

Bioaktive forbindelser i  
*Glinus oppositifolius*

Etnofarmakologiske studier i  
Mali

Truc Thi Nguyen



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk  
institutt

Det matematisk-naturvitenskapelig fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2012

# **Del I Bioaktive forbindelser i**

*Glinus oppositifolius*

# **Del II Etnofarmakologiske studier i Mali**

**Truc Thi Nguyen**

Masteroppgave i farmasi

Utført ved

Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelig fakultet

UNIVERSITET I OSLO

Mai 2012

Veiledere

Første amanuensis Helle Wangenstein

Professor emeritus Karl Egil Malterud

Professor Berit Smedstad Paulsen

Professor Drissa Diallo

# Forord

Jeg ønsker først og fremst å dedikere dette arbeidet til mine foreldre og takke dem og resten av familien for deres støtte og kjærighet

Videre vil jeg rette en varm og stor takk til Karl Egil Malterud for utrolig engasjerende oppfølging og høy faglig kompetanse. Hans bidrag under dette arbeidet har vært ubeskrivelig. Ytterligere ønsker jeg å takke Helle Wangensteen for hennes fagligveiledning og gode råd.

Jeg vil også takke Berit Smestad Paulsen og Drissa Diallo for god støtte under masteroppgaven og tilrettelegging av feltarbeidet i Mali.

Til sist, men ikke minst, vil jeg utrykke min takknemlighet til alle i avdelingen, samt mine gode medstudenter, for å ha bidratt til et hyggelig og koselig hovedfagsår.

Oslo, mai 2012

Truc Thi Nguyen

# INNHALDSFORTEGNELSE

<b>1. SAMMENDRAG .....</b>	<b>8</b>
<b>2. FORKORTELSER.....</b>	<b>10</b>
<b>3. HENSIKTEN MED OPPGAVEN.....</b>	<b>11</b>
<b>4. BAKGRUNN.....</b>	<b>13</b>
4.1 <i>GLINUS OPPOSITIFOLIUS</i> .....	13
4.1.1 Taksonomisk klassifisering .....	13
4.1.3 Habitat .....	14
4.1.4 Tradisjonell bruk.....	14
4.1.5 Tidligere studier.....	15
4.1.6 Høymolekylære forbindelser.....	17
4.2 ANTIOKSIDANTER .....	19
4.2.1 Hva er antioksidanter ? .....	19
4.2.2 Antioksidantforsvar.....	19
4.2.2a Enzymatiske antioksidanter i kroppen omfatter: .....	20
4.2.2b Antioksidanter som finnes i kosten : .....	21
4.2.3 Frie radikaler og oksidativt stress .....	22
4.2.3 a Frie radikaler.....	24
4.2.3b Ikke radikaler.....	25
4.2.4 Kilder til frie radikaler og reaktive species .....	26
4.3 ARAKIDONSYRE METABOLISME OG 15 LO .....	27
4.3.1 Arakidonsyre.....	27
4.3.2 Arakidonsyremetabolisme og lipoxygenase .....	27
4.4 SAPONINER .....	29
4.4.1 Struktur .....	30
<b>5. EKSPERIMENTELT .....</b>	<b>31</b>
5.1 MATERIALER.....	31
5.1.1 Kjemikaler.....	31
5.1.2. Apparaturl.....	32
<b>5.2 METODER .....</b>	<b>34</b>
5.2.1 GENERELLE METODER.....	34
5.2.1.1 Vannkvalitet .....	34
5.2.1.2 Innveiling .....	34
5.2.1.3 Inndamping .....	34

5.2.1.4 Filtrering.....	34
5.2.2 Separasjonsmetoder.....	35
5.2.2.1 væske- væske ekstraksjon.....	35
5.2.2.2 Versaflash kolonnekromatografi.....	36
5.2.2.3 Kromatotron.....	38
5.2.3 IDENTIFIKASJONSMETODER.....	40
5.2.3.1 Analytisk væskekromatografi (HPLC).....	40
5.2.3.2 Tynnsjiktchromatografi (TLC, thin-layer chromatography).....	42
5.2.3.3 Ceric spraying.....	43
5.2.3.4 NMR spektroskopi (Nuclear Magnetic Resonance).....	44
5.2.4 METODE FOR BIOLOGISK MÅLING.....	49
5.2.4.1 DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl) måling.....	49
5.2.4.2 15- Lipoksygenase enzymhemming.....	51
5.2.4.3 Xanthin oksidase hemming.....	54
5.2.4.4 Brine shrimp test i mikrobrønner.....	57
<b>5.3 EKSPERIMENTELL UTFØRELSE.....</b>	<b>59</b>
5.3.1. Ekstraksjon med diklormetan, DCM.....	59
5.3.2 Ekstraksjon med Metanol, meOH.....	59
5.3.3 Suspensjon i destillert vann, H <sub>2</sub> O.....	60
5.3.4. Væske-væske ekstraksjon med Etylacetat, EtOAc.....	60
5.3.5. Væske-væske ekstraksjon med BuOH.....	61
5.3.6 NMR.....	61
5.3.7 BIOASSAY.....	62
5.3.7.1 DPPH- måling.....	62
5.3.7.2 Lipoksygenase hemming.....	62
5.3.7.3 Xanthin oksidase.....	62
5.3.7.4 Brine shrimp test.....	62
5.3.8 FRAKSJONERING AV ETOAC- EKSTRAKTET.....	63
5.3.8.1 Versaflash kolonne kromatografi.....	63
5.3.8.2 15- LO hemming.....	64
5.3.8.3 Xanthin oksidase hemming.....	64
5.3.8.4 Analytisk HPLC.....	64
5.3.9 PREPARATIV KROMATOGRAFI AV ETOAC EKSTRAKT EV1.....	64
Utfelling av EV1V3.....	65
15-LO hemming av vitexin.....	66
Utfelling av EV1V8.....	66
5.3.9.1 Preparativ kromatografi av EtOAc fraksjon EV1 V9.....	66
5.3.10 KROMATOTRONSEPARERING AV ETOAC FRAKSJON EV3.....	67
5.3.10.1 Kromatotronseparering av EtOAc fraksjon EV3C5.....	68
5.3.11 KROMATOTRONSEPARERING AV ETOAC FRAKSJON EV5.....	69
5.4 PREPARATIV KROMATOGRAFI OG OPPARBEIDELSE AV BUOH EKSTRAKT.....	69
5.4.1 Preparativ kromatografi og opprensing av BuOH ekstrakt BV2.....	70

5.4.1a Opparbeidelse av BV2V6.....	71
5.4.2 PREPARATIV KROMATOGRAFI AV BUOH FRAKSJON BV9 .....	72
<b>6. RESULTATER OG DISKUSJON.....</b>	<b>73</b>
6.1 EKSTRAKSJON MED MEOH .....	73
6.2 NMR.....	73
6.2.1 NMR-spekter av DCM-ekstrakt.....	73
6.2.2 NMR spekter av MeOH-ekstrakt.....	74
6.2.3 NMR spekter av EtOAc-ekstrakt .....	74
6.2.4 NMR spekter av BuOH-ekstrakt.....	74
6.2.5 NMR spekter av vannfasen.....	74
6.3 DPPH-SCAVENGING.....	75
6.4 15-LO HEMMING.....	76
6.4.1 15-LO hemming av alle ekstraktene .....	76
6.4.2 15-LO hemming av EtOAc-ekstraktet .....	77
6.5 BRINE SHRIMP TEST.....	77
6.6 XANTHIN OKSIDASE-HEMMING .....	80
6.7 FRAKSJONERING AV ETOAC- EKSTRAKTET.....	81
6.8 PREPARATIV KROMATOGRAFI AV ETOAC EKSTRAKT EV1.....	84
6.9 UTFELLING AV EV1V3 .....	85
6.10 UTFELLING AV EV1V8 .....	87
6.11 KROMATOTRONSEPARERING AV ETOAC EKSTRAKT V1V9.....	87
6.12 FRAKSJONERING AV ETOAC EKSTRAKT EV3.....	88
6.13 KROMATOTRONSEPARERING AV ETOAC EKSTRAKT EV3C5 .....	89
6.14 UTFELLING AV EV3C7 (C12) .....	90
6.15 KROMATOTRONSEPARERING AV ETOAC FRAKSJON EV5.....	90
6.16 PREPARATIV KROMATOGRAFI OG OPPARBEIDELSE AV BUOH EKSTRAKT.....	92
6.17. PREPARATIV KROMATOGRAFI OG OPPRENSING AV BUOH EKSTRAKT BV2 .....	92
<b>7. ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER I MALI .....</b>	<b>98</b>
7.1 ETNOFARMAKOLOGI .....	98
7.2 MALI.....	99
7.3 TRADISJONELL MEDISIN .....	100
7.3.1 Hva er en tradisjonell healer? .....	101
7.3.2 Fordeler med tradisjonell medisin.....	101
7.3.5 TILBEREDNING OG APPLISERING AV DROGER .....	102
7.4 TRADISJONELL MEDISIN I MALI.....	103
7.5 FELTARBEID I MALI .....	104
7.6 FEM PLANTER SOM ANVENDES AV TRADISJONELLE HEALERE I MALI .....	107
7.7 BILDER AV FEM PLANTER SOM ANVENDES I TRADISJONELL MEDISIN .....	114
<b>8. KONKLUSJON.....</b>	<b>115</b>
8.1 VIDERE ARBEID MED <i>GLINUS OPPOSITIFOLIUS</i> .....	116

## 9. VEDLEGG..... 118

9.1 FLYTSKJEMA .....	118
9.1.1 Flytskjema <i>Glinus oppositifolius</i> .....	118
9.1.2 Flytskjema <i>Glinus oppositifolius</i> EtOAc råekstrakt.....	119
9.1.3 Flytskjema <i>Glinus oppositifolius</i> EtOAc fraksjon EV1 .....	120
9.1.4 Flytskjema <i>Glinus oppositifolius</i> EtOAc fraksjon EV3.....	121
9.1.5 Flytskjema <i>Glinus oppositifolius</i> EtOAc fraksjon EV 5 .....	122
9.1.6 Flytskjema <i>Glinus Oppositifolius</i> BuOH råekstrakt .....	123
9.2.1 Brine shrimp resultater ved konsentrasjon 0,1-10mg/mL.....	124
9.2.2 Brine shrimp resultater ved konsentrasjon 5mg/mL-40 mg/mL .....	126
9.3. NMR-SPEKTRA .....	128
9.3.1. $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av DCM-ekstrakt av <i>G. oppositifolius</i> .....	128
9.3.2 $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av MeOH råekstrakt av <i>G. oppositifolius</i> .....	129
9.3.3 $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av EtOAc råekstrakt av <i>G. oppositifolius</i> .....	130
9.3.3.1 $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av EtOAc fraksjon EV1. ....	131
9.3.3.1b $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av EtOAc fraksjon EV1V8C6-10.....	133
9.3.3.2 a $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av fraksjon EV3C5C5-7 .....	136
9.3.3.2.b $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av fraksjon EV3C7 .....	137
9.3.3.3 $^1\text{H}$ NMR spektrum av fraksjon EV5. ....	138
9.3.3.3a $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av EtOAc fraksjon EV5C3+4. ....	139
9.3.4 $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av BuOH-råekstrakt av <i>G. oppositifolius</i> .....	140
9.3.4.1a $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av BuOH fraksjon BV2V6 .....	141
9.3.4.1 $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av BuOH fraksjon BV2V6C10.....	142
9.3.4.2bb. Utsnitt av $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av BuOH fraksjon BV2V6C10...	143
9.3.4.2 $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av BuOH fraksjon BV9.....	144
9.3.5 $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av vannekstrakt av <i>G. oppositifolius</i> .....	146

## REFERANSER..... 147

# 1. Sammendrag

*G. oppositifolius* blir i dag anvendt til en rekke terapeutiske behandlinger i ulike land. Dens bidrag til tradisjonell medisin har vært av stor viktighet, og substanser fra planten har blitt isolert og analysert for bioaktivitet i flere land.

*G. oppositifolius* ble ekstrahert med DCM og MeOH. MeOH-ekstraktet ble fordelt mellom EtOAc BuOH og vann. Det ble observert sterk skumming i MeOH ekstraktet, noe som kan tyde på tilstedeværelse av saponiner. Videre ble det utført isolering og opprensing av aktuelle ekstrakter og fraksjoner ved hjelp av kolonne-, kromatotron- og tynnsjikt-kromatografi. De mest interessante forbindelser ble videre isolert og analysert med  $^1\text{H}$ - og  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopi. Fra EtOAc fraksjon ble det isolert triterpensaponinene GO1, GO5, GO6 og flavonoidet vitexin som tidligere har blitt isolert og identifisert. Et stoff som antas å være aglykonet av GO1 ble isolert fra EtOAc ekstraktet. Dette er ikke tidligere beskrevet. Det ble også isolert GO1 i BuOH ekstraktet. Videre ble det oppdaget et glykosid av GO1 i BuOH ekstraktet, dette er en ny forbindelse som tidligere ikke har blitt beskrevet.

Råekstraktene ble testet for 15-lipoksygenase (15 LO)- og Xanthin oksidase hemming, DPPH scavenging og toksisitet ved bruk av brine shrimp assay. Ingen av ekstraktene utøvde god 15 LO hemming utenom EtOAc ekstraktet, som utøvde en moderat hemmende effekt. Dette kan muligens forklares av vitexininholdet i planten. Ren vitexin ble testet for 15 LO hemming og viste seg å ha god hemmende effekt på 15 LO på lik linje med quercetin. DPPH-målinger som ble foretatt på råekstrakter viste lav aktivitet.

Toksisitetsmåling av brine shrimp ble anvendt på alle 6 råekstrakter ved ulike konsentrasjoner ( fra 0,1- 40 mg/mL). Ingen av ekstraktene viste noe tegn til toksisitet utenom EtOAc råekstrakt, som viste svakt toksisk effekt ved konsentrasjon 40 mg/mL. Ifølge resultater fra xanthin oksidase-hemming utøvde vannekstrakter fra *G. oppositifolius* aktiverende effekter på enzymet og derved økt dannelse av produkter.



*G. oppositifolius* anvendes hovedsakelig i Nord-Mali, og det er fåtall som anbefaler planten i Bamako, Siby eller Dioila. I et intervju med en kvinnelig healer i Bamako kom det frem at det er i stor grad nord-malianere i Bamako som anvender denne planten. Plantens indikasjonsområde omfatter blant annet malaria, fordøyelsesproblemer som konstipasjon, kvalme og oppkast.

## 2. Forkortelser

Tabell 2.1 Oversikt over forkortelser i oppgaven

Forkortelse	Fullstendig betegnelse
AG I	Arabinogalaktan type II
ATP	Adenosintrifosfat
BuOH	Butanol
CD <sub>3</sub> OD	Deuterert metanol
COX	Cykloxygenase
DCM	Diklormetan
DMSO	Dimetylsulfoxid
DMT	Department of traditional medicine
DPPH	1,1-difenyl-2- pikrylhydrazyl
EtOAc	Etylacetat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoksid
HPLC	High performance liquid chromatography
HPETE	Hydroperoxid derivater
<i>G. oppositifolius</i>	<i>Glinus oppositifolius</i>
GSH	Redusert glutathion
GSSG	Oksidert glutathion
GSHPX	Glutathion peroxidase
H <sub>2</sub> O	Vann
HOCl <sup>-</sup>	Hypoklorsyre
IC <sub>50</sub>	Konsentrasjon som gir 50% hemming
LOX	Lipoksygenase enzym
MeOH	Metanol
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotidfosfat
NMR	Nukleær magnetisk resonans
ONOO <sup>-</sup>	Peroksynitritt
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoksid
QUE	Quercetin
RG-I	Rhamnogalakturonan type I
RG-II	Rhamnogalakturonan type II
RNS	Reaktiv nitrogen species
ROS	Reaktiv oksygen species
RP	Reverse phase
RSS	Reaktiv svovel species
RHS	Reaktiv halogen species
SD	Standard avvik
SOD	Superoksid dismutase
TLC	Tynnsljiktromatografi
UV	Ultraviolet
XDH	Xanthin reduktase
XO	Xanthin oksidase
XOR	Xanthin oksidoreduktase
WHO	World Health Organization

### 3. Hensikten med oppgaven

*Glinus oppositifolius* er en plante som anvendes mot ulike inflammasjonslidelser og mot infeksjon av malariaparasitten. Hensikten med denne oppgaven var å isolere og identifisere biologisk aktive molekyler som kunne være underliggende årsaker til plantens terapeutiske effekt. Det ble anvendt analytisk og preparativ kromatografi og spektroskopi for å isolere og identifisere de lavmolekylære innholdsstoffene og det ble utført bestemte bioaktivitetstester på utvalgte ekstrakter. For å øke forståelsen og kunnskapen om tradisjonell bruk av planten, skulle det samles inn informasjon om plantens medisinske bruk i Mali. Dette ble gjort gjennom intervjuer med healere og tett samarbeid med Institutt for tradisjonell medisin i Mali. (TMD, Traditional Medicine Departement).

**Del I**  
**Bioaktive forbindelser i**  
***Glinus oppositifolius***



**Truc Thi Nguyen**  
**Avdeling for farmasøytisk kjemi**  
**Farmasøytisk institutt**  
**2012**

## 4. Bakgrunn

### 4.1 *Glinus oppositifolius*

#### 4.1.1 Taksonomisk klassifisering

##### Systematikk for *Glinus oppositifolius*

Rike: Plantae

Divisjon: Magnoliophyta

Klasse: Magnoliopsida

Order: Caryophyllales

Familie: Molluginacea

Slekt : *Glinus*

Art: *Oppositifolius*

#### Synonymer

*Glinus cambessedesii* Fenzl.

*Glinus denticulatus* (Guill. & Perr.) Fenzl.

*Glinus mollugo* Fenzl.

*Glinus spergula* (L.) Steud.

*Mollugo spergula* L.

*Mollugo glinoides* A. Rich.

*Mollugo oppositifolia* L.

*Mollugo serrulata* Sond.

Gjennom årene har *Glinus oppositifolius* fått på seg flere betegnelser. Dette kan skyldes nyere informasjon om plantens slektskapsforhold som har ført til endring av slektsnavnet eller artsnavnet. Andre grunner kan være at planten har blitt navngitt av flere personer, uten at de selv hadde kjennskap til plantens foreliggende navn. Mangel på kommunikasjon i tidligere tid kan være en avgjørende faktor i dette tilfelle (Austarheim 2007).

### 4.1.2 Botanikk

*Glinus oppositifolius* er en ettårig plante som kan bli opptil 40 cm lang. Den vokser krypende på bakken eller aksialt på husvegger. Bladene sitter mot hverandre 2 mot 2, i en sirkulær krets av 4-6 blader (Austarheim 2007; Inngjerdingen 2007). Bladene kan bli 2-3 centimeter lange med en glatt overflate og litt taggete sidekanter mot tuppen. De anses å være i noe grad sukkulente. *G. oppositifolius* blomsten består kun av 5 begerblader, uten noen kronblad. Disse begerbladene har en omvendt eggformet fasong som er 4-5 millimeter lange med en farge som kan variere fra hvit til grønn. Blomsterstilkene er som vanligvis 1,5 centimeter lange og plantens frø er som regel små og brune med uregelmessig tekstur (Burkill 1985; Austarheim 2007).

### 4.1.3 Habitat

*Glinus oppositifolius* finnes i store deler av verden. Dens habitat i Afrika strekker seg fra Senegal til Sør-Nigeria og den forekommer vanligvis i tropiske og subtropiske områder (Burkill 1985; Inngjerdingen 2007). Den lever i områder hvor det er fuktig sand med lav pH, lavt nitrogen innhold og høyt fosfor innhold. Den observeres ofte på steder hvor det er vann kun deler av året, som ved regntider. I Mali vil *Glinus oppositifolius* befinne seg på mange steder, men i tørketider ses den kun ved innsjøer i Gourma området. De befinner seg vanligvis i nordre del av Mali, områdene Gourma, Dire, Haussa og ved Lac Horo (Inngjerdingen 2007).

### 4.1.4 Tradisjonell bruk

I Mali blir den øvre delen av *Glinus oppositifolius* planten tørket, pulverisert og deretter blandet i mat til behandling av magesmerte og gulsott. Ved malariainfeksjon blir pulverisert *G. oppositifolius* blandet i vann, sur melk eller *Echinochloa stagnina* P. Beauv (Poacea) juice ( juice presset fra stammene) i noen få minutter og deretter drukket. Ferske blader av *G. oppositifolius* har blitt anvendt i forbindelse med svimmelhet og ved stimulering av appetitt. Fire håndfulle av ferske blader knuses og blandes med sur melk eller *E. Stagnina* juice. Et teglass av dette inntas hver dag for behandling mot svimmelhet og dårlig appetitt.

Andre indikasjonsområder for behandling med *G. oppositifolius* er ved lidelser som inflammasjon, leddsmerte, tarmparasitter og diaré. Ytterligere har planten blitt brukt

ved behandling av feber, sår og hudproblemer (Burkill 1985; Austarheim 2007; Inngjerdingen 2007).

*G. oppositifolius* anvendes også i andre land på andre indikasjoner. I India har planten blitt omtalt som magestyrkende og et middel mot forstoppelse, i tillegg blir planten anvendt på hudinfeksjoner, som et antiseptikum (Austarheim 2007; Inngjerdingen 2007). Ved behandling av øreverk og hudlidelser har ferske bladekstrakter blitt tatt i bruk. Det blir tilberedet varme ekstrakter til behandling av øreverk, og kalde ekstrakter til applisering på hudlidelser.

I Kenya behandles hodepine og mageproblemer med *G. oppositifolius*. Andre steder som i Tanganyika blir ferske blader maserert sammen med smør og applisert på hovne tær og fingrer, i Zaire derimot blir planten omtalt som et sårhelende middel.

*G. oppositifolius* anvendes som fôr både for mennesker og dyr.

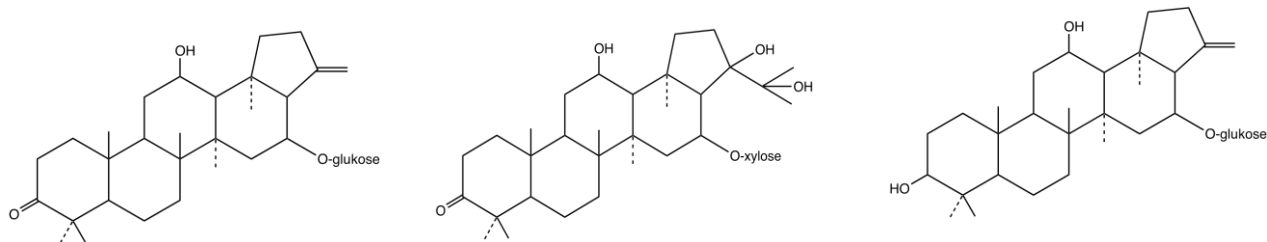
I Filippinene blir hele planten utenom roten ansett som en grønnsak og tilberedes ved lang koking for å få vekk den bitre smaken, mens dyra i Zaire beiter på denne planten ved mangel av bedre fôr (Burkill 1985; Inngjerdingen 2007).

Det har blitt observert forgiftninger ved stort inntak hos kveg. Planten har blitt rapportert å inneholde store mengder av jern og kalsium. *Glinus oppositifolius* selges på markedet sammen med andre planter av samme slekt til samme indikasjon. Dette kan tyde på at disse plantene muligens har samme bioaktive stoffer, eller inneholder aktive forbindelser fra samme biosyntesespor (Austarheim 2007; Inngjerdingen 2007).

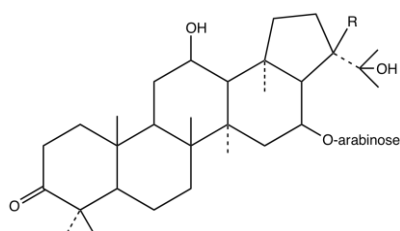
#### **4.1.5 Tidligere studier**

##### **Lavmolekylære forbindelser**

En rekke studier har blitt utført på *G. oppositifolius* og under plantens synonyme navn *Mollugo spergula* og *Mollugo oppositifolius* (Austarheim 2007). Stoffet som ble isolert før 1998 omfatter blant annet saponiner, alkaloider og alkaner. Den første kjemiske forbindelsen som ble isolert fra planten, i 1964, var spergulagenin A, et triterpenoidsaponin. Videre har det blitt isolert en rekke saponiner fra denne planten (Diallo et al. 2000; Fanta Traore et al. 2000).

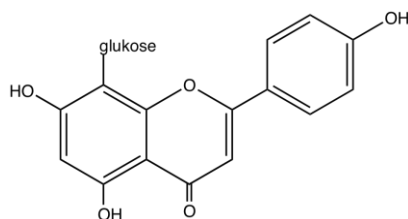


Strukturer for triterpenoidsaponinene GO1, GO5 og GO6 (Diallo 2000).



Strukturer for glicosid A (R=OH) og B (R=H) (Fanta Traore et al. 2000)

En rekke flavonoider, blant annet C-glykosidet vitexin, samt l-(-)-(N-trans-cinnamoyl)-arginin, adenosin og fenyilalanin, er rapportert i *G. oppositifolius* (Sahakitpichan et al. 2010).



Vitexin

### **Biologiske tester**

I en studie utført i 2001 ble det observert fungicid aktivitet mot *Candida albicans* i en DCM ekstrakt av *G. oppositifolius*. Det ble i tillegg observert larvicidal aktivitet mot *Anopheles gambiae* og *Culex quinquefasciatus* ved konsentrasjon 500 mg/L i DCM- og MeOH-ekstrakt av planten. Begge ekstraktene ble også bekreftet for molluscicid aktivitet på 3 type snegler: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria pfeifferi* og *Bulinus truncates* (Diallo 2001; Inngjerdingen 2007).



I Bangladesh ble *G. oppositifolius* testet for sin antibakterielle effekt. Bladestrakter av planten viste bakteriehemmende effekt spesielt på *Shigella dysenteriae* og *Staphylococcus aureus* (Islam et al. 2008).

#### Antioksidant

I en studie fullført i 2009 viste en 70% MeOH ekstrakt av *G. oppositifolius* potensiell evne til å scavage frie radikaler og redusere lipid peroksideringer (Asokkumar et al. 2009). På denne måten redusere skader forårsaket av oksidativ stress i forskjellige sykdomstilstander og på denne måten være en potensiell kilde for naturlige antioksidanter (Asokkumar et al. 2009). I samme studie ble det også observert en svak antioksidant aktivitet i MeOH ekstrakt under en DPPH test (Diallo 2001; Inngjerdingen 2007).

#### Saponiner

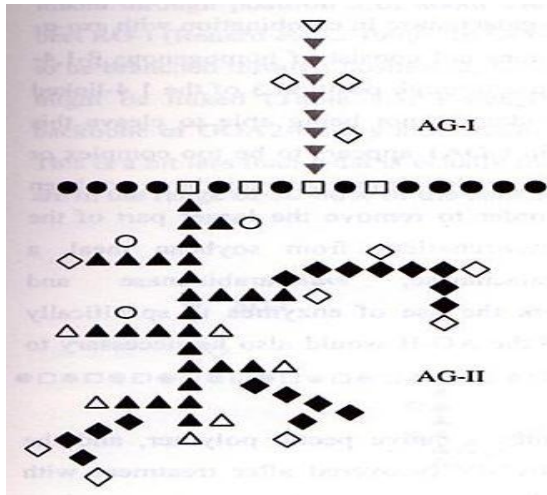
I en studie utført i 1999 ble det isolert to nye triterpenoidsaponiner fra den overjordiske delen av planten, glinosid A og B. Disse glinosidene viste seg å ha antiplasmodial aktivitet mot *Plasmodium falciparum in vitro* (Fanta Traore et al. 2000).

#### 4.1.6 Høymolekylære forbindelser

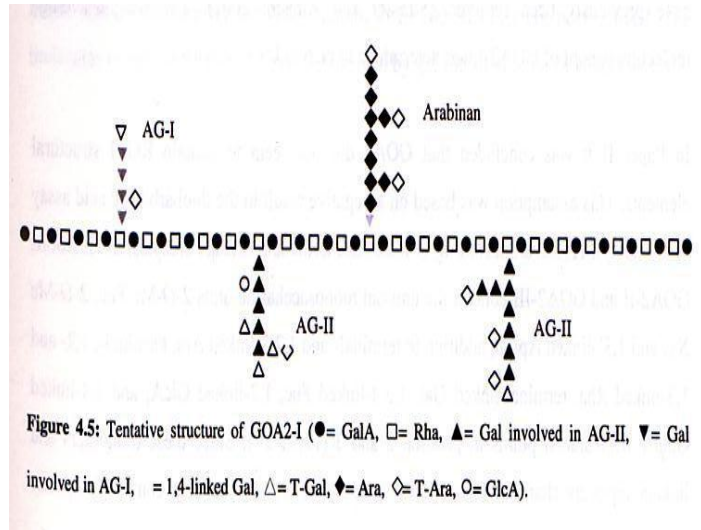
I en studie utført av Inngjerdingen et al. 2005 ble det isolert en nøytral og to sure pektiner fra et vannekstrakt av den overjordiske delen av *G. oppositifolius*. Disse pektinene fikk betegnelsen GON, GOA1 og GOA2. GOA1 har vist å inneholde betydelige mengder av de nøytrale monosakkaridene arabinose og galaktose. I tillegg har metylering indikert tilstedeværelse av arabinogalaktaner type I og type II. GOA2 bestod av rhamnose, arabinose, galaktose og store mengde av galakturonsyre.

Disse plantepolysakkaridene har vist å utøve immunmodulerende effekter ved å påvirke komplement systemet i en dose-avhengig måte, samtidig indusere kjemotakse av makrofager, T celler og NK celler. Biologiske aktivitetstester av GOA1 og GOA2 har vist signifikant økning i gen ekspresjon for IL-1 $\beta$  i makrofager og IL-1 $\gamma$  i NK-celler. Det ble i tillegg observert stimulerende aktiviteter på Peyer's patch celler, noe som igjen kan påvirke stimulering av beinmargceller. Det har ennå ikke vært mulig å gi noen forklaring om optimal struktur for effekt, men vi vet i dag at den

tredimensjonale strukturen og molekylvekten kan være viktige faktorer for den biologiske aktiviteten (Inngjerdingen et al. 2005)GOA1 inneholder en stor mengde av arabinogalaktan type II, disse har vist å ha høy aktivitet i biologisk systemer.



GO A1



GO A2 -1

Antatt strukturoppklaring av GOA1 og GOA2-1 polymer fra *G. oppositifolius* (Paulsen 2012). (• = GalA, □ = Rha, ■ = T-Rha, ▲ = Gal involved in AG-II, ▼ = Gal involved in AG-I, ▲ = T-Gal, ◆ = Ara, ◇ = T-Ara, ○ = 4-O-Me GlcA/GlcA )

## 4.2 Antioksidanter

### 4.2.1 Hva er antioksidanter ?

Antioksidanter er et begrep som brukes i mange sammenhenger og kan være vanskelig å definere. En felles definisjon på et bredt spekter av antioksidanter, er ”enhver substans som ved lave konsentrasjoner sammenlignet med oksiderbare substrater, signifikant forsinket eller forhindrer oksidasjonen av disse substratene” (Halliwell 2005; Rao 2011). Det er viktig å innse at det finnes ingen universal antioksidant. Ulike antioksidanter beskytter ulike biomolekyler *in vivo*, og derved er det behov for et bredt spekter av ulike antioksidanter for en optimal beskyttelse. Oksiderbare substrater omfatter omtrent alle molekyltyper funnet i levende celler, dette inkluderer DNA, proteiner, lipider og karbohydrater (Halliwell 1991). Generelt kan antioksidanter virke på ulike måter, blant annet ved å undertrykke produksjonen av bestemte reaktive species, som hydroperoksider, binde metallioner og scavenge frie radikaler. De kan også stoppe radikale kjedereaksjoner og inducere produksjonen av andre antioksidanter. Deres rolle omfatter nøytralisering av frie radikaler, samt beskyttelse av celler mot radikalenes toksiske effekter. På denne måten kan sykdommer assosiert med oksidativ stress forebygges (Rao et al. 2011).

### 4.2.2 Antioksidantforsvar

Antioksidantforsvar går ut på å scavenge frie radikaler, samtidig redusere dannelsen av reaktive oksygen species (ROS), men ingen forsvarssystem gir 100% beskyttelse. Det er av den grunn at kroppen har utviklet reparasjonssystemer til å fange opp oksiderte biomolekyler. Antioksidant nettverkssystem er et kompleks system som inkluderer både endogene og eksogene antioksidanter. Endogene antioksidanter omfatter blant annet superoksid dismutase (SOD), katalase, glutathion peroxidase (GSHPX) og fler, men hovedenzymene som er ansvarlig for å redusere dannelsen av ROS og oksidasjonsreaksjoner vil hovedsakelig omfatte disse (Halliwell 2005; Rao et al. 2011).

#### 4.2.2a Enzymatiske antioksidanter i kroppen omfatter:

- Superoksid dismutase (SOD)

SOD fjerner superoksid ( $O_2^{\cdot-}$ ) ved å omdanne det til hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ) og oksygen ( $O_2$ ).  $H_2O_2$  er i seg selv ikke et radikal, men et reaktivt oksygen species (ROS). SOD finnes i alle celler, og overflod av SOD i forhold til aktiviteten av peroksid- metaboliserende enzymer kan være farlig for mennesker. Dette kan assosieres med den kliniske tilstanden Down syndrom ( individer med 3 kromosomer av nummer 21, får forhøyet verdier av CuZNSOD) (Halliwell 1991; Rao et al. 2011).

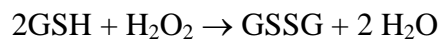
- Katalase

I kroppen vil katalase enzymet katalysere spalting av  $H_2O_2$  til vann og oksygen (Halliwell 1991).

- Glutathion peroxidase, GSHPX

GSHPX er et av de få enzymene som trenger selen (Se) for å kunne utføre katalytiske reaksjoner. Det befinner seg for det meste i cytosol og mitokondrier.

GSHPX fjerner  $H_2O_2$  ved å bruke  $H_2O_2$  til å oksidere redusert glutathion (GSH) til oksidert glutathion (GSSG). GSSG vil ved hjelp av NADPH og glutathion reduktase regenereres til den opprinnelige GSH (Halliwell 1991).



GSHPX bryter også ned lipidperoksider i kroppen (Halliwell 1991; Rao et al. 2011).

- Glutathion reduktase

Glutathion reduktase er et flavoprotein enzym som reduserer GSSG til GSH, ved hjelp av NADPH. (Rao et al. 2011).

#### 4.2.2b Antioksidanter som finnes i kosten :

- Vitamin C, askorbinsyre, askorbat

Vitamin C er en vannløselig, ikke-enzymatisk antioksidant.

Det har vist seg å ha anti-karsinogene og immunmodulerende egenskaper, samtidig som det virker synergistisk med vitamin E og bidrar til å redusere mengden av frie radikaler (Rao et al. 2011)

- Vitamin E,  $\alpha$ -tokoferol

Vitamin E er en fettløselig, ikke-enzymatisk antioksidant.

Det kan foreligge i 8 stereoisomere former. Blant disse 8 stereoisomerene er  $\alpha$ -tokoferol den mest bioaktive og betraktes som den viktigste antioksidanten i humane membraner. (Rao et al. 2011). Vitamin E har som hovedoppgave å hemme lipidperoksidering, samtidig bryte kjedereaksjoner ved å scavenge lipidperoksyldradikaler. På den hydrofobe strukturen av  $\alpha$ -tokoferol finner man hydroksyl-grupper som lett danner et hydrogenradikal. Dette fører til at peroksyld og alkoksyld radikaler reagerer lettere med  $\alpha$ -tokoferol enn med nærliggende fettsyrer, og på denne måten kan vitamin E føre til en endelse av en radikal kaskade reaksjon. Tidligere studier viser til at tokoferolradikal som dannes ved en interaksjon mellom  $\alpha$ -tokoferol og et radikal kan migrere til overflaten av membraner og lipoproteiner. Her vil det regenereres tilbake til  $\alpha$ -tokoferol ved hjelp av reaksjoner med askorbinsyre (vitamin C) (Halliwell 1991).

- Beta-karoten

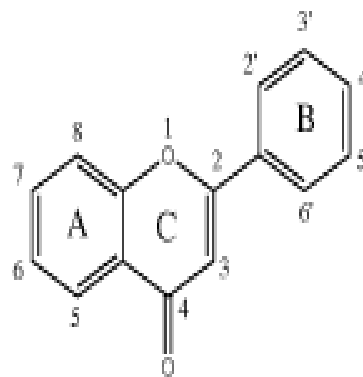
Beta-karoten er en fettløselig karotenoid, og betraktes som et pro-vitamin på grunn av evnen til å bli omdannet til aktivt vitamin A. Den er en antioksidant og kan fjerne dannelsen av singlet oksygen (Rao et al 2011).

- Flavonoider

Flavonoider er en underklasse av polyfenoler, som inkluderer blant annet flavanoler, flavanoner, flavoner, isoflavoner, katekiner, anthocyaniner og proanthocyanidiner. (Rao et al. 2011). Flavonoider finnes mest i frukt, grønnsaker, vin, te og kakao.

Her forekommer de som regel som glykosider og andre konjugater (Engler og engler 2006).

Flavonoidenes antioksidantaktivitet er avhengig av deres struktur. En katekolgruppe eller 2 hydroksylgrupper på B ring kan føre til en rask donasjon av hydrogen (elektron), derved en rask stabilisering av radikal species (Engler og Engler). Nummer, posisjon og type substituent på flavanskjelettet er med på å påvirke ulike effekter av flavonoidene (Heim et al 2002).



Figur 4.6. Flavon skjelett (Lehane et al. 2008).

Antioksidantaktivitet hos polyfenoler har vist å være høyere enn de av monofenoler, samtidig som posisjonen av andre og tredje hydroksylgruppe er en viktig moment for antioksidant aktiviteten. Resultater viser til at forbindelser med hydroksyl gruppe i orto eller para posisjon har høyere aktivitet enn de i meta (Molyneux 2004).

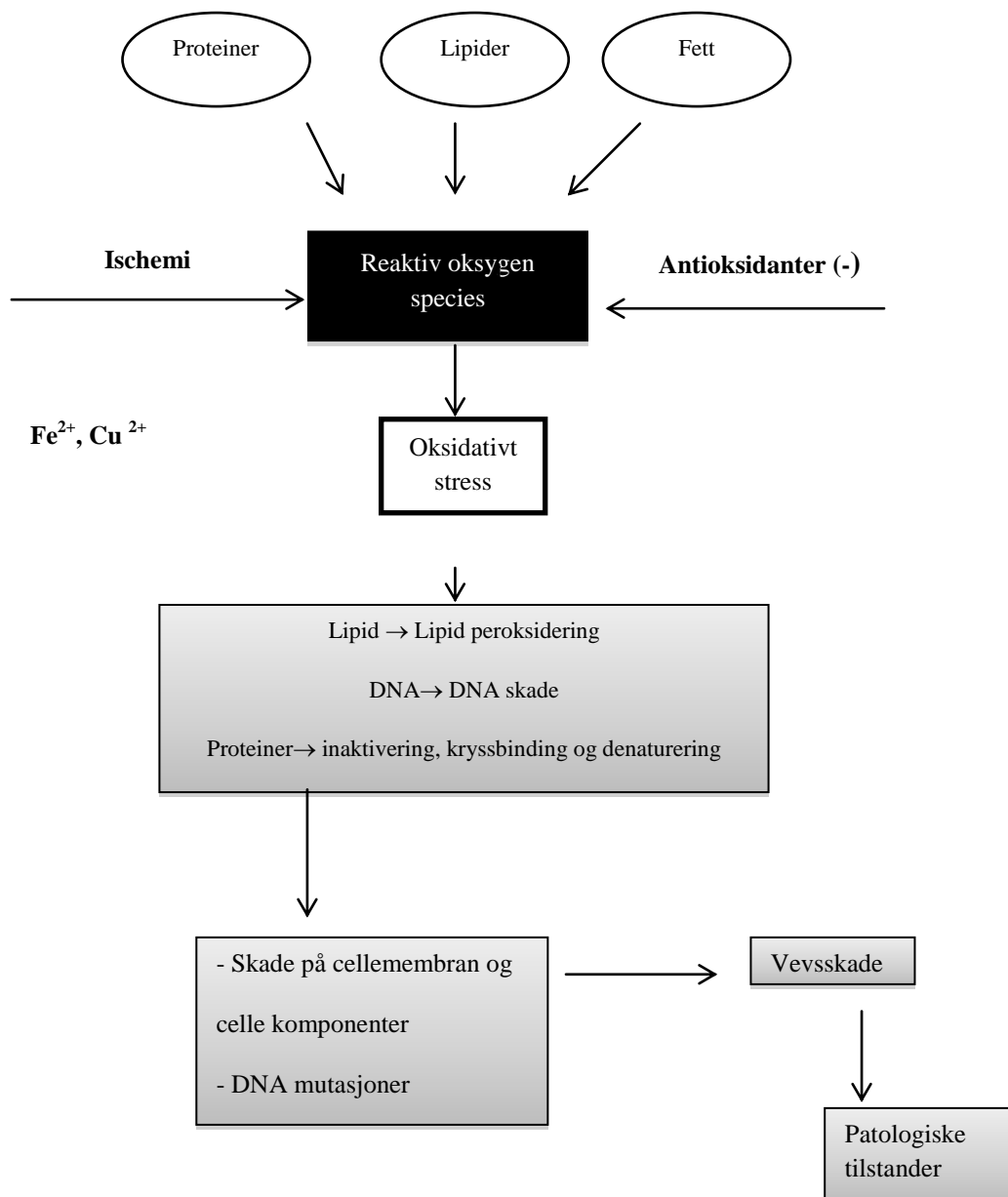
Aktivitetsstudier viser til at flavonoider hemmer nøkkelenzymer, som NADPH-oksidase, tyrosin kinase, og protein kinase, avhengig av deres hydroksylerings- og metoksyleringsmønster. Andre effekter av flavonoider kan omfatte regulering av signal transduksjon, samt modulering av enzymer og genekspressjon i kroppen. Dette kan forklare en rekke mekanismer som vasodilatasjon, blodtrykkssenkende og antiinflammatorisk aktivitet, inkludert hemming av blodplateaktivitet og redusering av LDL oksidasjon (Engler og engler). I tillegg har det blitt observert hemming av lipidperoksidering, chelatering av redox- aktive metaller, og derved bidragelse til reduksjon av risikoen for koronar hjertesykdom (Heim et al. 2002).

#### 4.2.3 Frie radikaler og oksidativt stress

Frie radikaler kan defineres som enhver species som inneholder et eller flere uparete elektroner på en orbital. Det finnes ulike type radikaler, og dette omfatter blant annet superoksid, hydroksyl- og peroksyd radikaler. Reaktiv oksygen-, nitrogen, halogen- og svovel species (ROS, RNS, RHS og RSS) omfatter både radikaler og ikke-radikaler. Akkumulering av disse molekylene kan forårsake alvorlig oksidativt stress og på denne måten påføre skade på proteiner, lipider, mitokondrier og DNA.

Oksidativt stress forekommer når det er en ubalanse mellom produksjonen av antioksidanter og reaktive species, og hvor produksjonen av reaktive species dominerer (Rao et al. 2011; Wangensteen 2012). Oksidativ skade initieres når frie radikaler, spesielt hydroksylradikal ( $\bullet\text{OH}$ ) angriper dobbeltbindinger på umettete fettsyrer i membranlipider. Interaksjonen mellom lipidmembranen og frie radikaler kan gi opphav til peroksider. Disse er i seg selv ustabile og vil videre kunne påføre skader på membraner, organeller og cellulær konstituent (Rao 2011 et al. 2011).

Figur 4.7. Fra frie radikaler til patologiske tilstander (Rao et al. 2011)

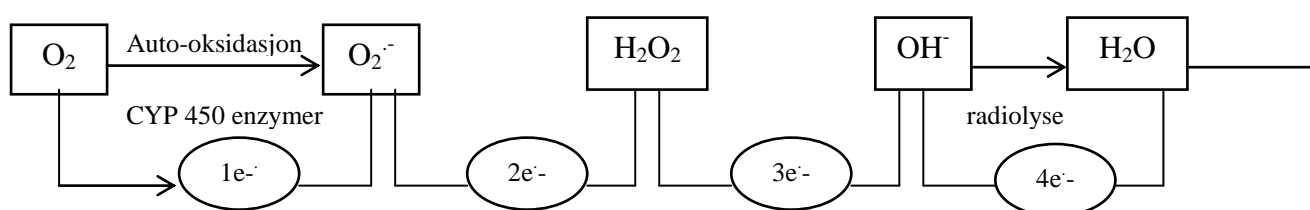


Radikaler kan reagere og genereres på forskjellige måter, et eksempel er når et radikal gir eller tar et elektron fra et ikke-radikal molekyl. I et slikt tilfelle vil det ikke-radikale molekylet bli omdannet til et radikal. Dannelsen av radikaler kan også skje når et radikal binder seg til et ikke-radikal molekyl. Et fellestrekk ved radikale reaksjoner med ikke-radikaler er at de ofte danner en kaskade reaksjon. I andre tilfeller hvor to radikaler møtes og via sine uparete elektroner danner en kovalent binding, kan en slik kaskade endes. (Halliwell 1991). Dette kan også skje ved at det dannes et radikal som er for lite reaktivt til å føre kaskaden videre, et eksempel er tokoferolradikalet.

### 4.2.3 a Frie radikaler

#### - Hydroksyl radikal ( $\bullet\text{OH}$ )

$\bullet\text{OH}$  er det mest reaktive radikalet. Det genereres ved hjelp av radiolyse i vann og reaksjoner med  $\text{H}_2\text{O}_2$  og toverdige jernioner (Fenton reaksjon).



Figur 3.

I noen tilfeller betraktes  $\bullet\text{OH}$  som karsinogen på grunn av deres angrep på DNA molekyler.

$\bullet\text{OH}$  kan også gi lipidperoksideringer på cellemembraner og lipoproteiner. Dette skjer når

$\bullet\text{OH}$  produseres nær eller inni membraner. Her vil de angripe dobbeltbindinger i flerumettede fettsyrer, slik som arakidonsyre (Halliwell 1991). Et slikt angrep på fettsyrenes sidekjeder vil resultere til dannelsen av lipidhydroperoksider. Videre kan akkumulering av disse lipidhydroperoxidene føre til forstyrrelse av cellemembranens funksjoner og ytterligere kollaps av membranen. Skader kan også forekomme når disse lipidene dekomponeres, noe som kan føre til dannelse av cytotoxiske produkter, som aldehyder. Disse aldehydene kan skade membranproteiner og inaktivere reseptorer og membranbunde enzymer (Halliwell 1991).



### Peroksyradikaler

I tillegg til å binde seg til hverandre, besitter peroksyradikaler også evnen til å inaktivere reseptorer og membranbundne enzymer. Disse radikalene kan forårsake skader ved å angripe membranproteiner og nærliggende sidekjeder av fettsyrer (Halliwell 1991).

### Superoksid

Fagocytiske celler, som monocytter, nøytrofiler, og eosinofiler produserer vanligvis  $O_2^{\cdot-}$ . Produksjonen av disse radikalene er viktig for at fagocytiske celler skal kunne tilintetgjøre bakterier de omslutter.  $O_2^{\cdot-}$  produseres også direkte under elektrontransport kjedereaksjoner i mitokondrier. Ved lekkasje av elektroner under denne prosessen vil elektronene reagere med oksygen og danne  $O_2^{\cdot-}$ . Enzymer som xanthin oksidase og cytokrom P450 befinner seg som regel i mitokondrier eller cytosol, og er enzymer som katalyserer produksjonen av  $O_2^{\cdot-}$  (Halliwell 1991; Rao et al. 2011).

### **4.2.3b Ikke radikaler**

ROS og RNS har en dobbelt rolle, hvor de både kan være skadelige og fordelaktige i biologiske systemer. Begge virker som mediatorer og kan derfor på denne måten ha gunstige fysiologiske effekter.

### ROS

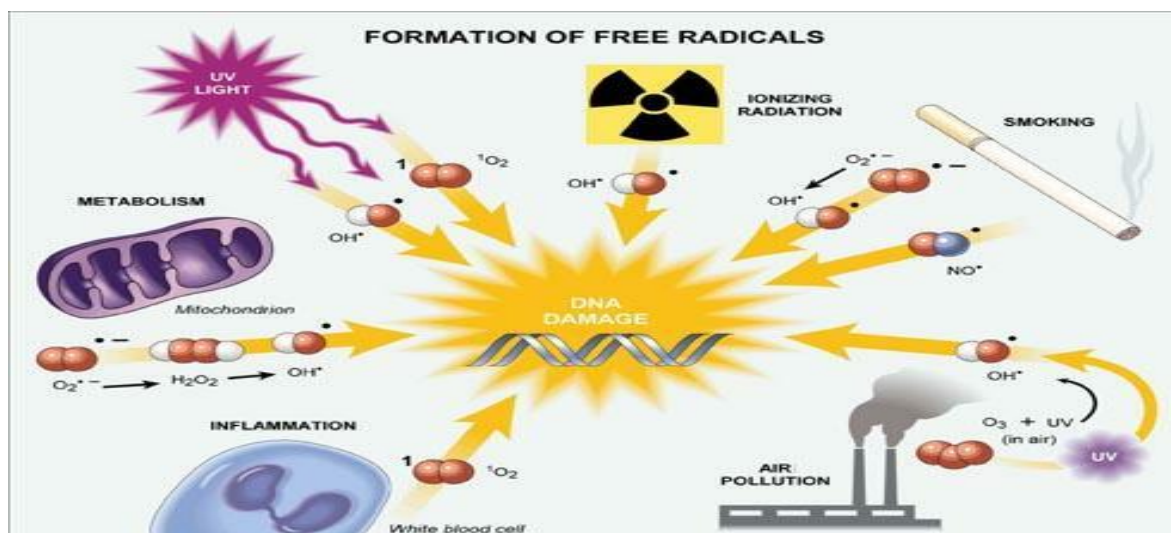
Hydrogenperoksid er et av de minst reaktive ROS, men kan være forløper for andre, mer reaktive som kan utløse en rekke kaskader som fører til dannelsen av andre radikaler. Eksempler på andre ROS som ikke er radikaler, omfatter blant annet ozon ( $O_3$ ), singlet oksygen ( $^1O_2$ ), og hypokloritt ( $ClO^-$ ) (Halliwell 1991; Wangensteen 2012).

### RNS

Nitrogenoksid ( $NO^{\cdot}$ ) spiller en viktig rolle i produksjonen av radikaler, samt i en rekke fysiologiske prosesser, som regulering av blodtrykk, forsvarsmekanismer, glattmuskelrelaksering og immunregulering.  $NO^{\cdot}$  er en kjemisk mediator som produseres blant annet av endotelceller, nevroner og makrofager. Når  $NO^{\cdot}$  reagerer med  $O_2^{\cdot-}$  dannes peroxynitrit ( $ONO$ ) som er en sterk proantioksidant potent. Ved inflammasjon vil det som regel produseres store mengder av  $NO^{\cdot}$  (Rao et al. 2011).

#### 4.2.4 Kilder til frie radikaler og reaktive species

Eksogene kilder til dannelsen av radikaler inkluderer røyking, stråling, organiske løsemidler, samt pesticider og visse forurensninger. Frie radikaler kan også genereres ved høyenergetisk stråling og ved metabolisme av bestemte legemidler (Halliwell 2005). Det har blitt vist at ulike sukkertyper som inntas i kroppen kan reagere med proteiner og produsere oksygenradikaler. En kjent endogen kilde til dannelsen av radikaler ligger i mitokondrier. Når oksygen reduseres i mitokondrier for å danne energirik adenosintrifosfat (ATP), frigjøres radikaler. Disse kan være nyttige i små mengder, men er skadelig i store mengder. Frie radikaler kan produseres på mange steder i kroppen, dette inkluderer blant annet mitokondrier, lysosomer, peroksisomer, endoplasmatisk retikulum, plasmamembran og i cytosol (Halliwell 1991; Halliwell 2005; Rao 2011).



Bilde 4.1. Kilder til dannelse av frie radikaler (The food advice centre)

## 4.3 Arakidonsyre metabolisme og 15 LO

### 4.3.1 Arakidonsyre

Arakidonsyre frigjøres fra cellemembraner ved hjelp av fosfolipase, som respons til ulike cytokiner, peptider og vekstfaktorer under inflammatoriske reaksjoner.

Arakidonsyre er en av hovedforløperne til eikosanoider. Disse består av 20 karbonatomer og har ulike fysiologiske funksjoner. Eikosanoidene spiller en viktig rolle i humane sykdommer, dette inkluderer blant annet aterosklerose, diabetes 1 og 2, samt nevrologiske sykdommer som parkinson og alzheimer.

Ved oksidasjon av arakidonsyre er det 3 hovedgrupper av enzymer som er involvert i prosessen, blant annet lipoksygenase, cyklooksygenase og cytokrom P450 (Dobrian et al. 2011).

### 4.3.2 Arakidonsyremetabolisme og lipoxygenase

Lipoksygenaser (LOX) er cytosoliske di-oksygenaser av et enkelt polypeptid (75-80kDa). Substrater til LOX omfatter både frie og esterifiserte flerumettede fettsyrer, arakidonsyre og linolsyre. Vanligvis inneholder LOX et essensielt jern atom (Fe), som ved inaktiv tilstand forekommer som  $Fe^{2+}$ . Ved hydroperoxid-drevet oksidering fra  $Fe^{2+}$  til  $Fe^{3+}$  vil en enzymatisk aktivering utløses og følgelig peroksidering av flerumettede fettsyrer (Lapenna et al. 2003). Flere ulike LOX blant annet lipoksygenase 5, 12 og 15 er blitt funnet i både mennesker og dyr. Disse LOXene adderer dioksygen på følgende posisjoner C5, C12 og C15 av arakidonsyrestrukturen (Lapenna et al. 2003). Basert på disse plasseringene karakteriseres LOX (Gleason et al. 2003). Eksempel vil 15-LOX addere oksygenmolekylet på posisjon 15 på arakidonsyre og posisjon 13 på linolsyre, derved resultere i dannelsen av 15-hydroperoksy-eicosatetraensyre (15-HPETE) fra arakidonsyre og 13-hydroperoksy-oktadekadiensyre (13-HPODE) fra linolsyre (Lapenna et al. 2003).

Hydroperoksid derivater (HPETE) er både forløper for leukotriener og lipoksiner.

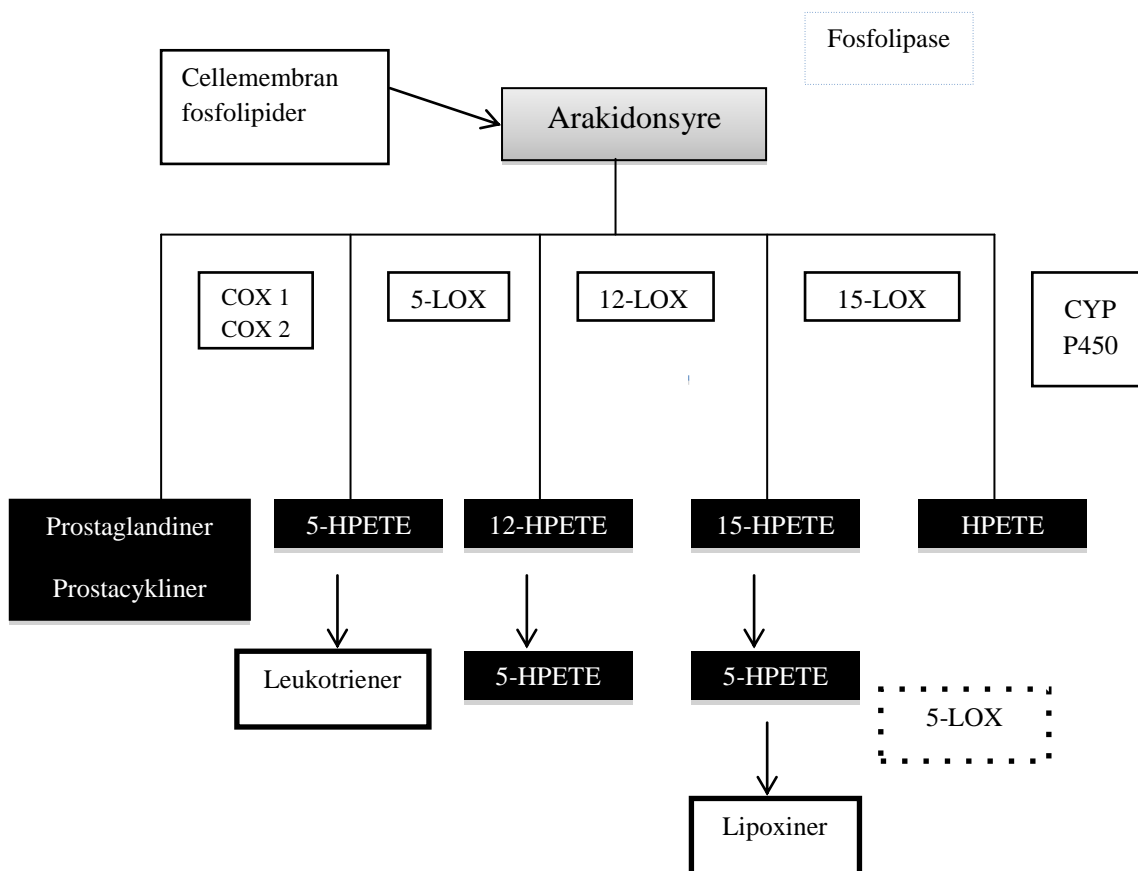
Lipoksiner spiller en viktig rolle i inflammasjon og immunresponser og er hemmere av

NK celler (Samuelsson et al. 1987). Disse forløperne kan ytterligere føre til dannelse av skadelige radikaler, samt utvikling av patogenese og ulike krefttyper (Bhattacharya et al.2009). 15- LOX er også vist å påvirke utviklingen av aterosklerose ved å katalysere oksidasjonen av LDL (Low density lipidprotein), i tillegg hemme syntesen av prostacykliner. En gruppe prostaglandiner som hemmer plateaggregering og virker vasodilaterende (Parthasarathy et al. 1988).

Cykloxygenaser (COX) består av COX 1 og COX 2. COX1 befinner seg i nesten alle celler, mens COX 2 blir induisert ved inflammatorisk stimuli.

COX 1 og 2 oksiderer arakidonsyre til prostacykliner, prostaglandiner og tromboksaner (Rang et al. 2007). Cytokrom P450 metaboliserer arakidonsyre til biologisk aktive hydroksy-eicosatetraensyre og epoxyeicosatrien syre. Disse derivatene har vist i flere studier å ha kraftige vasoaktive egenskaper (Makita et al. 1996; Rang et al. 2007)

**Figur 4.3 Oversikt over dannelse av Arakidonsyre og dens metabolitter**



Flere flavonoider og flavonoide rike planter har vist seg i flere studier å hemme lipoksygenase og derved dannelse av HPETE. Dette kan være årsaken til den antiinflammatoriske og anti-allergiske aktiviteten som har blitt observert (Lyckander og Malterud 1990). Mer informasjon om flavonoider se punkt 4.2.2 b

#### **4.4 Saponiner**

Saponiner er overflateaktive glykosider som forekommer i naturen.

De består som regel av et hydrofobt aglykon og hydrofile sukkermolekyler bundet til aglykonet. Denne strukturen ligger til grunn for de overflateaktive, emulgerende, skummende og fuktende egenskapene som er med på å karakteriserer saponiner.

De fleste saponinene viser hemolytisk aktivitet, som kommer av interaksjoner mellom saponiner og steroler, spesielt med kolesterol i erytrocyttens cellemembran. En slik interaksjon danner uløselige komplekser og fører til en irreversibel membranskade (Francis et al. 2002; Sparg et al. 2004). For de fleste kaldblodige dyr kan noen saponiner være toksiske. Dette forekommer i svært lite grad hos varmblodige og en mulig forklaring kan være dårlig absorpsjon hos varmblodige arter. Toksisitet mot kaldblodige dyr har ført til utvikling av saponinholdige midler til fiskefangst. (Sparg et al. 2004). Saponiner utøver ulike biologiske aktiviteter, blant annet antioksidant, immunstimulerende, antibakteriell, og antikarsinogen aktivitet. Ytterligere er det blitt antatt at de utøver hypoglykemisk, nevro-beskyttende og antiinflammatorisk aktivitet, samt mange fler. Mange saponiner er også kjent for å hemme mugg og beskytte planter mot insekter (Negi et al. 2011).

I forbindelse med reproduksjon og hormonbalanse er saponiner vist å utøve aborterende, antizygotiske og anti-implanterende egenskaper (Francis et al. 2002). Saponiner finnes i mange droger som anvendes i Sørøst-Asia, og anvendes også som utgangsmaterial i syntese av steroidhormoner i farmasøytisk industri (Aarnes 2011).

Det har blitt antatt at saponiner utgjør hovedkomponenten i ginsengroten (*Panax ginseng*) og antiprotozoal aktivitet i to triterpenoider i *Glinus oppositifolius* (Traore et al. 2000). Anvendelsen av saponiner er stort og omfatter blant annet i farmasien, mat, kosmetikk og som fuktemiddel. De er blitt funnet i mange planter, og har fått navnet sitt etter planten *Saponaria*, som før ble brukt som såpe (Negi et al. 2011).

Matkilder til saponiner inkluderer blant annet asparges, bønner, erter, poteter, sukker og te. En vanlig kilde til saponiner er i høyere planter, men de har også blitt funnet i marine dyr, som *Astroidea* (sjøstjerner) og *Holothuroidea* (sjøpølse) (Hostettmann og Marston 1995). Ytterligere har triterpenoidsaponiner blitt detektert i grønnsaker som soyabønner, bønner, erter, te, spinat, lakris og ginseng. Kilder til steroidsaponiner inkluderer blant annet hvete, aubergine, tomatfrø, asparges og ginseng (Francis et al. 2002).

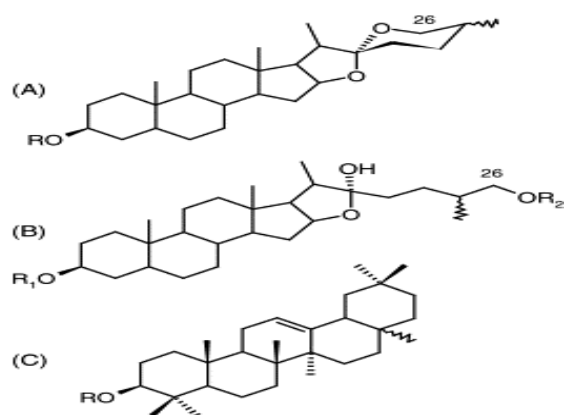
#### 4.4.1 Struktur

Saponinstrukturen består av et fettløselig aglykon og vannløselige sidekjerter av sukker. De vanligste sukkerartene som er bundet til aglykonet omfatter blant annet glukose, arabinose, glukuronsyre og xylose (Hostettmann og Marston 1995).

Disse mono- og oligosakkaridene er vanligvis bundet til C<sub>3</sub> posisjon, men forekommer også på C<sub>26</sub> og C<sub>28</sub> i mange saponiner (Francis et al. 2002).

Saponiner er vanligvis amorfe substanser med høy molekylær vekt. Når saponiner hydrolyseres dannes sapogener (Negi et al. 2004). Sapogenin eller genin refereres til aglykonet eller ikke-sakkarid delen av saponinmolekylet og kan være terpenoid eller steroid. Saponiner kan kategoriseres på ulike måter basert på den kjemiske strukturen. De tre hovedklassene omfatter blant annet triterpenglykosider, steroidglykosider, og steroidalkaloidglykosider avhengig av hvilket genin som er tilstede.

De vanligste er av triterpenglykosider og steroidglykosider (Hostettmann og Marston 1995; Aarnes 2011).



Figur 5. Struktur av aglykoner (genin)

- A. Steroid spirostane
- B. Steroid furostan
- C. Triterpenoid saponin

R= sukker grupper (Sparg et al. 2004).

Saponiner vil forekomme i en polar tilstand i naturen og er løselig i vann, men uløselig i upolare løsningsmidler. Siden de fleste saponiner mangler kromoforer vil de ikke kunne detekteres med UV detektor (Negi et al. 2011).

# 5. Eksperimentelt

## 5.1 Materialer

### 5.1.1 Kjemikaler

Kjemikaler	Produsent
1-Butanol , BuOH	Merck KGaG, 64271 Darmstadt Germany
Acetonitril HPLC-kvalitet	Lab-Scan Poch SA, Sowinskigo, Polen
Aceton purum	Chemi-Teknik AS, Oslo, Norge
Boratbuffer ( 0,2M natriumborat, pH9)	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Brine shrimp eggs	Ocean nutrition, Essen, Belgia
Etylacetat, EtOAc	Sigma–Aldrich, St. Louise , U.S.A
Ceric (1% ceriumsulfat i 10% vandig svovelsyre)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Deuterert kloroform (CDCl <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A
Deuterert metanol (CD <sub>3</sub> OD, MeOH-d <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A
Diklormetan , DCM	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A
Dimethylsulfoxid DMSO	Merck KGaG, 64271 Darmstadt Germany
2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl, DPPH	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A
Etanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A
Hypoxanthin (6-Hydroxypurin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A
Lipoksidase (Type-1 fra soyabønne)	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A
Linolsyre	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A
Metanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A
Natriumkaliumfosfatbuffer 0,05M, pH7,5	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Nitrogengass	AGA, Oslo, Norge
Quercetin	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A
Renset vann fra mikipore Elix 10	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Tetrametylsilan (TMS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Xanthine (2,6 Dihydroxypurine)	Sigma chemical company, St. Louise, U.S.A
Xanthine oxidase from bovine milk, Grade 1 X 1875- 50 UN	Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A

## 5.1.2. Apparatur

<b>Apparatur</b>	<b>Produsent</b>
<b>Analytisk tyynnsjikt-kromatografi</b>	
Normalfase plate silika gel 60 F <sub>254</sub>	Merck, Darmstadt, Tyskland
TLC-aluminiumsplate, silikagel RP18 F <sub>254</sub>	Merck, Darmstadt, Tyskland
TLC-Sprayer GW-1	Merck, , Darmstadt, Tyskland
<b>Automatpipetter</b>	
Finnpipette	Labsystems,Helsinki, Finland
Multipipette	Pipetman Gilson, Frankrike
Ependorf pipette	Ependorf, Hamburg, Tyskland
<b>Filter</b>	
Schleicher & Shuell rundfilter 150 mm	Schleicher & Shuell, Dassel, Tyskland
Whatman IPS, silicone treated, 15,0 cm	Whatman, Maidstone, England
HPLC filter, 3mm, 0,45 µm aero LC	Chiron, Trondheim, Norge
<b>Kolonne kromatografi Versaflash</b>	
Kromatografi pumpe Büchi 681	Büchi Flawil, Sveits
Versaflash kolonnestativ	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Versapak C <sub>18</sub> - kolonne	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Versapak C <sub>18</sub> - kolonne	Supelco, Bellefonte, PA, USA
<b>NMR</b>	
Bruker DPX 300	Bruker, Rheinstetten, Tyskland
<b>Oljepumpe</b>	
Modell E-lab 2	Sussex, England
<b>Kromatotron</b>	
Kromatotron kromatograf 7924T	Harrison Research, PA, California
Silika gel PF-254 gipsholdig	Harrison Research, PA, California
<b>Analytisk HPLC</b>	
Hitachi Elite Labchrom Organizer	Hitachi, Tokyo Japan
Hitachi Elite Labchrom Column ovn L2300	Hitachi, Tokyo Japan
Hitachi Elite Labchrom Autosampler L-2200	Hitachi, Tokyo Japan
Hitachi Elite Labchrom Pump L-2130	Hitachi, Tokyo Japan
Hitachi Elite Labchrom Diode Array Detector L2455	Hitachi, Tokyo Japan
Chromolith Guard Column RP-18 e 5-4,6 mm	Merck, Darmstadt, Tyskland
Chromolith Performance RP-18e 100-4,6mm	Merck, Darmstadt, Tyskland



Varian Microsorb-MV 100-5 C18 250 x 4,6 mm kolonne	Varian, Walnut Creek, CA, USA
<b>Rotavapor</b>	
Varnebad IKA ® HB 10 Basic	IKA, Jankel & Kunkel, Staufen, Tyskland
Vakuumpumpe IKA® RV10 Basic	IKA, Jankel & Kunkel, Staufen, Tyskland
<b>Ultralydbad</b> Ultrasonic cleaner 230V/50-60Hz	VWR, Leuven, Belgia
<b>USB mikroskop</b>	
VMS-004 USB microscope	Veho, Hampshire
<b>UV-lampe</b>	
Modell CC-10	Upland, California, USA
<b>UV-spektroskopi</b>	
Biochrom Libra S32 PC	Cambridge, England
Kvartskyvetter	Essex, England
<b>Varmeskap</b>	
Thermo scientific Heraeus ovn	Thermo electron LED GmbH, Langenselbold, Tyskland
<b>Vekt</b>	
Mettler PB 3002	Mettler, Greifensee, Sveits
Sartorius BP 221S	Sartorius, Goettingen, Tyskland
Sartorius PB 224S	Sartorius, Goettingen, Tyskland

## 5.2 Metoder

Metodene som ble anvendt til å isolere og identifisere lavmolekylære stoffer fra *Glinus oppositifolius* baserer seg på tidligere erfaringer.

*G. oppositifolius* ble først ekstrahert med ulike løsningsmidler og ekstraktene dampet inn til tørrhet med rotavapor og ytterligere med oljevakuumpumpe. Disse fraksjonene ble videre analysert med HPLC,  $^1\text{H}$ -NMR spektroskopi, og  $^{13}\text{C}$ -NMR spektroskopi på de mer interessante.

Det ble anvendt metoder som DPPH- scavenging, 15-lipoksygenase hemming, xantin oksidase hemming og brine shrimp test til å måle den biologiske aktiviteten.

Fraksjoner med høy vekt og høy biologisk aktivitet ble ytterligere fraksjonert med kolonnekromatografi eller kromatotron. Dette for å isolere mulige stoffer med biologisk aktivitet.

### 5.2.1 Generelle metoder

#### 5.2.1.1 Vannkvalitet

Det ble benyttet rensert vann fra Mikipore Elix 10 vannrenseanlegg.

#### 5.2.1.2 Innveiging

Det ble benyttet analysevekt og overskålsvekt avhengig av mengde som ble veid inn.

#### 5.2.1.3 Inndamping

Det ble anvendt rotavapor for å dampe inn løsemiddel i ulike ekstrakter, fraksjoner og delfraksjoner til tørrhet. Dette foregikk ved 40 °C under vakuum. Oljevakuumpumpe ble ytterligere anvendt for å fjerne løsemiddelrester.

#### 5.2.1.4 Filtrering

Ved ulike separasjonsmetoder ble det anvendt sprøytefilter og papirfilter.

## 5.2.2 Separasjonsmetoder

### 5.2.2.1 væske- væske ekstraksjon

#### *Prinsipp*

Prinsippet for væske-væske ekstraksjon baserer seg på egenskapen stoffer har til å fordele seg i to ikke-blandbare væsker. Den ene fasen er en vandig løsning mens den andre fasen er et organisk løsemiddel som ikke er blandbart med vann.

Væske-væske ekstraksjon utføres vanligvis i skilletrakt eller sentrifugerør avhengig av mengden som skal ekstraheres. Fordel med å bruke skilletrakt er at den tyngste fasen lett kan tappes ut i bunnen av skilletrakten, mens den letteste fasen blir igjen. Ekstraksjonsutbytte for nøytrale stoffer er avhengig av fordelingskoeffisienten.

Fordelingen av et stoff i organisk og vandig fase er avhengig av stoffets lipofile/hydrofile egenskaper, samt løsemidlets egenskaper.

En generell regel til dette er ”likt løser likt”. Upolare stoffer vil løse seg best i upolare løsemidler mens polare stoffer vil løse seg best i polare løsemidler. Det bør også tas hensyn til viskositet, tetthet og kokepunkt ved valg av løsemiddel.

For å få et optimalt utbytte bør man ekstrahere samme prøve flere ganger. Flere ekstraksjoner med små løsemiddelvolum gir større utbytte enn ved engangsekstraksjon med et større løsemiddelvolum (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

#### *Kjemikalier*

Butanol (BuOH)

Destillert vann

Etylacetat (EtOAc)

#### *Utstyr*

Skilletrakt

Stativ til skilletrakt

Begerglass

Filterpapir

Pærekolber

### *Prosedyre*

1. Løsningen suspenderes i egnet løsemiddel og overføres til skilletrakt
2. Suspensjonen ekstraheres flere ganger med løsemiddel
3. Før videre ekstraksjon med et nytt løsemiddel tappes den aktuelle fasen ut og nytt løsemiddel overføres til skilletrakta. Blandingen ekstraheres flere ganger med det nye løsemidlet.
4. Under hver ekstraksjon blir fasen godt rystet og luftet før separering.
5. Fasene tappes fra hverandre og overføres til pærekolber
6. Tilslutt dampes de inn til tørrhet med rotavapor og settes på vakuum oljepumpe.

Se væske-væske ekstraksjon 5.3.2 for ytterligere informasjon.

### **5.2.2.2 Versaflash kolonnekromatografi**

#### *Prinsipp*

Versaflash kolonneseparasjon er en metode som anvendes til å separere stoffer med ulik polaritet. Forbindelser med forskjellig polaritet har ulik affinitet til kolonnematerialet, og vil derved komme ut på ulike tidspunkter.

Stasjonærfasen er en kolonne som består av faste partikler og mobilfasen er en væske som beveger seg gjennom de faste partiklene. Kolonnen er koblet til en pumpe slik at mobilfasen presses kontinuerlig gjennom kolonnen i en bestemt hastighet og trykk.

Ved bruk av denne metoden kan prøven appliseres direkte på kolonnen samme vei som mobilfasen. I versaflash kolonnekromatografi anvendes ferdigpakkede Versapak kolonner med polar eller upolar stasjonær fase.

#### Stasjonærfasen

1. Normalfase- silika

Den viktigste stasjonærefasen i normalfasekromatografi er silika (silika gel). Silika er et porøst material med et stort overflateareal og absorberer stoffer til overflaten.

Når mobilfasen strømmer gjennom silika vil stoffer bli eksponert til aktive silanolgrupper (Si-OH). Det er disse gruppene som gjør overflaten svakt sur og polar. Interaksjoner mellom silanolgrupper og funksjonelle grupper på stoffer som skal separeres kalles for polare interaksjoner, av disse er hydrogenbindingsinteraksjoner de sterkeste. Videre er dipol interaksjoner sterkere enn dispersjonsinteraksjoner. Aminer og karboksylsyrer gir sterke interaksjoner med silika og kommer dermed sist ut av kolonnen. Mettede hydrokarboner derimot har ingen affinitet til silika og blir derfor ikke retardert. Mobilfasen består vanligvis av en blanding av organiske løsemidler. Styrken på mobilfasen reguleres ved hjelp av polare ( sterk mobilfase) og upolare løsemidler (svak mobilfase) (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

## 2. Omvendt fase silika

Silikabasert C-18 material er mest anvendt i omvendt fase kromatografi og består av C<sub>18</sub>- material som omfatter en hydrokarbonkjede med 18 karbonatomer.

I omvendt fase kromatografi er stasjonærfasen hydrofob, og mobilfasen vanligvis en vandig løsning. Mobilfasen er vanligvis en blanding av vann og organisk løsemiddel, blant annet metanol og acetonitril. Styrken på mobilfasen kan reguleres avhengig av mengde og type organisk modifikator i blandingen. Økende organisk modifikator i blandingen gir sterkere mobilfase og derved kortere retensjonstiden. Hydrofobe stoffer med mettede eller uioniserte forbindelser vil retarderes mest og ha lengst retensjonstid i kolonnen. Dette er på grunn av de hydrofobe interaksjonene. Van der Waals-krefter er relative svake krefter, men øker med økende molekylstørrelse og er av de viktigste retensjonsmekanismene i omvendt fase kromatografi (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

### *Kjemikalier*

Aceton

Destillert vann

Metanol

### *Utstyr*

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

Pumpe

Versa flashstativ

Begerglass

Dramsglass

## Prosedyre

1. Kolonnen kondisjoneres med ca. 3 kolonnevolum av startelueringsmiddel
2. Prøven løses i en lite mengde egnet løsemiddel (for eksempel MeOH), deretter tilsettes en liten mengde H<sub>2</sub>O for å gjøre det polart. ( Ønsker å ha en polaritet som er lik eller tilsvarer startelueringsmiddel i kolonnen).
3. Prøveløsningen filtreres og appliseres på kolonnen
4. Styrken på mobilfasen økes ved tilsetning av organisk løsemiddel (for eksempel MeOH)
5. Komponentene som elueres ut samles opp ( fraksjonsstørrelse varierer for ulike separasjoner)
6. Kolonnen vaskes tilslutt med en sterk eluent (for eksempel MeOH) for å fjerne eventuelle rester.

### 5.2.2.3 Kromatotron

#### Prinsipp

Kromatotron anvendes preparativt til å separere stoffer på en effektiv og rask måte. Kromatotron er en tynt-lag kromatograf som bruker sentrifugalkraft til å separere stoffer. Grovt sett består kromatotron av et tynt lag absorbent på en rund glassplate og en rotor. En motor under kromatografen sørger for en konstant hastighet gjennom en aksel som passerer et hull i sentrum av kromatotronen.

Fordeler med kromatotron er blant annet rask separasjonen, normalt innen 20 minutter, og høy kapasitet avhengig av tykkelsen av laget som kan være på 1, 2, 4 eller 8 millimeter. Sorbentlaget kan *in situ* lett la seg regenereres til gjenbruk og det trengs kun en liten mengde av solvent under kjøringen.

Andre fordeler med kromatotron er muligheten til gradient eluering, på denne måten vil det være mulig å kunne separere stoffer med stor forskjell i retensjon. Siden separasjonen foregår i en nitrogenholdig atmosfære vil dette kunne forhindre oksidasjon av stoffer i prøveløsningene.

I praksis er kromatotronen kompakt og lett å transportere, samtidig som maskinen ikke anvender høyt trykk som HPLC. Ved at kromatotron har et UV transparent lokk er det også mulig å observere UV absorberende eller fargede forbindelser under

separasjonen. Forbindelser uten kromoforer kan derimot bli detektert i eluerte fraksjoner via konvensjonell TLC (Harrison Research u.å.).

En begrensing er at kromatotron bare kan brukes med normalfase systemer. Det finnes foreløpig ikke noen reversfase silika som kan anvendes.

### *Kjemikalier*

Diklormetan (DCM)

Metanol (MeOH)

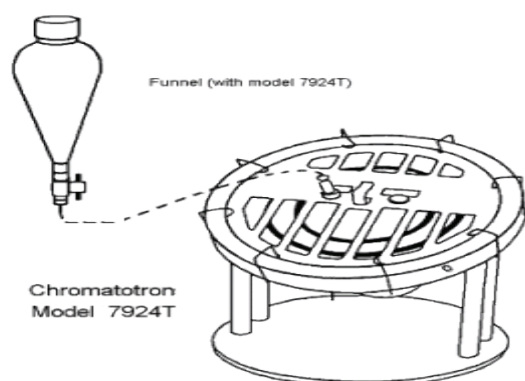
Silika Gel PF-254 gipsholdig  
(2 millimeter tykk normalfase tynnsjikt plate)

### *Utstyr*

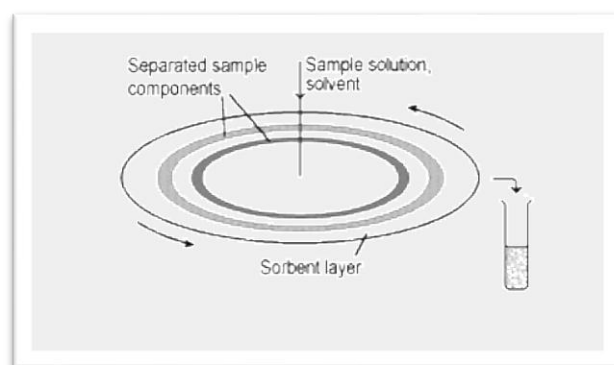
Kromatotron kromatograf modell

7924T

Drams glass



Figur 5.1



Figur 5.2

Figur 5.1 Kromatotron kromatograf

Figur 5.2 Fra applisering av prøveløsning og solvent til separasjon av prøveløsning

### *Prosedyre*

1. Prøveløsningen som skal separeres appliseres nær sentrum av den roterende platen med tynt lag sorbent.
2. Eluering danner sirkulære bånd av separerte komponenter som blir spunnet ut mot kanten av rotoren sammen med solvent.
3. Et samlingssystem samler eluerte prøveløsninger til et rør, og videre i dramsglass.

## 5.2.3 Identifikasjonsmetoder

### 5.2.3.1 Analytisk væskekromatografi (HPLC)

#### *Prinsipp*

Separasjonsprinsippet i HPLC er så å si det samme som Versaflash kolonnekromatografi, men i denne metoden kan man anvende eksklusjonskromatografi i tillegg. Metoden baserer seg på at en pumpe suger mobilfasen opp fra et reservoar og presser den gjennom en kolonne, vanligvis 10-25 cm lang. Prøveløsningen injiseres ved hjelp av en injektor inn i mobilfasen. Dette foregår på fronten av kolonnen og drives med strømmen av mobilfasen gjennom den stasjonære fasen.

En av forskjellene fra versaflash kolonnekromatografi er at pumpene i HPLC analysen må kunne pumpe væske med konstant hastighet mot et høyt trykk. Årsaken til dette er oppbygning av kolonnen. Kolonnen er pakket tett sammen av små, runde og like store partikler for å gi en god separasjon, dette vil føre til dannelsen av et mottrykk på 30- 300 bar når mobilfasen pumpes gjennom.

I en isokratisk eluering vil mobilfasen ha samme sammensetning under hele analysen, mens ved en gradienteluering vil styrken av mobilfasen øke. Når prøveløsningen inneholder stoffer med stor forskjell i retensjon anvendes gradient eluering.

Kolonnen retarderer stoffer i ulike grad avhengig av stoffenes affinitet til den stasjonære fasen. På denne måten og i samspill med mobilfasen separeres stoffene i prøven. Stoffene som elueres ut av kolonnen detekteres av en detektor.

Detektorresponsen som observeres under kjøringen gjør det mulig å dele prøven opp i mindre fraksjoner (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

#### Stasjonærfasen

Det kan bli anvendt ulike kolonnematerialer ved bruk av HPLC, dette omfatter blant annet normalfase silika og omvendt fase C<sub>2</sub>- C<sub>8</sub>- og C<sub>18</sub>- bundet silika.

HPLC kan anvendes både preparativt og analytisk. Forskjellen på disse to er at analytiske kolonner er mindre enn preparative kolonner, og at kromatogrammet fra analytisk kan anvendes til å se hvor rent et stoff er eller hvor komplisert en blanding kan være



Analytisk HPLC brukes også til kvantifisering av kjemiske komponenter og deteksjon av bestemte stoffer ved ulike bølgelengder. For å oppnå en god separasjon i preparativ HPLC, anvendes analytisk HPLC til å finne egnet mobilfase til preparativ kjøring, og det er kun et lite uttak av prøven som blir analysert (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

#### *Kjemikalier*

- Destillert vann
- Metanol med 0,1 % TFA (HPLC kvalitet)
- Acetonitril med 0,1% TFA (HPLC kvalitet)

#### *Utstyr*

- HPLC-apparat med tilhørende utstyr
- Sprøyte og sprøytedrevet filter
- Dramsglass
- Vial

#### *Prosedyre*

1. Kolonnen kondisjoneres i 20 minutter med starteluenten (mobilfase).
2. Prøveløsningen løses i egnet løsemiddel (mobilfasen) og filtreres gjennom et filter ved hjelp av en sprøyte. Dette for å fjerne eventuelle partikler som kan tette igjen kolonnen. Den filtrerte prøveløsningen overføres til vial og plasseres i autosampler. Normalt er injeksjonsvolumet på hver prøveløsning 40 µl.
3. Ved at det anvendes gradienteluering vil pumpen suge ut mobilfasen fra 2 reservoarer og presse den videre gjennom kolonnen i en konstant hastighet.
4. Prøveløsning som elueres ut fra kolonnen detekteres med en detektor.
5. Tilslutt vaskes kolonnen med 50% metanol og vann.

### 5.2.3.2 Tynnsjikt-kromatografi (TLC, thin-layer chromatography)

#### *Prinsipp*

TLC er en metode som anvendes til å identifisere virkestoffer og forurensninger, og er en væske-kromatografisk separasjonsmetode som både er rask og enkel.

Separasjonsprinsippet er basert på adsorpsjonskromatografi og at de mest polare stoffene får størst retensjon og lavest retensjonsfaktor ( $R_f$ -verdi).  $R_f$ -verdi er et mål på stoffenes retensjon og er både avhengig av mobilfasen og stoffenes egenskaper.

$R_f$ -verdi defineres som  $R_f = a/b$  ( $a$  = Avstand fra startlinjen til midten av flekken,  $b$  = avstanden fra startlinjen til frontlinjen av mobilfasen).

I denne metoden er stasjonærfasen er spredt som et tynt lag utover platen og er vanligvis silika eller  $C_{18}$ . Platen for normalfase-kromatografi er belagt med silika, mens for omvendtfase-kromatografi belegges platene med silanisert silika. Mobilfasen er en blanding av vann og organisk løsemiddel. Jo høyere løsemiddel styrke i omvendt fase kromatografi, desto mindre retensjon.

Prøvene løses i et flyktig løsemiddel og appliseres som flekker på platen. Flekkene påføres omtrent 2 cm fra platekanten. Når platen settes ned i et lukket kar med mobilfase vil mobilfasen ved hjelp av kapillærkrefter migrere oppover platen. Etter en bestemt migrasjonslengde mot toppen, tas platen opp og væskefronten merkes. Mobilfasen vil fordampe og stoffenes posisjon på platen vil synliggjøres og kan dermed sammenlignes med referansesubstans. Fargeløse stoffer kan påvises ved hjelp av UV-lys eller ved å anvende lokaliseringsreagenser (eks. ceric) som reagerer med stoffene og gir farge. For å lettere kunne påvise stoffer som absorberer UV-stråling kan stasjonærfasen også blandes med fluorescensindikator.

(Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004)

#### *Kjemikalier*

- Destillert vann
- Metanol
- Diklormetan

#### *Utstyr*

- TLC- plate
- Mikropipette 10  $\mu$ l
- Elueringskar med tett lokk
- UV-lampe
- Fargereagens (Ceric, se punkt 5.2.3.3 for mer informasjon).

### *Prosedyre*

1. Mobilfasen tilberedes til ønsket sammensetning og tilsettes elueringskar (1-1,5cm opp i karet). Karet lukkes i 10-30 minutter slik at en likevekt innstiller seg mellom mobilfasen og dampen av mobilfasen.
2. Et kryss markeres for hver prøve som skal appliseres på TLC-platen (ca. 1 cm fra hver prøve og 2 cm fra den ene kanten).
3. Prøvene løses i et flyktig løsemiddel.
4. Prøveløsning appliseres på TLC-platen ved hjelp av mikropipette (vanligvis omtrent 5-10  $\mu$ l)
5. Prøveløsningen fordampes og platen settes deretter ned i elueringskar.
6. Når mobilfase nærmer seg den øverste kanten, tas platen ut.
7. Frontlinjen til mobilfasen merkes og platen lufttørkes
8. Etter tørking settes TLC platen under en UV-lampe og observeres under kortbølget (254 nm) og langbølget (366 nm) UV-lys.
9. Flekker avmerkes og eventuelt sprayes med ceric reagens for ytterligere observasjoner.
10. Når TLC brukes til å følge en separasjon på kolonne, blir fraksjoner fra kolonnen slått sammen på basis av flekkenes størrelse, posisjon, intensitet og farge
- 11.

#### **5.2.3.3 Ceric spraying**

##### *Prinsipp*

Ceric- reagenset vil oksidere de fleste organiske forbindelser. Ved oksidasjon vil det observeres en fargeendring, og basert på disse observasjonene vil fraksjonene kunne bli slått sammen. Hvilke farger som blir dannet er avhengig av hvilke stoff det er på platen. Eksempel vil triterpenoider gi en sterk lilla farge ved oksidasjon med ceric-reagens.

### *Kjemikaler*

- Cerium(IV)sulfat 1 % løst i 10% vandig svovelsyre.

### *Utstyr*

- TLC- sprayer  
- Varmeskap

### *Prosedyre*

1. Ferdigbehandlet TLC-plate sprayes jevnt med ceric-reagens i avtrekk etter observering under UV-lampe og avmerking.
2. Etter spraying legges platen i varmeskapet i 10-15 minutter ved omtrent 100 grader celcius.
3. Tilslutt tas platen ut, og resultatene observeres visuelt.

## **5.2.3.4 NMR spektroskopi (Nuclear Magnetic Resonance)**

### *Prinsipp*

NMR spektroskopi er en metode som anvender kjernemagnetisk resonans til å oppklare strukturer av organiske forbindelser. Dette skjer ved identifisering av kjerner som  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ , og  $^{31}\text{P}$ . Disse kjernene og andre isotoper som er NMR aktive kan betraktes som små, spinnende magneter. I et ytre magnetfelt vil kjernenes magnetiske momentvektor rettes inn etter magnetfeltet og presesere rundt feltretningen. Når kjerner blir påvirket av et ytre magnetfelt kan de orientere seg i 2 ulike retninger, enten med feltet ( $\alpha$  spinn-tilstand) eller mot feltet ( $\beta$  spinn-tilstand).

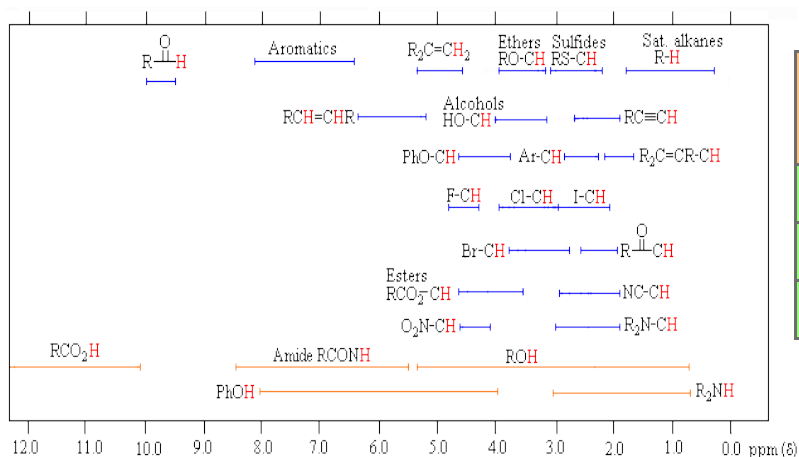
Kjerner som orienterer seg med det magnetiske feltet vil ha lavere energi enn de som orienterer seg mot. Når kjerner i  $\alpha$  spinn-tilstand blir plassert i et sterkt magnetfelt og bestrålt med elektromagnetisk stråling av riktig frekvens, vil disse kjernene absorbere energien og hoppe opp fra et lavt til et høyere energinivå. Kjernen er da i resonans med den magnetiske strålingen, derav navnet kjernemagnetisk resonans. Hvilken frekvens som kreves for å oppnå resonans er avhengig av styrken til det eksterne magnetfeltet og kjernen (Solomons og Fryhle 2004).

Ulike kjerner har ulike absorpsjonsfrekvenser, dette kan observeres både for  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$ . Forklaringen ligger i dannelsen av det lokale magnetiske feltet. Elektroner som omringer kjernen og andre steder på molekylet vil sammen innvirke på det lokale magnetiske feltet, og dermed gi opphav til ulike absorpsjonsfrekvenser.

I spektret vil ulike signaler være plassert i ulike posisjoner (på grunn av ulikt kjemisk shift). Disse posisjonene er basert på elektrontettheten og sirkulasjonen av elektroner. Elektrontettheten påvirkes av elektronegative grupper som trekker elektrontettheten fra kjernen og gir en avskjermingseffekt (deshielding). Dobbelbindinger med delokaliserte  $\pi$ -elektroner danner også et magnetfelt som kan gi skjermet (shielding) eller avskjermet (deshielding) effekter (Solomons og Fryhle 2004). Elektroner rundt kjernen former en elektronsky og danner dermed en skjermingseffekt på kjernen (shielding).

Ved hjelp av NMR instrument vil kjerner med ulik skjermingsgrad kunne detekteres, ved at ulike signaler på spektret representerer kjerner med forskjellige skjermingsgrad. En kerne med sterk skjerming vil føle mindre av det magnetiske feltet, og vil derfor absorbere ved høyere frekvens (upfield shift).

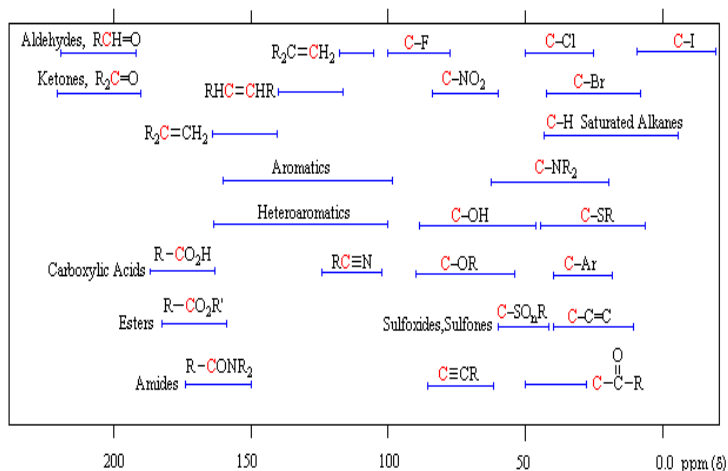
### Proton kjemisk shift (ppm)



Cpd./S ub.	X=Cl	X=Br	X=I	X= OR	X=S R
<b>CH<sub>3</sub>X</b>	3.0	2.7	2.1	3.1	2.1
<b>CH<sub>2</sub>X<sub>2</sub></b>	5.3	5.0	3.9	4.8	3.8
<b>CHX<sub>3</sub></b>	7.3	7.0	5.7	5.2	

Figur 5.3 og Tabell 5.1 viser  $^1\text{H}$ -NMR kjemisk shift verdi (Reuch 2010)

## Karbon Kjemisk shift (ppm)



Cpd./Sub.	X=F	X=Cl	X=Br	X=I	X=OMe
CH <sub>3</sub> X	75	25	10	-21	60
CH <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	110	54	22	-54	103
CHX <sub>3</sub>	119	77.5	12	-140	115
CX <sub>4</sub>	94	97	-29	-293	121

Figur 5.4 og tabell 5.2 viser <sup>13</sup>C- NMR kjemisk shift verdi (Reuch 2010).

I et NMR spekter vil økende feltstyrke gå fra venstre mot høyre.

I venstre del av NMR spektret vil det forekomme kjerner som er mindre skjermet (deskjermet) enn de på høyre del og derved har høyere ppm-verdi enn de til høyre.

Posisjonene til et signal i NMR-spektret kalles kjemisk shift ( $\delta$ ) og har enhet parts per million (ppm).

I NMR-spektret blir posisjonen til signalet fra tetrametylsilan (TMS)

definisjonsmessig satt til 0. Dette signalet brukes ofte til å kalibrere kjemisk shift-skalaen.

Når et <sup>1</sup>H-NMR spekter skal tolkes er det viktig å se på tre parametere.

### 1. Integralkurven

I <sup>1</sup>H NMR spekter vil arealet under hvert signal være proporsjonalt med antall korresponderende protoner i molekylet og ved å integrere arealet kan relativt antall protoner under ulike signaler beregnes. Integralkurven er proporsjonal med arealet under signalet.

## 2. Signal splitting

Når to nabokjerner påvirker hverandre med sine magnetiske felt og danner spin-spin-splitting, vil det resultere i dannelse av ulike signaler som singletter, dubletter, tripletter, doble dubletter, multipletter mer mer. Protoner med identisk magnetisk felt kobler seg ikke sammen, og gir derved ingen splitting av signal. For at to protoner skal kunne interagere med hverandre og gi opphav til splitting av signaler, må de være magnetisk ulike (ha ulikt kjemisk shift). En sier da at disse signalene kobler med hverandre. Signal splitting observeres vanligvis når kjernene er separert med 3 eller færre  $\sigma$ -bindinger. En kjerne med  $n$  identiske naboprotoner vil gi opphav til  $(n+1)$  signaler. For kjerner med nærliggende resonansfrekvens vil det bli dannet mer kompliserte splittings.

## 3. Koblingskonstant

I et signal som er splittet i flere topper, vil avstanden mellom disse toppene kalles koblingskonstant,  $J$ , med enhet Hertz. Koblingskonstanten ligger vanligvis mellom 0-18 og er like når kjerner påvirker hverandre. Med koblingskonstanten kan man finne ut hvilke kjerner som påvirker hverandre, derved identifisere kompliserte spektra.

NMR-spekter kan forekomme i ulike dimensjonale spektra.  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  og APT er eksempler på endimensjonal NMR- spektroskopi mens metoder for todimensjonal NMR omfatter blant annet COSY og HMBC.

### APT (Attached Proton Test)

APT er en metode som identifiserer substitusjonsmønster av alle karboner. Metoden går ut på å kategorisere karboner etter antall bundet hydrogenatomer. Prinsippet går ut på at signaler for primære og tertiære karboner peker oppover og gir positive signaler, mens signaler for sekundære og kvartenære karbonatomer peker nedover og gir negative signaler.

### COSY (correlation spectroscopy)

COSY er et spektroskopi basert på proton-proton korrelasjon.

Her blir det innhentet informasjon om hvilke protoner som kobler seg sammen uten behov for identifisering av koblingskonstanter.

### HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

Denne NMR metoden viser koblinger mellom C og H som ligger 2,3 og (4) bindinger fra hverandre. Signaler forekommer i spekteret der signaler fra C og H som kobler møtes. Denne metoden anvendes også til å oppklare bindingsmønstre i et molekyl. Andre metoder som danner todimensjonale NMR spektre omfatter blant annet HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) og HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence). Disse metodene anvendes til oppklaring av bindingsmønstre mellom C og H i molekylet og baserer seg på  $^1\text{H}$ - og  $^{13}\text{C}$ -NMR spektret. Spektrene ligger på hver sin akse og krysskoblingene forekommer hvor signaler for C og H som kobles sammen møtes. På denne måten får vi informasjon om krysskoblinger mellom C og H (Solomons og Fryhle 2004).

#### *Kjemikalier*

TMS (som referansesubstans)  
Deuterert kloroform med TMS  
Deuterert metanol med TMS

#### *Utstyr*

NMR- spektrometer  
NMR- rør  
Propp til NMR-rør

#### *Prosedyre*

1. En liten mengde av prøven løses i egnet deuterert løsningsmiddel med TMS.
2. Denne løsningen overføres til NMR- rør og en propp settes på
3. Prøven settes i NMR-spektrometer som analyserer prøven.





DPPH (Z') representerer frie radikaler hvor aktiviteten undertrykkes av substans (AH). Reaksjonen mellom DPPH og substrat forventes å være støkiometrisk og sluttresultatet kan presenteres som  $n_{\text{DPPH}}$  ( antall DPPH molekyler redusert av et substratmolekyl) . Et slikt støkiometrisk sluttresultat kan kun beregnes når molarmassen er kjent (Molyneux 2004). DPPH radikalet kan anvendes i polare og ikke-polare organiske løsningsmidler og gir derfor muligheten til analysering av hydrofile og hydrofobe antioksidanter (Cheng et al. 2006).

DPPH radikal scavenging er en lett og rask metode til måling av antioksidant aktivitet (Shahidi et al. 1992; Brand-Williams et al. 1995; Malterud 2009).

Absorbans ved 517nm måles før og etter tilsetning av DPPH, og ved tilstedeværelse av et radikal scavenger vil nedgang i absorbans observeres.

Prosentandel av DPPH som er scavenget kan beregnes ut fra denne formelen :

$$100 \times (A_0 \times 2,95/3,00) - A_t / ((A_0 \times 2,95 /3.00)-A_p)$$

$A_0$  = Startabsorbans (absorbans før tilsetning av prøveløsning /positiv kontroll)

$A_t$  = Sluttabsorbans etter avsluttet måletid (etter 5 minutter reaksjonstid).

$A_p$  = Absorbans etter 5 minutter reaksjonstid hvis alt DPPH har blitt scavenget

Prosentandel av DPPH- scavenging aktiviteten blir angitt i  $IC_{50}$  ( Den konsentrasjonen som gir 50 % scavenging).

Quercetin blir ofte anvendt til positiv kontroll på grunn av dets stabilitet, gode scavenger egenskaper og rimelighet i pris (Malterud 2009).

*Kjemikalier*

DPPH

MeOH

DMSO

Testsubstans

Quercetin

*Utstyr*

Kyvetter (kvart og glass kan anvendes)

Plastspatel

Mikropipetter

UV- spektrofotometer

### *Prosedyre*

1. DPPH pulver veies og løses i MeOH til konsentrasjon på 0,04 mg/ml.  
(Dette vil gi en absorbans på omtrent 1 ved 517 nm)
2. Prøvene som skal analyseres løses i DMSO til ønsket konsentrasjon
3. Quercetin løses i DMSO til ønsket konsentrasjon, som positiv kontroll
4. Spektrofotometer nullstilles med en blindprøve (2,95 mL MeOH) som skal stå i blindprøvebeholderen under hele målingen.
5. Startabsorbans måles i 2,95 mL DPPH ved 517 nm, i 3 paralleller.
6. Hver parallell tilsettes 50 µl prøveløsning og omrøres deretter med plastspatel
7. Etter tilsetning av prøve vil det ta 30 sekunder før registrering av absorbans.  
Absorbansen måles i hvert 60. sekund i totalt 5 minutter reaksjonstid.
8. Etter hver måling kastes innholdet og kyvetten vaskes med MeOH.

#### **5.2.4.2 15- Lipoksygenase enzymhemming**

##### *Prinsipp*

Denne målingen er basert på lipoksygenasekatalysert oksidasjonsreaksjon på flerumettede fettsyrer med 1,4-dien-type struktur. Oksidasjon på flerumettede forbindelser av denne typen vil føre til dannelse av konjugerte dobbeltbindinger og dermed absorbansøkning ved 234 nm. Økning i absorbans er proporsjonal med dannelsen av reaksjonsprodukter og blir derfor brukt til å kvantifisere peroksidierungsreaksjonen. Løsninger som hemmer 15-LOX aktivitet vil også redusere absorbansøkningen.

Hemmingsgraden av 15-LOX måles ved å sammenligne absorbansøkning i nærvær og fravær av en hemmer. Dette gjøres ved å sammenligne en blankprøve med en testprøve og ved hjelp av en formel regne ut prosentvis enzymhemming.

$$100 \times (A2-A1) / A2$$

A1 = Absorbansøkning per tidsenhet (AU/min) ved 234 nm for testløsning

A2 = Absorbansøkning per tidsenhet (AU/min) ved 234 for kun DMSO

(Lyckander og Malterud 1992)

15- lipoksygenase (15-LOX) kan lett utvinnes fra soyabønner og er i motsetning til andre lipoksygenase enzymer billig, relativt stabil og lett å måle. Av den grunn er det dette enzymet som anvendes under målingen. 15- lipoksygenase enzymer fra dyr (retikulocytter fra kaniner) er mer sensitiv ovenfor hemming enn de fra planter, men på grunn av likheter i struktur og høy korrelasjon i hemmingsaktivitet av LOX mellom soya og dyr (korrelasjonskoeffisient på mer enn 0,93) vil differansen i dette tilfelle være minimalt ( Utenova et al. 2007).

Linolsyre er billigere og mer stabil enn arakidonsyre og anvendes derfor vanligvis som substrat under målingen. Begge har tilsvarende strategenskaper, noe som gjør at resultater fra linolsyre og 15-LOX ( fra soyabønner) kan anvendes til å reflektere stoffers hemmingseffekt av 15 LOX på peroksidring av arakidonsyre i kroppen.

Quercetin er en god og tilgjengelig hemmer av lipoksygenase enzymet (  $IC_{50}$  verdi mellom 60 og 90  $\mu$ M), og anvendes derfor som positivkontroll i mange tilfeller (Lyckander og Malterud 1992).

### *Kjemikalier*

Alle løsninger unntak enzymløsning (C ) skal oppbevares i romtemperatur.

#### - **Løsning A:**

Borat buffer 0,2 M, pH 9 (Laget fra borsyre og natriumhydroksid).

#### - **Løsning B (Substratløsning):**

Først blandes 50  $\mu$ l linolsyre med 150  $\mu$ l etanol, deretter tilsettes det 50 mL boratbuffer (A). En uklar løsning vil bli dannet, og av den skal 10 mL tas ut og fortynnes med 150 mL boratbuffer (A). Denne løsningen skal anvendes samme dag som den tilberedes.

#### - **Enzymløsning C:**

Denne løsningen skal lages rett før målingene og legges i is.

Enzymløsningen lages i boratbuffer (A) til en konsentrasjon på omtrent 10 000 U/mL.

- **Substansløsning D:**

Testsubstans fortynnes i bestemte konsentrasjoner med DMSO.

(Det beste konsentrasjonsområdet for testsubstansene er avhengig av den hemmende aktiviteten. Denne aktiviteten må måles i hvert tilfelle og bør starte med en moderat styrke (10mg/mL) og deretter fortynne videre)

- DMSO løsning

Det blir anvendt DMSO i blindprøve og blank prøve.

- Quercetin løsning

Det blir anvendt quercetin som positiv kontroll

*Utstyr*

- Pipetter/ multipipetter
- Kvartskvetter ( 4 stk)
- Plastspatler
- UV-spektrofotometer (spektrofotometeret skal måle absorbans ved 234 nm)

*Prosedyre*

1. UV spektrofotometer nullstilles med blindprøve.  
Blindprøven består av 0,95 mL boratbuffer (A), 2,00 mL løsning B og 0,05 mL DMSO. Blindprøven omrøres godt med plastspatel og settes i prøveholderen under hele målingen
2. Blank prøve (uten hemmer) tilberedes ved at 0,90 mL boratbuffer (A), 2,00 mL løsning B, og 0,05 mL DMSO tilsettes en kyvette og blandes godt med en plastikkspatel. Det blir laget 3 paralleller for hver måling av blankprøve. Ved tiden  $t = 0$  tilsettes enzymløsning (C) og blandingen røres igjen med en plastspatel. Plasser kyvettene i prøverommet av spektrofotometeret og mål absorbansøkning ved 234 nm, fra 30-90 sekunder etter tilsetning av enzymløsning (C).  
Absorbansøkningen er normalt mellom 0,25-0,5 AU/min.  
Dette punktet bør gjøres etter hver 3. måleserie med testløsninger for å kontrollere stabiliteten av enzymaktiviteten.
3. Substansløsning (D) tilberedes ved at 0,90 mL boratbuffer (A), 2,00 mL løsning B og 0,05 mL testløsning tilsettes en kyvette og blandes godt med

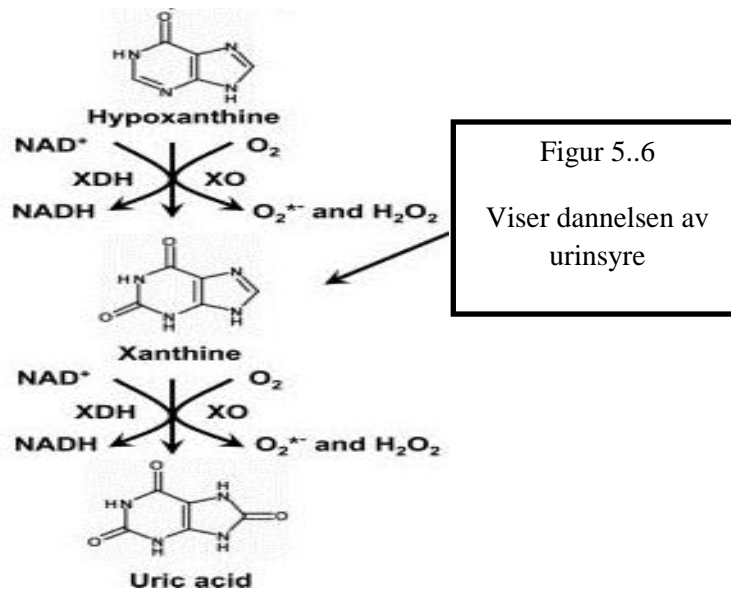
plastikkspatel. Ved tiden  $t = 0$  tilsettes 0,05mL enzymløsningen (C) og blandingen røres igjen med en plastikkspatel. Plasser kyvettene i prøverommet av spektrofotometeret og mål absorbansøkning ved 234 nm, fra 30-90 sekunder etter tilsetning av enzymløsning (C).

4. Quercetin brukes som positivkontroll. Punkt 3 utføres men testløsningen byttes ut med quercetinløsningen.
5. Etter hver måling vaskes kyvettene med boratbuffer (A) og en ny pipette blir anvendt til hver substansløsning.

#### **5.2.4.3 Xanthin oksidase hemming**

Xanthin oksidoreduktase (XOR) omfatter både xanthin oksidase (XO) og xanthin dehydrogenase (XDH). I celler er det XDH som forekommer mest, men ved proteolyse eller oksidasjon av sulfhydryl gruppen vil XO bli generert. XOR omdanner hypoxanthin til xanthin og fra xanthin til urinsyre.

I mennesker er det kun XOR som har evnen til å katalysere produksjonen av urinsyre. (George et al. 2009). Både XO og XDH kan katalysere dannelsen av urinsyre ved å bruke oksygen som substrat, men det er kun XDH som har evnen til å redusere  $\text{NAD}^+$ . Dette ved å binde seg til flavinadenin dinukleotid (FAD) reaksjonssete på  $\text{NAD}^+$ . Når XO bruker oksygen som substrat til å oksidere xanthin eller hypoxanthin, vil det føre til dannelse av superoksid anionradikal og hydrogenperoksid (Enroth et al. 2000; George et al. 2009). Superoksid anionradikalet kan videre reagere med NO og danne cytotoxiske radikaler som peroksynitritt og følgelig påføre oksidative skader på DNA, proteiner og lipider (Pacher et al. 2006). Superoksid anion produsert av XO er involvert i ulike patologiske tilstander som hepatitt, inflammasjon ulike former av iskemi, karsinogenese og aldring (Nguyen et al. 2004; Pacher et al. 2006).



En økt blodkonsentrasjon av urinsyre kan føre til hyperurikemi og følgelig resultere i urinsyregikt og dannelse av nyrestein (Lavelli et al. 2000; Akowuah et al. 2006). For å kunne redusere forhøyet urinsyrekonsentrasjon i blodet anvendes det i dag allopurinol. Allopurinol er et legemiddel som ved hjelp av XO vil oksidere til oxypurinol og virker som en aktiv XO hemmer. Gjennom humane kliniske studier og eksperimenter på dyr har det blitt påvist positive resultater på reduksjon av urinsyrekonsentrasjoner, men dessverre har det også blitt observert en tydelig bivirkningsprofil. Av den grunn er det nødvendige med utvikling av andre alternativer med mindre bivirkninger (Pacher et al. 2006).

Gen ekspresjon av XOR er forskjellig i mennesker og er 20 % høyere hos menn enn kvinner. Som regel er disse uttrykkene lite aktive, men ved steroidbehandling og økt nivå av IL1, IL-6 og TNF- $\alpha$  kan gentranskripsjonen for produksjonen av XOR oppreguleres. Celler øker omdannelsen av XDH til XO ved ischemi. Ved reperfusjon vil det dannede XO bruke oksygen og xanthin som substrat og produsere urinsyre og superoksid radikanion (George et al. 2009).

Xanthin oksidase aktivitet med hypoxanthin som substrat ble målt ved hjelp av spektrofotometrisk måling. Hovedfunksjonen til xanthin oksidase er å oksidere xanthin eller hypoxanthin til urinsyre. Akkumulering av urinsyre kan observeres spektrofotometrisk ved 290nm.

Prosent XO hemming kan beregnes etter følgende formel:

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

$A_1$  = Absorbansøkning per tidsenhet med testsubstans ved 290 nm

$A_2$  = Absorbansøkning per tidsenhet uten testsubstans ved 290 nm

### *Kjemikalier*

**A.** Natriumkaliumfosfatbuffer 0,05M, pH 7,5

(Laget av kaliumhydrogenfosfat og natriumhydrogenfosfat)

**B.** Substratløsning : 10 mg hypoxanthin løses i 500 ml renset vann

**C.** Enzymløsning : XO i fosfatbuffer (**A**) til en konsentrasjon på ca. 1,8 enheter/mL.

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

Testsubstans

Quercetin

DMSO

Renset vann

### *Utstyr*

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Pipetter

Plastspatel

### *Prosedyre*

1. Prøvene løses i DMSO til ønsket konsentrasjon
2. Quercetin løses i DMSO til ønsket konsentrasjon, og anvendes som positiv kontroll.
3. Spektrofotometer nullstilles med blindprøve ( 1,85 mL A, 0,05 mL DMSO, 1,0 mL renset vann og 0,1 mL C). Blindprøven blandes godt med en plastspatel og settes i blindprøve holderen under hele målingen.
4. Blankprøve: 1,85 mL A, 0,1 mL C og 0,05 mL DMSO tilsettes og blandes i kyvette (3 paralleller). Kyvettene settes i prøve holderne og omrøres med



plastspatel. Det tilsettes 1,0 mL B med påfølgende omrøring.

Absorbansøkningen ved 290 nm måles 30 sekunder etter tilsetning av B, og deretter hvert 30. sekund i 5 minutter. Etter hvert 3. måleserie med prøveløsninger gjentas dette punktet for å kontrollere enzymets stabilitet.

5. Testløsning: 1,85 mL A, 0,1 mL C og 0,05 mL prøveløsning eller quercetin tilsettes og blandes i kyvette (3 paralleller). Kyvettene settes i prøve holderne og omrøres med plastspatel. Det tilsettes 1,0 mL B med påfølgende omrøring. Absorbansøkningen ved 290 nm måles 30 sekunder etter tilsetning av B, og deretter hvert 30. sekund i 5 minutter.
6. Kyvettene vaskes med rensset vann etter hver måling.

#### 5.2.4.4 Brine shrimp test i mikrobrønner

##### *Prinsipp*

Brine shrimp test er en metode som anvendes til toksisitetmålinger av ulike planteekstrakter. Dette ved å bruke *Artemia salina* egg (Solis et al. 1993).

Karakteristikker ved disse testorganismene er at de er svært homogene, både i egg og i nyfødte individer. De er både viktig som mat for fisker og innenfor forskning i histologi, toksikologi, radiobiologi, biokjemi og flere (Duerr u.å.). Cystene har evnen til å forbli dormant i lengere perioder før de klekker. De kan tåle store fluktuasjoner i temperatur fordi de kan tåle store variasjoner i intracellulær vannmengde (Duerr u.å.). På grunn av disse egenskapene har de blitt anvendt som levende mat og forskningsobjekter i flere tiår (Anonym 2010).

##### *Kjemikalier*

Renset vann

Egg av rekelarver (*Artemia salina*)

Kunstig havsalt

##### *Utstyr*

Mikrobrønner

Klekkemåler

Mikroskop med USB-port

Pc med programvare for mikroskop

Lamp

## *Prosedyre*

Første dag:

1. Kunstig havsalt blandes med rensset vann til 3,3% saltvannløsning.  
Ved tungt løselig bunnfall kan løsningen røres med magnetrører.
2. Klekkekammeret til rekene fylles med saltvannløsning og en spatel-spiss med rekelarver tilsettes.
3. Klekkekammeret settes under en lampe ved romtemperatur. I løpet av 2 dager vil rekelarvene klekkes.

Tredje dag:

1. Substansene løses i DMSO til ønsket konsentrasjon (10mg/mL, 5mg/mL, 1mg/mL, og 0,1 mg/mL).
2. Saltvannløsning (198  $\mu$ l) med omtrent 10-15 rekelarver tilsettes hver brønn.  
(Det skal lages 3 paralleller for hver konsentrasjon av prøveløsning, positiv og negativ kontroll).
3. Prøveløsningen (2 $\mu$ l) tilsettes hver brønn, i 3 paralleller  
(sluttkonsentrasjon 100  $\mu$ g/mL, 50 $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL, 1 $\mu$ g/mL).
4. Positiv kontroll: 3 brønner tilsettes 2  $\mu$ L podofyllotoksin ( 5mg/mL løst i DMSO, tilsvarende 50 $\mu$ g/mL sluttkonsentrasjon ).
5. Negativ kontroll: 3 brønner tilsettes 2  $\mu$ L DMSO (1%).
6. Antall levende rekelarver i hvert brønn telles ved hjelp av et USB mikroskop
7. Et lokk settes over klekkekammeret (bare halve kammeret).
8. Kammeret settes under en lampe i romtemperatur i 24 timer.

Fjerde dag.

1. Antall døde rekelarver for hver brønn noteres ved hjelp av USB mikroskop.
2. 100  $\mu$ L metanol tilsettes hver brønn for å drepe de gjenlevende rekelarvene.
3. LC<sub>50</sub> verdien ble beregnet for hver prøve.

## 5.3 Eksperimentell utførelse

### Utgangsmateriale

Utgangsmaterialet som ble anvendt var tørt plantemateriale av *Glinus oppositifolius* og veide totalt 1503,3 g.

#### 5.3.1. Ekstraksjon med diklormetan, DCM

Kolbe med plantemateriale ble tilsatt DCM og tildekket med aluminiumsfolie til etterfølgende dag. Neste dag ble DCM-råekstrakt filtrert med sug, og ny DCM ble tilsatt det ekstraherte plantematerialet og filtrert. Samlende DCM- ekstrakter ble dampet inn til tørrhet med rotavapor og oljevakuumpumpe. Plantematerialet ble ekstrahert 4 ganger med omtrent 2,8 L DCM for hver ekstraksjon.

Vekt DCM-råekstrakt: 18,49 g

#### 5.3.2 Ekstraksjon med Metanol, meOH

Etter ekstraksjon med DCM ble det tørre plantematerialet tilsatt MeOH (se tabell neste side) og dekket med aluminiumsfolie til etterfølgende dag. Neste dag ble planterestene med MeOH filtrert med sug og deretter videre filtrert med faseparasjonsfilter for å fjerne partikler og grums etter filtrering. Filtrert MeOH-råekstrakt ble dampet inn til tørrhet med rotavapor, mens det tørre plantematerialet ble videre ekstrahert med MeOH til dagen etter. Plantematerialet ble totalt ekstrahert 4 ganger med MeOH, og ekstraktet tørket inn til tørrhet med rotavapor og oljevakuumpumpe. Det tørre MeOH-råekstraktet i kolben ble skrapet ut av rundkolben og lagt på aluminiumsfolie. Både kolben med MeOH-råekstrakt og det som ble skrapet ut ble lagt i avtrekk til tørrhet

**Tabell 5.3 Mengde MeOH som ble anvendt til ekstraksjon**

Tidspunkt	Mengde MeOH
Dag 1	Omtrent 2 L MeOH
Dag 2	Omtrent 2,3 L MeOH
Dag 3	Omtrent 2,4 L MeOH+ regenerert MeOH
Dag 4	Omtrent 1,9 L regenerert MeOH

Vekt MeOH-råekstrakt : 91,8 g

### 5.3.3 Suspensjon i destillert vann, H<sub>2</sub>O

Samlet MeOH-ekstraktet ble suspendert i 400 mL destillert vann i skilletrakt.

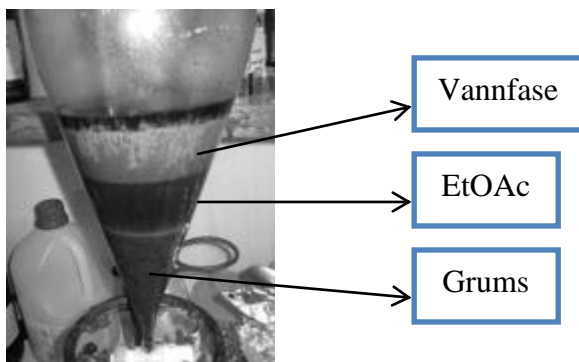
Kolben MeOH-ekstraktet hadde vært i, ble vasket etter med 300 mL EtOAc, som så ble overført til skilletrakten.

### 5.3.4. Væske-væske ekstraksjon med Etylacetat, EtOAc

Vannfasen i skilletrakten ble ekstrahert med i alt 3x300 mL EtOAc. Grums på bunnen av skilletrakten ble skilt fra og ekstrahert med 2x300mL EtOAc. Det siste av disse ekstraktene ble overført til skilltrakten og brukt i siste ekstraksjon av vannfasen.

EtOAc-råekstrakt ble filtrert med fase-separasjonsfilter og inndampet til tørrhet med rotavapor og oljevakuumpumpe.

Vekt EtOAc-ekstrakt: 17, 2 g.



**Bilde 5.1 Væske-væske ekstraksjon med EtOAc**

### 5.3.5. Væske-væske ekstraksjon med BuOH

Det ble brukt 300 mL BuOH til å ekstrahere vannfasen og 300 mL BuOH til å ekstrahere fast stoff (grums). Dette foregikk i 3 omganger, men på den siste runden ble 300 mL BuOH først brukt til å ekstrahere fast stoff og deretter vannfasen for siste gang. Fast stoff fra BuOH-råekstraktet ble filtrert med sug mens BuOH-fase i vannfasen ble separert ved hjelp av skilletrakt.



**Bilde 5.2 Ekstraksjon og filtrasjon av BuOH-ekstraktet.**

Tilslutt ble BuOH-fasen filtrert med fase-separasjonsfilter og dampet inn til tørrhet med rotavapor og oljevakuumpumpe.

Vekt BuOH-råekstrakt: 83,43g

Den resterende vannfasen ble forsøkt inndampet, men dette ga sterk skumming, så bare en alikvot ble inndampet.

### 5.3.6 NMR

En liten del av DCM råekstrakt ble løst i kloroform og overført til en liten pærekolbe, deretter dampet inn til tørrhet med rotavapor.

Tilsvarende ble gjort med de andre råekstraktene (MeOH-, BuOH-, EtOAc-, vann og bunfall råekstrakt) men her ble det anvendt MeOH som løsemiddel istedenfor kloroform. DCM- råekstrakt ble tilsatt  $\text{CDCl}_3$ , men resten av småkolbene ble tilsatt litt MeOH- $d_4$  (+TMS). Prøvene ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR og for de mer interessante  $^{13}\text{C}$  NMR.

## 5.3.7 Bioassay

### 5.3.7.1 DPPH- måling

DPPH-målinger ble utført på alle rækstraktene ved en konsentrasjon på 333 $\mu$ g/mL.

DMSO ble brukt som løsemiddel her og i de følgende testene.

Se punkt 5.2.4.1

### 5.3.7.2 Lipoksygenase hemming

Det ble utført lipoksygenase hemming på alle rækstraktene ved en konsentrasjon på 333 $\mu$ g/mL og lavere. Det ble anvendt quercetin (Que) som positiv kontroll.

Se punkt 5.2.4.2

### 5.3.7.3 Xanthin oksidase

Det ble utført XO-hemming på alle ekstraktene ved en konsentrasjon på 333 $\mu$ g/mL.

Se punkt 5.2.4.3

### 5.3.7.4 Brine shrimp test

Toksisiteten av alle ekstraktene ble målt ved hjelp av Brine shrimp test ( se punkt..).

Toksisitetstesten ble utført ved konsentrasjon 10 mg/mL, 5 mg/mL, 1 mg/mL og

0,1 mg/mL i DMSO løsningsmiddel. I en ny måleserie ble konsentrasjonene 40 mg/mL, 20 mg/mL, 10 mg/mL og 5 mg/mL anvendt.

Se punkt 5.2.4.4



Bilde 5.3 Brine shrimp egg og klekkekammer

## 5.3.8 Fraksjonering av EtOAc- ekstraktet

### 5.3.8.1 Versaflash kolonne kromatografi

En mengde på 5,4097 g EtOAc-ekstrakt ble løst i 10mL metanol og deretter 2 ml vann. Ved tilsetning av vann ble det dannet bunnfall og ekstraktet ble filtrert før applisering på kolonnen. Etter filtrering ble det samlet opp 448,2 mg bunnfall. Beggerglasset med ekstraktet ble ettervasket med 2 mL MeOH, som også ble filtrert. Samlede filtrater ble tilslutt applisert på en Versapak RP 18 kolonne (15x4 cm) og kondisjonert med 50% vandig MeOH. Elueringen foregikk i en vann-metanolgradient og ga til sammen 24 fraksjoner à 60 mL. Ved hjelp av analytisk tynnsjikt-kromatografi, TLC med ceric spraying ble fraksjonene slått sammen til 8 hovedfraksjoner.

#### Mobilfaser som ble benyttet under fraksjoneringen:

Fraksjon 1-5 ble eluert med MeOH 50 : H<sub>2</sub>O 50

Fraksjon 6-11 ble eluert med MeOH 70 : H<sub>2</sub>O 30

Fraksjon 12-20 ble eluert med ren MeOH

Fraksjon 21-24 ble eluert med aceton 70 : H<sub>2</sub>O 30

Etter å ha rensa kolonnen med aceton/vann, ble kolonnen vasket med metanol.

**Tabell 5.4 Fraksjoner etter separasjon av EtOAc-råekstrakt med versaflash**

Fraksjon	Volum, ml	Vekt, mg	Akkum. vekt	Kons. mg/ml	NMR <sup>1</sup> H	NMR <sup>13</sup> C
EV1 (1-2)	120	974,7	974,7	8,1	x	x
EV2 (3-5)	180	422,1	1396,8	2,3	x	
EV3 (6-8)	180	1495,4	2892,2	8,3	x	x
EV4 (9-10)	120	227,1	3119,3	1,9	x	
EV5 (11-12)	120	418,4	3537,7	3,5	x	
EV6 (13-16)	240	163,5	3701,2	0,7	x	
EV7 (17-20)	240	39,0	3740,2	0,2	x	
EV8 (21-23)	180	95,9	3836,1	0,5	x	
Total vekt		3836,1				
% recovery (på satt 4.95 g)		77				

Fraksjon 1-14 ble utviklet med MeOH 50 : H<sub>2</sub>O 50 som mobilfase.

Fraksjon 6-24 hadde ren metanol som mobilfase.

Begge platene ble observert under UV-lys (254 nm kortbølget og 366 nm langbølget). Platen ble deretter sprayet med ceric-reagens og lagt i varmeskap til 110° i 5 min. <sup>1</sup>H NMR spektra ble tatt opp av alle fraksjoner mens <sup>13</sup>C NMR spektra kun av fraksjon 1 og 3.

#### **5.3.8.2 15- LO hemming**

Det ble utført 15-LO hemming på Versaflash EtOAc fraksjonene.

Måling av enzymhemming foregikk ved konsentrasjon 167 µg/mL og lavere.

#### **5.3.8.3 Xanthin oksidase hemming**

Det ble utført xanthin oksidase hemming på EtOAc Versaflash fraksjonene ved konsentrasjon 167 µg/mL.

#### **5.3.8.4 Analytisk HPLC**

Det ble utført analytisk HPLC på EtOAc- ekstraktet og fraksjon EV1- EV4. For EtOAc ekstraktet, EV1 og EV2 foregikk analysen både ved 261nm og 206-306 nm, men kun ved 261nm for EV3 og EV4.

### **5.3.9 Preparativ kromatografi av EtOAc ekstrakt EV1**

Fraksjon V1 fra versaflashkromatografi av EtOAc-råekstrakt ble ytterligere fraksjonert med samme metode. En mengde på 0,9 g ble løst i 3 mL MeOH 1: vann 2 og applisert på en VersaPak RP 18 kolonne (110 x 23 millimeter),

Fraksjon EV1 ble eluert med følgende mobilfaser:

MeOH 20: vann 80 (fraksjon 1-5)

MeOH 50 :vann 50 (fraksjon 13-22)

MeOH 33: vann 67( fraksjon 6-12)

MeOH 100% (fraksjon 23-28)



Det ble samlet opp 27 fraksjoner à 22 ml ( fraksjon 28 : 60 mL) som ble applisert på en TLC RP Si gel F254s plate (Merck). Følgende konsentrasjoner av mobilfasen ble anvendt til de ulike fraksjonene:

Fraksjon 1-15 ble utviklet med MeOH 1 : vann 2.

Fraksjon 13-28 ble utviklet med MeOH 1 : vann 1.

Fraksjon 13-24 utviklet med 100% MeOH

**Tabell 5.5 Fraksjoner etter separasjon av fraksjon EV1 med versaflass**

Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Akkum. vekt	Kons mg/ml	NMR <sup>1</sup> H	NMR <sup>13</sup> C
1(1-2)	44	317,4	317,4	7,21	x	
2(3-7)	110	60,3	377,7	0,55	x	
3(8-12)	110	73,4	451,1	0,67	x	x
4(13)	22	26,4	477,5	1,20	x	
5(14)	22	28,5	506,0	1,30	x	
6(15)	22	17,4	523,4	0,79	x	
7(16-19)	88	47,1	570,5	0,54	x	
8(20-22)	66	63,4	633,9	0,96	x	
9(23)	22	159,3	793,2	7,24	x	x
10(24-28)	148	2,2	795,4	0,01		
	tot.vekt	795,4				
	% recovery	88	(på satt 0.9 g)			

TLC-platene ble påvist ved hjelp av UV 254, UV 366 og ceric- spraying. Basert på TLC resultatene ble fraksjonene slått sammen, inndampet med rotavapor og veiet. <sup>1</sup>H NMR spektra ble tatt opp av alle fraksjoner mens <sup>13</sup>C NMR spektra ble kun tatt opp av EV1V3 og EV1V9.

### Utfelling av EV1V3

Det ble observert en supernatant og utfelling i fraksjon EV1V3. Bunnfallet fra EV1V3 ble videre analysert med <sup>13</sup>H-NMR og <sup>13</sup>C-NMR.

### **15-LO hemming av vitexin**

Basert på NMR-resultatene av EV1V3, ble det tatt 15-LO hemming på vitexin. Vitexin (Sigma-Aldrich) ble løst i DMSO til ønskede konsentrasjoner (10mM, 5mM, 2,5 mM og 1,25 mM) og testet for 15-lipoksygenasehemming. Prosessen er blitt beskrevet tidligere, se punkt 5.2.4.2.

### **Utfelling av EV1V8**

Det ble også observert en supernatant og utfelling i fraksjon EV1V8. Bunnfallet fra denne fraksjon ble følgelig analysert med  $^{13}\text{H}$ -NMR og  $^{13}\text{C}$ -NMR spektra.

### **5.3.9.1 Preparativ kromatografi av EtOAc fraksjon EV1 V9**

Fraksjon EV1V9 (0,15 g) fra tidligere fraksjonering med versafashkromatografi av EtOAc-råekstrakt ble løst i omtrent 3 mL MeOH 1 : DCM 1. Prøveløsningen ble applisert på en 2 millimeter kromatotronplate og kondisjonert med DCM.

Fraksjonen ble eluert med:

DCM (fraksjon 1-3)	DCM-20% MeOH (fraksjon 14-18)
DCM-5% MeOH (fraksjon 3-8)	DCM-40% MeOH (fraksjon 19-23)
DCM -10% MeOH (fraksjon 9-13)	

Det ble samlet opp 28 fraksjoner à 15 ml og applisert på en TLC RP Si gel F254s plate (Merck).

Følgende konsentrasjoner av mobilfasen ble anvendt til de ulike fraksjonene:

Fraksjon 1-14 ble utviklet med 5% MeOH i DCM

Fraksjon 10-20 utviklet med 10% MeOH i DCM

Fraksjon 14-23 utviklet med 20%

MeOH i DCM

**Tabell 5.6 Fraksjoner etter separasjon av fraksjon EV1V9 med veraflash**

Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Akkum. vekt	Kons. mg/ml
1(1-6)	90	0,0	0,0	0,00
2(7-9)	45	0,0	0,0	0,00
3(10-12)	45	0,0	0,0	0,00
4(13)	15	0,4	0,4	0,03
5(14-15)	30	38,4	38,8	1,28
6(16)	15	15,6	54,4	1,04
7(17)	15	13,7	68,1	0,91
8(18)	15	6,5	74,6	0,43
9(19)	15	7,7	82,3	0,51
10(20-21)	30	21,3	103,6	0,71
11(22-23)	30	1,8	105,4	0,06
	tot.vekt	105,4		
	% recovery	70	(på satt 0.15 g)	

TLC-platene ble påvist ved hjelp av UV 254nm, UV 366nm og ceric-spraying. Basert på TLC resultatene ble fraksjonene slått sammen, inndampet med rotavapor og veiet.

<sup>1</sup>H NMR og <sup>13</sup>C NMR spektra ble tatt opp av fraksjon EV1V9C5.

### 5.3.10 Kromatotronseparering av EtOAc fraksjon EV3

Fraksjon EV3 ble løst i 3 ml DCM-MeOH (1:1) og applisert på en 2 millimeter kromatotronplate av silikagel med gips. Fraksjonen ble kondisjonert med DCM i en gradienteluering fra 8% DCM i MeOH til 40% DCM i MeOH.

Det ble samlet opp 15 fraksjoner à 22 ml og applisert på en TLC RP silikagel F254s.

Det ble anvendt mobilfase bestående av:

10% DCM i MeOH for fraksjon 1-10

15% DCM i MeOH for fraksjon 11-15

Fraksjonene ble slått sammen til 10 hovedfraksjoner ved påvisning med Ceric-spraying og oppvarming til 110° i 5 min. Disse ble inndampet til tørrhet i vakuum og deretter veid. <sup>1</sup>H NMR spektra ble tatt opp av fraksjon 4-10 og <sup>13</sup>C NMR spektra av fraksjon 5, 7 og 9.

**Tabell 5.7 Fraksjoner etter separasjon av fraksjon E3 med kromatotron**

Fraksjon	Volum, ml	Vekt, mg	Kons. mg/ml	% av total	Eluent
1(1-6)	132	14,5	0,11	4,5	DCM 0- >8%MeOH
2(7)	22	4,6	0,21	1,4	10% MeOH
3(8)	22	6,3	0,29	2,0	
4(9)	22	26,3	1,20	8,1	
5(10)	22	117,3	5,33	36,3	
6(11)	22	29,1	1,32	9,0	
7(12)	22	60,0	2,73	18,6	
8(13)	25	24,0	0,96	7,4	15% MeOH
9(14)	25	13,9	0,56	4,3	20% MeOH
10(15)	25	26,7	1,07	8,3	40% MeOH
	Total vekt	322,7			
	% recovery	81,5			

**5.3.10.1 Kromatotronseparering av EtOAc fraksjon EV3C5**

Fraksjon 5 (EV3C5) (117mg) ble rekromatografert på kromatotron. Det ble anvendt en 1 mm sjikt og isokratisk eluering med 10% MeOH i DCM i separasjonen.

**Tabell 5.8 Fraksjoner etter separasjon av fraksjon EV3C5 med kromatotron**

Fraksjon	volum ml	vekt mg	kons mg/ml	% av total påsatt	TLC
1(1-2)	20	0	0	0	tom
2(3)	10	5,7	0,	5	A+(B)
3(4)	10	41,6	4,2	36	A+B
4(5)	10	35	3,5	30	(A)+B
5(6-7)	30	9,8	0,3	8	(A)+B
6(8-10)	30	2,1	0,1	2	B
	sum mg	94,2			
	recovery%	81			

Ti fraksjoner ble mottatt og undersøkt med TLC. Fraksjonene ble inndampet til tørrhet i vakuum og veid. Basert på TLC resultatene ble fraksjon 4(5) og 5(6-7) slått sammen. <sup>1</sup>H og <sup>13</sup>C NMR spektra ble opptatt av sammenslått fraksjon 5-7 (EV3C5C5-7).

Se vedlegg 9.3.3.2 (EV3) og 9.3.3.2a (EV3C5C5-7).

### 5.3.11 Kromatotronseparering av EtOAc fraksjon EV5

Fraksjon EV5 (400mg) ble løst i litt DCM-MeOH (1:1) og applisert på en 2 millimeter kromatotronplate. I gradientelueringen ble det anvendt eluenter fra DCM til 40% MeOH i DCM. Nitten fraksjoner ble mottatt og analysert med TLC silika gel normalfase. I TLC ble det anvendt mobilfase 5-10% MeOH i DCM.

Ved påvisning med ceric-spraying fulgt av oppvarming til 110° i ca 5 min, ble fraksjonene slått sammen til 10 hovedfraksjoner.

Fraksjon 8 var størst og basert på TLC resultatene ble fraksjon 3 og 4 slått sammen.

<sup>1</sup>H-NMR og <sup>13</sup>C NMR spektra ble opptatt for sammenslått fraksjon EV5C3+4 og for fraksjon EV5C8. Se vedlegg 9.3.3.3a for spektra av fraksjon EV5C3+4.

### 5.4 Preparativ kromatografi og opparbeidelse av BuOH ekstrakt

En mengde på 10,5 g BuOH-ekstrakt ble løst i 50 mL blanding av MeOH 2 :vann 1 og deretter filtrert. Den filtrerte løsningen ble applisert på en VersaPak RP 18 kolonne (15x4cm) og eluert med følgende elueringsmiddel:

MeOH 20 : vann 80, 250 mL

MeOH 70 : vann 30, 250 mL

MeOH 30 : vann 70, 250 mL

MeOH 100%, 250 mL

MeOH 40 : vann 60, 250 mL

Aceton 70 : vann 30, 250 mL

MeOH 50 : vann 50, 250 mL

MeOH 100% , 300 mL

**Tabell 5.9 Fraksjoner etter separasjon av fraksjon BuOH med Versaflash**

Fraksjon	Volum, ml	Vekt, mg	Akkum. vekt	Kon. mg/ml	% av total	NMR <sup>1</sup> H	NMR <sup>13</sup> C
1(1)	15	329,0	329,0	21,9	3,6	x	
2(2-4)	60	3100,0	3429,0	51,7	34,2	x	x
3(5-8)	240	351,0	3780,0	1,5	3,9	x	x
4(9-11)	180	247,4	4027,4	1,4	2,7	x	x
5(12-15)	240	832,5	4859,9	3,5	9,2	x	x
6(16-19)	240	962,0	5821,9	4,0	10,6	x	x
7(20-21)	120	1690,9	7512,8	14,1	18,7	x	x
8(22-23)	120	558,3	8071,1	4,7	6,2	x	x
9(24-25)	120	803,9	8875,0	6,7	8,9	x	x
10(26-27)	120	111,0	8986,0	0,9	1,2	x	
11(28-32)	480	67,0	9053,0	0,1	0,7	x	
	tot.vekt	9053,0			100,0		
	% recovery	91					
	(påsett ca 10 g)						

Etter å ha rensa kolonnen med aceton/vann, ble kolonnen vasket med metanol. Det ble samlet opp 32 fraksjoner à 15-60 mL og applisert på en TLC RP Si gel F254s (Merck). Løpemedlet som ble benyttet under fraksjoneringen bestod av:

MeOH 30 : H<sub>2</sub>O 70 for fraksjon 1-10  
 MeOH 50 : H<sub>2</sub>O 50 for fraksjon 1-20  
 Aceton 70 : H<sub>2</sub>O 30 for fraksjon 21-24

Ved påvisning med ceric-spraying fulgt av oppvarming til 110° i ca 5 min ble fraksjonene slått sammen til 11 hovedfraksjoner basert på TLC resultatene. Fraksjonene ble inndampet med rotavapor, veiet og tatt NMR spektra for alle sammenslåtte fraksjoner, men kun fraksjon 2-9 for <sup>13</sup>C-NMR.

#### 5.4.1 Preparativ kromatografi og opprensing av BuOH ekstrakt BV2

Fraksjon BV2, ca. 1.6 g løst i 12 ml MeOH 3 : vann 1, ble applisert på en Versapak RP-18 kolonne (15x4 cm) og kondisjonert i 25% vandig MeOH).

Kolonnen ble eluert med

25% MeOH i vann, 400 mL	80% MeOH i vann, 250 ml
40% MeOH i vann, 250 mL	100% MeOH, 400 mL
60% MeOH i vann, 250 mL	

**Tabell 5.10 Fraksjoner etter separasjon av fraksjon BV2 med Versaflash**

Fraksjon	Volum, ml	Vekt, mg	Akkum. vekt	Kons. mg/ml	% av total	NMR <sup>1</sup> H	NMR <sup>13</sup> C
1(1)	60	158,5	158,5	2,64	11,7	x	x
2(2)	60	221,9	380,4	3,70	16,3	x	x
3(3-7)	300	72,5	452,9	0,24	5,3	x	
4(8-11)	240	162,2	615,1	0,68	11,9	x	
5(12)	60	70,6	685,7	1,18	5,2	x	x
6(13-14)	120	267,9	953,6	2,23	19,7	x	x
7(15)	60	121,5	1075,1	2,03	8,9	x	x
8(16-17)	120	236,2	1311,3	1,97	17,4	x	x
9(18-20)	180	28,1	1339,4	0,16	2,1		
10(21-23)	180	19,0	1358,4	0,11	1,4		
	tot.vekt	1358,4			100,0		
	% recovery	85					

Det ble mottatt 23 fraksjoner à 60 ml og applisert på TLC RP plater.

Kolonnen ble kondisjonert med følgende mobilfaser:

50% vandig MeOH for fraksjon 1-15

70% vandig MeOH for fraksjon 11-23

Ved påvisning med ceric-reagens spraying fulgt av 5 min oppvarming til 110° ble disse slått sammen til 10 fraksjoner, og deretter inndampet til tørrhet på rotavapor og veiet. <sup>1</sup>H NMR spektra ble opptatt for fraksjon 1-8, mens <sup>13</sup>C NMR spektra for fraksjon 1-2 og 5-8 (spektra for fraksjon BV2V6, vedlegg 9.3.4.1).

#### 5.4.1a Opparbeidelse av BV2V6

Fraksjon BV2V6 (ca. 260 mg) ble løst i 2 ml DCM-MeOH, 2:1, og applisert på en 2 mm kromatotronplate. Eluering ble utført med en DCM-MeOH gradient på 10-20% MeOH. Det ble mottatt 25 fraksjoner à 10 ml og applisert på TLC silikagel plate (normalfase). Platen ble utviklet med:

15% MeOH i DCM som mobilfase for fraksjon 1-20

20% MeOH i DCM for fraksjon 19-25

**Tabell 5.11 Fraksjoner etter separasjon av fraksjon BV2C6 med Kromatotron**

Fraksjon	Volum, ml	Vekt, mg	Kons. mg/ml	% av total	TLC	NMR <sup>1</sup> H	NMR <sup>13</sup> C
1(1-3)	30		0,00	0,0	tom		
2(4-6)	30		0,00	0,0	tom		
3(7-9)	30		0,00	0,0	tom		
4(10-11)	20	6,4	0,32	6,1	stoff 1	x	
5(12)	10	9,3	0,93	8,9	1+2		
6(13-14)	20	9,8	0,49	9,4	stoff 2	x	
7(15)	10	10,2	1,02	9,8	2+3		
8(16)	10	21,4	2,14	20,5	stoff 3	x	
9(17-18)	20	24,3	1,22	23,3	3+4		
10(19-21)	30	22,8	0,76	21,9	stoff 4	x	x
11(22-25)	100		0,00	0,0	tom		
	Total vekt	104,2					
	% recovery	40,1					

Ved påvisning som beskrevet over, ble fraksjonene slått sammen til 11 hovedfraksjoner, dampet inn på rotavapor og veiet.

## 5.4.2 Preparativ kromatografi av BuOH fraksjon BV9

BuOH fraksjon V9 (263,6g) ble løst i MeOH-DCM 1:1 og applisert på en 2 millimeter kromatotronplate av silikagel med gips. Fraksjon V9 ble følgende eluert med :

DCM (Fraksjon 1)	DCM- 12% MeOH (Fraksjon 15-19)
DCM- 5% MeOH (Fraksjon 2-5)	DCM- 20% MeOH (Fraksjon 20-21)
DCM- 8% MeOH (Fraksjon 6-14)	DCM- 40% MeOH (Fraksjon 22-23)

**Tabell 5.12 Fraksjoner etter separasjon av fraksjon BV9 med Kromatotron**

Fraksjon	Volum, ml	Vekt, mg	Akkum. vekt	Kons. mg/ml	% av total	NMR <sup>1</sup> H	NMR <sup>13</sup> C
1(1-4)	100	4,8	4,8	0,05	3,6		
2(5)	25	3,1	7,9	0,12	2,3		
3(6-8)	45	4,7	12,6	0,10	3,5		
4(9-10)	20	6,1	18,7	0,31	4,5		
5(11-12)	20	5,1	23,8	0,26	3,8		
6(13-15)	30	6,2	30,0	0,21	4,6		
7(16-18)	30	13,7	43,7	0,46	10,2	x	x
8(19-20)	40	24,3	68,0	0,61	18,0	x	x
9(21)	15	14,9	82,9	0,99	11,0	x	x
10(22)	30	21,6	104,5	0,72	16,0	x	x
11(23)	30	30,4	134,9	1,01	22,5	x	x
	tot.vekt	134,9			100,0		
	% recovery	51					

Det ble samlet 23 fraksjoner à 10-30 mL og applisert på en TLC RP Si gel F254s (Merck). Fraksjon 1-13 ble utviklet med DCM- 8% MeOH som løpemiddel.

Ved påvisning som beskrevet over, ble det slått sammen 11 hovedfraksjoner.

<sup>1</sup>H NMR og <sup>13</sup>C NMR spektra ble tatt opp av fraksjon BV9 V7 – BV9 B11.

Spektra av BV9C8 er vedlagt (vedlegg 9.3.4.2a).



## 6. Resultater og diskusjon

### 6.1 Ekstraksjon med MeOH

Da MeOH-råekstrakt ble dampet inn til tørrhet med rotavapor ble det observert sterk skumming. Skumdannelsen kan tyde på tilstedeværelse av saponiner i MeOH-råekstrakt. Saponiner består av en hydrofob og hydrofil del, noe som ligger til grunn for deres overflateaktive egenskaper og dermed skumdannelse i polare løsninger som vann. Sterk skumming ble observert i de første ekstraksjonene og avtok etterfølgende dager. Dette kan forklares ved at det meste ble ekstrahert ut de første dagene.

Det har tidligere blitt isolert seks triterpenoidsaponiner, glinosid A og B (Traore et al 2000) og GO1, GO3, GO5 og GO6 fra *G. oppositifolius* (Diallo 2000). Skumming av MeOH-råekstrakt kan tyde på at denne fasen muligens besitter disse eller andre saponiner.

### 6.2 NMR

#### 6.2.1 NMR-spekter av DCM-ekstrakt

Ut fra  $^1\text{H}$ -NMR spekter bestod DCM-ekstraktet i stor grad av fett og terpenoider. Det ble observert en stor topp ved 1,26 ppm noe som kan tyde på signaler fra fett. Små topper ble observert ved 0,8-1.1 ppm, som muligens kommer fra fett eller terpenoider. Signal ved 5,35 ppm kan tyde på signaler fra olefiniske protoner i umettet fett. Det ble observert olefinkarbon signaler ved 128-130 ppm på  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter.  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter tyder på de samme innholdsstoffene som  $^1\text{H}$ -NMR. Se spekter 9.3.1

### 6.2.2 NMR spekter av MeOH-ekstrakt

$^1\text{H}$ -NMR spektret av MeOH-ekstraktet viste signaler fra alifatiske protoner ved 0,7-2,5 ppm, og karbohydratsignaler ved 3.3-4.5 og 5.2-5.5 ppm. Det ble også observert svake signaler for aromat eller olefin ved 6,3, 7,0 og 7,9 ppm.

I  $^{13}\text{C}$  NMR ble det observert alifatiske karboner og karbohydratkarboner. Det ble også observert karbonyl-karbon ved 220,7 ppm og en topp på 150,9 ppm. Se spekter 9.3.2

### 6.2.3 NMR spekter av EtOAc-ekstrakt

I  $^1\text{H}$ -NMR spekter ble det observert svake signaler i aromat og olefinområdet (6-8 ppm). I tillegg ble det observert karbohydrat protoner med adskillige svakere signaler enn de i spektret av metanol-ekstraktet. Det ble også observert signaler fra olefin protoner. I  $^{13}\text{C}$ -spekteret ble det observert flere signaler i aromat og olefin området. I tillegg til et signal ved 220,4 ppm som kan tyde på en karbonyl gruppe. Spektret kan tyde på at EtOAc-fasen inneholder terpenoider/steroider og karbohydrater. Se spekter 9.3.3

### 6.2.4 NMR spekter av BuOH-ekstrakt

I  $^1\text{H}$ -NMR spekter ble hovedsakelig alifat signaler og noe karbohydrat signaler observert. I  $^{13}\text{C}$ -spekteret ble det også observert karbohydrat karboner og alifat karboner, i tillegg til to signaler ved 150,8 ppm og 220,4 ppm. BuOH fasen så ut til å inneholde terpenoider/steroider og karbohydrater. Se spekter 9.3.4

### 6.2.5 NMR spekter av vannfasen

I  $^1\text{H}$  NMR spekter av vannfasen ble det stort sett observert karbohydrat signaler og små mengder av alifatiske signaler. Tilsvarende ble observert i karbonspektret.

### 6.3 DPPH-scavenging

DPPH-scavenging ble målt for samtlige ekstrakter. Ut fra tabellen ser vi at aktiviteten er svært lav, og fraksjonene skiller seg ikke mye fra hverandre.

Det har tidligere blitt utført ulike antioksidant målinger på *G. oppositifolius*, dette inkluderer også DDPH målinger. I en studie gjort av Asokkumar et al. på *G. oppositifolius* ble det bekreftet en potensiell fri radikal scavenging aktivitet i planten. Disse målingene ble gjort på etanolekstrakter og viste en konsentrasjonsavhengig radikal scavenging aktivitet, med  $IC_{50}$  1,013 mg/mL. I tillegg har det blitt isolert vitexin fra *G. oppositifolius* (Sahakitpichan et al. 2010), et flavonoid med svak DPPH-scavenger aktivitet (KIM et al. 2005).

**Tabell 6.1 Radikalscavenging av råkstraktene**

	%scavenging	SD
DCM ekstrakt 333µg/ml	2,7	1
MeOH ekstrakt 333µg/ml	11,4	0,3
EtOAc ekstrakt 333µg/ml	13,2	0,4
Butanolekstrakt 333µg/ml	10,8	1,2
Bunnfall 333µg/ml	9	1
Vannfase 333µg/ml	4,4	0,6

Scavenging av råkstraktene ved 333µg/mL var på 2-13%. Siden aktiviteten var så lav var det ikke noe hensikt å fortsette målingen av DPPH aktiviteten ved lavere konsentrasjoner. Det er ingen korrelasjon mellom DPPH og enzymaktivitet på lipidperoksidering, av den grunn fortsatt vi videre med xanthin oksidase hemming og 15-LO hemming (Malterud et al. 1993).

## 6.4 15-LO hemming

### 6.4.1 15-LO hemming av alle ekstraktene

Det ble utført 15-LO hemming med DMSO som løsemiddel på alle 6 råekstrakter. Her ble quercetin brukt som positiv kontroll med  $IC_{50}$   $102 \pm 3 \mu\text{M}$ . Tall fra tabellen nedenfor viser at DCM-, MeOH-, BuOH- og bunnfall råekstrakt har tilsvarende lav hemmingseffekt på 15-LO. Bunnfall fasen har en lavere aktivitet enn disse råekstraktene, mens vannfasen utøver svakest enzymhemming. Det eneste ekstraktet som skiller seg ut er EtOAc-råekstrakt, med  $IC_{50} = 256 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ . I en ny måleserie på EtOAc med andre konsentrasjoner ble en  $IC_{50}$  på  $140 \pm 7 \mu\text{g/mL}$  innhentet.

**Tabell 6.2 15-LO hemming av rå-ekstraktene**

	% hemming	SD
<b>DCM ekstrakt</b>		
333 $\mu\text{g/ml}$	24,3	6,2
167 $\mu\text{g/ml}$	2,5	4,6
<b>MeOH ekstrakt</b>		
333 $\mu\text{g/ml}$	23,9	4,7
83 $\mu\text{g/ml}$	-1,1	7,9
<b>EtOAc ekstrakt</b>		
333 $\mu\text{g/ml}$	83,7	1,5
167 $\mu\text{g/ml}$	-5,3	2,7
83 $\text{mg/ml}$	1,6	6,4
<b>Butanolekstrakt</b>		
333 $\mu\text{g/ml}$	28,1	1,7
<b>Bunnfall</b>		
333 $\mu\text{g/ml}$	19,2	0,7
<b>Vannfase</b>		
333 $\mu\text{g/ml}$	4,1	0,7
<b>Positiv kontroll:</b>		
Quercetin		
167 $\mu\text{M}$	97,8	0,8
83 $\mu\text{M}$	29,9	3,3

### 6.4.2 15-LO hemming av EtOAc-ekstraktet

Målinger som ble gjort tidligere på EtOAc råekstrakt gav vikende resultater, og av den grunn ble det utført en ny 15-LO måling ved konsentrasjon 167 µg/mL, 83 µg/mL og 42 µg/mL.

**Tabell 6.3 15-LO hemming av EtOAc-råekstrakt**

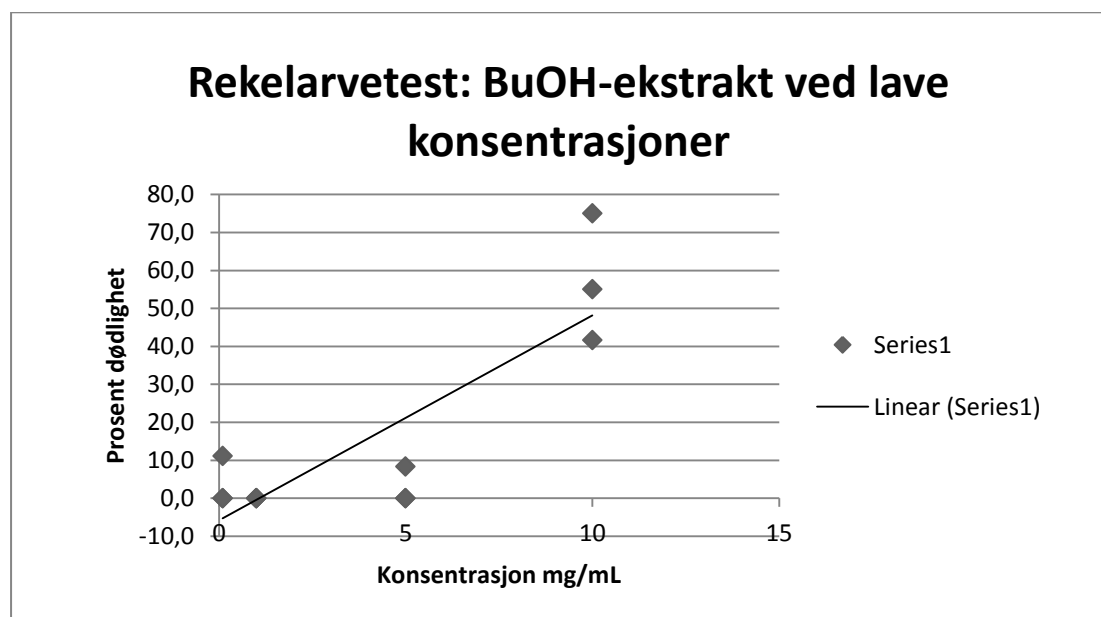
Kons i kyvette, µg/ml	log kons	% hemming	SD	IC50 µg/ml
166,7	2,2	62,6	3	140±7
83,3	1,9	12,7	4,3	
41,7	1,6	3,3	5,7	

Resultatene tyder på en konsentrasjonsavhengig hemmingseffekt av EtOAc råekstrakt.

### 6.5 Brine shrimp test

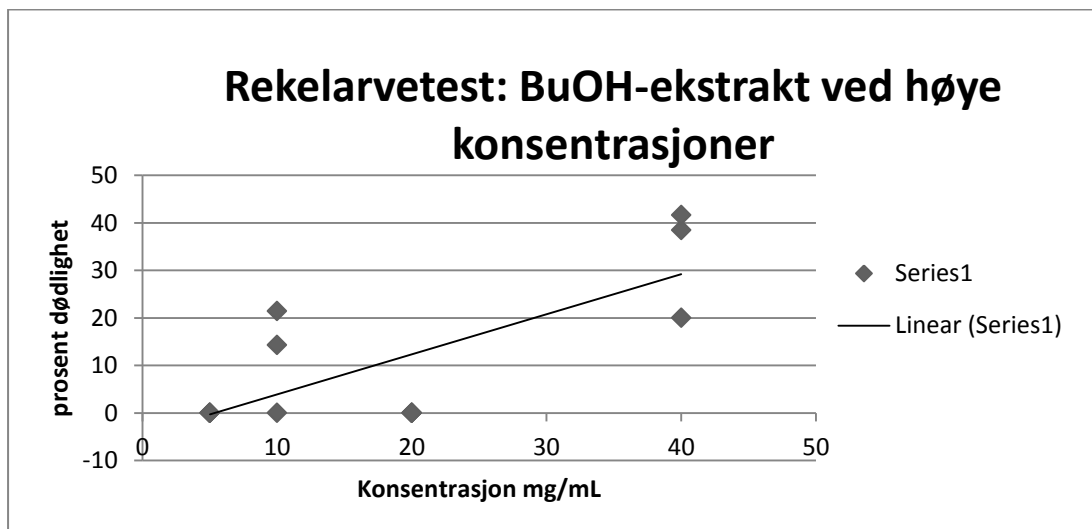
Det ble utført Brine shrimp test på alle råekstrakter ved konsentrasjon 1 µg/mL til 400 µg/mL.

**Figur 6.1 Toksistet av BuOH-råekstrakt ved lave konsentrasjoner**



Se vedlegg 9.2.1.

**Figur 6.2 Toksisitet av BuOH-råekstrakt ved høye konsentrasjoner**



Se vedlegg 9.2.2

### **Resultater av Brine shrimp test av råekstraktene**

#### **1. DCM-ekstrakt**

Ved lave konsentrasjoner (0,1 mg/mL-20 mg/mL) ble det ikke observert noe toksiske effekter i DCM-ekstraktet. Det var kun ved konsentrasjon 40 mg/mL at en mild toksisk effekt ble observert.

#### **2. MeOH-ekstrakt**

MeOH-ekstrakt viste relativt lav toksisitet og det ble kun registrert økt dødlighet ved konsentrasjon 40 mg/mL.

#### **3. Bunnfall**

Bunnfall viste ingen toksiske effekter ved lave konsentrasjoner, men ved 10 mg/mL og 40 mg/mL ble det observert svake toksiske effekter. Effekten imellom disse to konsentrasjonene viste ingen toksisitet, og av den grunn er det ikke mulig å danne en konklusjon av resultatene.

#### 4. EtOAc-ekstrakt

Det var kun ved konsentrasjon 40mg/mL at det ble observert en svak toksisk effekt i ekstraktet. Lavere konsentrasjoner enn dette gav ingen toksiske effekter på rekellarvene.

#### 5. BuOH-ekstrakt

Det ble observert toksiske effekter ved konsentrasjon 100 µg/mL og 400 µg/mL i BuOH-ekstraktet, men imellom disse to konsentrasjonen var ekstraktet så å si ufarlig. Resultatene er tvetydige og en konklusjon er derfor ikke mulig å foreta.

#### 6. Vann-ekstrakt

Vannekstraktet viste seg å være ugiftig selv høy konsentrasjon (40 mg/mL).

Mulige feilkilder:

1. Rekeeggene er oransje og nesten transparente og kan av den grunn vær vanskelig å telle. En mulig feilkilde kan være at det tilsettes flere rekeegg enn det som blir telt opp og dermed vil det være flere rekellarver dagen etter enn det som ble registret (Mulig forklaring til tvetydige resultater fra bunnfall).
2. En annen mulig feilkilde kan være at rekellarvene dør av andre årsaker som mekanisk bearbeiding eller for dårlige levevilkår. Dette vil føre til uønskede resultater som ikke gjenspeiler toksisiteten av ekstraktene våre.
3. Tellefeil er en hovedfaktor som også påvirker resultatene våre.

## 6.6 Xanthin oksidase-hemming

### 6.6.1 Xanthin oksidase-hemming av alle ekstrakter

Det ble utført xanthin oksidase-hemming på følgende råekstrakter med quercetin som positiv kontroll.

**Tabell 6.4 Xanthin oksidase-hemming av råekstraktene**

	Verdi (% hemming)	SD
MeOH-ekstrakt 333 µg/ml	-3,5	5,0
Butanolekstrakt 333 µg/ml	-3,7	6,1
Vannekstrakt 333µg/ml	-20,4	5,1
EtOAc 333 µg/ml	23,5	3,3
EtOAc 333 µg/ml-ny måling	-11,6	7,0
Quercetin 24 µM	96,0	8,4
Quercetin 6 µM	86,2	1,4
Quercetin 3 µM	76,4	1,4
Quercetin 1.5µmM	55,6	3,4

Konklusjon:

Negative verdier kan tyde på aktiverende effekter av enzymet, mens positive verdier tyder på enzymhemming. Quercetin målingene viser at systemet fungerer som det skal, men ingen av ekstraktene viste høy hemmende effekt på xanthin oksidase.

MeOH-, BuOH- og EtOAc-ekstrakt var inaktive, mens aktiverende effekt ble observert i vannfasen. En mulig forklaring kan være at vannfasen inneholder substanser som kan virke som substrat for enzymet og derved føre til økt dannelse av produkter.



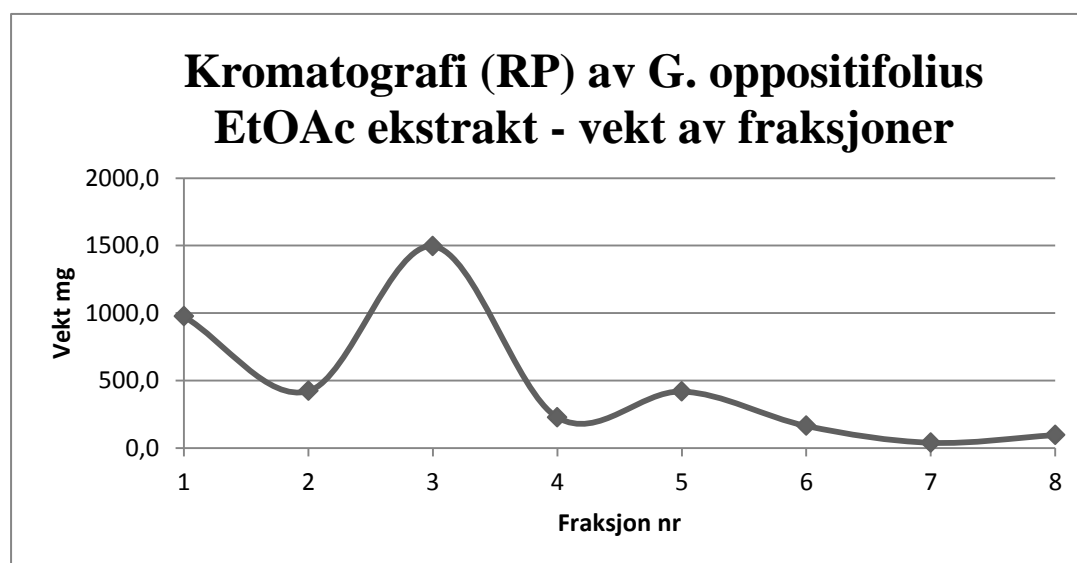
## 6.7 Fraksjonering av EtOAc- ekstraktet

### 6.7.1 Versaflash kolonne kromatografi

Blant alle råekstraktene som ble isolert fra *G. oppositifolius*, utøvde EtOAc-råekstrakt størst enzymhemmende aktivitet på 15 LO-hemming og ble av den grunn jobbet videre med.

En mengde på 5,4097 g EtOAc-råekstrakt ble kolonnekromatografert på en reverse phase-kolonne og 23 kolonnefraksjoner ble mottatt. Basert på TLC og ceric-spraying ble de slått sammen til 8 fraksjoner. Det samlede utbyttet var på 3836,1 mg og tilsvarer 77% av startmaterialet. Etter inndamping og veiing ble det klart at fraksjon EV1 og EV3 var av de største fraksjonene og av den grunn ble de jobbet videre med.  $^1\text{H}$ -NMR ble opptatt av alle fraksjoner mens  $^{13}\text{C}$ -NMR ble kun tatt opp av fraksjon 1 og 3. Se vedlegg 9.3.3.1 og 9.3.3.1a.

**Figur 6.3 Vekt av fraksjoner fra separasjon av EtOAc-råekstrakt på versaflash kolonne**



Under fraksjonering av EtOAc-råekstrakt ble det observert en sterk farge (gul/brun/grønn) ved eluering med 70% MeOH. Dette kan tyde på tilstedeværelse av flavonoider i EtOAc råekstraktet.

### Bilde 6.1 Fraksjoner fra opprensing av EtOAc-råekstrakt



**Tabell 6.5 Fraksjoner som ble slått sammen etter separasjon av EtOAc-råekstrakt på versaflash kolonne**

Følgende dramsglass ble slått sammen:

Fraksjon	vekt mg
EV (1-2)	974,7
EV2(3-5)	422,1
EV3(6-8)	1495,4
EV4(9-10)	227,1
EV5(11-12)	418,4
EV6(13-16)	163,5
EV7(17-20)	39,0
EV8(21-23)	95,9

Spektra er vist i vedlegg 9.7.3.1 og 9.7.3.2 for EV1 og EV3.

**I vedleggene står E for EtOAc-ekstrakt og B for BuOH-ekstrakt, V for fraksjon fra Versaflash og C for fraksjon fra kromatotron.**

### 6.7.2 a. Observasjoner på TLC

Etter utvikling av platen ble det observert fluorescerende farger (rødt og blått) for fraksjon 21,22 og 23. Det ble ytterligere observert en sterk lilla farge på TLC- platen etter ceric spraying. Dette kan tyde på tilstedeværelse av terpenoider, siden når terpenoider oksiderer vil det dannes en sterk lilla farge.

### 6.7.2 b. Inndamping med rotavapor

Mye skumming ble observert i fraksjon EV1- EV4 og noe skumming i fraksjon EV5. Skumming i EtOAc fasen kan tyde på tilstedeværelse saponiner i løsningen.

### 6.7.3 15-LO hemming av EtOAc fraksjonene EV

Etter fraksjonering av EtOAc ekstraktet ble fraksjonene målt for 15-LO hemming. Det ble observert en tydelig 15-LO hemming både i fraksjon EV1 og EV3. Dette kunne indikere tilstedeværelse av aktive substanser og ble av den grunn valgt å jobbe videre med.

**Tabell 6.6 15-LO hemming av EtOAc fraksjonene**

Fraksjon	% hemming	SD	vekt mg	vekt x hemming	% av totalhemming
EV1 (1-2)	96	2,2	974,7	93571	49,8
EV2 (3-5)	25	2,6	422,1	10553	5,6
EV3 (6-8)	65,6	2,4	1495,4	98098	52,2
EV4 (9-10)	-23,5	6,2	227,1	-5337	-2,8
EV5 (11-12)	-19,5	1,9	418,4	-8159	-4,3
EV6 (13-16)	-1,1	3,6	163,5	-180	-0,1
EV7 (17-20)	-20,4	4	39,0	-796	-0,4
EV8 (21-23)	1,2	8,1	95,9	115	0,1
				187866	100

#### 6.7.4 Xanthin oksidase-hemming av EtOAc fraksjonene

Alle EtOAc fraksjonene på 167 µg/mL utøvde svak eller tilnærmet ingen XO-hemmende aktivitet. Av den grunn ble det valgt å ikke analysere videre.

**Tabell 6.7 Xanthin oksidase-hemming av EtOAc fraksjonene**

Fraksjon	Hemming (%)	SD
EV 1(1-2)	7,0	4,7
EV 2(3-5)	12,5	4,5
EV 3(6-8)	13,9	8,4
EV 4(9-10)	13,0	2,3
EV5 (11-12)	7,0	3,9
EV 6(13-16)	-6,1	0,2
EV 7(17-20)	-6,9	2,2
EV 8(21-23)	0,1	2,3

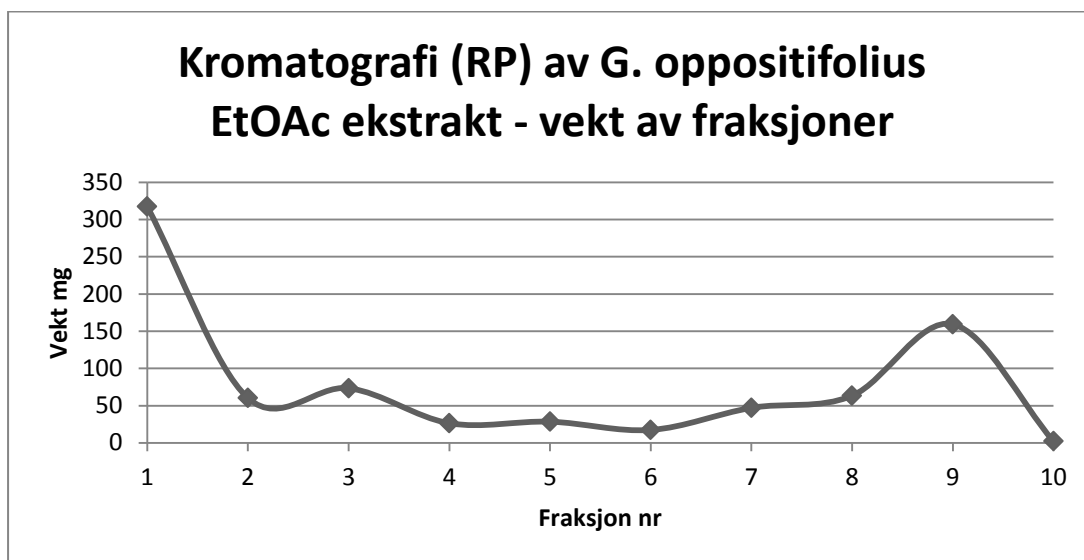
#### 6.7.5 Analytisk HPLC

På kromatogrammet vil hydrofile molekyler komme først, og deretter mer hydrofobe molekyler. Ved at saponiner har lav absorbanse og ingen konjugerte dobbeltbindinger vil lite observeres på HPLC kromatogrammet. Det ble derfor lagt mer vekt på 15-LO enn HPLC-resultater for valg av fraksjoner til videre arbeid.

### 6.8 Preparativ kromatografi av EtOAc ekstrakt EV1

Fraksjon EV1 var en av de største fraksjonene som ble eluert etter fraksjonering av EtOAc-råekstrakt på versaf-flash. Fraksjon EV1 (0,9g) ble videre kromatografert på en VersaPak RP18 kolonne. Det ble samlet totalt 28 kolonnefraksjoner og ved hjelp av analytisk TLC og ceric spraying ble de slått sammen til 10 fraksjoner. Blant disse fraksjonene var fraksjon 1, 3 og 9 av de største. På bakgrunn av analytisk TLC og NMR ble fraksjon 3, 8 og 9 valgt for videre arbeid. Det totale utbyttet var på 795,4 mg og tilsvarer 88 % av mengden som ble applisert.

**Figur 6.4 Vekt av fraksjoner fra separasjon av EV1 på versaflyskolonne**



### 6.8.1 TLC

Etter ceric-spraying ble det observert gule flekker på TLC-platen, noe som kan tyde på tilstedeværelse av flavonoider.

### 6.8.2 NMR av EtOAc ekstrakt EV1

I  $^1\text{H-NMR}$  spekter ble det observert alifatiske signaler og signaler for aromater og olefiner, i tillegg ble det observert sterke signaler for karbohydrat protoner.

$^{13}\text{C}$  NMR spekter hadde tilsvarende signaler som  $^1\text{H-NMR}$  spektret.

## 6.9 Utfelling av EV1V3

Det ble følgelig observert en supernatant og utfelling i fraksjon EV1V3. Bunnfallet (5,8 mg) fra EV1V3 ble videre analysert med  $^{13}\text{H-NMR}$  og  $^{13}\text{C-NMR}$  og viste seg å inneholde forbindelsen vitexin. Se vedlegg 9.3.3.1a.

### 6.9.1 NMR av EV1V3

NMR- resultater av EV1C3 viste likheter med signaler fra litteraturdata for vitexin (Kim et al. 2005). Isolert vitexin fra EV1C3 fraksjon var ikke rent og av den grunn ble det kjøpt inn rent vitexin (Sigma-Aldrich). Følgelig ble det tatt NMR- spekter av dette. Ved sammenligning av NMR spekter mellom rent vitexin og fraksjon EV1C3 ble det observert god overstemmelse mellom signalene. Vitexin har tidligere blitt isolert fra *G. oppositifolius* (Sahakitpichan et al. 2010) og er vist å være en svak DPPH-scavenger (KIM et al. 2005).

Se vedlegg 9.3.3.1a

### 6.9.2 15- lipoksygenasehemming av vitexin

Det har foreløpig ikke blitt funnet noen studier på vitexin som 15LO hemmer. Rent vitexin (Sigma-Aldrich) ble testet for 15-LO hemming ved konsentrasjon 167, 83, 41,7 og 20,8  $\mu\text{M}$ .

**Tabell 6.8 15-LO hemming av Vitexin**

Kons. mM	Kons. i kyvette $\mu\text{M}$	% Hemming	SD
10	167	104,5	0,4
5	83	47,9	2,0
2,5	41,7	12,7	8,2
1,25	20,8	6,7	2,3

$$\text{IC}_{50} = 85 \pm 3 \mu\text{M}$$

$$\text{IC}_{50} = 37 \pm 1 \mu\text{g/mL}$$

Resultatene viser til at vitexin er en sterk hemmer på linje med quercetin (positiv kontroll).. Innholdet av vitexin i fraksjon EV1C3 kan muligens forklare en del av 15-LO hemming av fraksjonen og fraksjonene rundt den.

## 6.10 Utfelling av EV1V8

Det ble ytterligere observert en supernatant og utfelling i fraksjon EV1V8 og ved hjelp av  $^1\text{H}$ -NMR og  $^{13}\text{C}$ -NMR spektra ble fraksjonen identifisert.

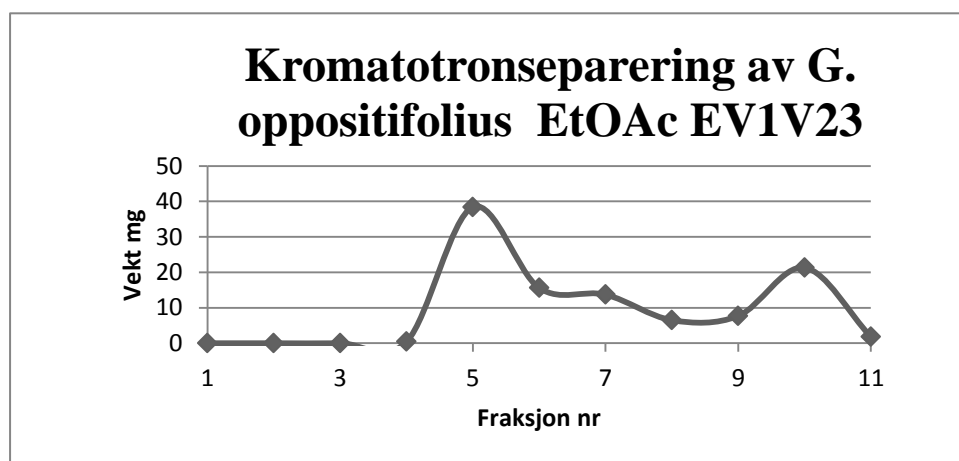
### 6.10.1 NMR av EtOAc fraksjon EV1V8C6-10

I protonspektret ble det observert 6 metylgrupper ved 0,85, 0,95, 1,01, 1,11, 1,19 og 1,20 ppm. Det ble også observert alifatiske karboner og karbohydrat karboner i  $^{13}\text{C}$  NMR spektret. Disse spektrene er identiske med spektrene av GO6 (Diallo 2000) (formel, se innledning punkt 4.1). Vedlegg 9.3.3.1b

## 6.11 Kromatotronseparering av EtOAc ekstrakt V1V9

Fraksjon V1V9 var den største fraksjonen som ble eluert etter separasjonen av EtOAc-råekstrakt med Versaflash. Fraksjonen ble videre opprenset med kromatotron og det ble samlet totalt 23 kolonnefraksjoner. Ved hjelp av analytisk TLC og ceric-spraying ble de slått sammen til 11 fraksjoner. Det totale utbyttet var på 105,4 mg og tilsvarer 70 % av startmaterialet. Den største fraksjon etter kromatotronseparering var V1V9C5, og av den grunn ble fraksjonen valgt ut til videre arbeid. Det ble både tatt opp  $^1\text{H}$  NMR- og  $^{13}\text{C}$  NMR spekter av fraksjon V1V9C5. Se vedlegg 9.3.3.1c.

**Figur 6.5** Vekt av fraksjoner fra separasjon av EV1V9 på kromatotron



### 6.11.1 NMR spekter av EtOAc fraksjon EV1V9C5

I protonspektret ble det observert singletter fra metylgrupper ved 0,83, 0,92, 1,00, 1,10 og 1,17, i tillegg til andre alifat - og karbohydrat protoner. Ytterligere ble det observert et signal ved 6,5 ppm som kan komme av et olefin proton. I karbonspektret ble signaler for alifat og karbohydrat karboner observert og et signal ved 216,4 ppm kan indikere tilstedeværelse av en karbonyl gruppe. Ved hjelp av  $^{13}\text{H-NMR}$  og  $^{13}\text{C-NMR}$  ble GO1 identifisert i denne fraksjonen. GO1 (innledning, punkt 4.1) er en forbindelse som tidligere har blitt identifisert av Drissa Diallo (Diallo 2000). Spektret er identisk med substans GO1. Vedlegg 9.7.3.1c.

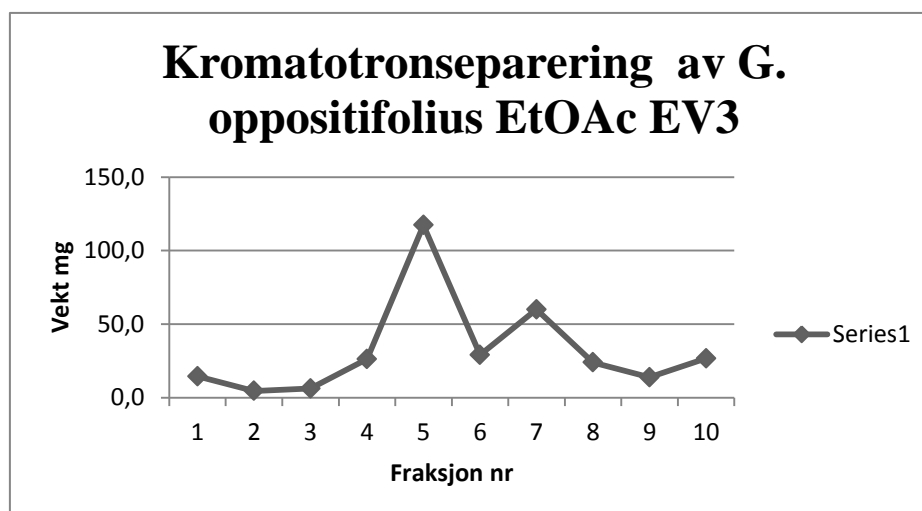
## 6.12 Fraksjonering av EtOAc ekstrakt EV3

### 6.12.1 Kromatotronseparering

Fraksjon 3 (1495,4 mg) var den største fraksjonen som ble isolert etter separering med kolonnekromatografi av EtOAc-råekstrakt. Fraksjon EV3 ble rensert på kromatotron og 15 kolonnefraksjoner ble samlet. Ved hjelp av analytisk TLC og ceric spraying ble de slått sammen til 10 fraksjoner.

Det samlede utbyttet var på 322,7 mg og utgjør 81,5 % av påsatt startmateriale (EV3). Etter damping og innveiling var det klart at kromatotronfraksjon 5 (EV3C5) og 7 (EV3C7) var av de største.  $^1\text{H-NMR}$  ble opptatt av fraksjon 5 til 10, mens  $^{13}\text{C-NMR}$  ble kun tatt på fraksjon 5 og 7. Basert på analytisk TLC og NMR spektra ble fraksjon EV3C5 og EV3C7 valgt ut for å jobbe videre med.

Figur 6.6 Vekt av fraksjoner fra separasjon av E3 på kromatotron





### 6.12.2 NMR spekter av EtOAc fraksjon EV3

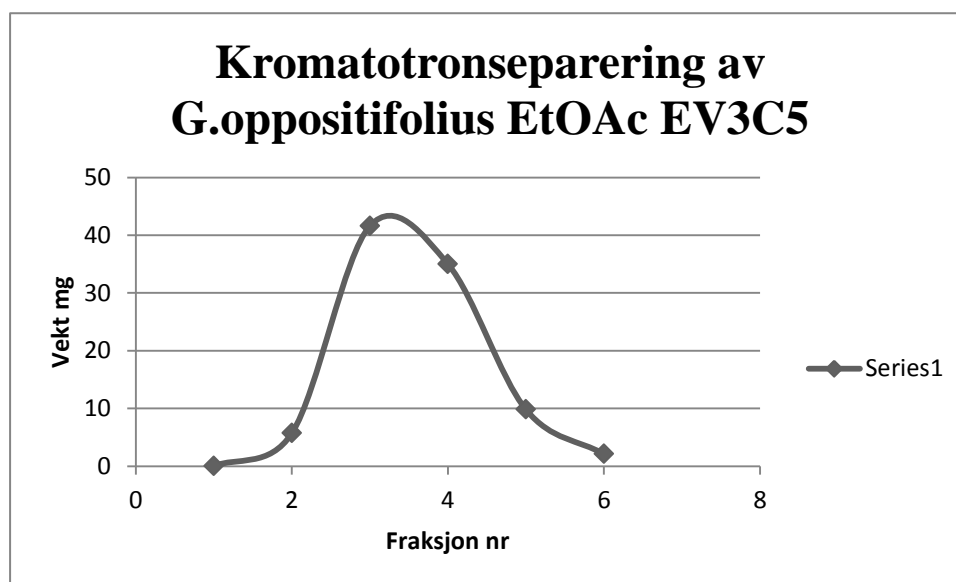
I  $^1\text{H}$  NMR spektret ble det observert signaler for alifat og karbohydrat protoner, tilsvarende ble også observert i  $^{13}\text{C}$  NMR spektret. På  $^{13}\text{C}$  NMR ble det i tillegg observert et olefin signal ved 150,8 ppm og et karbonyl signal ved 220 ppm.

Vedlegg 9.3.3.2.

### 6.13 Kromatotronseparering av EtOAc ekstrakt EV3C5

Fraksjon 5 (EV3C5) på 117,3 mg var den største fraksjonen som ble isolert ved kromatotronseparering av EV3. Fraksjonen ble rensert ved rekromatografering på kromatotron og 10 fraksjoner ble samlet. Det totale utbyttet var på 322,7 mg og tilsvarer 81,5 % av det som ble påsatt kromatotronen. Fraksjonene ble ved hjelp av TLC og ceric-spraying slått sammen til 6 fraksjoner og basert på TLC resultatene ble fraksjon 4 og 5 slått sammen. Det ble tatt  $^1\text{H}$ -NMR og  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter av denne sammenslåtte fraksjonen.

Figur 6.7 Vekt av fraksjoner fra separasjon av EV3C5 på kromatotron



### **6.13.1 NMR spekter av BuOH fraksjon V3C5C5-7**

I  $^1\text{H}$ -NMR spekter av den sammenslåtte fraksjonen ble det observert flere singletter fra metylgrupper, i tillegg til signaler fra alifat og karbohydrat protoner. Tilsvarende resultater ble også observert i karbonspektret. Ved sammenligning med GO1 spekter (Diallo 2000) ble V3C5 identifisert som GO1 (45mg). (vedlegg 9.3.3.2a).

### **6.14 Utfelling av EV3C7 (C12)**

Det ble observert en supernatant og utfelling i fraksjon EV3C7 (16mg). Bunnfallet fra EV3C7 ble videre analysert med  $^{13}\text{H}$ -NMR og  $^{13}\text{C}$ -NMR.

#### **6.14.1 NMR spekter av EtOAc fraksjon V3C7**

I  $^1\text{H}$ -NMR spekter ble det observert singletter fra metylgrupper ved 0,82, 0,96, 1,02, 1,12, 1,22, 1,54, og 1,68 ppm, i tillegg til alifat og karbohydrat protoner. I  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter ble tilsvarende funnet av alifat og karbohydrat karboner. I tillegg ble det observert et signal fra karbonyl gruppe ved 216,3 ppm. Ved å sammenligne innhentet NMR spektra med publiserte spektra (Diallo 2000) ble fraksjon 7 (60mg) identifiserte som substans GO5. Se vedlegg 9.3.3.2b.

### **6.15 Kromatotronseparering av EtOAc fraksjon EV5**

Fraksjon EV5 er en av de største fraksjonene som ble eluert fra EtOAc-råstrakt. Fraksjonen EV5 (400mg) ble rensert med kromatotrom og 19 kolonnefraksjoner ble mottatt. Ved hjelp av analytisk TLC og ceric spraying ble fraksjonene slått sammen til 10 fraksjoner og basert på TLC resultatene ble fraksjon 3 og 4 sammenslått. Etter damping og innveining ble det klart at fraksjon 8 var størst. Den sammenslåtte fraksjon EV5C3+4 og EV5C8 ble videre undersøkt med  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR i deuteropyridin.

### 6.15.1 NMR spekter av EtOAc fraksjon EV5

I  $^1\text{H}$ -NMR spektret ble det observert alifat og karbohydrat protoner, tilsvarende ble også observert i  $^{13}\text{C}$ -NMR- spektret. Se vedlegg 9.3.3.3

### 6.15.2 NMR spekter av EtOAc EV5C8

Begge spektra fra  $^1\text{H}$ -NMR og  $^{13}\text{C}$ -NMR gav signaler som var i samsvar med GO1 (Diallo 2000). Dette tyder på at fraksjon EV5C8 er stoff GO1, noe som tidligere har blitt isolert fra andre fraksjoner.

### 6.15.3 NMR spekter av EtOAc EV5 C3+4

I  $^1\text{H}$ -NMR spektra ble det observert signaler fra metylgrupper ved 0,87, 1,04, 1,05, 1,08, 1,13, og 1,14 ppm, men ingen signaler på karbohydrat protoner.

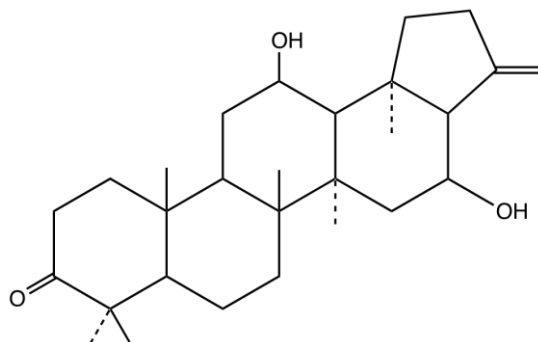
I  $^{13}\text{C}$ -NMR spektret ble det observert signal fra karbonylgruppe i posisjon 3 ved 216.3 ppm og antatte metylgruppesignaler ved 15.7, 16.1, 16.7, 18.9, 21.2 og 26.6 ppm.

Det ble i tillegg observert olefin signaler ved 106,1 ppm og 152,1 ppm.

I likhet med  $^1\text{H}$ -NMR spekter, viste  $^{13}\text{C}$ -NMR spektret ingen signaler fra karbohydrat karboner. Spektrene av fraksjon EV5C3+4 viste likheter med spektrene av GO1, med unntak fra signaler fra karbohydrat. Dette kan tyde på at dette stoffet er aglykonet av stoff GO1, noe som ser ut til å være et stoff som ikke har blitt rapportert tidligere.

Eventuell bekreftelse av dette kan gjøres ved hydrolyse av GO1 og deretter sammenligne det hydrolyseproduktet med EV5C3+4, men siden tiden var knapp lot det seg ikke gjøre. Se vedlegg 9.3.3.3a

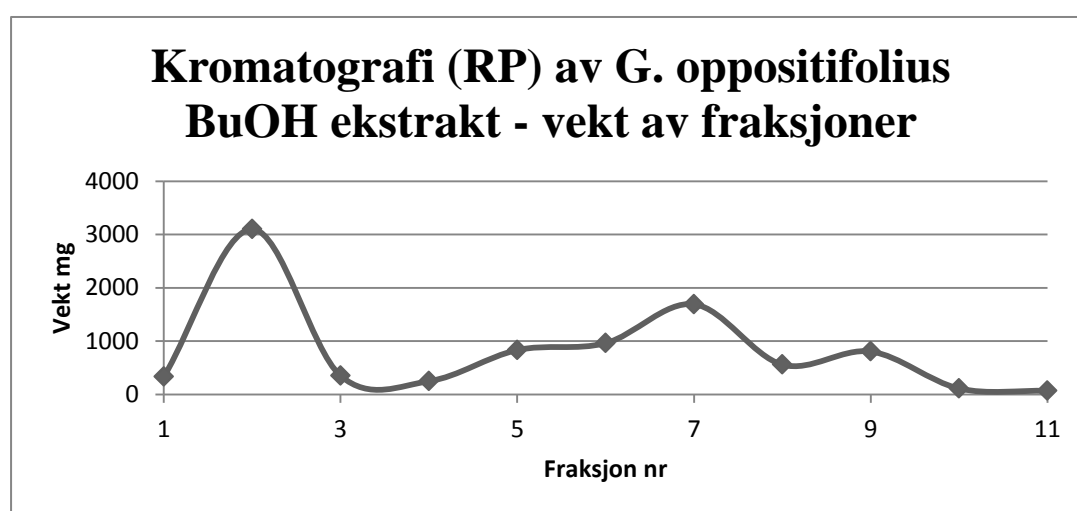
**Figur 6.8 Antatt struktur for EV5C3+4**



## 6.16 Preparativ kromatografi og opparbeidelse av BuOH ekstrakt

Butanolfraksjonen fra *G. oppositifolius*-råekstrakt ble kromatografert på en VersaPak RP18 kolonne. Det ble samlet opp 32 kolonnefraksjoner som ved hjelp av analytisk TLC og ceric-spraying ble slått sammen til 11 fraksjoner (BV1-BV11). Det samlede utbyttet var på 9053,0 mg, og utgjør 91% av det som ble påsatt. Ut fra NMR og TLC ble fraksjon BV2 og BV9 valgt ut til videre arbeid.

Figur 6.9 Vekt av fraksjoner fra separasjon av BuOH på Versaflash



### 6.16.1 NMR spekter av BuOH fraksjon

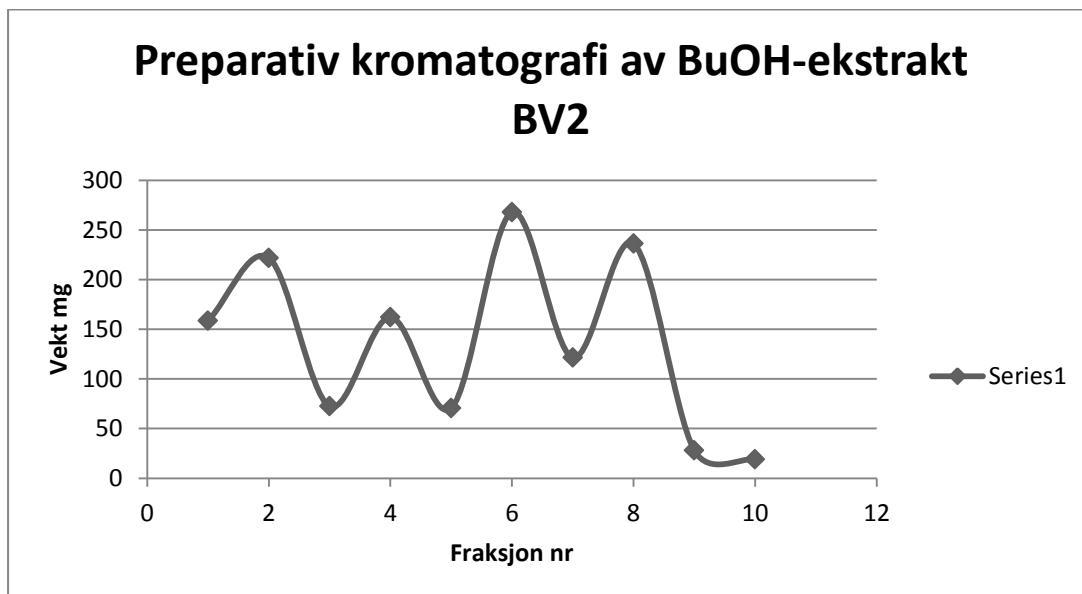
Fraksjon BV7 (1690 mg) så ut til å være rik på forbindelse GO1. En forbindelse som tidligere har blitt isolert fra andre fraksjoner. Se vedlegg 9.3.4.

## 6.17. Preparativ kromatografi og opprensing av BuOH ekstrakt BV2

Fraksjon BV2 var den største fraksjonen som ble eluert etter kromatografiseparasjon av BuOH-råekstrakt. 1,6 g av BV2 ble kolonnekromatografert på en VersaPak RP-18 kolonne. Totalt ble det mottatt 23 kolonnefraksjoner som på bakgrunn av analytisk TLC ble slått sammen til 10 fraksjoner (BV2V1-BV2V10). Av disse ble fraksjon 6 vurdert som den mest interessante ut fra vekt, TLC-mønster og NMR-spektra.

Det samlede utbyttet var på 1358,4 mg, noe som tilsvarer 85% av den påsatte mengden.

Figur 6.10 Vekt av fraksjoner fra separasjon av BV2 på Versaflash



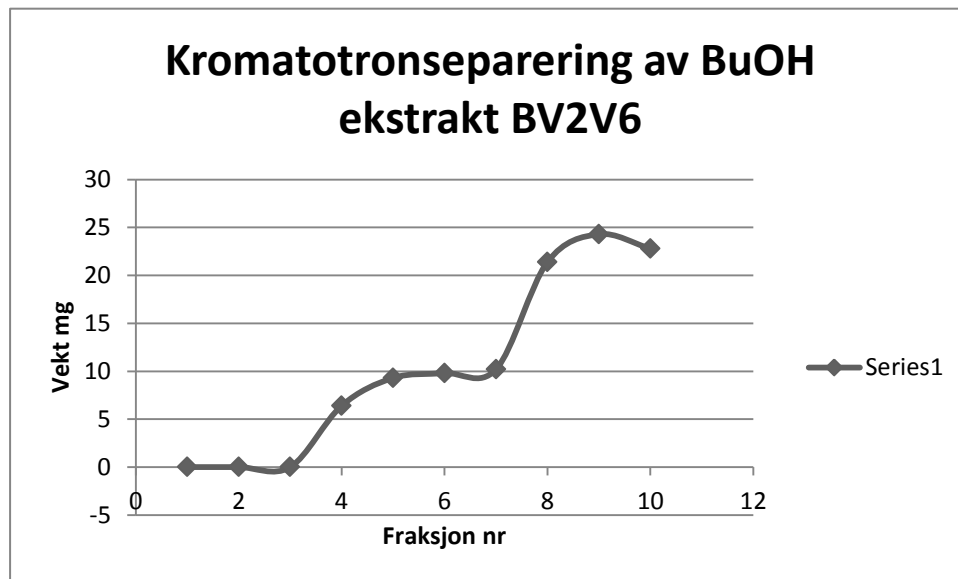
#### 6.17.1 NMR spekter av BuOH fraksjon BV2

Det ble observert alifat og karbohydrat signaler både i  $^1\text{H}$ -NMR og  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter.

#### 6.18 Preparativ kromatotronseparering av BuOH-ekstrakt BV2V6

Fraksjon BV2V6 (260 mg) var den største fraksjonen som ble isolert etter kromatografiseparasjon med versaflash av BuOH-råekstrakt. Fraksjon BV2V6 ble videre fraksjonert med kromatotron og det ble samlet totalt 23 kolonnefraksjoner. Ved hjelp av analytisk TLC ble fraksjonene samlet til 10 fraksjoner. Det totale utbyttet var på 104,2 g, tilsvarende 40,1 % av det som ble applisert til opprensning. Etter inndamping og veiing ble det observert størst utbytte på kromatotronfraksjon BV2V6C8 til BV2V6C10. Det ble tatt  $^1\text{H}$ -NMR spekter av fraksjon BV2V6C4, 6, 8 og 10, men kun  $^{13}\text{C}$ -NMR for fraksjon BV2V6C6 og 10.

**Figur 6.11 Vekt av fraksjoner fra separasjon av BV2V6 på Versaflash**



### 6.18.1 NMR spekter av BuOH fraksjon BV2V6

Både  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR spektra viser signaler for terpenoid og karbohydrat forbindelser.

Vedlegg 9.3.4.1a

### 6.18.2 NMR spekter av BuOH fraksjon av BV2V6C4

Basert på NMR spektrene ble det antatt at BV2V6C4 kunne være av GO1, grunnet likheter mellom spektrene av disse to forbindelsene. Dette ble ikke undersøkt videre på grunn av liten mengde (6,4 mg).

### 6.18.2 NMR-spektra av fraksjon BV2V6C10 $^1\text{H}$ NMR

$^1\text{H}$  NMR spekter av fraksjon BV2C6C10 (i deuteropyridin) viste likheter med  $^1\text{H}$  NMR spektret av stoff GO1. I  $^1\text{H}$  NMR spektret ble det observert en singlett av et olefinproton ved 6.46 ppm, og karbohydrat signaler ved 3.9-5,2 ppm. Metyl signaler ble ytterligere observert ved 0.73, 0.77, 0.97, 1.08, 1.11 og 1.25 ppm. Integralkurven tyder imidlertid på at det kan foreligge to karbohydratenheter i molekylet,.

### <sup>13</sup>C NMR

I <sup>13</sup>C NMR spektret ble det observert et signal ved 216.3 ppm, dette kan komme av karbonylgruppen i posisjon 3 og ligger ved samme posisjon som C-3 signalet i GO1. Det ble også observert metylsignaler ved 15.3, 15.7, 16.4, 19.0, 21.3 og 26.6 ppm. Disse signalene har tilsvarende posisjon som metylsignaler av GO1.

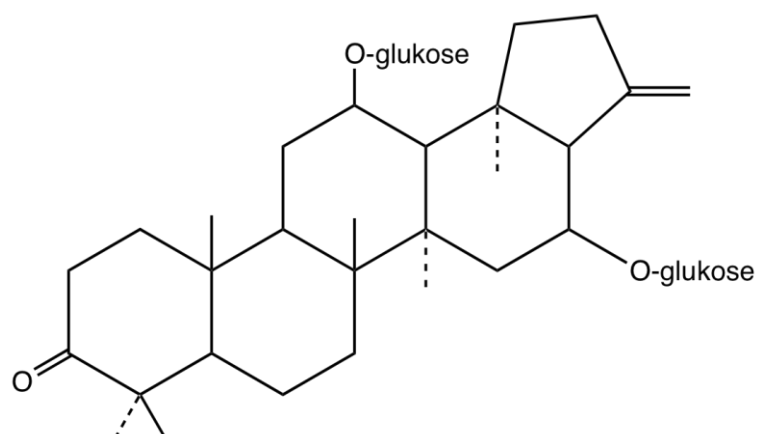
I følge referansen Diallo 2000 ligger signalet fra C-12 i GO1 ved 69.1 ppm, men i fraksjon B2V6C10 er det antatte C-12 signalet deshieldet og ligger ved 74.9 ppm.

Det blir i tillegg observert fordoblet signaler av glukose og et signal ved 101,4 ppm som kan tilskrive et anomerkarbon som ikke finnes i GO1. Det vil med andre ord si at forbindelse i fraksjon B2V6C10 inneholder to glukose molekyler mens GO1 inneholder kun et. På grunnlag av dette er det rimelig å anta at V2V6C10 er 12-glukosylderivatet av GO1. Hvis dette er tilfelle har det nå blitt isolert et nytt naturstoff fra *Glinus oppositifolius*.

Spektrene er vedlagt som vedlegg 9.3.4.1b- 9.3.4.1bb.

Dette stoffet kan også foreligge i fraksjon V2V4C4 og V2V5C5, i en mindre ren tilstand.

**Figur 6.12 Antatt struktur for BV2V6C10**

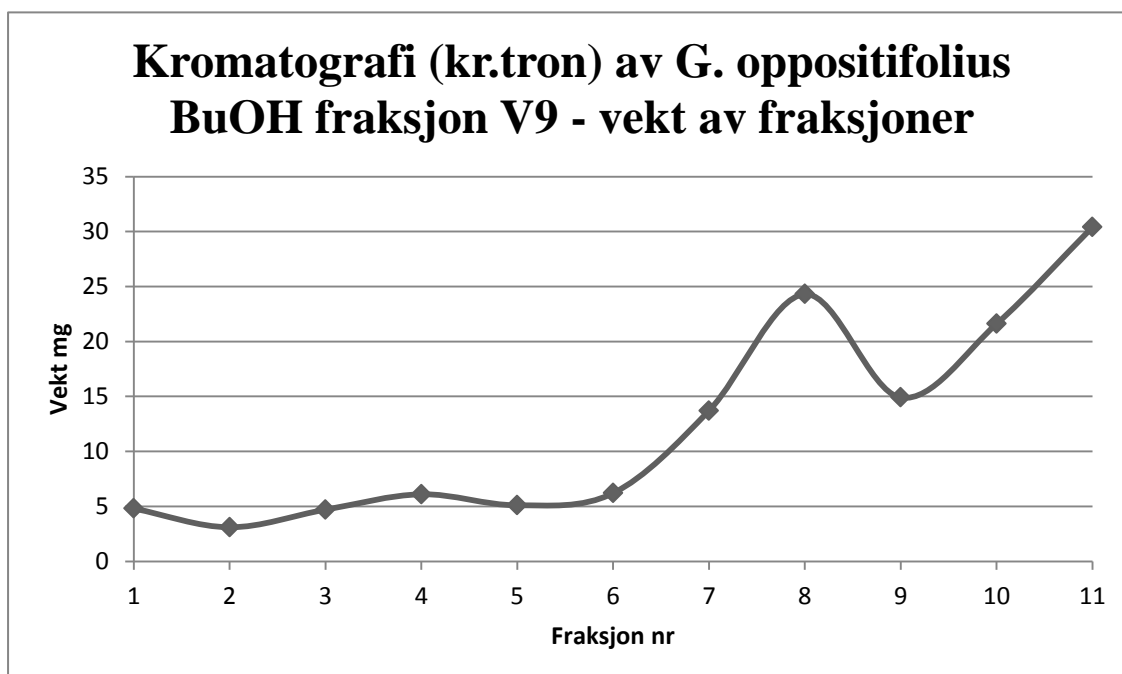


12-glukosylderivat av GO1

## 6.19 Preparativ kromatografi og opprensing av fraksjon BV9

En alikvot av fraksjon BV9 ( 263,6 mg) ble separert på kromatotron. Totalt ble det mottatt 23 kromatotronfraksjoner og basert på analytisk TLC ble de slått sammen til 11 fraksjoner. Fraksjon 7-11 utgjorde de største fraksjonene og ble videre analysert med  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR spektra. Analytisk TLC og NMR gav antydninger på at disse fraksjonene bestod for det meste av blandinger, unntak fraksjon BV9C8 som virket forholdsvis ren.

Figur 6.13 Vekt av fraksjoner fra separasjon av BV2V9 på kromatotron



### 6.19.1 NMR av BuOH fraksjon BV9C8

I  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR spektra ble det observert tilsvarende signaler for alifat, karbohydrat og singletter fra metylgruppene. Begge spektrene indikerer tilstedeværelse av stoff GO1.

Vedlegg 9.4.3.2a



**Del II**  
**Etnofarmakologiske studier i Mali**  
*Glinus oppositifolius*  
**og**  
**Tradisjonell medisin blant gravide og**  
**ammende kvinner**



# 7. Etnofarmakologiske studier i Mali

## 7.1 Etnofarmakologi

Etnofarmakologi er per i dag definert som studiet av fysiologiske reaksjoner av planter, dyr og andre substanser brukt i urbefolkningens medisiner. (Soejarto et al. 2005). Dette feltet har bidratt til oppdagelse av mange verdifulle legemidler med opphav fra folkemedisin og naturen. (Soejarto et al. 2005). Eksempler på noen viktige stoffer utledet fra naturen er morfin og kodein fra *Papaver somniferum*, pilokarpin fra *Pilocarpus jaborandi* og quinin fra *Cinchona succirubra*. (Heinrich og Simon 2001). Når det utføres et etnofarmakologisk studie på et biologisk materiale, må arbeidet etterfølge internasjonale og bilaterale avtaler i det landet planten har sitt opphav. En av de mest kjente avtalene er Rio konvensjonen eller konvensjonen om biologisk diversitet (Heinrich og Simon 2001).

Planteutledete legemidler har bidratt til utvikling av bedre, mer effektive og mindre toksiske legemidler som quinin, teofyllin, emetin og fysostigmin.

Målet med etnofarmakologi er å utvikle trygge og effektive legemidler, spesielt til lokal bruk og omfatter ofte komplekse planteekstrakter. Problemer som oppstår under studiet er ofte assosiert med sikkerhet og effektiviteten av magistrelle tilberedninger (Heinrich og Simon 2001).

Litt over 100 substanser ekstrahert fra høyere planter er i dag anvendt globalt innenfor allopatisk medisin. (Farnsworth 2007). Allopati er en behandlingsfilosofi som går ut på å helbrede en sykdom ved å fremkalle symptomer som er de motsatte av sykdommens egne. I praksis vil den første sykdommen erstattes av en annen (Bruset ; Gundersen 2011).

## 7.2 Mali

Mali er et land som ligger i den vestlige delen av Afrika og grenser mot Niger, Algerie, Burkina Faso, Guinea, Senegal, Mauritania og Elfenbenskysten. Landet omfatter et areal på 1, 246 000 km<sup>2</sup> og er delt i tre hovedområder. Først har vi den nordlige delen hvor det meste består av sahara-ørken, deretter det sentrale område hvor savanne og ørken møtes og danner en halvørken, og tilslutt den sørlige delen hvor det er fuktig savanne klima (Wikipedia, 2012). Hovedstaden i Mali er Bamako og selv om 80% av befolkningen snakker bambara, er det fransk som er det offisielle språket. Religion spiller en viktig del i dagliglivet i Mali og omtrent 90 % av befolkningen tilhører det islamske trossamfunnet (CIA 2012). Med en estimert befolkning på nærmere 16 millioner mennesker er Mali blant de 25 fattigste land i verden, og deres økonomi er hovedsakelig avhengig av gruvedrift og eksport av landbruksprodukter som gull, bomullsvarer og sheabutter. Omtrent 80 av sysselsettingen er bundet til jordbruk eller fiske og omtrent 10 % er nomader. (CIA 2012). Forventet levealder i Mali er gjennomsnittlig 50 år for menn og 54 år for kvinner (WHO 2012).

**Figur 7.1 Kart over Mali**



### 7.3 Tradisjonell medisin

En tredjedel av verdensbefolkning har dårlig tilgang til konvensjonell medisin og disse menneskene befinner seg for det meste i utviklingsland land i Asia og Afrika. I de siste tiårene har utviklingen av tradisjonell medisin økt og bidratt til bedre helsehjelp i urbane lokalsamfunn. Det er i disse områdene tradisjonell medisin forekommer på det sterkeste. Tradisjonell medisin omfatter ofte mer enn et virkestoff, noe som sjelden ses i konvensjonelle legemidler. En slik kombinasjon av virkestoffer kan gi planten tilgang til flere terapeutiske indikasjoner.

Tradisjonell medisin har blitt anvendt i flere generasjoner og praktiseres fortsatt den dag i dag. Den omfatter den totale kunnskapen og praksisen som anvendes til diagnose, forebygging og eliminering av fysiske, mentale og sosiale lidelser. Denne kunnskapen baseres på erfaringer og observasjoner som videreføres fra generasjon til generasjon, både skriftlig og muntlig. Vanligvis er det den muntlige overføringen som har dominert den naturmedisinske verden. En slik kunnskap holdes som regel hemmelig mellom nære slektninger og overføres som regel kun til førstefødte sønner eller andre kjente troverdige. Når en healer dør uten å videreføre kunnskapen sin kan mye nyttig informasjon gå tapt i den medisinske verden. Kunnskap om tradisjonell medisin overføres som regel når healeren blir gammel eller ligger på dødsleie. Mottakeren av denne kunnskapen vil vanligvis i slike situasjoner avgi et løfte om å ikke avsløre denne informasjon til andre. Når viktig og omfattende informasjon blir gitt ved dødsleiet kan det lett føre til misforståelser og glemsomhet på grunn av den emosjonelle situasjonen, derved tap av nyttig informasjon. Tradisjonelle healere blir vanligvis opplært til å tilberede ulike planter og hvilke plantedeler som skal anvendes ved bestemte lidelser. Det er da en viktig egenskap hos mottakeren å ha en god hukommelse. Dette er viktig i tilfeller hvor informasjon som overføres omfatter mange planter og forberedelsesprosedyrer, noe som kan bli for mye å huske i mange tilfeller (Kokwaro 1993).

### **7.3.1 Hva er en tradisjonell healer?**

En tradisjonell healer er en kompetent person som anvender materialer av planter, dyr og mineraler i praksisen sin. I tillegg kan deres praksis basere seg på metoder basert på sosial, kulturell og religiøs kunnskap (Kokwaro 1993).

### **7.3.2 Fordeler med tradisjonell medisin**

Tradisjonell medisin har gjennom flere generasjoner blitt anvendt i store populasjoner rundt i verden. I mange landsbyer er veien til et helsesenter for lang og kostbar. Når et helserelatert problem oppstår, er healeren den mest tilgjengelige i nærområdet og derved den eneste løsningen. Healeren vil i et slikt tilfelle kunne redusere antall sykdomstilfeller, samt fremme god helse i lokalbefolkningen. En annen fordel med tradisjonell medisin er ved utvikling av nye legemidler. Ved å studere planter som anvendes mot bestemte lidelser, kan kostnaden til utvikling av nye legemidler reduseres betraktelig. Dette kan være på grunn av mindre tidsbruk på leting eller syntetisering av en ny aktiv komponent. Andre grunner kan være kortere kliniske studier på grunn av langtidsbruk av drogen. I slike tilfeller kan behandling av bestemte lidelser bli mer effektiv og billigere. Tradisjonell medisin kan også bli brukt i forebygging av bestemte sykdommer, som malaria, schistosomiasis, dracunculiasis, etc. Dette skjer ved at drogene frastøter vektorer og parasitter som kan medføre slike sykdommer (Kokwaro 1993).

### **7.3.3 Negative aspekter ved tradisjonell medisin.**

I tradisjonell medisin blir det vanligvis dosert og diagnostisert på en unøyaktig måte. Det meste blir målt med øyemål eller en håndfull av material. For å kunne sammenslå tradisjonell medisin med moderne medisin, er dette noe som må jobbes med. Naturmedisin stiller seg både i bra og dårlig lys i dagens terapi. Dette kan være en refleksjon på hvordan ulike tradisjonelle healere praktiserer. Noen tradisjonelle healere kan i mange tilfeller ta imot penger for noe de ikke kan behandle. I slike situasjoner kan de behandlede pasientene få en rekke etterfølgende droger, noe som i verste tilfeller kan resultere i fatale konsekvenser og på denne måten gi en negativ omtale og ytterligere svekke troverdigheten til tradisjonell medisin. En ekte healer derimot vil kun behandle sykdommer de vet de kan behandle, og aksepterer ikke penger for noe de ikke kan behandle.

Disse tradisjonelle healere tar normalt kun en liten betaling på starten av behandlingen, og resterende beløp når pasienten har blitt frisk. Magi og overtroisk praksis er noe som også har blitt anvendt til å behandle ulike lidelser, men siden dette fenomenet ikke har blitt vitenskapelig bevist, kan det skape usikkerhet og mistro. Det er viktig å få healere til å forstå deres begrensninger i behandling og diagnose, og ved å samarbeide med leger kan en bedre behandling og diagnostisering fremmes. For å kunne utvikle nye forskjellige terapeutiske behandlinger er det viktig med et nært samarbeid mellom leger og healere (Kokwaro 1993).

### **7.3.5 TILBEREDNING OG APPLISERING AV DROGER**

Det finnes mange metoder for tilberedning og applisering av droger. Dette avhenges av hvilke sykdommer som skal behandles.

#### **1. Koking**

En av de vanligste metodene er å koke plantedelene. Røtter og bark av trær blir vanligvis kokt og ekstraktet kan enten bli drukket til interne behandlinger eller brukt som badevann mot eksterne sykdommer. I noen tilfeller kan ekstraktet både bli drukket og anvendt som badevann.

#### **2. Pulverisering / knusing**

Pulverisering er en prosedyre som anvendes under andre metoder som ved koking, ekstraksjon og brenning, avhengig av strukturen til planten eller plantedelen. Knust eller pulverisert materiale kan også bli applisert direkte på huden, mot sår, brannskader og andre hudsykdommer, ofte blandet med en slags krem eller Ghi (klar smør) til behandling av ulike hudlidelser. Det pulveriserte materialet blir gnidd på affiserte områder, og i noen tilfeller festet med en bandasje.

#### **3. Ekstraksjon / maserering**

Ved ekstraksjon vil blader vanligvis bli pulverisert og deretter ekstrahert med kaldt eller varmt vann, dette ekstraktet kan både bli brukt eksternt og internt.

#### **4. Aske**

Hele planten eller plantedeler blir først tørket og deretter brent.

Aske fra brent material blir normalt anvendt til behandling av åpent eller små sår, og i mange tilfeller blandet med salt.

## 5. Tygging

Tygging er en rask metode for ekstraksjon, og vanligvis er det blader som blir brukt ved tygging. Blader, røtter eller bark blir vanligvis tygget som en rask behandling mot slangebitt eller intern behandling mot magesmerter. Drogen kan også holdes i munnen i en lengre periode mot lidelser i munnhulen, som tannmerter.

## 6. Damping

Det viser seg at flere aromatiske droger anvendes i dampform, ved å la pasienten inhalere dampen fra kokende material (Kokwaro 1993).

Bruken av droger kan variere mellom forskjellige folkeslag og ulike healere. Selv om det er mange likheter ved anvendelsen av samme droge, kan samme droge bli brukt til ulike indikasjoner. Hvilke del av planten som anvendes varierer og kan være avhengig av strukturen til planten. For trær og busker er det mest vanlig å anvende bark og røtter. Noe mindre vanlig blader, og en sjelden gang anvendes blomster og frukter. For urter anvendes blader og røtter i større grad, og det er også ganske vanlig å bruke hele planten (Kokwaro 1993).

## **7.4 Tradisjonell medisin i Mali**

De mest utbredte sykdommene i Mali er diaré og pneumonia, etterfulgt av malaria. Ifølge statistikken fra World health organization (WHO 2012) bruker 75% av befolkningen i Mali tradisjonell medisin. Det vil si at det er omtrent en tradisjonell healer per 500 innbygger (WHO 2012). Av de plantene som anvendes i dagens tradisjonelle medisin, er det få som har blitt forsket på. Département de la Médecine Traditionnelle (DMT) er et forskningscenter på tradisjonell medisin i Mali. Et av målene i dette sentret er å fremme kvalitetssikring av tradisjonell medisin i lik linje med konvensjonell medisin. Det første studie som ble gjort på medisinske planter i Mali, var i et samarbeidsprosjekt mellom DMT og WHO. Målet med studien var å registrere tradisjonelle healere, få kjennskap til tradisjonell kunnskap og medisinske planter, i tillegg til å utføre forskning og utvikle forbedret tradisjonell medisin (Improved Traditional medicine, ITM) fra lokale planter (Togola 2005).

DMT har forsket på fytokjemien, toksikologien, og farmakologien av flere medisinske planter. Dette har medført til utvikling av 12 farmasøytiske preparater, ”Improved traditional medicine” (ITM) som i dag blir solgt på medisinske forretninger i Mali (Togola et al. 2005).

## 7.5 Feltarbeid i Mali

Det ble utført feltarbeid i Mali i perioden fra 25 oktober til 02 desember 2012. Hensikten med feltarbeidet var å innhente informasjon om den tradisjonelle bruken av *Glinus oppositifolius*. Dette ble ikke tilfelle under dette feltarbeidet, siden *G. oppositifolius* anvendes hovedsakelig i Nord Mali og veldig lite i de byene som vi skulle gjennom (Bamako, Dioila og Siby). Det ble derfor satt mer fokus på planter relatert til graviditet.

Ved hjelp av en tolk ble hver healer intervjuet individuelt i 20-45 minutter, fra Bambara til engelsk. Intervjuet ble startet med en introduksjon på hvem vi var, hvorfor vi var der og hva informasjonen skulle bli brukt til. De fikk da valget om å delta i intervjuet ved å sette igjen et fingeravtrykk eller avslå ved å gå. Etter hvert intervju mottok hver healer et lite beløp som takk for deltagelsen..

Et intervju om *G. oppositifolius* fant sted i Bamako ved hjelp av Drissa Diallo, men dette gav ikke tilstrekkelig data til videre arbeid.



## **Intervju om *G. oppositifolius* i Mali med en kvinnelig healer i Bamako.**

Lokalt navn på planten : Balasa

### **Lokasjon og innsamling:**

*Glinus oppositifolius* vokser som villplanter langs elven.

Vokser i rismarked og samles av bønder ved høsting av ris.

Plantene soltørkes over et større område før de lagres i plastposer og anvendes ved behov.

Perioden for innsamling av *G. oppositifolius* er på samme tidspunkt risen høstes inn, (på slutten av regnesesongen). I mars og april er det tørkeperioder i Mali, noe som kan føre til vanskeligheter med å skaffe planten.

### **Steder hvor man kan få tak i planten er:**

Dire, Rharus, Borem, Gau, Niafunke, Gondam og Ansongo i Nigeria.

### **Indikasjon og forberedelse :**

#### **Malaria**

Pulver blandes med salt og en chili pepper, kokes og drikkes.

#### **Konstipasjon/ Dårlig fordøyelse**

(5 fingers) av *G. oppositifolius* blandes med ( en liten kvantitet) Hibiscus i 3 tekopper (3x 75 ml) med vann. Masereres over natt og drikkes på morgen.

#### **Kvalme og oppkast**

Pulver av drogen blandes med kumin og litt salt (bakkesalt) ( forholdet er likt )

Tar 3 fingrer av blandingen og spiser om morgenen.

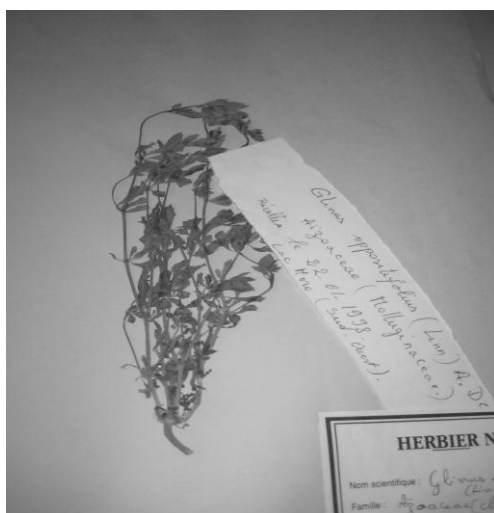
### Andre indikasjoner:

- Forebygging av forstoppelse
- Mot høy syreproduksjon
- Rensing av blod og kropp
- Mot magesmerte og gassdannelse i magen

### Gravide og barn

Gravide kvinner kan bruke denne drogen i små mengder opptil en tekopp per dag, og de kan bruke det så lenge de vil. Baby og små barn med konstipasjon kan også bruke denne drogen. Dette gjøres ved at det formes en stikkpille og administreres analt.

Healeren har brukt denne drogen siden hun var liten, og bekrefter at dette er hovedmedisin i Nord- Mali. Mange nord- malianere i Bamako bruker denne drogen og av den grunn samler hun fortsatt inn planten og selger den videre.



**Bilde 7.2**



**Bilde 7.3**

**Bilde 7.2 Tørket *G. oppositifolius* i herbarium ved DMT (private bilder)**

**Bilde 7.3 *G. oppositifolius* i plastpose for salg (Private bilder)**

## 7.6 Fem planter som anvendes av tradisjonelle healere i Mali

### 7.6.1. *Opilia celtidifolia*

Under feltarbeidet i Mali var det 11 healere som frarådet bruken av *O. celtidifolia* ved graviditet. Disse rådene kom hovedsakelig fra Siby og Dioila. Forklaringen til dette forbudet lå i den bitre smaken av bladene. Gravide kvinner skal generelt unngå inntak med bitter smak, dette kan gi spontan abort i følge 2 healere som ble intervjuet.

#### **Morfologi og habitat**

*Opilia celtidifolia* er en klatrende busk eller tre som tilhører Opiliaceae familien og kan bli opptil 10 meter høy. De vokser langs skoggrensene og savanner, fra Senegal til Nigeria og over tørre deler av den tropiske Afrika.

#### **Tradisjonell anvendelsesområde**

*Opilia celtidifolia* er en kjent plante i Mali, og brukes til behandling av flere alvorlige sykdommer. Den mest rapporterte sykdommen som planten anvendes mot er dermatitt. For tradisjonelle healere er dermatitt et terminologi som anvendes for nesten alle hudlidelser. Under feltarbeidet i Mali var det totalt 17 healere som anbefalte planten til dermatitt bruk.

Mali er et av mange land som anvender *Opilia celtidifolia*. I byen Siby er det vanlig å anvende planten mot sår, hudlesjoner og malaria. Andre steder som Dioila anvendes *O. celtidifolia* mot magesmerter, småmark og som et appetittøkende middel. I følge litteraturen anvender befolkningen i Ivory Coast avkok av blader til behandling av feber, mens i Senegal anvendes planten mot lidelser som ødemer og feber.

Planten blir også brukt som gurglevann mot abscesser i munnhulen og anvendes internt og eksternt mot spedalskhet. Ved lidelser som hodepine brennes planten og asken inntas oralt. I følge litteraturen kan planten påvirke fordøyelsessystemet og kan av den grunn virke både avførende og som anthelmintikum (Burkhill 1997; Togola et al. 2005). Bladene av planten anvendes i store deler av Vest Afrika ved sårbehandling. Såret blir vasket med varmtvannstrakter av bladene og deretter dekket over med pulveriserte blader eller knuste ferske blader for å stoppe blødningen. Dette gjøres også for å holde såret rent og øke helbredning av såret (Diallo et al. 2002; Inngjerdingen et al. 2004; Togola et al. 2005 ; Togola et al.2007 ).

### **Tidligere studier**

Isolerte saponiner fra metanolekstrakter av *O. celtidifolia* er i tidligere studier vist å utøve antispasmodisk og anthelmintisk effekt. Dette understøtter den terapeutiske bruken som er anbefalt hos tradisjonelle healere i Mali (Shihata et al. 1977; Togola et al. 2005). Dyrestudier av plantens vannekstrakter har bekreftet bronkodilaterende effekt, etterfulgt med økt NO produksjon i marsvin (Sutovska et al. 2010)

I en studie utført av Togola et al. ble det isolert polysakkarid fraksjoner fra blader av *O. celtidifolia*. Disse polysakkaridfraksjonene var av pektintypen og er vist å utøve både høy komplementfikseringsaktivitet og makrofagstimulerende aktivitet (Togola et al. 2007 ). Videre har nyere studier ført til isolering av bioaktive arabinogalaktaner II ved vannekstraksjon av bladene. Disse arabinogalaktanene er vist å besitte høy komplementfikserende evne i mennesker, samt evnen til å stimulere makrofager og dendritiske celler, inkludert B-celle profilering hos rotter. Disse resultatene indikerer at arabinogalaktan type II polymerer som er tilstede i bladene av *O. celtidifolia* har en potensiell anvendelse i regulering av inflammatoriske prosesser (Grønhaug 2010).

### **Toksiske effekter**

Analyser utført på planten har påvist alkaloider i blader, bark og røtter (Burkhill 1997). Mange alkaloider kan gi sterke fysiologiske effekter i mennesker, ved å stimulere aktiviteten av nerveceller og frigjøring av nevrotransmitter (acetylkolin, noradrenalin , dopamin og flere). Dette kan føre til muskelkontraksjon i indre organer som tarm og livmor. Et resultat av en slik stimulering kan føre til prematur fødsel (Aarnes 2011).

### 7.6.2. *Khaya senegalensis*

Ved intervju med tradisjonelle healere i Mali ble det oppdaget at *Khaya senegalensis* var den planten som var sterkest frarådet under svangerskap. Totalt 14 healere frarådet inntak av denne planten og disse rådene kom fra Bamako, Siby og Dioila.

#### **Morfologi og habitat**

*Khaya senegalensis* er et stort tre som kan bli 15-30 m høyt og 1 m bredt i diameter. Planten tilhører Meliaceae familien og er en kjent plante i Afrika. Frøene er rike på olje som anvendes til steking i Vest Afrika.

#### **Tradisjonelle anvendelsesområder**

*K. senegalensis* blir også brukt i spydgift og fiskegift, samt i behandling mot feber. Barken anvendes medisinsk mot skorpionbitt, allergier, infeksjoner i munnhulen og ved forstoppelse (Burkhill 1997; World Agroforestry centre u.å.).

Frø og blader blir anvendt mot feber og hodepine, mens røttene tilberedes til behandling mot sterilitet, mentale lidelser, syfilis og lepra (World Agroforestry centre u.å.). I tillegg anvendes denne planten ved behandling av malaria og anemi i Nigeria (Olowokudejo et al. 2008).

Under feltarbeidet var det totalt tre healere som anbefalte denne planten.

To av healerene anbefalte planten mot hudplager mens en brukte planten mot tuberkulose, hodepine og forstoppelse.

#### **Tidligere studier**

Abort har vært en av indikasjonene til *K. senegalensis*, men denne effekten har ennå ikke blitt påvist i noen studier. Ved en studie utført av Olurische et al. ble det påvist antagoniserende effekt mot oxytocin (en aktiv substans som kontraherer livmoren). Denne antagonistsiske effekten reverserte seg raskt hos ikke gravide kvinner, men forble i livmorsvevet hos gravide. Av den grunn er det fortsatt ingen data som danner grunnlag for abortering ved bruk av *K. senegalensis* (Olurische et al. 2006).

Selv om *K. senegalensis* ikke viser aborterende egenskaper, har den likevel vist seg å ha cytotoxiske effekter (Burkhill 2007).

### 7.6.3. *Guiera senegalensis*

I Mali anvendes busken mot forkjølelse, smerter og søvnproblemer. Under feltarbeidet var det totalt 17 healere som anbefalte planten ved forkjølelse .

Det var i tillegg 7 healere som brukte planten ved søvnproblemer og 6 healere som anbefalte planten ved smerter.

#### **Morfologi og habitat**

*G. senegalensis* er en busk som vokser i savanneområder hovedsakelig i Vest-Afrika, men forekommer også i Sentral-Afrika. Busken er en medlem av Combretaceae familien og kan bli 3-5 meter høy, med askegrå stammer (Fiot et al. 2006; Somboro et al. 2011).

#### **Tradisjonelle anvendelsesområder**

I følge litteraturen har planten flere terapeutiske bruksområder. Bladene blir vanligvis anvendt mot gastrointestinale og respiratoriske forstyrrelser, samt ved behandling av revmatisme og malaria (Fiot et al. 2006). Andre patalogiske tilstander som omfatter bruken av planten inkluderer blant annet malaria og diaré (Somboro et al. 2011).

#### **Tidligere studier**

Farmakologiske studier på bladene har vist antitussive og antimikrobielle egenskaper og kan av den grunn understøtte behandling ved forkjølelse og respiratoriske forstyrrelser og infeksjoner. Det har også blitt påvist antiplasmodial aktivitet ved ekstraksjon av blader og grein på to stammer av *Plasmodium falciparum*.

Videre har det blitt isolert alkaloider, harman og tetrahydroharman fra kloroform ekstrakter av røtter. Disse alkaloidene utøvde signifikant antimalaria aktivitet, assosiert med lav cytotoxicitet. Blader og røtter har vist å gi lignende effekter, men siden det er lettere å innhente blader enn røtter, er det blader som anvendes mest.

*G. senegalensis* anvendes ofte i kombinasjonsbehandling og ved kombinerende med *Mitragyna inermis* utøves en synergistisk effekt mot malaria parasitten. (Fiot et al. 2006). I tillegg kan de kombineres med *Combretum aculeatum* stammer og litt salt til behandling av smertefulle magekramper.

#### **7.6.4. *Heliotropium indicum***

I Mali anvendes planten for det meste mot kvalme, amenoré, øyeinfeksjon og høyt blodtrykk. Blant de tradisjonelle healere som ble intervjuet i Mali var det 13 som anbefalte denne planten mot kvalme. Det er for tiden ikke blitt funnet noen studier på kvalme som kan bekrefte dette bruksområdet hos planten.

##### **Morfologi og habitat**

*Heliotropium indicum* tilhører Boraginaceae familien og er en plante som kan bli opptil 50 cm høy. De forekommer vanligvis langs kystlinje, avløp og åpne tomter hvor det er god tilgang til lys og vann (Globinmed 2011).

##### **Tradisjonelle anvendelses områder**

Planten har blitt anvendt til ulike indikasjoner i ulike land.

I Malaysia blir planten applisert som en pasta for å redusere urinering, og motvirke forråtnelse, samt behandle pyoderma (bakterie infeksjon i huden) og ringorminfeksjon. I Burma blir planten ekstrahert og anvendt mot gonore, mens i Indonesia anvendes bladekstrakter mot munninflammasjon og som omslag ved herpes og revmatisme (Globinmed 2011; Burkill 1985; Togola et al. 2005). I Ivory Coast blir pulverisert tørket blader anvendt ved forkjølelse og sinusitt som slimhinneavsvellende middel (Burkill 1985). Ekstrakter fra røtter blir drukket i Filippinene for å fremme mensens, mens frøene blir anvendt i behandling av kolera, malaria og sårheling. I følge litteraturen tilberedes bladene ved avkoking for deretter å vaske spedbarn i områder i Sierra Leone. I andre land som Senegal blir pulveriserte blader anvendt til å behandle dermatitt, spesielt væskende eksem og impetigo hos barn.

##### **Tidligere studier**

En studie utført på albino rotter har bekreftet den antiinflammatoriske effekten av planten (Globinmed 2011). I tillegg har plantens sårhelende effekt blitt rapportert i litteraturen og studier viser til at dette muligens kan skyldes økning i sårkontraksjon og rask epitelisering og kollagenisering (Reddy et al. 2002) .

I følge litteraturen kan den antimikrobielle effekten skyldes pyrrolizidin alkaloider funnet i blader (Globinmed 2011; Bosch et al. 2006).

Disse alkaloidene kan være levertoksiske for både mennesker og husdyr og skal derfor ikke brukes av gravide eller ammende (Wiedenfeld 2010).

Planten er også vist å ha toksiske effekter ved inntak av plantefrøene på husdyr og i mennesker. Ammende mødrer bør av den grunn unngå å drikke teen, i tilfelle den skulle inneholde frø spor av frø (Globinmed 2011).

### **7.6.5. *Ficus capensis***

I Mali knuses frøene før avkoking, og deretter blandes ekstraktet med sheabutter for applisering på brystene morgen og kveld. Av healere som ble intervjuet i Mali var det 11 som anbefalte *Ficus capensis* til stimulering av melkeproduksjon. I tillegg var det to som brukte planten ved anemi, og en som brukte planten ved trøtthet.

#### **Morfologi og habitat**

*Ficus capensis* kommer fra Moraceae familien og vokser spredt gjennom den tropiske delen av Afrika. Planten befinner seg fra den østlig delen av Cape Verde til Somalia, Sør Angola og Sør Afrika, men også i Yemen (Barnes og Francis 2004).

Treet er en medisinsk plante som består av en tykk stamme og spredende røtter, som forekommer i terrestriske områder, vanligvis langs elver (Oyeleke et al. 2008).

#### **Tradisjonelle anvendelsesområder**

*Ficus capensis* har mange terapeutiske anvendelsesområder, selv om den er sagt å inneholde toksiske substanser. Inntak av rot- og barkekstrakt har tidligere vist seg å gi fatale resultater, men så langt har det ikke blitt gjort toksisitetsstudier på planten (Lumbile og Mogotsi 2008). Selv anvendes roten mot hoste, sår hals og diaré, mens fiken brukes i behandling av infertilitet og som et melkestimulerende middel. Både frø og fiken viser stimulerende effekter på melkeproduksjonen i mennesker. Ved stimulering av melkeproduksjon hos kuer har det blitt anvendt blader, fiken og melk fra planten (Olowokudejo, et al.2008; Lumbile og Mogotsi 2008). *Ficus capensis* blader er vist å besitte antidiare effekt i litteraturen og har blitt anvendt på denne indikasjonen i store deler av Benue State, Nigera (Olowokudejo et al. 2008).



Bladene blir avkokt og deretter drukket ved behandling av diare, følgelig anvendes bladene til behandling av dysenteri, ødemer, epilepsi og rykninger hos spedbarn i stammer i Edodelta områder (Ayinde et al. 2009).

### **Tidligere studier**

Det har blitt isolert tanniner, saponiner, flavonoider, hjerteglykosider, steroler og terpenener fra plantens rækstrakter. I en studie gjort på plantens vannekstrakter ble det observert antimuskarinerge effekter. Disse antimuskarinerge effektene gav reduksjon i intestinal motilitet og hemming av ileum kontraksjon forårsaket av induert acetylkolin (Oyeleke et al. 2008; Ayinde og Owolabi 2009). Disse funnene er med og støtter bruken av planten ved epilepsi og rykninger. Videre har det blitt gjort studier på rækstrakter av blader. Disse studiene har vist å hemme *Escherichia coli* og *Shigella* sp, og forklaringen kan ligge i plantens innhold av alkaloider. Ekstraktene viste ulik grad av antimikrobiell aktivitet, og den mest mottakelige bakterien for den antimikrobielle aktiviteten var *E. coli*. Planten inneholder også tanniner som spiller en viktig rolle i å stoppe blødninger og har av den grunn en viktig rolle i omskjæring. (Oyeleke et al. 2008).

## 7.7 Bilder av fem planter som anvendes i tradisjonell medisin



Bilde 7.4 av *Opilia celtidifolia*  
(Grønhaug 2011)



Bilde 7.5 av *Khaya senegalensis*  
(Shoot 2012)



Bilde 7.6 *Guiera senegalensis*  
(Fakara Plants 2012).



Bilde 7.7 *Heliotropium Indicum*  
(Barnes 2004)



Bilde 7.7 Bilde av *Ficus capensis* (Toptropicals 2012)

## 8. Konklusjon

Fra *Glinus oppositifolius* ble det laget 5 rækstrakter med DCM, MeOH, BuOH, H<sub>2</sub>O og EtOAc. Disse rækstraktene ble testet for effekter på radikal scavenging med DPPH, xanthine oksidase- og 15 lipoksygenase-hemming, og tilslutt toksisitet på brine shrimp.

Ved hjelp av TLC-, kolonne- og kromatotron kromatografi ble det isolert triterpensaponinene GO1, GO5, GO6 og flavonoidet vitexin fra EtOAc ekstrakt. I tillegg ble det isolert GO1 fra BuOH ekstraktet. Disse stoffene har tidligere blitt isolert og beskrevet i doktorgradsavhandlingen av Drissa Diallo i år 2000. Fra EtOAc ekstraktet ble det i tillegg isolert et nytt naturstoff som tidligere ikke er blitt beskrevet. Basert på NMR spektra ble det nye stoffet antatt å være 12-glukosylderivat av GO1. Fra EtOAc ekstraktet ble et stoff som antas å være aglykonet av GO1 isolert. Dette er ikke beskrevet tidligere.

Ved fraksjonering av EtOAc ekstraktet ble det observert gul/grønn/brun farge ved eluering med 70 % etanol, dette kan tyde på tilstedeværelse av flavonoider. Selv om resultater fra opprensningen hentyder til flavonoider var det lite antydning til dette i DPPH målingene, siden ingen av rækstraktene viste å ha god DPPH scavenger aktivitet. Samtlige rækstrakter viste lav hemmende effekt av 15 LO, utenom EtOAc ekstraktet. EtOAc utøvde moderat enzymhemmende effekt og en forklaring til dette kan være effekten av vitexin. I en 15 LO test utført på ren vitexin, ble det observert enzymhemmende effekt på lik line med quercetin. Saponiner (GO1, GO5, GO6 og fler) i planten kan forklare den sterke skumming som ble observert under inndampingen av MeOH.

Det ble utført toksisitetmålinger av brine shrimp på alle 6 rækstrakter ved ulike konsentrasjoner (0,1- 40 mg/mL). Ingen av ekstraktene viste tegn til toksisitet utenom EtOAc rækstrakt. Rækstrakt av EtOAc viste svak toksisitet ved konsentrasjon 40 mg/mL.

Ifølge resultater fra xanthin oksidase- hemming utøvde vannekstrakter av *G. oppositifolius* aktiverende effekter på enzymet og derved økt produktdannelse.

Det ble planlagt å utføre et etnofarmakologisk studie på *G. oppositifolius* i Mali, men på grunn av lite anvendelse i de byene som vi befant oss i, ble det istedenfor satt fokus på plantemedisiner relatert til graviditet.

Det ble valgt ut fem planter som skulle ses nærmere på. Disse plantene omfattet *Opilia celtidifolia*, *Khaya senegalensis*, *Ficus capensis*, *Helitropium indicum* og *Guiera senegalensis*. Av de fem plantene ble anvendelsen av *Opilia celtidifolia* og *Khaya senegalensis* sterk frarådet under graviditet. Healerne indikerte at *Ficus capensis* virket stimulerende på melkeproduksjonen mens *Helitropium indicum* var en droge som ble anbefalt ved kvalme. Tilslutt var det 17 healere som anbefalt *Guiera senegalensis* ved forkjølelse og søvnproblemer.

### **8.1 Videre arbeid med *Glinus oppositifolius***

Fra EtOAc fraksjon ble det isolert et antatt aglykon av GO1, videre studie av dette naturstoffet kan gi ytterligere informasjon om identifikasjon og eventuelle biologiske aktiviteter. I tillegg ble det innhentet tvetydige resultater av BuOH ekstraktet i toksisitetstesten med brineshrimp. En retest av BuOH ekstraktet hadde kunne gitt klarhet til ekstraktets toksisitet mot rekelarver.

Fra EtOAc ekstraktet ble det observert en svak toksisk effekt på rekelarver. En retest ved høyere konsentrasjoner kan bidra til å gi en mer definert toksisitetsgrense av EtOAc ekstraktet. Ved fraksjonering av EtOAc ekstraktet ble det observert gul/grønn/brun farge, dette kan indikere tilstedeværelse flavonoider. Siden DPPH målingene viste lav scavenger aktivitet, kunne det ha vært spennende å prøve andre antioksidant målinger på EtOAc ekstraktet. Det har blitt isolert flere interessante fraksjoner av EtOAc fasen, videre fraksjonering og isolering av EtOAc kan muligens bidra til oppdagelse av nye aktive biologiske stoffer.

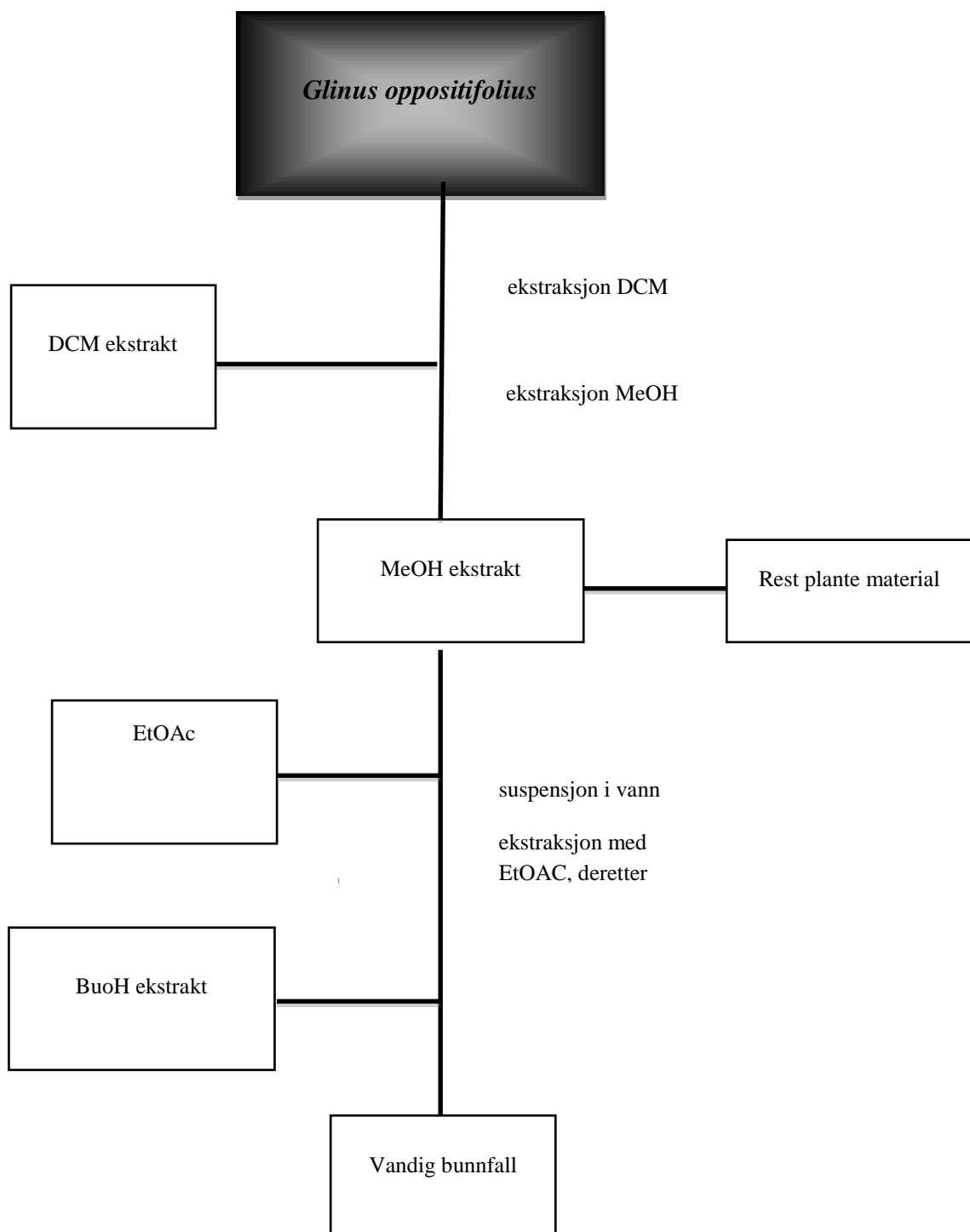
Det ble observert sterk skumming under inndamping av MeOH fasen. Skummingen kan indikere tilstedeværelse av saponiner. Videre arbeid med MeOH fasen kan være interessant for identifisering av eventuelle saponiner.

I vannfasen ble det observert aktiverende effekter på xanthin oksidase enzymet. Siden xanthin oksidase spiller en viktig rolle i kroppen hadde det vært av interesse å måle vannekstraktet igjen ved høyere konsentrasjoner og å isolere og identifisere de aktive substansene.

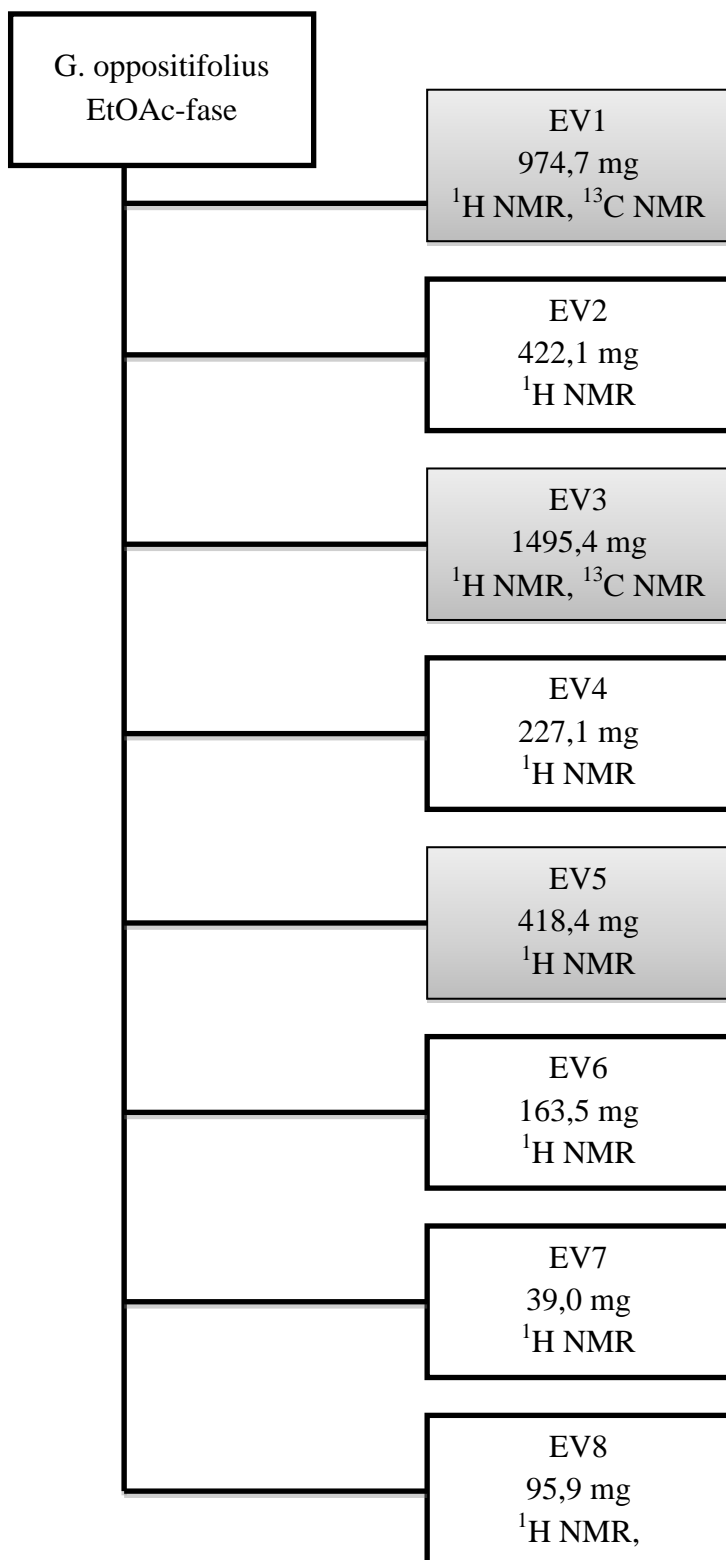
# 9. Vedlegg

## 9.1 Flytskjema

### 9.1.1 Flytskjema *Glinus oppositifolius*



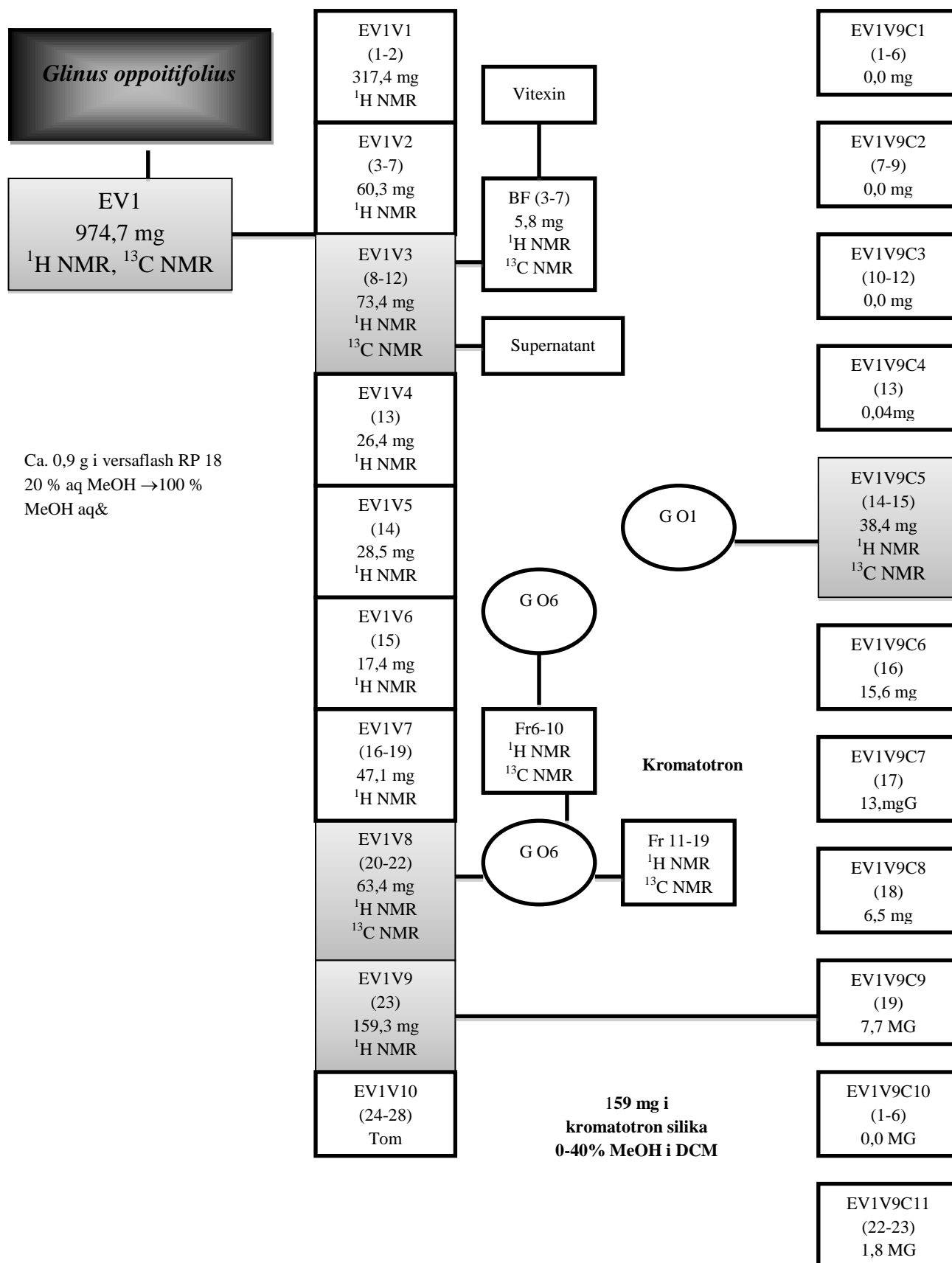
### 9.1.2 Flytskjema *Glinus oppositifolius* EtOAc råekstrakt



Versa flash RP 18

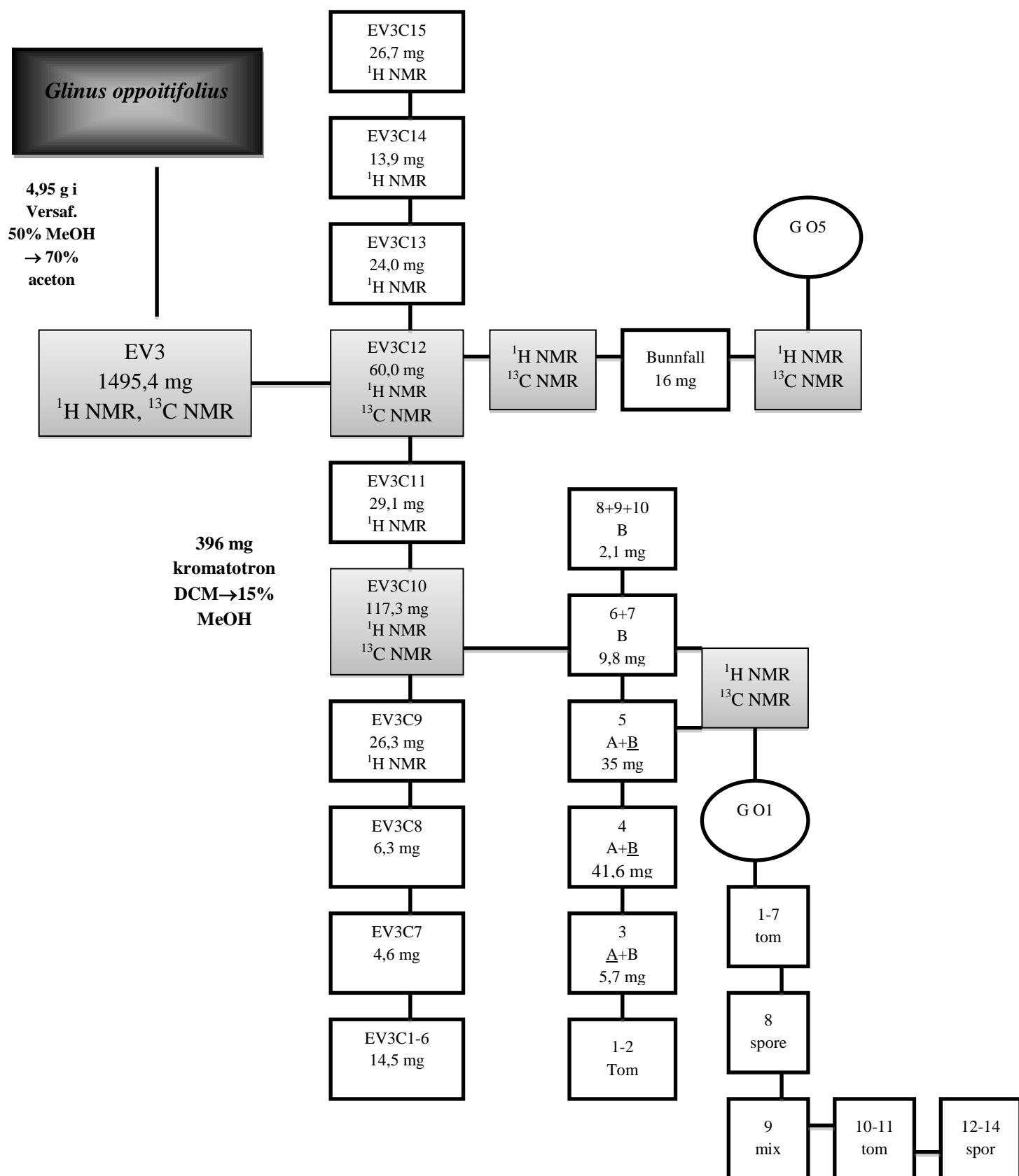
Vi velger å gå videre med V1, V3 og V5

### 9.1.3 Flytskjema *Glinus oppositifolius* EtOAc fraksjon EV1

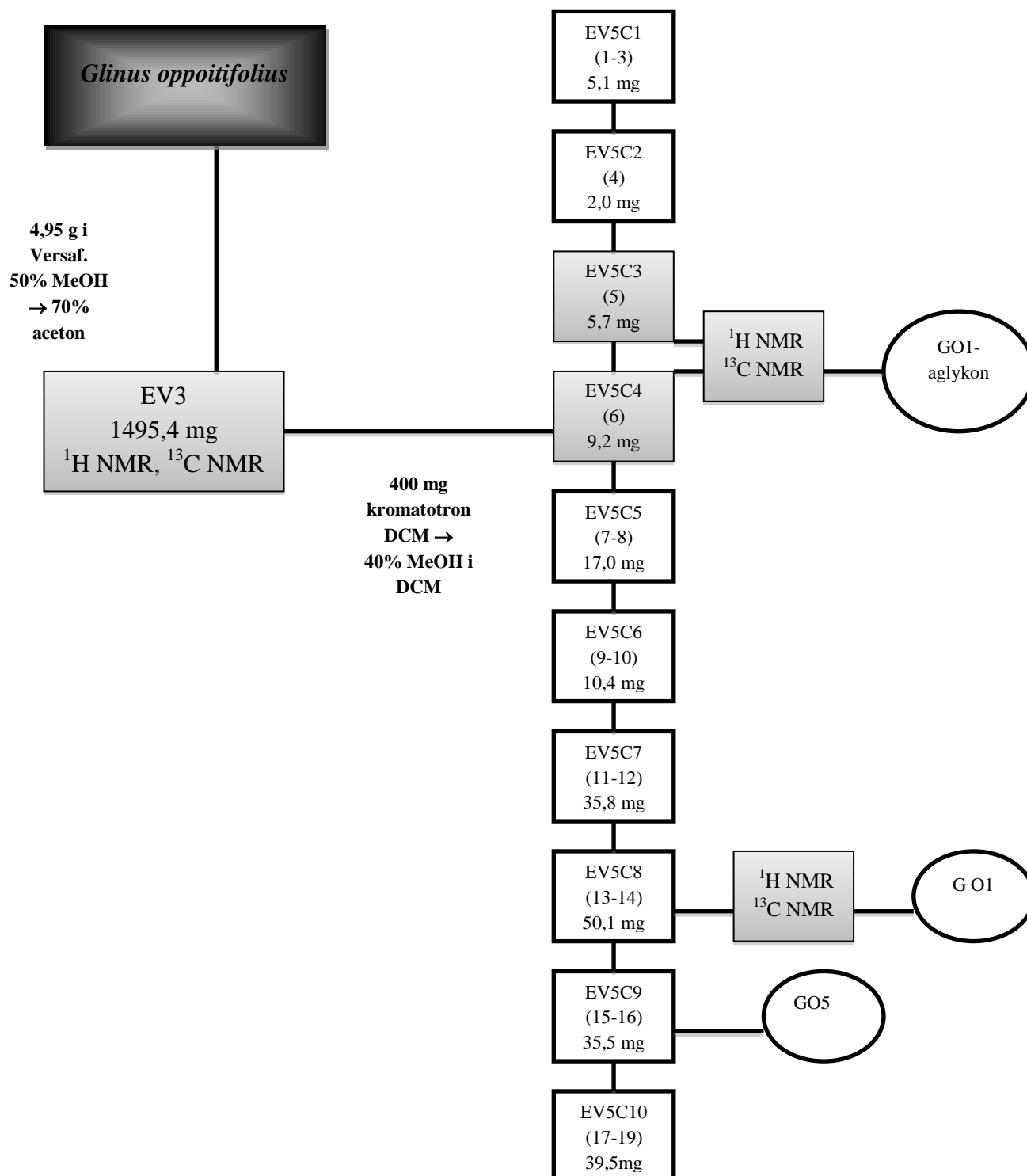




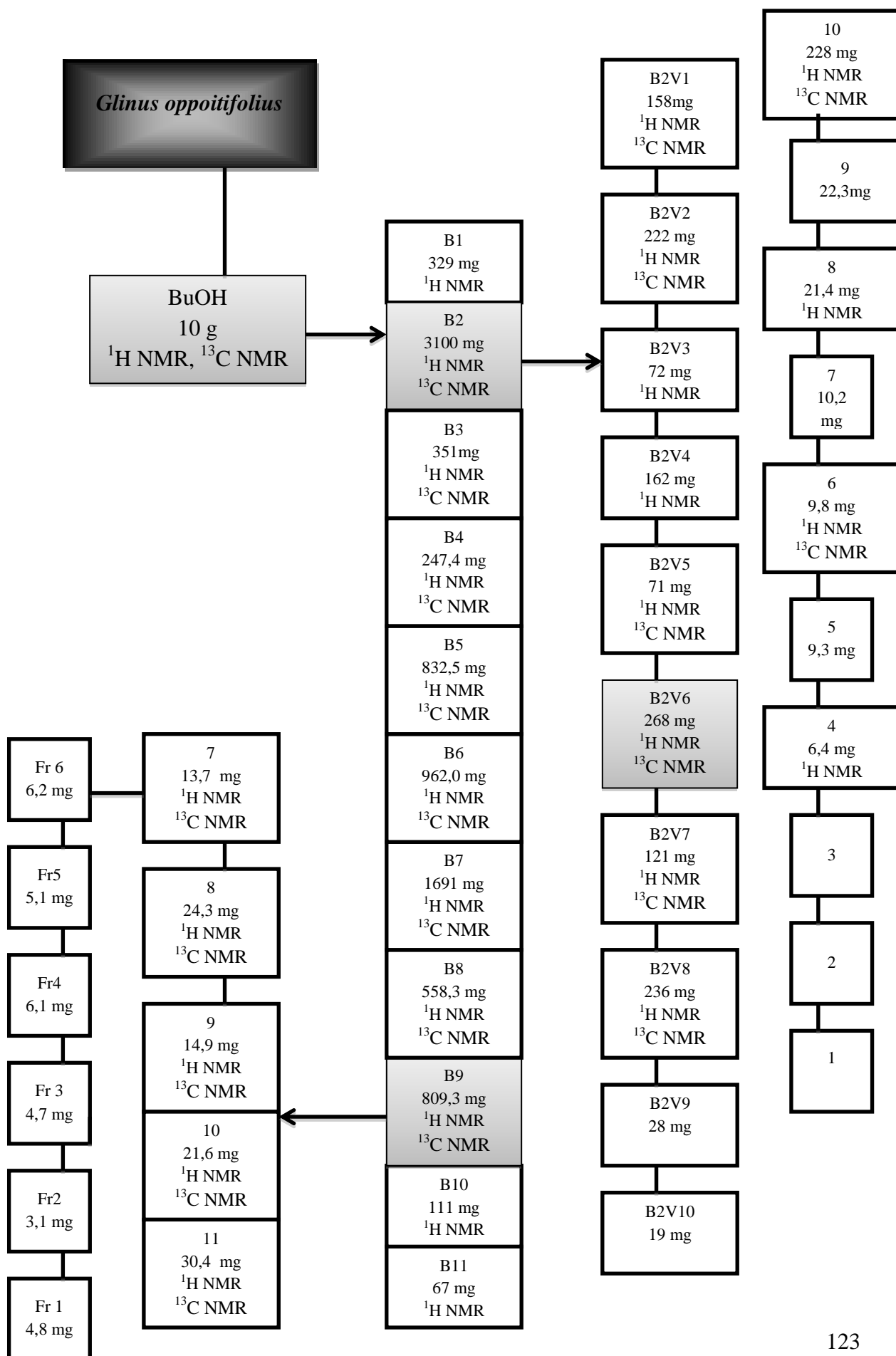
### 9.1.4 Flytskjema *Glinus oppositifolius* EtOAc fraksjon EV3



### 9.1.5 Flytskjema *Glinus oppositifolius* EtOAc fraksjon EV 5



### 9.1.6 Flytskjema *Glinus oppositifolius* BuOH råekstrakt



## 9.2.1 Brine shrimp resultater ved konsentrasjon 0,1-10mg/mL

### DCM ekstrakt

Konsentrasjoner mg/mL	10	10	10	5	5	5	1	1	1	0,1	0,1	0,1
Antall levende	15	20	18	19	15		14	16	18	21	17	19
Antall døde	1	2	3	1	1		1	0	4	0	1	2
Prosent døde	6,7	10,0	16,7	5,3	6,7	0,0	7,1	0,0	22,2	0,0	5,9	10,5
Gjennomsnitt	11,1			6,0			9,8			5,5		
Standardavvik	4,2			0,7			9,3			4,3		

### MeOH ekstrakt

Konsentrasjoner mg/mL	10	10	10	5	5	5	1	1	1	0,1	0,1	0,1
Antall levende	15	15	21	21	15	18	17	14	26	13	15	14
Antall døde	0	1	1	0	1	0	0	1	2	0	0	4
Prosent døde	0,0	6,7	4,8	0,0	6,7	0,0	0,0	7,1	7,7	0,0	0,0	28,6
Gjennomsnitt	3,8			2,2			4,9			9,5		
Standardavvik	2,8			3,1			3,5			13,5		

### Bunnfall ekstrakt

Konsentrasjoner mg/mL	10	10	10	5	5	5	1	1	1	0,1	0,1	0,1
Antall levende	11	11	20	15	21	16	16	12	14	16	12	14
Antall døde	3	3	7	3	0	0	1	0	1	2	0	1
Prosent døde	27,3	27,3	35,0	20,0	0,0	0,0	6,3	0,0	7,1	12,5	0,0	7,1
Gjennomsnitt	29,8			6,7			4,5			6,5		
Standardavvik	3,6			9,4			3,2			5,1		

### EtOAc ekstrakt

Konsentrasjoner mg/mL	10	10	10	5	5	5	1	1	1	0,1	0,1	0,1
Antall levende	20	16	12	12	13	19	11	16	22	11	13	18
Antall døde	11	12	5	1	0	0	0	0	0	0	0	2
Prosent døde	55,0	75,0	41,7	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1
Gjennomsnitt	57,2			2,8			0,0			3,7		
Standardavvik	13,7			3,9			0,0			5,2		

### BuOH ekstrakt

Konsentrasjoner mg/mL	10	10	10	5	5	5	1	1	1	0,1	0,1	0,1
Antall levende	20	18	18	18	19	15	19	10	14	22	17	18
Antall døde	4	0	3	1	1	0	4	0	0	0	0	0
Prosent døde	20,0	0,0	16,7	5,6	5,3	0,0	21,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gjennomsnitt	12,2			3,6			7,0			0,0		
Standardavvik	8,7			2,6			9,9			0,0		

### Vann ekstrakt

Konsentrasjoner mg/mL	10	10	10	5	5	5	1	1	1	0,1	0,1	0,1
Antall levende	16	14	14	23	20	19	11	12	12	13	13	12
Antall døde	2	1	2	2	2	3	3	2	0	2	1	1
Prosent døde	12,5	7,1	14,3	8,7	10,0	15,8	27,3	16,7	0,0	15,4	7,7	8,3
Gjennomsnitt	11,3			11,5			14,6			10,5		
Standardavvik	3,0			3,1			11,2			3,5		

#### Positiv kontroll

Antall levende	16	19	20
Antall døde	16	16	19
Prosent døde	100,0	84,2	95,0
Gjennomsnitt	93,1		
Standardavvik	6,6		

#### Negativ kontroll

Antall levende	15	17	15
Antall døde	1	0	1
Prosent døde	6,7	0,0	6,7
Gjennomsnitt	4,4		
Standardavvik	3,1		

## 9.2.2 Brine shrimp resultater ved konsentrasjon 5mg/mL-40 mg/mL

### DCM ekstrakt

Konsentrasjoner mg/mL	40	40	40	20	20	20	10	10	10	5	5	5
Antall levende	11	11	14	15	12	15	14	14	15	14	15	11
Antall døde	10	10	8	9	8	6	0	0	0	3	1	1
Prosent døde	90,9	90,9	57,1	60,0	66,7	40,0	0,0	0,0	0,0	21,4	6,7	9,1
Gjennomsnitt	79,7			55,6			0,0			12,4		
Standardavvik	15,9			11,3			0,0			6,5		

### MeOH ekstrakt

Konsentrasjoner mg/mL	40	40	40	20	20	20	10	10	10	5	5	5
Antall levende	11	15	11	12	15	11	12	14	16	15	10	13
Antall døde	6	8	10	0	2	1	0	0	0	3	0	1
Prosent døde	54,5	53,3	90,9	0,0	13,3	9,1	0,0	0,0	0,0	20,0	0,0	7,7
Gjennomsnitt	66,3			7,5			0,0			22,6		
Standardavvik	17,4			5,6			0,0			8,2		

### Bunfall ekstrakt

Konsentrasjoner mg/mL	40	40	40	20	20	20	10	10	10	5	5	5
Antall levende	5	3	6	8	12	11	0	0	0	0	0	0
Antall døde	12	6	11	7	0	1	0	0	0	0	0	0
Prosent døde	240,0	200,0	183,3	87,5	0,0	9,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gjennomsnitt	207,8			32,2			0,0			0,0		
Standardavvik	23,8			39,3			0,0			0,0		

### EtoAC ekstrakt

Konsentrasjoner mg/mL	40	40	40	20	20	20	10	10	10	5	5	5
Antall levende	10	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Antall døde	9	5	10	1	1	0	1	2	0	2	2	3
Prosent døde	90,0	125,0	166,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gjennomsnitt	127,2			0,0			0,0			0,0		
Standardavvik	31,3			0,0			0,0			0,0		

### BuOH

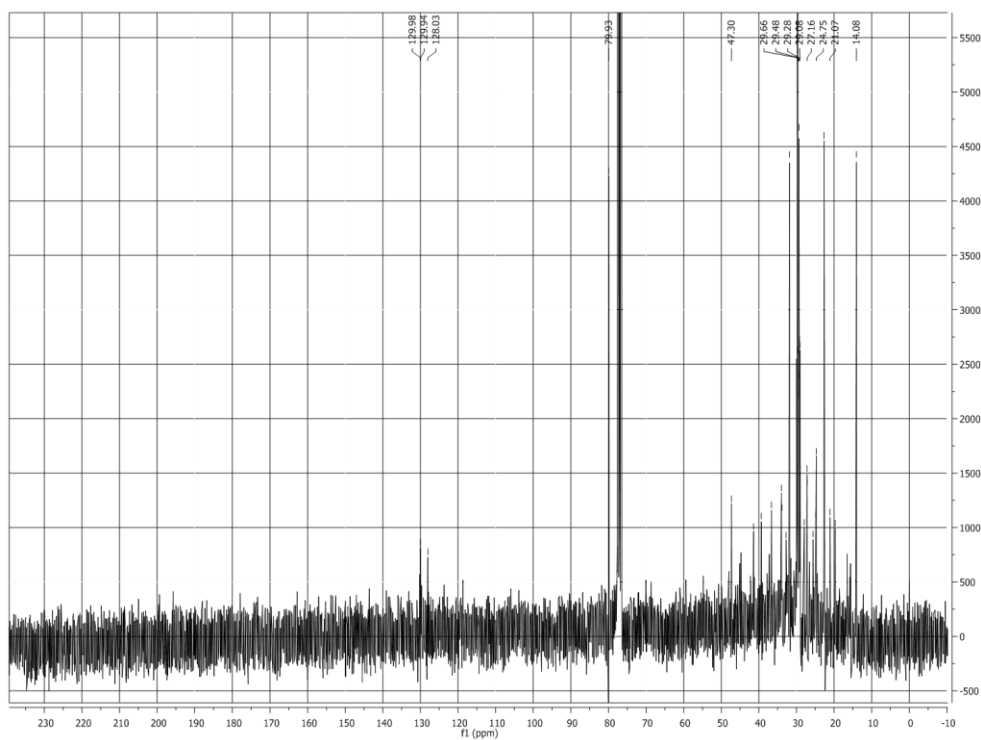
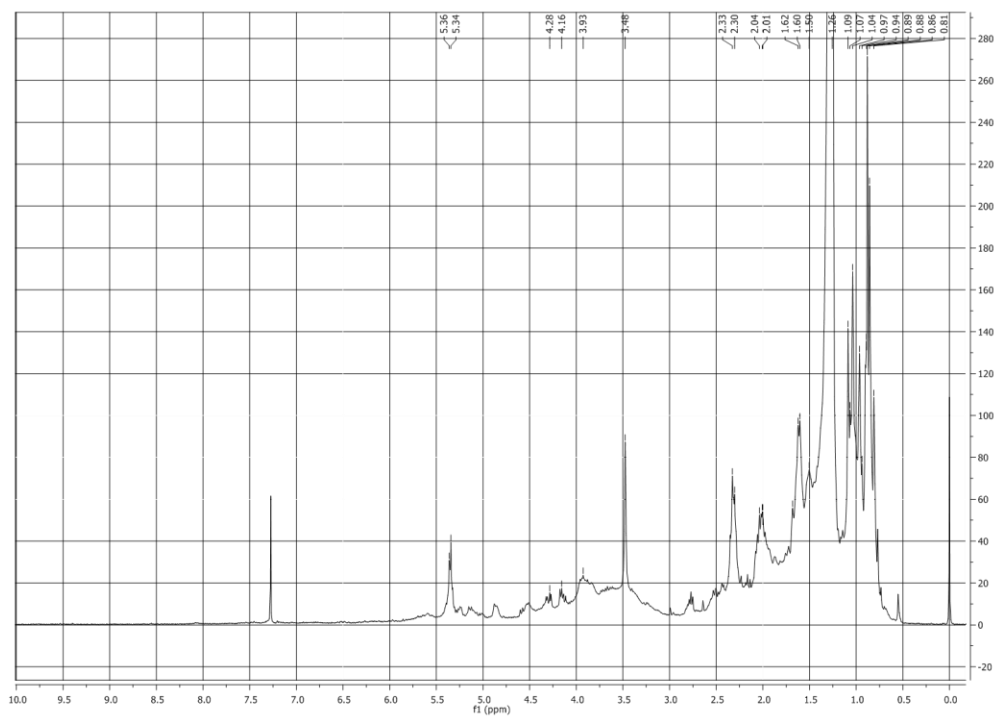
Konsentrasjon mg/mL	40	40	40	20	20	20	10	10	10	5	5	5
Antall levende	13	12	10	10	13	14	14	12	14	13	13	11
Antall døde	5	5	2	0	0	0	2	0	3	0	0	0
Prosent døde	38,5	41,7	20,0	0,0	0,0	0,0	14,3	0,0	21,4	0,0	0,0	0,0
Gjennomsnitt	33,4			0,0			11,9			0,0		
Standardavvik	9,5			0,0			8,9			0,0		

### Vannekstrakt

Konsentrasjoner mg/mL	40	40	40	20	20	20	10	10	10	5	5	5
Antall levende	14	15	14	11	10	13	14	10	12	13	15	15
Antall døde	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Prosent døde	7,1	0,0	7,1	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	0,0
Gjennomsnitt	4,8			3,3			0,0			2,2		
Standardavvik	3,4			4,7			0,0			3,1		

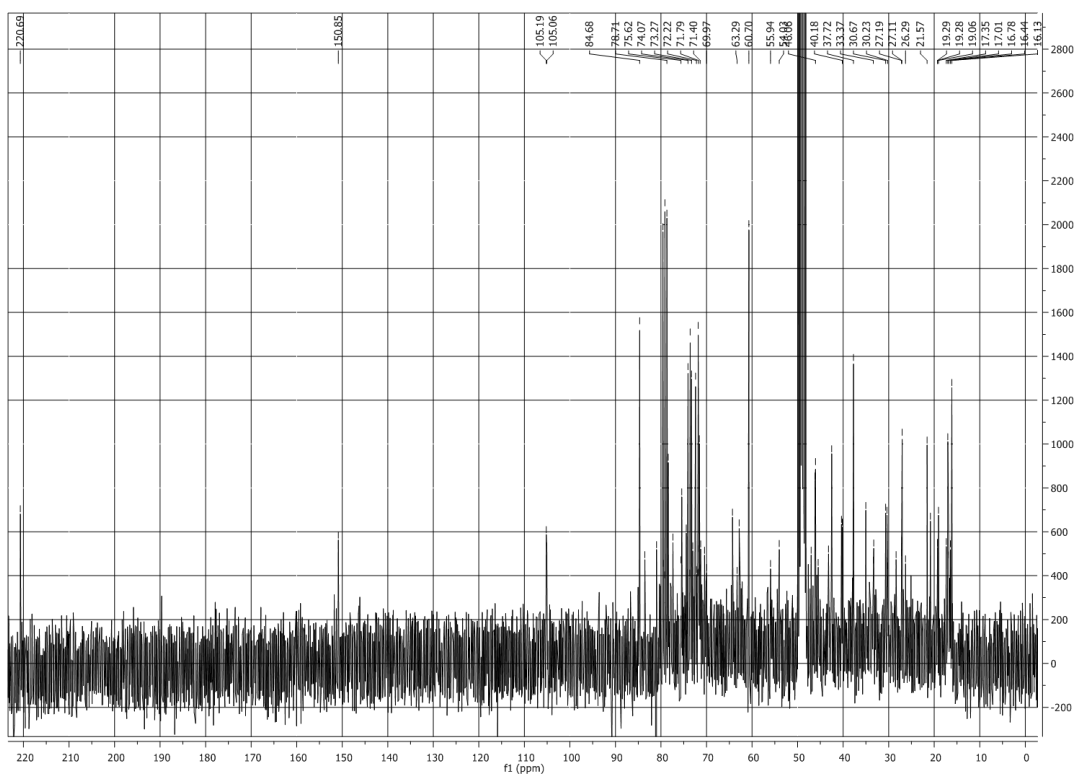
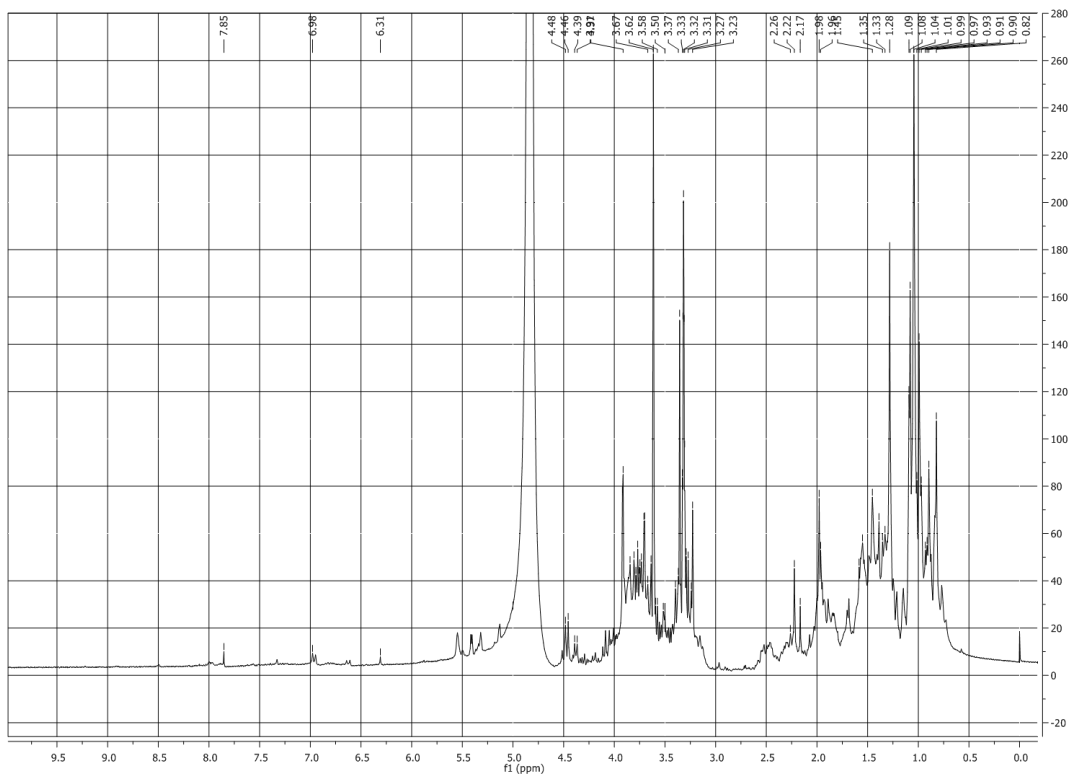
## 9.3. NMR-spektra

### 9.3.1. $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av DCM-ekstrakt av *G. oppositifolius*

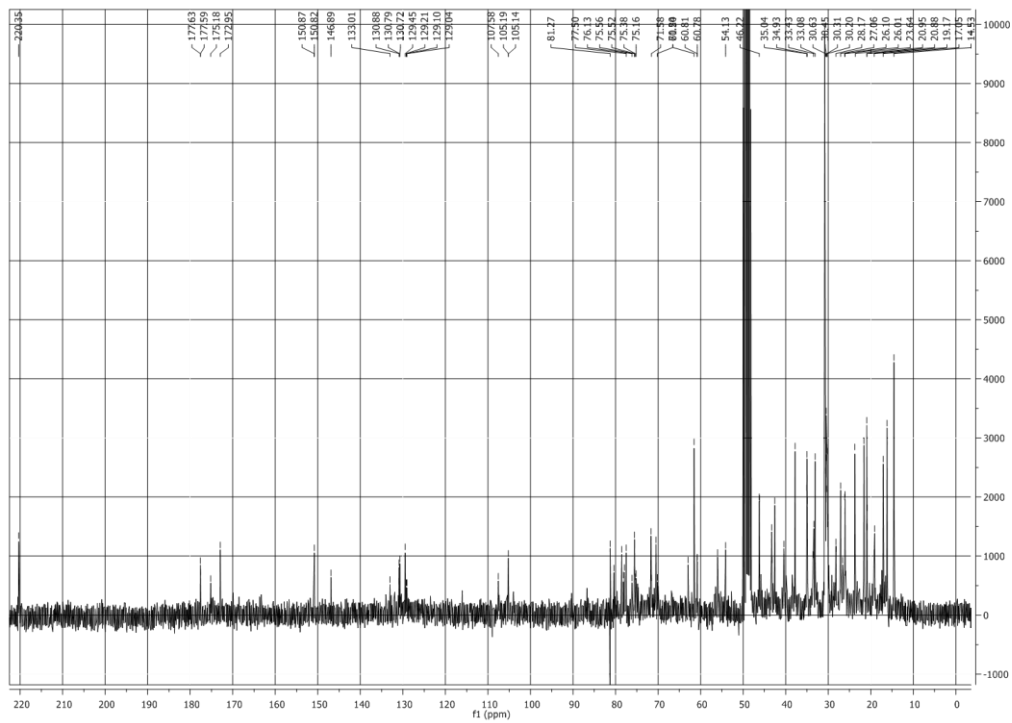
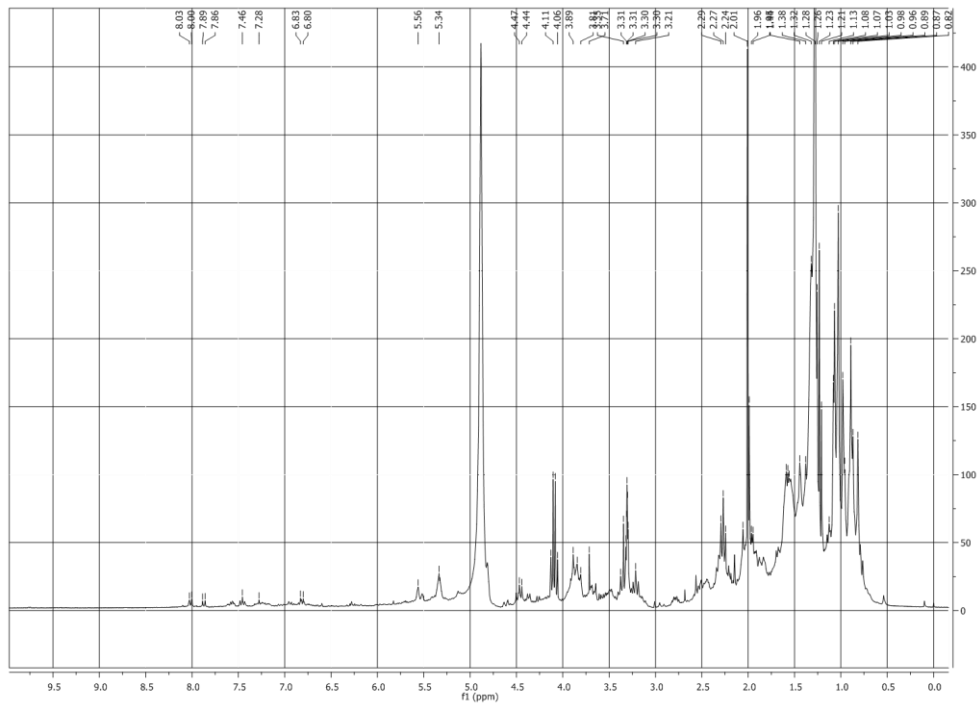




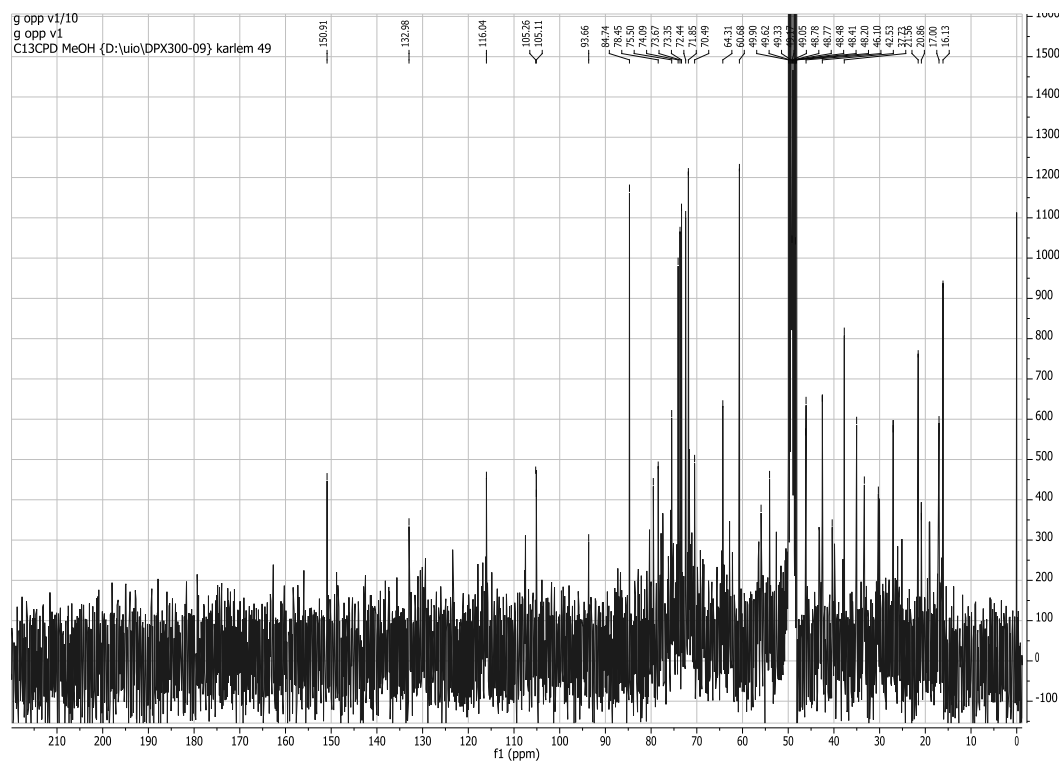
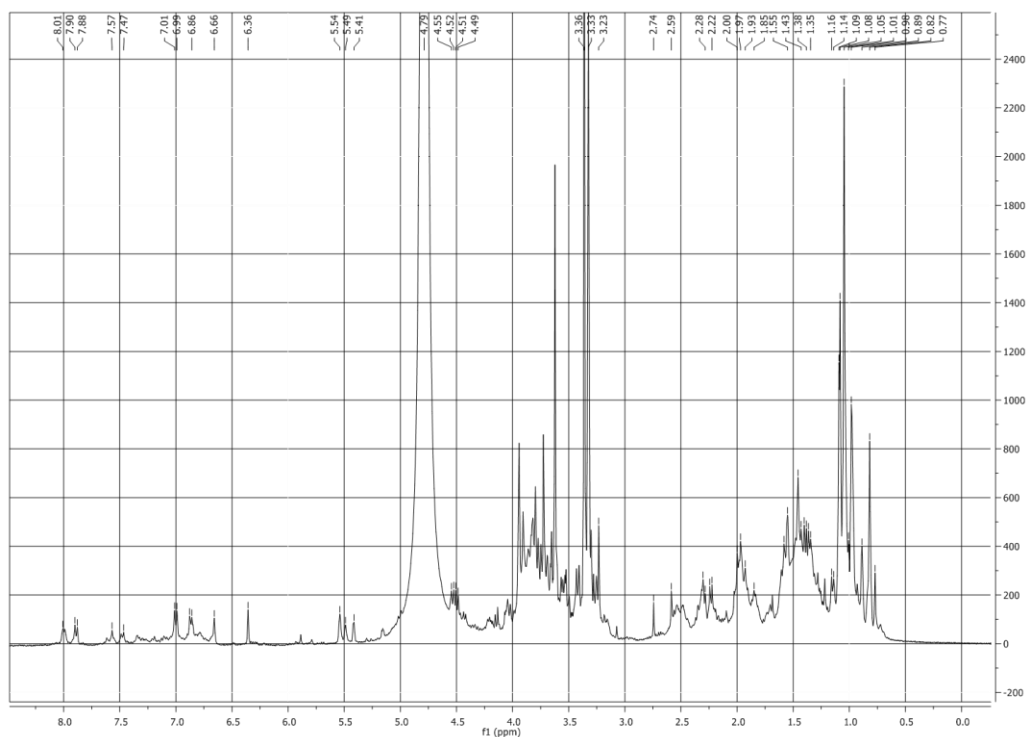
### 9.3.2 $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av MeOH råekstrakt av *G. oppositifolius*



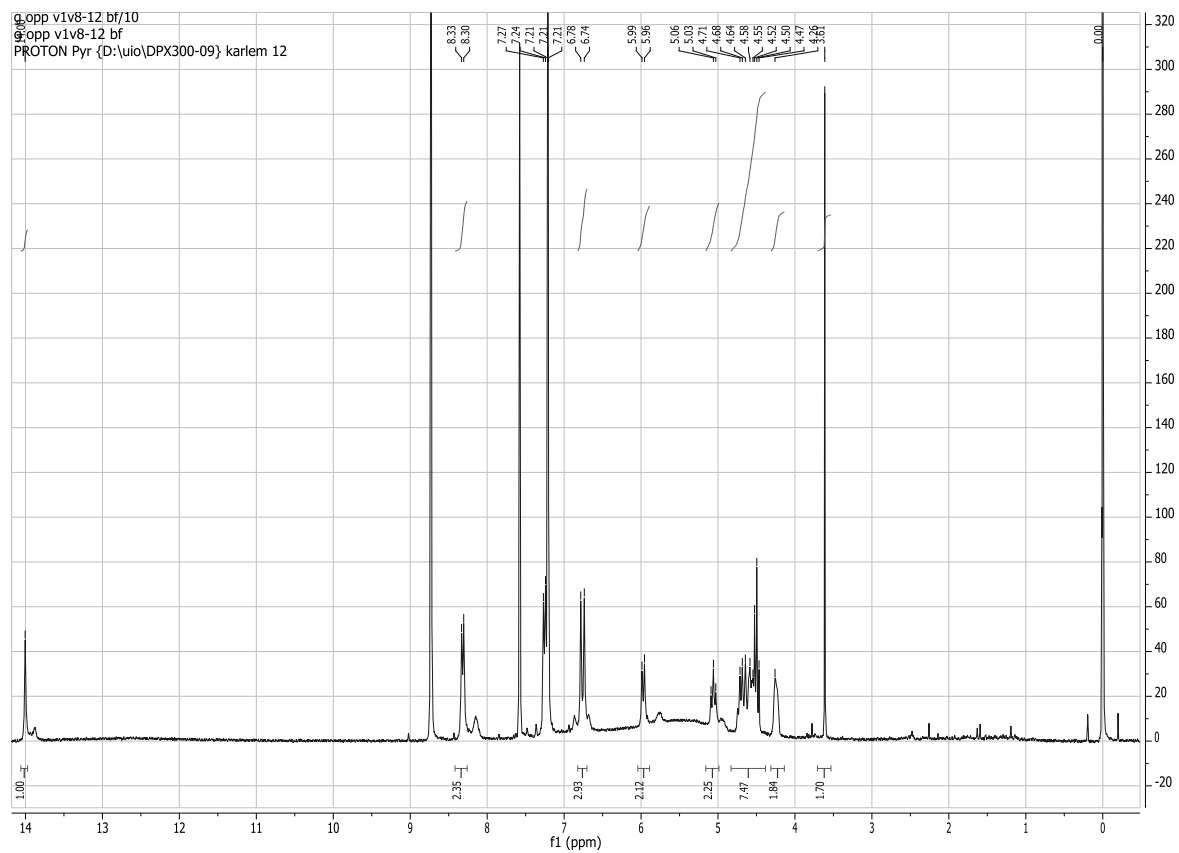
### 9.3.3 $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av EtOAc råekstrakt av *G. oppositifolius*



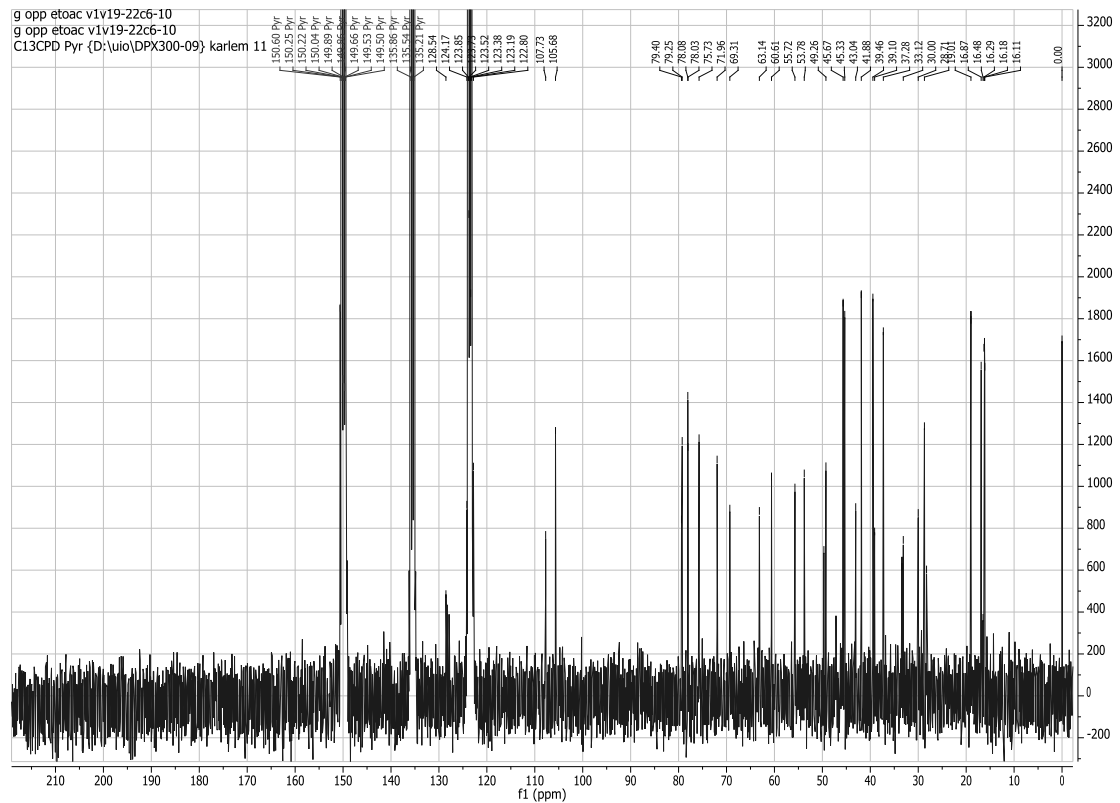
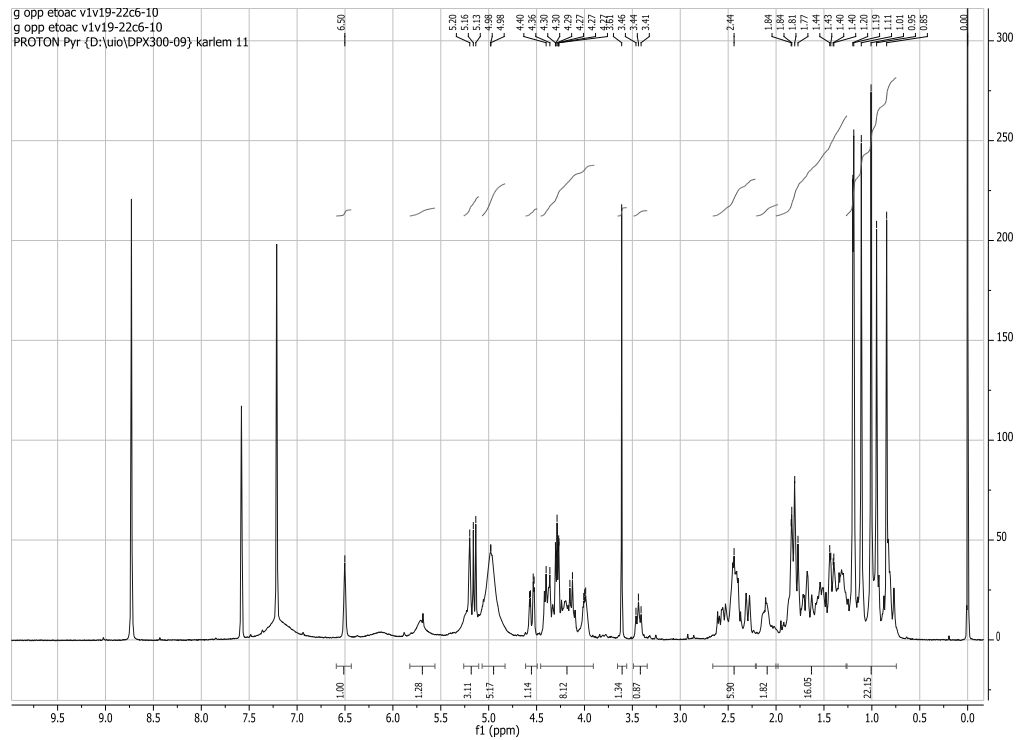
### 9.3.3.1 $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av EtOAc fraksjon EV1.



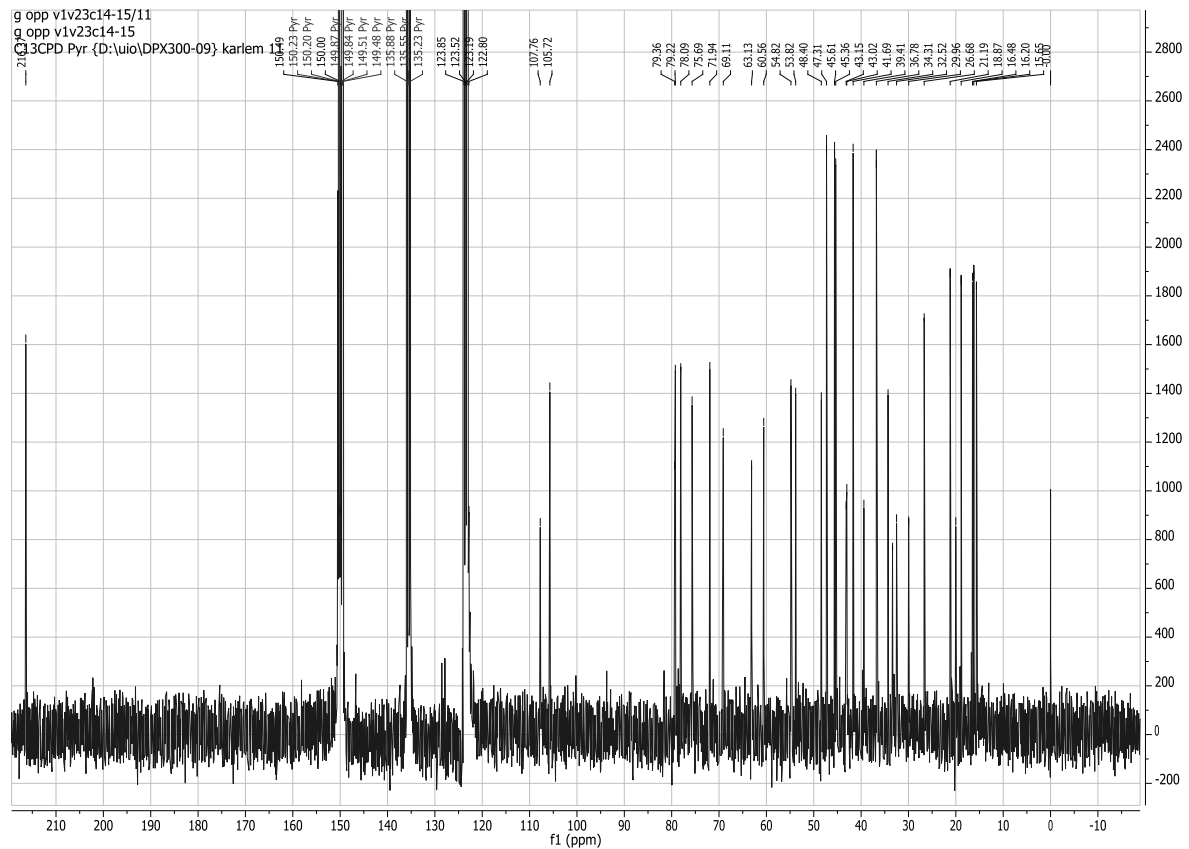
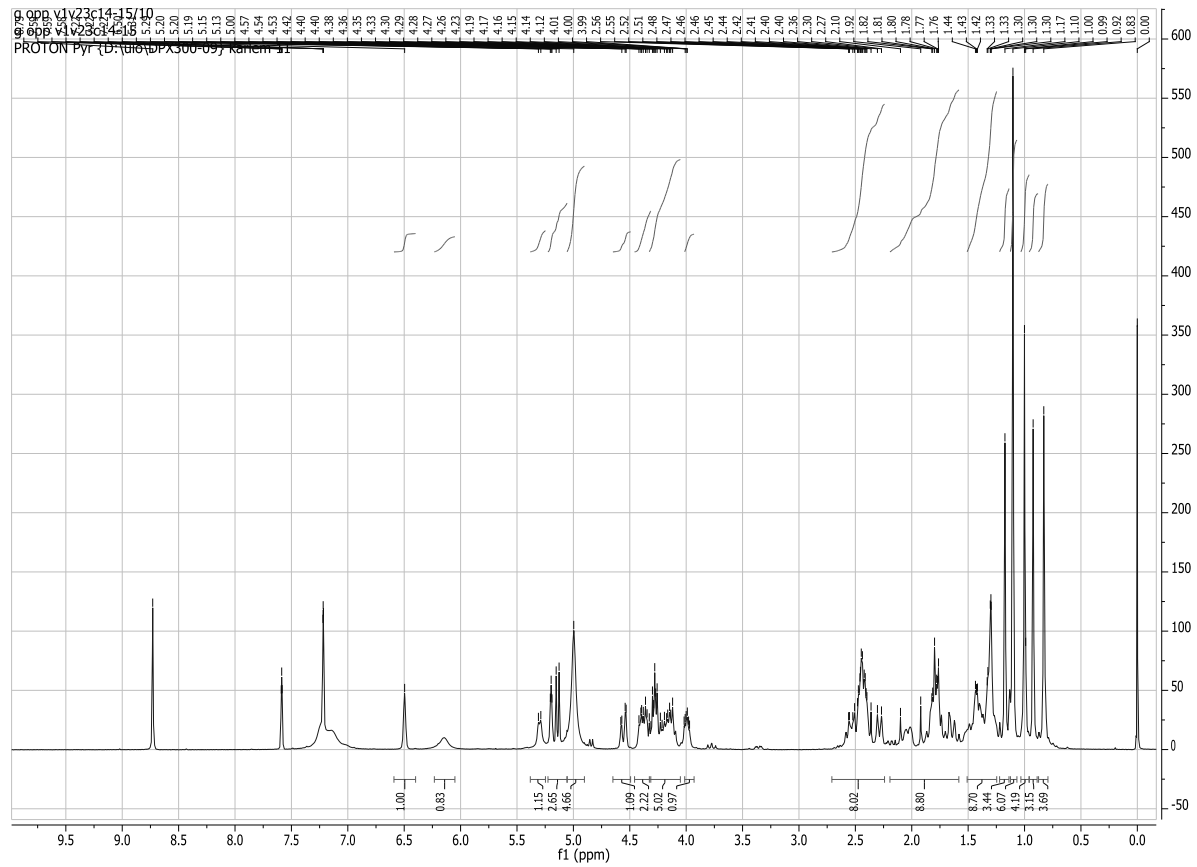
### 9.3.3.1a <sup>1</sup>H NMR spektrum av EtOAc fraksjon EV1V3



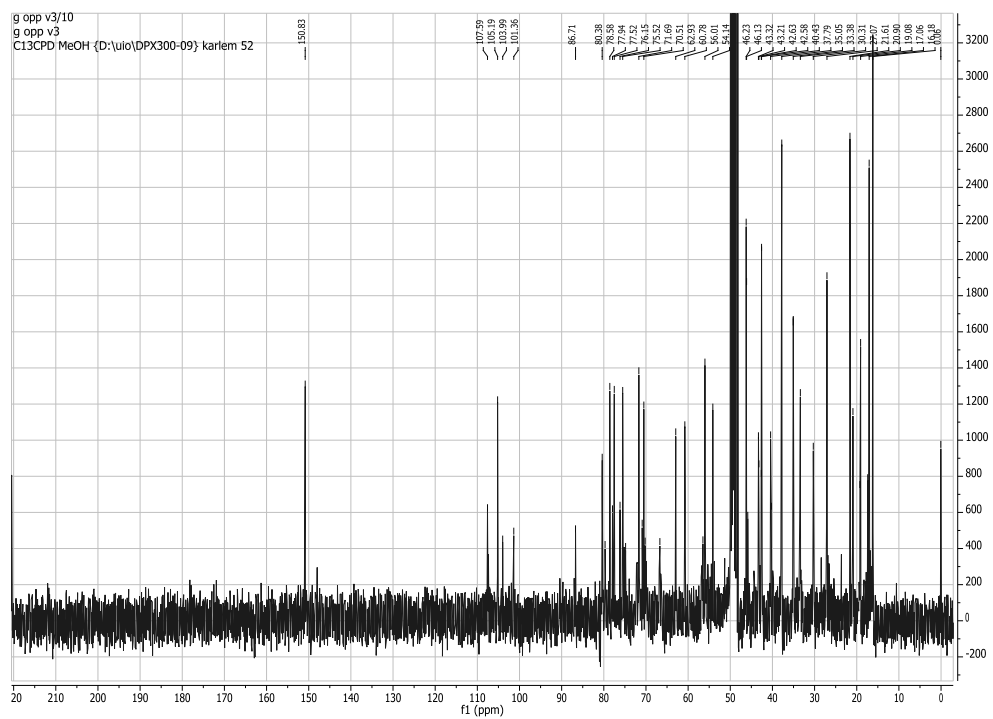
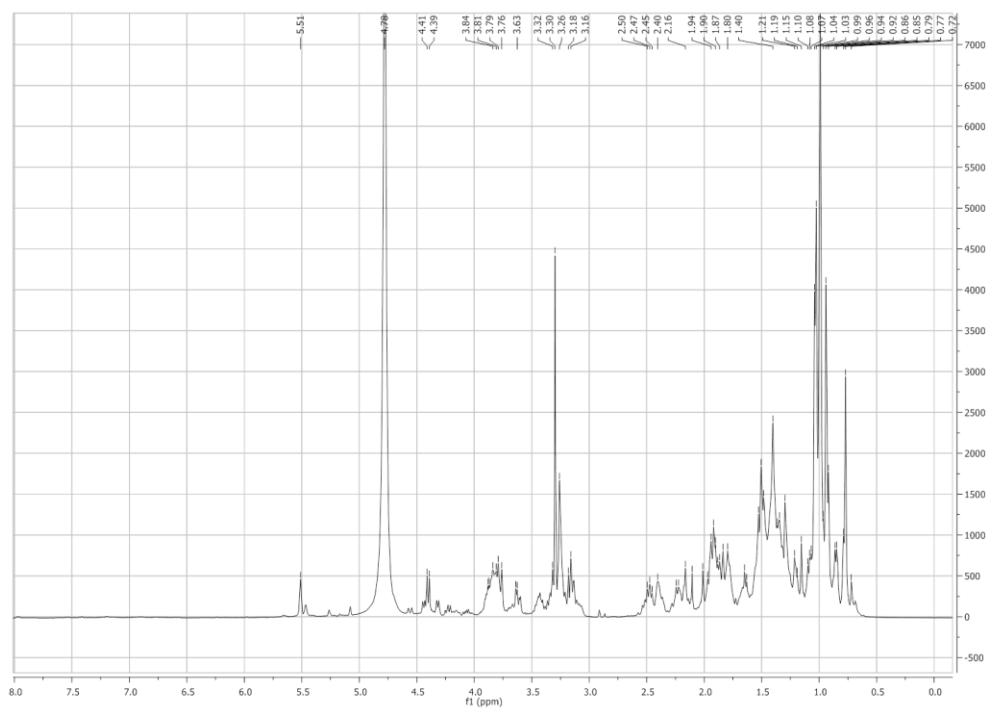
### 9.3.3.1b $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av EtOAc fraksjon EV1V8C6-10.



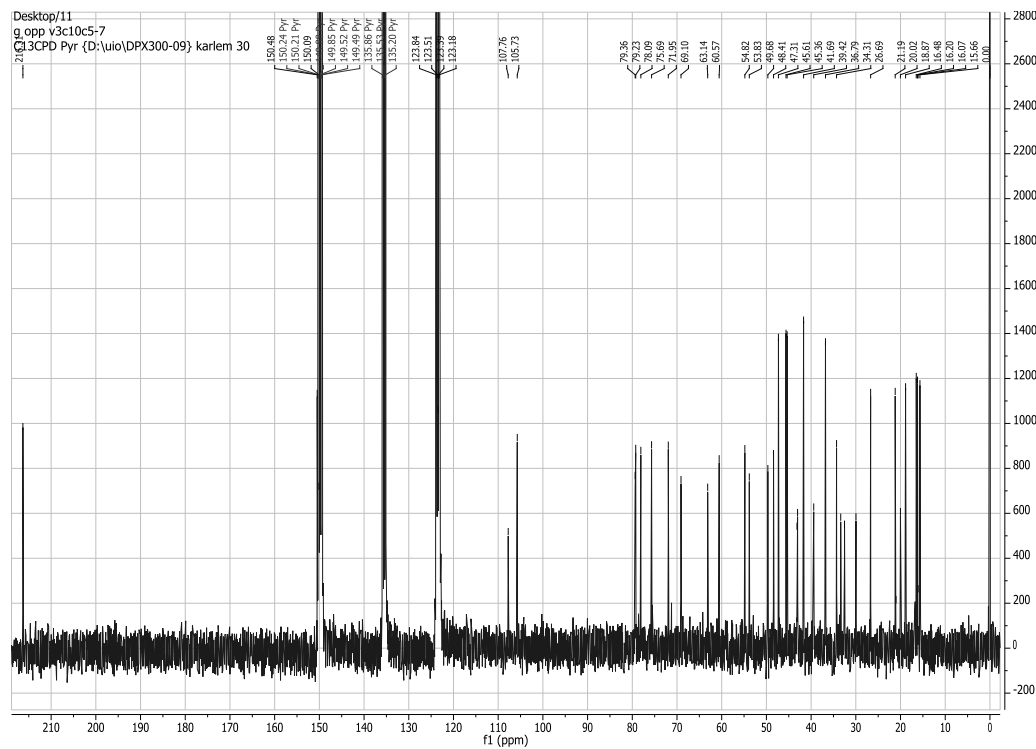
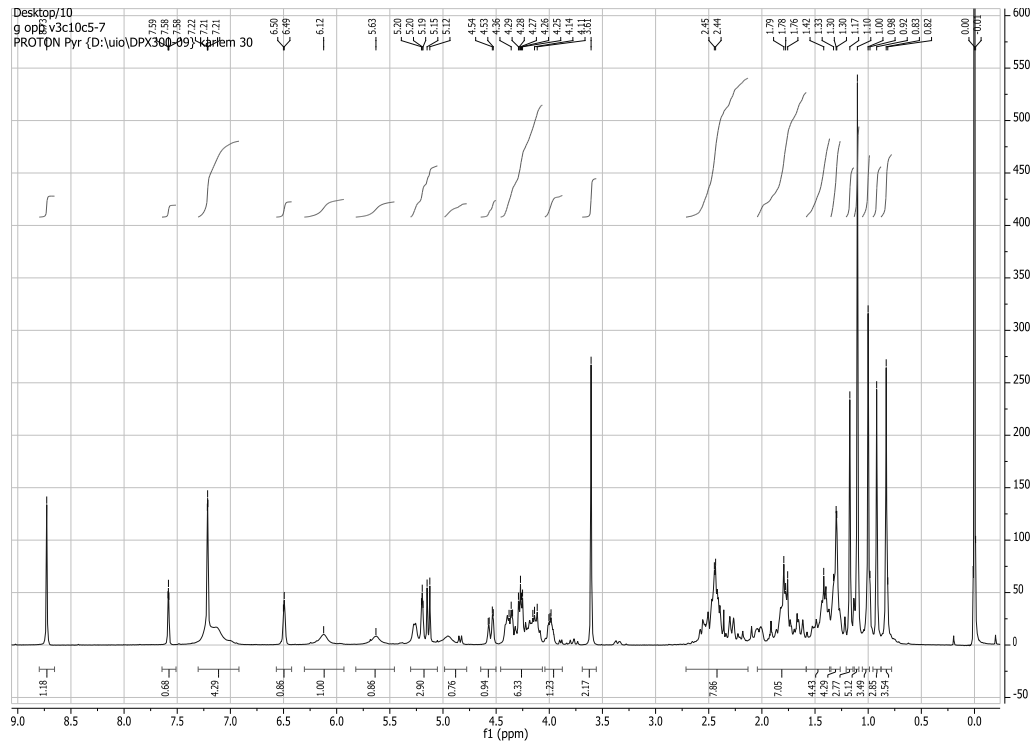
### 9.3.3.1C <sup>1</sup>H og <sup>13</sup>C NMR spektra av EtOAc fraksjon EV1V9C5



### 9.3.3.2 1H og 13C NMR spektra av fraksjon EV3.

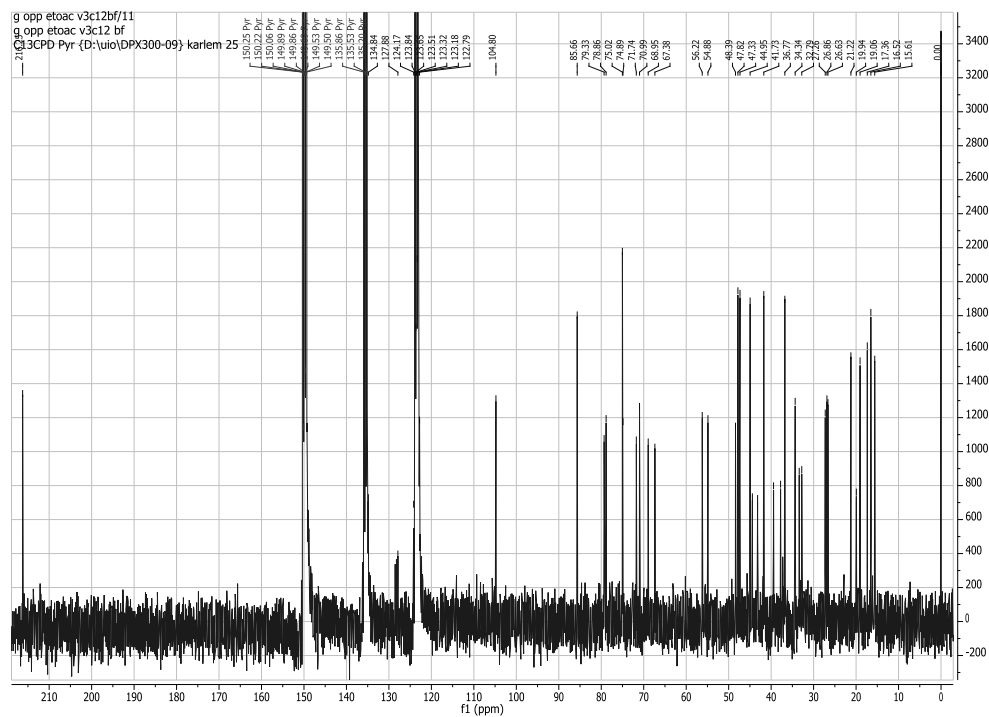
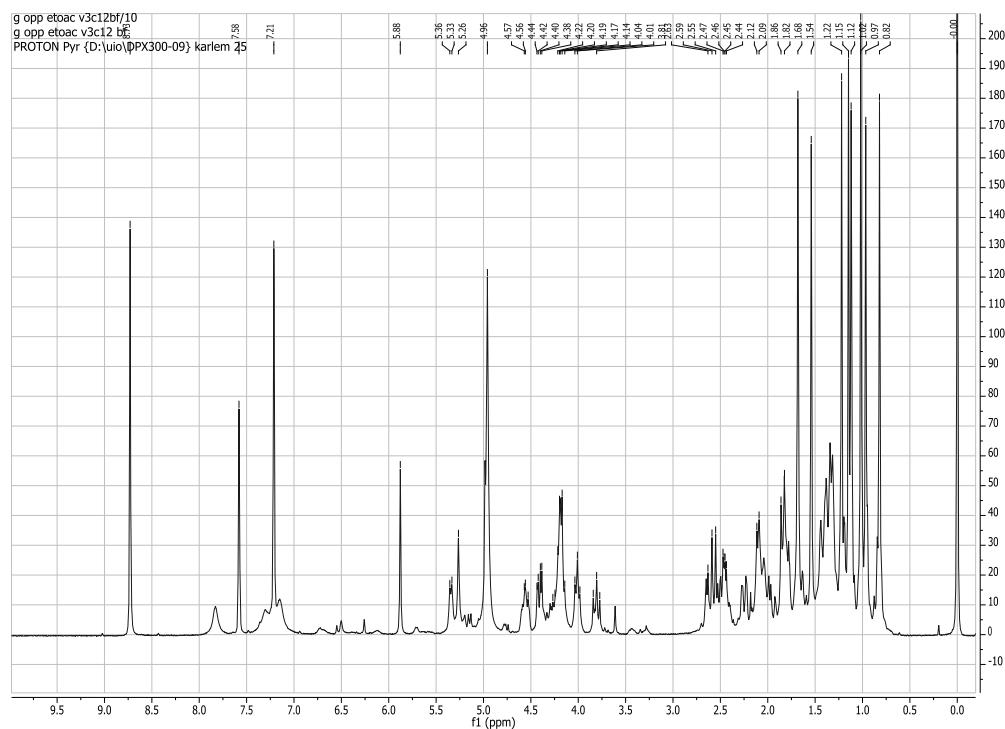


### 9.3.3.2 a <sup>1</sup>H og <sup>13</sup>C NMR spektra av fraksjon EV3C5C-7

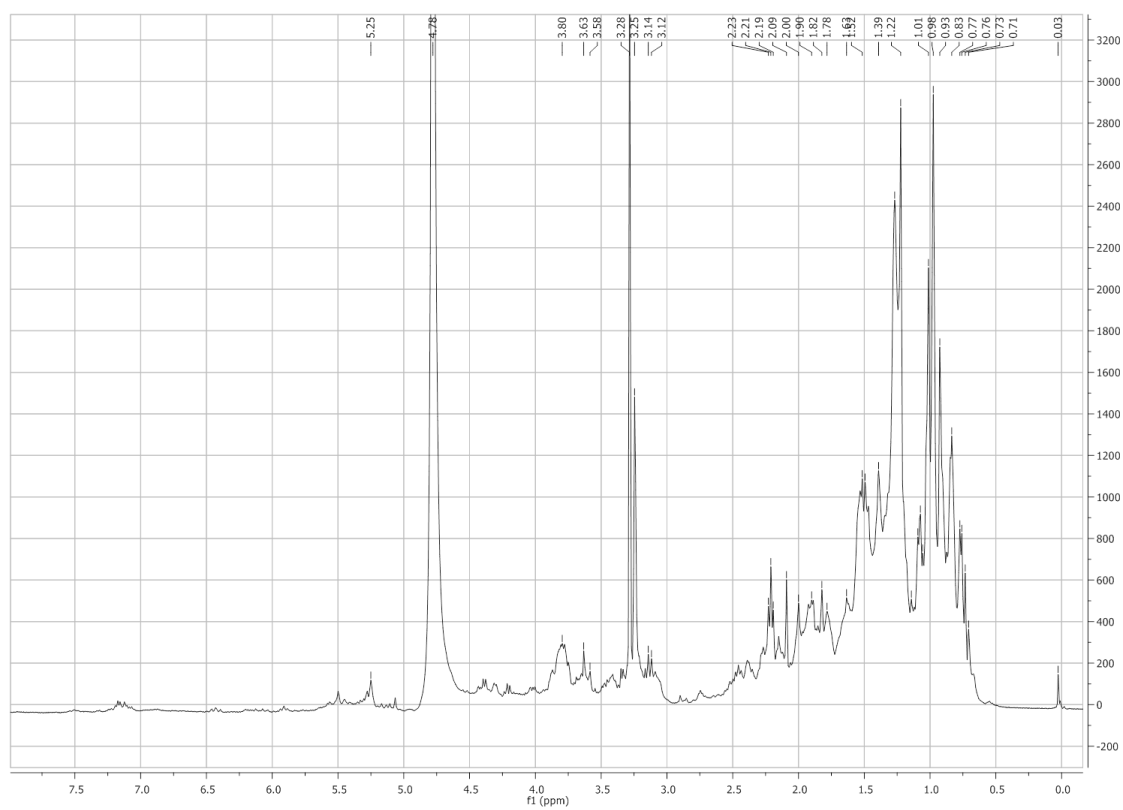




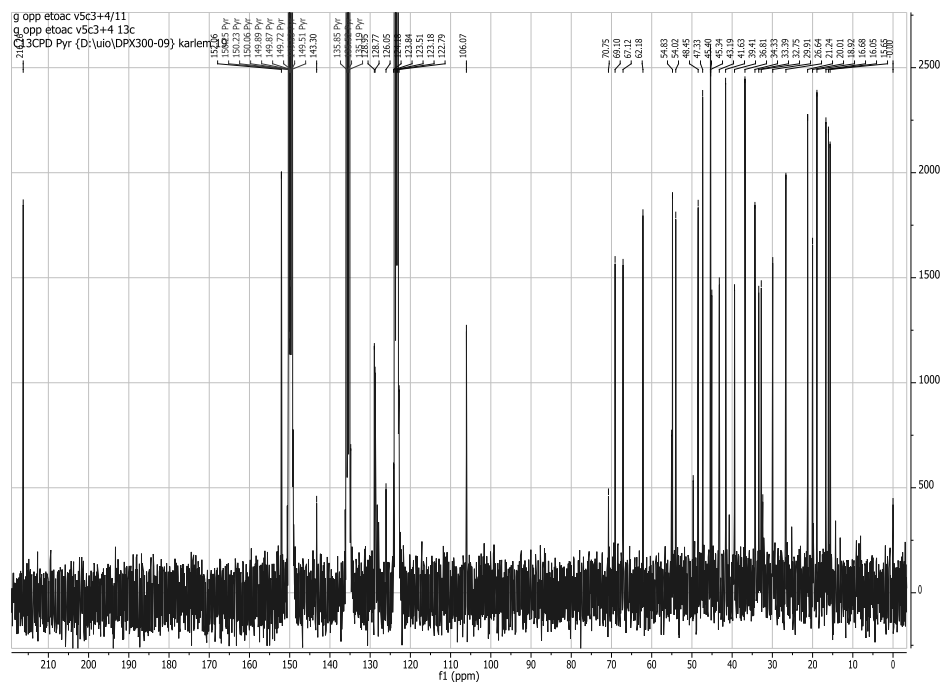
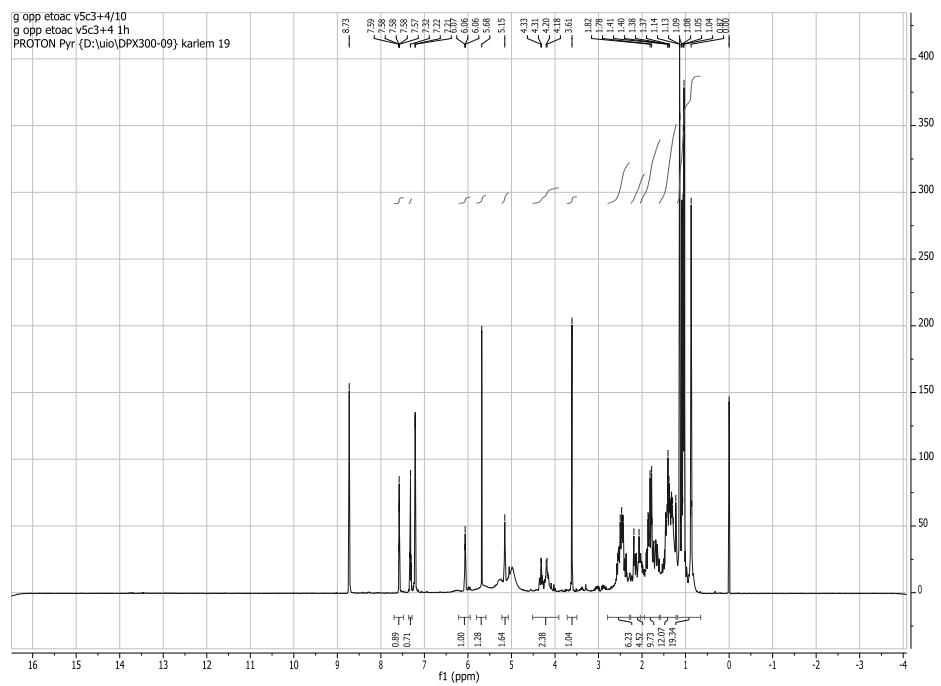
### 9.3.3.2.b $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av fraksjon EV3C7



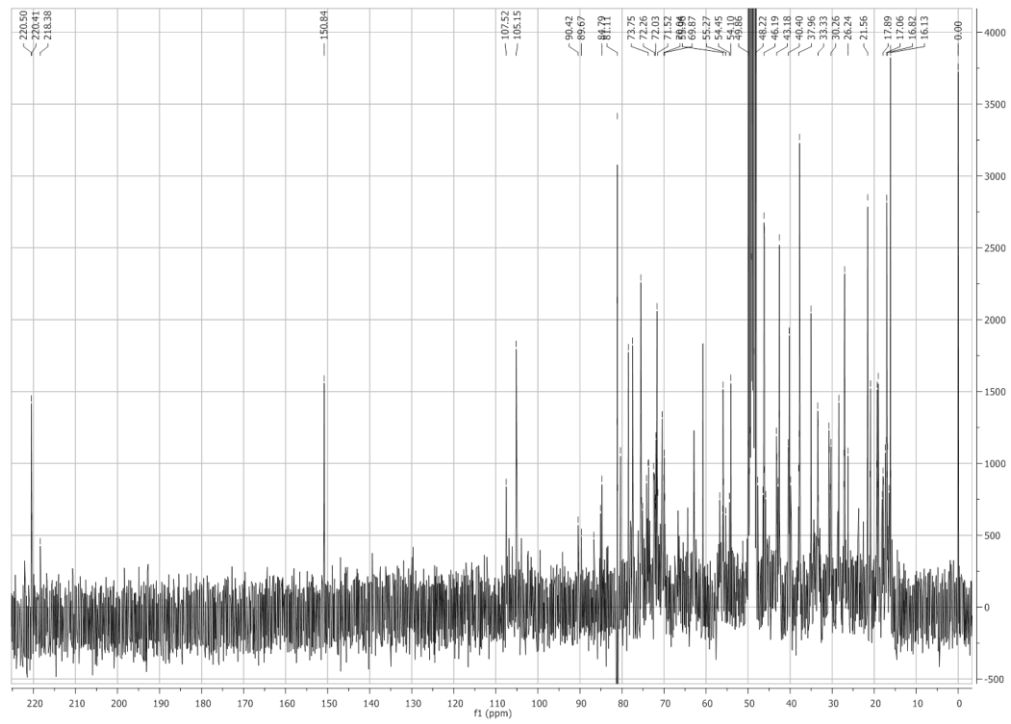
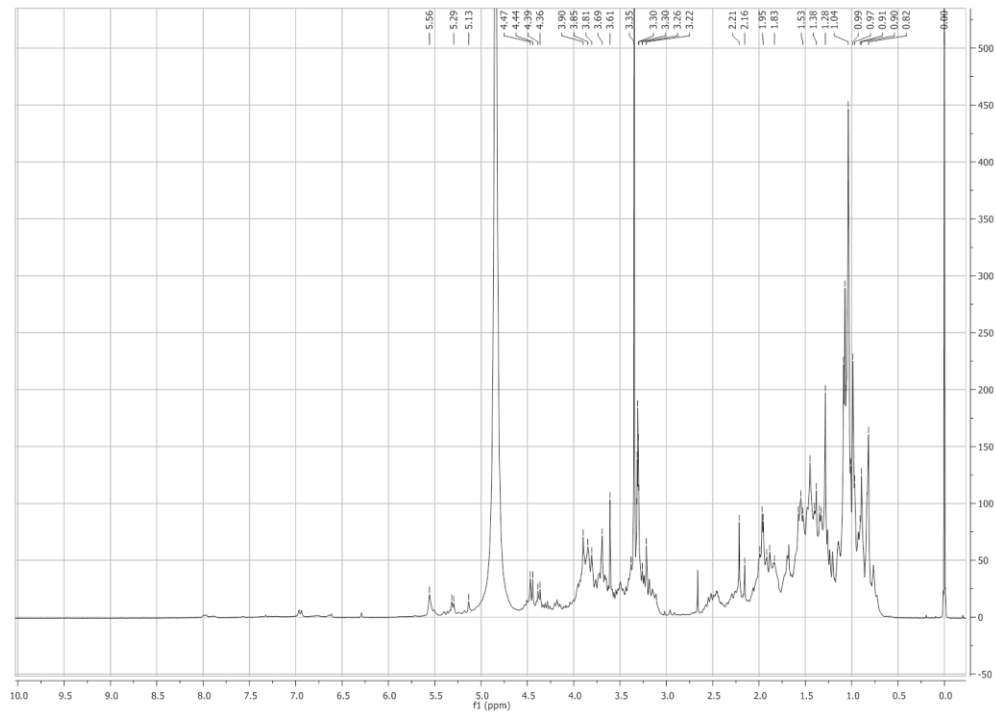
### 9.3.3.3 $^1\text{H}$ NMR spektrum av fraksjon EV5.



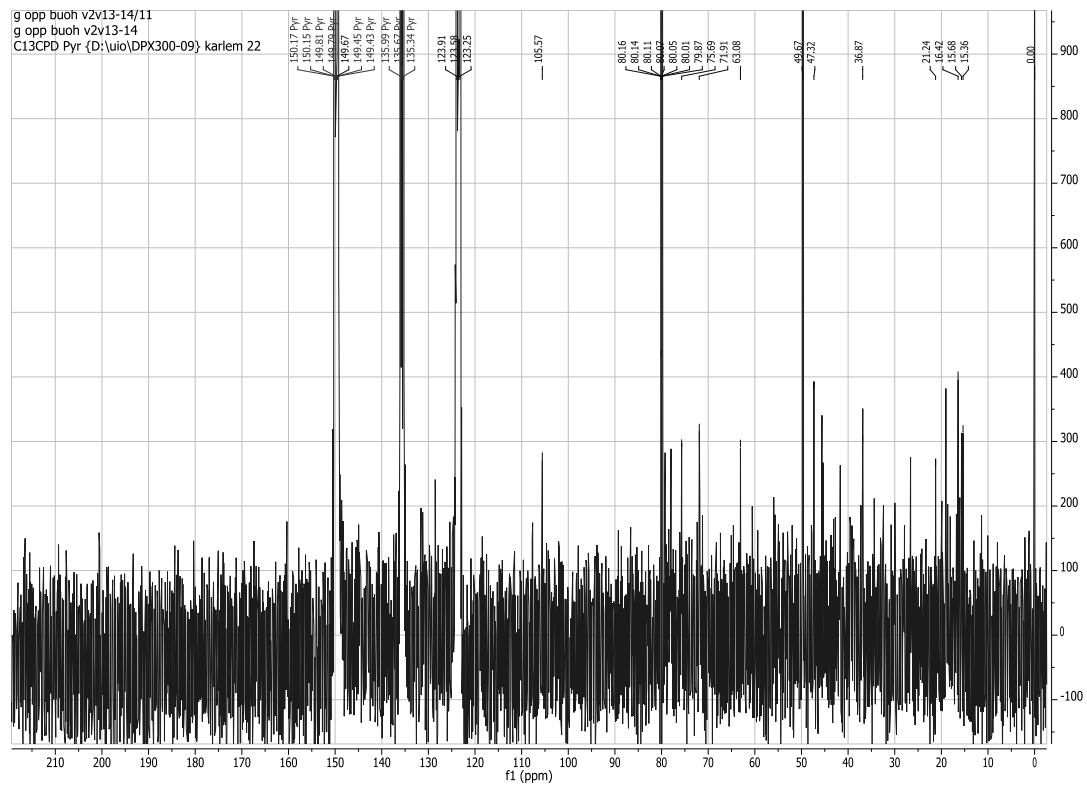
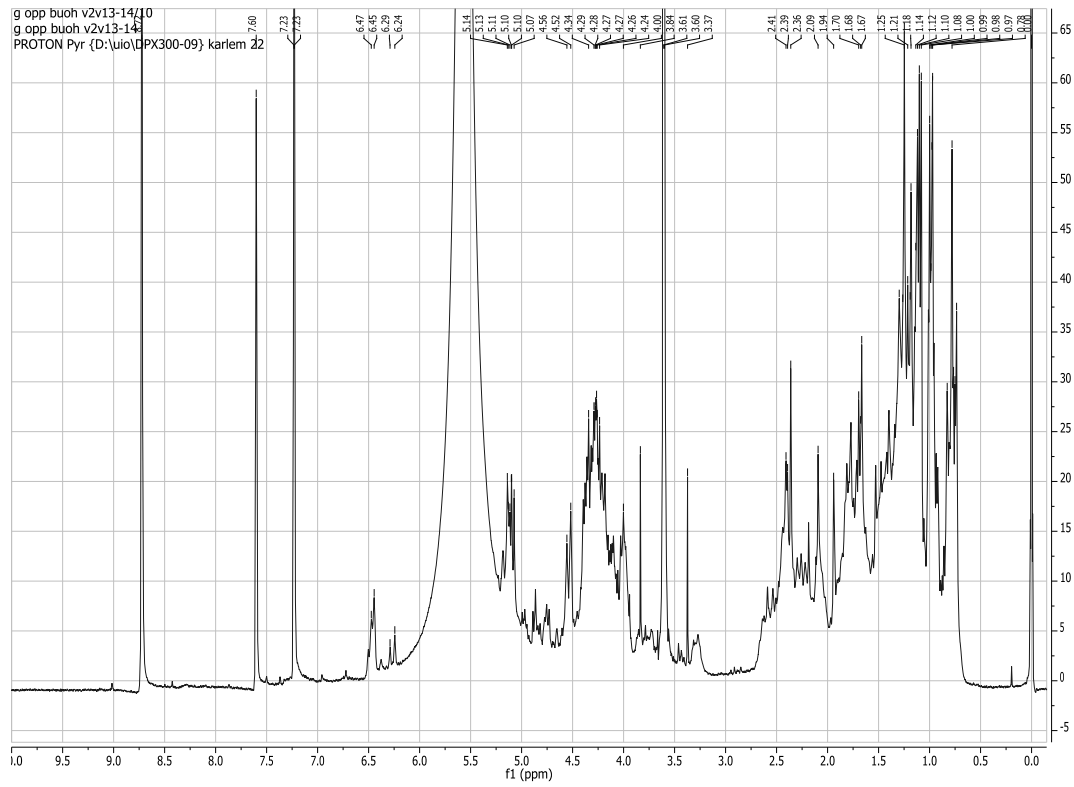
### 9.3.3.3a <sup>1</sup>H og <sup>13</sup>C NMR spektra av EtOAc fraksjon EV5C3+4.



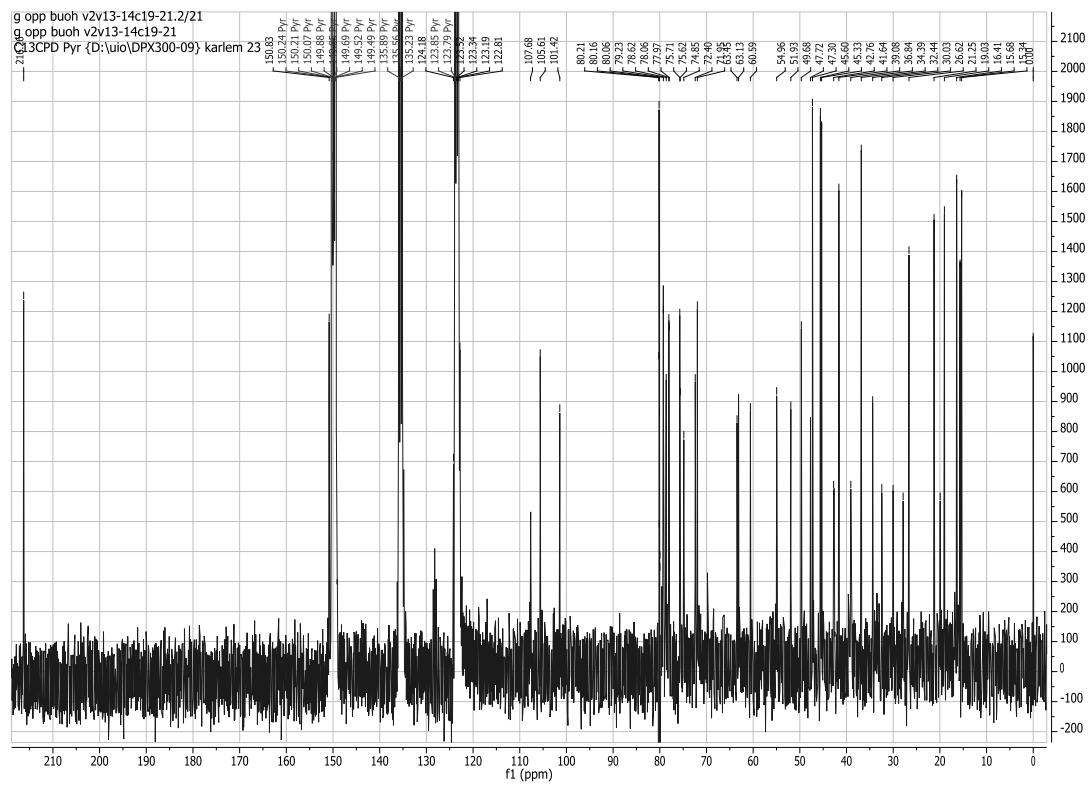
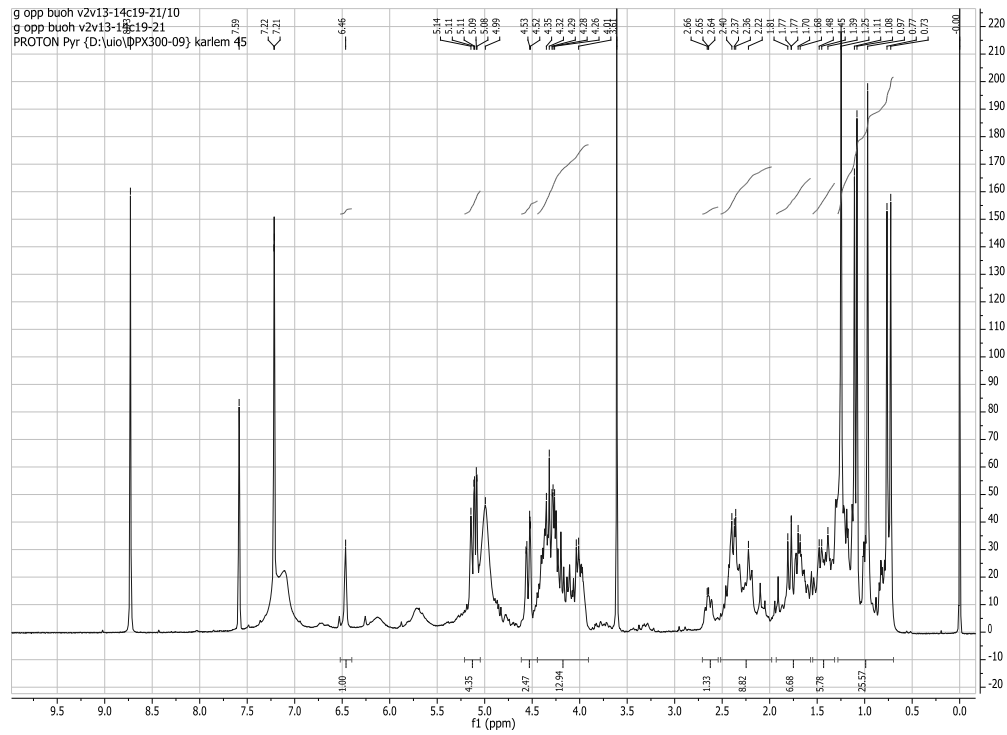
### 9.3.4 $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av BuOH-råekstrakt av *G. oppositifolius*



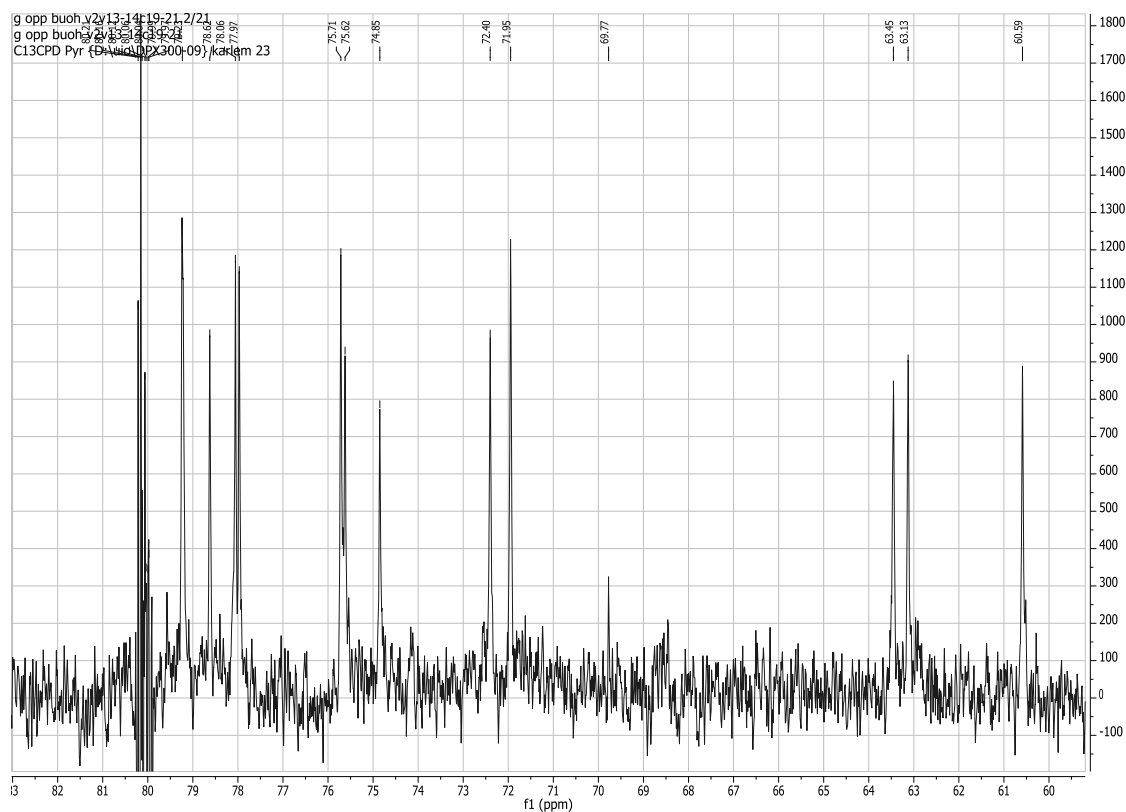
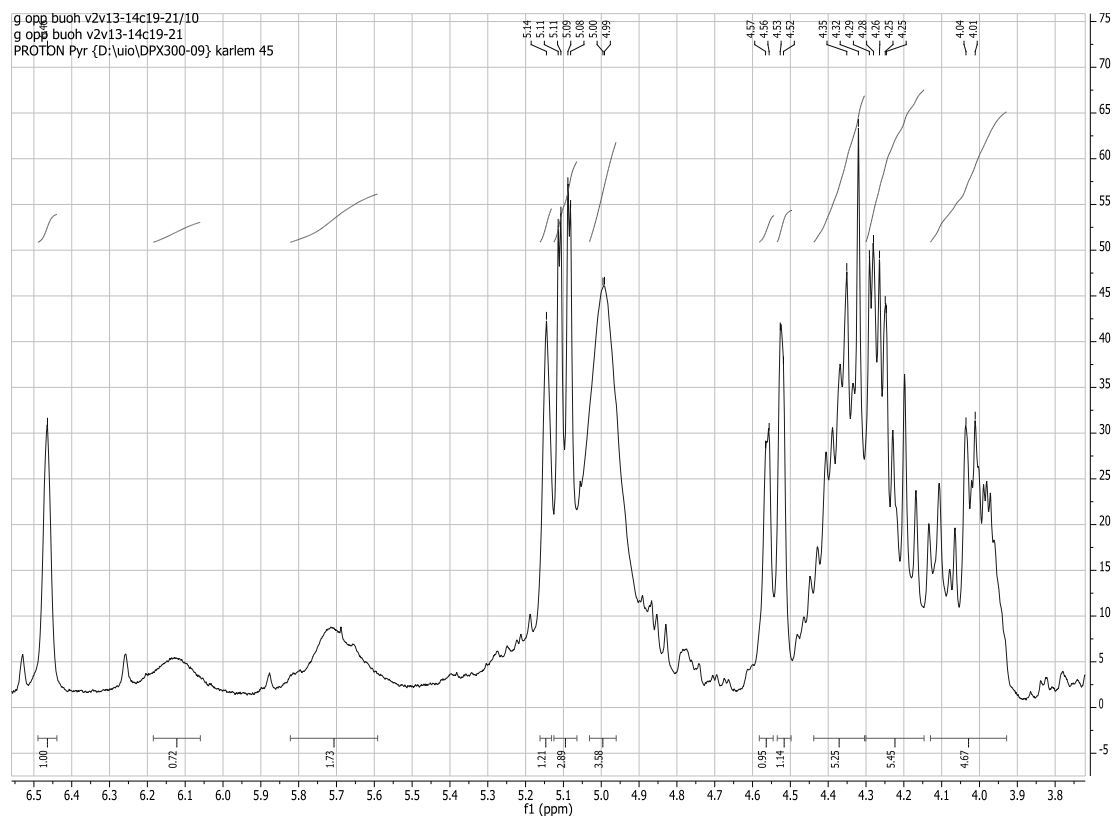
### 9.3.4.1a <sup>1</sup>H og <sup>13</sup>C NMR spektra av BuOH fraksjon BV2V6



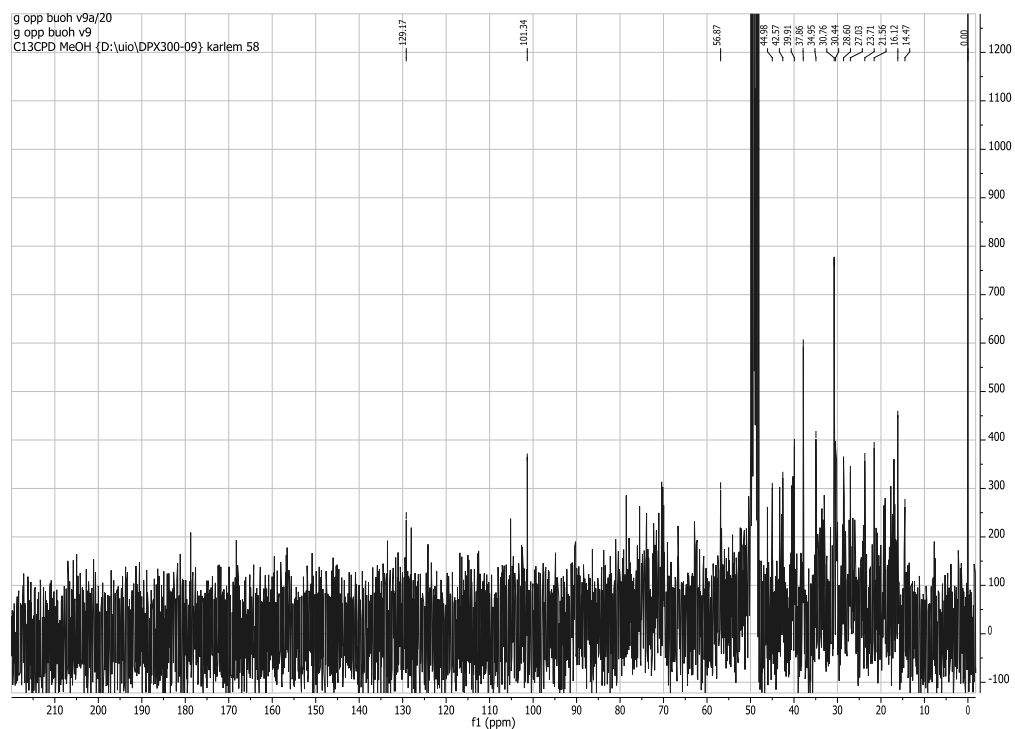
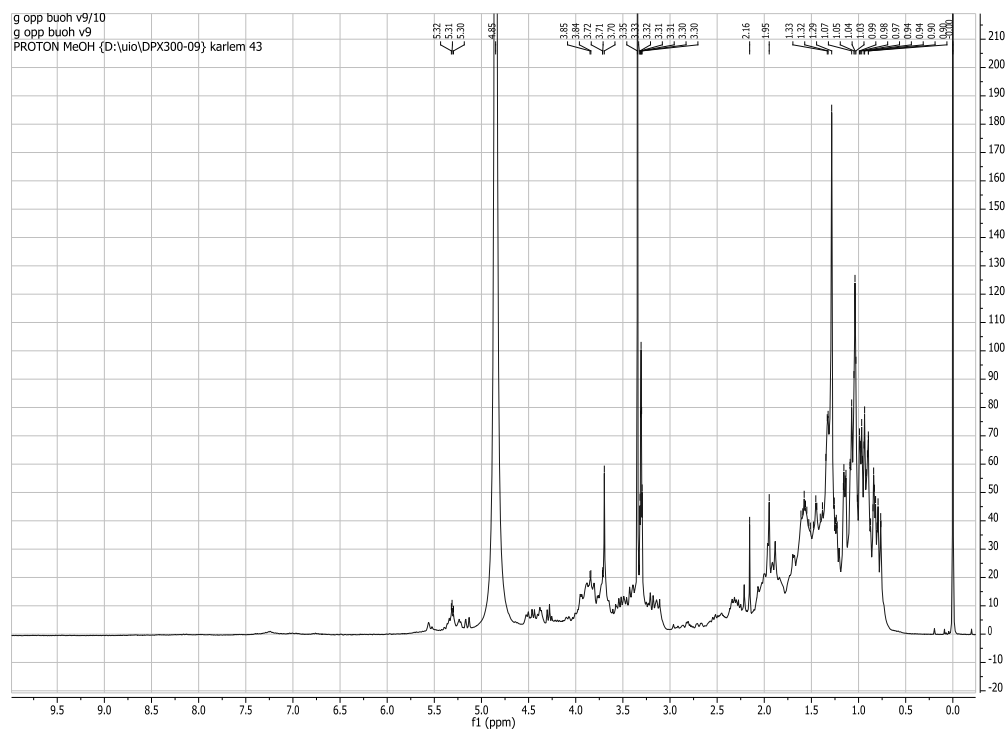
### 9.3.4.1b. $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av BuOH fraksjon BV2V6C10.



### 9.3.4.2bb. Utsnitt av $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av BuOH fraksjon BV2V6C10

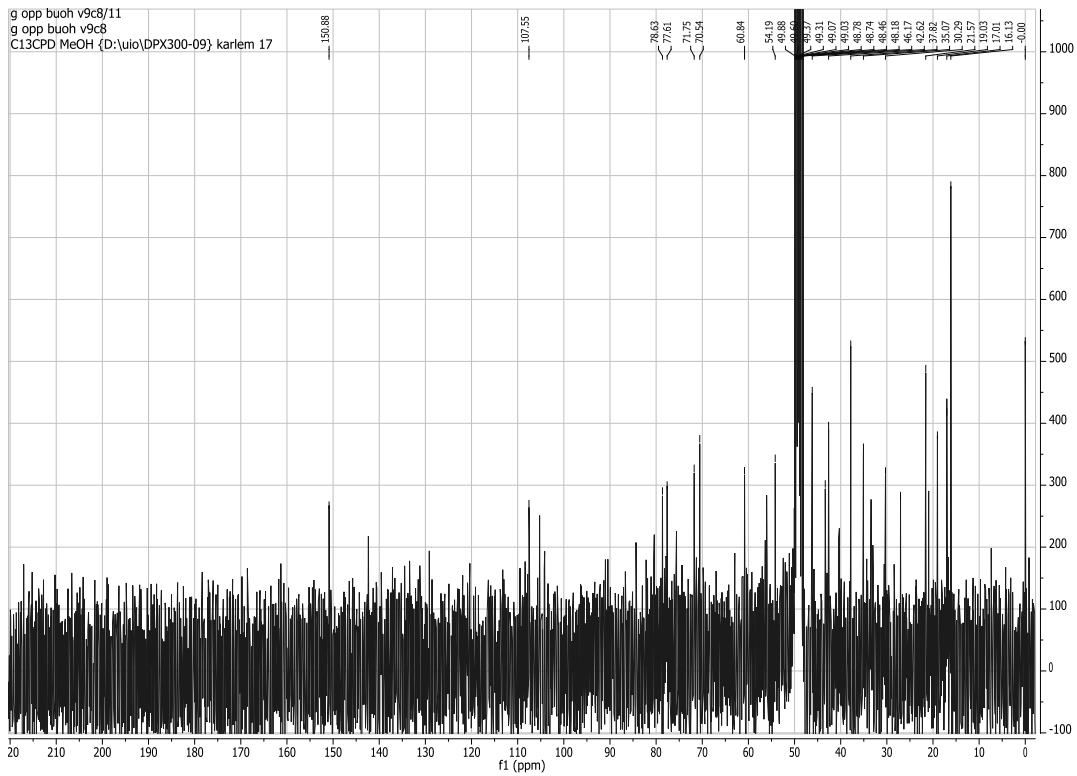
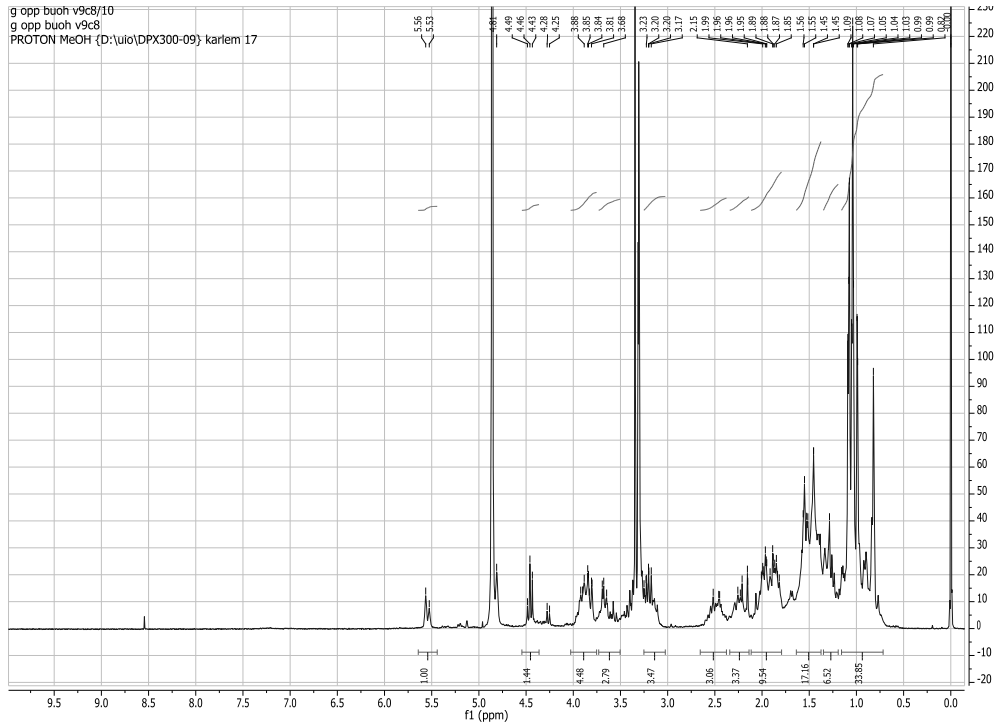


### 9.3.4.2 $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av BuOH fraksjon BV9.

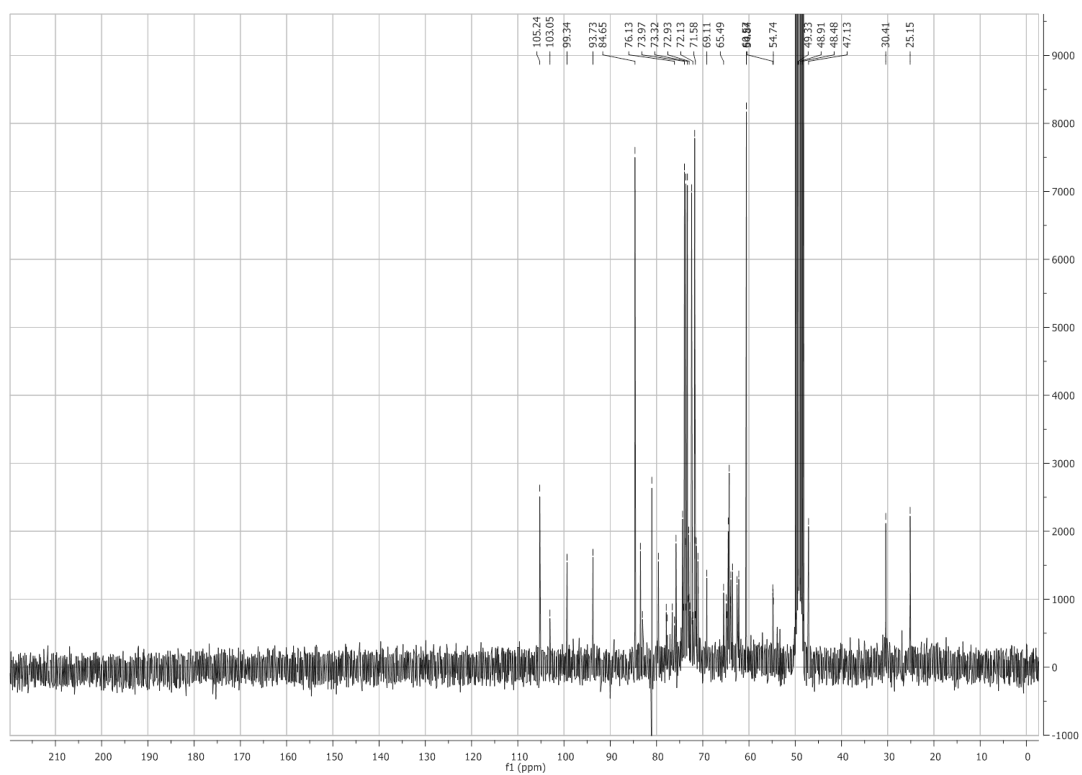
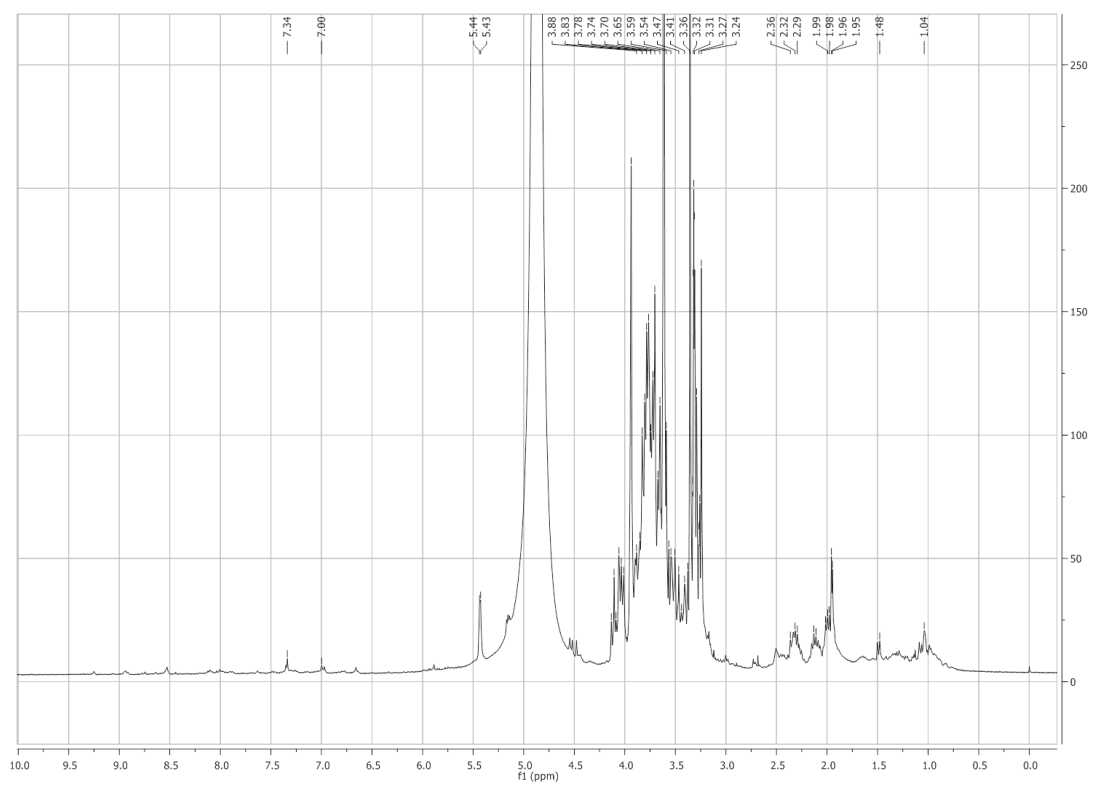




9.3.4.2a <sup>1</sup>H og <sup>13</sup>C NMR spektra av fraksjon BV9C8



### 9.3.5 $^1\text{H}$ og $^{13}\text{C}$ NMR spektra av vannekstrakt av *G. oppositifolius*



# Referanser

- Aarnes, H. (2011). "Saponiner." Aksessert 12.04.2012, from <http://www.mn.uio.no/bio/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/s/saponiner.html>.
- Anonym (2010) "Acute toxicity test on brine shrimp (*Artemia salina*)." aksessert 25.04.2012, fra [http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/studijni\\_materialy/Ekotox-Labo/AJverze/6\\_Eng\\_Artemia.pdf](http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/studijni_materialy/Ekotox-Labo/AJverze/6_Eng_Artemia.pdf).
- Akowuah, G. A., Zhari, I., Sadikun, A. og Norhayati I. (2006). "HPTLC densitometric analysis of *Orthosiphon stamineus* leaf extracts and inhibitory effect on xanthine oxidase activity." *Pharmaceutical Biology* **44** : 65-70.
- Asokkumar, K., Umamaheswari, M., Sivashanmugam, A.T., Subhadradevi, V., Subhashini, N. og Ravi, N. (2009). "Free radical scavenging and antioxidant activities of *Glinus oppositifolius* (carpet weed) using different in vitro assay systems." *Pharmaceutical Biology* **47**: 474-482.
- Ayinde, B. A. og Owolabi, O.J. (2009). "Effects of the aqueous extract of *Ficus capensis* Thunb. (Moraceae) leaf on gastrointestinal motility." *Journal of pharmacognosy and phytotherapy* **1**: 31-35.
- Austarheim, I. (2007). *I. Biologiske aktive polysakkarider fra Glinus oppositifolius (L.) Aug. DC , II Ethnopharmacological survey in Mali.* Mastergradsavhandling, Universitetet i Oslo.
- Barnes, T. G. og Francis, S.W. (2004). "Wildflowers and ferns of Kentucky " Aksessert 04.05.2012, fra <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=HEIN>
- Bhattacharya, S., Mathew, G., Jayne, D. G., Pelengaris, S., Khan, M. (2009). "15-Lipoxygenase-1 colorectal cancer: A review." *Tumor Biology* **30**: 185-199.
- Bruset, S. "Allopati." Aksessert 04.05.2012 fra [http://snl.no/sml\\_artikkel/allopati](http://snl.no/sml_artikkel/allopati).
- Bosch, C. H. (2006). "*Heliotropium steudneri*." Aksessert 09.05.2012, fra [http://database.prota.org/dbtw-wpd/exec/dbtwpub.dll?ac=qbe\\_query&bu=http://database.prota.org/search.htm&tn=protab~1&qb0=and&qf0=Species+Code&qj0=Heliotropium+steudneri&rf=Webdisplay](http://database.prota.org/dbtw-wpd/exec/dbtwpub.dll?ac=qbe_query&bu=http://database.prota.org/search.htm&tn=protab~1&qb0=and&qf0=Species+Code&qj0=Heliotropium+steudneri&rf=Webdisplay).

- Burkill, H. M. (1997). The useful plants of West tropical Africa, 2. utgave, bind 4. Royal Botanic Garden, Kew. Side 110-113, 194-197, 308-309.
- Burkill, H. M. (1985). The useful plants of West tropical Africa, 2. utgave, bind 1. Royal Botanic Gardens, Kew. Side 959.
- CIA (2012). "Central Intelligence Agency- The world factbook- Africa Mali." Akksessert 07.05.2012, fra <https://http://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/ml.html>.
- Diallo, D. (2000). Ethnopharmacological study of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (mimosaceae), *Trichilia emetica* (meliaceae). Ph.D. thesis, Universite de Lausanne
- Diallo, D., A.Marston, C. Terreaux , Y. Tour, B. Smestad Paulsen , K. Hostettmann (2001). "Screening of malian medicinal plants for antifungal, larvicidal, mollucidal, antioxidant and radical scavenging activities " Phytotherapy research **15**: 401-406.
- Dobrian, A. D., Lieb, D. C., Banumathi, C. K., Taylor-Fishwick D. A., Chakrabarti S. K., Nadler, J. L. (2011). "Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenase." Progress in lipid research **50**: 115-131.
- Duerr, C. (uten årstall) "Brine shrimp." Akksessert 25.04.2012, fra <http://seagrant.gso.uri.edu/factsheets/931brine.html>.
- Engler, og. Engler (2006). "The emerging role of flavanoid-rich cocoa and chocolate in cardiovascular health and disease." Nutrition reviews **64**: 109-118.
- Enroth, C., Eger, B.T., Okamoto, K., Nishino, T., Nishino, T. og Pai E.F. (2000). "Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion." Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America **97**: 10723-10728.
- Farnsworth, N. R. (2007). The role of ethnopharmacology in drug development Ciba Foundation Symposium 154 - Bioactive Compounds from Plants.
- Fakara Plants. "Guiera senegalensis J.G Gmel." Akksessert 09.05.2012, fra [http://www.jircas.affrc.go.jp/project/africa\\_dojofakara/FakaraPlants/Contents/Species\\_pages/Guierssen.html](http://www.jircas.affrc.go.jp/project/africa_dojofakara/FakaraPlants/Contents/Species_pages/Guierssen.html)
- Fiot, J., Sanon, S., Azas, N., Mahiou, V., Jansen, O., Angenot, L., Balansard, G., og Ollivier, E. (2006). "Phytochemical and pharmacological study of roots and

- leaves of *Guiera senegalensis* J.F Gmeø ( Combretaceae)." Journal of ethnopharmacology **106**: 173-178.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S., og Becker, K., (2002). "The biological action of saponins in animal systems: a review " British journal of nutrition **88**: 587-605.
- George, J., og Struthers, A.D. (2009). "Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress." Vascular health and risk management **5**: 265-272.
- Gleason, M. M., Rojas, C. J., Learn, K. S., Perrone, M. H., Bilder, G. E. (1995). "Characterization and inhibition of 15-lipoxygenase in human monocytes: comparison with soybean 15- lipoxygenase." American journal of physiology-cell physiology **258**: C1301-1307.
- Globinmed (2011). "*Heliotropium indicum* L. (Boraginaceae) " Aksessert 04.05.2012, fra [http://www.globinmed.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=78943:heliotropium-indicum-l-boraginaceae&catid=710:h](http://www.globinmed.com/index.php?option=com_content&view=article&id=78943:heliotropium-indicum-l-boraginaceae&catid=710:h).
- Grønhaug, T. E. (2011). "*Opilia celtidifolia* " Aksessert 04.05.2012, fra <http://www.mn.uio.no/farmasi/english/research/projects/maliplants/medicinal-plants/studied-in-norway/opilia-celtidifolia.html>.
- Grønhaug, T. E., Ghildyal, P., Barsett, H., Michaelsen , T.E., Morris, G., Diallo, D., Inngjerdigen, M., og Paulsen, B.S. (2010). "Bioactive arabinogalactans from leaves of *Opilia celtidifolia* Endl. ex Walp. (Opiliaceae)." Glycobiology **20**: 1654-1664.
- Gundersen, D. (2011). Fremmedord og synonymer blå ordbok. Kunnskapsforlaget, Oslo.
- Halliwell, B. (1991). "Drug antioxidant effects, A basis for drug selection? ." Drugs **42**: 569-605.
- Halliwell, B. (2005). "Free radicals and other reactive species in disease." Encyclopedia of life sciences, from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0003913/pdf>.
- Harrison Research uten år "The Chromatotron." Aksessert 13.04.2012, fra <http://www.sbwave.com/chromatotron/index.html>.

- Heim, K. E., Tagliaferro, A.R. og Bobilya, D.J., (2002). "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships." Journal of nutritional biochemistry **13**: 572-584.
- Heinrich, M. og Gibbons, S. (2001). "Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution " Pharmacy and Pharmacology 425-432.
- Hostettmann, K. og Marston., A. (1995). Saponins, Cambridge University. Press, Cambridge
- Inngjerdengen, K., Nergård, C.S., Diallo, D., Mounkoro, P. P., og Paulsen, B.S. (2004). "An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland, Mali, West Africa." Journal og ethnopharmacology **92**: 233-244.
- Kim, J.H., Lee, B.C., Kim, J.H, Sim, G.S, Lee, D.H., Lee, K.E., Yun Y.P og Pyo H.B (2005). " The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*." Archives of Pharmacal Research **28**: 195-202.
- Kokwaro, J. O. (1993). Medical plants of east Africa, 2. utgave, Kenya literature Bureau, Nairobi.
- Lapenna, D., Ciofani, G., Pierdomenico, S. D., Giamberardino M. A., Cuccurullo, F. (2003). "Dihydrolipoic acid inhibits 15-lipoxygenase- dependent lipid peroxidation " Free radical biology & medicine **35**: 1203-1209.
- Lavelli, V., Peri, C., og Rizzolo, A. (2000). "Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using xanthine oxidase, myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidations." Journal of agricultural and food chemistry **48**: 5630-5639.
- Lehane, A. M. og Saliba, K.J. (2008). "Common dietary flavonoids inhibit the growth of the intraerythrocytic malaria parasite " BMC research notes **1**(26): 5 sider.
- Lumbile, A. U., Mogotsi, K.K. (2008). "Ficus sur " Aksessert 07.05.2012, fra [http://database.prota.org/dbtw-wpd/exec/dbtwpub.dll?ac=qbe\\_query&bu=http://database.prota.org/search.htm&tn=protab~1&qb0=and&qf0=Species+Code&qj0=Ficus+sur&rf=Webdisplay](http://database.prota.org/dbtw-wpd/exec/dbtwpub.dll?ac=qbe_query&bu=http://database.prota.org/search.htm&tn=protab~1&qb0=and&qf0=Species+Code&qj0=Ficus+sur&rf=Webdisplay)
- Lyckander, I. M. og Malterud, K. E. (1990). "Lipoxygenase inhibiting flavonoids from *Orthosiphon spicatus*." Flavonoids in biology & medicine III(Flavonoid research ): 469-474. University of Singapore, Singapore.

- Lyckander, I. M. og Malterud, K. E. (1992). "Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* as inhibitors of 15-lipoxygenase." Acta Pharmaceutica Nordica **4**: 159-166.
- Lyckander, I. M. og Malterud, K. E. (1996). "Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* prevent oxidative inactivation av 15-lipoxygenase." Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acid **54**: 239-246.
- Inngjerdingen, K. T., Debes, S.C., Inngjerdingen, M., Hokputsa, S., Harding, S.E., Rolstad, B., Michaelsen, T.E., Diallo, D., og Paulsen, B.S. (2005). "Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization." Journal of ethnopharmacology **101**: 204-212.
- Inngjerdingen, K. T. (2007). Bioactive pectic polymers from malian medicinal plants. Ph.D. avhandling, Universitet Oslo.
- Islam, M. J., Barua, S., Das, S., Khan, M.S., og Ahmed, A. (2008). "Antibacterial activity of some indigenous medicinal plants " Journal of soil and nature **2**: 26-28.
- Makita, K., Falck, J. R., Falck og Capdevila J. H (1996). "Cytochrome P450, the arachidonic acid cascade, and hypertension: new vistas for an old enzyme system." The FASEB Journal **10**: 1456-1463.
- Molyneux, P. (2004). "The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity." Songklanakarin journal of Science and technology **26**: 211-219.
- Malterud, K. E., Farbrot, T.L., Huse., A.E., og Sund, R.B. (1993). "Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones." Pharmacology **47**(Suppl. 1): 77-85.
- Molyneux, P. (2004). "The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity." Songklanakarin journal of science and technology **26**: 211-219.
- Nguyen, M. T. T., Awale, S., Tezuka, Y., Tran, Q.L., Watanabe, H., og Kadota, S. (2004). "Xanthine oxidase inhibitory activity of vietnamese medicinal plants." Biological and pharmaceutical bulletin **27**: 1414-1421.
- Negi, J. S., Pramod, S., Pant, G. J. N. og Rawat M. S. M. (2011). "High-performance liquid chromatography analysis of plant saponins: An update 2005-2010." Pharmacognosy Reviews **5**: 155-158.

- Olowokudejo, J. D., Kadiri A.B., og Travih V.A (2008). "An ethnobotanical survey of herbal markets and medicinal plants in Lagos state of Nigeria " Ethnobotanical leaflets **12**: 851-865.
- Olurische, T., Kwanashie, H., og Anuka, K. (2006). "Effect of *Khaya senegalensis* on uterine contractility in rats " Journal of pharmacy & bioresources **3**: 30-35.
- Oyeleke, S. B., Dauda, B.E.N., Boye, O.A. (2008). "Antibacterial activity of *Ficus capensis* " African journal of biotechnology **7**: 1414-1417.
- Pacher, P., Nivorozhkin, A., og Csaba, S. (2006). "Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: Renaissance half a century after the discovery of Allopurinol. ." Pharmacological Reviews **58**:87-114.
- Parthasarathy, S., Wieland, E og Steinberg, D. (1988). "A role of endothelial cell lipoxxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein " (86): 1046-1050.
- Paulsen, B. S. (2012). Forelesningsnotater i Farmasøytiske naturstoffer (FRM 5410), Universitet i Oslo.
- Pedersen-Bjergaard, S. o. R. K. E. (2004). Legemiddelanalyse. Bergen, Fagbokforlaget.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J. (2007). Pharmacology. Edinburgh Skottland, Churchill Livingstone.
- Rao, S., Kalva, S., Yerramilli A. og Mamidi S., (2011). "Free radicals and tissue damage: Role of antioxidants." Free radicals and antioxidants**1**(4): 2-7
- Reddy, J. S., Rao, P.S. og Reddy, M.S. (2002). "Wound healing effects of *Heliotropium indicum*, *Plumbago zeylanicum* and *Acalypha indica* in rats " Journal of ethnopharmacology **79**: 249-251.
- Reuch, W. (2010) "NMR " Aksessert 20.04.2012, fra <http://www.cem.msu.edu/~reusch/OrgPage/nmr.htm>.
- Sahakitpichan, P., Disadee, W., Ruchirawat, S. Og Kanchanapoom, T. (2010). L-(*N-trans*-cinnamyl)-arginine, an acylamino acid from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC. Molecules **15** : 6186-6192.
- Samuelsson, B., Dahlen, S.E., Lindgren, J.Å., og Rouzer C.A, Serhan, C.N. (1987). "Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects." Science **237**: 1171-1176.
- Shihata, I. M., El-Gendi, A.Y. og El-Malik, M.M (1977). "Pharmacochemical studies on saponin fraction of *Opilia celtidifolia*." Planta Medica **31**: 60-67.



- Shoot (2012). "Khaya senegalensis, bilde." Aksessert 09.05.2012, fra <http://www.shootgardening.co.uk/plant/khaya-senegalensis>.
- Soejarto, D. D., Fong, H.S.S, Tan, G.T., Zhang, H.J., Ma, C.Y., Franzblau, S.G., Gyllenhaal, C., Riley, M.C., Kadushin, M.R., Pezzuto, J.M., Xuan, L.T., Hiep, N.T., Hung, N.V., Vu, B.M., Loc, P.K., Dac, L.X., Binh, L.T., Chien, N.Q., Hai, N.V., Bich, T.Q., Cuong, N.M., Southavong, B., Sydara, K., Bouamanivong, S., Ly, H.M., Tran, V.T., Rose, W.C., og Dietzman, G.R. (2005). "Ethnobotany/ ethnopharmacology and mass bioprospecting: Issues on intellectual property and benefit-sharing. ." Journal of ethnopharmacology **100**: 15-22.
- Solis, P. N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P og Phillipson, J.D. (1993). "A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp)." Planta Medica **59**(250-252).
- Solomons, T. W. G. og Fryhle, C.B. (2004). Organic chemistry, John Wiley & Sons, Hoboken.
- Somoro, A. A., Patel, K., Diallo, D., Sidibe, L., Chalchat, J.C., Figueredo, G., Ducki, S., Troin, Y. og Chlard, P. (2011). "An ethnobotanical and phytochemical study of the African medicinal plant *Guiera senegalensis* J.F Gmel." Journal of medicinal plants research **5**: 1639-1651.
- Sparg, S. G., Light, M.E. og Staden J.V. (2004). "Biological activities and distribution of plant saponins " Journal of ethnopharmacology **94**: 219-243.
- Sutovska, M., Franova, S., Sadlonova, V., Grønhaug, T.E., Diallo, D., Paulsen, B.S., Capek, P. (2010). "The relationship between dose-dependent antitussive and bronchodilatory effects of *Opilia celtidifolia* polysaccharide and nitric oxide in guinea pigs." International journal of biological macromolecules **47**: 508-513.
- The food advice centre, 2012. "Free radicals." Aksessert 14.03.2012 fra <http://www.thefoodadvicecentre.co.uk/reference/free-radicals/>.
- Topropicals (2012). "Ficus capensis, bilde." Aksessert 08.05.2012, fra [http://topropicals.com/catalog/uid/ficus\\_capensis.htm](http://topropicals.com/catalog/uid/ficus_capensis.htm).
- Togola, A., Diallo, D. Dembele, S., Barsett, H., og Paulsen, B.S (2005). "Ethnopharmacological survey of different uses of seven medicinal plants from Mali, (West Africa) in the regions Doila, Kolokani og Siby." Journal of ethnobiology and ethnomedicine **1**: 7 sider.

- Togola, A., Inngjerdingen, M., Diallo, D. Barsett, H., Rolstad, B., Michaelsen, T.E., Paulsen, B.S. (2007 ). "Polysaccharides with complement fixing and macrophage stimulation activity from *Opilia celtidifolia*, isolation and partial characterisation " Journal of Ethnopharmacology **115**: 423-431.
- Traore, F., Faure, R., Ollivier, E., Gasquet, M., Azas, N., Debrauwer, L., Keita, A., Timon-David, P. og Balansard, G. (2000). "Structure and antiprotozoal activity of Triterpenoid saponins from *Glinus oppositifolius*." Planta medica **66**: 368-371.
- Utenova, B.T., Malterud, K.E. og Rise, F. (2007)" Antioxidant activity of O-protected deivates of (-) epigallocatechin-3-gallate: inhibition of soyabean and rabbit 15-lipoxygenases. Arkivoc **9**: 6-16.
- Wangensteen, H. (2012). Antioksidanter, polyfenoler og flavonoider. Forelesninger i FRM 5410 Oslo, UIO.
- WHO (2012). "Mali." Aksessert 07.05.2012, fra <http://www.who.int/countries/mli/en/>.
- Wiedenfeld, H. (2010). "Plant containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems." Food additives and contaminants **28**: 282-292
- Wikipedia. (2011). "Mali " Aksessert 09.05.2012, fra <http://en.wikipedia.org/wiki/Mali>

