

# *Zanthoxylum zanthoxyloides*

- isolering av innholdsstoffer med  
antimalaria effekt

An Thuy Hoang



Masteroppgave

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2016



# ***Zanthoxylum zanthoxyloides* – isolering av innholdsstoffer med antimalaria effekt**

Av An Thuy Hoang

Utført ved

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Oslo, mai 2016

Veiledere:

Førsteamanuensis Helle Wangenstein

Professor emeritus Karl Egil Malterud

Postdoktor Ingvild Austarheim

© An Thuy Hoang

2016

*Zanthoxylum zanthoxyloides* – isolering av innholdsstoffer med antimalaria effekt

An Thuy Hoang

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo





# Sammendrag

*Zanthoxylum zanthoxyloides* (Rutaceae) er en tornet busk eller tre som vokser i tropiske områder i hele Vest-Afrika, spesielt kystnære områder fra Senegal til Nigeria og Kamerun. Planten som er kjent for sine antiseptiske, analgetiske og svettefremkallende egenskaper har flere bruksområder innenfor tradisjonell medisin som feber, forstoppelse, tann smerter, malaria og sigdcelleanemi. Tidligere *in vitro* studier har vist at rot (pellitorin, fagaramid og  $\gamma$ -sanshool), rotbark og blad av planten har insekticid aktivitet. Ekstrakt av rot er vist å ha antiplasmodium aktivitet, mens metanol-ekstrakt av rotbark har ikke gitt antiplasmodium aktivitet. Hensikten med oppgaven var å isolere innholdsstoffer fra *Z. zanthoxyloides*, som kan bidra til å forklare den tradisjonelle bruken mot malaria.

Rotbark og stammebark fra *Z. zanthoxyloides* ble ekstrahert med diklormetan og metanol i et Soxhlet apparat. Råekstraktene (med unntak av diklormetan-råekstrakt av stammebark) ble videre fraksjonert med Versaflash<sup>TM</sup> - eller Sephadex<sup>TM</sup>-kolonnekromatografi, og ytterligere separert med Chromatotron<sup>TM</sup> sentrifugalt akselerert TLC og/eller preparativ HPLC. For strukturoppklaring og identifisering av innholdsstoffer i fraksjonene ble det brukt NMR-spektroskopi, massespektrometri og måling av optisk rotasjon. Av bioassays ble det utført rekellarvetoksisitetstest og antiplasmodiumtest.

Fra råekstrakter av rotbark og stammebark av *Z. zanthoxyloides* ble det isolert og identifisert alkaloidene bis-dihydrochelerythrinyleter, buesgenin, chelerythrin, 6-hydroksydihydrochelerythrin, arnottianamid, diktamnin, skimmianin,  $\gamma$ -fagarin og synephrine, kumarinene scoparon og 6,7,8-trimetoksykumarin, alkaloidene *cis*-fagaramid, *trans*-fagaramid og pellitorin, lignanet sesamin, flavanonglykosidet hesperidin, kaffeoylkinasyrene klorogensyre og neoklorogensyre, og shikimatmetabolitten burkinabin B. Bis-dihydrochelerythrinyleter, buesgenin, 6-hydroksydihydrochelerythrin, synephrine og neoklorogensyre har ikke tidligere blitt rapportert i *Z. zanthoxylum*.

Råekstraktene viste toksisitet mot rekellarver, hvor diklormetan-ekstraktene av både rotbark ( $LD_{50}$ :  $0,4 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ ) og stammebark ( $LD_{50}$ :  $1,0 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ ) var mye mer toksiske enn metanol-ekstraktene av rotbark ( $LD_{50}$ :  $54 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ ) og stammebark ( $LD_{50}$ :  $76 \pm 7 \mu\text{g/ml}$ ). Av de isolerte naturstoffene var bis-dihydrochelerythrinyleter mest toksisk ( $LD_{50}$ :  $3 \pm 1 \mu\text{M}$ ), etterfulgt av chelerythrin ( $LD_{50}$ :  $43 \pm 26 \mu\text{M}$ ), pellitorin ( $LD_{50}$ :  $49 \pm 31 \mu\text{M}$ ), *trans*-fagaramid ( $LD_{50}$ :  $57 \pm 24 \mu\text{M}$ ), 6-hydroksydihydrochelerythrin ( $LD_{50}$ :  $68 \pm 6 \mu\text{M}$ ), sesamin ( $LD_{50}$ :  $79 \pm 11 \mu\text{M}$ ),  $\gamma$ -fagarin ( $LD_{50}$ :  $109 \pm 13 \mu\text{M}$ ) og scoparon ( $LD_{50}$ :  $320 \pm 107 \mu\text{M}$ ). Resten av de isolerte stoffene, unntatt buesgenin og diktamnin, viste ikke toksisitet mot rekellarver. Klorogensyre, pellitorin, scoparon og sesamin er tidligere undersøkt for rekellarvetoksitet, de andre stoffene er ikke tidligere undersøkt for dette.

Antiplasmodiumtest viste at diklormetan-ekstraktene av både rotbark og stammebark, og metanol-ekstrakt av stammebark hadde antiplasmodium aktivitet mot *P. falciparum* stammene 3D7 (klorokinsensitive) og DD2 (klorokinresistente) med  $IC_{50}$  verdier mellom 1 og  $10 \mu\text{g/ml}$ . Av de isolerte stoffene ga skimmianin ( $IC_{50}$ :  $0,7 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ ),  $\gamma$ -fagarin ( $IC_{50}$ :  $2,2 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ ), bis-dihydrochelerythrinyleter ( $IC_{50}$ :  $4,3 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$ ) og buesgenin ( $IC_{50}$ :  $3,4 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ ) antiplasmodiumaktivitet mot 3D7. Det har ikke blitt rapportert tidligere om antiplasmodiumaktivitet av bis-dihydrochelerythrinyleter og buesgenin. Det ble ikke utført antiplasmodiumtest av sesamin, pellitorin og chelerythrin, men tidligere studier har vist at disse stoffene har antiplasmodium aktivitet mot enkelte *P. falciparum* stammer.

Flere av de isolerte naturstoffene fra rotbark og stammebark av *Z. zanthoxylum* har ikke blitt rapportert i tidligere studier, som blant annet alkaloidene bis-dihydrochelerythrinyleter, 6-hydroksydihydrochelerythrin og buesgenin. Disse isolerte stoffene har vist både rekellarvetoksitet og/eller antiplasmodiumaktivitet som ikke har blitt rapportert tidligere. Disse funnene kan bidra til å forklare noe av den tradisjonelle bruken mot malaria i Vest-Afrika.

# Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved avdeling for farmakognosi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, i perioden høst 2015 til vår 2016.

Først og fremst ønsker jeg å rette en stor takk til mine veiledere Helle Wangensteen og Karl Egil Malterud for all den gode faglige og praktiske veiledningen og oppfølgingen underveis i året som har gått.

Jeg ønsker videre å takke medveileder Ingvild Austarheim og Christopher Dean Goodman for gjennomføring av antiplasmodiumtestene, og Anders Vik for gjennomføring av optisk rotasjon.

Til slutt vil jeg takke alle ansatte og masterstudentene ved avdelingen for hyggelig selskap og stor hjelpsomhet gjennom hele året.

Oslo, mai 2015

An Thuy Hoang



# Innholdsfortegnelse

Forkortelser .....	1
Hensikt .....	2
1 Bakgrunn .....	4
1.1 <i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i> .....	5
1.1.1 Taksonomisk klassifisering .....	5
1.1.2 Synonymer og lokale navn .....	5
1.1.3 Botaniske forhold .....	6
1.1.4 Habitat .....	7
1.1.5 Tradisjonell bruk .....	7
1.1.6 Tidligere studier .....	8
1.2 Malaria.....	16
1.2.1 Malariaparasitten og livssyklus .....	16
1.2.2 Malariamyggen og smitterisiko.....	17
1.2.3 Dagens malariasituasjon og resistensproblematikk.....	17
1.2.4 Sykdomsforløp og symptomer .....	18
1.2.5 Dagens behandlingsalternativer .....	18
1.2.6 Tradisjonell medisin mot malaria.....	19
1.3 Naturstoffer.....	20
1.3.1 Alkaloider.....	20
1.3.2 Alkamider.....	21
1.3.3 Flavonoider.....	22
1.3.4 Fenylpropanoider (Kumarin, kaffesyre, lignan).....	23
2 Materialer og metoder .....	24
2.1 Materialer.....	25
2.2 Generelle metoder.....	27
2.3 Separasjonsmetoder .....	28
2.3.1 Soxhlet ekstraksjon med organiske løsemidler .....	28
2.3.2 Kromatografiske metoder.....	31
2.3.3 Sephadex™ LH-20 gel kolonnekromatografi .....	33
2.3.4 Versaflash™ kolonnekromatografi .....	35
2.3.5 Tynnsjikt-kromatografi (TLC) og Ceric-spraying.....	36

2.3.6	Sentrifugal akselerert preparativ tynnsjikt-kromatografi - Chromatotron™	40
2.3.7	Høytrykksvæskerkromatografi (HPLC)	41
2.4	Identifikasjonsmetoder	45
2.4.1	Nukleær magnetisk resonans spektroskopi (NMR)	45
2.4.2	Massespektrometri (MS)	48
2.4.3	Optisk rotasjon	50
2.5	Metoder for måling av biologisk aktivitet	52
2.5.1	Rekellarvetest (Brine shrimp lethality assay)	52
2.5.2	Antiplasmodiumtest	54
3	Eksperimentell utførelse	56
3.1	Plantemateriale	57
3.2	Generell utførelse	57
3.3	Ekstraksjon av plantemateriale	58
3.4	Fraksjonering av DCM-råekstrakt av rotbark	59
3.4.1	Separering av Rb-dcm	59
3.4.2	Separering av Rb-dcm-v4	60
3.4.3	Separering av Rb-dcm-v4c4	61
3.4.4	Separering av Rb-dcm-v4c4h2	62
3.4.5	Separering av Rb-dcm-v5	63
3.4.6	Separering av Rb-dcm-v5c2	64
3.4.7	Separering av Rb-dcm-v5c3	65
3.4.8	Separering av Rb-dcm-v5c3h4	66
3.4.9	Separering av Rb-dcm-v5c4	67
3.4.10	Separering av Rb-dcm-v5c6	68
3.4.11	Separering av Rb-dcm-v5c6c4	69
3.4.12	Separering av Rb-dcm-v5c6c5	70
3.5	Fraksjonering av MeOH-råekstrakt av rotbark	71
3.5.1	Separering av Rb-meoh	71
3.5.2	Separering av Rb-meoh-v6	72
3.5.3	Separering Rb-meoh-v7	73
3.5.4	Separering av Rb-meoh-v7c2+3	74
3.6	Fraksjonering av MeOH-råekstrakt av stammebark	76
3.6.1	Separering av Sb-meoh	76

3.6.2	Separering av Sb-meoh-s3 .....	77
3.6.3	Separering Sb-meoh-s3v1 .....	79
3.6.4	Separering av Sb-meoh-s3v2 .....	80
3.6.5	Separering Sb-meoh-s7 .....	82
3.6.6	Separering av Sb-meoh-s7v1 .....	83
3.6.7	Separering av Sb-meoh-s11 med prep. HPLC .....	84
3.6.8	Separering av Sb-meoh-s11 med Versaflash <sup>TM</sup> .....	85
3.6.9	Separering av Sb-meoh-s12 .....	86
4	Resultater og diskusjon .....	88
4.1	Ekstraksjon av plantemateriale .....	89
4.2	Fraksjonering DCM-råekstrakt av rotbark .....	98
4.2.1	Separering av Rb-dcm .....	98
4.2.2	Separering av Rb-dcm-v4 .....	99
4.2.3	Separering av Rb-dcm-v4c4 .....	100
4.2.4	Separering av Rb-dcm-v4c4h2 .....	101
4.2.5	Separering av Rb-dcm-v5 .....	102
4.2.6	Separering av Rb-dcm-v5c2 .....	103
4.2.7	Separering av Rb-dcm-v5c3 .....	104
4.2.8	Separering av Rb-dcm-v5c3h4 .....	105
4.2.9	Separering av Rb-dcm-v5c4 .....	106
4.2.10	Separering av Rb-dcm-v5c6 .....	108
4.2.11	Separering av Rb-dcm-v5c6c4 .....	109
4.2.12	Separering av Rb-dcm-v5c6c5 .....	110
4.3	Fraksjonering av MeOH-råekstrakt av rotbark .....	111
4.3.1	Separering av Rb-meoh .....	111
4.3.2	Separering av Rb-meoh-v6 .....	112
4.3.3	Separering av Rb-meoh-v7 .....	113
4.3.4	Separering av Rb-meoh-v7c2+3 .....	113
4.4	Fraksjonering av stammebark MeOH-råekstrakt .....	115
4.4.1	Separering av Sb-meoh .....	115
4.4.2	Separering av Sb-meoh-s3 .....	119
4.4.3	Separering av Sb-meoh-s3v1 .....	120
4.4.4	Separering av Sb-meoh-s3v2 .....	121



4.4.5	Separering av Sb-meoh-s7 .....	122
4.4.6	Separering av Sb-meoh-s7v1 .....	123
4.4.7	Separering av Sb-meoh-s11 med prep. HPLC .....	124
4.4.8	Separering av Sb-meoh-s11 med Versaflash <sup>TM</sup> .....	125
4.4.9	Separering av Sb-meoh-s12 .....	126
4.5	Isolerte naturstoffer.....	127
4.5.1	Arnottianamid.....	127
4.5.2	Buesgenin .....	129
4.5.3	Burkinabin B .....	132
4.5.4	Chelerythrin.....	135
4.5.5	6-Hydroksydihydrochelerythrin .....	138
4.5.6	Bis-dihydrochelerythrinyleter .....	141
4.5.7	Diktamnin.....	146
4.5.8	<i>cis</i> -Fagaramid .....	148
4.5.9	<i>trans</i> -Fagaramid .....	151
4.5.10	$\gamma$ -Fagarin.....	154
4.5.11	Hesperidin .....	158
4.5.12	Klorogensyre .....	161
4.5.13	Neoklorogensyre .....	164
4.5.14	Scoparon (6,7-dimetoksykumarin).....	166
4.5.15	6,7,8-Trimetoksykumarin.....	168
4.5.16	Pellitorin .....	171
4.5.17	Sesamin .....	174
4.5.18	Skimmianin .....	176
4.5.19	(-)- <i>p</i> -Synephrine .....	180
5	Konklusjon .....	183
	Forslag til videre arbeid.....	185
	Vedlegg .....	186
	Litteraturliste .....	260



# Forkortelser

AChE	acetylkolinesterase	TFA	trifluoredikksyre
ACN	acetonitril	TLC	tynnskiktskromatografi
ACT	artemisinin	<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
	kombinasjonsterapi	TMS	tetrametylsilan
APT	attached proton test	UV	ultrafiolett
CDCl <sub>3</sub>	deuterert kloroform	<i>Z. zanthoxyloides</i>	<i>Zanthoxylum</i>
CD <sub>3</sub> OD	deuterert metanol		<i>zanthoxyloides</i>
COSY	correlation spectroscopy		
COX-1	cyklooksygenase 1		
DCM	diklormetan	For navnsetting av separerte fraksjoner:	
DMSO	dimetylsulfoksid	Rb	rotbark
DMSO-d <sub>6</sub>	deuterert dimetylsulfoksid	Sb	stammebark
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation	meoh	metanol-ekstrakt
HPLC	høytrykkskromatografi	dcm	diklormetan-ekstrakt
HSQC	heteronuclear singel quantum coherence	v	Versaflash™
		s	Sephadex™
kons.	konsentrasjon	c	Chromatotron™
l	liter	t	preparativ TLC
LPLC	lavtrykksvæskeskromatografi	h	preparativ HPLC
MeOH	metanol		
min	minutter		
NMR	nukleær magnetisk resonans		
ppm	parts per million		
prep. HPLC	preparativ HPLC		
Si-gel	silikagel		
t	timer		
t.h.	til høyre		
t.v.	til venstre		

# Hensikt

Malaria er en parasittsykdom som forårsaket 438 000 dødsfall i år 2015, de fleste i Afrika sør for Sahara (WHO 2016). For befolkningen i denne delen av verden er medisinplanter ofte den eneste muligheten for medisin, og det er derfor ønskelig å finne ut mer om de aktive innholdsstoffene i disse plantene.

Hensikten med denne oppgaven er å isolere innholdsstoffer fra den afrikanske medisinplanten *Zanthoxylum zanthoxyloides*, og å undersøke om ekstrakter og innholdsstoffer fra planten har toksisk effekt på rekellarver og antiplasmodiumaktivitet. Dette kan bidra til å forklare lokalbefolkningens tradisjonelle bruk av planten mot malaria.



# **1 Bakgrunn**

## 1.1 *Zanthoxylum zanthoxyloides*

---

### 1.1.1 Taksonomisk klassifisering

Taksonomisk klassifisering for *Zanthoxylum zanthoxyloides* er beskrevet som følgende (USDA 2016):

Rike:	Plantae (planterike)
Subrike:	Tracheobionta (karplanter)
Superdivisjon:	Spermatophyta (frøplanter)
Divisjon:	Magnoliophyta (blomster planter, dekkfrøede planter)
Klasse:	Magnoliopsida (tofrøbladet)
Underklasse:	Rosidae (roseunderklassen)
Orden:	Sapindales
Familie:	Rutaceae (rutefamilien, sitrusfamilien)
Slekt	<i>Zanthoxylum</i> L.
Art:	<i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i> (Lam.) Zepern. & Timler

### 1.1.2 Synonymer og lokale navn

#### Synonymer:

<i>Fagara senegalensis</i> (DC.) A.Chev	(TPL 2013)
<i>Fagara zanthoxyloides</i> Lam.	(TPL 2013)
<i>Zanthoxylum polygamum</i> Schumach	(APD 2016)
<i>Zanthoxylum senegalense</i> DC.	(TPL 2013)

#### Lokale navn:

Engelsk:	Senegal prickly-ash, candlewood, toothache bark	(Matu 2011)
Fransk:	Fagara jaune	(Matu 2011)
Hausa (Nigeria):	Fasakuwa	(Adefisoye et al. 2012)
Igede (Nigeria):	Ufu otachacha	(Igoli et al. 2005)
Yoruba (Nigeria):	Ata	(Adefisoye et al. 2012)
Bambara (Marli):	Wo	(Wangensteen et al. 2015)

### 1.1.3 Botaniske forhold

*Z. zanthoxyloides* er en busk eller et tre som kan bli 6-12 meter høyt. Den gråbeige barken har en grov overflate, med tynne vertikale sprekker, ofte med tilspissede piggbærende utvekster.

Tornene er lokalisert overalt på stammer, grener, stengler, og under bladstilker i uregelmessige intervaller. De er brune og beigestripet, vender nedover, og har en robust base.

Bladsammensetningen på stengelen er av skruetilt og ulikefinnet type, hvor småbladene ligger motsatt eller skruetilt på bladstilken. Bladene er 5-10 cm lange og 2-4 cm brede, og har et omvendt eggformet eller elliptisk bladform. Bladspissen er butt eller avrundet, og bladgrunnen er kileformet eller avrundet. De er ofte dekket av gjennomsiktige prikker som gir en lukt av pepper og sitron ved knusing. Nervemønsteret i bladet er av fjærnerve-typen, og blomsterstanden av er av løs topp-typen. De hvite eller grønne blomstene er 5-6 mm i diameter, og er pollenbærere med fem kronblader som knapt er åpne. Frukten som er 5-6 mm i diameter, er av oppsprettede kapsel-typen. Ved modning blir frukten brun, åpner seg og blottet det blå-svarte frøet. Planten blomstrer to ganger i året, under første del av tørr sesong og under regnsesong (Arbonnier 2004).



Figur 1.1: Fra venstre; bilder av *Z. zanthoxyloides* tre, tornet bark, tornete blader og modne frukter (Dressler et al. 2014).



### 1.1.4 Habitat

*Z. zanthoxyloides* vokser i tropiske områder i hele Vest-Afrika. Det finnes på savanner, i tørr- og overgangsskog, og er mest rikelig av i kystnære områder fra Senegal til Nigeria og Kamerun. Planten er avhengig av veldrenert jord, og forekommer vanligvis ved lave høyder over havet (APD 2016; Matu 2011; NPGS 2016).



Figur 1.2: Illustrasjon over hvor *Z. zanthoxyloides* vokser vilt (Matu 2011).

*Z. zanthoxyloides* regnes som en truet art, som følge av ukontrollerte høstemetoder og den stadig økende interesse for plantens farmakologiske egenskaper (Etsè et al. 2011).

### 1.1.5 Tradisjonell bruk

*Z. zanthoxyloides* som er kjent for sine antiseptiske, analgetiske og svettefremkallende egenskaper, har flere bruksområder innenfor tradisjonell medisin (Matu 2011). Planten brukes mye som tradisjonell medisin i vestafrikanske land, blant annet Nigeria og Kamerun (Ogunbolude et al. 2014).

Rot og stammebark av *Z. zanthoxyloides* brukes blant annet mot hoste, lammelser, gikt, parasitter, tann smerter og karies, og tarmproblemer som kolikk og dysenteri. I tillegg brukes de mot sigdcelleanemi, tuberkulose, kreft, gonore, og urinveissykdommer. De anvendes også til å stimulere og behandle smerter under fødsel (Adekunle et al. 2012; Arbonnier 2004; Matu 2011).

I Sørvest-Nigeria brukes roten av *Z. zanthoxyloides* som en antibakteriell tannbørste (Ogunbolude et al. 2014). Andre bruksområder av roten er feber, buk- og underlivssmerter, menstruasjonssmerter, seksuell impotens, elefantsyke og malaria (Adekunle et al. 2012; Olowokudejo et al. 2008). Utvendig påføring av røtter brukes mot åpne sår, hevelser, hemorroider, byller, slangebitt, framboesia, sår og revmatiske smerter (Matu 2011). I Mali har det blitt utviklet et produkt av roten som benyttes mot sigdcelleanemi (Wangensteen et al. 2015).

Stammebark av *Z. zanthoxyloides* brukes blant annet mot innvollsormer og ødem (Ogunbolude et al. 2014). Den anvendes også utvendig mot revmatiske plager (Adekunle et al. 2012). I tillegg blir stammebarken brukt som prevensjon, hvor den kokes og drikkes av kvinner før samleie (Igoli et al. 2005).

Blad av *Z. zanthoxyloides* brukes innvendig som avføringsmiddel, og utvendig som antiseptisk middel (Adekunle et al. 2012). Igede folket i Nigeria bruker dekokt av blad i kombinasjon med *Morinda lucida* for behandling mot diare (Igoli et al. 2005). Dekokt av blad og rot brukes også til å vaske sår (Ogunbolude et al. 2014).

*Z. zanthoxyloides* anvendes mot malaria i flere områder i Vest-Afrika, enten alene eller i kombinasjon med andre planter. I Burkina Faso er planten en av de mest brukte plantene til behandling av malaria og feber (Gansané et al. 2010). I Okeigbo i Nigeria blir roten av *Z. zanthoxyloides* brukt i kombinasjonsbehandling med to andre planter (Odugbemi et al. 2007), mens i Guinea og Ghana blir det brukt dekokt av stammebark (Asase et al. 2009; Traore et al. 2013).

*Z. zanthoxyloides* har også andre bruksområder enn medisinske bruksområder. Blad og frø brukes som krydder, hvor bladene har en sitronduft og frøene gir en smak av kanel og pepper. Planten blir også brukt som et religiøst middel for å beskytte mot dårlige ånder (Arbonnier 2004; Matu 2011).

### **1.1.6 Tidligere studier**

Et søk i databasen Scifinder, med søkeordet «*Zanthoxylum zanthoxyloides*» ga 76 treff (inkludert patenter) (22.mars 2015). De første studiene ble utført på 1950-tallet, og har til i dag resultert i identifikasjon og strukturoppklaring av flere innholdsstoffer fra eteriske oljer, rot, rotbark, stammebark, blad og frukt. Flere biologiske effekter er dokumentert, men det er svært få studier på plantens antimalaria aktivitet.

#### **1.1.6.1 Identifiserte innholdsstoffer**

Tidligere studier viser at plantedelene inneholder en rekke forskjellige stoffer fra ulike stoffgrupper, blant annet terpen, alkaloider, flavonoider og amider. Tabell 1.1-1.6 viser en oversikt over identifiserte innholdsstoffer i *Z. zanthoxyloides*, sortert etter plantedel og naturstoffgruppe.

Tabell 1.1: Oversikt over identifiserte innholdsstoffer i eteriske oljer av *Z. zanthoxyloides*.

Stoffgruppe	Naturstoff	Plantedel	Referanse
Monoterpen	3-Caren	Frø	(Olounladé et al. 2011)
	δ-3-Caren	Frø	(Adesina 1986)
	Camphen	Blad	(Menut et al. 2000)
	Citronellal	Frukt, frø	(Fogang et al. 2012a; Fogang et al. 2012b)
	β-citronellal	Ikke nevnt	(Gardini et al. 2009)
	Citronellol	Frukt, frø	(Fogang et al. 2012a; Fogang et al. 2012b; Ngassoum et al. 2003)
	<i>p</i> -Cymen	Frukt	(Ngassoum et al. 2003)
	α-Citronellol	Frukt	(Nana et al. 2015)
	β-Citronellol	Blad, frukt	(Kamdem et al. 2015; Misra et al. 2013)
	R-(+)-β-Citronellol	Ikke nevnt	(Gardini et al. 2009)
	Citronellylacetat	Frukt, frø	(Fogang et al. 2012a; Fogang et al. 2012b; Ngassoum et al. 2003)
	2,6-Dimetyl-2,6-oktadien	Blad, frukt	(Gardini et al. 2009; Kamdem et al. 2015)
	Geranial	Frukt	(Menut et al. 2000)
	Geraniol	Blad, frukt, frø	(Fogang et al. 2012a; Fogang et al. 2012b; Gardini et al. 2009; Kamdem et al. 2015; Misra et al. 2013; Ngassoum et al. 2003)
	<i>trans</i> -Geraniol	Frukt	(Nana et al. 2015)
	Geranylacetat	Blad, frukt	(Gardini et al. 2009; Kamdem et al. 2015; Menut et al. 2000)
	Isopulegol	Ikke nevnt	(Gardini et al. 2009)
	<i>neo</i> -Isopulegol	Frø	(Fogang et al. 2012b)
	Limonen	Blad, frukt, frø	(Affouet et al. 2012; Fogang et al. 2012a; Fogang et al. 2012b; Ngassoum et al. 2003)
	Linalool	Frukt	(Menut et al. 2000)
	Myrcen	Blad, frø	(Affouet et al. 2012; Fogang et al. 2012b; Menut et al. 2000; Ngassoum et al. 2003)
	( <i>E</i> )-β-ocimen	Blad, frukt, frø	(Adesina 1986; Fogang et al. 2012b; Menut et al. 2000; Ngassoum et al. 2003)
	α-Phellandren	Frukt	(Ngassoum et al. 2003)
	3-Pinanon	Frukt	(Adesina 1986)
	α-Pinen	Blad, frukt, frø	(Adesina 1986; Fogang et al. 2012b; Menut et al. 2000; Ngassoum et al. 2003)
	Sabinen	Frukt	(Ngassoum et al. 2003)
	Undecan	Frø	(Olounladé et al. 2011)

Monoterpen	$\gamma$ -Terpinen	Frø	(Olounladé et al. 2011)
	Terpinen-4-ol	Frukt, frø	(Fogang et al. 2012b; Ngassoum et al. 2003)
	$\alpha$ -Terpinolen	Frukt	(Ngassoum et al. 2003)
Sesquiterpen	$\beta$ -Caryofyllen	Blad	(Affouet et al. 2012)
	Germacren D	Blad	(Affouet et al. 2012)
	Valencen	Frø	(Olounladé et al. 2011)
Andre	Dekanal	Frø	(Affouet et al. 2012; Olounladé et al. 2011)

Tabell 1.2: Oversikt over identifiserte innholdsstoffer i rot av *Z. zanthoxyloides*.

Stoffgruppe	Naturstoff	Referanse
Alkaloid	Fagaridin	(Adesina 1986)
	Fagaronin (2-hydroksy-3,8,9-trimetoksy-5-metylbenzo[c]phenanthridin)	(Dupont et al. 2005; Pezzuto et al. 1983)
	Skimmianin	(Adesina 1986)
Amid	Dihydrochelerytrin	(Adesina 1986)
	Fagaramid	(Adesina 1986)
	Pellitorin	(Adesina 1986)
	$\gamma$ -Sanshool	(Adesina 1986)
Aromatisk syre	Hydroksymetylbenzosyre	(Adesina 1986)
Fenolisk syre	<i>p</i> -Hydroksybenzosyre	(Elujoba et al. 1989)
	Syringasyre	(Elujoba et al. 1989)
	Vaniljesyre	(Elujoba et al. 1989)
Lignan	(-)-Asarinin	(Adesina 1986)
Shikimat	Zanthoxylol	(Elujoba et al. 1985)
Steroid	Sitosterol	(Adesina 1986)
	Stigmasta-5.22-dien-3 $\beta$ -ol	(Adesina 1986)
Sesquiterpen	$\alpha$ -Copaen	(Adesina 1986)
	Guaia-1(5),7(11)-dien	(Adesina 1986)
Triterpen	Lupeol	(Adesina 1986)
	Squalen	(Adesina 1986)
Andre	<i>n</i> -Heksadekanoat	(Adesina 1986)
	9,12-Oktadekadienoat	(Adesina 1986)
	<i>n</i> -Oktadekanoat	(Adesina 1986)

Tabell 1.3: Oversikt over identifiserte innholdsstoffer i rotbark av *Z. zanthoxyloides*.

Stoffgruppe	Naturstoff	Referanse
Alkaloid	Chelerythrin	(Torto et al. 1966)
	Norchelerythrin	(Queiroz et al. 2006)
	8-Acetyldihydrochelerythrin	(Chaaib et al. 2003)
	<i>N,N</i> -Dimetylindiacarbin	(Queiroz et al. 2006)
	Fagaronin	(Queiroz et al. 2006)
Amid	<i>cis</i> -Fagaramid	(Chaaib et al. 2003)
	<i>trans</i> -Fagaramid	(Chaaib et al. 2003; Queiroz et al. 2006)
	<i>N</i> -Isobutyl-(2 <i>Z</i> ,4 <i>Z</i> )-deka-2,4-dienamid	(Chaaib et al. 2003)
	<i>N</i> -Isobutyl-(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> )-octa-2,4-dienamid	(Chaaib et al. 2003)
Flavonoid	Hesperidin	(Queiroz et al. 2006)
Lignan	(+)-Sesamin	(Chaaib et al. 2003)
Shikimat	Burkinabin A (3,4-O-divanilloylkinasyre)	(Ouattara et al. 2004; Ouattara et al. 2009; Queiroz et al. 2006)
	Burkinabin B (3,5-O- divanilloylkinasyre)	(Ouattara et al. 2004; Ouattara et al. 2009)
	Burkinabin C (4,5-O- divanilloylkinasyre)	(Ouattara et al. 2004; Ouattara et al. 2009; Queiroz et al. 2006)
Triterpen	Lupeol	(Chaaib et al. 2003)
Andre	1,8-Di- <i>O</i> -(3-metoksy-4-hydroksybenzoyl)-3,6-dihydroksycyclooktan-2,7-endoperoksid	(Queiroz et al. 2006)
	4'-(4''-hydroksy-3''-metyl-butylloksy)-2-Fenyletanol	(Chaaib et al. 2003)
	4'-(3''-metylbut-2''-enyloksy)-3-Fenylpropanol	(Chaaib et al. 2003)
	Cuspidiol	(Chaaib et al. 2003)
	Dihydrocuspidiol	(Chaaib et al. 2003)

Tabell 1.4: Oversikt over identifiserte innholdsstoffer i stammebark av *Z. zanthoxyloides*.

Stoffgruppe	Naturstoff	Referanse
Fenolsyre	Kaffesyre	(Ogunbolude et al. 2014)
	Klorogensyre	(Ogunbolude et al. 2014)
Flavonoid	Kaempferol	(Ogunbolude et al. 2014)
	Rutin	(Ogunbolude et al. 2014)
	Quercetin	(Ogunbolude et al. 2014)

Tabell 1.5: Oversikt over identifiserte innholdsstoffer i blad av *Z. zanthoxyloides*.

Stoffgruppe	Naturstoff	Referanse
Fenolisk syre	2,5-Dihydroksybenzosyre	(Asante et al. 2009)
	Gallesyre	(Asante et al. 2009)
	Kaffesyre	(Asante et al. 2009)
	<i>para</i> -Kumarsyre	(Asante et al. 2009)
	Rosmarinsyre	(Asante et al. 2009)
	Syringasyre	(Asante et al. 2009)
	Vaniljesyre	(Asante et al. 2009)

Tabell 1.6: Oversikt over identifiserte innholdsstoffer i frukt av *Z. zanthoxyloides*.

Stoffgruppe	Naturstoff	Referanse
Alkaloid (acridoner)	1,6-Dihydroksy-3-metoksy-9-acridon	(Wouatsa et al. 2013b)
	Helebelecine A	(Wouatsa et al. 2013b)
	3-Hydroksy-1,5,6-trimetoksy-9-acridon	(Wouatsa et al. 2013b)
	1-Hydroksy-3-metoksy-10-metyl-9-acridon	(Wouatsa et al. 2013b)
	4-Hydroksy-zanthacridon	(Wouatsa et al. 2013b)
	4-Hydroksy-zanthacridonoksid	(Wouatsa et al. 2013b)
	4-Metoksy-zanthacridon	(Wouatsa et al. 2013b)
	3,4,5,7-Tetrahydroksy-1-metoksy-10-metyl-9-acridon	(Wouatsa et al. 2013b)
Kumarin	Bergapten	(Adesina 1986)
	Imperatorin	(Adesina 1986)
	Marmesin	(Adesina 1986)
	Psoralen	(Adesina 1986)
	Scoparon	(Adesina 1986; Misra et al. 2013)
	Scopoletin	(Adesina 1986)
	Umbelliferon	(Adesina 1986)
	Xanthotoxin	(Adesina 1986)
Monoterpen	<i>p</i> -Mentha-1,8-dien-9-ol	(Misra et al. 2013)
	Zantholsyre	(Wouatsa et al. 2013a)
Triterpen	Lupeol	(Misra et al. 2013)
Steroid	$\beta$ -Sitosterol	(Misra et al. 2013)
	Stigmasterol	(Misra et al. 2013)

### **1.1.6.2 Biologisk aktivitet**

#### **Acetylkolinesterasehemmende (AChE) aktivitet**

Fagaronin og *trans*-fagaramid fra planten har vist god AChE hemmende effekt, mens benzophenantridinalkaloider som chelerytrin er allerede kjent som sterke hemmere av AChE (Queiroz et al. 2006).

#### **Antibakteriell aktivitet**

*In vitro* studier har vist at eteriske oljer fra frukt og blad, og ekstrakter fra frukt og rotbark har antimikrobiell effekt mot en rekke bakterier. Eteriske oljer av blad og/eller frukt viste hemmende effekt på gram-negative bakterier, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, og gram-positive, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (Gardini et al. 2009; Kamdem et al. 2015; Misra et al. 2013; Ngassoum et al. 2003). Det er foreslått at den høye konsentrasjon av geraniol i eterisk olje av planten har en sammenheng med antimikrobiell aktivitet (Gardini et al. 2009). Et stoff isolert fra frukt, 3,4,5,7-tetrahydroksy-1-metoksy-10-metyl-9-acridon ga moderat antibakteriell aktivitet mot gram-positiv *Micrococcus luteus* og gram-negativ *Pseudomonas aeruginosa* (Misra et al. 2013; Wouatsa et al. 2013b). En del isolerte stoffer fra rotbark viste antibakteriell aktivitet, som cuspidiol og N-isobutyl-(2E,4Z)-octa-2,4-dienamid (Chaaib et al. 2003; Queiroz et al. 2006). Disse studiene kan tyde på virkning av den tradisjonelle bruken mot tarmplager.

#### **Anthelmintika (innvollsorm)**

Ekstrakt av blad viste signifikant effekt på nematoder, og at tanniner og flavonoider, men også andre forbindelser kunne være involvert i denne aktiviteten (Azando et al. 2011). Eterisk olje av frø har også vist anthelmintisk aktivitet på nematoder (Olounladé et al. 2011)

#### **Antihypertensiv aktivitet**

Ekstrakt av rotbark viste hypotensiv aktivitet (Zahoui et al. 2010), og kan dermed begrunne tradisjonell bruk mot arteriell hypertensjon.

### **Antiinflammatorisk aktivitet**

Ekstrakt av røtter med en konsentrasjon på 0,1 µg/µl, viste *in vitro* COX-1 hemmende aktivitet med en hemming på over 90 % (Larsen et al. 2015). Dette støtter den tradisjonelle bruken mot inflammatoriske lidelser, smerter, feber og infeksjoner.

### **Antioksidant aktivitet**

Antioksidantaktivitet kan være aktuell ved behandling av sykdommer der oksydativt stress er involvert. Isolerte stoffer fra rotbark har vist antioksidantaktivitet (Chaaib et al. 2003; Queiroz et al. 2006). Fenoliske syrer og andre sekundærmetabolitter isolert fra blad har også vist antioksidant effekt (Asante et al. 2009).

### **Cytotoksisk aktivitet**

Ekstrakt av frukt viste *in vitro* cytotoksisk aktivitet på brystkreft, leverkreft, tykktarmkreft, og prostatakreft (Misra et al. 2013; Wouatsa et al. 2013a). Av isolerte stoffer fra frukt viste zantholsyre cytotoksisk aktivitet mot brystkreft, og 3-hydroksy-1,5,6-trimetoksy-9-acridon viste moderat cytotoksisk effekt mot leverkreft (Wouatsa et al. 2013a; Wouatsa et al. 2013b). En annen studie viste at cytotoksisk aktivitet sannsynligvis skyldes geraniol og citronellol (Fogang et al. 2012a). Fagaronin, som ble isolert fra rot, induserer erythroleukemisk celledifferensiering ved genaktivering (Dupont et al. 2005). En studie viste at mitokondrietoksitet kan være en del av mekanismen som hemmer celledeling og død i brystkreft, og konkluderte dermed at det må vises forsiktighet ved overdreven bruk av disse som krydder (Choumessi et al. 2012). Disse studiene kan bekrefte den tradisjonelle bruken mot kreft.

### **Fungicid aktivitet**

Ekstrakt av hele planten viste potensiell veksthemmende aktivitet mot *Candida glabrata* (Kolaczowski et al. 2009). Isolerte stoffer fra rotbark har vist fungicid aktivitet (Chaaib et al. 2003; Queiroz et al. 2006), blant annet ble det vist at alkaloidet fagaronin var 10 ganger mer aktivt mot *Cladosporium cucumerinum* enn referansestoffet miconazol (Queiroz et al. 2006). Eterisk olje av frukt ga veksthemmende effekt på sopplignende patogen, *Phytophthora megakarya* som angriper kakaotreet (Nana et al. 2015). Disse studiene bekrefter tradisjonell bruk mot infeksjoner.



### **Insekticid aktivitet**

Flere studier har vist at rot, rotbark og blad har insekticid aktivitet, blant annet mot skadeinsektene *Prostephanus truncatus* og *Tribolium castaneum* (Eziah et al. 2013) og *Acanthoscelides obtectus* (Fogang et al. 2012b). Rotekstrakt viste seg å være giftig og frastøtende mot husfluen, *Musca domestica*, som er hovedvektor for mange patogene organismer (Bisseleua et al. 2008). En studie har vist at det er stoffene pellitorin, fagaramid, og  $\gamma$ -sanshool fra rot som er årsaken til insekticid aktivitet (Adesina 1986).

### **Parasitticid og antimalaria aktivitet**

Vannekstrakt av rot er vist å hemme veksten av *Plasmodium falciparum* stammen 3D7 (klorokinsensitiv) *in vitro* ( $IC_{50}$ :4.9  $\mu$ g/ml), hvor det er foreslått at fagaronin, som også hemmet vekst av *P.falciparum*, kan være det aktive stoffet (Kassim et al. 2005). Metanolekstrakt av rotbark ga en svak *in vitro* antiprotozoisk effekt på *Trypanosoma brucei brucei* og *Trypanosoma cruzi*, men var inaktiv på *Leishmania infantum* og *P. falciparum* stammen K1 (Traore et al. 2014). Alkaloidekstrakt av stammebark er rapportert å ha en god antiplasmodiumaktivitet ( $IC_{50}$ :1,2  $\mu$ g/ml) mot *P.falciparum* stammen W2 (klorokinresistent), mens metanol- og diklormetaneekstrakt er rapportert å være inaktiv ( $IC_{50}$ >10  $\mu$ g/ml) (Gansané et al. 2010).

### **Sigdcelle anemi**

Burkinabin A-C isolert fra rotbark viste *in vitro* aktivitet mot sigdcelleanemi, hvor effekten økte fra burkinabin A til C (Ouattara et al. 2009). Fenoliske syrer isolert fra rot, som p-hydroksybenzosyre, syringasyre og vaniljesyre, viste også effekt mot sigdcelleanemi (Elujoba et al. 1989). Et annet stoff som har effekt er zanthoxylol fra rot (Elujoba et al. 1985).

### **Toksitet**

En studie viste at mitokondrietoksitet kan være en del av mekanismen som hemmer celledeling og død i brystkreft, og konkluderer dermed at det må vises forsiktighet ved overdreven bruk av planten som krydder (Choumessi et al. 2012). Stammebark er vist å være cytotoxisk og gentoksisk til leukocytter ved høy konsentrasjon, og bekrefter dermed nødvendigheten å være forsiktig med bruken av planten (Ogunbolude et al. 2014)

## 1.2 Malaria

---

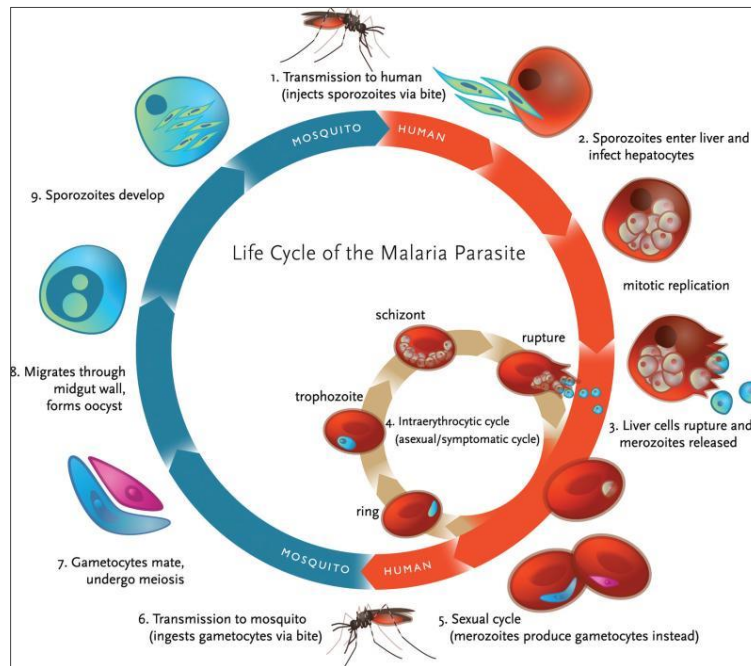
Malaria er en livstruende infeksjonssykdom som forårsakes av parasitten *Plasmodium*, som overføres til mennesker gjennom myggstikk av infiserte hunkjønnsmygg av *Anopheles* slekten (WHO 2016).

### 1.2.1 Malariaparasitten og livssyklus

Det finnes fem typer *Plasmodium* arter som kan infisere mennesker, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* og *P. knowlesi*, hvor to av disse utgjør den største trusselen. *P. falciparum* er den mest vanligste og dødeligste malariaparasitten i Afrika og er årsaken til flest malariarelaterte dødsfall globalt. *P. vivax* forårsaker kronisk malaria med periodiske tilbakevendinger av symptomer og har bredere fordeling enn *P. falciparum*, og dominerer i mange land utenfor Afrika (WHO 2016).

Under et myggstikk fra infisert hunnkjønnnet *Anopheles* mygg injiseres et stadium av parasitten som kalles sporozoitter, inn i menneskets blod. Livssyklusen for *Plasmodium* (se figur 1.3) kan deles i 3 trinn (Bauman et al. 2011; Rang et al. 2016):

1. *Exoerytrocyttisk syklus i lever*: Gjennom blodstrømmen når sporozoitter inn til leverceller, hvor det etter 1-2 uker blir dannet merozoitter som gjør at levercellen revner og malariaparasittene sendes videre ut i blodet. I dette trinnet kan *P. ovale* og *P. vivax* utvikle seg til hypnozoitter, som kan forbli hvilende i leverceller i årevis og bli reaktivert når som helst, noe som dermed fører til tilbakefall av malaria.
2. *Erytrocyttisk syklus*: Frie merozoitter penetrerer erytrocytter og utvikles til trophozoitter som endocytiserer blodcellenes hemoglobin protein. Gjennom celledeling utvikles det flere merozoitter som frigjøres av revnede blodceller. Lysering av erytrocytter skjer hver 48-72 timer, avhengig av arten av *Plasmodium*. De fleste vil videre infisere andre røde blodceller, men andre utvikles til hann- og hunnkjønnnet gametocytt i røde blodceller, som kan infisere nye mygg gjennom myggstikk.
3. *Sporogen syklus*: Gjennom myggstikk får myggen gametocytene fra blodcellene. De utvikles til gameter, og gjennom kjønnnet formering dannes zygoter. De differensierer videre til oocytter som undergår meiose, og etter 10-20 dager revner oocytten og frigjør sporozoitter som vandrer til myggens spyttkjertler.



Figur 1.3: Livssyklus av malariaparasitten (Klein 2013).

### 1.2.2 Malariamyggen og smitterisiko

I de fleste tilfeller er malaria overført gjennom bitt av hunnkjønnede *Anopheles* mygg. *Anopheles*-mygg legger eggene i vann, eggene utklekkes til larver, som deretter utvikles til voksne mygg. Hunnkjønnede mygg søker blodmåltid for å ernære eggene (WHO 2016).

Smittetrisikoen er større i steder hvor myggens levetid er lengre, slik at parasitten har tid til å fullføre sin utvikling inne i myggen, noe som vanligvis tar 9-21 dager. Varm temperatur kan forkorte livssyklusen, mens lavere temperatur kan forlenge livssyklusen slik at malaria ikke kan overføres (FHI 2016). Smittetrisikoen er ofte størst under og rett etter regnsesong (WHO 2016).

### 1.2.3 Dagens malariasituasjon og resistensproblematikk

Ifølge WHO ble det registrert 214 millioner tilfeller av malaria som forårsaket 438 000 dødsfall globalt i år 2015. Omtrent 90 % av dødsfallene skjedde i Afrika, og 83 % av dødsfallene var blant barn under 5 år. De fleste malariatilfellene og dødsfallene skjer i Afrika sør for Sahara, men også i Asia, Latin-Amerika og Midtøsten. Risikogruppene består av spedbarn, barn under 5 år, gravide kvinner og pasienter med HIV/AIDS. I tillegg er ikke-immune innvandrere, mobile populasjoner og reisende utsatt for å få malaria (WHO 2016).

Malaria var utryddet fra de fleste tempererte land i det 20. -århundre, som et resultat av WHO's forsøk på å eliminere malaria ved bruk av insekticider og antimalaria legemidler som klorokin. Dessverre førte dette til økende resistens både mot insekticider og antimalaria legemidler. Malaria har nå dukket opp igjen i flere land hvor det tidligere var under kontroll eller fjernet (Rang et al. 2016).

Resistens av *P.falciparum* mot tidligere generasjoner av legemidler, som klorokin og sulfadoksin-pyrimetamin, ble utbredt i 70-80 tallet. I de siste årene har det blitt oppdaget parasittresistens til artemisinin i Kambodsja, Laos, Myanmar, Thailand og Vietnam. De fleste som blir infisert herfra, kan fortsatt bli kurert når behandlet med artemisinin kombinasjonsterapi (ACT), hvis det ikke er resistens mot kombinasjonslegemidlet i ACT. I deler av Kambodsja og Thailand har det blitt utviklet parasittresistens både mot artemisinin og tilsetningslegemidlet (FHI 2016).

I perioden år 2000 til 2015 har innendørs bruk av insektmidler sammen med utstrakt bruk av myggnett i utsatte områder medført til en bedre global malariasituasjon, men fortsatt er statistikken dystre, spesielt i Afrika (FHI 2016).

#### **1.2.4 Sykdomsforløp og symptomer**

Symptomer vil først opptre 7-15 dager etter å ha blitt stukket av infisert mygg. De første symptomene er feber, hodepine, frysninger og oppkast. Ved ikke-behandlet *P.falciparum* malaria kan det utvikles til alvorlig sykdom som kan være dødelig. Barn med alvorlig malaria kan få et eller flere følgende symptomer; anemi, åndenød i sammenheng med metabolsk acidose, eller cerebral malaria. Voksne med alvorlig malaria kan også få multi-organ komplikasjoner. I endemiske områder med malaria kan folk utvikle delvis immunitet, og kan dermed unngå å få synlige symptomer (WHO 2016).

#### **1.2.5 Dagens behandlingsalternativer**

I områder som er utsatt for malaria bør det først og fremst brukes insekticid behandlet myggnett og innendørs spraying, for å forebygge og redusere malariaoverføring. Det anbefales å bruke ulike klasser av insekticid for innendørs spraying, og bruk av 2 ulike insekticider i myggnett for å redusere risikoen for utvikling og spredning av mygg resistens. (WHO 2016).

Ingen forebyggende legemidler gir fullstendig beskyttelse mot malaria. Legemidler som atovakvon og proguanil virker i den exoerytrocyttiske syklusen. Andre legemidler som klorokin og meflokin hemmer formering av parasittene i erytrocyttfasen. Klorokin brukes mot parasitten *P. vivax*, mens meflokin brukes for klorokinresistente malariaparasitter. Kombinasjon av sulfadoksin og pyrimetamin ble mye brukt tidligere, men ble trukket fra det norske markedet i 1997 (FHI 2016).

Bruk av legemidler mot malaria har blitt endret under siste århundre hovedsakelig på grunn av resistensutvikling mot klorokin og andre suksessfulle legemiddelkombinasjoner. Monoterapi har derfor blitt fjernet og erstattet med artemisinin-basert kombinasjonsterapi som førstevalgs behandling mot alvorlig malaria (FHI 2016).

### 1.2.6 Tradisjonell medisin mot malaria

Tradisjonelle medisinske planter har blitt brukt for å behandle malaria i tusenvis av år, og forblir en hovedkilde til artemisin og kininderivater. Ifølge WHO er 80 % av verdens befolkning avhengig av primær helseomsorg basert på tradisjonell medisin. Den økende bruken av tradisjonell medisin i utviklingsland skyldes delvis den økende befolkningen, og for dyr og utilstrekkelig tilgang til moderne legemidler (Mohammed 2009).

Siden 1979 har Departement du Medicine Traditionelle i Mali arbeidet for å utvikle forbedrede tradisjonelle medisiner. Med forbedring menes farmakologisk bevis på sikkerhet og effektivitet, standardisert dose og kvalitetskontroll. En av disse forbedrede tradisjonelle medisiner er Malarial som brukes mot malaria.

Malarial er en standardisert fytomedisin som består av tre forskjellige plantearter, *Senna occidentalis*, *Lippia chevalieri* og *Acmella oleracea*. *S. occidentalis* brukes mot malaria og har vist in vitro effekt mot malariaparasitter. *L. chevalieri* er en aromatisk urt som brukes for å gi smak til te og behandle feber. *A. oleracea* har varierende bruk i tradisjonell medisin, blant annet som lokalanestetikum og antipyretisk. Planten inneholder spilanthol som er effektiv mot *P. falciparum*. Studier viste at Malarial ikke var veldig aktiv mot malariaparasitter i mus, men at den forlenget overlevelse av malariainfiserte dyr, og at den ikke var toksisk. Tre kliniske studier viste at Malarial var bedre tolerert og ga bedre effekt mot parasitter enn klorokin (Willcox et al. 2012).

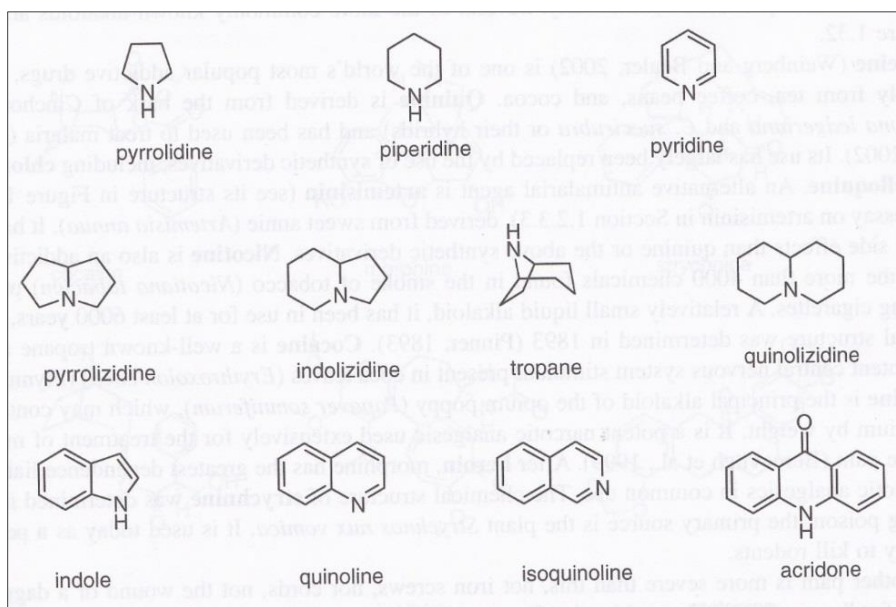
## 1.3 Naturstoffer

### 1.3.1 Alkaloider

Alkaloider er nitrogenforbindelser som er av enten plante- eller dyreopprinnelse. Ekte alkaloider er definert til å ha følgende fire betingelser; nitrogen bør være en del av en heterosyklisk ring, forbindelsen bør finnes i planteriket, strukturen bør være kompleks, og forbindelsen bør være assosiert med fysiologisk aktivitet. Disse betingelsene gjør at forbindelser som aminosyre, aminosukker, peptid, nukleinsyre ikke regnes som alkaloider. Forbindelser som ikke oppfyller betingelsen over eller kommer fra andre levende organismer, blir kalt for pseudoalkaloider. Naturlige forbindelser hvor nitrogen er i en amidgruppe kan også regnes som alkaloider (Kalsi et al. 2013).

#### *Klassifisering*

De fleste alkaloider er avledet fra aminosyrer, mens andre er dannet gjennom opptakelse av nitrogenatom i karbonskjelettet av polyketid, shikimat, og terpenoid opprinnelse. Alkaloider kan klassifiseres i grupper basert på nitrogen ringsystemet (Kalsi et al. 2013) som vist i figur 1.4.



Figur 1.4: Klasser av alkaloider (Cseke 2006)

### *Kilder og forekomst*

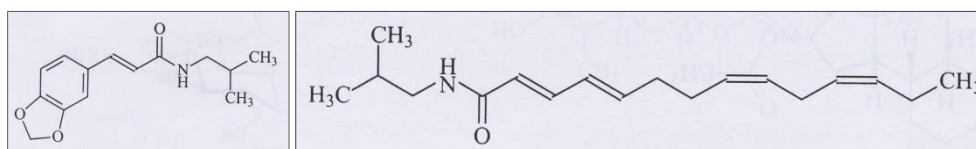
Alkaloider finnes i ca. 15 % av karplantene og i ca. 150 familier. Alkaloidene er bredt fordelt i høyere planter, spesielt tofrøbladete, som familiene Apocynaceae, Rutaceae, og Lauraceae. Alkaloider er normalt lokalisert i frø, blad, bark og rot av planten. På grunn av alkaloidenes basiske natur forekommer de stort sett som salter av organiske syrer (Kalsi et al. 2013).

### *Farmakologiske egenskaper*

Alkaloider i form av planteekstrakter har blitt brukt som medisiner, gift, og bedøvelsesmiddel. Mange legemidler som har vært brukt tidligere eller brukes i dag er alkaloidbaserte, eksempler på dette er koffein, kinin, nikotin, kokain og morfin (Cseke 2006). Flere studier har vist at flere naturlige alkaloider har in vitro effekt mot malaria, et eksempel på dette er kinin (Tringali 2001).

## **1.3.2 Alkamider**

Alkamider er naturlige forekommende amider, vanligvis av umettede syrer. De er funnet i minst 33 plantefamilier, inkludert Asteraceae, Solanaceae, Rutaceae og Piperaceae (Rios 2012; Tringali 2001).



Figur 1.5: Eksempler på alkamider, fagaramid (t.v.) og hazaleamid (t.h) (Tringali 2001).

### *Biologisk aktivitet*

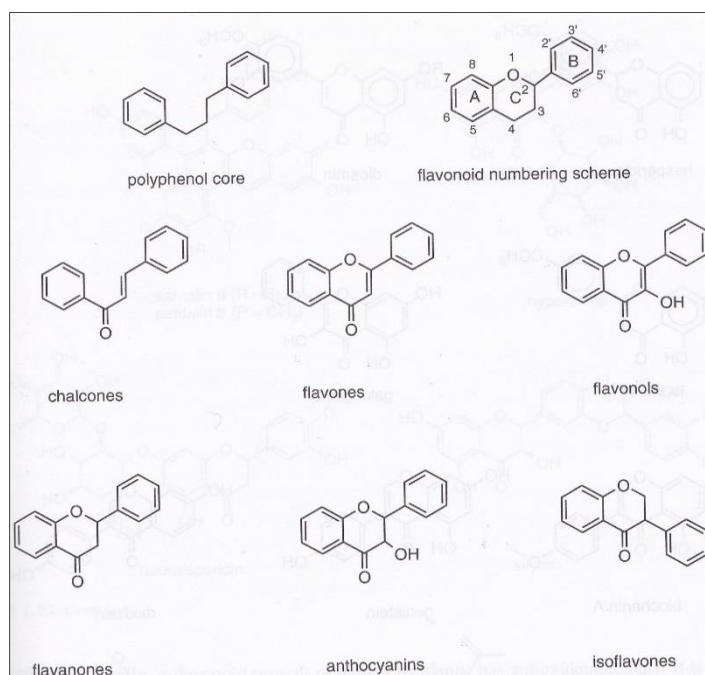
Alkamider har en rekke biologiske effekter, som immunmodulerende, antimikrobiell, antiviral, insekticid, diuretisk, analgetisk og antioksidant aktivitet. Mange plantearter som inneholder alkamider har blitt brukt i tradisjonell medisin, som f.eks. til behandling av tannsmertor og sår hals (Rios 2012). Fagaramid, isobutyl-2,4-dekadienamid (pellitorin), 2,4-oktadienamid, 2,4-dekadienamid og hazaleamid har vist beskjedne antamalariaeffekt in vitro (Tringali 2001).

### 1.3.3 Flavonoider

Flavonoider er en gruppe fenolforbindelser som finnes i planter. Forbindelsen består av en C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>-del som kommer fra shikimisyre, og en C<sub>6</sub>-del som kommer fra et polyketid (Tringali 2001).

#### Klassifisering

Ulike klasser har ulike strukturelle enheter på C2, C3 og C4 på aryl substituert benzopyran (Cseke 2006), se figur 1.6.



Figur 1.6: Klasser av flavonoider (Cseke 2006).

#### Kilder og forekomst.

Flavonoider er naturlig forekommende, vanligvis trisykliske, fenoler som finnes i ulike deler av planter som fri eller glykosylerte forbindelser. Flavonoider er plantemetabolitter som finnes i plantepigmenter (Kalsi et al. 2013).

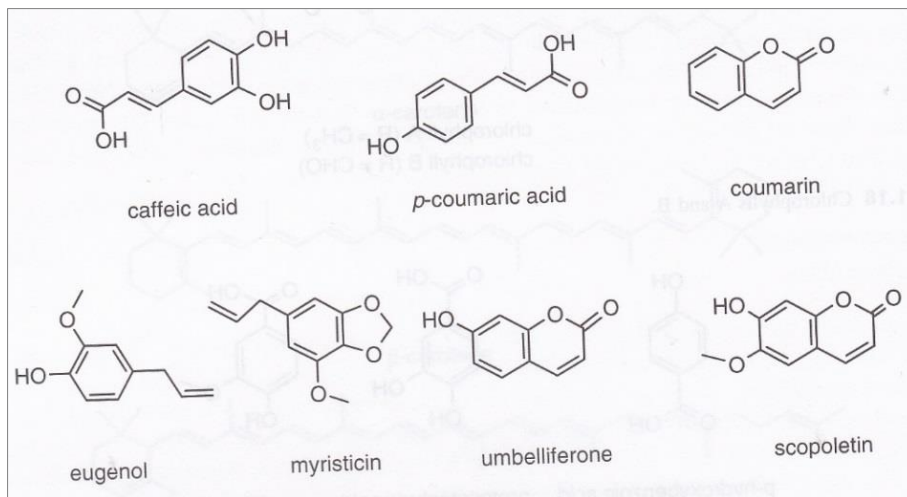
#### Biologisk aktivitet

Flere flavonoider er vist å ha antioksidantaktivitet, og det har vært foreslått at noen kan gi beskyttelse mot bestemte former av kreft. Studier har vist at noen flavonoider også har antimalariaaktivitet, hvor det er chalconer som har antiplasmodial virkning. Chalconet licochalcon A, isolert fra kinesisk lakrisrot, hemmet *in vitro* vekst av både klorokinsensitive og klorokinresistente parasitter av *P.falciparum* (Kalsi et al. 2013).



### 1.3.4 Fenylpropanoider (Kumarin, kaffesyre, lignan)

Fenylpropanoider er gruppe forbindelser som har en sidekjede med tre karbonatomer bundet til en aromaring, ofte en fenol. Eksempler er kumariner, fenylpropener, lignaner, og forskjellige hydroksykanselsyrer, som kaffesyre og kumarsyre (Cseke 2006).



Figur 1.7: Eksempler på fenylpropanoider (Cseke 2006).

Lignan er oppbygd av to  $C_6C_3$ -halvdel som er opprinnelig fra shikimisyre. Et neolignan niasol, er vist å hemme vekst av klorokinresistente og klorokinsensitive parasitter av *P.falciparum* (Tringali 2001).

Kumariner har et 2-oxobenzopyranskjelett. 5,6,7-Trimetoksykumarin og isofraxidin har vist in vitro antimalariaaktivitet, mens scopoletin og pectachol viste signifikant mindre aktivitet (Tringali 2001).

## **2 Materialer og metoder**

## 2.1 Materialer

### Kjemikalier

Kjemikalier	Produsent
Aceton	Chemi-Teknik AS, Oslo, Norge
Acetonitril HPLC-kvalitet	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Destillert vann	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Deuterert kloroform (CDCl <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Deuterert metanol (CD <sub>3</sub> OD)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Deuterert dimetylsulfoksid, DMSO-d <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Diklormetan (DCM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck, KGaA, Darmstadt, Tyskland
Ceric (1% Ceric(IV)sulfat i 10% svovelsyre)	Merck, KGaA, Darmstadt, Tyskland
Etylacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Etanol	Arcus, Oslo, Norge
Kloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Metanol HiPerSolv Chromanorm for HPLC	VWR Chemicals (Prolabo), Darmstadt, Tyskland
Nitrogengass	AGA, Oslo, Norge
Podofyllotoksin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Silika gel PF254 containing gypsum (nr.7749)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Tetrametylsilan (TMS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Trifluoredikksyre (TFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Sephadex <sup>TM</sup> LH-20 gel	Pharmacia, Biotech, Uppsala, Sverige

### Apparatur

Apparatur	Produsent
<b>Inndamping</b>	
Edwards E-LAB 2 oljepumpe	Edwards High Vacuum Int., Crawley, England
Rotavapor med varmebad HB10/RV10	IKA, Staufen, Tyskland
miVac vakuumsentrifuge	Genevac, Ipswich, England
<b>HPLC, analytisk</b>	
Elite LaChrome Hitachi Autosampler 1-2000	Tokyo, Japan
Elite LaChrome Hitachi Diodearray detector	Tokyo, Japan
Elite LaChrome Hitachi Kolonne ovn 1-2300	Tokyo, Japan
Elite LaChrome Hitachi Organizer	Tokyo, Japan

Elite LaChrome Hitachi Pumpe 1-2130	Tokyo, Japan
Chromolith RP-18e 100x4.6 mm kolonne	Merck, KGaA, Darmstadt, Tyskland
Kinetex 5u C18 100A, 150x 4,6 mm kolonne	Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA
<b>HPLC, preparativ</b>	
Varian Prostar detektor, modell 210 pumpe	Palo, Alto, California, USA
Chromolith Semiprep RP-18e (100x10 mm kolonne)	Merck, KGaA, Darmstadt, Tyskland
Kinetex 5u C18 100A AXIA (150x21,2 mm kolonne)	Phenomenex Onc. Torrance, CA, USA
<b>NMR-spektroskopi</b>	
Bruker AV II 400	Rheinstetten, Tyskland
Bruker AV III 400	Rheinstetten, Tyskland
Bruker AV 600	Rheinstetten, Tyskland
<b>Sentrifugalt akselerert kromatografi</b>	
Chromatotron™ modell 7924T	Harrison Research, Palo Alto, CA, USA
Silika Gel PF.254 gipsholdig, Merck 7749	Merck, Darmstadt, Tyskland
<b>Vekt</b>	
Sartorius BP 221S	Sartorius, Goettingen, Tyskland
Sartorius ED224S	Sartorius, Goettingen, Tyskland
<b>Versaflash kolonnekromatografi</b>	
Kromatografi pumpe Bushi 681	Flawil, Sveits
Versapak C18-kolonne (40 x150mm)	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Versapak™ C18-kolonne (23 x110mm)	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Versapak™ silika-kolonne (80 x110mm)	Supelco, Bellefonte, PA, USA
<b>Diverse</b>	
Minerallight lamp modell UVGL-58 (UV-lampe)	Upland, California, USA
Ultrasonic cleaner (ultralydbad)	VWR, Leuven, Belgia

## 2.2 Generelle metoder

---

### Innveiging

Det ble brukt overskålsvekt ved innveiging av store mengder ( $>10$  g) og analysevekt ved innveiging av små mengder ( $<10$  g).

### Inndamping

Løsemidler i ekstrakter, fraksjoner og delfraksjoner ble dampet til tørrhet på rotavapor under vakuum, og resterende løsemidler ble fjernet ved bruk av oljevakuumpumpe i 5-60 min. Noen av delfraksjonene ble også dampet til tørrhet i en vakuumsentrifuge. Temperaturen på rotavapor og vakuumsentrifuge var  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  for de fleste løsemidler, mens  $50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$  ble benyttet for vannholdige løsemidler.



Figur 2.1: Fra venstre; Rotavapor, vakuumsentrifuge, og oljepumpe ved FI.

### Vannkvalitet

Det ble benyttet destillert vann fra Millipore-reanseanlegg til alle metoder.

## 2.3 Separasjonsmetoder

### 2.3.1 Soxhlet ekstraksjon med organiske løsemidler

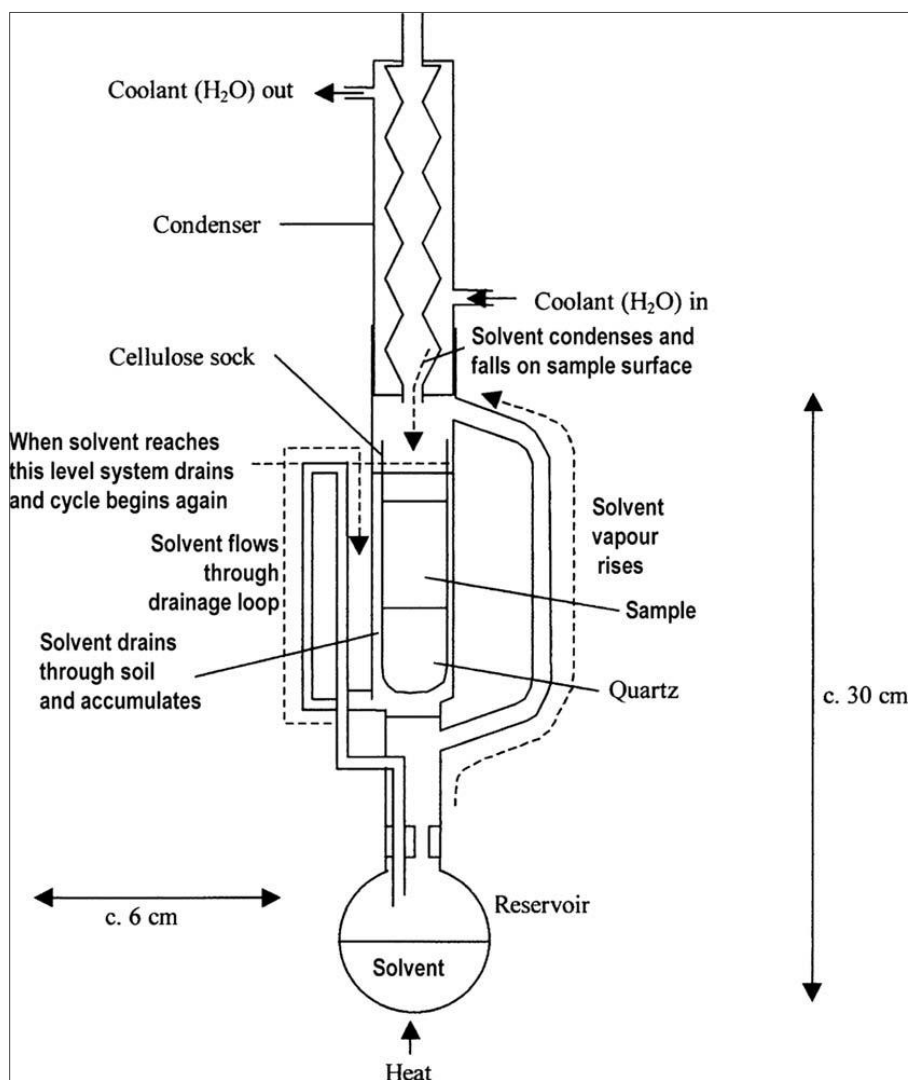
Før prosessen med isolering og rensing av stoffer kan starte, må naturproduktene ekstraheres fra planten (Sarker et al. 2012). I denne oppgaven ble det brukt Soxhletekstraksjon. Soxhlet apparaturen er basert på ekstraksjon av fast fase med væske og ble oppfunnet i 1879, teknikken har siden blitt mye brukt til ekstraksjon av naturprodukter fra planter. Soxhletekstraksjon er en veletablert metode som gir større utbytte enn andre konvensjonelle ekstraksjonsmetoder, men som ikke er egnet for termolabile stoffer (Rostagno et al. 2013).

#### *Prinsipp*

Oppsetting av en typisk Soxhlet apparatur er vist i figur 2.3. Plantematerialet blir plassert i en hylse lagd av tykt filterpapir, eller fra glass med porøs glassmasse. Hylsen settes i et ekstraksjonskammer av glass som ligger over en kolbe med løsemiddel og under en kondensator. Når løsemidlet kokes, fylles gradvis ekstraksjonskammeret med kondensert løsemiddel fra kolben til den når et maksimumsnivå. Løsemidlet med de oppløste ekstraherte komponentene blir skylt tilbake til kolben gjennom en hevert, til hylsen blir tom for løsemiddel. Denne syklusen gjentas vanligvis hver 10-15 min. Komponentene som ønskes ekstrahert fra plantematerialet må ha en lavere flyktighet enn løsemidlet slik at den videre ekstraksjon foregår med rent løsemiddel. På denne måten blir de oppløste komponentene liggende igjen i kolben, mens rent løsemiddel blir fordampet og plantematerialet i hylsen blir på nytt fylt med løsemiddel (Rostagno et al. 2013).



Figur 2.2: Et Soxhlet apparat ved FI.



Figur 2.3: Oppsetting av et typisk Soxhlet system (Rostagno et al. 2013).

### Valg av løsemiddel

Et egnet løsemiddel velges på bakgrunn av polaritetsprinsippet, at «likt løser likt». Selektive ekstraksjoner kan oppnås ved å bruke løsemidler med økende polaritet, og en tilnærmet total ekstraksjon kan oppnås ved å bruke alkoholer som løsemiddel som har evnen til å øke cellevegg permeabilitet, og dermed gi ekstraksjon av både polare og medium- til lavt polare komponenter. Toksiske løsemidler som benzen og karbon tetraklorid bør ikke brukes. Både dietyleter og alifatiske hydrokarboner er veldig brannfarlige, og bør derfor unngås. Diklormetan er mindre toksisk enn kloroform, og er derfor foretrukket fremfor kloroform. Aceton kan føre til at det dannes artefakter under sure betingelser. Metanol, diklormetan, og kloroform kan også produsere artefakter. Ikke polare løsemidler kan ekstrahere lipofile forbindelser som, alkaner, fettsyrer, voks, steroler, samt lipofile terpenoider, alkaloider og kumariner. Medium-polare løsemidler kan løse forbindelser med mellomliggende polaritet som alkaloider og flavonoider. Polare løsemidler

er brukt for mer polare forbindelser som flavonoidglykosider, tanniner (hydrolyserbare) og noen alkaloider (Sarker et al. 2012).

### *Praksis*

En Soxhlet-ekstraksjon kan ha en varighet opptil 72 timer. Vanligvis brukes 2,5-5 l løsemiddel for en bulkekstraksjon. Etter fullført ekstraksjon bør løsemidlet fjernes umiddelbart for å unngå tap av ustabile forbindelser i løsning (Sarker et al. 2012).

### **Prosedyre**

#### *Utstyr:*

Soxhlet ekstraksjonskammer (2 l)

Kondensator (kjølerør 250 mm)

Varmemantel

Rundkolbe (5 l)

Papphylse og glassull

Diverse: topp for Soxhlet, gummiring, fester, lang tut

#### *Reagenser:*

Diklormetan

Metanol

1. Oppsats for Soxhletekstraksjon settes opp som vist på figur 2.3
2. Kjølevannsslanger kobles til kjøleren (inngang nederst, utgang øverst).
3. Pulverisert plantemateriale settes i papphylsen og dekkes med glassull.
4. Løsemiddel tilsettes (ca. 3 l) i Soxhlet kammeret og i rundkolben.
5. Kjølevann og varme slås på. Temperaturen reguleres slik at det blir en stabil koking.
6. For hver plantedel og hvert løsemiddel ble det brukt en ekstraksjonstid på ca. 10 timer.



## 2.3.2 Kromatografiske metoder

Ekstrakter er komplekse og vil inneholde flere ulike klasser av kjemiske forbindelser. For å få rene forbindelser kreves det egnede isolering- og rensemetoder (Rostagno et al. 2013). I denne oppgaven ble det brukt kromatografiske metoder som Sephadex™ LH20 gelkromatografi, Versaflash™ kolonnekromatografi, tynnsjikt-kromatografi (TLC) og høytrykksvæskekromatografi (HPLC).

### *Prinsipp*

Kromatografi er den mest brukte separasjonsmetode, hvor stoffene i en blanding blir separert som følge av ulikheter i stoffenes fordeling mellom en fase som beveger seg (mobilfase) og en fase som står i ro (stasjonærfase). I væskekromatografi er mobilfasen en væske, og stasjonærfasen består typisk av porøse partikler med aktive grupper på overflaten. Når mobilfasen transporterer stoffene gjennom stasjonærfasen, kan det oppstå interaksjoner mellom stoffene og aktive grupper på overflaten i stasjonærfasen. Jo sterkere interaksjonen er, desto større vil retensjonen bli. Separasjon av stoffer kan dermed skje ved at stoffer retarderes forskjellig. Separerte stoffer vil komme ut av stasjonærfasen i ulike tider og stoffene kan dermed samles opp i fraksjoner. I væskekromatografi skilles det ofte mellom normalfasekromatografi, omvendt-fase-kromatografi og eksklusjonskromatografi. (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).

### *Normalfasekromatografi*

I normalfasekromatografi har stasjonærfasen polare grupper på overflaten og mobilfasen er organiske løsemidler. Dermed er stasjonærfasen mer polar enn mobilfasen, og stoffene retarderes av polare interaksjoner. Den viktigste stasjonærfasen i normalfasekromatografi er silikagel som har et stort overflateareal på grunn av dets porøse materiale. På overflaten av silika ligger det silanolgrupper (Si-OH) som gjør at overflaten er polar og svakt sur. Mellom silanolgrupper kan det dannes hydrogenbindinger, som kan føre til at styrken på interaksjoner med andre stoffer i prøven vil variere etter hvilken silanolgruppe de gir interaksjon med. Dette kan løses ved å tilsette små mengder av vann, amin eller syre til mobilfasen for å maskere de meste aktive gruppene på overflaten av silika. Ulike stoffer separeres etter styrken av interaksjoner med silika. Aminer og karboksylsyrer retarderes sterkest på silika på grunn av sterke hydrogenbindinger. Deretter kommer alkoholer og fenoler som også danner hydrogenbindinger med silika. Stoffet

med karbonylgrupper er sterkere dipoler enn etere, og etere gir sterkere interaksjoner enn aromater som danner dispersjonsinteraksjoner med silika (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).

#### *Omvendt-fase-kromatografi*

I omvendt-fase-kromatografi består stasjonærfasen av upolare grupper på overflaten, og mobilfasen er polare/ vannholdige løsemidler. Dermed er stasjonærfasen mindre polar enn mobilfasen, og stoffene retarderes av hydrofobe interaksjoner. Den mest brukte stasjonærfasen i omvendt-fase-kromatografi er silikabasert C18-materiale. Jo mindre hydrofobt stoffet er, jo mindre retensjon blir det. De viktigste hydrofobe kreftene er van der Waals-krefter som er relativt svake krefter som øker med molekylstørrelsen. Umettede forbindelser har vanligvis mindre retensjon enn mettede forbindelser. Retensjonen avtar også med økende ionisering av ioniserbare funksjonelle grupper. Mobilfasen består vanligvis av en blanding av vann og organiske løsemidler som er blandbare med vann, for eksempel metanol eller acetonitril (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).

#### *Eksklusjonskromatografi*

I eksklusjonskromatografi separeres stoffer etter molekylstørrelse. Stoffene må være løselige i mobilfasen, og stasjonærfasen med kontrollert porestørrelse skal være inert og ikke gi interaksjoner med stoffene. Når stoffene transporteres med mobilfasen gjennom en kolonne med stasjonærfase, vil stoffer som er for store til å vandre inn i porene, bli transportert gjennom kolonnen på utsiden av partiklene med samme hastighet som mobilfasen. De minste stoffmolekylene transporteres av mobilfasen inn i de minste porene av partiklene, og har en mye lengre vei gjennom kolonnen enn stoffene som ikke går inn i porene. De største molekylene får kortest retensjon og retensjonen øker ettersom molekylene blir mindre og penetrerer lettere inn i porene (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).

### 2.3.3 Sephadex™ LH-20 gel kolonnekromatografi

Sephadex™ gel er et pakkematerialmerke som brukes til lavtrykks væskekolonnekromatografi (LPLC) basert på eksklusjonskromatografi (se avsnitt 3.3.2). Sephadex™ LH-20 gel er den mest brukte pakkemateriale for separasjon av små hydrofobe naturstoffer fra større kontaminanter som klorofyll, karotener, fettsyrer og glyserider. Sammenlignet med høytrykksvæskekolonnekromatografi (HPLC) gir LPLC lavere oppløsning, mindre separasjon og lengre elueringstid. Metoden blir derfor vanligvis kun brukt for separasjon av stoffer fra rå ekstrakter og kan gi et stort antall av fraksjoner (Rostagno et al. 2013).

#### *Prinsipp*

I Sephadex™ LH-20 kromatografi blir stoffene separert etter molekulstørrelse, dette kalles eksklusjonskromatografi (se avsnitt 3.3.2).

Mobilfasen tilsettes på toppen av en åpen kolonne, og ved hjelp av tyngdekraften flyter mobilfasen naturlig nedover. Egnet løsemiddel kan brukes til å øke kapasiteten, og en utløpsventil kan kontrollere flowhastigheten av mobilfasen. Sephadex™ er laget ved å krysslinke vannløselig dekstran med epiklorohydrin, som gir et tredimensjonalt nettverk. Sephadex™ LH-20 er en hydroksypropylert form av Sephadex™ G-25, som gir gelen lipofile egenskaper i tillegg til hydrofile egenskaper. Dette gjør at gelen sveller i organiske løsemidler, og tillater dermed separering av stoffer som er løselig i organiske løsemidler. Sephadex™ LH-20 er derfor et av de mest brukte pakkematerial for separering av ikke-polare og medium-polare stoffer. Gelen kan ha uvanlig affinitet til blant annet fenoler og heteroaromater som gjør at retensjonen blir sterkere enn forventet basert på molekulvekt, spesielt ved bruk av lavere alkohol som løsemiddel. Gelen som består av polysakkarider tåler ikke sterke syrer (Sarker et al. 2012).



Figur 2.4: Sephadex™ LH-20 kolonne ved FI.

## Prosedyre

### *Utstyr:*

Sephadex™ LH-20 gel

Kolonne med ventil

Diverse: stativ, erlenmeyerkolbe, glass Pasteurpipette, glassull, glasstrakt.

### *Reagenser:*

Metanol

Destillert vann

1. Kolonnematriks, Sephadex® LH-20 gel, suspenderes og svelles i egnet starteluent.
2. Kolonnen monteres loddrett på stativet og glassull legges i bunnen av kolonnen, som vist på figur 2.4
3. Kolonnen fylles med opp svellet kolonnematriks. Eventuelle ujevnheter eller luft i pakkematerialet kan fjernes ved å røre i materialet.
4. Glassull legges på toppen av kolonnematriksen, og skilletrakt med elueringsmiddel monteres over kolonnen.
5. Kolonnen kondisjoneres med starteluent.
6. Prøven løses i egnet løsemiddel og appliseres på toppen av kolonnen ved å bruke en pipette, for å sikre en jevn fordeling i kolonnematerialet.
7. Etter hvert som molekylene elueres ut av kolonnen samles fraksjonene opp i egnede mottaksglass.
8. Kolonnen vaskes med 100 % metanol, eventuelt også med 70% vandig aceton, for å skylle ut eventuelle rester.

### 2.3.4 Versaflash™ kolonnekromatografi

#### *Prinsipp*

Versaflash™ kolonnekromatografi er en type lav-trykks væske kolonnekromatografi (LPLC) som er basert på normalfase-kromatografi eller omvendt-fase-kromatografi (se avsnitt 3.3.2). I Versaflash™ kromatografi er partikkelstørrelsen av pakkematerialet på 40-60 µm, og trykk tilføres på toppen av kolonnen ved hjelp av en pumpe for å øke elueringshastigheten og oppnå bedre separasjon (Rostagno et al. 2013).



Figur 2.5: Versaflash™ kolonnekromatografi med pumpe ved FI.

#### **Prosedyre**

##### *Utstyr:*

Versapak® C<sub>18</sub>-kolonne

Kromatografipumpe og Versaflash™ stativ

Diverse: glass til mottak av fraksjoner, begerglass, sprøytefilter, sprøyte, målesylinder.

##### *Reagenser:*

Metanol

Destillert vann

Aceton

1. Kolonnen og diverse utstyr settes opp som vist på figur 2.5. Når pumpen slås på, pumpes mobilfasen ut fra et reservoar og gjennom kolonnen via pumpen. Det må alltid være tilgjengelig løsemiddel, slik at det ikke luft påføres kolonnen når pumpen er på.
2. Kolonnen vaskes med metanol tilsvarende et fuktevolum av kolonnen.
3. Kolonnen kondisjoneres med en mengde starteluent som tilsvarer tre ganger fuktevolum.
4. Prøven løses i en liten mengde (1-3 ml) med egnet løsemiddel, helst lik starteluent.
5. Plastsprøyte uten stempel med filter setter øverst på kolonnen. Prøveløsningen overføres til plastsprøyten, stempelet settes på og prøveløsningen blir applisert på kolonnen.
6. Egnede mobilfaser med økende løsemiddelstyrke i en passende mengde tilsettes til løsemiddelreservoaret, for å eluere ut alle stoffer.
7. Fraksjoner samles opp.
8. Kolonnen vaskes med en mengde 100 % metanol som tilsvarer 3 ganger fuktvolum.

### 2.3.5 Tynnsjikt-kromatografi (TLC) og Ceric-spraying

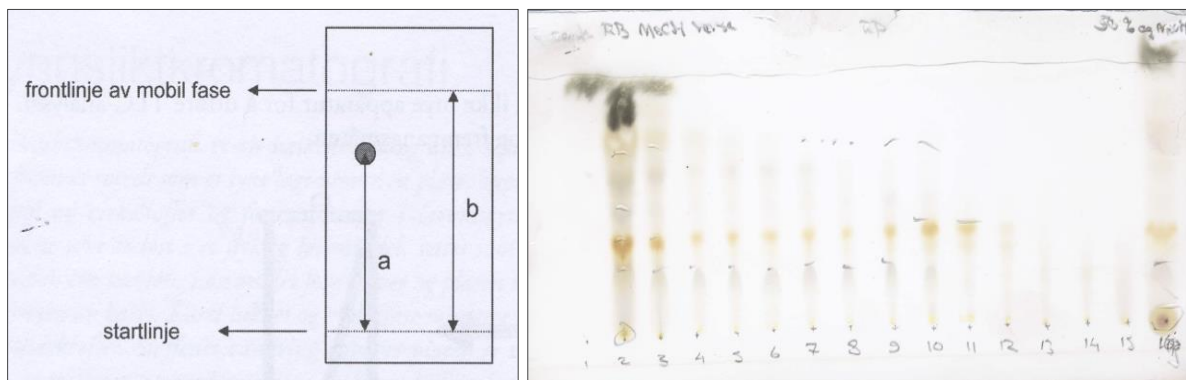
Tynnsjikt-kromatografi (TLC) er en væske-kromatografisk separasjonsmetode hvor stasjonærfasen er spredt som et tynt lag utover en plate. Metoden er basert på normalfase-kromatografi eller omvendt-fase kromatografi (se avsnitt 3.3.2). Fordelen med metoden i tillegg til at den er billig og enkel å utføre, er at alle komponentene i prøven vises, også stoffer med sterk interaksjon til stasjonærfasen. Ulempen med TLC er at deteksjonsgrensene er mye dårligere enn for andre separasjonsmetoder som HPLC, og lettflyktige stoffer kan ikke analyseres fordi de kan fordampe ved påsetting av prøven og under utviklingen av kromatogrammet (Pedersen-Bjergaard et al. 2004). I denne oppgaven ble det både brukt analytisk og preparativ TLC.

#### *Prinsipp*

Prøvene som er løst i et flyktig løsemiddel, appliseres som flekker på platen parallelt med den nederste kanten. Løsemidlet fordampes og platen settes i et kar mettet med mobilfase og hvor mobilfasenivået står under de appliserte prøvene slik at de ikke skylles ut i mobilfasen. Karet lukkes og mobilfase migrerer oppover platen ved hjelp av kapillærkrefter. Stoffenes vandring oppover platen er styrt av deres fordeling mellom mobilfase og stasjonærfase, avhengig om det er normalfase- eller omvendt-fase-kromatografi (se avsnitt 3.2.2). Når mobilfase har vandret et bestemt stykke opp mot toppen av platen, tas platen opp og mobilfasen fordampes av. Fargede stoffer er umiddelbart synlige, mens stoffer som absorberer UV-lys eller fluorescerer kan påvises ved belysning med UV-lampe. Platen kan også sprayes med reagens som reagerer med stoffene og danner fargede forbindelser (Pedersen-Bjergaard et al. 2004). Et eksempel på et slikt reagens er Ceric spray som består av cerium(IV)sulfat som har evnen til å oksidere stoffer (Le et al. 2012).

#### *Retensjonsfaktor ( $R_f$ )*

Retensjonen av stoffene på platen kan angis som retensjonsfaktor,  $R_f$ .  $R_f$ -verdien defineres som  $R_f = a/b$ , hvor  $a$  er avstanden fra startlinjen til midten av flekken og  $b$  er avstanden mellom startlinjen og frontlinjen av mobilfase som vist i figur 2.6. Stoffer med sterkest interaksjon med stasjonærfasen retarderes mest og har lavest  $R_f$ -verdi (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).



Figur 2.6 Parametere til bestemmelse av stoffet  $R_f$ -verdi (t.v.), og et eksempel på en TLC-plate etter Ceric-spray ved FI (t.h.).

### *Valg av TLC-plate*

TLC-plater kan bestå av glass, plast eller metall, hvor de brukes som underlag for sjiktet av stasjonærfase. For normalfasekromatografi benyttes plater belagt med et sjikt av ren silika (TLC-silikagel) som kan være tilblandet fluorescensindikatorer (TLC-silikagel F<sub>254</sub>), eller tilblandet gips som bindemiddel for å gjøre sjiktet sterkere (TLC-silikagel G og TLC-silikagel GF<sub>254</sub>). For omvendt-fase-kromatografi benyttes plater belagt med et sjikt av silanisert silika (TLC-silikagel silanised, TLC-silikagel F<sub>254</sub> silanised). Når en plate med fluorescensindikatorer bestråles med UV-stråling, fluorescerer indikatoren i sjiktet og platene skinner med en gulgrønn farge. Stoffer som absorberer UV-stråling, hindrer indikatoren i å fluorescere og fremstår som mørke flekker mot den fluorescerende bakgrunnen. For å påvise stoffer som fluorescerer benyttes TLC-plater uten fluorescensindikator. Fluorescerende stoffer påvises som lysende flekker på platen når den bestråles med UV-stråling (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).

### *Valg av mobilfase*

Mobilfaser til normalfasekromatografi er vanligvis et organisk løsemiddel eller en blanding av organiske løsemidler, og for omvendt-fase-kromatografi benyttes vandige løsninger av organiske løsemidler som er blandbare med vann (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).

## Prosedyre for preparativ TLC

### *Utstyr:*

Elueringskar med tett lokk  
TLC-plate av glass  
UV-lampe med lyskasse  
Pasteurpipette  
Objektglass

### *Reagenser:*

Metanol  
Destillert vann  
Etylacetat  
Aceton  
Diklormetan

1. Egnet mobilfase overføres til et elueringskar. Lokket settes på i 10-15 min for å sikre en mett atmosfære av mobilfase i karet.
2. TLC-platen av glass merkes med en vannrett linje med blyant hvor prøven skal påføres. Merkingen skal være ca. 2 cm fra nedre kant.
3. Prøven løses i et flyktig løsemiddel, og appliseres på oppmerket linje med en Pasteurpipette. Er det mye prøve, så bør den påføres i flere omganger oppå den merkede linjen med avdamping av løsemiddel ved lufttørking mellom hver påsetting.
4. Platen settes i elueringskaret med prøvekannten nederst. Høyden av mobilfasen i karet må være lavere enn høyden på applisert prøven på TLC-platen. Lokket settes på.
5. Når mobilfasen nærmer seg toppen av TLC-platen, tas den ut av karet, og væskefronten merkes av med blyant. Mobilfasen dampes av ved lufttørking.
6. Fargede stoffer er synlige, mens UV-absorberende eller langbølgefluorescerende stoffer påvises med UV-lys ved 254 eller 366 nm. Påviste separerte områder på platen markeres med blyant.
7. Ønskede komponenter skrapes av glassplaten med et objektglass. Forbindelsene ekstraheres fra adsorbenten ved å løse med egnet løsemiddel og filtreres fra silikagel.



## Prosedyre for analytisk TLC

### *Utstyr:*

Elueringskar med tett lokk  
TLC-plate  
Påvisningsskap med UV-lampe  
Mikropipette (10 µl)

### *Reagenser:*

Metanol  
Destillert vann  
Etylacetat  
Aceton  
Diklormetan

1. Egnet mobilfase lages og overføres til et elueringskar. Lokket settes på i 10-15 min for å sikre en mett atmosfære av mobilfase i karet.
2. Punkter merkes på TLC-platen hvor prøvene skal påføres. Merkingen skal være ca. 2 cm fra nedre kant, med minst 1 cm avstand mellom hver prøve.
3. Prøvene løses i et flyktig løsemiddel og appliseres på oppmerkede punkter på platen med en mikropipette (10 µl). Løsemidler dampes av ved lufttørking etter applisering.
4. Platen settes i elueringskaret med prøvekannten nederst. Høyden av mobilfasen i karet må være lavere enn høyden på de appliserte prøvene på TLC-platen. Lokket settes på.
5. Når mobilfasen nærmer seg toppen av TLC-platen, tas den ut av karet, og væskefronten merkes av med blyant. Mobilfasen dampes av ved lufttørking.
6. Fargede stoffer er synlige, mens UV-absorberende eller langbølgefluorescerende stoffer påvises med UV-lys ved 254 nm eller 366 nm. Andre stoffer kan påvises ved behandling med fargereagens, eks. Ceric-spraying (se neste avsnitt). Påviste flekker merkes med blyant.

## Prosedyre for Ceric-spraying av TLC plate

### *Utstyr*

TLC-sprayer  
Varmeskap  
Avtrekksskap

### *Kjemikalier*

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

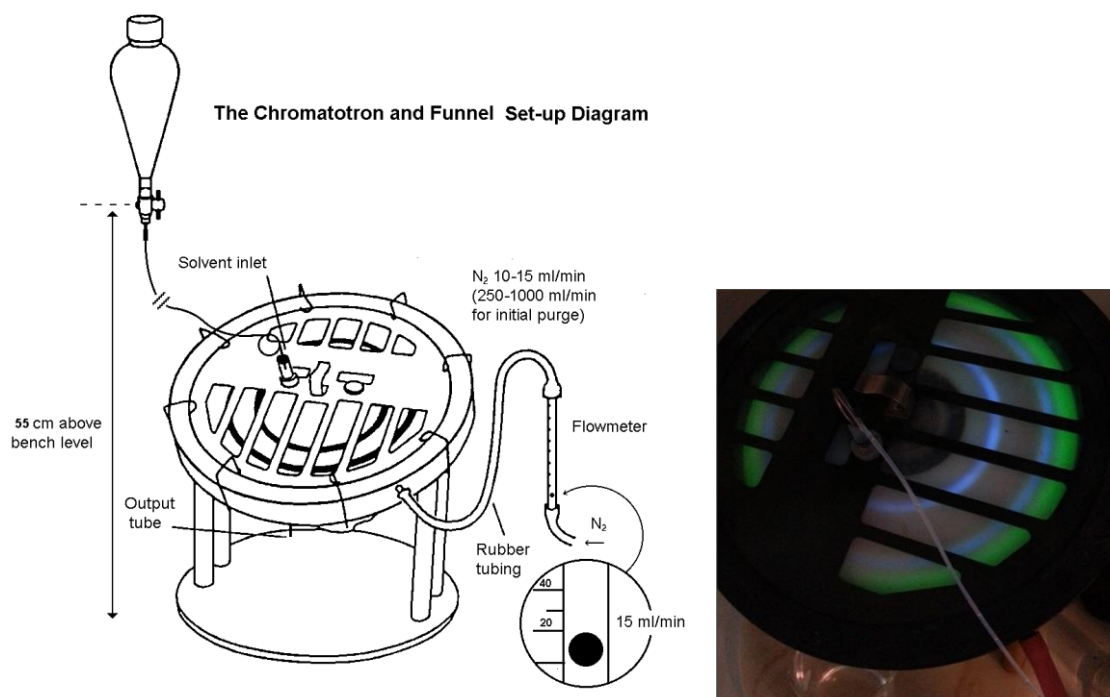
1. Etter kromatografering og avdamping av mobilfasen sprayer TLC-platen jevnt med Ceric-reagens i avtrekksskap.
2. TLC-platen plasseres i varmeskap i 10-15 min ved ca. 105 °C for at reaksjonen skal skje raskere.
3. Resultatet avleses visuelt, og synlige flekker merkes av med blyant.

### 2.3.6 Sentrifugal akselerert preparativ tynnsjikt-kromatografi - Chromatotron™

Chromatotron™ er et instrument for preparativ sentrifugalt akselerert tynnsjikt-kromatografi, som kan erstatte preparativ TLC, kolonnekromatografi på små kolonner eller HPLC. Fordelen med metoden er at det gir rask (20-60 min) og effektiv separasjon. I tillegg er apparatet billig i forhold til en preparativ HPLC. Ulempen med denne metoden er den kun brukes til normalfasekromatografi fordi stasjonærfasen må være av silikagel, og omvendt-fase-kromatografi er derfor ikke mulig å utføre (Harrison 2014).

#### Prinsipp

Chromatotron™ systemet består av en rund plate med stasjonærfase av silika og bindemiddelet gips. Prinsippet baserer seg dermed på normalfasekromatografi (se avsnitt 3.3.2). Platen blir festet til en rotor og rotert rundt i en konstant hastighet. For å hindre oksidasjon av stoffene på platen skjer separasjonen i nitrogenatmosfære. Prøveløsningen tilsettes i midten på platen. Mobilfasen vil migrere gjennom prøveløsningen og trekke stoffene ut mot kanten ved hjelp av sentrifugalkrefter og kapillærkrefter. Ettersom forbindelsene i prøveløsningen retarderes ulikt av stasjonærfasen, vil det dannes sirkulære bånd av separerte stoffer på platen som kan samles opp i fraksjoner. Disse sirkulære båndene kan påvises direkte på platen ved å bruke UV-lys (Harrison 2014; Sarker et al. 2012).



Figur 2.7: Fra venstre; Oppsetting av et Chromatotron™ system (Harrison 2014) og et eksempel på påvisning av sirkulære bånd på platen ved å bruke UV-lys ved FI.

## Prosedyre

### *Utstyr:*

Chromatotron<sup>TM</sup> og diverse tilhørende utstyr  
Plater med silikagel til Chromatotron<sup>TM</sup>, 1-2 mm tykt lag  
Glass til mottak av fraksjoner  
UV- lampe

### *Reagenser:*

Nitrogengass  
Etylacetat  
Diklormetan  
Metanol

1. Silikaplater lages etter produsentens manual. Tykkelsen på platen er avhengig av mengde prøve som skal tilsettes.
2. Apparatet og utstyret settes opp som vist på figur 2.7 og platen monteres på. Apparatet og tilførsel av nitrogengass slås på.
3. Platen kondisjoneres med egnet starteluent.
4. Prøveløsningen appliseres i sentrum av den roterende platen, og egnede mobilfaser tilføres på samme måte. Påsatte stoffer migrerer til ytterkant av platen, slynges av og renner ut gjennom åpningen nederst.
5. Eluert prøveløsning samles i prøveglass.

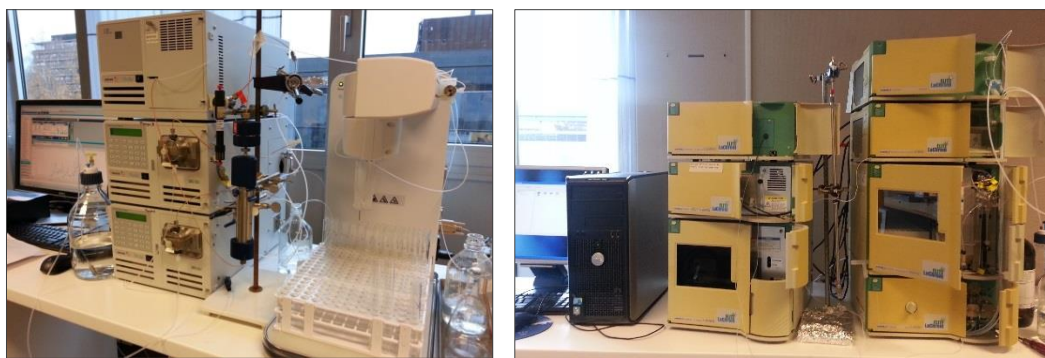
## 2.3.7 Høytrykksvæskekromatografi (HPLC)

Høytrykksvæskekromatografi (HPLC) blir brukt både som analytisk og preparativ separasjonsmetode. Målet med analytisk HPLC er å få informasjon om stoffer i prøven, mens med preparativ HPLC (prep. HPLC) er målet å isolere stoffer fra prøven. Ofte blir analytisk HPLC utført på en liten mengde prøve for å utvikle en passende metode (blant annet mobilsammensetning) som kan videre brukes i prep. HPLC (Rostagno et al. 2013). Ved sammenligning med lavtrykk kolonnekromatografi, har prep-HPLC flere fordeler. Mindre partikkelstørrelse og større overflateareal gjør at det blir bedre oppløsning og separasjon av stoffer i en blanding. I tillegg kan systemet kobles til flere detektorer som UV-detektor, diode-array, brytningsindeks og fluorescens (Rostagno et al. 2013).

### *Prinsipp*

Hovedkomponentene i prep. HPLC er det samme som i analytisk HPLC. Systemet består av reservoar for mobilfase, pumpe, injektor, kolonne, detektorer, pc og skriver. I tillegg har prep-HPLC også en fraksjonssamler (se figur 2.8). Pumpen suger mobilfase fra et reservoar og presser

den gjennom en kolonne pakket med et pakkemateriale som typisk består av 3-5µm silikapartikler med en hydrofil eller hydrofob overflate. Separasjonsprinsippet er enten omvendt-fase-kromatografi, normalfasekromatografi eller eksklusjonskromatografi (se avsnitt 1.2.2). I en isokratisk eluering har mobilfasen samme sammensetning, mens i en gradient eluering økes styrken på mobilfasen under analysen ved å bruke flere pumper samtidig. Prøveløsningen injiseres via en injektor inn i mobilfasen før kolonnen. Stoffene som elueres fra kolonnen, detekteres av en detektor, og resultatet skrives ut som kromatogrammer. I kromatogrammet blir det rapportert retensjonstider, topphøyder og topparealer som evt. kan sammenlignes med referansekromatogrammer. Den mest brukte detektoren er UV-detektor (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).



Figur 2.8: Preparativ HPLC system (t.v.) ved og analytisk HPLC system (t.h.) ved FI.

### *Valg av mobilfase*

Mobilfaser skal ikke inneholde urenheter som gir detektorrespons eller som reduserer levetiden på kolonnen. I tillegg skal løsemidlene være lite toksiske, lite brennbare, ikke reaktive, og egnet til destruksjon etter bruk. Løsemidler som benyttes i omvendt-fase-kromatografi som vann, metanol og acetonitril har lavest «UV-cutoff», og kan brukes ved bølgelengder over 205 nm. Med «UV-cutoff» menes den laveste bølgelengden som kan benyttes sammen med løsemiddelet. Siden disse løsemidlene også er relativt lite toksiske og har lav viskositet, er det foretrukket å bruke omvendt-fase-kromatografi som separasjonsprinsipp i HPLC. Gradienteluering bør brukes for å separere stoffer med stor forskjell i retensjon (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).

### *UV-detektor*

I et UV-spekter registreres absorpsjonene til stoffene som funksjon av bølgelengde. Forskjellige stoffer har vanligvis forskjellige UV-spektre, men flere ulike stoffer kan ha omtrent samme UV-spektre. Absorpsjon fra elektroner i enkeltbindinger finnes kun ved bølgelengder under 200 nm, hvor strålingen inneholder mye energi. Det er ikke vanlig å måle ved bølgelengder under 200 nm, og elektroner i enkeltbindinger bidrar derfor normalt ikke til absorpsjonene som vises i et UV-spekter. Elektroner i dobbelt- eller trippelbindinger som sitter mye løsere, krever mindre energi for å eksiteres, og vil derfor gi bidrag til absorpsjonen i et UV-spekter. Dette gjelder også for ikke-bindende elektroner på atomer, som O, N og halogener, som sitter forholdsvis løst. UV-detektor er en selektiv detektor for stoffer som absorberer UV-stråling ved bølgelengde over 190 nm. Diodearray-detektor er en type av UV-detektor hvor det i stedet for monokromatisk stråling, sendes polykromatisk stråling som kan oppta et fullt UV-spektrum av toppen som kan benyttes til identifisering. En annen fordel med en diodearray-detektor er at det er lett å endre bølgelengden under analysen, slik at hvert stoff kan detekteres ved optimal bølgelengde (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).

### **Prosedyre for prep. HPLC**

#### *Utstyr:*

HPLC apparat med UV detektor, fraksjonssamler og tilhørende utstyr  
kolonner  
Diverse: vialer, reagensrør, sprøyte, filter

#### *Reagenser:*

Destillert vann  
Metanol av HPLC kvalitet  
Trifluoreddiksyre (TFA)  
Acetonitril av HPLC kvalitet

1. «Purge» hver pumpe i 1 min. Ventilen må åpnes før «purging» og lukkes etter «purging».
2. Egnet kolonne kondisjoneres med egnet starteluent i 15-20 min avhengig av kolonnen. Dette er for å mette kolonnen og fjerne evt. luft i detektor og kolonne.
3. Lage eller endre metode i programmet med hensyn til kolonne, pumpe, mobilfaser, detektor og fraksjonssamler osv.
4. Prøven løses i minst mulig volum (<1ml) og må være oppløst, helst med en løsemiddelsammensetning som er lik starteluenten.
5. Prøveløsningen filtreres med et sprøytefilter over til en vial for å fjerne partikler.
6. Filtrert prøveløsning (<1ml) trekkes opp med en glass-sprøyte, og injiseres i injeksjonsloopen samtidig som man starter «single sample» i programmet.

7. Når stoffer i prøveløsningen etter hvert kommer ut av kolonnen og detekteres, kan fraksjoner separeres automatisk med bestemte tidsintervall, eller manuelt ved å få programmet til å bytte til neste fraksjon avhengig av topper som dukker opp i kromatogrammet.
8. Ved avslutning vaskes kolonnen i 30 min med 50% metanol-vann blanding eller med løsemidler lik slutteluenten. Loopen må også skylles ved å injisere full sprøyte med MeOH tre ganger, hvor hendelen vris noen ganger mellom «loop» og «inject».

### **Prosedyre for analytisk HPLC**

#### *Utstyr:*

HPLC apparat tilkoblet DAD-detektor og tilhørende utstyr  
kolonner

Diverse: vialer, reagensrør, sprøyte, filter

#### *Reagenser:*

Destillert vann

Metanol av HPLC kvalitet

Trifluoreddiksyre (TFA)

Acetonitril av HPLC kvalitet

1. «Purge» hver pumpe i 1 min. Ventilen må åpnes før «purging» og lukkes etter «purging».
2. Egnet kolonne kondisjoneres med løsemidler lik starteluent i 20-30 min avhengig av kolonnen. Dette er for å mette kolonnen og fjerne evt. luft i detektor og kolonne.
3. Lage eller endre metode i programmet med hensyn til kolonne, pumpe, mobilfaser, detektor osv.
4. Prøven løses i ca. 1ml med løsemidler helst lik starteluent, som gir en konsentrasjon mellom 0,2-2 mg/ml avhengig av hvor sammensatt prøven er.
5. Prøveløsningen filtreres med et sprøytefilter over i vialer for å fjerne partikler. Vialene plasseres i autosampleren.
6. Prøven kjøres ved å trykke «single run» i programmet, og det injiseres vanligvis 10-20 µl av prøveløsningen. Stoffer i prøveløsning kommer ut av kolonnen og detekteres av DAD-detektor.
7. Ved avslutning, vaskes kolonnen i 20 min med 50 % metanol-vann blanding eller med løsemidler lik slutteluenten.

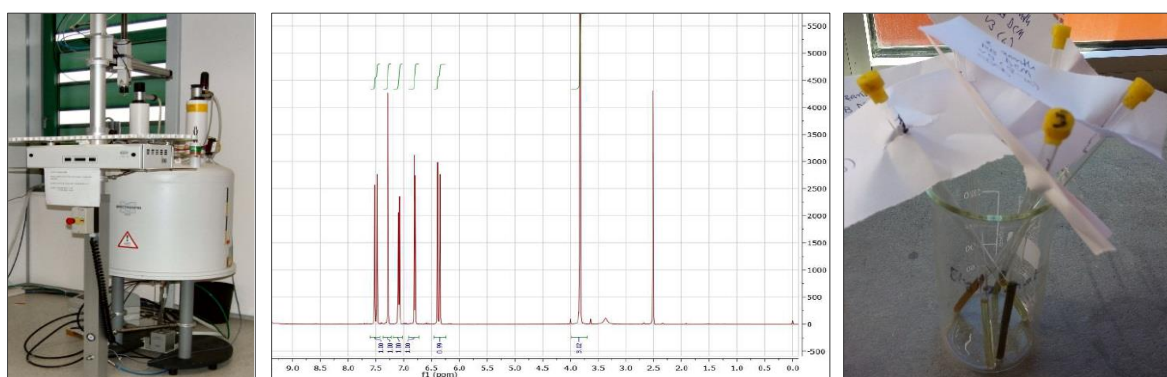
## 2.4 Identifikasjonsmetoder

### 2.4.1 Nukleær magnetisk resonans spektroskopi (NMR)

Nukleær magnetisk resonans spektroskopi (NMR) er en metode som brukes til identifikasjon av kjente og strukturoppklaring av ukjente forbindelser.

#### *Prinsipp*

Noen atomer, som hydrogen ( $^1\text{H}$ ) og karbonisotopen  $^{13}\text{C}$  har kjerner som oppfører seg som om de var magneter som spinner rundt sin egen akse. I NMR-spektroskopi blir kjernene utsatt for et sterkt magnetisk felt og bestrålt med elektromagnetisk energi. Når disse kjernene blir utsatt for magnetisk felt vil de orientere seg enten med magnetfeltet ( $\alpha$ -spinn-tilstand) eller mot magnetfeltet ( $\beta$ -spinn-tilstand). Ettersom kjernene i  $\alpha$ -spinn tilstand har lavere energi enn i  $\beta$ -spinn-tilstand, må det tilføres elektromagnetisk energi i en spesifikk frekvens tilsvarende presesjonsfrekvensen for kjernenes magnetiske momentvektor for å «flippe» kjernene i  $\alpha$ -spinn til  $\beta$ -spinn-tilstand. Forskjellige kjerner kan absorbere energi ved forskjellige frekvens i et gitt magnetfelt, fordi fordelingen og bevegelsen til elektronene rundt kjernene er forskjellige. Når denne energien absorberes, så er kjernene i resonans med den elektromagnetiske strålingen. Etter at de ulike kjernene har «flippet» og kommet tilbake til sin opprinnelige energitilstand, vil det frigjøres energi som kommer til uttrykk i form av signaler i NMR-spektret, og det dannes et karakteristisk spektrum for forbindelsen (Solomons et al. 2008).



Figur 2.9: Fra venstre: NMR-instrument, NMR-spektre, og NMR-rør med prøveløsninger ved FI.

#### *NMR-spektre og kjemisk skift*

Posisjonen av et signal langs x-aksen i et NMR-spektre kalles for kjemisk skift, og angis i enheten ppm (parts per million) med symbolet  $\delta$ . Flere signaler med ulikt kjemisk skift indikerer

nærvær av kjerner i ulike magnetisk miljø. Et signal som ligger mer mot venstre på x-aksen (høyere ppm verdi) sies å være mer «downfield», hvor mindre energi kreves for å få kjernen i resonans. Et signal som ligger mer mot høyre på x-aksen (lavere ppm verdi) vil være mer «upfield», og mer energi kreves. Kjemisk skift av et signal avhenger av kjernens magnetiske miljø, som igjen avhenger av elektrontetthet og andre faktorer. Elektroner som er ladede partikler vil under påvirkning av ekstern magnetisk felt bevege i bestemte foretrukket baner, og dermed generere små magnetisk felt, som kalles for indusert felt. Dette induserte feltet ved kjernen vil i større eller mindre grad motsette seg det eksterne magnetiske feltet, slik at kjernen blir mer «shieldet» av elektroner og kreve høyere energi («upfield») for absorpsjon. Elektrontettheten rundt kjernen er avhengig av nærvær av elektronegative grupper som kan tiltrekke elektrontettheten fra kjernen, spesielt hvis de er bundet til samme karbon. Sirkulering av delokaliserte elektroner i dobbeltbindinger kan enten «shielde» eller «deshielde» nærværende kjerne, som er avhengig av lokaliseringen av kjernen i det induserte feltet (Solomons et al. 2008).

### *<sup>1</sup>H-NMR spektre*

Ved tolkning av <sup>1</sup>H-NMR spektre er det fire egenskaper som er viktige å vurdere (Solomons et al. 2008):

- Kjemisk skift: Antall signaler i spektra indikerer antall unike proton miljøer i et molekyl. Posisjonen av signalet, kjemisk skift kan indikere hvilket magnetisk miljø protoner har, og kan dermed vise hvilke kjemiske grupper det er i molekylet. Det blir ofte brukt tetrametylsilan (TMS) som en intern standard. Posisjonen for TMS-signalet defineres som 0 ppm.
- Integralkurve: Arealet under hvert signal er proporsjonal med antall hydrogen atomer som bidrar til det signalet.
- Signalsplitting (multiplisitet): Splitting av et signal gir to eller flere topper som skyldes magnetisk effekt av hydrogen atomer ved andre skiftposisjoner enn signalet, som vanligvis er innenfor 2-3 bindinger av hydrogenatomet som forårsaker signalet. Signalsplitting gir dermed viktig informasjon om molekylstruktur. Antall topper som forventes å vises i et signal er lik  $n+1$ , hvor  $n$  er antall av nærliggende ikke-ekvivalente hydrogen atomer. Antall topper benevnes blant annet som singlett (en topp), dublett (to topper), triplett (tre topper) og multiplett (flere enn fire topper). Slike signaler som splitter hverandre i flere topper sies å koble med hverandre.



- Koblingskonstant: Avstanden mellom toppene av et splittet signal er målt i hertz (J), og kalles for koblingskonstanten. Signaler fra koblede protoner har lik koblingskonstant. Ved kobling mellom signaler som ligger nær hverandre i spektret (mindre enn ca. 5 ganger koblingskonstant) er mønsteret til signalsplitting komplisert, og følger derfor høyere ordens kobling som har andre regler.

### *<sup>13</sup>C-NMR spektre*

<sup>13</sup>C-NMR spektre er vanligvis mindre komplisert og lettere å tolke enn <sup>1</sup>H-NMR spektre forutsatt at <sup>13</sup>C – <sup>1</sup>H koblinger er fjernet. Hvert unikt karbon i et vanlig organisk molekyl gir kun en topp i <sup>13</sup>C-NMR spektre, og gir dermed ingen signalsplitting. I et APT-spektre (“attached proton test”) vises vanligvis kvaternære C- og CH<sub>2</sub>-grupper som positive signaler (peker oppover langs y-aksen), mens CH- og CH<sub>3</sub>-grupper som negative signaler (peker nedover) (Solomons et al. 2008).

### *2-dimensjonale NMR-spektre: HSQC, COSY og HMBC*

COSY (Correlation Spectroscopy) viser proton-proton koblinger, hvor <sup>1</sup>H-spektret blir vist på begge aksene. Signaler vises i form av punkter langs en diagonal linje i spektre. To protoner er koblet til hverandre hvis de danner kryssstopper som står vinkelrett på diagonallinjen. HSQC-spektre (heteronuclear single quantum coherence) viser hvilke protoner som er bundet til hvilke karboner. Et <sup>13</sup>C-spektre vises på den ene aksene, og et <sup>1</sup>H-spektre vises på den andre aksene. HMBC-spektre (heteronuclear multiple bond correlation) viser også proton-karbon koblinger som i HSQC, men her vises det over lengre koblinger, vanligvis 2-3 bindinger (Solomons et al. 2008).

## **Prosedyre**

### *Utstyr:*

NMR-spektrometer

NMR-rør med lokk

Diverse: Pasteurpipette, linjal

### *Reagenser:*

TMS (intern standard)

Deutererte løsemidler (eks. CD<sub>3</sub>OD, CDCl<sub>3</sub>,

DMSO-d<sub>6</sub>)

1. En liten mengde prøve (vanligvis 1-50 mg) løses i ca. 1 ml deuterert løsemiddel.
2. En mengde prøveløsning overføres til et NMR-rør, som tilsvarer 4,2 cm høyde røret.
3. Prøven analyseres i et NMR-spektrometer.

## 2.4.2 Massespektrometri (MS)

Massespektrometri (MS) er en metode som ioniserer forbindelsene, slik at det dannes ladede molekyler og eventuelle fragmenter, som kan gi informasjon om molekylmasse og struktur til forbindelsen.

### *Prinsipp*

Når en forbindelse blir ionisert, dannes det positive ioner (molekylene mister et elektron) eller negative ioner (molekylene tar opp et elektron), som kalles for molekylioner. Massen til molekylionene ( $[M]$ ) tilsvarer massen til de opprinnelige molekylene fordi vekten til mistede eller tilførte elektroner er ubetydelig. Molekylioner som er ustabile kan raskt spaltes opp i mindre fragmenter, ved at bindinger i molekylene brytes. Noen av fragmentene kan fortsatt være ioniserte, mens andre mister ladningen (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).

I et massespektrometer blir prøveforbindelsen ionisert av en ionekilde. Massen til molekylioner og fragmentionene bestemmes ved at ionene blir akselerert inne i en masseanalysator. I dette trinnet separeres ionene etter forholdet mellom masse ( $m$ ) og ladning ( $z$ ) enten i et magnetisk felt eller elektrostatisk felt. Ioner med liten masse i forhold til ladning vil bøyes av kraftig, mens ioner med høy masse i forhold til ladning vil bøyes av i noe mindre grad. I mange tilfeller vil ladningen til ionene være lik 1, og da er avbøyningen kun avhengig av massen til ionene. Etter analysatoren detekteres ionene ved hjelp av en detektor som registrerer mengden av ioner som dannes, og hvilke masser disse ionene har. Sluttresultatet registreres i et massespektrum hvor intensiteten (mengden) av ioner plottes i et diagram som funksjon av  $m/z$  (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).

### *Tolking av massespekter*

Y-aksen i et massespekter blir ofte justert slik at det mest intense fragmentionet (hovedionet) blir skalert til 100 %, og de øvrige fragmentionene skaleres deretter relativt til hovedionet. Ved tolkning av massespekter er viktig å ta høyde for at MS skiller mellom ulike masser for isotoper. Forholdet mellom intensiteten til de ulike isotoptoppene i et massespekter er lik forholdet mellom naturlig forekommende isotoper (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).

### *Elektronionisasjon (EI)*

I massespektrometri finnes det flere ioniseringsteknikker, blant annet elektronionisasjon (EI) og elektronsprayionisasjon (ESI). I EI foregår ioniseringen under vakuum, ved at analytten passerer en stråle med elektroner som kommer fra en liten tråd av rhenium eller wolfram. Når analytten føres inn i elektronstrålen, vil det i noen tilfeller rives løs et elektron i molekylet som følge av elektrisk frastøtning. Under ioniseringen dannes molekyllionet,  $M^+$ . Molekyllionet er positivt ladet fordi det har blitt fjernet et elektron, og prikken betyr at molekyllionet er et radikalion. Generelt er de fleste molekyllionene som dannes under EI relativt ustabile. Mange av dem vil fort fragmentere og danne fragmentioner, og molekyllionet vil ofte derfor ikke finnes i massespektret. Ved tolkning av massespektre er det vanlig å anta at signalet ved den høyeste massen tilsvarer molekyllionet. Denne massen vil ofte ikke direkte tilsvare molekylvekten, men være forskjøvet en eller to masseenheter ( $[M+1]$  eller  $[M+2]$ ) høyere enn molekylvekten på grunn av isotopeffekter fra  $^{13}\text{C}$  og andre tyngre isotoper (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).

### *Elektrosprayionisasjon (ESI)*

Elektrosprayionisasjon (ESI) benyttes mye som ioniseringsteknikk når massespektrometri brukes i kombinasjon med HPLC. Prøven føres inn i en væskestrøm i et kapillærrør, hvor nitrogengass forstøver løsningen slik at det dannes aerosol. Elektroder som er plassert etter kapillærrøret vil gjøre at de små dråpene i aerosolen får elektrisk ladning. Løsningen vil etter hvert fordampes, og denne spyles videre i massespektrometeret, vanligvis ved hjelp av nitrogengass.

Analyttmolekylene vil beholde ladningen, og disse dyttes videre inn i masseanalysatoren ved hjelp av elektrisk spenning. I masseanalysatoren bestemmes massen på samme måte som under EI. ESI er en myk ioniseringsteknikk, hvor det stort sett dannes molekyllioner som ikke fragmenterer videre. Massespektre i ESI vil derfor i hovedsak kun inneholde molekyllioner (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).

## **Prosedyre**

En liten mengde av prøven ble løst i metanol, og prøven ble sendt videre til Kjemisk Institutt ved Universitet i Oslo, hvor det ble foretatt massespektrometrisk analyse på et LC/MS- instrument med ioniseringsteknikkene, EI og/eller ESI. Det foreligger derfor ikke reagenser og prosedyre.

### 2.4.3 Optisk rotasjon

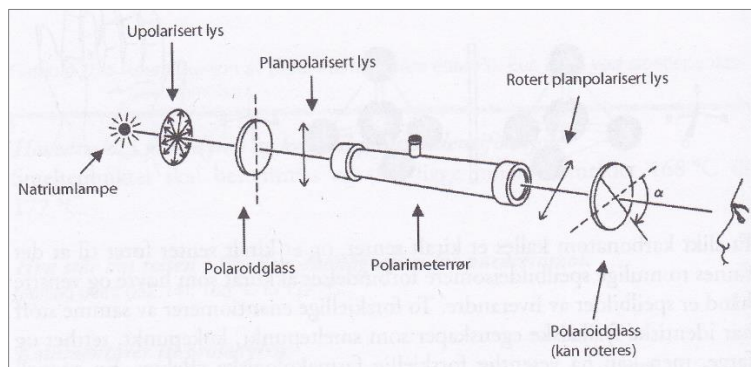
Måling av optisk aktivitet er den enkleste metoden for å identifisere ulike enantiomere av samme stoff. Flere ulike forbindelser kan ha omtrent samme verdi for spesifikk optisk rotasjon, og metoden må derfor kombineres med andre metoder for identifikasjon. Fordelen med metoden er at det er rask å utføre, og krever lite utstyr og reagenser (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).

#### *Prinsipp*

Alle kirale forbindelser roterer planpolarisert lys. Et kiralt senter består av ett eller flere karbonatomer som er bundet til fire ulike atomer eller grupper, og kan dermed foreligge i to speilbilder av hverandre, som kalles for enantiomere. Andre former for kiralitet er aksialkiralitet og plankiralitet. To ulike enantiomere av samme stoff har like fysikalske egenskaper som smeltepunkt, kokepunkt, tetthet og farge, men kan ha forskjellige farmakologiske egenskaper. Planpolarisert lys er elektromagnetisk svingninger som stråler kun i ett plan. Hvis stoffet roterer planpolarisert lys mot høyre (med klokka) blir det betegnet med (+) eller d (dextrorotatory) foran navnet, og hvis stoffet roterer mot venstre (mot klokka) blir det betegnet med (-) eller l (levorotatory). Dersom stoffet har like mye av (+)- og (-)-enantiomerene, altså en racemat, vil disse rotere planpolarisert lys like mye til høyre og til venstre, og dermed vil det totalt gi ingen rotasjon. Hvis et stoff har flere kirale sentre kan det foreligge som optisk isomere som ikke er speilbildeformer, dette kalles diastereomere (Pedersen-Bjergaard et al. 2004; Solomons et al. 2008).

#### *Polarimeter*

Optisk rotasjon måles med et polarimeter, se figur x. En løsning av optisk aktiv prøve plasseres i polarimeterøret, og planpolarisert lys sendes gjennom. Når prøven roterer det planpolariserte lyset, vil det oppstå en kraftig reduksjon i lysintensiteten. Polariseringsplanet for lyset må roteres til høyre eller til venstre i bestemt vinkel for å observere maksimal lysgjennomgang igjen. Denne vinkelen og retningen som kan avleses på instrumentet, kalles for observert rotasjon (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).



Figur 2.10 Prinsippet for et polarimeter (t.v.) (Pedersen-Bjergaard et al. 2004), og et polarimeter ved FI (t.h.).

### *Spesifikk optisk rotasjon*

Den observerte rotasjonen er avhengig av forbindelsens struktur, lengden til polarimerrøret, konsentrasjon av stoff og bølgelengden på lyset. For å få et tall som kan sammenlignes med andre forbindelser, må det beregnes spesifikk optisk rotasjon. Spesifikk optisk rotasjon,  $[\alpha]_D^{20}$  er definert som følgende:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l * c}$$

Hvor  $\alpha$  er den observerte rotasjonen i grader,  $l$  er lengden til polarimerrøret i dm,  $c$  er konsentrasjonen av forbindelsen i g/ml, D og 20 indikerer at målingen er utført med en natriumlampe ved 589,3 nm og ved 20 grader. I tillegg vil valg av løsemiddel påvirke verdien (Pedersen-Bjergaard et al. 2004).

### **Prosedyre**

<i>Utstyr:</i>	<i>Reagenser:</i>
Polarimeter	Destillert vann
	Metanol

1. Rene stoffer som skal testes løses i 1-2 ml (avhengig hvor store kyvettene er) av et egnet løsemiddel.
2. Passende kyvette plasseres i polarimerrøret, og prøveløsningen tilsettes ved hjelp av en sprøyte. Det er viktig å fjerne evt. luftbobler i polarimerrøret.
3. Polarimerrøret plasseres i polarimeteret, analyseres og verdien for rotasjon avleses når den har stabilisert seg. Spesifikk optisk rotasjon beregnes ut ifra observert optisk rotasjon.

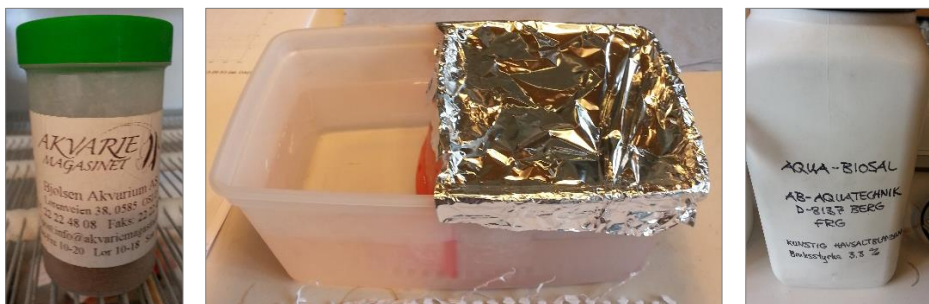
## 2.5 Metoder for måling av biologisk aktivitet

### 2.5.1 Rekelarvetest (Brine shrimp lethality assay)

Rekelarvetest er en biologisk test som kan brukes til å måle toksiske egenskaper hos planteekstrakter og isolerte naturstoffer. Fordelen med denne testen er at den krever relativt lite tid, er rimelig, og er enkel å utføre. I tillegg kreves en relativ liten mengde av testmateriale, og det kreves ikke spesielt utstyr (Meyer et al. 1982).

Prinsippet går ut på å tilsette levende rekelarver av arten *Artemia salina* til ulike konsentrasjoner av testsubstansen. Etter 24 timer telles antall overlevende rekelarver, og disse dataene kan brukes til å beregne stoffkonsentrasjon av prøven som gir 50% dødelighet hos rekelarvene (LD<sub>50</sub>) (Meyer et al. 1982).

For at *Artemia salina* egg skal klekkes må temperaturen være rundt 30°, og det må være tilstrekkelig vann som ikke har altfor høy saltkonsentrasjon. En rekelarve utvikles til en voksen etter omtrent en uke. Utklekkede *Artemia salina* takler bemerkelsesverdig mye endringer i miljøet. De kan leve i vann med opptil 50 % saltkonsentrasjon, og i vanntemperaturer mellom 6-37°C (EOL 2016).



Figur 2.11: Fra venstre; nedfrysede rekelarveegg, klekkekammer, og kunstig havsalt til bruk for rekelarvetest ved FI.

#### Prosedyre

##### Utstyr:

Reagensglass eller 96-brønnsbrett  
Magnetrører og røremagnet  
Klekkekammer, aluminiumsfolie, lampe  
PC med USB-mikroskop  
Div: Pasteur-/ automatpipette, mikroplate av porselen.

##### Reagenser:

Destillert vann  
DMSO  
Kunstig havsalt (Aqua-Biosal)  
Podofyllotoksin  
Rekelarveegg (*Artemia salina*)

#### *Dag 1:*

1. 3,3 % saltvannløsning lages ved å løse 16,5 g kunstig havsaltblanding i 500 ml destillert vann i en målekolbe. Blandingen kan være noe tungløselig, og det bør derfor røres med magnetrører.
2. Klekkekammeret fylles med saltvannløsning.
3. En spatelskje med rekellarver tilsettes, og rekellarvesiden av kammeret dekkes av aluminiumsfolie.
4. En glødelampe plasseres over klekkekammeret. I løpet av 2 dager vil rekellarver klekkes.

#### *Dag 3:*

1. Prøven løses i DMSO til ønskede konsentrasjoner, f.eks. 10, 5, 1 og 0,1 mg/ml.
2. Klekkekammeret fylles med saltvannløsning.
3. Et merke settes ved 5 ml volum i alle reagensglassene som benyttes.
4. 50 µl prøveløsning tilsettes til hvert reagensglass, og det skal utføres 3 paralleller for hver konsentrasjon.
5. For positiv kontroll tilsettes 50 µl podofyllotoksin (10 mg/ml løst i DMSO) i 3 reagensglass.
6. For negativ kontroll tilsettes 50 µl DMSO i 3 reagensglass.
7. Ca. 4 ml saltvannløsning tilsettes reagensglassene.
8. 10 levende rekellarver med saltvannløsning tilsettes til hvert reagensglass, ved hjelp av Pasteur pipette, mikroplate av porselen, og eventuelt USB mikroskop.
9. Saltvannløsning tilsettes reagensglassene til merket 5 ml streken, og dekkes med aluminiumsfolie på toppen.
10. Løsningene med rekellarver inkuberes i romtemperatur i ett døgn under en glødelampe.

#### *Dag 4:*

1. Antall levende og døde rekellarver for hvert reagensglass/ brønn telles ved hjelp av USB-mikroskop.
2. LD<sub>50</sub>-verdien beregnes for hver prøve.

Hvis mengde tilgjengelig prøve er for liten for å bruke prosedyren ovenfor, kan det i stedet for reagensglass benyttes mikrobrønner. Dag 3 kan erstattes med denne prosedyren:

#### *Dag 3:*

1. Prøven løses i DMSO til ønskede konsentrasjoner, f.eks. 10, 5, 1 og 0,1 mg/ml.

2. 198 µl saltvannsløsning med innhold av 10-15 levende rekellarver tilsettes til det antall brønner som skal benyttes, ved å bruke automatpipette, mikroplate av porselen, og evt. USB-mikroskop.
3. 2 µl prøveløsning tilsettes hver av brønnene, hvor hver konsentrasjon skal ha tre paralleller.
4. For positiv kontroll tilsettes 2 µl podofyllotoksin (10 mg/ml løst i DMSO) i tre brønner.
5. For negativ kontroll tilsettes 2 µl DMSO i tre brønner.
6. Et lokk eller plastfolie settes over, og blandingen inkuberes under en glødelampe i romtemperatur i ett døgn.

### 2.5.2 Antiplasmodiumtest

Antiplasmodiumtest ble utført av Dr. Dean Goodman fra Plant Cell Biology Research Centre, The University of Melbourne i Australia.

Antiplasmodiumtesten utføres i mikrotiterplater ved å infisere røde blodceller med plasmodier, prøveløsning og vekstmedium tilsettes, og blodcellene inkuberes i 48 timer. Deretter lyseres cellene med saponin, og fluorescens måles ved en eksitasjonsbølgelengde på 485 nm og emisjonsbølgelengde på 530 nm. Resultater fra kontroller trekkes fra fluorescensverdiene, og det beregnes prosentvis antiplasmodiumaktivitet (Mollard 2013).

For denne oppgaven ble det benyttet to arter av *Plasmodium*, både klorokin-følsomme parasitter (3D7) og klorokin-resistente (Dd2) parasitter. Som positiv kontroll ble det benyttet klorokin. Det ble utført screeningforsøk og fullverdige testforsøk på 48 og 72 timer. Deretter ble det beregnet konsentrasjonen av prøven som ga 50 % hemmende effekt hos parasittene.

#### **Prosedyre for sending av prøver til Australia for parasitt testing:**

1. Løseligheten til ekstraktene i DMSO ble bestemt.
2. Minst 2 mg prøve veies inn i vialglass (1ml) med kork.
3. Noen dråper aceton eller metanol tilsettes og fjernes deretter ved fordampning, slik at stoffet blir sittende fast i bunnen og ikke havner i korken under sending.
4. Prøvene pakkes med bobleplast, og nødvendige skriv for sending av prøver til Australia festes utenpå pakken. Løselighet og molare masser til evt. isolerte stoffer angis.





### **3 Eksperimentell utførelse**

## 3.1 Plantemateriale

---

Anvendt råmateriale var rotbark og stammebark av planten, *Zanthoxylum zanthoxyloides*, som ble samlet inn i Blendio, Mali, den 30. desember 2014 og identifisert av Professor Drissa Diallo fra Université de Bamako. Plantematerialet ble videre lufttørket og pulverisert før det ble sendt til Norge. Prøver av dette plantematerialet er lagret ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

## 3.2 Generell utførelse

---

Rotbark og stammebark av *Z. zanthoxyloides* ble ekstrahert med diklormetan (DCM) og metanol (MeOH) i et Soxhlet apparat. DCM- og MeOH-råekstraktet av rotbark og MeOH-råekstraktet av stammebark ble videre fraksjonert med Versaflash<sup>TM</sup> - eller Sephadex<sup>®</sup>-kolonnekromatografi. Samlede kolonnefraksjoner ble videre slått sammen til fraksjoner ut i fra analytisk TLC og påvisning med UV-bestråling og spraying med ceric-reagens fulgt av oppvarming. Deretter ble fraksjonene separert ytterligere med Chromatotron<sup>TM</sup> akselerert TLC og/eller preparativ HPLC. Analytisk HPLC ble benyttet for å studere fraksjonenes sammensetning samt for å finne mobilfasesammensetning for preparativ kromatografi. For strukturoppklaring og identifisering av innholdsstoffer i fraksjonene ble det brukt NMR-spektroskopi, massespektrometri og måling av optisk rotasjon. Det ble utført rekellarve-test og antiplasmodiumtest av alle råekstraktene, Sephadex<sup>TM</sup> fraksjoner av MeOH-ekstraktet av stammebark, og isolerte stoffer. Metoder og prosedyrer som er benyttet i denne eksperimentelle utførelsen er beskrevet i kapittel 3. For enkelthetens skyld har fraksjonene blitt navngitt etter formen «plantedel-ekstrakt-separasjonsmetode-fraksjon nr.». For eksempel betyr «Rb-meoh-s1v2c3h4» rotbark (rb) metanol (meoh) ekstrakt, Sephadex<sup>®</sup> fraksjon nr. 1 (s1), Versaflash<sup>TM</sup> fraksjon nr. 2 (v2), Chromatotron<sup>TM</sup> fraksjon nr.3 (c3) og prep-HPLC fraksjon nr.4 (h4). Løsningsmidlene som er benyttet til NMR, er deuterert kloroform (CDCl<sub>3</sub>) eller deuterert metanol (CD<sub>3</sub>OD) tilsatt ca. 1 % tetrametylsilan (TMS).

## 3.3 Ekstraksjon av plantemateriale

### 3.3.1 Soxhlet ekstraksjon

Både rotbark (291,8 g) og stammebark (288,5 g) ble først ekstrahert med DCM (3 l), og deretter med MeOH (3 l) i et Soxhlet apparat. For hver plantedel og hvert løsemiddel varte ekstraksjonen i ca. 10 timer fordelt på to dager, og plantematerialet lå i henstand i løsemidlet i romtemperatur i 20 timer over natten. Ekstraktløsningene ble filtrert med filterpapir, dampet inn på rotavapor, ettertørket på oljepumpe og veid.

### 3.3.2 NMR-spektroskopi

En liten mengde av DCM-råekstraktene av både rotbark og stammebark ble løst i  $\text{CDCl}_3$ , mens MeOH-råekstraktene ble løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Det ble tatt  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz) og  $^{13}\text{C}$  APT-NMR (100 MHz) spektre for de fire råekstraktene.

### 3.3.3 Analytisk HPLC

En liten mengde av DCM- og MeOH-ekstrakter av både rotbark og stammebark ble løst i acetonitril (ACN) til en konsentrasjon på ca. 1 mg/ml. Det ble brukt Chromolith<sup>®</sup> RP-18e omvendt-fase kolonne og UV-DAD detektor (237 nm). Analysen av ekstraktene ble utført ved gradienteluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.1 for DCM-ekstrakter, og i tabell 3.2 for MeOH-ekstrakter.

Tabell 3.1: Gradientsystem for analytisk HPLC av DCM-råekstrakt av rotbark og stammebark.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	80	20	3
1	80	20	3
15	5	95	3
18	5	95	3
19	80	20	3
22	80	20	3

Tabell 3.2: Gradientsystem for analytisk HPLC av MeOH-råekstrakt av rotbark og stammebark.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	98	2	3
1	98	2	3
15	5	95	3
18	5	95	3
19	98	2	3
22	98	2	3

#### 4.3.4 Bioassays

Rekelarvetest ble utført på prøveløsninger av ekstraktene i flere konsentrasjoner. Det ble også sendt prøver av disse ekstraktene til Australia for antiplasmodiumtesting. For å vite noe om løseligheten av råekstraktene før disse testene ble utført, ble løseligheten av ekstraktene i DMSO og etanol bestemt.

### 3.4 Fraksjonering av DCM-råekstrakt av rotbark

#### 3.4.1 Separering av Rb-dcm

##### 3.4.1.1 Versaflash™ kolonne separasjon

Rotbark DCM-ekstraktet (7,7 g) ble løst i DCM, og applisert på en Versapak® normalfase kolonne (80 x 110 mm). Kolonnen ble kondisjonert med DCM-heksan (30:70) og deretter gradientluert med DCM-heksan, DCM, EtOAc og EtOAc-MeOH som vist i tabell 3.3. Totalt ble det samlet 10 kolonnefraksjoner à 400 ml (fraksjon nr. 1-4) og à 500 ml (fraksjon nr. 5-10).

Tabell 3.3: Mobilfaser benyttet ved Versaflash™ separasjon av rotbark DCM-råekstrakt.

Mobilfase	Kolonnefraksjon nr.	Mengde (ml)
DCM-heksan (30:70)	1-2	600
DCM	3-4	1000
EtOAc	5-9	2000
EtOAc-MeOH (75:25)	10	500

##### 3.4.1.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel normalfase), som ble utviklet med kloroform som mobilfase. På bakgrunn av fargen av fraksjonene, påviste flekker under UV-lys og etter Ceric-spray ble kolonnefraksjonene slått sammen til 5 fraksjoner (Rb-dcm-v1 til Rb-dcm-v5) som vist i tabell 3.4. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

Tabell 3.4: Sammenslåing av rotbark DCM-råekstrakt kolonnefraksjoner på bakgrunn av analytisk TLC.

Kolonnefraksjon nr.	Fraksjon
1-3	Rb-dcm-v1
4-5	Rb-dcm-v2
6	Rb-dcm-v3
7	Rb-dcm-v4
8-10	Rb-dcm-v5

### 3.4.1.3 NMR-spektroskopi

En liten mengde av hver fraksjon ble løst i  $\text{CDCl}_3$ , og det ble tatt  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz) og  $^{13}\text{C}$  APT-NMR (100 MHz) spektre.

### 3.4.1.4 Analytisk HPLC

En liten mengde av fraksjonene v3, v4, og v5 ble løst i ACN til en konsentrasjon på 0,5 mg/ml. Det ble brukt Chromolith® RP-18e omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237 nm). Analysen ble utført ved gradienteluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.5.

Tabell 3.5: Gradientsystem for analytisk HPLC av Rb-dcm-v3, Rb-dcm-v4 og Rb-dcm-v5.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	80	20	3
1	80	20	3
15	5	95	3
18	5	95	3
19	80	20	3
22	80	20	3

## 3.4.2 Separering av Rb-dcm-v4

### 3.4.2.1 Sentrifugal akselerert preparativ TLC - Chromatotron™

Fraksjonen, Rb-dcm-v4 (443 mg) ble løst i DCM (ca. 2 ml), og applisert på en 2 mm kromatotronplate (Si gel PF254 gipshaltig). Platen ble kondisjonert med DCM, og deretter gradienteluert med DCM, DCM-EtOAc, EtOAc og EtOAc-MeOH som vist i tabell 3.6. Totalt ble det samlet 13 platefraksjoner à ca. 15 ml.

Tabell 3.6: Mobilfaser benyttet ved sentrifugalt akselerert TLC av Rb-dcm-v4.

Mobilfase	Platefraksjon nr.	Mengde (ml)
DCM	*	20
DCM-EtOAc (90:10)	*	15
DCM-EtOAc (80:20)	1	45
DCM-EtOAc (60:40)	2-4	60
EtOAc	5-8	110
EtOAc-MeOH (80:20)	9-13	85

\* Det ble ikke samlet fraksjoner av de første elueringsmidlene ettersom den påsatte prøven ikke hadde bevegde seg utover platen.

### 3.4.2.2 Analytisk TLC

Platefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel normalfase) som ble utviklet med DCM-EtOAc (90:10) som mobilfase. På bakgrunn av påviste flekker under UV-lys og etter Ceric-spray ble platefraksjonene slått sammen til 8 fraksjoner (Rb-dcm-v4c1 til Rb-dcm-v4c8) som vist i tabell 3.7. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

Tabell 3.7: Sammenslåing av Rb-dcm-v4 platefraksjoner på bakgrunn av analytisk TLC.

Platefraksjon nr.	Fraksjon
1	Rb-dcm-v4c1
2	Rb-dcm-v4c2
3	Rb-dcm-v4c3
4	Rb-dcm-v4c4
5-6	Rb-dcm-v4c5
7-10	Rb-dcm-v4c6
11	Rb-dcm-v4c7
12-13	Rb-dcm-v4c8

### 3.4.2.3 NMR-spektroskopi

En liten mengde av hver fraksjon ble løst i CDCl<sub>3</sub>, og det ble tatt <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) spektre.

## 3.4.3 Separering av Rb-dcm-v4c4

### 3.4.3.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen, Rb-dcm-v4c4 (19 mg) ble løst i ACN (ca. 1 ml). Det ble brukt Kinetex<sup>®</sup> 5u C18 100A omvendt-fase kolonne og UV detektor (237 nm). Analysen ble utført ved gradienteluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.8. Det ble samlet 31 kolonnefraksjoner. På bakgrunn av absorpsjonstopper i kromatogrammet ble kolonnefraksjonene slått sammen til 14 fraksjoner (Rb-dcm-v4c4h1 til Rb-dcm-v4c4h14) som vist i tabell 3.9. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor, oljepumpe og vakuum sentrifuge, og veid.

Tabell 3.8: Gradientsystem for preparativ HPLC av Rb-dcm-v4c4.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	80	20	20
20	20	80	20
25	20	80	20

Tabell 3.9: Sammenslåing av Rb-dcm-v4c4 kolonnefraksjoner.

Kolonnefraksjon nr.	Fraksjon
1-13	Rb-dcm-v4c4 h1
14-15	Rb-dcm-v4c4 h2
16	Rb-dcm-v4c4 h3
17	Rb-dcm-v4c4 h4
18	Rb-dcm-v4c4 h5
19	Rb-dcm-v4c4 h6
20	Rb-dcm-v4c4 h7
21	Rb-dcm-v4c4 h8
22	Rb-dcm-v4c4 h9
23	Rb-dcm-v4c4 h10
24-25	Rb-dcm-v4c4 h11
26	Rb-dcm-v4c4 h12
27	Rb-dcm-v4c4 h13
28-31	Rb-dcm-v4c4 h14

### 3.4.3.2 NMR-spektroskopi

En liten mengde av fraksjonene h2, h4, h7, h9, h11 og h14 ble løst i CDCl<sub>3</sub>, og det ble tatt opp <sup>1</sup>H-NMR (400 eller 600 MHz) spektre. For fraksjonene h4, h7, h9 og h11 ble det også tatt opp <sup>13</sup>C APT (150 MHz) og HSQC (400 eller 600/150 MHz). For fraksjonene, h7, h9 og h11 ble i tillegg tatt COSY (600 MHz) og HMBC (600/150 MHz).

### 3.4.3.3 Biologiske tester

Rekelarvetest ble utført på prøveløsninger av h7, h9 og h11 i flere konsentrasjoner. Det ble også sendt prøver av h7 og h9 til Australia for antiplasmodiumtest.

## 3.4.4 Separering av Rb-dcm-v4c4h2

### 3.4.4.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen, Rb-dcm-v4c4h2 (1,6 mg) ble løst i ACN (ca. 0,5 ml). Det ble brukt Chromolith® Semiprep RP-18e omvendt-fase kolonne og UV detektor (237 nm). Analysen ble utført ved gradienteluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.10. På bakgrunn av absorpsjonstopper i kromatogrammet ble 2 kolonnefraksjoner valgt ut (Rb-dcm-v4c4h2 og Rb-dcm-v4c4h3) som vist i tabell 3.11. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor, oljepumpe og vakuumsentrifuge, og veid.



Tabell 3.10: Gradientsystem for preparativ HPLC av Rb-dcm-v4c4h2.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	80	20	10
20	20	80	10
25	20	80	10

Tabell 3.11: Sammenslåing av Rb-dcm-v4c4h2 kolonnefraksjoner.

Kolonnefraksjon nr.	Fraksjon
2	Rb-dcm-v4c4h2h2
3	Rb-dcm-v4c4h2h3

### 3.4.4.2 NMR-spektroskopi

En liten mengde av begge fraksjonene ble løst i CDCl<sub>3</sub>, og det ble tatt <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) spektre. For fraksjon h3 ble det også tatt <sup>13</sup>C APT (150 MHz), HMBC og HSQC spektre.

### 3.4.4.3 Biologiske tester

Rekelarvetest ble utført på prøveløsninger av h3 i flere konsentrasjoner. Det ble også sendt prøve av h3 for antiplasmodiumtest.

## 3.4.5 Separering av Rb-dcm-v5

### 3.4.5.1 Sentrifugal akselerert TLC – Chromatotron™

Fraksjonen, Rb-dcm-v5 (700 mg) ble løst i EtOAc (4 ml), og applisert på en 2 mm kromatotronplate (Si gel PF254 gipshaltig). Platen ble kondisjonert med DCM og deretter gradientluert med DCM, DCM-EtOAc, EtOAc og EtOAc-MeOH som vist i tabell 3.12. Totalt ble det samlet 35 platefraksjoner à ca. 15 ml.

Tabell 3.12: Mobilfaser benyttet ved sentrifugalt akselerert TLC av Rb-dcm-v5.

Mobilfase	Platefraksjon nr.	Mengde (ml)
DCM	1-2	30
DCM-EtOAc (80:20)	3-12	160
DCM-EtOAc (60:40)	13-18	100
EtOAc	19-26	100
EtOAc-MeOH (90:10)	27-32	100
EtOAc-MeOH (80:20)	33-35	50

### 3.4.5.2 Analytisk TLC

Platefraksjon nr. 1-24 ble applisert på TLC-plater (silikagel normalfase) som ble utviklet med DCM-EtOAc (50:50), mens for platefraksjon nr. 24-35 ble det benyttet EtOAc som mobilfase. På bakgrunn av påviste flekker under UV-lys og etter Ceric-spray ble platefraksjonene slått sammen til 13 fraksjoner (Rb-dcm-v5c1 til Rb-dcm-v5c13) som vist i tabell 3.13. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

Tabell 3.13: Sammenslåing av Rb-dcm-v5 platefraksjoner på bakgrunn av analytisk TLC.

Platefraksjon nr.	Fraksjon
1-4	Rb-dcm-v5c1
5	Rb-dcm-v5c2
6	Rb-dcm-v5c3
7	Rb-dcm-v5c4
8-10	Rb-dcm-v5c5
11-14	Rb-dcm-v5c6
15-18	Rb-dcm-v5c7
19-20	Rb-dcm-v5c8
21	Rb-dcm-v5c9
22	Rb-dcm-v5c10
23-26	Rb-dcm-v5c11
27-29	Rb-dcm-v5c12
30-35	Rb-dcm-v5c13

### 3.4.5.3 NMR-spektroskopi

En liten mengde av hver fraksjon ble løst i  $\text{CDCl}_3$ , og det ble tatt  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz) spektre. For fraksjonene Rb-dcm-v5 c3-c6 ble det også tatt opp  $^{13}\text{C}$  APT (100 MHz).

## 3.4.6 Separering av Rb-dcm-v5c2

### 3.4.6.1 Preparativ-TLC

Fraksjonen, Rb-dcm-v5c2 (12 mg) ble løst i aceton og applisert på en preparativ TLC-plate med konsentreringssone (normalfase, Kieselgel 60F<sub>254</sub>, 20x80, 0,25 mm tykk), og det ble brukt DCM som mobilfase. På bakgrunn av påviste soner under UV-lys ble det skrapet av 6 soner (Rb-dcm-v5c2t1 til Rb-dcm-v5c3t6) fra platen, stoffene ble deretter ekstrahert fra silikamaterialet med etylacetat og filtrert (se tabell 3.14). Fraksjonssonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

Tabell 3.14: Fraksjoner av preparativ TLC av Rb-dcm-v5c2.

Soner	Fraksjon
1	Rb-dcm-v5c2t1
2	Rb-dcm-v5c2t2
3	Rb-dcm-v5c2t3
4	Rb-dcm-v5c2t4
5	Rb-dcm-v5c2t5
6	Rb-dcm-v5c2t6

### 3.4.6.2 NMR-spektroskopi

En liten mengde av hver fraksjon ble løst i  $\text{CDCl}_3$ , og det ble tatt  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz) spektre.

### 3.4.6.3 Bioassays

Rekelarvetest ble utført på prøveløsning av Rb-dcm-v5c2t2 i flere konsentrasjoner.

## 3.4.7 Separering av Rb-dcm-v5c3

### 3.4.7.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen, Rb-dcm-v5c3 (34,7 mg) ble løst i ACN (ca. 1 ml). Det ble brukt Kinetex<sup>®</sup> 5u C18 100A omvendt-fase kolonne og UV- detektor (237 nm). Analysen ble utført ved gradienteluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.15. Det ble samlet 46 kolonnefraksjoner. På bakgrunn av absorpsjonstopper i kromatogrammet ble det valgt ut og slått sammen til 10 fraksjoner (Rb-dcm-v5c3h1 til Rb-dcm-v5c3h10) som vist i tabell 3.16.

Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor, oljepumpe og vakuumsentrifuge, og veid.

Tabell 3.15: Gradientsystem for prep. HPLC av Rb-dcm-v5c3.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	80	20	20
20	20	80	20
25	20	80	20

Tabell 3.16: Sammenslåing av Rb-dcm-v5c3 kolonnefraksjoner.

Kolonnefraksjon nr.	Fraksjon
2-3	Rb-dcm-v5c3 h1
6	Rb-dcm-v5c3 h2
9	Rb-dcm-v5c3 h3
12	Rb-dcm-v5c3 h4
13	Rb-dcm-v5c3 h5
15	Rb-dcm-v5c3 h6
20-21	Rb-dcm-v5c3 h7
23	Rb-dcm-v5c3 h8
27-28	Rb-dcm-v5c3 h9
29-30	Rb-dcm-v5c3 h10

### 3.4.7.2 NMR-spektroskopi

Fraksjonene, Rb-dcm-v5c3 h1-10 ble løst i CDCl<sub>3</sub>, og det ble tatt <sup>1</sup>H-NMR spektre. For fraksjonen h9 ble det også tatt opp <sup>13</sup>C APT. For fraksjonene h1, h2 og h4 ble det i tillegg tatt HMBC og HSQC.

### 3.4.7.3 Bioassays

Rekelarvetest ble utført på prøveløsninger av h1, h2 og h9 i flere konsentrasjoner.

## 3.4.8 Separering av Rb-dcm-v5c3h4

### 3.4.8.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen, Rb-dcm-v5c3h4 (0,1 mg) ble løst i ACN (ca. 0,5 ml). Det ble brukt Chromolith Semiprep RP-18e omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237 nm). Analysen ble utført ved gradienteluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.17. Det ble samlet 21 kolonnefraksjoner. På bakgrunn av absorpsjonstopper i kromatogrammet ble 2 kolonnefraksjoner valgt ut (Rb-dcm-v5c3h4h5 og Rb-dcm-v5c3h6) som vist i tabell 3.18. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor, oljepumpe og vakuumsentrifuge, og veid.

Tabell 3.17: Gradientsystem for preparativ HPLC av Rb-dcm-v5c3h4.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	80	20	10
20	20	80	10
25	20	80	10

Tabell 3.18: Utvalgte Rb-dcm-v5c3h4 kolonnefraksjoner.

Kolonnefraksjon nr.	Fraksjon
5	Rb-dcm-v5c3h2h5
6	Rb-dcm-v5c3h2h6

### 3.4.8.2 NMR-spektroskopi

Begge fraksjonene ble løst i CDCl<sub>3</sub>, og det ble tatt <sup>1</sup>H-NMR spektre.

### 3.4.9 Separering av Rb-dcm-v5c4

#### 3.4.9.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen, Rb-dcm-v5c4 (45 mg) ble løst i ACN (ca. 1 ml). Det ble brukt Kinetex 5u C18 100A omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237 nm). Analysen ble utført ved gradienteluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.19. Det ble samlet 31 kolonnefraksjoner. På bakgrunn av absorpsjonstopper i kromatogrammet ble kolonnefraksjonene slått sammen til 22 fraksjoner (Rb-dcm-v5c4h1 til Rb-dcm-v5c4h22) som vist i tabell 3.20. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor, oljepumpe og vakuumsentrifuge, og veid.

Tabell 3.19: Gradientsystem for preparativ HPLC av Rb-dcm-v5c4.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	80	20	20
20	20	80	20
25	20	80	20

Tabell 3.20: Sammenslåing av Rb-dcm-v5c4 kolonnefraksjoner.

Kolonnefraksjon nr.	Fraksjon
1-8	Rb-dcm-v5c4 h1
9	Rb-dcm-v5c4 h2
10	Rb-dcm-v5c4 h3
11	Rb-dcm-v5c4 h4
12	Rb-dcm-v5c4 h5
13	Rb-dcm-v5c4 h6
14	Rb-dcm-v5c4 h7
15	Rb-dcm-v5c4 h8
16	Rb-dcm-v5c4 h9
17	Rb-dcm-v5c4 h10
18	Rb-dcm-v5c4 h11
19	Rb-dcm-v5c4 h12
20	Rb-dcm-v5c4 h13
21	Rb-dcm-v5c4 h14
22	Rb-dcm-v5c4 h15
23-24	Rb-dcm-v5c4 h16
25	Rb-dcm-v5c4 h17
26	Rb-dcm-v5c4 h18
27	Rb-dcm-v5c4 h19
28	Rb-dcm-v5c4 h20
29	Rb-dcm-v5c4 h21
28-31	Rb-dcm-v5c4 h22

### 3.4.9.2 NMR-spektroskopi

Fraksjonene h3, h5, h6, h9, h10 og h11 ble løst i  $\text{CDCl}_3$ , og det ble tatt  $^1\text{H}$ -NMR (400 eller 600 MHz) spektre. For fraksjonene, h3, h5 og h6 ble det også tatt opp  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz) eller  $^{13}\text{C}$  APT (150 MHz). For fraksjonene h3 og h5 ble det i tillegg tatt COSY (600 MHz), HMBC (600/150 MHz) og HSQC (600/150 MHz).

### 3.4.9.3 Biologiske tester

Rekelarvetest ble utført på prøveløsninger av h5 løst i flere konsentrasjoner. Det ble også sendt prøver av h6 og h9 til Australia for antiplasmodiumtesting.

## 3.4.10 Separering av Rb-dcm-v5c6

### 3.4.10.1 Sentrifugal akselerert TLC – Chromatotron™

Fraksjonen, Rb-dcm-v5c6 (60 mg) ble løst i EtOAc (ca. 2 ml) og applisert på en 1 mm kromatotronplate (Si gel PF254 gipshaltig). Platen ble kondisjonert med DCM og deretter gradientuert med DCM, DCM-EtOAc og EtOAc som vist i tabell 3.21. Totalt ble det samlet 20 platefraksjoner à ca. 15 ml.

Tabell 3.21: Mobilfaser benyttet ved sentrifugalt akselerert TLC av Rb-dcm-v5c6.

Mobilfase	Platefraksjon nr.	Mengde (ml)
DCM	1-4	60
DCM-EtOAc (85:15)	5-10	100
DCM-EtOAc (80:20)	11-16	100
EtOAc	17-20	53

### 3.4.10.2 Analytisk TLC

Platefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel normalfase) som ble utviklet med DCM-EtOAc (85:15) som mobilfase. På bakgrunn av påviste flekker under UV-lys og etter Ceric-spray ble platefraksjonene slått sammen til 7 fraksjoner (Rb-dcm-v5c6c1 til Rb-dcm-v5c6c7) som vist i tabell 3.22. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

Tabell 3.22: Sammenslåing av Rb-dcm-v5c6 platefraksjoner på bakgrunn av analytisk TLC.

Platefraksjon nr.	Fraksjon
1-10	Rb-dcm-v5c6c1
11	Rb-dcm-v5c6c2
12	Rb-dcm-v5c6c3
13	Rb-dcm-v5c6c4
14	Rb-dcm-v5c6c5
15-16	Rb-dcm-v5c6c6
17-20	Rb-dcm-v5c6c7

### 3.4.10.3 NMR-spektroskopi

En liten mengde av hver fraksjon ble løst i  $\text{CDCl}_3$ , og det ble tatt  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz) spektre. For fraksjon c4 ble det også tatt opp  $^{13}\text{C}$  APT (100 MHz).

## 3.4.11 Separering av Rb-dcm-v5c6c4

### 3.4.11.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen, Rb-dcm-v5c6c4 (12 mg) ble løst i ACN (ca. 1 ml). Det ble brukt Kinetex 5u C18 100A omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237 nm). Analysen ble utført ved gradienteluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.23. Det ble samlet 21 kolonnefraksjoner. På bakgrunn av absorpsjonstopper i kromatogrammet ble kolonnefraksjonene slått sammen til 16 fraksjoner (Rb-dcm-v5c6c4h1 til Rb-dcm-v5c6c4h15) som vist i tabell 3.24. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor, oljepumpe og vakuumsentrifuge, og veid.

Tabell 3.23: Gradientsystem for preparativ HPLC av Rb-dcm-v5c6c4.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	80	20	20
20	20	80	20
25	20	20	20

Tabell 3.24: Sammenslåing av Rb-dcm-v5c6c4 kolonnefraksjoner.

Kolonnefraksjon nr.	Fraksjon
1	Rb-dcm-v5c6c4 h1
2	Rb-dcm-v5c6c4 h2
3	Rb-dcm-v5c6c4 h3
4	Rb-dcm-v5c6c4 h4
5-7	Rb-dcm-v5c6c4 h5
8	Rb-dcm-v5c6c4 h6
9	Rb-dcm-v5c6c4 h7
10	Rb-dcm-v5c6c4 h8
11	Rb-dcm-v5c6c4 h9
12	Rb-dcm-v5c6c4 h10
13	Rb-dcm-v5c6c4 h11
14	Rb-dcm-v5c6c4 h12
15	Rb-dcm-v5c6c4 h13
16	Rb-dcm-v5c6c4 h14
17	Rb-dcm-v5c6c4 h15
18-21	Rb-dcm-v5c6c4 h16

### 3.4.11.2 NMR-spektroskopi

Fraksjonene h2-h4, h11 og h15 ble løst i deuterert CDCl<sub>3</sub>, og det ble tatt <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) spektre. For fraksjonene h11 og h15 ble det også tatt opp <sup>13</sup>C APT (150 MHz).

## 3.4.12 Separering av Rb-dcm-v5c6c5

### 3.4.12.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen, Rb-dcm-v5c6c5 (ca. 5 mg) ble løst i ACN (ca. 1 ml). Det ble brukt Chromolith Semiprep RP-18e omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237 nm). Analysen ble utført ved gradienteluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.25. Det ble samlet 15 kolonnefraksjoner (Rb-dcm-v5c6c5h1 til Rb-dcm-v5c6c5h15) som vist i tabell 3.26. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på vakuumsentrifuge og veid.

Tabell 3.25: Gradientsystem for preparativ HPLC av Rb-dcm-v5c6c5.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	80	20	10
20	20	80	10
25	20	80	10

Tabell 3.26: Sammenslåing av Rb-dcm-v5c6c5 kolonnefraksjoner.

Kolonnefraksjon nr.	Fraksjon
1	Rb-dcm-v5c6c5 h1
2	Rb-dcm-v5c6c5 h2
3	Rb-dcm-v5c6c5 h3
4	Rb-dcm-v5c6c5 h4
5	Rb-dcm-v5c6c5 h5
6	Rb-dcm-v5c6c5 h6
7	Rb-dcm-v5c6c5 h7
8	Rb-dcm-v5c6c5 h8
9	Rb-dcm-v5c6c5 h9
10	Rb-dcm-v5c6c5 h10
11	Rb-dcm-v5c6c5 h11
12	Rb-dcm-v5c6c5 h12
13	Rb-dcm-v5c6c5 h13
14	Rb-dcm-v5c6c5 h14
15	Rb-dcm-v5c6c5 h15

### 4.4.12.2 NMR-spektroskopi

Fraksjonene Rb-dcm-v5c6c5 h1 og h6-h7 ble løst i CDCl<sub>3</sub>, og det ble tatt <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) spektre.



## 3.5 Fraksjonering av MeOH-råekstrakt av rotbark

### 3.5.1 Separering av Rb-meoh

#### 3.5.1.1 Versaflash™ kolonne separasjon

MeOH-råekstrakt av rotbark (4,0 g) ble løst i MeOH, og applisert på en Versapak® omvendt-fase kolonne (40 x 150 mm). Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (40:60) og deretter gradienteluert med MeOH-vann og MeOH som vist i tabell 3.27. Totalt ble det samlet 27 kolonnefraksjoner à ca. 30 ml (fraksjon nr. 1-9) og à ca. 60 ml (fraksjon nr. 10-27).

Tabell 3.27: Mobilfaser benyttet ved Versaflash™ separasjon av MeOH-råekstrakt av rotbark

Mobilfase	Kolonnefraksjon nr.	Mengde (ml)
MeOH-vann (40:60)	1-9	240
MeOH-vann (50:50)	10-14	280
MeOH-vann (60:50)	15-18	275
MeOH-vann (70:30)	19-22	300
MeOH	23-27	400

#### 3.5.1.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel omvendt-fase). For kolonnefraksjon nr. 1-15 ble MeOH-vann (50:50) brukt som mobilfase, mens for kolonnefraksjon nr. 12-27 ble det brukt MeOH. På bakgrunn av påviste flekker under UV-lys og etter Ceric-spray ble kolonnefraksjonene slått sammen til 9 fraksjoner (Rb-meoh-v1 til Rb-meoh-v9) som vist i tabell 3.28. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

Tabell 3.28: Sammenslåing av Rb-meoh kolonnefraksjoner på bakgrunn av analytisk TLC.

Kolonnefraksjon nr.	Fraksjon
1-3	Rb-meoh-v1
4-6	Rb-meoh-v2
7-8	Rb-meoh-v3
9-13	Rb-meoh-v4
14-16	Rb-meoh-v5
17-22	Rb-meoh-v6
23-24	Rb-meoh-v7
25	Rb-meoh-v8
26-27	Rb-meoh-v9

#### 3.5.1.3 NMR-spektroskopi

En liten mengde av hver fraksjon ble løst i CD<sub>3</sub>OD, og det ble tatt <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) spektre. For fraksjon v7 ble det også tatt <sup>13</sup>C APT (100 MHz) og HSQC (400/100 MHz).

### 3.5.2 Separering av Rb-meoh-v6

#### 3.5.2.1 Sentrifugal akselerert preparativ TLC - Chromatotron™

Fraksjonen, Rb-meoh-v6 (100 mg) ble løst i EtOAc (1 ml) og noen dråper MeOH.

Prøveløsningen ble applisert på en 2 mm kromatotronplate (Si gel PF254 gipshaltig). Platen ble kondisjonert med DCM-EtOAc (50:50) og deretter gradienteluert med DCM-EtOAc, EtOAc og EtOAc-MeOH blandinger som vist i tabell 4.29. Totalt ble det samlet 25 platefraksjoner à ca. 14 ml.

Tabell 3.29: Mobilfaser benyttet ved sentrifugalt akselerert TLC av Rb-meoh-v6.

Mobilfase	Platefraksjon nr.	Mengde (ml)
DCM-EtOAc (50:50)	1-6	100
EtOAc	7-9	50
EtOAc-MeOH (98:2)	10-12	50
EtOAc-MeOH (96:4)	13-16	50
EtOAc-MeOH (94:6)	17-19	50
EtOAc-MeOH (80:20)	20-22	50
EtOAc-MeOH (70:30)	23-25	50

#### 3.5.2.2 Analytisk TLC

Platefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel normalfase) som ble utviklet med DCM-EtOAc (50:50), EtOAc, og EtOAc-MeOH (95:5) som mobilfase. På bakgrunn av påviste flekker under UV-lys og etter Ceric-spray ble platefraksjonene slått sammen til 6 fraksjoner (Rb-meoh-v6c1 til Rb-meoh-v6c6) som vist i tabell 4.30. Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

Tabell 3.30: Sammenslåing av Rb-meoh-v6 platefraksjoner på bakgrunn av analytisk TLC.

Platefraksjon nr.	Fraksjon
1	Rb-meoh-v6c1
2	Rb-meoh-v6c2
3	Rb-meoh-v6c3
4	Rb-meoh-v6c4
5	Rb-meoh-v6c5
6	Rb-meoh-v6c6

#### 3.5.2.3 NMR-spektroskopi

En liten mengde av hver fraksjon ble løst i CDCl<sub>3</sub>, og det ble tatt opp <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) spektra. For fraksjonen c5 ble det også tatt opp <sup>13</sup>C APT (100 MHz), COSY (400MHz) og HSQC (400/100) spektre.

### 3.5.2.4 Analytisk HPLC

En liten mengde av fraksjonen c5 ble løst i ACN-vann (50:50) til en konsentrasjon på 0,1 mg/ml. Det ble brukt Chromolith® RP-18e omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237nm). Analysen ble utført ved gradienteluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.31.

Tabell 3.31: Gradientsystem for analytisk HPLC av Rb-dcm-v6c5.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	80	20	3
1	80	20	3
15	5	95	3
18	5	95	3
19	80	20	3
22	80	20	3

## 3.5.3 Separering Rb-meoh-v7

### 3.5.3.1 Sentrifugal akselerert preparativ TLC - Chromatotron™

Fraksjonen, Rb-MeOH-v7 (230 mg) ble løst i ca. 2 ml EtOAc-MeOH (90:10), og applisert på en 2 mm kromatotronplate (Si gel PF254 gipshaltig). Platen ble kondisjonert med EtOAc og deretter gradienteluert med EtOAc og EtOAc-MeOH som vist i tabell 3.32. Totalt ble det samlet 11 platefraksjoner à ca. 15 ml.

Tabell 3.32: Mobilfaser benyttet ved sentrifugalt akselerert TLC av Rb-meoh-v7.

Mobilfase	Platefraksjon nr.	Mengde (ml)
EtOAc	1-5	80
EtOAc-MeOH (98:2)	6-8	50
EtOAc-MeOH (80:20)	9-11	47

### 4.5.3.2 Analytisk TLC

Platefraksjonene ble applisert på en TLC-plate (silikagel normalfase) som ble utviklet med EtOAc-MeOH (90:10) som mobilfase. På bakgrunn av påviste flekker under UV-lys og etter Ceric-spray ble platefraksjonene slått sammen til 6 fraksjoner (Rb-meoh-v7c1 til Rb-meoh-v7c6) som vist i tabell 3.33. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

Tabell 3.33: Sammenslåing av Rb-meoh-v7 platefraksjoner på bakgrunn av analytisk TLC.

Platefraksjon nr.	Fraksjon
1	Rb-meoh-v7c1
2	Rb-meoh-v7c2
3	Rb-meoh-v7c3
4-6	Rb-meoh-v7c4
7-10	Rb-meoh-v7c5
11	Rb-meoh-v7c6

### 3.5.3.3 NMR-spektroskopi

En liten mengde av hver fraksjon ble løst i CD<sub>3</sub>OD, og det ble tatt opp <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) spektre.

## 3.5.4 Separering av Rb-meoh-v7c2+3

### 3.5.4.1 Sentrifugal akselerert preparativ TLC - Chromatotron™

Fraksjonene Rb-meoh-v7c2 og Rb-meoh-v7c3 ble slått sammen til fraksjon Rb-meoh-v7c2-3 på bakgrunn av NMR-spektroskopi. Denne fraksjonen (150 mg) ble løst i DCM (ca. 2ml), og applisert på en 2 mm kromatotronplate (Si gel PF254 gipshaltig). Platen ble kondisjonert med DCM og deretter gradienteluert med DCM, DCM-EtOAc, EtOAc og EtOAc-MeOH som vist i tabell 3.34. Totalt ble det samlet 26 platefraksjoner à ca. 25 ml (fr. 1), 15 ml (fr. 2-9) og 18 ml (fr. 10-26).

Tabell 3.34: Mobilfaser benyttet ved sentrifugalt akselerert TLC av Rb-meoh-v7c2+3.

Mobilfase	Platefraksjon nr.	Mengde (ml)
DCM	1-4	60
DCM-EtOAc (50:50)	4-7	50
DCM-EtOAc (30:70)	8-11	50
EtOAc	12-14	50
EtOAc-MeOH (98:2)	15-17	50
EtOAc-MeOH (96:4)	18-20	50
EtOAc-MeOH (92:8)	21-23	50
EtOAc-MeOH (80:20)	24-26	50

### 3.5.4.2 Analytisk TLC

Platefraksjon nr. 1-15 ble applisert på TLC-plater (silikagel normalfase) som ble utviklet med EtOAc som mobilfase, mens EtOAc-MeOH (80:20) ble brukt som mobilfase for platefraksjon nr. 10-16. På bakgrunn av påviste flekker under UV-lys og etter Ceric-spray ble platefraksjonene slått sammen til 8 fraksjoner (Rb-meoh-v7c2+3c1 til Rb-meoh-v7c2+3c8) som vist i tabell 3.35. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

Tabell 3.35: Sammenslåing av Rb-meoh-v7c2+3 platefraksjoner på bakgrunn av analytisk TLC.

Platefraksjon nr.	Fraksjon
2-5	Rb-meoh-v7c2+3c1
6-7	Rb-meoh-v7c2+3c2
8	Rb-meoh-v7c2+3c3
9-11	Rb-meoh-v7c2+3c4
12-13	Rb-meoh-v7c2+3c5
14-18	Rb-meoh-v7c2+3c6
19-20	Rb-meoh-v7c2+3c7
21-26	Rb-meoh-v7c2+3c8

### 3.5.4.3 NMR-spektroskopi

Hver fraksjon ble løst i CDCl<sub>3</sub>, og det ble tatt opp <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) spektre. For fraksjonene c4 og c6 ble det også tatt opp <sup>13</sup>C APT (100 MHz), COSY (400MHz) og HSQC (400/100 MHz).

### 3.5.4.4 Analytisk HPLC

En liten mengde av fraksjonen c6 ble løst i ACN-vann (50:50) til en konsentrasjon på 0,1 mg/ml. Det ble brukt Chromolith® RP-18e omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237nm, 280 nm). Analysen ble utført ved gradienteluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.36.

Tabell 3.36: Gradientsystem for analytisk HPLC av Rb-dcm-v7c2+3c6.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	80	20	3
1	80	20	3
15	5	95	3
18	5	95	3
19	80	20	3
22	80	20	3

### 3.5.4.5 Optisk rotasjon

Fraksjonen c6 ble løst i kloroform, til en konsentrasjon på 1 mg/ml. Apparatet ble innstilt til en temperatur på 25 °C, og optisk rotasjon ble målt.

### 3.5.4.6 Bioassays

Rekelarvetest ble utført på prøveløsninger av c6 i flere konsentrasjoner. Det ble også sendt prøve av denne fraksjonen til Australia for antiplasmodiumtesting.

## 3.6 Fraksjonering av MeOH-råekstrakt av stammebark

### 3.6.1 Separering av Sb-meoh

#### 3.6.1.1 Sephadex™ LH-20 kolonne separasjon

En Sephadex™ LH-20 kolonne (45 x 360 mm) ble kondisjonert med MeOH-vann (20:80). MeOH-ekstraktet av stammebark (18 g) ble løst i MeOH-vann (50:50), filtrert, og applisert på kolonnen. Som mobilfase ble det brukt gradienteluering med MeOH og vann som vist i tabell 4.37. Totalt ble det samlet 14 kolonnefraksjoner à ca. 250 ml (fr. 1-10) og 500 ml (fr. 11-14).

Tabell 3.37: Mobilfaser benyttet ved Sephadex™ LH-20 kolonne separasjon av MeOH-ekstrakt av stammebark.

Mobilfase	Kolonnefraksjon nr.	Mengde (ml)
MeOH-Vann (20:80)	1-2	500
MeOH-Vann (30:70)	3-4	500
MeOH-Vann (40:60)	5-6	500
MeOH-Vann (50:50)	7-8	500
MeOH-Vann (70:30)	9-10	500
MeOH-Vann (85:15)	11	500
MeOH	12-14	1500

#### 3.6.1.2 Analytisk TLC

Fraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel omvendt-fase) som ble utviklet med MeOH-vann (50:50) som mobilfase for kolonnefraksjon nr. 1-5, og for kolonnefraksjon nr. 4-14 ble det brukt MeOH-vann (67:33). På bakgrunn av påviste flekker under UV-lys og etter Ceric-spray ble kolonnefraksjonene slått sammen til 12 fraksjoner (Sb-meoh-s1 til Sb-meoh-s12) som vist i tabell 3.38. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

Tabell 3.38: Sammenslåing av Sb-meoh kolonnefraksjoner på bakgrunn av analytisk TLC.

Kolonnefraksjon nr.	Fraksjon
1	Sb-meoh-s1
2	Sb-meoh-s2
3	Sb-meoh-s3
4	Sb-meoh-s4
5-6	Sb-meoh-s5
7	Sb-meoh-s6
8	Sb-meoh-s7
9	Sb-meoh-s8
10-11	Sb-meoh-s9
12	Sb-meoh-s10
13	Sb-meoh-s11
14	Sb-meoh-s12

### 3.6.1.3 NMR-spektroskopi

En liten mengde av hver fraksjon ble løst i CD<sub>3</sub>OD, og det ble tatt <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) spektre. Det ble også tatt <sup>1</sup>H-NMR og <sup>13</sup>C APT spektre for krystaller i fraksjon s5.

### 3.6.1.4 Bioassays

Rekelarvetest ble utført på prøveløsninger av alle fraksjonene i flere konsentrasjoner. Det ble også sendt prøver av alle fraksjonene til Australia for antiplasmodiumtesting.

## 3.6.2 Separering av Sb-meoh-s3

### 3.6.2.1 Versaflash™ kolonneparasjon

Fraksjonen Sb-meoh-s3 (ca. 1500 mg) ble løst i MeOH (3 ml), og applisert på en Versapak® omvendt-fase kolonne (40 x 150 mm). Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (5:95) og deretter gradienteluert med MeOH og vann som vist i tabell 3.39. Totalt ble det samlet 66 kolonnefraksjoner à ca. 30 ml (fraksjon nr. 1-11) og 60 ml (fraksjon nr. 12-66).

Tabell 3.39: Mobilfaser benyttet ved Versaflash separasjon av Sb-meoh-s3.

Mobilfase	Kolonnefraksjon nr.	Mengde (ml)
MeOH-vann (5:95)	1-12	400
MeOH-vann (10:90)	13-17	300
MeOH-vann (20:80)	18-22	300
MeOH-vann (30:70)	23-32	600
MeOH-vann (40:60)	33-42	600
MeOH-vann (50:50)	43-52	600
MeOH-vann (60:50)	53-57	300
MeOH-vann (82:18)	58-62	300
MeOH	63-66	300

### 3.6.2.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel omvendt-fase) og utviklet med MeOH-vann (10:90) og MeOH-vann (20:80) som mobilfase. På bakgrunn av påviste flekker under UV-lys og etter Ceric-spray ble kolonnefraksjonene slått sammen til 9 hovedfraksjoner (Sb-meoh-s3v1 til Sb-meoh-s3v9) som vist i tabell 3.40. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

Tabell 3.40: Sammenslåing av Sb-meoh-s3 kolonnefraksjoner på bakgrunn av analytisk TLC.

Kolonnefraksjon nr.	Fraksjon
1-11	Sb-meoh-s3 v1
12-17	Sb-meoh-s3 v2
18-22	Sb-meoh-s3 v3
23-33	Sb-meoh-s3 v4
34-42	Sb-meoh-s3 v5
43-52	Sb-meoh-s3 v6
53-57	Sb-meoh-s3 v7
58-62	Sb-meoh-s3 v8
63-66	Sb-meoh-s3 v9

### 3.6.2.3 NMR-spektroskopi

En liten mengde av hver fraksjon ble løst i CD<sub>3</sub>OD, og det ble tatt <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz).

### 3.6.2.4 Analytisk HPLC

En liten mengde av fraksjonene v1-v4 og v7-v8 ble løst i ACN-vann (30:70) til en konsentrasjon på 0,2 mg/ml. Det ble brukt Chromolith® RP-18e omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237nm). Analysen ble utført ved gradienteluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.41.

Tabell 3.41: Gradientsystem for analytisk HPLC av Sb-meoh-s3v1 til Sb-meoh-s3v8.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	98	2	3
1	98	2	3
15	20	80	3
16	98	2	3
21	98	2	3

Det ble også brukt analytisk HPLC med isokratisk eluering, for å finne en enklere og raskere metode som er passende for eventuell videre separering i preparativ HPLC. En liten mengde av fraksjonene v2–v4 ble løst i ACN-vann (30:70) til en konsentrasjon på 0,2 mg/ml. Det ble brukt Kinetex 5u C18 100 A omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237nm). Analysen ble utført ved isokratisk eluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.42.

Tabell 3.42: Isokratisk eluering system for analytisk HPLC av Sb-meoh-s3v2 til Sb-meoh-s3v4.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	87	13	1
10	87	13	1



En liten mengde av fraksjonene Sb-meoh-s3v7 og Sb-meoh-s3v8 ble løst i ACN-vann (30:70) til en konsentrasjon på 0,2 mg/ml. Det ble brukt Kinetex 5u C18 100 A omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237 nm). Analysen ble utført ved isokratisk eluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.43.

Tabell 3.43: Isokratisk eluering system for analytisk HPLC av Sb-meoh-s3v7 og Sb-meoh-s3v8.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	Acetonitril (%)	Flow (ml/min)
0	80	20	1
10	80	20	1

### 3.6.3 Separering Sb-meoh-s3v1

#### 3.6.3.1 Preparativ HPLC

Det ble veid ut 40 mg av Sb-meoh-s3v1, og ettersom det er en relativ stor mengde ble fraksjonen fordelt på to prep. HPLC separasjoner. Hver prøve (ca. 20 mg) ble løst i ca. 1 ml ACN-vann (30:70). Det ble brukt Kinetex 5u C18 100A (150 x 21,2 mm) omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237 nm). Analysen ble utført ved isokratisk eluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.44. På bakgrunn av absorpsjonstopper i kromatogrammet ble det totalt valgt ut 9 kolonnefraksjoner etter kjøring av begge prøvene, og slått sammen til 8 hovedfraksjoner (Sb-meoh-s3v1h1 til Sb-meoh-s3v1h8) som vist i tabell 3.45. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor, oljepumpe og vakuumsentrifuge, og veid.

Tabell 3.44: Isokratisk eluering system for preparativ HPLC av Sb-meoh-s3v1.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	87	13	20
25	87	13	20

Tabell 3.45: Utvalgte og sammenslåtte Sb-meoh-s3v1 kolonnefraksjoner.

Kolonnefraksjon nr. (1.prøve)	Kolonnefraksjon nr. (2.prøve)	Fraksjon
5		Sb-meoh-s3v1h1
6		Sb-meoh-s3v1h2
7		Sb-meoh-s3v1h3
	4	Sb-meoh-s3v1h4
	5	Sb-meoh-s3v1h5
	6	Sb-meoh-s3v1h6
	7	Sb-meoh-s3v1h7
8	8	Sb-meoh-s3v1h8

### 3.6.3.2 NMR-spektroskopi

Fraksjonene h1 og h4 ble løst i CD<sub>3</sub>OD, og det ble tatt <sup>1</sup>H-NMR spekter (400 MHz). På bakgrunn av spektrene ble fraksjonene slått sammen til h1+h4. For fraksjonen h1+h4 ble det også tatt <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz), HSQC (400/100 MHz), COSY (400 MHz) og HMBC (400/100 MHz).

### 3.6.3.3 Optisk rotasjon

Fraksjonen h1+h4 ble løst i vann, til en konsentrasjon på 4 mg/ml. Apparatet ble innstilt til en temperatur på 20 °C, og optisk rotasjon ble målt.

### 3.6.3.4 Massespektrometri

Det ble sendt en liten mengde av fraksjonen h1+h4 til Kjemisk Institutt ved Universitetet i Oslo for massespektrometri analyse.

### 3.6.3.5 Bioassays

Rekelarvetest ble utført på prøveløsninger av h1+h4 i flere konsentrasjoner. Det ble også sendt prøve av fraksjonen h1+h4 til Australia for antiplasmodiumtesting.

## 3.6.4 Separering av Sb-meoh-s3v2

### 3.6.4.1 Preparativ HPLC

Det ble veid ut 50 mg av Sb-meoh-s3v2, og ettersom det var en relativ stor mengde, ble fraksjonen fordelt på to prep-HPLC separasjoner. Hver prøve (ca. 25 mg) ble løst i ca. 1 ml ACN-vann (30:70). Det ble brukt Kinetex 5u C18 100A (150 x 21,2 mm) omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237 nm). Analysen ble utført ved isokratisk eluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.46. På bakgrunn av absorpsjonstopper i kromatogrammet ble det totalt valgt ut 16 kolonnefraksjoner etter kjøring av begge prøvene. For å bestemme sammenslåing av kolonnefraksjoner, ble det utført analytisk HPLC på noen av kolonnefraksjonene (se avsnitt 4.6.4.2). Kolonnefraksjonene ble slått sammen til 6 hovedfraksjoner (Sb-meoh-s3v2h1 til Sb-meoh-s3v2h6) som vist i tabell 3.47. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor, oljepumpe og vakuumsentrifuge, og veid.

Tabell 3.46: Isokratisk eluering system for preparativ HPLC av Sb-meoh-s3v2.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	87	13	20
25	87	13	20

Tabell 3.47: Utvalgte og sammenslåtte Sb-meoh-s3v2 kolonnefraksjoner.

Kolonnefraksjon nr. (1.prøve)	Kolonnefraksjon nr. (2.prøve)	Fraksjon
4	4	Sb-meoh-s3v2h1
5	5	Sb-meoh-s3v2h2
6	6	Sb-meoh-s3v2h3
7-8	7-8	Sb-meoh-s3v2h4
9	9-10	Sb-meoh-s3v2h5
11	11-12	Sb-meoh-s3v2h6

### 3.6.4.2 Analytisk HPLC

Kolonnefraksjonene h5(1.prøve), h6 (2.prøve), h5(2.prøve), h6 (2.prøve) og h7(2.prøve) ble løst i ACN-vann (30:70) til en konsentrasjon på 0,2 mg/ml. Det ble brukt Kinetex 5u C18 100A (150 x 4,6 mm) omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237 nm). Analysen ble utført ved isokratisk eluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.48.

Tabell 3.48: Isokratisk eluering system for analytisk HPLC av noen kolonnefraksjoner av Sb-meoh-s3v2.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	87	13	1
10	87	13	1

### 3.6.4.3 NMR-spektroskopi

Fraksjonene ble løst i CD<sub>3</sub>OD, og det ble tatt opp <sup>1</sup>H-NMR spekter (400 MHz). For fraksjonene h3 og h5 ble det også tatt opp <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) og HSQC spektre (400/100 MHz). I tillegg for fraksjon h5 ble det i tillegg tatt COSY (400 MHz) og HMBC (400/100 MHz).

### 3.6.4.4 Bioassays

Rekelarvetest ble utført på prøveløsninger av h3 og h5 i flere konsentrasjoner. Det ble også sendt prøver av h3 og h5 til Australia for antiplasmodiumtesting.

### 3.6.5 Separering Sb-meoh-s7

#### 3.6.5.1 Versaflash™ kolonne separasjon

Fraksjonen Sb-meoh-s7 (ca. 590 mg) ble løst i MeOH (1 ml), og applisert på en Versapak® omvendt-fase kolonne (40 x 150 mm). Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (20:80) og deretter gradienteluert med MeOH-vann og MeOH som vist i tabell 3.49. Totalt ble det samlet 40 kolonnefraksjoner à ca. 60 ml.

Tabell 3.49 Mobilfaser benyttet ved Versaflash separasjon av Sb-meoh-s7.

Mobilfase	Kolonnefraksjon nr.	Mengde (ml)
MeOH-vann (20:80)	1-7	300
MeOH-vann (40:60)	8-13	400
MeOH-vann (50:50)	14-28	900
MeOH-vann (60:40)	29-35	500
MeOH-vann (80:20)	36-40	300
MeOH	41-45	300

#### 3.6.5.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel omvendt-fase) som ble utviklet med MeOH-vann (50:50) som mobilfase. På bakgrunn av påviste flekker under UV-lys og etter Ceric-spray ble kolonnefraksjonene slått sammen til 7 hovedfraksjoner (Sb-meoh-s7v1 til Sb-meoh-s7v7) som vist i tabell 3.50. Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

Tabell 3.50: Sammenslåing av Sb-meoh-s7 kolonnefraksjoner på bakgrunn av analytisk TLC.

Kolonnefraksjon nr.	Fraksjon
8-13	Sb-meoh-s7 v1
14-16	Sb-meoh-s7 v2
17-19	Sb-meoh-s7 v3
20-22	Sb-meoh-s7 v4
23-27	Sb-meoh-s7 v5
28-35	Sb-meoh-s7 v6
36-40	Sb-meoh-s7 v7

#### 3.6.5.3 NMR-spektroskopi

En liten mengde av hver fraksjon ble løst i CD<sub>3</sub>OD, og det ble tatt opp <sup>1</sup>H-NMR spekter (400 MHz).

### 3.6.5.3 Analytisk HPLC

En liten mengde av fraksjonen v1 ble løst i ACN-vann (50:50) til en konsentrasjon på 0,6 mg/ml. Det ble brukt Kinetex 5u C18 100A (150 x 4,6 mm) omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237 nm). Analysen ble utført ved gradienteluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.51.

Tabell 3.51: Gradientsystem for analytisk HPLC av Sb-meoh-s7v1.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	80	20	1
1	80	20	1
15	5	95	1
18	5	95	1
19	80	20	1
22	80	20	1

### 3.6.6 Separering av Sb-meoh-s7v1

#### 3.6.6.1 Preparativ HPLC

Det ble veid ut 30 mg av Sb-meoh-s7v1, og ettersom det er en relativ stor mengde, ble fraksjonen fordelt på to prep. HPLC separasjoner. Hver prøve (ca. 15 mg) ble løst i ca. 1ml ACN-vann (50:50). Det ble brukt Kinetex 5u C18 100A (150 x 21,2 mm) omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237 nm). Analysen ble utført ved isokratisk eluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 4.52. På bakgrunn av absorpsjonstopper i kromatogrammet ble det totalt valgt ut 12 kolonnefraksjoner fra begge prøvene, og de ble slått sammen til 4 hovedfraksjoner (Sb-meoh-s7v1h1 til Sb-meoh-s7v1h4) som vist i tabell 3.53. Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor, oljepumpe og vakuumsentrifuge, og veid.

Tabell 3.52: Gradienteluering system for preparativ HPLC av Sb-meoh-s7v1.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	Acetonitril (%)	Flow (ml/min)
0	80	20	20
1	80	20	20
17	5	95	20
20	5	95	20

Tabell 3.53: Utvalgte og sammenslåtte Sb-meoh-s7v1 kolonnefraksjoner.

Kolonnefraksjon nr. (1.prøve)	Kolonnefraksjon nr. (2.prøve)	Fraksjon
6-8	6-8	Sb-meoh-s3v1h1
9	9	Sb-meoh-s3v1h2
10	10	Sb-meoh-s3v1h3
11	11	Sb-meoh-s3v1h4

### 3.6.6.2 NMR-spektroskopi

Fraksjonene ble løst i CD<sub>3</sub>OD, og det ble tatt opp <sup>1</sup>H-NMR spekter (400 MHz). For fraksjonene h3 og h4 ble det også tatt <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz), <sup>3</sup>C APT (100 MHz), HSQC (400/100 MHz), COSY (400 MHz), HMBC (400/100 MHz) og NOESY (600 MHz) spektre.

### 3.6.6.3 Analytisk HPLC

Fraksjonen h3 og h4 ble løst i ACN-vann (50:50) til en konsentrasjon på 0,5 mg/ml. Det ble brukt Kinetex 5u C18 100A (150 x 4,6 mm) omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237nm). Analysen ble utført ved gradienteluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.54.

Tabell 3.54: Gradientsystem for analytisk HPLC av Sb-meoh-s7v1h3 og h4.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN ( % )	Flow (ml/min)
0	90	10	1
2	90	10	1
15	50	50	1
18	5	95	1
19	80	20	1
22	80	20	1

### 3.6.6.3 Massespektrometri

Det ble sendt en liten mengde av fraksjonen h3 og h4 til Kjemisk Institutt ved Universitetet i Oslo for massespektrometri analyse.

### 3.6.6.4 Biologiske tester

Rekelarvetest ble utført på prøveløsning av h4 i flere konsentrasjoner. Det ble også sendt prøve av fraksjonen h4 til Australia for antiplasmodiumtesting.

## 3.6.7 Separering av Sb-meoh-s11 med prep. HPLC

### 3.6.7.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen, Sb-meoh-s11 (ukjent mengde) ble løst i ca. 1ml ACN-vann (50:50). Det ble brukt Chromolith Semiprep RP 18e (100 x 10 mm) omvendt-fase kolonne og UV-detektor (237 nm). Analysen ble utført ved gradienteluering med ACN og vann tilsatt 0,05 % TFA som vist i tabell 3.55. Det ble samlet 13 kolonnefraksjoner. På bakgrunn av absorpsjonstopper i kromatogrammet

ble det valgt ut 2 kolonnefraksjoner (Sb-meoh-s11h4 og Sb-meoh-s11h5) som vist i tabell 3.56. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor, oljepumpe og vakuumsentrifuge, og veid.

Tabell 3.55: Gradientsystem for preparativ HPLC av Sb-meoh-s11.

Tid (min)	Vann + 0,05 % TFA (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)
0	80	20	20
20	20	80	20
25	20	80	20

Tabell 3.56: Utvalgte Sb-meoh-s11 kolonnefraksjoner.

Kolonnefraksjon nr.	Fraksjon
4	Sb-meoh-s11-h4
5	Sb-meoh-s11-h5

### 3.6.7.2 NMR-spektroskopi

Begge fraksjonene ble løst i CD<sub>3</sub>OD, og det ble tatt <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) og HSQC (600/150 MHz) spektre. For fraksjonen h4 ble det også tatt opp <sup>13</sup>C APT (150 MHz) og HMBC (600/150 MHz).

### 3.6.7.3 Biologiske tester

Rekelarvetest ble utført på prøveløsninger av h4 i flere konsentrasjoner.

## 3.6.8 Separering av Sb-meoh-s11 med Versaflash™

### 3.6.8.1 Versaflash™ kolonne separasjon

Fraksjonen Sb-meoh-s11 (21 mg) ble løst i MeOH (2 ml), og applisert på en Versapak® omvendt-fase kolonne (23 x 110 mm). Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (50:50) og deretter gradientluert med MeOH-vann og MeOH som vist i tabell 3.57. Totalt ble det samlet 32 kolonnefraksjoner à ca. 12 ml (fraksjon nr. 1-7), 16 ml (fraksjon nr. 9-10, 12-31), 22 ml (fraksjon nr. 8 og 11) og 8 ml (fraksjon nr. 2).

Tabell 3.57: Mobilfaser benyttet ved Versaflash separasjon av Sb-meoh-s11.

Mobilfase	Kolonnefraksjon nr.	Mengde (ml)
MeOH-vann (70:30)	1-11	124
MeOH-vann (85:15)	12	16
MeOH	13-28	224

### 3.6.8.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel normalfase) som ble utviklet med EtOAc som mobilfase. På bakgrunn av påviste flekker under UV-lys og etter Ceric-spray ble kolonnefraksjonene slått sammen til 8 hovedfraksjoner (Sb-meoh-s11v1 til Sb-meoh-s11v8) som vist i tabell 3.58. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

Tabell 3.58: Sammenslåing av Sb-meoh-s11 kolonnefraksjoner på bakgrunn av analytisk TLC.

Kolonnefraksjon nr.	Fraksjon
2	Sb-meoh-s11 v1
3-9	Sb-meoh-s11 v2
10-15	Sb-meoh-s11 v3
16-18	Sb-meoh-s11 v4
19-20	Sb-meoh-s11 v5
21-25	Sb-meoh-s11 v6
26-29	Sb-meoh-s11 v7
30-32	Sb-meoh-s11 v8

### 3.6.8.3 NMR-spektroskopi

En liten mengde av hver fraksjon ble løst i CD<sub>3</sub>OD, og det ble tatt <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz).

## 3.6.9 Separering av Sb-meoh-s12

### 3.6.9.1 Versaflash™ kolonne-separasjon

Fraksjonen Sb-meoh-s12 (24 mg) ble løst i MeOH (2 ml), og applisert på en Versapak™ omvendt-fase kolonne (23 x 110 mm). Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (50:50) og deretter gradienteluert med MeOH-vann og vann som vist i tabell 3.59. Totalt ble det samlet 9 kolonnefraksjoner à ca. 12 ml (fraksjon nr. 1-9) og 19 fraksjoner à ca. 16 ml (fraksjon nr. 10-28).

Tabell 3.59: Mobilfaser benyttet ved Versaflash™ separasjon av Sb-meoh-s12.

Mobilfase	Kolonnefraksjon nr.	Mengde (ml)
MeOH-vann (70:30)	1-11	124
MeOH-vann (85:15)	12	16
MeOH	13-28	224



### 3.6.9.2 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på TLC-plater (silikagel normalfase) som ble utviklet med MeOH-EtOAc (5:95) som mobilfase. På bakgrunn av påviste flekker under UV-lys og etter Ceric-spray ble kolonnefraksjonene slått sammen til 10 fraksjoner (Sb-meoh-s12v2 til Sb-meoh-s12v11) som vist i tabell 3.60. Fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og veid.

Tabell 3.60: Sammenslåing av Sb-meoh-s12 kolonnefraksjoner på bakgrunn av analytisk TLC.

Kolonnefraksjon nr.	Fraksjon
2	Sb-meoh-s12 v2
3	Sb-meoh-s12 v3
4-6	Sb-meoh-s12 v4
7-10	Sb-meoh-s12 v5
11-14	Sb-meoh-s12 v6
15	Sb-meoh-s12 v7
16-17	Sb-meoh-s12 v8
18	Sb-meoh-s12 v9
19-21	Sb-meoh-s12 v10
22-28	Sb-meoh-s12 v11

### 3.6.9.3 NMR-spektroskopi

En liten mengde av hver fraksjon ble løst i CD<sub>3</sub>OD, og det ble tatt opp <sup>1</sup>H-NMR spekter (600 MHz). For fraksjon Sb-meoh-s12v10 ble det også tatt opp <sup>13</sup>C APT (150 MHz), HMBC (150/600 MHz) og HSQC (150/600 MHz) spektrre.

### 3.6.9.4 Bioassays

Rekelarvetest ble utført på prøveløsninger av v10 i flere konsentrasjoner. Ettersom det ikke var nok mengde igjen av fraksjonen Sb-meoh-s12v10, ble det ikke sendt prøve til Australia for antiplasmodiumtesting.

## **4 Resultater og diskusjon**

## 4.1 Ekstraksjon av plantemateriale

### 4.1.1 Soxhlet ekstraksjon

Soxhlet ekstraksjon av pulverisert rotbark og stammebark fra *Z. zanthoxylum* med DCM og MeOH ga fire råekstrakter med ulik farge og konsistens (se figur 4.1). Utbytte av råekstraktene av rotbark er vist i tabell 4.1 og stammebark er vist i tabell 4.2 (se vedlegg 1.1).



Figur 4.1: MeOH- og DCM-råekstrakt av rotbark (t.v.) og MeOH- og DCM-råekstrakt av stammebark (t.h.).

Tabell 4.1: Utbytte av råekstrakter av rotbark etter ekstraksjon.

Løsemiddel	Utbytte (g)	Utbytte (%)
DCM	15,4	5,3
MeOH	29,9	10,2
Totalt	45,3	15,5

Tabell 4.2: Utbytte av råekstrakter av stammebark etter ekstraksjon

Løsemiddel	Utbytte (g)	Utbytte (%)
DCM	6,8	2,4
MeOH	22,0	7,6
Totalt	28,8	10

Tallene fra tabell 4.1 og 4.2 viser at ekstraksjonen av rotbark ga 1,5 ganger større utbytte enn ekstraksjon av stammebark. Ekstraksjon av rotbark og stammebark med MeOH ga henholdsvis 2 og 3 ganger større utbytte enn med DCM. Dette kan tyde på at det var mer av polare forbindelser enn det var av upolare forbindelser i plantedelene. Naturlig forekommende polare forbindelser kan f.eks. være flavonoidglykosider.

#### 4.1.2 NMR-spektroskopi

$^1\text{H}$ -NMR spektrene av DCM-råekstrakt av både rotbark og stammebark ser grovt sett ganske like ut (se vedlegg 2.1a, 2.2a). Store signaler mellom 0,5 og 2 ppm tyder på at mesteparten av DCM-ekstraktene bestod av alifatiske forbindelser. Begge signalene ved rundt 1,3 ppm (bred singlett) og 0,9 ppm (multipllett) er i typiske signalområder for fett. Ellers er det signaler mellom 2 og 5 ppm som kan tyde på alkoholer og ketoner. Det er også signaler mellom 5 og 8 ppm som tyder på olefiner og aromater. Signalet ved 0 ppm skyldes TMS som er brukt som intern standard.

$^{13}\text{C}$  APT spektrene av DCM-råekstrakt av både rotbark og stammebark ser også grovt sett like ut (se vedlegg 2.1b, 2.2b), og viser mye av det samme som  $^1\text{H}$ -NMR spektrene viser. Det er store signaler ved 0-50 ppm som tyder på alifatiske forbindelser, hvor et signal ved ca. 29 ppm er typisk for fett. Signaler ved 50-90 ppm kan tyde på karbon som er bundet til oksygen, 100-150 ppm tyder på aromater og olefiner, og signal ved ca. 168 ppm tyder på en karbonylgruppe. Tripletten ved 77 ppm er løsemidlet,  $\text{CDCl}_3$ .

$^1\text{H}$ -NMR spektrene av MeOH-råekstrakt av både rotbark og stammebark ser grovt sett like ut (se vedlegg 2.3a, 2.4a). Signalene ved 3,3 og rundt 4,9 ppm kommer sannsynligvis fra løsemidlet,  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Det observeres store signaler rundt 3,5-4 ppm som tyder på at det er mye av H-C-O strukturer; dette området er typisk for karbohydrater. Ellers er det også små signaler som tyder på alifatiske forbindelser (0,5-2 ppm) og olefiner / aromater (5,7-8 ppm).

$^{13}\text{C}$  APT spektrene av MeOH-råekstrakt av både rotbark og stammebark ser også stort sett like ut (se vedlegg 2.3b, 2.4b). Multipletten ved 49 ppm skyldes løsemidlet,  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Det er store signaler ved 50-100 ppm som tyder på karbonatomer som er bundet til oksygen. Det observeres også små signaler i områdene 15-45, 105-150, 150-170 ppm som tyder på henholdsvis alifatiske forbindelser, olefiner og aromater, og karbonylgrupper.  $^{13}\text{C}$  APT spektrene viser dermed mye av det samme som  $^1\text{H}$ -NMR spektrene viser.

For både rotbark og stammebark er det stor forskjell mellom spektrene av DCM- og MeOH-råekstrakt. Sannsynligvis er det meste av fett og lipofile forbindelser i plantematerialet blitt ekstrahert med DCM, men rester av lipofile forbindelser i plantematerialet etter DCM ekstraksjon er ekstrahert ut med MeOH, og kommer derfor som små signaler i MeOH-råekstrakt spektrene. I MeOH-råekstrakt spektrene er det mye mer av signalene som tyder på oksygenerte forbindelser, sannsynligvis karbohydrater, mens i DCM-råekstrakt spektrene er det flere signaler av olefiner og aromater.

NMR-spektrene viser ingen tydelig forskjeller mellom rotbark og stammebark, men viser tydelige forskjeller mellom DCM- og MeOH-råekstrakter. DCM-råekstraktene inneholder sannsynligvis mer av fett og andre lipofile forbindelser, mens MeOH-råekstraktene sannsynligvis inneholder mer av karbohydrater og polare eller semipolare forbindelser, som alkaloider.

#### 4.1.3 Analytisk HPLC

I kromatogrammet til DCM-råekstrakt av både rotbark og stammebark observeres det store topper ved retensjonstidene 5.0, 7.4, 7.5, 8.3 og 9.3 min ved 237 nm (se vedlegg 3.1-3.2). I kromatogrammet til MeOH-råekstrakt av stammebark observeres en stor topp ved 4.6 min, som også finnes i kromatogrammet til rotbark, men med mye mindre areal under toppen relativt til de andre toppene i kromatogrammet (se vedlegg 3.3-3.4). Det er også flere store topper ved 5.4, 6.0, 6.2 og 6.8 min i MeOH-råekstrakt av rotbark som stammebark ikke har.

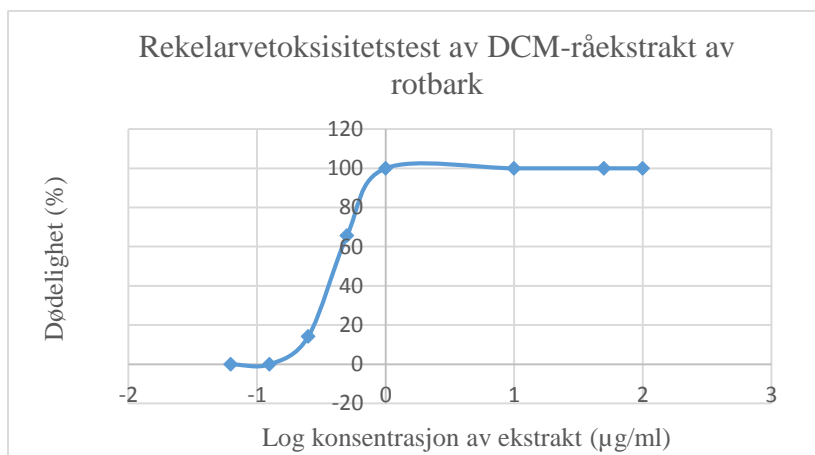
#### 4.1.4 Rekelarvetest

##### *DCM-råekstrakt av rotbark*

DCM-råekstrakt av rotbark viste en tydelig toksisitet på rekelarver (se tabell 4.4). Effekten var konsentrasjonsavhengig (se figur 4.2), og LD<sub>50</sub> ble bestemt til  $0,4 \pm 0,2$  µg/ml. Positiv kontroll med podofyllotoksin (100 µg/ml) ga  $85 \pm 4$  % dødelighet av rekelarver. Negativ kontroll med løsemidlet DMSO ga  $4 \pm 6$  % dødelighet.

Tabell 4.4 Toksisitet på rekelarver av DCM-råekstrakt av rotbark.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,0	100	0	0,4 ± 0,2
50	1,7	100	0	
10	1,0	100	0	
1	0,0	100	0	
0,5	-0,30	66	25	
0,25	-0,6	14	5	
0,125	-0,90	0	0	
0,0625	-1,20	0	0	



Figur 4.2: Toksisitet på rekelarver av DCM-råekstrakt av rotbark.

### *MeOH-råekstrakt av rotbark*

MeOH-råekstrakt av rotbark viste toksisitet på rekelarver, men mye mindre enn DCM-råekstraktet (se tabell 4.5). Effekten var konsentrasjonsavhengig (se figur 4.3), og LD<sub>50</sub> ble bestemt til  $54 \pm 3$  µg/ml. Resultatet av positiv og negativ kontroll ble den samme som for DCM-råekstrakt av rotbark.

Tabell 4.5: Toksisitet på rekelarver av MeOH-råekstrakt av rotbark.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,0	96	6	$54 \pm 3$
80	1,9	85	17	
60	1,8	78	14	
50	1,7	28	10	
10	1	0	0	
1	0	0	0	



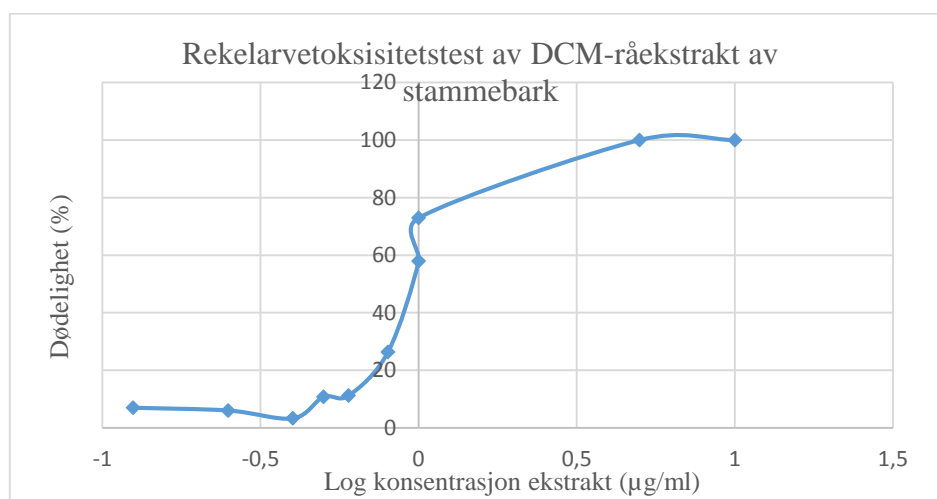
Figur 4.3: Toksisitet på rekelarver av MeOH-råekstrakt av rotbark.

### *Stammebark DCM-råekstrakt*

DCM-ekstrakt av rotbark viste en tydelig toksisitet på rekellarver (se tabell 4.6). Effekten var konsentrasjonsavhengig (se figur 4.4), og LD<sub>50</sub> ble bestemt til  $0,95 \pm 0,10$  µg/ml. Positiv kontroll med podofyllotoksin (100 µg/ml) ga  $69 \pm 4$  % dødelighet av rekellarver. Negativ kontroll med løsemidlet DMSO ga  $7 \pm 7$  % dødelighet av rekellarver.

Tabell 4.6: Toksisitet på rekellarver av DCM-råekstrakt av stammebark.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
10	1,0	100	0	0,95 ± 0,10
5	0,7	100	0	
1	0,0	73	20	
1	0,0	58	8	
0,8	-0,1	26	21	
0,6	-0,2	11	1	
0,5	-0,3	11	10	
0,4	-0,4	3	6	
0,25	-0,6	6	10	
0,125	-0,9	7	6	



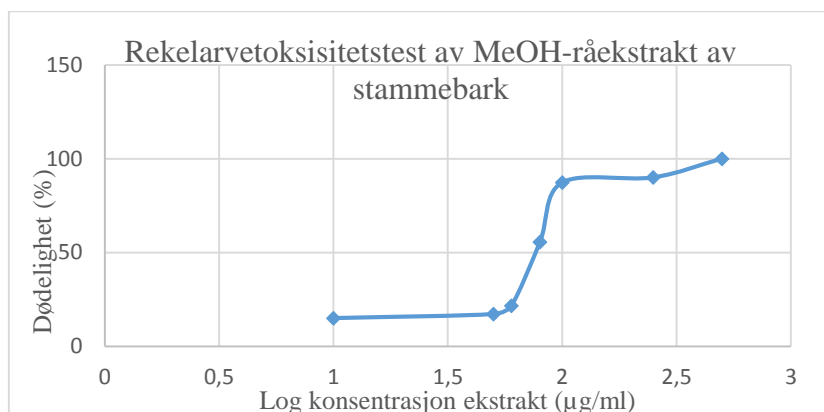
Figur 4.4: Toksisitet på rekellarver av DCM-råekstrakt av rotbark.

### Stammebark MeOH-råekstrakt

MeOH-råekstrakt av rotbark viste toksisitet på rekellarver, men mye mindre enn DCM-råekstraktet (se tabell 4.7). Effekten var konsentrasjonsavhengig (se figur 4.5), og LD<sub>50</sub> ble bestemt til  $76 \pm 7$  µg/ml. Resultatet av positiv og negativ kontroll ble den samme som for DCM-råekstrakt av stammebark.

Tabell 4.7: Toksisitet på rekellarver av MeOH-råekstrakt av stammebark.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
500	2,7	100	0	76 ± 7
250	2,4	90	0	
100	2,0	87	11	
80	1,9	56	10	
60	1,8	22	3	
50	1,7	17	17	
10	1,0	15	13	

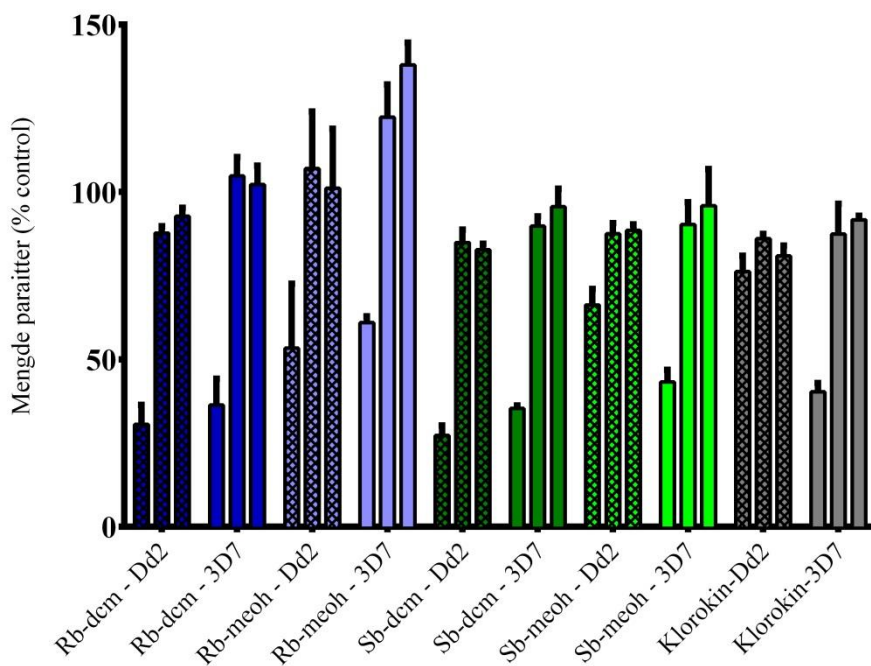


Figur 4.5: Toksisitet på rekellarver av MeOH-råekstrakt av stammebark.

### 4.1.5 Antiplasmodiumtest

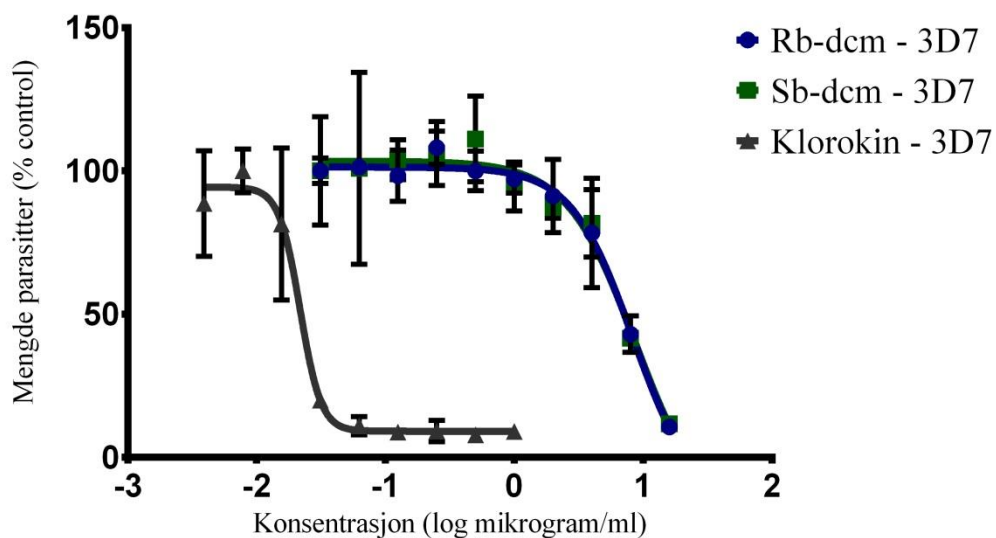
Resultater fra screening forsøk (48 timer) av råekstraktene (se figur 4.6) viste at DCM-råekstraktene av rotbark og stammebark er aktive mot plasmodiumstammene 3D7 (klorokinsensitive parasitter) og Dd2 (klorokinresistente parasitter), mens MeOH-råekstrakt av stammebark er bare aktive mot 3D7. IC<sub>50</sub>-verdier for disse ekstraktene ligger mellom 1 og 10 µ/ml. DCM-råekstraktene av både rotbark og stammebark er noe mer aktive enn klorokin. MeOH-råekstrakt av stammebark er nesten like aktiv som klorokin mot 3D7, mens MeOH-råekstrakt av rotbark er mye mindre aktiv enn klorokin.





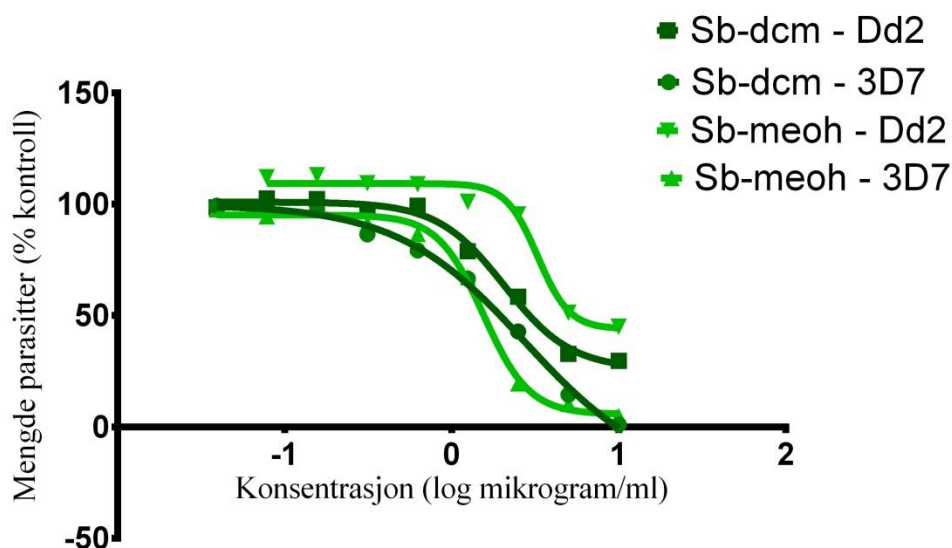
Figur 4.6: Screening antiplasmodiumtest av r  kstraktene i tre konsentrasjoner (10, 1, 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ). Klorokin ble ogs   benyttet ogs   i tre konsentrasjoner (100, 10, 1 nM). Det ble brukt to ulike *P. falciparum* stammer, Dd2 (klorokinresistente parasitter) og 3D7 (klorokinsensitive parasitter).

Resultater fra fullstendig 48-timers fors  k av DCM-r  kstrakter av rot og stammebark ga henholdsvis en  $\text{IC}_{50}$ -verdi p   8,3 og 8,6  $\mu\text{g/ml}$  for 3D7 (se figur 4.7). Det ble ikke m  lt  $\text{IC}_{50}$ -verdi for Dd2 p   grunn av sannsynligvis feil under fors  ket.



Figur 4.7: Fullstendig 48-timers fors  k av DCM-r  kstrakter av stammebark og rotbark for 3D7. Begge r  kstraktene viser lavere antiplasmodiumaktivitet enn klorokin.

Resultater fra fullstendig 72-timers forsøk av DCM- og MeOH-råekstrakter av stammebark på Dd2 og 3D7 ga en  $IC_{50}$ -verdi 2,7 (3D7) og 2,1 (Dd2)  $\mu\text{g/ml}$  for DCM-råekstrakt, og 1,5 (3D7) og 3,3 (Dd2)  $\mu\text{g/ml}$  for MeOH-råekstrakt (se figur 4.8).  $IC_{50}$ -verdi for DCM-råekstrakt av stammebark på 3D7 i dette forsøket viste nesten 4 ganger mer aktivitet enn i 48-timersforsøket.



Figur 4.8: Fullstendig 72-timers forsøk av DCM- og MeOH-råekstrakter av stammebark for plasmodiumstammene Dd2 og 3D7.

Screening av råekstraktene viste at DCM-råekstraktene av både rotbark og stammebark viste antiplasmodiumaktivitet mot 3D7 og Dd2, og MeOH-råekstrakt av stammebark viste antiplasmodiumaktivitet mot 3D7. Resultatene fra 48-timers forsøk viste at DCM-råekstrakt av både rotbark og stammebark ga antiplasmodiumaktivitet mot 3D7. I tillegg viste også DCM- og MeOH-råekstrakt av stammebark antiplasmodiumaktivitet mot 3D7 og Dd2 i et 72-timers forsøk. Det ble ikke utført 48- og 72-timers fullstendige forsøk av MeOH-råekstrakt av rotbark fordi ekstraktet viste seg å være relativt inaktivt ut ifra screening forsøket.

#### 4.1.6 Løselighet

Bestemmelse av løselighet i DMSO og etanol viste at DCM- og MeOH-råekstrakt av rotbark er løselig i 20 mg/ml DMSO. DCM-råekstrakt av stammebark er løselig i 10 mg/ml DMSO og MeOH-råekstrakt av stammebark er løselig i 20 mg/ml DMSO. Ingen av disse råekstraktene er løselig i etanol i konsentrasjonsområdet 10-20 mg/ml.

#### **4.1.7 Videre arbeid**

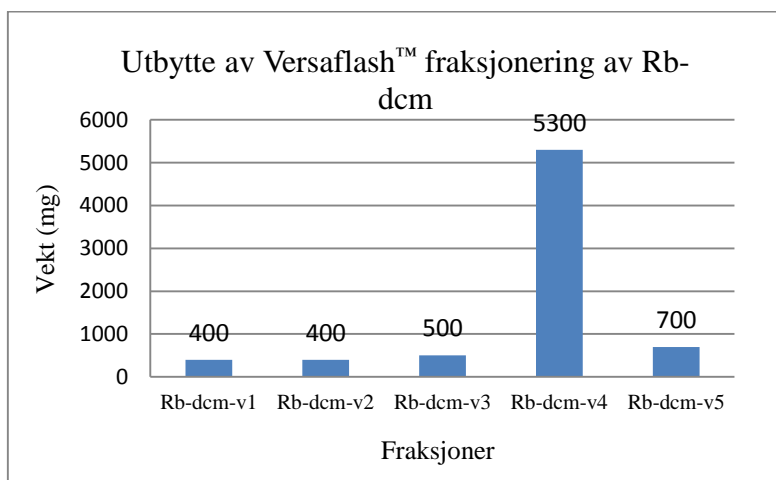
Ut fra utbytte av råekstrakt, NMR-spektroskopi, kromatografi og bioassays ble separering av DCM- og MeOH-råekstrakt av rotbark og MeOH-ekstrakt av stammebark, prioritert.

## 4.2 Fraksjonering DCM-råekstrakt av rotbark

### 4.2.1 Separering av Rb-dcm

#### 4.2.1.1 Versaflash™ kolonneparasjon og analytisk TLC

Ettersom det ble brukt normalfase kolonne ble de mest upolare stoffene eluert først, etterfulgt av de mer polare stoffene på grunn av den økende polare mobilfasesammensetningen. Det ble samlet og slått sammen til 5 fraksjoner (Rb-dcm-v1-Rb-dcm-v5) på bakgrunn av analytisk TLC, hvor fraksjonen v4 og v5 var de største fraksjonene (se figur 4.9). Fraksjonen v4 ble eluert med EtOAc, mens v5 ble eluert med EtOAc og deretter med EtOAc-MeOH (75:25). Siden fraksjonen v4 kom ut av kolonnen før v5, betyr det at fraksjon v4 er mindre polar enn v5. Summen av fraksjonene ga et utbytte på 7,3 g, altså 95 % av påsatt mengde. Tap av stoff kan skyldes at noe stoff ble sittende igjen i sprøyten eller filter som ble brukt til applisering, eller irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Se vedlegg 1.2 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.9: Utbytte av Versaflash™ fraksjoner av Rb-dcm.

#### 4.2.1.2 NMR-spektroskopi

NMR spektrene tyder på at fraksjon v1 og v2 i hovedsak inneholder fett og terpenoider.

Fraksjonene v3, v4 og v5 inneholder sannsynligvis aromater, fett og terpenoider, hvor v4 og v5 inneholder mye mindre fett enn v3.

#### 4.2.1.3 Analytisk HPLC

I kromatogrammene til v3 og v4 observeres det store topper ved retensjonstidene 3.1, 5.4, og 6.4 min. I kromatogrammet til v5 observeres det store topper ved retensjonstidene 2.4, 3.0, 4.0 og 6.4 min.

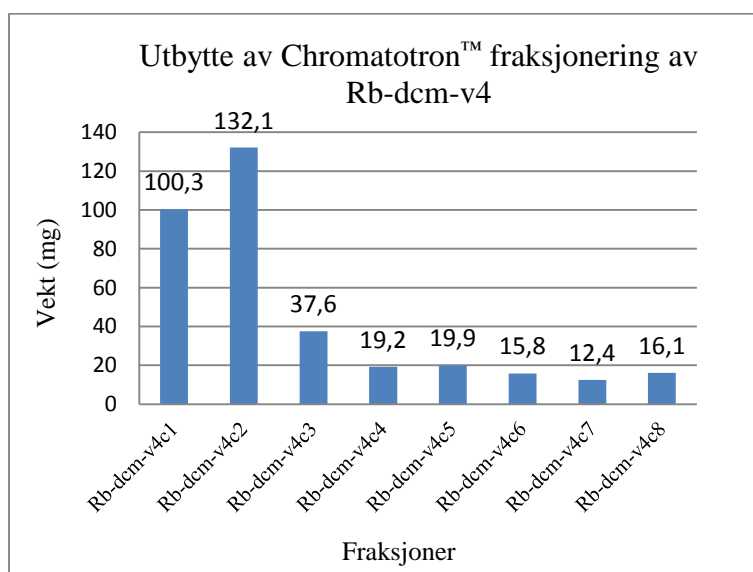
#### 4.2.1.4 Videre arbeid

Ut fra utbytte, NMR-spektroskopi og analytisk HPLC var det ønskelig å gå videre med separasjon av Rb-dcm-v4 og Rb-dcm-v5.

### 4.2.2 Separering av Rb-dcm-v4

#### 4.2.2.1 Sentrifugal akselerert preparativ TLC - Chromatotron™ og analytisk TLC

Ettersom det ble brukt normalfaseplate til Chromatotron™ ble de mest upolare stoffene eluert først, etterfulgt av de mer polare stoffene på grunn av den økende polare mobilfasesammensetningen. Fraksjonene fra kromatograferingen ble samlet og slått sammen til 8 hovedfraksjoner (Rb-dcm-v4-c1 til Rb-dcm-v4-c8) på bakgrunn av analytisk TLC, hvor fraksjonene c1-c3 var de største fraksjonene (se figur 4.10). Summen av fraksjonene ga et utbytte på 353,4 mg, altså 80 % av påsatt mengde. Tap av stoff kan skyldes at noe stoff ble sittende igjen i sprøyten som ble brukt til applisering, eller irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Se vedlegg 1.3 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.10: Utbytte av Chromatotron™ fraksjoner av Rb-dcm-v4.

#### **4.2.2.2 NMR-spektroskopi**

<sup>1</sup>H-NMR spektre viser at fraksjon c1 sannsynligvis inneholder en blanding av flere forbindelser med et stort O-CH<sub>2</sub>-O signal ved 6.0 ppm. Det er mulig denne fraksjonen inneholder uren sesamin (Moussavi et al. 2015). Fraksjon c2 ligner på pellitorin, men er uren. Spektret til fraksjon c3 tyder også på uren pellitorin og en mulig O-CH<sub>2</sub>-O-holdig amid. Fraksjon c4 er renere enn forrige fraksjon, og tyder på fagaramid (Cheng et al. 2002).

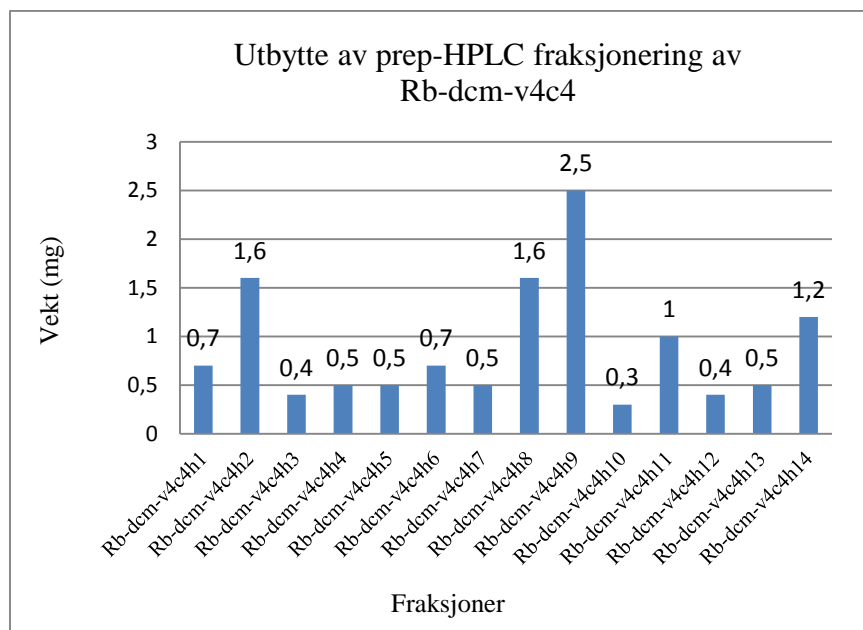
#### **4.2.2.3 Videre arbeid**

Ut fra utbytte og NMR-spektroskopi var det ønskelig å gå videre med separasjon av Rb-dcm-v4c4.

### **4.2.3 Separering av Rb-dcm-v4c4**

#### **4.2.3.4 Preparativ HPLC**

Ettersom det ble brukt omvendt-fase kolonne til prep-HPLC ble de mest polare stoffene eluert først, etterfulgt av de mindre polare stoffene på grunn av økende mengde organisk mobilfase. Det ble samlet og slått sammen 14 fraksjoner (Rb-dcm-v4c4h1 til Rb-dcm-v4c4h14) på bakgrunn av absorpsjonstoppene i kromatogrammet, hvor fraksjonene h2, h8, h9, h11 og h14 var de største fraksjonene (se figur 4.11). Det samlede utbytte ble 12,4 mg, altså 65 % av påsatt mengde. Tap av utbytte kan skyldes at noe av prøveløsningen ble igjen i sprøyten, sprøytefilteret og kolonnen. Noe stoff kan også ha gått tapt under injisering i loopen. Se vedlegg 1.4 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.11: Utbytte av prep-HPLC fraksjoner av Rb-dcm-v4c4.

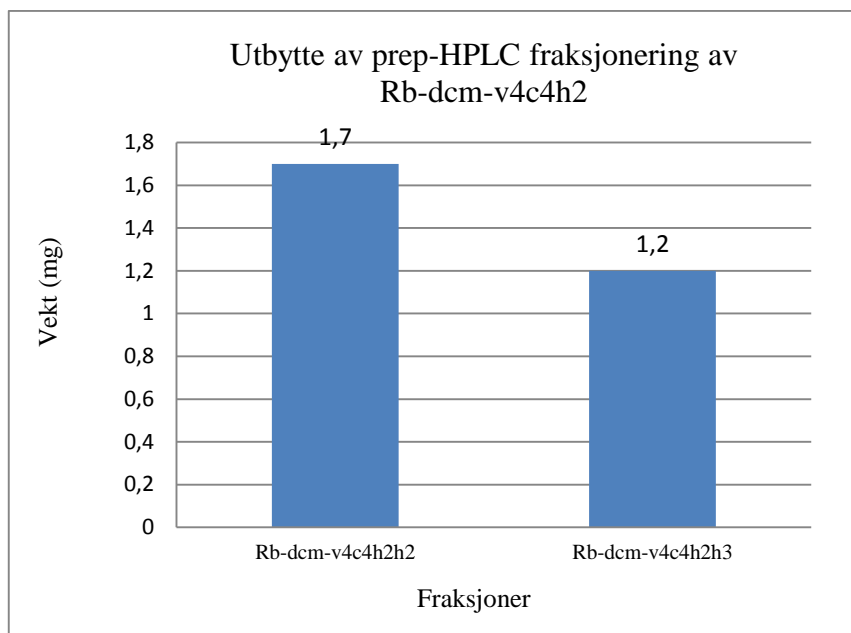
#### 4.2.3.5 NMR-spektroskopi

Ved å tolke NMR-spektrene av fraksjonene og sammenligne spektrene med spektraldata i litteraturen ble flere av fraksjonene identifisert. Fraksjon h7 ble identifisert som *cis*-fagaramid (se avsnitt 4.5.8), h9 ble identifisert som *trans*-fagaramid (se avsnitt 4.5.9) og fraksjon h11 ble identifisert som arnottianamid (se avsnitt 4.5.1). Spektrene av fraksjon h2 tydet på uren skimmianin, og fraksjonen ble derfor videre opprenset.

### 4.2.4 Separering av Rb-dcm-v4c4h2

#### 4.2.4.1 Preparativ HPLC

Ettersom det ble brukt omvendt-fase kolonne til prep-HPLC ble de mest polare stoffene eluert først, etterfulgt av de mindre polare stoffene på grunn av økende mengde organisk komponent i mobilfasen. Det ble valgt ut 2 kolonnefraksjoner (Rb-dcm-v4c4h2h2 til Rb-dcm-v4c4h2h3) på bakgrunn av absorpsjonstoppene i kromatogrammet, hvor fraksjonene var nesten like store (se figur 4.12). Det samlede utbytte ble 2,9 mg, altså 181 % av påsatt mengde. Årsaken til at det ble mer stoff enn utgangsstoffet kan være stor usikkerhet ved veiing av så små mengder. Se vedlegg 1.5, for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.12: Utbytte av prep-HPLC fraksjoner av Rb-dcm-v4c4h.

#### 4.2.4.2 NMR-spektroskopi

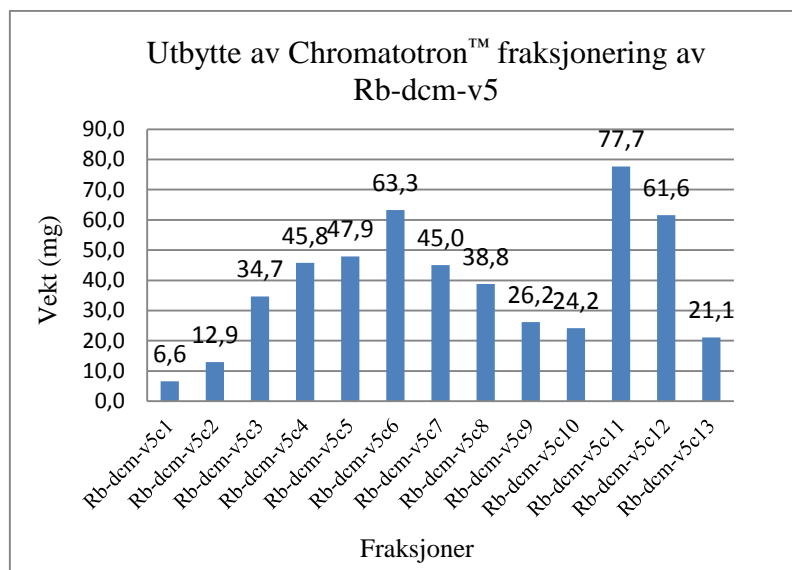
NMR-spektre av fraksjon h3 viste fortsatt uren skimmianin (se avsnitt 4.5.18), og så ikke ut til å være renere enn utgangsstoffet Rb-dcm-v4c4h2.  $^1\text{H}$ -NMR spekter av fraksjon h2 så ikke ut til å inneholde noe interessant.

### 4.2.5 Separering av Rb-dcm-v5

#### 4.2.5.1 Sentrifugal akselerert preparativ TLC - Chromatotron™ og analytisk TLC

Platefraksjonene fra Chromatotron™ kromatografi av Rb-dcm-v5 ble slått sammen til 13 hovedfraksjoner (Rb-dcm-v5c1 til Rb-dcm-v5c13) på bakgrunn av analytisk TLC, hvor fraksjonene c6, c11 og c12 var de største fraksjonene (se figur 4.13). Summen av alle fraksjonene ga et utbytte på 505,8 mg, altså 72 % av påsatt mengde. Tap av stoff kan skyldes at noe stoff ble sittende igjen i sprøyten eller filter som ble brukt til applisering, eller irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Se vedlegg 1.6 for en oversikt over separasjonen.





Figur 4.13: Utbytte av Chromatotron™ fraksjoner av Rb-dcm-v5.

#### 4.2.5.2 NMR-spektroskopi

NMR-spektrene viser at fraksjon c2 inneholder noe uren sesamin, fraksjon c3 inneholder en blanding av fagaramid og pellitorin, og fraksjon c4 inneholder sannsynligvis uren fagaramid (Cheng et al. 2002; Moussavi et al. 2015). Fraksjon c5-6 har signaler som tyder på metoksyliert alkaloid (skarp singlett ved ca 3,9-4,0 ppm). Fraksjon c8-c11 har signaler som tyder på iso-butyl amider (dublett ca 0,9 ppm (6H), multipllett ca 1,8 ppm (1H) og dobbel dublett ca 3,2 ppm (2H), og fraksjon c12 har signaler som tyder på iso-butyl amider og fett (signaler som nevnt for c8-c11 og bred singlett ved 1,26 ppm). Fraksjon c13 har ikke noen spesielt interessante signaler.

#### 4.2.5.3 Videre arbeid

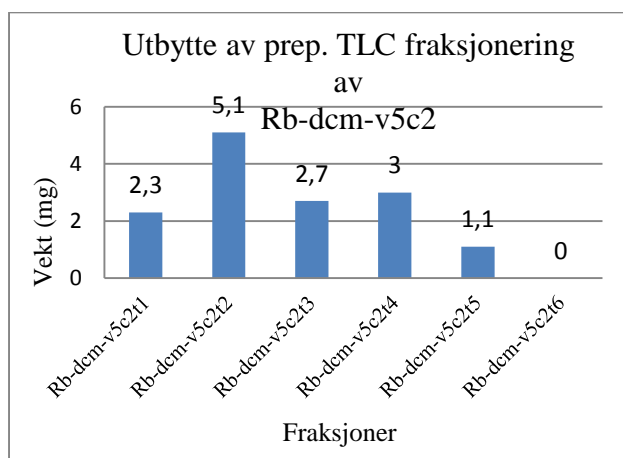
Ut fra utbytte, NMR-spektroskopi og analytisk HPLC var det ønskelig å gå videre med separasjon av Rb-dcm-v5c2, c3, c4 og c6.

### 4.2.6 Separering av Rb-dcm-v5c2

#### 4.2.6.1 Preparativ TLC

Ettersom det ble brukt normal fase i TLC-platen ble de minst polare stoffene eluert først, etterfulgt av de mer polare stoffene. Det ble skrapet av og samlet 6 fraksjoner (Rb-dcm-v5c2t1 til Rb-dcm-v5c2t6) på bakgrunn av påvisning med UV-bestråling. Fraksjon t2 var den største fraksjonen (se figur 4.14). Det samlede utbytte ble 14,2 mg, altså 118 % av påsatt mengde. At

det ble mer utbytte enn den påsatte mengden kan skyldes rester av silikagel fra TLC-platen. Se vedlegg 1.7 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.14: Utbytte av prep-TLC fraksjoner av Rb-dcm-v5c2.

#### 4.2.6.2 NMR-spektroskopi

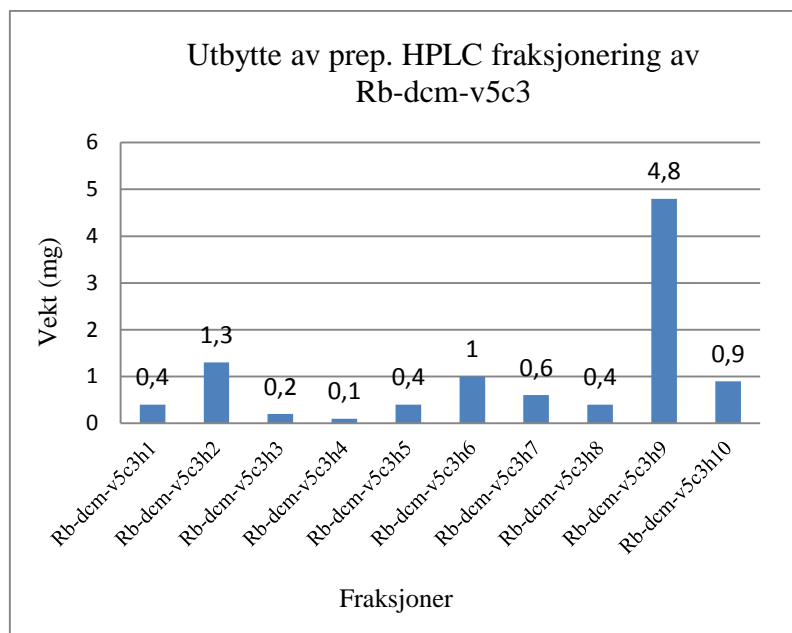
Ved å tolke NMR-spektrene av fraksjonene ble fraksjon t2 identifisert som sesamin (se avsnitt 4.5.17). Fraksjonene t1, t5 og t6 inneholdt mest fett og ble vurdert som lite interessante.

Fraksjonene t3 og t4 hadde signaler som tydet på terpenoider (signaler fra metylgrupper i området 0,9-1,5 ppm).

### 4.2.7 Separering av Rb-dcm-v5c3

#### 4.2.7.1 Preparativ HPLC

Utvalgte kolonnefraksjoner fra prep. HPLC (omvendt-fase) av Rb-dcm-v5c3 ble slått sammen til 10 hovedfraksjoner (Rb-dcm-v5c3h1 til Rb-dcm-v5c3h10) på bakgrunn av absorpsjonstoppene i kromatogrammet, hvor fraksjonen h9 var den største fraksjonen (se figur 4.15). Det samlede utbytte ble 10,1 mg, altså 29 % av påsatt mengde. Tap av stoff i dette tilfellet skyldes at kun de valgte kolonnefraksjonene (h1-h10) og ikke resten av kolonnefraksjonene som kom ut av kolonnen, ble veid. Det kan også skyldes at noe stoff ble sittende igjen i filteret eller sprøyten som ble brukt til applisering, eller irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Se vedlegg 1.8, for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.15: Utbytte av prep. HPLC fraksjoner av Rb-dcm-v5c3.

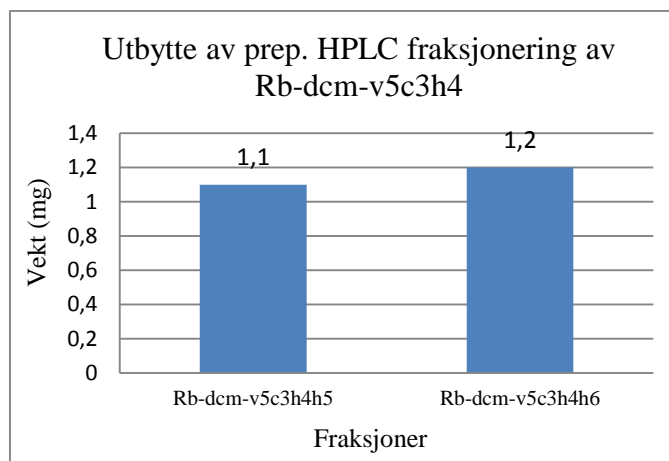
#### 4.2.7.2 NMR-spektroskopi

Ved å tolke NMR-spektrene ble fraksjon h1 identifisert som scoparon (se avsnitt 4.5.14), og fraksjon h2 ble identifisert som 6,7,8-trimetoksykumarin (se avsnitt 4.5.15). Fraksjon h4 så ut til å inneholde uren diktamnin og ble derfor separert videre. Fraksjon h6 ble identifisert som *trans*-fagaramid (se avsnitt 4.5.9) og fraksjon h9 ble identifisert som pellitorin (se avsnitt 5.5.16).

### 4.2.8 Separering av Rb-dcm-v5c3h4

#### 4.2.8.1 Preparativ HPLC

Det ble valgt ut 2 kolonnefraksjoner (Rb-dcm-v5c3h4h5 til Rb-dcm-v5c3h4h6) fra prep. HPLC (omvendt-fase) av Rb-dcm-v5c3h4 på bakgrunn av absorpsjonstoppene i kromatogrammet, hvor fraksjonene var nesten like store (se figur 4.16). Det samlede utbytte ble 2,3 mg, altså 144 % av påsatt mengde. At utbytte ble større enn påsatt mengde kan skyldes veifeil ved veiing av små mengder. Se vedlegg 1.9 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.16: Utbytte av prep. HPLC fraksjoner av Rb-dcm-v5c3h4.

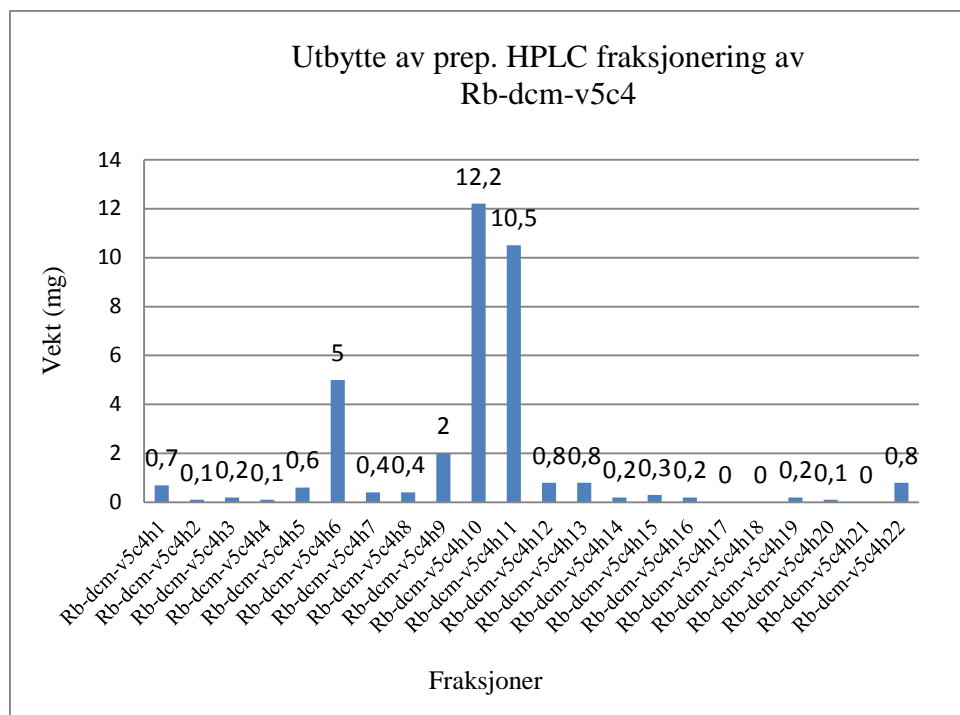
#### 4.2.8.2 NMR-spektroskopi

Ved å tolke  $^1\text{H}$ -NMR-spekter ble fraksjon h5 identifisert som uren diktamnin (se avsnitt 4.5.7). Fraksjonen ble ikke renere enn utgangsfraksjonen Rb-dcm-v5c3h4.

### 4.2.9 Separering av Rb-dcm-v5c4

#### 4.2.9.1 Preparativ HPLC

Fra prep. HPLC av Rb-dcm-v5c4 ble det valgt ut og slått sammen til 22 kolonnefraksjoner (Rb-dcm-v5c4h1 til Rb-dcm-v5c4h22) på bakgrunn av absorpsjonstoppene i kromatogrammet, hvor fraksjonene h6, h10 og h11 var de største fraksjonene (se figur 4.17). Det samlede utbytte ble 35,6 mg, altså 79 % av påsatt mengde. Tap av stoff kan skyldes at noe stoff ble sittende igjen i filteret eller sprøyten som ble brukt til applisering, eller irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Se vedlegg 1.10 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.17: Utbytte av prep. HPLC fraksjoner av Rb-dcm-v5c4.

#### 4.2.9.2 NMR-spektroskopi

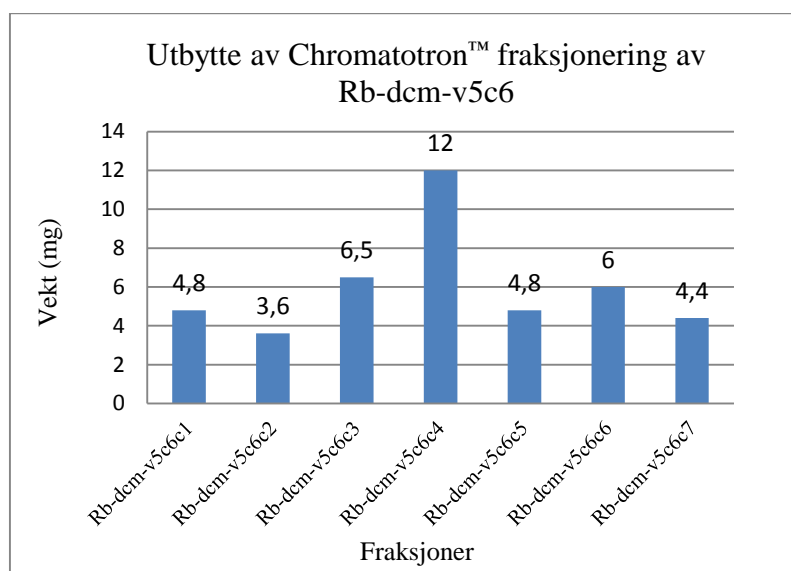
Ved å tolke NMR-spektrene ble fraksjon h3 identifisert som scoparon (se avsnitt 4.5.14).

Fraksjon h9 ble identifisert som *cis*-fagaramid (se avsnitt 4.5.8), og fraksjon h10 og h11 identifisert som *trans*-fagaramid (se avsnitt 4.5.9). Det ble også identifisert  $\gamma$ -fagarin (se avsnitt 4.5.10) i fraksjon h5, h6 og h7, hvor h7 var uren  $\gamma$ -fagarin.

## 4.2.10 Separering av Rb-dcm-v5c6

### 4.2.10.1 Sentrifugal akselerert preparativ TLC - Chromatotron™ og analytisk TLC

Platefraksjonene fra Chromatotron™ kromatografi (normalfase) av Rb-dcm-v5c6 ble samlet og slått sammen til 7 hovedfraksjoner (Rb-dcm-v5c6c1 til Rb-dcm-v5c6c7) på bakgrunn av analytisk TLC, hvor fraksjonen c4 var den største fraksjonen (se figur 4.18). Summen av fraksjonene ga et utbytte på 42,1 mg, altså 70 % av påsatt mengde. Tap av stoff kan skyldes at noe stoff ble sittende igjen i sprøyten som ble brukt til applisering, eller irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Se vedlegg 1.11 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.18: Utbytte av Chromatotron™ fraksjoner av Rb-dcm-v5c6.

### 4.2.10.2 NMR-spektroskopi

NMR spektre viser at fraksjon c1 sannsynligvis inneholder mest fett, og fraksjon c2 ser ut til å inneholde 3 metoksylder (3,9-4,0 ppm), men er urent. Fraksjon c3, c4 og c5 ser ut til å inneholde uren arnottianamid (Wang et al. 2015), mens fraksjon c6 og c7 var svært blandet og derfor ikke ble fulgt opp videre.

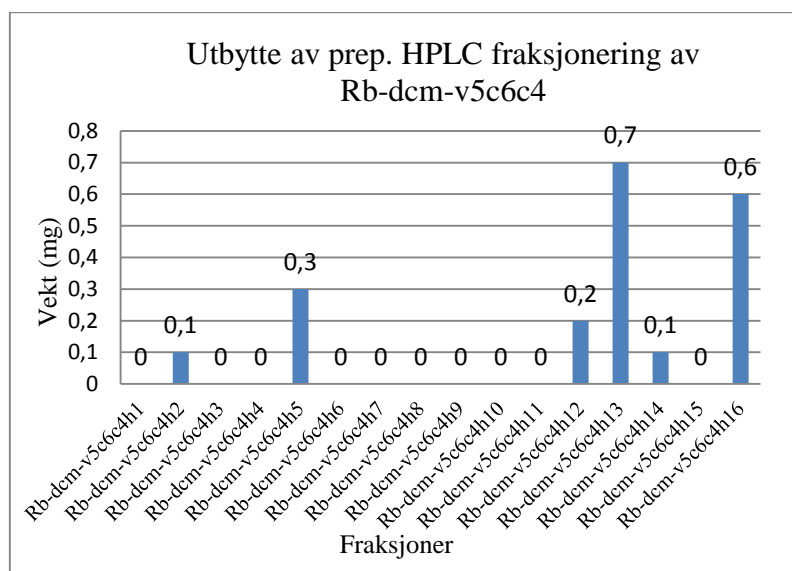
### 4.2.10.3 Videre arbeid

Ut fra utbytte og NMR-spektroskopi var det ønskelig å gå videre med separasjon av Rb-dcm-v5c6c4 og c5.

## 4.2.11 Separering av Rb-dcm-v5c6c4

### 4.2.11.1 Preparativ HPLC

Samlede kolonnefraksjoner fra prep. HPLC (omvendt fase) av fraksjon Rb-dcm-v5c6c4 ble slått sammen til 16 hovedfraksjoner (Rb-dcm-v5c6c4h1 til Rb-dcm-v5c6c4h16) på bakgrunn av absorpsjonstoppene i kromatogrammet, hvor fraksjonen h13 og h16 var de største fraksjonene (se figur 4.19). Det samlede utbytte ble 2 mg, altså 17 % av påsatt mengde. Tap av stoff kan skyldes at noe stoff ble sittende igjen i platen eller sprøyten som ble brukt til applisering, eller irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Svært små stoffmengder gjør veiingen usikker. Se vedlegg 1.12 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.19: Utbytte av prep. HPLC fraksjoner av Rb-dcm-v5c6c4.

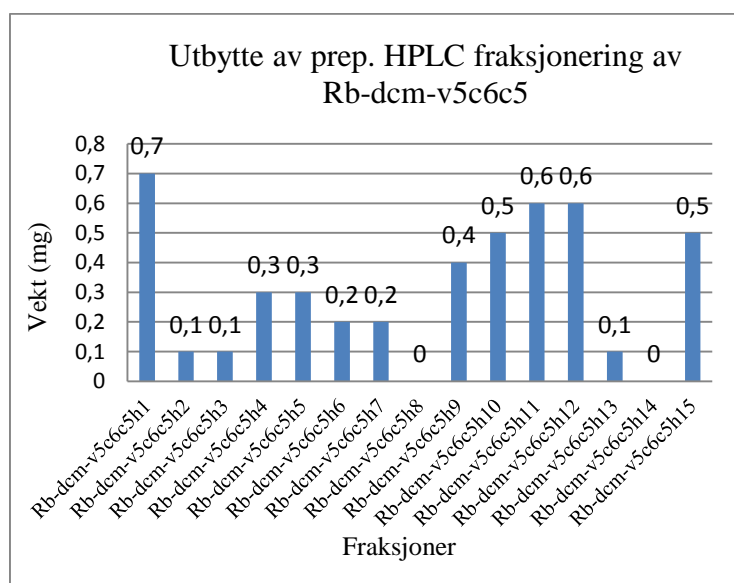
### 4.2.11.2 NMR-spektroskopi

Ved å tolke NMR-spektrene ble fraksjon h11 identifisert som arnottianamid (se avsnitt 4.5.1).

## 4.2.12 Separering av Rb-dcm-v5c6c5

### 4.2.12.1 Preparativ HPLC

Det ble samlet 15 kolonnefraksjoner (Rb-dcm-v5c6c5h1 til Rb-dcm-v5c6c5h15) fra prep. HPLC (omvendt-fase) av Rb-dcm-v5c6c5 på bakgrunn av absorpsjonstoppene i kromatogrammet, hvor fraksjonen h1 var den største fraksjonen (se figur 4.20). Det samlede utbytte ble 4,6 mg, altså 92 % av påsatt mengde. Tap av stoff kan skyldes at noe stoff ble sittende igjen i sprøyten eller filteret som ble brukt til applisering, eller irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Små stoffmengder kan gjøre veieresultatene usikre. Se vedlegg 1.13 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.20: Utbytte av prep. HPLC fraksjoner av Rb-dcm-v5c6c5.

### 4.2.12.2 NMR-spektroskopi

Ved å tolke  $^1\text{H}$ -NMR-spekter ble fraksjon h6 identifisert som arnottianamid (se avsnitt 4.5.1).

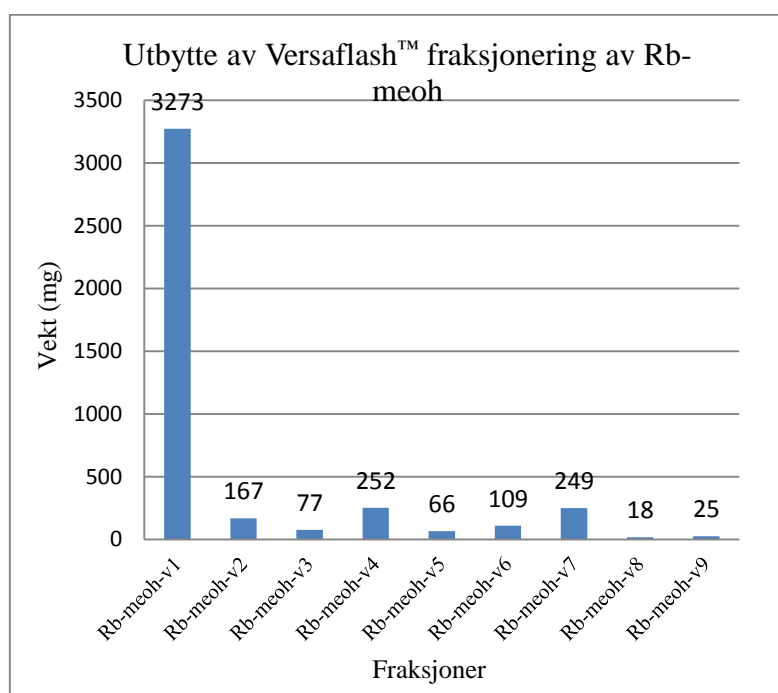


## 4.3 Fraksjonering av MeOH-råekstrakt av rotbark

### 4.3.1 Separering av Rb-meoh

#### 4.3.1.1 Versaflash™ kolonneparasjon og analytisk TLC

Det ble samlet og slått sammen til 9 fraksjoner (Rb-meoh-v1 til Rb-meoh-v9) fra Versaflash™ separasjon av Rb-meoh på bakgrunn av analytisk TLC, hvor fraksjonen v1 var den største fraksjonen (se figur 4.21). Summen av fraksjonene ga et utbytte på 4236 mg, altså 106 % av påsatt mengde. Årsaken til at det ble mer stoff enn utgangsstoffet kan være at stasjonærfase ble vasket ut med metanol på slutten av kromatograferingen. Se vedlegg 1.14 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.21: Utbytte av Versaflash™ fraksjoner av Rb-meoh.

#### 4.3.1.2 NMR-spektroskopi

NMR spektrene tyder på at fraksjon v1 inneholder mest sukker (protonsignaler i området 3-4,5 ppm), mens fraksjonene v2-v5 inneholder en blanding av forbindelser, hvor v2-v4 sannsynligvis har fenoliske og glykosidiske grupper. Fraksjon v6 ser ut til å inneholde fagaramid (Chaaib et al. 2003), og v7-v9 inneholder muligens benzofenantridinalkaloider (Wangenstein et al. 2016).

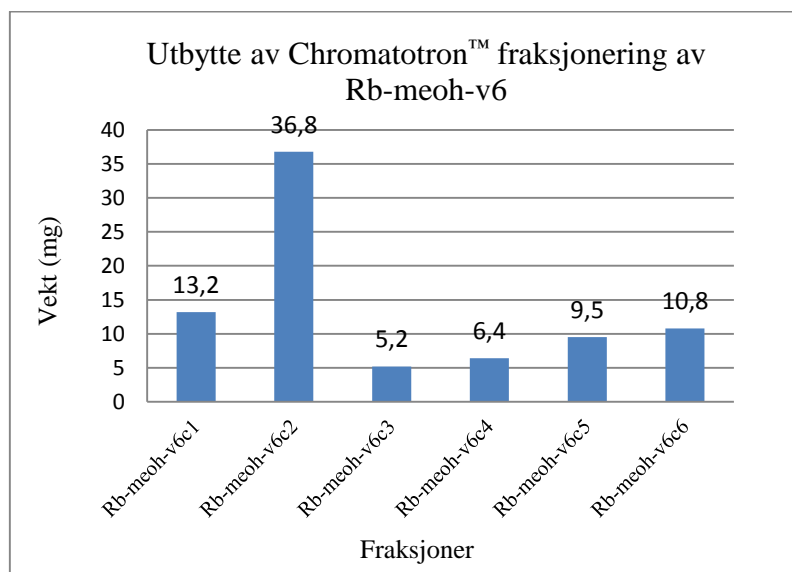
#### 4.3.1.3 Videre arbeid

Ut i fra utbytte, NMR-spektroskopi var det ønskelig å gå videre med separasjon av v6 og v7.

### 4.3.2 Separering av Rb-meoh-v6

#### 4.3.2.1 Sentrifugal akselerert preparativ TLC - Chromatotron™ og analytisk TLC

Fra Chromatotron™ separasjon av Rb-meoh-v6 ble det samlet og slått sammen til 6 hovedfraksjoner (Rb-meoh-v6c1 til Rb-meoh-v6c6) på bakgrunn av analytisk TLC, hvor fraksjonene c2 var den største fraksjonen (se figur 4.22). Summen av fraksjonene ga et utbytte på 81,9 mg, altså 82 % av påsatt mengde. Tap av stoff kan skyldes at noe stoff ble sittende igjen i sprøyten som ble brukt til applisering, eller irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Se vedlegg 1.15, for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.22: Utbytte av Chromatotron™ fraksjoner av Rb-meoh-v6.

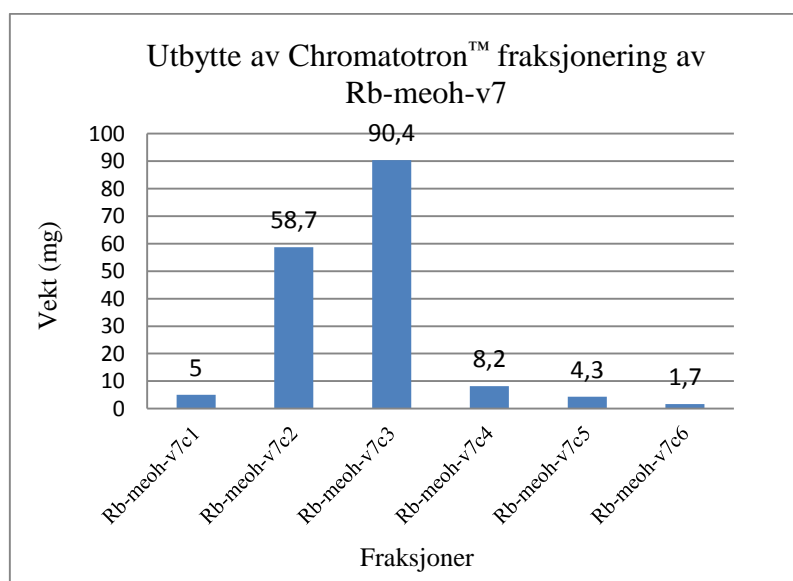
#### 4.3.2.2 NMR-spektroskopi

Ut i fra NMR-spektrene ble fraksjon c5 ble identifisert som buesgenin (se avsnitt 4.5.2). Fraksjon c1 inneholdt sannsynligvis et urent amid, muligens fagaramid. Fraksjon c2 så ut til å være en mulig blanding av et benzofenantridinalkaloid og et iso-butylamid. Fraksjon c3 inneholdt muligens benzofenantridinalkaloid med mange metoksylder (singletter ved 3.9-4 ppm).

### 4.3.3 Separering av Rb-meoh-v7

#### 4.3.3.1 Sentrifugal akselerert preparativ TLC - Chromatotron™ og analytisk TLC

Fra Chromatotron™ separasjon av Rb-meoh-v7 ble det samlet og slått sammen til 6 hovedfraksjoner (Rb-meoh-v7c1 til Rb-meoh-v7c6) på bakgrunn av analytisk TLC, hvor fraksjonene c2 og c3 var de største fraksjonene (se figur 4.23). Summen av fraksjonene ga et utbytte på 168,3 mg, altså 73 % av påsatt mengde. Tap av stoff kan skyldes at noe stoff ble sittende igjen i sprøyten som ble brukt til applisering, eller irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Se vedlegg 1.16 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.23: Utbytte av Chromatotron™ fraksjoner av Rb-meoh-v7.

#### 4.3.3.2 NMR-spektroskopi

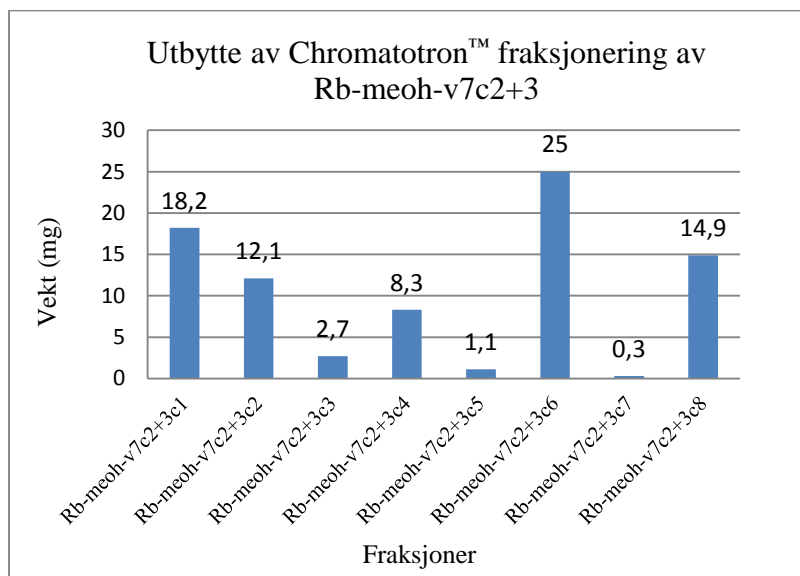
NMR-spektrene viser at fraksjonene c2 og c3 var ganske like og kompliserte, mens resten av fraksjonene var uinteressante. Fraksjonene c2 og c3 ble derfor slått sammen og separert videre.

### 4.3.4 Separering av Rb-meoh-v7c2+3

#### 4.3.4.1 Sentrifugal akselerert preparativ TLC - Chromatotron™ og analytisk TLC

Fraksjonene fra kromatograferingen ble samlet og slått sammen til 8 hovedfraksjoner (Rb-meoh-v7c2+3c1 til Rb-meoh-v7c2+3c8) på bakgrunn av analytisk TLC, hvor fraksjonene c2 og c3 var de største fraksjonene (se figur 4.24). Summen av fraksjonene ga et utbytte på 168,3 mg, altså 73

% av påsatt mengde. Tap av stoff kan skyldes at noe stoff ble sittende igjen i sprøyten som ble brukt til applisering, eller irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Se vedlegg 1.17 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.24: Utbytte av Chromatotron™ fraksjoner av Rb-meoh-v7c2+3.

#### 4.3.4.2 NMR-spektroskopi

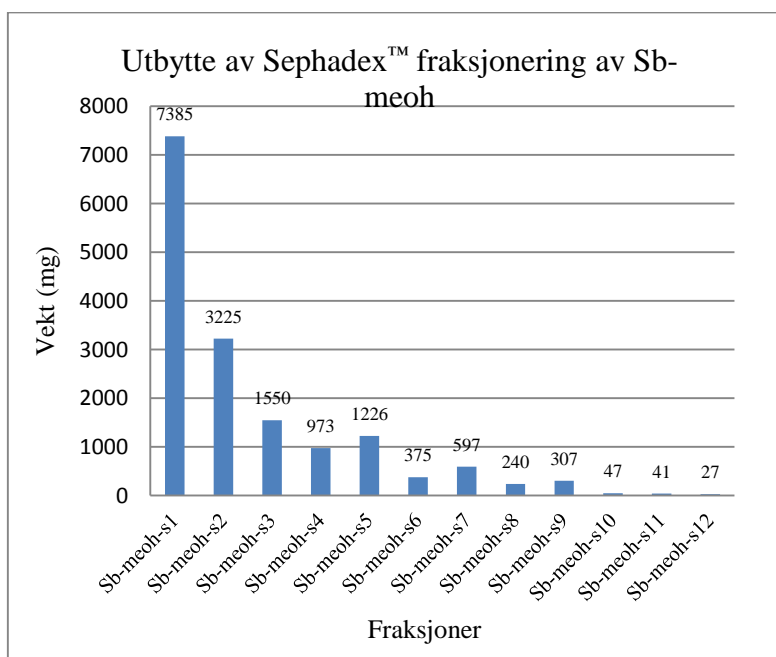
NMR-spektrene viste at fraksjon c6 inneholdt bis-dihydrochelerythrinyleter (se avsnitt 4.5.6). Fraksjon c1 og c2 så ut til å inneholde uren sesamin. <sup>1</sup>H-NMR-spektrene av fraksjon c3 og c4 tydet på innhold av både iso-butylamid og aromatiske forbindelser. Resten av fraksjonene er enten blandet eller består av fett.

## 4.4 Fraksjonering av stammebark MeOH-råekstrakt

### 4.4.1 Separering av Sb-meoh

#### 4.4.1.1 Sephadex™ LH-20 kolonne-separasjon og analytisk TLC

Fraksjonene fra Sephadex™ LH-20 separasjon av Sb-meoh ble samlet og slått sammen til 12 hovedfraksjoner (Sb-meoh-s1 til Sb-meoh-s12) på bakgrunn av analytisk TLC, hvor fraksjonen s1 var den største fraksjonen (se figur 4.25). Summen av fraksjonene ga et utbytte på 16 g, altså 100 % av påsatt mengde. I fraksjon s5 ble det dannet krystaller (ca. 120 mg). Se vedlegg 1.18 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.25: Utbytte av Sephadex™ fraksjoner av Sb-meoh.

#### 4.4.1.2 NMR-spektroskopi

Krystallene fra fraksjon s5 ble identifisert som hesperidin ved NMR-spektroskopi (se avsnitt 4.5.11). Fraksjon s1 og s2 inneholdt hovedsakelig sukker (store signaler i NMR spekterets karbohydratområde), og NMR spektrene for fraksjon s3-s6 inneholdt signaler fra aromatiske forbindelser og metoksylder. NMR-spektrene indikerte at fraksjon s7 inneholdt isobutylamid-, metoksylder,  $\text{OCH}_2\text{O}$  og trans-olefin grupper, signaler som finnes i fagaramid, i tillegg til mindre mengder andre forbindelser. Fraksjon s10-12 ga signaler i  $^1\text{H}$ -NMR spekteret som indikerte innhold av benzofenantridinalkaloide (Wangenstein et al. 2016).

#### 4.4.1.3 Rekellarvetest

Fraksjonene s1-s5 var ikke toksisk på rekellarver (se figur 4.26), og LD<sub>50</sub> ble derfor ikke bestemt. Fraksjonene s6-s12 viste toksisitet på rekellarver med en LD<sub>50</sub>-verdi mellom  $46 \pm 12$  og  $2 \pm 0,3$  µg/ml, hvor s7-s8 og s11 var mest toksiske (se tabell 4.8-4.14 og figur 4.26). Positiv kontroll med podofyllotoksin (100 µg/ml) ga 93-100 % dødelighet av rekellarver, mens negativ kontroll med DMSO ga 3-10 % dødelighet av rekellarver.

Tabell 4.8: Rekellarvetoksisitet av Sb-meoh-s6.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelig- het (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
500	2,70	100	0	$46 \pm 12$
250	2,40	100	0	
100	2,00	97	6	
75	1,88	87	6	
50	1,70	55	15	
25	1,40	10	14	
10	1,00	10	10	
1	0,00	4	6	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Tabell 4.9: Rekellarvetoksisitet av Sb-meoh-s7

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelig- het (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
500	2,70	100	0	$3 \pm 0,2$
250	2,40	100	0	
100	2,00	100	0	
75	1,88	100	0	
50	1,70	100	0	
10	1,00	100	0	
1	0,00	3	6	
0,5	-0,30	0	0	
0,25	-0,60	3	6	
0,125	-0,90	3	6	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Tabell 4.10: Rekellarvetoksisitet av Sb-meoh-s8.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelig- het (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,00	100	0	$3 \pm 0,3$
50	1,70	100	0	
10	1,00	100	0	
1	0,00	13	6	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Tabell 4.11: Rekellarvetoksisitet av Sb-meoh-s9.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelig- het (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,00	100	0	$4 \pm 3$
50	1,70	100	0	
10	1,00	80	20	
1	0,00	0	0	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Tabell 4.12: Rekellarvetoksisitet av Sb-meoh-s10.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelig- het (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,00	93	6	$6 \pm 2$
50	1,70	100	0	
10	1,00	70	10	
5	0,70	47	8	
2,5	0,40	3	6	
1	0,00	7	12	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Tabell 4.13: Rekelarvetoksisitet av Sb-meoh-s11.

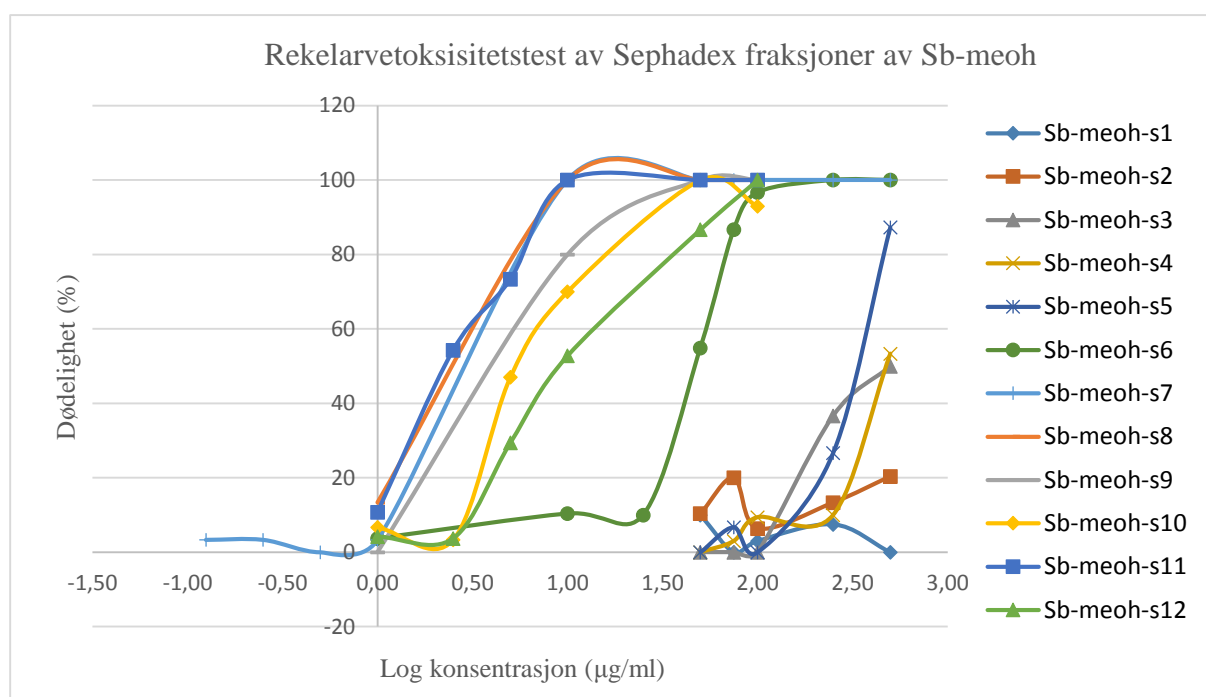
Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelig- het (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,00	100	0	2 ± 0,3
50	1,70	100	0	
10	1,00	100	0	
5	0,70	73	6	
2,5	0,40	54	4	
1	0,00	11	11	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

Tabell 4.14: Rekelarvetoksisitet av Sb-meoh-s12.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelig- het (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,00	100	0	9 ± 3
50	1,70	87	6	
10	1,00	53	11	
5	0,70	29	11	
2,5	0,40	4	6	
1	0,00	4	7	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)



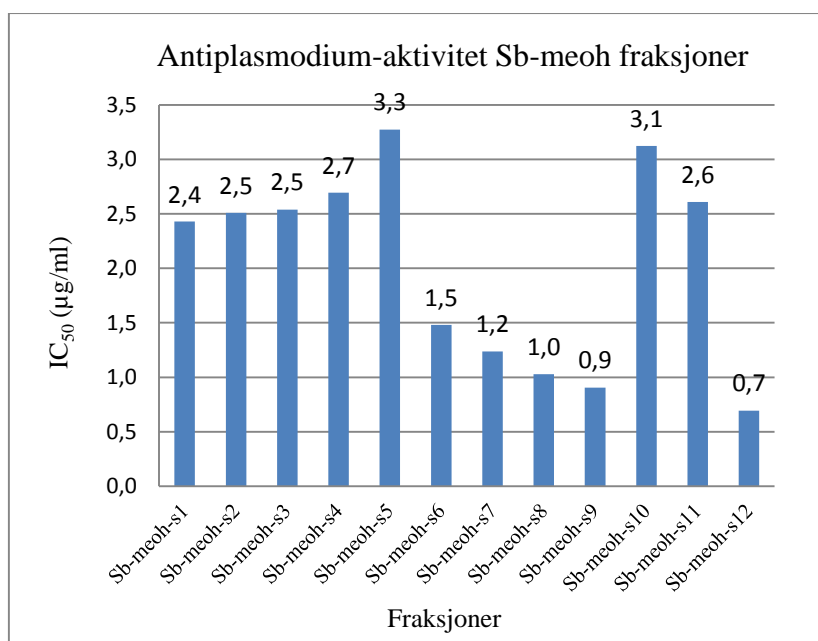
Figur 4.26: Toksisitet på rekelarver av Sephadex™ LH-20 fraksjoner av Sb-meoh vist som % dødelig.

#### 4.4.1.4 Antiplasmodiumtest

Resultater fra antiplasmodiumtest (utført i Australia) viste at alle Sb-meoh fraksjonene ga antiplasmodium-aktivitet mot *P. falciparum* stammen 3D7 (se tabell 4.15), hvor s12 var mest aktiv med en IC<sub>50</sub>-verdi på  $0,7 \pm 0,1$  µg/ml (se figur 4.27).

Tabell 4.15: IC<sub>50</sub>-verdier av antiplasmodium-aktivitet (3D7) av Sb-meoh fraksjoner

Fraksjoner av Sb-meoh	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Sb-meoh-s1	2,4 ± 0,4
Sb-meoh-s2	2,5 ± 0,7
Sb-meoh-s3	2,5 ± 0,7
Sb-meoh-s4	2,7 ± 0,3
Sb-meoh-s5	3,3 ± 0,7
Sb-meoh-s6	1,5 ± 0,2
Sb-meoh-s7	1,2 ± 0,2
Sb-meoh-s8	1,0 ± 0,1
Sb-meoh-s9	0,9 ± 0,1
Sb-meoh-s10	3,1 ± 0,9
Sb-meoh-s11	2,6 ± 0,5
Sb-meoh-s12	0,7 ± 0,1



Figur 4.27: IC<sub>50</sub>-verdier av antiplasmodium-aktivitet av Sb-meoh fraksjoner

#### 4.4.1.5 Videre arbeid

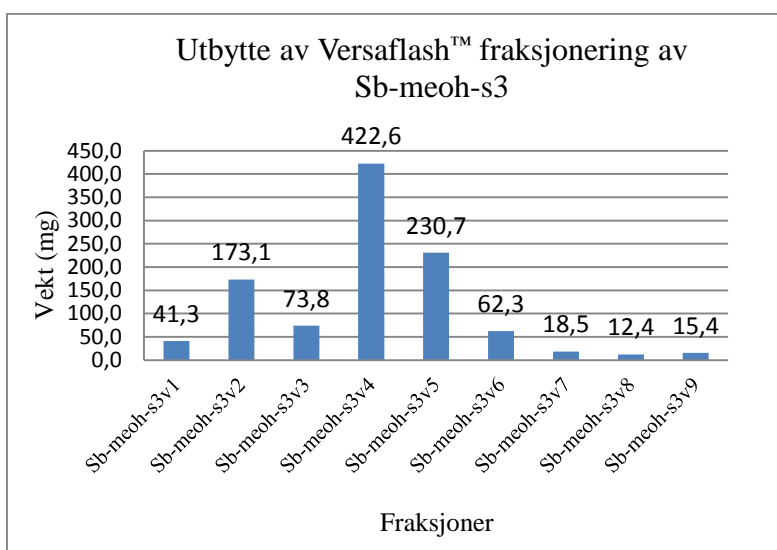
Ut fra NMR-spektroskopi og bioassays var det ønskelig å gå videre med separasjon av Sb-meoh s3, s7, s11 og s12.



## 4.4.2 Separering av Sb-meoh-s3

### 4.4.2.1 Versaflash™ kolonne separasjon og analytisk TLC

Fraksjonene fra Versaflash™ separasjon av Sb-meoh-s3 ble samlet og slått sammen til 9 hovedfraksjoner (Sb-meoh-s3v1 til Sb-meoh-s3v9) på bakgrunn av analytisk TLC, hvor fraksjonen v4 var den største fraksjonen (se figur 4.28). Summen av fraksjonene ga et utbytte på 1050 g, altså 70 % av påsatt mengde. Tap av stoff kan skyldes at noe stoff ble sittende igjen i sprøyten som ble brukt til applisering, eller irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Se vedlegg 1.19 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.28: Utbytte av Versaflash™ fraksjoner av Sb-meoh-s3.

### 4.4.2.2 NMR-spektroskopi

NMR-spektrene tydet på at fraksjon v1-v4 inneholdt aromatiske forbindelser og stoffer med N-metyl-grupper. Fraksjon v5-v6 viste mindre karakteristiske aromatsignaler, mens fraksjon v7-v8 ga aromatsignaler og signaler fra metoksylder. Fraksjon v9 ga et lite interessant NMR-spekter.

### 4.4.2.3 Analytisk HPLC

Ut i fra kromatogrammene av v1-v4 og v7-v8 hvor det ble brukt gradienteluering (se vedlegg 3.5-3.10), var det v1 og v2 som så mest rent ut. Fraksjon v1 ga en bred sammensatt topp ved retensjonstid ca 2,1 min og fraksjon v2 ga en stor topp ved retensjonstid 3,0. Det ble også

utført analytisk HPLC med isokratisk eluering av de samme fraksjonene for å finne en raskere og enklere metode som er passende for eventuell videre separering i preparativ HPLC.

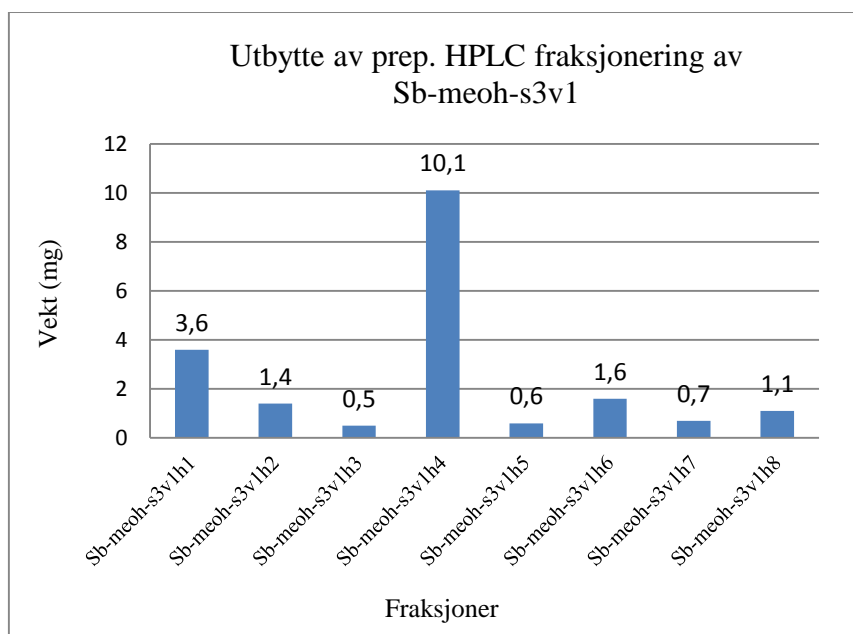
#### 4.4.2.4 Videre arbeid

Ut fra NMR-spektroskopi og analytisk HPLC var det ønskelig å gå videre med separasjon av Sb-meoh-s3v1 og v2.

### 4.4.3 Separering av Sb-meoh-s3v1

#### 4.4.3.1 Preparativ HPLC

Fraksjonene fra prep. HPLC av Sb-meoh-s3v1 ble slått sammen til 8 hovedfraksjoner (Sb-meoh-s3v1h1 til Sb-meoh-s3v1h8) på bakgrunn av absorpsjonstoppene i kromatogrammet, hvor fraksjonen h4 var den største fraksjonen (se figur 4.29). Det samlede utbytte ble 19,6 mg, altså 49 % av påsatt mengde. Tap av utbytte kan skyldes at noe av prøveløsningen ble igjen i sprøyten, sprøytefilteret og kolonnen. Noe stoff kan også ha gått tapt under injisering i loopen. Se vedlegg 1.20 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.29: Utbytte av prep-HPLC fraksjoner av Sb-meoh-s3v1.

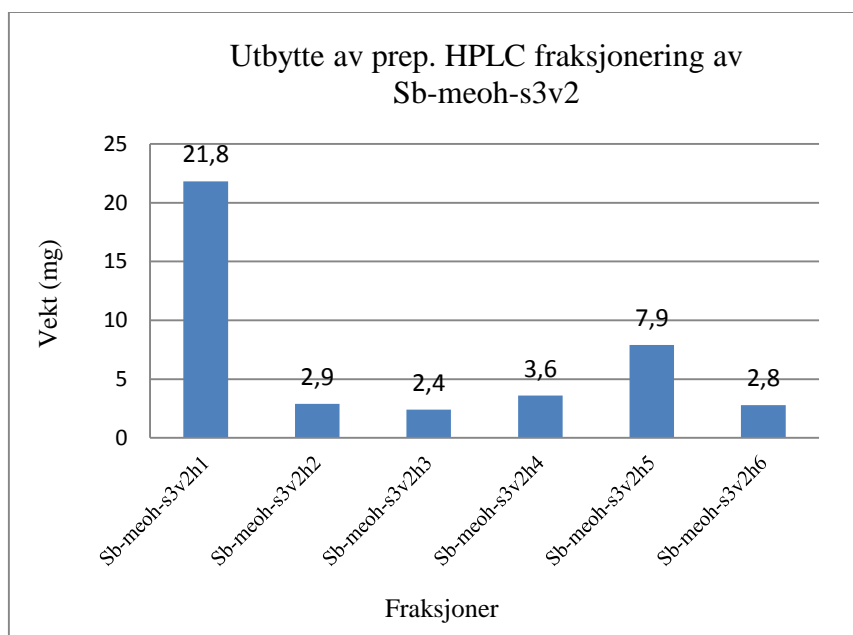
#### 4.4.3.2 NMR-spektroskopi

Ut i fra  $^1\text{H}$ -NMR spektrene ble fraksjonene h1 og h4 slått sammen til h1+h4, og det ble i tillegg tatt opp  $^{13}\text{C}$  og 2D-spektre. Ved sammenligning med spektraldata i litteraturen ble fraksjonen h1+h4 identifisert som synephrine (se avsnitt 4.5.19).

#### 4.4.4 Separering av Sb-meoh-s3v2

##### 5.4.4.1 Preparativ HPLC

Fraksjonene fra preparativ HPLC av Sb-meoh-s3v2 ble slått sammen til 6 hovedfraksjoner (Sb-meoh-s3v2h1 til Sb-meoh-s3v2h6) på bakgrunn av absorpsjonstoppene i kromatogrammet og analytisk HPLC, hvor fraksjonen h1 var den største fraksjonen (se figur 4.30). Det samlede utbytte ble 41,4 mg, altså 83 % av påsatt mengde. Tap av utbytte kan skyldes at noe av prøveløsningen ble igjen i sprøyten, sprøytefilteret og kolonnen. Noe stoff kan også ha gått tapt under injisering i loopen. Se vedlegg 1.21 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.30: Utbytte av prep. HPLC fraksjoner av Sb-meoh-s3v2.

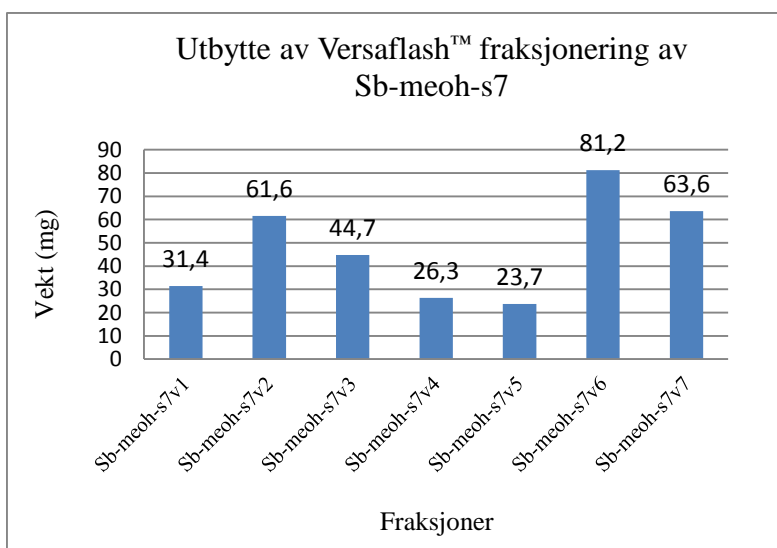
#### 4.4.4.2 NMR-spektroskopi

H3 og h4 ble identifisert som neoklorogensyre (se avsnitt 4.5.13), og fraksjonene h5 og h6 ble identifisert som klorogensyre (se avsnitt 4.5.12) ved analyse av NMR spektrene og sammenligning med spektraldata fra litteraturen.

#### 4.4.5 Separering av Sb-meoh-s7

##### 4.4.5.1 Versaflash™ kolonne-separasjon og analytisk TLC

Fraksjonene fra Versaflash™ separasjon (omvendt-fase) av Sb-meoh-s7 ble slått sammen til 7 hovedfraksjoner (Sb-meoh-s7v1 til Sb-meoh-s7v7) på bakgrunn av analytisk TLC, hvor fraksjonen v4 var den største fraksjonen (se figur 4.31). Summen av fraksjonene ga et utbytte på 332,5 mg, altså 56 % av påsatt mengde. Tap av stoff kan skyldes at noe stoff ble sittende igjen i sprøyten eller filter som ble brukt til applisering, eller irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Se vedlegg 1.22 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.31: Utbytte av Versaflash™ fraksjoner av Sb-meoh-s7.

##### 4.4.5.2 NMR-spektroskopi

NMR spektrene indikerte at fraksjon v1 inneholdt en 1,2,4-substituert aromatisk forbindelse, metoksygrupper var tilstede, og fraksjonen var ganske ren. Fraksjon v2 inneholdt en blanding med aromatiske forbindelser, mens fraksjon v3-v5 var svært blandet. Fraksjon v6 ble identifisert som *trans*-fagaramid (se avsnitt 4.5.9), og fraksjon v7 identifisert som uren pellitorin (se avsnitt 4.5.16).

### 5.4.5.3 Analytisk HPLC

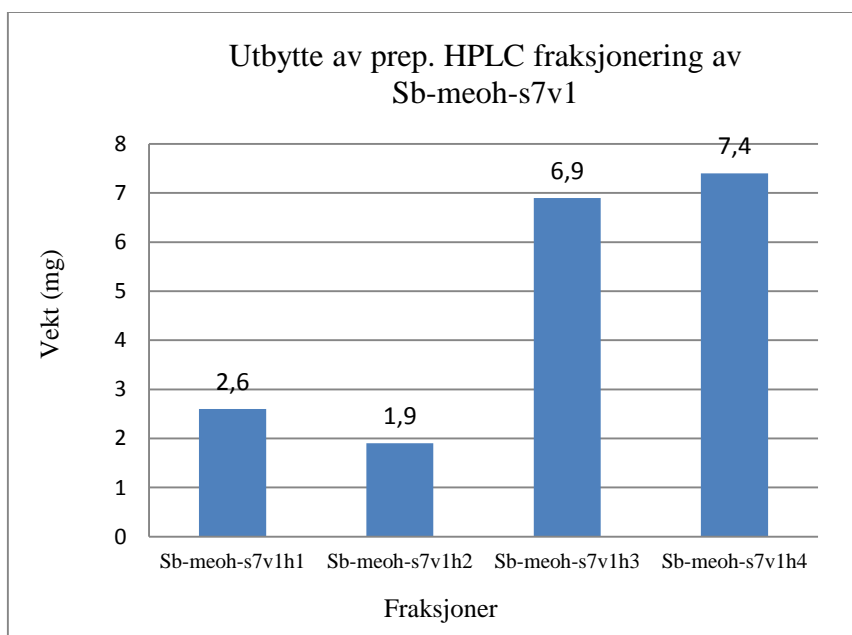
I kromatogrammet til fraksjon v1 ble det observert en stor topp med retensjonstid 4,3 min som har et UV-spektrum med absorpsjonstopper ved 219, 264 og 293 nm (se vedlegg 3.16).

Toppene i kromatogrammet så ut til å være separert, og samme gradientsystem ble derfor valgt for preparativ HPLC for videre separasjon av v1.

## 4.4.6 Separering av Sb-meoh-s7v1

### 5.4.6.1 Preparativ HPLC

Fraksjonene fra preparativ HPLC av Sb-meoh-s7v1 ble slått sammen til 4 hovedfraksjoner (Sb-meoh-s7v1h1 til Sb-meoh-s7v1h4) på bakgrunn av absorpsjonstoppene i kromatogrammet, hvor fraksjonene h3 og h4 var de største fraksjonene (se figur 4.32). Det samlede utbytte ble 18,8 mg, altså 63 % av påsatt mengde. Tap av utbytte kan skyldes at noe av prøveløsningen ble igjen i sprøyten, sprøytefilteret og kolonnen. Noe stoff kan også ha gått tapt under injisering i loopen. Se vedlegg 7.23 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.32: Utbytte av prep-HPLC fraksjoner av Sb-meoh-s7v1.

#### 4.4.6.2 NMR-spektroskopi

Ved å tolke NMR spektrene og sammenligne med spektraldata fra litteraturen ble fraksjon h4 identifisert som burkinabin B (se avsnitt 4.5.3). NMR-spektre av h3 ligner h4, men har en ekstra metoksyl-gruppe.

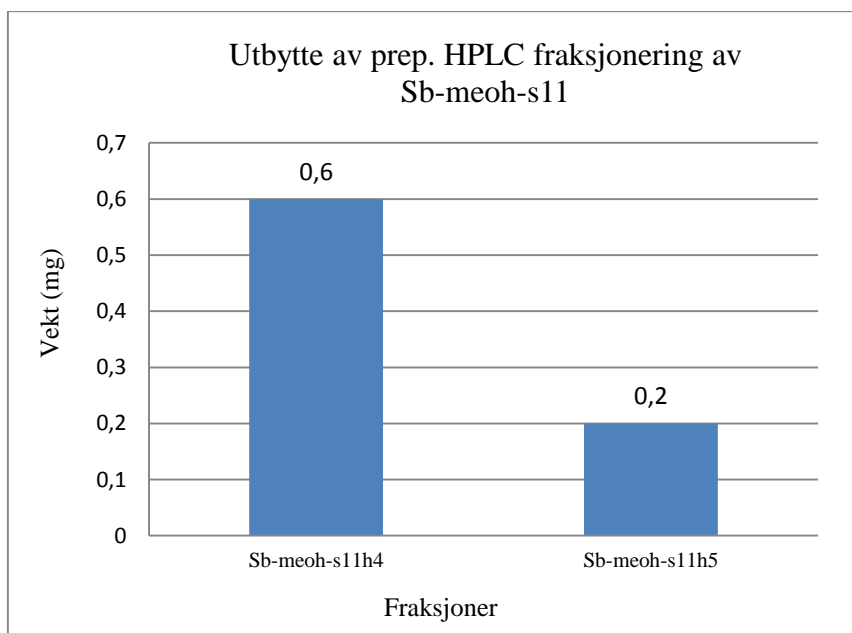
#### 4.4.6.3 Analytisk HPLC

Kromatogrammene til fraksjonene h3 og h4 så ganske like ut med samme retensjonstid (11,0 min) og med like UV-spektre med absorpsjonstopper ved 219, 264 og 293 nm (se vedlegg 3.17-3.18).

### 4.4.7 Separering av Sb-meoh-s11 med prep. HPLC

#### 4.4.7.1 Preparativ HPLC

Etter preparativ HPLC av Sb-meoh-s11 ble det valgt ut 2 kolonnefraksjoner (Sb-meoh-s7v1h4 og Sb-meoh-s7v1h5) på bakgrunn av absorpsjonstoppene i kromatogrammet, hvor h4 var den største fraksjonen av de to fraksjonene (se figur 4.33). Det samlede utbytte ble ikke beregnet ettersom påsatt mengde var ukjent. Se vedlegg 1.24 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.33: Utbytte av utvalgte prep-HPLC fraksjoner av Sb-meoh-s11.

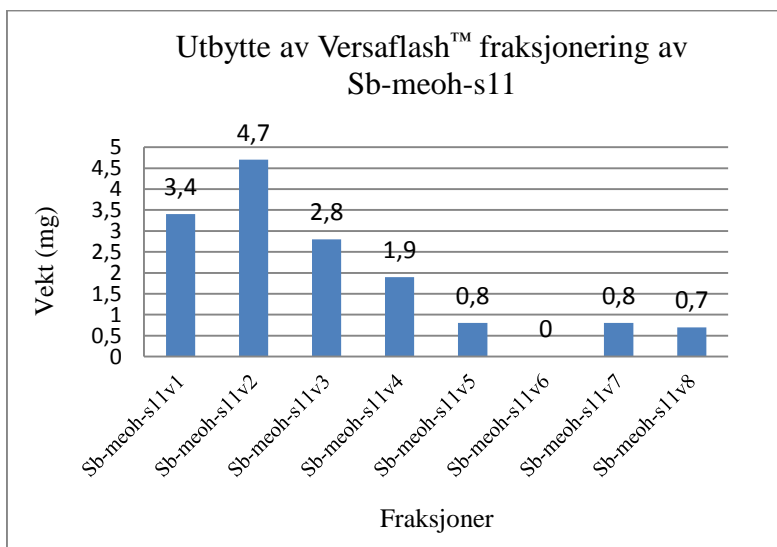
#### 4.4.7.2 NMR-spektroskopi

Ved å tolke NMR spektrene og sammenligne med spektraldata fra litteraturen ble fraksjon h4 identifisert som chelerythrin (se avsnitt 4.5.4).

#### 4.4.8 Separering av Sb-meoh-s11 med Versaflash™

##### 4.4.8.1 Versaflash™ kolonne separasjon og analytisk TLC

Kolonnefraksjonene fra Versaflash™ separasjon av Sb-meoh-s11 ble slått sammen til 8 hovedfraksjoner (Sb-meoh-s11v1 til Sb-meoh-s11v8) på bakgrunn av analytisk TLC, hvor fraksjonen v2 var den største fraksjonen (se figur 4.34). Summen av fraksjonene ga et utbytte på 15,1 mg, altså 72 % av påsatt mengde. Tap av stoff kan skyldes at noe stoff ble sittende igjen i sprøyten som ble brukt til applisering, eller irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Se vedlegg 1.24 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.34: Utbytte av Versaflash™ fraksjoner av Sb-meoh-s11.

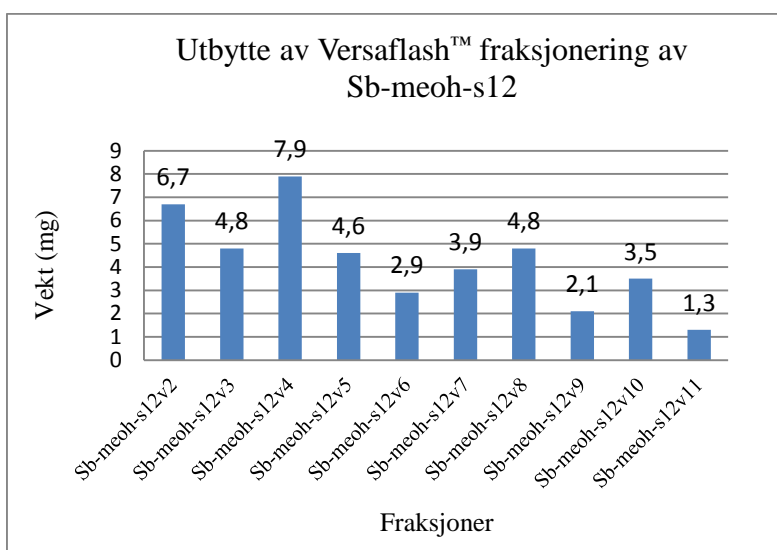
##### 4.4.8.2 NMR-spektroskopi

NMR spektrene tydet på at det var samme stoff i fraksjon v3 til v7, men hvor v3, v5 og v7 var renest. Ved å tolke og sammenligne spektraldata fra litteraturen ble fraksjon v3 identifisert som 6-hydroksydihydrochelerythrin (se avsnitt 4.5.5).

## 4.4.9 Separering av Sb-meoh-s12

### 4.4.9.1 Versaflash™ kolonne separasjon og analytisk TLC

Fraksjonene fra Versaflash™ kromatografi av Sb-meoh-s12 ble slått sammen til 10 hovedfraksjoner (Sb-meoh-s12v2 til Sb-meoh-s12v11) på bakgrunn av analytisk TLC, hvor fraksjonen v4 var den største fraksjonen (se figur 4.35). Summen av fraksjonene ga et utbytte på 42,5 mg, altså 177 % av påsatt mengde. At det ble mye mer utbytte enn påsatt mengde kan skyldes veifeil, vannrester, eller utvasking av kolonnemateriale. Se vedlegg 1.25 for en oversikt over separasjonen.



Figur 4.35: Utbytte av Versaflash™ fraksjoner av Sb-meoh-s12.

### 4.4.9.2 NMR-spektroskopi

Fraksjon v9 og v10 ble identifisert som 6-hydroksydidydrochelerythrin (se avsnitt 4.5.5). NMR-spektrene av resten av fraksjonene tydet på svært blandede fraksjoner, som ble vurdert som mindre interessante.

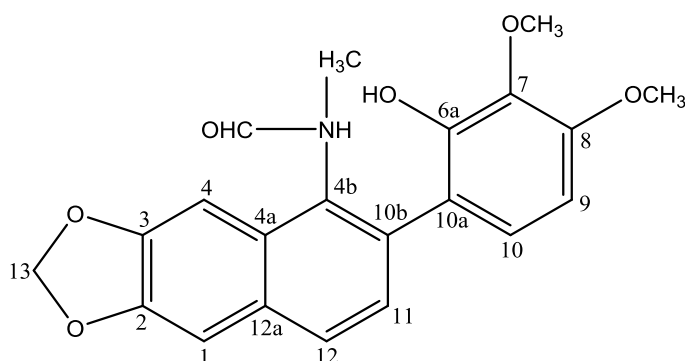


## 4.5 Isolerte naturstoffer

### 4.5.1 Arnottianamid

#### 4.5.1.1 Identifikasjon

Alkaloidet arnottianamid (se figur 4.36) er tidligere rapportert i rotbark av *Z. zanthoxyloides* (Queiroz et al. 2006), og i andre *Zanthoxylum*-arter som *Z. archoum* (Yao-Kouassi et al. 2015) og *Z. avicennae* (Chen et al. 2015).



Figur 4.36: Molekylstruktur for arnottianamid.

Tolkning av spektrene for isolert arnottianamid fra Rb-dcm-v4c4h11 (se vedlegg 2.5) er gitt i tabell 4.16 hvor vår spektraldata er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.17.

Fraksjonen Rb-dcm-v5c6c4h11 har også blitt identifisert som arnottianamid ved sammenligning av NMR-spektrene.

Tabell 4.16:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for arnottianamid.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	7.08 (1H, s)	99.3	CH	3, 4a, 12a
2		149 <sup>a</sup>	C	
3		148 <sup>a</sup>	C	
4	7.20 (1H, s)	104.0	CH	2, 4b
4a		128.8	C	
4b		136 <sup>a</sup>	C	
6a		147 <sup>a</sup>	C	
7		135 <sup>a</sup>	C	
8		152.1	C	
9	6.54 (1H, d, J=8.6)	104.4	CH	7, 8, 10a

10	6.80 (1H, d, J=8.5)	125.1	CH	8, 6a, 10b
10a		119.8	C	
10b		133.4	C	
11	7.31 (1H, d, J=8.3)	127.4	CH <sup>a</sup>	12a, 4b, 10a
12	7.73(1H, d, J=8.3)	127.5 <sup>a</sup>	CH	4a, 10b
12a		131.3	C	
13	6.09 (2H, s)	101.5	CH <sub>2</sub>	3
-OH	5.93 (1H, s)			6a, 7
7-OCH <sub>3</sub>	3.93 (3H, s)	61.2	CH <sub>3</sub>	7
8-OCH <sub>3</sub>	3.90 (3H, s)	55.9	CH <sub>3</sub>	8
N-CH <sub>3</sub>	3.00 (3H, s) <sup>b</sup>	33.0	CH <sub>3</sub>	4a, CHO
CHO	8.16 (1H, s) <sup>c</sup>	165 <sup>a</sup>	CH	N-CH <sub>3</sub>

<sup>a</sup>Data er tatt fra HSQC og HMBC spektra.

<sup>b</sup>Signal fra minor atropisomer kan observeres (3,20 ppm) (Wangsteen et al. 2016).

<sup>c</sup>Signal fra minor atropisomer kan observeres (8,30 ppm) (Wangsteen et al. 2016).

Tabell 4.17: Litteraturdata av <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) og <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data for arnottianamid (Wang et al. 2015).

Posisjon	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	δ <sub>C</sub>
1	7.11 (1H, s)	99.30
2		149.33
3		148.14
4	7.22 (1H, s)	103.99
4a		135.62
4b		128.76
6a		147.70
7		135.81
8		152.06
9	6.56 (1H, d, J=8.5)	104.35
10	6.82 (1H, d, J=8.5)	125.11
10a		118.61
10b		133.39
11	7.75 (1H, d, J=8.5)	127.41
12	7.34 (1H, d, J=8.5)	127.44
12a		131,26
13	6.11 (2H, s)	101.50
-OH	5.97 (1H, s)	
7-OCH <sub>3</sub>	3.95 (3H, s)	61.17
8-OCH <sub>3</sub>	3.93 (3H, s)	55.85

N-CH <sub>3</sub>	3.02 (3H, s)	33.03
CHO	8.19 (1H, s) <sup>a</sup>	164.51

<sup>a</sup> Antar at nevnt posisjon H-6 i referansen er det samme som posisjon CHO.

#### 4.5.1.2 Rekelarvetest

Arnottianamid viste ikke toksisitet på rekelarver, og LD<sub>50</sub>-verdi ble derfor ikke beregnet (se tabell 4.18). Den toksiske effekten så ikke ut til å øke med økt konsentrasjon, og det var derfor ingen korrelasjon mellom konsentrasjon og dødelighet. Positiv kontroll med podofyllotoksin (100 µg/ml) ga 100 % dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga 6 ± 6 % dødelighet av rekelarver. Et søk i databasen SciFinder viste at det ikke foreligger tidligere publiserte studier på toksisitet av arnottianamid på rekelarver.

Tabell 4.18: Toksisitet på rekelarver av arnottianamid.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,00	6	10	Ikke toksisk
12	1,08	9	8	
1	0,00	3	6	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

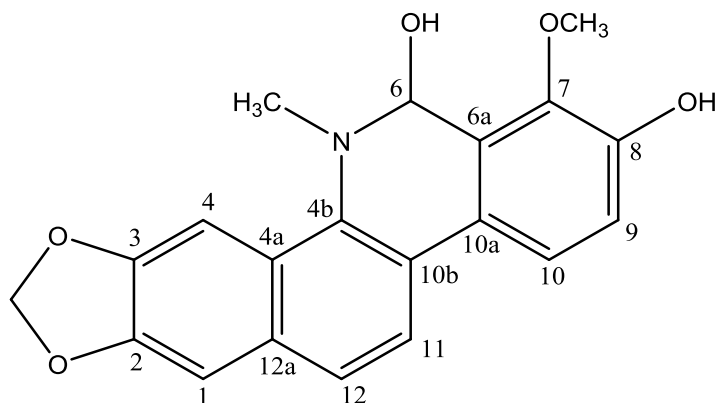
#### 4.5.1.3 Antiplasmodiumtest

Det ble ikke tatt antiplasmodiumtest av arnottianamid på grunn av for liten mengde isolert stoff. Det foreligger heller ingen studier av antiplasmodium-effekt av arnottianamid.

### 4.5.2 Buesgenin

#### 4.5.2.1 Identifikasjon

Alkaloidet buesgenin (se figur 4.37) er ikke tidligere rapportert i *Z. zanthoxyloides*, men i andre *Zanthoxylum* arter som *Z. buesgenin* (Sandjo et al. 2014) og *Z. tessmannii* (Tankeo et al. 2015).



Figur 4.37: Molekylstruktur buesgenin.

Tolkning av spektrene for isolert buesgenin fra Rb-meoh-v6c5 (se vedlegg 2.6) er gitt i tabell 4.19 hvor spektraldataene er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.20. Det ble observert også andre signaler ved 7.34 ppm som sannsynligvis er forurensninger.

Tabell 4.19  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for buesgenin.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet
1	7.13 (1H, s)	104.5	CH
2	-	147.8	C
3	-	147.1	C
4	7.69 (1H, s)	100.3	CH
4a	-	124.9	C
4b	-	137.6	C
6	5.50 (1H, s)	86.0	CH
6a	-	122.6/124	C
7	-	144.9	C
8	-	148.9	C
9	7.04 (1H, d, 8.4)	117.0	CH
10	7.57 (1H, d, 8.6)	119.5	CH
10a	-	126.5	C
10b	-	124.0/126	C
11	7.77 (1H, d, J=8.7)	120.0	CH
12	7.48 (1H, d, J=8.5)	123.4	CH
12a	-	130.7	C
OCH <sub>2</sub> O	6.07 (2H, s)	101.0	CH <sub>2</sub>
NCH <sub>3</sub>	2.76 (3H, s)	40.3	CH <sub>3</sub>
OCH <sub>3</sub>	3.97 (3H, s)	61.8	CH <sub>3</sub>

Tabell 4.20: Litteraturdata av  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) data for buesgenin (Sandjo et al. 2014).

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet
1	7.31 (s)	105.3	CH
2	-	148.8	C
3	-	148.2	C
4	7.89 (s)	101.7	CH
4a	-	128.2	C
4b	-	140.1	C
6	6.54 (s)	80.0	CH
6a		124.3	C
7		146.9	C
8		150.6	C
9	7.41 (d, J=8.4)	118.3	CH
10	7.82 (d, J=8.4)	120.4	CH
10a	-	129.1	C
10b	-	124.3	C
11	8.02 (d, J=8.5)	121.0	CH
12	7.62 (d, J=8.5)	124.2	CH
12a	-	131.7	C
OCH <sub>2</sub> O	6.04 (d, J=1.2)	102.0	CH <sub>2</sub>
	6.08 (d, J=1.2)		
NCH <sub>3</sub>	2.77 (s)	40.6	CH <sub>3</sub>
OCH <sub>3</sub>	4.24 (s)	62.2	CH <sub>3</sub>

### *Analytisk HPLC*

Kromatogrammet av buesgenin viser en stor topp ved retensjonstid 3.07 min som har et UV-spektrum med absorpsjonstopper ved 267, 316, 338 nm (se vedlegg 3.11). I kromatogrammet til MeOH-råekstrakt av rotbark hvor det er brukt samme metode, observeres det en topp ved 3.36 min som har et UV-spektrum med absorpsjonstopper ved med absorpsjonstopper ved 268, 316 og 338 nm (se vedlegg 3.12). I kromatogrammet hvor buesgenin og råekstraktet ble blandet sammen, observeres det en stor topp ved 3.19 min som har et UV-spektrum med absorpsjonstopper ved 268, 316 og 338 nm (se vedlegg 3.13). Dette kan bekrefte at buesgenin ikke er et artefakt, men at det finnes i råekstraktet.

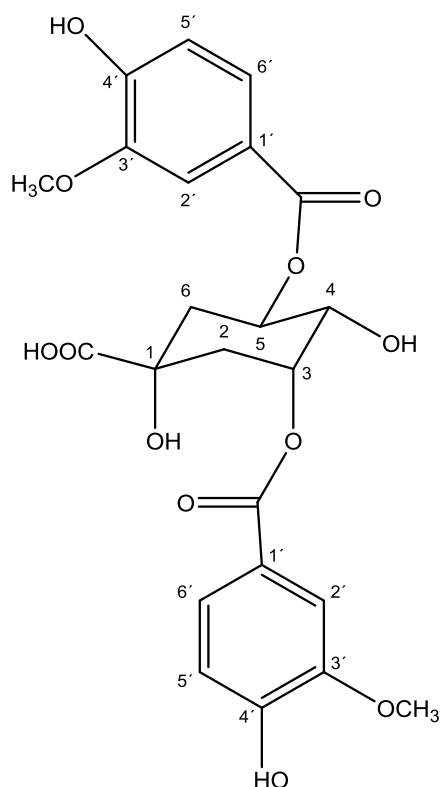
#### 4.5.2.2 Bioassays

Det ble ikke tatt rekellarvetest og antiplasmodiumtest av buesgenin som følge av at stoffet har blitt ødelagt. Det foreligger ingen tidligere publiserte studier på rekellarvetoksisitetstest eller antiplasmodiumtest av buesgenin, men buesgenin har vist å være cytotoxisk (Sandjo et al. 2014), parasitticid mot *Trypanozoma cruzi* og *Leishmania amazonensis* (Sandjo et al. 2016), og antibakterielt (Tankeo et al. 2015).

### 4.5.3 Burkinabin B

#### 4.5.3.1 Identifikasjon

Burkinabin B er en shikimatmetabolitt som er en 3,5-divaniljesyreester av kinasyre (se figur 5.38). Forbindelsen er tidligere rapportert i rotbark av *Z. zanthoxyloides* (Ouattara et al. 2004; Ouattara et al. 2009), men ikke i andre planter.



Figur 4.38: Molekylstruktur av burkinabin B.

Tolkning av NMR-spektrene for isolert burkinabin fra Sb-meoh-s7v1h4 (se vedlegg 2.7) er gitt i tabell 4.21, hvor spektraldata er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.22. Data for  $^{13}\text{C}$  NMR av burkinabin B er ikke oppgitt i litteraturen.

Tabell 4.21:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) data for burkinabin B.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1		74.7	C	
2 eq	2.22 (1H, m)	35.7	$\text{CH}_2$	1, 1-COOH
2 ax	2.40 (1H, m)			1-COOH
3	5.61 (1H, m)	72.7	CH	1, 2, -O-C=O-1''
4	4.09 (1H, dd, J = 3.1, 7.0)	70.5	CH	
5	5.53 (1H, m)	72.5	CH	
6 eq	2.36 (1H, m)	37.5	$\text{CH}_2$	1, 1-COOH,
6 ax	2.27 (1H, m)			1-COOH
1'		123.0	C	
2'	7.59 (1H, m)	113.8	CH	-O-C=O-1', 4'
3'		148.8	C	
4'		152.9	C	
5'	6.85 (1H, d, J=8.5)	115.8/115.9	CH	3',
6'	7.58 (1H, m)	125.3	CH	-O-C=O-1'
1''		122.6	C	
2''	7.69 (1H, d, J=2.0)	114.1	CH	1'', -O-C=O-1''
3''		148.7	C	
4''		152.8	C	
5''	6.86 (1H, d, J=8.5)	115.8/115.9	CH	3'', -O-C=O-1''
6''	7.66 (1H, dd, J=1.9, 8.2)	125.4	CH	-O-C=O-1''
1-COOH		177.4	C	
-O-C=O-1'		167.3	C	
-O-C=O-1''		167.7	C	
3''-OCH <sub>3</sub>	3.92 (3H, s)		$\text{CH}_3$	
3'-OCH <sub>3</sub>	3.91 (3H, s)		$\text{CH}_3$	

Tabell 4.22: Litteraturdata av  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Ouattara et al. 2004).

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
2 ax	2.42
2 eq	2.02
3	5.61
4	4.17
5	5.52
6 ax	2.34
6 eq	2.44
2'	7.69 (d, $J=1.53$ )
5'	6.98 (d=8.24)
6'	7.68 (dd, $J=1.53, 8.24$ )
-OCH <sub>3</sub>	3.93 (s)

### Massespektrometri

Spekter av negativt ion ESI-MS av fraksjon Sb-meoh-s7v1h4 viste en topp ved  $m/z$  491 (M-1) som stemmer med molekylvekten til Burkinabin B som er 492 (se vedlegg 4.1). Det er også en topp ved  $m/z$  323 som tilsvarer avspaltning av vanniljesyre (ion ved  $m/z$  167). Dette stemmer overens med litteraturdata for burkinabin B (Ouattara et al. 2004).

### 4.5.3.2 Rekelarvetest

Burkinabin B fra fraksjon Sb-meoh-s7v1h4 var ikke toksisk på rekelarver (se tabell 4.23), og  $\text{LD}_{50}$  ble derfor ikke bestemt. Positiv kontroll med podofyllotoksin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) ga  $97 \pm 5$  % dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga  $3 \pm 5$  % dødelighet av rekelarver. Et søk i SciFinder viste at det ikke finnes tidligere publiserte studier på toksisitet av burkinabin B på rekelarver.

Tabell 4.23: Toksisitet på rekelarver av burkinabin B.

Kons. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	$\text{LD}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
100	2,0	5	4	ikke toksisk
10	1,0	6	5	
1	0,0	0	0	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)



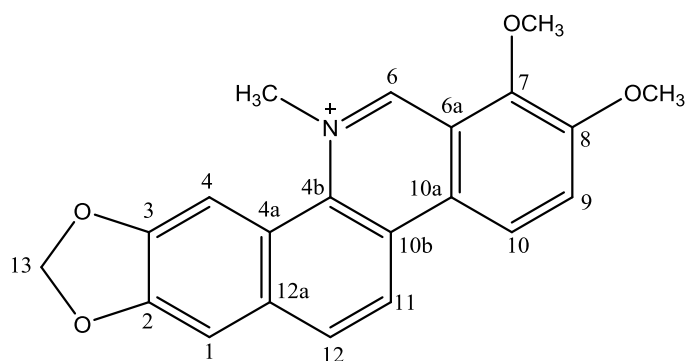
#### 4.5.3.3 Antiplasmodiumtest

Resultater fra antiplasmodiumtest i Australia viste at burkinabin B ikke ga antiplasmodium-effekt ( $IC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$ ) mot *P. falciparum* stammen 3D7. Det foreligger ingen tidligere studier av antiplasmodium-effekt av burkinabin B.

#### 4.5.4 Chelerythrin

##### 4.5.4.1 Identifikasjon

Benzofenantridinalkaloid chelerythrin (se figur 4.39) er ikke tidligere rapportert i stammebark av *Z. zanthoxyloides*. Stoffet er tidligere rapportert i rotbark av *Z. zanthoxyloides* (Torto et al. 1966), og i andre *Zanthoxylum*-arter som *Z. artchoum* (Yao-Kouassi et al. 2015) og *Z. nitidum* (Jia et al. 2014).



Figur 4.39: Molekylstruktur for chelerythrin.

Tolkning av NMR-spektrene for isolert chelerythrin fra Sb-meoh-s11h4 (se vedlegg 2.8) er gitt i tabell 4.24, hvor vår spektraldata er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.25 og 4.26.

Tabell 4.24:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) data for chelerythrin.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet	HMBC
1	7.60 (1H, s)	107.2	CH	4a, 3, 12
2		150.9 <sup>a</sup>		
3		150.9 <sup>a</sup>		
4	8.22 (1H, s)	105.2	CH	2, 12a
4a		121.0	C	
4b		132.7	C	

6	10.01 (1H, s)	151.3	CH	
6a		120.6	C	
7		147.7 <sup>a</sup>		
8		152.3 <sup>a</sup>		
9	8.24 (1H, d, J=9.1)	127.5	CH	7, 8, 10a
10	8.73 (1H, d, J=9.2)	120.0	CH	6a, 7, 8, 10b
10a		130.2	C	
10b		127.5	C	
11	8.70 (1H, d, J=8.9)	119.6	CH	10a
12	8.26 (1H, d, J=8.9)	132.7	CH	1, 4a, 10b
12a		134.4	C	
13	6.28 (2H, s)	104.4	CH <sub>2</sub>	2 eller 3
7-OCH <sub>3</sub>	4.29 (3H, s)	62.9	CH <sub>3</sub>	7
8-OCH <sub>3</sub>	4.15 (3H, s)	57.6	CH <sub>3</sub>	8
N-CH <sub>3</sub>	5.01 (3H, s)	52.9	CH <sub>3</sub>	4, 6, 4b

<sup>a</sup> Noe usikkerhet, signalene er detektert via HMBC

Tabell 4.25: Litteraturdata av <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) og <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) data for chelerythrin (Miao et al. 2011).

Posisjon	δ <sub>H</sub> (J i Hz)	δ <sub>C</sub>
1	7.49 (1H, s)	107.3
2		151.0
3		150.9
4	8.08 (1H, s)	105.3
4a		121.8
4b		133.5
6	9.92 (1H, s)	152.1
6a		120.1
7		147.6
8		151.8
9	8.10 (1H, d, J=9.0)	127.6
10	8.60 (1H, d, J=9.0)	120.9
10a		130.1
10b		127.2
11	8.56 (1H, d, J=9.0)	119.7
12	8.10 (1H, d, J=9.0)	132.8
12a		134.3

13	6.26 (2H, s)	104.5
7-OCH <sub>3</sub>	4.27 (3H, s)	63.2
8-OCH <sub>3</sub>	4.12 (3H, s)	57.8
N-CH <sub>3</sub>	4.97 (3H, s)	53.2

Tabell 4.26: Litteraturdata av <sup>1</sup>H NMR (60 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data for chelerythrin (Krane et al. 1984).

Posisjon	δ <sub>H</sub> (J i Hz)
1	7.57 (1H, s)
4	8.15 (1H, s)
6	9.89 (1H, s)
9	8.72 (1H, d, J=9.6)
10	8.22 (1H, d, J=9.6)
11	8.67 (1H, d, J=9.6)
12	8.27 (1H, d, J=9.6)
13	6.31 (2H, s)
7-OCH <sub>3</sub>	4.44 (3H, s)
8-OCH <sub>3</sub>	4.26 (3H, s)
N-CH <sub>3</sub>	5.12 (3H, s)

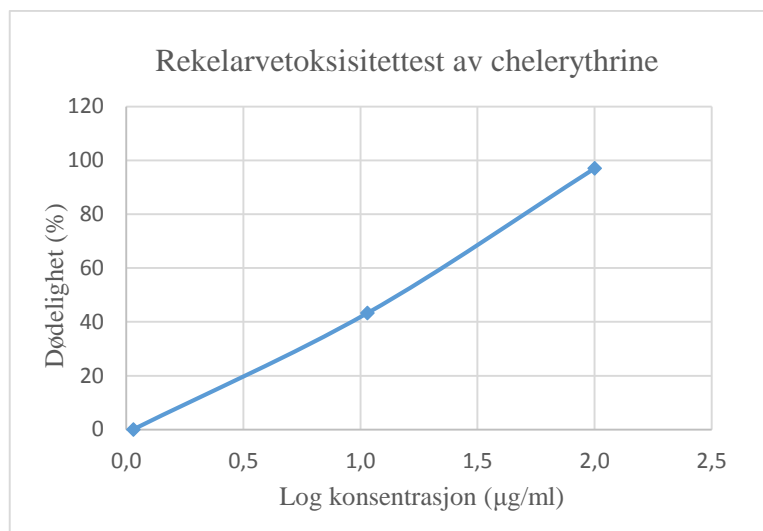
#### 4.5.4.2 Rekelarvetest

Chelerythrin isolert fra Sb-meoh-s11h4 viste toksisitet på rekelarver med en LD<sub>50</sub>-verdi på 43 ± 26 µM (se tabell 4.27). Denne IC<sub>50</sub>-verdien er usikker på grunn av få konsentrasjoner i området 10-100 µg/ml. Den toksiske effekten økte med økt konsentrasjon, og viste dermed korrelasjon mellom konsentrasjon og dødelighet (se figur 4.40). Positiv kontroll med podofyllotoksin (100 µg/ml) ga 100 % dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga 6 ± 6 % dødelighet av rekelarver. Et søk på i SciFinder viste at det ikke foreligger tidligere publiserte studier på toksisitet av chelerythrin på rekelarver.

Tabell 4.27: Toksisitet på rekelarver av chelerythrin.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)	LD <sub>50</sub> (µM)
100	2,0	97	5	15 ± 9	43 ± 26
10	1,0	43	15		
1	0,0	0	0		

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)



Figur 4.40: Toksisitet på rekelarver av chelerythrin vist som % dødelighet.

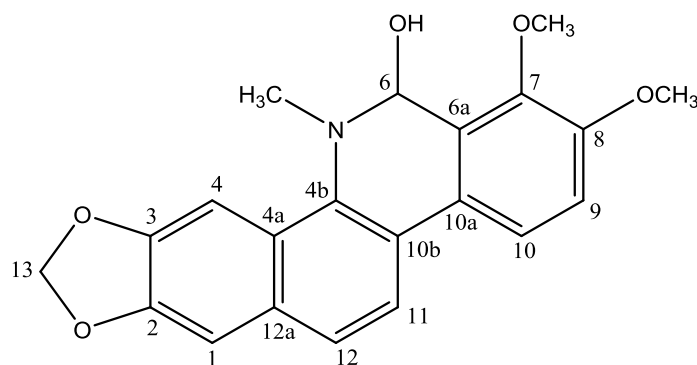
#### 4.5.4.3 Antiplasmodiumtest

Det ble ikke tatt antiplasmodiumtest av chelerythrin på grunn av for liten mengde isolert stoff. Det foreligger en studie som viser at chelerythrin er aktiv mot på *P. falciparum* stammen 3D7 med  $IC_{50}$ -verdi på  $1,35 \pm 0,80 \mu\text{g/ml}$  (Muganga et al. 2014). Chelerythrin er også vist være toksisk mot mygglarver (*Anopheles gambiae*), hvor det ble oppgitt 100% dødelighet ved 1000  $\mu\text{g/ml}$  (Talontsi et al. 2011).

### 4.5.5 6-Hydroksydyhydrochelerythrin

#### 4.5.5.1 Identifikasjon

Alkaloidet 6-hydroksydyhydrochelerythrin (se figur 4.41) er ikke tidligere rapportert i *Z. zanthoxyloides*, men i andre *Zanthoxylum* arter som *Z. nitidum* (Wang et al. 2015).



Figur 4.41: Molekylstruktur 6-hydroksydyhydrochelerytrin.

Tolkning av spektrene for isolert 6-hydroksydidhydrochelerytrin fra Sb-meoh-s12v10 (se vedlegg 2.9) er gitt i tabell 4.28, hvor spektraldata er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.29. Fraksjonen Sb-meoh-s11v3 ble også identifisert som 6-hydroksydidhydrochelerytrin ved å sammenligne NMR-spektrene.

Tabell 4.28:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) data for 6-hydroksydidhydrochelerytrin..

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	7.16 (1H, s)	105.5	CH	3, 4, 4a, 4b
2		149.1	C	
3		149.7	C	
4	7.66 (1H, s)	101.3	CH	1, 2, 4b, 10b
4a		126.3	C	
4b		139.4	C	
6	5.55 (1H, s)	87.5	CH	4b, 7, 10a, N-CH <sub>3</sub>
6a		124.0	C	
7		148.0	C	
8		153.5	C	
9	7.18 (1H, d, J=8.6)	114.6	CH	7, 8, 10a
10	7.70 (1H, d, J=8.6)	120.1	CH	6, 6a, 7, 8, 9, 10a
10a		126.3	C	
10b		132.6	C	
11	7.81 (1H, d, J=8.6)	120.9	CH	4b, 10b, 12a
12	7.51 (1H, d, J=8.5)	124.8	CH	1, 4b, 6a, 10b, 12a
12a		128.1	C	
13	6.06 (2H, s)	102.6	CH <sub>2</sub>	2/3
7-OCH <sub>3</sub>	3.92 (3H, s)	62.0	CH <sub>3</sub>	7
8-OCH <sub>3</sub>	3.93 (3H, s)	56.5	CH <sub>3</sub>	8
N-CH <sub>3</sub>	2.73 (3H, s)	41.0	CH <sub>3</sub>	4b, 6

Tabell 4.29: Litteraturdata av  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) data for 6-hydroksydidhydrochelerytrin (Wang et al. 2015).

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	7.16 (1H, s)	104.63
2		147.33
3		147.90
4	7.72 (1H, s)	100.69
4a		126.04

4b		138.68
6	5.73 (1H, s)	84.52
6a		122.67
7		146.63
8		152.18
9	7.05 (1H, d, J=8.5)	112.86
10	7.65 (1H, d, J=8.5)	119.02
10a		124.98
10b		131.02
11	7.81 (1H, d, J=8.5)	120.14
12	7.50 (1H, d, J=8.5)	123.34
12a		126.79
13	6.08 (2H, s)	101.02
7-OCH <sub>3</sub>	3.95 (3H, s)	55.97
8-OCH <sub>3</sub>	4.02 (3H, s)	61.64
N-CH <sub>3</sub>	2.78 (3H, s)	40.70

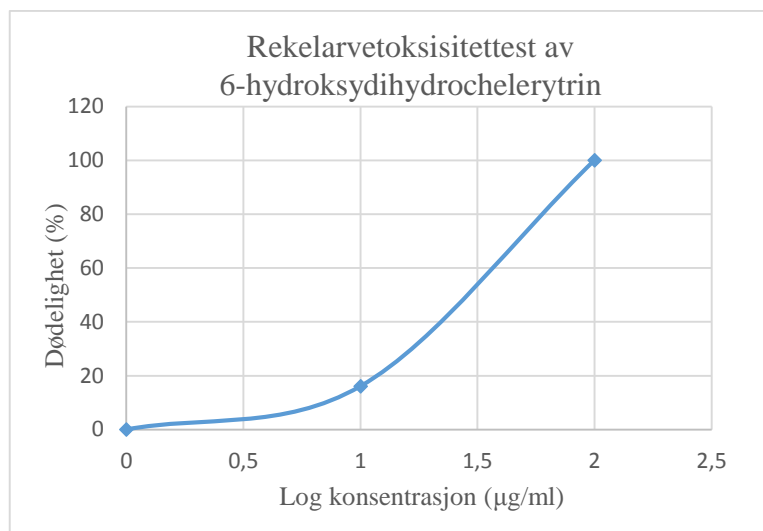
#### 4.5.5.2 Rekellarvetest

6-hydroksydidihydrochelerytrin fra fraksjon Sb-meoh-s12v10 viste toksisitet på rekellarver med en LD<sub>50</sub>-verdi på  $68 \pm 6$   $\mu$ M (se tabell 4.30). Denne IC<sub>50</sub>-verdien er usikker på grunn av få konsentrasjoner i området 10-100  $\mu$ g/ml. Den toksiske effekten økte med økt konsentrasjon, og viste dermed korrelasjon mellom konsentrasjon og dødelighet (se figur 4.42). Positiv kontroll med podofyllotoksin (100  $\mu$ g/ml) ga  $96 \pm 6$  % dødelighet av rekellarver, mens negativ kontroll med DMSO ga  $3 \pm 5$  % dødelighet av rekellarver. Et søk på i SciFinder viste at det ikke foreligger tidligere publiserte studier på toksisitet av 6-hydroksydidihydrochelerytrin på rekellarver.

Tabell 4.30: Toksisitet på rekellarver av 6-hydroksydidihydrochelerytrin.

Kons. ( $\mu$ g/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	LD <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
100	2,0	100	0	25 $\pm$ 2	68 $\pm$ 6
10	1,0	16	5		
1	0,0	0	0		

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)



Figur 4.42: Toksisitet på rekellarver av 6-hydroksydihydrochelerytrin vist som % dødelighet.

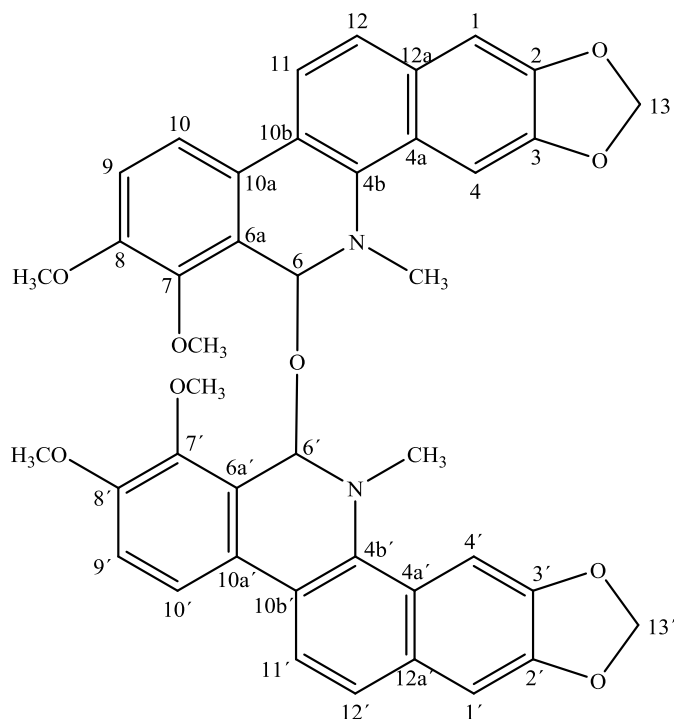
#### 4.5.5.3 Antiplasmodiumtest

Det ble ikke tatt antiplasmodiumtest av chelerythrin på grunn av for liten mengde isolert stoff, og det foreligger heller ingen tidligere studier av antiplasmodium effekt av 6-hydroksydihydrochelerytrin.

### 4.5.6 Bis-dihydrochelerythrinyleter

#### 4.5.6.1 Identifikasjon

Bis-dihydrochelerythrinyleter som er et dimert alkaloid (se figur 4.43) er ikke tidligere rapportert i *Z. zanthoxyloides*, men i andre *Zanthoxylum*-arter som *Z. rubescens* (Penali et al. 2007) og *Z. monophyllum* (Rodriguez-Guzman et al. 2011). Dette stoffet har også blitt fremstilt syntetisk ved alkalisering av chelerythrinklorid (Tousek et al. 2002).



Figur 4.43: Molekylstruktur for bis-dihydrochelerythrinyleter.

Tolkning av NMR spektrene for isolert bis-dihydrochelerythrinyleter fra Rb-meoh-v7c2+3c6 (se vedlegg 2.10) er gitt i tabell 4.31, hvor spektraldataene er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.32 og 4.33. Det observeres også andre signaler ved 2.04, 2.17, 2.76, 2.71 og 3.9-4.2 som sannsynligvis skyldes forurensninger. Signaler ved 0,93 og 1.24-1.34 ppm indikerer innhold av fett. HMBC-kobling mellom signaler ved 6.60 ppm (H-6) og 77.5 ppm (C-6') viser at det er en dimer (Marek et al. 1996).

Tabell 4.31:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for bis-dihydrochelerythrinyleter.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet
1, 1'	7.16 (1H, s)	104.5	CH
2, 2'		147.5	C
3, 3'		148.1	C
4, 4'	7.92 (1H, s)	100.9	CH
4a, 4a'		126.9	C
4b, 4b'		138.4	C
6, 6'	6.60 (1H, s)	77.5	CH
6a, 6a'		123.0	C
7, 7'		146.3	C
8, 8'		152.1	C
9, 9'	6.85 (d, J=8.6)	112.3	CH



10, 10'	7.48 (d, J=8.6)	118.7	CH
10a, 10a'		126.2	C
10b, 10b'		125.5	C
11, 11'	7.69 (1H, d, J=8.7)	119.8	CH
12, 12'	7.45 (1H, d, J=8.6)	123.3	CH
12a, 12a'		131.2	C
13	6.11 (1H, d, J=1.3)	101.1	CH <sub>2</sub>
13'	6.10 (1H, d, J=1.3)		
7-OCH <sub>3</sub> , 7-OCH <sub>3</sub> '	2.41 (3H, s)	60.4	CH <sub>3</sub>
8-OCH <sub>3</sub> , 8-OCH <sub>3</sub> '	3.72 (3H, s)	55.7	CH <sub>3</sub>
-N-CH <sub>3</sub> x2	3.05 (3H, s)	40.9	CH <sub>3</sub>

Tabell 4.32: Litteraturodata av <sup>1</sup>H NMR (400/500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) og <sup>13</sup>C NMR (100/125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data for bis-dihydrochelerythrinyler (Tousek et al. 2002).

Posisjon	δ <sub>H</sub> (J i Hz)	δ <sub>C</sub>
1, 1'	7.16	104.51
2, 2'		147.53
3, 3'		148.08
4, 4'	7.92	101.11
4a, 4a'		126.96
4b, 4b'		138.45
6, 6'	6.60	77.51
6a, 6a'		
7, 7'		146.38
8, 8'		152.13
9, 9'	6.85	112.36
10, 10'	7.49	118.69
10a, 10a'		125.56
10b, 10b'		123.04
11, 11'	7.69	119.84
12, 12'	7.45	123.26
12a, 12a'		131.23
13	6.11	100.87
13'	6.12	

7-OCH <sub>3</sub> , 7-OCH <sub>3</sub> '	2.42	60.41
8-OCH <sub>3</sub> , 8-OCH <sub>3</sub> '	3.73	55.69
-N-CH <sub>3</sub> x2	3.05	40.87

Tabell 4.33: Litteraturdata av <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) og <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data for bis-dihydrochelerythrinyleter (Dostal et al. 1995).

Posisjon	δ <sub>H</sub> (J i Hz)	δ <sub>C</sub>
1, 1'	7.16 (s)	104.46
2, 2'		147.47/ 148.03
3, 3'		148.03/ 147.47
4, 4'	7.93 (s)	100.81
4a, 4a'		126.89
4b, 4b'		138.37
6, 6'	6.61 (s)	77.42
6a, 6a'		123.22
7, 7'		146.27
8, 8'		152.07
9, 9'	6.84 (d, J=8.7)	112.25
10, 10'	7.48 (d, J=8.7)	118.66
10a, 10a'		126.11/ 125.47
10b, 10b'		125.47/ 126.11
11, 11'	7.68 (d, J=8.5)	119.79
12, 12'	7.44 (d, J=8.5)	123.22
12a, 12a'		131.16
13	6.11 (s)	101.09
13'		
7-OCH <sub>3</sub> , 7-OCH <sub>3</sub> '	2.41 (s)	60.37
8-OCH <sub>3</sub> , 8-OCH <sub>3</sub> '	3.72 (s)	55.62
-N-CH <sub>3</sub> x2	3.05 (s)	40.87

### *Analytisk HPLC*

Siden det har blitt rapportert at chelerythrin lett kan danne bis-dihydrochelerythrinyleter, f.eks. ved samtidig kontakt med vandig ammoniakk og silikagel (Savina et al. 2000), er det mulig at det isolerte bis-dihydrochelerythrinyleter fra fraksjonen Rb-meoh-v7c2+3c6 er et artefakt. Stoffet kan ha blitt dannet fra chelerythrin og fagaradin, som begge er kjent i *Z. zanthoxyloides* (Adesina 1986; Torto et al. 1966). Det ble derfor utført analytisk HPLC av Rb-

meoh-v7c2+3c6 og MeOH-råekstrakt av rotbark med samme metodebetingelser for å sammenligne og se om det isolerte stoffet kunne observeres i råekstraktet.

Kromatogrammet til isolert bis-dihydrochelerythrinyleter viste en stor topp med retensjonstiden 4,04 min som har et UV-spektrum med absorpsjonstopper ved 219, 269, 317 og 339 nm (se vedlegg 3.14). I kromatogrammet til MeOH-råekstrakt av rotbark ble det observert en topp ved 4,25 min som har et UV-spektrum med absorpsjonstopper ved 227, 269, 317 og 339 (se vedlegg 3.15), som er tilnærmet identisk med bis-dihydrochelerythrinyleter. Ekstraktene og substansene har ikke vært i kontakt verken med ammoniakk eller andre baser, og råekstraktet har ikke vært i kontakt med silikagel. Det kan derfor virke sannsynlig at bis-dihydrochelerythrinyleter ikke er et artefakt, men at stoffet finnes i planten.

#### *Optisk rotasjon*

Optisk rotasjon ( $[\alpha]_D^{25}$ ) av 1 mg/ml bis-dihydrochelerythrinyleter løst i MeOH ble målt til -30,0°. Ettersom det ikke foreligger tidligere studier på optisk rotasjon av bis-dihydrochelerythrinyleter, er det ikke mulig å bestemme om stoffet har en (6S, 6'S) eller (6R, 6'S) konfigurasjon.

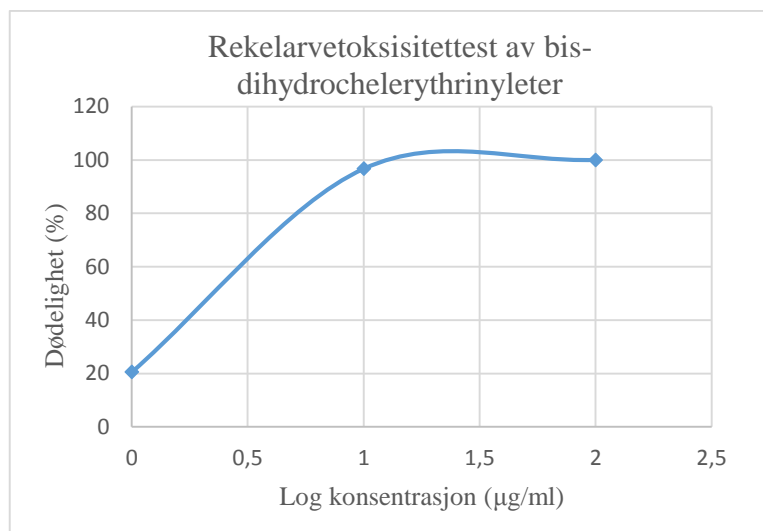
#### **4.5.6.2 Rekelarvetest**

Bis-dihydrochelerythrinyleter viste toksisitet på rekelarver med en LD<sub>50</sub>-verdi på  $3 \pm 1$  µM (se tabell 4.34). Den toksiske effekten så ut til å øke med økt konsentrasjon, og viste dermed korrelasjon mellom konsentrasjon og dødelighet (se figur 4.44). Positiv kontroll med podofyllotoksin (100 µg/ml) ga 100 % dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga  $6 \pm 6$  % dødelighet av rekelarver. Et søk i SciFinder viste at det ikke foreligger tidligere publiserte studier på toksisitet av bis-dihydrochelerythrinyleter på rekelarver.

Tabell 4.34: Toksisitet på rekelarver av bis-dihydrochelerythrinyleter.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)	LD <sub>50</sub> (µM)
100	2,0	100	0	$2 \pm 0,8$	$3 \pm 1$
10	1,0	97	6		
1	0,0	21	12		

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)



Figur 4.44: Toksisitet på rekelarver av bis-dihydrochelerythrinyleter vist som % dødelighet.

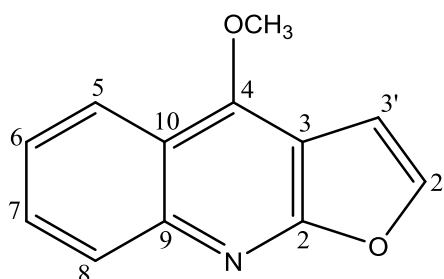
#### 4.5.6.3 Antiplasmodiumtest

Resultater fra Australia viste at bis-dihydrochelerythrinyleter hadde antiplasmodium-effekt med en  $IC_{50}$ -verdi på  $4,3 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$  mot *P. falciparum* stammen 3D7. Det foreligger ingen tidligere studier av antiplasmodium effekt av bis-dihydrochelerythrinyleter.

### 4.5.7 Diktamnin

#### 4.5.7.1 Identifikasjon

Diktamnin som er et furokinolinalkaloid (se figur 4.45), har ikke blitt rapportert i *Z. zanthoxyloides*, men har blitt rapportert i andre *Zanthoxylum* arter som *Z. dissitum* (Wang et al. 2013) og *Z. simulans* (Chen et al. 1994).



Figur 4.45: Molekylstruktur for diktamnin.

Tolkning av spektraldata ( $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC) for isolert diktamnin fra Rb-dcm-v5c3h4 (se vedlegg 2.11) er gitt i tabell 4.35, hvor spektraldataene er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.36 og 4.37. Det ble også observert en rekke mindre signaler ved 6.78-5.96, 4.34-0.84 ppm i  $^1\text{H}$ -NMR-spektret som indikerer at fraksjonen med diktamnin ikke var ren. Fraksjonen Rb-dcm-v5c3h4h5 ble også identifisert som uren diktamnin, og det ble ikke prioritert å rense fraksjonene ytterligere grunnet begrenset tid.

Tabell 4.35:  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$ -NMR data for diktamnin.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	Multiplisitet	HMBC (H $\rightarrow$ C)
4		157	C	
5	8.29 (1H, ddd, J=8.5, 1.6, 0.6)		CH	2
6	7.46 (1H, ddd, J=8.5, 6.9, 1.4)		CH	10
7	7.69 (1H, ddd, J=8.5, 6.9, 1.6)		CH	
8	8.02 (1H, dd, J=8.5, 1.4) <sup>b</sup>		CH	7
4 -OCH <sub>3</sub>	4.47 (3H, s)	59	CH <sub>3</sub>	4
2'	7.65 (1H, d, J=2.8)		CH	2
3'	7.10 (1H, d, J=2.7)		CH	

<sup>a</sup> Noe usikkerhet, data tatt fra HSQC og HMBC.

<sup>b</sup> Ut i fra  $^1\text{H}$ -NMR spekteret vises det ikke en tydelig dobbel dublett. Signalet var sannsynligvis for dårlig til å detektere det siste signalet på 8.01 ppm. Årsaken til dette kan være fordi fraksjonen ikke var ren.

Tabell 4.36: Litteraturdata av  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (50.3 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for diktamnin (Pusset et al. 1991).

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		168.9
3		103.7
4		157.0
5	8.27 (dd, J=8.4, 1.7)	122.4
6	7.45 (ddd, J=8.4, 8.4, 1.7)	123.8
7	7.68 (ddd, J=8.4, 8.4, 1.4)	129.6
8	8.01 (dd, J=8.4, 1.4)	128.0
9		145.9
10		119.0
4 -OCH <sub>3</sub>	4.45 (s)	59.1
2'	7.69 (d, J=2.8)	143.7
3'	7.08 (d, J=2.8)	104.8

Tabell 4.37: Litteraturdata av  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) for diktamnin (Bhoga et al. 2004).

$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)
8.19 (1H, dd, J=8.3, 1.7)
7.39 (1H, ddd, J=8.3, 6.8, 1.5)
7.64 (1H, ddd, J=8.3, 6.8, 1.7)
8.00 (1H, dd, J=8.6, 1.5)
4.28 (3H, s)
7.53 (1H, d, J=2.7)
6.95 (1H, d, J=2.7)

#### 4.5.7.2 Rekelarvetest

Det ble ikke utført rekelarvetest på diktamnin på grunn av at fraksjonen ikke var ren nok, og det foreligger heller ingen tidligere studier på rekelarvetoksisitet av diktamnin.

#### 4.5.7.3 Antiplasmodiumtest

Det ble ikke tatt antiplasmodiumtest av diktamnin på grunn av at stoffet ikke var ren nok. Tidligere studier viser at diktamnin er inaktive mot flere ulike stammer av *P.falciparum* (se tabell 4.38).

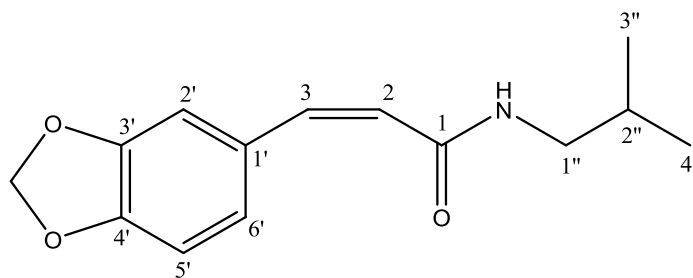
Tabell 4.38: Tidligere studier på antiplasmodium aktivitet av pellitorin

Stamme av <i>P. falciparum</i>	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Litteratur
Dd2 (klorokinresistent)	inaktiv	(Yang et al. 2011)
3D7 (klorokinsensitiv)	inaktiv	(Severino et al. 2009)
HB3 (klorokinsensitiv)	inaktiv	(Muriithi et al. 2002)
K1 (klorokinresistent)	inaktiv	(Muriithi et al. 2002)

### 4.5.8 *cis*-Fagaramid

#### 4.5.8.1 Identifikasjon

Alkamidet *cis*-fagaramid (se figur 4.46) er tidligere rapportert i rotbark av *Z. zanthoxyloides* (Chaaib et al. 2003), og i andre *Zanthoxylum*-arter som *Z. schinifolium* (Cheng et al. 2002).



Figur 4.46: Molekylstruktur for *cis*-fagaramid.

Tolkning av spektrene for isolert *cis*-fagaramid fra Rb-dcm-v4c4h7 (se vedlegg 2.12) er gitt i tabell 4.39, hvor vår spektraldata er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.40.

Fraksjonen Rb-dcm-v5c4h9 har også blitt identifisert som *cis*-fagaramid ved å sammenligne NMR-spektrene.

Tabell 4.39:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for *cis*-fagaramid.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1		167 <sup>a</sup>		
2	5.88 (1H, d, J=12.5)	123.5	CH	1
3	6.64 (1H, d, J=12.5)	135.9	CH	5, 6 eller 8, 9
1'		129.1	C	
2'	7.11 (1H, d, J=1.7)	109.2	CH	3 eller 4, 6, 7
3'		147 <sup>a</sup> -148 <sup>a</sup>		
4'		147 <sup>a</sup> -148 <sup>a</sup>		
5'	6.78 (1H, d, J=8.0)	108.2	CH	1, 3 eller 4
6'	6.94 (1H, ddd, J=0.7, 1.8, 8.1)	123.8	CH	2, 3 eller 4, 7
1''	3.09 (2H, dd, J=6.1, 6.9)	46.9	CH <sub>2</sub>	9, 13 eller 14
2''	1.73 (1H, m)	28.3	CH	
3'', 4''	0.85 (6H, d, J=6.6)	20.1	2 x CH <sub>3</sub>	11
-OCH <sub>2</sub> O-	5.96 (2H, s)	101.3	CH <sub>2</sub>	3 eller 4
-NH	5.56 (1H, br s)			

<sup>a</sup> Noe usikkerhet, data tatt fra HMBC

Tabell 4.40: Litteraturdata av  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for *cis*-fagaramid (Cheng et al. 2002).

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		167.1
2	5.88 (1H, d, J=12.6)	123.4
3	6.63 (1H, d, J=12.6)	135.9
1'		129.1

2'	7.11 (1H, d, J=1.6)	109.1
3'		147.1
4'		147.9
5'	6.77 (1H, d, J=8.0)	108.2
6'	6.94 (1H, dd, J=8.0, 1.6)	123.8
1''	3.09 (2H, t, J=6.8)	46.8
2''	1.73 (1H, m)	28.2
3''	0.84 (3H, d, J=6.8)	20.1
4''	0.84 (3H, d, J=6.8)	20.1
-OCH <sub>2</sub> O-	5.96 (2H, s)	101.2
-NH	5.60 (1H, br s)	

#### 4.5.8.2 Rekelarvetest

*cis*-Fagaramid viste ikke toksisitet på rekelarver, og LD<sub>50</sub>-verdi ble derfor ikke beregnet (se tabell 4.41). Positiv kontroll med podofyllotoksin (100 µg/ml) ga 100 % dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga 6 ± 6 % dødelighet av rekelarver. Et søk i SciFinder viste at det ikke foreligger tidligere publiserte studier på toksisitet av *cis*-fagaramid på rekelarver.

Tabell 4.41: Toksisitet på rekelarver av *cis*-Fagaramid.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,00	10	10	Ikke toksisk
11	1,04	0	0	
1	0,00	0	0	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

#### 4.5.8.3 Antiplasmodiumtest

Resultater fra Australia viste at *cis*-fagaramid ikke hadde antiplasmodium-effekt (IC<sub>50</sub> > 20 µg/ml) mot *P. falciparum* stammen 3D7.

Det foreligger to tidligere studier av antiplasmodium effekt av fagaramid, hvor det ikke er angitt om det er *trans*- eller *cis*-fagaramid (se tabell 4.42). Siden det ikke har blitt brukt samme plasmodium-stammer, og det ikke er angitt om det er *cis*- eller *trans*-fagaramid, er det vanskelig å sammenligne dataene.



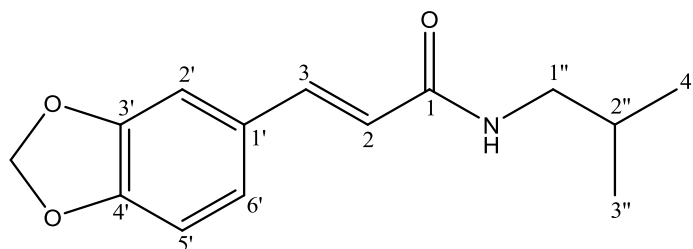
Tabell 4.42: Tidligere studier på antiplasmodium aktivitet av fagaramid (ikke angitt om *cis*- eller *trans*-fagaramid).

Stamme av <i>P. falciparum</i>	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Litteratur
FCR <sub>3</sub> (klorokinsensitiv)	2,85 ± 1,03	(Adia et al. 2016)
NF54 (klorokinresistent)	16,6 ± 0,5	(Adia et al. 2016)
Ikke angitt	Ikke aktiv	(Weenen et al. 1990)

## 4.5.9 *trans*-Fagaramid

### 4.5.9.1 Identifikasjon

*trans*-Fagaramid som er et alkamid (se figur 4.47) er tidligere rapportert i rotbark av *Z. zanthoxyloides* (Chaaib et al. 2003; Queiroz et al. 2006), og i flere andre *Zanthoxylum* arter, f.eks. i *Z. gilletti* (Gaya et al. 2013) og *Z. heitzii* (Mbaze et al. 2009).



Figur 4.47: Molekylstruktur for *trans*-fagaramid.

Tolkning av spektraldata (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C APT, COSY, HSQC, HMBC) for isolert *trans*-fagaramid fra Rb-dcm-v4c4h9 (se vedlegg 2.13) er gitt i tabell 4.43, hvor vår spektraldata er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.44 og 4.45. Fraksjonene Rb-dcm-v5c3h6, Rb-dcm-v5c4h10, Rb-dcm-v5c4h11 og Sb-meoh-s7v6 har også blitt identifisert som *trans*-fagaramid ved å sammenligne NMR-spektrene.

Tabell 4.43:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for *trans*-fagaramid.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1		166.0	C	
2	6.22 (1H, d, J=15.4)	118.8	CH	1, 3, 1'
3	7.54 (1H, d, J=15.5)	140.7	CH	1, 2, 1', 2' 6'
1'		129.3	C	
2'	7.01 (1H, d, J=1.6)	106.3	CH	3 <sup>a</sup> , 4' <sup>a</sup> , 6'
3'		148.2	C	
4'		149.0	C	
5'	6.80 (1H, d, J=7.9)	108.5	CH	1', 3'
6'	6.99 (1H, dd, J=1.7, 8.0)	123.8	CH	3 <sup>a</sup> , 2', 4' <sup>a</sup>
1''	3.22 (2H, dd, J=6.1, 6.9)	47.1	CH <sub>2</sub>	1, 2'', 3'', 4''
2''	1.84 (1H, m)	28.7	CH	1'', 3'', 4''
3'', 4''	0.96 (6H, d, J=6.6)	20.2	CH <sub>3</sub>	1'', 2''
-OCH <sub>2</sub> O-	5.99 (2H, s)	101.4	CH <sub>2</sub>	
-NH	5.58 (1H, br s)			

<sup>a</sup> ikke mulig å skille mellom 7.01 og 6.99 ppm i HMBC, både posisjon 3 og 4' er mulige koblinger for begge signalene.

Tabell 5.44: Litteraturdata av  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for *trans*-fagaramid (Correa et al. 2010).

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		166.5
2	6.38 (1H, d, J=15.5)	119.4
3	7.49 (1H, d, J=15.7)	140.3
1'		129.4
2'		106.4
3'		148.2
4'		148.9
5'	6.69 (1H, d, J=8.0)	108.4
6'	6.89 (1H, dd, J=1.7, 7.9)	123.7
1''	3.18 (2H, t, J=6.5)	47.2
2''	1.82 (1H, m)	28.7
3'', 4''	0.91 (6H, d, J=6.7)	20.2
-OCH <sub>2</sub> O-	5.91 (2H, s)	101.4
-NH	6.64 (1H, t, J=6.7)	

Tabell 4.45: Litteraturdata av  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for *trans*-fagaramid (Schobert et al. 2001).

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		166.2
2	6.28 (1H, d, J=15.49)	106.3/108.5/119.0/123.7
3	7.55 (1H, d, J=15.49)	140.5
1'		129.3
2'	<sup>a</sup>	106.3/108.5/119.0/123.7
3'		148.2/148.9
4'		148.2/148.9
5'	<sup>a</sup>	106.3/108.5/119.0/123.7
6'	<sup>a</sup>	106.3/108.5/119.0/123.7
1''	3.20 (2H, d, J=6.33)	47.1
2''	1.79-1.88 (1H, m)	28.7
3'', 4''	0.94 (6H, d, J=8.93)	20.2
-OCH <sub>2</sub> O-	5.59 (2H, s)	101.4
-NH	6.05 (1H, s)	

<sup>a</sup> 6.75-6.99 (3H, m, 2'-H, 5'-H, 6'-H). Sannsynligvis skal det stå 3'-H i stedet for 2'-H. Posisjon 2' har ingen binding til H.

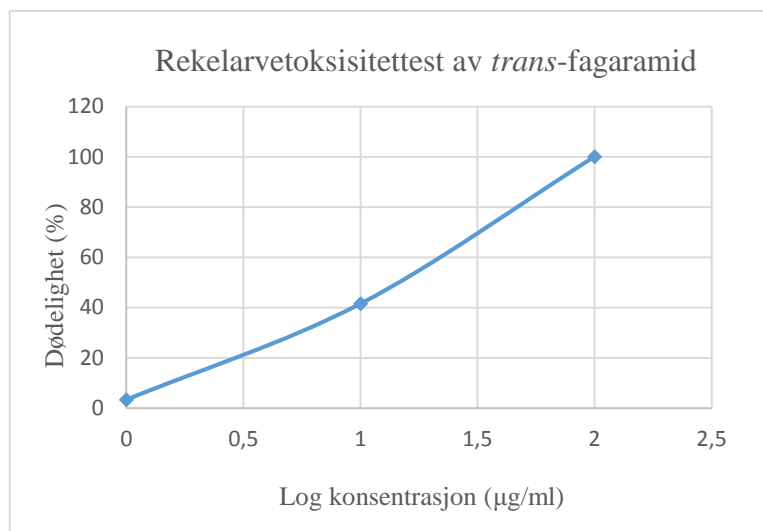
#### 4.5.9.2 Rekelarvetest

*trans*-Fagaramid isolert fra Rb-dcm-v4c4h9 viste toksisitet på rekelarver med en LD<sub>50</sub>-verdi på  $14 \pm 6$  µg/ml ( $57 \pm 24$  µM) (se tabell 4.46). Den toksiske effekten økte med økt konsentrasjon, og viste dermed korrelasjon mellom konsentrasjon og dødelighet (se figur 4.48). Positiv kontroll med podofyllotoksin (100 µg/ml) ga 100 % dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga  $15 \pm 13$  % dødelighet av rekelarver. Et søk på i SciFinder viste at det ikke foreligger tidligere publiserte studier på toksisitet av *trans*-fagaramid på rekelarver.

Tabell 4.46: Toksisitet på rekelarver av *trans*-fagaramid.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)	LD <sub>50</sub> (µM)
100	2,0	100	0	$14 \pm 6$	$57 \pm 24$
10	1,0	42	12		
1	0,0	3	6		

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)



Figur 4.48: Toksisitet på rekelarver av *trans*-fagaramid vist som % dødelighet.

#### 4.5.9.3 Antiplasmodiumtest

Resultater fra Australia viste at *trans*-fagaramid ikke ga antiplasmodium-effekt ( $IC_{50} > 20$  µg/ml) mot *P. falciparum* stammene 3D7.

Det foreligger to tidligere studier av antiplasmodium-effekt av fagaramid, hvor det ikke er angitt om det er *trans*- eller *cis*-fagaramid (se tabell 4.47). Siden det ikke har blitt brukt samme plasmodium stammer og ikke er angitt om det er *cis*- eller *trans*-fagaramid, blir det vanskelig å sammenligne dataene.

Tabell 4.47: Tidligere studier på antiplasmodium aktivitet av fagaramid (ikke angitt om *cis*- eller *trans*-fagaramid).

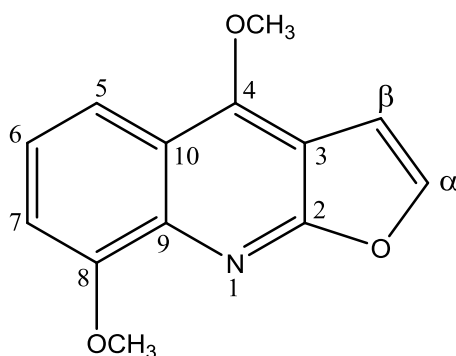
Stamme av <i>P. falciparum</i>	$IC_{50}$ (µg/ml)	Litteratur
FCR <sub>3</sub> (klorokinsensitive)	$2,85 \pm 1,03$	(Adia et al. 2016)
NF54 (klorokinsensitive)	$16,6 \pm 0,5$	(Adia et al. 2016)
Ikke angitt	Ikke aktiv	(Weenen et al. 1990)

#### 4.5.10 $\gamma$ -Fagarin

##### 4.5.10.1 Identifikasjon

$\gamma$ -Fagarin som er et furokinolinalkaloid (se figur 4.49) er ikke rapportert i selve planten, *Z. zanthoxyloides*, men er tidligere rapportert i cellekulturer av *Z. zanthoxyloides* (Couillerot et

al. 1996; Couillerot et al. 1994a), og i andre *Zanthoxylum* arter som *Z. avicennae* (Chen et al. 2015) og *Z. rhoifolium* (Tavares et al. 2014).



Figur 4.49: Molekylstruktur for  $\gamma$ -Fagarin.

Tolkning av spektrene for isolert  $\gamma$ -fagarin fra Rb-dcm-v5c4h5 (se vedlegg 2.14) er gitt i tabell 4.48, hvor spektraldataene er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.49. Fraksjonen Rb-dcm-v5c4h6 ble også identifisert som  $\gamma$ -fagarin ved sammenligning av spektrene.

Tabell 4.48:  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for  $\gamma$ -fagarin.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet	HMBC (H $\rightarrow$ C)
2		163,2	C	
3		103,9	C	
4		157	C	
5	7.85 (1H, dd, J=8.5, 1.1)	114,1	CH	4,7,9
6	7.37 (1H, dd, J=8.5, 7.6)	123,5	CH	8, 10
7	7.06 (1H, dd, J=7.6, 1.1)	107,8	CH	5, 8, 9
8		154,4	C	
9		137	C	
10		119,6	C	
4-OCH <sub>3</sub>	4.46 (3H, s)	59,1	CH <sub>3</sub> <sup>a</sup>	3, 4
8-OCH <sub>3</sub>	4.08 (3H, s)	55,9	CH <sub>3</sub> <sup>a</sup>	7, 8
furan $\alpha$	7.66 (1H, d, J=2.7)	143,9	CH	2, 3
furan $\beta$	7.09 (1H, d, J=2.8)	104,6	CH	2, 3, $\alpha$

<sup>a</sup> HSQC spektra for disse signalene var vanskelige å fasejustere og ga både blå ( $\text{CH}_2$ ) og røde ( $\text{CH}/\text{CH}_3$ ) signaler. Multiplisitetsdata er derfor bestemt fra  $^1\text{H}$ -NMR.

Tabell 4.49: Litteraturdata av  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for  $\gamma$ -fagarin (Min et al. 2007).

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		154,57 <sup>a</sup>
3		103,87
4		163,21 <sup>a</sup>
5	7.84 (1H, dd, J=8.5, 1.2)	114,06
6	7.35 (1H, dd, J=8.5, 7.6)	123,41
7	7.06 (1H, dd, J=7.6, 1.2)	104,50
8		156,85
9		137,52
10		119,65
$\text{OCH}_3$	4.44 (3H, s)	58,98
$\text{OCH}_3$	4.08 (3H, s)	55,94
furan $\alpha$	7.64 (1H, d, J=2.9)	143,88
furan $\beta$	7.07 (1H, d, J=2.9)	107,70

<sup>a</sup> Referansen har sannsynligvis tatt feil. C-4 skal ha 154,57 ppm, og C-2 skal ha 163,21 ppm.

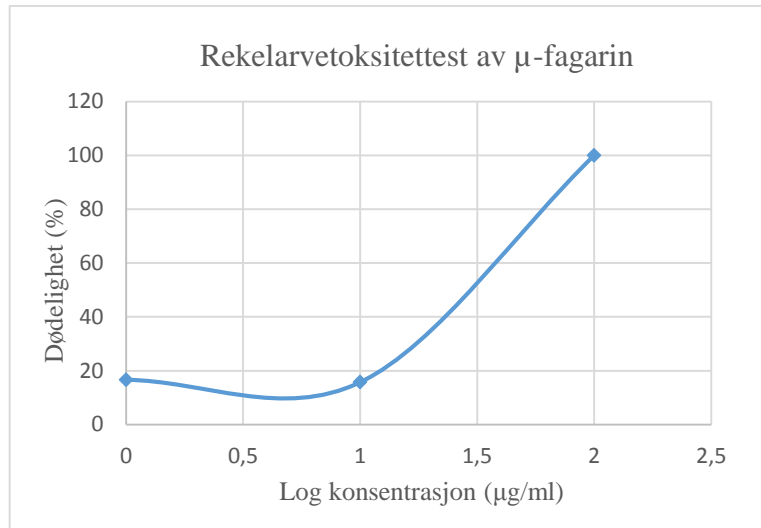
#### 4.5.10.2 Rekelarvetest

$\gamma$ -Fagarin viste toksisitet på rekelarver med en  $\text{LD}_{50}$ -verdi på  $109 \pm 13 \mu\text{M}$  (se tabell 4.50). Denne  $\text{IC}_{50}$ -verdien er usikker på grunn av få konsentrasjoner i området 10-100  $\mu\text{g/ml}$ . Den toksiske effekten økte med økt konsentrasjon, og viste dermed korrelasjon mellom konsentrasjon og dødelighet (se figur 4.50). Positiv kontroll med podofyllotoksin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) ga 100 % dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga  $15 \pm 3$  % dødelighet av rekelarver. Et søk i SciFinder viste at det ikke foreligger litteraturdata for rekelarvetoksisitet av  $\gamma$ -fagarin.

Tabell.4.50: Toksisitet på rekelarver av  $\gamma$ -fagarin.

Kons. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	$\text{LD}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\text{LD}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
100	2,00	100	0	$25 \pm 3 \mu\text{g/ml}$	$109 \pm 13 \mu\text{M}$
10	1,00	16	6		
1	0,00	17	12		

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)



Figur 4.50: Toksisitet på rekelarver av  $\gamma$ -fagarin vist som % dødelighet.

#### 4.5.10.3 Antiplasmodiumtest

Resultater fra Australia viste at  $\gamma$ -fagarin ga antiplasmodium-aktivitet med en  $\text{IC}_{50}$ -verdi på  $2,2 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$  mot *P. falciparum* stammen 3D7.

Antiplasmodium-effekt av  $\gamma$ -fagarin er rapportert i tre tidligere studier (søk i SciFinder) (se tabell 4.51).  $\gamma$ -Fagarin fra Rb-dcm-v5c4h5 ga en mye lavere  $\text{IC}_{50}$ -verdi, og dermed mye større antiplasmodium-aktivitet sammenlignet med tidligere studier som både har brukt samme stamme (3D7) og ulike stammer. Årsaken til at  $\text{IC}_{50}$ -verdiene varierer såpass mye kan blant annet være ulike metoder for måling av antiplasmodiumaktivitet.

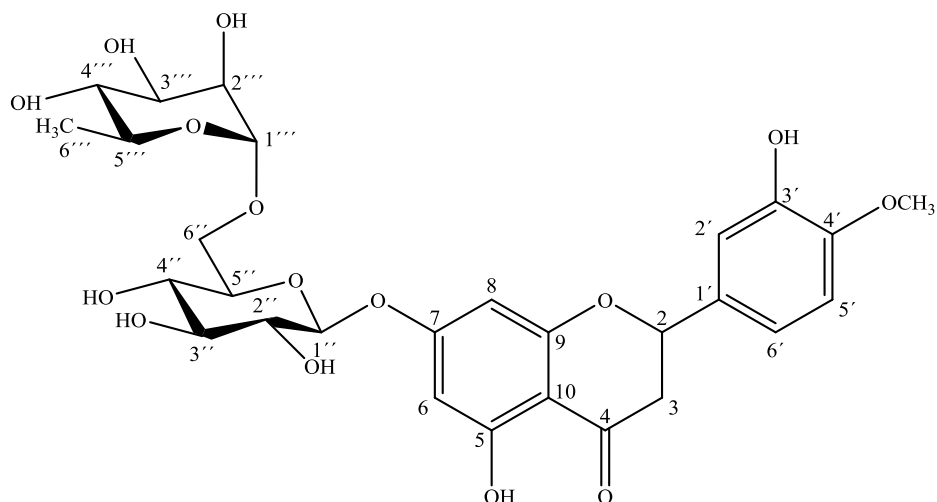
Tabell 4.51: Tidligere studier på antiplasmodium aktivitet av  $\gamma$ -fagarin.

Stamme av <i>P. falciparum</i>	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Litteratur
3D7 (klorokinsensitiv)	$25 \pm 4$	(Dolabela et al. 2008)
W-2 (klorokinresistent)	$36 \pm 3$	(Dolabela et al. 2008)
FCM29 (klorokinresistent)	23	(Randrianariveლოსია et al. 2003)
Dd2 (klorokinresistent)	Inaktivt ved $18,3 \mu\text{g/ml}$	(Yang et al. 2011)

## 4.5.11 Hesperidin

### 4.5.11.1 Identifikasjon

Hesperidin som er et flavanonglykosid (se figur 4.51) er tidligere rapportert i rotbark av *Z. zanthoxyloides* (Queiroz et al. 2006), og i andre *Zanthoxylum* arter som *Z. avicennae* (Xia et al. 2012) og *Z. conspersipunctatum* (Krajniak et al. 1973).



Figur 4.51: Molekylstruktur for hesperidin.

Tolkning av spektraldata ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  APT, COSY) for isolert hesperidin fra krystaller fra Sb-meoh-s5 (se vedlegg 2.15) er gitt i tabell 4.52, hvor spektraldata er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.53 og 4.54.

Tabell 4.52:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) data for hesperidin.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet
2	5.50 (1H, dd, J=3.2, 12.2)	78.3	CH
3	2.78 (1H, m)	42.2	CH <sub>2</sub>
	3.30 <sup>a</sup>		
6	6.14 (1H, d, J=2.4)	96.3	CH
8	6.13 (1H, d, J= 2.1)	95.4	CH
2'	6.89-6.96 (3H, m)	114.0	CH
5'		112.0	CH
6'		117.7	CH
1''	3.17-5.40	99.4	CH
2''-5''		68.2-78.3	CH



6''		66.3	CH
1'''		100.5	CH
2'''-5'''		68.2-78.3	CH
6'''	1.09 (3H, d, J=6.2)	17.7	CH <sub>3</sub>
5-OH	12.01 (1H, s)		
3'-OH	9.10 (1H, s)		
4'-OCH <sub>3</sub>	3.78 (1H, s)	55.6	CH <sub>3</sub>

<sup>a</sup> Tatt fra HSQC data, sannsynligvis ligger signalet skjult under løsemiddeltoppen i <sup>1</sup>H-NMR.

Tabell 4.53: Litteraturdata av <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) og <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) data for hesperidin (Yoo et al. 2002).

Posisjon	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	δ <sub>C</sub>
2	5.50 (1H, dd, J=3.2, 12.0)	78.6
3		42.3
4		197.2
5		163.3
6	6.11 (1H, s)	96.6
7		165.3
8	6.13 (1H, s)	95.8
9		162.7
10		103.5
1'		131.1
2'	6.92 (1H, d, J=2.4)	114.4
3'		148.2
4'		146.7
5'	6.94 (1H, d, J=8.4)	112.2
6'	6.87 (1H, dd, J=1.5, 8.4)	118.2
1''		99.7
2''		73.2
3''		76.5
4''		70.9
5''		75.7
6''		66.3
1'''		108.8
2'''		70.5
3'''		69.8
4'''		72.3
5'''		68.5
6'''		18.1

5-OH	12.02 (1H, s)	
3'-OH	9.10 (1H, br s)	
4'-OCH <sub>3</sub>		55.9

Tabell 4.54: Litteraturdata av <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) for hesperidin (Maltese et al. 2009).

Posisjon	δ <sub>H</sub> (J in Hz)
2	5.44 (dd, J=7.8, 3.0)
3 ax	2.79 (dd, J=17.4, 3.0)
3 eq	3.31 (dd, J=17.3, 8.1)
6	6.18 (d, J=2.4)
8	6.16 (d, J=3)
2'	6.97 (d, J=1.6)
5'	6.83 (d, J=8.4)
6'	6.99 (dd, J=7.9, 1.6)
1''	5.01 (d, J=7.7)
1'''	4.55 (d, J=2.9)
6'''	1.12 (d, J=6.6)
4'-OCH <sub>3</sub>	3.81 (s)

#### 4.5.11.2 Rekelarvetest

Hesperidin (Sb-meoh-s5 krystaller) var ikke toksisk på rekelarver (se tabell 4.55), og LD<sub>50</sub> ble derfor ikke bestemt. Positiv kontroll med podofyllotoksin (100 µg/ml) ga 96 ± 6 % dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga 3 ± 5 % dødelighet av rekelarver. Et søk i SciFinder viste at det ikke finnes tidligere publiserte studier på toksisitet av hesperidin på rekelarver.

Tabell 4.55: Toksisitet på rekelarver av hesperidin.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,0	3	5	Ikke toksisk
10	1,0	0	0	
5	0,7	0	0	
1	0,0	0	0	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

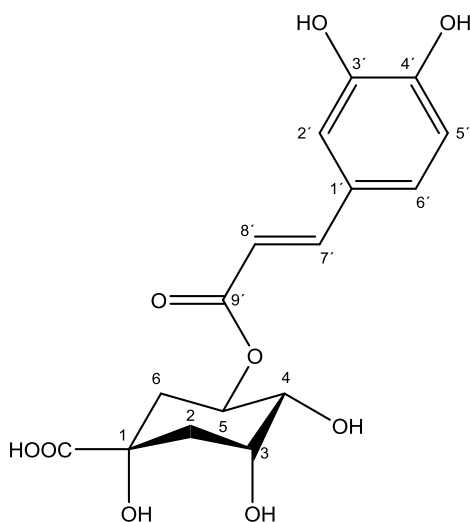
#### 4.5.11.3 Antiplasmodiumtest

Resultater fra Australia viste at hesperidin ikke ga antiplasmodium-effekt ( $IC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$ ) mot *P. falciparum* stammen 3D7. Det foreligger ingen tilgjengelige studier av antiplasmodium effekt av hesperidin.

### 4.5.12 Klorogensyre

#### 4.5.12.1 Identifikasjon

Klorogensyre, som er en 5-*O*-kaffeoylkinasyre (se figur 4.52) er tidligere rapportert i stammebark av *Z. zanthoxyloides* (Ogunbolude et al. 2014), og i andre *Zanthoxylum*-arter som *Z. bungeanum* (Yang et al. 2013).



Figur 4.52: Molekylstruktur for klorogensyre.

Tolkning av spektraldata ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, HMBC) for isolert klorogensyre fra Sb-meoh-s3v2h5 (se vedlegg 2.16) er gitt i tabell 4.56, hvor spektraldata er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.57. Fraksjon Sb-meoh-s3v2h6 ble også identifisert som klorogensyre ved å sammenligne NMR-spektrene.

Tabell 4.56:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) data for klorogensyre.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1		76.2		

2	2.02-2.11 (2H, m)	38.2	CH <sub>2</sub>	1, 5, 6
3	4.17 (1H, m) <sup>1</sup>	71.3	CH	4
4	3.73 (1H, dd, J=3.2, 8.5)	73.5	CH	5
5	5.33 (1H, m) <sup>1</sup>	72.0	CH	1, 4, 9'
6	2.16-2.25 (2H, m)	38.8	CH <sub>2</sub>	1, 5
7		177.0		
1'		127.8		
2'	7.05 (1H, d, J=2.1)	115.2	CH	3'/7', 4', 6'
3'		146.8		
4'		149.6		
5'	6.78 (1H, d, J=8.2)	116.5	CH	1', 2', 3', 4', 6'
6'	6.96 (1H, dd, J=2.1, 8.3)	123.0	CH	2', 3'/7', 4'
7'	7.56 (1H, d, J=15.8)	147.1	CH	1', 2'/8', 6', 9'
8'	6.26 (1H, d, J=15.9)	115.3	CH	1', 9'
9'		168.7		

<sup>1</sup> Det kan se ut som en dt, men pga to ulike protoner på hhv C-2 og C-6 og en nabo proton på C-4 skal det oppstå en ddd som angitt i referansen (Pauli et al 1999). Signalene fra disse ligger oppå hverandre.

Tabell 4.57: Litteraturdata av <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, CD<sub>3</sub>OD) og <sup>13</sup>C NMR (90 MHz, CD<sub>3</sub>OD) for klorogensyre (Pauli et al. 1999).

Posisjon	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	δ <sub>C</sub>
1		76.17
2α[eq]	2.047 (ddd, J=2.2, 5.4, -14.2)	38.12
2β[ax]	2.175 (dd, J=3.4, -14.2)	
3β[eq]	4.168 (ddd, J=3.3, 3.4, 5.4)	71.35
4β[ax]	3.726 (dd, J=3.3, 8.6)	73.57
5α[ax]	5.334 (ddd, J=4.4, 8.6, 9.3)	71.86
6α[eq]	2.227 (ddd, J=2.2, 4.4, -13.5)	38.85
6β[ax]	2.078 (dd, J=9.3, -13.5)	
7		176.96
1'		127.78
2'	7.049 (d, J=1.9)	115.26
3'		146.59
4'		149.36
5'	6.779 (d, J=8.0)	116.49
6'	6.953 (dd, J=1.9, 8.0)	122.94
7'	7.558 (d, J=16.1)	147.01

8'	6.263 (d, J=16.1)	115.26
9'		168.70

#### 4.5.12.2 Rekelarvetest

Klorogensyre (Sb-meoh-s3v2h5) var ikke toksisk på rekelarver (se tabell 4.58), og LD<sub>50</sub> ble derfor ikke bestemt. Positiv kontroll med podofyllotoksin (100 µg/ml) ga 100 % dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga 6 ± 6 % dødelighet av rekelarver. En tidligere studie vist at klorogensyre er toksisk på rekelarver med LD<sub>50</sub>-verdi på 70 µm (25 µg/ml) (Shoeb et al. 2007) og en annen studie rapporterer en LD<sub>50</sub>-verdi på 3.7-4.8 µM (1300-1700 µg/ml) (Nelson et al. 1999).

Tabell 4.58: Toksisitet på rekelarver av klorogensyre.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,0	0	0	Ikke toksisk
10	1,0	0	0	
1	0,0	0	0	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

#### 5.5.12.3 Antiplasmodiumtest

Resultater fra antiplasmodiumtest i Australia viste at klorogensyre ikke ga antiplasmodium-effekt (IC<sub>50</sub> > 20 µg/ml) mot *P. falciparum* stammen 3D7. Et søk i SciFinder resulterte i 6 studier av antiplasmodium-effekt av klorogensyre som kan sammenlignes med resultatet vårt (se tabell 4.59). Studiene viser at klorogensyre er lite aktiv mot ulike stammer av *P. falciparum* og dette stemmer overens med resultatet vårt. Årsaken til at IC<sub>50</sub>-verdiene varierer, kan blant annet være ulike metoder for måling av antiplasmodium aktivitet.

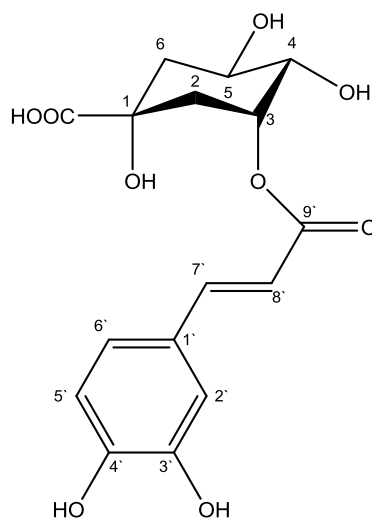
Tabell 4.59: Tidligere studier på antiplasmodium aktivitet av klorogensyre.

Stamme av <i>P. falciparum</i>	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Litteratur
K1 (multiresistent)	74,1	(Attioua et al. 2012)
	>50	(Kirmizibekmez et al. 2004)
	>50	(Tasdemir et al. 2008)
NF54 (klorokinsensitiv)	>10	(Vargas et al. 2011)
D10 (klorokinsensitiv) og W2 (klorokinresistent)	>100	(Vitalini et al. 2011)
FcB1 (klorokinresistent)	13,8	(Grellier et al. 2008)

## 4.5.13 Neoklorogensyre

### 4.5.13.1 Identifikasjon

Neoklorogensyre er en isomer av klorogensyre, hvor kaffesyre er forestret med OH-gruppe i 3-posisjon på kinasyre, 3-*O*-kaffeoylkinasyre (se figur 4.53), og er ikke tidligere rapportert i *Z. zanthoxyloides*, men i en annen *Zanthoxylum*-art, *Z. bungeanum* (Gao et al. 2014).



Figur 4.53: Molekylstruktur for neoklorogensyre.

Tolkning av spektraldata ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC) for isolert neoklorogensyre fra Sb-meoh-s3v2h3 (se vedlegg 2.17) er gitt i tabell 4.60, hvor spektraldata er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.61. Fraksjon Sb-meoh-s3v2h4 ble også identifisert som neoklorogensyre ved å sammenligne NMR-spektrene.

Tabell 4.60:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) data for neoklorogensyre.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2	2.11-2.23 (2H, m)	41 <sup>1</sup>
3	5.35 (1H, d, J=3.9)	72,9
4	3.64 (1H, dd, J=3.4, 8.6)	75 <sup>1</sup>
5	4.15 (1H, m)	68,4
6	1.92-1.98 (2H, m)	36.8
1'		128.0
2'	7.05 (1H, d, J=2.0)	115.1

3'		146.9
5'	6.77 (1H, d, J=8.2)	116.5
6'	6.94 (1H, dd, J=2.2, 8.1)	123.0
7'	7.58 (1H, d, J=15.8)	
8'	6.31 (1H, d, J=15.9)	115.9
9'		169.1

<sup>1</sup> Fra HSQC spektrum

Tabell 4.61: Litteraturdata av <sup>1</sup>H NMR (360 MHz, CD<sub>3</sub>OD) og <sup>13</sup>C NMR (90 MHz, CD<sub>3</sub>OD) for neoklorogensyre (Pauli et al. 1999).

Posisjon	δ <sub>H</sub> (J in Hz)
2α[eq]	2.140 (ddd, J=2.0, 4.3, 14.3)
2β[ax]	2.188 (dd, J=3.2, 14.3)
3β[eq]	5.344 (ddd, J=3.2, 3.2 4.3)
4β[ax]	3.635 (dd, J=3.2, 8.3)
5α[ax]	4.144 (ddd, J=4.0, 8.3, 9.7)
6α[eq]	2.120 (ddd, J=2.0, 4.0, 13.4)
6β[ax]	1.951 (dd, J=9.7, 13.4)
2'	7.036 (d, J=1.9)
5'	6.763 (d, J=8.2)
6'	6.932 (dd, J=1.9, 8.2)
7'	7.576 (d, J=15.9)
8'	6.303 (d, J=15.9)

#### 4.5.13.2 Rekelarvetest

Neoklorogensyre (Sb-meoh-s3v2h4) var ikke toksisk på rekelarver (se tabell 4.62), og LD<sub>50</sub> ble derfor ikke bestemt. Positiv kontroll med podofyllotoksin (100 µg/ml) ga 100 % dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga 3 ± 4 % dødelighet av rekelarver. Et søk i SciFinder viste at det ikke finnes tidligere publiserte studier på toksisitet av neoklorogensyre på rekelarver.

Tabell 4.62: Toksisitet på rekelarver av neoklorogensyre.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,0	6	5	Ikke toksisk
10	1,0	3	5	
1	0,0	0	0	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

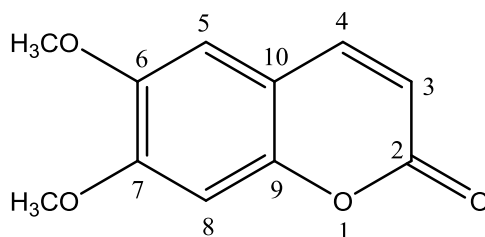
#### 4.5.13.3 Antiplasmodiumtest

Resultater fra Australia viste at neoklorogensyre ikke ga antiplasmodium-effekt ( $IC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$ ) mot *P. falciparum* stammen 3D7. Det foreligger ingen studier av antiplasmodium-effekt av neoklorogensyre som kan sammenlignes med resultatet vårt.

#### 4.5.14 Scoparon (6,7-dimetoksykumarin)

##### 4.5.14.1 Identifikasjon

Kumarinet scoparon (6,7-dimetoksykumarin) (se figur 4.54) er tidligere rapportert i frukt eller fruktskall av *Z. zanthoxyloides* (Adesina 1986; Misra et al. 2013), og i andre *Zanthoxylum* arter som *Z. avicennae* (Chen et al. 2015) og *Z. schinifolium* (Li et al. 2013).



Figur 4.54: Molekylstruktur for scoparon (6,7-dimetoksykumarin).

Tolkning av NMR spektrene for isolert scoparon fra Rb-dcm-v5c3h1 (se vedlegg 2.18) er gitt i tabell 4.63, hvor spektraldata er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.64.

Fraksjonen Rb-dcm-v5c4h3 har også blitt identifisert som scoparon ved sammenligning med NMR-spektrene.

Tabell 4.63:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for scoparon.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet	HMBC (H $\rightarrow$ C)
2		162 <sup>ab</sup>	C	
3	6,29 (1H, d, J=9,5)	113,6 <sup>c</sup>	CH	2,10
4	7,61 (1H, d, J=9,4)	141,6 <sup>c</sup>	CH	2, 5, 9
5	6,85 (1H, s)	108,0 <sup>c</sup>	CH	6/7 <sup>d</sup>
6		149,6 <sup>c</sup>	C	
7		152,8 <sup>c</sup>	C	
8	6,85 (1H, s)	100,0 <sup>c</sup>	CH	6/7 <sup>d</sup>
9		150 <sup>a</sup>	C	
10		111 <sup>a</sup>	C	



6-OCH <sub>3</sub>	3,92 (3H, s)	56,4	CH <sub>3</sub>	6
7-OCH <sub>3</sub>	3,95 (3H, s)	56,4	CH <sub>3</sub>	7

<sup>a</sup>Noe usikkert, signalene er detektert via HMBC.

<sup>b</sup>Data tatt fra HMBC av Rb-dcm-v5c4h3 (se vedlegg 2.18d, s. x).

<sup>c</sup>Data tatt fra <sup>13</sup>C APT av Rb-dcmv5c4h3 (se vedlegg 2.18e, s. x).

<sup>d</sup>Ikke mulig å skille mellom signalene fra 5-H og 8-H.

Tabell 4.64: Litteraturdata av <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) og <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data for scoparon (Ma et al. 2006).

Posisjon	δ <sub>H</sub> (J in Hz) <sup>a</sup>	δ <sub>C</sub> <sup>a</sup>
2		161,7
3	6,28 (1H, d, J=9,6)	111,7
4	7,65 (1H, d, J=9,6)	143,6
5	6,88 (1H, s)	108,2
6		150,2
7		153,0
8	6,85 (1H, s)	100,2
6-OCH <sub>3</sub>	3,96 (3H, s)	56,6
7-OCH <sub>3</sub>	3,94 (3H, s)	56,6

#### 4.5.14.2 Rekelarvetest

Scoparon viste toksisitet på rekelarver med en LD<sub>50</sub>-verdi på 320 ± 107 µM (se tabell 4.65). Denne verdien kan være usikker på grunn av manglende målinger mellom 0% dødelighet (10 µg/ml) og 61% dødelighet (100 µg/ml). Den toksiske effekten økte med økt konsentrasjon, og viste dermed korrelasjon mellom konsentrasjon og dødelighet (se figur 4.55). Positiv kontroll med podofyllotoksin (100 µg/ml) ga 100 % dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga 3 ± 4 % dødelighet av rekelarver. En tidligere studie har rapportert en LD<sub>50</sub>-verdi på 280 ± 39 µM (Vila-Nova et al. 2013) som stemmer godt overens med våre data, mens en annen studie har rapportert en verdi på 349 ppm, tilsvarende 1,7 mM (95 % CI 1.2-2.2 mM) (Anderson et al. 1988) som er betydelig mindre toksisk enn våre data. Avvik i resultatene kan skyldes bruk av ulike metoder.

Tabell 4.65: Toksisitet på rekelarver av scoparon.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)	LD <sub>50</sub> (µM)
100	2,00	61	8	66 ± 22	320 ± 107
10	1,00	0	0		
1	0,00	0	0		

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)



Figur 4.55: Toksisitet på rekelarver av scoparon vist som % dødelighet.

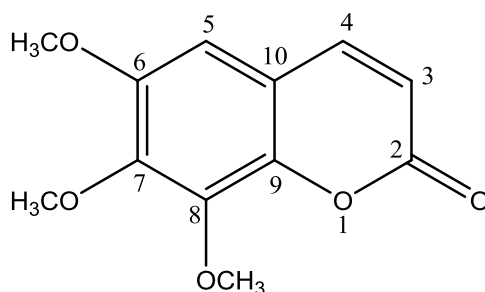
#### 4.5.14.3 Antiplasmodiumtest

Det ble ikke tatt antiplasmodiumtest av scoparon på grunn av mangel på stoff. Tidligere studie har vist at scoparon er inaktiv ( $IC_{50} > 25 \mu\text{g/ml}$ ) mot *P.falciparum* stammen 3D7 (Tchinda et al. 2009).

### 4.5.15 6,7,8-Trimetoksykumarin

#### 4.5.15.1 Identifikasjon

6,7,8-Trimetoksykumarin som er et kumarin (se figur 4.56) har ikke blitt rapportert i *Z. zanthoxyloides*, men har blitt rapportert i andre *Zanthoxylum* arter som *Z. nitidum* (Hu et al. 2006) og *Z. integrifolium* (Ishii et al. 1982).



Figur 4.56: Molekylstruktur for 6,7,8-trimetoksykumarin.

Tolkning av spektraldata ( $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC) for 6,7,8-trimetoksykumarin fra Rb-dcm-v5c3h2 (se vedlegg 2.19) er gitt i tabell 4.56, hvor vår spektraldata er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.57 og 4.58.

Tabell 4.56:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for 6,7,8-trimetoksykumarin.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	Multiplisitet	HMBC <sup>a</sup> (H→C)
2		160,3		
3	6,34 (1H, d, J=9,5)	115,0	CH	3, 2
4	7,60 (1H, d, J=9,5)	143,3	CH	5, 7, 2
5	6,66 (1H, s)	103,6	CH	4, 8, 9
6		141,1		
7		142,6		
8		146,0		
9		150,1		
6- $\text{OCH}_3$	4,04 (3H, s)	61,8	$\text{CH}_3$	6
7- $\text{OCH}_3$	3,99 (3H, s)	61,4	$\text{CH}_3$	8
8- $\text{OCH}_3$	3,90 (3H, s)	56,3	$\text{CH}_3$	9

<sup>a</sup> Data er tatt fra HSQC og HMBC spektra.

Tabell 4.57: Litteraturdata av  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for 6,7,8-trimetoksykumarin (Gao et al. 2013).

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		160,5
3	6,35 (1H, d, J=9,5)	115,2 <sup>a</sup>
4	7,63 (1H, d, J=9,5)	143,5
5	6,69 (1H, s)	103,7
6		141,2
7		143,1
8		145,9
9		150,1 <sup>b</sup>
10		114,3 <sup>b</sup>
$\text{OCH}_3$	4,00 (3H, s)	61,5
$\text{OCH}_3$	4,04 (3H, s)	61,8
$\text{OCH}_3$	3,91 (3H, s)	56,3

<sup>a</sup> Det er nevnt 2 ulike kjemiske skift for posisjon 8 i <sup>13</sup>C NMR data, det antas derfor at kjemisk skift på 115,2 ppm ikke er posisjon 8, men posisjon 3.

<sup>b</sup> Antar oppgitt posisjon 4a i litteraturen tilsvarer posisjon 10 i figur x, og posisjon 8a tilsvarer posisjon 9.

Tabell 4.58: Litteraturdata av <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) og <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data for 6,7,8-trimetoksykumarin (Amaral et al. 2001).

Posisjon	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	δ <sub>C</sub>
2		160,51
3	6,33 (1H, d, J=9,5)	115,22
4	7,61 (1H, d, J=9,5)	143,42
5	6,67 (1H, s)	103,64
6		150,09
7		143,06
8		143,06
9		145,93
10		114,32
OCH <sub>3</sub>	3,99 (3H, s)	61,53
OCH <sub>3</sub>	4,04 (3H, s)	61,84
OCH <sub>3</sub>	3,90 (3H, s)	56,30

#### 4.5.15.2 Rekelarvetest

6,7,8-Trimetoksykumarin isolert fra Rb-dcm-v5c3h2 var ikke toksisk på rekelarver (se tabell 4.59), og LD<sub>50</sub> ble derfor ikke bestemt. Selv om den toksiske effekten økte med økende konsentrasjon, var dødeligheten av rekelarver (45 %) ved høyeste konsentrasjon (100 µg/ml) fortsatt for svak til at stoffet ble ansett som toksisk. Positiv kontroll med podofyllotoksin (100 µg/ml) ga 100 % dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga 15 ± 13 % dødelighet av rekelarver. Et søk i databasen Scifinder viste at det ikke finnes tidligere studier på toksisitet av 6,7,8-trimetoksykumarin på rekelarver.

Tabell 4.59: Toksisitet på rekelarver av 6,7,8-trimetoksykumarin.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,0	45	5	ikke toksisk
10	1,0	29	12	
1	0,0	9	9	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

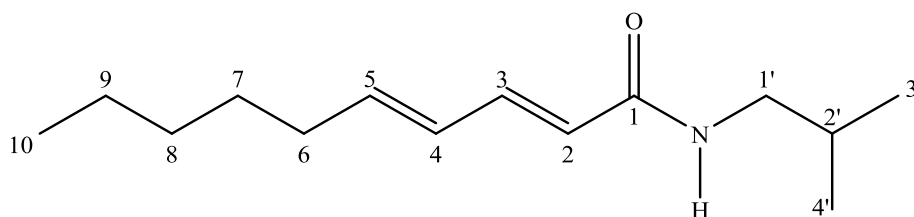
### 4.5.15.3 Antiplasmodiumtest

Det ble ikke tatt antiplasmodiumtest av 6,7,8-trimetoksykumarin på grunn av mangel på stoff. Et søk i databasen SciFinder viser at det foreligger ingen studier på antiplasmodiumtest av 6,7,8-trimetoksykumarin.

## 4.5.16 Pellitorin

### 4.5.16.1 Identifikasjon

Pellitorin som er et alkamid (se figur 4.57) er tidligere rapportert i rot og rotbark av *Z. zanthoxyloides* (Adesina 1986; Nuto 1996), og i flere andre *Zanthoxylum* arter, f.eks. i *Z. heitzii* (Moussavi et al. 2015) og *Z. atchoum* (Yao-Kouassi et al. 2015).



Figur 4.57: Molekylstruktur for pellitorin.

Tolkning av spektraldata ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  APT) for isolert pellitorin fra Rb-dcm-v5c3h9 (se vedlegg 2.20) er gitt i tabell 4.60, hvor spektraldataene er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.61 og 4.62. Det ble også observert signaler ved 3.49 ppm i  $^1\text{H}$ -NMR og 50.9 ppm i  $^{13}\text{C}$  APT spektrene som muligens tyder på rester av MeOH.

Tabell 4.60:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for pellitorin.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet
1		166.5	C
2	5.75 (1H, d, J=15.0)	121.7	CH
3	7.18 (1H, dd, J=9.9, 15.0)	141.4	CH
4	6.09 (2H, m)	128.2	CH
-NH			
5		143.3	CH
6	2.14 (2H, q, J=6.9)	32.9	$\text{CH}_2$
7	1.42 (2H, m)	28.5	$\text{CH}_2$

8	1.28 (6H, m)	31.4	CH <sub>2</sub>
9		22.5	CH <sub>2</sub>
10	0.89 (3H, t, J=6.8)	14.0	CH <sub>3</sub>
1'	3.16 (2H, t, J=6.4)	47.0	CH <sub>2</sub>
2'	1.8 (1H, m)	28.7	CH
3'	0.92 (6H, d, J=6.6)	20.13	CH <sub>3</sub>
4'			CH <sub>3</sub>

Tabell 4.61: Litteraturdata av <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) og <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data for pellitorin (Moussavi et al. 2015).

Posisjon	δ <sub>H</sub> (J i Hz)
2	5,84 (1H, d, J=15.1)
3	7.18 (1H, dd, J=10.0,15.0)
4	6.10 (1H, m)
6	2.14 (2H, q, J=6.8)
7, 8, 9	1.26-1.44 (6H, m)
10	0.89 (3H, t, J=7.0)
1'	3.15 (2H, t, J=6.4)
2'	1.79 (1H, m)
3',4'	0,91(6H, d J=6.7)
-NH	6,09 (1H, m)

Tabell 4.62: Litteraturdata av <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) og <sup>13</sup>C NMR (63 Hz, CDCl<sub>3</sub>) data for pellitorin (Oh et al. 2010).

Posisjon	δ <sub>H</sub> (J i Hz)	δ <sub>c</sub>
1		166.9
2	5,18 (1H, d, J=15.0)	122.0
3	7.20 (1H, m)	141.8
4	6.17 (1H, m)	128.6
5		143.8
6	2.18 (2H, dd, J=12.5, 6.2)	33.3
7	1.44 (2H, m)	28.9
8	1.32 (4H, m)	31.8
9		22.9
10	0.91 (3H, s)	14.4
1'	3.18 (2H, t, J=12.9, 6.57)	47.3
2'	1.82 (1H, m)	29.0
3'	0,93 (3H, s)	20.5

4'	0,96 (3H, s)	20.5
-NH	5,58 (1H, br s)	

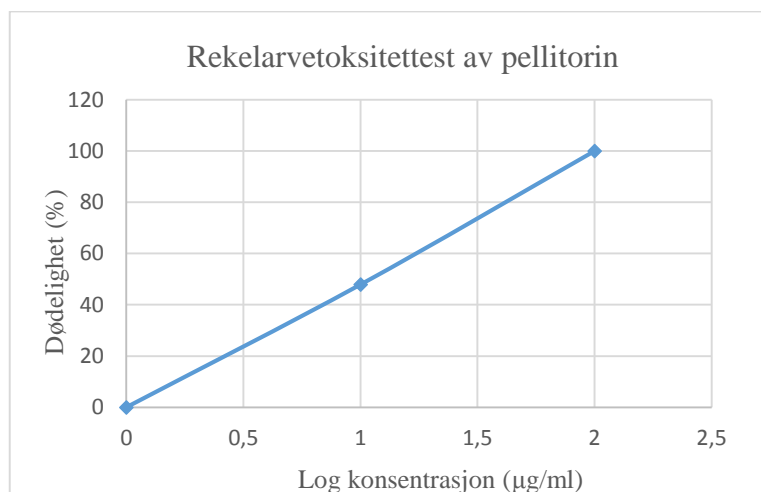
#### 4.5.16.2 Rekelarvetest

Pellitorin viste toksisitet på rekelarver med en LD<sub>50</sub>-verdi på  $49 \pm 31 \mu\text{M}$  (se tabell 4.63). Den toksiske effekten økte med økt konsentrasjon, og viste dermed korrelasjon mellom konsentrasjon og dødelighet (se figur 4.58). Positiv kontroll med podofyllotoksin ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) ga 100 % dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga  $3 \pm 4 \%$  dødelighet av rekelarver. Dette stemmer godt overens med en tidligere studie hvor det ble rapportert en LD<sub>50</sub>-verdi på  $37 \mu\text{M}$  (95 % CI: 23-62  $\mu\text{M}$ ) (Wangenstein et al. 2016).

Tabell 4.63: Toksisitet på rekelarver av DCM-ekstrakt av rotbark.

Kons. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	LD <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
100	2,0	100	0	$11 \pm 7$	$49 \pm 31$
10	1,0	48	15		
1	0,0	0	0		

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)



Figur 4.58: Toksisitet på rekelarver av pellitorin vist som % dødelighet.

#### 4.5.16.3 Antiplasmodiumtest

Det ble ikke tatt antiplasmodiumtest av pellitorin på grunn av begrenset tid. Tidligere studier viser forskjellige IC<sub>50</sub>-verdi for ulike stammer av *P.falciparum* (se tabell 4.64). Den ene studien viser at pellitorin har antiplasmodiumaktivitet mot stammen NF54, mens den andre studien viser at pellitorin er inaktiv mot stammen K1.

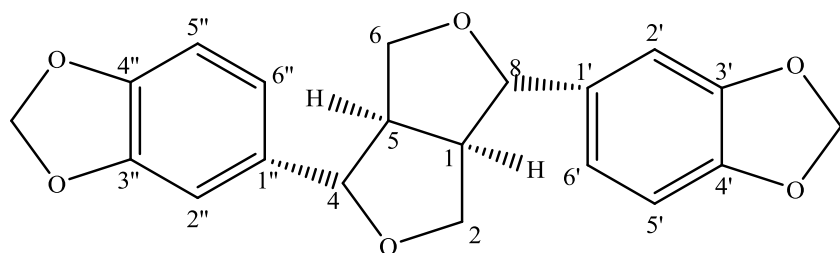
Tabell 4.64: Tidligere studier på antiplasmodium aktivitet av pellitorin

Stamme av <i>P. falciparum</i>	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Litteratur
NF54 (klorokinsensitiv)	3.26 ± 0.53	(Althaus et al. 2014)
K1 (multiresistent)	>20 (inaktiv)	(Tuntiwachwuttikul et al. 2006)

## 4.5.17 Sesamin

### 5.5.17.1 Identifikasjon

Lignanet sesamin (se figur 4.59) er tidligere rapportert i rotbark av *Z. zanthoxyloides* (Chaaib et al. 2003), og i andre *Zanthoxylum* arter som *Z. heitzii* (Moussavi et al. 2015) og *Z. atchoum* (Yao-Kouassi et al. 2015).



Figur 4.59: Molekylstruktur for sesamin.

Tolkning av spektrene for isolert sesamin fra Rb-dcm-v5c2t2 (se vedlegg 2.21) er gitt i tabell 4.65 hvor spektraldata er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.66. Det ble også observert små signaler ved 1.73-1.77, 4.06 og 4.13 ppm i <sup>1</sup>H spektret som sannsynligvis skyldes forurensninger.

Tabell 4.65: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) data for sesamin.

Posisjon	δ <sub>H</sub> (J in Hz)
1, 5	4.24 (2H, m)
2, 4, 6, 8	6.77-6.85 (6H, m)
2', 2''	4.72 (2H, d, J=4.2)
5', 5''	3.88 (2H, dd, J=3.6, 9.3)
6', 6''	3.05 (2H, m)
-O-CH <sub>2</sub> -O- x2	5.95 (4H, s)



Tabell 4.66: Litteraturdata av  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for sesamin (Moussavi et al. 2015).

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
1, 5	4.24 (2H, m)
2, 4, 6, 8	6.78-6.85 (6H, m)
2', 2''	4.72 (2H, d, $J=4.4$ )
5', 5''	3.88 (2H, dd, $J=3.6, 9.3$ )
6', 6''	3.05 (2H, m)
-O-CH <sub>2</sub> -O- x2	5.95 (4H, s)

#### 4.5.17.2 Rekelarvetest

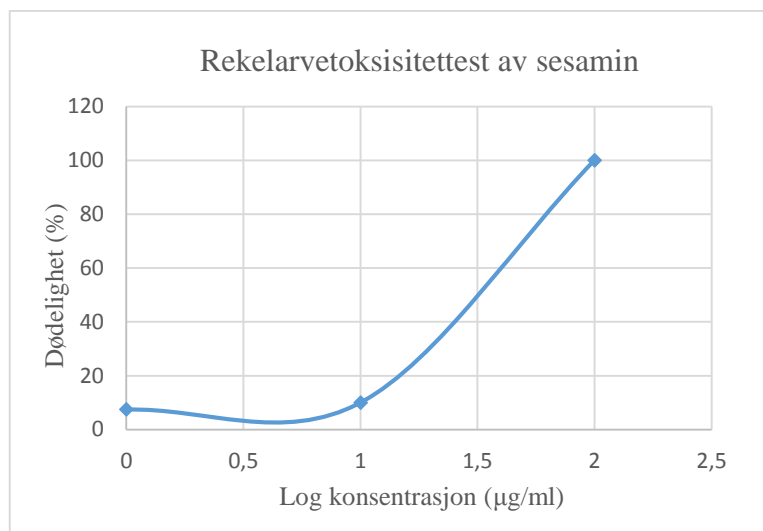
Sesamin viste toksisitet på rekelarver med en  $\text{LD}_{50}$ -verdi på  $79 \pm 11 \mu\text{M}$  (se tabell 4.67). Den toksiske effekten økte med økt konsentrasjon og viste dermed korrelasjon mellom konsentrasjon og dødelighet (se figur 4.60). Positiv kontroll med podofyllotoksin ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) ga 100 % dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga  $3 \pm 4$  % dødelighet av rekelarver. Imidlertid er våre verdier usikre siden målinger mellom 10% dødelighet ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) og 100% dødelighet ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) mangler. Tidligere studier har vist  $\text{IC}_{50}$ -verdi på  $6.8 \mu\text{M}$  (Spatafora et al. 1997) og  $300 \mu\text{M}$  (Wangenstein et al. 2016). Dette viser at det er betydelige uoverensstemmelser mellom litteraturdata og våre data. Årsaken til dette kan skyldes forskjellige utførelser av metoden.

Tabell 4.67: Toksisitet på rekelarver av sesamin.

Kons. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	$\text{LD}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\text{LD}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
100	2,00	100	0	$28 \pm 4^{\text{a}}$	$79 \pm 11^{\text{a}}$
10	1,00	10	10		
1	0,00	7	13		

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

<sup>a</sup> Usikre verdier på grunn av for få målinger mellom 10 og 100 % dødelighet.



Figur 4.60: Toksisitet på rekelarver av sesamin vist som % dødelighet.

### 4.5.17.3 Antiplasmodiumtest

Det ble ikke tatt antiplasmodiumtest av sesamin på grunn av begrenset tid. Tidligere studier viser forskjellige  $IC_{50}$ -verdi for ulike stammer av *P.falciparum* (se tabell 4.67). To studier har vist at sesamin har antiplasmodiumaktivitet mot stammen FcB1.

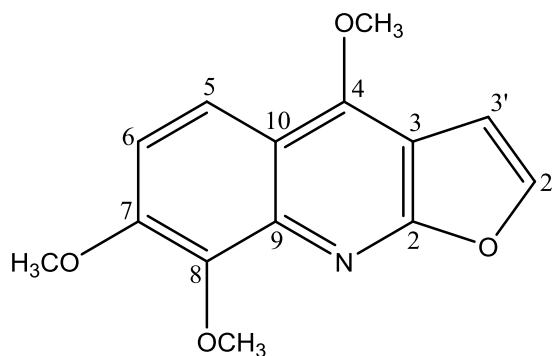
Tabell 4.67: Tidligere studier på antiplasmodium aktivitet av sesamin.

Stamme av <i>P. falciparum</i>	$IC_{50}$ (µg/ml)	Litteratur
FcB1 (klorokinresistent)	$9.1 \pm 0.9$	(Carneiro Albernaz et al. 2012)
	3.37	(Ortet et al. 2011)
K1 (multiresistent)	> 20 (inaktiv)	(Tuntiwachwuttikul et al. 2006)

## 4.5.18 Skimmianin

### 5.5.18.1 Identifikasjon

Skimmianin, som er et furokinolinalkaloid (se figur 4.61), er tidligere rapportert i rot av *Z. zanthoxyloides* (Adesina 1986), og i flere andre *Zanthoxylum*-arter, f.eks. i *Z. armatum* (Li 2015), *Z. atchoum* (Yao-Kouassi et al. 2015), og *Z. nitidum* (Ye et al. 2013).



Figur 4.61: Molekylstruktur for skimmianin.

Tolkning av spektraldata ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  APT, HSQC, HMBC) for isolert skimmianin fra Rb-dcm-v4c4h2h3 (se vedlegg 2.22) er gitt i tabell 4.68, hvor vår spektraldata er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.69 og 4.70. Det ble også observert en rekke andre signaler i  $^1\text{H}$ -spektret som hadde mye mindre intensitet enn signalene for skimmianin. Dette tydet på at skimmianin ikke var helt rent.

Tabell 4.68:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data for skimmianin.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet	HMBC (H $\rightarrow$ C)
2		164 <sup>c</sup>		
3		115 <sup>c</sup>		
4		157 <sup>c</sup>		
5	8.03 (1H, d, J=9.4)	118.2	CH	
6	7.24 (d) <sup>a</sup>	112.1	CH	
7		152 <sup>c</sup>		
8		142 <sup>c</sup>		
9				
10		102 <sup>c</sup>		
4 -OCH <sub>3</sub>	4.44 (3H, s)	59.0	CH <sub>3</sub>	4
7-OCH <sub>3</sub>	4.04 (3H, s)	56.8	CH <sub>3</sub>	7
8-OCH <sub>3</sub>	4.12 (3H, s)	62 <sup>b</sup>	CH <sub>3</sub>	8
2'	7.59 (1H, d, J=2.9)	143 <sup>c</sup>		2, 10
3'	7.05 (1H, d, J=2.8)	104.6	CH <sub>3</sub>	2, 10, 2'

<sup>a</sup> Noe av dubletten ved 7.24 ppm er skjult under det brede  $\text{CDCl}_3$  signalet på 7.26 ppm.

<sup>b</sup> Data er tatt fra HSQC

<sup>c</sup> Data er tatt fra HMBC

Tabell 4.69: Litteraturdata av  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) for skimmianin (Couillerot et al. 1994b).

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)	$\delta_{\text{C}}$
5	8.03 (1H, d, J=9)	118.2
6	7.25 (1H, d, J=9)	111.6
7		142
4-OCH <sub>3</sub>	4.45	58.9
7-OCH <sub>3</sub>	4.03	56.5
8-OCH <sub>3</sub>	4.12	61.8
2'	7.6 (1H, d, J=2.5)	142.8
3'	7.06 (1H, d, J=2.5)	104.5

Tabell 4.70: Litteraturdata av  $^1\text{H}$  NMR (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (22,63 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ) for skimmianin (Ahond et al. 1978).

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2		164.3
3		114.8
4		157.1
5	8.03 (d, J=9)	118.1
6	7.23 (d, J=9)	111.8
7		141.9
8		141.1
9		152.0
10		101.8
4-OCH <sub>3</sub>	4.46	58.8
7-OCH <sub>3</sub>	4.07	56.7
8-OCH <sub>3</sub>	4.16	61.6
2'	7.58 (d, J=2.5)	142.8
3'	7.05 (d, J=2.5)	104.6

#### 4.5.18.2 Rekelarvetest

Skimmianin isolert fra Rb-dcm-v4c4h2h3 var lite toksisk på rekelarver (se tabell 4.71), og LD<sub>50</sub> ble derfor ikke bestemt. Ettersom denne fraksjonen inneholdt uren skimmianin, kan den faktiske konsentrasjonen av skimmianin være lavere enn antatt, og at det også er mulig at andre komponenter i fraksjonen bidro til toksisitet. Positiv kontroll med podofyllotoksin (100 µg/ml) ga 100 % dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga 3 ± 4 %

dødelighet av rekellarver. Et søk i SciFinder viste at det ikke finnes tidligere publiserte studier på toksisitet av skimmianin på rekellarver.

Tabell 4.71: Toksisitet på rekellarver av DCM-ekstrakt av rotbark.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,0	33	12	Ikke toksisk
10	1,0	3	5	
1	0,0	0	0	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

#### 4.5.18.3 Antiplasmodiumtest

Resultater fra Australia viste at ren skimmianin fra en annen fraksjon (Rb-meoh-s7v6) som ikke er beskrevet i denne oppgaven, ga antiplasmodium-effekt (IC<sub>50</sub> 0,7 ± 0,2 µg/ml) mot *P. falciparum* stammen, 3D7.

Et søk i SciFinder resulterte i 8 studier av antiplasmodium-effekt av skimmianin som kan sammenlignes med resultatet vårt. Resultatene fra studiene viser at det er store sprik mellom IC<sub>50</sub>-verdiene for forskjellige stammer av *P. falciparum*, men også innen samme stamme (se tabell 4.72).

Skimmianin fra Rb-dcm-v4c4h2h3 ga en mye lavere IC<sub>50</sub>-verdi, og dermed mye større antiplasmodium-aktivitet sammenlignet med tidligere studier som både har brukt samme stamme (3D7) og ulike stammer. Årsaken til at IC<sub>50</sub>-verdiene varierer såpass mye kan blant annet være ulike metoder for måling av antiplasmodium aktivitet.

Tabell 4.72: Tidligere studier på antiplasmodium aktivitet av skimmianin.

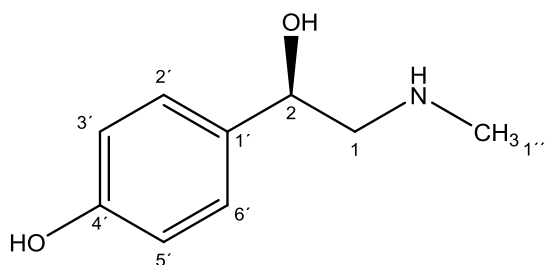
Stamme av <i>P. falciparum</i>	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Litteratur
3D7 (klorokinsensitiv)	43,0 ± 1,4	(Dolabela et al. 2008)
Dd2 (klorokinresistent)	inaktiv ved 20 µg/ml	(Yang et al. 2011)
FcB1 (Colombia) (klorokinresistent)	77.3	(Lacroix et al. 2012)
FCM29 (klorokinresistent)	35	(Randrianariveojosia et al. 2003)
FCMSU <sub>1</sub> (Sudan)	48,2	(Khalid et al. 1986)
HB3 (klorokinsensitiv)	15,7	(Basco et al. 1994)
	12,3 ± 0,1	(Muriithi et al. 2002)
K1 (multiresistent)	5.6	(Mwangi et al. 2010)
	15,2 ± 0,1	(Muriithi et al. 2002)

W2 (klorokinresistent)	14,1	(Basco et al. 1994)
	19,5 ± 0,7	(Dolabela et al. 2008)

## 4.5.19 (-)-*p*-Synephrine

### 4.5.19.1 Identifikasjon

Alkaloidet synephrine (se figur 4.62) er ikke tidligere rapportert i *Z. zanthoxyloides*, men i andre *Zanthoxylum* arter som *Z. fagara* (Stermitz et al. 1980) og *Z. culantrillo* (Swinehart et al. 1980).



Figur 4.62: Molekylstruktur (-)-*p*-Synephrine

Tolkning av spektrene for isolert synephrine fra Sb-meoh-s3v1h1+h4 (se vedlegg 2.23) er gitt i tabell 4.73, hvor spektraldata er sammenlignet med referansedata gitt i tabell 4.74 og 4.75.

Tabell 4.73:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) og  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) data for (-)-*p*-synephrine.

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	Multiplisitet	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	3.12 (2H, m)	56.8	$\text{CH}_2$	2, 1', 1''
2	4.85 <sup>a</sup>	69.8	CH	1, 1', 3'/5'
1'		132.8		
2' og 6'	6.80 (2H, d, J=8.4)	116.5	CH	1', 2'/6', 4'
3' og 5'	7.25 (2H, d, J=8.4)	128.4	CH	2, 2'/6', 3'/5', 4'
4'		158.8		
1''	2.73 (3H, s)	33.7	$\text{CH}_3$	1

<sup>a</sup> HSQC spekteret viser en kobling mellom  $\delta_{\text{H}}$  4.86 og  $\delta_{\text{C}}$  69.20. COSY spekteret viser en kobling mellom  $\delta_{\text{H}}$  3.13 og  $\delta_{\text{H}}$  4.85. HMBC viser en kobling mellom  $\delta_{\text{H}}$  4.84 og posisjon 1, 1', 3'/5'. Dette tyder på at det er et signal ved  $\delta_{\text{H}}$  4.85 som ligger skjult under vann toppen ved  $\delta_{\text{H}}$  4.85.

Tabell 4.74: Litteraturdata av  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) (Pellati et al. 2005).

Posisjon <sup>a</sup>	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
1	2.95 (2H, m)
2	4.77 (1H, dd, J=9.22, 4.10)
1'	9.46 (1H, s)
2' og 6'	6.76 (2H, d, J=8.60)
3' og 5'	7.16 (2H, d, J=8.60)
4'	
1''	2.55 (3H, s)

<sup>a</sup> kilden oppgir ingen posisjon, dette er antakelser.

Tabell 4.75: Litteraturdata av  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )  $^{13}\text{C}$  NMR (75,4 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) data for ( $\pm$ )-*p*-synephrine (Andrade et al. 2009)

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	2.41-2.59 (2H, m)	59.9
2	4.49 (1H, dd, J=8.1, 4.5)	70,8
1'		134.8
2' og 6' / 3' og 5'	6.70 (2H, d, J=8.5)	114.7
3' og 5' / 2' og 6'	7.10 (2H, d, J=8.5)	127.0
4'		156.2
1''	2.27 (3H, s)	35.9

### Optisk rotasjon

Optisk rotasjon ( $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ ) av 4 mg/ml i vann ble målt til  $-32,3^\circ$ . Tidligere studie har vist at 10 mg/ml (-)-synephrine i vann har en optisk rotasjon ( $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ ) på  $-45,8^\circ$ , mens (+)-synephrine har en optisk rotasjon på  $+46,4^\circ$  (Pellati et al. 2005). Samme fortegn på optisk rotasjon betyr at lyset roterer i samme retning, og dette bekrefter at stoffet har stereokjemien til (-)-synephrine.

### 4.5.19.2 Rekelarvetest

Synephrine fra fraksjon Sb-meoh-s3v1h1+h4 var ikke toksisk på rekelarver (se tabell 4.76), og  $\text{LD}_{50}$  ble derfor ikke bestemt. Den toksiske effekten så ikke ut til å øke med økt konsentrasjon, og det var dermed ingen korrelasjon mellom konsentrasjon og dødelighet. Positiv kontroll med podofyllotoksin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ga  $96 \pm 6\%$  dødelighet av rekelarver, mens negativ kontroll med DMSO ga  $3 \pm 5\%$  dødelighet av rekelarver. Et søk i SciFinder viste at det ikke finnes tidligere publiserte studier på toksisitet av synephrine på rekelarver.

Tabell 4.76: Toksisitet på rekellarver av (-)-*p*-synephrine.

Kons. (µg/ml)	Log kons.	Dødelighet (%)	SD (%)	LD <sub>50</sub> (µg/ml)
100	2,0	3	5	ikke toksisk
10	1,0	3	6	
1	0,0	6	5	

(Kons. = konsentrasjon, SD = standardavvik)

#### 4.5.19.3 Antiplasmodiumtest

Resultater fra Australia viste at (-)-*p*-synephrine ikke ga antiplasmodium-effekt (IC<sub>50</sub> > 20 µg/ml) mot *P. falciparum* stammen 3D7. Det foreligger ingen tidligere studier av antiplasmodium-effekt av synephrine.



## 5 Konklusjon

Fra diklormetan-råekstraktet av rotbark av *Zanthoxylum zanthoxyloides* ble det isolert og identifisert alkaloidene arnottianamid, diktamnin, skimmianin og  $\gamma$ -fagarin, kumarinene scoparon og 6,7,8-trimetoksykumarin, alkamidene cis-fagaramid, trans-fagaramid og pellitorin, og lignanet sesamin. Fra metanol-råekstraktet av rotbark ble det isolert alkaloidene bis-dihydrochelerythrinyleter og buesgenin. Fra metanol-råekstraktet av stammebark ble det isolert alkaloidene chelerythrin, 6-hydroksydihydrochelerythrin og synephrine, flavanonglykosidet hesperidin, kaffeoylkinasyrene klorogensyre og neoklorogensyre, og shikimatmetabolitten burkinabin B. Bis-dihydrochelerythrinyleter, buesgenin, 6-hydroksydihydrochelerythrin, synephrine og neoklorogensyre har ikke tidligere blitt rapportert i *Z. zanthoxylum*.

Råekstraktene viste toksisitet mot rekellarver, hvor diklormetan-ekstraktene av både rotbark ( $LD_{50}$ :  $0,4 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ ) og stammebark ( $LD_{50}$ :  $1,0 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ ) var mye mer toksiske enn metanol-ekstraktene av rotbark ( $LD_{50}$ :  $54 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ ) og stammebark ( $LD_{50}$ :  $76 \pm 7 \mu\text{g/ml}$ ). Av de isolerte naturstoffene, var bis-dihydrochelerythrinyleter mest toksisk ( $LD_{50}$ :  $3 \pm 1 \mu\text{M}$ ), etterfulgt av chelerythrin ( $LD_{50}$ :  $43 \pm 26 \mu\text{M}$ ), pellitorin ( $LD_{50}$ :  $49 \pm 31 \mu\text{M}$ ), trans-fagaramid ( $LD_{50}$ :  $57 \pm 24 \mu\text{M}$ ), 6-hydroksydihydrochelerythrin ( $LD_{50}$ :  $68 \pm 6 \mu\text{M}$ ), sesamin ( $LD_{50}$ :  $79 \pm 11 \mu\text{M}$ ),  $\gamma$ -fagarin ( $LD_{50}$ :  $109 \pm 13 \mu\text{M}$ ) og scoparon ( $LD_{50}$ :  $320 \pm 107 \mu\text{M}$ ).

6-Hydroksydihydrochelerythrin var omtrent like toksisk som chelerythrin, og en dimerisering til bis-dihydrochelerythrinyleter økte toksisiteten med mer enn en tierpotens. Resten av de isolerte stoffene, unntatt buesgenin og diktamnin, viste ikke toksisitet mot rekellarver.

Klorogensyre, pellitorin, scoparon og sesamin er tidligere undersøkt for rekellarvetoksisitet, de andre er ikke tidligere undersøkt for dette.

Screening av råekstraktene viste at diklormetan-ekstraktene av både rotbark og stammebark, og metanol-ekstrakt av stammebark hadde antiplasmodium aktivitet mot *P.falciparum* stammene 3D7 (klorokinfølsomme) og DD2 (klorokinresistente) med  $IC_{50}$  verdier mellom 1 og  $10 \mu\text{g/ml}$ . Av de isolerte stoffene ga skimmianin ( $IC_{50}$ :  $0,7 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ ),  $\gamma$ -fagarin ( $IC_{50}$ :  $2,2 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ ), bis-dihydrochelerythrinyleter ( $IC_{50}$ :  $4,3 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$ ) og buesgenin ( $IC_{50}$ :  $3,4 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ ) antiplasmodiumaktivitet mot 3D7. Det har ikke blitt rapportert tidligere om antiplasmodiumaktivitet av bis-dihydrochelerythrinyleter og buesgenin. Det ble ikke tatt

antiplasmodiumtest av sesamin, pellitorin og chelerythrin, men tidligere studier har vist at disse stoffene har antiplasmodium aktivitet mot enkelte *P.falciparum* stammer. De andre isolerte stoffene som ble testet, var inaktive mot parasittene, og har ikke blitt rapportert i tidligere studier. Noen av stoffene ble ikke testet mot *Plasmodium* på grunn av stoffmangel eller tidsmangel.

Flere av de isolerte naturstoffene fra rotbark og stammebark av *Z. zanthoxylum* har ikke blitt rapportert i tidligere studier, som blant annet alkaloidene bis-dihydrochelerythrinyleter, 6-hydroksydihydrochelerythrin og buesgenin. Disse isolerte stoffene har vist både rekeltarvetoksisitet og/eller antiplasmodiumaktivitet som ikke har blitt rapportert tidligere. Disse funnene kan bidra til å forklare noe av den tradisjonelle bruken mot malaria i Vest-Afrika.

# Forslag til videre arbeid

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

- Isolere og identifisere flere stoffer fra forskjellige plantedeler av *Zanthoxylum zanthoxyloides*, inkludert diklormetan- og metanolekstrakt av blad, og diklormetanekstrakt av stammebark som ikke ble utført i denne oppgaven.
- Utføre rekellarvetoksisitetstest og antiplasmodiumtest av de isolerte stoffene som ikke ble testet. Eventuelt studere ekstraktenes og innholdsstoffenes insekticid eller repellent effekter mot malariamygg og for mygglarvetoksisitet.
- Etnofarmakologisk feltarbeid i forbindelse med tradisjonell medisin mot malaria og andre protozofremkalte sykdommer. Interessant ville det også vært å undersøke om den tradisjonelle bruken som medisin har en effekt på pasientene som behandles.
- Utvidelse av prosjektet til å omfatte andre *Zanthoxylum*-arter med lignende medisinsk anvendelse.

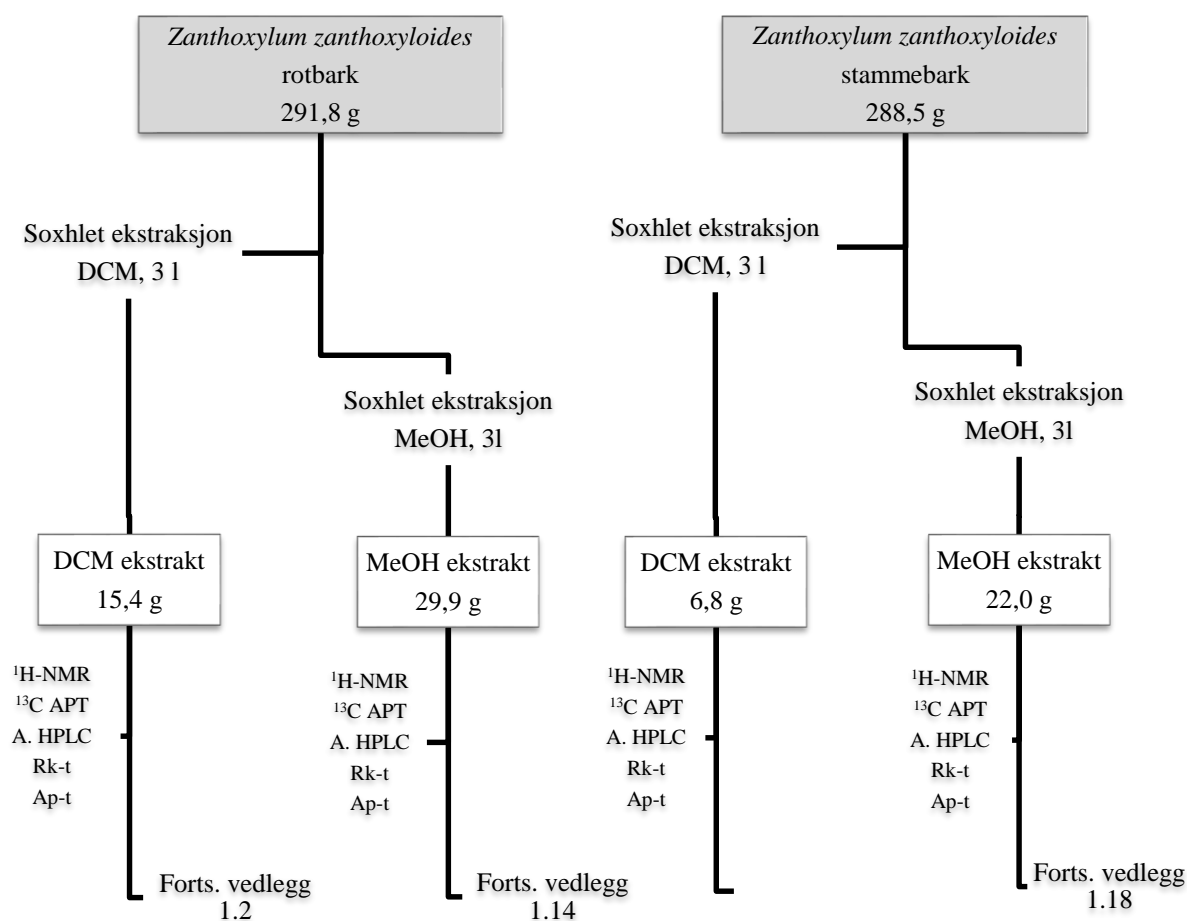
# Vedlegg

# 1. FLYTSKJEMAER

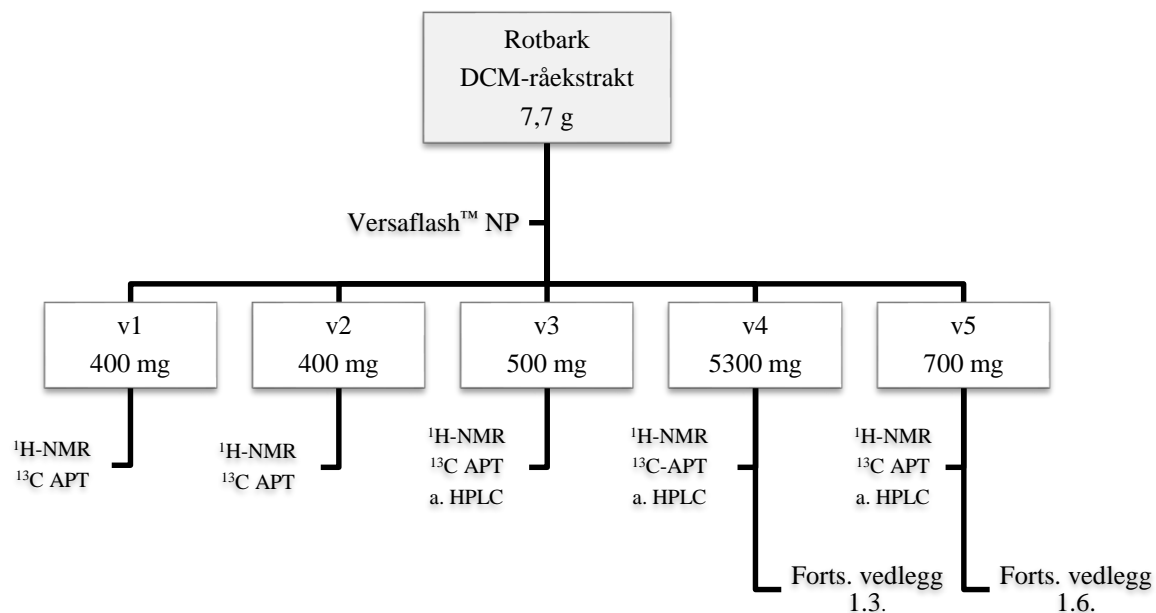
Forkortelser: Analytisk HPLC (A. HPLC), preparativ HPLC (Prep. HPLC), preparativ TLC (Prep. TLC) rekellarvetest (Rk-t), antiplasmodiumtest (Ap-t), normalfase kromatografi (NP), omvendt-fase kromatografi (RP), optisk rotasjon (optisk r.), massespektrometri (MS).

Fraksjoner fra preparativ HPLC som var tomme eller som ikke ble fulgt opp, er ikke vist i flytskjemaene.

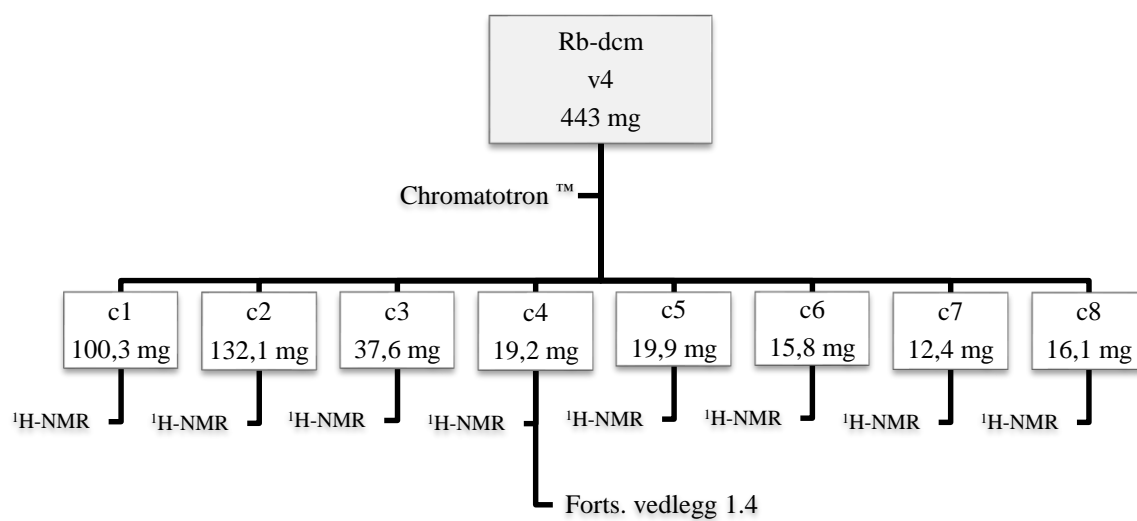
## 1.1 Ekstraksjon av plantemateriale



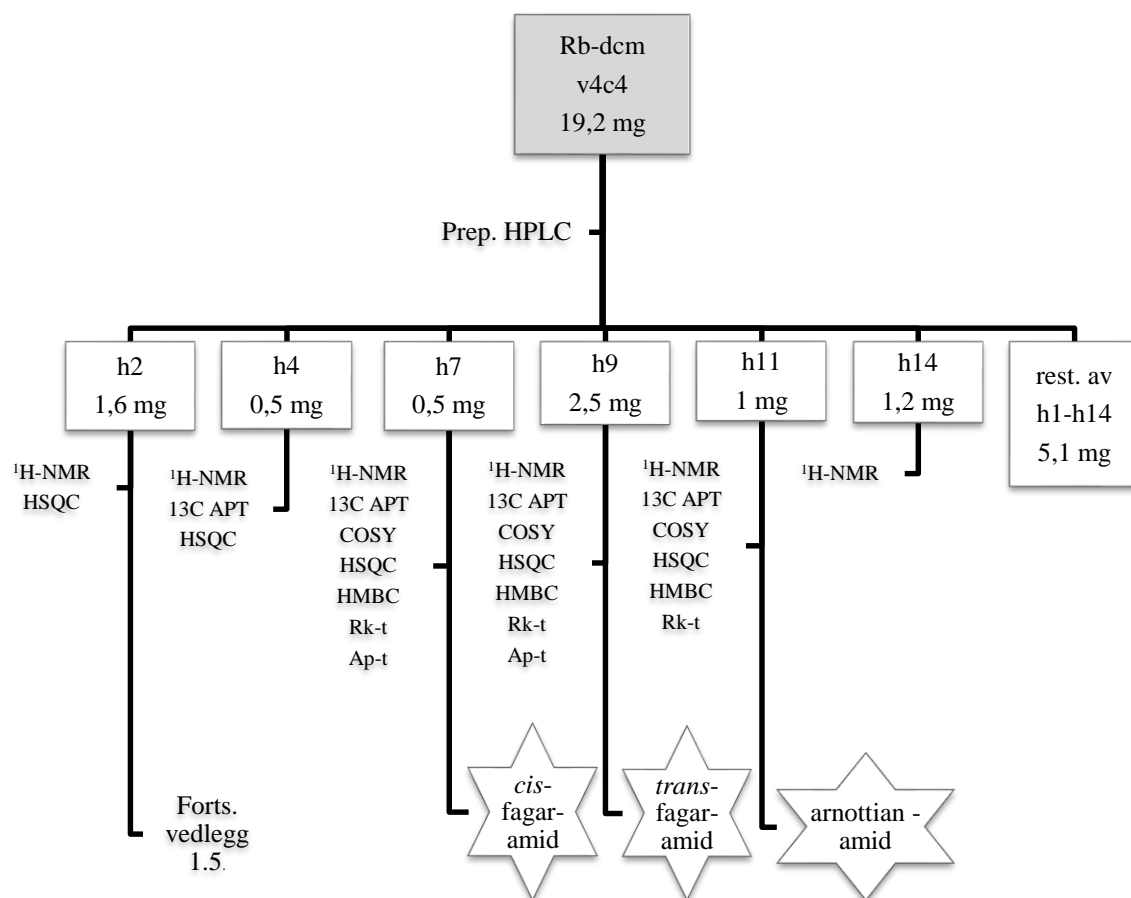
## 1.2 Fraksjonering av DCM-råekstrakt av rotbark (Rb-dcm)



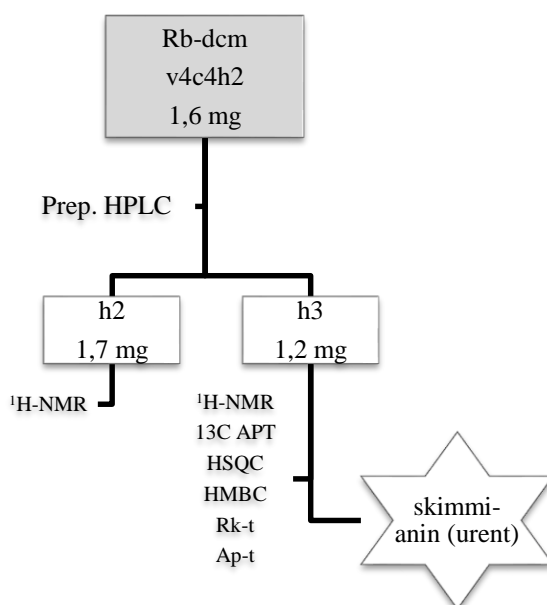
## 1.3 Separering av Rb-dcm-v4



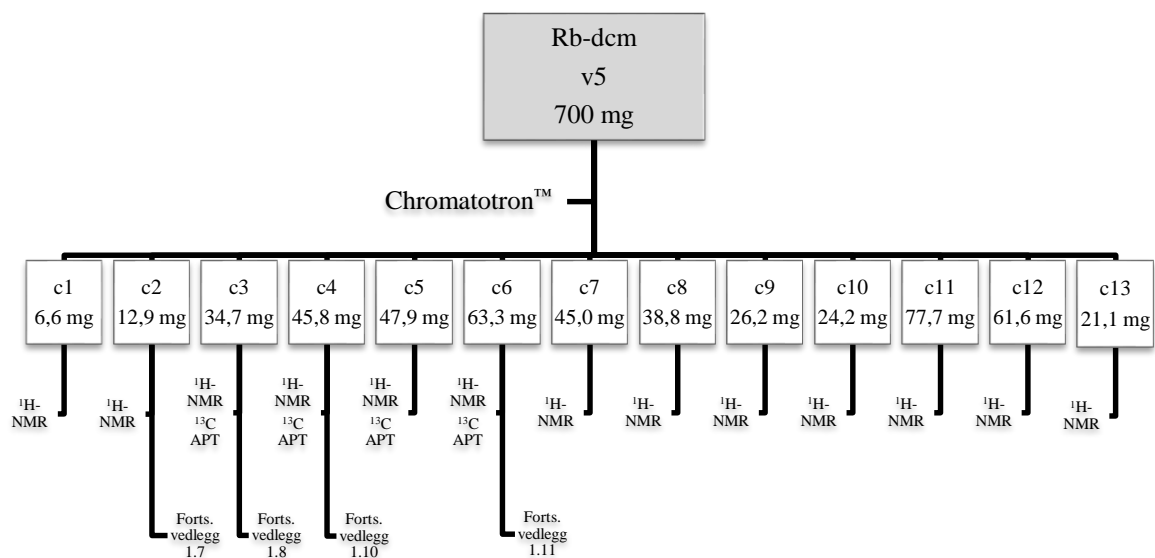
## 1.4 Separering av Rb-dcm-v4c4



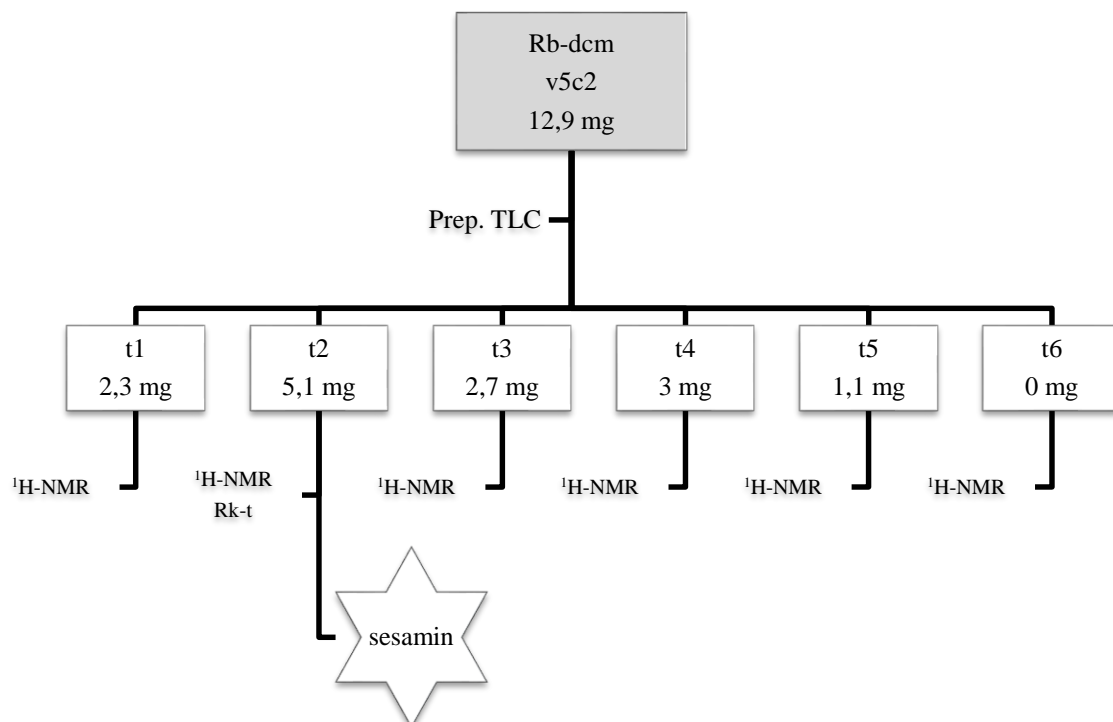
## 1.5 Separering av Rb-dcm-v4c4h2



## 1.6 Separering av Rb-dcm-v5

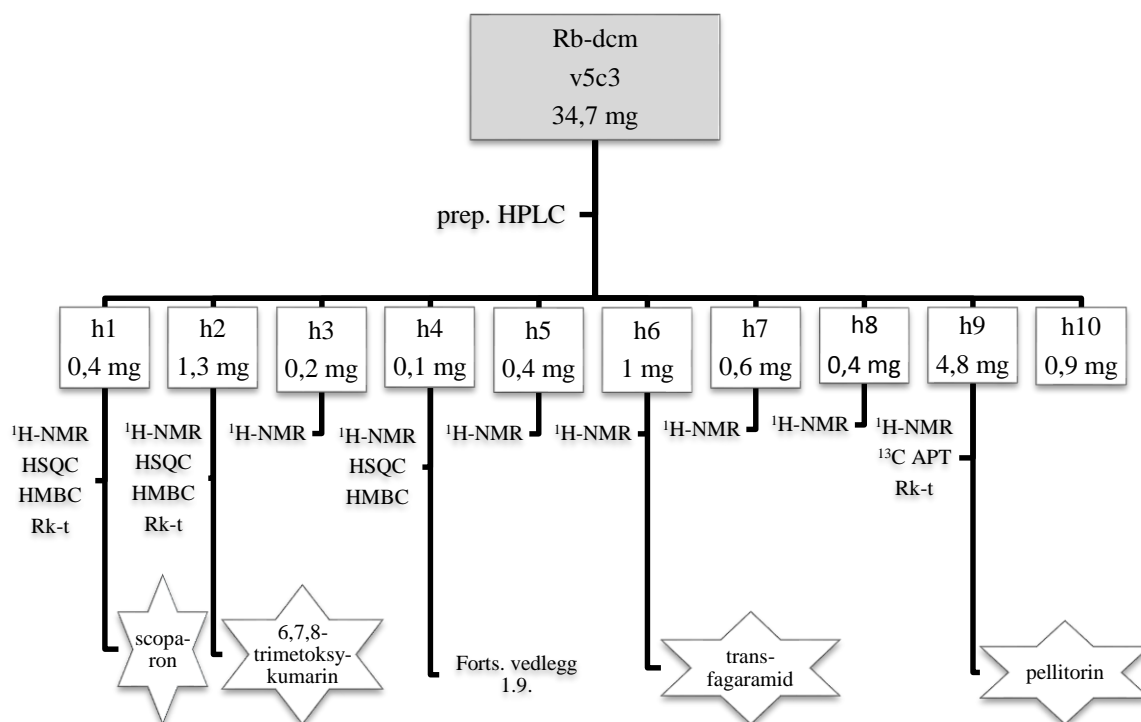


## 1.7 Separering av Rb-dcm-v5c2

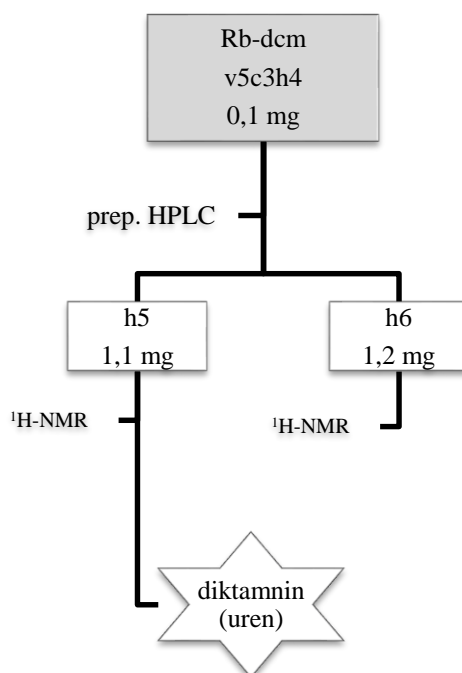




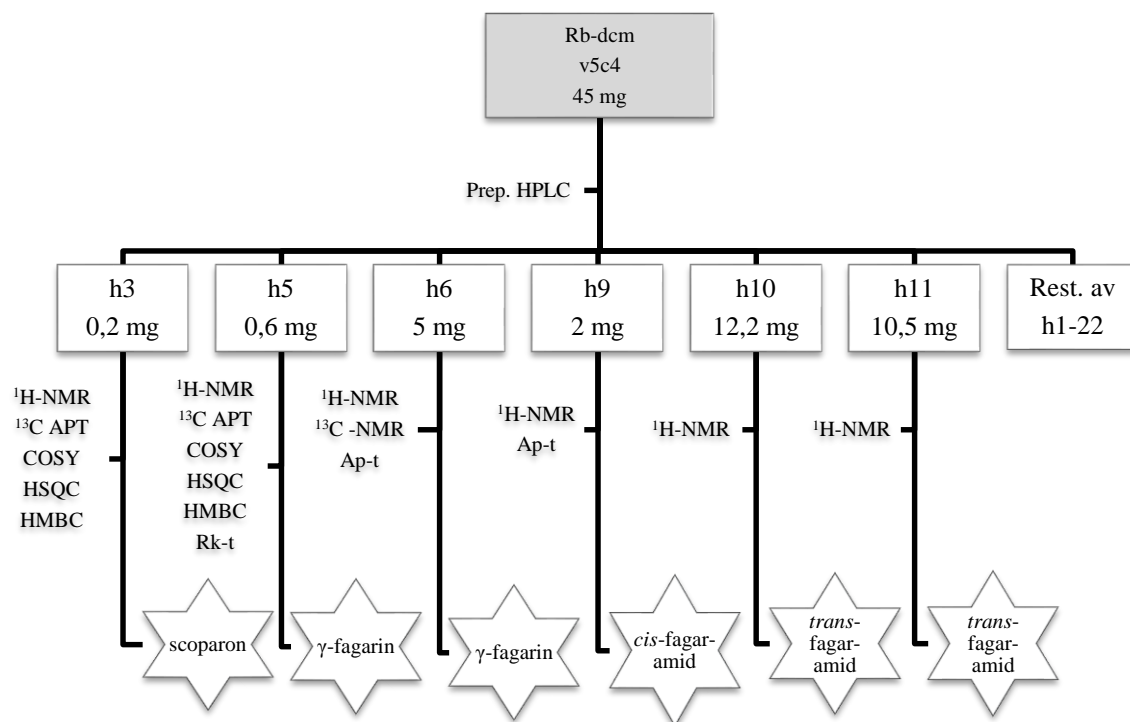
## 1.8 Separering av Rb-dcm-v5c3



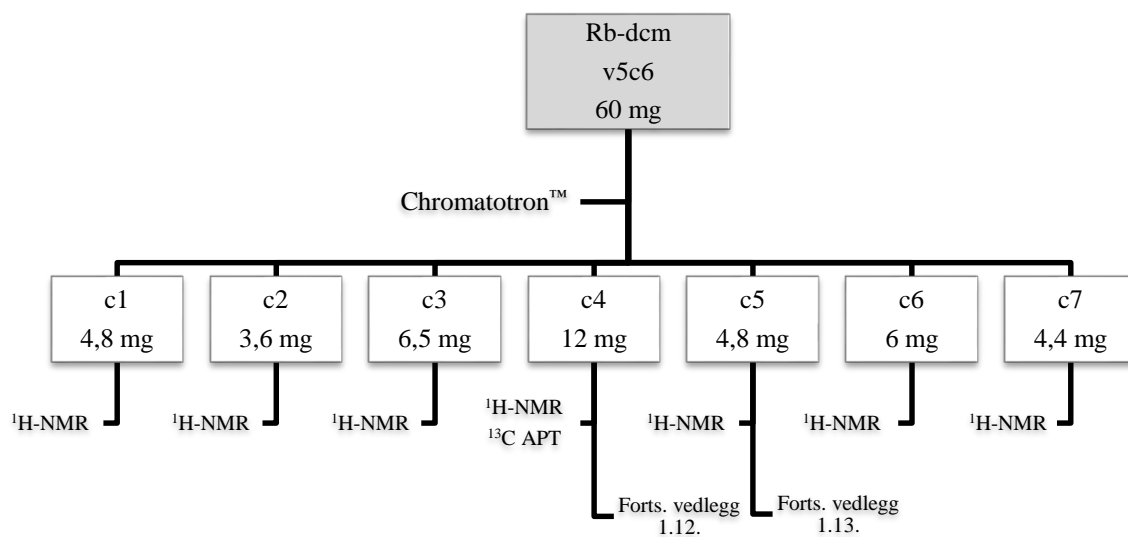
## 1.9 Separering av Rb-dcm-v5c3h4



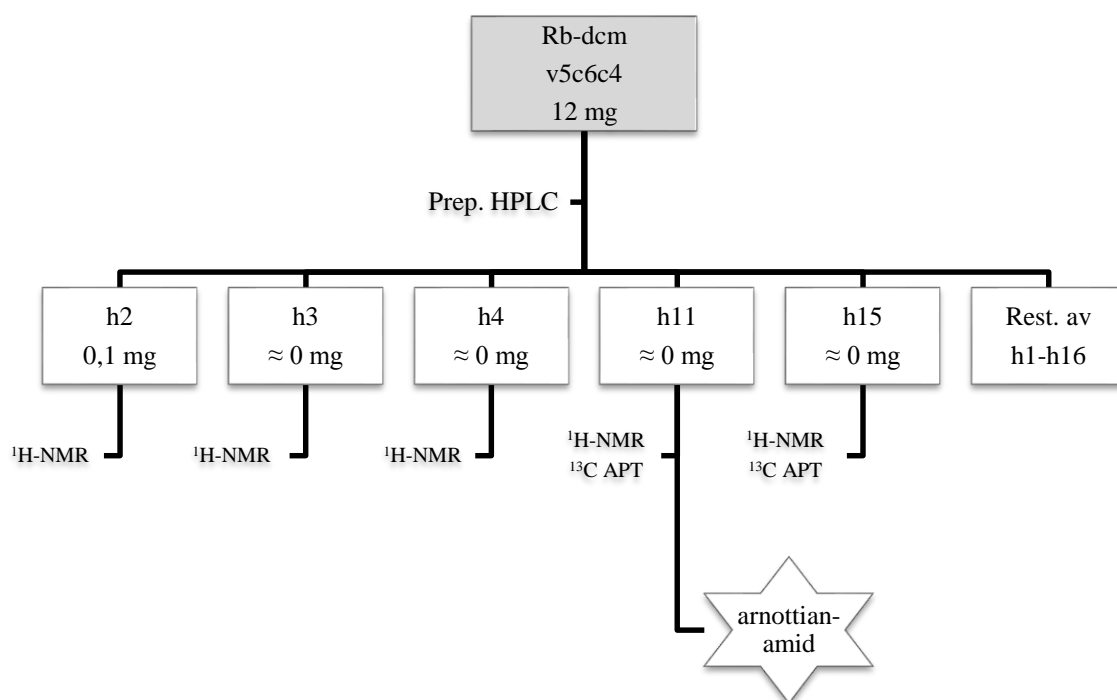
## 1.10 Separering av Rb-dcm-v5c4



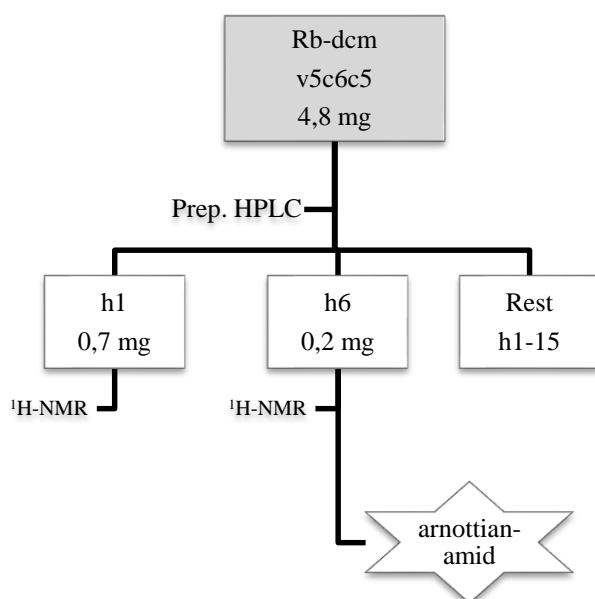
## 1.11 Separering av Rb-dcm-v5c6



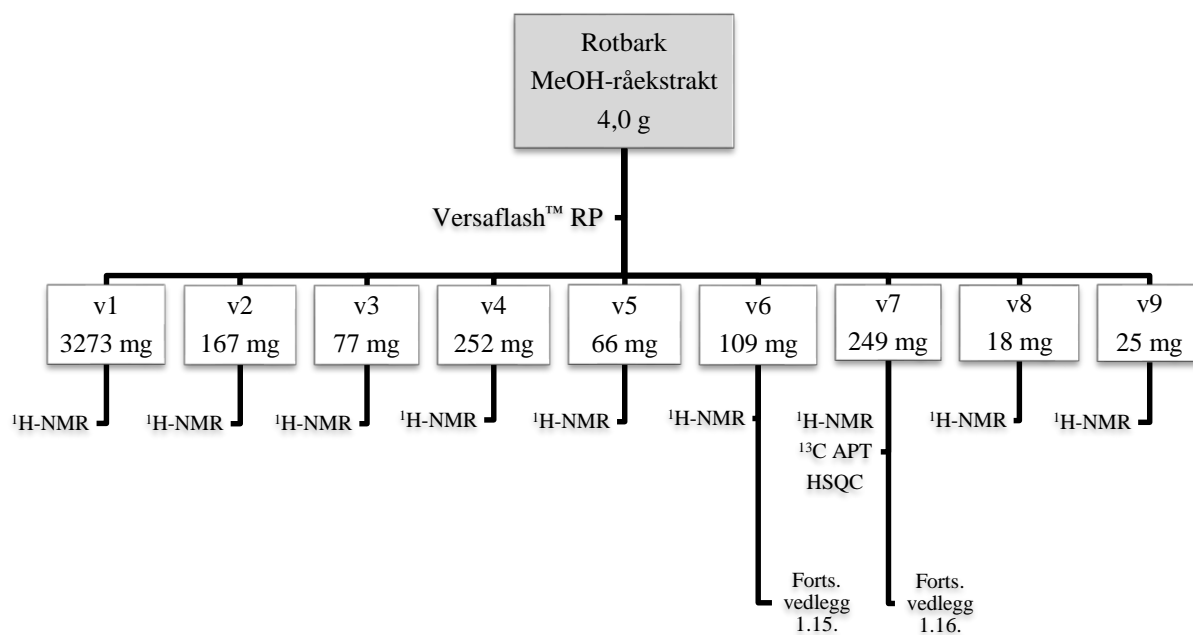
### 1.12 Separering av Rb-dcm-v5c6c4



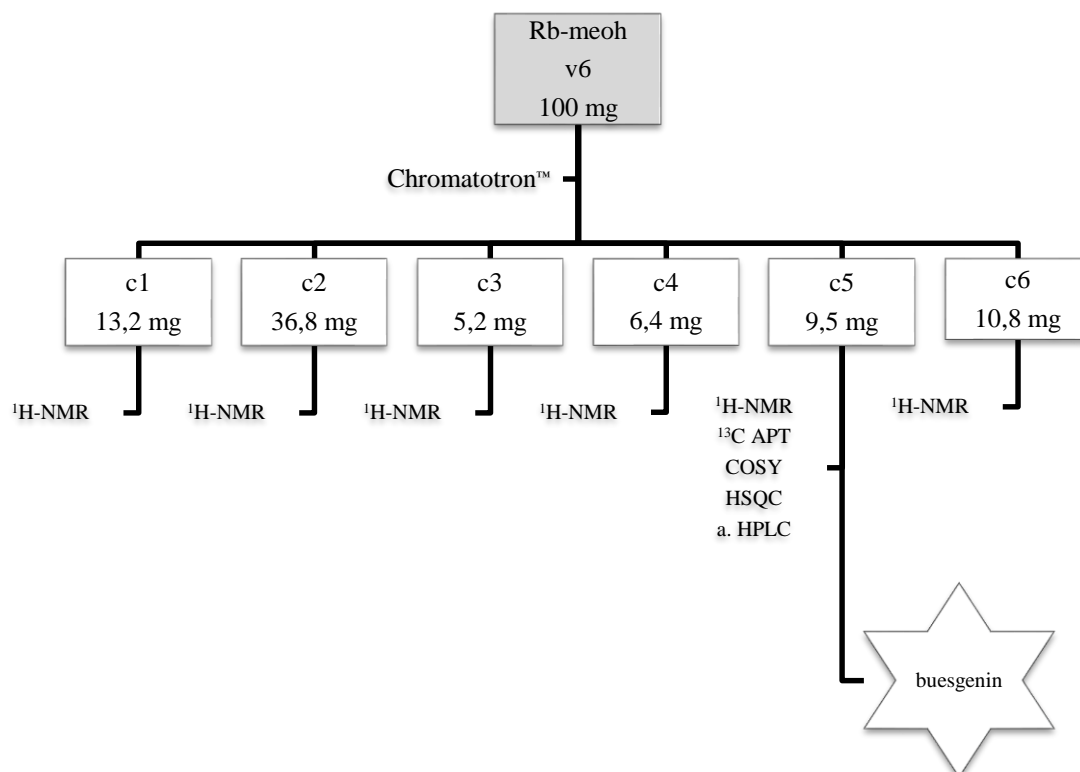
### 1.13 Separering av Rb-dcm-v5c6c5



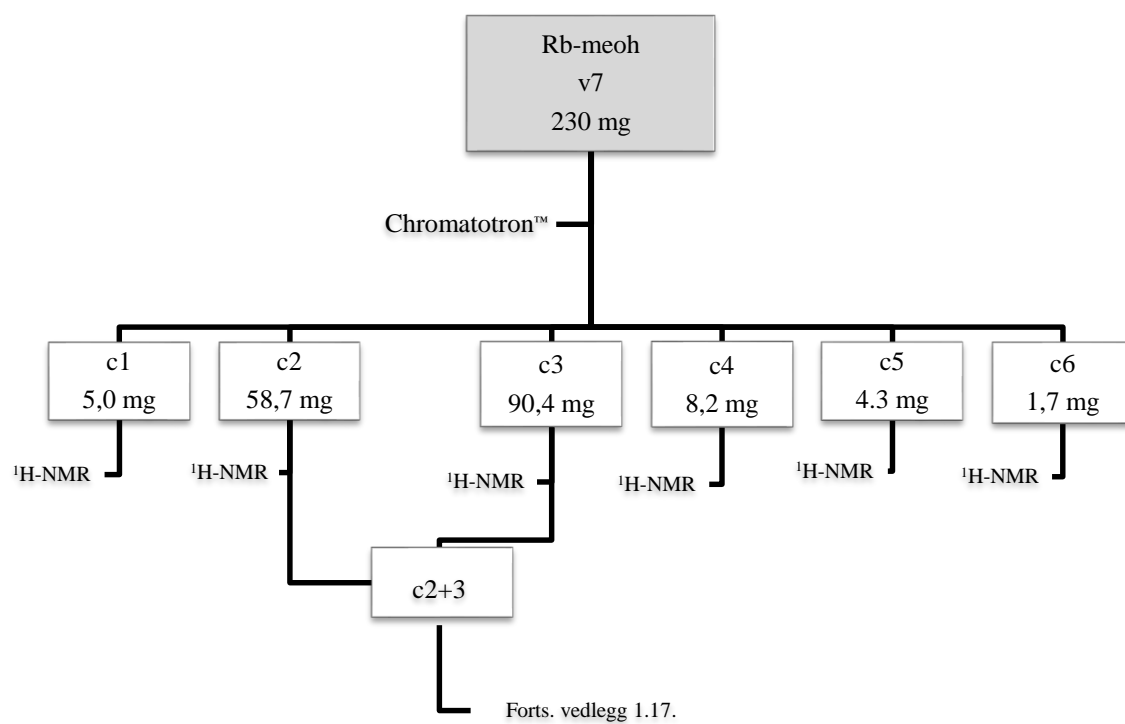
### 1.14 Fraksjonering av rotbark MeOH-råekstrakt (Rb-meoh)



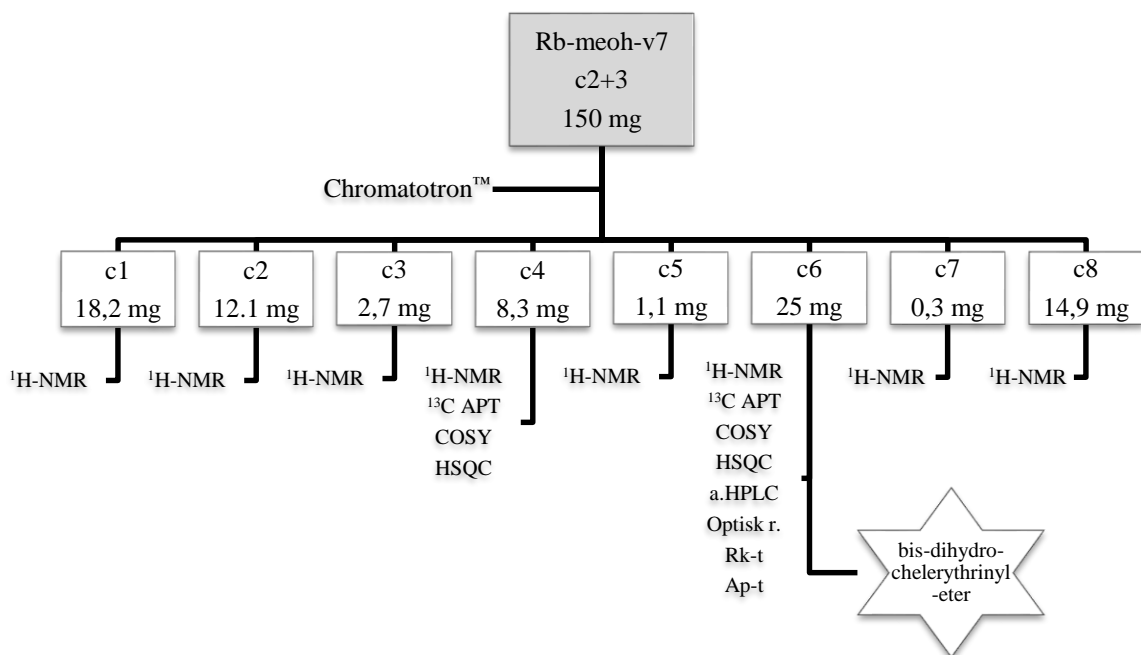
### 1.15 Separering av Rb-meoh-v6



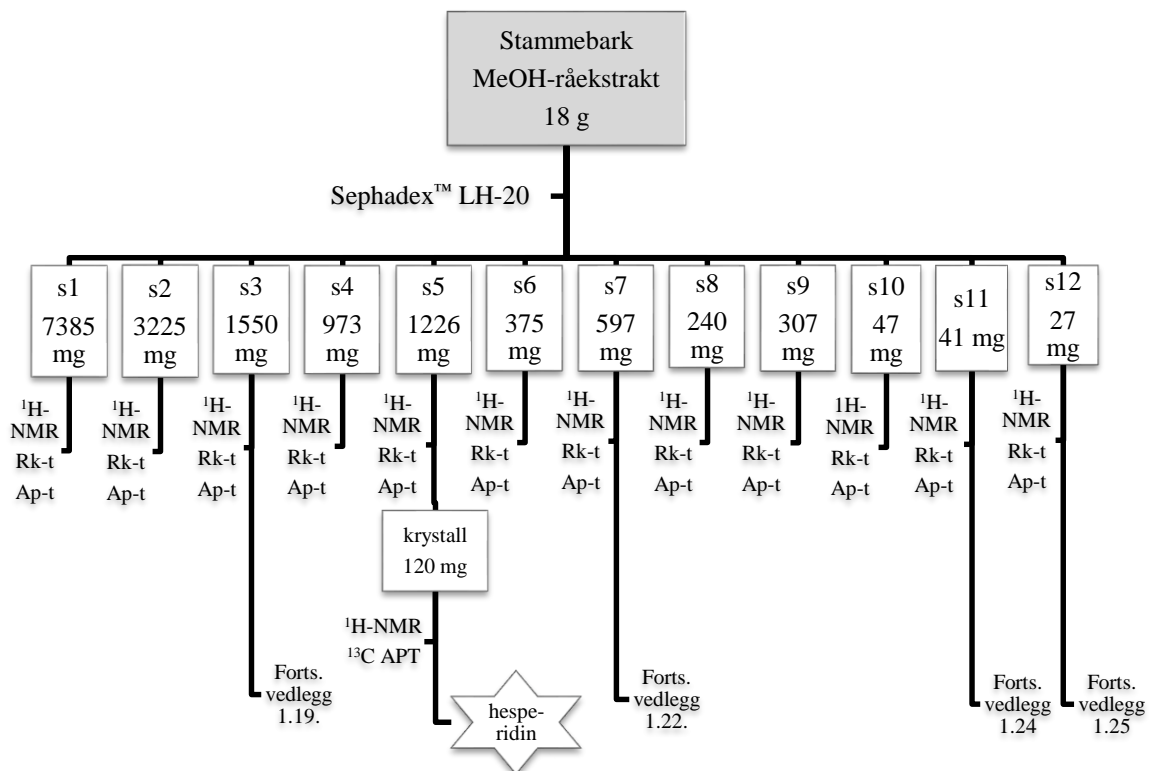
### 1.16 Separering av Rb-meoh-v7



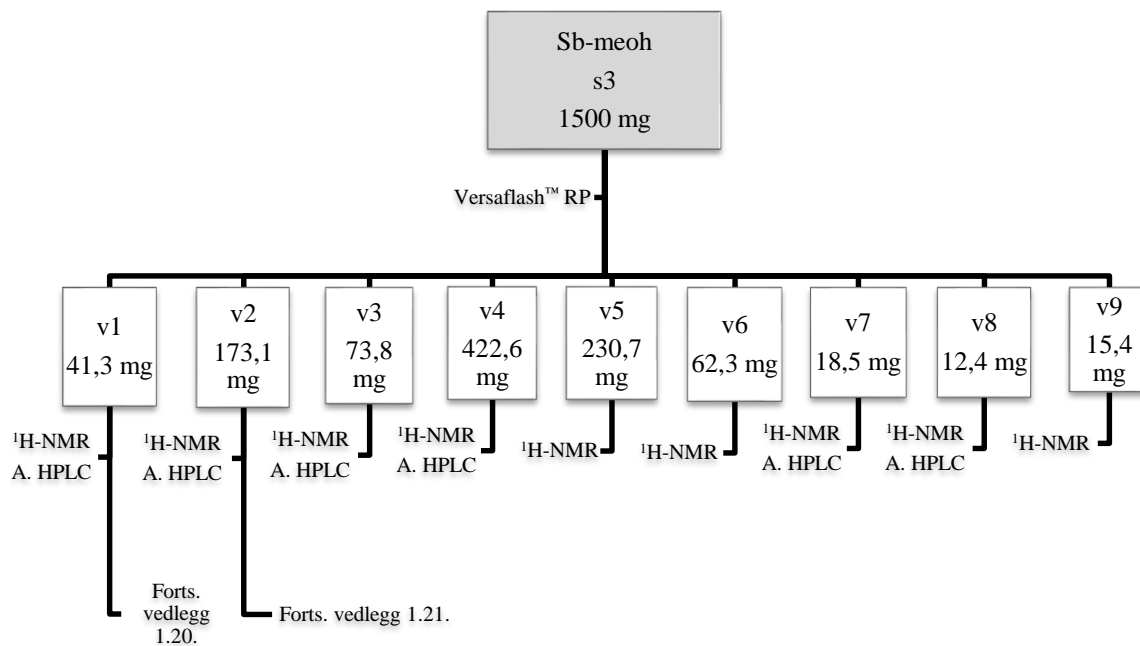
### 1.17 Separering av Rb-meoh-v7c2+3



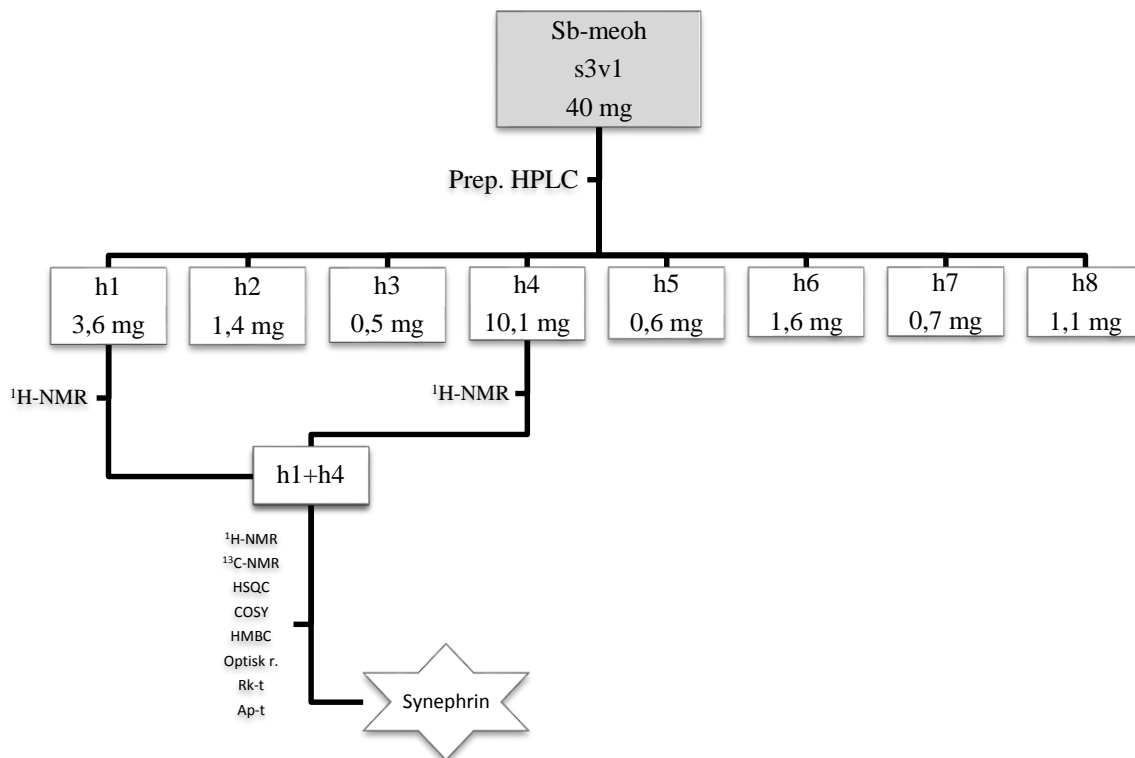
### 1.18 Fraksjonering av MeOH-råekstrakt av stammebark (Sb-meoh)



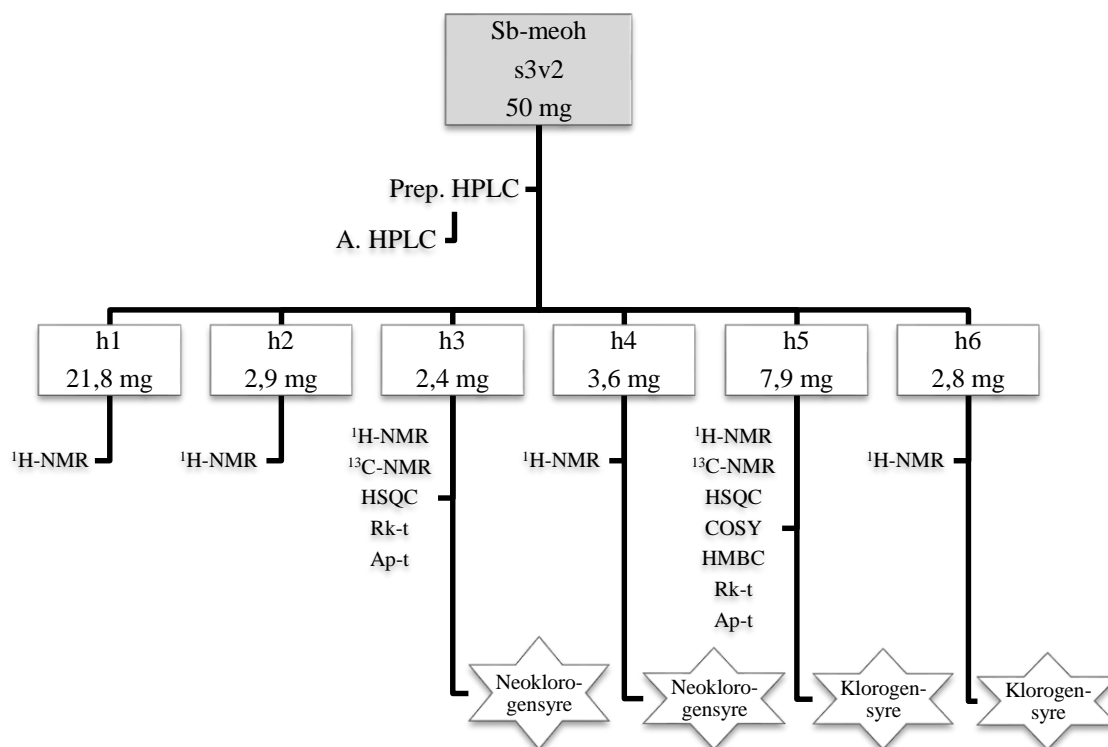
## 1.19 Separering av Sb-meoh-s3



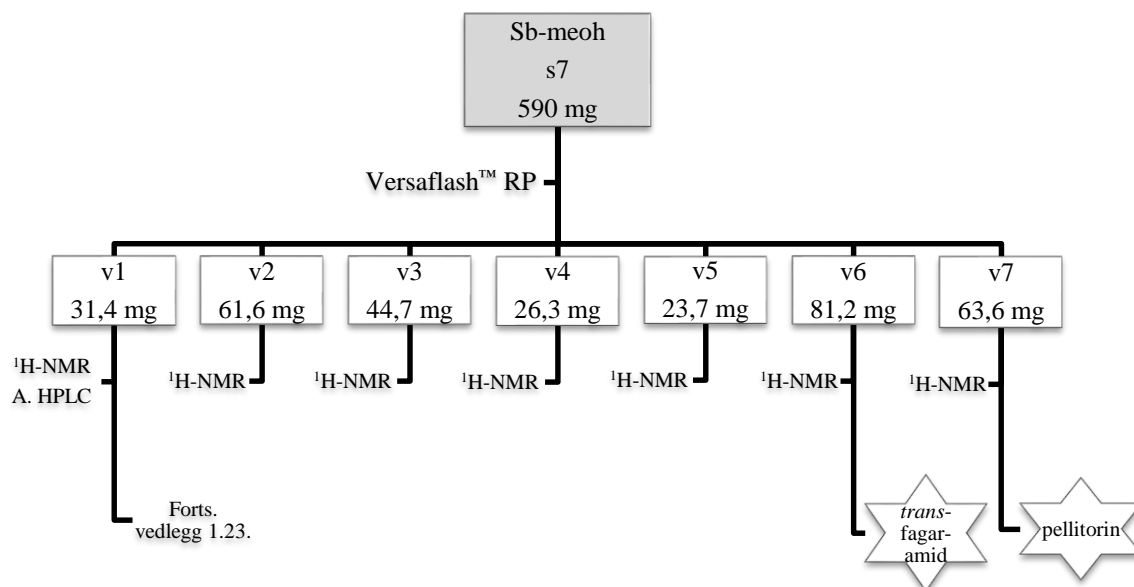
## 1.20 Separering av Sb-meoh-s3v1



## 1.21 Separering av Sb-meoh-s3v2

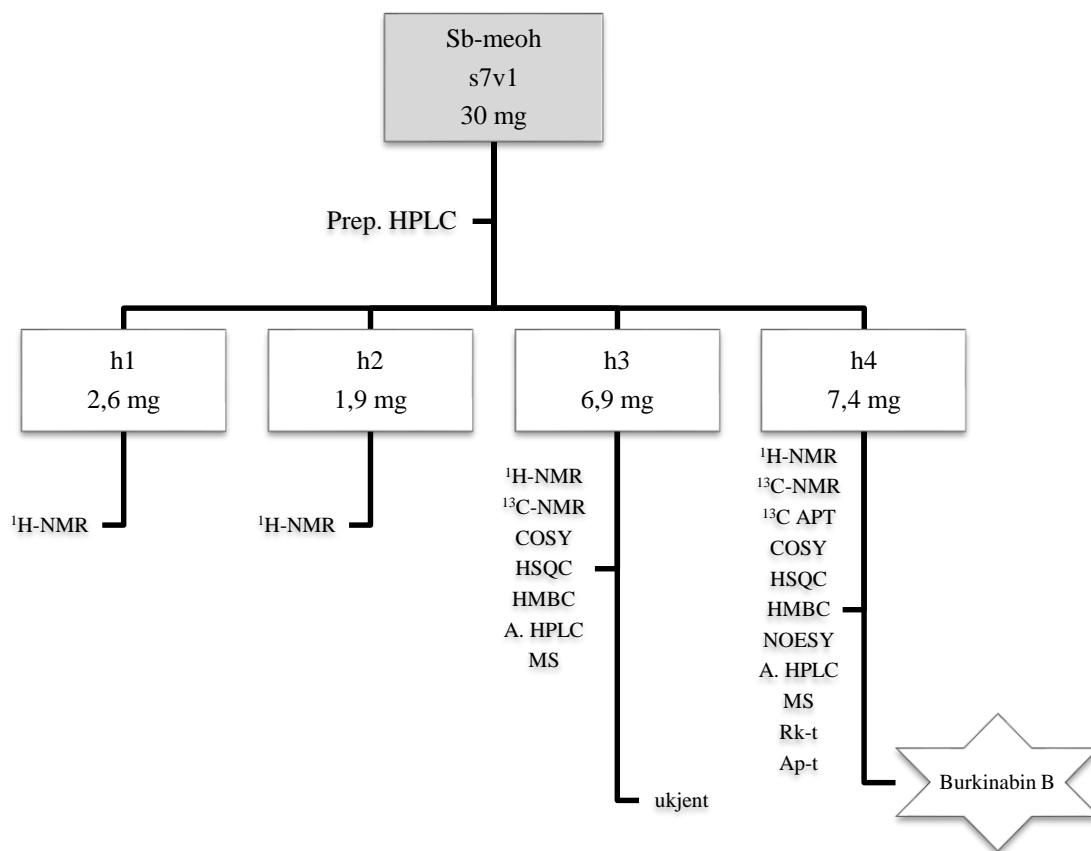


## 1.22 Separering av Sb-meoh-s7

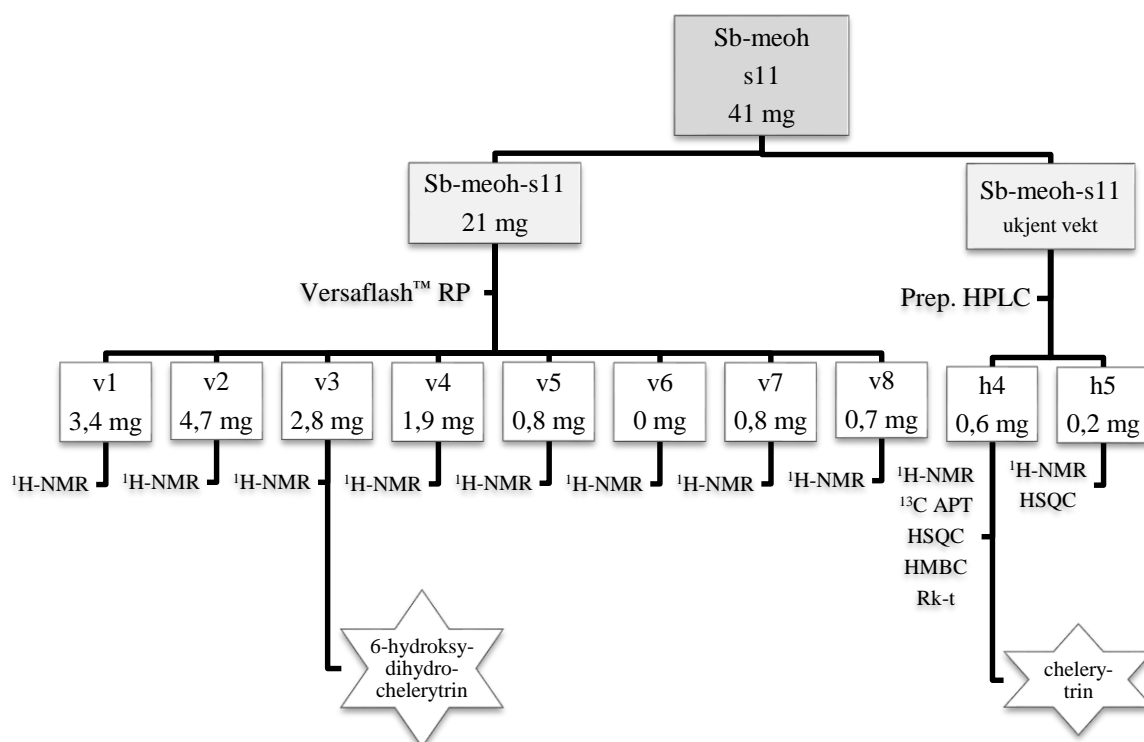


## 1.23 Separering av Sb-meoh-s7v1

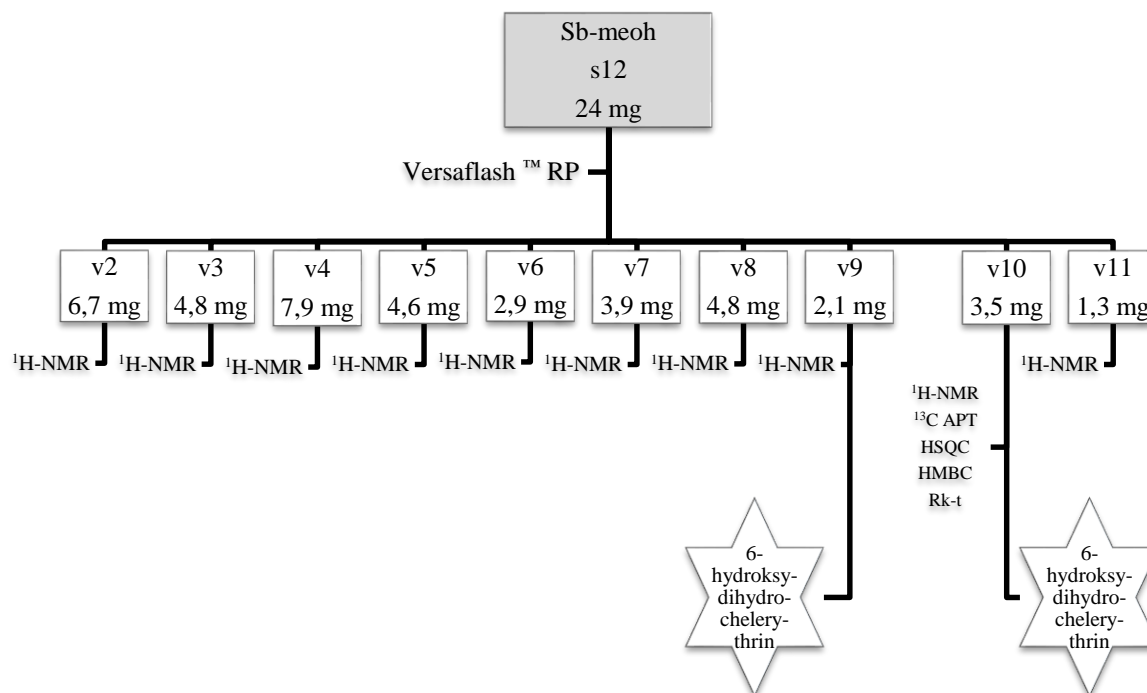




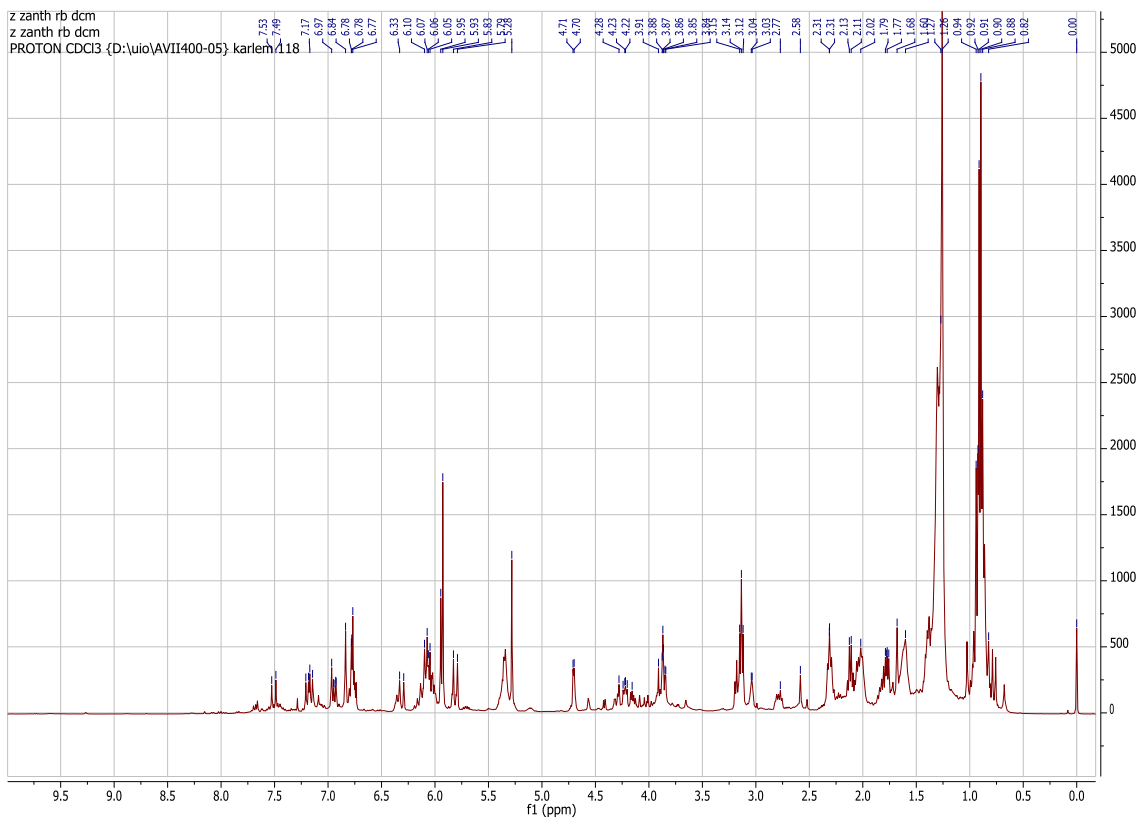
## 1.24 Separering av Sb-meoh-s11



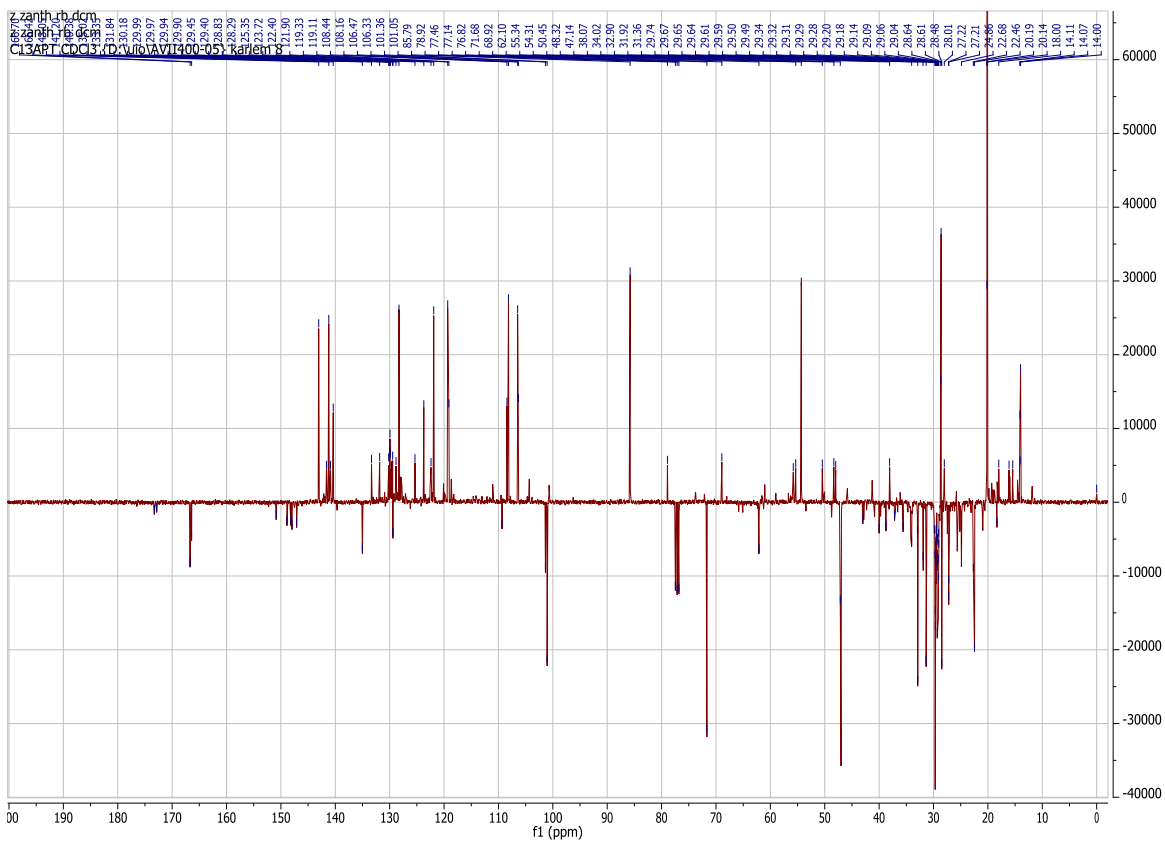
## 1.25 Separering av Sb-meoh-s12



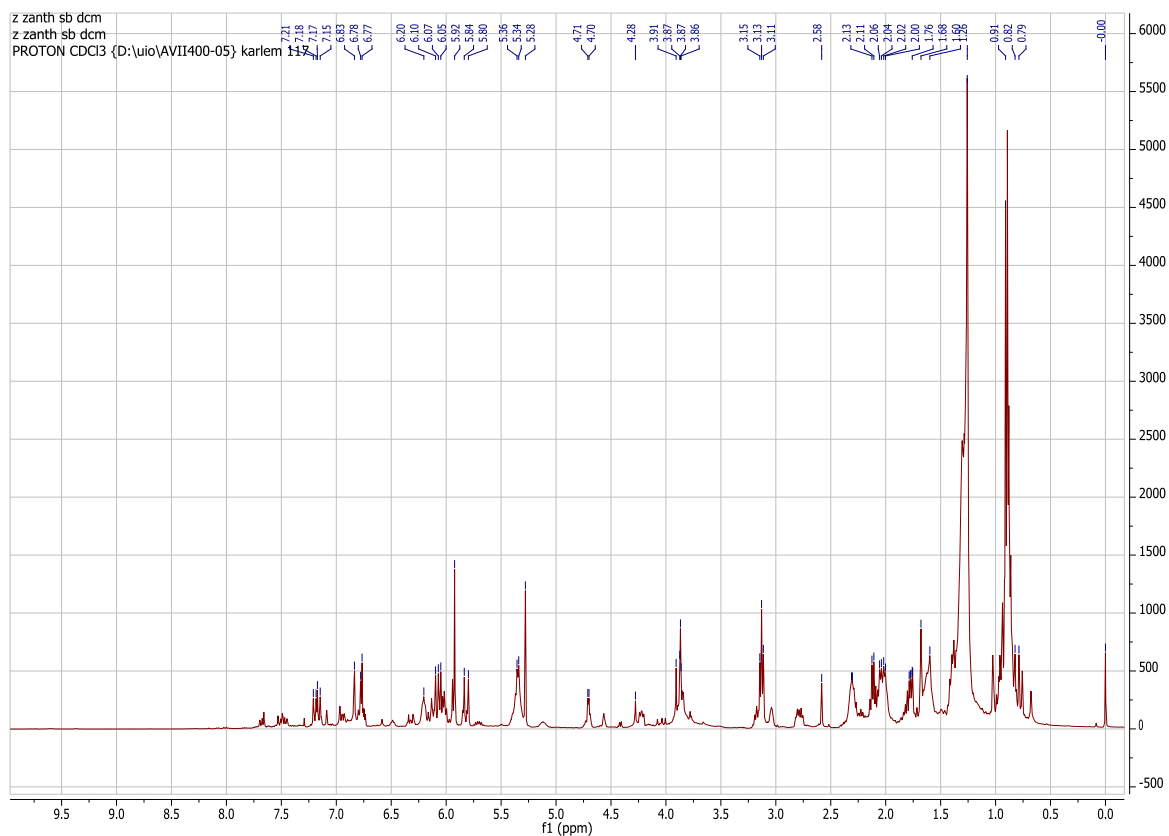
## 2. NMR-SPEKTRE



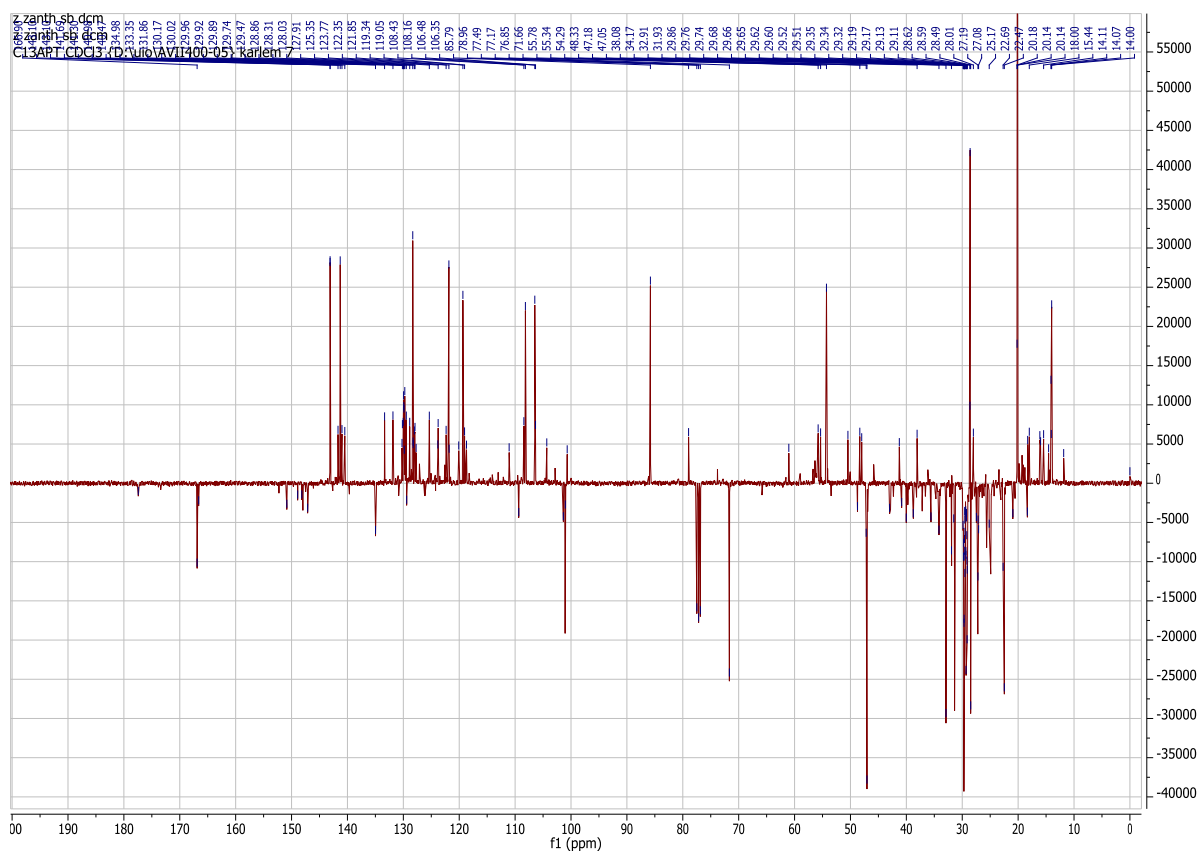
Vedlegg 2.1a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter av rotbark DCM-råekstrakt løst i  $\text{CDCl}_3$ .



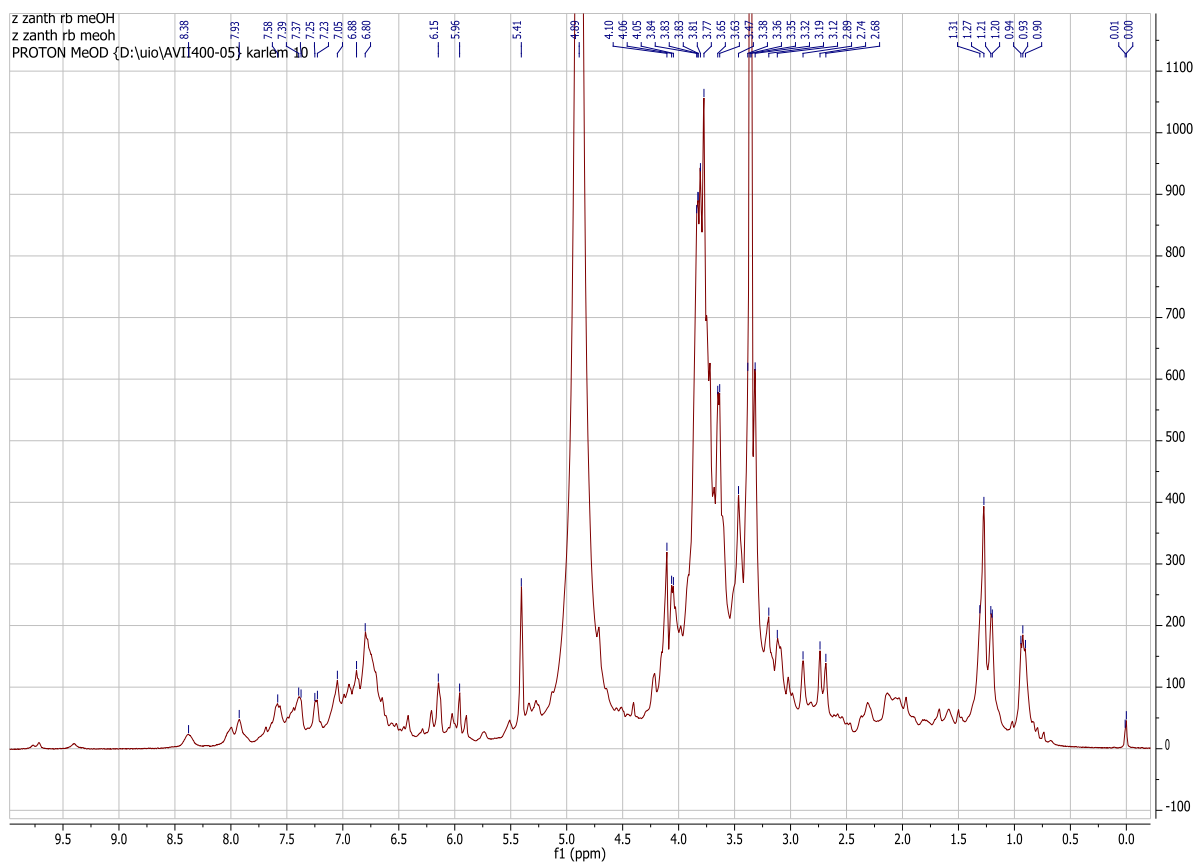
Vedlegg 2.1b:  $^{13}\text{C}$  APT spekter av rotbark DCM-råekstrakt løst i  $\text{CDCl}_3$ .



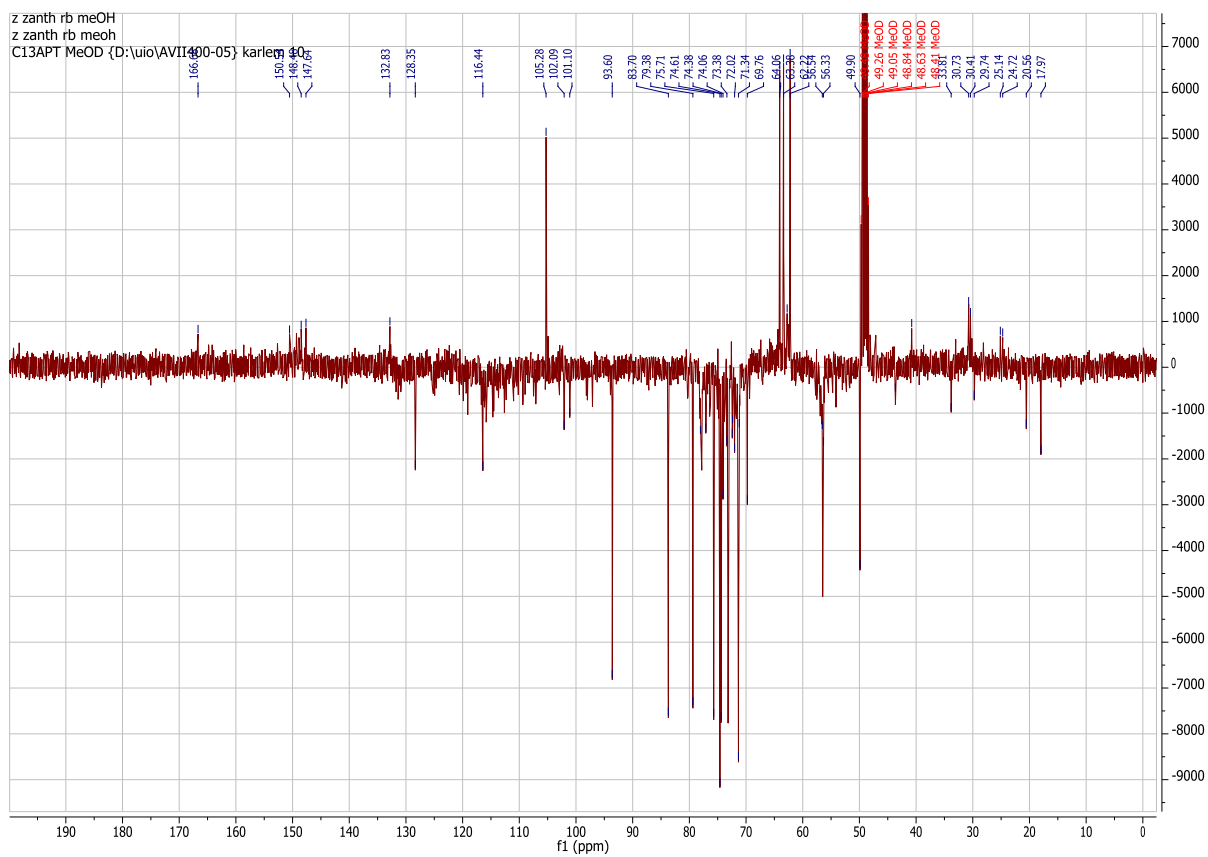
Figur 2.2a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter av stammebark DCM-råekstrakt løst i  $\text{CDCl}_3$ .



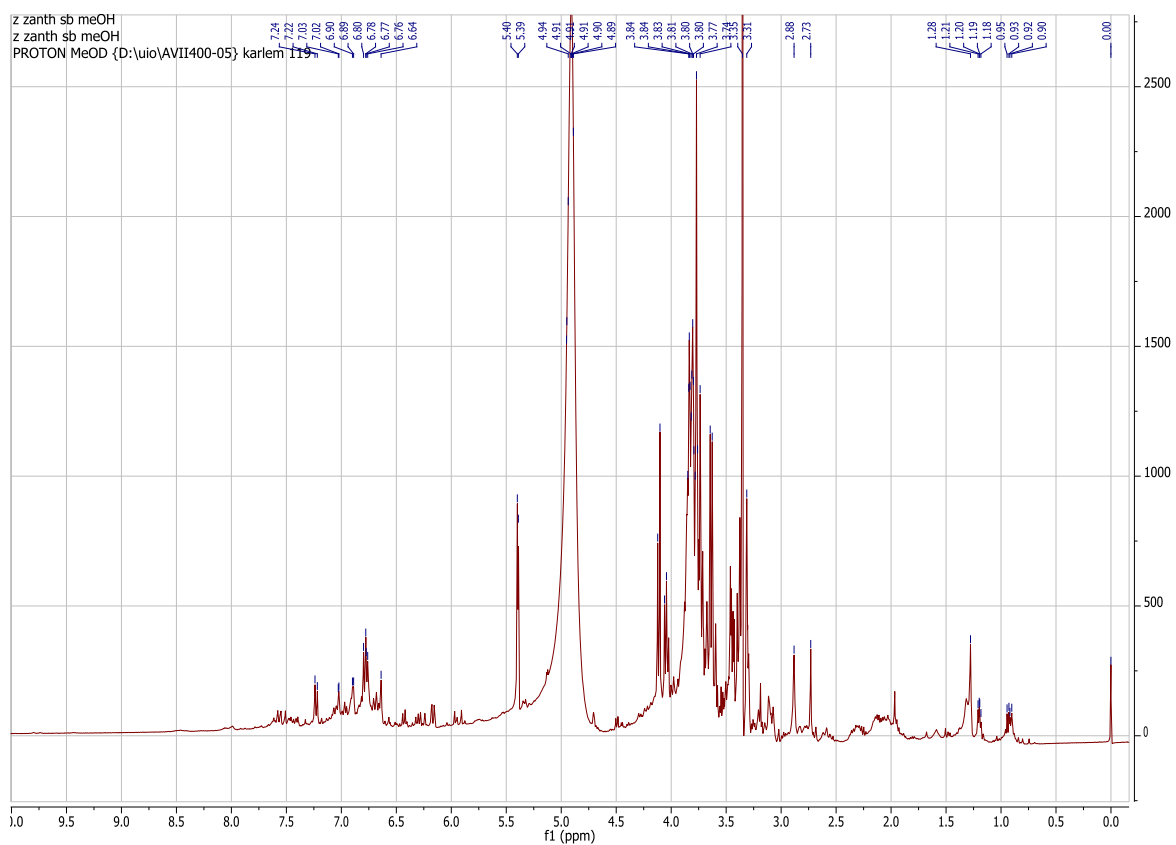
Figur 2.2b:  $^{13}\text{C}$  APT spekter av stammebark DCM-råekstrakt løst i  $\text{CDCl}_3$ .



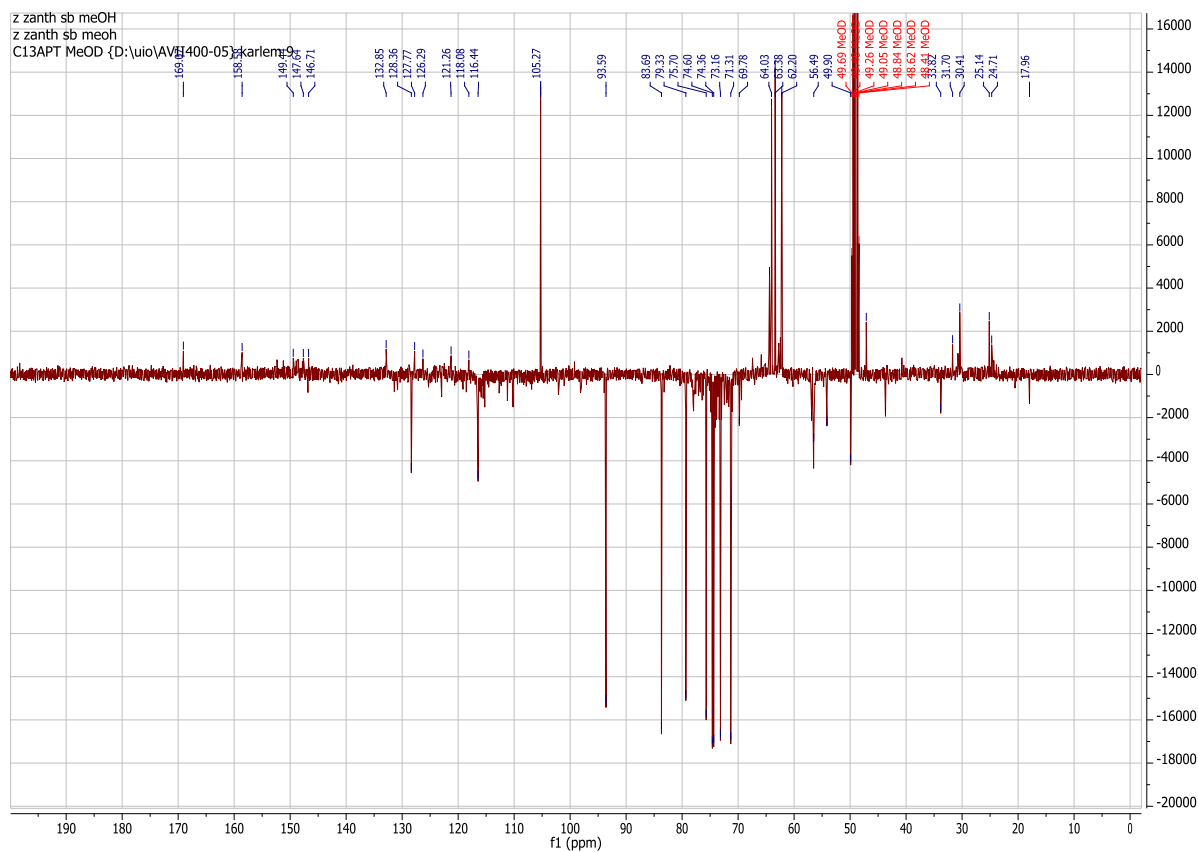
Vedlegg 2.3a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter av rotbark MeOH-råekstrakt løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



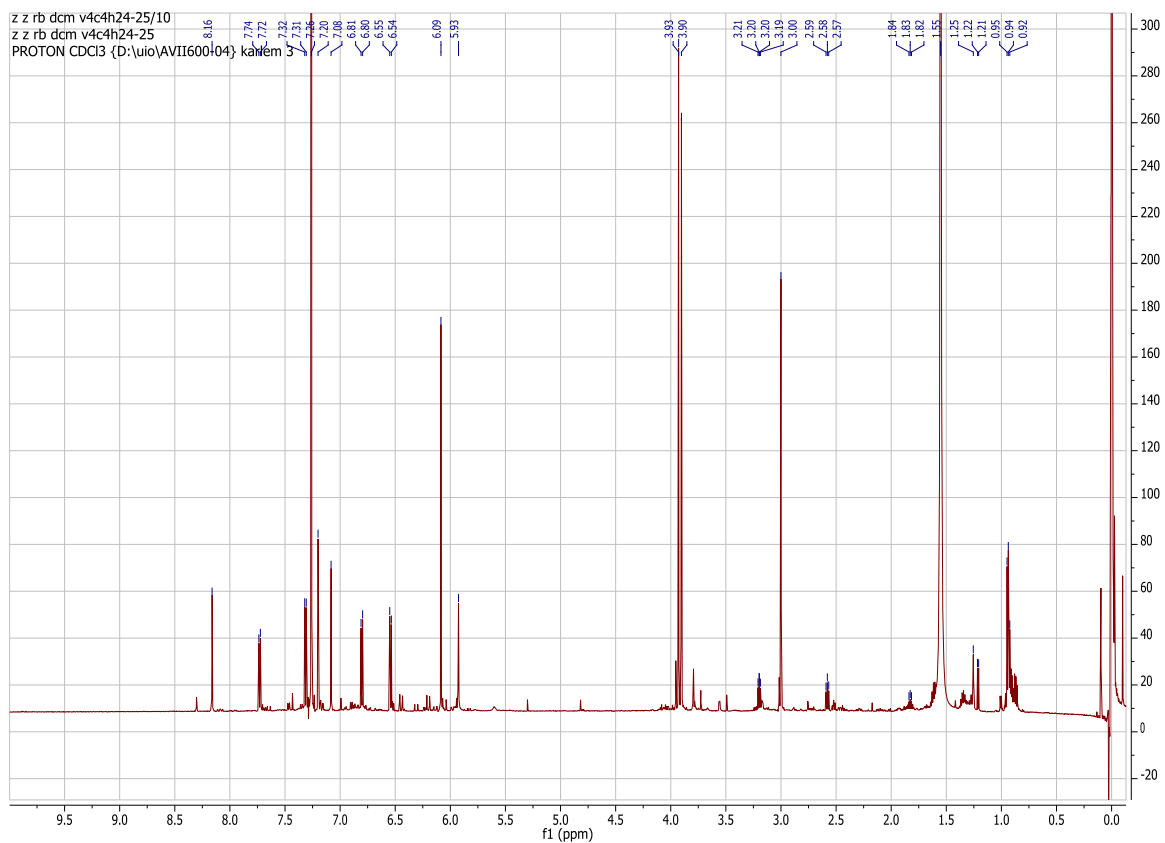
Vedlegg 2.3b:  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter av rotbark MeOH-råekstrakt løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



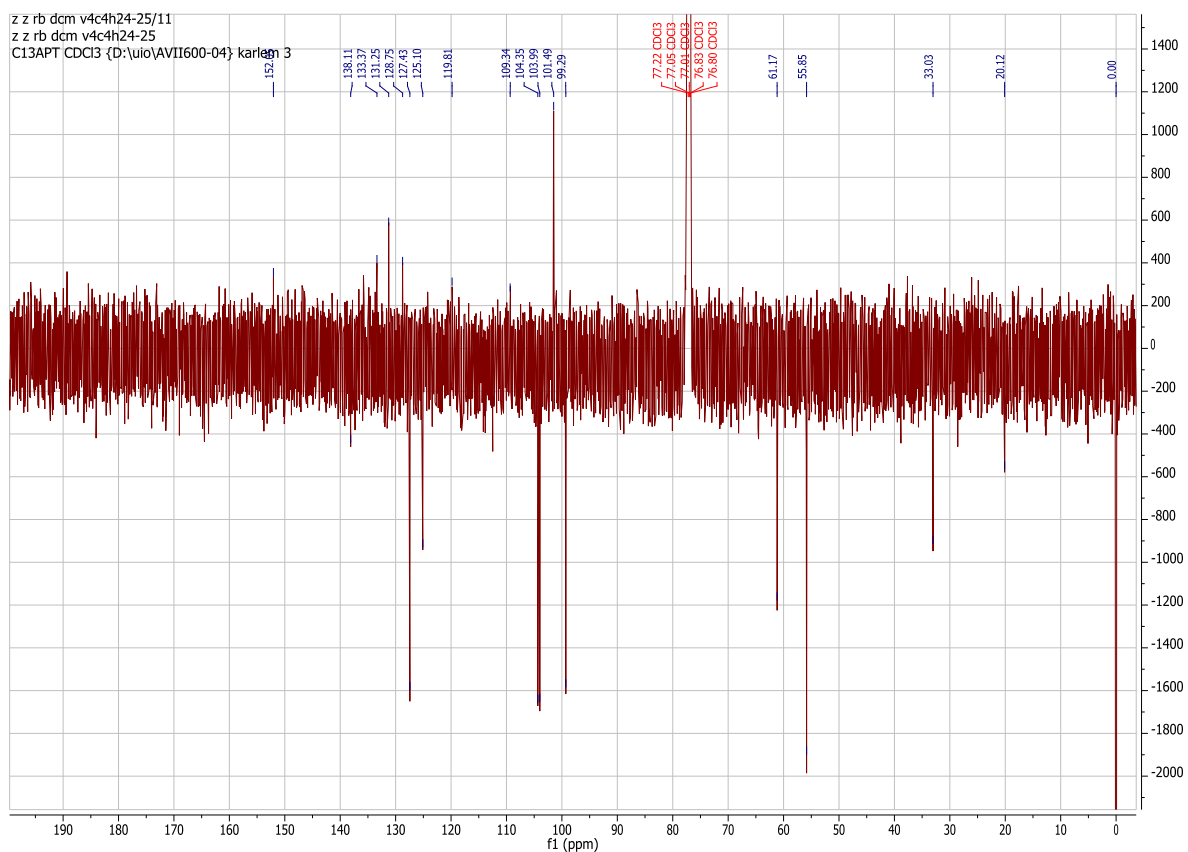
Vedlegg 2.4a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter av stammebark MeOH-råekstrakt løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



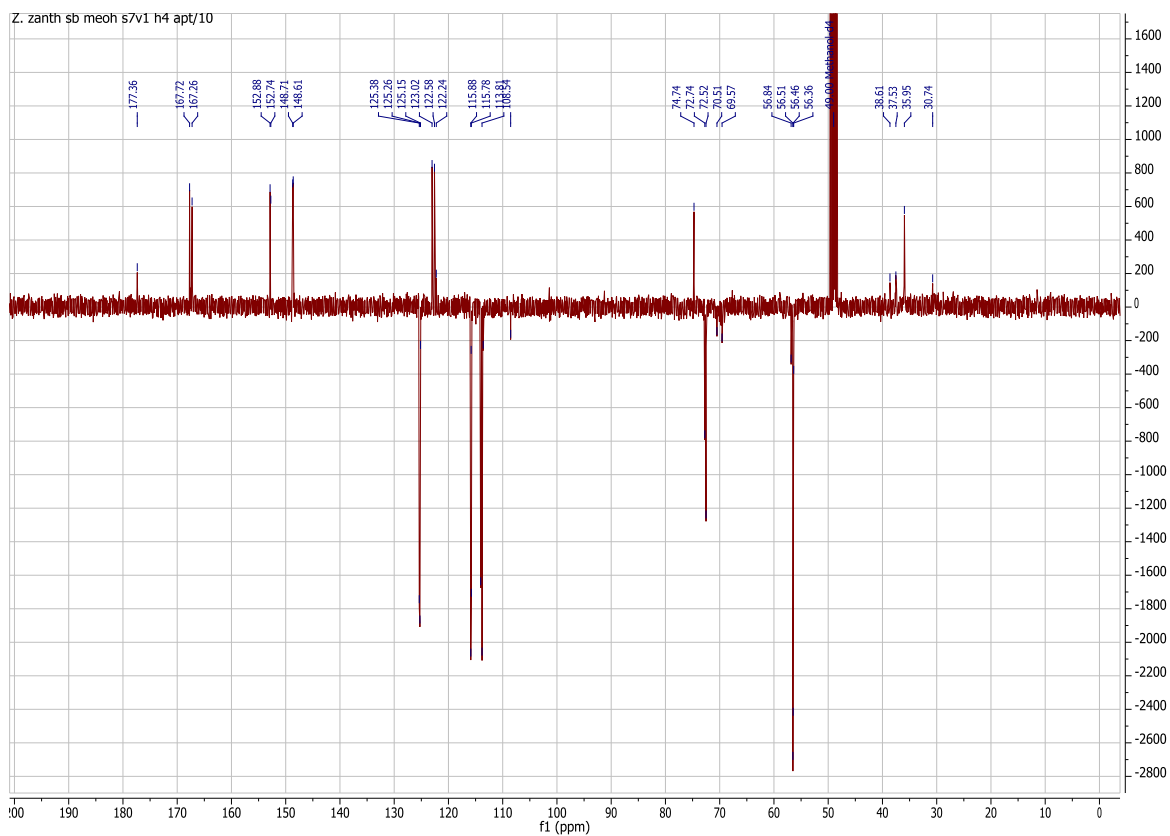
Vedlegg 2.4b:  $^{13}\text{C}$  APT spekter av stammebark MeOH-råekstrakt løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



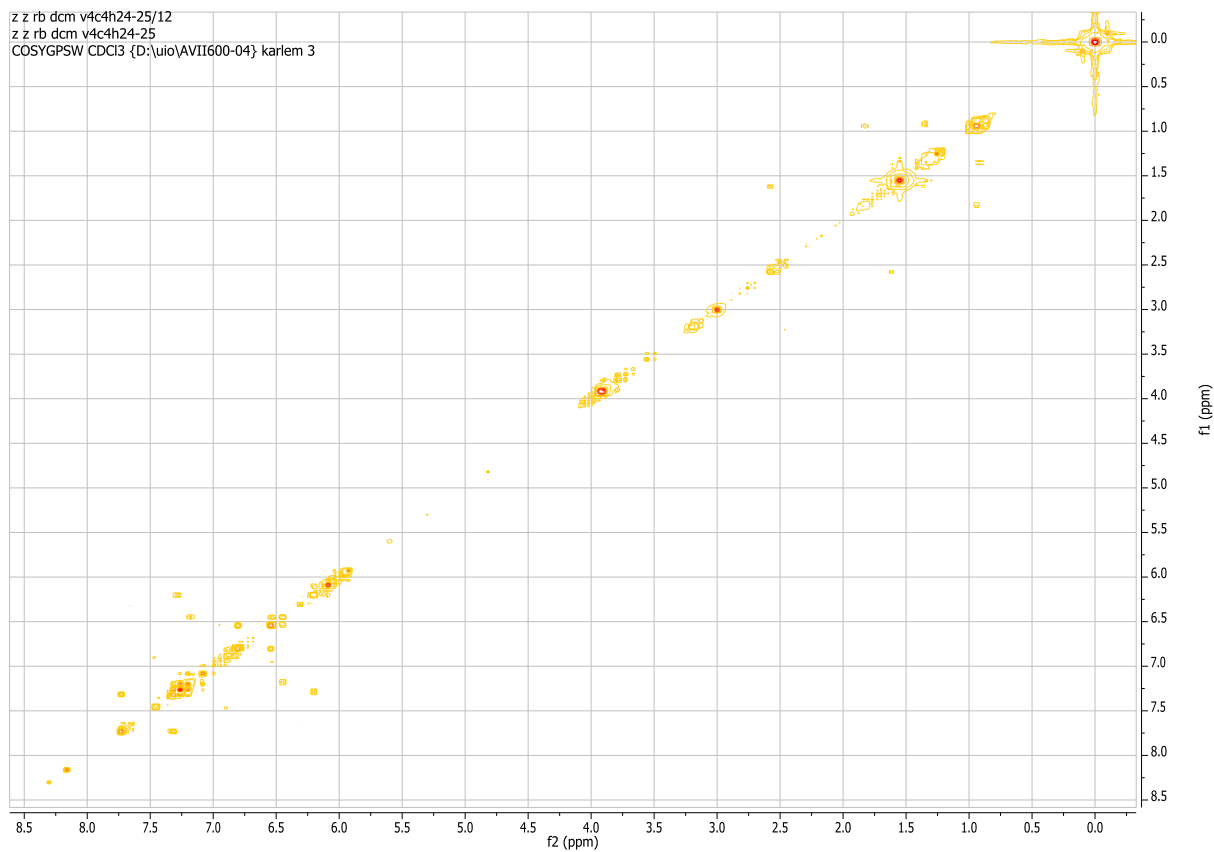
Vedlegg 2.5a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter (600 MHz) av arnottianamid (Rb-dcm-v4c4h11) løst i  $\text{CDCl}_3$ .



Vedlegg 2.5b:  $^{13}\text{C}$  APT spekter (150 MHz) av arnottianamid (Rb-dcm-v4c4h11) løst i  $\text{CDCl}_3$ .

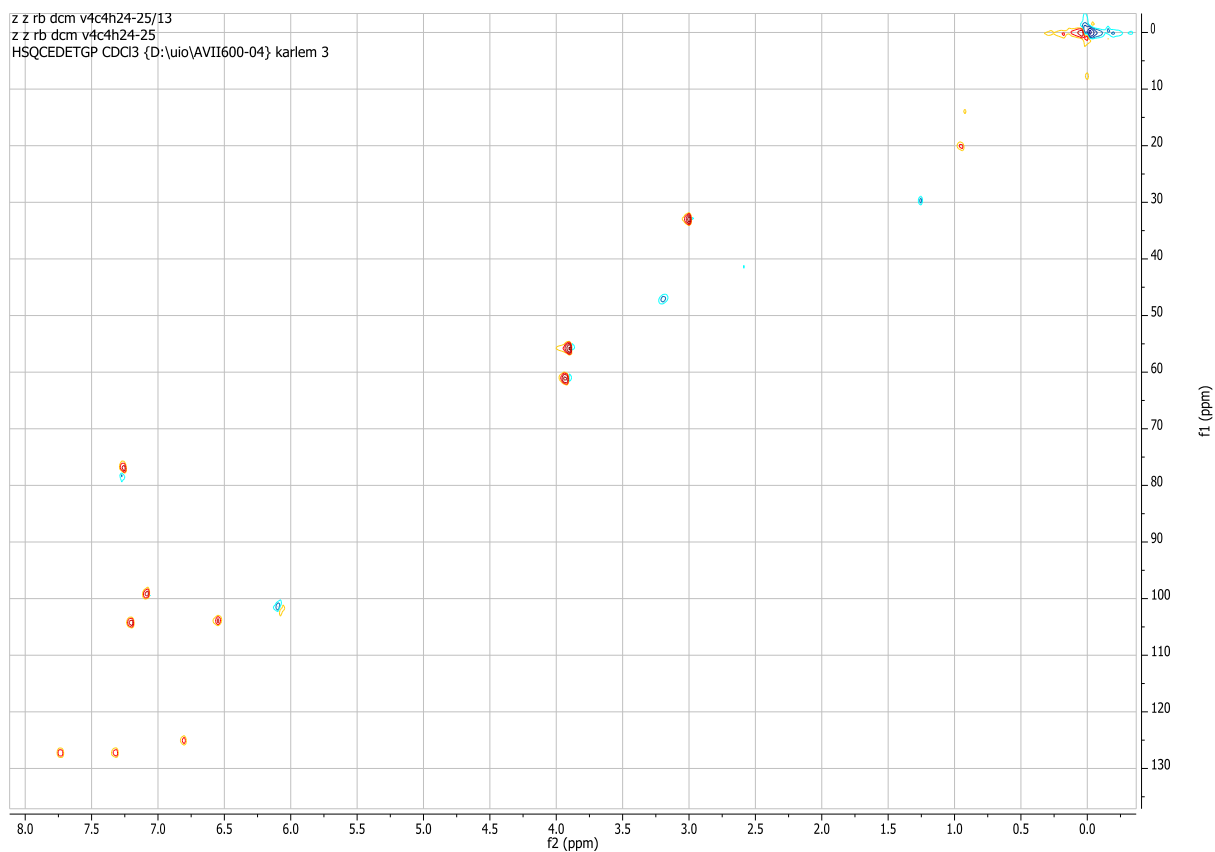


Vedlegg 2.5c:  $^{13}\text{C}$ -APT spekter (100 MHz) av arnottianamid (Rb-dcm-v4c4h11) løst i  $\text{CDCl}_3$ .

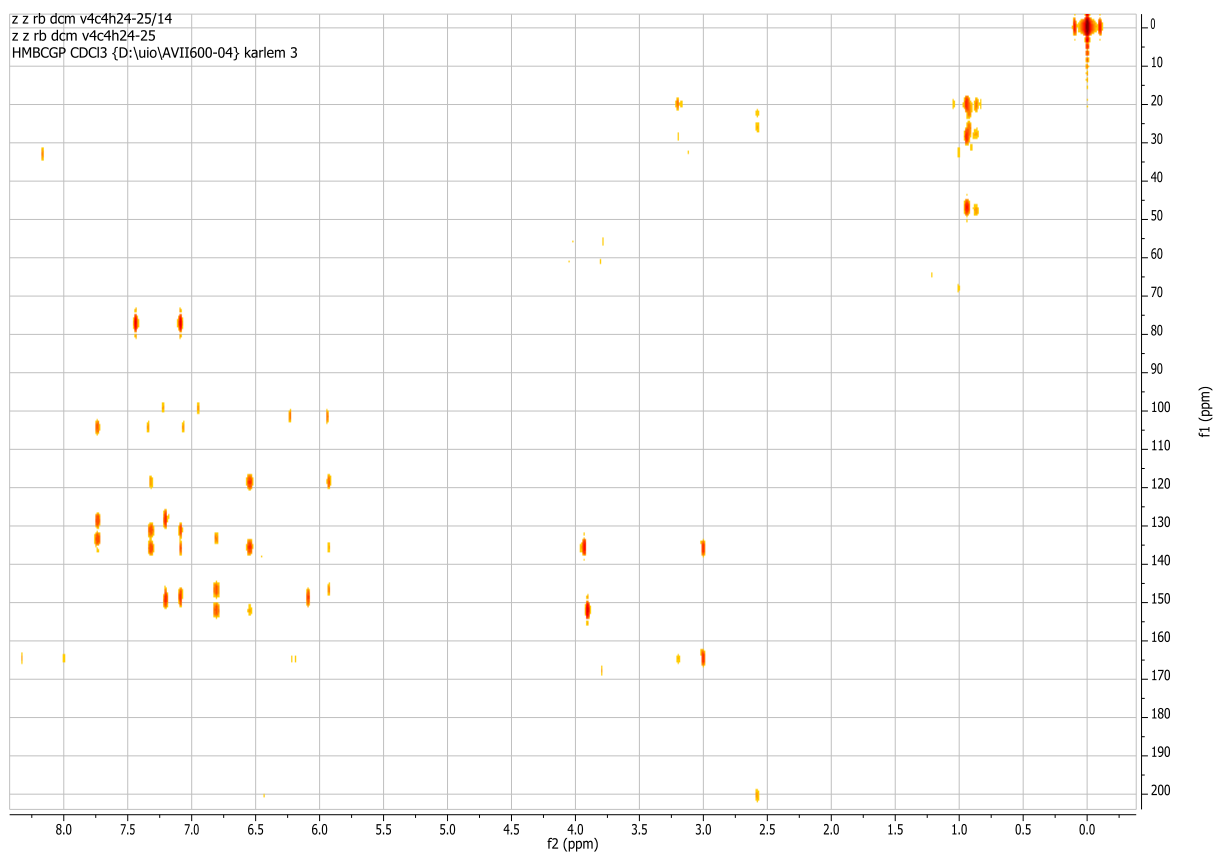


Vedlegg 2.5d: COSY spekter (600 MHz) av arnottianamid (Rb-dcm-v4c4h11) løst i  $\text{CDCl}_3$ .

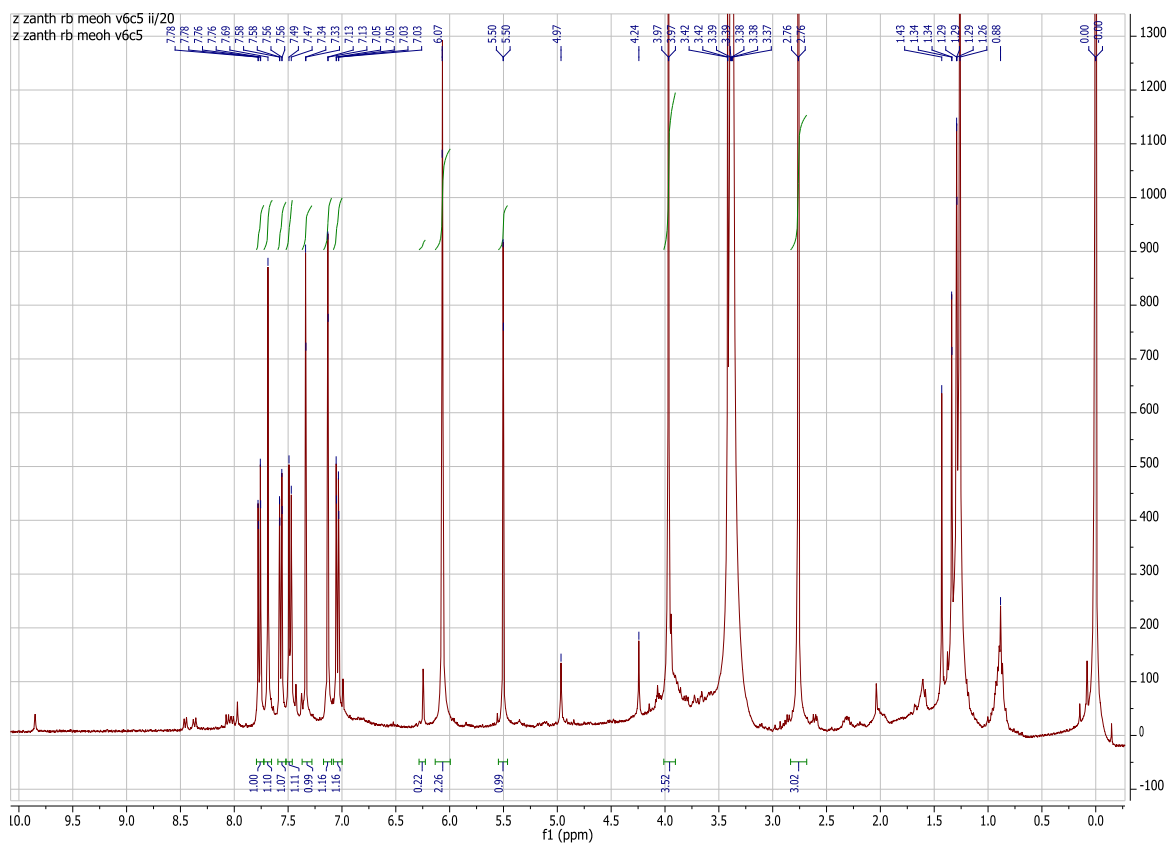




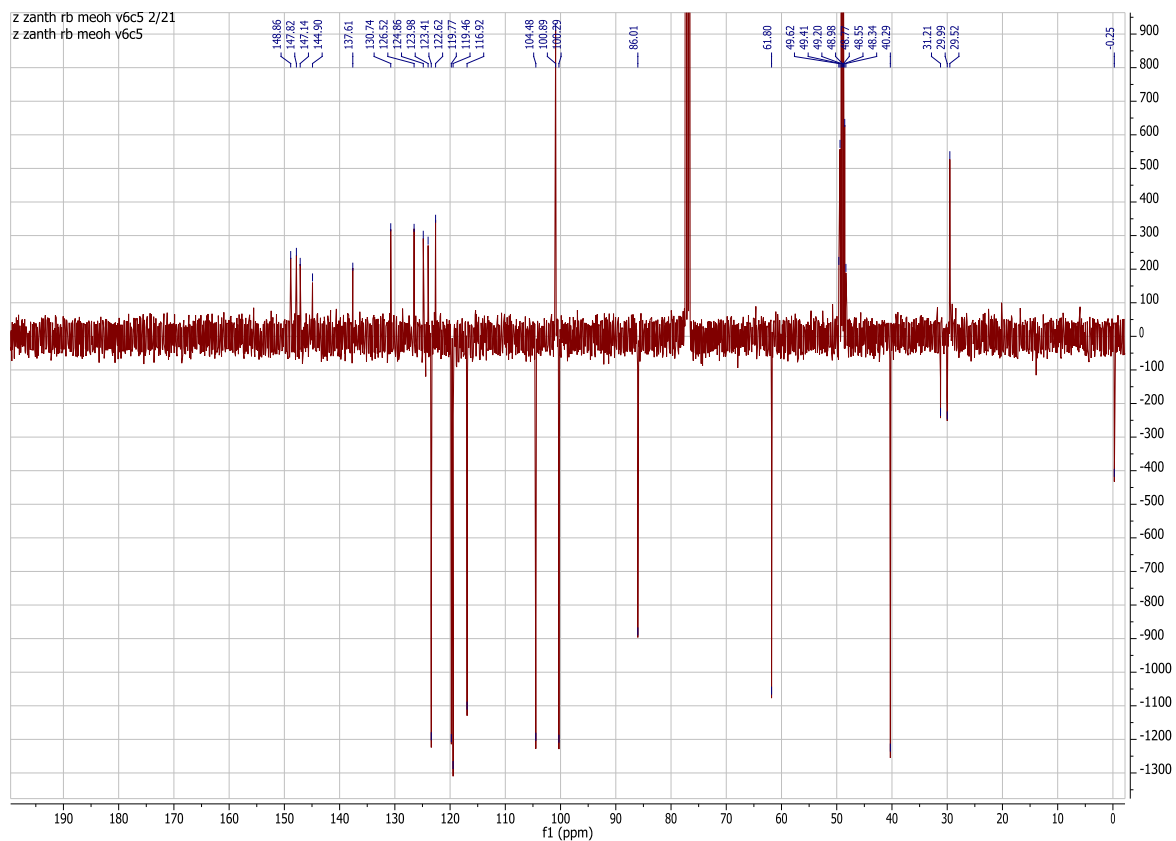
Vedlegg 2.5e: HSQC spekter (600/150 MHz) av arnottianamid (Rb-dcm-v4c4h11) løst i CDCl<sub>3</sub>.



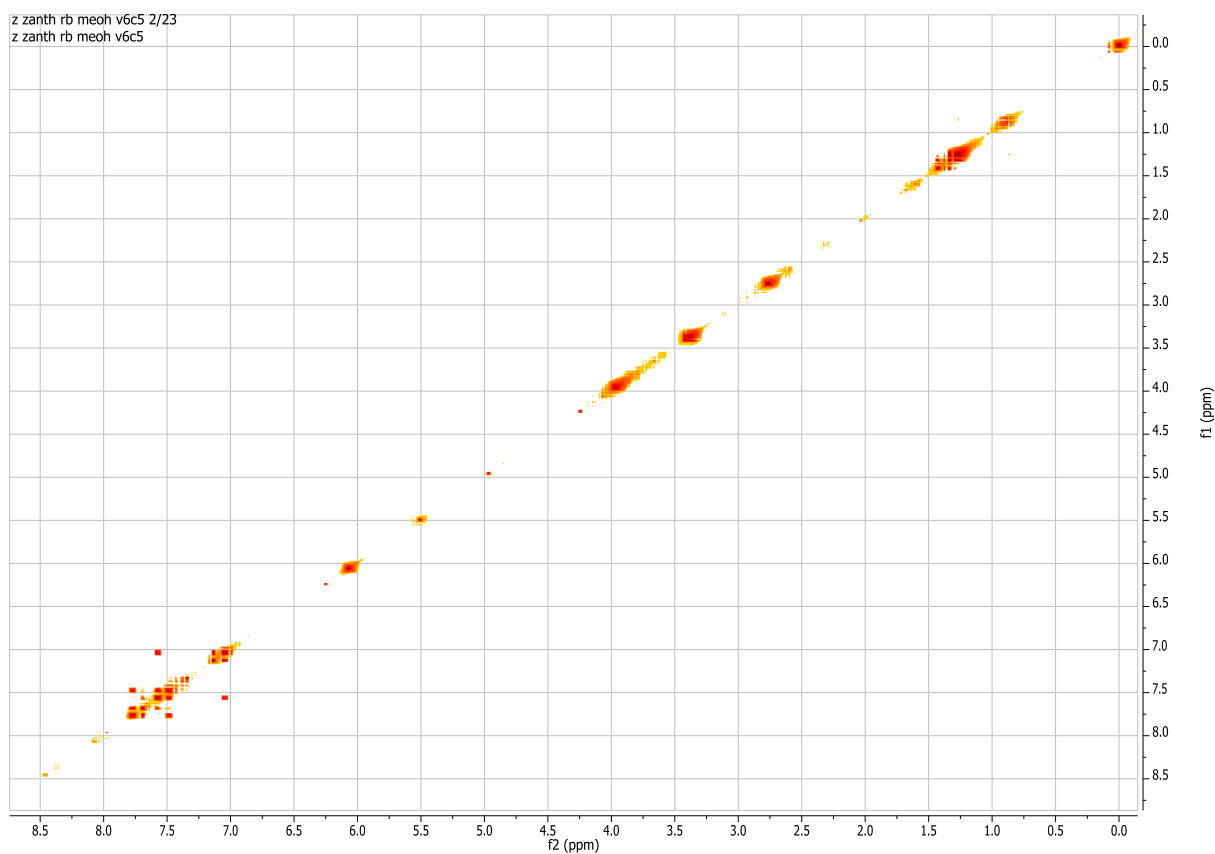
Vedlegg 2.5f: HMBC spekter (600/150 MHz) av arnottianamid (Rb-dcm-v4c4h11) løst i CDCl<sub>3</sub>.



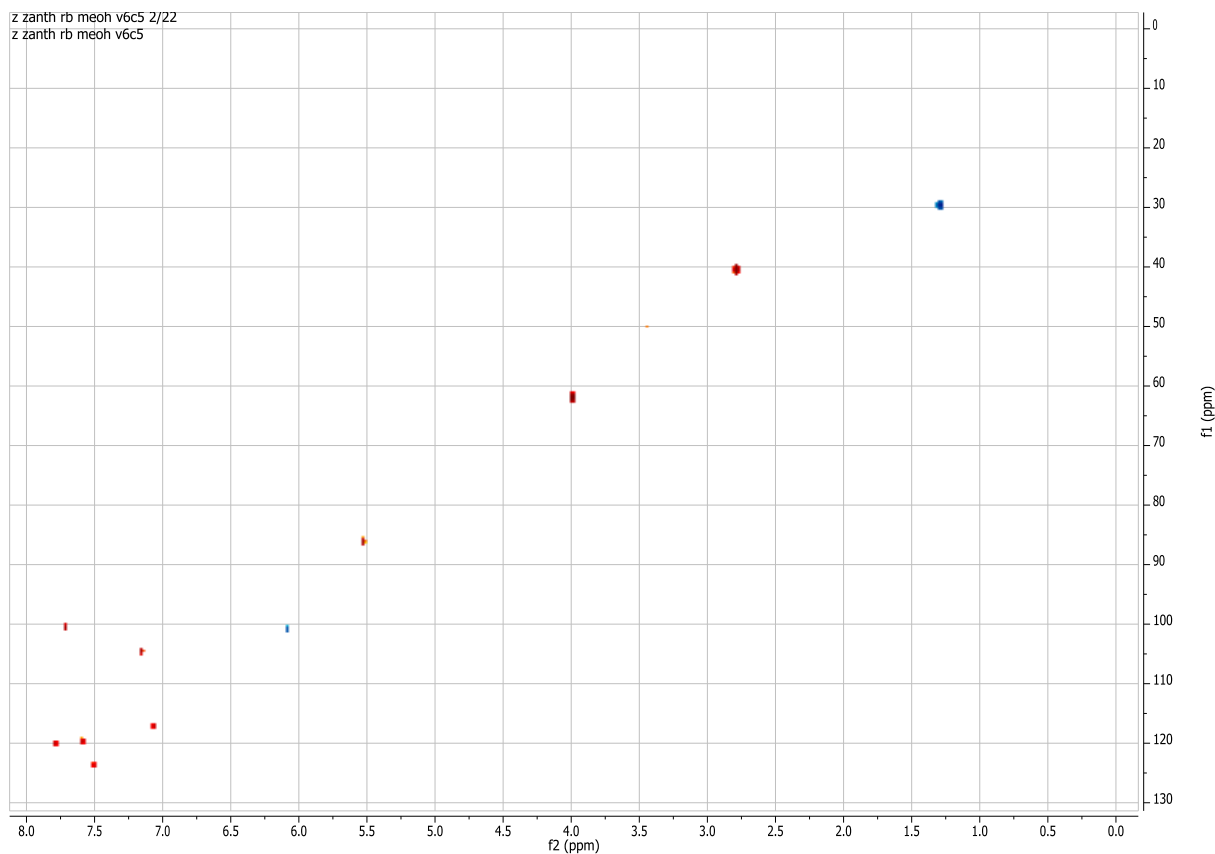
Vedlegg 2.6a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter (400 MHz) av buesgenin (Rb-meoh-v6c5) løst i  $\text{CDCl}_3$ .



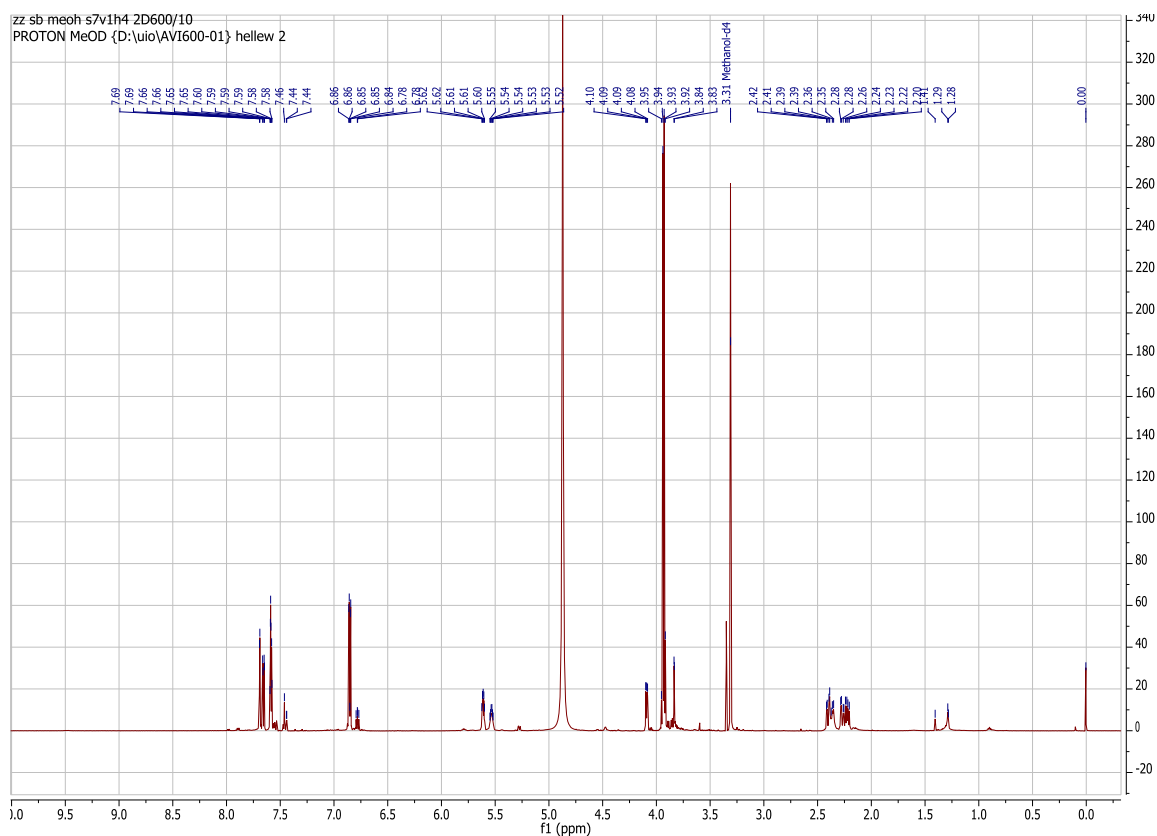
Vedlegg 2.6b:  $^{13}\text{C}$  APT spekter (100 MHz) av buesgenin (Rb-meoh-v6c5) løst i  $\text{CDCl}_3$ .



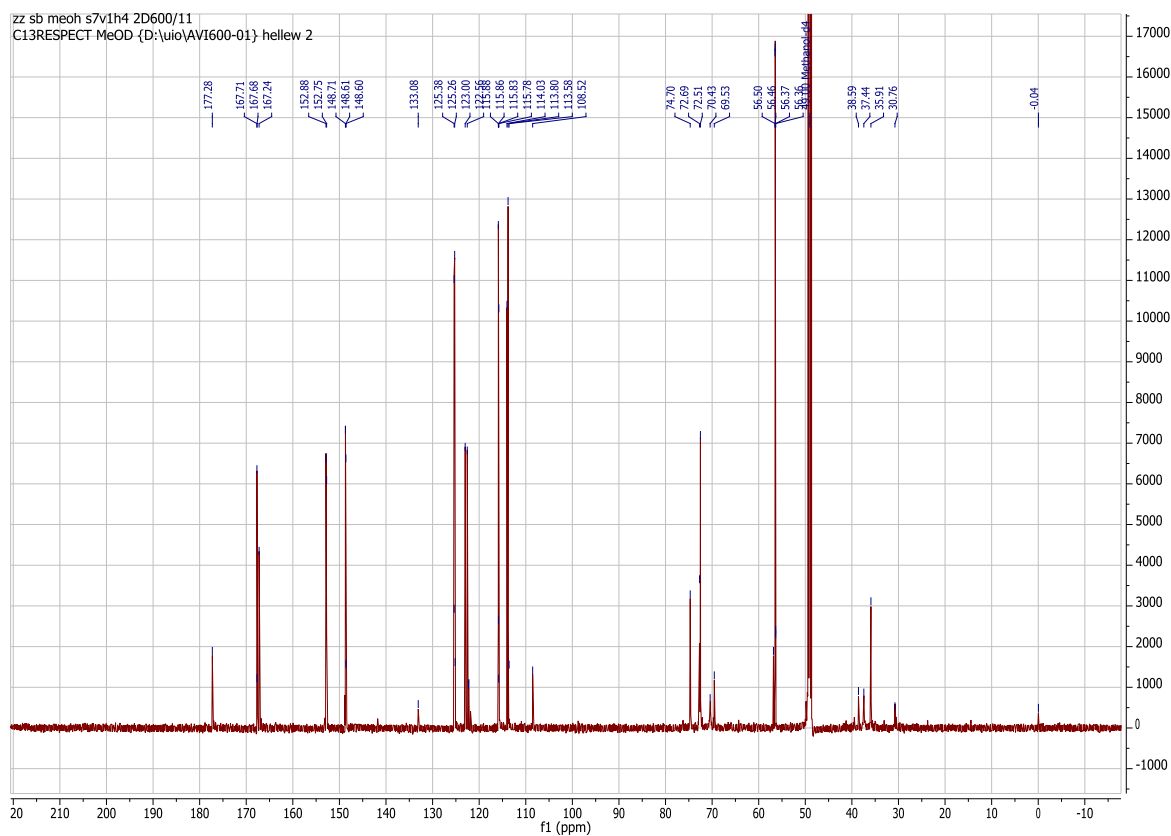
Vedlegg 2.6c: COSY spekter (400 MHz) av buesgenin (Rb-meoh-v6c5) løst i  $\text{CDCl}_3$ .



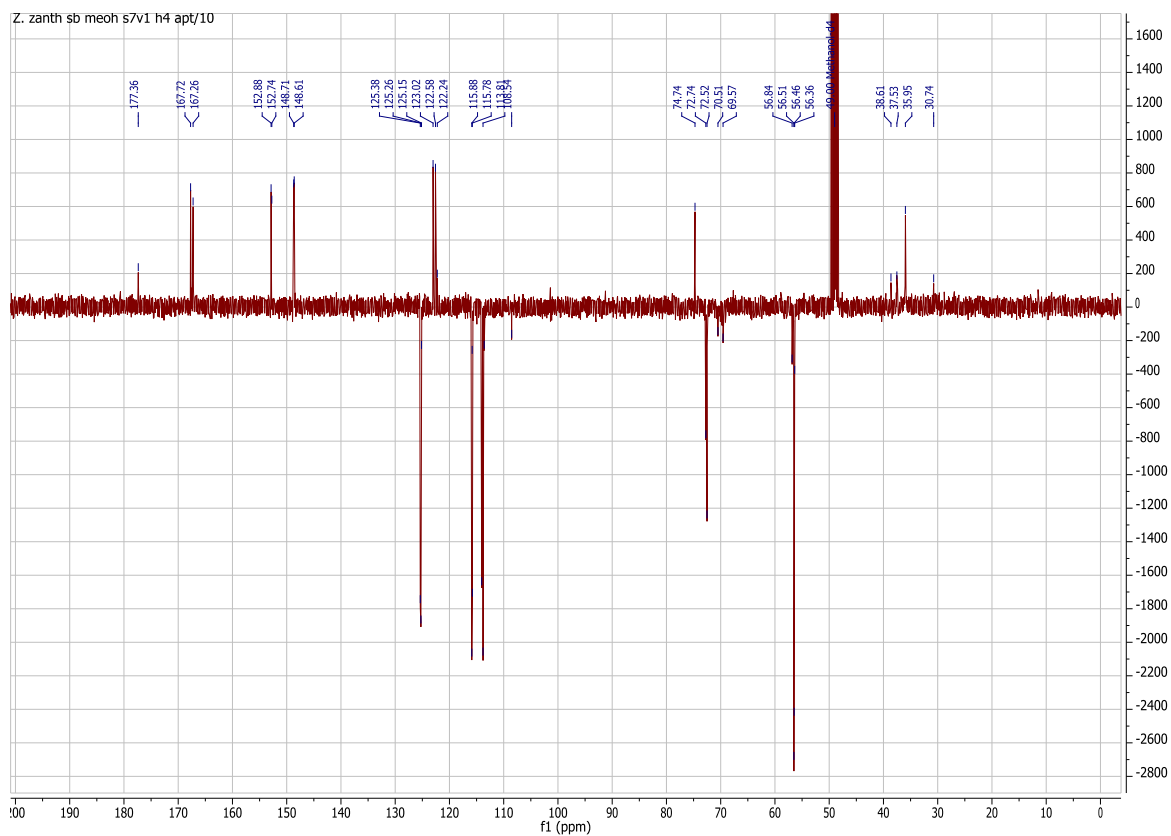
Vedlegg 2.6d: HSQC spekter (400/100 MHz) av buesgenin (Rb-meoh-v6c5) løst i  $\text{CDCl}_3$ .



Vedlegg 2.7a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter (600 MHz) av burkinabin B (Sb-meoh-s7v1h4) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



Vedlegg 2.7b:  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter (150 MHz) av burkinabin B (Sb-meoh-s7v1h4) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



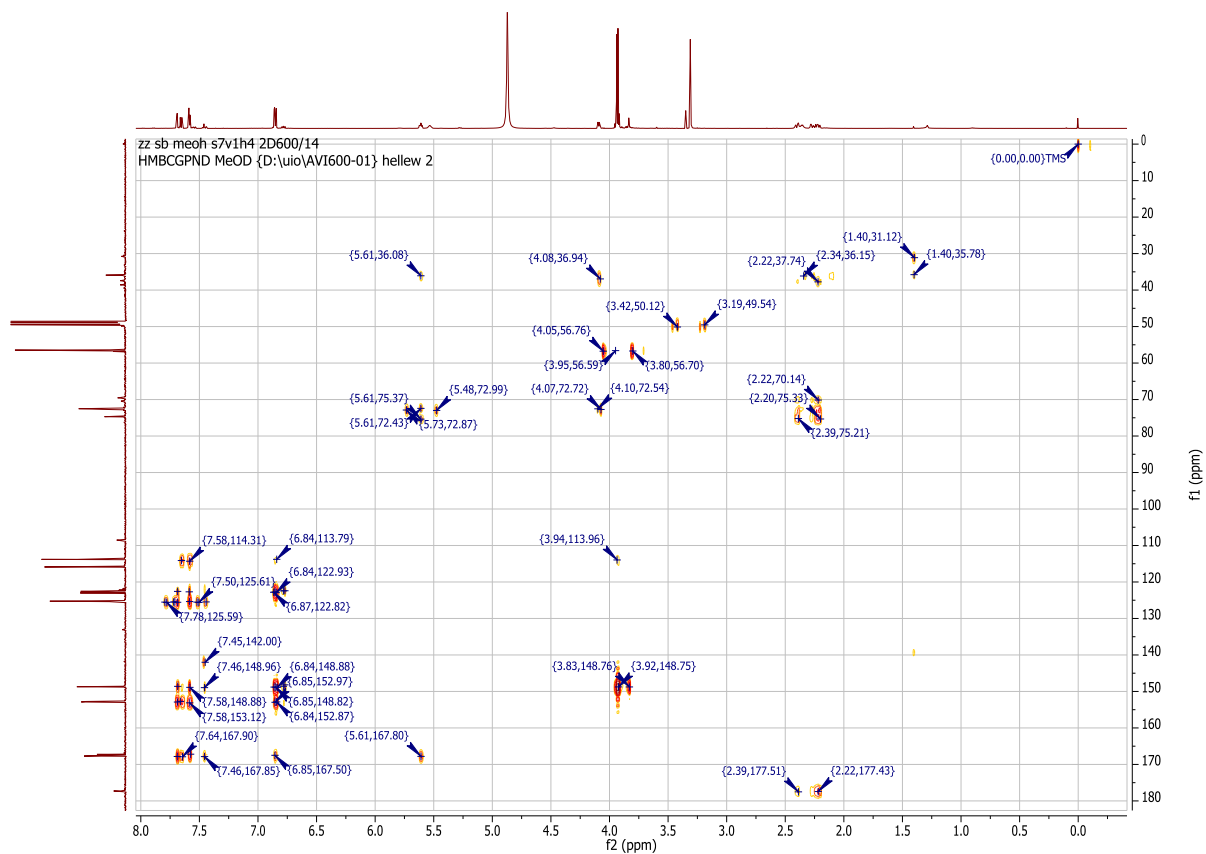
Vedlegg 2.7c:  $^{13}\text{C}$ -APT spekter (100 MHz) av burkinabin B (Sb-meoh-s7v1h4) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



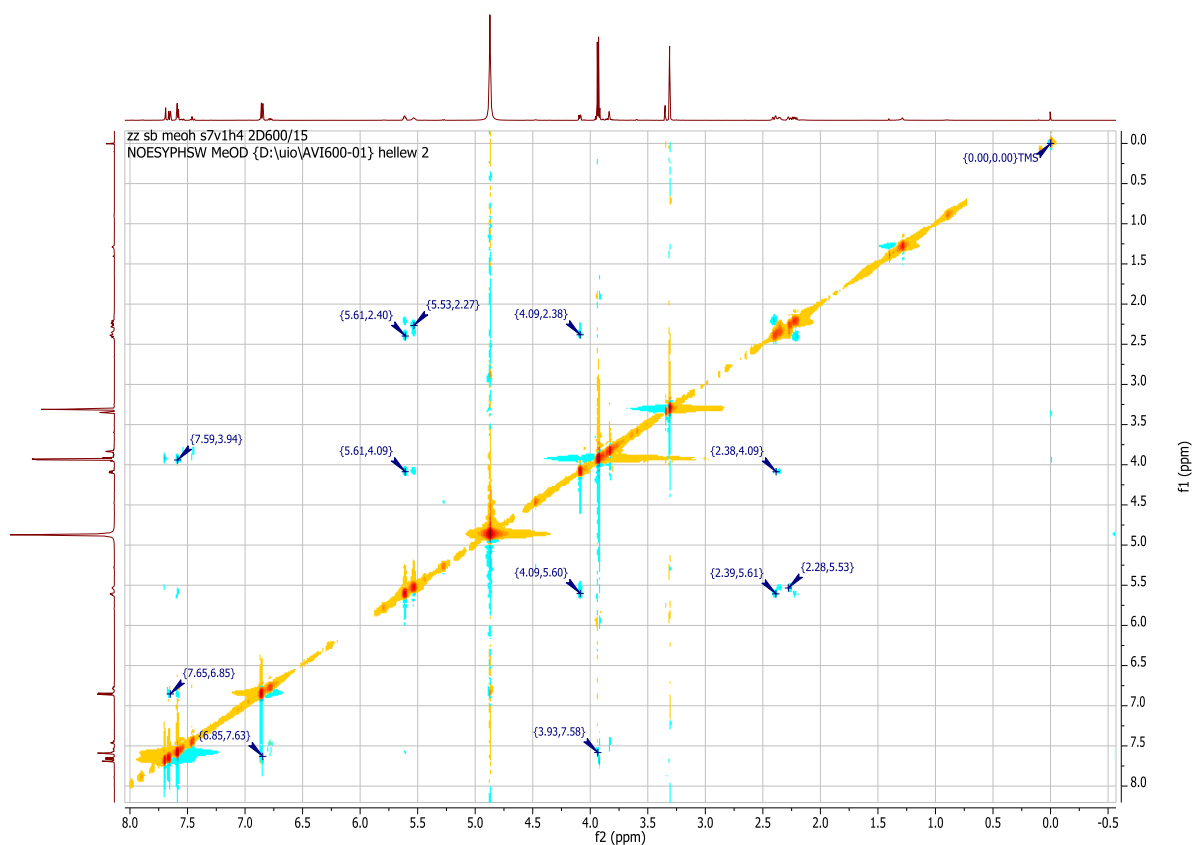
Vedlegg 2.7d: COSY spekter (600 MHz) av burkinabin B (Sb-meoh-s7v1h4) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



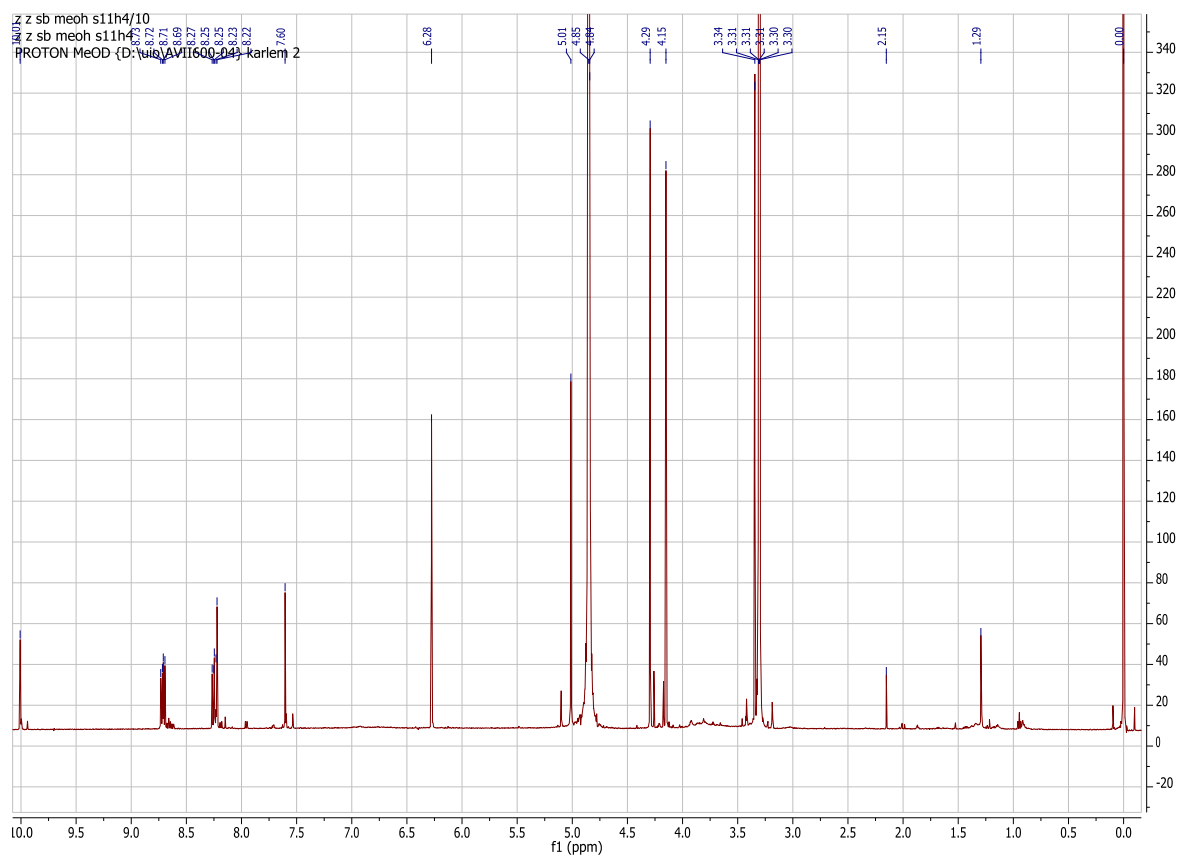
Vedlegg 2.7e: HSQC spekter (600/150 MHz) av burkinabin B (Sb-meoh-s7v1h4) løst i CD<sub>3</sub>OD.



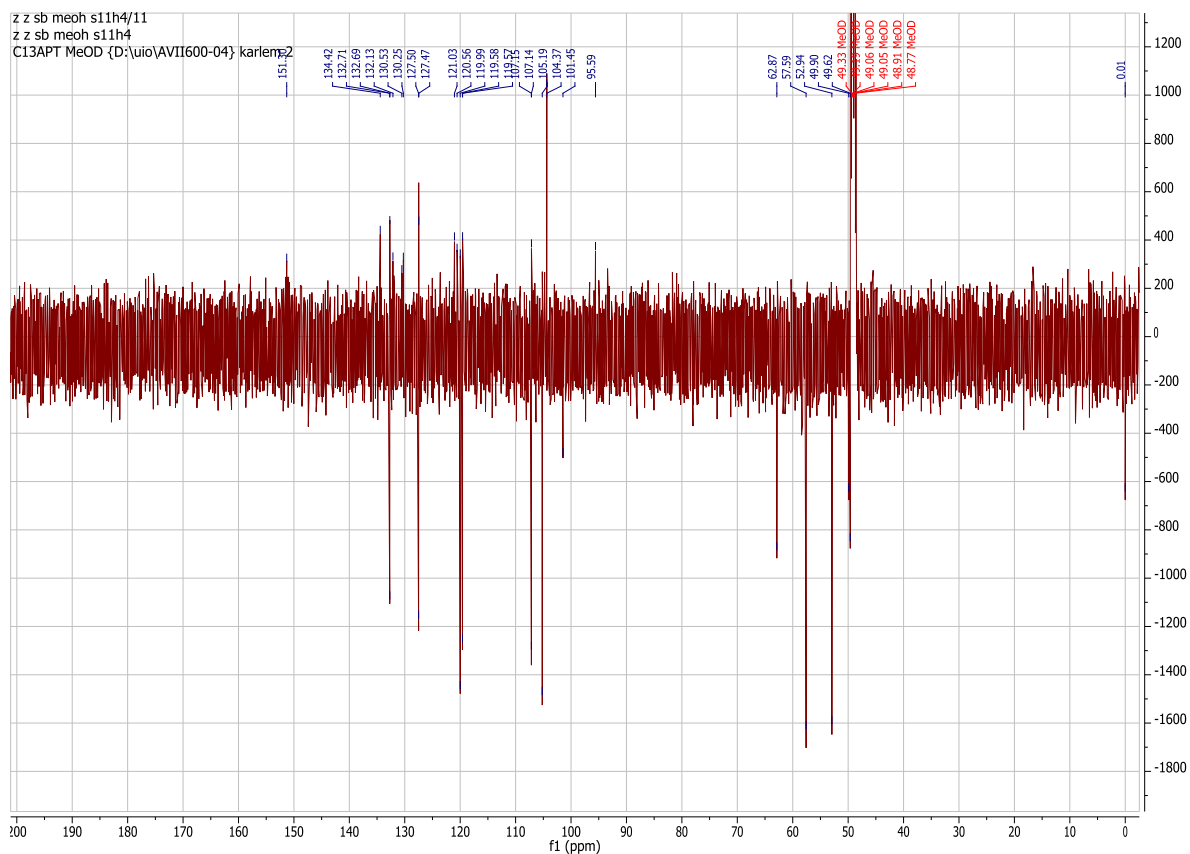
Vedlegg 2.7f: HMBC spekter (600/150 MHz) av burkinabin B (Sb-meoh-s7v1h4) løst i CD<sub>3</sub>OD.



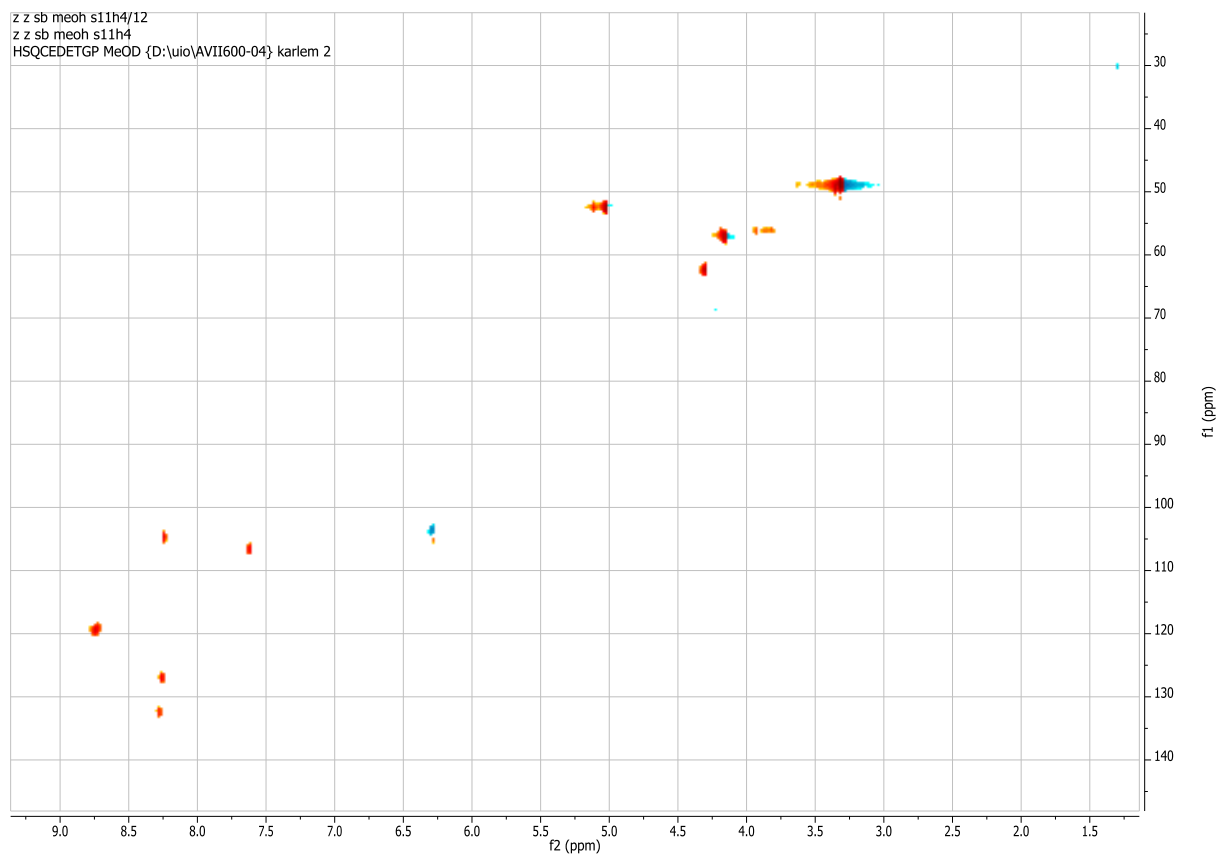
Vedlegg 2.7g: NOESY spekter (600 MHz) av burkinabin B (Sb-meoh-s7v1h4) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



Vedlegg 2.8a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter (600 MHz) av chelerythrin (Sb-meohs11h4) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

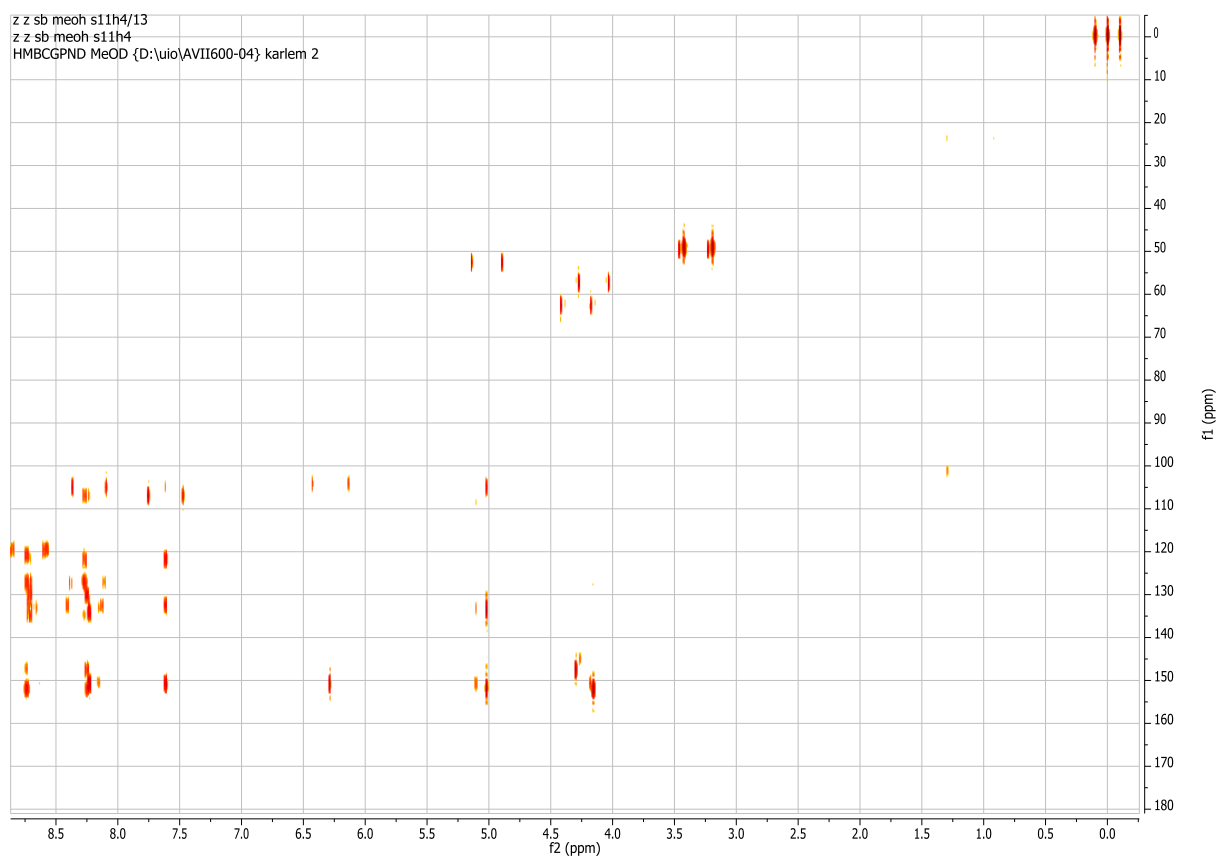


Vedlegg 2.8b:  $^{13}\text{C}$  APT spekter (150 MHz) av chelerythrin (Sb-meohs11h4) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

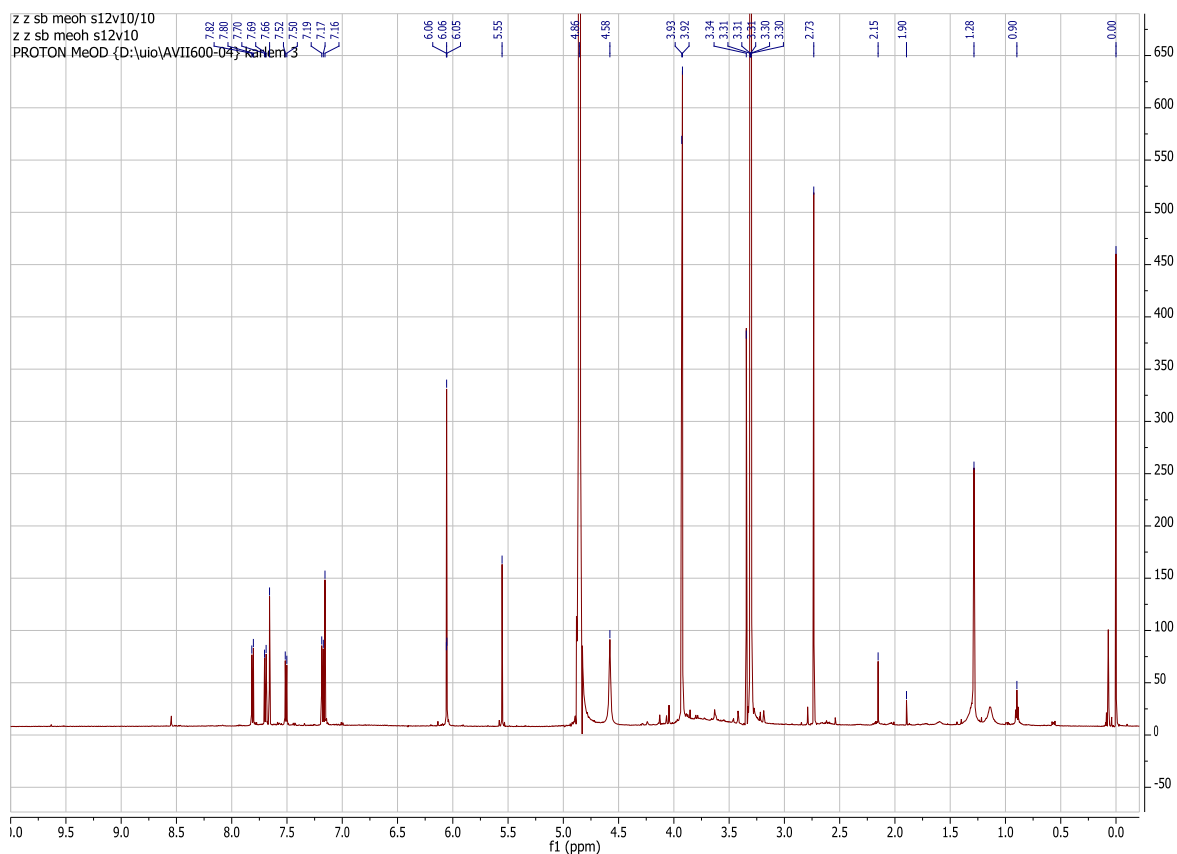


Vedlegg 2.8c: HSQC spekter (600/150 MHz) av chelerythrin (Sb-meohs11h4) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

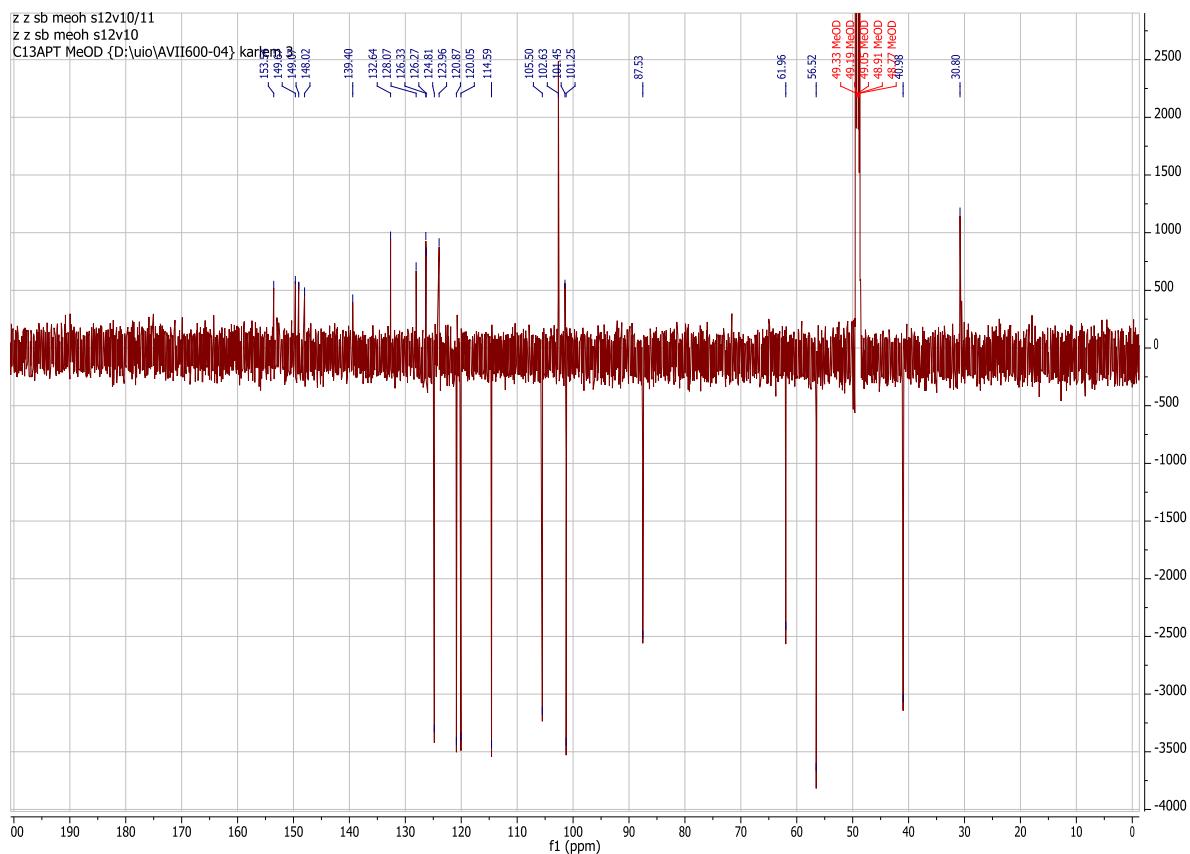




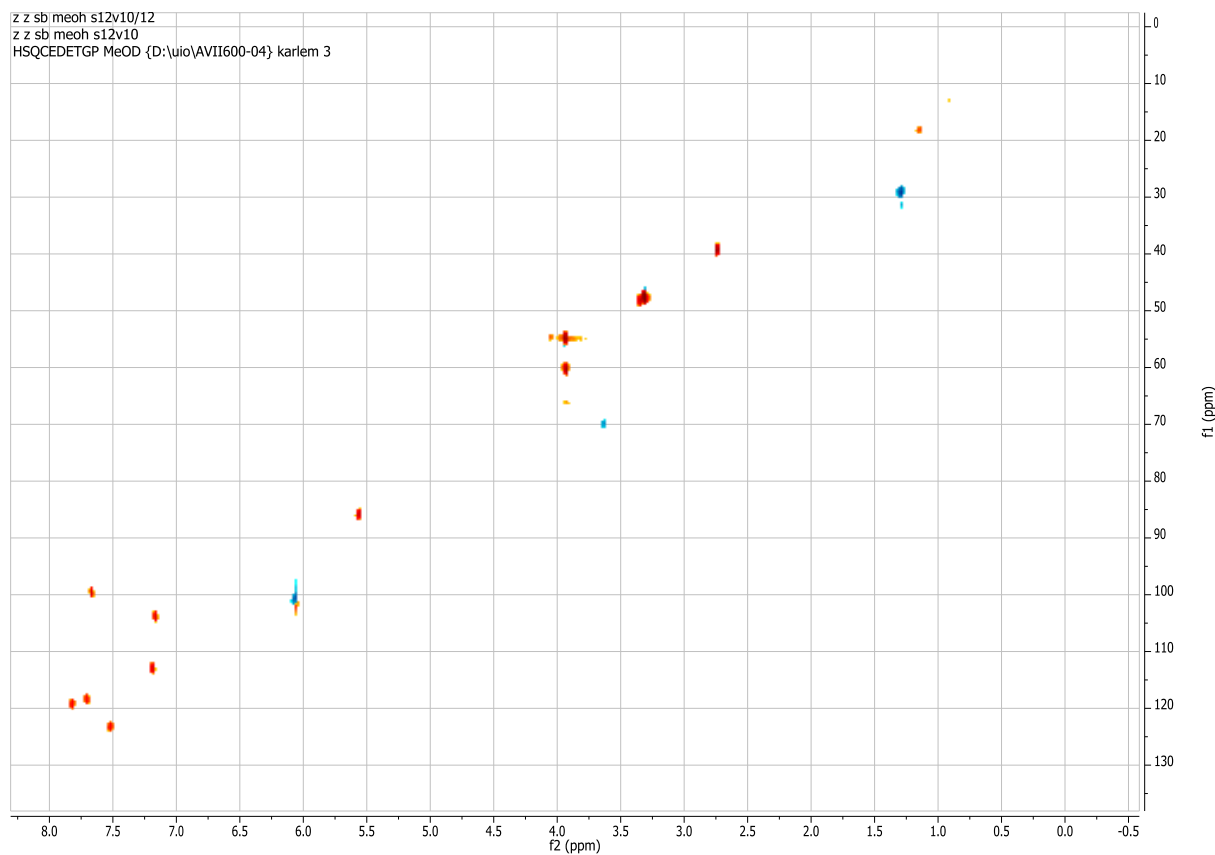
Vedlegg 2.8d: HMBC spekter (600/150 MHz) av chelerythrin (Sb-meohs11h4) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



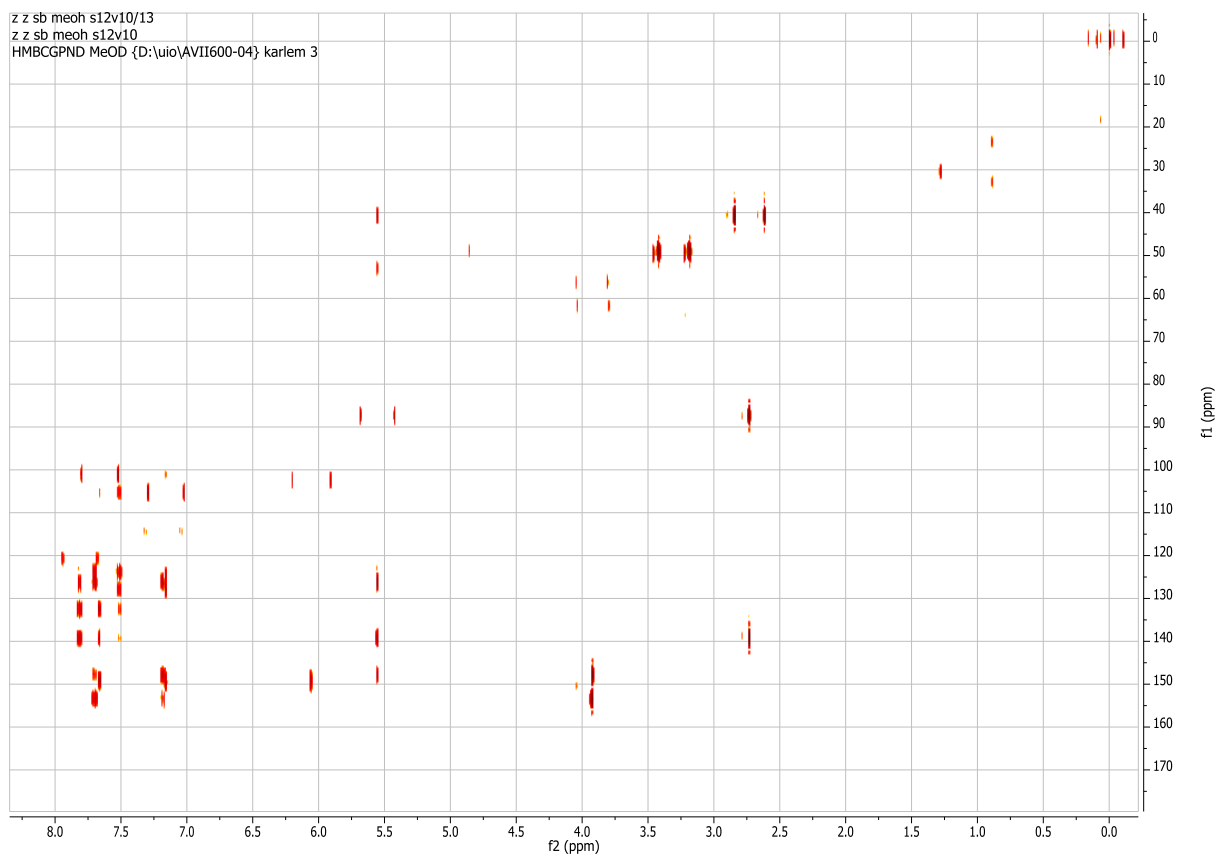
Vedlegg 2.9a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter (600 MHz) av 6-hydroksydihydrochelerytrin (Sb-meoh-s12v10) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



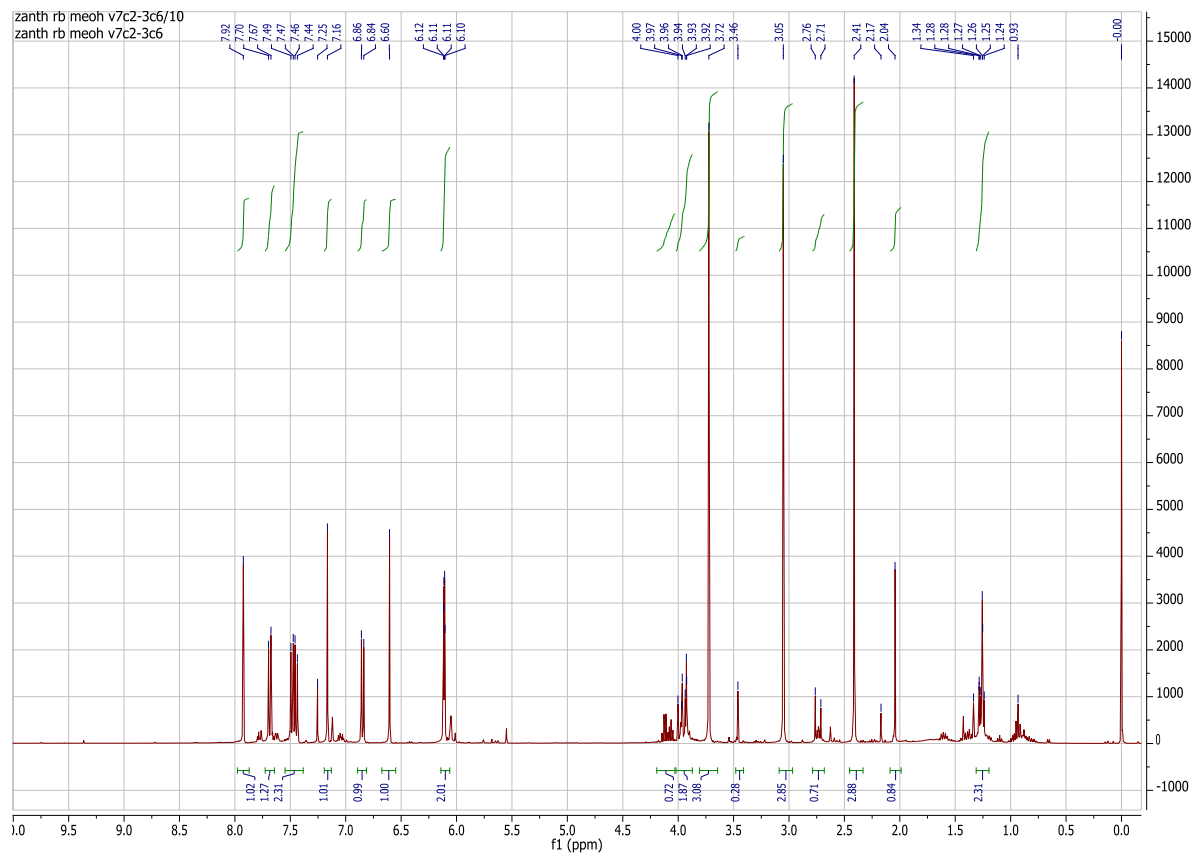
Vedlegg 2.9b:  $^{13}\text{C}$  APT spekter (150 MHz) av 6-hydroksydihydrochelerytrin (Sb-meoh-s12v10) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



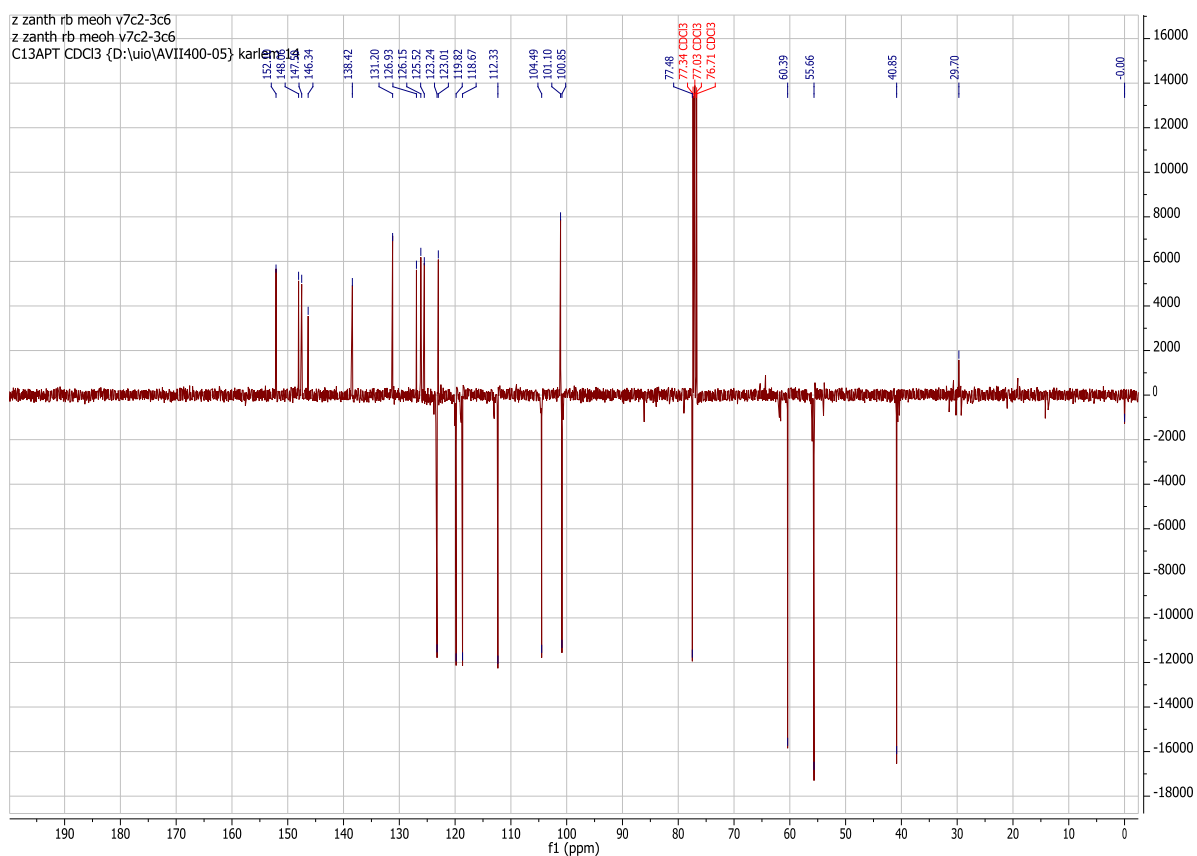
Vedlegg 2.9c: HSQC spekter (600/150 MHz) av 6-hydroksydihydrochelerytrin (Sb-meoh-s12v10) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



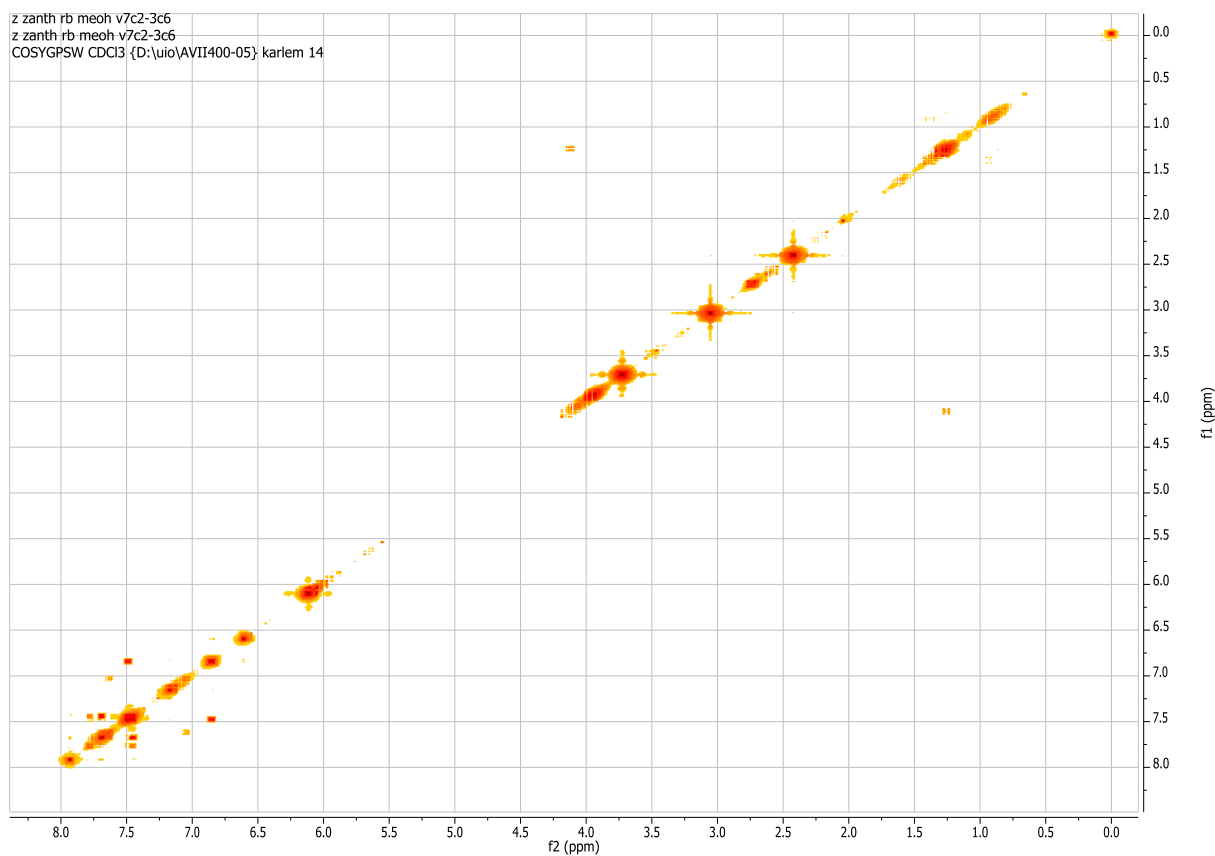
Vedlegg 2.9d: HMBC spekter (600/150 MHz) av 6-hydroksydihydrochelytryrin (Sb-meoh-s12v10) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



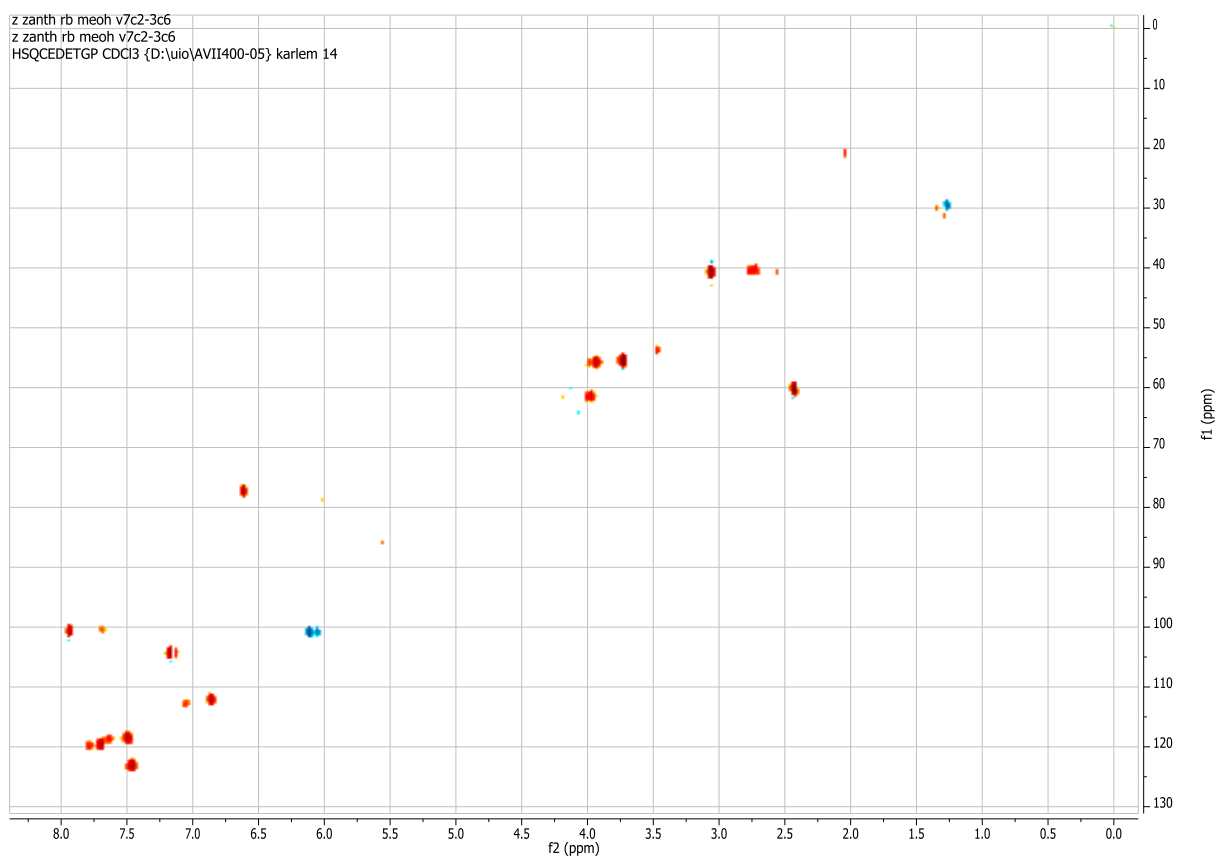
Vedlegg 2.10a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter (400 MHz) av bis-dihydrochelytrynyleter (Rb-meoh-v7c2+3c6) løst i  $\text{CDCl}_3$ .



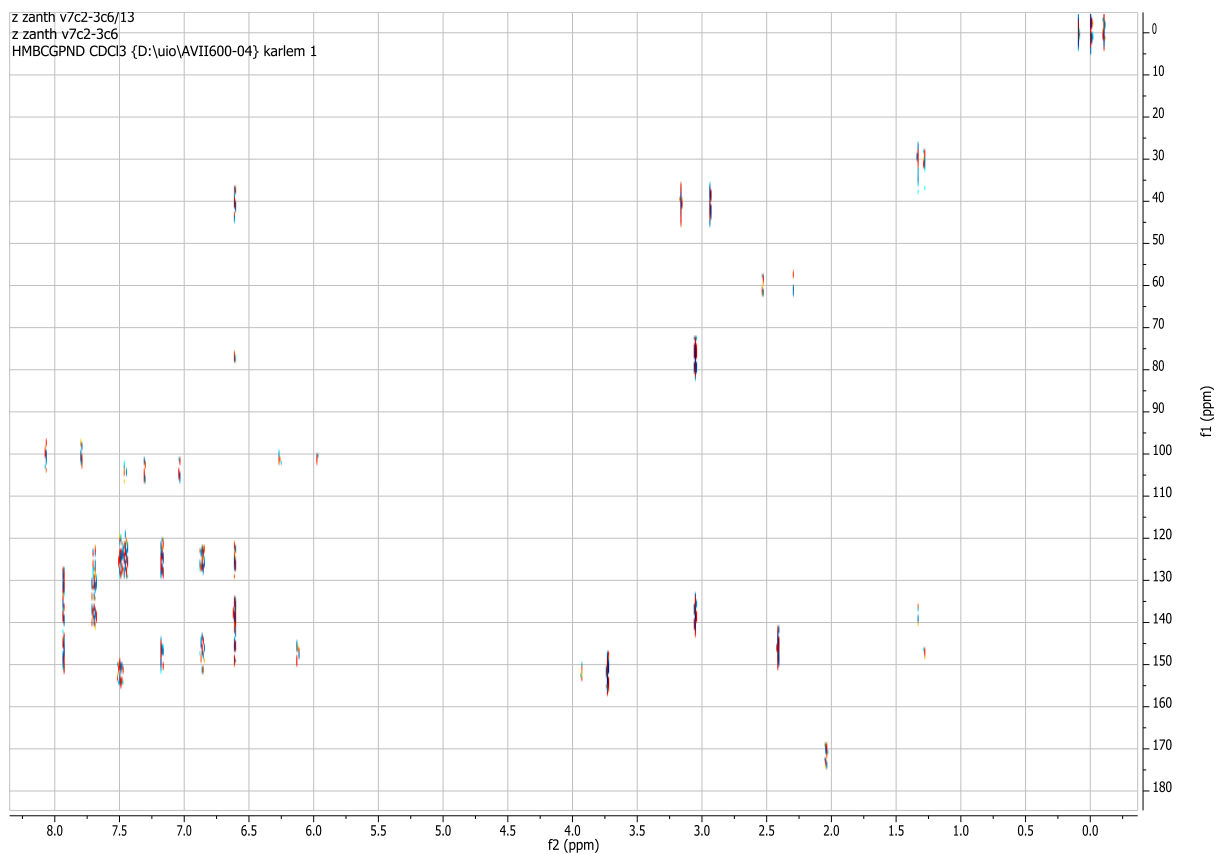
Vedlegg 2.10b: <sup>13</sup>C APT spekter (100 MHz) av bis-dihydrochelerythrinyleter (Rb-meoh-v7c2+3c6) løst i CDCl<sub>3</sub>.



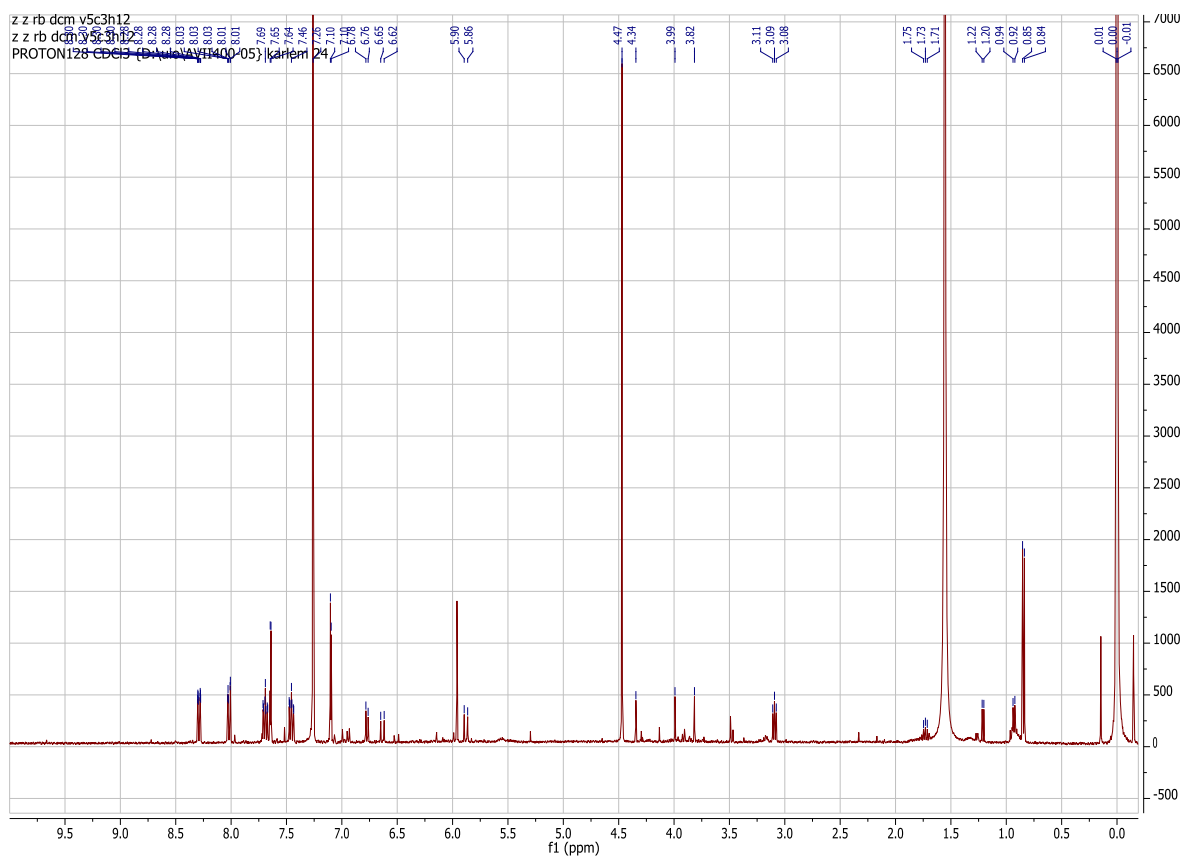
Vedlegg 2.10c: COSY spekter (400 MHz) av bis-dihydrochelerythrinyleter (Rb-meoh-v7c2+3c6) løst i CDCl<sub>3</sub>.



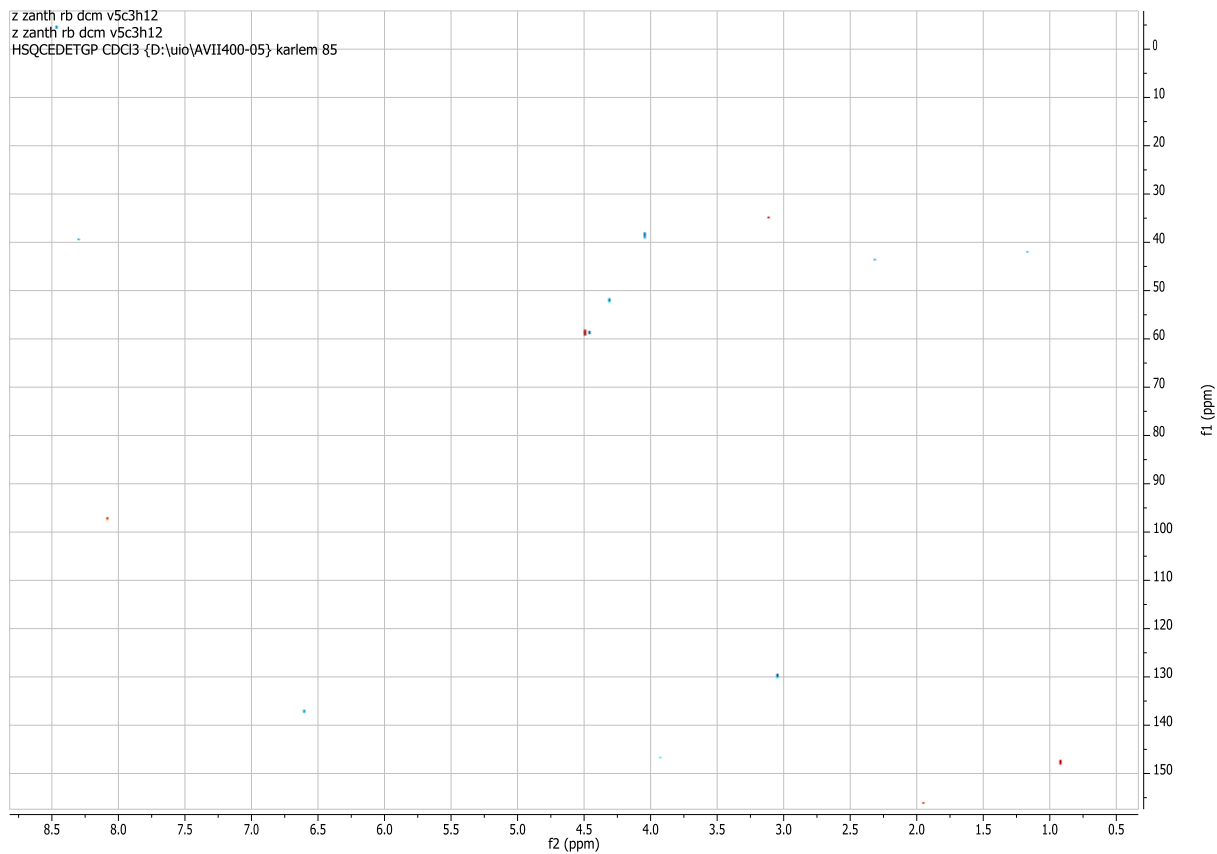
Vedlegg 2.10d: HSQC spekter (400/100 MHz) av bis-dihydrochelerythrinyleter (Rb-meoh-v7c2+3c6) løst i CDCl<sub>3</sub>.



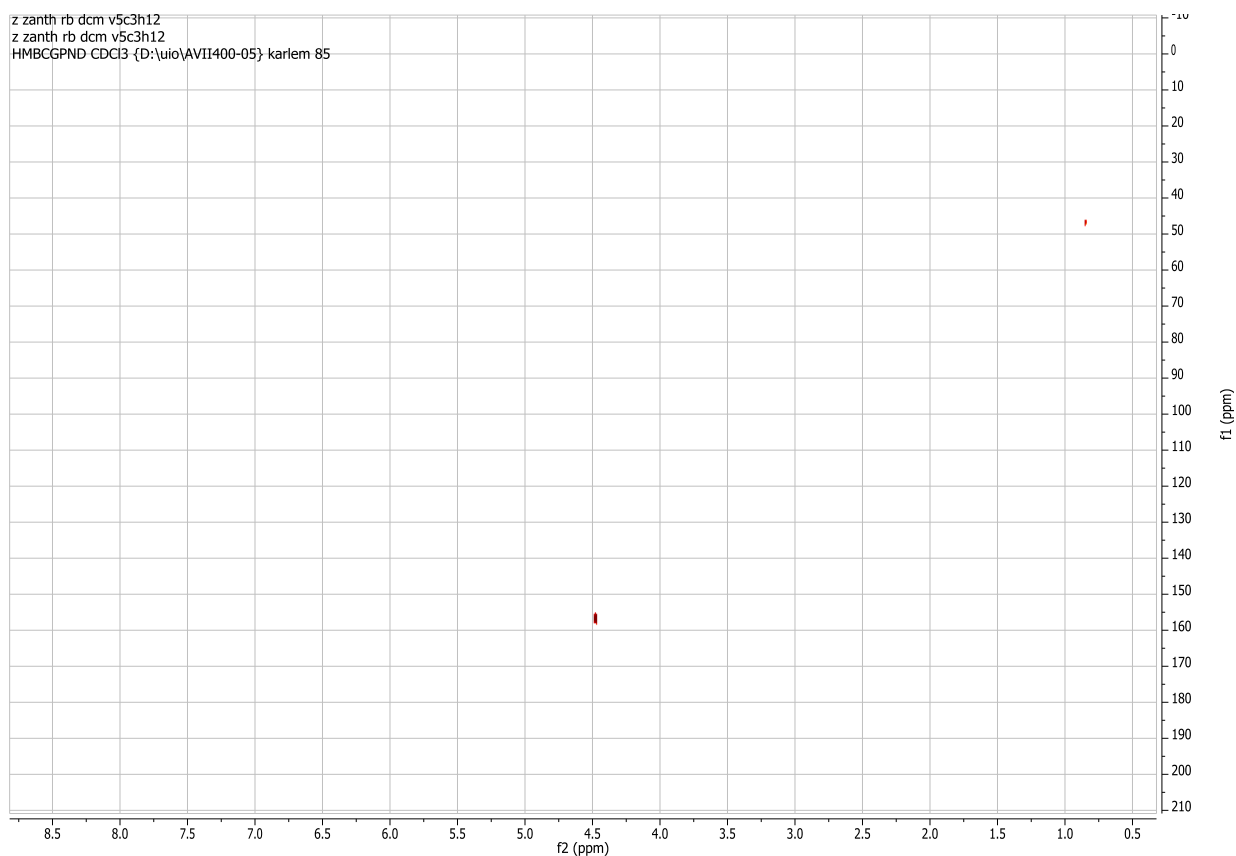
Vedlegg 2.10e: HMBC spekter (600/150 MHz) av bis-dihydrochelerythrinyleter (Rb-meoh-v7c2+3c6) løst i CDCl<sub>3</sub>.



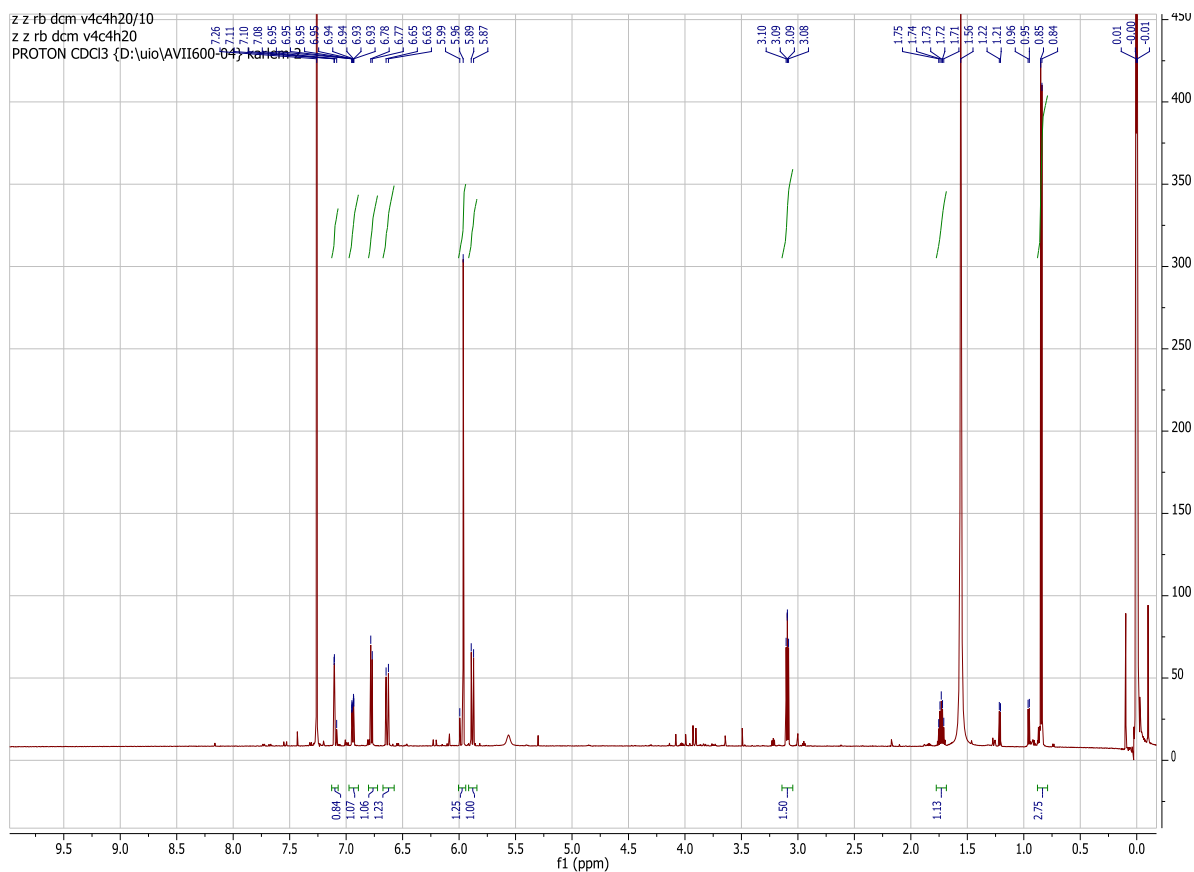
Vedlegg 2.11a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter (400 MHz) av diktamnin (Rb-dcm-v5c3h4) løst i  $\text{CDCl}_3$ .



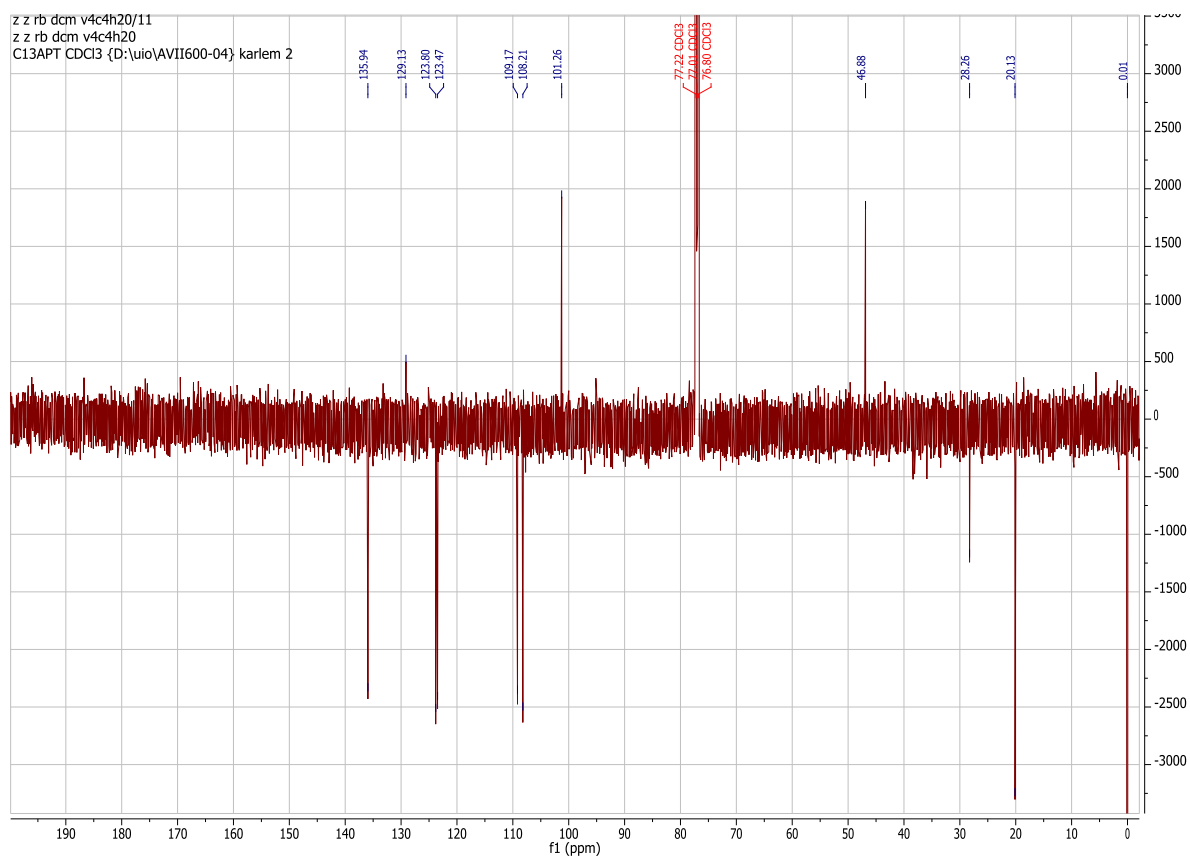
Vedlegg 2.11b: HSQC spekter (400/100 MHz) av diktamnin (Rb-dcm-v5c3h4) løst i  $\text{CDCl}_3$ .



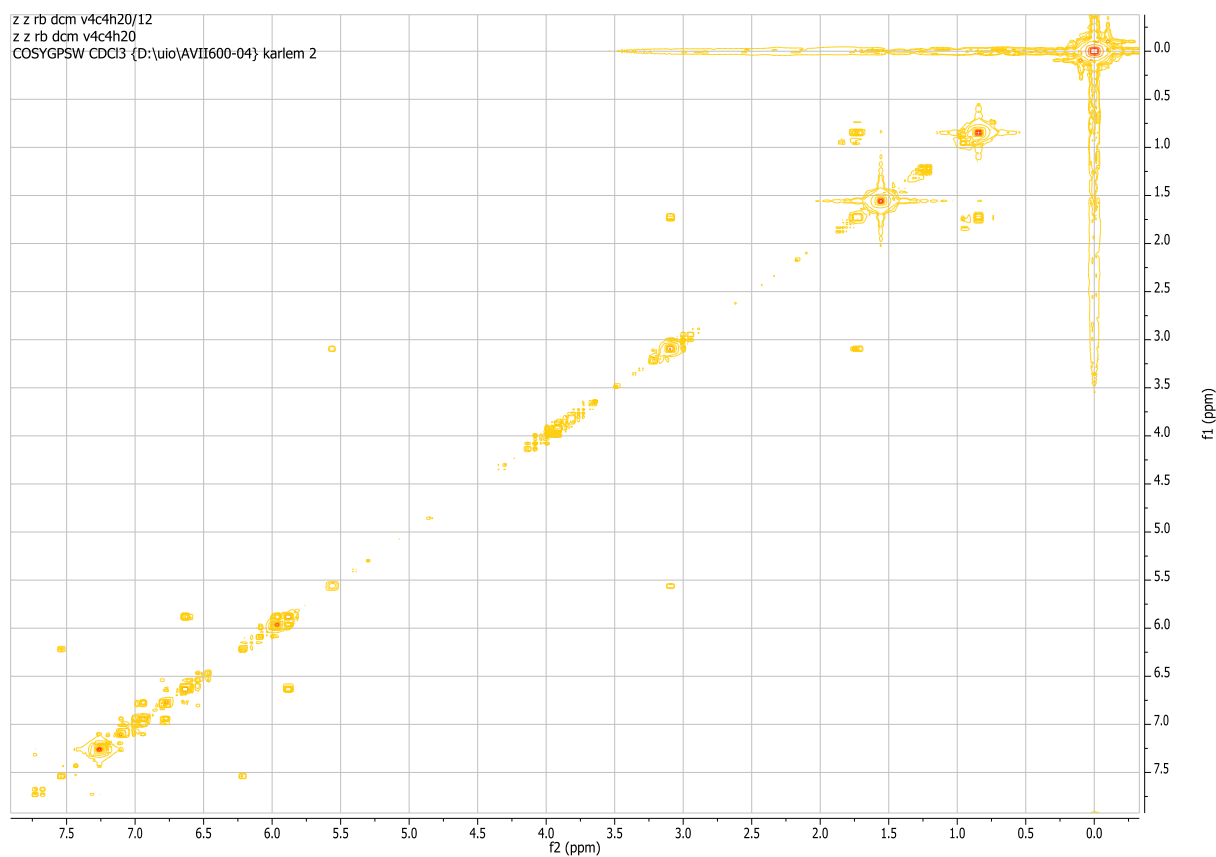
Vedlegg 2.11c: HMBC spekter (400/100 MHz) av diktamnin (Rb-dcm-v5c3h4) løst i CDCl<sub>3</sub>.



Vedlegg 2.12a: <sup>1</sup>H-NMR spekter (600 MHz) av *cis*-fagaramid (Rb-dcm-v4c4h7) løst i CDCl<sub>3</sub>.

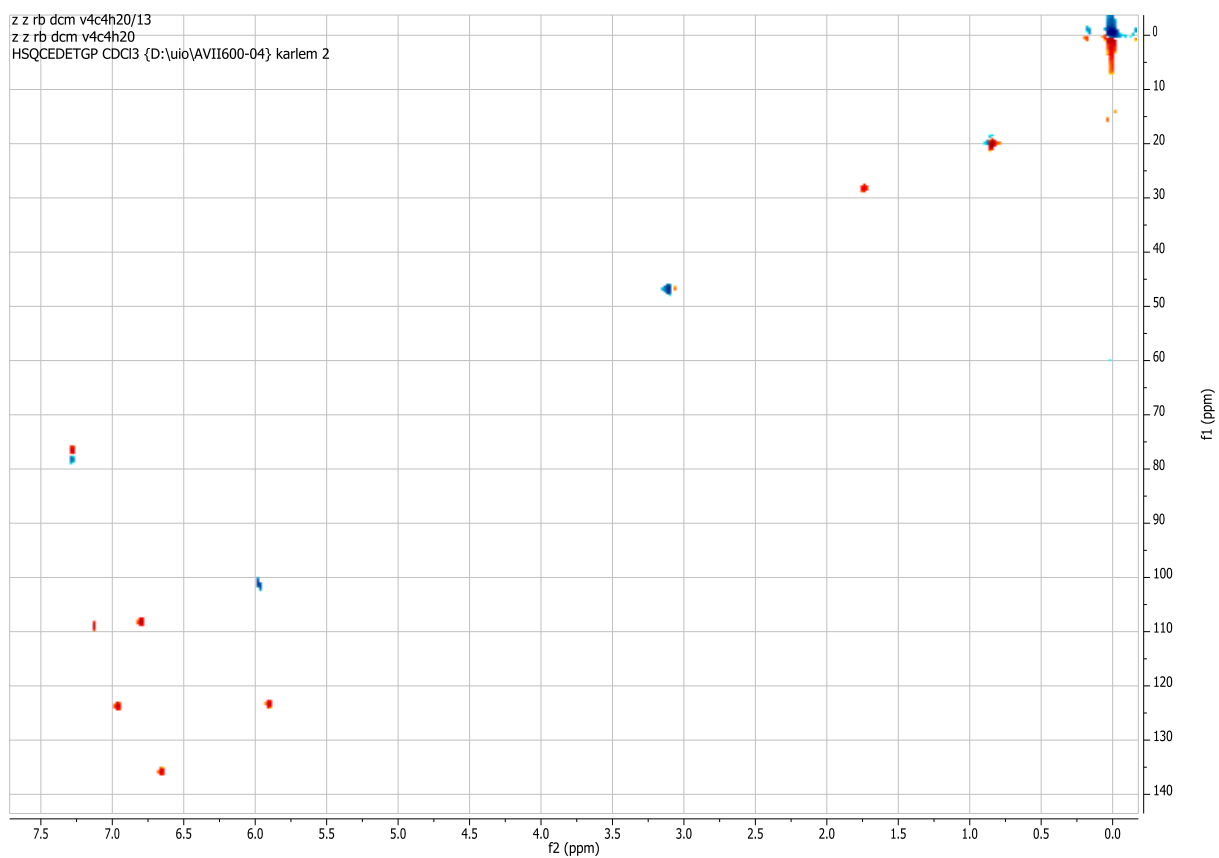


Vedlegg 2.12b: <sup>13</sup>C APT spekter (150 MHz) av cis-fagaramid (Rb-dcm-v4c4h7) løst i CDCl<sub>3</sub>.

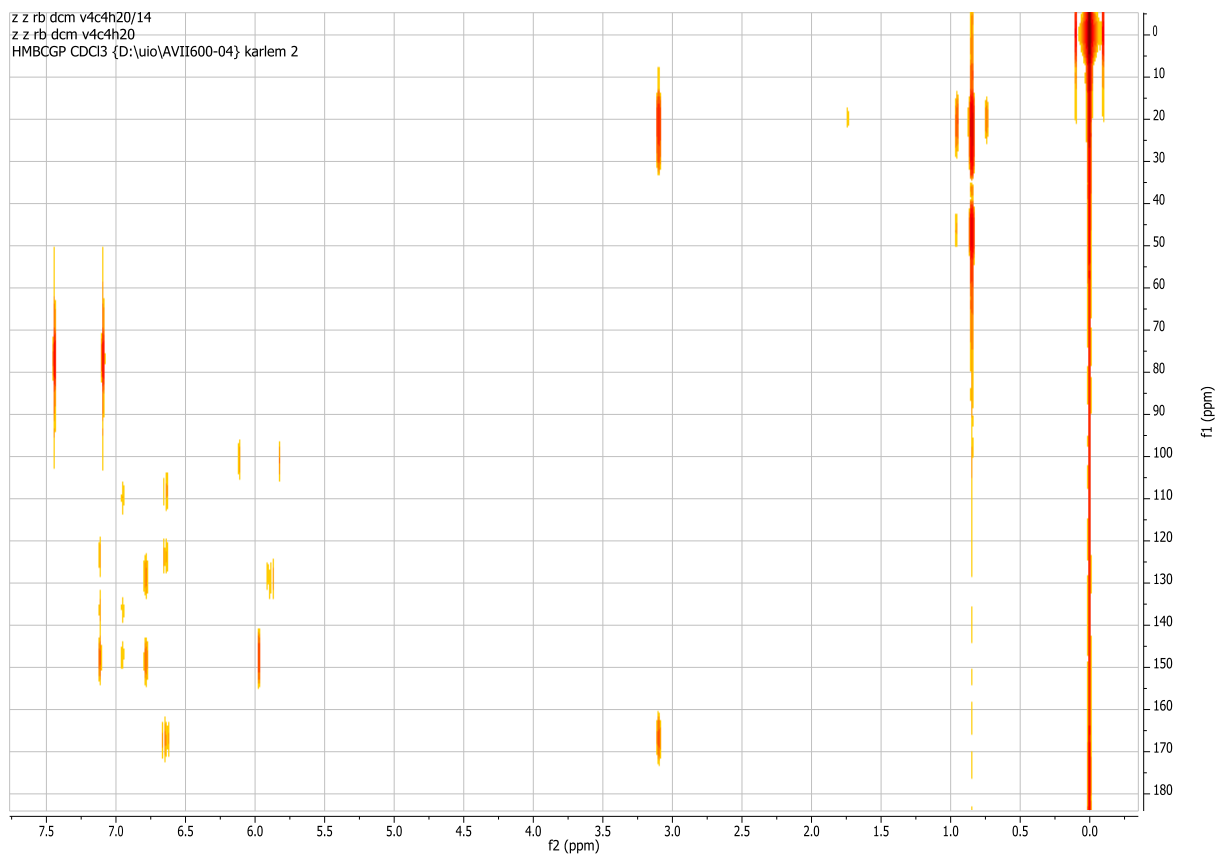


Vedlegg 2.12c: COSY spekter (600 MHz) av cis-fagaramid (Rb-dcm-v4c4h9) løst i CDCl<sub>3</sub>.

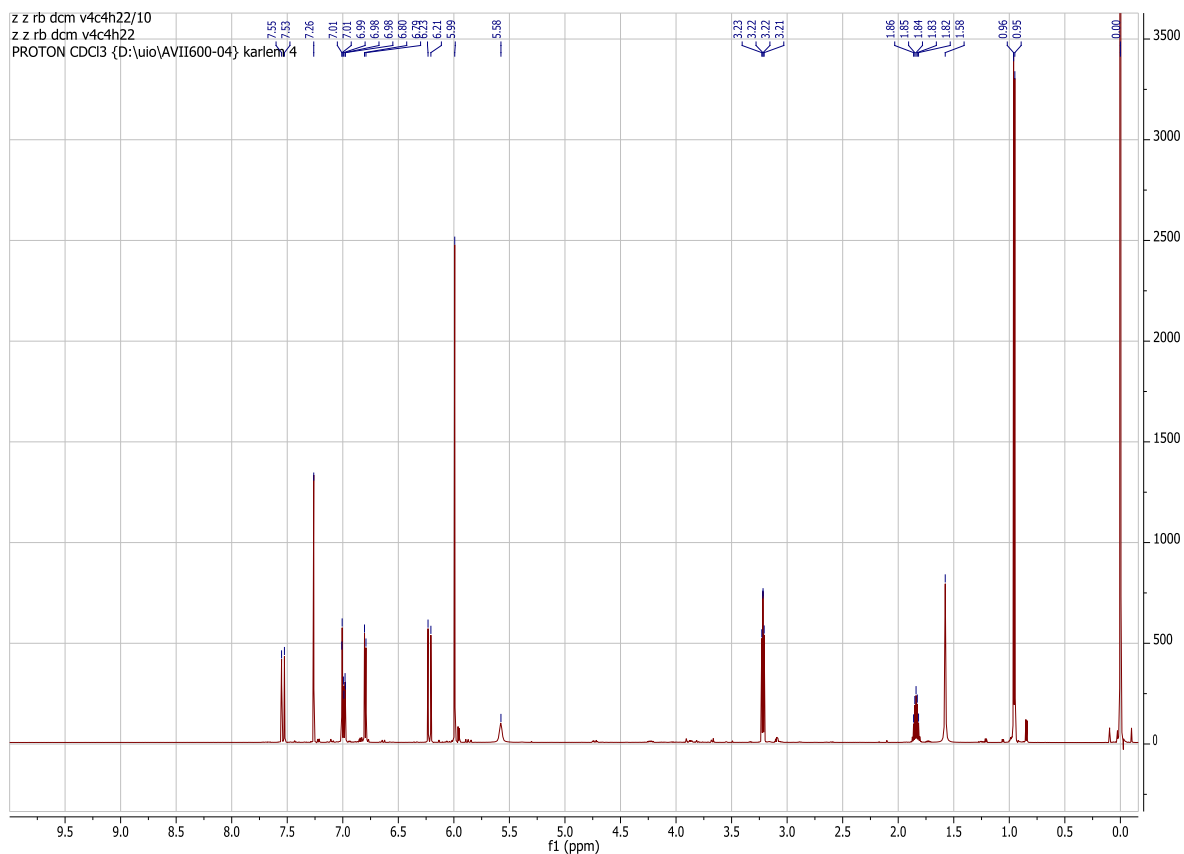




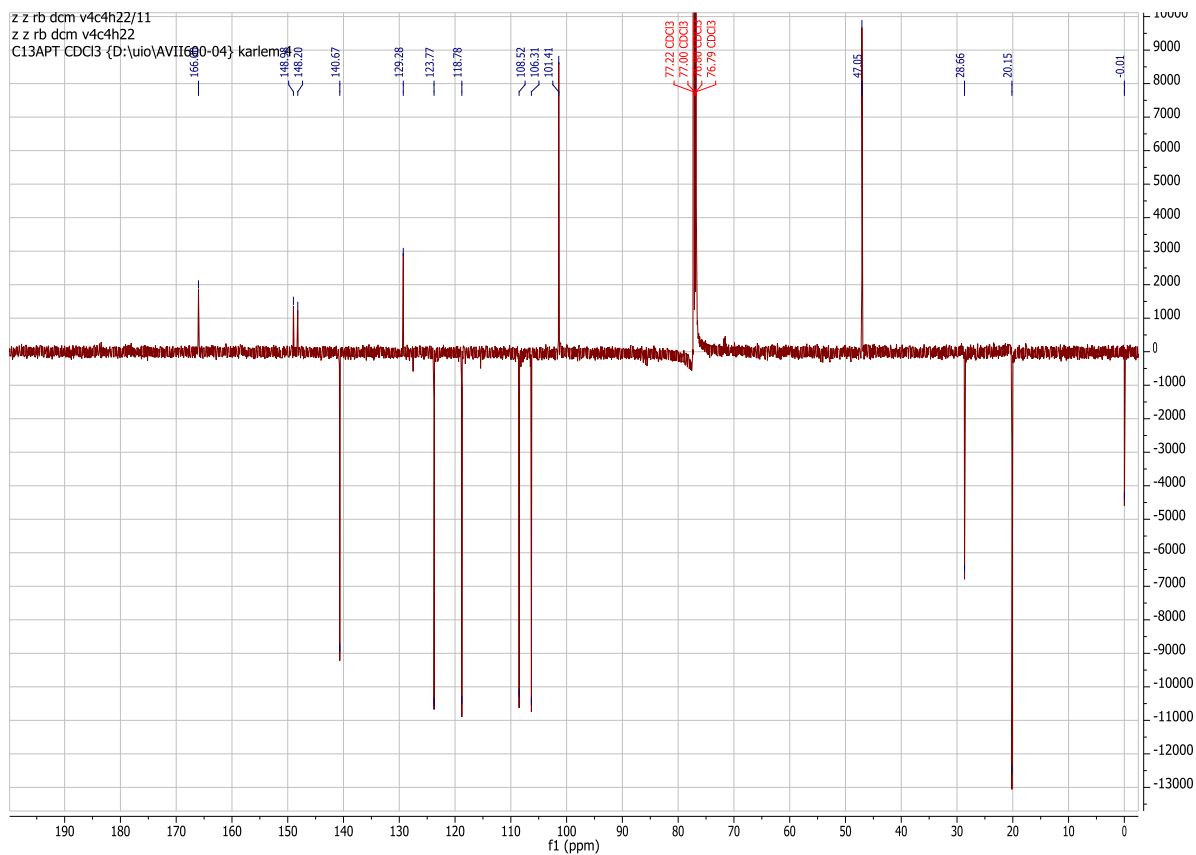
Vedlegg 2.12d: HSQC spekter (600/150 MHz) av cis-fagaramid (Rb-dcm-v4c4h9) løst i CDCl<sub>3</sub>.



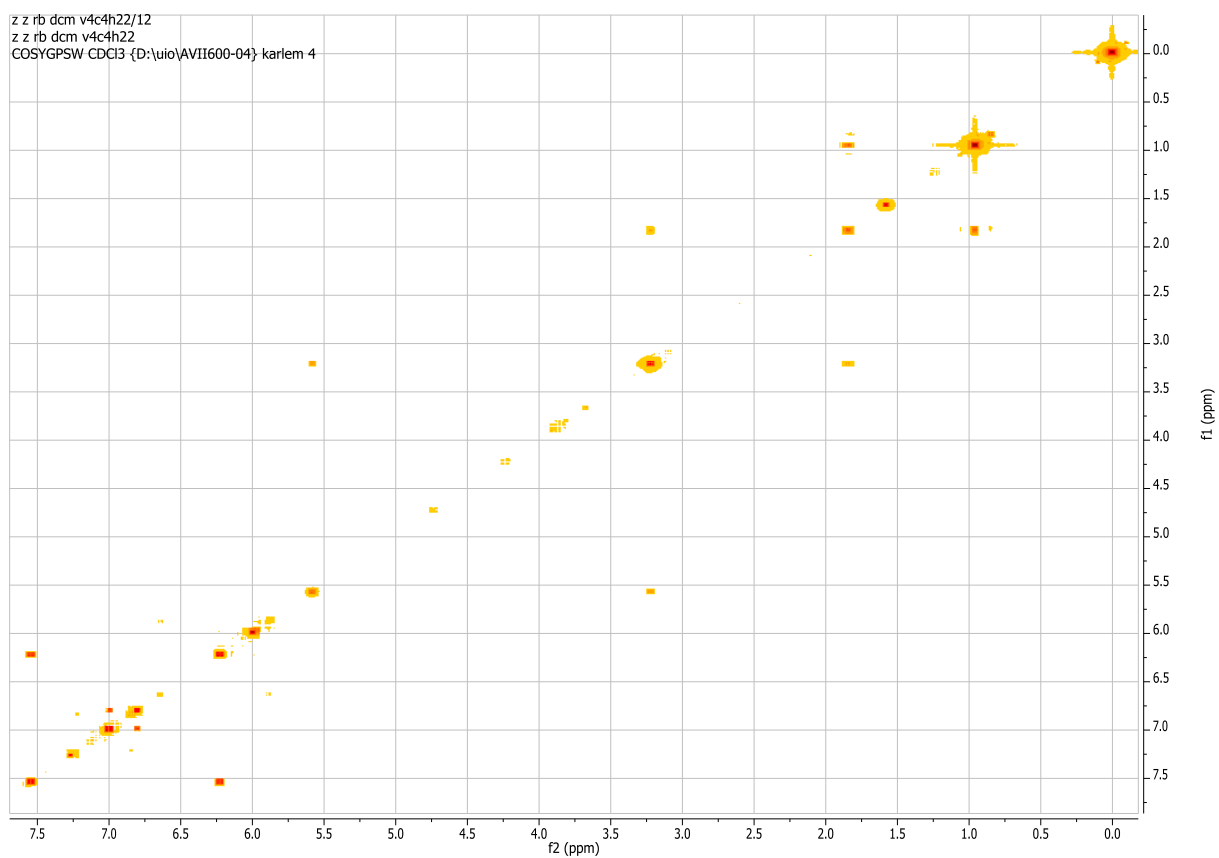
Vedlegg 2.12e: HMBC spekter (600/150 MHz) av cis-fagaramid (Rb-dcm-v4c4h9) løst i CDCl<sub>3</sub>.



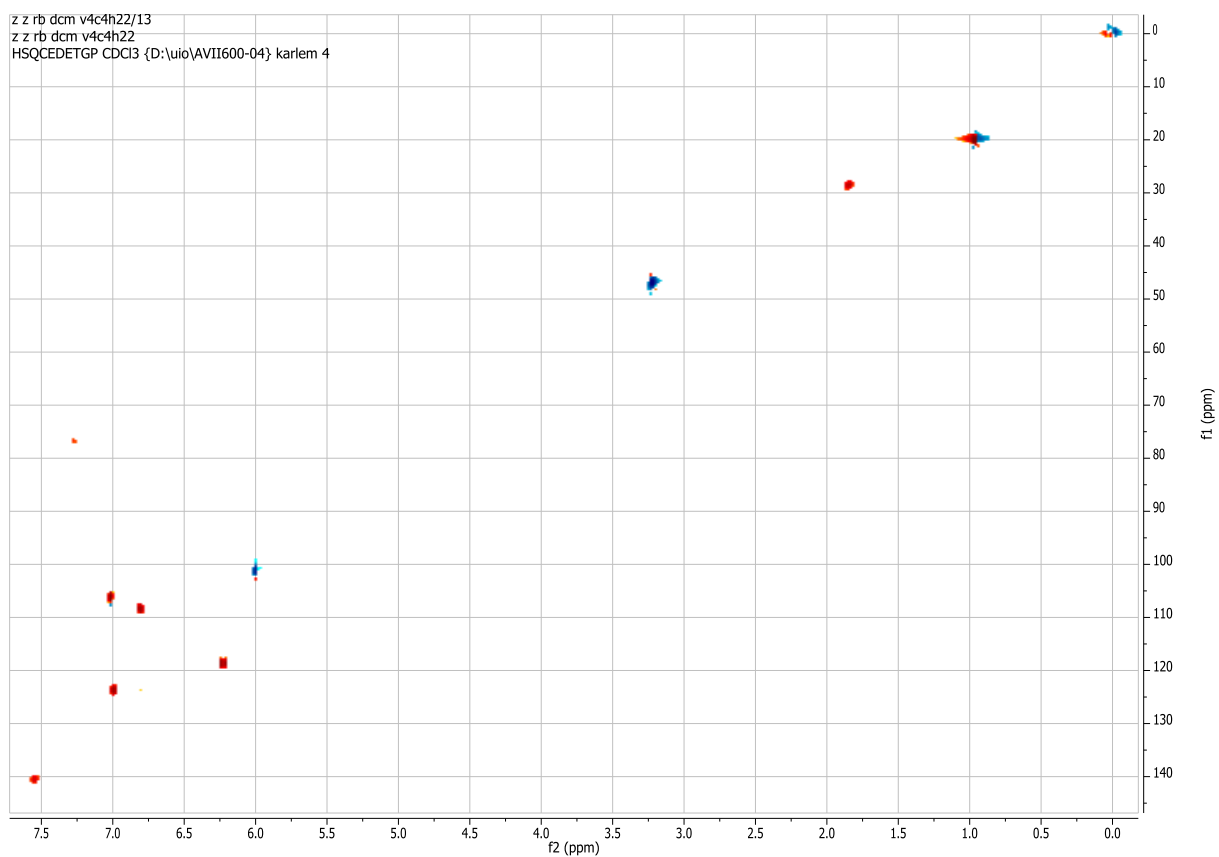
Vedlegg 2.13a: <sup>1</sup>H-NMR spekter (600 MHz) av trans-fagaramid (Rb-dcm-v4c4h9) løst i CDCl<sub>3</sub>.



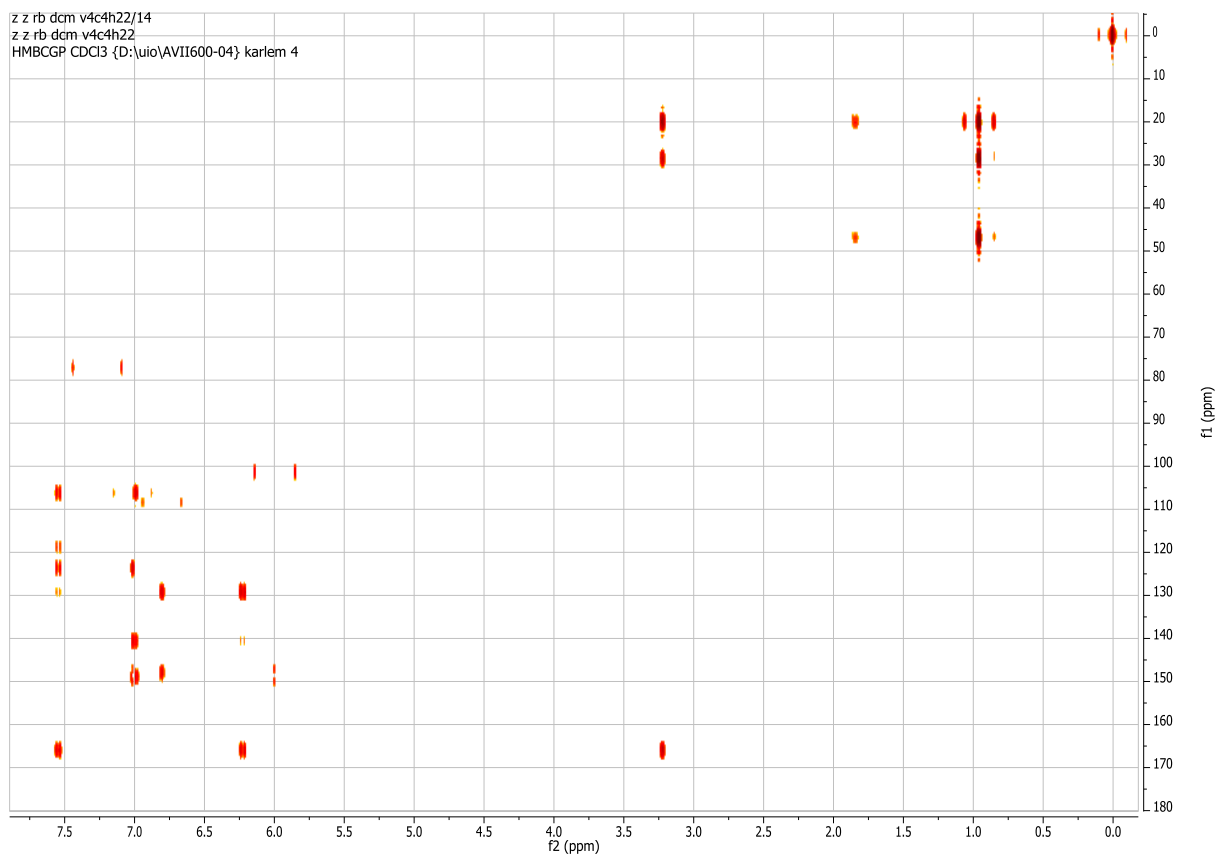
Vedlegg 2.13b: <sup>13</sup>C APT spekter (150 MHz) av trans-fagaramid (Rb-dcm-v4c4h9) løst i CDCl<sub>3</sub>.



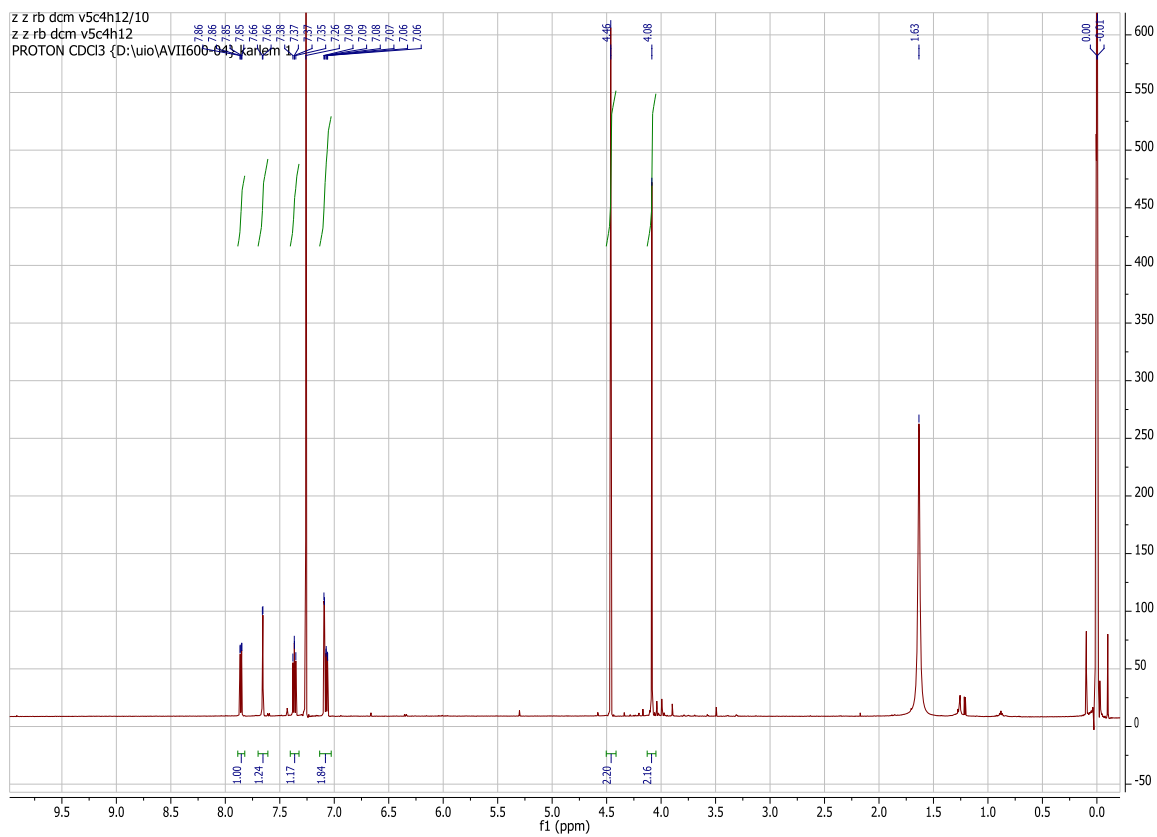
Vedlegg 2.13c: COSY spekter (600 MHz) av trans-fagaramid (Rb-dcm-v4c4h9) løst i CDCl<sub>3</sub>.



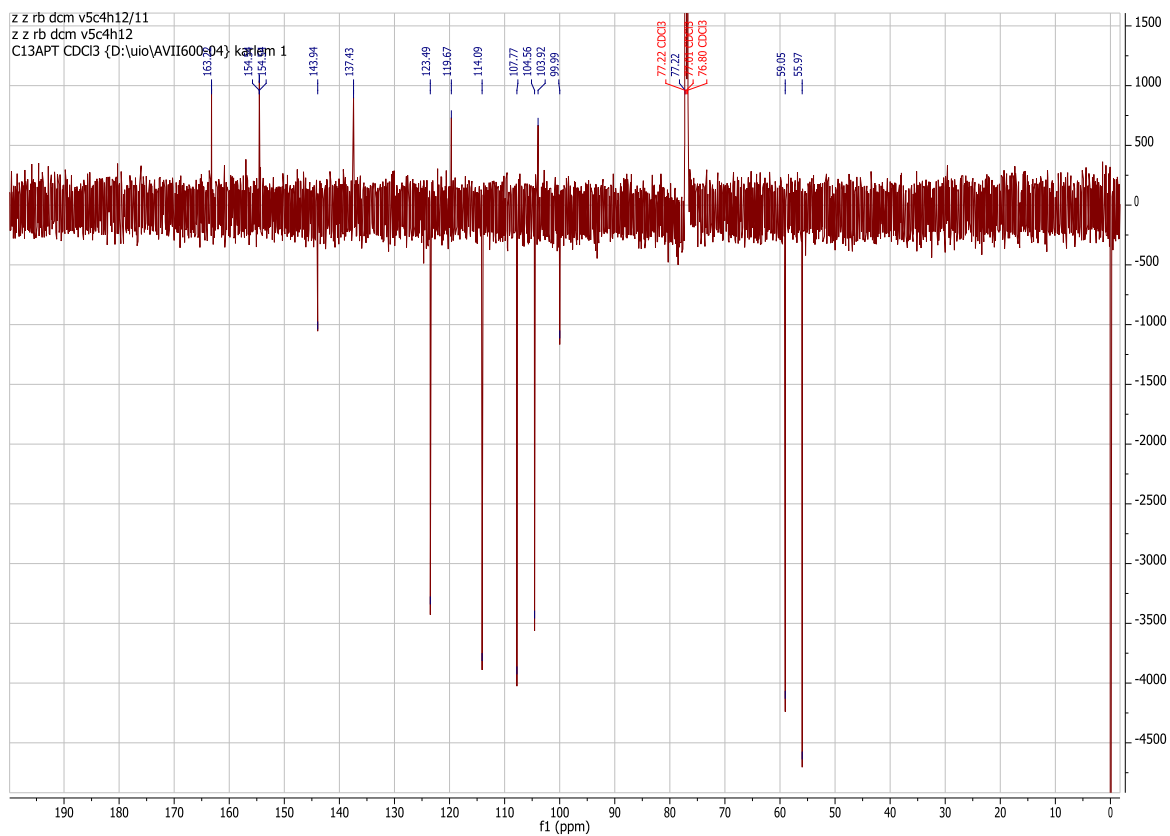
Vedlegg 2.13d: HSQC spekter (600/150 MHz) av trans-fagaramid (Rb-dcm-v4c4h9) løst i CDCl<sub>3</sub>.



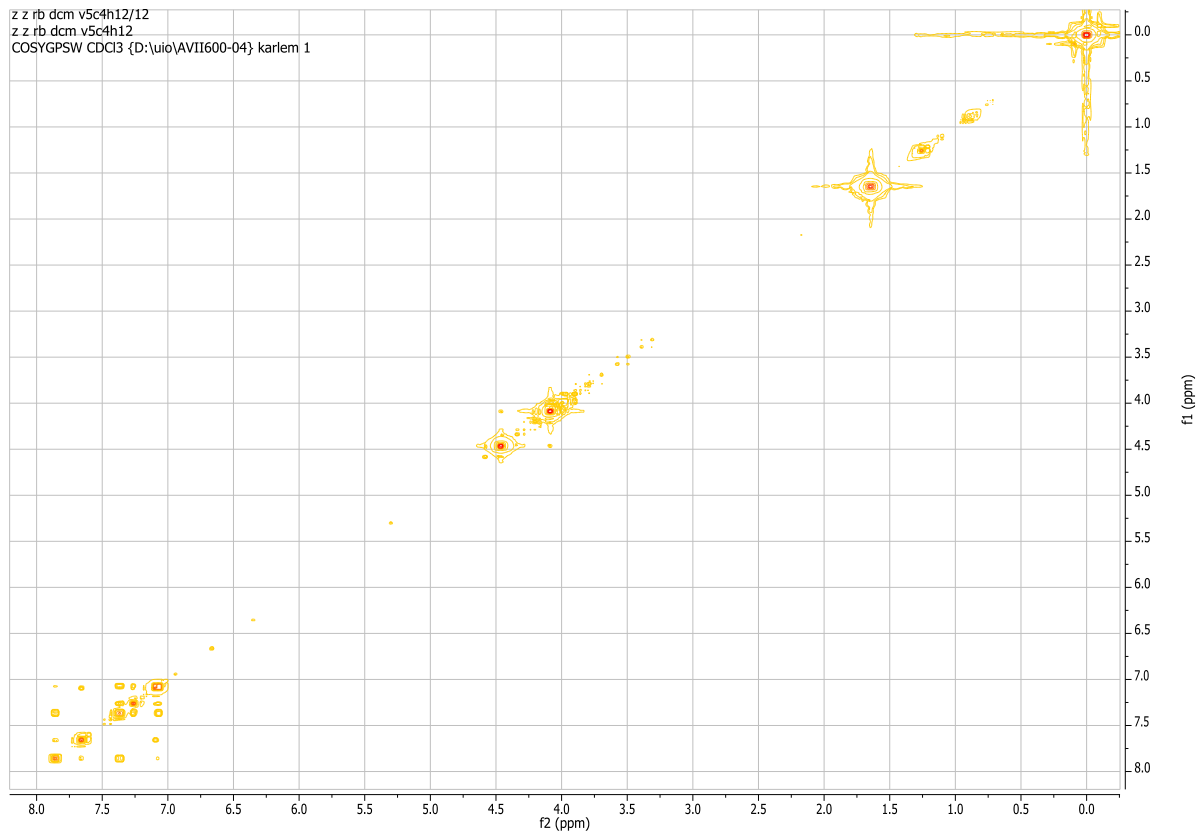
Vedlegg 2.13e: HMBC spekter (600/150 MHz) av trans-fagaramid (Rb-dcm-v4c4h9) løst i CDCl<sub>3</sub>.



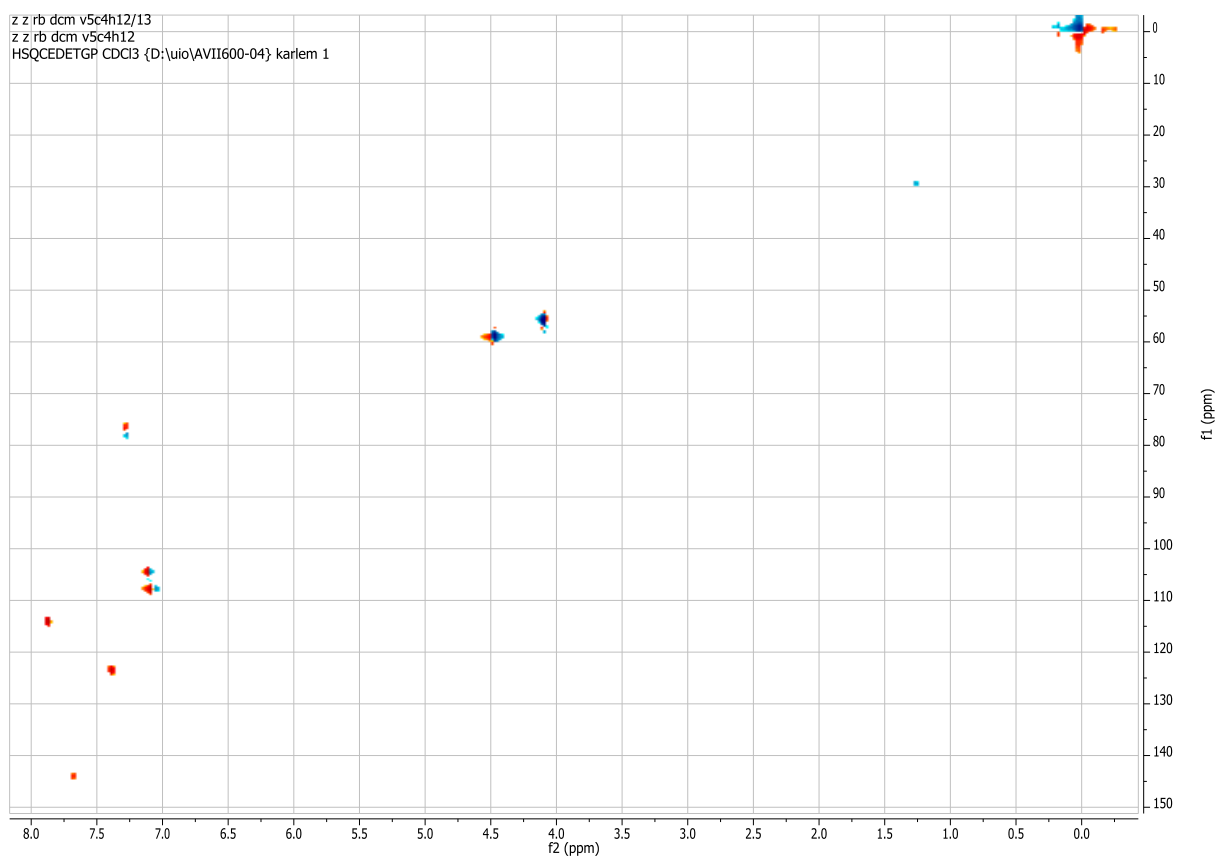
Vedlegg 2.14a: <sup>1</sup>H-NMR spekter (600 MHz) av  $\gamma$ -fagarin (Rb-dcm-v5c4h5) løst i CDCl<sub>3</sub>.



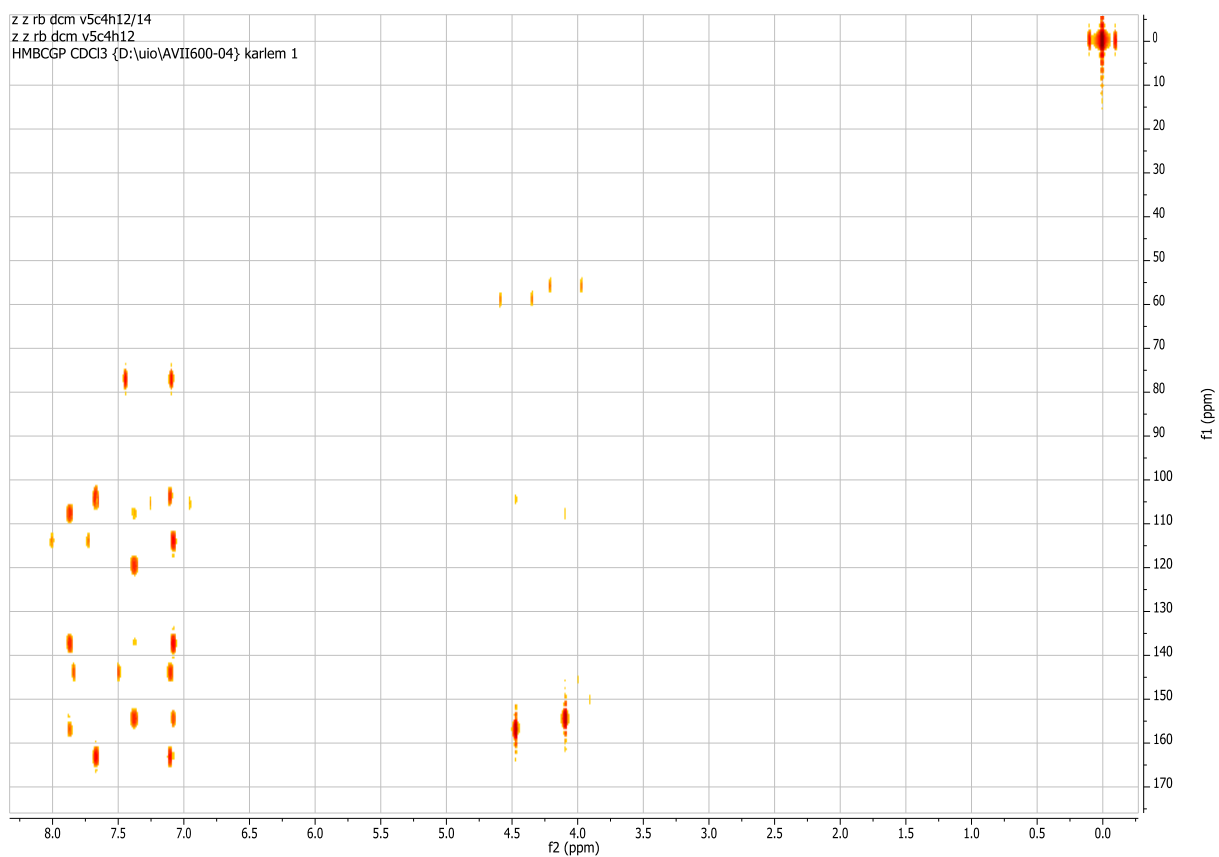
Vedlegg 2.14b: <sup>13</sup>C APT spekter (150 MHz) av  $\gamma$ -fagarin (Rb-dcm-v5c4h5) løst i CDCl<sub>3</sub>.



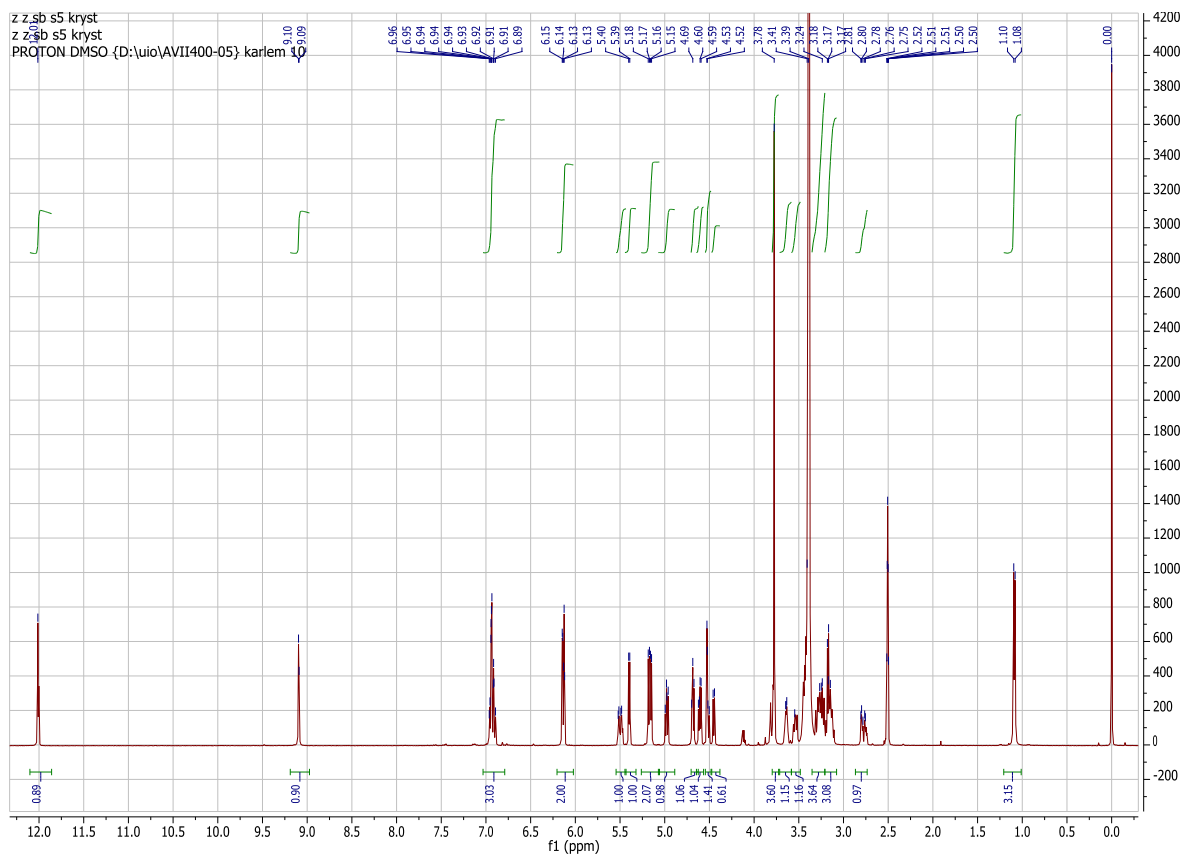
Vedlegg 2.14c: COSY spekter (600 MHz) av  $\gamma$ -fagarin (Rb-dcm-v5c4h5) løst i CDCl<sub>3</sub>.



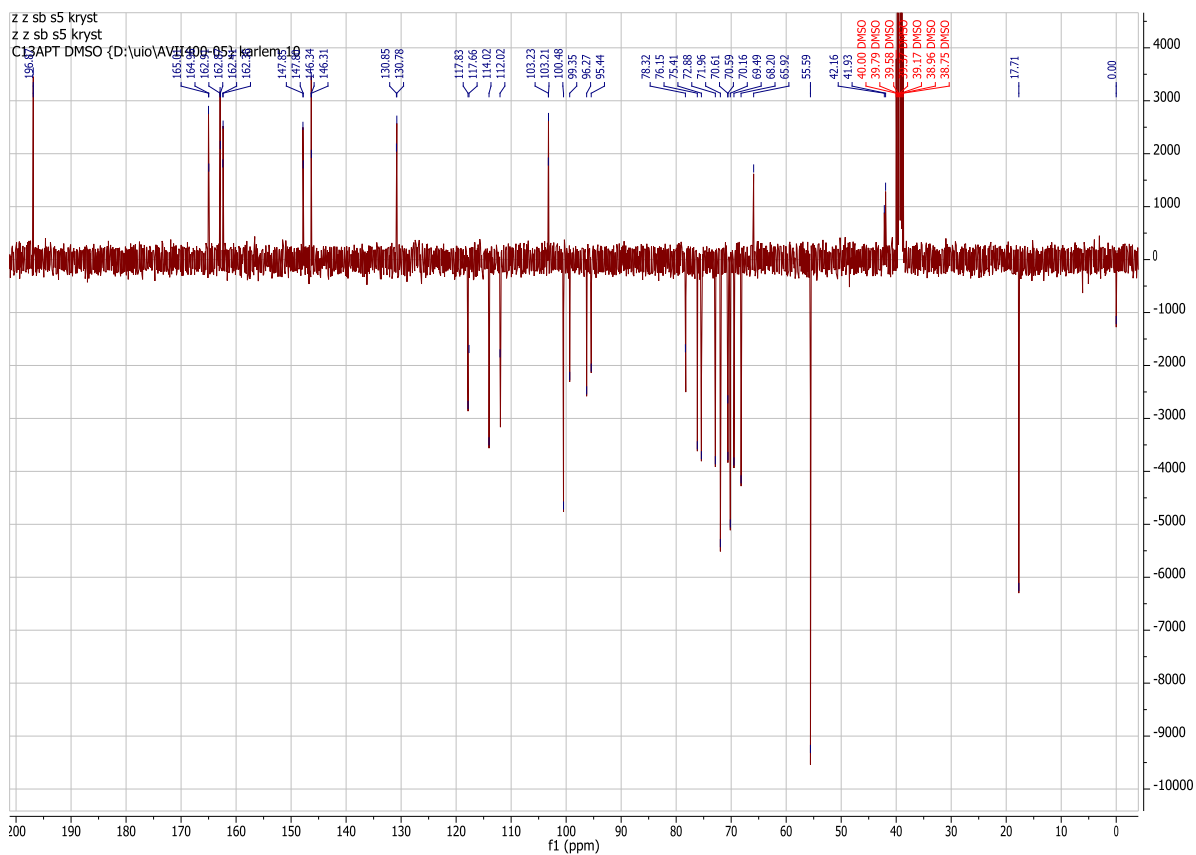
Vedlegg 2.14d: HSQC spekter (600/150 MHz) av  $\gamma$ -fagarin (Rb-dcm-v5c4h5) løst i CDCl<sub>3</sub>.



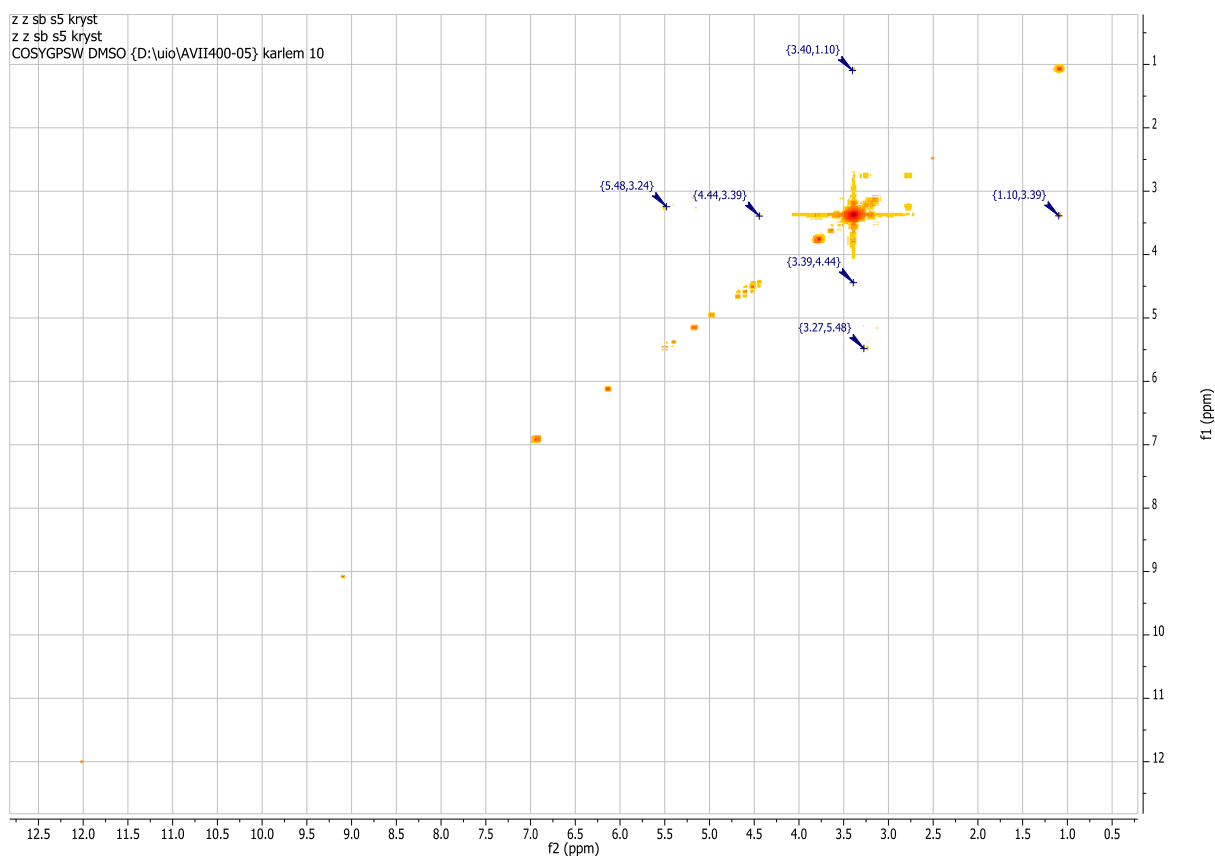
Vedlegg 2.14e: HMBC spekter (600/150 MHz) av  $\gamma$ -fagarin (Rb-dcm-v5c4h5) løst i CDCl<sub>3</sub>.



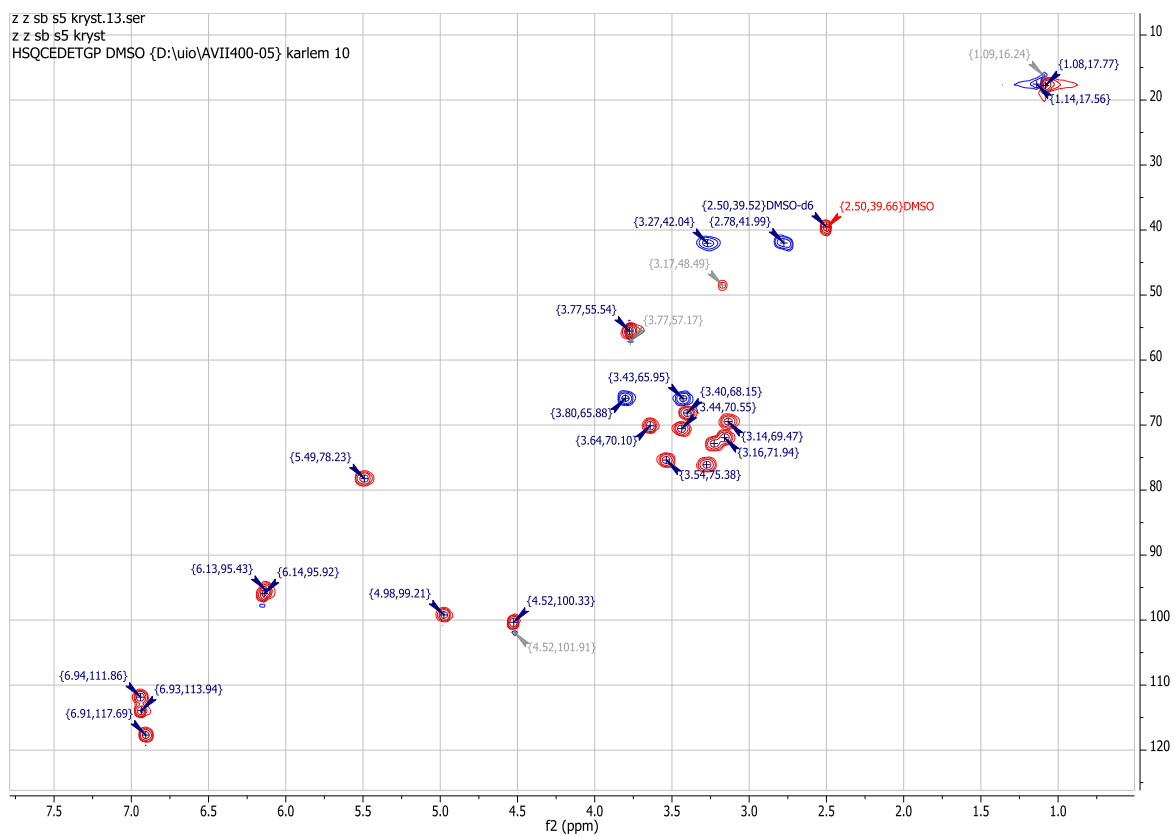
Vedlegg 2.15a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter (400 MHz) av hesperidin (Sb-meoh-s5 kryst.) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



Vedlegg 2.15b:  $^{13}\text{C}$  APT spekter (100 MHz) av hesperidin (Sb-meoh-s5 kryst.) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

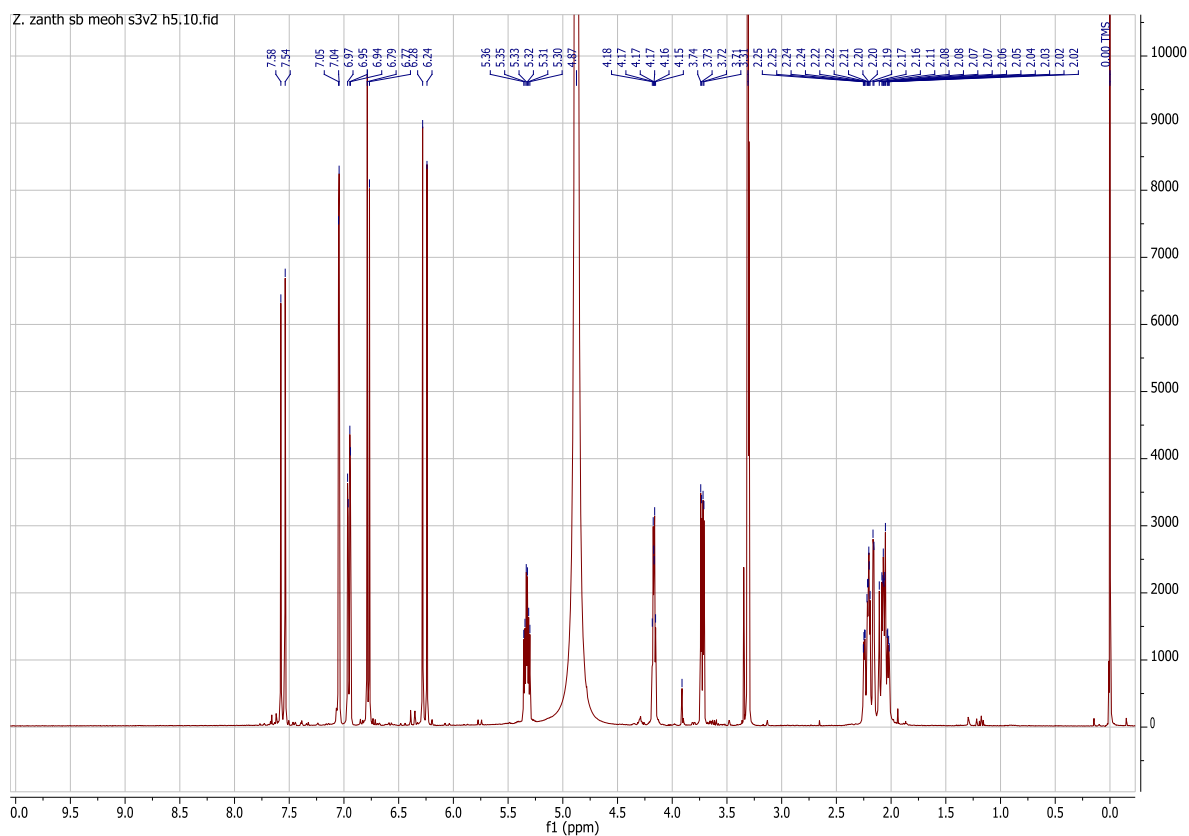


Vedlegg 2.15c: COSY spekter (400 MHz) av hesperidin (Sb-meoh-s5 kryst.) løst i CD<sub>3</sub>OD.

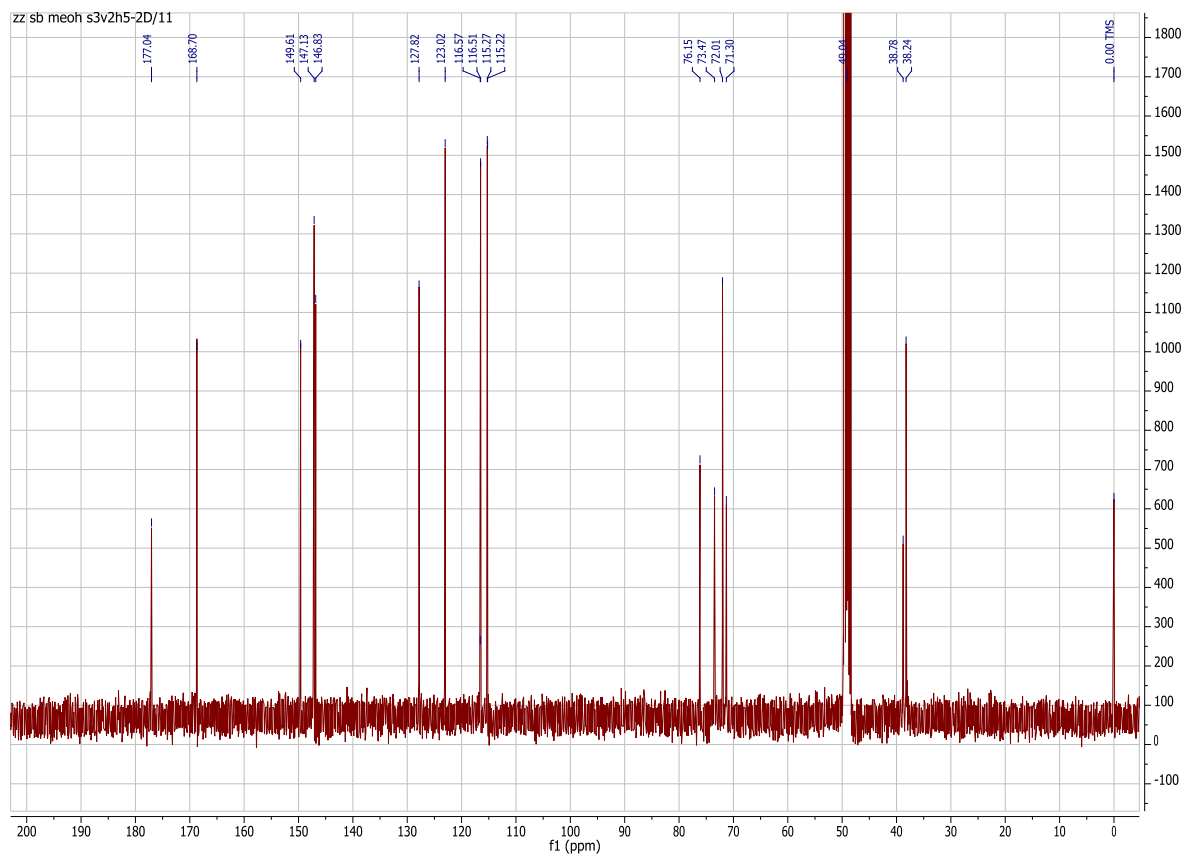


Vedlegg 2.15d: HSQC spekter (400/100 MHz) av hesperidin (Sb-meoh-s5 kryst.) løst i CD<sub>3</sub>OD.

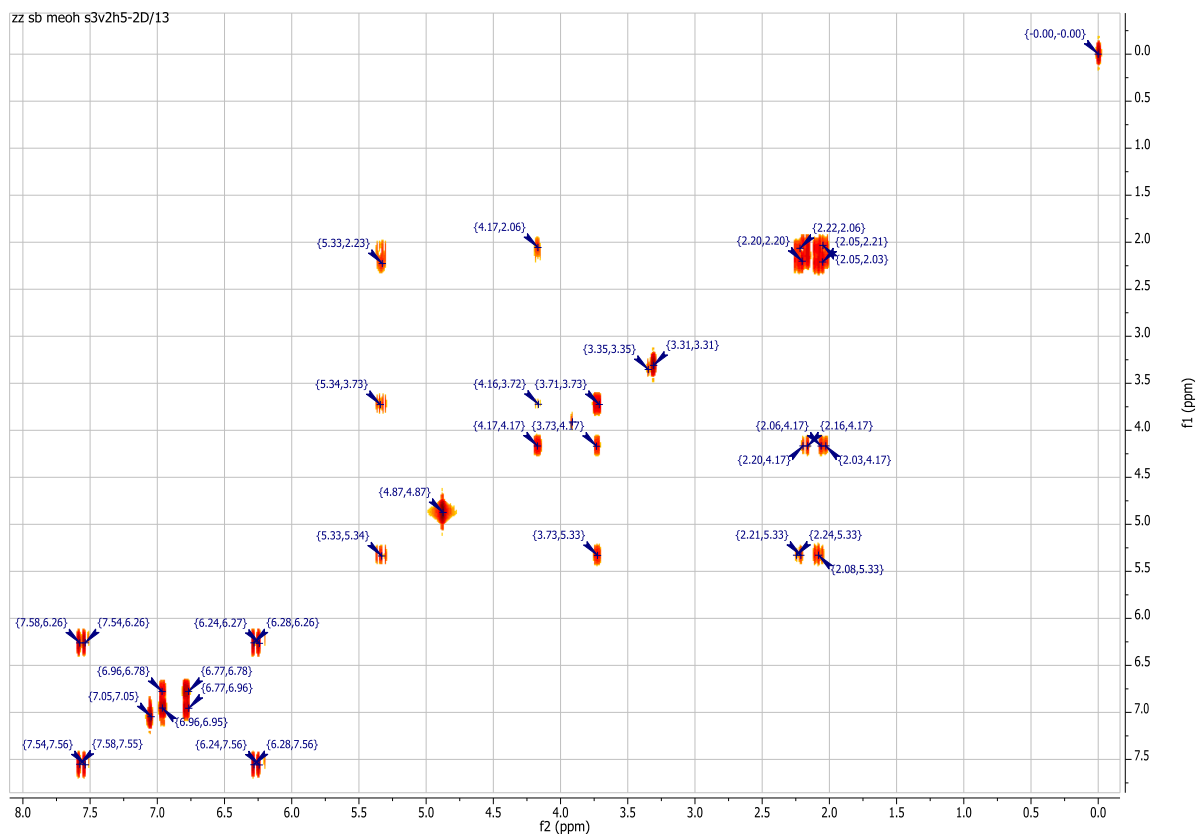




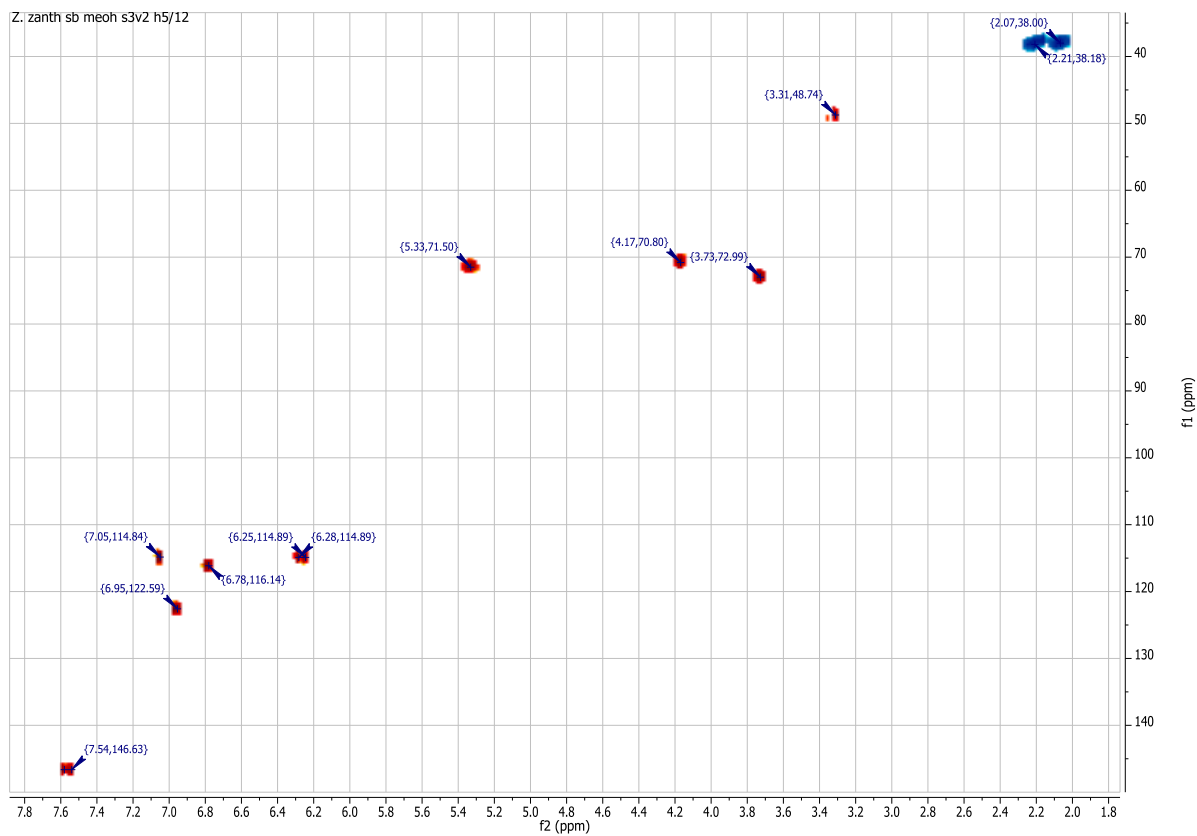
Vedlegg 2.16a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter (400 MHz) av klorogensyre (Sb-meoh-s3v2h5) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



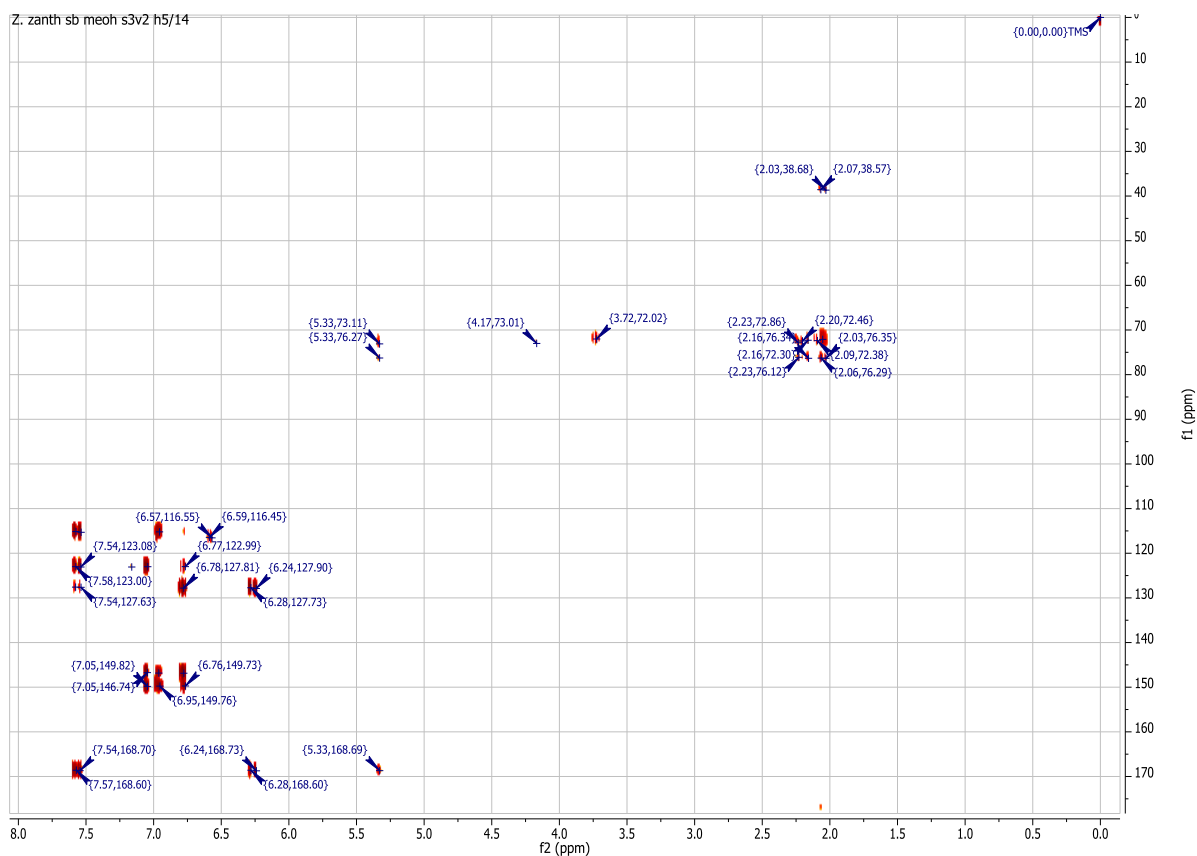
Vedlegg 2.16b:  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter (100 MHz) av klorogensyre (Sb-meoh-s3v2h5) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



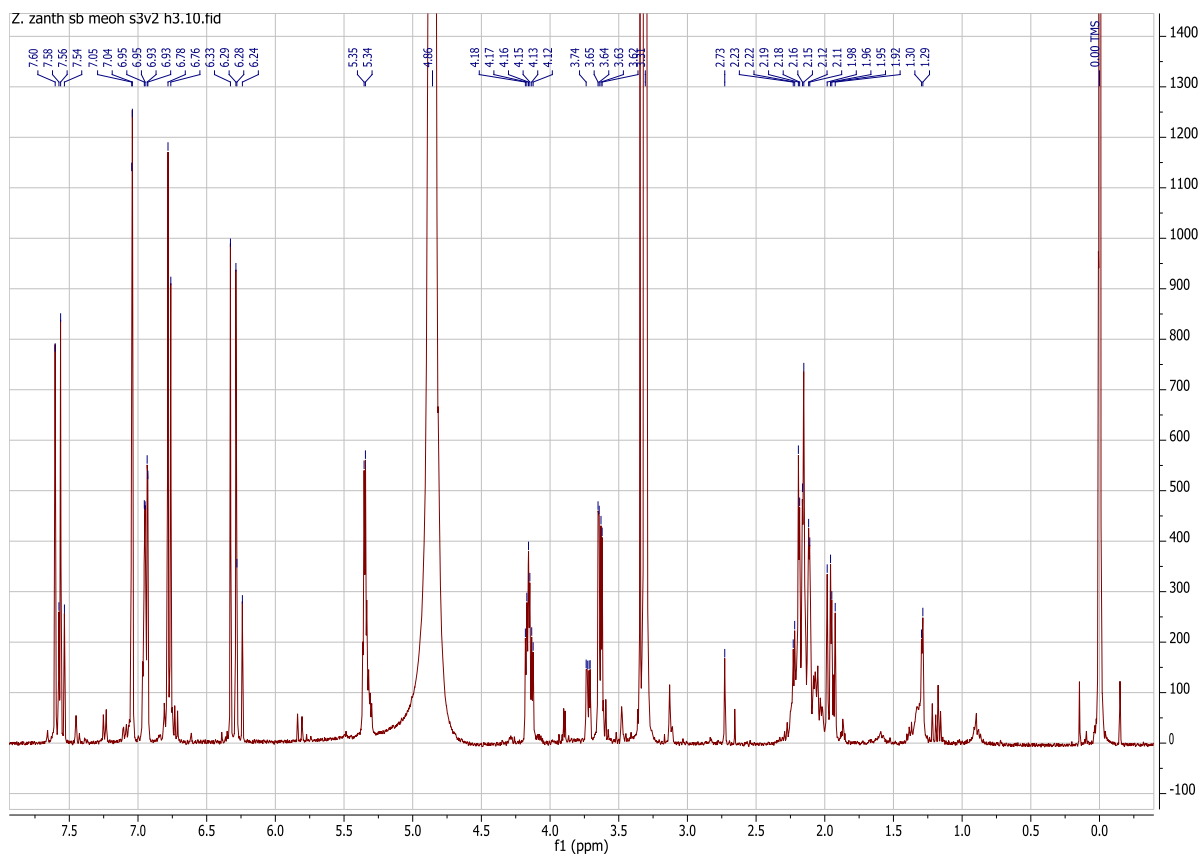
Vedlegg 2.16c: COSY spekter (400 MHz) av klorogensyre (Sb-meoh-s3v2h5) løst i CD<sub>3</sub>OD.



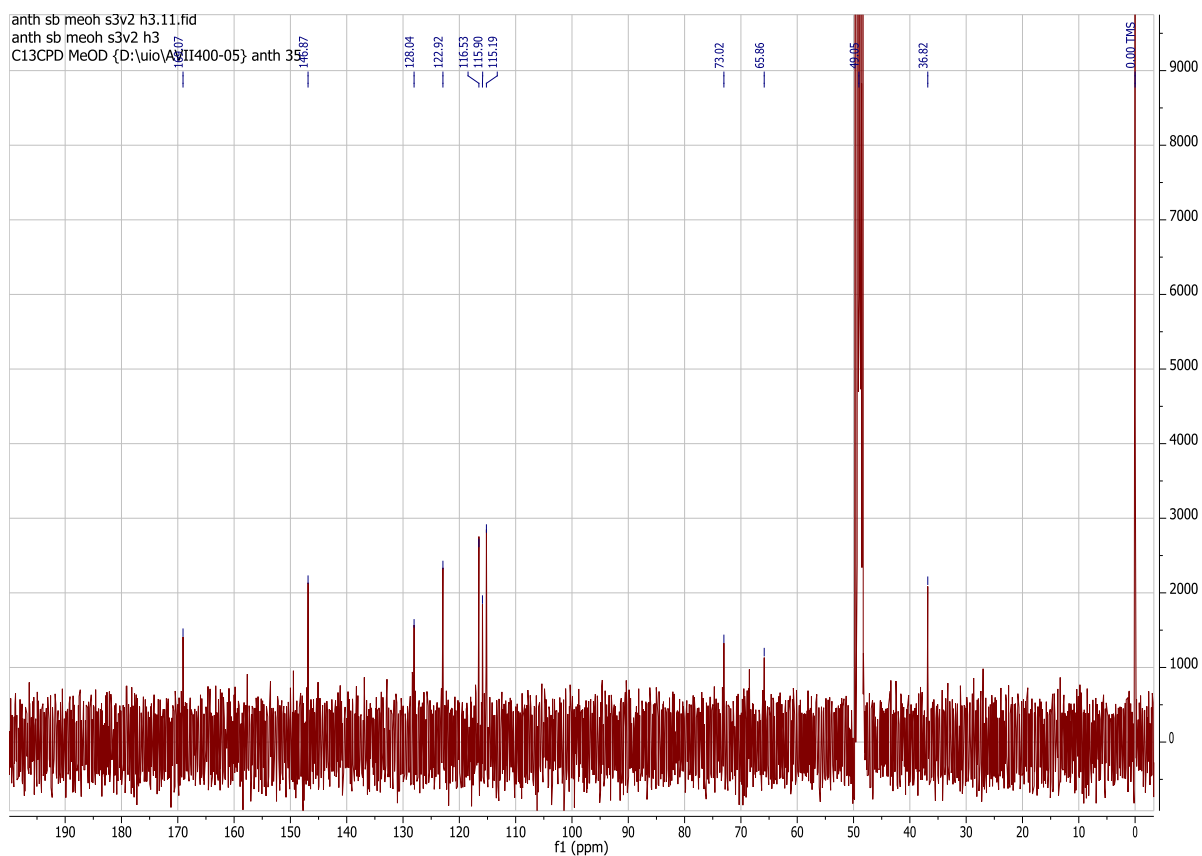
Vedlegg 2.16d: HSQC spekter (400/100 MHz) av klorogensyre (Sb-meoh-s3v2h5) løst i CD<sub>3</sub>OD.



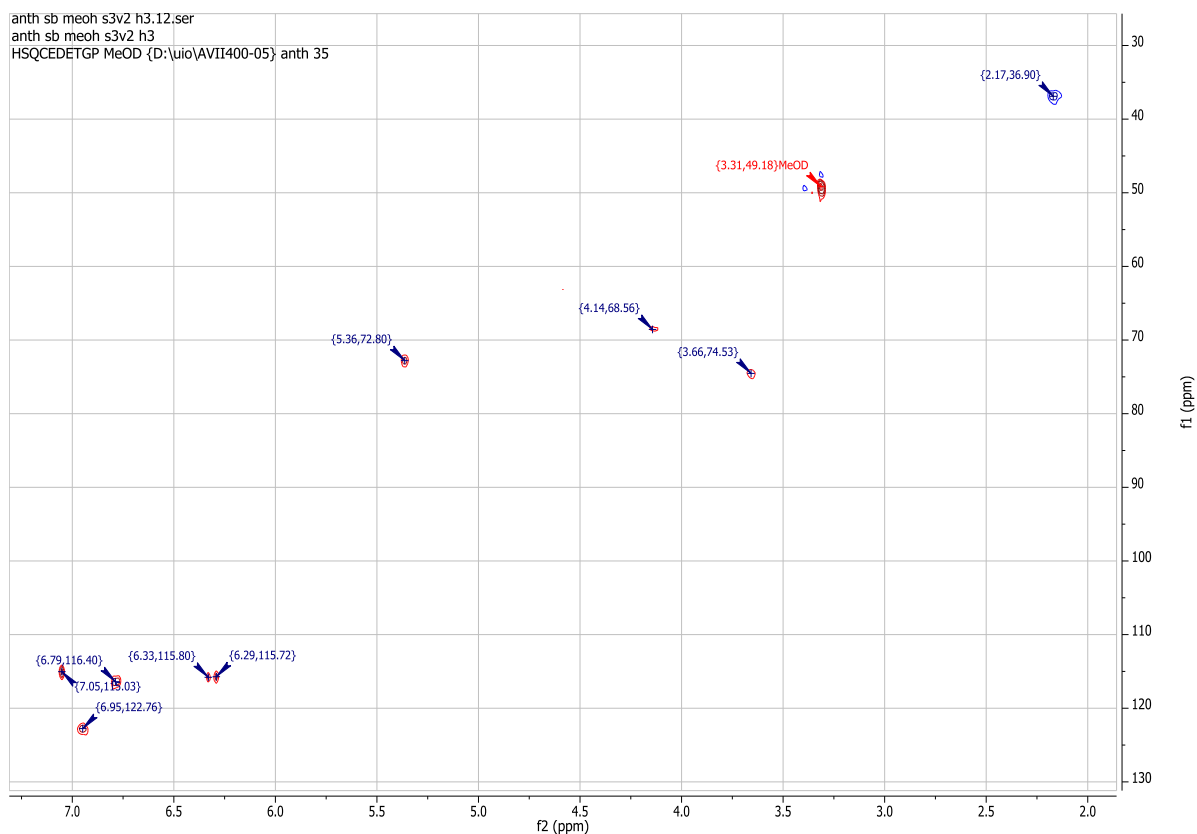
Vedlegg 2.16e: HMBC spekter (400/100 MHz) av klorogensyre (Sb-meoh-s3v2h5) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



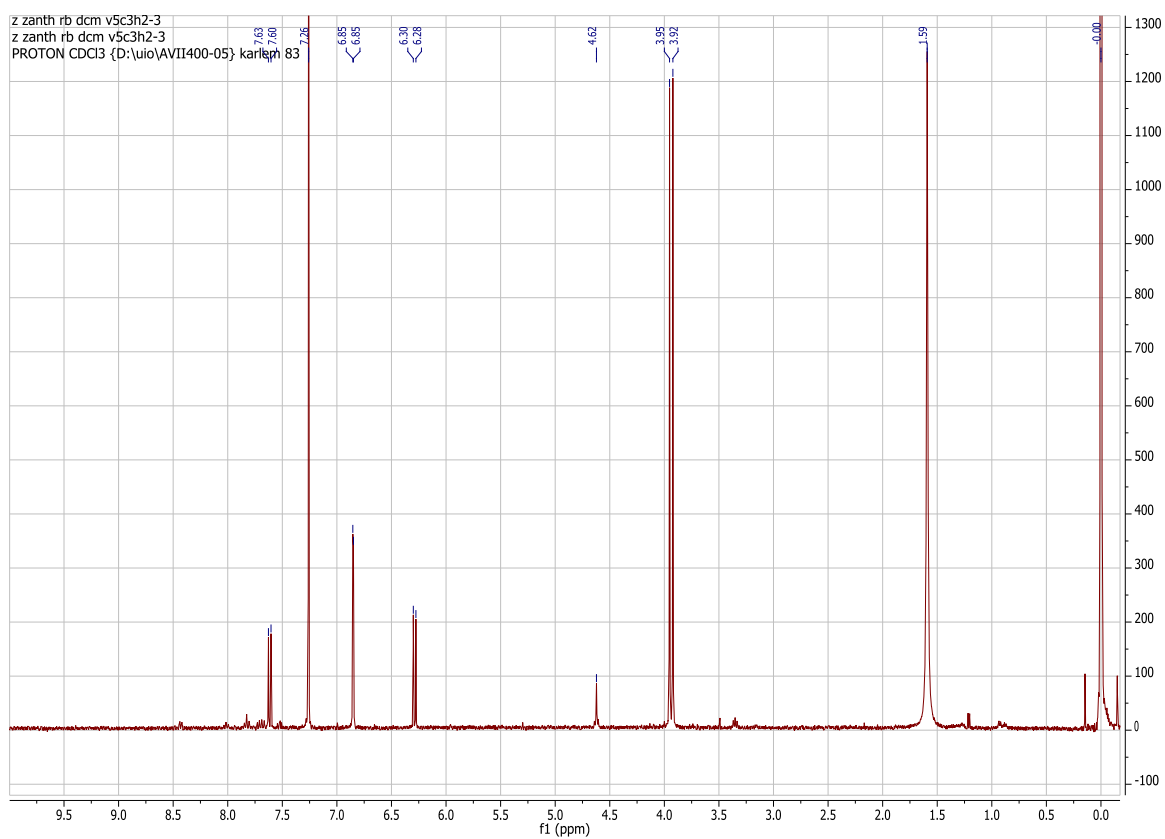
Vedlegg 2.17a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter (400 MHz) av neoklorogensyre (Sb-meoh-s3v2h3) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



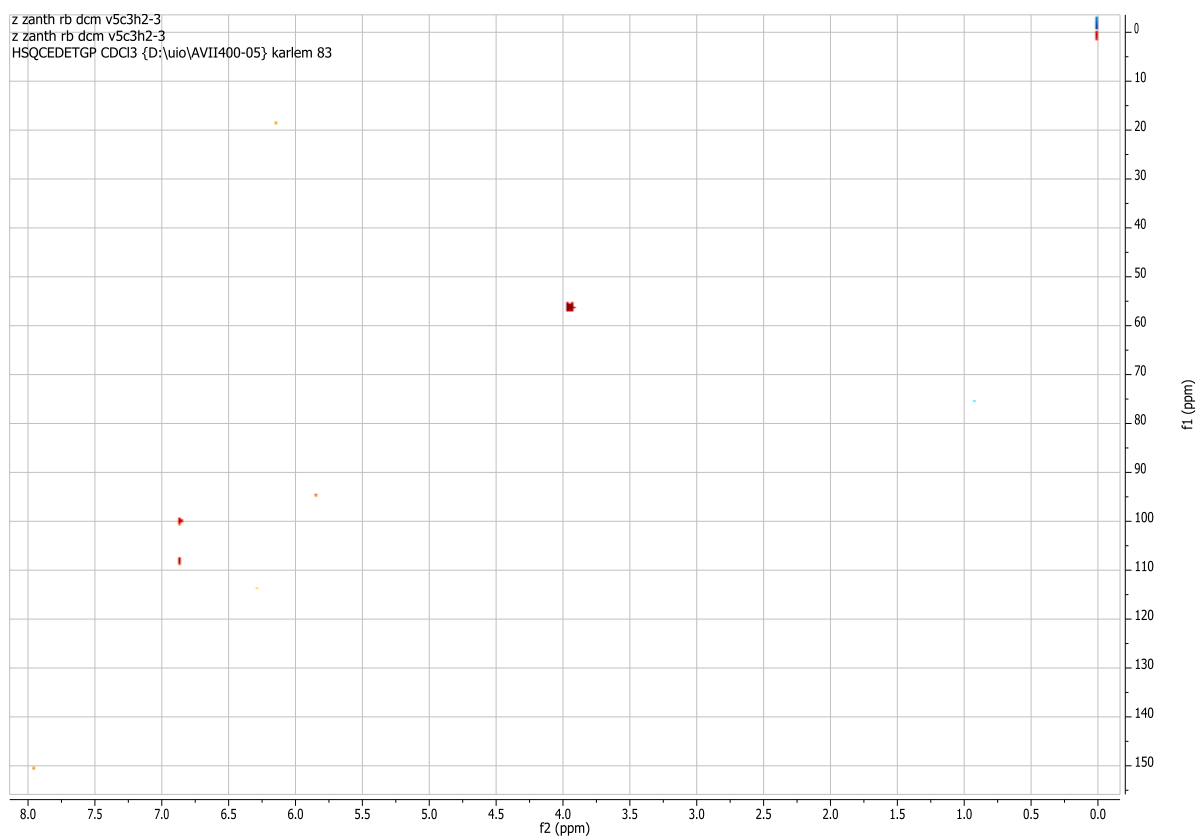
Vedlegg 2.17b:  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter (100 MHz) av neoklorogensyre (Sb-meoh-s3v2h3) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



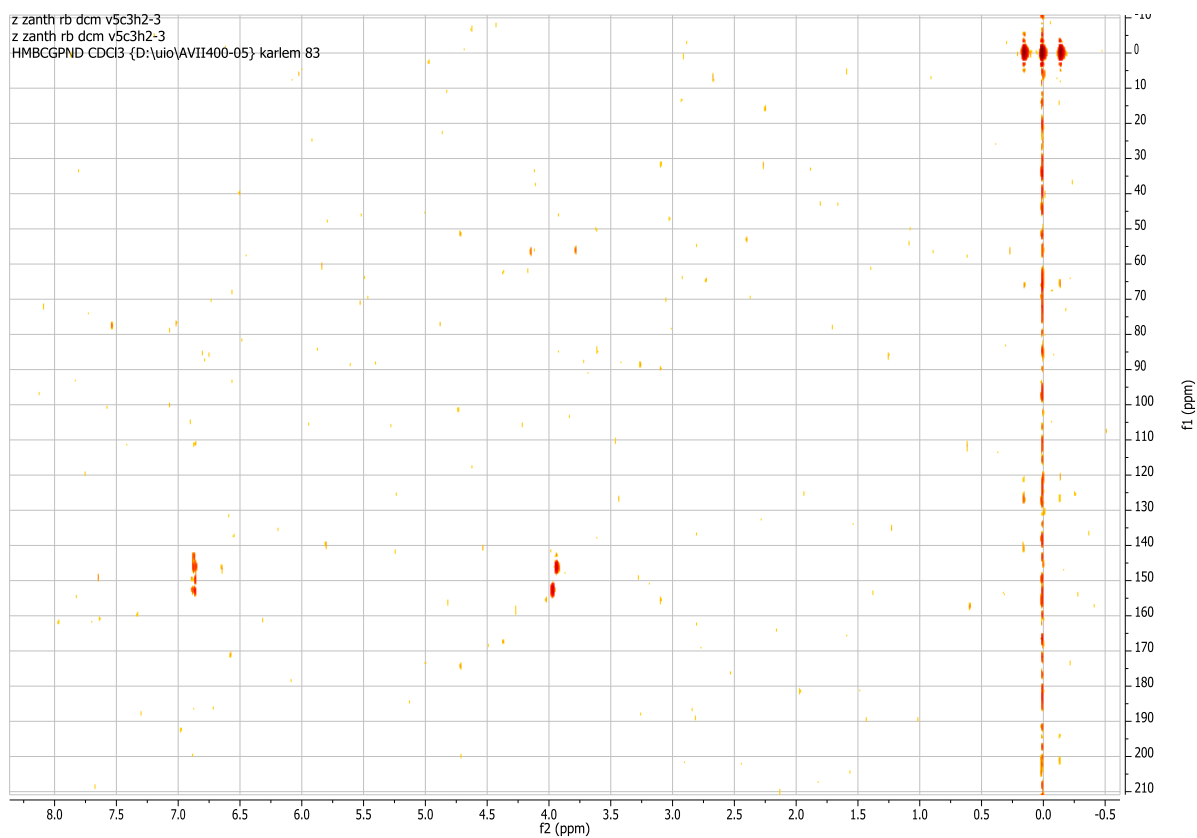
Vedlegg 2.17c: HSQC spekter (400/100 MHz) av neoklorogensyre (Sb-meoh-s3v2h3) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



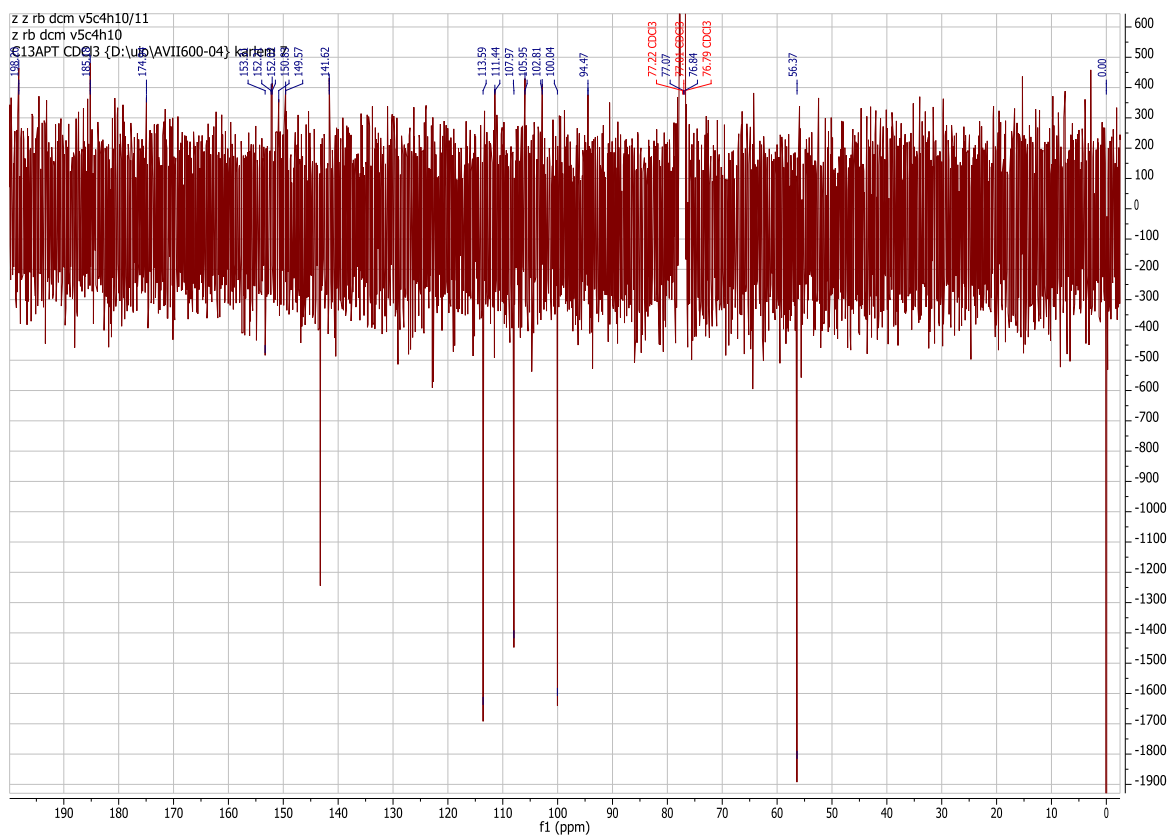
Vedlegg 2.18a: <sup>1</sup>H-NMR spekter (400 MHz) av scoparon (Rb-dcm-v5c3h1) løst i CDCl<sub>3</sub>.



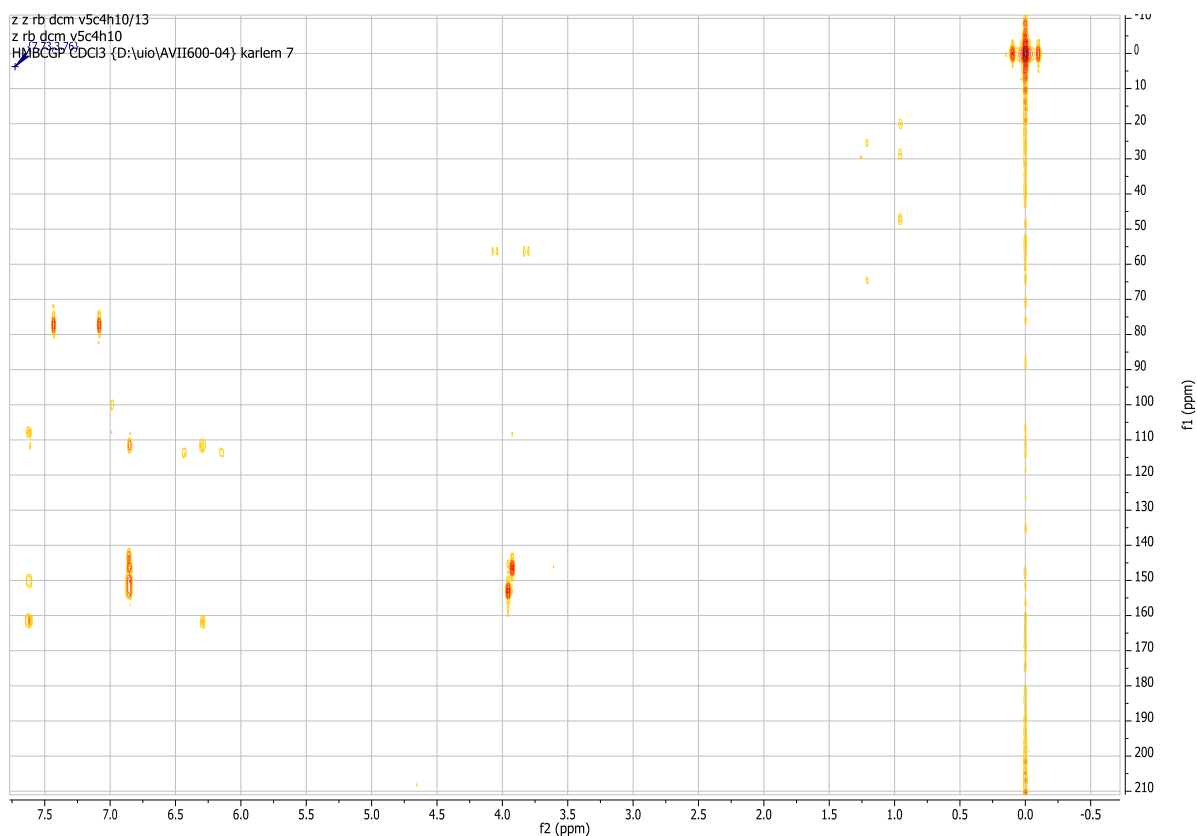
Vedlegg 2.18b: HSQC spekter (400/100 MHz) av scoparon (Rb-dcm-v5c3h1) løst i CDCl<sub>3</sub>.



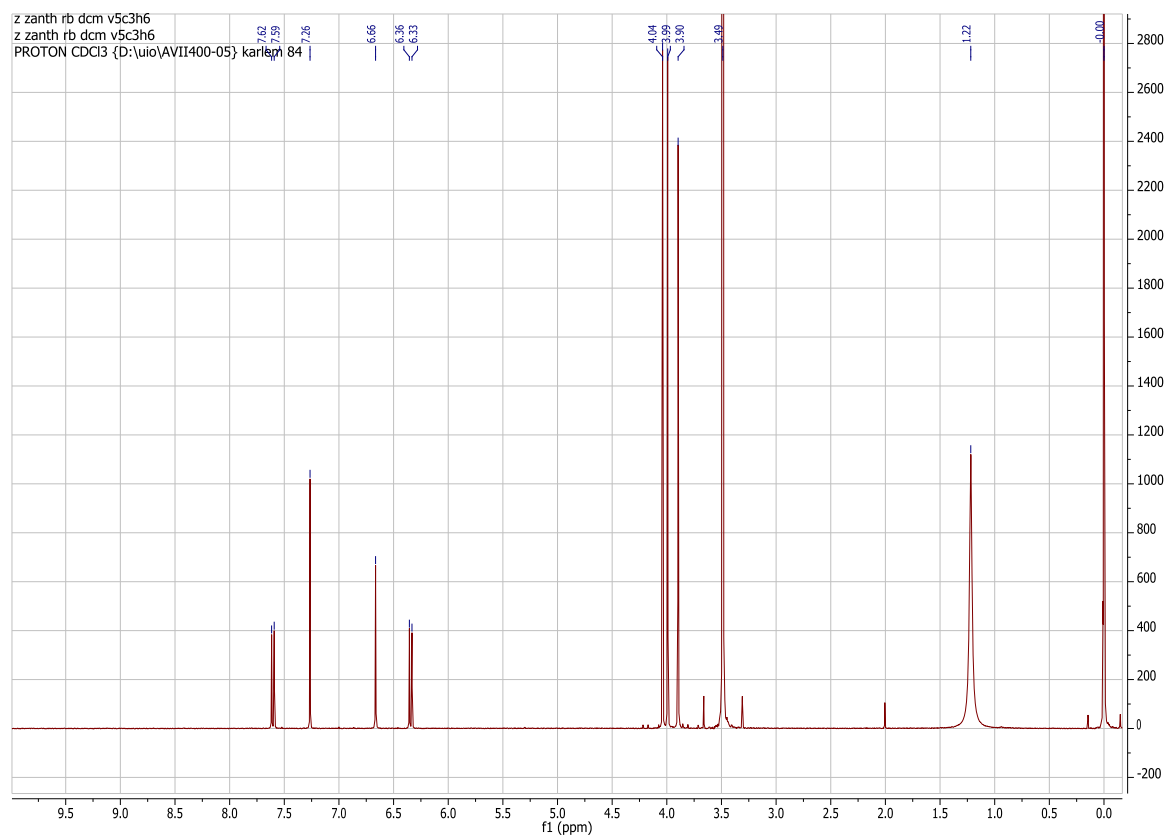
Vedlegg 2.18c: HMBC spekter (400/100 MHz) av scoparon (Rb-dcm-v5c3h1) løst i CDCl<sub>3</sub>.



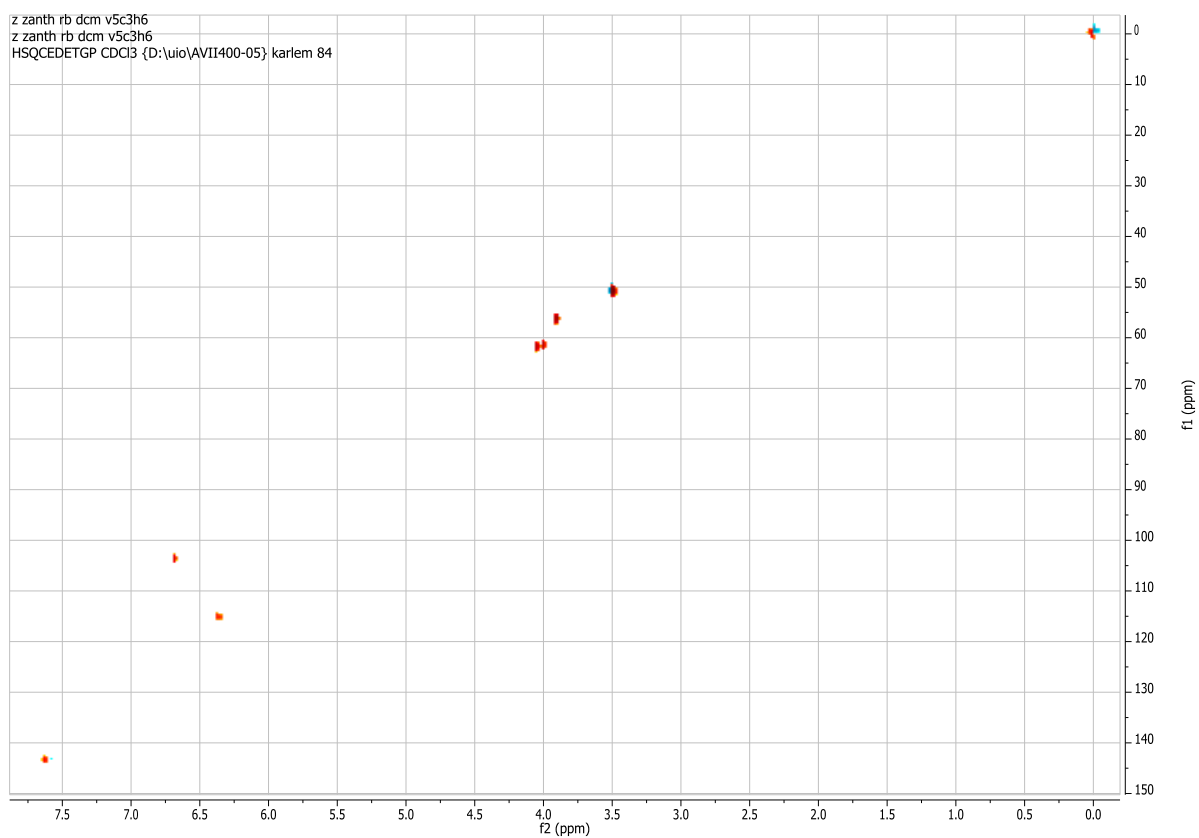
Vedlegg 2.18d: <sup>13</sup>C APT spekter (150 MHz) av scoparon (Rb-dcm-v5c4h3) løst i CDCl<sub>3</sub>.



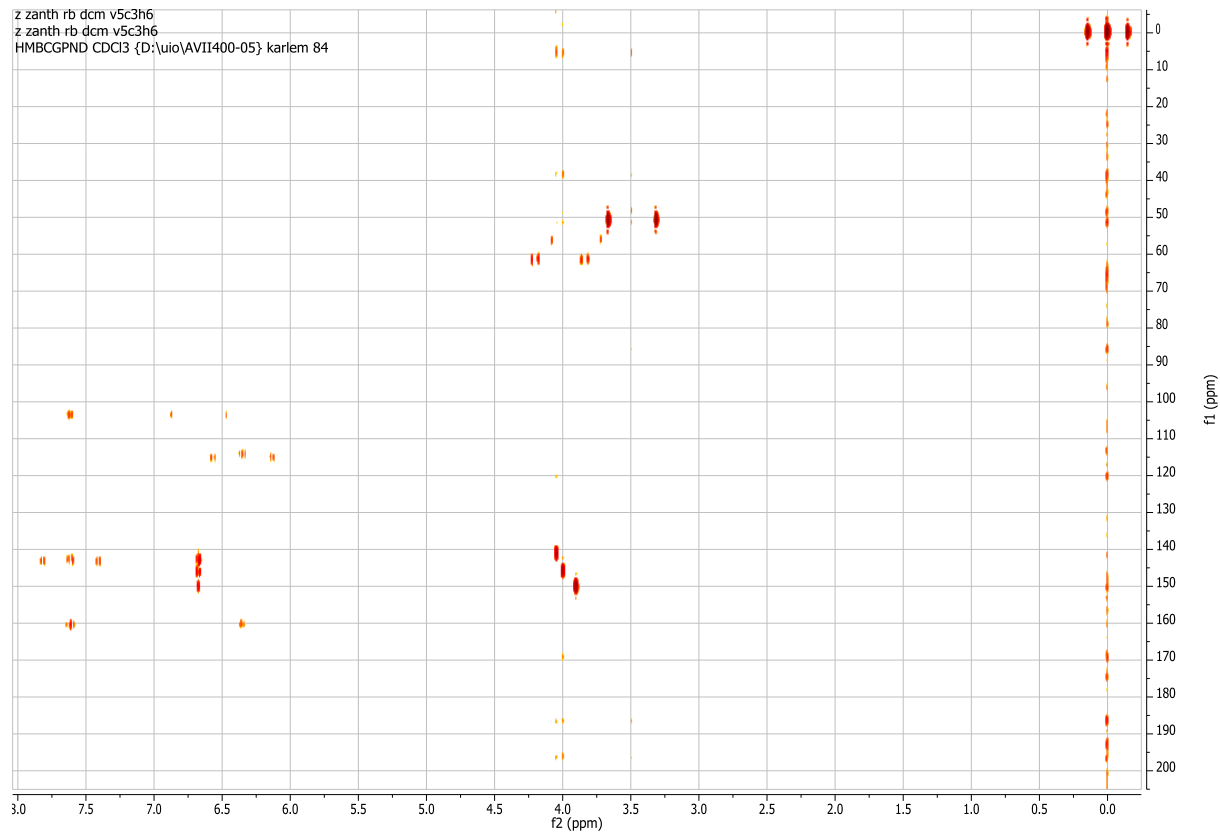
Vedlegg 2.18e: HMBC spekter (600/150 MHz) av scoparon (Rb-dcm-v5c4h3) løst i CDCl<sub>3</sub>.



Vedlegg 2.19a: <sup>1</sup>H-NMR spekter (400 MHz) av 6,7,8-trimetoksykumarin (Rb-dcm-v5c3h2) løst i CDCl<sub>3</sub>.

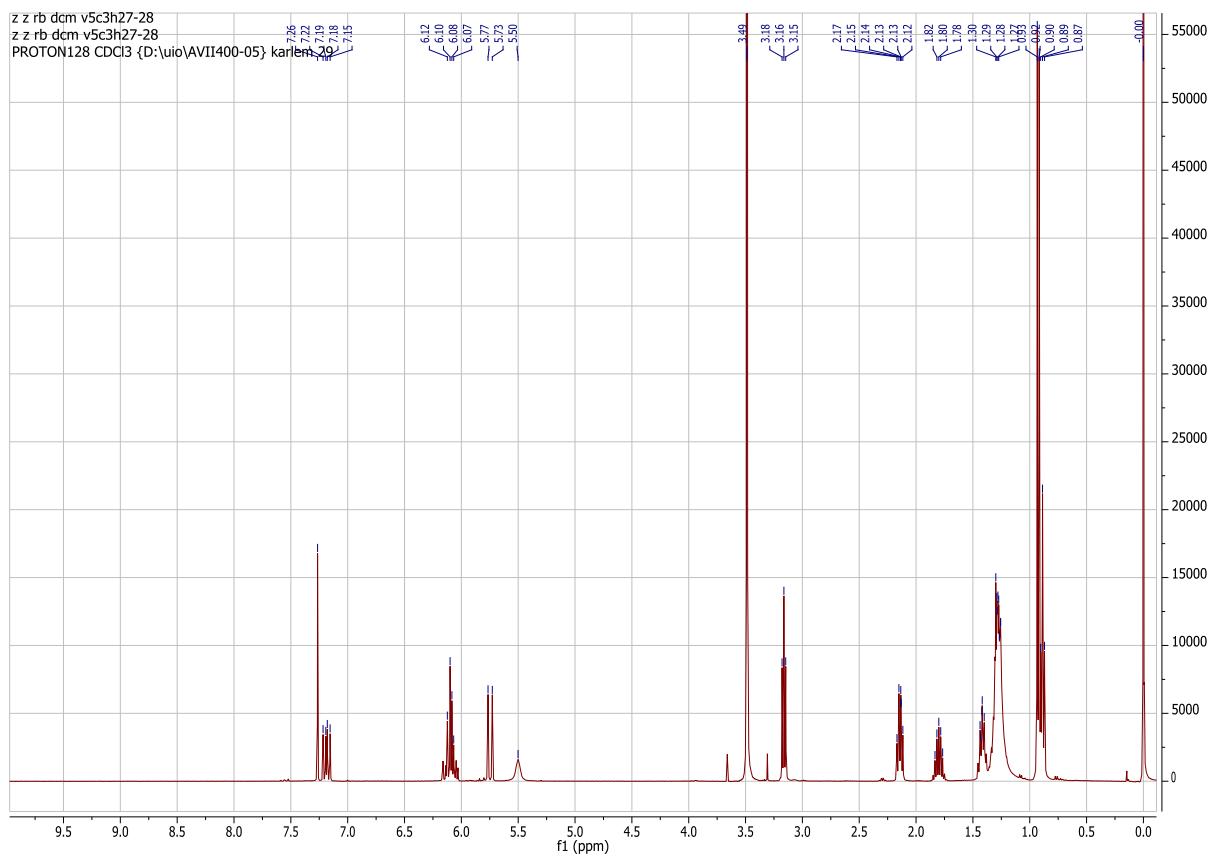


Vedlegg 2.19b: HSQC spekter (400/100 MHz) av 6,7,8-trimetoksykumarin (Rb-dcm-v5c3h2) løst i CDCl<sub>3</sub>.

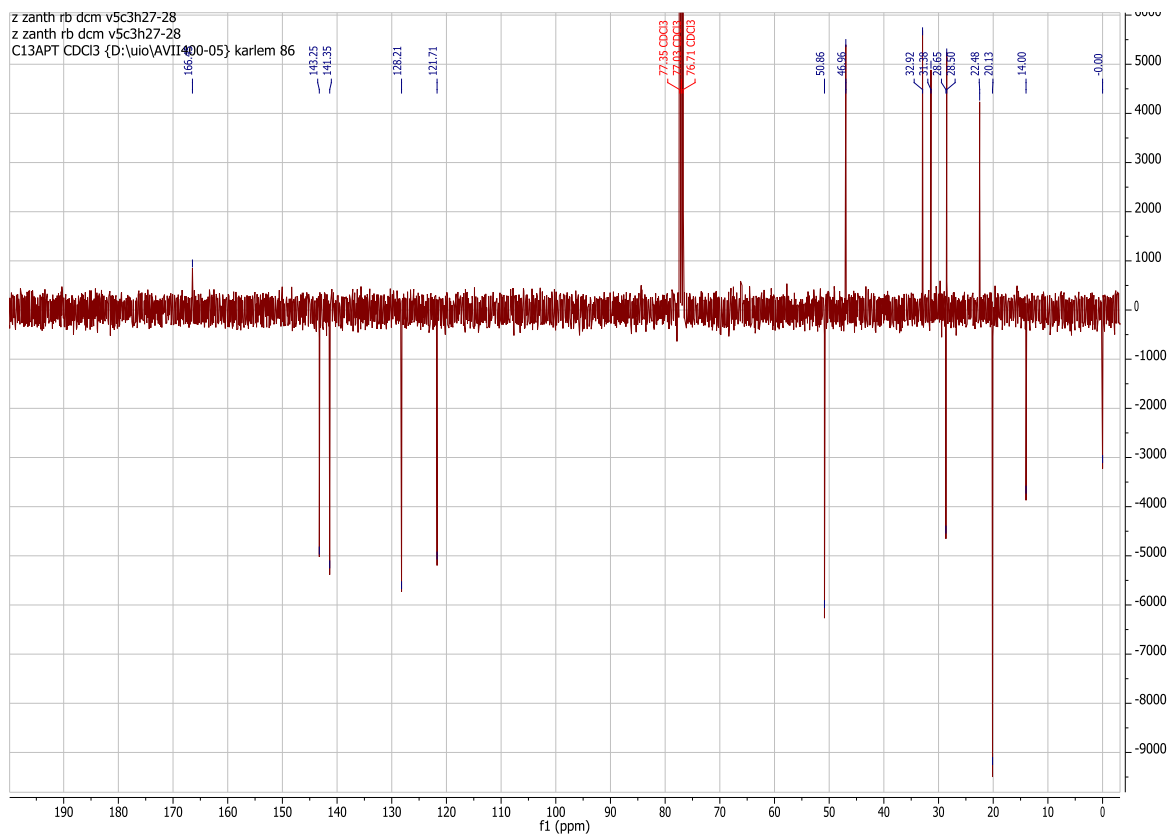


Vedlegg 2.19c: HMBC spekter (400/100 MHz) av 6,7,8-trimetoksykumarin (Rb-dcm-v5c3h2) løst i CDCl<sub>3</sub>.

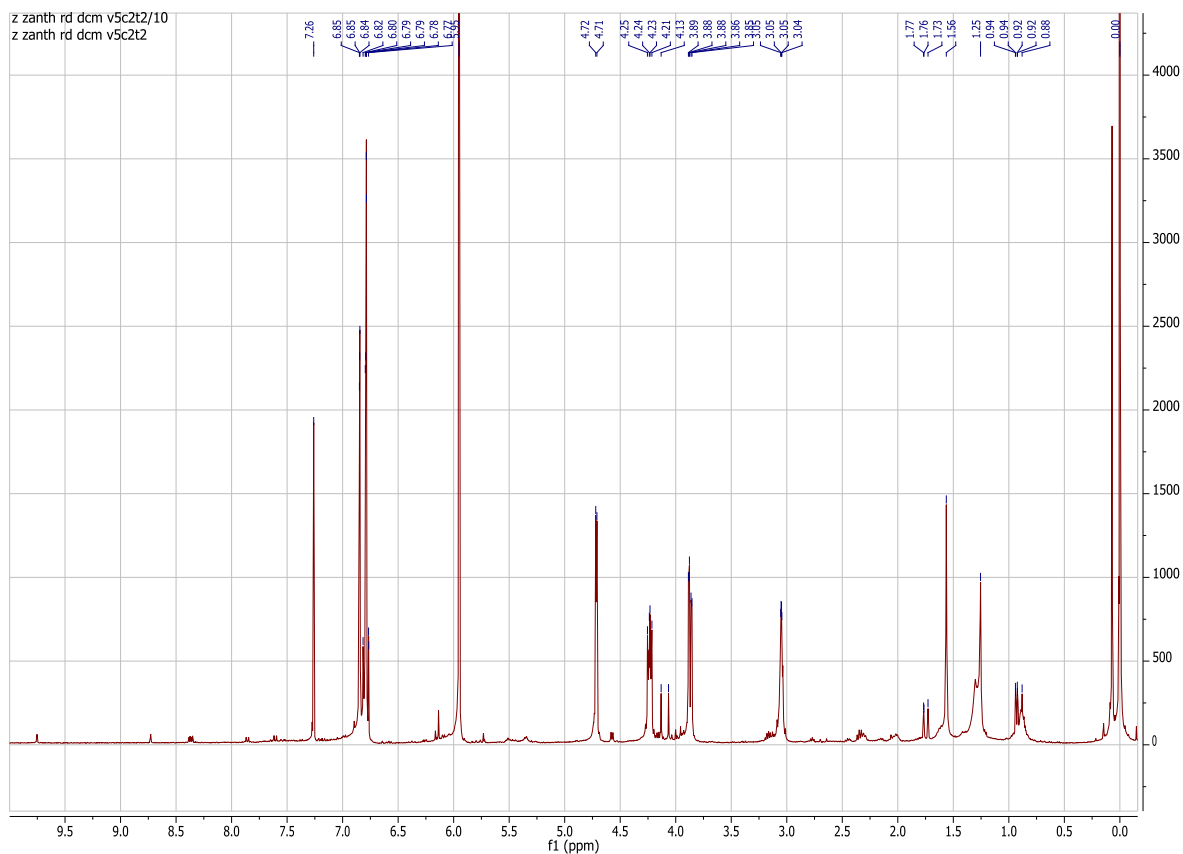




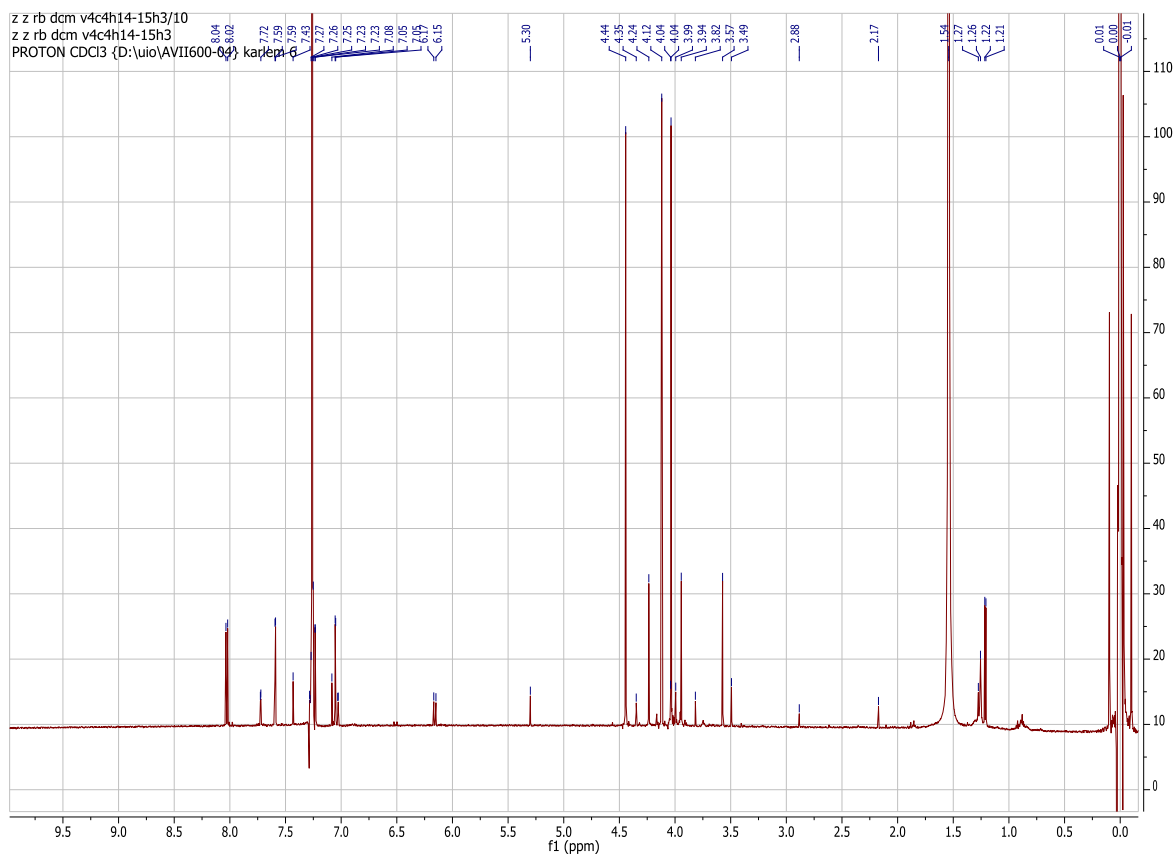
Vedlegg 2.20a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter (400 MHz) av pellitorin (Rb-dcm-v5c3h9) løst i  $\text{CDCl}_3$ .



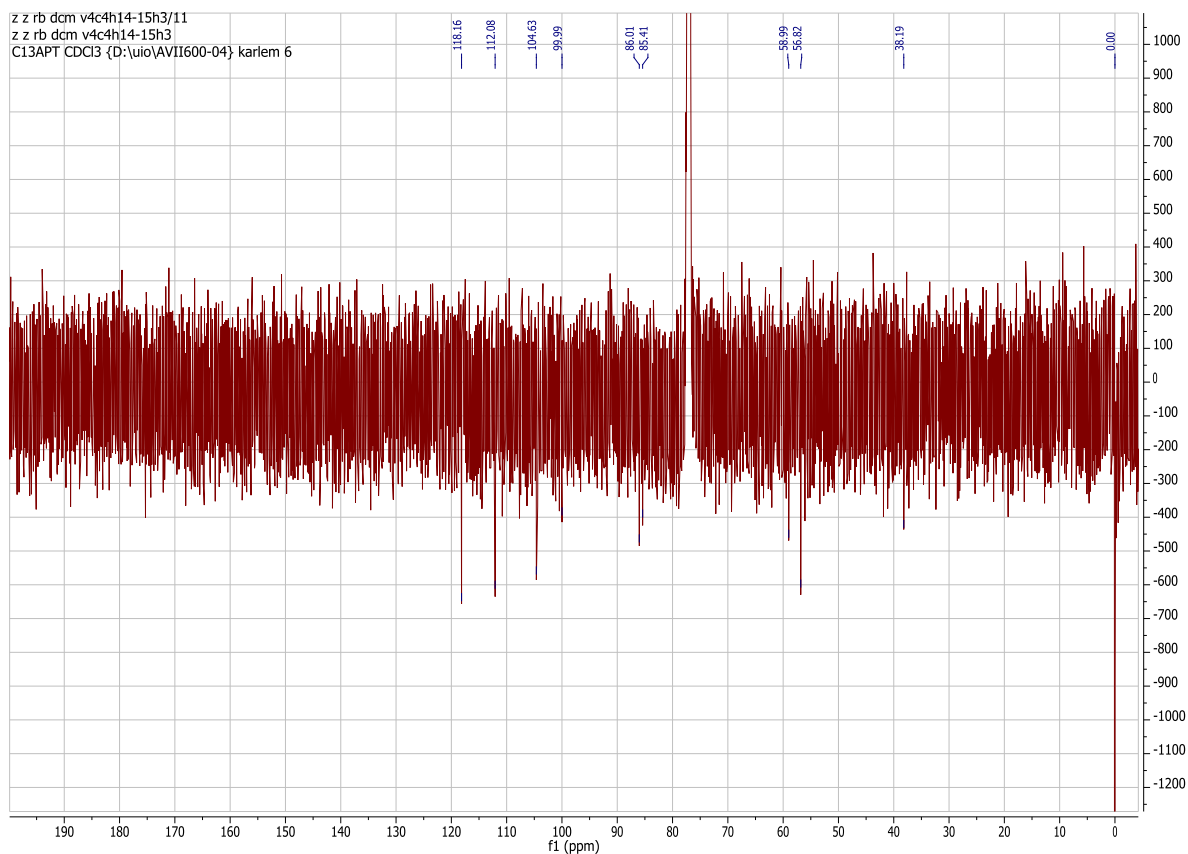
Vedlegg 2.20b:  $^{13}\text{C}$  APT spekter (100 MHz) av pellitorin (Rb-dcm-v5c3h9) løst i  $\text{CDCl}_3$ .



Vedlegg 2.21:  $^1\text{H}$ -NMR spekter (400 MHz) av sesamin (Rb-dcm-v5c3t2) løst i  $\text{CDCl}_3$ .



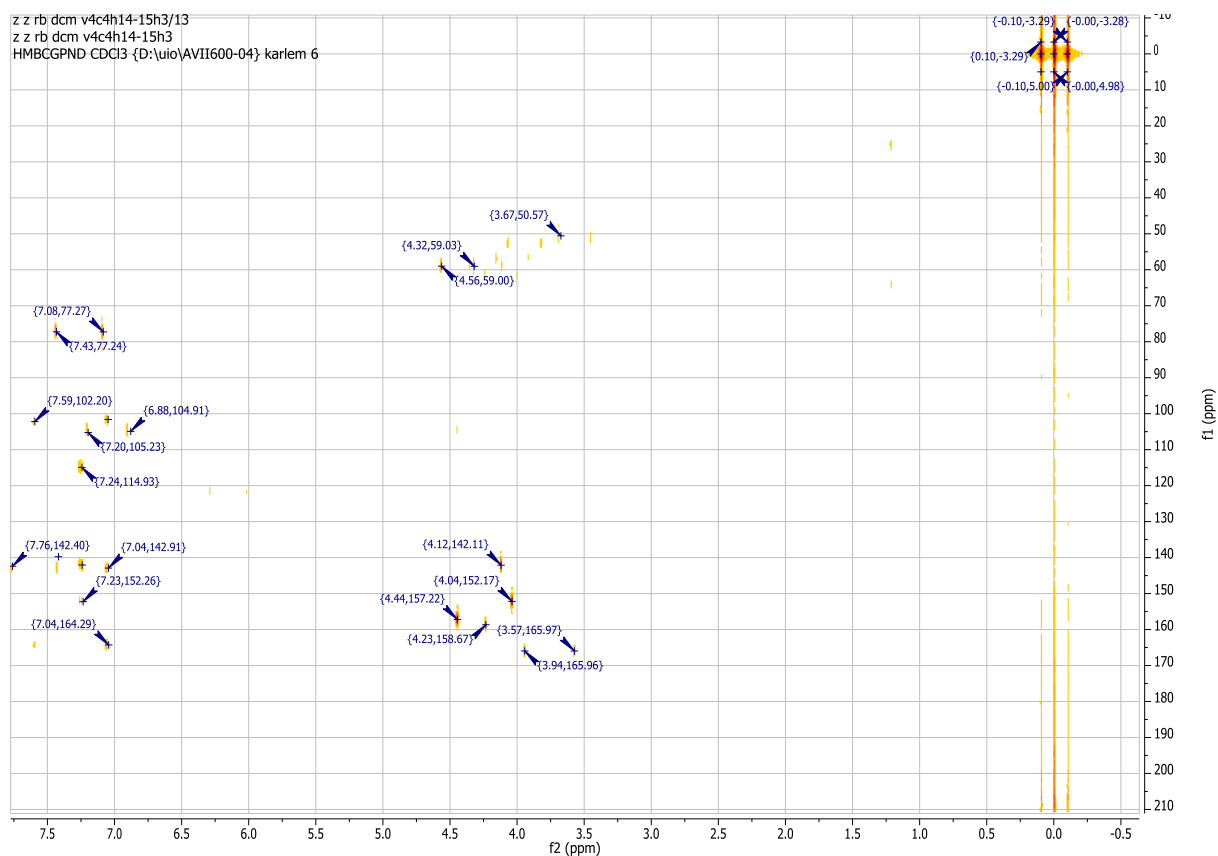
Vedlegg 2.22a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter (600 MHz) av uren skimmianin (Rb-dcm-v4c4h2h3) løst i  $\text{CDCl}_3$ .



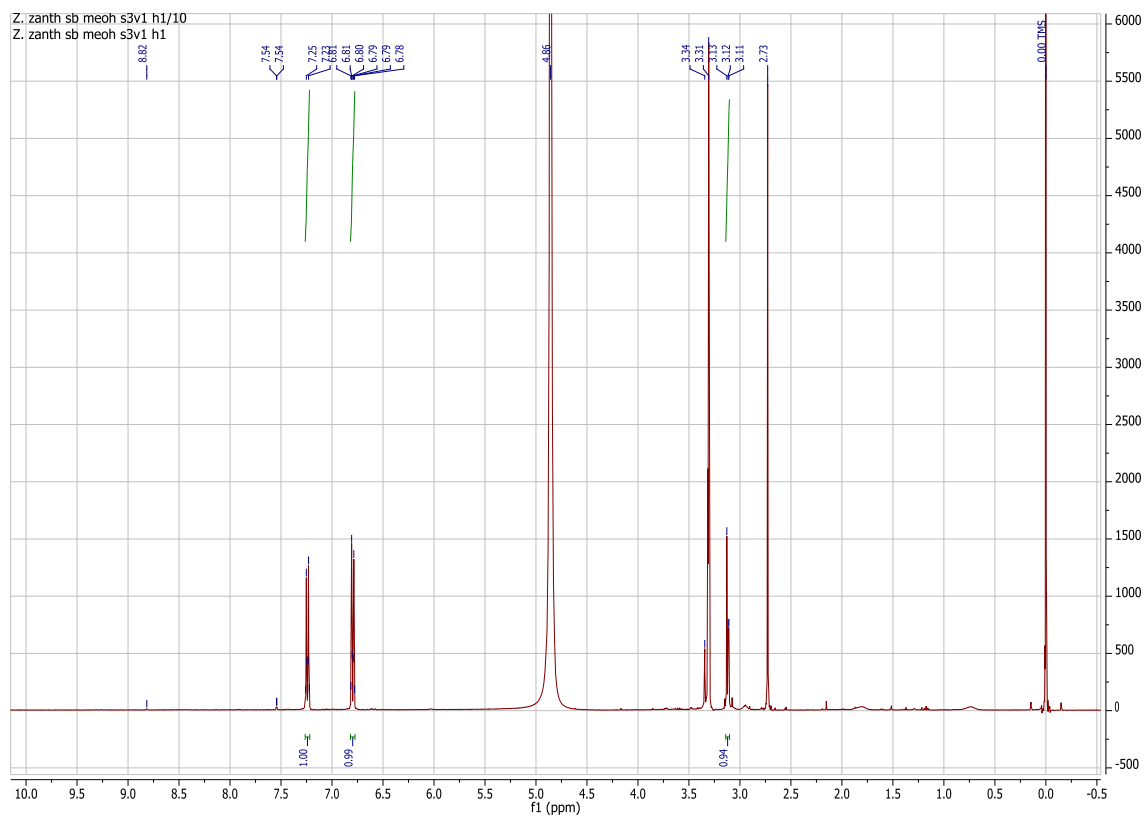
Vedlegg 2.22b: <sup>13</sup>C APT spekter (150 MHz) av uren skimmianin (Rb-dcm-v4c4h2h3) løst i CDCl<sub>3</sub>.



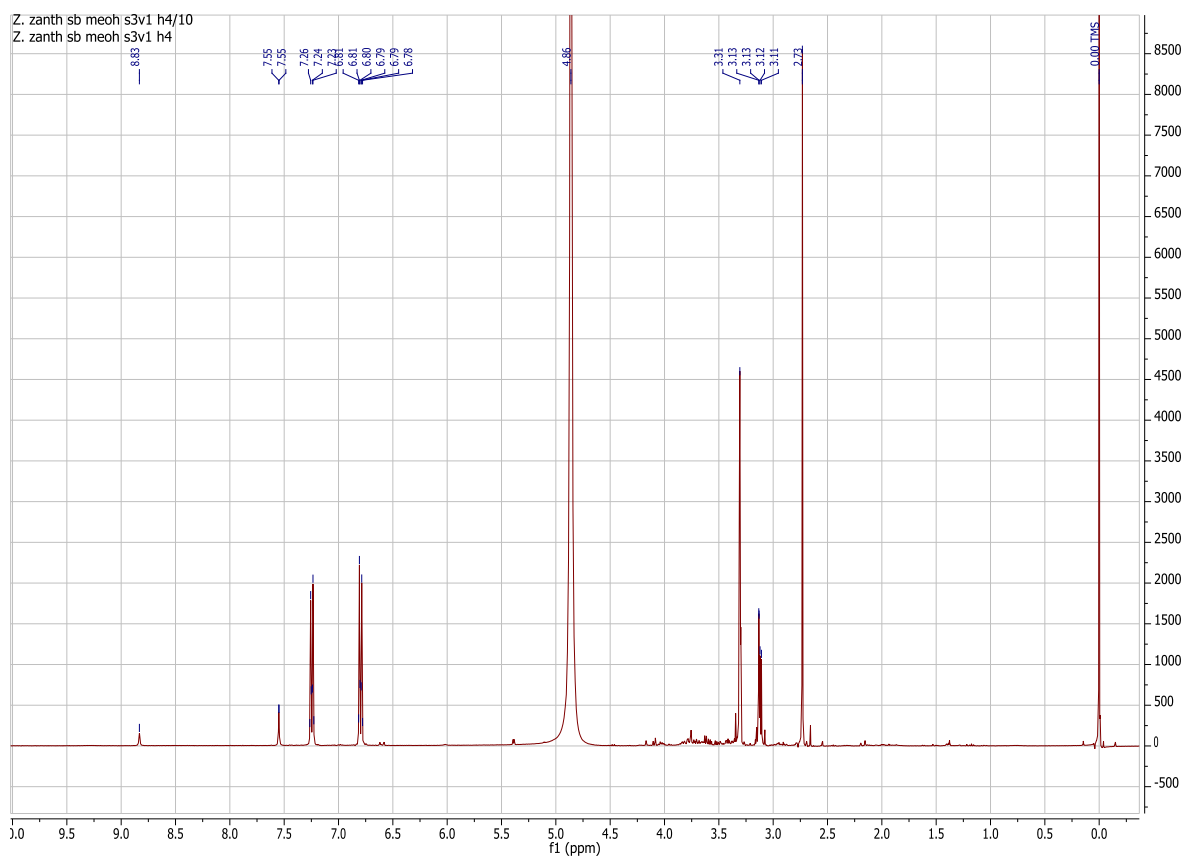
Vedlegg 2.22c: HSQC spekter av uren skimmianin (Rb-dcm-v4c4h2h3) løst i CDCl<sub>3</sub>.



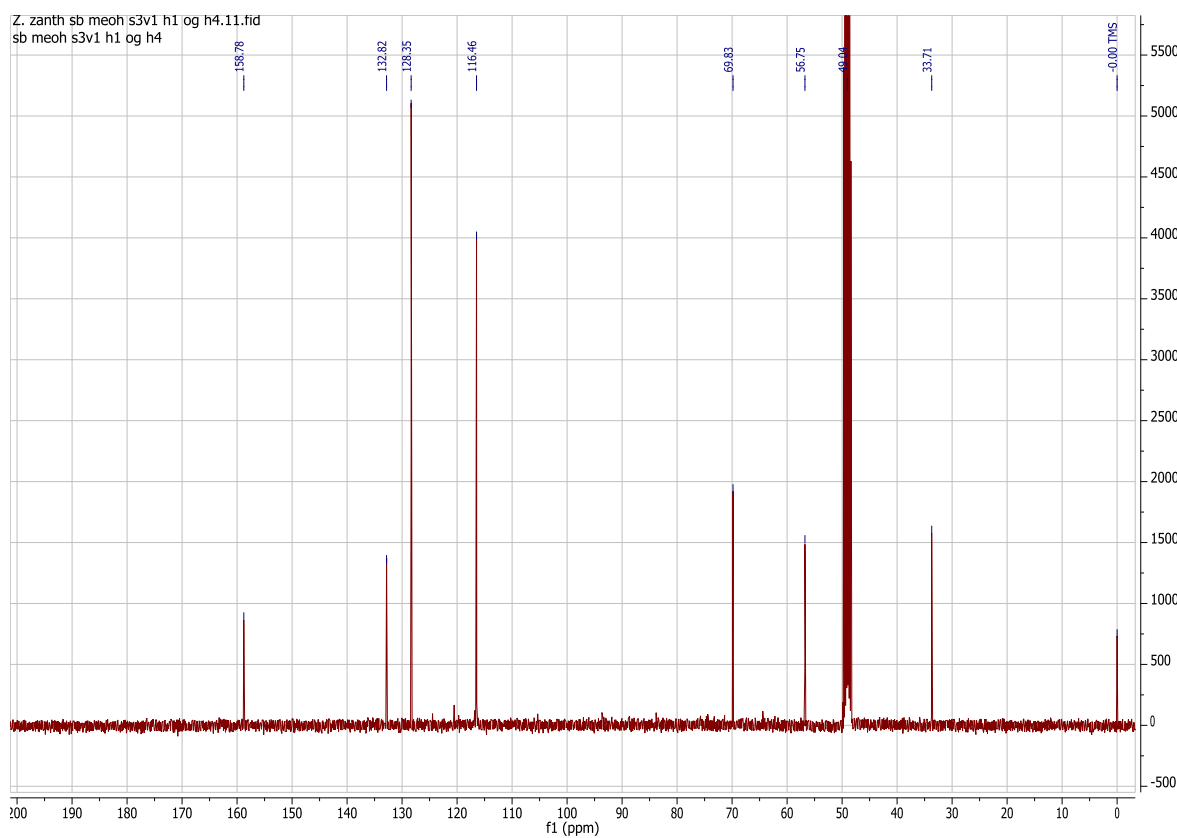
Vedlegg 2.22d: HMBC spekter av uren skimmianin (Rb-dcm-v44h2h3) løst i  $\text{CDCl}_3$ .



Vedlegg 2.23a:  $^1\text{H}$ -NMR spekter (400 MHz) av synephrine (Sb-meoh-s3v1h1) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



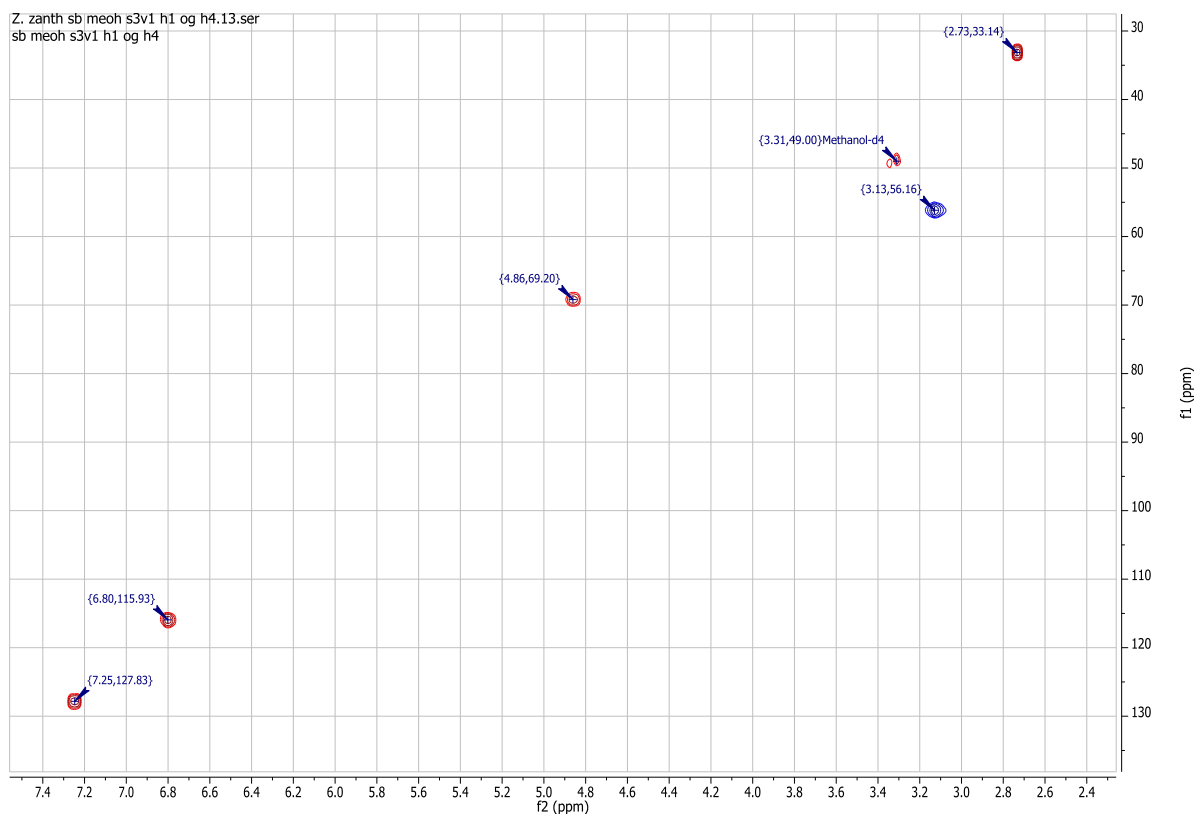
Vedlegg 2.23b:  $^1\text{H}$ -NMR spekter (400 MHz) av synephrine (Sb-meoh-s3v1h4) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



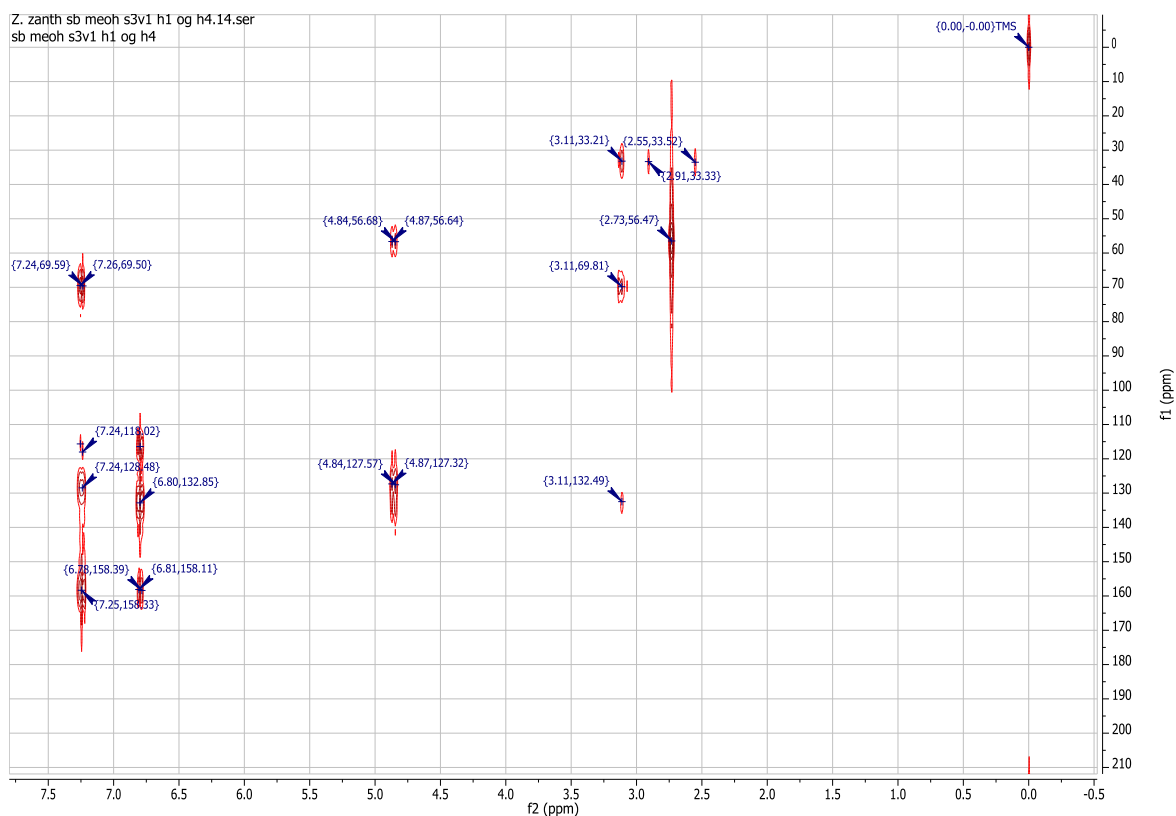
Vedlegg 2.23c:  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter (100 MHz) av synephrine (Sb-meoh-s3v1h1+h4) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



Vedlegg 2.23d: COSY spekter (400 MHz) av synephrine (Sb-meoh-s3v1h1+h4) løst i CD<sub>3</sub>OD.

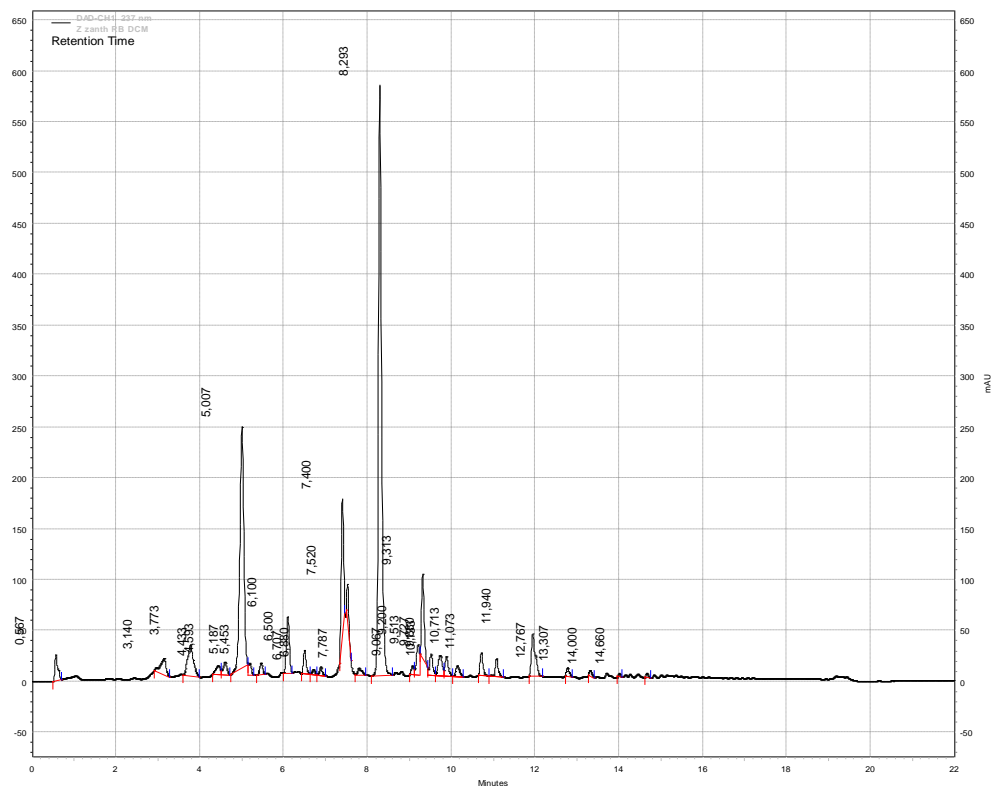


Vedlegg 2.23e: HSQC spekter (400/100 MHz) av synephrine (Sb-meoh-s3v1h1+h4) løst i CD<sub>3</sub>OD.

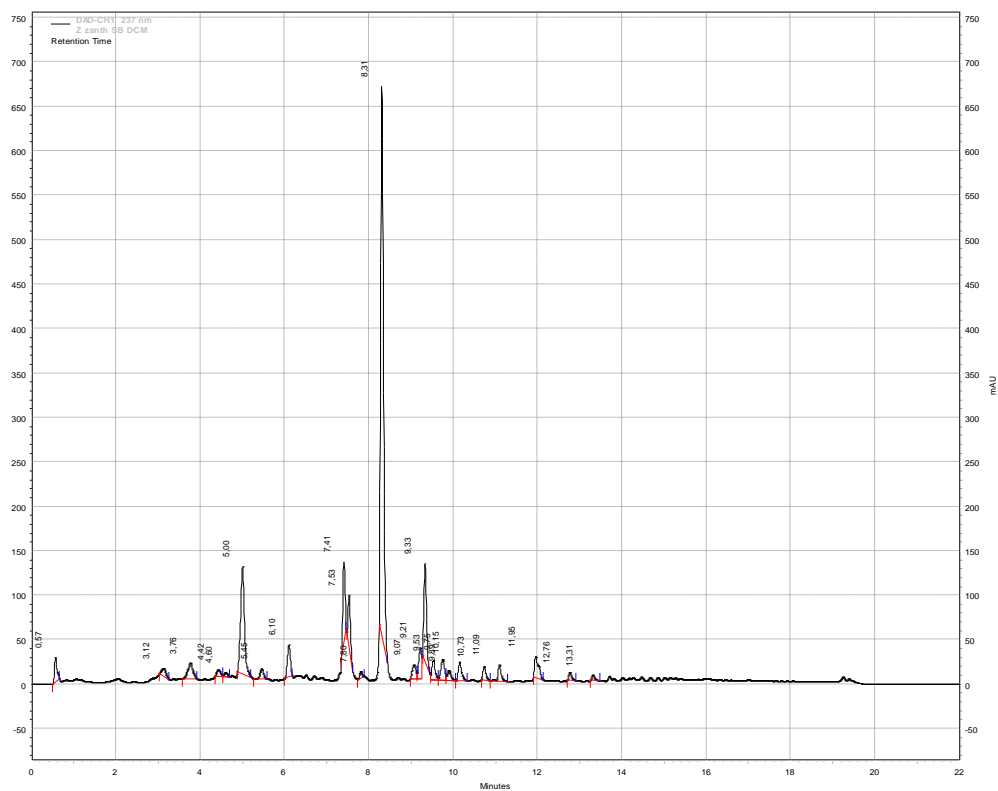


Vedlegg 2.23f: HMBC spekter (400/100 MHz) av synephrine (Sb-meoh-s3v1h1+h4) løst i  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

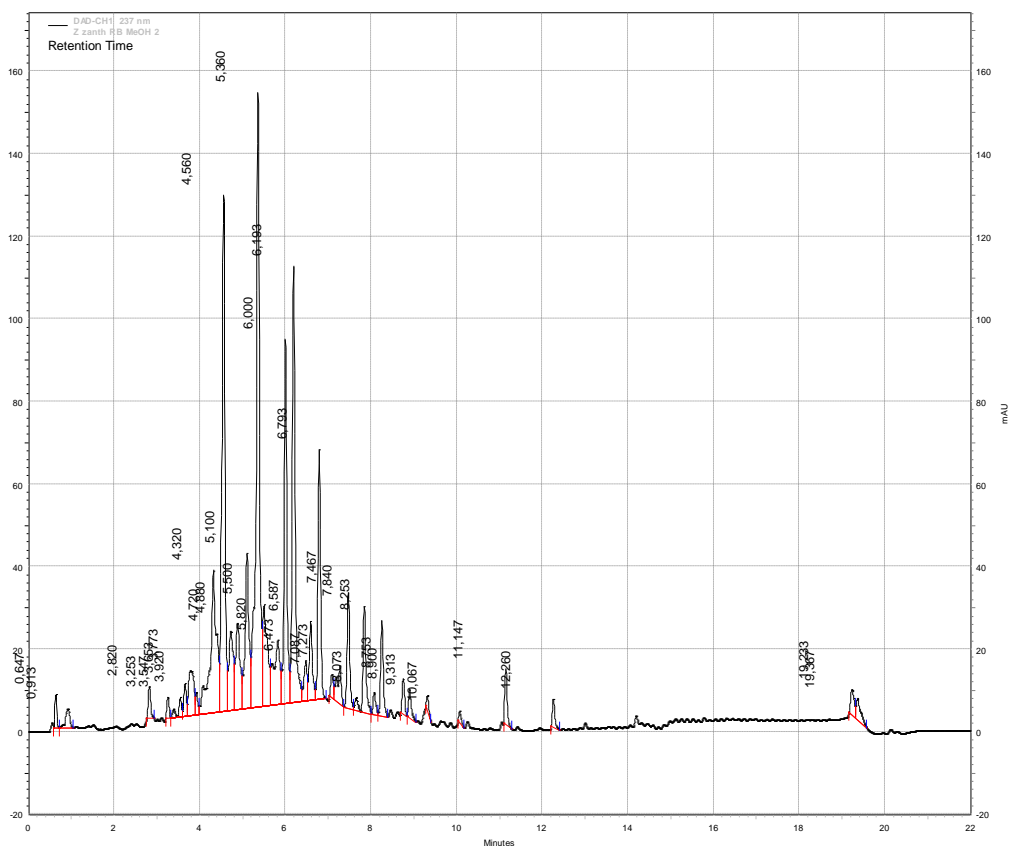
### 3. KROMATOGRAMMER FRA ANALYTISK HPLC



Vedlegg 3.1: Kromatogram (237 nm) av rotbark DCM-råekstrakt.

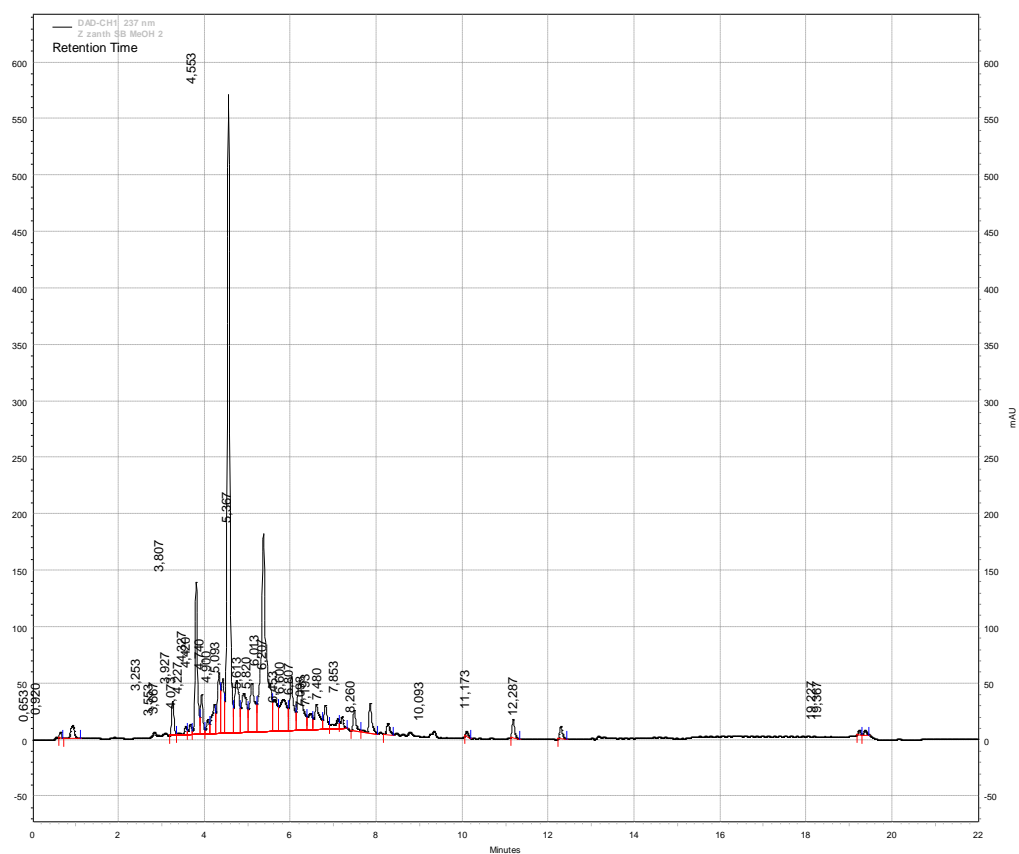


Vedlegg 3.2: Kromatogram (237 nm) av stammebark DCM-råekstrakt.

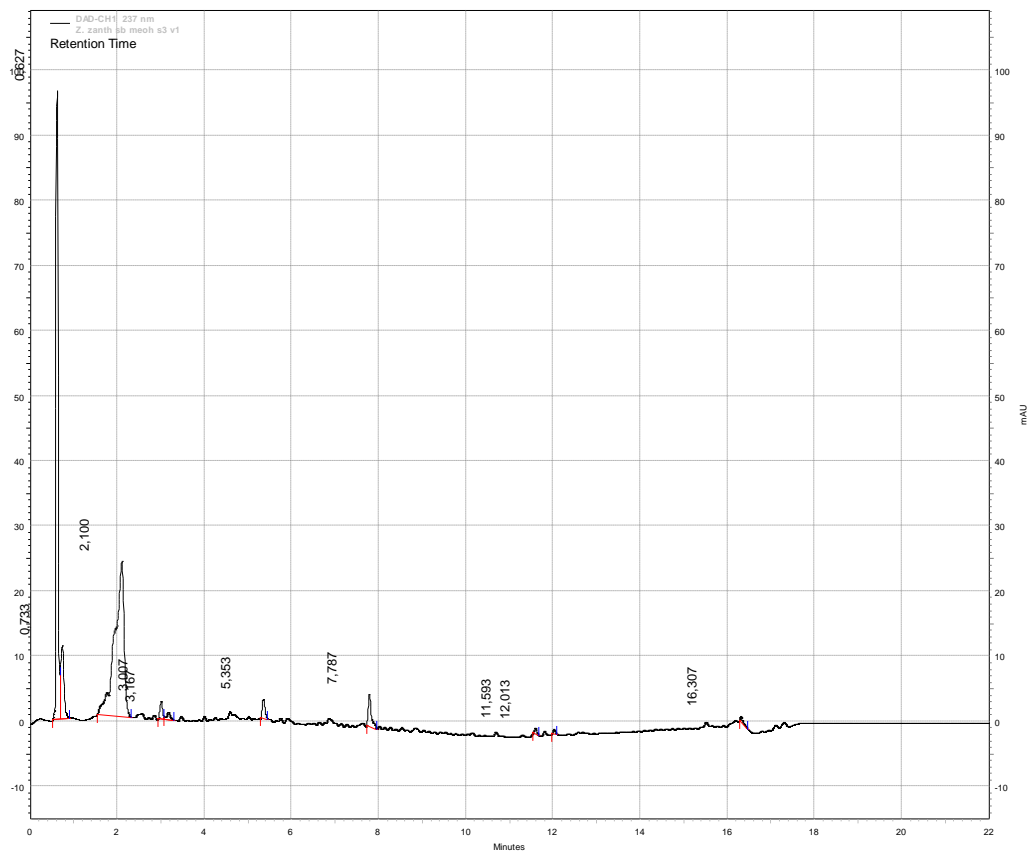


Vedlegg 3.3: Kromatogram (237 nm) av MeOH-råekstrakt av rotbark.

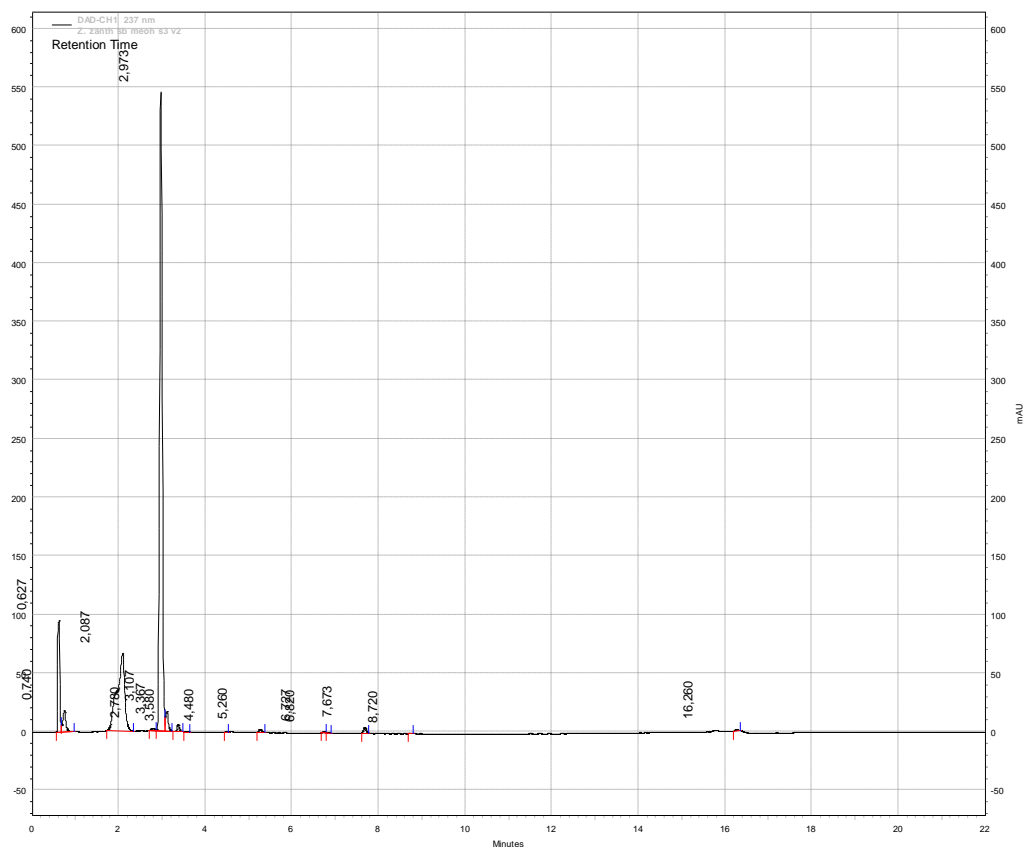




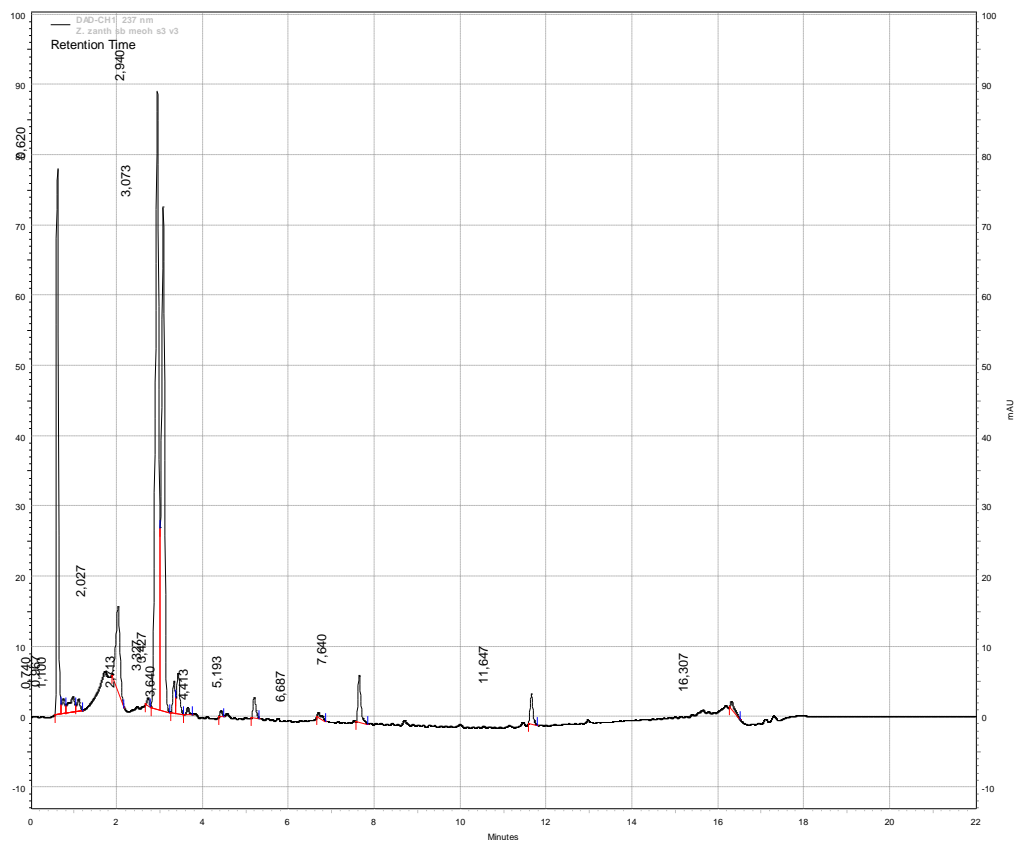
Vedlegg 3.4: Kromatogram (237 nm) av MeOH-råekstrakt av stammebark.



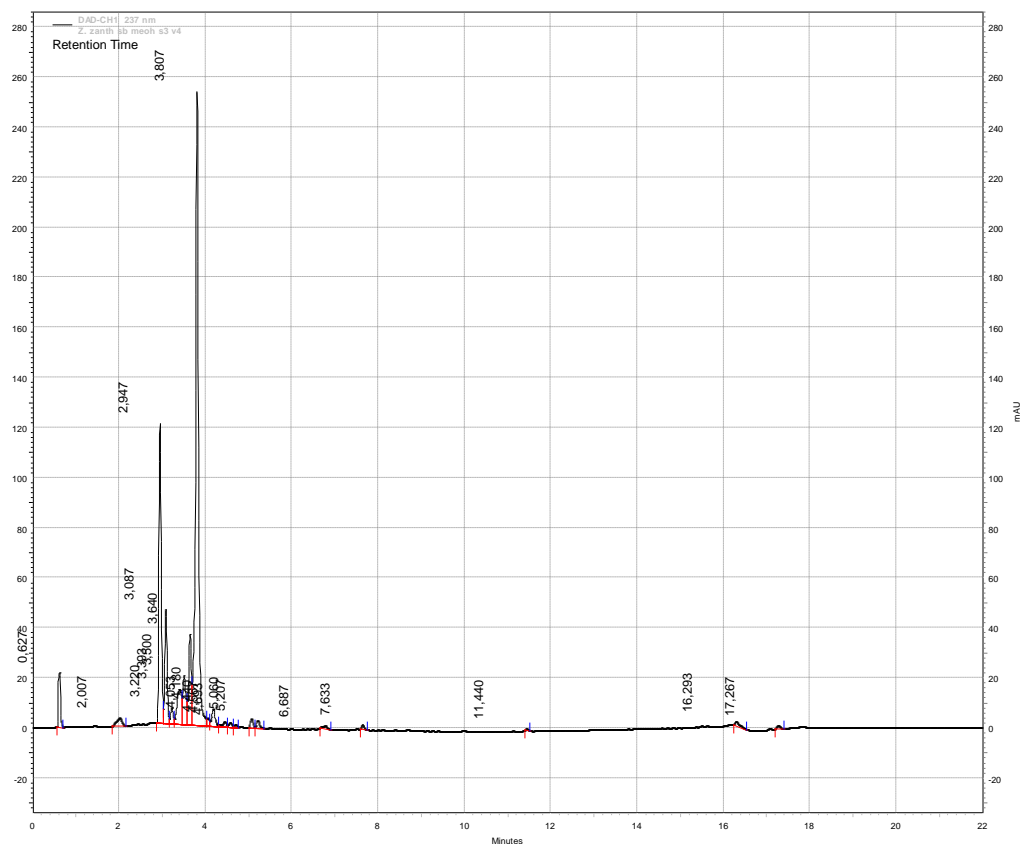
Vedlegg 3.5: Kromatogram (237 nm) av Sb-meoh-s3v1 med gradienteluering.



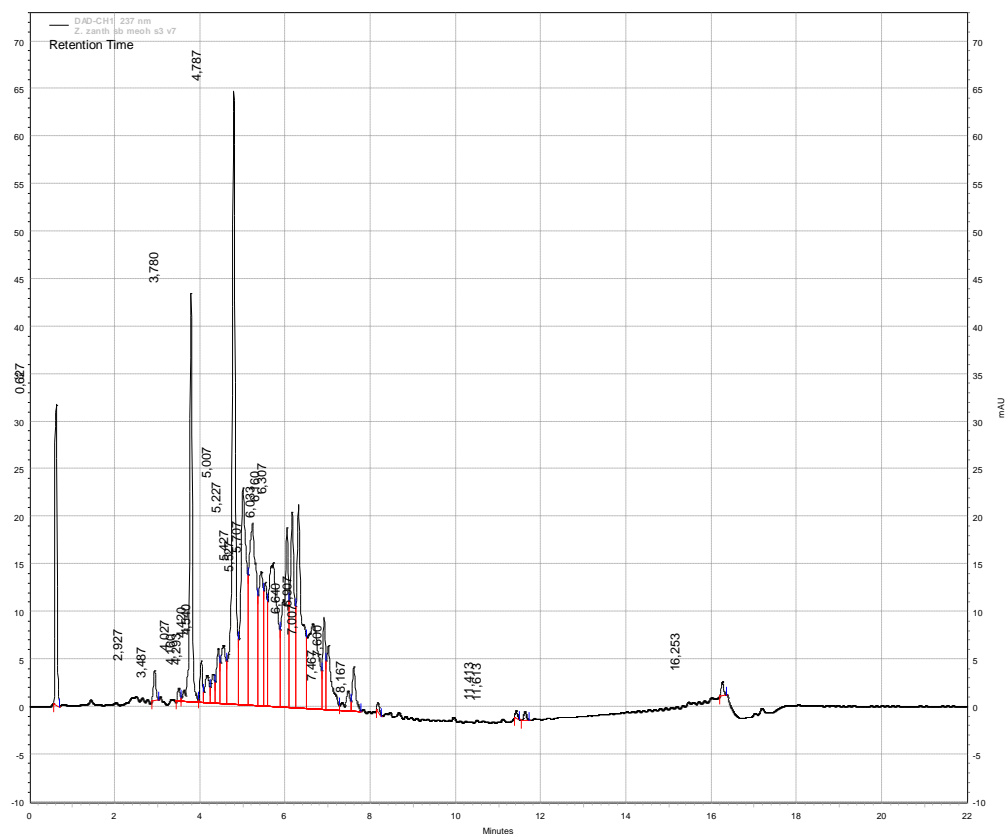
Vedlegg 3.6: Kromatogram (237 nm) av Sb-meoh-s3v2 med gradienteluering.



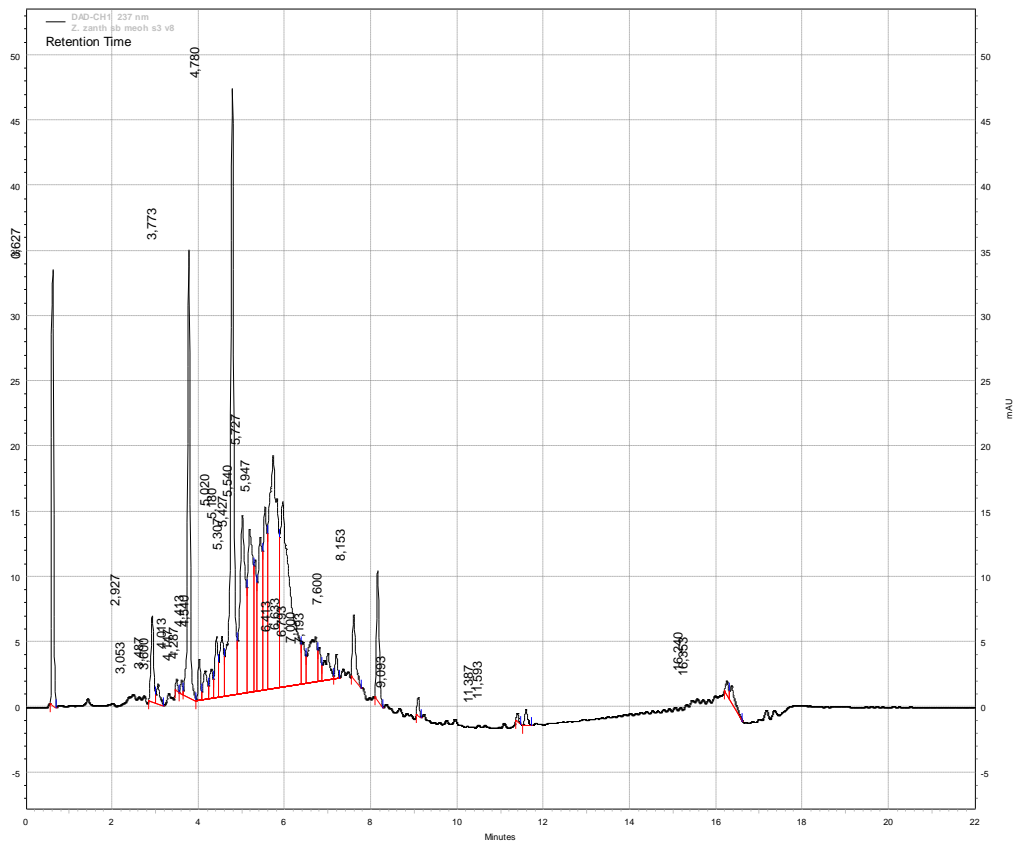
Vedlegg 3.7: Kromatogram (237 nm) av Sb-meoh-s3v3 med gradienteluering.



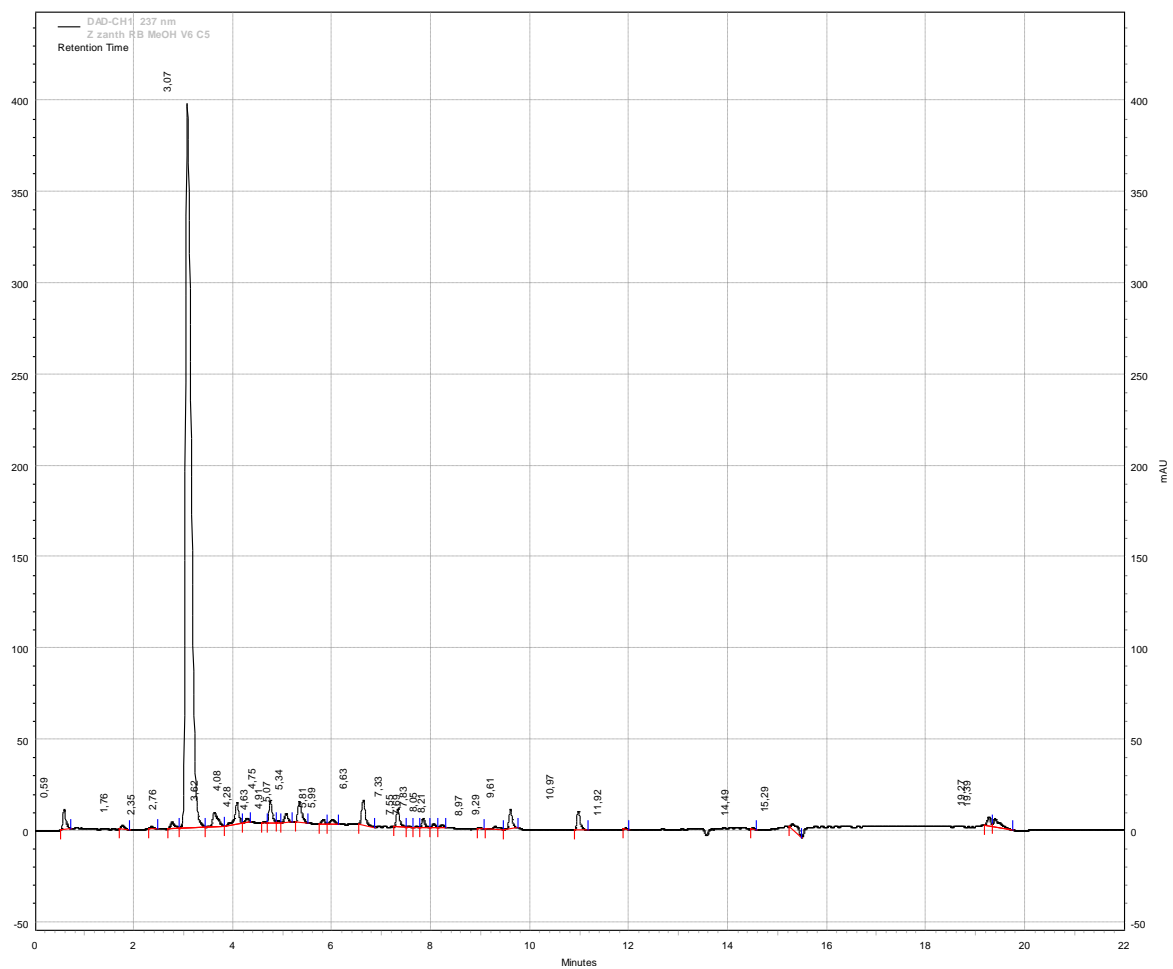
Vedlegg 3.8: Kromatogram (237 nm) av Sb-meoh-s3v4 med gradienteluering.



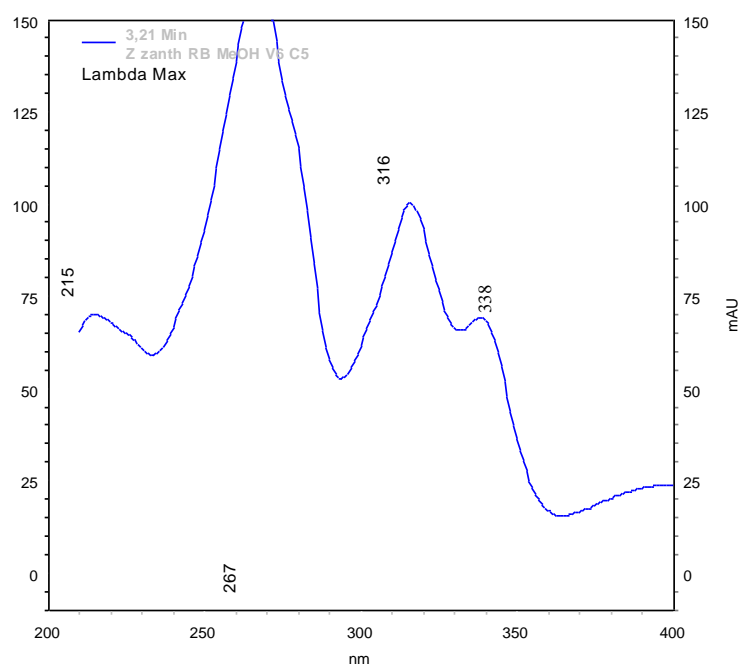
Vedlegg 3.9: Kromatogram (237 nm) av Sb-meoh-s3v7 med gradienteluering.



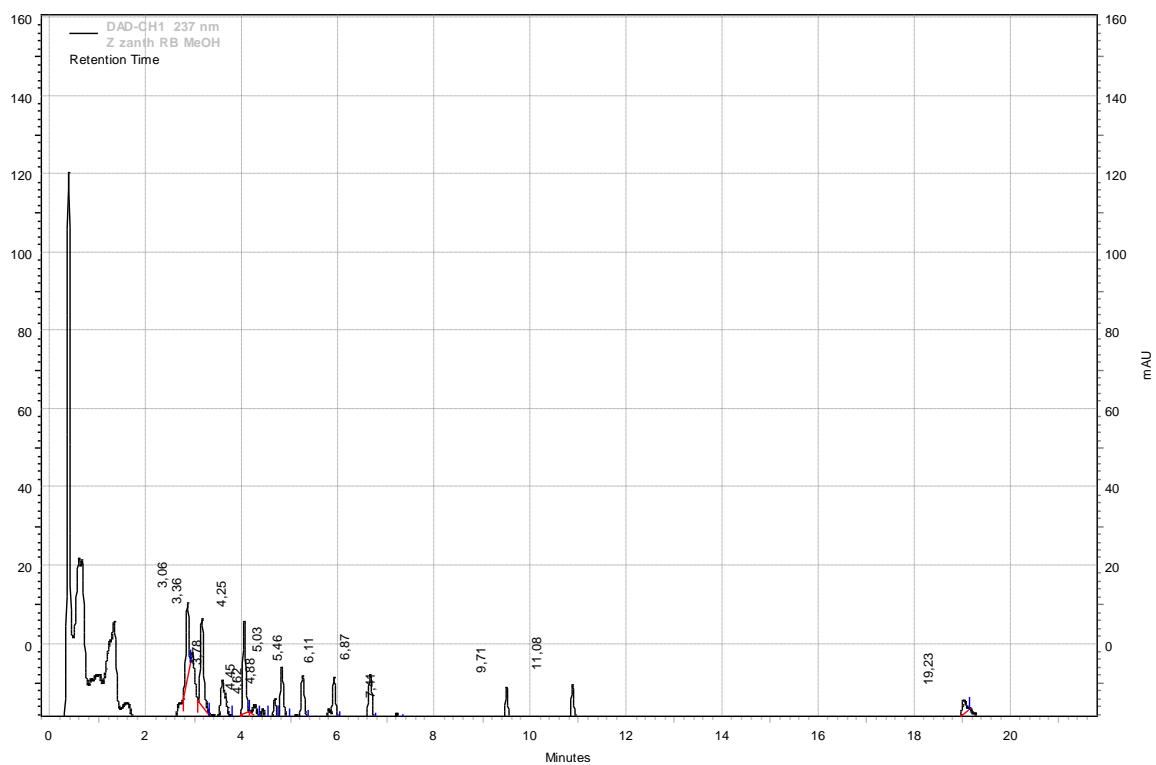
Vedlegg 3.10: Kromatogram (237 nm) av Sb-meoh-s3v8 med gradienteluering.



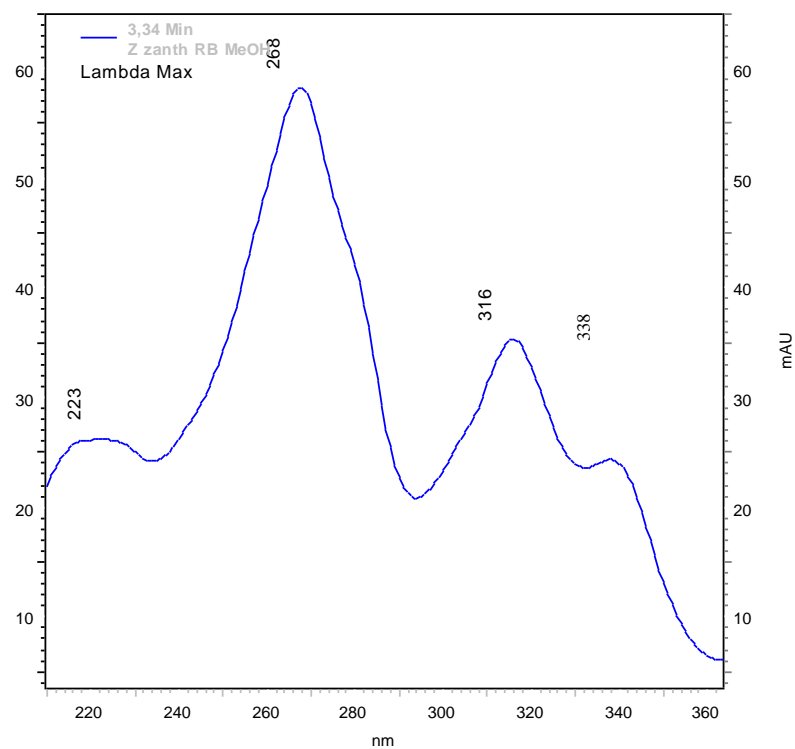
Vedlegg 3.11a: Kromatogram (237 nm) av buesgenin (Rb-meoh-v6c5).



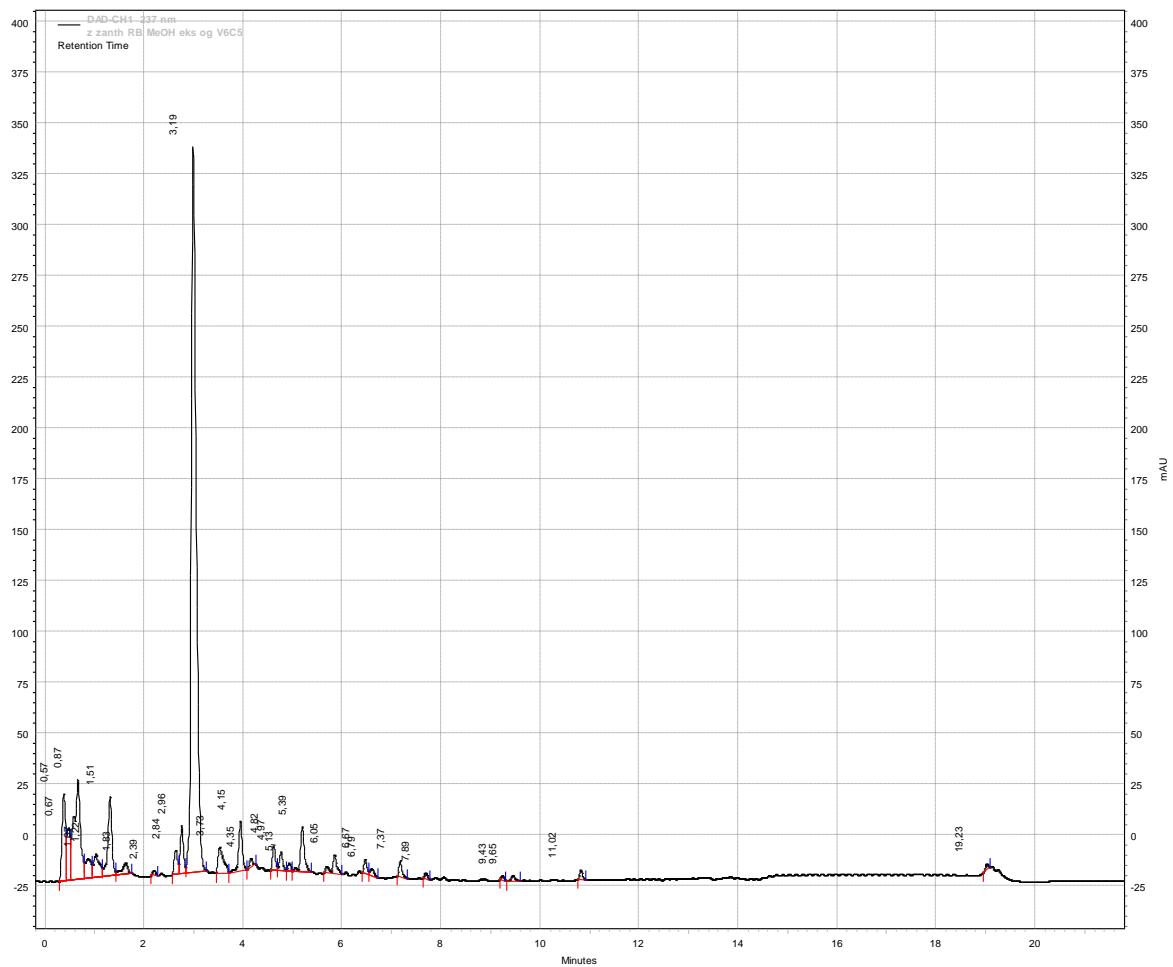
Vedlegg 3.11b: UV-spektrum (237 nm) av buesgenin (Rb-meoh-v6c5) ved 3,2 min.



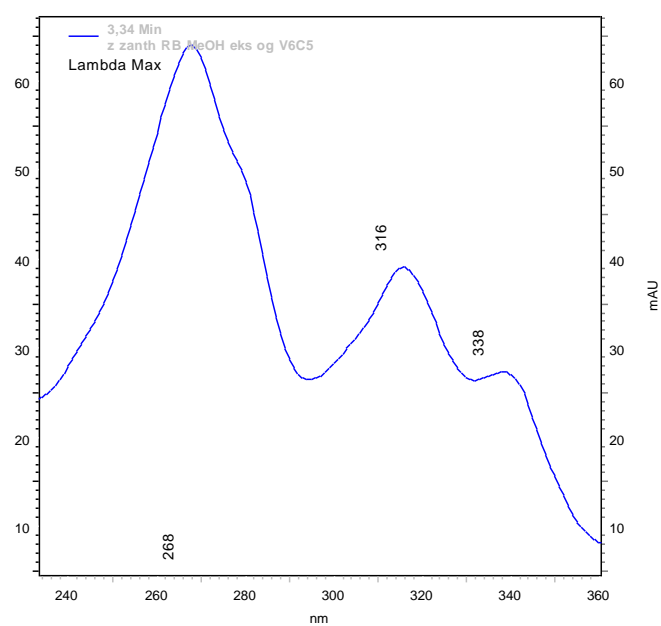
Vedlegg 3.12a: Kromatogram (237 nm) av MeOH-råekstrakt av rotbark med samme metode som for buesgenin.



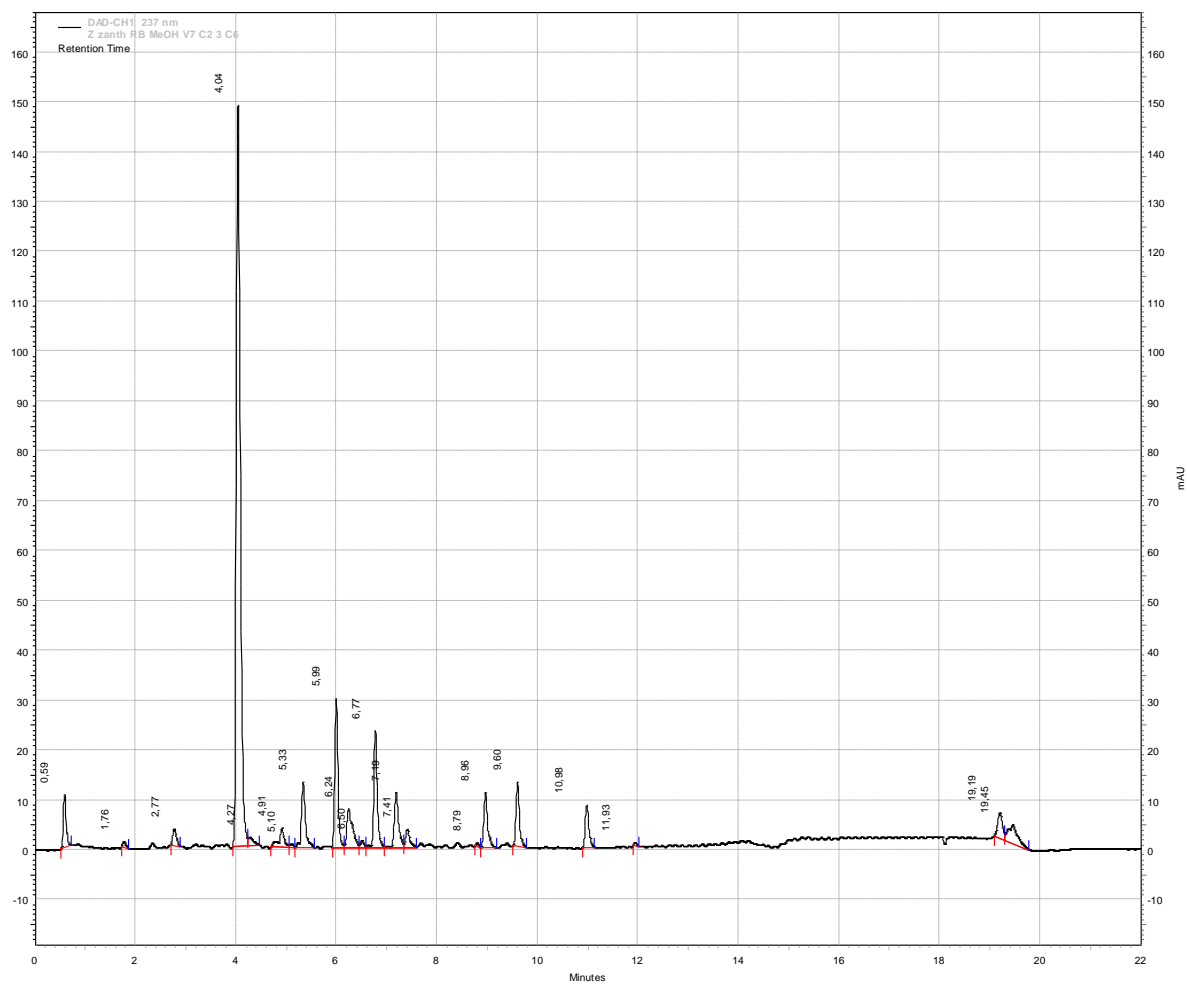
Vedlegg 3.12b: UV-spektrum (237 nm) av MeOH-råekstrakt av rotbark ved 3.3 min.



Vedlegg 3.13a: Kromatogram (237 nm) av buesgenin (Rb-meoh-v6c5) og MeOH-rækstrakt av rotbark.

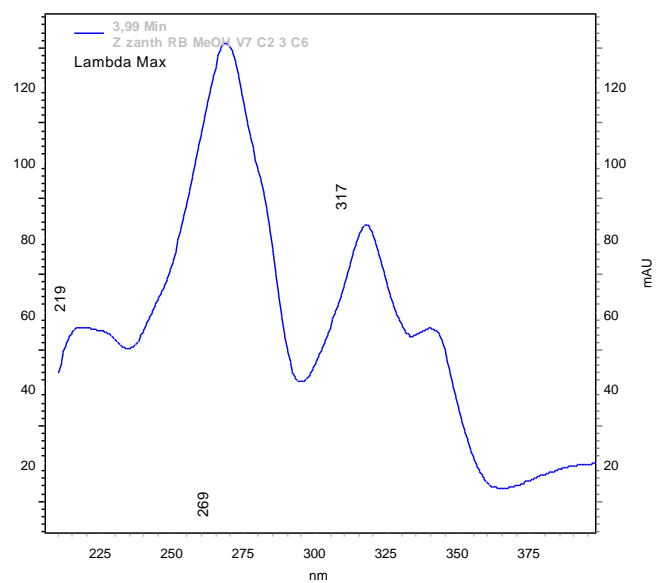


Vedlegg 3.13b: UV-spektrum (237 nm) av buesgenin (Rb-meoh-v6c5) og MeOH-rækstrakt av rotbark ved 3.3 min.

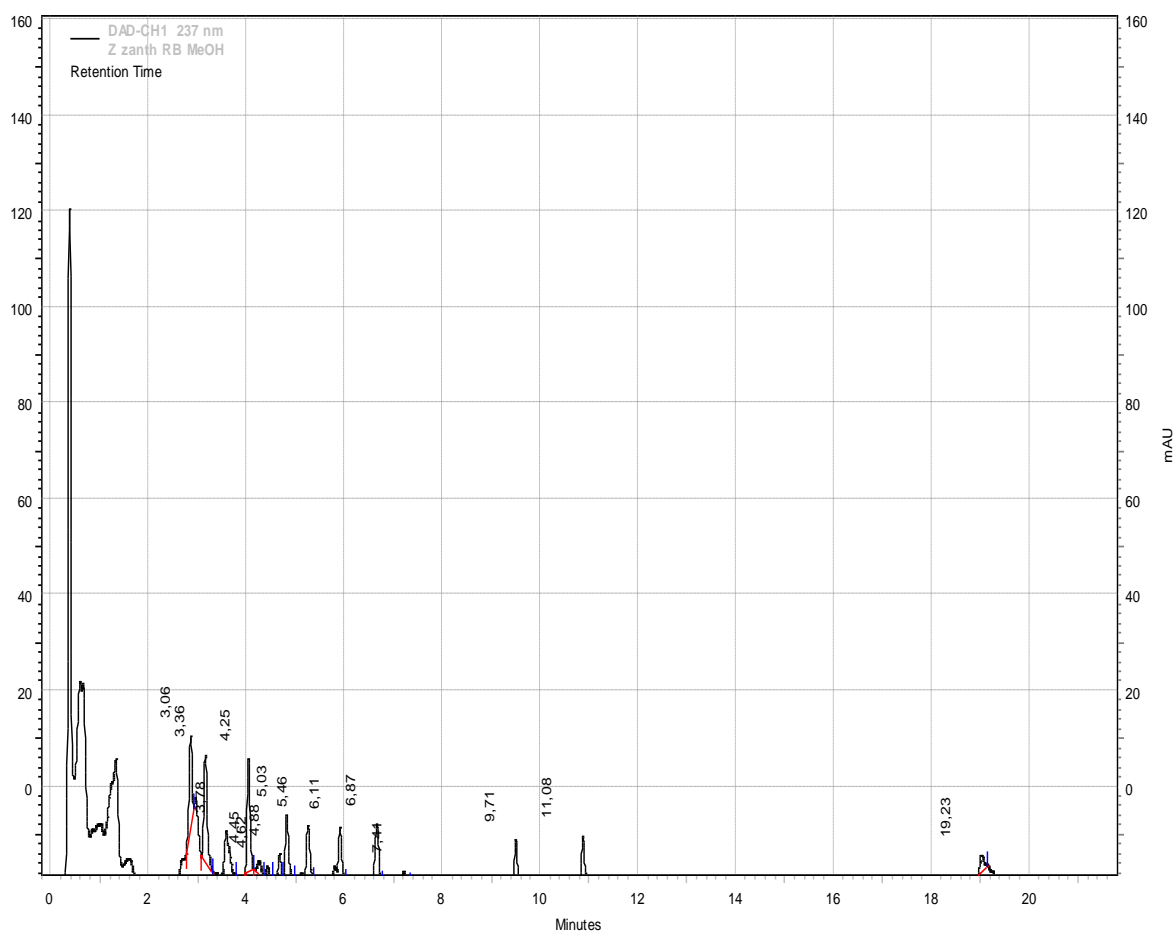


Vedlegg 3.14a: Kromatogram (237 nm) av bis-dihydrochelerythrinyleter (Rb-dcm-v7c2+3c6)

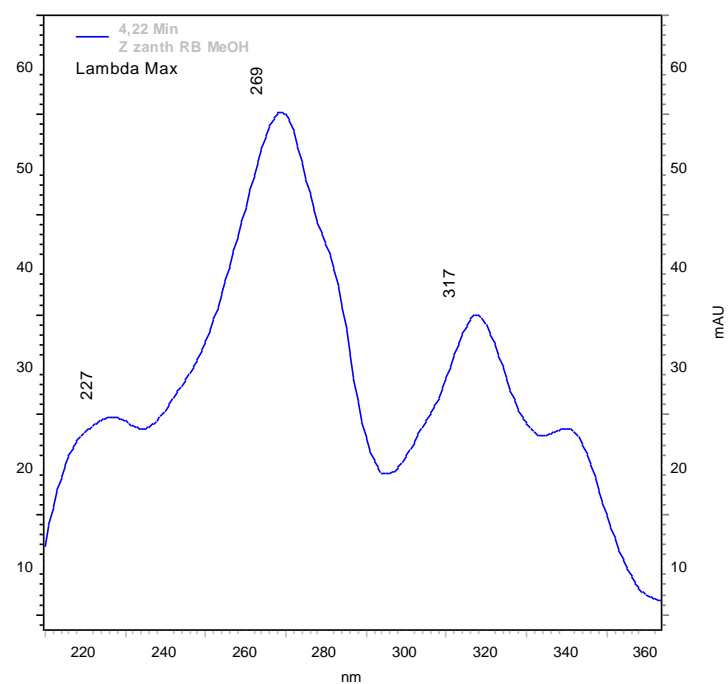




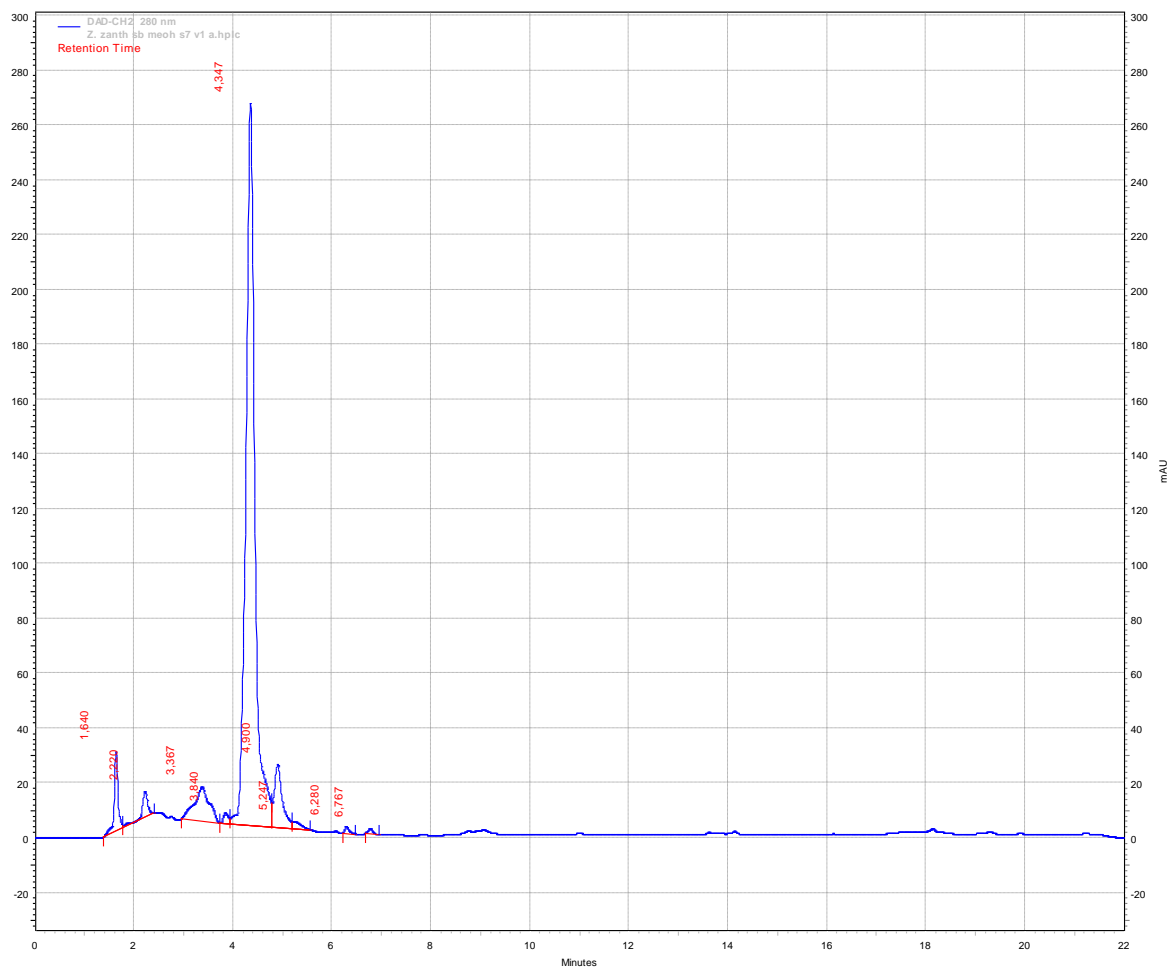
Vedlegg 3.14b: UV-spektrum (237 nm) av bis-dihydrochelerythrinyleter (Rb-dcm-v7c2+3c6) ved 3.99 min.



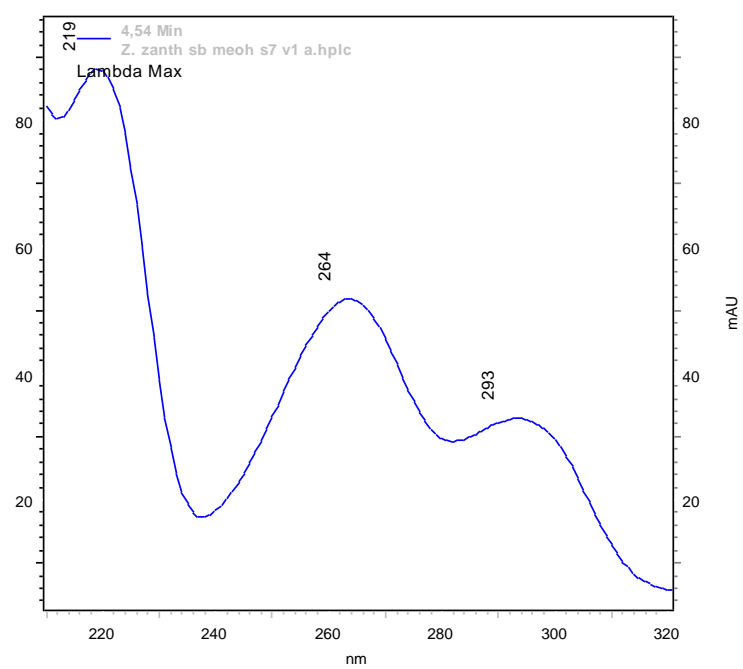
Vedlegg 3.15a: Kromatogram (237 nm) av MeOH-rækstrakt av rotbark med samme metode som for bis-dihydrochelerythrinyleter.



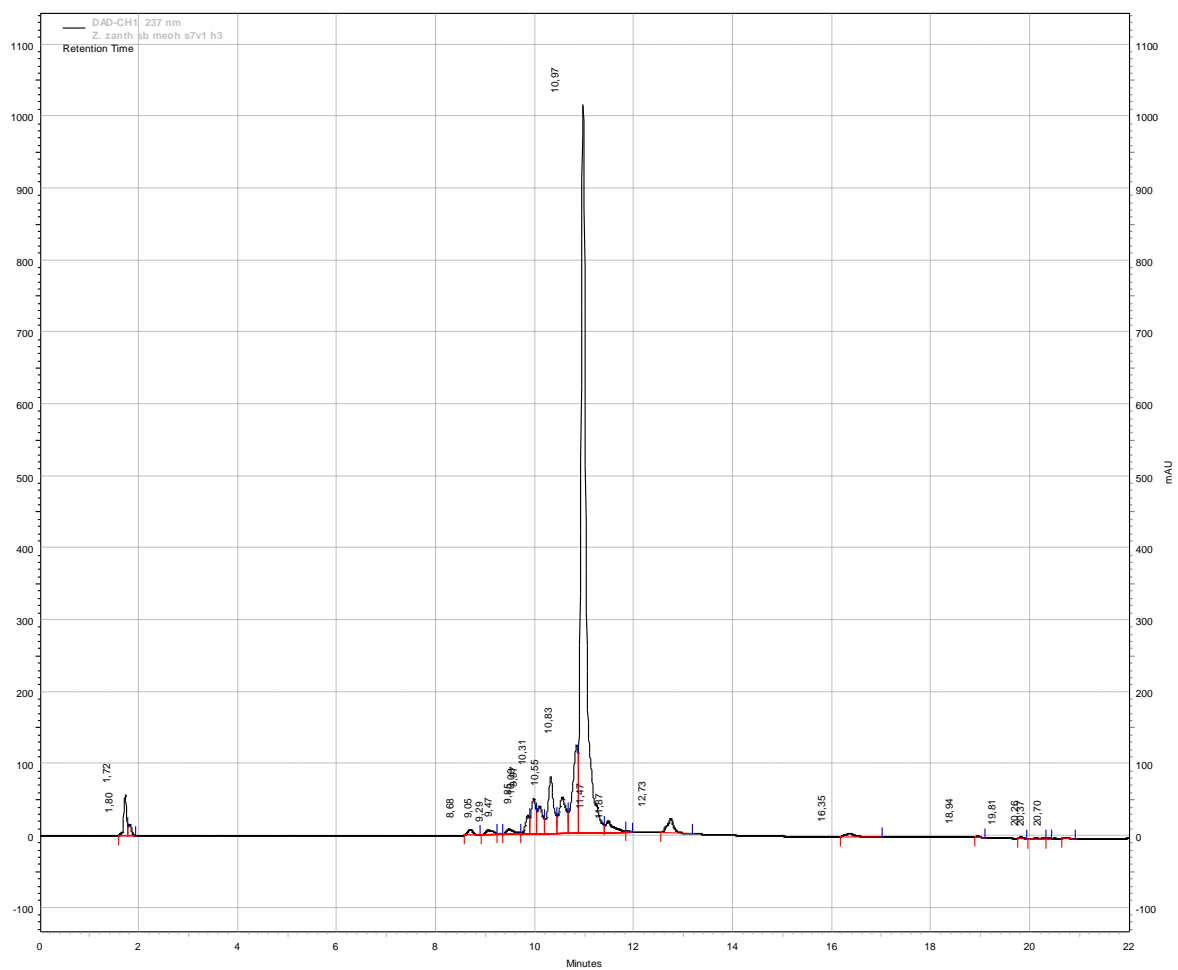
Vedlegg 3.15b: UV-spektrum (237 nm) av MeOH-råekstrakt av rotbark ved 4.22 min.



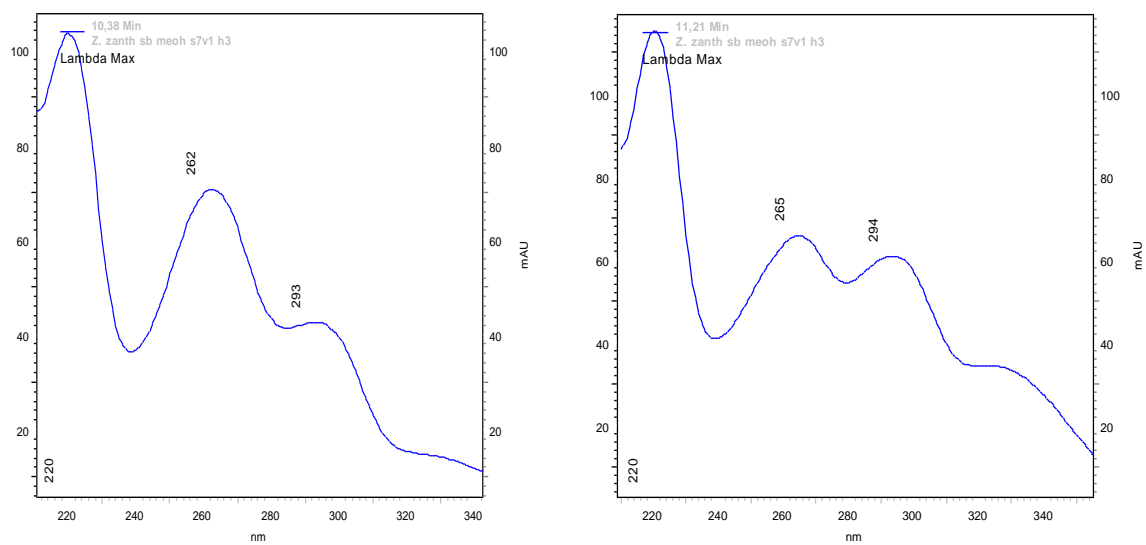
Vedlegg 3.16a: Kromatogram (237 nm) av Sb-meoh-s7v1.



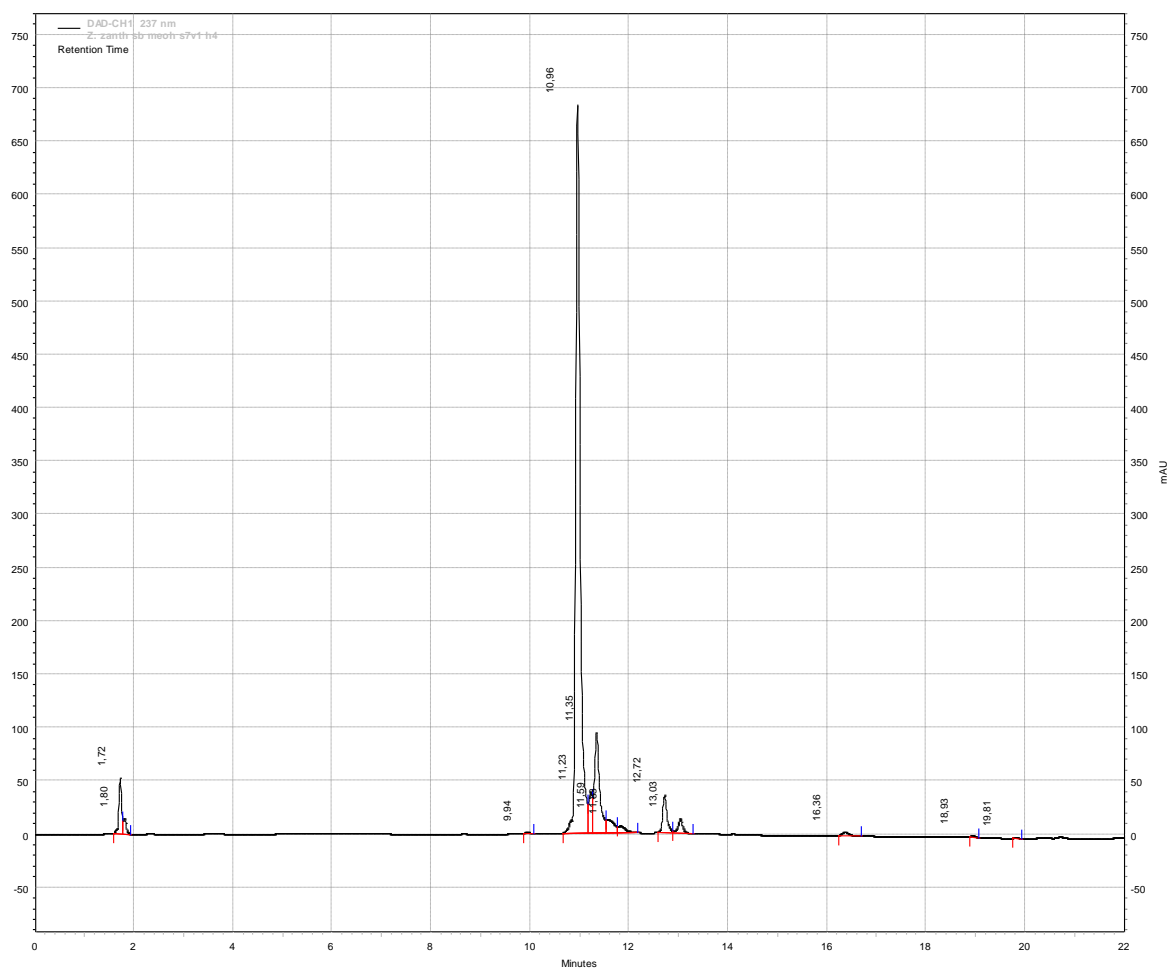
Vedlegg 3.16b: UV-spektrum (237 nm) av Sb-meoh-s7v1 ved 4.5 min.



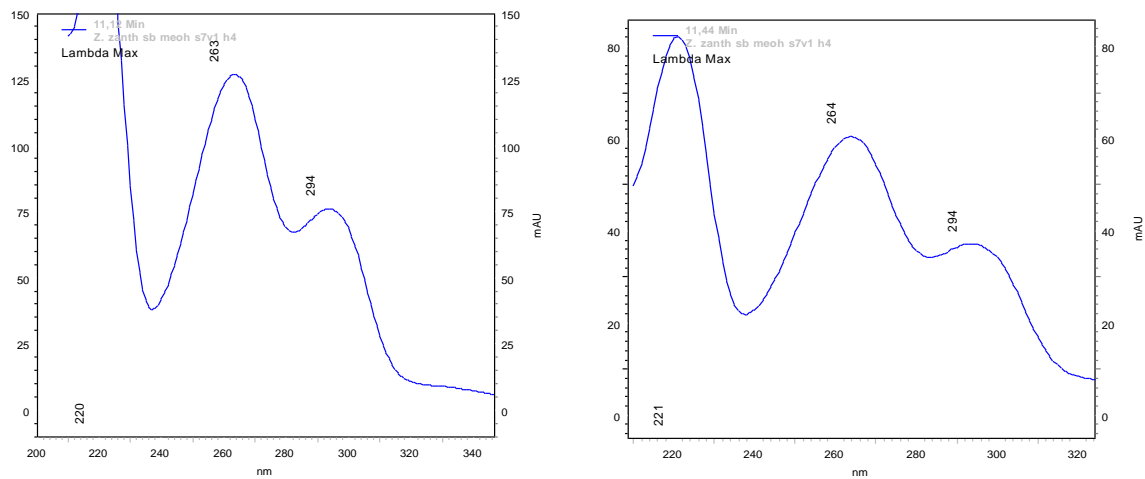
Vedlegg 3.17a: Kromatogram (237 nm) av Sb-meoh-s7v1h3.



Vedlegg 3.17b: UV-spektrum (237 nm) av Sb-meoh-s7v1h3 ved 10,4 og 11,2 min.

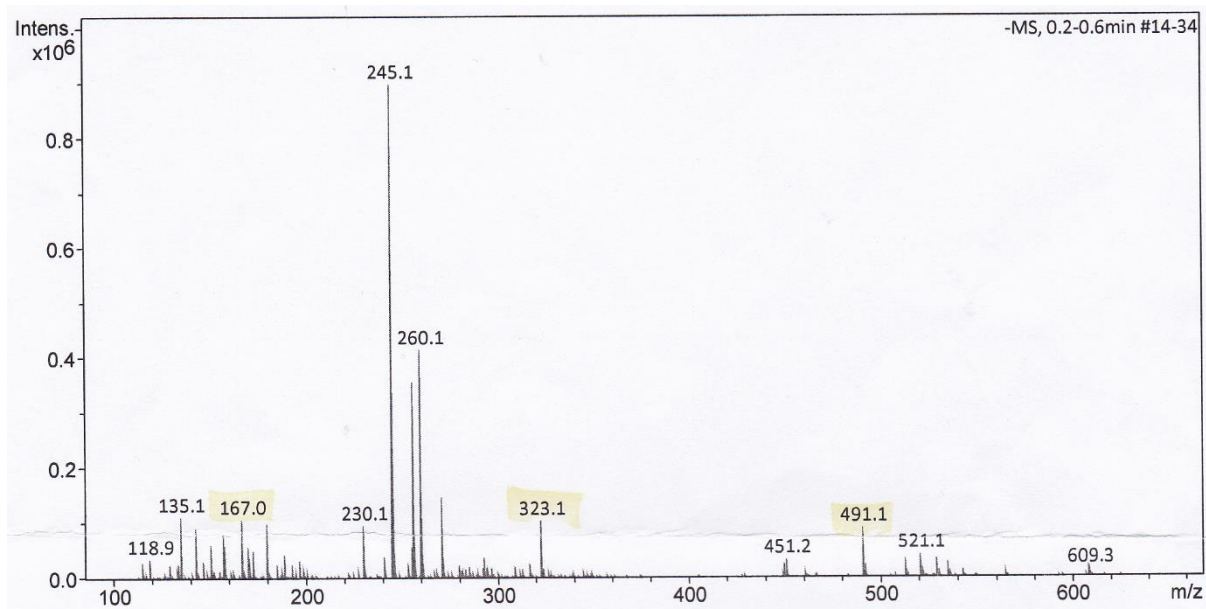


Vedlegg 3.18a: Kromatogram (237 nm) av Sb-meoh-s7v1h4.



Vedlegg 3.18b: UV-spektrum (237 nm) av Sb-meoh-s7v1h4 ved 11,1 og 11,4 min.

#### 4. MASSESPEKTROMETRI SPEKTRE



Vedlegg 4.1: ESI-MS negativ ion spekter av burkinabin B (Sb-meoh-s7v1h4).

# Litteraturliste

- Adefisoye M. A., AjibadeAko-Nai K. og Bisi-Johnson M. A. (2012). Phytochemical and antibacterial activity of the extracts of *Fagara zanthoxyloides* on selected cariogenic and enteric bacterial isolates. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* **1**: 1-6.
- Adekunle A. S., Kamdem J. P. og Rocha J. B. T. (2012). Antioxidant Activity and HPLC Analysis of *Zanthoxylum zanthoxyloide*. *Report and Opinion* **4**: 6-13.
- Adesina S. K. (1986). Further Novel Constituents of *Zanthoxylum zanthoxyloides* Root and Pericarp. *Journal of Natural Products* **49**: 715-16.
- Adia M. M., Emami S. N., Byamukama R., Faye I. og Borg-Karlson A. K. (2016). Antiplasmodial activity and phytochemical analysis of extracts from selected Ugandan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **186**: 14-19.
- Affouet K. M., Tonzibo Z. F., Attioua B. K. og Chalchat J. C. (2012). Chemical Investigations of Volatile Oils from Aromatic Plants Growing in Côte d'Ivoire: *Harisonia abyssinica* Oliv., *Canarium schwerfuthii* Engl. *Zanthoxylum gilletti* (De wild) Waterm. and *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam. *Analytical Chemistry Letters* **2**: 367-72.
- Ahond A., Picot F., Potier P., Poupat C. og Sévenet T. (1978). Alcaloides de *Melicope leratii*. *Phytochemistry* **17**: 166-67.
- Althaus J. B., Kaiser M., Brun R. og Schmidt T. J. (2014). Antiprotozoal activity of *Achillea ptarmica* (Asteraceae) and its main alkamide constituents. *Molecules* **19**: 6428-38.
- Amaral L. F. G., Leitao S. G., Delle Monache F. og Leitao G. G. (2001). 3,4-seco-Lupanes and other constituents from *Platypodium elegans*. *Fitoterapia* **72**: 441-43.
- Anderson J. E., Chang C. J. og McLaughlin J. L. (1988). Bioactive Components of *Allamanda schottii*. *Journal of Natural Products* **51**: 307-08.
- Andrade A. S., Schmitt G. C., Rossato L. G., Russowsky D. og Limberger R. P. (2009). Gas chromatographic method for analysis of p-synephrine in *Citrus aurantium* L. products. *Chromatographia* **69**: 225-29.
- APD, African plant database (2016). *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepern. & Timler. <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=89787>. Lest 13.01.16.
- Arbonnier M. (2004). Trees, shrubs and lianas of West African dry zones. Margraf Publishers GmbH, Weikersheim.
- Asante K. I., Amuzu N., Donkor A. og Annan K. (2009). Screening of some Ghanaian medicinal plants for phenolic compounds and radical scavenging activities. *Pharmacognosy Journal* **1**: 201-06.
- Asase A. og Oppong-Mensah G. (2009). Traditional antimalarial phytotherapy remedies in herbal markets in southern Ghana. *Journal of Ethnopharmacology* **126**: 492-9.
- Attioua B., Yeo D., Lagnika L., Harisololo R., Antheaume C., Weniger B., et al. (2012). In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of a new ventiloquinone and five known triterpenes from *Parinari excelsa*. *Pharmaceutical Biology* **50**: 801-06.
- Azando E. V., Hounzangbe-Adote M. S., Olounlade P. A., Brunet S., Fabre N., Valentin A., et al. (2011). Involvement of tannins and flavonoids in the in vitro effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* **180**: 292-7.

- Basco L. K., Mitaku S., Skaltsounis A. L., Ravelomanantsoa N., Tillequin F., Koch M., et al. (1994). In vitro activities of furoquinoline and acridone alkaloids against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**: 1169-71.
- Bauman R. W. og Machunis-Masuoka E. (2011). *Microbiology : with diseases by taxonomy*. Benjamin Cummings, Boston.
- Bhoga U., Mali R. S. og Adapa S. R. (2004). New synthesis of linear furoquinoline alkaloids. *Tetrahedron Letters* **45**: 9483-85.
- Bisseleua H. B. D., Gbewonyo S. W. K. og Obeng-Ofori D. (2008). Toxicity, growth regulatory and repellent activities of medicinal plant extracts on *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *African Journal of Biotechnology* **7**: 4635-42.
- Carneiro Albernaz L., Deville A., Dubost L., de Paula J. E., Bodo B., Grellier P., et al. (2012). Spiranthrenones A and B, tetraprenylated phloroglucinol derivatives from the leaves of *Spiranthera odoratissima*. *Planta Medica* **78**: 459-64.
- Chaaib F., Queiroz E. F., Ndjoko K., Diallo D. og Hostettmann K. (2003). Antifungal and Antioxidant Compounds from the Root Bark of *Fagara zanthoxyloides*. *Planta Medica* **69**: 316-20.
- Chen I.-S., Wu S.-J., Tsai I.-L., Wu T.-S., Pezzuto J. M., Lu M. C., et al. (1994). Chemical and bioactive constituents from *Zanthoxylum simulans*. *Journal of Natural Products* **57**: 1206-11.
- Chen J.-J., Yang C.-K., Kuo Y.-H., Hwang T.-L., Kuo W.-L., Lim Y.-P., et al. (2015). New coumarin derivatives and other constituents from the stem bark of *Zanthoxylum avicennae*: effects on neutrophil pro-inflammatory responses. *International Journal of Molecular Sciences* **16**: 9719-31.
- Cheng M.-J., Yang C.-H., Lin W.-Y., Lin W.-Y., Tsai I.-L. og Chen I.-S. (2002). Chemical Constituents from the Leaves of *Zanthoxylum Schinifolium*. *Journal of the Chinese Chemical Society* **49**: 125-28.
- Choumessi A. T., Loureiro R., Silva A. M., Moreira A. C., Pieme A. C., Tazoacha A., et al. (2012). Toxicity evaluation of some traditional African spices on breast cancer cells and isolated rat hepatic mitochondria. *Food Chemistry and Toxicology* **50**: 4199-208.
- Correa E. A., Hoegestaett E. D., Sterner O., Echeverri F. og Zygmunt P. M. (2010). In vitro TRPV1 activity of piperine derived amides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **18**: 3299-306.
- Couillerot E., Caron C., Audran J. C., Jardillier J. C. og Chénieux J. C. (1996). Furoquinoline alkaloid accumulation in *Fagara zanthoxyloides* cell cultures is highly dependent on the presence of exogenous benzylaminopurine. *Plant Growth Regulation* **19**: 203-06.
- Couillerot E., Caron C., Comoe L., Audran J.-C., Molinatti P., Zeches M., et al. (1994a). Benzophenanthridine and furoquinoline accumulation in cell suspension cultures of *Fagara zanthoxyloides*. *Phytochemistry* **37**: 425-28.
- Couillerot E., Caron C., Comoe L., Audran J. C., Molinatti P., Zeches M., et al. (1994b). Benzophenanthridine and furoquinoline accumulation in cell suspension cultures of *Fagara zanthoxyloides*. *Phytochemistry* **37**: 425-8.
- Cseke L. J. (2006). *Natural Products from Plants*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida.
- Dolabela M. F., Oliveira S. G., Nascimento J. M., Peres J. M., Wagner H., Pova M. M., et al. (2008). In vitro antiplasmodial activity of extract and constituents from *Esenbeckia febrifuga*, a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon. *Phytomedicine* **15**: 367-72.
- Dostal J., Taborska E., Slavik J., Potacek M. og de Hoffmann E. (1995). Structure of chelerythrine base. *Journal of Natural Products* **58**: 723-9.

- Dressler S., Schmidt M. og Zizka G. (2014). African Plants - A Photo Guide. Forschungsinstitut Senckenberg, Frankfurt/Main, Germany. <http://www.africanplants.senckenberg.de>. Lest 05.04.16.
- Dupont C., Couillerot E., Gillet R., Caron C., Zeches-Hanrot M., Riou J.-F., et al. (2005). The Benzophenanthridine Alkaloid Fagaronine Induces Erythroleukemic Cell Differentiation by Gene Activation. *Planta Medica* **71**: 489-94.
- Elujoba A. A. og Nagels L. (1985). Chromatographic isolation and estimation of zanthoxylol: An antisickling agent from the roots of *Zanthoxylum* species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **3**: 447-51.
- Elujoba A. A., Nagels L., Sofowora A. og van Dongen W. (1989). Chromatographic analysis of antisickling compounds in *Zanthoxylum* species. *International Journal of Pharmaceutics* **53**: R1-R3.
- EOL, Encyclopedia of Life (2016). *Artemia salina* Brine Shrimp. <http://eol.org/pages/1020243/details>. Lest 13.04.16.
- Etsè K. D., Aidam A. V., de Souza C., Crèche J. og Lanoue A. (2011). In vitro propagation of *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam., an endangered African medicinal plant. *Acta Botanica Gallica* **158**: 47-55.
- Eziah V. Y., Buxton T. og Owusu E. O. (2013). Bioefficacy of *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Securidaca longependuncata* against *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera:Bostrichidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera:Tenebrionidae). *Journal of Biopesticides* **6**: 54-62.
- FHI, Folkehelseinstituttet (2016). *Malaria - veiledet for helsepersonell*. [http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=239&trg=Content\\_6493&Main\\_6157=6287:0:25,5499&MainContent\\_6287=6493:0:25,6833&Content\\_6493=6441:82817::0:6446:77::0:0](http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=239&trg=Content_6493&Main_6157=6287:0:25,5499&MainContent_6287=6493:0:25,6833&Content_6493=6441:82817::0:6446:77::0:0). Lest 01.04.16.
- Fogang H. P. D., Tapondjou L. A., Womeni H. M., Quassinti L., Bramucci M., Vitali L. A., et al. (2012a). Characterization and biological activity of essential oils from fruits of *Zanthoxylum xanthoxyloides* Lam. and *Z. leprieurii* Guill. & Perr., two culinary plants from Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal* **27**: 171-79.
- Fogang H. P. D., Womeni H. M., Piombo G., Barouh N. og Tapondjou L. A. (2012b). Bioefficacy of Essential and Vegetable Oils of *Zanthoxylum xanthoxyloides* Seeds against *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Food Protection* **75**: 547-55.
- Gansané A., Sanon S., Ouattara L. P., Traoré A., Hutter S., Ollivier E., et al. (2010). Antiplasmodial activity and toxicity of crude extracts from alternatives parts of plants widely used for the treatment of malaria in Burkina Faso: contribution for their preservation. *Parasitology Research* **106**: 335-40.
- Gao H., Yan H., Zhong K., Huang Y. og Zhou Z. (2014). A method for preparing chlorogenic acid and neochlorogenic acid from folium *zanthoxyli bungeani*. Kinesisk patent CN104016864 A 20140903.
- Gao W., Li Q., Chen J., Wang Z. og Hua C. (2013). Total synthesis of six 3,4-unsubstituted coumarins. *Molecules* **18**: 15613-23.
- Gardini F., Belletti N., Ndagijimana M., Guerzoni M. E., Tchoumboungang F., Zollo P. H. A., et al. (2009). Composition of four essential oils obtained from plants from Cameroon, and their bactericidal and bacteriostatic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research* **3**: 264-71.
- Gaya C. H., Kawaka J. F., Muchugi A. og Ngeranwa J. J. (2013). Variation of alkaloids in the Kenyan *Zanthoxylum gillettii* (De Wild Waterman). *African Journal of Plant Science* **7**: 438-44.



- Grellier P., Nemeikaite-Cenienė A., Sarlauskas J. og Cenas N. (2008). Role of single-electron oxidation potential and lipophilicity in the antiparasitic in vitro activity of polyphenols: comparison to mammalian cells. *Zeitschrift für Naturforschung C* **63c**: 445-50.
- Harrison R. (2014). The Chromatotron.  
<http://www.harrisonresearch.com/chromatotron/specs.html>. Lest 15.04.16.
- Hu J., Zhang W. D., Liu R. H., Zhang C., Shen Y. H., Xu X. K., et al. (2006). Chemical constituents in root of *Zanthoxylum nitidum*. *China Journal of Chinese Materia Medica* **31**: 1689-91.
- Igoli J. O., Ogaji O. G., Tor-Anyiin T. A. og Igoli N. P. (2005). Traditional medicine practice amongst the Igede people of Nigeria. Part II. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* **2**: 134-52.
- Ishii H., Chen I., Akaike M., Ishikawa T. og Lu S. (1982). Studies on the Chemical Constituents of Rutaceous Plants. XLIV. The Chemical Constituents of *Xanthoxylum integrifoliolum* (MERR.) MERR. (*Fagara integrifoliola* MERR.) (1) The Chemical Constituents of the Root Wood. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **102**: 182-95.
- Jia C.-p., Qian Y.-f. og Zhang B. (2014). Identification of major compounds in bile after oral administration of *Zanthoxylum nitidum* by liquid chromatography-mass spectrometry. *Guangzhou Huagong* **42**: 144-47.
- Kalsi P. S. og Jagtap S. (2013). *Pharmaceutical, medicinal and natural product chemistry*. Alpha Science International, Oxford.
- Kamdem S. L. S., Belletti N., Tchoumboungang F., Essia-Ngang J. J., Montanari C., Tabanelli G., et al. (2015). Effect of mild heat treatments on the antimicrobial activity of essential oils of *Curcuma longa*, *Xylopi aethiopica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* against *Salmonella enteritidis*. *Journal of Essential Oil Research* **27**: 52-60.
- Kassim O. O., Loyevsky M., Elliott B., Geall A., Amonoo H. og Gordeuk V. R. (2005). Effects of Root Extracts of *Fagara zanthoxyloides* on the In Vitro Growth and Stage Distribution of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 264-68.
- Khalid S. A., Farouk A., Geary T. G. og Jensen J. B. (1986). Potential antimalarial candidates from African plants: an in vitro approach using *Plasmodium falciparum*. *Journal of Ethnopharmacology* **15**: 201-9.
- Kirmizibekmez H., Calis I., Perozzo R., Brun R., Donmez A. A., Linden A., et al. (2004). Inhibiting activities of the secondary metabolites of *Phlomis brunneogaleata* against parasitic protozoa and plasmodial enoyl-ACP Reductase, a crucial enzyme in fatty acid biosynthesis. *Planta Medica* **70**: 711-7.
- Klein E. Y. (2013). Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. *International journal of antimicrobial agents* **41**: 311-17.
- Kolaczkowski M., Kolaczowska A. og Stermitz F. R. (2009). Modulation of the antifungal activity of new medicinal plant extracts active on *Candida glabrata* by the major transporters and regulators of the pleiotropic drug-resistance network in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Drug Resistance* **15**: 11-7.
- Krajniak E. R., Ritchie E. og Taylor W. C. (1973). Chemical constituents of Australian *Zanthoxylum* species. VI. Examination of the constituents of the bark of *Zanthoxylum conspersipunctatum* (Rutaceae). *Australian Journal of Chemistry* **26**: 687-9.
- Krane B. D., Fagbule M. O., Shamma M. og Gozler B. (1984). The benzophenanthridine alkaloids. *Journal of Natural Products* **47**: 1-43.

- Lacroix D., Prado S., Kamoga D., Kasenene J. og Bodo B. (2012). Absolute configuration of 2'(R)-acetylmontrifoline and 2'(R)-montrifoline, furoquinolines from the fruits of *Teclea nobilis*. *Phytochemistry Letters* **5**: 22-25.
- Larsen B. H. V., Soelberg J. og Jäger A. K. (2015). COX-1 inhibitory effect of medicinal plants of Ghana. *South African Journal of Botany* **99**: 129-31.
- Le N. H. T., Malterud K. E., Diallo D., Paulsen B. S., Nergård C. S. og Wangensteen H. (2012). Bioactive polyphenols in *Ximenia americana* and the traditional use among Malian healers. *Journal of Ethnopharmacology* **139**: 858-62.
- Li W.-p. (2015). Simultaneous determination of the contents of dictamnolactone and skimmianine in roots of *Zanthoxylum armatum* DC. from Gansu Province by HPLC. *Zhongguo Zhongyiyao Xinxizazhi* **22**: 91-93.
- Li W., Sun Y. N., Yan X. T., Yang S. Y., Kim E.-J., Kang H. K., et al. (2013). Coumarins and Lignans from *Zanthoxylum schinifolium* and Their Anticancer Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 10730-40.
- Ma C. H., Ke W., Sun Z. L., Peng J. Y., Li Z. X., Zhou X., et al. (2006). Large-Scale Isolation and Purification of Scoparone from *Herba artemisiae scopariae* by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Chromatographia* **64**: 83-87.
- Maltese F., Erkelens C., Kooy F. v. d., Choi Y. H. og Verpoorte R. (2009). Identification of natural epimeric flavanone glycosides by NMR spectroscopy. *Food Chemistry* **116**: 575-79.
- Marek R., Sklenár V., Dostál J. og Slavík J. (1996). Determination of a symmetrical dimer structure in benzo[c]phenanthridine alkaloids by pulsed-field-gradient HMBC. *Tetrahedron Letters* **37**: 1655-58.
- Matu E. N. (2011). *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepern. & Timler. Plant Resources of Tropical Africa (PROTA). <http://www.prota4u.org/protav8.asp?h=M27&t=Zanthoxylum,xanthoxyloides&p=Zanthoxylum+zanthoxyloides#OtherReferences>. Lest 03.03.16.
- Mbaze L. M. a., Lado J. A., Wansi J. D., Shiao T. C., Chiozem D. D., Mesaik M. A., et al. (2009). Oxidative burst inhibitory and cytotoxic amides and lignans from the stem bark of *Fagara heitzii* (Rutaceae). *Phytochemistry* **70**: 1442-47.
- Menut C., Lamaty G., Bessière J. M., Molangui T., Ayedoun M. A., Sossou P. V., et al. (2000). Aromatic Plants of Tropical West Africa. X. Volatile Constituents of *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam. Leaves and Fruit Pericarps from Benin. *Journal of Essential Oil Research* **12**: 33-35.
- Meyer B. N., Ferrigni N. R., Putnam J. E., Jacobsen L. B., Nichols D. E. og McLaughlin J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **45**: 31-4.
- Miao F., Yang X.-J., Zhou L., Hu H.-J., Zheng F., Ding X.-D., et al. (2011). Structural modification of sanguinarine and chelerythrine and their antibacterial activity. *Natural Product Research* **25**: 863-75.
- Min Y. D., Kwon H. C., Yang M. C., Lee K. H., Choi S. U. og Lee K. R. (2007). Isolation of limonoids and alkaloids from *Phellodendron amurense* and their multidrug resistance (MDR) reversal activity. *Archives of Pharmacal Research* **30**: 58-63.
- Misra L. N., Wouatsa N. A. V., Kumar S., Venkatesh Kumar R. og Tchoumboungang F. (2013). Antibacterial, cytotoxic activities and chemical composition of fruits of two Cameroonian *Zanthoxylum* species. *Journal of Ethnopharmacology* **148**: 74-80.
- Mohammed M. S. A. (2009). Traditional medicinal plants and malaria in Africa. *American Chemical Society Symposium Series* **1021**: 217-30.

- Mollard V. (2013). SOP PF66: The fluorescence-based technique for drug trials in *Plasmodium falciparum* (based on Smilkstein et al 2004). School of Botany, University of Melbourne, Australia.
- Moussavi N., Malterud K. E., Mikolo B., Dawes D., Chandre F., Corbel V., et al. (2015). Identification of chemical constituents of *Zanthoxylum heitzii* stem bark and their insecticidal activity against the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Parasites & Vectors* **8**: 503-600.
- Muganga R., Angenot L., Tits M. og Frederich M. (2014). In Vitro and In Vivo Antiplasmodial Activity of Three Rwandan Medicinal Plants and Identification of Their Active Compounds. *Planta Medica* **80**: 482-89.
- Muriithi M. W., Abraham W. R., Addae-Kyereme J., Scowen I., Croft S. L., Gitu P. M., et al. (2002). Isolation and in vitro antiplasmodial activities of alkaloids from *Teclea trichocarpa*: In vivo antimalarial activity and x-ray crystal structure of normelicopicine. *Journal of Natural Products* **65**: 956-59.
- Mwangi E. S. K., Keriko J. M., Machocho A. K., Wanyonyi A. W., Malebo H. M., Chhabra S. C., et al. (2010). Antiprotozoal activity and cytotoxicity of metabolites from leaves of *Teclea trichocarpa*. *Journal of Medicinal Plants Research* **4**: 726-31.
- Nana W. L., Eke P., Fokom R., Bakanrga-Via I., Begoude D., Tchana T., et al. (2015). Antimicrobial Activity of *Syzygium aromaticum* and *Zanthoxylum xanthoxyloides* Essential Oils Against *Phytophthora megakarya*. *Journal of Phytopathology* **163**: 632-41.
- Nelson C. A. og Kursar A. T. (1999). Interactions among plant defense compounds: a method for analysis. *CHEMOECOLOGY* **9**: 81-92.
- Ngassoum M. B., Essia-Ngang J. J., Tatsadjieu L. N., Jirovetz L., Buchbauer G. og Adjoudji O. (2003). Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. *Fitoterapia* **74**: 284-87.
- NPGS, U.S. National Plant Germplasm System (2016). *Taxon: Zanthoxylum zanthoxyloides*. <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?417587>. Lest 17.03.2016.
- Nuto Y. (1996). Synergistic action of co-occurring toxins in the root bark of *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Rutaceae) against the cowpea beetle *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Ph.D. avhandling, State University of New York.
- Odugbemi T. O., Akinsulire O. R., Aibinu I. E. og Fabeku P. O. (2007). Medicinal Plants Useful for Malaria Therapy in Okeigbo, Ondo State, Southwest Nigeria. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines* **4**: 191-98.
- Ogunbolude Y., Ibrahim M., Elekofehinti O. O., Adeniran A., Abolajif A. O., Rochab J. B. T., et al. (2014). Effects of *Tapinanthus globiferus* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on human leukocytes in vitro. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* **3**: 167-72.
- Oh J., Hwang I. H., Kim D. C., Kang S.-C., Jang T.-S., Lee S. H., et al. (2010). Anti-listerial compounds from *Asari Radix*. *Archives of Pharmacal Research* **33**: 1339-45.
- Olounladé P. A., Azando E. V. B., Hounzangbé-Adoté M. S., Ha T. B. T., Leroy E., Moulis C., et al. (2011). In vitro anthelmintic activity of the essential oils of *Zanthoxylum zanthoxyloides* and *Newbouldia laevis* against *Strongyloides ratti*. *Parasitology Research* **110**: 1427-33.
- Olowokudejo J. D., Kadiri A. B. og Travih V. A. (2008). An Ethnobotanical Survey of Herbal Markets and Medicinal Plants in Lagos State of Nigeria. *Ethnobotanical Leaflets* **12**: 851-65.

- Ortet R., Prado S., Regalado E. L., Valeriote F. A., Media J., Mendiola J., et al. (2011). Furfuran lignans and a flavone from *Artemisia gorgonum* Webb and their in vitro activity against *Plasmodium falciparum*. *Journal of Ethnopharmacology* **138**: 637-40.
- Ouattara B., Angenot L., Guissou P., Fondou P., Dubois J., Frédérich M., et al. (2004). LC/MS/NMR analysis of isomeric divanilloylquinic acids from the root bark of *Fagara zanthoxyloides* Lam. *Phytochemistry* **65**: 1145-51.
- Ouattara B., Jansen O., Angenot L., Guissou I. P., Frédérich M., Fondou P., et al. (2009). Antisickling properties of divanilloylquinic acids isolated from *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae). *Phytomedicine* **16**: 125-29.
- Pauli G. F., Kuczkowiak U. og Nahrstedt A. (1999). Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids. *Magnetic Resonance in Chemistry* **37**: 827-36.
- Pedersen-Bjergaard S. og Rasmussen K. E. (2004). *Legemiddelanalyse*. Fagbokforlaget, Bergen, Norge.
- Pellati F., Benvenuti S. og Melegari M. (2005). Enantioselective LC analysis of synephrine in natural products on a protein-based chiral stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **37**: 839-49.
- Penali L., Mulholland D. A., Tano K. D., Cheplogoi P. K. og Randrianarivelojosia M. (2007). Low antiplasmodial activity of alkaloids and amides from the stem bark of *Zanthoxylum rubescens* (Rutaceae). *Parasite* **14**: 161-4.
- Pezzuto J. M., Antosiak S. K., Messmer W. M., Slaytor M. B. og Honig G. R. (1983). Interaction of the antileukemic alkaloid, 2-hydroxy-3,8,9-trimethoxy-5-methylbenzo[c]phenanthridine (fagaronine), with nucleic acids. *Chemico-Biological Interactions* **43**: 323-39.
- Pusset J., Lopez J. L., Pais M., Neirabeyeh M. A. og Veillon J. M. (1991). Isolation and 2D NMR Studies of Alkaloids from *Comptonella sessilifoliola*. *Planta Medica* **57**: 153-5.
- Queiroz E. F., Hay A.-E., Chaaib F., van Diemen D., Diallo D. og Hostettmann K. (2006). New and Bioactive Aromatic Compounds from *Zanthoxylum zanthoxyloides*. *Planta Medica* **72**: 746-50.
- Randrianarivelojosia M., Rasidimanana V. T., Rabarison H., Cheplogoi P. K., Ratsimbason M., Mulholland D. A., et al. (2003). Plants traditionally prescribed to treat tazo (malaria) in the eastern region of Madagascar. *Malaria Journal* **2**: 25-33.
- Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Flower R. J. og Henderson G. (2016). *Rang and Dale's pharmacology*. Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Rios M. Y. (2012). Natural Alkamides: Pharmacology, Chemistry and Distribution, Drug Discovery Research in Pharmacognosy. <http://www.intechopen.com/books/drug-discovery-research-in-pharmacognosy/natural-alkamides-pharmacology-chemistry-and-distribution>. Lest 20.03.15.
- Rodriguez-Guzman R., Fulks L. C. J., Radwan M. M., Burandt C. L. og Ross S. A. (2011). Chemical constituents, antimicrobial and antimalarial activities of *Zanthoxylum monophyllum*. *Planta Medica* **77**: 1542-44.
- Rostagno M. A. og Prado J. M. (2013). *Natural Product Extraction : Principles and Applications*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Sandjo L. P., de Moraes M. H., Kuete V., Kamdoun B. C., Ngadjui B. T. og Steindel M. (2016). Individual and combined antiparasitic effect of six plant metabolites against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **26**: 1772-75.
- Sandjo L. P., Kuete V., Tchanga R. S., Efferth T. og Ngadjui B. T. (2014). Cytotoxic Benzophenanthridine and Furoquinoline Alkaloids from *Zanthoxylum buesgenii* (Rutaceae). *Chemistry Central Journal* **8**: 1-5.
- Sarker S. D. og Nahar L. (2012). *Natural Products Isolation*. Humana Press, New York, USA.



- Schobert R., Siegfried S. og Gordon G. J. (2001). Three-component synthesis of (E)- $\alpha,\beta$ -unsaturated amides of the piperine family. *Journal of the Chemical Society* **1**: 2393-97.
- Severino V. G. P., Cazal C. d. M., Forim M. R., da Silva M. F. d. G. F., Rodrigues-Filho E., Fernandes J. B., et al. (2009). Isolation of secondary metabolites from *Hortia oreadica* (Rutaceae) leaves through high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1216**: 4275-81.
- Shoeb M., Jaspars M., MacManus S. M., Celik S., Nahar L., Kong-Thoo-Lin P., et al. (2007). Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of *Centaurea gigantea* (Asteraceae). *Journal of Natural Medicines* **61**: 164-69.
- Solomons T. W. G. og Fryhle C. B. (2008). Organic chemistry. John Wiley & Sons, New Jersey, USA.
- Spatafora C. og Tringali C. (1997). Bioactive Metabolites from the Bark of *Fagara macrophylla*. *Phytochemical Analysis* **8**: 139-42.
- Stermitz F. R., Caolo M. A. og Swinehart J. A. (1980). Alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum williamsii*, *Z. monophyllum*, and *Z. fagara*. *Phytochemistry* **19**: 1469-72.
- Swinehart J. A. og Stermitz F. R. (1980). Bishordeninyl terpene alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum culantrillo* and *Z. coriaceum*. *Phytochemistry* **19**: 1219-23.
- Talontsi F. M., Matasyoh J. C., Ngoumfo R. M. og Chepkorir R. (2011). Mosquito larvicidal activity of alkaloids from *Zanthoxylum lemairei* against the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **99**: 82-85.
- Tankeo S. B., Damen F., Awouafack M. D., Mpetga J., Tane P., Eloff J. N., et al. (2015). Antibacterial activities of the methanol extracts, fractions and compounds from *Fagara tessmannii*. *Journal of Ethnopharmacology* **169**: 275-9.
- Tasdemir D., Brun R., Franzblau S. G., Sezgin Y. og Calis I. (2008). Evaluation of antiprotozoal and antimycobacterial activities of the resin glycosides and the other metabolites of *Scrophularia cryptophila*. *Phytomedicine* **15**: 209-15.
- Tavares d. C. L., Zanon G., Weber A. D., Neto A. T., Mostardeiro C. P., Da Cruz I. B. M., et al. (2014). Structure-activity relationship of benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium* having antimicrobial activity. *PLoS One* **9**: e97000/1-e00/10, 10 pp.
- Tchinda A. T., Fuendjie V., Sajjad A., Matchawe C., Wafo P., Khan S., et al. (2009). Bioactive compounds from the fruits of *Zanthoxylum leprieurii*. *Pharmacologyonline*: 406-15.
- Torto F. G., Sefcovic P. og Dadson B. A. (1966). Medicinal plants of ghana: Identity of alkaloid from *Fagara xanthoxyloides*. *Tetrahedron Letters* **7**: 181-83.
- Tousek J., Dommis R., Dostal J., Zak Z., Pieters L. og Marek R. (2002). Configurations and conformations of sanguinarine and chelerythrine free bases stereoisomers. *Journal of Molecular Structure* **613**: 103-13.
- TPL, The Plant List (2013). *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepern. & Timler. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2469127>. Lest 13.01.16.
- Traore M. S., Balde M. A., Diallo M. S., Balde E. S., Diane S., Camara A., et al. (2013). Ethnobotanical survey on medicinal plants used by Guinean traditional healers in the treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology* **150**: 1145-53.
- Traore M. S., Diane S., Diallo M. S., Balde E. S., Balde M. A., Camara A., et al. (2014). In vitro antiprotozoal and cytotoxic activity of ethnopharmacologically selected guinean plants. *Planta Medica* **80**: 1340-4.
- Tringali C. (2001). Bioactive compounds from natural sources : isolation, characterisation, and biological properties. Taylor & Francis, New York.

- Tuntiwachwuttikul P., Phansa P., Pootaeng-On Y. og Taylor W. C. (2006). Chemical constituents of the roots of *Piper sarmentosum*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin **54**: 149-51.
- USDA, United States Department of Agriculture (2016). Classification for kingdom *Plantae* down to genus *Zanthoxylum* L. <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=ZANTH&display=31>. Lest 11.01.16.
- Vargas S., Ndjoko Ioset K., Hay A. E., Ioset J. R., Wittlin S. og Hostettmann K. (2011). Screening medicinal plants for the detection of novel antimalarial products applying the inhibition of  $\beta$ -hematin formation. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **56**: 880-86.
- Vila-Nova N. S., de Morais S. M., Falcão M. J. C., Alcantara T. T. N., Ferreira P. A. T., Cavalcanti E. S. B., et al. (2013). Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corossolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. Experimental Parasitology **133**: 334-38.
- Vitalini S., Beretta G., Iriti M., Orsenigo S., Basilico N., Dall'Acqua S., et al. (2011). Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity. Acta Biochimica Polonica **58**: 203-09.
- Wang C.-F., Fan L., Tian M., Du S.-S., Deng Z.-W., Feng J.-B., et al. (2015). Cytotoxicity of benzophenanthridine alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. var. *fastuosum* How ex Huang. Natural Product Research **29**: 1380-83.
- Wang L.-m., Wang P., Sun J.-k., Cheng P. og Fei M.-l. (2013). Quantitative determination of dictamnine in *Zanthoxylum dissitum* Hemsl by using HPLC. Zhongnan Linye Keji Daxue Xuebao **33**: 75-78.
- Wangensteen H., Diallo D. og Paulsen B. S. (2015). Medicinal plants from Mali: Chemistry and biology. Journal of Ethnopharmacology **176**: 429-37.
- Wangensteen H., Ho G. T. T., Tadesse M., Miles C. O., Moussavi N., Mikolo B., et al. (2016). A new benzophenanthridine alkaloid and other bioactive constituents from the stem bark of *Zanthoxylum heitzii*. Fitoterapia **109**: 196-200.
- Weenen H., Nkunya M. H., Bray D. H., Mwasumbi L. B., Kinabo L. S., Kilimali V. A., et al. (1990). Antimalarial compounds containing an alpha,beta-unsaturated carbonyl moiety from Tanzanian medicinal plants. Planta Medica **56**: 371-3.
- WHO, World Health Organization (2016). Malaria fact sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>. Lest 31.03.16.
- Willcox M., Sanogo R., Diakite C., Giani S., Paulsen B. S. og Diallo D. (2012). Improved traditional medicines in Mali. Journal of Alternative Complementary Medicine **18**: 212-20.
- Wouatsa N. A. V., Misra L. N., Kumar R. V., Darokar M. P. og Tchoumboungang F. (2013a). Zantholic acid, a new monoterpenoid from *Zanthoxylum zanthoxyloides*. Natural Product Research **27**: 1994-98.
- Wouatsa V. N., Misra L., Kumar S., Prakash O., Khan F., Tchoumboungang F., et al. (2013b). Aromatase and glycosyl transferase inhibiting acridone alkaloids from fruits of Cameroonian *Zanthoxylum* species. Chemistry Central Journal **7**: 125-39.
- Xia A., Wei S. og Liao H. (2012). Determination of hesperidin in *Zanthoxylum avicennae* by HPLC. Jiefangjun Yaoxue Xuebao **28**: 248-49.
- Yang L.-C., Li R., Tan J. og Jiang Z.-T. (2013). Polyphenolics composition of the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. grown in Hebei, China, and their radical scavenging activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry **61**: 1772-78.

- Yang X., Feng Y., Duffy S., Avery V. M., Camp D., Quinn R. J., et al. (2011). A new quinoline epoxide from the Australian plant *Drummondita calida*. *Planta Medica* **77**: 1644-47.
- Yao-Kouassi P. A., Caron C., Ramiarantsoa H., Prost É., Harakat D., Magrex-Debar É. L., et al. (2015). New nitro-benzo[c]phenanthridine and indolopyridoquinazoline alkaloids from *Zanthoxylum atchoum*. *Comptes Rendus Chimie* **18**: 891-97.
- Ye Y.-S., Liu J.-W., Liu X.-Q., Qiu J.-X., Min H., Zheng R.-S., et al. (2013). Antibacterial constituents from roots of *Zanthoxylum nitidum*. *Zhongcaoyao* **44**: 1546-51.
- Yoo S. W., Kim J. S., Kang S. S., Son K. H., Chang H. W., Kim H. P., et al. (2002). Constituents of the fruits and leaves of *Euodia daniellii*. *Archives of Pharmacal Research* **25**: 824-30.
- Zahoui S. O., Zirihi N. G., Soro Y. T. og Traore F. (2010). Hypotensive effect of aqueous extract from *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Waterman (Rutaceae). *Phytothérapie* **8**: 359-69.