $\pm$  0,6  $\mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.40: XO-hemming på myricetin**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{M}$ )	Hemming (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
5	83,3	85,8	2,3	8,1 $\pm$ 0,7
2,5	41,7	76,9	0,9	
1,25	20,8	74,6	1,8	
0,625	10,4	56,5	1,3	
0,3125	5,2	38,2	3,7	

(Kons. =konsentrasjon, SD=standardavvik)

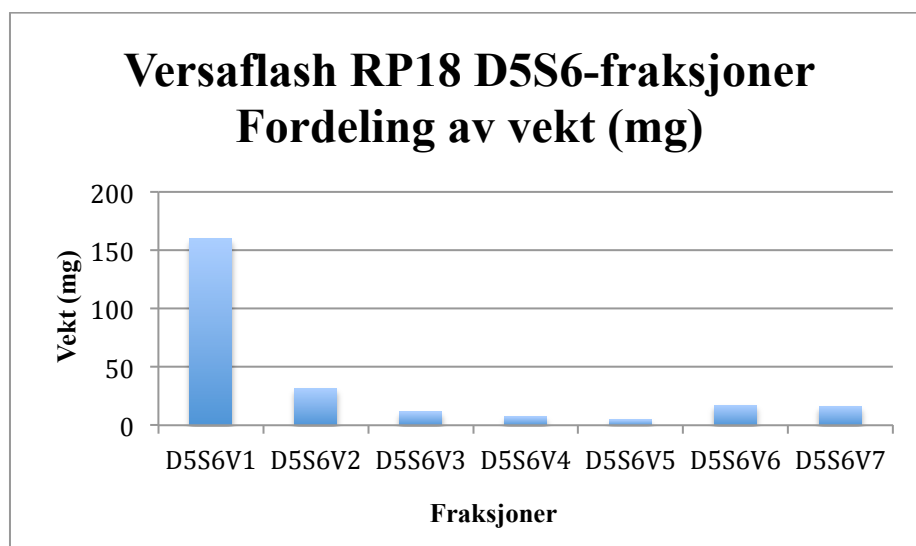
Verdiene i tabellen viste at myricetin hadde en konsentrasjonsavhengig hemming av XO. IC<sub>50</sub>-verdien til myricetin var 8,1  $\pm$  0,7  $\mu\text{M}$  (på vektbasis 2,6  $\pm$  0,2  $\mu\text{g/ml}$ ). Det isolerte stoffet var dermed en moderat hemmer av XO, da verdien var nesten fire ganger høyere enn for den positive kontrollen, quercetin. IC<sub>50</sub>-verdien fra vår undersøkelse stemte forholdsvis bra med resultatet fra en tidligere undersøkelse som hadde en verdi på 12,9  $\mu\text{M}$  (Hsieh og Chang 2010).

## **5.19 Separasjon av fraksjon D5S6**

### **5.19.1 Versaflash kolonne-separasjon**

Fraksjon D5SS6 ble applisert på en omvendt-fase kolonne. Det ble samlet opp 28 kolonnefraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC ble slått sammen til 7 hovedfraksjoner (D5S6V1-D5S6V7). Ca. 300 mg av fraksjon D5S6 ble applisert på kolonnen og det samlede utbyttet var 249,1 mg (83 % av påsatt mengde). Fraksjon D5S6V1 var tydelig den største fraksjonen (se figur 5.32). Siden denne fraksjonen kom ut av kolonnen først, inneholdt den stoffer som var mer polare enn de stoffene i fraksjonene som kom senere.





*Figur 5.32: Utbytte av fraksjoner fra D5S6*

### 5.19.2 NMR-spektroskopi

Alle fraksjoner ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR. Det ble også tatt  $^{13}\text{C}$  NMR av fraksjon D5S6V1.

Spektrene til fraksjon D5S6V1 tydet på at fraksjonen inneholdt 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose. I  $^1\text{H}$  NMR-spektret ble signaler observert i aromat- og olefinområdet, (5 singletter, 5,57-7,86 ppm) og karbohydratområdet (3,5-5,6 ppm).  $^{13}\text{C}$  NMR-spektret viste signaler ved 63,2-168,0 ppm. NMR-spektrene var ikke rene, men fraksjonen var mest interessant.

Fraksjon D5S6V2 viste å være lik fraksjon D5S6V1, men her var signalene mye svakere.

Fraksjon D5S6V3 var svært uren og hadde komplekse signaler i aromat- og olefinområdet, karbohydratområdet og fettområdet. Denne var dermed mindre interessant.

Fraksjon D5S6V6 viste signaler ved 6,17 ppm, 6,37 ppm og 7,34 ppm og 3,30-3,64 ppm. Dette kunne muligens være uren myricetin. Myricetin var allerede identifisert tidligere og fraksjonen ble dermed ikke prioritert til videre arbeid.

Fraksjon D5S6V4, D5S6V5 og D5S6V7 var uinteressante fraksjoner.

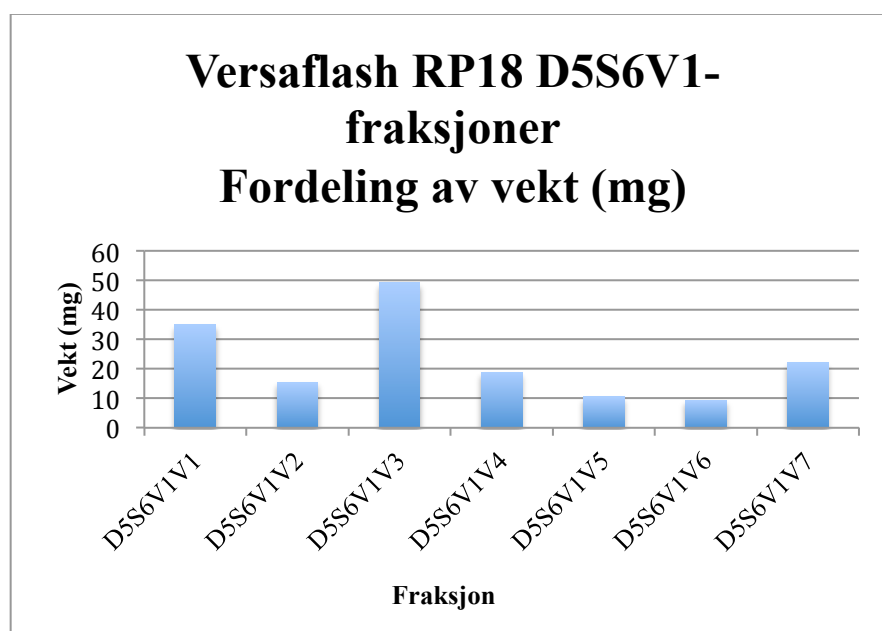
### 5.19.3 Videre arbeid

Fraksjon D5S6V1 veide mest (største fraksjonen) og virket mest interessant ut fra NMR-spektrene. Fraksjonen ble dermed prioritert til videre opprensing.

## 5.20 Separasjon av fraksjon D5S6V1

### 5.20.1 Versaflash kolonne-separasjon

Fraksjon D5S6V1 ble applisert på en omvendt-fase kolonne. Det ble samlet opp 26 kolonnefraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC ble slått sammen til 7 hovedfraksjoner (D5S6V1V1-D5S6V1V7). Ca. 150 mg av fraksjon D5S6V1 ble applisert på kolonnen og det samlede utbyttet var 160,2 mg (106,8 % av påsatt mengde). Fraksjon D5S6V1V1 og D5S6V1V3 var de største fraksjonene (se figur 5.33). Disse fraksjonene ble eluert ut av kolonnen først og inneholdt sannsynligvis mer polare stoffer enn de stoffene i fraksjonene som kom ut senere.



Figur 5.33: Utbytte av fraksjoner fra D5S6V1

### 5.20.2 NMR-spektroskopi

Alle fraksjoner ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR. D5S6V1V3 ble også analysert med  $^{13}\text{C}$  NMR.

Fraksjon D5S6V1V1, D5S6V1V4 og D5S6V1V5 viste komplekse signaler i karbohydratområdet og aromat- og olefinområdet. Disse var dermed mindre interessante.

Fraksjon D5S6V1V2 var ikke så ren, men viste seg å muligens inneholde 1,2,3,6-*a-O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose. Signaler ble observert ved 5,43-7,12 ppm (aromat- og olefinområdet; fire singletter ved 7,02-7,12 ppm) og 4,5-6,0 ppm (karbohydratområdet). Det ble også observert et signal for alifatisk proton ved 1,29 ppm. Denne fraksjonen var dermed interessant for videre separasjon og opprensing.

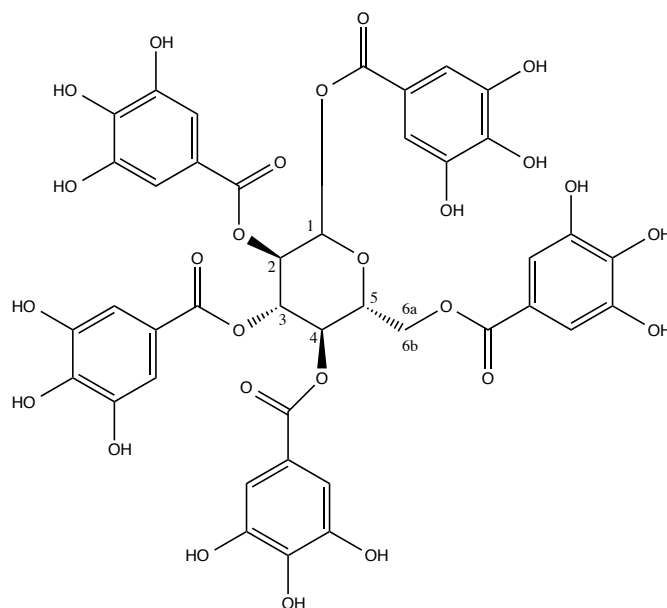
Fraksjon D5S6V1V3 ble identifisert som 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose. Identifiseringen var basert på tolkning av NMR-spektrene og ved sammenligning med litteraturdata.

Fraksjon D5S6V1V6 var ikke veldig ren, men så ut til å inneholde myricetin. Signaler ble observert ved 6,17 ppm, 6,37 ppm og 7,34 ppm. Dette stoffet var tidligere isolert fra fraksjon D5S5V6H9 (se avsnitt 5.18.4 og 5.18.5 for myricetin og bioassay).

Fraksjon D5S6V1V7 var uinteressant.

### 5.20.3 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose

Det ser ikke ut til at 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose er funnet tidligere i *S. guineense*. Dette ble undersøkt i databasen Scifinder. 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose (se figur 5.34) er en polyfenolisk forbindelse av type gallotannin som finnes mye av i en del planter. En rekke *in vitro* og noen få *in vivo* studier av stoffet har vist flere biologiske effekter. Det har vært diskutert om dette kan ha et potensiale for bruk i terapeutisk og forebyggende behandling av flere sykdommer, inkludert kreft og diabetes. 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose har også vist å ha anti-inflammatoriske og antioksidantegenskaper (Zhang et al. 2009).



**Figur 5.34: Molekylstruktur av 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glukose**

Tolkning av spektraldata for isolert 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glukose (se vedlegg, NMR-spekter 22 og 23) er gitt i tabell 5.41 og 5.42 med sammenligning av våre spektraldata med referansedata for 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glukose (Cho et al. 2010).

**Tabell 5.41:  $^1\text{H}$  NMR spektraldata for 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glukose**

Posisjon	Observert	Litteratur (Cho et al. 2010)
6a	4,37-4,41 (2 H, m)	4,35 (1 H, dd, J=4,5 og 10,2)
5		4,41 (1H, m)
6b	4,52 (1 H, d, J=10,3)	4,51 (1 H, d, J=10,2)
2	5,56 (1H, m)	5,57 (1 H, t, J=9,0)
4	5,62 (1 H, m)	5,60 (1 H, t, J=9,0)
3	5,91 (1 H, t, J=9,7)	5,90 (1 H, t, J=9,0)
1	6,23 (1H, d, J=8,3)	6,23 (1 H, d, J=9,0)
Galloyl proton	6,91 (2 H, s)	6,89 (2 H, s)
Galloyl proton	6,96 (2 H, s)	6,94 (2 H, s)
Galloyl proton	6,98 (2 H, s)	6,97 (2 H, s)
Galloyl proton	7,06 (2 H, s)	7,04 (2 H, s)
Galloyl proton	7,12 (2 H, s)	7,10 (2 H, s)

( $\delta$ -skala gitt i enheten ppm)

**Tabell 5.42:  $^{13}\text{C}$  NMR spektraldata for 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -*D*-glukose**

Posisjon	Observervert	Litteratur
1	63,1	63,3
4	69,9	70,0
2	72,2	72,4
3	74,1	74,3
5	74,4	74,6
1	93,9	94,0
Galloyl 2 og 6	110,4, 110,4, 110, 6, 110,6, 119,7	110,5, 110,6, 110,6, 110,6, 110,8, 120,0
Galloyl 1	120,2, 120,3, 120,4, 121,1	120,4, 120,4, 120,5, 121,2
Galloyl 4	140,2, 140,3, 140,8	140,2, 140,3, 140,5, 140,5, 140,9
Galloyl 3 og 5	146,3, 146,4, 146,5, 146,5, 146,6	146,4, 146,5, 146, 6, 146,6, 146,7
-COO-	166,2, 166,9, 167,0, 167,3, 168,0	166,4, 167,1, 167,2, 167,5, 168,1

( $\delta$ -skala gitt i enheten ppm)

Et svakt signal ble observert ved 1,29 ppm i  $^1\text{H}$  NMR-spektret, trolig på grunn av små mengder fett/alkaner, men i hovedsak virket stoffet nokså rent. I  $^{13}\text{C}$  NMR-spektret var det tre signaler som ikke ble observert (ett signal for galloyl 2 og 6, og to signaler for galloyl 1). Dette kunne komme av at signalene overlappet med andre slik at de ikke ble registrert.

## 5.20.4 Bioassay

### *DPPH*-test

1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -*D*-glukose ble testet for radikalscavenging (se tabell 5.43). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $\text{IC}_{50} = 3,6 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$  eller  $11,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ).

**Tabell 5.43: *DPPH*-test på 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -*D*-glukose**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette ( $\mu\text{M}$ )	Scavengeraktivitet (%)	SD (%)	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
10	166,7	91,5	0,3	
5	83,3	92,6	0,6	
2,5	41,7	93,4	0,1	

1,25	20,8	94	0,3	4,9 ± 1,1
0,625	10,4	88,7	0,9	
0,3125	5,2	52,4	8,3	
0,1563	2,6	23,3	7,2	

(Kons. =konsentrasjon, SD=standardavvik)

IC<sub>50</sub>-verdien for 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-glukose var 4,9 ± 1,1 μM (på vektbasis 4,6 ± 1,0 μg/ml). Denne verdien var nesten lik quercetin sin IC<sub>50</sub>-verdi. Tabellen viste at scavengeraktiviteten til det isolerte stoffet tilsynelatende økte ved konsentrasjoner fra 166,7 μM og ned til 20,8 μM, men siden aktiviteten bare økte med svært få prosent, ble det konkludert med at stoffet var en god radikalscavenger, da aktiviteten ble redusert ved måling av 10,4 μM og nedover til 2,6 μM.

IC<sub>50</sub>-verdien stemte ikke helt med et tidligere funn som hadde en noe lavere verdi, 1,68 ± 0,04 μM (Yokozawa et al. 1998). Disse forfatterne fant imidlertid også lavere verdi enn rapportert av andre for gallokatekin. Det er mulig at dette skyldes metodeforskjeller. Resultatene stemmer imidlertid godt med Al-Sayed et al. (2010) som fant en IC<sub>50</sub>-verdi på 5,5 ± 0,2 μM (Al-Sayed et al. 2010).

### **15-LOX hemming**

Det ble utført 15-LOX hemming på 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-glukose (se tabell 5.44). Quercetin ble benyttet som positiv kontroll (IC<sub>50</sub> = 21,7 ± 2,2 μg/ml eller 72 ± 7,4 μM).

**Tabell 5.44: 15-LOX hemming på 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-glukose**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette (μM)	Hemming (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> (μM)
10	166,7	117,3	13,5	25 ± 4
5	83,3	101,4	2	
2,5	41,7	76,2	1,9	
1,25	20,8	42	8,9	
0,625	10,4	17,7	12,7	

(Kons. =konsentrasjon, SD=standardavvik)

Verdiene i tabellen viste at 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-glukose hadde ganske høy hemmingsaktivitet, da IC<sub>50</sub>-verdien på molbasis var betydelig lavere enn quercetin sin IC<sub>50</sub>-

verdi. Stoffets IC<sub>50</sub>-verdi var 25 ± 4 μM (på vektbasis 23,5 ± 3,8 μg/ml). Det isolerte stoffet var dermed en god hemmer av 15-LOX. Dette ser ikke ut til å være rapportert tidligere.

### ***XO-hemming***

1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-glukose ble testet for XO-hemming (se tabell 5.45). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC<sub>50</sub> = 0,8 ± 0,2 μg/ml eller 2,8 ± 0,6 μM).

**Tabell 5.45: XO-hemming på 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-glukose**

Kons. (mM)	Kons. i kyvette (μM)	Hemming (%)	SD (%)	IC <sub>50</sub> (μM)
10	166,7	117,8	3,3	8,0 ± 1,4
0,625	10,4	63,5	6,1	
0,3125	5,2	27	12,9	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Verdiene i tabellen viste at 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-glukose hadde en konsentrasjonsavhengig hemming av XO. IC<sub>50</sub>-verdien til 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-glukose var 8,0 ± 1,4 μM (på vektbasis 7,5 ± 1,3 μg/ml). Denne verdien var høyere enn quercetin sin IC<sub>50</sub>-verdi. Det isolerte stoffet var likevel en relativ god hemmer av XO.

IC<sub>50</sub>-verdien var omtrent dobbelt så stor som verdien fra tidligere funn (Hayashi et al. 1989).

## **5.20.5 Videre arbeid**

NMR-spektrene viste at fraksjon D5S6V1V2 var mest interessant, da den kunne inneholde 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl-β-D-glukose. Fraksjonen ble dermed prioritert for opprensing.

## **5.21 Separasjon av fraksjon D5S6V1V2**

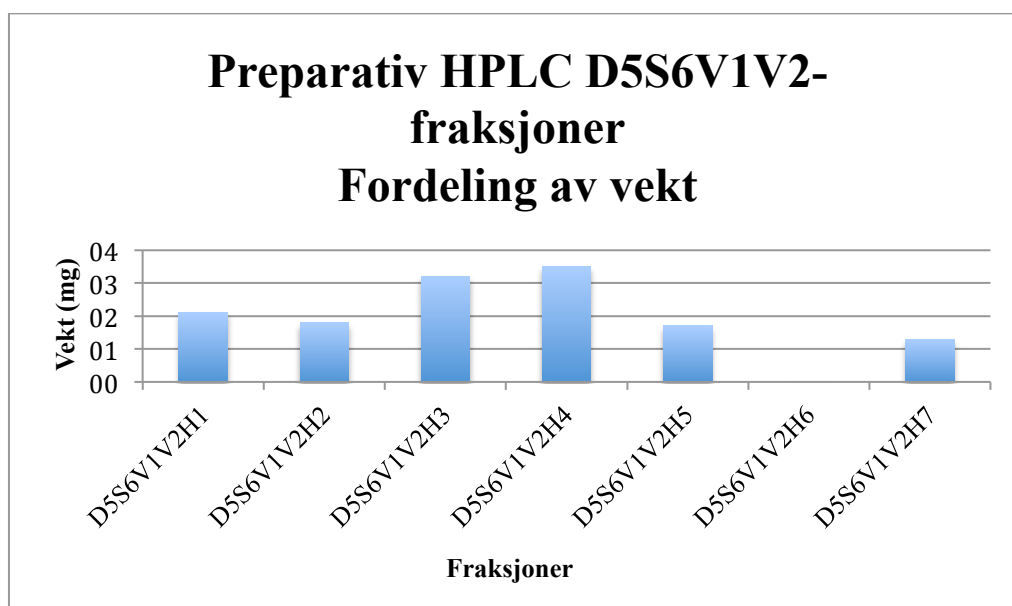
### **5.21.1 Analytisk HPLC**

Fraksjon D5S6V1V2 ble analysert på analytisk HPLC for å finne egnet eluering til preparativ HPLC. 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl-β-D-glukose har maksabsorpsjon ved ca. 278 nm. Ved 280 nm viste kromatogrammet fra analytisk HPLC to store topper ved retensjonstidene 20,7 minutter og 21,1 minutter. En av disse toppene kunne muligens komme fra 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl-β-D-glukose, og samme gradienteluering ble derfor benyttet til preparativ HPLC.

### 5.21.2 Preparativ HPLC

12 mg av fraksjon D5S6V1V2 ble løst i ACN-vann (50:50) og injisert på C<sub>18</sub>-kolonne, og det ble samlet totalt 30 kolonnefraksjoner som ble slått sammen til 7 hovedfraksjoner (D5S6V1V2H1-D5S6V1V2H7), basert på resultater fra analytisk TLC.

Det samlede utbyttet var 13,6 mg (88,9 % av påsatt mengde). Fraksjon D5S6V1V2H3 og D5S6V1V2H4 var de største fraksjonene (se figur 5.35).



Figur 5.35: Utbytte av fraksjoner fra D5S6V1V2

### 5.21.3 NMR-spektroskopi

<sup>1</sup>H NMR ble tatt opp av alle fraksjonene unntatt fraksjon D5S6V1V2H6, fordi den inneholdt for liten mengde.

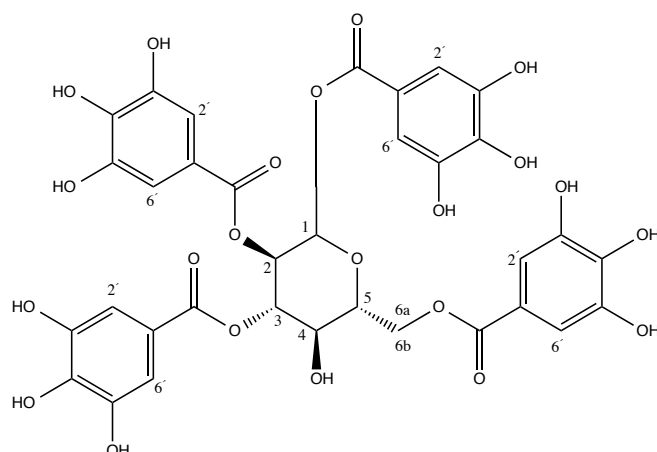
<sup>13</sup>C NMR ble også tatt opp av fraksjon D5S6V1V2H3. Denne fraksjonen ble identifisert som 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose. Signaler fra 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose forelå også i fraksjon D5S6V1V2H4, men denne fraksjonen var mer uren.

Fraksjon D5S6V1V2H1 og D5S6V1V2H2 var tomme og derfor uinteressante. Fraksjon D5S6V1V2H5 og D5S6V1V2H7 viste mye støy og det ble observert noen signaler i aromat- og olefinområdet, men fraksjonene var ikke rene og dermed mindre interessante.



#### 5.21.4 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose

1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose (se figur 5.36) er ikke tidligere rapportert i *S. guineense*. Dette ble undersøkt i Scifinder. Forbindelsen er langt mindre vanlig enn 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose, men har tidligere blitt isolert og identifisert i blant annet *Terminalia chebula* frukter (Mahajan og Pai 2010) og *Quercus infectoria* (Nishizawa et al. 1983).



Figur 5.36: 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose

Tolkning av spektraldata for isolert 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose er gitt i tabell 5.46 for  $^1\text{H}$  NMR og tabell 5.47 for  $^{13}\text{C}$  NMR. Tilordningen er foretatt ut fra skiftposisjoner, multiplisitet og koblingskonstanter (se vedlegg, NMR-spekter 24 og 25). Spektraldataen ble sammenlignet med spektraldata fra litteraturen (Fouad og Abdel-Hafeez 2009; Mahajan og Pai 2010). Avvik fra litteraturdata på  $^{13}\text{C}$  NMR kan skyldes forskjellige løsemidler (deuterert MeOH i vårt spektrum, deuterert aceton i litteraturen).

Tabell 5.46:  $^1\text{H}$  NMR spektraldata for 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose

Posisjon	Observert	Litteratur (Mahajan og Pai 2010)
Galloylgruppene	6,93, 7,02, 7,03, 7,12 (2 H for hver singlett)	6,99, 7,07, 7,08, 7,17 (2H, for hver singlett)
1	6,09 (1H, d, J=8,3)	6,11 (1H, d, J=12)
2	5,44 (1H, m)	5,44 (1 H, dt, J=8)
3	5,56 (1H, m)	5,57 (1H, d, J=12)
4	4,56 (1H, m)	4,56 (1 H, m)
5	Signalet lå under vanntoppen (ved 4,85)	4,65 (1H, m)
6a/6b	3,97 (2 H, d, J=8,4)	3,97 (2H, d, J=8)

$\delta$ -skala gitt i enheten ppm

Andre signaler i  $^1\text{H}$  NMR-spektret tydet på at stoffet ikke var helt rent. For eksempel ble det observert signaler i alifatområdet (2,65 ppm, 2,03 ppm, 1,30 ppm og 0,90 ppm).

**Tabell 5.47:**  $^{13}\text{C}$  NMR spektraldata for 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -D-glukose

Posisjon	Observert	Litteratur (Fouad og Abdel-Hafeez 2009)
2' og 6'	110,3-110,6	110,4-110,8
1'	119,9-121,3	120,9-121,2
4'	140,0-140,7	140,0-140,7
3'	146,4-146,0	146,3-146,6
C=O i estergruppene	166,4-168,2	166,3-167,2
1	94,0	91,5
2	72,4	71,8
3	76,7	76,7
4	69,7	70,3
5	76,5	76,7
6	64,0	63,6

( $\delta$ -skala gitt i enheten ppm)

Litteraturen angir ikke skiftverdier for aromatdelen av 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -D-glukose.

## 6 Konklusjon

Denne studien har vist at blader fra *S. guineense* inneholder en rekke lavmolekylære forbindelser som bidrar til antioksidant og antiradikaleffekt.

Fra metanolekstraktet ble gallotanninene 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose og 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose isolert og identifisert. I bioassay viste 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose nesten like god radikalscavenger effekt og hemmende effekt på enzymer som den positive kontrollen, quercetin, mens hemmingsaktiviteten i XO var noe lavere.

Det ble også isolert og identifisert flavonoider fra metanolekstraktet. Disse var: gallokatekin, myricetin og glykosidene myricetin 3-*O*-rhamnosid, myricetin 3-*O*-glukosid, myricetin 3-*O*-glukuronid og 3-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin. Av disse forbindelsene viste myricetin 3-*O*-glukosid og 3-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin både høyest radikalscavenger effekt og hemming av 15-LOX. Myricetin aglykonet viste derimot å være en moderat hemmer av XO, og hadde dermed høyest XO-hemmende effekt blant flavonoidene. Resultatene fra bioassay viste at galloyl-substitusjon muligens kunne øke enzymhemmings- og radikalscavenger aktiviteten til flavonoider.

Ingen av de isolerte forbindelsene er tidligere rapportert i *S. guineense*, men de har blitt rapportert i andre planter. Noen av dem, som 3-*O*- $\beta$ -D-(6''-*O*-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin og 1,2,3,4,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose er sjeldne naturstoffer. Flere av de observerte aktivitetene er ikke rapportert tidligere i litteraturen. Metanolekstraktet av blad viste ikke toksisk effekt på rekellarver (*Artemia salina*).

Mange av de isolerte forbindelsene fra *S. guineense* kan bidra til biologiske aktiviteter, og denne masterstudien kan derfor kanskje bidra til å forklare noe av den tradisjonelle medisinske bruken av planten.

## 7 Forslag til videre arbeid

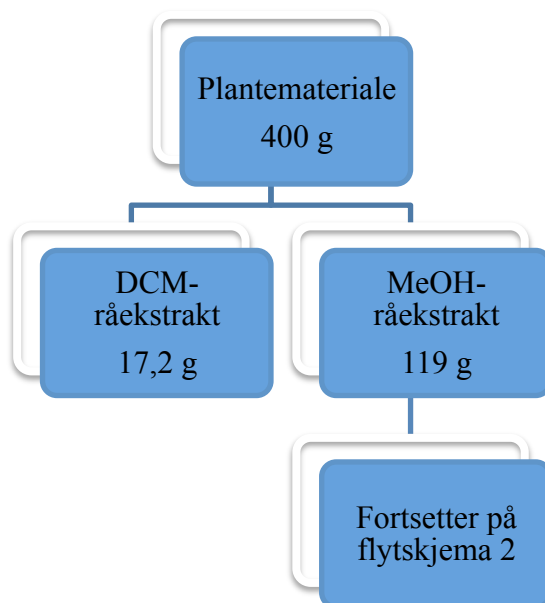
En rekke undersøkelser og videre arbeid kan være ønskelig å gjøre som en fortsettelse på dette prosjektet:

- Å se på struktur og bioaktivitet av komponenter fra DCM-råekstraktet siden det ikke ble gjort noe med dette ekstraktet.
- Å teste toksisitet av DCM-råekstraktet på rekelarver *Artemia salina*.
- Utføre bioassay på 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose, siden det på grunn av for lite stoff ikke ble utført. Dette vil også være aktuelt å gjennomføre, særlig da det andre isolerte gallotanninet 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukose viste høy radikalscavenging- og hemmingsaktivitet.
- Teste alle isolerte forbindelser i flere bioassays, som for eksempel glukosidase, da søk i Scifinder har vist svært få treff.
- Isolere og identifisere flere innholdsstoffer i råekstraktene fra *S. guineense*. Vedlegg / Appendiks

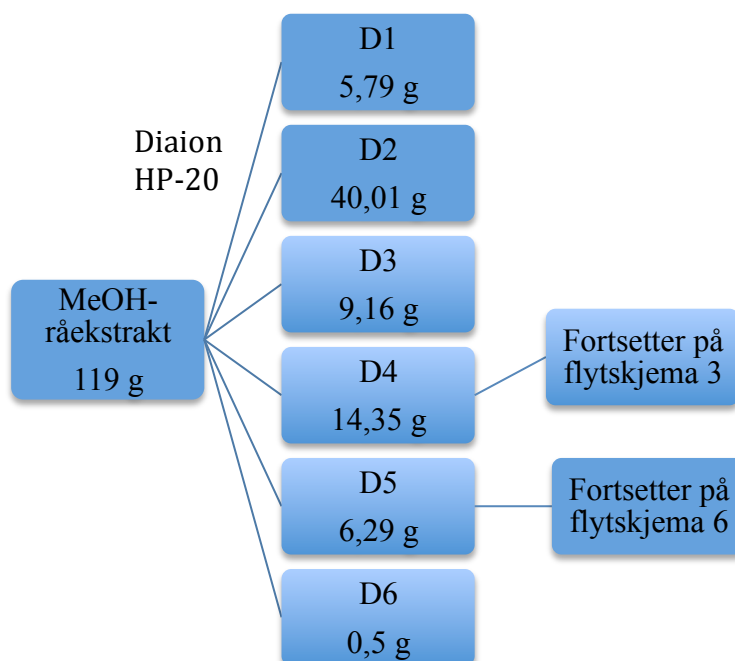
# 8 Vedlegg

## 8.1 Flytskjema

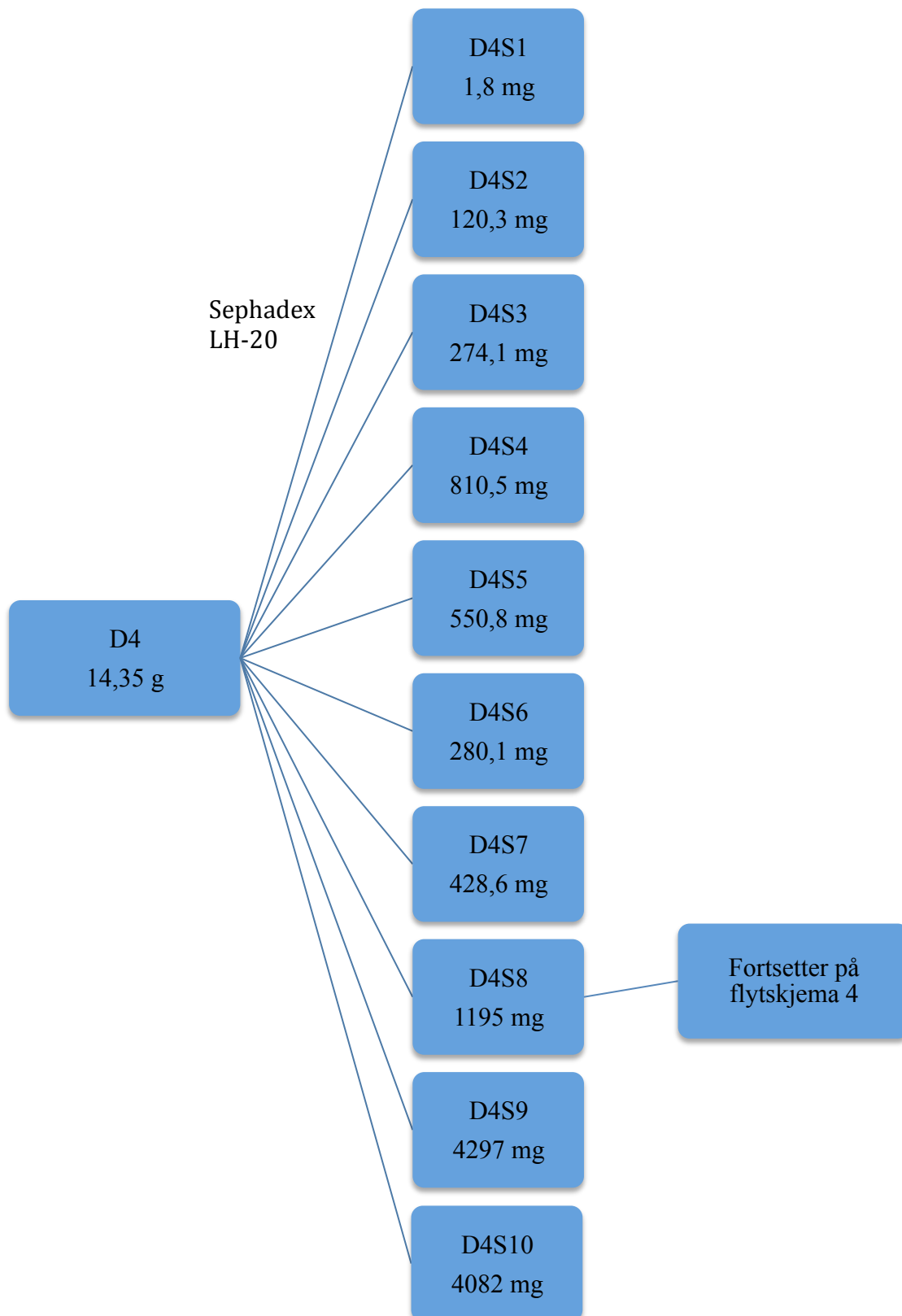
### 8.1.1 Flytskjema 1



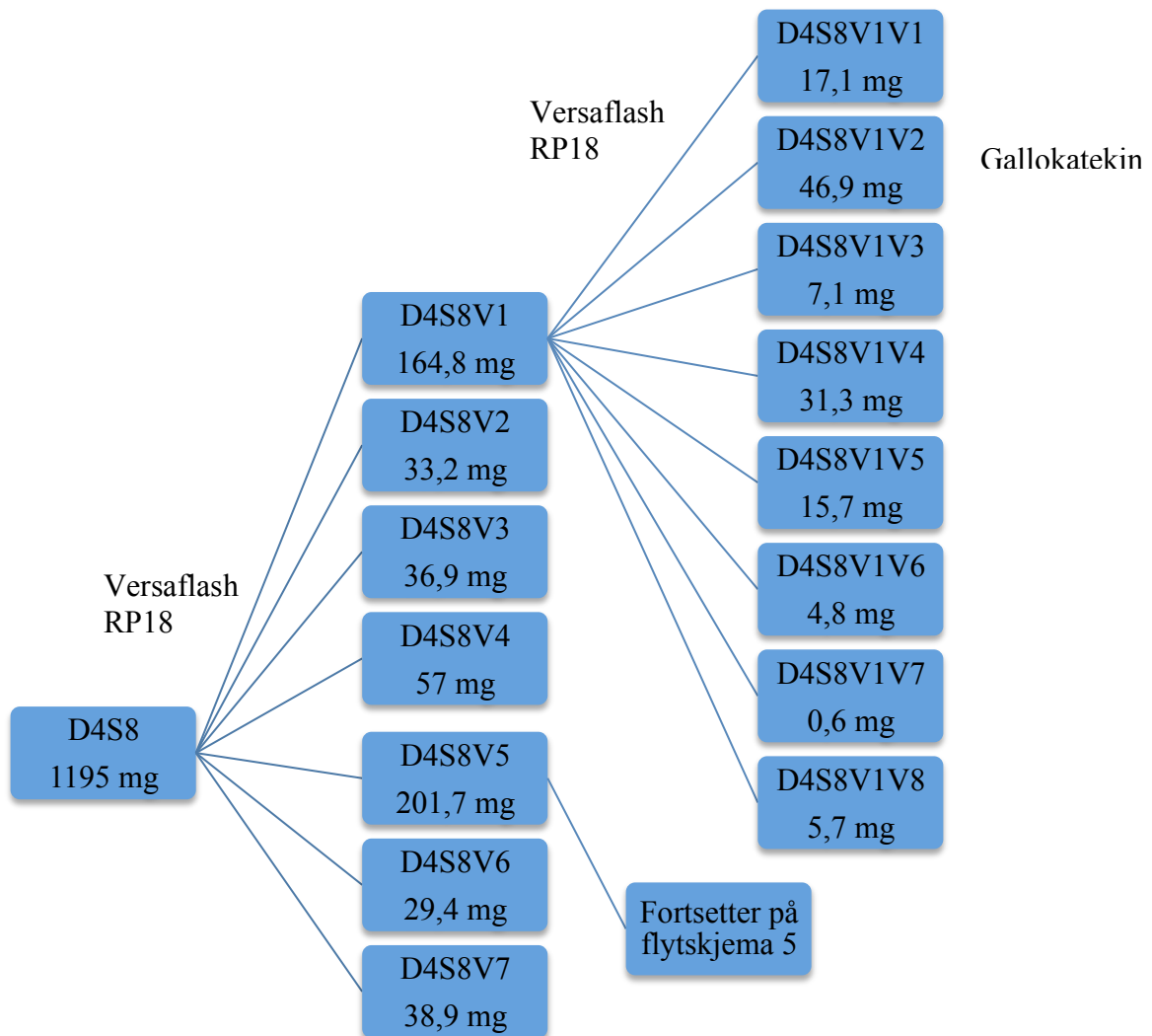
### 8.1.2 Flytskjema 2



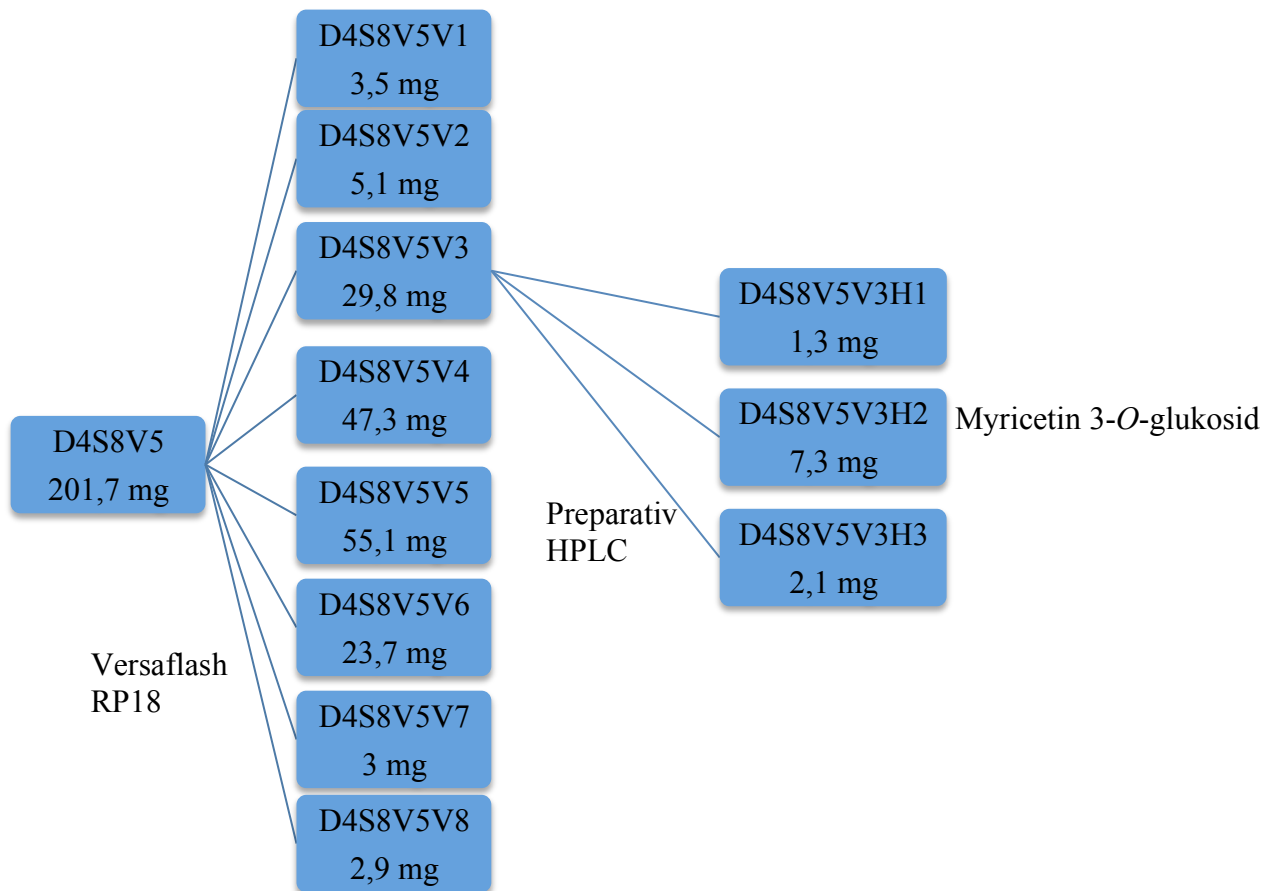
### 8.1.3 Flytskjema 3



### 8.1.4 Flytskjema 4

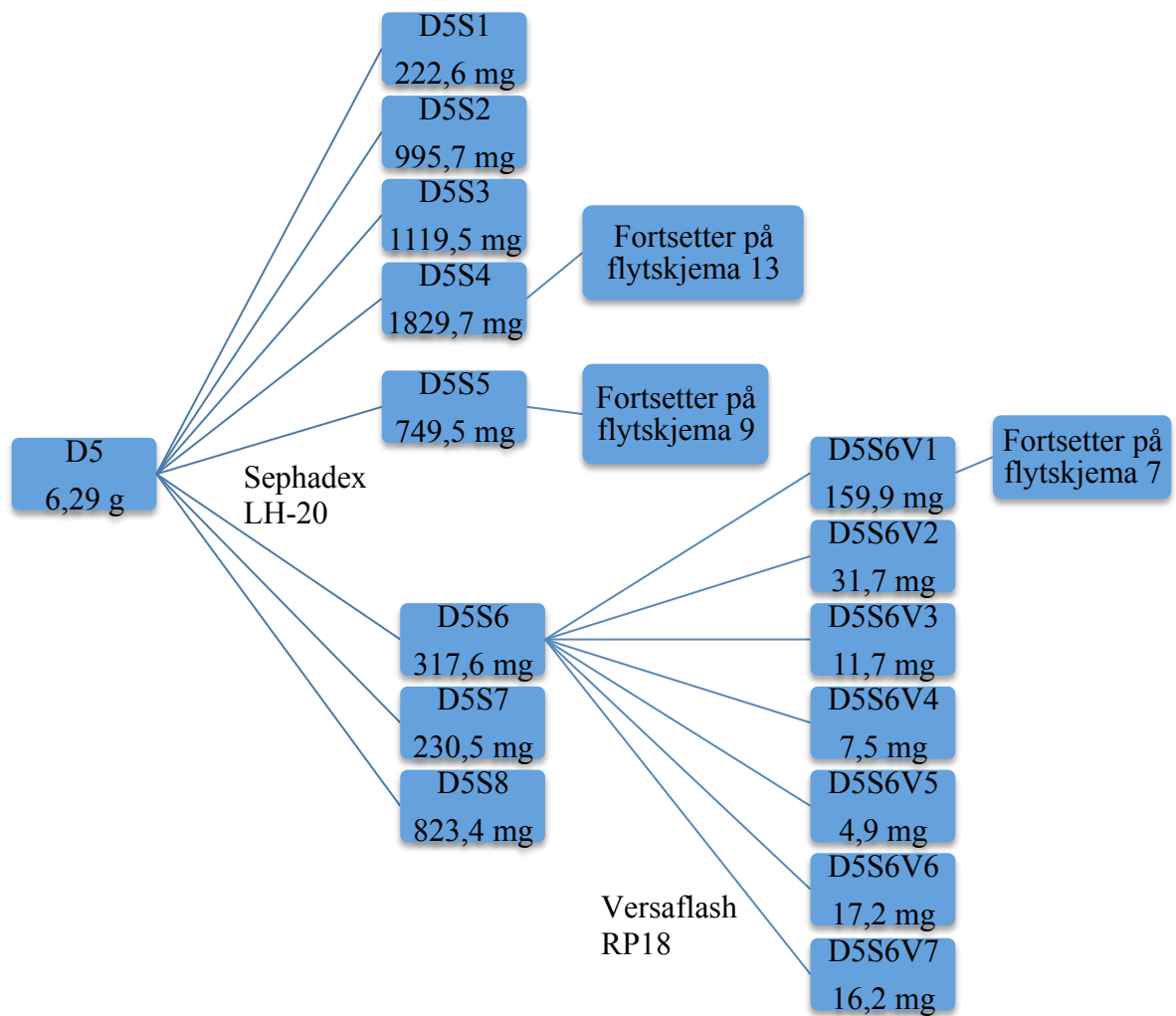


### 8.1.5 Flytskjema 5

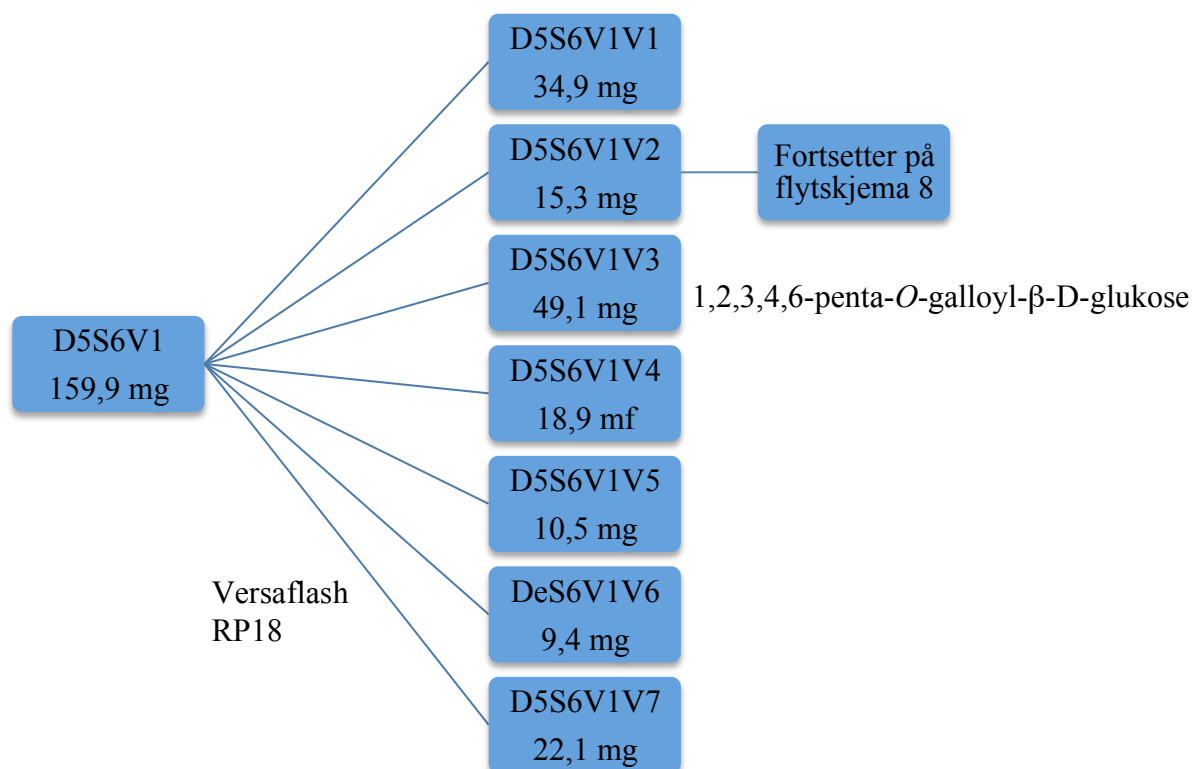




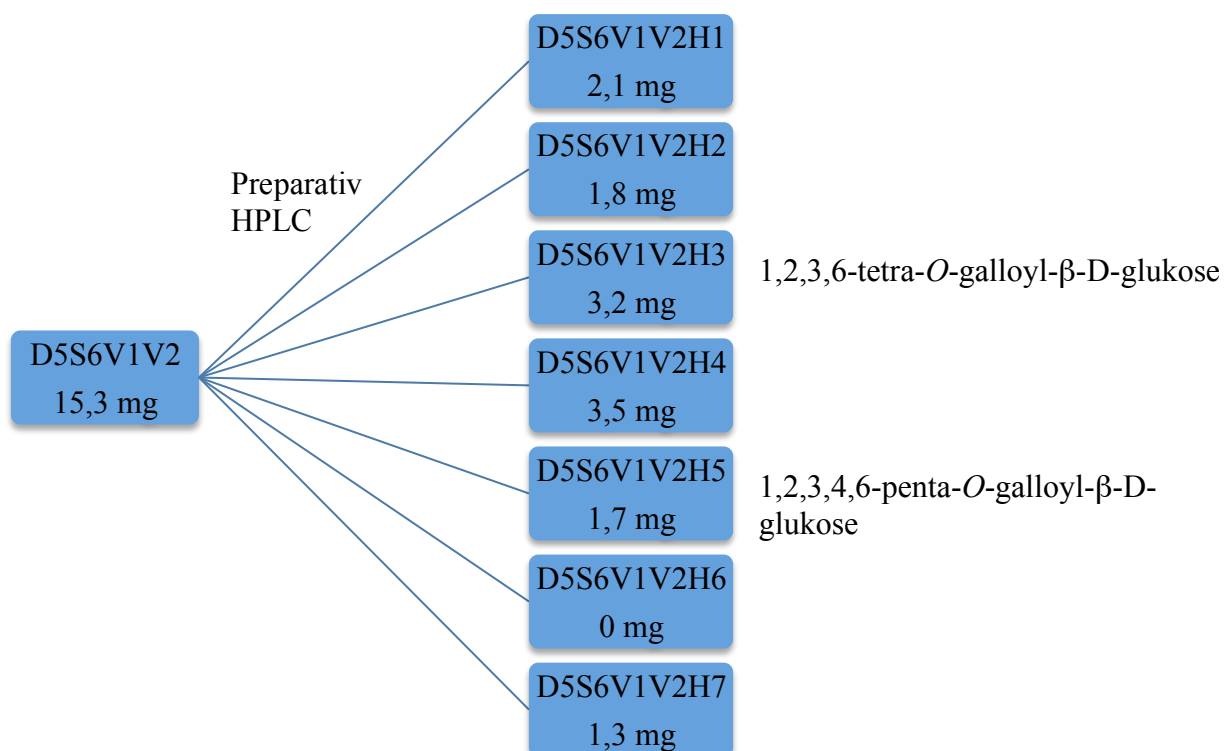
### 8.1.6 Flytskjema 6



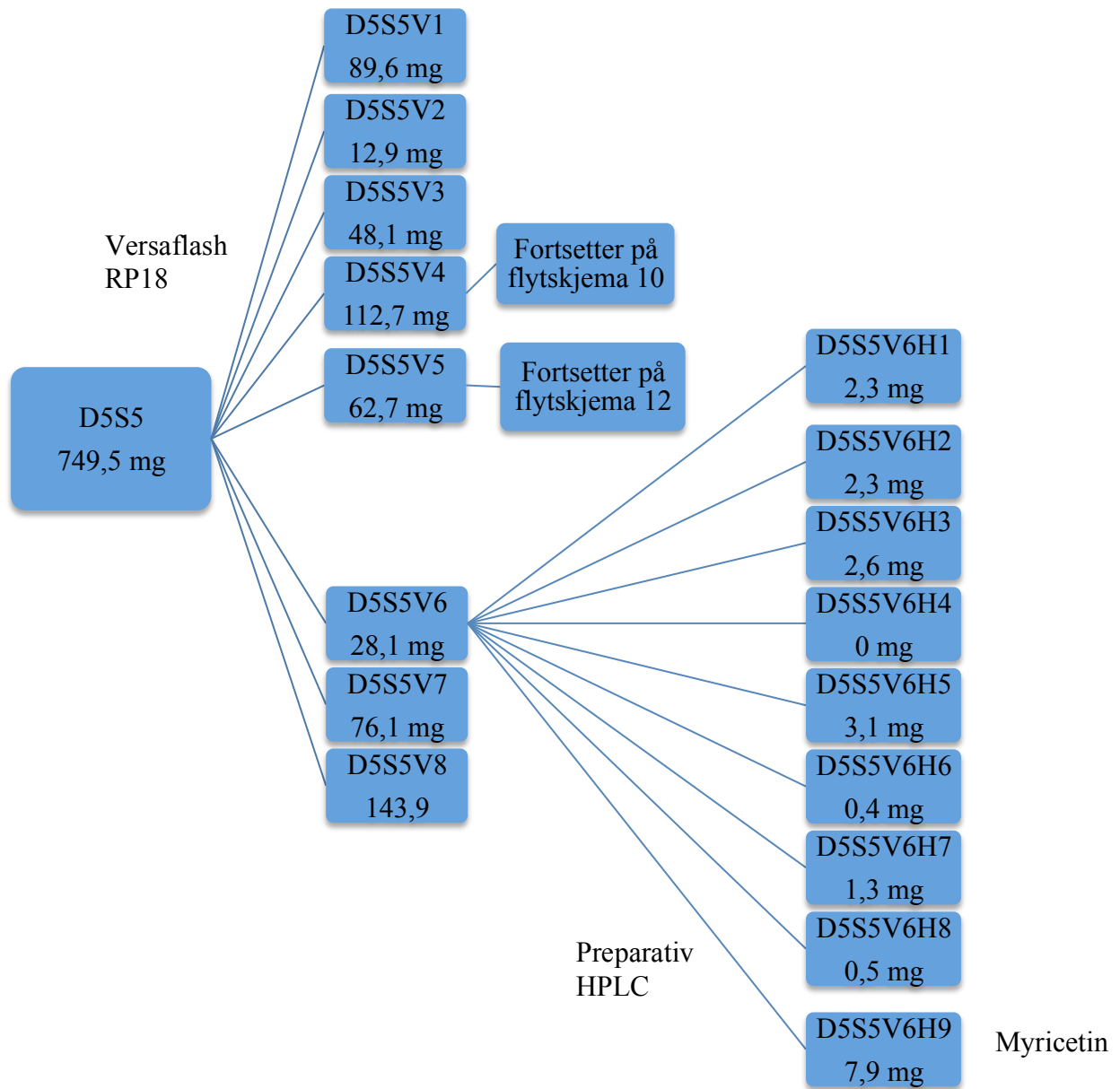
### 8.1.7 Flytskjema 7



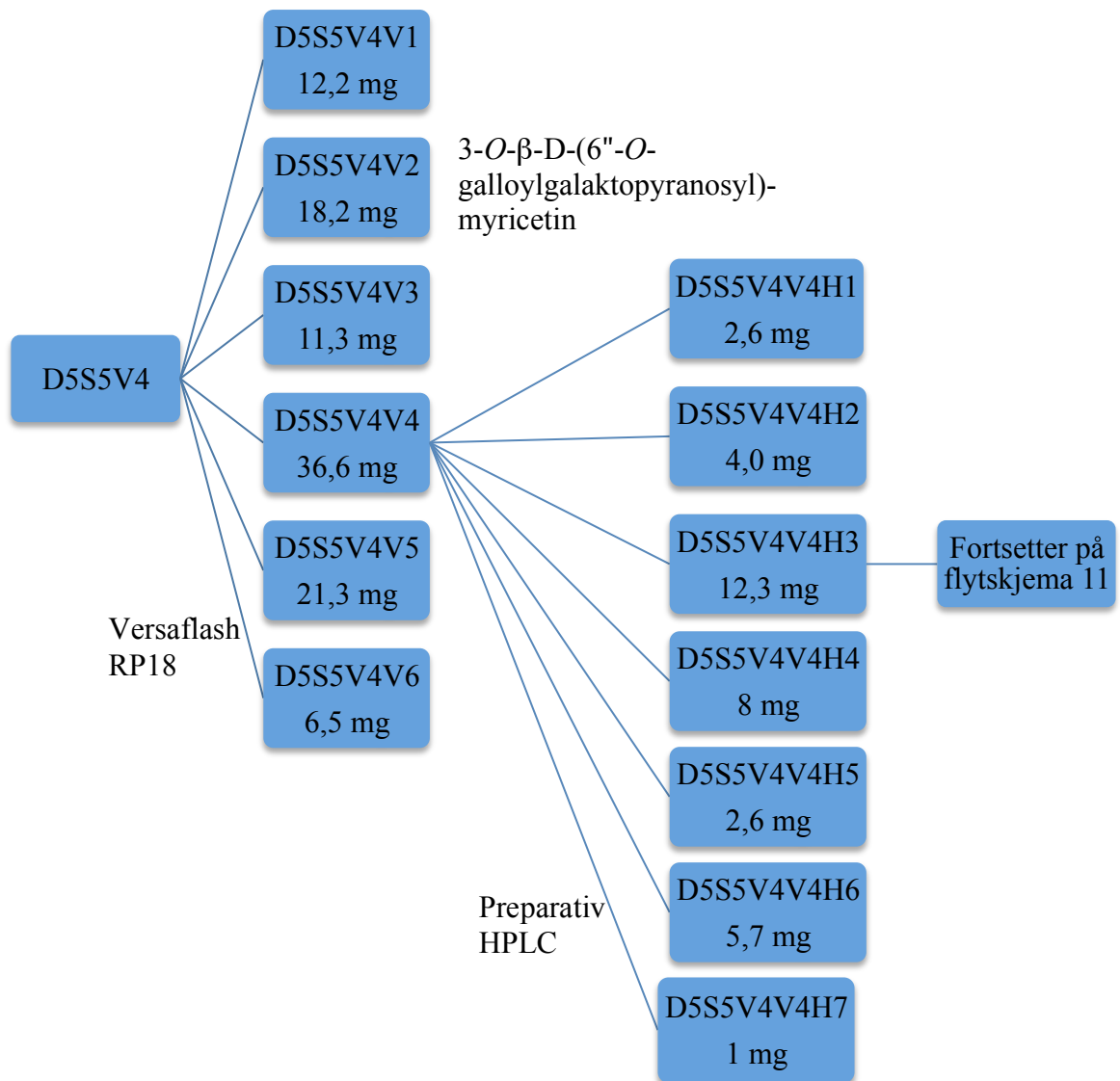
### 8.1.8 Flytskjema 8



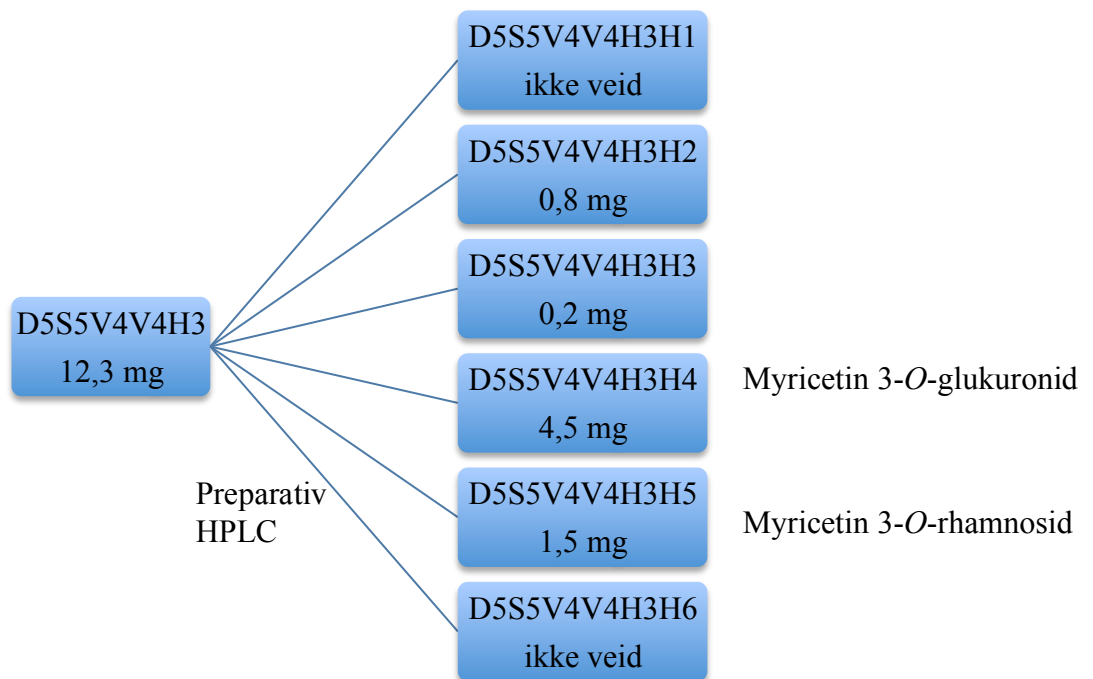
### 8.1.9 Flytskjema 9



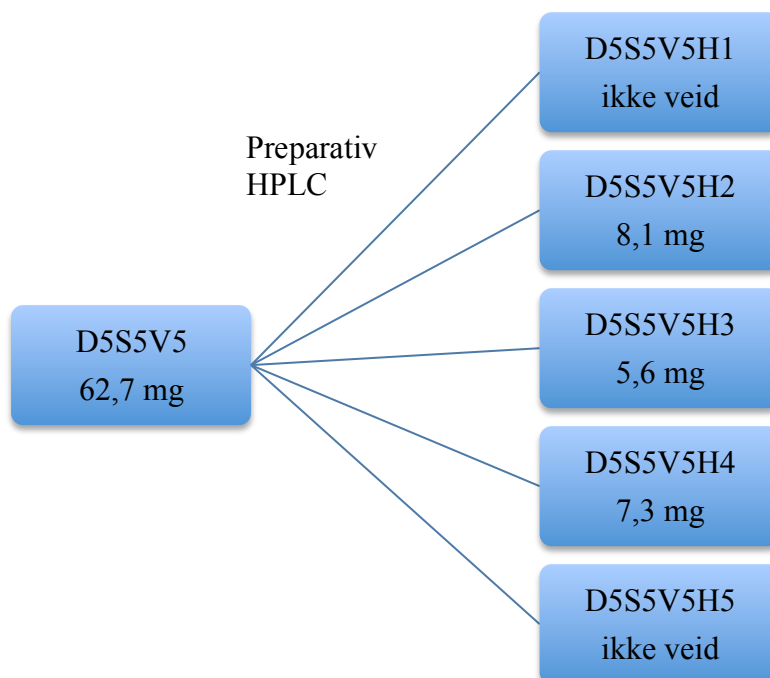
### 8.1.10 Flytskjema 10



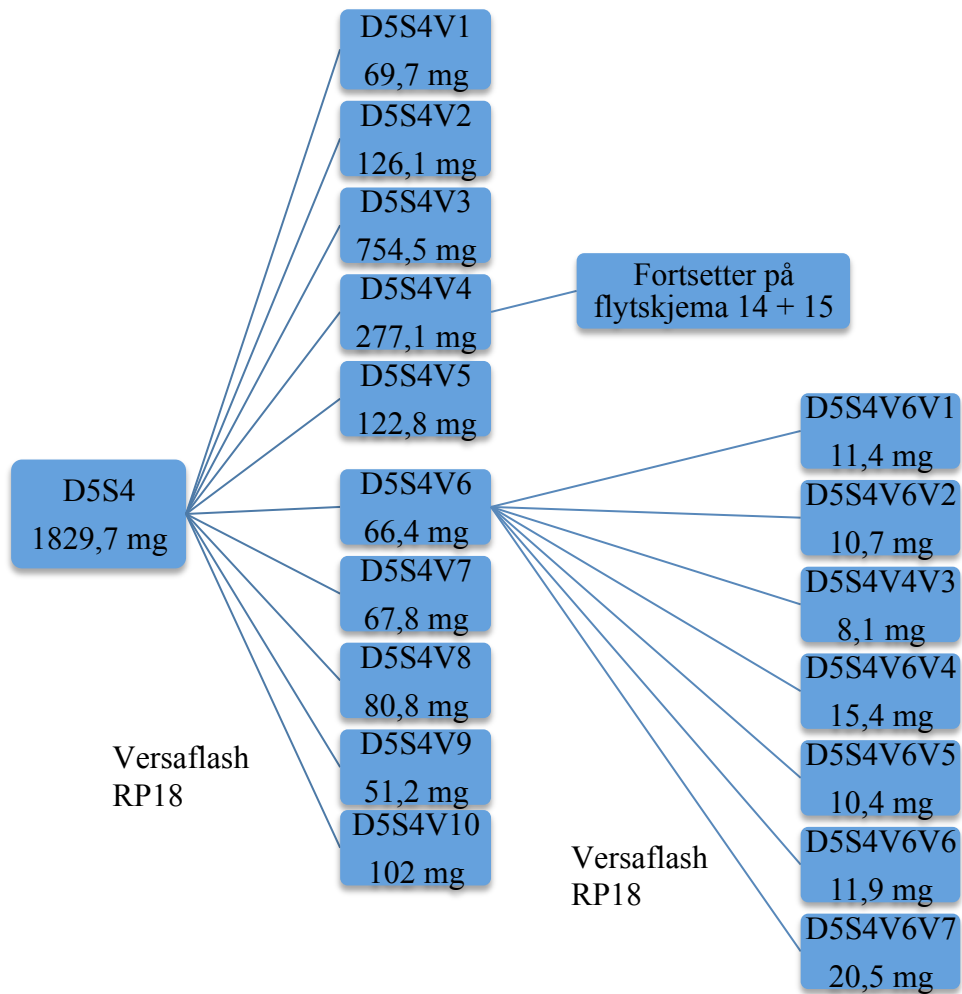
### 8.1.11 Flytskjema 11



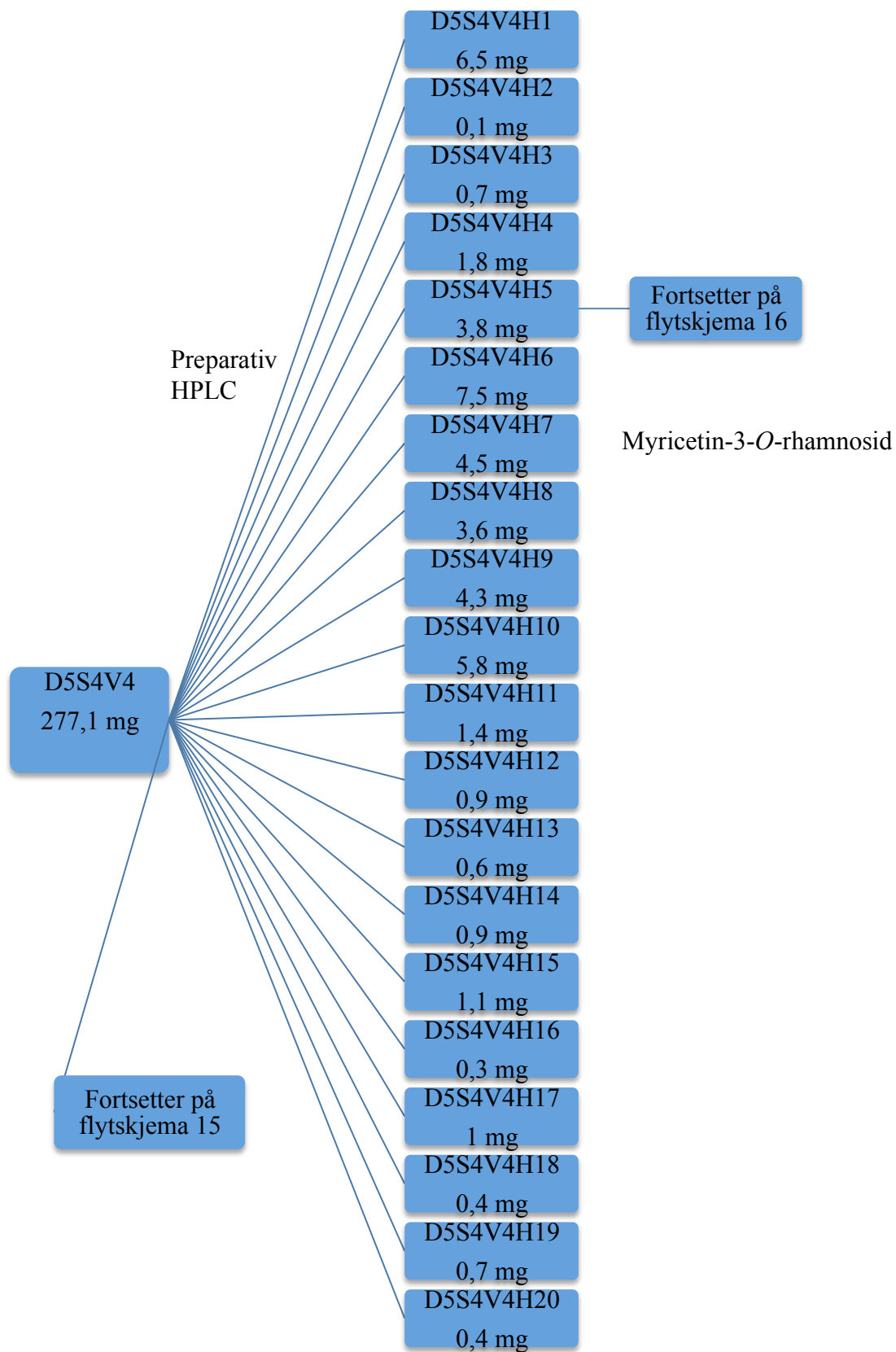
### 8.1.12 Flytskjema 12



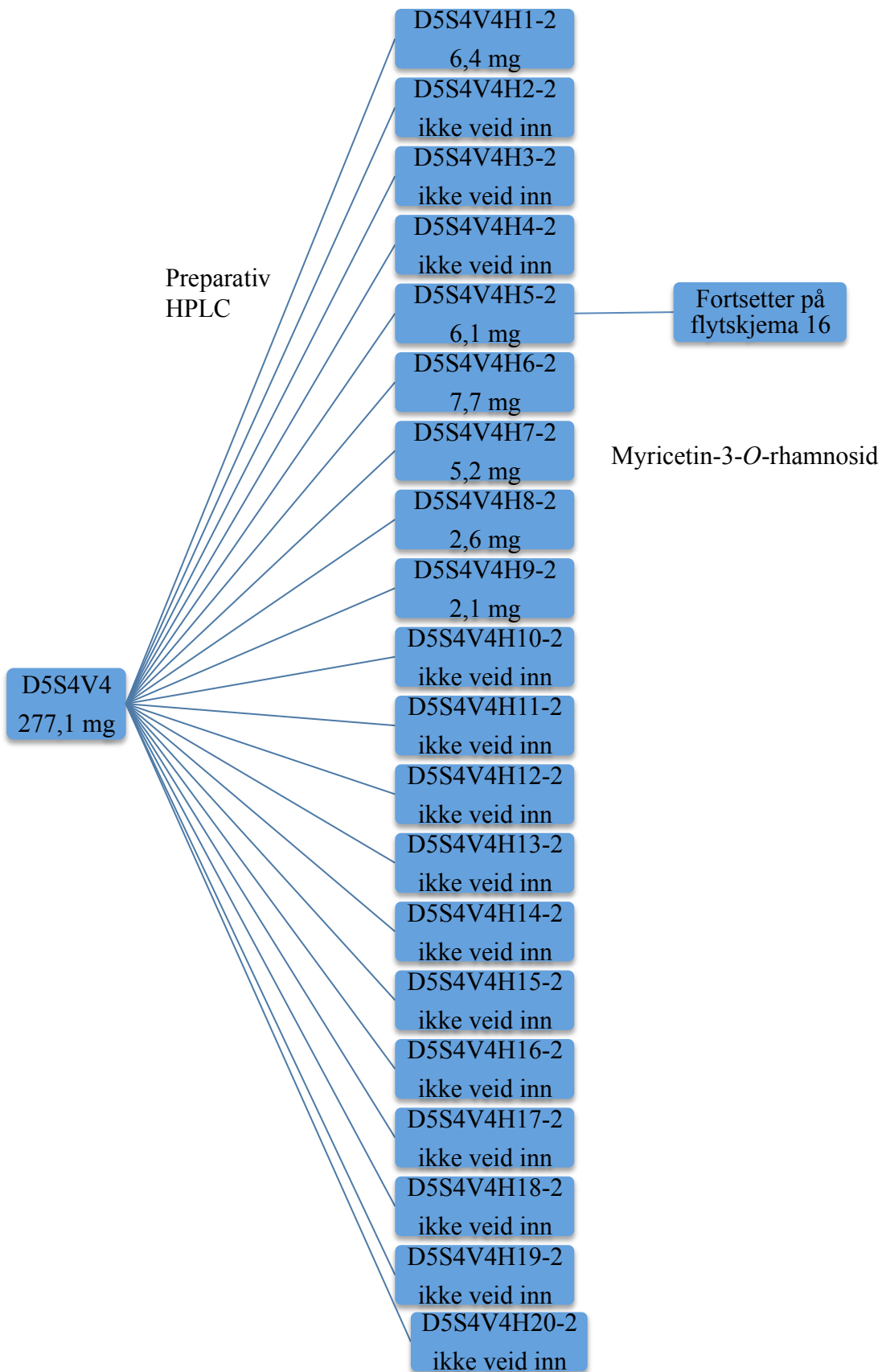
### 8.1.13 Flytskjema 13



### 8.1.14 Flytskjema 14

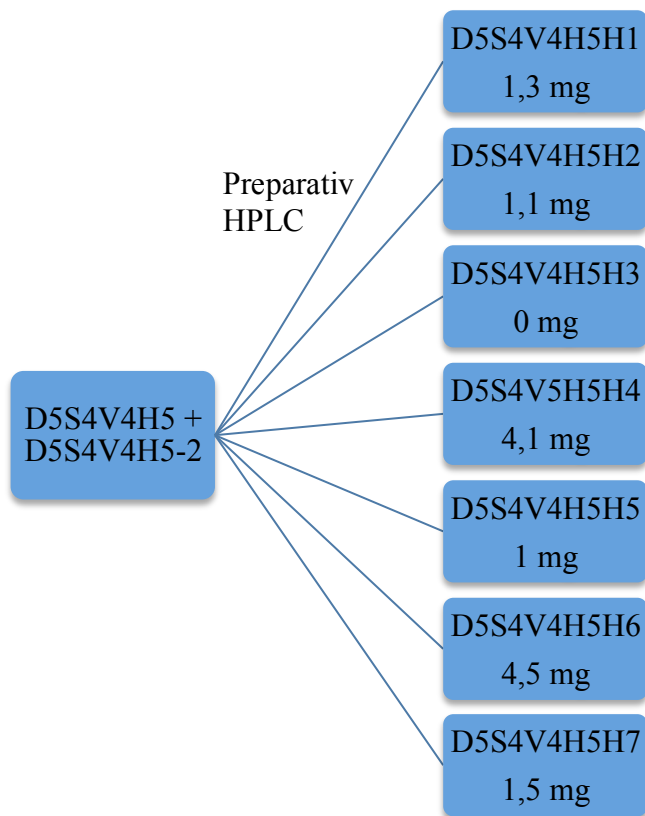


### 8.1.15 Flytskjema 15

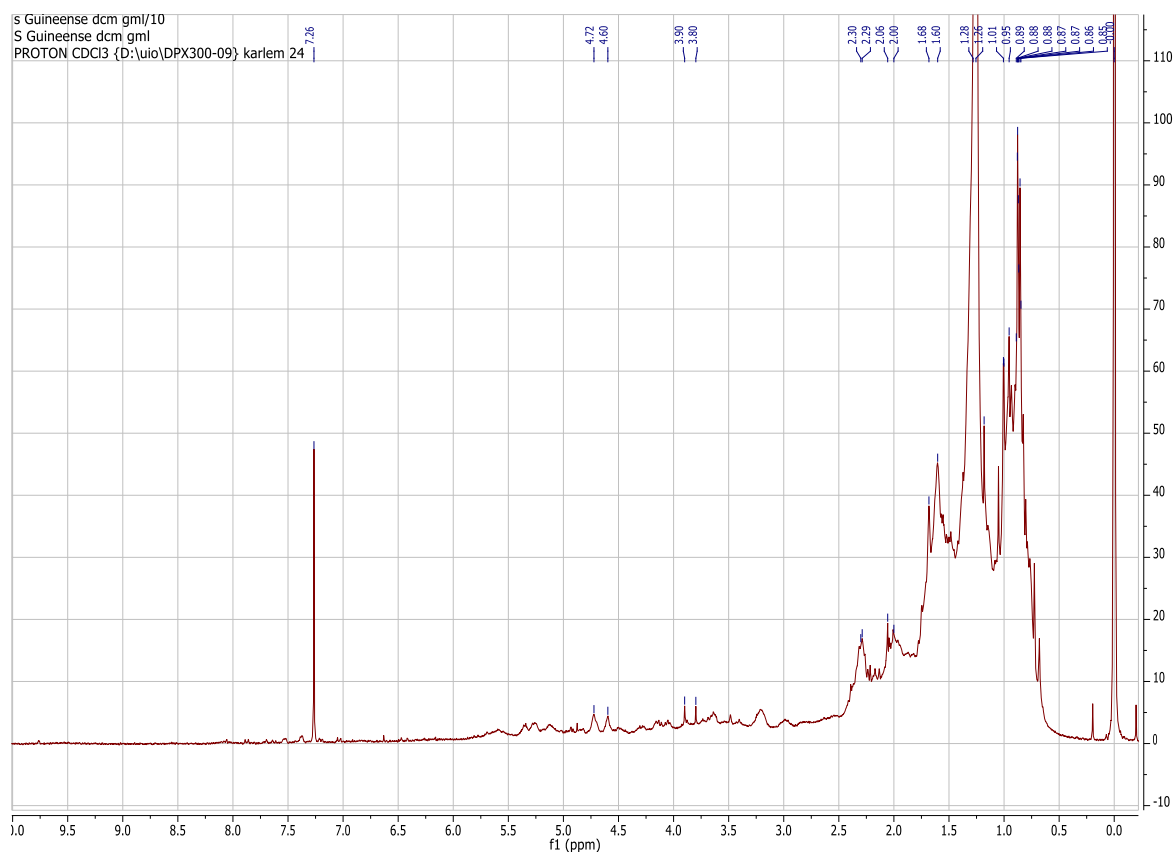




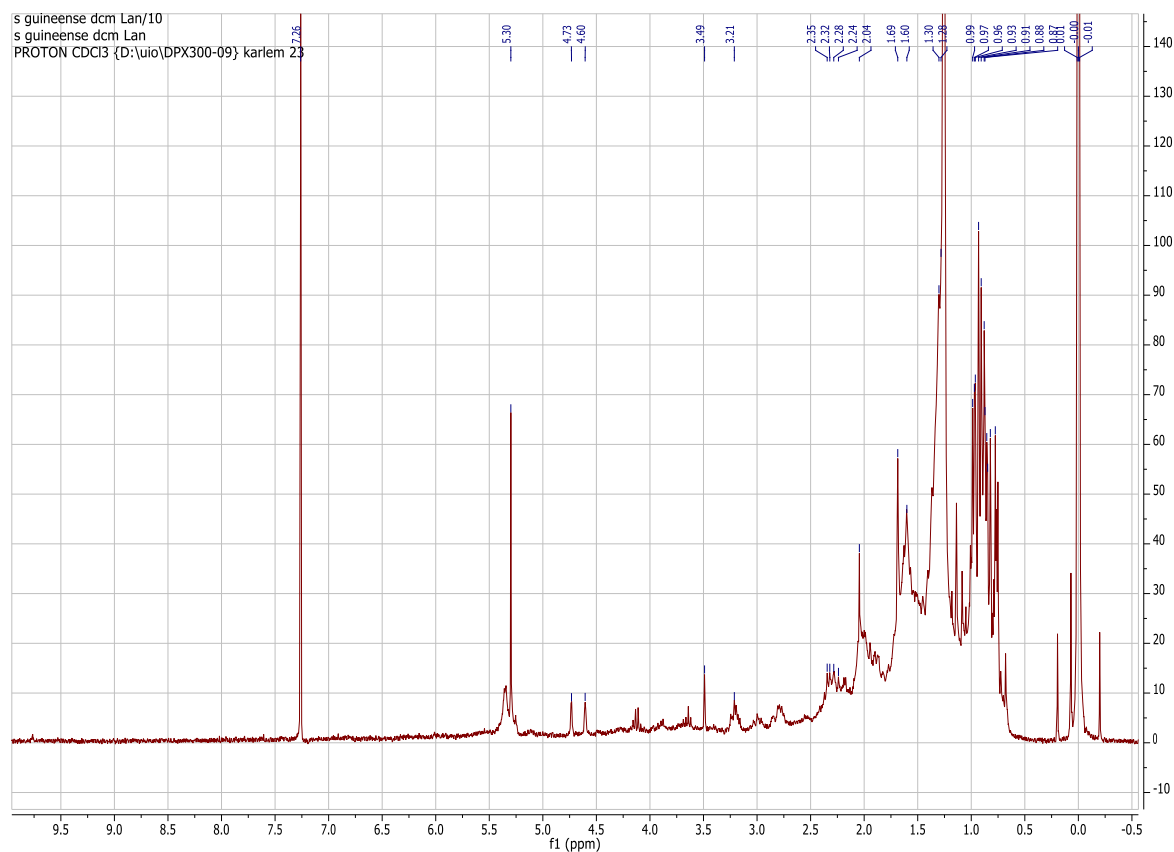
### 8.1.16 Flytskjema 16



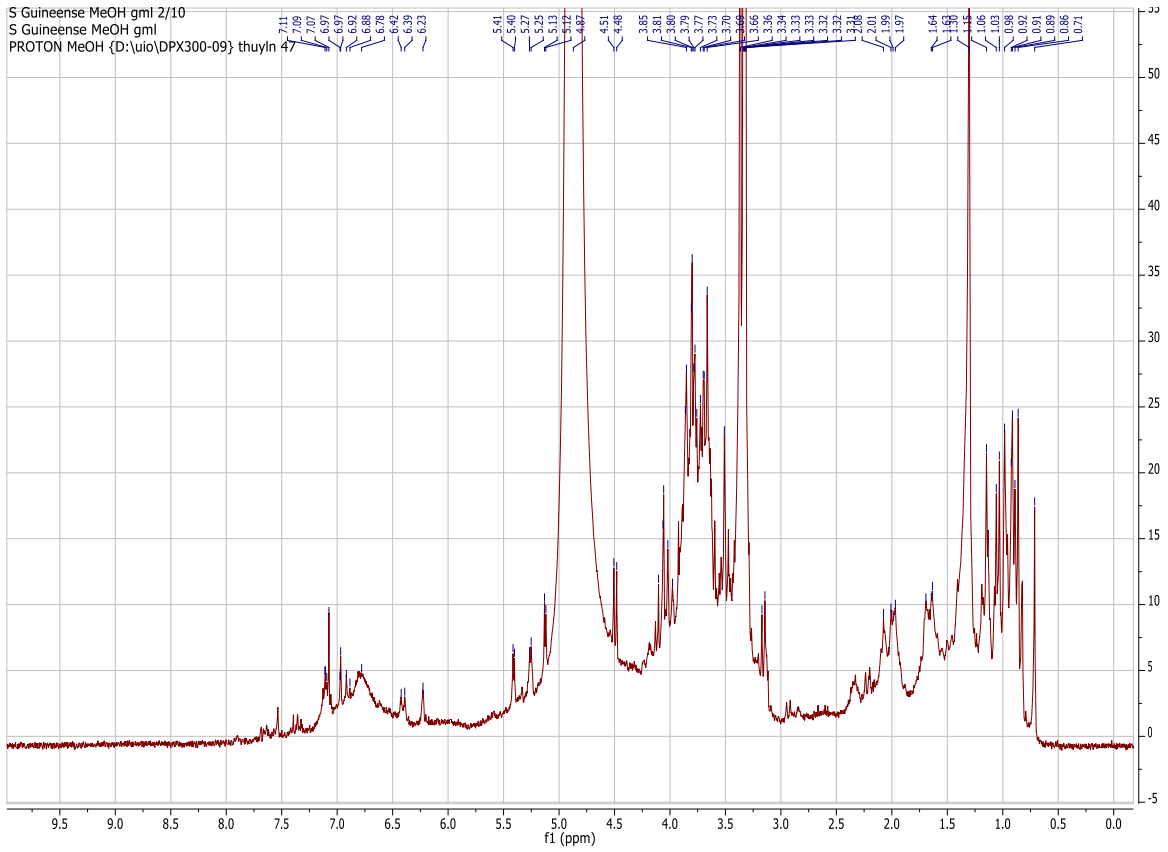
## 8.2 NMR-spektra



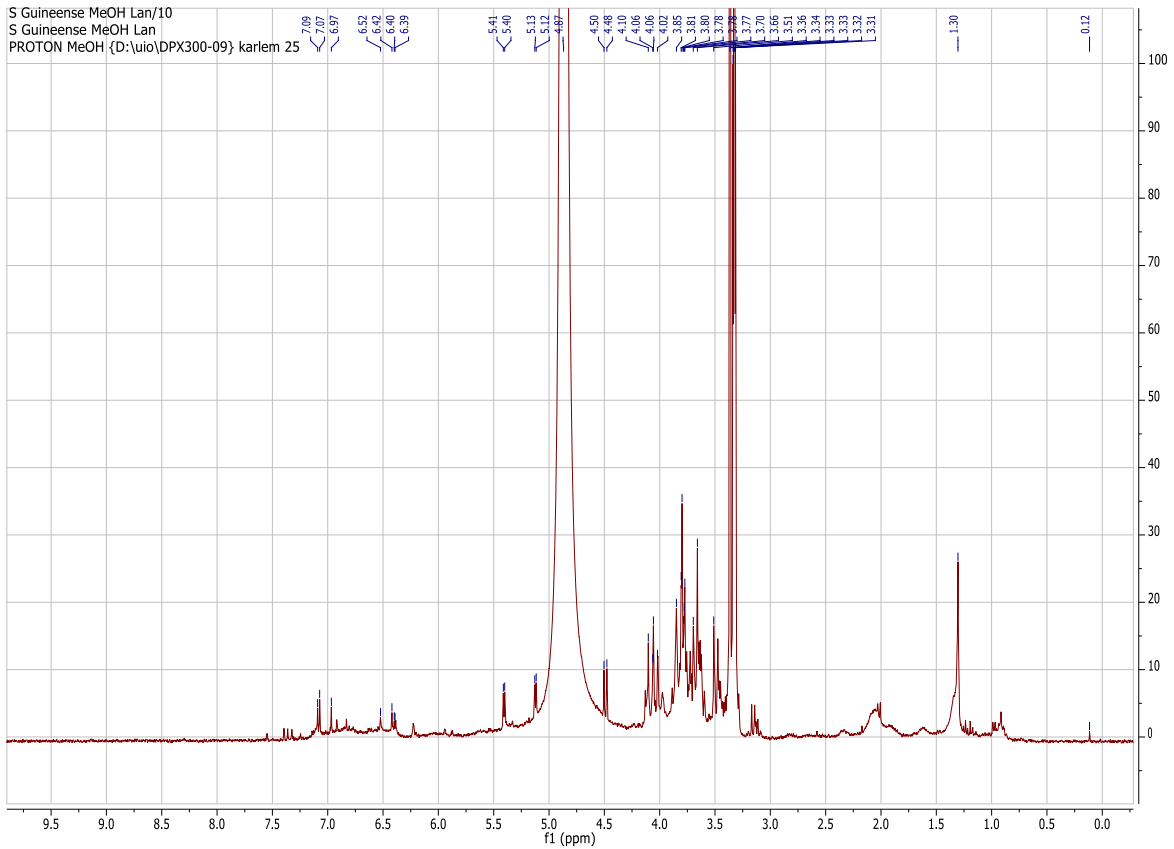
**NMR-spekter 1:  $^1\text{H}$  NMR-spekter DCM gml ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )**



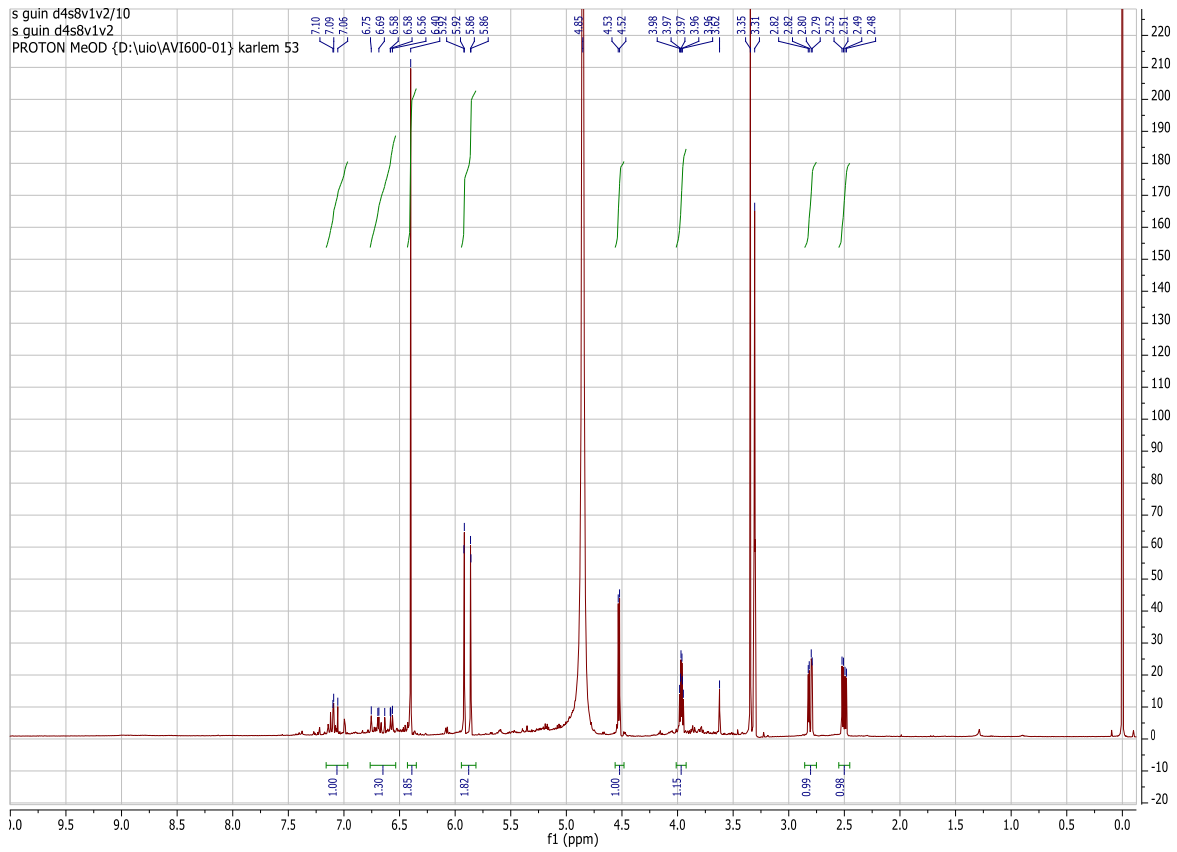
**NMR-spekter 2:  $^1\text{H}$  NMR-spekter DCM Lan ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )**



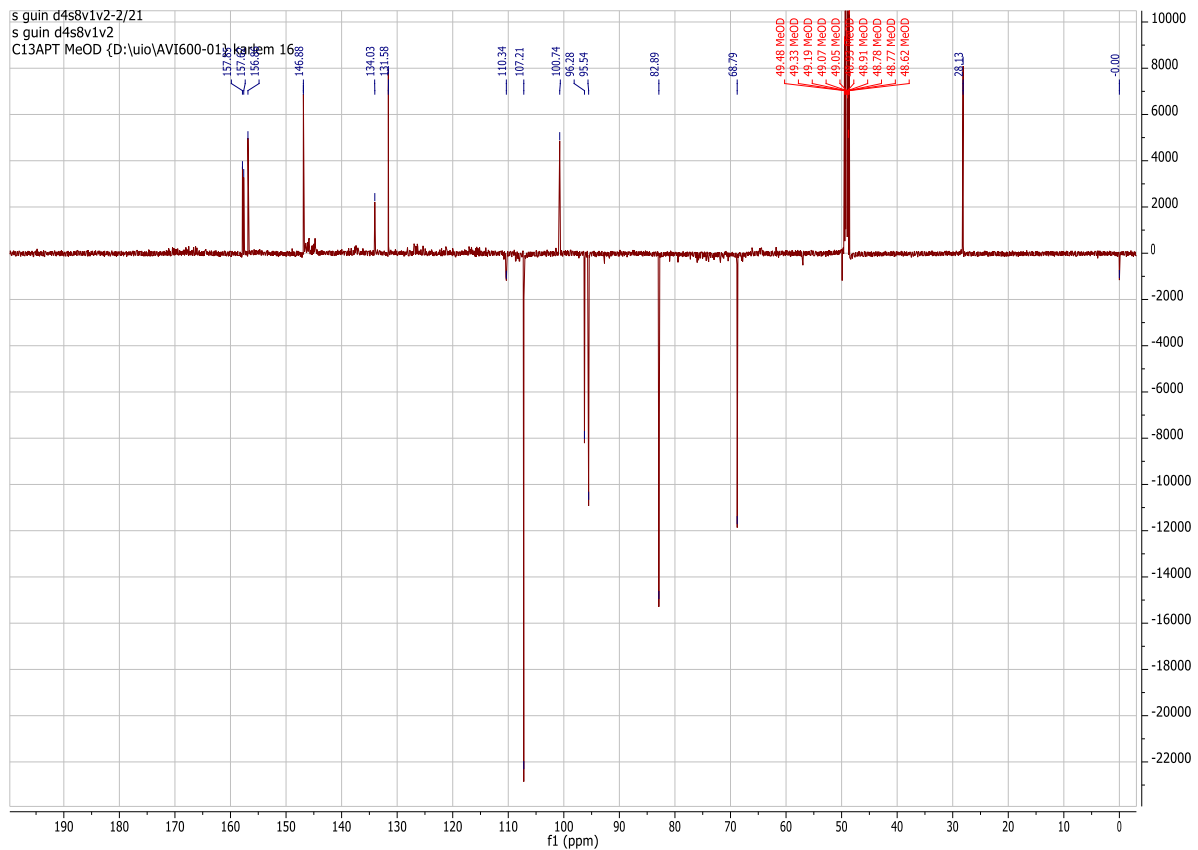
**NMR-spekter 3: <sup>1</sup>H NMR-spekter MeOH gml (CD<sub>3</sub>OD)**



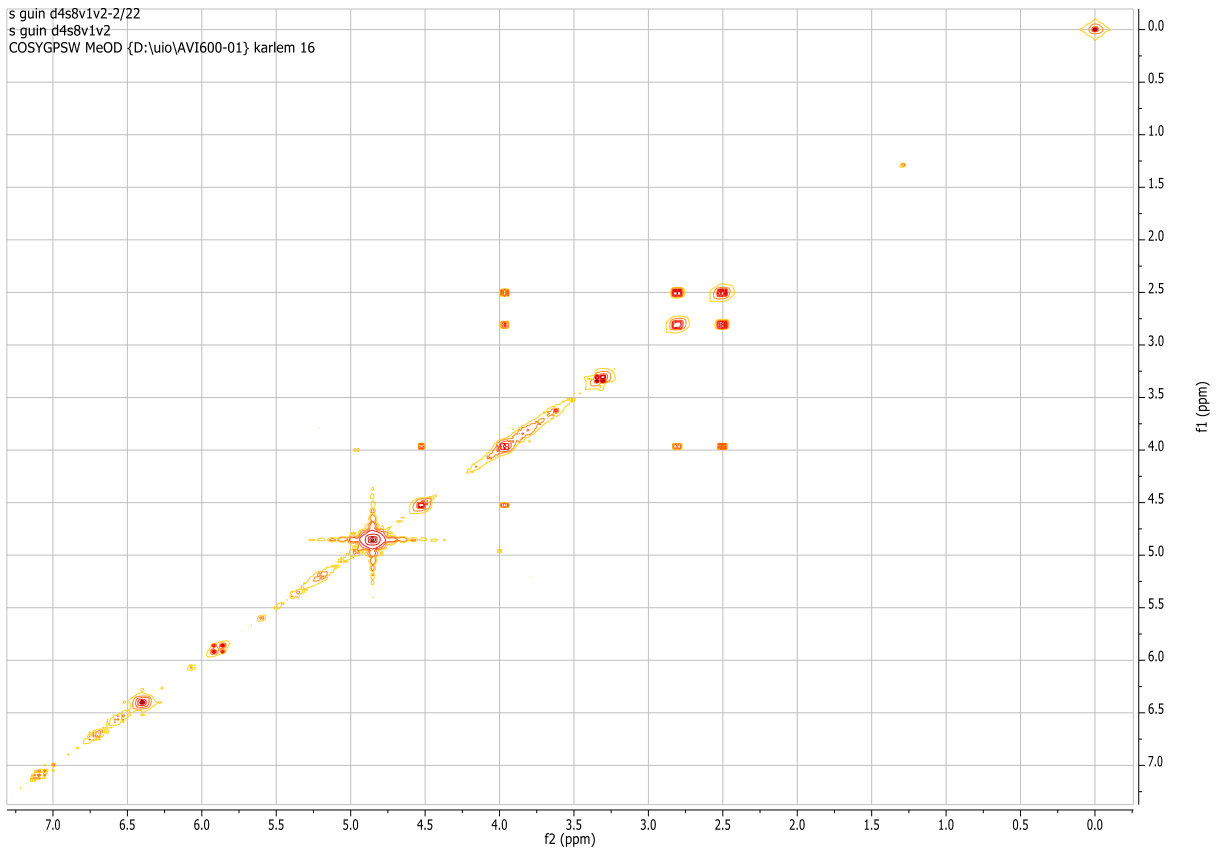
**NMR-spekter 4: <sup>1</sup>H NMR-spekter MeOH Lan (CD<sub>3</sub>OD)**



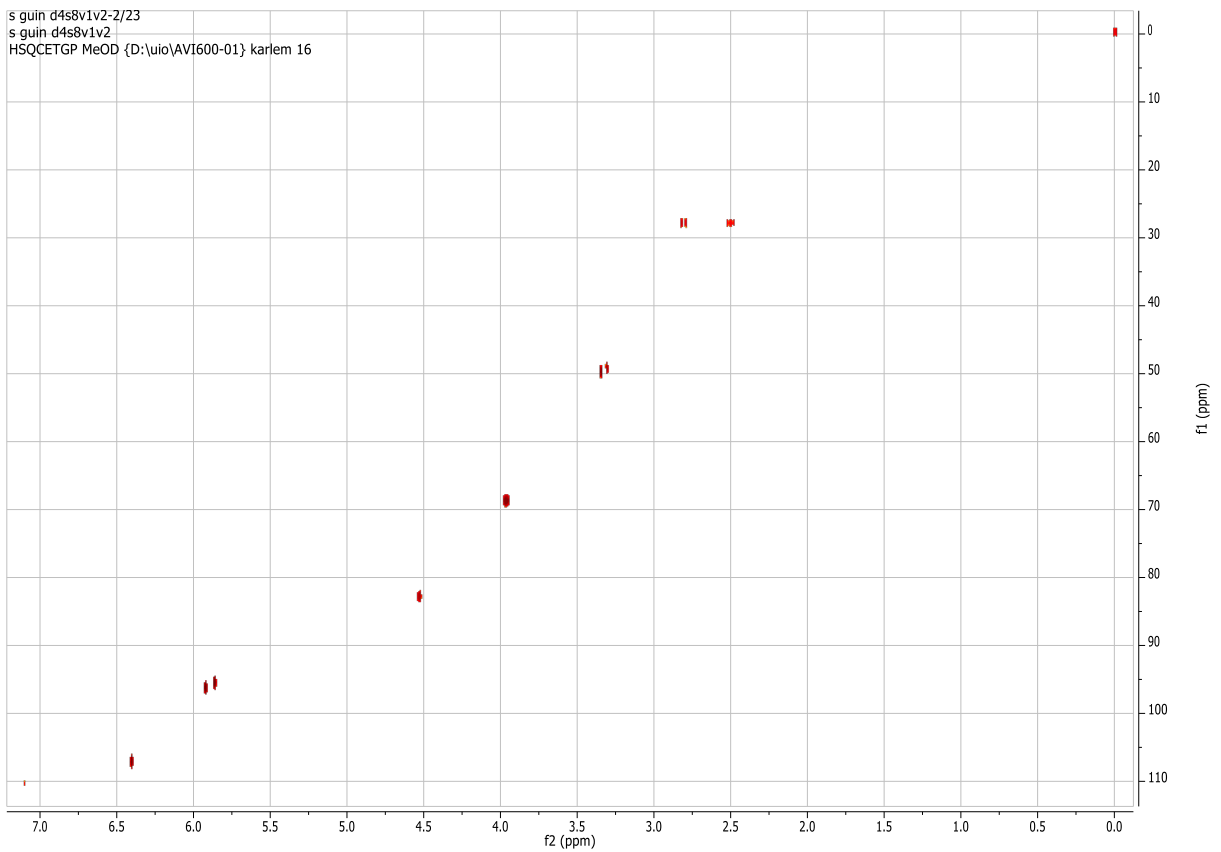
**NMR-spekter 5:  $^1\text{H}$  NMR-spekter gallo catekin ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )**



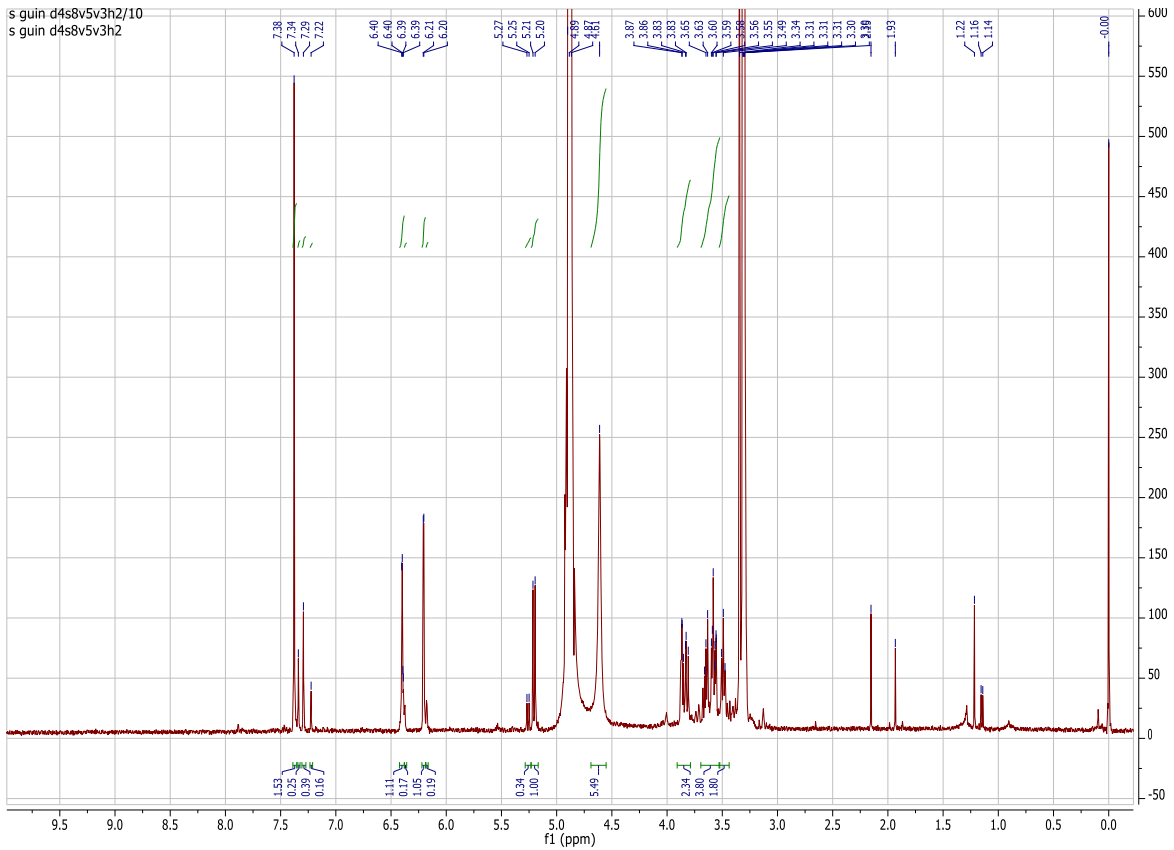
**NMR-spekter 6:  $^{13}\text{C}$  NMR-spekter gallo catekin ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )**



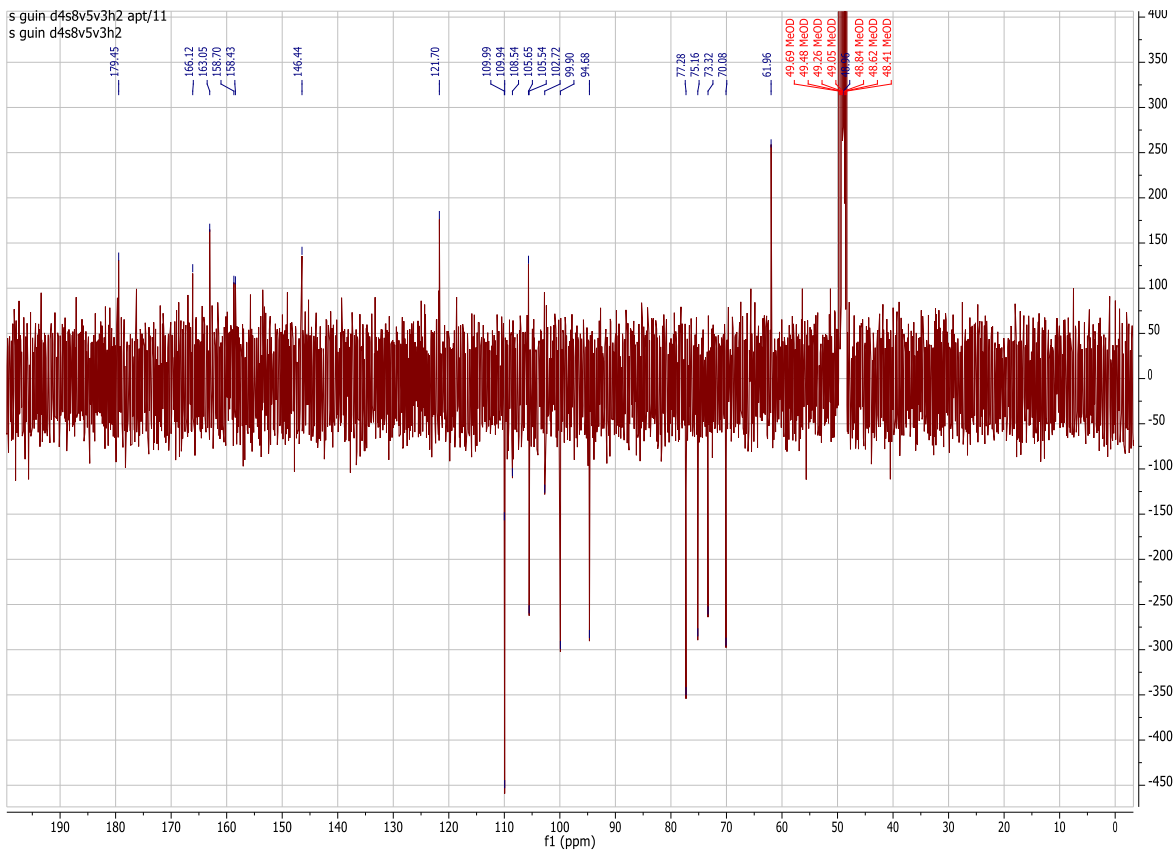
**NMR-spekter 7: COSY-spekter gallokatekin ( $CD_3OD$ )**



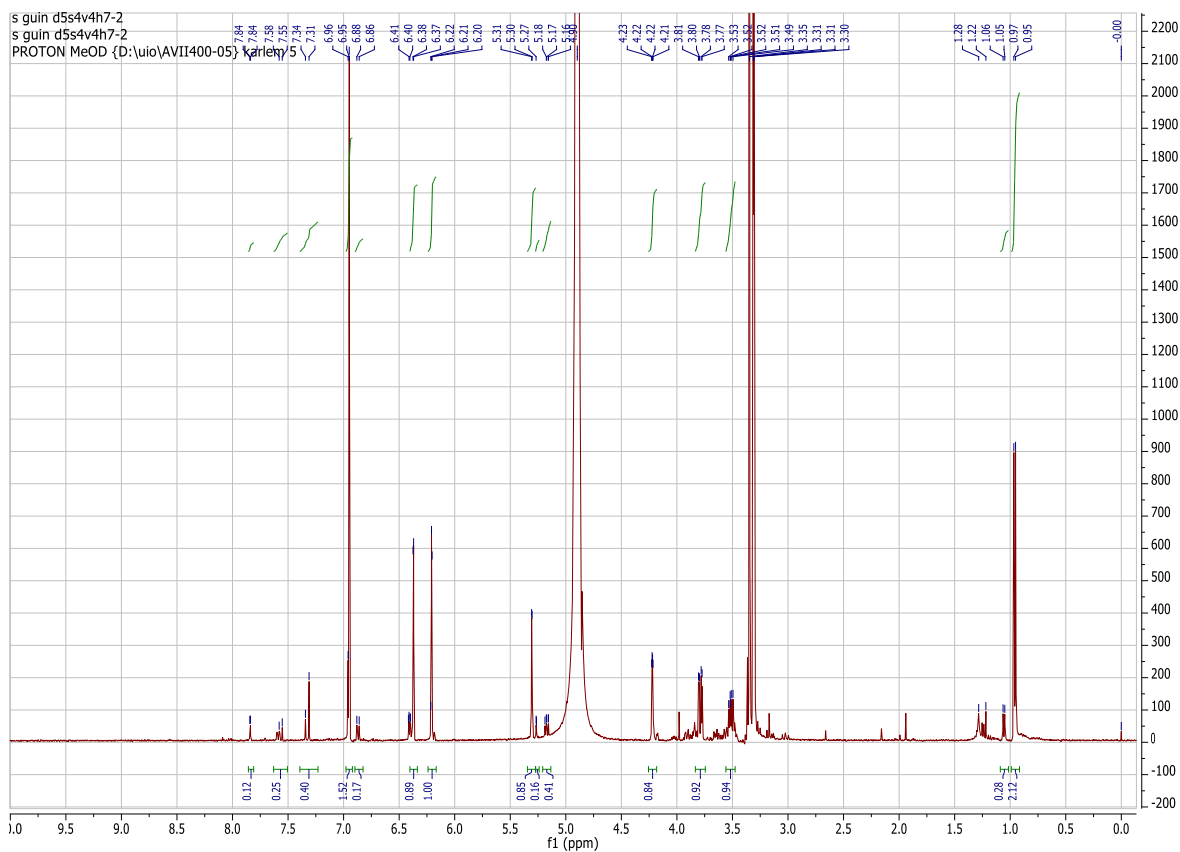
**NMR-spekter 8: HSQC-spekter gallokatekin ( $CD_3OD$ )**



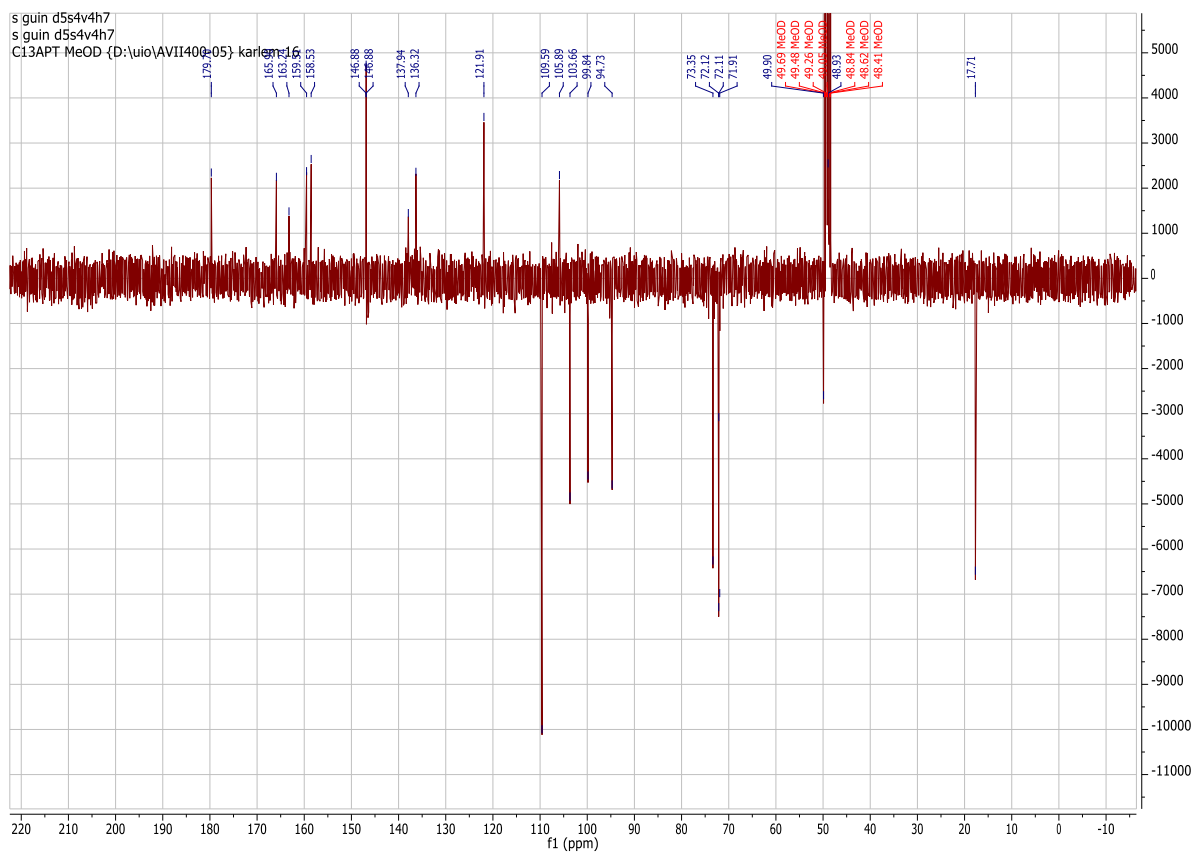
**NMR-spekter 9:  $^1\text{H}$  NMR -spekter myricetin 3-O-glukosid ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )**



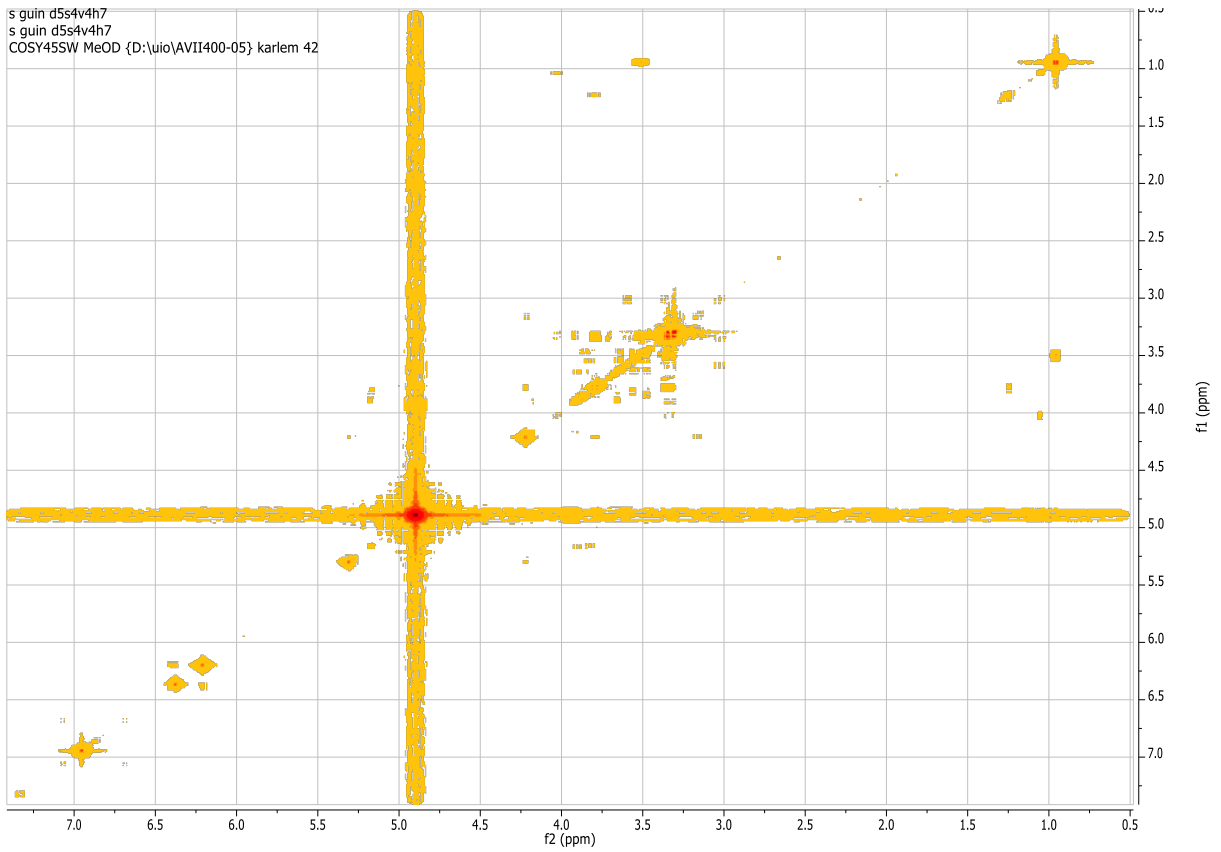
**NMR-spekter 10:  $^{13}\text{C}$  NMR -spekter myricetin 3-O-glukosid ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )**



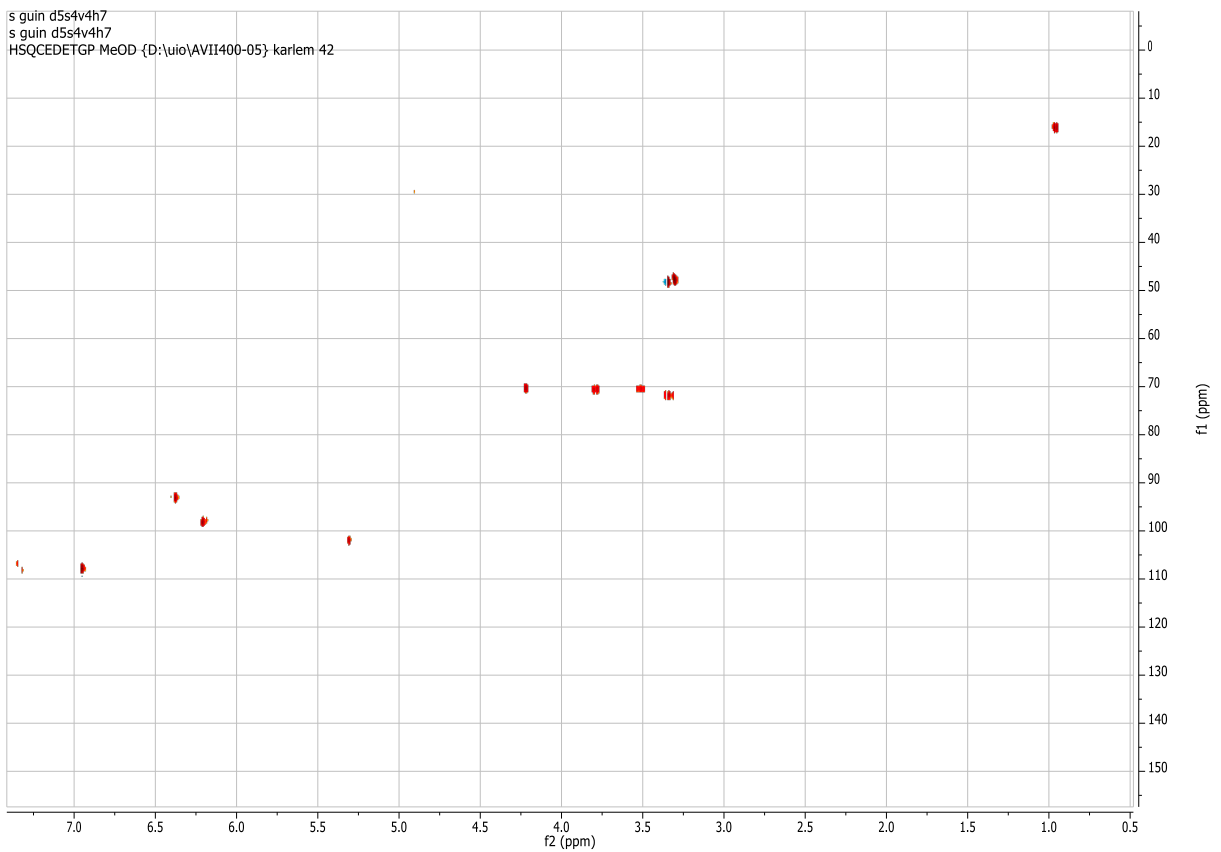
**NMR-spekter 11:  $^1\text{H}$  NMR-spekter myricetin 3-O-rhamnosid ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )**



**NMR-spekter 12:  $^{13}\text{C}$  NMR-spekter myricetin 3-O-rhamnosid ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )**

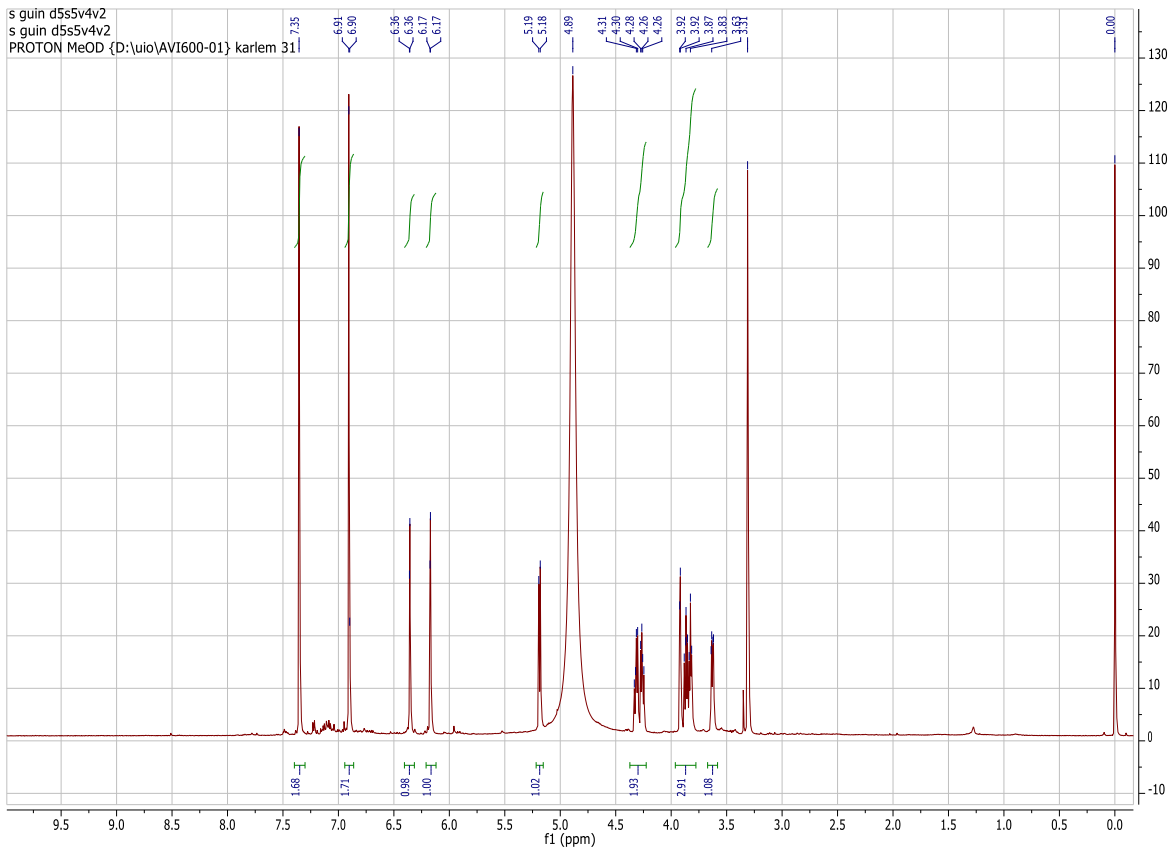


**NMR-spekter 13: COSY-spekter myricetin 3-O-rhamnosid ( $CD_3OD$ )**

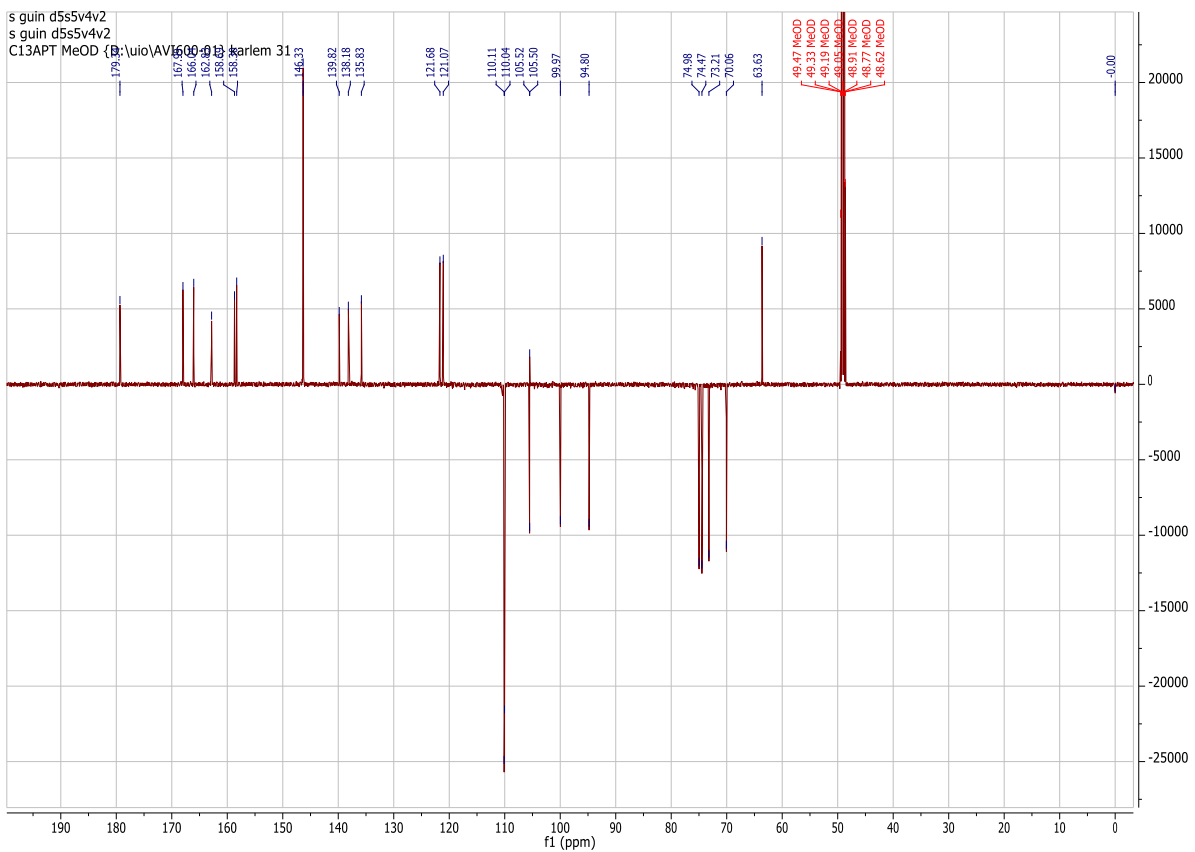


**NMR-spekter 14: HSQC-spekter myricetin 3-O-rhamnosid ( $CD_3OD$ )**

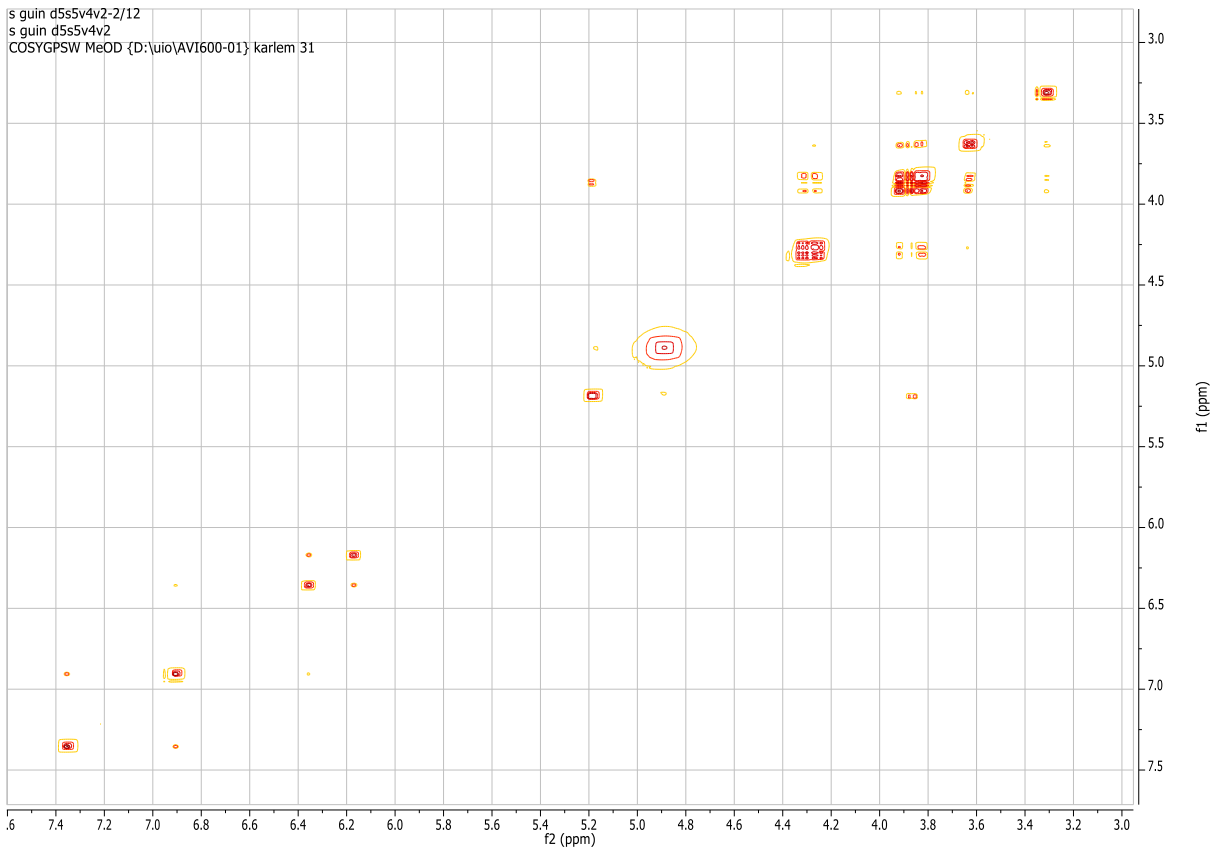




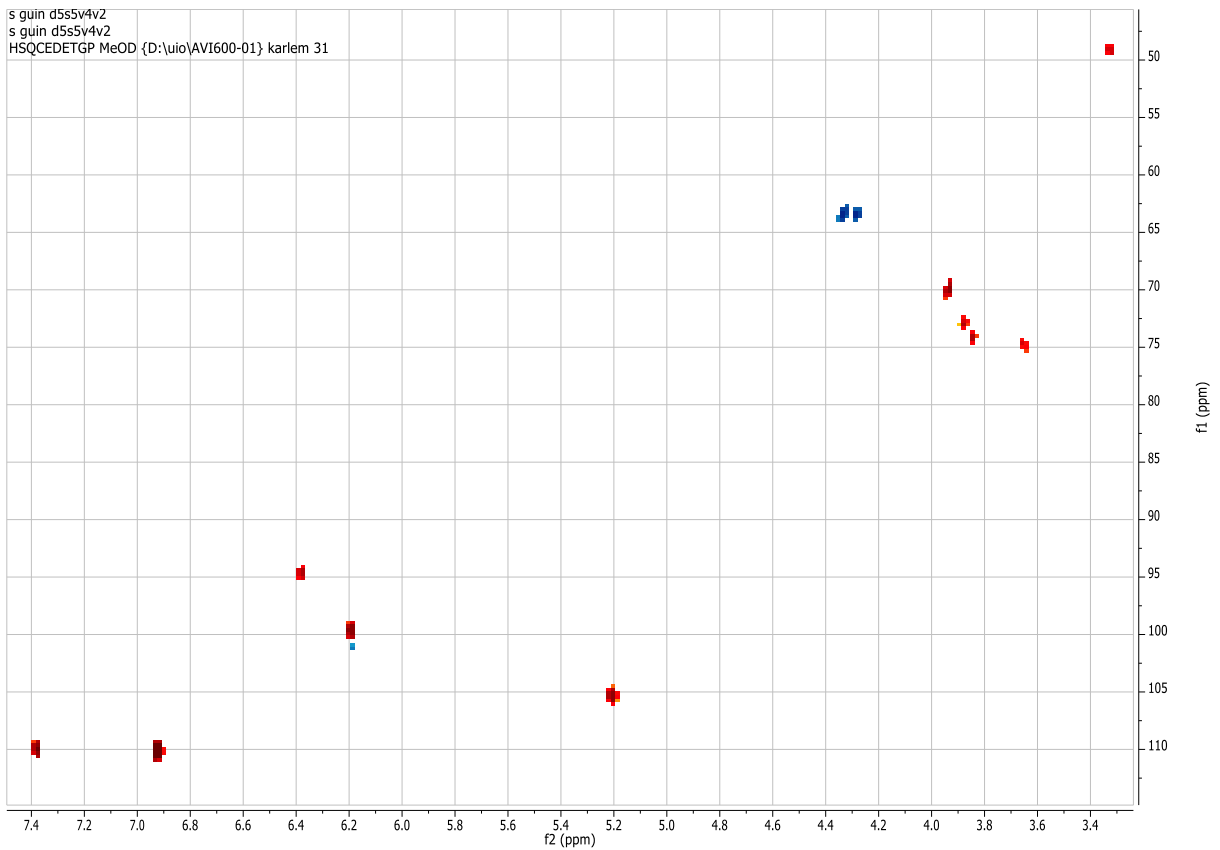
**NMR-spekter 15:  $^1\text{H}$  NMR-spekter 3-O- $\beta$ -D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )**



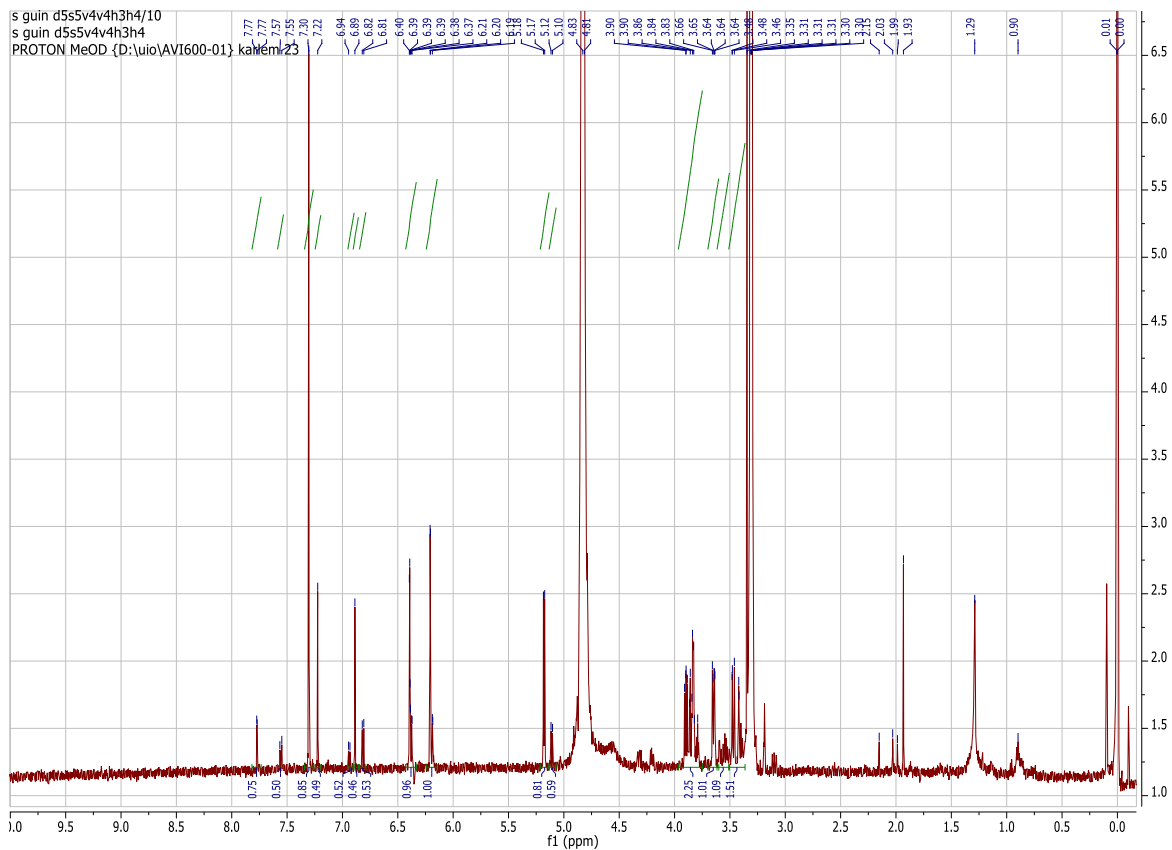
**NMR-spekter 16:  $^{13}\text{C}$  NMR-spekter 3-O- $\beta$ -D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )**



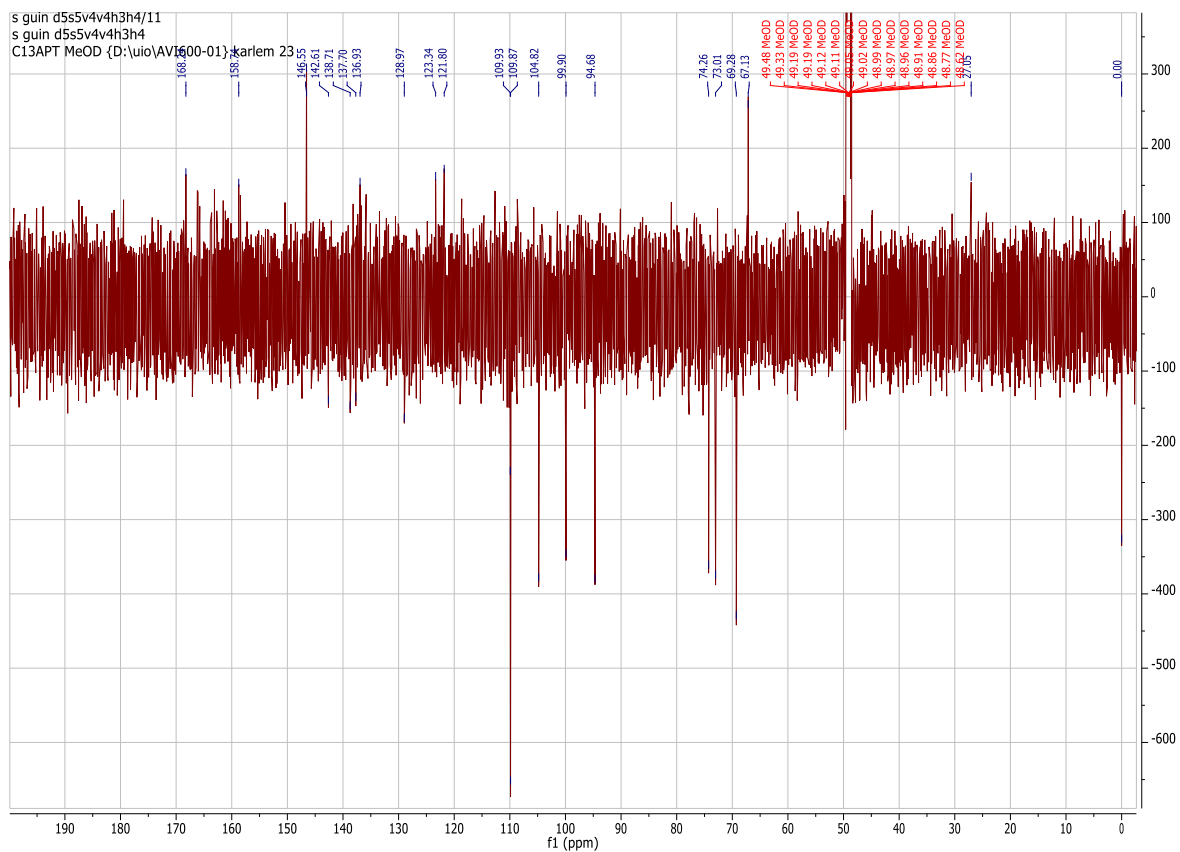
**NMR-spekter 17: COSY-spekter 3-O- $\beta$ -D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin ( $CD_3OD$ )**



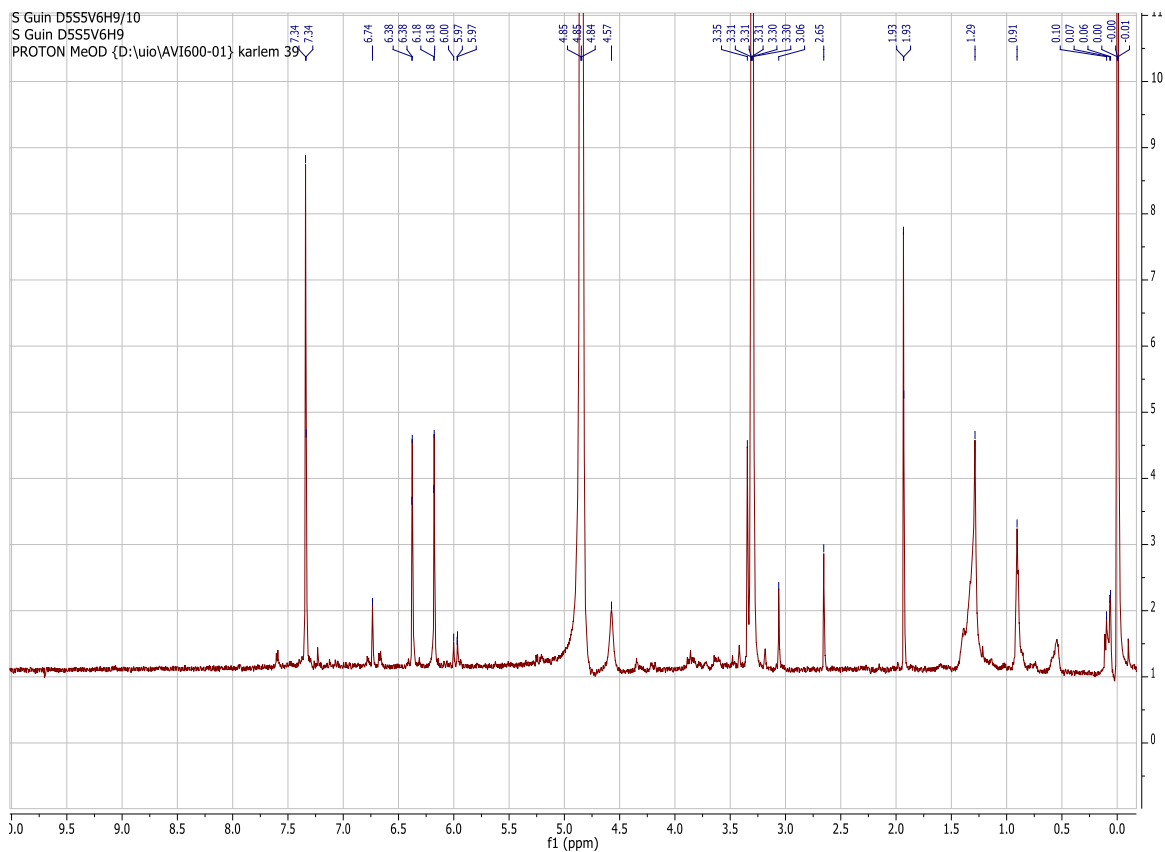
**NMR-spekter 18: HSQC-spekter 3-O- $\beta$ -D-(6''-O-galloylgalaktopyranosyl)-myricetin ( $CD_3OD$ )**



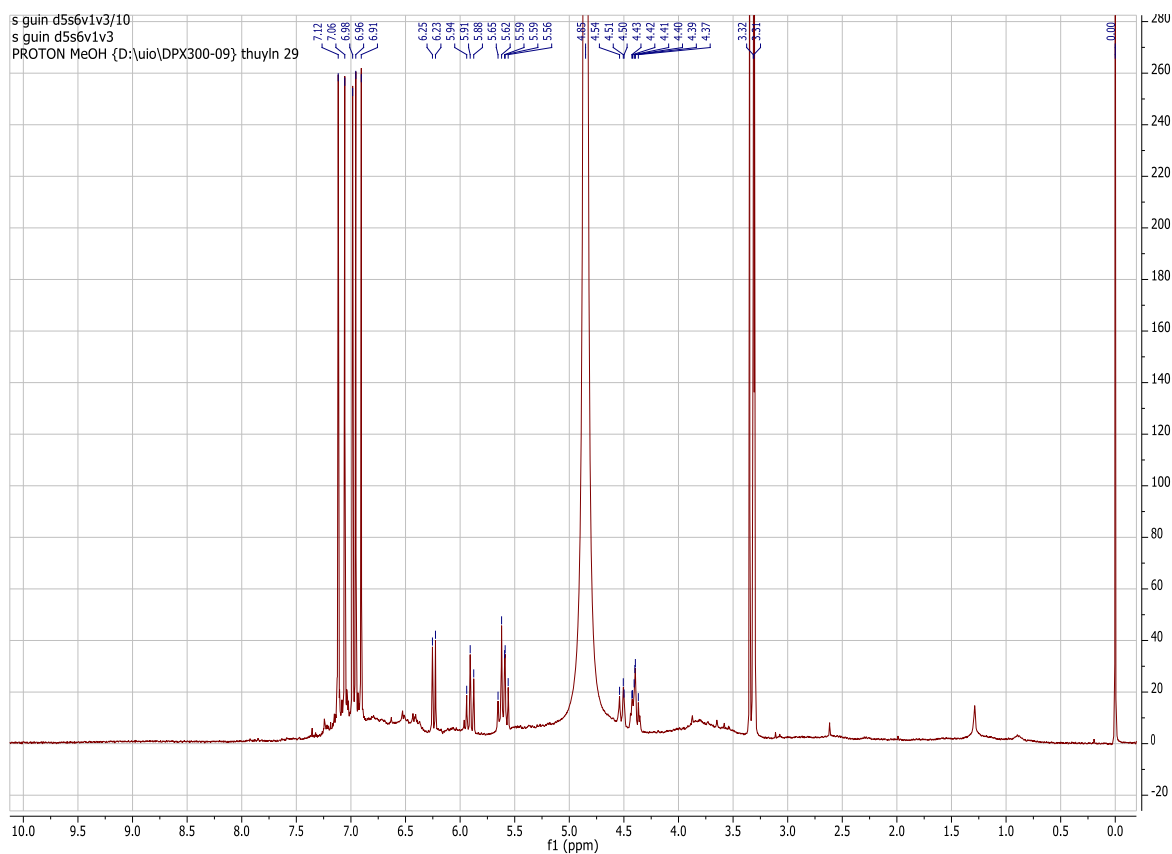
**NMR-spekter 19: <sup>1</sup>H NMR-spekter myricetin 3-O-glukuronid (CD<sub>3</sub>OD)**



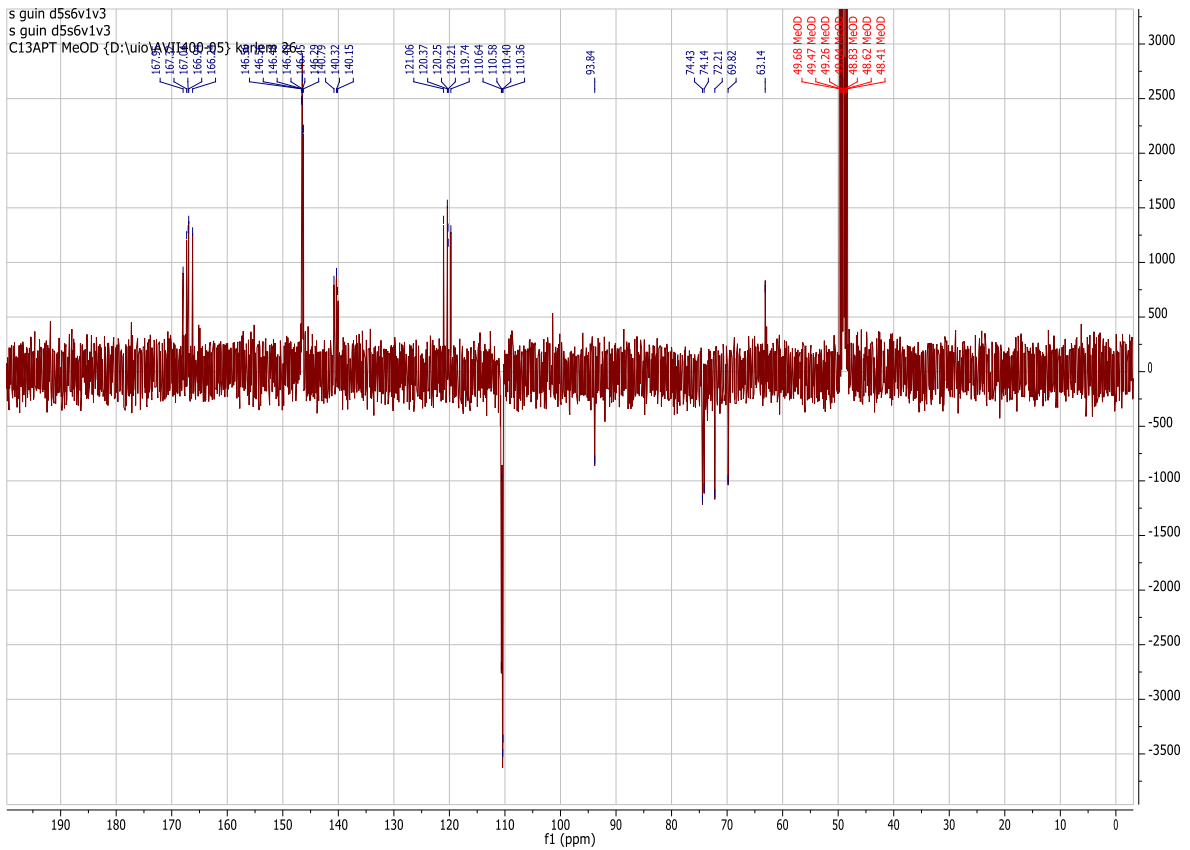
**NMR-spekter 20: <sup>13</sup>C NMR-spekter myricetin 3-O-glukuronid (CD<sub>3</sub>OD)**



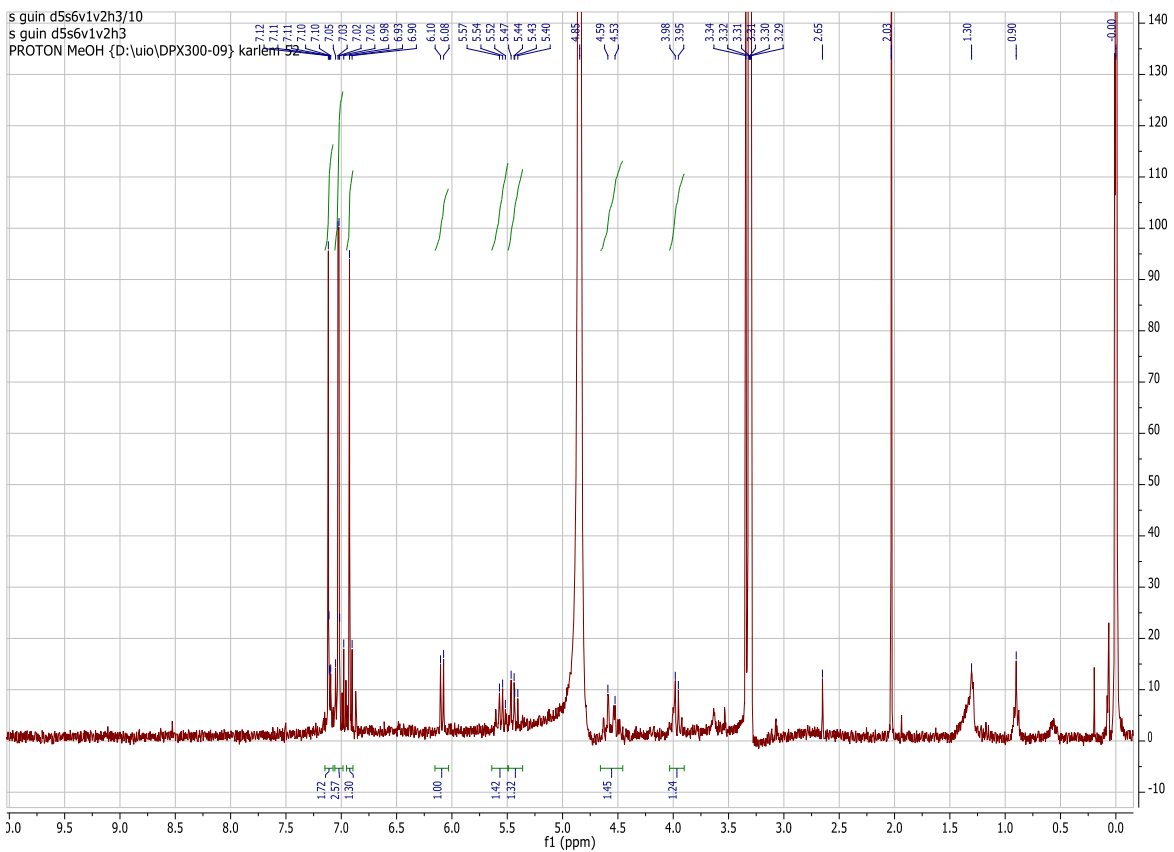
**NMR-spekter 21:  $^1\text{H}$  NMR-spekter myricetin ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )**



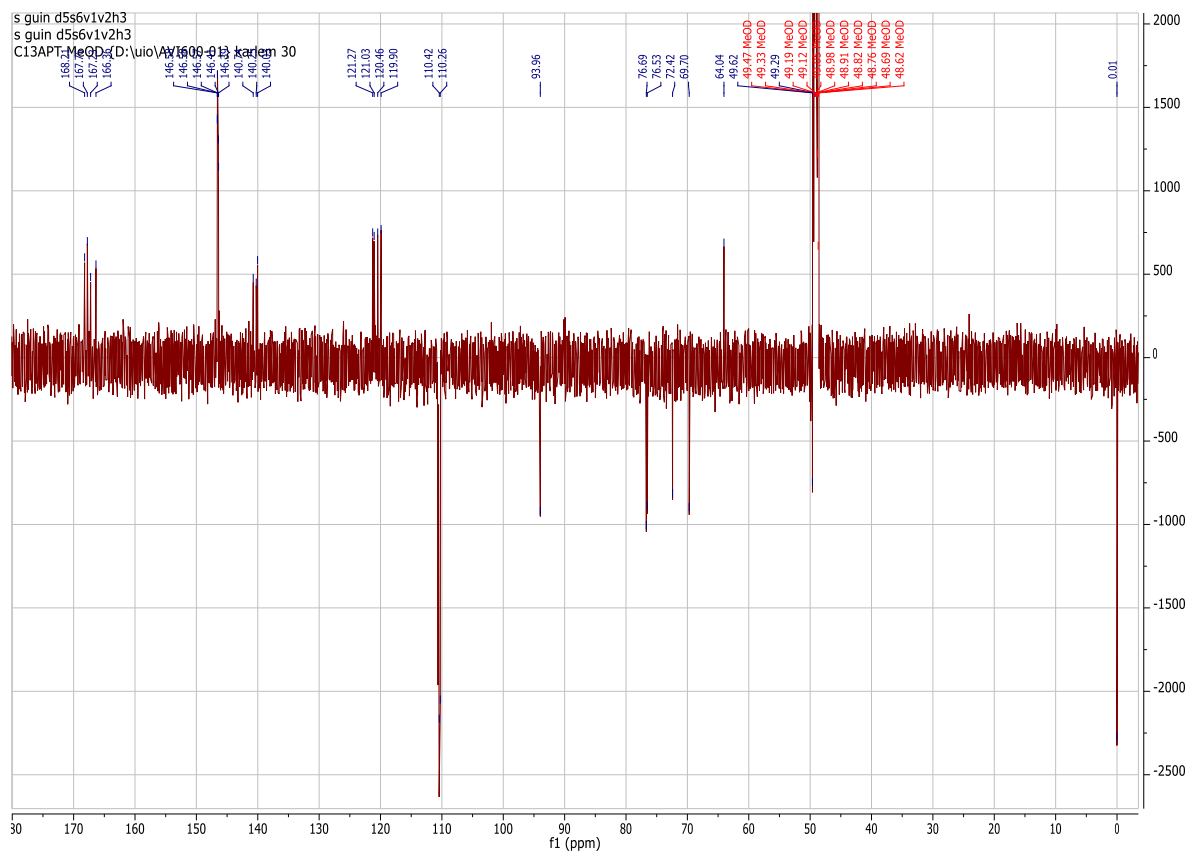
**NMR-spekter 22:  $^1\text{H}$  NMR-spekter 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glukose ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )**



**NMR-spekter 23:**  $^{13}\text{C}$  NMR-spekter 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glukose ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )



**NMR-spekter 24:**  $^1\text{H}$  NMR-spekter 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -D-glukose ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )



**NMR-spekter 25:  $^{13}\text{C}$  NMR-spekter 1,2,3,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -D-glukose ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )**

# Litteraturliste

- Al-Sayed, E., Martiskainen, O., Bobrowska-Hagerstrand, M., et al., (2010). Phenolic compounds from *Eucalyptus gomphocephala* with potential cytotoxic and antioxidant activities. *Natural Product Communications* **5**, 1639-1642.
- Ayele, Y., Urga, K. og Engidawork, E., (2010). Evaluation of *In vivo* antihypertensive and *in vitro* vasodepressor activities of the leaf extract of *Syzygium guineense* (Willd) D.C. *Phytotherapy Research* **24**, 1457-1462.
- Battelli, M.G., Polito, L. og Bolognesi, A., (2014). Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: Not only oxidative stress. *Atherosclerosis* **237**, 562-567.
- Beecher, G.R., (2003). Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *Journal of Nutrition* **133**, 3248-3254.
- Braca, A., Sortino, C., Politi, M., et al., (2002). Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology* **79**, 379-381.
- Cho, J.-Y., Sohn, M.-J., Lee, J., et al., (2010). Isolation and identification of pentagalloylglucose with broad-spectrum antibacterial activity from *Rhus trichocarpa* Miquel. *Food Chemistry* **123**, 501-506.
- Cho, Y.J., An, B.J. og Choi, C., (1993). Isolation and enzyme inhibition of tannins from Korean green tea. *Korean Biochemical Journal* **26**, 216-223.
- Cole, B.K., Lieb, D.C., Dobrian, A.D., et al., (2013). 12- and 15-lipoxygenases in adipose tissue inflammation. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **104–105**, 84-92.
- Davis, A.L., Cai, Y., Davies, A.P., et al., (1996). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols. *Magnetic Resonance in Chemistry* **34**, 887-890.
- De Leo, M., Braca, A., Sanogo, R., et al., (2006). Antiproliferative Activity of *Pteleopsis suberosa* Leaf Extract and its Flavonoid Components in Human Prostate Carcinoma Cells. *Planta Medica* **72**, 604-610.
- Dionex. (2011). ASE 350® Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual Dionex Corporation, Sunnyvale, USA.
- Djoukeng, J., (2007). Identification of ellagic acid derivatives from stem bark of *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *Natural Product Communications* **2**, 261-266.
- Djoukeng, J.D., Abou-Mansour, E., Tabacchi, R., et al., (2005). Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **101**, 283-286.
- EOL (2015a) *Artemia salina* Brine Shrimp. <http://eol.org/pages/1020243/details> Aksessert 23.februar 2015.
- EOL (2015b) *Syzygium guineense* Dwarf Waterberry. [http://eol.org/pages/5589455/hierarchy\\_entries/57304433/names/synonyms](http://eol.org/pages/5589455/hierarchy_entries/57304433/names/synonyms) Aksessert 6.mars 2015.
- Fouad, M.A. og Abdel-Hafeez, A.S., (2009). Chemical and biological studies of the methanolic extract of *Primula elatior* L. seeds. *Bulletin of Pharmaceutical Science, Assiut University* **32**, 111-123.
- Funk, C.D. og Cyrus, T., (2001). 12/15-Lipoxygenase, Oxidative Modification of LDL and Atherogenesis. *Trends in Cardiovascular Medicine* **11**, 116-124.
- Furusawa, M., Ito, T., Nakaya, K.I., et al., (2003). Flavonol Glycosides in Two Diospyros Plants and Their Radical Scavenging Activity. *Heterocycles* **60**, 2557-2563.
- Ghildyal, P., Groenhaus, T.E., Rusten, A., et al., (2010). Chemical composition and immunological activities of polysaccharides isolated from the Malian medicinal plant *Syzygium guineense*. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* **2**, 76-85.
- Halliwell, B. (2001) Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0002269.pub3> Aksessert 6.mai 2015.

- Halliwell, B. (2005) Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0003913/pdf> Aksessert 25.mars 2015.
- Halliwell, B. (2015) Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0002269.pub3/pdf> Aksessert 25.mars 2015.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., et al., (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* **33**, 601-617.
- Halliwell, B. og Gutteridge, J.M.C. (2015). Free Radicals in Biology and Medicine. 5.utgave, Oxford University Press, Oxford, England.
- Hayashi, T., Hayashi, K., Nagayama, M., et al., (1989). Pentagalloylglucose, A Xanthine Oxidase Inhibitor from a Paraguayan Crude Drug, "Molle-I" (Schinus terebinthifolius). *Journal of Natural Products* **52**, 210-211.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. og Bobilya, D.J., (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **13**, 572-584.
- Hilbert, G., Temsamani, H., Bordenave, L., et al., (2015). Flavonol profiles in berries of wild Vitis accessions using liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry. *Food Chemistry* **169**, 49-58.
- Hsieh, C.Y. og Chang, S.T., (2010). Antioxidant activities and xanthine oxidase inhibitory effects of phenolic phytochemicals from *Acacia confusa* twigs and branches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 1578-1583.
- Hsu, F.-L., Huang, W.-J., Wu, T.-H., et al., (2012). Evaluation of Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacities of Polyphenolics from Pods of *Caesalpinia pulcherrima*. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 6073-6088.
- Iwashina, T., Kitajima, J. og Takemura, T., (2012). Flavonoids from the leaves of six *Corylopsis* species (Hamamelidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **44**, 361-363.
- Kiss, A.K., Bazylo, A., Filipek, A., et al., (2011). Oenothrin B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of *Epilobium* sp. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **18**, 557-560.
- Korol'kina, L.M., Shul'ts, E.E., Zhusupova, G.E., et al., (2004). Biologically active compounds from *Limonium Gmelinii* and *L. Popovii* I. *Chemistry of Natural Compounds* **40**, 465-471.
- Lambert, J.B. og Mazzola, E.P. (2004). Nuclear magnetic resonance spectroscopy Pearson Education Inc., Upper Saddle River, USA.
- Lapenna, D., Ciofani, G., Pierdomenico, S.D., et al., (2003). Dihydrolipoic acid inhibits 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine* **35**, 1203-1209.
- Lespade, L. og Bercion, S., (2010). Theoretical Study of the Mechanism of Inhibition of Xanthine Oxydase by Flavonoids and Gallic Acid Derivatives. *The Journal of Physical Chemistry. B* **114**, 921-928.
- Lyckander, I.M. og Malterud, K.E., (1990). Lipoxygenase inhibiting flavonoids from *Orthosiphon spicatus*. I Das, N.P. (red.): *Flavonoids in Biology and Medicine III: Current Issues in Flavonoid Research*, 469-474.
- Lyckander, I.M. og Malterud, K.E., (1996). Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* prevent oxidative inactivation of 15-lipoxygenase. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **54**, 239-246.
- Mahajan, A. og Pai, N., (2010). Simultaneous isolation and identification of phytoconstituents from *Terminalia chebula* by preparative chromatography. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **2**, 97-103.



Malele, R.S., Moshi, M.J., Mwangi, J.W., et al., (1997). Pharmacological properties of extracts from the stem bark of *Syzygium guineense* on the ileum and heart of laboratory rodents. African Journal of Health Sciences **4**, 43-45.

Malterud, K.E. (1998). Procedure for assay of 15-lipoxygenase inhibition. Internt notat. Farmasøytisk institutt, Seksjon for Farmakognosi, Universitetet i Oslo.

Malterud, K.E. (2009). Procedure for DPPH assay for radical scavenging. Internt notat. Farmasøytisk institutt, Seksjon for Farmakognosi, Universitetet i Oslo.

Marino, S.D., Gala, F., Zollo, F., et al., (2008). Identification of Minor Secondary Metabolites from the Latex of *Croton lechleri* (Muell-Arg) and Evaluation of Their Antioxidant Activity. Molecules **13**, 1219-1229.

Maroyi, A. (2008) *Syzygium guineense* (Wild.) DC. I: Louppe D., Oteng-Amoako, A.A. & Brink, M. (Red.) Protá 7(1): Timbers/Bois d'œuvre 1.  
[http://database.prota.org/PROTAhtml/Syzygium\\_guineense\\_En.htm](http://database.prota.org/PROTAhtml/Syzygium_guineense_En.htm) Aksessert 22.mars 2015.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., et al., (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. Planta Medica **45**, 31-34.

Miean, K.H. og Mohamed, S., (2001). Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**, 3106-3112.

Mirecka, A.A., Kolodziejczyk-Czepas, J. og Wachowicz, B., (2013). Catechins - biological activity and role in the prevention of cardiovascular diseases. Kosmos (Krakow, Pol.) **62**, 77-85.

Mladěnka, P., Zatloukalová, L., Filipský, T., et al., (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radical Biology and Medicine **49**, 963-975.

Molyneux, P., (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology **26**, 211-219.

Nishizawa, M., Yamagishi, T., Nonaka, G.-i., et al., (1983). Tannins and related compounds. Part 9. Isolation and characterization of polygalloylglucoses from Turkish galls (*Quercus infectoria*). Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 961-965.

Noudogbessi, J.-P., Yédomonhan, P., Sohounhloúé, D.C., et al., (2008). Chemical composition of essential oil of *Syzygium guineense* (Willd.) DC. var. *guineense* (Myrtaceae) from Benin. Records of Natural Products **2**, 33-38.

Omastová, M., Mosnáčková, K., Trchová, M., et al., (2010). Polypyrrole and polyaniline prepared with cerium(IV) sulfate oxidant. Synthetic Metals **160**, 701-707.

Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., et al. (2009) Agroforestree Database: a tree reference and selection guide version 4.0.  
<http://www.worldagroforestry.org/treedb2/speciesprofile.php?Spid=1578> Aksessert 6.mars 2015.

Pacher, P., Nivorozhkin, A. og Szabó, C., (2006). Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. Pharmacological Reviews **58**, 87-114.

Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K.E. (2004). Legemiddelanalyse. 2. utgave, Fagbokforlaget, Bergen, Norge.

Pharmacia. (1975). Sephadex® LH 20 chromatography in organic solvents Pharmacia, Uppsala, Sverige.

Pieme, C., Ngoupayo, J., Nkoulou, C., et al., (2014). *Syzygium guineense* Extracts Show Antioxidant Activities and Beneficial Activities on Oxidative Stress Induced by Ferric Chloride in the Liver Homogenate. Antioxidants **3**, 618-635.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., et al. (2007). Pharmacology. 6. utgave, Churchill Livingstone, Edinburgh, Skottland.

Rashed, K., Ciric, A., Glamoclija, J., et al., (2014). Antibacterial and antifungal activities of methanol extract and phenolic compounds from *Diospyros virginiana* L. *Industrial Crops and Products* **59**, 210-215.

Robak, J., Shridi, F., Wolbis, M., et al., (1988). Screening of the influence of flavonoids on lipoxygenase and cyclooxygenase activity, as well as on nonenzymic lipid oxidation. *Polish journal of pharmacology and pharmacy* **40**, 451-458.

Rusten, A. (2006). Struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider isolert fra *Syzygium guineense*. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Scharbert, S., Holzmann, N. og Hofmann, T., (2004). Identification of the Astringent Taste Compounds in Black Tea Infusions by Combining Instrumental Analysis and Human Bioresponse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 3498-3508.

Sigma-Aldrich (2015) Diaion® HP-20.  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/13606?lang=en&region=NO>  
 Aksessert 9.februar 2015.

Solomons, T.W.G. og Fryhle, C.B. (2011). Organic chemistry. 10. utgave, John Wiley & Sons, Hoboken, USA.

Tropicos (2015) *Syzygium guineense* (Wild.) DC.  
<http://www.tropicos.org/Name/22102217?tab=synonyms> Aksessert 6.mars 2015.

Tsakala, T.M., Penge, O. og John, K., (1996). Screening of in vitro antibacterial activity from *Syzygium Guineense* (Willd) hydrosoluble dry extract. *Annales Pharmaceutiques Francaises* **54**, 276-279.

USDA (2015) Classification for Kingdom Plantae Down to Genus *Syzygium* P. Br. ex Gaertn.  
<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=SYZYG>  
 Aksessert 6. mars 2015.

van Leyen, K., (2013). Lipoxygenase: An Emerging Target for Stroke Therapy. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets* **12**, 191-199.

Vik, A. (2014). NMR-spektroskopi.Forelesningsnotater i FRM 4030.Farmasøytisk Insitutt, Universitetet i Oslo.

Wan, C., Yuan, T., Cirello, A.L., et al., (2012). Antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory phenolics isolated from highbush blueberry flowers. *Food Chemistry* **135**, 1929-1937.

Wangensteen, H. (2014). Antioksidanter, polyfenoler og flavonoider.Forelesningsnotater i FRM 5410.Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., et al., (2004). Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* **59**, 113-122.

Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., et al., (1998). Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Biochemical Pharmacology* **56**, 213-222.

Yoshimura, M., Amakura, Y., Tokuhara, M., et al., (2008). Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. *Journal of natural medicines* **62**, 366-368.

Zenze, K. (2013) *Syzygium guineense* (Wild.) DC.  
<http://www.plantzafrika.com/plantqrs/syzygiumguin.htm> Aksessert 16.mars 2015.

Zhang, J., Li, L., Kim, S.-H., et al., (2009). Anti-Cancer, Anti-Diabetic and Other Pharmacologic and Biological Activities of Penta-Galloyl-Glucose. *Pharmaceutical Research* **26**, 2066-2080.