

**Biologisk effekt og karakterisering av polyfenoler fra
*Hypericum maculatum***

Hafsa Ali



Masteroppgave i farmasi
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2021

Biologisk effekt og karakterisering av polyfenoler fra
Hypericum maculatum

Hafsa Ali

Masteroppgaven ble utført ved:

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Mai 2021

Veiledere:

Professor Helle Wangensteen

Førsteamanuensis Kari Tvette Inngjerdingen

© Hafsa Ali

Mai 2021

Biologisk effekt og karakterisering av polyfenoler fra *Hypericum maculatum*

Hafsa Ali

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Sammendrag

Bakgrunn: *Hypericum maculatum* (firkantperikum) er en flerårig urt med utbredelse over store deler av Europa. Planten har lang tradisjon som medisinplante, og sammenlignes ofte med *Hypericum perforatum* (prikkperikum) som ligner både i utseende og kjemisk sammensetning. Hensikten med oppgaven var å isolere og karakterisere polyfenoler i *H. maculatum*, og undersøke antiinflammatorisk aktivitet og effekter på tarmmikrobiota *in vitro*.

Metoder: Tørket overjordisk del av *H. maculatum* ble pulverisert på en slipemølle og ekstrahert med 70 % etanol (EtOH). EtOH-ekstraktet ble suspendert i vann og væske-væske ekstrahert med diklormetan (DCM), etylacetat (EtOAc) og butanol (BuOH). BuOH- og EtOAc-fasene ble videre rensert opp og fraksjonert med ulike kolonnekromatografiske metoder for isolering av substanser i planten. Innholdsstoffene ble strukturelt karakterisert og identifisert ved NMR-spektroskopiske metoder som ^1H , ^{13}C , ^{13}C APT, COSY, HSQC, HMBC og NOESY. Antiinflammatorisk aktivitet ble bestemt ved å måle reduksjon i konsentrasjon av NO i LPS stimulerte J774A.1 makrofager. For å avkrefte at cytotoxisk effekt var årsaken til en eventuell NO-reduksjon, ble MTT-test utført for å bestemme viabilitet for cellene. Effekten av polyfenoler på tarmmikrobiota ble undersøkt ved Institutt for biovitenskap, UiO. Ekstrakter og isolerte stoffer ble tilsatt til *in vitro* kulturer av tarmmikrobiota, og mengde bakteriearter i disse ble bestemt ved sekvensering.

Resultat og diskusjon: Det identifisert ti forbindelser: epicatechin, acetylannulatophenaside, hyperosid, quercitrin, guaijaverin, procyanidin B2, I3, II8''-biapigenin, quercetin, klorogensyre og neoklorogensyre. Alle de isolerte stoffene er tidligere blitt rapportert i *H. maculatum*. HPLC analyse av EtOH-ekstraktet viste et høyt innhold av hyperosid og quercetin. De biologiske testene ble gjennomført på hovedfraksjonene og fem av de isolerte stoffene: klorogensyre, hyperosid, epicatechin, quercetin og acetylannulatophenaside, og en proanthocyanidin rik fraksjon fra BuOH-fasen. EtOH-ekstraktet, EtOAc- og BuOH-fasene ga en reduksjon av NO-konsentrasjonen ved 50 $\mu\text{g/ml}$ og 100 $\mu\text{g/ml}$, mens ved 100 $\mu\text{g/ml}$ var EtOAc- og BuOH-fasene cytotoxiske. DCM-fasen var cytotoxisk med 2,0 -11,2 % celleviabilitet ved alle konsentrasjoner målt. Vann-fasen hadde liten NO-hemmende effekt og høy celleviabilitet.

I MTT testen for de isolerte substansene ble det observert liten cytotoxisk effekt, unntak av proanthocyanidin-fraksjon ved 100 μ M. Av de isolerte stoffene hadde klorogensyre og quercetin sterkest NO-hemmende effekt ved 100 μ M med henholdsvis 69,1% og 75,6 % hemming. Hyperosid og acetylannulatophenonoside viste lav NO-hemmende aktivitet, og epicatechin avvirket fra et forventet dose-respons resultat.

Mikrobiotaforsøket var et pilotforsøk hvor det ble observert en reduksjon i mengde Clostridiaceae bakterier og økt mengde Ruminococcaceae og Lachnospiraceae etter inkubering med BuOH-fasen, epicatechin og klorogensyre. Quercetin ga en økning av Ruminococcaceae, hyperosid ga en økning av Lachnospiraceae og reduksjon av Clostridiaceae bakterier, mens DCM-fasen og vandig rest reduserte mengde Clostridiaceae og økte mengden av Ruminococcaceae bakterier. Resultatene var ikke signifikant forskjellige fra kontroll, og forsøket må gjentas med flere paralleller for å bekrefte funnene.

De biologiske forsøkene viser at quercetin muligens er den viktigste bidragsyteren til en antiinflammatorisk effekt i *H. maculatum*. Ekstrakter og polyfenoler fra planten kan muligens påvirke vekst av mikroorganismer i tarm, men flere studier må utføres for å bekrefte dette.

Forord

Først og fremst ønsker jeg å rette en stor takk til min hovedveileder Helle Wangensteen for kjempegod faglig og praktisk veiledning, samtidig oppfølging under masteroppgaven. I tillegg vil jeg takke Kari Tvette Inngjerdningen og de ansatte på avdelingen for faglig råd, tips og hyggelige samtaler. Jeg ønsker også å takke mine medstudenter og venner for motivasjon og hjelp under denne perioden. Et spesielt takk til min aller gode venninne Nabile Esam for alt støtten, oppmuntringen og minnerike tiden sammen, som har gjort studietiden mye lettere. Til sist vil jeg takke min kjære familie for all kjærighet og støtte jeg har mottatt under studietiden.

Forkortelser

Forkortelser	Full form
AP-1	Aktivatorprotein 1 (Activator protein 1)
ACN	Acetonitril
BuOH	Butanol
ARE	Antioksidant respons element
CMV	Cytomegalovirus
¹³ C- NMR	Karbonspekter (Carbon-13 nuclear magnetic resonance)
COX-2	Sykloxygenase-2
COSY	Correlation spectroscopy
CRP	C-reaktivt protein
C18	Octadecyl
DMSO-d ₆	Deuterert dimetylsulfoksid
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DPPH	Difenylpicrylhydrazyl
DCM	Diklormetan
EMA	Europeiske medisin byrå
EtOH	Etanol
EtOAc	Etylacetat
GLP	Glukagon-lignende peptid
GC	Gasskromatografi
GI	Mage-tarmkanalen (gastrointestinal)
OH•	Hydroksyl radikal
HPLC	Høypresisjonsvæskeskromatografi (High performance liquid chromatography)
PHPLC	Preparativ høypresisjonsvæskeskromatografi
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
HSV1	Herpes simplex virus 1

HSV2	Herpes simplex virus 2
HIV	Humant immunsviktvirus
¹ H-NMR	Proton kjernemagnetisk resonans- spektroskopi (Proton nuclear magnetic resonance)
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
IFN	Interferon
iNOS	Indusert NOS (Inducible NOS)
LP	Lipid peroksidering
LPS	Lipopolysakkarid
LC-MS	Væskekromatografi-massespektrometri
MAO-A	Monoamin oksidase
MeOH	Metanol
MIC	Minimum inhibering konsentrasjon
MMC	Minimum mikrobicid konsentrasjon
MIP	Makrofag inflammatorisk protein
MS	Massespektrometri
MAPK	Mitogen-aktivert protein kinase
MKK4	Mitogen-aktivert protein kinase kinase 4
MEK1	Mitogen-aktivert protein kinase 1
NMR	Kjernemagnetisk resonansspektroskopi (Nuclear magnetic resonance)
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
NO	Nitrogenoksid
NO ₂ ⁻	Nitritt
NF- κ B	Nukleær transkripsjons faktor-Kb (Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells)

NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
OH•	Hydroksyl
O ₂ •-	Superoksid
PRDX2	Peroxiredoxin 2
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PGE2	Prostaglandin
R _f	Retensjonsfaktor
ROS	Reaktive oksygen spesier
Si-OH	Silanol
TLC	Tynnsljikt-kromatografi
TNF- α	Tumor nekrose faktor alfa
TFA	Trifluoreddiksyre
UAE	Ultralydassistert ekstraksjon
VEGF	Vaskulært endotel vekst faktor
WHO	Verdens helse organisasjon

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	4
Forord.....	6
Forkortelser	7
1 Innledning.....	14
1.1 <i>Hypericum maculatum</i>	14
1.1.2 Botaniske forhold	16
1.1.3 Habitat.....	17
1.1.4 Tradisjonell bruk	17
1.2 Tidligere forskning.....	18
1.2.1 Kjemiske innholdsstoffer	19
1.2.2 Innholdsstoffer i olje av <i>H. maculatum</i>	23
1.3 Biologisk aktivitet.....	23
1.3.1 Antidepressiv effekt.....	23
1.3.2 Antioksidanteffekt	24
1.3.3 Antibakteriell	24
1.3.4 Antiviral	25
1.3.5 Antiinflammatorisk effekt.....	25
1.4 Isolasjon av substanser fra plantematerialet	26
1.4.1 Plantematerialet.....	26
1.4.2 Ekstraksjon og ekstraksjonsmetoder	26
1.4.3 Kromatografiske metoder	27
1.4.4 Strukturoppklaring.....	30
1.5 Polyfenoler.....	33
1.5.1 Flavonoider	34
1.5.2 Antiinflammatorisk effekt.....	35

1.5.3 Nitrogenoksid fra aktiverte makrofager.....	36
1.5.4 Mikrobiota.....	38
2 Hensikten.....	40
3 Materiell og metode.....	41
3.1 Materialer.....	41
3.2 Generelle metoder.....	45
3.2.1 Vannkvalitet.....	45
3.2.2 Innveining.....	45
3.2.3 Inndamping på rotavapor.....	45
3.2.4 Filtrering.....	45
3.2.5 Frysetørking.....	45
3.2.6 Sephadex LH-20 kolonneseparering.....	46
3.2.7 Flash kromatografi.....	47
3.2.8 Analytisk TLC.....	49
3.2.9 Analytisk HPLC.....	50
3.2.10 Preparativ HPLC (PHPLC).....	51
3.2.11 Identifisering av topper i HPLC kromatogram.....	53
3.2.12 Analysering av fraksjoner.....	53
3.2.13 Sammenslåing av fraksjoner.....	54
3.2.14 Reduksjon av NO-akkumulering i LPS-stimulerte makrofager og test av cellenes levedyktighet (MTT-test).....	54
3.2.15 Mikrobiotaforsøk.....	58
4 Eksperimentell del.....	59
4.1 Plantematerialet.....	59
4.2 Separering av plantematerialet og 70% EtOH-ekstrakt.....	59
4.2.1 Ekstraksjon av <i>H. maculatum</i>	59
4.2.2 Væske-væske ekstraksjon.....	60

4.3 Sephadex LH-20 kolonne fraksjonering	61
4.4 Seperasjon av EtOAc-fasen	63
4.4.1 Flash kromatografi av EtOAc fraksjoner	63
4.4.2 Opprensing av EtOAc subfraksjoner	64
4.4.3 Opprensning med PHPLC	66
4.5 Seperasjon av BuOH-fasen.....	68
5 Resultater og diskusjon	69
5.1 Ekstraksjon med 70 % EtOH og analyse av ekstraktet	69
5.1.1 Maserering av <i>H. maculatum</i>	69
5.1.2 Utbytte av 70 % EtOH-ekstrakt	69
5.1.3 Analytisk HPLC av 70 % EtOH ekstrakt	69
5.1.4 NMR-spektroskopi av 70 % EtOH ekstrakt.....	70
5.2 Væske-væske ekstraksjon og analyse	71
5.2.1 Væske-væske ekstraksjon	71
5.2.2 NMR- spektroskopi av væske-væske ekstraherte faser	71
5.2.3 Analytisk HPLC av væske-væske ekstraherte faser	73
5.3 Sephadex LH-20 kolonne og analyse av fraksjoner	74
5.3.1 Fraksjonering med Sephadex LH-20 kolonne	74
5.3.2 NMR spektroskopi av EtOAc S1- EtOAc S7	76
5.3.3 NMR spektroskopi av BuOH S1- BuOH S9	76
5.4 Isolasjon av isolerte substanser	77
5.4.1 Epicatechin	77
5.4.2 Acetylannulatophenonoside	80
5.4.3 Hyperosid (quercetin 3-O- β -galactoside)	82
5.4.4 Quercitrin (quercetin 3-O- α -rhamnoside).....	85
5.4.5 Guaijaverin (Quercetin 3-O- α -arabinopyranoside)	87
5.4.6 Procyanidin B2	89

5.4.7 I3, II8''-Biapigenin.....	91
5.4.8 Quercetin.....	93
5.4.9 Neoklorogensyre	95
5.4.10 Klorogensyre.....	95
5.5 Identifisering av topper i HPLC kromatogram.....	97
5.6 Biologisk aktivitet.....	98
5.6.1 Reduksjon av NO-akkumulering i LPS-stimulerte makrofagiske celler av 70 % EtOH-ekstrakt og hovedfraksjonene.....	98
5.6.2 Reduksjon av NO-akkumulering i LPS-stimulerte makrofagiske celler av isolerte substanser	101
5.6.3 Interaksjon mellom tarmmikrobiota og <i>H. maculatum</i> prøver	104
6 Konklusjon	107
7 Videre studier	108
8 Litteraturliste	109
9 Vedlegg	116
1. NMR-spekter	116
2. Flash Kromatogram	139
3. Preparativ HPLC.....	141
4. Referanse spektraldata	144

1 Innledning

1.1 *Hypericum maculatum*



Figur 1.1 *Hypericum maculatum* (Artsdatabanken, 2018)

Hypericum maculatum (se figur 1.1), bedre kjent som firkantperikum på norsk, er en flerårig urteplante fra perikumfamilien (Hypericaceae). Planten tilhører perikumslekten *Hypericum* L. som inneholder omtrent 500 arter fordelt på 36 botaniske seksjoner (Kladar, Srdenovic *et al.*, 2015). Artsnavnet *maculatum* kommer fra det latinske ordet *macula* som betyr flekkete, og refererer til de gjennomsiktige bladjertlene på planten. *H. maculatum* blir ofte sammenlignet med arten fra samme slekt, *Hypericum perforatum*, på grunn av deres lik utseende (Anderberg, 2010).

1.1.1 Taksonomisk klassifisering

Den taksonomiske klassifiseringen for *Hypericum maculatum* Crantz er vist i tabell 1.1 (Artsdatabanken, 2018, USDA, 2016)

Tabell 1.1: Fullstendig systematikk for *Hypericum maculatum*

Rike	Planteriket (Plantae)
Rekke	Dekkrøet plante (Magnoliophyta)
Subrike	Karplante (Tracheobionta)
Superdivisjon	Frø plante (Spermatophyta)
Klasse	Tofrøbladet plante (Eudicots)
Underklasse	Dilleniidae
Orden	Vierodenen (Malpighiales)
Familie	Perikumfamilien (Hypericaceae)
Slekt	Perikumslekten (<i>Hypericum</i> L.)
Art	<i>Hypericum maculatum</i> Crantz

Synonymer til *H. maculatum* (The Plant List, 2012):

- *Hypericum commutatum* Nolte
- *Hypericum delphinense* Vill.
- *Hypericum fallax* Grimm
- *Hypericum fallax* f. *punctatum* O.Schwarz
- *Hypericum maculatum* f. *luteum* A.Fröhl.
- *Hypericum maculatum* var. *punctatum* (Schinz) A.Fröhl.
- *Hypericum maculatum* f. *punctatum* (Schinz) Stjepanovic-Veselicic
- *Hypericum quadrangulum* auct.
- *Hypericum quadrangulum* var. *macrophyllum* Schur
- *Hypericum quadrangulum* var. *maculatum* (Crantz) Choisy
- *Hypericum quadrangulum* subsp. *maculatum* (Crantz) Rivas Goday & Borja
- *Hypericum quadrangulum* var. *subcorymbosum* Schur
- *Hypericum tetragonum* Fr.
- *Hypericum umbellatum* Miel. ex Wohlf.

Lokale navn

H. maculatum har ulike lokale navn i følgende land (Anderberg, 2010) :

Tabell 1.2: Lokale navn for *Hypericum maculatum*

Land	Lokalnavn
Norge	Firkantperikum
Sverige	Mannablod
Finland	Särmäkuisma
Danmark	Kantet Perikon
England	Imperforate St John's-wort
Tyskland	Geflecktes Johanniskraut

1.1.2 Botaniske forhold

H. maculatum består av brungrønne stilker som kan bli 40-70 cm høye. Bladene er motsatte, eggformet og gulgrønne med få gjennomsiktige prikker (kjertler). Kronbladene er gule, har svarte kjertelprikker, og er tre ganger lengre enn begerbladene. Planten har få fem-talls blomster som er 2-3 cm brede. Disse sitter i en ganske tett samling på toppen av stilken. *H. maculatum* kan lett forveksles med andre arter i slekten. Det som skiller planten er stengelen som består av fire lister i stedet for to som er tilstede i *H. perforatum* (Mossberg, Stenberg *et al.*, 1995). Planten er en kapselfrukt og inneholder enten få eller mange frø. I tillegg er *H. maculatum* en pollenbærer med pollentråder, hvor stilken er sammenvokst i bunter og pollenknappene er frie (Vetlesen, 2005).

1.1.3 Habitat

Planten stammer opprinnelig fra Europa og Sørvest-Asia. I følge figur 1.2 er planten utbredt i nesten hele Europa, og senere blitt introdusert til USA, Canada og Sibir (Online, 2017, Zheleva-Dimitrova, Nedialkov *et al.*, 2012).



Figur 1.2: Kart over utbredelsen av *Hypericum maculatum*. Det grønne området representerer land planten har sin opprinnelse fra, og det lilla området markerer land planten har spredt seg til (Online, 2017).

Planten er sent blomstrende og vokser fra juli-september. Den vokser både på høyfjell, tørrbakker, enger og skogkanter

(Vetlesen, 2005). *H. maculatum* er avhengig av et stabilt og næringsrik vegetasjon for å vokse. Den trives best ved ugjødsle mark, beiting eller sein slått (Artsdatabanken, 2018).

1.1.4 Tradisjonell bruk

H. maculatum har tradisjonelt blitt brukt i folkemedisin for flere formål, og ble regnet som et universalmiddel. Begge artene, *H. maculatum* og *H. perforatum*, er så like at folk flest ikke har skjelnet mellom dem. I det europeiske medisin byrået (EMA) finnes det monografi av *herba* av *H. perforatum* for både veletablert- og tradisjonell bruk. Derimot er det ingen monografier av *H. maculatum* (EMA, 2009, 2009).

Ifølge EMA har *H. perforatum* tradisjonelt blitt brukt mot symptomer for milde gastrointestinale forstyrrelser (EMA, 2009). I Norge på 1900-tallet ble knoppene og blomstene av *H. maculatum* brukt i brennevin og øl for å forbedre smak og farge. Senere ble det oppdaget at *Hypericum*- brennevin blandingen var et effektivt smertestillende middel mot magesmerter og lungebetennelse (Høeg, 1974). I tillegg ble *H. perforatum* utvendig brukt som sårmiddel for behandling av skader og inflammasjon på huden (EMA, 2009). *H. maculatum* har både en desinfiserende og adstringerende virkning. For eksempel ble *Hypericum* brennevinet brukt for å helbrede sår, eksem og til å smøre på såre øyne. Blandingen ble kjent overalt i Norge, og kombinasjonen ble en effektiv helsedrikk for både innvendig og utvortes bruk (Høeg, 1974).

I folkemedisin er tilberedninger av *H. maculatum* kjent som et helbredende aromatisk middel mot forskjellige lidelser. Uttrekk ble tilberedt av overjordisk del av planten ved å koke med vann (te) eller som alkoholekstrakt. Uttrekket ble brukt mot magesmerter, forkjølelse, hoste, astma og leddgikt. I Elverum ble *Hypericum*-te kalt for «røyspost». Teen ble ikke drukket på grunn av sin medisinske virkning, men heller som en velsmakende og sunn drikke. I tillegg ble den sterke røde fargen på plantesaften benyttet til hårvask og som blekk til skriving (Høeg, 1974).

Tradisjonelt har *H. perforatum* også blitt brukt mot imidlertid mental utmattelse og nedstemthet (EMA, 2009). I nyere tid har *H. perforatum* blitt en av de mest populære plantebaserte legemidlene mot depresjon. Planten blir solgt på det norske markedet i form av både tinktur og kapsler. I apoteket finnes preparatet «Hypericum STADA» som anvendes for kortvarig behandling av mild nedstemthet (Vitusapotek, 2020). I Tyskland har planten lang tradisjon som foretrukket medikament mot vanlig depresjon, og regnes som likeverdig med andre antidepressive legemidler (Linde, Berner *et al.*, 2008). Perikumolje, tilberedt av frøene til *H. maculatum*, har tradisjonelt blitt solgt i apoteket mot frosne bein og som sårmiddel (Høeg, 1974). Det finnes ingen preparater av *H. maculatum* på det norske markedet.

1.2 Tidligere forskning

Ved å søke i databasen SciFinder, med søkeordet «*Hypericum maculatum*», får man 1493 treff. I flere av studiene er *H. perforatum* sammenlignet med de andre *Hypericum* artene. Verdens helse organisasjon (WHO) har markert *perforatum* arten som den eneste botaniske kilden til *Hyperici herba*. Derimot mener noen farmakopéer at *H. maculatum* kan være like viktig på grunn av artens innhold av aktive substanser (Kladar, Grujić *et al.*, 2015). I de siste årene har derfor interessen for forskning på *H. maculatum* økt for å identifisere biologisk aktive substanser i planten.

1.2.1 Kjemiske innholdsstoffer

Den første fytokjemiske studien på *H. maculatum* ble utført i 1963, og siden da har en rekke innholdsstoffer blitt identifisert. Innholdstoffene varierer ut ifra habitat og hvilken plantedel som undersøkes. Ifølge de fleste studiene inneholder arten naftodiantroner, floroglucinoler, biflavoner og flavonoider. En fytokjemisk undersøkelse fra 2018 viser at *H. maculatum* også består av en rekke forskjellige benzosyrederivater, kanelsyrederivater, flavonoler, flavoner, flavanoner, flavanoler og andre fenoliske komponenter som vist i tabell 1.3 (Tocci, Perenzoni *et al.*, 2018).

Tabell 1.3 Fullstendig liste av kjemiske innholdsstoffer identifisert i *H. maculatum*

Benzosyre- og kanelsyrederivater	
3,5-dihydroxybenzosyre	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Ellagsyre	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Ferulasyre	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018) (Kladar, Srdenovic <i>et al.</i> , 2015)
Gallinsyre	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
<i>p</i> -Kumarsyre	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Klorogensyre	(Bagdonaite, Janulis <i>et al.</i> , 2012) (Bozin, Kladar <i>et al.</i> , 2013) (Oniga, Toiu <i>et al.</i> , 2016) (Kladar, Srdenovic <i>et al.</i> , 2015)
Kaffesyre	(Bozin, Kladar <i>et al.</i> , 2013)
Kryptoklorogen syre	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Neoklorogen syre	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Benzofenon	
Annulatophenonoside	(Zheleva-Dimitrova, Nedialkov <i>et al.</i> , 2012)
Acetylannulatophenonoside	(Zheleva-Dimitrova, Nedialkov <i>et al.</i> , 2012)
Annulatophenone	(Zheleva-Dimitrova, Nedialkov <i>et al.</i> , 2012)

Chalcone	
Phlorizin	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Flavanon	
Naringenin-7-glukosid	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Flavonol	
Hyperosid	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018) (Kladar, Grujić <i>et al.</i> , 2015) (Bagdonaite, Janulis <i>et al.</i> , 2012, Oniga, Toiu <i>et al.</i> , 2016) (Smelcerovic, Verma <i>et al.</i> , 2006) (Zheleva-Dimitrova, Nedialkov <i>et al.</i> , 2012)
Quercetin	(Kladar, Grujić <i>et al.</i> , 2015) (Bagdonaite, Janulis <i>et al.</i> , 2012) (Martonfi, Repčák <i>et al.</i> , 2006) (Oniga, Toiu <i>et al.</i> , 2016) (Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018) (Zheleva-Dimitrova, Nedialkov <i>et al.</i> , 2012)
Quercitrin	(Kladar, Grujić <i>et al.</i> , 2015) (Bozin, Kladar <i>et al.</i> , 2013) (Kladar, Srdenic <i>et al.</i> , 2015) (Bagdonaite, Janulis <i>et al.</i> , 2012) (Martonfi, Repčák <i>et al.</i> , 2006) (Oniga, Toiu <i>et al.</i> , 2016) (Smelcerovic, Verma <i>et al.</i> , 2006) (Zheleva-Dimitrova, Nedialkov <i>et al.</i> , 2012)
Quercetin 3-O- α -arabinopyranoside (Guaijaverin))	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018) (Zheleva-Dimitrova, Nedialkov <i>et al.</i> , 2012)
Quercetin-3-glukosid	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Quercetin-3-sulfat	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Rutin	(Bozin, Kladar <i>et al.</i> , 2013) (Kladar, Srdenic <i>et al.</i> , 2015) (Bagdonaite, Janulis <i>et al.</i> , 2012) (Oniga, Toiu <i>et al.</i> , 2016)

	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018) (Zheleva-Dimitrova, Nedialkov <i>et al.</i> , 2012)
Kaempferol	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018) (Zheleva-Dimitrova, Nedialkov <i>et al.</i> , 2012)
Kaempferol -3-glukosid	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Isorhamnetin	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Myricetin	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Flavon	
Luteolin	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Luteolin 7- <i>O</i> -glukosid	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Amentoflavon	(Kladar, Grujić <i>et al.</i> , 2015) (Kladar, Srdenovic <i>et al.</i> , 2015) (Zheleva-Dimitrova, Nedialkov <i>et al.</i> , 2012)
Apigenin	(Kladar, Srdenovic <i>et al.</i> , 2015)
Biapigenin	(Martonfi, Repčák <i>et al.</i> , 2006) (Zheleva-Dimitrova, Nedialkov <i>et al.</i> , 2012)
Flavan-3-oler	
Catechin	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Epicatechin	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Epigallocatechin	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Floroglucinol	
Hyperforin	(Kladar, Grujić <i>et al.</i> , 2015) (Kladar, Srdenovic <i>et al.</i> , 2015) (Bagdonaite, Janulis <i>et al.</i> , 2012) (Smelcerovic, Verma <i>et al.</i> , 2006) (Zheleva-Dimitrova, Nedialkov <i>et al.</i> , 2012)

Kumarin	
Esculin	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Naftodiantron	
Hypericin	(Kladar, Grujić <i>et al.</i> , 2015) (Kladar, Srdenovic <i>et al.</i> , 2015) (Bagdonaite, Janulis <i>et al.</i> , 2012) (Martonfi, Repčák <i>et al.</i> , 2006) (Oniga, Toiu <i>et al.</i> , 2016) (Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018) (Smelcerovic, Verma <i>et al.</i> , 2006) (Zheleva-Dimitrova, Nedialkov <i>et al.</i> , 2012)
Pseudohypericin	(Kladar, Grujić <i>et al.</i> , 2015) (Martonfi, Repčák <i>et al.</i> , 2006) (Smelcerovic, Verma <i>et al.</i> , 2006) (Zheleva-Dimitrova, Nedialkov <i>et al.</i> , 2012)
Procyanidin	
Procyanidin B1	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Procyanidin B2	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)
Stilbenoid	
Cis-piceid	(Tocci, Perenzoni <i>et al.</i> , 2018)

Sammenligning av *H.perforatum* og *H.maculatum* viser at artenes innhold av kjemiske komponenter er veldig lik. Hovedforskjellen er at *H. maculatum* har fravær eller mindre mengder av hyperforin og rutin, som vanligvis finnes i *perforatum* arten. Studier utført både i Lithuania, Slovenia og Serbia viste at begge artene hadde like nivåer av klorogensyre og hypericin. Derimot er det høyere innhold av quercitrin og hyperforin i *H.perforatum*, og hyperosid i *H. maculatum* (Bagdonaite, Janulis *et al.*, 2012, Oniga, Toiu *et al.*, 2016, Smelcerovic, Verma *et al.*, 2006). Det høye innholdet av flavonolet hyperosid har skapt stor interesse for videre forskning på *maculatum* arten.

1.2.2 Innholdsstoffer i olje av *H. maculatum*

Det har blitt oppdaget ulike type oksygenerte og hydrokarbonholdige monoterpener og sesquiterpener i oljen av *H. maculatum*. Den overjordiske delen av planten undersøkt i Sørøst Serbia hadde et lavt innhold av monoterpener (8,2%) og høyt innhold av sesquiterpener (61,1%). Det var like mye innhold av både oksygenerte og hydrokarbonholdige monoterpener, men høyere innhold av hydrokarbonholdige sesquiterpener.

Hovedkomponentene var n-undecane (8.2%), β -farnesene (10.0%) , β -caryophyllene (7.6%), δ -cadinene (7.2%) og γ -muurolene (5.2%) (Gudzic, Djokovic *et al.*, 2002).

En annen studie rapporterte viktige eteriske oljekomponenter fra bladene av *H. maculatum*. Innholdstoffene som var detektert var n-nonane , n-undecane, monoterpenene α - og β -pinene og spathulenol (Crockett, 2010). Resultatene var i samsvar med olje av *H. maculatum* identifisert i Bulgaria og fjellene i vest-Serbia (Stjepanovic, 1965, Vasileva, Georgieva *et al.*, 2003). Både genetikk og miljø er viktige faktorer som avgjør innholdstoffene av oljen for de ulike plantedelene.

1.3 Biologisk aktivitet

1.3.1 Antidepressiv effekt

Både *in vitro* og *in vivo* studier viser at *H. perforatum* har effekt i behandling av mild til moderat depresjon (Klemow, Bartlow *et al.*, 2004). En Cochrane studie konkluderer med at *H. perforatum* har mer effekt enn placebo i behandling av depresjon, og har samme effekt som standard antidepressiv (Linde, Berner *et al.*, 2008). I tillegg rapporterer en studie utført i Romania lik antidepressiv effekt på alkoholholdige ekstrakter av *H. perforatum* og *H. maculatum*. Det er usikkert hvilken av innholdstoffene som er ansvarlig for denne effekten, men studiene konkluderer med at hyperforin og hypericin er hovedkomponentene (Klemow, Bartlow *et al.*, 2004, Oniga, Toiu *et al.*, 2016).

Den antidepressive mekanismen er hypericins evne til å inhibere enzymet monoamin oksidase (MAO-A). MAO-A reduserer monoamin neurotransmittere som dopamin, serotonin og norepinephrine, og utøver depressiv effekt (Klemow, Bartlow *et al.*, 2004). Derimot viser *in vitro* forsøk at hypericin ikke har affinitet for monoamin oksidase (Cott, 1997, Gaster og Holroyd, 2000). En foreslått hovedmekanisme er reopptakshemming av monoaminer i synaptosomer. Kliniske- og dyreforsøk viser at hyperforin har denne hemmende egenskapen (Singer, 1999).

1.3.2 Antioksidanteffekt

I en studie ble det utført fire ulike tester *in vitro* for å undersøke antioksidanteffekt av etanolekstraktet av *H. maculatum*. Difenylnitrikrylhydrazyl (DPPH) testen viste at arten hadde en antioksidantaktivitet målt som scavenging av DPPH- radikalet med en IC₅₀ verdi på $4,10 \pm 0,05$ µg/ml (Bozin, Kladar *et al.*, 2013). En annen studie rapporterte mer enn 20 % inhibering av DPPH- radikalet med en konsentrasjon på 12 µg/ml (Kladar, Grujić *et al.*, 2015). Testene som undersøkte inhibering av hydroksyl (OH) og nitrogenoksid (NO) radikalet viste at *H. maculatum* hadde en scavenging av radikalene med IC₅₀ verdier på henholdsvis $70,09 \pm 0,21$ µg/ml og $112,23 \pm 0,24$ µg/ml. I tillegg inhiberte planten lipid peroksidering (LP) prosessen, en modell for estimering av skade på biologisk membran forårsaket av oksidativ stress, med en IC₅₀ verdi på $29,90 \pm 0,13$ (Bozin, Kladar *et al.*, 2013).

1.3.3 Antibakteriell

Både metanolekstraktet og oljen av *H. maculatum* har effekt mot gram-negative bakterier som *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* og *Pseudomonas aeruginosa*. I tillegg rapporteres antibakteriell effekt mot *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* og soppene *Aspergillus niger* og *Candida albicans*. Oljen av plantene hadde sterkere antibakteriell aktivitet mot *C. albicans*, med minimum inhibering konsentrasjon (MIC) på 12 µL/mL og minimum mikrobicid konsentrasjon (MMC) på 16 µL/mL. Antimikrobiell effekt av oljekomponentene α-pinene, β-pinene og β-caryophyllene er godt dokumentert, og de to sistnevnte finnes i *H. maculatum* (Crockett, 2010, Gudziec, Djokovic *et al.*, 2002, Kladar, Grujić *et al.*, 2015).

1.3.4 Antiviral

Flere studier konkluderer med at naftodiantron, hypericin og pseudohypericin, har hovedansvaret for antiviral aktivitet mot herpes simplex virus 1 (HSV1), herpes simplex virus 2 (HSV2), humant immunsviktvirus (HIV) og cytomegalovirus (CMV) (Hudson, Lopez-Bazzocchi *et al.*, 1991, Meruelo, Lavie *et al.*, 1988), mens andre studier rapporterer at flavonoid- og catechinrik ekstrakter har aktivitet mot influensavirus (Kladar, Grujić *et al.*, 2015). Derimot ble antiviral aktivitet ikke rapportert i en klinisk studie som estimerte behandlingseffektivitet av HIV-positive pasienter for hypericin 0,25 mg/kg og 0,5 mg/kg to ganger i uken (Gulick, McAuliffe *et al.*, 1999). I studien var toksiske effekter tilstede uten signifikante endringer i CD4-celler og HIV p24 antigener (Kladar, Grujić *et al.*, 2015).

1.3.5 Antiinflammatorisk effekt

Den biologiske effekten av *H. maculatum* tørreksrakt ble studert på biomarkører for oksidativ stress og inflammatoriske cytokiner hos rotter. Resultatene rapporterte at *H. maculatum* nedregulerte de inflammatoriske cytokinene interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-1 β (IL-1 β), interferon (IFN) og makrofag inflammatorisk protein (MIP). I tillegg reduserte tørreksraktet effekten av nukleær transkripsjons faktor- κ B (NF- κ B) i hippocampus (Sevastre-Berghian, Toma *et al.*, 2018).

En annen studie undersøkte antiinflammatorisk effekt i rotter på både vann og vann-alkohol ekstrakter av *H. maculatum* og *H. perforatum*. Av alle ekstraktene ble det påvist høyest effekt av *H. maculatum* vann-alkohol ekstraktet med 59,5 % hemming av inflammasjonsresponsen (Sologub og Grytsyk, 2012).

1.4 Isolasjon av substanser fra plantematerialet

1.4.1 Plantematerialet

Naturstoffer kan være kilde til nye legemidler, både i form av isolerte forbindelser eller i form av ekstrakter. Før å identifisere nye biologisk aktive forbindelsene brukes ulike strategier. En etnofarmakologisk tilnærming er basert på at medisinerplanter velges ut basert på observasjoner og intervjuer av grupper som har kjennskap om spesifikke planter. For eksempel har noen planter tradisjonelt blitt brukt av urbefolkningen mot ulike lidelser basert på deres tro, kultur og erfaring. Denne kunnskapen kan benyttes for å isolere substanser fra disse plantene og forske på biologisk aktivitet (Vandebroek, 2013). For det andre kan planter velges ut ifra kjemiske, fysiske eller toksiske egenskaper. Kunnskap om at spesifikke plantegrupper inneholder en viss type naturprodukter, kan brukes til å forutsi at taksonomisk relaterte planter inneholder strukturelt beslektede komponenter. Disse kjente egenskapene kan brukes til å velge ut planter med lignende egenskaper, og det gir en større sannsynlighet for å finne molekyler med en ønsket biologisk aktivitet. I tillegg kan planter velges ut mer tilfeldig uavhengig av eksisterende kunnskap om deres kjemiske og biologiske aktivitet. Dette åpner muligheten til forskning på uvanlige planter som eksisterer i bestemte habitat. Etter innhøsting må plantematerialet tørkes i romtemperatur, i varmeskap eller med frysetørker. Det tørkede plantematerialet kvernes med blender eller mølle til egnet partikkelstørrelse for videre ekstraksjon. Ekstraksjonen er avhengig av partikkelstørrelsen, hvor store partikler ekstraheres lite effektivt mens små partikler med høyere overflateareal gir bedre ekstraksjonsutbytte (Heinrich, 2012).

1.4.2 Ekstraksjon og ekstraksjonsmetoder

Ekstraksjon er uttrekking av innholdsstoffer fra et fast stoff. Det finnes ulike ekstraksjonsmetoder, og hvilken som benyttes er avhengig av stabilitet og polaritet til substansene. Stoffenes egenskaper til å løses i ulike løsningsmidler varierer, og bør tas i betraktning ved valg av løsningsmiddel for ekstraksjon. For de fleste planter er kombinasjon av vann og alkohol et godt valg for å ekstrahere ut både lipofile og hydrofile komponenter, men for ekstraksjon av lipofile stoffer gir upolare løsemidler bedre og mer selektivt resultat (Heinrich, 2012).

De konvensjonelle ekstraksjonsmetodene for utvinning av naturlige produkter er soxhlet-ekstraksjon, maserering, varmeeekstraksjon og ultralydassistert ekstraksjon (UAE) (Sticher, 2008). Soxhlet ekstraksjon baserer seg på kontinuerlig ekstraksjon med løsemidler som resirkuleres, destilleres fra ekstrahert prøve og kommer i kontakt med fast stoff igjen. Metoden gir effektiv separering, hvor store mengder ekstraheres ved bruk av relativt lite ekstraksjonsløsningsmiddel. Derimot er ulempen degradering av substanser ved tilførsel av varme (Heinrich, 2012). Maserering er en mild ekstraksjonsmetode som foregår i romtemperatur over en tidsperiode. Målet med metoden er å mykne plantemateriale i et egnet løsemiddel. For å øke kontakten mellom planten som blir ekstrahert og løsningsmiddelet må løsningen røres jevnlig, og plantematerialet være malt i egnet partikkelstørrelse. Partikkelstørrelse mellom 0,3-4,0 mm er egnet for ekstraksjon av planter. Fordelen med ekstraksjonsmetoden er at den har moderate ekstraksjonsbetingelser uten krav om spesifikt utstyr. I tillegg foregår prosessen uten tilsetning av varme, og dermed er det lite sjanse for nedbrytning av produkt. Derimot er ulempen høyt forbruk av løsningsmiddel, lang ekstraksjonstid og lavt ekstraksjonsutbytte (Bucar, Wube *et al.*, 2013).

I ekstraksjon med varmt ekstraksjonsmiddel er det fare for degradering, siden plantematerialet varmes i etanol blandinger eller ren etanol under reflux. Derimot er fordelen med metoden økt ekstraksjonsutbytte (Heinrich, 2012). UAE er en ikke-termisk ekstraksjonsteknikk, hvor plantematerialet dekkes av ekstraksjonsløsningsmidlet og plasseres i et ultralydbad. Metoden kan utvinne substanser både ved lav temperatur, på kort tid og med mindre løsemiddelbehov (Bucar, Wube *et al.*, 2013).

1.4.3 Kromatografiske metoder

Kromatografi er et samlenavn på separasjonsmetoder for å skille stoffer fra hverandre ved å fordele dem mellom to faser: mobil (beveger seg) og stasjonær (står i ro). Stasjonærfasen kan være et fast stoff eller væske, og mobilfasen kan være væske, gass eller superkritisk væske. Separasjonen foregår i en kolonne eller plate med tynt sjikt av stasjonærfase. Prøven transporteres med mobilfasen gjennom stasjonærfasen. Separasjon av stoffer er avhengig av stoffenes kjemiske og fysiske egenskaper, og avgjør om de retarderes mer eller mindre på stasjonærfasen (Wibetoe, 2020). Separasjonene er basert på stoffenes interaksjon med aktive grupper på stasjonærfasen, som for eksempel kan være i form av svake intermolekylære

bindinger som London krefter og hydrogenbindinger eller kapillærkrefter (Heinrich, 2012). En sterk interaksjon med overflaten fører til økt retensjon av stoffet, og lavere hastighet sammenlignet med mobilfasen. Stoffene kommer ut med ulik retensjonshastighet og retensjonstid og som følge av dette separeres. De separerte stoffene detekteres med detektorer som UV, fluorescens eller massespektrometer. Det finnes både analytisk og preparativ kromatografi. Analytisk kromatografi benyttes for å skille komponenter i prøven, analysere enkeltkomponenter eller for å optimalisere betingelser til preparativ kromatografi. Hovedmålet med preparativ kromatografi er å isolere og rense substansen i en stoffblanding (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2004).

I adsorpsjonskromatografi benyttes et fast adsorpsjonsmiddel pakket i en kolonne som stasjonærfase, og en væske som mobilfase. Polaritet til stasjonærfasen, mobilfasen og de ulike stoffene bestemmer adsorpsjonen til kolonnematerialet. Det kan benyttes ulike type stasjonærfaser basert på separasjonsprinsippet. Et av de viktigste adsorpsjonsmidlene er silikagel som brukes i normalfasekromatografi. På silikagelen er silanolgrupper (Si-OH) de aktive gruppene og bidrar til en polar overflate. Si-OH gruppene kan derivatiseres med klorsilaner som fester på upolare grupper. Dette fører til dannelsen av stasjonærfaser som C8 og C18 (octadecyl). Disse upolare stasjonærfasene brukes i omvendtfasekromatografi, og fører til økt retensjon av upolare stoffer (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2004). For mobilfasene benyttes enten isokratisk- eller gradient eluering. Den førstnevnte består av samme løsemiddel sammensetning, og den sistnevnte med ulik sammensetning av løsemidler (Heinrich, 2012).

En metode som brukes mye for opprensning av stoffer er eksklusjonskromatografi, hvor stoffene separeres etter molekylstørrelse. Stasjonærfasen består av kryssbundet dekstran (sukker polymer) som svelles, og danner en gel matriks etter tilsetning av egnet løsningsmiddel. Gelen består av porer med gitt størrelse, hvor små molekyler retarderes på kolonnen mens store molekyler retarderes lite og elueres først. For noen stasjonærfaser, eksempelvis Sephadex-LH-20, vil det også forekomme adsorptive mekanismer overfor aromatiske og sykliske forbindelser (Woof og Pierce, 1967). Gelkromatografi er egnet for separasjon av store molekyler slik som proteiner, karbohydrater, tanniner og glykosider (Heinrich, 2012).

Ioneporkromatografi benyttes for separasjon av ioniske forbindelser på stasjonærfasen som består av silikabaserte kolonner. Mobilfasen tilsettes et medium med store hydrofobe grupper som øker retensjon av ioneparet i forhold til stoffet selv. Kvartære ammoniumforbindelser og sulfonsyrer er vanlige midler for henholdsvis syrer og baser (Heinrich, 2012).

De to mest brukte instrumentelle teknikkene for analyser av naturstoffer er høypresisjonsvæskerkromatografi (HPLC) og gaskromatografi (GC). HPLC instrumentet består av mobilfasereservoar, høytrykkspumpe, injektor, separasjonskolonne, detektor og datasystem. Adsorpsjon, ionebytting og eksklusjon er separasjonsprinsipper som benyttes i HPLC. Teknikken har en stor anvendelsesområde, og kan brukes til forbindelser med høyt kokepunkt og molekylvekt (Wibetoe, 2020). GC brukes til å separere flyktige og termisk stabile stoffer. Mobilfasen er en bæregass, og stasjonærfasen en pakket kapillærkolonne. Prøven løses i egnet løsningsmiddel og injiseres i fordampingsinjektor. Bæregassen bringer stoffet gjennom kolonnen som fordeler seg ulikt mellom stasjonær- og mobilfasen, og strømmer med forskjellig hastighet gjennom kolonnen. Temperaturen til kolonnen styres av et temperaturprogram, og flyktigheten til stoffene er temperaturavhengig. Lett flyktige stoffer analyseres ved lavere temperatur enn mindre flyktige stoffer (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2004). Derimot er det fare for dekomponering av stoffer som er ustabile ved høyere temperatur (Heinrich, 2012).

En annen kjent instrumentell metode er flash-kromatografi, hvor det gjerne brukes pre-pakkede kolonner med løsningsmiddel som pumpes gjennom eller presses via komprimerte gasser. Det kan både benyttes polare og ikke-polare stasjonærfaser. Den mest brukte stasjonærfasen er silika gel med partikkelstørrelsen 36-70 μm eller 40-63 μm , men mindre partikkelstørrelser kan også benyttes. For partikler mindre enn 25 μm skal det benyttes mobilfaser med lav viskositet, for å unngå lav gjennomstrømningshastighet (Sticher, 2008). Et flash-kromatografiinstrument består av pumpe koplet til en kolonne, en innbygget UV-detektor og fraksjonsoppsamlere. Prøven injiseres på kolonnen som kan pumpe flere løsemidler med høy hastighet. Instrumentet som benyttes i flash-kromatografi er forholdsvis dyrt, men gir rask fraksjonering av store og komplekse blandinger (Heinrich, 2012).

I tynnsjiktskromatografi (TLC) består mobilfasen av væske, og stasjonærfasen ligger som et tynt sjikt utover en plate. Stasjonærfasen er vanligvis silika eller kjemisk bundet silikabaserte faser. På platen appliseres prøvene nederst på platekanten. Platen plasseres i et lukket kar med mobilfasen som migrerer oppover platen ved hjelp av kapillærkrefter, og separerer prøven avhengig av polariteten til substansene. Stoffe som absorberer UV-lys eller som fluorescerer kan ses ved hjelp av en UV-lampe. Platen kan også sprayes med reagenser, eksempelvis Ceric, etterfulgt av tørking, for å danne synlige fargede forbindelser til observering. For hver flekk på platen er retensjonsfaktoren (R_f) beregnet. R_f er forholdet mellom avstanden fra startlinjen til midten av flekken og startlinjen til frontlinjen av mobilfasen. Vandringslengden og hastigheten er styrt av fordelingen mellom mobil- og stasjonærfasen, som avhenger om det er normal- eller omvendtfasekromatografi. TLC kan benyttes til både analytisk og preparativ separasjon, og valg av mobil- og stasjonærfase er fleksibelt. I tillegg er metoden kostnadseffektiv og rask sammenlignet med HPLC, siden det er mulig å analysere mange prøver samtidig (Heinrich, 2012).

1.4.4 Strukturoppklaring

Det finnes to klassiske spektroskopiske metoder til strukturoppklaring av naturstoffer og andre organiske forbindelser: Kjernemagnetisk resonansspektroskopi (NMR) og massespektrometri (MS). Teknikkene kan determinere strukturen av komponenter på mikrogramms størrelse, og anvendes også til kontroll og kvalitetssikring av produkter (Heinrich, 2012).

NMR baserer seg på interaksjon mellom atomkjernen og elektromagnetiske stråler. Kjerner som kan studeres ved denne metoden er ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F og ^{31}P . Disse atomene har kjernespinns og oppfører seg som små magneter. Når kjernen utsettes for magnetfeltet, kan kjernens magnetiske moment justeres enten med (α -spinn-tilstand) eller mot (β -spinn-tilstand) instrumentets magnetfelt. En radiopuls, som inneholder alle frekvenser, sendes til α -spinn-tilstand som absorberer energien og eksisterer til en høyere energi nivå (β -spinn-tilstand). Frekvensene i radiopulsen som absorberes detekteres når kjernen relaxerer tilbake til α -spinn-tilstand, og gir signal i NMR-spekteret ved hver eneste frekvens hvor kjernen var i resonans. Disse signalene kalles for kjemisk skift og angis i parts per million (ppm) (Klein, 2015).

Frekvensen er avhengig av styrken på magnetfeltet og påvirkes av elektrontetthet rundt kjernen. Et signal med høy frekvens har høyere ppm verdi og er mer «downfield» i motsetning til signal med lavere frekvens som er «upfield». Elektrontettheten er basert på grupper i nærheten som tiltrekker elektroner fra kjernen. Elektrontiltrekkende grupper har lavere elektrontetthet og er mindre skjermet (deshielding) av nabostående atomer, mens elektrondonerende grupper har høyere elektrontetthet og er mer skjermet (shielding) av nabostående atomer (Klein, 2015).

NMR-spekter kan foreligge som både endimensjonalt og todimensjonalt spektrere. Proton kjernemagnetisk resonansspektroskopi ($^1\text{H-NMR}$), karbon- 13 kjernemagnetisk resonansspektroskopi ($^{13}\text{C-NMR}$) og distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) er endimensjonale spektrere, mens correlation spectroscopy (COSY), heteronuclear multiple bond correlation (HMBC), nuclear overhauser effect spectroscopy (NOESY) og heteronuclear single quantum coherence (HSQC) gir todimensjonale spektrere (Heinrich, 2012).

$^1\text{H-NMR}$ angir kjemisk skift til protonene i spekteret, som tolkes etter integrering, koblingskonstant, signalsplitting og kjemisk skift. Integrering benytter arealet under hvert signal og forteller hvor mange hydrogenatomer som er assosiert med signalet. Signalsplitting er basert på $n+1$ regelen, hvor n er antall nærliggende naboprotoner og avgjør om toppene blir singletter, dubletter eller triplerter. Koblingskonstanten (J) forteller om avstand mellom topper i et splittet signal. Koblingskonstanten er lik i kjerner som kobler sammen, og gir nyttig informasjon om hvilken protoner som ligger i same protonmiljø (Heinrich, 2012).

$^{13}\text{C-NMR}$ tyder kjemisk skift til karbonatomene, og er en lite følsom metode sammenlignet med $^1\text{H-NMR}$. I $^{13}\text{C-NMR}$ elimineres koblingen mellom ^1H – ^{13}C , og spekteret består hovedsakelig av singletter som angir signal for hvert karbonatom. Signalene ligger i kjemisk skift mellom 0-220 ppm. På samme måte som for ^1H -signaler vil kjemiske skift for ^{13}C -signaler påvirkes av shielding og deshielding. DEPT er en teknikk som gir informasjon om antall hydrogenatomer bundet til hvert karbonatom. I DEPT vil CH_3 og CH signaler være positive og peke oppover, men CH_2 og kvarternære karboner vil peke nedover langs y -asken og gi negative signaler (Heinrich, 2012).

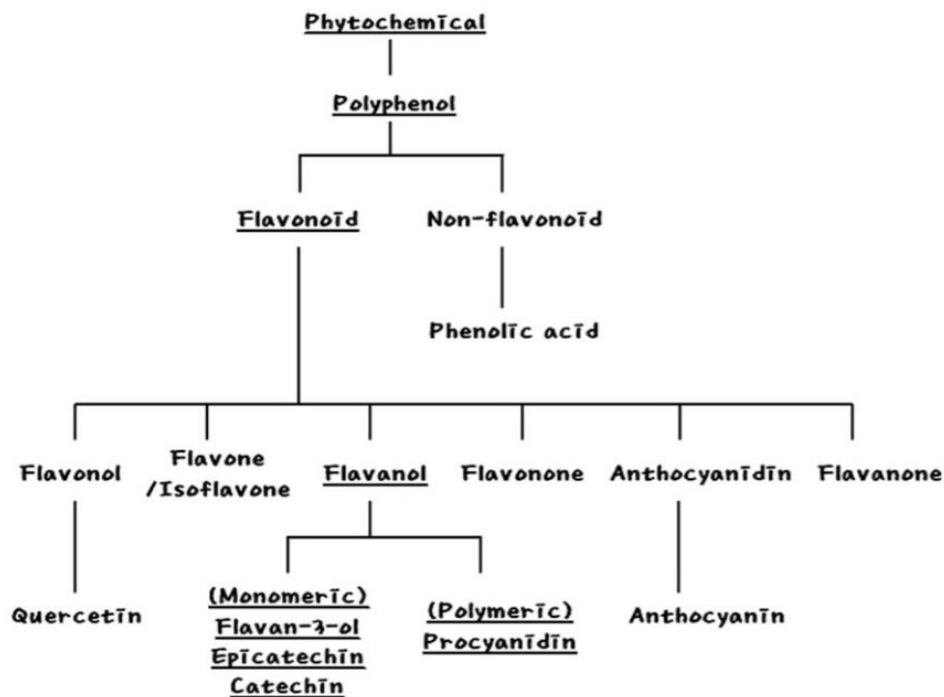
COSY angir koblingen mellom nærliggende protoner uten å identifisere koblingskonstanter. I COSY korreleres to hydrogenspektre av samme forbindelse mot hver sin akse. Signalene observeres som krystopper, og gjør det mulig å identifisere protoner som kobler sammen. I motsetning til COSY observerer NOESY koblinger gjennom rommet i stedet for gjennom bindinger. Dette muliggjør bestemmelsen av stereokjemi til produktet som analyseres (Heinrich, 2012).

HSQC forteller hvilket proton som er bundet til hvilket karbonatom, og består av ^1H -NMR spekter og ^{13}C -NMR spekter på hver sin akse. HMBC er en effektiv metode som viser korrelasjon mellom protoner og karboner som er to til tre bindingsavstander unna. Ut i fra HMBC er det mulig å sammenslå delvis strukturinformasjon observert fra andre spektre (Heinrich, 2012).

Den spektroskopiske metoden MS baserer seg på at organiske forbindelser utsettes for elektroner i vakuum. Dette fører til at molekylene ioniseres til molekylioner, som enten er positive eller negative ladd. Når bindingene i de ustabile molekylionene brytes, dannes mindre fragmenter som observeres i et massespekter. Massespekteret består av stolpediagram hvor mengde intensitet av molekylionet og fragmentionet plottes som funksjon av masse/ladning (m/z). MS gir både informasjon om molekylvekten til stoffet, masse til molekylfragmenter etter ionisering og hvilke atomer som finnes i forbindelsen (Heinrich, 2012, Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2004).

1.5 Polyfenoler

Polyfenoler er vanlige kjemiske forbindelser i planteriket og dannes ved sekundær metabolisme gjennom to grunnleggende biosynteseveier: shikimat og acetat. Hovedstrukturen består av benzenringer med en eller flere hydroksylgrupper (pyrogallo, floroglucinol, resorcinol, pyrokatekol) som er bundet til glykosid eller aglykon. Som vist i figur 1.3 kan polyfenoler klassifiseres som flavonoider og ikke-flavonoider. Flavonoider deles inn i flere undergrupper basert på deres kjemiske struktur: flavonoler, flavoner, isoflavoner, flavanoler, flavononer, anthocyaniner og flavanoner. Ikke-flavonoider består blant annet av fenolsyrer, hydrolyserbare tanniner og stilbener. Polyfenoler utøver både antioksidant, antibakteriell, antritrombogen og antiinflammatorisk effekt ved å påvirke ulike mekanismer i kroppen (Santhakumar, Battino *et al.*, 2018).

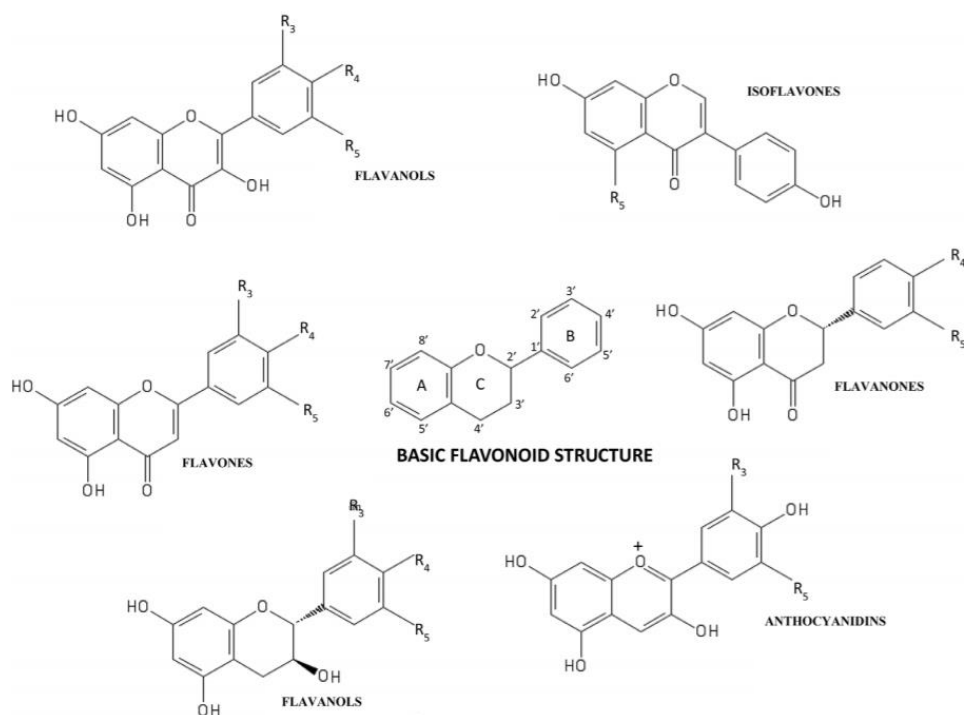


Figur 1.3 Inndeling av polyfenoler til grupper av ikke-flavonoider og flavonoider (Kim, Shim *et al.*, 2014).

1.5.1 Flavonoider

Flavonoider er en hovedgruppe av polyfenoler, og finnes i mange planter, matvarer, frukt og grønnsaker. Flavonoider kan gi opphav til ulike farmakologiske aktiviteter, og har en antatt helsemessig gunstig effekt på kroppen. Mange studier rapporterer at flavonoider virker som antioksidant, antikarsinogen, antimikrobiell, antiviral, hjerteforebyggende og nevrobeskyttende agenter. Derimot er det nødvendig med mer studier og forskning som diskuterer sammenhengen mellom flavonoider og enkelte sykdommer (Aron og Kennedy, 2008). De farmakologiske effektene er ofte svake, og det er i mange tilfeller uklart hvilke mekanismer som forårsaker observerte kliniske effekter.

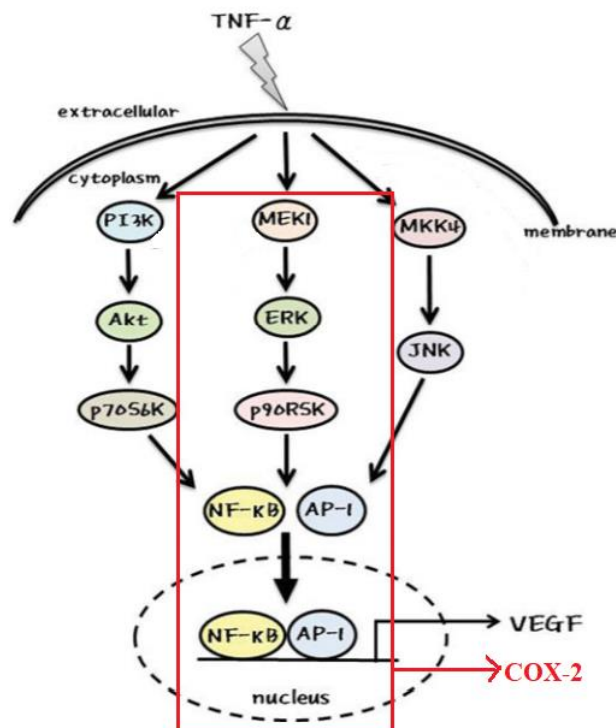
Flavonoider utgjør en gruppe fenoliske sekundære plantemetabolitter som er strukturelt karakterisert av et fenylobenzopyran, hvor to benzenringer er bundet sammen med tre karbonatomer (C6-C3-C6). Grunnstrukturen består av 15 karbonatomer fordelt på tre aromatiske ringer, A, B og C (se figur 1.4). En av disse ringene består av minst en OH-gruppe, eller OH-gruppene kan være metylert, glykosylert eller forestret med en organisk syre (Aron og Kennedy, 2008).



Figur 1.4 Kjemisk struktur av de ulike flavonoidene (Santhakumar, Battino *et al.*, 2018)

1.5.2 Antinflammatorisk effekt

Det eksisterer en sammenheng mellom oksidativ stress og proinflammatoriske responser, som tyder på at oksidativ stress kan føre til inflammasjon (Santhakumar, Battino *et al.*, 2018). Mange kroniske tilstander, blant annet diabetes, er knyttet til økt produksjon av reaktive oksygen spesier (ROS) som følge av oksidativt stress og protein oksidasjon. Protein oksidasjon frigjør inflammatoriske signalmolekyler, eksempelvis peroxiredoxin 2 (PRDX2), som aktiverer makrofager til å produsere og frigjøre det proinflammatoriske cytokinet tumor nekrose faktor alfa (TNF- α). Som vist i figur 1.5 aktiverer TNF- α signalveiene phosphoinositide 3-kinase (PI3K), mitogen aktivert protein kinase 1 (MEK1) og mitogen aktivert protein kinase kinase 4 (MKK4). Alle signalveiene påvirker NF- κ B og aktivatorprotein (AP-1) som stimulerer vaskulært endotel vekst faktor (VEGF). NF- κ B er en sentral transkripsjonsfaktor ved inflammasjon og regulerer genuttrykk for ulike proinflammatoriske cytokiner som blant annet interleukin-6 (IL-6) og c-reaktivt protein (CRP). I tillegg induserer signalveien MEK1/ERK dannelsen av enzymet cyklooksxygenase-2 (COX-2), som er involvert i utvikling av kreft og inflammasjon (Kim, Shim *et al.*, 2014).



Figur 1.5 Signalvei for aktivering av NF- κ B og AP-1 (Kim, Shim *et al.*, 2014)

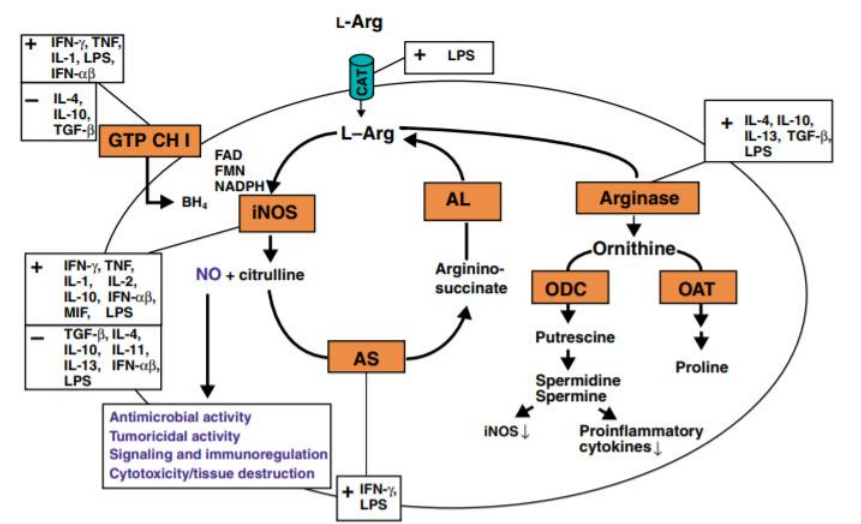
Det er utført ulike *in vivo* studier for å undersøke antiinflammatorisk potensial av polyfenoler på grupper av mennesker over lengre tid. Resultatene viste at polyfenoler utøver antiinflammatorisk effekt ved å påvirke signalveier og enzymatiske prosesser involvert i inflammasjon. Polyfenoler påvirker også proteinkinasene, tyrosin og serine-threonin, som er involvert i B-lymfocyt aktivering og T-celleproliferasjon. I tillegg har polyfenoler evnen til å hemme mitogen aktivert protein kinase (MAPK) og NF- κ B, og dermed redusere produksjon av proinflammatoriske molekyler som TNF- α , IL-6, CRP, NO, protein kinase-C og COX-2. Studier viser også at polyfenoler har evnen til å modulere inflammatoriske mediatorer, altså metabolitter fra cytokiner og peptider (Santhakumar, Battino *et al.*, 2018).

I tillegg kan flavonoider forbedre tarmbarrierefunksjonen ved å hemme NF- κ B, redusere oksidativ stress, oppregulere tarmhormonet glukagon-lignende peptid-2 (GLP-2) og hemme inflammatoriske prostaglandin (PGE₂) utskillelse ved å regulere enzymet COX-2.

Tarmmetabolittene påvirker også permeabilitet i tarmveggen og lekkasje inn i proinflammatoriske stoffer. Evnen flavonoider har til å modulere mikrobiota og positivt påvirke tarmbarrierefunksjonen kan muligens forbedre kolitt i tarmen (Veza, Nogales *et al.*, 2016).

1.5.3 Nitrogenoksid fra aktiverte makrofager

NO er medlem av ROS og består av nitrogen bundet til et uparret oksygenatom. NO nedbrytes gjennom en oksidasjonsprosess til nitritt (NO₂⁻) som er et ikke-flyktig og mer stabilt atom. Som vist i figur 1.6 produseres NO fra aktiverte makrofager. NO dannes av enzymet induert NOS (iNOS) som blir aktivert av cytokiner og mikrobielle produkter som LPS. Disse produktene påvirker blant annet opptaket av L-arginin induert av kationiske aminosyretransportørproteiner (CAT). Ved for høye nivåer av NO kan produksjonen nedreguleres av polyaminer, eksempelvis putrescine, spermidin, og spermin. som er produkter fra enzymet arginase (Bogdan, 2001).



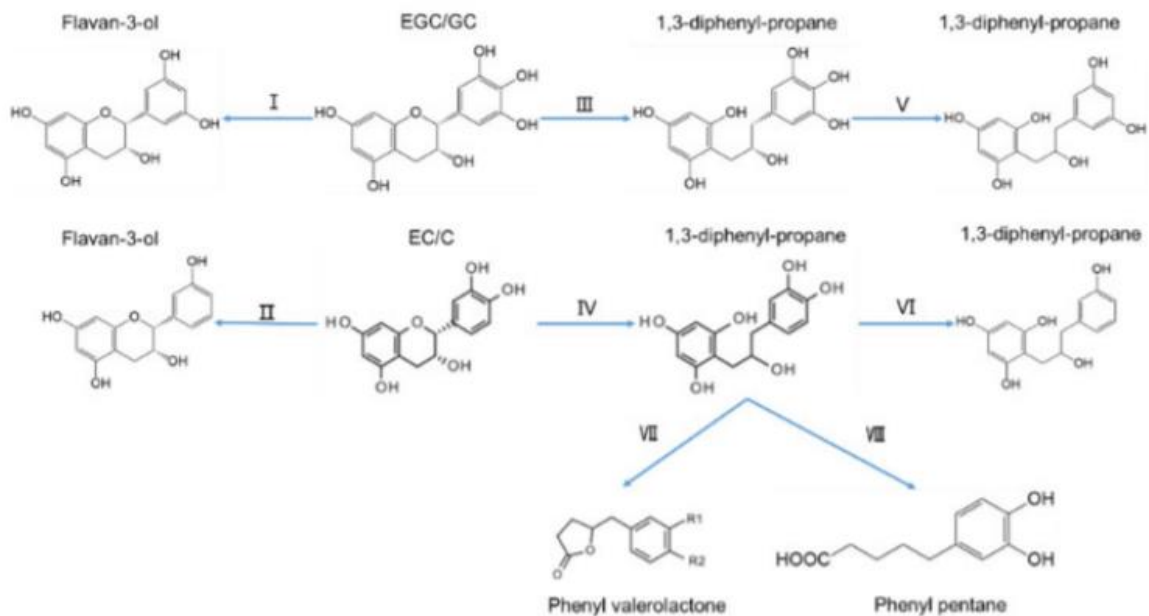
Figur 1.6 Regulering av NO produksjon fra makrofag (Bogdan, 2001)

NO produksjon avledet fra iNOS har vist både positive og negative effekter. De aktiverte makrofagene produserer NO som en inflammatorisk mediator, hvor økt stimulering med høye NO-nivåer medfører inflammatoriske skader og vevsødeleggelser. Eksempelvis har høyt innhold av iNOS-uttrykk blitt assosiert med utvikling av transplantasjon arteriosklerose. Den proinflammatoriske effekten av NO fra makrofager, forekommer som oppregulering av ulike cytokiner og vekstfaktor (Bogdan, 2001). Derfor har NO-hemmere viktig rolle i inflammatoriske sykdommer som revmatoid artritt og Crohns sykdom (Veza, Nogales *et al.*, 2016). Derimot har den cytotoxiske effekten av NO på vev vist å kunne drepe kreftceller *in vivo* og *in vitro*. I tillegg har L-arginin-iNOS signalveien vist antitrombotiske og antibakterielle effekter. Enzymet iNOS spiller også en viktig rolle i immunresponsen, hvor den bidrar med å motvirke overdrevne immunreaksjoner, beskytter mot auto immunitet og fungerer som et intra- og intercellulært signalmolekyl som former immunresponsen (Bogdan, 2001).

Flavanoider kan både øke og redusere NO-nivåer avhengig av flavonoidstruktur og konsentrasjon som er til stede. Flavanoider kan fjerne NO ved å virke som prooksidanter, men under oksidativt stress kan flavanoider med deres antioksidant egenskaper beskytte NO mot superoksyd drevet inaktivering. I tillegg viser *in vitro* studier at flavanoider har evnen til å redusere overproduksjon av NO, som følge av iNOS hemming (Pei, Liu *et al.*, 2020).

1.5.4 Mikrobiota

Mage-tarmkanalen (GI) spiller en sentral rolle i absorpsjon, distribusjon, metabolisme og utskillelse av blant annet flavonoider og andre polyfenoler. Disse mekanismene er modulert av samspillet mellom flavonoider og blant annet GI-mikrobiota. Flavonoider absorberes i liten grad fra tynntarmen og passerer til tykktarmen hvor mikrobiotaen metaboliserer flavonoider til ulike fenylylvalerolaktoner og fenoliske syrer. Som vist i figur 1.7 nedbrytes flavanoler gjennom flere trinn til blant annet fenylylvalerolakton og fenylyl pentan via bakterier i tarmen, som spalter C-ringer og dehydroksylerer C4' posisjoner (Oteiza, Fraga *et al.*, 2018, Tao, Zhang *et al.*, 2019).



Figur 1.7 Metabolsk rute av EC/C og EGC/GC. I: Dehydroksylering på C4'. III og IV: C-ring splitting. V og VI: Dehydroksylering på C4' av splittet produkt. VII og VIII: Degradering av splittet produkt (Tao, Zhang *et al.*, 2019).

Flere studier tyder på at flavonoider og deres tarmmetabolitter samarbeider og fører til gunstige helseeffekter i tarmen. Eksempelvis kan tarmmetabolittene ha en antiinflammatorisk effekt, og det drøftes om de kan bidra i forebygging av sykdommer som Alzheimer, Parkinson, diabetes, tykktarmskreft, kardiovaskulære sykdommer og tarmsykdommer som Chrons sykdom og ulcerøs kolitt (Oteiza, Fraga *et al.*, 2018, Serra, Almeida *et al.*, 2018). Det er mange mekanismer og prosesser som er knyttet til den antiinflammatoriske effekten i tarmen. Flavonoider øker blant annet antiinflammatoriske IL-10 cytokiner ved å øke regulatorisk TH17 celledifferensiering i lamina propria. I tillegg kan flavonoider og

tarmmetabolitter forme tarmmikrobiota ved å hemme veksten av forskjellige patogener, og øke fordelaktige probiotika slekter som *Bifidobacterium* og *Lactobacillus*. Flavonoider kan på denne måten ha en prebiotisk effekt. Disse probiotiske bakteriene kan forbedre tarmhelsen ved å redusere endotoksinproduksjonen, opprettholde tarmimmuneostase og fremme absorpsjon av næringsstoffer (Pei, Liu *et al.*, 2020).

Nyere arbeid viser at kombinasjonen av flavonoider og tarmmikrobiota forbedrer insulinresistens og lever homeostase *in vitro*. I tillegg har økt inntak av flavonoider og konvertering av tarmmikrobiota vist å kunne gi vekttap hos mennesker og dyr, samtidig en positiv innvirkning på kognitiv ytelse gjennom tarm-hjerneaksen (Kaakoush og Morris, 2017).

2 Hensikten

Hypericum maculatum (firkantperikum) er en medisinsplante som er vanlig både i Norge og resten av Europa. Selv om planten har blitt brukt medisinsk mot flere sykdommer, blir andre arter fra samme slekter regnet som mer virksom, som for eksempel *Hypericum perforatum* (prikperikum). Det er kjent at *H. maculatum* har et høyt innhold av flavonoider, mens det er relativt få studier som omhandler plantens biologiske effekter og mulige virkninger.

Hensikten med oppgaven er å isolere og karakterisere innholdsstoffer i et vandig alkoholekstrakt av *H. maculatum* og undersøke deres effekter på LPS stimulerte makrofager og hvordan de påvirker tarmmikrobiota *in vitro*. Fokuset er spesielt rettet mot å ekstrahere og isolere polyfenoler, da de har evnen til å utøve immunmodulerende og antiinflammatoriske effekter, og det er en økende interesse for å forstå hvordan polyfenoler påvirker tarmhelsen.

3 Materielle og metode

3.1 Materialer

Tabell 3.1 Liste over kjemikalier og produsent

Kjemikalier	Produsent
Acetonitril (ACN)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Tyskland
Acetonitril HPLC- kvalitet	A/S Chemi Teknik, Oslo
Aceton	VWR Chemicals, Frankrike
Butanol (BuOH)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Cerium (IV)sulfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Destillert vann, MilliQ	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Diklormetan (DCM)	VWR Chemicals, Frankrike
Deuterert dimetylsulfoksid (DMSO-d ₆)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Deuterert metanol (CD ₃ OD)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Tyskland
DMEM glutaMAX tilsatt 10 % FBS og 1 % penicillin/streptomycin	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, UK
Etanol (EtOH)	Antibac AS, Asker, Norge
Etylacetat (EtOAc)	VWR Chemicals, Frankrike
Griess-reagens A (1% sulfanilamid i 5% fosforsyre)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Griess-reagens B (0.1% N-(1-naptyl) etylendiamin (NED) i destillert vann)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Interferon-gamma (IFN- γ)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Lipopolysakkarid fra <i>E.coli</i> 055:B5	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
MTT oppløsnings buffer	Roche, Mannheim, Tyskland
Maursyre	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
MTT labeling reagent	Roche, Mannheim, Tyskland
Metanol (MeOH)	VWR Chemicals, Darmstadt, Tyskland
Metanol HPLC kvalitet	VWR Chemicals, Darmstadt, Tyskland
Natriumnitritt (NaNO ₂)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA

Sephadex™ LH-20	GE healthcare, Uppsala, Sverige
Trifluoreddiksyre (TFA)	Sigma-Aldrich , St.Louis, MO, USA
Tryptan blå	Thermo Fisher Scientific, California, USA
TMS	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Quercetin	Sigma, Tyskland

Tabell 3.2 Liste over apparatur

Apparatur	Produsent
Analytisk HPLC	
Elite LaChrome Pumpe 1-2130	Hitachi, Tokyo, Japan
Elite LaChrome Autosampler 1-2000	Hitachi, Tokyo, Japan
Elite LaChrome Kolonneovn 1-2300	Hitachi, Tokyo, Japan
Elite LaChrome Diodearray detector	Hitachi, Tokyo, Japan
Elite LaChrome Organizer	Hitachi, Tokyo, Japan
Kinetex 5u C18 100A, 150 x 4,6 mm kolonne	Phenomenex, Torrance, CA, USA
Vial med lokk	Supelco, USA
Analytisk tynnsjikt-kromatografi (TLC)	
Elueringskar, glass	Camag, Muttenz, Sveits
TLC-sprayer GW-1	Merck, Darmstadt, Tyskland
Silikagel 60 F254, aluminiumsplater	Merck, Darmstadt, Tyskland
RP-18 F254 S, aluminiumsplater	Merck, Darmstadt, Tyskland
End-to-End mikropipetter, 20 µl	Marienfeld GmbH, Tyskland
Celleforsøk	
Falcon-rør (sentrifugerør)	Corning Science, Mexico
Mikrotiterplater (96 brønns) med flat og rund bunn	Costar corning incorporated, NY, USA
Stripetter 5, 10 og 25 ml	Costar corning incorporated, NY, USA
Reagent reservoar	Costar corning incorporated, NY, USA
Dyrkningsflasker	Thermo Fisher Scientific, NY, USA
Celleskraper	TPP, Switzerland
Varmebad SUB Aqua 12 Plus	Grant, England

Sentrifuge 4200 Celleinkubatorskap med CO ₂ -kontroll Celleteller (Countess Automated Cell Counter) SpectraMax 190 absorbansmåler	Kubota, Tokyo, Japan ESCO, Singapore Invitrogen, California, USA Molecular Devices, California, USA
Frysetøking Chemistry hybrid pump RC5 CHRIST LOC-1m	Vacuubrand GMBH+CO KG, Tyskland
Filter Kvalitativ- og faseseparasjonsfilterpapir Sprøytefilter, 0.45µm PTFE membrane, 4 mm 0,2 µm sterilfilter	Whatman, Maldstone, England Whatman, Maldstone, England Pall corporation, England
Flash kromatografi Biotage Selekt flash kromatografi instrument Sfår C18 12 g og 60 g kolonne	Biotage AB, Uppsala, Sverige Biotage AB, Uppsala, Sverige
Inndamping Rotavapor med varmebad HB10/RV10 E-LAB 2 oljepumpe	IKA, Staufen, Tyskland Edwards, West Sussex, England
Mølle Ultra Centrifugal Mill ZM 100	Retsch GmbH &CO, KG, Tyskland
Mikrobiotaforsøk Vanlige eppendorfrør (0,5-2 ml) Sterile eppendorfrør (spisse og runde) 1 ml soft-Ject Luer sprøyter	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland Henke sass wolf, Tyskland
NMR- Spektroskopi Bruker AV III-400 Bruker AV II-600	Bruker, Rheinstetten, Tyskland Bruker, Rheinstetten, Tyskland
Preperativ HPLC Varian ProStar, model 210 preparativ HPLC Agilent 440-LC fraksjonssamler Kinetex 5 µm C18 LC kolonne (150 x 21,2mm)	Palo, Alto, California, USA Agilent Technologies, California, USA Phenomenex Onc. Torrance, CA, USA
UV-lyskasse Mineralight lamp modell UVGL-58	Ultra-Violet Products, Upland, CA, USA

Ultralydbad Ultrasonic cleaner USC300T	VWR, Darmstadt, Tyskland
Vekt TE 313S ED224S Analytical Balance	Sartorius, Goettingen, Tyskland Sartorius, Goettingen, Tyskland
Varmeskap Thermo electron T6	Heraeus, Hanau, Tyskland

3.2 Generelle metoder

3.2.1 Vannkvalitet

Destillert vann fra Millipore renevann ble benyttet ved utføring av alle metodene.

3.2.2 Innveiing

Analysevekt ble brukt for innveiing av mindre mengder (<10 g), og overskålsvekt for innveiing av store mengder (>10 g).

3.2.3 Inndamping på rotavapor

Rotavapor er en instrumentell metode som ble benyttet for å fjerne løsemidler og vann etter ekstraksjon og kromatografi ved inndamping.

3.2.4 Filtrering

Filtrering ble benyttet for å skille væske fra et fast stoff ved bruk av kvalitativ filter papir. I tillegg ble det brukt vakuumpumpe for å gi sug til å utføre filtreringen raskere.

3.2.5 Frysetøking

Frysetøking ble brukt for å fjerne vann eller andre løsningsmidler fra materialet uten oppvarming for å forbedre stabilitet.

3.2.6 Sephadex LH-20 kolonne-separering

Sephadex LH-20, 5 cm x 42 cm, kolonne ble benyttet for fraksjonering. Som vist i tabell 3.3 ble det utført gradienteluering med metanol (MeOH) og vann som mobilfaser. Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (1:5), etterfulgt av økende mengde av MeOH og til slutt rensing med aceton:vann (7:3). Det ble samlet kolonnefraksjoner i størrelser på 250 ml og 500 ml.

Tabell 3.3 Gradienteluering av mobilfasene

Trinn	Mobilfasesammensetning
1	MeOH- vann (1:5)
2	MeOH- vann (2:5)
3	MeOH- vann (4:5)
4	MeOH
5	Aceton-vann (7:3)

Prosedyre

Utstyr	Reagenser
Sephadex LH-20 gel	Destillert vann
Stativ	Metanol (MeOH)
Glass Pasteurpipette	Aceton
Trakt	
Kolonne 5 cm x 42 cm	
Erlenmeyerkolbe	
Glassull	

1. Sephadex LH-20 gel suspenderes og svelles i passende starteluent for 24 timer.
2. Kolonnen monteres vertikalt på et stativ og glassull legges i bunnen av kolonnen.
3. Kolonnen fylles med oppsvulget kolonnematriks. Det er viktig at kolonnematriksen er pakket jevnt i kolonnen for å få god separasjon.
4. Glasstrakt med elueringsmiddel monteres over kolonnen.
5. Kolonnen kondisjoneres med starteluent.
6. Prøven løses i et egnet løsemiddel, med sammensetning som starteluent. Når væske nivået er lik som kolonne materialet appliseres prøven på toppen av kolonne veggen med en pipette.
7. Stoffene elueres med elueringsmidler med økende løsemiddelstyrke.
8. Små fraksjoner samles i passende erlenmeyerkolber.
9. Kolonnen vaskes med 70 % vandig aceton og 20 % MeOH.

3.2.7 Flash kromatografi

Det ble utført flash kromatografi på et «Biotage Selekt»-instrument med en C18 12 g og 60 g kolonne. Som en hovedregel ble det for fraksjoner <100 mg benyttet en 12 g kolonne, og for fraksjoner >100 mg ble det brukt en 60 g kolonne.

Metode A: Flash kromatografi med en C18 12 g kolonne

Fraksjoner (<100 mg) ble løst i 1 ml acetonitril:vann (1:1), og applisert på kolonnen med sprøyte. Som vist i tabell 3.4 ble gradienteluering av destillert vann og ACN benyttet som mobilfase, og UV absorbanen ble målt ved 270 nm og 320 nm. Fraksjonene ble samlet i reagensrør ved hjelp av fraksjonsoppsamlere.

Tabell 3.4 Metode for flash kromatografi utført på et «Biotage Selekt»-instrument med en C18 60 g kolonne

ACN i vann	Kolonnevolum (CV)
5-95%	12
95%	4

Metode B: Flash kromatografi med en C18 60 g kolonne

Fraksjoner (>100 mg) ble løst i 5 ml ACN:vann (1:1). Samme betingelser ble benyttet som i metode A, men med ulik gradientelueringssammensetning av mobilfasene som vist i tabell 3.5.

Tabell 3.5 Metode for flash kromatografi utført på et Biotage Selekt instrument med en C18 12 g kolonne

ACN i vann	Kolonnevolum (CV)
10-70%	7
70-90%	1
90-90 %	3

Prosedyre

Utstyr	Reagenser
Biotage Flash instrument	Destiller vann
Biotage Sfar C18 12 g og 60 g kolonne	Degasset vann
Sprøyte	Acetonitril (ACN)
Erlenmeyerkolbe	

Prosedyre

1. En egnet separasjonsmetode settes inn i flash instrumentet.
2. Alle løsningsmidlene som skal benyttes plasseres i riktig kanal og «purges» i systemet.
3. Prøven løses i egnet løsningsmiddel.
4. Trykkes på «run» i instrumentet for å starte ekvilibringen.
5. Prøven appliseres med en sprøyte i kolonnen.
6. Fraksjonene samles i reagensrør.

3.2.8 Analytisk TLC

Kolonnefraksjonene etter sephadex fraksjonering ble applisert på en silika gel 60 F₂₅₄ TLC plate (normalfasekromatografi) med mobilfasesammensetning av EtOAc: H₂O: maursyre (90:5:5), og silikagel RP18-TLC plate (Omvendtphasekromatografi) med MeOH og vann som mobilfaser (1:5).

Prosedyre

Utstyr	Reagenser
Silika gel 60 F ₂₅₄ TLC plate	Etylacetat (EtOAc)
RP18 TLC plate	Destillert vann
Elueringskar med tett lokk	Maursyre
Mikropipette (20 µl)	Metanol (MeOH)
UV-lampe med lyskasse	Ceric
Varmeskap	
Spray	
Hårføner	

1. En passende mobilfase lages og overføres til elueringskaret, og et lokk settes på i 10 minutter for å sikre en mett atmosfære av mobilfasen.
2. TLC platen markeres med blyant for hvor prøvene skal appliseres, omtrent 2 cm fra nedre kant av platen med 1,5 cm avstand mellom hver prøve.
3. Prøven løses i flyktig løsemiddel, dersom stoffene allerede ikke er løst i mobilfase etter separasjon på kolonne.
4. Prøveløsningene appliserer på avmerkede punktene på platen med en mikropipette.
5. Løsningsmidlene dampes av med hårføner og TLC platen settes i elueringskaret med lokk.
6. Når mobilfasen nærmer seg på toppen av platen, tas platen ut av elueringskaret og frontlinjen av mobilfasen markeres.
7. Mobilfasen dampes av med hårføner, og platene betraktes i kort- og langbølget UV-lys.
8. Platene sprayes med ceric-reagens og plasseres i et varmeskap ved 105 °C i 15 min for å påvise stoffer som ikke var synlig i UV-lys.
9. Flekkene markeres med blyant.

3.2.9 Analytisk HPLC

En liten mengde (cirka 20-30 mg) av hvert stoff ble løst i ACN:vann (1:1) til konsentrasjoner på 0,5 mg/ml eller 100 µg/ml . Til HPLC analysen ble det brukt to mobilfaser: 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) i vann (A) og ACN (B). Analysen ble undersøkt ved hjelp av gradientelueringsmetode med en flowhastighet på 1 ml/min som vist i tabell 3.6. Kolonnen var kinetex omvendt fase C18 (150 x 4,6 mm), og deteksjonen ble utført ved 210 nm, 254 nm, 280 nm og 330 nm.

Tabell 3.6 Gradientsystem for analytisk HPLC

Tid (min)	A= % 0.1% TFA-vann	B= % ACN	Flowhastighet (ml/min)
0	97	3	1
30	75	25	1
40	5	95	1
45	5	95	1
46	97	3	1
55	97	3	1

Prosedyre

Utstyr	Reagenser
Vialer	Destillert vann
Dramsglass	Acetonitril av HPLC kvalitet
Sprøyte og sprøytedrevet filter	Trifluoreddiksyre (TFA)
Reagensrør	
HPLC-apparat med tilhørende utstyr	

1. Luftbobler som sitter i pumpene fjernes ved å «purge» hver av pumpene i 1 min.
2. Mobilfasen (lik starteluent) benyttes til kondisjonering av kolonnen i 20-30 minutter.
3. En metode tilpasses med hensyn til kolonnen, pumpen, mobilfasen, detektor og fraksjonssamleren.
4. Prøven løses i et lite volum til egnet konsentrasjon.
5. Prøveløsningen filtreres med et sprøytefilter til vialer for å fjerne partikler. Vialen plasseres i autosampleren.
6. Metoden startes ved å trykke «single run» i programmet, og stoffene detekteres av DAD-detektor.
7. Til slutt vaskes kolonnen i 30 minutter med løsemidler lik slutteluenten.

3.2.10 Preparativ HPLC (PHPLC)

For PHPLC ble mobilfasene vann (A) og ACN (B) benyttet. Mobilfasehastigheten var 15 ml/min og absorbansen ble målt ved 270 nm (se tabell 3.7). Analysen ble utført på 40 minutter, hvor det ble brukt økende grad av mobilfase B under analysen. Som en hovedregel ble fraksjoner >10 mg løst i 4 ml ACN:vann (1:1), og PHPLC ble utført 4 ganger ved å injisere 1 ml løsning om gangen. For små fraksjoner (<10 mg) ble det kun gjennomført en runde med PHPLC, og fraksjonen ble løst i 1 ml ACN: vann (1:1). Faksjonene ble samlet i reagensrør i fraksjonssamler.

Tabell 3.7 Metode for gradientsystem av preparativ HPLC

Tid (min)	Total hastighet (mL/min)	Vann (A)	Acetonitril (B)
0	15	90%	10%
2	15	90%	10%
30	15	20%	80%
40	15	20%	80%

Prosedyre

Utstyr	Reagenser
Vialer	Destillert vann
Dramsglass	Acetonitril (ACN)
Sprøyte og sprøytedrevet filter	Metanol (MeOH)
Injektorsprøyten	
Reagensrør	
HPLC-apparat med tilhørende utstyr	

1. Luftbobler som sitter i pumpene fjernes ved å «purge» hver av pumpene i 1 min.
2. Mobilfasen (lik starteluent) benyttes til kondisjonering av kolonnen i 20-30 minutter.
3. En metode tilpasses med hensyn til kolonnen, pumpen, mobilfasen, detektor og fraksjonssamleren.
4. Prøven løses i et lite volum, helst <1 ml til egnet konsentrasjon basert på hvor mye stoff som injiserer.
5. Prøveløsningen filtreres for å fjerne partikler, og ca. 1 ml injiseres via injeksjonsloopen.
6. Injektorknappen vrir samtidig som man starter «single sample» i programmet.
7. Fraksjoner samles i reagensrør gjennom fraksjonssamlere. Dette kan skje automatisk eller manuelt.
8. Til slutt vaskes kolonnen i 30 minutter med løsemidler lik slutteluenten eller med MeOH-vann i ulike konsentrasjonsforhold.

3.2.11 Identifisering av topper i HPLC kromatogram

De isolerte stoffene ble koeluert med råekstraktet for identifisering av topper i HPLC kromatogrammet. Samme metode, gradientsystem og mobilfaser ble benyttet som beskrevet i avsnitt 3.2.9. Derimot ble de isolerte prøvene og råekstraktet henholdsvis laget i konsentrasjon på 20 µg/ml og 200 µg/ml (1:10 forhold). Det ble tilberedt 1 ml prøver i forhold 1:1 av isolert stoff og råekstraktet. I tillegg ble de isolerte substansene analysert enkeltvis.

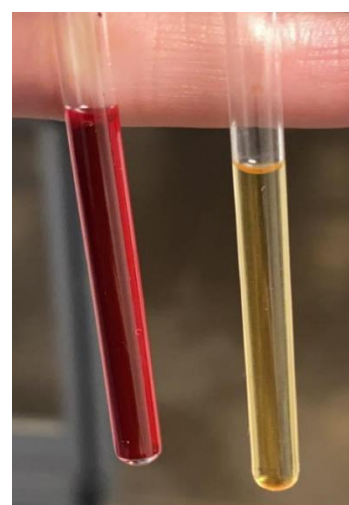
3.2.12 Analysering av fraksjoner

Alle fraksjonene ble analysert ved $^1\text{H-NMR}$. Opptak av $^{13}\text{C-NMR}$ og 2D- spektre for visse fraksjoner er angitt i eksperimentell del.

Prosedyre

Utstyr	Reagenser
NMR-spektrometer	TMS (Intern standard)
NMR-rør	Deuterert løsemidler (DMSO- d_6 og CD_3OD)
Lokk	
Pateurpipette	
Linjal	

1. Omtrent 0,7-1 ml av deuterert løsemidler pipetteres til en liten mengde prøve på ca. 1-50 mg.
2. Cirka 600 µl prøveløsning overføres til NMR-rør, 4 cm opp i røret, med lokk på.
3. Prøven analyseres i NMR spektrometer.



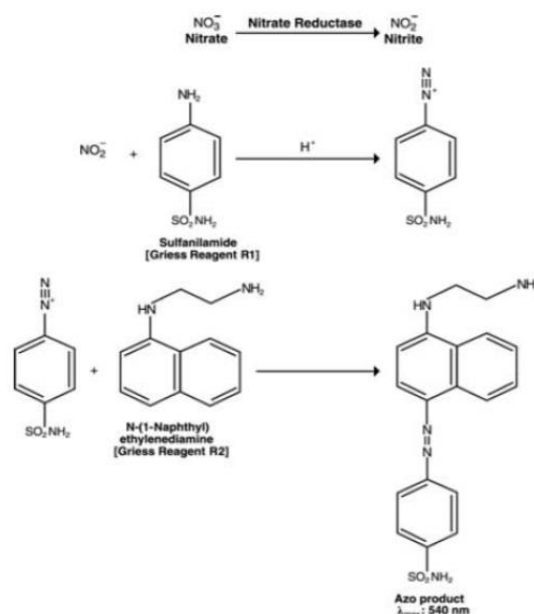
Figur 3.1 NMR prøver av EtOAc-fasen i venstre rør og vann-fasen i høyre rør

3.2.13 Sammenslåing av fraksjoner

Fraksjoner ble slått sammen etter sephadex LH-20 kolonneseparering basert på TLC etterfulgt av ceric spraying. Sammenslåing av fraksjoner baserte seg også på kromatogram for HPLC og flash kromatografi, dersom annet ikke er angitt. Fraksjoner ble dampet inn til tørrhet på rotavapor eller frysetørker, og eventuelt ble oljepumpe benyttet. Utbytte ble beregnet.

3.2.14 Reduksjon av NO-akkumulering i LPS-stimulerte makrofager og test av cellenes levedyktighet (MTT-test)

Mengden av NO som frigjøres fra makrofager og dendrittiske celler måles gjennom NO_2^- , som er nedbrytningsproduktet av NO. Denne forbindelsen har vist seg å være en god markør for makrofagaktivering. Som vist i figur 3.2 vil det ved bruk av Griess-reagenser dannes NO_2^- som en farget azo-forbindelse ved reaksjon med sulfanilamid og N-(1-naptyl) etylendiamin i surt miljø. Denne egenskapen ble brukt for å måle NO- frigjøringen fra J774A.1 celler derivert fra musemakrofager. Absorbansen av den fargede løsningen ble målt ved 540 nm.



Figur 3.2 Kjemiske reaksjoner involvert i måling av NO_2^- ved bruk av Griess-reagens (Merck, 2021).

LPS (lipopolysakkarider) finnes i celleveggen av gram-negative bakterier, eksempelvis *E. coli*, LPS er en viktig aktivator av makrofager og bidrar i produksjon av proinflammatoriske cytokiner. Dermed vil en hemming av NO-akkumulering i LPS-stimulerte makrofager, som J774A.1 eller RAW264.1, være en egnet metode for observasjon av antiinflammatorisk effekt av substanser (Joo, Sowndhararajanb *et al.*, 2014).

I tillegg ble det utført MTT-test for tolkning av cellenes levedyktighet og cytotoksitet. Mitokondrie avhengig reduksjon av tetrazolium saltet MTT (3-(4,5-Dimetyltiazol-2-yl)-2,5-Difenylnitrazolium bromid) til blåfargede formazan substans ble benyttet til å måle cellenes evne til å forholde seg aktive (Berridge og S.Tan, 1993).

For NO-testen ble quercetin løst i DMSO og vann benyttet som positiv kontroll. For MTT-testen ble 20% DMSO brukt som negativ kontroll for observasjon av full celledød, og LPS+ IFN γ + DMSO som positiv kontroll for utslag av friske celler. I tillegg ble 1 % DMSO benyttet som kontrollbønner for å sjekke utslag på MTT testen, og rent medium som blank kontroll (se figur 3.3).

Prosedyre

Utstyr	Reagenser
Falcon-rør (sentrifugerør)	DMEM GlutaMAX tilsatt 10% FBS og 1%
Dyrkningsflasker	penicillin/streptomycin
Celleskraper	Griess-reagens A: 1% sulfanilamid løst i 5%
Mikrotiterplater med flat og rund bunn	fosforsyre
Stripetter 5, 10 og 25 ml	Griess-reagens B: 0.1% N ⁻ (1-naptyl)
Reagent reservoar	etylendiamin (NED) løst i destillert vann.
Celleinkubatorskap med CO ₂ -kontroll	Cellelinjer: J774A.1 (makrofager)
Sentrifuge	Lipopolysakkarid (LPS fra <i>E.coli</i> 055:B5)
Celleteller	IFN- γ
Absorbansmåler	Quercetin
LAF-benk	Tryptanblå
	MTT oppløsnings buffer
	MTT labeling reagent
	100 mM Natriumnitrat (NaNO ₂)
	Destillert vann
	DMSO

Splitting av celler

1. Celleskraper brukes til å løsne cellene fra dyrkningsflasken.
2. Det pipetteres opp og ned 10-15 ganger med stripette for å løse opp eventuelle celleklumper.
3. 0,2-0,8 ml cellesuspensjon tilsettes ca. 15-18 ml nytt cellemedium og dyrkes videre for neste forsøk. Etter noen dager observeres cellene og splittes dersom det er nødvendig.
4. Resten av cellesuspensjonen overføres til et falcon-rør for videre bruk.

Hemming av NO-akkumulering: Dag 1

1. En fortynningsrekke av prøvene på eksempelvis 5 mg/ml (5 mM), 2,5 mg/ml (2,5 mM), og 1,25 mg/ml (1.25 mM) lages i 50/50 % DMSO/vann eller medium.
2. Tillagning av aktivatorene LPS og IFN- γ for 100 brønner: 6 μ l LPS (1 mg/ml stock) og 4,8 μ l IFN- γ (0,1 mg/ml) til 535.2 μ l DMEM medium.
3. Celler høstes fra cellekultur og spinnes ned ved 1300 rpm/400g i 5 min.
4. Supernatant fjernes og cellene resuspenderes i 5-7 ml dyrkningsmedium ved å pipettere opp og ned med en 5 ml pipette for å løse opp celleklumpen.
5. For å telle cellene blandes 10 μ l cellesuspensjon med 10 μ l tryptanblått i et eppendorfrør. 10 μ l overføres til et tellekammer og settes inn i celledelleren (tas to paralleller). Tallet for levende celler brukes.
6. Cellene resuspenderes i medium til en konsentrasjon på 538.000 celler/ml eller avhengig av antall celler.
7. 93 μ l cellesuspensjon (= 50.000 celler) tilsettes hver brønn i en flatbunnet mikrotiterplate. Platen undersøkes i mikroskop for å observere celler i brønnene.
8. 2 μ l av hver prøve (3 paralleller) tilsettes til hver sin brønn. I tillegg tilsettes positiv kontroll, MTT kontroll, blank kontroll og kontrollbrønner uten LPS og IFN- γ (se figur 3.3). Flatbunnet mikrotiterplate benyttes. Cellene inkuberes i 1 time i CO₂-skap (37C, 5% CO₂).
9. Etter 1 time tilsettes 5 μ l LPS+IFN- γ -løsning alle brønnene, bortsett fra blank kontroll (untreated), DMSO brønner og vann.
10. Cellene inkuberes ved 37°C i en celleinkubator med 5 % CO₂ i 22-24 t.

Hemming av NO-akkumulering: Dag 2

1. Supernatanten (100 µl) overføres til rundbunnet mikrotiterplate og sentrifugeres ved 1400/400 g rpm i 5 min. Det spares på platen med celler etter overføring av supernatant og tilsettes 100 µl rent DMEM medium, for deretter å sette i inkubatorskap for 1 time.
2. 50 µl av supernatanten overføres fra rundbunnet til flatbunnet mikrotiterplate, for å forsikre seg at alle celler fra supernatant fjernes.
3. Det lages en standardkurve med fortynninger av 100 mM NaNO₂ (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 µM, samtidig blankbrønner). Disse behandles likt som prøvene.
4. 50 µl Griess reagens A tilsettes hver brønn og platen settes mørkt i 10 min. Griess-reagens A lages ved å løse 50 mg Griess-reagens A i 5 ml 5 % fosforsyre.
5. 50 µl Griess reagens B tilsettes hver brønn. Griess-reagens B tilberedes ved å løse 5 mg Griess-reagens B i 5 ml destillert vann.
6. Mikrotiterplaten sentrifugeres ved 1400 rpm i 2 minutter for å fjerne luftbobler.
7. Absorbansen måles ved 540 nm.
8. For MTT måling tas cellene fra punkt 1 ut fra inkubatorskap, og tilsettes 10 µl MTT labeling reagent. Platen inkuberes i 4 timer (37C, 5% CO₂).
9. Tilsettes 100 µl MTT oppløsnings buffer. Inkuberes over natt (37C, 5% CO₂).

Måling av MTT-testen: Dag 3

- Absorbansen leses ved 570 nm (absorbans av Formazan) og 690 nm (bakgrunn)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Untreated	Untreated	Untreated	1 % DMSO	1 % DMSO	1 % DMSO	LPS/INF-γ DMSO	LPS/INF-γ DMSO	LPS/INF-γ DMSO	STD 100 µM	STD 100 µM	STD 100 µM
B	Quercetin 100 µg/ml	Quercetin 100 µg/ml	Quercetin 100 µg/ml	Quercetin 50 µg/ml	Quercetin 50 µg/ml	Quercetin 50 µg/ml	Quercetin 25 µg/ml	Quercetin 25 µg/ml	Quercetin 25 µg/ml	STD 50 µM	STD 50 µM	STD 50 µM
C	Prøve 1 100 µg/ml			Prøve 1 50 µg/ml			Prøve 1 25 µg/ml			STD 25 µM	STD 25 µM	STD 25 µM
D	Prøve 2 100 µg/ml			Prøve 2 50 µg/ml			Prøve 2 25 µg/ml			STD 12,5 µM	STD 12,5 µM	STD 12,5 µM
E	Prøve 3 100 µg/ml			Prøve 3 50 µg/ml			Prøve 3 25 µg/ml			STD 6,25 µM	STD 6,25 µM	STD 6,25 µM
F	Prøve 4 100 µg/ml			Prøve 4 50 µg/ml			Prøve 4 25 µg/ml			STD 3,13 µM	STD 3,13 µM	STD 3,13 µM
G	Prøve 5 100 µg/ml			Prøve 5 50 µg/ml			Prøve 5 25 µg/ml			STD 1,56 µM	STD 1,56 µM	STD 1,56 µM
H	Prøve 6 100 µg/ml			Prøve 6 50 µg/ml			DMSO 20 %	DMSO 20 %	DMSO 20 %	Blank Vann	Blank Vann	Blank Vann

Figur 3.3 Mikrotiterplateoppsett ved utførelse av forsøk for inhibering av NO-akkumulering hos LPS stimulerede makrofagiske celler. Det utføres tre paralleller av hver prøvekonsentrasjon. STD = standard.

3.2.15 Mikrobiotaforsøk

Mikrobiotaforsøk ble utført for å observere effekten av hovedfraksjoner og renstoffer på mikrobiota i tarmen. Tillagning av prøver for mikrobiotaforsøk ble utført i farmasibygningen på UiO, og resten av areidet ble gjennomført av avdelingen på instituttet for biovitenskap.

Prosedyre

Utstyr	Reagenser
Analysevekt	DMSO
Vanlige eppendorfrør (0,5-2 ml)	Destillert vann
Pipetter	
Sterile eppendorfrør (spisse og runde)	
Sterilfilter	
Engangssprøyte (1 ml)	

1. Prøvene tilberedes ved å lage stamløsninger i DMSO av hovedfraksjoner til 20 mg/ml og renstoffer til 20 mM.
2. Stamløsningene fortynnes med destillert vann i vanlige eppendorfrør til konsentrasjon på 100 µg/ml.
3. Prøvene sterilfiltreres i steril cellelab over i sterile eppendorfrør (spiss formet)
4. 200 µl av hver steril prøve pipetteres til hver sin nye steril eppendorfrør (rund formet). Det lages fem paralleller for hver prøve.

4 Eksperimentell del

4.1 Plantematerialet

Råmaterialet var tørket overjordisk del av *H. maculatum* fra Vang i Valdres (Koordinater (WGS84) 61°9'19'' N 8°47'58'' E, 590 m.o.h.) 14.08.2020. Herbarieeksemplar (RL-20200814-hm) er oppbevart på Naturhistorisk museum, UiO. Plantematerialet ble pulverisert på slipemøllen Ultra Centrifugal Mill ZM 100. Det ble brukt en siktstørrelse på 3 mm. Vekt etter sikting var 370 g.



Figur 4.1 Pulverisert plantemateriale av *Hypericum maculatum*

4.2 Separering av plantematerialet og 70% EtOH-ekstrakt

4.2.1 Ekstraksjon av *H. maculatum*

Det ble utført maserering ved bruk av 70 % EtOH som ekstraksjonsmiddel. Plantematerialet (370 g) ble ekstrahert i en erlenmeyerkolbe ved romtemperatur i 24 timer før det ble filtrert med filterpapir og vakuumpumpe. Ekstraksjonsprosessen ble gjentatt 7 ganger.

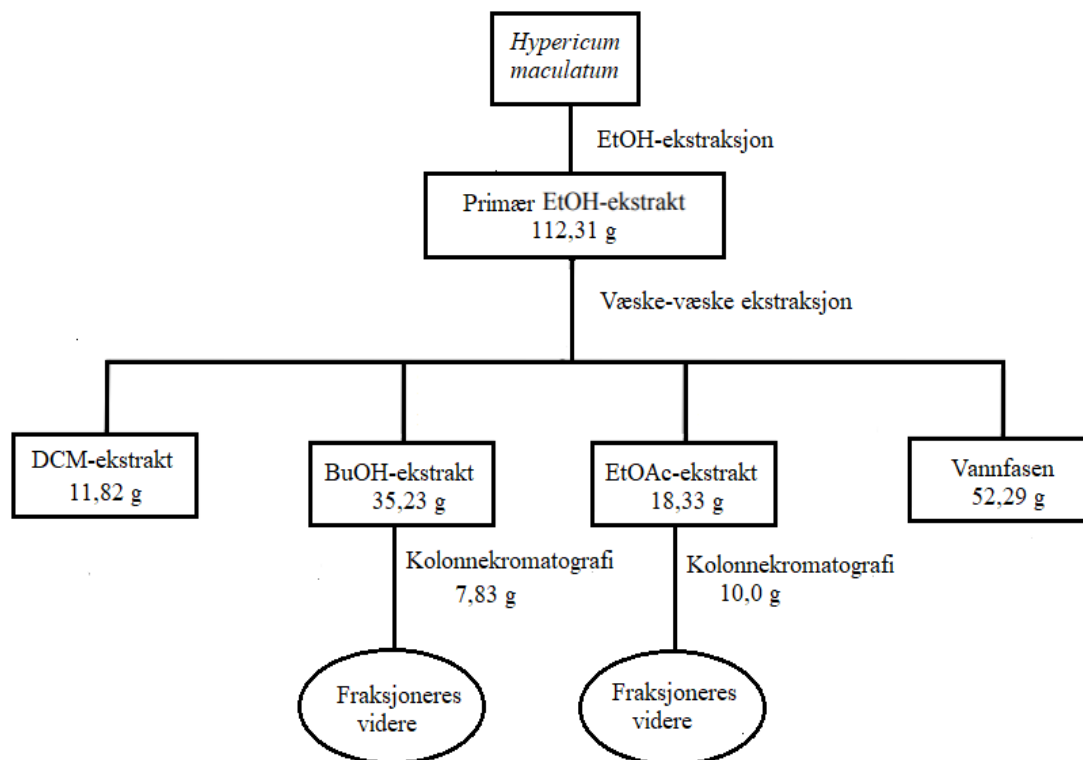
Ekstraksjonsmiddelet ble dampet vekk på rotavapor, og rester av vann ble fjernet med frysetørker. Ekstraksjonen ble gjentatt flere ganger helt til det ikke var noe endring i vekten av råekstraktet. Utbytte av EtOH fraksjonen var 112,31 g.

4.2.2 Væske-væske ekstraksjon

Primære EtOH-ekstraktet (112,31 g) ble tilsatt 500 ml destillert vann. I en skilletrakt ble det ekstrahert med DCM (250 ml x 6), EtOAc (250 ml x 6) og BuOH (250 ml x 6). Skilletrakten ble sakte ristet flere ganger mellom hver tilsetning av løsemiddel. Organiske fasene ble tappet ut fra skilletraktene, og filtrert ved hjelp av vakuumpumpe i hver sin erlenmeyerkolbe. DCM-, EtOAc-, BuOH-ekstraktene og den resterende vann-fasen ble overført til rundkolber og dampet til tørrhet på rotavapor.



Figur 4.2 Væske-væske ekstraksjon med diklormetan (DCM)



Figur 4.3 Flytskjema for væske-væske ekstraksjon av 70 % EtOH- ekstrakt

4.3 Sephadex LH-20 kolonne fraksjonering

Som vist i flytskjema i figur 4.3 ble 7,83 g av EtOAc-fasen og 10 g av BuOH-fasen fraksjonert på sephadex kolonnen. EtOAc ble løst i 20 ml MeOH:vann (3:5) og BuOH-fasen i 35 ml MeOH: vann (4:6). Det ble samlet 28 kolonnefraksjoner for hver av fasene som vist i tabell 4.1 og 4.2,

Tabell 4.1 Gradientsystem for fraksjonering av EtOAc-fasen på Sephadex LH-20 kolonne

Mobilfase	Kolonnefraksjoner	Mengde (ml)
MeOH- vann (1:5)	1-5	1500
MeOH- vann (2:5)	6-9	1000
MeOH- vann (4:5)	10-14	1250
MeoH	15-26	3000
Aceton-vann (7:3)	27-28	500

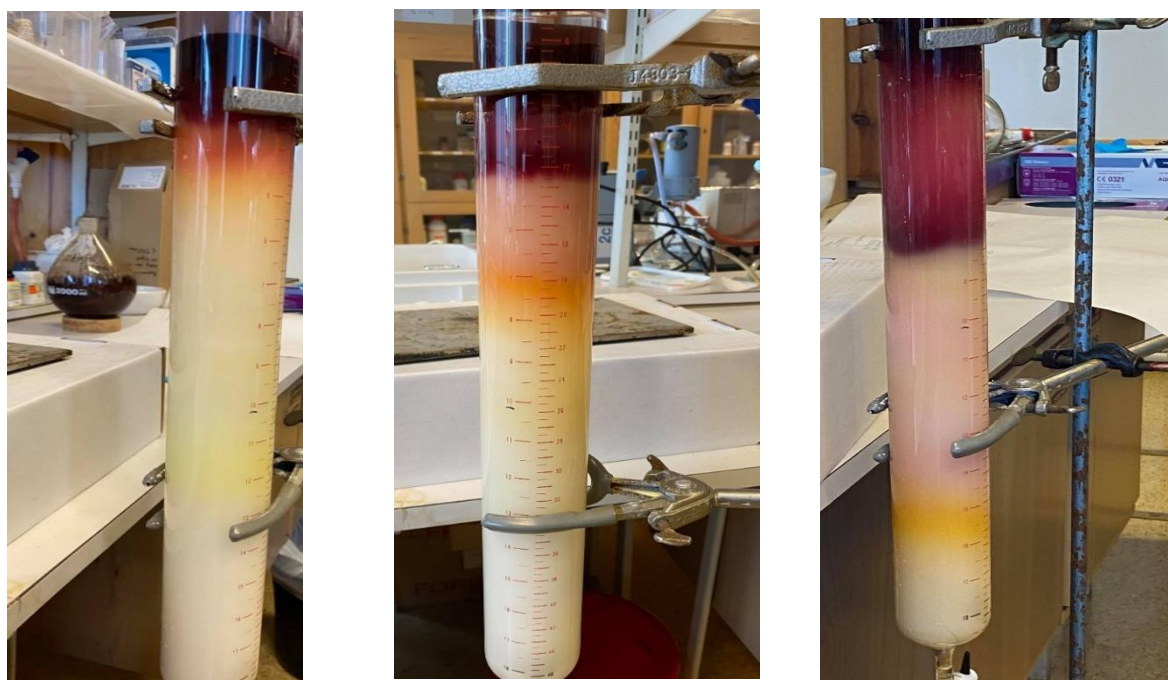
Tabell 4.2 Gradientsystem for fraksjonering av BuOH-fasen på Sephadex LH-20 kolonne

Mobilfase	Kolonnefraksjoner	Mengde (ml)
MeOH- vann (1:5)	1-5	1500
MeOH- vann (2:5)	6-10	1500
MeOH- vann (4:5)	11-15	1500
MeoH	16-24	2500
Aceton-vann (7:3)	25-28	1250

Basert på sephadex LH-20 kolonne fraksjonering etterfulgt av analytisk TLC, ble kolonnefraksjonene slått sammen til syv hovedfraksjoner av EtOAc (EtOAc S1- EtOAc S7) og ni hovedfraksjoner av BuOH (BuOH S1- BuOH S7) som vist i tabell 4.3.

Tabell 4.3 Sammenslåing av kolonnefraksjoner fra fraksjonering på Sephadex LH-20 kolonne for EtOAc- og BuOH-fasen.

EtOAc-fasen		BuOH-fasen	
Fraksjoner	Kolonnefraksjoner	Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
EtOAc S1	1-9	BuOH S1	1-5
EtOAc S2	10-13	BuOH S2	6-9
EtOAc S3	14	BuOH S3	10-11
EtOAc S4	15	BuOH S4	12-13
EtOAc S5	16-18	BuOH S5	14
EtOAc S6	19-20	BuOH S6	15
EtOAc S7	21-28	BuOH S7	16-17
		BuOH S8	18-19
		BuOH S9	20-28

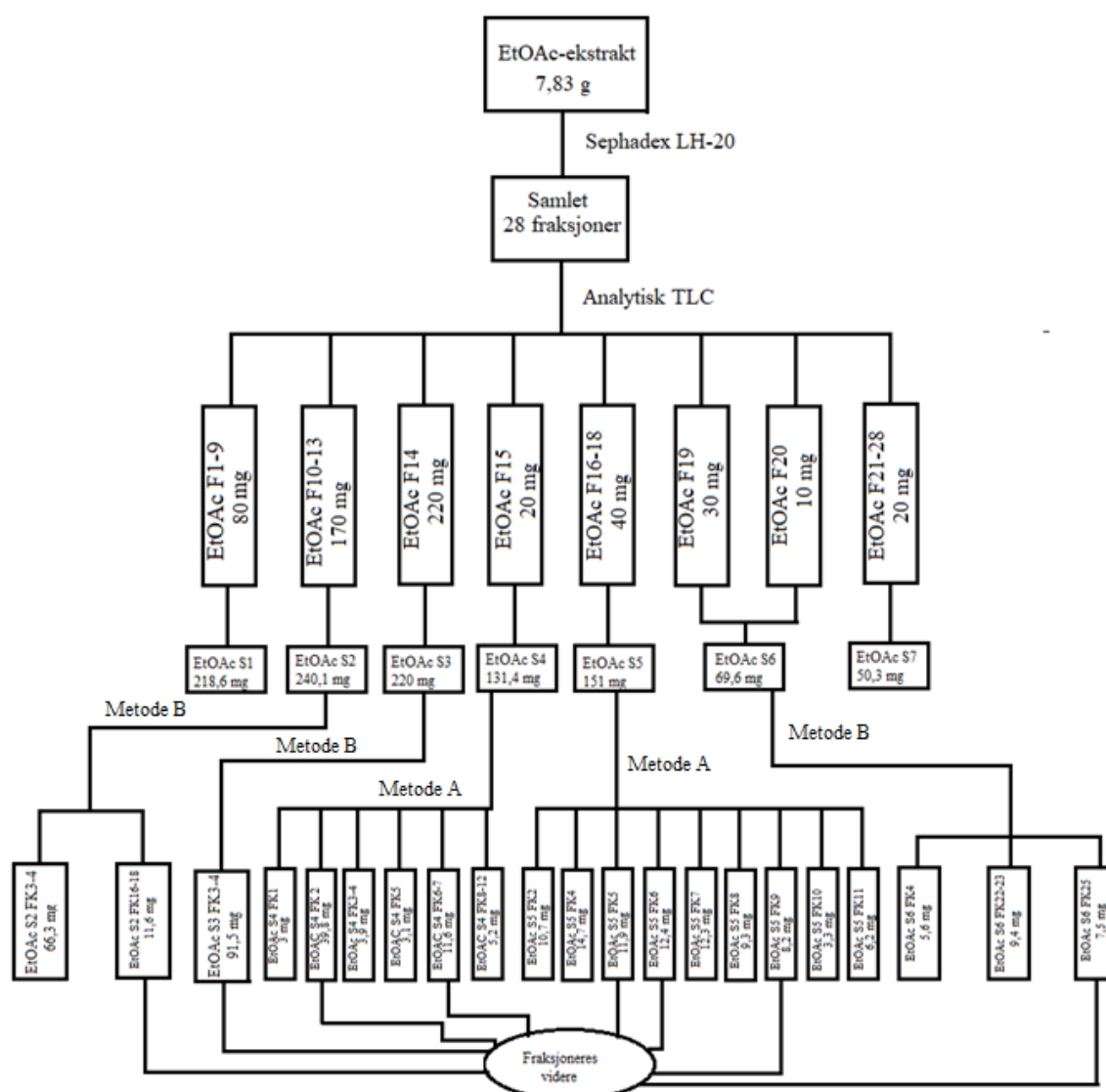


Figur 4.4 Bilder av separering på Sephadex LH-20 kolonne for BuOH-fasen ved bruk av økende mengde MeOH

4.4 Seperasjon av EtOAc-fasen

4.4.1 Flash kromatografi av EtOAc fraksjoner

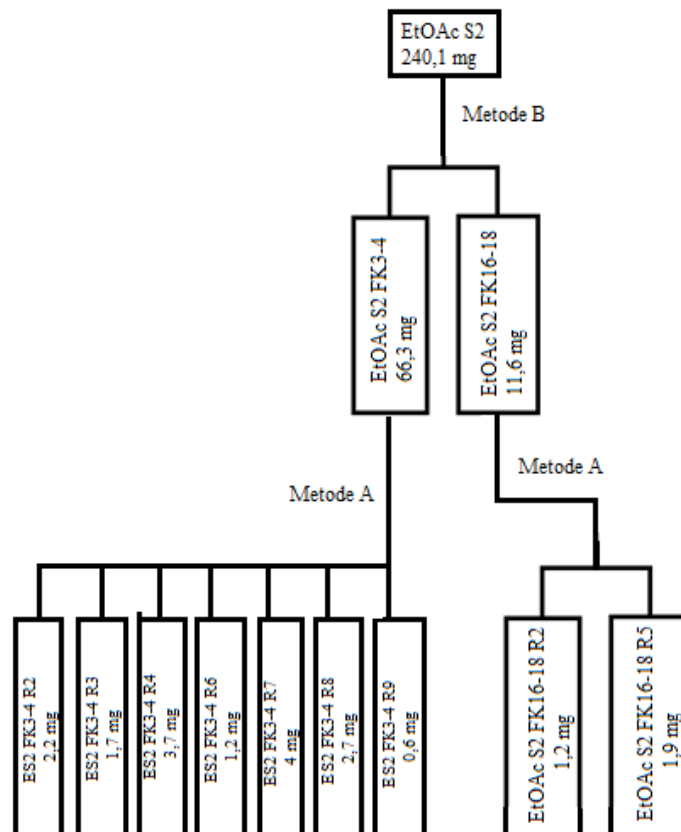
EtOAc S2- EtOAc S6 fraksjonene ble opprenset med flash kromatografi ved å bruke metode A og B (se detaljer i avsnitt 3.2.7) som vist i figur 4.5. Det ble tatt opp ^{13}C -NMR, COSY, HMBC og HSQC av subfraksjonen EtOAc S2 FK 16-18 og EtOAc S6 FK 25, inkludert NOESY av sistnevnte fraksjon. I tillegg ble det tatt opp ^{13}C -NMR av EtOAc S6 FK 22-23 og 13 CAPT- NMR av subfraksjonen EtOAc S2 FK 3-4. Hyperosid ble undersøkt på både ^{13}C -NMR og HSQC.



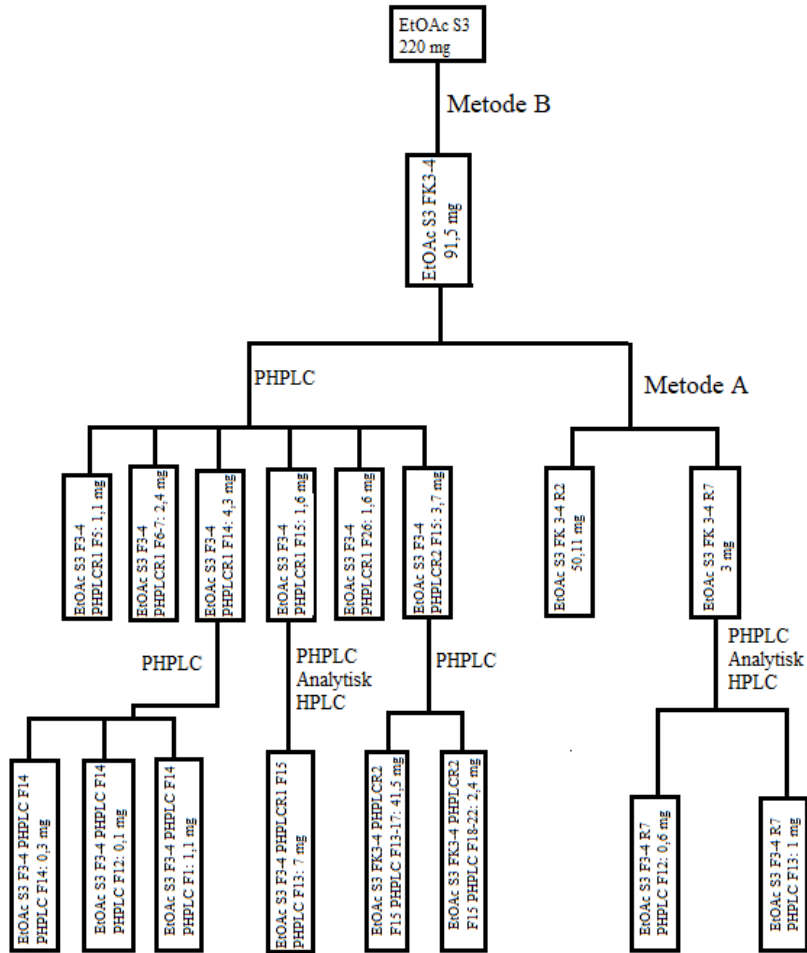
Figur 4.5 Flytskjema for opprensing av EtOAc fasen. Metode A: Flash kromatografi med C18 12 g kolonne. Metode B: Flash kromatografi med C18 60 g kolonne.

4.4.2 Opprensing av EtOAc subfraksjoner

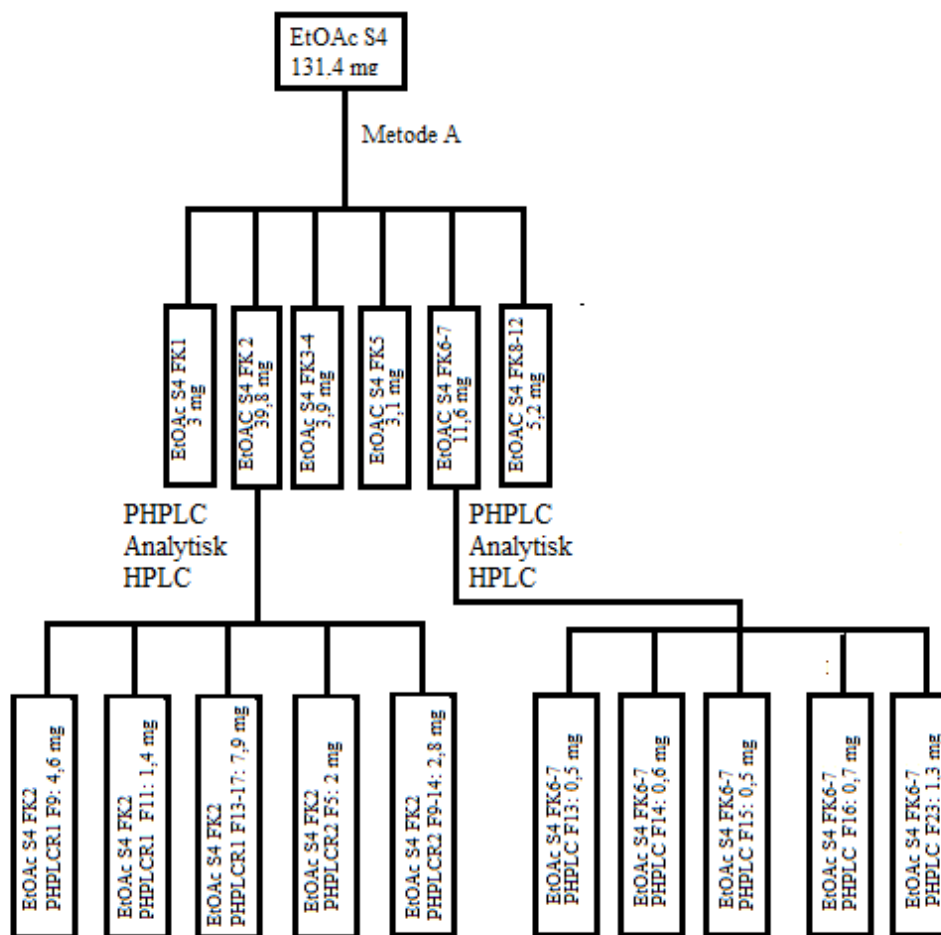
Ut ifra NMR- spektrene ble enkelte subfraksjoner, vist i flytskjema for figur 4.6 og 4.7, opprenset videre på flash kromatografi. Det ble også utført analytisk HPLC av noen fraksjoner som er tydelig angitt i flytskjemaene.



Figur 4.6 Flytskjema for opprensing av EtOAc S2



Figur 4.7 Flytskjema for opprensning av EtOAc S3



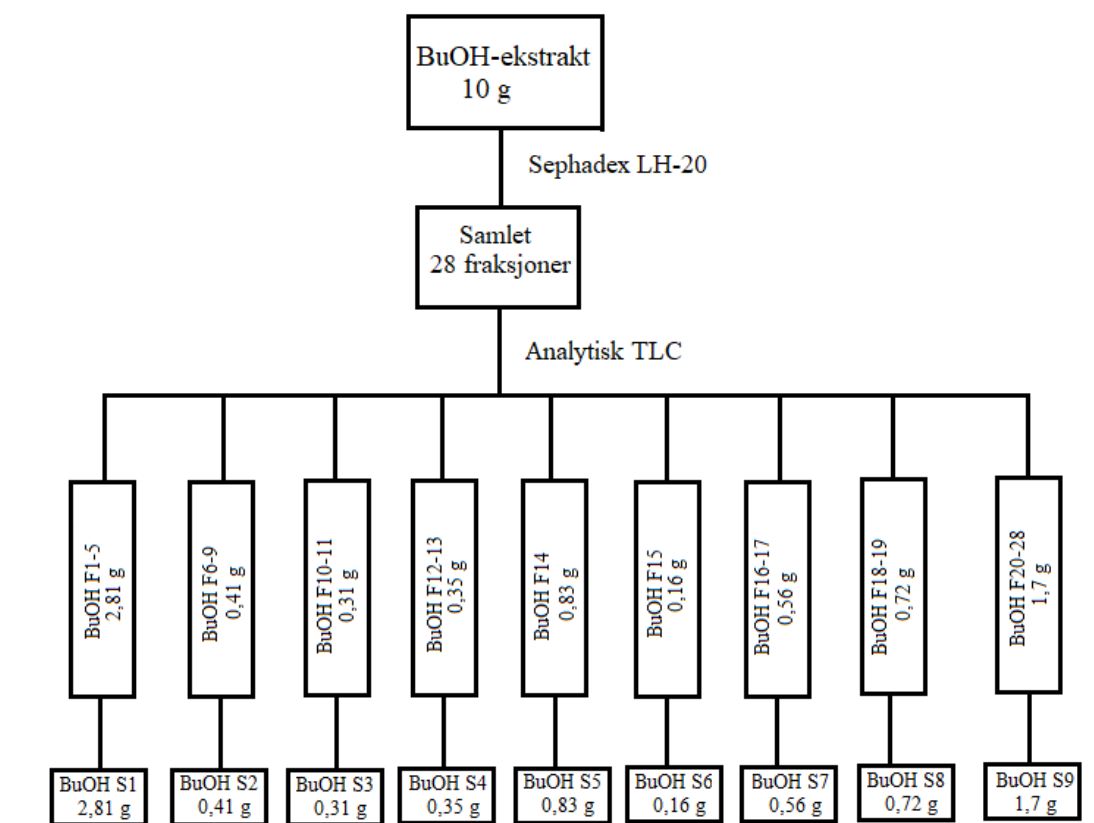
Figur 4.8 Flytskjema for opprensning av EtOAc S4

4.4.3 Opprensning med PHPLC

For videre opprensning og isolering av stoff ble det utført PHPLC av subfraksjoner fra flash kromatografi. Dette er vist i flytskjema i figur 4.7- 4.10. Fraksjonen EtOAc S6 FK25 ble først rensert på PHPLC etterfulgt av isolering av fraksjon EtOAc S6 FK25 PHPLC19 ved bruk av flash kromatografi (se figur 4.10).

4.5 Seperasjon av BuOH-fasen

Flytskjema på figur 4.11 gir en oversikt av sammenslåing av BuOH fraksjoner etter analytisk TLC og mengde av de ulike fraksjonene.



Figur 4.11 Flytskjema for arbeid utført med BuOH-fasen

5 Resultater og diskusjon

5.1 Ekstraksjon med 70 % EtOH og analyse av ekstraktet

5.1.1 Maserering av *H. maculatum*

Ekstraktet av *H. maculatum* ble tilberedt ved å maserere tørket droge med 70% EtOH (Kladar, Srdenovic *et al.*, 2015). Flere studier tyder på at det kan brukes ulike løsemidler til ekstraksjon av flavonoider, eksempelvis MeOH, aceton, EtOH, vann og vann-alkohol blandinger (Dianursanti, Nugroho *et al.*, 2020). Alkoholholdige løsningsmidler er ofte benyttet til å ekstrahere flavonoider siden de gir høye ekstraksjonsutbytter (Rajbhar, Dawda *et al.*, 2015). EtOH er tryggere for kroppen sammenlignet med andre alkoholer dersom ekstraktet skal benyttes oralt, for eksempel i form av en tinktur.

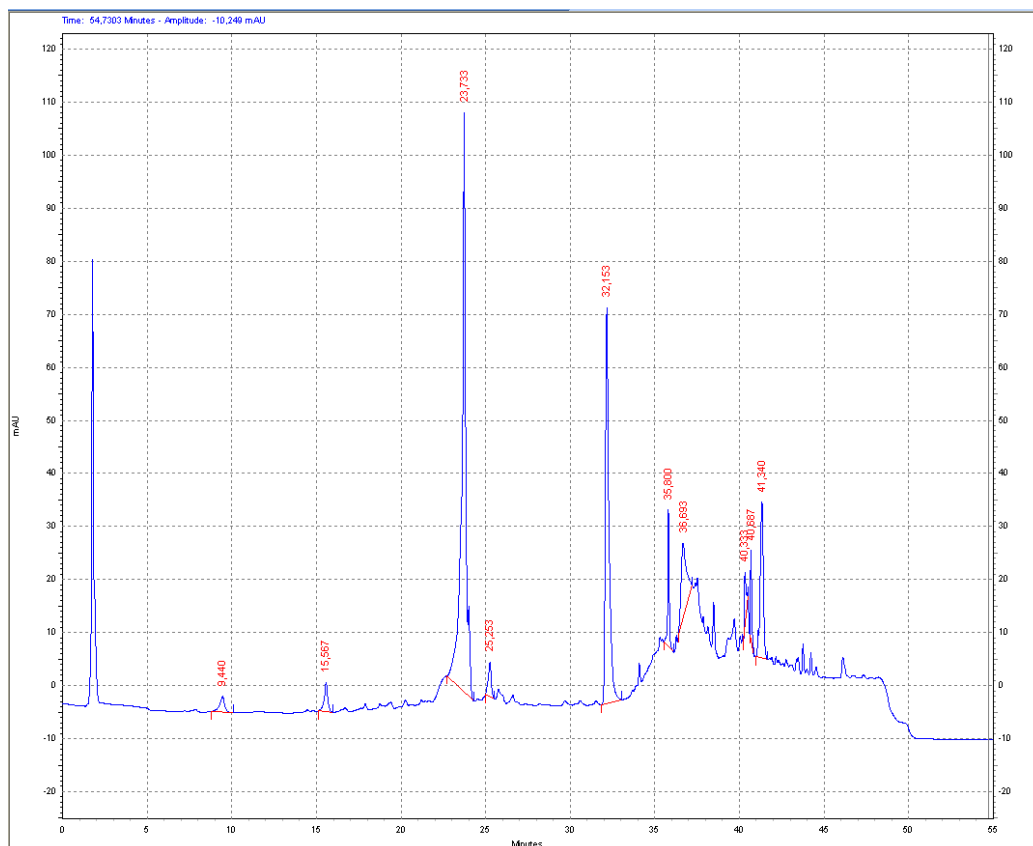
5.1.2 Utbytte av 70 % EtOH-ekstrakt

Ekstraksjon av 370 g tørket plantemateriale ga 112,3 g 70 % EtOH-ekstrakt, et utbytte på 30,4 %. Ekstraktet var brun/svart farget.

5.1.3 Analytisk HPLC av 70 % EtOH ekstrakt

70 % etanolekstraktet ble analysert med HPLC-DAD. Det ble benyttet UV-deteksjon på 254 nm, 280 nm og 330 nm for å kunne detektere ulike typer naturstoffer, inkludert flavonoider. I tillegg ble det scannet over et kontinuerlig bølgelengdeintervall mellom 200 og 400 nm, slik at absorpsjon ved flere bølgelengder ble observert. Flavoner og flavonoler viser to hoved absorpsjonsbånd i UV-spekteret: Bånd I, 320–385 nm, representerer B-ringabsorpsjonen mens Bånd II, 250–285 nm, tilsvarer A-ringsabsorpsjonen. Flavanoner viser et sterkt absorpsjonsmaksimum mellom 270 nm og 295 nm. Flavoner absorberer UV-stråling ved 310–350 nm, mens flavonoler viser absorpsjon ved 350–385 nm. Det kan derimot være endringer i absorpsjonen forårsaket av funksjonelle grupper som fester seg til flavonoidskjelettet (Rice-Evans *et al.*, 1998 og Yao *et al.*, 2014).

Som vist i figur 5.1 ble det ved 254 nm på HPLC-kromatogrammet for 70 % EtOH ekstrakt observert store topper ved retensjonstidene 23,73 min og 32,15 min.



Figur 5.1 Analytisk HPLC kromatogram av 70 % EtOH ekstrakt ved 254 nm

5.1.4 NMR-spektroskopi av 70 % EtOH ekstrakt

I ^1H -NMR spekteret av 70 % EtOH-ekstrakt (se vedlegg spektrum 1) utgjør signalene ved 3,44 ppm (CH_2), 1,06 (CH_3) og 4,35 (OH) løsningsmiddelet EtOH. Signalene i området mellom 0,7 ppm og 3 ppm tyder på alifatiske forbindelser som CH, CH_2 og CH_3 . De brede signalene mellom 3-4 ppm viser metoksy- og karbohydratgrupper (O-C-H-struktur), og de små signalene mellom 5,5 ppm til 7,7 ppm er protonsignaler fra alkener og aromater.

5.2 Væske-væske ekstraksjon og analyse

5.2.1 Væske-væske ekstraksjon

70% EtOH ekstraktet, 102,31 g, ble fordelt mellom løsemidler av ulik polaritet (DCM, EtOAc, BuOH og vann). Vann har høyest polaritet, etterfulgt av BuOH, EtOAc og den minst polare DCM. Hensikten var å separere de lipofile og hydrofile innholdsstoffene i planten. Som vist i tabell 5.1 inneholder *H.maculatum* en høyt innhold av polare forbindelser sammenlignet med upolare. Vann-fasen (44,4%) er størst, etterfulgt av BuOH-fasen (29,9%), EtOAc-fasen (15,6%) og til slutt DCM-fasen (10%). Totalt utbytte av de fire fasene var 99,9%.

Tabell 5.1 Utbytte av de ulike fasene fra væske-væske ekstraksjon av råekstraktet

Fasene	Utbytte (g)	Utbytte (%)
DCM-fase	11,8	10,0
EtOAc-fase	18,3	15,6
BuOH-fase	35,2	29,9
Vann-fase	52,3	44,4
Totalt -fase	117,6	99,9

5.2.2 NMR- spektroskopi av væske-væske ekstraherte faser

Vann-fase

¹H-NMR spekteret for vann-fasen (se vedlegg spektrum 2) viser hovedsakelig sukker proton-signaler, og det er minimalt med signaler for alifatiske hydrokarboner og aromater. Signalet med kjemisk skift på 2,5 ppm kommer fra løsningsmiddelet (DMSO-d₆).

EtOAc-fase

¹H-NMR spekteret for EtOAc-fasen (vedlegg spektrum 3) består av mange signaler som er karakteristiske for flavonoider. Eksempelvis 5,7(d) ppm og 5,9 (d) ppm som kommer for A-ring protoner, og B-rings system ved 6,8 ppm og 7,5-7,8 ppm. Som for 70 % EtOH-ekstraktet, er det observert kun mindre signaler i området 0,7 ppm og 3 ppm, samtidig karbohydratsignaler ved 3-4 ppm. I området fra 4 ppm til 10 ppm er det tydelige signaler, som utgjør alkener, fenoler og benzener. I tillegg observeres topper mellom 10,7 ppm og 12,64 ppm som er karakteristisk for protoner fra syre-, hydroksyl- og aldehydgrupper. Toppene med kjemisk skift 1,17 ppm, 1,99 ppm og 4,03 ppm er fra løsningsmidlet EtOAc.

BuOH-fase

BuOH-fasen gir opphav til et komplekst ¹H-NMR spektrum med mange brede signaler (se vedlegg spektrum 4). Akkurat som i 70 % EtOH-ekstraktet er det observert brede signaler ved 3 ppm til 4 ppm som kommer fra karbohydrater. I tillegg er det som for EtOAc-fasen signaler som trolig kommer fra A-ring og B-ring protoner i flavonoider (A-ring: 6,2 ppm (d) og 6,4 ppm (d), B-ring: 6,8 ppm, 7,5 ppm og 7,8 ppm). Det er også observert brede signaler ved 5,6 ppm og 6,8 ppm, som viser tilstedeværelsen av proanthocyanidiner. Det ble observert en topp på 12,64 ppm, på samme måte som i EtOAc-spekteret, som muligens representerer OH-grupper. Signalet for løsningsmiddelet BuOH er observert ved kjemisk skift 3,38 ppm, 1,25 ppm- 1,43 ppm og 0,82 ppm.

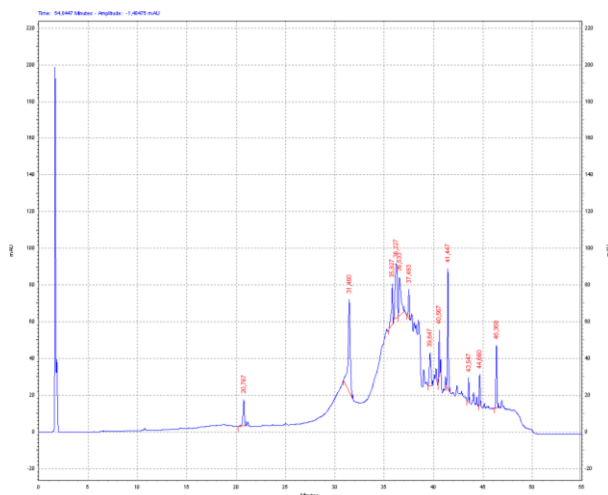
DCM -fase

Som vist i vedlegg spektrum 5 har ¹H-NMR spekteret for DCM-fasen få signaler for aromatiske protoner, og består hovedsakelig av alifatiske protonsignaler. DCM-fasen er den mest upolare fasen og inneholder sannsynligvis mettede terpenoider og alifater. Signalene ved 5,32 ppm representerer muligens protoner i umettede fettsyrekjeder.

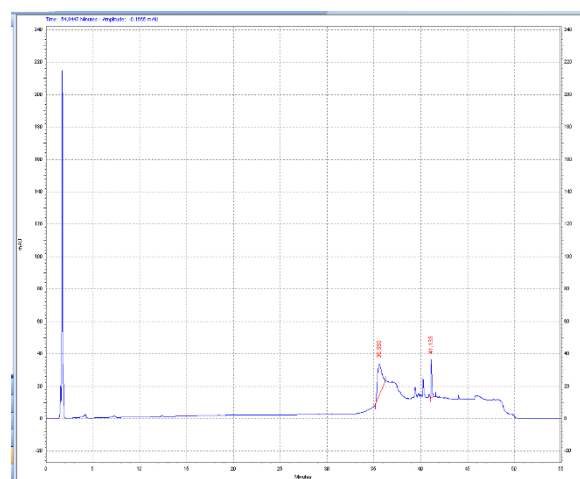
5.2.3 Analytisk HPLC av væske-væske ekstraherte faser

De fire væske-væske ekstraherte fasene ble analysert ved samme bølgelengder som i avsnitt 5.1.3. Det ble benyttet omvendtfasekromatografi, og dermed elueres de polare stoffene først etterfulgt av de mindre polare.

I analytisk HPLC-kromatogrammet for DCM-fasen ved 254 nm (se figur 5.2) ble det observert brede og utydelige signaler. Årsaken kan være at DCM-fasen inneholder forbindelser, eksempelvis terpenoider og mettede alifater, som ikke absorberer UV-lys ved de spesifikke bølgelengdene. ¹H-NMR –spekteret bekrefter dette, hvor det ble observert flere fettforbindelser og lite aromatiske eller olefin-signaler. Vann-fasen viste heller ingen relevante topper i HPLC-kromatogrammet som vist i figur 5.3. HPLC kromatogrammet for EtOAc ved 254 nm (se figur 5.4) viste to tydelige hovedtopper på 17,29 min og 28,33 min. Disse toppene er også observert i BuOH-fasen (se figur 5.5), men med litt lavere retensjonstider (16,85 min og 27,60 min). UV-spektrene var like for disse toppene. Dette tyder på at disse to fasene inneholder noen av de samme forbindelsene.

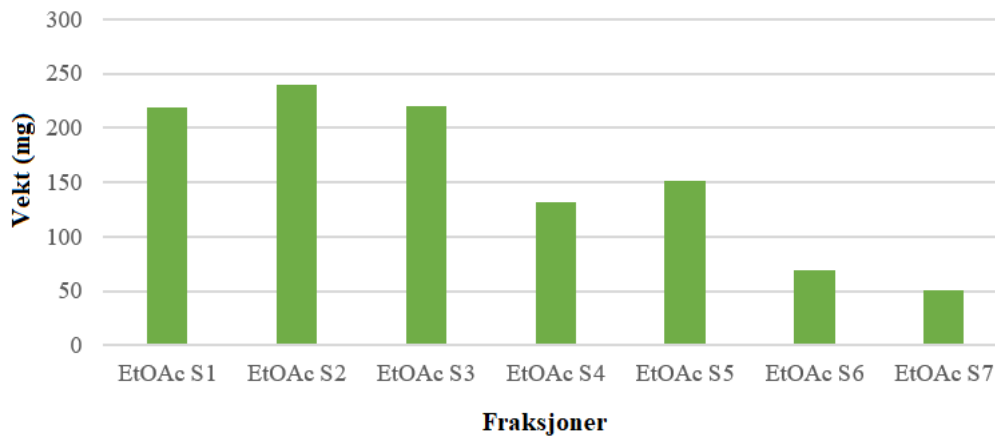


Figur 5.2 Analytisk HPLC kromatogram av DCM-fasen ved 254 nm



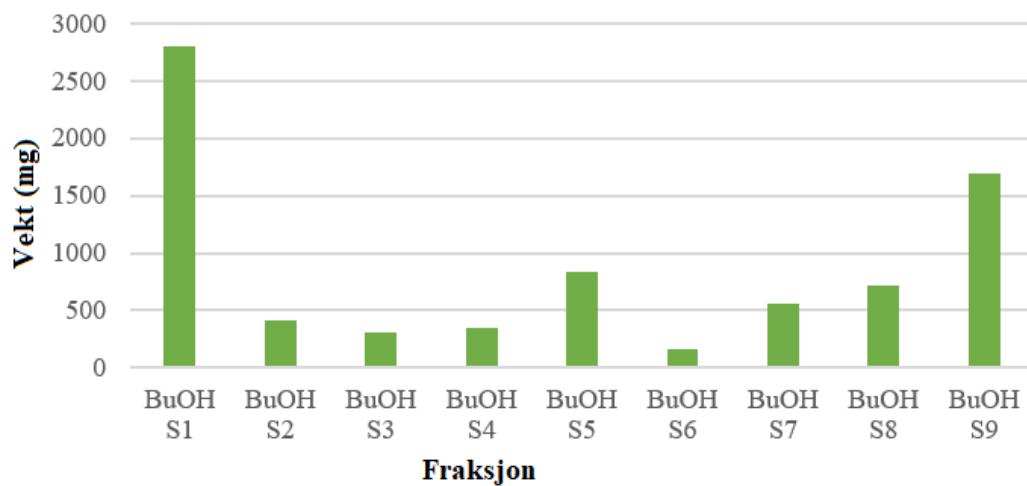
Figur 5.3 Analytisk HPLC kromatogram av vann-fasen ved 254 nm

Sephadex LH-20 EtOAc-ekstrakt Fordeling av vekt (mg)



Figur 5.6 Utbytte (mg) for fraksjoner EtOAc S1- EtOAc S7 fra Sephadex LH-20 kolonne

Sephadex LH-20 BuOH-ekstrakt Fordeling av vekt (mg)



Figur 5.7 Utbytte (mg) for fraksjoner BuOH S1- BuOH S9 fra Sephadex LH-20 kolonnen

5.3.2 NMR spektroskopi av EtOAc S1- EtOAc S7

EtOAc S1- EtOAc S7 ble analysert ved ^1H -NMR med MeOD som løsemiddel. Toppen ved 3,3 ppm representerer MeOH toppen (se vedlegg spektrum 6-12 for EtOAc S1-S7)

EtOAc S1 spekteret består av en kompleks blanding av signaler, og domineres for det meste av sukkersignaler mellom 3,0 ppm og 4,5 ppm. I EtOAc S2 og EtOAc S3 spektret ble det observert signaler ved olefin- og aromatområdet fra 5,0 ppm til 7,1 ppm. Disse signalene var sterkere sammenlignet med sukkersignalene. Spektrene for EtOAc S3 og EtOAc S4 viser stor andel aromatsignaler, trolig fra flavonoider med A-ring meta koblede dubletter ved 6,2 -6,4 ppm, og B-ring protoner mellom 6,8 ppm og 7,8 ppm.

EtOAc S5 og EtOAc S7 spektrene er komplekse og består av brede signaler fra 5,7 ppm til 7,8 ppm. Dette tyder på at fraksjonene kan inneholde proanthocyanidiner. Spekteret for fraksjon EtOAc S6 har tydelige aromatsignaler mellom 6,2 ppm og 7,8 ppm med mange karakteristiske dubletter. Det er ingen karbohydratsignaler i spekteret, og kan tyde på innhold av ikke-glykosylerte flavonoider.

5.3.3 NMR spektroskopi av BuOH S1- BuOH S9

Se vedlegg spektrum 13-21 for ^1H -NMR spektrene av BuOH S1- BuOH S9 og for ^{13}C -NMR spektrene av BuOH S2 og BuOH S3 løst i DMSO- d_6 og TMS.

BuOH S1 består hovedsakelig av sukker signaler mellom 3,0 ppm og 4,0 ppm. BuOH S2 og BuOH S3 ligner hverandre, men spekteret for den sistnevnte er mer renere. Begge spektrene har signaler i aromat- og alifatområdet. I tillegg er det observert signaler ved kjemisk skift cirka 9,0 ppm -10,0 ppm, som er typisk for protoner i syrer og aldehyder. BuOH S4 er svært blandet og skiller seg fra de andre spektrene.

BuOH S5 består hovedsakelig av flavonoider og andre interessante signaler, men er derimot ikke ren. Eksempelvis er det observert signaler ved 6,2 ppm og 6,4 ppm som er typisk for protoner i posisjon 6 (H-6) og 8 (H-8) i flavonoid skjelettet, samtidig signaler for B-ring protoner ved 6,8 ppm (d), 7,5 ppm (d) og 7,7 ppm (dd). BuOH S6 ligner på BuOH S5 hvor flavonoider trolig er hoved forbindelsen.

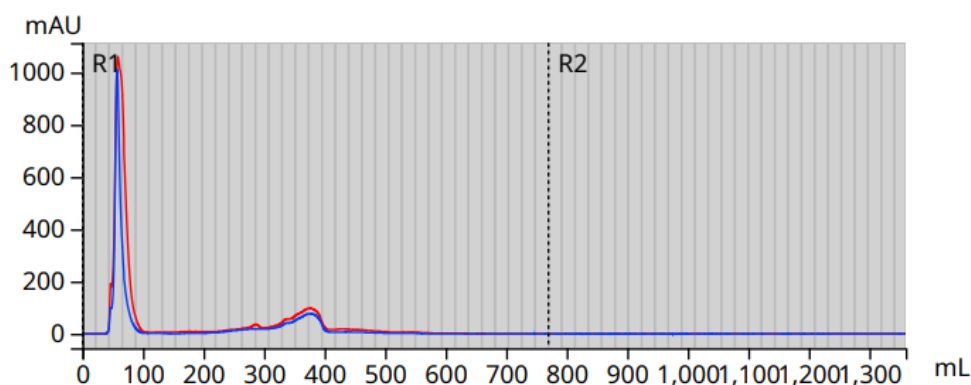
Både BuOH S7, BuOH S8 og BuOH S9 er komplekse spektret. De inneholder muligens proanthocyanidiner på grunn av brede signaler ved 5,8 ppm og 6,8 ppm.

5.4 Isolasjon av isolerte substanser

Utvalgte Sephadex-fraksjoner fra EtOAc og BuOH-fasene ble renset opp med kolonnekromatografiske og HPLC metoder, som blant annet flash kromatografi og preparativ HPLC. Ut ifra opprensingen ble det isolert og identifisert ti forbindelser i *H. maculatum* ekstraktet. Molekylbestemmelse er basert på tolkning av NMR-spektra og sammenligning med NMR-data i vitenskapelig litteratur. Basert på søk i databasen SciFinder har alle substansene blitt rapportert i planten tidligere, ved bruk av blant annet væskekromatografi-massespektrometri (LC-MS). I de neste delavsnittene er det angitt molekylstruktur av de ulike substansene, og tabell over NMR spektroskopiske data.

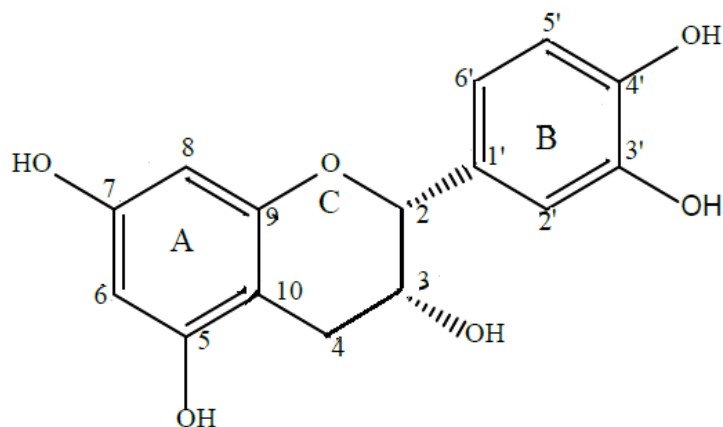
5.4.1 Epicatechin

Fraksjonen EtOAc S2 ble renset gjentatte ganger på flash kromatografi (C18) for å isolere innholdsstoffer i fraksjonen (se vedlegg flash kromatogram 1-2). Fraksjoner for videre arbeid ble valgt ut basert på toppene observert i kromatogrammet. Eksempelvis for EtOAc S2 ble det som vist i figur 5.8 observert to toppe ved UV absorbans 270 nm (rødt) og 320 nm (blått). Den ene toppen ble samlet i rør 3-4 (EtOAc S2 FK 3-4), og den andre toppen i rør 16-18 (EtOAc S2 F16-18). Fraksjon EtOAc S2 FK 3-4 ble rekromatografert for å oppnå tilstrekkelige renhet på det isolerte stoffet, og basert på tolkning av $^1\text{H-NMR}$ og $^{13}\text{C-NMR}$ spektra og sammenligning med litteraturdata (Usman, 2016) ble det isolerte stoffet identifisert som epicatechin.



Figur 5.8 Kromatogram av fraksjon EtOAc S2 fra flash kromatografi

Epicatechin (se figur 5.9) har en flavanol struktur og tilhører gruppen flavan-3-oler. Tidligere studier rapporterer at epicatechin kan beskytte mot kardiovaskulære sykdommer og metabolske forstyrrelser. Substansen aktiverer NO-syntesen i endotelceller, og dermed forbedre endotelfunksjon og reduserer hypertensjon. I tillegg er det foreslått at epicatechin kan ha nevrobeskyttende, antiinflammatoriske og antidiabetiske egenskaper (Bernatova, 2018).



Figur 5.9 Molekylstruktur for epicatechin

Tolkning av spektraldata for isolert epicatechin (se vedlegg spektrum 22H og 22C) er angitt i tabell 5.2 for både $^1\text{H-NMR}$ og $^{13}\text{C-NMR}$. Referansedata fra litteraturen er angitt i vedlegg referanse spektraldata 1.

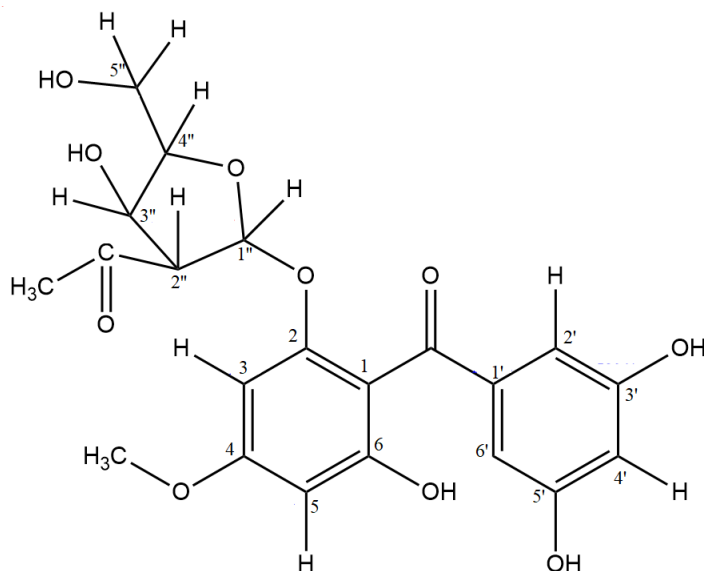
Tabell 5.2 NMR spektroskopiske data for fraksjon *H. maculatum* EtOAc S2 FK3-4 R3 (Vedlegg, spektrum 22H og 22C- 400/100 MHz, CD₃OD):

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)	δ C
2	4,81 (1H, br,s)	78,42
3	4,17 (1H, m)	66,06
4 a	2,86 (1H, dd, 4,6 og 16,8)	27,89
4 b	2,73 (1H, dd, 3,1 og 16,8)	27,89
5	-	156 ^a
6	5,91 (1H, d, 2,3)	98,76
7	-	156 ^a
8	5,94 (1H, d, 2,4)	95,05
9	-	156 ^a
10	-	Ikke observert
1'	-	130,90
2'	6,97 (1H, d, 1,9)	114,57
3'	-	144,51
4'	-	144,35
5'	6,75 (1H, d, 8,1)	114,74
6'	6,8 (1H, dd, 1,9 og 8,2)	118,06

^a Karbonsignaler for C5, C7 og C9 kunne ikke skilles fra hverandre

5.4.2 Acetylannulatophenonoside

EtOAc S2 FK16-18 (se vedlegg spektrum 23H) ble renset ved flash kromatografi (C18) til ren substans, fraksjon EtOAc S2 FK16-18 R5, se vedlegg spektrum 24 og identifisert som acetylannulatophenonoside etter sammenligning med eksisterende litteratur (Nedialkov og Kitanov, 2002). Det ble tatt opp 2D- spektra (se vedlegg spektrum 23COSY-23NOESY) av EtOAc S2 FK16-18 for å kunne tilordne kjemisk skift til atomene, og vite plassering av kjemiske grupper i molekylet. For eksempel var et av hensiktene med å ta opp NOESY å bestemme plasseringen til metoksygruppen (3,81 ppm) i acetylannulatophenonoside. Det ble oppdaget krysskoplinger mellom metoksygruppen og de to aromatiske protonene på C-3 (6,32 ppm) og C-5 (6,18 ppm). Disse signalene var av lik intensitet som indikerte lik avstand mellom metoksygruppa og protonene. Metoksygruppen ble derfor plassert i posisjon C-4 (mellom protonene) som vist i figur 5.10. Substansen er tidligere rapportert fra *H. maculatum* og vist å ha antioksidant effekt ved å scavenge frie radikaler (Zheleva-Dimitrova, Nedialkov *et al.*, 2012).



Figur 5.10 Molekylstruktur for acetylannulatophenonoside

^1H -NMR og ^{13}C -NMR data for isolert acetylannulatophenonosid er vist i tabell 5.3.

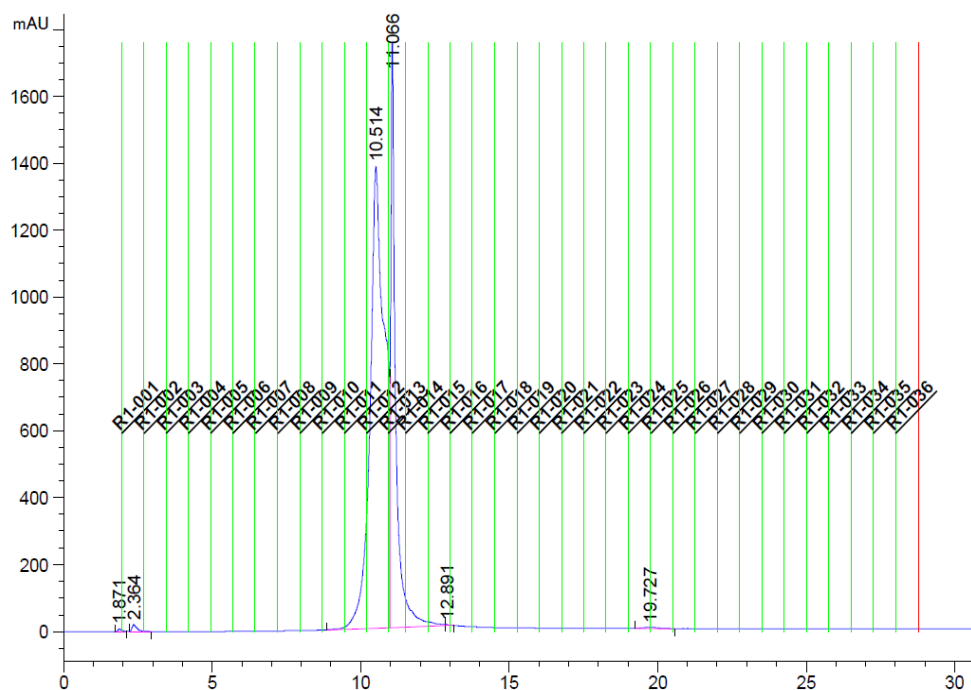
Referansedata for substansen er angitt i vedlegg referanse spektraldata 2.

Tabell 5.3 NMR spektroskopiske data for fraksjon *H. maculatum* EtOAc S2 FK16-18 R5 (Vedlegg, spektrum 24. - 600/100 MHz, CD_3OD):

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)	δ C
1	-	110,50
2	-	158,30
3	6,32 (1H, d, 2,2)	94,50
4	-	165,20
5	8,18 (1H, d, 2,2)	96,00
6	-	161,00
1'	-	143,20
2'	6,63 (1H, d, 2,3)	108,30
3'	-	159,70
4'	6,44 (1H, t, 2,3)	107,70
5'	-	-
6'	-	-
1''	5,53 (1H, s)	107,70
2''	3,69 (1H, d, 1,3)	80,50
3''	4,71 (1H, dd, 1,3 og 3,9)	
4''	3,98 (1H, dt, 3,9, 3,9 og 5,1)	86,20
5''	H-5''a: 3,7 (1H, dd, 3,0 og 12) H-5''b: 3,64 (1H, dd, 5,1 og 11,7)	62,90
OCH ₃	3,81 (3H, s)	56,10
C=O	-	198,90
CH ₃ (AcO)	1,93 (3H, s)	20,70
C=O (AcO)	-	172,50

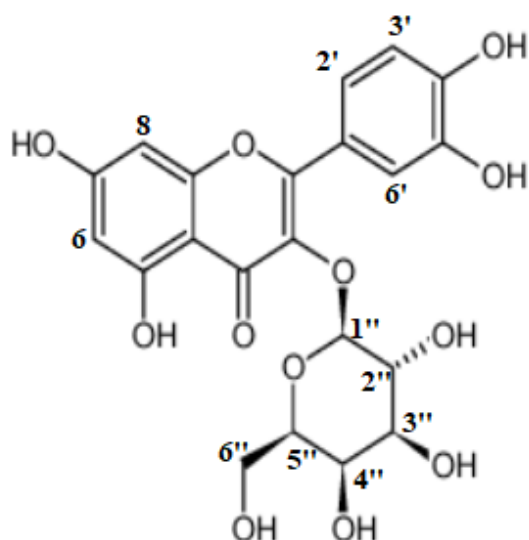
5.4.3 Hyperosid (quercetin 3-O- β -galactoside)

Etter gjentatt opprensing av EtOAc S3 ved bruk av flash kromatografi og PHPLC ble stoffet hyperosid isolert (Se vedlegg flash kromatogram 3 og 4 og PHPLC kromatogram 1). Figur 5.11 viser PHPLC kromatogrammet for isolert hyperosid fraksjon, hvor substansen ble identifisert ved de to høyeste toppene (10,51 min og 11,07 min).



Figur 5.11 PHPLC kromatogram av EtOAc S3 F3-4 R7

De fraksjonene som inneholdt rent hyperosid (se figur 5.12) var EtOAc S3 FK3-4 R7 PHPLC F12, EtOAc S3 FK3-4 R7 PHPLC F13, EtOAc S3 FK3-4 PHPLCR1 F14 PHPLC F14 og EtOAc S3 FK3-4 PHPLCR1 F14 PHPLC F12. Disse ble slått sammen til en samlet fraksjon. De biologiske aktiviteten av hyperosid kjent fra tidlige studier inkluderer egenskaper som cytotoxisk, antiinflammatorisk og antimikrobiell (Tocci, Perenzoni *et al.*, 2018).



Figur 5.12 Molekylstruktur for hyperosid

Tabell 5.4 viser tolkning av $^1\text{H-NMR}$ og $^{13}\text{C-NMR}$ spekterdata for hovedfraksjonen av hyperosid (se vedlegg spektrum 25H og 25C). HSQC spekteret for substansen er angitt i vedlegg spektrum 25HSQC. Spektraldata ble sammenlignet med referansedata fra litteraturen (Abedini, Roumy *et al.*, 2013). Se vedlegg spektraldata 3 for hyperosid.

Tabell 5.4 NMR spektroskopiske data for fraksjon *H. maculatum* hyperosid fraksjon (Vedlegg, spektrum 25H og 25C - 600/100 MHz, CD₃OD):

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)	δ C
2	-	158,80/158,51 ^a
3	-	135,81
4	-	179,56
5	-	163,06
6	6,20 (1H, d, 2,1)	100,0
7	-	166,34
8	6,40 (1H, d, 2,1)	94,80
9	-	158,80/158,51 ^a
10	-	105,61
1'	-	122,92/122,96 ^b
2'	7,84 (1H, d, 2,3)	117,81
3'	-	145,87
4'	-	150,00
5'	6,86 (1H, d, 8,6)	116,12
6'	7,59 (1H, dd, 8,6 og 2,3)	122,92/122,96 ^b
1''	5,16 (1H, d, 7,8)	105,45
2''	3,80 (1H, d, 8,6)	73,23
3''	3,55 (1H, m ^c)	75,15
4''	3,84 (1H, d, 3,4)	70,07
5''	3,48 (1H, m)	77,24
6''	H-6''a: 3,55 (1H, dd, 6,1 og 11,2) H-6''b: 3,64 (1H, m ^c)	61,98

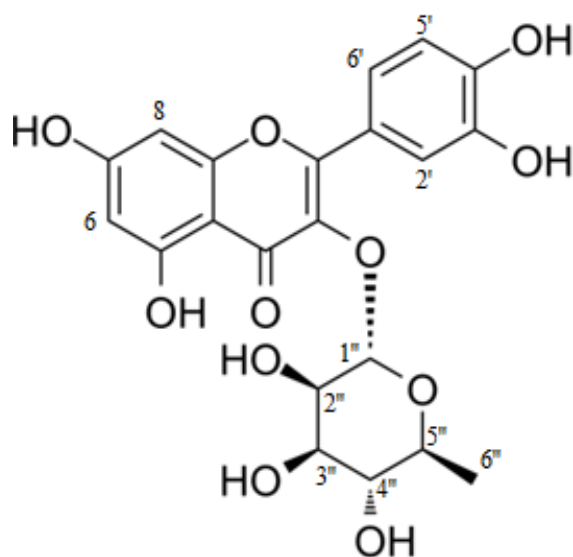
^a Karbonsignaler for C2 og C9 kunne ikke skilles fra hverandre

^b Karbonsignaler for C1' og C2' kunne ikke skilles fra hverandre

^c Overlappende signaler

5.4.4 Quercitrin (quercetin 3-O- α -rhamnoside)

Etter gjentatt opprensning av fraksjon EtOAc S4 ble flere fraksjoner identifisert som blandinger av hyperosid og beslektet quercetin-glykosider (se vedlegg flash kromatogram 5). I fraksjonene EtOAc S4 FK2 PHPLCR2 F9-14 og EtOAc S4 F2 PHPLCR1 F13-17 ble hyperosid i blanding med quercetin 3-O- α -rhamnoside (quercitrin) identifisert (se figur 5.13). PHPLC for isolert substans er angitt i vedlegg PHPLC kromatogram 2 og 3.



Figur 5.13 Molekylstruktur for quercitrin

Tabell 5.5 representerer tolkning av $^1\text{H-NMR}$ spekteret for quercitrin (se vedlegg spektrum 26). Spektraldata ble sammenlignet med referansedata fra litteraturen som er angitt i vedlegg spektraldata 4 (Park, Matsuta *et al.*, 2012).

Tabell 5.5 NMR spektroskopiske data for fraksjon *H. maculatum* EtOAc S4 FK2 PHPLCR1 F13-17 (Vedlegg, spektrum 26. - 400/100 MHz, CD₃OD):

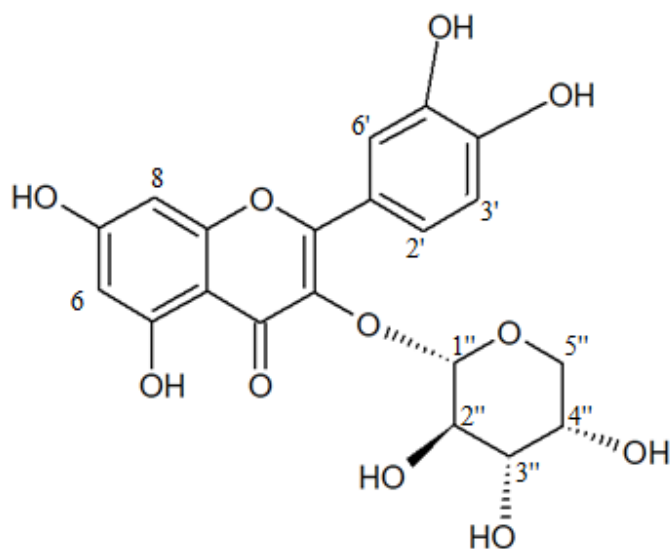
Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)
6	6,20 ^a
8	6.37 ^a
2'	7.34 (1H, d, 2)
5'	6,91 (1H, d, 8,1)
6'	7.30 (1H, dd, 2,2 og 8,3)
1''	5,35 (1H, br, s)
2''	4,21 (1H, br, s)
3''	3,74(1H, dd, 3,5 og 9,2)
4''	3.30 ^b
5''	3,41 ^a
6''	0,94(3H, d, 6)

^a Vanskelig å detektere splitting for H6, H8 og H5'' på grunn av overlappende signaler

^b Overlappet av MeOH signal

5.4.5 Guaijaverin (Quercetin 3-O- α -arabinopyranoside)

I fraksjon EtOAc S4 FK6-7 PHPLC F14 (se vedlegg spektrum 27) ble det observert blanding av quercitrin og quercetin 3-O- α -arabinopyranoside (Guaijaverin). Se vedlegg PHPLC kromatogram 4 for fraksjonen. Guaijaverin (se figur 5.14) tilhører gruppen flavonoler og består av quercetin bundet til arabinose i C-3 posisjon. Guaijaverin i *H. maculatum* utøver radikal scavenging og antioksidant aktivitet og har vist sterkere DPPH-radikal scavenging aktivitet sammenlignet med hyperosid (Zheleva-Dimitrova, Nedialkov *et al.*, 2012).



Figur 5.14 Molekylstruktur for guaijaverin

Tabell 5.6 viser $^1\text{H-NMR}$ spekterdata for guaijaverin. Spektraldata ble sammenlignet med referansedata fra litteraturen som er angitt i vedlegg spektraldata 5 (Park, Matsuta *et al.*, 2012). NMR dataene observert er konsekvent forskjøvet 0.01-0.02 ppm i forhold til referansen.

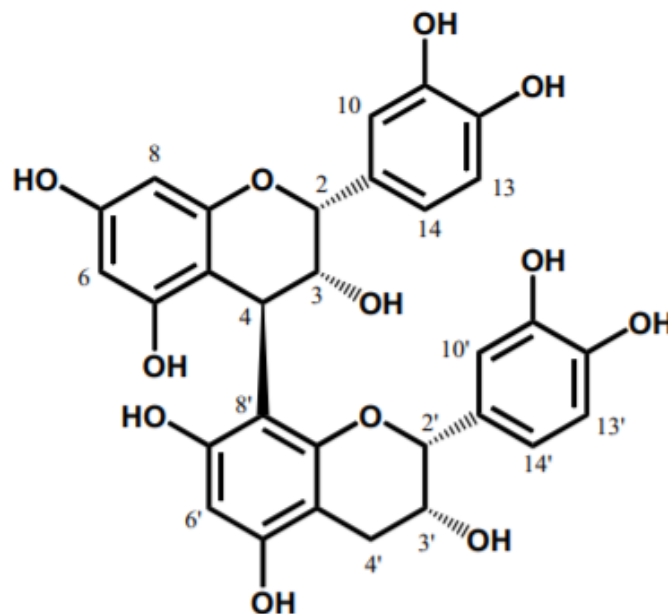
Tabell 5.6 NMR spektroskopiske data for fraksjon *H. maculatum* EtOAc S4 FK6-7 PHPLC F14 (vedlegg, spektrum 27 - 400/100 MHz, CD₃OD):

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)
6	6,21 (1H, overlappende signal, 1,6)
8	6,41 (1H, d, 1,6)
2'	7,75 (1H, d, 2,2)
5'	6,88 (1H, d, 8,5)
6'	7,59 (1H, dd, 2,2 og 8,5)
1''	5,17 (1H, d, 6,5)
2''	3,90 (1H, dd, 6,6 og 8,5)
3''	3,65 (1H, dd, 3,2 og 8,6)
4''	3,81 (m)
5''	3,81 (m)
	3,45 (1H, dd, 3,4 og 13,5)

5.4.6 Procyanidin B2

EtOAc S5 fraksjonen ble opprenset ved bruk av flash kromatografi og PHPLC (vedlegg flash kromatogram 6 og PHPLC kromatogram 5) hvor procyanidin B2 eller (-)-epicatechin-(4 β →8)-(-)-epicatechin ble isolert (se vedlegg spektrum 28). Både fraksjon EtOAc S5 FK6 PHPLC F12 og EtOAc S5 FK6 PHPLC F13 inneholdt den isolerte substansen.

Som vist i figur 5.15 er procyanidin B2 et proanthocyanidin bestående av to epicatechin molekyler forbundet med binding mellom posisjonen C-4 og C-8' i beta konfigurasjon. Et av mange hovedegenskaper til proanthocyanidiner er å danne komplekser med proteiner og dermed utøve ulike biologiske aktiviteter. Disse biologiske aktivitetene inkluderer antioksidantegenskaper, cytotoksisk aktivitet, betennelsesdempende og antidiabetiske effekter (Xu, Du *et al.*, 2012).



Figur 5.15 Molekylstruktur for procyanidin B2

Tabell 5.7 viser $^1\text{H-NMR}$ spekterdata for procyanidin B2. Spektraldata ble sammenlignet med to referanser fra litteraturen som er angitt i vedlegg spektraldata 6 og 7 (Jeong, Cho *et al.*, 2017, Watson, Wallis *et al.*, 2019).

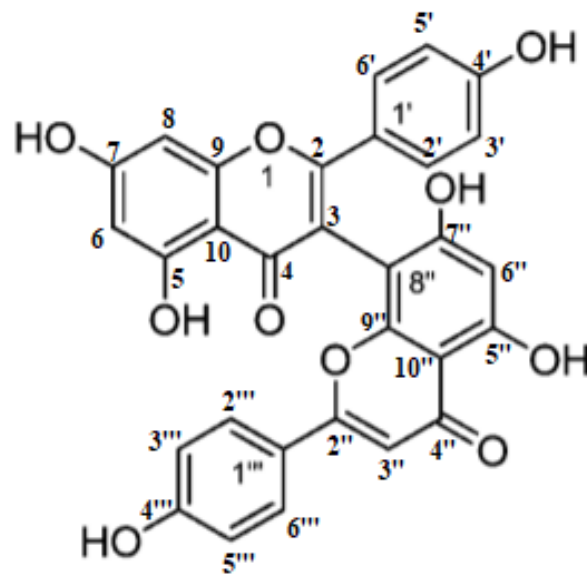
Tabell 5.7 NMR spektroskopiske data for fraksjon *H. maculatum* EtOAc S5 FK6 PHPLC F12 (vedlegg, spektrum 28 - 400/100 MHz, CD₃OD):

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)
2	4,90 ^a
3	4,01 (1H, br. s)
4	4,57 (1H, br s)
6	5,99(1H, d, 2,3)
8	6,05 (1H, d, 2,4)
10	6,89 (1H, d, 2)
13	6,73 (1H, d, 8,1)
14	6,68 (1H, dd, 1,9 og 8,4)
2'	4,81 ^a
3'	4,15 (1H, br, s)
4' α	2,68 (1H, d, 16,5)
4' β	2,84 (1H, d, 16,9)
6'	6,06 (1H, s)
10'	6,98 (1H, d, 2)
13'	6,76 (1H, d, 8,1)
14'	6,81 (1H, dd, 2,0 og 8,3)

^a overlapper med vanntoppen

5.4.7 I3, II8''-Biapigenin

I3, II8''-biapigenin (se vedlegg spektrum 29H) ble isolert ved opprensing av fraksjon EtOAc S6 på flash kromatografi og PHPLC. I vedlegg flash kromatogram 7 og 8 er kromatogrammene for opprensingen vist. I tillegg ble det tatt opp 2D-spektra av en blandet fraksjon som inneholdt quercetin og I3, II8''-biapigenin for å tilordne kjemisk skift til H- og C-atomene i de to flavonoidene (se vedlegg spektrum 31COSY- 31HMBC).



Figur 5.16 Molekylstruktur for I3,II8''biapigenin

Som vist i figur 5.16 er I3,II8''-biapigenin en biflavonoid som er koblet til hverandre mellom C3 og C8''. Biflavonoider isolert fra *Hypericum* arter er rapportert å kunne virke beroligende, inflammasjon reduserende og sårhelende (Kladar, Grujić *et al.*, 2015).

Tabell 5.8 viser ^1H -NMR og ^{13}C -NMR spekterdata for I3,II8''-biapigenin (se vedlegg spektrum 29C). Spektraldata ble sammenlignet med to referanser fra litteraturen som er angitt i vedlegg spektraldata 8 og 9 (Couladis, Baziou *et al.*, 2002, Schmidt, Jaroszewski *et al.*, 2008)

Tabell 5.8 NMR spektroskopiske data for fraksjon *H. maculatum* EtOAc S6 FK25 PHPLC F19 FK7 (vedlegg, spektrum 29H og 29C - 600/100 MHz, CD_3OD):

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)	δ C
6	6,27 ^a	100,43
8	6,48 (1H, d, 2,2)	95,05
2' og 6'	7,32 (1H, 1H, d, 8,8)	129,16
3' og 5'	6,63 (1H, 1H, d, 8,8)	116,05
3''	6,53 (1H, s)	103,63
6''	6,26 ^a	99 ^b
8''	-	99 ^b
5''' og 3'''	6,78 (1H, 1H, d, 8,8)	116,96
2''' og 6'''	7,55 (1H, 1H, d, 8,8)	131

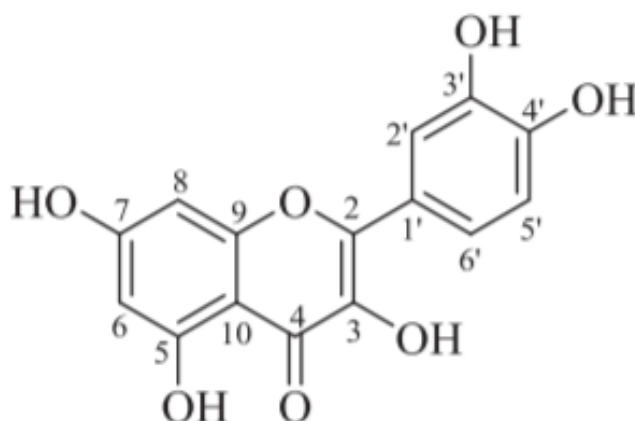
^a H6 og H6'' signalene overlapper hverandre

^b Karbonsignaler for C6'' og C8'' kunne ikke skilles fra hverandre

5.4.8 Quercetin

I fraksjon EtOAc S6 FK22-23 (se vedlegg spektrum 31H) ble flavonolet quercetin isolert. Quercetin, som vist i figur 5.17, finnes i mange planter, frukt og grønnsaker (Demirkiran, 2012). Quercetin har en katekolstruktur (3', 4'-dihydroxy) i B ringen som bidrar til deres antioksidantkapasitet, samtidig forsterker konjugasjonen mellom A- og B-ringene denne egenskapen (Bernatova, 2018).

Quercetin utøver flere farmakologiske og biologiske effekter, eksempelvis er substansen rapportert å kunne virke antidepressiv (hemmer MAO-A) og antiinflammatorisk (Kladar, Grujić *et al.*, 2015). I tillegg har quercetin antihypertensiv effekt ved å aktivere NO-syntesen i endotelceller, og reduserer oksidativt stress ved å blokkere nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH)-oksidase. Quercetin kan også påvirke syntesen av prostaglandiner, leukotriener og tromboksan ved å inhibere COX og lipoksygenase (LOX) (Ciumărnean, Milaciu *et al.*, 2020).



Figur 5.17 Molekylstruktur for quercetin

Tabell 5.9 representerer både $^1\text{H-NMR}$ og $^{13}\text{C-NMR}$ spekterdata for quercetin. $^{13}\text{C-NMR}$ spekteret er angitt i vedlegg spektrum 31C. Spektraldata ble sammenlignet med referanse fra litteraturen som er angitt i vedlegg spektraldata 10 (Pabuprapap, Wassanatip *et al.*, 2019)

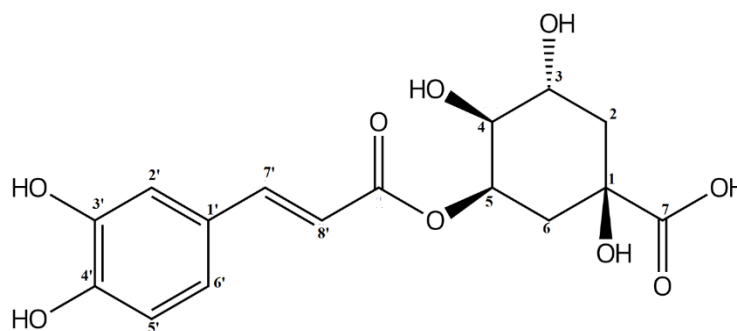
Tabell 5.9 NMR spektroskopiske data for fraksjon *H. maculatum* EtOAc S6 FK22-23 (vedlegg, spektrum 31H og 31C- 400/100 MHz, CD₃OD):

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)	δ C
2	-	146,57
3	-	135,80
4	-	175,89
5	-	161,07
6	6,18 (1H, d, 2,1)	97,82
7	-	164,14
8	6,37 (1H, d, 2,1)	92,99
9	-	156,79
10	-	103,09
1'	-	122,71
2'	7,72 (1H, d, 2,1)	115,81
3'	-	144,79
4'	-	147,34
5'	6,88 (1H, d, 8,5)	116,10
6'	7,62 (1H, dd, 8,4 og 2,2)	120,26

5.4.9 Neoklorogensyre

I BuOH S2 (se vedlegg spektrum 14H og 14C) ble den fenoliske syren neoklorogensyre trolig identifisert. Signalene observert i $^1\text{H-NMR}$ og $^{13}\text{C-NMR}$ spektrene for fraksjonen var i overensstemmelse med NMR data for neoklorogensyre beskrevet av Pauli et al 1999.

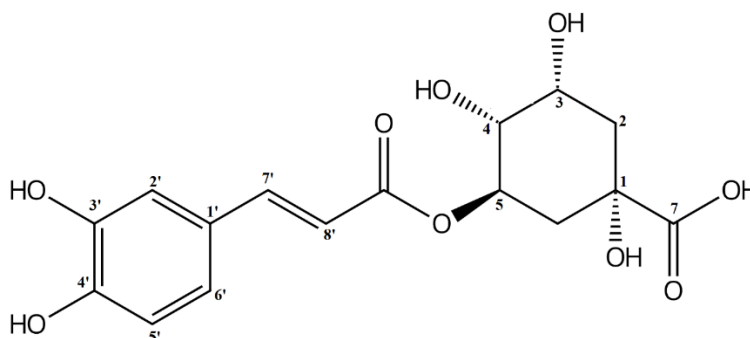
Fraksjonen ble ikke rensert videre da kjøpevare av stoffet var tilgjengelig. Neoklorogensyre (se figur 5.18) er medlem av klassen kaffeoylkinasyrer, og er isomer av klorogensyre.



Figur 5.18 Molekylstruktur for neoklorogensyre

5.4.10 Klorogensyre

Klorogensyre (se figur 5.19) ble identifisert i fraksjon BuOH S3 (Se vedlegg spektrum 15H og 15C) ved tolkning av ^1H og $^{13}\text{C-NMR}$ data og sammenligning med litteraturdata (Pauli, Kuczkowiak *et al.*, 1999). Spekteret ligner på fraksjon BuOH S2, men er renere og penere i sammenligning. Substansen er den dominerende fenolsyren i alle *Hypericum* arter (Bagdonaite, Janulis *et al.*, 2012), og er rapportert å kunne ha både antiinflammatoriske og kolagoge egenskaper (Roman, Cristescu *et al.*, 2011).



Figur 5.19 Molekylstruktur for klorogensyre

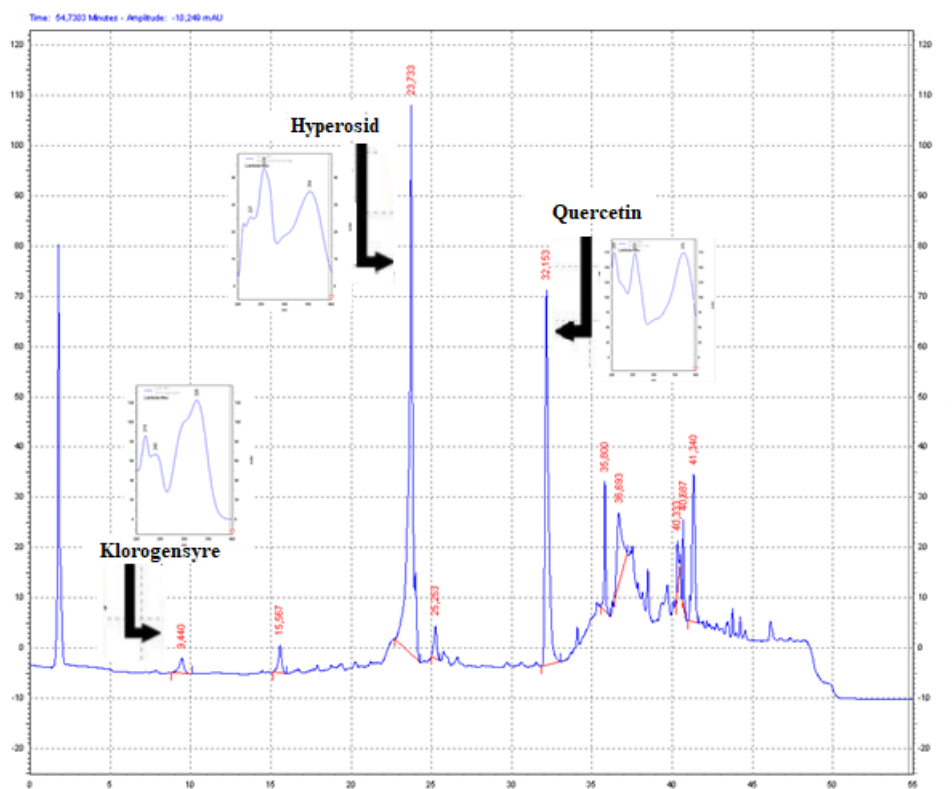
Tabell 5.10 viser både ^1H -NMR og ^{13}C -NMR spekterdata for substansene. Referansedata av spektraldata for substansen er angitt i vedlegg spektraldata 11.

Tabell 5.10 NMR spektroskopiske data for fraksjon *H. maculatum* BuOH S3 (vedlegg, spektrum 15H og 15C-400/100 MHz, CD_3OD):

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)	δ C
1	-	74,73
2	1,76-2,04 (2H, m)	36,81
3	3,93 (1H, m)	70,57
4	3,55-3,58 (1H, m)	74,73
5	5,07 (1H, ddd, 4,2 11,2 og 7,1)	72,05
6	1.95- 2,02 (2H, m)	37,37
7	-	175,62
1'	-	126,38
2'	7,04 (1H, d, 2,1)	115,06
3'	-	145,68
4'	-	148,17
5'	6,77(1H,d, 8,2)	115,06
6'	6,99 (1H, dd, 2,1 og 8,2)	121,58
7'	7,42 (1H, d, 15,8)	148,17
8'	6,15 (1H, d, 15,9)	115,06
9'	-	167,25

5.5 Identifisering av topper i HPLC kromatogram

De isolerte renstoffene ble koeluert med råkstraktet for å identifisere hvilke topper som tilsvarte de isolerte stoffene. UV spektrene ble i tillegg benyttet for å bekrefte identitet på toppene på råkstraktet. Som vist i figur 5.20 er hyperosid en av hovedkomponentene i alkoholekstraktet fra *H. maculatum*, etterfulgt av quercetin med retensjonstid på 32,15 min. UV spekteret av toppen på 23,73 min i råkstraktet var lik UV-spekteret for isolert hyperosid med UV-max på 256 nm og 354 nm. Disse UV verdiene stemmer godt overens med verdiene fra litteraturen (Wan, Yuan *et al.*, 2012). Både hyperosid og quercetin er til stede i store mengder i *H. maculatum* som samsvarer med tidligere studier utført på arten (Bagdonaite, Janulis *et al.*, 2009, Zdunic, Godjevac *et al.*, 2017).



Figur 5.20: HPLC kromatogram (270 nm) av 70 % EtOH råkstrakt med identifiserte innholdsstoffer

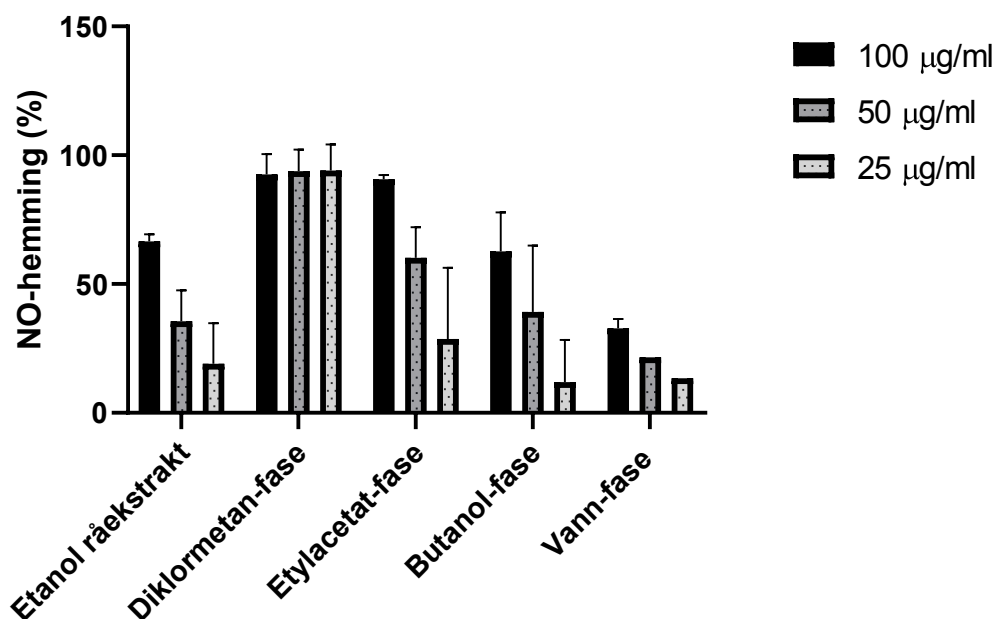
Klorogensyre ble identifisert ved lavere retensjonstid (9,44 min) i råekstraktet, som stemmer da substansen er et av de polare innholdstoffene isolert. Acetylannulatophenonoside, neoklorogensyre og epicatechin var ikke mulig å detektere i råekstraktet da ingen av toppene samsvarte med UV-max verdiene for de isolerte stoffene. Eksempelvis hadde acetylannulatophenonoside toppen UV-max på 277 nm og 301 nm, som samsvarte med litteraturdata (Nedialkov og Kitanov, 2002). Toppen i HPLC kromatogrammet for acetylannulatophenonoside hadde høyere retensjonstid enn hyperosid, men substansen ble ikke identifiserer i råekstraktet, da ingen av toppene i UV-spekteret samsvarte med 277 nm og 301 nm. De fleste toppene i kromatogrammet, eksempelvis mellom 15 min og 35 min, hadde UV maksima som lå mellom 250 nm og 350 nm. Dette kjennetegner de konjugerte systemene av flavon og fenyletanoider (Lin og Harnly, 2007).

5.6 Biologisk aktivitet

5.6.1 Reduksjon av NO-akkumulering i LPS-stimulerte makrofagiske celler av 70 % EtOH-ekstrakt og hovedfraksjonene

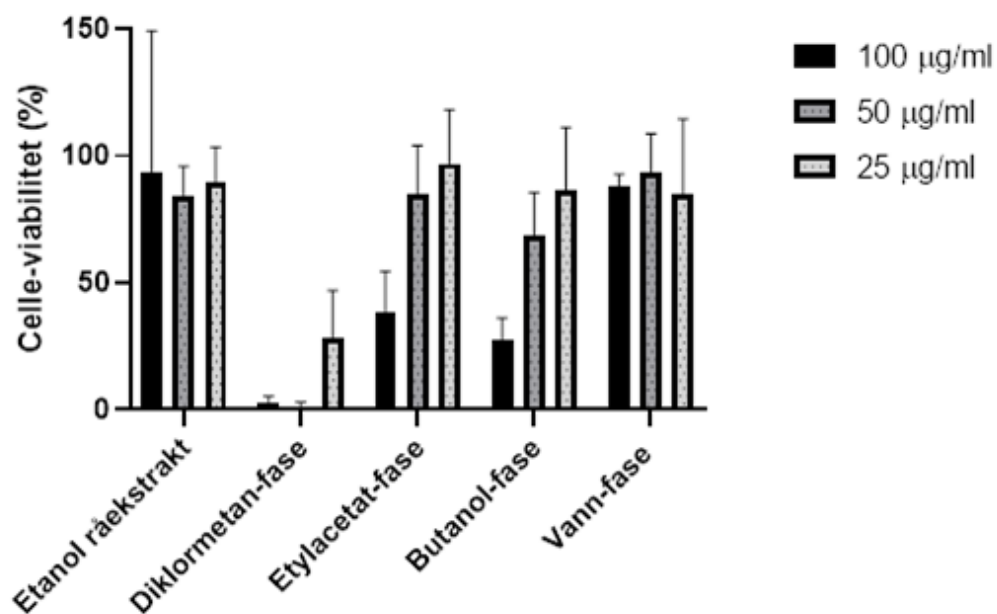
Basert på preliminare NO-hemmingsforsøk ble konsentrasjoner på 25 µg/ml, 50 µg/ml og 100 µg/ml ekstrakt benyttet for testing av antiinflammatorisk effekt av 70 % EtOH råekstraktet og fasene oppnådd fra væske-væske ekstraksjon. Quercetin løst i DMSO/vann ble benyttet som positiv kontroll, siden quercetin er en kjent hemmer av NO i makrofager (Wang og Mazza, 2002). Det ble utført tre celleforsøk med tre paralleller av de samme konsentrasjonene. I tillegg ble det utført MTT-test for å observere om prøvene ga redusert overlevelse i makrofagene. Gjennomsnittet av begge resultatene er presentert i figur 5.21 og 5.22.

LPS-stimulerte J774A makrofager



Figur 5.21 Hemmende effekter på NO produksjon i lipopolysakkarid (LPS) aktiverte J774A.1 makrofager av rækstrakt og væske-væske ekstraherte faser fra *Hypericum maculatum*. Data er presentert som gjennomsnitt av tre uavhengige forsøk ± SD.

MTT-test J774A makrofager



Figur 5.22 Prosent celleviabilitet i lipopolysakkarid (LPS) aktiverte J774A.1 makrofager behandlet med rækstrakt og væske-væske ekstraherte faser fra *Hypericum maculatum*. Data er presentert som gjennomsnitt av tre uavhengige forsøk ± SD.

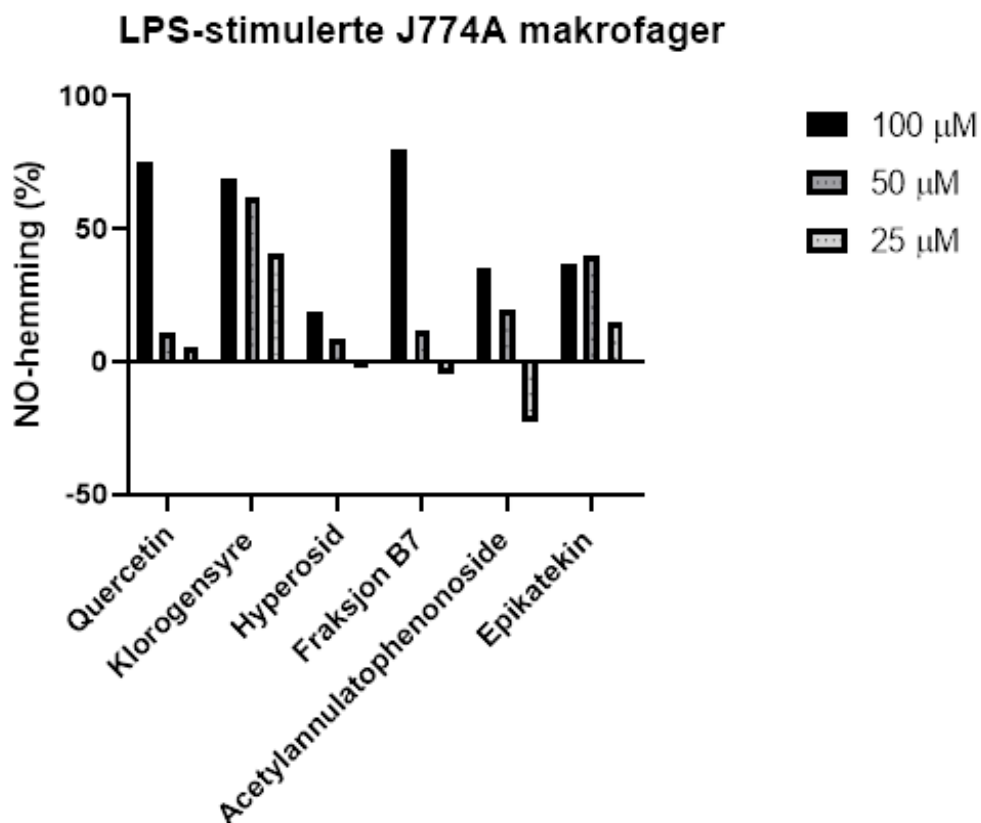
Som vist i figur 5.21 er det for EtOH-, EtOAc-, BuOH- og vann-fasen observert et dose-respons resultat. Alle prøvene har sterkest NO hemming ved 100 µg/ml, og denne inhibisjonseffekten avtar ved de lavere konsentrasjonene. Unntak observeres for DCM-fasen med omtrent 93 % NO hemming ved alle konsentrasjonene. DCM-fasen hadde cytotoxisk effekt med 2,0 % til 11,2 % celleviabilitet etter MTT-testen (se figur 5.22). For EtOAc-fasen ble det også observert en toksisk effekt mot de LPS aktiverte makrofagiske cellene ved 100 µg/ml (38,7 % viabilitet), mens ved 50 µg/ml og 25 µg/ml var celleviabilitet på henholdsvis 84,8 % og 96,9 %. På samme måte ble det for BuOH-fasen observert lavere celleviabilitet ved den høyeste konsentrasjonen (27,3% viabilitet) i motsetning til de lavere konsentrasjonene med 68,5 % (50 µg/ml) og 86,3 % (25 µg/ml) celleviabilitet.

I NO-testen hadde BuOH-fasen og EtOH råekstraktet omtrent lik inhibisjonseffekt ved de ulike konsentrasjonene. I sammenligning reduserte EtOAc-fasen produksjon av NO konsentrasjonen i større grad med 90,7 %, 60,2 % og 28,7 % hemming ved henholdsvis 100 µg/ml, 50 µg/ml og 25 µg/ml. Vann ekstraktet skiller seg fra resten av fraksjonene ved å utøve liten NO hemming (37 % ved 100 µg/ml) og høy celleviabilitet på over 85 %. I MTT-testen ble det i 20% DMSO brønnene (positiv kontroll) observert gul farge i brønnene som indikerer drap av celler, og i brønner med LPS/IFN γ + 1 % DMSO observert blå/lilla formazan krystaller i brønnene som tyder på friske aktive celler.

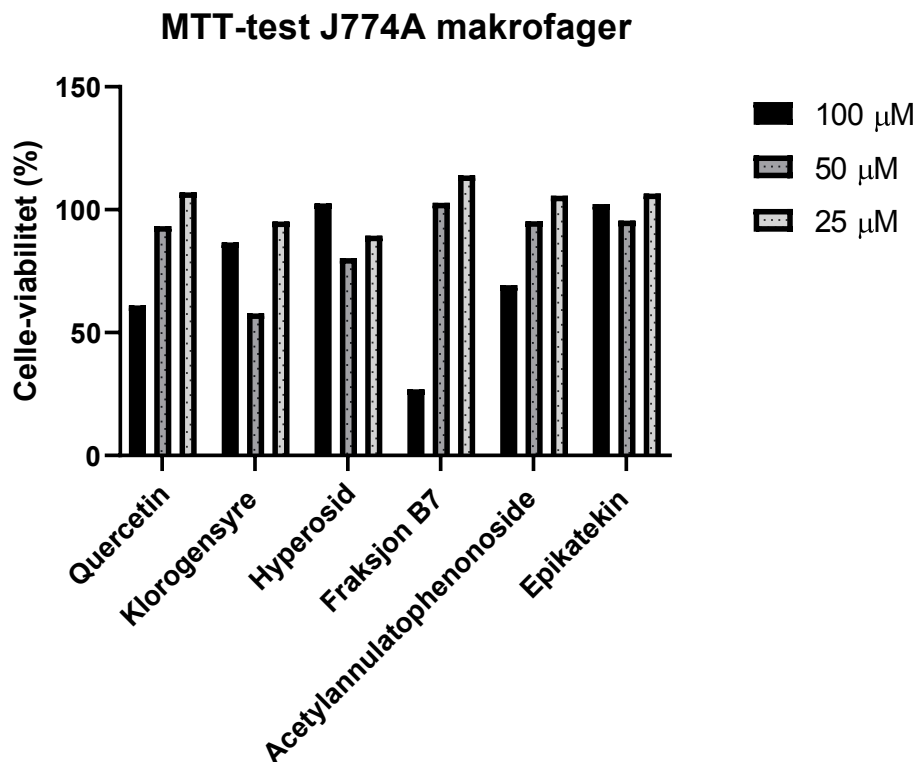
Resultatene viser at den cytotoxiske effekten av DCM-fasen er årsaken til høy NO-hemming observert for DCM-fasen. Derimot gir EtOAc-fasen, BuOH-fasen og EtOH-råekstraktet NO-hemming ved 50 µg/ml og 25 µg/ml som kan ikke skyldes cytotoxisk effekt på cellene. Vann- fasen viser lav NO-hemmende effekt, og høy celleviabilitet. I følge SciFinder er *H. maculatum* i motsetning til de andre *hypericum* artene, eksempelvis *H. perforatum* og *Hypericum gentianoides*, tidligere ikke blitt testet for NO-hemming i makrofager. *In vivo* studie utført på *H. perforatum* tyder at EtOH ekstraktet utøver antiinflammatorisk aktivitet, hvor substansene pseudohypericin, quercetin, amentoflavon og klorogensyre er viktige bidragsyttere (Huang, Rizshsky *et al.*, 2011).

5.6.2 Reduksjon av NO-akkumulering i LPS-stimulerte makrofagiske celler av isolerte substanser

NO hemmingsforsøk og MTT testen ble også utført på fem av de isolerte stoffene (klorogensyre, hyperosid, benzofenon, epicatechin og quercetin) og en proanthocyanidin rik fraksjon (BuOH- S7) med konsentrasjonene 25 μM , 50 μM og 100 μM . Det ble kun utført to paralleller av celleforsøket da det ikke var nok celler tilgjengelig for å gjennomføre den siste parallellen. Ideelt sett bør dette forsøket gjentas minst en gang til for å sikre presis, nøyaktig og konsistent resultat. Ved å utføre forsøket tre ganger eller mer vil man ha nok informasjon til å bestemme betydningen av dataene statistisk, og avgjøre om resultatet er mer eller mindre pålitelig. Derfor ble standardavvik i dette forsøket utelatt basert på kun to paralleller. Gjennomsnittet av parallellene for begge testene er presentert i figur 5.23 og 5.24.



Figur 5.23 Hemmende effekter av NO produksjon i lipopolysakkarid (LPS) aktiverte J774A.1 makrofager for isolerte substanser. Data er presentert som gjennomsnitt av to uavhengige forsøk.



Figur 5.24 Prosent celleviabilitet i lipopolysakkarid (LPS) aktiverte J774A.1 makrofager for isolerte substanser. Data er presentert som gjennomsnitt av to uavhengige forsøk.

Proanthocyanidin- fraksjonen, klorogensyre og quercetin, som også fungerer som positiv kontroll, viste god inhibering av NO-produksjon med henholdsvis 79,9 %, 69,1 % og 75,6 % ved 100 μM (se figur 5.23). Makrofagene med klorogensyre og quercetin hadde høy celleviabilitet ved alle konsentrasjonene (25-100 μM) etter MTT-måling som vist i figur 5.24. Proanthocyanidin-fraksjonen ga 27,0 % i celleviabilitet ved 100 μM , som tyder på at lav NO konsentrasjon skyldes cytotoxisk effekt på cellene. Klorogensyre viste også å redusere NO-konsentrasjonen ved 50 μM (61,9 % hemming) og 25 μM (40,4 % hemming).

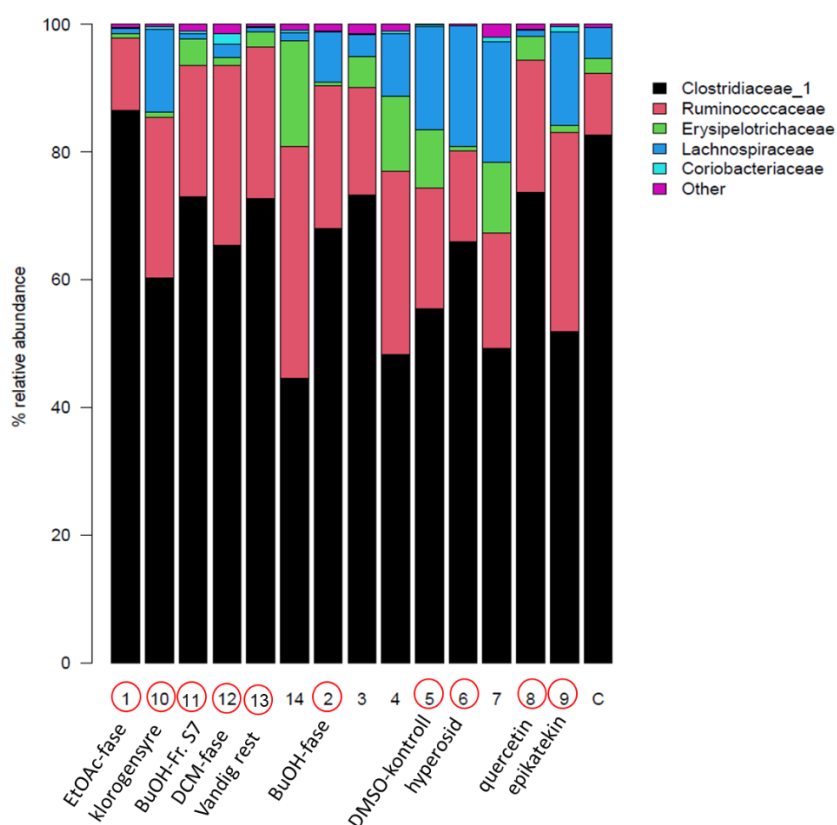
Hyperosid og acetylannulatophenonoside reduserer NO-konsentrasjonen i liten grad ved alle konsentrasjonene som ble testet. Hyperosid hemmer NO med 18,5 %, 8,6 % og -2,7 % ved henholdsvis 100 μM , 50 μM og 25 μM . Acetylannulatophenonoside viser også negativ inhibisjonseffekt ved 25 μM . Epicatechin avvike fra et forventet dose-respons resultat i NO testen med hemming på 36,6 % (100 μM), 39,9 % (50 μM) og 14,5 % (25 μM). Tidligere studier rapporterer at epicatechin bidrar til lite NO hemming (Ho, Wangenstein *et al.*, 2017, Hämäläinen, Nieminen *et al.*, 2007), som stemmer overens med effekten av substansen observert i forsøket. Derimot er acetylannulatophenonoside og hyperosid tidligere ikke blitt undersøkt for NO-hemming i makrofager.

I MTT testen er det ikke observert noen cytotoksiske effekter av de isolerte substansene med unntak av proanthocyanidin-fraksjonen ved 100 μM . Klorogensyre har tidligere blitt rapportert til å ha ingen inhibitorisk effekt i J774 makrofager ved 100 μM (Hämäläinen, Nieminen *et al.*, 2007), men har vist signifikant NO-hemming ved 100 $\mu\text{g/ml}$ i RAW 264.7 makrofager (Balkan, Gören *et al.*, 2018). I dette NO-forsøket derimot viste klorogensyre hemmende effekt ved 100 μM . Quercetin er tilstedet i større mengder i *H. maculatum* sammenlignet med klorogensyre, og er trolig den viktigste bidragsyteren til NO-hemming i etanolekstrakt fra planten.

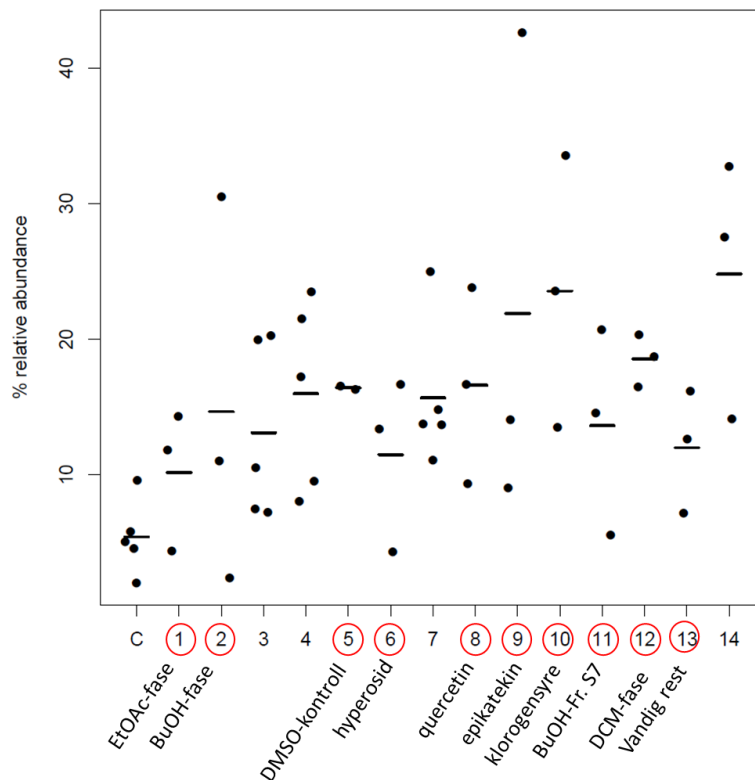
Basert på to paralleller med til dels sprikende resultater er det vanskelig å trekke en konklusjon om hvilke innholdsstoffer i *H. maculatum* som kan bidra til en mulig anti-inflammatorisk effekt, quercetin er sannsynlig involvert. Det kan også være andre substanser i ekstraktet som ikke ble testet, men som kanskje utøver antiinflammatorisk effekt. Samtidig kan det være synergistiske effekter mellom innholdstoffene, hvor stoffene forsterker hverandres virkning. Dette kan føre til at virkestoffene hver for seg ikke utøver like sterk biologisk effekt sammenlignet med en blanding av flere stoffer. Dette kan være en mulig forklaring på den beskjedne effekten observert for de isolerte stoffene, mens det ble observert en NO-hemmende effekt av råekstraktet og EtOAc- og BuOH-fasene.

5.6.3 Interaksjon mellom tarmmikrobiota og *H. maculatum* prøver

En pilotstudie ble utført hvor det ble undersøkt om ekstrakter og isolerte stoffer fra *H. maculatum* kunne påvirke tarmmikrobiotaen i et *in vitro* forsøksoppsett. Forsøket ble utført i samarbeid med Eric de Muinck og Bastiaan Star, Centre for Ecological and Evolutionary Synthesis på institutt for biovitenskap i UiO. Prøvene ble løst i DMSO (0,5 % sluttkonsentrasjon) og sterilfiltrert (0,2 µm) før inokulering med tre paralleller av hver prøve i en *in vitro* tarmmikrobiotakultur. Temperaturen som ble benyttet var 37 °C, og prøvene ble inkubert i seks dager under anaerobe forhold. Prøvene ble oppbevart ved -20 °C før sekvensering. Innhold av 192 bakteriearter ble bestemt ved high-throughput sekvensering.



Figur 5.25: Relativ forekomst (%) av de dominerende bakteriefamiliene etter inokulering med prøver fra *H. maculatum*. C; kontroll (Prøve 3,4,7 og 14 tilhører prøver i et annet prosjekt)



Figur 5.26. Relativ forekomst (%) av *Intestinimonas butyriciproducens* (Ruminococcaceae) etter inokulering med prøver fra *H. maculatum*. C; kontroll. (Prøve 3,4,7 og 14 tilhører prøver i et annet prosjekt.)

Analysen viste en dominans av Firmicutes bakterier og fravær av Bacterioidetes som var uventet. Det ble observert en reduksjon i mengde Clostridiaceae_1 bakterier og økt mengde Ruminococcaceae og Lachnospiraceae etter inkubering med BuOH-fasen, epicatechin og klorogensyre. Ifølge figur 5.25 ga quercetin en økning av Ruminococcaceae, hyperosid ga en økning av Lachnospiraceae og reduksjon av Clostridiaceae_1 bakterier, mens DCM-fasen og vandig rest reduserte mengde Clostridiaceae_1 og økte mengden av Ruminococcaceae bakterier. Det ble også analysert på species-nivå, hvor slekten som dominerte var *Clostridium sensu stricto* (Clostridiaceae_1) etterfulgt av *Intestinimonas butyriciproducens* (Ruminococcaceae) (se figur 5.26). Som vist i figur 5.26 er det stor spredning i resultatene og ikke signifikante forskjeller fra kontroll. En usikkerhetskilde er bruk av DMSO som løsemiddel. DMSO (1 %) er brukt i tidligere studier (Zhao, Hu *et al.*, 2020), men i dette forsøket ser det ut til at DMSO kontroll (0,5 %) endrer sammensetningen av bakteriestammer. Flere forsøk må utføres for å få klarhet i om forskjellen er tilfeldig eller ikke. Videre må forsøket med *H. maculatum* gjentas med flere paralleller og det må oppnås reproducerbare resultater før man kan bruke metoden i flere studier.

Lachnospiraceae og Ruminococcaceae bakterier i tarmen er forbundet med gunstig immunfunksjon og tarmhelse (DeJong, Surette *et al.*, 2020, Vacca, Celano *et al.*, 2020), og hvordan polyfenoler kan påvirke denne type bakterier bør studeres videre. I tillegg er det andre bakteriearter som også er forbundet med helsegunstige effekter, eksempelvis *Akkermansia muciniphila* (Naito, Uchiyama *et al.*, 2018), som ville vært interessant å studere nærmere.

6 Konklusjon

Flavonolglykosidet hyperosid og dets aglykon quercetin ble identifisert som hovedinnholdsstoffer i EtOH-råekstraktet fra *H. maculatum*. Det ble observert NO-hemmende effekt i LPS-stimulerte makrofager ved 50 µg/ml og 100 µg/ml konsentrasjoner av ekstraktet *in vitro* og ekstraktene var ikke cytotoxisk. EtOAc-fasen viste høyest NO-hemmende effekt blant de væske-væske ekstraherte fasene, og effekten var høyere enn for EtOH-ekstraktet. Fra denne fasen ble det isolert epicatechin, acetylannulatophenolide, hyperosid, quercitrin, guaijaverin, procyanidin B2, I3, II8''-biapigenin og quercetin.

Resultatene fra NO- forsøket tyder på at *H. maculatum* kan ha en antiinflammatorisk effekt som sannsynligvis skyldes innhold av quercetin, i tillegg til andre innholdsstoffer. Om det derimot er en mulig synergieffekt må studeres videre.

Det er vist at ekstrakter og isolerte stoffer fra *H. maculatum* kan påvirke mengden av tarmbakterier som Clostridiaceae, Ruminococcaceae og Lachnospiraceae *in vitro*.

Lachnospiraceae og Ruminococcaceae er forbundet med gunstig tarmhelse, og hvordan polyfenoler kan påvirke denne type bakterier bør studeres videre.

7 Videre studier

Det var noen fraksjoner det ikke ble arbeidet videre med for isolering og identifisering av substanser på grunn av tidsbegrensning, eller for lite mengde av hvert stoff. De fraksjonene som spesielt kan jobbes videre med er fra BuOH-fasen, eksempelvis BuOH S5 som inneholder mye flavonoider. I tillegg bør BuOH S7-S9 fraksjonene renses videre og struktur oppklares på grunn av deres muligens innhold av proanthocyanidiner. Videre bør forsøket med LPS-stimulerte makrofager gjentas. Innholdsstoffenes og ekstraktenes effekt på tarmmikrobiota bør undersøkes videre.

8 Litteraturliste

- Abedini, A., V. Roumy, S. Mahieux, M. Biabiany, A. Standaert-Vitse, C. Rivière, S. Sahpaz, F. Bailleul, C. Neut and T. Hennebelle (2013). "Rosmarinic Acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae)." Evidence-based complementary and alternative medicine. **2013**: 604536-604536.
- Anderberg, A. (2010). "Fyrkantig johannesört *Hypericum maculatum* Crantz." Aksessert 20.08.20 fra <http://linnaeus.nrm.se/flora/di/hyperica/hyper/hypemac.html>.
- Aron, P. M. and J. A. Kennedy (2008). "Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity." Molecular nutrition & food research. **52** (1): 79-104.
- Artsdatabanken. (2018). "Firkantperikum *Hypericum maculatum* Crantz." Aksessert 21.08.20 fra <https://www.artsdatabanken.no/taxon/Hypericum%20maculatum/102624>.
- Artsdatabanken. (2018). "Informasjon hentet fra bondens kulturmarksflora for midt-Norge." Aksessert 22.08.20 fra <https://www.artsdatabanken.no/Pages/168484/Firkantperikum>.
- Bagdonaite, E., V. Janulis, L. Ivanauskas and J. Labokas (2009). "Variation in contents of hypericin and flavonoids in *Hypericum maculatum* (Hypericaceae) from Lithuania." Acta Botanica Hungarica. **51**(3-4): 237-244.
- Bagdonaite, E., V. Janulis, L. Ivanauskas and J. Labokas (2012). "Between species diversity of *Hypericum Perforatum* and *Hypericum maculatum* by the content of bioactive compounds." Natural product communications. **7** (2): 99-200.
- Balkan, I. A., A. C. Gören, H. Kırmızıbekmez and E. Y. Yeşilada (2018). "Evaluation of the *in vitro* anti-inflammatory activity of *Nerium oleander* L. Flower extracts and activity-guided isolation of the active constituents." Records of Natural Products Records of natural products. **12**(2): 128-141.
- Bernatova, I. (2018). "Biological activities of (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-containing foods: Focus on cardiovascular and neuropsychological health." Biotechnology advances. **36**(3): 666-681.
- Berridge, M. V. and A. S. Tan (1993). "Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT Reduction." Archives of biochemistry and biophysics. **303**(2): 474-482.
- Bogdan, C. (2001). "Nitric oxide and the immune response." Nature immunology. **2** (10): 907-916.

Bozin, B., N. Kladar, N. Grujić, G. Anačkov, I. Samojlik, N. Gavarić and B. Čonić (2013). "Impact of origin and biological source on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant properties of some St. John's Wort species (*Hypericum* spp., Hypericaceae) from the central Balkans." *Molecules*. **18** (10): 11733-11750.

Bucar, F., A. Wube and M. Schmid (2013). "Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds." *Natural product reports*. **3** (4): 525-545.

Ciumărnean, L., M. V. Milaciu, O. Runcan, Ș. C. Vesa, A. L. Răchișan, V. Negrean, M.-G. Perné, V. I. Donca, T.-G. Alexescu, I. Para and G. Dogaru (2020). "The effects of flavonoids in cardiovascular diseases." *Molecules*. **5** (18): 4320.

Cott, J. M. (1997). "*In vitro* receptor binding and enzyme inhibition by *Hypericum perforatum* extract." *Pharmacopsychiatry*. **30** (S 2): 108-112.

Couladis, M., P. Baziou, E. Verykokidou and A. Loukis (2002). "Antioxidant activity of polyphenols from *Hypericum triquetrifolium* Turra." *Phytotherapy research*. **16** (8): 769-770.

Crockett, S. L. (2010). "Essential oil and volatile components of the genus *Hypericum* (Hypericaceae)." *Natural product communications*. **5** (9): 1493-1506.

DeJong, E. N., M. G. Surette and D. M. E. Bowdish (2020). "The gut microbiota and unhealthy aging: Disentangling cause from consequence." *Cell host & microbe*. **28** (2): 180-189.

Demirkiran, O. (2012). "Three new benzophenone glycosides with MAO-A inhibitory activity from *Hypericum thasium* Griseb." *Phytochemistry letters*. **5** (4): 700-704.

Dianursanti, P. Nugroho and M. B. Prakasa (2020). "Comparison of maceration and soxhletation method for flavonoid production from *Spirulina platensis* as a sunscreen's raw material." *AIP conference proceedings*. **2230** (1)

EMA. (2009). "Community herbal monograph on *Hypericum Perforatum* L., Herba (Traditional use) " Aksessert 25.08.20 fra https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-community-herbal-monograph-hypericum-perforatum-l-herba-traditional-use_en.pdf.

EMA. (2009). "Community herbal monograph on *Hypericum Perforatum* L., Herba (Well-established medicinal use) " Aksessert 25.08.20 fra https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-community-herbal-monograph-hypericum-perforatum-l-herba-well-established-medicinal-use_en.pdf.

Gaster, B. and J. Holroyd (2000). "St John's Wort for depression- A systematic review." *Archives of internal medicine*. **160** (2): 152-156.

Gudzcic, B., D. Djokovic, V. Vajs, R. Pali and G. Stojanovic (2002). "Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum maculatum* Crantz." Flavour and fragrance journal. **17** (5): 392-394.

Gulick, R. M., V. McAuliffe, J. Holden-Wiltse, C. Crumpacker, L. Liebes, D. S. Stein, P. Meehan, S. Hussey, J. Forcht and F. T. Valentine (1999). "Phase I studies of hypericin, the active compound in St. John's Wort, as an antiretroviral agent in HIV-infected adults. AIDS clinical trials group protocols 150 and 258." Ann Intern Med. **130**(6): 510-514.

Heinrich, M. (2012). Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. Edinburgh, Elsevier, Churchill Livingstone. Side 121-141

Ho, G. T. T., H. Wangenstein, H. Barsett and G. Ho (2017). "Elderberry and elderflower extracts, phenolic compounds, and metabolites and their effect on complement, RAW 264.7 macrophages and dendritic cells." International journal of molecular sciences. **18** (3): 584.

Huang, N., L. Rizshsky, C. Hauck, B. J. Nikolau, P. A. Murphy and D. F. Birt (2011). "Identification of anti-inflammatory constituents in *Hypericum perforatum* and *Hypericum gentianoides* extracts using RAW 264.7 mouse macrophages." Phytochemistry. **72** (16): 2015-2023.

Hudson, J. B., I. Lopez-Bazzocchi and G. H. N. Towers (1991). "Antiviral activities of hypericin." Antiviral research. **15** (2): 101-112.

Hämäläinen, M., R. Nieminen, P. Vuorela, M. Heinonen and E. Moilanen (2007). "Anti-Inflammatory effects of flavonoids: Genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B Activation along with their inhibitory effect on iNOS Expression and NO production in activated macrophages." Mediators of inflammation. **2007** (1): 1-10.

Høeg, O. A. (1974). Planter og tradisjon: floraen i levende tale og tradisjon i Norge 1925-1973. Oslo, Universitetsforlaget. Side 387-389

Jeong, D. E., J.-Y. Cho, C. Y. Lee, H. Y. Jeong, H. J. Lee and J.-H. Moon (2017). "Isolation of five proanthocyanidins from pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) fruit peels." Food science and biotechnology. **26** (5): 1209-1215.

Joo, T., K. Sowndhararajanb, S. Honga, J. Leea, S.-Y. Park, S. Kim and J.-W. Jhooa (2014). "Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila* L." Saudi journal of biological sciences. **21** (5): 427-435.

Kim, J., J. Shim, J. Kim, C. Y. Lee, K. W. Lee and H. J. Lee (2014). "Cocoa phytochemicals: Recent advances in molecular mechanisms on health." Critical reviews in food science and nutrition. **54** (11): 1458-1472.

- Kladar, N., N. Grujić, B. Srđenović, M. Rat, N. Gavarić, G. Anačkov and B. Božin (2015). "ST. John's wort (*Hypericum* spp.) –Relation between the biological source and medical properties." *Hypericum: Botanical Sources, Medical Properties and Health Effects*.
- Kladar, N., B. Srđenović, N. Grujić, B. Bokić, M. Rat, G. Anačkov and B. Božin (2015). "Ecologically and ontogenetically induced variations in phenolic compounds and biological activities of *Hypericum maculatum* subsp. *maculatum*, Hypericaceae." *Botanical Society of Sao Paulo*. **38**(4): 703-715.
- Klein, D. R. (2015). *Organic Chemistry*. Hoboken, Wiley. Kapittel 15
- Klemow, K. M., A. Bartlow, J. Crawford, N. Kocher, J. Shah and M. Ritsick. (2004). "Medical attributes of St. John's wort (*Hypericum perforatum*)." *Oxidative Stress and Disease*. **14**: 757-780.
- Kaakoush, N. O. and M. J. Morris (2017). "More flavor for flavonoid-based interventions?" *Trends in molecular medicine*. **23** (4): 293-295.
- Lin, L.-Z. and J. M. Harnly (2007). "A Screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials." *Journal of agricultural and food chemistry*. **55** (4): 1084-1096.
- Linde, K., M. Berner and L. Kriston (2008). "St. John's wort for treating depression." *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Martonfi, P., M. Repčák and P. Závrit (2006). "Secondary metabolites variation in *Hypericum maculatum* and its relatives." *Biochemical systematics and ecology*. **34** (1): 56-59.
- Merck. (2021). "Nitric Oxide Synthase Assay Kit Colorimetric." Aksessert 25.03.21 fra https://www.merckmillipore.com/NO/en/product/Nitric-Oxide-Synthase-Assay-Kit-Colorimetric,EMD_BIO-482702?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.bing.com%2F.
- Meruelo, D., G. Lavie and D. Lavie (1988). "Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **85**: 5230-5234.
- Mossberg, B., L. Stenberg, S. Ericsson and S. Moen (1995). *Gyldendals store nordiske flora*. Oslo, Gyldendal : I samarbeid med det norske hageselskap. Side 515
- Naito, Y., K. Uchiyama and T. Takagi (2018). "A next-generation beneficial microbe: *Akkermansia muciniphila*." *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. **63** (1): 33-35.

Nedialkov, P. T. and G. M. Kitanov (2002). "Two benzophenone O-arabinosides and a chromone from *Hypericum annulatum*." *Phytochemistry*. **59** (8): 867-871.

Oniga, I., A. Toiu, D. Benedec, I. Tomuta and L. Vlase (2016). "Phytochemical analysis of *Hypericum maculatum* in order to obtain standardized extracts." *Farmacia*. **64**(2): 171-174.

Plants of the World Online (2017). "*Hypericum maculatum* Crantz." Aksessert 22.08.20 fra <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:325096-2>.

Oteiza, P. I., C. G. Fraga, D. A. Mills and D. H. Taft (2018). "Flavonoids and the gastrointestinal tract: Local and systemic effects." *Molecular aspects of medicine*. **61**: 41-49.

Pabuprapap, W., Y. Wassanatip, P. Khetkam, W. Chaichompoo, S. Kunkaewom, P. Senabud, J. Hata, R. Chokchaisiri, S. Svasti and A. Suksamrarn (2019). "Quercetin analogs with high fetal hemoglobin-inducing activity." *Medicinal chemistry research*. **28** (10): 1755-1765.

Park, B.-J., T. Matsuta, T. Kanazawa, C.-H. Park, K.-J. Chang and M. Onjo (2012). "Phenolic compounds from the leaves of *Psidium guajava* II. Quercetin and its glycosides." *Chemistry of natural compounds*. **48** (3): 477-479.

Pauli, G. F., U. Kuczkowiak and A. Nahrstedt (1999). "Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids." *Magnetic resonance in chemistry*. **37** (11): 827-836.

Pedersen-Bjergaard, S. and K. E. Rasmussen (2004). *Legemiddelanalyse*. Bergen, Fagbokforlag. Side 139-166 og 239-268

Pei, R., X. Liu and B. Bolling (2020). "Flavonoids and gut health." *Current opinion in biotechnology*. **61**: 153-159.

Rajbhar, K., H. Dawda and U. Mukundan (2015). "Polyphenols: methods of extraction." *Scientific Reviews & Chemical Communications*. **5**(1): 1-6.

Roman, I., M. Cristescu and C. PUICĂ (2011). "Effects of *Hypericum perforatum* and *Hypericum Maculatum* extracts administration on some morphological and biochemical parameters in rat liver intoxicated with alcohol." *Life Sciences Series*. **21** (2): 361.

Santhakumar, A. B., M. Battino and J. M. Alvarez-Suarez (2018). "Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis." *Food and chemical toxicology*. **113**: 49-65.

Schmidt, B., J. W. Jaroszewski, R. Bro and M. Witt (2008). "Combining PARAFAC analysis of HPLC-PDA profiles and structural characterization using HPLC-PDA-SPE-NMR-MS experiments: Commercial preparations of St. John's Wort." *Analytical chemistry*. **80** (6): 1978-1987.

Serra, D., L. M. Almeida and T. C. P. Dinis (2018). "Dietary polyphenols: A novel strategy to modulate microbiota-gut-brain axis." *Trends in food science & technology*. **78**: 224-233.

Sevastre-Berghian, A. C., V. A. Toma, B. Sevastre, D. Hanganu, L. Vlase, D. Benedec, I. Oniga, L. Baldea, D. Olteanu, R. Moldovan, N. Decea, G. A. Filip and S. V. Clichici (2018). "Characterization and biological effects of *hypericum* extracts on experimentally-induced - anxiety, oxidative stress and inflammation in rats." *Journal of physiology and pharmacology*. **69**(5): 789-800.

Singer, A. (1999). "Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na⁺." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **290** (3): 1363-1368.

Smelcerovic, A., V. Verma, M. Spiteller, S. M. Ahmad, S. C. Puri and G. N. Qazi (2006). "Phytochemical analysis and genetic characterization of six *Hypericum* species from Serbia." *Phytochemistry*. **67** (2): 171-177.

Sologub, V. and A. Grytsyk (2012). "The research of the *Hypericum* extracts pharmacological activity." *The Pharma innovation*. **1**(11).

Sticher, O. (2008). "Natural product isolation." *Natural product reports*. **25** (3): 517-554.

Stjepanovic, L. (1965). "Essential oil content and number of oil vesicles in *Hypericum* species from various habitats of Tara mountain." *Archiv of pharmacy*. **15**(3): 177-188.

Tao, W., Y. Zhang, Xuemin Shen, Y. Cao, J. Shi, X. Ye and S. Chen (2019). "Rethinking the mechanism of the health benefits of proanthocyanidins: Absorption, metabolism, and interaction with gut microbiota." *Comprehensive reviews in food science and food safety*. **18** (4): 971-985.

Tocci, N., D. Perenzoni, D. Iamonic, F. Fava, T. Weil and F. Mattivi (2018). "Extracts From *Hypericum hircinum* subsp. *majus* exert antifungal activity against a panel of sensitive and drug-resistant clinical strains." *Frontiers in Pharmacology*. **9**: 382

USDA. (2016). "*Hypericum maculatum* Crantz spotted St. Johnswort." Aksessert 21.08.20 fra <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=HYMA10>.

Usman, A. (2016). "Isolation of (-) - epicatechin from *Trichilia emetica* whole seeds." *American journal of organic chemistry*. **6**(3): 81-85.

Vacca, M., G. Celano, F. M. Calabrese, P. Portincasa, M. Gobbetti and M. D. Angelis (2020). "The controversial role of human gut Lachnospiraceae." *Microorganisms*. **8** (4): 573.

Vandebroek, I. (2013). "Intercultural health and ethnobotany: How to improve healthcare for underserved and minority communities?" *Journal of ethnopharmacology*. **148** (3): 746-754.

Vasileva, R., V. Georgieva, J. Vojnova and T. Milkova (2003). "GC-MS study on the essential oils of Bulgarian *Hypericum maculatum* Grantz and *Hypericum perforatum* L." *Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences*. **56**(12): 71-74.

Vetlesen, V. (2005). Osloflora: med åtte botaniske gatevandringar. Oslo, Damm. Side 143

Veza, T., A. R.-. Nogales, F. Algieri, M. P. U. M. E. Rodriguez-Cabezas and J. Galvez (2016). "Flavonoids in inflammatory bowel disease: a review." *Nutrients*. **8** (4): 211.

Vitusapotek. (2020). "*Hypericum* Stada Kapsler " Aksessert 20.08.20 fra <https://www.vitusapotek.no/kosthold-og-kosttilskudd/ovrig-kosttilskudd/hypericum-stada-kaps-30-stk/p/379992>.

Wan, C., T. Yuan, A. L. Cirello and N. P. Seeram (2012). "Antioxidant and α -glucosidase inhibitory phenolics isolated from highbush blueberry flowers." *Food chemistry*. **135** (3): 1929-1937.

Wang, J. and G. Mazza (2002). "Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages." *Journal of agricultural and food chemistry*. **50** (4): 850-857.

Watson, A., C. Wallis and A. H. Franz (2019). "NMR solution structures and MD-simulation of procyanidin B1, B2, and C1." *ARKIVOC free online journal of organic chemistry*. **2018** (3): 279-301.

Wibetoe, G. Store norske leksikon (2020). "Kromatografi " Aksessert 01.03.21 fra <https://snl.no/kromatografi>.

Woof, J. B. and J. S. Pierce (1967). "Separation of complex mixtures of polyhydroxy phenols on columns of sephadex." *Journal of Chromatography A*. **28**: 94-103.

Xu, Z., P. Du, P. Meiser and C. Jacob (2012). "Proanthocyanidins: Oligomeric structures with unique biochemical properties and great therapeutic promise." *Natural product communications*. **7** (3): 381-388

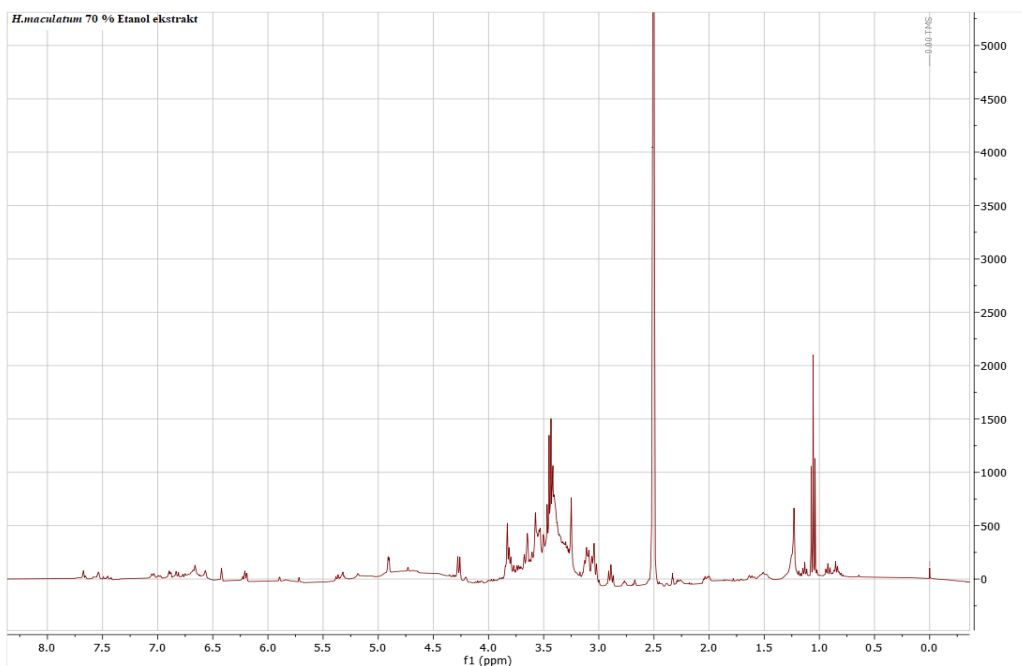
Zdunic, G., D. Godjevac, K. Savikin and S. Petrovic (2017). "Comparative analysis of phenolic compounds in seven *Hypericum* species and their antioxidant properties." *Natural product communications*. **12** (11):1934578.

Zhao, C., Y. Hu, H. Chen, B. Li, L. Cao, J. Xia, Y. Yin and Z. Ling (2020). "An *in vitro* evaluation of the effects of different statins on the structure and function of human gut bacterial community." *PloS one*. **15** (3): e0230200.

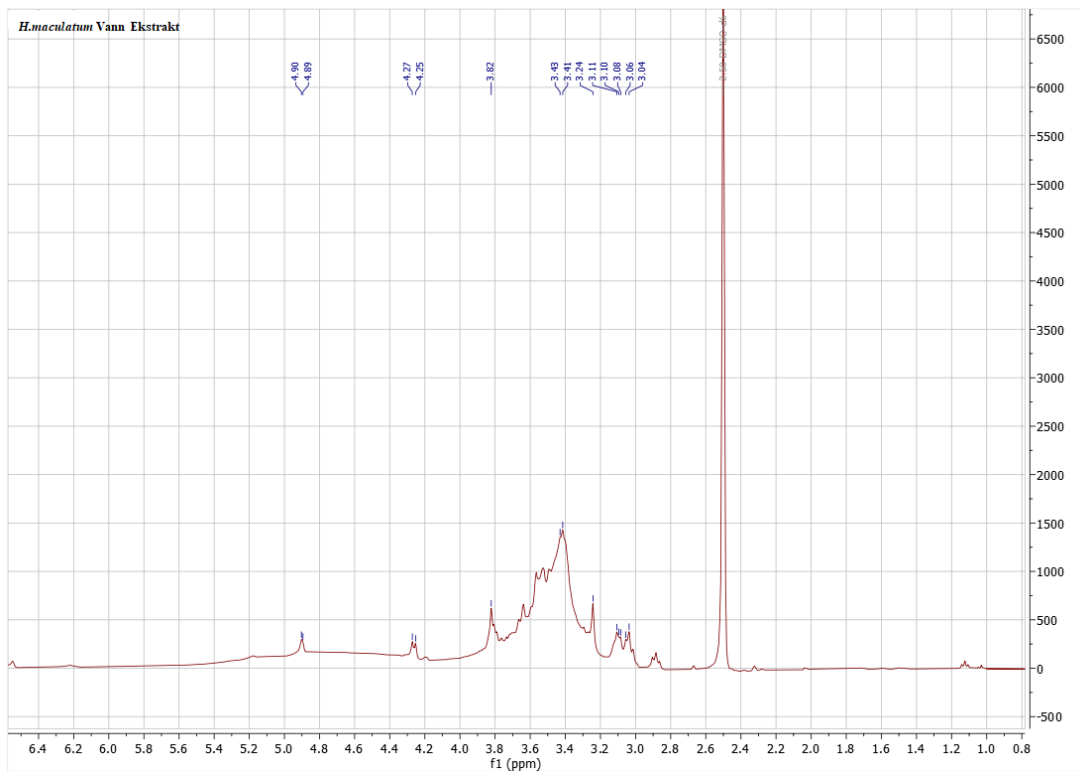
Zheleva-Dimitrova, D., P. Nedialkov, U. Girreser and G. Kitanov (2012). "Benzophenones and flavonoids from *Hypericum maculatum* and their antioxidant activities." *Natural product research*. **26** (17): 1576-1583.

9 Vedlegg

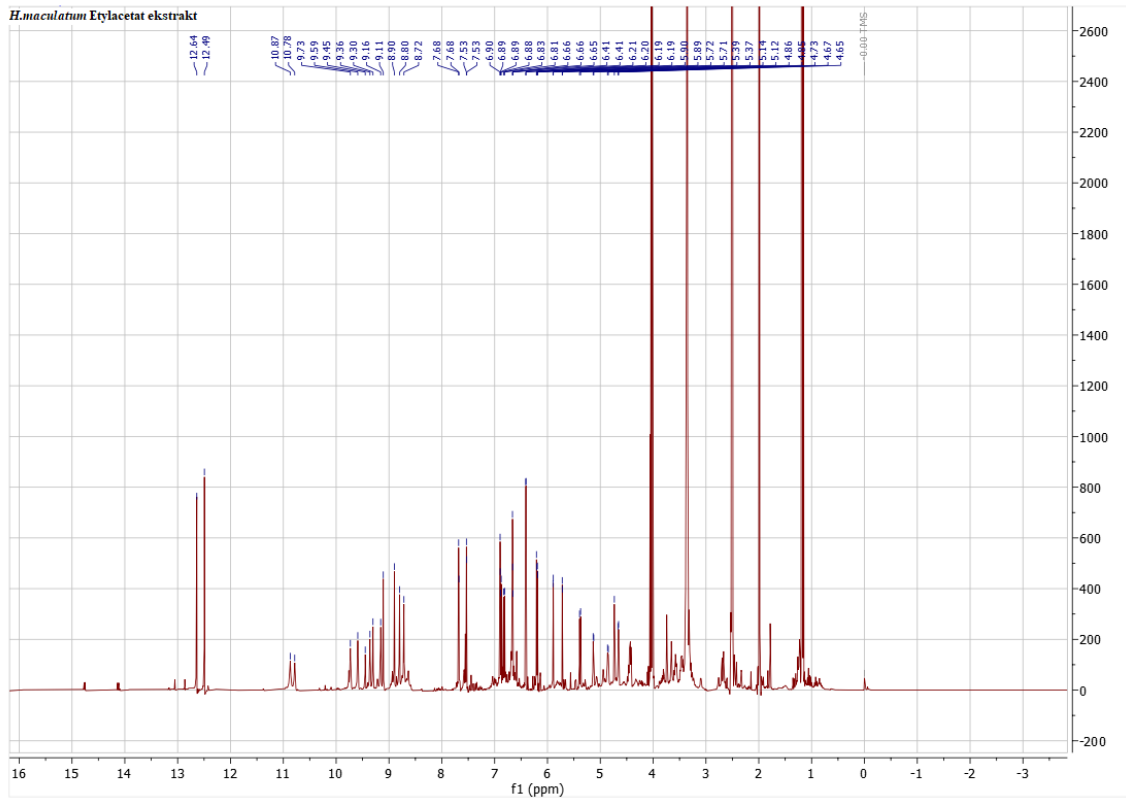
1. NMR-spekter



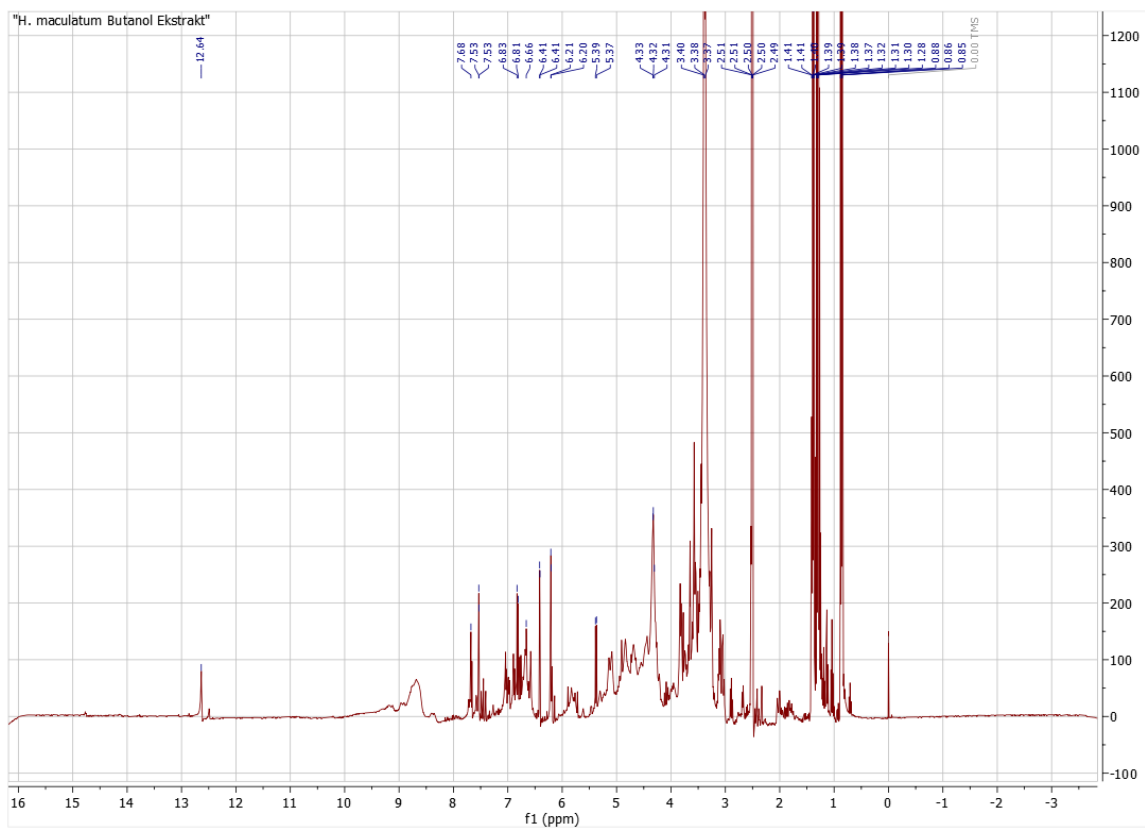
Spektrum 1: *H. maculatum* 70% EtOH fraksjon 1H 400MHz



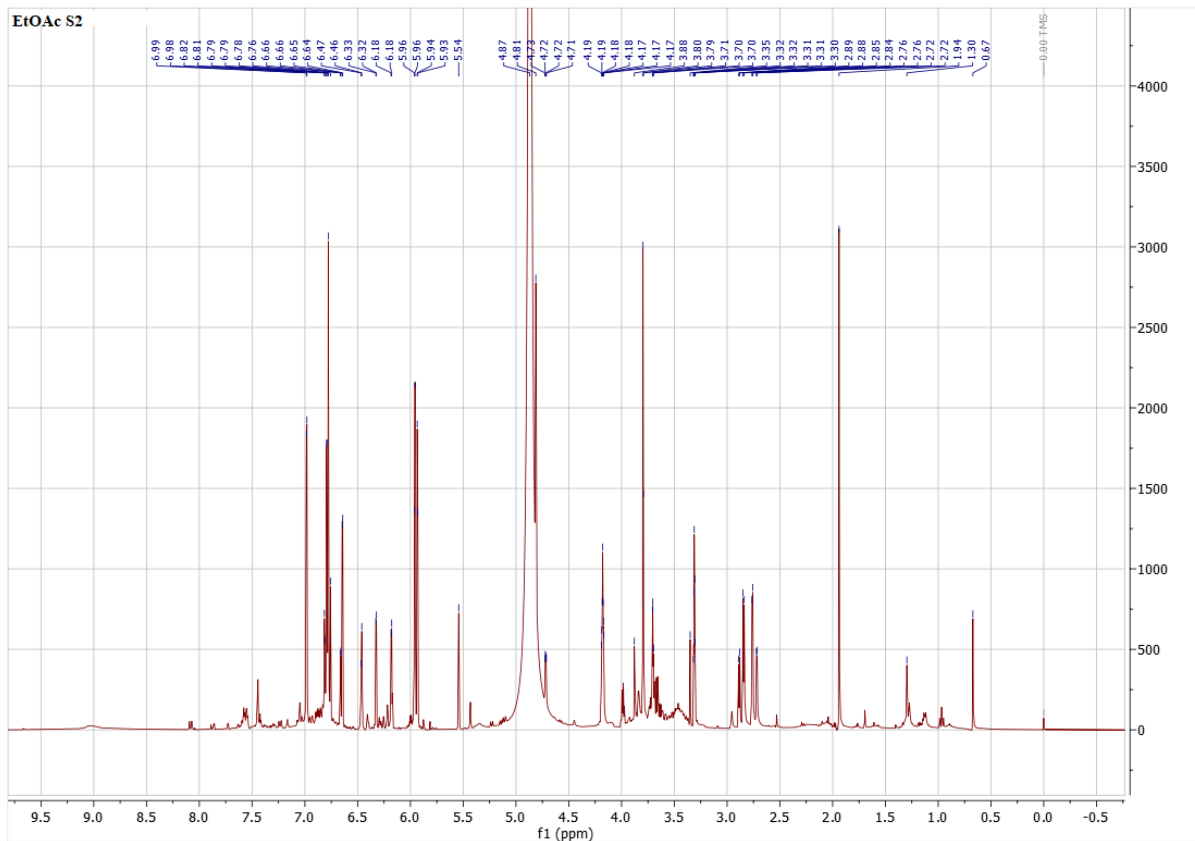
Spektrum 2: *H. maculatum* vann fraksjon 1H 400MHz



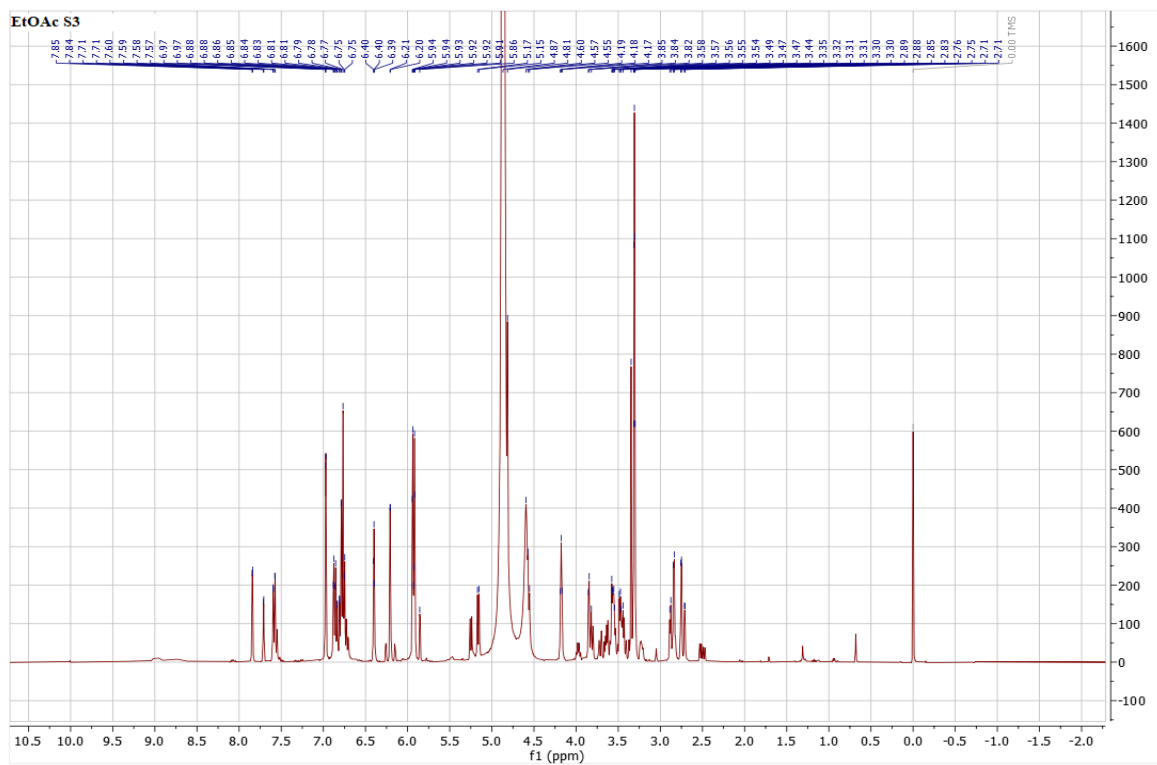
Spektrum 3: *H. maculatum* EtOAc fraksjon 1H 400MHz



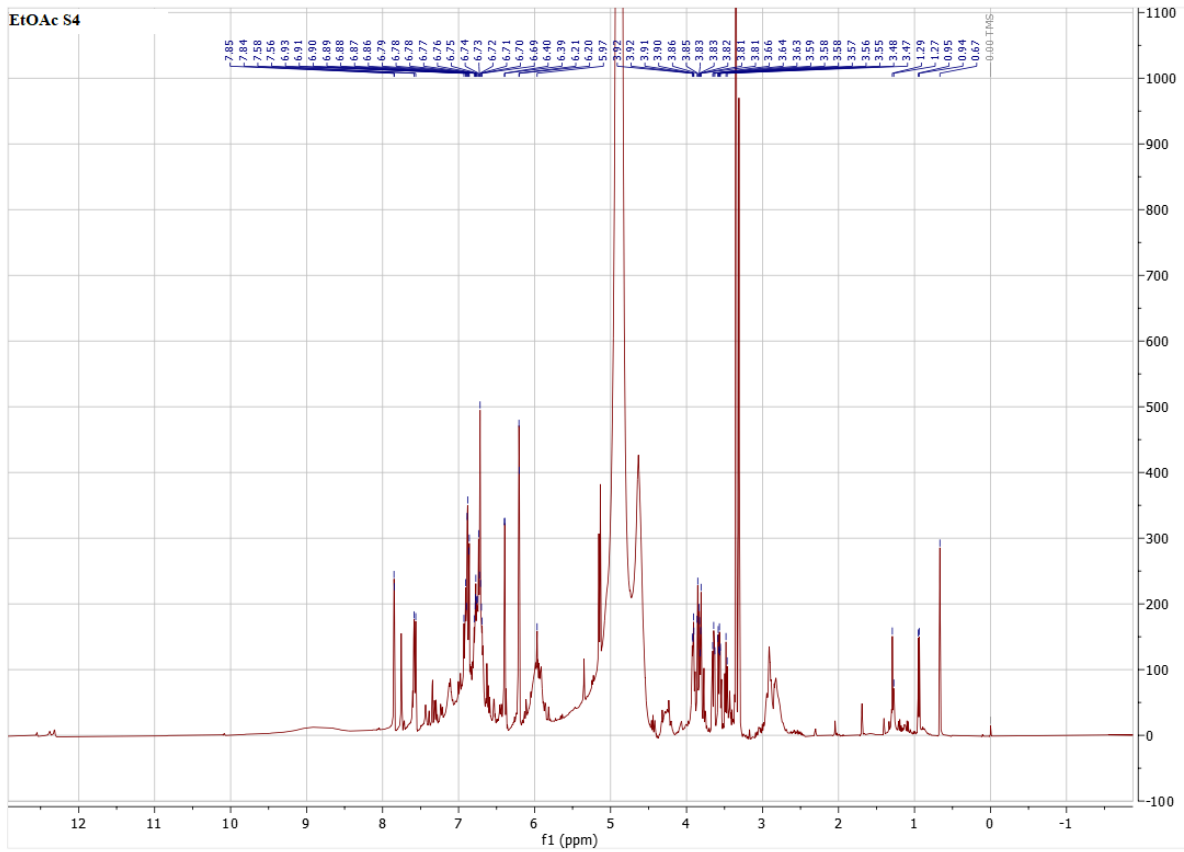
Spektrum 4: *H. maculatum* BuOH fraksjon 1H 400MHz



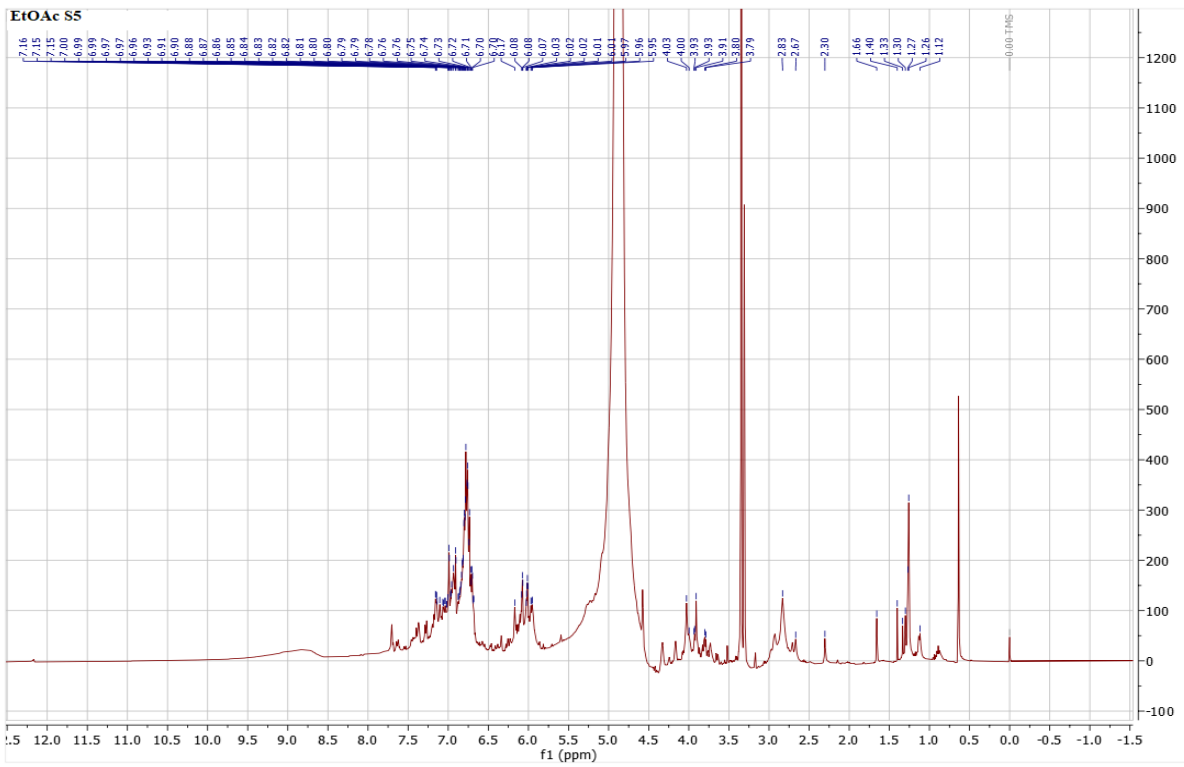
Spektrum 7: *H. maculatum* EtOAc S2 fraksjon 1H 400MHz

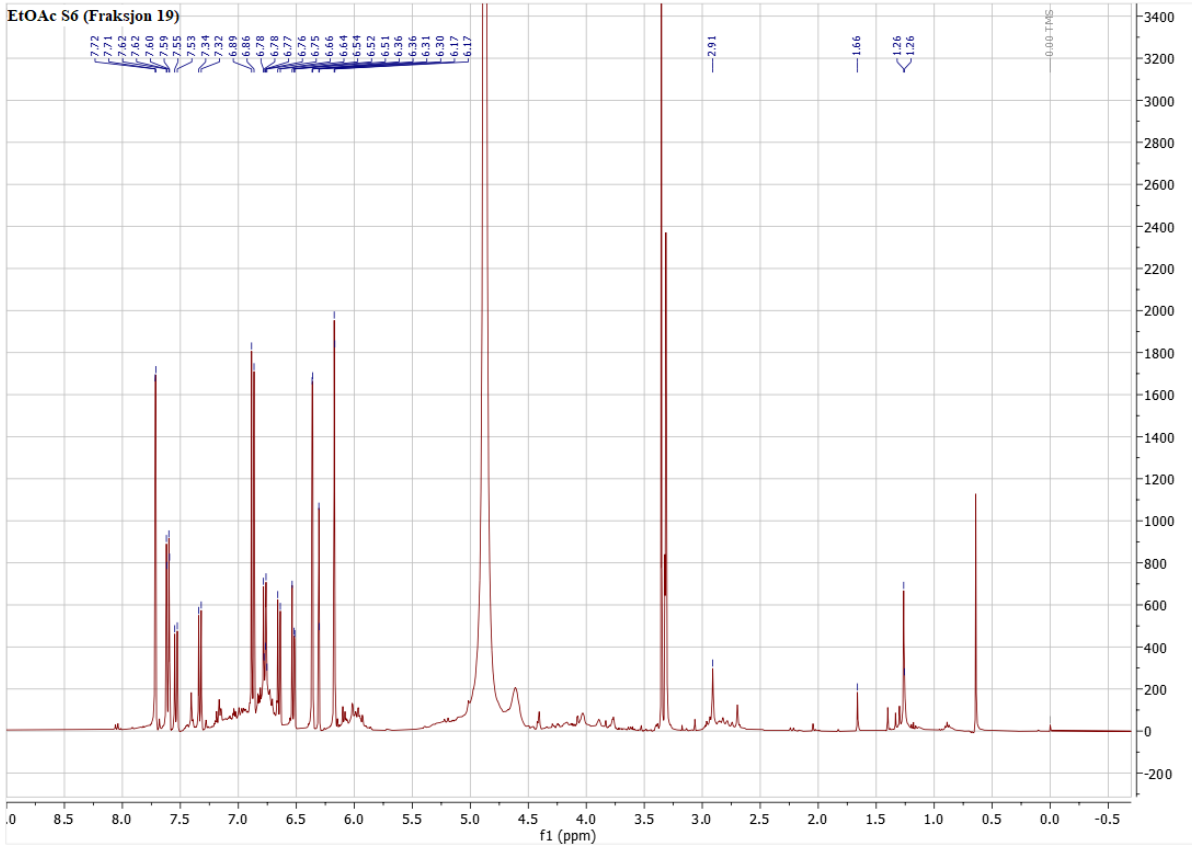


Spektrum 8: *H. maculatum* EtOAc S3 fraksjon 1H 400MHz

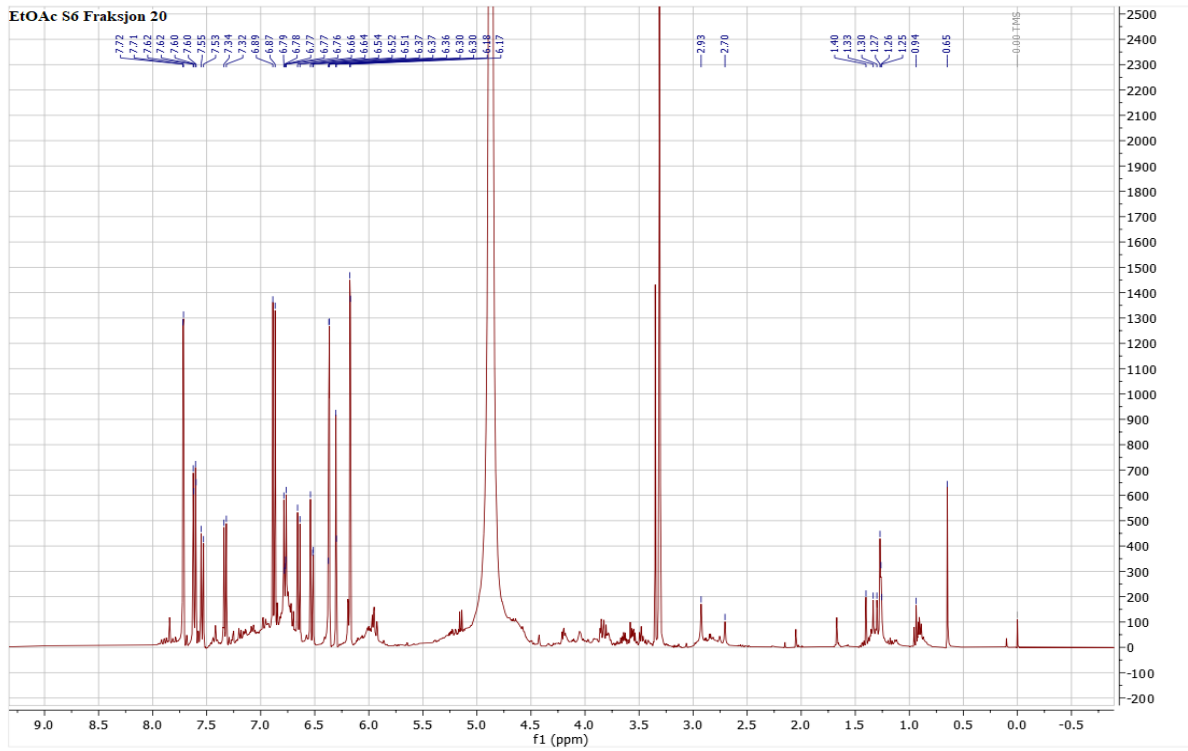


Spektrum 9: *H. maculatum* EtOAc S4 fraksjon 1H 400MHz

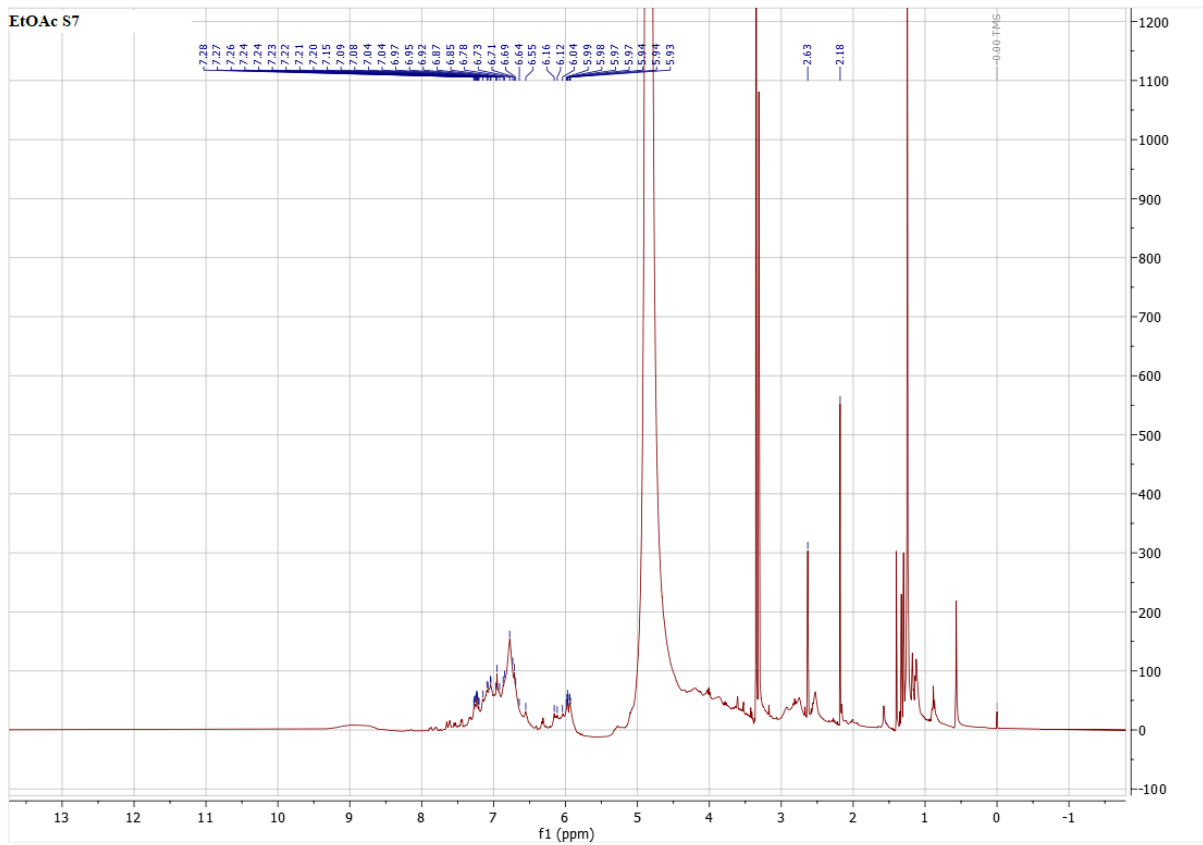




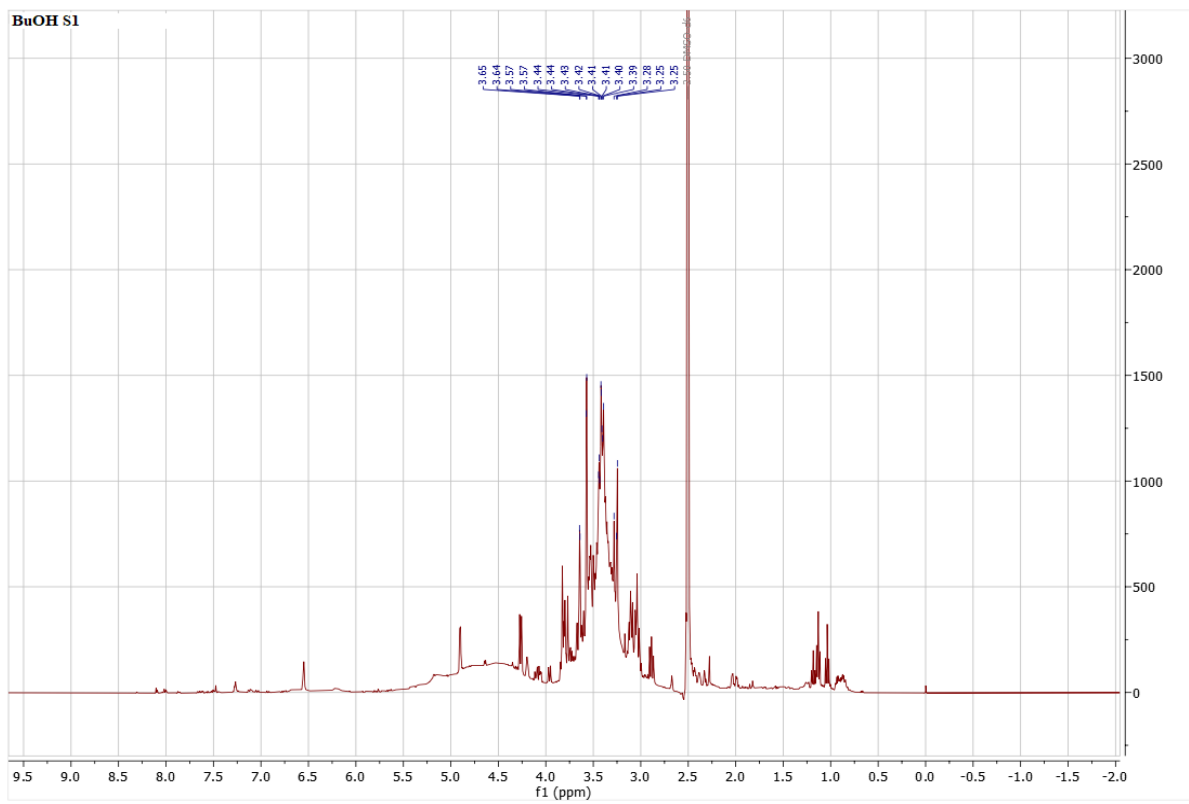
Spektrum 11: *H.maculatum* EtOAc S6 bestående av fraksjon 19 1H 400MHz



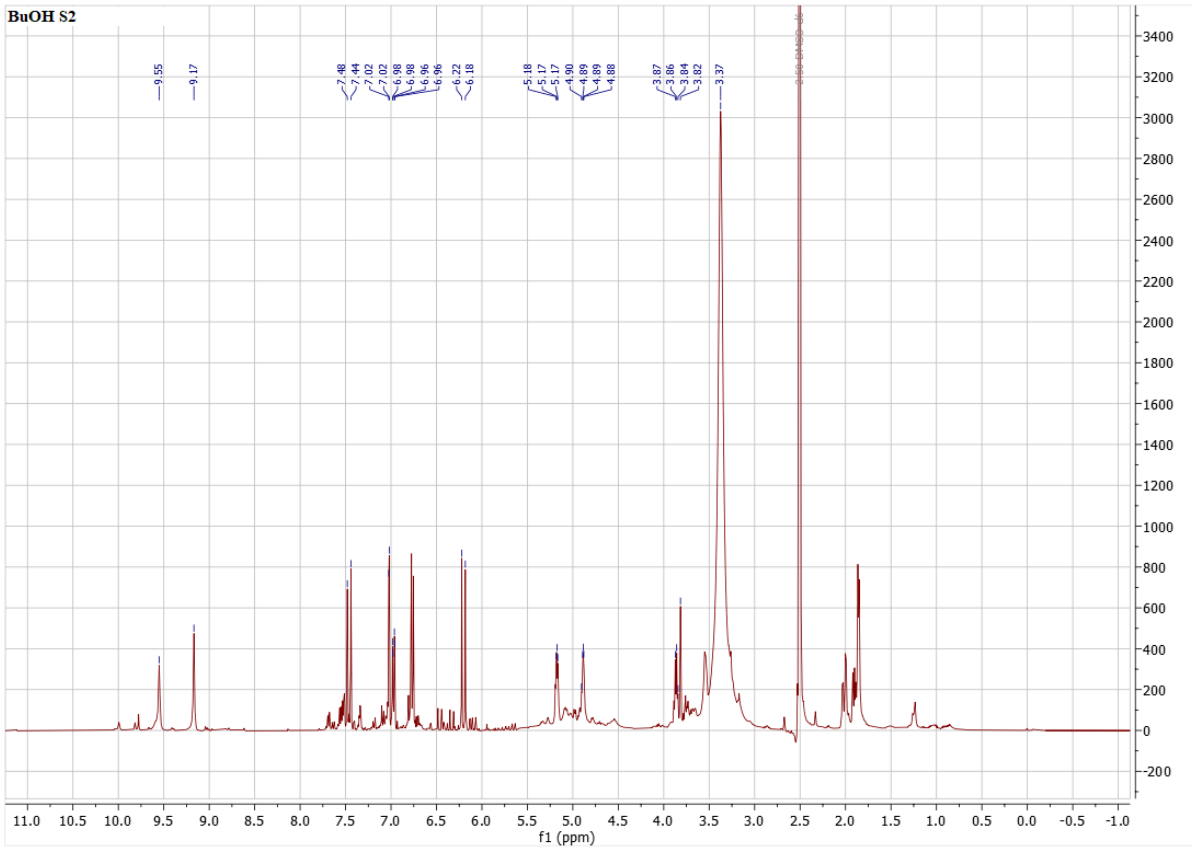
Spektrum 11: *H.maculatum* EtOAc S6 bestående av fraksjon 20 1H 400MHz



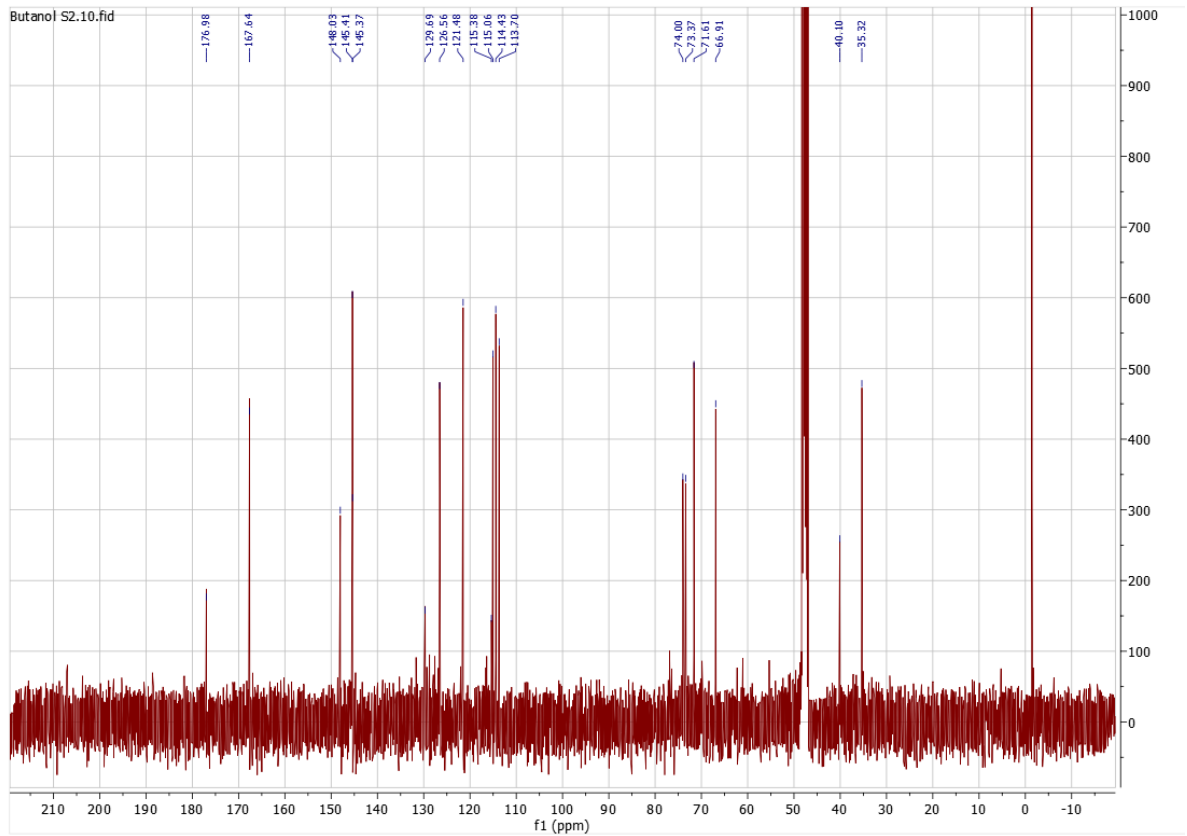
Spektrum 12: *H. maculatum* EtOAc S7 fraksjon 1H 400MHz



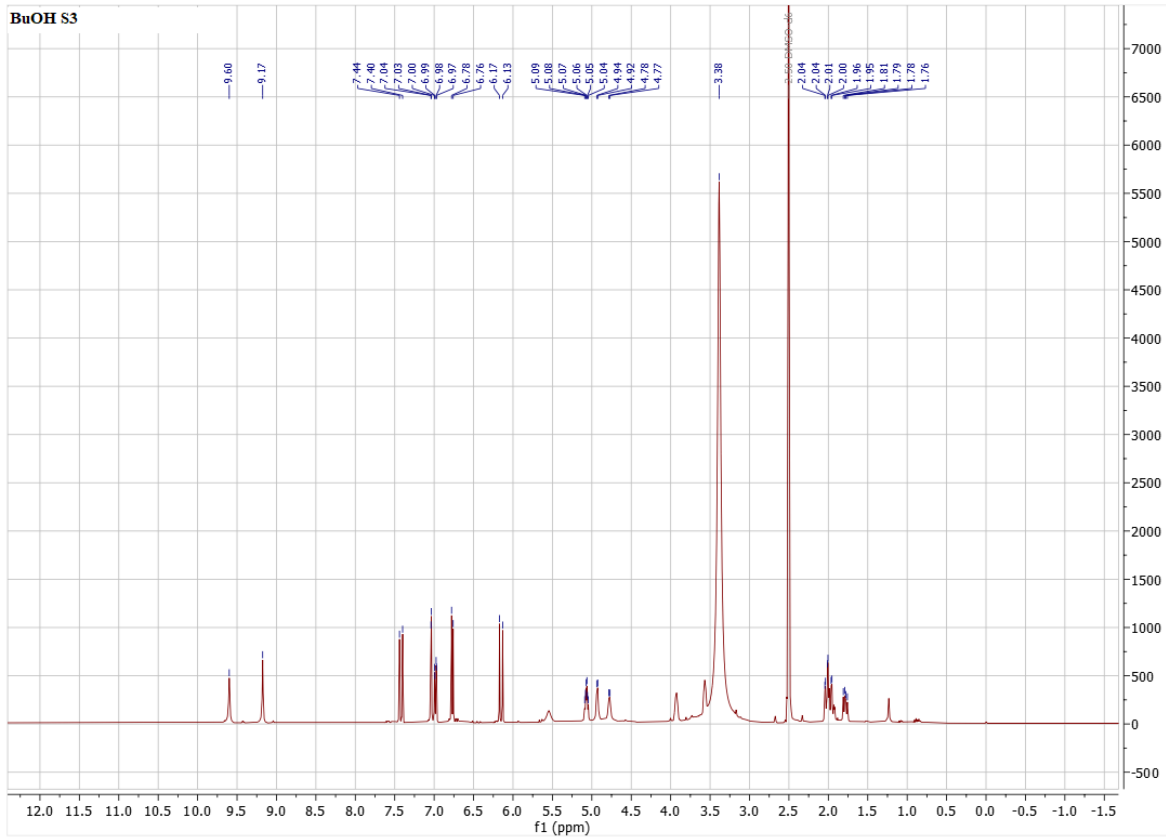
Spektrum 13: *H. maculatum* BuOH S1 fraksjon 1H 400MHz



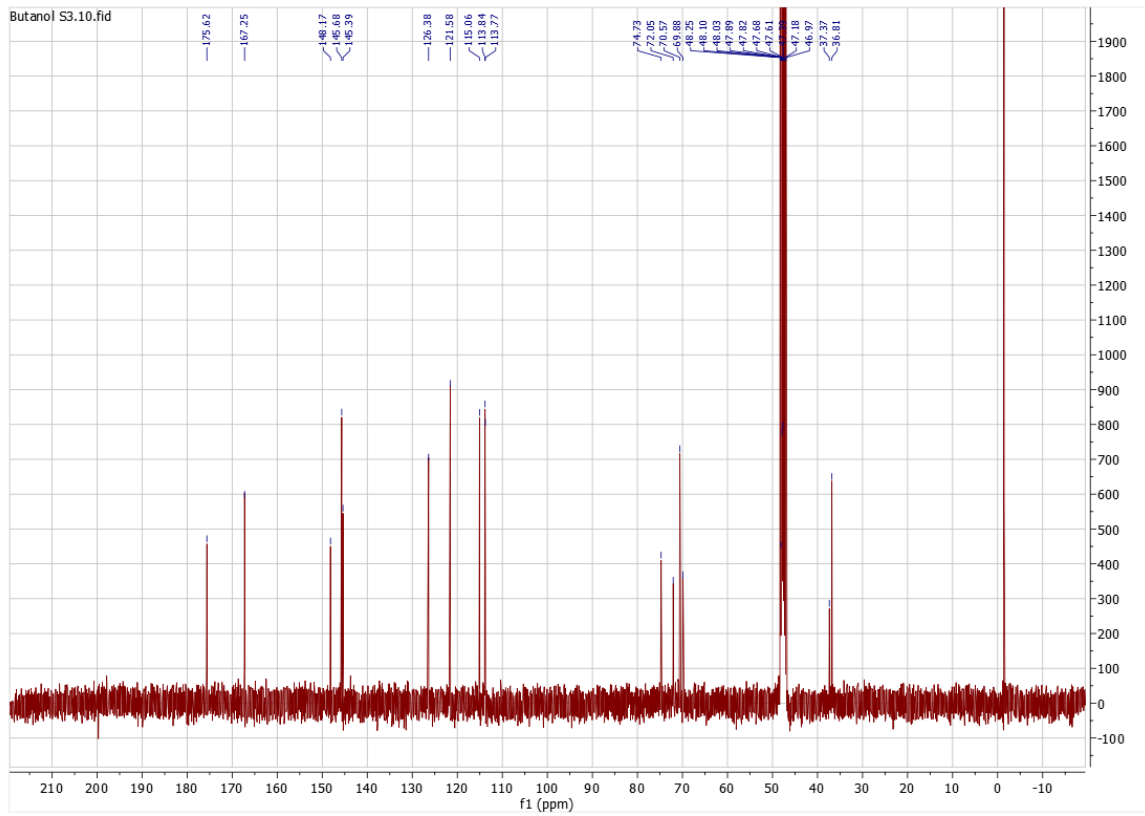
Spektrum 14H: *H. maculatum* BuOH S2 fraksjon 1H 400MHz



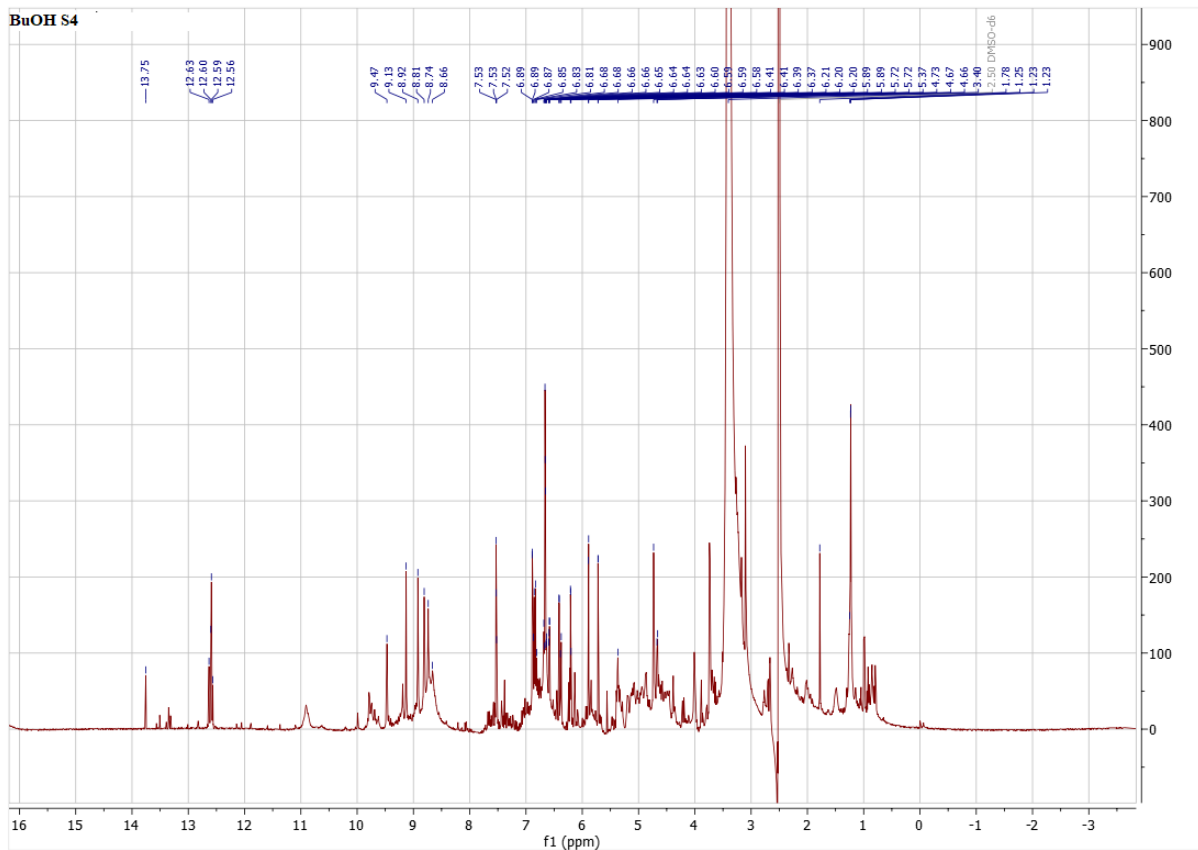
Spektrum 14C: *H. maculatum* BuOH S2 fraksjon ¹³C-NMR 400MHz



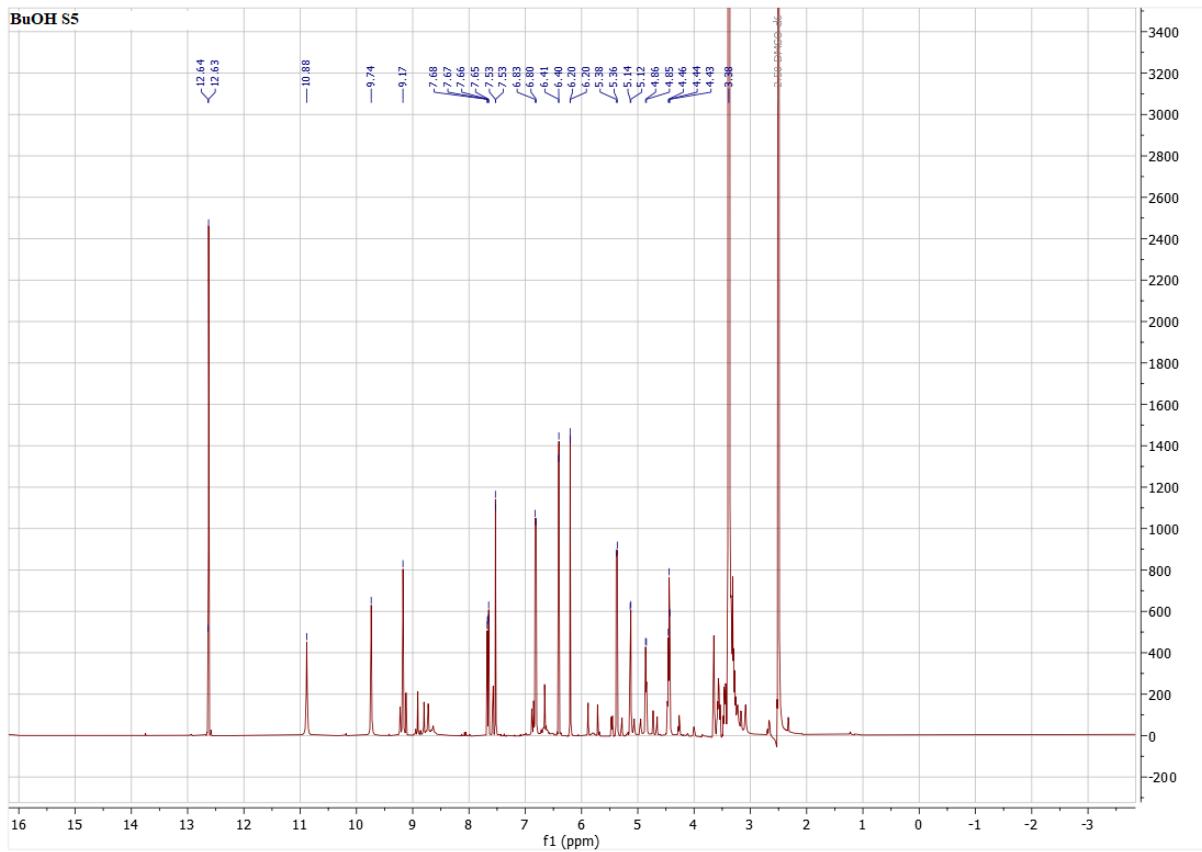
Spektrum 15H: *H.maculatum* BuOH S3 fraksjon 1H 400MHz



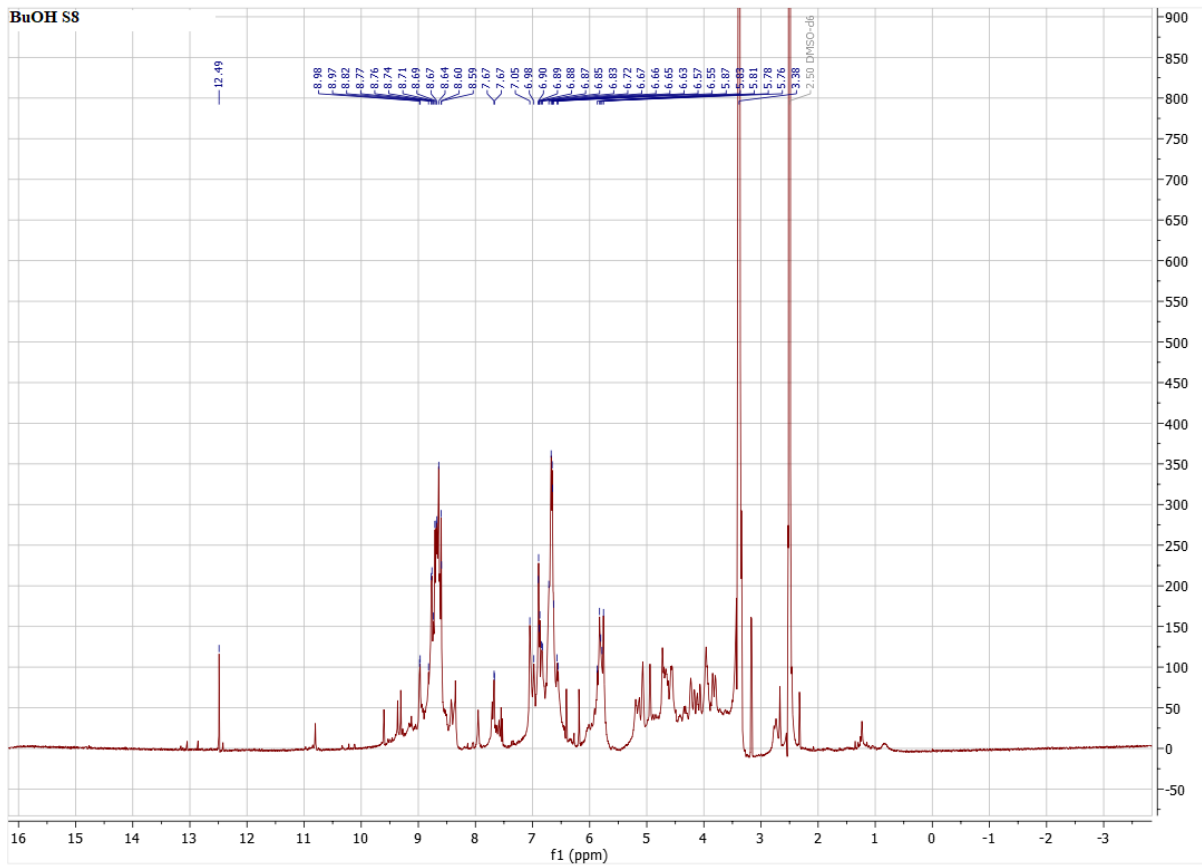
Spektrum 15C: *H.maculatum* BuOH S3 fraksjon ¹³C-NMR 400MHz



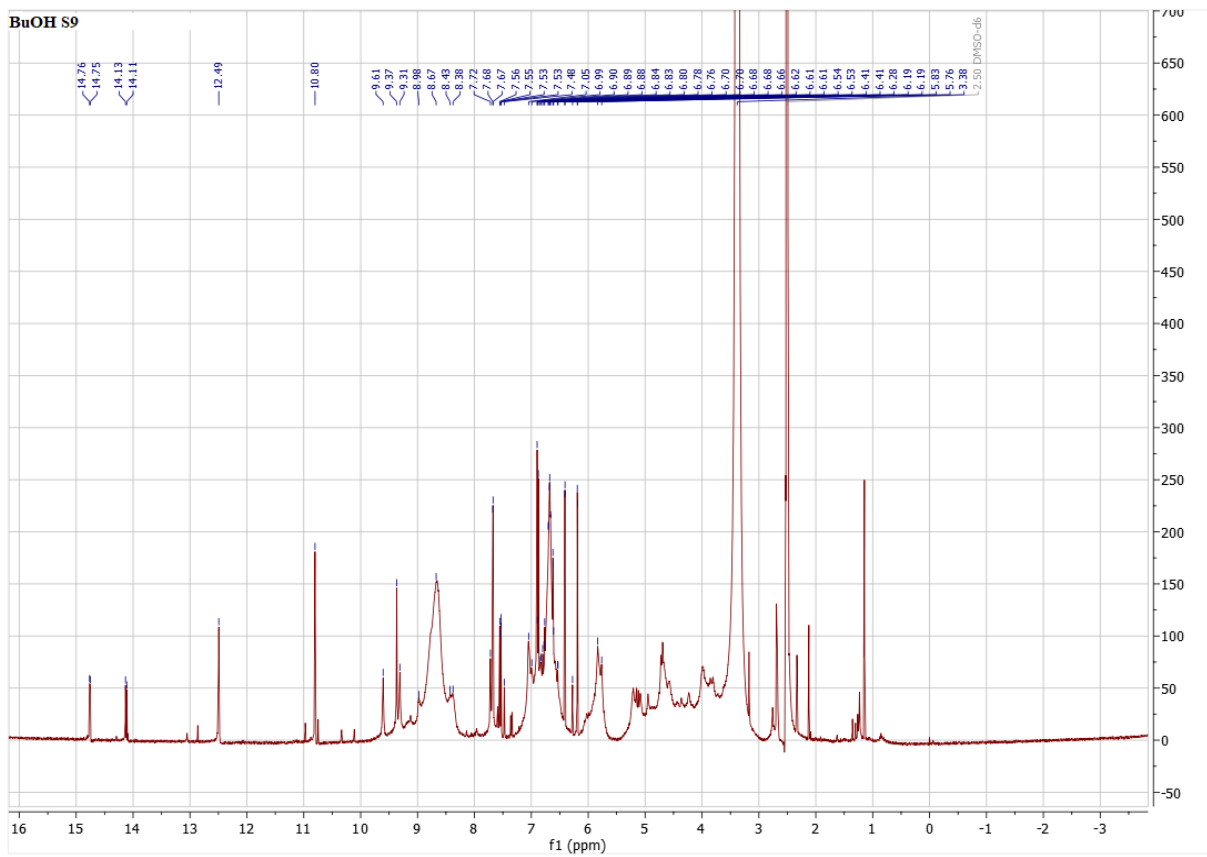
Spektrum 16: *H. maculatum* BuOH S4 fraksjon 1H 400MHz



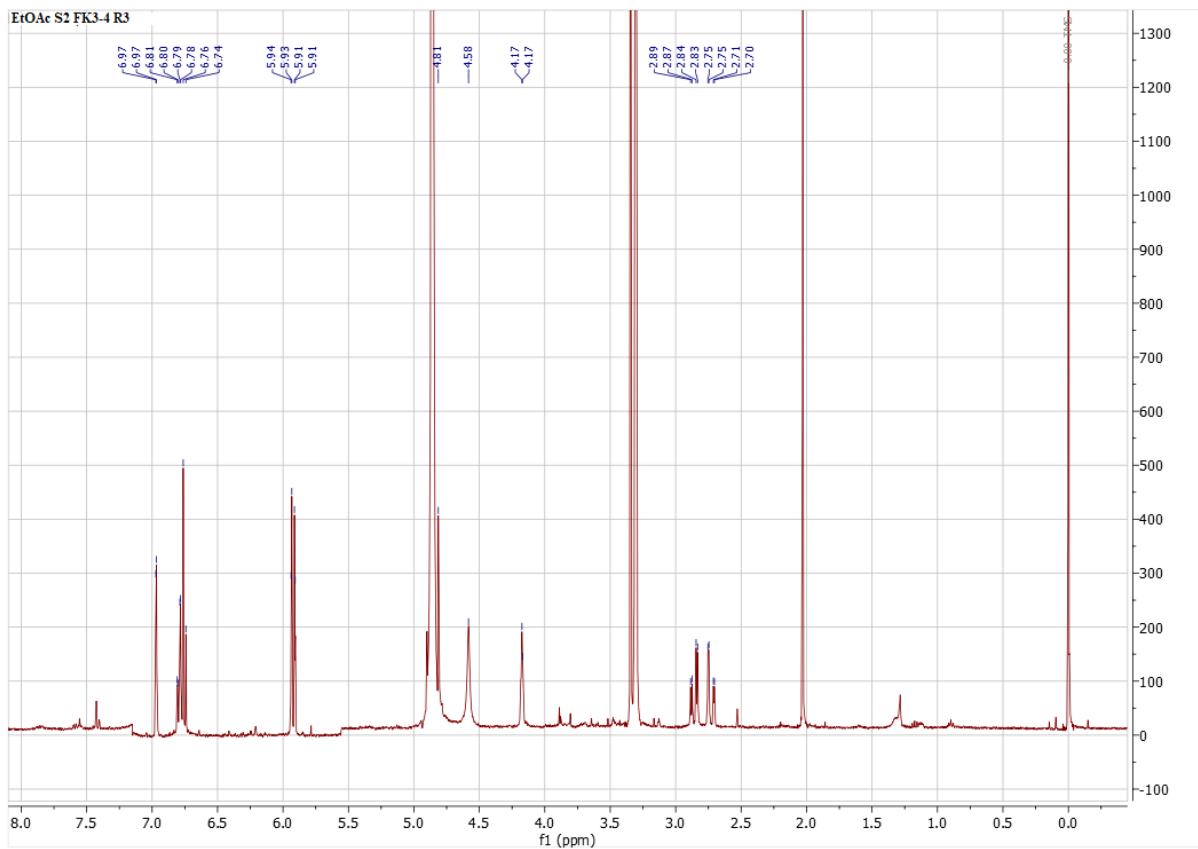
Spektrum 17: *H. maculatum* BuOH S5 fraksjon 1H 400MHz



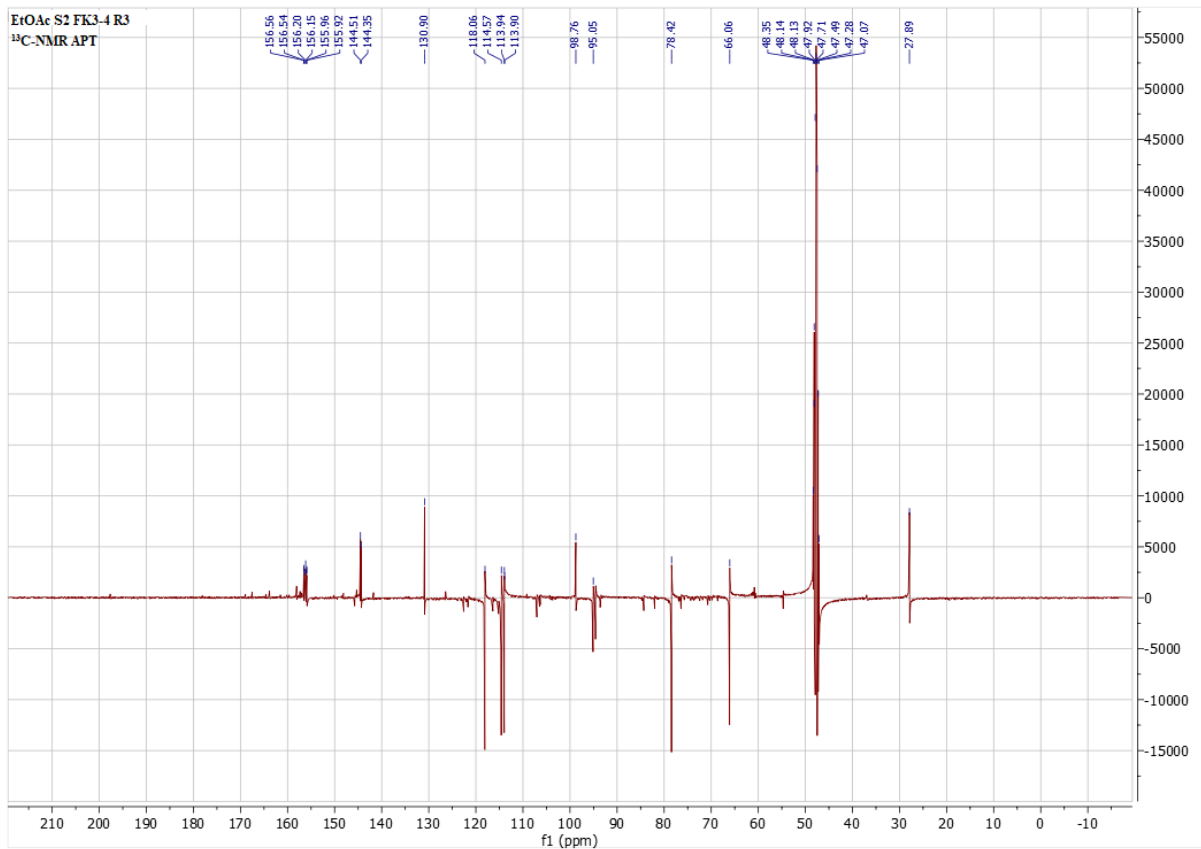
Spektrum 20: *H. maculatum* BuOH S8 fraksjon 1H 400MHz



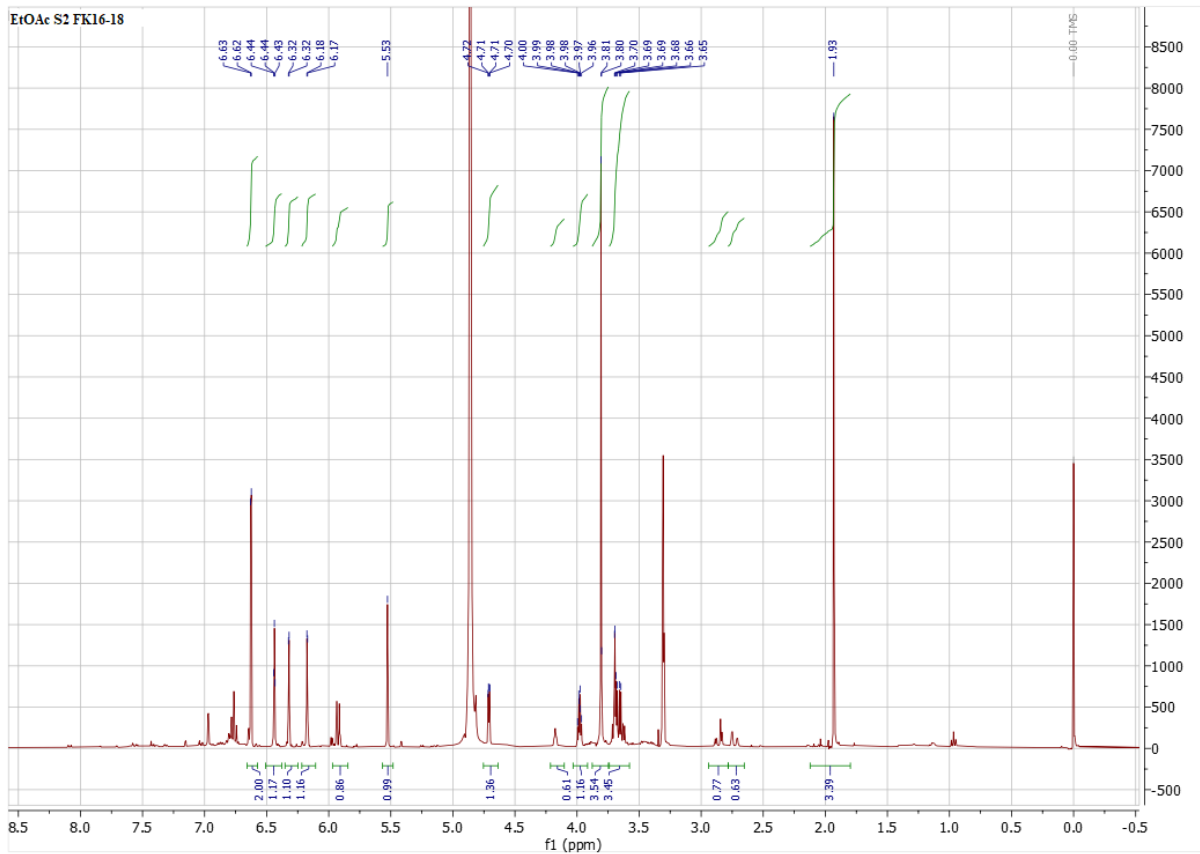
Spektrum 21: *H. maculatum* BuOH S9 fraksjon 1H 400MHz



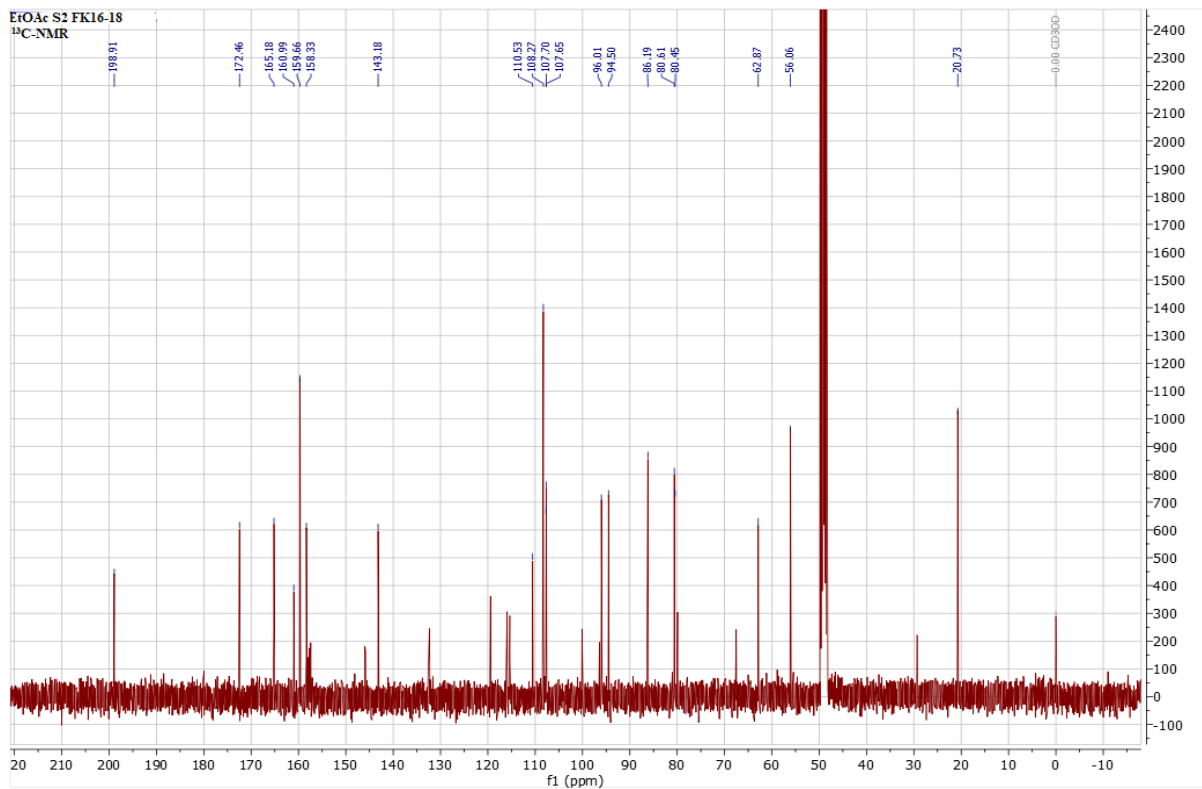
Spektrum 22H: *H. maculatum* EtOAc S2 FK3-4 R3 1H 400 MHz, Epicatechin



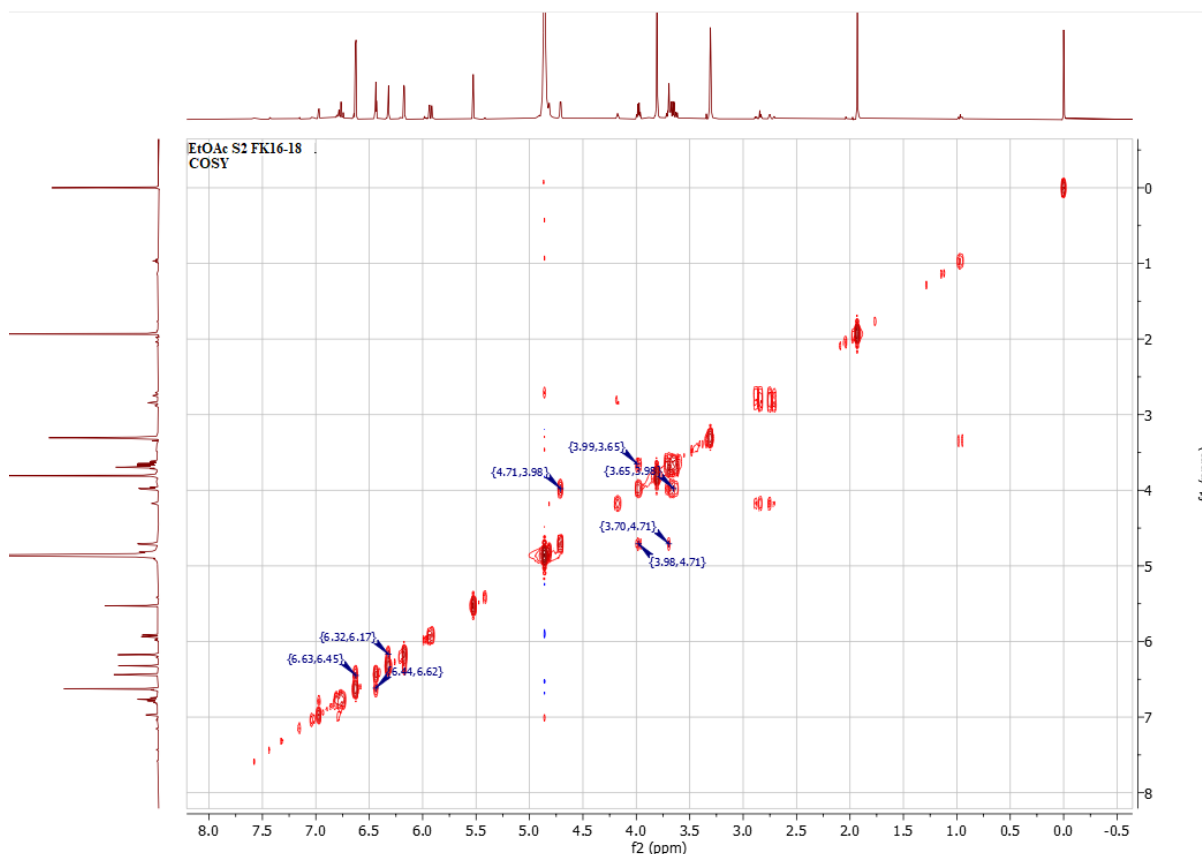
Spektrum 22C: *H. maculatum* EtOAc S2 FK3-4 R5 13C-NMR APT 400 MHz, Epicatechin



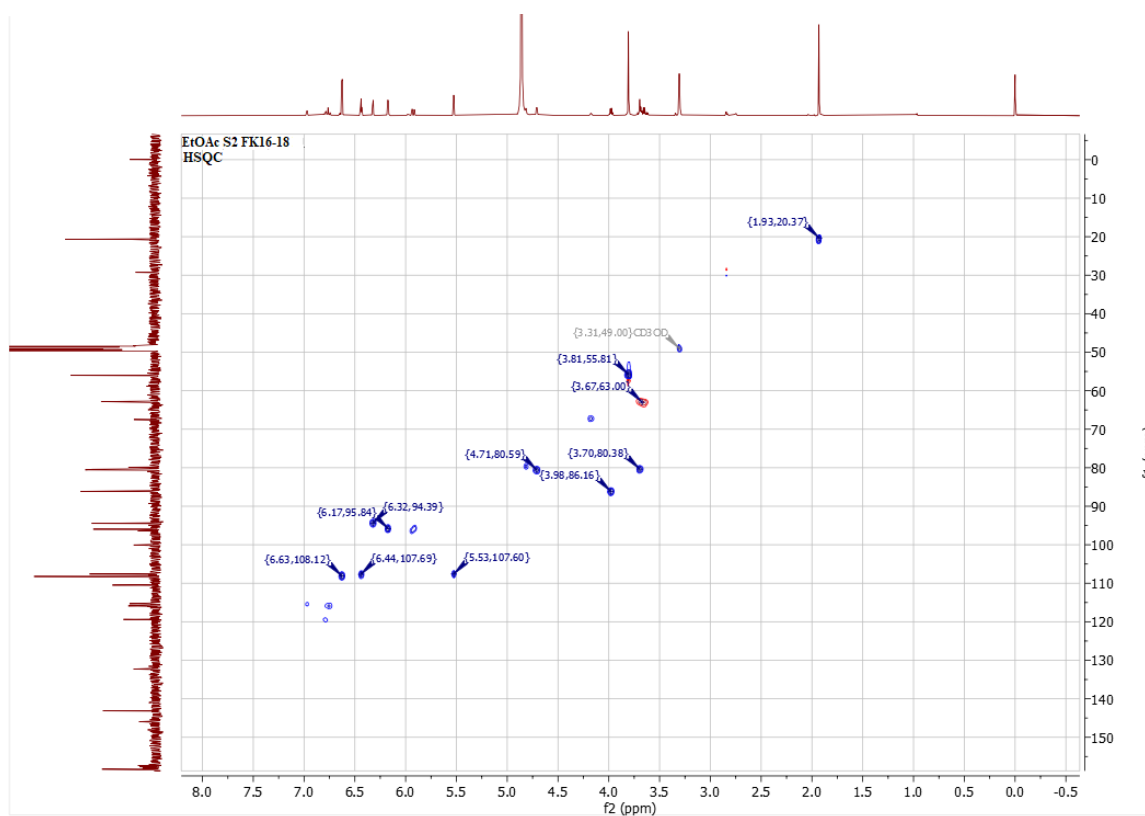
Spektrum 23H: *H. maculatum* EtOAc S2 FK16-18 fraksjon 1H 400 MHz



Spektrum 23C: *H. maculatum* EtOAc S2 FK16-18 fraksjon C-NMR 400 MHz



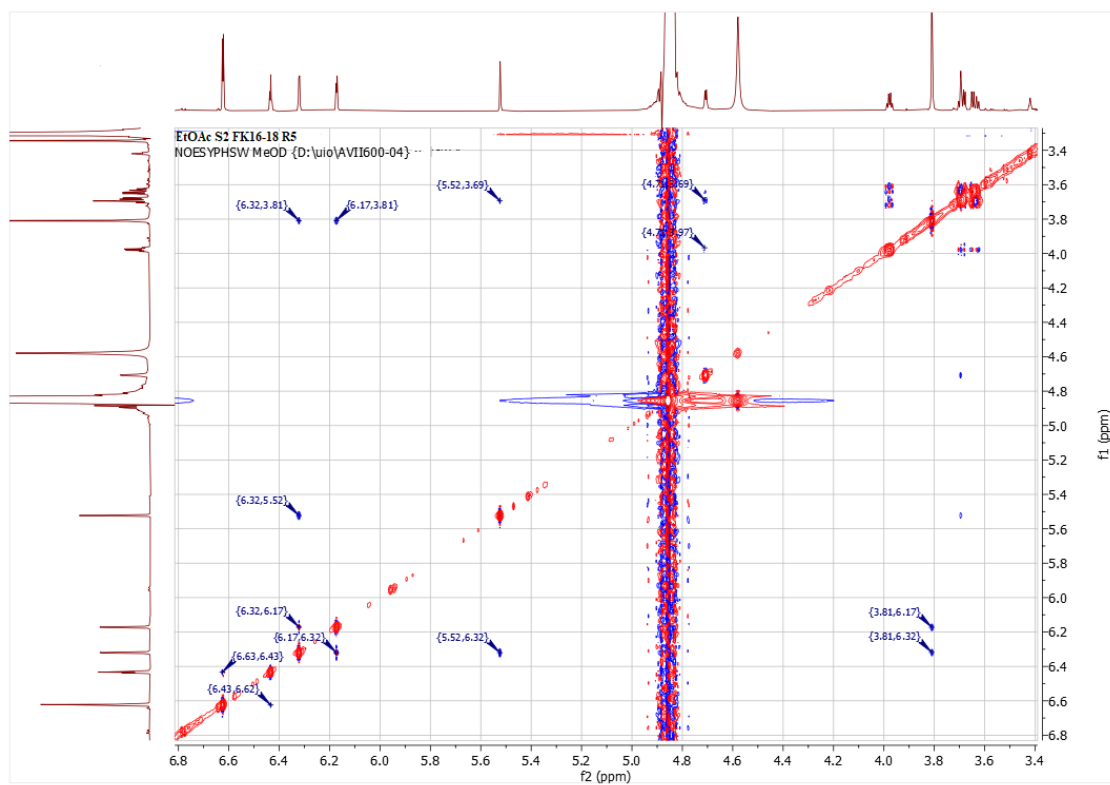
Spektrum 23COSY: *H. maculatum* EtOAc S2 FK16-18 fraksjon COSY 400 MHz



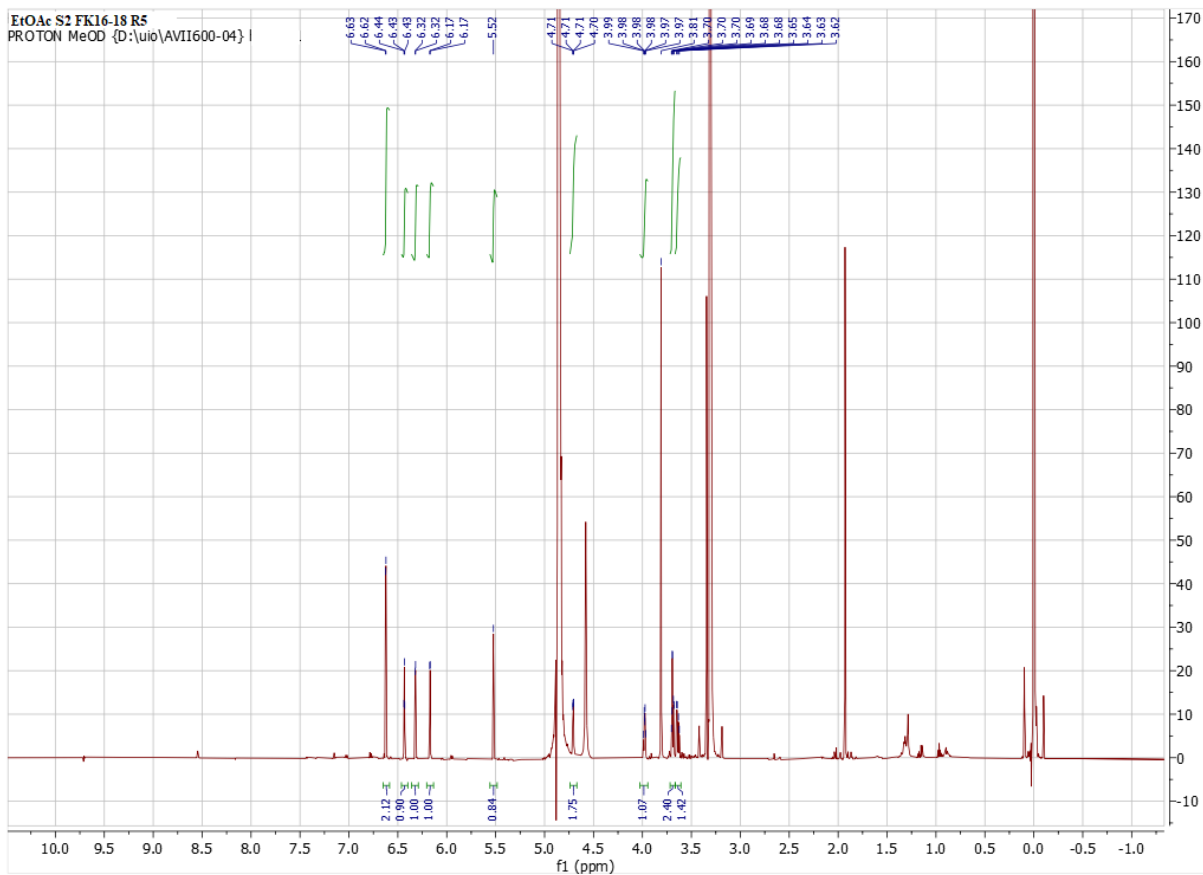
Spektrum 23HSQC: *H. maculatum* EtOAc S2 FK16-18 fraksjon HSQC 400 MHz



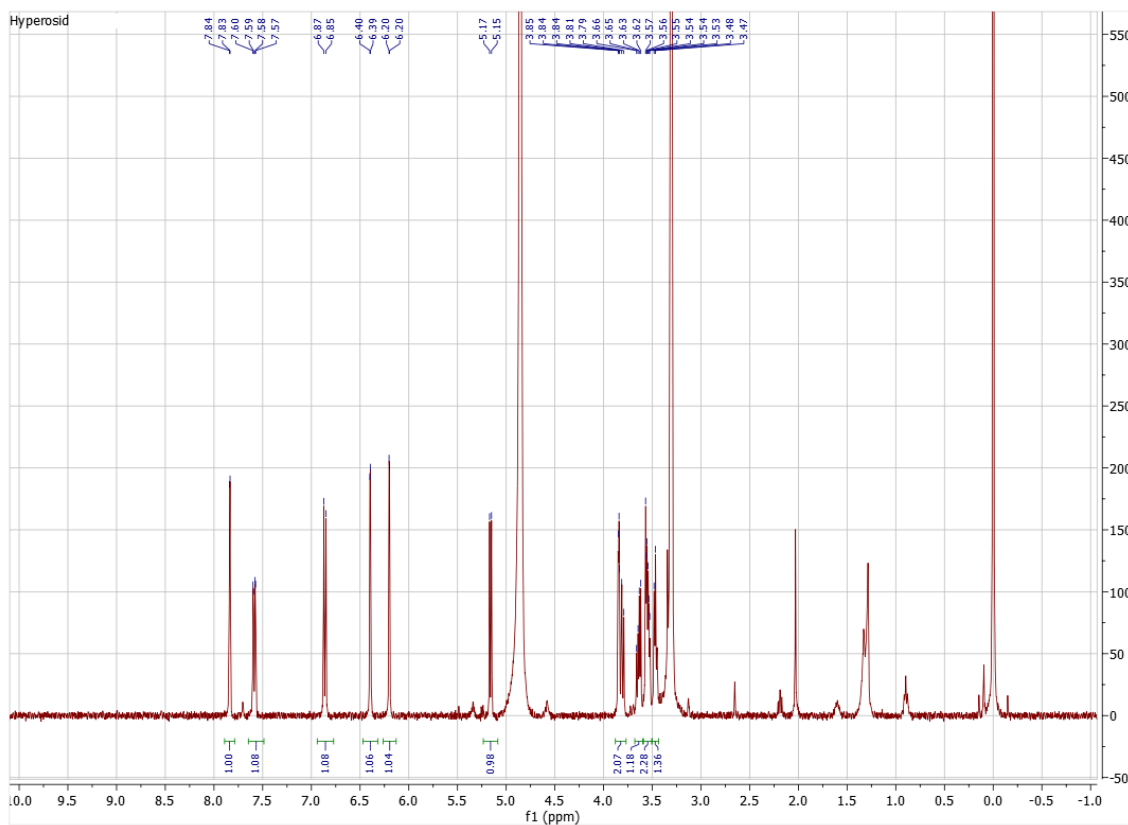
Spektrum 23HMBC: *H. maculatum* EtOAc S2 FK16-18 fraksjon HMBC 400 MHz



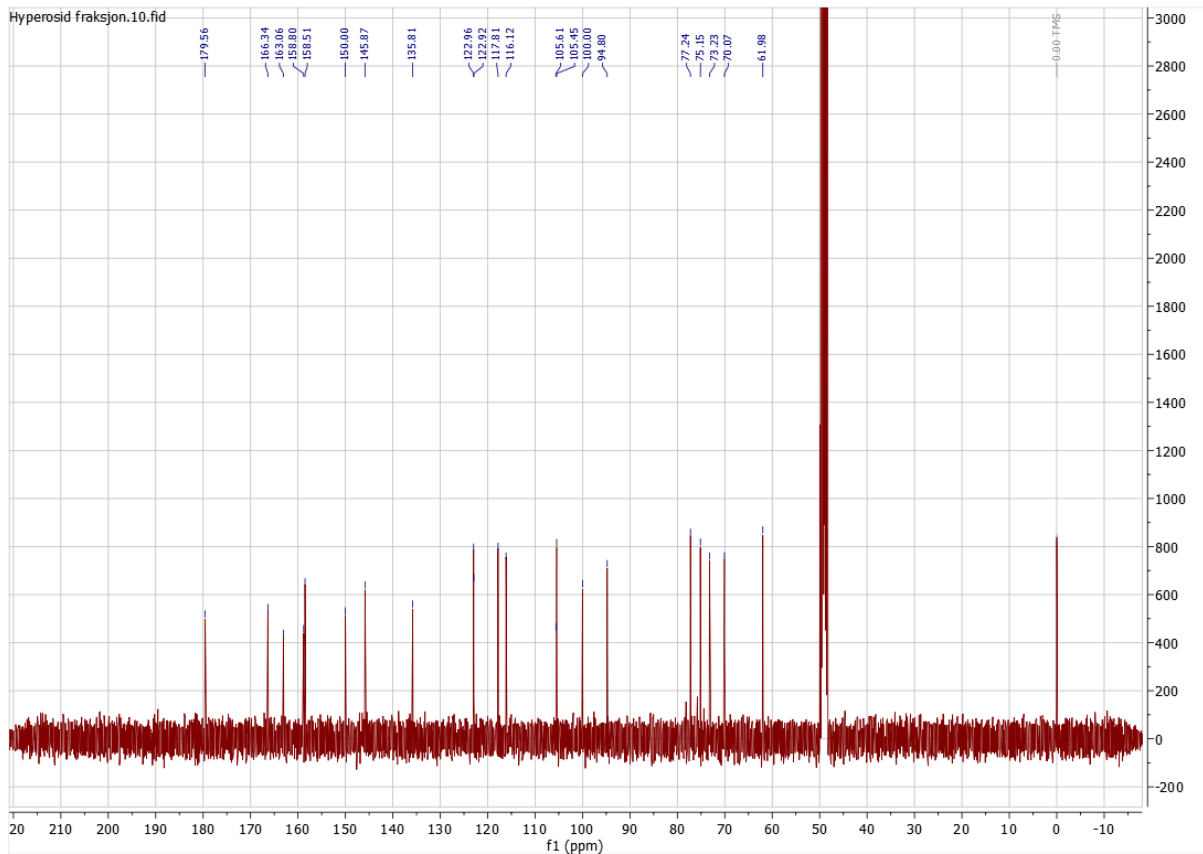
Spektrum 23NOESY: *H. maculatum* EtOAc S2 FK16-18 fraksjon NOESY 400 MHz



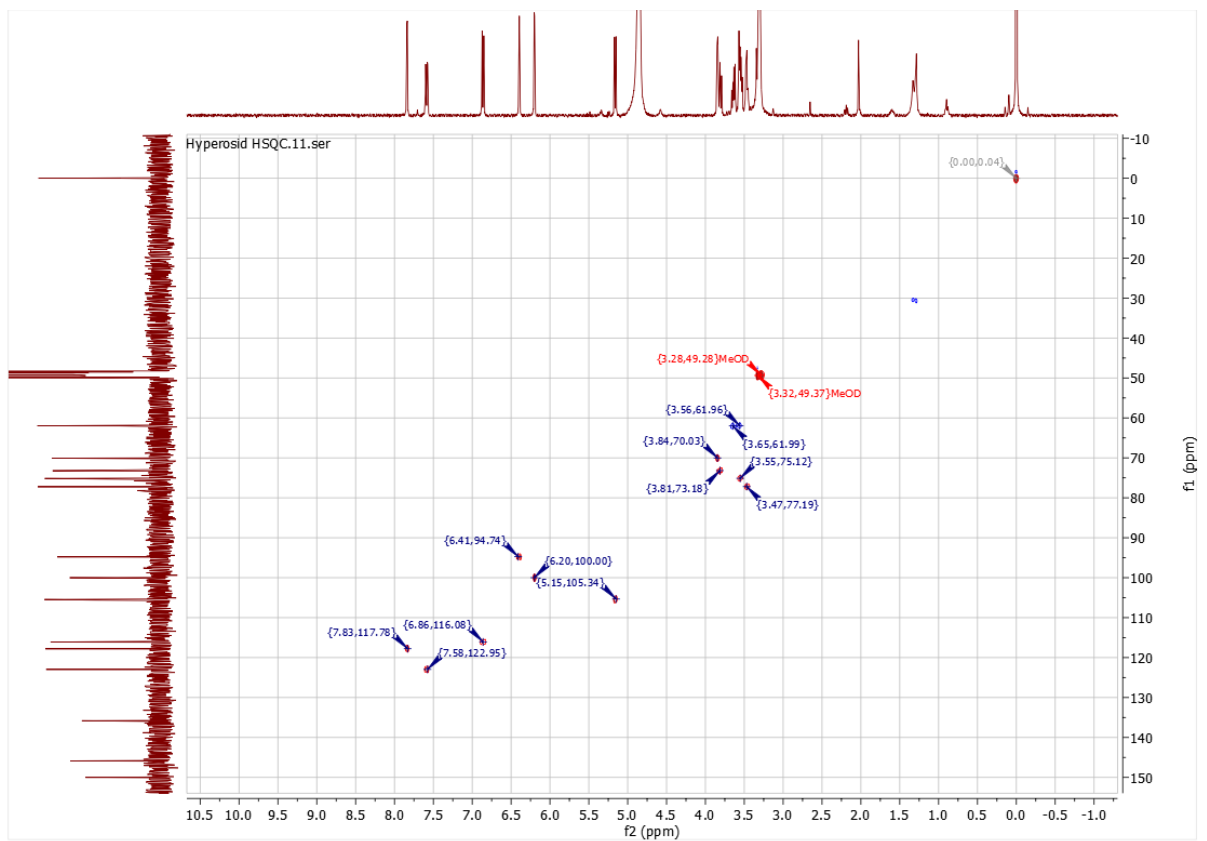
Spektrum 24: *H. maculatum* EtOAc S2 FK16-18 R5 fraksjon 1H 600 MHz



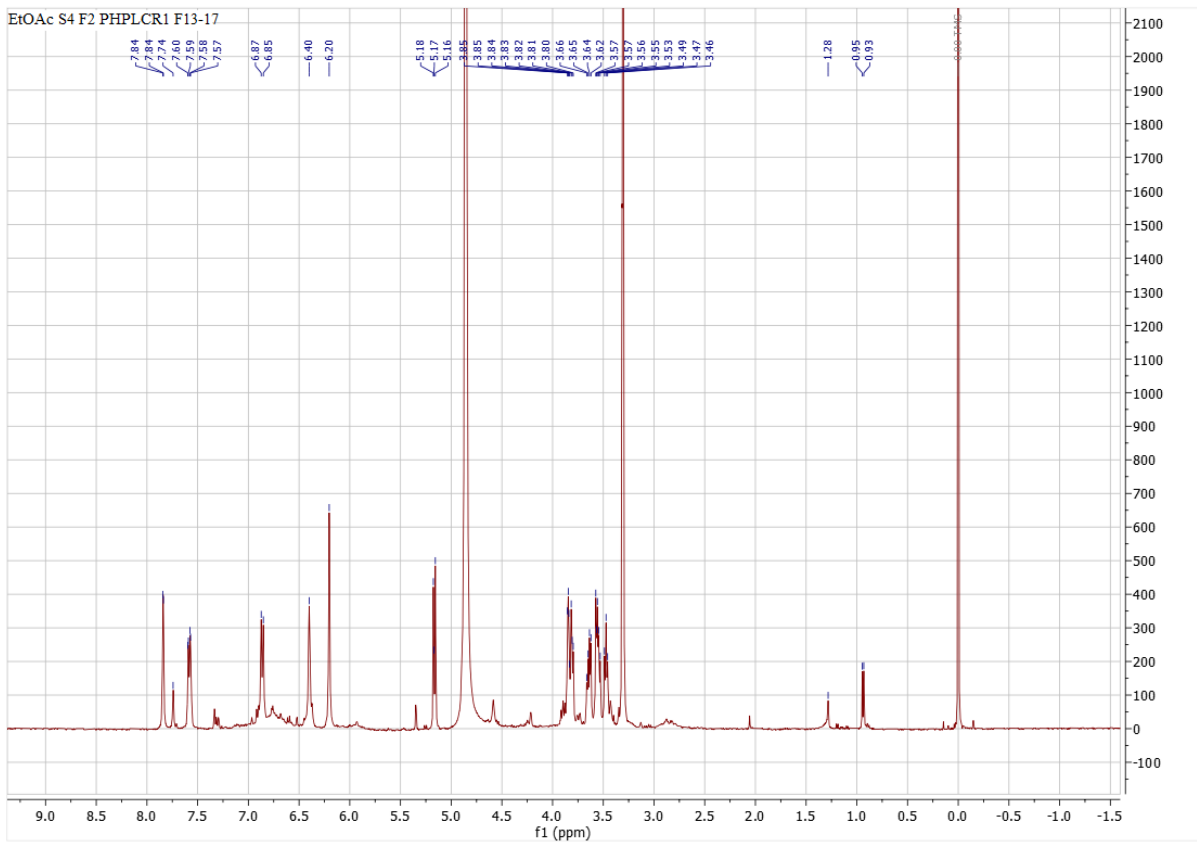
Spektrum 25H: *H. maculatum* hyperosid fraksjon 1H 400 MHz, Hyperosid



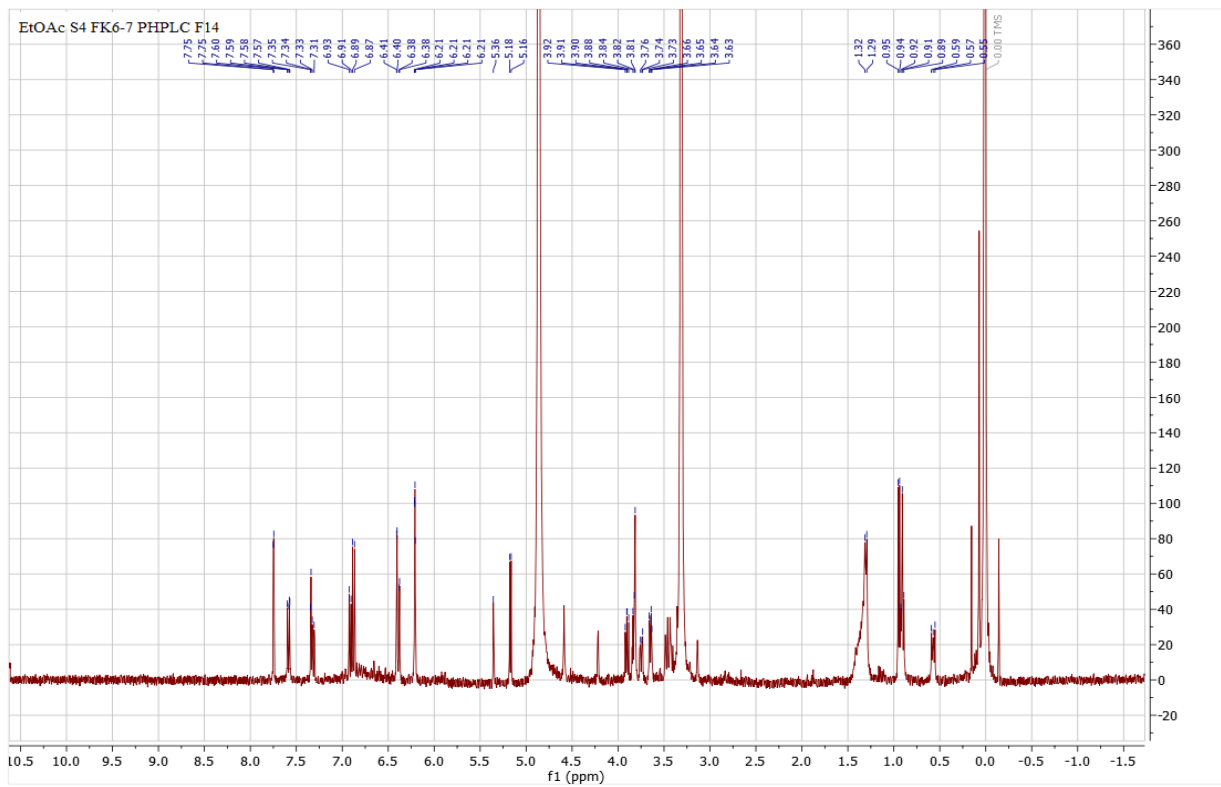
Spektrum 25C: *H. maculatum* hyperosid fraksjon ^{13}C -NMR 400 MHz, Hyperosid



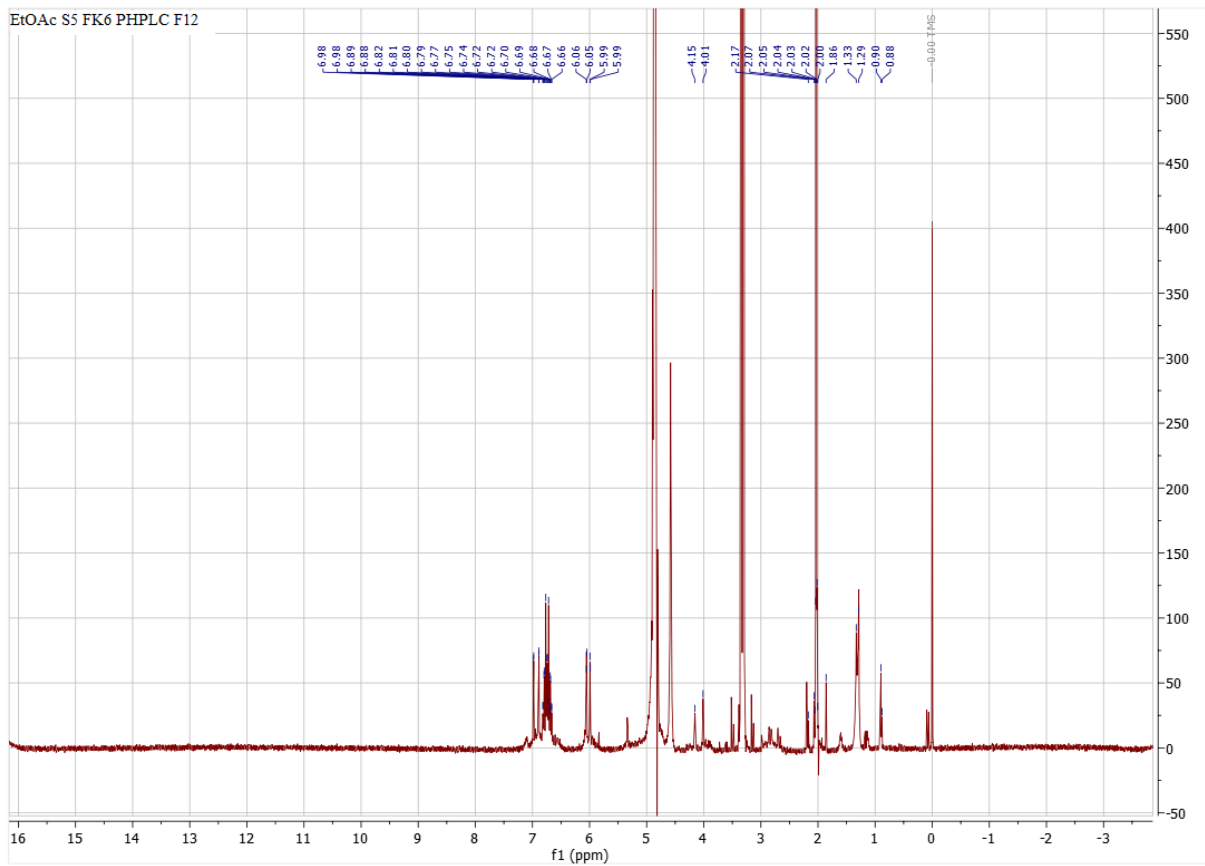
Spektrum 25HSQC: *H. maculatum* hyperosid fraksjon HSQC 400 MHz, Hyperosid



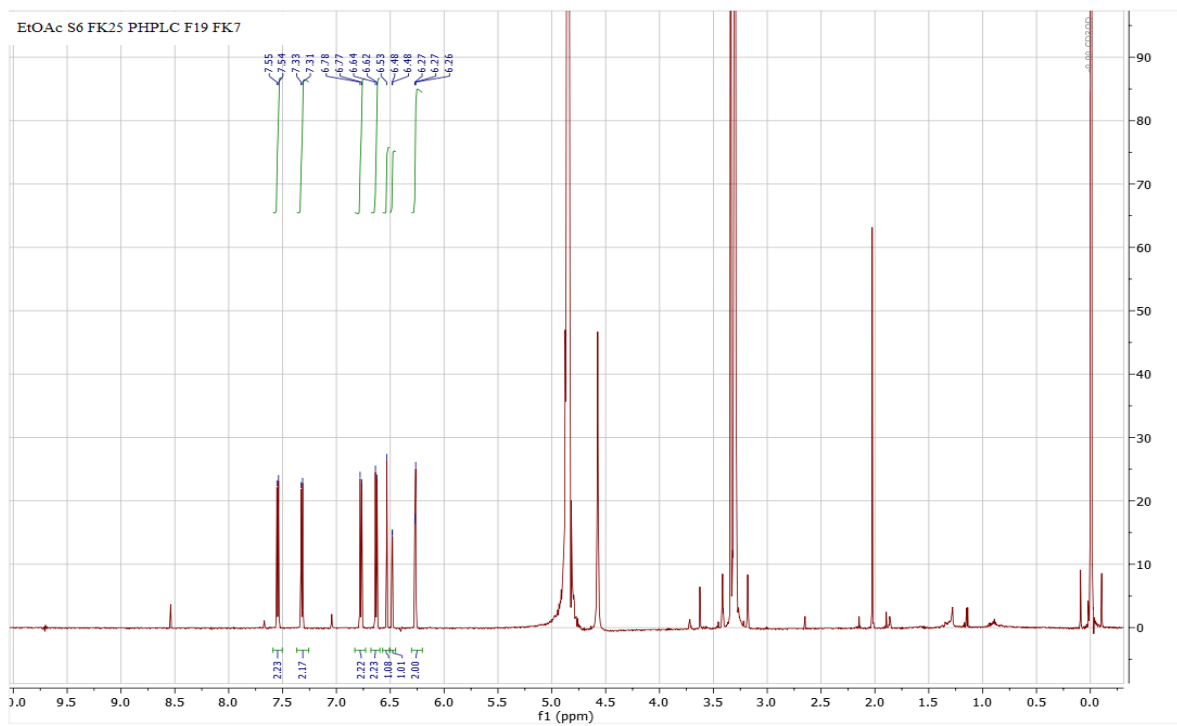
Spektrum 26: *H. maculatum* EtOAc S4 F2 PHPLCR1 F13-17 fraksjon 1H 400 MHz, Hyperosid og Quercitrin



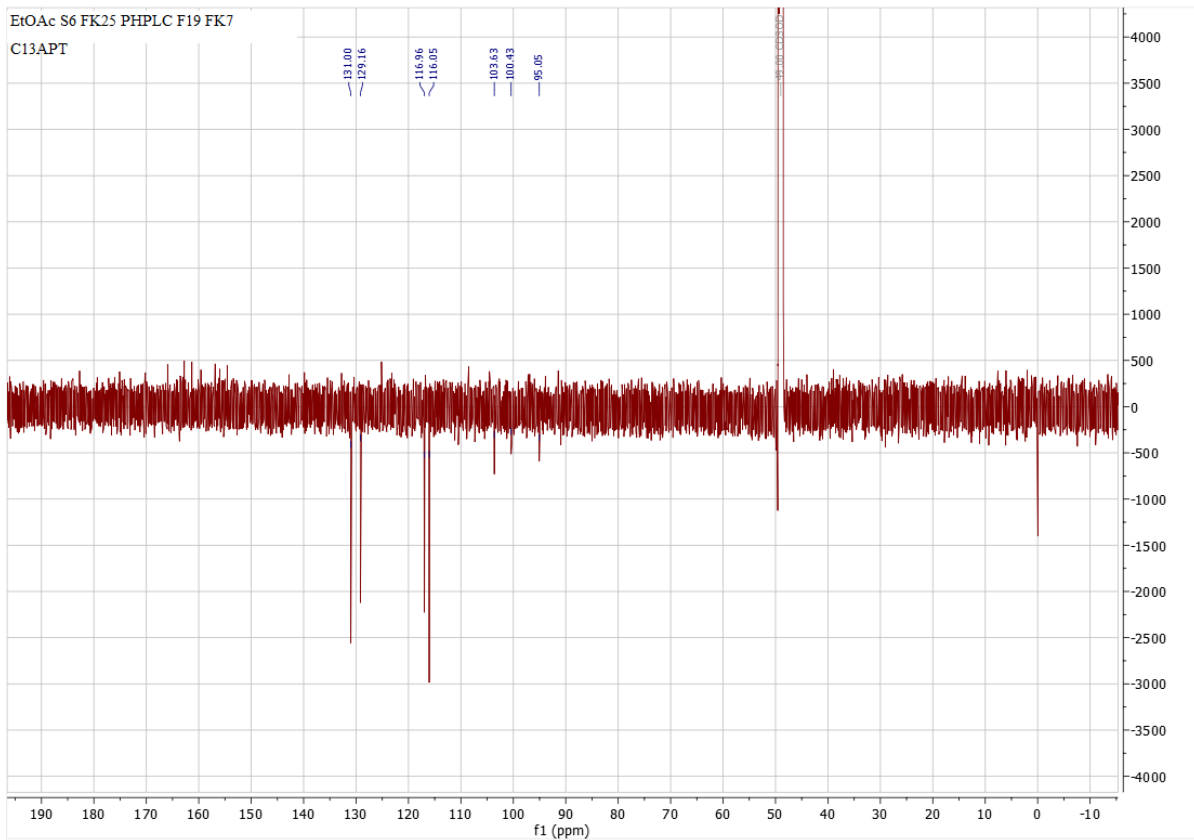
Spektrum 27: *H. maculatum* EtOAc S4 FK6-7 PHPLC F14 fraksjon 1H 400 MHz, Guaijaverin



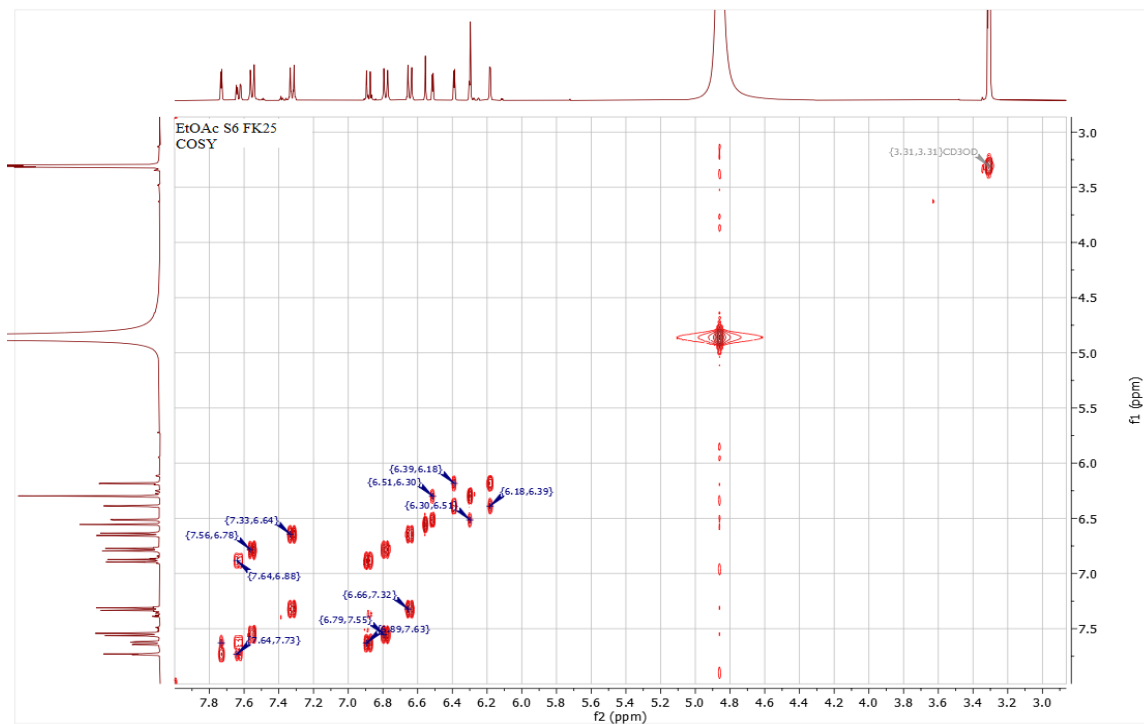
Spektrum 28: *H. maculatum* EtOAc S5 FK6 PHPLC F12 fraksjon 1H 400 MHz, Procyanidin B2



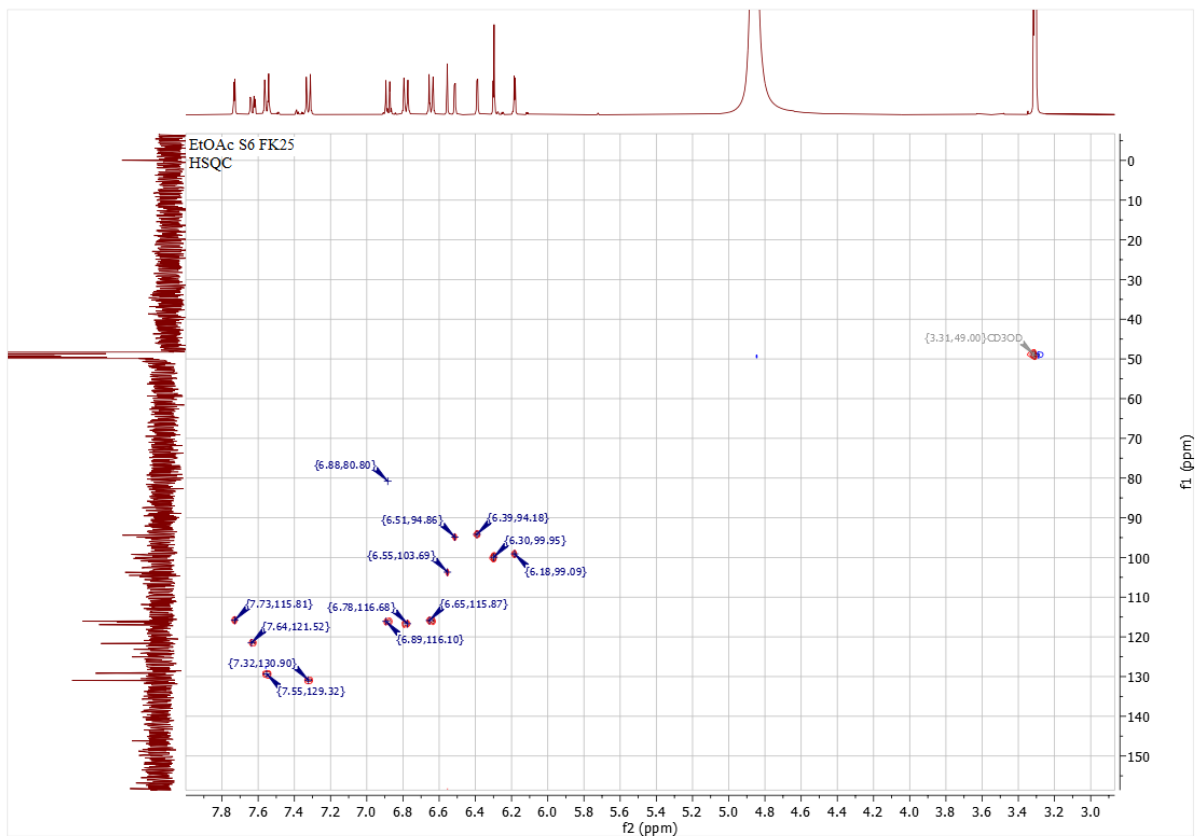
Spektrum 29H: *H. maculatum* EtOAc S6 FK25 PHPLC F19 FK7 fraksjon 1H 600 MHz, Biapigenin



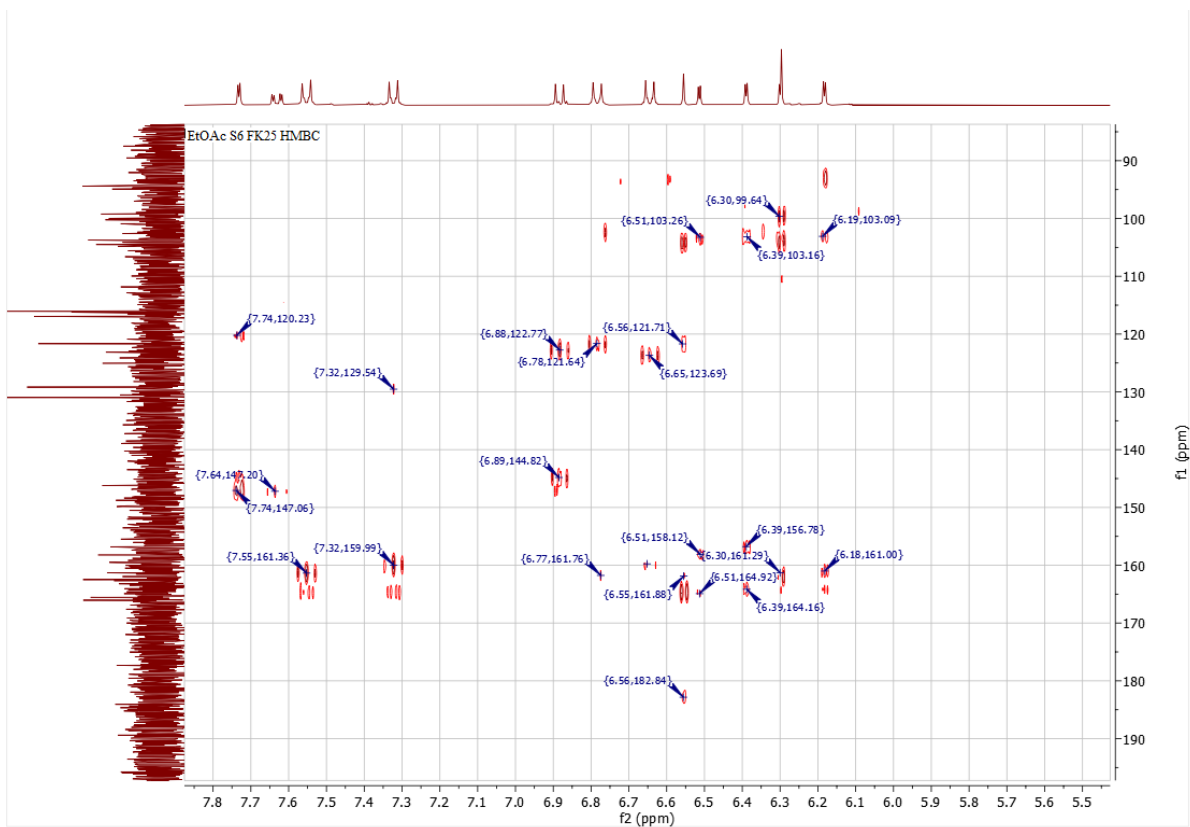
Spektrum 29C: *H. maculatum* EtOAc S6 FK25 PHPLC F19 FK7 fraksjon CAPT 600 MHz, Biapigenin



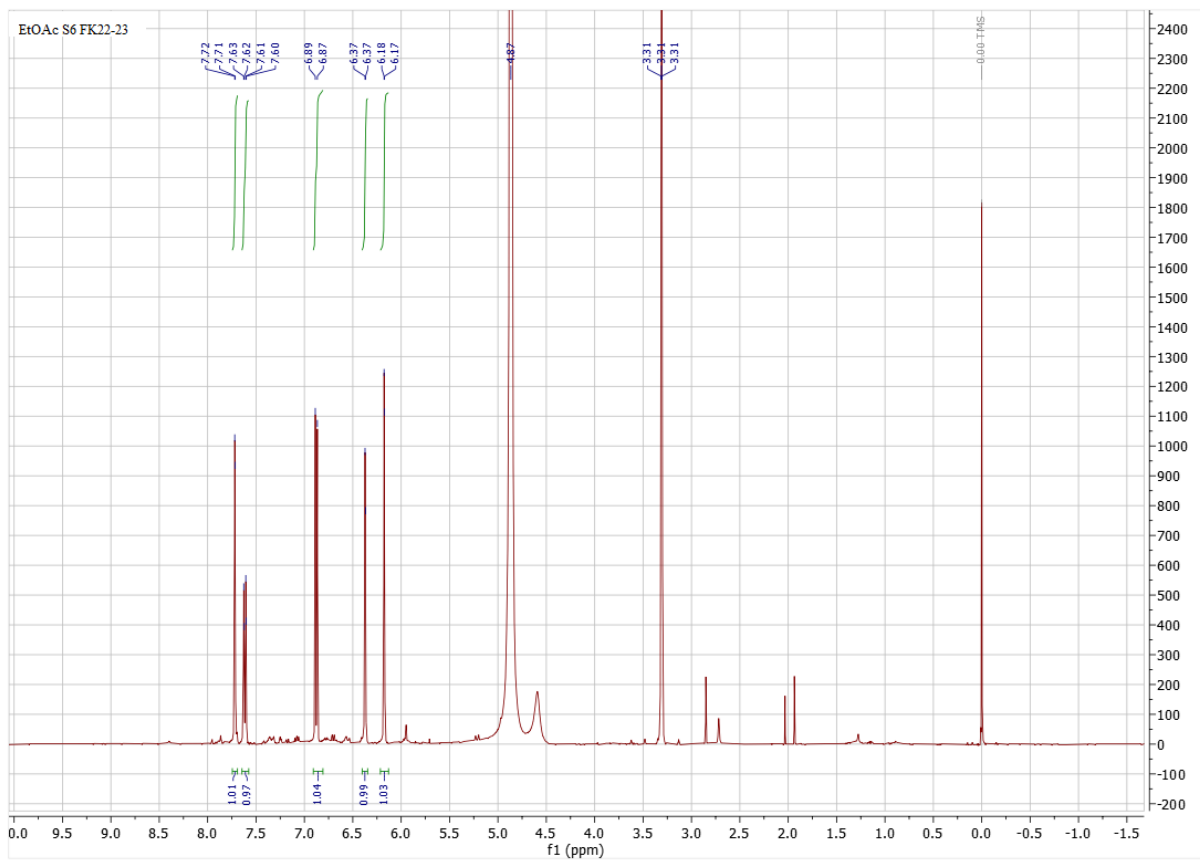
Spektrum 30COSY: *H. maculatum* EtOAc S6 FK25 fraksjon COSY 400 MHz, Biapigenin og quercetin



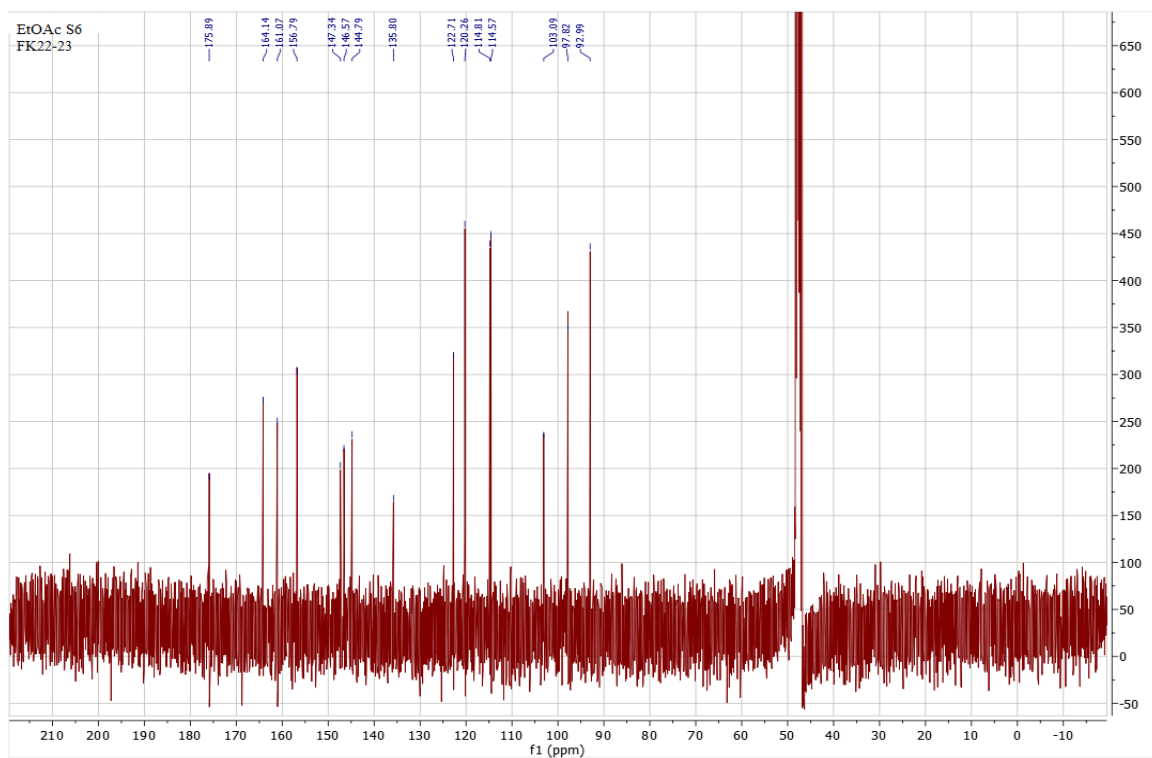
Spektrum 30HSQC: *H. maculatum* EtOAc S6 FK25 fraksjon HSQC 400 MHz, Biapigenin og quercetin



Spektrum 30HMBC: *H. maculatum* EtOAc S6 FK25 fraksjon HMBC 400 MHz, Biapigenin og quercetin

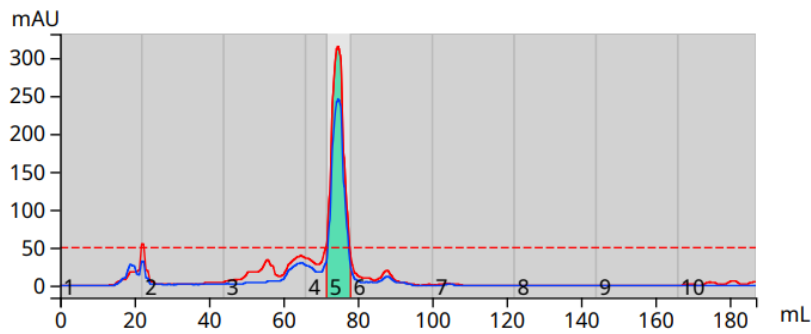


Spektrum 31H: *H. maculatum* EtOAc S6 FK22-23 fraksjon 1H 400 MHz, Quercetin

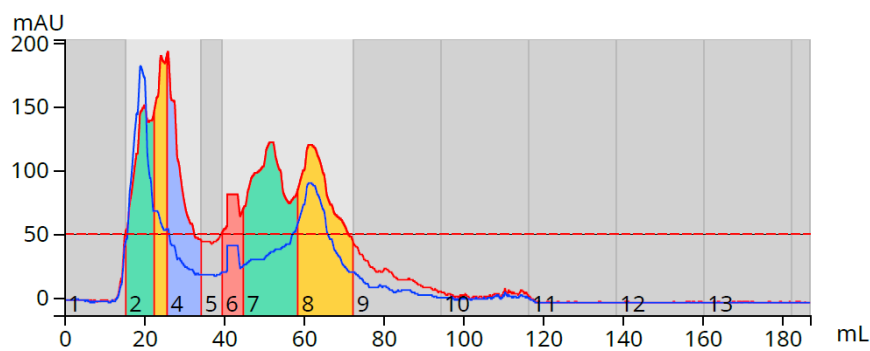


Spektrum 31C: *H. maculatum* EtOAc S6 FK22-23 fraksjon ¹³C-NMR 400 MHz, Quercetin

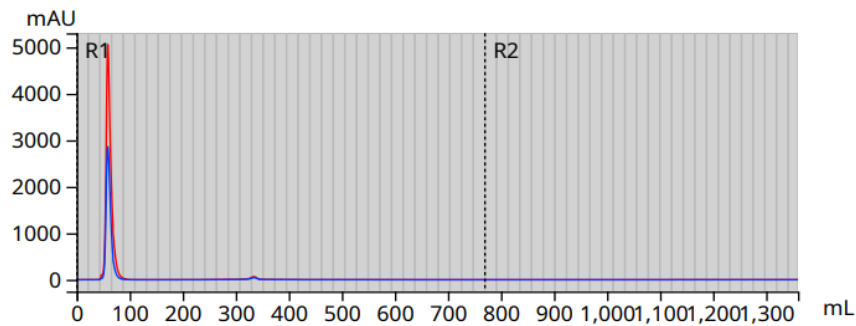
2. Flash Kromatogram



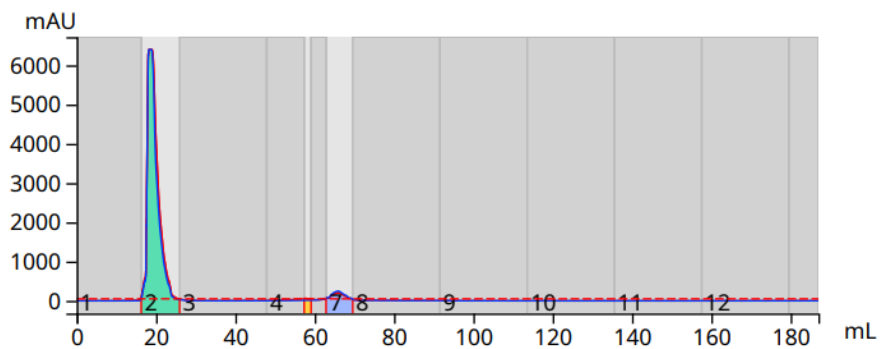
Flash kromatogram 1: EtOAc S2 FK16-18 på biotage Selekt instrument C18 12 g kolonne



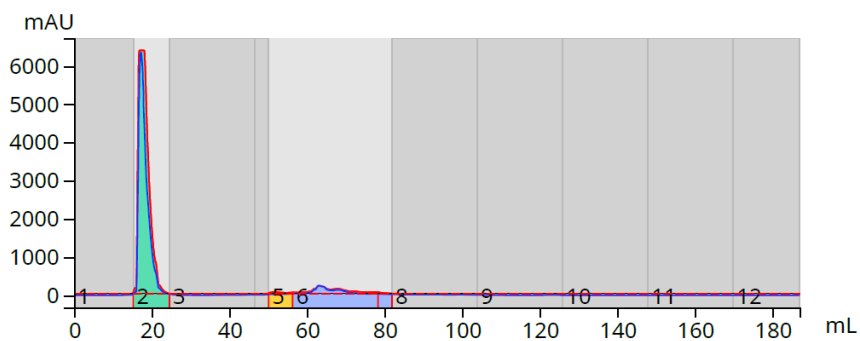
Flash kromatogram 2: EtOAc S2 FK3-4 på biotage Selekt instrument C18 12 g kolonne



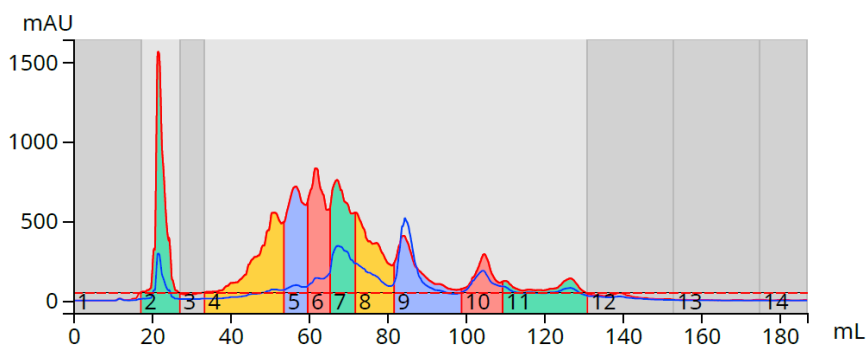
Flash kromatogram 3: EtOAc S3 på biotage Selekt instrument C18 60 g kolonne



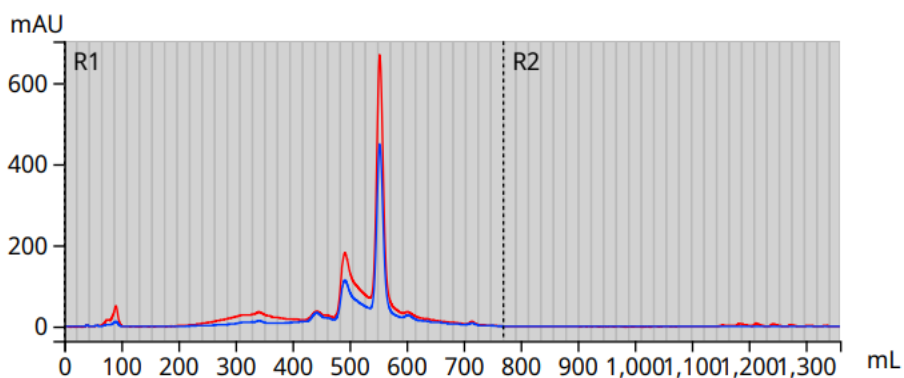
Flash kromatogram 4: EtOAc S3 FK3-4 på biotage Selekt instrument C18 12 g kolonne



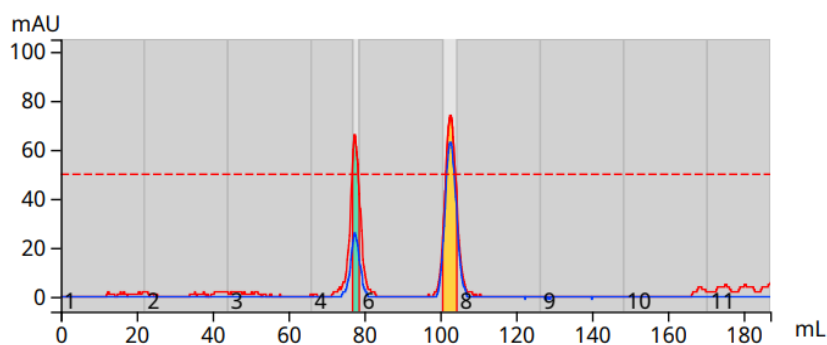
Flash kromatogram 5: EtOAc S4 på biotage Selekt instrument C18 12 g kolonne



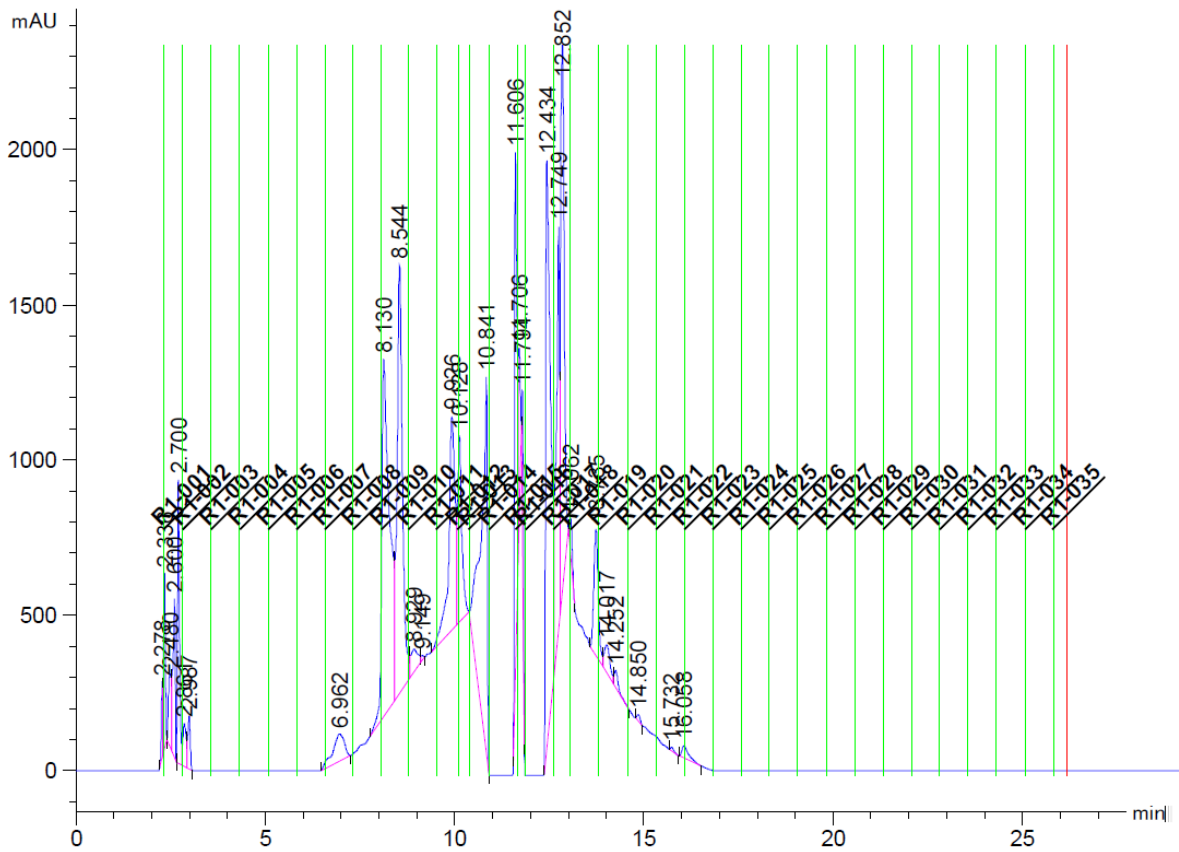
Flash kromatogram 6 EtOAc S5 på biotage Selekt instrument C18 12 g kolonne



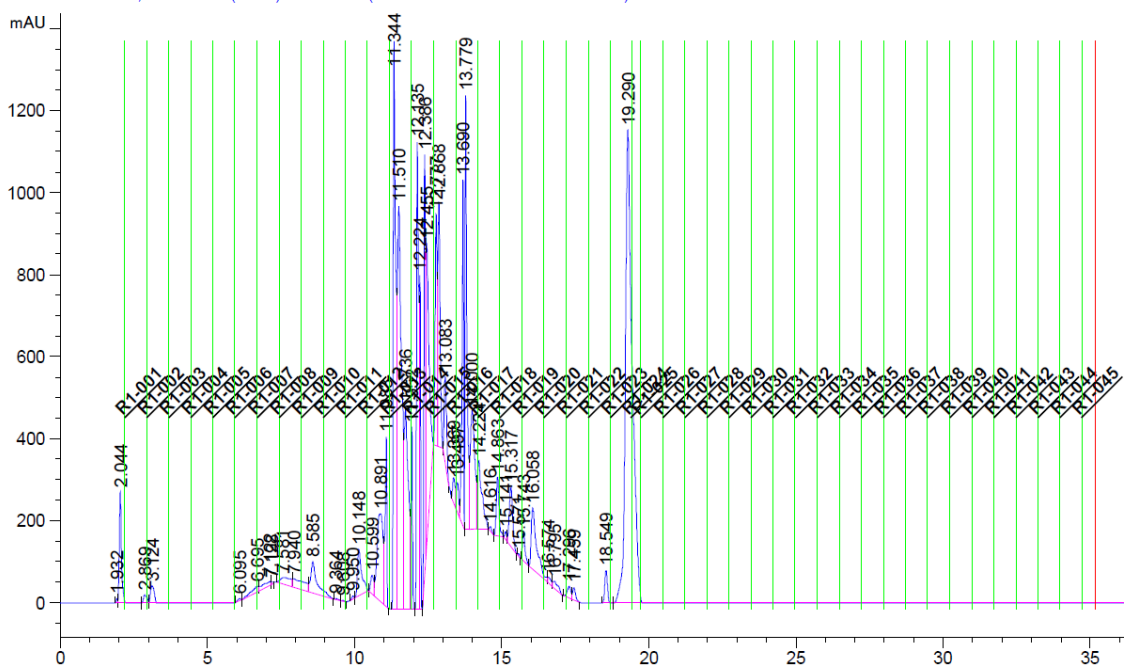
Flash kromatogram 7 EtOAc S6 på biotage Selekt instrument C18 60 g kolonne



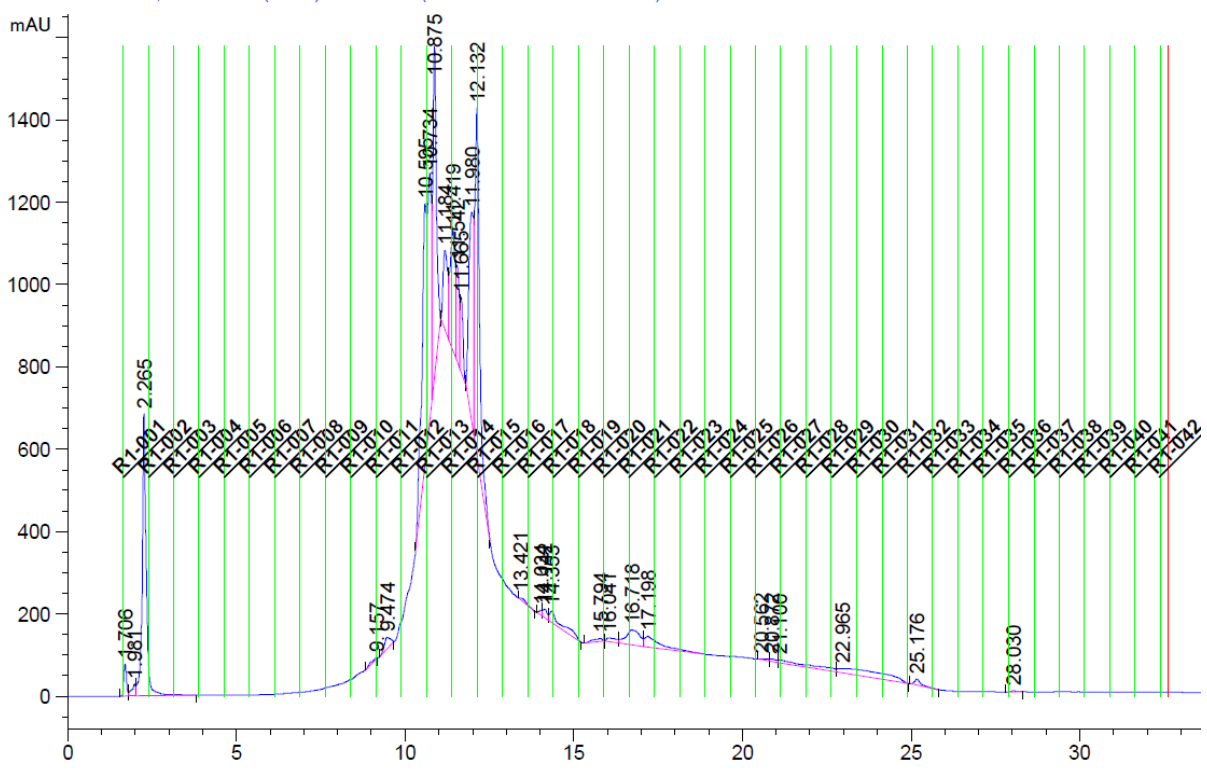
Flash kromatogram 8: EtOAc S6 FK25 PHPLC F19 på biotage Selekt instrument C18 12 g kolonne



PHPLC kromatogram 3: EtOAc S4 FK2 PHPLCR1



PHPLC kromatogram 4: EtOAc S4 FK6-7



PHPLC kromatogram 5 EtOAc S5 FK6

4. Referanse spektraldata

Referanse spektraldata 1: Epicatechin (Usman, 2016)

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)	δ C
2	4,83 (br,s)	79,90
3	4,19 (1H, m)	67,50
4 a	2,86 (1H, dd, 4,8 og 16,8)	29,30
4 b	2,73 (1H, dd, 2,7 og 16,8)	29,30
5	-	157,40
6	5,93 (1H, d, 2,3)	95,90
7		157,70
8	5,96 (1H, d, 2,3)	95,90
9	-	157,70
10	-	100,10
1'	-	132,30
2'	6,99 (1H, 1,7)	115,30
3'	-	145,90
4'	-	145,8
5'	6,77 (1H, d, 8,2)	115,90
6'	6,81 (1H, dd, 1,7 og 8,2)	119,40

Referanse spektraldata 2: Acetylannulatophenonosid (Nedialkov og Kitanov, 2002)

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)	δ C
1	-	109,5
2	-	159,72
3	6,33 (1H, d, 2,3)	95,53
4	-	166,42
5	6,22 (1H, d, 2,3)	96,24
6	10,77 (br.s, OH)	163,98
7	-	144,57
1'	-	144,57
2'	6,62 (1H, d, 2,2)	108,17
3'	8,51(br.s, OH)	159,72
4'	6,51 (1H, t, 2,2)	107,25
5'	8,51 (br.s, OH)	159,72
6'	6,62 (1H, d, 2,2)	108,18
1''	5,51 (1H, s)	108,36
2''	3,55 (1H, d, 1,2)	80,49
3''	4,77 (1H, dd, 1,2 og 3,6)	80,59
4''	4,06 (1H, dd, 3,6 og 3,7)	86,58
5''	3,71 (t, 3,7)	63,03
OCH ₃	3,86 (3H, s)	56,69
C=O	-	198,94
CH ₃ (AcO)	1,96 (3H, s)	21,38
C=O (AcO)	-	171,65

Referanse spektraldata 3: Hyperosid (Abedini, Roumy *et al.*, 2013)

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)	δ C
2	-	159,2
3	-	133,7
4	-	177,6
5	-	161,2
6	6,28 (1H, d, 2,2)	98,6
7	-	164,1
8	6,48 (1H, d, 2,2)	93,5
9	-	156,3
10	-	103,9
1'	-	121,3
2'	7,54 (1H, dd, 8,4 og 2,2)	115,3
3'	-	144,7
4'	-	148,3
5'	6,94 (1H, d, 8,4)	116,2
6'	7,97 (1H, d, 2,2)	121,8
1''	5,01 (1H, d, 7,7)	102,3
2''	3,64 (1H, dd, 9,5 og 7,7)	71,3
3''	3,52 (1H, dd, 9,5 og 4,4)	73,4
4''	3,77 (1H, dd, 4,4 og 3,7)	68,1
5''	3,48 (1H, m)	75,7
6''	H-6''a: 3,60 (1H, d, 5,5) H-6''b: 3,64 (1H, d, 5,5)	60,6

Referanse spektraldata 4: Quercitrin (Park, Matsuta *et al.*, 2012)

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)
6	6,20 (br.s)
8	6,36 (br.s)
2'	7,33 (1H, d, 1.5)
5'	6,90 (1H, d, 8.3)
6'	7,30 (1H, dd, 1,5 og 8,3)
1''	5,35 (br.s)
2''	4,21 (br.s)
3''	3,74 (1H, dd, 2.9 og 9.3)
4''	3,30 (m)
5''	3,41 (m)
6''	0,93 (3H, d, 5.9)

Referanse spektraldata 5: Guajiverin (Park, Matsuta *et al.*, 2012)

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)
6	6,20 (1H, d, 2)
8	6,39 (1H,d, 2)
2'	7,73 (1H,d, 2)
5'	6,86 (1H,d, 8,4)
6'	7,57 (1H, dd, 2,0 og 8,4)
1''	5,15 (1H, d, 6,4)
2''	3,89 (1H, dd, 6,4 og 8,2)
3''	3,64 (1H, dd, 3,1 og 8,2)
4''	3,81 (m)
5''	3,81 (m) 3,43 (1H, dd, 3,1 og 13,5)

Referanse spektraldata 6: Procyanidin B2 (Jeong, Cho *et al.*, 2017)

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)
2	4,92 (1H, br. S)
3	4,01 (1H, br. s)
4	4,56 (1H, br. s)
6	5,99 (1H, d, 2)
8	6,05 (1H, d, 2)
10	6,89 (1H, d, 2)
13	6,72 (1H, d, 8,5)
14	6,67 (1H, dd, 8,5 og 2,0)
2'	4,81 (1H, br. s,)
3'	4,15 (1H, br, s)
4' α	2,68 (1H, br. d, 9,0)
4' β	2,85 (1H, br. d, 9,0)
6'	6,06 (1H, s)
10'	6,98 (1H, d, 2)
13'	6,75 (1H, d, 8,5)
14'	6,80 (1H, dd, 8,5 og 2,0)

Referanse spektraldata 7: Procyanidin B2 (Watson, Wallis *et al.*, 2019)

Posisjon	δ H(Hz)
2A	5,02 ($J_{2,3}<1$)
2B	4,94 ($J_{2,3}<1$)
3A	3,81 ($J_{3,2}<1$, $J_{3,4}=1,5$)
3B	4,25 ($J_{3,4R}=3,7$ og $J_{3,4S}=3,7$)
4A	4,61 ($J_{4,3}=1,3$)
4 _R B	2,78 ($J_{4R,4S}=-16,9$ og $J_{4R,3}<1$)
4 _S B	2,92 ($J_{4S,4R}=-16,9$ og $J_{4S,3}=4,2$)
6A	5,93 ($J_{6,8}=2,3$)
6B	5,86
8A	5,95 ($J_{8,6}=2,3$)
2'A	6,82 ($J_{2',6'}=1,7$)
2'B	7,08 ($J_{2',6'}=1,7$)
5'A	6,67 ($J_{5',6'}=8,2$)
5'B	6,71 ($J_{5',6'}=8,2$)
6'A	6,61 ($J_{6',2'}=1,7$ og $J_{6',5'}=8,1$)
6'B	6,85 ($J_{6',2'}=1,2$ og $J_{6',5'}=8,7$)

Referanse spektraldata 8: 3,II8'' - Biapigenin (Couladis, Baziou *et al.*, 2002)

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)
6	6,23 (1H, d, 2)
8	6,45 (1H, d, 2)
2' og 6'	7,25 (2H, dd, 2 og 8)
3' og 5'	6,60 (2H, dd, 2 og 8)
3''	6,50 (1H,s)
6''	6,25 (1H,s)
5''' og 3'''	6,75(2H, dd, 2 og 8)
2''' og 6'''	7,50 (2H, dd, 2 og 8)

Referanse spektraldata 9: 3,II8'' - Biapigenin (Schmidt, Jaroszewski *et al.*, 2008)

Posisjon	δ H (Multiplisitet, J i Hz)	δ C
6	6,32 (1H, d, 2,2)	100
8	6,55 (1H d, 2,2)	94,9
2' og 6'	7,39 (2H, d, 8,8)	129,0
3' og 5'	6,70 (2H, d, 8,8)	116,2
3''	6,57 (s)	104,6
6''	6,28 (s)	99,8
5''' og 3'''	6,83 (2H, d, 8,8)	116,7
2''' og 6'''	7,58 (2H, d, 8,8)	130,7

Referanse spektraldata 10: Quercetin (Pabuprapap, Wassanatip *et al.*, 2019)

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)	δ C
2	-	148,5
3	-	137,7
4	-	177,8
5	-	163,0
6	6,18 (1H, d, 1,8)	99,7
7	-	166,1
8	6,37 (1H, d, 1,8)	94,9
9	-	158,7
10	-	104,5
1'	-	124,6
2'	7,71 (1H, d, 2)	116,7
3'	-	146,7
4'	-	149,2
5'	6,88 (1H, d, 8,5)	116,5
6'	7,62 (1H, dd, 8,5 og 2)	122,1

Referanse spektraldata 11: Klorogensyre (Pauli, Kuczkowiak *et al.*, 1999)

Posisjon	δ H (Antall H-atomer, multiplisitet, J i Hz)	δ C
1	--	76,17
2 α	1,788 (1H,ddd,-13,2 , 8,~0)	38,12
2 β	2,023 (1H, dd, -13,2 og 3)	
3 β	3,931 (1H, ddd, 8,0, 3,0 og 2,9)	71,35
4 β	3,568 (1H, dd, 2,9 og 6,8)	73,56
5 α	5,072 (1H, ddd, 6,8, 6,8 og ,4,5	71,86
6 α	1,950 (1H, ddd, -13,0, ~0 og 4,5)	38,85
6 β	2,010 (1H, dd, -13,0 og 6,8)	
7	-	176,96
1'	-	127,78
2'	7,040 (1H, d, 2,1	115,26
3'	-	146,59
4'	-	149,36
5'	6,772(1H, d, 8,2)	116,49
6'	6,983 (1H, dd, 2,1 og 8,2)	122,94
7'	7,423 (1H, d, 15,9)	147,01
8'	6,153 (1H, d, 15,9)	115,26
9'	-	168,70