

**Isolering og karakterisering av bioaktive  
forbindelser fra *Ficus platyphylla*, en afrikansk  
medisinplante**

Stanislava Stevanovic



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

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2019

Av Stanislava Stevanovic

Utført ved

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultetet

Universitetet i Oslo

Oslo, januar 2019

Veiledere:

Førstemanuensis Helle Wangenstein

Professor emeritus Karl Egil Malterud



Copyright Stanislava Stevanovic

2019

Isolering og karakterisering av bioaktive forbindelser fra *Ficus platyphylla*, en afrikansk medisinplante

Stanislava Stevanovic

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

# Sammendrag

*Ficus platyphylla* er en afrikansk medisinplante som blant annet er benyttet mot ulike mentale lidelser, smerte og betennelse, tuberkulose og epilepsi. Noen få studier har undersøkt de kjemiske innholdsstoffene i planten, blant annet er triterpener, saponiner, flavonoider, kumariner og steroider rapportert. Det er av stor interesse å identifisere innholdsstoffer som kan bidra til å forklare den tradisjonelle bruken av planten mot CNS-lidelser. Dyreforsøk viser at stammebarkekstrakt blant annet har antikonvulsiv og smertestillende effekt.

Hensikten med denne oppgaven var å isolere, strukturoppklare og identifisere biologisk aktive substanser i planten. Undersøkelse av hvilke substanser som planten inneholder kan bidra til å forklare den tradisjonelle bruken.

Stammebarken fra *F. platyphylla* ble ekstrahert med diklormetan og metanol.

Diklormetanekestret ga ved fraksjonering triterpenalkolholene  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin og lupeol, som tidligere er kjent i planten. Acetatene av disse var hovedkomponenter i diklormetanekestret. Disse er tidligere ikke rapportert fra *F. platyphylla*. En blanding av høyere fettsyrestere av  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin og lupeol ble ikke undersøkt videre.

Metanolrækstraktet utgjorde den største fraksjonen og ble fraksjonert videre ved kolonnekromatografi og preparativ HPLC for å isolere innholdsstoffene fra stammebarken. En forbindelse ble isolert, og den ble strukturoppklart ved hjelp av 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) og 2D (HSQC, HMBC) NMR-spektroskopi.

Det isolerte og identifiserte stoffet var protocatechusyre (3,4-dihydroksybenzosyre). Det er ikke rapportert tidligere fra *F. platyphylla*, men er kjent fra flere andre *Ficus* arter.

Protocatechusyre er rapportert å ha en rekke biologiske aktiviteter, blant annet er det en antioksidant og har også antimikrobielle egenskaper.

En blanding av proantocyanidiner med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad på 14 og epicatechin som viktigste monomer ble isolert fra metanolekstraktet.

Rækstraktet, mellomfraksjoner og isolerte forbindelser ble testet for radikalscavenging aktivitet ovenfor radikalet difenylpikrylhydrazyl (DPPH). Det ble også utført hemming av det

peroksyderende enzymet 15-lipoksygenase (15-LO) og av det prooksyderende enzymet xantin oksidase (XO).

MeOH råekstraktet av *F. platyphylla* viste god DPPH-radicalscaenger aktivitet ( $IC_{50}$   $55 \pm 24$   $\mu\text{g/ml}$ ).  $IC_{50}$  verdier av MeOH råekstraktet ved måling av enzymhemmende effekt av 15-LO var  $56 \pm 3$   $\mu\text{g/ml}$  og for XO  $55 \pm 6$   $\mu\text{g/ml}$ .

Protocatechusyre ble testet for radicalscaenging aktivitet ovenfor radikalet DPPH, og det ble testet også hemming av 15-LO og XO.  $IC_{50}$  verdi ved måling av DPPH-radicalscaenging var  $29 \pm 8$   $\mu\text{g/ml}$ . Ved måling av 15-LO enzymhemming effekt ga den  $IC_{50}$  verdi på  $59,8 \pm 1,2$   $\mu\text{g/ml}$ .  $IC_{50}$  verdi ved måling av enzymhemming effekt av XO var over 83  $\mu\text{g/ml}$ .



# Forord

Jeg ønsker først og fremst å rette en spesiell takk til Helle Wangensteen og Karl Egil Malterud for god veiledning og oppfølging underveis i året som har gått. Deres råd, faglige dyktighet og entusiasme for faget har vært en stor inspirasjonskilde!

Jeg ønsker videre å takke til alle ansatte ved avdeling for hjelp med tekniske, faglige (og ikke faglige) samtaler.

Jeg ønsker å takke mine gode venner for all den oppmuntring, motivasjonen og hjelpen jeg har fått den siste tiden. Spesielt vil jeg takke min gode venninne, Jelena Komnecic, for den minnerike tiden sammen her på farmasi og for å ha gjort studiedagene betydelig lettere.

Sist, men ikke minst, vil jeg si tusen takk til mine foreldre, Jagoda og Slobodan Stevanovic, som aldri har mistet tro på meg, og som har gitt meg støtte gjennom hele studietiden, sammen med brødrene mine, Nikola og Marko.



# Innholdsfortegnelse

## Contents

Sammendrag.....	V
Forord.....	VIII
Innholdsfortegnelse .....	IX
1 Forkortelser .....	1
2 Hensikt .....	2
3 Bakgrunn .....	3
3.1 <i>Ficus platyphylla</i> .....	3
3.1.1 Taksonomisk klassifisering .....	3
3.1.2 Lokale navn .....	4
3.1.3 Botaniske forhold .....	4
3.1.4 Habitat .....	5
3.1.5 Tradisjonell bruk .....	5
3.1.6 Kjemiske innholdsstoffer .....	6
3.1.7 Biologisk aktivitet .....	8
4 Materialer og metoder .....	12
4.1 Materialer.....	12
4.2 Generelt .....	14
4.2.1 Innveining.....	14
4.2.2 Inndamping.....	14
4.2.3 Vannkvalitet .....	15
4.2.4.....	15
4.3 Separasjonsmetoder .....	15
4.3.1 Sephadex LH-20 gel kolonnekromatografi .....	16
4.3.2 Flash kolonnekromatografi .....	18
4.3.3 Tynnsjiktromatografi (TLC, thin-layer chromatography).....	20
4.3.4 NMR-spektroskopi ( Nuclear Magnetic Resonance) .....	22
4.3.5 UV-spektroskopi .....	25
4.3.6 Høytrykksvæskekromatografi (HPLC) .....	27
4.4 Metoder for måling av radikalscavenger og enzymhemmende aktivitet.....	31

4.4.1	15- Lipoksygenasehemming (15-LO-hemming).....	31
4.4.2	DPPH-scavenging .....	34
4.4.3	Xantin oksidase hemming (XO-hemming) .....	36
5	Eksperimentell utførelse.....	40
5.1	Plantemateriale .....	40
5.2	Ekstraksjon av plantemateriale .....	40
5.2.1	Ekstraksjon med DCM .....	40
5.2.2	Ekstraksjon med metanol .....	40
5.3	Analyse .....	41
5.3.1	NMR-spektroskopi .....	41
5.3.2	Analytisk HPLC .....	41
5.3.3	TLC .....	41
5.4	Fraksjonering av MeOH-råekstrakt .....	42
5.4.1	Sephadex LH-20 kolonneseparering .....	42
5.4.2	Analyse.....	42
5.5	Fraksjonering av DCM-råekstraktet .....	43
5.5.1	Flashkromatografi .....	43
5.5.2	TLC .....	43
5.5.3	Analyse.....	45
5.6	Separasjon av fraksjon MeOH S2 .....	45
5.6.1	Flashkromatografi .....	45
5.6.2	TLC .....	45
5.6.3	Analyse.....	47
5.7	Separasjon av fraksjon MeOH S4 .....	49
5.7.1	Flashkromatografi .....	49
5.7.2	TLC .....	49
5.7.3	Analyse.....	50
5.8	Separasjon av fraksjon MeOH S7 og S8 .....	52
5.8.1	Flashkromatografi .....	52
5.8.2	TLC .....	53
5.8.3	Analyse.....	54
5.9	Fraksjon MeOH S10 .....	54
5.9.1	NMR spektroskopi av fraksjon S10 .....	54

5.9.2	Spalting av proanthocyanidinene .....	54
5.9.3	TLC .....	54
5.9.4	NMR-spektroskopi av proanthocyanidinene.....	54
5.10	Måling av radikal scavenger, og enzymhemmingseffekter .....	55
5.10.1	DPPH-scavenging av DCM- og MeOH-råekstraktet .....	55
5.10.2	DPPH-scavenging av MeOH S1-S13 fraksjoner .....	55
5.10.3	Lipoksygenasehemming av MeOH-råekstraktet .....	55
5.10.4	Lipoksygenasehemming av MeOH S1-S13 fraksjoner og protocatechusyre.....	55
5.10.5	Xantin oksidase hemming av MeOH-råekstraktet .....	56
5.10.6	Xantin oksidase hemming av MeOH S1-S13 fraksjoner og protocatechusyre..	56
6	Resultater og diskusjon .....	57
6.1	Ekstraksjon av plantemateriale .....	57
6.1.1	Utbyttet av DCM-råekstraktet.....	57
6.1.2	Utbyttet av MeOH-råekstraktet.....	57
6.2	Analyse .....	57
6.2.1	NMR-spektroskopi .....	57
6.2.2	HPLC-kromatografi av MeOH-råekstraktet.....	58
6.3	Fraksjonering av MeOH-råekstrakt .....	59
6.3.1	Sephadex LH-20 kolonne separasjon.....	59
6.3.2	NMR-spektroskopi .....	60
6.4	Måling av radikalscavenging og enzymhemmingseffekter .....	60
6.4.1	DPPH-test av MeOH- og DCM-råekstraktet .....	60
6.4.2	DPPH-scavenging av MeOH S1-S13 fraksjoner .....	60
6.4.3	Lipoksygenasehemming av MeOH-råekstraktet .....	62
6.4.4	Lipoksygenasehemming av MeOH S1-S13 fraksjoner .....	62
6.4.5	Xantin oksidase hemming av MeOH-råekstraktet .....	63
6.4.6	Xantin oksidase hemming av MeOH S1-S13 fraksjoner .....	64
6.5	Fraksjonering av DCM-råekstrakt .....	65
6.5.1	Flashkromatografi .....	65
6.5.2	NMR-spektroskopi .....	66
6.5.3	Biologisk aktivitet av triterpenene .....	72
6.6	Separasjon av fraksjon MeOH S2 .....	72
6.6.1	Flashkromatografi .....	72

6.6.2	NMR-spektroskopi .....	73
6.6.3	Analytisk HPLC .....	73
6.6.4	Preparativ HPLC .....	73
6.7	Separasjon av fraksjon MeOH S4 .....	73
6.7.1	Flashkromatografi .....	73
6.8	NMR-spektroskopi av S4V2-Isolering og strukturoppklaring av protocatechusyre .	74
6.8.1	Analytisk HPLC .....	75
6.8.2	Preparativ HPLC .....	75
6.9	DPPH-scavenging og enzymhemmingseffekt (15-LO og XO) av protocatechusyre	76
6.10	Separasjon av fraksjon MeOH S7 og S8.....	77
6.10.1	Flashkromatografi .....	77
6.10.2	NMR-spektroskopi .....	78
6.11	NMR-spektroskopi av MeOH S10 fraksjonen.....	78
6.12	Spalting av proanthocyanidinene .....	80
7	Konklusjon .....	82
8	Forslag til videre arbeid.....	84
	Litteraturliste .....	85
	Vedlegg .....	90

# 1 Forkortelser

Forkortelse	Fullstendig betegnelse
MeOH	Metanol
DCM	Diklormetan
C	Karbon
CD <sub>3</sub> OD	Deuterert metanol
DMSO	Dimetylsulfoksid
<i>F. platyphylla</i>	<i>Ficus platyphylla</i>
HPLC	High performance liquid chromatography
TLC	Tynnsljiktromatografi
NMR	Nukleær magnetisk resonans
Ppm	Parts per million
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
LO	Lipoksygenase
UV	Ultrafiolett
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl
Kons.	Konsentrasjon
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
H	Hydrogen
OH	Hydroksyl

## 2 Hensikt

*Ficus platyphylla* er en plante som vokser i tropiske deler av Afrika, fra Senegal til Somalia, sør til Elfenbenskysten og Uganda. Planten brukes tradisjonelt i behandling av ulike sykdommer og lidelser som for eksempel epilepsi, tuberkulose, smerte og betennelse, forskjellige typer psykoser og depresjon. Hensikten med oppgaven var å isolere, strukturoppklare og identifisere biologisk aktive substanser i planten. Det ble utført test av radikalscavenging og ulike enzymhemmingstester for å finne mulige årsaker for de rapporterte effektene og for å kunne sette det i sammenheng med medisinsplantens tradisjonelle bruk.

# 3 Bakgrunn

## 3.1 *Ficus platyphylla*

### 3.1.1 Taksonomisk klassifisering

Taksonomisk klassifisering for *Ficus platyphylla* Delile er beskrevet som følgende (United States Department of Agriculture 2019):

Rike:	Plantae (planterike)
Subrike:	Tracheobionta (karplanter)
Superdivisjon:	Spermatophyta (frøplanter)
Divisjon:	Magnoliophyta (blomster-planter, dekkfrøede planter)
Klasse:	Magnoliopsida (tofrøbladet)
Underklasse:	Hamamelididae
Orden:	Urticales
Familie:	Moraceae
Slekt:	<i>Ficus</i> L.
Art:	<i>Ficus platyphylla</i> Delile

**Synonymer** (The plant list, 2013):

*Ficus kotschyana* (Miq.) Miq.

*Urostigma kotschyanum* Miq.

*Ficus lateralis* Warb

*Ficus platyphylla* var. *pubescens* Aubrev.

### 3.1.2 Lokale navn

Gamji- blant `Hausas` i Nord-Nigeria (Chindo, Adamu et al. 2011)

Epo-obo- blant `Yorubas` i Sør-Vest-Nigeria (Chindo, Adamu et al. 2011)

Gutta percha treet- i Nord-Nigeria (Ugwah-Oguejiofor, Bello et al. 2014)

### 3.1.3 Botaniske forhold

*Ficus platyphylla* er et tre som kan bli inntil 25 m høyt. Det har en kraftig, forgrenet, ganske tett og spredende krone. Ofte starter denne planten sitt liv som en epifytt, den vokser opp på en annen plante. Etter hvert sender *F. platyphylla* røttene sine gjennom luften, og ved kontakt med bakken blir røttene mye tykkere og mer kraftige. Gjennom dem får *F. platyphylla* mer næringsstoffer, og den starter å vokse raskere enn vertstreet. De røttene som står i luften samles rundt vertstreet, og de forhindrer at treet vokser ut som vanlig. Til slutt dør vertstreet, og *Ficus* forsetter å vokse uten konkurranse (Burkill 1997).

Barken er glatt eller skjellete, gul-grå eller rustfarget, med rosa til røde skråstreker, som utskiller mye hvit lateks. Planten har lange, hårete stengler. Bladene er alternerende, spiralordnet, elliptiske, 10-25 cm lange, avrundet ved apeks, avrundet eller hjerte-formet ved base. Bladstilken er tykk, 4-12 cm lang (Arbonnier 2004).

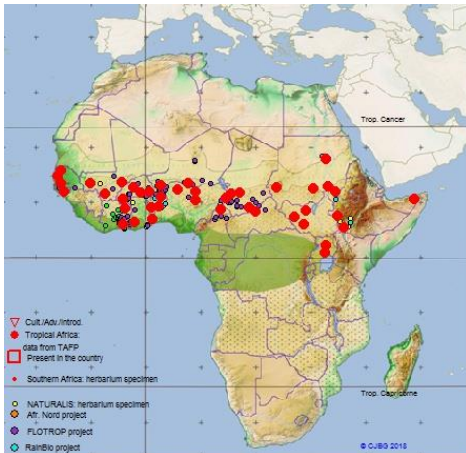


**Figur 3.1:** *Ficus platyphylla*, blader og treet (West African plants- A photo guide)



### 3.1.4 Habitat

*F. platyphylla* vokser i tropiske deler av Afrika, fra Senegal til Somalia, sør til



Elfenbenskysten og Uganda (figur 3.2) (Useful Tropical Plants 2018) . Den forekommer på nesten alle jordtyper, blant annet på sand, steinete steder, på kanten av skoger, buskområder og savanner langs kysten. Den kan finnes opp til 1700 m over havnivået (African plant database, 2012).

**Figur 3.2:** Geografisk område hvor *Ficus platyphylla* vokser (African plant database, 2012)

### 3.1.5 Tradisjonell bruk

Stammebark av *F. platyphylla* brukes tradisjonelt i Vest-Afrika mot forskjellige typer psykoser, søvnløshet, depresjon, smerte og betennelse (Chindo, Amos et al. 2003). Kaldt vann-ekstrakt eller dekokt av stammebark tas oralt. Pulver kan også blandes med mat og spises eller plasseres på brennende trekull og inhaleres (Audu 1989).

I nordlige deler av Nigeria brukes *F. platyphylla* tradisjonelt mot epilepsi (Chindo, Anuka et al. 2009, Chindo, Ya'U et al. 2014, Chindo, Schroder et al. 2015). Det er dokumentert at oral bruk av metanolekstrakt (fra et dyreforsøk) av *F. platyphylla* har antikonvulsiv effekt (Chindo 2012).

Stammebark brukes også mot malaria (Nadembega, Boussim et al. 2011, Abubakar, Yusuf et al. 2016), tuberkulose (Kubmarawa, Ajoku et al. 2007, Abubakar, Yusuf et al. 2016), og mot parasittiske sykdommer som sovesyke (trypanosomiasis, forårsaket av protozoen *Trypanosoma brucei brucei*) (Sawadogo, Le et al. 2012). Dekokt laget av stammebarken eller roten brukes mot anemi (Kone, Koffi et al. 2012). Bark øker melkeproduksjon. Den brukes også mot gastritt, diaré, menoragi (Arbonnier 2004).

Frø, bark og blader brukes sammen i kombinasjon for å forbedre fertilitet (Ugwah-Oguejiofor, Bello et al. 2011, Ugwah-Oguejiofor, Bello et al. 2014). Blader brukes mot slangebitt (Molander, Nielsen et al. 2014).

I Sørøst-Afrika blir barn som ammes noen ganger eksponert for en kompleks blanding av planter som skal virke forebyggende og styrkende for barna. En av plantene er *F. platyphylla*. Barna drikker infusjonen for å lindre eller forebygge et stort antall av sykdommer på grunn av deres antimikrobielle, antiinflammatoriske, psykotrope og/eller neurotrope egenskaper (Delgado, Nunez et al. 2011).

Lateks brukes i tyggegummi produksjon (Arbonnier 2004).

### 3.1.6 Kjemiske innholdsstoffer

Det er utført relativt lite forskning på innholdsstoffer i *F. platyphylla*. Et søk i databasen Scifinder med søkeordet *Ficus platyphylla* ga 52 treff (27. desember 2018). Per dags dato er få stoffer blitt isolert, identifisert og strukturoppklart. Det har blitt dokumentert noen biologiske effekter, men ytterligere forskning på planten trengs.

Ifølge litteraturen inneholder plantedelene forskjellige komponenter fra ulike stoffgrupper. Blant disse er flavonoider, tanniner, saponiner (Chindo, Adamu et al. 2011), karbohydrater, steroider/terpenoider (Danmalam 2003), proanthocyanidiner (Ntenga, Pagore et al. 2017), furanokumariner og eteriske oljer (Ugwah-Oguejiofor, Bello et al. 2014). Tabell 3.1 viser en oversikt over identifiserte innholdsstoffer i *F. platyphylla*, sortert etter kjemisk stoffgruppe, plantedelen de er hentet fra, samt en kildehenvisning.

**Tablell 3.1:** Oversikt over identifiserte innholdsstoffer i *Ficus platyphylla*

Kjemisk stoffgruppe	Komponent	Plantedel	Kilde
Flavonoid	Procyanidin	Bark	(Ntenga, Pagore et al. 2017)
Flavonoid	Prodelphinidin	Bark	(Ntenga, Pagore et al. 2017)
Flavonoid	Fisetinidin	Bark	(Ntenga, Pagore et al. 2017)
Flavonoid	Catechin gallat	Bark	(Ntenga, Pagore et al. 2017)

Flavonoid	Rutin	Blad og bark	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Flavonoid	Luteolin-5-rutinosid	Blad	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Flavonoid	Chalcone-3',5'-dihydroksy-4-O-glukosid	Blad	(Sayed, Backheet et al. 1991)
Flavonoid	Cosmosiin	Blad	(Sayed, Backheet et al. 1991)
Flavonoid	Galuteolin	Blad	(Sayed, Backheet et al. 1991)
Benzosyre derivat	1-Metoxetyyl-benzoat	Lateks	(Eddy, Ameh et al. 2012)
Fett	Palmitinsyre	Lateks	(Eddy, Ameh et al. 2012)
Fett	Oljesyre	Lateks	(Eddy, Ameh et al. 2012)
Fett	Octadekansyre (stearinsyre)	Lateks	(Eddy, Ameh et al. 2012)
Furanokumarin	Isopimpinellin	Blad	(Khattab 1993)
Furanokumarin	Xanthoxol	Blad	(Khattab 1993)
Furanokumarin	Umbelliferon	Blad	(Sayed, Backheet et al. 1991)
Furanokumarin	Xanthotoxin	Blad	(Sayed, Backheet et al. 1991)
Kumarin	Herniarin	Blad	(Khattab 1993)
Kumarin	7-Metoksykumarin	Blad og bark	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Triterpener	$\alpha$ -Amyrin	Blad og bark	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Triterpener	$\beta$ -Amyrin	Blad og bark	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Triterpener	Ursolsyre	Blad og bark	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Fettalkohol	Cerylalkohol	Blad og bark	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Steroid	$\beta$ -Sitosterol	Blad og bark	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Organisk syre	Tartrat	Frukt	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Organisk syre	Sitronsyre	Frukt	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Organisk syre	Malat	Frukt	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Organisk syre	Kojat	Frukt	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Organisk syre	Maleat	Frukt	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Organisk syre	Malonat	Frukt	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)

Organisk syre	1-Fenanthrenkarboksylsyre	Lateks	(Eddy, Ameh et al. 2012)
Organisk syre	Abietinsyre	Lateks	(Eddy, Ameh et al. 2012)
Aminosyre	Aspartat	Lateks	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Aminosyre	Hydroxyprolin	Lateks	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Aminosyre	Tryptofan	Lateks	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Aminosyre	Arginin	Lateks	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Aminosyre	Lysin	Lateks	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Aminosyre	Alanin	Lateks	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Aminosyre	Histidin	Lateks	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
Vitamin C	Askorbat	Frukt	(El-Sayyad, Sayed et al. 1986)
	6,8,9-Trimetyl-4-(1-fenyletyl)-3-oxa bicyclo[3.3.1] non-6-en-1-yl)metanol	Lateks	(Eddy, Ameh et al. 2012)
	Tetracosametyl-cyclododecasiloksan-(2,2,4,4,6,6,8,8,10,10,12,12,14,16,16,18,18,20,20,22,22,24,24-tetracosametyl cyclododecasiloxane	Lateks	(Eddy, Ameh et al. 2012)
	Metoxy-fenyl-oxim	Lateks	(Eddy, Ameh et al. 2012)

### 3.1.7 Biologisk aktivitet

#### Analgetisk og antiinflammatorisk aktivitet

Metanolekstrakt av stammebark ble undersøkt for smertestillende og betennelsesdempende aktivitet på hannmus (Amos 2002). I eksperimentet ble det brukt 2-4 % av LD<sub>50</sub> for mus (LD<sub>50</sub>= 5000 mg/kg). Effekten ble testet som nociceptiv terskel på varmeplate og vokaliserings-terskel som et svar på elektrisk stimulering av haleroten. Resultatene viser økt nociceptiv og vokaliserings-terskel hos mus etter bruk av stammebarkekstraktet. I samme eksperimentet ble det undersøkt molekylær mekanisme for denne aktiviteten. Det ble vist at *F. platyphylla* ekstraktet har en affinitet for  $\mu$  opiat reseptorer, men ikke for  $\delta$  eller  $\kappa$  opiat

reseptorer. Det ble også oppdaget at *F. platyphylla* hemmer aktivitet av COX-2 og 5-LO (Chindo, Schroder et al. 2016). Det ble konkludert at det er saponiner fra *F. platyphylla* som har ansvar for smertestillende og betennelsesdempende effekt av ekstraktet (Amos 2002).

### **Antikonvulsiv aktivitet (Krampestillende)**

Et annet eksperiment som var gjort av samme forskere hadde som et mål å bekrefte krampestillende effekt av saponin-rik fraksjon av stammebark (SFG). Albino mus ble brukt som en dyremodell. Som standard krampeinduserende middel ble pentylentetrazol (PTZ, 85 mg/kg s.c) og stryknin nitrat (STN, 2,5 mg/kg s.c) benyttet. Fenobarbiton (PBT, 10 mg/kg i.p) og klonazepam (CZP, 3 mg/kg i.p) ble brukt som positiv kontroll. LD<sub>50</sub> for SFG hos mus er 1274 ± 42,2 mg/kg. Resultatene viste at SFG beskytter mus mot pentylentetrazol- og stryknin-induserte anfall. Den beskyttende effekten er dose-avhengig (Chindo, Anuka et al. 2009).

Chindo et al. (2003; 2014) har også undersøkt adferdsmessige og krampestillende egenskaper av metanolekstrakt av stammebark. De ville sjekke effekten av ekstraktet på aminofyllin-, isoniazid- og pikrotoksin-induserte anfall hos albinomus. Alle stoffene ble administrert intraperitoneal (i.p). Resultatene viste vesentlig forsinkelse i latenstid av myokloniske rykninger og toniske anfall induert av alle de konvulsive stoffene (AMI, PCT, STN) som ble brukt i studien. Ekstraktet beskyttet ikke musene mot MES-anfall i dosene som ble testet. Ekstraktet (200-400 mg/kg) forkortet også utbruddet og forlenget varighet av diazepam-indusert søvn, men hadde ingen virkning på motorisk koordinasjon i rota-stav tredemølla eller balansetest i mus ved de testede doser som ble brukt (Chindo, Amos et al. 2003, Chindo, Ya'U et al. 2014).

### **Gastrointestinal aktivitet**

I 1999. ble det gjort en studie for å undersøke effekt av metanol stammebarkekstrakt på gastrointestinal aktivitet. LD<sub>50</sub> for ekstraktet ved intraperitoneal bruk var 2000 mg/kg. Studien ble gjort på isolert kanin-jejunum og rotte-duodenum, og gastrointestinal motilitet hos mus ble testet. Ekstraktet viste bifasisk effekt på glatt muskulatur - lavere doser induerte kontraksjon, mens høyere doser induerte dilatasjon. Det ble også vist doseavhengig hemming av gastrointestinal motilitet (Amos, Binda et al. 2001).

## **Antimalaria aktivitet**

En annen studie fra 2011. har undersøkt tradisjonell bruk av etanolekstrakt av stammebark mot malaria. Mus ble infisert med *Plasmodium berghei*. Mus fra kontrollgruppe som var infisert, men ikke behandlet, døde 7-9 dager etter infeksjon. Mus som fikk ekstrakt i dose på 300 mg/kg viste kraftig redusert parasitt-anfall på 43,5 % og en gjennomsnittlig overlevelse på 28 dager etter infeksjon (Shittu, Emmanuel et al. 2011).

## **Hormonell aktivitet**

Det ble gjort også en studie for å undersøke effektene av *F. platyphylla* på hunn-Wistar-rotter med østradiolvalerat-(EV)-indusert polycystisk ovariesyndrom (PCOS). Dyrene var delt i 5 forskjellige grupper: positiv kontroll gruppe fikk klomifencitrat, negativ kontrollgruppe fikk destillert vann, og de andre gruppene fikk 100, 200 og 400 mg/kg vannekstrakt av *F. platyphylla*. Det er vanlig å ha et forhøyet forhold mellom luteiniserende hormon (LH) og follikkelstimulerende hormon (FSH) når en har PCOS. De gruppene som ble behandlet med ekstraktene viste et lavere LH/FSH forhold sammenlignet med både de positive og de negative kontrollgruppene. På den andre siden var progesteronnivåene høyere i de ekstraktbehandlende gruppene sammenlignet med den negative kontrollgruppen (indiserer lutealfasereparasjon) (Ugwah-Oguejiofor, Bello et al. 2014).

## **Antidepressiv aktivitet**

I 2008. ble det gjort en studie på albinomus og -rotter. Det ble undersøkt effekt av saponinrik ekstrakt av stammebark av *F. platyphylla* på spontan motorisk aktivitet (SMA), pentobarbital-indusert søvn, motorisk koordinering, amfetamin-indusert hyperaktivitet, katalepsi, tvunget svømming og halesuspensjonstest hos gnagere. Det ble benyttet saponinrik fraksjon av ekstrakt (SFG) på 25 mg/kg, 50 mg/kg og 100 mg/kg i.p. SFG reduserte SMA doseavhengig, dette kan tyde på at det finnes psykoaktive stoffer med beroligende effekt i SFG. Ventetid for pentobarbital-indusert søvn ble forkortet, og varigheten av søvnen ble forlenget. Antidepressive egenskaper ble dokumentert ved redusert immobilitetstid i tvunget-svømming og hale-suspensjonstest. Ekstraktet svekket også amfetamin-indusert hyperaktivitet, og

forverret haloperidol-indusert katalepsi. Det hadde ingen effekt på motorisk koordinering i tredemølleforsøk (Chindo, Anuka et al. 2008).

### **Neuroleptisk aktivitet**

I en annen studie ble det undersøkt effekt av standardisert ekstrakt av *F. platyphylla* på apomorfin-indusert endringer i prepulsinhibering og lokomotorisk aktivitet hos rotter. I eksperimentet ble det benyttet saltvann, klozapin (5 mg/kg) og 12,5 mg/kg, 50 mg/kg og 100 mg/kg av *F. platyphylla* ekstraktet. Resultatene viste at lokomotorisk aktivitet ble vesentlig redusert ved bruk av ekstraktet, mens det ikke påvirket basal prepulsinhibering. Alt dette indikerer at *F. platyphylla* inneholder psykoaktive ingredienser med neuroleptiske egenskaper (Chindo, Kahl et al. 2015).

## 4 Materialer og metoder

### 4.1 Materialer

#### Liste over kjemikalier

Kjemikalier	Produsent
Aceton purum	VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, Frankrike
Boratbuffer (0,2 M natriumborat, pH 9)	Farmasøytisk institutt, Oslo, Norge
Cerium (IV) sulfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Deuterert metanol (CD <sub>3</sub> OD)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Destillert vann, MilliQ	Farmasøytisk institutt, Oslo, Norge
Diklormetan (DCM)	VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, Frankrike
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Tyskland
2,2-Difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Etyl acetat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Etanol (EtOH)	Farmasøytisk institutt, Oslo, Norge
Kloroform (CHCl <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Tyskland
Linolsyre	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
15-Lipoksygenase	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Metanol (MeOH)	VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, Frankrike
Quercetin	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Sephadex LH-20 gel	Pharmacia Biotech, Uppsala, Sverige

#### Liste over apparatur

Apparatur	Produsent
Analytisk tynnsjiktskromatografi (TLC)	
RP-18 F254S, aluminiumsplater	Merck, Darmstadt, Tyskland



Silikagel 60 F254, aluminiumsplater	Merck, Darmstadt, Tyskland
Elueringskar, glass	ukjent
End-to-End pipetter, 10µl	Drummond, Broomall, PA, USA
<b>Blender</b>	
High Performance Blender Machine Raw Pro X1500	RAW, Høvik, Norge
<b>Filter</b>	
Syringe filter 0,45 µm	Whatman, Little Chalfont, England
Acrodisc PTFE membran filter, 0,45µm, 4mm	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<b>Inndamping</b>	
E-LAB 2 Oljepumpe	Edwards, Crawley, England
miVac vakuumsentrifuge	Genevac, Ipswich, England
Rotavapor med varmebad HB10/RV10	IKA, Staufen, Tyskland
Frysetørker, Alpha 1-4 LD	Christ, Osterode am Harz, Tyskland
<b>Mikroplateleser</b>	
SpectraMax 190 microplate reader	Molecular Devices, San Jose, CA, USA
<b>NMR-spektroskopi</b>	
Bruker AV II 400	Bruker, Rheinstetten, Tyskland
Bruker AV III 400	Bruker, Rheinstetten, Tyskland
Bruker AV II 600	Bruker, Rheinstetten, Tyskland
<b>Analytisk HPLC</b>	
La Chrom Elite HPLC system	Hitachi, Tokyo, Japan
La Chrom Elite diode array detector	Hitachi, Tokyo, Japan
Kinetex 5u C18 100A, 150 x 4,6 mm kolonne	Phenomenex, Torrance, CA, USA
<b>Preparativ HPLC</b>	
Varian Prostar Polaris, modell 210 pumpe	Varian, Palo Alto, CA, USA
Kinetex C18 100A kolonne (150 mm x 21,2 mm, 5µm)	Phenomenex, Torrance, CA, USA
<b>Ultralydbad</b>	
Ultrasonic cleaning bath USC300T	VWR, Leuven, Belgia

<b>UV-lampe</b>	
Minerallight lamp modell UVGL-58	Ultra-Violet Products, Upland, CA, USA
<b>UV-spektroskopi</b>	
Libra S32 PC	Biochrom, Cambridge, England
Kvartskyvetter	Hellma, Müllheim, Tyskland
<b>Vekt</b>	
BP 2215	Sartorius, Göttingen, Tyskland
<b>Varmeskap</b>	
Thermo electron T6	Heraeus, Langenselbold, Tyskland
<b>Flash kolonnekromatografi</b>	
Versaflash - Versapak C18 kolonne (40 x 75 mm)	Heraeus, Langenselbold, Tyskland
Biotage Selekt instrument - Biotage Sfär Silica D100 g (60 µm) - Biotage Sfär C18 D 60 g (30 µm)	Biotage, Uppsala, Sverige

## 4.2 Generelt

### 4.2.1 Innveiling

Overskålsvekt ble brukt ved innveiling av store mengder (> 10 g) og analysevekt ved innveiling av små mengder (< 10 g).

### 4.2.2 Inndamping

Rotavapor ble brukt for å fjerne løsemidler og vann under vakuum i ekstrakter, fraksjoner og delfraksjoner. Temperaturen på rotavapor var 40 °C for løsemidler, og 50-60 °C for vannholdige løsemidler. Det ble også brukt frysetørker på de fraksjonene som ikke kunne dampes inn ved hjelp av rotavapor. For å fjerne resterende løsemidler ble oljevakuumpumpe benyttet. I noen tilfeller ble også vakuumsentrifuge benyttet. Temperaturen på vakuumsentrifugen var også 40 °C.

### 4.2.3 Vannkvalitet

Til alle metoder ble benyttet vann fra Millipore-reanseanlegg.

### 4.2.4 Filtrering

Til preparativ og analytisk væskekromatografi (high performance liquid chromatography-HPLC) ble sprøytefiltre med porestørrelse på 0,45 µm benyttet. Til flashkromatografi ble prøvene filtrert gjennom glassinterfilter.

## 4.3 Separasjonsmetoder

### Kromatografi

Kromatografi er et fellesnavn på separasjonsmetoder som er basert på det prinsippet at stoffene som skal separeres fordeles mellom to forskjellige faser. Den ene fasen er mobil (beveger seg), og den andre fasen er stasjonær (beveger seg ikke, står stille). Mobilfasen kan enten være gass (gasskromatografi) eller væske (væskekromatografi). Det er flere eksperimentelle betingelser som påvirker separasjonen: type stasjonær- og mobilfase, lengde og diameter på kolonnen, trykk og temperatur, prøvens størrelse, osv. Det er viktig å velge en riktig kombinasjon av disse betingelsene for å kunne separere en blanding av stoffer. Stoffene beveger seg med forskjellig hastighet i kolonne. Forskjell i hastighet hos individuelle stoffer i kolonnen er avhengig av likevektsfordeling mellom stasjonær- og mobilfase (Greibrokk 1994).

Separasjonsprinsipper i væskekromatografi som er benyttet i oppgaven: adsorpsjonskromatografi (normalfasekromatografi og omvendt-fase-kromatografi) og eksklusjonskromatografi.

### 4.3.1 Sephadex LH-20 gel kolonnekromatografi

#### Prinsipp

Dette er en type av eksklusjonskromatografi hvor stoffene separeres etter deres molekylstørrelse (figur 4.1). Det finnes forskjellige typer av Sephadex geler som lages ved tverrbinding av dekstrankjeder med epiklorhydrin. Sephadex LH-20 består av 3-hydroksypropylert Sephadex G-25 (den har mindre hydrofil karakter enn Sephadex G-25). Den brukes ofte for blandinger av vann og organiske løsningsmidler, eller utelukkende i organiske løsningsmidler og får da karakter av normalfase fordelingskromatografi. På grunn av sterke adsorptive egenskaper, brukes LH-20 ofte for aromatiske forbindelser (Greibrokk 1994).



**Figur 4.1** Sephadex LH-20 kolonne

#### Reagenser

Aceton

Metanol

Vann

#### Utstyr

Sephadex LH-20 kolonnemateriale

Stativ

Kolonne (40 x 5 cm)

Erlenmeyerkolbe 300 ml

Glass pasteurpipette

Glasstrakt

Glassull

## **Prosedyre**

1. Sephadex LH-20 suspenderes og svelles i ønsket starteluent
2. Kolonnen monteres vertikalt på stativet og glassull legges i bunnen av kolonnen
3. Kolonnen fylles med oppsvulget kolonnematriks. Det er viktig å påse at det ikke forekommer ujevnheter eller luft i pakkingen for å oppnå god separasjon
4. Glassull legges på toppen av kolonnematriksen
5. Glasstrakt med elueringsmiddel monteres over kolonnen
6. Kolonnen kondisjoneres med starteluenten
7. Prøven løses i egnet løsemiddel/løsemiddelblanding og når væsknivået står likt som kolonnematerialet appliseres prøven langs veggen på toppen av kolonnen med en pipette, for å sikre en jevn fordeling over kolonnematriksen
8. Stoffmolekylene elueres ut av kolonnen ved hjelp av elueringsmidler med økende løsemiddelstyrke
9. Fraksjoner samles opp i erlenmeyerkolber

## 4.3.2 Flash kolonnekromatografi

### Prinsipp

I flashkolonnekromatografi som ble benyttet i denne oppgaven ble det brukt ferdigpakke­de kolonner med normalfase silika eller omvendt fase C18 som stasjonær fase. Prinsippet baseres på adsorpsjonskromatografi hvor de appliserte stoffene skilles fra hverandre avhengig av de tiltrekkende kreftene med stasjonærfasen. Molekylene separeres ved å fordele seg mellom to faser, mobilfase (som beveger seg) og stasjonær fase (som holder seg i ro). Mekanisme av separasjonen på omvendt fase C18 materiale er basert på hydrofobiske interaksjoner, og de viktigste kreftene er van der Waals-krefter. Disse interaksjoner øker med molekylstørrelsen. Hydrofobe stoffer, mettede forbindelser og uioniserte forbindelser retarderes mest ved å bindes til stasjonærfasen. Derfor har de lengst retensjonstid og kommer sist ut av kolonnen. Stasjonær fase er hydrofob, og mobilfase er mer polar vandig løsning. Kolonnematerialer som er i bruk som stasjonær fase i omvendt-fase kromatografi er vanligvis laget av silika som er derivatisert for å få en hydrofob overflate på silikapartiklene. De mest brukte stasjonærfaser er de som er laget av silikabaserte C<sub>18</sub>-materialer (octadecyl). Den består av hydrokarbonkjeder med 18 karbonatomer, og er den mest hydrofobe fasen. Mobilfase består av en blanding av vann og en organisk modifikator, som for eksempel metanol eller acetonitril (metanol er billigere og mindre toksisk enn den andre). Styrken på mobilfasen styres av hvilken mengde og type av organisk modifikator som er i bruk. Med et økende innhold av organisk modifikator avtar retensjon (2009). I oppgaven ble det benyttet to ulike instrumenter for flashkromatografi: VersaFlash med Versapak C18 kolonne og Biotage Selekt med Biotage Sfar C18 og silika kolonner.

### Reagenser

Diklormetan

Etylacetat

Metanol

Destillert vann

Aceton

## **Utstyr**

Versapak C<sub>18</sub>-kolonne (40 x 75 mm)

Pumpe

VersaFlash stativ

Biotage Sfar Silica D 100 g (60 µm) kolonne

Biotage Selekt instrument

Dramsglass

Begerglass

Sprøyte og sprøytefilter

## **Prosedyre**

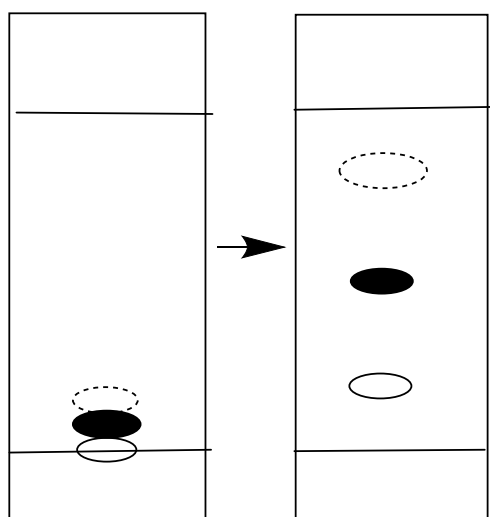
1. Prøven løses i en liten mengde med egnet løsemiddel (prøveløsning)
2. Kolonnen kondisjoneres med ønsket mobilfase lik 3 ganger kolonnevolum
3. Prøveløsningen filtreres for å fjerne partikler, og appliseres på kolonnen
4. Mobilfase med økende løsemiddelstyrke benyttes for å eluere ut alle stoffer
5. Fraksjoner samles opp i dramsglass
6. Kolonnen vaskes med 100 % metanol

### 4.3.3 Tynnsjiktchromatografi (TLC, thin-layer chromatography)

#### Prinsipp

TLC regnes å være den enkleste av de kromatografiske teknikkene. Dette er en væskechromatografisk separasjonsmetode hvor en væske brukes som mobilfase, og stasjonærfase ligger som et tynt sjikt på en flate. Kommersielle plater har et underlag som kan være av glass, plast eller metall. Silika er den mest brukte stasjonærfasen. Det kan brukes mobilfaser med relativt høyt damptrykk, og også de som vil interferere i en kolonnechromatografisk separasjon. Prøver og standarder løses i et løsningsmiddel, og påsettes som flekker på stasjonærfasen. Platen settes ned i et lukket kar med mobilfasen etter at løsningsmidlet er fordampet. Etter å ha kommet i kontakt med platen, trekkes mobilfasen oppover platen ved hjelp av kapillærkrefter. På denne måten transporteres komponentene i prøvene med forskjellig hastighet og blir separert. Vandringen til et stoff beskrives med retensjonsfaktor,  $R_f$  (figur 4.2) :  $R_f = L_s/L_{mf}$ , hvor  $L_s$  er stoffets vandringsavstand fra startsonens senter(start-linjen) til flekkens senterpunkt, og  $L_{mf}$  er avstanden fra startlinjen til mobilfasefronten (Greibrokk 1994).

front

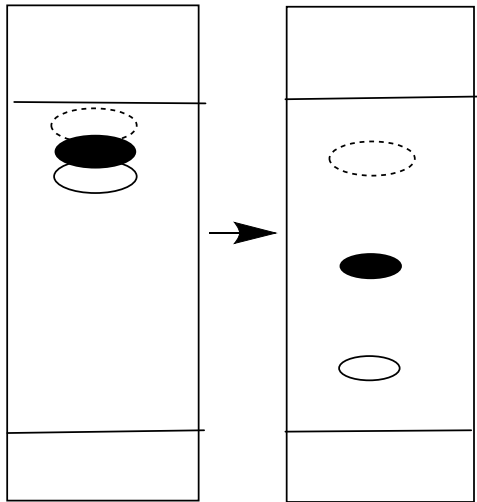


Start

For lave  $R_f$ -verdier (for høy retensjon) → Mer polar MF → sterkere MF → lavere retensjon



front



Start

For høye  $R_f$ -verdier (for lav retensjon) → Bruk mindre polar MF ("svakere MF")-få sterkere retensjon/riktigere (lavere)  $R_f$

**Figur 4.2:** Forhold mellom type av mobilfase og retensjonsfaktor

## Reagenser

Metanol

Destillert vann

## Utstyr

Elueringskar med tett lokk

TLC-plate

UV-lampe med lyskasse

Mikropipette (20  $\mu$ l)

## Prosedyre

1. Mobilfase overføres til et elueringskar og lokket settes på i ca. 10 minutter for å få en mett atmosfære
2. Det markeres på TLC-platen hvor prøvene skal påføres med minst 1 cm avstand mellom hver prøve
3. Prøvene, som er løst i egnet løsemiddel, appliseres på platen med mikropipette
4. Etter at alt løsemidlet har tørket bort settes platen ned i elueringskaret med prøvekannten nederst, slik at mobilfasen i karet er lavere enn høyden på de appliserte prøvene på platen. Lokket settes på
5. TLC-platen tas ut fra karet når mobilfasen har migrert ca. 1-2 cm fra toppen, og frontlinjen markeres
6. Mobilfasen dampes av ved lufttørkning
7. Platen settes under en UV-lampe og observeres med langbølget (366 nm) og kortbølget (254 nm) UV-stråling. Fargede stoffer vil være synlige uten UV-lys
8. Flekkene markeres og sprayes med fargereagens, eks. Ceric-spraying, for påvisning av ikke-synlige stoffer
9. Platen varmes opp ved 105 °C i 5 minutter

### 4.3.4 NMR-spektroskopi ( Nuclear Magnetic Resonance)

#### Prinsipp

NMR (kjernemagnetisk resonansspektroskopi) er den mest anvendte metoden til strukturoppklaring av organiske forbindelser. Denne metoden baseres på interaksjoner mellom elektromagnetisk stråling og atomkjerner. Noen atomer, som hydrogen ( $^1\text{H}$ ) og karbonisotopen  $^{13}\text{C}$  har kjerner som oppfører seg som om de var magneter som spinner rundt sin egen akse. Det finnes mange andre atomer som har kjernespin, som for eksempel  $^{19}\text{F}$ ,  $^{15}\text{N}$

og  $^{31}\text{P}$ . Når kjernene blir utsatt for et ytre magnetfelt, kan de orientere seg på 2 måter i forhold til det ytre magnetfeltet: enten med feltet ( $\alpha$ -spinn-tilstand) eller mot feltet ( $\beta$ -spinn-tilstand). De som blir orientert ved  $\alpha$ -spinn-tilstand har lavere energi enn de som er orientert ved  $\beta$ -spinn-tilstand. Hvis energi blir tilført i form av et roterende elektromagnetisk felt til kjernen som finnes i  $\alpha$ -spinn-tilstand, vil disse kunne absorbere energien. De hopper da opp fra et lavt til et høyere,  $\beta$ -spinn-tilstand. Etter hvert relaxeres disse kjernene tilbake til  $\alpha$ -spinn-tilstand. De gir da elektromagnetisk stråling som blir registrert ved hjelp av instrumentet. En kurve som viser karakteristiske energiabsorpsjonsfrekvenser og intensiteter for en prøve i et magnetfelt kalles NMR-spektrum. Disse brukes for å få informasjon om struktur av alle molekylene som vi ønsker å studere. Antall signaler i et spektrum gir oss informasjon om hvor mange ulike protoner som finnes i et molekyl. Posisjonen i spektret langs x-aksen kalles for kjemisk skift ( $\delta$ ), og angis i enheten parts per million (ppm). Et signal med høy frekvens ligger mer mot venstre på x-aksen, den er mer *downfield*. Mens et signal med lav frekvens ligger mer mot høyre på x-aksen, den er mer *upfield*. Med andre ord, et *downfield* signal har en høy ppm-verdi og et *upfield* signal har en lav ppm-verdi. Elektrontettheten rundt en kjerne er avhengig av lokalisering av grupper som kan tiltrekke elektroner fra kjernen, spesielt hvis de er bundet til samme karbon. Sirkulering av delokaliserte elektroner i dobbeltbindinger kan enten skjerme eller deskjerme nærværende kjerner. Jo mindre elektrontetthet er, desto mindre blir skjerming, og det blir høyere frekvens på NMR-signalet (Solomons T.W.G., Fryhle et al. 2017).

## **$^1\text{H}$ -NMR spektre**

$^1\text{H}$  NMR er en metode i NMR spektroskopi som tar hensyn til hydrogen-1- kjerner i molekylene av et stoff for å bestemme strukturen av den. Protoner fra løsemiddel som skal brukes til en prøve må ikke gi minimalt signal. Derfor brukes forskjellige deutererte løsemidler i NMR-spektroskopi, som  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{CDCl}_3$ . Proton NMR spektra av de fleste organiske forbindelser er karakterisert ved kjemiske skift i område +14 til -4 ppm og ved spin-spin kobling mellom protoner. Molekylær struktur og løsningsmiddel bestemmer verdien av kjemisk skift, sammen med temperatur, magnetfelt hvor spektret blir registrert og andre nærliggende funksjonelle grupper. Integreringskurve brukes for å se hvor mange protoner som finnes i hvert signal. Høyden av integralkurven er proporsjonal med arealet under signalet, og størrelsen på signalet er proporsjonal med antall hydrogenatomer i hvert signal. Et signal kan være splittet i flere topper. Avstand mellom de toppene kalles for koblingskonstant, J. Den

måles i Hertz, og den ligger mellom 0-18 Hz. Signaler fra koblede protoner har lik koblingskonstant (Claridge 2015).

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

Karbon spektre er ofte lettere å tolke enn proton spektre. Dette er fordi i et organisk molekyl gir hvert unikt karbon kun en topp i proton dekoplete <sup>13</sup>C NMR spektre. Signalene ligger fra 0 til ca. 220 ppm i δ-skalaen. De kjemiske skift verdiene blir avhengige av elektrontettheten rundt kjerner (Solomons T.W.G., Fryhle et al.).

## **Todimensjonale NMR metoder benyttet i oppgaven**

**HMBC** er en todimensjonal (2D) metode som viser korrelasjoner mellom protoner og karboner som er 2, 3 eller flere bindinger vekk fra hverandre (Claridge 2015).

**HSQC** er også en todimensjonal (2D) metode som viser hvilke protoner som er bundet direkte til hvilke karboner. Proton-spektret vises på den ene aksene og karbon-spektret på den andre aksene (Claridge 2015).

**COSY** er en todimensjonal (2D) metode som viser korrelasjoner mellom protoner som kobler med hverandre. <sup>1</sup>H spektret er vist på begge aksene. Signaler vises i form av punkter langs en diagonal linje i spektre, og hvis to protoner danner kryssstopper som står vinkelrett på diagonallinjen, så er de koblet til hverandre (Claridge 2015).

## **Reagenser**

TMS (intern standard)

Deuterert metanol (CD<sub>3</sub>OD)

Deuterert kloroform (CDCl<sub>3</sub>)

## **Utstyr**

NMR-spektrometer

NMR-rør med lokk

## **Prosedyre**

1. En liten mengde prøve (normalt 1-20 mg) løses i ca. 1 ml deuterert løsemiddel (=prøveløsningen)
2. Prøveløsningen overføres til NMR-rør (skal fylle omtrent 4 cm opp i røret)
3. Prøven analyseres i NMR-spektrometer

### **4.3.5 UV-spektroskopi**

#### **Prinsipp**

UV-spektrofotometri er en offisiell metode i den europeiske farmakopéen. Den brukes for kvalitativ kontroll av aktive ingredienser, hjelpestoffer og farmasøytiske produkter. Prøven som skal analyseres løses opp først i et løsemiddel. Den settes i en kyvette som kan være laget av glass, plastikk eller kvarts. For måling innen UV-område brukes kvartskyvetter fordi glass og plastikk absorberer elektromagnetisk stråling. Ved UV-spektroskopi er det viktig å velge et egnet løsemiddel. Det er viktig at analytt er løselig i det løsemidlet som brukes. Det løsemidlet må også være transparent for stråling ved det anvendte bølgelengdeområdet. Analytten må være stabil i det utvalgte løsemidlet. For å få mest sensitiv kvalitativ måling bør brukes den bølgelengden hvor analytten absorberer maksimalt. Da oppnår man best lineær kalibreringskurve. Kalibreringskurven burde være i absorptionsområde mellom 0,2 og 0,8 (Pedersen-Bjergaard 2012).

#### **Reagenser**

Løsemiddel

#### **Utstyr**

Plastspatel (til omrøring i kyvetten)

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

### **Generell prosedyre for måling av reaksjoner med UV-apparat**

1. Spektrofotometeret innstilles ved ønsket bølgelengde
2. En blindprøve plasseres i blindprøvebeholder
3. Prøven løses i egnet løsemiddel, overføres til kvartskyvettene (vanligvis 3 paralleller), og omrøres
4. Absorbansmåling startes umiddelbart

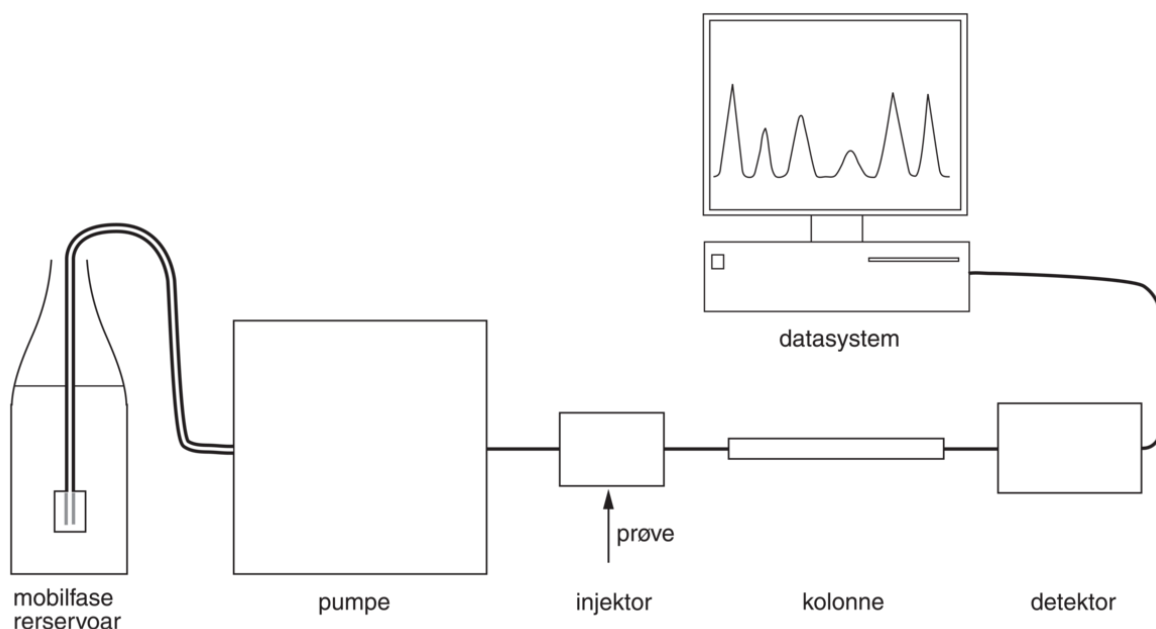
### 4.3.6 Høytrykksvæskekromatografi (HPLC)

Væskekromatografi er den mest brukte metoden til å bestemme legemidler i farmasøytiske preparater og i biologisk materiale (Greibrokk 1994). Denne metoden er også sentral i naturstoffkjemi.

Ved bruk av analytisk HPLC får vi informasjon om stoffer i prøven, og med preparativ HPLC isoleres stoffer fra prøven (Satyajit 2012). Preparativ isolering av rene stoffer ved hjelp av preparativ HPLC inkludere også bruk av analytisk HPLC hvor vi bruker en liten mengde prøve for å utvikle en passende metode først (Satyajit 2012).

#### Prinsipp

Apparaturen til HPLC (figur 4.3) består av reservoar for mobilfase, pumpe, injektor, kolonne, detektor, oppsamlingskar forbrukt mobilfase, og skriver. Den brukes både til analytisk og preparativ separasjonsmetode. I tillegg har preparativ HPLC en fraksjonssamler.



**Figur 4.3:** Apparaturen til HPLC

Mobilfase er en væske som presses gjennom en kolonne pakket med et materiale som retarderer stoffene. En prøve med stoffene injiseres i strømmen av mobilfase før kolonnen. De

beveger seg gjennom kolonnen sammen med mobilfase og blir detektert med en detektor. Kolonnene er ofte 5-25 cm lange og pakket med stasjonærfase. Det brukes mindre partikler i kortere kolonner. Stoffene separeres i kolonnen, og spredning av stoffene bør være så liten som mulig. Separasjonsprinsippet er enten omvendt-fase-kromatografi, normalfase-kromatografi eller eksklusjonskromatografi. Mobilfase pumpes med konstant hastighet gjennom kolonnen (oftest 0,5-3 ml/min). Væsker som benyttes til mobilfaser skal være transparente med tilfredsstillende renhetsgrad, lav viskositet og med lav toksisitet. Pumpen må være i stand til å pumpe væske med konstant hastighet mot et høyt trykk som blir mellom 30 og 300 bar. Når man lager en HPLC prøve, velger man et løsemiddel som er blandbar med mobilfase. Det injiseres vanligvis volum mellom 5 og 100 µl. Detektoren gir et elektrisk signal for de stoffene som detekteres. Signalet er proporsjonalt med enten konsentrasjon av stoff i mobilfase eller med massen av stoff i mobilfase. På denne måten blir det mulig å utføre kvantitative analyser som baseres seg på måling av topparealer eller topphøyder. Det er flere typer detektorer som brukes, som UV-, fluorescens-, elektrokjemisk-, brytningsindeks og massespektrometer-detektorer. UV detektoren brukes til kvalitetskontroll av rensstoffer og farmasøytiske preparater. Det er en selektiv detektor for stoffer som absorberer UV stråling ved bølgelengder over 190 nm (Greibrokk 1994) .

## **Preparativ HPLC**

### **Utstyr**

HPLC instrument med UV detektor, fraksjonssamler og tilhørende utstyr

Kolonner

Diverse: vialer, reagenserør, sprøyte, filter

### **Reagenser**

Destillert vann

Metanol av HPLC kvalitet

Trifluoreddiksyre (TFA)



## Prosedyre

1. Purge hver pumpe i 1 min. Ventilen må åpnes før purging og lukkes etter purging.
2. Egnet kolonne kondisjoneres med egnet starteluent i 15-20 min avhengig av kolonnen.
3. Lage eller endre metode i programmet med hensyn til kolonne, pumpe, mobilfaser, detektor og fraksjonssamler osv.
4. Prøven løses i minst mulig volum ( $< 1$  ml) og må være oppløst, helst med en løsemiddelsammensetning som er lik starteluenten.
5. Prøveløsningen filtreres med et sprøytefilter over til en vial for å fjerne partikler.
6. Filtrert prøveløsning ( $< 1$  ml) trekkes opp med en glass-sprøyte, og injiseres i injeksjonsloopen.
7. Når stoffer i prøveløsningen kommer ut av kolonnen og detekteres, kan fraksjoner separeres automatisk med bestemte tidsintervall, eller manuelt ved å få programmet til å bytte til neste fraksjon avhengig av topper som dukker opp i kromatogrammet.
8. Ved avslutning vaskes kolonnen i 30 min med 50 % metanol-vann blanding eller med løsemidler lik slutteluenten. Loopen må også skylles ved å injisere full sprøyte (vanligvis med MeOH) tre ganger, hvor hendelen vris noen ganger mellom `loop` og `inject`.

## Analytisk HPLC

### Utstyr

HPLC apparat tilkoblet DAD-detektor og tilhørende utstyr

Kolonner

Diverse: vialer, reagensrør, sprøyte, filter

## Reagenser

Destillert vann

Metanol av HPLC kvalitet

Trifluoreddiksyre (TFA)

## Prosedyre

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

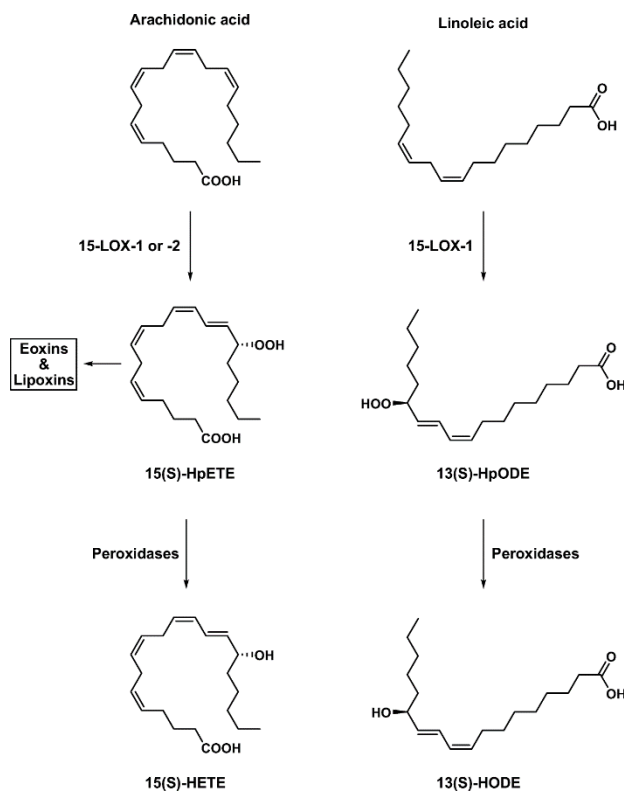
## 4.4 Metoder for måling av radikalscavenger og enzymhemmende aktivitet

### 4.4.1 15- Lipoksygenasehemming (15-LO-hemming)

#### Prinsipp

Lipoksygenaser (LO) er lipidperoksyderende enzymer som kan finnes både i planter, sopp, invertebrater og pattedyr (Czapski, Czubowicz et al. 2012). De er familie av ikke-hem jernholdige enzymer som setter inn oksygen i 1,4-flerumettede fettsyrer (arakidon- og linolsyre), og produserer tilsvarende hydroperoksy derivater (Sadeghian and Jabbari 2016).

Det er flere typer av LO som 5-LO, 12-LO, 15-LO. Tallet angir hvilken posisjon i arakidonsyre som peroksideres (figur 4.4) (Sadeghian and Jabbari 2016).



Figur 4.4: Peroksidering av arakidon- og linol-syre

15-Lipoxigenase-1 (LOX-1) har en viktig rolle i biosyntesen av eoxiner som er proinflammatoriske mediatorer i eosinofiler og mastceller (Sadeghian and Jabbari 2016). Dette enzymet er trolig en mediator i neurodegenerative sykdomer, som hjerneslag, Alzheimers og Parkinsons sykdom (Sadeghian and Jabbari 2016). Enzymet 15-LO inngår i LDL-oksidering (low density lipoprotein), som spiller en viktig rolle for utvikling av aterosklerose (Sadeghian and Jabbari 2016), og er involvert i mange andre sykdommer som diabetes, fedme, nyresykdommer, osv. (Lyckander and Malterud 1996, Sadeghian and Jabbari 2016). Det er stadig flere bevis som indikerer at økende aktivitet av 15-LOX-1 er i direkte korrelasjon med graden av malignitet i flere krefttyper (Orafaie, Matin et al. 2018).

Enzymhemmingsgraden beregnes ved hjelp av denne formelen: (Lyckander and Malterud 1996)

$$\% \text{ hemming} = 100 \times [(dA_1/dt) - (dA_2/dt) / (dA_1/dt)]$$

$dA_1/dt$ : verdi for absorbansøkning ved 234 nm per tidsenhet uten testsubstans tilsatt

$dA_2/dt$ : verdi for absorbansøkning ved 234 nm per tidsenhet med testsubstans tilsatt

## Reagenser

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

B: Substratløsning. 50  $\mu$ l linolsyre og 150  $\mu$ l etanol blandes, deretter tilsettes 50 ml A til blandingen. 10 ml av blandingen fortynnes med 150 ml A. Denne løsningen (B) lages kort tid før bruk.

C: Enzymløsning. 15-Lipoksygenase (15-LO) løses i A til en konsentrasjon på ca. 10 000 enheter/ml. Løsningen lages rett før bruk og oppbevares på is under hele forsøket

D: Testsubstans. Stoff løses i DMSO i ønsket konsentrasjon.

Quercetin (positiv kontroll)

DMSO

## Utstyr

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Plastspatel

Pipetter/multipipette

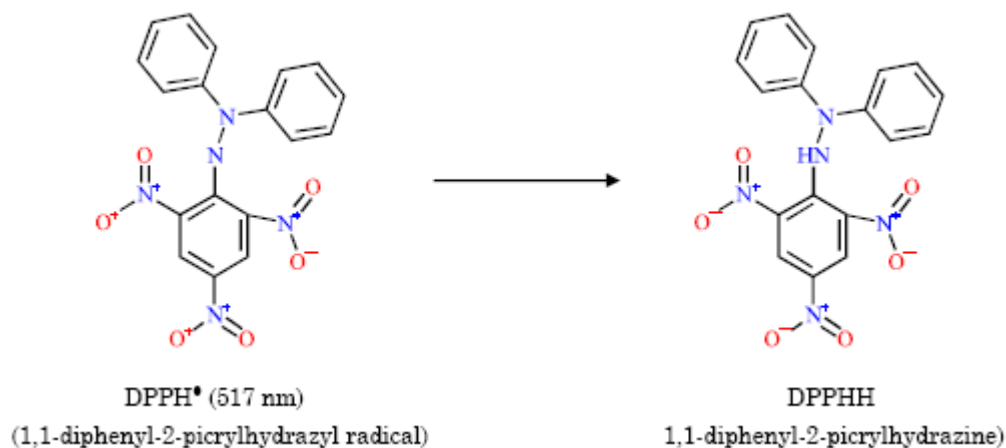
## Prosedyre

1. Testsubstanser løses i DMSO til ønsket konsentrasjon
2. Spektrofotometer nullstilles med den blindprøve bestående av 0,950 ml A, 2,00 ml B og 0,050 ml DMSO i en kvartskyvette. Blandingen omrøres godt med plastspatel. Kyvetten skal stå i blindprøveholderen under hele forsøket.
3. Blank prøve (uten hemmer): 0,900 ml A, 2,00 ml B og 0,050 ml DMSO blandes i kvartskyvette (3 paralleller). Ved tid=0 tilsettes 0,050 ml C og blandingen omrøres godt med en plastspatel. Absorbans måles ved 234 nm fra 30 til 0 sekunder, etter tilsetning av C. Økningen i absorbans bør være mellom 0,3-0,5 AU/min. For å kontrollere stabiliteten av enymaktiviteten, bør dette punktet gjentas etter hver 3.måleserie med testløsninger.
4. Testløsning (med hemmer): 0,900 ml A, 2,00 ml B og 0,050 ml D blandes i kvartskyvette (3 paralleller). 0,050 ml C tilsettes ved tid=0 og blandingen omrøres godt med plastspatel. Absorbansøkning måles ved 234 nm fra 30 til 90 sekunder, etter tilsetning av C
5. Quercetin brukes som positiv kontroll og testes som under punkt 4, men D byttes ut med quercetinløsning.
6. Innholdet i kvartskyvettene kastes etter hver måling, og kyvettene skylles med buffer A.

## 4.4.2 DPPH-scavenging

### Prinsipp

DPPH fritt radikal er kjent som et stabilt nitrogen radikal, med en dyp fiolett farge i løøsning og det viser sterkt absorpsjonsbånd ved 517 nm. Det uparede elektronet i DPPH kan delokaliseres og molekylene unngår dimerisering (Molyneux 2004). DPPH-scavenging analysen er en svært vanlig brukt analyse for estimering av radicalscavengeraktiviteten til en forbindelse. Den baserer seg på prinsippet av reduksjon av DPPH (difenylikrylhydrazyl) fritt radikal ved å kunne akseptere et hydrogenatom fra scavenger-forbindelsen (figur 4.5) (Ahmad, Jumbri et al. 2018). Den reduserte formen mister sin fiolette farge og går over til en gul farge ( på grunn av pikrylgruppen som fremdeles er tilstede) (Ahmad, Jumbri et al. 2018). Dette fører også til nedgang i absorpsjonsverdi ved 517 nm (Molyneux 2004). Quercetin er en god scavenger som er stabil og rimelig. Den brukes ofte som positiv kontroll (Maiga, Malterud et al. 2006).



**Figur 4.5:** Omdannelse av DPPH til DPPH-H

Prosent radikalscavenging kan beregnes ved hjelp av følgende formel (Wangensteen, Samuelsen et al. 2004):

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

$A_0$ : startabsorbans (absorbans før tilstning av testløsning/positive kontroll)

$A_t$ : absorbans med testløsning/positiv kontroll etter 5 minutter reaksjonstid

$A_p$ : absorbans etter 5 minutter reaksjonstid hvis alt DPPH er blitt scavenget. Denne verdien settes ofte lik 0.

Aktiviteten angis som  $IC_{50}$ , det vil si konsentrasjonen som gir 50 % scavenging (Wangensteen, Samuelsen et al. 2004).

## **Reagenser**

Metanol

DPPH

Dimetylsulfoksid (DMSO)

Quercetin

Testsubstans

## **Utstyr**

UV-spektrofotometer

Kyvetter

Plastspatler

Pipetter og multipipette

Erlenmeyerkolbe

## **Prosedyre**

1. DPPH-pulver løses i metanol (ca. 0,04 mg/ml) i en erlenmeyerkolbe og blandes
2. Testsubstanser løses i DMSO til ønsket konsentrasjon. Quercetin løst i DMSO eller metanol brukes som positiv kontroll
3. Spektrofotometer nullstilles med en blindprøve bestående av ca. 3 ml MeOH. Blindprøven skal stå i blindprøveholder under hele forsøket.

4. Startabsorbans måles ved 517 nm i 2,95 ml DPPH-løsning (3 paralleller).
5. Ved tid=0 tilsettes 50 µl av testløsning (ved hjelp av en multipipette) til hver parallell.
6. Absorbansmåling starter 30 sekunder etter tilsetning av testløsning. Absorbansen måles hvert 60. sekund i 5 minutter.
7. Innholdet i kyvettene kastes etter hver måling og kyvettene skylles med MeOH (3 ganger).

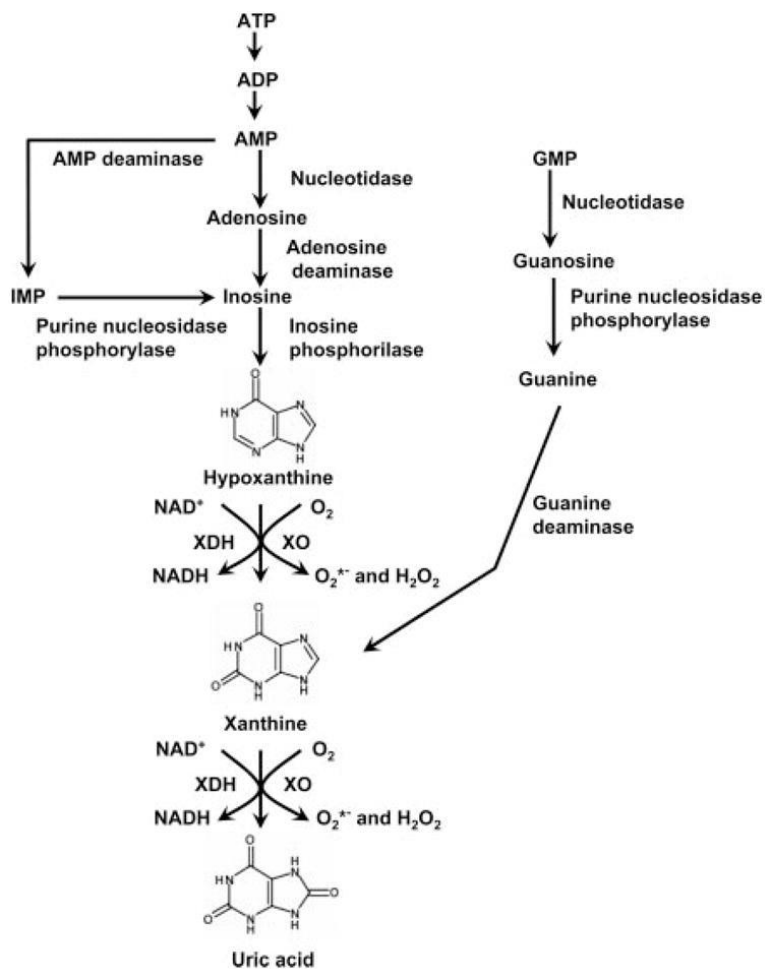
### 4.4.3 Xantin oksidase hemming (XO-hemming)

#### Prinsipp

Xantin oksidase (XO) og xantin dehydrogenase (XDH) er to enzymformer som går over i hverandre. De er kjent under felles navn xantin oksidoreduktase (XOR). Xantin oksidase er ansvarlig for dannelsen av urinsyre fra hypoxantin eller xantin (figur 4.6) (Pacher 2006). Både xantin oksidase og xantin oksidoreduktase kan katalysere denne reaksjonen ved hjelp av hypoxanthine eller xanthine som substrat, samt tilstedeværelse av oksygen og superoksid ( $O_2^{\cdot-}$ ) som er en reaktiv oksygenspecie dannes. Hyperurikemi er en tilstand med meget høy konsentrasjon av urinsyre i blodet. Urinsyre felles ut i vev da, og dette forårsaker urinsyregikt (podagra). Xantin oksidase spiller også en viktig rolle i forskjellige typer ischemi, vaskulære skader, inflammatoriske tilstander og kronisk hjerte svikt. XOR er inkludert i mange biokjemiske reaksjoner, som hydroksylering av forskjellige puriner, pteriner og aromatiske heterocykliske grupper, samt alifatiske og aromatiske aldehyder (Pacher 2006).

Allopurinol er en syntetisk XOD inhibitor som brukes i terapi mot urinsyregikt. Den blir raskt oksydert av XO til sin aktive metabolitt oxypurinol, som også hemmer XO (Wang, Shi et al. 2017). På grunn av mange bivirkninger som allopurinol gir (feber og kløe, leukocytose, eosinofili, vaskulitis, aseptisk meningitt, nefritt og nyresvikt), letes det etter nye medisiner som kan erstatte den (Pacher 2006).





**Figur 4.6:** Skjematisk diagram av purin nedbrytningsveien (Pacher 2006)

XO-hemmingsaktiviteten kan beregnes ved hjelp av denne formelen (Pham 2011):

$$\% \text{ hemming} = 100 \times \left[ \frac{(dA_1/d_t) - (dA_2/d_t)}{(dA_1/d_t)} \right]$$

$dA_1/d_t$ : verdi for absorbansøkning ved 290 nm per tidsenhet uten testsubstans tilsatt

$dA_2/d_t$ : verdi for absorbansøkning ved 290 nm per tidsenhet med testsubstans tilsatt

## Reagenser

A: Natriumkaliumfosfatbuffer 0,05 M, pH= 7,5, lagd av kaliumdihydrogenfosfat og natriumhydrogenfosfat

B: Substratløsning. 10 mg hypoxantin løses i 500 ml destillert vann

C: Enzymløsning. XO (xantin oksidase) løses i A til en konsentrasjon på ca. 1,8 enheter/ml. Løsningen lages rett før bruk og oppbevares på is under hele forsøket

D: Testsubstans

DMSO

Quercetin

Destillert vann

## Utstyr

UV spektrofotometer

Pipetter/multipipette

Kvartskyvetter

Plastspatel

## Prosedyre

1. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve bestående av 1,85 ml A, 0,050 ml DMSO, 1,00 ml destillert vann og 0,100 ml C. Blandingen omrøres godt med en plastspatel og skal stå i blindprøveholderen under hele forsøket
2. Blank prøve: 1,85 ml A, 0,100 ml C og 0,050 ml DMSO blandes i kvartskyvette (3 paralleller). Deretter tilsettes 1,00 ml B med påfølgende omrøring med plastspatel. Absorbansøkning ved 290 nm måles 30 sekunder etter tilsettingen av B, og absorbansøkning måles hvert 30. sekund i 5 minutter. Dette punktet gjennomføres etter hvert 3. måleserie med testløsninger for å kontrollere at enzymaktiviteten er stabil
3. Testløsning: 1,85 ml A, 0,100 ml C og 0,050 ml prøveløsning blandes i kvartskyvette (3 paralleller). Deretter tilsetes 1,00 ml B med påfølgende omrøring med plastspatel. Absorbansøkning ved 290 nm måles 30 sekunder etter tilsetting av B, og absorbansen måles hvert 30. sekund i 5 minutter

4. Quercetin brukes som positiv kontroll og skal testes på samme måte som under punkt 3, men her byttes 0,050 ml prøveløsning ut med quercetinløsning
5. Innholdet i kvartskyvettene kastes etter hver måling, og kyvettene skylles med destillert vann

# 5 Eksperimentell utførelse

## 5.1 Plantemateriale

Anvendt droge var stammebark av planten *F. platyphylla* innsamlet i Blendio, Mali. Plantematerialet ble lufttørket og pulverisert før det ble sendt til Norge. En prøve av det anvendte plantematerialet foreligger ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

## 5.2 Ekstraksjon av plantemateriale

Plantematerialet ble oppmalt på kommersiell blender RAW Pro X1500 og siktet på 1 mm sikt. Vekt etter sikting: 354 g.

### 5.2.1 Ekstraksjon med DCM

Plantematerialet (354 g) ble overført til en erlenmeyerkolbe på 5 L, tilsatt 1250 ml diklormetan (DCM), og ekstrahert ved maserering. Etter cirka 24 timer ble ekstraktet filtrert over i en kolbe. Prosessen ble gjentatt to ganger, og til sammen ble det ekstrahert 3 ganger med 1250 ml DCM hver gang. Etter ekstraksjonene ble DCM-løsningen overført til forhåndsveid rundkolbe, inndampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og ga et DCM-råekstrakt.

### 5.2.2 Ekstraksjon med metanol

Det DCM-ekstraherte plantematerialet ble overført til en stor erlenmeyerkolbe og tilsatt 1250 ml 100 % metanol. Etter cirka 24 timer ble den filtrert, og prosessen ble gjentatt to ganger til, og til sammen ble de ekstrahert 3 ganger med 1250 ml metanol hver gang. Etter ekstraksjonene ble metanol-fasen overført til forhåndsveid rundkolbe, inndampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe, og ga et MeOH-råekstrakt.

## 5.3 Analyse

### 5.3.1 NMR-spektroskopi

DCM-råekstrakt og MeOH-råekstrakt ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopi (se vedlegg nr. 1-4, side nr.). Som løsemidler ble brukt deuterert klorofom (DCM-råekstrakt) og deuterert MeOH (MeOH-råekstrakt).

### 5.3.2 Analytisk HPLC

MeOH-råekstrakt ble analysert på HPLC med DAD (diode array) detektor. Kinetex C18 kolonne (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm i.d.; Phenomenex) ble brukt. En liten mengde av ekstraktet ble løst i metanol til en konsentrasjon på ca 1 mg/ml. Prøveløsningen ble filtrert gjennom et sprøytefilter for å fjerne eventuell partikler. Deteksjonen ble foretatt ved 254 nm og 280 nm, 20  $\mu\text{l}$  ble injisert og mobilfasesammensetning er vist i tabell 5.1.

**Tabell 5.1:** Gradientsystem for analytisk HPLC av MeOH-råekstrakt

Tid (min)	% vann med 0,1% TFA (A)	% metanol (B)	Flowhastighet (ml/min)
0-3	98	2	1
3-45	98-5	2-95	1
45-53	5	95	1
53-55	5-98	95-2	1
55-60	98	2	1

### 5.3.3 TLC

DCM-råekstrakt ble løst i liten mengde av kloroform. Den ble applisert på TLC-plate (silikagel 60 F254). Etylacetat i kloroform (1:1) og 100 % etylacetat ble brukt som eluenter. Etter at TLC-platen var ferdig utviklet og tørket, ble den betraktet i kort- og langbølget UV-lys. Flekker ble avmerket og platen ble sprayet med Ceric-reagens etterfulgt av oppvarming ved 105  $^{\circ}\text{C}$ , 5 minutter.

## 5.4 Fraksjonering av MeOH-råekstrakt

### 5.4.1 Sephadex LH-20 kolonneseparering

Sephadex LH-20, 40 x 5 cm kolonne, ble brukt for fraksjonering av 11 g av MeOH-råekstrakt av *F. platyphylla*. Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (1:9). Råekstraktet ble løst i 120 ml MeOH-vann (2:1), og applisert på kolonnen. Mobilfasen var forskjellige blandinger av MeOH-vann og til slutt 70 % vandig aceton og ren aceton (tabell 5.2). Det ble samlet opp 13 fraksjoner (150-300 ml). Fraksjoner ble dampet inn til tørrhet ved hjelp av rotavapor eller frysetørker, og veiet. Fraksjonering resulterte i 13 fraksjoner: MeOH S1-S13.

**Tabell 5.2:** Mobilfaser benyttet ved Sephadex LH-20 separasjon av MeOH-råekstraktet

Mobilfase	Kolonnefraksjoner	Mengde (ml)
MeOH-vann (1:9)	1-3	1000
MeOH-vann (2:8)	4-6	1000
MeOH-vann (4:6)	7	250
MeOH	8-10	1000
Aceton-vann (7:3)	11-12	1000
Aceton	13	500

### 5.4.2 Analyse

#### 5.4.2.1 NMR-spektroskopi

Det ble tatt  $^1\text{H}$  NMR-spektra av fraksjonene MeOH S1-S13 i  $\text{CD}_3\text{OD}$  som løsemiddel. HMBC, HSQC og  $^{13}\text{C}$  (APT)-spektra ble tatt av fraksjon S4 (se vedlegg nr. 5-6, side nr.), APT av fraksjon S8 (se vedlegg nr.7-8, side nr.) og  $^{13}\text{C}$  av fraksjon S10 (se vedlegg nr. 9-11, side nr.).

## 5.5 Fraksjonering av DCM-råekstraktet

### 5.5.1 Flashkromatografi

DCM-råekstraktet, 9 g, ble løst opp i 30 ml DCM. En Biotage Sfar Silica D 100 g (60  $\mu\text{m}$ ) kolonne ble benyttet på et Biotage Selekt instrument. Kolonnen ble kondisjonert med 3 kolonnevolum (150 ml x 3) DCM. DCM-råekstraktet ble applisert på kolonnen. DCM-etylacetat i ulike blandingsforhold ble benyttet som mobilfase (tabell 5.3). Det ble samlet opp til sammen 75 fraksjoner a` 22 ml.

**Tabell 5.3:** Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av DCM-råekstraktet

Mobilfase	Mengde (ml)
DCM	150
DCM-etylacetat (0-100%)	900
Etylacetat	600

### 5.5.2 TLC

Kolonnefraksjonene (DCM 1-75) ble applisert på TLC plater (silikagel 60 F254) med ulike mobilfasesammensetning av etylacetat og DCM (tabell 5.4)

**Tabell 5.4:** Mobilfase benyttet ved TLC analyse av DCM råekstrakt

Mobilfase	Kolonnefraksjoner
Etylacetat-DCM (1:4)	1-43
Etylacetat-DCM (1:1)	44-75

Etter at TLC-platene ble ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kortbølget (254 nm) og langbølget (366 nm) UV-stråling. Flekker ble avmerket og platene ble sprayet med Ceric-reagens etterfulgt av oppvarming ved 105 °C, 5 minutter.

På bakgrunn av TLC-resultatet ble kolonnefraksjonene slått sammen og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette resulterte i fraksjoner DCM 1-18 (tabell 5.5).

**Tabell 5.5:** Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av DCM-råekstraktet

<b>Fraksjoner</b>	<b>Kolonnefraksjoner</b>
DCM-1	1-3
DCM-2	4-6
DCM-3	7
DCM-4	8
DCM-5	9-20
DCM-6	21
DCM-7	22-23
DCM-8	24
DCM-9	25-28
DCM-10	29
DCM-11	30-32
DCM-12	33-35
DCM-13	36-41
DCM-14	42-43
DCM-15	44-47
DCM-16	48-51
DCM-17	52-55
DCM-18	56-75

Fraksjonene DCM 2-9 ble applisert på TLC-plate (Si gel 60 F<sub>254</sub>, 0,2 mm).. Benyttet mobilfase var heksan-DCM 1:1. Etter at TLC-platen ble ferdig utviklet og tørket, ble den betraktet i kort- og langbølget UV-stråling. Flekker ble avmerket og platene ble sprayet med Ceric-reagens etterfulgt av oppvarming ved 105 °C, 5 minutter.



## 5.5.3 Analyse

### 5.5.3.1 NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp  $^1\text{H}$  NMR-spektra av alle fraksjonene DCM 1-18 med  $\text{CDCl}_3$  som løsemiddel. For fraksjonene 2-9 ble det tatt opp  $^{13}\text{C}$  (APT) spektra, og for fraksjonene 2, 3, 4, 5 og 7 ble det også tatt opp HSQC- og HMBC-spektra (se vedlegg nr. 12-25, side nr.).

## 5.6 Separasjon av fraksjon MeOH S2

### 5.6.1 Flashkromatografi

Fraksjon MeOH S2 (500 mg) ble forsøkt løst opp i 5 ml 80 % MeOH. Uløst stoff ble filtrert fra på glassinterfilter (ca. 280 mg). Versapak kolonne (40 x 75 mm) pakket med C18-materiale ble brukt for fraksjonering. Den ble kondisjonert med MeOH-vann (1:9) og eluert med en trinnvis gradient av MeOH-vann og til slutt aceton (tabell 5.6). Det ble samlet opp 10 fraksjoner à 30 ml.

Tabell 5.6: Mobilfaser benyttet ved VersaFlash C18 separasjon av fraksjon MeOH S2

Mobilfase	Kolonnefraksjoner	Mengde (ml)
MeOH-vann (1:9)	1-7	210
MeOH-vann (2:8)	8-9	60
MeOH-vann (4:6)	10-17	240
MeOH-vann (8:2)	18-24	210
MeOH	25-30	180
Aceton-vann (7:3)	31-36	180
Aceton	37-43	210

### 5.6.2 TLC

Kolonnefraksjonene (MeOH S2 1-43) ble applisert på RP-18 TLC-plater (silikagel 60 RP-18) med ulike mobilfasesammensetning av MeOH-vann (tabell 5.7).

**Tabell 5.7:** Mobilfaser benyttet ved TLC analyse

<b>Mobilfase</b>	<b>Kolonnefraksjoner</b>
MeOH-vann (1:9)	1-11
MeOH-vann (8:2)	12-14
MeOH-vann (4:6)	16-19
MeOH-vann (8:2)	20-32

Etter at TLC-platene var ferdige utviklet og tørket, ble de betraktet i kort- og langbølget UV-stråling. Flekker ble avmerket og platene ble sprayet med Ceric-reagens etterfulgt av oppvarming ved 105 °C, 5 minutter.

På bakgrunn av TLC-resultatet ble kolonnefraksjonene slått sammen og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette resulterte i fraksjonene MeH S2V1-S2V10 (tabell 5.8).

**Tabell 5.8:** Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av MeOH S2

<b>Fraksjoner</b>	<b>Kolonnefraksjoner</b>
MeOH S2V1	1
MeOH S2V2	2
MeOH S2V3	3-8
MeOH S2V4	9
MeOH S2V5	10-11
MeOH S2V6	12-15
MeOH S2V7	16-19
MeOH S2V8	20-24
MeOH S2V9	25-30
MeOH S2V10	31-43

## 5.6.3 Analyse

### 5.6.3.1 NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp  $^1\text{H}$  NMR-spektra av alle fraksjonene MeOH S2V1-S2V10 med  $\text{CD}_3\text{OD}$  som løsemiddel. I tillegg ble  $^{13}\text{C}$  NMR-spektra tatt opp av MeOH S2V1 og S2V10.

### 5.6.3.2 Analytisk HPLC

MeOH S2V1, S2V5 og S2V10 ble analysert på HPLC med DAD detektor. Kinetex C18 kolonne (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm i.d.; Phenomenex) ble brukt. En liten mengde av ekstraktene ble løst i metanol til en konsentrasjon på ca 1 mg/ml. 20  $\mu\text{l}$  ble injisert og mobilfasesammensetning er vist i tabell 5.9. Deteksjonen ble foretatt ved 280 nm og 320 nm.

**Tabell 5.9:** Gradientsystem for analytisk HPLC av MeOH S2V1, S2V5 og S2V

Tid (min)	% vann med 0,1 TFA (A)	% metanol (B)	Flowhastighet (ml/min)
0-3	98	2	1
3-20	20	80	1
20-25	20	80	1
25-26	98	2	1

### 5.6.3.3 Preparativ HPLC

Fraksjon S2V5 (10,7 mg) ble løst i 1 ml metanol. Prøveløsningen ble filtrert gjennom et sprøytefilter for å fjerne eventuelle partikler og injisert på en Kinetex 5u C18-preparativ HPLC kolonne (150 x 4,6 mm, Phenomenex). Deteksjonen ble foretatt ved 280 nm. Mobilfasen bestod av forskjellige blandinger av metanol-vann med 0,1% TFA tilsatt. Gradienteluering er presentert i tabell 5.10. Det ble samlet 29 kolonnefraksjoner a` ca. 20 ml.

**Tabell 5.10:** Gradientsystem for preparativ HPLC av fraksjon S2V5

<b>Tid (min)</b>	<b>% vann med 0,1 TFA (A)</b>	<b>% metanol (B)</b>	<b>Flowhastighet (ml/min)</b>
0-3	95	5	10
3-20	20	80	10
20-25	20	80	10
25-26	95	5	10

#### **5.6.3.4 NMR-spektroskopi av S2V5H24-29**

Det ble tatt opp  $^1\text{H}$  NMR spektra av fraksjonene S2V5H24, S2V5H25, S2V5H26, S2V5H27, S2V5H28 og S2V5H29.  $\text{CD}_3\text{OD}$  ble benyttet som løsningsmiddel.

## 5.7 Separasjon av fraksjon MeOH S4

### 5.7.1 Flashkromatografi

Fraksjon MeOH S4 (50 mg) ble løst opp i cirka 6,5 ml 10 % vandig MeOH. Versapak kolonne (40 x 75 mm) pakket med C18-materiale ble brukt for fraksjonering. Den ble kondisjonert med MeOH-vann (1:9) og eluert med en trinnvis gradient av MeOH-vann og til slutt aceton (tabell 5.11). Det ble samlet opp 39 fraksjoner a` ca. 30 ml.

**Tabell 5.11:** Mobilfaser benyttet ved Versaflash C18 separasjon av fraksjon MeOH S4

Mobilfase	Kolonnefraksjoner	Mengde (ml)
MeOH-vann (1:9)	1-2	60
MeOH-vann (2:8)	3-7	150
MeOH-vann (4:6)	8-18	330
MeOH-vann (8,5:1,5)	19-23	150
MeOH	24-33	300
Aceton-vann (7:3)	34-36	120
Aceton	37-39	120

### 5.7.2 TLC

Kolonnefraksjonene (MeOH S4, kolonnefraksjon 1-39) ble applisert på RP-18 TLC-plater (silikagel 60 RP-18) med ulike mobilfasesammensetning av MeOH-vann (tabell 5.12).

**Tabell 5.12:** Mobilfase benyttet ved TLC analyse

Mobilfase	Kolonnefraksjoner
Metanol-vann (1:9)	1-14
Metanol-vann (4:6)	15-27
Metanol	28-39

Etter at TLC-platene var ferdige utviklet og tørket, ble de betraktet i kort- og langbølget UV-stråling. Flekker ble avmerket og platene ble sprayet med Ceric-reagens etterfulgt av oppvarming ved 105 °C, 5 minutter.

På bakgrunn av TLC-resultatet ble kolonnefraksjonene slått sammen og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette resulterte i fraksjonene MeOH S4V1-S4V9 (tabell 5.13).

**Tabell 5.13:** Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av MeOH S4

<b>Frakjosner</b>	<b>Kolonnefraksjoner</b>
MeOH S4V1	1
MeOH S4V2	2-9
MeOH S4V3	10-11
MeOH S4V4	12-15
MeOH S4V5	16-20
MeOH S4V6	21-26
MeOH S4V7	27-28
MeOH S4V8	29-33
MeOH S4V9	34-39

## **5.7.3 Analyse**

### **5.7.3.1 NMR-spektroskopi**

Det ble tatt opp <sup>1</sup>H NMR-spektra av alle fraksjonene MeOH S4V1-S4V9 med CD<sub>3</sub>OD som løsemiddel. I tillegg ble <sup>13</sup>C, HSQC og HMBC spektra tatt opp av MeOH S4V2 (se vedlegg nr. 26-29, side 102-104).

### **5.7.3.2 Analytisk HPLC**

MeOH S4V9 ble analysert på HPLC med DAD detektor. Kinetex C18 kolonne (5 µm, 150 x 4,6 mm i.d.; Phenomenex) ble brukt. En liten mengde av ekstraktet ble løst i metanol til en konsentrasjon på ca 1 mg/ml. Deteksjonen ble foretatt ved 254 nm og 280 nm. 20 µl ble injisert og mobilfasesammensetning er vist i tabell 5.14.

**Tabell 5.14:** Gradientsystem for analytisk HPLC av MeOH S4V9

Tid (min)	% vann med 0,1% TFA (A)	% metanol (B)	Flowhastighet (ml/min)
0-3	60	40	1
3-20	55	95	1
20-25	5	95	1
25-26	60	40	1
26-30	60	40	1

### 5.7.3.3 Preparativ HPLC

Fraksjon MeOH S4V9 (ca. 6,1 mg) ble løst i 1 ml metanol. Preparativ HPLC ble utført som tidligere (se avsnitt 5.6.3.3). Deteksjonen ble foretatt ved 280 nm. Gradienteluering er presentert i tabell 5.15. Totalt ble det samlet 10 kolonnefraksjoner a` ca. 20 ml.

**Tabell 5.15:** Gradientsystem for preparativ HPLC av fraksjon S4V9

Time (min)	% vann med TFA (A)	% metanol (B)	Flowhastighet (ml/min)
0-5	95	5	15
5-25	95	5	15
25-30	20	80	15
30	20	80	15

Kolonnefraksjoner ble slått sammen til 5 hovedfraksjoner: S4V9H1-S4V9H5 (tabell 5.16). De sammenslåtte fraksjonene ble dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

**Tabell 5.16:** Sammenslåing av fraksjoner etter preparativ HPLC av MeOH S4V9

<b>Fraksjon</b>	<b>Kolonnefraksjon</b>
S4V9H1	1
S4V9H2	2-3
S4V9H3	4
S4V9H4	5-6
S4V9H5	7-10

### 5.7.3.4 NMR-spektroskopi

<sup>1</sup>H NMR-spektra ble tatt opp av fraksjon S4V9H1-S4V9H5. Det ble benyttet CD<sub>3</sub>OD som løsningsmiddel.

## 5.8 Separasjon av fraksjon MeOH S7 og S8

### 5.8.1 Flashkromatografi

Fraksjon MeOH S7 (0,49 mg) og MeOH S8 (0,17 mg) ble løst opp i 5 ml 100% metanol. Biotage Sfar C18 D 60 g (30 µm) kolonne ble benyttet på et Biotage Selekt instrument. Kolonnen ble kondisjonert med 3 kolonnevolum (85 ml x 3). Metanol-vann i ulike blandingsforhold ble benyttet som mobilfase (tabell 5.17). Blandingen av fraksjonene MeOH S7 og S8 ble applisert på kolonnen. Det ble samlet opp 43 fraksjoner a` 22 ml.

**Tabell 5.17:** Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av MeOH S7 og S8

<b>Mobilfase</b>	<b>Mengde (ml)</b>
Metanol 10 %	85
Metanol 10-100 %	442
Metanol 100 %	238



## 5.8.2 TLC

Kolonnefraksjonene (MeOH S<sub>7,8</sub> 1-43) ble applisert på RP-18 TLC-plater (silikagel 60 RP-18) med ulike mobilfasesammensetning av MeOH-vann (tabell 5.18).

**Tabell 5.18:** Mobilfase benyttet ved TLC analyse

Mobilfase	Kolonnefraksjoner
MeOH-vann (1:1)	1-20
MeOH	21-43

Etter at TLC-platene var ferdig utviklet og tørket, ble de betraktet i kort-langbølget UV-lys. Flekker ble avmerket og platene ble sprayet med Ceric-reagens etterfulgt av oppvarming ved 105 °C, 5 minutter. På bakgrunn av TLC-resultatet, ble kolonnefraksjonene slått sammen og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette resulterte i fraksjonene MeOH S<sub>7,8</sub>B1 til S<sub>7,8</sub>B14 (tabell 5.19).

**Tabell 5.19:** Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av MeOH S<sub>7</sub> og S<sub>8</sub>

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
MeOH S <sub>7,8</sub> B1	1-2
MeOH S <sub>7,8</sub> B2	3
MeOH S <sub>7,8</sub> B3	4
MeOH S <sub>7,8</sub> B4	5-8
MeOH S <sub>7,8</sub> B5	9-12
MeOH S <sub>7,8</sub> B6	13
MeOH S <sub>7,8</sub> B7	14
MeOH S <sub>7,8</sub> B8	15-17
MeOH S <sub>7,8</sub> B9	18-20
MeOH S <sub>7,8</sub> B10	21-22
MeOH S <sub>7,8</sub> B11	23-24
MeOH S <sub>7,8</sub> B12	25
MeOH S <sub>7,8</sub> B13	26-33
MeOH S <sub>7,8</sub> B14	33-43

## 5.8.3 Analyse

### 5.8.3.1 NMR-spektroskopi

Det ble tatt opp  $^1\text{H}$  NMR-spektra av alle fraksjonene S<sub>7,8</sub>B1 til S<sub>7,8</sub>B14 med CD<sub>3</sub>OD som løsemiddel.

## 5.9 Fraksjon MeOH S10

### 5.9.1 NMR spektroskopi av fraksjon S10

Det ble tatt opp  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$  NMR-spektra av fraksjon MeOH S10 med CD<sub>3</sub>OD som løsemiddel på AV II 600 instrument (se vedlegg nr. 9-10, side nr.).

### 5.9.2 Spalting av proanthocyanidinene

Den ble utført som tidligere beskrevet (Grønhaug 2006). S10 (200 mg) ble løst i 5 ml av en 1 % HCl-løsning i etanol. Blandingen ble rystet i 15 minutter og konsentrert til ca. 1/3 volum under N<sub>2</sub>. Denne løsningen ble applisert på en Sephadex LH20-kolonne (2,5 x 22 cm) pakket i etanol. Etanol ble brukt som eluent for fraksjon 1 (50 ml), 2-12 (30 ml hver), deretter ble 70 % vandig aceton brukt som eluent for fraksjon 13.

### 5.9.3 TLC

Fraksjonene ble tynnsjikt-kromatografert på celluloseplate (Macherey-Nagel, F<sub>254</sub>, 0,1 mm sjikttykkelse) med 6 % vandig eddiksyre som mobilfase. Flekker ble visualisert med kortbølget UV-stråling (254 nm). Ut fra TLC-resultatene ble fraksjon 6-7, 8-10 og 11-12 slått sammen. Samtlige fraksjoner ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og veid.

### 5.9.4 NMR-spektroskopi av proanthocyanidinene

$^1\text{H}$  NMR-spektra ble tatt opp av alle fraksjonene (600 MHz), og  $^{13}\text{C}$  (APT) NMR-spektra (150 MHz) av fraksjonene som ut fra  $^1\text{H}$  NMR så interessante ut.

## **5.10 Måling av radikal scavenger, og enzymhemmingseffekter**

### **5.10.1 DPPH-scavenging av DCM- og MeOH-råekstraktet**

Måling av DPPH-scavenging ble utført på både DCM- og MeOH-råekstraktene. Begge ekstraktene ble løst i DMSO til konsentrasjoner på 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml og 1,25 mg/ml. Dette tilsvarer sluttkonsentrasjoner i kyvette på 166,7, 83,3, 41,7, 20,8 µg/ml. Quercetin ble anvendt som positiv kontroll.

### **5.10.2 DPPH-scavenging av MeOH S1-S13 fraksjoner**

Måling av DPPH-scavenging ble utført på alle MeOH S fraksjonene (S1-S13), og på protocatechusyre. Alle fraksjonene ble først løst i DMSO til konsentrasjoner på 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml og 1,25 mg/ml. Dette tilsvarer sluttkonsentrasjoner i kyvette på 166,7, 83,3, 41,7, 20,8 µg/ml. Testen ble foretatt ved synkende konsentrasjoner inntil aktiviteten var forsvunnet. Quercetin ble brukt som positiv kontroll.

### **5.10.3 Lipoksygenasehemming av MeOH-råekstraktet**

Det ble utført 15-LO-hemmingstest kun på MeOH-råekstraktet siden DCM-råekstraktet ikke var løselig i noe løsemiddel som er blandbart med vann. Ekstraktet ble løst i DMSO til konsentrasjoner på 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml og 1,25 mg/ml. Dette tilsvarer sluttkonsentrasjoner i kyvette på 166,7, 83,3, 41,7, 20,8 µg/ml. Testen ble foretatt ved synkende konsentrasjoner inntil aktiviteten var forsvunnet. Quercetin ble anvendt som positiv kontroll.

### **5.10.4 Lipoksygenasehemming av MeOH S1-S13 fraksjoner og protocatechusyre**

Det ble utført 15-LO-hemmingstest på alle MeOH S fraksjoner (S1-S13, fra Sephadex LH20-kolonne), og på protocatechusyre. Fraksjonene ble løst i DMSO testet til konsentrasjoner på 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml og 1,25 mg/ml. Testen ble foretatt ved synkende konsentrasjoner inntil aktiviteten var forsvunnet. Quercetin ble brukt som positiv kontroll.

### **5.10.5 Xantin oksidase hemming av MeOH-råekstraktet**

Det ble utført XO-hemmingstest på MeOH-råekstraktet. Samme konsentrasjoner av råekstraktet i samme løsemiddel ble brukt som i 15-LO-hemmingstest. Quercetin ble brukt som positiv kontroll.

### **5.10.6 Xantin oksidase hemming av MeOH S1-S13 fraksjoner og protocatechusyre**

Det ble utført XO-hemmingstest på alle MeOH S fraksjonene (S1-S13) og på protocatechusyre. De ble testet ved samme konsentrasjoner som i 15-LO og DPPH forsøk. Quercetin ble brukt som positiv kontroll.

# 6 Resultater og diskusjon

## 6.1 Ekstraksjon av plantemateriale

### 6.1.1 Utbyttet av DCM-råekstraktet

Ekstraksjon av malt plantemateriale fra *F. platyphylla* med DCM ga et gul-grønt ekstrakt, og utbyttet ble 3,6 % (12,88 g fra 354 g plantemateriale).

### 6.1.2 Utbyttet av MeOH-råekstraktet

Ekstraksjon av malt, DCM-ekstrahert plantemateriale fra *F. platyphylla* med MeOH ga et rødt-brunt ekstrakt, og utbytte av ekstraktet ble 9,1 % (32,157 g fra 354 g plantemateriale).

## 6.2 Analyse

### 6.2.1 NMR-spektroskopi

$^1\text{H}$  NMR-spektret av MeOH-råekstraktet viser en del signaler i område mellom 0 ppm og 3 ppm som tyder på alifatiske forbindelser. I område mellom 3,5 ppm til 4 ppm ser vi karbohydratsignaler. Signaler som antas å komme fra proantocyanidiner dominerer i området mellom 6-7 ppm (brede signaler ved ca. 6,8 og 6,0 ppm). Proanthocyanidiner er aromatiske stoffer av flavonoidtype som er vanlige i barkdroger. En dublett ved 7,44 ppm og en dobbel dublett ved 7,42 ppm skyldes trolig aromatiske protoner. Signalet ved 1,29 ppm skyldes fett, signalet ved 3,3 ppm kommer fra protoner i  $\text{CD}_3\text{OD}$ , mens vannsignalet vises ved 4,79 ppm. Se vedlegg nr. 1, side nr. 90.

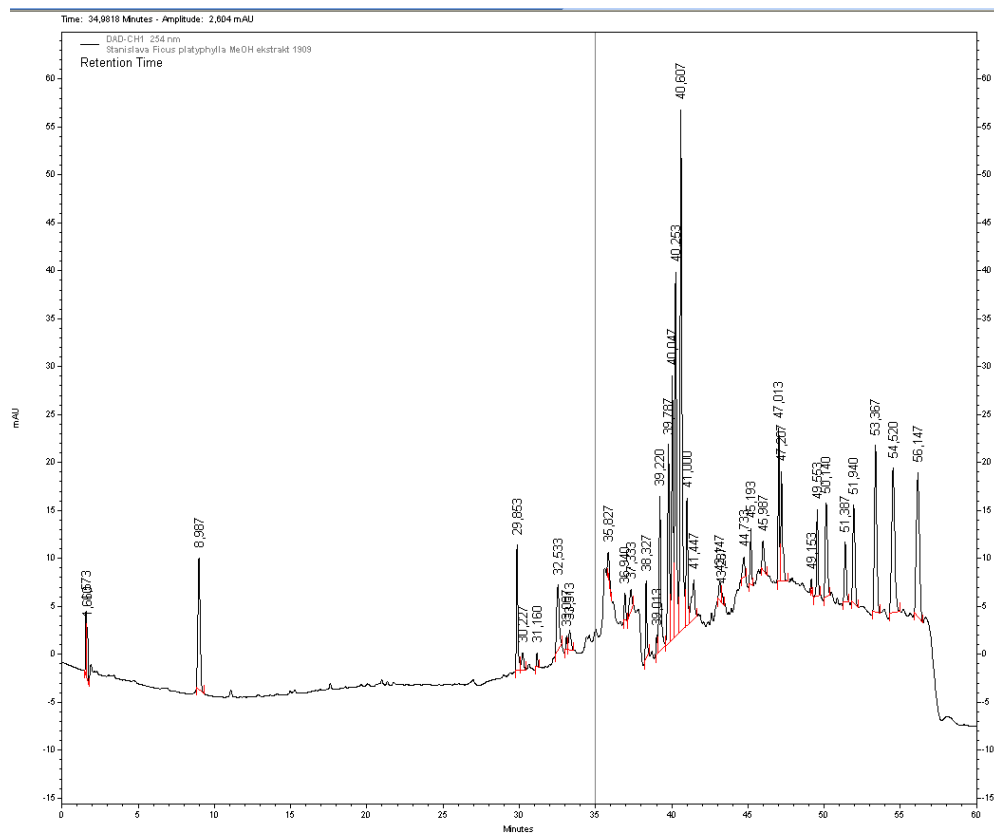
$^{13}\text{C}$  NMR-spektret av MeOH-råekstraktet viser relativt lave sukkersignaler i området 60 ppm til 70 ppm. Signaler fra proantocyanidiner dominerer i karbonspektret også: signaler fra C2 og C3 fra 67 til 82 ppm, signaler fra protonerte aromatkarboner fra 95 til 120 ppm, signaler fra kvaternære karboner fra 130 til 160 ppm (se vedlegg nr. 2, side nr. 90).

$^1\text{H}$  NMR-spektret av DCM-råekstraktet viser mange signaler i det alifatiske område som kan tyde på terpenener i tillegg til fett (se vedlegg nr. 3, side nr. 91). Signaler fra dobbeltbindingsprotoner, muligens umettete fettsyrer mellom 5,0 og 5,5 ppm. Protoner på oksygenerte karboner vises mellom 3 ppm og 4 ppm, mens det er få signaler over 6 ppm. Kloroformsignalet sees ved 7,26 ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR-spektret av DCM-råekstraktet viser mye alifatiske karbonsignaler (se vedlegg nr 4, side nr. 91). Signaler over 110 ppm kommer trolig fra olefin forbindelser. Karbonyl signaler sees mellom 170 ppm og 180 ppm, de er mest sannsynlig fra syrer eller estere.

## 6.2.2 HPLC-kromatografi av MeOH-råekstraktet

MeOH-råekstraktet ble analysert med HPLC-DAD (200-400 nm) og separasjon fulgt ved 254 og 280 nm. De dominerende stoffer har liten eller ingen absorpsjon over 280 nm. De største toppene har UV maksimum på ca. 277 nm (ca. 5 topper). De tyder på aromatiske forbindelser. En av de er mest sannsynlig protocatechusyre (Kennedy 2001).

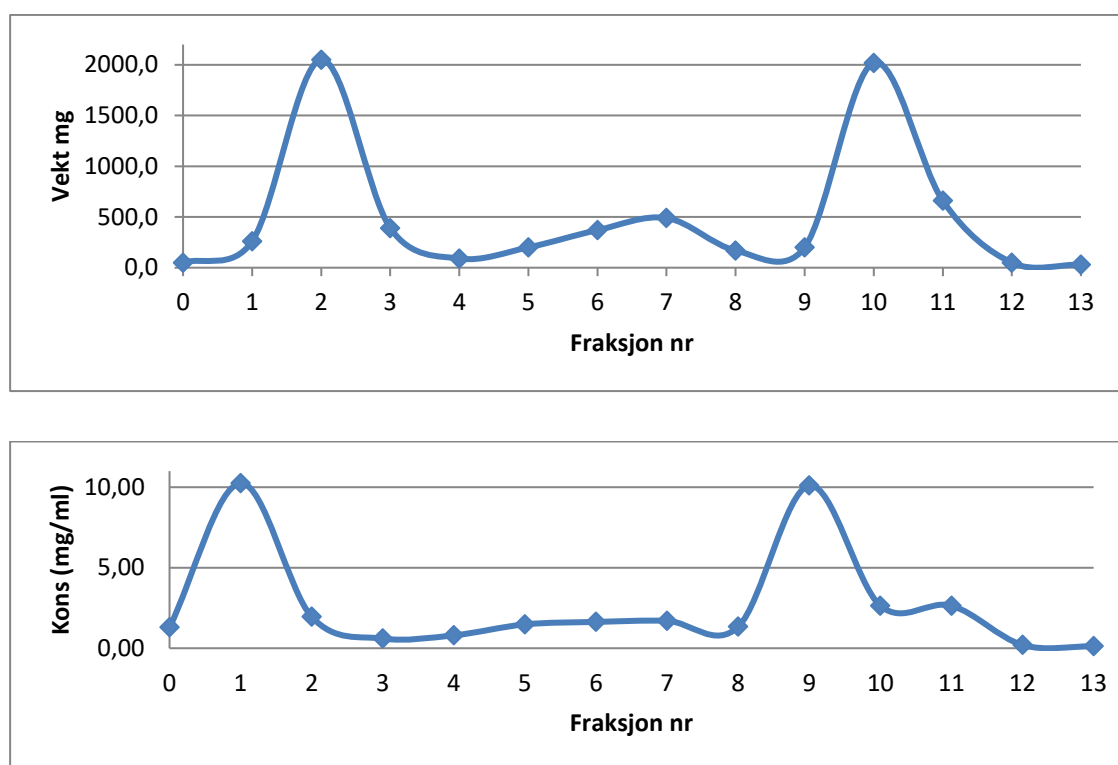


**Figur 6.1:** HPLC-kromatogrammet til MeOH-råekstraktet (254 nm bølgelengde)

## 6.3 Fraksjonering av MeOH-råekstrakt

### 6.3.1 Sephadex LH-20 kolonne separasjon

MeOH-råekstrakt ble opprensenset på en Sephadex LH-20 kolonne. Det ble applisert 11 g av *F. platyphylla* MeOH-råekstraktet. En eluent med økende mengde MeOH i vann ble benyttet. Det resulterte i at de mest polare forbindelser ble eluert først, etterfulgt av mindre polare forbindelsene. Aceton blandet med med vann (7:3) ble brukt etter 100 % metanol for å eluere ut proantocyanidiner. Det ble samlet 13 forskjellige fraksjoner (figur 6.2). Det samlede utbytte var 8,05 g (73,2 %). Det lave utbytte kan skyldes at noe av MeOH-råekstraktet ble igjen på kolonnen.



**Figur 6.2:** Kromatografi av fraksjoner S1 til S13. Øverst: vekt av fraksjoner (i mg), nederst: konsentrasjon i fraksjoner (i mg/ml).

### 6.3.2 NMR-spektroskopi

Alle MeOH S fraksjonene (uten MeOH S1 som var uløselig i deuterert metanol) ble analysert med  $^1\text{H-NMR}$ . MeOH S2 fraksjonen inneholder en del aromatsignaler, karbohydrat og noe alifatsignaler. Spektrene fra MeOH S3-S7 viser lite karbohydrat og alifatsignaler, noe fett og aromatsignaler. Fraksjonene MeOH S8-S11 inneholder proanthocyanidiner. MeOH S13 har mest fett, litt aromatsignaler og litt proanthocyanidin.

## 6.4 Måling av radikalscavenging og enzymhemmingseffekter

### 6.4.1 DPPH-test av MeOH- og DCM-råekstraktet

Både MeOH- og DCM-råekstrakt ble testet for radikalscavenger effekt, resultater er vist i tabell 6.1. Quercetin ble brukt som positiv kontroll.

**Tabell 6.1:** DPPH-test av MeOH-råekstraktet

Konsentrasjon i kyvette ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hemming (%)	Standardavvik (%)
83,3	55,6	4,1
41,6	46,0	6,6

MeOH-råekstraktet ga en  $\text{IC}_{50}$  verdi på  $55 \pm 24 \mu\text{g/ml}$  og viste radikalscavenger aktivitet. Aktiviteten var allikevel lavere enn den positive kontrollen, quercetin ( $\text{IC}_{50} = 3,0 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$ ).

DCM-råekstraktet ga ingen radikalscavenger effekt ved  $167 \mu\text{g/ml}$  og kan anses som inaktivt. All DPPH radikalscavenger aktiviteten av *F. platyphylla* kommer fra medium polare innholdstoffer som finnes i MeOH råekstraktet.

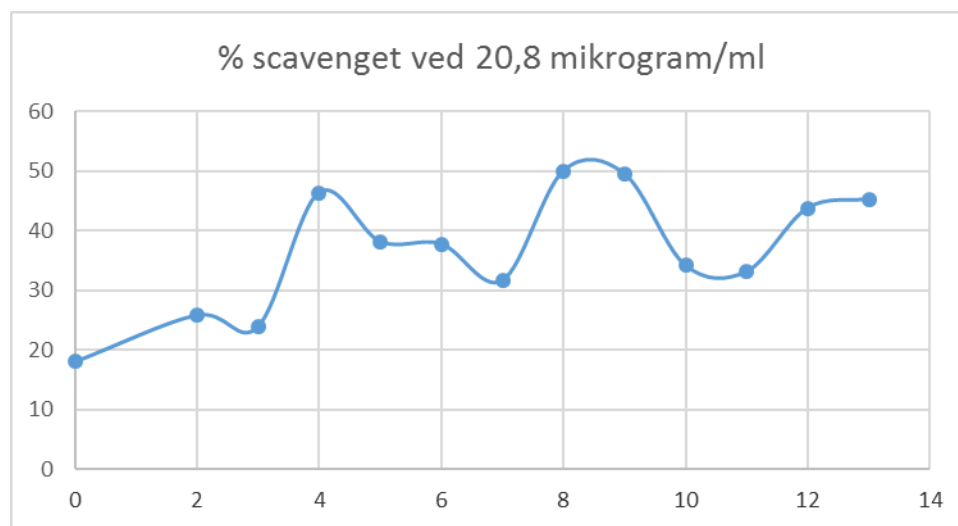
### 6.4.2 DPPH-scavenging av MeOH S1-S13 fraksjoner

MeOH S1-S13 fraksjonene ble testet for radikalscavenger effekt, resultatene er vist i tabell 6.2. Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $\text{IC}_{50} = 3,5 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ ).



**Tabell 6.2:** DPPH-test av MeOH S1-S13 fraksjonene

Fraksjon	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Vekt (mg)	Prosent av total aktivitet (%)
MeOH S1	-	260	-
MeOH S2	>83	2050	24
MeOH S3	95 ± 11	391	5
MeOH S4	23 ± 3	90	2
MeOH S5	63 ± 8	230	4
MeOH S6	54 ± 8	370	6
MeOH S7	82 ± 4	490	7
MeOH S8	21 ± 3	170	4
MeOH S9	21 ± 3	200	5
MeOH S10	85 ± 10	2030	32
MeOH S11	90 ± 8	660	10
MeOH S12	36 ± 8	50	1
MeOH S13	28 ± 4	30	1



**Figur 6.3:** DPPH-scavenging av S1-S13 fraksjoner ved 20,8 µg/ml

Fraksjon MeOH S1 var ikke løselig i DMSO, så det var ikke mulig å utføre DPPH-test på den. Fraksjon MeOH S2 og S10 inneholder mest av totalaktiviteten, men har lav spesifikk

aktivitet (figur 6.3). Fraksjon MeOH S4, S8 og S9 har høyest spesifikk aktivitet, men er små fraksjoner og bidrar derfor ikke så mye til totalaktiviteten.

### 6.4.3 Lipoksygenasehemming av MeOH-råekstraktet

MeOH-råekstraktet av *F. platyphylla* ble testet for 15-lipoksygenase (15-LO) hemming (tabell 6.3). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $IC_{50} = 23,0 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$  eller  $77 \pm 3 \mu\text{M}$ ).

**Tabell 6.3:** 15-LO hemming av MeOH-råekstraktet.

Konsentrasjon i kyvette ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hemming (%)	Standardavvik (%)
166,7	106,5	0,7
83,3	88,4	1,2
41,7	22,3	7,8
20,8	-9,2	7,7

15-LO-hemmings effekten av MeOH-råekstraktet ga en  $IC_{50}$  verdi på  $56 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ .

### 6.4.4 Lipoksygenasehemming av MeOH S1-S13 fraksjoner

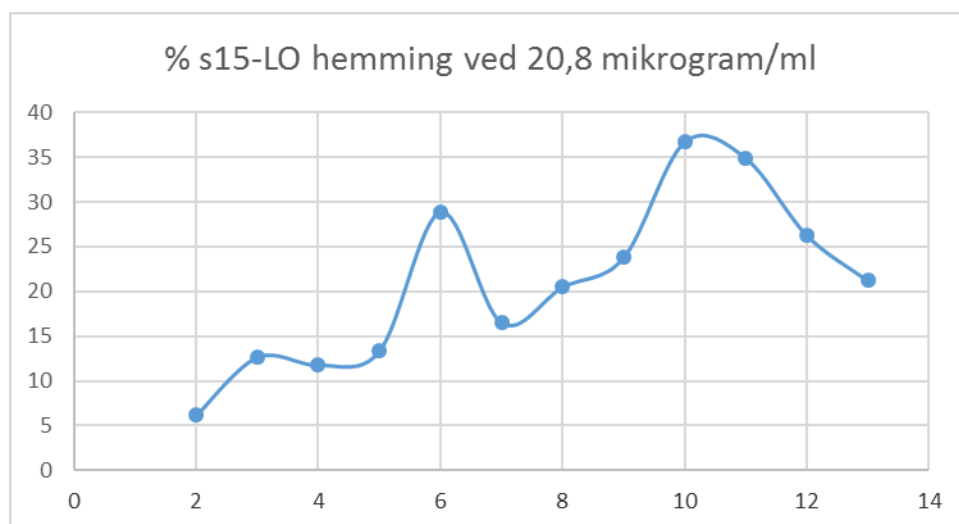
Fraksjonene MeOH S1-S13 ble testet for 15-lipoksygenase (15-LO) hemming (tabell 6.4). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $IC_{50} = 30 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ ).

**Tabell 6.4:** 15-LO hemming av fraksjonene MeOH S1 til S13

Fraksjon	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Vekt (mg)	Prosent av total aktivitet (%)
MeOH S1	-	260	-
MeOH S2	$55,4 \pm 2,5$	2050	9
MeOH S3	$44,6 \pm 3,0$	391	3
MeOH S4	$62,2 \pm 5,3$	90	1
MeOH S5	$38,6 \pm 2,8$	230	2
MeOH S6	$34,9 \pm 2,8$	370	7
MeOH S7	$53,2 \pm 0,7$	490	5

MeOH S8	37,0 ± 1,5	170	2
MeOH S9	32,1 ± 0,5	200	3
MeOH S10	24,3 ± 1,4	2030	50
MeOH S11	24,8 ± 1,5	660	16
MeOH S12	26,9 ± 1,0	50	1
MeOH S13	36,7 ± 3,0	30	0

Fraksjon MeOH S1 var uløselig i DMSO. Fraksjon MeOH S10 inneholder mest av totalaktiviteten, den har høy aktivitet og høy vekt (figur 6.4). Fraksjon MeOH S11 har også høy aktivitet. De andre fraksjonene veier mindre og har lavere aktivitet, og bidrar derfor ikke så mye til totalaktiviteten.



**Figur 6.4:** 15-LO hemming av S1-S13 fraksjoner ved 20,8 µg/ml

### 6.4.5 Xantin oksidase hemming av MeOH-råekstraktet

MeOH-råekstraktet ble testet for XO-hemming (tabell 6.5). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC<sub>50</sub> 0,47 ± 0,09 µg/ml).

**Tabell 6.5:** XO-hemming av MeOH-råekstraktet

Kons. (mg/ml)	Kons. i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)
2,5	41,7	39,7	± 2,1
5	83,3	65,1	± 5,6

XO-hemmingsaktiviteten av MeOH-råekstraktet ( $IC_{50} = 55 \pm 6 \mu\text{g/ml}$ ) var mye svakere sammenlignet med quercetin.

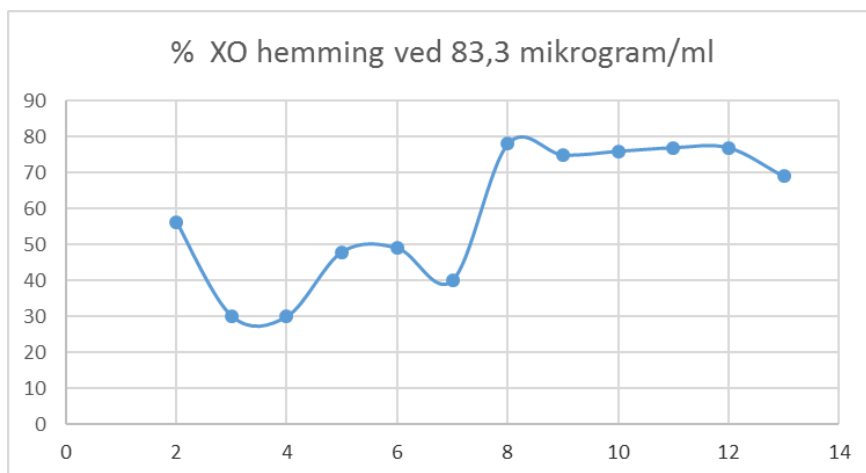
#### 6.4.6 Xantin oksidase hemming av MeOH S1-S13 fraksjoner

MeOH-råekstraktet ble testet for XO-hemming (tabell 6.6). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $IC_{50} = 0,47 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ ).

**Tabell 6.6:** XO-hemming av MeOH-råekstraktet

Fraksjon	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Vekt (mg)	Prosent av total aktivitet (%)
MeOH S1	-	260	-
MeOH S2	$70 \pm 3$	2050	28
MeOH S3	$146 \pm 10$	391	3
MeOH S4	ca 150	90	1
MeOH S5	$90 \pm 7$	230	3
MeOH S6	$87 \pm 5$	370	4
MeOH S7	$112 \pm 11$	490	5
MeOH S8	$56 \pm 3$	170	3
MeOH S9	$61 \pm 3$	200	4
MeOH S10	$57 \pm 1$	2030	37
MeOH S11	$57 \pm 2$	60	12
MeOH S12	$55 \pm 3$	50	1
MeOH S13	$65 \pm 2$	30	0

Fraksjon MeOH S10 inneholder mest av totalaktiviteten, den har høy aktivitet og høy vekt (figur 6.5).

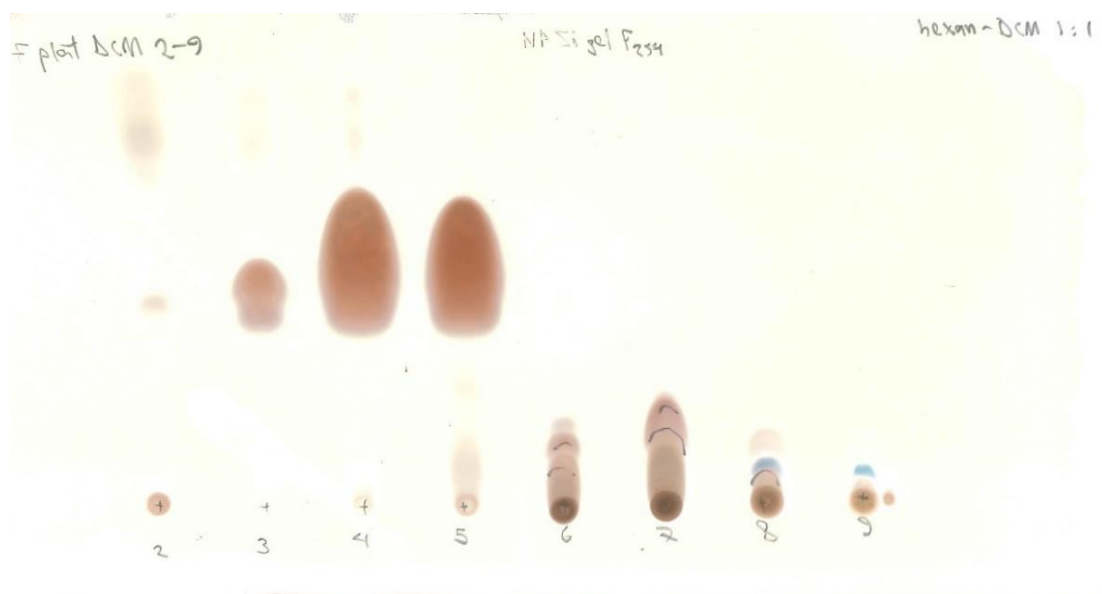


**Figur 6.5:** XO hemming av S1-S13 ved 83,3 µg/ml

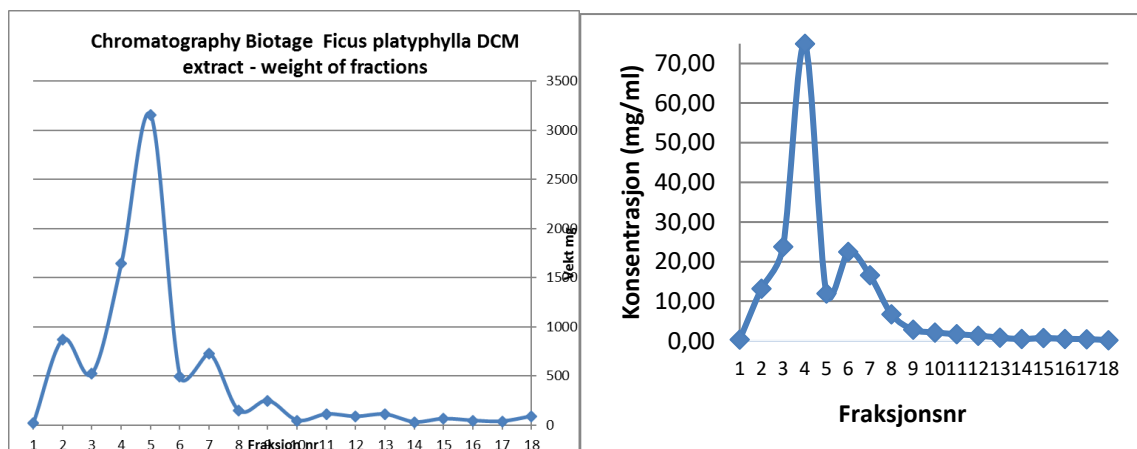
## 6.5 Fraksjonering av DCM-råekstraktet

### 6.5.1 Flashkromatografi

DCM-råekstrakt ble fraksjonert med flash kromatografi ved hjelp av et Biotage selekt instrument. Det ble applisert 9,0 g på kolonnen, og det ble samlet 75 kolonnefraksjoner á 22 ml. Ved hjelp av TLC-resultatene ble de slått sammen til 18 fraksjoner (DCM-1 til 18) (figur 6.6). Det samlede utbytte ble 84,6 g (94 %). DCM-4 og DCM-5 utgjorde de største fraksjonene (se figur 6.7).



**Figur 6.6:** TLC av fraksjon 2-9 fra DCM ekstrakt av *F. platyphylla*



**Figur 6.7:** Kromatografi av DCM ekstrakt. Venstre: vekt av fraksjoner (i mg), høyre: konsentrasjon i fraksjoner (i mg/ml).

Det meste av stoffet forelå i fraksjon 4 (2,2 g) og 5 (4,8 g), men fraksjon 4 hadde et mindre volum enn fraksjon 5 (22 ml mot 264 ml) og var den mest konsentrerte. Disse fraksjonene ble derfor prioritert i videre arbeid.

## 6.5.2 NMR-spektroskopi

Fraksjon 4 og 5 hadde lignende NMR spektra og så nokså like ut ved TLC. Ut fra NMR-spektrene så det ut som triterpener er hovedkomponenter i disse fraksjonene (se vedlegg nr. 16-23, side nr. 97-101).

Det er tidligere rapportert (El-Sayyad, Sayed et al. 1986) at bladene av *F. platyphylla* inneholder triterpenene  $\alpha$ - og  $\beta$ -amyrin og ursolsyre, samt sterolen  $\beta$ -sitosterol. Denne artikkelen er ikke tilgjengelig, og opplysningene er hentet fra sammendraget i SciFinder (<http://scifinder.cas.org>). Ut fra sammenligning av  $^{13}\text{C}$ -spektrene i tabell 6.7, 6.8 og 6.9 med litteratordata (Jung, Park et al. 2014, Silva, e. M. et al. 2016, Pimentel da Silva, Furlani et al. 2018) så det ut til at disse stoffene ikke forelå i disse fraksjonene av barkekstraktet, men at  $\alpha$ - og  $\beta$ -amyrin samt lupeol forelå i forestret form, se tabell 6.7. Disse forbindelsene er ikke tidligere rapportert fra planten.

**Tabell 6.7:** Sammenligning av  $^{13}\text{C}$  NMR data for fraksjon 4 med litteratordata. Alle spektrene i tabell er tatt opp med  $\text{CDCl}_3$  som løsemiddel.

Signaler med uthevet trykk er felles for  $\alpha$ -amyrinacetat,  $\beta$ -amyrinacetat og lupeolacetat. Signaler i grønt er indikative for  $\alpha$ -amyrinacetat, i blått for  $\beta$ -amyrinacetat og rødt for lupeolacetat.

Fr. 4	$\alpha$ -am ac	$\beta$ -am ac	lup ac	$\beta$ -sit
<b>170,6</b>	<b>171,0</b>	<b>171,0</b>	<b>171,0</b>	
150,6			151,0	
145,8				
145,1		145,2		
				140,7
139,5	139,6			
125,1				
124,3	124,3			
121,6		121,6		121,7
117,5				
109,4			109,3	
<b>80,9</b>	<b>80,9</b>	<b>80,9</b>	<b>81,0</b>	
				71,8
59,0	59,0			
				56,7
<b>55,3</b>	<b>55,2</b>	<b>55,2</b>	<b>55,3</b>	56,0
51,2				
50,2			50,3	50,1
48,2			48,2	
<b>47,6</b>	<b>47,6</b>	<b>47,5</b>	<b>48,0</b>	
47,2		47,2		
46,7		46,8		
				45,8
42,9			43,0	
			42,8	
42,0	42,0			

41,5	41,5	41,7		42,3
			40,8	
40,0	40,0	40,0	40,0	

Signal ved ca. 81 ppm er indikativt for forestring på O-3 i triterpener. Manglende signal ved 79 ppm tyder på fravær av ikke-forestrede forbindelser. På grunn av tettliggende og overlappende signaler er område fra 0 til 40 ppm ikke tatt med i denne vurderingen. Ved forestring vil signalet fra C-3 i triterpenet deshieldes med ca. 2 ppm, fra 79 til 81 ppm. I HMBC-spektrene av fraksjon 4 og 5 ses kryssstopp mellom antatt signal fra esterkarbonyl ved ca. 170 ppm og et protonsignal ved ca. 2,1 ppm som ses som tre nærliggende singletter i protonspektret og kan skyldes CH<sub>3</sub>-gruppe i acetyldel. En annen krysskobling fra karbonylsignalet går til et protonsignal ved ca. 4,5 ppm. Dette viser trolig kobling til H-3 i triterpenmolekylet (Jung, Park et al. 2014).

Acetatene av  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin og lupeol er velkjente plantestoffer, med mellom 500 og 1000 oppføringer hver i SciFinder. Alle har over 20 rapporter om antiinflammatorisk effekt (eksempel: (Akihisa, Kojima et al. 2010)). Det kan derfor være mulig at de kan bidra til eventuelle medisinske effekter av *F. platyphylla* stammebark.

Ut fra tabell 6.7 ser det ut til at  $\alpha$ -amyrinacetat,  $\beta$ -amyrinacetat og lupeolacetat er hovedkomponenter i fraksjon 4.  $\beta$ -Sitosterol ser ikke ut til å foreligge i denne fraksjonen. Skiftposisjoner over 40 ppm er vist i tabellen, ved lavere skiftposisjoner er det svært mange signaler og stor grad av overlapping mellom signalene.

Fraksjon 2 ble undersøkt på tilsvarende måte. Resultatene er vist i tabell 6.8. For NMR-spektra se vedlegg nr. 12-13, side nr. 96-97.

**Tabell 6.8:** Sammenligning av <sup>13</sup>C NMR data for fraksjon 2 med litteraturodata. Forklaringer, se tabell 6.7.

Fr. 2	$\alpha$ -am ac	$\beta$ -am ac	lup ac	$\beta$ -sit
173,5				
	<b>171,0</b>	<b>171,0</b>	<b>171,0</b>	
150,7			151,0	



145,2		145,2		
				140,7
139,6	139,6			
135,1				
129,9				
129,8				
125,0				
124,3	124,3			
121,7		121,6		121,7
116,4				
109,4			109,3	
<b>80,5</b>	<b>80,9</b>	<b>80,9</b>	<b>81,0</b>	
				71,8
64,3				
59,1	59,0			
				56,7
<b>55,4</b>	<b>55,2</b>	<b>55,2</b>	<b>55,3</b>	<b>56,0</b>
50,3			50,3	50,1
48,3			48,2	
<b>47,6</b>	<b>47,6</b>	<b>47,5</b>	<b>48,0</b>	
46,8				
47,2		47,2		
46,7		46,8		
				45,8
43,0			43,0	
42,8			42,8	
42,1	42,0			
41,6	41,5	41,7		42,3
40,9			40,8	

40,0	40,0	40,0	40,0	
40,0				

Stoffene i fraksjon 2 ser ut til å være beslektet med stoffene i fraksjon 4, men viser noen avvik i NMR-spektrene. Spesielt er karbonylsignalet deshieldet (173,4 ppm versus 171,0 ppm). I HMBC-spektret viser karbonylsignalet en krysstopp med et protonsignal ved 2,30 ppm, mot 2,05 ppm for fraksjon 4. Signal fra C-3 ved 80,5 ppm tyder på at hydroksylgruppen i triterpenene er forestret. Deshieldingen av karbonylsignalet og krysstoppen i HMBC (som antas å skyldes kobling fra karbonyl-C til H-2 i fettsyrekjede) stemmer godt med data for  $\beta$ -amyrinstearat (Da Rocha, Vilela et al. 2015). Hvilke fettsyrer triterpenene er forestret med, er vanskelig å si uten videre undersøkelser.

Tilsvarende ga fraksjon 7 følgende (tabell 6.9):

**Tabell 6.9:** Sammenligning av  $^{13}\text{C}$  NMR data for fraksjon 7 med litteratordata. Forklaringer, se tabell 6.7.

Fr. 7	lupeol	$\alpha$ -am	$\beta$ -am	$\alpha$ -am	$\beta$ -am	lupeol	$\beta$ -sit
171,0							
150,7	151,0					150,9	
145,7			145,3		145,2		
							140,7
139,5		139,7		139,5			
134,7							
130,3							
129,8							
125,2							
124,4		124,6		124,4			
*121,7*			121,9		121,7		121,7
109,4	109,3					109,3	
89,9							
81,8							
80,7							

78,9	79,0	79,2	79,2	79,0	79,0	78,9	
							71,8
60,4							
59,0				59,0			
55,2	55,3	55,3	55,3	55,1	55,1	55,2	56,0
53,1							
51,2							
*50,7*	50,4					50,3	50,1
48,7	48,3					48,2	
*47,7*	48,0	47,9	47,8	47,7	47,6	47,9	
			47,4		47,2		
47,1			47,0		46,8		
45,2							45,8
43,5							
42,9	43,0					42,9	
42,8	42,8					42,7	
42,0			41,9	42,0			42,2
41,5				41,5	41,7		42,2
40,8	40,8						40,7
40,4		40,2					
	40,0						
40,0							

Signaler for fraksjon 7 som er merket med stjerner finnes i spektret, men er svakere enn de andre vist i tabellen (se vedlegg nr. 24-25, side nr. 102-103).

Det kan se ut som ikke-forestret lupeol,  $\alpha$ -amyrin og  $\beta$ -amyrin kan finnes i denne fraksjonen. Andre ikke identifiserte stoffer er også tilstede, men  $\beta$ -sitosterol ser ut til å

mangle. Det er litt avvik mellom de forskjellige litteraturverdiene. Signaler ved 171,0 og 80,7 ppm tyder på at triterpenacetater er tilstede i denne fraksjonen også.

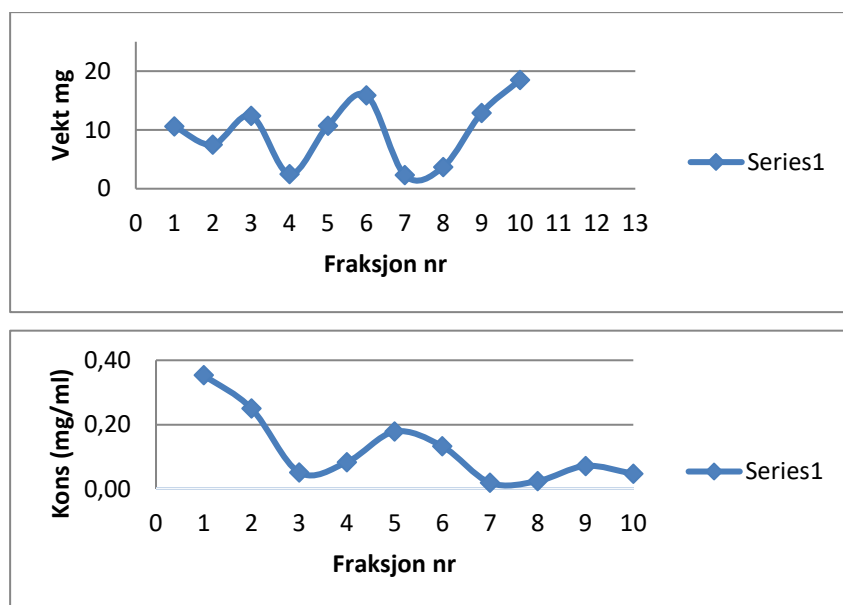
### 6.5.3 Biologisk aktivitet av triterpenene

Triterpenene  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin og lupeol, acetatene deres og esterene deres med høyere fettsyrer, er rapportert å ha antiinflammatorisk egenskaper (Akihisa, Kojima et al. 2010, Sultana 2012, Okoye 2014). Det er rapportert at forestring øker den antiinflammatoriske aktiviteten (Kweifio-Okai 1995). Det høye innholdet av acetater og høyere fettsyreestere av disse triterpenene i *Ficus platyphylla* kan derfor tenkes å ha betydning for den medisinske bruken av planten.

## 6.6 Separasjon av fraksjon MeOH S2

### 6.6.1 Flashkromatografi

MeOH S2 fraksjonen ble videre fraksjonert med Versaflash kromatografi. Det ble applisert 280 mg, og det ble samlet 43 kolonnefraksjoner. Ved hjelp av TLC-resultatene ble de slått sammen til 10 fraksjoner (MeOH S2V1-S2V10) (figur 6.8). Det samlede utbytte ble 97 mg, 34,6 %).



**Figur 6.8:** Kromatografi av MeOH S2V1-V10. Øverst: vekt av fraksjoner (i mg), Nederst: konsentrasjon i fraksjoner (i mg/ml).

## 6.6.2 NMR-spektroskopi

Fraksjon MeOH S2V8 og S2V9 ga  $^1\text{H}$  NMR-signaler ved 7,12 ppm (d,  $J= 8,6$  Hz) og 6,77 (d,  $J= 8,6$  Hz). Dette tyder på orto-stående aromatkarboner. 4-Hydroksybenzosyre kunne være en mulig struktur, men sammenligning med litteraturdata tyder på at dette ikke er tilfelle (Tsiftoglou 2018).

## 6.6.3 Analytisk HPLC

På bakgrunn av resultatene fra analytisk HPLC og  $^1\text{H}$  NMR-spektra ble fraksjonen S2V5 valgt ut for videre opprensing.

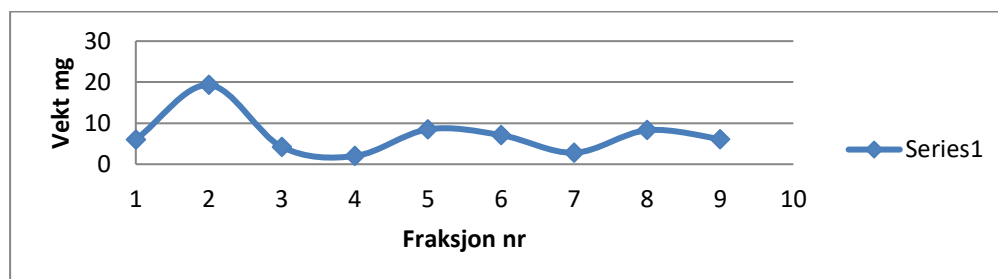
## 6.6.4 Preparativ HPLC

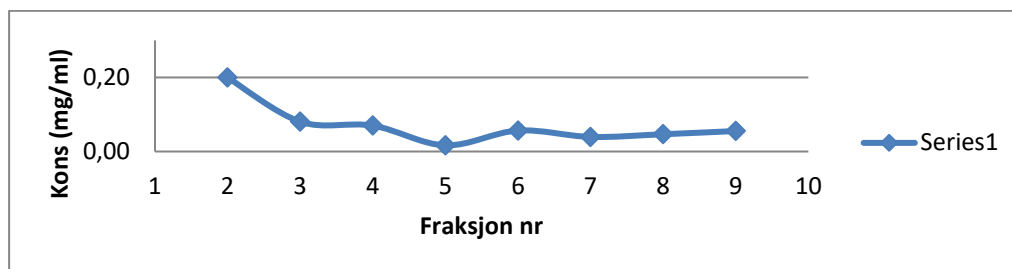
Fraksjoner S2V5H25 og S2V5H28 hadde intensiv aromatisk lukt. Det ble ikke mulig å rense de videre siden de var for små.

# 6.7 Separasjon av fraksjon MeOH S4

## 6.7.1 Flashkromatografi

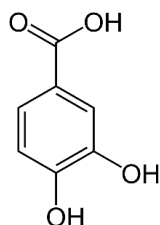
MeOH S4 fraksjonen ble videre fraksjonert med Versaflash kromatografi. Det ble applisert cirka 50 mg på kolonnen, og det ble samlet 39 kolonnefraksjoner. Ved hjelp av TLC-resultatene ble de slått sammen til 9 fraksjoner (S4V1-S4V9) (figur 6.9). Det samlede utbytte ble 0,17 g (340 %). Met et så høyt utbytte kan det ha vært at vann ikke ble helt dampet ut før veiing av fraksjoner.





**Figur 6.9:** Kromatografi av MeOH S4V1-V9. Øverst: vekt av fraksjoner (i mg), Nederst: konsentrasjon i fraksjoner (i mg/ml).

## 6.8 NMR-spektroskopi av S4V2-Isolering og strukturoppklaring av protocatechusyre



### Protocatechusyre

Protocatechusyre (3,4-dihydroksibenzosyre) er et vanlig naturstoff, men som ikke tidligere er rapportert fra *F. platyphylla*. Se vedlegg nr. 5-6, side nr. 92, og vedlegg nr. 26-29, side nr. 103-105. Det er kjent fra flere andre *Ficus*-arter, som fra *Ficus ovata* (Kuete 2009) og *Ficus microcarpa* (Ao 2008).

**Tabell 6.10:**  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$  NMR data for protocatechusyre ifølge litteratur (Ochuko 2017)

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		123,7
2	7,42 (1H, d)	117,7
3		145,8
4		150,8
5	6,76 (1H, d, J=8,0)	115,5
6	7,40 (1H, dd, J=8,0;2,0)	123,6
7		170,57

**Tabell 6.11:**  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$  NMR data for *F. platyphylla* MeOH S4V2 fraksjonen

Posisjon	$\delta_{\text{H}}$ (J i Hz)	$\delta_{\text{C}}$	HSQC	HMBC
1		123,22		
2	7,43 (1H,d, J=8,0)	117,71	x	151,67 145,94 123,81
3		145,94		
4		151,67		
5	6,81 (1H, d, J=8,0)	115,74	x	151,67 145,94 123,81
6	7,41 (1H,dd, J=8,0; 2,0)	123,81	x	170,04 151,67
7		170,04		

Disse signalene er også synlige i  $^1\text{H}$  spektrum av råekstraktet (se vedlegg nr. 1, side nr. 89).

### 6.8.1 Analytisk HPLC

På bakgrunn av resultatene fra analytisk HPLC og  $^1\text{H}$  NMR-spektra ble fraksjonen S4V9 valgt ut for videre opprensing.

### 6.8.2 Preparativ HPLC

Fraksjonen MeOH S4V9 ble videre rensert ved preparativ HPLC. Det ble applisert 6,1 mg på kolonnen. Det ble samlet inn 10 kolonnefraksjoner. Disse ble slått sammen til 5 hovedfraksjoner- S4V9H1 til S4V9H5. Det samlede utbytte var 6,35 mg (104,1 %).

## 6.9 DPPH-scavenging og enzymhemmingseffekt (15-LO og XO) av protocatechusyre

Protocatechusyre ble testet for DPPH-scavenging (tabell 6.12). Den ga en  $IC_{50}$  på  $29 \pm 8$   $\mu\text{g/ml}$  ( $188 \pm 50$   $\mu\text{M}$ ). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $3,5 \pm 0,6$  eller  $12 \pm 2$   $\mu\text{M}$ ).

**Tabell 6.12:** DPPH-scavenging av protocatechusyre

Konsentrasjon i kyvette ( $\mu\text{g/ml}$ )	Prosent hemming (%)
41,7	$52,7 \pm 1,9$
20,8	$47,5 \pm 2,1$
10,4	$37,1 \pm 1,7$

Protocatechusyre ble testet for hemming av 15-LO (tabell 6.13). Den ga en  $IC_{50}$  på  $59,8 \pm 1,2$  ( $388 \pm 7$   $\mu\text{M}$ ). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $30 \pm 2$  eller  $100 \pm 7$   $\mu\text{M}$ ).

**Tabell 6.13:** 15-LO hemming av protocatechusyre

Konsentrasjon i kyvette ( $\mu\text{g/ml}$ )	Prosent hemming (%)
83,3	$80,2 \pm 0,7$
41,7	$17 \pm 3$

Protocatechusyre ble testet for hemming av XO (tabell 6.14). Den ga en  $IC_{50} > 83$   $\mu\text{g/ml}$ . Quercetin ble brukt som positiv kontroll ( $IC_{50} = 0,47 \pm 0,09$   $\mu\text{g/ml}$ ). Ut fra dette forsøket er protocatechusyre en nokså svak hemmer av xantin oksidase. Ved den høyeste anvendte konsentrasjonen, 166,7  $\mu\text{g/ml}$ , var egenabsorbansen av prøven for høy til at den kunne måles.

**Tabell 6.14:** XO-hemming av protocatechusyre

Konsentrasjon i kyvette ( $\mu\text{g/ml}$ )	Prosent hemming (%)
83,3	$22,6 \pm 1,5$
41,7	$-2,7 \pm 2,6$

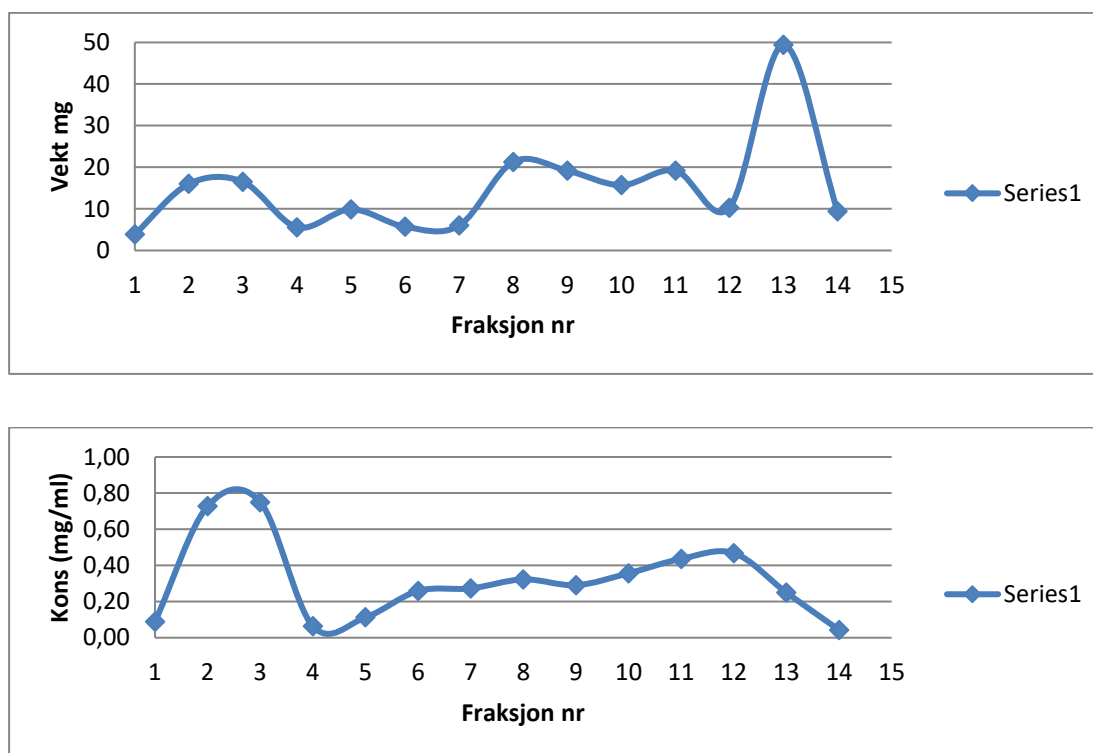


Xantin oksidase-hemming av protocatechusyre er rapportert flere ganger, men resultatene er svært sprikende. (Ho 2017) gir en  $IC_{50}$  verdi på  $103,3 \pm 2,8 \mu\text{M}$  med samme forsøksoppsett som i mitt forsøk. (Liu 2002) brukte en lignende metode, men viste ikke resultatene numerisk. Ut fra en illustrasjon i artikkelen antas det en  $IC_{50}$  verdi på ca.  $100 \mu\text{g/ml}$ . (Khallouki 2011) fant en  $IC_{50}$  verdi på  $467 \mu\text{g/ml}$ . (Nguyen 2006) beskrev xantin oksidase-hemmingen av protocatechusyre som «moderate or weak», men uten å angi noen tallverdi.

## 6.10 Separasjon av fraksjon MeOH S7 og S8

### 6.10.1 Flashkromatografi

Fraksjonene MeOH S7 og S8 ble samlet i en (tilsammen 660 mg), de ble filtrert og applisert på kolonnen. Det ble samlet 43 kolonnefraksjoner. Ved hjelp av TLC-resultatene ble de slått sammen til 14 fraksjoner S<sub>7/8</sub>B1 til S<sub>7/8</sub>B14 (figur 6.10). Det samlede utbytte ble 208,1 mg (31,5 %). Det lave utbyttet skyldes at mye av fraksjonene var uløselig og ble fjernet ved filtrering.



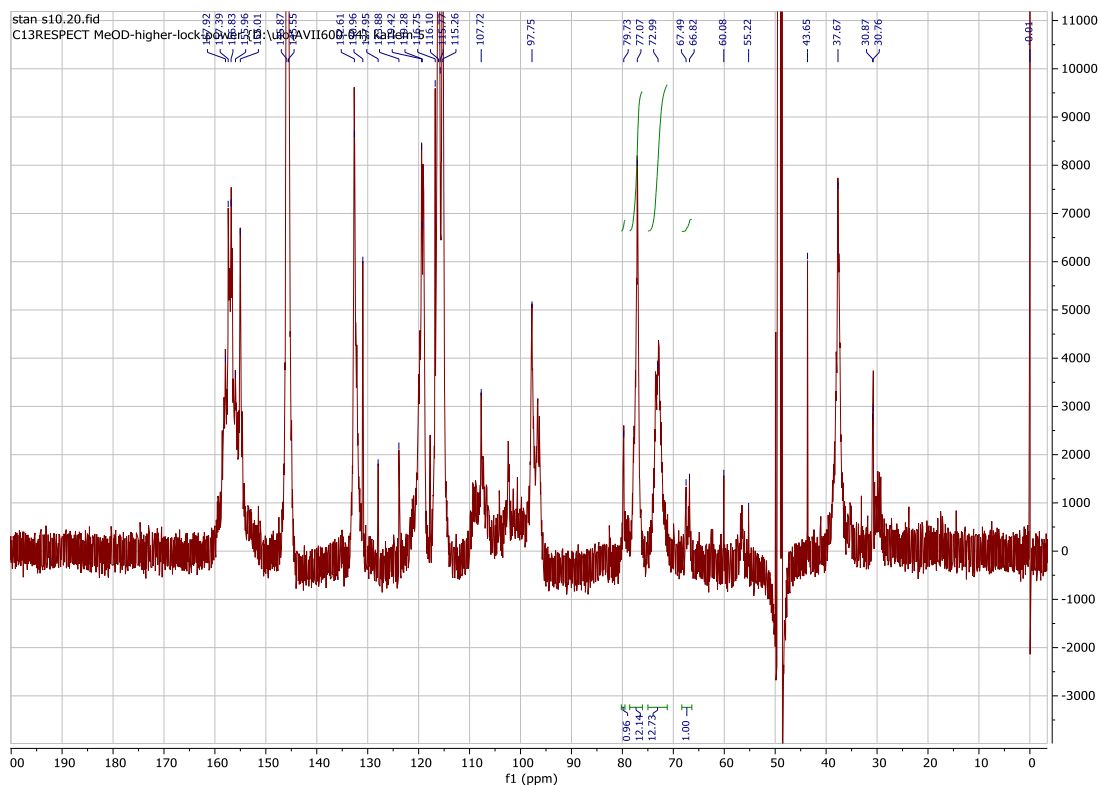
**Figur 6.10:** Kromatografi av MeOH S<sub>7/8</sub>B1-B14. Øverst: vekt av fraksjoner (i mg), Nederst: konsentrasjon i fraksjoner (i mg/ml).

## 6.10.2 NMR-spektroskopi

Fraksjon S<sub>7/8</sub>B3 og B4 ser ut til å inneholde protocatechusyre. Fraksjonene B6-B8 ga svake aromatsignaler, men disse fraksjonene ble ikke prioritert for videre arbeid. B13 og B14 ga mest alifatsignaler. Ortokoblede aromatsignaler ved 7,10 og 6,75 ppm var for svake til at disse fraksjonene ble fulgt opp videre. Se vedlegg nr. 7-8, side nr. 93.

## 6.11 NMR-spektroskopi av MeOH S10 fraksjonen

Spektret av denne fraksjonen tyder på at hovedkomponentene er proanthocyanidiner (figur 6.10). Gjennomsnittlig kjedelengde kan estimeres ut fra arealeforhold mellom signaler ved 67-68 ppm (startenhet) og 72-74 ppm (forlengerenhet) og 2,3-*cis* (epicatechinstereokjemi) / 2,3-*trans* (catechinstereokjemi) ut fra arealforhold mellom signaler ved 76-78 ppm og 80-82 ppm (Eberhardt and Young 1994). Spektret av fraksjon S10 tyder på gjennomsnittlig kjedelengde på ca 14 monomerenheter og ca en enhet med catehin-type stereokjemi i hver enhet (Figur 6.11). Se vedlegg nr. 9-11, side nr. 94-95.



Figur 6.11: <sup>13</sup>C NMR-spektrum av fraksjon S10 (CD<sub>3</sub>OD som løsemiddel)

Foreslått tilordning av signalene i spektret ut fra litteraturdata (Czochanska, Foo et al. 1980) er vist i tabell 6.15.

**Tabell 6.15:** Signaler i  $^{13}\text{C}$  NMR spektret av fraksjon S10.

Skiftposisjon (ppm)	Foreslått tilordning
155-158	C-5 C-7
145-146	C-3` C-4` C-3`, C-5` i prodelphinidin
131-133	C-1` C-4` i prodelphinidin
119-120	C-6`
115-117	C-2` C-5
107-108	`C-8 i startenhet C-2`, C-6` i prodelphinidin
95-98	C-6 C-8 i forlengerenhet (epicatechin)
80-82	C-2 (catechin)
77-79	C-2 (epicatechin)
72-74	C-3 i forlengerenhet
67-68	C-3 i startenhet
36-37	C-4 i forlengerenhet (epicatechin)

Mangel på signaler ved 139 og 165 ppm tyder på lite eller ingen galloylering (Mathisen, Diallo et al. 2002). Ut fra disse data er det vanskelig å sonde mellom 3`,4`-dihydroksyforbindelser (catechin, epicatechin) og 3`,4,5`-trihydroksyforbindelser (gallocatechin, epigallocatechin).

Dette stemmer bare delvis med tidligere rapporterte data (Ntenga, Pagore et al. 2017), men i det arbeidet ble det ikke angitt om stammebark eller rotbark ble undersøkt, og metodene avviker fra våre.

## 6.12 Spalting av proanthocyanidinene

Spalting av fraksjon S10 med floroglucinol/saltsyre ga ureagert floroglucinol (fraksjon 3), ureagert proanthocyanidin (fraksjon 13) og spaltingsprodukter som catechintype-floroglucinol addukter (fra forlengerenheter) eller catechiner (fra startenheten). Ut fra sammenligning av NMR spektra med litteraturverdier (Rösch 2002) består fraksjonene 7-8 i hovedsak av epicatechin (4 $\beta$ →2) floroglucinol. Signaler fra catechin- eller galocatechin-addukter ble ikke sett i disse fraksjonene. Dette tyder på at forlengerenhetene i proanthocyanidinene i fraksjon S10 hovedsakelig består av epicatechiner.

I tabell 6.16 er data for fraksjon 6 av floroglucinolspaltet materiale sammenlignet med data for tidligere opptatte spektra av autentiske referansesubstanser (catechin: Koch-Light, epicatechin: Roth). Ut fra dette ser det ut som startenheten i proanthocyanidinene er epicatechin.

**Tabell 6.16:** Sammenligning av data for fraksjon S10 flgl6 med referansespektra

<sup>13</sup> C NMR data			<sup>1</sup> H NMR data		
flgl6	cat	epicat	flgl6	cat	epicat
29,3	28,6	29,3	2,71 (1H, dd, J=3,1;16,9)	2,50 (1H, dd, J=8,1;16,2)	2,71 (1H, d, J=2,9;16,8)
58,4	-	-	2,86 (1H, dd, J=4,6;16,9)	2,85 (1H, dd, J=5,4;16,1)	2,86 (1H, dd, J=3,4;16,8)
64,5	-	-	4,17 (1H,m)	3,97 (1H, m)	4,17 (1H, m)
67,6	68,8	67,5	4,56 (1H, m) 4,81(1H,m)	4,56 (1H,d, J=7,5)	4,81 (1H,m)
79,9	82,8	79,9	5,91 (1H,d, J=2,3)	5,86 (1H, d, J=2,2)	5,92 (1H, d, J=2,2)
95,9	95,5	95,9	5,94 (1H, d,J=2,3)	5,93 (1H, d, J=2,3)	5,94 (1H,d, J=2,2)
96,4	96,3	96,4	6,75 (1H, d, J=8,1)	6,71 (1H, dd, J=1,6;8,2)	6,75 (2H,m)
100,1	100,8	100,1	6,80 (1H, dd, J=2,3;8,3)	6,77 (1H, d, J=8,0)	

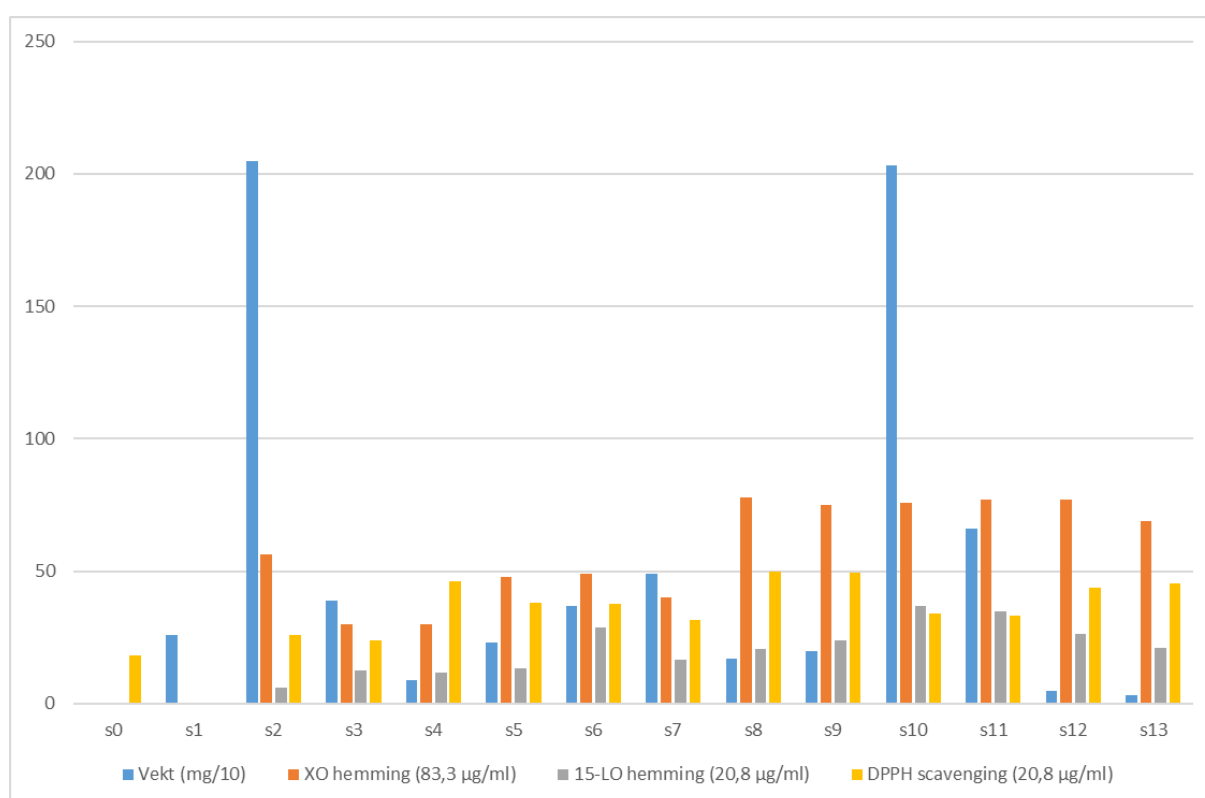
115,4	115,2	115,3	6,97 (1H, d, J=2,1)	6,84 (1H, d, J=1,6)	6,97(1H, d, J=1,8)
115,9	116,1	115,9			
119,4	120,0	119,4			
132,3	132,2	132,2			
145,8	146,2	145,7			
146,0	-	145,9			
157,4	156,8	157,3			
157,7	157,5	157,6			
158,1	157,8	157,9			

Det kan konkluderes med at proanthocyanidinet i fraksjon S10 har epicatechin som startenhet og som hovedkomponent i forlengerenhetene. Litt catechin (mindre enn 10 %) foreligger i forlengerenhetene- dette vist ikke i NMR-spektrene av spaltingsproduktene; det kan skyldes for lav konsentrasjon. Gallocatechin eller epigallocatechin er ikke påvist.

# 7 Konklusjon

Fra MeOH-råekstraktet av stammebark av *F. platyphylla* ble det isolert og identifisert protocatechusyre. Den er ikke rapportert fra *F. platyphylla* fra før. Protocatechusyre ble testet for radikal-scavenging aktivitet ovenfor radikalet difenylpikrylhydrayl (DPPH), hvor den har vist lavere aktiviteten enn positiv kontroll (quercetin). Den er en forholdsvis svak XO og 15-LO hemmer sammenlignet med quercetin.

Fra metanolekstraktet ble det isolert en blanding av proantocyanidiner med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad på 14, og epicatechin som viktigste monomer. XO-hemming er høyest i fraksjonene mellom MeOH S8-S13 hvor er mest proantocyanidiner (figur 7.1).



Figur 7.1: Søylediagram som illustrerer antioksidantaktiviteten og fraksjonsvekter av S-fraksjoner fra MeOH-ekstraktet.

Diklormetaneekstraktet ga ved fraksjonering triterpenalkoholene  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin og lupeol. Acetatene av disse var hovedkomponenter i diklormetaneekstraktet. Disse er tidligere ikke rapportert fra *F. platyphylla*.

## 8 Forslag til videre arbeid

En rekke undersøkelser kan være ønskelig å gjøre som en fortsettelse på dette prosjektet:

- Analysere fraksjonene fra DCM ekstraktet med GC-MS for å identifisere triterpener i stammebarken. Noen triterpener er tidligere rapportert fra planten, men våre data indikerer at triterpenacetater, som tentativt ble identifisert i fraksjon 4 og 5 fra DCM ekstraktet, er kvantitativt viktigere enn triterpenalkoholene i fraksjon 7.
- Identifisere innholdsstoffer i S2 fraksjonen, som var den største fraksjonen fra MeOH-ekstraktet.
- Protocatechusyre og proanthocyanidiner er viktige bestanddeler i barken, og deres biologiske effekter bør studeres ytterligere, for eksempel i modeller for mentale lidelser som er en viktig indikasjon for tradisjonell bruk av planten.
- Isolere triterpener og triterpenacetater i fraksjonene 4,5 og 7, og undersøke deres effekt i modeller for mentale lidelser, og for anti-inflammatorisk effekt.



# Litteraturliste

- . "West African Plants-A Photo Guide." Retrieved 10.03., 2019, from [http://www.westafricanplants.senckenberg.de/root/index.php?page\\_id=14&id=721](http://www.westafricanplants.senckenberg.de/root/index.php?page_id=14&id=721).
- Abubakar, U. S., K. M. Yusuf, G. T. Abdu, T. T. Tyokyaa, H. Sagir, M. N. Mujahid, M. Joseph and S. Muhammad (2016). "Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of malaria in Kano metropolis." Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences **7**(4): 2033-2040.
- Ahmad, N. A., K. Jumbri, A. Ramli, G. N. Abd, J. W. Lim, K. Jumbri, G. N. Abd and H. Ahmad (2018). "A kinetic approach of DPPH free radical assay of ferulate-based protic Ionic liquids (PILs)." Molecules **23**(12).
- Akihisa, T., N. Kojima, T. Kikuchi, K. Yasukawa, H. Tokuda, E. T. Masters, A. Manosroi and J. Manosroi (2010). "Anti-inflammatory and chemopreventive effects of triterpene cinnamates and acetates from shea fat." Journal of Oleo Science **59**(6): 273-280.
- Amos, S., L. Binda, B. Chindo, P. Akah, M. Abdurahman, H. U. Danmallam, C. Wambebe and K. Gamaniel (2001). "Evaluation of methanolic extract of *Ficus platyphylla* on gastrointestinal activity." Indian Journal of Experimental Biology **39**(1): 63-67.
- Amos, S., Chindo, B.A., Edmond, I., Akah P., Wambebe, C., Gamaniel, K.S., (2002). "Antiinflammatory and antinociceptive effects of *Ficus platyphylla* extract in mice and rats." Herbs Spices: 47-53.
- Ao, C., Li, A., Elzaawely, A.A., Xuan, T.D., Tawata, S., (2008). "Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. extract." Food Control **19**: 940-948.
- Arbonnier, M. (2004). Trees, shrubs and lianas of West African dry zones. Weikersheim, Margraf.
- Audu, J. A. (1989). "Medicinal plants and their use in Bauchi state " Niger: 157-168.
- Burkill, H. M. (1997). The useful plants of West tropical Africa. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Chindo, B., J. Anuka, G. Lees, A. Yaro, S. Adamu, S. Amos, C. Wambebe and K. Gamaniel (2008). "Psychopharmacological properties of the saponin fraction of *Ficus platyphylla* stem bark." International Journal of Biological and Chemical Sciences **2**(3): 239-248.
- Chindo, B. A., S. Amos, A. A. Odutola, H. O. Vongtau, J. Abbah, C. Wambebe and K. S. Gamaniel (2003). "Central nervous system activity of the methanol extract of *Ficus platyphylla* stem bark." Journal of Ethnopharmacology **85**(1): 131-137.
- Chindo, B. A., J. A. Anuka, L. McNeil, A. H. Yaro, S. S. Adamu, S. Amos, W. K. Connelly, G. Lees and K. S. Gamaniel (2009). "Anticonvulsant properties of saponins from *Ficus platyphylla* stem bark." Brain research bulletin **78**(6): 276-282.
- Chindo, B. A., Anuka, J.A., Gamaniel, K.S., (2012). "Toxicity screenings of *Ficus platyphylla* stem bark in rats." Pharmacologia **3**.
- Chindo, B. A., E. Kahl, D. Trzeczak, P. Dehmel, A. Becker and M. Fendt (2015). "Standardized extract of *Ficus platyphylla* reverses apomorphine-induced changes in prepulse inhibition and locomotor activity in rats." Behavioural Brain Research **293**: 74-80.
- Chindo, B. A., H. Schroder and A. Becker (2015). "Methanol extract of *Ficus platyphylla* ameliorates seizure severity, cognitive deficit and neuronal cell loss in pentylenetetrazole-kindled mice." Phytomedicine **22**(1): 86-93.

- Chindo, B. A., H. Schroder, A. Koeberle, O. Werz and A. Becker (2016). "Analgesic potential of standardized methanol stem bark extract of *Ficus platyphylla* in mice: Mechanisms of action." Journal of Ethnopharmacology **184**: 101-106.
- Chindo, B. A., J. Ya'U, N. M. Danjuma, S. E. Okhale, K. S. Gamaniel and A. Becker (2014). "Behavioral and anticonvulsant effects of the standardized extract of *Ficus platyphylla* stem bark." Journal of Ethnopharmacology **154**(2): 351-360.
- Chindo, I. Y., H. M. Adamu and K. S. Gamaniel (2011). "1,4-dimethylbenzenedicarboxylic acid ester from the ethanol extracts of *Ficus platyphylla* stem bark." International Journal of Applied Chemistry **7**(1): 101-109.
- Claridge, T. W. (2015). High Resolution NMR techniques in Organic Chemistry. Amsterdam, Elsevier.
- Czapski, G. A., K. Czubowicz and R. P. Strosznajder (2012). "Evaluation of the antioxidative properties of lipoxygenase inhibitors." Pharmacological Reports **64**(5): 1179-1188.
- Czochanska, Z., L. Y. Foo, R. H. Newman and L. J. Porter (1980). "Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units, and molecular weight." Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1 (10): 2278-2286.
- Da Rocha, C. Q., F. C. Vilela, F. V. Santa-Cecilia, G. P. Cavalcante, W. Vilegas, A. Giusti-Paiva and M. H. dos Santos (2015). "Oleanane-type triterpenoid: an anti-inflammatory compound of the roots *Arrabidaea brachypoda*." The Brazilian Journal of Pharmacognosy **25**(3): 228-232.
- Danmalam, H. U., Abdulrahman, E.M., (2003). "Preliminary phytochemical studies on the stem bark of *Ficus platyphylla*, Del." Nigerian Journal of Natural Products and Medicine **7**.
- Delgado, S., F. Nunez, B. Sanchez, E. Bermudez and J. M. Rodriguez (2011). "Toxicogenic microorganisms in medicinal plants used for ritual protection of infants." Food Research International **44**(1): 304-309.
- Eberhardt, T. L. and R. A. Young (1994). "Conifer Seed Cone Proanthocyanidin Polymers: Characterization by <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy and Determination of Antifungal Activities." Journal of Agricultural and Food Chemistry **42**(8): 1704-1708.
- Eddy, N. O., P. Ameh, C. E. Gimba and E. E. Ebenso (2012). "Chemical information from GCMS of *Ficus platyphylla* gum and its corrosion inhibition potential for mild steel in 0.1 M HCl." International Journal of Electrochemical Science **7**(6): 5677-5691.
- El-Sayyad, S. M., H. M. Sayed and S. A. Mousa (1986). "Chemical constituents and preliminary anthelmintic activity of *Ficus platyphylla* (Del)." Bulletin of Pharmaceutical Sciences (Assiut University) **9**(1): 164-177.
- Greibrokk, T., Lundanes, E., Rasmussen, K.E., og Karlsen, J., (1994). Kromatografi: separasjon og deteksjon. Oslo, Universitetsforlaget.
- Grønhaug, T. E. (2006). Antioksidanter i *Xylocarpus moluccensis*, en medisinske plante fra mangroveskogen i Bangladesh. Master, Universitetet i Oslo.
- Ho, G. T. T., Kase, E.T., Wangensteen, H., Barsett, H., (2017). "Phenolic elderberry extracts, anthocyanins, procyanidins, and metabolites influence glucose and fatty acid uptake in human skeletal muscle cells." Journal of Agricultural and Food Chemistry **65**: 2677-2685.
- Jung, J.-W., J.-H. Park, Y.-J. Jung, C.-H. Lee, D. Han and N.-I. Baek (2014). "Isolation and identification of triterpenoids from the mulberry (*Morus alba*) root bark." Applied Biological Chemistry **57**(4): 295-299.
- Kennedy, J. A., Jones, G.P., (2001). "Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**: 1740-1746.
- Khallouki, F., Haubner, R., Ulrich, C.M., Owen, R.W., (2011). "Ethnobotanical survey, chemical composition, and antioxidant capacity of methanolic extract of the root bark of *Annona cuneata* Oliv." Journal of Medicinal Food **14**: 1397-1402.

Khatab, A. A. (1993). "Coumarin constituents of some Egyptian *Ficus* species." Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University **31**(1): 19-20.

Kone, W. M., A. G. Koffi, E. L. Bomisso and F. H. T. Bi (2012). "Ethnomedical study and iron content of some medicinal herbs used in traditional medicine in Cote d'Ivoire for the treatment of anaemia." African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines **9**(1): 81-87.

Kubmarawa, D., G. A. Ajoku, N. M. Enwerem and D. A. Okorie (2007). "Preliminary phytochemical and antimicrobial screening of 50 medicinal plants from Nigeria." African Journal of Biotechnology **6**(14): 1690-1696.

Kuete, V., Nana, F., Ngmeni, B., Mbaveng, A.T., Keumedjio, F., Ngadjui, B.T., (2009). "Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae)." Journal of Ethnopharmacology **124**: 556-561.

Kweifio-Okai, G., Field, B., Rumble, B.A., Macrides, T.A., De Munk, F., (1995). "Esterification improves antiarthritic effectiveness of lupeol." Drug Development Research **35**: 137-141.

Liu, C. L., Wang, J.M., Chu, C.Y., Cheng, M.T., Tseng, T.H., (2002). "In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity." Food and Chemical Toxicology **40**: 635-641.

Lyckander, I. M. and K. E. Malterud (1996). "Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* prevent oxidative inactivation of 15-lipoxygenase." Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids **54**(4): 239-246.

Maiga, A., K. E. Malterud, D. Diallo and B. S. Paulsen (2006). "Antioxidant and 15-lipoxygenase inhibitory activities of the Malian medicinal plants *Diospyros abyssinica* (Hiern) F. White (*Ebenaceae*), *Lannea velutina* A. Rich (*Anacardiaceae*) and *Crossopteryx febrifuga* (Afzel) Benth. (*Rubiaceae*)." Journal of Ethnopharmacology **104**(1-2): 132-137.

Mathisen, E., D. Diallo, O. M. Andersen and K. E. Malterud (2002). "Antioxidants from the bark of *Burkea africana*, an African medicinal plant." Phytotherapy Research **16**(S1): 148-153.

Molander, M., L. Nielsen, S. Soegaard, D. Staerk, N. Roensted, D. Diallo, K. Z. Chifundera, J. van Staden and A. K. Jager (2014). "Hyaluronidase, phospholipase A2 and protease inhibitory activity of plants used in traditional treatment of snakebite-induced tissue necrosis in Mali, DR Congo and South Africa." Journal of Ethnopharmacology **157**: 171-180.

Molyneux, P. (2004). "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity." Songklanakarin Journal of Science and Technology **26**(2): 211-219.

Nadembega, P., J. I. Boussim, J. B. Nikiema, F. Poli and F. Antognoni (2011). "Medicinal plants in Baskoure, Kourittenga Province, Burkina Faso: an ethnobotanical study." Journal of Ethnopharmacology **133**(2): 378-395.

Nguyen, M. T. T., Awale, S., Tezuka, Y., Ueda, J.Y., Tran, Q.L., Kadota, S., (2006). "Xanthin oxidase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum sinense*." Planta Medica **72**: 46-51.

Ntenga, R., F. D. Pagore, A. Pizzi, E. Mfoumou and L.-M. A. Ohandja (2017). "Characterization of tannin-based resins from the barks of *Ficus platyphylla* and of *Vitellaria paradoxa*: composites' performances and applications." Materials Sciences and Applications **8**(12): 899-917.

Ochuko, L. E., Rahman, M.H., Choudhary, M.I., Achyut, A., Mesaik, A.M., Atolani, O., Banerjee, P., Preissner, R., Aliyu, M., Islam, M.S., (2017). "Anti-diabetic effect of the ethyl acetate fraction of *Clerodendrum volubile*: protocatechuic acid suppresses phagocytic oxidative burst and modulates inflammatory cytokines." Biomedicine and Pharmacotherapy **86**: 307-315.

Okoye, N. N., Ajaghaku, D.L., Okeke, H.N., Ilodigwe, E.E., Nworu, C.S., Okoye, F.B.C., (2014). " $\beta$ -Amyrin and  $\alpha$ -amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound antiinflammatory activity. ." Pharmaceutical Biology **52**: 1478-1486.

Orafaie, A., M. M. Matin and H. Sadeghian (2018). "The importance of 15-lipoxygenase inhibitors in cancer treatment." Cancer and Metastasis Reviews **37**(2-3): 397-408.

Pacher, P., Nivorozhkin, ., Szabo, C., (2006). "Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol." 58: 87-114.

Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E, (2012). Introduction to pharmaceutical chemical analysis. Chichester.

Pham, A. T., Malterud, K.E., Paulsen, B.S., Diallo D., Wangenstein, H., (2011). "DPPH radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity of *Terminalia macroptera* leaves." Natural Product Communications **6**: 1125-1128.

Pimentel da Silva, U., G. M. Furlani, A. J. Demuner, O. L. Marques da Silva and E. V. V. Varejao (2018). "Allelopathic activity and chemical constituents of extracts from roots of *Euphorbia heterophylla* L." Natural Product Research: Ahead of Print.

Rösch, D., C. Mügge, V. Fogliano og L.W. Kroh (2002). "Antioxidant oligomeric proanthocanidins from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**: 6712-6718.

Sadeghian, H. and A. Jabbari (2016). "15-Lipoxygenase inhibitors: a patent review." Expert Opinion on Therapeutic Patents **26**(1): 65-88.

Satyajit, S. D., Nahar, L. (2012). Natural products isolation. New York.

Sawadogo, W. R., D. G. Le, A. Maciuk, C. Bories, P. M. Loiseau, B. Figadere, I. P. Guissou and O. G. Nacoulma (2012). "In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of five medicinal plants from Burkina Faso." Parasitology Research **110**(5): 1779-1783.

Sayed, H. M., E. Y. Backheet and S. M. El-Sayyad (1991). "Further flavonoids and coumarins from *Ficus platyphylla* Del. leaves." Bulletin of the Faculty of Science. Assiut University **20**(1): 105-113.

Shittu, I. i., A. Emmanuel and A. J. Nok (2011). "Antimalaria effect of the ethanolic stem bark extracts of *Ficus platyphylla* Del." Journal of Parasitology Research **2011**: 618209.

Silva, C. A. d. M., O. e. M., R., I. S. Resck and D. Silveira (2016). "Triterpenes from *Pouteria gardneri* (Mart. & Miq.) Baehni extracts." Journal of Applied Pharmaceutical Science **6**(12): 197-201.

Solomons T.W.G., G. B. Fryhle and S. A. Snyder (2017). Solomons' Organic Chemistry. Hoboken, John Wiley & Sons.

Sultana, N., Saify, Z.S., (2012). "Naturally occurring and synthetic agents as potential anti-inflammatory and immunomodulants." Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry **11**: 3-19.

Supelco (2009). VersaFlash high throughput flash purification. Supelco. Bellefonte, PA,USA, Supelco.

Tsiftoglou, O. S., Lazari, D.M., Stefanakis, M.K., Kokkalou, E.L. (2018). "Flavonoids and phenolic acids from the aerial parts of *Alyssum alyssoides* L. (*Brassicaceae*). ." Biochemical Systematics and Ecology **83**: 51-53.

Ugwah-Oguejiofor, C. J., S. O. Bello, R. U. Okolo, E. U. Etuk, M. O. Ugwah and V. U. Igbokwe (2011). "*Ficus platyphylla* promotes fertility in female *Rattus norvegicus* Wistar strain: a preliminary study." Reproductive Biology and Endocrinology **9**: 145.

Ugwah-Oguejiofor, C. J., S. O. Bello, R. U. Okolo, E. U. Etuk, M. O. Ugwah, V. U. Igbokwe and M. Umar (2014). "Effect of aqueous extract of *Ficus platyphylla* on female Wistar rats with estradiol valerate-induced polycystic ovarian syndrome." International Journal of Phytomedicine **6**(3): 405-411.

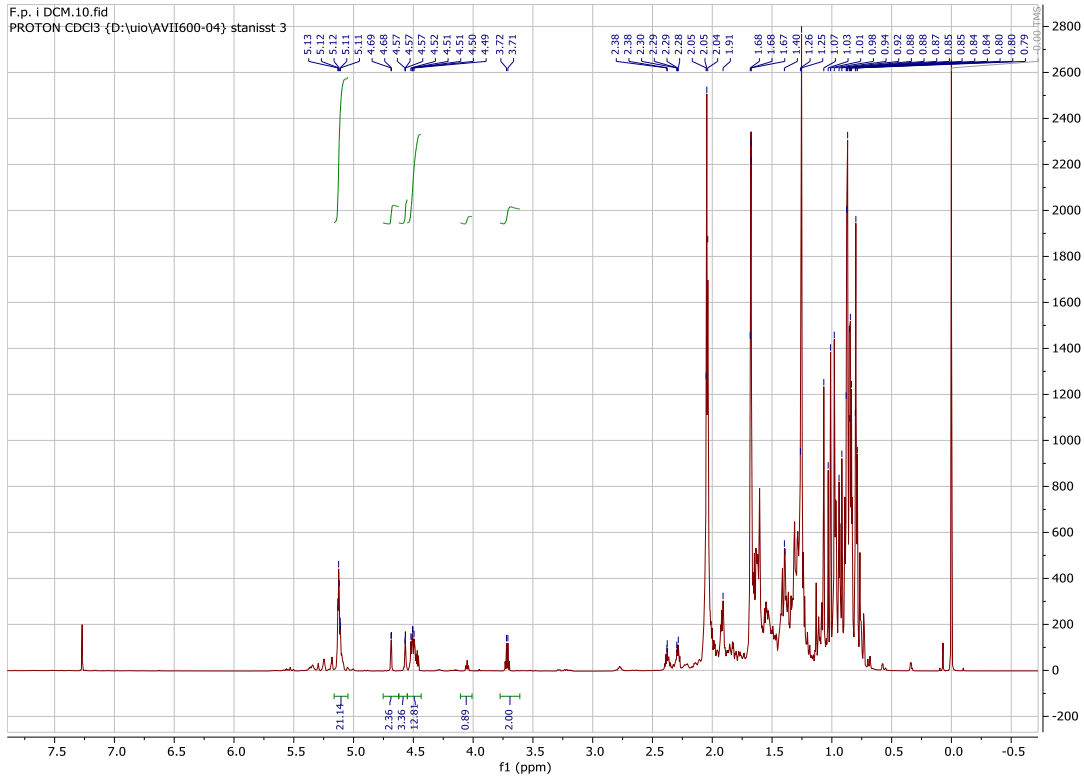
United States Department of Agriculture. (2019). "USDA classification for kingdom plantae down to genus *Ficus* L." Retrieved 15.03., 2019, from <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=FICUS>.

Useful Tropical Plants. (2018). from <http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Ficus+platyphylla>.

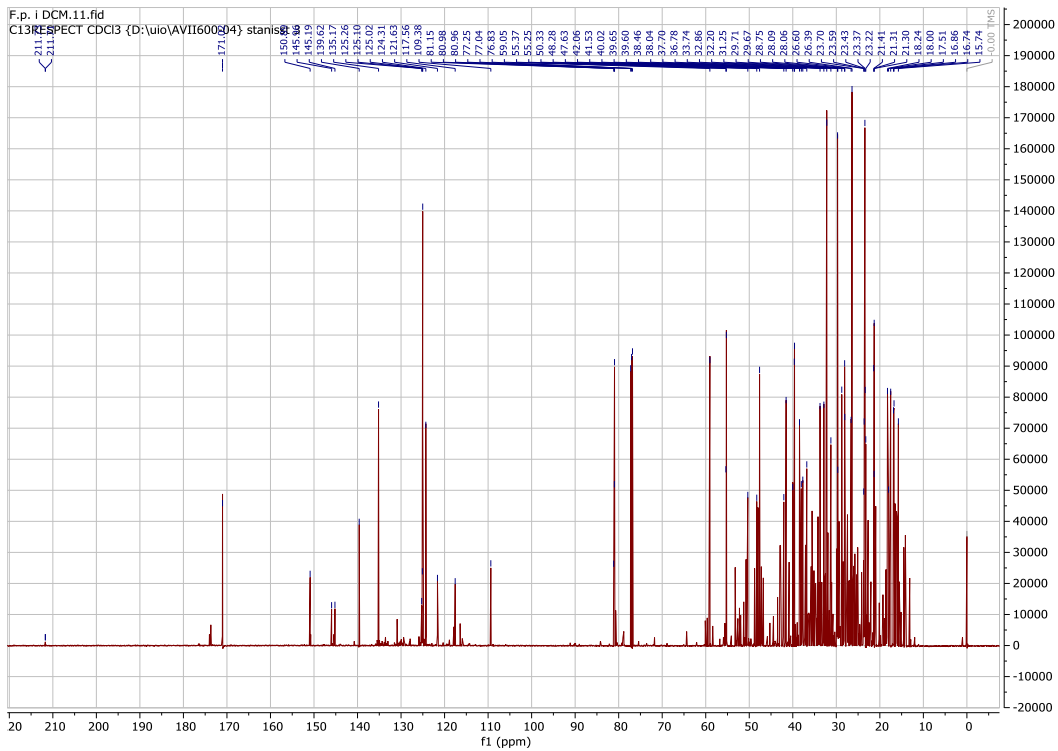
Wang, J., D. Shi, M. Zheng, B. Ma, J. Cui, C. Liu and C. Liu (2017). "Screening, separation, and evaluation of xanthine oxidase inhibitors from *Paeonia lactiflora* using chromatography combined with a multi-mode microplate reader." Journal of Separation Science **40**(21): 4160-4167.

Wangensteen, H., A. B. Samuelsen and K. E. Malterud (2004). "Antioxidant activity in extracts from coriander." Food Chemistry **88**(2): 293-297.

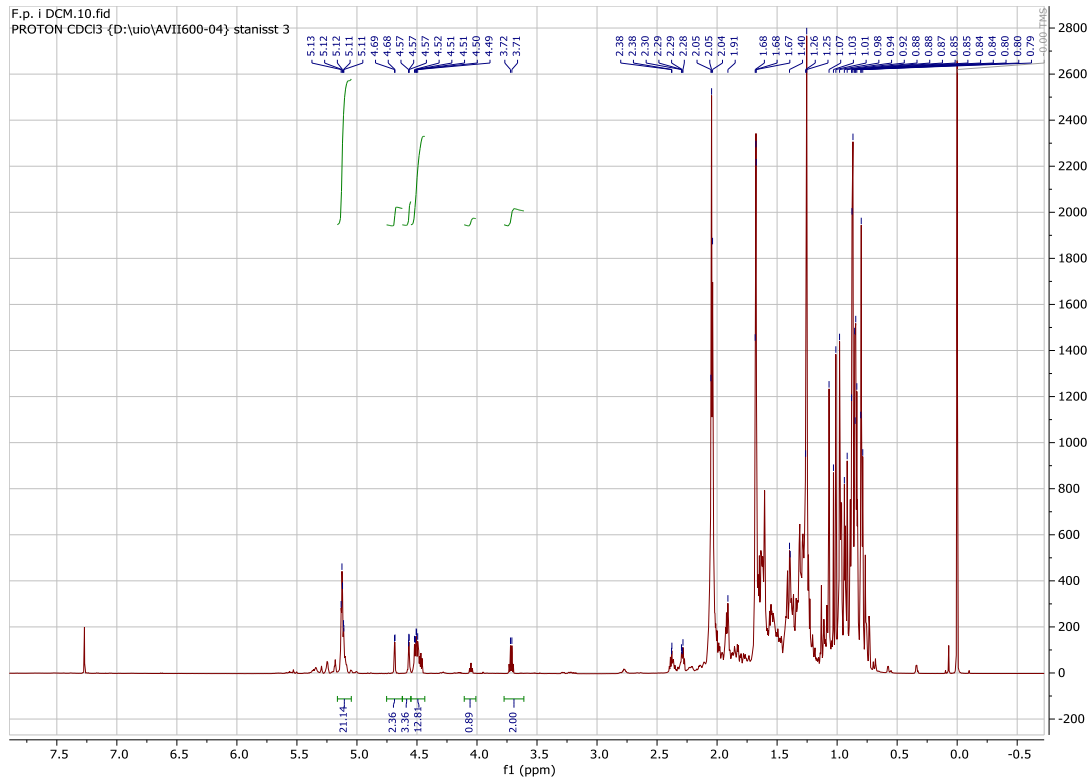
# Vedlegg



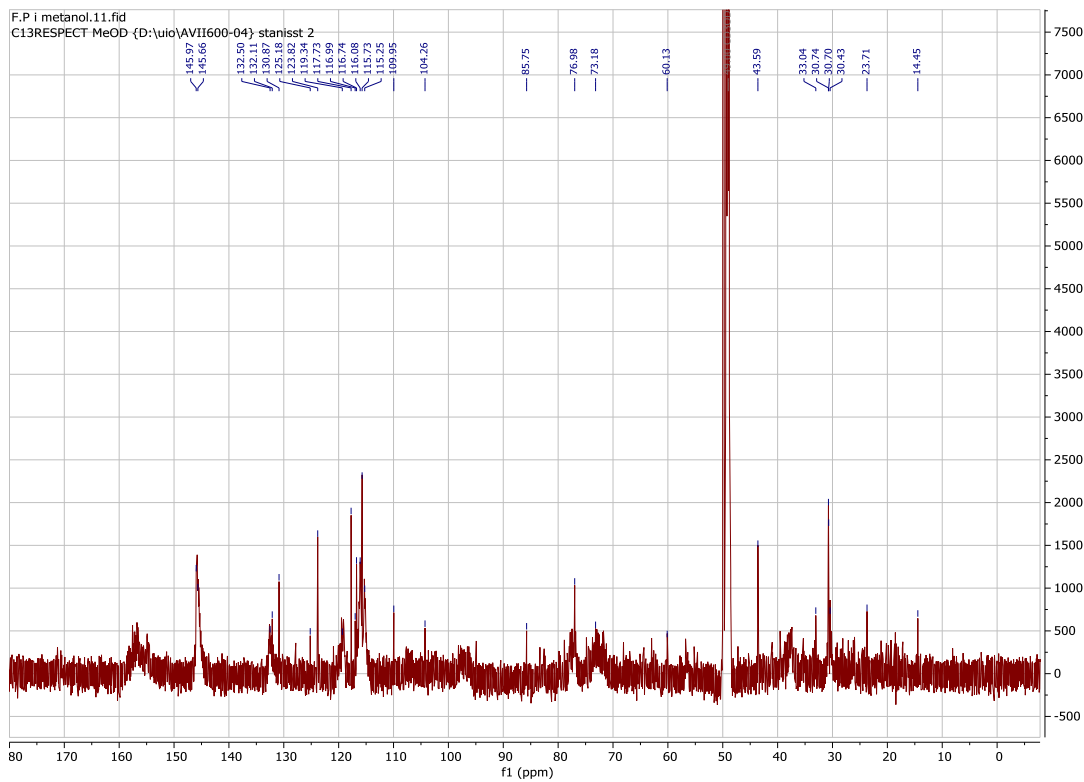
Vedlegg 1.  $^1\text{H}$  NMR-spektrum av *F. platyphylla* DCM-ekstrakt



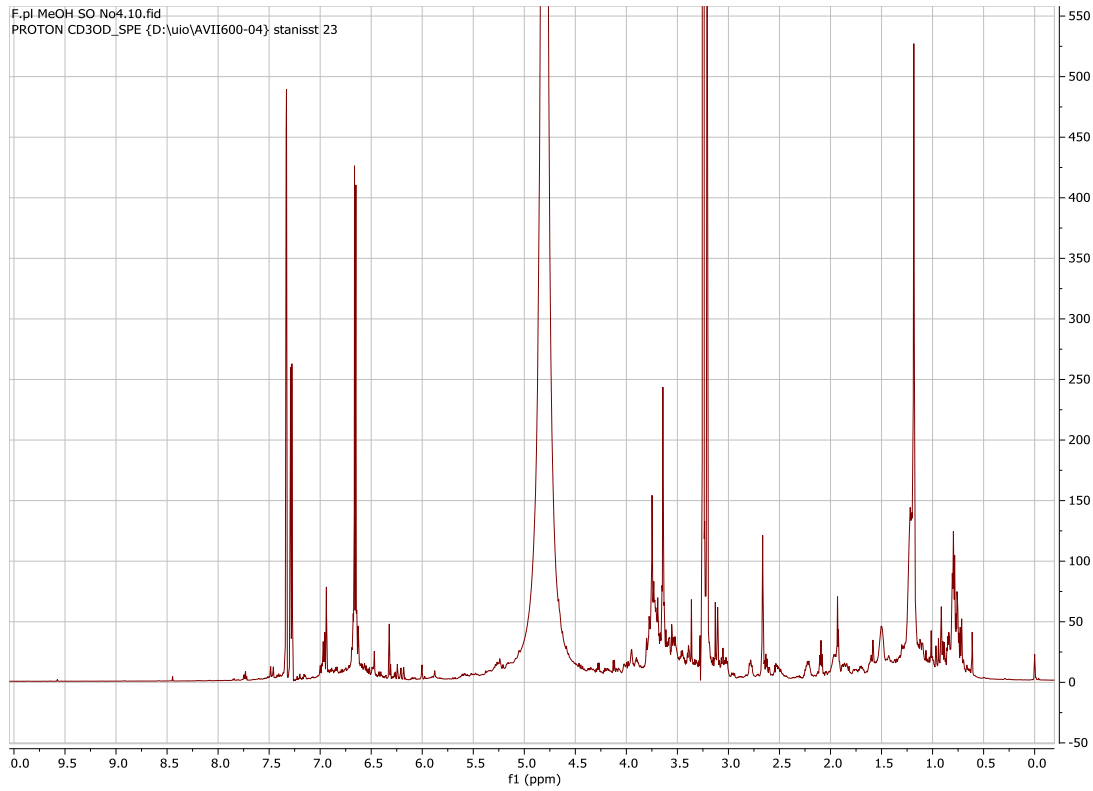
Vedlegg 2.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrum av *F. platyphylla* DCM-ekstrakt



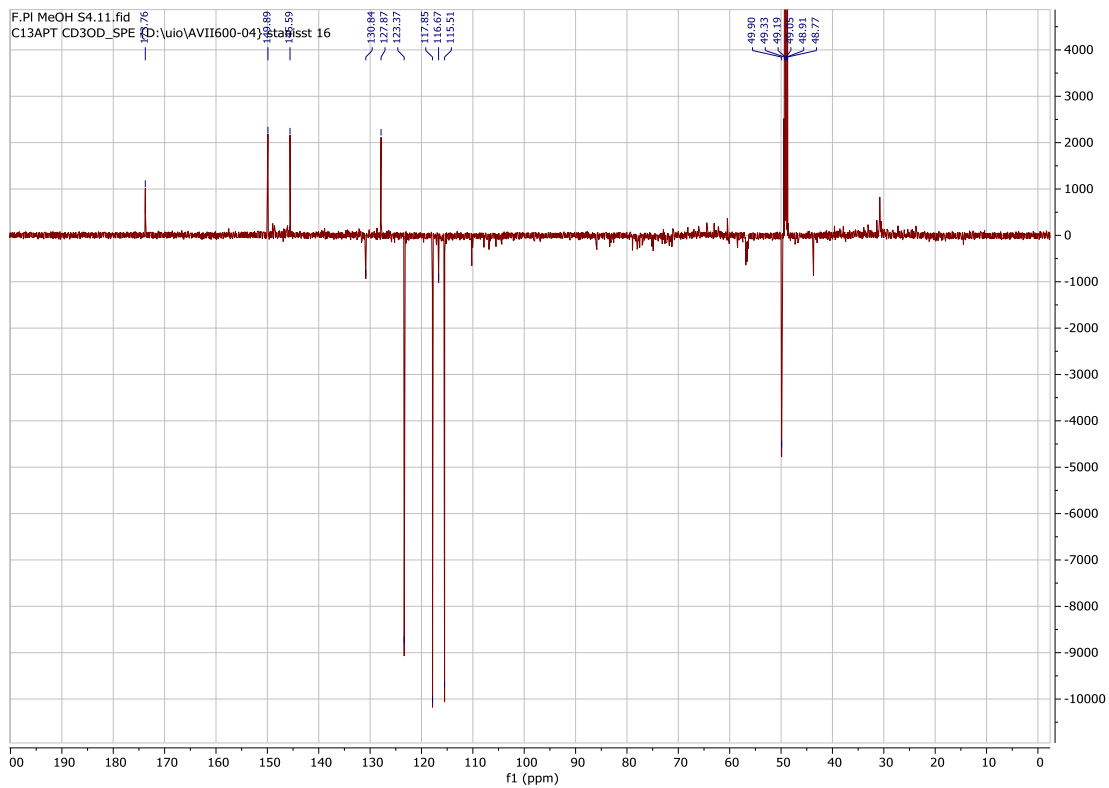
Vedlegg 3. <sup>1</sup>H NMR-spektrum av *F. platyphylla* MeOH-ekstrakt



Vedlegg 4. <sup>13</sup>C NMR-spektrum av *F. platyphylla* MeOH-råekstrakt

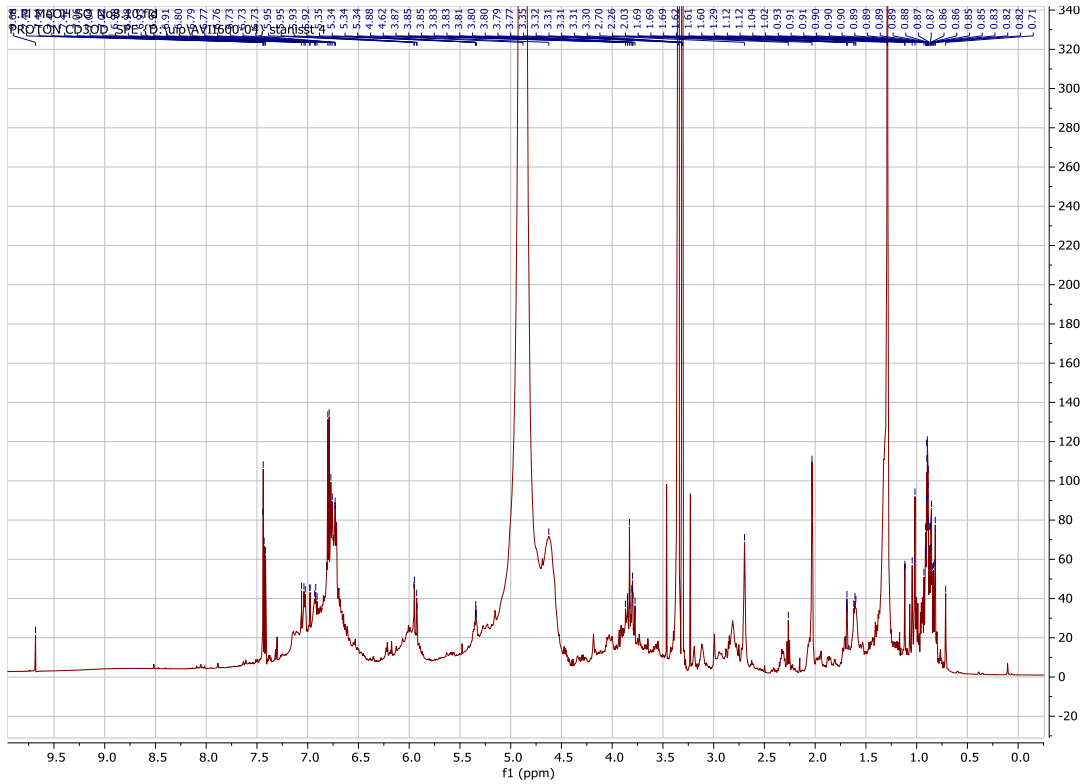


Vedlegg 5.  $^1\text{H}$  NMR-spektrum av MeOH S4 fraksjon

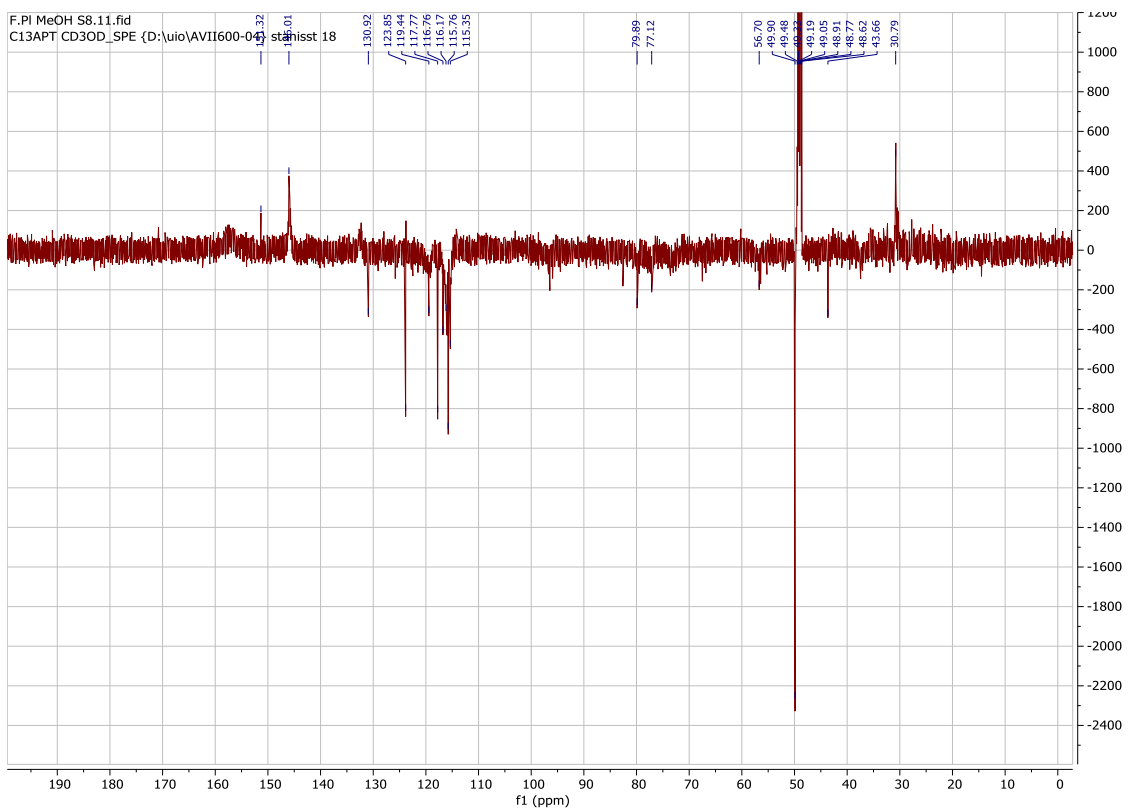


Vedlegg 6.  $^{13}\text{C}$ -APT NMR spektrum av MeOH S4 fraksjon

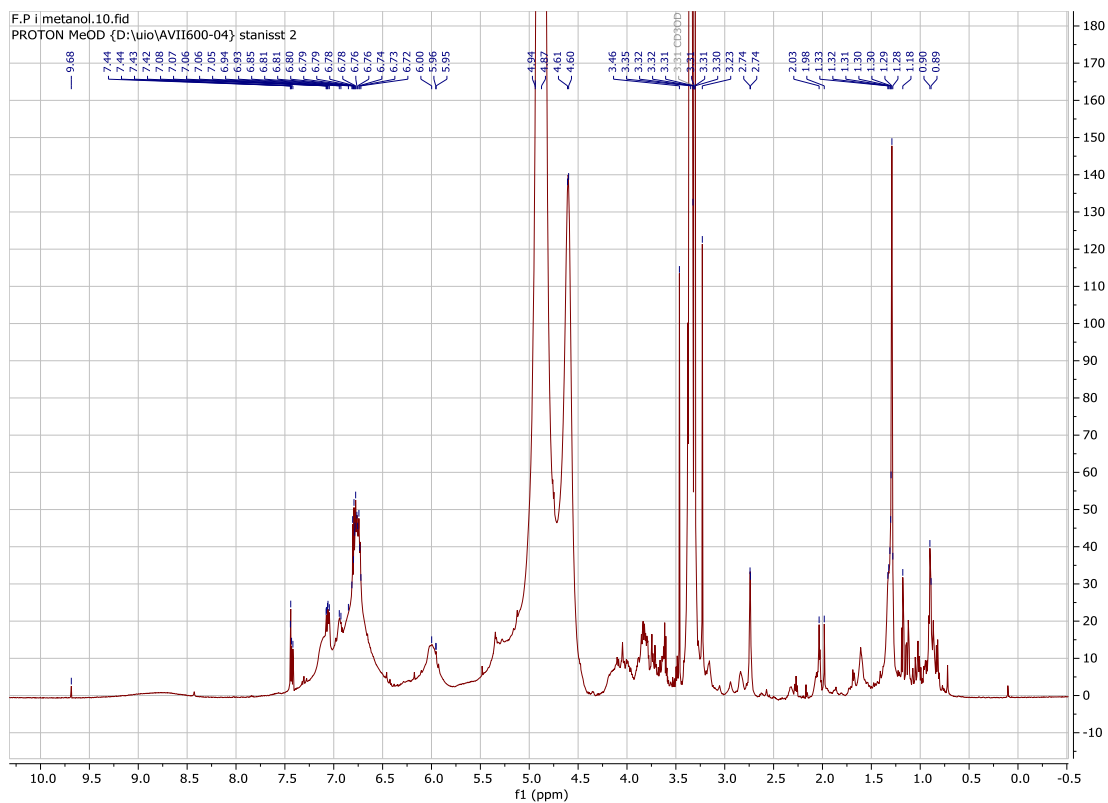




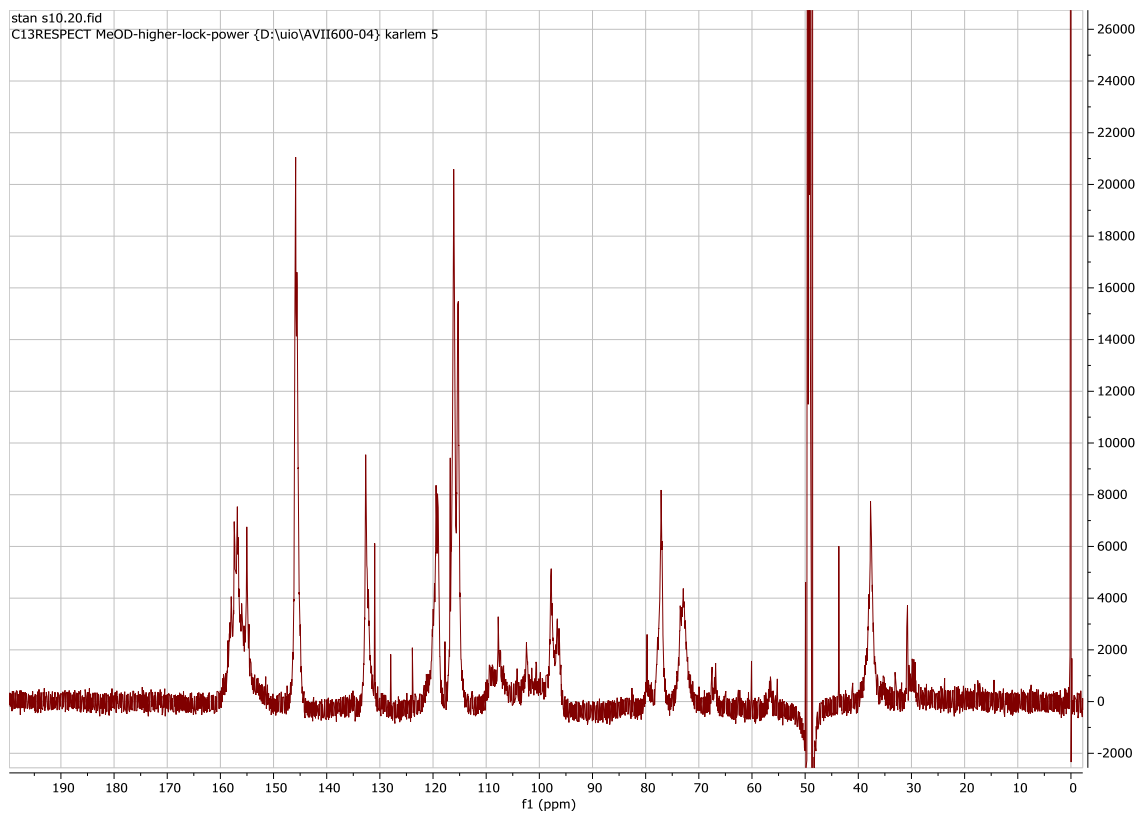
Vedlegg 7. <sup>1</sup>H-NMR spektrum av MeOH S8 fraksjon



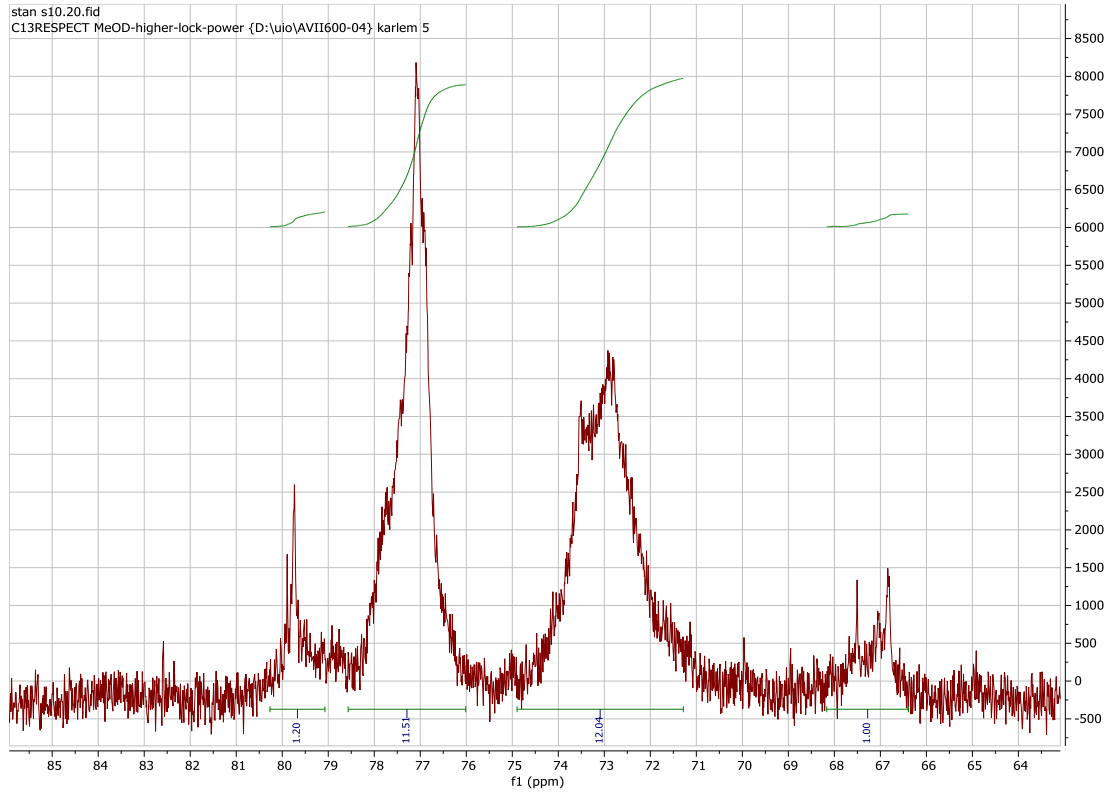
Vedlegg 8. <sup>13</sup>C-APT NMR spektrum av MeOH S8 fraksjon



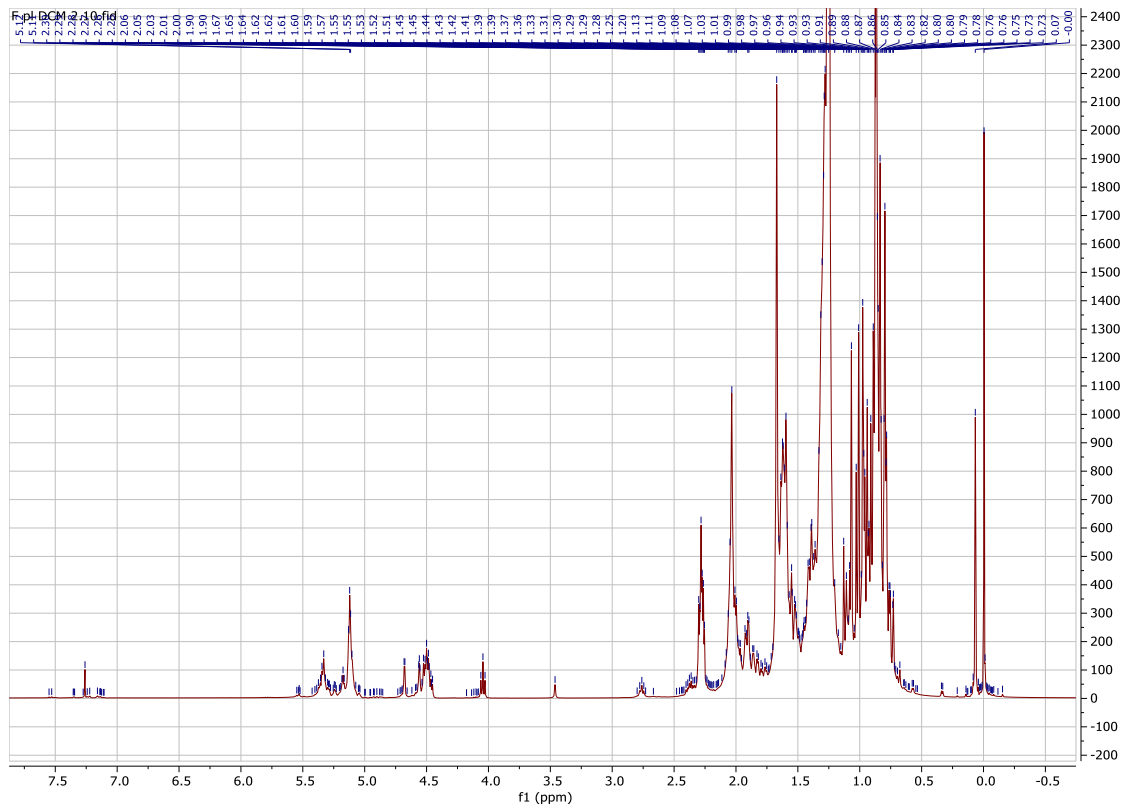
Vedlegg 9.  $^1\text{H}$ -NMR spektrum av MeOH S10 fraksjon



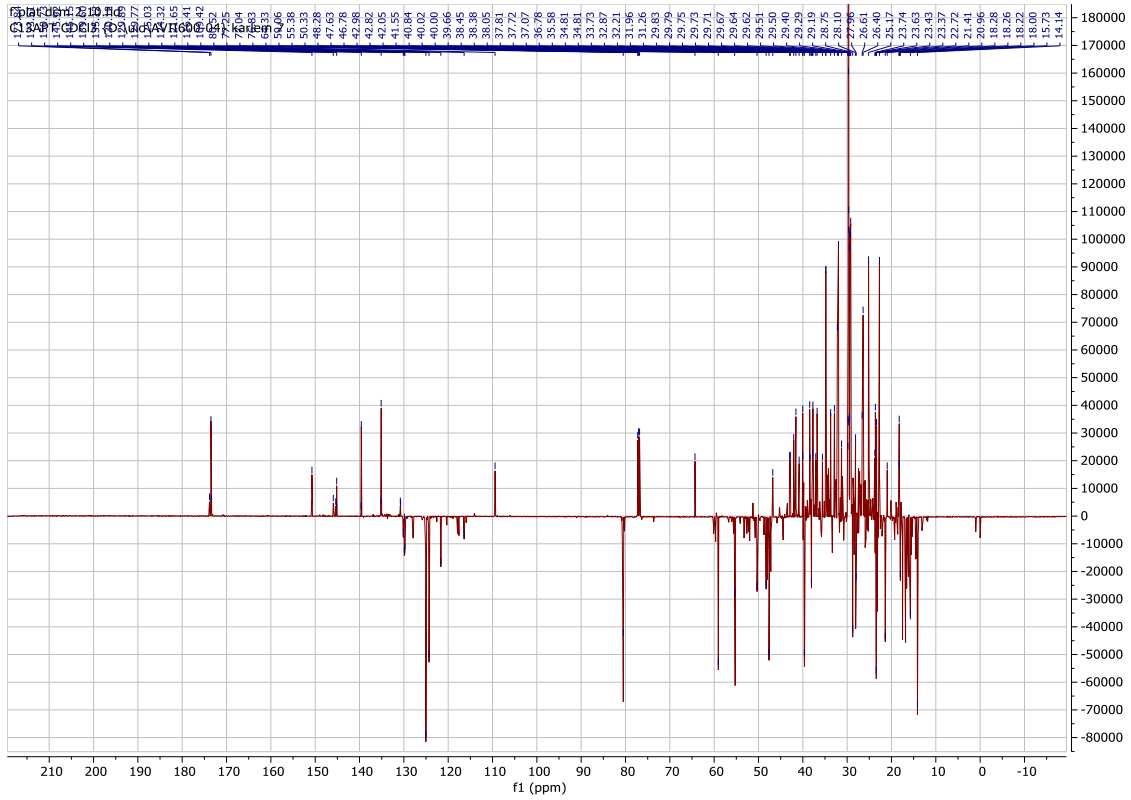
Vedlegg 10.  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum av MeOH S10 fraksjon



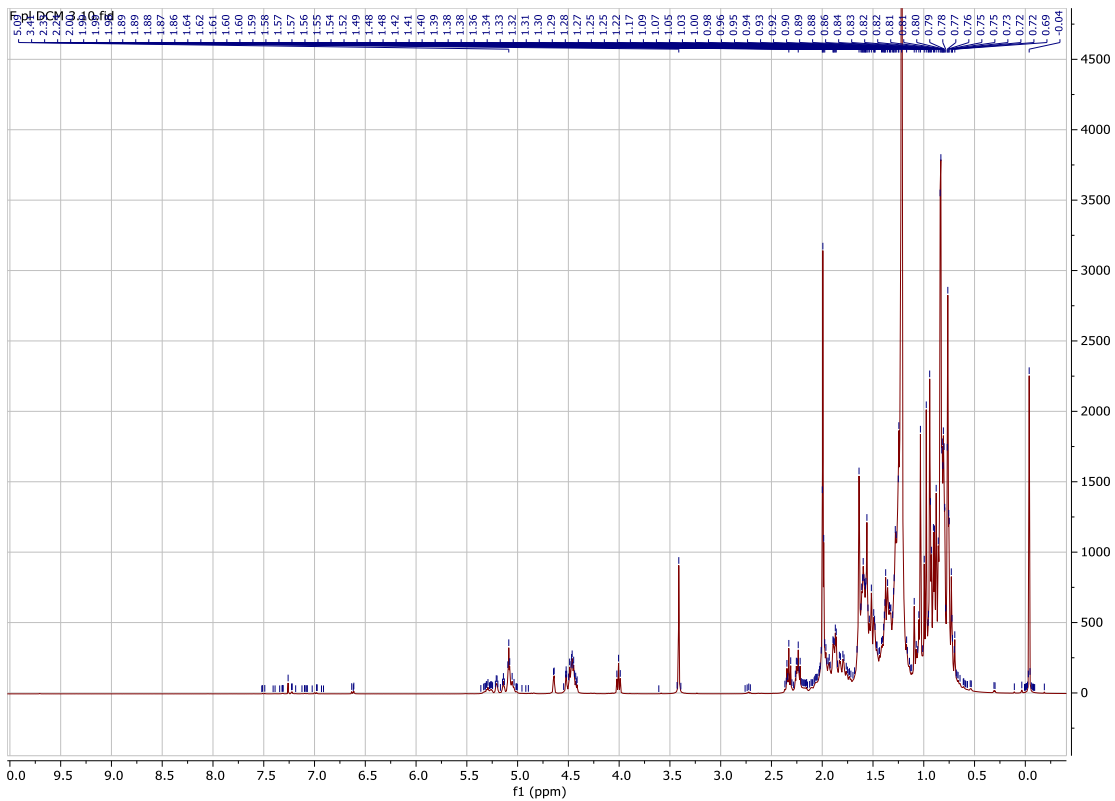
Vedlegg 11.  $^{13}\text{C}$ -APT NMR spektrum (utsnitt) av MeOH S10 fraksjon



Vedlegg 12.  $^1\text{H}$ -NMR spektrum av DCM-2 fraksjon



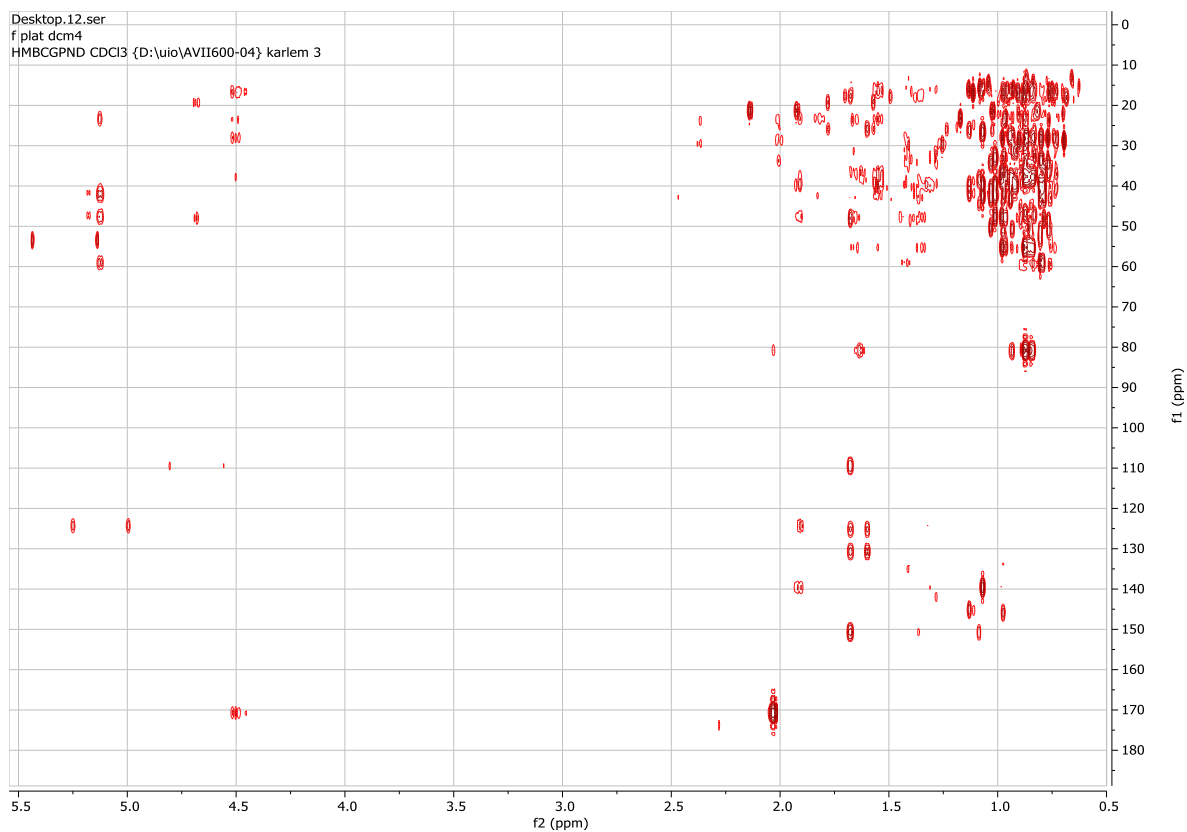
Vedlegg 13. <sup>13</sup>C-APT NMR spektrum av DCM-2 fraksjon



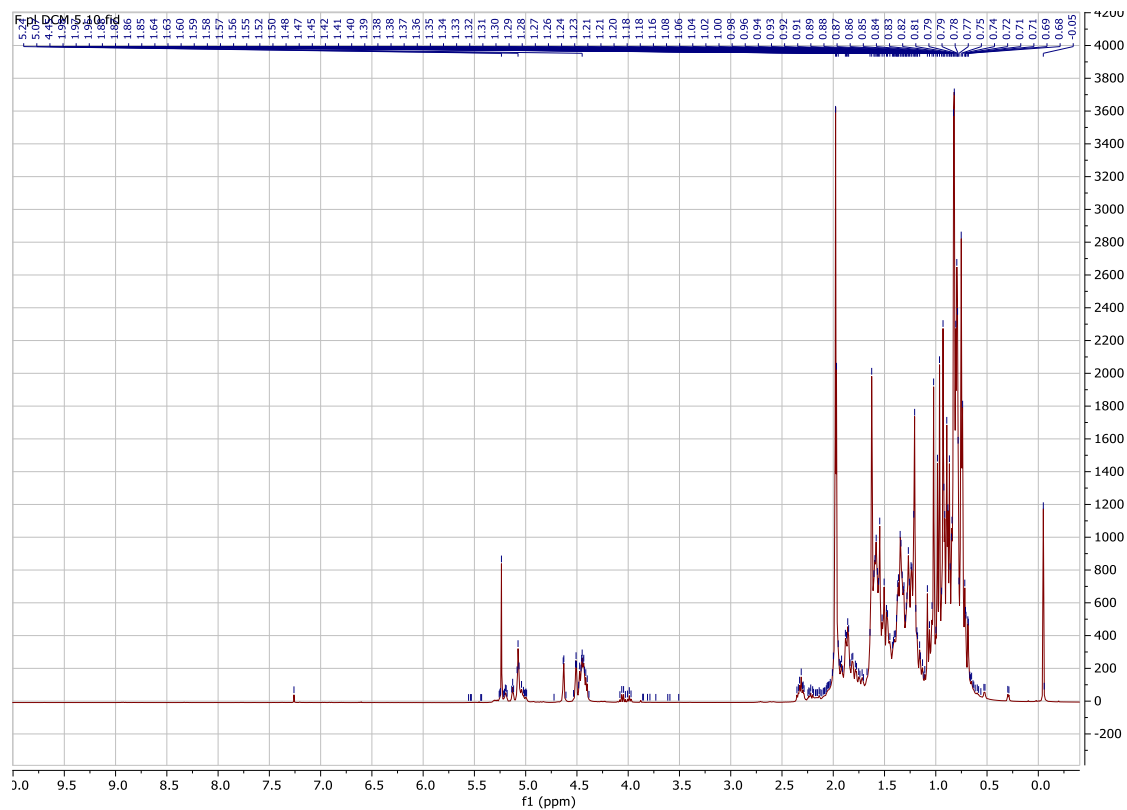
Vedlegg 14. <sup>1</sup>H-NMR spektrum av DCM-3 fraksjon



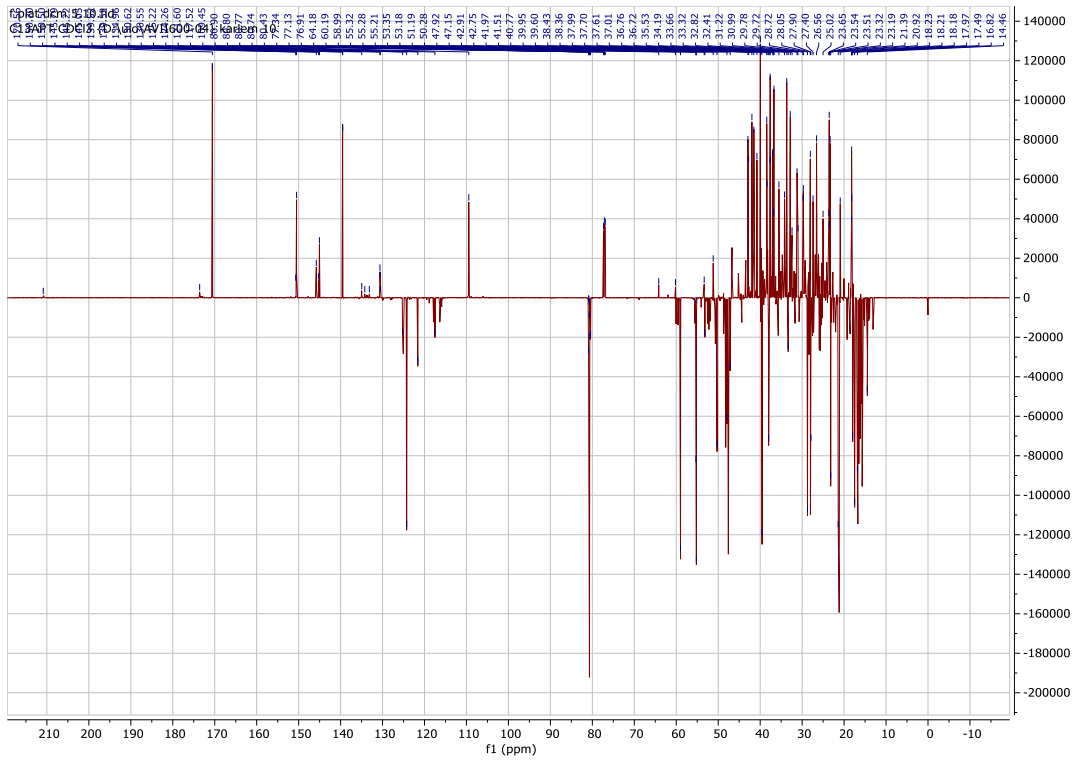




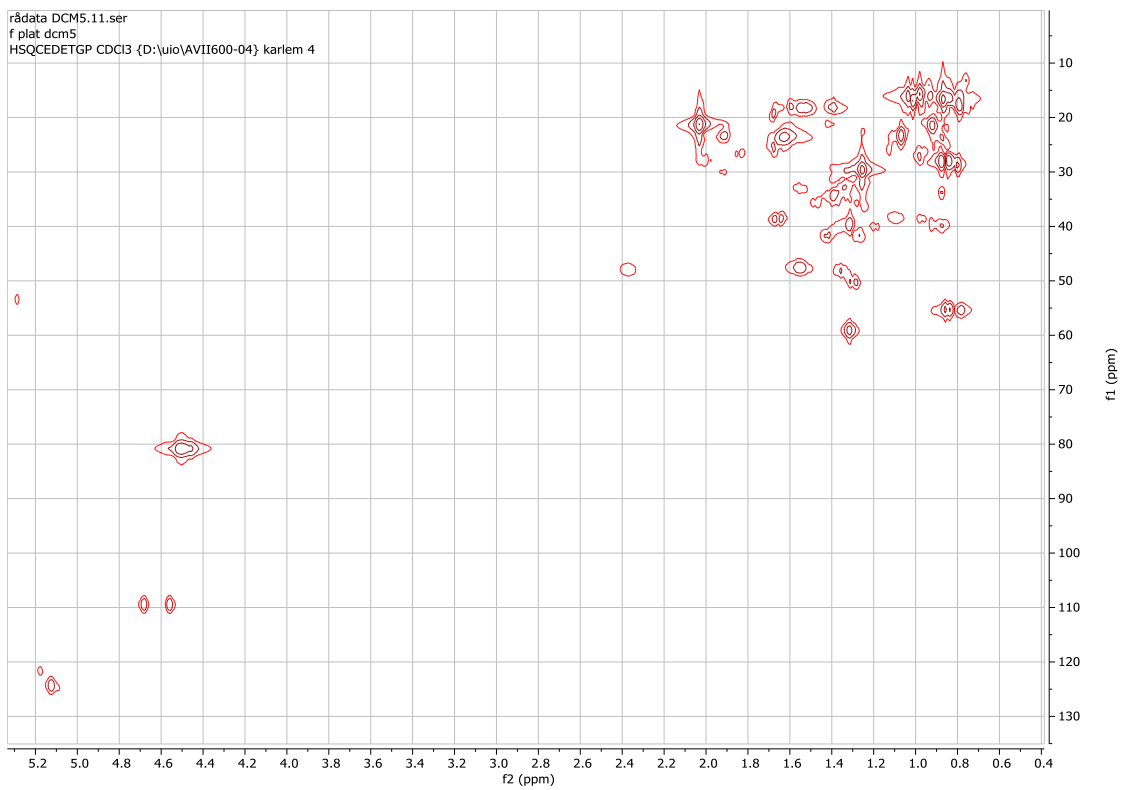
Vedlegg 19. HMBC-NMR spektrum av DCM-4 fraksjon



Vedlegg 20. <sup>1</sup>H-NMR spektrum av DCM-5 fraksjon

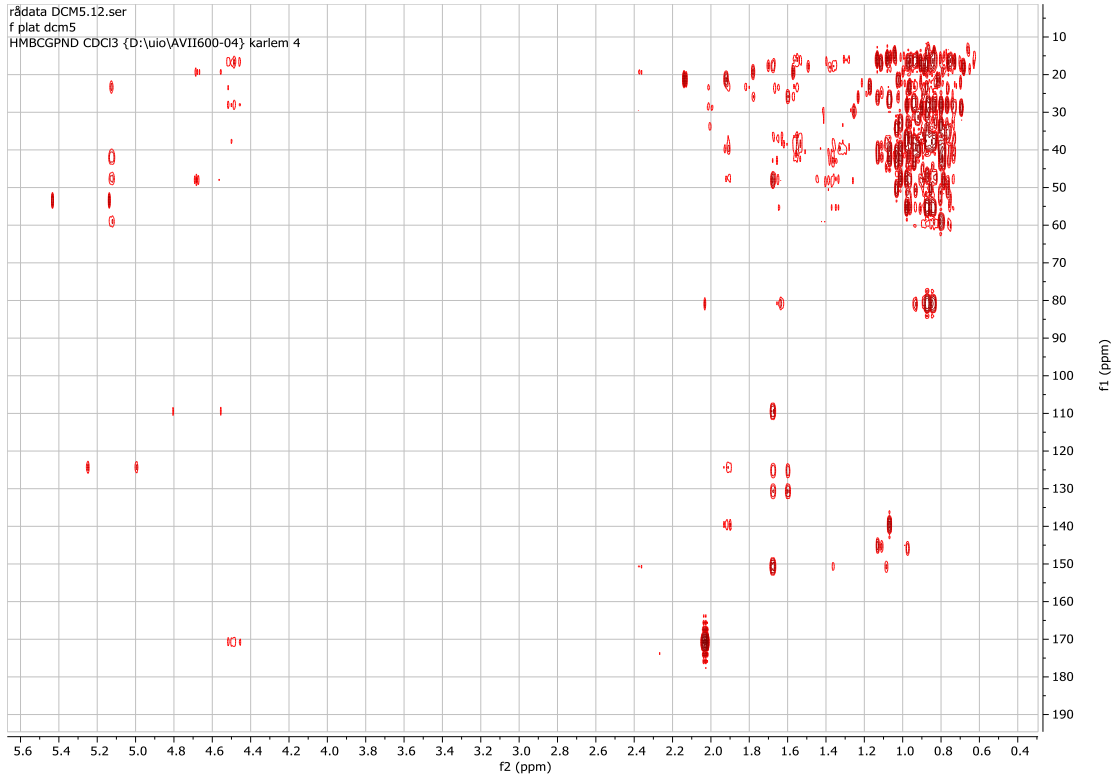


Vedlegg 21.  $^{13}\text{C}$ -APT NMR spektrum av DCM-5 fraksjon

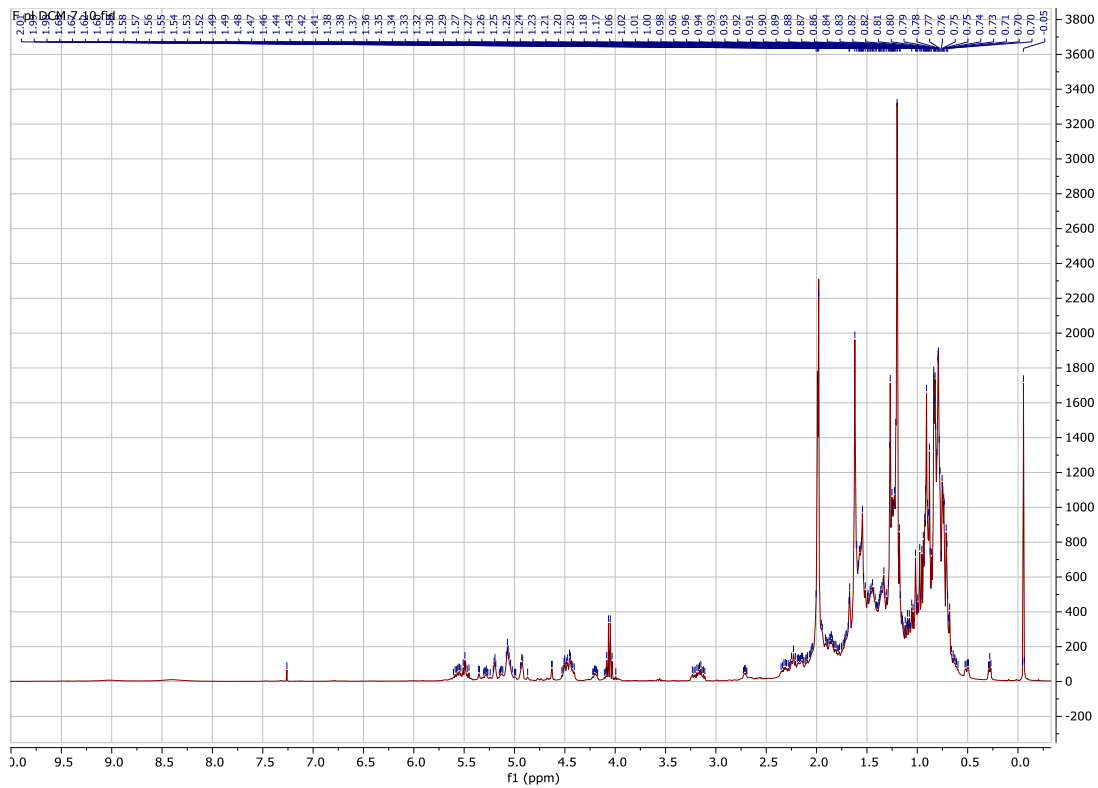


Vedlegg 22. HSQC NMR spektrum av DCM-5 fraksjon

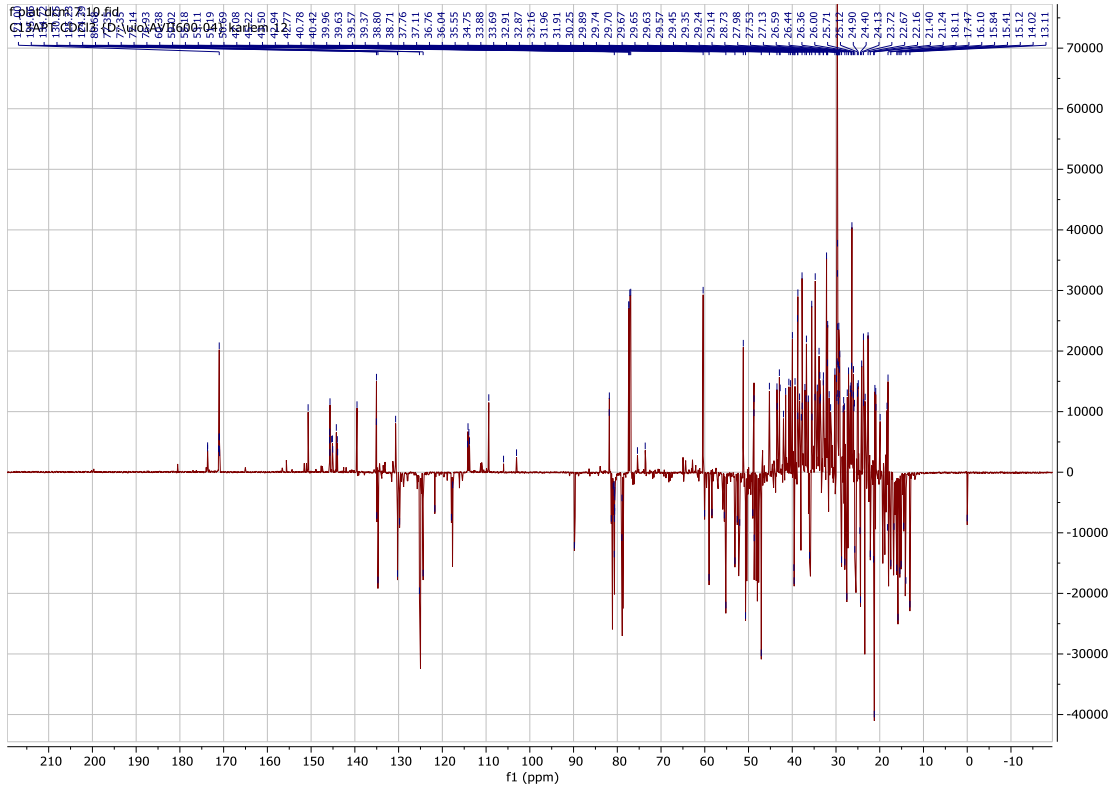




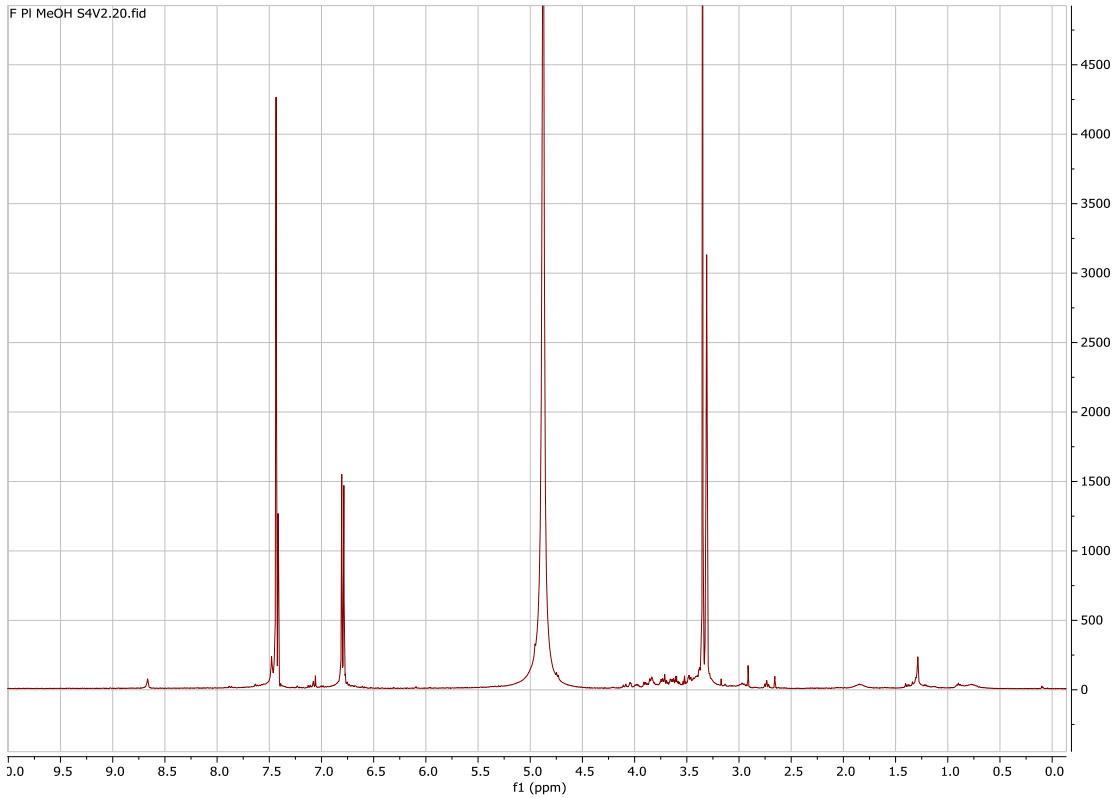
Vedlegg 23. HMBC-NMR spektrum av DCM-5 fraksjon



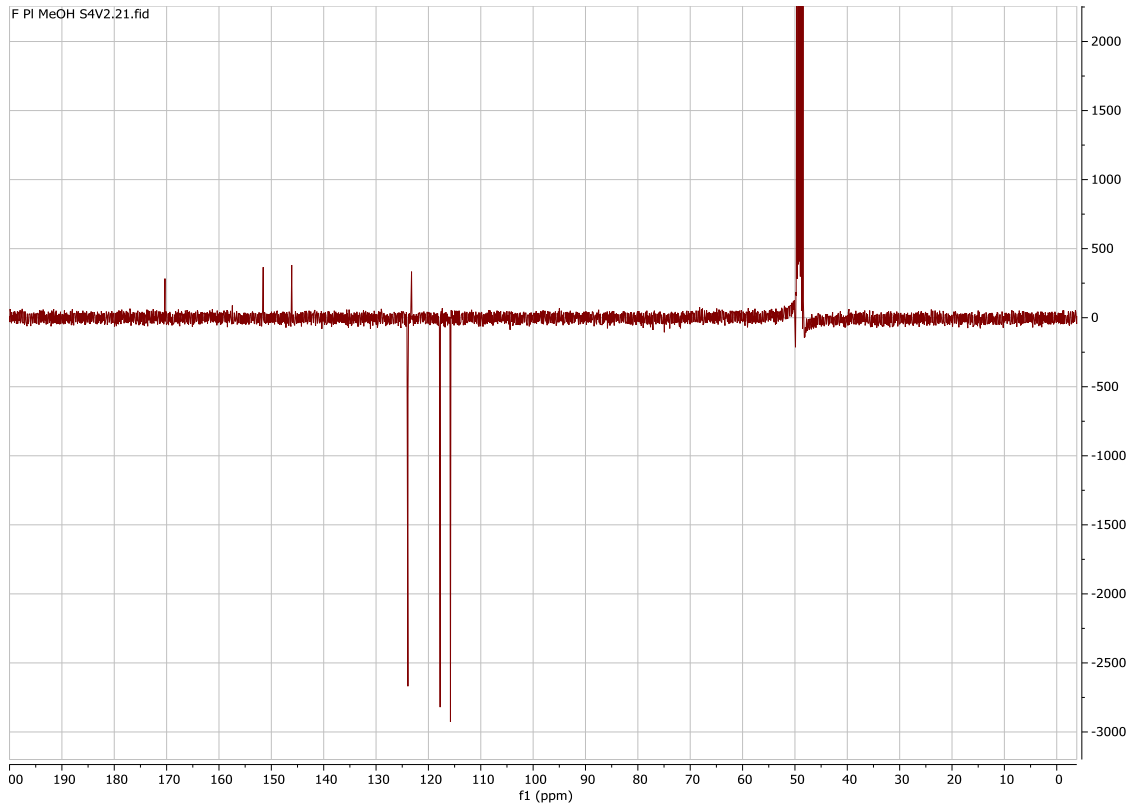
Vedlegg 24.  $^1\text{H}$ -NMR spektrum av DCM-7 fraksjon



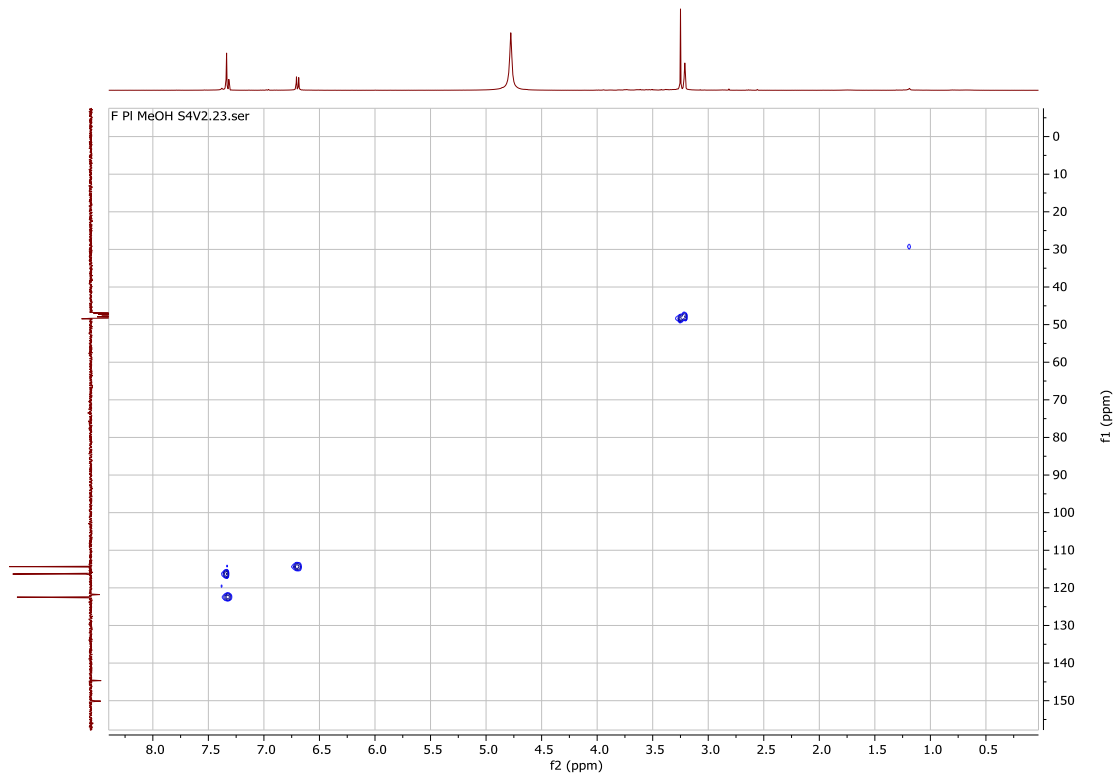
Vedlegg 25. <sup>13</sup>C-APT NMR spektrum av DCM-7 fraksjon



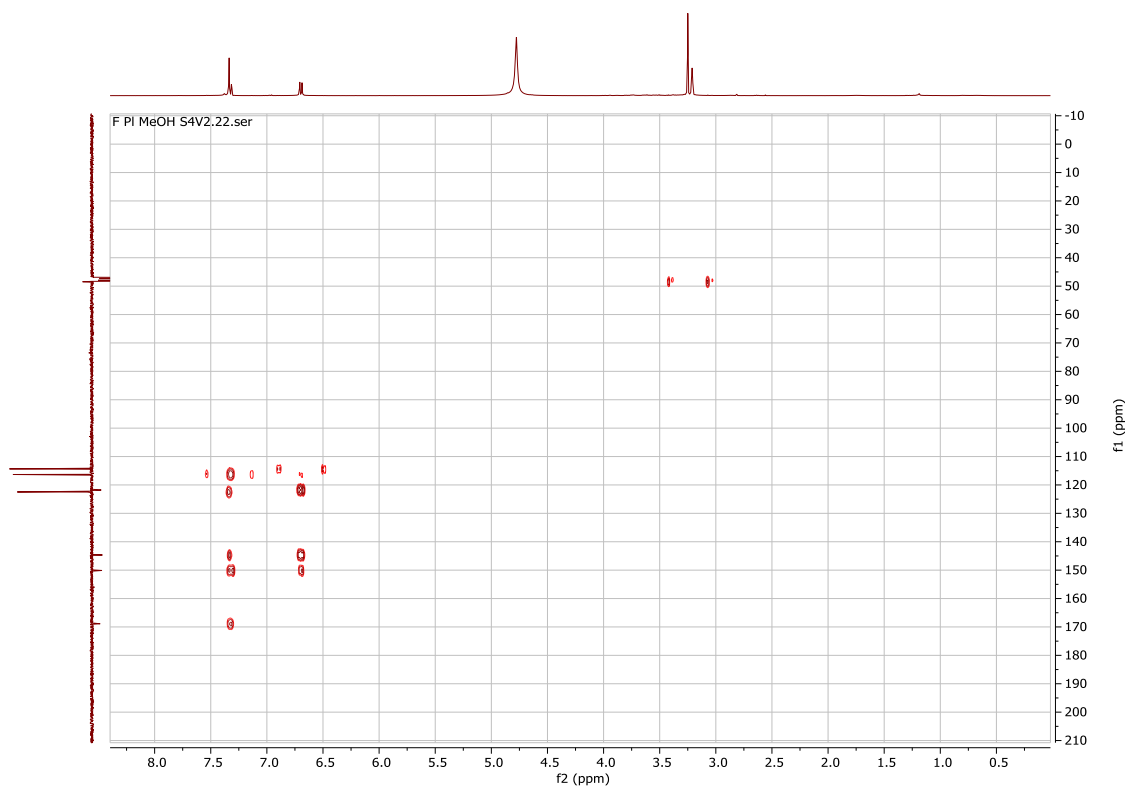
Vedlegg 26. <sup>1</sup>H-NMR spektrum av MeOH S4V2 fraksjon



Vedlegg 27. <sup>13</sup>C-APT NMR spektrum av MeOH S4V2 fraksjon



Vedlegg 28. HSQC-NMR spektrum av MeOH S4V2 fraksjon



Vedlegg 29. HMBC-NMR spektrum av MeOH S4V2 fraksjon