

Hovedfagsoppgave i farmakognosi for graden cand.pharm.

*Erythrina Senegalensis*  
– En medisinplante fra Mali  
**Undersøkelse av  
antifungale komponenter  
Etnofarmakologiske studier**



**Annette Theis**  
**Avdeling for farmasøytisk kjemi**  
**Farmasøytisk Institutt**  
**Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet**  
**Universitetet i Oslo**  
**2006**

---

*Erythrina Senegalensis*  
– En medisinsplante fra Mali  
**Undersøkelse av  
antifungale komponenter  
Etnofarmakologiske studier**

**Hovedfagsoppgave i farmakognosi**

**Utført ved  
Avdeling for farmasøytisk kjemi  
Farmasøytisk Institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige  
fakultet  
Universitetet i Oslo**

**Av Annette Theis**

**Veiledere  
Professor Berit Smestad Paulsen  
Professor Karl Egil Malterud  
Professor Drissa Diallo**

**Oslo 2006**

## **FORORD**

Denne hovedfagsoppgaven i farmakognosi er utført ved avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden november 2005 til august 2006.

Først vil jeg rette en stor takk til Karl Egil Malterud, for god veiledning og hjelp gjennom arbeidet med oppgaven. Jeg vil også takke Berit Smestad Paulsen for veiledning og støtte underveis, og ikke minst for stor fleksibilitet, slik at et lengre opphold i Mali kunne gjennomføres.

Jeg vil også gjerne få takke Drissa Diallo, som la alt til rette for gjennomføring av feltarbeid og laboratoriearbeid i Mali.

Ellers vil jeg takke:

Anders Vik på kjemisk institutt, for hjelp til måling av optisk aktivitet.

Anne-Lise Rishovd, Ewa Jaroszewicz og Ida K. Hegna ved avdeling for farmasøytiske biovitenskaper, Farmasøytisk Institutt for tilretteleggelse og hjelp i forbindelse med utføring av antifungaltesting.

Dominique Arama, Maiga Ababacar og alle andre ansatte og studenter ved DMT for god hjelp og støtte under oppholdet i Mali.

Reisefølget mitt i Mali, Kristin Sagberg og Anders Rusten, for hyggelig selskap.

Tilslutt vil jeg takke alle ansatte ved avdelingen for godt selskap og stor hjelpsomhet gjennom hele hovedfagsåret.

Klepp, 15.juli 2006

Annette Theis

# INNHOOLD

<b>1</b>	<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>FORKORTELSER</b> .....	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>HENSIKT MED OPPGAVEN</b> .....	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>BAKGRUNN</b> .....	<b>8</b>
<b>4.1</b>	<b>ERYTHRINA SENELGALENSIS DC</b> .....	<b>8</b>
4.1.1	Systematikk .....	8
4.1.2	Nomenklatur .....	8
4.1.3	Lokale navn .....	9
4.1.4	Botaniske forhold .....	9
4.1.5	Tidligere funn.....	11
4.1.5.1	<i>Kjemiske forbindelser isolert fra Erythrina senegalensis</i> .....	11
4.1.5.2	<i>Biologisk aktivitet</i> .....	12
4.1.5.3	<i>Tradisjonell bruk</i> .....	15
<b>4.2</b>	<b>MYKOSER -SOPPSYKDOMMER</b> .....	<b>16</b>
4.2.1	Soppbiologi.....	16
4.2.2	Gjærsopp.....	16
4.2.3	<i>Candida albicans</i> .....	17
4.2.4	Kandidiasis.....	18
4.2.4.1	<i>Kandidiasis i Mali</i> .....	20
4.2.5	Dermatofytter.....	20
4.2.6	Antimykotika -legemidler mot sopp.....	20
4.2.6.1	<i>Amfotericin B</i> .....	20
4.2.6.2	<i>Imidazol- og triazol derivater</i> .....	21
4.2.6.3	<i>Casporfungin</i> .....	21
4.2.6.4	<i>Terbinafin</i> .....	21
4.2.6.5	<i>Amorolfin</i> .....	21
4.2.6.6	<i>Nystatin</i> .....	22
4.2.6.7	<i>Ciklopiroksolamin</i> .....	22
4.2.6.8	<i>Andre midler</i> .....	22
<b>5</b>	<b>EKSPERIMENTELT</b> .....	<b>23</b>
<b>5.1</b>	<b>MATERIALER</b> .....	<b>23</b>
5.1.1	Reagenser .....	23
5.1.2	Apparatur .....	25
<b>5.2</b>	<b>METODER</b> .....	<b>28</b>
<b>GENERELLE METODER</b>		
5.2.1	Innveiging .....	28
5.2.2	Volumreduksjon.....	28
5.2.3	Fjerning av løsemiddelrester .....	29
5.2.4	Fremkalling av flekker på tynnsjiktplate.....	29
5.2.4.1	<i>UV-lys</i> .....	29
5.2.4.2	<i>Dragendorff reagens</i> .....	29
5.2.4.3	<i>Godin reagens</i> .....	30

5.2.4.4	<i>Ceric reagens</i> .....	30
5.2.5	Analytisk tynnsjikt-kromatografi.....	30
5.2.5.1	<i>Tynnsjiktsevaluering av metanol- og diklormetan råekstrakter fra rotbark og stammebark av E.senegalensis</i> .....	32
5.2.5.2	<i>Tynnsjiktsevaluering av fraksjoner fra diklormetan-ekstrakt av rotbark (DR) etter kolonnekromatografi.</i> .....	32
<b>FRAKSJONERINGSMETODER</b>		
5.2.6	Ekstraksjon av plantemateriale.....	33
5.2.7	Silika kolonneseparasjon.....	34
5.2.7.1	<i>Fraksjonering av diklormetane-ekstrakt fra rotbark</i> .....	35
5.2.7.2	<i>Fraksjonering av fraksjon XIV + XV</i> .....	35
5.2.7.3	<i>Fraksjonering av fraksjon XVIII + XIX</i> .....	36
5.2.8	VersaFlash kolonneseparasjon.....	37
5.2.8.1	<i>Fraksjonering av fraksjonene XX, 2VI og 4I-4III</i> .....	37
5.2.9	Sentrifugalt akselerert TLC (CA-TLC).....	39
5.2.9.1	<i>Fraksjonering av fraksjon 5I-5II-5III</i> .....	39
<b>METODER FOR STRUKTUROPPLARING</b>		
5.2.10	NMR spektroskopi.....	40
5.2.11	Måling av optisk aktivitet.....	42
<b>BIOLOGISK TESTING</b>		
5.2.12	Test av antifungal aktivitet.....	44
5.2.13	DPPH scavenging.....	49
5.2.14	Hemming av 15-lipoksygenase.....	51
<b>6</b>	<b>RESULTATER OG DISKUSJON</b> .....	<b>55</b>
<b>6.1</b>	<b>EKSTRAKSJON AV ERYTHRINA SENEGALENSIS ROTBARK</b> .....	<b>55</b>
<b>6.2</b>	<b>EKSTRAKSJON AV ERYTHRINA SENEGALENSIS STAMMEBARK</b> .....	<b>55</b>
<b>6.3</b>	<b>NMR SPEKTRUM AV RÅEKSTRAKTENE</b> .....	<b>55</b>
6.3.1	<sup>1</sup> H-NMR av MR.....	55
6.3.2	<sup>1</sup> H-NMR av DR.....	55
6.3.3	<sup>1</sup> H-NMR av MS.....	55
6.3.4	<sup>1</sup> H-NMR av DS.....	56
<b>6.4</b>	<b>ANTIOKSIDANT AKTIVITET AV RÅEKSTRAKTENE</b> .....	<b>56</b>
6.4.1	DPPH-scavenging.....	56
6.4.2	Hemming av enzymet 15-lipoksygenase.....	56
<b>6.5</b>	<b>FRAKSJONERING AV DIKLORMETANEKSTRAKT AV ROTBARK (DR)</b> .....	<b>59</b>
<b>6.6</b>	<b>ANTIFUNGALTEST 1</b> .....	<b>60</b>
<b>6.7</b>	<b>FRAKSJONERING AV XIV + XV</b> .....	<b>63</b>
<b>6.8</b>	<b>FRAKSJONERING AV XVIII + XIX</b> .....	<b>64</b>
<b>6.9</b>	<b>ANTIFUNGALTEST 2</b> .....	<b>65</b>
<b>6.10</b>	<b>NMR-SPEKTER FRA 2-SERIEN</b> .....	<b>66</b>
<b>6.11</b>	<b>NMR SPEKTER AV 3V</b> .....	<b>66</b>

---

<b>6.12</b>	<b>FRAKSJONERING AV FRAKSJON 2VI</b> .....	<b>67</b>
<b>6.13</b>	<b>NMR SPEKTRUM AV FRAKSJONER FRA 4-SERIEN</b> .....	<b>67</b>
6.13.1	Identifisering av erybraedin A.....	68
6.13.2	Litteratur om erybraedin A.....	70
<b>6.14</b>	<b>FRAKSJONERING AV FRAKSJON 4I -4II-4III</b> .....	<b>72</b>
<b>6.15</b>	<b>OPTISK AKTIVITET AV ERYBRAEDIN A</b> .....	<b>72</b>
<b>6.16</b>	<b>BIOLOGISK AKTIVITET AV ERYBRAEDIN A</b> .....	<b>73</b>
6.16.1	DPPH-scavenging .....	73
6.16.2	Hemming av enzymet 15-lipoksygenase .....	73
6.16.3	Antifungal aktivitet av erybraedin A.....	74
<b>6.17</b>	<b>NMR AV FRAKSJON XX</b> .....	<b>75</b>
<b>6.18</b>	<b>FRAKSJONERING AV FRAKSJON XX</b> .....	<b>75</b>
<b>6.19</b>	<b>NMR SPEKTRUM AV FRAKSJONER FRA 5 – SERIEN</b> .....	<b>76</b>
6.19.1	Identifisering av shinpterocarpin /phaseollin .....	76
6.19.2	Litteratur om shinpterocarpin .....	78
6.19.3	Litteratur om phaseollin .....	80
<b>6.20</b>	<b>FRAKSJONERING AV FRAKSJON 5I -5II-5III</b> .....	<b>82</b>
<b>6.21</b>	<b>OPTISK AKTIVITET AV SHINPTEROCARPIN – PHASEOLLIN (3:1)</b> .....	<b>82</b>
<b>6.22</b>	<b>BIOLOGISK TESTING AV SHINPTEROCARPIN – PHASEOLLIN</b> .....	<b>83</b>
6.22.1	DPPH-scavenging .....	83
6.22.2	Hemming av enzymet 15-lipoksygenase .....	83
6.22.3	Antifungal aktivitet av shinpterocarpin-phaseollin (3:1).....	85
<b>6.23</b>	<b>ANTIFUNGALTEST 3</b> .....	<b>85</b>
6.23.1	Resultater fra antifungaltest 3 .....	85
6.23.2	Resultat fra tetthetsmåling av <i>C. albicans</i> .....	88
6.23.3	Diskusjon av resultatene.....	88
<b>7</b>	<b>ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER</b> .....	<b>90</b>
<b>7.1</b>	<b>INNLEDNING</b> .....	<b>90</b>
7.1.1	Etnofarmakologi og etnobotanikk .....	90
7.1.2	Fakta om Mali .....	92
7.1.3	Tradisjonell medisin i Mali .....	93
<b>7.2</b>	<b>TIDLIGERE ARBEID</b> .....	<b>94</b>
<b>7.3</b>	<b>FELTARBEID</b> .....	<b>94</b>
<b>7.4</b>	<b>RESULTATER OG DISKUSJON</b> .....	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>KONKLUSJON</b> .....	<b>112</b>
<b>9</b>	<b>REFERANSER</b> .....	<b>113</b>

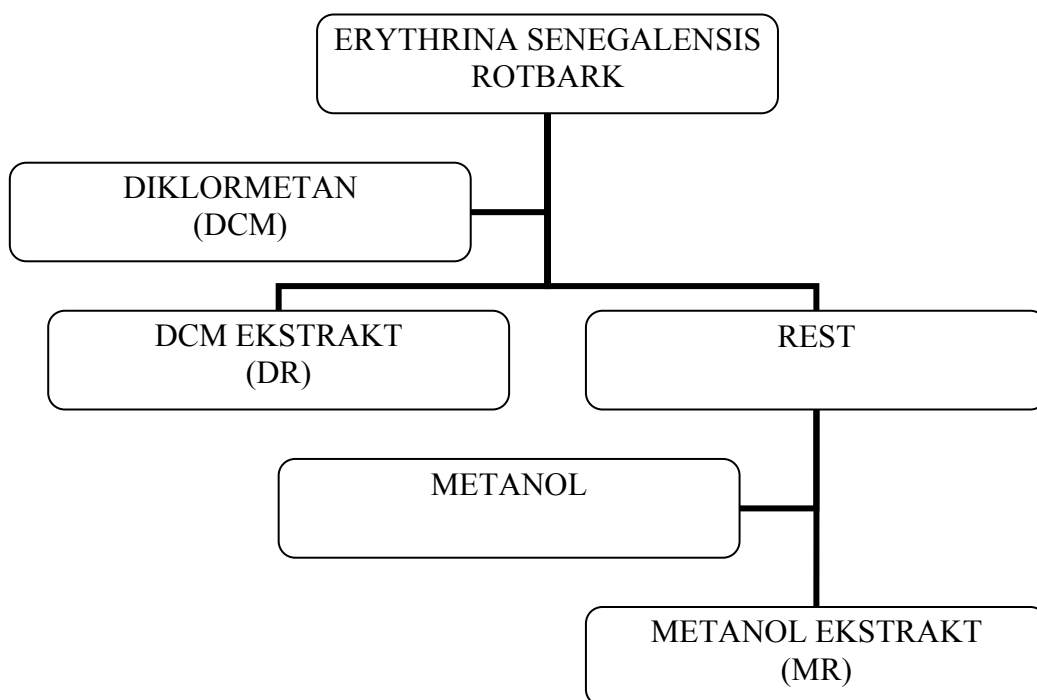
---

---

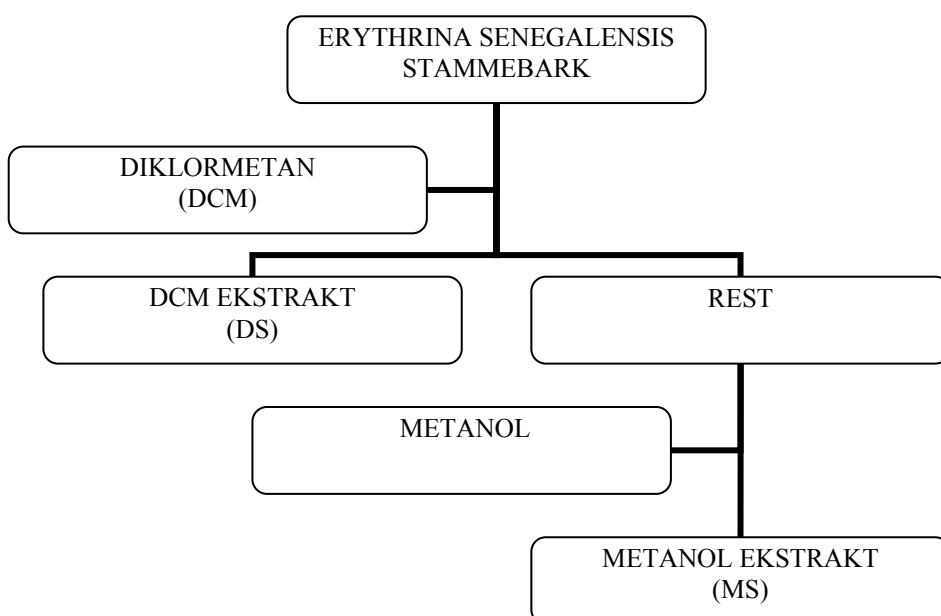
<b>10</b>	<b>VEDLEGG .....</b>	<b>121</b>
10.1	<sup>1</sup> H-NMR-SPEKTRUM AV MR.....	121
10.2	<sup>1</sup> H-NMR-SPEKTRUM AV DR.....	121
10.3	<sup>1</sup> H-NMR-SPEKTRUM AV MS.....	122
10.4	<sup>1</sup> H-NMR-SPEKTRUM AV DS .....	122
10.5	<sup>1</sup> H-NMR-SPEKTRUM AV 2VI .....	123
10.6	<sup>1</sup> H-NMR-SPEKTRUM AV 2X.....	123
10.7	<sup>1</sup> H-NMR-SPEKTRUM AV 3V.....	124
10.8	<sup>13</sup> C-NMR-SPEKTRUM AV 3V .....	124
10.9	<sup>1</sup> H-NMR-SPEKTRUM AV 4II .....	125
10.10	<sup>13</sup> C-NMR-SPEKTRUM AV 4II.....	125
10.11	<sup>1</sup> H-NMR-SPEKTRUM AV 6III .....	126
10.12	<sup>1</sup> H-NMR-SPEKTRUM AV XX .....	126
10.13	<sup>1</sup> H-NMR-SPEKTRUM AV 5I.....	127
10.14	<sup>13</sup> C-NMR-SPEKTRUM AV 5I .....	127
10.15	<sup>13</sup> C-APT-SPEKTRUM AV 5I.....	128
10.16	<sup>1</sup> H-COSY-SPEKTRUM AV 5I.....	128
10.17	<sup>1</sup> H-COSY-SPEKTRUM (UTSNITT) AV 5I .....	129
10.18	<sup>1</sup> H-COSY-SPEKTRUM (UTSNITT) AV 5I .....	129
10.19	<sup>1</sup> H-NMR-SPEKTRUM AV 7III .....	130
10.20	15-LO HEMMING AV MR.....	131
10.21	15-LO HEMMING AV DR .....	131
10.22	15-LO HEMMING AV MS .....	131
10.23	15-LO HEMMING AV DS.....	132
10.24	15-LO HEMMING AV QUERCETIN.....	132
10.25	R <sub>f</sub> -VERDIER ANTIFUNGALTEST 1.....	133
10.26	R <sub>f</sub> -VERDIER ANTIFUNGALTEST 2.....	134
10.27	R <sub>f</sub> -VERDIER ANTIFUNGALTEST 3.....	135

## 1 SAMMENDRAG

Rotbark og stammebark av *Erythrina senegalensis* ble ekstrahert hver for seg, først med diklormetan og så med metanol, og gav 4 ekstrakter: diklormetanekestekt fra rotbark (DR), metanolekstrakt fra rotbark (MR), diklormetanekestekt fra stammebark (DS) og metanolekstrakt fra stammebark (MS). Se figur 1.1 og 1.2.



Figur 1.1: Oversikt over ekstrakter fra *E.senegalensis* rotbark.



Figur 1.2: Oversikt over ekstrakter fra *E.senegalensis* stammebark.



Det ble arbeidet videre med diklormetaneekstraktet fra rotbark. DR ble fraksjonert på silikakolonne, og gav 28 fraksjoner, merket I-XXVIII

Alle fraksjonene I-XXVIII ble testet for antifungal aktivitet med en TLC bioautografisk agaroverleggingsmetode. Alle fraksjonene fra X og oppover, unntatt fraksjon XVI<sub>MeOH</sub> viste aktivitet mot *C. albicans*.

Fraksjon XIV og XV ble slått sammen og fraksjonert på nytt på silikakolonne. Det gav opphav til 13 nye fraksjoner, 2I-2XIII.

Fraksjon XVIII og XIX ble også slått sammen og fraksjonert på nytt på silikakolonne. Det gav opphav til 9 nye fraksjoner, 3I-3IX

Fraksjonene fra 2-serien og 3-serien ble testet for antifungalaktivitet med samme metode mot *C. albicans*. Fraksjon 2VI-2VII, 2XII og 2XIII, samt fraksjon 3VI-3IX viste seg å være aktive.

Fraksjon 2VI ble separert videre på VersaFlash C-18 kolonne, og gav fraksjon 4I-4VIII. NMR-spektre av fraksjonene viste at fraksjon 4I -4III var ganske like, og på bakgrunn av spektrene fra disse 3 fraksjonene ble erybraedin A identifisert ved å sammenligne våre spektraldata med litteraturdata. Erybraedin A er ikke tidligere påvist i *E. senegalensis*.

Fraksjonene 4I-4III ble slått sammen, renses en gang til på VersaFlash C-18 kolonne, og gav fraksjonene 6I-6VI. NMR-spektrum av fraksjon 6III viste en ganske ren erybraedin A fraksjon, så denne ble brukt til å bestemme optisk-, og biologisk aktivitet.

Erybraedin A hadde en optisk aktivitet på  $[\alpha]_D = -62^\circ$  (ved 20 °C, c= 0,0335 g/ml i diklormetan)

Erybraedin A ble testet for DPPH-scavenging, 15-LO hemming og antifungal aktivitet mot *C. albicans*. Substansen viste seg å være en dårlig DPPH-scavenger men en meget sterk hemmer av 15-LO. (IC<sub>50</sub> -verdi  $23 \pm 2 \mu\text{M}$ ). Den gav også hemming av vekst av *C. albicans*.

Fraksjon XX ble separert på VersaFlash C-18 kolonne, til 9 fraksjoner 5.0- 5VIII. Fraksjon 5I-5III ble slått sammen på bakgrunn av NMR-spektrum, og separert på nytt på kromatotron til fraksjon 7I-7V. Ved å sammenligne våre spektraldata med

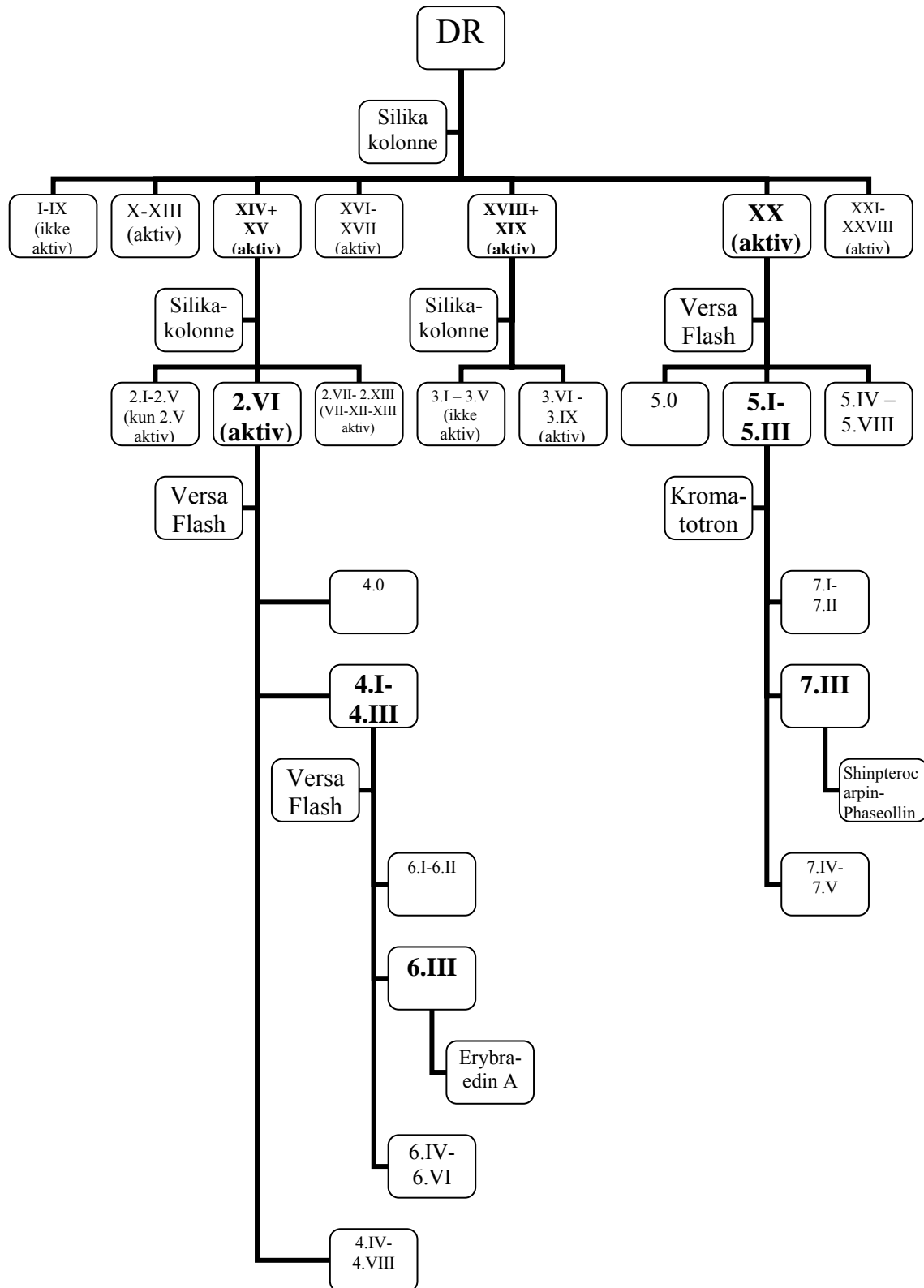
litteraturdata ble en blanding av shinpterocarpin og phaseollin i forhold 3:1 identifisert i fraksjon 5I-5III, og i den opprensede fraksjonen 7III. Fraksjon 7III ble bruk til å bestemme optisk- og biologisk aktivitet av shinpterocarpin-phaseollin (3:1).

Shinpterocarpin-phaseollin (3:1) hadde en optisk aktivitet på  $[\alpha]_D = -117^\circ$  (ved 20 °C, c= 0,054 g/ml i diklormetan)

Shinpterocarpin- phaseollin (3:1) ble også testet for DPPH-scavenging, 15-LO hemming og antifungal aktivitet mot *C.albicans*. Blandingen viste seg å være en dårlig DPPH-scavenger men en meget sterk hemmer av 15-LO (IC<sub>50</sub>-verdi 16,5 ±1,1). Den gav også hemming av vekst av *C.albicans*.

Fullstendig oversikt over all fraksjonering vises i figur 1.3

Deler av hovedoppgaven er utført i Mali, i perioden 14.januar til 21. april. I løpet av denne tiden ble det gjennomført 2 feltarbeid, et i Kolokani og et i Dioila. Til sammen ble 45 healere intervjuet, og 38 av disse brukte *Erythrina senegalensis* i sin praksis. De hyppigste indikasjonene var amenorrhé, malaria, gulsott og ødem.



Figur 1.3: Oversikt over alle fraksjoneringene som ble gjort. (aktiv) eller (ikke aktiv) viser hvilke fraksjoner som var aktive eller ikke aktive mot *C. albicans* i de 2 første antifungaltestene som ble utført.

## 2 FORKORTELSER

Forkortelse	Fullstendig beskrivelse
<i>A.cerevisiae</i>	<i>Acetobacter cerevisiae</i>
ADP	Adenosine Difosfat
APT	Attached Proton Test
<i>B.subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C.mycoderma</i>	<i>Candida mycoderma</i>
CA-TLC	Sentrifugalt aksellerert tynnsjiktskromatografi
CDCl <sub>3</sub>	Deuterokloroform
CD <sub>3</sub> OD	Deuterometanol
COSY	Korrelasjonspektroskopi
d	dublett
dd	dobbel dublett
DMSO	Dimetylsulfoksyd
DMT	Departement Medecine Traditionnelle
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
DR	Diklormetaneekstrakt av rotbark
DS	Diklormetaneekstrakt av stammebark
ED <sub>50</sub>	Effektiv dose som gir 50 % respons
<i>E. senegalensis</i>	<i>Erythrina senegalensis</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
FI	Farmasøytisk Institutt
hhv.	henholdsvis
HPETE	Hydroperoksyekosatetraensyre
IC <sub>50</sub>	Konsentrasjon som gir 50 % aktivitet, for eksempel 50 % hemming av 15-lipoksygenase
INRSP	Institut National de Recherche en Sante Publique
LDL	Low-density lipoprotein
15-LO	15-Lipoksygenase
m	multiplett
<i>m</i> -posisjon	<i>meta</i> -posisjon
MIC	Minimum Inhibitory Concentration, minste hemmende konsentrasjon
MR	Metanolekstrakt av rotbak
MRSA	Methicillin resistent <i>S.aureus</i>

---

MS	Metanolekstrakt av stammebark
MTT	3-(4,5-dimetyltiazolyl-2)-2,5-difenyltetrazolium bromide
NMR	Kjernemagnetisk resonans (Nuclear Magnetic Resonance)
<i>o</i> -posisjon	<i>ortho</i> -posisjon
<i>p</i> -posisjon	<i>para</i> -posisjon
P	Statistisk signifikans
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ppm	part per million
RP-18	Omvendt fase (Reversed Phase) med C-18 kjeder bundet til silikaen.
rpm	Rotasjoner per minutt
s	singlet
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SD	Standardavvik
SOS	Seksuelt overførbart sykdom
t	triplett
TLC	Tynnsjiktskromatografi (Thin Layer Chromatography)
TMS	Tetrametylsilan
UV	Ultrafiolett
UiO	Universitetet i Oslo
VRE	Vankomycin Resistente Enterokokker
WHO	Verdens Helseorganisasjon

### **3 HENSIKT MED OPPGAVEN**

Denne oppgaven er basert på en hovedfagsoppgave i farmasi, utført ved DMT i Bamako, Mali og skrevet av Patomo Dominique Arama i 2005. Han arbeidet med 3 maliske medisinerplanter, blant annet *Erythrina senegalensis*, og fant at røekstrakter fra rotbark av denne planten var aktivt mot gjærsoppen *C.albicans* (Arama 2005).

Denne hovedfagsoppgaven hadde som hensikt å isolere, identifisere og karakterisere en eller flere av de antifungale komponentene fra *Erythrina senegalensis*. I tillegg skulle det samles inn informasjon om planten som en del av en etnofarmakologisk studie som inkluderte feltarbeid og intervju av healere i 2 områder i Mali.

## 4 BAKGRUNN

### 4.1 *ERYTHRINA SENEGALENSIS* DC

*Erythrina senegalensis* DC er et tre som tilhører erteblomstfamilien. Fullstendig systematikk med synonymer, lokale navn og botanisk beskrivelse er gitt under i punktene 4.1.1- 4.1.4, samt oversikt over tradisjonell bruk (4.1.5) og tidligere funn (4.1.6).

#### 4.1.1 Systematikk

Rike <sup>1</sup> :	Plantae (planteriket)
Underrike <sup>1</sup> :	Tracheobionta (karplanter)
Divisjon <sup>1</sup> :	Magnoliophyta (blomsterplanter, dekkfrøet)
Klasse <sup>1</sup> :	Magnoliopsida (tofrøbladet)
Underklasse <sup>1</sup> :	Rosidae
Orden <sup>1</sup> :	Fabales
Familie:	Fabaceae <sup>2</sup> (Erteblomstfamilien)
Slekt:	<i>Erythrina</i>
Art:	<i>senegalensis</i>

<sup>1</sup> Ble funnet på IT IS database med "Fabaceae" som søkeord (ITIS 2005).

<sup>2</sup> Leguminosae og Papilionaceae er synonymer til Fabaceae, og brukes fremdeles noe, men det er Fabaceae som er akseptert standard.

#### 4.1.2 Nomenklatur<sup>1</sup>

Akseptert standard for navnet på planten er *Erythrina senegalensis* DC.

#### Synonymer

*Chirocalyx latifolius* Walp

*Erythrina guineensis* G.Don

*Erythrina latifolia* Schumach&Thonn.

*Corallodendron senegalense* (DC.) Kuntze, 1891\*

*Duchassaingia senegalensis* (DC.) Hassk, 1858\*

\* Disse er også basionymmer (=forfatteren er uenig i akseptert standard)

Ingen av disse gir relevante referanser ved SciFinder-søk.

#### Homonymer (= samme navn på 2 forskjellige planter)

*Erythrina senegalensis* A. Rich., 1847

#### Infraspesifikke navn (= ulike varieteter)

*Erythrina senegalensis* var. *camerounensis* Aubrév, 1950

*Erythrina senegalensis* var. *senegalensis*

<sup>1</sup> Alle navn i dette avsnittet er funnet ved å bruke "*Erythrina senegalensis*" som søkerord på Missouri Botanical Garden's VAST nomenklaturdatabase (W<sup>3</sup>TROPICOS).

### 4.1.3 Lokale navn

#### Mali:

Bambara: to nté, sio dé, timba, n'tékissè, n'teblin, n'timini, n'te, n'tieme

Dogon: beina, benina, bëy tímu, njabe-ana, pøle jirin

Senoufo: kaferiŋe

Peulh/Fulani: môtötäy, mbototi, bodola, funduñ, dolimba

**Fransk:** Arbre corail, Érythrine du Sénégal

**Engelsk:** Coral tree, coral flower

(Berhaut 1976, Burkill 1995, Togola et al 2005)

### 4.1.4 Botaniske forhold

*Erythrina senegalensis* er et mellomstort tre fra savannen. Det kan bli opptil 15 meter høyt, men er vanligvis noe lavere (10-15 meter). Det vokser i tropiske og subtropiske områder og finnes dermed i Vest-Afrika fra Senegal til Kamerun. (Det vil si i Senegal, Guinea, Gambia, Mali, Sierra Leone, Liberia, Elfenbenskysten, Ghana, Togo, Benin, Nigeria og i østlige deler av Kamerun)

Trestammen er belagt med myk, korkaktig bark med store sprekker i. Sevjeveden er gul, myk og porøs. Den har ingen verdi, og angripes lett av insekter. Et ferskt kutt i treverket bringer frem en sterkt ubehagelig lukt. Kjerneveden er rød. Grenene har kurvede torner spredt rundt på seg. Løvverket består av kraftige, vekselstilte bladstilker, 3-6 cm lange og noe tykkere nederst. På hver bladstilk sitter det 3 blader, hvorav det i midten er større enn de to andre. Bladstilkene er vanligvis også dekket av krummede torner. Bladene er 5-10 cm lange, og 3-5 cm brede. Blomstene er 15-25 cm lange. De finnes som oftest på toppen av bladløse kvister/grener eller sammen med de første bladene. Fanene er 4-5 cm lange med en sterk korallrød farge. Den åpnes bare så vidt, og skjuler på den måten de andre delene av blomsten. Belgfruktene er lange og smale, med en lengde på 8-15 cm og en bredde på 10mm. De inneholder knallrøde, eggformede frø som er giftige på grunn av sitt innhold av alkaloider med curarelignende aktivitet.

*Erythrina senegalensis* er en mye brukt prydplante, og plantes gjerne i nærheten av hus som hekk, palisader og kveginnehgninger. Røttene og stammebarken er mye brukt til mange ulike medisinske formål, og mange trær ødelegges fordi barken fjernes.

(Berhaut 1976, Burkill 1995)

Bilder av treet er vist i figur 4.1 -4.4.





Figur 4.1: *Erythrina senegalensis* og forfatteren



Figur 4.2: Stammen på *E. senegalensis*



Figur 4.3: *E. senegalensis*, løvverk. Ser også en rød blomst oppe til høyre



Figur 4.4: Frøene fra *E. senegalensis*

(FOTO: Theis 2006)

## 4.1.5 Tidligere funn

### 4.1.5.1 Kjemiske forbindelser isolert fra *Erythrina senegalensis*

Mange forbindelser har blitt isolert fra *Erythrina senegalensis*. I tillegg til lektin og alkaloider isolert fra frøene, er det isolert flere flavonoider og isoflavonoider fra stammebarken. Under finnes en kort oversikt over de kjemiske forbindelsene som er isolert og identifisert til nå.

#### Alkaloider

- erysodine
- erysopine (Folkers et al. 1941)
  
- erysodine
- glucoerysodine
- hypaphorine (Wandji et al. 1995a)

#### Lektin

*E. senegalensis* agglutinin, ESA (Animashaun, T. 1993)

#### Prenylerte flavanoner

- erythrisenegalone, (Fomum et al. 1985, Wandji et al 1990, Wandji et al 1994c)
- senegalensein (Fomum et al 1987)

#### Prenylerte isoflavonoider

- erysenegalensein J (3-hydroksykumaronokromon)
- erysenegalensein K (furanoisoflavon) (Wandji et al. 1995b)
  
- erysenegalensein N (isoflavon)
- erysenegalensein O (isoflavon) (Oh et al. 1999)
  
- senegalensin (isoflavon) (Wandji et al 1990, Wandji et al 1994c)

#### Prenylerte isoflavanoner

- 2, 3-dihydroauriculatin (Taylor et al. 1986)
  
- erysenegalensein B
- erysenegalensein C (Wandji og Fomum 1995)
  
- 8-prenyl-luteone (Wandji et al 1994a, Oh et al 1999)
- 6,8-diprenylgenistein (Taylor et al 1986, Wandji et al 1994a)

#### Isoflavonoider

- auriculatin (Taylor et al 1986, Wandji et al 1994c, Oh et al 1999)

- derrone (Oh et al 1999)
- alpinumisoflavone (Oh et al 1999)
- 6,8-diprenylgenistein (Oh et al 1999)

#### Isoflavoner

-5, 7, 4'-trihydroxy-6, 8-diprenylisoflavone (Fomum et al. 1986a)

- erysenegalensein D (Wandji et al.1994a, Oh et al 1999)
- erysenegalensein E (Wandji et al. 1994a)
- erysenegalensein L (Wandji et al 1995a)
- erysenegalensien M (Wandji et al 1995a)
  
- erysenegalensein H (Wandji et al 1994c)
- erysenegalensein I (Wandji et al 1994c)

#### Epoxyisoflavoner

- erysenegalensein F (Wandji et al 1994b)
- erysenegalensein G (Wandji et al 1994b)

#### Estere

- erythrinasinat (Fomum et al. 1986b)
- n*-triacontyl-4-cinnamate (Wandji et al 1990)

#### Pentasykliske triterpener

- β-amyrin
- maniladiol
- erythrodiol
- oleanolsyre
- cornulacticin syre (Wandji et al 1995b)

#### Andre

- warangalone, gule krystaller (Wandji et al 1994b)
- lupinifolin (Wandji et al 1994c)

- senegalensin
- euchrenone b10 (Revidert struktur, Tanaka et al 2001)

#### **4.1.5.2 Biologisk aktivitet**

Slekten *Erythrina* er godt kjent for sine alkaloider med curarelignende aktivitet. (Folkers et al 1941, Dyke og Quessy 1981) Alkaloidene erysodine, erysopine og hypaphorinehydroklorid er noen av dem som er isolert fra *Erythrina senegalensis*. (Folkers et al 1941). I senere tid er det også vist at mange *Erythrina* arter inneholder flavonoider, særlig pterocarpaner med antimikrobiell aktivitet (Mitcher et al 1987).

### Nitratreduksjon

Noen planter i erteblomstfamilien har den egenskapen at de inneholder enzymer som kan omdanne nitrogen i luften til N-holdige forbindelser som planten kan benytte. Stewart og kollegaer har studert *Erythrina senegalensis* med hensyn på nitrat reduksjon. Nitratreduksjonen i *E. senegalensis* skiller seg fra den i andre høyere planter på flere måter. Den kan best karakteriseres som et høy aktivitet- lav affinitet system, og det er foreslått at det bare er én molekylær form av enzymet nitrat reductase til stede (Stewart og Orebamjo 1979).

### Anti-HIV aktivitet

Lektinet ESA, (galaktose bindende) er testet for anti-HIV aktivitet, sammen med flere andre lektiner. Resultatet viste at alle galaktosebindende lektiner, inkludert ESA er ineffektive i hemming av HIV-1 infeksjon (Animashaun et al 1993).

### Hemming av phospholipase C (PLC) aktivitet

Spesifikke hemmere av phospholipase C kan ha potensielt terapeutisk verdi ved å inaktivere signaloverføringsveier i kreftceller som kan bidra til vekst av tumorer. Auriculatin og 8-prenylluteone fra *E. senegalensis* er testet for hemming av PLC. Begge forbindelsene viste seg å være potente hemmere in vitro (IC<sub>50</sub>-verdi på 20 µM), sammenlignet med andre vanlige flavonoider (quercetin, leuteolin etc, IC<sub>50</sub>- verdi på 250 µM). Forbindelsene ble også studert med hensyn på cytotoxicitet mot flere humane tumorceller, og viste her moderat aktivitet. Auriculatin var mer potent enn 8-prenylluteone overfor 2 av cellerlinjene (Oh et al 1998).

Seks prenylerte flavonoider fra *E. senegalensis* er også undersøkt for PLCγ1- hemming in vitro (erysenegalensein O, D, N, derrone, alpinumisoflavone og 6,8-diprenylgenistein isolert fra rot). Erysenegalensein D og N var de mest potente hemmerne (Oh et al. 2005).

### Antiplasmodium- , smertestillende og antiinflammatorisk aktivitet

Vannekstrakt av stammebarken fra *E. senegalensis*, med innhold av alkaloider og glykosider, ble testet for ulike biologiske aktiviteter i mus. LD<sub>50</sub>-verdien for ekstraktet ble bestemt til 450 ± 24 mg/ kg i mus, ved intraperitoneal (i.p.) administrasjon.

Ekstraktene i en dosering på 50 og 100 mg/kg reduserte gjennomsnittlig parasitemi med *Plasmodium berghei*, i mus, men resultatene var ikke signifikante. Heller ikke testene med mus for å finne gjennomsnittlig overlevelsesperiode, viste signifikante resultater.

Når det gjaldt smertestillende effekt, ble ekstraktene testet for hemming av eddiksyreinduserte magekramper hos mus. Ekstraktet viste signifikant hemming i doser på 50 og 100 mg/kg. Effekten var noe dårligere enn for standarden acetylsalisylsyre (ASA), i en dose 150 mg /kg, men her var dosen høyere enn for ekstraktene.

Antiinflammatorisk aktivitet ble undersøkt på egg-albumin induisert inflammasjon i rotter. Ekstraktene viste signifikant suppresjon av inflammasjonsproteiner sammenlignet med kontrollen, men suppresjonen oppnådd med ASA var høyere (Saidu et al 2000).

#### Antitrypanosomal- og antiplasmodiumaktivitet

Etanolekstraktet av pulverisert stammebark fra *E. senegalensis* var et av mange ekstrakter fra mange ulike planter som ble testet for antitrypanosomal aktivitet med protozoen *Trypanosoma brucei rhodesiense* (forårsaker sovesyke) og for antiplasmodisk aktivitet med K1 stammen av *Plasmodium falciparum* (forårsaker malaria, K1 stammen er resistent mot klorokin og pyrimethamine). Ekstraktet viste signifikant aktivitet mot begge parasittene, med IC<sub>50</sub>-verdier på hhv 7,2 og 1,82 µg/ml. Til sammenligning har standardene IC<sub>50</sub>-verdier på hhv 0,010 µg/ml (suramin) og 0,064 µg/ml (klorokin) (Atindehou 2004).

Også Ajajyeoba og kollegaer har testet ekstrakt av stammebark fra *E. senegalensis* mot en multiresistent K1 stamme av *Plasmodium falciparum*. De fant en IC<sub>50</sub>-verdi på 99,7 µg/ml for *E. senegalensis* ekstraktet og tilsvarende for klorokin var 0,21 µg/ml (Ajaiyeoba et al. 2004).

#### Antibakteriell aktivitet

67 etanolekstrakt fra 50 planter brukt i tradisjonell medisin mot bakterielle sykdommer, ble screenet for aktivitet mot G+ (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*) og G- bakterier (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). 31 ekstrakter viste antibakteriell aktivitet, men kun mot G+ bakterier. Av disse 31 hadde 10 ekstrakter fra 10 ulike plantearter lovende nivåer av antibakteriell aktivitet, også mot bakteriestammer som er resistente mot visse typer antibiotika som aminosider, penicillin M, macrolider, lincosamide og streptogramin B. Det mest aktive var ekstrakt fra roten av *Erythrina senegalensis* DC. (Kone et al. 2004).

#### 4.1.5.3 Tradisjonell bruk

Slekten *Erythrina* har en lang historie i folkemedisinsk bruk i store deler av verden. Mange av indikasjonene kan sies å være relatert til infeksjonssykdommer. I tillegg finnes flere studier som fokuserer på de antimikrobielle komponentene i *Erythrina*-slekten, som støtter opp om den folkemedisinske bruken (Mitscher, 1987). Alkaloidet og muskelrelaksanten  $\beta$ -erythroidine fra *Erythrina senegalensis* har historisk sett vært brukt som pilgift (Okpako 1999).

En etnofarmakologisk studie utført i Siby-området i Mali i 2005, viste at planten ikke var godt kjent blant healere i området. De som hadde kjennskap til den brukte den på følgende indikasjoner; Amenorré, sterilitet, urinveisproblemer, problemer i forbindelse med at små barn får tenner, malaria, svimmelhet og oppkast. Både røtter, greiner, stammebark, blomster og blader ble brukt som pulver eller dekokt både til bad og drikke (Arama 2005, Togola et al 2005).

I Senegal tas et uttrekk av stammebarken innvortes for amenorré, og utvortes for hodepine og øyeproblemer. Dekokt av bark brukes som febernedsettende, og gis til kvinner etter fødsel. Barken blandes av og til med bark fra *Diospyros mespiliformis*, i behandling av yaws (en spiroketsykdom). Det lages hirsegrøt fra dekokt av bark som gis mot amenorré eller for å indusere abort (Burkill 1995).

I Gambia knuses roten og has på sår, for sårheling, i Ghana og Nigeria blandes knust bark og blad i maten mot sterilitet. Barkinfusjon brukes som mildt laksativ hos små barn. Barken brukes også mot dysenteri (Burkill 1995).

I Nord-Nigeria blir *E. senegalensis* brukt mot gulsott, anemi, gonoré og dysenteri. Det inntas vanligvis som filtrert eller dekantert dekokt av bark eller røtter i vann, oralt 2 ganger daglig i spesifikke doser. Alternativt kan pulverisert bark eller rot blandes i mat og spises (Saidu et al 2000).

I Elfenbenskysten brukes stammebark og røtter mot tørrhoste, gonoré og magesmerter (Koné et al 2004).

*Erythrina senegalensis* brukes også til dyr. Barken gis til hester, sammen med rikelig med vann, som diuretikum (Burkill 1995).

## 4.2 MYKOSER -SOPPSYKDOMMER

Mange sopparter kan gi sykdom hos mennesker. De fleste patogene soppartene under våre forhold er opportunistiske mikrober som kan påvises i normalfloraen hos friske personer (Bergan et al 1989)

Mykoser deles vanligvis inn i overflatiske og systemiske. Som årsak til systemiske mykoser dominerer ulike *Candida* arter, særlig *C.albicans*. Dermatofyttene, som angriper keratinholdig substans i hud, hår og negler, er dominerende som årsak til overflatiske mykoser. Den gjærsopplignende *Pityrosporum ovale* forårsaker flass og hudsykdommen pityriasis versicolor, også kalt tinea (Norsk Legemiddelhåndbok 2006).

I dette avsnittet legges det størst vekt på gjærsopplignende arter, og særlig *Candida albicans*, som er den sopparten som er brukt til testing i denne hovedfagsoppgaven. Det tas også med noe om kandidiasis, sopp sykdommen forårsaket av slekten *Candida* og som oftest *Candida albicans*.

### 4.2.1 Soppbiologi

Soppartene er eukaryote, det vil si de har en organisert cellekjerne, begrenset utad av en egen kjernemembran. Soppceller har stive cellevegger, vanligvis med innhold av kitin (N-acetylglukosamin polymer). I motsetning til bakterier har sopp flere kromosomer, mitokondrier, og store ribosomer, og deres celler deler seg ved mitose. Til forskjell fra planter mangler soppene klorofyll, og kan ikke bruke CO<sub>2</sub> som karbonkilde. Patogene sopper danner sporer. Enkelte har seksuelle sporer (dannet ved sammensmelting av to kjønnsceller), men de fleste patogene artene mangler seksuell syklus. Disse har bare aseksuelle sporer, og regnes derfor til klassen fungi imperfecti, også kalt *Deuteromycetes*. I denne klassen inngår de medisinske viktigste gruppene av hudsoppene, dermatofyttene *Epidermophyton*, *Microsporum* og *Trichophyton* og de gjærsopplignende slektene *Candida*, *Cryptococcus* og *Torulopsis* (Bergan et al 1989).

### 4.2.2 Gjærsopp

Sopparter med runde, eggformede eller avlange enkeltceller uten luftmycel regnes som gjærsopp. Betegnelsen gjærsopp gjelder i strengeste forstand bare askomyceter i slekten *Saccharomyces*, som brukes til gjæring i bakst, ølbrygging, vinlegging og i andre tekniske sammenhenger, men betegnelsen brukes i praksis også om blant annet *Candida* og *Torulopsis* fordi de ligner *Saccharomyces* morfologisk (Bergan et al 1989).

Gjærsoppene danner ikke hyfer (trådformet element som tilsvarer cellene hos sopparter og i store mengder utgjør mycelet), men enkelte av de gjærsopplignende artene i slekten *Candida* danner pseudohyfer. De består av kjeder av meget langstrakte celler som ligger på en rekke etter hverandre, og derfor minner om hyfer. *Candida* kan også danne spesielle klamydosporer, det vil si vegetative, tykkveggete sporer som er resistente mot fysiske og kjemiske påvirkninger. Gjærsoppene danner små datterceller ved knoppdannelse, små celler som sitter som knopper på opphavscellene og kalles blastosporer (Bergan et al 1989).

De fleste gjærsoppene reproduseres kun som enkle celler, men ved spesielle betingelser kan enkelte gjærsopper danne filamenter. Og hos disse artene uttrykkes enkelte karakteristikk kun i filamentøs form. Filamentvekst er for eksempel essensiell for patogenisiteten hos *C. albicans* (Madigan 2003).

Gjærsopp angriper på ulike steder, se tabell 4. 1

Diagnosen av de gjærsopplignende artene baseres særlig på utvikling av kimrør, morfologien av vekst under objektglass på risagar (eller tilsvarende) og biokjemisk-kulturelle egenskaper. (Bergan et al 1989)

Tabell 4.1: Organer som angripes av gjærsopp-lignende arter (Bergan et al 1989)

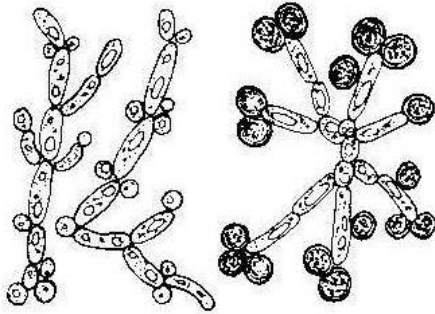
	<i>Candida</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Rhodo- torula</i>	<i>Toru- lopsi</i>	<i>Trichosporon</i>
<b>Mucosa</b>					
<b>Vagina</b>	+		+	+	
<b>Munnhule</b>	+				
<b>Mage- tarm</b>	+	+	+	+	
<b>Urinveier</b>	+	+			
<b>Hud</b>	+	+	+	+	+
<b>Negl</b>	+		+	+	+
<b>Ytre øregang</b>	+				
<b>Øye</b>	+	+			
<b>Luftveier</b>	+	+		+	+
<b>Sentralnerve- system</b>	+	+			
<b>Benmarg</b>	+	+			
<b>Hematogen spredning</b>	+	+	+		

### 4.2.3 *Candida albicans*

*Candida albicans* er en gjærsopplignende organisme fra klassen *Deuteromycetes*. Den danner blastosporer, klamydosporer og pseudomycel (figur 4.5) Organismen danner også kimrør i serum



fra menneske, sau, hest, kyr eller kanin, innen 2-4 timer ved 37 °C. (figur 4.6) Kimrøret representerer begynnelsen av spiring av cellen med dannelse av tråd som imidlertid ikke utvikles videre i dette miljøet. Kimrørlignende dannelser utvikles også hos *Candida stellatoidea*, men gjerne noe senere enn hos *Candida albicans*. Dersom prøvene leses av etter 2-4 timer, kan fenomenet med kimrør brukes som en noenlunde sikkert diagnostisk kriterium på *C. albicans*.



Figur 4.5: Blastosporer, klamydosporer og pseudomycel av *C. albicans*. (Bergan et al 1989)



Figur 4.6: Kimrør hos *C. albicans* (Bergan et al 1989)

*Candida albicans* er en opportunistisk patogen og den er den hyppigste sykdomsårsaken blant gjærsoppene og innen slekten *Candida*. Den forekommer normalt i tarm og på slimhinner hos friske mennesker. *C. albicans* er vanligste årsak til orale soppinfeksjoner. Den finnes i munnhulen hos nær 50 % av friske individer. Smitte til hud og neglerøtter skjer fra munn og tarm. Vekst av *C. albicans* i negler forekommer ved uttalt påvirkning med vann, rengjøringsmidler og andre kjemikalier (Bergan et al 1989, Norsk legemiddelhandbok 2006).

#### 4.2.4 Kandidiasis

Kandidiasis er en akutt eller subakutt infeksjon med gjærlignende sopp, oftest *C. albicans*. Hyppigst sees lokalaffeksjoner på slimhinner, samt kutane former med spredning, men affeksjon av indre organer forekommer.

Normalt er *Candida* ikke luftbåren, og smitte på huden skjer fra egen tarm eller munnflora. Derimot kan nyfødte smittes under fødsel eller fra omgivelsene. Kandidiasis opptrer ofte i forbindelse med redusert allmenntilstand og/eller immunforsvar. Symptomer skyldes ofte underliggende patologiske tilstander, eller predisponerende faktorer som for eksempel alder (spedbarn og

gamle er særlig utsatte), underernæring og behandling med antibiotika, immunosuppresiva eller steroider. Protoser er også en disponerende faktor. Omtrent en fjerdepart av protesebærere får symptomer som kan settes i forbindelse med kandidiasis i munnhulen. Det antas at høyt sukkernivå i urin, vevsvæske og svette predisponerer en diabetiker for kandidiasis.

#### Oral kandidiasis

Oral kandidiasis, også kalt trøske i munnhulen, oppstår lettere hos spedbarn, gamle og alvorlig syke, fordi karbohydratnivået stiger på grunn av matrester i munnhulen. Gjærsoppen vil da ikke hemmes av den bakterielle floraen. Symptomer er kremaktige, hvite og bløte belegg i velavgrensede områder flere steder i slimhinnen. Når belegget fjernes avdekkes en rød basis. Enkelte personer, spesielt i forbindelse med antibiotikaterapi, kan få nakne, atrofiske og smertefulle partier på tungen og ellers i munnen. Ved AIDS sees utbredte forandringer.

#### Candida vaginitt

Soppinfeksjoner i vulva og vagina skuldes i de aller fleste tilfellene *C. albicans*. Det dominerende symptomet er kløe, men svie og brenning og vannlatingsproblemer forekommer også, sammen med en grå, tykk vaginal utflod med utseende som kan minne om pultost. Infeksjonen forekommer ofte hos gravide.

#### Andre former for lokal kandidiasis

Infeksjoner med *Candida* sees også i bleieområdet hos små barn (bleieutslett). Hos voksne kan det forekomme rundt kjønnsorganer, noen ganger sekundært til seboréisk eksem eller andre typer eksem. Overvektige kan få utslett i hudfolder, og neglerotbetennelse med *Candida* infeksjon er hyppigst blant personer som stadig bløter hendene i vann, for eksempel husmødre og rengjøringspersonell. Bakere, kokker og kjøkkenpersonell utsettes for predisponerende faktorer både med fuktighet, mel og andre typer karbohydrater som deponeres i neglefolden.

#### Systemisk kandidiasis

Systemisk infeksjon med *Candida* ses hyppigst hos pasienter med betydelig nedsatt infeksjonsforsvar, som ved akutte leukemier, lymfomer, behandling med store doser cytotoksiske og immunosuppressive medikamenter, utbredte brannskader og AIDS. Pasienter med normalt infeksjonsforsvar får omtrent alltid slike infeksjoner iatrogen, det vil si at infeksjonen påføres under sykehusoppholdet som ledd i diagnostikk eller behandling.

Systemisk kandidiasis omfatter infeksjoner i alle vev unntatt hud, hår, negler, konjunktiva, munn og skjede.

(Bergan et al 1989)

#### **4.2.4.1 Kandidiasis i Mali**

Infeksjonssykdommer er hyppig forekommende i Mali. De forårsakes av bakterier, virus, sopp og andre parasitter. I Mali har vaginitt forårsaket av *C. albicans* en prevalens på 9,7 % i Sikasso, 9,8 % i Bamako og 26,6 % i Mopti. På grunn av høye kostnader for konvensjonelle legemidler mot *C. albicans* (se punkt 4.2.6) i Mali, og den lange tradisjonen for å bruke medisplanter, brukes sistnevnte av mange for behandling av sykdommen (Diallo 2000).

#### **4.2.5 Dermatofytter**

Definisjonsmessig omfattes dermatofyttene av sopp som forårsaker ringorm eller tinea (soppinfeksjon i hud) hos mennesker og dyr ved å invadere huden. Til dermatofyttene regnes slektene *Epidermophyton*, *Microsporum* og *Trichophyton*. Dermatofyttene gir bare overfladiske infeksjoner, som kun innebærer invasjon av keratin-substans, det vil si hud, hår og negler. De enkelte artene har ulike angrepssteder (Bergan et al 1989). Dermatofyttene kan virke patogene ved direkte vevsinvasjon og fordi de danner allergener.

Identifikasjon av dermatofytter er basert på utseende av kolonier på Sabouraud- eller Kimmig-agar og mikroskopisk morfologi.

#### **4.2.6 Antimykotika -legemidler mot sopp**

Mange soppmidler påvirker oppbygningen av soppens celle-membran. Mange vil også metaboliseres av cytokrom P-450 systemet (CYP), noe som ofte medfører interaksjoner med andre legemidler. Behandlingen av de fleste mykoser tar lang tid, noe som øker faren for resistensutvikling, ikke bare blant patogene sopparter, men også hos andre ikke-patogene sopparter i eller på kroppen. Langvarig behandling, fare for bivirkninger, interaksjoner og resistensutvikling gjør det viktig å velge riktig strategi i behandlingsopplegget. Midler som kan ha effekt ved systemiske mykoser, bør mest mulig være forbeholdt bruk ved disse tilstandene (Legemiddelhandboka 2006).

##### **4.2.6.1 Amfotericin B**

Amfotericin B har fungistatisk eller fungicid effekt avhengig av konsentrasjon. Middelet binder seg til steroler i soppens cellevegg,

og fører til endring i membranpermeabiliteten og lekkasje av celleinnhold.

Amfotericin B virker mot de fleste stammene av *Candida*, *Aspergillus* og kryptokokker. Disse har MIC 1 mg / l eller lavere. Primært resistente stammer forekommer sjelden, men resistens kan utvikles under behandling.

#### **4.2.6.2 Imidazol- og triazol derivater**

Det er i dag 7 imidazol-/triazolderivater på markedet. 4 av disse, flukonazol, vorikonazol, itrakonazol og ketokonazol kan gis peroralt og de to førstnevnte kan også gis parenteralt. Ekonazol, mikonazol og klortimazol brukes bare lokalt. Alle midlene virker ved å hemme ergosterolsyntesen i soppenes cellemembran, denne blir defekt og soppcellen dør. De ulike midlene har noe forskjellig antimykotisk spektrum. Resistensutvikling forekommer, og det er også en viss kryssresistens mellom de ulike derivatene. Alle midlene kan virke hemmende på pasientens egen steroidproduksjon, og alle blir metabolisert i lever.

#### **4.2.6.3 Caspofungin**

Caspofungin representerer en relativt ny klasse soppmidler, echinocandiner (ofte forkortet til candiner), som hovedsakelig virker ved å hemme det enzymet som fører til dannelse av glukane i soppens cellevegg. De nydannede soppcellene sprenes pga sitt høye intracellulære osmotiske trykk. Candiner har dermed fungicid effekt.

Caspofungin virker på mange ulike sopparter. Adekvat klinisk dokumentasjon mangler ved andre infeksjoner enn aspergillose, og selv her er dokumentasjonen meget liten.

#### **4.2.6.4 Terbinafin**

Terbinafin virker fungicid ved å interferere på sterolbiosyntesen. Finnes både til lokal og systemisk bruk. Virker på de fleste dermatofytter og *Candida*.

#### **4.2.6.5 Amorolfen**

Amorolfen har fungistatisk eller fungicid effekt ved å påvirke cellemembranen. Penetrerer lett huden, og neglelakk med amorolfen diffunderer gjennom negleplaten. Finnes på det norske markedet under navnet Loceryl.

#### **4.2.6.6 Nystatin**

Nystatin brukes som lokalbehandling ved *Candida*-infeksjoner på hud og slimhinner. Middelet bindes til steroler i soppens cellevegg og endrer membranpermeabiliteten. Virker spesifikt mot *Candida*, liten eller ingen resistensutvikling.

#### **4.2.6.7 Ciklopiroksolamin**

Ciklorpiroksolamin har fungicid effekt mot flere gjærsopper, blant annen *pityrosporum*-arter. Det har også noe effekt mot en del bakterier, foruten antiinflammatorisk effekt. Kun til lokal bruk. Brukes mot seboréisk dermatitt i hodebunnen hos voksne, og finnes på det norske markedet under navnet Stieprox.

#### **4.2.6.8 Andre midler**

Parahydroksybenzosyre, metylrosanilin (krystallfiolett) og salisylsyre i form av pudder, salve og spritholdige løsninger kan ha god effekt ved visse overflatiske soppinfeksjoner.

(Norsk legemiddelhåndbok 2006)

## 5 EKSPERIMENTELT

### 5.1 MATERIALER

#### 5.1.1 Reagenser

Aceton p.a	Prolabo, Fontenay sous Bois, Frankrike
Benzen	Merck, Darmstadt, Tyskland
Benzen	Prolabo Fontenay sous Bois, Frankrike
Boratbuffer 0,2 M, pH= 9 Laget av borsyre og NaOH	Farmasøytisk Institutt Universitetet i Oslo
Butanol	Merck, Darmstadt, Tyskland
<i>Candida albicans</i>	"Laboratoire de biologie médicale", INRSP, Bamako, Mali
<i>Candida albicans</i>	Farmasøytisk institutt, v/Anne-Lise Rishovd Universitetet i Oslo
1,1-Difenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH	Sigma, St.Louis, MO, USA
Diklormetan, p.a	Merck Darmstadt, Tyskland
Diklormetan	Fluka, Buchs, Sveits
Dimetylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Eddiksyre	VWR International Poole, England
<i>Erythrina senegalensis</i> , rotbark	DMT, Bamako, Mali
<i>Erythrina senegalensis</i> , stammebark	DMT, Bamako, Mali
Etanol	Arcus Produkter AS Oslo, Norge
Etylacetat	Fluka, Buchs, Sveits
Fysiologisk saltvann, sterilt	Farmasøytisk Institutt Universitetet i Oslo
d-Kloroform (CDCl <sub>3</sub> )	Aldrich Steinheim, Tyskland

Kloroform	Riedel de Haën, Seelze, Tyskland
Linolsyre	Sigma St.Louis, MO, USA
Lipoksidase (15-lipoksygenase)	Sigma, St.Louis, MO, USA
Maltekstraktagar Inneholder: Maltekstrakt 30 g/l Pepton from soya 3 g/l Agar-agar 15g/l (48 gram blandes i 1 liter vann og autoklaveres ved 121 °C i 10 minutter)	Merck, Darmstadt, Tyskland
d-Metanol (CD <sub>3</sub> OD)	Aldrich, Steinheim, Tyskland
Metanol normapur	Prolabo, Fontenay sous Bois, Frankrike eller Chemi-Teknik AS Oslo, Norge
Metanol p.a.	Merck, Darmstadt, Tyskland
3-(4,5-dimetyltiazolyl-2)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT)	Aldrich Steinheim, Tyskland
Nitrogen, N <sub>2</sub>	AGA AS Oslo, Norge
Mycostatin, tabletter Inneholder: Nystatin 500.000 IE	Bristol-Myers Squibb NY, USA
Petroleumseter	Merck, Darmstadt, Tyskland
Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) Dihydrate	Sigma St. Louis, MO, USA
Sabouraud 2 % glukoseagar Inneholder: Peptoner 10 g/l D(+)glucose 20g/l Agar-agar 17 g/l 47 g blandes i 1 liter vann, autoklaveres ved 121 °C i 15 minutter	Merck, Damstadt, Tyskland
Sabouraud 2 % glukosebuljong Inneholder: Pepton from meat 5 g/l Pepton from casein 5 g/l D(+) glucose 20 g/l 30 g blandes i 1 liter vann, autoklaveres ved 121 °C i 15 minutter	Merck, Damstadt, Tyskland
Serum, humant	INRSP, Bamako, Mali
Serum, Horse serum, sterilfiltrert for cellekultur, CAT. 14-403E,	Bio Whitaker, Combrex Company Walkersville, MD, USA
Silikagel 60 (0,2 – 0,5 mm)	Merck, Darmstadt, Tyskland

Silikagel 60 (0,040-0,063 mm)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Silikagel 60 PF <sub>254</sub> med gips	Merck, Darmstadt, Tyskland
Sulconazol	Sigma, St.Louis, MO, USA
Tetrametylsilan (TMS)	Aldrich Steinheim, Tyskland
Vann, destillert	Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

### 5.1.2 Apparat

<p><b>Analytisk tynnsjiktskromatografi</b> Silika 60 F<sub>254</sub>, aluminiumsplater</p> <p>RP-18 F<sub>254S</sub>, aluminiumsplater</p> <p>Elueringskar med lokk, ulike størrelser T.L.C. Chromatank</p> <p>Schott Duran, elueringskar med lokk</p>	<p>Merck, Darmstadt, Tyskland</p> <p>Merck, Darmstadt, Tyskland</p> <p>Desaga, Heidelberg, Tyskland</p> <p>Schott Duran, Wertheim /Main, Tyskland</p>
<p><b>Antifungaltest Mali</b> Silika 60 F<sub>254</sub>, glassplater 10 x10 cm</p> <p>Glassflaske (pyrex) med skrukork Autoklav Alpha Heat Industrial, Type-V</p> <p>Varmeovn Fuktighetsbevarende inkuberingskar (plastboks med lokk)</p>	<p>Merck, Darmstadt, Tyskland</p> <p>Ukjent leverandør Alpha Heat Industrial Co.Ltd, Tokyo, Japan.</p> <p>Ukjent leverandør Ukjent leverandør</p>
<p><b>Antifungaltest Norge</b> Silika 60 F<sub>254</sub>, glassplater 20x10 cm</p> <p>Autoklav: Hiclave-HV50</p>	<p>Merck, Darmstadt, Tyskland</p> <p>Wagner og Munz München, Tyskland</p> <p>Heraeus,</p>



<p>Varmeovn: Heraeus</p> <p>Varmeplate/magnetrorer: IKA RCT basic,</p> <p>Risteinkubator: C24 Incubator Shaker,</p> <p>Vortexmikser: MS2 Minishaker,</p> <p>Fuktighetsbevarende inkuberingskar (plastboks med plastfolie over)</p>	<p>Hanau, Tyskland</p> <p>IKA Labortechnik Staufen, Tyskland New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA</p> <p>IKA works Inc., Wilmington, NC, USA Ukjent leverandør</p>
<p><b>Automatpipetter</b> Finnpipette</p> <p>Nichiryo modell 8100</p>	<p>Labsystems, Helsinki, Finland Nichiryo, Tokyo, Japan</p>
<p><b>Fraksjonering på silikakolonne</b> Glasskolonne (diameter 35mm, lengde 92,5cm) Glasskolonne (diameter 17 mm, lengde 80 cm) Skilletrakt, 500ml (mobilfasereservoar) Prøveglass</p>	<p>Ukjent leverandør</p> <p>Ukjent leverandør</p> <p>Ukjent leverandør</p> <p>Ukjent leverandør</p>
<p><b>Fremkalling av flekker på tynnsjiktplater</b> Manuel spraydyse i glass Hårføner</p> <p>Elektrisk spraydyse, model GW 1</p> <p>Varmeovn, type S3</p>	<p>Ukjent leverandør Ukjent leverandør</p> <p>Merck, Darmstedt, Tyskland Odd A. Simonsen A/S Oslo, Norge</p>
<p><b>Mikroskopering</b> Leica mikroskop modell DMLS, fasekontrast Objektglass Menzel-glaser, 76 x 26 mm,</p>	<p>Leica Microsystems Wetzlar, Tyskland Braunschweig, Tyskland</p>
<p><b>NMR-spektrometer</b> Varian Gemini 2000.<sup>1</sup>H-200 MHz. <sup>13</sup>C-50 MHz.</p>	<p>Varian Palo Alto, CA, USA</p>



UVGL-58 (254 og 365 nm)	Ultra Violet Products, San Gabriel, CA, USA
<b>Varmemantel</b> Electromantle  Labmaster Isopad, type LMM/ER/3L	Electrothermal, London, England Tyco Thermal Controls, Menlo Park, CA, USA
<b>Vekter</b> <i>Analysevekter</i> Sartorius TE3135 (Norge)  Sartorius A2005 (Mali)  <i>Overskålsvekter</i> Mettler Toledo PB3002 (Norge)  Sartorius Basic B310-S (Norge)  A&D EK-400H  Gibertini EU-C7500BP (INRSP, Mali)	Sartorius, Göttingen, Tyskland Sartorius Göttingen, Tyskland  Mettler, Nänikon, Sveits Sartorius, Göttingen, Tyskland A&D, Bradford, MA, USA Gibertini Elettronica, Novate, Italia
<b>VersaFlash separasjon</b> VersaFlash stativ  VersaPak C-18, 40x150 mm kolonne  Kromatografpumpe Büchi 681	Supelco, Bellefonte, PA, USA Supelco, Bellefonte, PA, USA Büchi, Flawil, Sveits

## 5.2 METODER

### GENERELLE METODER

#### 5.2.1 Innveiting

Stoffer ble veid inn på analysevekt eller overskålsvekt avhengig av mengde.

#### 5.2.2 Volumreduksjon

Løsninger ble dampet inn under vakuum ved 40-60 °C på rotavapor for å redusere volum, oppkonsentrere løsninger eller bli kvitt alt løsemiddel.

Små mengder løsemiddel ble også fjernet ved at små prøveglass ble satt åpne i avtrekkskap slik at væske kunne fordampe.

### 5.2.3 Fjerning av løsemiddelrester

Ekstrakter og fraksjoner ble koblet til en oljevakuumpumpe i 5-60 minutter for å fjerne løsemiddelrester.

### 5.2.4 Fremkalling av flekker på tynnsjiktplate

#### Utstyr

Mali: En manuell spraydyse i glass ble brukt til å spraye på reagensene.

Hårføner ble brukt til oppvarming / fremkalling av flekkene etter å ha sprayet med Godin reagens (se 5.4.3)

Norge: Elektrisk spraydyse ble brukt til å spraye på reagensene. Fremkalling skjedde ved oppvarming i varmeovn til 105 °C i ca 5 minutter.

#### 5.2.4.1 UV-lys

Flekker som ikke er synlige i dagslys blir ofte synlig under kortbølget (254 nm) og/eller langbølget (366 nm) UV-lys.

UV-254 nm: Detekterer quenching-soner forårsaket av konjugerte dobbeltbindinger (f.eks. hos flavonoider, kumariner, noen alkaloider med mer.) På TLC plater merket 60<sub>254</sub> vil stoffer med konjugerte dobbeltbindinger vises som mørkere soner mot en gul-grønn fluorescerende bakgrunn.

UV-366 nm: Detekterer fluorescerende soner. (F.eks antraglykosider, kumariner, flavonoider og fenolkarboksylysyre, og noen typer alkaloider (Wagner and Bladt 1996).

#### 5.2.4.2 Dragendorff reagens

Sprayløsning:	Vismutnitrat	20,80 g
	Jod	38,10 g
	Natriumjodid	200 g
	Destillert vann	ad 1000 ml

Ristes godt i 30 minutter

Benyttes for å detektere alkaloider og heterosykliske nitrogenforbindelser. Gir en mørk brunoransje farge på en lysere bakgrunn (Wagner og Bladt 1996, Cannell 1998, Arama 2005).

### 5.2.4.3 *Godin reagens*

Sprayløsning A:	Vanilin	1 g
	Etanol 95 %	1000ml
Sprayløsning B:	Perklorsyre	3 ml
	Destillert vann	100 ml

Løsning A og B blandes umiddelbart før bruk og sprayeres på plata.

Etterpå sprayeres på en løsning av 4 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (løsning C)  
Tilslutt varmes platene med en hårføner, og ulike farger kommer til syne.

Detekterer ulike typer forbindelser og fargen på flekken kan antyde noe om hvilken type forbindelse som er tilstede. Ble brukt til å avgjøre hvilke fraksjoner som skulle slås sammen ved kolonnekromatografi i Mali. Fraksjoner som gav opphav til like flekker på tynnsjiktspatene ble slått sammen.

### 5.2.4.4 *Ceric reagens*

Sprayløsning:	Ceriumsulfat	1g
	Konsentrert svovelsyre	10 ml
	Vann	ad 100ml

Ceric reagens vil oksidere de fleste organiske komponenter på en tynnsjiktplate til fargede forbindelser. Syren inngår også muligens i redoksreaksjonen, men den fullstendige mekanismen er ukjent. For å få reaksjonen til å gå, plasseres platene i en varmeovn i ca. 10 minutter ved 100 °C. Reagensen ble brukt til å avgjøre hvilke fraksjoner som skulle slås sammen etter fraksjonering ved kolonnekromatografi og på kromatotron i Norge. Fraksjoner som gav like flekker på tynnsjiktspatene ble slått sammen.

## 5.2.5 Analytisk tynnsjikt-kromatografi

### Prinsipp

Kromatografi er et samlebegrep på separasjonsmetoder som er basert på det prinsipp at stoffene som skal separeres fordeler seg mellom to faser, hvorav den ene fasen er mobil mens den andre er stasjoner.

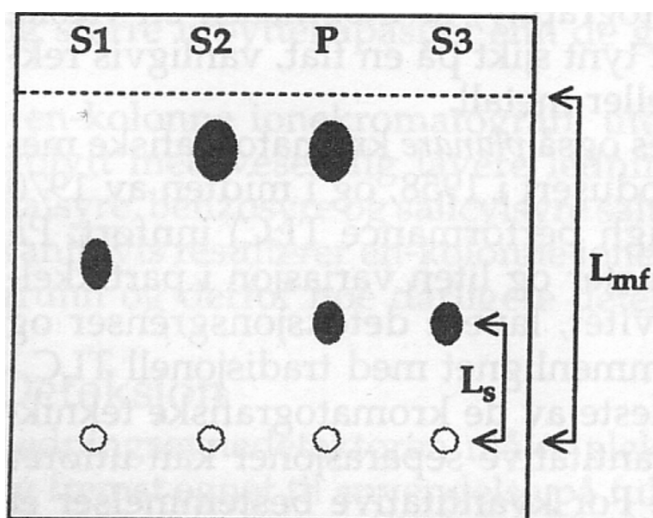
I TLC (Tynnsjikt-kromatografi, Thin Layer Chromatography) ligger stasjonærfasen som et tynt lag på en flat plate av glass, plast eller metall, og mobilfasen er en væske. Silika er den vanligste stasjonærfasen, men det finnes flere ulike typer. For omvendtfase (RP) systemer, bruker man ofte en silikabasert fase som er kjemisk

bundet til karbonkjeder med 18 karbonatomer, C-18 kjeder. Prøver og standarder påsettes som flekker eller bånd nær og like langt fra den ene sidekanten av platen. Løsningsmidlet dampes av og platen settes med påsettingskanten ned i et kar med tett lokk som inneholder mobilfasen slik at man får en mettet atmosfære. Nivået av mobilfasen må være lavere enn avstanden mellom platekanten og de påsatte flekkene. Når platen kommer i kontakt med mobilfasen vil mobilfasen trekkes oppover platen ved hjelp av kapillærkrefter, og komponentene i prøvene vil bli transportert med ulik hastighet og bli separert etter i hvilken grad de interagerer med stasjonær- og mobilfasen. I normalfase TLC (polar stasjonærfase og upolar mobilfase) vil polare substanser ha større affinitet en upolare stoffer for den stasjonære fasen, de retarderes og vandrer dermed saktere enn upolare stoffer på TLC platene. I omvendtfase kromatografi er det motsatt, da vil de polare stoffene vandre lengst.

Når mobilfasen nærmer seg øvre platekant, tas platen ut av karet og mobilfasen fjernes (fordamper vanligvis ved lufttørking).

Vandringen til et stoff beskrives med stoffets retensjonsfaktor ( $R_f$ -verdi) som kan defineres på følgende måte:

$R_f = L_s / L_{mf}$ , hvor  $L_s$  er stoffets vandringsavstand fra startsonens senter (startlinjen) til flekkens senterpunkt, og  $L_{mf}$  er avstanden fra startlinjen til mobilfasefronten (se figur 5.1) (Lundanes 1998)



Figur 5.1: Prinsipp for påsetting av prøve og standarder på TLC plate, samt utregning av  $R_f$ -verdi (Lundanes 1998).

### **5.2.5.1 Tynnsjiktsevaluering av metanol- og diklormetan råekstrakter fra rotbark og stammebark av *E.senegalensis***

#### **Prøver**

DR løst i diklormetan (10 mg/ml)

DS løst i diklormetan (10mg/ml)

MR løst i metanol (10 mg/ml)

MS løst i metanol (10 mg / ml)

#### **Reagenser**

Ulike mobilfaser:

1. Petroleumseter-Etylacetat (4:1)

2. Petroleumseter-Etylacetat (8:1)

3. Petroleumseter-Etylacetat (1:1)

4. Kloroform

5. Diklormetan

6. Etylacetat

7. Butanol: eddiksyre:vann (60:15:25)

8. Butanol: eddiksyre:vann (60:10:30)

#### **Utstyr**

Tynnsjiktspalter, Silika 60 F<sub>254</sub>,

Blyant

Linjal

Pinsett

Elueringskar med lokk

Kapillærrør (10 µl) til påføring av ekstrakt på tynnsjiktspalte

#### **Prosedyre**

1. DR, DS, MR og MS (10 µl av hver) ble applisert på tynnsjiktspalter ved hjelp av et kapillærrør. (DR og DS på samme plate, MR og MS på samme plate)
2. Tynnsjiktspalterne ble utviklet med mobilfasene 1-6 for DR og DS og 7-8 for MR og MS.
3. Platene ble så lufttørket, betraktet i kort- og langbølget UV-lys og sprayet med fremkallingsreagensene Godin og Dragendorf. (2 tynnsjiktspalter per mobilfase, 1 til hver fremkallingsreagens). Flekker ble avmerket.

### **5.2.5.2 Tynnsjiktsevaluering av fraksjoner fra diklormetan- ekstrakt av rotbark (DR) etter kolonnekromatografi.**

#### **Prøver**

Fraksjoner av diklormetanekestekt

**Reagenser**

Diklormetan  
Kloroform  
Etylacetat

**Utstyr**

Tynnsjiktspalter (Silika 60 F<sub>254</sub>), 10 x 20 cm  
Blyant  
Linjal  
Pinsett  
Elueringskar med lokk

**Prosedyre**

Prosedyren er den samme som i 5.5.2. men opptil 40 µl av hver fraksjon ble påsatt tynnsjiktspalterne og mobilfasene varierer i henhold til tabell 5.1

Tabell 5.1: oversikt over hvilke fraksjoner som ble eluert med hvilke løsemiddel

Utgangsfraksjon(er)/referanser	Løsemiddel	Sammenslåtte fraksjoner
DR	Diklormetan	I-XXVIII
XIV + XV	Kloroform	2I-2XIII
XVIII+ XIX	Kloroform:etylacetat (60:1)	3I-3IX
2VI	Kloroform	4I-4IX
XX	Diklormetan	5.0-5VIII
4I-4II-4III	Kloroform	6I-6VI
5I-5II-5III	2 % etylacetat i kloroform	7I-7V

**FRAKSJONERINGSMETODER****5.2.6 Ekstraksjon av plantemateriale****Plantemateriale**

Oppmalt rotbark fra *E.senegalensis*  
Oppmalt stammebark fra *E.senegalensis*

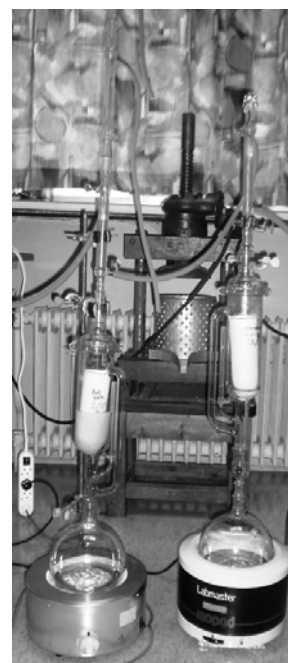
**Reagenser**

Diklormetan  
Metanol

**Utstyr**

Soxhlet oppsett (figur 5.2)  
Varmemantel

Figur 5.2: Soxhletoppsett for ekstraksjon av rotbark og stammebark av *E.senegalensis*





**Prosedyre**

1. Et Soxhletfilter ble fylt med plantemateriale nesten helt opp. Ett glassfiberfilter ble lagt på toppen for å hindre at plantematerialet sprutet over kanten. Filteret ble plassert i en Soxhletekstrator som på forhånd var fylt med diklormetan. (Det ble brukt 2-3 filterbeholdervolum med ekstraksjonsmiddel).
2. Plantematerialet ble ekstrahert helt til fargen på ekstraksjonsmiddelet i filterbeholderen var fargeløst (1-3 dager)
3. Etter ekstraksjon med diklormetan ble samme plantemateriale ekstrahert med metanol på samme måte.
4. Alle 4 ekstraktene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor, satt på oljevakuumpumpe og veid.
5. Ekstraktene ble så tatt med til Mali.

**5.2.7 Silika kolonneseparasjon****Prinsipp**

I kolonnekromatografi har man en fast stasjonærfase, mettet med elueringsvæske (mobilfase), pakket i en kolonne. Stoffene i stoffblandingen som appliseres på kolonnen vil vanligvis ha ulik affinitet for stasjonærfasen og mobilfasen. Dermed vil stoffene ved eluering vandre med ulik hastighet gjennom kolonnen og separeres.

Silika, også kalt silikagel, kiselgel og porøst glass, er et hydrofilt materiale med liten partikkelstørrelse. På overflaten finnes silanolgrupper (Si-OH) og siloxangrupper (Si-O-Si). Silanolgruppene er svakt sure og kan danne hydrofile interaksjoner med andre stoffer (Rasmussen 1998). En polar stasjonær fase med et upolart elueringsmiddel kalles for normalfase kromatografi, mens en upolar stasjonær fase, med et polart elueringsmiddel kalles for omvendtfase kromatografi. Polare stoffer vil ha størst affinitet for stasjonærfasen, mindre affinitet for en upolar mobilfase, og vil dermed vandre saktere gjennom kolonnen enn upolare stoffer som har størst affinitet for mobilfase. Store molekyler vil vandre saktere enn små molekyler, fordi disse vil møte større motstand i pakkematerialet. Så stoffene i kolonnen blir separert etter polaritet og størrelse.

Lengde og diameter på kolonnen, vil variere i forhold til hvor mye stoff som skal fraksjoneres. Pakkemateriale (her: silika) og elueringsvæske velges ut fra stoffblandingen som skal separeres. Man prøver gjerne ut ulike typer eluenter vha TLC først, til man finner et system som passer for det aktuelle stoffet på den kolonnen.

### 5.2.7.1 *Fraksjonering av diklormetaneekstrakt fra rotbark*

#### **Prøve**

Diklormetaneekstrakt rotbark (DR)

#### **Reagenser**

Diklormetan

Benzen

#### **Utstyr**

Glasskolonne pakket med silikagel (0,040-0,063mm)

Skilletrakt (fungerer som mobilfasereservoar)

Prøveglass til å samle opp fraksjonene

#### **Prosedyre**

1. Ca. 250 g silika ble rørt ut i benzen og overført til en kolonne (diameter 3,5 cm og lengde 92,5cm).
2. Kolonnen ble pakket slik at det ble 76,7 cm gel.
3. Kolonnen ble så vasket med litt benzen.
4. 10,1273 g av ekstrakt DR ble løst i 10 ml diklormetan og påført kolonnen med en pasteurpipette.
5. Stoffblandingen ble eluert ut med benzen, og rundt fraksjon 73 ble det skiftet til diklormetan.
6. Det ble først samlet opp 2 fraksjoner på 100 ml, deretter ble det samlet opp fraksjoner på ca 50 ml. Midt i fraksjon 154 gikk kolonnen uheldigvis tørr.
7. Resten av væska ble eluert ut, før silikaen med resten av materialet ble helt oppi et begerglass og ekstrahert med etylacetat over natten, og deretter filtrert.
8. Det ble så tilsatt metanol til begeret og ekstrahert i ca 1-2 timer, filtrert og gjentatt.
9. Fraksjoner ble slått sammen på bakgrunn av UV og Godinfremkalling av tynnsjiktspalter (Metode 5.2.4.1 og 5.2.4.3). Unntakene er etylacetatekstraktet som bare ble dampet rett inn og de 2 metanolekstraktene ble slått sammen og så dampet inn.

### 5.2.7.2 *Fraksjonering av fraksjon XIV +XV*

#### **Prøver**

Fraksjon XIV og XV (sammenslått)

#### **Reagenser**

Benzen

Benzen: kloroform i forhold 9:1 – 5:1 – 3:1

Kloroform

### **Utstyr**

Kolonne pakket med silikagel (0,2-0,5mm)  
Skilletrakt (fungerer som mobilfasereservoar)  
Prøveglass til å samle opp fraksjonene

### **Prosedyre**

1. Ca. 65 g silika ble rørt ut benzen og overført til en kolonne (diameter 1,7 cm og lengde 80,0 cm).
2. Kolonnen ble pakket slik at det ble 69 cm gel.
3. Kolonnen ble så vasket med benzen.
4. 339,6 mg av fraksjonene XIV + XV (sammenslått) som skal separeres ble løst i 2 ml benzen og påført kolonnen med en pasteurpipette.
5. Elueringshastigheten ble stilt inn på 1 ml / min.
6. Stoffblandingen ble først eluert ut med benzen, rundt fraksjon 110 ble det skiftet til benzen-kloroform (9:1), ved fraksjon 347 ble det byttet til benzen:kloroform (5:1), ved fraksjon 393 ble det byttet til benzen: kloroform (3:1) og tilslutt ble det ved fraksjon 458 byttet til ren kloroform.
7. Fraksjoner på 5 ml, (totalt 519 fraksjoner) ble samlet opp
8. Fraksjoner ble slått sammen på bakgrunn av UV og Godin-fremkalling av tynnsjiktspalter (Metode 5.2.4.1 og 5.2.4.3).

### **5.2.7.3 Fraksjonering av fraksjon XVIII + XIX**

#### **Prøver**

Fraksjon XVIII og XIX (sammenslått)

#### **Reagenser**

Diklormetan  
Benzen

### **Utstyr**

Kolonne pakket med silikagel 60 (0,2-0,5mm).  
Skilletrakt (fungerer som mobilfasereservoar)  
Prøveglass til å samle opp fraksjonene

### **Prosedyre**

1. Ca. 65 g silika ble blandet med benzen og overført til en kolonne (diameter 1,7 cm og lengde 80,0 cm).
2. Kolonnen ble pakket slik at det ble 68 cm gel.
3. Kolonnen ble så vasket med benzen.
4. 150,6 mg av fraksjonene XVIII + XIX (sammenslått). som skal separeres ble løst i 2 ml benzen og påført kolonnen med en pasteurpipette.

5. Elueringshastigheten ble stilt inn på 1 ml / min.
6. Stoffblandingen ble først eluert ut med benzen, rundt fraksjon 138 ble det skiftet til benzen-kloroform (9:1), ved fraksjon 249 ble det byttet til benzen:kloroform (5:1), ved fraksjon 588 ble det byttet til benzen: kloroform (3:1) og tilslutt ble det ved fraksjon 592 byttet til ren kloroform.
7. Det ble samlet 591 fraksjoner på 5 ml, og tilslutt 3 fraksjoner på 50 ml.
8. Fraksjoner ble slått sammen på bakgrunn av UV og Godin-fremkalling av tynnsjiktspalter (Metode 5.2.4.1 og 5.2.4.3).

### 5.2.8 VersaFlash kolonne-separasjon

#### Prinsipp

Prinsippet er det samme som for tradisjonell kolonnevæskrokromatografi, men det tar mye kortere tid. I Versaflash kolonne-separasjon benytter man seg av ferdig pakkede VersaPak kolonner, som settes inn i et VersaFlash stativ. Kolonnen kobles til pumpe som raskt pumper mobilfasen gjennom, og det samles opp fraksjoner på vanlig måte. Det finnes både silikakolonner (normalfase) og C-18 kolonner (omvendtfase).

Stoffblandingen som ønskes separert, påføres kolonnen på toppen ved hjelp av en sprøyte, kolonnen settes så inn i stativet, og mobilfasen pumpes gjennom kolonnen. Stoffer med ulik affinitet til kolonnen vil vandre gjennom kolonnen med ulik hastighet og bli separert på vanlig måte.



F

Figur 5.3: Bilde av VersaFlash utstyr (Sigma-Aldrich)

#### 5.2.8.1 Fraksjonering av fraksjonene XX, 2VI og 4I-4III

#### Prøver

Fraksjon XX

Fraksjon 2VI

Fraksjon 4I-4II-4III (sammenslått)

**Reagenser**

Metanol med 1 % eddiksyre

**Utstyr**

VersaFlash utstyr

Sprøyte, 5ml

Prøveglass til å samle fraksjoner i

**Prosedyre**

1. Kolonnen ble vasket med metanol eller mobilfase (metanol med 1 % eddiksyre).
2. DR 2VI ble forsøkt løst i metanol, aceton og etylacetat uten hell, så den ble tilslutt løst i diklormetan. Ikke alt løste seg, det kan skape problem i forhold til at det løses etter hvert og dermed skape brede bånd og dårlig separasjon, i tillegg til at DCM kan skape en væskefront når mobilfasen er metanol med 1 % eddiksyre, og ta med seg alt stoffet. Heldigvis ble ikke dette noe problem her. Fraksjon 4I-4III og fraksjon XX ble derfor løst direkte i diklormetan.
3. Fraksjonsløsningen ble overført til en sprøyte som var koblet til toppen av kolonnen, ved hjelp av en pasteurpipette. Stempelet ble satt nedpå, med luft i mellom stempelet og prøven, slik at gummien ikke kom i kontakt med diklormetanløsningen (det ville løst opp gummien) Ved hjelp av stempelet ble prøven presset ned i kolonnen.
4. Kolonnen ble satt tilbake i VersaFlash stativet, og isokratisk eluering ble startet.
5. Det ble samlet opp fraksjoner a 20 ml (første fraksjon var ca 50 ml), for antall fraksjoner fra hver utgangsfraksjon, se tabell 2.
6. Tilslutt ble det eluert med aceton, for å vaske ut eventuelle rester.
7. Kolonnen ble deretter vasket med 50 % metanol i vann, tatt ut av stativet, og det ble satt på propper i begge ender, for oppbevaring til neste gang.
8. Fraksjoner ble slått sammen på bakgrunn betraktning i UV-lys og Ceric-spraying av tynnslaktsplatene. (Metode 5.2.4.1 og 5.2.4.4.) Fraksjoner som gav opphav til like flekker på platene, ble slått sammen.
9. Etter sammenslåing ble fraksjonene dampet inn på rotavapor, og oljevakuumpumpe og veid.

Tabell 5.2: Oversikt over ulike fraksjoner som ble separert på VersaFlash.

Utgangsfraksjon(er)	Vekt	Antall fraksjoner	Sammenslåtte fraksjoner
2VI	229,9 mg	21	4I-4VIII
XX	281,5 mg	23	5.0-5VIII
4I-4II-4III	156 mg	17	6I-6VI

## 5.2.9 Sentrifugalt akselerert TLC (CA-TLC)

### Prinsipp

Prinsippet er det samme som for vanlig analytisk TLC, men TLC platen er sirkulær, og den dreier rundt. Fraksjonen som ønskes separert, påsettes innerste del av platen gjennom et hull og en veke som går ned på platen. Eluenten kobles deretter til, og stoffer vil eluere oppover plata på vanlig måte, samtidig som sentrifugalkraften vil virke inn. Når de når enden av plata slynges de ut, og kan samles opp i fraksjoner. Lokket på kromatotronen er gjennomtrengelig for UV-lys, så dersom stoffene er synlige i kort- og/eller langbølget UV-lys, kan man følge med på når stoffene vil eluere ut. Hele prosessen foregår under en inert  $N_2$  atmosfære, fordi oksygen lett kan reagere med stoffer som sitter på silikaplaten.

### 5.2.9.1 Fraksjonering av fraksjon 5I-5II-5III

#### Prøver

Fraksjon 5I,5II og 5III (sammenslått)

#### Reagenser

Kloroform med 2 % etylacetat

$N_2$

#### Utstyr

Kromatotron

Prøveglass til å samle fraksjoner i

Skilletrakt (mobilfasereservoar) koblet til kromatotronen

UV-lampe, til å følge med på hvor ønsket stoff var.

#### Prosedyre

1. En TLC plate med et 2 mm lag av Silika-gel 60 PF254 med 25 % gips, ble festet i kromatotronen.
2.  $N_2$  ble koblet til apparatet via et flowmeter.
3. Mobilfase ble kjørt gjennom systemet, for å deaktivere mulige aktiverte Si-grupper, og for å fjerne eventuelle fettforurensinger.
4. Fraksjon 5I-5III (sammenslått) ble løst i litt kloroform, og påført kromatotronen ved hjelp av en pasteurpipette.
5. I starten ble det samlet opp 20 ml fraksjoner. Etter hvert begynte ønsket stoff å nærme seg kanten av TLC platen, dette kunne følges med på ved hjelp av UV-lampe.
6. Nå ønsket stoff begynte å komme ut fra kromatotronen, ble det samlet opp 5 ml fraksjoner. Etter at alt så ut til å ha kommet ut ble det til slutt samlet opp 3 fraksjoner på 20 ml, for å være helt sikre på å få med alt.
7. Fraksjonene ble testet på vanlig analytisk TLC, og fraksjoner ble utvalgt for NMR-spektroskopi.

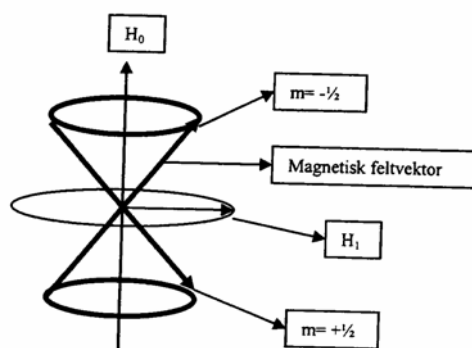
## ANALYSEMETODER FOR STRUKTUROPPLARING

### 5.2.10 NMR spektroskopi

#### Prinsipp

NMR-spektroskopi (Nuclear Magnetic Resonance), eller kjernemagnetisk resonans spektroskopi gir informasjon om karbon og hydrogen "skjelettet" i et organisk molekyl.

Alle atomkjerner med et odde antall protoner og/eller nøytroner har spinn (dvs. spinner rundt sin egen akse) og oppfører seg derfor som små magneter. Eksempel på slike atomkjerner er blant annet  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$ .



Figur 5.4: NMR prinsipp (Malterud, 1991)

Magnetiske atomkjerner har et magnetisk kvantetall  $m = + / - 1/2$  og de vil orientere seg enten med (parallelt til) eller mot (antiparallelt til) et ytre magnetfelt ( $H_0$ ). Dette magnetfeltet roterer og magnetfeltvektoren har en rotasjonshastighet  $\nu_0$ . Den parallelle orienteringen er noe lavere i energi, og favoriseres derfor litt over den antiparallele retningen. Dersom en magnetisk kjerne innstilt etter et ytre magnetfelt, så bestråles med elektromagnetisk stråling med den riktige frekvensen (Larmorfrekvensen, resonansfrekvens), vil den absorbere energi og "flippe over" fra det lave energinivået til det høyere, og vi sier da at den magnetiske kjernen er i resonans. Energien tilføres kjernen via et roterende magnetfelt ( $H_1$ ) som står vinkelrett på  $H_0$ . Når  $H_1$  har rotasjonshastighet  $\nu = \nu_0$ , vil energien overføres til kjernen og  $m = -1/2 \rightarrow m = +1/2$ . Det er dette energiopptaket som måles som funksjon av  $\nu$ , og gir opphav til et spekter som gir strukturinformasjon. Fordi Larmorfrekvensen påvirkes av lokalmiljøet til den enkelte kjerne, vil alle kjerner som ikke har et identisk lokalmiljø gi opphav til signaler på ulike steder i spekteret. Atomkjerner som er omgitt av et elektronrikt miljø, vil være "shielded" fra det ytre magnetfeltet og dermed kreve høyere energi for resonans. I spekteret vil feltstyrken øke fra venstre mot høyre (Malterud 1991; McMurry 1999).

Egenskaper ved  $^1\text{H}$ -NMR spekter som brukes ved tolkning er

Kjemisk skift ( $\delta$ ): Posisjon i spekteret. Måles relativt i forhold til en indre standard, vanligvis TMS (tetrametylsilan) Jo mer mot venstre et signal er, jo lavere feltstyrke og jo mindre "shielded" er atomkjernen (McMurry 1999)

Integreringskurve: Den relative intensiteten, (arealet under kurven), til et signal i  $^1\text{H}$ -NMR spektroskopi er proporsjonal til antall protoner som gir opphav til signalet. Ved å måle høyden på integralkurven av toppene kan man bestemme forholdet mellom antall H-atomer i hver topp. (Malterud 1991)

Kobling/splitting: I et  $^1\text{H}$ -NMR spekter vil signal fra et gitt proton påvirkes av et eller flere proton på samme eller nabo C-atom. Like proton kobler ikke med hverandre, så for at 2 proton på samme C skal koble, og signalene splittes, må de være ulike. Koblingen gir opphav til et komplekst mønster, og denne splittingen av signalet kan ofte gi verdifull informasjon om strukturen til molekylet, fordi det er et direkte resultat av interaksjon med naboprotonene, og antall topper i et signal (for eksempel singlet, dublett, triplett, multipllett) kan gi informasjon om hvor mange proton som sitter i nabostilling. Koblingsregel: Et signal fra en gruppe med  $n$  like naboer, er oppsplittet til  $n + 1$  topper. For nærstående topper gjelder mer komplekse regler. (Malterud 1991; McMurry 1999)

Koblingskonstant: Avstanden mellom toppene i en multipllett kalles koblingskonstant, betegnet  $J$ . Den måles i Hz, og ligger generelt i området 0-18. Samme koblingskonstant finnes i begge signalene fra 2 protoner som kobler med hverandre. Dersom et proton har flere ulike naboer, kan det få flere koblingskonstanter. Størrelsen på koblingskonstanten kan også si oss noe om strukturen. For eksempel så vil  $o$ -protoner på en aromatring gjerne ha en koblingskonstant  $J$  på ca. 8 Hz.

I tillegg til de mest brukte  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$  spekter, ble det for en fraksjon også tatt opp andre spektra som kunne gi mer strukturinformasjon



APT-spektrum "Attached Proton Test" gir en indikasjon på de ulike karbonatomenes kjemiske natur ved at signalene for sekundære og kvartære karbonatomer peker oppover, mens de primære og tertiære peker nedover. Alle signalene kommer ved deres naturlige shift.

COSY-spektrum Proton-proton korrelasjonsspektroskopi spektra gir informasjon om koblinger mellom ulike protoner. Signalene merkes av langs to akser, hvilket gir en speilbildeeffekt langs et diagonalt mønster. Signaler utenfor denne diagonalen viser koblingene.

### Reagenser

Deuterert kloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) tilsatt TMS

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

### Utstyr

NMR-rør med propp

NMR- spektrometer

### Prosedyre

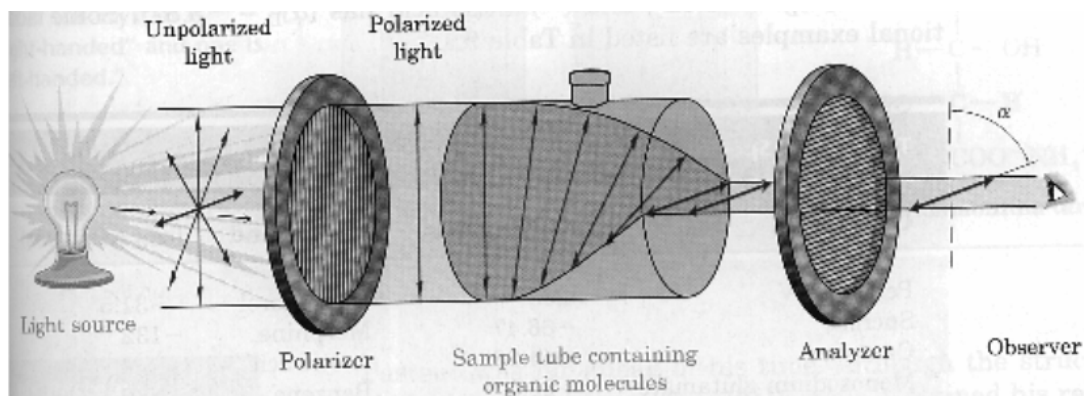
1. Prøvene som skal testes løses i rundt 1 ml deuterert løsemiddel. Metanolekstraktene ble løst i deuterert metanol, diklormetaneekstrakt og fraksjoner ble løst i deuterert kloroform.
2. Løsningen ble overført til NMR-rør ved hjelp av pipette og analysert på NMR-spektrometeret. Både H-NMR og C-NMR ble utført.

## 5.2.11 Måling av optisk aktivitet

### Prinsipp

Alle kirale stoffer vil dreie rotere planpolarisert lys. Dvs. molekyler som har et eller flere kirale senter, mest vanlig er et C-atom med 4 ulike substituenten.

Når en stråle av planpolarisert lys sendes gjennom en løsning av optisk aktive molekyler, blir planet for polariseringen rotert. Mengden av rotasjon kan bestemmes ved hjelp av et polarimeter (se figur 5.5).



Figur 5.5: Skjematisk fremstilling av polarimeter (McMurry 1999)

En løsning av optisk aktive molekyler plasseres i prøvebeholderen, planpolarisert lys sendes gjennom og roteres. Lyset går så gjennom en analysator, som roterer inntil lyset går gjennom den, og man kan da observere i hvor stor grad rotering har skjedd. Rotasjon blir betegnet med  $\alpha$  og benevnes med  $^{\circ}$  (grader). I tillegg til å bestemme graden av rotasjon, kan man også bestemme retningen. De molekylene som roterer lyset mot venstre (mot klokka) sies å være levorotatory, mens de som roterer med klokka kalles dextrorotatory. For enkelthetskyld blir rotasjon til venstre kalt (-) mens rotasjon til høyre blir kalt (+).

Rotasjonen observert i en løsning er avhengig av antall optisk aktive molekyler i løsningen. Dvs. jo høyere konsentrasjon, og jo lengre vei lyset må gå gjennom prøven, jo større rotasjon. Rotasjonen er også avhengig av bølgelengden på lyset som brukes. Spesifikk rotasjon,  $[\alpha]_D$ , er et tall som tar hensyn til alle disse tingene, og som gir oss et tall som kan sammenlignes. Det er definert som den observerte rotasjonen ved 589 nm (D-linjen i Na spekteret) når prøvelengden,  $l$ , er 1 desimeter, og konsentrasjonen  $C$  er 1 mg / ml. Den kan beregnes fra formelen:

$$[\alpha]_D = \alpha / lc,$$

hvor  $\alpha$  er observert rotasjon,  $l$  er veilengden for lyset gjennom prøvecellen målt i desimeter og  $c$  er konsentrasjonen i g/ml. I tillegg vil temperatur og løsemiddel spille inn på verdien.

### Prøver

Fraksjon 6III

Fraksjon 7III

### Reagenser

Kloroform

**Utstyr**

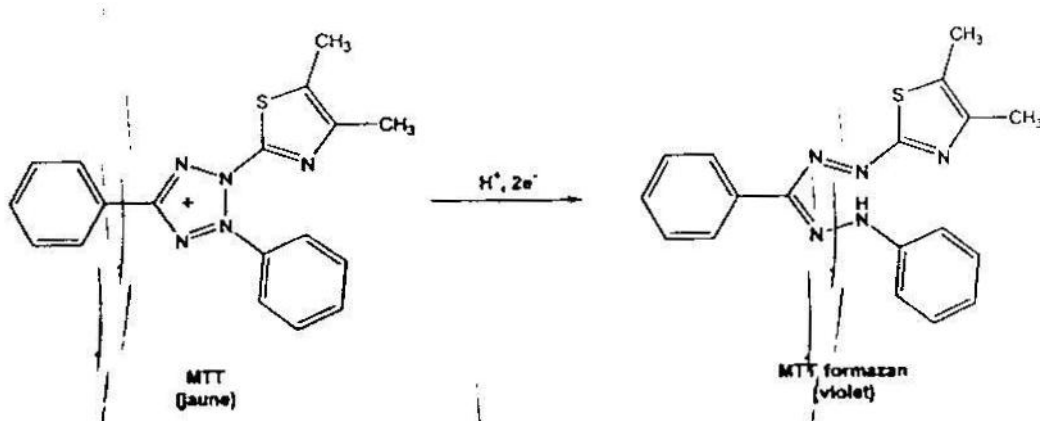
Polarimeter

**Prosedyre**

1. Stoffene som skal testes løses i 2 ml av et egnet løsemiddel (her: kloroform).
2. Løsningen overføres til kyvetten ved hjelp av en pipette, kyvetten fylles helt full.
3. Kyvetten plasseres i polarimeteret, analyseres og verdien for rotasjon avleses når den har stabilisert seg.

**BIOLOGISK TESTING****5.2.12 Test av antifungal aktivitet****Prinsipp**

Dette forsøket baserer seg på en TLC bioautografisk metode beskrevet av Rahalison og kollegaer i 1991 (Rahalison et al 1991). Metoden er den samme som ble brukt av Arama i hans arbeid med testing av antifungal aktivitet (Arama 2005). En silikatynnsjiktplate i glass hvor de ulike fraksjonene samt rækstraktet er applisert og eluert i et passende system, blir påført en maltagar-sopp suspensjon og inkubert. Etter inkubasjon sprayeres platene med en løsning av 3-(4,5-dimetyltiazolyl-2)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) (2,5 mg/ml). MTT er gult. Det vil spaltes og bli redusert av enzymer i mitokondrier hos metabolsk aktive celler til den fiolette substansen MTT-formazan (figur 5.6). Hemmingssoner vil da fremtre som lyse, fargeløse soner mot en fiolett bakgrunn. Eventuelle hemmingssoner vil da indikere tilstedeværelse av fungicide og/eller fungistatiske stoffer. På denne måten kan man finne ut i hvilke(n) fraksjon(er) man skal arbeide videre med for å få isolert aktive komponenter.



Figur 5.6: Reduksjon av MTT (gul) til MTT formazan (fiolett) av enzymer i mitokondrier hos levende celler.

### **Reagenser**

TLC plater i glass  
Diklormetan  
Kloroform  
Nystatin (positiv kontroll Mali)  
Sulconazol (positiv kontroll Norge)

### *Candida albicans*

Sterilt fysiologisk saltvann (0,9 % NaCl løsning)  
Sabouraud 2 % glukoseagar  
Sabouraud 2 % glukosebuljong  
(I Mali ble det brukt ferdig pulverblanding, i Norge laget vi det selv)

Maltekstraktagar  
Tetrazolium blue for microscopy (MTT)  
Etanol 70 %  
Serum

### **Utstyr**

Vekt  
Elueringskar med lokk  
Varmeplate /magnetrorer  
Erlenmeyerkolber  
Glassflasker (pyrex) med kork  
Petriskåler  
Autoklav  
Varmeovn  
Fuktighetsbevarende inkuberingskar (plastboks med lokk)  
Vortexmikser  
Risteinkubator  
Mikroskop  
Objektglass

### **Prosedyre**

Forsøket ble utført 2 ganger ved laboratoriet for medisinsk biologi ved INRSP i Bamako, Mali, og en gang ved avdeling for mikrobiologi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

### **Dag 1:**

#### **Støping av petriskåler med Sabouraud 2 % glukoseagar**

1. 4,7 g Sabouraud 2 % glukoseagar ble veid inn og løst i 100 ml destillert vann under oppvarming og omrøring med glasstav til alt var løst.
2. Løsningen ble hatt over i en pyrex glassflaske med skrukork og autoklavert ved 121 °C i 15 minutter.

- Løsningen ble så avkjølt litt, før den ble helt over i 4 petriskåler. Skålene ble så avkjølt i kjøleskap til agaren stivnet (ca. 30 minutter).

### Utsåing av *C.albicans*

For å få en fersk soppkultur å jobbe med dagen etter, måtte vi så ut på nytt.

- 10 ml fysiologisk saltvann ble fordelt på 2 små reagensglass.
- C.albicans* fra 2 ulike agarskåler (fått fra INRSP) ble overført til hver sitt reagensrør ved hjelp av en plastikkøse og blandet godt.
- 1 øsespeil fra hvert reagensglass ble overført til hver sin nystøpte petriskål og spredt ut i et mønster omtrent slik:



Figur 5.7: Illustrasjon over hvordan en suspensjon av *C.albicans* ble sådd ut på agarskål

Skålene ble inkubert over natten ved 30 °C.

Det ble laget 2 skåler for sikkerhets skyld, i tilfelle den ene ikke skulle bli bra.

### Dag 2:

#### Tillaging av Sabouraud glukose 2 % buljong

- I Mali ble 3,0 g Sabouraud 2 % glukosebuljongpulver veid inn og løst i 100 ml destillert vann under omrøring. Løsningen ble fordelt likt på 2 erlenmeyerkolber, og en magnet ble hatt oppi hver kolbe. I Norge ble ingredienser til 50 ml veid inn hver for seg i 2 omganger, og løst i 2 x 50 ml destillert vann (se reagensliste, punkt 5.1.1).
- I Mali ble kolbene tettet med bomull på toppen, i Norge ble de tettet med aluminiumsfolie og autoklaveringsstape, og autoklavert i 15 minutter ved 121 °C.
- Løsningene ble så avkjølt. Den ene kolben (A) ble tilsatt en god del (ca. 1 linje) *C.albicans*, fersk kultur og satt på magnetrører (Mali) eller risteinkubator (30 °C, 217 rpm (Norge) over natten.
- Den andre kolben (B) ble satt i kjøleskap.

#### Kimrørstest av *C.albicans*.

For å være sikre på at det var *C.albicans* vi arbeidet med, ble det utført en kimrørstest på den 24 timer gamle kulturen utsådd tidligere. Det er bare *C.albicans* av gjærsoppene som danner kimrør

etter inkubering i 2-4 timer i serum. (Se punkt 4.2.3). I Mali ble testen kalt filamenttest.

5. 2 kolonier *C.albicans* ble overført til et lite reagensglass med 1 ml humant serum (INRSP) eller hesteserum (FI) ved hjelp av en avbrent øse, og inkubert ved 37 °C i 3-4 timer.
6. Deretter ble en dråpe av løsningen hatt over på objektglass, dekket til med dekkglass og studert i mikroskop.

### **Dag 3:**

#### **Tillaging av tynnsjiktspalter**

##### **Prosedyre**

1. 10 mg (nøyaktig vekt ble notert) av hver fraksjon som skulle undersøkes ble løst i 1 ml diklormetan og 20-30 µl av hver av disse løsningene ble applisert på en TLC plate. Alternativt ble en mindre fraksjon løst i et mindre volum løsemiddel, eller det ble applisert på flere ganger på plata, men til sammen 200-300 µg av hver fraksjon ble påført tynnsjiktspalterne.
2. I tillegg ble det laget positiv kontroll:
  - Mali: En nystatinløsning ble laget av 1 tablett Mycostatine 500.000 UI. Den ble pulverisert i morter og 1 mg av dette pulveret ble løst i 1 ml kloroform. 10 -20µl av denne løsningen ble også applisert på hver TLC plate
  - Norge: 10 mg sulconazol ble veid inn og løst i 5 ml metanol, for å gi en løsning på 2 mg / ml. 10 µl av denne løsningen (20 µg) ble applisert på hver TLC plate ved hjelp av et kapillærrør.
3. 40 ml diklormetan (0,5 cm væske) ble hatt oppi et stort elueringskar, og platene ble eluert til væskefronten var 1 cm fra toppen (ca. 20-30 minutter).
4. Platene ble tatt ut, lufttørket, eventuelt betraktet i UV-lys, og fraktet til INRSP for antifungal testing i Mali, eller til avdeling for Mikrobiologi, ved FI.
5. Det ble laget referanseplater i glass eller aluminium, som ble betraktet i kort- og langbølget UV lys og fremkalt ved spraying med enten Godin eller Ceric reagens.

##### **Tillaging av *C.albicans* suspensjon og maltagar**

6. Tidlig på morgenen ble 0,5 ml av løsningen fra kolbe A tatt over i kolbe B, (se punkt 3-4, dag 2) det vil si en 100 gangers fortykning. Kolbe B ble så satt på magnetrører eller risteinkubator i 7 timer. Etter 7 timer er sannsynligheten stor for at man er i eksponentiell vekstfase, som er den fasen hvor soppcellene vokser best.

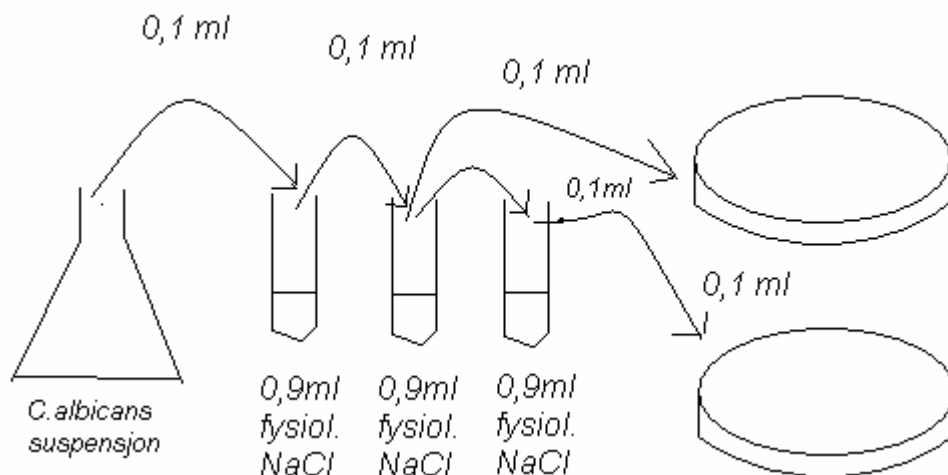
7. Imens ble det laget et medium av maltagar, som er det mediet som skal påføres TLC platene. Mengden som lages er avhenging av størrelse og antall TLC plater (4,8 g maltekstrakt løses i 100 ml destillert vann). Til en TLC plate på 10x10 cm trengs ca 10 ml maltagar.
8. Maltagaren autoklaveres og holdes flytende på vannbad ved ca. 45 °C (over 48 °C dør soppcellene og under 43 °C stivner mediet).
9. Etter 7 timers omrøring på magnetrører eller risteinkubator, tilsettes 1,0 ml av suspensjonen i (B) per 100 ml maltagar, og man skal da få en løsning med ca  $10^5$  celler / ml.
10. 10 ml av løsningen appliseres på hver 10 x10 cm TLC plate, jevnt og raskt ved hjelp av sterile pipetter.
11. Platene inkuberes i et fuktig miljø (plastboks med lokk, fuktig papir i bunnen og eventuelt en skål med vann) i 30 °C over natten.

### Tetthetsmåling av *C.albicans*

For å bekrefte at det faktisk var  $10^5$  celler i maltagaren, og at forsøket dermed er overførbart til norske betingelser, ble det utført en fortynnings- og talletest.

### Prosedyre

12. Det ble laget en fortynningsrekke hvor 0,1 ml av Sabouraud buljongen fra kolbe B ble fortynnet i 3 omganger med fysiologisk saltvann som vist på figur 5.8 (under).



Figur 5.8: Fortyning av *C.albicans* suspensjon

13. Fra de 2 siste fortynning ble 0,1 ml av løsningen overført på en Sabouraud 2 % glukose agarskål, og inkubert ved 30 °C natten over.

**Dag 4:****Fremkalling av tynnsjiktspatene**

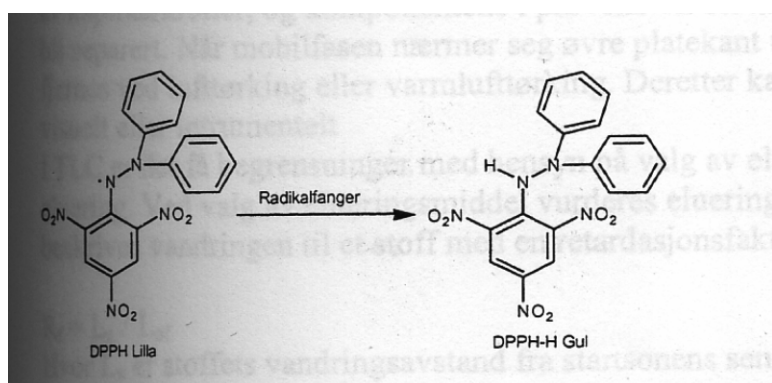
1. Tynnsjiktspatene som har vært inkubert over natt, sprayes med en vandig løsning av MTT 2,5 mg / ml, og inkuberes i nye 4 timer ved 30 °C. Hemmingssonene vil fremstå som fargeløse soner på en lilla bakgrunn.
2. Etter 4 timer tas platene ut, sprayes med 70 % etanol for å drepe soppen, tørkes, avfotograferes og pakkes i plastfolie for å hindre at de går i stykker.

**Telling av kolonier og beregning av tetthet**

1. Agarskålene med *C.albicans* fra punkt 13 dag 3, ble tatt ut, og den skålen som var enklest å telle ble telt. Når man vet antall kolonier på skåla, og hvilken fortykning skålen er sådd ut fra, kan man enkelt regne seg tilbake hvor mange soppceller det var i utgangssuspensjonen, fordi hver enkelt koloni på skåla stammer fra en soppcelle.

**5.2.13 DPPH-scavenging****Prinsipp**

En metode for å bestemme antioksidantaktivitet ved hjelp av det frie radikalet DPPH ble foreslått av Blois i 1958. DPPH (1,1 Diphenyl 2 picrylhydrazyl) er et relativt stabilt fritt radikal. På grunn av det uparrede elektronet (se figur 5.9) har DPPH et sterkt absorpsjonsbånd ved 517 nm, og DPPH i løsning gir en sterk lilla farge (Blois 1958). Ved reaksjon med en radikalscavenger vil fargen skifte fra lilla til gul, og absorbansen ved 517 nm vil gå ned (Glavind 1963).



Figur 5.9: DPPH skifter farge fra lilla til gul i kontakt med en radikalfanger

Nedgangen i absorbans ved 517 nm er relatert til mengde og aktivitet av radikalscavenger. I et bestemt konsentrasjonsområde



vil en metanolisk DPPH-løsning følge Lambert-Beers lov (Blois 1958).

$$A = a \times b \times c$$

Der A er absorbans, a er spesifikk absorpsjonskoeffisient, b er lyslengden i kyvetten og c er konsentrasjonen av stoffet det måles på (her DPPH). Fordi a og b er konstante vil absorbansen A endres som en funksjon av konsentrasjonen c. Når DPPH-konsentrasjonen i kyvetten går ned som følge av reaksjon med en radikalscavenger, vil absorbansen gå ned.

Prosent DPPH-schavenging kan beregnes ved følgende formel:

$$100 \times (A_{\text{start}} \times (29,5/30) - A_{\text{slutt}}) / (A_{\text{start}} \times (29,5/30)), \text{ der}$$

$A_{\text{start}}$  = Absorbans av DPPH løsningen før tilsetning av prøve (29,5 / 30) faktoren skyldes fortykning av DPPH løsningen etter tilsetning av 50 µl prøveløsning til en 2,95 ml DPPH løsning

$A_{\text{slutt}}$  = Absorbans i løsningen etter 5 minutter (Malterud et al. 1993).

### **Prøver**

Flere fortykninger av hver av prøvene som skal testes (DR, MR, DS, MS, 6III og 7III)

### **Reagenser**

DPPH  
Metanol  
DMSO

### **Utstyr**

UV apparat  
Kyvetter  
Pipetter

### **Prosedyre**

1. UV-spektrofotometret ble slått på, og de ulike parameterne innstilt.
2. Ren metanol ble tilsatt kyvette og brukt som blindprøve.
3. Det ble laget en DPPH løsning ved å tilsett litt DPPH i metanol. Løsningen ble satt på magnetrører for omrøring.
4. DPPH-løsningen ble innstilt, ved å måle absorbansen av den. Absorbansen skulle være ca.1. Ved for høy absorbans ble det tilsatt mer metanol, ved for lav absorbans ble mer DPPH tilsatt løsningen.

5. Det ble laget løsningen med kjente konsentrasjoner av de ulike prøvene som skulle testes. For 6III (erybraedin A) og 7III (shinpterocarpin – phaseollin 3:1) ble det laget løsninger på følgende måte:
  - a. Fraksjonene med nøyaktig kjent vekt, (og molvekt) ble løst i 10 ml kloroform. Hhv 1,12 ml og 0,6 ml av løsningene ble pipettert ut, dampet inn og løst på nytt i 2 ml DMSO, slik at konsentrasjonen blir 10 mM.
  - b. Denne løsningen ble så seriefortynnet ved å pipettere ut 1 ml og tilsette 1 ml DMSO flere ganger, slik at konsentrasjoner på hhv 5 mM, 2,5 mM, 1.25 mM ble oppnådd.
6. For MR, DR, MS og DS ble det laget en løsning på 10 mg/ml, ved å veie inn 30 mg og løse dette i 3 ml. Denne løsningen ble så fortynnet videre til 5 mg/ml (MR, DR) og til 2,5 mg/ml (MR).
7. Det ble laget en positiv kontroll av quercetin ved å løse 5 mg i 3 ml DMSO for å gi en konsentrasjon på 5 mM, som ble fortynnet videre til 2,5 mM og til 1,25 mM.
8. 2,95 ml DPPH ble tilsatt 3 kyvetter. Absorbansen ble målt i alle kyvettene og notert ned. Deretter ble 50 µl fra prøven som skulle testes tilsatt hver av kyvettene. En stoppeklokke innstilt på 20 sekunder ble satt i gang og i løpet av denne tiden ble prøvene omrørt med plastspatler. Når de 20 sekundene var omme, ble apparatet startet og absorbansmålingene begynte.
9. For MS og DS ble det kun målt på konsentrasjonen 10 mg / ml.
10. For DR, 6III og 7III ble det kun målt på 5 mg / ml konsentrasjonen.
11. For MR ble det målt på konsentrasjonene 10 mg/ml, 5 mg/ml og 2,5 mg/ml.
12. For quercetin ble det målt på 5 mM, 2,5 mM og på 1.25 mM.
13. % DPPH scavenging ble beregnet ved hjelp av overnevnte formel.

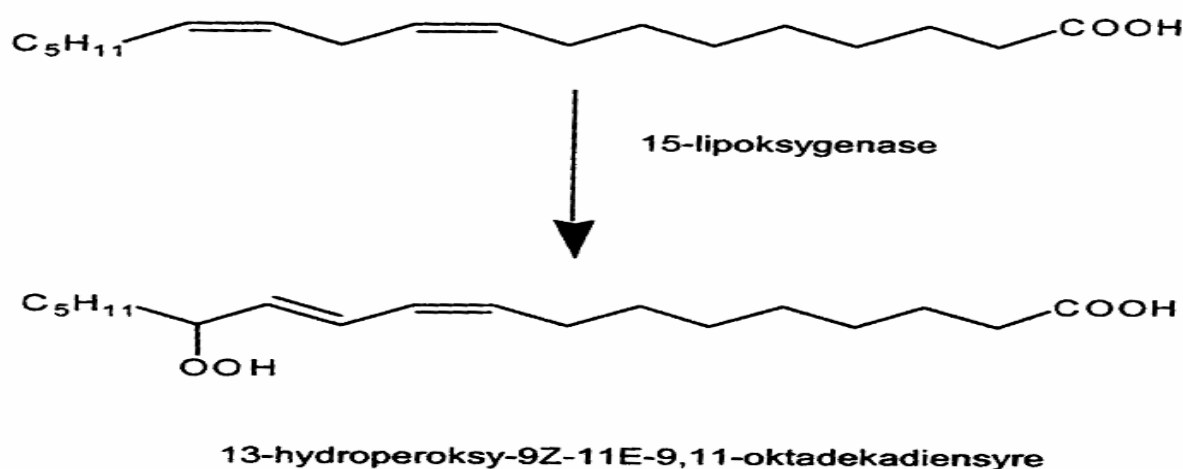
#### **5.2.14 Hemming av 15-lipoksygenase**

##### **Prinsipp**

Lipoksygenaser er enzymer som katalyserer peroksidering av polyumettede fettsyrer. Hemming av 15-lipoksydase er av interesse fordi enzymet inngår i LDL-oksidering, en prosess som er viktig i forbindelse med aterosklerose (Lyckander og Malterud 1996). Produktet som dannes når arakidonsyre oksideres av 15-LO, 15-

HPETE, hemmer dannelse av prostacyclin som er vasodillaterende og hemmer blodplateaggregering. 15-HPETE er et mellomprodukt i dannelsen av lipoxiner som kan spille en viktig rolle i inflammasjons- og immunresponser, og er hemmere av aktiviteten til NK-cellene i immunforsvaret (Lyckander og Malterud 1992 og 1996).

I dette forsøket testes det i hvilken grad råekstraktene og renfraksjonene med erybraedin A og shinpterocarpin-phaseollin (3:1) er hemmere av enzymet 15-lipoksygenase (15-LO). Forsøket baserer seg på den 15-LO katalyserte reaksjonen mellom oksygen og den flerumettede fettsyren linolsyre, med 1,4-dien struktur. Reaksjonen er vist i figur 5.9.



Figur 5.9 Oksidering av linolsyre

Arakidonsyre kan også brukes, men den er dyrere, mer ustabil og inhiberingsverdiene i linolsyre er like i forhold til arakidonsyre (Malterud 2003).

Når fettsyren oksideres av 15-LO, dannes en konjugert dobbeltbinding som absorberer UV lys ved 234 nm. (Malterud 2003) Absorbansen øker proporsjonalt med konsentrasjonen av dannet dien. Ved hemming av 15-LO vil økningen i absorbansen bli mindre.

Prosentvis enzymhemming ble beregnet etter følgende formel:

$$100 \times (A_b - A_h) / A_b \text{ der}$$

$A_b$  = beregnet enzymaktivitet (absorbansøkning per tidsenhet) uten hemmer

$A_h$  = enzymaktivitet med hemmer

Beregningene ble gjort i et dataprogram, som også beregnet standardavvik og statistisk signifikans (Student's t-test) for hemmingen.

### **Prøver**

Forskjellige fortyninger av råekstrakt og renfraksjoner som skulle testes.

### **Reagenser**

Linolsyre

0,2 M boratbuffer, pH 9 (laget av borsyre og NaOH)

DMSO

Etanol

15-LO fra soyabønner

### **Utstyr**

UV apparat

### **Prosedyre**

1. Det ble først laget 2 forskjellige løsninger pluss testløsninger
  - a. Substratløsning: 50 µl linolsyre ble blandet med 150 µl etanol. Deretter ble det tilsatt boratbuffer til totalt 50 ml.
  - b. Enzymløsning: 15-LO ble løst i boratbuffer, og mengden justert slik at løsningen hadde en absorbansøkning på 0,3-0,5 AU / min på apparatet. Løsningen ble oppbevart på is gjennom hele forsøket.
  - c. Samme testløsninger som i 5.2.13 ble brukt, og disse ble om nødvendig fortyntet flere ganger på samme måte, ved å pipettere ut 1 ml av en løsning med kjent konsentrasjon, og ha denne over i et nytt glass med 1 ml av DMSO.
2. UV-spektrofotometeret ble slått på og de forskjellige parameterne stilt inn.
3. En blindprøve ble laget ved å blande 0,95 ml boratbuffer, 2 ml substratløsning og 0,05 ml DMSO i en kyvette.
4. Det ble laget blankprøver (3 paralleller) på samme måte som blindprøven i punkt 3, men med 0,90 ml boratbuffer i stedet for 0,95.
5. Blankprøvene i 4 ble tilsatt 50 µl enzymløsning. En stoppeklokke innstilt på 20 sekunder ble satt i gang umiddelbart ved tilsetning og i løpet av denne tiden ble prøvene omrørt med plastspatler. Når de 20 sekundene var omme ble apparatet startet. Absorbans av blankprøver (3 paralleller) ble målt mellom hver tredje prøveløsning som i punkt 4 og 5.

6. Prøveløsninger (3 paralleller) ble laget på samme måte som blankprøven i 4, men med 0,05 ml prøveløsning istedenfor DMSO. Enzymløsningen ble tilsatt på samme måte.
7. Punkt 6 ble gjentatt for alle testløsningene og for quercetin. Kyvettene ble vasket 3 ganger med boratbuffer mellom hver prøve.
8. % enzymhemming ble beregnet ved hjelp av et dataprogram.
9. Konsentrasjon av prøveløsning som hemmer 50 % av 15-LO ( $IC_{50}$ ) ble beregnet ved interpolering av en lineær kurve basert på en konsentrasjonsmåling som hemmer 15-LO < 50 % og en konsentrasjonsmåling som hemmer 15-LO > 50 %.

## 6 RESULTATER OG DISKUSJON

### 6.1 EKSTRAKSJON AV *ERYTHRINA SENEGALENSIS* ROTBARK

1055,84 g plantemateriale ble veid inn. Diklormetanekstraktet (DR) veide 33,77g, og metanolekstraktet (MR) veide 24,87 gram. Det vil si at utbyttet ble 3,20 % diklormetanekstrakt og 2,36 % metanolekstrakt. Diklormetanekstraktet var brunrødt på fargen, og litt seigt og klissete, nesten litt karamellaktig. Metanolekstraktet var en mørk smørje i midten og brunrødt langs kanten på kolben.

### 6.2 EKSTRAKSJON AV *ERYTHRINA SENEGALENSIS* STAMMEBARK

627,78 gram plantemateriale ble veid inn. Diklormetanekstraktet (DS) veide 7,54 gram og metanolekstraktet (MS) veide 24,48 gram. Det gir et utbytte på 1,20 % diklormetanekstrakt og 3,90 % metanolekstrakt. Diklormetanekstraktet var brungrønt på fargen, og relativt lett å tørke. Metanolekstraktet var en viskøs, mørk smørje som var vanskelig å få helt tørr.

### 6.3 NMR SPEKTRUM AV RÅEKSTRAKTENE

Det ble tatt opp  $^1\text{H}$ -NMR spektrum av alle de 4 råekstraktene, MR, DR, MS og DS.

#### 6.3.1 $^1\text{H}$ -NMR av MR

Spekteret har en stor topp ved 1,28 ppm som sannsynligvis er fra fett. I tillegg ser vi tydelige topper fra løsemidlene aceton, metanol og vann på ca 2,33 og 5 ppm. Signalene ved ca 3,6-4 ppm og 5,4 ppm tyder på at fraksjonen inneholder karbohydrater. Det er lite signaler i aromatområdet (Vedlegg 10.1).

#### 6.3.2 $^1\text{H}$ -NMR av DR

Dette spekteret har mye signaler i aromatområdet, og mindre fra fett. Signalene fra 0,8 – 2 ppm kan tyde på innhold av noe terpenoider (Vedlegg 10.2).

#### 6.3.3 $^1\text{H}$ -NMR av MS

Dette spekteret ligner på spekteret fra MR, men inneholder noe mer aromatsignaler, samt signaler som tyder på glykosider (Vedlegg 10.3).

### 6.3.4 $^1\text{H-NMR}$ av DS

Dette spekteret viser at fraksjonen inneholder mye fett. Det er tydelige signaler både for proton i fettkjeden, og fra glyseroldelen av triglyserider. Det er ellers lite signaler i aromatområdet (Vedlegg 10.4).

## 6.4 ANTIOKSIDANT AKTIVITET AV RÅEKSTRAKTENE

Alle 4 råekstraktene ble testet for antioksidantaktivitet, ved å måle nedgang i UV-absorbans som følge av DPPH-scavenging, og for hemming av enzymet 15-lipoksygenase ved å måle økning i UV-absorbans per tidsenhet som følge av konjugert dien dannelse. Quercetin ble brukt som positiv kontroll i begge forsøkene.

### 6.4.1 DPPH-scavenging

Resultatene fra DPPH-scavengingen er fremstilt i tabell 6.1

Tabell 6.1: Resultater fra DPPH-scavenging av råekstraktene

Råekstrakt	Konsentrasjon	Konsentrasjon i kyvette	% scavenging
MR	10 mg/ml	166,7 $\mu\text{g/ml}$	43,2 $\pm$ 1,2
	5 mg/ml	83,3 $\mu\text{g/ml}$	24,0 $\pm$ 0,6
	2,5 mg/ml	41,7 $\mu\text{g/ml}$	13,3 $\pm$ 0,3
DR	5 mg/ml	83,3 $\mu\text{g/ml}$	36,1 $\pm$ 2,4
MS	10 mg/ml	166,7 $\mu\text{g/ml}$	33,9 $\pm$ 1,8
DS	10 mg/ml	166,7 $\mu\text{g/ml}$	9,6 $\pm$ 0,2
Quercetin (positiv kontroll)	5 mM	83,3 $\mu\text{M}$	92,8 $\pm$ 1,6
	2,5 mM	41,7 $\mu\text{M}$	95,2 $\pm$ 0
	1,25 mM	20,8 $\mu\text{M}$	92,5 $\pm$ 0,2

Som det kommer frem av tabellen, er ingen av råekstraktene særlig gode radikalscavengere, og derfor ble det i stor grad bare målt på en konsentrasjon. De var for dårlige radikalscavengere til at vi fikk beregnet en  $\text{IC}_{50}$ -verdi. Diklormetaneekstraktet fra rotbarken var likevel det mest aktive ekstraktet.

### 6.4.2 Hemming av enzymet 15-lipoksygenase

De 4 ekstraktenes grad av hemming av enzymet 15-LO ble målt. Det ble gjort ved å måle UV-absorbansen fra konjugerte dobbeltbindinger (dien) som er produktet fra 15-lipoksygenaseaktivitet på flerumettede fettsyrer med dobbeltbindinger i n-6 og n-9 posisjon. Linolsyre ble brukt som substrat. Absorbansen øker proporsjonalt med konsentrasjonen av dannet dien. Dannelsen av produkt går ned dersom enzymet hemmes. Med hjelp fra et dataprogram ble det beregnet grad av hemming for ulike konsentrasjoner, og det ble funnet en  $\text{IC}_{50}$ -verdi for hvert

ekstrakt, som er den konsentrasjonen som gir 50 % hemming av enzymet.

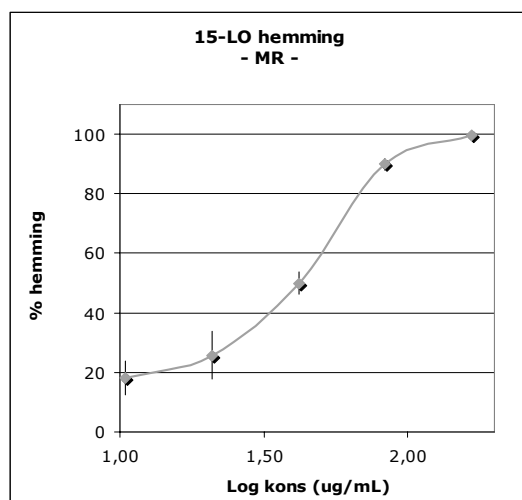
Tabell 6.2: Resultater fra 15-LO forsøk.

Råekstrakt	Konsentrasjon ( $\mu\text{M}$ )	Konsentrasjon ( $\mu\text{g/ml}$ )	% Hemming	$\text{IC}_{50}$ -verdi ( $\mu\text{g/ml}$ )
MR		166,7 83,4 41,7 20,8 10,4	99,6 $\pm$ 0,4 90 $\pm$ 1,9 50 $\pm$ 3,8 25,7 $\pm$ 8 18,3 $\pm$ 5,7	42 $\pm$ 5
DR		83,4 41,7 20,8 10,4 5,2	100,3 $\pm$ 0,7 91,5 $\pm$ 1,2 56 $\pm$ 4 24,7 $\pm$ 6,2 19,5 $\pm$ 8,9	18 $\pm$ 2
MS		166,7 83,4 41,7 20,8 10,4	99,6 $\pm$ 1 80,4 $\pm$ 2,2 50,1 $\pm$ 2,9 26,4 $\pm$ 3,6 11,2 $\pm$ 4,3	42 $\pm$ 4
DS		166,7 83,4 41,7 20,8	97,8 $\pm$ 2,1 89,4 $\pm$ 1,4 55,5 $\pm$ 3,5 28 $\pm$ 3,7	36 $\pm$ 4
Quercetin	83,4 41,7 20,8	28,2 14,1 7,1	89,8 $\pm$ 0,6 48,7 $\pm$ 2,8 25,2 $\pm$ 4,6	42 $\pm$ 2 $\mu\text{M}$ (14,3 $\mu\text{g/ml}$ )

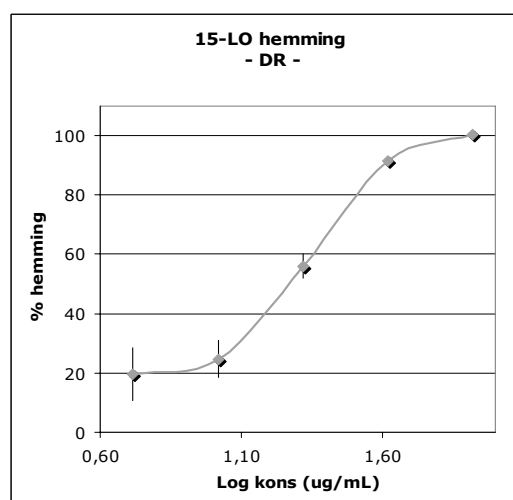
Alle råekstraktene var aktive. Metanolekstraktene MR og MS var minst aktive, og disse hadde  $\text{IC}_{50}$ -verdi på 42  $\mu\text{g/ml}$ . Diklormetaneekstraktet DS var noe mer aktivt med en  $\text{IC}_{50}$ -verdi på 36  $\mu\text{g/ml}$ , mens det helt klart mest aktive ekstraktet var diklormetaneekstraktet fra rotbark (DR), men en  $\text{IC}_{50}$ -verdi på 18  $\pm$  2  $\mu\text{g/ml}$ . Til sammenligning hadde quercetin en  $\text{IC}_{50}$ -verdi på 42,2  $\mu\text{M}$ , som tilsvarer 14,3  $\mu\text{g/ml}$  (molar masse quercetin: 338,3 g/mol). DR er dermed nesten like aktivt som quercetin, noe som anses som veldig aktivt for et råekstrakt. Figur 6.1-6.5 fremstiller resultatene grafisk.

Alle verdiene var statistisk signifikante,  $p < 0,001-0,025$ . For mer detaljerte opplysninger, se vedlegg 10.20-10.24

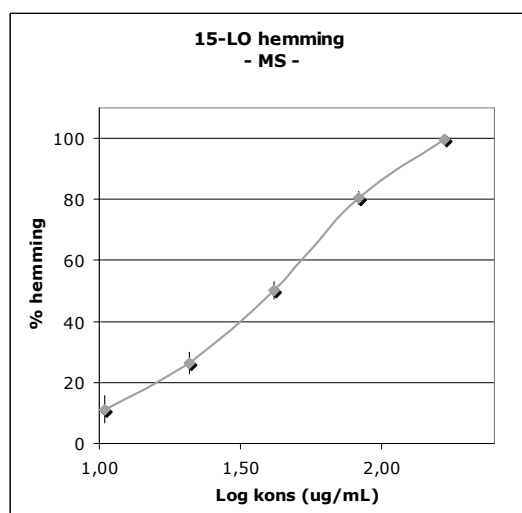




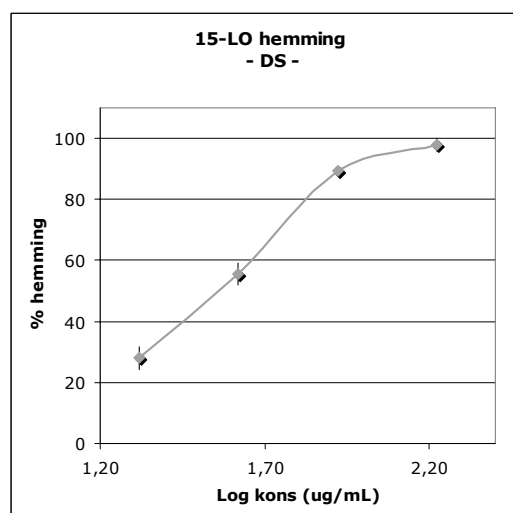
Figur 6.1: 15-LO hemming av MR



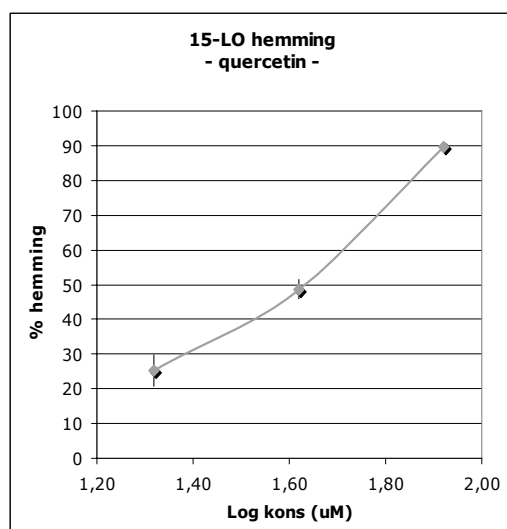
Figur 6.2: 15-LO hemming av DR



Figur 6.3: 15-LO hemming av MS



Figur 6.4: 15-LO hemming av DS



Figur 6.5 15-LO hemming av quercetin

## 6.5 FRAKSJONERING AV DIKLORMETANEKSTRAKT AV ROTBARK (DR)

På bakgrunn av resultater fra tidligere arbeid ble det bestemt å jobbe videre med diklormetanekestektet fra rotbark.

Diklormetanekestektet ble fraksjonert på en silikakolonne som beskrevet i metode 5.2.7.1. Det ble samlet 154 fraksjoner totalt før kolonnen gikk tørr og deretter fikk vi 15 fraksjoner til. Tabell 6.3 gir en oversikt over hvilke fraksjoner som ble eluert med hvilke elueringsmiddel.

Tabell 6.3: Oversikt over antall fraksjoner og hva de ble eluert med

Fraksjonsrør	Antall ml	Elueringsmiddel
-1	Ca.100	Bensen
0	Ca.100	Bensen
1-74	Ca.50	Bensen
75-165	Ca.50	Diklormetan
166	Ca.300	Etylacetat
167	Ca.300	Metanol
168	Ca.300	Metanol

Fraksjonene ble slått sammen på bakgrunn av TLC plater betraktet i kort- og langbølget UV-lys, samt fremkalling med Godinreagens. De ble totalt sett 28 (30\*) ulike fraksjoner. Etter sammenslåing ble fraksjonene dampet inn på rotavapor overført til små prøveglass som ble lufttørket, og veid.

Fraksjonene ble slått sammen som vist i tabell 6.4

Tabell 6.4: Oversikt over hvilke fraksjoner som ble slått sammen

Fraksjon	Glass som ble slått sammen	Vekt (mg)
DRI	(-1)-1	7
DRII	2-4	(121,3)
DRIII	5-6	(177,1)
DRIV	7-10	(84,4)
DRV	11	6
DRVI	12-13	(100,4)
DRVII	14-18	(336,3)
DRVIII	19-23	(231,5)
DRXI	24-26	(>10)
DRX	27-30	(107,7)
DRXI	31-34	(54,3)
DRXII	35-37	(49,1)
DRXIII	38	7
DRXIV	39-42	34
DRXV	43-71	(359,3)
DRXVI	72-82	(90,3)
DRXVI <sub>MeOH</sub>	72-82	(60,1)
DRXVII	83-87	74,4
DRXVIII	88-91	100,5

DRXIX	92-95	103,3
DRXX	96-104	305,5
DRXXI	105-109	182,3
DRXXII	110-140	713,7
DRXXIII	141-145	80,3
DRXXIV	146-148	27,1
DRXXV	149-159	148,3
DRXXVI	160-165	65,3
DRXXVII	166	807,3
DRXXVIII	167-168	2559,3
DRXXVIII <sub>DCM</sub>	167-168	284,5
Utbytte:		6,97343gram

\* Det var i utgangspunktet 28 fraksjoner, men 2 av fraksjonene var vanskelig å få løst når de skulle overføres fra rundkolbe til prøveglass, og måtte derfor overføres i 2 omganger med 2 ulike løsemiddel, som dermed gav 2 nye fraksjoner, XVI<sub>MeOH</sub> og XXVIII<sub>DCM</sub>.

Totalt utbytte fra kolonnen ble 6,97343 g / 10, 1273 g x 100 % = 69 %.

Tall i parentes er ikke helt nøyaktige da tomt prøveglass ikke ble veid, og tallet er derfor basert på gjennomsnittsverken for 13 andre tomme prøveglass.

## 6.6 ANTIFUNGALTEST 1

For å bestemme hvilke av fraksjonene I-XXVIII det skulle arbeides videre med, ble det utført en antifungaltest på alle de overnevnte fraksjoner.

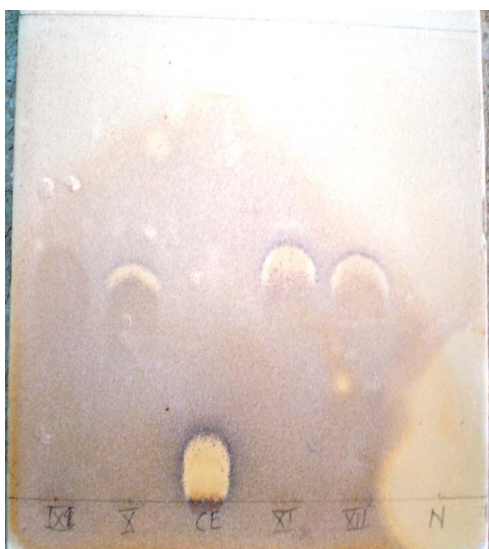
Fraksjonene I-XXVIII ble applisert på TLC plater og testet for antifungal aktivitet ved å inkubere platene med en sopp suspensjon og se etter hemmingssoner. Nystatin ble brukt som positiv kontroll. Resultatet er vist i figur 6.6 – 6.13.



Figur 6.6: Fraksjon I-IV



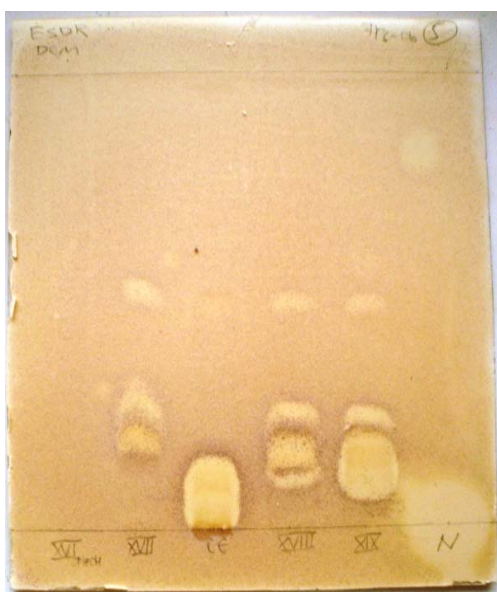
Figur 6.7: Fraksjon V-VIII



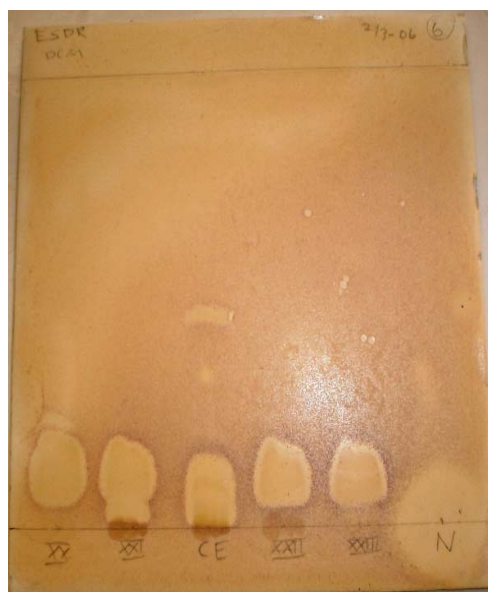
Figur 6.8: Fraksjon IX-XII



Fraksjon 6.9: Fraksjon XIII-XVI



Figur 6.10: Fraksjon XVI<sub>MeOH</sub>-XIX



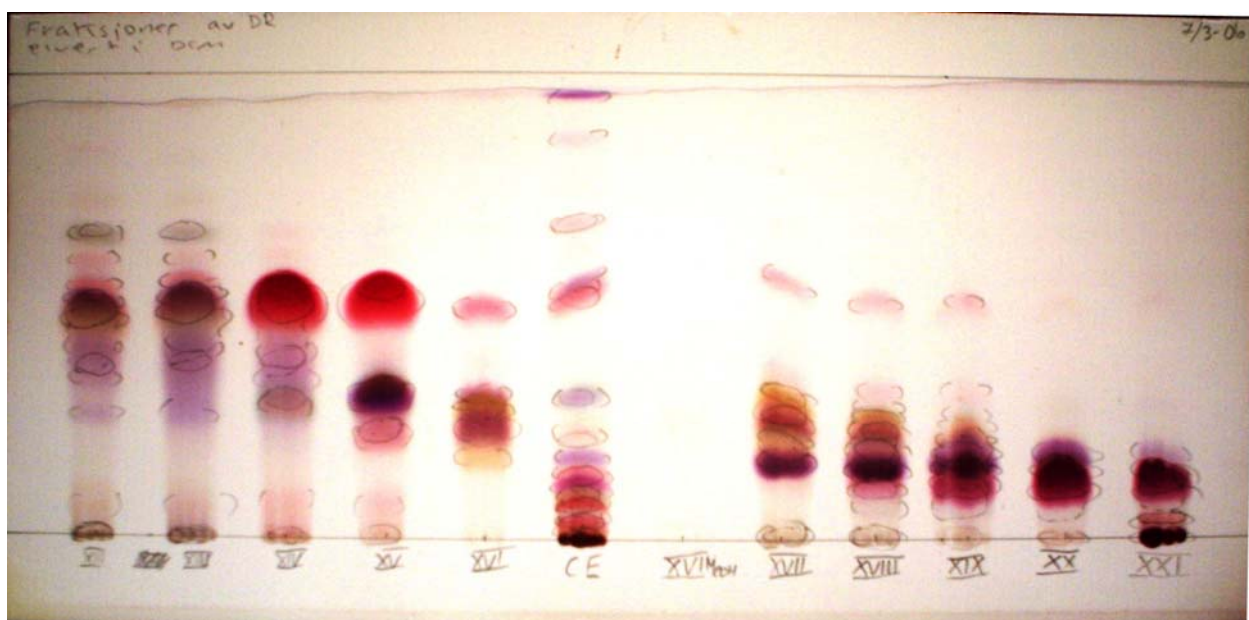
Figur 6.11: Fraksjon XX-XXIII



Figur 6.12: Fraksjon XXIV-XXVII

Figur 6.13: Fraksjon XXVIII-XXVIII<sub>DCM</sub>

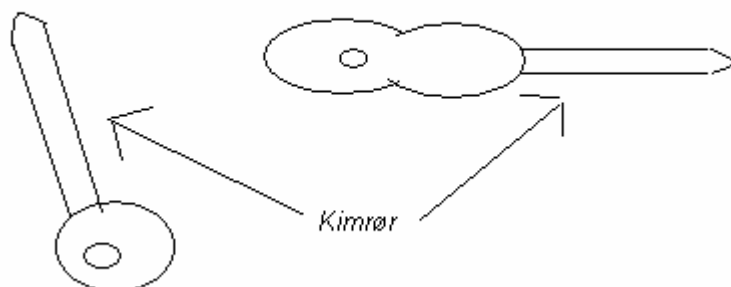
Ekstrakt I-IX, samt XVI<sub>MeOH</sub> viste ingen hemning, mens alle de andre ekstraktene hadde en eller flere hemningssoner. For tabell over  $R_f$  – verdier til alle hemningssonene, se vedlegg 10.25. Basert på en sammenligning med referanseplater (figur 6.14), samt en vurdering av størrelsen på fraksjonene, ble det valgt ut 5 fraksjoner til videre arbeid: DR XIV, XV (slås sammen), XVIII, XIX (slås sammen) og XX.



Figur 6.14: Referanseplate for fraksjon XII- XXI, eluert med diklormetan. CE står for "Crude Extract", råekstrakt. Platen er observert i kort-og langbølget UV-lys, samt fremkalt med Godin reagens.

**Filamenttest av *C. albicans*.**

For å bekrefte at det faktisk var *C. albicans* vi hadde, ble en liten mengde inkubert i serum ved 37 °C i 3-4 timer, og deretter observert i mikroskop. Dette var det vi så:



Figur 6.15: Illustrasjon av *Candida albicans* observert i mikroskop

Dannelsen av kimrør tyder på *C. albicans*.

**6.7 FRAKSJONERING AV XIV + XV**

På bakgrunn av resultatene fra antifungaltesten ble det bestemt å fraksjonere XIV og XV på en ny kolonne, for å prøve å få renisolert det aktive stoffet, som forelå i begge fraksjonene.

Metoden var som forrige gang, men med en mindre kolonne. (Lengde 80 cm, d= 1,7 cm og lengde gel 69 cm). Elueringsmiddel som ble brukt var benzen, deretter benzen-kloroform i forholdene 9:1, 5:1 og 3:1 og tilslutt ren kloroform (Se tabell 6.5).

Tabell 6.5: Oversikt over hvilke fraksjoner som ble eluert med hva. Alle fraksjonene var ca. 5 ml, bortsett fra fraksjon 501-519 som var ca. 50 ml.

Glass nr.	Elueringsmiddel
1-110	Benzen
111-347	Benzen: kloroform 9:1
348-393	Benzen: kloroform 5:1
394-458	Benzen: kloroform 3:1
459-519	Kloroform

Fraksjoner ble slått sammen som vist i tabell 6.6, på grunnlag av tynnsjiktspalter, betraktet i UV-lys og fremkalt med Godin reagens.

Tabell 6.6: Oversikt over hvilke fraksjoner som ble slått sammen i 2-serien

Fraksjon	Glass som ble slått sammen	Vekt (mg)
2I	1-40	5,0
2II	41-75	1,1
2III	76-100	1,0
2IV	101-131	1,0
2V	132-149	8,6
2VI	150-278	224,2
2VII	279-325	21,0
2VIII	326-379	9,7
2IX	380-467	8,8
2X	468-487	0,9
2XI	488-505	22,9
2XII	506-517	0,0
2XIII	518-519	2,0

Utbytte: 306,2 mg av 339,6 mg d.v.s. 90 %

## 6.8 FRAKSJONERING AV XVIII + XIX

På bakgrunn av resultatene fra antifungaltesten ble det bestemt å fraksjonere XIII og XIX på en ny kolonne, for å prøve å få renisolert et eller flere av de aktive stoffene, som forelå i begge fraksjonene. Metoden var som forrige gang, med samme kolonne som over (l=80cm og d=1,7 cm). Lengde gel = 68 cm. Elueringsmiddel som ble brukt var benzen, deretter benzen-kloroform i forholdene 9:1, 5:1 og 3:1 og tilslutt ren kloroform. Tabell 6.7 og 6.8 viser hvilke fraksjoner som ble eluert med hva og hvordan de ble slått sammen.

Tabell 6.7: Oversikt over hvilket løsningsmiddel fraksjonene ble eluert med. Den første fraksjonen, samt fraksjon 591-594 var 10 ml, resten var 5 ml fraksjoner.

Glass nr.	Elueringsmiddel
1-138	Benzen
139-249	Benzen: kloroform 9:1
250-588	Benzen: kloroform 5:1
589-591	Benzen: kloroform 3:1
592-594	Kloroform

Tabell 6.8: Oversikt over hvilke fraksjoner som ble slått sammen i 3-serien

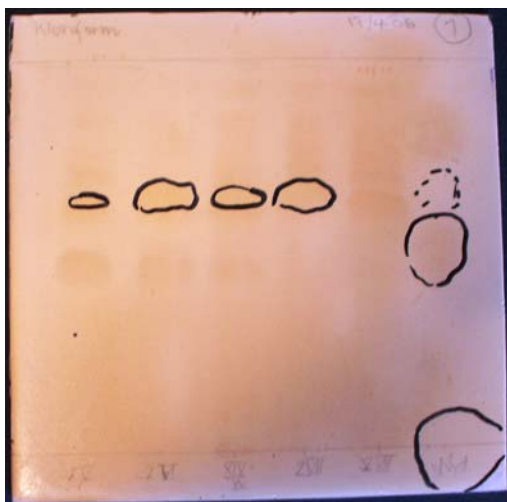
Fraksjon	Glass som ble slått sammen	Vekt (mg)
3I	1-74	3,1
3II	75-164	2,0
3III	165-244	2,0
3IV	245-301	2,6
3V	302-449	57,0
3VI	450-536	23,1
3VII	537-541	2,1
3VIII	542-569	69,4
3IX	570-594	3,0
Totalt		164,3

Utbytte:  $164,3 / 150,6 \times 100 \% = 109 \%$

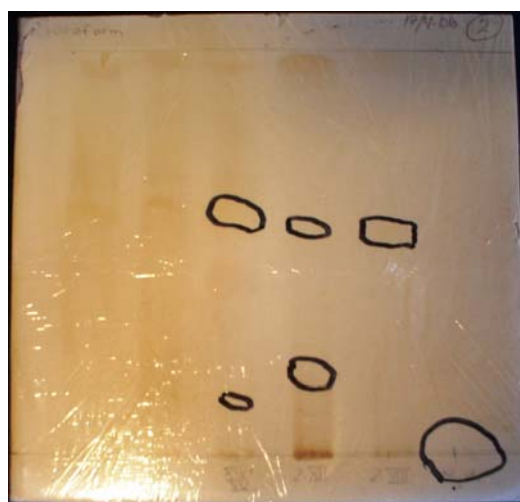
At utbytte er større enn 100 % skyldes nok usikkerhet og unøyaktighet i vekta.

## 6.9 ANTIFUNGALTEST 2

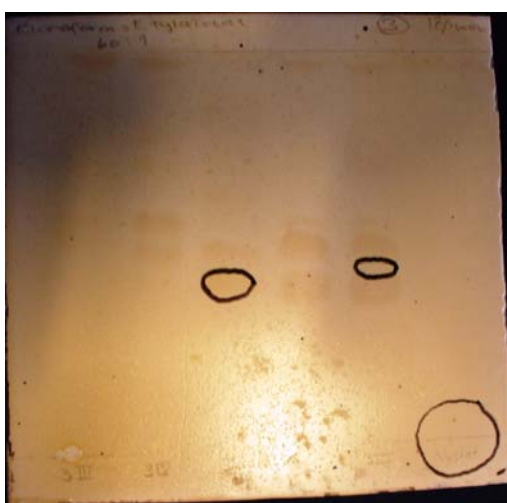
Fraksjoner fra 2-serien og 3-serien ble valgt ut for antifungal testing. Samme test som forrige gang, hvor aktuelle fraksjonene ble testet for aktivitet mot *C. albicans*. Fraksjon 2I-2IV, 2X og 3I-II ble ikke testet, da disse var små. Resultatet er vist i figur 6.16-6.19.



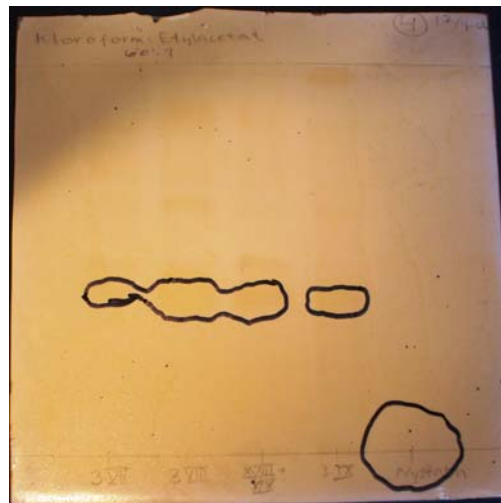
Figur 6.16: Fraksjon 2V-2VIII, med Nystatin nede til høyre, og fraksjon XIV og XV i midten som referanse



Figur 6.17: Fraksjon 2IX, 2XI-2XIII med nystatin nede til høyre og fraksjon XIV og XV i midten som referanse



Figur 6.18: Fraksjon 3III-3VI, med nystatin nede til høyre og fraksjon XVIII og XIX i midten som referanse



Figur 6.19: Fraksjon 3VII-3IX med nystatin nede til høyre og fraksjon XVIII og XIX i midten som referanse



Som figurene på forrige side viser, var forsøket noe mislykket, da hemningssonene ikke fremstår som lyse soner mot en lilla bakgrunn. Sannsynligvis har noe vært galt med MTT-løsningen. Det gikk likevel an å se hemningssoner, og disse ble markert med svart sprittusj. Fraksjon 2V, 2VI, 2VII, 2XII, og 2XIII samt fraksjon 3VI-3IX var aktive. For tabell over  $R_f$ -verdier til hemningssonene, se vedlegg 10.26.

## 6.10 NMR-SPEKTER FRA 2-SERIEN

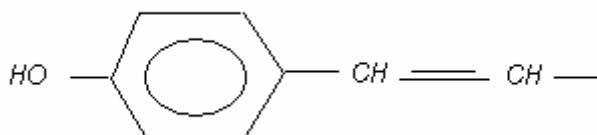
Det ble tatt opp  $^1\text{H}$ -NMR spektre av utvalgte fraksjoner fra 2-serien, og disse viste stor grad av opprensing i forhold til råekstraktene, men ingen var helt rene.

Spektrum av fraksjon 2VI (vedlegg 10.5) viser erybraedin A. (tolkning av renere spekter kommer senere i oppgaven, se punkt 6.15.1), samt en del signaler i terpenoidområdet, og en del signaler som sannsynligvis stammer fra fett.

Spektrum av fraksjon 2X (vedlegg 10.6) viser at fraksjonen sannsynligvis inneholder et stoff som er beslektet med erybraedin A, men fraksjonen er liten (0,9 mg, se punkt 6.7) og ikke ren, dermed ble stoffet ikke prioritert for identifisering.

## 6.11 NMR SPEKTER AV 3V

Fraksjon 3V var den største fraksjonen i 3-serien, og derfor ble det tatt opp  $^1\text{H}$ -NMR og  $^{13}\text{C}$ -spektrum av fraksjonen (vedlegg 10.7-10.8). Protonspekteret viser mange store signaler i terpenoidområdet, samt noen småsignaler i aromatområdet. Basert på signal utenfor terpenoidområdet, kan man foreslå et sannsynlig strukturelement (figur 6.20), basert på en *para*-disubstituert benzenring og en *trans*-substituert dobbeltbinding, men siden fraksjonen var inaktiv i den antifungale testen, ble den ikke prioritert for videre arbeid.



Figur 6.20: Sannsynlig strukturelement i fraksjon 3V

## 6.12 FRAKSJONERING AV FRAKSJON 2VI

Etter NMR-opptak av de største fraksjonene fra 2.kolonne, samt den største fra 3.kolonne, ble det bestemt å jobbe videre med fraksjon 2VI, som var stor (229,9 mg) og aktiv mot *C.albicans*. Fraksjon 2VI ble dermed løst i DCM, separert på Versa Flash, C-18 revers fase kolonne, med elueringsmiddel 1 % eddiksyre i metanol. Det ble samlet 21 fraksjoner på 20 ml hver, bortsett fra den første (fraksjon 0) som var 45 ml.

Tabell 6.9: Oversikt over hvilke fraksjoner som ble slått sammen og vekten av disse i 4-serien

Fraksjon	Glass som ble slått sammen	Vekt (mg)
4.0	0	69,1
4I	1	41
4II	2	58
4III	3	41
4IV	4	23
4V	5	6
4VI	6	7
4VII	7-13	27
4VIII	14-21	22
Totalt		294,1

Utbytte:  $294,1 / 229,9 \times 100 \% = 128 \%$

NMR av fraksjon 4.0 viste at den ikke inneholdt noen ting. De 69,1 mg er sansynligvis silika fra kolonnen så fraksjonen ble kastet. Og trekker man da fra de 69,1 mg, får man utbytte på  $(294,1 - 69,1) / 229,9 \times 100 \% = 97,9 \%$ .

## 6.13 NMR SPEKTRUM AV FRAKSJONER FRA 4-SERIEN

Det ble tatt opp  $^1\text{H}$ -NMR spekter av alle fraksjonene i 4-serien (4.0-4VIII). Spektrene viste at fraksjon 4I - 4III var veldig like. Protonspekter av 4II er tatt med som vedlegg 10.9. Det ble også tatt opp  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter av denne fraksjonen (vedlegg 10.10) Basert på proton- og karbonspekter ble erybraedin A identifisert (se punkt 6.13.1).

### 6.13.1 Identifisering av erybraedin A

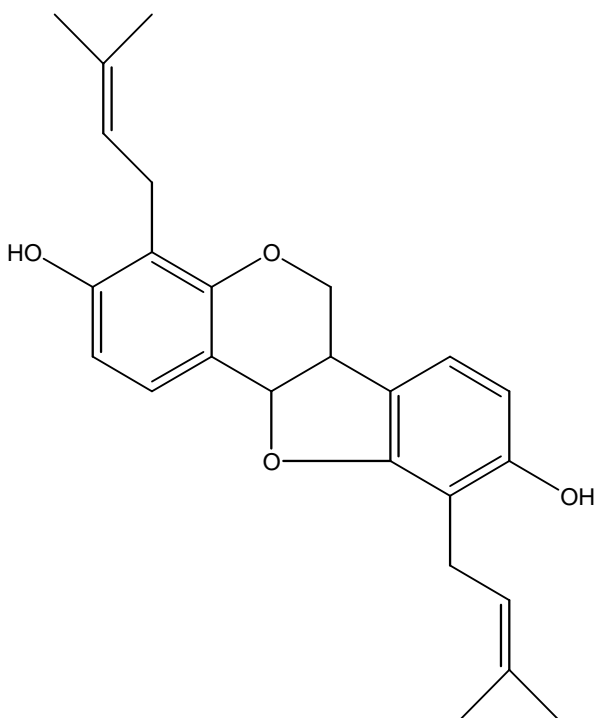
Protonspekteret av fraksjon 4II (vedlegg 10.9) viste 3 topper: 0,8-1,28-1,4 ppm, som antas å være hhv metylgruppene i fett, CH<sub>2</sub>-gruppene i fett, og vann.

Man antok at forbindelsen hadde slektskap til forbindelser funnet tidligere, altså flavonoider eller mest sannsynlig isoflavonoider. 2 singletter på hhv 1,7 og 1,8 ppm kunne ut i fra integralkurven antas å komme fra 6H-atomer hver, og signaler i det området kommer gjerne fra metylgrupper som sitter på en dobbeltbinding. Prenylsidekjeder er vanlig i denne type forbindelse man antar å ha, og cis- og transmetylgruppene er litt forskjellige og vil gi opphav til 2 ulike signaler, 2 singletter på hhv 1,7 og 1,8 ppm hvor hver singlet stammer fra 2 metylgrupper.

Spekteret viser 4 dubletter i området 6,3-7,3 ppm hvor av 2 har koblingskonstant 7,8 Hz og to har koblingskonstant 8,4 Hz. Dette er en typisk *ortho*-kobling, så vi kan anta 2 par av *o*-stående H-atomer på en aromatrings.

Skjelettet til et isoflavonoid gir plass til 9 aromatiske substituenten. Vi har nå 2 prenylgrupper og 4 H-atomer. Resten kan man anta er –OH grupper. OH-gruppene ble plassert på isoflavonoidskjelettet, i posisjoner som kan forventes ut fra biosyntesen av slike substanser, og der hvor de tidligere har blitt funnet, i posisjon 3 og 9. Dermed kunne man plassere 2 *o*-stående H-atomene, det var kun 1 mulighet, posisjon 1 og 2 og da var det bare 1 plass igjen til prenylsidekjeden i posisjon 4.

Av <sup>13</sup>C-spekteret så man at det ikke var karbonylsignal, altså manglet karbonylgruppen, som ofte finnes i posisjon 11a. Da var det 2 muligheter, enten var det en CH<sub>2</sub> gruppe der, eller så var det et pterokarpan, hvor O har syklisert over til aromatringsen. Det finnes flere slike kjente forbindelser i *Erythrina*-slekten. Man gjettet derfor på pterokarpanstrukturen og plasserte deretter de to siste *o*-stående H-atomene og prenylsidekjeden. Resultatet ble (6aR, 11aR)-3,9-dihydroxy-4,10-di( $\gamma,\gamma$ -dimetylallyl)pterocarpan, litt enklere kalt erybraedin A. Strukturen vises i figur 6.21.



Figur 6.21: Strukturformel for erybraedin A

Stereokjemien bekreftes senere i punkt 6.15.  
Sammenligning av våre spektraldata med litteraturdata foreligger i tabell 6.10 og 6.11.

Tabell 6.10: Sammenligning av spektraldata fra vårt  $^1\text{H-NMR}$  spektrum med litteraturdata

H/C nummer	$\delta$ (ppm)		Antall H	Koblingskonstant J (Hz)		Signaltype
	4II (våre data)	Litteratur data (Mitscher et al 1988)		Oberservert data	Litteratur data (Mitscher et al 1988)	
4'/5'	1,73	1,73	6	-	-	s
4'/5'	1,8	1,8	6	-	-	s
1'	3,48	3,48	4	-	-	m
6 <sub>ax</sub>	3,5	3,49	1	-	-	m
6a	3,55	3,56	1	10,1	10,8	dd
6 <sub>eq</sub>	4,29	4,29	1	10,1	4,8 - 10,8	dd
2'	5,19	5,18	1	-	-	t
2'	5,28	5,28	1	-	-	m
OH	5,43	5,41	1	-	-	s
11a	5,45	5,47	1	6,2	7,2	d
OH	5,49	5,5	1	-	-	s
8	6,39	6,37	1	7,9	7,8	d
2	6,54	6,55	1	8,4	8,4	d
7	6,97	6,95	1	7,9	7,8	d
1	7,3	7,29	1	8,4	8,4	d

Tabell 6.11: Sammenligning av spektraldata fra vårt  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum med litteraturdata

C nummer	Våre data 4II ( $\text{CDCl}_3$ )	Mitscher et al (1988) ( $\text{CDCl}_3$ )	Nkengfack et al (1995) ( $\text{CDCl}_3$ )
5'	17,9	17,93	17,8
5'	18,4	18,03	17,8
1'	22,4	22,45	22,0
1'	23,2	23,25	23,1
4'	25,8	25,86	25,0
4'	25,8	25,96	25,3
6a	40	40,1	39,8
6	66,8	66,94	66,8
11a	78,8	78,93	78,8
8	108	108,18	108
2	109,8	109,79	109,7
4	110,2	110,41	110,3
11b	112,6	112,76	112,6
10	114,9	115,07	114,9
6b	118,7	118,91	118,8
2'	121,7	121,56	121,7
2'	121,9	121,85	121,4
7	122,2	122,43	122,3
1	129,3	129,46	129,3
3'	134,3	134,52	134,3
3'	134,9	135,1	134,9
11a	153,9	154,03	153,9
10a	155,5	155,16	155,5
4a	155,7	155,82	155,7
3	158,4	158,53	158,4

Etter sammenligning med NMR data fra litteraturen, kan fraksjon 4I, 4II og 4III med stor sannsynlighet sies å inneholde erybraedin A.

### 6.13.2 Litteratur om erybraedin A

Erybraedin A er et isoflavonoid, i undergruppen pterocarpan. Substansen ble første gang isolert og beskrevet av Mitscher og kollegaer i 1988. De isolerte erybraedin A sammen med 4 andre pterocarpaner fra røttene til *Erythrina mildbraedii*, og fant også at erybraedin A er aktiv mot den gram positive bakterien *Staphylococcus aureus* og mot *Mycobacterium smegmatis*. (Mitscher et al 1988). I ettertid er erybraedin A funnet i flere andre *Erythrina*-arter.

Erybraedin A er blant annet isolert fra rotbark fra *Erythrina eriotricha* og testet for aktivitet mot *Staphylococcus aureus*, det ble da funnet en MIC-verdi ("minimum inhibitory concentration", laveste konsentrasjon som gir hemming av vekst) på 13,6  $\mu\text{g/ml}$ .

Til sammenligning ga penicillin en MIC-verdi på 6.0 µg/ml. Forsøket viste ingen aktivitet mot den gram negative bakterien *Escherischa coli* (Nkengfack et al 1995).

Også fra rotbark av *Erythrina burttii* er erybraedin A isolert. I samme forsøk ble også phaseollin (se punkt 6.21.1 og 6.21.3) isolert og identifisert (Yenesew et al 2002).

Rotbark fra *Erythrina latissima* er også vist å inneholde erybraedin A. Wanjala og kollegaer testet aktiviteten mot 6 ulike mikroorganismer ved hjelp av TLC bioautografi for antibakterielle og antifungale assay med hhv kloramfenikol og miconazol som positive standarder. De fant ingen effekt mot de gram-negative bakteriene *E.coli* og *P.aeruginosa*. Mot de gram-positive bakteriene *S.aureus* og *B.subtilis* fant de en minimums hemningsmengde på hhv 0,55 og 0,50 µg mot 0,0001 µg kloramfenikol som positiv standard. Erybraedin A viste seg mest aktiv mot gjærsoppene *C.mycoderma* (0,007 µg) og *A.cerevisiae* (0,006µg), hvor miconazol ble brukt som positiv standard og hadde minste mengde for hemming på 0,0001 µg. (Wanjala et al 2002).

Tanaka og kollegaer isolerte erybraedin A fra *Erythrina zeyheri* (Tanaka et al 2003).

Sato og kollegaer har i sin artikkel *Antibacterial activity of phytochemicals isolated from Erythrina zeyheri against vancomycin-resistant enterococci and their combinations with vancomycin* undersøkt blant annet erybraedin A's effekt mot vancomysin resistente enterokokker (VRE) og multiresistente gule stafylokokker (MRSA, "methicillin resistant *Staphylococcus aureus*"), både alene og i kombinasjon med vancomysin. De fant at erybraedin viste sterk veksthemming av VRE med en MIC-verdi på 1,56 – 3.13 µg/ml. Mot MRSA hadde erybraedin A en MIC-verdi på 3.13 – 6,25 µg/ml. De viste også at hemmingen var bakteriostatisk. I kombinasjon med vancomysin hadde erybraedin A en FIC ("fractional inhibitory concentration) indeks på 0,5305 – 1,0 mot VRE og 0,6125-1,0 mot MRSA. (FIC-indeks lavere enn 0,5 = synergi, FIC-indeks større enn 0,5 men lavere enn 1 = delvis synergi, FIC-indeks på 1.0 = additiv aktivitet, mens en FIC-indeks på 2 eller større = antagonisme). Det vil si at erybraedin A i tillegg egen aktivitet mot VRE og MRSA også virker delvis synergistisk eller additivt sammen med vancomysin (Sato et al 2004).

Så vidt jeg kan se er ikke erybraedin A tidligere påvist i *Erythrina senegalensis*. Ut i fra litteraturen er det ikke utenkelig at erybraedin A står for deler av den antifungale aktiviteten mot *C.albicans* funnet

i råekstraktet og i enkelte fraksjoner av dette. Dette argumentet blir underbygget av antifungaltest 3 (punkt 6.25.1) og figur 6.29 som viser at erybraedin A er aktiv mot *C.albicans*, i en mengde på 300 µg.

### 6.14 FRAKSJONERING AV FRAKSJON 4I -4II-4III

Med ønske om å få til en renere fraksjon av erybraedin A, som kunne brukes til å måle lysdreining og til biologisk testing, ble de tre fraksjonene slått sammen til en fraksjon på 140 mg og kjørt på VersaFlash samme system en gang til. Første fraksjon var ca 50 ml, deretter ble det samlet 17 20ml-fraksjoner.

Tabell 6.12: Oversikt over hvilke fraksjoner som ble slått sammen og vekten av disse i 6-serien

Fraksjon	Glass som ble slått sammen	Vekt (mg)
6I	0-1	3
6II	2	15
6III	3	74
6IV	4	16
6V	5-7	6
6VI	8-17	6

Utbytte: 120 mg / 140 mg x 100 % = 85 %

Etter NMR av fraksjonene ble det klart at fraksjon 6III var ren nok (vedlegg 10.11), og stor nok for måling av optisk aktivitet, samt testing for biologisk aktivitet.

### 6.15 OPTISK AKTIVITET AV ERYBRAEDIN A

Tidligere beskrevet stereokjemi for erybraedin A er R, R formen (Sato et al, 2004), med en optisk aktivitet på  $[\alpha]_D = -40,67^\circ$  ved 25 °C og metanol som løsningsmiddel. (Mitscher et al 1988). For å bekrefte at det er samme stereokjemi i den forbindelsen vi har isolert, ble det målt optisk aktivitet.

Fraksjon 6III ble løst i kloroform, til en konsentrasjon på 33,5 mg/ml, det vil si 0,0335g/ml

Temperaturen var 20 °C

Bølgelengden  $\lambda = 589$  nm (D-linjen i Na-spektrumet)

Målecellens lengde = 1 dm

Spektrofotometeret ble avlest til -2,077

Beregning av spesifikk rotasjon gjøres etter formelen  $[\alpha]_D = \alpha / l \times c$ , hvor  $\alpha$  er observert rotasjon,  $l$  er lysveien og  $c$  er konsentrasjon i g/ml. (se punkt 5.2.11).

Vi får da  $[\alpha]_D = -2,077 / (1 \times 0,0335) = -62^\circ$

Dette avviker fra litteraturen ( $-42^\circ$ ) men det kan skyldes forskjeller i temperatur ( $20^\circ\text{C}$  versus  $25^\circ\text{C}$ ) og løsemiddel (metanol versus kloroform). Lyset roterer i samme retning, og det bekrefter at vår erybraedin A har samme stereokjemi som den som tidligere er funnet.

## **6.16 BIOLOGISK AKTIVITET AV ERYBRAEDIN A**

Fraksjon 6III ble også testet for biologisk aktivitet til erybraedin A. Det ble testet både for antioksidanteffekt vha DPPH-scavenging (metode 5.2.13), for hemming av 15-LO (metode 5.2.14) og for antifungal aktivitet mot *C. albicans*. (kapittel 5.2.12)

### **6.16.1 DPPH-scavenging**

Erybraedin A viste seg å ikke være en særlig god DPPH-scavenger. Det ble målt på bare en konsentrasjon 5mg / ml, som tilsvarer 83,3  $\mu\text{g/ml}$  i kyvetten, og da ble det målt en radikalscavenger aktivitet på bare  $6,4 \pm 0,4\%$ .

Dette er helt i tråd med hva vi hadde forventet, da rækstraktet heller ikke var særlig aktivt (se punkt 6.4.1).

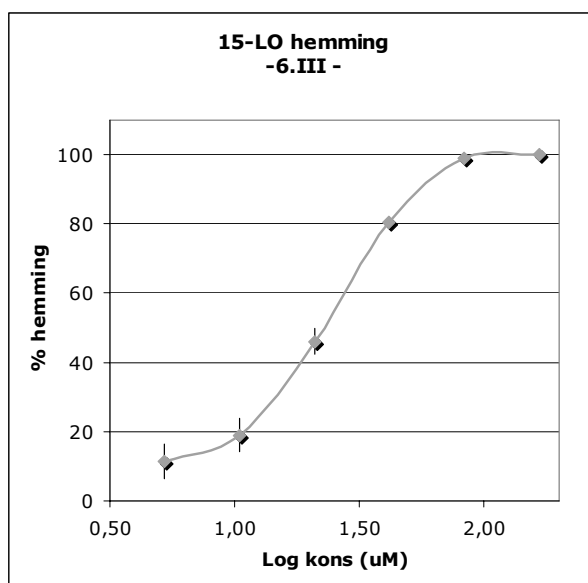
### **6.16.2 Hemming av enzymet 15-lipoksygenase**

På samme måte som for rækstraktene ble erybraedin A også testet for evne til å hemme enzymet 15-lipoksygenase. Resultatene er fremstilt i tabell 6.13, og figur 6.22 viser en grafisk fremstilling av resultatet.



Tabell 6.13: Resultat av 15-LO hemming for erybraedin A, med quercetin som positiv kontroll

Fraksjon /substans	Kons. kyvette ( $\mu\text{M}$ )	% hemming	p<
6III erybraedin A	166,7	99,9 $\pm$ 0,5	0,001
	83,3	98,8 $\pm$ 0,7	0,001
	41,7	80,3 $\pm$ 1,5	0,001
	20,8	46 $\pm$ 3,8	0,001
	10,4	19 $\pm$ 4,9	0,001
	5,2	11,4 $\pm$ 5,1	0,025
	IC <sub>50</sub>	23 $\pm$ 2 $\mu\text{M}$	
Quercetin (positiv kontroll)	83,3	89,8 $\pm$ 0,6	0,001
	41,7	48,7 $\pm$ 2,8	0,001
	20,8	25,2 $\pm$ 4,6	0,001
	IC <sub>50</sub>	42 $\pm$ 2 $\mu\text{M}$	



Figur 6.22: Grafisk fremstilling av fraksjon 6IIIs hemming av enzymet 15-lipoksydase. Prosentvis hemming vises som funksjon av konsentrasjonen.

Det kommer frem av tabellen at erybraedin A er en meget sterk hemmer av 15-lipoksygenase, den har en IC<sub>50</sub>-verdi på nesten halvparten av quercetin, som er positiv kontroll. At erybraedin A er en god hemmer av 15-LO er ikke uventet, da råekstraktet også var meget aktivt.

### 6.16.3 Antifungal aktivitet av erybraedin A

Som beskrevet senere i denne delen (punkt 6.23) ble erybraedin A testet for antifungal aktivitet mot *C.albicans*. En tynnsjiktplate ble

inkubert med en suspensjon av *C. albicans* og resultatet var en liten hemmingszone med  $R_f$ -verdi på ca 0,1. Platen var utviklet med kloroform. Denne  $R_f$ -verdien stemmer ikke overens med det som er funnet tidligere fraksjoner ( $R_f = 0,63$  for fraksjon 2VI i antifungaltest 2 (vedlegg 10.26)). Dette kan tyde på at tidligere fraksjoner kan inneholde flere forbindelser med antifungal aktivitet. Kanskje har konsentrasjonen av erybraedin A vært for lav til å hemme vekst i de tidligere fraksjonene, og først når det ble rent og oppkonsentrert i fraksjon 6III ble det nok til å hemme vekst av *C. albicans*.

### 6.17 NMR AV FRAKSJON XX

$^1\text{H}$ -NMR spekteret av fraksjon XX (vedlegg 12) viser at vi har fått en betydelig grad av opprensing på den første kolonnen. Nesten alle signalene i terpenoidområdet er borte. En liten topp på 1,28 ppm er sannsynligvis fra fett, og en større topp like ved kan være fra metylgrupper. Ellers finnes det både fenoliske og ikke-fenoliske signaler.

### 6.18 FRAKSJONERING AV FRAKSJON XX

Fraksjon XX var veldig aktiv mot *C. albicans* i antifungaltest 1 (se punkt 6.6), og så også interessant ut på NMR (vedlegg 12), derfor ble det bestemt å prøve å rense opp denne litt mer. Hele fraksjonen (281,5 mg) ble separert på VersaFlash kolonne, med eluent 1 % eddiksyre i metanol. Første fraksjonen var ca 100 ml, deretter ble det samlet fraksjoner på 20 ml, 23 stk. Fraksjonene ble slått sammen på bakgrunn av UV fremkalling og Ceric-spraying av TLC plater.

Tabell 6.14: Oversikt over hvilke fraksjoner som ble slått sammen og vekten av disse i 5-serien

Fraksjon	Glass som ble slått sammen	Vekt (mg)
5.0	0	9
5I	1	86
5II	2	79
5III	3	20
5IV	4	6
5V	5	2
5VI	6	4
5VII	7-10	10
5VIII	11-23	15
Totalt		231

Utbytte:  $231 / 281,5 \times 100 \% = 82 \%$

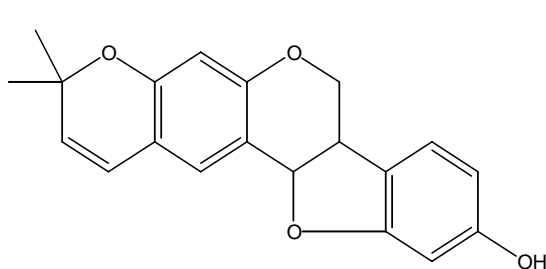
## 6.19 NMR SPEKTRUM AV FRAKSJONER FRA 5 - SERIEN

Det ble tatt opp  $^1\text{H}$ -NMR spekter fra alle fraksjonene i 5-serien, 5.0-5.VIII. Spektrum 5-I (vedlegg 13), 5II og 5III viste seg å være ganske like. Det ble fra fraksjon 5I i tillegg tatt opp  $^{13}\text{C}$  spekter (vedlegg 10.14), APT-spekter (vedlegg 10.15) og COSY-spekter (vedlegg 10.16-10.18). For utfyllende informasjon om de ulike spektertyperne se punkt 5.2.10. Tolkning av spekterne kommer i punkt 6.19.1.

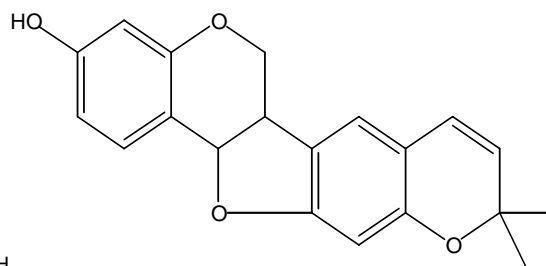
### 6.19.1 Identifisering av shinpterocarpin /phaseollin

Det ble antatt at fraksjonen inneholdt noe som lignet på erybraedin A., da spekteret var tydelig beslektet. Men integralet for metylgruppen tydet på at vi kun hadde 6 H-atomer der, så vi tenkte oss pterocarpan, men med bare 2 metylgrupper, det vil si 1 sidekjede. Metylgruppene var nesten helt like, og fremstår på spekteret som en singlet. Kjemisk skift er flyttet noe i forholdt til erybraedin A, fra 1,73/1,8 ppm til 1,43 ppm. Dette kan tyde på at sidekjeden er syklisert, slik at metylgruppene ikke sitter på en dobbeltbinding, men nærmere oksygen. Syklisering på en slik måte som vist på figurene under, passet godt med litteraturdata, og vi sto da med 4 muligheter for strukturer, 2 ulike sykliseringer for hver av plasseringene av prenylsidekjeden.

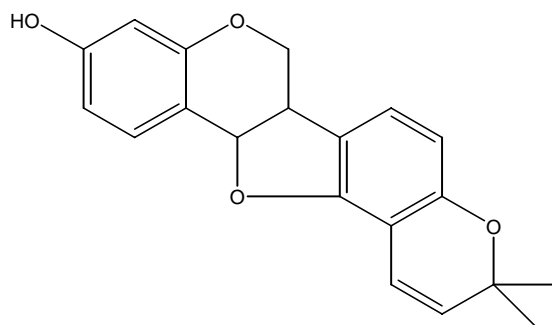
De fire alternativene er vist i figur 6.23-6.26 under:



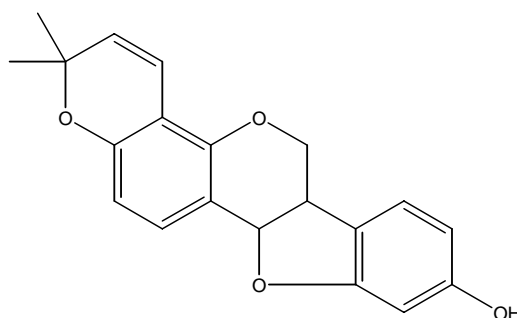
Figur 6.23: Alt. 1 Neorautenol



Figur 6.24: Alt. 2 Isoneorautenol



Figur 6.25: Alt. 3 Phaseollin



Figur 6.26: Alt. 4 Shinpterocarpin

Det ble funnet spektraldata for alle 4 i litteraturen (Agrawal 1989, Bailey et al 1977, Brink et al 1974, Chalmers et al 1977, Dewick et al 1982, Ingham og Tahara 1985, Kitagawa et al 1994, Mitscher et al 1988, Perrin et al 1972, Yenesew et al 1998). Alternativ 1 og 2 ble raskt utelukket som muligheter. De hadde begge to singletter, forårsaket av H-atomer i  $\rho$ -posisjon i hhv A og C ringen. Vi observerte dubletter i våre spekter.

Dermed gjensto 2 muligheter, alternativ 3 phaseollin og alternativ 4 shinpterocarpin, og våre signaler stemte godt overens med litteraturdata for enten det ene eller det andre (se tabell 6.15). Konklusjonen blir derfor at begge stoffer er tilstede i blanding. De store toppene stemmer godt overens med shinpterocarpin, mens de små toppene stemmer godt overens med phaseollin. Stoffene er så like i polaritet at det er vanskelig å skille dem både på kolonnekromatografi, kromatotron og på tynnsjikt-kromatografi.

Ved å måle høyden på integralkurven for et signal tilsvarende 1H for både shinpterocarpin og phaseollin, og sammenligne dem, får vi forholdet mellom mengden shinpterocarpin og phaseollin i blandingen. Man fant da at blandingen består av 77 % shinpterocarpin og 23 % phaseollin.

Tabell 6.15: Sammenligning av  $^1\text{H-NMR}$  spektraldata for shinpterocarpin og phaseollin i våre spekter med litteraturdata

5.I (våre data) ( $\text{CDCl}_3$ )		phaseollin (Bailey et al 1977) ( $\text{CDCl}_3$ )	phaseollin (Perrin et al 1972) ( $\text{CDCl}_3$ )	shinpterocarpin (Kitagawa et al 1994) ( $\text{CDCl}_3$ )	
$\delta$ (ppm)	Antall H Type signal Koblings- konstant (J)	$\delta$ (ppm) Antall H	$\delta$ (ppm) Antall H	$\delta$ (ppm)	Antall H Type signal Koblingskonstant J (Hz)
1,43	6H,s	1,45; 6H	1,49;1,52;2x3H	1,39	6H,s
3,43- 3,67	m	3,55; 1H	3,50:1H 3,64:1H	3,61 3,65	1H,m 1H,dd,J 9,4; 10,5
4,26	1H,dd,J 4,3; 10	4,22; 1H	4,20;1H	4,33	1H,dd,J 4,4; 10,5
5,47	1H,d,J 6,4	5,53; 1H	5,54;1H	5,48	1H,d,J 6,6
5,58	1H,d,J 9,9	5,55; 1H	5,55;1H	5,67	1H,d,J 9,9
		6,35; 1H	6,32;1H	6,31	1H,d,J 2,2
6,38	?	6,35;1H	6,41;1H	6,38	1H,dd,J 2,2; 8,3
6,53	1H,d,J 8,2	6,45;1H	6,48;1H	6,48	1H,d,J 8,8
6,63	1H,d,J 9,9	6,58;1H	6,54;1H	6,60	1H,d,J 9,9
7,05	1H,d,J 8,6	6,95;1H	6,92;1H	7,13	1H,d,J 8,3
7,25	1H,d,J 8,2	7,35; 1H	7,37;1H	7,25	1H,d,J 8,8

Tabell 6.16: Sammenligning av  $^{13}\text{C}$ -NMR spektraldata for shinpterocarpin og phaseollin i våre spektre med litteraturdata.

5.I (våre data) (CDCl <sub>3</sub> )	phaseollin (Dewick et al 1982)	phaseollin (Agrawal 1989)	phaseollin (Bailey et al 1977) (d <sub>6</sub> -acetone)	shinpterocarpin (Kitagawa et al 1994) (CDCl <sub>3</sub> )
27,7	27,8	28,0	28,0	27,3
27,8	27,8	28,0	28,0	29,8
39,4	39,7	39,7	40,5	39,5
66,6	66,6	66,6	67,1	66,8
76,2	76,1	76,6	76,6	76,3
78,9	78,7	78,7	79,8	78,8
98,3				98,5
103,6	103,7	103,7	103,9	
	106,3	106,3	106,5	
107,7				107,7
108,6	108,6	108,6	109,1	
110,4	109,7	109,7	110,4	110,7
112,1	112,7	112,7	112,7	112,7
116,4	116,5	116,5	117,1	116,6
				116,7
119,0	119,1	119,1	120,5	119,5
123,8	123,8	123,8		
124,9			125,0	125,0
129,1				129,3
130,7	129,6	130,4	130,4	130,9
132,2	132,3	132,3	133,1	
151,1				150,9
153,9	153,8	153,8	154,5	
	155,4	155,4	156,3	
156,9	156,8	156,8	157,7	157,0
157,2	157,1	157,1	159,7	
160,5				160,7
				161,2

Som vi ser av tabell 6.15 og 6.16 så stemmer våre data godt overens med begge stoffer. I  $^{13}\text{C}$ -spekteret er det verdt å merke seg at signalet på 98,5 ppm fra C8 i shinpterocarpin ikke finnes i phaseollin, og signalet på 103 ppm fra C4 i phaseollin, ikke finnes i shinpterocarpin.

### 6.19.2 Litteratur om shinpterocarpin

Shinpterocarpin er et pyranopterocarpan, med systematisk navn 9-hydroxy-6', 6'-dimetylpyrano(2',3':3,4)(6aR,11aR)-pterocarpan. Det ble første gang isolert og identifisert fra røttene av *Glycyrrhiza glabra*, kommersielt kjent som kinesisk og russisk lakrisrot, av Kitagawa og kollegaer i 1994. De beskrev shinpterocarpin som en gul, oljeaktig substans (Kitagawa et al 1994).

Shinpterocarpin er også senere funnet i samme plante (Fukai 1996), hvor den inngår i en stor preescreeningstest for lakrisfenoler, på leting etter kjemiske mutagener. I dette Rec-assayet viser shinpterocarpin noe hemming av *B.subtilis* (H17, villtype, rec +), men ingen hemming av mutante celler av *B.subtilis* som er mer sensitive for kjemiske mutagener (Fukai et al 1998).

Shinpterocarpin ble første gang rapportert funnet i *Erythrina* slekten av Yenesew og kollegaer i 2000. De påviste da shinpterocarpin i stammebarken av *Erythrina sacleuxii* (Yenesew et al 2000).

Senere ble shinpterocarpin påvist i rotbark av *Erythrina latissima*, og testet for antimikrobiell aktivitet mot 6 ulike mikroorganismer med en TLC bioautografisk metode for antibakterielle og antifungale assay med hhv kloramfenikol og miconazol som positive standarder. De fant ingen effekt mot de gram-negative bakteriene *E.coli* og *P.aeruginosa*. Mot de gram-positive bakteriene *S.aureus* og *B.subtilis* fant de en minimums hemningsmengde på hhv 0,70 og 1.00 µg mot 0,0001 µg kloramfenikol som positiv standard. På samme måte som for erybraedin A (punkt 6.15.2) viste også shinpterocarpin seg å være mest aktiv mot gjærsoppene *C.mycoderma* (0,007 µg) og *A.cerevisiae* (0,006µg), hvor miconazole ble brukt som positiv standard og hadde minste mengde for hemming på 0,0001 µg (Wanjala et al 2002).

Den siste rapporteringen om shinpterocarpin er fra rotbarken til *Erythrina sacleuxii*. Acetonekstraktet viste stor antiplasmodisk aktivitet, og shinpterocarpin var et av de mest aktive komponentene i dette ekstraktet, men en IC<sub>50</sub> verdi på 6,6 ± 1,2 µM for klorokinsensitiv *Plasmodium falciparum* (D6) og 8,3 ± 1,1 µM for klorokinresistent *Plasmodium falciparum* (W2). Til sammenligning har klorokin og kinin hhv IC<sub>50</sub>-verdier på 0,008 ± 0,002 µM og 0,050 ± 0,02 µM for D6 og 0,075 ± 0,002 µM og 0,28 ± 0,02 µM for W2 (Andayi et al 2006).

Så vidt meg bekjent er ikke shinpterocarpin tidligere funnet i *Erythrina senegalensis*, og heller ikke i blanding med phaseollin slik som her. At shinpterocarpin er aktiv mot gjærsoppene *C.mycoderma* og *A.cerevisiae* stemmer godt overens med at den også kan være aktiv mot *C.albicans* som også er en gjærsopp.

### 6.19.3 Litteratur om phaseollin

Phaseollin er en velkjent substans, som det finnes mye litteratur om. I dette avsnittet presenteres en del av litteraturen omkring oppdagelsen av phaseollin, og dens antifungale aktivitet.

Phaseollin er et fytoalexin. Fytoalexiner er definert som en klasse kjemiske substanser med antifungal aktivitet som produseres i vertsplanten dersom planten utsettes for en soppinfeksjon (Cruickshank og Perrin 1963). De er en del av plantens immunforsvar, og er involvert i plantenes motstand mot sopp og bakterier (Arnoldi og Merlini 1990).

Phaseollin ble første gang isolert i 1963 av Cruickshank og Perrin. De innokulerte frittliggende, åpne belger fra den franske bønneplanten *Phaseolus vulgaris* L., med soppsporesuspensjon av *Monilinia fructicola* (Wint.), med påfølgende ekstraksjon og rekrySTALLISERING. Resultatet ble hvite, nåleformede krystaller med smeltepunkt 177-178 °C (Cruickshank og Perrin 1963). Strukturen ble første gang beskrevet i 1964 (Perrin 1964).

Biosyntesen av phaseollin er også beskrevet, og inkluderer en spesifikk folding av polyketidkjeden (Dewick og Steele 1982).

I biologiske assay viser phaseollin antifungal aktivitet. Det ble funnet en ED<sub>50</sub>-verdi på 3 µg/ml for vekst av *M. fructicola* (en ikke-patogen sopp for *Phaseolus vulgaris*). Den korresponderende ED<sub>50</sub>-verdien for phaseollin mot *Colletotrichum lindemuthianus* (en patogen sopp for *Phaseolus vulgaris*) var 50 µg/ml. (Cruickshank og Perrin 1963).

I artikkelen "Antimicrobial agents from an East African medicinal plant *Erythrina abyssinica*" (Kamat et al 1981) blir phaseollins antifungale aktivitet spesielt bemerket. Phaseollin hadde MIC-verdier på 12,5 og 6,25 µg/ml mot bakteriene *Staphylococcus aureus* og *Bacillus subtilis*, 25 og 50 µg/ml mot gjærsoppene *Saccharomyces cerevisiae* og *Candida utilis* og 12,5 µg/ml mot alle soppene *Sclerotinia libertiana*, *Mucor mucedo* og *Rhizopus chinensis* (Kamat et al 1981). Da ingen positive standarder var tatt med, er det vanskelig å si noe om disse tallene, men de var stort sett lavere enn tilsvarende tall for de andre substansene som var testet.

Det ble også testet for blodplatehemming. Det ble da funnet IC<sub>50</sub>-verdier på 30, 36 og 80 µg/ml for plateaggresjon induisert av hhv ADP (10 µM), collagen (38 µg/ml) og arakidonsyre (0,57 mM) (Kamat et al 1981). Heller ikke her var det tatt med tall for positive standarder.

En struktur-aktivitetsanalyse, og videreføring av tanker om at phaseollin muligens interfererer med prosesser nødvendig for membranfunksjon, og at det kanskje finnes en strukturspesifikk reseptor for pterocarpaner i membranene hos sensitive sopper, blir beskrevet av VanEtten i 1976. Her blir phaseollin sammen med flere andre substanser (pterocarpaner, dehydropterocarpaner, isoflavaner, coumestaner og isoflavon) testet for antifungal aktivitet. Testsoppene som ble brukt var *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* og *Aphanomyces euteiches*. Konklusjonen er at det er usannsynlig at en spesifikk tredimensjonal form må inntas for aktivitet, og at det kanskje heller eksisterer flere forskjellige reseptorseter i soppceller og en felles fysiokjemiske base for aktivitet eksisterer kanskje ikke (VanEtten 1976).

Forskjellig sopparter har ulik grad av patogenisitet for samme vertsplante. Dette kan skyldes de ulike måtene å metabolisere og detoksifisere induserte, antifungale substanser, fytoalexiner. En artikkel som tar for seg phaseollins metabolisme i ulike sopparter er skrevet av Bailey og kollegaer. De finner at den ikke-patogene *Septoria nodorum* og den patogene *Colletotrichum lindemuthianum* har ulike metabolitter fra phaseollin, og at metabolittene fra den sistnevnte er mindre aktive. Resultatene viser at begge soppene har en metabolisme som fører til stor grad av detoksifisering av phaseollin (Bailey et al 1977).

Lipofilisitet og antifungal aktivitet av isoflavonoid fytoalexiner er studert og blant annet lipofile substituenten, for eksempel dimetylkromengruppen i phaseollin, ser ut til å favorisere fungicid aktivitet. At lipofilisitet spiller en viktig rolle for antifungal aktivitet er resultatet i en artikkel skrevet av Arnoldi og Merlini. Her ble oktanol-vann fordelingskoeffisienten, log P, bestemt for en rekke phytoalexiner, og VanEttens data (VanEtten 1976) ble brukt til å studere korrelasjonen. For phaseollin ble log P bestemt til å være 3.58. De mest aktive komponentene hadde en log P verdi større enn 2.6 (Arnoldi og Merlini 1990).

Basert på funnene i litteraturen om at phaseollin er et fytoalexin som induseres av soppangrep, kan det tenkes at treet som rotbarken er hentet fra kanskje har vært angrepet av sopp. Så vidt meg bekjent er ikke phaseollin tidligere funnet i *Erythrina senegalensis*.

Basert på funnene i litteraturen er ikke uventet at blandingen shapterocarpin-phaseollin 3:1 har antifungal aktivitet, og gir hemming av vekst av *C. albicans*.



## 6.20 FRAKSJONERING AV FRAKSJON 5I -5II-5III

NMR spekter av fraksjonene 5I, 5II og 5III var ganske like, men fraksjonene var ikke helt rene. Disse fraksjonene ble slått sammen, og forsøkt rensert opp på kromatotron. Det ble utført en normalfase separasjon, med kloroform i 2 % etylacetat som elueringsmiddel. Det ble samlet opp 23 fraksjoner, de 3 første og siste var 20 ml, resten var på 5 ml. Fraksjoner ble slått sammen på bakgrunn av UV fremkalling og Ceric spraying av TLC plater, samt NMR spekter fra fraksjonsglass 11, 14 og 17 (se tabell 6.17).

Tabell 6.17: Oversikt over hvilke fraksjoner som ble slått sammen og vekten av disse i 7-serien

Fraksjon	Glass som ble slått sammen	Vekt (mg)
7I	1-8	5
7II	9-11	12
7III	12-16	107
7IV	17-18	12
7V	19-23	1
Totalt		137

Utbytte:  $137 / 185 \times 100 \% = 74 \%$

$^1\text{H-NMR}$  spekter av fraksjon 7III (vedlegg 10.19) viste seg å være stor og blandingen ren nok til å måle optisk- og biologisk aktivitet.

## 6.21 OPTISK AKTIVITET AV SHINPTEROCARPIN - PHASEOLLIN (3:1)

Optisk aktivitet av shinpterocarpin-phaseollin (3:1) blandingen ble målt. Fraksjon 7III ble løst i 2 ml kloroform som gav en konsentrasjon på 54 mg/ml, dvs. 0,054 g/ml. Vi observerte en rotasjon på  $-6,3^\circ$ , ved en bølgelengde på 589 nm, og en temperatur på  $20^\circ\text{C}$ . Spesifikk rotasjon ble beregnet etter formelen  $[\alpha]_D = \alpha / l \times c$ , som gir

$$[\alpha]_D^{20} = -6,3 / 1 \times 0,054 = -117^\circ$$

I litteraturen er det tidligere rapportert at shinpterocarpin er optisk aktiv med en spesifikk rotasjon på  $[\alpha] -9,9^\circ$ , og en 6aR, 11aR konfigurasjon på samme måte som erybraedin A (Kitagawa et al 1994).

Når det gjelder phaseollin er det rapportert en optisk aktivitet på  $[\alpha]_{578} = -145^\circ$  ved  $20^\circ\text{C}$ , og  $c=0,17$  g/ml i etanol (Cruickshank og Perrin 1963).

Resultatet vårt stemmer overens med det som er oppgitt i litteraturen. Lyset dreier i samme retning, og tallet for vår blanding ligger mellom litteraturverdiene for shinpterocarpin og phaseollin.

## **6.22 BIOLOGISK TESTING AV SHINPTEROCARPIN – PHASEOLLIN**

Da shinpterocarpin og phaseollin har så lik polaritet at det ble vanskelig å separere dem fra hverandre, ble det testet for biologisk aktivitet på blandingen. På samme måte som for råekstrakt og for erybraedin A, ble det testet for DPPH-scavenging (metode 5.2.13), 15-LO hemming (metode 5.2.14) og for antifungal aktivitet mot *C. albicans* (metode 5.2.12).

### **6.22.1 DPPH-scavenging**

Heller ikke blandingen av shinpterocarpin-phaseollin (3:1) viste seg å være en særlig god DPPH-scavenger. Det ble målt på bare en konsentrasjon 5mg / ml, som tilsvarer 83,3 µg/ml i kyvetten, og da ble det målt en radikalscavenger aktivitet på bare  $2,5 \pm 0,4\%$ , som er enda lavere enn for erybraedin A (se punkt 6.18.1).

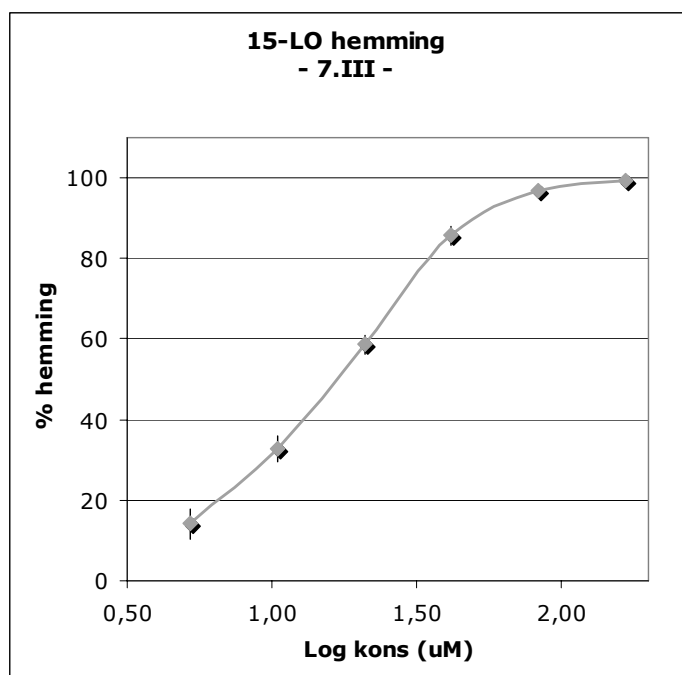
Dette er i tråd med hva vi hadde forventet, da råekstraktet heller ikke var særlig aktivt (se punkt 6.4.1).

### **6.22.2 Hemming av enzymet 15-lipoksygenase**

På samme måte som for råekstraktene og erybraedin A, ble shinpterocarpin-phaseollin (3:1) testet for evne til å hemme enzymet 15-lipoksygenase. Resultatene er fremstilt i tabell 6.18. Figur 6.27 viser grafisk fremstilling av resultatet.

Tabell 6.18: Resultatet av 15-LO hemming av shinpterocarpin-phaseollin (3:1)

Fraksjon /substans	Kons. kyvette ( $\mu\text{M}$ )	% hemming	p<
7III shinpterocarpin- phaseollin (3:1)	166,7	99,4 $\pm$ 0,6	0,001
	83,3	96,9 $\pm$ 0,7	0,001
	41,7	85,7 $\pm$ 2,3	0,001
	20,8	58,7 $\pm$ 2,3	0,001
	10,4	32,6 $\pm$ 3,2	0,001
	5,2	14,1 $\pm$ 3,7	0,005
	IC <sub>50</sub>	16,5 $\pm$ 1,1	
Quercetin (positiv kontroll)	83,3	89,8 $\pm$ 0,6	0,001
	41,7	48,7 $\pm$ 2,8	0,001
	20,8	25,2 $\pm$ 4,6	0,001
	IC <sub>50</sub>	42 $\pm$ 2 $\mu\text{M}$	



Figur 6.27: Grafisk fremstilling av shinpterocarpin-phaseollin (3:1)s evne til å hemme enzymet 15-lipoksydase. Prosentvis hemming vises som en funksjon av log. konsentrasjon

### **6.22.3 Antifungal aktivitet av shinpterocarpin-phaseollin (3:1)**

Som beskrevet senere i denne delen (punkt 6.25) ble fraksjon 7III som består av blandingen shinpterocarpin-phaseollin (3:1) testet for antifungal aktivitet mot *C.albicans*. En tynnsjiksplate ble inkubert med en suspensjon av *C.albicans* og resultatet var en tydelig hemningssone med  $R_f$ -verdi på 0,19. Platen var eluert i diklormetan. Denne  $R_f$ -verdien stemmer brukbart overens med de to verdiene (0,13 og 0,23) som ble funnet for fraksjon XX i antifungaltest 1 (vedlegg 10.25). Fraksjonen inneholder nok fremdeles noen urenheter i tillegg til shinpterocarpin-phaseollin-blanding, og referanseplaten kan tyde på at det ligger 2 stoff nær hverandre. Hemningssonen fra fraksjon 7III (figur 6.28, 6.31 og vedlegg 10.27) er litt smalere på toppen, og man kan tenke seg at den er forårsaket av 2 stoffer med  $R_f$ -verdier 0,15 og 0,25 som ligger tett slik at hemningssonene overlapper hverandre. Men blandingen shinpterocarpin-phaseollin kan altså sies å være aktiv mot *C.albicans*. Dette stemmer bra med tidligere litteratur hvor shinpterocarpin er funnet å være aktiv mot gjærsopp (Wanjala et al 2002). Phaseollin, som er et phytoalexin, er også vist å ha antifungal aktivitet (Cruickshank og Perrin 1963, Kamat et al 1981). Se forøvrig kapittel 6.19.2 og 6.19.3.

## **6.23 ANTIFUNGALTEST 3**

Som avslutning på denne hovedoppgaven ble det gjort en stor antifungaltest av til sammen 54 fraksjoner, noen av de samme som ble testet i Mali, samt alle nye. Dette var for å se om testen kunne utføres i Norge under andre forhold enn det som er i Mali, hvor de to første testene ble utført, teste antifungal aktivitet på alle de nye fraksjonene jeg hadde fått i Norge, samt bekrefte en del av de resultatene jeg fikk i Mali. Sulconazol (20µg) ble brukt som positiv kontroll. Det ble også utført en tetthetsmåling, for å se at vi hadde omtrent samme antall soppceller som i Mali i suspensjonen som ble påført tynnsjiksplatene.

### **6.23.1 Resultater fra antifungaltest 3**

Resultatene fra testen vises i figur 6.28-6.30.



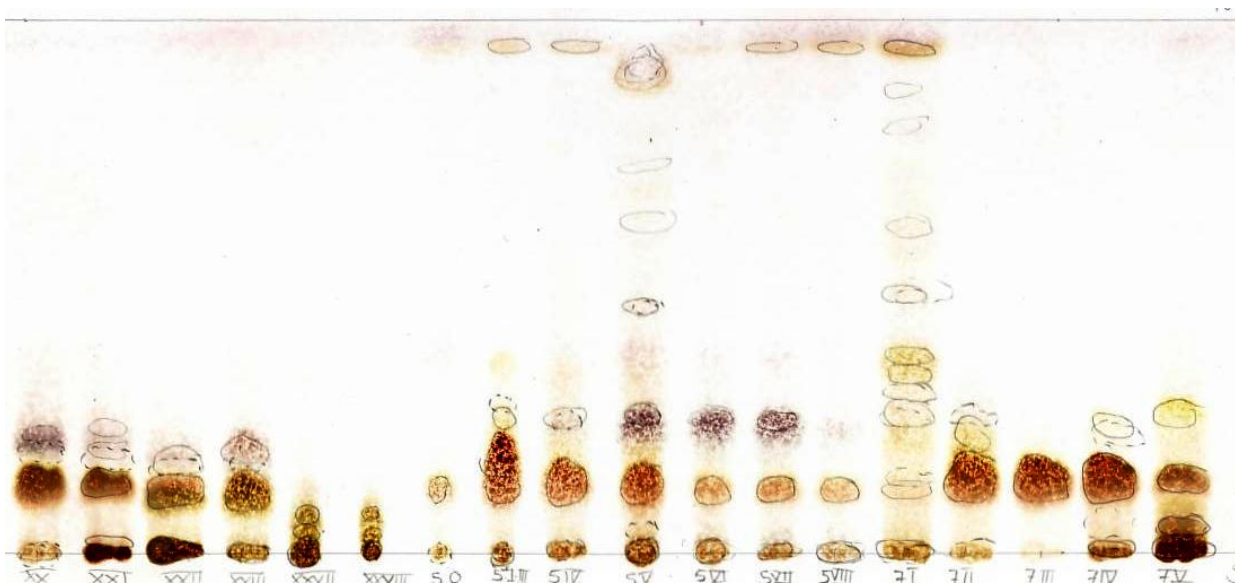
Figur 6.28: Resultat fra plate 1 i antifungaltest 3. Fraksjonene fra venstre mot høyre er: XX, XXI, XXII, XXIII, XXVII, XXVIII, 5.0, 5.1-5.3 (sammenslått), 5IV, 5V, 5VI, 5VII, 5VIII, 7I, 7II, 7III (shinpterocarpin-phaseollin (3:1)), 7IV, 7V og sulconazol.



Figur 6.29: Resultat fra plate 2 i antifungaltest 3. Fraksjonene fra venstre mot høyre er: XIV, XV, 2I, 2VI, 2VII, 2XI, 2XIII, 4I-4III (sammenslått), 4IV, 4V, 4VI, 4VII, 4VIII, 6I, 6II, 6III (erybraedin A), 6IV, 6V og sulconazol. Platen har begynt å gå litt i oppløsning, og den er ikke helt tørt oppe til venstre.



Figur 6.30: Resultat fra plate 3 i antifungaltest 3. Fraksjonene fra venstre mot høyre er: III, VI, VIII, X, XII, XVI, XVII, XVIII, XIX, 3I, 3II, 3III, 3IV, 3V, 3VI, 3VII, 3VIII, 3IX og sulconazol. Platen har begynt å gå i oppløsning, særlig i øvre, høyre hjørne.



Figur 6.31: Referanseplate til plate 1 i antifungaltest 3. Platen er utviklet med diklormetan, betraktet i kort-og langbølget UV-lyst, samt fremkalt med Ceric reagens. Referanseplaten har en støttefase i aluminium, så  $R_f$ -verdien vil kunne variere litt i forhold til glassplatene antifungaltesten ble gjort med. Fraksjonene fra venstre mot høyre er: XX, XXI, XXII, XXIII, XXVII, XXVIII, 5.0, 5I-5III (sammenslått), 5IV, 5V, 5VI, 5VII, 5VIII, 7I, 7II, 7III (shinpterocarpin-phaseollin (3:1)), 7IV, 7V og sulconazol.

For tabell med alle hemmingssonenes  $R_f$ -verdi, samt tilhørende  $R_f$ -verdier fra referanseplatene, se vedlegg 10.27.

### 6.23.2 Resultat fra tetthetsmåling av *C.albicans*

Målet var å finne ut hvor mange soppceller vi hadde i sopp suspensjonen av maltagar vi la ut på tynnsjiksplatene. Det ble laget en fortynningsrekke av *C.albicans* og de to siste fortytningene ble sådd ut på agarskål og inkubert ved 30 °C over natt (se figur 5.8). Neste dag ble antall kolonier telt på den skålen som var lettest å telle.

Halvparten av skålen som ble utsådd fra den siste fortytningen ble talt. Den inneholdt 589 kolonier. Det vil si at hele skålen inneholder ca 1200 kolonier,  $1,2 \times 10^3$ . Dersom vi regner oss tilbake, finner vi at utgangssuspensjonen inneholder ca  $1,2 \times 10^7$  celler/ml. Denne blir så fortynnet 100 ganger (1 ml i 100 ml maltagar) til en celletetthet på  $1,2 \times 10^5$  celler/ml, som er det samme som det man sannsynligvis hadde i Mali.

### 6.23.3 Diskusjon av resultatene

Resultatene fra denne testen stemmer godt overens med de resultatene jeg fikk i Mali på antifungaltest 1 og 2. De fraksjonene som ikke gav hemmingssoner i Mali, gjorde det heller ikke på denne testen, og de fleste fraksjonene som gav hemming i Mali, gjorde det også her.

Det ene unntaket er fraksjon XIV og XV, som viste tydelig hemming i test 1 og 2, men ingenting i denne. Dette er uventet, og helt klart en feil, fordi fraksjoner i 2-, 4-, og 6- serien, som stammer fra disse fraksjonene, viser tydelige hemmingssoner. Det kan skyldes at TLC-løsningen som ble brukt, har stått lenge og de aktive stoffene har blitt nedbrutt, eller det kan skyldes at det var så lite igjen av fraksjonen i prøveglasset, slik at konsentrasjonen ble for lav.

Resultatet av tetthetsmålingen sammen med det faktum at de aller fleste fraksjonene viste samme resultat både i Mali og i Norge, viser at testen er godt egnet for utførelse begge steder, og resultatene er sammenlignbare, selv om ikke alle betingelsene er like.

$R_f$ -verdiene varierer i mer eller mindre grad for de samme fraksjonene i ulike tester og på ulike steder, og fra testplate til referanseplate. Dette kan ha mange grunner. For det første så er utseende på flekken varierende, og det kan være vanskelig å finne midten. Løsningsmidlene kan være litt forskjellige, selv om de er fra samme produsent i Norge og Mali, men oppbevaringsbetingelsene er ulike. I tillegg er platene blitt utviklet i ulik romtemperatur, og metningsgraden i karet kan ha påvirket elueringen. Det kan også være litt ulik  $R_f$ -verdi på aluminiums- og glassplater, med samme

stasjonærfase. Relative  $R_r$ -verdier (for eksempel i forhold til en standard) vil ofte være mer reproduerbare enn absolutte verdier.

Både erybraedin A og blandingen med shinpterocarpin og phaseollin i forholdet 3:1 viste seg å være antifungale forbindelser med effekt mot *C.albicans*. I tillegg er det flere fraksjoner som enda ikke er rene, som også viser seg svært aktive.



## 7 ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER

### 7.1 INNLEDNING

Jakten på nye legemidler er stadig et aktuelt tema. Ny forskning og mer avansert teknologi har gitt oss muligheten til å forstå sykdommer på et mer detaljert nivå. Høyere krav stilles til behandling, og mange ganger viser det seg at dagens legemidler ikke er gode nok eller ikke virker lenger. Resistensproblematikk blir mer og mer aktuelt. Derfor er man stadig på let etter nye legemidler.

Naturmedisin har en voksende interesse i den vestlige verden. Den konvensjonelle medisinen er i ferd med å akseptere bruken av planteprodukter som et tillegg eller alternativ til moderne medisin, så sant midlene er validert vitenskaplig (Giliani and Rahman 2005). Godt over halvparten av alle legemidler på markedet i dag er naturpreparater, eller derivater av disse (Iwu 2002a). Naturen har mange uoppdagede ressurser. Mindre enn 10 % av alt biologisk mangfold er undersøkt, så sjansen for at det er noe av interesse der er stor (Iwu 2002b). Det finnes mange ulike måter å arbeide på når det gjelder søk etter nye potensielle legemidler. Det har vist seg i flere studier at etnofarmakologisk styrt jakt på nye legemidler er mer effektivt enn tilfeldig søk (Carlson 2002). Det blir derfor stadig større fokus på bruk av tradisjonelle samfunns kunnskap og ressurser i jakten på nye legemidler.

En stor del av verdens befolkning er avhengige av tradisjonell medisin som sin primære form for helsetjeneste. Med utviklingen i dagens samfunn og det faktum at flere plantearter forsvinner hver dag, er både det biologiske mangfoldet og kunnskapen knyttet til dette i ferd med å forsvinne (Fenwick 1998).

Denne delen av oppgaven beskriver kort hva etnofarmakologi og tradisjonell medisin er. Videre blir det tatt med litt fakta om Mali, som er utgangspunktet for de etnofarmakologiske studiene jeg har gjort, samt en kort beskrivelse av tidligere arbeid som er gjort på området. Tilslutt litt om hvordan informasjonen ble samlet inn og resultatene fra arbeidet. På feltarbeidet ble det samlet inn informasjon om 5 forskjellige planter, men bare resultatene for *Erythrina senegalensis* er tatt med her.

#### 7.1.1 Etnofarmakologi og etnobotanikk

En mye brukt definisjon på etnofarmakologi er presentert av Bruhn og Helmstedt i 1981 som et "tverrfaglig vitenskaplig studium av biologisk aktive forbindelser som tradisjonelt har vært benyttet eller

kjent av mennesker til behandling av sykdom" (Bruhn and Helmstedt 1981). Etnofarmakologi dreier seg altså om studier av tradisjonell kunnskap om og bruk av lokale, biologiske ressurser. Det er et meget tverrfaglig område. En etnofarmakologisk studie inkluderer både feltarbeid for å samle inn data, bearbeidelse av disse og ikke minst screening / bioassay av aktuelle planter og ekstrakter. Dette krever kunnskap og ekspertise fra mange områder inkludert antropologi, botanikk, farmakognosi, organisk kjemi, farmakologi og analytisk kjemi.

Målene med etnofarmakologi er å samle inn og dokumentere en viktig kulturarv, informasjon, som kanskje er i ferd med å forsvinne, og å undersøke, evaluere og dokumentere sikkerhet og mulig effekt av midlene som blir brukt (Bruhn and Helmstedt 1981) og på den måten bidra til et bedre helsevesen og helsetilbud for befolkningen der studiene utføres. Utviklingen av såkalte "forbedrete legemidler" for lokal bruk og gjøre disse lettere tilgjengelig for lokalbefolkningen kan også være en viktig del av arbeidet.

Vitenskaplige studier og evalueringer, særlig med hensyn på sikkerhet og effekt av medisinplanter / medisinblandinger brukt av healere er viktig for etnofarmakologer. Plantestudier bidrar også til å forstå den kulturelle meningen og den sosiale viktigheten av medisinske og andre nyttige planter. Etnofarmakologiske studier er viktig for dokumentere og bevare den kunnskapen som ulike kulturer har tilegnet seg gjennom mange års erfaring, før den går tapt i den raske utviklingen som mange nå opplever (Heinrich and Gibbons 2001; Heinrich 2003).

Etnobotanikk er studier av menneskelig interaksjon med planter, inkludert studier av medisinplanter, og omfatter botanikk (planteanatomi, fysiologi, genetikk), fytokjemi (isolering og karakterisering av stoffer) og farmakologi (virkemekanismer). Etnobotaniske studier er et viktig steg i identifisering, seleksjon og utvikling av legemidler fra medisinplanter (Ajaiyeoba, Ashidi et al. 2004). Det finnes flere eksempler på at undersøkelser av plantemedisin har gitt opphav til viktig legemidler i den vestlige medisinen, enten som lead-compounds eller direkte som legemiddel. For eksempel hjertemedisinen digoxin (fra *Digitalis lanata*), malariamedisinen kinin og kinidin mot hjertearytmier (fra kinabark, *cinchona*-slekten) og kreftmedisinene vinkristin og vinblastin (*Catharanthus roseus*) er alle viktige legemidler med utgangspunkt i planter, funnet ved hjelp av etnomedisinsk forskning.

### 7.1.2 Fakta om Mali

Det vestafrikanske landet Mali er det nest største landet i Afrika, med sine 1 240 190 km<sup>2</sup> (se kart figur 1). Klimaet er subtropisk til tørt; varmt og tørt i tørketiden (februar – juni), vått og fuktig i regntiden (juni – november) og kaldt og tørt på "vinteren" (november til februar). 65 % av landarealet er ørken eller halvørken. Terrenget er flatt med store sletter dekket av sand i nord, og savannelandskap i sør. I nordøst finnes det noe fjellandskap (CIA-World Factbook, 2006).

Landet har ca 11,7 millioner innbyggere (innbyggertallet er estimert til 11 716 829 for juli 2006) og alderfordelingen blant befolkningen er som følger:

0-14 år: 48.2% (gutter 2,857,670 / jenter 2,787,506)  
15-64år: 48.8% (menn 2,804,344 / kvinner 2,910,097)  
65 år og eldre: 3% (menn 146,458 / kvinner 210,754)  
(CIA-World Factbook, 2006 estimat)

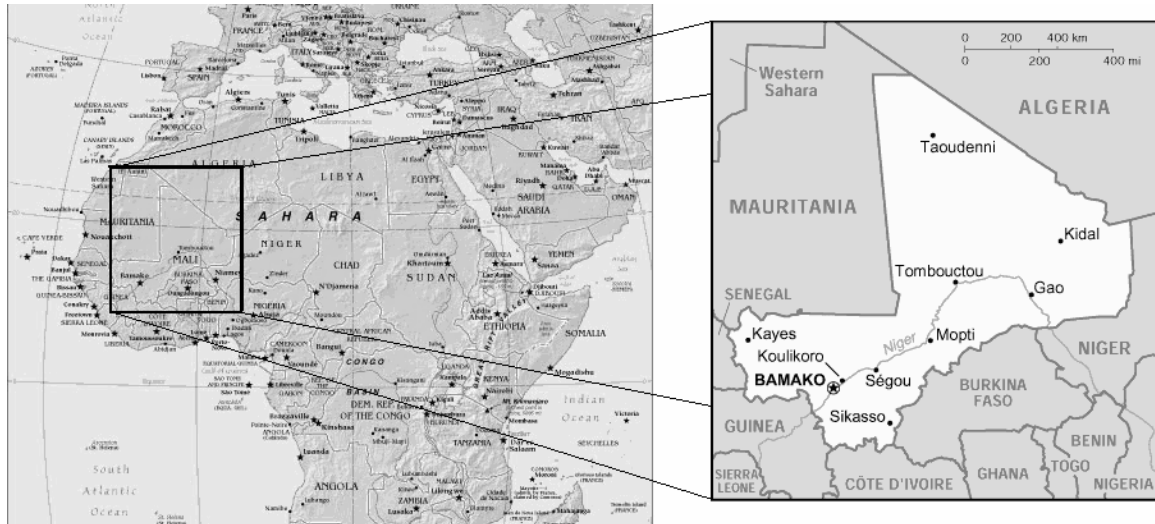
Forventet levealder er

Hele befolkningen: 49 år  
menn: 47.05 år  
kvinner: 51.01 år (CIA-World Factbook, 2006 est.)

Mali er et av de fattigste land i verden, med store forskjeller i inntekt. Økonomisk aktivitet er i stor del konsentrert rundt elva Niger. Ca 10 % av befolkningen er nomader og ca 80 % av arbeidsstokken driver med jordbruk eller fiske. De fleste driver med såkalt selvbergingsjordbruk, og dyrker hirse, durra, ris og mais og også i noen grad poteter, yamsrot og kassavabusk til eget bruk (Velton 2004). Den industrielle aktiviteten begrenser seg til produksjon av jordbruksutstyr. De største eksportvarene er bomull, gull og buskap.

30 % av befolkningen i byene og 70 % av befolkningen på landsbygda lever under fattigdomsgrensa. Det utgjør totalt 64 % av befolkningen i Mali (Tall fra 2001).

(CIA-World Factbook 2006)



Figur 7.1: Kart over Afrika og Mali (CIA-World Factbook)

### 7.1.3 Tradisjonell medisin i Mali

Tradisjonell medisin kan ha flere betydninger. I denne oppgaven vil tradisjonell medisin referere til den praksis som utøves av medisinmenn / tradisjonelle healere, og som er basert på kunnskap som gjerne har gått i arv fra far til sønn gjennom flere generasjoner. Tradisjonell medisin eller etnomedisin i denne forstand inkluderer helsefremmende, kulturelle skikker og bruk av minimalt prosesserte, naturlig forekommende produkter for å motvirke og behandle sykdom og å opprettholde fysisk og emosjonell helse (Iwu 2002a). Tradisjonelle healere har stor kunnskap om planter og plantemedisin, og kjenner det biologiske mangfoldet i lokalområdet godt.

I Mali finner man både konvensjonell og tradisjonell medisin. Med konvensjonell medisin menes vestlig medisin basert på vitenskap. Men det er få leger i forhold til den totale populasjonen (WHO: 1 lege per 10.000 innbyggere i 2004), og de fleste innbyggerne har ikke råd til å oppsøke lege, eller det er for langt unna, så den konvensjonelle medisinen er i stor grad forbeholdt de rike i byene. Den gjennomsnittlige malier oppsøker som regel en tradisjonell healer for å få hjelp når han er syk. Det finnes minst en tradisjonell healer i hver landsby. Derfor bygger store deler av helsevesenet i Mali på tradisjonell medisin.

De som praktiserer tradisjonell medisin i Mali kan deles inn i tre grupper. Tradisjonelle healere er personer som er kjent i området de bor for å kunne utøve tradisjonell medisin. De behandler alle typer sykdommer, både av fysisk og psykisk art, og de kan også fordrive onde ånder. Tradisjonelle jordmødre eller fødselshjelpere er gjerne kvinner som hjelper gravide og assisterer under fødsel, og mange av disse er også tradisjonelle healere for barnesykdommer.

Herbalister er betegnelsen på de som selger medisinerplanter på markedet, og legemiddelselgere er folk som selger substanser basert på dyr eller mineraler som brukes i preparering av legemidler (Diallo 2000).

Tradisjonelt praktiserende er i Mali organisert i foreninger som for eksempel Forening for Tradisjonelle Healere og Herbalister i Bamako (Association des thérapeutes traditionnels et des herboristes de Bamako, Keneya yiriwaton) og Forening for tradisjonelle healere i Siby (Association des Thérapeutes traditionnels de Siby). Men man behøver ikke være organisert for å arbeide, man kan også arbeide alene (Diallo 2000).

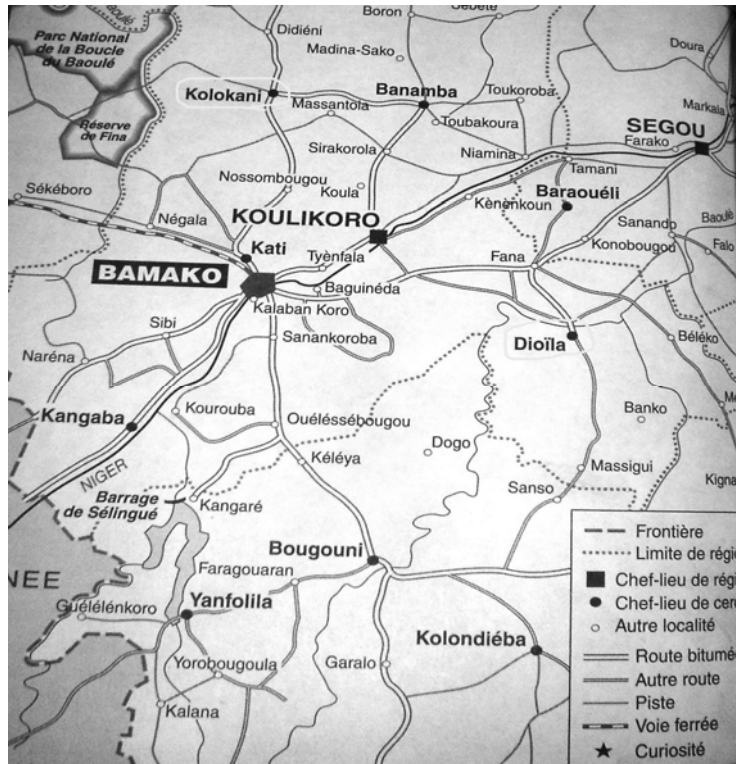
Department of Traditional Medicine (DMT), underlagt Nasjonalt Institutt for forskning på folkehelse (INRSP), ble opprettet for å få fornyet aksept for tradisjonell medisin og medisinerplanter i Mali. DMT er en av WHO's samarbeidspartnere for forskning på tradisjonell medisin. Et av hovedmålene til DMT er å etablere en mekanisme for å sikre at tradisjonell medisin skal være komplementært til konvensjonell medisin, og at medisiner kan produseres fra lokale ressurser, hovedsakelig fra medisinerplanter. Hovedaktivitetene til DMT er registrering av tradisjonelle healere og medisinerplanter og forskning og utvikling av forbedret tradisjonell medisin. DMT har utviklet flere såkalte forbedrede legemidler (Médicaments Traditionnels Améliorés, MTA) som er anerkjent som essensielle medisiner i Mali. Denne hovedfagsoppgaven er et samarbeidsprosjekt mellom DMT og UiO, og deler av arbeidet, inkludert alt feltarbeidet er gjort i regi av DMT.

## **7.2 TIDLIGERE ARBEID**

Det ble i februar 2004 utført etnofarmakologiske studier i Mali på *Erythrina senegalensis*, i landsbyene i og omkring i Siby, som er ca. 50 km sørvest for Bamako, i Koulikoro-regionen i Mali. I intervjuer med 32 healere ble det funnet at røtter, stammebark, blader, greiner, blomster og frukt av *E. senegalensis* ble brukt i bad, som drikke, pulver og tannpikere mot mageproblemer, malaria, amenorré, impotens, hoste, kvinnelig sterilitet og mot gonokokkinfeksjoner (Arama 2005).

## **7.3 FELTARBEID**

Det ble utført 2 feltarbeid i løpet av den perioden vi var i Mali. Ett i perioden 21.-24 januar 2006 i Kolokani, en landsby ca. 20 mil nord for Bamako, og ett i perioden 28. januar – 2. februar 2006 i Dioila, ca 23 mil øst for Bamako (se kart figur 2).



Figur 7.2: Kart over stedene for feltarbeid, Kolokani og Dioila. (Le Petit Futé du Mali)

På begge turene hadde vi med oss Professor Drissa Diallo, direktør for DMT. Han fungerte både som intervjuer og oversetter for oss. Språket som ble benyttet i alle intervjuene var bambara, så alt som ble sagt ble direkte oversatt til engelsk av ham. I tillegg var det med en gartner fra DMT som også samlet inn en del plantemateriale. Healerene ble lokalisert ved hjelp av lokale kontakter, og vi dro enten ut til landsbyene og intervjuet dem der, eller de kom til oss.

Intervjuene foregikk ved at healerne ble spurt generelt om hva de visste om 5 ulike planter (*Combretum glutinosum*, *Syzygium guinense*, *Erythrina senegalensis*, *Terminalia microptia* og *Anogeissus leiocarpus*), hva de ble brukt til og hvordan de ble brukt. Dersom healerne svarte kort og upresist, ble det stilt mer spesifikke spørsmål. I løpet av et intervju ble følgende informasjon samlet inn om hver av de 5 plantene:

- Hvilke(n) indikasjon(er) har denne planten
- Hvilke(n) del(er) av planten blir benyttet
- Hvordan preparatet fremstilles
- Hvordan preparatet brukes
- Hvilken dossering blir benyttet

Bilder fra intervjuene vises i figur 7.3-7.5



Figur 7.3: Intervju av healeren Salia Togola i landsbyen Diana, utenfor Diolla.



Figur 7.4: Healeren Mi Dagnoko er veldig kjent i Mali. Han behandler 20-30 pasienter per dag.



Figur 7.5: Den kvinnelige healeren Mah Tenin Fomba er spesialist på barnesykdommer

## 7.4 RESULTATER OG DISKUSJON

Resultatene er fremstilt i tabell 1 og 2, og bare resultatene fra *Erythrina senegalensis* er tatt med her.

Tabell 7.11: Restultat fra healerintervju i Kolokani.  
Lokalt navn på *Erythrina senegalensis*: N'Té

Healerens navn, alder og dialekt	Landsby Populasjon	Opplysninger om praksisen	Indikasjon	Plantedel, tilberedning og administrasjon
Samba Diarra 51 år Bambara	Diecouma, 40 km fra Kolokani	4-5 pasienter/dag	Brystsmerter  Amenorré  Abort	<b>Stammebark.</b> Lager dekokt av stammebark og tar dampbad. Kan også drikkes. Ta da 1 ss i ½ L vann. Drikk ½ liter Kontraindikasjon: Kvinner som er gravide, mindre enn 2 måneder på vei.  <b>Blomst.</b> Tørkes, pulveriseres. 1 ts. pulver blandes i vann eller grøt, drikk dekoktet.  <b>Rot.</b> Lager dekokt som drikkes.
Kassoum Traoré 56 år Bambara	Fra Tao-Tomo Bor i Kolokani	5-7 pasienter/dag, men store variasjoner	Magesår/-smerter  Trøtthet, slapphet	<b>Rotbark.</b> Blandes med stammebark fra <i>Boscia angustifolia</i> og pulveriseres. 1 "3-fingerklype" av pulver tas enten rett i munnen, eller blandes med litt vann og drikkes 3 ganger daglig etter mat. Noen ganger doubles doser til 2 "3-fingerklyper" x3.  <b>Blader og stammebark.</b> Det lages dekokt av 3 bunter av hver. Man drikker 2 glass 8, og vasker seg i resten. Dersom det er nødvendig kan det gjentas med 3 nye bunter av hver.



## 7 Etnofarmakologiske studier

N`golo Coulibaly 67 år Bambara	Fra Seabougou Bor/jobber i Kolokani	5-6 pasienter/dag	Malaria / Ikterus	<b>Stammebark.</b> Det lages dekokt av 1 håndfull små biter stammebark i 2 L vann. Skal stå i 5-10 minutter når det har begynt å koke til man ser fargeforandring. Løsningen filtreres, og man drikker 1 glass 8 hver dag i 4-7 dager. Kan også bruke pulverisert stammebark. Tas da 1 ss pulver i 3 glass 8 med vann, samme koketid og dossering.
Koncoura Diarra (k) 63 år Bambara	Fra Sido Bor/jobber i Kolokani	3-5 pasienter/dag	Abort	<b>Blader, stammebark.</b> Lager dekokt som man drikker og bader i.  Bruker ikke planten, nettopp pga abort, det er ikke ønskelig. Hun mener mange unge jenter ikke blir informert.
Sékou Tangara 67 år	Fra Yangasso Jobber i Kolokani	3 pasienter/dag		Bruker ikke planten
Wena Keita 71 år Bambara	Fra Safimébougou, 17 km fra Kolokani		(Skape tiltrekking mellom mann og kvinne)	Rotbark fra øst. Lager dekokt av pulverisert bark fra øst, som man vasker seg i hver mandag og fredag. Da vil man få gifte seg med den man ønsker. Skal virke både for menn og kvinner.
Famory Traoré 46 år Bambara	Sébécoro gouinzana, 5 km fra Kolokani	5-10 pasienter/dag	Sårheling, særlig gamle, infiserte sår. Inflammasjon  Magesmerter hos barn (de får ofte diaré og sår i rektum)	<b>Stammebark.</b> Tørkes og pulveriseres. Såret vaskes med vann og vanlig såpe. Pulveret appliseres på såret.  <b>Stammebark.</b> 1 håndfull i 3 glass 8 vann, kokes som te, i 15-20 minutter. Gir 1 ts. x 3 (morgen, midt på dagen og kveld).

## 7 Etnofarmakologiske studier

Tiegneri Diarra 52 år Bambara	Tiénéguibougou, 4 km fra Kolokani	5-15 pasienter/dag  President i healer- foreningen	Malaria   Amenorrhé   Sårheling. Særlig på gamle sår (opptil 1 år)	<b>Blad.</b> 3 (4) bunter i 3 L vann. Kokes til vannmengden er reduisert til 1,5L Drikker 1 glass 8 x 3 (morgen, midt på dagen og kveld) i 7 dager.  <b>Stammebark.</b> 1 håndfull i 3 L vann (Skal bruke vaskevannet fra hirsen), skal kokes til vannmengden er reduisert til 1,5 L. Så skal det stå i 2 netter. 3.natten begynner man å drikke. Man drikker 1 glass 8 x 3 i 3 dager.  <b>Rotbark.</b> Pulverisert rotbark appliseres på nyvasket sår hver 3. dag.
N'gonkoura Traorè (k) 72 år	Kolokani	Inntil 4 pasienter/dag  Spesialist på behandling av barn	Indre skader/ sykdommer. (F.eks hjerte- og mage- problemer)	<b>Rotbark.</b> 1 ts. pulverisert rotbark blandes med litt vann (så mye som man vil drikke)og drikkes
Mossa M. Kéita 50 år	Fra Kangaba, bor og jobber i Kolokani	2-3 pasienter/dag Jobber for assosiasjonen	Dysmenorrhé	<b>Rot.</b> Tar av ytre barken og kaster. Små biter av rot has i en helt ny kjele og vann tilsettes. Skal ligge i 4-5 dager. Så drikkes ¼ l hver morgen til man blir bra. Vannet fornyes etter en måned. Honning kan tilsettes for bedre smak.
Namassé Traoré 55 år Bambara	Kolokani	5 pasienter/dag	Malaria, Gulsott og "tamadiala en infeksjonssykdom, SOS (gonoré)	<b>Stammebark.</b> Tørkes og pulveriseres. 1 glass 8 pulver + 1,5l vann kokes til vannmengden er reduisert til 1l. 1 glass 8 drikkes x 3 (morgen, kl 12. og kl.18) til det ikke er mer igjen.

## 7 Etnofarmakologiske studier

Wori Coulibaly (k) > 60 år	Fra Tao-Tomo Bor og jobber i Kolokani	Store variasjoner, men har pasienter hver dag	Mot indre sykdommer, for eksempel diaré  Vaskulær sykdom som gjør babyer svake.	<b>Blad.</b> 3 (4) bunter i 2 l vann, lager dekott i 2 timer. Drikker 1 glass 8 i 3- 6 (4-8) dager.  <b>Blad.</b> Lager dekott på samme måte, og tar dampbad i løsningen, eller Stammebark. Pulverisert. 1 ts. i litt vann eller grøt (som ikke inneholder melk) Dersom kvinnen ammer, kan man ha litt pulver på brystet, så får babyen det i seg.
Namasson Kané Ca 58 år	Falaka, 7 km fra Kolokani	4 pasienter/dag		Bruker ikke planten.
Fassey Konaré 65 år	Zorokoro, 5 km fra Kolokani	> 20 års praksis 5-10 pasienter/dag	Amenorré	<b>Blomster.</b> Tørker, knuser og pulveriserer. Lager maceration av 2-3 "peanøttskall" pulver i ½ glass 8 vann og drikker.
Tiéwari Diarra > 60 år	Sebecoro, 5 km fra Kolokani	Ca 20 års praksis 5 pasienter/dag	Brystsmerter	<b>Blad.</b> Lager dekott av 3 (4) bunter i 1l vann, kokes i 1 time. Tar til side det som skal drikkes., tar dampbad (dekott has i en kalebass) og vasker kroppen i resten. Drikker 2 glass 8 x 2
N'Tio Traoré  Ca. 80år  Bambara	Tioubabougoua  Ca 5-7km fra kolokani		Amenorré	<b>Frø.</b> 5 frø svelges, så skal man begynne å blø.
<p>Tall i parentes er for kvinner. Disse må ofte ha mer pga at de blir hardere rammet av sykdommen.</p> <p>Glass nr 8 rommer ca 75 ml. 1 ts = 5 ml 1ss = 15ml</p> <p>16 healere ble intervjuet, 2 kvinner og 14 menn. Av disse benyttet 13 <i>E. senegalensis</i> i sin praksis.</p>				

Tabell 7.2: Resultat fra healerintervju i Dioila.

Lokale navn på *Erythrina senegalensis*: N'Tiémè og Musonidé / Muso n'tiémè

Healerens navn, alder og dialekt	Landsby Populasjon	Opplysninger om praksisen	Indikasjon	Plantedel, tilberedning og administrasjon
N'golo Sidibé 46 år Bambara	Dioila	5 pasienter per dag, har praktisert siden 1989 (første gulfkrig)		Bruker ikke planten.
Moussa Sidibé 54 år Bambara	Dioila	5-7 pasienter per dag	Feber hos barn  Neseblod "Epitaxie"  Inflammasjon  Malaria / Gulsott	<b>Rot.</b> Dekokt av 5 rotbiter à 15 cm i 2-3 l vann, tar av varmen når det begynner å koke. Tar bad i dekokt og appliserer lokalt på kroppen. Alternativt kan man blande 1 ts pulver av forkullet rot i 2 biter (ca 30g) karitésmør, og applisere på kroppen.  <b>Rot.</b> Pulver av forkullet rot appliseres lokalt i nesen.  <b>Stammebark.</b> Kullpulver av stammebark blandes i like forhold med kullpulver av bananskall. 1 "3-fingerklype" av pulveret blandes i karitésmør og appliseres på inflammasjonen i 7 dager.  <b>Blad, rot og stammebark.</b> Lager dekokt av 1 bunt blad, 1 bunt rot og 1 bunt stammebark og en vannmengde som dekker materialet. Tar et bad i og

## 7 Etnofarmakologiske studier

			Amenorrhé	<p>drikker 1 glass 8 morgen og kveld (rett før sengetid) i 3 dager</p> <p><b>Rot.</b> Lager dekokt av 5-6 rotbiter i 1 l vann. Litt dekokt tilsettes en "luce"(gresskarøse til grøt) med grøt, og drikkes. Eventuelt kan man bruke 1 "3-fingerklype" av rotpulver i stedet for dekokt i grøten.</p>
Yamoussa Mariko 56 år Bamabara	Wolomin	20-30 pasienter per dag. 28 års erfaring	<p>Malaria / Gulsott (gul)</p> <p>Ødem</p> <p>Prostata-problemer</p>	<p><b>Rot og stammebark.</b> Tar av den ytterste delen av rotbarken og kaster. Resten kuttes i små biter og has sammen med stammebark. Lager dekokt av litt materiale (oppgav ikke mengde) i 3-4 l vann. (2 røde bokser) Drikke 0,5 l og tar bad i resten.</p> <p><b>Rot.</b> Små biter av rot has i en canari, og dekket med vann. Lag masserasjon i 3 dager. Den 4. dagen begynner man å drikke ½ liter morgen og kveld til man føler seg bedre.</p> <p><b>Rot.</b> Lag dekokt av en god del rot og vann (mengde avhengig av pasientens tilstand), kok godt og filtrer. Bruk litt av løsningen til å tilberede ris eller hirse med masse</p>



## 7 Etnofarmakologiske studier

Madou Diakité 64 år	Fignana	4-5 pasienter per dag. Overtatt etter faren sin, holdt på i ca 20 år.	Angst og mareritt	<b>Blad og stammebark.</b> Lag dekokt av 3(4) bunter blad og litt stammebark (mengde ikke spesifisert) i nok vann til å dekke materialet. Drikk 1 glass 8 hver dag og bad. Man kan også bruke Stammebark. 1 "3-fingerklype" av pulver has på ild, og røyken pustes inn hver kveld før man legger seg.
Seydou Fané 65 år	Fignana	Vet ikke antall pasienter per dag, han behandler de som kommer. Er smed i tillegg.	Somnolens (sover hele tiden)	<b>Rot.</b> Lag dekokt av 4 rotbiter à 15 cm i 4 l vann. Drikk en "luce" morgen og kveld i 3 (4) dager og bad. Behandlingen kan gjenntas etter 1 uke.
Moumini Mariko 53 år	Fignana	Vet ikke. Hjelper folk når de er syke, men det er ikke hans eneste jobb. Praktisert i 10 år	Inflammasjon  Amenorré	<b>Stammebark.</b> Ytre stammebark karboniseres og kullet blandes med karitésmør nok til å smøre på inflammasjonen.  <b>Rot.</b> Lag dekokt av 3 rotbiter à 15 cm i 2-3 l vann. Drikk 1 glass 8 morgen og kveld i 1 måned.
Mariam Traoré (kvinne) 57 år	Diana 7 km fra Dioila	10 pasienter per dag  5 års erfaring	Onde ånder  Amenorré	<b>Stammebark.</b> 1- "3-fingerklype" pulverisert stammebark has i vannet man bader i hver gang man tar et bad i løpet av dagen. <b>Stammebark.</b> Lager dekokt i en leirgryte (canari) av 1 håndfull stammebark i 2 l vann. Kokes i 1,5 timer. Drikk ¼ liter 1 gang daglig.





## 7 Etnofarmakologiske studier

			Trøtthet	<b>Stammebark.</b> Lager dekokt av 2 håndfuller stammebark i 2 liter vann. Koker 1-2 timer. Drikker 0,5 liter og tar et bad i dekoktet så lenge det er behov.
Zoumana Konaté 63 år	Sirimabougou Ca 25 km fra Dioila	5-8 pasienter per dag 30 års erfaring	Ødem	<b>Rotbark.</b> Lager dekokt av 2 håndfuller rotbark i 2 liter vann til løsningen blir rød. Filtrer. Tilsett litt honning og drikk 1 glass 8 hver morgen.
N'Pié Mariko 101 år	Dinkoro	Vet ikke hvor mange pasienter han har per dag		Bruker ikke planten.
Zankoura Mariko >50år	Dinkoro	6 pasienter per dag 20 års erfaring	Ødem	<b>Rot.</b> Lager dekokt av 1 håndfull rot, blandet med 1 håndfull rot fra " <i>Entada africana</i> " i 3 liter vann til det begynner å koke. Drikker 1-2 håndfuller 1 gang daglig i 1 uke.
Mi Dagnoko (Han berømte) 98 år	Falakonon	40 pasienter per dag 70 års erfaring (Sjef i landsbyen og for jegerne)	Amenorré  Bringer hell og lykke og mye penger	<b>Rotbark.</b> Knuses, tørkes og pulveriseres. Bland 2 "3-fingerklyper" med pulver i litt grøt, kaffe e.l. og drikk 1 gang daglig i 2-3 dager.  <b>Stammebark.</b> Lager dekokt (nok til å bade i) av pulver av stammebark, og så tilsetter man eterisk olje fra løk av <i>Cyperus articulatis</i> som man vasker kroppen med.



## 7 Etnofarmakologiske studier

				timer. Drikk ½ liter i 4 dager. Etter 4 dager fornyes dekoktet.
Mamou Traoré (kvinne)	Nizama	4-5 pasienter per dag 4 års erfaring Spesialist på barnesykdommer	For å få seg en mann eller kone.	<b>Blad.</b> Lag dekokt av 2 bunter blad i den vannmengden som er nødvendig for å ta et bad. Drikk og vask kroppen Til du blir fornøyd.
Adama Sanogo 70 år	Adamabougou 5 km fra Falakonon	10 pasienter per dag 20 års erfaring	Amenorrhé  Dysmenorrhé	<b>Blomst.</b> Tørkes og pulveriseres. 1 "5-fingerklype" pulver has i 1 glass 8 vann eller i grøt og drikk morgen og kveld (1 dag er nok).  <b>Rot.</b> Lag masserasjon av 2 håndfull rot i nok vann (hirsevaskevann). Drikk 1 glass 8 morgen og kveld.
Tièblé Tioro 80år	Dontiguila	Vet ikke hvor mange pasienter per dag. Han behandler dem som kommen innom, men gjør andre ting også. Lang erfaring	Dysmenoré	<b>Rotbark og stammebark.</b> Lag dekokt og ta bad i det, den dagen man slutter å blø. Lager masserasjon av rotbark og stammebark, filtrerer og bruker løsningen til å lage grøt av så mye som man spiser. Litt pulver av rotbark has på ild og kjønnsorganene røykes i 2 dager (Ingen bestemte mengde ble oppgitt).
Korotoumi Ballo (kvinne) 50år	N'Pedjan	4 pasienter per dag		Bruker ikke planten.

## 7 Etnofarmakologiske studier

Bafing Togola  55år	Yiribabougou	7 pasienter per dag  10 års erfaring	Amenoré	Rot. Lager masserasjon av 2 håndfull rot, 3 liter vann (vanlig eller hirse-vaskevann) og litt honning i 7 dager. Drikk 1 glass 8 morgen og kveld til man er frisk.
Fatogoma Fomba  91 år	N'Galla, 15 km fra Dioila	Vet ikke antall pasienter per dag 60 års erfaring	Amenorré	<b>Stammebark.</b> 2 håndfull stammebark tørkes og pulveriseres, og blandes med 1 pulveriset rød kolanøtt. Man tar 4 "2-fingerklyper" pulver i grøt eller vann og drikker morgen og kveld til man er frisk.
Salia Togola  70 år	Diana	5 pasienter per dag  30 års erfaring	Amenorré	<b>Stammebark.</b> Lag dekokt av 1 håndfull stammebark i 3 glass 8 vann i 15-20 minutter. Drikk 2 glass 8 1 gang daglig i 3 dager. (Dersom man begynner å blø etter 2 dager stopper man da).
<p>Tall i parantes er for kvinner. Vi fikk fortalt at de må ofte ha høyere doser fordi de blir hardere rammet av sykdommer.</p> <p>Glass nr 8 rommer ca 75 ml. 1 ts = 5 ml 1ss = 15ml 1 "luce" = en gresskarøse til grøt. Rommer ca 1-2 dl.</p> <p>29 healere ble intervjuet, 4 kvinner og 25 menn. Av disse benyttet 25 <i>E. Senegalensis</i> i sin praksis.</p>				

### Diskusjon av resultatene

En total oversikt over den informasjonen som er samlet inn gjengis under i tabell 7.3.

Tabell 7.3: En oversikt over de ulike sykdommene *Erythrina senegalensis* ble brukt mot, og hvor mange healere som hadde den indikasjonen, og hvilken plantedel som ble benyttet.

Sykdom	Antall healere som bruker planten til denne indikasjonen	Rot	Rot-bark	Stamme-bark	Blad	Blomst	Frø
Amenorrhé	18	5	3	5		5	1
Gulsott	5	2		5	2		
Malaria	5	2		4	2		
Dysmenoré	4	3	1	1			
Ødem	4	3	1				
Indre skader (f.eks hjerte-/mageproblemer)	2		1		1		
Feber (barn)	2	1			1		
Gamle sår	2		1	1			
Inflammasjon	2			2			
Onde ånder	2			2			
For å få seg mann / kone	2		1		1		
Brystsmerter	2			1	1		
Abort	2	1		1	1		
Magesmerter	2		1	1			
Trøtthet/Slapphet	2			2	1		
Somnolens	1	1					
Smerte	1			1	1		
Onkoserka Volvilus	1			1			
"Hell og lykke"	1			1			
Ryggsmerter	1			1			
Forstoppelse	1		1				
Angst/mareritt	1			1	1		
Prostata-problemer	1	1					
Neseblod (Epitaxie)	1	1					
Tamadiala En seksuelt overførbart sykdom (sos)	1			1			
Vaskulær sykdom (svake babyer)	1			1	1		

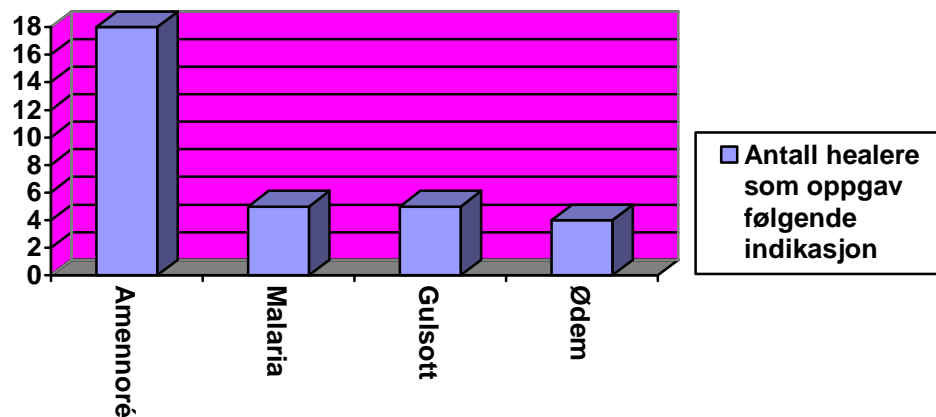
### Kommentar til tabellen.

På enkelte indikasjoner kan man se at det ikke helt er overensstemmelse mellom antall healere som benytter planten på gitt indikasjon og antall plantedeler som blir brukt. Det skyldes at healerne noen ganger bruker flere plantedeler i samme preparat.

For eksempel så bruker en healer både stammebark og blad av *E. senegalensis* mot vaskulær sykdom.

Da *Erythrina senegalensis* var en godt kjent plante av healerne på begge feltarbeidene, og de aller fleste healerene benyttet seg av den, så jeg ingen grunn til at resultatene fra de to feltarbeidene ikke kunne slås sammen.

Totalt sett bruker 38 av 45 healere *Erythrina senegalensis* i sin praksis mot hele 27 ulike indikasjoner. Det er særlig en indikasjon, amenorré som skiller seg veldig ut. Hele 18 av de 38 healerene som brukte *E. senegalensis*, hadde amenorré som indikasjon. De andre sykdommene som ble nevnt oftest var ødem, dysmenorré og gulsott. Se figur 7.4.



Figur 7.4: Oversikt over de hyppigst nevnte indikasjoner for *E. Senegalensis*

Amenorré og Malaria som er 2 av de hyppigste indikasjonene på dette feltarbeidet, går også igjen i tidligere arbeid. Det er nok ikke nok informasjon til å trekke konklusjoner, men det er absolutt mulig å spekulere i om det kan være noen komponenter i planten som har effekt mot amenorré. At planten brukes mot amenorré går også igjen i andre studier, utført i andre land, blant annet i Senegal (se punkt 4.1.5.3).

## 8 KONKLUSJON

Erybraedin A ble isolert som renstoff fra diklormetanekstraktet av rotbarken til *Erythrina senegalensis*. Substansen viste hemmende aktivitet overfor gjærsoppen *C.albicans*. Erybraedin A viste seg også å være en meget sterk hemmer av enzymet 15-lipoksygenase, men ikke en særlig god radikalscavenger.

Shinpterocarpin og phaseollin ble identifisert i en blanding med blandingsforholdet shinpterocarpin-phaseollin 3:1. Disse stoffene i blanding viste også hemmende aktivitet for *C.albicans*. Og på samme måte som for erybraedin A var blandingen en meget god hemmer av 15-lipoksygenase, men ingen god radikalscavenger.

Informasjonen om *E. senegalensis* som ble samlet inn på feltarbeid er ikke stor nok til at det kan trekkes noen konklusjoner. Men det at 18 av de 38 healerne brukte planten på samme indikasjon, amenorrhé, som også går igjen i litteraturen er interessant. Så langt har jeg ikke sett noen studier som støtter opp om denne bruken. Bruk av *Erythrina senegalensis* mot infeksjonssykdommer, da særlig infeksjoner forårsaket av gram-positive bakterier og sopp, begynner nå å få en del støtte fra litteraturen. Men et problem er at det gjerne er vannekstrakt som blir brukt i tradisjonell medisin, mens det i mitt tilfelle er diklormetanekstraktet som er aktivt.

### Forslag til videre arbeid

Det gjenstår fremdeles mange fraksjoner som har vist aktivitet, hvor man kan isolere og identifisere stoffer. I tillegg kunne man ha testet fraksjonene og renstoffene mot andre sopparter og mikroorganismer enn bare *C.albicans*.

Metanolekstraktene MR og MS, samt diklormetanekstraktet fra stammebarken ble det ikke gjort noen ting med på dette hovedfaget, så screening av disse for antimikrobiell aktivitet kunne også vært gjort.

## 9 REFERANSER

### Bøker og tidsskrifter

- Agrawal, P.K. (red.) (1989) "Carbon-13 NMR of flavonoids."  
Elsevier, Amsterdam
- Ajaiyeoba, E., J et al (2004) "Antimalarial ethnobotany: In vitro antiplasmodial activity of seven plants identified in the Nigerian Middle Belt" *Pharmaceutical Biology* **42** (8), s. 588-591.
- Andayi, A. W., Yenesew, A., Derese, S. et al (2006) "Antiplasmodial flavonoids from *Erythrina saculeuxii*". *Planta Medica* **72**, s. 187-189.
- Animashaun, T., Mahmood, N., Hay, A. J., Huges, R. C. (1993) "Inhibitory effects of novel mannose-binding lectins on HIV-infectivity and syncytium formation." *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **4** (3), 145-153.
- Arama, P.D. (2005) "Phytochimie et activites biologiques de trois plantes utilisees dans le traitement traditionnel des infections sexuellement transmissibles (IST) au Mali: *Anthocleista djalonensis* A.Chev. (Loganiaceae), *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) et *Heliotropium indicum* L. (Borraginaceae)" *Hovedfagsoppgave i farmasi, Universite de Bamako, Bamako, Mali*
- Arnoldi, A. og Merlini, L. (1990) "Lipophilicity-antifungal activity relationships for some isoflavonoid phytoalexins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**, s. 834-838.
- Atindehou, K. K., Schmid, C., Brun, R., Koné, M.W., Traore, D. (2004) "Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Côte d' Ivoire." *Journal of Ethnopharmacology*, vol. **90**, s. 221-227.
- Auzias, D. og Labourdette, J-P. (2005). *Le Petit futé du Mali, 2005 / 2006 edition, Petit Futé, Paris*
- Bailey, J. A., Burden, R. S., Mynett, A., Brown, C. (1977). "Metabolism of phaseollin by *Septoria nodorum* and other non-pathogens of *Phaseolus vulgaris*" *Phytochemistry* **16** s. 1541-1544.



- Bergan, T., Gjønnæss, G., Solberg, C.O., Thune, P. (1989)  
"Soppsykdommer. Mykologi og klinikk", Bayer Norge AS, Oslo.
- Berhaut, J. (1976). Flore illustrée du Sénégal. Vol.5 s.267-269,  
Gouvernement du Sénégal, Ministère du Développement Rural  
et de l'Hydraulique, Direction des Eaux et Forêts, Dakar
- Blois, M.S. (1958) "Antioxidant determinations by the use of a  
stable free radical", *Nature* **181**, s. 1199-1200
- Brink, A.J., Rall, G.J.H., Engelbrecht, J.P. (1974) "Structures of  
some minor pterocarpans of *Neorautenanenia edulis*."  
*Phytochemistry* **13**, s. 1581-1585
- Bruhn, J. G. og Helmstedt, B. (1981). "Ethnopharmacology:  
Objectives, Principles and Perspectives." I *Natural Products as  
Medicinal Agents*. Beal, J.L. og Reinhard, E. (red.),  
Hippokrates Verlag, Stuttgart, s. 405-430.
- Burkill, H. M. (1995). The Useful Plants of West Tropical Africa. Vol.  
4, 2<sup>nd</sup> edition, Kew, Royal Botanic Gardens. s.352-355.
- Cannell, R.J.P. (1998). "Natural Products Isolation." I serien  
*Methods in Biotechnology*. Walker, J.M (red.), Humana Press,  
Totowa, New Jersey.
- Carlson, T. J. S. (2002). "Medical ethnobotanical research as a  
method to identify bioactive plants to treat infectious  
diseases." I *Ethnomedicine and Drug Discovery*. M. M. Iwu,  
Wooton J.C.(red.) Elsevier, Amsterdam, s. 45-53.
- Chalmers, A.A., Rall, G.J.H., Oberholzer, M.E. (1977) "13C-NMR of  
pterocarpans" *Tetrahedron* **33**, s. 1735-1737.
- Cruickshank, I. A. M. og Perrin, D.R.(1963) "Phytoalexins of the  
leguminosae. phaseolin from *Phaseolus vulgaris* L." *Life  
Sciences* **9**, s. 680-682
- Dewick, P.M., Steele, M.J., Dixon R.A., Whitehead, I.M. (1982)  
"Biosynthesis of isoflavonoid phytoalexins: incorporation of  
sodium [1,2-13C2]acetate into phaseollin and kievitone." *Z.  
Naturforsch.* **37c**, s. 363-368.
- Dyke, S.F., Quessy, D. (1981) I *The alkaloids Chemistry and  
physiology*, Rodrigo, R.G.A (red.), Vol. **18**. Academic Press,  
New York, s.1

- Diallo, D. (2000). "Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (mimosaceae), *Trichilia emetica* (meliaceae)." Doktorgradsoppgave, Université de Lausanne.
- Fenwick, S. (1998). " Bioprospecting or biopiracy? ." *Drug Discovery Today* **3**, s. 399-402.
- Folkers, K., Shavel J.R, J., Koniuszy, F., (1941) "*Erythrina* alkaloids. X. Isolation and characterization of erysonine and other liberated alkaloids." *Journal of the American Chemical Society*. vol. **63** (6), s. 1544-1549
- Fomum, Z. T., Ayafor, J.F., Wandji, J. (1985) "Erythrisenegalone, a prenylated flavanone from *Erythrina senegalensis*" *Phytochemistry* Vol. **24** (12) s. 3075-3076
- Fomum, Z. T., Ayafor, J.F., Ifeadike, P. N., Nkengfack, A. E., Wandji, J. (1986a). "Erythrina Studies; part 3. Isolation of an isoflavone from *Erythrina senegalensis* and *Erythrina excelsa*." *Planta Medica* vol. **4**, s. 341
- Fomum, Z. T., Ayafor, J.F., Wandji, J., Fomban, W.G., Nkengfack, A. E. (1986b). "Erythrinasinatate, an ester from three *Erythrina* species." *Phytochemistry*, vol. **25** (3), s. 757-759.
- Fomum, Z. T., Ayafor, J.F., Wandji, J. (1987) "Senegalensein, a novel prenylated flavanone from *Erythrina senegalensis*" *Journal of natural products*, vol. **50** (5), s 921-922.
- Fukai, T., Sheng, C-B., Horikoshi, T., Nomura, T. (1996) "Isoprenylated flavonoids from underground parts of *Glycyrrhiza glabra*." *Phytochemistry* **43** (5), s. 1119-1124.
- Fukai, T., Cai, B-S., Maruno, K., Miyakawa, Y., Konishi, M., Nomura, T. (1998) "An isoprenylated flavanone from *Glycyrrhiza glabra* and rec-assay of licorice phenols." *Phytochemistry* **49** (7), s. 2005-2013.
- Giliani, A. H. og Rahman, A. (2005). "Trends in ethnopharmacology." *Journal of Ethnopharmacology* **100**, s. 43-49.
- Glavind, J. (1963) "Antioxidants in animal tissue". *Acta Chemica Scandinavica* **17** s. 1635-1640.

- Heinrich, M. (2003). "Ethnobotany and Natural Products: The Search for New Molecules, New Treatments of Old Diseases or a Better Understanding of Indigenous Cultures?" *Current Topics in Medicinal Chemistry* **3**, s.141-154.
- Heinrich, M. and S. Gibbons (2001). "Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **53**, s. 425-432.
- Ingham, J.L. og Tahara S. (1985). "Isoneorautenol and other pterocarpan phytoalexins from *Calopogonium mucunoides*. *Z. Naturforsch* **40c**, s.482-489.
- Iwu, M. M. (2002a). "Ethnobotanical approach to pharmaceutical drug discovery: strengths and limitations." I *Ethnomedicine and Drug Discovery*. M. M. Iwu, Wooton J.C.(red.) Elsevier, Amsterdam, s. 309-320.
- Iwu, M. M. (2002b). "Introduction: therapeutic agents from ethnomedicine." I *Ethnomedicine and Drug Discovery*. M. M. Iwu, Wooton J.C.(red.) Elsevier, Amsterdam, s. 1-22.
- Kamat, V.S., Chuo, F.Y., Kubo, I., Nakanishi, K. (1981) "Antimicrobial agents from an East African medicinal plant *Erythrina abyssinica*." *Heterocycles* **15** (2), s. 1163-1170.
- Kitagawa, I., Wei-Zhong, C., Kazuyuki, H. et al (1994) "Chemical studies of Chinese licorice-roots. I. Elucidation of five new flavonoid constituents from the root of *Glycyrrhiza glabra* L. collected in Xinjiang." *Chemical and pharmaceutical bulletin* **42** (5), s. 1056-1062
- Koné, W. M., Atindehou, K. K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traoré, D., Dosso, M. (2004) "Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity." *Journal of Ethnopharmacology*, **93**, s. 43-49.
- Lundanes, E. (1998). Tynnsjiktskromatografi (TLC). I *Kromatografi*. Greibrokk, T., Lundanes, E. og Rasmussen, K.E. (red.), Universitetsforlaget, Aurskog, s. 227-237.
- Lyckander, I.M., Malterud, K.E., (1992). "Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* as inhibitors of 15-lipoksygenase" *Acta Pharmaceutica Nordica* **4** (3), s. 159-166.

- Lyckander, I.M., Malterud, K.E., (1996). "Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* prevent oxidative inactivation of 15-lipoxygenase." *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids* **54** (4), s. 239-246.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2003) "Brock biology of Microorganisms" 10<sup>th</sup> edition, Pearson Education, Upper Saddle River, New Jersey.
- Malterud, K. E. (1991). "Kort Sammendrag: NMR." Forelesningsnotater i NMR-spektroskopi, Farmasøytisk Institutt, seksjon for farmakognosi, Universitetet i Oslo.
- Malterud, K.E., Farbro, T.L., Huse, A.E., Sund, R.B. (1993). "Antioxidant and Radical Scavenging Effects of Anthraquinones and Anthrones" *Pharmacology* **47**(suppl 1), s. 77-85.
- Malterud, K.E. (2003) "Procedure for assay of 15-lipoxygenase inhibition." Internt notat, Farmasøytisk institutt, seksjon for farmakognosi, Universitetet i Oslo.
- McMurry, J. (1999). Organic Chemistry. Pacific Grove, Brooks/Cole.
- Mitscher, L.A., Drake, S., Gollapudi, S.R., Okwute, S.K (1987) "A modern look at folkloric use of anti-infective agents" *Journal of Natural Products* **50** (6), s. 1025-1040
- Mitscher, L. A., Okwute, S. K., Gollapudi, S. R., Drake, S., Avona, E. (1988) "Antimicrobial pterocarpanes of nigerian *Erythrina mildbraedii*." *Phytochemistry* **27**(11), s. 3449-3452
- Nkengfack, A. E., Vardamides, J. C., Fomum, Z. T., Meyer, M. (1995) "Prenylated isoflavanone from *Erythrina eriotricha*" *Phytochemistry* **40** (6), s. 1803-1808.
- Oh, W. K., Lee, H. S., Kim, B. Y. et al (1998) "Inhibition of phospholipase C activity by auriculatin and 8-prenylluteone isolated from *Erythrina senegalensis*." *Phytotherapy Research* vol. **12**, s. 9-12.
- Oh, W. K., Lee, H. S., Ahn, S.C. et al. (1999) "Prenylated isoflavanoids from *Erythrina senegalensis*" *Phytochemistry* **51**, s. 1147-1150
- Oh, W. K., Kim, B. Y., Oh, H., Kim, B. S., Ahn, J. S. (2005). "Phospholipase Cy1 inhibitory activities of prenylated

- flavonoids isolated from *Erythrina senegalensis*." *Planta Medica* **71**, s. 780-782.
- Okpako, D. T., (1999) "Traditoinal African medicine: theory and pharmacology explored" *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. **20** (12), s 482-485
- Perrin, D.R. (1964) "The structure of Phaseolin", *Tetrahedon Letters* **1**, s. 29-35.
- Perrin, D. R.og Whittle, C. P. (1972) "The structure of phaseollidin." *Tetrahedon Letters* **17**, s. 1673-1676
- Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M., Frenk, E., (1991). "A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants" *Phytochemical Analysis* **2**, s. 199-203.
- Rasmussen, K. E. (1998). "Adsorpsjonskromatografi" I *Kromatografi*. Greibrokk, T., Lundanes, E. og Rasmussen, K.E. (red.), Universitetsforlaget, Aurskog, s. 25-39.
- Saidu, K., Onah, J., Orisadipe, A., Olusola, A., Wambebe, C., Gamaniel, K. (2000) "Antiplasmodial, analgetic and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the stem bark of *Erythrina senegalensis*" *Journal of Ethnopharmacology* **71**, s. 275-280.
- Sato, M., Tanaka, H., Oh-Uchi, T., Fukai, T., Etoh, H., Yamaguchi, R. (2004) "Antibacterial activity of phytochemicals isolated from *Erythrina zeyheri* against vancomycin-resistant enterococci and their combinations with vancomycin." *Phytotherapy Research* **18**, s. 906-910.
- Stewart, G. R., Orebamjo, T. O. (1979) "Some unusual characteristics of nitrate reduction in *Erythrina senegalensis* DC." *The New Phytologist*, vol. **83**, s. 311-319
- Tanaka, H., Doi, M., Etoh, H., Watanabe, N., Shimizu, H., Hirata, M., Ahmad, M., Qurashi, I., Khan, M. R. (2001) "Revised structures for Senegalensin and Euchrenone b10", *Journal of Natural Products*, vol. **64**, s. 1336-1340.
- Tanaka, H., Oh-Uchi, T., Etoh, H. et al (2003) "Isoflavonoids from roots of *Ertyrina zeyheri*." *Phytochemistry* **64** (3), 753-758.

- Taylor, R. B., Corley, D. G., Tempesta, M. S., (1986) "2,3-dihydroauriculatin, a new prenylated isoflavanone from *Erythrina senegalensis*. Application of the selective inept technique." *Journal of Natural Products*, Vol. **49**(4), s. 670-673.
- Togola, A., Diallo, D., Dembélé, S., Barsett, H., Paulsen, B.S. (2005) "Ethnopharmacological survey of different uses of seven medicinal plants from Mali (West Africa) in the regions Dioila, Kolokani and Siby" *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, **1** (7)
- VanEtten, H.D. (1976) "Antifungal activity of pterocarpan and other selected isoflavonoids." *Phytochemistry* **15**, s.655-659.
- Wagner, H. og Bladt, S. (1996). "Plant Drug Analysis". Springer-Verlag, Berlin
- Wandji, J., Nkengfack, A. E., Fomum, Z. T. (1990) "A new prenylated isoflavone and long chain esters from two *Erythrina* species." *Journal of Natural Products*, vol. **53** (6) s.1425-1429.
- Wandji, J., Fomum, Z. T., Tillequin, F., Seguin, E., Koch, M. (1994a) "Two isoflavones from *Erythrina senegalensis*." *Phytochemistry*, vol. **35** (1), s. 245-248
- Wandji, J., Fomum, Z. T., Tillequin, F., Baudouin, G., Koch, M. (1994b). "Epoxyisoflavones from *Erythrina senegalensis*" *Phytochemistry*, vol. **35** (6), s. 1573-1577
- Wandji, J., Fomum, Z. T., Tillequin, Skaltsounis, A. L., Koch, M. (1994c). "Erysenegalenseins H and I: Two new isoflavones from *Erythrina senegalensis*", *Planta Medica* **60**, s. 178-180
- Wandji, J., Awanchiri, S. S., Fomum, Z. T., Tillequin, F., Libot, F. (1995a) "Isoflavones and alkaloids from the stem bark and seeds of *Erythrina senegalensis*." *Phytochemistry*, vol. **39** (3), s. 677-681
- Wandji, J., Awanchiri, S. S., Fomum, Z. T., Tillequin, F., Michel-Daniwicz, S. (1995b) "Prenylated isoflavonoids from *Erythrina senegalensis*", *Phytochemistry*, Vol. **38** (5), s. 1309-1313
- Wandji, J., Fomum, Z. T. (1995) "Erysenegalenseins B and C, two new prenylated isoflavonones from *Erythrina senegalensis*" *Journal of Natural Products*, vol. **58** (1), s. 105-108

Wanjala, C. C. W., Juma, B. F., Bojase, G., Gashe, B. A., Majinda, R. R. T. (2002) "Erythraline alkaloids and antimicrobial flavonoids from *Erythrina latissima*." *Planta Medica* **68**, (7), s. 640-642.

Yenesew, A., Midiwo, J.O., Miessner, M., Heydenreich, M., Peter, M.G., (1998). "Two prenylated flavanones from stem bark of *Erythrina burtii*." *Phytochemistry* **48**, s. 1439-1443.

Yenesew, A., Midiwo, J. O., Heydenreich, M., Schanzenbach, D., Peter, M. G. (2000) "Two isoflavanones from the stem bark of *Erythrina saculeuxii*." *Phytochemistry* **55**, s. 457-459.

Yenesew, A., Midiwo, J. O., Guchu, S. M., Heydenreich, M., Peter, M. G. (2002) "Three isoflav-3-enes and a 2-arylbenzofuran from the root bark of *Erythrina burttii*." *Phytochemistry* **59**, s. 337-341

### **Internett sider**

CIA- World Factbook

<http://www.cia.gov/cia/publications/factbook/geos/ml.html>  
(05.06.2006)

WHO – World Health Organisation

[http://www3.who.int/whosis/core/core\\_select\\_process.cfm](http://www3.who.int/whosis/core/core_select_process.cfm)  
(05.06.06)

ITIS- Integrated Taxonomic Information System

[www.itis.usda.gov/](http://www.itis.usda.gov/) (21.11.2005)

Norsk Legemiddelhåndbok

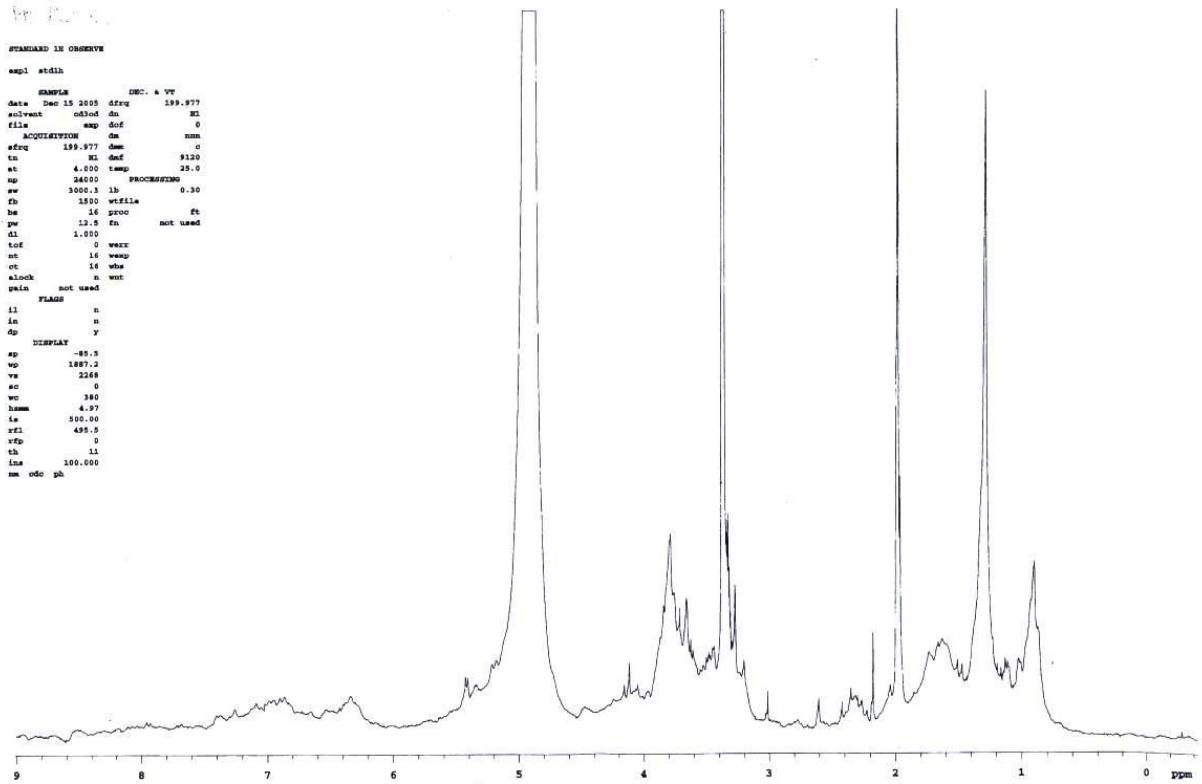
<http://www.legemiddelhandboka.no/xml/> (19.07.2006)

W<sup>3</sup>TROPICOS (Missouri Botanical Garden's VAST (VAScular Tropicos) nomenclatural database)

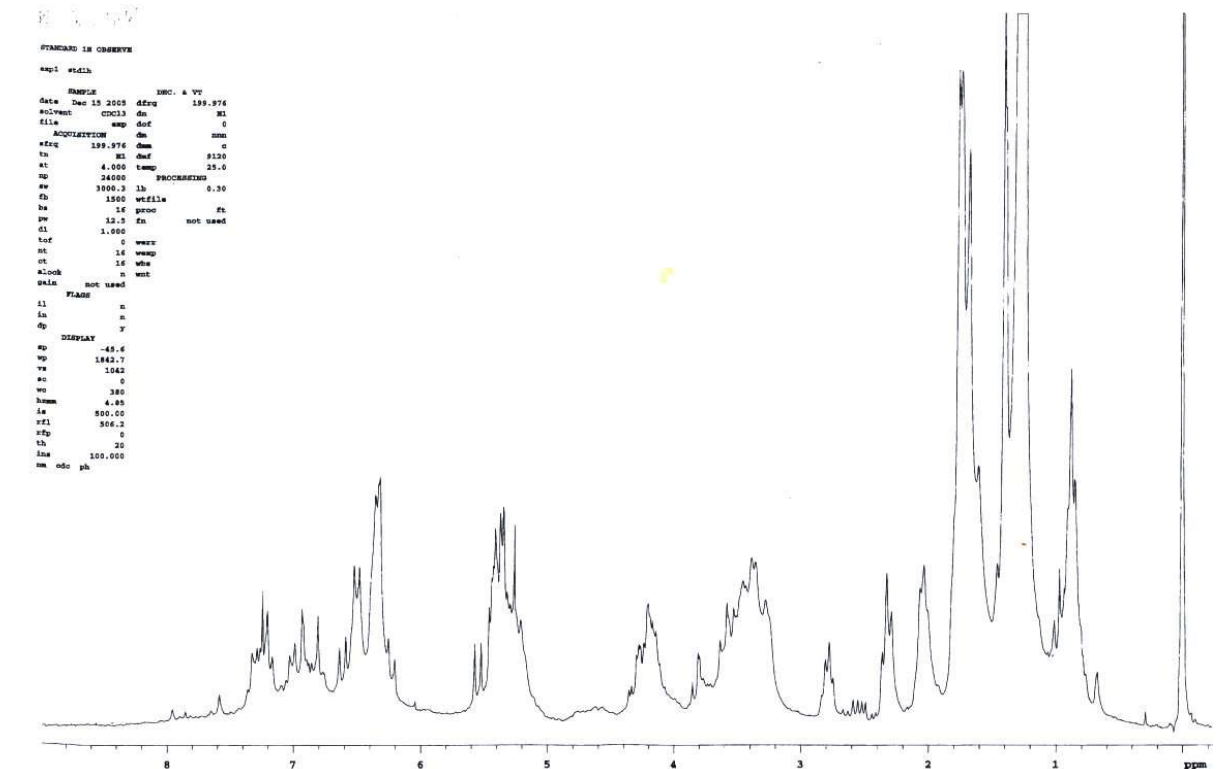
<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html> (12.07.2006)

# 10 VEDLEGG

## 10.1 <sup>1</sup>H-NMR-SPEKTRUM AV MR

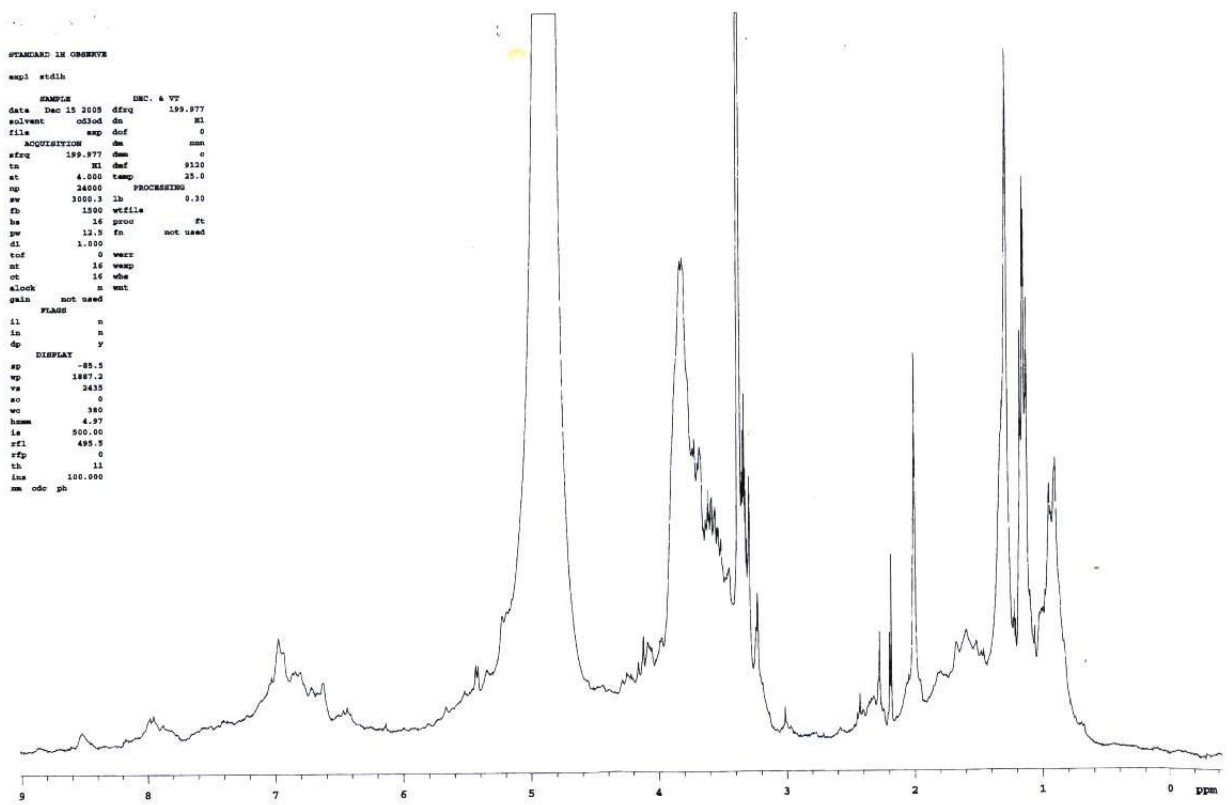


## 10.2 <sup>1</sup>H-NMR-SPEKTRUM AV DR

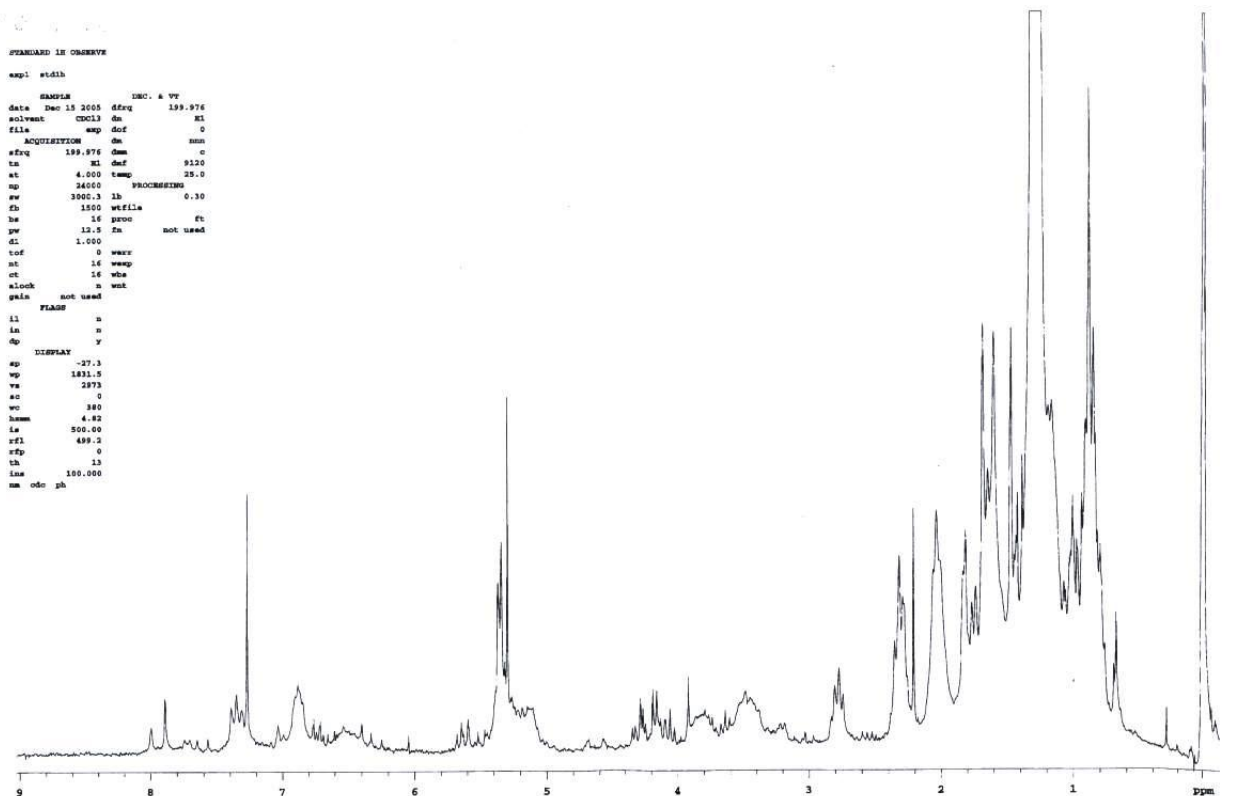




### 10.3 $^1\text{H-NMR-SPEKTRUM AV MS}$



### 10.4 $^1\text{H-NMR-SPEKTRUM AV DS}$

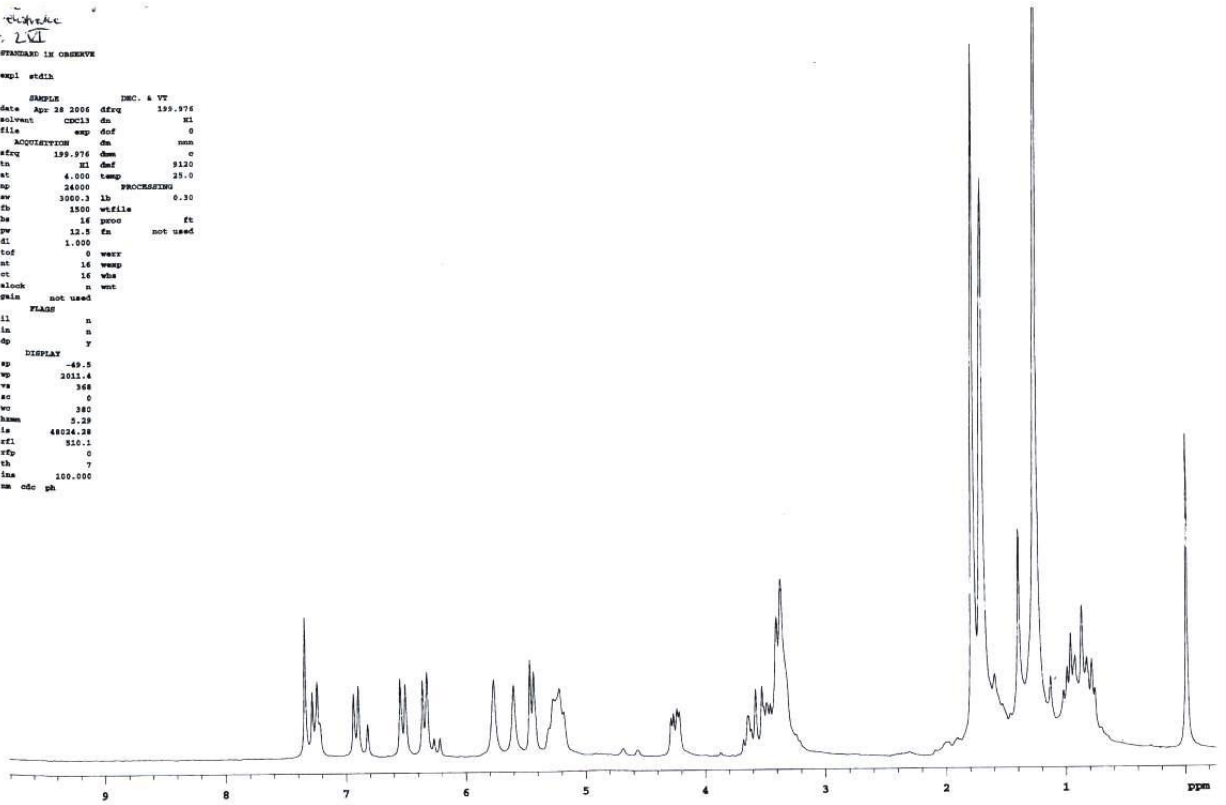


## 10.5 $^1\text{H-NMR-SPEKTRUM AV 2VI}$

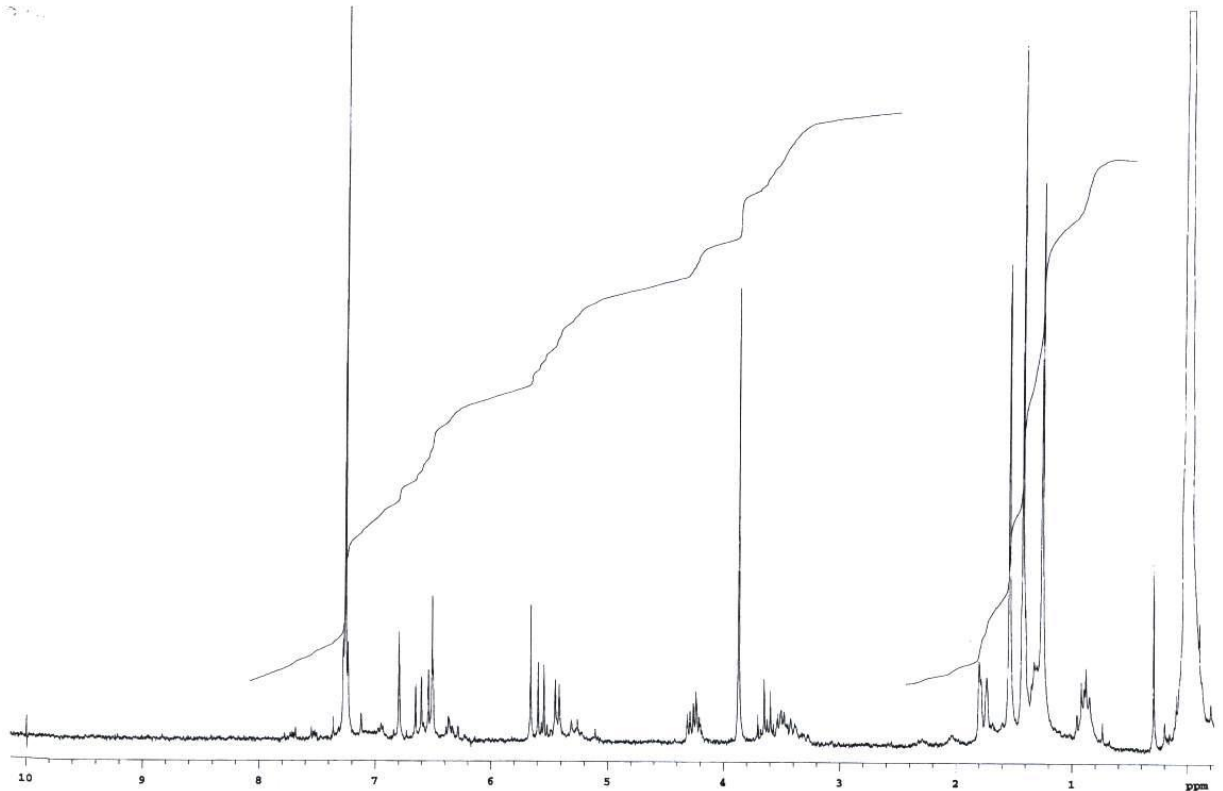
1 - *chete*  
 to 2VI

```

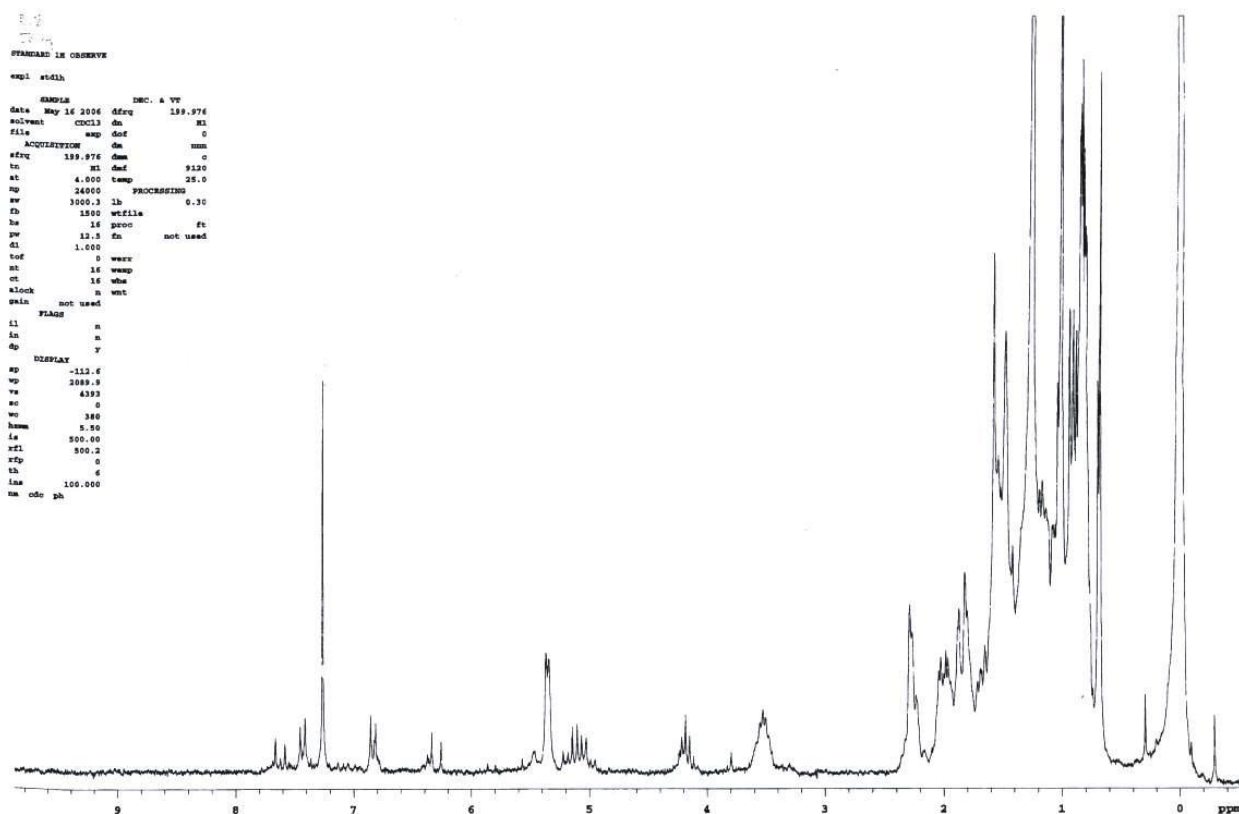
STANDARD IN OBSERVE
exp1 std1h
=====
SAMPLE
date Apr 28 2006 dfrq 100.626
solvent CDCl3 da 0
file ACQUISITION
=====
ACQUISITION
dfrq 100.626 dm 0
in 01 dmf 0120
sc 4.000 temp 25.0
wg 24000 PROCESSING
=====
pr 3500.3 lb 0.30
ch 1500 wffile
ba 16 smoo not used
pw 12.8 En
sl 1.000
tcf 0 wst
nt 16 wwp
ct 16 vha
alock 0 wnt
gain not used
=====
F1 F2
in 0
op 0
=====
DISPLAY
=====
sp -49.5
wp 2011.4
va 368
sc 0
wc 380
hann 0.29
ia 48024.28
rf1 910.1
rfp 0
ch 0
ins 100.000
na cdc ph
  
```



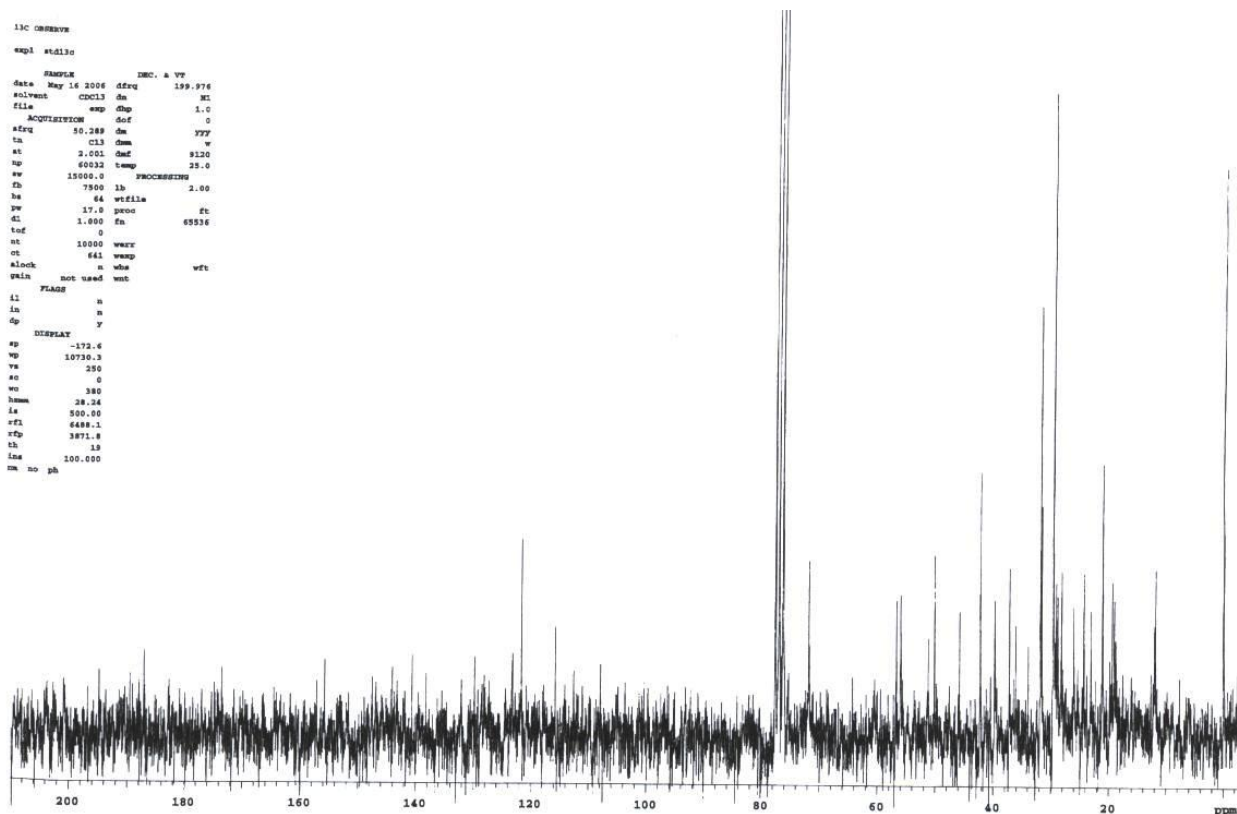
## 10.6 $^1\text{H-NMR-SPEKTRUM AV 2X}$



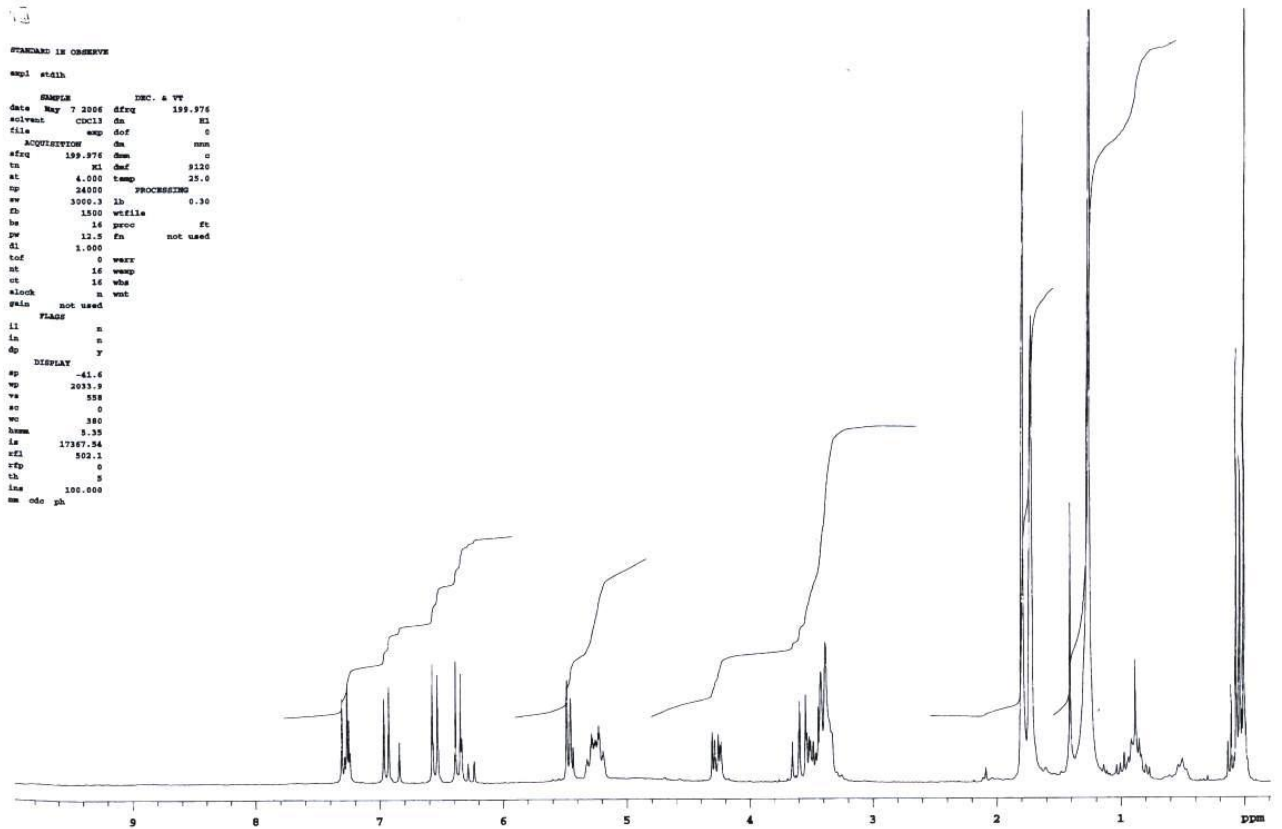
## 10.7 $^1\text{H}$ -NMR-SPEKTRUM AV 3V



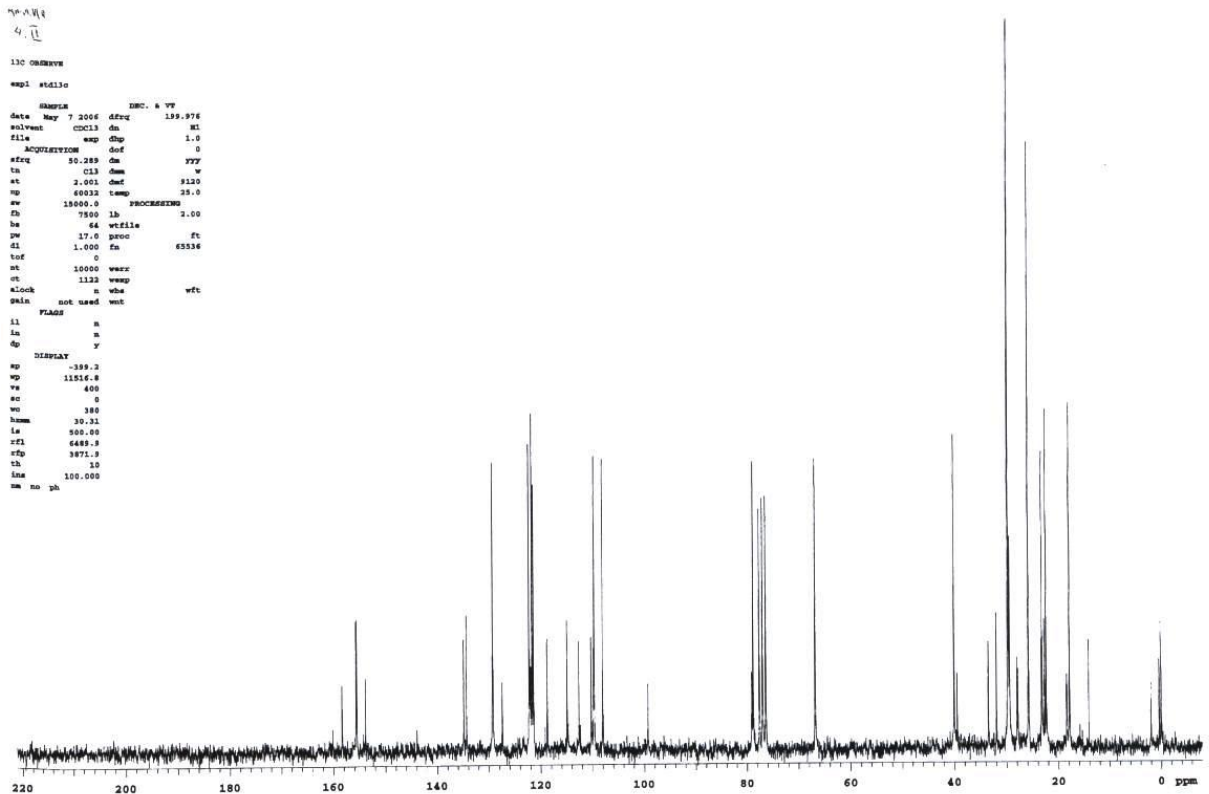
## 10.8 $^{13}\text{C}$ -NMR-SPEKTRUM AV 3V

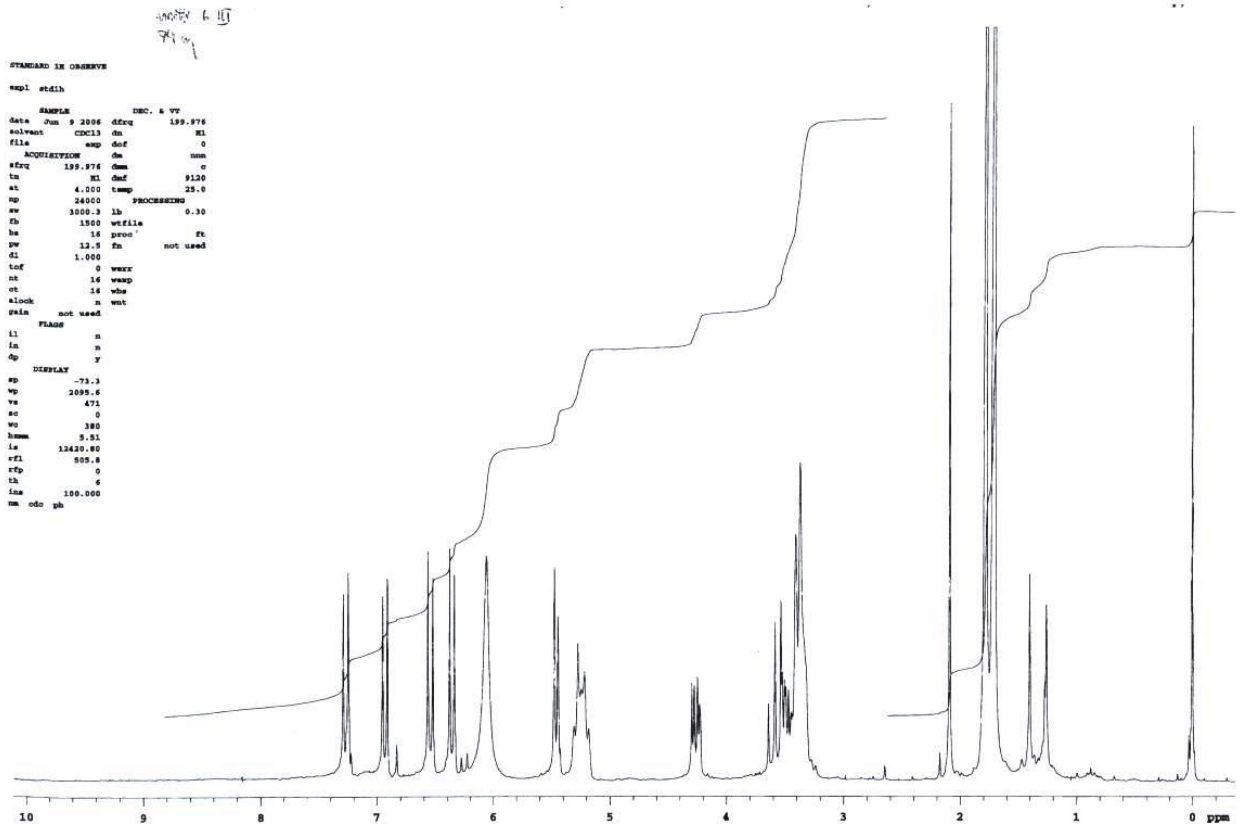
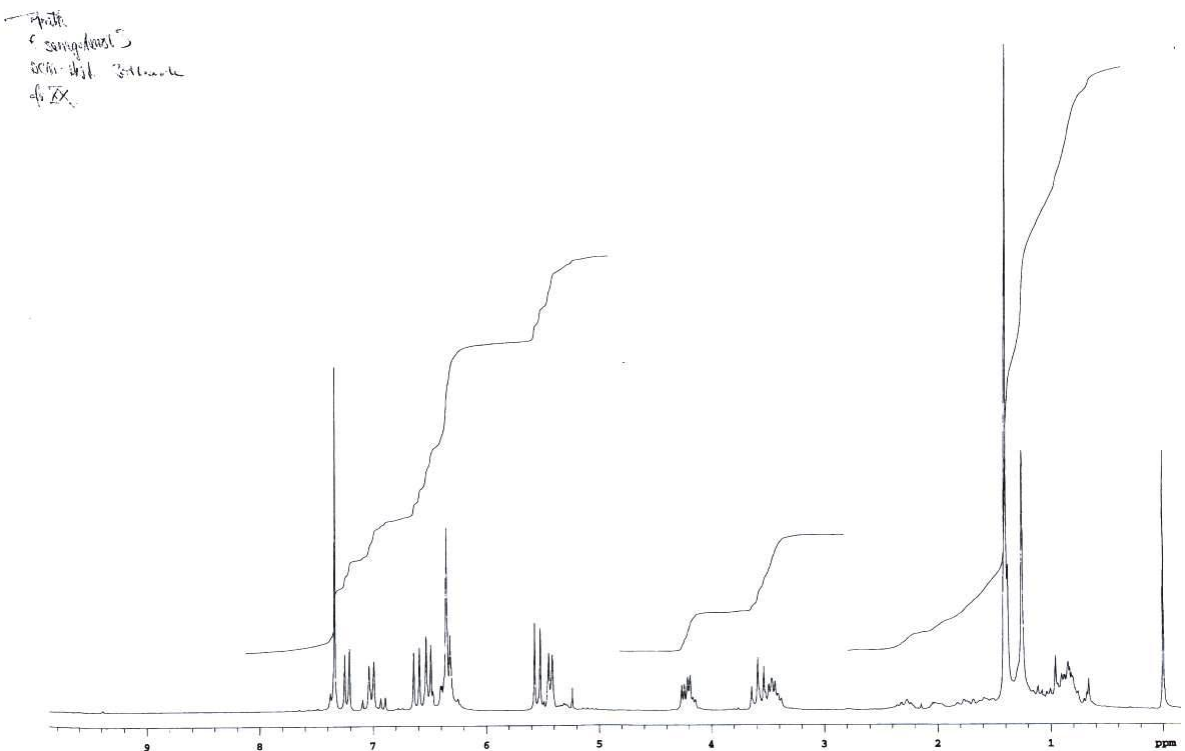


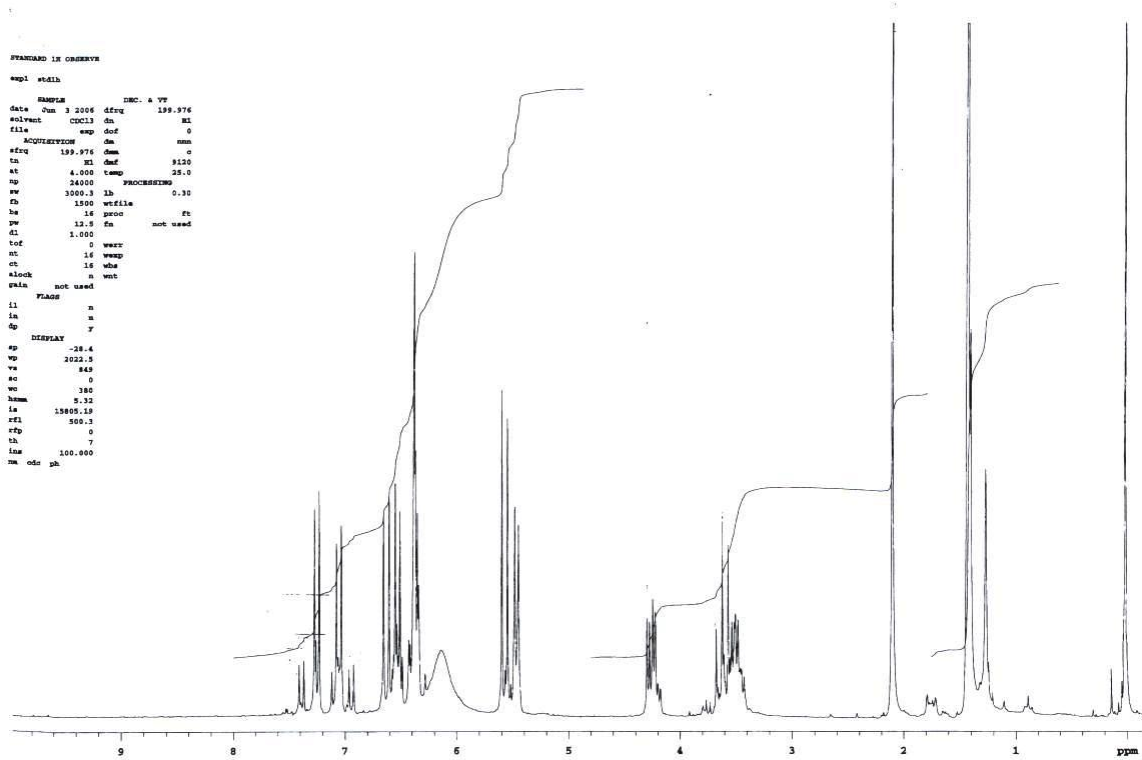
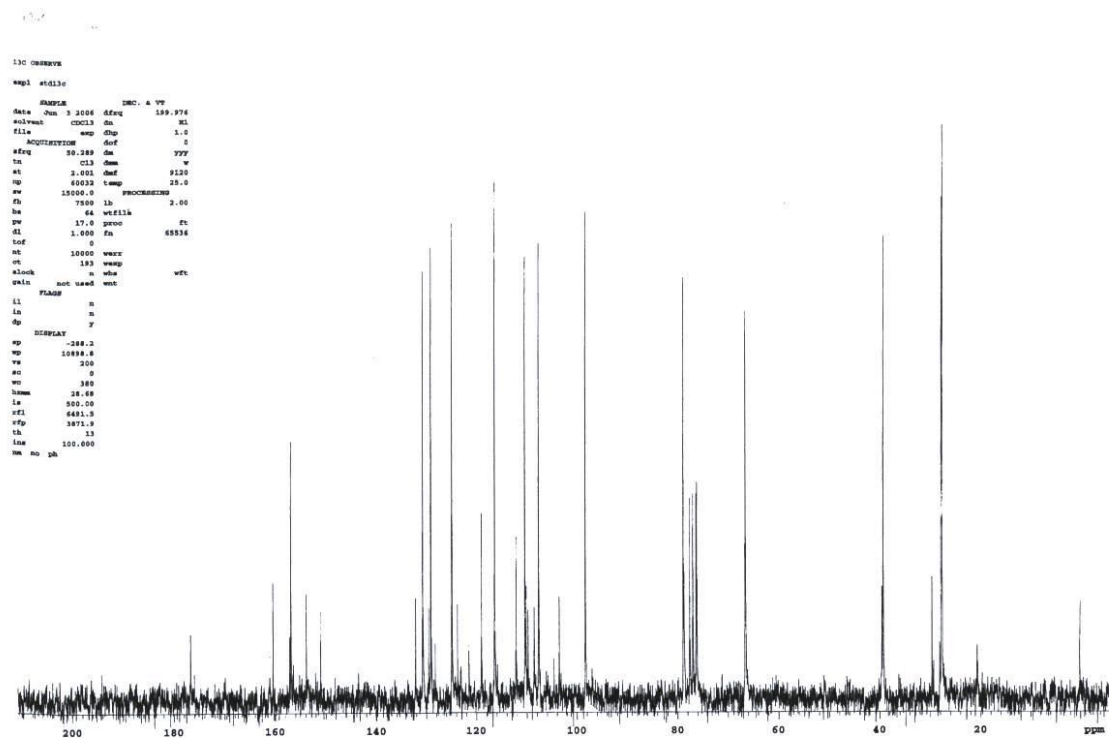
## 10.9 <sup>1</sup>H-NMR-SPEKTRUM AV 4II

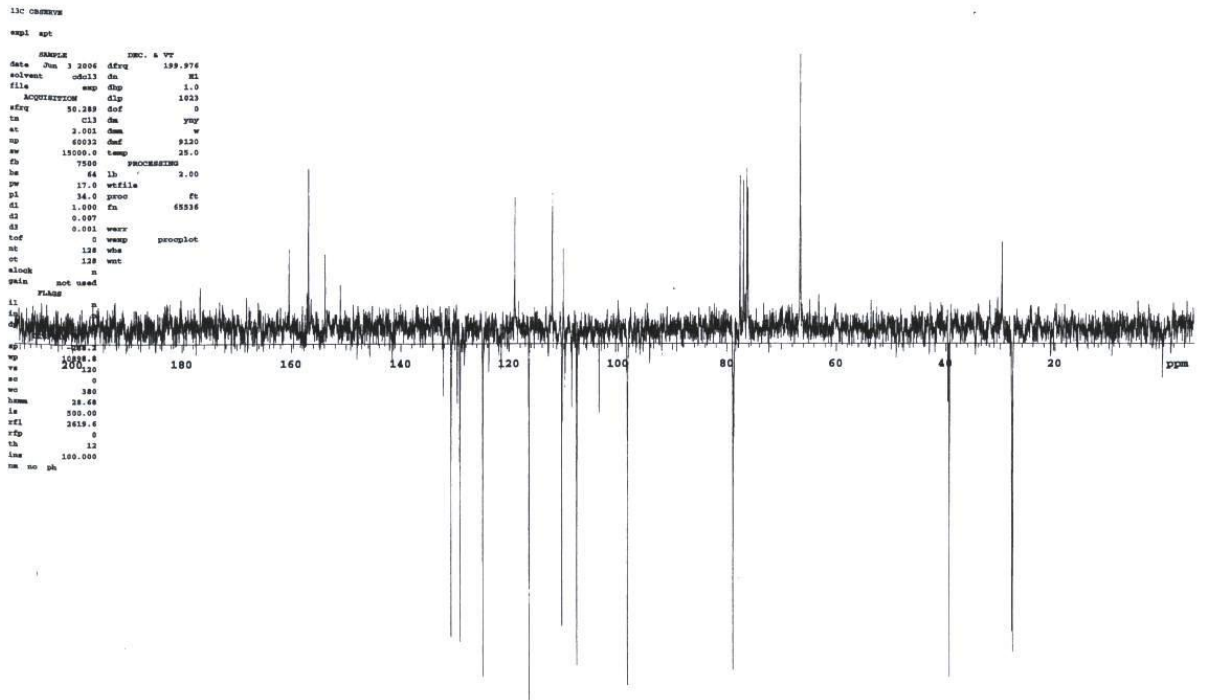


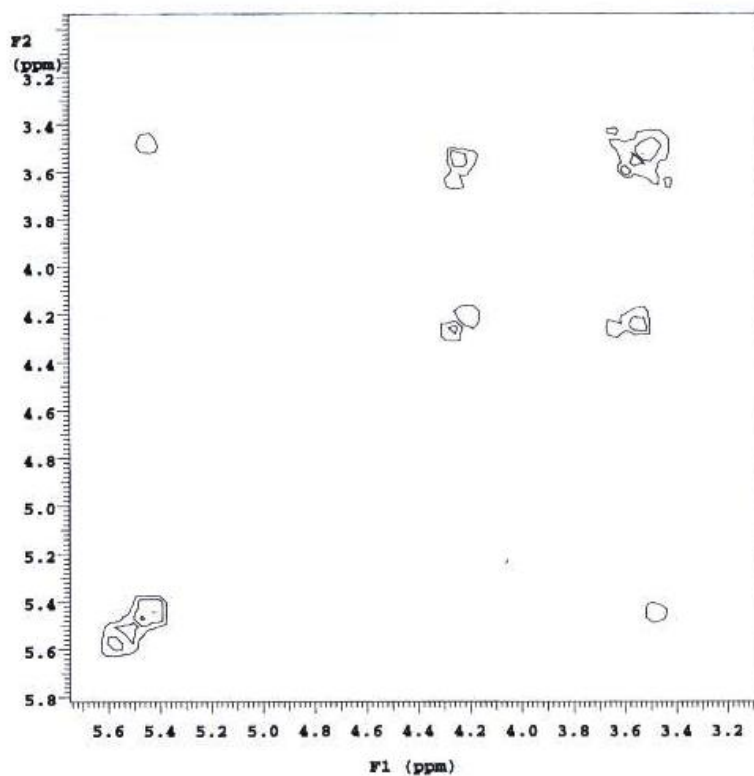
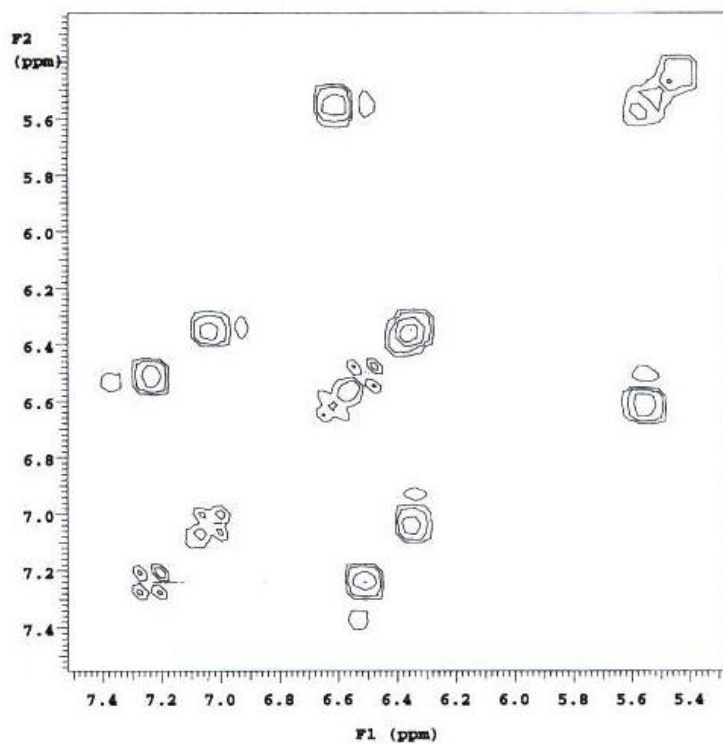
## 10.10 <sup>13</sup>C-NMR-SPEKTRUM AV 4II



10.11 <sup>1</sup>H-NMR-SPEKTRUM AV 6III10.12 <sup>1</sup>H-NMR-SPEKTRUM AV XX

10.13  $^1\text{H-NMR-SPEKTRUM AV 5I}$ 10.14  $^{13}\text{C-NMR-SPEKTRUM AV 5I}$ 

**10.15  $^{13}\text{C}$ -APT-SPEKTRUM AV 5I**

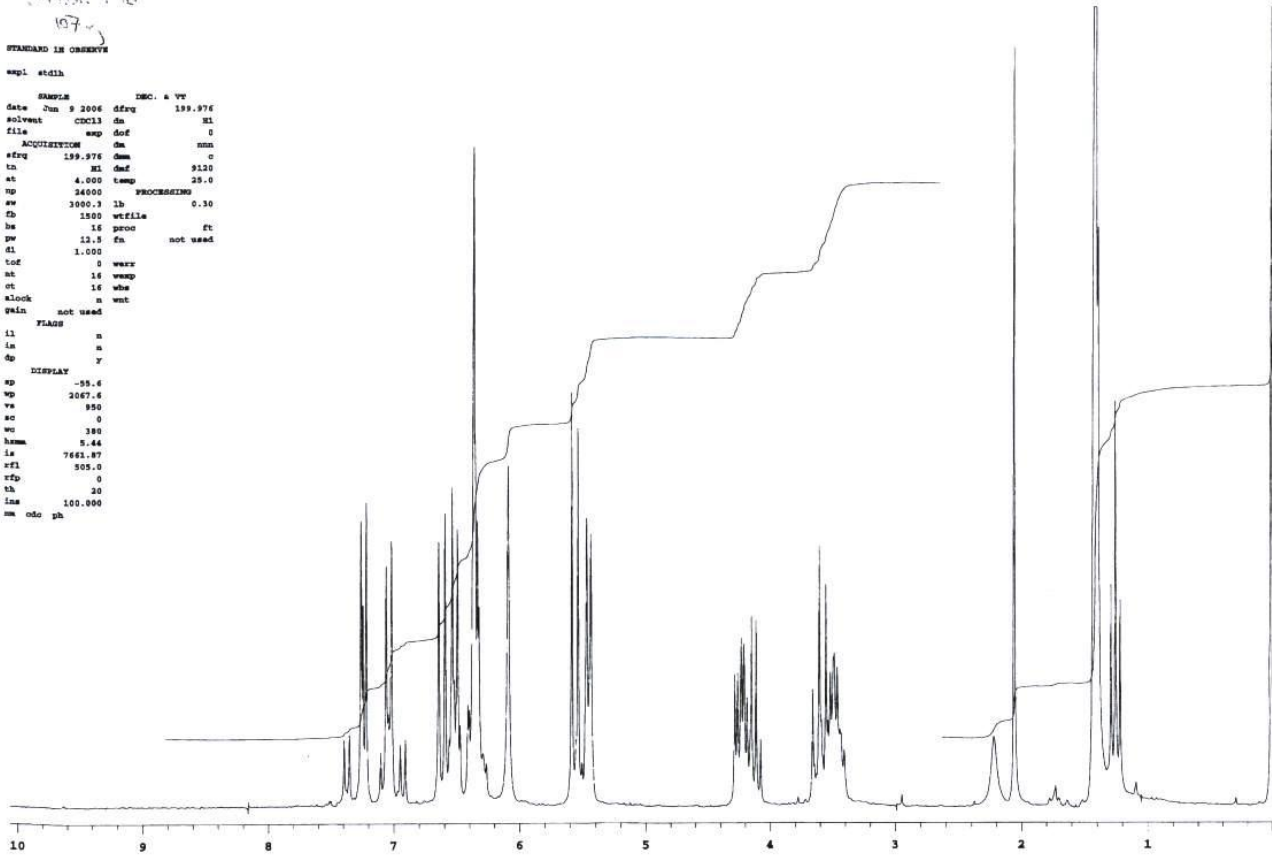
**10.17  $^1\text{H}$ -COSY-SPEKTRUM (UTSNITT) AV 5I****10.18  $^1\text{H}$ -COSY-SPEKTRUM (UTSNITT) AV 5I**



10.19 <sup>1</sup>H-NMR-SPEKTRUM AV 7III

107  
STANDARD IN OBSERVE

```
expt etdla  
SAMPLE  
date Jun 9 2006 dfrq 199.976  
solvent CCl3 d4 KI  
file exp dof 0  
ACQUISITION  
dfrq 199.976 Sm c  
tn KI def 9130  
at 4.000 temp 25.0  
np 24000 PROCESSING  
sw 3000.3 lb 0.30  
fb 1500 wfile  
bs 16 proc ft  
pw 12.5 fa not used  
sl 1.000  
tof 0 warr  
nt 16 wexp  
ot 16 whe  
clock a wnt  
gain not used  
FLASK  
l1 n  
l2 n  
sp Y  
DISPLAY  
sp -25.6  
np 2067.6  
vs 950  
sc 0  
wc 380  
hmm 5.44  
ls 7661.87  
rfl 505.0  
rfg 0  
th 20  
lms 100.000  
ms odo ph
```



## 10.20 15-LO HEMMING AV MR

### 15-LO hemming av metanolekstrakt av rotbark (MR)

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Log konsentrasjon	% hemming	SD	p<
10	166,7	2,22	99,6	0,4	0,001
5,00	83,4	1,92	90	1,9	0,001
2,50	41,7	1,62	50	3,8	0,001
1,25	20,8	1,32	25,7	8	0,005
0,63	10,4	1,02	18,3	5,7	0,025
IC <sub>50</sub> -verdi	42 ± 5				

## 10.21 15-LO HEMMING AV DR

### 15-LO hemming av diklormetaneekstrakt fra rotbark (DR)

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Log konsentrasjon	% hemming	SD	p<
5,00	83,4	1,92	100,3	0,7	0,001
2,50	41,7	1,62	91,5	1,2	0,001
1,25	20,8	1,32	56	4	0,001
0,63	10,4	1,02	24,7	6,2	0,005
0,31	5,2	0,72	19,5	8,9	0,005
IC <sub>50</sub> -verdi	18,2 ± 2				

## 10.22 15-LO HEMMING AV MS

### 15-LO hemming av metanolekstrakt av stammebark (MS)

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Log konsentrasjon	% hemming	SD	p<
10	166,7	2,22	99,6	1	0,001
5,00	83,4	1,92	80,4	2,2	0,001
2,50	41,7	1,62	50,1	2,9	0,001
1,25	20,8	1,32	26,4	3,6	0,001
0,63	10,4	1,02	11,2	4,3	0,005
IC <sub>50</sub> -verdi	42 ± 4				

## 10.23 15-LO HEMMING AV DS

### 15-LO hemming av diklormetaneekstrakt av stammebark (DS)

Konsentrasjon (mg/ml)	Konsentrasjon i kyvette ( $\mu\text{g/ml}$ )	Log konsentrasjon	% hemming	SD	p<
10	166,7	2,22	97,8	2,1	0,001
5,00	83,4	1,92	89,4	1,4	0,001
2,50	41,7	1,62	55,5	3,5	0,001
1,25	20,8	1,32	28	3,7	0,001
<b>IC<sub>50</sub>-verdi</b>	<b>36 <math>\pm</math> 4</b>				

## 10.24 15-LO HEMMING AV QUERCETIN

### 15-LO hemming av quercetin (positiv kontroll)

Konsentrasjon (mM)	Konsentrasjon i kyvette ( $\mu\text{M}$ )	Log konsentrasjon	% hemming	SD	p<
5,00	83,4	1,92	89,8	0,6	0,001
2,50	41,7	1,62	48,7	2,8	0,001
1,25	20,8	1,32	25,2	4,6	0,001
<b>IC<sub>50</sub>-verdi</b>	<b>42 <math>\pm</math> 2</b>				

## 10.25 R<sub>f</sub>-VERDIER ANTIFUNGALTEST 1

Tabell over fraksjoner med hemmingssoner i antifungaltest 1. Alle R<sub>f</sub>-verdier til tilhørende referansefraksjon er tatt med, og de verdiene som sannsynligvis svarer til de aktive forbindelsene er uthevet. Platene er eluert i diklormetan. Kun fraksjoner som viser hemmingssone(r) er tatt med

Fraksjon nummer	R <sub>f</sub> -verdi for hemminson(e)r i antifungaltest	R <sub>f</sub> -verdier på referanseplatene (UV og Godin)
X	<b>0,46</b>	0,19-0,25-0,28-0,30-0,33-0,36- <b>0,41</b>
XI	<b>0,50</b>	0,19-0,28-0,34-0,35-0,38- <b>0,43</b>
XII	<b>0,49</b>	0,13-0,16-0,20-0,29-0,35-0,36- <b>0,39</b>
XIII	<b>0,51</b>	0,13-0,18-0,21-0,29-0,33-0,35- <b>0,39</b>
XIV	<b>0,46</b>	0,04-0,14-0,21-0,26-0,33- <b>0,36</b>
XV	<b>0,46</b>	0,10-0,14-0,18-0,29- <b>0,36</b>
XVI	<b>0,11</b>	0,08- <b>0,11</b> -0,16-0,19-0,29-0,31-0,41
XVII	<b>0,19-0,28-0,51</b>	0,08-0,10-0,13-0,15-0,16- <b>0,21-0,31-0,35</b>
XVIII	<b>0,10-0,16-0,25-0,49</b>	0,04- <b>0,08</b> -0,13- <b>0,15</b> -0,18- <b>0,26</b> -0,30- <b>0,35</b>
XIX	<b>0,13-0,25-0,49</b>	0,04-0,08- <b>0,11-0,15-0,36</b>
XX	<b>0,13-0,23</b>	0,05-0,08- <b>0,13-0,31</b>
XXI	<b>0,04-0,13</b>	0,02-0,06-0,08-0,12-0,14-0,39
XXII	<b>0,10</b>	0,04-0,07- <b>0,12</b> -0,39
XXIII	<b>0,10</b>	0,04-0,07- <b>0,12</b> -0,39
XXIV	<b>0,14</b>	0,02-0,06- <b>0,12</b> -0,21-0,36-0,41
XXV	<b>0,09</b>	0,02-0,04-0,06- <b>0,09</b> -0,35-0,41
XXVI	<b>0,09</b>	0,02-0,05- <b>0,07-0,11</b> -0,35-0,40
XXVII	<b>0,05</b>	0,02- <b>0,05</b> -0,41
XXVIII	<b>0,05</b>	0- <b>0,04-0,06</b>
XXVIII <sub>DCM</sub>	<b>0,06</b>	0,03- <b>0,06</b> -0,09-0,46
Rækstrakt (CE)	<b>Hemming fra grunnlinja og 1 cm opp. (R<sub>f</sub> ~ 0,4)</b>	
Nystatin (N), positiv kontroll	<b>0</b>	-

## 10.26 R<sub>f</sub>-VERDIER ANTIFUNGALTEST 2

Tabell over R<sub>f</sub>-verdier til hemningssoner i antifungaltest 2. Platene med fraksjoner i 2-serien er eluert i kloroform, mens platene med fraksjoner fra 3-serien er eluert i kloroform:etylacetat (60:1) Kun fraksjoner med hemningssoner er tatt med

Fraksjon nummer	R <sub>f</sub> -verdi for hemningsone(r) i antifungaltest	R <sub>f</sub> -verdier på referanseplatene (UV, Godin og Dragendorf (D))
2.V	<b>0,63</b>	0,20-0,27-0,36-0,57- <b>0,61</b> -0,66-0,71-0,75- 0,88 D: 0,51
2.VI	<b>0,63</b>	0,16-0,25-0,34-0,54- <b>0,61</b> -0,69-0,75-0,78- 0,82-0,86
2.VII	<b>0,63</b>	0,11-0,25-0,17-0,23- 0,33-0,39-0,47-0,53- <b>0,60</b> -0,69-0,73-0,77- 0,80-0,84-0,90
2.XII	<b>0,19-0,55</b>	0,11-0,14- <b>0,18</b> -0,24- 0,28-0,48- <b>0,59</b> -0,82- 0,90 D:0,51
2.XIII	<b>0,56</b>	0,28- <b>0,60</b>
3.VI	<b>0,38</b>	0,34- <b>0,39</b> -0,42-0,46- 0,50-0,55-0,59-0,63- 0,66-0,70-0,75-0,78- 0,83-0,88 D: 0,59-0,91
3.VII	<b>0,38</b>	0,34- <b>0,38</b> -0,46-0,55- 0,61-0,68-0,76-0,81 D:0,59
3.VIII	<b>0,38</b>	<b>0,35</b> -0,48-0,57-0,62- 0,70-0,78-0,83 D:0,60
3.IX	<b>0,38</b>	0,10-0,20-0,27- <b>0,36</b> - 0,53-0,58-0,75-0,81- 0,86
Ref: XIV + XV	<b>Plate 1: 0,63</b> <b>Plate 2: 0,13-0,61</b>	<b>0,17</b> -0,34-0,40-0,48- 0,55- <b>0,62</b> -0,68-0,76- 0,81-0,89 D: 0,51
Ref: XVIII+XIX	<b>Plate 3: 0,39</b> <b>Plate 4: 0,38</b>	0,08-0,13-0,20- <b>0,30</b> - <b>0,49</b> -0,58-0,67-0,71- 0,80-0,84-0,89 D: 0,59
Nystatin	<b>0</b>	-

## 10.27 R<sub>f</sub>-VERDIER ANTIFUNGALTEST 3

Tabell over fraksjoner med hemminssoner i antifungaltest 3. Det ble påført 300 µg av hver fraksjon, samt 20µg sulkonazol som positiv kontroll. Plate 1 er eluert i diklormetan, plate 2 og 3 er eluert i kloroform.

Fraksjon nummer	R <sub>f</sub> -verdi for hemminssone(r) i antifungaltest	R <sub>f</sub> -verdier på referanseplatene (UV og Ceric)
<b>Plate 1</b>		
XX	<b>0,13</b>	0,11- <b>0,14</b> -0,17-0,21
XXI	<b>0,05-0,13</b>	<b>0,01</b> -0,10- <b>0,13</b> -0,17-0,21
XXII	<b>0,1</b>	<b>0,03</b> -0,10-0,13-0,17
XXIII	<b>0,1</b>	<b>0,11</b> -0,19
XXVII	<b>0,08 (0,05-0,10)</b>	<b>0,04-0,07</b>
XXVIII	<b>0,08 (0,05-0,10)</b>	<b>0,04-0,07</b>
5.0	<b>0,13</b>	<b>0,11</b> -0,93-0,97
5.I-5.III (sammenslått)	<b>0,15 (0,11-0,19)</b>	<b>0,11-0,15-0,19</b> -0,25-0,28-0,36-0,94
5.IV	<b>0,14</b>	<b>0,13</b> -0,25-0,35-0,83
5.V	<b>0,15-0,73</b>	0,04- <b>0,13</b> -0,25-0,46-0,63- <b>0,74</b> -0,90
VI	<b>0,10</b>	<b>0,11</b> -0,25
5.VII	<b>0,10</b>	<b>0,11</b> -0,25-0,94
5.VIII	<b>0,10-0,88</b>	<b>0,11-0,94</b>
7.I	<b>0,11-0,86</b>	<b>0,11</b> -0,14-0,21-0,26-0,31-0,35-0,38-0,49-0,60-0,81- <b>0,88</b> -0,94
7.II	<b>0,15-0,26</b>	<b>0,14</b> -0,22- <b>0,26</b>
7.III	<b>0,19</b>	<b>0,13</b>
7.IV	<b>0,25</b>	0,06-0,13-0,22- <b>0,24</b>
7.V	<b>0,15- 0,38</b>	0,04-0,10- <b>0,14-0,26</b>
Sulkonazol	<b>0,14</b>	-
<b>Plate 2</b>		
2.VI	<b>0,06-0,41</b>	<b>0,08</b> -0,19-0,23-0,35- <b>0,43</b>
2.VII	<b>0,06-0,41</b>	<b>0,09</b> -0,15-0,21-0,35- <b>0,43</b>
2.XIII	<b>0,10-0,28</b>	0,06- <b>0,12</b> -0,18-0,20- <b>0,24</b> -0,35
4.IV	<b>0,10-0,30</b>	0,10-0,15-0,23-0,38-0,51
4.V	<b>0,10</b>	<b>0,11</b> -0,15-0,19-0,25-0,33-0,40-0,53-0,74-0,78
4.VI	<b>0,10-0,33-0,44</b>	0,08- <b>0,11</b> -0,18-0,24- <b>0,36-0,45</b> -0,54-0,74-0,78
6.II	<b>0,10-0,35</b>	0,06- <b>0,11</b> -0,18-0,28- <b>0,35</b> -0,40-0,48-0,54-0,74
6.III	<b>0,10</b>	<b>0,11</b> -0,15-0,19-0,28-0,35-0,41-0,55

6.IV	<b>0,13</b>	<b>0,11-0,15-0,19-0,28-0,30-0,38-0,44-0,55-0,63-0,75</b>
6.V	<b>0,15</b>	<b>0,15-0,18-0,20-0,28-0,30-0,44-0,51-0,55-0,61-0,75-0,79</b>
Sulkonazol	<b>0,16</b>	-
<b>Plate 3</b>		
X	<b>0,4</b>	<b>0,17-0,23-0,51-0,58-0,67-0,75-0,83-0,87</b>
XII	<b>0,4</b>	<b>0,17-0,23-0,41-0,49-0,55-0,65-0,72-0,84</b>
XVI	<b>0,29</b>	<b>0,14-0,22-0,23-0,35-0,46-0,51</b>
XVII	<b>0,10-0,29</b>	<b>0,19-0,23-0,30-0,46-0,49-0,70</b>
XVIII	<b>0,10</b>	<b>0,13-0,16-0,19-0,23-0,30-0,49-0,52</b>
XIX	<b>0,10</b>	<b>0,13-0,19-0,23-0,30-0,36-0,43-0,52</b>
3.VI	<b>0,15</b>	<b>0,10-0,21-0,26-0,35-0,63-0,86</b>
3.VII	<b>0,15-0,31</b>	<b>0,19-0,23-0,32-0,36-0,48-0,52-0,55-0,71-0,75-0,86-0,93</b>
3.VIII	<b>0,15-0,31-0,81</b>	<b>0,19-0,32-0,36-0,48-0,55-0,71-0,78</b>
3.IX	<b>0,5</b>	<b>0,10-0,17-0,39-0,48-0,55-0,62-0,84-0,91</b>
Sulkonazol	<b>0,06</b>	-