
Hovedfagsoppgave i farmakognosi for graden cand. pharm.

**Antioksidanter i *Xylocarpus moluccensis*, en medisinplante
fra mangroveskogen i Bangladesh**



Tom Erik Grønhaug

Kjemisk seksjon – Fagområde farmakognosi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

2006

Hovedfagsoppgave i farmakognosi for graden cand. pharm.

**Antioksidanter i *Xylocarpus moluccensis*, en medisiplante
fra mangroveskogen i Bangladesh**



Tom Erik Grønhaug

Arbeidet ble utført ved fagområde farmakognosi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo, 2006

Veiledere

Professor Karl Egil Malterud

Stipendiat Helle Wangenstein

Forord

Først vil jeg takke Karl Egil Malterud og Helle Wangensteen for dyktig veiledning og godt samarbeid med utførelsen av hovedfaget. Gjennom engasjert veiledning har dere bidratt til et utfordrende og lærerikt hovedfagsår.

Jeg vil også takke våre menn i Bangladesh, M. Alamgir og M. Sarder, for å ha tilberedt og forsynt oss med metanolekstrakt av *Xylocarpus moluccensis*. Uten dem hadde det blitt vanskelig å gjennomføre denne oppgaven.

En stor takk til kjæresten min, Monica, for god støtte hele året.

Til slutt vil jeg takke de andre hovedfagsstudentene og alle ansatte på avdelingen for et kjekt hovedfagsår.

Oslo, 24 september 2006



Tom Erik Grønhaug

Innholdsfortegnelse

1	SAMMENDRAG	6
2	FORKORTELSER	7
3	HENSIKT MED OPPGAVEN	9
4	BAKGRUNN	10
4.1	XYLOCARPUS MOLUCCENSIS (LAMK.) M ROEM.	10
4.1.1	<i>Tradisjonell bruk</i>	10
4.1.2	<i>Tidligere funn</i>	10
4.2	ANTIOKSIDANTER OG FRIE RADIKALER.....	11
4.2.1	<i>Antioksidanter</i>	11
4.2.2	<i>Frie radikaler</i>	12
4.2.3	<i>Dannelse av frie radikaler og reaktive oksygen species</i>	12
4.2.4	<i>Kroppens antioksidantforsvar</i>	13
4.2.5	<i>Oksidativt stress</i>	15
4.2.6	<i>Lipidperoksidering</i>	15
4.2.7	<i>Patologisk betydning</i>	17
4.2.7.1	<i>Aterosklerose</i>	17
4.2.7.2	<i>Reumatoid artritt</i>	17
4.2.7.3	<i>Kreft</i>	17
4.3	PROANTHOCYANIDINER	18
4.3.1	<i>Struktur og klassifisering</i>	18
4.3.2	<i>Betydning i planten</i>	20
4.3.3	<i>Kjemisk og biologisk aktivitet</i>	21
4.3.4	<i>Potensielle medisinske anvendelser</i>	21
4.3.4.1	<i>Urinveisinfeksjon</i>	21
4.3.4.2	<i>Aterosklerose</i>	22
4.3.4.3	<i>Hypertensjon</i>	22
4.3.4.4	<i>Antiinflammatorisk effekt</i>	22
4.3.4.5	<i>Kreftbehandling</i>	23
4.3.4.6	<i>Diabetes</i>	23
4.3.5	<i>Bivirkninger</i>	23
4.4	EIKOSANOIDBIOSYNTSE OG 15-LIPOKSYGENASE	24
5	EKSPERIMENTELT	27
5.1	MATERIALER	27
5.1.1	<i>Kjemikalier</i>	27
5.1.2	<i>Apparatur</i>	28
5.2	METODER	30
5.2.1	<i>Metodeprinsipper</i>	30
5.2.1.1	<i>Separasjonsmetoder</i>	30
5.2.1.1.1	<i>Væske-væske ekstraksjon</i>	30
5.2.1.1.2	<i>Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk</i>	30
5.2.1.1.3	<i>Høytrykksvæskrokromatografi</i>	32
5.2.1.2	<i>Identifikasjonsmetoder</i>	32
5.2.1.2.1	<i>Analytisk tynnsjiktromatografi</i>	32
5.2.1.2.2	<i>DPPH-spraying</i>	33
5.2.1.2.3	<i>NMR-spektroskopi</i>	33
5.2.1.2.4	<i>Syrekatalysert floroglucinolspalting av proanthocyanidiner</i>	35
5.2.1.3	<i>Metoder for måling av biologisk aktivitet</i>	37
5.2.1.3.1	<i>Radikalscavenging (DPPH-test)</i>	37
5.2.1.3.2	<i>Hemming av 15-lipoksygenase (15-LO test)</i>	38
5.2.2	<i>Generelle eksperimentelle metoder</i>	39
5.2.2.1	<i>Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk</i>	39
5.2.2.2	<i>Høytrykksvæskrokromatografi</i>	40
5.2.2.3	<i>Analytisk tynnsjiktromatografi (TLC)</i>	40
5.2.2.4	<i>DPPH-spraying</i>	41
5.2.2.5	<i>Ceric-spraying</i>	41
5.2.2.6	<i>NMR-spektroskopi</i>	41
5.2.2.7	<i>Syrekatalysert floroglucinolspalting av proanthocyanidiner</i>	41

5.2.2.8	Radikalscavenging (DPPH-test).....	42
5.2.2.9	Hemming av 15-lipoksygenase (15-LO test).....	42
5.2.3	<i>Ekspérimentell utførelse</i>	43
5.2.3.1	Utgangsmateriale og ekstraksjon.....	43
5.2.3.2	Primært MeOH-ekstrakt.....	43
5.2.3.3	Fraksjonering av EtOAc-ekstraktet.....	44
5.2.3.4	Videre arbeid med E4 og E5.....	45
5.2.3.5	Fraksjonering av E4-5.....	45
5.2.3.6	Videre arbeid med E4-5.1.....	46
5.2.3.7	Fraksjonering av E4-5.1.....	47
5.2.3.8	Videre arbeid med E4-5.1.5.....	47
5.2.3.9	Fraksjonering av E4-5.1.5.....	48
5.2.3.10	Fraksjonering av E6.....	48
5.2.3.11	Fraksjonering av E7.....	49
5.2.3.12	Fraksjonering av E13.....	50
5.2.3.13	Fraksjonering av PeOH-ekstraktet.....	50
5.2.3.14	Videre arbeid med P7.....	51
5.2.3.15	Videre arbeid med P8.....	52
5.2.3.16	Videre arbeid med P9.....	53
6	RESULTAT OG DISKUSJON	54
6.1	PRIMERT MEOH-EKSTRAKT.....	54
6.2	FRAKSJONERING AV ETOAC-EKSTRAKTET.....	56
6.3	VIDERE ARBEID MED E4 OG E5.....	59
6.4	FRAKSJONERING AV E4-5.....	60
6.5	VIDERE ARBEID MED E4-5.1.....	61
6.6	FRAKSJONERING AV E4-5.1.....	61
6.7	VIDERE ARBEID MED E4-5.1.5.....	62
6.8	FRAKSJONERING AV E4-5.1.5.....	62
6.9	FRAKSJONERING AV E6.....	64
6.10	FRAKSJONERING AV E7.....	66
6.11	FRAKSJONERING AV E13.....	69
6.12	FRAKSJONERING AV PEOH-EKSTRAKTET.....	70
6.13	VIDERE ARBEID MED P7.....	76
6.14	VIDERE ARBEID MED P8.....	77
6.15	VIDERE ARBEID MED P9.....	78
6.16	POTENSIELLE MEDISINSKE ANVENDELSER.....	78
7	KONKLUSJON	80
7.1	FORSLAG TIL VIDERE ARBEID.....	81
8	VEDLEGG	82
8.1	FLYTSKJEMA.....	82
8.2	TABELLER.....	87
8.3	NMR-SPEKTRA.....	107
8.4	KROMATOGRAM.....	147
9	LITTERATURLISTE	150

1 Sammendrag

Barken fra mangroveplanten *Xylocarpus moluccensis* er benyttet i tradisjonell medisin i Asia. I denne studien ble metanolekstrakt fra barken til *X. moluccensis* ekstrahert suksessivt med kloroform, etylacetat og pentanol. Etylacetat- og pentanolekstraktene ble videre separert, og forbindelser isolert, ved eksklusjons- og omvendt fase kolonnekromatografi (kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk og preparativ HPLC). De isolerte forbindelsene ble strukturoppklart ved ¹H- og ¹³C-NMR-spektroskopi. Proanthocyanidiner ble depolymerisert ved syrekatalysert floroglucinolspalting for å bestemme startenhet og monomer sammensetning. Antioksidantaktivitet ble testet for med hensyn til 1,1-difenylpicrylhydrazyl (DPPH)-radikalscavenging. I tillegg ble det testet for hemming av enzymet 15-lipoksygenase (15-LO) fra soyabønner.

Flavonoidene catechin og epicatechin ble isolert og identifisert fra etylacetatfraksjonen. Det ble også isolert triterpenoider av xylocensintype fra etylacetatfraksjonen, men disse var ustabile og dekomponerte under forsøk på identifisering og strukturoppklaring. Fra etylacetat- og pentanolfraksjonene ble det i tillegg isolert og identifisert dimer, trimer, pentamer, heksamer, dekamer og undekamer proanthocyanidiner.

Etylacetat- og pentanolekstraktene viste seg å ha høyere aktivitet enn kloroformekstraktet og den vandige resten både når det gjaldt 15-LO-hemming og radikalscavenging. Det videre arbeidet ble derfor i hovedsak utført med disse ekstraktene. Catechin, epicatechin og de isolerte proanthocyanidinene viste høy DPPH-scavenging og 15-LO hemming. Trimer proanthocyanidin var mest aktiv som radikalscavenger ($EC_{50} 6,0 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$), og undekamer proanthocyanidin var den sterkeste lipoksygenasehemmeren ($IC_{50} 10 \pm 1 \mu\text{g/ml}$).

Antioksidantaktiviteten til barken fra *X. moluccensis* kan med stor sannsynlighet tilskrives disse forbindelsene.

2 Forkortelser

Tabell 1. Liste over forkortelser i oppgaven.

Forkortelse	Fullstendig betegnelse
Aceton-d6	Deuteroacetone
ACN	Acetonitril
ANR	Anthocyanidin reduktase
ANS	Anthocyanidin syntase
APT	Attached proton test
CD ₃ OD	Deuterometanol
CDCl ₃	Deuterokloroform
CHCl ₃	Kloroform
COSY	Correlated spectroscopy
COX	Cyclooxygenase
D ₂ O	Tungtvann, deuteriumoksid
DAG	Diacylglycerol
DFR	Dihydroflavonol reduktase
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DPPH	1,1-Difenyl-2-picrylhydrazyl
EC ₅₀	Den konsentrasjonen som viser 50 % radikalscavenging
EDRF	Endotel-derivert relaksasjons faktor
EtOAc	Etylacetat
EtOH	Etanol
F3H	Flavanon 3-hydroksylase
GSH	Glutation (redusert form)
GSSG	Glutation (oksidert form)
13-HPODE	13-hydroperoksy-(9Z,11E)-oktadekadiensyre
H ₂ O ₂	Hydrogenperoksid
HCl	Saltsyre, hydrogenklorid
HETE	Hydroeikosatetraensyre
HPETE	Hydroperoksy-eikosatetraensyre
HPLC	Høytrykksvæskerkromatografi
IC ₅₀	Den konsentrasjonen som viser 50 % hemming av 15-Lipoksygenase
IP	Inositolfosfat
LAR	Leucoanthocyanidin reduktase
LDL	Low density lipoprotein
LO	Lipoksygenase
MeOH	Metanol
N ₂ -gass	Nitrogen gass
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat

NMR	Kjernemagnetisk resonans
NS	Ikke signifikant
$^1\text{O}_2$	Singlett oksygen
O_2^-	Superoksid
ODC	Ornitin dekarboksylase
OH^\cdot	Hydroksylradikal
P	Statistisk signifikans
PeOH	n-Pentanol
ppm	Parts per million
ROH	Generell formel for organisk alkohol
ROOH	Generell formel for lipidperoksid
ROS	Reaktive oksygenspecies
SD	Standardavvik
SOD	Superoksid dismutase
TLC	Tynnsjikt-kromatografi
TMS	Tetrametylsilan
UV	Ultrafiolett
<i>X. moluccensis</i>	<i>Xylocarpus moluccensis</i> (Lamk.) Roem
α	Alfaposisjon, indikerer at gruppen peker nedover
β	Betaposisjon, indikerer at gruppen peker oppover
δ	kjemisk skift

3 Hensikt med oppgaven

Hensikten med oppgaven var å studere antioksidant-, radikalscavenger- og 15-lipoksygenase (15-LO) hemningsaktiviteten i mangroveplanten *Xylocarpus moluccensis*, samt å isolere og identifisere inholdsstoffer i planten som hadde 15-LO hemmende og radikalscavenger aktivitet.

Frie radikaler og reaktive oksygenspecies (ROS) inngår i en rekke patologiske tilstander og enzymet 15-lipoksygenase (15-LO) med i utviklingen av aterosklerose. Det er derfor av interesse å finne stoff med antioksidative egenskaper og hemmere av 15-LO som kan virke inn på disse tilstandene.

4 Bakgrunn

4.1 *Xylocarpus moluccensis* (Lamk.) M Roem.

Xylocarpus moluccensis (Lamk.) Roem. tilhører familien *Meliaceae* og er vanligst i mangroveskoger fra Sørøst-Asia til Nord-Australia, men den vokser også på Stillehavøyene og i Øst-Afrika [1, 2]. Slekten *Xylocarpus* består også av to andre planter, *Xylocarpus rumphii* og medisiplanten *Xylocarpus granatum*. Treet *X. moluccensis* kan ble opptil 18 meter høyt, med en omkrets rundt stammen på 2 meter. Det har spisse blader, en dyp taggete bark og frukten til treet er på størrelse med en mandarin [1, 3]. I Bangladesh, hvor prøvematerialet vårt ble samlet inn, vokser *X. moluccensis* i de nordlige områdene, langt fra havet men hovedsakelig i de lavtliggende sumpområdene av mangroveskogene i Sundarban [2].

4.1.1 Tradisjonell bruk

I Indonesia blir roten brukt til å behandle kolera, og det lages en styrkende mikstur av frukten. Saft fra frukten blir i Indonesia også brukt på huden for å dempe inflammasjon. Barken blir brukt til å behandle akutt diare i hele Sørøst-Asia, og i Filippinene spiser de frukten for å behandle diare [1, 2].

I Bangladesh blir uttrekk av barken brukt som et astringerende og et feberdempende middel. Tradisjonelt har barken også blitt brukt mot diare og andre mage- og tarmproblemer. Frukten blir brukt mot hevelse i ledd og hovne bryster og en salve bestående av asken til frøene, svovel og kokosnøttolje blir brukt til behandling av kløe [2]. *X. moluccensis* sin antibakterielle effekt og effekten mot diare er påvist eksperimentelt [1, 2].

4.1.2 Tidligere funn

X. moluccensis og spesielt barken er tidligere lite undersøkt kjemisk. De viktigste funnene er gjengitt i Tabell 2.

Tabell 2: Forbindelser fra *X. moluccensis*.

Kjemiske forbindelser	Plantedel	Plantens opphav
[4]: Xyloccensin A - C Xyloccensin F - I	Ved Ved	Ikke angitt
[5]: Xyloccensin A - F Metylangolensat	Frø/Ved Frø/Ved	Tanzania
[6]: Xylomollin Xyloccensin I + J 4-okso-19-fenylnonadeka-5-enoinsyre Metylesteren til syren over (24R)-6 β -hydroksystigmast-4-en-3-on (24R)-stigmast-4-en-3-on Stigmasterol β -sitosterol	Frukt Frukt Ved Ved Ved Ved Ved Ved	Fiji
[7]: Xylocarpin Xyloccensin I + J	Frø Frø	Fiji
[3]: Destigloyl-6-deoksyswieteninacetat Fragmalin-3,30-diacetat Fragmalin-2,3,30-triacetat 7-okso-7-deacetoksygedunin Humilin B	Ved Ved Ved Frø Frø	Australia

Det er tidligere utført få undersøkelser på hvilke forbindelser polare ekstrakt fra *X. moluccensis* inneholder.

4.2 Antioksidanter og frie radikaler

4.2.1 Antioksidanter

Antioksidanter er forbindelser som, når de er tilstede i lave konsentrasjoner i forhold til et oksiderbart substrat, signifikant forsinket eller hemmer oksidasjon av substratet [8, 9]. Oksiderbare substrater i kroppen inkluderer bl. a. proteiner, lipider, nukleinsyrer og karbohydrater. Antioksidanter er viktige fordi reaktive oksygenspecies (ROS) oksiderer organiske molekyler. Ioner av metaller kan katalysere dannelsen av ROS. Antioksidanter kan forhindre oksidasjonene ved å fjerne katalysatorene, at de oksideres lettere enn substratene eller at de reparerer skadene forårsaket av ROS [8].

4.2.2 Frie radikaler

Et fritt radikal er et hvert molekyl med et eller flere uparrede elektroner som har evnen til å eksistere som et uavhengig molekyl [8, 9]. Det finnes mange typer frie radikaler og den kjemiske reaktiviteten varierer, men generelt sett er frie radikaler mer reaktive enn ikke-radikaler. Eksempler på radikaler er superoksidet ($O_2^{\cdot-}$) og hydroksylradikalet (OH^{\cdot}). ROS omfatter oksygenradikaler og ikke-radikal derivater av oksygen som singlett oksygen (1O_2) og hydrogenperoksid (H_2O_2). ROS deltar selektivt i dannelsen av frie radikaler [10, 11].

4.2.3 Dannelse av frie radikaler og reaktive oksygen species

I aerob metabolisme reagerer oksygen med mange forskjellige molekyler hvor det dannes oksygensentrerte radikaler. ROS er et biprodukt av mange normale reaksjoner i kroppen som energidannelse, nedbrytning av lipider og proteiner, katekolamin respons og inflammasjonsprosessen [10].

Superoksid ($O_2^{\cdot-}$) dannes i mitokondriene av alle aerobiske celler under elektrontransportkjeden ved at et elektron adderes til O_2 . Selv om $O_2^{\cdot-}$ er reaktivt kan det unnsnippe reaksjonssetet i mitokondriene og komme seg til cytoplasma eller ut av cellene. Det meste av $O_2^{\cdot-}$ vil reagere med seg selv eller dismutere, katalysert av superoksid dismutase (SOD), til hydrogenperoksid (H_2O_2). $O_2^{\cdot-}$ kan i nærvær av jern- eller kobberioner reagere med H_2O_2 og danne det veldig reaktive hydroksylradikalet (OH^{\cdot}) (Metallkatalysert Haber-Weiss reaksjon). $O_2^{\cdot-}$ har evne til å forårsake vasodilatasjon i enkelte vev fordi det kan oksidere katekolaminene adrenalin og noradrenalin. Det er antatt å spille en viktig rolle i inflammasjonsprosessen, hvor det utskilles fra fagocytter som et baktericid middel, og i iskemiskreperfusjonsskade [11].

Alle systemer som produserer $O_2^{\cdot-}$ kan også produsere H_2O_2 . H_2O_2 har ingen uparrede elektroner, og det gjør det i stand til å krysse biologiske membraner, hvor dets oksiderende egenskaper kan forårsake celledskader. H_2O_2 har en vasodilaterende effekt ved at det enten virker direkte på glatt muskulatur eller stimulerer til utskillelse av en ikke-prostanoid avslapningsfaktor for glatt muskulatur fra endotelet (EDRF, endothelium derived relaxation factor) [11].

Singlett oksygen (1O_2) dannes ved produksjon av frie radikaler ved overføring av energi til oksygen. 1O_2 har kort levetid i vandig miljø, men overlever lenger i lipofile omgivelser. På

grunn av elektronkonfigurasjonen er $^1\text{O}_2$ svært reaktivt og kan reagere med flerumettede fettsyrer i membraner og danne lipidperoksider [11].

Hydroksylradikalet (OH^\bullet) er en av de aller mest reaktive forbindelsene i organisk kjemi, og det reagerer umiddelbart med nesten hvilket som helst molekyl i cellen. Det er derfor viktig at kroppens metallioner er bundet til proteiner slik at ikke OH^\bullet dannes [11]. OH^\bullet dannes også når kroppen utsettes for ioniserende stråling, fordi O-H bindingen i vannmolekylet splittes [8].

4.2.4 Kroppens antioksidantforsvar

Kroppen har utviklet antioksidantforsvar for å beskytte seg mot frie radikaler [12].

Forsvarssystemet består av enzymer, radikalscavengere, forbindelser som kompleksbinder metaller og systemer som reparerer skader forårsaket av radikaler [9, 12].

Enzymer [9, 12]:

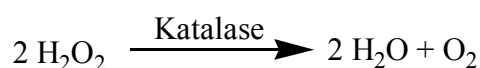
Superoksid dismutase (SOD)

Omdanner superoksid til hydrogenperoksid



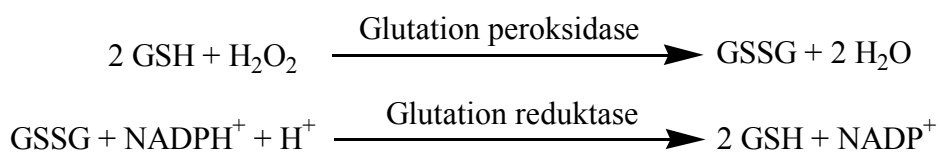
Katalase

Reduserer hydrogenperoksid til vann

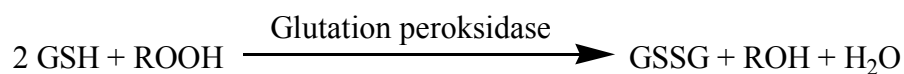


Glutation peroksidase

Fjerner hydrogenperoksid ved å oksidere redusert glutatation (GSH) til oksidert glutatation (GSSG). Glutation reduktase reduserer GSSG til GSH ved hjelp av NADPH.



Glutation peroksidase kan også fjerne andre peroksider, f.eks lipidperoksider (ROOH) ved å omdanne dem til alkoholer (ROH).



Radkalscavengere [9, 12, 13]:

- Glutation
Kan virke ved direkte radikalscavenging
- Vitamin E (tokoferol)
Reagerer ved å reagere med peroksyldradikaler som er intermediater i lipidperoksideringen. Vitamin E regenereres ved reaksjon med vitamin C ved grenseflaten mellom cellemembran og ekstracellulærvæske.
- Vitamin C (askorbinsyre)
Kan virke ved direkte radikalscavenging. Regenererer vitamin E.
- Urinsyre
Kan virke ved direkte radikalscavenging

Forbindelser som kompleksbinder metaller [9]:

- Ferritin
Jern-lagring
- Transferrin
Transportprotein for jern i plasma
- Caeruloplasmin
Transportprotein for kobber i plasma
- Urinsyre
Binder kobber
- Albumin
Binder kobber, og kan virke som radikalscavenger direkte
- Metallotioneiner
Binder sink, kobber, kadmium og kvikksølv

Siden antioksidantforsvaret ikke er helt effektivt, finnes det reparasjonsezymer som ødelegger radikalskadet protein, fjerner oksiderte fettsyrer fra membranen og reparerer DNA skade fra frie radikaler. Alle disse forsvarsmekanismene finnes hovedsakelig intracellulært [12].

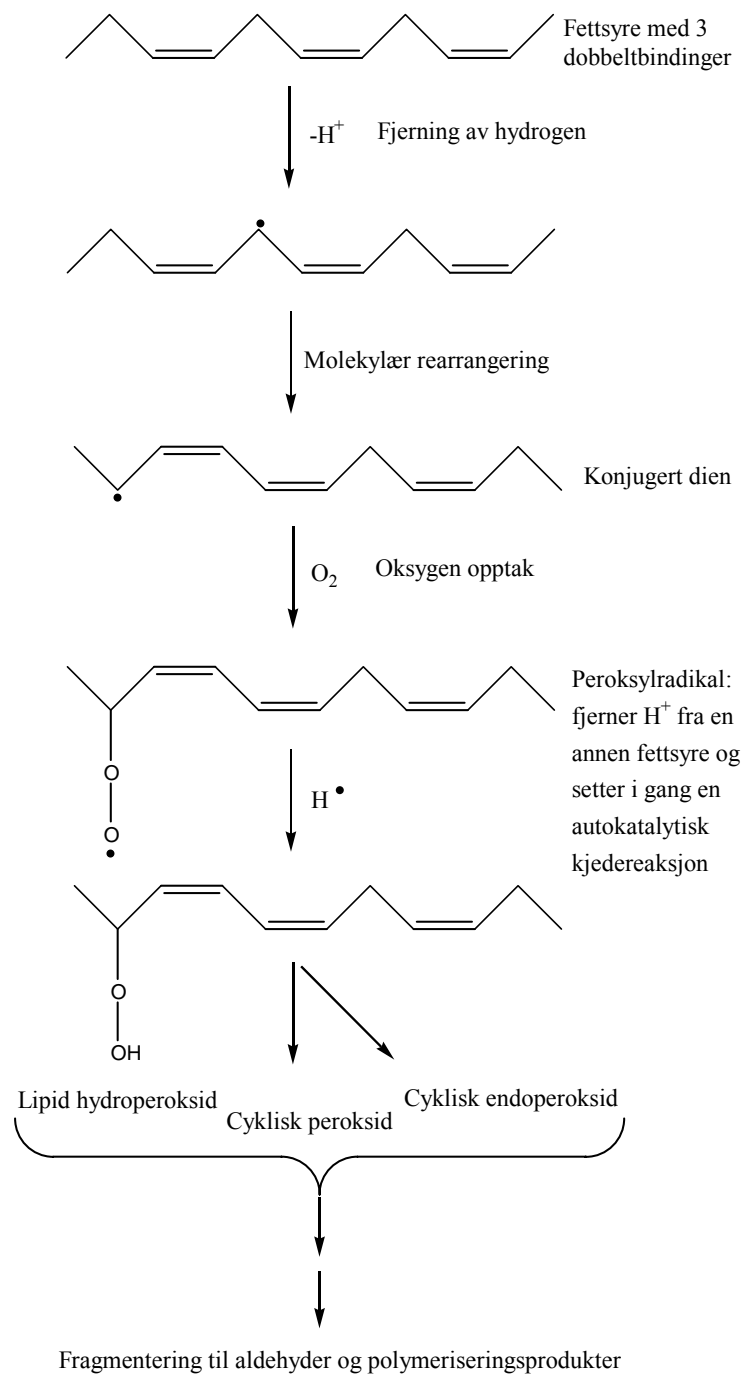
4.2.5 Oksidativt stress

I kroppen er det vanligvis en balanse mellom antioksidanter og kroppens egenproduksjon av frie radikaler og ROS. Oksidativt stress oppstår når denne balansen skyves i retning av frie radikaler og ROS, og kroppen ikke har tilstrekkelig antioksidanter til å forsvare seg. De fleste celler kan tolerere mildt oksidativt stress fordi cellene har reparasjonssystemer som gjenkjenner og fjerner skadede oksiderte molekyler og erstatter disse. Celler kan også øke antioksidantforsvaret som en respons på oksidativt stress. Alvorlig oksidativt stress kan føre til forstyrrelser i cellemetabolismen som økning av intracellulært Ca^{2+} , DNA fragmentering, lipidperoksidering og proteinskade. Alt dette kan medføre celledød [8].

4.2.6 Lipidperoksidering

Lipidperoksidering er oksidativ degradering av flerumettede lipider [9]. Biologiske membraner består av en fosfolipid dobbeltmembran. De flerumettede fettsyrene er utsatt for radikalangrep og dette kan starte lipidperoksidering. Peroksidering forårsaker skade på membranlipider og -proteiner, og tømning av antioksidantlagrene i membranen [8].

Det er to typer lipidperoksidering, enzymatisk og ikke-enzymatisk lipidperoksidering. Enzymatisk lipidperoksidering er kontrollert peroksidering av fettsyrer og gir hydroperoksider og endoperoksider som produkter. Enzymene cyklooksygenase og lipoksygenase katalyserer disse reaksjonene (Se avsnitt "4.4 Eikosanoidbiosyntese og 15-lipoksygenase"). Ikke-enzymatisk peroksidering kan forårsakes av ROS, metallioner og hydroperoksider [13].



Figur 1. Peroksidering av en fettsyre med tre dobbeltbindinger [9].

Ikke-enzymatisk peroksidering starter ved at et radikal som er reaktivt nok fjerner et hydrogenatom fra metylengruppe mellom to dobbeltbindinger i fettsyren (Figur 1). Det dannes et fettsyreradikal som er ustabil, og dette stabiliseres ved molekylær rearrangering til et konjugert dien. Fettsyreradikalet reagerer med oksygen og det dannes et peroksyldradikal. Peroksyldradikalet kan så angripe en annen fettsyre og videreføre kjedereaksjonen ved at det dannes et nytt fettsyreradikal og et lipidhydroperoksid. Lipidhydroperoksidet kan danne

sykliske peroksider og sykliske endoperoksider, disse kan fragmenteres videre og gi opphav til ulike aldehyder som malondialdehyd [9].

4.2.7 Patologisk betydning

Skade på vev fører vanligvis til dannelse av frie radikaler og ROS. Oksidativ skade kan derfor spille en viktig rolle ved en del sykdommer. I de fleste tilfeller er økt oksidativ aktivitet en konsekvens av, og ikke en årsak til sykdommen. Oksidativ skade kan dermed bidra til å forverre en sykdomstilstand [9].

4.2.7.1 Aterosklerose

Det er antatt at aterosklerose begynner med skade på endotelveggen i blodårene. Monocytter tiltrekkes av skaden og flytter seg fra blodet og inn i endotelvevet hvor de utvikler seg til makrofager. Makrofagene utskiller $O_2^{\cdot -}$ og H_2O_2 og forårsaker et lokalt oksidativt stress. LDL som befinner seg i nærheten av det skadestedet kan oksideres. Oksidert LDL gjenkjennes av spesielle scavenger reseptorer på makrofagene, og tas hurtig opp av makrofagene og det dannes skumceller. Skumceller er forstadiet til fettstreker og plakk i blodårene. Peroksidert LDL påvirker makrofagene til å skille ut vekstfaktorer som stimulerer celledelingen av glatte muskelceller på skadestedet. Vekst av muskelceller og plakk fører til en innsnevring av arteriene og redusert blodtilførsel til organer som hjerte og hjerne. Slag eller hjerteinfarkt oppstår når en blodåre blir fullstendig blokkert, vanligvis ved trombedannelse rundt plaketten [8, 9].

4.2.7.2 Reumatoid artritt

Reumatoid artritt er en kronisk betennelse i leddene som forårsaker smertefull hevelse og nedsatt bevegelse. Reumatoide ledd er sentre for intenst oksidativt stress. Makrofager og nøytrofiler er tilstede og slipper ut $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , HOCl, NO \cdot og andre potensielt skadelige produkter. Blødninger i leddene kan øke jernkonsentrasjonen og føre til dannelse av OH \cdot [8].

4.2.7.3 Kreft

Første trinn i utviklingen av kreft er reaksjon mellom kreftfremkallende stoffer og DNA som gjør at genomet skades. Skader på DNA i regioner som regulerer celledeling og -vekst kan føre til ukontrollert celledeling og dannelse av kreftsvulster. ROS kan reagere med DNA og danne en hel rekke med modifiserte purin- og pyrimidinbaser. ROS initierer ikke celledeling, men kreft kan utvikles hvis disse skadene ikke repareres og cellene utsettes for stimuli som starter celledelingen [9].

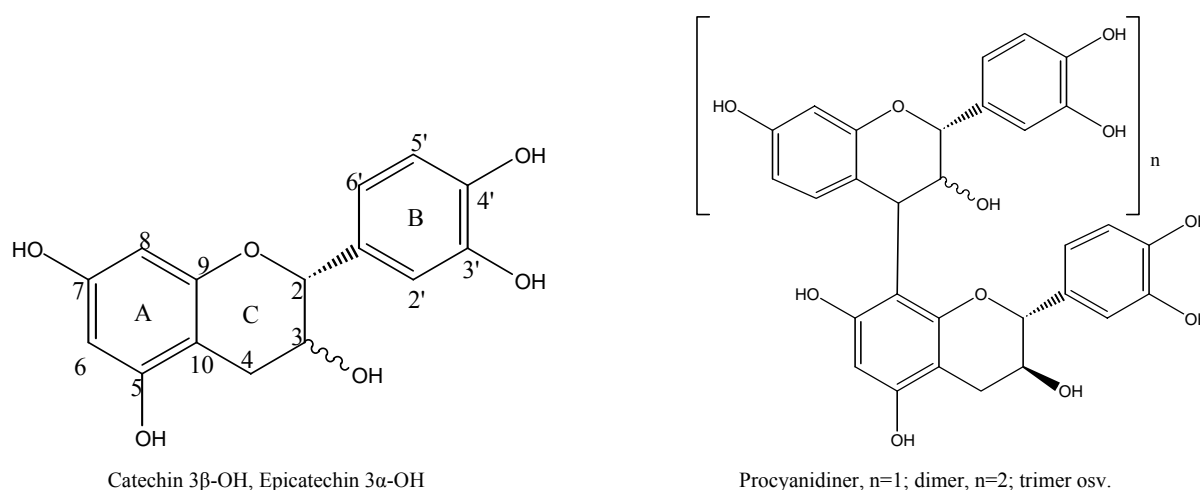
4.3 Proanthocyanidiner

Proanthocyanidiner er en gruppe flavonoider som er utbredt hos planter og spiller en betydelig rolle for plantenes funksjon og overlevelse. Disse forbindelsene er av medisinsk interesse fordi det i tradisjonell folkemedisin gjennom tidene har blitt benyttet mange proanthocyanidinrike planter [14]. Det er funnet store mengder proanthocyanidiner i den bangladeshiske medisinplanten *Xylocarpus granatum*, som er nært beslektet med *X. moluccensis* [15].

4.3.1 Struktur og klassifisering

Proanthocyanidiner kalles også for ikke-hydrolyserbare garvestoffer og er polyfenoliske forbindelser [16]. Proanthocyanidiner er oligomere og polymere sluttprodukter i biosynteseveien av flavonoider [17].

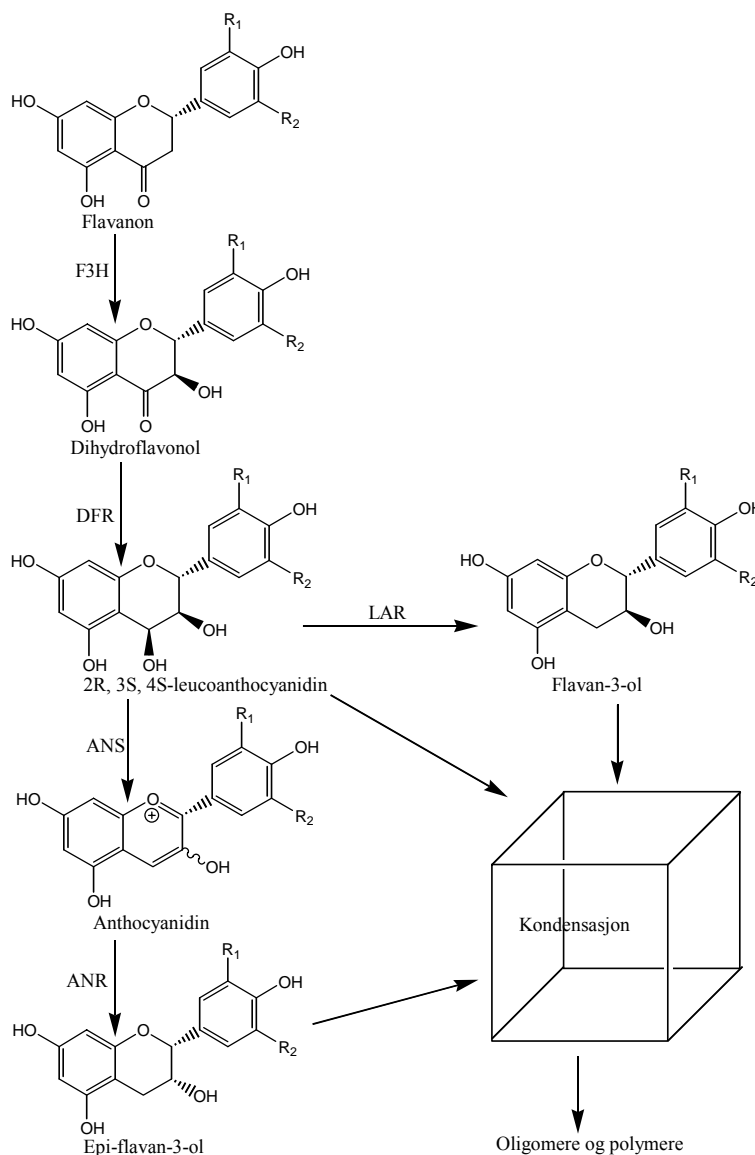
Proanthocyanidiner består av rekker med flavan-3-ol enheter, og det finnes femten underklasser av proanthocyanidiner. Procyanidiner av B-type er den vanligste gruppen og består av kjeder av catechin og/eller epicatechin som er koblet 4→6 eller 4→8 (Figur 2) En annen vanlig proanthocyanidin gruppe er prodelfinidin som er bygd opp av kjeder av gallocatechin og/eller epigallocatechin. [16, 18].



Figur 2. Kjemisk struktur av catechin, epicatechin og procyanidin

Under syrekatalysert depolymerisering av proanthocyanidiner skjer det en intramolekylær endring i strukturen til de monomere enhetene. De ulike underklassene har fått sine navn etter produktet som dannes. Procyanidinene har fått sitt navn fordi catechin og epicatechin omdannes til cyanidin, mens prodelfinidinene har fått sitt navn fordi gallo catechin og epigallo catechin omdannes til delfinidin [18]. Catechin er antatt å være den vanligste startenheten i procyanidiner, mens epicatechin er den vanligste forlengerenheten. Dannelsen av procyanidiner er under streng enzymatisk kontroll (Figur 3) og sammensetningen av oligomere og polymere er karakteristisk for ulike plantetyper [17].

Proanthocyanidiner av A-type er mindre vanlige enn B-typen. A-type proanthocyanidiner har i tillegg til C-C bindingen mellom catechinenhetene en eterbro mellom C-2 i en catechinenhet og C-7 i en annen.



Figur 3. Dannelse av proanthocyanidiner. F3H, flavanon 3-hydroksylase; DFR, dihydroflavonol reduktase; LAR, leucoanthocyanidin reduktase; ANS, anthocyanidin syntase; ANR, anthocyanidin reduktase [17].

4.3.2 Betydning i planten

Proanthocyanidiner, monomere flavan-3-oler og derivater av dem er tilstede i frukt, bark, blad og frø i mange planter [17, 19]. Flavonoider er pigmentene som er ansvarlig for gul-, orange-, rød-, blå- og lillafargen i blomstrende planter [19]. Hovedfunksjonen til proanthocyanidinene er å beskytte plantene mot patogene bakterier, insekter og større planteetere, men de er også involvert i vekst og utvikling av planten [17, 19]. Proanthocyanidinene kan binde metallioner ved kompleksbinding mellom metallene og difenolgruppene. Mangel på jern fører til redusert

bakterievekst og det er foreslått at kompleksbinding av jern kan være en av årsakene til proanthocyanidinenes antibakterielle effekt [17].

4.3.3 Kjemisk og biologisk aktivitet

Proanthocyanidiner kan binde og denaturere proteiner, og de binder særlig sterkt til prolin og hydroksypolin rike proteiner. Denne egenskapen gir proanthocyanidinene en astringerende effekt som øker med polymeriserings graden [18].

Proanthocyanidiner har en unik polyhydroksyfenol struktur som gjør dem til gode antioksidanter og radikalfangere. Antioksidantaktiviteten er i noen systemer sterkere enn f. eks. vitamin C og vitamin E. Strukturen til proanthocyanidinene gjør at de kan binde metallioner, og det kan forsterke antioksidantaktiviteten, fordi metallioner kan katalysere dannelsen av frie radikaler og ROS [18].

Mange flavonoider har vist biologiske aktiviteter som antiinflammatoriske, antiallergiske, antiischemiske, immunomodulerende og antitumorale aktiviteter. Flavonoider kan hemme en rekke enzymer blant annet cyclooksygenase, lipoksygenase og fosfolipase A₂. De biologiske aktivitetene til flavonoidene er hovedsaklig knyttet til antioksidantegenskapene deres, ved at de hemmer produksjonen av ROS og/eller fanger ROS [19].

4.3.4 Potensielle medisinske anvendelser

Flavonoider er representert i måltider som inneholder grønnsaker og frukt og er antatt å være en nøkkelforbindelse i sammenhengen mellom helse og mat [19]. Ikke-polymeriserte flavan-3-oler og deres derivater har signifikant farmakologisk aktivitet, og et stort antall medisinske planter inneholder høye konsentrasjoner av disse forbindelsene [17].

4.3.4.1 Urinveisinfeksjon

Tranebærjuice inneholder høye konsentrasjoner av A-type proanthocyanidiner og brukes forebyggende mot urinveisinfeksjon. Den viktigste effekten er at proanthocyanidinene hindrer fimbriene til *Escherichia coli* å feste seg til urinveiene [17, 18]. B-type proanthocyanidiner har ikke denne effekten.

4.3.4.2 Aterosklerose

Proanthocyanidiner og/eller deres metabolitter ser ut til å påvirke flere steg i utviklingen av aterosklerose. In vitro studier med syntetiske liposomer viste at flavan-3-ol monomere og proanthocyanidin dimere og trimere beskyttet mot oksidering i vannfasen, mens høyere polymere beskyttet mot oksidering i lipidfasen. Det er også vist at proanthocyanidiner (fra dimer til heksamer) og ekstrakter som inneholder proanthocyanidiner hemmer kjemisk og metallkatalysert oksidering av LDL. Grapefruktkjerneekstrakt, som er rikt på proanthocyanidiner, nedregulerer et genet CD 36, som koder for oksidert-LDL reseptor (scavenger-reseptor). Denne reseptoren er ansvarlig for opptak av oksidert LDL til makrofager og er med i utviklingen av skumceller.[18, 20]

4.3.4.3 Hypertensjon

Flere studier har vist at proanthocyanidiner hemmer enzymet angiotensin converting enzyme (ACE) som omdanner angiotensin I til angiotensin II. Angiotensin II er en vasokonstriktor som øker blodtrykket ved å kontrahere glatt muskulatur i endotelveggen i blodårene. ACE-hemmingen øker med økende polymeriseringsgrad [18, 20].

Proanthocyanidiner fra kakao hemmer blodplateaktivering og –aggregering. Dette gjør at blodet flyter lettere gjennom årene og blodtrykket synker [18, 20]. Aktiviteten var kvalitativt sammenlignbar med acetylsalicylsyre, men ikke like sterk [18].

Proanthocyanidiner stimulerer produksjonen av NO som er en endotel-derivert relaksasjonsfaktor (EDRF). NO øker vasodilatasjonen i arteriene. Det er usikkerhet om det er de oligomere eller polymere proanthocyanidinene som har størst effekt [18, 20].

4.3.4.4 Antiinflammatorisk effekt

Flavonoler og oligomere proanthocyanidiner har vist seg å hemme enzymene cyclooxygenase 1 og 2 og 5-lipoksygenase i konsentrasjoner som er lik for legemidler som blir brukt til det formålet, f. eks. indometacin [18]. Procyanidin A1 har vist seg å utøve sterk antiinflammatorisk aktivitet [17].

4.3.4.5 Kreftbehandling

Oksidativt stress er forbundet med patogenesen av kreft, og antioksidanter som proanthocyanidiner kan derfor være nyttige som kreftforebyggende og/eller antitumor midler. Studier har vist at enkelte proanthocyanidiner induserer kontrollert celledød i kreftceller, men ikke i friske celler. I en studie på mus viste at proanthocyanidiner hemmet kreftutviklingen og virkningen ble tilskrevet antioksidantegenskapene og hemming av ornitin dekarboksylase (ODC). ODC er det hastighetsbestemmende enzymet i biosyntesen av polyaminer og høy uttrykkelse av ODC er et karakteristisk trekk for kreftceller og svulst utvikling [20].

4.3.4.6 Diabetes

Studier har vist at et ekstrakt fra kanel som inneholdt A-type oligomere proanthocyanidiner reduserte nivået med fastende blodglukose hos type 2 diabetikere. In vitro forsøk har også vist at kanelekstrakt har en insulinlignende effekt [18].

4.3.5 Bivirkninger

Siden proanthocyanidiner kan binde og denaturere proteiner er det muligheter for at det kan inntreffe bivirkninger. Det er rapportert at inntak av kosttilskudd som inneholder ekstrakt av kaffebønner, druer, grønn te og *Ginko biloba* kan gi økt risiko for kreft i tykktarmen [18].

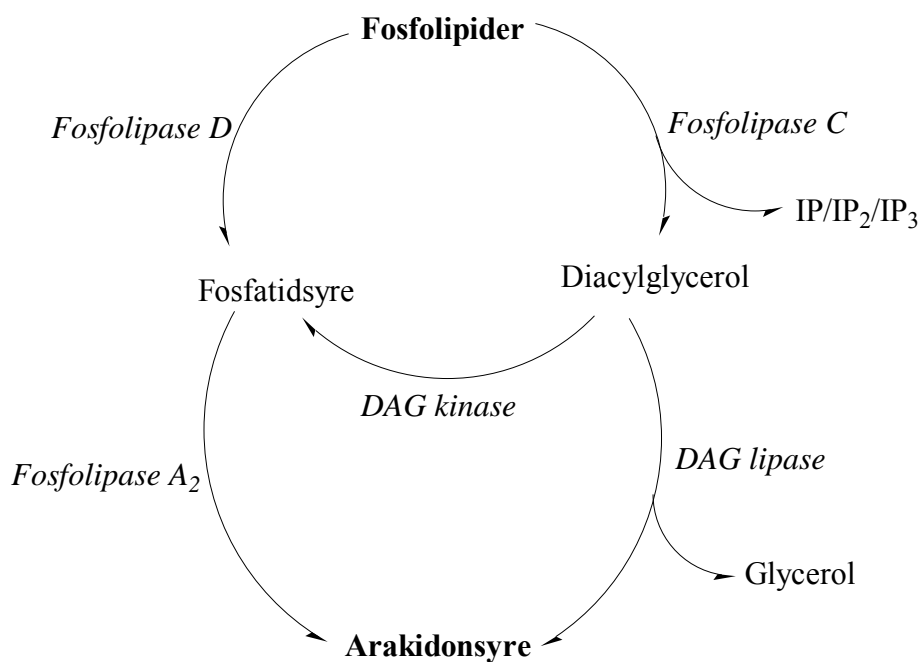
Proanthocyanidiner kan ha en negativ effekt på næringsopptaket fra mage og tarm fordi de kan kompleksbinde, og dermed redusere biotilgjengeligheten til sporstoffer som jern og sink. Dette kan være et problem i utviklingsland hvor de har et kosthold som er rikt på proanthocyanidiner. Det er usikkert hvor stor den kliniske relevansen av dette er [17].

Det er en risiko for interaksjon mellom legemidler og proanthocyanidiner. En undersøkelse viste at det i 6 % av tilfellene oppstod en alvorlig bivirkning, som muligens var en følge av samtidig inntak av proanthocyanidinholdig kosttilskudd. Stort sett tolererer kroppen kosthold og kosttilskudd med proanthocyanidiner godt, og det oppstår få bivirkninger. Mage-tarmsvør er den hyppigst rapporterte bivirkningen [18].

4.4 Eikosanoidbiosyntese og 15-lipoksygenase

Eikosanoider er en fellesbetegnelse på fysiologisk aktive derivater som dannes ved metabolisme av arakidonsyre, en C₂₀-flerumettet fettsyre som inneholder 4 dobbelbindinger. Disse forbindelsene er prostaglandiner, leukotriener, tromboksaner, hydroperoksyekosatetraensyre (HPETE) og hydroeikosatetraensyre (HETE) [21, 22]. Eikosanoidene produseres *de novo* fra fosfolipider i kroppen og er med i kontrollen av mange fysiologiske prosesser. Eikosanoidene er blant de viktigste mediatorene og modulatorene i inflammasjonsprosessen [22].

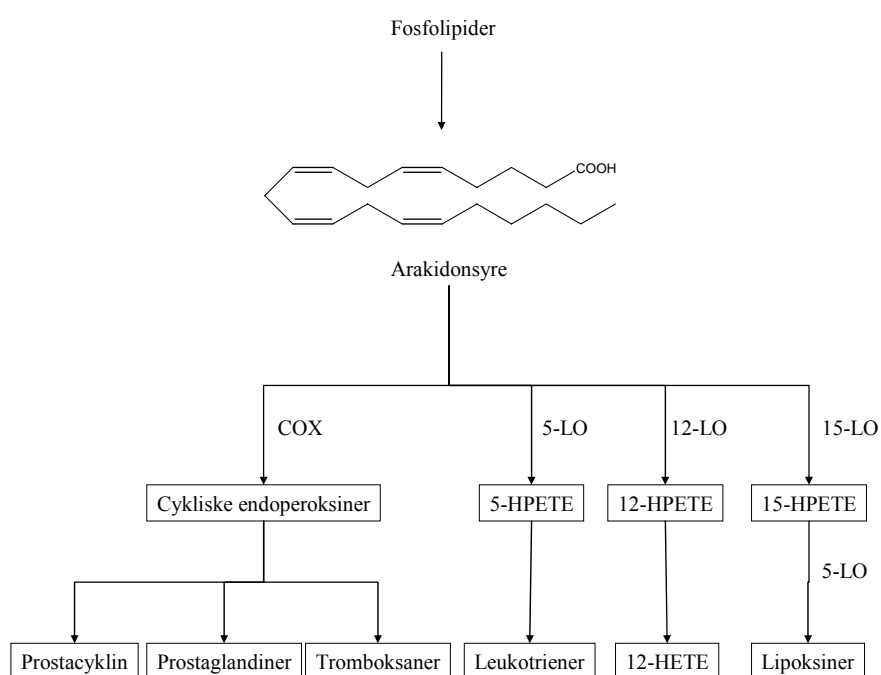
Frigjøring av arakidonsyre fra fosfolipider er det initielle og hastighetsbestemmende trinnet i eikosanoidsyntesen (Figur 4). Dette kan skje på tre måter: (1) ved hjelp av fosfolipase A₂ direkte, (2) ved hjelp av fosfolipase C etter fulgt av diacylglycerol lipase eller (3) ved hjelp av fosfolipase D etterfulgt av fosfolipase A₂ [22].



Figur 4. Frigjørelse av arakidonsyre fra fosfolipider via to-trinnsprosesser. IP = inositolfosfat, DAG = diacylglycerol [22].

Den frie arakidonsyren kan metaboliseres videre ved hjelp av ulike enzymer (Figur 5). Cyklooksygenase-1 og -2 (COX) omdanner arakidonsyre til prostacyclin, prostaglandiner og tromboksaner, mens lipoksygenaser (5-, 12- og 15-LO) omdanner arakidonsyre til hydroperoksyfettsyrer, som videre kan gi leukotriener og lipoksiner [22].

Mange ulike stimuli kan frigjøre arakidonsyre og disse avhenger av celletypen. For eksempel trombin i blodplater, bradykinin i fibroblaster og antigen-antistoff reaksjoner i mast celler. Celleskader kan også føre til frigjørelse av arakidonsyre [22].



Figur 5. Arakidonsyremetabolismen. COX = cyklooksygenase, LO = lipoksygenase [22].

5-LO er sannsynligvis det viktigste enzymet av lipoksygenasene og er det første trinnet i biosyntesen av leukotrienene. 5-LO adderer en hydroperoksygruppe til C5 i arakidonsyre og det dannes 5-HPETE. Denne forbindelsen er forløperen til leukotriene. 12-LO og 15-LO danner ved reaksjon med arakidonsyre henholdsvis 12-HPETE og 15-HPETE. 15-HPETE omdannes ved hjelp av 5-LO til lipoksiner [22]. 5-, 12-, og 15-HPETE er lipidhydroperoksider, og det er derfor mulig at de kan gi opphav til frie radikaler som lipidperoksyd [23].

15-LO antas å spille en rolle i flere patologiske tilstander. Enzymet oksiderer lavtetthet-lipoprotein (LDL) som spiller en viktig rolle i utviklingen av plakk i blodårene, og 15-HPETE hemmer i tillegg syntesen av antiaggregerende prostacyclin [24-26]. Det er funnet en overekspressjon av 15-LO og dets metabolitter i humane prostatakrefteceller og 15-LO kan være med i utviklingen av prostatakrefte [27, 28]. Det er også antydning av en mulig sammenheng mellom overekspressjon av 15-LO og nedsatt reproduksjon og abort [29]. Dyreforsøk viser at 15-LO hemmere reduserer endotelcelle- og makrofag mediert oksidering av LDL [25].

5 Eksperimentelt

5.1 Materialer

5.1.1 Kjemikalier

Tabell 3: Liste over kjemikalier

Aceton, for HPLC	Prolab Fontenay S/Bois, Frankrike
Aceton-d6	Sigma-Aldrich St.Louis, USA
Acetonitril, gradient grade	Merck Darmstadt, Tyskland
Borsyre, p.a.	Merck Darmstadt, Tyskland
Catechin	Koch-Light Laboratories Ltd Colnbrook, England
Cerium(IV)sulfat, p.a.	Merck Darmstadt, Tyskland
DMSO, tørket	Merck Darmstadt, Tyskland
DPPH	Sigma-Aldrich St.Louis, USA
Eddiksyre, (>90%)	VWR International Oslo, Norge
Epicatechin	Carl Roth KG Karlsruhe, Tyskland
Etanol	Arcus Oslo, Norge
Etylacetat, p.a.	Fluka Chemie Buchs, Sveits
Floroglucinol	Fluka Chemie Buchs, Sveits
Kloroform, p.a.	Merck Darmstadt, Tyskland
d-Kloroform (CDCl ₃)	Sigma-Aldrich St.Louis, USA
Linolsyre	Sigma St.Louis, USA
Lipoxidase 15-Lipoxygenase	Sigma St.Louis, USA
Maurisyre, 98-100% p.a.	Merck Darmstadt, Tyskland
Metanol, p.a.	Chemi-Teknik Oslo, Norge
Metanol purum	Chemi-Teknik Oslo, Norge
d-Metanol (CD ₃ OD)	Sigma-Aldrich

	St.Louis, USA
N ₂ -gass	AGA Oslo, Norge
1-pentanol p.a.	Merck Darmstadt, Tyskland
Saltsyre, 37% p.a.	Chemi-Teknik Oslo, Norge
Sephadex LH20	Pharmacia Biotech Uppsala, Sverige
TMS	Sigma-Aldrich Steinheim, Tyskland
Toluen p.a.	Prolab Fontenay S/Bois, Frankrike
Toyopearl HW40	Tosoh Bioscience Tokyo, Japan
Vann, destillert	Farmasøytisk institutt Oslo, Norge
d-Vann (D ₂ O)	Aldrich Milwaukee, USA

5.1.2 Apparatur

Tabell 4: Liste over apparatur

Analytisk TLC Kiselgel 60 F ₂₅₄ , aluminiumsplater RP-18 F _{254S} , aluminiumsplater Cellulose F, DC Plastikfolien	Merck, Darmstadt, Tyskland
Filterpapir Whatman, div størrelser Faseseparasjonspapir Whatman phase separators, silicone treated	Whatman, Maidstone, England
HPLC Varian Prostar Pumpe modell 210 Analytisk Detektor Analytic 9x0mm Analytisk kolonne Varian 250x4,6 mm microsorb mv 100-5 C18 Hamilton 705SN 50µl sprøyte Preparativ Detektor Prep 9x1mm Preparativ kolonne Varian dynamax 250x21,4 mm	Varian, Walnut Creek, CA, USA

microsorb 60-8 C18 Varian 1002 TLL 2,5ml sprøyte	
Kolonnekromatografi The FMI LAB PUMP modell RP-G150 VersaFlash Büchi 681 Chrom pump	Fluid Metering inc, New York, USA Büchi, Flawil, Sveits
Kyvetter Kvartskyvetter	Starna, Essex, England
Magnetrorer RCT basic	Janke & Kunkel, Staufen, Tyskland
NMR Varian Gemini 200 Bruker DPX 300	Varian, Palo Alto, CA, USA Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Tyskland
Oljepumpe Edwards E-Lab 2	Edwards High Vacuum International, Sussex, England
Ristemaskin IKA-VIBRAK-VXR	Janke & Kunkel, Staufen, Tyskland
Rotavapor Büchi Rotavapor-R	Büchi, Flawil, Sveits
Sprayapparat TLC sprayer	Camag, Muttenz, Sveits
UV-apparat Uv-spektrofotometer: Shimadzu UV 160A Temperaturregulator: Shimadzu CPS-controller Kyvetteholder: Shimadzu CPS-240A	Shimadzu, Kyoto, Japan
UV-lampe Model UVSL-58 (254 og 366 nm)	Ultra Violet Products, San Gabriel, CA, USA
Vekt Sartorius modell BP221S	Sartorius, Göttingen, Tyskland

5.2 Metoder

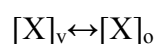
5.2.1 Metodeprinsipper

5.2.1.1 Separasjonsmetoder

5.2.1.1.1 Væske-væske ekstraksjon

Prinsipp

Væske-væske ekstraksjon baserer seg på stoffers fordeling mellom to ikke blandbare væsker. Vanligvis benyttes en vandig væske og et organisk løsningsmiddel. Likevektsfordelingen for et stoff, X, kan beskrives på følgende måte:



Hvor v og o er henholdsvis vandig- og organisk fase. For å ekstrahere et stoff fra en vandig løsning benyttes et løsningsmiddel med tilstrekkelig løsemiddelstyrke til å løse stoffet og med tilstrekkelig selektivitet slik at uønskede forbindelser ikke blir ekstrahert med. Startes ekstraksjonen med et upolart løsningsmiddel, vil kun de mest upolare forbindelsene ekstraheres over i den organiske fasen. Den vandige fasen kan deretter ekstraheres med et litt mer polart løsningsmiddel og dermed vil forbindelser som er litt mer polare ekstraheres over. Gjentatte ekstraksjoner med små volum gir høyere utbytte enn en enkelt ekstraksjon med et stort volum [30].

5.2.1.1.2 Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

Prinsipp

Kolonnekromatografi er en teknikk som brukes for å separere stoffer i blanding. Kolonnen er tilknyttet en pumpe som driver mobilfasen gjennom kolonnen. Når en prøve appliseres på kolonnen og elueres med et passende elueringsmiddel, vil de ulike forbindelsene i prøven vandre langs kolonnen med forskjellig hastighet på grunn av ulik interaksjon med kolonnematerialet, dermed kan stoffene separeres [30]. Mobilfase velges ut ifra hvilke stoffer som skal separeres og hvilken stasjonærfase man bruker. Det er vanlig å bruke en blanding av flere løsningsmidler som mobilfase, og elueringen kan foretas isokratisk eller med gradient. Det finnes ulike stasjonærfaser som benytter forskjellig separasjonsprinsipp.

- Toyopearl HW40

Toyopearl er en semi-rigid, porøs, hydrofil gel utviklet til bruk ved mellomtrykks væskekromatografi. Den består av en matriks som er copolymerisert av oligoetylenglykol, glycidylmetacrylat og pentaerytrodimetacrylat. Toyopearl HW40 separerer stoffer med molekylvekt mellom 100 og 10 000 Da [31]. Prinsippet for separasjon med Toyopearl HW40 er eksklusjonskromatografi. Dette innebærer at et stoff separeres etter dets molekylstørrelse. Stasjonærfasen er et porøst pakkemateriale med en gitt porestørrelse og molekyler som er for store til å passere gjennom porene blir ført med mobilfasen mellom partiklene og eluert ut først. Deretter kommer molekylene ut etter avtagende molekylstørrelse. Toyopearl HW40 har høy kjemisk stabilitet og er kompatibel med organiske løsningsmidler [30, 31].

- Sephadex LH-20

Sephadex LH-20 består av hydroksypropylert Sephadex G-25, og er en dekstran gel som lages ved kryssbinding av dextranskjeder, dette gir et tre-dimensjonal polysakkarid nettverk. Hydroksypropyl gruppene er bundet til glukoseenheterne i dextranskjeden med eterbindinger. Dette gir gelen både lipofile og hydrofile egenskaper [32]. Prinsippet for separasjon med Sephadex LH-20 er eksklusjonskromatografi. Adsorpsjon spiller i tillegg til eksklusjon en viktig rolle fordi Sephadex LH-20 har sterkt adsorptive egenskaper ovenfor aromatiske forbindelser. Disse egenskapene varierer med ulike mobilfaser [30, 32].

- Omvendt fase C₁₈-bundet silica

Omvendt fase C₁₈-bundet silica er et kolonnemateriale som brukes til omvendtfase kromatografi. Ved omvendt fase kromatografi anvendes en upolar stasjonærfase og en polar mobilfase. Modifisert silica med C₁₈H₃₇-grupper bundet til seg ble i dette tilfellet brukt. De viktigste interaksjonene som finner sted i omvendt fase kromatografi er van der Waalske krefter mellom stasjonærfase og analytt. Dette er relativt svake krefter som øker med molekylstørrelsen. Polare interaksjoner har liten betydning på grunn av den vandige mobilfasen som motvirker slike interaksjoner. Det er i hovedsak størrelsen på den upolare delen av molekylet som har noen effekt på retensjonen. I omvendt fase kromatografi elueres derfor de polare komponentene ut først og de upolare komponentene sist [30].

5.2.1.1.3 Høytrykksvæskekromatografi

Prinsipp

Prinsippet for høytrykksvæskekromatografi (HPLC) er ganske likt som for kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk, med unntak at separasjonsprosessen foregår ved et trykk på 100-300 bar. Det høye trykket skyldes de fysiske egenskapene til kolonnen, og det er derfor nødvendig med en pumpe for å drive mobilfasen gjennom kolonnen. Prinsippet for separasjon på C₁₈-kolonne er beskrevet under avsnitt ”5.2.1.1.2 Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk”. I tillegg skiller HPLC seg ut ved at det er koblet en detektor til enden av kolonnen, vanligvis en UV-detektor [30]. HPLC kan brukes preparativt og analytisk.

5.2.1.2 Identifikasjonsmetoder

5.2.1.2.1 Analytisk tynnsjikt-kromatografi

Prinsipp

Tynnsjikt-kromatografi (TLC) er en analysemetode hvor mobilfasen er en væske og stasjonærfasen ligger som et tynt sjikt på en flat plate av glass, plast eller metall. I TLC kan flere prøver og eventuelt standarder påsettes samme plate og separeres samtidig med samme mobilfase. Silica, normal- eller omvendtfase, er den stasjonærfasen som brukes mest, men det finnes også andre [30].

Prøver og standarder løses i egnet løsningsmiddel og påsettes som flekker eller bånd langs en linje ved den ene enden av platen. Løsningsmiddelet dampes av og platen settes med påsettningskanten ned i et kar med mobilfasen og som har en atmosfære som er mettet av denne. Nivået av mobilfasen må være lavere enn linjen med de påsatte prøvene. Når platen kommer i kontakt med mobilfasen vil denne trekkes oppover ved hjelp av kapillærkrefter. Komponentene i prøvene vil bli transportert med forskjellig hastighet og bli separert. Når mobilfasen nærmer seg den øvre kanten av platen tas platen ut av karet, væskefronten merkes og mobilfasen dampes av. Deretter kan komponentene detekteres enten instrumentelt eller visuelt [30].

Vandringen til et stoff beskrives i TLC med dets retensjonsfaktor, R_f , definert som:

$$R_f = L_s / L_{mf}$$

L_s : stoffets vandringsavstand fra startlinjen til flekkens sentrum.

L_{mf} : avstanden fra startlinjen til mobilfasefronten.

5.2.1.2.2 DPPH-spraying

Prinsipp

Prinsippet for DPPH-spraying er det samme som for DPPH-testen som er beskrevet i avsnitt "5.2.1.3.1 Radikalscavenging (DPPH-test)". Ved spraying av prøver på satt tynnskjiktplate, enten som flekker eller som utviklede prøver, vil stoff med radikalfangende evne kunne detekteres visuelt ved at det dannes gule flekker mot lilla bakgrunn (Figur 6) [33].



Figur 6. Eksempel på TLC-plate sprayet med DPPH. De gule flekkene indikerer radikalfangende stoff.

5.2.1.2.3 NMR-spektroskopi

Prinsipp

NMR (kjernemagnetisk resonans)-spektroskopi er en teknikk som brukes til strukturbestemmelse av organiske forbindelser. Teknikken gir et kart over karbonhydrogenskjelettet til et organisk molekyl [34].

Alle atomkjerner som inneholder et odde antall protoner og/eller nøytroner har spinn og er magnetisk aktive. Eksempler på slike kjerner er ^1H , ^{13}C , ^{19}F og ^{31}P . Disse atomkjernene er positivt ladet og spinner rundt sin egen akse, kombinasjonene av dette gjør at de fungerer som magneter og interagerer med et eksternt magnetfelt, B_0 . Uten påvirkning fra magnetfeltet er spinnene orientert tilfeldig, men når kjernene plasseres i et ytre magnetfelt, B_0 , orienteres spinnene enten parallelt eller antiparallelt til B_0 . Det kreves mer energi for å stille seg mot B_0 , derfor vil de fleste kjernene orienteres parallelt med B_0 . Hvis de orienterte kjernene blir bestrålt med elektromagnetisk stråling med rett frekvens, tar de opp energi og det lavere energinivået ”spinn-flipper” til det høyere energinivået. Når dette skjer sies det at den magnetiske kjernen er i resonans med den påførte strålingen, der av navnet kjernemagnetisk resonans. Frekvensen som er nødvendig for resonans er avhengig av styrken på magnetfeltet og kjernen [34].

Absorpsjonsfrekvensen til ^1H og ^{13}C er ikke lik for kjernene. Alle kjerner i molekyler er omringet av elektroner. Disse er negativt ladet og danner et magnetfelt som virker motsatt vei av B_0 når det settes på. Det effektive magnetfeltet på hver kjerne blir:

$$B_{\text{effektiv}} = B_0 - B_{\text{lokal}}$$

Vi sier at kjernen er skjermet fra full effekt av magnetfeltet. Hver ikke ekvivalente ^1H -eller ^{13}C -kjerne gir opphav til forskjellige signaler, mens kjemisk identiske atomer er representert ved samme signal. NMR-spektre viser applisert feltstyrke økende fra venstre mot høyre, dvs at kjerner i den venstre delen av spekteret er mindre skjermet enn kjerner i den høyre delen av spekteret. For å bestemme posisjonen til kjernenes absorbans brukes vanligvis tetrametylsilan, TMS, som referanse. TMS brukes i både ^1H og ^{13}C fordi det gir en enkelt topp som oppstår til høyre for der vanlige topper i organiske forbindelser forekommer. Posisjonen i spekteret hvor en kjerne absorberer kalles dets kjemiske skift, δ , og TMS settes til null (0).

$$\delta = \frac{\text{observert kjemisk skift (antall Hz vekk fra TMS)}}{\text{Spektrometer frekvens i MHz}}$$

For ^1H -NMR-spekterene ligger signalene vanlig vis i området 0-15 δ , mens de for ^{13}C -NMR-spekterene ligger i området 0-220 δ . Generelt gir elektronegative substituent, aromatiske

karboner og protoner deshielding (signaler til venstre i spekteret), mens atomer av alifatisk opphav gir shielding (signaler til høyre i spekteret) [34].

Det kjemiske skiftet gir informasjon om de ulike protonenes kjemiske natur. Arealet under hver topp er proporsjonalt med antallet protoner som utgjør toppen, vha integrasjon er det mulig å beregne det relative antall protoner den integrerte toppen utgjør i molekylet. Toppene i spektret kan splittes i flere topper (spinn-spinn splitting), dette skyldes at protonene kobler med spinnene i naboprotoner. Vanligvis vil et proton med n identiske naboprotoner gi opphav til $(n+1)$ signaler. Avstanden mellom toppene i en multipllett kalles koblingskonstanten, J , og måles i Hz. J er felles for de protonene som kobler med hverandre [34].

Et ^{13}C -NMR-spektrum gir informasjon om antall ulike karbonatomer i et molekyl. Basert på antall signaler og det kjemiske skiftet til hvert signal gir ^{13}C -NMR informasjon om karbonatomets kjemiske natur. Toppene har ikke nødvendigvis samme størrelse selv om de representerer samme antall C-atomer [34].

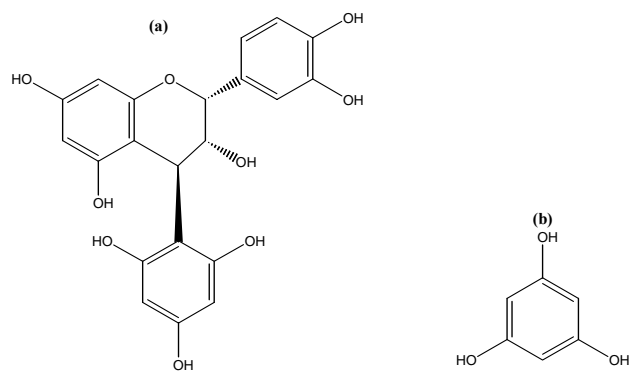
I tillegg til vanlige ^1H - og ^{13}C -NMR spektra, finnes det andre spektra som kan gi mer strukturinformasjon [34, 35].

5.2.1.2.4 Syrekatalysert floroglucinolspalting av proanthocyanidiner

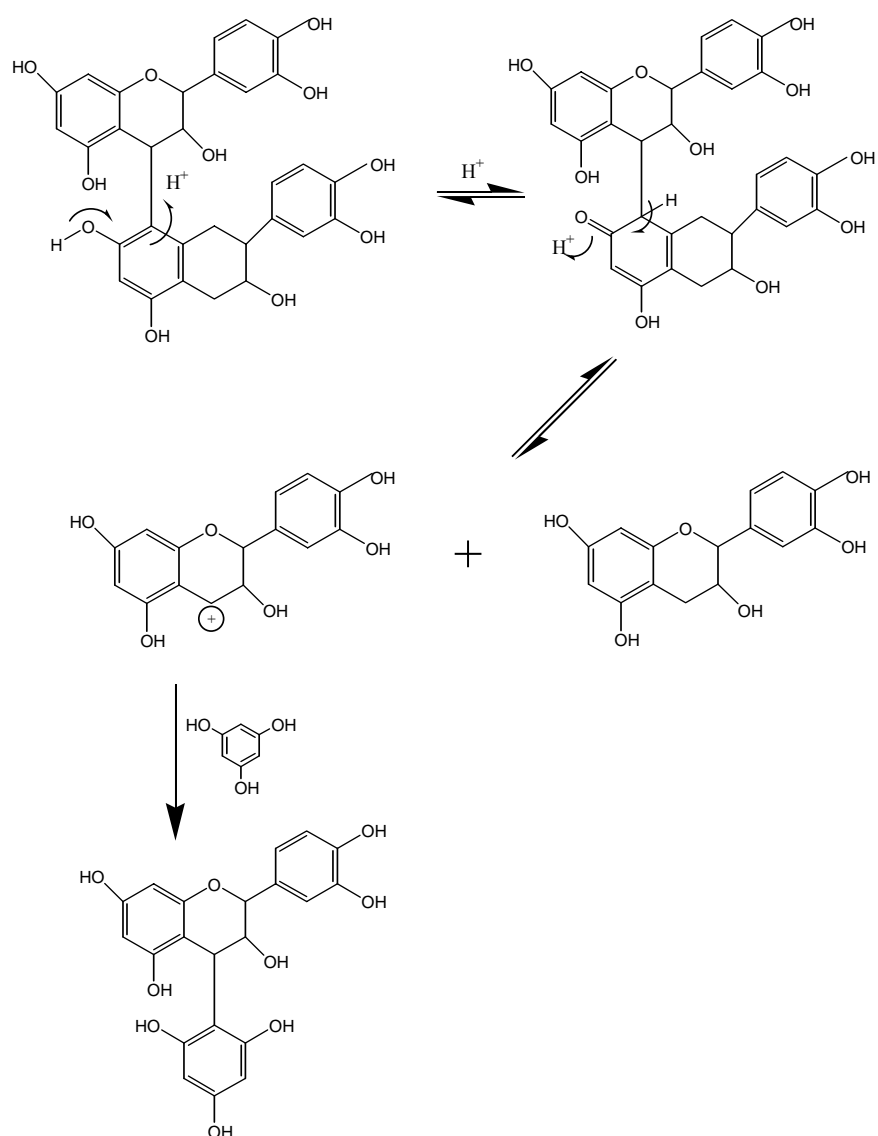
Prinsipp

For å beskrive sammensetningen av proanthocyanidinene må enkeltenhetene kartlegges. Dette gjøres ved å depolymerisere proanthocyanidinene. Proanthocyanidinene er ikke-hydrolyserbare garvestoffer og må spaltes på annen måte enn vanlig hydrolyse [21].

Det er mulig å bestemme hvilke monomere enheter proanthocyanidiner er bygd opp av ved å bryte den interflavonoide bindingen mellom monomerene. Denne bindingen brytes under sure forhold og man ender opp med startenheten som en flavan-3-ol monomer og forlengerenhetene som elektrofile flavan-3-ol intermediater. Disse intermediatene kan fanges av nukleofile reagenser som floroglucinol (Figur 7 (b)) og det gir analyserbare forbindelser (Figur 7 (a) og Figur 8) [36].



Figur 7. (a): Epicatechin-floroglucinol etter depolymerisering. **(b):** Floroglucinol



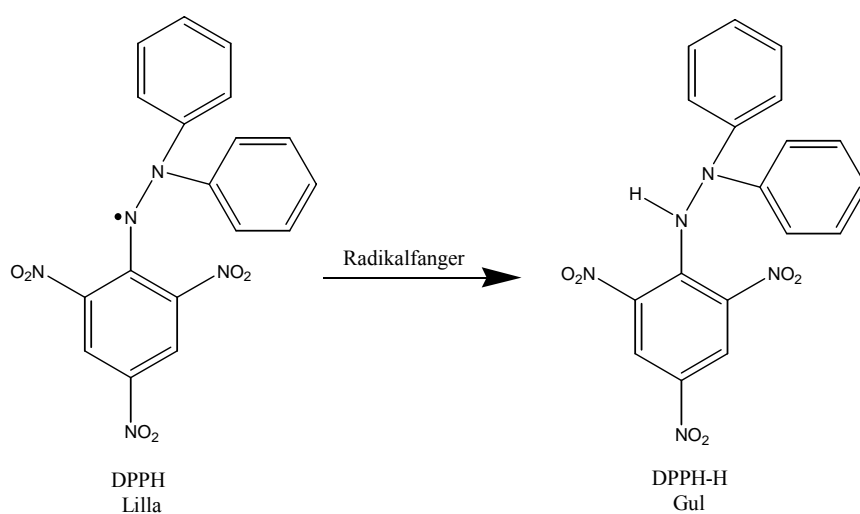
Figur 8. Teoretisk reaksjonsmekanisme for syrekatalysert floroglucinolspalting av Proanthocyanidiner [36].

5.2.1.3 Metoder for måling av biologisk aktivitet

5.2.1.3.1 Radikalscavenging (DPPH-test)

Prinsipp

1,1-Difenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) er et stabilt radikal som holder seg godt i løsning. På grunn av dets uparrede elektron har DPPH-radikalet et sterkt absorpsjonsbånd ved 517 nm, og løsningen har en dyp lilla farge [37]. Ved reaksjon med en radikalscavenger går løsningen fra å være dyp lilla til svak gul (Figur 9). Dette skyldes dannelsen av DPPH-H som kun har svak absorpsjon ved 517 nm.



Figur 9. Reduksjon av DPPH ved radikalscavenging [38].

Reduksjon i absorpsjon er relatert til mengde og aktivitet av radikalscavenger [37, 39, 40]. På grunn av DPPH-radikalets sterke absorpsjon ved 517 nm kan det anvendes løsninger med lav konsentrasjon, og denne lave konsentrasjonen gjør at Beer-Lamberts lov gjelder for hele det aktuelle området [37]. Det skjer en fortykning ved tilsetning av prøveløsningen til DPPH-løsningen og denne korrigeres for ved å multiplisere startabsorbansen med 0,983 ($=2,95/3$). DPPH-scavenging kan beregnes i prosent etter følgende formel [40]:

$$100 * \frac{(A_0 * 0,983) - A_1}{(A_0 * 0,983)}$$

A_0 : Absorbans i kyvetten før tilsetning av prøveløsning.

A_1 : Absorbans i kyvetten etter endt måletid.

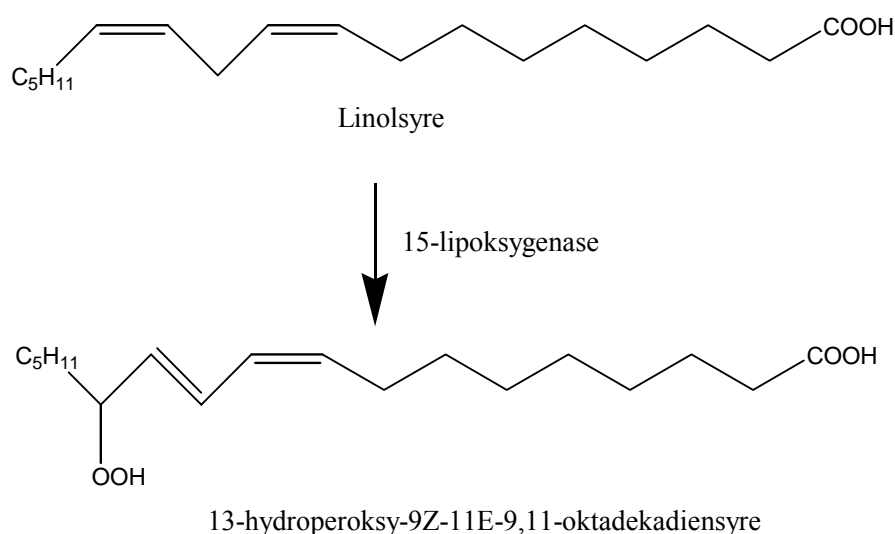
5.2.1.3.2 Hemming av 15-lipoksygenase (15-LO test)

Prinsipp

Enzymet 15-lipoksygenase (15-LO) peroksidierer arakidonsyre til 15-HPETE som omdannes videre til andre eikosanoider. I denne testen benyttes 15-LO fra soyabønner. Denne er ikke identisk med mammalsk 15-LO, men det er forholdsvis god korrelasjon mellom inhiberingsverdiene til de to enzymene. Soyabønnelipoksygenase kan derfor brukes som testenzym for å identifisere hemmere av mammalsk 15-LO [41-43]. En annen grunn er at 15-LO fra soyabønner er billig, lett tilgjengelig og forholdsvis stabilt [43]. Enzymløsningen oppbevares på is under forsøksperioden for å forsinke tap av aktivitet ved oksidativ denaturering. Enzymaktiviteten reduseres lineært som en funksjon av løsningens lagringstid [44]. Dette kan korrigeres for ved beregninger, og derfor måles aktiviteten med jevne mellomrom under forsøket.

Linolsyre brukes som substrat for 15-LO i stedet for arakidonsyre fordi den er billigere og mer stabil. Hemming av peroksidering av linolsyre er ikke forskjellig fra hemming av peroksidering av arakidonsyre. Linolsyre er derfor en god modellsubstans ved testing av ulike stoffs hemningseffekt på 15-LOs peroksidering av arakidonsyre [43].

Linolsyre har en 1,4-dienstruktur og danner ved peroksidering 13-hydroperoksy-(9Z,11E)-oktadekadiensyre (13-HPODE) [41, 44] (Figur 10).



Figur 10. Reaksjon mellom linolsyre og 15-LO [38].

13-HPODE har to konjugerte dobbeltbindinger og dette gjør at forbindelsen absorberer UV-stråling i området 230-235 nm. Linolsyre har ikke konjugerte dobbeltbindinger og har dermed ikke denne egenskapen. Peroksidering av linolsyre vil øke absorbansen ved 234 nm proporsjonalt med konsentrasjonen av dannet dien. Hemming av enzymet 15-LO vil føre til at denne absorbansøkningen blir mindre [45, 46]. Ved å måle økningen i absorbans for prøver med og uten hemmere over en periode på 30-90 sekunder etter ensymtilsetning, kan man beregne prosentvis enzymhemming etter følgende formel [43]:

$$\frac{100*(A_2-A_1)}{A_2}$$

A_1 : Absorbansøkning (AU/min) for prøve med hemmer

A_2 : Absorbansøkning for prøve uten hemmer

For å løse linolsyren brukes boratbuffer med pH 9,00. Linolsyre har pK_a -verdi = 4,77 [47] og mesteparten av linolsyren vil derfor være ionisert. Dette, samt at man løser linolsyren i 150 μ l etanol før tilsetning av buffer, er med på å øke løseligheten. Resultatet er at man får en klar løsning, noe som er nødvendig for å kunne måle riktig absorbans [48].

Det må være små mengder av lipidperoksid tilstede for at 15-LO skal kunne peroksidere linolsyre. Dette oppnås ved at en ampulle med linolsyre åpnes og oppbevares i romtemperatur i 1 døgn før den brukes i forsøket. Tilgangen på luft gjør at små mengder linolsyre oksideres til lipidperoksid. Linolsyre med små mengder oksidert linolsyre gjør det også enklere å få løsningen klar [48].

5.2.2 Generelle eksperimentelle metoder

5.2.2.1 Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

Utførelse

Før separasjonen ble kolonnen pakket ved at kolonnematerialet ble rørt ut i starteluenten. Etter eventuell svelling av kolonnematerialet ble det overført til en kolonne av ønsket størrelse. Kolonnen ble så skylt gjennom med litt av starteluenten tilsvarende 1-2 ganger volumet av kolonnen.

Prøven som skulle separeres ble løst i et lite volum av start eluenten og applisert på kolonnen. Deretter ble komponentene eluert ut ved hjelp av gradienteluering, og fraksjoner med passende volum ble samlet i prøveglass. Tilslutt ble kolonnen vasket med 70% aceton og/eller 100% aceton for å skylle ut eventuelle rester.

Løsninger og reagenser

Et egnet løsningsmiddel ble brukt til å løse prøven og blandinger av vann og metanol, aceton og acetonitril ble brukt til eluering av prøven.

5.2.2.2 Høytrykksvæskekromatografi

Utførelse

Før applisering av prøven ble kolonnen kondisjonert med mobilfasen i 30 minutter. Deretter ble prøven som var ønsket analysert injisert på kolonnen ved hjelp av injeksjonsloopen. Gradient eluering ble benyttet. Ved analytisk HPLC ble det tatt opp et kromatogram, mens det ved preparativ HPLC også ble samlet opp fraksjoner.

Løsninger og reagenser

Acetonitril og vann og forskjellige konsentrasjonsblandinger av disse.

5.2.2.3 Analytisk tynnsjikt-kromatografi (TLC)

Utførelse

Den ønskede mobilfase ble laget og overført til utviklingskaret, mobilfasen ble helt i karet 15 minutter før utvikling av platene for at atmosfæren i karene skulle bli mettet. Prøvene som skulle undersøkes ble applisert på TLC-platene ved hjelp av kapillærrør. Prøvestørrelsen varierte fra 5-20 µl. Etter at løsningsmidlene til prøvene var dampet av, ble TLC-platene satt i karet for utvikling. Platene ble tatt av før mobilfasefronten nådde toppen av platen, og fronten ble avmerket. Etter at mobilfasen var fordampet ble komponentene detektert ved at platen ble betraktet under UV-lys ved 254 nm (kortbølget) og 366 nm (langbølget). Deretter ble platene eventuelt sprayet med DPPH- eller Ceric-reagens.

Løsninger og reagenser

Løsningsmidler ble brukt for å løse prøvene, og blandinger av løsningsmidler ble brukt for å utvikle platene, for eksempel metanol, etylacetat, maursyre, eddiksyre og vann.

5.2.2.4 DPPH-spraying

Utførelse

Etter at prøver som ble ønsket undersøkt var applisert på en TLC-plate og eventuelt utviklet og tørket, ble platen sprayet med DPPH-reagens. Deretter ble resultatet avlest etter noen minutter.

Løsninger og reagenser

DPPH-reagens løst i metanol i en konsentrasjon så sterk at den farger TLC-platen jevnt lilla.

5.2.2.5 Ceric-spraying

Utførelse

Etter at prøver som ble ønsket undersøkt var applisert på en TLC-plate, utviklet og tørket, ble platen sprayet med ceric-reagens og plassert i varmeskap ved 100 °C i 5 minutter. Platene ble så undersøkt visuelt og resultatene avlest.

Løsninger og reagenser

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

5.2.2.6 NMR-spektroskopi

Utførelse

En mengde av prøven (vanligvis 5-100 mg) ble løst i 1 ml løsningsmiddel tilsatt 1 dråpe TMS. Prøveløsningen ble overført til et NMR-rør og analysert på et NMR-spektrometer.

Løsninger og reagenser

TMS ble brukt som referanse og deutererte løsningsmidler av kloroform, aceton, metanol og vann ble brukt for å løse prøvene.

5.2.2.7 Syrekatalysert floroglucinolspalting av proanthocyanidiner

Utførelse

Floroglucinolspaltingen ble utført som beskrevet av Foo et al 1996 [49], men med noen modifikasjoner som beskrevet av Duong 2005 [15]. 200 mg prøve ble løst i 5 ml etanol og 140 mg floroglucinol ble løst i 5 ml 1 % HCl i etanol. Floroglucinol-løsningen ble tilsatt prøven og ristet i 15 minutter. Prøveblandingen ble dampet inn til ca 2,5 ml under N₂-gass. Etter spaltingen ble enhetene separert på en Sephadex LH20 kolonne med mobilfase etanol,

og deretter ble fraksjonene analysert på tynnsljiktplater av cellulose med mobilfase eddiksyre – vann (3:47) [49]. Fraksjonene ble slått sammen på bakgrunn av dette. De sammenslåtte fraksjonene ble identifisert ved hjelp av ^1H NMR-spektroskopi [50].

Løsninger og reagenser

Etanol, floroglucinol tilsvarende 70 % av vektmengden til prøven og 1 % HCl i etanol.

5.2.2.8 Radikalscavenging (DPPH-test)

Utførelse

Spektrofotometeret ble nullstilt med en blindprøve bestående av metanol. DPPH ble løst i metanol slik at løsnings absorbans ved 517 nm var ca 1,00. Prøveløsninger av de ulike fraksjonene ble løst i dimetylsulfoksid (DMSO). Konsentrasjonen til prøveløsningene ble valgt ut fra forventet aktivitet for den enkelte fraksjon basert på TLC. A_0 ble målt i 2,95 ml DPPH-løsning før tilsetning av prøve ved 517 nm. Prøveløsningen (50 μl) ble deretter tilsatt og løsningen omrørt med plastspatel. 30 sekunder etter tilsetning av prøve startet registreringen av absorbansen. Absorbansen ble målt hvert 60. sekund i 5 minutter. Tre paralleller ble utført for hver prøve.

Løsninger og reagenser

DMSO ble brukt til å lage fortynningsrekker av prøvene. DPPH ble løst i metanol med en konsentrasjon som gir en absorbans ved 517 nm på mellom 1,1 – 0,9. Metanol til blindprøve.

5.2.2.9 Hemming av 15-lipoksygenase (15-LO test)

Utførelse

Alle løsninger ble oppbevart ved romtemperatur, unntatt løsning C som ble oppbevart på is. Prøveløsninger av de ulike fraksjonene ble løst i DMSO. Kvartskvetter ble benyttet under forsøket fordi disse slipper igjennom UV-stråling ved 234 nm. Spektrofotometeret ble nullstilt med en blankprøve bestående av 0,95 ml A, 2,00 ml B og 0,05 ml DMSO. Løsningen ble blandet med plastspatel. Blankprøver ble tatt før forsøket, etter hver tredje måleserie og tilslutt for å sjekke om enzymaktiviteten holdt seg stabil gjennom forsøket. Sammensetning var 0,90 ml A, 2,00 ml B og 0,05 ml DMSO eller prøveløsning for henholdsvis blankprøver og prøver. Etter omrøring ble det tilsatt 0,05 ml C, med påfølgende omrøring. Absorbansøkningen ble målt for perioden 30-90 sekunder etter tilsetning av C. Tre paralleller ble utført for hver prøve.

Løsninger og reagenser

DMSO ble brukt til å lage fortynningsrekker av prøvene.

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

B: Substratløsning: 50 µl linolsyre og 150 µl etanol blandes og tilsettes A til 50 ml. 15 ml av denne løsningen fortynnes med 225 ml A. Løsningen ble laget rett før forsøket.

C: Enzymløsning: 15-LO løses i A til en konsentrasjon som gir en absorbansøkning på 0,3-0,5 AU/min, enzymkonsentrasjonen bør være på ca 10 000 enheter/ml. Løsningen ble laget rett før bruk og oppbevart på is under hele forsøket.

5.2.3 Eksperimentell utførelse

5.2.3.1 Utgangsmateriale og ekstraksjon

Plantematerialet var bark fra den bangladeshiske planten *Xylocarpus moluccensis*. Den ble samlet inn av M. Alamgir og M. Sarder fra Universitetet i Khulna, Bangladesh.

Herbarieeksemplar av planten er oppbevart der.

Ekstraksjon av barken med metanol ble også utført ved Universitetet i Khulna og omtales ikke videre her. Ekstraksjonen resulterte i primært metanolekstrakt (MeOH-ekstrakt) som ble tilsendt Farmasøytisk Institutt, og undersøkt videre her.

5.2.3.2 Primært MeOH-ekstrakt

Væske-væske ekstraksjon

Primært MeOH-ekstrakt, 20,36 g, ble løst i 50 ml MeOH og rørt med magnetrører i 20 min. Det som løste seg ble dekantert over i en skilletrakt og suspendert med 7,5 dl destillert vann. Primær MeOH-ekstrakt som ikke var løst ble så løst i 25 ml MeOH og det som løste seg ble dekantert over i skilletrakten. 25 ml MeOH ble igjen tilsatt og da alt var løst ble det overført til skilletrakten.

Primært MeOH-ekstrakt ble så ekstrahert med kloroform (CHCl₃) (3x150 ml), etylacetat (EtOAc) (8x150 ml) og n-pentanol (PeOH) (5x150 ml). Etter hver tilsetning av løsningsmiddel ble skilletrakten ristet kraftig. Da fasene hadde separert seg ble den organiske fasen tappet av og filtrert over i innveide rundkolber. Ekstraktene i rundkolbene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Etter siste ekstraksjon med PeOH var det igjen en

vandig rest som ble overført til innveid rundkolbe og dampet inn til tørrhet på samme måte som ekstraktene. Etter tørking ble ekstraktene og den vandige resten veid (Tabell 5).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra (NMR-spektra 9.3.1, 9.3.3, 9.3.5 og 9.3.8) og ^{13}C -NMR-spektra (NMR-spektra 9.3.2, 9.3.4, 9.3.6 og 9.3.9) av ekstraktene og den vandige resten.

Bioassay

Assay for radikalscavenging (DPPH-test) (Tabell 6) og for hemming av 15-lipoksygenase (15-LO test) (Tabell 7) ble utført for ekstraktene og den vandige resten. Ekstraktene ble testet på konsentrasjonene 166,7 $\mu\text{g/ml}$, 83,3 $\mu\text{g/ml}$, 41,7 $\mu\text{g/ml}$, 20,8 $\mu\text{g/ml}$, 10,4 $\mu\text{g/ml}$, 5,2 $\mu\text{g/ml}$ og 2,6 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.3.3 Fraksjonering av EtOAc-ekstraktet

Flytskjema for fraksjonering av EtOAc-ekstraktet og videre arbeid med de opparbeidede fraksjonene er vist i vedleggsdelen av hovedfagsoppgaven.

Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

EtOAc-ekstraktet, 3,29 g, ble løst i 5 ml MeOH og applisert på en Toyopearl HW40 kolonne (260 x 25 mm). Destillert vann og 25, 50, 75 og 100 % MeOH ble brukt som mobilfase og det ble samlet fraksjoner på 30 ml. Gjenværende stoff på kolonnen ble vasket ut med 50 og 100 % aceton. Det ble i alt samlet 61 fraksjoner (Tabell 9.2.1).

Analytisk TLC

Fraksjonene 1-60 ble undersøkt ved normalfase TLC (kiselgel 60 F₂₅₄)

Mobilfase: EtOAc : destillert vann : maursyre : eddiksyre (70:30:3:2) [51]

Dette ble blandet, den organiske fasen ble tatt av og brukt som mobilfase.

Før og etter platene ble utviklet ble de undersøkt ved kort- og langbølget UV-lys. Fraksjoner som absorberte UV-lys ble avmerket. Platene ble så sprayet med DPPH-løsning og fraksjoner som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene E1 - E15 (Tabell 9.2.1).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av alle fraksjonene unntatt E3 og E14 (NMR-spektra 9.3.10, 9.3.12, 9.3.14, 9.3.16, 9.3.19, 9.3.22, 9.3.25 og 9.3.28). Det ble tatt ^{13}C -NMR-spektra av alle fraksjonene unntatt E1-3, E5 og E14 (NMR-spektra 9.3.11, 9.3.13, 9.3.15, 9.3.17, 9.3.20, 9.3.23, 9.3.26 og 9.3.29).

Bioassay

DPPH-testen ble utført på alle fraksjonene unntatt E3, E5 og E14 (Figur 11 og Tabell 9.2.2). 15-LO-testen ble utført på fraksjonene E4, E6 og E7 (Tabell 9.2.3). Fraksjonene ble testet på konsentrasjonene 83,3 $\mu\text{g/ml}$, 41,7 $\mu\text{g/ml}$, 20,8 $\mu\text{g/ml}$, 10,4 $\mu\text{g/ml}$, 5,2 $\mu\text{g/ml}$ og 2,6 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.3.4 Videre arbeid med E4 og E5

Siden ^1H -NMR-spektra til E4 og E5 indikerte at de kunne inneholde de samme stoffene, ble det foretatt noen undersøkelser for å finne ut om de kunne slås sammen.

Analytisk TLC

Siden vi ikke visste hvilke forbindelser det var i E4 og E5 måtte vi prøve oss frem med hvilke mobilfaser og stasjonærphaser som separerte stoffene best.

Normal fase silica (kiselgel 60 F₂₅₄)

Mobilfase: EtOAc, EtOAc : aceton (75:25), EtOAc : aceton (50:50), EtOAc : aceton (25:75), aceton : MeOH.

Omvendt fase (TLC-aluminium plater RP-18 F_{254S})

Mobilfase: Aceton, vann, MeOH, MeOH : EtOAc (50:50), EtOAc, MeOH : aceton (50:50), MeOH : vann (75:25), MeOH : vann (50:50) og MeOH : vann : EtOAc (5:5:1).

Resultatene tydet på at det var de samme forbindelsene og E4 og E5 ble slått sammen til fraksjon E4-5.

5.2.3.5 Fraksjonering av E4-5

Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

Fraksjon E4-5, 83,9 mg, ble løst i et par ml 50 % vandig MeOH og applisert på en Sephadex LH20 kolonne (200 x 25 mm). 50, 75 og 100 % MeOH ble benyttet som mobilfase, og

fraksjoner på 30 ml ble samlet. Gjenværende stoff på kolonnen ble vasket ut med 100 % MeOH. Det ble i alt samlet 23 fraksjoner (Tabell 9.2.4).

Analytisk TLC

Fraksjonene 1-23 ble undersøkt ved omvendt fase TLC (aluminium plater RP-18 F_{254S})

Mobilfase: Vann : MeOH (75:25)

Bestemt ut i fra tidligere TLC undersøkelser av E4 og E5.

Før og etter platene ble utviklet ble de undersøkt ved kort- og langbølget UV-lys. Fraksjoner som absorberte UV-lys ble avmerket. Platene ble sprayet med Ceric-løsning og plassert i varmeskap ved 100 °C i 5 minutter. Fraksjoner som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene E4-5.1 – E4-5.6 (Tabell 9.2.4).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektra av E4-5.1, E4-5.2 og E4-5.3 (NMR-spektrum 9.3.31).

Anmerkninger:

- Det var noe stoff som ikke løste seg og ble liggende igjen i rundkolben før separasjon.
- Det satt igjen litt stoff på kolonnen etter vask med aceton.

Kolonnematerialet ble satt i aceton over natten og det som løste seg i aceton ble til fraksjon E4-5.7.

5.2.3.6 Videre arbeid med E4-5.1

Analytisk HPLC

For å finne ut hvor mange forbindelser E4-5.1 inneholdt ble 20 µl av E4-5.1 løst i mobilfase og injisert på en omvendt fase C18-kolonne (250 x 4,6 mm).

Mobilfase: vann : acetonitril (ACN).

Gradienteluering, startet med (80:20) i fem minutter, så 20 minutter gradient til (20:80) og denne konsentrasjonen ble holdt i 10 minutter før 5 minutter gradient tilbake til (80:20).

Total analyse tid var 45 minutter og det ble kjørt to måleserier. UV-absorbans måling ble utført ved henholdsvis 254 nm og 280 nm etterhvert som forbindelsene passerte UV-detektoren (Kromatogram 9.4.1).

5.2.3.7 Fraksjonering av E4-5.1

Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

34,4 mg av E4-5.1 ble løst i 25 % vandig ACN og applisert på en VersaFlash – C18-kolonne (kolonnevolum = 60 ml). 25, 50, 75 og 100 % ACN ble brukt som mobilfase, og det ble samlet fraksjoner på 20 ml. Kolonnen ble vasket med 100 % aceton og 66 % vandig MeOH for å få ut forbindelser som eventuelt satt igjen på kolonnen. Det ble i alt samlet 44 fraksjoner (Tabell 9.2.5).

Analytisk TLC

Fraksjonene 1-44 ble undersøkt ved omvendt fase TLC (aluminium plater RP-18 F_{254S})

Mobilfase: MeOH : vann (50:50)

Før og etter platene ble utviklet ble de undersøkt ved kort- og langbølget UV-lys. Fraksjoner som absorberte UV-lys ble avmerket. Platene ble sprayet med Ceric-løsning og plassert i varmeskap ved 100 °C i 5 minutter. Fraksjoner som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene E4-5.1.1 – E4-5.1.6 (Tabell 9.2.5).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektra av alle fraksjonene (NMR-spektrum 9.3.33 er vist).

Anmerkninger: - Påsatt mengde stoff var 34,4 mg, etter inndampning og veiing veide de nye fraksjonene tilsammen 249,5 mg. Dette kan skyldes at det ble tatt i bruk en ny VersaFlash-kolonne og at det var en del stasjonærfase som ikke var bundet til kolonnen og ble eluert ut med mobilfasen.

5.2.3.8 Videre arbeid med E4-5.1.5

Analytisk HPLC

Fraksjon E4-5.1.5 skulle separeres på preparativ HPLC, og for å finne ut hvilken mobilfase-sammensetning som var best, ble det først utført analytisk HPLC.

20 µl av E4-5.1.5 løst i mobilfase ble injisert på en omvendt fase C18-kolonne (250 x 4,6 mm). To ulike gradientelueringer ble forsøkt.

Mobilfase: Vann : ACN. I: Start (60:40) og gradienteluering over 30 minutter til (40:60)

II: Start (60:40) og gradienteluering over 30 minutter til (50:50)

UV-absorbans måling ble utført ved 254 nm etterhvert som forbindelsene passerte UV-detektoren (Kromatogram 9.4.2).

5.2.3.9 Fraksjonering av E4-5.1.5

Preparativ HPLC

22,3 mg ble løst i 5 ml vann : ACN (60:40) og 2,5 ml ble injisert på omvendt fase C18 kolonne (250 x 21,4 mm).

Mobilfase: Vann : ACN Start (60:40) og gradientluering over 30 minutter til (50:50).

UV-absorbans måling ble utført ved 254 nm etterhvert som forbindelsene passerte UV-detektoren (Kromatogram 9.4.3). Det ble samlet opp fraksjoner fra to kolonnekjøringer. For hver topp i kromatogrammet ble det samlet opp fraksjoner som ble dampet inn på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene E4-5.1.5.1 – E4-5.1.5.8 (Tabell 9.2.6).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra for alle fraksjonene (NMR-spektra 9.3.34-37).

5.2.3.10 Fraksjonering av E6

Av denne fraksjonen ble 202,4 mg løst i 12 ml 50 % vandig MeOH og applisert på en Sephadex LH20 kolonne (200 x 25 mm). 50, 75 og 100 % MeOH ble benyttet som mobilfase, og fraksjoner på 20 ml ble samlet. Før første fraksjon ble 40 ml samlet i et begerglass. Gjenværende stoff på kolonnen ble vasket ut med 100 % aceton og og tilslutt 200 ml 50 % MeOH. Det ble i alt samlet 30 fraksjoner (Tabell 9.2.7).

Analytisk TLC

Fraksjonene 1-30 ble undersøkt ved normal fase TLC (kiselgel 60 F₂₅₄)

Mobilfase: CHCl_3 : EtOAc : eddiksyre (50:50:1) [52]

Før og etter platene ble utviklet ble de undersøkt ved kort- og langbølget UV-lys. Fraksjoner som absorberte UV-lys ble avmerket. Fraksjoner som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene E6.1 – E6.8 (Tabell 9.2.7).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av fraksjonene E6.1 - E6.5 (NMR-spektra 9.3.38 og 9.3.40) og ^{13}C -NMR-spektra av E6.1 og E6.4 (NMR-spektra 9.3.39 og 9.3.41).

Anmerkninger: - Analysevekten var ustabil ved veiing av rundkolber og veiing av rundkolber og fraksjon. For eksempel var det tydelig stoff i fraksjon E6.8, men den kom ut med vekt 0 mg. Dette kan ha ført til at enkelte av fraksjonene har blitt innveid feil.

5.2.3.11 Fraksjonering av E7

Av denne fraksjonen ble 343,3 mg løst i 2 ml 50 % vandig MeOH og applisert på en Sephadex LH20 kolonne (200 x 25 mm). 50, 75, og 100 % MeOH ble benyttet som mobilfase, og fraksjoner på 20 ml ble samlet. Før første fraksjon ble 40 ml samlet opp i et begerglass. Gjenværende stoff på kolonnen ble vasket ut med 100 ml 50 % MeOH og samlet i et begerglass. Det ble i alt samlet 29 fraksjoner (Tabell 9.2.8).

Analytisk TLC

Fraksjonene 1-29 ble undersøkt ved normal fase TLC (kiselgel 60 F₂₅₄)

Mobilfase: CHCl₃ : EtOAc : edikksyre (50:50:1) [52]

Før og etter platene ble utviklet ble de undersøkt ved kort- og langbølget UV-lys. Fraksjoner som absorberte UV-lys ble avmerket. Platene ble så sprayet med Ceric-løsning og plassert i varmeskap ved 100 °C i 5 minutter. Fraksjoner som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene E7.1 – E7.8 (Tabell 9.2.8).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR- og ¹³C-NMR-spektra av fraksjonene E7.3 og E7.5.

Bioassay

Det ble utført DPPH-test (Tabell 9.2.9) og 15-LO-test (Tabell 9.2.10) på fraksjon E7.5.

Fraksjonen ble testet på konsentrasjonene 83,3 µg/ml, 41,7 µg/ml, 20,8 µg/ml, 10,4 µg/ml, 5,2 µg/ml og 2,6 µg/ml.

5.2.3.12 Fraksjonering av E13

Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

Av denne fraksjonen ble 136,2 mg løst i litt av starteluenten og applisert på en Sephadex LH20 kolonne (200 x 25 mm). 50, 75, og 100 % MeOH ble benyttet som mobilfase, og fraksjoner på 30 ml ble samlet. Før første fraksjon ble 90 ml samlet opp i et begerglass. Gjenværende stoff på kolonnen ble vasket ut med 70 og 100 % aceton og samlet i prøveglass (30 ml). Det ble i alt samlet 27 fraksjoner (Tabell 9.2.11).

Analytisk TLC

Fraksjonene 1-27 ble undersøkt ved normal fase TLC (kiselgel 60 F₂₅₄)

Mobilfase: Toluen : aceton : edikksyre (3:3:1) [53]

Før og etter platene ble utviklet ble de undersøkt ved kort- og langbølget UV-lys. Fraksjoner som absorberte UV-lys ble avmerket. Platene ble så sprayet med DPPH-løsning og fraksjoner som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene E13.1 – E13.7 (Tabell 9.2.11).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektra av E13.1 og E13.4 og ¹³C-NMR-spektra av E13.1 – E13.5. Disse lignet svært på tilsvarende spektra av E12 (NMR-spektra 9.3.25 og 9.3.26) og E13, og er ikke vedlagt.

5.2.3.13 Fraksjonering av PeOH-ekstraktet

Flytskjema for fraksjonering av PeOH-ekstraktet er vist i vedleggsdelen av hovedfagsoppgaven.

Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

Av PeOH-ekstraktet ble 9,16 g løst i 30 ml 50 % vandig MeOH og applisert på en Sephadex LH20 kolonne (450 x 25 mm). 25, 50, 75 og 100 % MeOH ble benyttet som mobilfase, og fraksjoner på 60 ml ble samlet. Gjenværende stoff på kolonnen ble vasket ut med 70 og 100 % aceton og samlet i fraksjoner på 60 ml. Det ble samlet totalt 30 fraksjoner (Tabell 9.2.12).

Analytisk TLC

Fraksjonene 1-30 ble undersøkt på cellulose plater (DC Plastikfolien, Cellulose F)

Mobilfase: Eddiksyre : vann (3:47) [49]

Før og etter platene ble utviklet ble de undersøkt ved kort- og langbølget UV-lys. Fraksjoner som absorberte UV-lys ble avmerket. Platene ble så sprayet med DPPH-løsning og fraksjoner som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene P1 – P11 (Tabell 9.2.12).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av fraksjon P2 - P11 (NMR-spektra 9.3.42, 9.3.45, 9.3.48, 9.3.51, 9.3.54, 9.3.57, 9.3.60, 9.3.63, 9.3.66 og 9.3.69) og ^{13}C -NMR-spektra av fraksjon P2 - P11 (NMR-spektra 9.3.43, 9.3.46, 9.3.49, 9.3.52, 9.3.55, 9.3.58, 9.3.61, 9.3.64, 9.3.67, og 9.3.70).

Bioassay

DPPH-testen (Tabell 9.2.13) og 15-LO-testen (Tabell 9.2.14) ble utført på alle fraksjonene unntatt P1. Fraksjonene ble testet på konsentrasjonene 83,3 $\mu\text{g/ml}$, 41,7 $\mu\text{g/ml}$, 20,8 $\mu\text{g/ml}$, 10,4 $\mu\text{g/ml}$, 5,2 $\mu\text{g/ml}$ og 2,6 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.3.14 Videre arbeid med P7

Syrekatalysert floroglucinolspalting

Fraksjon P7, 203,4 mg, ble løst i 5 ml EtOH. Floroglucinol, 140 mg, ble løst i 5 ml 1 % HCl i EtOH. Disse ble blandet og ristet i 15 minutter. Depolymeriseringsproduktene ble separert på en Sephadex LH20-kolonne.

Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

Prøven ble applisert på en Sephadex LH 20 kolonne (200 x 25 mm). 50, 75 og 96 % EtOH ble brukt som mobilfase og fraksjoner på 20-25 ml ble samlet. Gjenværende stoff på kolonnen ble vasket ut med 70 og 100 % aceton og samlet i fraksjoner på 20-25 ml. Det ble samlet totalt 26 fraksjoner. De første og siste 60 ml ble samlet opp i begerglass (Tabell 9.2.15).

Analytisk TLC

Fraksjonene 1-26 ble undersøkt på cellulose plater (DC Plastikfolien, Cellulose F)

Mobilfase: Eddiksyre : vann (3:47) [49]

De ferdig utviklede platene ble sprayet med DPPH-løsning og fraksjoner som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene P7.1 – P7.9 (Tabell 9.2.15).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektra av P7.2, P7.5, P7.6 og P7.8 (NMR-spektra 9.3.71 og 9.3.72).

Anmerkning: - Etter tilsetning av floroglucinol til P7, med påfølgende risting i 15 minutter, ble ikke løsningen inndampet til ca ¼ volum under N₂-gass. Det ble derfor applisert 10 ml prøve på kolonnen.

5.2.3.15 Videre arbeid med P8**Syrekatalysert floroglucinolspalting**

Fraksjon P8, 200,2 mg, ble løst i 5 ml EtOH. Floroglucinol, 143,7 mg, ble løst i 5 ml 1 % HCl i EtOH. Disse ble blandet og ristet i 15 minutter før løsningen ble dampet inn under N₂-gass til det var igjen ca 2,5 ml. Depolymeriseringsproduktene ble separert på en Sephadex LH20-kolonne.

Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

Ca 2,5 ml ble applisert på en Sephadex LH 20 kolonne (200 x 25 mm). 50, 75 og 96 % EtOH ble brukt som mobilfase og fraksjoner på 20-25 ml ble samlet. Gjenværende stoff på kolonnen ble vasket ut med 70 og 100 % aceton og samlet i fraksjoner på 20-25 ml. Det ble samlet totalt 21 fraksjoner. De første og siste 80 ml ble samlet opp i begerglass (Tabell 9.2.16).

Analytisk TLC

Fraksjonene 1-21 ble undersøkt på cellulose plater (DC Plastikfolien, Cellulose F)

Mobilfase: Eddiksyre : vann (3:47) [49]

De ferdig utviklede platene ble sprayet med DPPH-løsning og fraksjoner som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene P8.1 – P8.9 (Tabell 9.2.16).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av P8.2 - P8.5 (NMR-spektra 9.3.73 og 9.3.74).

5.2.3.16 Videre arbeid med P9

Syrekatalysert floroglucinolspalting

Fraksjon P9, 206,6 mg, av ble løst i 5 ml EtOH. Floroglucinol, 141,4 mg, ble løst i 5 ml 1 % HCl i EtOH. Disse ble blandet og ristet i 15 minutter før løsningen ble dampet inn under N_2 -gass til det var igjen ca 2,5 ml. Depolymeriseringsproduktene ble separert på en Sephadex LH20-kolonne.

Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

Ca 2,5 ml ble applisert på en Sephadex LH 20 kolonne (200 x 25 mm). 50, 75 og 96 % EtOH ble brukt som mobilfase og fraksjoner på 20-25 ml ble samlet. Gjenværende stoff på kolonnen ble vasket ut med 70 og 100 % aceton og samlet i fraksjoner på 20-25 ml. Det ble samlet totalt 23 fraksjoner. De første og siste 80 ml ble samlet opp i begerglass (Tabell 9.2.17).

Analytisk TLC

Fraksjonene 1-23 ble undersøkt på cellulose plater (DC Plastikfolien, Cellulose F)

Mobilfase: Eddiksyre : vann (3:47) [49]

De ferdig utviklede platene ble sprayet med DPPH-løsning og fraksjoner som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene P9.1 – P9.6 (Tabell 9.2.17).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av P9.2 – P9.5 (NMR-spektra 9.3.75 og 9.3.76).

6 Resultat og diskusjon

6.1 Primært MeOH-ekstrakt

Suksessiv ekstraksjon med CHCl_3 , EtOAc og PeOH gav tre ekstrakt, i tillegg til den vandige resten.

Den suksessive ekstraksjonen av plantematerialet førte til at innholdsstoffene fordelte seg i løsningsmidler med ulik polaritet. De mest upolare forbindelsene ble ekstrahert over i CHCl_3 , de ikke fullt så upolare i EtOAc, de litt polare i PeOH, mens de mest polare forbindelsene ble igjen i den vandige resten. Dette medførte en grovseparering av innholdsstoffene i plantematerialet (Tabell 5).

Tabell 5: Utbytte fra ekstraksjon

Fraksjon/ekstrakt	Utbytte
Primært MeOH-ekstrakt fra <i>X. moluccensis</i>	20,36 g
CHCl_3 -ekstrakt	41,5 mg
EtOAc-ekstrakt	3,62 g
PeOH-ekstrakt	10,19 g
Vandig rest	5,96 g

NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spekteret av CHCl_3 -ekstraktet (NMR-spektrum 9.3.1) viste signaler i alifatområdet mellom 0,6 – 2,4 ppm. Dette tyder på innhold av alifatiske forbindelser, og muligens en del fett. Det var noen topper i aromat- og olefinområdet mellom 5 – 8 ppm, men disse var færre og mindre enn de andre toppene. ^{13}C -NMR-spekteret av CHCl_3 -ekstraktet (NMR-spektrum 9.3.2) bekreftet funnene som ble gjort i protonspekteret. NMR-spektrene tyder på at CHCl_3 -ekstraktet inneholder hydrofobe forbindelser, noe som var forventet fordi CHCl_3 er et upolart løsningsmiddel.

^1H -NMR-spekteret av EtOAc-ekstraktet (NMR-spektrum 9.3.3) viste signaler i aromat- og olefinområdet, som ligger rundt 5 - 8 ppm. Dette kan tyde på at ekstraktet inneholder fenoliske forbindelser. Spekteret viste også noen topper i alifatområdet, og det er nok en blanding av aromatiske- og alifatiske forbindelser. ^{13}C -NMR-spekteret av EtOAc-ekstraktet (NMR-spektrum 9.3.4) støttet opp om resultatene fra protonspekteret og viste topper i aromatområdet og i mindre grad i alifatområdet.

¹H-NMR-spekteret av PeOH-ekstraktet (NMR-spektrum 9.3.5) viste brede topper i aromat- og olefinområdet. Dette kan forårsakes av oligomere og polymere fenoliske forbindelser som proanthocyanidiner. ¹³C-NMR-spekteret av PeOH-fraksjonen (NMR-spektrum 9.3.6) støttet funnene fra protonspekteret. Et utsnitt av karbonspekteret fra 65 – 85 ppm (NMR-spektrum 9.3.7), viser toppen for C2 i catechin og epicatechin ved henholdsvis 84 og 77 ppm og toppen for start- og forlengerenhet ved henholdsvis 69 og 73 ppm. Ved integrasjon av toppene ble forholdet mellom catechin og epicatechin beregnet, og gjennomsnittlig var PeOH-ekstraktet tetramerpolymerisert, hvor forholdet catechin / epicatechin var ca 1:1.

¹H-NMR-spekteret av den vandige resten (NMR-spektrum 9.3.8) viste en rekke signaler i området 3,2 – 4,2 ppm, noe som kan skyldes innhold av karbohydrater. I tillegg var det en noen brede topper i aromat- og olefinområdet. ¹³C-NMR-spekteret av den vandige resten (NMR-spektrum 9.3.9) underbygget det protonspekteret viste, og den vandige resten er nok en blanding av karbohydrater og fenoliske forbindelser.

Bioassay

Ekstraktene viste seg å ha radikalfangeraktivitet i rekkefølgen EtOAc > PeOH > vandig rest, med EC₅₀-verdier på henholdsvis 8,1 ± 1,0 µg/ml, 12,3 ± 1,0 µg/ml og 15,0 ± 0,9 µg/ml. CHCl₃-ekstraktet hadde ikke radikalfangende aktivitet (Tabell 6). Ekstraktene hemmet 15-LO med PeOH > EtOAc > vandig rest > CHCl₃. IC₅₀-verdiene for de tre mest aktive ekstraktene var ganske like og lå rundt 20 µg/ml. CHCl₃-ekstraktet viste signifikant lavere aktivitet enn de tre andre ekstraktene (Tabell 7).

Tabell 6: Ekstraktenes radikalscavengeraktivitet

Ekstrakt	EC ₅₀ (µg/ml)	SD
CHCl ₃ -ekstrakt	>167	-
EtOAc-ekstrakt	8,1	1,0
PeOH-ekstrakt	12,3	1,0
Vandig rest	15,0	0,9

Tabell 7: Ekstraktenes hemming av 15-LO

Ekstrakt	IC ₅₀ (µg/ml)	SD
CHCl ₃ -ekstrakt	98,0	6,0
EtOAc-ekstrakt	20,0	2,0
PeOH-ekstrakt	17,0	2,0
Vandig rest	21,0	2,0

På bakgrunn av at EtOAc-, og PeOH-ekstraktene hadde høy radikalfangeraktivitet og hemmet 15-LO, ble disse ekstraktene valgt ut til videre arbeid.

6.2 Fraksjonering av EtOAc-ekstraktet

Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

EtOAc-ekstraktet ble fraksjonert og separert på en Toyopearl HW40 kolonne. Det ble samlet 61 fraksjoner som ble slått sammen til fraksjonene E1 - E15 basert på analytisk TLC etterfulgt av undersøkelse av kort og langbølget UV-absorpsjon og DPPH-spraying. Samlet utbytte var 3,25 g (98,8 %) (Tabell 9.2.1).

Separasjon av polyfenoliske forbindelser ved bruk av Topopearl HW40 vil føre til at monomere elueres ut først, så oligomere og polymere til slutt [54].

Analytisk TLC

Bestråling med kortbølget UV-lys viste absorpsjon i fraksjonene E1-2, E4-13 og E15. Fraksjonene E3 og E5-6 absorberte langbølget UV-lys. DPPH-spraying viste innhold av radikalscavengere i fraksjonene E6-13 og E15.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekterne til fraksjonene E1 og E2 tydet på at disse fraksjonene ikke inneholdt forbindelser av interesse. E1 og E2 var derfor ikke av interesse for videre opparbeidelse.

¹H-NMR-spekteret av fraksjon E4 (NMR-spektrum 9.3.10) viste mulig innhold av alifatiske forbindelser, ved å ha singletter i området 0,6 - 1,8 ppm. Det var også en del topper i området rundt 2 ppm. ¹³C-NMR-spekteret av E4 (NMR-spektrum 9.3.11) støttet funnene fra protonspekteret. ¹H-NMR-spekteret av fraksjon E5 minste om protonspekteret til E4 og inneholdt nok mange av de samme forbindelsene som E4.

¹H-NMR-spekteret av fraksjon E6 (NMR-spektrum 9.3.12) viste skarpe topper i aromat området, men hadde også noen topper i alifatområdet. Det ser ut som om E6 er en blandingsfraksjon av polyfenoliske forbindelser og alifatiske forbindelser. ¹³C-NMR-spekteret av fraksjon E6 (NMR-spektrum 9.3.13) bekrefter det som vises i protonspekteret.

^1H -NMR-spekteret av E7 (NMR-spektrum 9.3.14) tydet på at fraksjonen hovedsakelig inneholdt monomere flavonoider. Det var to doble dubletter i området 2,4 – 3 ppm, en multipllett rundt 4 ppm, en dublett ved 4,5 ppm og flere topper i aromat området. ^{13}C -NMR-spekteret til fraksjon E7 (NMR-spektrum 9.3.15) støttet opp om funnene som ble gjort i protonspekteret. Sammenligning med proton- og karbonspektrum av catechin (NMR-spektrum 9.3.77 og 9.3.78) viste at fraksjon E7 sannsynligvis inneholdt mest catechin. Signalene ved 2,4 – 3 ppm kommer fra H-4_α og H-4_β, ved 4 ppm fra H-3 og ved 4,5 ppm fra H-2. ^1H - og ^{13}C -NMR-spektrene til E8 viste at denne fraksjonen lignet E7.

^1H -NMR-spekteret av fraksjon E9 (NMR-spektrum 9.3.16) tydet på at denne fraksjonen inneholdt polymere polyfenoliske forbindelser. Det var store brede signaler i området 3,5 – 5 ppm og rundt 6 ppm og 7 ppm. ^{13}C -NMR-spekteret av fraksjon E9 (NMR-spektrum 9.3.17) viste at det sannsynligvis var proanthocyanidiner som var til stede i fraksjonen. Signalet for C4 i startenheten sees ikke fordi den er gjemt bak toppen for aceton-d₆ som ble brukt som løsningsmiddel. Spekteret viste signaler for C4 i forlengerenhet (topp i underkant av 40 ppm), C3 i startenhet (topp rundt 68 ppm), C3 i forlengerenhet (topp rundt 72 ppm). Signaler for C2 i epicatechin og C2 i catechin var på henholdsvis rundt 77 og 82 ppm. Signaler for C6 og C8 lå rundt 98, mens signalene for C1', C2', C5', C6', C9 og C10 lå i området 100 – 135 ppm. Signaler for C3' og C4' fantes i spekteret på rundt 144 ppm, mens signalene for C5 og C7 lå i underkant av 160 ppm. Utsnitt og integral av toppene i området 65 -85 ppm (NMR-spektrum 9.3.18) viste at forholdet mellom start- og forlengerenhet er 1:1. Det vil si at denne fraksjonen hovedsakelig inneholdt dimer. Forholdet mellom C2 fra catechin- og C2 fra epicatechin er 2:1 og det er sannsynligvis en blanding av dimerene epicatechin(4β→8)catechin og catechin(4β→8)catechin i fraksjon E9.

^1H -NMR-spekteret av fraksjon E10 (NMR-spektrum 9.3.19) viste som protonspekteret til E9 brede topper i det aromatiske området. ^{13}C -NMR-spekteret av fraksjon E10 (NMR-spektrum 9.3.20) viste signaler i de samme områdene som E9 og det er proanthocyanidiner i denne fraksjonen. Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 ppm (NMR-spektrum 9.3.21) viste at forholdet mellom start- og forlengerenheten var 1:1. E10 inneholder hovedsakelig dimer. Forholdet mellom C2 fra catechin og epicatechin var 1:2 og det er sannsynligvis en blanding av dimerene epicatechin(4β→8)catechin og epicatechin(4β→8)epicatechin.

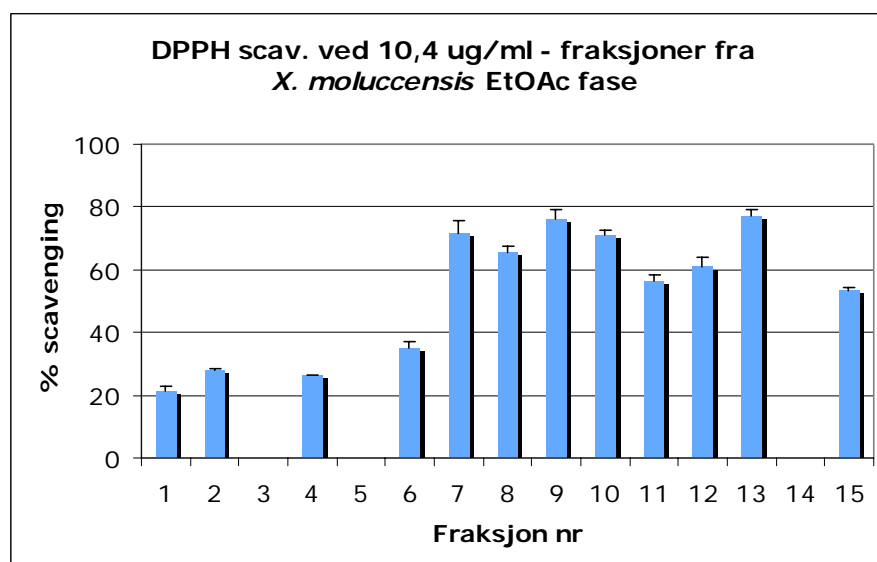
^1H -NMR-spekteret av fraksjon E11 (NMR-spektrum 9.3.22) viste store brede topper i aromat området. ^{13}C -NMR-spekteret av fraksjon E11 (NMR-spektrum 9.3.23) viste topper i de samme områdene som E9 og E10, og det er også proanthocyanidiner i denne fraksjonen. Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 ppm (NMR-spektrum 9.3.24) viste at forholdet mellom start- og forlengerenheten var 1:1. Dette viser at E11 er en dimer. Forholdet mellom C2 fra catechin og epicatechin var 1:1 og E11 består sannsynligvis av dimeren epicatechin(4 β →8)catechin.

^1H -NMR-spekteret av fraksjon E12 (NMR-spektrum 9.3.25) viste store brede topper i aromat området. ^{13}C -NMR-spekteret av fraksjon E12 (NMR-spektrum 9.3.26) viste topper i de samme områdene som E9 – E11, og det er også proanthocyanidiner i denne fraksjonen. Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 ppm (NMR-spektrum 9.3.27) viste at forholdet mellom start- og forlengerenhet var 1:2, og E12 inneholder gjennomsnittlig proanthocyanidiner av trimer type. Forholdet mellom C2 fra catechin og epicatechin var 1:1. ^1H - og ^{13}C -NMR-spektrene for E13 lignet spektrene til E12, og utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 ppm viste at forholdene var de samme som for E12.

^1H -NMR-spekteret av fraksjon E15 (NMR-spektrum 9.3.28) viste store brede topper i aromat området. ^{13}C -NMR-spekteret av fraksjon E15 (NMR-spektrum 9.3.29) viste topper i de samme områdene som E9 – E13, og det er også proanthocyanidiner i denne fraksjonen. Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 ppm (NMR-spektrum 9.3.30) at forholdet mellom start- og forlengerenhet var ca 1:4, det vil si at fraksjon E15 inneholder proanthocyanidiner med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad som pentamer. Det ble ut fra integralkurvene beregnet at E15 inneholdt ca 45 % catechin og 55 % epicatechin.

Bioassay

Fraksjonene E7-12 viste høyest radikalscavengeraktivitet med EC_{50} -verdier på rundt 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Figur 11 og Tabell 9.2.2). På grunn av tidsmangel ble 15-LO testen bare utført på fraksjonene E4, E6 og E7. IC_{50} -verdiene for disse fraksjonene var henholdsvis $33 \pm 2 \mu\text{g}/\text{ml}$, $26 \pm 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ og $13 \pm 3 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Tabell 9.2.3). Quercetin er en kjent hemmer av 15-LO som har en IC_{50} -verdi på $9,6 \pm 0,8 \mu\text{g}/\text{ml}$ [15]. Ingen av de testede fraksjonene viser like kraftig hemming av 15-LO som quercetin.



Figur 11. Radikalscavenging ved 10,4 µg/ml for E1-E15

¹H-NMR-spektrene av fraksjonene E4 og E5 tydet på at de muligens inneholdt forbindelser av xylocensin-type og det ble besluttet at disse skulle undersøkes nærmere. Fraksjonene E6, E7 og E13 viste høy aktivitet på DPPH-testen de inneholdt forholdsvis mye stoff. E6 og E7 viste også hemming av enzymet 15-LO. I henhold til NMR-spektrene inneholdt de trolig fenoliske forbindelser og derfor ble disse fraksjonene valgt ut til videre fraksjonering.

6.3 Videre arbeid med E4 og E5

Analytisk TLC

Normal fase og omvendt fase analytisk TLC med ulike mobilfaser tydet på at fraksjonene E4 og E5 inneholdt de samme forbindelsene. Alle platene ble bestrålt med kort- og langbølge UV-lys etter at platene var utviklet. Det viste seg at forbindelsene som absorberte kortbølge-UV vandret like langt i begge fraksjonene. Det samme gjaldt for forbindelsene som absorberte langbølge-UV.

Resultatene fra analytisk TLC og ¹H-NMR-spekterne som viste at det sannsynligvis var snakk om de samme forbindelsene gjorde at E4 og E5 ble slått sammen til E4-5.

6.4 Fraksjonering av E4-5

Fraksjon E4-5 ble separert på en Sephadex LH20 kolonne. Det ble samlet i alt 24 fraksjoner og disse ble slått sammen til fraksjonene E4-5.1 – E4-5.7 basert på analytisk TLC etterfulgt av undersøkelse av kort- og langbølget UV-absorpsjon og Ceric-spraying. Samlet utbytte var 54,5 mg (65 %) (Tabell 9.2.4).

Ved bruk av Sephadex LH20 er elueringsrekkefølgen noe uforutsigbar, på grunn av at separasjon av de ulike forbindelsene er basert på eksklusjonskromatografi og adsorpsjon av aromatiske forbindelser. I dette tilfelle ble xylocensin-lignende forbindelser eluert ut først, mens de etterfølgende fraksjonene inneholdt små mengder stoff.

Analytisk TLC

Bestråling med kortbølget UV-lys viste svak absorpsjon i alle fraksjonene, i tillegg absorberte E4-5.2 langbølget UV-lys. Ceric-spraying viste at E4-5.1 inneholdt organiske forbindelser, mens det var vanskelig å detektere noen forbindelser i de andre fraksjonene.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret av fraksjon E4-5.1 (NMR-spektrum 9.3.31) viste signaler i det alifatiske området, og en del singletter i området fra 4,5 – 8,0 ppm. Dette signalmønsteret minnte om protonspekter fra xylocensiner (NMR-spektrum 9.3.80). NMR-spektrum 32 viser protonspekteret til E4-5.1 med integral av toppene. Sammenligning med protonspektrum av et triterpen av limonoidtype, xylocensin P (NMR-spektrum 9.3.80) viste at E4-5.1 muligens inneholdt xylocensiner. Protonspekteret til E4-5.1 viste at fraksjonen ikke var ren.

¹H-NMR-spektrene E4-5.2 og E4-5.3 viste at ingen av disse fraksjonene inneholdt forbindelser av interesse.

Siden protonspekteret til fraksjon E4-5.1 viste at fraksjonen ikke var ren, ble det bestemt å prøve å rense opp og isolere forbindelsene som var i fraksjonen.

6.5 Videre arbeid med E4-5.1

Analytisk HPLC

Fraksjon E4-5.1 ble undersøkt på en analytisk C18 HPLC-kolonne og det ble tatt opp kromatogram ved hjelp av UV-detektor ved 254 og 280 nm. E4-5.1 ser ut til å inneholde to forbindelser, en relativt hydrofil og en relativt hydrofob (Kromatogram 9.4.1).

Deteksjon ved 254 nm var best, da deteksjon ved 280 nm bare detekterte en forbindelse, mens det ved 254 nm ble detektert to forbindelser (Kromatogram 9.4.1).

Det ble bestemt å prøve å separere forbindelsene fra hverandre.

6.6 Fraksjonering av E4-5.1

Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

Fraksjon E4-5.1 ble separert på en VersaFlash C18-kolonne. Det ble samlet i alt 44 fraksjoner og disse ble slått sammen til fraksjonene E4-5.1.1 – E4-5.1.6 basert på analytisk TLC etterfulgt av undersøkelse av kort og langbølget UV-absorpsjon og Ceric-spraying (Tabell 9.2.5). Utbyttet ble noe usikkert, da en del silica fra stasjonærfasen også ble eluert ut.

Analytisk TLC

Bestråling med kortbølget UV-lys viste absorpsjon i fraksjon E4-5.1.1, mens E4-5.1.3 absorberte langbølget UV-lys. Ceric-spraying viste at E4-5.1.5 inneholdt organiske forbindelser, mens det var vanskelig å detektere noen forbindelser i de andre fraksjonene (Tabell 9.2.5).

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret til fraksjon E4-5.1.1 viste signaler i området 2 – 4 ppm og kunne vært interessant å jobbe videre med, men fraksjonen ble ødelagt etter opparbeidelse av NMR-spekteret.

¹H-NMR-spekteret til fraksjon E4-5.1.2 – E4-5.1.4 og E4-5.1.5.6 viste at fraksjonene ikke inneholdt noen forbindelser av interesse.

¹H-NMR-spekteret til fraksjon E4-5.1.5 (NMR-spektrum 9.3.33) viste ved sammenligning med protonspektrum av xyloccensin P (NMR-spektrum 9.3.80) at fraksjonen sannsynligvis inneholdt forbindelser med xyloccensinstruktur, men at fraksjonen ikke var helt ren.

Det ble bestemt å prøve å separere forbindelsene i fraksjon E4-5.1.5 på preparativ HPLC.

6.7 Videre arbeid med E4-5.1.5

Analytisk HPLC

Fraksjon E4-5.1.5 ble undersøkt på en analytisk C18 HPLC-kolonne og det ble tatt opp kromatogram ved hjelp av UV-detektor ved 254. Kromatogrammet viser at E4-5.1.5 inneholder åtte mulige forbindelser (Kromatogram 9.4.2).

Ut i fra kromatogrammene var det mobilfasen med gradientstigning fra vann:ACN (60:40) til vann:ACN (50:50) som gav best separasjon av forbindelsene i E4-5.1.5 (Kromatogram 9.4.2).

Det ble bestemt å bruke denne gradienten til preparativ HPLC av fraksjon E4-5.1.5.

6.8 Fraksjonering av E4-5.1.5

Preparativ HPLC

Fraksjon E4-5.1.5 ble separert på en C18-kolonne. Det ble samlet totalt 8 fraksjoner, E4-5.1.5.1 – E4-5.1.5.8 (Tabell 9.2.6 og Kromatogram 9.4.3).

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekterne av fraksjonene E4-5.1.5.1, E4-5.1.5.2, E4-5.1.5.6 - E4-5.1.5.8 viste at disse fraksjonene ikke inneholdt forbindelser av interesse.

¹H-NMR-spekteret av fraksjon E4-5.1.5.3 (NMR-spektrum 9.3.34) viste signaler i samme mønster som er karakteristisk for xyloccensiner (NMR-spektrum 9.3.80). På grunn av at fraksjonen var så liten ble en del av toppene i spekteret så små at det var vanskelig å få identifisert hvilket xyloccensin som var i fraksjonen.

¹H-NMR-spekteret av fraksjon E4-5.1.5.4 (NMR-spektrum 9.3.35) viste signaler i samme mønster som er karakteristiske for xyloccensiner (NMR-spektrum 9.3.80). Det er fire

singletter mellom 0,8 og 1,2 ppm som kan skyldes proton fra metylgrupper. I området 2,0 – 2,4 ppm er det to toppen som kan fra være acetylgrupper, og toppen ved 3,70 ppm kan være en metoksygruppe. I området 4,5 – 6,5 ppm er det noen enkle singletter og dette mønsteret ser man igjen på spekteret til xyloccensin P (NMR-spektrum 9.3.80), og protonspekteret til E4-5.1.5.4 har også de to karakteristiske toppene rundt 7,5 ppm som kjennetegner xyloccensiner. De kjemiske skift verdiene til protonspekteret av E4-5.1.5.4 ble sammenlignet med litteraturdata for isolerte og identifiserte xyloccensiner [7, 55-64], men ingen av de tidligere identifiserte xyloccensinene hadde skift verdier som stemte overens med dataene fra denne fraksjonen. At fraksjon E4-5.1.5.4 kun veide 5,3 mg og at fraksjon E4-5.1.5.5 viste seg å være ustabil i CHCl_3 , som også fraksjon E4-5.1.5.4 var løst i, førte til at det ikke ble gjort noe videre forsøk på å strukturbestemme xyloccensinet i fraksjon E4-5.1.5.4.

^1H -NMR-spekteret av fraksjon E4-5.1.5.5 (NMR-spektrum 9.3.36) viste det samme karakteristiske signalmønsteret som E4-5.1.5.4 og xyloccensin P (NMR-spektrum 9.3.80). Sammenligning av protonspekterne til E4-5.1.5.4 og E4-5.1.5.5 tydet på at fraksjonene inneholdt forskjellige forbindelser. De kjemiske skift verdiene til protonspekteret av E4-5.1.5.5 ble sammenlignet med litteraturdata for isolerte og identifiserte xyloccensiner [7, 55-64], men ingen av de tidligere identifiserte xyloccensinene hadde skift verdier som stemte overens med dataene fra denne fraksjonen.

Fraksjon E4-5.1.5.5 var den største av fraksjonene etter isolering og veide 7,3 mg. Det ble bestemt å prøve å strukturbestemme xyloccensinet i denne fraksjonen, og det var planlagt å utføre ulike NMR-teknikker (APT, COSY, HMBC og HSQC) for å finne ut mer om strukturforholdene i forbindelsen. Før dette ble gjort ble det tatt et nytt protonspektrum av fraksjonen (NMR-spektrum 9.3.37) og det viste seg da at xyloccensinet var ustabil i CHCl_3 , og hadde dekomponert. Ved sammenligning av spekterne ser man at de to toppene ved 7,5 ppm er helt borte samtidig som det er kommet en rekke nye signaler i området 4,0 - 6,5 ppm. Dekomponeringen av fraksjon E4-5.1.5.5 umuliggjorde videre strukturbestemmelse av xyloccensinet i denne fraksjonen.

6.9 Fraksjonering av E6

Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

Fraksjon E6 ble separert på en Sephadex LH20 kolonne. Det ble samlet i alt 30 fraksjoner og disse ble slått sammen til fraksjonene E6.1 – E6.8 basert på analytisk TLC etterfulgt av undersøkelse av kort og langbølget UV-absorpsjon. Samlet utbytte var 115,2 mg (56,9 %) (Tabell 9.2.7).

Analytisk TLC

Bestråling med kortbølget UV-lys viste absorpsjon i fraksjon E6.1 – E6.4. Fraksjon E6.2 og E6.6 absorberte langbølget UV-lys.

NMR-spektroskopi

^1H -NMR- og ^{13}C -NMR -spekteret av fraksjon E6.1 (NMR-spektrum 9.3.38 og 9.3.39) viste mange signaler i det alifatisk område, men også en del signaler i det aromatiske område. ^1H -NMR-spekteret lignet på ^1H -NMR-spekteret til fraksjon E4-5.1 (NMR-spektrum 9.3.31) som senere viste seg å inneholde terpenoider av xyloccensintype. Det er derfor mulig at E6.1 inneholder xyloccensiner.

^1H -NMR-spektrene til E6.2 og E6.3 viste nesten bare signaler fra løsningsmidlene og inneholder sannsynligvis ikke forbindelser av interesse.

^1H -NMR-spekteret til E6.4 (NMR-spektrum 9.3.40) viste at det sannsynligvis inneholdt catechin. Spekteret viste at fraksjonen ikke var helt ren. Sammenligning av spektrum og skift data fra E6.4 og referansespektrum av catechin (NMR-spektrum 9.3.77) viste at fraksjonen inneholdt catechin (Tabell 8). ^{13}C -NMR-spekteret til E6.4 (NMR-spektrum 9.3.41) indikerte også innhold av catechin, og sammenligning av spektrum og skift data fra E6.4 og referansespektrum av catechin (NMR-spektrum 9.3.78) viste at fraksjonen inneholdt catechin (Tabell 9). Karbonspekteret til E6.4 viste at fraksjonen ikke var helt ren, og sammenligning av de minste toppene i karbonspekteret med et referansespektrum av epicatechin (NMR-spektrum 9.3.79) viste at fraksjonen inneholdt mindre mengder epicatechin (Tabell 10). Fraksjon E6.4 inneholdt hovedsakelig catechin med mindre mengder epicatechin

Tabell 8. Sammenligning av observerte ^1H -NMR data for catechin med data fra referansespektrum for catechin.

H/C nummer	ppm (δ)		Signal type
	Referanse	E6.4	
H-4 α	2,5	2,51	dd
H-4 β	2,85	2,85	dd
	3,31	Ligger i løsningsmiddeltoppen for MeOH	m
H-3 α	3,98	3,99	ddd
H-2 β	4,57	4,58	d
H-6 og H-8	5,86	5,87	d
	5,93	5,95	d
H-2', H-5' og H-6'	6,68-6,84	6,71-6,85	m

Tabell 9. Sammenligning av observerte ^{13}C -NMR data for catechin med data fra referansespektrum for catechin.

H/C nummer	ppm (δ)	
	Referanse	E6.4
C4	28,56	28,48
C3	68,83	68,77
C2	82,85	82,80
C6 og C8	95,52	95,57
	96,31	96,38
C10	100,82	100,90
C2', C5' og C6'	115,24	115,30
	116,08	116,18
	120,02	120,11
C1'	132,19	132,18
C3' og C4'	146,17	146,19 / 146,22
C5, C7 og C9	156,85	156,87
	157,50	157,52
	157,76	157,74

Tabell 10. Sammenligning av observerte ^{13}C -NMR data for epicatechin med data fra referansespektrum for epicatechin.

H/C nummer	ppm (δ)	
	Referanse	E6.4
C4	29,31	29,25
C3	67,50	67,46
C2	79,88	79,85
C6 og C8	95,89	95,97
	96,40	96,48
C10	100,08	100,16
C2', C5' og C6'	115,30	115,35
	115,87	116,00
	119,38	119,47
C1'	132,24	132,27
C3' og C4'	145,71	145,74
	145,88	145,90
C5, C7 og C9	157,30	157,33
	157,60	157,57
	157,92	157,93

Noen av de kjemiske skift verdiene lå litt over eller litt under verdiene til rent catechin og epicatechin. Grunnen til det kan være at fraksjon E6.4 inneholder en blanding av catechin og epicatechin og blandingen av disse kan forskyve skift verdiene litt i forhold til rene NMR-prøver.

^1H -NMR-spekteret av E6.5 viste innhold av små mengder catechin.

6.10 Fraksjonering av E7

Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

Fraksjon E7 ble separert på en Sephadex LH20 kolonne. Det ble samlet i alt 29 fraksjoner og disse ble slått sammen til fraksjonene E7.1 – E7.8 basert på analytisk TLC etterfulgt av undersøkelse av kort og langbølget UV-absorpsjon og Ceric-spraying. Samlet utbytte var 358,7 mg (104,5 %) (Tabell 9.2.8).

Årsaken til at fraksjonene E7.1 – E7.8 veier mer enn fraksjon E7 kan være at litt av kolonnematerialet ble eluert ut sammen med mobilfasen, eller at fraksjonene ikke ble dampet godt nok inn, slik at det fremdeles var løsningsmiddelrester igjen i rundkolbene da de ble veid inn.

Analytisk TLC

Bestråling med kortbølget UV-lys viste absorpsjon i alle fraksjonene, men fraksjon E7.2, og E7.4 – E7.6 absorberte mest. E7.7 absorberte langbølget UV-lys. Ceric-spraying viste at det var organiske forbindelser i alle fraksjonene.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret av fraksjon E7.3 tydet på at dette var en uren fraksjon, det var noen sterke signaler i alifatområdet, og noen signaler i aromatområdet. ¹³C-NMR-spekteret av E7.3 tydet på det samme som protonspekteret.

¹H-NMR-spekteret av fraksjon E7.5 lignet på spekterne til E7 og E6.4 (NMR-spektrum 9.3.14 og 9.3.40) og hadde signalene som er karakteristiske for catechin. Spekteret viste at fraksjonen ikke var helt ren. Identiteten av catechin ble bestemt som for fraksjon E6.4, se Tabell 11 og 12. Karbonspekteret av E7.5 viste at fraksjonen ikke var helt ren, og sammenligning av de minste toppene i karbonspekteret med et referanse spektrum av epicatechin (NMR-spektrum 9.3.79) viste at fraksjonen inneholdt mindre mengder epicatechin (Tabell 13). Fraksjon E7.5 inneholdt, som E6.4, hovedsakelig catechin med mindre mengder epicatechin

Tabell 11. Sammenligning av observerte ¹H-NMR data for Catechin med data fra referanse spektrum for Catechin.

H/C nummer	ppm (δ)		Signal type
	Referanse	E7.5	
H-4 α	2,5	2,52	dd
H-4 β	2,85	2,83	dd
	3,31	Ligger i løsningsmiddeltoppen for MeOH	m
H-3 α	3,98	3,99	ddd
H-2 β	4,57	4,57	d
H-6 og H-8	5,86	5,89	d
	5,93	5,96	d
H-2', H-5' og H-6'	6,68-6,84	6,70-6,84	m

Tabell 12. Sammenligning av observerte ^{13}C -NMR data for Catechin med data fra referansespektrum for Catechin.

H/C nummer	ppm (δ)	
	Referanse	E7.5
C4	28,56	28,01
C3	68,83	68,45
C2	82,85	82,34
C6 og C8	95,52	95,53
	96,31	96,31
C10	100,82	100,8
C2', C5' og C6'	115,24	115,07
	116,08	116,14
	120,02	120,04
C1'	132,19	131,84
C3' og C4'	146,17	145,78 / 145,80
C5, C7 og C9	156,85	156,52
	157,50	157,12
	157,76	157,24

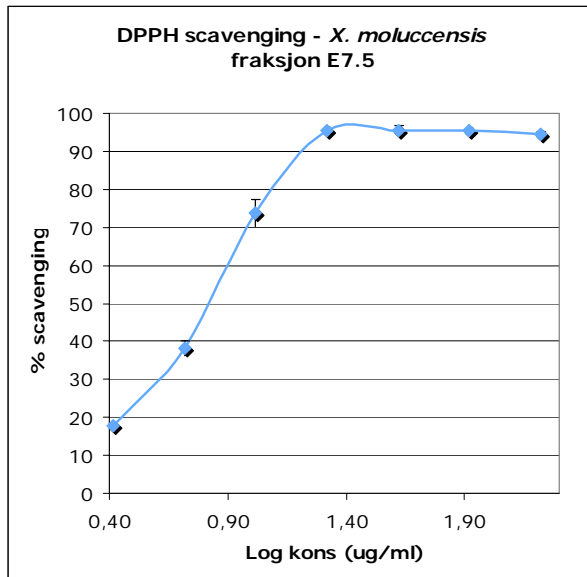
Tabell 13. Sammenligning av observerte ^{13}C -NMR data for Epicatechin med data fra referansespektrum for Epicatechin.

H/C nummer	ppm (δ)	
	Referanse	E7.5
C4	29,31	28,96
C3	67,50	67,16
C2	79,88	79,43
C6 og C8	95,89	95,92
	96,40	96,41
C10	100,08	100,06
C2', C5' og C6'	115,30	115,64
	115,87	115,95
	119,38	119,39
C1'	132,24	132,00
C3' og C4'	145,71	145,30
	145,88	145,48
C5, C7 og C9	157,30	157,05
	157,60	157,20
	157,92	157,52

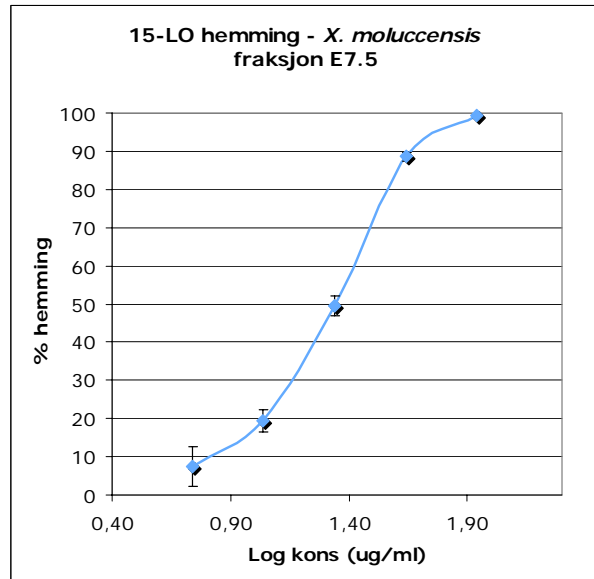
Noen av de kjemiske skift verdiene lå litt over eller litt under verdiene til rent catechin og epicatechin. Dette var også tilfelle for fraksjon E6.4, som nevnt tidligere.

Bioassay

Fraksjon E7.5 ble testet på DPPH-testen og viste radikalscavengingeffekt med EC_{50} -verdi på $6,5 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$ (Tabell 9.2.9 og Figur 12). E7.5 hemmet også 15-LO, med en IC_{50} -verdi på $22 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ (Tabell 9.2.10 og Figur 13). Sammenlignet med quercetin (IC_{50} -verdi = $9,6 \pm 0,8$) viser catechinfraksjonen hemming av enzymet 15-LO, men ikke så sterk som quercetin.



Figur 12. Radikalscavenging for fraksjon E7.5.



Figur 13. 15-LO hemming for fraksjon E7.5.

6.11 Fraksjonering av E13

Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

Fraksjon E13 ble separert på en Sephadex LH20 kolonne. Det ble samlet i alt 27 fraksjoner og disse ble slått sammen til fraksjonene E13.1 – E13.7 basert på analytisk TLC etterfulgt av undersøkelse av kort og langbølget UV-absorpsjon og DPPH-spraying. Samlet utbytte var 117 mg (85,9 %) (Tabell 9.2.11).

Analytisk TLC

Bestråling med kortbølget UV-lys viste absorpsjon i alle fraksjonene, ingen absorberte langbølget UV-lys. Ingen av fraksjonene forflyttet seg på TLC-platen. Platene ble derfor sprayet med DPPH-løsning og delt i fraksjoner på bakgrunn av radikalscavenging.

NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spektrene av fraksjon E13.1 og E13.4 lignet protonspekterne til E12 og E13 (NMR-spektrum 9.3.25) med brede topper i det aromatiske området. ^{13}C -NMR-spektrene av fraksjonene E13.1 – E13.5 lignet karbonspekterne til E12 og E13 (NMR-spektrum 9.3.26). Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 i karbonspekteret til E13.1 viste at forholdet mellom catechin og epicatechin var 1:1 og at proanthocyanidinene i denne fraksjonene gjennomsnittlig var av trimer type. Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 i karbonspekteret til E13.2 viste at forholdet catechin:epicatechin var 1:2 og at proanthocyanidinene i denne fraksjonen gjennomsnittlig var dimere.

Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 i karbonspekteret til E13.3 viste at forholdet catechin:epicatechin var 1:1 og at proanthocyanidinene i denne fraksjonen gjennomsnittlig var trimere. Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 i karbonspekteret til E13.4 viste at forholdet catechin:epicatechin og at gjennomsnittlig polymeriseringsgrad for proanthocyanidinene i denne fraksjonen var lik fraksjon E13.3.

Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 i karbonspekteret til E13.5 viste at forholdet catechin:epicatechin var 1:1 og at proanthocyanidinene i denne fraksjonen gjennomsnittlig var dimere.

6.12 Fraksjonering av *PeOH*-ekstraktet

Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

PeOH-ekstraktet ble fraksjonert og separert på en Sephadex LH 20 kolonne. Det ble samlet 30 fraksjoner som ble slått sammen til fraksjonene P1 – P11 basert på analytisk TLC etterfulgt av undersøkelse av kort og langbølget UV-absorpsjon og DPPH-spraying. Samlet utbytte var 7,65 g (83,5 %) (Tabell 9.2.12).

Ved bruk av Sephadex LH20 kolonne til separering av polyfenoliske forbindelser som proanthocyanidiner vil de ulike forbindelsene i ekstraktet hovedsaklig separeres etter økende molekylstørrelse fordi Sephadex LH20 interagerer med aromatringerne i proanthocyanidinene. Dette vil føre til at eksklusjonskromatografien som normalt ligger til grunn ved bruk av Sephadex LH20 får mindre betydning for separasjonen.

Analytisk TLC

Bestråling med kortbølget UV-lys viste absorpsjon i alle fraksjonene unntatt P1, i tillegg absorberte P1, P3, P10 og P11 langbølget UV-lys. DPPH-spraying viste innhold av radikalscavengere i fraksjonene P2 og P4-10 (Tabell 9.2.12).

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret av fraksjon P2 (NMR-spektrum 9.3.42) viste store brede topper i aromatområdet. ¹³C-NMR-spekteret av fraksjon P2 (NMR-spektrum 9.3.43) viste at det sannsynligvis var proanthocyanidiner som var til stede i fraksjonen. I hovedtrekk lignet spekteret på spekteret til fraksjon E9 (Konf. avsnitt 6.2 "Fraksjonering av EtOAc-ekstraktet" og NMR-spektrum 9.3.17). Der signalene lå tett gled signalene litt over i hverandre. Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 ppm (NMR-spektrum 9.3.44) viste at forholdet mellom start- og forlengerenhet var ca 1:10, det vil si at fraksjon P2 inneholder proanthocyanidiner med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad som undekamer. Det ble ut fra integralkurvene beregnet at P2 inneholdt ca 37 % catechin og ca 63 % epicatechin.

¹H-NMR-spekteret av fraksjon P3 (NMR-spektrum 9.3.45) viste brede topper i aromatområdet, men hadde også noen topper i området 0,7 – 2,1 ppm. ¹³C-NMR-spekteret av fraksjon P3 (NMR-spektrum 9.3.46) viste topper i de samme områdene som P2, men disse var mindre tydelige. Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 ppm (NMR-spektrum 9.3.47) viste at forholdet mellom start- og forlengerenhet var ca 1:2, det vil si at fraksjon P3 inneholder proanthocyanidiner med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad som trimer. Det ble ut fra integralkurvene beregnet at P3 inneholdt catechin og epicatechin i forholdet 1:4.

¹H-NMR-spekteret av fraksjon P4 (NMR-spektrum 9.3.48) viste to brede topper i aromatområdet og noen multipletter i området 2,0 – 3,5 ppm. ¹³C-NMR-spekteret av fraksjon P4 (NMR-spektrum 9.3.49) viste at P4 inneholdt proanthocyanidiner, da spekteret hadde topper i samme område som P2 og P3. Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 ppm (NMR-spektrum 9.3.50) viste at forholdet mellom start- og forlengerenhet var ca 1:1, det vil si at fraksjon P4 inneholder proanthocyanidiner med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad som dimer. Det ble ut fra integralkurvene beregnet at P4 inneholdt catechin og epicatechin i forholdet 1:1.

¹H-NMR-spekteret av fraksjon P5 (NMR-spektrum 9.3.51) tydet på at dette er en blandingsfraksjon. Det er brede topper i aromatområdet som kjennetegnes for proanthocyanidiner, samtidig som det er det karakteristiske mønsteret for catechin i området 2,5 – 3 ppm. ¹³C-NMR-spekteret av fraksjon P5 (NMR-spektrum 9.3.52) bekreftet det protonspekteret viste. I området 65 – 85 ppm (NMR-spekter 9.3.53) er det syv topper i spekteret til P5, mens det for proanthocyanidiner vanligvis er fire topper.

¹H-NMR-spekteret av fraksjon P6 (NMR-spektrum 9.3.54) viser brede topper i aromatområdet og noen lave topper i området 2,5 – 3,0 ppm. Dette tyder på at P6 hovedsaklig inneholder proanthocyanidiner. ¹³C-NMR-spekteret av fraksjon P6 (NMR-spektrum 9.3.55) bekreftet det protonspekteret viste, da det inneholder topper i samme område som karbonspekterne til P2 – P4. Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 ppm (NMR-spektrum 9.3.56) viste at forholdet mellom start- og forlengerenhet var ca 1:1, det vil si at fraksjon P6 inneholder proanthocyanidiner med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad som dimer. Det ble ut fra integralkurvene beregnet at P6 inneholdt catechin og epicatechin i forholdet 2:1. P6 er sannsynligvis en blanding av dimerene epicatechin(4β→8)catechin og catechin(4β→8)catechin.

¹H-NMR-spekteret av fraksjon P7 (NMR-spektrum 9.3.57) viste brede topper i aromatområdet. ¹³C-NMR-spekteret av fraksjon P7 (NMR-spektrum 9.3.58) viste topper i samme område som fraksjonene tidligere i PeOH-serien. Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 ppm (NMR-spektrum 9.3.59) viste at forholdet mellom start- og forlengerenhet var ca 1:2, det vil si at fraksjon P7 inneholder proanthocyanidiner med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad som trimer. Det ble ut fra integralkurvene beregnet at P7 inneholdt henholdsvis 45 % catechin og 55 % epicatechin.

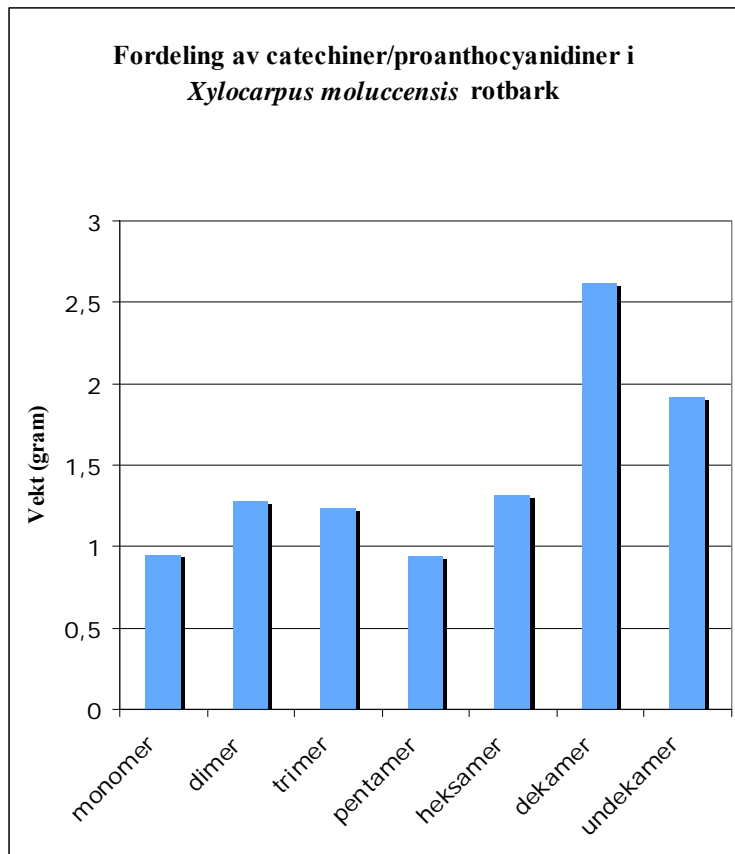
¹H-NMR-spekteret av fraksjon P8 (NMR-spektrum 9.3.60) viste brede topper i aromatområdet. ¹³C-NMR-spekteret av fraksjon P8 (NMR-spektrum 9.3.61) viste topper i samme område som fraksjonene tidligere i PeOH-serien. Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 ppm (NMR-spektrum 9.3.62) viste at forholdet mellom start- og forlengerenhet var ca 1:5. P8 inneholder proanthocyanidiner med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad heksamer. Forholdet mellom catechin og epicatechin ble ut i fra integralkurvene til toppene beregnet til å være ca 4:5.

¹H-NMR-spekteret av fraksjon P9 (NMR-spektrum 9.3.63) viste brede topper i aromatområdet. ¹³C-NMR-spekteret av fraksjon P9 (NMR-spektrum 9.3.64) viste topper i samme området som de tidligere fraksjonene i PeOH-serien. Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 ppm (MNR-spektrum 9.3.65) viste at forholdet mellom start- og forlengerenhet var ca 1:9. P9 inneholder proanthocyanidiner med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad dekamer. Forholdet mellom catechin og epicatechin ble beregnet til å være 1:1.

¹H-NMR-spekteret av fraksjon P10 (NMR-spektrum 9.3.66) viste brede topper i aromat området. ¹³C-NMR-spekteret av fraksjon P10 (NMR-spektrum 9.3.67) viste topper i samme område som fraksjonene tidligere i PeOH-serien. Utsnitt og integral av toppene i området 65 – 85 ppm (NMR-spektrum 9.3.68) viste at forholdet mellom start- og forlengerenhet var ca 1:9. P10 inneholder som P9 proanthocyanidiner med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad dekamer. Det ble ut fra integralkurvene beregnet at P10 inneholdt henholdsvis 40 % catechin og 60 % epicatechin.

¹H-NMR-spekteret av fraksjon P11 (NMR-spektrum 9.3.69) viste at det ikke var noen topper i aromatområdet. Det var noen topper i området 0,6 – 1,5 ppm og noen topper i området 1,7 – 2,1 ppm, samt en singlett ved 3,2 ppm. Det var vanskelig å slå fast hva denne fraksjonen inneholdt, men det ser ut som om den kanskje inneholder forbindelser med fettkjeder. ¹³C-NMR-spekteret til fraksjon P11 (NMR-spektrum 9.3.70) bekreftet at det ikke var snakk om aromatiske forbindelser, men ut ifra karbonspekteret var det ikke så lett å slå fast hvilke forbindelser det var snakk om. På karbonspekteret var det to topper i området 20 ppm, noen topper i området 45 – 55 ppm og noen topper rundt 180 ppm.

NMR-spektrene til fraksjonene P2 – P10 viste at polymeriseringsgraden til proanthocyanidinene fordelte seg fra monomer til undekamer (Figur 14).



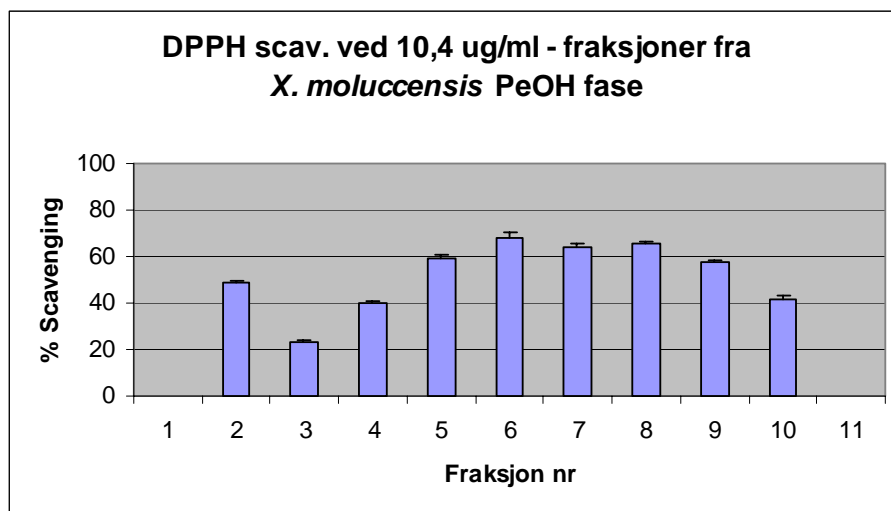
Figur 14. Fordeling av catechiner/proanthocyanidiner i PeOH-ekstraktet fra *X. moluccensis*

Hvis det er slik at sammensetningen av proanthocyanidiner er enzymatisk styrt i *X. moluccensis*, kan det se ut som to monomere kan settes sammen til en dimer, og at en monomer kan adderes til en dimer for å få dannet en trimer. Videre ser det ut som om at en dimer og en trimer kan adderes til pentamer, eller to trimere kan adderes for å gi en heksamer. To pentamere kan adderes for å danne en dekamer eller en pentamer og en heksamer kan adderes for å få en undekamer. Det er ikke funnet andre polymeriseringsgrader i EtOAc- eller PeOH-ekstraktet, så det er mulig at *X. moluccensis* ikke kan danne proanthocyanidiner med en annen polymeriseringsgrad enn de som er vist i Figur 14.

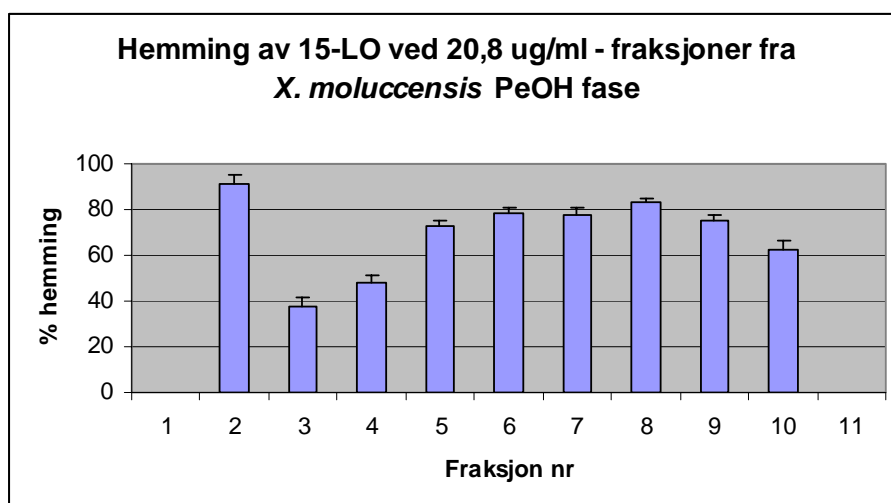
Bioassay

Alle fraksjonene unntatt P1 som ikke veide noe og P11 som var inaktiv hadde antioksidantaktivitet (Figur 15 og Tabell 9.2.13) og hemmet 15-LO (Figur 16 og Tabell 9.2.14). Fraksjonene P5 – P9 viste høyest radikalscavenging aktivitet med EC_{50} -verdier i området 6 - 8 $\mu\text{g/ml}$. Fraksjon P2 viste kraftigst hemming av 15-LO med $IC_{50} = 10 \pm 1 \mu\text{g/ml}$. Fraksjonene P5 – P9 fulgte etter med IC_{50} -verdier i området 12 – 14 $\mu\text{g/ml}$. Sammenlignet med quercetin viser fraksjon P2 nesten like kraftig hemming av 15-LO. Fraksjon P2 viser i

tillegg nesten like kraftig 15-LO hemming som DPPH-scavenging med henholdsvis $IC_{50} = 10 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ og $EC_{50} = 10,7 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$, dette var ikke tilfellet for noen av de andre fraksjonene (Tabell 9.2.13 og 9.2.14).



Figur 15. Radikalscavenging ved 10,4 µg/ml for P1 – P11.



Figur 16. 15-LO hemming ved 20,8 µg/ml for P1 – P11.

NMR-spektrene av P2 – P10 viste at disse fraksjonene inneholdt flavonoider og/eller proanthocyanidiner. Fraksjonene P7 – P9 var sterke antioksidanter og hemmere av 15-LO, og disse fraksjonene ble valgt ut til videre arbeid for å bestemme hvilke monomere proanthocyanidinene var bygget opp av. Dette ble gjort ved syrekatalysert floroglucinolspalting og etterfølgende identifisering med NMR-spektroskopi.

6.13 Videre arbeid med P7

Syrekatalysert floroglucinolspalting

Proanthocyanidinene i P7 ble spaltet til monomere ved syrekatalysert floroglucinolspalting under omrøstning i 15 minutter.

Kolonnekromatografi ved bruk av lavt trykk

Prøven fra floroglucinolspaltingen ble fraksjonert og separert på en Sephadex LH 20 kolonne. Det ble samlet 26 fraksjoner som ble slått sammen til fraksjonene P7.1 – P7.9 basert på analytisk TLC etterfulgt av DPPH-spraying (Tabell 9.2.15).

Ved bruk av Sephadex LH20 kolonne til separering av reaksjonsproduktene etter floroglucinolspalting, vil først overskuddet av floroglucinol elueres ut, så startenheten fra proanthocyanidinene som ikke er bundet til floroglucinol og til slutt forlengerenhetene som er bundet til floroglucinol.

Analytisk TLC

DPPH-spraying av de ferdig utviklede prøvene viste innhold av radikalscavengere i fraksjonene P7.2 – P7.8 og i første omgang ble kun disse fraksjonene dampet inn til tørrhet (Tabell 9.2.15).

NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spekteret av fraksjon P7.2 viste at fraksjonen inneholdt floroglucinol.

^1H -NMR-spekteret av fraksjon P7.5 (NMR-spektrum 9.3.71) ble sammenlignet med referansespekteret for catechin (NMR-spektrum 9.3.77) og det viste seg at fraksjonen inneholdt catechin som ikke var bundet til floroglucinol. Proanthocyanidinet i fraksjon P7 har dermed catechin som startenhet.

^1H -NMR-spekteret av fraksjon P7.6 (NMR-spektrum 9.3.72) viste etter sammenligning med kjemiske skift fra Köhler og Winterhalter [50] at fraksjonen inneholdt catechin-floroglucinol og epicatechin-floroglucinol. Proanthocyanidinet i fraksjon P7 har dermed både catechin og epicatechin som forlengerenhet i molekylet. Dette stemmer overens med data fra ^{13}C -NMR-spekteret til fraksjon P7 (NMR-spektrum 9.3.58) som viste at P7 gjennomsnittlig var en

trimer og inneholdt ca 45 % catechin og 55 % epicatechin. Tallene fra karbonspekteret til P7 tydet på at catechin måtte være forlengerenhet i tillegg til startenhet i proanthocyanidinet.

¹H-NMR-spekteret av fraksjon P7.8 inneholdt en del ureagert proanthocyanidin og andre forurensinger som ble eluert ut til slutt i denne separasjonen, og inneholdt ikke forbindelser av interesse.

6.14 Videre arbeid med P8

Syrekatalysert floroglucinolspalting

Proanthocyanidinene i P8 ble spaltet til enkeltmonomere ved syrekatalysert floroglucinolspalting under omrøstning i 15 minutter. Prøveløsningen ble deretter dampet inn til ca ¼ volumstørrelse og applisert på en kolonne for separasjon av reaksjonsproduktene.

Kolonnekromatografi og analytisk TLC ble utført som beskrevet i punkt 6.13 ”Videre arbeid med P7” og ga fraksjonene P8.1 – P8.9 (Tabell 9.2.16).

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret av fraksjon P8.2 (NMR-spektrum 9.3.73) ble sammenlignet med referansespekteret for catechin (NMR-spektrum 9.3.77) og det viste seg at fraksjonen inneholdt catechin som ikke var bundet til floroglucinol. Proanthocyanidinet i fraksjon P8 har dermed catechin som startenhet.

¹H-NMR-spekteret av fraksjon P8.3 viste at denne fraksjonene var en mellomfraksjon hvor det var rester av catechin.

¹H-NMR-spektrene av fraksjonene P8.4 og P8.5 (NMR-spektrum 9.3.74) at fraksjonen inneholdt catechin-floroglucinol og epicatechin-floroglucinol (se punkt 6.13 ”Videre arbeid med P7”). Proanthocyanidinet i fraksjon P8 har dermed både catechin og epicatechin som forlengerenhet i molekylet. Dette stemte overens med ¹³C-NMR-spekteret til P8 (NMR-spektrum 9.3.61) som viste at P8 gjennomsnittlig var heksamere, mens forholdet mellom catechin og epicatechin var 4:5. Tallene fra karbonspekteret av P8 tydet på at catechin også måtte være forlengerenhet i proanthocyanidinet.

6.15 Videre arbeid med P9

Syrekatalysert floroglucinolspalting, kolonnekromatografi og analytisk TLC ble utført som beskrevet i punkt 6.14 "Videre arbeid med P8" og ga fraksjonene P9.1 – P9.6 (Tabell 9.2.17)

NMR-spektroskopi

I likhet med fraksjon P7 og P8 ble det funnet at catechin var startenhet (NMR-spektrum 9.3.75), mens forlengerenhetene bestod av både catechin og epicatechin (NMR-spektrum 9.3.76). Dette stemte overens med ¹³C-NMR-spekteret til fraksjon P9 (NMR-spektrum 9.3.64) som viste at P9 var gjennomsnittlig dekamer og forholdet mellom catechin og epicatechin var ca 1:1. Tallene fra karbonspekteret av P9 tydet på at catechin også måtte være forlengerenhet i proanthocyanidinet.

6.16 Potensielle medisinske anvendelser

Resultatene fra NMR-spektroskopi av de ulike fraksjonene fra primært MeOH-ekstrakt viser at *X. moluccensis* inneholder mye proanthocyanidiner. Det er påvist at proanthocyanidiner har et bredt spekter av biologiske, farmakologiske og terapeutiske aktiviteter mot frie radikaler og oksidativt stress [18, 20].

Proanthocyanidinrike planter har lenge blitt brukt mot diare i folkemedisinen [65]. *X. moluccensis*, som i denne oppgaven er vist å inneholde mye proanthocyanidiner, har effekt mot lakserolje- og magnesiumsulfat induisert diare i mus. Selv om effekten er påvist for planten er det ikke påvist hvilke forbindelser som er skyld i denne effekten.

Det er uvisst i hvilken grad polymere proanthocyanidiner tas opp fra mage- tarmkanalen. Studier har vist at monomere som catechin og epicatechin og dimere og trimere tas opp i blodsirkulasjonen. Proanthocyanidiner med høyere polymeriseringsgrad tas i mindre grad opp, og blir i stedet ført til tykktarmen hvor de degraderes [66, 67]. Selv om proanthocyanidinene ikke absorberes fra magetarmkanalen kan de fremdeles utøve antioksidanteffekt lokalt i tarmen. Det kan være denne lokale effekten av proanthocyanidinene som registreres når proanthocyanidinrike planter har effekt mot diare. Det er tidligere rapportert at *Shigella dysenteriae* toksin og *Entamoeba histolytica* lektin øker oksidativt stress i tarmcellene [68, 69]. Begge disse organismene er kjent for å forårsake dysenteri.

Tradisjonelt er også *X. moluccensis* blitt brukt mot andre mage- og tarm problemer. Det er vist at antioksidanter og opprensete proanthocyanidiner kan motvirke magesår og kolitt [70].

Denne effekten til proanthocyanidinene kan være med på å forklare den tradisjonelle bruken av *X. moluccensis*.

Proanthocyanidiner og andre antioksidanter brukes mot flere forskjellige hudsykdommer [71]. Det er mulig at innholdet av proanthocyanidiner i frøene til *X. moluccensis* kan forklare at asken til frøene blir brukt i en salve mot kløe i Bangladesh.

De proanthocyanidinene fra *X. moluccensis* som ble undersøkt med syrekatalysert floroglucinolspalting viste at catechin inngikk både som start- og forlengerenhet i molekylene. Epicatechin var kun forlengerenhet i molekylene. Dette er forskjellig fra det som ble funnet i *X. granatum* hvor catechin kun ble funnet som startenhet med epicatechin som forlengerenhet [15]. Dette resultatet kan indikere et biosyntesepor som skiller de to nært beslektede plantene fra hverandre.

Proanthocyanidinene som ble undersøkt i *X. moluccensis* var ikke forestret med gallesyre. Det er heller ikke funnet proanthocyanidiner som er forestret med gallesyre i *X. granatum* [15]. Gallesyreestere av proanthocyanidiner er forholdsvis vanlig å finne i plantematerialer og det kan tyde på at *Xylocarpus* plantene ikke har evne til å forestre gallesyre til proanthocyanidiner.

7 Konklusjon

Barken til *X. moluccensis* inneholder en rekke forbindelser som har radikalscavenger- og 15-LO hemmende aktivitet. Catechin og epicatechin ble isolert og identifisert fra EtOAc-ekstraktet.

Det ble også isolert xyloccensiner fra EtOAc-ekstraktet. Disse ble sjekket opp mot $^1\text{H-NMR}$ -verdiene til tidligere identifiserte xyloccensiner, men verdiene stemte ikke overens med spekterverdiene til xyloccensinene fra EtOAc-ekstraktet. Strukturbestemmelse av xyloccensinene ble ikke utført da forbindelsene viste seg å være ustabile i CHCl_3 og dekomponerte.

Fra EtOAc- og PeOH-ekstraktet ble det isolert proanthocyanidiner av dimer, trimer, pentamer, heksamer, dekamer og undekamer polymeriseringsgrad. Av proanthocyanidinene som ble spaltet med floroglucinol, hadde alle catechin som startenhet og catechin og epicatechin som forlengerenheter.

Fraksjon E13 var den kraftigste radikalscavengeren med EC_{50} -verdi på $6,0 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$. Fraksjonene E7, E9, E10 og P6 – P8 var også kraftige radikalscavengere med EC_{50} -verdier på mellom 6 og $7 \mu\text{g/ml}$. Fraksjon P2 var den kraftigste hemmeren av 15-LO med IC_{50} -verdi på $10 \pm 1 \mu\text{g/ml}$. Aktiviteten var omtrent lik som for quercetin som har en IC_{50} -verdi på $9,6 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$ og er en kjent hemmer av 15-LO. P2 hadde en gjennomsnittlig polymeriseringsgrad som undekamer.

Tidligere arbeid på *X. moluccensis* har hovedsakelig vært utført på upolare ekstrakter av ved, frukt og frø. Xyloccensiner er tidligere rapportert funnet i planten, men ikke i barken eller i MeOH-ekstrakt. Catechin, epicatechin og proanthocyanidiner er ikke tidligere rapportert funnet i denne medisinsplanter.

Barken til *X. moluccensis* inneholder flere aktive forbindelser som kan bidra til plantens eventuelle medisinske egenskaper. Dette kan kanskje forklare den tradisjonelle medisinske bruken av planten på Stillehavsoyene og i Sørøst-Asia.

7.1 Forslag til videre arbeid

Både CHCl_3 -ekstraktet og den vandige resten kunne kan vært interessant å arbeide videre med for å fastslå om det er andre forbindelser i barken som kan bidra til plantens aktivitet og forklare plantens tradisjonelle medisinske bruk.

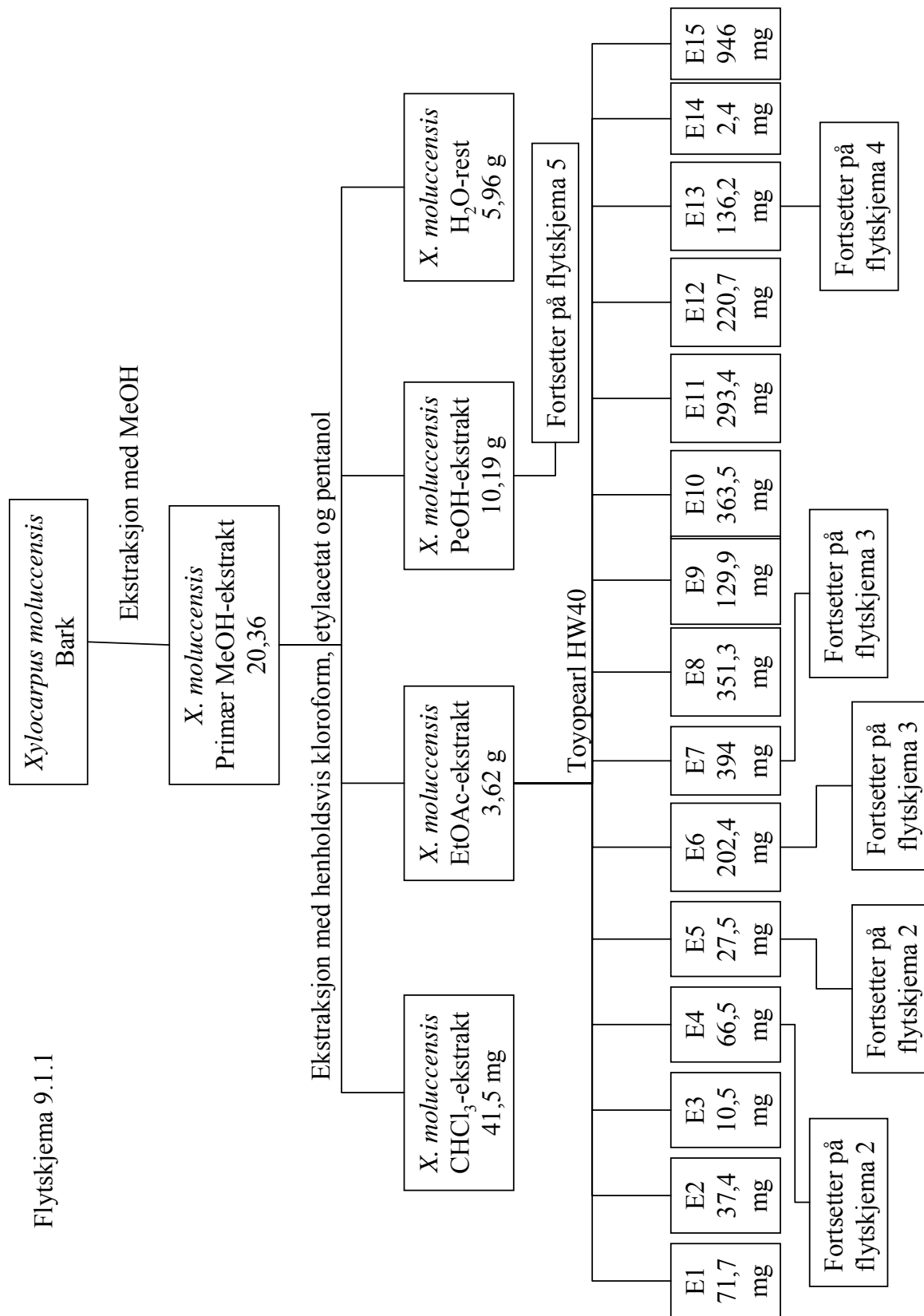
Den vandige resten viste aktivitet i DPPH-testen og 15-LO-testen og det hadde vært interessant å fraksjonere og rense opp denne fraksjonen. Det hadde også vært interessant å undersøke CHCl_3 -ekstraktet da NMR-spekterne til denne fraksjonen viste at dette ekstraktet kunne inneholde xyloccensiner.

Det er også flere mellomfraksjoner som er aktuelle for videre arbeid. NMR-spektrene til fraksjon E6.1 viste mulig innhold av xyloccensiner, og det kunne vært interessant og isolere og identifisere disse forbindelsene. Fraksjonene E9 – E12 og E15 viste høy aktivitet med tanke på radikalscavenging og det hadde vært interessant å foreta syrekatalysert floroglucinolspalting for å bestemme hva som er startenhet og hva som er forlengerenhet i proanthocyanidinene i disse fraksjonene. Det sammen gjelder de andre proanthocyanidin fraksjonene fra PeOH -ekstraktet som, på grunn av tidsmangel, ikke ble undersøkt i denne oppgaven. Det kunne også vært interessant å undersøke de ulike fraksjonene i bioassay for antibakteriell effekt.

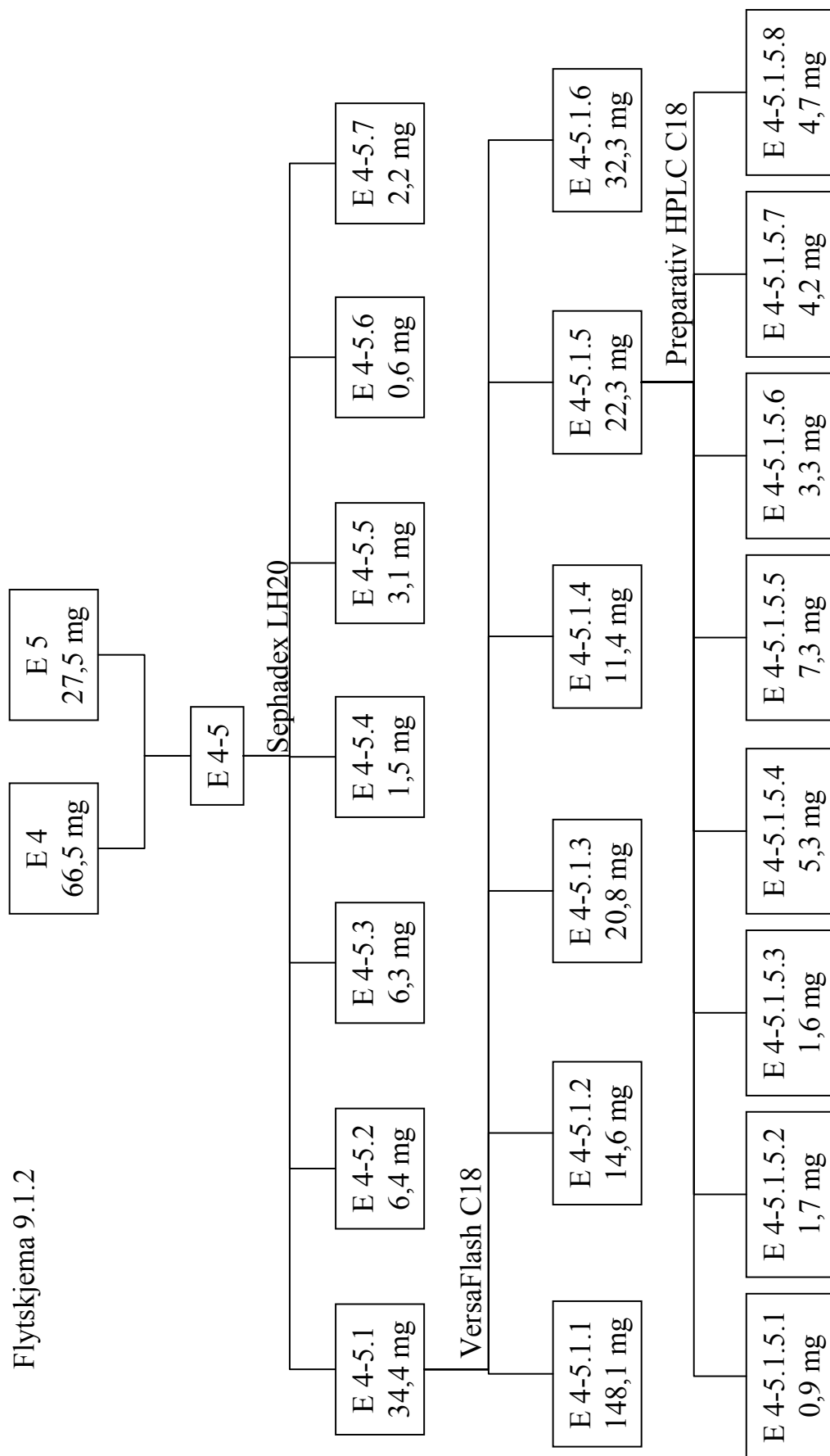
Bioassaymetodene er *in vitro* forsøk og gir dermed kun en indikasjon på om forbindelsene har effekt *in vivo*. Det er derfor nødvendig med ytterlige undersøkelser for å finne ut om resultatene kan ha noe medisinsk betydning.

8 Vedlegg

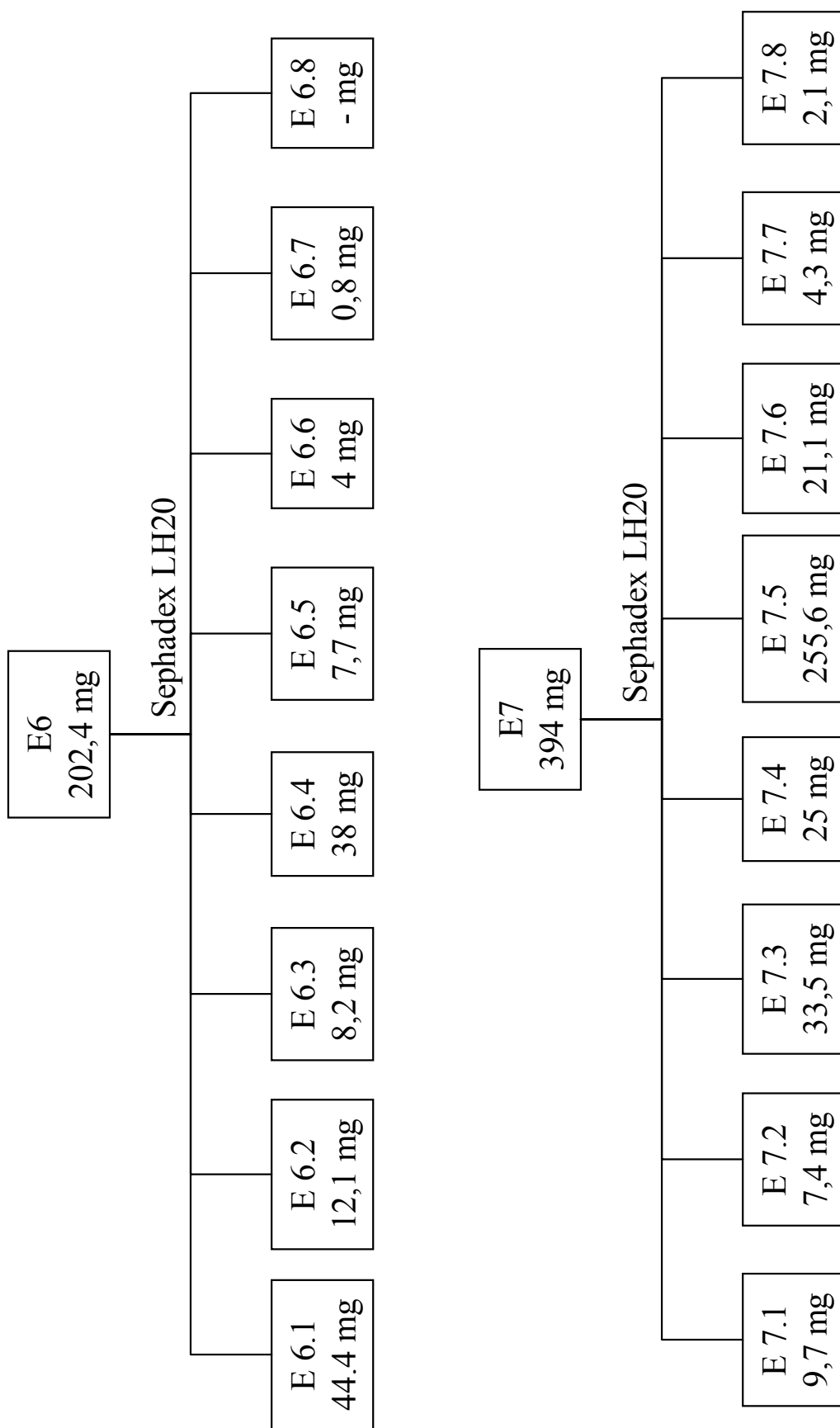
8.1 Flytskjema



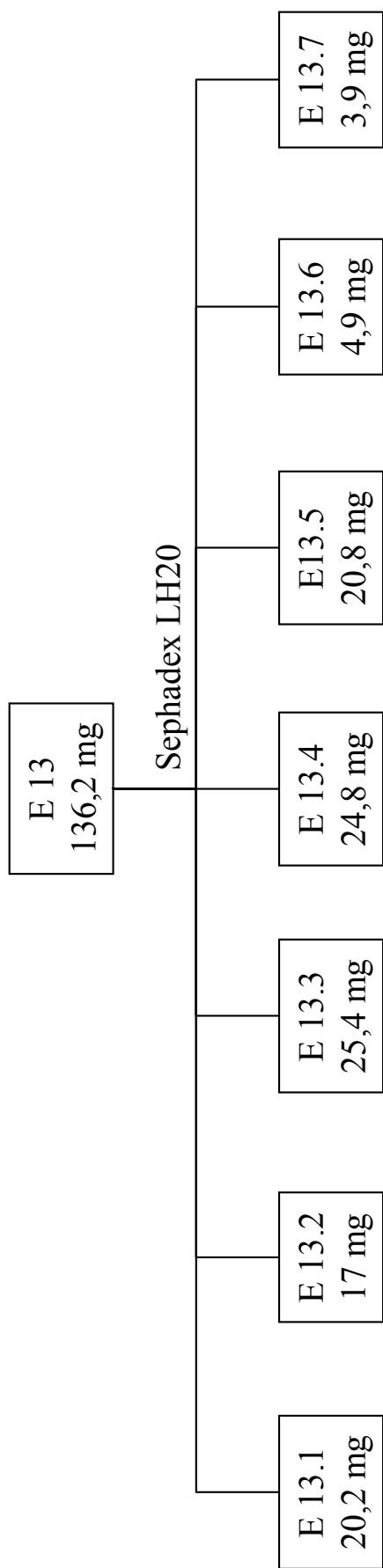
Flytskjema 9.1.2



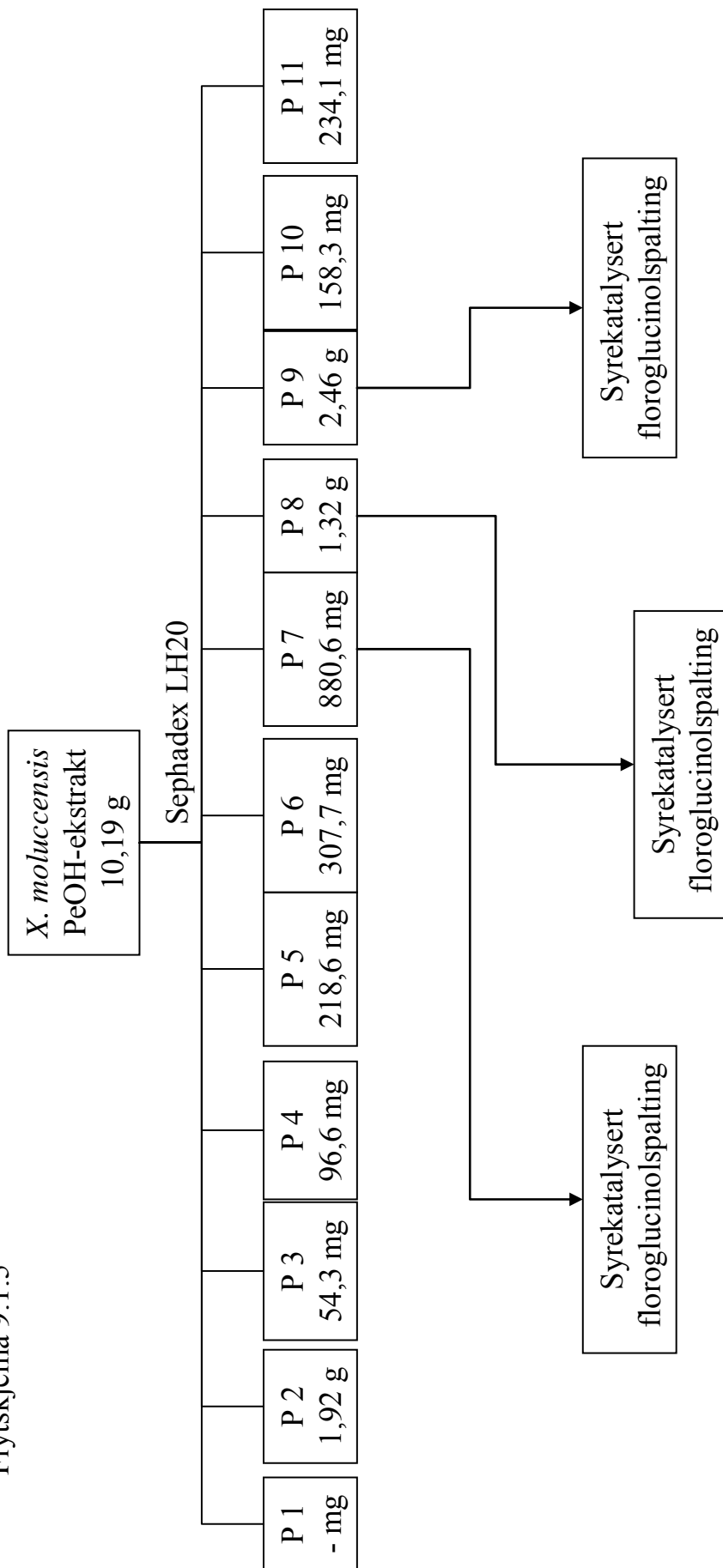
Flytskjema 9.1.3



Flytskjema 9.1.4



Flytskjema 9.1.5



8.2 Tabeller

Tabell 9.2.1. Kolonnekromatografi av EtOAc-ekstrakt (3,29 g) på Toyopearl HW40.

Fraksjon	Mengde (ml)	Elueringsmiddel	DPPH	Fraksjon	Mengde (ml)	Masse (mg)
1	30	Vann	-	-		
2	30	Vann	-	E1	90	71,7
3	30	Vann	-			
4	30	Vann / 25 % MeOH	-			
5	30	25 % MeOH	-	E2	120	37,4
6	30	25 % MeOH	-			
7	30	25 % MeOH	-			
8	30	25 % MeOH	-			
9	30	25 % MeOH	-	E3	60	10,5
10	30	25 % / 50 % MeOH	-			
11	30	50 % MeOH	-	E4	150	66,5
12	30	50 % MeOH	-			
13	30	50 % MeOH	-			
14	30	50 % MeOH	-			
15	30	50 % MeOH	-			
16	30	50 % MeOH	-	E5	30	27,5
17	30	50 % MeOH	+	E6	90	202,4
18	30	50 % MeOH	+			
19	30	50 % MeOH	+			
20	30	50 % MeOH	+	E7	150	394
21	30	50 % MeOH	+			
22	30	50 % / 75 % MeOH	+			
23	30	75 % MeOH	+			
24	30	75 % MeOH	+			
25	30	75 % MeOH	+	E8	90	351,3
26	30	75 % MeOH	+			
27	30	75 % MeOH	+			
28	30	75 % MeOH	+	E9	60	129,9
29	30	75 % MeOH	+			
30	30	75 % MeOH	+	E10	180	363,5
31	30	75 % MeOH	+			
32	30	75 % MeOH	+			
33	30	75 % MeOH	+			
34	30	75 % MeOH	+			
35	30	75 % MeOH / MeOH	+			
36	30	MeOH	+	E11	210	293,4
37	30	MeOH	+			
38	30	MeOH	+			
39	30	MeOH	+			
40	30	MeOH	+			

41	30	MeOH	+			
42	30	MeOH	+			
43	30	MeOH	+	E12	270	220,7
44	30	MeOH	+			
45	30	MeOH	+			
46	30	MeOH	+			
47	30	MeOH	+			
48	30	MeOH	+			
49	30	MeOH / Aceton	+			
50	30	Aceton	+			
51	30	Aceton	+			
52	30	Aceton	+	E13	90	136,2
53	30	Aceton	+			
54	30	Aceton	+			
55	30	Aceton	-	E14	180	2,4
56	30	Aceton	-			
57	30	Aceton	-			
58	30	Aceton	-			
59	30	Aceton	-			
60	30	Aceton	-			
61	100	Aceton / Vann	+	E15	100	946
SUM						3253,4

Tabell 9.2.2. Radikalscavengeraktivitet til fraksjonene E1 – E15.

Fraksjon	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	% Radikalscavenging	SD	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
E1	83,3	69,2	0,9	46 \pm 3
	41,7	46,8	2,2	
	20,8	31,2	1,7	
	10,4	21,4	1,3	
	5,2	14,1	1,6	
E2	83,3	87,3	0,2	21 \pm 3
	41,7	69,1	0,9	
	20,8	50	4,1	
	10,4	27,7	0,7	
	5,2	19,7	0,4	
	2,6	11,6	0,3	
E3	Ikke målt			
E4	83,3	84	0,9	31 \pm 3
	41,7	57,9	3,2	
	20,8	40,4	0,5	
	10,4	26,3	0,1	
	5,2	13	1,4	
E5	Ikke målt			
E6	83,3	94,1	0,2	15,3 \pm 0,5
	41,7	89,4	1,5	
	20,8	61	0,3	
	10,4	34,9	2,4	
	5,2	17,2	0,9	
	2,6	9	0,3	
E7	83,3	94,4	0,1	6,8 \pm 0,3
	41,7	95,1	0	
	20,8	94,8	0,8	
	10,4	71,3	3,9	
	5,2	36,9	1,3	
	2,6	18,9	0,5	
E8	83,3	94	0,2	7,5 \pm 0,2
	41,7	95	0	
	20,8	94	0,7	
	10,4	65,3	2,2	
	5,2	33	0,3	
	2,6	17	1	
E9	83,3	92,2	0,5	6,6 \pm 0,4
	41,7	93,6	0,2	
	20,8	92,8	0,9	
	10,4	76,2	3,2	
	5,2	35,8	2,7	

	2,6	20,9	1,4	
E10	83,3	92,5	0	6,2±0,3
	41,7	93,9	0,2	
	20,8	94,2	0,2	
	10,4	71,1	1,4	
	5,2	42,6	2,3	
	2,6	20,1	1,6	
E11	83,3	89,9	0,4	8,6±0,6
	41,7	83	1,9	
	20,8	69	1,5	
	10,4	56,2	2,1	
	5,2	33	1,2	
	2,6	18,4	1	
E12	83,3	90,6	0,3	7,6±0,6
	41,7	89,1	0,7	
	20,8	79	0,7	
	10,4	60,8	3,4	
	5,2	37,1	1,3	
	2,6	19,5	1,6	
E13	83,3	90,8	0,4	6,0±0,2
	41,7	92	0,4	
	20,8	92,7	0,2	
	10,4	77,2	2	
	5,2	42,6	1,5	
	2,6	19,9	2	
E14	Ikke målt			
E15	83,3	89,8	0,3	9,2±0,5
	41,7	84	1	
	20,8	67,7	2,5	
	10,4	53,2	1,3	
	5,2	34,3	1,6	
	2,6	20,6	1,1	

Tabell 9.2.3. Hemming av 15-LO til fraksjonene E1 – E15.

Fraksjon	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	% Hemming	SD	P<	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
E1	Ikke målt				
E2	Ikke målt				
E3	Ikke målt				
E4	83,3	100,1	0,6	0,001	33±2
	41,7	61	2,9	0,001	
	20,8	27,7	2	0,001	
	10,4	10,1	3,2	0,001	
	5,2	1,8	4,7	NS	
	2,6	-0,7	4,1	NS	
E5	Ikke målt				
E6	83,3	96,8	0,4	0,001	26±1
	41,7	72,9	1,5	0,001	
	20,8	38,4	2,3	0,001	
	10,4	17,5	4,3	0,001	
	5,2	8,5	5,2	0,05	
	2,6	4,9	6,6	NS	
E7	83,3	100,6	0,3	0,001	13±3
	41,7	96,2	1	0,001	
	20,8	70,9	1,8	0,001	
	10,4	41,3	9,4	0,001	
	5,2	11,3	9,6	NS	
E8	Ikke målt				
E9	Ikke målt				
E10	Ikke målt				
E11	Ikke målt				
E12	Ikke målt				
E13	Ikke målt				
E14	Ikke målt				
E15	Ikke målt				

Tabell 9.2.4. Kolonnekromatografi av fraksjon E4-5 (83,9 mg) på Sephadex-LH20.

Fraksjon	Mengde (ml)	Elueringsmiddel	Ceric	Fraksjon	Mengde (ml)	Masse (mg)
0	40	50 % MeOH	-	-	40	-
1	30	50 % MeOH	+	E4-5.1	120	34,4
2	30	50 % / 75 % MeOH	+			
3	30	75 % MeOH	+			
4	30	75 % MeOH	+			
5	30	75 % MeOH	-	E4-5.2	60	6,4
6	30	75 % MeOH	-			
7	30	75 % MeOH	-	E4-5.3	120	6,3
8	30	75 % MeOH	-			
9	30	75 % MeOH	-			
10	30	75 % MeOH / MeOH	-			
11	30	MeOH	-	E4-5.4	120	1,5
12	30	MeOH	-			
13	30	MeOH	-			
14	30	MeOH	-			
15	30	MeOH	-	E4-5.5	180	3,1
16	30	MeOH / Aceton	-			
17	30	Aceton	-			
18	30	Aceton	-			
19	30	Aceton	-			
20	30	Aceton	-	E4-5.6	90	0,6
21	30	Aceton	-			
22	30	Aceton	-			
23	30	Aceton	-	E4-5.7	100	2,2
24	100	Aceton	-			
SUM						54,5

Tabell 9.2.5. Kolonnekromatografi av fraksjon E4-5.1 (34,4 mg) på VersaFlash C18.

Fraksjon	Mengde (ml)	Elueringsmiddel	Ceric	Fraksjon	Mengde (ml)	Masse (mg)
1	20	25 % ACN	-	E4-5.1.1	20	148,1
2	20	25 % ACN	-	E4-5.1.2	60	14,6
3	20	25 % ACN	-			
4	20	25 % ACN	-			
5	20	25 % ACN	-	E4-5.1.3	140	20,8
6	20	25 % ACN	-			
7	20	25 % ACN	-			
8	20	25 % ACN	-			
9	20	25 % ACN	-			
10	20	25 % / 50 % ACN	-			
11	20	50 % ACN	-	E4-5.1.4	120	11,4
12	20	50 % ACN	-			
13	20	50 % ACN	-			
14	20	50 % ACN	-			
15	20	50 % ACN	-			
16	20	50 % ACN	-			
17	20	50 % ACN	-	E4-5.1.5	140	22,3
18	20	50 % ACN	+			
19	20	50 % / 75 % ACN	+			
20	20	75 % ACN	+			
21	20	75 % ACN	+			
22	20	75 % ACN	+			
23	20	75 % ACN	+			
24	20	75 % ACN	+	E4-5.1.6	400	32,3
25	20	75 % ACN	-			
26	20	75 % ACN	-			
27	20	75 % ACN	-			
28	20	75 % ACN / ACN	-			
29	20	ACN	-			
30	20	ACN	-			
31	20	ACN	-			
32	20	ACN	-			
33	20	ACN	-			
34	20	ACN	-			
35	20	ACN	-			
36	20	ACN	-			
37	20	ACN / Aceton	-			
38	20	Aceton	-			
39	20	Aceton	-			
40	20	Aceton	-			
41	20	Aceton / 66 % MeOH	-			
42	20	66 % MeOH	-			

43	20	66 % MeOH	-			
44	10	66 % MeOH	-			
SUM						249,5

Tabell 9.2.6. Kolonnekromatografi av fraksjon E4-5.1.5 (22,3 mg) på preparativ C18-HPLC.

Topp	Fraksjon	Masse (mg)
1	E4-5.1.5.1	0,9
2	E4-5.1.5.2	1,7
3	E4-5.1.5.3	1,6
4	E4-5.1.5.4	5,3
5	E4-5.1.5.5	7,3
6	E4-5.1.5.6	3,3
7	E4-5.1.5.7	4,2
8	E4-5.1.5.8	4,7
SUM		29

Tabell 9.2.7. Kolonnekromatografi av fraksjon E6 (202,4 mg) på Sephadex-LH20.

Fraksjon	Mengde (ml)	Elueringsmiddel	Fraksjon	Mengde (ml)	Masse (mg)
0	80	50 % MeOH	E6.1	160	44,4
1	20	50 % MeOH			
2	20	50 % MeOH			
3	20	50 % / 75 % MeOH			
4	20	75 % MeOH			
5	20	75 % MeOH	E6.2	60	12,1
6	20	75 % MeOH			
7	20	75 % MeOH			
8	20	75 % MeOH	E6.3	40	8,2
9	20	75 % MeOH			
10	20	75 % MeOH	E6.4	80	38
11	20	75 % MeOH			
12	20	75 % MeOH / MeOH			
13	20	MeOH	E6.5	100	7,7
14	20	MeOH			
15	20	MeOH			
16	20	MeOH			
17	20	MeOH			
18	20	MeOH			
19	20	MeOH	E6.6	120	4
20	20	MeOH / Aceton			
21	20	Aceton			
22	20	Aceton			
23	20	Aceton			
24	20	Aceton			
25	20	Aceton	E6.7	80	0,8
26	20	Aceton			
27	20	Aceton			
28	20	Aceton / 50 % MeOH			
29	250	50 % MeOH	E6.8	250	0
SUM					115,2

Tabell 9.2.8. Kolonnekromatografi av fraksjon E7 (343,3 mg) på Sephadex-LH20.

Fraksjon	Mengde (ml)	Elueringsmiddel	Fraksjon	Mengde (ml)	Masse (mg)
0	40	50 % MeOH	-	40	-
1	20	50 % MeOH	E7.1	40	9,7
2	20	50 % MeOH			
3	20	50 % MeOH	E7.2	20	7,4
4	20	50 % MeOH	E7.3	140	33,5
5	20	50 % MeOH			
6	20	50 % MeOH			
7	20	50 % / 75 % MeOH			
8	20	75 % MeOH			
9	20	75 % MeOH			
10	20	75 % MeOH / MeOH	E7.4	40	25
11	20	MeOH			
12	20	MeOH	E7.5	80	255,6
13	20	MeOH			
14	20	MeOH			
15	20	MeOH			
16	20	MeOH			
17	20	MeOH	E7.6	80	21,1
18	20	MeOH			
19	20	MeOH			
20	20	MeOH			
21	20	MeOH	E7.7	60	4,3
22	20	MeOH			
23	20	MeOH			
24	20	MeOH	E7.8	80	2,1
25	20	MeOH			
26	20	MeOH			
27	20	MeOH / 50 % MeOH			
28	100	50 % MeOH	-	100	-
SUM					358,7

Tabell 9.2.9. Radikalscavengeraktivitet til fraksjon E7.5.

Fraksjon	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	% Radikalscavenging	SD	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
E7.5	166,7	94,4	0,6	6,5 \pm 0,4
	83,4	95,5	0,1	
	41,7	95,5	1,3	
	20,8	95,4	0,3	
	10,4	73,8	3,6	
	5,2	38,2	1,8	
	2,6	17,8	0,3	

Tabell 9.2.10. Hemming av 15-LO til fraksjon E7.5.

Fraksjon	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	% Hemming	SD	P<	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
E7.5	87,5	99,2	0,5	0,001	22 \pm 1
	43,8	88,6	1,1	0,001	
	21,9	49,6	2,6	0,001	
	10,9	19,5	2,9	0,001	
	5,5	7,4	5,2	0,025	

Tabell 9.2.11. Kolonnekromatografi av fraksjon E13 (136,2 mg) på Sephadex-LH20.

Fraksjon	Mengde (ml)	Elueringsmiddel	Fraksjon	Mengde (ml)	Masse (mg)
0	90	50 % MeOH	-	90	-
1	30	50 % / 75 % MeOH	E13.1	270	20,2
2	30	75 % MeOH			
3	30	75 % MeOH			
4	30	75 % MeOH / MeOH			
5	30	MeOH			
6	30	MeOH			
7	30	MeOH			
8	30	MeOH			
9	30	MeOH			
10	30	MeOH	E13.2	60	17
11	30	MeOH			
12	30	MeOH	E13.3	120	25,4
13	30	MeOH			
14	30	MeOH / 70 % Aceton			
15	30	70 % Aceton	E13.4	90	24,8
16	30	70 % Aceton			
17	30	70 % Aceton			
18	30	70 % Aceton			
19	30	70 % Aceton	E13.5	30	20,8
20	30	70 % Aceton	E13.6	60	4,9
21	30	70 % Aceton / Aceton			
22	30	Aceton	E13.7	150	3,9
23	30	Aceton			
24	30	Aceton			
25	30	Aceton			
26	30	Aceton			
SUM					117

Tabell 9.2.12. Kolonnekromatografi av PeOH-ekstraktet (9,16 g) på Sephadex-LH20.

Fraksjon	Mengde (ml)	Elueringsmiddel	DPPH	Fraksjon	Mengde (ml)	Masse (mg)
1	60	25 % MeOH	-	P1	60	0
2	60	25 % MeOH	+	P2	180	1918,8
3	60	25 % MeOH	+			
4	60	25 % / 50 % MeOH	+			
5	60	50 % MeOH	-	P3	360	54,3
6	60	50 % MeOH	-			
7	60	50 % MeOH	-			
8	60	50 % / 75 % MeOH	-			
9	60	75 % MeOH	-			
10	60	75 % MeOH	-	P4	120	96,6
11	60	75 % MeOH	+			
12	60	75 % MeOH	+	P5	120	218,6
13	60	75 % MeOH	+			
14	60	75 % MeOH / MeOH	+	P6	120	307,7
15	60	MeOH	+			
16	60	MeOH	+	P7	180	880,6
17	60	MeOH	+			
18	60	MeOH	+			
19	60	MeOH	+	P8	300	1315,2
20	60	MeOH	+			
21	60	MeOH	+			
22	60	MeOH / 70 % Aceton	+			
23	60	70 % Aceton	+			
24	60	70 % Aceton	+	P9	120	2464,4
25	60	70 % Aceton	+			
26	60	70 % Aceton / Aceton	+	P10	180	158,3
27	60	Aceton	+			
28	60	Aceton	+			
29	60	Aceton	+	P11	60	234,1
30	60	Aceton	-			
SUM						7,648,6

Tabell 9.2.13. Radikalscavengeraktivitet til fraksjonene P1 – P11.

Fraksjon	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	% Radikalscavenging	SD	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
P1	Ikke målt			
P2	83,3	90,8	0,5	10,7 \pm 0,4
	41,7	82,1	3	
	20,8	66,1	0,7	
	10,4	49,2	0,8	
	5,2	32,4	1,5	
	2,6	21,4	0,4	
P3	83,3	86	0,8	33 \pm 2
	41,7	56,5	1,3	
	20,8	37,3	1,1	
	10,4	23,4	0,7	
	5,2	13	0,4	
	2,6	7,1	0,6	
P4	83,3	89,8	0,2	15,2 \pm 0,7
	41,7	75	0,8	
	20,8	58,5	1,3	
	10,4	39,7	1	
	5,2	22,3	1,4	
	2,6	12,5	0,1	
P5	83,3	92,2	0,2	8,2 \pm 0,5
	41,7	87,9	1,7	
	20,8	74,1	2,9	
	10,4	59,1	1,4	
	5,2	32,2	3,6	
	2,6	17,9	0,9	
P6	83,3	93,8	0,4	6,3 \pm 0,4
	41,7	93,8	0,5	
	20,8	86,9	1,2	
	10,4	68,2	1,9	
	5,2	43,4	2,1	
	2,6	24,1	1,2	
P7	83,3	86,1	0,8	6,6 \pm 0,4
	41,7	83,2	0,9	
	20,8	78,3	0,9	
	10,4	63,8	1,5	
	5,2	42,6	1,9	
	2,6	23,3	2	
P8	83,3	86,2	0,1	6,2 \pm 0,4
	41,7	82,6	0,7	
	20,8	75,9	0,4	
	10,4	65,4	1,2	

	5,2	44,9	1,9	
	2,6	27,9	0,6	
P9	83,3	83,9	0	7,4±0,2
	41,7	77,4	1,3	
	20,8	69,5	1,4	
	10,4	57,8	0,3	
	5,2	42	0,9	
	2,6	25,3	1	
P10	83,3	81,9	0,3	16,7±1,2
	41,7	70,8	1,4	
	20,8	53,9	1,1	
	10,4	41,6	1,5	
	5,2	29,8	0,7	
	2,6	17,9	0,9	
P11	83,3	-2,6	0,7	>83,3

Tabell 9.2.14. Hemming av 15-LO til fraksjonene P1 – P11.

Fraksjon	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	% Hemming	SD	P<	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
P1	Ikke målt				
P2	83,3	106,3	3,4	0,001	10 \pm 1
	41,7	104,7	3,8	0,001	
	20,8	91	3,9	0,001	
	10,4	52	3,6	0,001	
	5,2	22,2	5,1	0,001	
	2,6	12,3	6,4	0,01	
P3	83,3	98,8	0,3	0,001	26 \pm 2
	41,7	74,5	3,3	0,001	
	20,8	37,4	4,6	0,001	
	10,4	12,4	8,6	NS	
	5,2	3,5	10,3	NS	
P4	83,3	101,1	0,3	0,001	21,6 \pm 1,4
	41,7	85,8	1,1	0,001	
	20,8	48	3,6	0,001	
	10,4	21,1	6,4	0,005	
	5,2	19,1	8	0,005	
P5	83,3	100,8	1,5	0,001	13,7 \pm 1,0
	41,7	98	1	0,001	
	20,8	72,9	2	0,001	
	10,4	34,9	5,2	0,001	
	5,2	16,1	5,9	0,005	
	2,6	4	4,6	NS	
P6	83,3	102,5	1	0,001	13,2 \pm 0,9
	41,7	98,1	1,7	0,001	
	20,8	78,5	2,5	0,001	
	10,4	35,3	4,9	0,001	
	5,2	17,2	4,4	0,001	
	2,6	6,3	5,7	NS	
P7	83,3	101	0,7	0,001	13,0 \pm 1,5
	41,7	95,1	0,9	0,001	
	20,8	77,8	3,4	0,001	
	10,4	36,9	7,7	0,001	
	5,2	19,6	7,2	0,005	
	2,6	13	7,3	0,05	
P8	83,3	101,6	0,6	0,001	12,0 \pm 0,6
	41,7	98,7	0,3	0,001	
	20,8	83,4	1,6	0,001	
	10,4	41,6	3,1	0,001	
	5,2	15,2	5,6	0,005	
	2,6	7,9	6,8	NS	

P9	83,3	103,2	0,8	0,001	11,8±0,9
	41,7	99,4	0,5	0,001	
	20,8	75,2	2,1	0,001	
	10,4	44,2	3,6	0,001	
	5,2	25,4	4,8	0,001	
	2,6	11,8	5,7	0,025	
P10	83,3	102,8	1,4	0,001	15,9±1,3
	41,7	94,5	3,2	0,001	
	20,8	62,5	3,6	0,001	
	10,4	30,1	3,5	0,001	
	5,2	9,6	3,6	0,005	
	2,6	6,2	5,4	NS	
P11	83,3	7,5	5,3	NS	>83,3

Tabell 9.2.15. Kolonnekromatografi av fraksjon P7 (203,4 mg) etter syrekatalysert floroglucinolspalting på Sephadex-LH20.

Fraksjon	Mengde (ml)	Elueringsmiddel	DPPH	Fraksjon	Mengde (ml)	Masse (mg)
0	60	50 % EtOH	-	Ikke dampet inn		
1	20	50 % EtOH	-			
2	20	50 % / 75 % EtOH	-			
3	20	75 % EtOH	-			
4	20	75 % EtOH	+	P7.2	40	37
5	20	75 % EtOH	+			
6	20	75 % EtOH	+	P7.3	20	16,8
7	20	75 % EtOH	+	P7.4	20	-
8	20	75 % EtOH	+	P7.5	40	23,5
9	20	75 % EtOH / EtOH	+			
10	20	EtOH	+	P7.6	40	29,8
11	20	EtOH	+			
12	20	EtOH		Ikke dampet inn		
13	20	EtOH	+	P7.7	80	21,8
14	20	EtOH	+			
15	20	EtOH / 70 % Aceton	+			
16	20	70 % Aceton	+			
17	20	70 % Aceton	+	P7.8	60	87,9
18	20	70 % Aceton	+			
19	20	70 % Aceton	+			
20	20	70 % Aceton	-	Ikke dampet inn		
21	20	70 % Aceton	-			
22	20	70 % Aceton	-			
23	20	70 % Aceton	-			
24	20	70 % Aceton	-			
25	20	70 % Aceton	-			
26	20	70 % Aceton / Aceton	-			
27	100	Aceton	-			

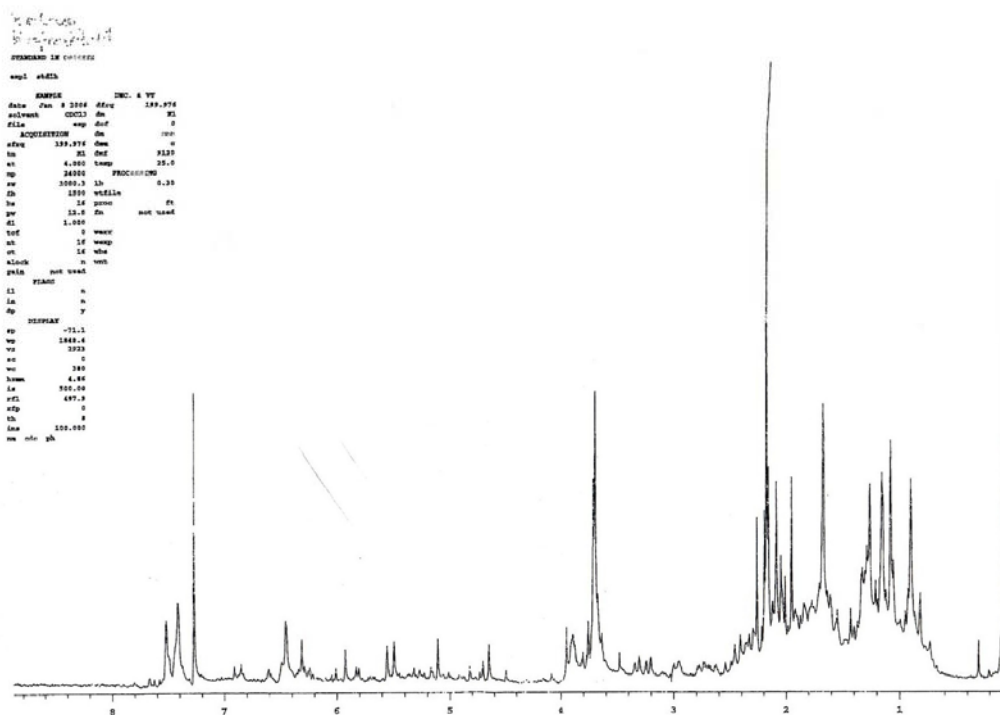
Tabell 9.2.16. Kolonnekromatografi av fraksjon P8 (200,2 mg) etter syrekatalysert floroglucinolspalting på Sephadex-LH20.

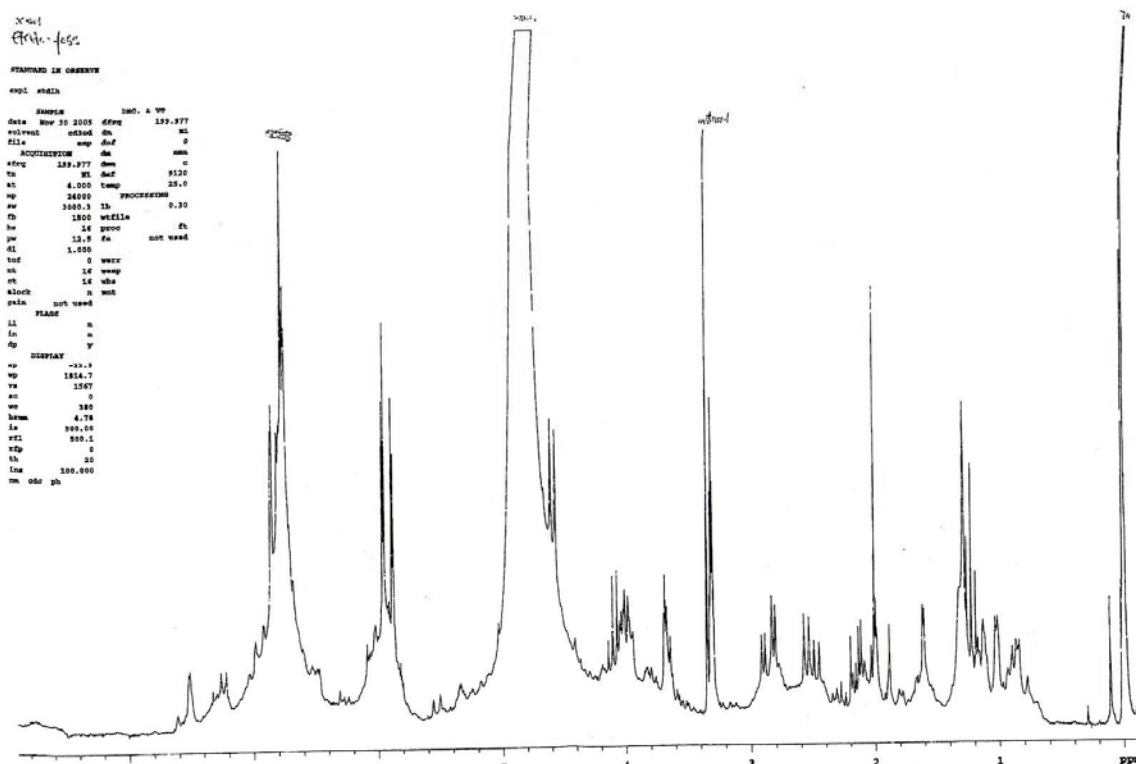
Fraksjon	Mengde (ml)	Elueringsmiddel	DPPH	Fraksjon	Mengde (ml)	Masse (mg)
0	80	50 % EtOH	-	Ikke dampet inn		
1	20	50 % / 75 % EtOH	-			
2	20	75 % EtOH	-			
3	20	75 % EtOH	-			
4	20	75 % EtOH	+	P8.1	40	92,7
5	20	75 % EtOH	+	P8.2	40	23,1
6	20	75 % EtOH	+			
7	20	75 % EtOH	+	P8.3	40	22
8	20	75 % EtOH / EtOH	+			
9	20	EtOH	+	P8.4	40	27,8
10	20	EtOH	+			
11	20	EtOH	+	P8.5	40	18,4
12	20	EtOH	+			
13	20	EtOH	+	P8.6	60	15,9
14	20	EtOH / 70 % Aceton	+			
15	20	70 % Aceton	+			
16	20	70 % Aceton	+	P8.7	20	38,1
17	20	70 % Aceton	+	P8.8	20	68,3
18	20	70 % Aceton	+	P8.9	60	19,8
19	20	70 % Aceton	+			
20	20	70 % Aceton	+			
21	20	70 % Aceton / Aceton	+	Ikke dampet inn		
22	100	Aceton	-			

Tabell 9.2.17. Kolonnekromatografi av fraksjon P9 (206,6 mg) etter syrekatalysert floroglucinolspalting på Sephadex-LH20.

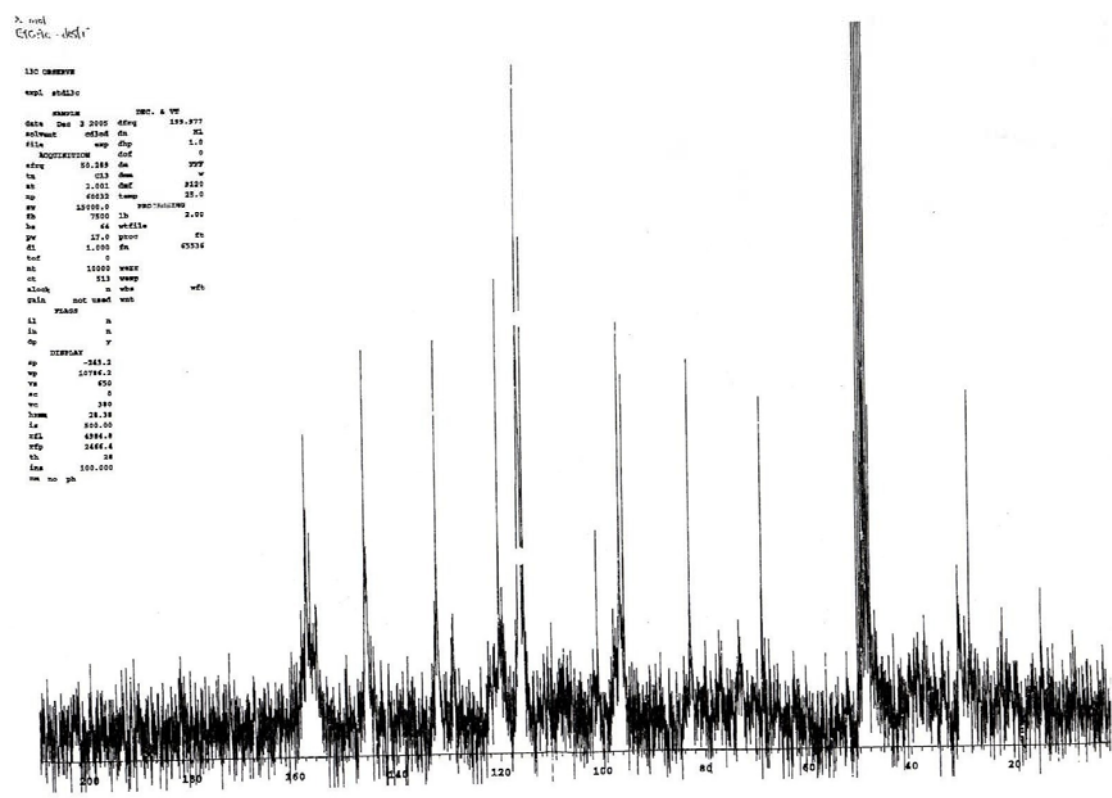
Fraksjon	Mengde (ml)	Elueringsmiddel	DPPH	Fraksjon	Mengde (ml)	Masse (mg)
0	80	50 % EtOH	-	Ikke dampet inn		
1	20	50 % / 75 % EtOH	-			
2	20	75 % EtOH	-			
3	20	75 % EtOH	+	P9.1	60	100,1
4	20	75 % EtOH	+			
5	20	75 % EtOH	+			
6	20	75 % EtOH	+	P9.2	40	15,7
7	20	75 % EtOH	+			
8	20	75 % EtOH / EtOH	+	P9.3	40	21,2
9	20	EtOH	+			
10	20	EtOH	+	P9.4	40	25,7
11	20	EtOH	+			
12	20	EtOH	+	P9.5	100	23,5
13	20	EtOH	+			
14	20	EtOH / 70 % Aceton	+			
15	20	70 % Aceton	+			
16	20	70 % Aceton	+			
17	20	70 % Aceton	+	P9.6	60	109,1
18	20	70 % Aceton	+			
19	20	70 % Aceton	+			
20	20	70 % Aceton	-	Ikke dampet inn		
21	20	70 % Aceton	-			
22	20	70 % Aceton / Aceton	-			
23	100	Aceton	-			

8.3 NMR-spektra

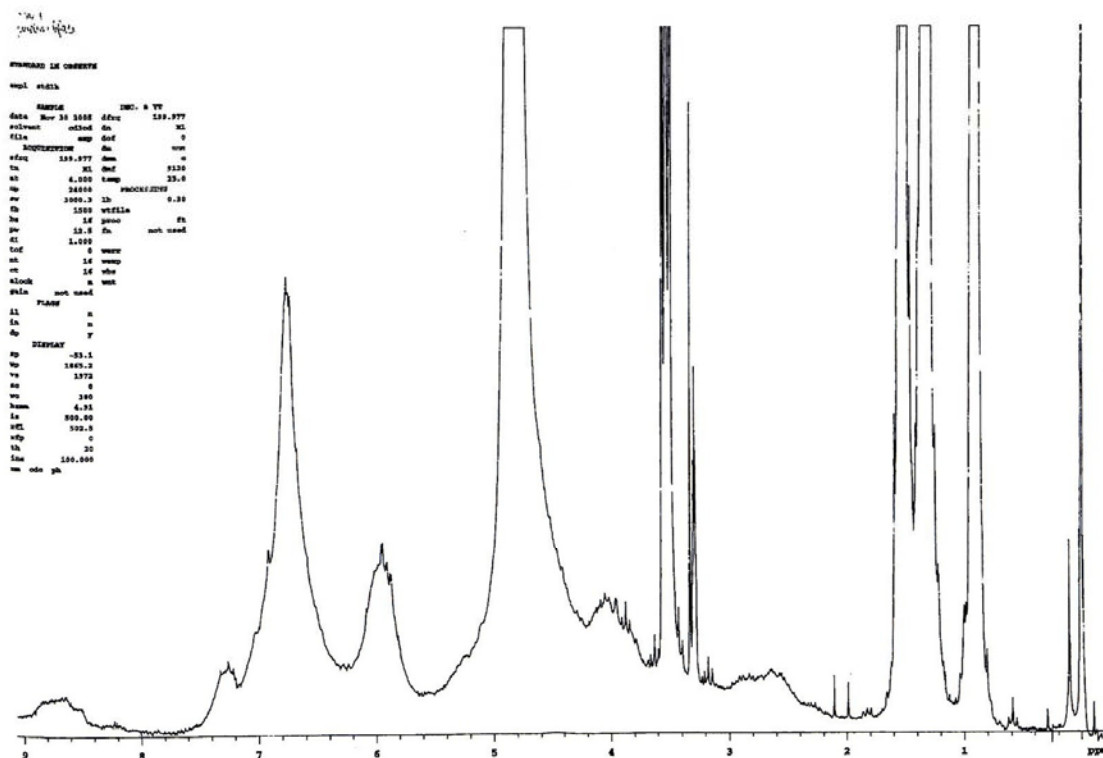




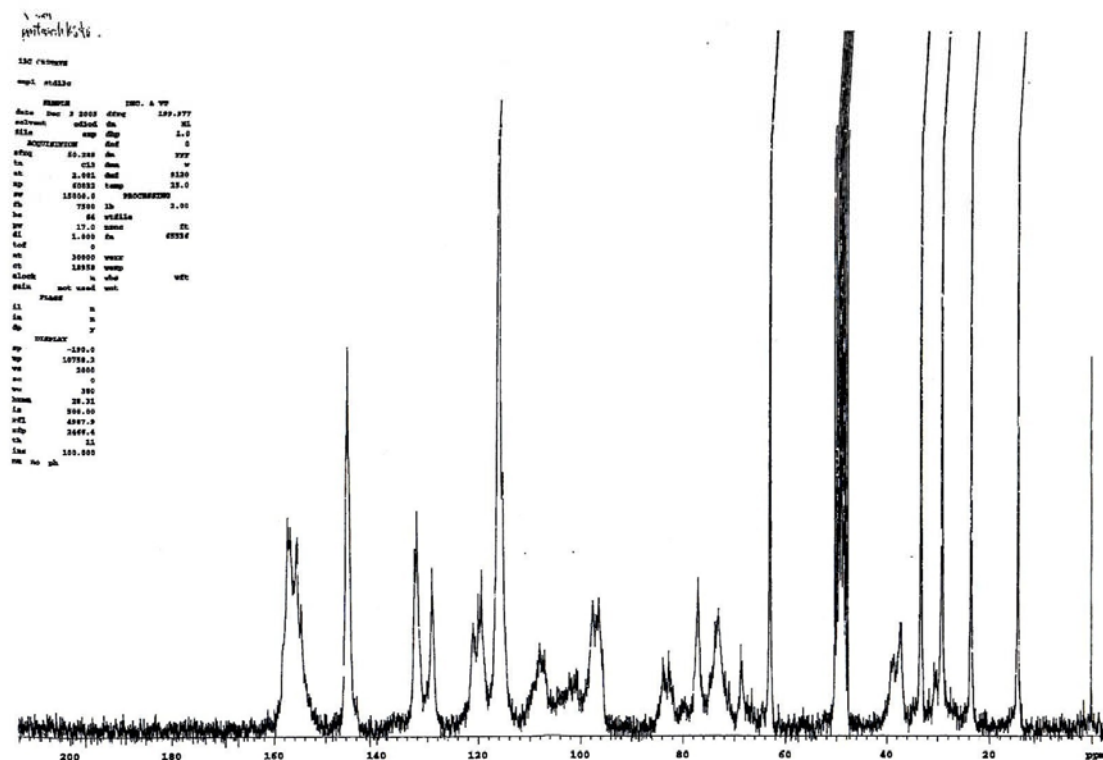
NMR-spektrum 9.3.3: ¹H-NMR-spektrum av EtOAc-ekstraktet.



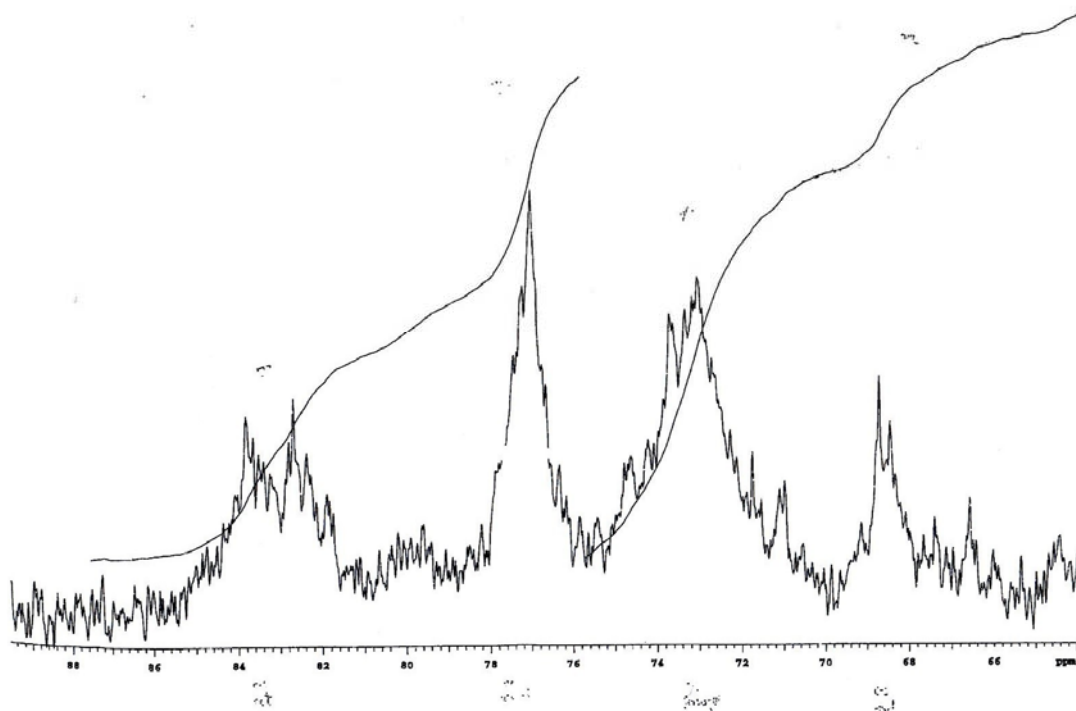
NMR-spektrum 9.3.4: ¹³C-NMR-spektrum av EtOAc-ekstraktet.



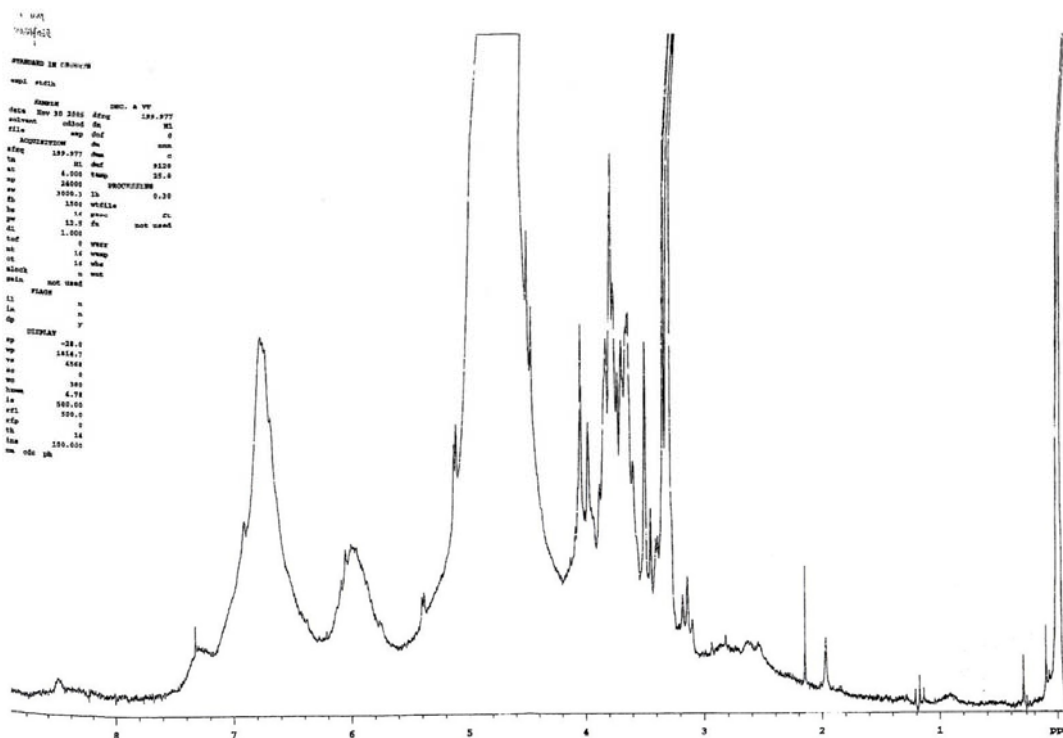
NMR-spektrum 9.3.5: ^1H -NMR-spektrum av PeOH-ekstraktet.



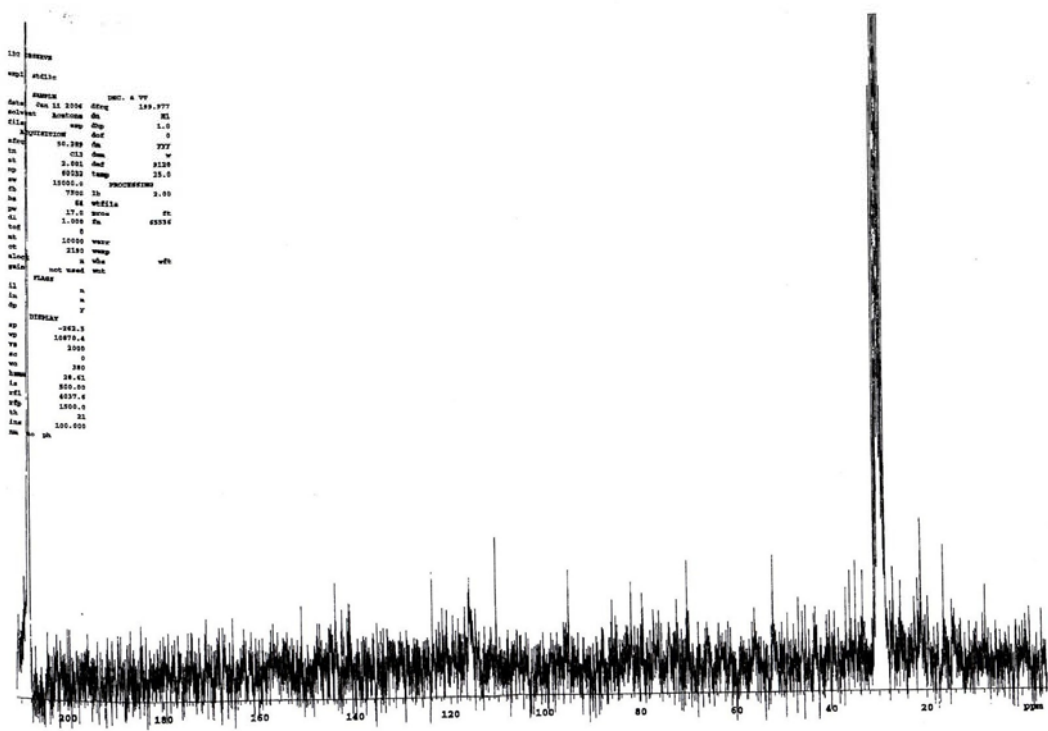
NMR-spektrum 9.3.6: ^{13}C -NMR-spektrum av PeOH-ekstraktet.



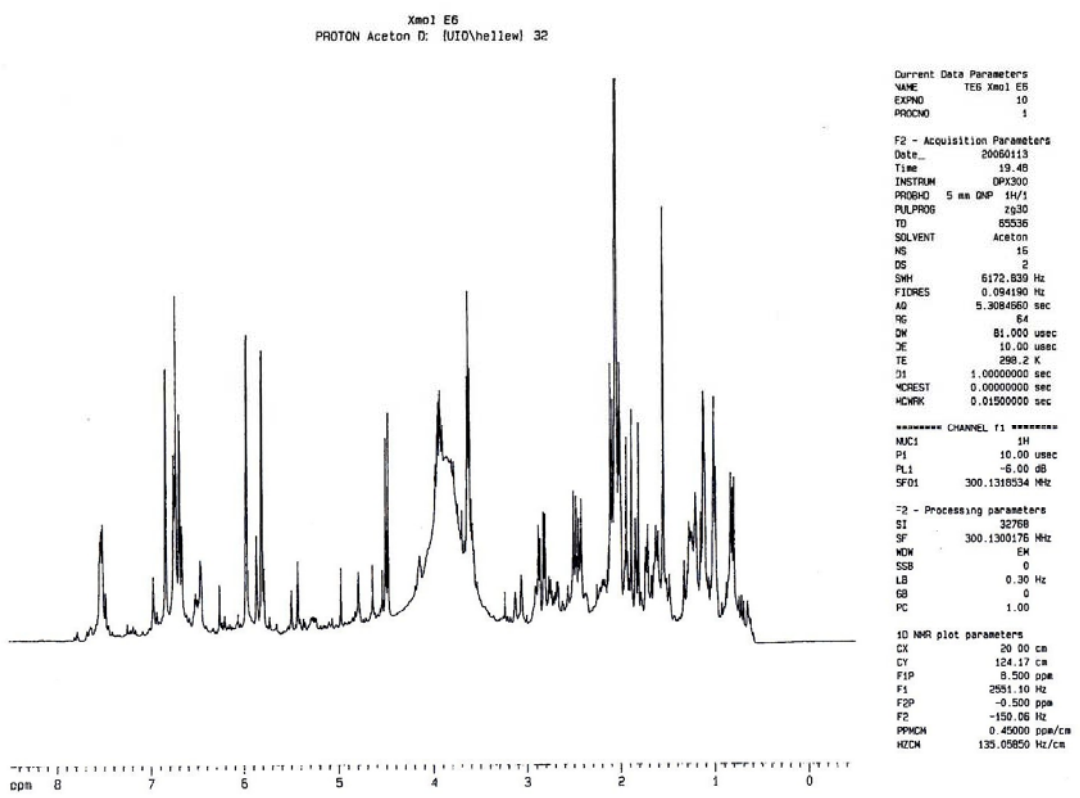
NMR-spektrum 9.3.7: Utsnitt og integral av ^{13}C -NMR-spekteret av PeOH-ekstraktet.



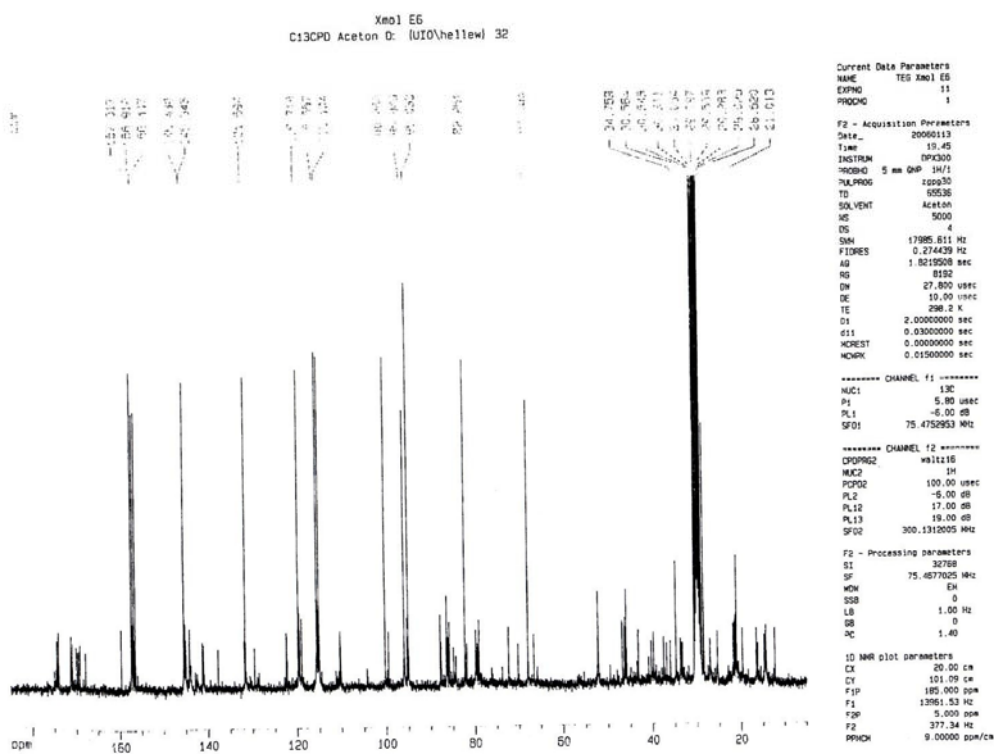
NMR-spektrum 9.3.8: ^1H -NMR-spektrum av vandig rest.



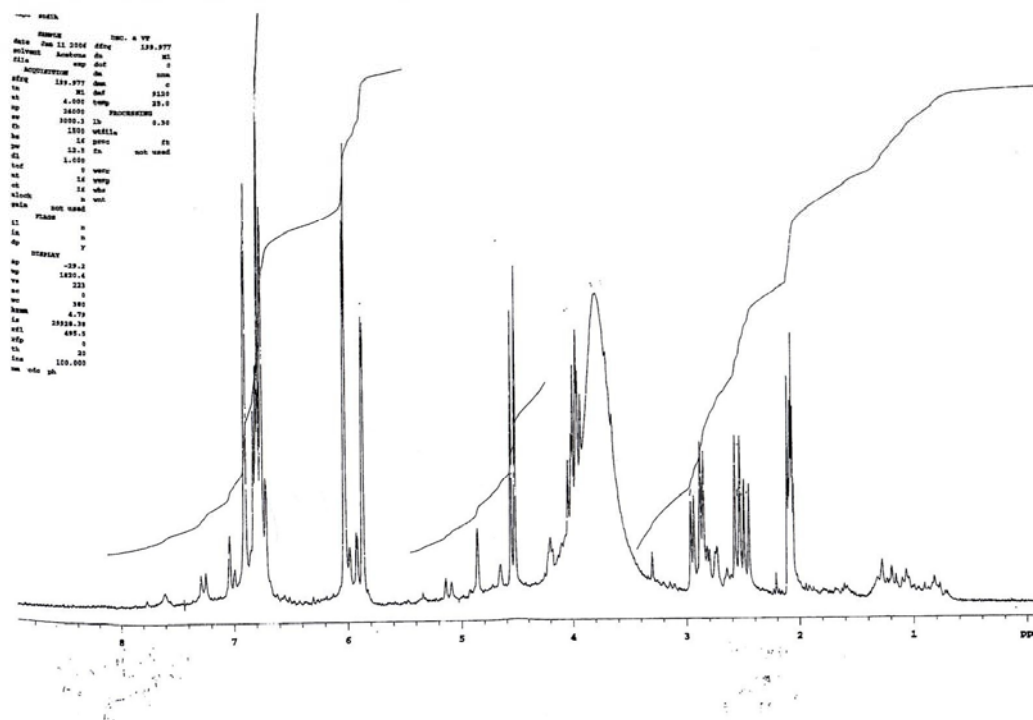
NMR-spektrum 9.3.11: ¹³C-NMR-spektrum av fraksjon E4.



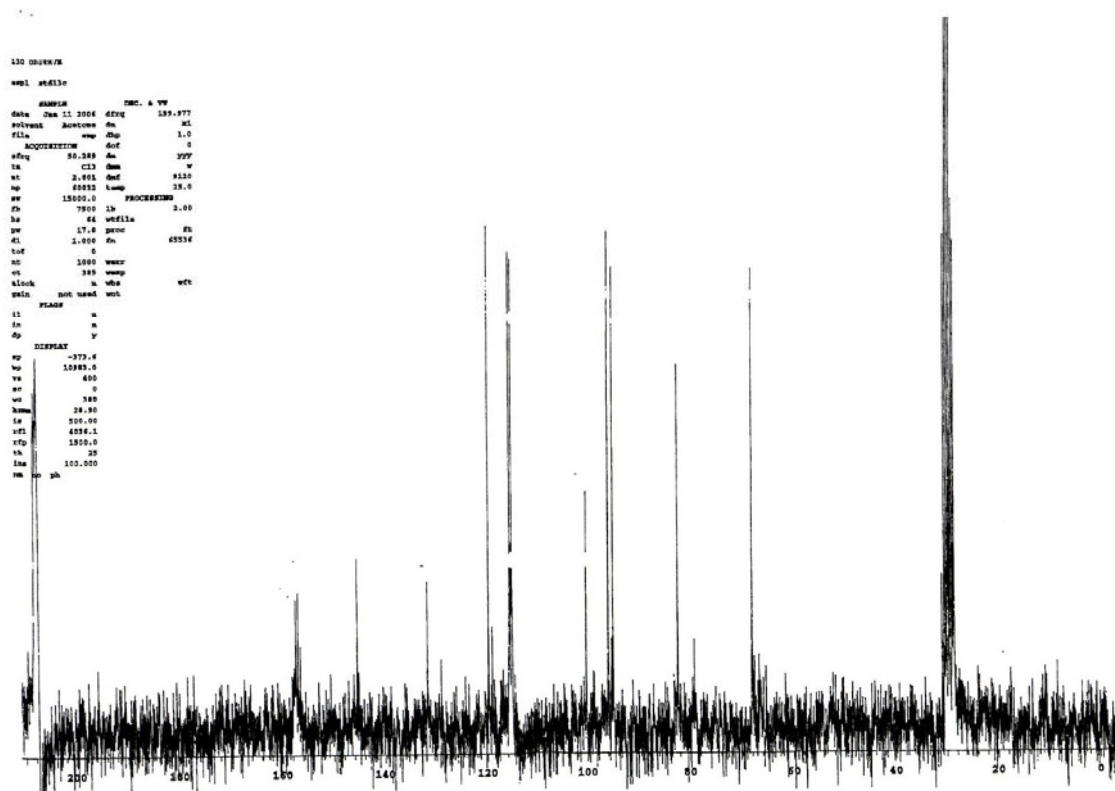
NMR-spektrum 9.3.12: ¹H-NMR-spektrum av fraksjon E6.



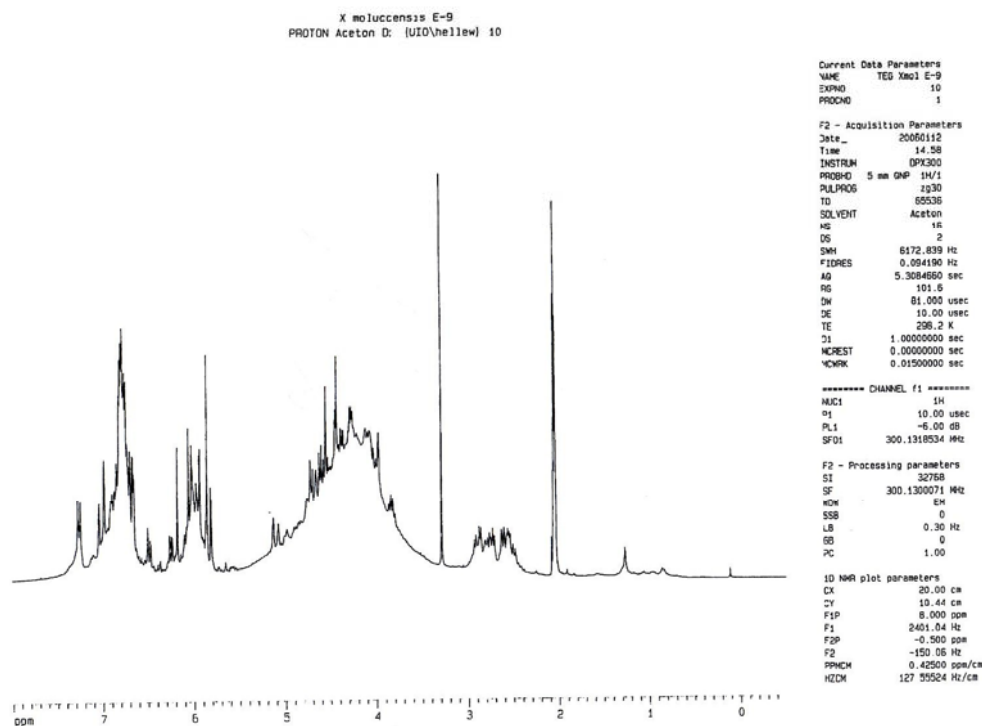
NMR-spektrum 9.3.13: ¹³C-NMR-spektrum av fraksjon E6.



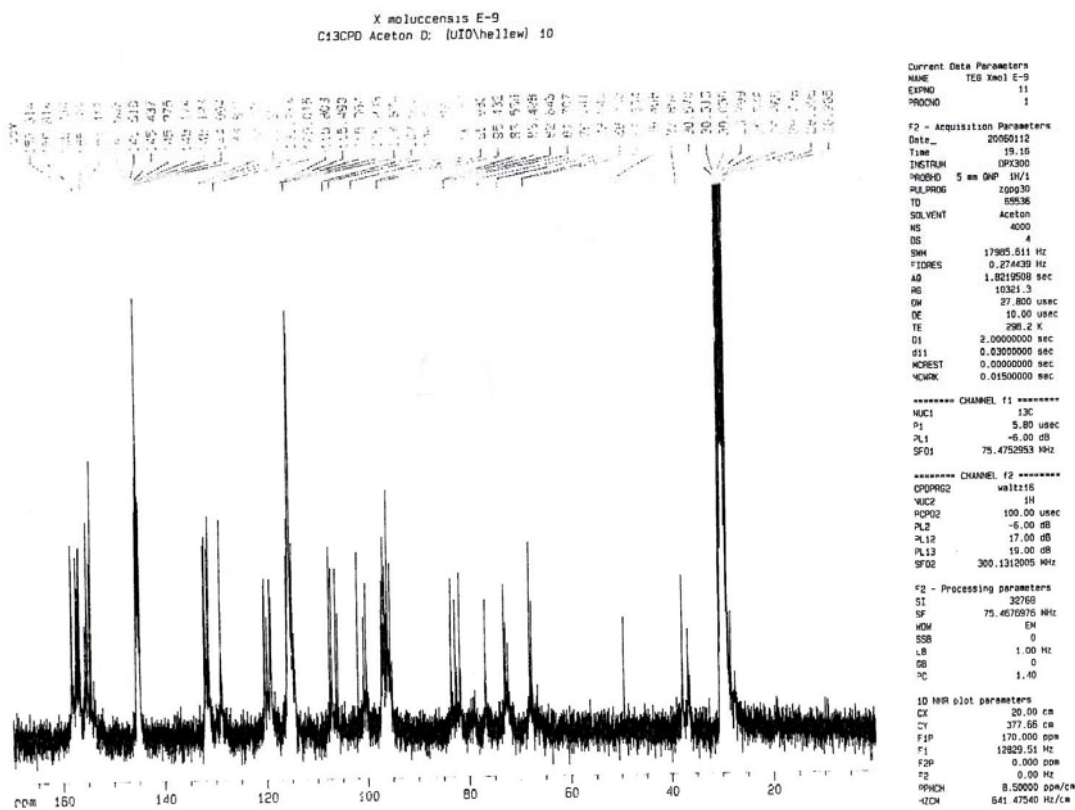
NMR-spektrum 9.3.14: ¹H-NMR-spektrum av fraksjon E7.



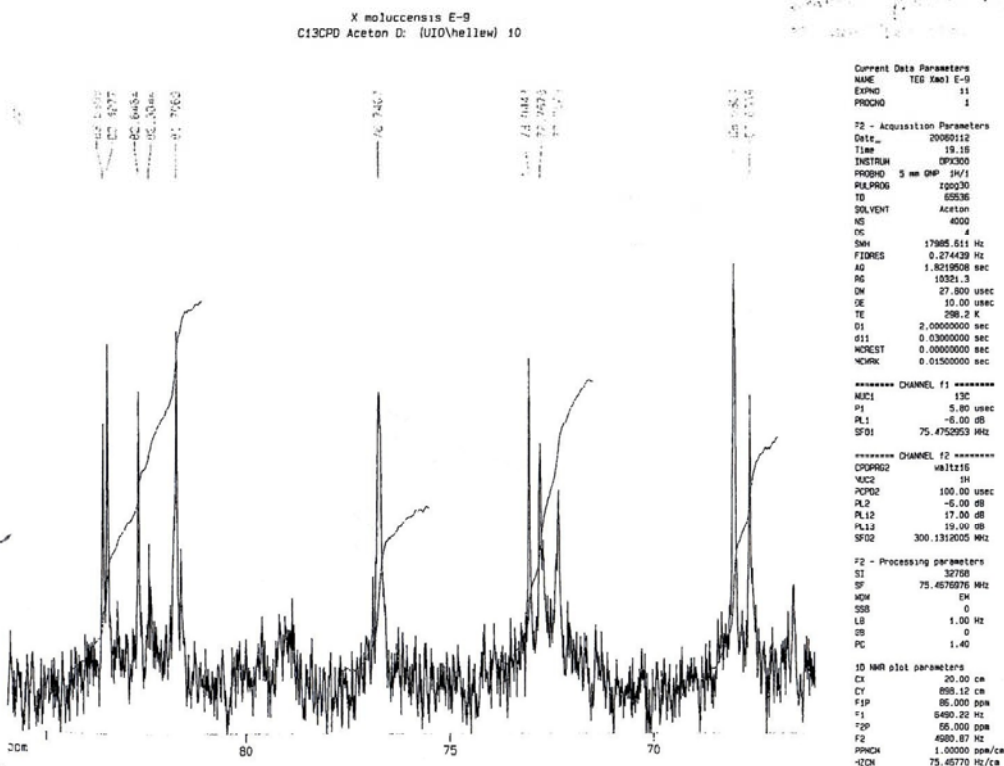
NMR-spektrum 9.3.15: ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon E7.



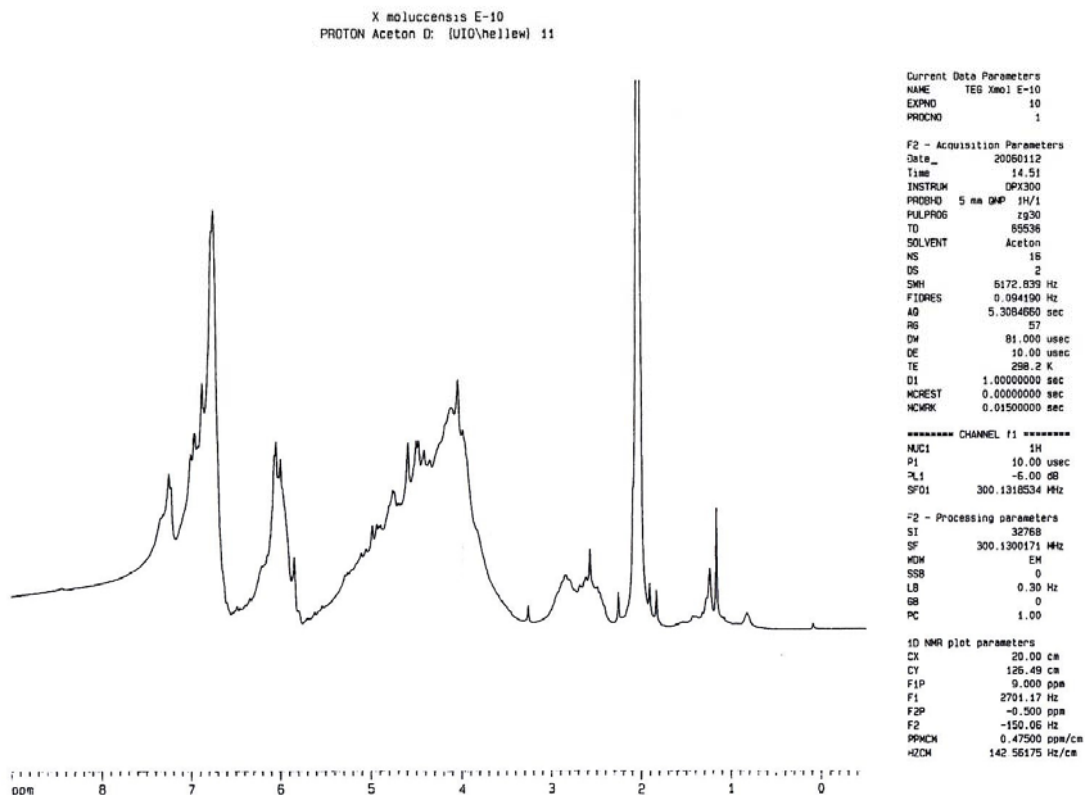
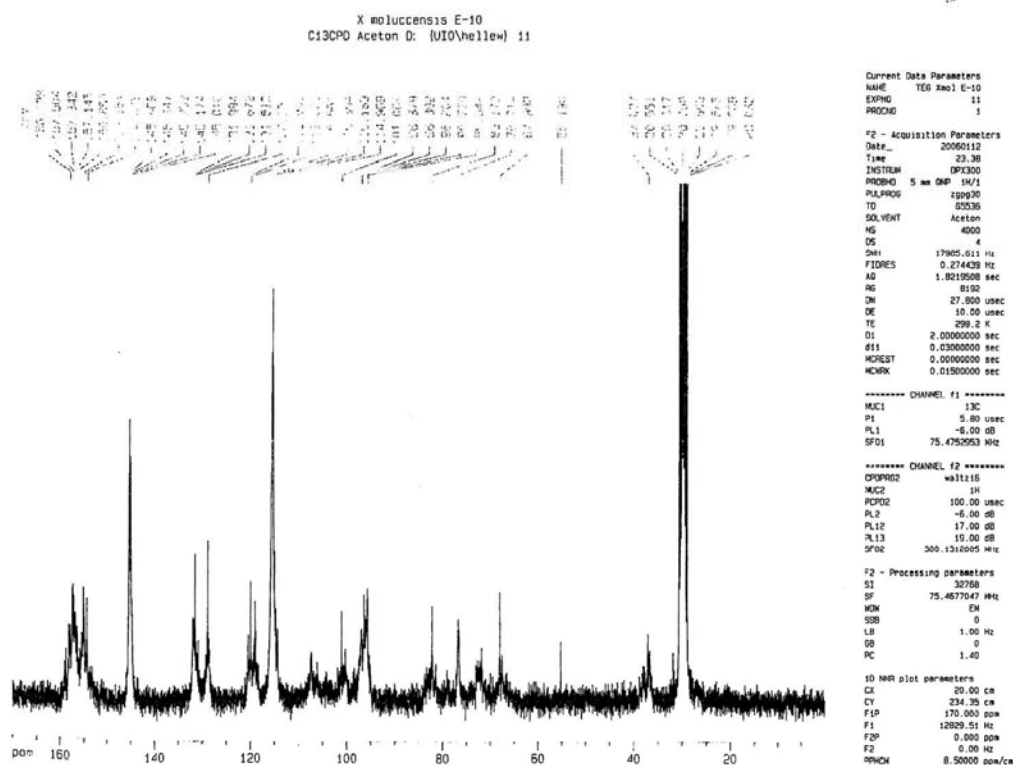
NMR-spektrum 9.3.16: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon E9.

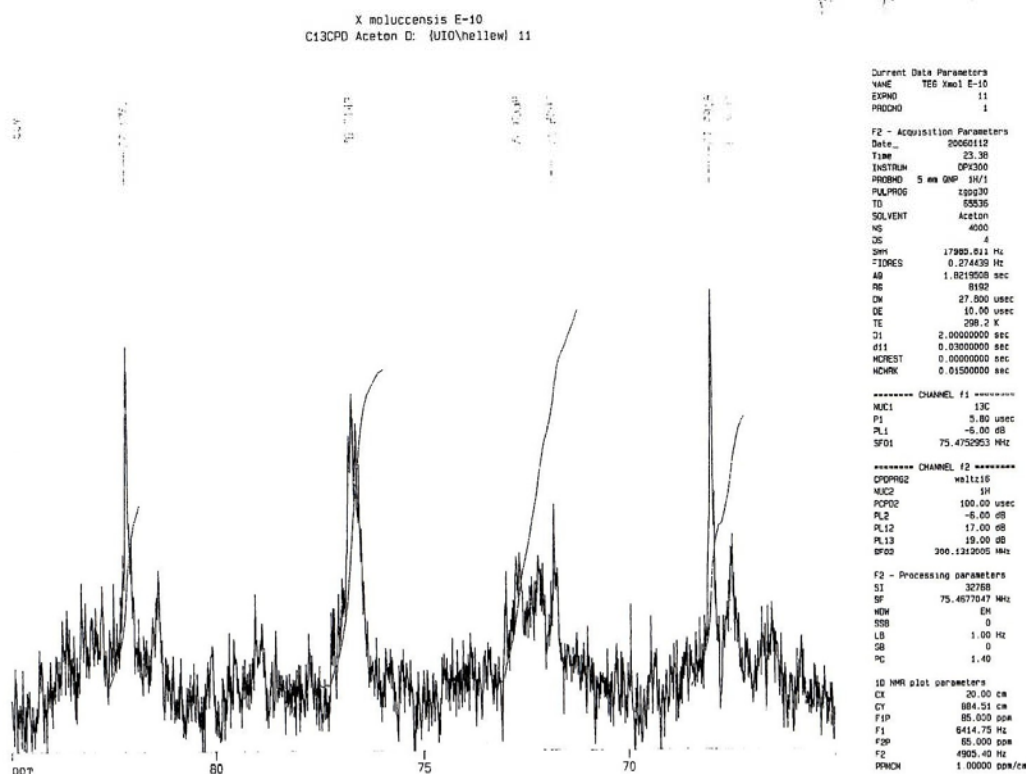


NMR-spektrum 9.3.17: ¹³C-NMR-spektrum av fraksjon E9.

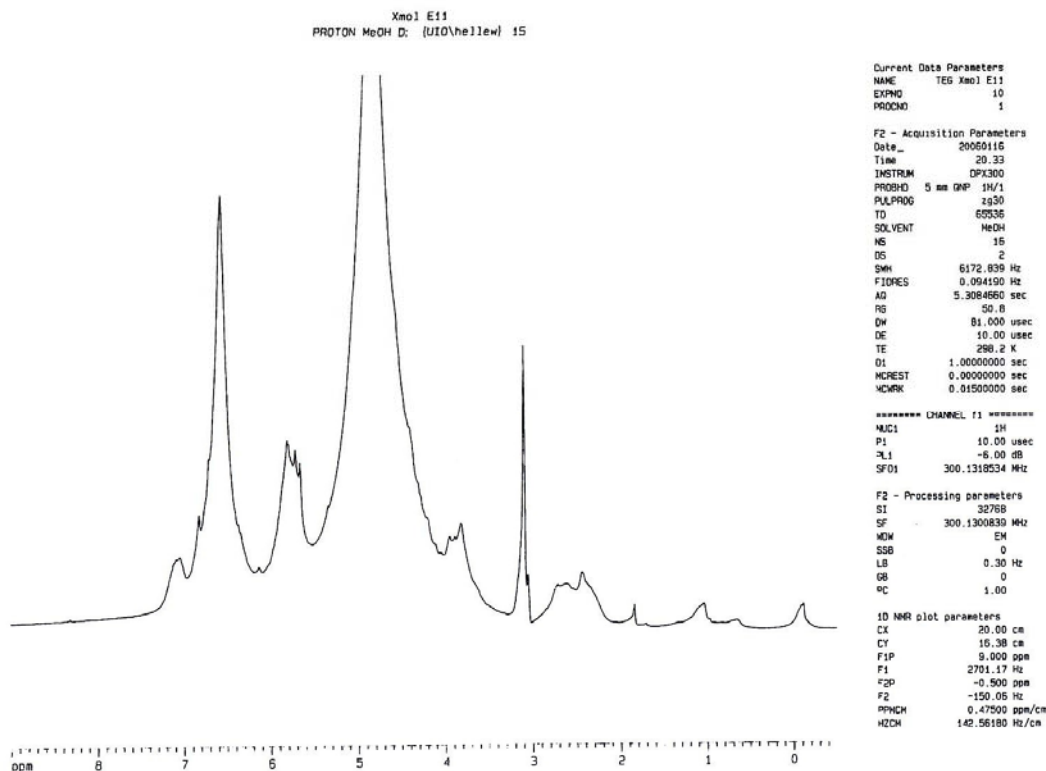


NMR-spektrum 9.3.18: Utsnitt og integral av ¹³C-NMR-spekteret av fraksjon E9.

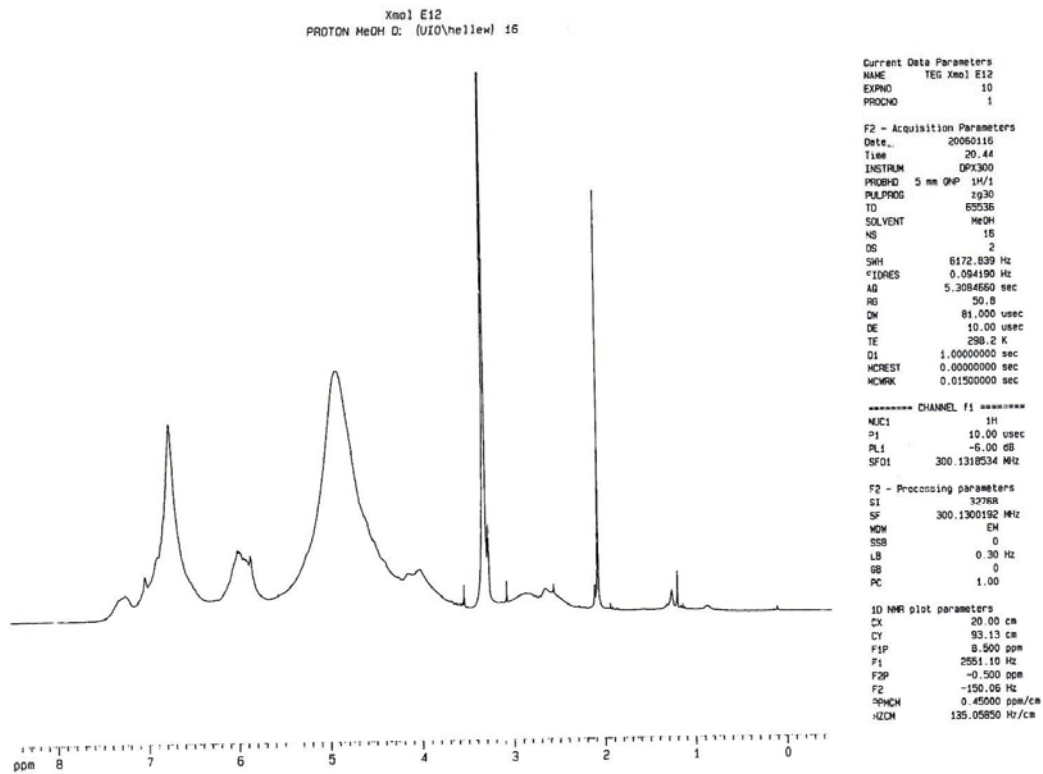
NMR-spektrum 9.3.19: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon E10.NMR-spektrum 9.3.20: ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon E10.



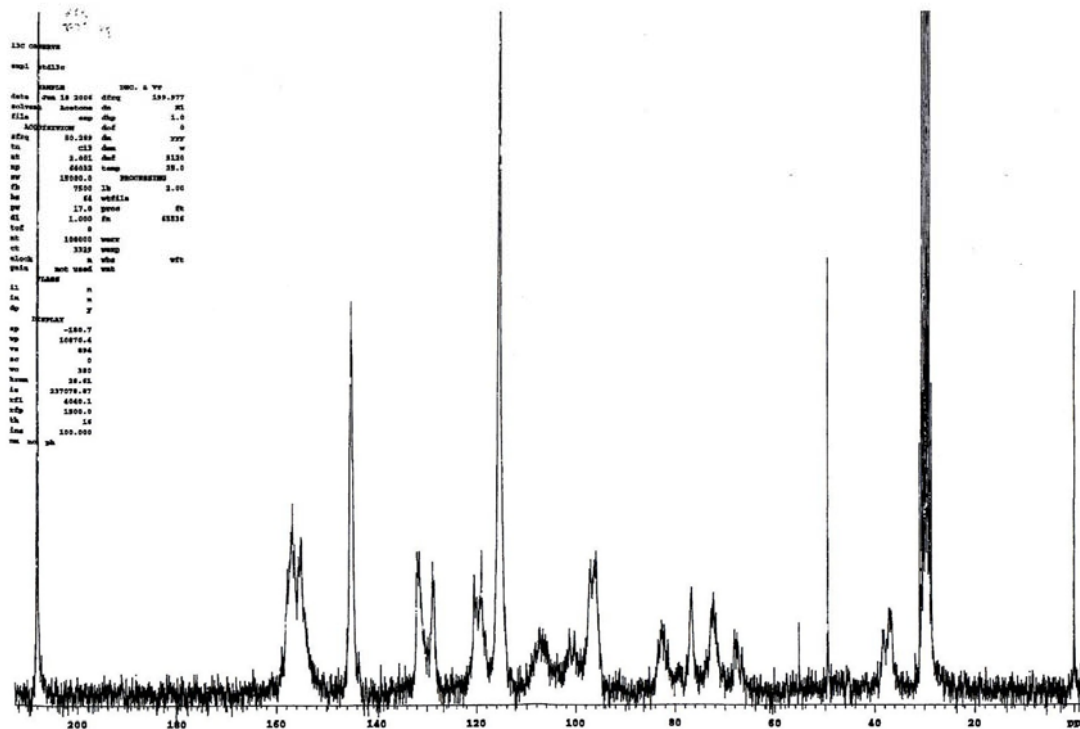
NMR-spektrum 9.3.21: Utsnitt og integral av ^{13}C -NMR-spekteret av fraksjon E10.



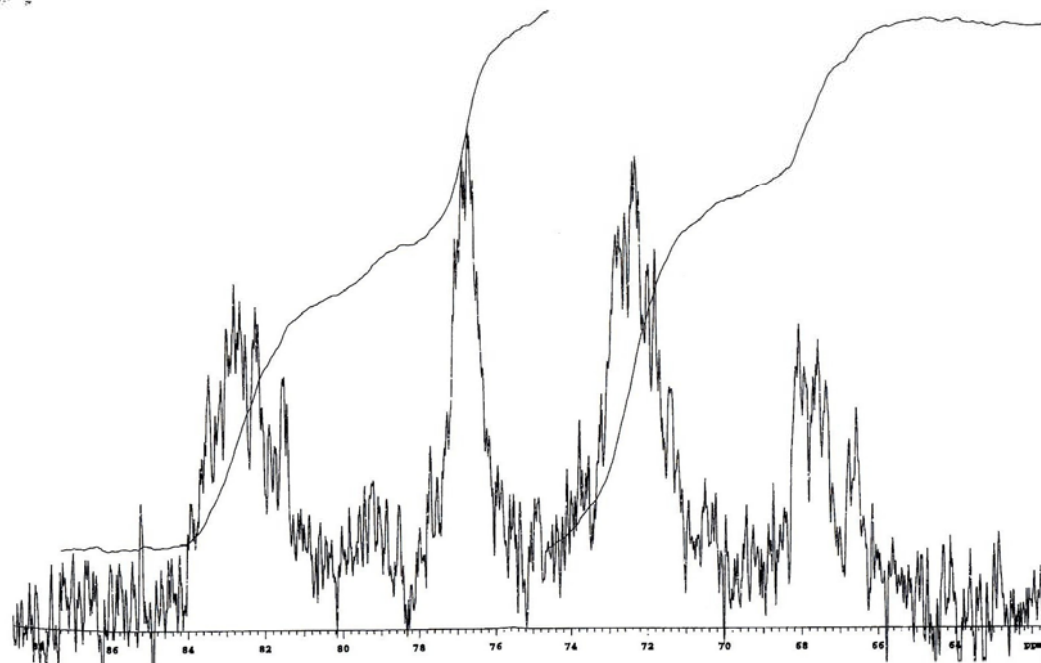
NMR-spektrum 9.3.22: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon E11.



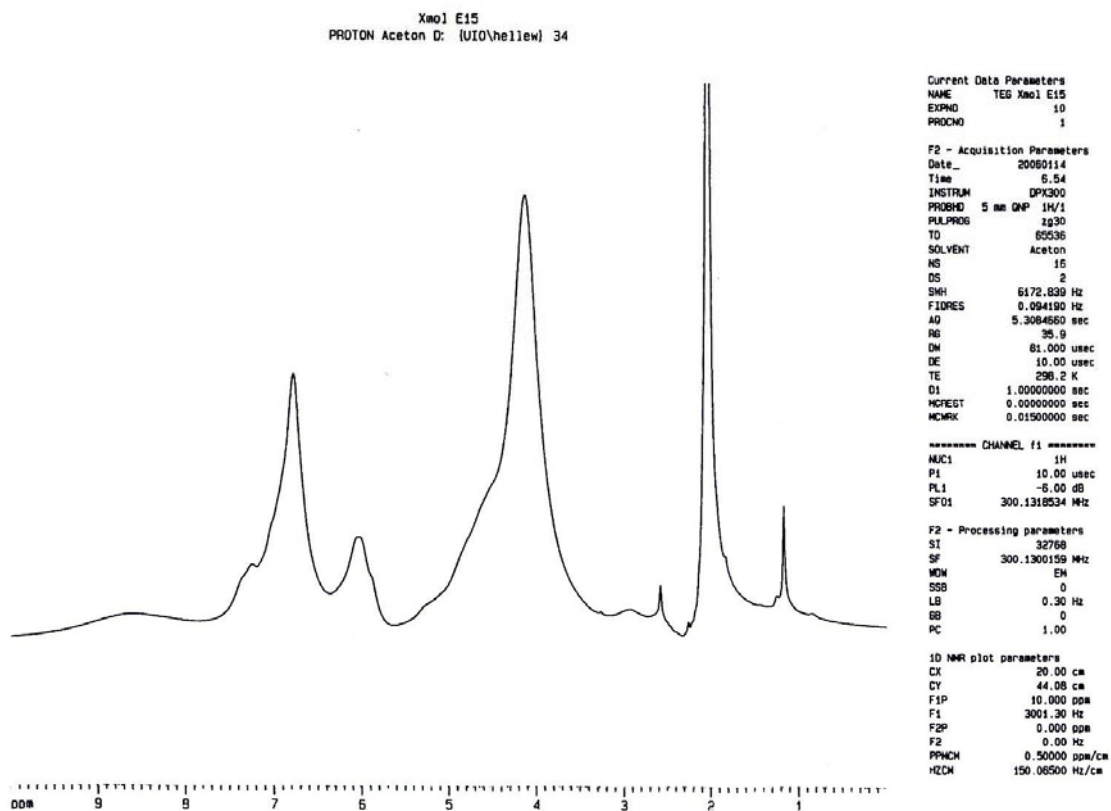
NMR-spektrum 9.3.25: ¹H-NMR-spektrum av fraksjon E12.



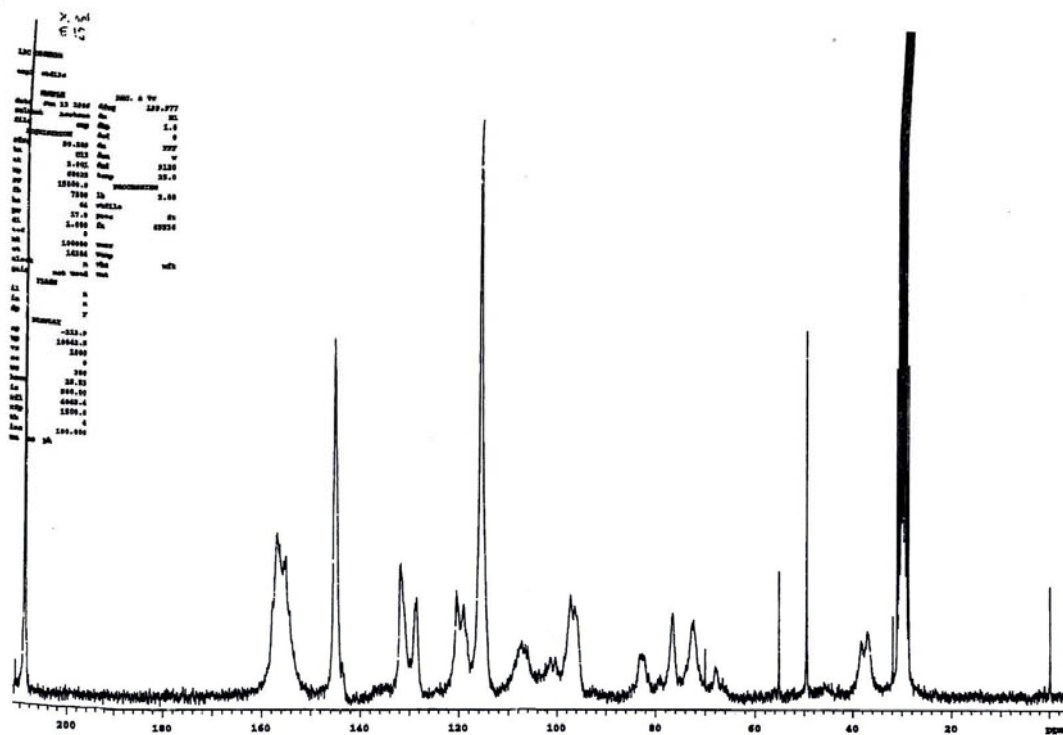
NMR-spektrum 9.3.26: ¹³C-NMR-spektrum av fraksjon E12.



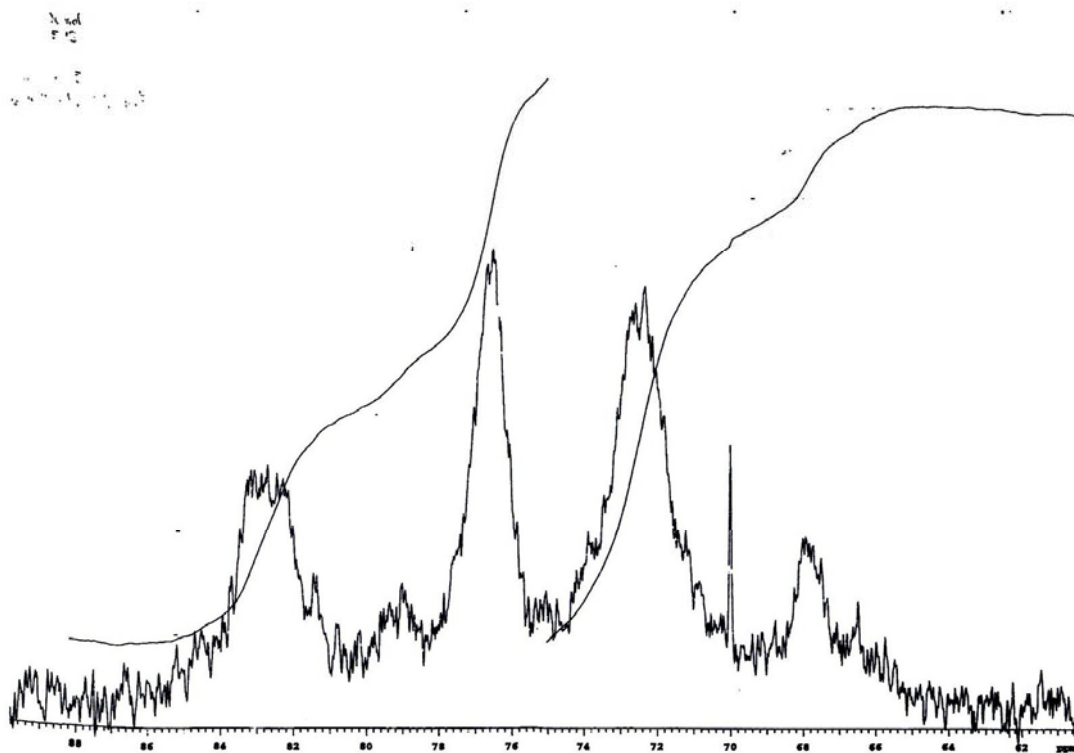
NMR-spektrum 9.3.27: Utsnitt og integral av ^{13}C -NMR-spekteret av fraksjon E12.



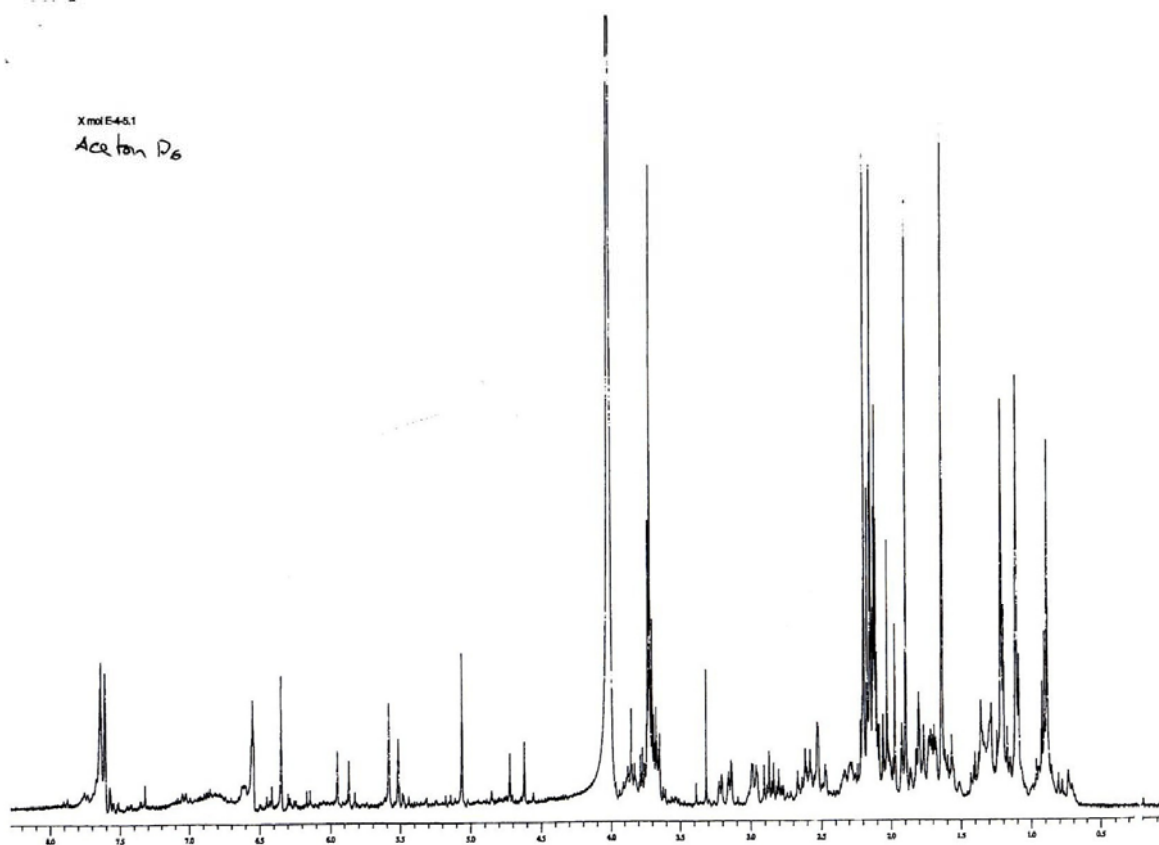
NMR-spektrum 9.3.28: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon E15.



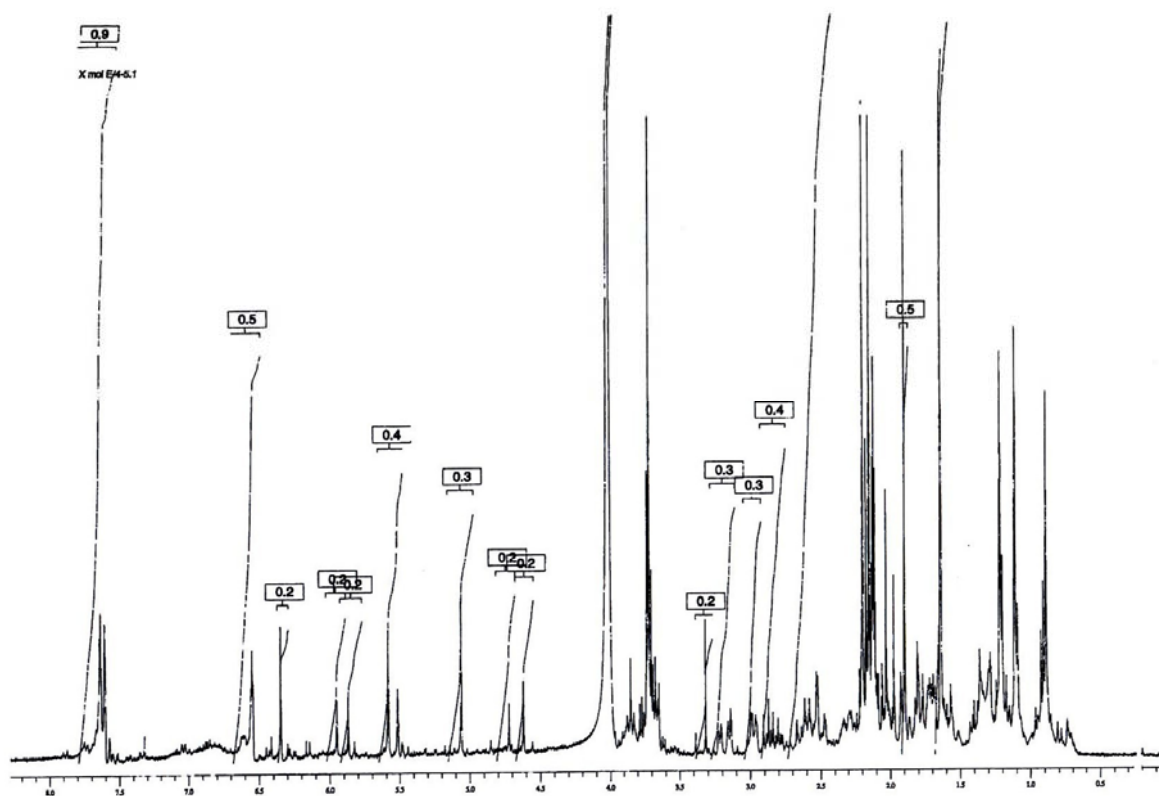
NMR-spektrum 9.3.29: ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon E15.



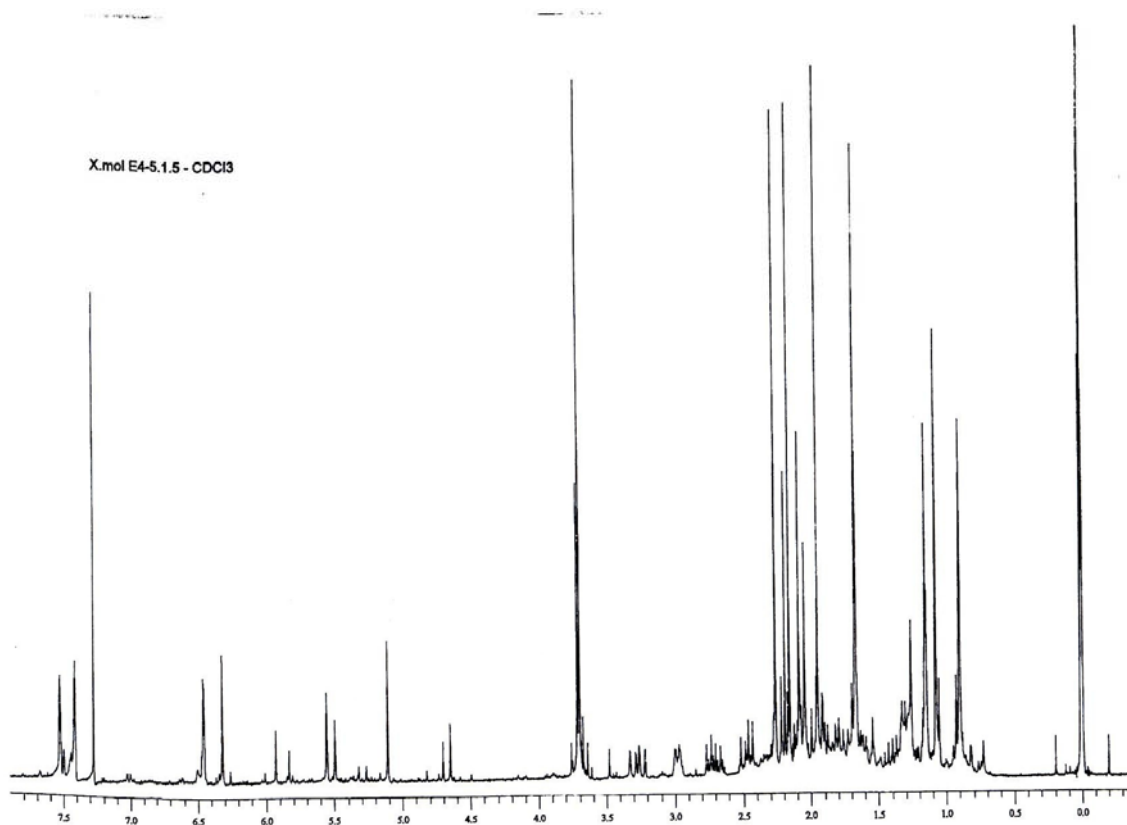
NMR-spektrum 9.3.30: Utsnitt og integral av ^{13}C -NMR-spekteret av fraksjon E15.



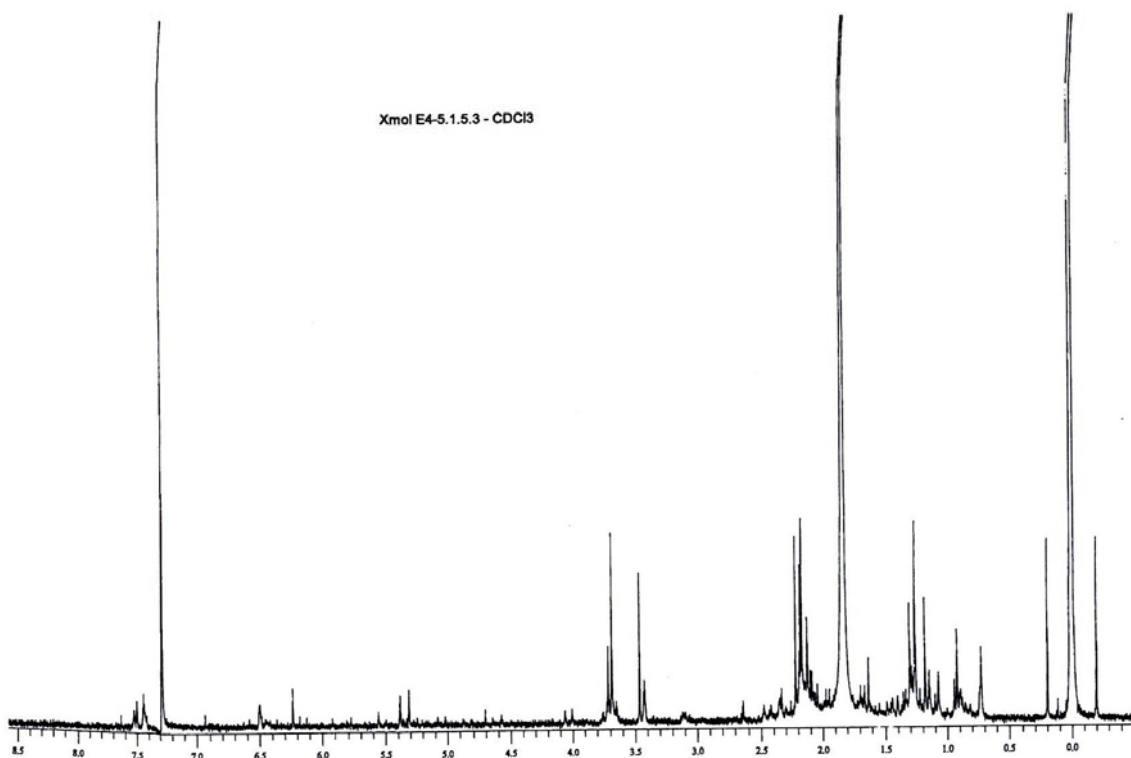
NMR-spektrum 9.3.31: ¹H-NMR-spektrum av fraksjon E4-5.1.



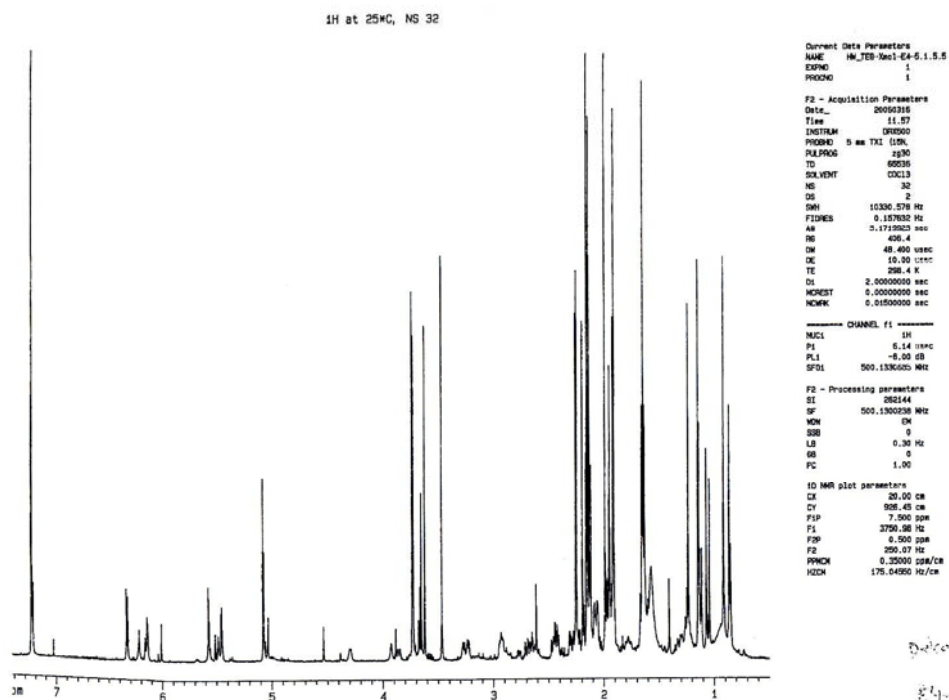
NMR-spektrum 9.3.32: Utsnitt og integral av ¹H-NMR-spekteret av fraksjon E4-5.1.



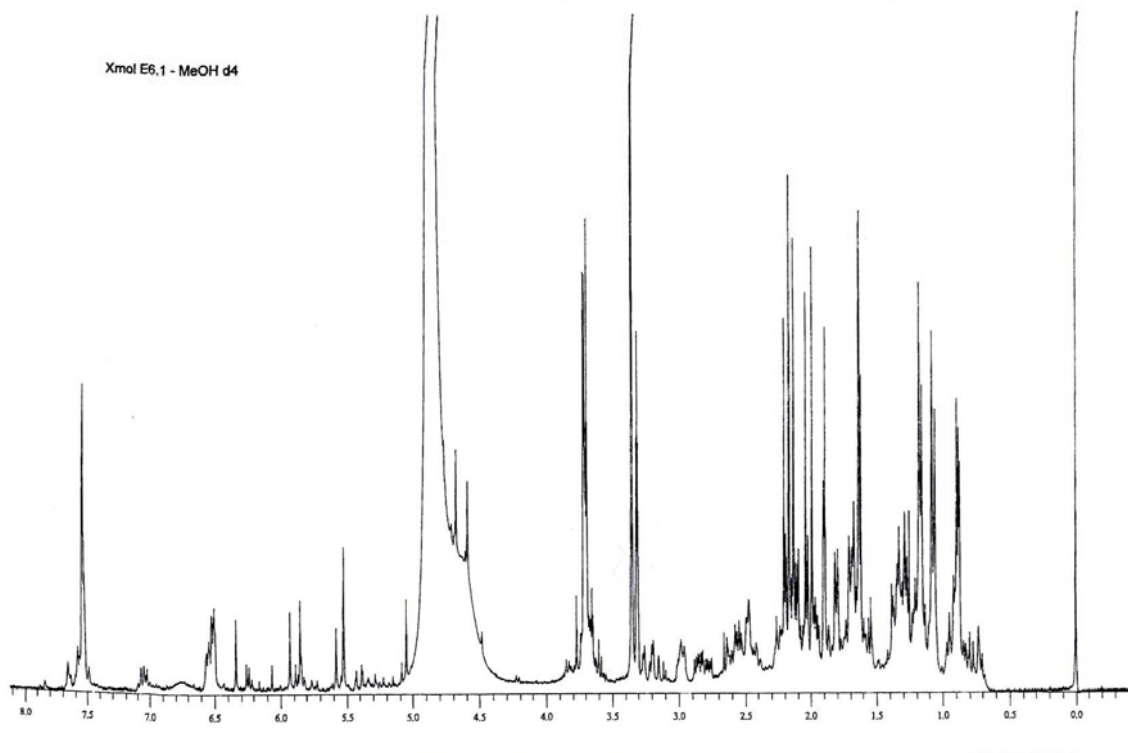
NMR-spektrum 9.3.33: ¹H-NMR-spektrum av fraksjon E4-5.1.5.



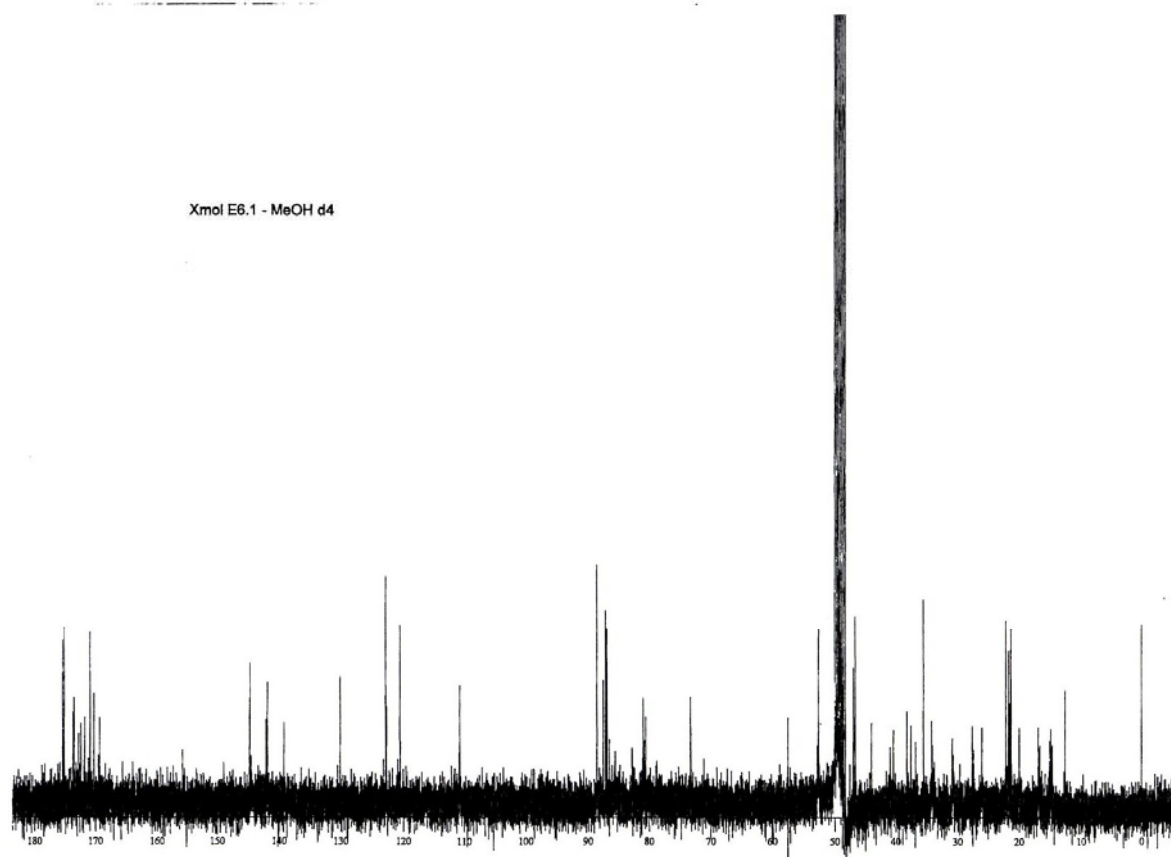
NMR-spektrum 9.3.34: ¹H-NMR-spektrum av fraksjon E4-5.1.5.3.



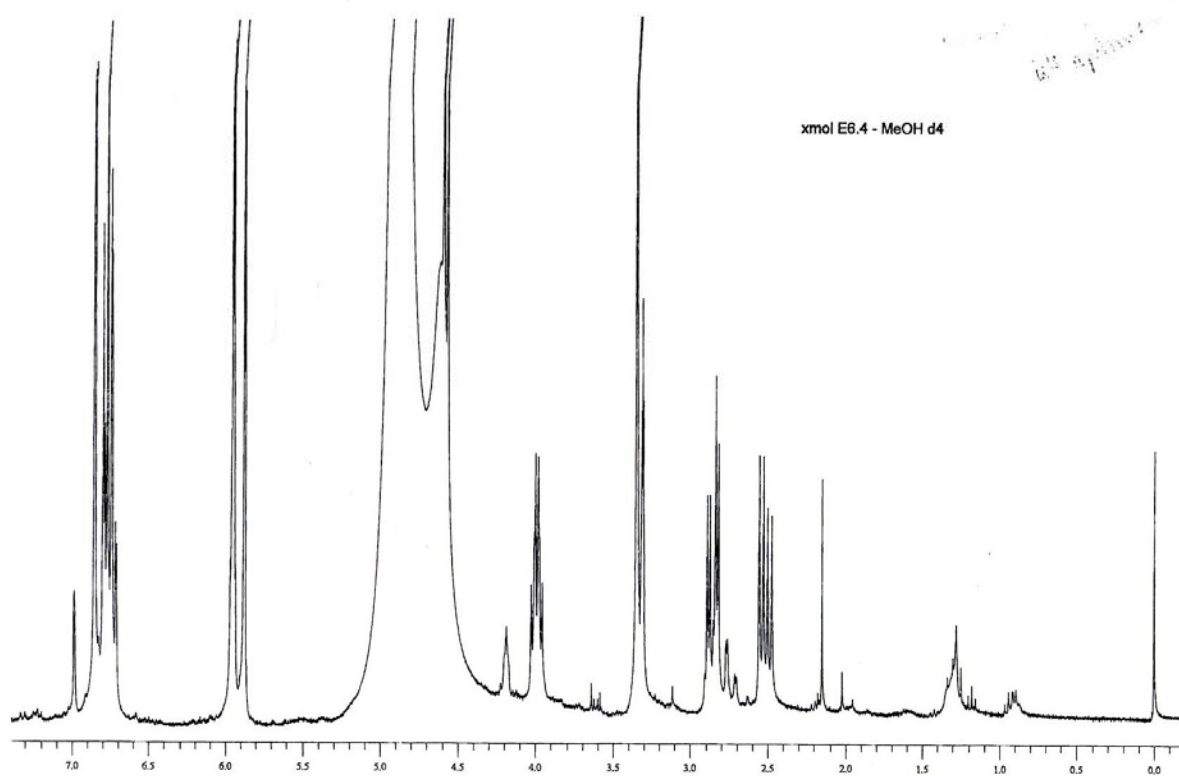
NMR-spektrum 9.3.37: ^1H -NMR-spektrum av dekomponert fraksjon E4-5.1.5.5.



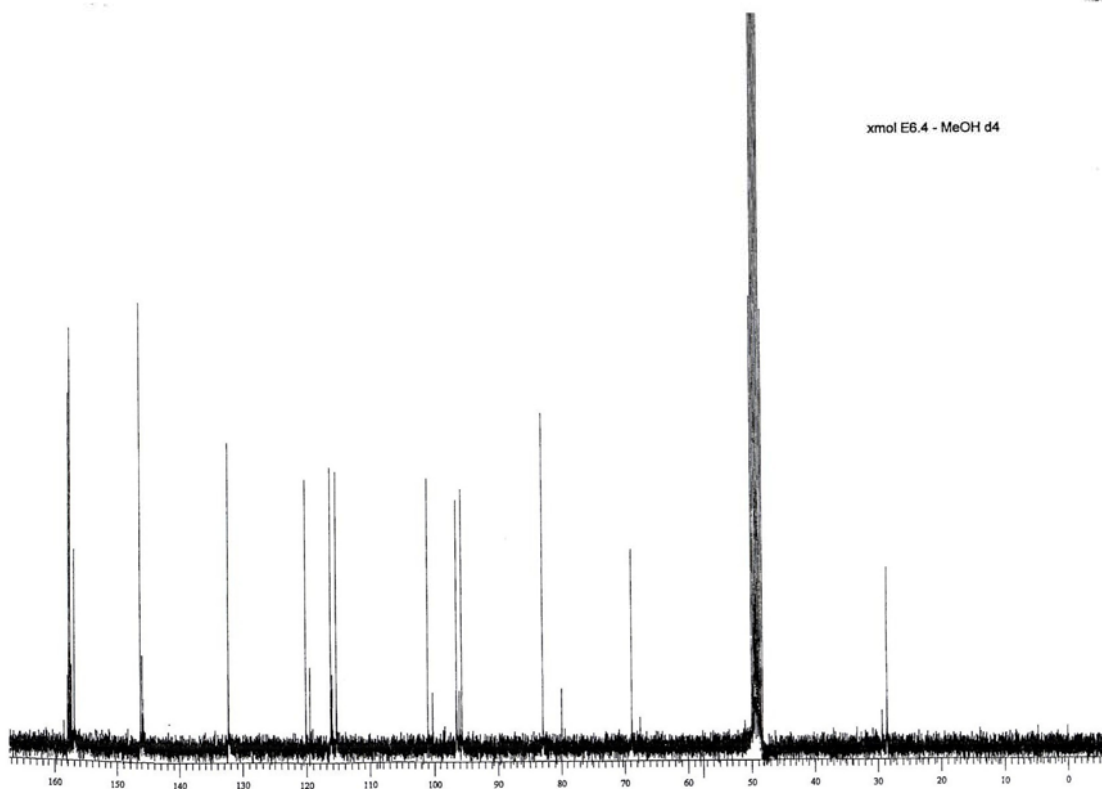
NMR-spektrum 9.3.38: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon E6.1.



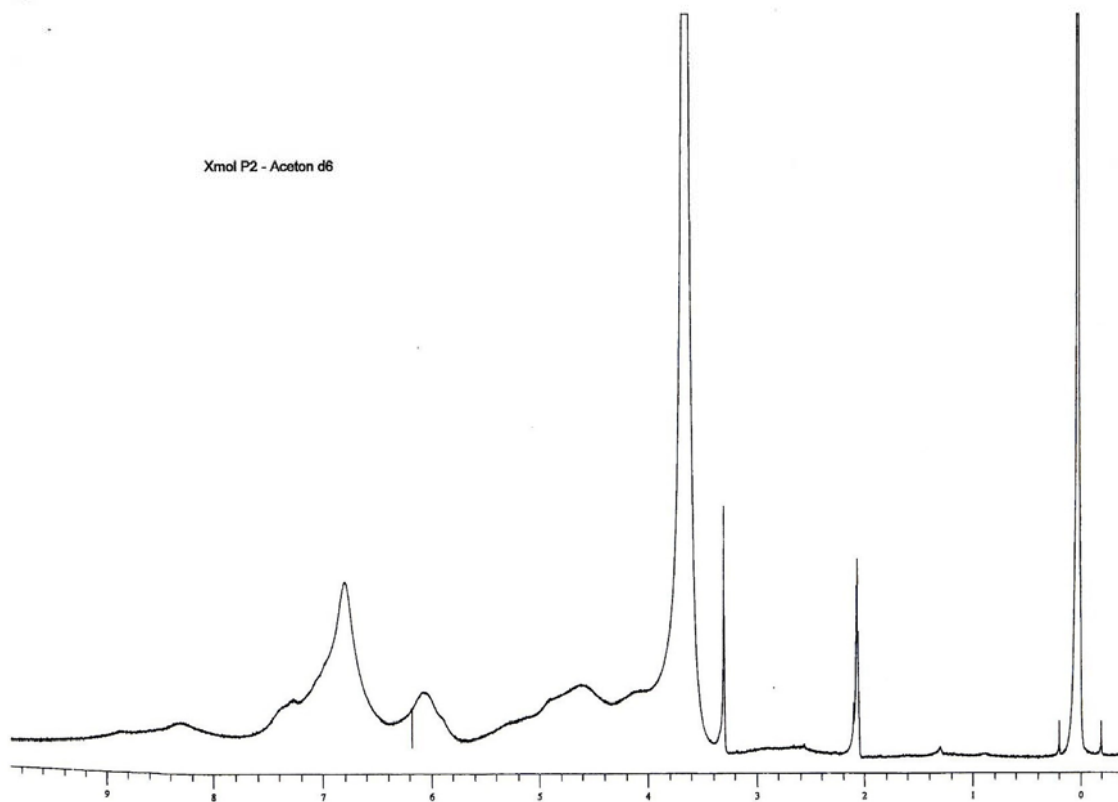
NMR-spektrum 9.3.39: ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon E6.1.



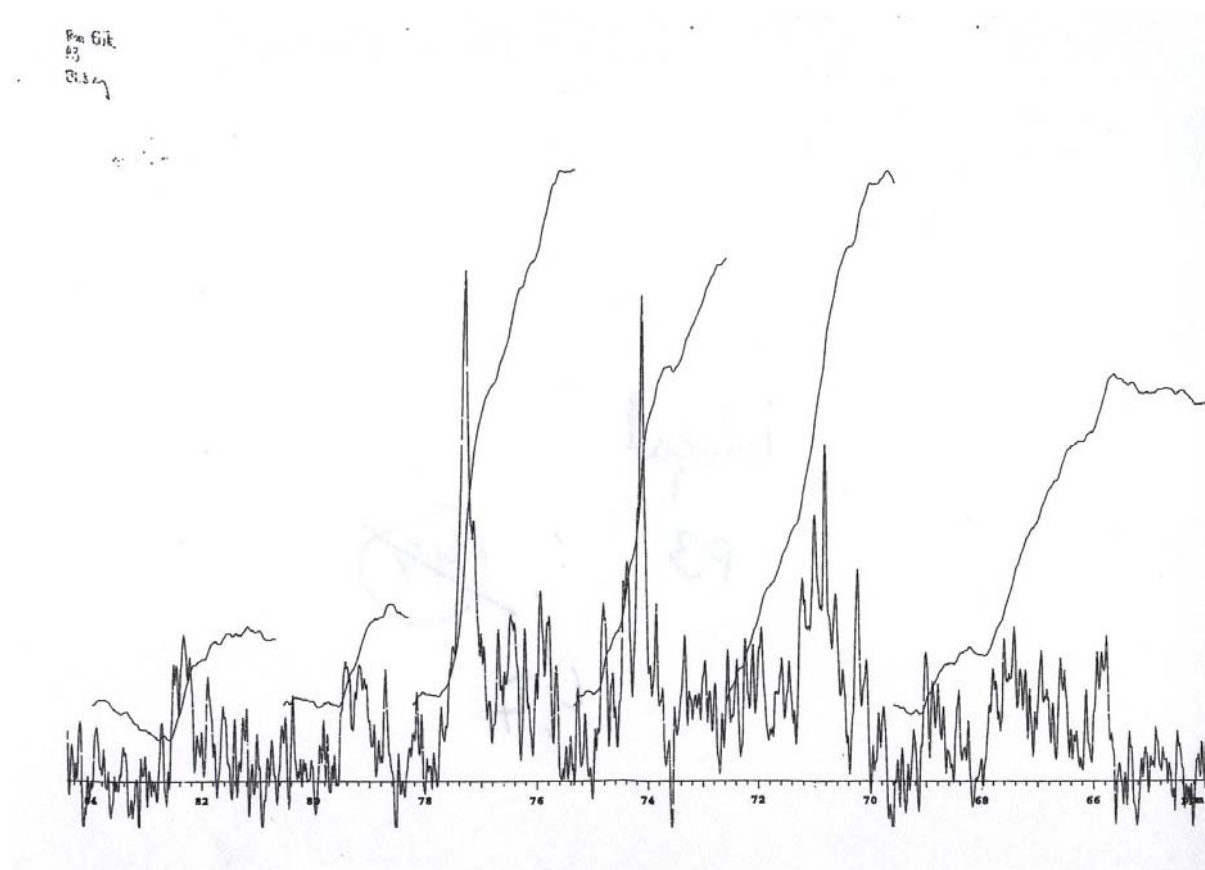
NMR-spektrum 9.3.40: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon E6.4.



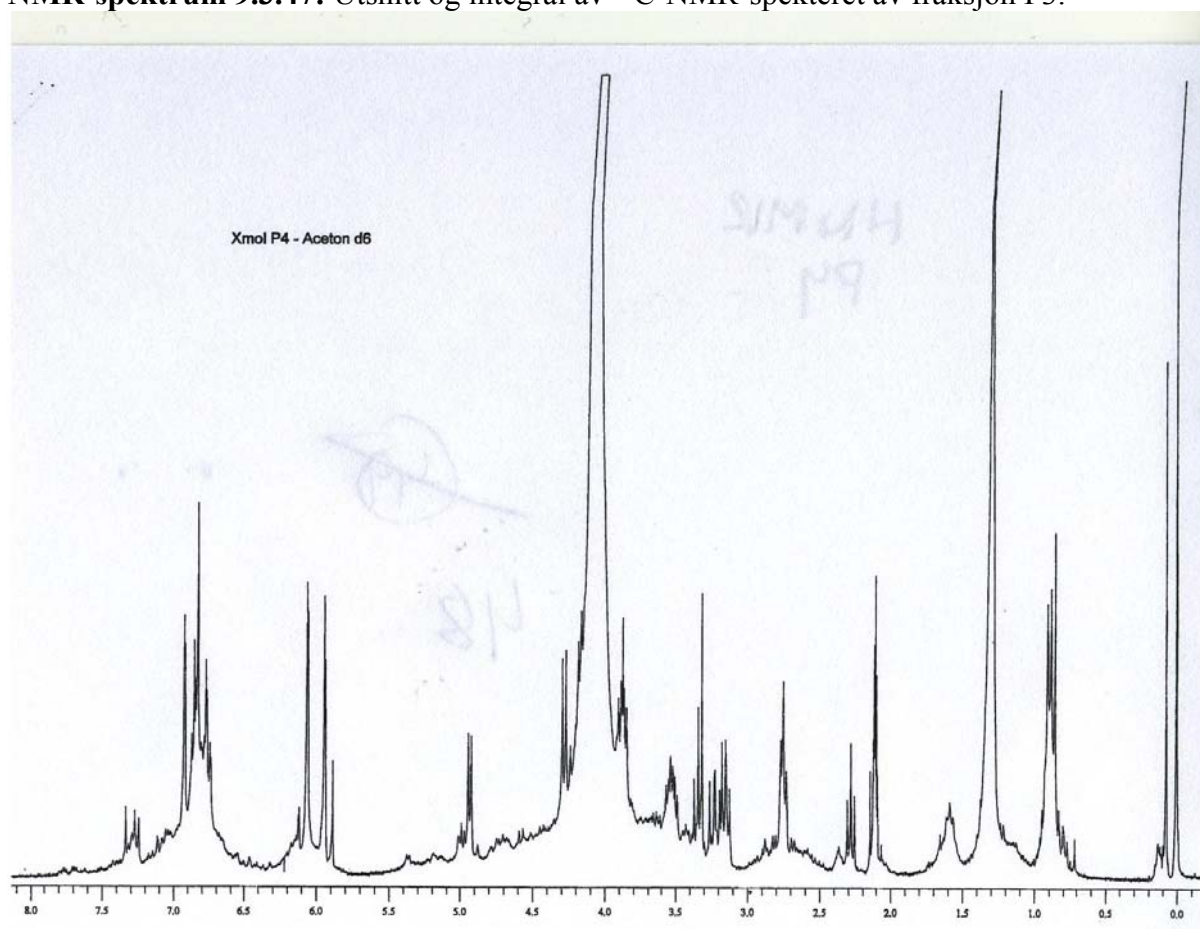
NMR-spektrum 9.3.41: ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon E6.4.



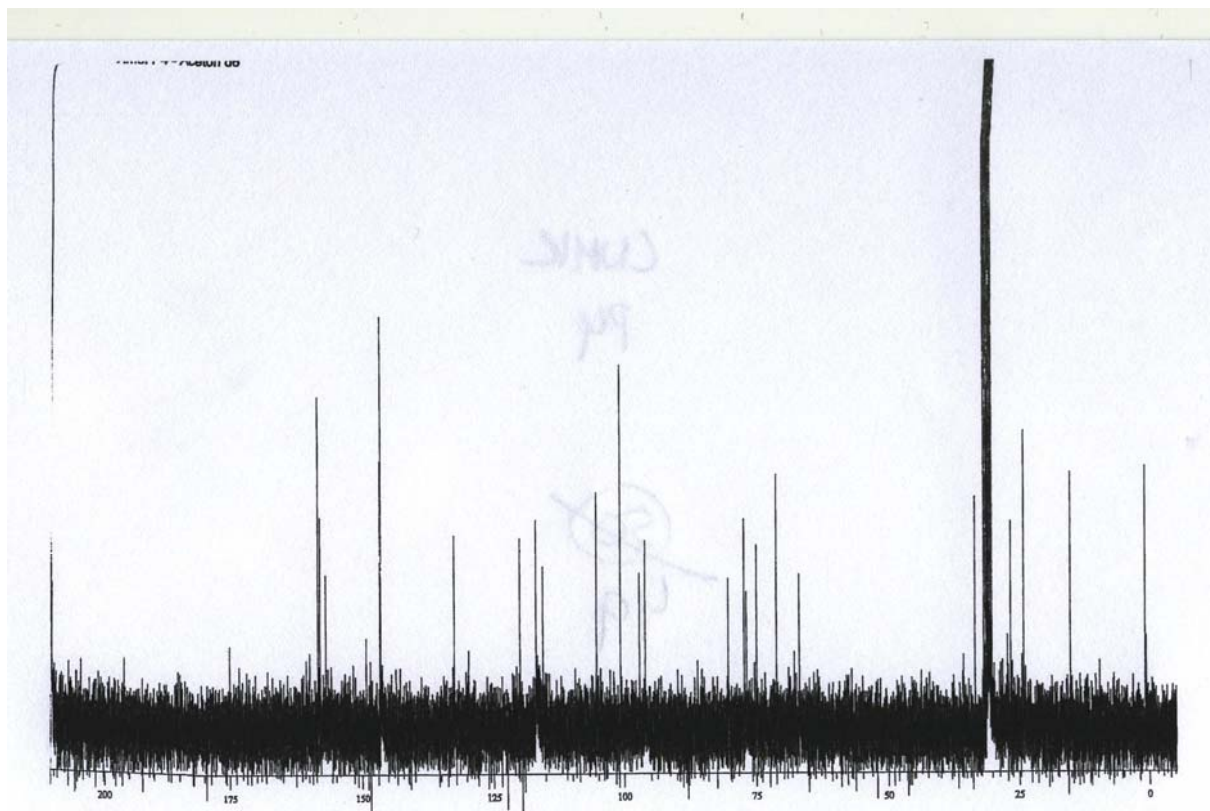
NMR-spektrum 9.3.42: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon P2.



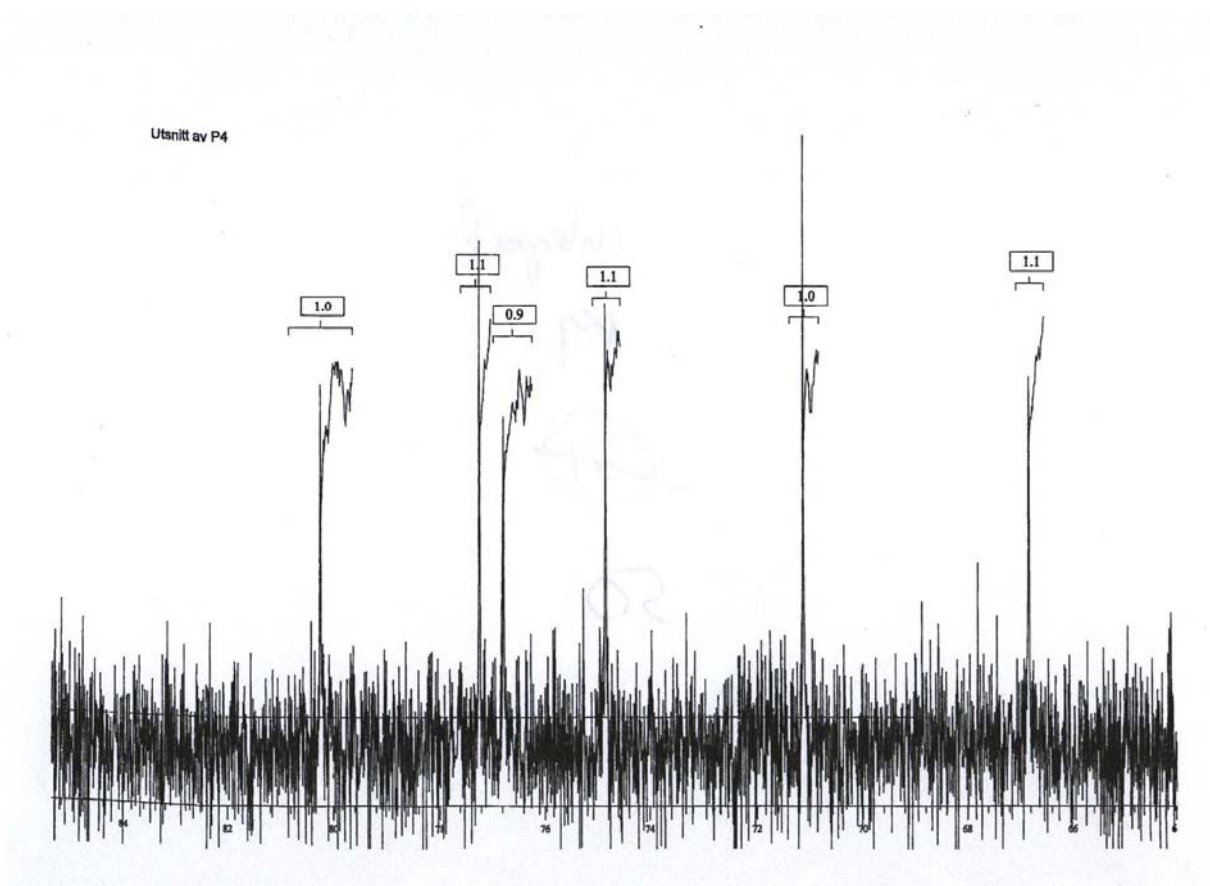
NMR-spektrum 9.3.47: Utsnitt og integral av ^{13}C -NMR-spekteret av fraksjon P3.



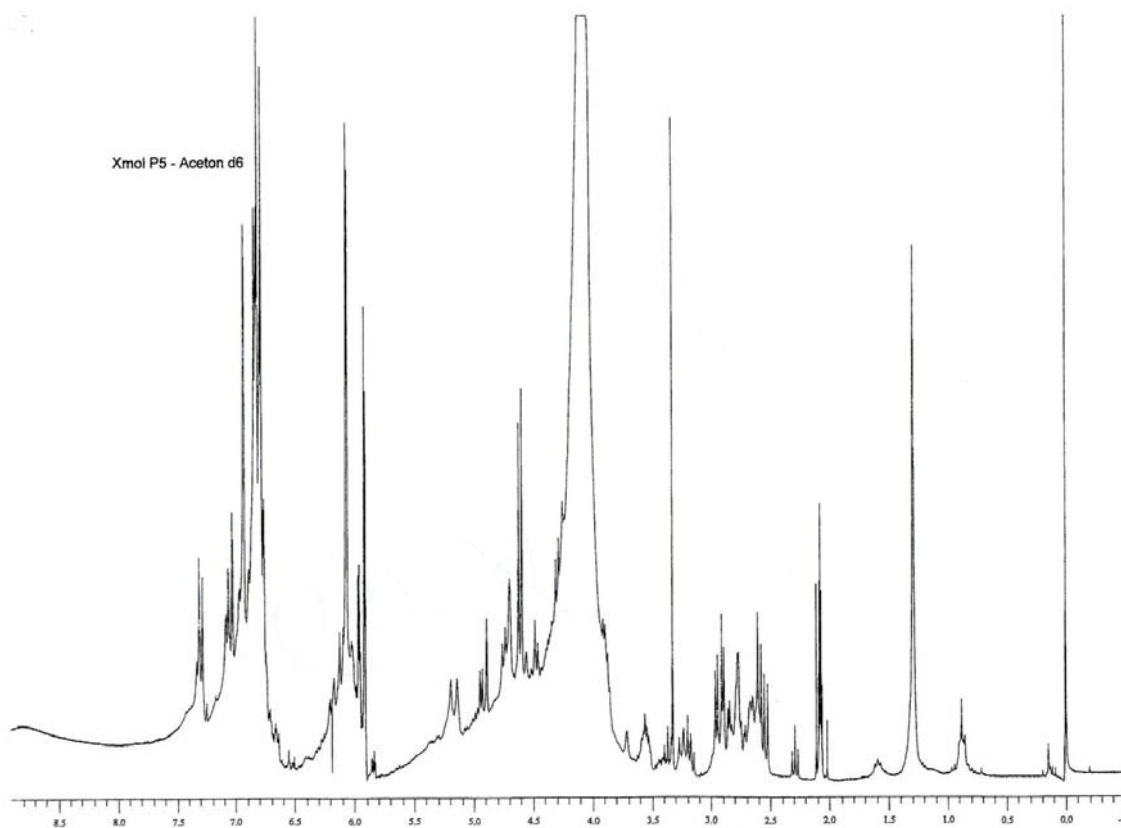
NMR-spektrum 9.3.48: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon P4.



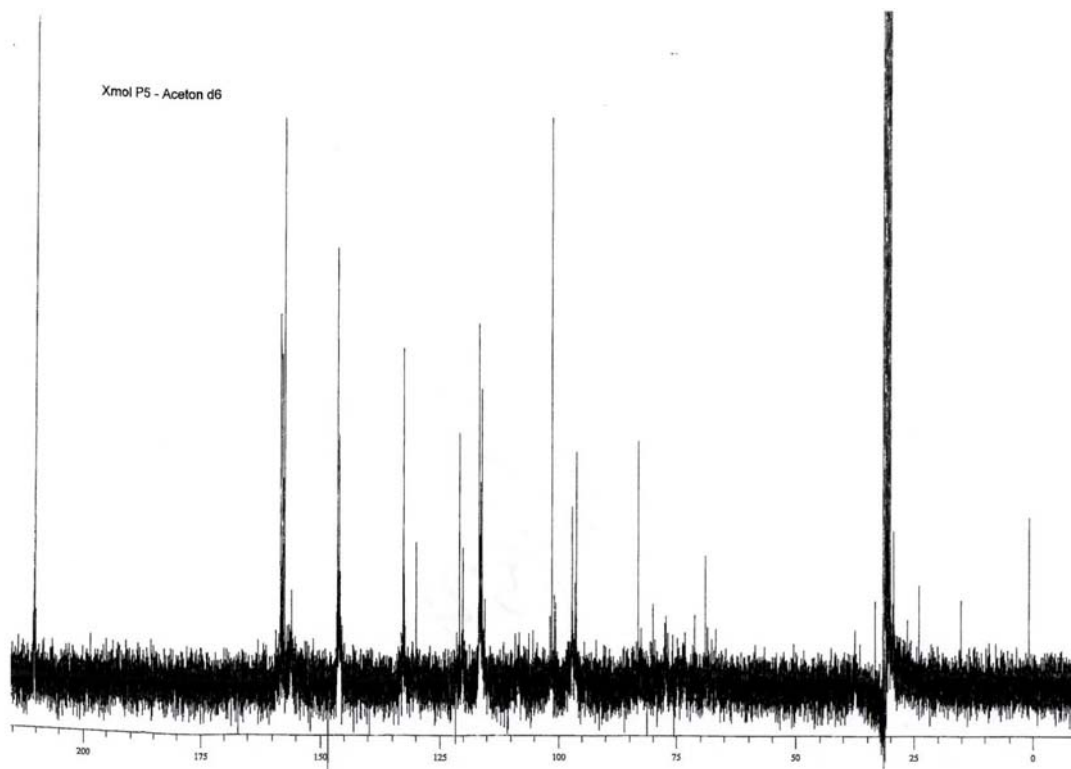
NMR-spektrum 9.3.49: ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon P4.



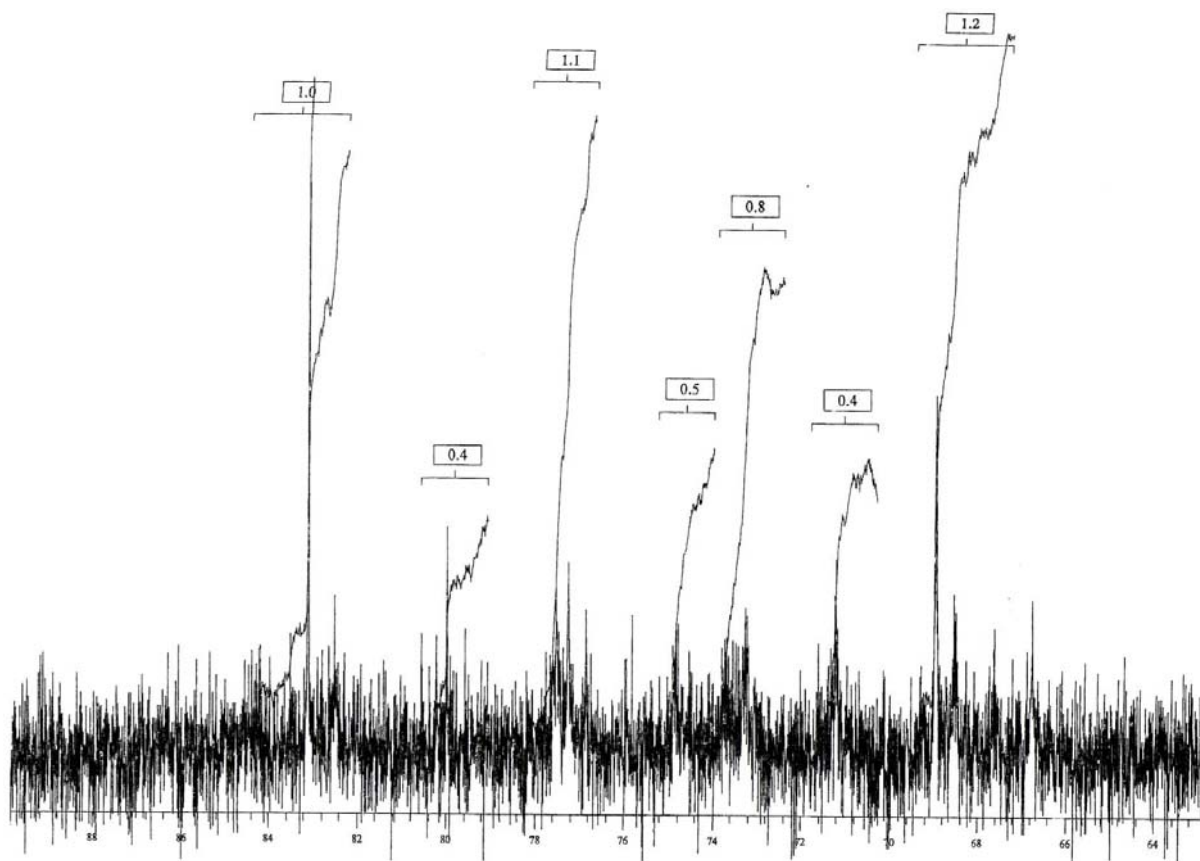
NMR-spektrum 9.3.50: Utsnitt og integral av ^{13}C -NMR-spekteret av fraksjon P4.



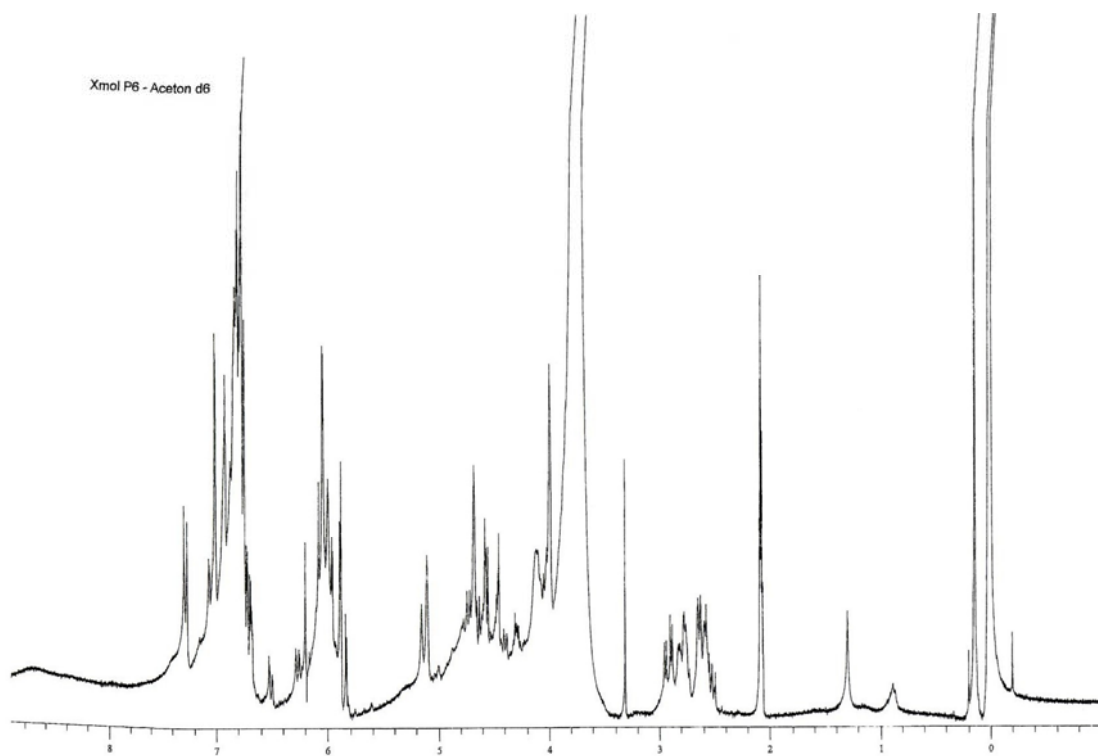
NMR-spektrum 9.3.51: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon P5.



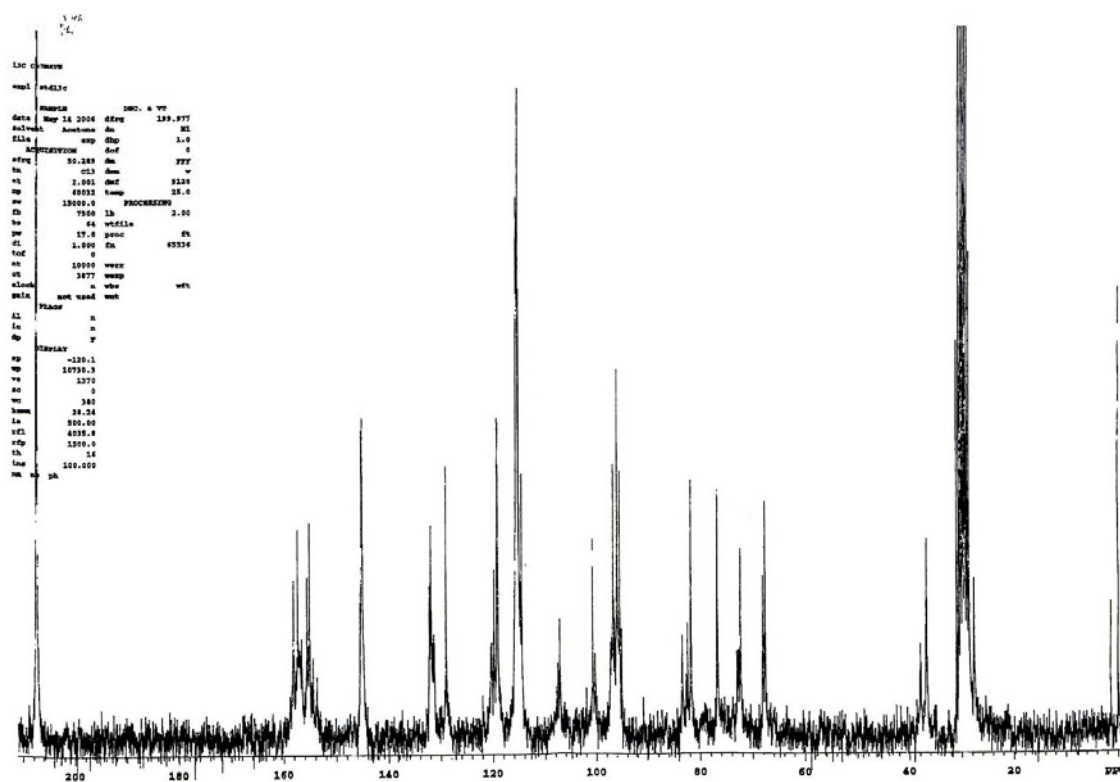
NMR-spektrum 9.3.52: ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon P5.



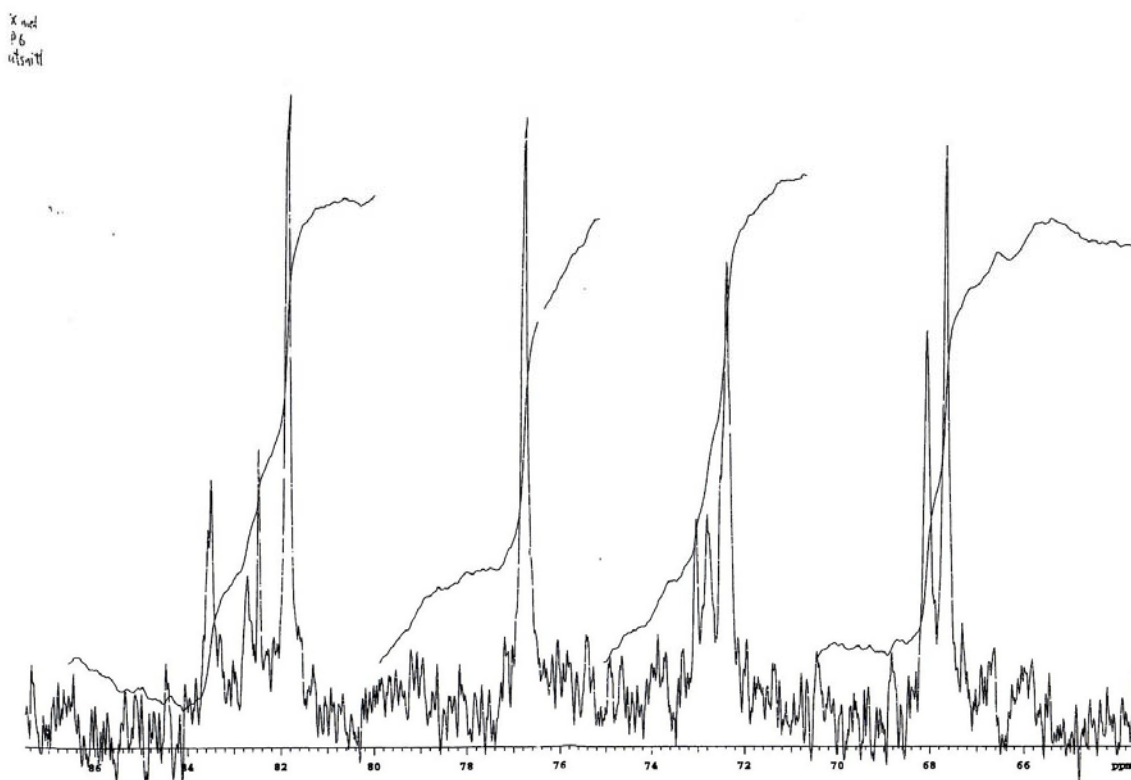
NMR-spektrum 9.3.53: Utsnitt og integral av ^{13}C -NMR-spekteret av fraksjon P5.



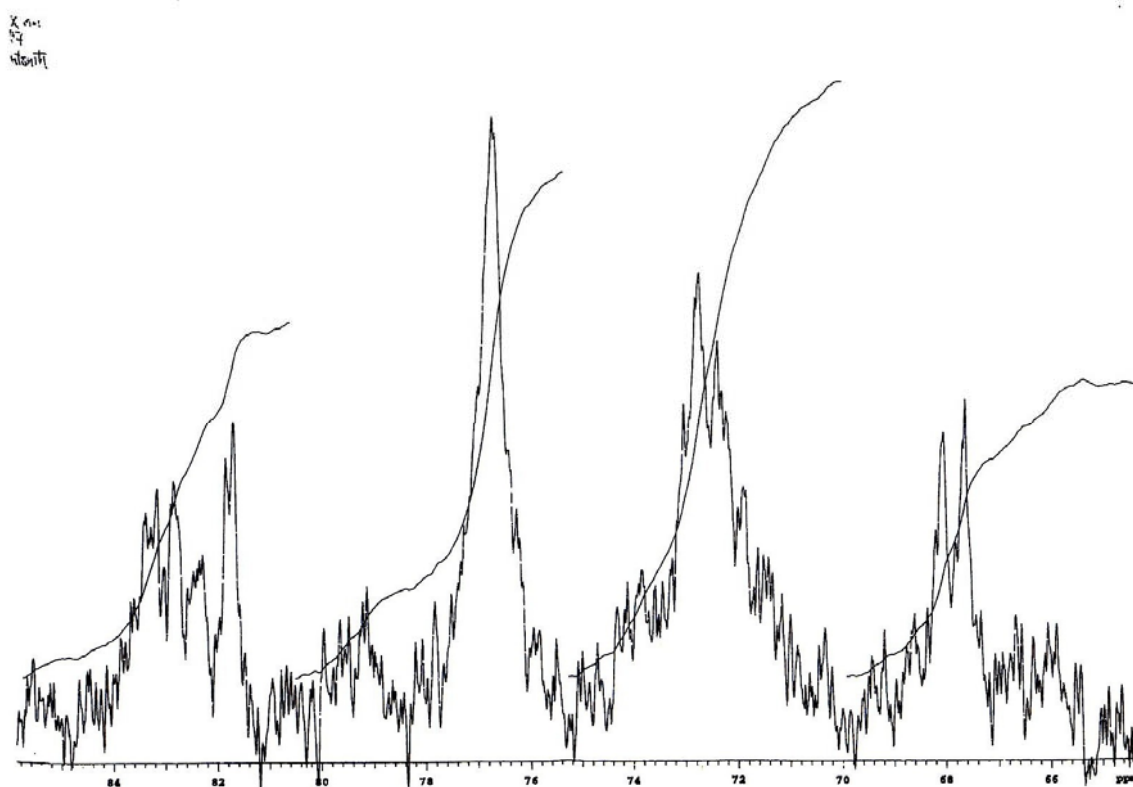
NMR-spektrum 9.3.54: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon P6.



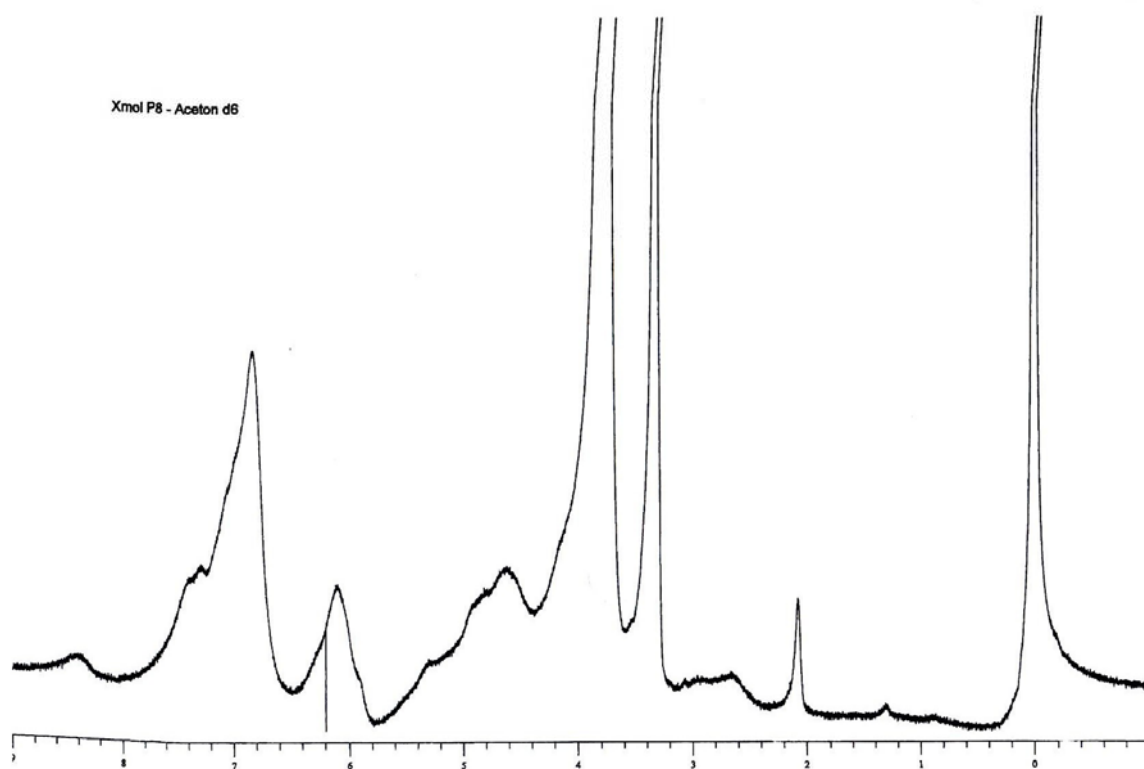
NMR-spektrum 9.3.55: ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon P6.



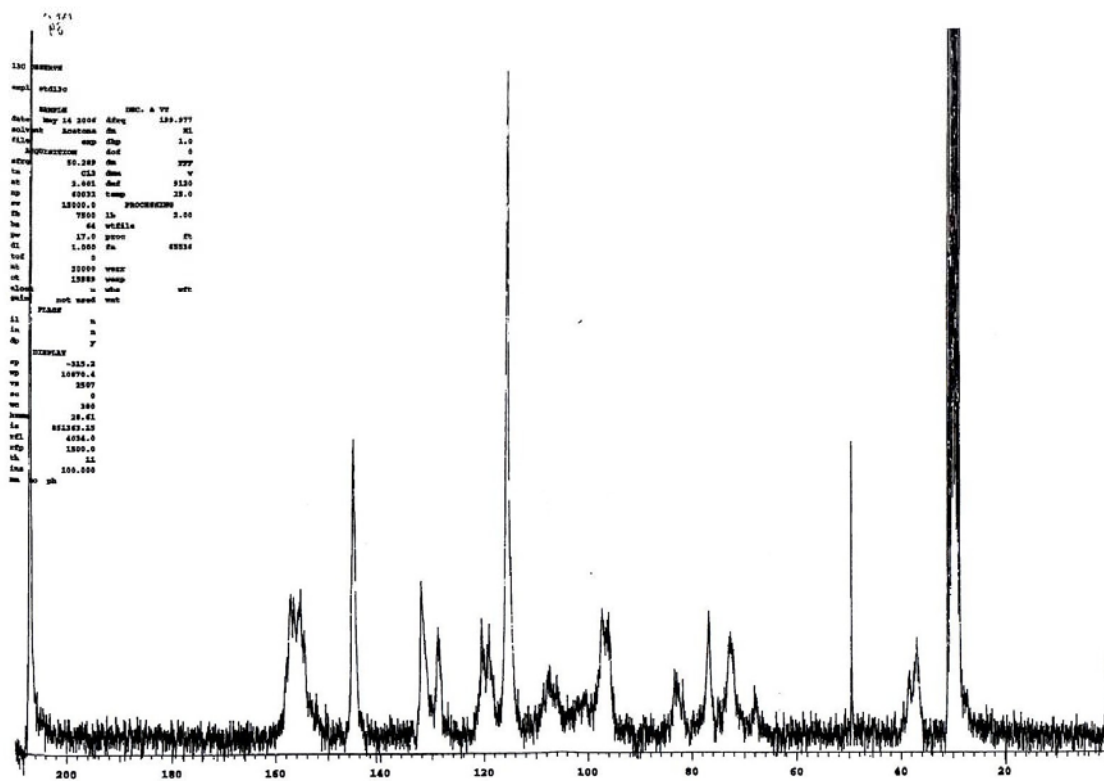
NMR-spektrum 9.3.56: Utsnitt og integral av ^{13}C -NMR-spekteret av fraksjon P6.



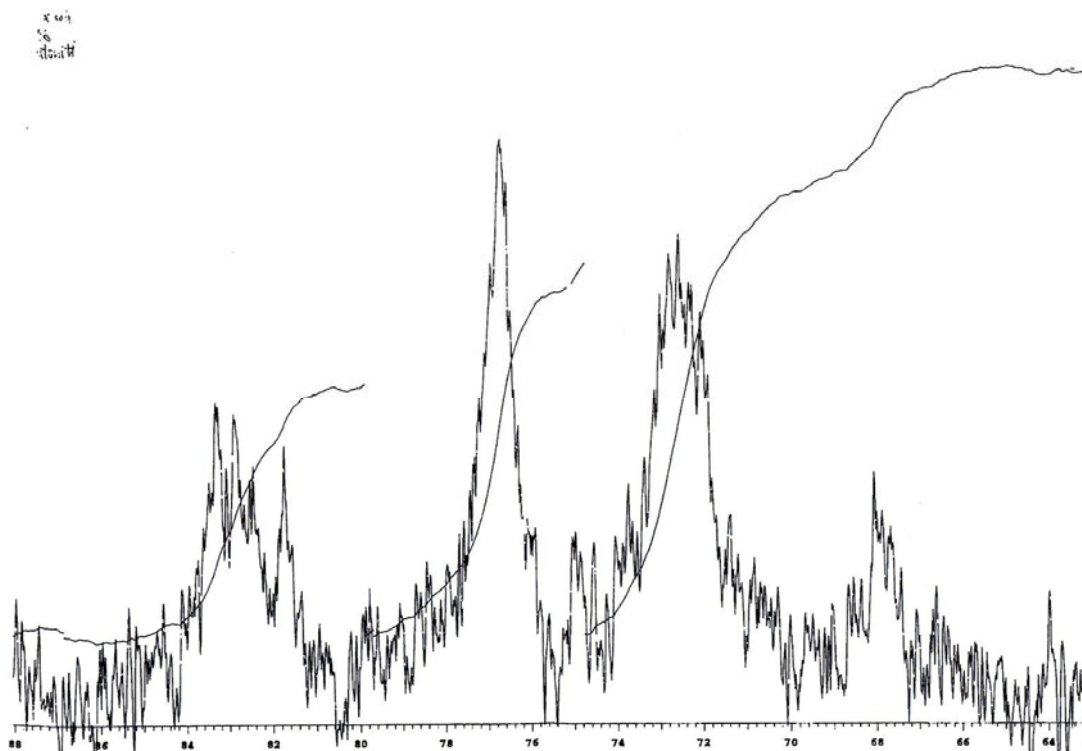
NMR-spektrum 9.3.59: Utsnitt og integral av ^{13}C -NMR-spekteret av fraksjon P7.



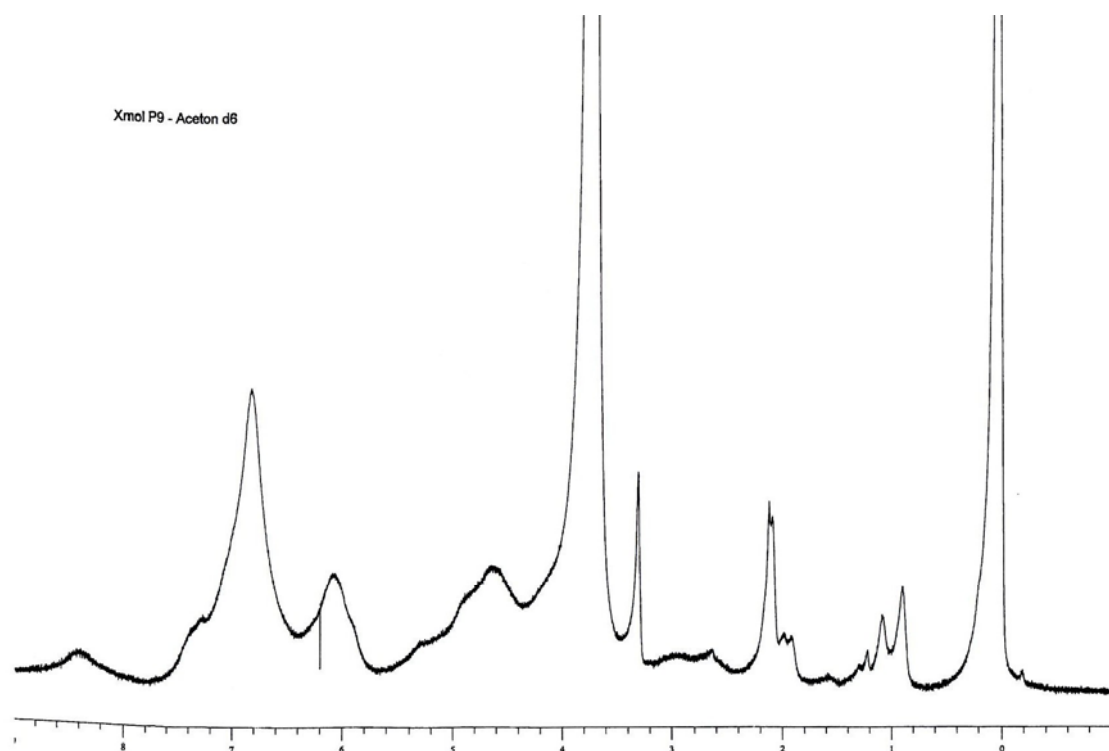
NMR-spektrum 9.3.60: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon P8.



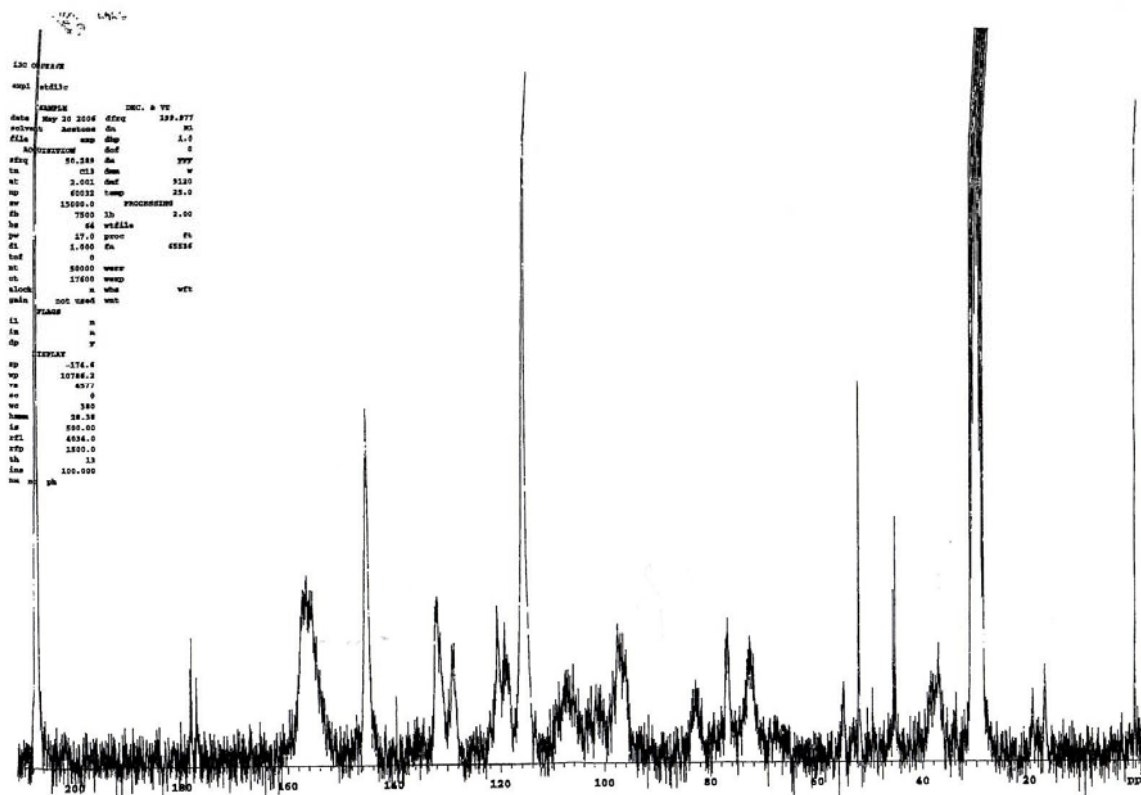
NMR-spektrum 9.3.61: ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon P8.



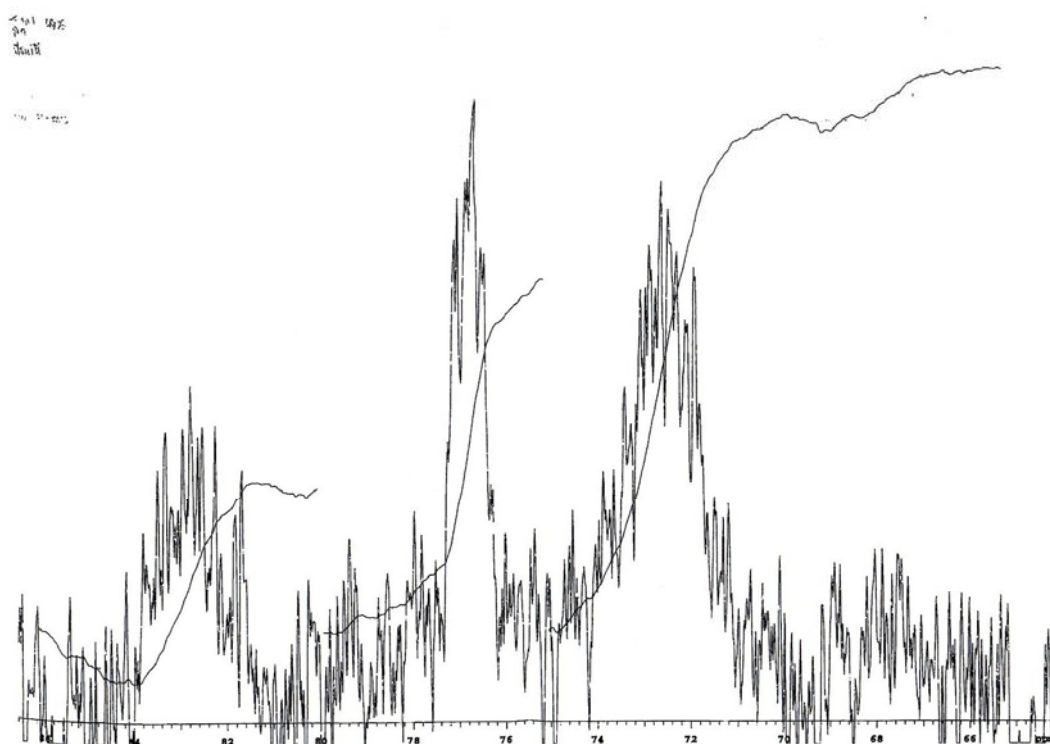
NMR-spektrum 9.3.62: Utsnitt og integral av ^{13}C -NMR-spekteret av fraksjon P8.



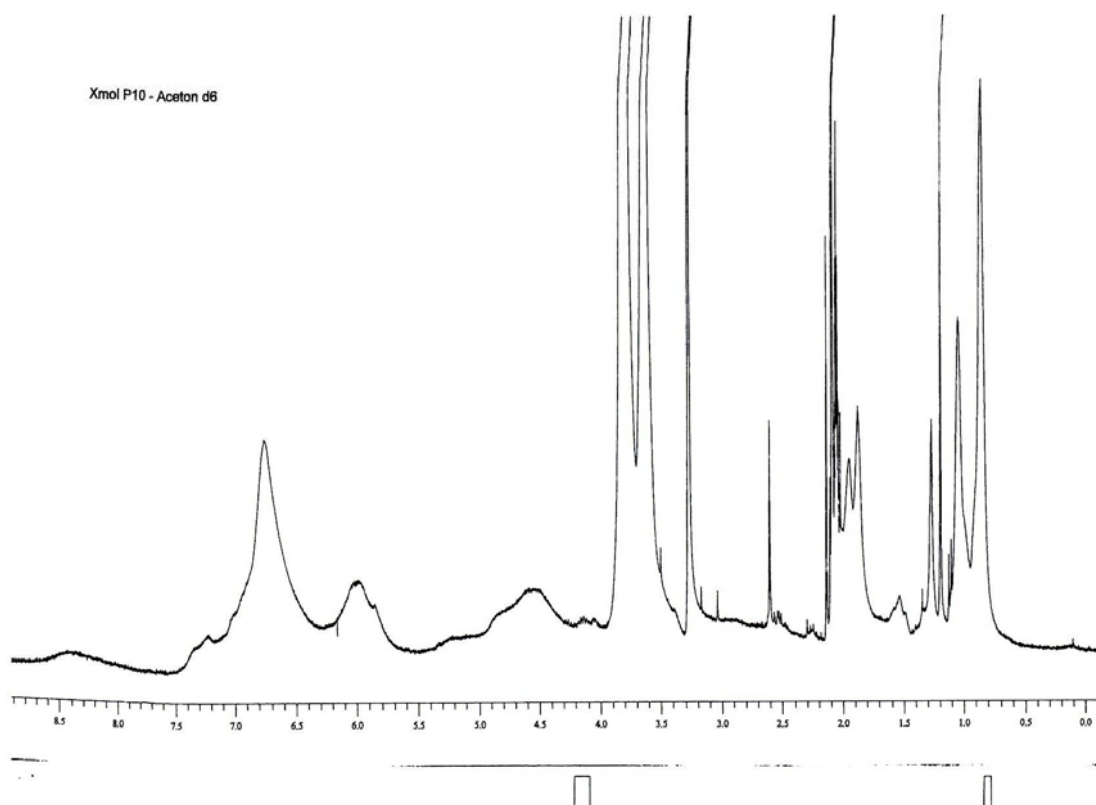
NMR-spektrum 9.3.63: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon P9.



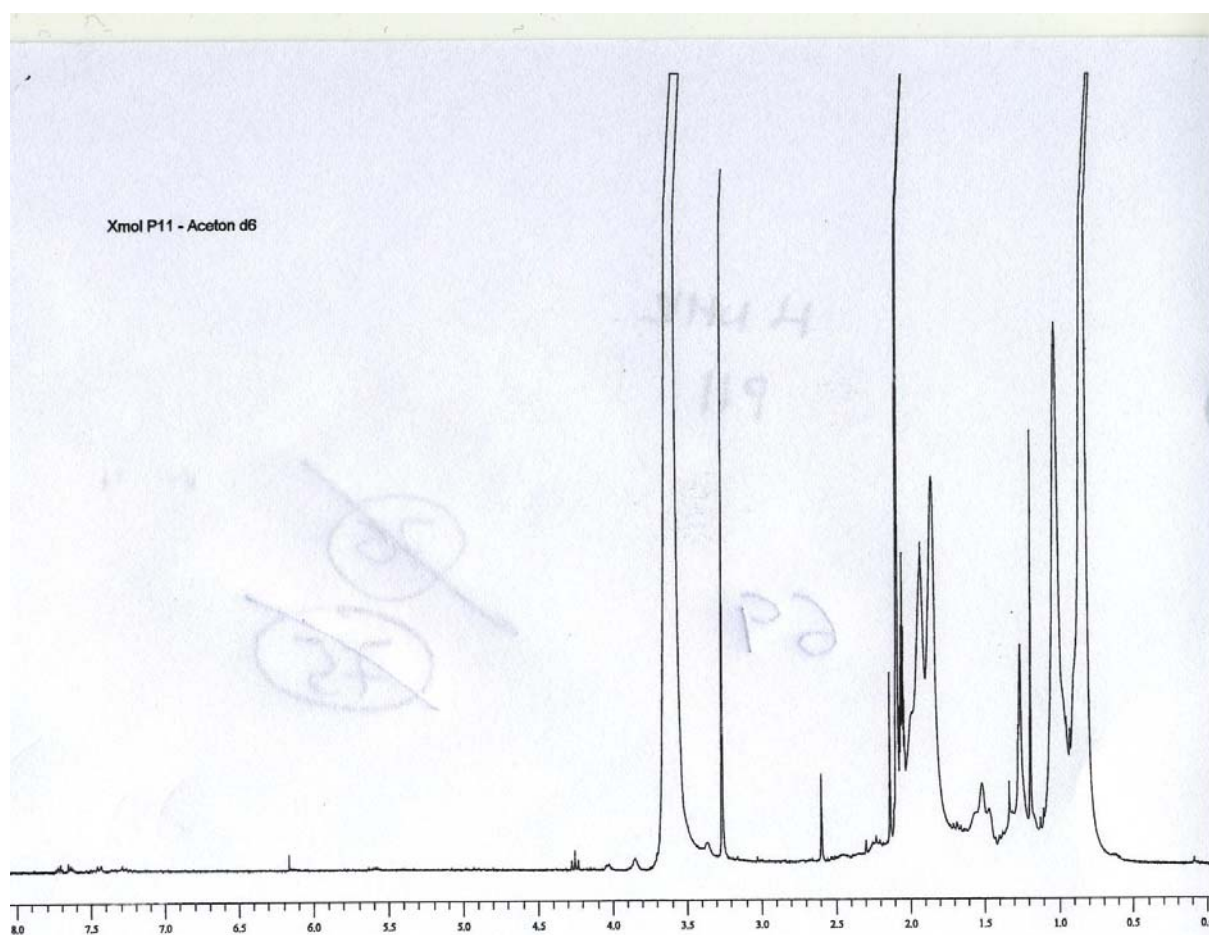
NMR-spektrum 9.3.64: ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon P9.



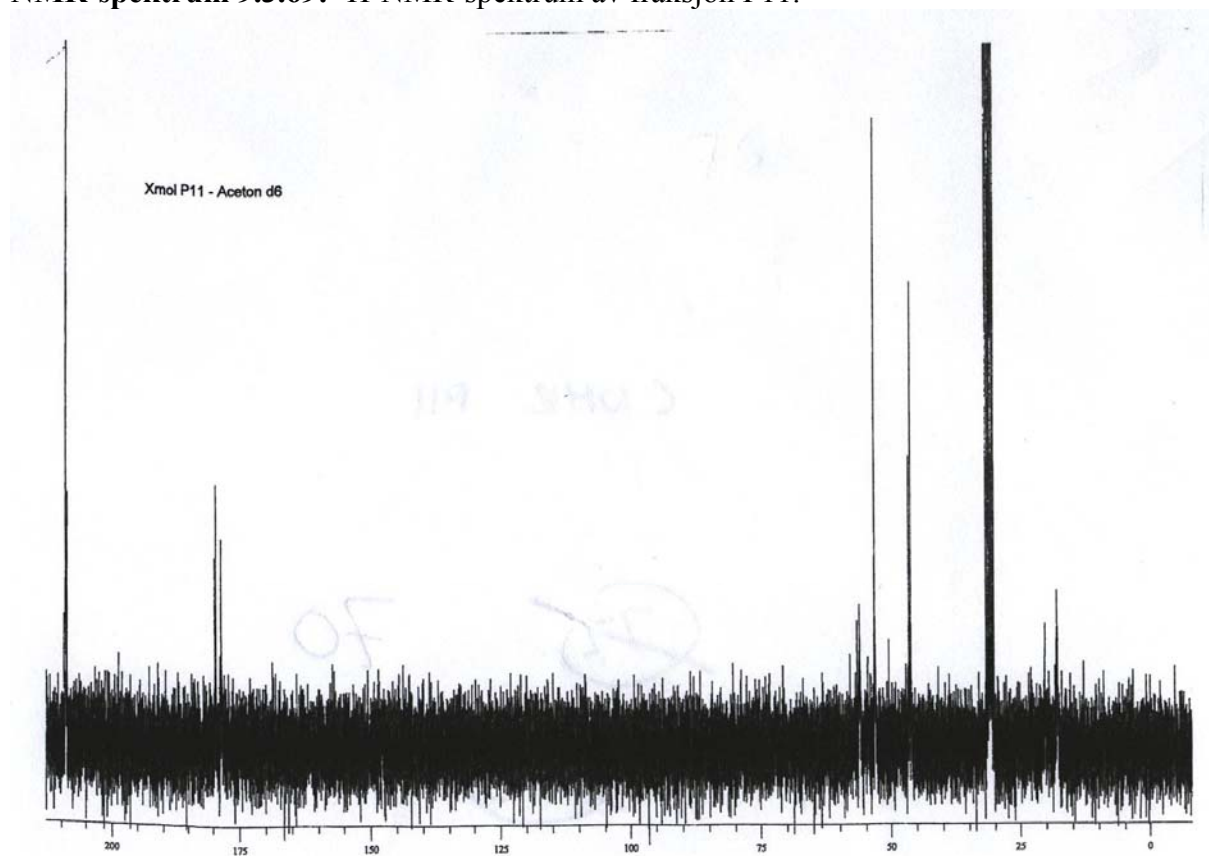
NMR-spektrum 9.3.65: Utsnitt og integral av ^{13}C -NMR-spekteret av fraksjon P9.



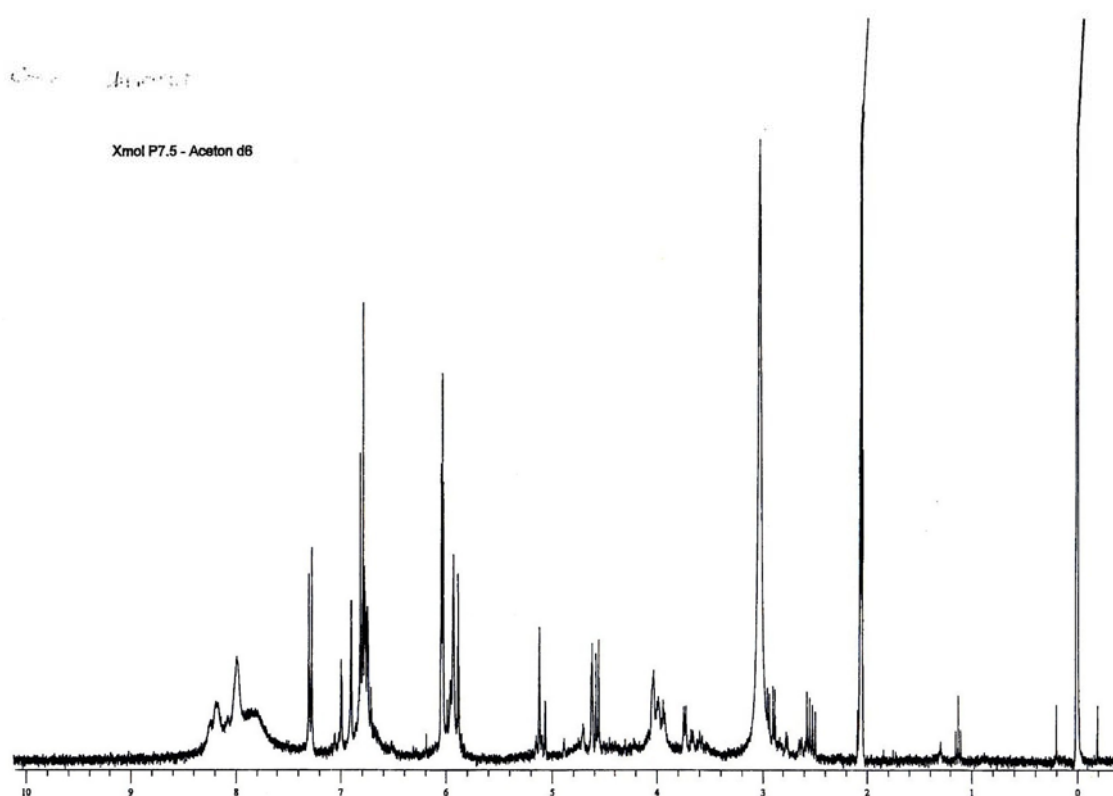
NMR-spektrum 9.3.66: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon P10.



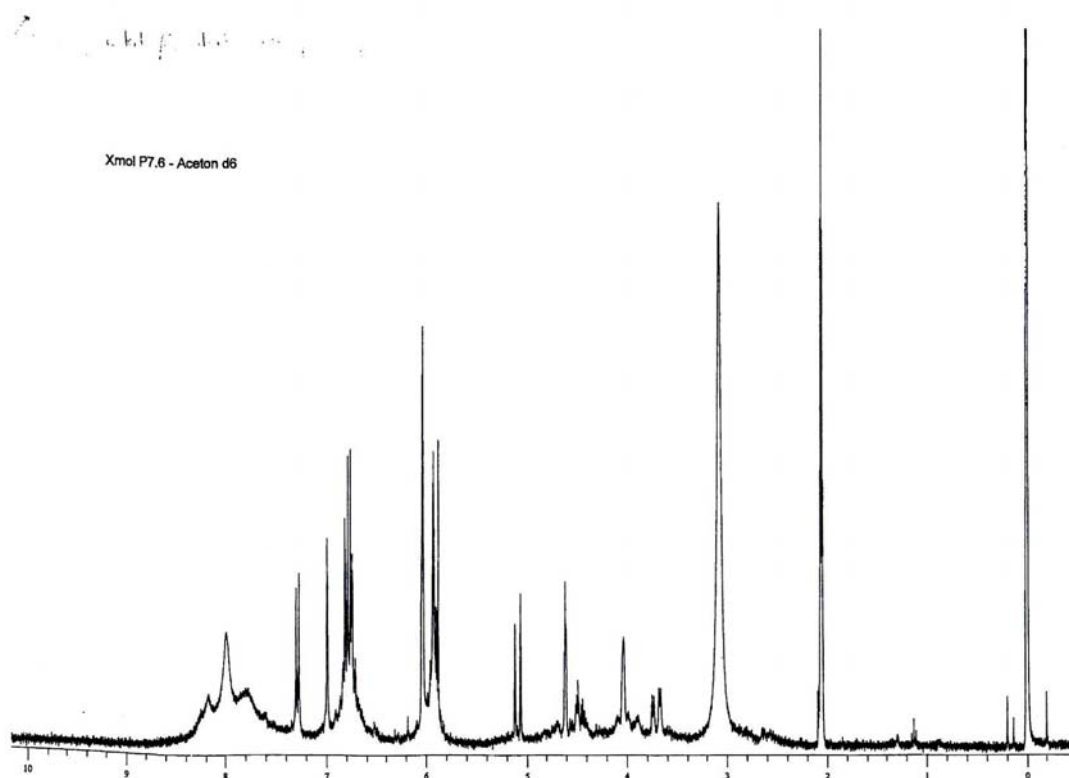
NMR-spektrum 9.3.69: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon P11.



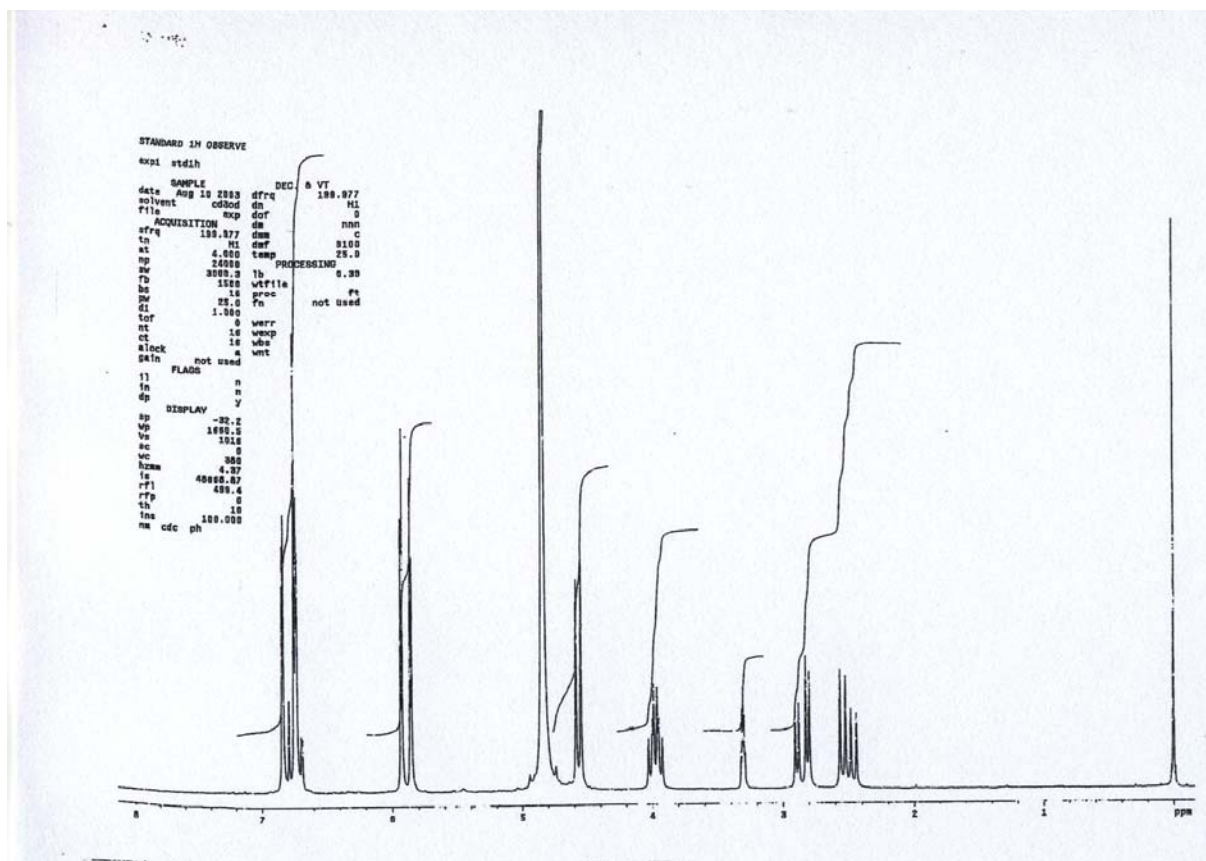
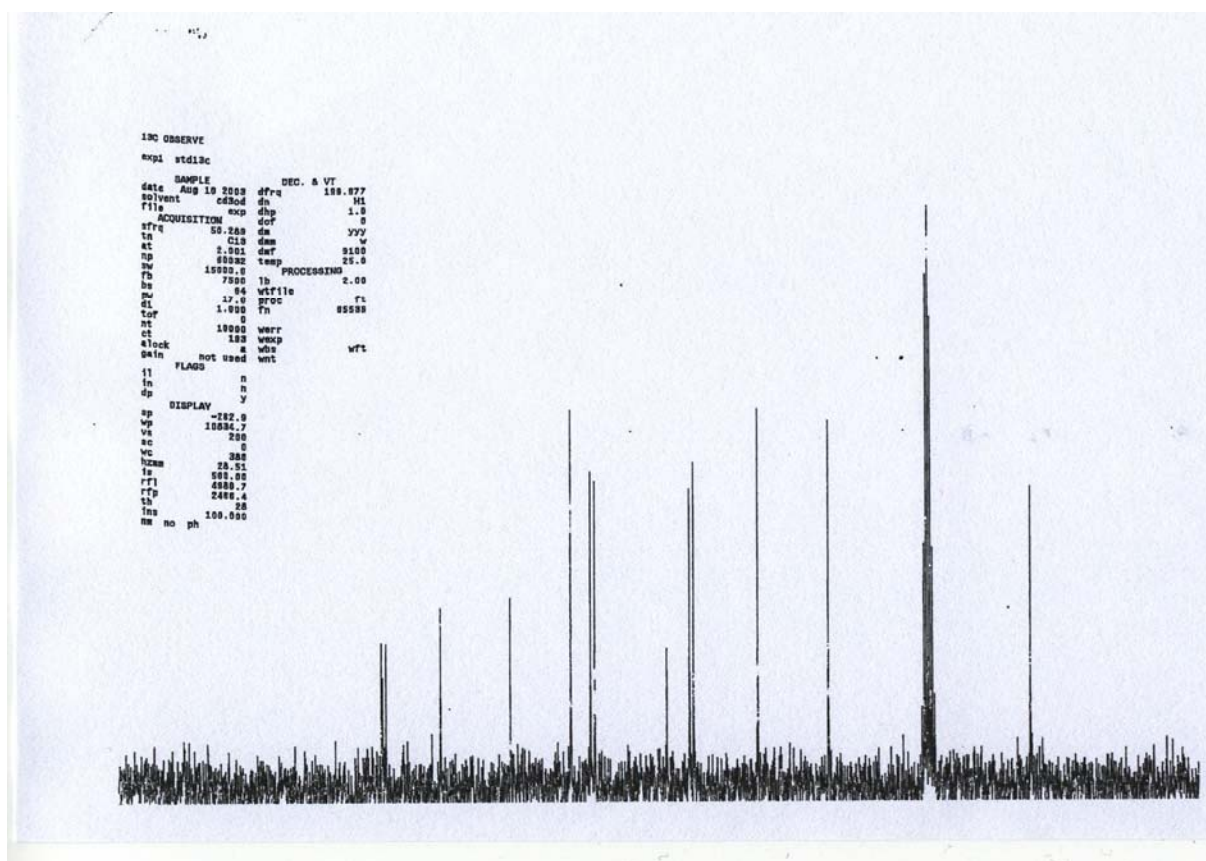
NMR-spektrum 9.3.70: ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon P11.

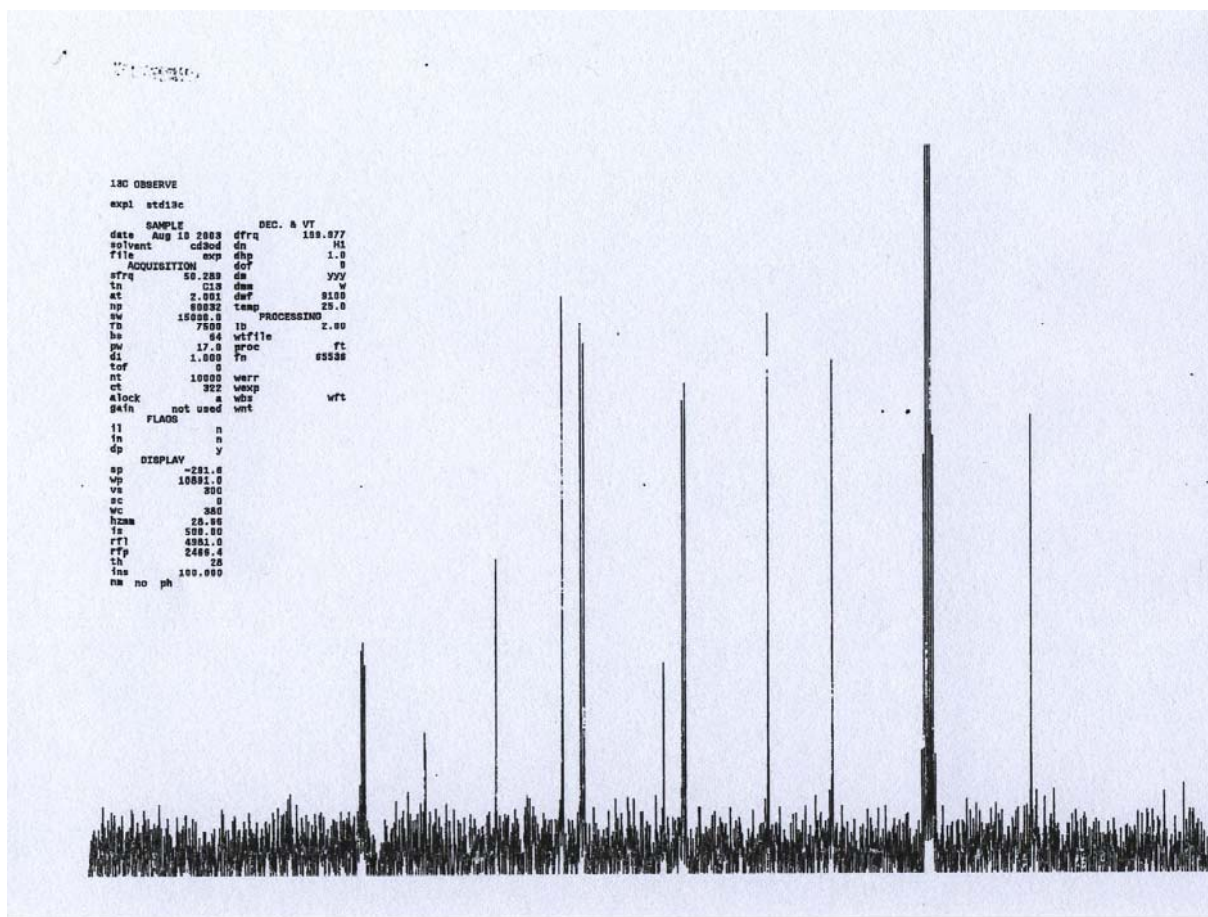


NMR-spektrum 9.3.71: ¹H-NMR-spektrum av fraksjon P7 etter floroglucinolspalting – Catechin-startenhet.

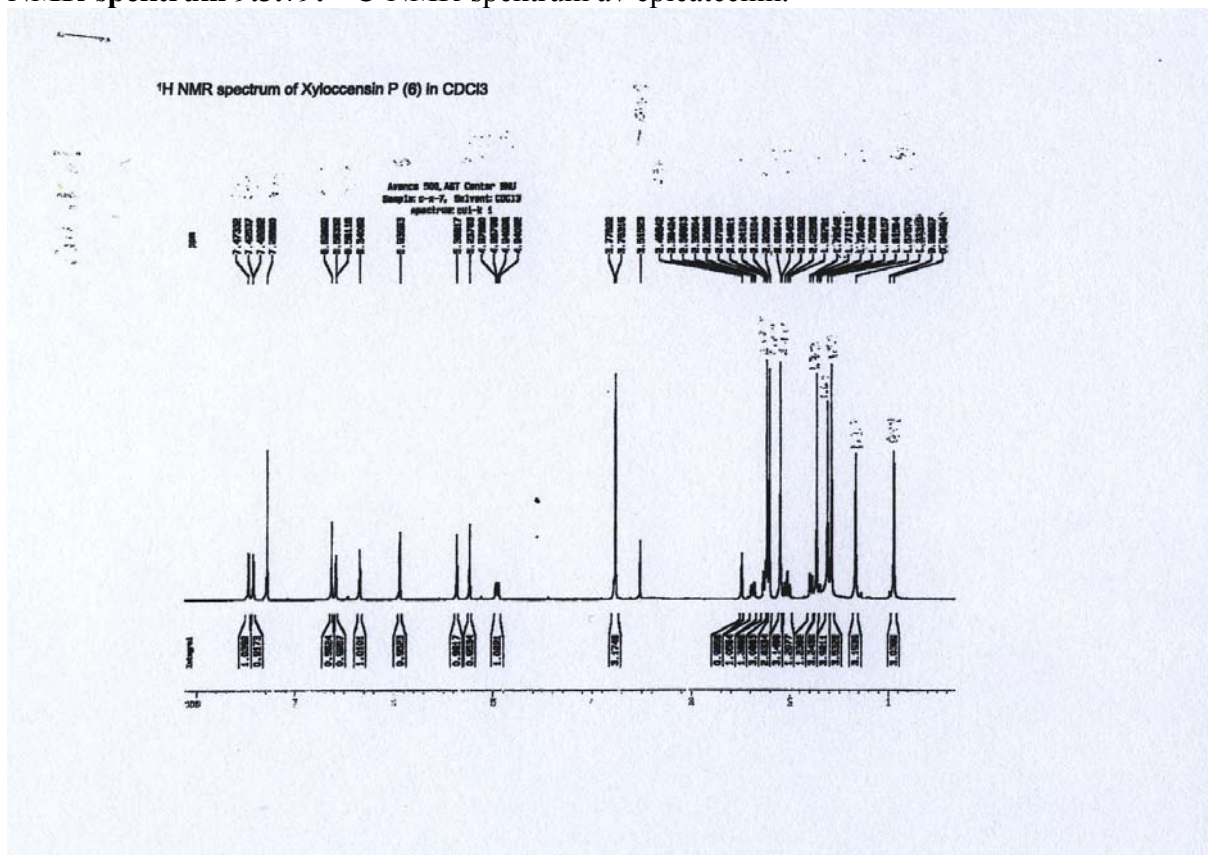


NMR-spektrum 9.3.72: ¹H-NMR-spektrum av fraksjon P7 etter floroglucinolspalting – Catechin- og epicatechinforlengerenhet.

NMR-spektrum 9.3.77: ^1H -NMR-spektrum av catechin.NMR-spektrum 9.3.78: ^{13}C -NMR-spektrum av catechin.



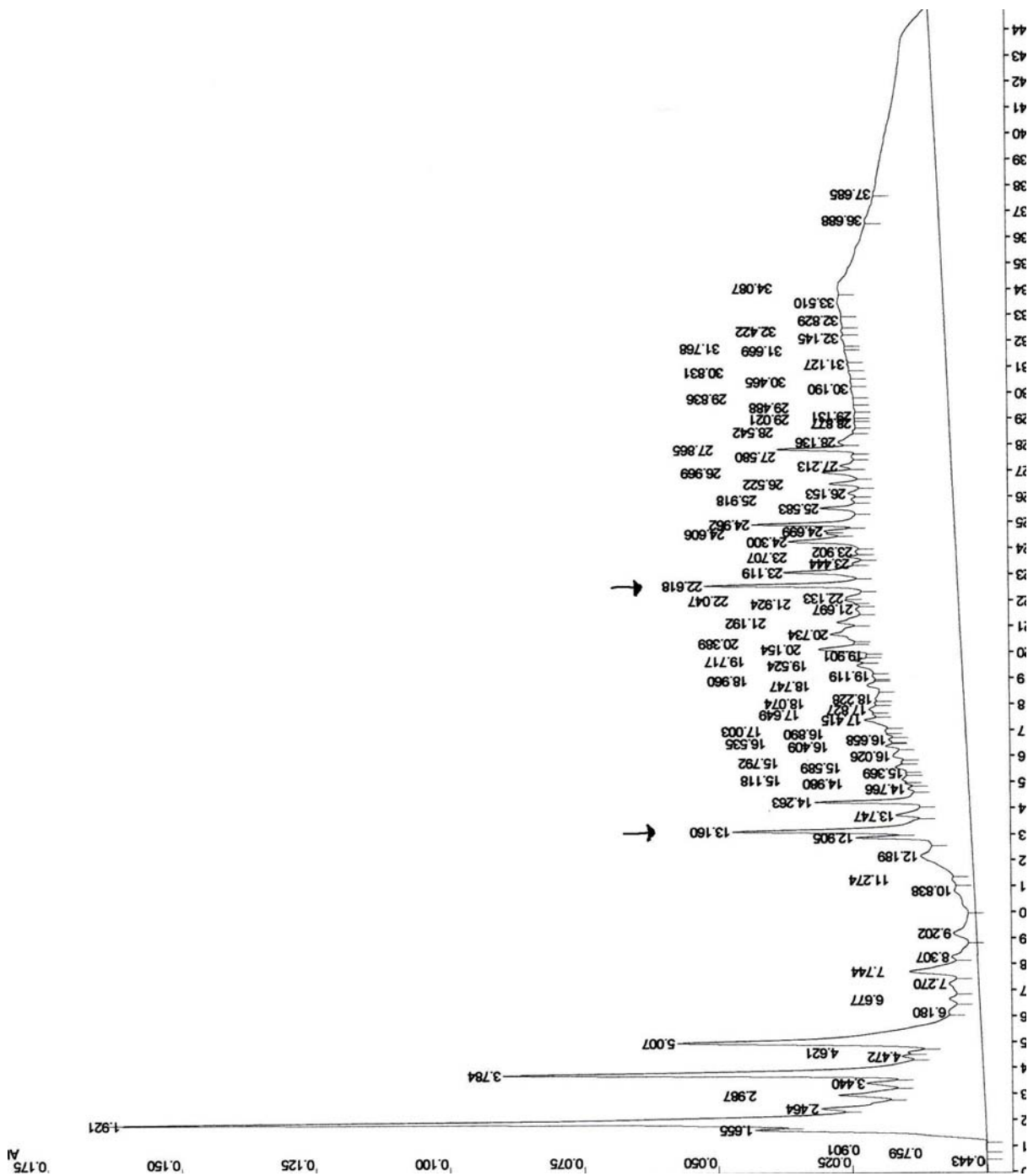
NMR-spektrum 9.3.79: ¹³C-NMR-spektrum av epicatechin.



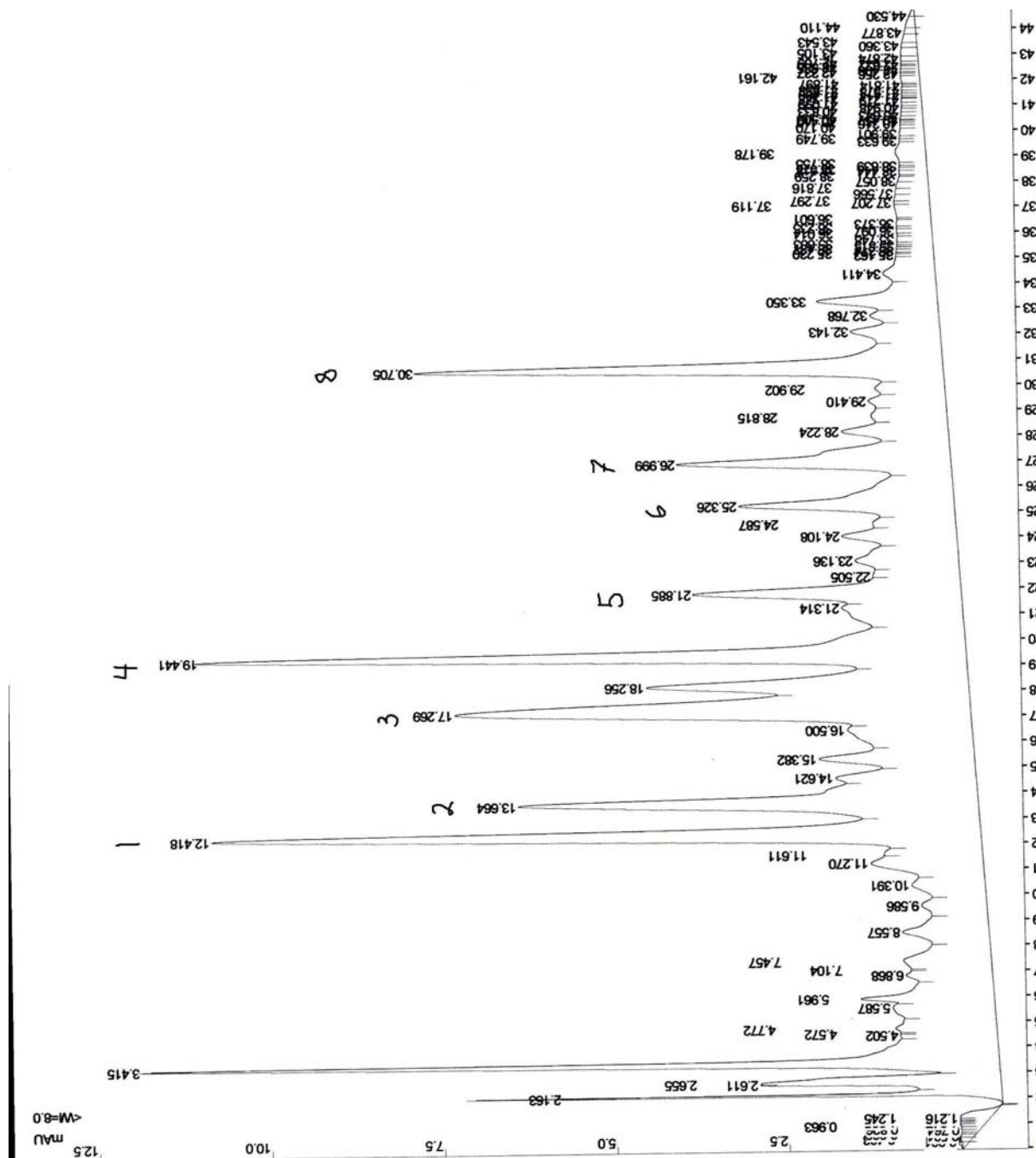
NMR-spektrum 9.3.80: ¹³C-NMR-spektrum av xylococensin P [63].

8.4 Kromatogram

Kromatogram 9.4.1. Analytisk HPLC av fraksjon E4-5.1.



Kromatogram 9.4.2. Analytisk HPLC av fraksjon E4-5.1.5.



9 Litteraturliste

1. Wiart, C., Medicinal Plants of Asia and the Pacific. 2006, Boca Raton: CRC Taylor & Francis. 206-8.
2. Uddin, S.J., J.A. Shilpi, S.M.S. Alam, M. Alamgir, M.T. Rahman, og S.D. Sarker, Antidiarrhoeal activity of the methanol extract of the barks of *Xylocarpus moluccensis* in castor oil- and magnesium sulphate-induced diarrhoea models in mice. Journal of Ethnopharmacology, 2005. **101**: 139-43.
3. Mulholland, D.A. og D.A.H. Taylor, Limonoids from Australian members of the Meliaceae. Phytochemistry, 1992. **31**: 4163-6.
4. Taylor, D.A.H., Limonoid extractives from *Xylocarpus moluccensis*. Phytochemistry 1983. **22**: 1297-9.
5. Connolly, J.D., M. MacLellan, D.A. Okorie, og D.A.H. Taylor, Limonoids from *Xylocarpus moluccensis* (Lam.) M. Roem. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I, 1976: 1993-6.
6. Bercich, M.G., R.C. Cambie, A.R. Lal, og D. Sidwell, Chemistry of Fijian plants. XIV an unsaturated aryl keto acid from *Xylocarpus moluccensis*. Australian Journal of Chemistry, 1998. **51**: 795-797.
7. Alvi, K.A., P. Crews, B. Aalbersberg, og R. Prasad, Limonoids from the Fijian Medicinal Plant Dabi (*Xylocarpus*). Tetrahedron, 1991. **47**: 8943-8.
8. Gutteridge, J.M.C. og B. Halliwell, Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease. 1 utg. 1994, Oxford: Oxford University Press.
9. Halliwell, B. og J.M.C. Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine. 2 utg. 1989, Oxford: Oxford University Press.
10. Kerr, M.E., C.M. Bender, og E.J. Monti, An introduction to oxygen free radicals. Heart & Lung, 1996. **25**: 200-9.
11. Stogner, S.W. og D.K. Payne, Oxygen toxicity. Annals of Pharmacotherapy, 1992. **26**: 1554-62.
12. Halliwell, B., Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? Lancet, 1994. **344**: 721-4.
13. Halliwell, B., Oxidation of low-density lipoproteins: Questions of initiation, propagation, and the effect of antioxidants. American Journal of Clinical Nutrition, 1995. **61**: 670S-677.
14. Bohm, B.A., Introduction to Flavonoids. 1998, Singapore: Harwood Academic Publishers.
15. Duong, G.M., Antioksidanter i *Xylocarpus granatum*, en medisinsplante fra mangroveskogen i Bangladesh - Hovedfagsoppgave. 2005, Oslo: Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.
16. Porter, L.J., Tannins. Methods in Plant Biochemistry, red. P.M. Dey and J.B. Harborne. Vol. 1. 1989, London: Academic Press. 389-419.
17. Dixon, R.A., D.-Y. Xie, og S.B. Sharma, Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? New Phytologist, 2005. **165**: 9-28.
18. Beecher, G.R., Proanthocyanidins: Biological activities associated with human health. Pharmaceutical Biology, 2004. **42**: 2-20.
19. Rice-Evans, C.A. og L. Packer, Flavonoids in Health and Disease. 2 utg. 2003, New York: Marcel Dekker Inc.
20. Cos, P., T. De Bruyne, N. Hermans, S. Apers, D. Vanden Berghe, og A.J. Vlietinck, Proanthocyanidins in health care: Current and new trends. Current Medicinal Chemistry, 2004. **11**: 1345-1359.

21. Samuelson, G., Drugs of Natural Origin. 5 utg. 2004, Stockholm: Apotekarsocieteten.
22. Rang, H.P., M.M. Dale, J.M. Ritter, og P.K. Moore, Pharmacology. 5 utg. 2003, Edinburgh: Churchill Livingstone. 231-236.
23. Lyckander, I.M. og K.E. Malterud, Lipoxygenase inhibiting flavonoids from *Orthosiphon spicatus*. Flavonoids in Biology and Medicine III, red. N.P. Das. 1990, Singapore: National University of Singapore. 469-474.
24. Steinberg, D., At last, direct evidence that lipoxygenases play a role in atherogenesis. Journal of Clinical Investigation, 1999. **103**: 1487-8.
25. Sendobry, S.M., et al., Attenuation of diet-induced atherosclerosis in rabbits with a highly selective 15-lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties. British Journal of Pharmacology, 1997. **120**: 1199-1206.
26. El Tahir, K.E.H. og K.I. Williams, Factors effecting prostacyclin formation by the rat pregnant myometrium. British Journal of Pharmacology, 1980. **71**: 641-9.
27. Kelavkar, U.P., J.B. Nixon, C. Cohen, D. Dillehay, T.E. Eling, og K.F. Badr, Overexpression of 15-lipoxygenase-1 in PC-3 human prostate cancer cells increases tumorigenesis. Carcinogenesis, 2001. **22**: 1765-1773.
28. Kelavkar, U.P., C. Cohen, H. Kamitani, T.E. Eling, og K.F. Badr, Concordant induction of 15-lipoxygenase-1 and mutant p53 expression in human prostate adenocarcinoma: Correlation with gleason staging. Carcinogenesis, 2000. **21**: 1777-1787.
29. Dar, P., D. Strassburger, A. Shaish, H. Levkovitz, R. Halperin, og D. Harats, Reduced reproduction with increased abortion rate in transgenic mice that overexpress 15-lipoxygenase. Gynecologic and Obstetric Investigation, 2001. **52**: 18-21.
30. Greibrokk, T., E. Lundanes, og K.E. Rasmussen, Kromatografi. 3 utg. 1998, Oslo: Universitetsforlaget.
31. Hostettmann, K., A. Marston, og M. Hostettmann, Preparative Chromatography Techniques. 2 utg. 1998, Berlin: Springer - Verlag Berlin Heidelberg New York. 203-204.
32. Pharmacia Fine Chemicals AB, Sephadex LH-20, chromatography in organic solvents. mangler årstall, Uppsala: Pharmacia Fine Chemicals AB.
33. Glavind, J. og G. Holmer, Thin-layer chromatographic determination of antioxidants by the stable free radical a,a-diphenyl-b-picrylhydrazyl. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1967. **44**: 539-42.
34. McMurry, J., Organic Chemistry. 5 utg. 1999, Pacific Grove: Brooks/Cole - Thomson Learning. 475-521.
35. Williams, D.H. og I. Fleming, Spectroscopic Methods in Organic Chemistry. 4 utg. 1987, London: McGraw-Hill Book Company (UK) Limited.
36. Kennedy, J.A. og G.P. Jones, Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**: 1740-1746.
37. Blois, M.S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 1958. **181**: 1199-200.
38. Sæther, P.A., Radikalscavengere og antioksidanter fra rogneved - Hovedfagsoppgave. 1999, Oslo: Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.
39. Glavind, J., Antioxidants in animal tissue. Acta Chemica Scandinavica, 1963. **17**: 1635-40.
40. Malterud, K.E., T.L. Farbrot, A.E. Huse, og R.B. Sund, Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. Pharmacology, 1993. **47**: 77-85.

41. Gleason, M.M., C.J. Rojas, K.S. Learn, M.H. Perrone, og G.E. Bilder, Characterization and inhibition of 15-lipoxygenase in human monocytes: comparison with soybean 15-lipoxygenase. *American Journal of Physiology*, 1995. **268**: 1301-7.
42. Langner, A. og H. Bekemeier, Vergleich der Wirksamkeit von Lipoxygenaseinhibitoren an Sojabohnen- und Kaninchenretikulozytenlipoxygenase. *Pharmazie*, 1987. **42**: 351.
43. Lyckander, I.M. og K.E. Malterud, Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* as inhibitors of 15-lipoxygenase. *Acta Pharmaceutica Nordica*, 1992. **4**: 159-66.
44. Lyckander, I.M. og K.E. Malterud, Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* prevent oxidative inactivation of 15-lipoxygenase. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 1996. **54**: 239-246.
45. Gutteridge, J.M.C. og B. Halliwell, The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 1990. **15**: 129-35.
46. Gutteridge, J.M.C., Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation. *Free Radical Research Communications*, 1986. **1**: 173-84.
47. Aylward, G. og T. Findlay, SI Chemical Data. 5 utg. 2002, Milton: John Wiley & Sons Australia, Ltd.
48. Haining, J.L. og B. Axelrod, Induction period in the lipoxidase-catalyzed oxidation of linoleic acid and its abolition by substrate peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 1958. **232**: 193-202.
49. Foo, L.Y., R. Newman, G. Waghorn, W.C. McNabb, og M.J. Ulyatt, Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. *Phytochemistry*, 1996. **41**: 617-24.
50. Koehler, N. og P. Winterhalter, Large-scale isolation of flavan-3-ol phloroglucinol adducts by high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Chromatography, A*, 2005. **1072**: 217-222.
51. Tits, M., P. Poukens, L. Angenot, og Y. Dierckxsens, Thin-layer chromatographic analysis of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1992. **10**: 1097-1100.
52. Sharma, O.P., T.K. Bhat, og B. Singh, Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid. *Journal of Chromatography, A*, 1998. **822**: 167-171.
53. Sun, B., C. Leandro, J.M. Ricardo da Silva, og I. Spranger, Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998. **46**: 1390-1396.
54. Fitzpatrick, D.F., R.C. Fleming, B. Bing, D.A. Maggi, og R.M. O'Malley, Isolation and characterization of endothelium-dependent vasorelaxing compounds from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000. **48**: 6384-6390.
55. Zhou, Y., F. Cheng, J. Wu, og K. Zou, Polyhydroxylated phragmalins from the fruit of a Chinese mangrove, *Xylocarpus granatum*. *Journal of Natural Products*, 2006. **69**: 1083-1085.
56. Wu, J., et al., Xylocensins O and P, unique 8,9,30-phragmalin ortho esters from *Xylocarpus granatum*. *Organic Letters*, 2004. **6**: 1841-1844.
57. Wu, J., et al., Xylocensins Q-V, six new 8,9,30-phragmalin ortho ester antifeedants from the Chinese mangrove *Xylocarpus granatum*. *Tetrahedron*, 2005. **61**: 8382-8389.
58. Wu, J., et al., Xylocensin M and N, two new B,D-seco limonoids from *Xylocarpus granatum*. *Zeitschrift für Naturforschung Section B*, 2003. **58**: 1216-1219.
59. Wu, J., et al., Xylocensin L, a novel limonoid from *Xylocarpus granatum*. *Tetrahedron Letters*, 2004. **45**: 591-593.

60. Wu, J., et al., Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR data for two 3beta,8beta-epoxymexicanolides from the fruit of a Chinese mangrove *Xylocarpus granatum*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2006. **44**: 87-9.
61. Okorie, D.A. og D.A.H. Taylor, Limonoids from *Xylocarpus granatum*. *Journal of the Chemical Society C*, 1970: 211-13.
62. Kokpol, U., et al., A Limonoid from *Xylocarpus granatum*. *Phytochemistry*, 1996. **41**: 903-5.
63. Cui, J., Z. Deng, J. Li, H. Fu, P. Proksch, og W. Lin, Phragmalin-type limonoids from the mangrove plant *Xylocarpus granatum*. *Phytochemistry*, 2005. **66**: 2334-2339.
64. Wu, J., S. Zhang, Y. Song, Z. Xiao, Q. Xiao, og Q. Li, Two new mexicanolides from the fruit of the Chinese mangrove *Xylocarpus granatum*. *Zeitschrift für Naturforschung Section B*, 2005. **60**: 1291-1294.
65. Lewis, W.H. og M.P.F. Elvin-Lewis, Medical Botany. 2 utg. 2003, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 472.
66. Lamuela-Raventos, R.M., A.I. Romero-Perez, C. Andres-Lacueva, og A. Tornero, Review: Health effects of Cocoa flavonoids. *Food Science and Technology International*, 2005. **11**: 159-176.
67. Rasmussen, S.E., H. Frederiksen, K.S. Krogholm, og L. Poulsen, Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary Intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005. **49**: 159-174.
68. Kaur, T., S. Singh, V. Dhawan, og N.K. Ganguly, *Shigella dysenteriae* Type 1 toxin induced lipid peroxidation in enterocytes isolated from rabbit ileum. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1998. **178**: 169-179.
69. Rawal, S., S. Majumdar, V. Dhawan, og H. Vohra, *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin depletes antioxidant defenses of target epithelial cells. *Parasitology*, 2004. **128**: 617-624.
70. Iwasaki, Y., T. Matsui, og Y. Arakawa, The protective and hormonal effects of proanthocyanidin against gastric mucosal injury in wistar rats. *Journal of Gastroenterology*, 2004. **39**: 831-7.
71. Deters, A., A. Dauer, E. Schnetz, M. Fartasch, og A. Hensel, High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from *Hamamelis virginiana* bark: Influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin. *Phytochemistry*, 2001. **58**: 949-958.