

Hovedfagsoppgave i farmakognosi for graden cand. pharm.

Antioksidanter i *Heritiera fomes*, en medisinsplante fra mangroveskogen i Bangladesh



Huong Cam Thi Dang

Kjemisk seksjon – Fagområde farmakognosi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk–naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Høst 2007



Hovedfagsoppgave i farmakognosi for graden cand. pharm.

**Antioksidanter i *Heritiera fomes*,
en medisinsplante
fra mangroveskogen i Bangladesh**



Huong Cam Thi Dang

Arbeidet ble utført ved fagområde farmakognosi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Høst 2007

Veiledere

Professor Karl Egil Malterud

Doktor Helle Wangenstein

FORORD

Først og fremst vil jeg uttrykke min dypeste takknemlighet overfor mine veiledere Karl Egil Malterud og Helle Wangensteen for deres engasjement og veldig gode veiledning. En spesiell takk til Karl for hans store tålmodighet og velvilje når det gjaldt å få meg på riktig spor med oppgaven min. Hans forståelse og innsats har vært til uvurderlig hjelp.

Deretter vil jeg takke vår venn i Bangladesh, Mahiuddin Alamgir for å ha tilberedt og forsynt oss med primært etanolekstrakt av *Heritiera fomes*. Uten hans bidrag hadde det blitt vanskelig å gjennomføre denne oppgaven.

Jeg vil også takke alle ansatte på farmakognosiavdelingen for en hyggelig tid, og for å ha gitt meg en god anledning til å delta i Naturstoff kongress i Danmark.

En varm takk til min familie og nærmeste venner for god støtte og forståelse gjennom hele året. Jeg vil spesielt takke min søster, Huong, for hennes oppmuntring og bønn i de vanskelige periodene. Til slutt vil jeg takke Gud for å ha gitt meg styrke og mange nådegaver i de 24 årene som har gått, og spesielt i studietiden min.



Huong C. T. Dang

INNHOLDSFORTEGNELSE

1. SAMMENDRAG	1
2. FORKORTELSER	2
3. HENSIKT MED OPPGAVEN	3
4. BAKGRUNN	4
4.1 Heritiera fomes	4
4.1.1 Tradisjonell bruk av <i>H. fomes</i>	5
4.1.2 Medisinsk bruk av <i>H. fomes</i>	5
4.1.3 Tidligere funn	6
4.2 Frie radikaler og antioksidanter	6
4.2.1 Frie radikaler og reaktive oksygenspecier (ROS)	6
4.2.2 Dannelse av frie radikaler og ROS	7
4.2.3 Antioksidanter	8
4.2.4 Kroppens antioksidantforsvar	8
4.2.4.1 Enzymatiske antioksidanter	9
4.2.4.2 Ikke-enzymatiske antioksidanter	10
4.2.4.3 Chelatorer	11
4.2.5 Oksidativt stress	11
4.2.6 Lipidperoksidering	11
4.2.7 Patologisk betydning	13
4.2.7.1 Aterosklerose	13
4.2.7.2 Revmatoid artritt	13
4.2.7.3 Kreft	14
4.3 Eikosanoidbiosyntese og 15-lipoksygenase	14
4.4 Adenosin deaminase	17
4.5 Proanthocyanidiner	18
4.5.1 Struktur og klassifisering	18
4.5.2 Betydning i planten	21
4.5.3 Kjemisk og biologisk aktivitet	21
4.5.4 Potensielle medisinske anvendelser	22
4.5.4.1 Urinveisinfeksjoner	22
4.5.4.2 Aterosklerose	22
4.5.4.3 Hypertensjon	23
4.5.4.4 Inflammasjon	23
4.5.4.5 Kreft	24
4.5.4.6 Diabetes	24
4.5.5 Absorpsjon, biotilgjengelighet og metabolismen	24
4.5.6 Bivirkninger	25
5. EKSPERIMENTELT	26
5.1 Materialer	26
5.1.1 Kjemikalier	26
5.1.2 Apparatatur	27
5.2 Prinsippene bak anvendte metoder	29
5.2.1 Kolonnekromatografi	29
5.2.1.1 Generelt om kolonnekromatografi	29
5.2.1.2 Sephadex LH-20	30
5.2.1.3 Omvendtfase C ₁₈ (RP-C ₁₈)	30
5.2.1.4 Isolute C ₁₈ fastfase ekstraksjon	31

5.2.2 Tynnsjikt-kromatografi (TLC)	31
5.2.3 DPPH-spraying	32
5.2.4 NMR-spektroskopi	32
5.2.5 Syrekatalysert depolymerisering med floroglucinol	34
5.2.6 DPPH-scavenging	37
5.2.7 Hemming av 15-lipoksygenase (15-LO).....	38
5.2.8 Hemming av adenosin deaminase (ADA).....	39
5.3 Generell eksperimentell utførelse	40
5.3.1 Kolonnekromatografi	40
5.3.1.1 Sephadex LH-20.....	40
5.3.1.2 Omvendtfase C ₁₈ (RP-C ₁₈)	41
5.3.1.3 Isolute C ₁₈ fastfase ekstraksjon.....	41
5.3.2 Tynnsjikt-kromatografi	42
5.3.3 DPPH- spraying.....	42
5.3.4 Ceric-spraying.....	43
5.3.5 NMR-spektroskopi.....	43
5.3.6 Syrekatalysert depolymerisering med floroglucinol	43
5.3.7 DPPH-scavenging (DPPH-test).....	44
5.3.8 Hemming av 15-lipoksygenase (15-LO-test).....	45
5.3.9 Hemming av adenosin deaminase (ADA-test).....	46
5.4 Spesifikk eksperimentell utførelse	47
5.4.1 Utgangsmateriale og ekstraksjon.....	47
5.4.2 Fraksjonering av BuOH-ekstraktet	48
5.4.2.1 Første separasjon med Isolute C ₁₈ etterfulgt av Sephadex LH-20	48
– utvikling av metode	48
5.4.2.2 Annen separasjon med Sephadex LH-20	49
5.4.2.3 Videre fraksjonering av B3 og B4.....	50
5.4.2.4 Videre arbeid med B6	52
5.4.2.5 Videre arbeid med B9	52
5.4.2.6 Videre arbeid med B14	53
5.4.3 Fraksjonering av EtOAc-ekstraktet.....	54
5.4.3.1 Separasjon med Sephadex LH-20	54
5.4.3.2 Videre fraksjonering av E3	55
5.4.3.3 Videre arbeid med E4.....	56
5.4.4 Videre arbeid med den vandige resten.....	56
6 RESULTAT OG DISKUSJON	57
6.1 Primært EtOH-ekstrakt	57
6.2 Fraksjonering av BuOH-ekstraktet.....	61
6.2.1 Første separasjon med Isolute C ₁₈ etterfulgt av Sephadex LH-20 – utvikling av metode	61
6.2.2 Annen separasjon med Sephadex LH-20.....	63
6.2.3 Videre fraksjonering av B3 og B4	67
6.2.4 Videre arbeid med B6.....	70
6.2.5 Videre arbeid med B9.....	71
6.2.6 Videre arbeid med B14.....	72
6.3 Fraksjonering av EtOAc-ekstraktet	74
6.3.1 Separasjon med Sephadex LH-20	74
6.3.2 Videre fraksjonering av E3	77
6.3.3 Videre arbeid med E4.....	78
6.4 Videre arbeid med den vandige resten.....	80

6.5 Potensielle medisinske anvendelser	82
7. KONKLUSJON	83
8. VEDLEGG	85
8.1 Flytskjema.....	85
8.2 Tabeller	89
8.3 NMR-spektra	107
9. REFERANSELISTE	134

1. SAMMENDRAG

Barken av medisiplanten *Heritiera fomes* fra mangroveskogen i Bangladesh har blitt studert med hensyn til innholdsstoffer med antioksidantaktivitet, både radikalscavengere og 15-LO hemmere.

Primært EtOH-ekstraktet fra *H. fomes* bark ble ekstrahert med kloroform, etylacetat og butanol. Ekstrakter fra primært EtOH-ekstraktet ble videre separert ved kolonnekromatografi (Sephadex LH-20 og omvendtfase C₁₈). De separerte og isolerte forbindelsene ble identifisert ved tynnsjikt-kromatografi (TLC) og ¹H-NMR- og ¹³C-NMR-spektroskopi.

Proanthocyanidinenes start- og forlengerenhet ble bestemt ved syrekatalysert depolymerisering med floroglucinol. Radikalfangende og 15-LO hemming ble studert v.h.a. henholdsvis difenylpicrylhydrazyl (DPPH) og enzymet 15-lipoksygenase isolert fra soyabønner. Utvalgte ekstrakter og fraksjoner ble også testet for adenosin deaminase (ADA) hemmende aktivitet med ADA isolert fra kalvetarm.

Fra EtOAc-ekstraktet ble det isolert epicatechin og fraksjoner med trimere og tetramere proanthocyanidiner. Ekstraktet inneholdt hovedsakelig epicatechin som start- og forlengerenhet, og små mengder catechin som forlengerenhet. Det ble isolert fraksjoner fra BuOH-ekstraktet med gjennomsnittlig polymeringsgrad fra 3 – 6. Proanthocyanidinene hadde også mest epicatechin som start- og forlengerenhet. Forholdet mellom catechin og epicatechin i fraksjonene var i gjennomsnitt 15:85. Det ble sannsynligvis også isolert metoksylerede proanthocyanidiner fra BuOH-ekstraktet.

Radikalscavenging og 15-LO hemmende aktivitet til epicatechin og flere isolerte fraksjoner var høy og statistisk signifikant $P \leq 0.05$. Fraksjon E7 fra EtOAc-ekstraktet viste høyest DPPH-scavenging. EC₅₀-verdien til E7 lå på $5.5 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$. Epicatechin hadde EC₅₀-verdi på $8.5 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$, og IC₅₀-verdi for 15-LO hemming var $15 \pm 1 \mu\text{g/ml}$. E12 fra EtOAc-ekstraktet hadde sterkest 15-LO hemmende aktivitet. Med en IC₅₀-verdi på $8.7 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$, var 15-LO hemmingen for E12 bedre enn for referansesubstansen quercetin. ADA hemmende aktivitet til de ekstrakter og fraksjoner som ble testet viste vesentlig lavere hemming enn quercetin.

2. FORKORTELSER

Tabell 1. Liste over forkortelser i oppgaven

Forkortelse	Fullstendig betegnelse
Aceton-d6	Deuteroacetone
ADA	Adenosin deaminase
ATP	Adenosintrifosfat
BuOH	Butanol
CHCl ₃	Kloroform
COX	Syklooksygenase
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DP	Polymeriseringsgrad
DPPH	α, α - Difenyl- β -pikrylhydrazyl
EC ₅₀	Den konsentrasjonen som viser 50 % radikalscavenging
EtOAc	Etylacetat
EtOH	Etanol
GSH	Redusert glutation
GSSH	Oksidert glutation
H ₂ O ₂	Hydrogenperoksid
HCl	Hydrogenklorid
HOCl	Hypoklorsyre
IC ₅₀	Den konsentrasjonen som viser 50 % hemming av 15-lipoksygenase eller adenosin deaminase
L [•]	Fettsyreradikal
LDL	Low-density lipoprotein
LH	Flerumettet fettsyre
LO	Lipoksygenase
LOO [•]	Lipidperoksy radikal
LOOH	Lipidhydroperoksid
MeOH	Metanol
d-Metanol	Deuterometanol
N ₂ -gass	Nitrogengass
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat
NMR	Kjernemagnetisk resonans
NO [•]	Nitrogenmonoksid
¹ O ₂	Singlett oksygen
O ₂ ^{•-}	Superoksid anion
OH [•]	Hydroksylradikal
ROS	Reaktive oksygenspecier
SD	Standardavvik
SOD	Superoksid dismutase
TLC	Tynnsljikt-kromatografi
TMS	Tetrametylsilan
UV	Ultrafiolett

3. HENSIKT MED OPPGAVEN

Hensikten med oppgaven var å identifisere og isolere kjemiske forbindelser i mangroveplanten *Heritiera fomes* som har antioksidantaktivitet, samt å undersøke radikalscavenger, 15-LO hemmende aktivitet og adenosin deaminase (ADA) hemmende aktivitet i ekstrakter og isolerte stoffer/fraksjoner fra planten.

Frie radikalmedierte og peroksidative prosesser har blitt knyttet til utvikling av mange sykdommer, f.eks. hjertekarlidelser, inflammatoriske lidelser og kreft. Det er derfor av interesse å søke etter nye antioksidanter og radikalfangere, siden forbindelser med denne aktiviteten kan medvirke til forebygging og behandling av viktige sykdommer.

ADA er et viktig enzym i DNA metabolismen. Flere sykdommer er assosiert med forhøyet nivå av ADA, bl.a. koronar hjertesykdom, noen former for leukemi og kreft. Siden det er gjort lite studier på ADA hemmende aktivitet i naturstoffer, er det et interessant felt å undersøke.

4. BAKGRUNN

4.1 *Heritiera fomes*

Heritiera fomes tilhører familien Sterculiaceae og er funnet i nesten alle tropiske strøk (Hossain og Nizam 2004). Den vokser langs kystene til Sundarbans¹ mangroveskogen. Treet kan bli opptil 2 m i omkrets og 15-25 m høyt, men trær over 1 m i omkrets er ikke lenger vanlig grunnet sterk innhøsting (Figur 1). De mørkegrønne bladene er gruppert i enden av grenene. *H. fomes* har små, hvite og brune blomster, og fruktene er 4-5 cm lange og 3-4 cm brede (Figur 2). Frøene modnes i juni og juli og kan sås direkte etter innsamling. En spesiell karakter til *H. fomes* er at den har evnen til å produsere oppreiste, spisse pneumatoforer² (Figur 3) (Tomlinson 1986; Hossain og Nizam 2004). I India blir treet kalt for Sundari eller Sundri, som kan være opphavet til navnet Sundarbans (Tomlinson 1986; Sau 2004). Sundari betyr vakker (Bandaranayake 1998).



Figur 1. Fargerike bregner, lav og klatreplanter vokser på trestammen til *H. fomes* (Anonym 2003)

¹ Sundarbans er den største mangroveskogen i verden. Skogen ligger i Ganges-Brahmaputra deltaet i Bangladesh og Vest Bengal av India. Sundarbans betyr "vakker skog" på bengalsk. (Wikipedia 2007a).

² Pneumatoforer er luftrøtter som gjør at planter på vannfylte jord kan puste (Wikipedia 2007b).



Figur 2. En tegnet gren av *H. fomes* med blomster og frukt
(Colnaghi uten årstall)



Figur 3. Pneumatoforer til mangrovetrær
(Wikipedia 2007b)

4.1.1 Tradisjonell bruk av *H. fomes*

H. fomes som blir benyttet i dette prosjektet er hentet fra Sundarbans i Bangladesh, der den og *Excoecaria agallocha* er de to viktigste plantene. Treet er sosioøkonomisk viktig. Det blir benyttet til å bygge bl.a. hus, broer og båter. I hjemmet brukes ved fra treet som brennmateriale for matlaging samt som gulvbelegg og panel (Sirajul Islam 2003; Hossain og Nizam 2004). Til en viss grad blir *H. fomes* brukt til produksjon av cellulose acetat og andre cellulosederivater (Bandaranayake 1998). Fruktene av *H. fomes* er spiselige, men blir kun spist ved hungersnød (Christensen 1983).

4.1.2 Medisinsk bruk av *H. fomes*

Det ble ikke funnet noe om tradisjonell medisinbruk av *H. fomes* i tilgjengelig litteratur. *Heritiera littoralis* som er i familie med *H. fomes* har derimot flere medisinske bruksområder,

deriblant mot diaré og dysenteri (Bandaranayake 1998; Hirway og Goswami 2004). Imidlertid har vår kontaktperson, Dr. Mahiuddin Alamgir fra Universitetet i Khulna, Bangladesh, funnet ut at *H. fomes* ble brukt mot sykelige tilstander av lokalbefolkningen i Bangladesh.

4.1.3 Tidligere funn

Det er utført veldig få studier på biologisk aktive substanser i *H. fomes*. Bandaranayake (2002) har vist at bladene til *H. fomes* inneholder karotenoider, klorofyll a og b, polyfenoler, proteiner og tanniner. I 2004 ble det utført en *in vitro* screening av leishmanicid¹ aktivitet i ekstrakter av ved fra trær fra Myanmar², deriblant *H. fomes*. Ekstraktet fra veden til *H. fomes* har svært lav leishmanicid aktivitet (Takahashi et al. 2004).

4.2 Frie radikaler og antioksidanter

4.2.1 Frie radikaler og reaktive oksygenspecier (ROS)

Et fritt radikal defineres som ethvert atom eller molekyl med en eller flere uparete elektroner. Det kan være i anion-, kation- eller nøytralform (Punchard og Kelly 1996), og kan eksistere som et fritt species (Gutteridge og Halliwell 1994). Det finnes mange typer frie radikaler, og disse har forskjellige kjemiske aktiviteter. Vanligvis er de mer reaktive enn ikke-radikaler, og kan reagere raskt med nærliggende molekyler, slik som proteiner, lipider, karbohydrater og nukleinsyrer. Det er hovedsakelig oksygenbaserte frie radikaler som skader biologiske systemer (Rahman 2007). Disse omfatter bl.a. superoksid anion ($O_2^{\bullet-}$), hydroksylradikal (OH^{\bullet}), lipidperoksyld radikal (LOO^{\bullet}) og nitrogenmonoksid (NO^{\bullet}). For å inkludere andre reaktive oksygenforbindelser som ikke er frie radikaler, blir begrepet reaktive oksygenspecier (ROS) anvendt. Singlett oksygen (1O_2), hydrogenperoksid (H_2O_2), lipidhydroperoksid (LOOH) og hypoklorsyre (HOCl) er eksempler på disse. ROS er blant de viktigste biproduktene dannet i cellene til aerobe organismer. De kan initiere en kjede av reaksjoner når de først angriper et biomolekyl, fordi molekyllene de reagerer med blir selv omdannet til frie radikaler, og kan reagere videre med andre biomolekyler (Gutteridge og Halliwell 1994; Rahman 2007)

¹ Leishmaniasis er en infeksjonssykdom som forårsakes av protozoer av slekten *Leishmania*. Protozoene finnes utbredt i tropiske og subtropiske områder, og overføres til mennesker v.h.a. en sandflue (Kåss 1998).

² Myanmar ligger i Sørøst Asia.

4.2.2 Dannelse av frie radikaler og ROS

Produksjonen av frie radikaler og andre reaktive oksygenforbindelser viser seg å være en naturlig del av den cellulære metabolismen. Ved reduksjon av oksygen til vann under den mitokondrielle elektrontransportkjeden, blir det dannet oksygenbaserte frie radikaler. Det er estimert at inntil 5 % av all oksygen brukt i metabolismen lekker ut som frie radikalintermediater (Punchard og Kelly 1996). Cytokrom P450 som er viktig ved metabolisering og eliminering av legemidler og visse endogene substanser, samt syklooksygenase (COX) genererer også frie radikalintermediater (Devasagayam et al. 2004). Ikke minst er ROS normalt produsert av makrofager og neutrofiler til bekjemping av patogener. Dette er imidlertid en positiv effekt av ROS.

Superoksid ($O_2^{\bullet -}$) er et anion radikal med en halveringstid på 10^{-6} sekunder (Devasagayam et al. 2004). Det dannes i mitokondriene under elektrontransportkjeden ved at et oksygenmolekyl tar opp et elektron (Alberts et al. 2002). Under den oksidative metabolismen med cytokrom P450 i endoplasmatisk reticulum, tar også oksygen opp et elektron og danner $O_2^{\bullet -}$ (Mulder 2006). Radikalet dannes i tillegg i fagocytter (makrofager og neutrofiler) v.h.a. enzymet NADPH oksidase. $O_2^{\bullet -}$ og flere andre ROS blir normalt frigjort fra fagocytterne for å drepe patogener ved en infeksjon (Punchard og Kelly 1996; Rahman 2007). Produksjonen av $O_2^{\bullet -}$ forekommer også ved iskemi. På grunn av oksygenmangel blir ATP metabolisert til xanthin og hypoxanthin, mens enzymet xanthin dehydrogenase blir konvertert til xanthin oksidase. Ved påfølgende reperfusjon, omdanner xanthin oksidase hypoxanthin og xanthin til urinsyre, og $O_2^{\bullet -}$ blir generert som et biprodukt (Punchard og Kelly 1996; Rahman 2007).

Hydroksylradikalet (OH^{\bullet}) er det mest reaktive oksygenradikalet som er kjent. Det har en halveringstid på 10^{-9} sekunder (Devasagayam et al. 2004). Det reagerer veldig raskt med alle biologiske molekyler det kommer i kontakt med, og kan derfor forårsake store skader på cellen. *In vivo* dannes OH^{\bullet} hovedsakelig fra hydrogenperoksid og superoksid radikal ved en såkalt Haber-Weiss reaksjon. Denne reaksjonen er katalysert av metallioner som Fe^{2+} og Cu^+ (Punchard og Kelly 1996; Rahman 2007). Hvis kroppen blir utsatt for ioniserende stråling, vil vann (hovedbestanddel i levende celler) spaltes for å danne OH^{\bullet} og H^{\bullet} (Halliwell 2005).

Singlett oksygen ($^1\text{O}_2$) er et eksitert oksygen, og ikke et radikal. Halveringstiden til $^1\text{O}_2$ er 10^{-6} sekunder (Devasagayam et al. 2004). Derfor er det både ustabilt og reaktivt (Gutteridge og Halliwell 1994). Dannelsen av $^1\text{O}_2$ krever energi, og kan fås fra fotosensitiserende stoffer som riboflavin og hem. Disse stoffene absorberer energi fra lys. Noe av denne energien kan bli overført til molekylært oksygen, og danner $^1\text{O}_2$. Dette er den underliggende årsaken til at noen fotosensitive legemidler (visse beroligende legemidler, antibiotika, og antiinflammatoriske legemidler) kan gi hudskader når pasientene soler seg. Små mengder $^1\text{O}_2$ er også dannet under lipidperoksidering (Gutteridge og Halliwell 1994).

Hydrogenperoksid (H_2O_2) er ikke et radikal, og i fravær av katalysatorer for spalting forblir det stabilt. H_2O_2 kan dannes ved dismutering av $\text{O}_2^{\cdot-}$. Enzymet superoksid dismutase (SOD) katalyserer denne reaksjonen (Rahman 2007). H_2O_2 blir også generert ved fettsyreoksidasjonen i peroksisomer som et biprodukt (Nelson og Cox 2000), eller ved metabolismen av endogene aminer slik som adrenalin og dopamin (Mulder 2006).

4.2.3 Antioksidanter

En antioksidant har vært definert som en substans som i lave konsentrasjoner i forhold til et oksiderbart substrat gir en signifikant forsinkelse eller hemming av oksidasjon av substratet (Halliwell og Gutteridge 1999). De grunnleggende mekanismene for antioksidanteffekten omfatter scavenging av de frie radikalene, hemming av ROS dannelsen, binding av metallioner som trengs for katalyse av ROS dannelse, og oppregulering av kroppens endogene antioksidantforsvar (Halliwell 1997). En ideell antioksidant bør absorberes rask (dersom den blir tilført utenfra) og kunne fange frie radikaler, og bør kunne chelatere radikalkatalyserende metaller ved fysiologisk relevante nivåer. Den bør også virke i både vandig miljø og/eller membranområder og virke positivt på genekspressjonen (Rahman 2007).

4.2.4 Kroppens antioksidantforsvar

Kroppen er normalt utstyrt med et meget komplekst antioksidantforsvar mot de naturlig produserte ROS. Disse forsvarssubstansene kalles for endogene antioksidanter og spiller en viktig rolle i å opprettholde optimale cellulære funksjoner og gir god helse og velvære. Når mengden ROS overstiger kroppens egen antioksidantkapasitet, kan tilførsel gjennom kosten være nødvendig for optimal opprettholdelse av cellulære funksjoner (Rahman 2007).

Kroppens antioksidantforsvar kan inndeles i enzymatiske og ikke-enzymatiske antioksidanter. De mest effektive enzymatiske antioksidantene er glutathion peroksidase, katalase og superoksid dismutase (SOD) (Rahman 2007). De viktigste ikke-enzymatiske antioksidantene omfatter vitamin C og vitamin E, glutathion og melatonin. I tillegg er kroppen utviklet med flere metallbindende forbindelser – chelatorer, for å begrense metallkatalysering av ROS-dannelse.

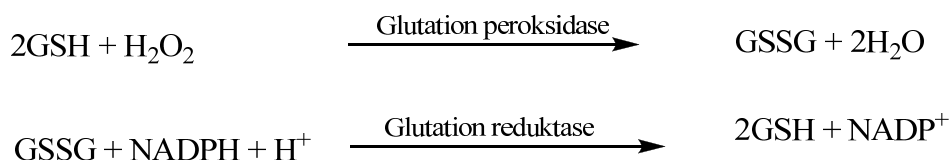
4.2.4.1 Enzymatiske antioksidanter

Superoksid dismutase (SOD) katalyserer fjerning av superoksidradikaler (Gutteridge og Halliwell 1994; Wilson og Gelb 2002; Rahman 2007). Denne reaksjonen medfører dannelse av molekylær oksygen og H₂O₂.



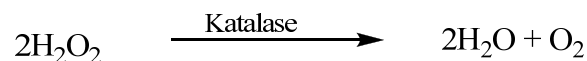
Det finnes tre varianter av SOD; Cu,Zn-SOD, Mn-SOD og Fe-SOD. De to førstnevnte finnes i henholdsvis cytosol og mitokondria hos mennesker. Fe-SOD eksisterer kun i bakterier og høyere planter (Gutteridge og Halliwell 1994).

Glutathion peroksidase finnes både i cellens cytosol og i mitokondriene. Hovedansvaret til enzymet er å fjerne peroksider i kroppens vev (Gutteridge og Halliwell 1994). H₂O₂ blir et substrat for glutathion peroksidasen for oksidasjon av redusert glutathion (GSH) til oksidert glutathion (GSSG). GSH kan gjenvinnes v.h.a. glutathion reduktase og NADPH:



Glutathion peroksidase kan også konvertere organiske peroksider (f.eks. LOOH) til vann og alkohol på samme måte.

Katalase er et annet enzym som fjerner H₂O₂. Enzymet har en av de høyeste kjente omsetningshastighetene der et katalasemolekyl kan konvertere omtrent 6 millioner H₂O₂-molekyler til vann og molekylær oksygen pr. minutt. Katalaser finnes i cellens peroksisomer (Rahman 2007).



4.2.4.2 Ikke-enzymatiske antioksidanter

Vitamin E (α -tokoferol¹) er fettløselig og befinner seg i cellens membraner som en kraftig antioksidant for å beskytte cellen mot lipidperoksidering. Under reaksjonen donerer hydroksylgruppen på α -tokoferol sitt hydrogenatom til lipid peroksyldradikalet, og det blir dannet et relativt stabilt α -tokoferolradikal. Det nydannede radikalet kan bli redusert av vitamin C til det opprinnelige α -tokoferol (Gutteridge og Halliwell 1994; Rahman 2007).

Vitamin C (askorbinsyre) er en svært effektiv vannløselig antioksidant. Det fanger flere ROS (superoksid radikal, singlett O₂ og hydroksylradikal), og beskytter lungene mot skader ved luftforurensninger (f.eks. ozon og NO_x) og ved sigarettøyk (Gutteridge og Halliwell 1994). Askorbinsyre gir ytterligere beskyttelse mot lipidperoksidering fordi det regenererer α -tokoferol. Imidlertid har askorbinsyre også prooksidante egenskaper, d.v.s. det kan øke oksidative skader (Gutteridge og Halliwell 1994).

Glutation finnes i store mengder i cytosol, cellekjernen og mitokondria, og er en viktig løselig antioksidant i disse organellene. Den beskyttende rollen til glutatone tilskrives flere funksjoner, bl.a. fanger glutatone OH[•] og singlett O₂ direkte, og regenererer vitaminene C og E til sine aktive former (Rahman 2007). Glutatone fjerner også lipidperoksyldradikaler og H₂O₂ indirekte via enzymet glutatone peroksidase.

Melatonin (*N*-acetyl-5-metoksytryptamin) er et neurohormon som er produsert i epifysen. Det har mange funksjoner, der en viktig funksjon er å fange frie radikaler i oksygenmetabolismen (Rahman 2007).

¹ Det finnes 8 forskjellige tokoferolformer. α -Tokoferol er den mest aktive formen i kroppen (Rahman 2007).

4.2.4.3 Chelatorer (Gutteridge og Halliwell 1994)

- Transferrin i blodplasma binder jern.
- Laktoferrin binder også jern, og finnes i tårevæske og i nasal sekreter.
- I tillegg finnes et annet jernbindende protein som fungerer som et jernlager for kroppen, ferritin.
- Caeruloplasmin binder kobber i blodplasma, og har også antioksidanteffekter. Det hemmer peroksidering av flere lipider og oksiderer Fe^{2+} til Fe^{3+} .
- Albumin binder også kobber i blodplasma og har i tillegg antioksidative egenskaper ved at de fjerner kobber-peroksyldradikaler.

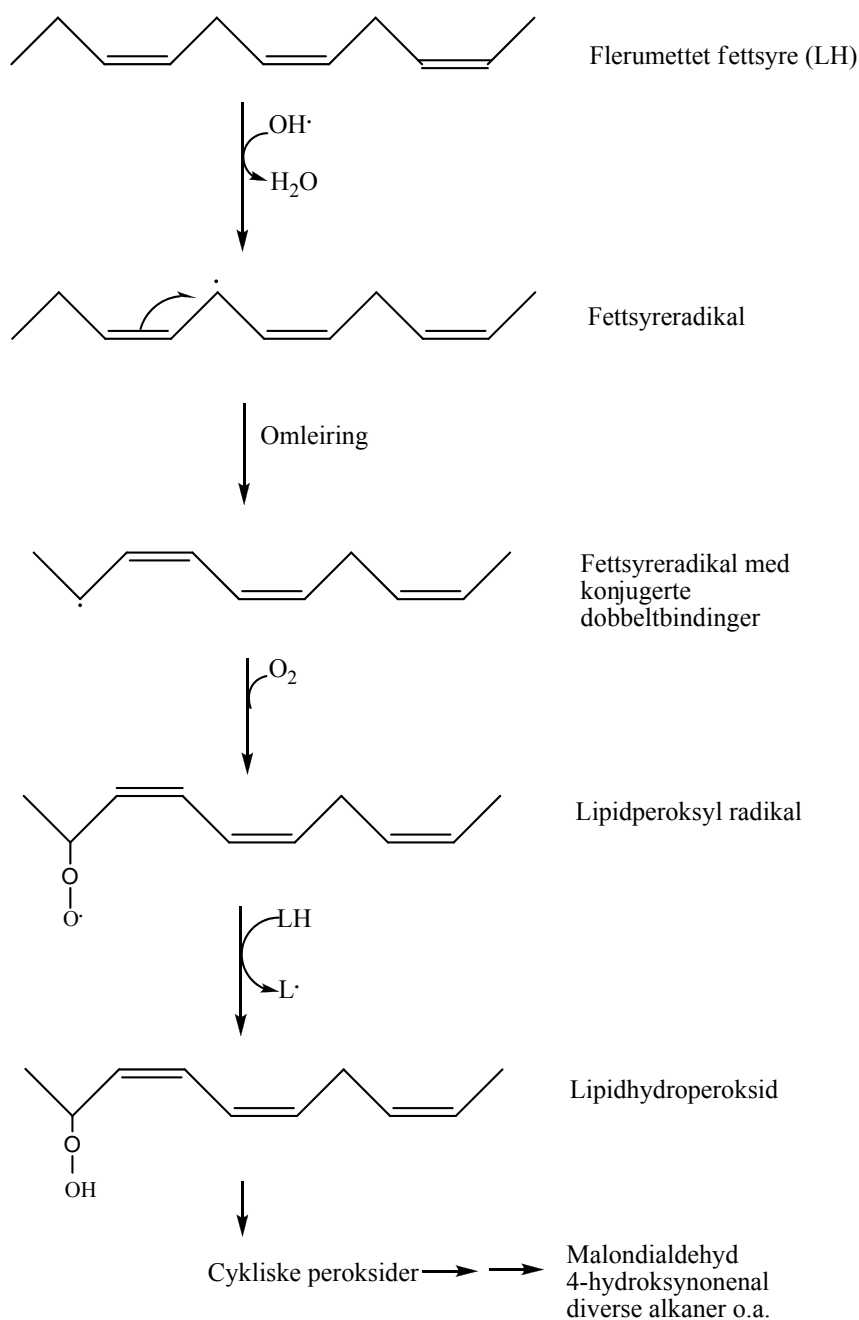
4.2.5 Oksidativt stress

Oksidativt stress er resultatet av overproduksjon av ROS i forhold til fjerning av dem (Gutteridge og Halliwell 1994; Wilson og Gelb 2002). Kroppens lagring av antioksidanter er kun tilstrekkelig for å fjerne normale mengder ROS (Gutteridge og Halliwell 1994). Ved tilstander som medfører økt produksjon av ROS kan cellen respondere med øking av antioksidantforsvaret. De fleste celler har også evnen til å gjenkjenne og fjerne oksidativt skadete molekyler (jf. cellens reparasjonssystem) og erstatte disse. Dersom kroppen mister kontrollen over ROS, kan disse forbindelsene gi flere skader på cellen (f.eks. DNA skade, proteinskade og cellemembranskade), og eventuelt celledød (Gutteridge og Halliwell 1994).

4.2.6 Lipidperoksidering

Lipidperoksidering er en kjede av reaksjoner der en flerumettet fettsyre blir angrepet av et fritt radikal (Figur 4). Flerumettet fettsyre (LH) er svært følsom mot radikalangrep. Reaksjonen begynner med at et fritt radikal (f.eks. OH^{\bullet}) tar opp et elektron fra en diallylisk metylengruppe i en flerumettet fettsyresidekjede, og gjør den til et fettsyreradikal (L^{\bullet}) (Gutteridge og Halliwell 1994; Wilson og Gelb 2002). Etter en omleiring til et mindre reaktivt fettsyreradikal med konjugerte dobbeltbindinger, reagerer det med molekylært oksygen (O_2) for å danne et lipidperoksyldradikal (LOO^{\bullet}). Lipidperoksyldradikalet er reaktivt, og kan starte en ny lipidperoksidering (jf. kjedereaksjon) ved oksidasjon av nærliggende flerumettet fettsyre. Resultatet er at flere lipidhydroperoksider og fettsyreradikaler blir dannet. Lipidhydroperoksid blir degradert til mange toksiske produkter; malondialdehyd, 4-hydroksynonenal og diverse 2-

alkenaler (Devasagayam et al. 2004). Lipidperoksy radikalet kan også angripe membranproteiner (f.eks. reseptorer og enzymer på cellemembranen).



Figur 4. Lipidperoksidering

Lipidperoksideringen skjer hovedsakelig i cellens membran, fordi denne membranen består av en fosfolipid dobbeltmembran som har flerumettet fettsyresidekjeder bundet til seg.

Peroksideringen skader cellemembranen og membranproteiner, samt tømmer cellemembranen for antioksidanter (Gutteridge og Halliwell 1994).

4.2.7 Patologisk betydning

Likevekten mellom ROS produksjon og kroppens antioksidantforsvar er viktig å opprettholde for å oppnå god helse, normal/forsinket aldringsprosess og forebygging av aldersrelaterte sykdommer. Oksidativt stress kan medføre oksidative skader som akkumuleres over tid, og har vært implisert i aldring, og aldersrelaterte sykdommer som hjertekarlidelser, kreft og neurodegenerative sykdommer (Rahman 2007). I noen tilfeller kan oksidativt stress være primærårsak til sykdom, f.eks. ved strålingsinduserte skader og ved vitamin E mangel p.g.a. svikt i intestinal fettabsorpsjon (Halliwell 2005). Men i de fleste tilfeller er den tiltakende ROS-produksjonen en konsekvens av sykdommen, og det medfører ytterligere vevskade.

4.2.7.1 Aterosklerose

Aterosklerose er en patologisk tilstand der arterielumen innsnevres ved at arterieveggen belegges med unormale lipoproteinrike avsetninger. Oksidativt stress, spesielt oksidasjonen av low-density lipoprotein (LDL) er en av flere risikofaktorer og spiller en avgjørende rolle i ateroskleroseutviklingen. Skader på endotelcellene (p.g.a. hypertensjon med turbulent blodgjennomstrømming, toksiner fra sigarettøyk eller hyperglykemi ved diabetes) tiltrekker monocyttene fra blodsirkulasjonen. Monocytene utvikles til makrofager i arterieveggen, og det utskilles $O_2^{\cdot-}$ og H_2O_2 fra begge celletypene. Høye mengder ROS forårsaker oksidativt stress. Dessuten kan de reaktive forbindelsene peroksidere nærliggende LDL og ødelegge reseptorer som trengs for normal reseptormediert fjerning av LDL. Oksidert LDL blir i stedet tatt opp av makrofager via "scavenger reseptorer", som blir omgjort til skumceller. En samling av skumceller og T lymfocytter danner fettstreker. I tillegg frigjør blodplater, makrofager og endotelcellene cytokiner og vekstfaktorer som bidrar til plakkdannelse. Plakket kan bryte og gjennom flere prosesser medføre trombosedannelse. En trombose kan blokkere blodgjennomstrømming til viktige organer som hjertet og hjernen, og gir henholdsvis hjerteinfarkt og hjerneslag (Gutteridge og Halliwell 1994; Rang et al. 2003).

4.2.7.2 Revmatoid artritt

Revmatoid artritt er en kronisk inflammatorisk leddsykdom som fører til alvorlig vevskade med smerter og stivhet i affiserte ledd. Revmatoid ledd er et sted med intens oksidativt stress p.g.a. at $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HOCl og NO^{\cdot} er frigjort fra et stort antall makrofager og neutrofiler.

Årsaken til det høye antallet av makrofager og neutrofiler i revmatoid leddet er ukjent (Gutteridge og Halliwell 1994).

4.2.7.3 Kreft

Det er veletablert at frie radikaler reagerer med alle komponenter i DNA. Når frie radikaler kommer nær DNA, kan de oksidere deoxyribose med brudd på DNA-tråden som resultat. De kan også skade DNA-basene ved produksjon av forskjellige hydroksylerte baser som er mutagene (f.eks. 8-hydroksyguanosin og hydroksylerte adeniner). De kan skade tumorsuppressor gener, og øker ekspresjon av proto-onkogener¹. Dette er kjernen i kreftutviklingen, fordi kreft utvikles enten ved mutasjon eller inaktivering av tumorsuppressor gener eller ved mutasjon eller aktivering av protoonkogener i en flertrinnsprosess (Rang et al. 2003). Kroppen har heldigvis reparasjonsmekanismer for å dempe disse oksidative skadene, og det innebærer bl.a. hydrolytisk fjerning av oksiderte DNA-baser. Reparasjonen er imidlertid ikke fullstendig effektiv. Dermed vil oksidative skader på DNA være mutagene, og vil akkumuleres med alder (Fridovich 2001; Devasagayam et al. 2004; Halliwell 2005).

4.3 Eikosanoidbiosyntese og 15-lipoksygenase

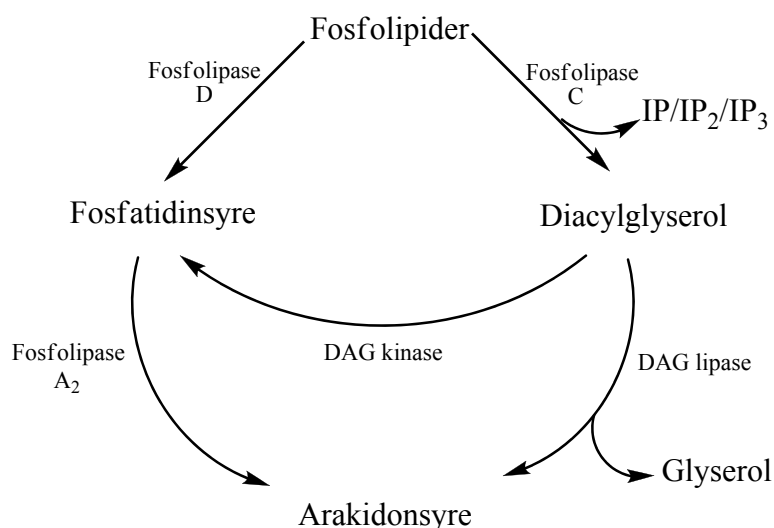
Eikosanoider er betegnelsen til en stor gruppe oksygenerte C₂₀ fettsyrer. Prostaglandiner, tromboksaner og leukotriener er de viktigste undergruppene av eikosanoider og er involvert i flere fysiologiske prosesser. Prostanoidene regulerer bl.a. immunfunksjonen, blodplateaggregeringen, vaskulær homeostase, og beskytter mageslimhinnen. Leukotriener modulerer inflammasjon, og har vært implisert i celleprolifisering, differensiering og apoptose (Rang et al. 2003; Nie 2007).

Eikosanoider er dannet *de novo* fra arakidonsyre, som finnes i cellemembranen som en av fettsyrene i fosfolipidene. Arakidonsyre er en C₂₀ umettet fettsyre med fire dobbeltbindinger (5,8,11,14-eikosatetraensyre). Biosyntesen av eikosanoidene starter med frigjøring av

¹ protoonkogener er gener som normalt kontrollerer celledeling, apoptose, og differensiering, men kan bli omdannet til onkogener av virus eller kreftfremkallende kjemikalier. Onkogener koder for kreftaktige forandringer (Rang et al. 2003).

arakidonsyre fra membranfosfolipidene ved forskjellige stimuli avhengig av celletypen. F.eks. danner blodplater tromboksen A_2 som respons på trombin eller kollagen, mens andre celler responderer til $C5a$ (nøytrofiler), bradykinin (fibroblaster) og immunkomplekser (mastceller). Vanlige celskader kan også initiere denne prosessen (Funk 2001; Rang et al. 2003).

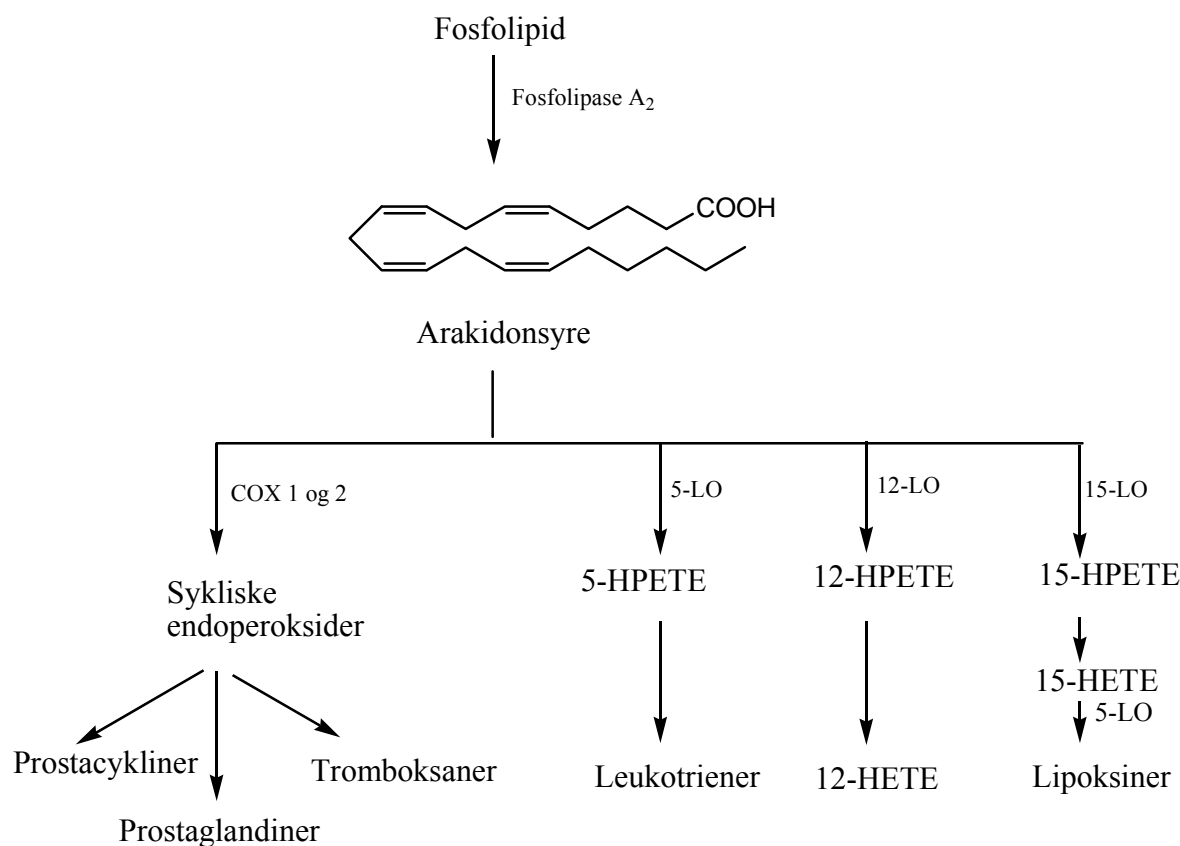
Frigjøring av arakidonsyre er det hastighetsbegrensende trinnet, og katalyseres hovedsakelig av intracellulære fosfolipase A_2 i enten ettrinns- eller tottrinnsprosess (Figur 5). Ettrinnsprosess er direkte spalting av fosfolipidene v.h.a. fosfolipase A_2 , mens tottrinnsprosess skjer enten v.h.a. fosfolipase D etterfulgt av fosfolipase A_2 eller v.h.a. fosfolipase C etterfulgt av diacylglycerol lipase (Rang et al. 2003).



Figur 5. Frigjøring av arakidonsyre fra fosfolipider via tottrinnsprosesser. IP = inositolfosfat, DAG = diacylglycerol.

De frispaltete arakidonsyremolekylene omsettes enzymatisk til mange forskjellige eikosanoider. Syklooksygenaser (COX) 1 og 2 katalyserer syntesen av prostaglandiner, prostacykliner og tromboksaner, mens forskjellige lipoksygenaser (5-, 12- og 15-LO) katalyserer syntesen av leukotriener, lipoksiner og andre hydroksyeikosatetraensyrer (Figur 6) (Rang et al. 2003; Nie 2007).

Lipoksiner er sluttproduktet til 15-LO, og blir dannet ved at 15-LO dioksygenerer arakidonsyre i C-15 posisjon med 15-hydroperoksyekosatetraensyre (15-HPETE) som intermediat. 15-HPETE reduseres til 15-hydroksyeikosatetraensyre (15-HETE) som til slutt blir omdannet til lipoksiner v.h.a. 5-LO (Rang et al. 2003; Schneider og Bucar 2005).



Figur 6. Oversikt over eikosanoidbiosyntesen. HPETE = hydroperoksyekosatetraensyre, HETE = hydroksyeikosatetraensyre (Rang et al. 2003).

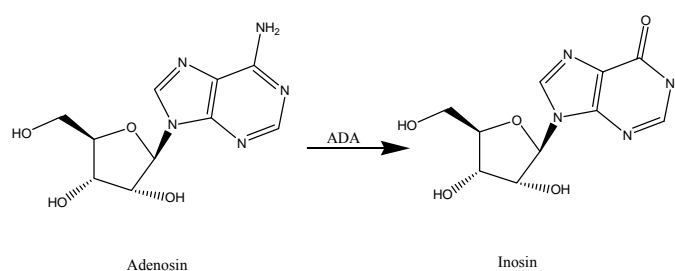
15-LO kan ha betydning i flere sykdommer, slik som aterosklerose og kreft. *In vitro* undersøkelser viser at 15-LO har evnen til å oksidere forestrete fettsyrer i biologiske membraner og i LDL. Det antyder at 15-LO kan være involvert i ateroskleroseutviklingen. Hemming av 15-LO vil antagelig medføre redusert LDL oksidasjon, og følgelig redusere risiko for aterosklerose (Schneider og Bucar 2005).

Nyere studier viser at uttrykkningen av 15-LO isomere er endret ved flere kreftformer. Økt uttrykking av 15-LO-1 er observert ved prostatakraft, og det stimulerer cellevekst *in vitro* og tumorvekst *in vivo*. Imidlertid er ekspresjonen og aktiviteten av 15-LO-1 nedregulert ved kreft

i kolon, altså virker 15-LO-1 som en tumor suppressor ved denne kreftformen. 15-LO-2 er imidlertid vist å ha forebyggende effekt på kreft i prostata (Nie 2007).

4.4 Adenosin deaminase

Adenosin deaminase (ADA) er et nøkkelenzym i metabolismen av puriner og DNA omsetningen. Enzymet katalyserer omdanningen av adenosin og 2-deoksyadenosin til henholdsvis inosin og 2-deoksyinosin (Figur 7) (Harriman et al. 1994; Ho og Hensel 2006).



Figur 7. Omdanning av adenosin til inosin v.h.a. adenosin deaminase (ADA) (Bojack et al. 2001).

ADA finnes i alle vev, med høyest nivå i lymfatiske vev bl.a. lymfeknuter, milt og tymus, og påvirker differensiering av lymfatiske celler. Den genetiske mangelen på ADA medfører en opphopning av 2-deoksyadenosin, og er assosiert med immunsvikt. Barn som er født med denne genetiske feilen har lavt nivå av lymfocytter i blodet, en tilstand kalt SCID (severe combined immunodeficiency disease¹). ADA inaktiverer også flere antivirale og syntetiske adenosinanaloger som benyttes mot kreft. Følgelig vil en hemming av ADA forhindre inaktivering av klinisk nyttige adenosinanaloger, og en tilførsel av ADA-agonister vil være effektive for behandling av SCID (Harriman et al. 1994; Ho og Hensel 2006).

I flere studier er det funnet en økning, reduksjon eller uforandret ADA aktivitet avhengig av celle- og vevstyper (Durak et al. 2005). Noen former for leukemi er assosiert med forhøyet nivå av ADA, og det er blitt utviklet noen hemmere av ADA som har vært klinisk brukt mot

¹ SCID: arvelig immunsvikt med få lymfocytter i blodet, små lymfeknuter, liten tymus, liten milt og små mengder av alle immunglobulin i serum, slik at pasientene lett får alvorlige infeksjoner (Øyri 1996).

T-celle leukemi, f.eks. pentostatin, cladribin og fludarabin (Dearden 2006; Ho og Hensel 2006). Durak og medarbeidere viste at ADA aktiviteten var høyere i kolonkreftvev sammenlignet med normal kolonvev, og ekstrakter av blå druer hemmet signifikant ADA aktiviteten i begge vevstypene (Durak et al. 2005).

Det har vært foreslått at ADA kan spille en rolle i koronar hjertesykdom (Tang et al. 2006), og øket nivå av ADA er rapportert i psoriasis (Erbaqci et al. 2006), selv om den kliniske relevansen av dette er uklar. Siden det er gjort lite undersøkelser av naturstoffer som hemmere av ADA, er dette et interessant felt å undersøke.

4.5 Proanthocyanidiner

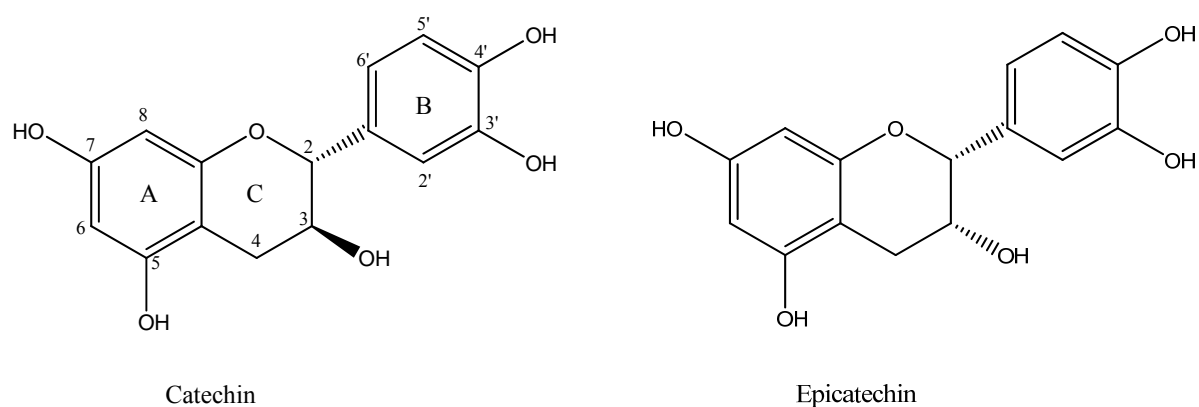
Proanthocyanidiner er utbredt i planteriket. De har mange viktige funksjoner for plantene, deriblant er de til stede for å gi beskyttelse mot planteetere (Xie og Dixon 2005). Det er økende interesser for dem p.g.a. deres potensielle, gunstige effekter på menneskenes helse. Spesielt finnes proanthocyanidiner i betydelige mengder i medisinplanter og krydder, som ofte er velkjente for sine farmakologiske aktiviteter (Sokol-Letowska et al. 2006). Dette omfatter bl.a. *Gingko biloba*, pyknogenol, kanel, sjokolade, i tillegg til druer og flere andre typer bær (Beecher 2004).

4.5.1 Struktur og klassifisering

Data i dette avsnittet er i hovedsak hentet fra nyere oversiktsartikler, f.eks. Beecher 2004, Cos et al. 2004 og Dixon et al. 2005. Det er henvist til relevante oversikter under hvert punkt.

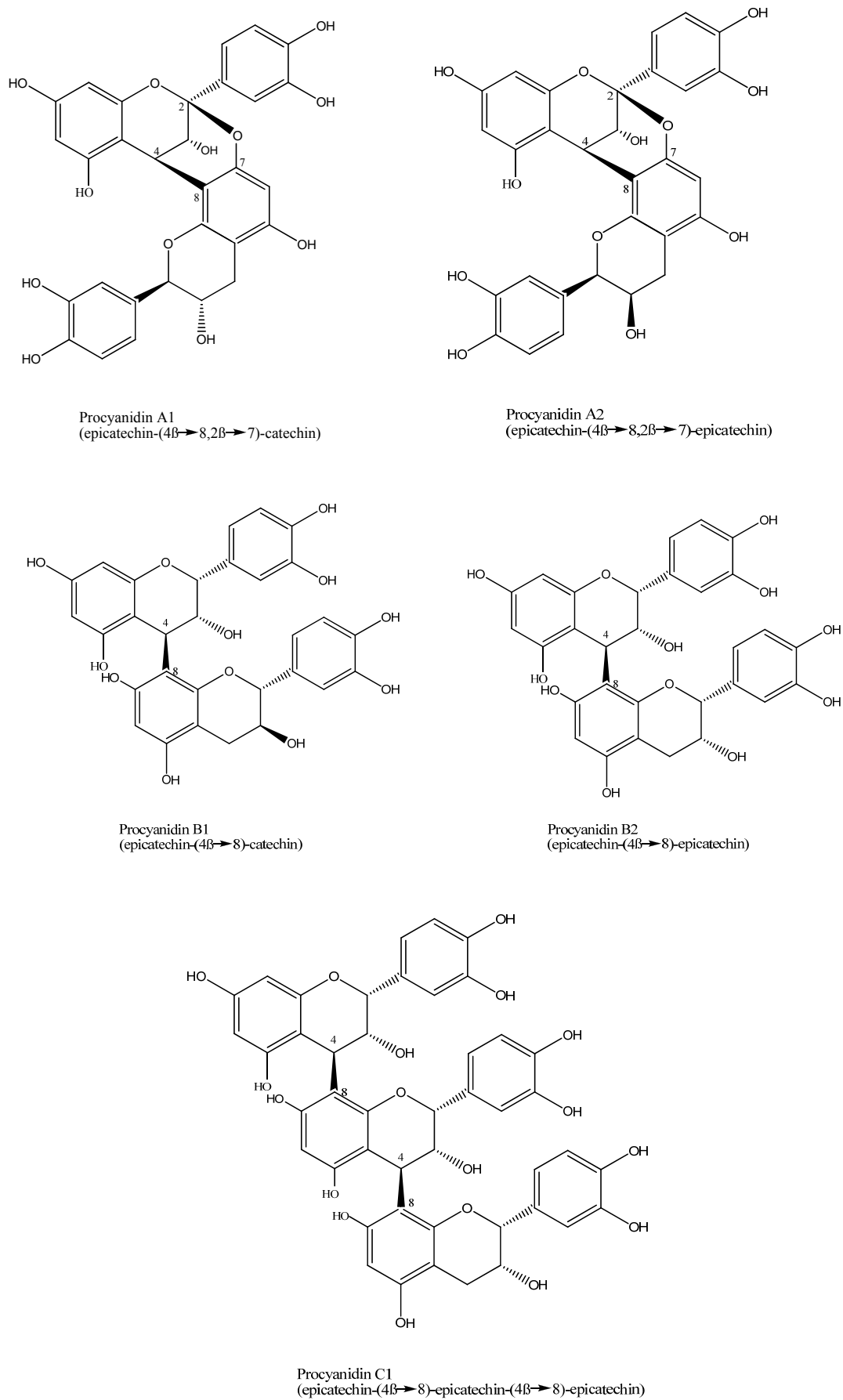
Proanthocyanidiner er polyfenolske forbindelser, og har fått sitt navn fordi de ved oppvarming i sur alkoholisk løsning danner røde anthocyanidinpigmenter. De tilhører klassen tanniner (garvestoffer) som er klassifisert i tre hovedgrupper: hydrolyserbare, delvis hydrolyserbare, og ikke-hydrolyserbare tanniner som også kalles for proanthocyanidiner. Hydrolyserbare og delvis hydrolyserbare tanniner er mye mindre utbredt i naturen enn ikke-hydrolyserbare tanniner (Cos et al. 2004).

Proanthocyanidiner bygges opp ved polymerisering av flavan-3-ol enheter. Catechin og epicatechin er de vanligste flavan-3-ol enhetene i proanthocyanidiner (Figur 8). Andre flavan-3-ol enheter som gallocatechin, epigallocatechin og epigallocatechin gallat er også vanlige. Ved ulike hydroksyleringsmåter av B-ringene fås forskjellige undergrupper av proanthocyanidiner. Procyanidin er den vanligste undergruppen av naturlige proanthocyanidiner (Cos et al. 2004; Dixon et al. 2005). Navnet kommer av at ved syrekatalysert depolymerisering av (epi)catechin dannes cyanidin (Beecher 2004).



Figur 8. Kjemiske strukturer til catechin og epicatechin

Procyanidiner er oligomere proanthocyanidiner bestående av catechin og epicatechin enheter, altså ligger hydroksylgruppene i 3' og 4' posisjon i B-ringene (Figur 9). Procyanidiner av B-type (dimere) og C-type (trimere) er karakterisert ved binding mellom C₄ i forlengerenheten (øvre enheten) og C₈ eller C₆ i startenheten (nedre enheten). A-type procyanidin har i tillegg en eterbinding mellom C₂ av forlengerenheten og hydroksylgruppen av C₇ og/eller C₅ i startenheten. B-typen procyanidin er dominerende i naturen (Cos et al. 2004; Xie og Dixon 2005).



Figur 9. Kjemiske strukturer til noen A-, B- og C-type procyanidiner.

Proanthocyanidiner finnes i plantene som en kompleks blanding av polymere med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad mellom 4 og 11 (Cos et al. 2004).

4.5.2 Betydning i planten

Proanthocyanidiner er sekundære metabolitter til planter, med andre ord er de ikke viktig for den strukturelle eller metabolske integriteten til planten. Proanthocyanidiner finnes i frukt, bark, blad og frø i mange planter. De gir ofte en snerpende smak. Anthocyanidiner er naturlige pigmenter som gir blomster og frukt rød-, lilla- og blåfargen (Aviram og Fuhrman 2003; Dixon et al. 2005). Hovedfunksjonen til proanthocyanidiner er å beskytte plantene mot mikroorganismer, sopp og planteetere. Proanthocyanidiner har også evnen til å kompleksbinde metaller via difenolgruppene. Når det er f.eks. mangel på jern p.g.a. kompleksdannelsene, hemmes bakterieveksten. Dette er en påstått mekanisme bak den antibakterielle egenskapen til proanthocyanidiner (Beecher 2004; Dixon et al. 2005).

4.5.3 Kjemisk og biologisk aktivitet

Proanthocyanidiner var tidlig kjent for å kunne binde og denaturere proteiner. Denne egenskapen blir brukt til garving av dyreskinn. Herav kommer betegnelsen tanniner, som betyr garvestoffer. Proanthocyanidiner binder spesielt sterkt til prolin/hydroksyprolinrike proteiner som det er mye av i kollagenet til dyreskinn (Beecher 2004).

Proanthocyanidiner har vanligvis høy antioksidantaktivitet, ofte høyere enn vitamin C og E. Det skyldes den spesielle polyhydroksyfenol strukturen som gjør dem i stand til å gi fra seg protoner til frie radikaler og likevel forbli relativt stabilt. I tillegg binder proanthocyanidiner metallioner som Fe^{2+} og Cu^+ , og dermed begrenses metallkatalysert dannelse av frie radikaler (Beecher 2004). Proanthocyanidiner kan også utøve antioksidantaktivitet ved hemming av prooksidative enzymer slik som 5-, 12- og 15-lipoksygenase, samt nNOS (nitrogenoksid syntetase) og xanthin oksidase, og er i seg selv ikke prooksidative (Cos et al. 2004).

Tanniner, inkludert proanthocyanidiner, virker antibakterielt og antifungalt, muligens ved (1) hemming av ekstracellulære mikrobielle enzymer, (2) påvirkning av den mikrobielle metabolismen (hemming av oksidativ fosforylering) eller (3) ved å kompleksbinde metallioner (Cos et al. 2004).

Flere proanthocyanidiner er i tillegg vist å utøve andre biologiske og farmakologiske aktiviteter slik som antiinflammatorisk, kreftforebyggende, antiviral, antiprotozoal, antiiskemisk og immunmodulering (Beecher 2004; Cos et al. 2004). Mesteparten av dette er bare vist *in vitro*.

4.5.4 Potensielle medisinske anvendelser

Proanthocyanidiner og deres påståtte metabolitter har høy antioksidantaktivitet. Disse forbindelsene kan derfor beskytte kroppens celler mot oksidative skader, som resulterer i en kaskade av degraderende effekter som til sist kan forverre flere patologiske tilstander (Beecher 2004).

4.5.4.1 Urinveisinfeksjoner

Tranebær har tradisjonelt blitt brukt både til forebygging og behandling av urinveisinfeksjoner. Effekten er relatert til den antibakterielle aktiviteten av proanthocyanidiner i tranebær. Proanthocyanidiner i tranebær virker muligens ved å hemme P-fimbrierte *E. Coli* i å feste seg til epitelcellene på urinveiene. Det er A-type proanthocyanidiner som har denne egenskapen (Beecher 2004; Cos et al. 2004; Dixon et al. 2005).

4.5.4.2 Aterosklerose

Proanthocyanidiner og/eller deres eventuelle metabolitter synes å ha positiv innvirkning på flere trinn i ateroskleroseutviklingen. Undersøkelser på syntetiske liposomer demonstrerer at proanthocyanidiner med opptil seks flavan-3-ol enheter kan binde fosfolipiddelen av liposomet, og gir beskyttelse mot oksidanter. *In vitro* undersøkelser viser en hemming av kjemisk induisert oksidasjon av LDL med isolerte procyanidiner (monomer til heksamer) eller proanthocyanidinrike ekstrakter. Den antioksidative aktiviteten øker med økende polymeriseringsgrad, muligens fordi større polymere har sterkere affinitet for LDL partikler enn oligomere. I tillegg viser *in vitro* forsøk at hemming av 15-lipoksygenase med kakao-proanthocyanidiner forhindrer oksidasjon av LDL (Beecher 2004; Cos et al. 2004).

Druekjerneekstrakt som er rik på proanthocyanidiner var oppdaget å kunne nedregulere genet CD 36. Dette genet koder for oksidert LDL reseptor (jf. scavenger reseptor), og er direkte forbundet med skumcelledannelsen og ateroskleroseutviklingen (Beecher 2004).

Ved aterosklerose er endotelium skadet, og blodplater blir aktivert og adheres til endoteliet med følgende trombosedannelser. Procyanidinrike kakao undertrykker ADP- eller adrenalin-stimulert blodplateaktivering og blodplateaggregering. De observerte effektene var kvalitativt sammenlignbart med acetylsalisylsyre, men ikke like sterke (Beecher 2004; Cos et al. 2004).

4.5.4.3 Hypertensjon

Mange *in vitro* studier viser at procyanidiner har en vasodilaterende effekt ved å øke syntese av NO[•] i endotelceller. NO[•] er en relakserende faktor som dannes i blodkarepitel (EDRF, endothelium derived relaxing factor). Vasodilatasjonen er størst for dimere og trimere proanthocyanidiner, mens større polymere er inaktive (Beecher 2004; Cos et al. 2004).

Både *in vitro* og *in vivo* eksperimenter har vist at proanthocyanidiner hemmer ACE (angiotensin converting enzyme), et enzym som omdanner angiotensin I til angiotensin II. Angiotensin II øker blodtrykket direkte ved å trekke sammen glatt muskulatur i endotelveggen i blodårene, og indirekte ved stimulering av binyrebarkens aldosteronproduksjon. Den ACE hemmende aktiviteten er proporsjonal med polymeriseringsgraden (Beecher 2004; Cos et al. 2004).

4.5.4.4 Inflammasjon

Det er isolert diverse flavan-3-oler og deres derivater fra planter som er tradisjonelt brukt ved inflammatoriske lidelser. *In vitro* forsøk viser at disse forbindelsene hemmer COX-2 (Dixon et al. 2005). Andre studier med oligomere proanthocyanidiner har vist hemming av både COX-1 og 2, samt 5-lipoksygenase i konsentrasjoner som er sammenlignbare med antiinflammatoriske legemidler, f.eks. indometacin (Beecher 2004). Videre viser nyere studier at proanthocyanidiner har antiinflammatoriske egenskaper ved blokkering av transkripsjonsfaktoren NF-κB (nuclear factor-κB) (Cos et al. 2004). NF-κB regulerer genespresjon og initierer transkripsjon av cytokiner, og medfører økt dannelse av inflammatoriske mediatorer.

4.5.4.5 Kreft

Flere studier indikerer at proanthocyanidiner og flavan-3-oler kan forebygge kreft. Det er mange foreslåtte virkningsmekanismer. Den kreftforebyggende effekten kan skyldes en induksjon av apoptose i kreftceller ved modulering av apoptoseregulerende gener Bcl-2 og p53. Normale celler blir ikke berørt. Proanthocyanidiner kan også hemme tumorutvikling via den antioksidative aktiviteten og den hemmende aktiviteten på ornitin dekarboksylase (ODC). ODC er det hastighetsbegrensende enzymet i biosyntesen av polyaminer, og en høy ekspresjon av dette enzymet er typisk for kreftceller og tumorutvikling (Cos et al. 2004).

4.5.4.6 Diabetes

Ekstrakter fra kanel er vist å redusere fastende blodglukose i type 2 diabetikere, og det er relatert til A-type proanthocyanidiner. Disse ekstrakter stimulerer glykogensyntesen ved aktivisering av glykogensyntaser. I tillegg viser dyre- og humanstudier at proanthocyanidiner hemmer utviklingen av katarakt og retinopati som er to vanlige komplikasjoner til type 2 diabetes (Beecher 2004).

4.5.5 Absorpsjon, biotilgjengelighet og metabolismen

Biotilgjengeligheten til proanthocyanidiner er bare studert i begrenset grad. Det var lenge antatt at proanthocyanidiner ikke absorberes p.g.a. stor molekylærvækt. *In vitro* og dyrestudier har også indikert at polymerisering i stor grad reduserer absorpsjonen fra tarmen. Lokale helseeffekter kan imidlertid oppnås ved at proanthocyanidiner kan beskytte tarmveggen mot oksidativt stress og virkninger av karsinogener. I tillegg er inntak av proanthocyanidinrik mat, som kakao, rød vin eller druekjerneekstrakter vist bl.a. å øke antioksidantkapasiteten i blodplasma, kanskje via interaksjoner med lipider og jern i tarmene (Cos et al. 2004; Manach et al. 2005).

Det er imidlertid påstått på grunnlag av en *in vitro* studie at polymerer kan degraderes til monomere og dimere når de passere magesekken. Motsigende resultater sees allikevel i mennesker, sannsynligvis fordi pH i magesekken ved matinntak i realiteten ikke er tilstrekkelig lav for proanthocyanidin hydrolyse (Cos et al. 2004; Manach et al. 2005).

Det har blitt rapportert at tarmflora kan degradere proanthocyanidiner til aromatiske syrer som f.eks. *m*-hydroksyfenylpropionsyre, *m*-hydroksyfenyleddiksyre og *m*-hydroksyfenylvaleriansyre. En økning av disse metabolittene er sett i menneskeurin etter inntak av procyanidinrik sjokolade. I en studie på rotter er det vist at degraderingsgraden avtar med økende polymeriseringsgrad. Dette skyldes muligens de antimikrobielle og proteinbindende egenskapene som ofte er tilskrevet proanthocyanidiner (Cos et al. 2004; Manach et al. 2005).

4.5.6 Bivirkninger (Beecher 2004)

Det er antydnet en økt risiko for kreft i kolon og rektum både hos mennesker og i rotter ved inntak av en ekstraktblanding av kolanøtt, druer, grønn te og *Gingko biloba*.

Proanthocyanidiner kan redusere opptak av proteiner/aminosyrer, samt forskjellige spormetaller som kobber og jern p.g.a. den kompleksdannende egenskapen.

Når proanthocyanidiner tas som kosttilskudd sammen med legemidler, er det en risiko for interaksjon. En studie viste at 6 % av pasientene har en potensial for en alvorlig interaksjon, hvorav en av pasientene i undersøkelsen fikk en alvorlig bivirkning.

Toksikologiske studier med rotter viser ingen synlige tegn til bivirkninger ved oralt inntak av ca. 1.5 g druekjerneekstrakter per kg kroppsvekt. Altså vil et estimert daglig inntak av proanthocyanidiner på 54 mg/dag per person være trygt. Flere studier har også indikert svært god toleranse for proanthocyanidinrike kosttilskudd. Det oppstår sjelden bivirkninger, og de mest rapporterte bivirkningene er mage/tarbesvær.

5. EKSPERIMENTELT

5.1 Materialer

5.1.1 Kjemikalier

Tabell 2. Liste over kjemikalier

Aceton purum	Chemi-Teknik Oslo, Norge
Aceton-d6	Sigma-Aldrich St. Louis, U.S.A.
Adenosin	Acros Organics New Jersey, U.S.A.
Adenosin deaminase (ADA)	Fluka Buchs Sveits
Albumin, bovint serum	Sigma-Aldrich St. Louis, U.S.A.
Borsyre	Merck Darmstadt, Tyskland
Catechin	Koch-Light Laboratories Ltd Colnbrook, England
DMSO, tørket	Merck Darmstadt, Tyskland
DPPH (difenylpikrylhydrazyl)	Sigma-Aldrich St. Louis, U.S.A.
Eddiksyre, (100 %)	VWR International Oslo, Norge
Epicatechin	Carl Roth KG Karlsruhe, Tyskland
Etanol	Arcus Oslo, Norge
Floroglucinol	Fluka Chemie Buchs, Sveits
Kaliumdihydrogenfosfat	Merck Darmstadt, Tyskland
Linolsyre	Sigma-Aldrich St. Louis, U.S.A.
Lipoxidase (15-Lipoxigenase)	Sigma-Aldrich St. Louis, U.S.A.
Metanol, p.a.	Chemi-Teknik Oslo, Norge
Metanol purum	Chemi-Teknik Oslo, Norge
d-Metanol (CD ₃ OD)	Sigma-Aldrich St. Louis, U.S.A.

N ₂ -gass	AGA Oslo, Norge
Natriumhydroksid	VWR International Oslo, Norge
Omvendtphase silikagel: Lichroprep RP18, 25-40 µM	Merck Darmstadt, Tyskland
Quercetin	Sigma-Aldrich St. Louis, U.S.A.
Sephadex LH20	Pharmacia Biotech Uppsala, Sverige
TMS	Sigma-Aldrich St. Louis, U.S.A.
Vann, destillert	Farmasøytisk institutt Oslo, Norge
d-Vann (D ₂ O)	Aldrich Milwaukee, U.S.A.

5.1.2 Apparatur

Tabell 3: Liste over apparatur

Analytisk TLC Silikagel 60 F ₂₅₄ , aluminiumsplater Cellulose F, DC Plastikfolien Polygram Cellulose End-to-End Pipettes 10 µl	Merck Darmstadt, Tyskland Macherey-Nagel & Co Düren, Tyskland Modulohm Herlev, Danmark
Kolonnekromatografi Isolute C ₁₈ Pumpe: FMI Lab Pump, Model RP-G150	Separtis Grenzach-Wyhlen, Tyskland Fluid Metering Inc New York, U.S.A.
Kyvetter Kvartskyvetter	Starna Hainault, England

Magnetrører IKA-Combimag RCO	Janke & Kunkel Staufen, Tyskland
Oljepumpe Edwards E-lab 2	Edwards High Vacuum International Sussex, England
pH-meter Model 420A	Orion Research Inc Boston, U.S.A.
Pipetter Finnpipette: 40-200 µl, 200-1000 µl og 1-5 ml. Multipipette Nichiryo Modell 8100 SMI micropettor D50	VWR International Oslo, Norge Nichiryo Tokyo, Japan Bio-Rad Hercules, U.S.A.
Ristemaskin IKA-VIBRAX-VXR	Janke & Kunkel Staufen, Tyskland
Rotavapor Büchi Rotavapor-R	Büchi Flawil, Sveits
Sprayapparat TLC sprayer	Merck Darmstadt, Tyskland
UV-apparat <u>UV-spektrofotometer:</u> Shimadzu UV 160A med termostatert kyvetteholder CPS-240A Libra S32PC	Shimadzu Kyoto, Japan Biochrom Cambridge, England

UV-lampe Model UVGL-58 (254 og 366 nm)	Ultra Violet Products Upland, CA, U.S.A.
Vekt Sartorius model BP221S Sartorius model A200S	Sartorius Göttingen, Tyskland

5.2 Prinsippene bak anvendte metoder

Følgende teknikker ble benyttet for å separere og identifisere de ulike forbindelsene fra råekstraktet:

Separasjonsteknikker: Kolonnekromatografi (Sephadex LH-20 og omvendtfase C₁₈)

Analytiske metoder: Tynnsljiktromatografi (TLC), ¹H-NMR- og ¹³C-NMR-spektroskopi, og syrekatalysert depolymerisering med floroglucinol

Bioaktivitetstester: DPPH-radikalscavenging, 15-lipoksygenase hemming og ADA hemming

5.2.1 Kolonnekromatografi

5.2.1.1 Generelt om kolonnekromatografi

I kolonnekromatografi tvinges de ulike forbindelsene gjennom kolonnen med en mobilfase (væske/gass) med konstant hastighet. Kolonnen er fylt med stasjonærfase som skal retardere forbindelsene. Hvis retensjonen er forskjellig for de ulike forbindelsene, er det mulig å separere dem. Prinsippet bak denne separasjonsmetoden er altså fordeling av stoffene mellom den mobile fasen og den stasjonære fasen, og påvirkes av flere faktorer: type stasjonær- og mobilfase, lengde og diameter på kolonnen, trykk og temperatur, samt prøveløsløstet. Ved valg av riktig kombinasjon av de eksperimentelle betingelsene som påvirker separasjonen er det mulig å separere mange typer blandinger. I denne oppgaven anvendes kolonnematerialene Sephadex LH-20, omvendtfase C₁₈ og Isolute C₁₈ til separasjon av *H. fomes* råmaterialet (Greibrokk et al. 1998).

5.2.1.2 Sephadex LH-20

Sephadex LH-20 dannes fra hydroksypropylerte dextrankjeder. Dextrankjedene er kryssbundet og danner et polysakkarid nettverk som svelles ved kontakt med blandinger av vann og organiske løsningsmidler. Ved forskjellig grad av kryssbindinger av dextrankjeder produseres forskjellige Sephadex materialer. Sephadex G25 gir ved hydroksypropylering opphav til Sephadex LH-20. Hydroksypropylgruppene i Sephadex LH-20 er bundet til glukoseenhetene i dextrankjeden med eterbindinger. Dette gir gelen både hydrofile og hydrofobe egenskaper. Med disse egenskapene oppnås en unik separasjonsselektivitet ved visse anvendelser. Sephadexgelen har lav mekanisk stabilitet, og tåler av den grunn ikke høyt trykk (Greibrokk et al. 1998; Amersham-Biosciences 2002).

Sephadex LH-20 brukes for separasjon av forbindelser som har lav vannløselighet, f.eks. steroider, terpenoider, lipider og små peptider. Med en porestørrelse som gir et fraksjoneringsområde <5000 Dalton, kan Sephadex LH-20 også brukes for separering av oligomere og polymere proanthocyanidiner. Stoffene separeres dels etter molekylstørrelse, jf. eksklusjonskromatografi. Høymolekylære forbindelser elueres ut først, mens molekyler med lav molekylvekt kommer ut sist p.g.a. diffusjon inn og ut av porene til gelen. I tillegg har Sephadex LH-20 evnen til å adsorbere aromatiske forbindelser (jf. adsorpsjonskromatografi), og er derfor spesielt egnet til separasjon/isolering av slike forbindelser (Greibrokk et al. 1998; Amersham-Biosciences 2002).

5.2.1.3 Omvendtfase C₁₈ (RP-C₁₈)

I omvendtfase kromatografi er C₁₈ (oktadecylsilika) mest brukt som stasjonærfase. C₁₈ kjeder er bundet til bærersubstansen silika, og gir kolonnen den lipofile egenskapen. Som mobilfase benyttes blandinger av vann og en organisk komponent som er fullstendig blandbar med vann, f.eks. metanol og acetonitril. Mobilfasen er hydrofil (Greibrokk et al. 1998).

De viktigste interaksjoner mellom stoff og stasjonærfasen er Van der Waals krefter. I en blanding av stoff vil de minst hydrofobe stoffene elueres ut først. De mest hydrofobe stoffene retarderes mest. Retensjonen kan reguleres av mengde organisk modifikator i mobilfasen. Økende innhold av organisk modifikator gir mindre retensjon. Selektiviteten styres av kjemiske egenskaper til organisk modifikator og av kjemiske egenskaper til den stasjonære fasen. Omvendtfase C₁₈ er spesielt egnet til separasjon av nøytrale stoffer, men ved bruk av en

buffer og regulering av pH i denne bufferen kan den også anvendes til separering av syrer og baser (Greibrokk et al. 1998).

5.2.1.4 Isolute C₁₈ fastfase ekstraksjon (Greibrokk et al. 1998)

Isolute C₁₈-kolonne er en ekstraksjonskolonne for fastfase ekstraksjon. Fastfase ekstraksjon baserer seg på et stoffs fordeling mellom en væske og overflaten til et fast materiale, en sorbent.

Isolute C₁₈-kolonnen er pakket med C₁₈-kjeder (oktadecylsilika), med et øvre og nedre polyetylenfilter for å holde sorbenten på plass. C₁₈ er den mest anvendte sorbenten i omvendtfase ekstraksjon. Imidlertid vil C₁₈ retardere mange stoffer og har dermed lav selektivitet. Isolute C₁₈-kolonnen er anvendt for rensing av upolare stoffer fra polare, vandige prøveløsninger. De upolare forbindelsene blir retardert fra prøveløsningene gjennom van der Waalske krefter.

Denne separasjonsmetoden benytter vakuum for å suge gjennom løsninger, og består av 4 trinn: kondisjonering av sorbent, applisering av prøveløsning, utvasking av forurensninger og til slutt eluering av ønsket stoff. Kondisjoneringen aktiverer sorbenten slik at den kan adsorbere aktuelle stoffer i prøveløsningen. Kondisjoneringsmidlet må imidlertid vaskes ut av kolonnen før applisering av prøveløsningen. Utvaskingen av forurensninger sørger for at svake retarderte forbindelser blir vasket ut av kolonnen. Sterkere retarderte forbindelser kan således bli eluert fra kolonnen. Vanlige elueringsmidler er metanol og blandinger av metanol og vann.

5.2.2 Tynnsjikt-kromatografi (TLC)

I tynnsjikt-kromatografi ligger stasjonærfasen som et tynt sjikt på en plate av plast, glass eller metall. Silika er den mest brukte stasjonærfasen. Det er relativt få begrensninger for valg av mobilfase i TLC, og det bestemmes av separasjonsprinsippet. Prøver og referansesubstanser løses i et egnet løsningsmiddel og appliseres som flekker nederst på tynnsjikt-platen. Etter avdampning av løsningsmidlet settes platen i kar som inneholder mobilfasen og er mettet med denne. Når platen kommer i kontakt med mobilfasen, vil kapillærkrefter trekke mobilfasen oppover. Forbindelsene i prøvene og referansesubstansene vil bli transportert med mobilfasen

i forskjellige hastighet avhengig av prøve- og referansesubstansenes affinitet for den stasjonære fasen versus mobilfasen. Etter endt utvikling detekteres de separerte forbindelsene visuelt eller instrumentelt. TLC har stort anvendelsesområde, og brukes mye til analyser av enkle blandinger for preliminær identifisering av ønskede forbindelser (Greibrokk et al. 1998).

Vandringen til en forbindelse er definert med retardasjonsfaktor R_f , som er forholdet mellom forbindelsens vandringsavstand fra startsonens senter til flekkens senterpunkt etter avsluttet utvikling (L_s) og avstanden fra startlinjen til mobilfasefronten etter avsluttet utvikling (L_{mf}) (Greibrokk et al. 1998):

$$R_f = \frac{L_s}{L_{mf}}$$

5.2.3 DPPH-spraying

Radikalscavenger aktivitet kan bestemmes kvalitativt ved bruk av TLC-plater. Prinsippet for DPPH-spraying er det samme som for DPPH-scavenging (jf. punkt 5.2.6 DPPH-scavenging). Appliserte prøver på TLC-plater med eller uten bruk av mobilfase kan bli sprayet med DPPH-løsning (metanol). Radikalscavengere vil synes som gule flekker, mens resten av platen har lilla farge (Malterud og Rydland 2000).

5.2.4 NMR-spektroskopi (McMurry 2000)

NMR står for "nuclear magnetic resonance", på norsk heter det kjernemagnetisk resonans. NMR-spektroskopi er en teknikk anvendt til bestemmelse av karbon-hydrogen skjelettet til et organisk molekyl.

Alle atomkjerner med et odde antall protoner eller odde antall nøytroner spinner rundt en akse lik små magneter. Disse atomkjernene kan derfor interagere med et ytre magnetisk felt. ^1H er et eksempel på en atomkerne med odde antall protoner. ^{13}C har odde antall nøytroner. I NMR-spektroskopi er ^1H og ^{13}C mest anvendelig.

Uten det ytre magnetiske feltet til stede, får den magnetiske momentvektoren i atomkjernene helt tilfeldig retning. Når en prøve som inneholder disse kjernene blir plassert mellom sterke

magnetpoler, vil kjernene orientere seg parallelt eller antiparallelt med det ytre magnetiske feltet. Den parallelle orienteringen er litt lavere i energi og er favorisert. Hvis de parallelt orienterte kjernene blir bestrålt med elektromagnetiske stråler av rett frekvens, vil de absorbere energi og det lavere energinivået "spin-flipper" til det høyere energinivået. For at spin-flipping skal skje, må den magnetiske kjernen være i resonans med den påførte strålingen, herav kommer navnet kjernemagnetisk resonans. Frekvensen som er nødvendig for resonans avhenger både av styrken til det ytre magnetiske feltet og type magnetisk kjerne.

Absorpsjonsfrekvensen er ikke lik for alle ^1H - eller alle ^{13}C -kjerner. Elektroner som kretser rundt hver atomkjerne i et molekyl setter også opp små lokale magnetiske felter som modulerer det ytre magnetiske feltet. Disse lokale magnetiske feltene virker i motsetning til det påførte feltet. Det effektive feltet som når kjernen er således litt lavere enn det påførte feltet. Denne effekten kalles "skjerming". Dersom hver atomkjerne i et molekyl har forskjellig elektronkonfigurasjon, vil det effektive feltet være forskjellig for hver kjerne. Et sensitivt NMR instrument kan detektere de små forskjellene i effektiv magnetiske felter og gi signaler ved ulike posisjoner for de kjemisk forskjellige hydrogen- eller karbonkjerner i et molekyl. Atomkjerner som har samme elektronkonfigurasjon blir skjermet i samme grad, og gir samme signal.

Et NMR-spektrum viser påført feltstyrke økende fra venstre mot høyre. Venstredelen kalles lavfeltet, mens høyredelen kalles høytfeltet. Kjerner som trenger en lav feltstyrke for resonans, absorberer ved lavt felt. Disse kjerner er relativt lite skjermet. Derimot trenger kjerner som er mye skjermet en høyere feltstyrke for resonans, og disse kjernene absorberer ved høyt felt.

Tetrametylsilan (TMS) blir brukt som referansesubstans i både ^1H - og ^{13}C -NMR spektroskopi fordi det gir en enkelt topp som ligger ved høyere felt enn der vanlige topper i organiske forbindelser forekommer. Posisjonene til andre signaler kan bestemmes utfra referansetoppen. Posisjonen hvor en atomkjerne absorberer, kalles kjemisk skift. Kjemisk skift til TMS settes til null. Et NMR-spektrum er kalibrert med delta skala og har enheten ppm (parts per million). Kjemisk skift i delta (δ) skala defineres som:

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

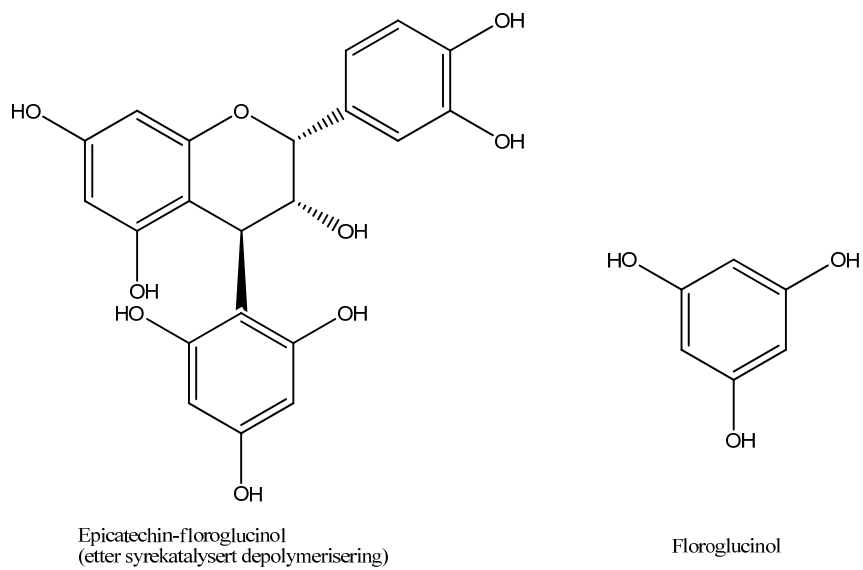
Fordelen med å bruke delta skala er at det er mulig å sammenligne spektra fra forskjellige NMR-instrumenter. De fleste protoner (H^1) absorberer i området 0-10 ppm, og ^{13}C i området

0-220 ppm. Flere faktorer påvirker kjemisk skift. En faktor er elektronegativitet. Karboner som er bundet til oksygen, nitrogen eller halogener er mindre skjermet og vil absorbere mot lavt felt. Vanligvis absorberer mettede karboner i området 0-90 ppm, mens umettede karboner absorberer i området 110-220 ppm. Når det gjelder protoner, absorberer protoner som er bundet til mettede karboner ved høyere felt, mens protoner bundet til umettede karboner absorberer ved lavere felt. Protoner på karboner som er bundet til elektronegative atomer absorberer også ved lavere felt.

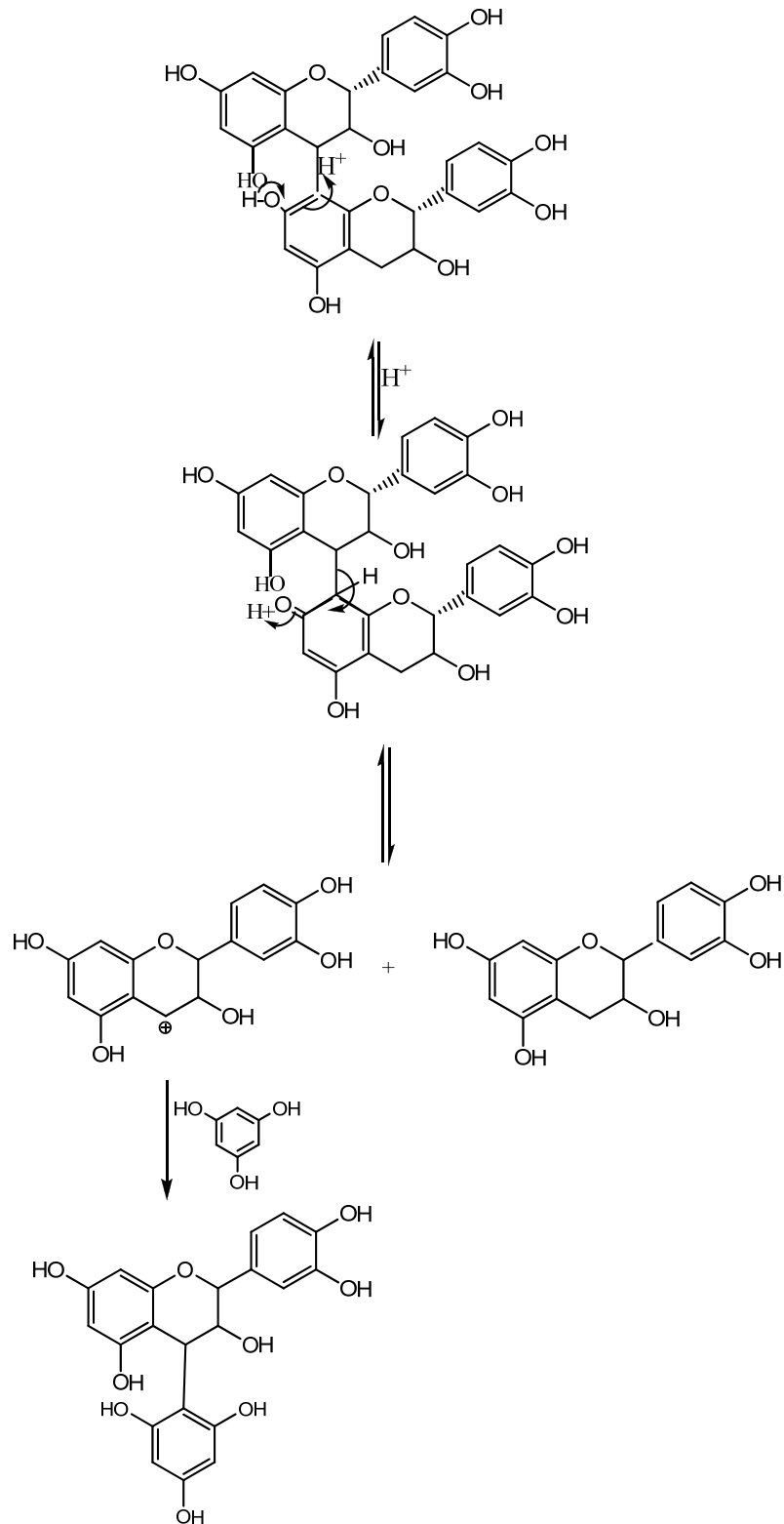
Arealet under hver topp er proporsjonal med antall ^1H som gir den toppen. Ved integrasjon fås dette arealet, som kan brukes til beregning av det relative antallet ^1H for hver type ^1H i et molekyl. Absorpsjonen av ^1H kan splittes i flere toppler (multiplett) ved såkalte "spin-spin splitting". Det skyldes kopligng/interaksjon med spinnene fra nabokjernen. En generell regel kalt "n + 1 regel" kan brukes for beregning av antall splittet toppler. ^1H som har n ekvivalente naboprotoner viser "n + 1" toppler i sitt NMR-spektrum. Denne regelen gjelder for første ordens spektra, hvor avstanden mellom signalene er stor ($> 5x$) i forhold til koblingskonstanten. I høyere ordens spektra, med signaler nær hverandre i forhold til koblingskonstanten, gjelder andre, mer kompliserte regler (meddelelse fra K.E. Malterud). Avstanden mellom toppene i en multiplett kalles koblingskonstant (J). Koblingskonstanter er målt i Hertz (Hz) og er den samme for protoner som er koplet med hverandre.

5.2.5 Syrekatalysert depolymerisering med floroglucinol

Proanthocyanidiner er ikke-hydrolyserbare garvestoffer, og kan derfor ikke spaltes ved hydrolyse (Samuelsson 2004). I surt miljø blir imidlertid proanthocyanidinene depolymerisert ved spalting av interflavonoidbindinger (Figur 11). Startenheten frigjøres som flavan-3-ol monomere, og forlengerenhetene som elektrofile flavan-3-ol intermediater. De elektrofile intermediatene kan reagere med floroglucinol som er nukleofil, og danner et analyserbart produkt (Figur 10). På denne måten er det mulig å bestemme den monomere sammensetningen av proanthocyanidinene. I tillegg fås informasjon om posisjonen til den interflavonoide bindingen (Kennedy og Jones 2001).



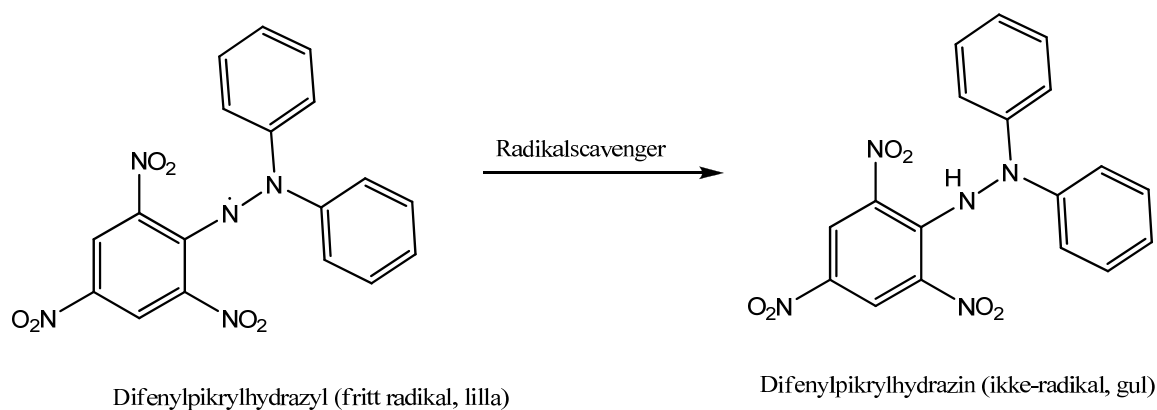
Figur 10. Kjemiske strukturer til epicatechin-floroglucinol og floroglucinol (Kennedy og Jones 2001)



Figur 11. Teoretisk reaksjonsmekanisme til syrekatalysert spalting av proanthocyanidiner (Kennedy og Jones 2001).

5.2.6 DPPH-scavenging

Den antioksidative aktiviteten kan måles ved bruk av det stabile radikalet α, α - difenyl- β -pikrylhydrazyl (DPPH). DPPH har et uparet elektron, og gjør at radikalet har et sterkt absorpsjonsbånd ved 517 nm. Den sterke absorpsjonen er gunstig fordi DPPH har forholdsvis lav løselighet. Den lave konsentrasjonen som fås ved oppløsning i alkoholer er allikevel tilstrekkelig for antioksidanttesting, og p.g.a. det vil Beer-Lamberts lov gjelde for hele det aktuelle absorpsjonsområdet. Løsningen har en intens lilla farge. Når DPPH tar opp et elektron eller et hydrogenatom og danner DPPH-H (ikke-radikal), svekkes absorpsjonen (Figur 12). Nedgangen i absorpsjon ved 517 nm gjør det mulig å følge radikalscavenging med UV-spektrofotometer. Radikalscavenging kan også detekteres visuelt da fargen på løsningen forandres til blekgul (Blois 1958; Malterud et al. 1993).



Figur 12. DPPH-scavenging som resulterer i dannelse av et ikke-radikal (Molyneux 2004)

Prosent DPPH-scavenging kan beregnes etter følgende formel (Grønhaug 2006):

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

A_0 : Absorbans i kyvetten før tilsetning av testløsning

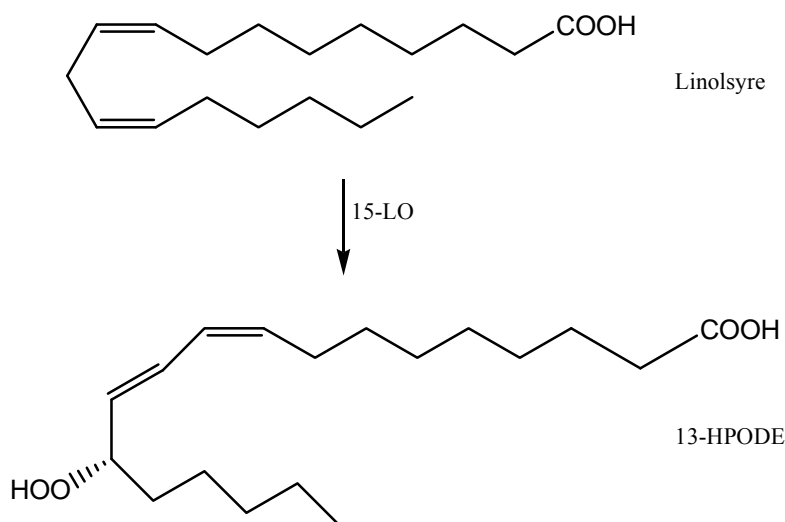
A_1 : Absorbans i kyvetten etter endt måletid

Startabsorbansen blir multiplisert med 0,983 (=2,95/3) for korrigerings av den fortyningen som skjer ved tilsetning av testløsningen til DPPH-løsningen.

5.2.7 Hemming av 15-lipoksygenase (15-LO)

Metoden for å måle hemming av 15-LO er basert på den enzymatiske peroksideringen av flerumettede fettsyrer med dannelse av konjugerte diener. 15-LO benyttet i denne metoden er isolert fra soyabønner. Denne er ikke identisk med enzymet fra pattedyr, men det er vist god korrelasjon mellom inhiberingsverdiene til de to enzymene (Gleason et al. 1995). Dessuten er 15-LO fra soyabønner billig, relativt stabilt og lett tilgjengelig (Malterud og Lyckander 1992).

Som substrat for 15-LO anvendes linolsyre. Linolsyre er billig og forholdsvis stabil, og den hemmende aktiviteten er sammenlignbar med arakidonsyre (Malterud og Lyckander 1992). 15-LO oksiderer linolsyre og danner 13-hydroperoksy-9*Z*,11*E*-oktadekadiensyre (13-HPODE) (Figur 13). De konjugerte dobbeltbindingene til 13-HPODE gjør at forbindelsen kan absorbere UV-stråling ved 234 nm (Malterud et al. 1993). Linolsyre har ikke konjugerte dobbeltbindinger, og har dermed ikke denne egenskapen. Dannelsen av konjugerte diener under peroksideringen medfører en økning i absorpsjon som er proporsjonal med konsentrasjonen av dannet konjugerte diener. Denne økningen reduseres når en hemmer av 15-LO er til stede.



Figur 13. Peroksidering av linolsyre (Funk og Tillmann 2001)

Prosent hemming av enzymaktivitet kan beregnes etter følgende formel (Malterud og Lyckander 1992):

$$100 \times \frac{A_2 - A_1}{A_2}$$

A₁: absorbansøkning (AU/min) for prøve med hemmer

A₂: absorbansøkning for prøve uten hemmer

IC₅₀ kan bestemmes ved lineær interpolasjon mellom målingene som ligger nærmest 50 % enzymaktivitet. Gjennomsnittsverdiene for IC₅₀ oppgis med standardavvik (SD). Hemmingen anses statistisk signifikant dersom P-verdien er ≤ 0.05 (jf. Students *t*-test). Både prosent enzymhemming og IC₅₀ verdi med SD og P-verdi er beregnet v.h.a. dataprogrammer utviklet ved avdeling for farmakognosi (Malterud et al. 2004).

Enzym og substratløsningen lages på forsøksdagen. Boratbuffer blir brukt som løsningsmiddel for både enzymet og substratet. Boratbuffer med høy pH (0.2 M, pH 9.00) øker løseligheten til linolsyren ved å bringe den (pKa verdi 4.77 (Aylward og Findlay 2002)) på ionisert form. Imidlertid må linolsyren løses i etanol først for å lette løsning i bufferen. Det er viktig å holde konsentrasjonen av substratet lav (< 200 μM) for å unngå dannelse av forbindelser med andre absorberende egenskaper (Malterud og Lyckander 1992). Enzymløsningen legges på is og aktiviteten kontrolleres med gitte intervaller for å sikre konstant enzymaktivitet under hele forsøket (Malterud og Rydland 2000).

5.2.8 Hemming av adenosin deaminase (ADA)

Prinsippet for måling av ADA hemming ligger i purinenes evne til å absorbere UV-stråling. Alle puriner har sterk UV-absorbans i området mellom 250-290 nm. Adenosin har maksimal UV-absorbans ved 265 nm og ved pH 7. Inosin har en annen maksimalabsorbans (250 nm ved pH 7,2) og kun lav absorbans ved 265 nm. ADA katalyserer omdanningen av adenosin til inosin. Den initielle hastigheten til deaminering av adenosin er proporsjonal med mengden enzym tilsatt, og hastigheten er konstant i minst 10 minutter ved tilstrekkelig lav mengde av enzymet. Hastigheten til deamineringen avhenger også av substratkonsentrasjonen, og vil øke med økende mengde av substratet. Reaksjonen kan følges ved nedgang i UV-absorbans ved 265 nm. Når en hemmer er tilsatt, vil denne nedgangen bli mindre (Kalckar 1947).

ADA benyttet i denne undersøkelsen er isolert fra kalvetarm. Enzymaktiviteten er høyest ved pH nær 7 (Kalckar 1947). Enzymet er fortynnet i en kaliumfosfatbuffer (50 mM, pH 7.0) inneholdende 1 mg/ml bovint albumin. Denne bufferen har en stabiliserende egenskap på ADA enzymet (Harriman et al. 1994). Forskjellige konsentrasjoner av en ADA-hemmer preinkuberes i 5 minutter i UV-spektrofotometer ved 30 °C med enzymløsningen. Preinkuberingen blir utført fordi ADA og hemmer (semi-tight bindingstype) trenger noe tid for å assosiere og oppnå et stabilt nivå (Agarwal et al. 1977). Reaksjonene starter ved tilsetning av substratløsning, og nedgangen i absorbans måles i 4 minutter. Over en fire minutters periode er tid-absorbans kurven lineær. Ved lengre måleperioder reduseres enzymaktiviteten. Positiv kontroll utføres med quercetin, et flavonoid ofte brukt som modellsubstans for testing av bioaktivitet.

Beregningene av prosentvis ADA hemming, samt IC_{50} verdi med standardavvik og P-verdi er det samme som for hemming av 15-LO (jf. punkt 5.2.7 Hemming av 15-lipoksygenase).

5.3 Generell eksperimentell utførelse

5.3.1 Kolonnekromatografi

5.3.1.1 Sephadex LH-20

Utførelse:

Kolonnen ble pakket ved at Sephadex LH-20 ble rørt ut i starteluenten. Etter svelling av kolonnematerialet, ble det overført til en kolonne av ønsket størrelse. Kolonnen ble deretter vasket med 1-2 kolonnevolum av starteluenten (inntil elueringsvæsken som kom ut var relativt fargeløs).

Prøvematerialet som skulle separeres ble løst i et lite volum av starteluenten, og forsiktig applisert på den ferdigpakke kolonnen. Etter at prøveløsningen var trukket inn i kolonnematerialet, startet elueringen med økende styrke av passende elueringsmidler. Passende fraksjoner av separasjonen ble samlet i prøveglass. Til slutt ble kolonnen vasket med henholdsvis 70 % og 100 % aceton. Dersom elueringshastigheten var for lav, ble en pumpe koblet til kolonnen og et svakt trykk ble påsatt. Sephadexkolonnen tåler ikke høy trykk p.g.a. lav mekanisk stabilitet (Greibrokk et al. 1998).

Løsninger og reagenser:

Forskjellige blandinger av metanol og vann, og aceton og vann ble brukt som elueringsmidler. Prøvematerialet ble løst i egnet løsningsmiddel.

5.3.1.2 Omvendtfase C₁₈ (RP-C₁₈)**Utførelse:**

Omvendtfase silikagel ble rørt ut i starteluenten og overført til en kolonne av ønsket størrelse. Kolonnen ble deretter vasket med 1-2 kolonnevolum av starteluenten (inntil elueringsvæsken som kom ut var fargeløs). Prøvematerialet ble løst i starteluenten og applisert på den ferdigpakkede kolonnen. Etter at prøveløsningen var trukket inn kolonnematerialet ble en pumpe tilkoblet. Elueringen foregikk med økende styrke av passende elueringsmidler. Trykket ble regulert etter ønsket elueringshastighet. Passende volum av eluatet ble samlet i prøveglass. Til slutt ble kolonnen vasket med henholdsvis 70 % og 100 % aceton.

Løsninger og reagenser:

Forskjellige blandinger av metanol og vann, og aceton og vann ble brukt som elueringsmidler. Prøvematerialet ble løst i egnet løsningsmiddel.

5.3.1.3 Isolute C₁₈ fastfase ekstraksjon**Utførelse:**

Fastfase ekstraksjonen var delvis utført som beskrevet av Tsai og Hwang (1999), og delvis utført som beskrevet av Helle Wangensteen (personlig meddelelse) ved avdeling for farmakognosi. Ønsket separert prøvematerialer, 1g, ble ekstrahert med 10 ml destillert vann. Blandingen ble ristet i ett minutt med ristemaskin, og etter 10-minutters henstand ble den ristet i ett minutt.

En Isolute C₁₈-kolonne ble satt i en vakuumanifold som ble tilkoblet en vannstrålepumpe. Kolonnen ble så kondisjonert med 20 ml metanol, og metanol ble vasket ut med 20 ml destillert vann. Vannekstraktet ble deretter applisert på kolonnen og fraksjoner ble samlet i prøveglass. Eventuelle forurensninger ble vasket ut med 10 ml 20 % metanol og ved gjennom suging med luft (purging) i 10 minutter. Elueringen foregikk med 20 ml destillert vann, etterfulgt av 60 ml 20 % metanol og 40 ml 100 % metanol.

Løsninger og reagenser:

Løsningsmidlet for prøvematerialet var destillert vann. Metanol ble benyttet til kondisjonering, og blandinger av metanol og vann som elueringsmidler.

5.3.2 Tynnsjikt-kromatografi**Utførelse:**

Den utvalgte mobilfasen ble klargjort og overført til et utviklingskar. Karet ble satt i avtrekkskapet i ca. 15 minutter slik at atmosfæren i karet ble mettet med mobilfasen.

Påsettingssonene på den ønskede TLC-platen ble merket med en blyant ca. 2 cm fra bunnen av platen, og prøveløsningene, samt referanseløsningene ble applisert med kapillærrør. Prøvestørrelsen varierte fra 10-20 µl. Etter at løsningsmidlet til prøvene og referansesubstansene var avdampet, ble platen lagt forsiktig i det klargjorte utviklingskaret for utvikling. Platen ble tatt ut da fronten til mobilfasen nærmet toppen av platen, og mobilfasefronten ble avmerket. Mobilfasen ble fjernet ved hensetting i avtrekkskapet, eventuell med en hårføner. De separerte forbindelsene ble detektert under UV-lys ved 254 nm (kortbølget) og 366 nm (langbølget). Deretter ble platene sprayet med DPPH- eller Ceric-reagens.

Løsninger og reagens:

Mobilfasen som ble benyttet var en blanding av eddiksyre og vann, eller kun etylacetat. Metanol eller etanol ble benyttet som løsningsmidler for prøver og referansesubstansene.

5.3.3 DPPH- spraying**Utførelse:**

Prøver som ble ønsket undersøkt og eventuelle referansesubstanser var applisert på en TLC-plate. Etter eventuell utvikling og tørking ble platen sprayet med en sterk DPPH-løsning, og resultatet ble avlest etter noen minutter.

Løsninger og reagens:

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

5.3.4 Ceric-spraying

Utførelse:

Appliserte prøveløsninger og referanseløsninger på en TLC-plate ble etter utvikling og tørking sprayet med ceric-reagens. Deretter ble platen plassert i varmeskap ved 100 °C i 5 minutter. Platen ble til slutt observert visuelt, og resultatet avlest.

Løsninger og reagenser:

Ceric-reagens var laget fra cerium(IV)sulfat 1 %, løst i 10 % vandig svovelsyre.

5.3.5 NMR-spektroskopi

Utførelse:

For å ta et ^{13}C -NMR-spektrum, ble få milligram av prøven løst i 1 ml løsningsmiddel tilsatt 1 dråpe TMS. Tilsvarende ble gjort for opptak av ^1H -NMR-spektrum, men mindre prøvemengder kunne være tilstrekkelig ved lite stoff. Prøveløsningen ble så overført til et NMR-rør og analysert på et NMR-spektrometer.

Løsninger og reagenser:

Løsningsmidlene som ble brukt var deuterert aceton, deuterert metanol og tungtvann. TMS ble brukt som referanse i deutererte organiske løsningsmidler.

5.3.6 Syrekatalysert depolymerisering med floroglucinol

Utførelse:

Floroglucinolspaltingen ble utført som beskrevet av Foo et al (1996), men med noen modifikasjoner som beskrevet av Duong (2005). Ønsket depolymerisert prøvesubstans (100-200 mg) ble innveid og løst i 5 ml etanol. Deretter ble prøveløsningen tilsatt 5 ml floroglucinol-løsning og blandingen ble ristet kraftig i 15 minutter. Denne blandingen ble så konsentrert til 1/5 av startvolumet under N_2 -gass.

Etter spaltingen ble de forskjellige enhetene separert med Sephadex LH-20. En kolonne av passende størrelse ble fylt med forhåndssvellet Sephadex LH-20 (jf. punkt 5.3.1.1 Sephadex LH-20). Deretter ble kolonnen vasket med 1-2 kolonnevolum av 50 % etanol. Den depolymeriserte prøveløsningen ble forsiktig applisert på kolonnen og eluert med henholdsvis

50 %, 70 %, og 96 % etanol. Fraksjonsvolum på 20 ml ble samlet i prøveglass. Videre ble kolonnen vasket med henholdsvis 70 % og 100 % aceton.

Subfraksjonene ble analysert på celluloseplater med eddiksyre og vann (3:47) som mobilfase (jf. punkt 5.3.2 Tynnsjikt-kromatografi). Referansene var catechin og epicatechin løst i MeOH, og floroglucinol løst i EtOH. Platen ble DPPH-sprayet (jf. punkt 5.3.3 DPPH-spraying) og subfraksjonene ble sammenslått på grunnlag av dette. Til slutt ble enhetene identifisert ved NMR-spektrometri (jf. punkt 5.3.5 NMR-spektroskopi).

Løsninger og reagenser:

1 % HCl ble lagd ved at 0,675 ml 37 % HCl ble målt og fortynnet med 24,33 ml etanol. For tilberedning av floroglucinol-løsningen ble en mengde floroglucinol som tilsvarte 70 % av vektmengden til prøvesubstansen innveid og løst i 5 ml 1 % HCl. Prøvesubstansen ble løst i etanol, og elueringsmidlene var blandinger av etanol og vann, og aceton og vann.

5.3.7 DPPH-scavenging (DPPH-test)

Utførelse:

De utvalgte prøvematerialene ble innveid og løst i DMSO til en ønsket konsentrasjon (vanligvis mellom 1.25 – 5 mg/ml). En fortynningsrekke ble deretter lagd fra startkonsentrasjonene. Konsentrasjonen av prøveløsningene ble valgt ut fra forventet aktivitet for den enkelte fraksjon basert på TLC.

Metanol ble benyttet som blindprøve for nullstilling av UV-apparatet. Kvartskyvetter ble fylt med 2.95 ml DPPH-løsning og startabsorbansene (absorbansen til DPPH) ble avlest manuelt eller automatisk avhengig av type UV-spektrofotometer. Prøveløsningen, 50 µl, ble tilsatt og omrørt med plastspatel. Absorbansen ble målt over en 5-minutters periode ved 517 nm.

Kyvettene ble skylt tre ganger med metanol etter hver måling.

Løsninger og reagenser:

Prøvematerialene ble løst i DMSO, mens DPPH-pulveret ble løst i metanol til en konsentrasjon som ga en absorbans mellom 0.9 – 1.1 ved 517 nm.

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

Utførelse:

Prøvematerialene fra de ulike fraksjonene ble løst i DMSO. Konsentrasjonene varierte fra 0.3125 – 5 mg/ml. Den sterkeste konsentrasjonen ble lagd først, og en serie av fortyninger ble gjort. Vanligvis ble prøveløsningene som var lagd til DPPH-testen benyttet. Alle løsninger ble tilberedt og fikk romtemperatur under forsøket, med unntak av enzymløsning som ble oppbevart på is. Kvartskyvetter ble benyttet til målingene fordi disse slipper igjennom UV-stråling ved 234 nm. Løsningene i kyvettene ble blandet med plastspatel, og kyvettene ble skylt tre ganger med boratbuffer etter hver måling.

UV-apparatet ble nullstilt med en blindprøve bestående av 950 µl bufferløsning, 2.00 ml substratløsning og 50 µl DMSO. Deretter ble blankprøven uten testsubstans, 900 µl bufferløsning, 2.00 ml substratløsning og 50 µl DMSO, tilberedt. Etter tilsetning av enzymløsning til blankprøven og påfølgende omrøring, ble økningen i absorbansen målt fra 30-90 sekunder. Blankprøven ble målt i starten og på slutten av målingene, og med et intervall på 3.

Prøven ble lagd ved sammenblanding av 900 µl bufferløsning, 2.00 ml substratløsning og 50 µl prøveløsning. Det ble målt 3-4 paralleller av prøven og blankprøven. Flere paralleller ble gjort hvis spredningen på resultatene var uakseptabelt stor. Dersom aktiviteten i blankprøven sank til under 0.3 AU/min, ble ny enzymløsning laget.

Løsninger og reagenser:

Boratbuffer ble lagd fra borsyre og natriumhydroksid til en konsentrasjon på 0.2 M, pH 9.00.

Substratløsning ble tilberedt ved å blande 50 µl linolsyre med 150 µl etanol, og fortynnet til 50 ml med boratbuffer. 15 ml av denne løsningen ble ytterligere fortynnet med 225 ml boratbuffer. *Enzymløsning* ble lagd like før forsøket. 15-LO fra soyabønner ble løst i boratbuffer til en konsentrasjon som ga en absorbansøkning på mellom 0.3 – 0.5 AU/min ved 234 nm.

5.3.9 Hemming av adenosin deaminase (ADA-test)

Utførelse:

Testen for ADA hemming ble utført som beskrevet av Harriman og Abushanab (1994), men med noen modifikasjoner gjort av Helle Wangensteen (personlig meddelelse) ved avdeling for farmakognosi. Prøvematerialer som var ønsket testet ble løst i DMSO, og en fortynningsrekke ble lagd. Alle løsningene fikk romtemperatur før forsøket ble satt i gang. Løsningene ble blandet i kvartskvvetter med plastspatel.

UV-apparatet ble nullstilt med en blindprøve bestående av 2.67 ml bufferløsning, 30 µl DMSO og 300 µl substratløsning. Enzymaktiviteten ble målt og var akseptabel hvis nedgangen i absorbans ligger i området 0.03 – 0.05 AU/ml ved 265 nm. Blankprøven (uten testsubstans) og prøven ble lagd ved sammenblanding av 2.37 ml bufferløsning, henholdsvis 30 µl DMSO og prøveløsning, og 300 µl enzymløsning. Etter 5 minutters inkubering i spektrofotometer ved 30 °C, ble det tilsatt 300 µl substratløsning og omrørt. Nedgangen i absorbansen ble målt over en 4 minutters periode. Blankprøven ble målt i starten, etter hver tredje måleserie, og på slutten av målingene. Det ble målt 3 paralleller for hver prøve. Tilsvarende ble gjort for quercetin som en positiv kontroll av systemet.

Løsninger og reagenser:

Bufferløsningen ble lagd fra kaliumfosfat og natriumhydroksid til en konsentrasjon på 50 mM, pH 7.00. Bovint albumin ble så tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 1 mg/ml. For tillaging av *enzymløsning* ble en stamløsning på 8.3 U/ml lagd og fortynnet til 0.083 U/ml med buffer/albumin. *Substratløsning* ble tilberedt ved oppløsning av 10 mg adenosin i 100 ml buffer/albumin.

5.4 Spesifikk eksperimentell utførelse

5.4.1 Utgangsmateriale og ekstraksjon

Barken av *H. fomes* ble samlet inn, ekstrahert med etanol og inndampet til tørrhet av Dr. Mahiuddin Alamgir fra Universitetet i Khulna, Bangladesh. Ekstraksjonen resulterte i primært etanolekstrakt som ble tilsendt Farmasøytisk Institutt for nærmere analyse.

Primært etanolekstraktet (35.0 g) ble videre ekstrahert av Helle Wangensteen ved avdeling for farmakognosi. Løsningsmidlene som ble benyttet var kloroform (CHCl₃), etylacetat (EtOAc) og butanol (BuOH). Etter siste ekstraksjon med BuOH gjenstod en uløselig rest som ble filtrert fra den vandige resten. Ekstraktene, den vandige resten og den uløselige resten ble inndampet og veid. Oversikt over ekstraheringer av primært EtOH-ekstrakt og videre fraksjonering og arbeid av de forskjellige ekstraktene vedlegges under punkt 8 "Vedlegg" (Flytskjema 8.1.1).

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektra av ekstraktene, inkludert primært EtOH-ekstraktet, den vandige resten og den uløselige resten. For EtOAc- og BuOH-ekstraktet ble det også tatt ¹³C-NMR-spektrum.

Bioaktivitetstesting

Tester for DPPH-scavenging (DPPH-test, Tabell 5) og hemming av 15-LO (15-LO-test, Tabell 6) ble utført for ekstraktene, inkludert primært EtOH-ekstraktet, den vandige resten og den uløselige resten. DPPH-testen ble gjort på konsentrasjonene 5.2, 10.4, 20.8, 41.7 og 83.3 µg/ml, mens konsentrasjonen i 15-LO-testen var 10.4, 20.8, 41.7 og 83.3 µg/ml.

Det ble også testet for hemming av ADA (ADA-test) for primært EtOH-, BuOH-, EtOAc-ekstraktet og den uløselige resten. Konsentrasjonene det ble målt på var 50, 100 og 200 µg/ml. En positiv kontroll med quercetin ble utført på konsentrasjonene 7.6, 15.1 og 30.2 µg/ml.

Anmerkninger: - Det var noe stoff i primært EtOH-ekstraktet som ikke løste seg i DMSO.
- Mye stoff i den uløselige resten løste seg ikke i DMSO.

- Den vandige resten ble ikke testet for ADA hemming fordi det ikke var nok stoff igjen til det.

5.4.2 Fraksjonering av BuOH-ekstraktet

BuOH-ekstraktet ble forsøkt å separeres ved Isolute C₁₈ fastfase ekstraksjon. Da metoden ikke var vellykket, ble det prøvd å separere med Sephadex LH-20 med mindre mengder stoff. Fraksjonering med Sephadex LH-20 gav forholdsvis god utbytte og bra separasjon av de aktuelle forbindelsene. Metoden ble derfor valgt til fraksjonering av BuOH-ekstraktet med en større mengde stoff. Oversikt over fraksjonering BuOH-ekstrakt og videre arbeid av de forskjellige fraksjonene vedlegges under punkt 8 ”Vedlegg” (Flytskjema 8.1.2 og 8.1.3).

5.4.2.1 Første separasjon med Isolute C₁₈ etterfulgt av Sephadex LH-20

– utvikling av metode

Kolonnekromatografi med Isolute C₁₈

BuOH-ekstraktet, 1 g, ble tilsatt 10 ml destillert vann. Blandingen ble ristet i ett minutt med ristemaskin, latt stå i 10 minutter og så ristet i ett minutt. Vannekstraktet ble applisert på en prekondisjonert Isolute C₁₈-kolonne (27 x 30 mm). Fraksjoner ble samlet etter gjennom suging med luft (purging), eluering med 20 ml destillert vann, 60 ml 20 % MeOH og 40 ml 100 % MeOH. Totalt ble det samlet 4 fraksjoner som ble inndampet på rotavapor.

Anmerkninger: Uløst stoff i vannekstraktet tettet igjen det øvre filteret på kolonnen eller ble liggende i kolonnen.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektra av alle 4 fraksjoner. ¹³C-NMR-spektra ble også tatt for fraksjonen med destillert vann og fraksjonen med 20 % MeOH.

Kolonnekromatografi med Sephadex LH-20

De 4 fraksjonene fra Isolute C₁₈ fastfase ekstraksjon ble løst i metanol og slått sammen. Denne blandingen ble applisert på en forhåndssvellet Sephadex LH-20 kolonne (35 x 580 mm), og eluert med henholdsvis 50 %, 75 % og 100 % MeOH. Det ble totalt samlet 70

fraksjoner på 60 ml. Gjenværende stoff på kolonnen ble vasket ut med henholdsvis 70 % og 100 % aceton.

Anmerkninger: Ved oppsamling av fraksjon 45 ble kolonnen utsatt for luft.

DPPH-spraying

Fraksjonene 0-69 fra kromatograferingen over Sephadex LH-20 ble applisert på TLC-plater (Silikagel 60 F₂₅₄). Platene ble tørket og undersøkt ved kort- og langbølget UV-lys. Deretter ble platene sprayet med DPPH-løsning og fraksjoner som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene A1 – A13.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H- og ¹³C-NMR-spektra av A3 og A8.

Bioaktivitetstesting

DPPH- og 15-LO-test ble utført for A2-A4 og A7-A10 på konsentrasjonene 5.2, 10.4, 20.8 µg/ml. Disse fraksjonene ble valgt på grunnlag av vekten til de største fraksjonene, A3 og A8.

5.4.2.2 Annen separasjon med Sephadex LH-20

Kolonnekromatografi med Sephadex LH-20

BuOH-ekstraktet, 11.53 g, ble løst i metanol og applisert på forhåndssvellet Sephadex LH-20 kolonne (35 x 475 mm). Elueringen foregikk med henholdsvis 50 %, 75 % og 100 % MeOH. I alt ble det samlet 75 fraksjoner på 60 ml. Gjenværende stoff på kolonnen ble vasket ut med henholdsvis 70 % og 100 % aceton.

DPPH-spraying

Fraksjonene 0-74 ble applisert på TLC-plater (Silikagel 60 F₂₅₄). Platene ble tørket og undersøkt ved kort- og langbølget UV-lys. Deretter ble platene sprayet med DPPH-løsning og fraksjoner som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene B1 – B17.

Anmerkninger: - Det ble observert bunnfall i fraksjon 2 og 3 ved hensetting i kjøleskap.
- Tilsynelatende utbytte var større enn påsatt mengde stoff.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H - og ^{13}C -NMR-spektra av fraksjonene B1-B6, B9-B11, B14 og B15.

Bioaktivitetstesting

DPPH- og 15-LO-test ble utført for B1, B2, B9, B11 og B14 på konsentrasjonene 5.2, 10.4, 20.8 $\mu\text{g/ml}$. For B14 ble det også utført ADA-test. Konsentrasjonene som ble valgt var 50, 100 og 200 $\mu\text{g/ml}$.

Anmerkninger: - B1, B2, B9 og B11 ble målt med Libra S32PC (nytt UV-spektrofotometer), mens B14 ble målt med Shimadzu UV 160A med termostatert kyvetteholder CPS-240A (gammelt UV-spektrofotometer).

5.4.2.3 Videre fraksjonering av B3 og B4

^{13}C -NMR-spektra til B3 og B4 indikerte at begge fraksjonene kunne inneholde metoksylerede proanthocyanidiner. Fraksjonene ble slått sammen og separert med Sephadex LH-20.

Kolonnekromatografi med Sephadex LH-20

B3 og B4, løst i metanol, ble slått sammen og applisert på forhåndssvellet Sephadex LH-20 kolonne (230 x 28 mm). Elueringen foregikk med henholdsvis 50 %, 75 % og 100 % MeOH. Totalt 26 fraksjoner på 20 ml ble samlet, med unntak av den første fraksjonen (50 ml) og de to siste fraksjonene (60 ml). Gjenværende stoff på kolonnen ble vasket ut med henholdsvis 70 % og 100 % aceton.

DPPH-spraying

Fraksjonene 1-27 ble applisert på TLC-plater (Silikagel 60 F₂₅₄). Platene ble tørket og undersøkt ved kort- og langbølget UV-lys. Deretter ble platene sprayet med DPPH-løsning og fraksjoner som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene B3-4.1 – B3-4.10.

Anmerkninger: Det ble tapt en del stoff i B3-4.1 til oljepumpen.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av B3-4.2 – B3-4.6 og B3-4.9. Det ble også tatt ^{13}C -NMR-spektrum for B3-4.3.

Syrekatalysert depolymerisering med floroglucinol

Fraksjon B3-4.3 ble valgt til syrekatalysert floroglucinolspalting fordi den hadde størst mengde (48.3 mg) og mest sannsynlig ville inneholde interessante forbindelser ut fra NMR-spektrene. B3-4.3, 42.0 mg, ble løst i 5 ml EtOH. Floroglucinol, 29.4 mg, ble løst i 5 ml 1 % HCl i EtOH. Løsningene ble blandet og ristet kraftig i 15 minutter. Spaltingsproduktene ble separert på forhåndssvellet Sephadex LH-20 kolonne (28 x 147 mm). 50, 75 og 96 % etanol ble brukt som elueringsmiddel, og fraksjoner på 20 ml ble samlet. Totalt 22 fraksjoner ble samlet. Den første og siste fraksjonen var på 60 ml. Kolonnen ble vasket med 70 % og 100 % aceton.

Anmerkninger: Ved en feiltakelse ble floroglucinolspaltede prøver eluert med 75 % EtOH i stedet for 70 % EtOH, den egentlige konsentrasjonen. Siden det er liten forskjell mellom konsentrasjonene, i tillegg hadde 75 % EtOH vært brukt i flere syrekatalysert floroglucinolspaltinger, ble det bestemt å fortsette med denne konsentrasjonen for å få et sammenlignbart resultat.

Analytisk TLC

Subfraksjonene ble analysert på celluloseplater (Polygram Cellulose) med eddiksyre og vann (3:47) som mobilfase. Etter utviklingen ble platene tørket og undersøkt ved kort- og langbølget UV-lys. Så ble platene sprayet med DPPH-løsning. Muligens p.g.a. lav konsentrasjon, ble det ikke observert noe tegn til at stoffene har vandret både under UV-lys og ved DPPH-spraying. De 22 fraksjonene ble derfor konsentrert til $\frac{1}{2}$ av startvolumet ved hensetting i avtrekkskapet i 5 dager. Så ble det utført ny utvikling på celluloseplater etterfulgt av UV-undersøkelser og DPPH-spraying. Subfraksjonene som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene B3-4.3.1 – B3-4.3.9.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av alle fraksjoner unntatt den første og siste fraksjonen.

5.4.2.4 Videre arbeid med B6

Syrekatalysert depolymerisering med floroglucinol

B6, 99.8 mg, ble løst i 5 ml EtOH. Floroglucinol, 69.9 mg, ble løst i 5 ml 1 % HCl i EtOH. Løsningene ble blandet og ristet kraftig i 15 minutter. Spaltningsproduktene ble separert på forhåndssvellet Sephadex LH-20 kolonne (28 x 156 mm). 50, 75 og 96 % etanol ble brukt som elueringsmiddel og fraksjoner på 20 ml ble samlet. Det ble i alt samlet 20 fraksjoner. Den første og siste fraksjonen var på 60 ml. Kolonnen ble vasket med 70 % og 100 % aceton.

Analytisk TLC

Subfraksjonene ble analysert på celluloseplater (Cellulose F, DC Plastikfolien) med eddiksyre og vann (3:47) som mobilfase. Etter elueringen ble platene tørket og undersøkt ved kort- og langbølget UV-lys. Platene ble deretter sprayet med DPPH-løsning. Subfraksjonene som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene B6.1 – B6.6.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av B6.1 – B6.4.

5.4.2.5 Videre arbeid med B9

Syrekatalysert depolymerisering med floroglucinol

B9, 201.9 mg, ble løst i 5 ml EtOH. Floroglucinol, 141.6 mg, ble løst i 5 ml 1 % HCl i EtOH. Spalting og kolonnekromatografi ble utført som beskrevet under punkt 5.4.2.4 ”Videre arbeid med B6”. Totalt 25 fraksjoner ble samlet.

Analytisk TLC

Subfraksjonene ble analysert på celluloseplater som beskrevet under punkt 5.4.2.4 ”Videre arbeid med B6”. Dette gav fraksjonene B9.1 – B9.5.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av B9.2 – B9.4.

5.4.2.6 Videre arbeid med B14

Syrekatalysert depolymerisering med floroglucinol

B14, 200.2 mg, ble løst i 5 ml EtOH. Floroglucinol, 140.3 mg, ble løst i 5 ml 1 % HCl i EtOH. Spalting og kolonnekromatografi ble utført som beskrevet under punkt 5.4.2.4 ”Videre arbeid med B6”. Totalt ble det samlet 29 fraksjoner.

Anmerkninger: Den depolymeriserte prøveløsningen ble konsentrert med rotavapor ved romtemperatur fordi N₂-gassbeholderen gikk tom for N₂-gass.

Analytisk TLC

Subfraksjonene ble analysert på celluloseplater som beskrevet under punkt 5.4.2.4 ”Videre arbeid med B6”. Dette gav fraksjonene B14.1 – B14.9.

Anmerkninger: Ved inndamping av fraksjonene 20-23 (B14.8) ble blandingen kokt over i kondensatoren.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektra av B14.3 – B14.8.

5.4.3 Fraksjonering av EtOAc-ekstraktet

Oversikt over fraksjonering av EtOAc-ekstrakt og videre arbeid av de forskjellige fraksjonene vedlegges under punkt 8 ”Vedlegg” (Flytskjema 8.1.4).

5.4.3.1 Separasjon med Sephadex LH-20

Kolonnekromatografi med Sephadex LH-20

EtOAc-ekstraktet, 2.0 g, ble løst i MeOH og applisert på forhåndssvellet Sephadex LH-20 kolonne (35 x 490 mm). Elueringen foregikk med henholdsvis 50 %, 75 % og 100 % MeOH. Totalt ble det samlet 64 fraksjoner på 60 ml. Gjenværende stoff på kolonnen ble vasket ut med henholdsvis 70 % og 100 % aceton.

DPPH-spraying

De 64 fraksjonene ble applisert på TLC-plater (Silikagel 60 F₂₅₄). Platene ble tørket og undersøkt ved kort- og langbølget UV-lys. Deretter ble platene sprayet med DPPH-løsning og fraksjoner som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene E1 – E13.

Anmerkninger: Det dannet seg bunnfall i fraksjonene 6 – 17 ved hensetting i kjøleskap.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektra av fraksjonene E2-E5, E7 og E11. ¹³C-NMR-spektra ble tatt for E3-E5, E7 og E11.

Bioaktivitetstesting

DPPH- og 15-LO-test ble utført for alle fraksjonene. Fraksjonene ble testet på konsentrasjonene 5.2, 10.4, 20.8 µg/ml. ADA-test ble utført for E3 på konsentrasjonene 50, 100 og 200 µg/ml.

5.4.3.2 Videre fraksjonering av E3

Separasjon med Omvendtfase C₁₈

NMR-spektrene av E3 viste at fraksjonen kunne inneholde monomert epicatechin. Det ble besluttet å separere stoffene i E3 på en omvendtfase C₁₈-kolonne for identifisering og isolering av epicatechin monomerene.

E3, 9/10 del (ca. 450 mg), ble dampet inn til tørrhet og løst i 50 % MeOH. Den uløselige resten ble løst i 100 % MeOH. Disse ble blandet og applisert på omvendtfase C₁₈-kolonne (28 x 145 mm). 50, 75 og 100 % MeOH ble brukt som mobilfase. Kolonnen ble vasket med 70 og 100 % aceton. Det ble i alt samlet 50 fraksjoner på 10 ml.

Analytisk TLC

For å finne egnet mobilfase og stasjonærfase ble det prøvd med epicatechin utviklet med 100 % etylacetat på silikaplate (Silikagel 60 F₂₅₄). Mobilfasen ga passende bevegelighet og god konsentrasjon av stoff og ble benyttet til analyse av fraksjon 0-49.

Hver fraksjon ble applisert på silikaplater ((Silikagel 60 F₂₅₄) og eluert med 100 % etylacetat. Epicatechin løst i MeOH ble brukt som referanse. Etter avsluttet eluering ble platene tørket og undersøkt ved kort- og langbølget UV-lys. Platene ble så sprayet med Ceric-reagens og plassert i varmeskap ved 100 °C i 5 minutter. Fraksjonene som så ut til å inneholde de samme forbindelsene ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Dette gav fraksjonene E3.1 – E3.7.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektra av E3.1, E3.2 og E3.6. ¹³C-NMR-spektrum ble også tatt for E3.2.

Bioaktivitetstesting

Ut fra ¹³C-NMR-spektra kunne E3.2 inneholde monomert epicatechin. Denne fraksjonen ble testet for DPPH-scavenging og hemming av 15-LO. Konsentrasjonene det ble målt på var 5.2, 10.4, 20.8 µg/ml.

5.4.3.3 Videre arbeid med E4

Syrekatalysert depolymerisering med floroglucinol

E4, 200.1 mg, ble løst i 5 ml EtOH. Floroglucinol, 140.9 mg, ble løst i 5 ml 1 % HCl i EtOH. Spalting og kolonnekromatografi ble utført som beskrevet under punkt 5.4.2.4 ”Videre arbeid med B6”. Det ble i alt samlet 23 fraksjoner. Den første og siste fraksjonen var på 60 ml.

Analytisk TLC

Subfraksjonene ble analysert på celluloseplater som beskrevet under punkt 5.4.2.4 ”Videre arbeid med B6”. Dette gav fraksjonene E4.1 – E4.7.

Anmerkninger: Etter DPPH-spraying ble fraksjonene hensatt i nærmere to måneder.

Disse ble analysert på nytt med celluloseplater (Polygram Cellulose) og DPPH-løsning. Resultatene viste at løsningene holdt seg stabile og kunne bli inndampet og analysert med NMR-spektroskopi.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av E4.3-E4.6. I tillegg ble ^{13}C -NMR-spektra tatt for E4.4 og E4.5.

5.4.4 Videre arbeid med den vandige resten

NMR-spektroskopi

Da NMR-prøven for den vandige resten ble gjort i stand, ble det oppdaget at en del av den vandige resten ikke løste seg i deuterert aceton. Det uløste ble dermed løst med deuterert metanol og det ble tatt ^1H - og ^{13}C -NMR-spektra av begge løsningene.

Bioaktivitetstesting

DPPH- og 15-LO-test ble utført for den acetonløselige og den acetonuløselige (men metanolløselige) delen av den vandige resten. Konsentrasjonene som ble målt var 5.2, 10.4 og 20.8 $\mu\text{g/ml}$.

Anmerkninger: Små mengder stoffer løste seg ikke i metanol.

6 RESULTAT OG DISKUSJON

6.1 Primært EtOH-ekstrakt

Ekstraksjonen utført av Helle Wangensteen ved farmakognosiavdeling gav følgende fraksjoner: CHCl₃-ekstrakt (0.68 g), EtOAc-ekstrakt (2.6 g) og BuOH-ekstrakt (13.0 g), en vandig rest (300 mg) og en uløselig rest (7.91 g).

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret av primært EtOH-ekstrakt (NMR-spektrum 8.3.1) viste et komplisert mønster, og det skyldes at råekstraktet var en kompleks blanding av forbindelser. Spekteret viste signaler i området 0.8 – 1.5 ppm. Det kan tyde på at ekstraktet inneholdt alifatiske forbindelser. Signaler i området 5.5 – 7.5 ppm kan tyde på innhold av aromatiske og olefiniske forbindelser. Et bredt signal fra 8.4 – 9 ppm kan tyde på innhold av forbindelser med hydroksylgrupper (f.eks. alkoholer og fenoler). Hydroksylgruppene gir mulighet til dannelsen av hydrogenbindinger og medfører ”deshielding” av hydrogenbundet proton som resulterer i absorpsjon ved lavt felt (Williams og Fleming 1987). Det høye signalet ved 2.5 og 3.4 ppm viste henholdsvis løsningsmidlet DMSO og vannrester.

¹H-NMR-spekteret av CHCl₃-ekstraktet (NMR-spektrum 8.3.2) viste flere signaler i området 0.6 – 2.4 ppm, som kan være tegn på innhold av alifatiske forbindelser. Signalene fra 3.8 – 4.2 ppm forårsakes av ¹H på oksygenbundet karbon, sannsynligvis fra glyserol. Ekstraktet inneholdt trolig også olefiniske forbindelser siden det var noen signaler ved 5.4 ppm. Totalt sett viste protonspekteret at CHCl₃-ekstraktet hovedsakelig bestod av umettede fettsyrer. Signalet for løsningsmidlet kloroform lå på 7.27 ppm.

¹H-NMR-spekteret av EtOAc-ekstraktet (NMR-spektrum 8.3.3) viste sterke signaler i alifatområdet; 0.6 – 2.4 ppm. Signalet for løsningsmidlet aceton lå nær 2 ppm, og signalet for metylengruppen i etylacetatrester ble vist som en kvartett ved 4 ppm. Spekteret viste også noen topper i aromat- og olefinområdet, som lå rundt 5.5 – 8 ppm. Protonspekteret viste altså at EtOAc-ekstraktet var en blanding av alifatiske, aromatiske og olefiniske forbindelser. Det ble også tatt ¹³C-NMR-spekter for EtOAc-ekstraktet, men p.g.a. et komplisert signalmønster var det vanskelig å fortolke spekteret.

¹H-NMR-spekteret av BuOH-ekstraktet (NMR-spektrum 8.3.4) viste store, brede signaler i aromatområdet. I området 0.6 – 5 ppm lå flere signaler for løsningsmiddelrester (butanol, metanol og vann). ¹³C-NMR-spekteret (NMR-spektrum 8.3.5) viste flere signaler som forsterker antydninger til innhold av aromatiske forbindelser i følge protonspekteret. I tillegg fås mer detaljert informasjon om strukturen til de aromatiske forbindelsene, og der av en antydning til innhold av proanthocyanidiner. Signalene for løsningsmiddelrestene butanol og metanol lå i området fra 15 – 63 ppm. Det ble tatt et utsnitt av karbonspekteret fra 63 – 83 ppm. Utsnittet viste toppen for C2 i epicatechin som lå på 77 ppm. Toppen for C2 i catechin ligger vanligvis på 82 – 84 ppm, men denne toppen ble ikke observert i spekteret. Utsnittet viste i tillegg toppene for C3 i start- og forlengerenheten ved henholdsvis 66 og 73 ppm. Integral av disse fire toppene og beregning av forholdet mellom dem, fås forholdet mellom catechin og epicatechin, samt gjennomsnittlig polymeriseringsgrad (DP). Ut fra omtrentlige beregninger, kunne BuOH-ekstraktet i gjennomsnitt bestå av en oktamer, som hovedsakelig bestod av epicatechin.

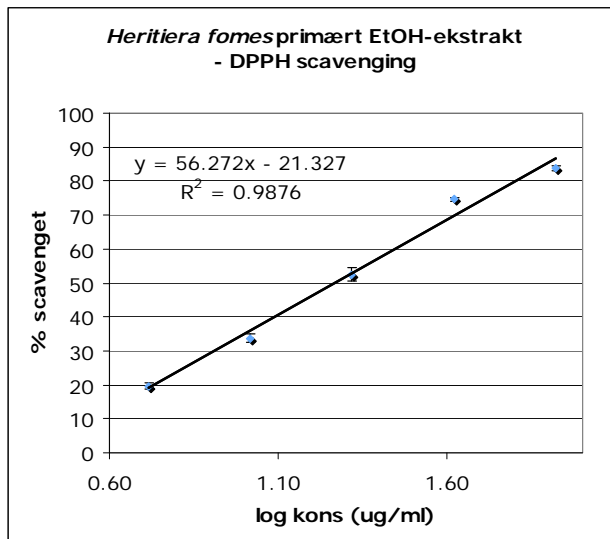
¹H-NMR-spekteret av den vandige resten (NMR-spektrum 8.3.6) tyder på at ekstraktet inneholdt karbohydrater. Signalene for disse lå i området 3.2 – 4.2 ppm. To brede topper i aromatområdet indikerer innhold av aromatiske forbindelser. d-Vann ble brukt som løsningsmiddel for tillaging av NMR-prøven, og signal for denne lå på 4.8 ppm. Ved 2.2 ppm viste en topp som trolig tilhører acetonrester.

¹H-NMR-spekteret av den uløselige resten (NMR-spektrum 8.3.7) viste noen brede signaler i aromatområdet, og det kan være tegn på innhold av aromatiske forbindelser. Spekteret viste en bred topp ved 8.6 ppm. Det indikerer at ekstraktet inneholdt forbindelser med hydrogenbundne hydroksylgrupper. Fra 0.8 – 4.4 ppm viste hovedsakelig signaler for løsningsmiddelrester (butanol, metanol og DMSO).

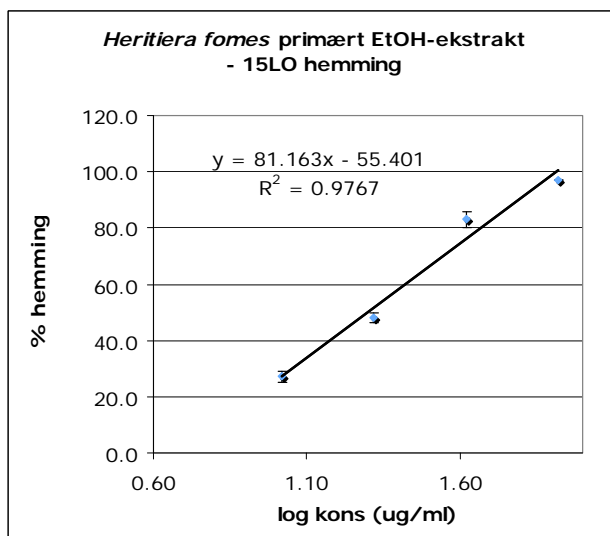
Bioaktivitetstesting

Primært EtOH-ekstraktet viste seg å ha DPPH-scavengeraktivitet med EC₅₀-verdi på 19.0 ± 1.3 µg/ml (Tabell 5 og Tabell 8.2.1). DPPH er et forholdsvis stabilt radikal, og frie radikaler som superoksid radikal og hydroksylradikal som er mye mer reaktiv, kan forventes å bli scavengert mer effektivt. Ekstraktet hemmet 15-LO med IC₅₀-verdi på 21.6 ± 0.8 µg/ml (Tabell 6 og Tabell 8.2.2). I tillegg hemmet ekstraktet ADA. IC₅₀-verdi for ADA hemmingen var 191 ± 16 µg/ml (Tabell 7 og Tabell 8.2.3). Disse aktivitetene kunne sannsynligvis blitt

noe større om alt stoff hadde løst seg. DPPH-scavengereffekten (Figur 14), 15-LO hemmingen (Figur 15) og ADA hemmingen var konsentrasjonsrelaterte.



Figur 14. Konsentrasjonsrelaterte DPPH-scavengeraktivitet.



Figur 15. Konsentrasjonsrelaterte 15-LO hemmende aktivitet.

CHCl₃-ekstraktet ble undersøkt tidligere av Helle Wangensteen og viste ikke innhold av antioksidanter (ikke publisert). Resten av ekstraktene viste seg å ha DPPH-scavengeraktivitet i følgende grad: EtOAc > BuOH > vandig rest > uløselig rest. EC₅₀-verdier for disse var henholdsvis 15.3 ± 1.1, 16.5 ± 1.0, 16.7 ± 0.5, 30.9 ± 1.4 µg/ml (Tabell 5 og Tabell 8.2.1). 15-LO ble hemmet av ekstraktene i følgende rekkefølge: vandig rest > BuOH > EtOAc > uløselig rest (Tabell 6 og Tabell 8.2.2). BuOH-ekstraktet og den vandige resten hadde høyest aktivitet og hadde IC₅₀-verdier på rundt 15 µg/ml. Både DPPH-scavengeraktivitet og 15-LO

hemmende aktivitet var relativt lavt for den uløselige resten. En grunn kunne være at mye stoff ikke løste seg i DMSO slik at konsentrasjonen av antioksidative forbindelser ble lavere enn det skulle være. Alle ekstraktene hadde lavere 15-LO hemmende aktivitet enn quercetin. Quercetin er et flavonoid som er kjent for å være en god 15-LO-hemmer. Quercetin har IC_{50} -verdi på $9.6 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$ (Duong 2005).

Hemming av ADA ble målt for EtOAc-, BuOH-ekstraktet og den uløselige resten.

Ekstraktene viste seg å ha ADA hemmende aktivitet med lignende IC_{50} -verdier (Tabell 7 og Tabell 8.2.3). Den uløselige resten hadde ikke ADA hemmende aktivitet. Sammenlignet med quercetin som hadde IC_{50} -verdi på $16.3 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$, var aktiviteten til begge ekstraktene vesentlig lavere.

Tabell 5. Ekstraktenes DPPH-scavengeraktivitet

Ekstrakt	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	SD
EtOH	19.0	1.3
EtOAc	15.3	1.1
BuOH	16.5	1.0
Vandig rest	16.7	0.5
Uløselig rest	30.9	1.4

Tabell 6. Ekstraktenes 15-LO hemmende aktivitet

Ekstrakt	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	SD
EtOH	21.6	0.8
EtOAc	20.0	3.0
BuOH	15.5	1.4
Vandig rest	15.0	2.0
Uløselig rest	27.0	4.0

Tabell 7. Ekstraktenes ADA hemmende aktivitet

Ekstrakt	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	SD
EtOH	191	16
EtOAc	132	6
BuOH	138	9
Uløselig rest	> 200	-
Quercetin (Positiv kontroll)	16.3	0.4

6.2 Fraksjonering av BuOH-ekstraktet

6.2.1 Første separasjon med Isolute C₁₈ etterfulgt av Sephadex LH-20 – utvikling av metode

Kolonnekromatografi med Isolute C₁₈

Separasjon av BuOH-ekstraktet med Isolute C₁₈ var ikke vellykket. Elueringen skulle foregå med 20 ml destillert vann, 60 ml 20 % MeOH og 40 ml 80 % MeOH. Siden det var ingen synlige tegn til at stoffene hadde vandret gjennom kolonnen etter påsetting av 60 ml 20 % MeOH og elueringshastigheten var svært lav, ble det bestemt å bruke 100 % MeOH. Grunnen til det inntruffne var at det øvre filteret på kolonnen ble tettet av uløst stoff i vannekstraktet. Da 100 % MeOH løste opp disse, kunne stoffene fås ut av kolonnen. Det ble samlet 4 fraksjoner som ble inndampet til tørrhet og tatt NMR-spektrer.

Hvis man hadde sentrifugert og filtrert vannekstraktet før applisering på kolonnen, kunne Isolute C₁₈ muligens separere stoffene i vannekstraktet. I dette tilfelle ble det besluttet å slå sammen fraksjonene og separere dem med en annen metode.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret av ”gjennomsuging med luft”-fraksjonen viste signaler i aromatområdet (6 – 7.5 ppm). Det indikerer innhold av aromatiske forbindelser. Spekteret viste en svært stor topp for vannrester ved omtrent 4 ppm som var uønsket fordi den kunne overlappes signaler fra andre protoner som absorberer i det området.

¹H-NMR-spekteret av vannfraksjonen viste også signaler for aromatiske forbindelser. Toppen for vannrester var mindre enn vanntoppen i den foregående fraksjonen, og den påvirket dermed i mindre grad andre topper. ¹³C-NMR-spekteret (NMR-spektrum 8.3.8) støtter strukturinformasjonen fra protonspekteret, og viste et karakteristisk signalmønster for proanthocyanidiner. C4 i startenheden lå i toppen for løsningsmidlet aceton som var på 30 ppm. Toppen kunne sees ved å benytte et annet løsningsmiddel for NMR-prøven. C4 i forlengerenheten lå på 37 ppm. C3 i start- og forlengerenheten lå på henholdsvis 66 og 73 ppm. C2 i catechin og epicatechin var som tidligere nevnt på henholdsvis 83 og 77 ppm. Signalet for C6 og C8 lå på 97 ppm, signalet for C3' og C4' lå på 145 ppm og signalet for C5 og C7 lå på 156 ppm. Signalene for resten av de aromatiske karbonatomene viste seg i området 104 – 136 ppm.

Utsnittet av karbonspekteret i området fra 60 – 86 ppm viste toppen for C2 i catechin og C2 i epicatechin. Ved integral og beregning av forholdet mellom toppene, ble det funnet at forholdet mellom catechin og epicatechin var omtrent 1:7. Utsnittet viste også toppene for C3 i start- og forlengerenheten, og v.h.a. integral og beregning av forholdet mellom toppene indikerer vannfraksjonen innhold av oligomere proanthocyanidiner med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad som heptamer.

¹H-NMR-spekteret av metanolfraksjonen, 20 % metanol, viste absorpsjoner i området for aromatiske forbindelser. Karbonspekteret underbygger dette funnet, og et utsnitt og integral av toppene i området 62 – 86 ppm viste at forholdet mellom start- og forlengerenhet var omtrent 1:4. Det betyr at denne fraksjonen hovedsakelig inneholdt pentamer (gjennomsnittsverdi). Forholdet mellom catechin og epicatechin var omtrent 1:4.

¹H-NMR-spekteret av metanolfraksjonen, 100 % metanol (d.v.s. rest på filteret), viste flere signaler i alifatområdet (0.8 – 2.4 ppm), som muligens skyldes fettsyrer. Signalene i aromatområdet tyder på innhold av aromatiske forbindelser.

Totalt sett viste NMR-spektroskopi av fraksjonene fra Isolute C₁₈ at separasjonen ikke var helt vellykket. Fraksjonene lignet på hverandre og inneholdt mye vann som kunne forstyrre andre mulige signaler. Karbonspekteret av vannfraksjonen og metanolfraksjonen (20 % metanol) gav tegn på at heptamere proanthocyanidiner ble eluert ut av kolonnen før pentamere proanthocyanidiner.

Kolonnekromatografi med Sephadex LH-20

De sammenslåtte fraksjonene fra Isolute C₁₈ kolonnekromatografi ble separert på en Sephadex LH-20 kolonne. Det ble samlet 70 fraksjoner som ble slått sammen til fraksjonene A1 – A13 på grunnlag av UV-observasjoner og DPPH-spraying (Tabell 8.2.4). Totalt utbytte var 739 mg (~ 74 %; totalt påsatt: 1g).

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret av A3 viste innhold av aromatiske og olefiniske forbindelser. Signalene i området 0.6 – 1.6 tyder på at A3 inneholdt alifatiske forbindelser. ¹³C-NMR-spekteret underbygger det protonspekteret viste og gav et signalmønster som indikerer innhold av proanthocyanidiner. Utsnitt av karbonspekteret fra 63 – 83 ppm og integral av toppene viste at

A3 bestod i gjennomsnitt av tetramere proanthocyanidiner. Beregning av forholdet mellom C2 fra catechin og C2 fra epicatechin forteller at A3 inneholdt nesten kun epicatechin (5 % catechin).

¹H-NMR-spekteret av A8 viste signaler for alifatiske og aromatiske forbindelser.

Karbonspekteret viste innhold av proanthocyanidiner. Utsnitt og integral av toppene fra 64 – 84 ppm viste at proanthocyanidiner i A8 hadde gjennomsnittlig polymeriseringsgrad som heptamer, og bestod mest av epicatechin (5 % catechin). Disse spektrene er ikke vist, siden tilsvarende forsøk ble gjort siden med større stoffmengder.

Bioaktivitetstesting

Av de fraksjonene som ble DPPH-testet var det A3, A4, A8 og A9 som viste høyest DPPH-scavengeraktivitet. EC₅₀-verdier for disse fraksjonene lå rundt 10 µg/ml (Tabell 8.2.5).

Fraksjonene A2-A3 og A8-A10 hemmet 15-LO med IC₅₀-verdi rundt 11 µg/ml, mens A7 hadde forholdsvis lavere hemmende aktivitet (Tabell 8.2.6). Flere av de målte fraksjonene viste nesten like sterk hemming av 15-LO som quercetin (IC₅₀-verdi 9.6 ± 0.4 µg/ml).

6.2.2 Annen separasjon med Sephadex LH-20

Kolonnekromatografi med Sephadex LH-20

Siden Sephadex LH-20 viste seg å kunne separere aktuelle forbindelser i BuOH – ekstraktet med forholdsvis god utbytte, ble det benyttet til separasjon av ekstraktet med en større mengde stoff (11.53 g). Det ble i alt samlet 75 fraksjoner. Fraksjon 2 og 3 hadde bunnfall ved hensetting i kjøleskap. Det kan skyldes at flavonoider har utilstrekkelig løselighet ved lav temperatur. Fraksjonene ble slått sammen til B1 – B17 basert på observasjoner fra UV-lys og DPPH-spraying (Tabell 8.2.7). Totalt utbytte var 12.77 g. Utbyttet var større enn den påsatte mengden, og det kan skyldes rester av elueringsmidler. Med relativt stor mengde stoff som i dette tilfelle, kan det være vanskelig å dampe vekk alt vann- og metanolinnholdet.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret av B1 viste en meget stor topp for vannrester og signalmønsteret var kompliserte. Det var kun mulig å identifisere signalene for aromatiske og alifatiske forbindelser, i tillegg til løsningsmiddelrester (metanol, aceton og vann). Karbonspekteret av B1 viste også et komplisert mønster, men gav likevel tegn til proanthocyanidiner. Et utsnitt

fra 64 – 84 ppm og integral av toppene i dette området viste at B1 inneholdt kun epicatechinpolymer med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad på omtrent 4 (tetramer).

NMR-spektrene for B2 ble først tatt med aceton-d₆ som løsningsmiddel, så med d-metanol fordi det viste seg at en del stoff som ikke løste i deuterert aceton, løste seg i deuterert metanol. Grunnene til det kan være at NMR-prøven var mettet eller løseligheten til polymerene var forskjellige. ¹H-NMR-spekteret av den acetonløselige delen av B2 viste seg å inneholde alifatiske forbindelser (muligens butanolrester) med signaler fra 0.6 – 2.4 ppm. Svake signaler for aromatiske forbindelser viste seg i området 6.4 – 7 ppm. Protonspekteret av den acetonuløselig, men metanolløselig delen viste trolig også innhold av alifatiske og aromatiske forbindelser. Det ble tatt ¹³C-NMR-spekter av den acetonuløselige delen, og spekteret støtter funnene fra protonspekteret. Et utsnitt av karbonspekteret fra 60 – 82 ppm inkludert integral av toppene forteller at B2 sannsynligvis kun inneholdt epicatechin. I tillegg ble det observert en stor topp ved 64 ppm og en uforholdsmessig stor topp fra 71 – 74 ppm (signal for C3 i forlengerenheten) i forhold til 77 ppm (C2 i epicatechin), som indikerer innhold av andre stoffer enn proanthocyanidiner. Manglende signal ved 66 – 67 ppm (C3 i startenheten) tyder på at B2 var høyt polymerisert.

¹H-NMR-spekteret av B3 (NMR-spektrum 8.3.9) viste store signaler for aromatiske og alifatiske forbindelser, muligens butanolrester. Karbonspekter (NMR-spektrum 8.3.10) bekrefter disse funnene, og viste det karakteristiske signalmønsteret for proanthocyanidiner. Imidlertid viste spekteret signaler ved 64 og 72 ppm som trolig tilhører noe annet enn proanthocyanidiner. Det ble observert et signal ved 56 ppm som kan tyde på innhold av metoksylerede aromatiske forbindelser. Utsnittet og integral av toppene i området 65 – 84 ppm (NMR-spektrum 8.3.11) viste at forholdet mellom catechin og epicatechin var 1:4. Det vil si at B3 inneholdt omtrent 20 % catechin og omtrent 80 % epicatechin. Etter korrigering for integral av toppen ved 72 ppm som ikke stammet fra proanthocyanidin, ble det anslått at B3 bestod i gjennomsnitt av en pentamer.

¹H-NMR-spekteret av B4 lignet på protonspekteret av B3, men med kraftigere signaler for aromatiske og alifatiske forbindelser. Karbonspekteret viste også sterkere signaler for proanthocyanidiner enn på karbonspekteret av B3. Spekteret manglet imidlertid signalene ved 64 og 72 ppm, og signalet for muligens metoksylerede aromatiske forbindelser var svakere. Det ble ikke tatt utsnitt av karbonspekteret.

^1H -NMR-spekteret av B5 (NMR-spektrum 8.3.12) viste store, brede signaler i aromatområdet. Signalene på alifatiske forbindelser var færre enn de foregående fraksjonene. ^{13}C -NMR-spekteret (NMR-spektrum 8.3.13) underbygger funnene fra protonspekteret. Utsnitt og integral av toppene fra 64 – 86 ppm viste at B5 inneholdt ca. 15 % catechin og ca. 85 % epicatechin. Gjennomsnittlig polymeriseringsgrad til proanthocyanidin-innholdet var omtrent 4.5.

NMR-spektrene av B6 ligner på NMR-spektrene av B5. Utsnittet av karbonspekteret i området 64 – 84 ppm og integral av toppene viste at B6 hadde gjennomsnittlig polymeriseringsgrad som trimer, og inneholdt omtrent 24 % catechin og omtrent 76 % epicatechin.

^1H -NMR-spekteret av B9 (NMR-spektrum 8.3.14) viste store, brede signaler for aromatiske forbindelser og enkelte, små signaler i alifatområdet som kan skyldes spormengder av fettsyrer. Karbonspekteret (NMR-spektrum 8.3.15) bekrefter antydningene fra protonspekteret. Utsnitt og integral av toppene fra 64 – 86 ppm viste at catechin og epicatechin forekom i B9 med forholdet 1:5.4, med andre ord inneholdt fraksjonen ca. 15 % catechin og ca. 85 % epicatechin. B9 inneholdt i gjennomsnitt pentamere proanthocyanidiner.

B10 viste seg å kunne inneholde aromatiske forbindelser og en del alifatiske forbindelser ut fra protonspekteret. Karbonspekteret bekrefter disse funnene, og antyder tilstedeværelse av proanthocyanidiner. Et utsnitt og integral av toppene i området 64 – 86 ppm viste at proanthocyanidinene hadde gjennomsnittlig polymeriseringsgrad som tetramer. Fraksjonen inneholdt ca. 15 % catechin og ca. 85 % epicatechin.

NMR-spektrene av B11 minnet om NMR-spektrene av B10. Utsnittet av karbonspekteret viste trolig innhold av pentamere proanthocyanidiner (gjennomsnittsverdi) med omtrent 12 % catechin og omtrent 88 % epicatechin.

^1H -NMR-spekteret av B14 (NMR-spektrum 8.3.16) tyder også på at B14 kunne inneholde aromatiske og alifatiske forbindelser. ^{13}C -NMR-spekteret (NMR-spektrum 8.3.17) underbygger antydningene fra protonspekteret og viste det karakteristiske signalmønsteret for proanthocyanidiner. Utsnitt av karbonspekteret inkludert integral av toppene fra 64 – 84 ppm (NMR-spektrum 8.3.18) indikerer innhold av oligomere proanthocyanidiner med

gjennomsnittlig polymeriseringsgrad som heksamer. Forholdet mellom catechin og epicatechin var 1:9.

NMR-spektrene av B15 lignet på NMR-spektrene av B14, men protonspekteret av B15 viste litt større signaler i alifatområdet. Det kan være tegn på at B15 inneholdt større mengder fettsyrer enn B14. Utsnittet av B15 viste at fraksjonen muligens inneholdt omtrent 13 % catechin og omtrent 87 % epicatechin. Graden av polymeriseringen var i gjennomsnitt 5 (pentamer).

Bioaktivitetstesting

Fraksjon B11 viste høyest DPPH-scavengeraktivitet med EC_{50} -verdi på $6.8 \pm 1,1$ $\mu\text{g/ml}$, mens B2 hadde lavest scavengeraktivitet (EC_{50} -verdi > 21 $\mu\text{g/ml}$; Tabell 8.2.8). B2 viste også lavest 15-LO hemming ved 15-LO-test (IC_{50} -verdi > 21 $\mu\text{g/ml}$). Fraksjon B9 og B14 hadde nesten like kraftig hemmende aktivitet på 15-LO som quercetin. IC_{50} -verdi for disse to fraksjonene lå på omtrent 10 $\mu\text{g/ml}$ (Tabell 8.2.9).

Hemming av ADA ble kun målt for B14 p.g.a. tidsmangel. IC_{50} -verdi for ADA hemmende aktivitet av denne fraksjonen var 96 ± 4 $\mu\text{g/ml}$, og aktiviteten var betydelig lavere enn quercetin (IC_{50} -verdi 16.3 ± 0.4 $\mu\text{g/ml}$).

DPPH-scavengeraktivitet ble målt med forskjellige UV-spektrofotometer p.g.a. en forveksling mellom B11 og B14. B1, B2, B9 og B11 ble målt med Libra S32PC, og B14 ble målt ved et annet tidspunkt med Shimadzu UV 160A med termostatert kyvetteholder CPS-240A. Resultatene for DPPH-scavengeraktivitet (Tabell 8.2.9) med spesielt hensyn på standardavvik til målingene viste imidlertid at det var liten forskjell mellom standardavvikene fra UV-spektrofotometene.

6.2.3 Videre fraksjonering av B3 og B4

^{13}C -NMR-spektrene av B3 og B4 antydte at fraksjonene kunne inneholde proanthocyanidiner med metoksylder, som er interessant å undersøke nærmere på fordi metoksylder proanthocyanidiner er uvanlige i naturen.

Kolonnekromatografi med Sephadex LH-20

Fraksjonene ble slått sammen fordi både B3 og B4 inneholdt små mengder stoff, i tillegg indikerte karbonspekteret at innhold av metoksylder aromatiske forbindelser forholdsvis var lavt. Den sammenslåtte fraksjonen B3-4 ble separert på nytt med Sephadex LH-20, denne gang med en mindre kolonne p.g.a. lite påsatt stoff. I alt ble det samlet 26 fraksjoner som ble slått sammen til B3-4.1 – B3-4.10 på grunnlag av UV-observasjoner og DPPH-spraying (Tabell 8.2.10).

NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spekteret av B3-4.2 viste seg å kunne inneholde to metoksylder signaler ved 3.99 og 4.02 ppm. Det ble også observert store, brede signaler i aromatområdet. Observasjonene kan tyde på at metoksylder aromatiske forbindelser var til stede. Proanthocyanidiner i B3-4.2 var muligens metylert ved to hydroksylder grupper innad molekylet ellers var metylgruppen bundet til ulike hydroksylder grupper ved forskjellige proanthocyanidiner.

^1H -NMR-spekteret av B3-4.3 (NMR-spektrum 8.3.19) viste et signal på 3.82 ppm og store signaler i aromatområdet, noe som indikerer innhold av metoksylder aromatiske forbindelser. ^{13}C -NMR-spekteret (NMR-spektrum 8.3.20) støtter funnene fra protonspekteret. Det svake signalet ved 56 ppm som ble tydeligere på utsnittspekteret kan være et metoksylder signal. Utsnitt og integral av toppene fra 55 – 85 ppm viste, riktignok med stor usikkerhet, at B3-4.3 i hovedsak kunne inneholde en trimer med to epicatechin og en catechin, og en metoksylder gruppe.

^1H -NMR-spekteret av B3-4.4 tydet også på at fraksjonen kunne inneholde aromatiske forbindelser med en metoksylder gruppe. Metoksylder signalet lå på 3.86 ppm og var svakere enn for B3-4.2 og B3-4.3. Det ble ikke observert tegn på metoksylder aromatiske forbindelser på ^1H -NMR-spektrene av B3-4.5, B3-4.6 og B3-4.9.

Ut fra NMR-spektrene som ble tatt kan det konkluderes at separasjon med Sephadex LH-20 var vellykket. Det viste seg at fraksjonene B3-4.2 – B3-4.4 sannsynligvis inneholdt metoksylerede proanthocyanidiner. B3-4.3 hadde størst mengde stoff og ble derfor valgt til syrekatalysert floroglucinolspalting med håp om å få en monomer som var metoksyliert.

Syrekatalysert depolymerisering med floroglucinol

Proanthocyanidinene i B3-4.3 ble spaltet til monomere ved syrekatalysert floroglucinolspalting. Prøveløsningen og floroglucinol-løsningen (floroglucinol løst i 1 % HCl i EtOH) fikk reagere i 15 minutter under kraftig omrøsting og reaksjonsproduktene ble separert med Sephadex LH-20. Det ble totalt samlet 22 fraksjoner som ble analysert med celluloseplater.

Analytisk TLC

Fraksjonene 1 – 21 ble undersøkt to ganger med analytisk TLC. Første gang var kun fraksjon 3, 4 og 5 som var synlig under UV-lys, og disse fraksjonene hadde omtrent samme vandringslengde som floroglucinol. Etter DPPH-spraying var det bare fraksjon 3 og 4 som viste radikalfangende aktivitet. Den andre undersøkelsen ble utført med dobbelt så sterk konsentrasjon som den første, og gav litt bedre resultat. Fraksjon 3 – 6 og fraksjon 10 – 13 viste UV-absorberende egenskaper. Fraksjon 3 og 4 hadde omtrent samme vandringslengde som floroglucinol, mens fraksjon 5 og 6 viste svak UV-absorpsjon. Fraksjonene 10 – 13 viste sterke UV-absorberende egenskaper, men de UV-absorberende forbindelsene viste seg å ikke ha vandret noe særlig.

Undersøkelse av celluloseplaten etter DPPH-spraying viste at fraksjonene 3 – 11 hadde radikalfangende aktivitet. Fraksjonene 3 og 4 viste seg å kunne være floroglucinol og det er ganske sannsynlig fordi floroglucinol blir vanligvis eluert ut først ved separasjon med Sephadex LH-20 etterfulgt av startenhetene og floroglucinolbundete forlengerenheter. Fraksjonene 5 – 9 viste avtagende radikalfangende aktivitet, og vandringslengden var vanskelig å avlese. Fraksjon 10 og 11 syntes å ha lik vandringslengde. På grunnlag av disse observasjonene ble fraksjonene 1 – 21 sammenslått til fraksjon B3-4.3.1 – B3-4.3.9 (Tabell 8.2.11).

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret av B3-4.3.2 viste et signal ved 5.8 ppm som kunne tilhøre floroglucinol. Det ble ikke observert noen signaler for startenhet eller floroglucinolbundet forlengerenhet, noe som tyder på at fraksjonen hovedsakelig bestod av ureagert floroglucinol.

¹H-NMR-spekteret av B3-4.3.3 (NMR-spektrum 8.3.21) viste to dubletter omkring 2.8 ppm som kunne skyldes H4 i epicatechin. Ved beregning av koplingskonstanten (J) for den ene dubletten (2.76 ppm, J 3.3) og sammenligning med verdien fra referansespekteret for catechin og epicatechin ($d_{\text{epicatechin}}$, 2.77 ppm, J 3.5), indikerer at fraksjonen kunne inneholde epicatechin. Koblingskonstanten for den andre dubletten kunne ikke beregnes p.g.a. manglende data for det laveste signalet av dubletten. Spekteret ble så sammenlignet med referansespekteret for epicatechin og catechin (NMR-spektrum 8.3.51 og NMR-spektrum 8.3.53), og det viste forholdsvis god overensstemmelse med epicatechinspekteret. Metoksylnsignalet ble ikke observert. Selv om signalmønsteret var komplisert, gav funnene indikasjon på at B3-4.3.3 inneholdt epicatechin som startenhet. Epicatechin var trolig ikke metoksyliert.

¹H-NMR-spekteret av B3-4.3.4 viste et meget komplisert signalmønster, og indikerer bare at fraksjonen inneholdt floroglucinol, aromatiske og alifatiske forbindelser.

¹H-NMR-spektrene av B3-4.3.5 – B3-4.3.8 (NMR-spektrum 8.3.22) viste også kompliserte signalmønstre. Det kan imidlertid tyde at fraksjonene inneholdt aromatiske og alifatiske forbindelser i tillegg til floroglucinol. Siden det ikke ble observert dubletter i området 2.50 – 2.95 ppm, kunne fraksjonene ikke inneholde startenheter. Fraksjonene inneholdt sannsynligvis floroglucinolbundet forlengerenheter. Spektrene viste også to singletter ved 3.56 og 3.61 ppm, noe som kan tyde på innhold av metoksylierte forlengerenheter.

NMR-spektrene av B3-4.3 viste at fraksjonen inneholdt umetoksyliert epicatechin som startenhet og metoksylierte forlengerenheter. Det kan være interessant å slå sammen fraksjonene B3-4.3.5 – B3-4.3.8 og forsøke å oppklare strukturen til metoksylierte forlengerenhetene. På grunnlag av disse funnene og data fra ¹³C-NMR-spekteret av B3-4.3 kunne B3-4.3 inneholde en trimer med umetoksyliert epicatechin som startenhet og en catechin og en epicatechin som forlengerenhet. Både catechin og epicatechin i forlengerenheten kunne være metoksylierte.

6.2.4 Videre arbeid med B6

Syrekatalysert depolymerisering med floroglucinol

Proanthocyanidiner i B6 (100 mg) ble spaltet til monomere ved syrekatalysert floroglucinol under kraftig omristing i 15 minutter. Blandingen ble konsentrert til ca. 2 ml og separert med Sephadex LH-20 kolonne. Det ble samlet 20 fraksjoner i alt.

Analytisk TLC

Analyse av fraksjonene med celluloseplater viste at flere dem hadde UV-absorberende egenskaper og DPPH-scavengeraktivitet. Imidlertid var det vanskelig å bestemme type forbindelser i fraksjonen p.g.a. fortynnet konsentrasjon. Fraksjonene som ble forventet å inneholde startenhet og floroglucinolbundet forlengerenhet ble dampet inn uten sammenslåing (Tabell 8.2.12).

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret av B6.1 (NMR-spektrum 8.3.23) viste to dubletter fra 2.7 – 2.9 ppm. Fire dubletter i dette området er karakteristisk for epicatechin, og forårsakes av H4 α og H4 β i epicatechin. De to andre dublettene var trolig overlappet av vanntoppen som lå rundt 3 ppm. Koplingskonstantene for dublettene ble beregnet (d_1 , 2.71 ppm, J 3.3; d_2 , 2.79 ppm, J 3.3) og sammenlignet med verdiene fra referansespekteret for epicatechin (d_1 , 2.69 ppm, J 3.3; d_2 , 2.77 ppm, J 3.5). God overensstemmelse av kjemisk skift og koplingskonstant tyder på at fraksjonen inneholdt epicatechin som monomer. Ved 5.9 ppm ble det observert et signal som trolig tilhører floroglucinol. Det indikerer at B6.1 sannsynligvis inneholdt rester av ureagert floroglucinol.

¹H-NMR-spektrene av B6.2 og B6.3 viste kompliserte signalmønstre. Dette vanskeliggjør fortolkningen av spektrene. I tillegg var vanntoppen relativt stort slik at det ble vanskelig å si om startenheten epicatechin fortsatt var til stede eller om disse fraksjonene hadde floroglucinolbundete forlengerenheter.

¹H-NMR-spekteret av B6.4 (NMR-spektrum 8.3.24) ble sammenlignet med kjemisk skift fra Köhler og Winterhalter (2005). Det viste at B6.4 inneholdt hovedsakelig epicatechin-floroglucinol og små mengder catechin-floroglucinol.

Resultatene fra syrekatalysert floroglucinolspaltingen forteller at startenheten til proanthocyanidiner i B6 var epicatechin og forlengerenheten var overveiende epicatechin, men med mindre mengder catechin. Funnene samsvarer med data fra ^{13}C -NMR-spekteret til B6 som viste at B6 i gjennomsnitt bestod av trimere proanthocyanidiner. Catechin var til stede med omtrent 24 %, mens epicatechin med ca. 76 %. Basert på ^{13}C -NMR-data til B6 før og etter floroglucinolspaltingen kunne proanthocyanidiner i B6 bestå av trimerene epicatechin-catechin-epicatechin, epicatechin-epicatechin-catechin og epicatechin-epicatechin-epicatechin, med startenheten nevnt først. Om bindingene mellom monomerenhetene er $4 \rightarrow 6$ eller $4 \rightarrow 8$ er ikke mulig å si ut fra ^{13}C -NMR-spektrene.

6.2.5 Videre arbeid med B9

Syrekatalysert floroglucinolspalting og kolonnekromatografi med Sephadex LH-20 av B9 (200 mg) ble utført som beskrevet under punkt 6.2.4 "Videre arbeid med B6".

Analytisk TLC

De utviklede celluloseplatene ble undersøkt under UV-lys etterfulgt av DPPH-spraying. Fraksjon 3 – 5 viste seg å kunne være floroglucinol, mens 6 og 7 viste tegn på innhold av startenheter. De påfølgende fraksjonene var vanskelig å sammenligne med referansesubstansene grunnet spredning av stoff og manglende vandringsfront. På basis av disse observasjonene ble fraksjonene slått sammen til B9.1 – B9.5 (Tabell 8.2.13).

NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spekteret av B9.2 (NMR-spektrum 8.3.25) viste tre dubletter i området 2.7 – 2.9 ppm som indikerer innhold av epicatechin. Den fjerde dubletten lå trolig i vanntoppen. Koplingskonstantene til dublettene (d_1 , 2.69 ppm, J 3.5; d_2 , 2.77 ppm, J 3.5; d_3 , 2.83 ppm, J 4.4) var tilnærmet lik koplingskonstantene beregnet fra spekteret for epicatechin (d_1 , 2.69 ppm, J 3.3; d_2 , 2.77 ppm, J 3.5; d_3 , 2.84 ppm, J 4.4). I tillegg viste spekteret en topp ved 5.9 ppm som tyder på at fraksjonen inneholdt rester av ureagert floroglucinol. Resten av epicatechinsignalene viste ved omtrent samme posisjon som for referansespekteret.

^1H -NMR-spekteret av B9.3 (NMR-spektrum 8.3.26) viste at fraksjonen inneholdt mest epicatechin-floroglucinol og en del catechin-floroglucinol ved sammenligning med kjemisk

skift fra Köhler og Winterhalter (2005). ^1H -NMR-spekteret av B9.4 viste seg å ikke inneholde noe av interesse.

Ut fra disse funnene inneholdt B9 proanthocyanidiner med epicatechin som startenhet, og hovedsakelig epicatechin som forlengerenhet. Dette stemmer overens med resultatet fra ^{13}C -NMR-spekteret til fraksjon B9. Spekteret viste at B9 inneholdt omtrent 15 % catechin og omtrent 85 % epicatechin og var i gjennomsnitt en pentamer.

6.2.6 Videre arbeid med B14

Syrekatalysert depolymerisering med floroglucinol, kolonnekromatografi med Sephadex LH-20 og analytisk TLC av B14 (200 mg) ble utført som beskrevet under punkt 6.2.5 "Videre arbeid med B9" og gav B14.1 – B14.9 (Tabell 8.2.14).

NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spekteret av B14.3 viste en stor topp på 5.88 ppm som forårsakes av floroglucinol. Det var ingen signaler fra startenhet og forlengerenhet, så fraksjonen inneholdt stort sett bare floroglucinol.

Protonspekteret av B14.4 (NMR-spektrum 8.3.27) viste et komplisert mønster. Utsnitt av spekteret fra områdene 5.84 – 6.10 ppm, 3.95 – 4.50 ppm og 2.40 – 2.95 ppm ble tatt for å lette fortolkningen. Fra området 5.84 – 6.10 ppm (NMR-spektrum 8.3.28) viste det seg at dublettene ved 5.92 (J 2.4) og 6.02 ppm (J 2.4) hadde lik signalposisjon og tilnærmet lik koplingskonstant som autentisk epicatechin. Autentisk epicatechin har vanligvis en dublett for H6 ved 5.92 ppm og en dublett for H8 ved 6.02 ppm med henholdsvis koplingskonstant 2.2 og 2.4 Hz. Koplingskonstantene for de to dublettene ved 2.77 (J 3.8) og 2.83 ppm (J 4.0) fra området 2.40 – 2.95 ppm (NMR-spektrum 8.3.29) viste seg å avvike mer sammenlignet med koplingskonstantene for tilsvarende dubletter fra epicatechinspekteret (d_1 , 2.77 ppm, J 3.5; d_2 , 2.84 ppm, J 4.4). Det var få indikasjoner på at B14.4 inneholdt catechin. En sammenligning av andre signalposisjoner fra spekteret med referansespekteret for epicatechin og catechin (NMR-spektrum 8.3.51 og NMR-spektrum 8.3.53) forsterker antydningen til at B14.4 inneholdt startenheten epicatechin. Det ble ikke funnet noe fra utsnittet mellom 3.95 og 4.50 ppm som var sammenlignbart med referansespektrene.

Protonspekteret av B14.5 (NMR-spektrum 8.3.30) viste seg å inneholde rester av elueringsmidlet etanol da det viste en triplett nær 1.1 ppm og en kvartett ved 3.6 ppm. Et utsnitt av spekteret fra 5.86 – 6.12 ppm (NMR-spektrum 8.3.31) viste to dubletter i området 6.01 – 6.06 ppm. Koplingskonstanten og signalposisjonen til hver dublett (d_1 , 6.03 ppm, J 2.4; d_2 , 6.05 ppm, J 2.4) ble beregnet og sammenlignet med ^1H -NMR data for floroglucinolbundet catechin (d_1 , 5.89 ppm, J 2.3; d_2 , 5.91 ppm, J 2.3) og epicatechin (d_1 , 6.00 ppm, J 2.3; d_2 , 6.02 ppm, J 2.3) (Köhler og Winterhalter 2005). Dublettene viste seg å tilhøre epicatechin. Spekteret hadde i tillegg en singlett ved 5.06 ppm og en smal dublett ved 4.61 ppm som samsvarer med data for floroglucinolbundet epicatechin. Singletten ved 5.06 ppm og dubletten ved 4.61 ppm skyldes henholdsvis H2 og H4 i epicatechin-floroglucinol.

^1H -NMR-spekteret av B14.6 tydet på at også denne fraksjonen stort sett inneholdt epicatechin som forlengerenhet. Svake signaler omkring 4.5 ppm indikerer innhold av små mengder catechin som forlengerenhet.

^1H -NMR-spekteret av B14.7 viste et komplisert signalmønster og gir kun antydning til å inneholde floroglucinoladdukter av epicatechin eller catechin.

^1H -NMR-spekteret av B14.8 viste seg å inneholde ureagerte proanthocyanidiner i tillegg til løsningsmiddelrester og andre forurensninger som ble eluert ut i slutten av denne separasjonen.

Resultatene fra NMR-spektrene tyder på at proanthocyanidinene i B14 hadde epicatechin både som start- og forlengerenhet. Catechin forekom i liten grad som forlengerenhet. Dette samsvarer med data fra karbonspekteret til B14 som anslo at forholdet mellom catechin og epicatechin var 1:9, og proanthocyanidinene var i gjennomsnitt heksamere.

6.3 Fraksjonering av EtOAc-ekstraktet

6.3.1 Separasjon med Sephadex LH-20

EtOAc-ekstraktet (2.00 g) ble separert med Sephadex LH-20 og de 64 fraksjonene som ble samlet, ble sammenslått til E1 – E13 basert på observasjonene under UV-lys og etter DPPH-spraying (Tabell 8.2.15). Totalt utbytte var 1.88 g (94 %).

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret av E2 viste signaler for alifatiske forbindelser og muligens karbohydrater (3.5 – 4 ppm). Fraksjonen viste seg å ikke inneholde aromatiske forbindelser.

¹H-NMR-spekteret av E3 (NMR-spektrum 8.3.32) viste signaler fra 2.6 – 3 ppm som lignet på mønsteret med to doble dubletter til epicatechin. Koplingskonstantene for dublettene ble beregnet (dd₁ ved 2.73 ppm, *J* 16.8, 3.3; dd₂ ved 2.87 ppm, *J* 16.3, 4.6) og sammenlignet med referanseverdiene, og det viste relativt god overensstemmelse. Spekteret ble sammenlignet med protonspekteret av autentisk epicatechin og catechin (NMR-spektrum 8.3.51 og NMR-spektrum 8.3.53), og flere andre signaler viste seg å stemme overens med epicatechin.

Antydningen til at E3 inneholdt monomeren epicatechin ble bekreftet av ¹³C-NMR-spekteret (NMR-spektrum 8.3.33) ved sammenligning av spekteret med karbonspektrene for autentisk epicatechin og catechin (NMR-spektrum 8.3.52 og NMR-spektrum 8.3.54). Utsnitt fra 64 – 86 ppm (NMR-spektrum 8.3.34) viste en topp rundt 78 – 80 ppm som trolig tilhører C2 i epicatechin som startenhet. Signalet for C2 i epicatechin som forlengerenhet lå mellom 76 og 77 ppm. Integral av toppene i utsnittet viste at E3 hovedsakelig inneholdt monomeren epicatechin, i tillegg til en del epicatechin som startenhet i proanthocyanidiner. Fraksjonen inneholdt noe oligomere proanthocyanidiner, men p.g.a. flere andre interfererende signaler som ut fra protonspekteret muligens var karbohydrater, ble det vanskelig å beregne gjennomsnittlig polymeriseringsgrad. Det er imidlertid indikasjon på at E3 inneholdt noe epicatechin som forlengerenhet. Catechin forekom i små mengder i fraksjonen.

Protonspekteret av E4 (NMR-spektrum 8.3.35) tyder på at fraksjonen inneholdt aromatiske forbindelser. Karbonspekteret (NMR-spektrum 8.3.36) underbygger denne antydningen og utdyper den ved å vise det typiske signalmønsteret for proanthocyanidiner. Utsnittet og integral av toppene i området 65 – 86 ppm (NMR-spektrum 8.3.37) viste at proanthocyanidinene i E4 var gjennomsnittlig trimere. E4 inneholdt ca. 15 % catechin og 85

% epicatechin. Toppen ved 79 ppm viste at trimerene hadde stort sett epicatechin som startenhet, og følgelig ville catechin hovedsakelig være forlengerenheten i trimeren. Trimerene kunne da ha følgende sammensetning: Epicatechin-epicatechin-catechin, epicatechin-catechin-epicatechin og epicatechin-epicatechin-epicatechin, med startenheten nevnt først. Type bindinger mellom monomerenhetene er, som tidligere nevnt, ikke mulig å si ut fra ^{13}C -NMR-spekteret.

^1H - og ^{13}C -NMR-spekteret av E5 ligner på spektrene fra E4, men toppen for C2 i epicatechin som startenhet (79 ppm) var noe lavere relativt til C2 i epicatechin som forlengerenhet (77 ppm). Det indikerer at proanthocyanidinene i E5 inneholdt litt mindre epicatechin som startenhet enn E4. E5 bestod i gjennomsnitt av trimere proanthocyanidiner og forholdet mellom catechin og epicatechin var omtrent lik for E4.

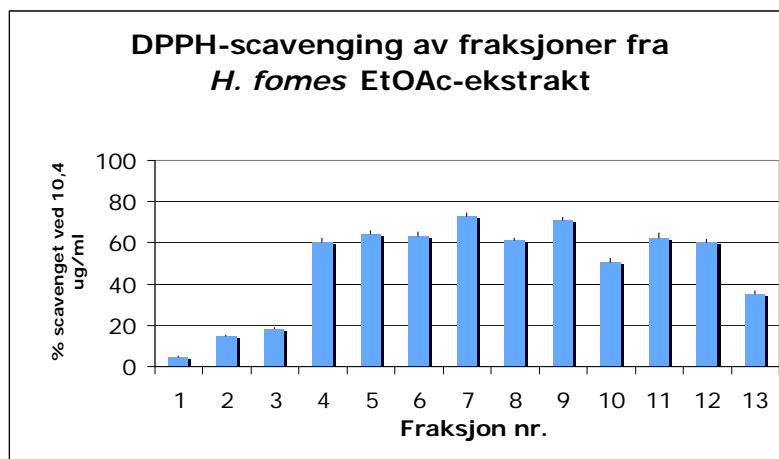
^1H - og ^{13}C -NMR-spekteret av E7 og E11, inkludert utsnitt og integral av karbonspektrene viste at gjennomsnittlig polymeriseringsgraden for proanthocyanidinene økte gradvis. E7 og E11 hadde i gjennomsnitt polymeriseringsgrad på henholdsvis 3.5 og 3.7. Andelen av catechin i fraksjonene økte også til ca. 22 % for E7 og ca. 24 % for E11, mens mengden av epicatechin som startenhet var betydelig redusert.

NMR-spektrene tydet på at proanthocyanidinene i EtOAc-ekstraktet hadde lavere polymeriseringsgrad enn proanthocyanidinene i BuOH-ekstraktet. Det skyldes at større proanthocyanidiner har bedre løselighet i butanol enn i etylacetat.

Bioaktivitetstesting

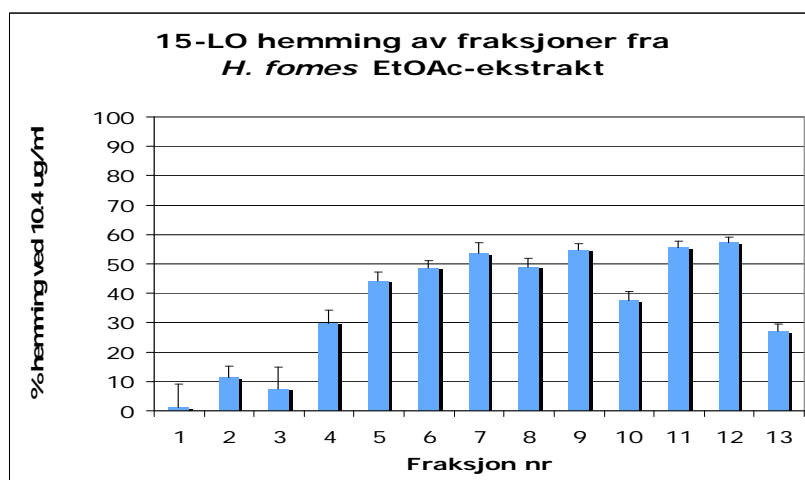
EtOAc-ekstraktet hadde høyest radikalfangende aktivitet av ekstraksjonene fra primært EtOH-ekstrakt. Det forklarer den høye DPPH-scavengeraktiviteten som ble observert i fraksjonene fra EtOAc-ekstraktet. Alle fraksjonene ble DPPH-testet, og det viste seg at fraksjon E7 hadde lavest EC_{50} -verdi, $5.5 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$, d.v.s. E7 hadde høyest radikalfangende aktivitet.

Fraksjonene E4 – E6, E8, E9, E11 og E12 viste høy DPPH-scavengeraktivitet med EC_{50} -verdiene mellom 6.5 – 7.8 $\mu\text{g/ml}$. De tre første fraksjonene E1 – E3 hadde lavest radikalfangende aktivitet (Tabell 8.2.16, Figur 16).



Figur 16. DPPH-scavenging av fraksjonene E1-E13 ved 10.4 µg/ml

Fraksjonene E7, E9, E11 og E12 viste minst like kraftig 15-LO hemming som quercetin (IC_{50} -verdi 9.6 ± 0.4 µg/ml). IC_{50} -verdiene for disse lå mellom 8.7 – 9.5 µg/ml. E5, E6 og E8 hadde også relativt sterk 15-LO hemmende aktivitet, med IC_{50} -verdi på tilnærmet 11 µg/ml. De tre første fraksjonene E1 – E3 viste også lavest 15-LO hemmende aktivitet som ved DPPH-testen (Tabell 8.2.17, Figur 17).



Figur 17. 15-LO hemmende aktivitet av fraksjonene E1-E13 ved 10.4 µg/ml

ADA-test ble kun utført for E3 p.g.a. tidsmangel. E3 viste en vesentlig lavere ADA hemming enn referansesubstansen quercetin. IC_{50} -verdi for ADA hemmingen av E3 var 156 ± 8 µg/ml.

6.3.2 Videre fraksjonering av E3

Separasjon med Omvendtfase C₁₈

Ut fra NMR-spektrene inneholdt E3 sannsynligvis monomert epicatechin. Fraksjonen ble derfor ytterligere separert med omvendtfase C₁₈ for identifisering og isolering av epicatechin. Det ble totalt samlet 50 fraksjoner.

Analytisk TLC

Fraksjonene ble analysert på TLC-plate etterfulgt av undersøkelse under UV-lys og til slutt Ceric-spraying. Ved observering under UV-lys viste kun fraksjon 0 – 3 UV-absorberende egenskaper, og etter Ceric-spraying var det bare fraksjon 0 og 1 som hadde reagert med ceriumsulfat. De lave aktivitetene skyldes muligens lav konsentrasjon i fraksjonene. De 50 fraksjonene ble sammenslått til E3.1 – E3.7 basert på UV-observasjoner, Ceric-spraying og forventet elueringsrekkefølge av aktuelle forbindelser (Tabell 8.2.18).

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret av E3.1 (NMR-spektrum 8.3.38) viste to doble dubletter i underkant av 3 ppm og minner om signalene fra H4 α og H4 β i epicatechin. Spekteret ble sammenlignet med referansespekteret for rent epicatechin og catechin (NMR-spektrum 8.3.51 og NMR-spektrum 8.3.53), og det så ut til at E3.1 kunne inneholde epicatechin. Fraksjonen var imidlertid ikke helt ren, og det var flere interfererende signaler med epicatechin. Nærmere undersøkelse av signalposisjonene og beregning av koplingskonstantene for de doble dublettene ble gjort for å få mer sikker informasjon. Det viste seg at den ene doble dubletten tilhørte H-4 β i epicatechin og hadde signalposisjon på 2.86 ppm (dd, *J* 16.4, 4.5). Den andre doble dubletten tilhørte H-4 α og signalposisjonen lå på 2.72 ppm (dd, *J* 16.7, 3.3). Verdiene for kjemisk skift og koplingskonstantene ble sammenlignet med verdiene for rent epicatechin; H-4 β ved 2.88 ppm (dd, *J* 16.6, 4.4) og H-4 α ved 2.73 ppm (dd, *J* 16.6, 3.4). Verdiene viste seg å ligge litt over eller litt under verdiene for rent epicatechin. Årsaken kan være at E3.1 inneholdt små mengder catechin i tillegg til epicatechin (jf. NMR-tolkning av E3 under punkt 6.3.1 ”Separasjon med Sephadex LH-20”). Ut fra disse funnene kan det konkluderes at E3.1 inneholdt epicatechin, i tillegg til muligens noe catechin og små mengder av andre forurensninger.

De to doble dublettene til epicatechin kom tydeligere frem på protonspekteret av E3.2 (NMR-spektrum 8.3.39). Spekteret ble sammenlignet med referansespekteret for epicatechin og catechin (NMR-spektrum 8.3.51 og NMR-spektrum 8.3.53), og viste god overensstemmelse med epicatechin. ^{13}C -NMR-spekteret (NMR-spektrum 8.3.40) støtter funnene fra protonspekteret, og viste det typiske signalet ved 79 ppm som nevnt tidligere. Fraksjonen inneholdt altså epicatechin i tillegg til en del forurensninger.

Protonspekteret av E3.6 viste ingen signaler på aromatiske forbindelser, og indikerer at fraksjonen ikke inneholdt proanthocyanidiner. Fraksjonen inneholdt store mengder fett, og det er logisk fordi hydrofobe forbindelser har størst retensjon ved omvendtfase C_{18} kolonnekromatografi.

Bioaktivitetstesting

DPPH- og 15-LO-test ble utført for E3.2 fordi NMR-spektrene viste at fraksjonen inneholdt forholdsvis stor mengde epicatechin. Testene viste at E3.2 (epicatechin) hadde både radikalfangende og 15-LO hemmende aktivitet. EC_{50} -verdi for DPPH-scavenging lå på $8.5 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$ og IC_{50} -verdi for hemming av 15-LO var $15 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ (Tabell 8.2.19 og 8.2.20). Disse aktivitetene viste seg å være vesentlig høyere enn for E3. Både IC_{50} -verdi og EC_{50} -verdi for henholdsvis 15-LO hemming og DPPH-scavenging for E3 var $> 21 \mu\text{g/ml}$. Årsaken er at vi har fått isolert epicatechin som trolig var det aktive stoffet i fraksjonen og følgelig oppnådd en mer konsentrert fraksjon med aktive forbindelser.

6.3.3 Videre arbeid med E4

Proanthocyanidinene i E4 ble floroglucinolspaltet, separert med Sephadex LH-20 og analysert med TLC-plater som beskrevet under punkt 6.2.5 "Videre arbeid med B9" og gav E4.1 – E4.6 (Tabell 8.2.21).

NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spekteret av E4.3 (NMR-spektrum 8.3.41) viste to doble dubletter i underkanten av 3 ppm, som er karakteristisk for epicatechin. Sammenligning av spekteret og spekteret for rent epicatechin og catechin (NMR-spektrum 8.3.51 og NMR-spektrum 8.3.53) indikerer at E4.3 inneholdt epicatechin som startenhet.

^1H -NMR-spekteret av E4.4 hadde ingen dubletter ved 3 ppm, og viste dermed at fraksjonen ikke inneholdt startenhet. Singletten ved 5.06 ppm og de smale dublettene ved 6.03 (*J* 2.4) og 6.05 ppm (*J* 2.4) hadde tilnærmet lik kjemisk skift og koplingskonstant som epicatechin-floroglucinol. Signal for floroglucinol lå på 5.93 ppm. ^{13}C -NMR-spekteret av E4.4 ble også tatt, og kjemisk skift av flere signaler stemmer mer overens med kjemisk skift av karbonspektrum for epicatechin-floroglucinol enn for catechin-floroglucinol (Tabell 8). Kjemisk skift i ppm var jevnt under 0.8 ppm for E4.4 enn for referansespekteret, og det skyldes nok en forskyvning i NMR-instrumentet.

Tabell 8. Sammenligning av observerte ^{13}C -NMR data for E4.4 med ^{13}C -NMR data for epicatechin-floroglucinol; kjemisk skift δ i ppm.

C nr.	Referanse	E4.4
2	77.8	77.0
3	73.3	72.5
4	37.6	36.9
6	96.7	95.8
8	97.2	96.3

^1H -NMR-spekteret av E4.5 (NMR-spektrum 8.3.42) lignet på protonspekteret av E4.4, men viste i tillegg noen svake signaler fra 4.4 – 4.5 ppm. Signalene kan skyldes innhold av omtrent 15 % catechin (jf. NMR-spektrene av E4). Et utsnitt av protonspekteret fra 4.40 – 4.75 ppm og integral av dubletten ved 4.61 ppm og signalene ved 4.44 – 4.52 ppm (NMR-spektrum 8.3.43) viste at fraksjonen inneholdt mest epicatechin-floroglucinol og sannsynligvis catechin-floroglucinol eller floroglucinolbundet catechinderivater. ^{13}C -NMR-spekteret (NMR-spektrum 8.3.44) ble sammenlignet med kjemisk skift fra karbonspektrum av floroglucinolbundet epicatechin og floroglucinolbundet catechin (Tabell 9). Forholdsvis god overensstemmelse med data for epicatechin-floroglucinol tyder på at epicatechin var forlengerenhet. Det var vanskelig å observere signaler som er typiske for catechin på karbonspekteret, trolig grunnet lite catechin i E4.5, samt kompliserte signalmønstre. Da E4 viste seg å inneholde trimere, antas fraksjonen å inneholde et eller flere av epicatechin-epicatechin-catechin, epicatechin-catechin-epicatechin og ren trimer av epicatechin (startenhet nevnt først). Disse resultatene samsvarer med funnene fra ^{13}C -NMR-spekteret av E4.

Tabell 9. Sammenligning av observerte ^{13}C -NMR data for E4.5 med ^{13}C -NMR data for epicatechin-floroglucinol; kjemisk skift δ i ppm.

C nr.	Referanse	E4.5
2	77.8	77.0
3	73.3	72.5
4	37.6	36.9
4a	101.4	100.5
6	96.7	95.8
8	97.2	96.3

^1H -NMR-spekteret av E4.6 viste at fraksjonen ikke inneholdt noe som er interessant.

6.4 Videre arbeid med den vandige resten

Stoffene i den vandige resten viste seg å ha forskjellig løselighet i aceton- d_6 og d-metanol. Årsaken til det kunne være, som tidligere nevnt, at NMR-prøven var mettet eller løseligheten til polymerene var forskjellige. Den delen som ikke løste seg i deuterert aceton, ble videre forsøkt å løses i deuterert metanol.

NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spekteret av den acetonløselige delen av vannfasen (NMR-spektrum 8.3.45) tyder på innhold av hovedsakelig aromatiske forbindelser og løsningsmiddelrester (vann, metanol og aceton). Karbonspekteret (NMR-spektrum 8.3.46) bekrefter informasjonene fra protonspekteret og viste et proanthocyanidin-signalmønster. Utsnitt og integral av toppene fra 64 – 84 ppm (NMR-spektrum 8.3.47) viste at den acetonløselige delen ikke inneholdt påvisbare mengder catechin, og proanthocyanidinene var høyt polymerisert. Gjennomsnittlig polymeriseringsgrad anslås til å være omtrent 18.

Den acetonuløselige delen av vannfasen ble løst i metanol for opptaking av NMR-spektrer. Protonspekteret (NMR-spektrum 8.3.48) viste signaler for aromatiske forbindelser, inkludert vann-, metanol- og acetonrester. Karbonspekteret (NMR-spektrum 8.3.49) bekrefter funnene fra protonspekteret og indikerer innhold av proanthocyanidiner. Utsnitt og integral av toppene fra 67 – 84 ppm (NMR-spektrum 8.3.50) viste at den acetonuløselige delen også var høyt polymerisert. Gjennomsnittlig polymeriseringsgraden var anslagsvis 25 eller mer. Den acetonuløselige delen bestod antagelig av 12 % catechin og 88 % epicatechin.

Funnene fra NMR-spektrene gav indikasjon på at begge fraksjonene av den vandige resten inneholdt proanthocyanidiner av høy polymeriseringsgrad. Proanthocyanidinene i den acetonuløselige, men metanolløselige delen var mer polymerisert enn den acetonløselige delen. Resultatene tydet også på at den acetonløselige delen sannsynligvis inneholdt ren epicatechinpolymer, mens den acetonuløselige delen trolig bestod av små mengder catechin i tillegg til epicatechin.

Bioaktivitetstesting

Undersøkelse på biologiske aktiviteter til den vandige resten viste både høy DPPH-scavenging og høy 15-LO hemming. Etter ”ekstrahering” med aceton etterfulgt av metanol, økte den radikalfangende aktiviteten for begge ”ekstrakter”. Den acetonløselige delen av vannfasen hadde EC_{50} -verdi på $10,4 \pm 1,1$ ug/ml, mens EC_{50} -verdi for den acetonuløselige delen lå på 13 ± 2 ug/ml (Tabell 10, Tabell 8.2.22 og 8.2.23). 15-LO hemmende aktivitet var også høy for den acetonløselige delen (IC_{50} -verdi $15,6 \pm 0,7$ ug/ml). Den acetonuløselige delen hadde IC_{50} -verdi >21 ug/ml.

Resultatene tyder på at radikalfangende og 15-LO hemmende aktiviteten var høyere for den acetonløselige delen enn for den acetonuløselige delen.

Tabell 10. DPPH-scavengeraktivitet og 15-LO hemmende aktivitet av den acetonløselige og acetonuløselige delen av vannfasen.

Ekstrakter	DPPH-scavenging (EC_{50} -verdi i $\mu\text{g/ml}$)	15-LO hemming (IC_{50} -verdi i $\mu\text{g/ml}$)
Acetonløselige delen	10.4 ± 1.1	15.6 ± 0.7
Acetonuløselige delen	13 ± 2	> 21

6.5 Potensielle medisinske anvendelser

Barken fra *Heritiera fomes* viste seg å ha et høyt innhold av proanthocyanidiner ifølge data fra NMR-spektroskopi. DPPH-test og 15-LO-test viste at primært EtOH-ekstrakt og tilhørende ekstrakter og fraksjoner hadde høy DPPH-scavengeraktivitet og 15-LO hemmende aktivitet. Antioksidanteffektene i barken av *H. fomes* synes å skyldes proanthocyanidin-innholdet.

H. fomes blir benyttet som en medisinske plante av lokalbefolkningen i Bangladesh.

Det er uvisst hvilke sykkelige tilstander *H. fomes* ble benyttet til og hvordan planten ble tilberedt for administrering. Proanthocyanidiner har imidlertid blitt rapportert å ha biologiske, farmakologiske og terapeutiske aktiviteter mot frie radikaler og oksidativt stress (Beecher 2004; Cos et al. 2004; Dixon et al. 2005).

At konsentrasjonen av proanthocyanidiner i *H. fomes* bark er høyt, vil det ikke nødvendigvis medføre høy konsentrasjon av aktive metabolitter i målorganet/vev ved inntak. Begrensede studier indikerte at kun proanthocyanidiner med lav polymeriseringsgrad og/eller deres metabolitter som ble dannet av tarmfloraen som ble absorbert. Effekten av proanthocyanidiner i *H. fomes* barken bør derfor testes *in vivo* for å bestemme om systemiske helseeffekter oppnås. Proanthocyanidiner kan imidlertid påvirke tarmslimhinnen direkte og beskytte den mot oksidativt stress (Cos et al. 2004; Manach et al. 2005). *Shigella dysenteriae* toksin og *Entamoeba histolytica* lektin som induserer dysenteri har blitt rapportert å øke oksidativt stress i tarmepitelcellene (Maiga et al. 2007).

Det har vært nevnt tidligere at dysenteri og diaré er bl.a. indikasjonsområder til den nær beslektede planten *Heritiera littoralis*. Det kan dermed ikke utelukkes at *H. fomes* kan vise lignende effekter på dysenteri og diaré, spesielt når planter som er rik på proanthocyanidiner har lenge vært brukt mot diaré i folkemedisin, og oksidativt stress er forbundet med dysenteri. Proanthocyanidiner og andre antioksidanter som f.eks. vitamin E har utstrakt anvendelse innen behandling av hudsykdommer som kløe og dermatitt (Maiga et al. 2007).

Hemming av 15-LO til flere fraksjoner fra EtOAc-ekstraktet viste seg å være minst like høy som quercetin. Det er således verdt å teste 15-lipoksygenase hemmingen *in vivo* for å bestemme hvorvidt *H. fomes* bark har beskyttende effekter mot f.eks. aterosklerose. Siden proanthocyanidiner vanligvis har lav toksisitet, kan de være av interesse i denne forbindelsen.

7. KONKLUSJON

Primært EtOH-ekstraktet av barken fra *Heritiera fomes* er rik på proanthocyanidiner og har både radikalfangende og 15-LO hemmende egenskaper.

BuOH-ekstraktet inneholdt i gjennomsnitt oktamere proanthocyanidiner bestående av hovedsakelig flavan-3-ol enheten epicatechin. Det ble isolert fraksjoner av ekstraktet med gjennomsnittlig polymeriseringsgrad mellom 3 og 6. Catechin-innholdet i de analyserte fraksjonene lå på omtrent 15 %. Depolymerisering av proanthocyanidinene i enkelte fraksjoner av BuOH-ekstraktet viste at epicatechin var både start- og forlengerenhet. Catechin forekom i små mengder og muligens som forlengerenhet. Det ble også isolert to fraksjoner, B3 og B4, som kunne inneholde metoksylerede proanthocyanidiner. Videre opprensing av B3 og B4 og depolymerisering av proanthocyanidinene i B3-4.3 indikerte at umetoksyliert epicatechin var startenhet. Forlengerenheten kunne ikke bestemmes p.g.a. kompliserte signalmønstre, men B3-4.3 inneholdt sannsynligvis metoksylerede forlengerenheter.

Det ble isolert og identifisert monomert epicatechin fra EtOAc-ekstraktet. Proanthocyanidiner i isolerte fraksjoner av ekstraktet var i gjennomsnitt trimere og tetramere, med mellom 15 – 24 % catechin. Ut fra det unike signalet fra ^{13}C -NMR-spektrum ved 78 – 80 ppm for C2 i epicatechin som startenhet, kunne det anslås at EtOAc-ekstraktet bestod av hovedsakelig epicatechin som start- og forlengerenhet. Depolymerisering av E3 viste at fraksjonen inneholdt stort sett av epicatechin som start- og forlengerenhet, og mindre mengder catechin som forlengerenhet.

Den vandige resten viste høy radikalscavenger aktivitet og 15-LO hemming. Både den acetonløselige og acetonuløselige delen av vannfasen var høyt polymerisert (DP ca. 18 og DP > 25) og inneholdt hovedsakelig epicatechin, med små mengder catechin.

Av alle isolerte fraksjoner fra primært EtOH-ekstraktet viste E7 fra EtOAc-ekstraktet høyest radikalfangende aktivitet. E7 bestod av 22 % catechin og hadde i gjennomsnitt polymeriseringsgrad 3.5. EC_{50} -verdien til E7 lå på $5.5 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$. Flere andre fraksjoner hadde høy radikalfangende aktivitet, deriblant E4-E6, E8, E9, E11 og E12 fra EtOAc-ekstrakt og B11 fra BuOH-ekstrakt med EC_{50} -verdier mellom 6.5 – 7.8 $\mu\text{g/ml}$. Fraksjonene E7, E9, E11, E12, B9 og B14 viste høy 15-LO hemming. E12 hadde sterkest 15-LO hemmende

aktivitet. Med en IC_{50} -verdi på 8.7 ± 0.5 $\mu\text{g/ml}$, var 15-LO hemmingen for E12 bedre enn for quercetin. Quercetin er en god 15-LO hemmer med IC_{50} -verdi på 9.6 ± 0.8 $\mu\text{g/ml}$.

ADA hemmingen av primært EtOH-ekstraktet, dets ekstrakter og enkelte fraksjoner var vesentlig lavere sammenlignet med quercetin.

Barken av *H. fomes* er en god kilde til antioksidanten proanthocyanidin. Proanthocyanidiner, epicatechin og catechin har ikke blitt isolert og identifisert fra *H. fomes* barken tidligere. Generelt er det gjort lite studier på biologiske aktive stoffer i *H. fomes*. *H. fomes* barken kan ha potensielle medisinske anvendelser som dysenteri og diaré p.g.a. det høye innholdet av proanthocyanidiner.

Forslag til videre arbeid:

Den vandige resten viste høy biologiske aktiviteter og var høypolymerisert. Videre fraksjonering og opprensing av ekstraktet kunne være interessant for isolering og identifisering av de aktive forbindelsene.

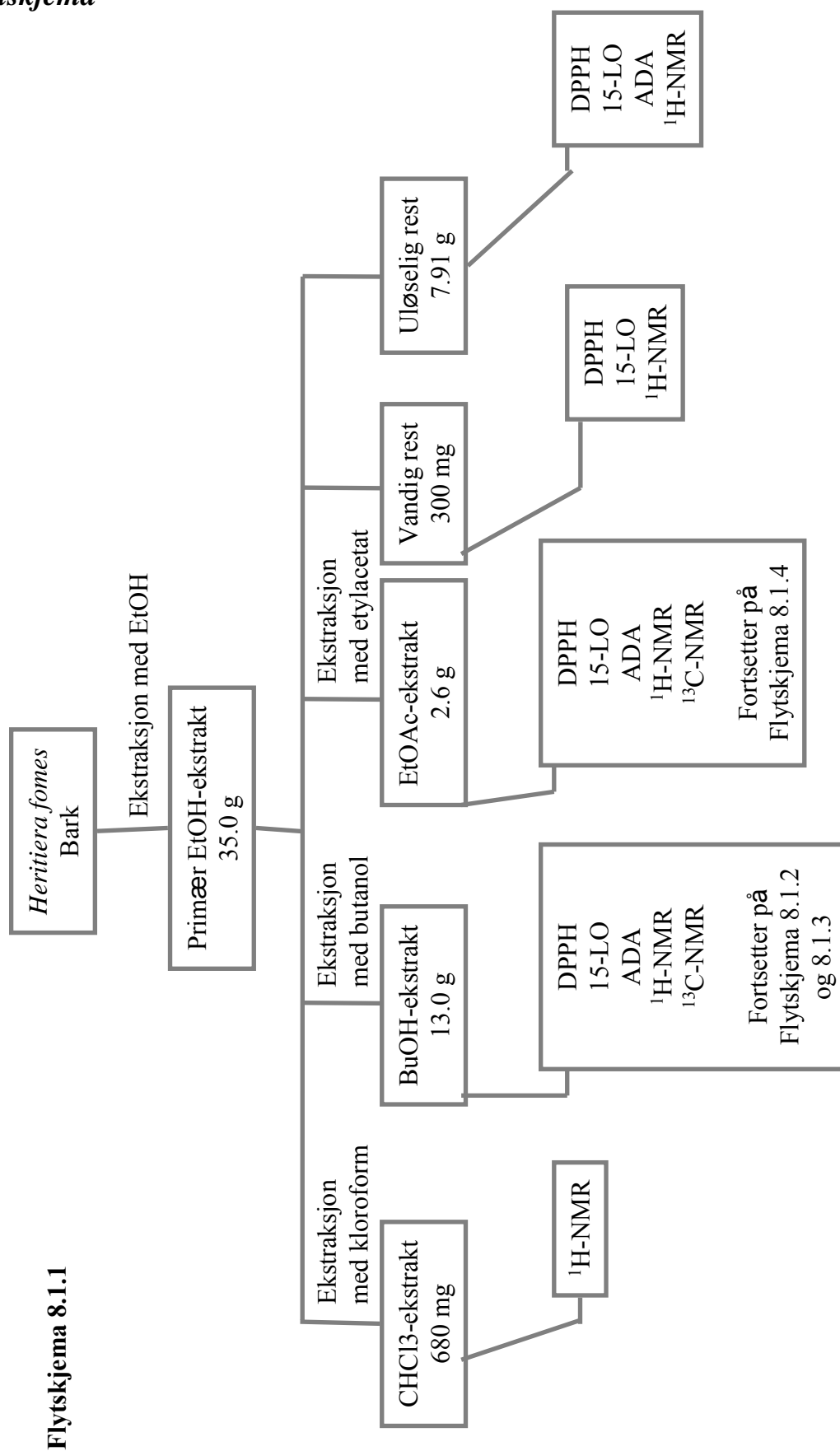
Fraksjonene B3-4.3.5 – B3-4.3.8 fra floroglucinolspaltet B3-4.3 kunne inneholde metoksylerede forlengerenheter, og det hadde vært interessant å slå sammen fraksjonene for nærmere strukturoppklaring. P.g.a. lite stoff ble det ikke testet for DPPH-scavenging og 15-LO hemming. Det kunne være interessant å teste hvorvidt eventuell metylering(er) påvirker scavenger- og 15-LO hemmende aktiviteten til proanthocyanidinene.

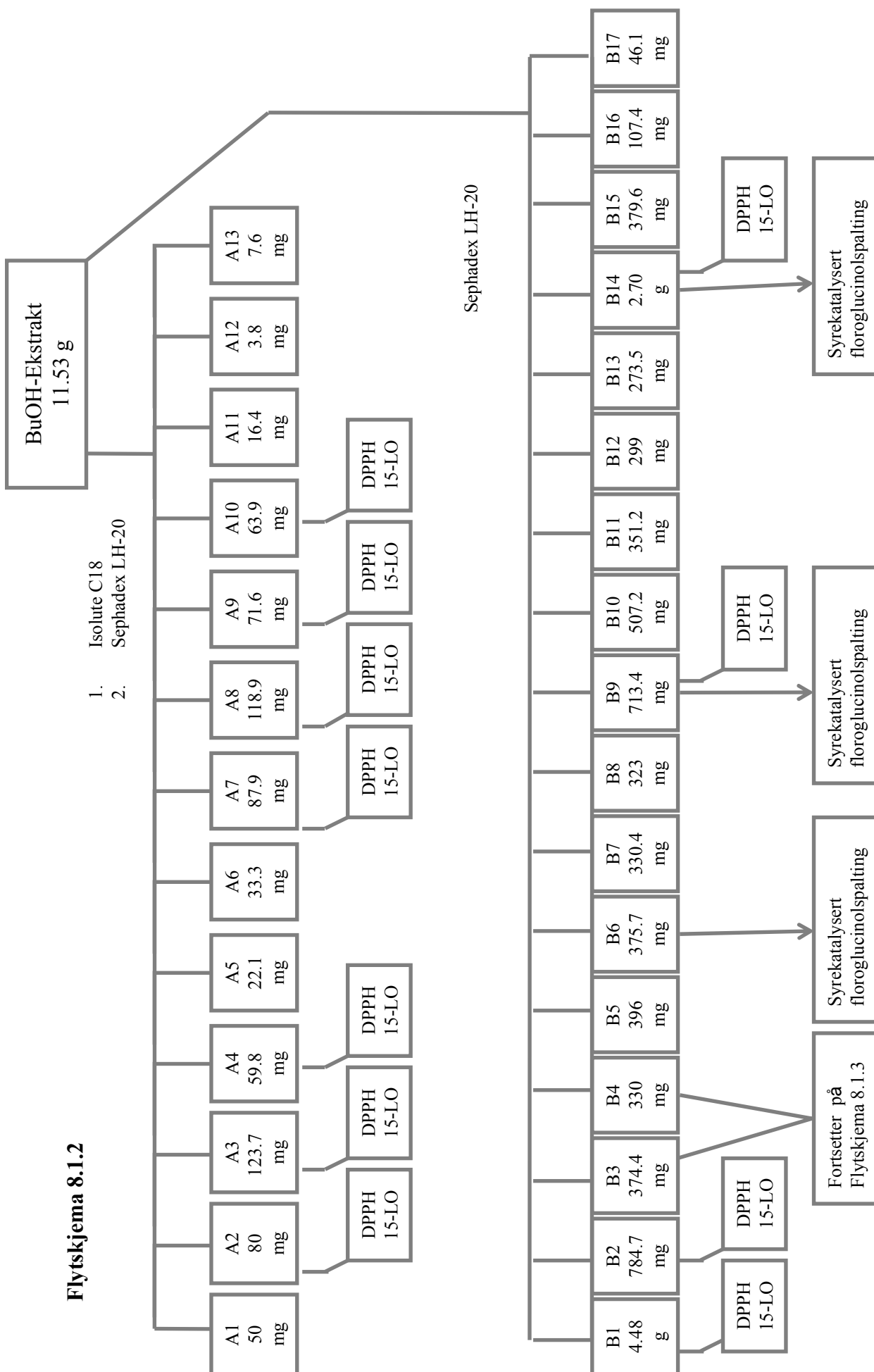
Flere mellomfraksjoner viste høy biologiske aktiviteter og kunne være aktuelle for videre arbeid. Det gjaldt B11 som viste høyest DPPH-scavengeraktivitet av de målte fraksjonene fra BuOH-ekstraktet, og flere fraksjoner fra EtOAc-ekstraktet (E4-5, E8, E9, E11 og E12). Fraksjonene E7, E9, E11 og E12 viste forholdsvis høy 15-LO hemmende aktiviteter, og det hadde vært interessant å floroglucinolspalte for bestemmelse av start- og forlengerenheten til proanthocyanidiner i fraksjonene.

Biologiske aktiviteter til *H. fomes* bark er kun testet *in vitro*. *Ex vivo* og *in vivo* studier på *H. fomes* bark er nødvendig for å bestemme biotilgjengeligheten og følgelig potensielle systemiske effekter, i tillegg til lokale helseeffekter på mage/tarm og hud.

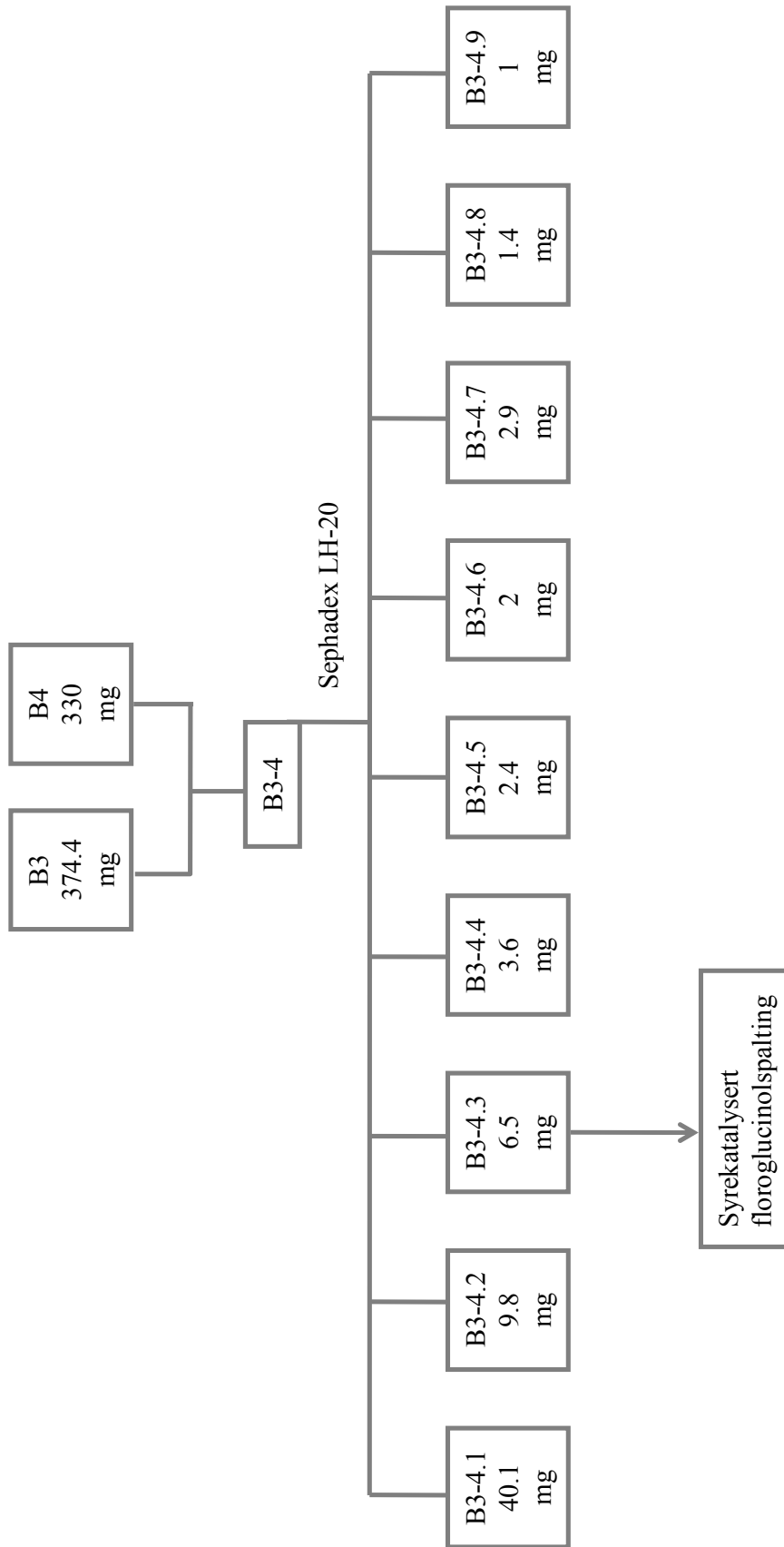
8. VEDLEGG

8.1 Flytskjema

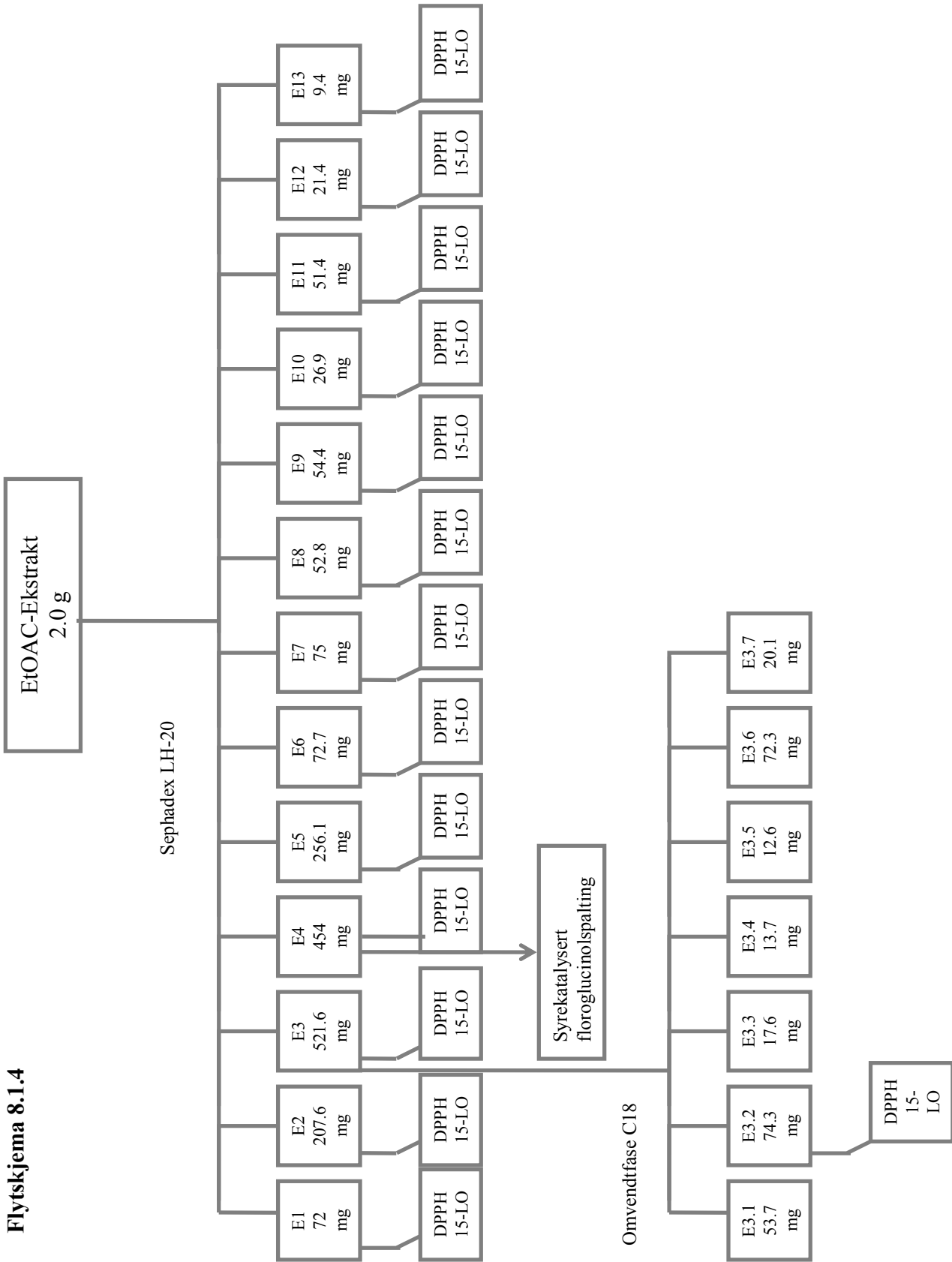




Flytskjema 8.1.3



Flytskjema 8.1.4



8.2 Tabeller

Tabell 8.2.1 DPPH-scavengeraktivitet til primært EtOH-ekstrakt og dets ekstrakter

Fraksjon	Konsentrasjon (µg/ml)	%Radikalscavenging	SD	EC ₅₀ (µg/ml)
EtOH	83.3	83.9	0.7	19.0 ± 1.3
	41.7	74.6	0.5	
	20.8	52.5	1.9	
	10.4	33.7	1.2	
	5.2	19.6	0.9	
EtOAc	83.3	78.2	1.3	15.3 ± 1.1
	41.7	71.6	2.5	
	20.8	57	2.1	
	10.4	41.2	0.5	
	5.2	25.2	1.6	
BuOH	83.3	77	0.3	16.5 ± 1.0
	41.7	75	0.6	
	20.8	55.8	1.8	
	10.4	38.6	0.7	
	5.2	25.8	0.8	
Vandig rest	83.3	75	0.5	16.7 ± 0.5
	41.7	68.1	0.6	
	20.8	55.9	0.6	
	10.4	37.7	0.8	
	5.2	25.7	0.5	
Uløselig rest	83.3	74.5	1.1	30.9 ± 1.4
	41.7	57.9	0.8	
	20.8	39.6	1.7	

Tabell 8.2.2 15-LO hemming av primært EtOH-ekstrakt og dets ekstrakter

Fraksjon	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	% 15-LO hemming	SD	P<	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
EtOH	83.3	97	0.1	0.001	21.6 \pm 0.8
	41.7	83	2.8	0.001	
	20.8	48.2	1.8	0.001	
	10.4	27.1	2	0.001	
EtOAc	83.3	99.5	0.8	0.001	20 \pm 3
	41.7	88.7	1.8	0.001	
	20.8	52.8	5.8	0.001	
	10.4	23.7	10.1	0.001	
	5.2	8.4	5.5	0.05	
BuOH	83.3	100.6	0.6	0.001	15.5 \pm 1.4
	41.7	92.3	2	0.001	
	20.8	64.4	4.3	0.001	
	10.4	30.2	4.3	0.001	
	5.2	18.8	8.7	0.005	
Vandig rest	83.3	100	0.8	0.001	15 \pm 2
	41.7	92.4	1.5	0.001	
	20.8	61.9	2.7	0.001	
	10.4	36.8	5.9	0.001	
	5.2	17.8	7.8	0.005	
Uløselig rest	83.3	93	1.2	0.001	27 \pm 4
	41.7	69	4.4	0.001	
	20.8	38.6	6.7	0.001	

Tabell 8.2.3 ADA hemmende aktivitet til primært EtOH-ekstrakt og dets ekstrakter

Fraksjon	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	% ADA hemming	SD	P<	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
EtOH	200	52.8	5	0.001	191 \pm 16
	100	12.3	4.2	0.005	
	50	3.3	4.2	0.25	
EtOAc	200	79.3	2.5	0.001	132 \pm 6
	100	30.9	4	0.001	
	50	12.3	2	0.001	
BuOH	200	75.5	5.5	0.001	138 \pm 9
	100	27.9	3.9	0.005	
	50	12	4	0.001	
Uløselig rest	200	40.8	1.4	0.001	>200
	100	14.9	3.9	0.001	
	50	6.5	3.4	0.025	
Quercetin	30.2	88	0.5	0.001	16.3 \pm 0.4
	15.1	45.3	1.6	0.001	
	7.6	21.2	2.9	0.001	

Tabell 8.2.4 Kolonnekromatografi av BuOH-ekstrakt (1 g) med Sephadex LH-20 (utvikling av metode)

Fraksjon	Volum (ml)	Elueringsmiddel	Fraksjon	Volum (ml)	Mengde (mg)	DPPH EC ₅₀ (µg/ml)	15-LO IC ₅₀ (µg/ml)
1	60	50 % MeOH					
2	60	50 % MeOH					
3	60	50 % MeOH					
4	60	50 % MeOH					
5	60	50 % MeOH					
6	60	50 % MeOH					
7	60	50 % MeOH					
8	60	75 % MeOH					
9	60	75 % MeOH					
10	60	75 % MeOH	A1	600	50	-	-
11	60	75 % MeOH					
12	60	MeOH					
13	60	MeOH					
14	60	MeOH					
15	60	MeOH					
16	60	MeOH					
17	60	MeOH					
18	60	MeOH					
19	60	MeOH	A2	540	80	14.4 ± 0.5	12.8 ± 1.5
20	60	MeOH					
21	60	MeOH					
22	60	MeOH					
23	60	MeOH					
24	60	MeOH					
25	60	MeOH					
26	60	MeOH					
27	60	MeOH					
28	60	MeOH					
29	60	MeOH					
30	60	MeOH	A3	660	123.7	10 ± 0.1	10.7 ± 1.0
31	60	MeOH					
32	60	MeOH					
33	60	MeOH					
34	60	MeOH					
35	60	MeOH					
36	60	MeOH					
37	60	MeOH					
38	60	MeOH					
39	60	MeOH					
40	60	MeOH					
41	60	MeOH	A4	600	59.8	8.6 ± 0.4	10.6 ± 0.9
42	60	MeOH					
43	60	MeOH					
44	60	MeOH					
45	60	MeOH	A5	240	22.1	-	-
46	60	70 % Aceton	A6	300	33.3	-	-
47	60	70 % Aceton					
48	60	70 % Aceton					
49	60	70 % Aceton					

50	60	70 % Aceton					
51	60	70 % Aceton					
52	60	70 % Aceton					
53	60	70 % Aceton	A7	180	87.9	15.8 ± 0.3	18.6 ± 1.2
54	60	70 % Aceton	A8	60	118.9	9.5 ± 0.4	11.3 ± 0.9
55	60	70 % Aceton					
56	60	70 % Aceton	A9	120	71.6	9.3 ± 0.6	11.1 ± 1.0
57	60	70 % Aceton					
58	60	70 % Aceton					
59	60	70 % Aceton	A10	180	63.9	11.3 ± 0.4	10.0 ± 0.9
60	60	70 % Aceton					
61	60	70 % Aceton					
62	60	70 % Aceton					
63	60	70 % Aceton					
64	60	70 % Aceton	A11	300	16.4	-	-
65	60	70 % Aceton					
66	60	70 % Aceton	A12	120	3.8	-	-
67	60	70 % Aceton	A13	350	7.6	-	-
SUM					739 mg		

Tabell 8.2.5 DPPH-scavengeraktivitet til fraksjonene A2-A4 og A7-A10

Fraksjon	Konsentrasjon (µg/ml)	%Radikalscavenging	SD	EC ₅₀ (µg/ml)
A2	20.8	63.6	1.1	14.4 ± 0.5
	10.4	38.2	1.1	
	5.2	26.3	0.3	
A3	20.8	78.2	0.7	10 ± 0.1
	10.4	51	0.3	
	5.2	32.4	0.5	
A4	20.8	80	0.8	8.6 ± 0.4
	10.4	55.9	1.4	
	5.2	34.4	1	
A7	20.8	59.1	0.4	15.8 ± 0.3
	10.4	36.1	0.8	
	5.2	24.1	0.3	
A8	20.8	68.1	1.7	9.5 ± 0.4
	10.4	52.4	0.9	
	5.2	33.2	1.3	
A9	20.8	72.7	1.6	9.3 ± 0.6
	10.4	53.3	1.9	
	5.2	33.6	0.8	
A10	20.8	69.5	0.9	11.3 ± 0.4
	10.4	47.3	1	
	5.2	31.9	1.1	

Tabell 8.2.6 15-LO hemmende aktivitet til fraksjonene A2-A4 og A7-A10

Fraksjon	Konsentrasjon (µg/ml)	%15-LO hemming	SD	P<	IC ₅₀ (µg/ml)
A2	20.8	69.4	1.4	0.001	12.8 ± 1.5
	10.4	41.6	5.5	0.001	
	5.2	24.7	3.4	0.001	
A3	20.8	81.1	1.8	0.001	10.7 ± 1.0
	10.4	48.7	4.2	0.001	
	5.2	26	4.6	0.001	
A4	20.8	80.7	1.3	0.001	10.6 ± 0.9
	10.4	49	3.8	0.001	
	5.2	25.9	4.6	0.001	
A7	20.8	54.8	2.6	0.001	18.6 ± 1.2
	10.4	24.4	2.6	0.001	
	5.2	10.7	3.5	0.001	
A8	20.8	75.7	1.1	0.001	11.3 ± 0.9
	10.4	46.7	3.4	0.001	
	5.2	24	4.8	0.001	
A9	20.8	78.4	2.5	0.001	11.1 ± 1.0
	10.4	47	4.1	0.001	
	5.2	25.4	3.6	0.001	
A10	20.8	81.7	2	0.001	10.0 ± 0.9
	10.4	51.6	3	0.001	
	5.2	24.1	6.5	0.001	

Tabell 8.2.7 Kolonnekromatografi av BuOH-ekstrakt (10 g) med Sephadex LH-20

Fraksjon	Volum (ml)	Eluerings-middel	Fraksjon	Volum (ml)	Mengde (mg)	DPPH EC ₅₀ (µg/ml)	15-LO IC ₅₀ (µg/ml)
0	60	50 % MeOH	B1	120	4482.1	14.3 ± 1.3	14.2 ± 1.3
1	60	50 % MeOH					
2	60	50 % MeOH					
3	60	50 % MeOH	B2	120	784.7	>21	>21
4	60	50 % MeOH					
5	60	75 % MeOH					
6	60	75 % MeOH	B3	360	374.4	-	-
7	60	75 % MeOH					
8	60	75 % MeOH					
9	60	75 % MeOH	B4	300	330	-	-
10	60	75 % MeOH					
11	60	75 % MeOH					
12	60	75 % MeOH	B5	300	396	-	-
13	60	75 % MeOH					
14	60	75 % MeOH					
15	60	75 % MeOH	B6	360	375.7	-	-
16	60	75 % MeOH					
17	60	75 % MeOH					
18	60	75 % MeOH	MeOH				
19	60	75 % MeOH					
20	60	75 % MeOH					
21	60	MeOH	MeOH				
22	60	MeOH					
23	60	MeOH					

24	60	MeOH					
25	60	MeOH					
26	60	MeOH					
27	60	MeOH					
28	60	MeOH	B7	180	330.4	-	-
29	60	MeOH					
30	60	MeOH	B8	120	323	-	-
31	60	MeOH					
32	60	MeOH					
33	60	MeOH					
34	60	MeOH					
35	60	MeOH	B9	300	713.4	9.8 ± 1.1	9.9 ± 0.8
36	60	MeOH					
37	60	MeOH					
38	60	MeOH					
39	60	MeOH					
40	60	MeOH	B10	300	507.2	-	-
41	60	MeOH					
42	60	MeOH					
43	60	MeOH					
44	60	MeOH					
45	60	MeOH	B11	300	351.2	6.8 ± 1.1	11.4 ± 0.7
46	60	MeOH					
47	60	MeOH					
48	60	MeOH					
49	60	MeOH					
50	60	MeOH	B12	300	299	-	-
51	60	MeOH					
52	60	MeOH					
53	60	70 % Aceton					
54	60	70 % Aceton					
55	60	70 % Aceton					
56	60	70 % Aceton	B13	360	273.5	-	-
57	60	70 % Aceton					
58	60	70 % Aceton					
59	60	70 % Aceton					
60	60	70 % Aceton	B14	240	2700.7	15 ± 1	10 ± 1
61	60	70 % Aceton					
62	60	70 % Aceton					
63	60	70 % Aceton					
64	60	70 % Aceton	B15	240	379.6	-	-
65	60	70 % Aceton					
66	60	70 % Aceton					
67	60	70 % Aceton					
68	60	70 % Aceton					
69	60	70 % Aceton	B16	300	107.4	-	-
70	60	MeOH					
71	60	MeOH					
72	60	MeOH					
73	60	MeOH					
74	60	MeOH	B17	300	46.1	-	-
SUM					12774 ≈12.77g		

Tabell 8.2.8 DPPH-scavengeraktivitet til fraksjonene B1, B2, B9, B11 og B14

Fraksjon	Konsentrasjon (µg/ml)	%DPPH-scavenging	SD	EC ₅₀ (µg/ml)
B1	20.8	57.8	1.5	14.3 ± 1.3
	10.4	43.3	2.1	
	5.2	28.2	1.5	
B2	20.8	26.2	1	>21
	10.4	21.6	0.6	
	5.2	14	0.6	
B9	20.8	62.4	0.6	9.8 ± 1.1
	10.4	51	1.7	
	5.2	39.6	1.5	
B11	20.8	65.9	1	6.8 ± 1.1
	10.4	56.4	2.2	
	5.2	45.8	2.4	
B14	20.8	56.5	1.7	15 ± 1
	10.4	43.6	0.4	
	5.2	30.7	0.8	

Tabell 8.2.9 15-LO hemmende aktivitet til fraksjonene B1, B2, B9, B11 og B14

Fraksjon	Konsentrasjon (µg/ml)	% 15-LO hemming	SD	P<	IC ₅₀ (µg/ml)
B1	20.8	66.2	3.4	0.001	14.2 ± 1.3
	10.4	36.7	4.2	0.001	
	5.2	21.1	5.2	0.001	
B2	20.8	25.3	4.6	0.001	>21
	10.4	12.5	3.5	0.001	
	5.2	8.2	5.9	0.01	
B9	20.8	78.4	1.5	0.001	9.9 ± 0.8
	10.4	51.5	2.2	0.001	
	5.2	30.4	4.7	0.001	
B11	20.8	80.6	1.2	0.001	11.4 ± 0.7
	10.4	45.4	3.2	0.001	
	5.2	25.4	5.5	0.001	
B14	20.8	81.7	1.1	0.001	10 ± 1
	10.4	50.2	3.1	0.001	
	5.2	24.3	7.1	0.001	

Tabell 8.2.10 Kolonnekromatografi av B3-4 på Sephadex LH-20

Fraksjon	Volum (ml)	Elueringsmiddel	Fraksjon	Volum (ml)	Mengde (mg)
1	50	50 % MeOH	-	50	
2	20	75 % MeOH	B3-4.1	40	7.9
3	20	75 % MeOH			
4	20	75 % MeOH	B3-4.2	40	21.5
5	20	75 % MeOH			
6	20	75 % MeOH	B3-4.3	40	48.3
7	20	75 % MeOH			
8	20	100 % MeOH	B3-4.4	60	31.9
9	20	100 % MeOH			
10	20	100 % MeOH			
11	20	100 % MeOH	B3-4.5	60	28.6
12	20	100 % MeOH			
13	20	100 % MeOH			
14	20	100 % MeOH	B3-4.6	80	29.1
15	20	100 % MeOH			
16	20	100 % MeOH			
17	20	100 % MeOH	B3-4.7	80	11.6
18	20	100 % MeOH			
19	20	100 % MeOH			
20	20	100 % MeOH	B3-4.8	60	4.2
21	20	70 % Aceton			
22	20	70 % Aceton	B3-4.9	60	11.3
23	20	70 % Aceton			
24	20	70 % Aceton	B3-4.10	60	3.2
25	60	70 % Aceton			
26	60	70 % Aceton			

Tabell 8.2.11 Kolonnekromatografi av B3-4.3 etter syrekatalysert floroglucinolspalting med Sephadex LH-20

Fraksjon	Volum (ml)	Elueringsmiddel	Fraksjon	Volum (ml)	Mengde (mg)
0	60	50 % EtOH	-	60	-
1	20	75 % EtOH	-	20	-
2	20	75 % EtOH	-	20	-
3	20	75 % EtOH	B3-4.3.1	40	40.1
4	20	75 % EtOH			
5	20	75 % EtOH	B3-4.3.2	20	9.8
6	20	75 % EtOH	B3-4.3.3	20	6.5
7	20	75 % EtOH	B3-4.3.4	20	3.6
8	20	75 % EtOH	B3-4.3.5	20	2.4
9	20	75 % EtOH	B3-4.3.6	20	2
10	20	75 % EtOH	B3-4.3.7	40	2.9
11	20	75 % EtOH			
12	20	MeOH	B3-4.3.8	40	1.4
13	20	MeOH			
14	20	MeOH	B3-4.3.9	40	1
15	20	MeOH			
16	20	MeOH	-	20	-
17	20	MeOH	-	20	-
18	20	70 % Aceton	-	20	-
19	20	70 % Aceton	-	20	-
20	20	70 % Aceton	-	20	-
21	60	70 % Aceton	-	60	-

Tabell 8.2.12 Kolonnekromatografi av B6 etter syrekatalysert floroglucinolspalting med Sephadex LH-20

Fraksjon	Volum (ml)	Elueringsmiddel	Fraksjon	Volum (ml)	Mengde (mg)
0	60	75 % EtOH	-	60	-
1	20	75 % EtOH	B6.1	100	6.8
2	20	75 % EtOH			
3	20	75 % EtOH			
4	20	75 % EtOH			
5	20	75 % EtOH			
6	20	96 % EtOH	B6.2	20	4.7
7	20	96 % EtOH	B6.3	20	5.7
8	20	96 % EtOH	B6.4	20	7.2
9	20	96 % EtOH	B6.5	20	5.1
10	20	96 % EtOH	B6.6	60	2.1
11	20	96 % EtOH			
12	20	96 % EtOH			
13	20	70 % Aceton	-	20	-
14	20	70 % Aceton	-	20	-
15	20	70 % Aceton	-	20	-
16	20	70 % Aceton	-	20	-
17	20	70 % Aceton	-	20	-
18	20	70 % Aceton	-	20	-
19	60	100 % Aceton	-	60	-

Tabell 8.2.13 Kolonnekromatografi av B9 etter syrekatalysert floroglucinolspalting med Sephadex LH-20

Fraksjon	Volum (ml)	Elueringsmiddel	Fraksjon	Volum (ml)	Mengde (mg)
0	60	50 % EtOH	-	100	-
1	20	50 % EtOH			
2	20	75 % EtOH			
3	20	75 % EtOH	B9.1	60	74.6
4	20	75 % EtOH			
5	20	75 % EtOH	B9.2	40	17.6
6	20	75 % EtOH			
7	20	96 % EtOH	B9.3	100	41.5
8	20	96 % EtOH			
9	20	96 % EtOH			
10	20	96 % EtOH			
11	20	96 % EtOH			
12	20	96 % EtOH			
13	20	96 % EtOH	B9.4	80	9.3
14	20	96 % EtOH			
15	20	96 % EtOH	B9.5	140	110.3
16	20	96 % EtOH			
17	20	70 % Aceton			
18	20	70 % Aceton			
19	20	70 % Aceton			
20	20	70 % Aceton			
21	20	70 % Aceton			
22	20	70 % Aceton			
23	20	70 % Aceton	-	60	-
24	60	100 % Aceton			

Tabell 8.2.14 Kolonnekromatografi av B14 etter syrekatalysert floroglucinolspalting med Sephadex LH-20

Fraksjon	Volum (ml)	Elueringsmiddel	Fraksjon	Volum (ml)	Mengde (mg)
0	40	50 % EtOH	B14.1	120	5.3
1	20	50 % EtOH			
2	20	50 % EtOH			
3	20	75 % EtOH			
4	20	75 % EtOH			
5	20	75 % EtOH	B14.2	40	118.1
6	20	75 % EtOH			
7	20	75 % EtOH	B14.3	40	27.8
8	20	96 % EtOH			
9	20	96 % EtOH	B14.4	40	21.9
10	20	96 % EtOH			
11	20	96 % EtOH			
12	20	96 % EtOH	B14.5	60	32.2
13	20	96 % EtOH			
14	20	96 % EtOH			
15	20	96 % EtOH	B14.6	40	9
16	20	96 % EtOH			
17	20	96 % EtOH	B14.7	80	10.2
18	20	70 % Aceton			
19	20	70 % Aceton			
20	20	70 % Aceton	B14.8	80	236.5
21	20	70 % Aceton			
22	20	70 % Aceton			
23	20	70 % Aceton			
24	20	70 % Aceton			
25	20	70 % Aceton	B14.9	140	6.6
26	20	70 % Aceton			
27	20	100 % Aceton			
28	60	100 % Aceton			

Tabell 8.2.15 Kolonnekromatografi av EtOAc-ekstrakt (2.0 g) med Sephadex LH-20

Fraksjon	Volum (ml)	Elueringsmiddel	Fraksjon	Volum (ml)	Mengde (mg)	DPPH EC ₅₀ (µg/ml)	15-LO IC ₅₀ (µg/ml)
1	60	50 % MeOH					
2	60	75 % MeOH					
3	60	75 % MeOH					
4	60	75 % MeOH					
5	60	75 % MeOH	E1	300	72	>21	>21
6	60	75 % MeOH					
7	60	75 % MeOH					
8	60	MeOH					
9	60	MeOH					
10	60	MeOH	E2	300	207.6	>21	>21
11	60	MeOH					
12	60	MeOH					
13	60	MeOH					
14	60	MeOH					
15	60	MeOH	E3	300	521.6	>21	>21
16	60	MeOH					
17	60	MeOH					
18	60	MeOH					
19	60	MeOH					
20	60	MeOH	E4	300	454	7.8 ± 0.4	15 ± 1
21	60	MeOH					
22	60	MeOH					
23	60	MeOH					
24	60	MeOH					
25	60	MeOH	E5	300	256.1	6.5 ± 0.3	10.6 ± 0.8
26	60	MeOH					
27	60	MeOH					
28	60	MeOH					
29	60	MeOH					
30	60	MeOH	E6	300	72.7	6.9 ± 0.3	10.8 ± 0.7
31	60	MeOH					
32	60	MeOH					
33	60	MeOH					
34	60	MeOH					
35	60	MeOH	E7	300	75	5.5 ± 0.2	9.5 ± 0.9
36	60	MeOH					
37	60	MeOH					
38	60	MeOH					
39	60	MeOH					
40	60	MeOH	E8	300	52.8	7.5 ± 0.3	10.7 ± 0.7
41	60	MeOH	E9	600	54.4	6.6 ± 0.2	9.2 ± 0.5
42	60	MeOH					
43	60	MeOH					
44	60	MeOH					
45	60	MeOH					
46	60	MeOH					
47	60	70 % Aceton					
48	60	70 % Aceton					
49	60	70 % Aceton					

50	60	70 % Aceton					
51	60	70 % Aceton	E10	120	26.9	10.3 ± 0.7	13.7 ± 0.9
52	60	70 % Aceton					
53	60	70 % Aceton	E11	120	51.4	7.2 ± 0.4	9.1 ± 0.5
54	60	70 % Aceton					
55	60	70 % Aceton	E12	120	21.4	7.5 ± 0.4	8.7 ± 0.6
56	60	70 % Aceton					
57	60	70 % Aceton	E13	360	9.4	16.8 ± 1.1	18 ± 1
58	60	70 % Aceton					
59	60	70 % Aceton					
60	60	70 % Aceton					
61	60	70 % Aceton					
62	60	70 % Aceton					
SUM					1875.3 ≈ 1.88 g		

Tabell 8.2.16 DPPH-scavengeraktivitet til E1 - E13

Fraksjon	Konsentrasjon (µg/ml)	%Radikalscavenging	SD	EC ₅₀ (µg/ml)
E1	20.8	8.3	0.5	>21
	10.4	4.7	0.4	
	5.2	2.8	0.1	
E2	20.8	21.4	0.9	>21
	10.4	14.9	0.3	
	5.2	9	0.5	
E3	20.8	30.1	1.5	>21
	10.4	18.4	0.7	
	5.2	10.9	0.5	
E4	20.8	77.1	1.7	7.8 ± 0.4
	10.4	60.1	1.9	
	5.2	36	1.6	
E5	20.8	82.4	2	6.5 ± 0.3
	10.4	64.5	1.3	
	5.2	42.9	0.9	
E6	20.8	81.3	1.9	6.9 ± 0.3
	10.4	63.3	1.9	
	5.2	40.8	1.2	
E7	20.8	85.1	2	5.5 ± 0.2
	10.4	72.8	1.7	
	5.2	47.9	0.8	
E8	20.8	83.2	0.8	7.5 ± 0.3
	10.4	61.3	0.9	
	5.2	37	1.7	
E9	20.8	85.2	0.9	6.6 ± 0.2
	10.4	71.1	1.5	
	5.2	39.4	1.4	
E10	20.8	72	0.4	10.3 ± 0.7
	10.4	50.4	1.9	
	5.2	29.9	0.5	
E11	20.8	78.1	1.2	7.2 ± 0.4
	10.4	62.5	2.3	
	5.2	38.6	1.1	
E12	20.8	79.9	1.1	7.5 ± 0.4
	10.4	60.3	1.3	
	5.2	38.2	1.9	
E13	20.8	56.4	1.9	16.8 ± 1.1
	10.4	35.4	1.5	
	5.2	21.5	0.1	

Tabell 8.2.17 15-LO hemmende aktivitet til E1 - E13

Fraksjon	Konsentrasjon (µg/ml)	% 15-LO hemming	SD	P<	IC ₅₀ (µg/ml)
E1	20.8	12.3	6	0.025	>21
	10.4	1	8.1	NS	
	5.2	2.6	7.3	NS	
E2	20.8	37.2	3.7	0.001	>21
	10.4	11.3	3.9	0.001	
	5.2	-0.1	4.6	NS	
E3	20.8	29.5	4.5	0.001	>21
	10.4	7.5	7.4	NS	
	5.2	7	6.7	NS	
E4	20.8	66.3	3.3	0.001	15 ± 1
	10.4	29.9	4.3	0.001	
	5.2	17	5	0.001	
E5	20.8	76.9	1.4	0.001	10.6 ± 0.8
	10.4	49.3	2.8	0.001	
	5.2	20.2	2.9	0.001	
E6	20.8	79	1.4	0.001	10.8 ± 0.7
	10.4	48.5	2.7	0.001	
	5.2	25.7	2.7	0.001	
E7	20.8	82.6	0.4	0.001	9.5 ± 0.9
	10.4	53.6	3.5	0.001	
	5.2	27	2.8	0.001	
E8	20.8	79.9	0.9	0.001	10.7 ± 0.7
	10.4	48.9	2.9	0.001	
	5.2	25.4	3	0.001	
E9	20.8	82.3	0.7	0.001	9.2 ± 0.5
	10.4	54.8	2	0.001	
	5.2	28	2.6	0.001	
E10	20.8	68.6	2.5	0.001	13.7 ± 0.9
	10.4	37.7	3	0.001	
	5.2	17.5	1.6	0.001	
E11	20.8	85.6	1	0.001	9.1 ± 0.5
	10.4	55.4	2.3	0.001	
	5.2	26.8	2.1	0.001	
E12	20.8	86.6	0.5	0.001	8.7 ± 0.5
	10.4	57.3	1.7	0.001	
	5.2	28.8	4.3	0.001	
E13	20.8	56.8	2.7	0.001	18 ± 1
	10.4	27.1	2.4	0.001	
	5.2	15	3	0.001	

Tabell 8.2.18 Kolonnekromatografi av E3 med omvendtfase C₁₈

Fraksjon	Volum (ml)	Elueringsmiddel	Fraksjon	Volum (ml)	Mengde (mg)
0	10	50 % MeOH	E3.1	10	53.7
1	10	50 % MeOH	E3.2	30	74.3
2	10	50 % MeOH			
3	10	50 % MeOH			
4	10	50 % MeOH	E3.3	30	17.6
5	10	50 % MeOH			
6	10	50 % MeOH			
7	10	50 % MeOH	E3.4	70	13.7
8	10	50 % MeOH			
9	10	50 % MeOH			
10	10	75 % MeOH			
11	10	75 % MeOH			
12	10	75 % MeOH			
13	10	75 % MeOH			
14	10	75 % MeOH	E3.5	100	12.6
15	10	75 % MeOH			
16	10	75 % MeOH			
17	10	75 % MeOH			
18	10	75 % MeOH			
19	10	75 % MeOH			
20	10	75 % MeOH			
21	10	MeOH			
22	10	MeOH			
23	10	MeOH			
24	10	MeOH	E3.6	120	72.3
25	10	MeOH			
26	10	MeOH			
27	10	MeOH			
28	10	MeOH			
29	10	MeOH			
30	10	MeOH			
31	10	MeOH			
32	10	MeOH			
33	10	MeOH	E3.7	130	20.1
34	10	MeOH			
35	10	MeOH			
36	10	MeOH			
37	10	70 % Aceton			
38	10	70 % Aceton			
39	10	70 % Aceton			
40	10	70 % Aceton			
41	10	70 % Aceton			
42	10	70 % Aceton			
43	10	70 % Aceton			
44	10	70 % Aceton			
45	10	70 % Aceton			
46	10	70 % Aceton			
47-48	20	70 % Aceton			

Tabell 8.2.19 DPPH-svangeraktivitet av E3.2

Fraksjon	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	%Radikalscavenging	SD	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
E3.2	20.8	88.2	0.6	8.5 ± 0.6
	10.4	56.7	2.5	
	5.2	33.2	0.4	

Tabell 8.2.20 15-LO hemmende aktivitet av E3.2

Fraksjon	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	% 15-LO hemming	SD	P<	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
E3.2	20.8	65	2.7	0.001	15 ± 1
	10.4	56.7	4.2	0.001	
	5.2	33.2	7.4	0.001	

Tabell 8.2.21. Kolonnekromatografi av E4 etter syrekatalysert floroglucinolspalting med Sephadex LH-20

Fraksjon	Volum (ml)	Elueringsmiddel	Fraksjon	Volum (ml)	Mengde (mg)
0	60	50 % EtOH	E4.1	100	-
1	20	75 % EtOH			
2	20	75 % EtOH			
3	20	75 % EtOH	E4.2	40	124.8
4	20	75 % EtOH			
5	20	75 % EtOH	E4.3	40	42
6	20	75 % EtOH			
7	20	75 % EtOH			
8	20	75 % EtOH	E4.4	40	31.6
9	20	75 % EtOH			
10	20	75 % EtOH	E4.5	40	32.2
11	20	75 % EtOH			
12	20	96 % EtOH	E4.6	60	24.2
13	20	96 % EtOH			
14	20	96 % EtOH			
15	20	96 % EtOH	E4.7	220	51.3
16	20	96 % EtOH			
17	20	96 % EtOH			
18	20	70 % Aceton			
19	20	70 % Aceton			
20	20	70 % Aceton			
21	20	70 % Aceton			
22	60	70 % Aceton			

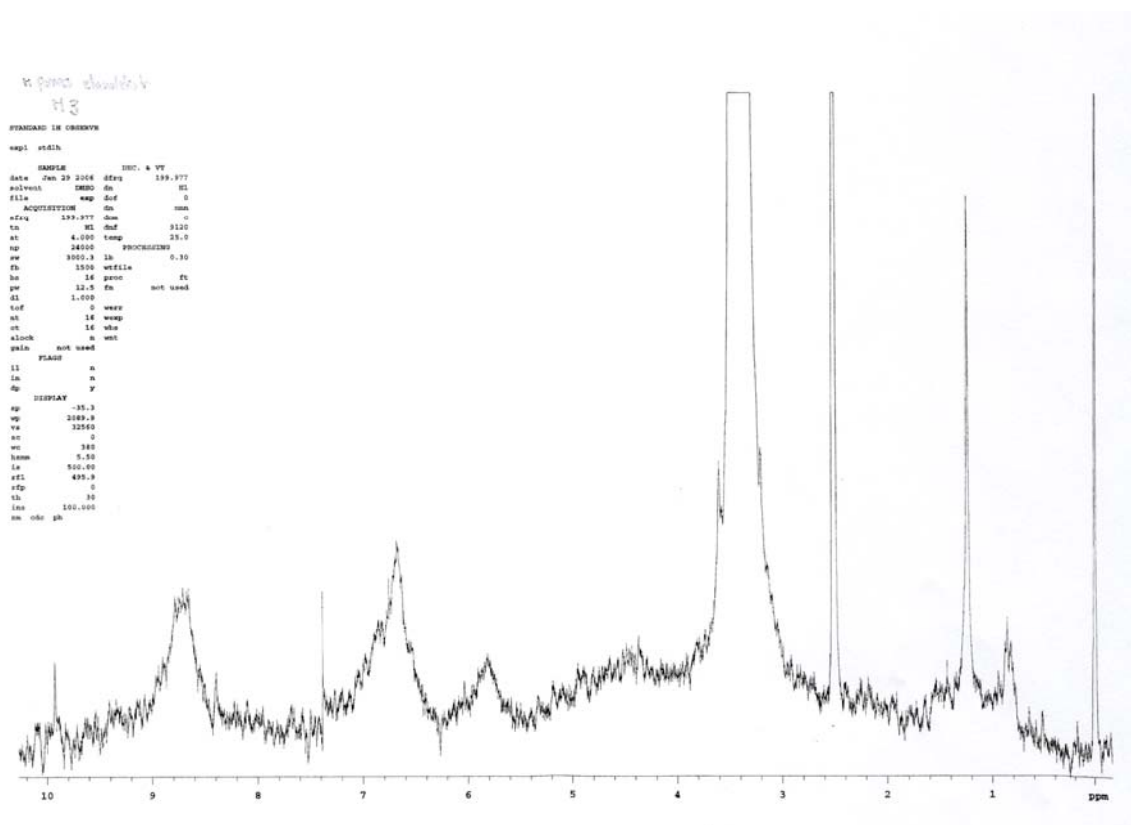
Tabell 8.2.22 DPPH-scavengeraktivitet av den acetonløselige og den acetonuløselige delen av vannfasen

Ekstrakter	Konsentrasjon (µg/ml)	%Radikalscavenging	SD	EC ₅₀ (µg/ml)
Acetonløselig	20.8	60.1	1.9	10.4 ± 1.1
	10.4	50.1	2.2	
	5.2	34.4	0.7	
Acetonuløselig	20.8	57.5	2.4	13 ± 2
	10.4	45.8	1.6	
	5.2	23	0.9	

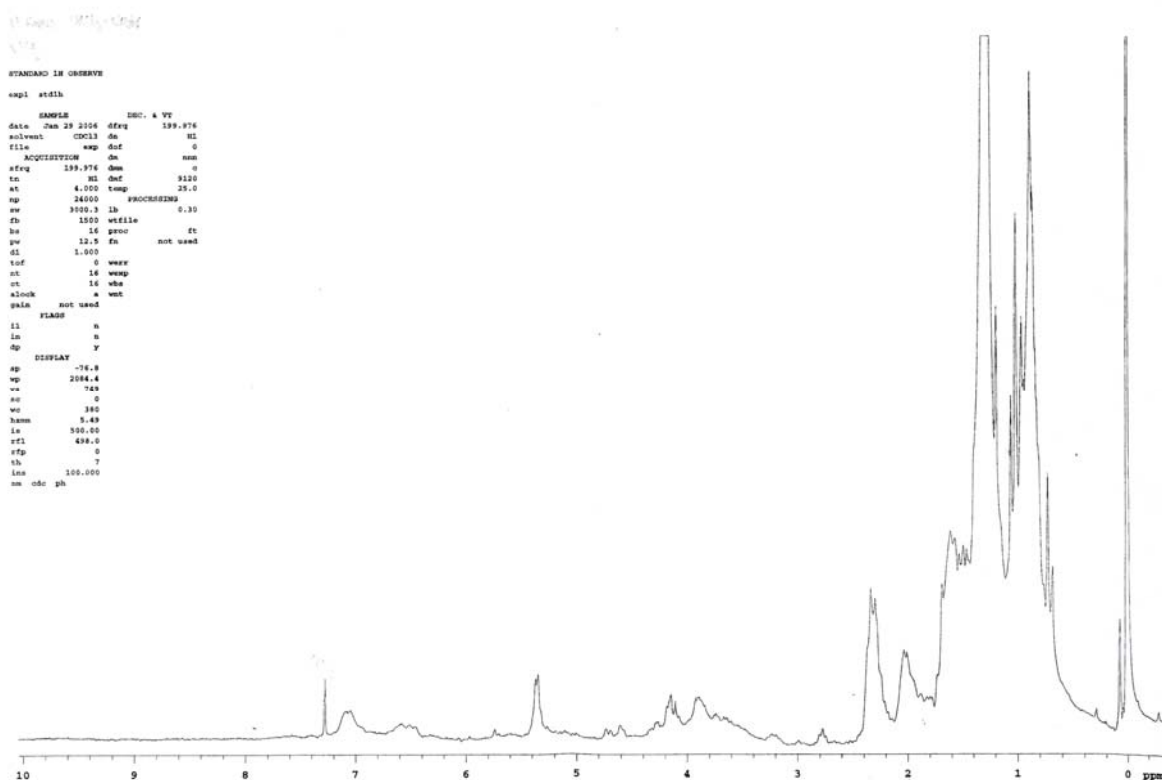
Tabell 8.2.23 15-LO hemmende aktivitet av den acetonløselige og den acetonuløselige delen av vannfasen

Ekstrakter	Konsentrasjon (µg/ml)	%15-LO hemming	SD	P<	IC ₅₀ (µg/ml)
Acetonløselig	20.8	70.5	2.4	0.001	15.6 ± 0.7
	10.4	21.3	4.2	0.001	
	5.2	10.4	5.3	0.025	
Acetonuløselig	20.8	48.2	7.3	0.001	>21
	10.4	13.4	5.5	0.005	
	5.2	1.2	8.2	NS	

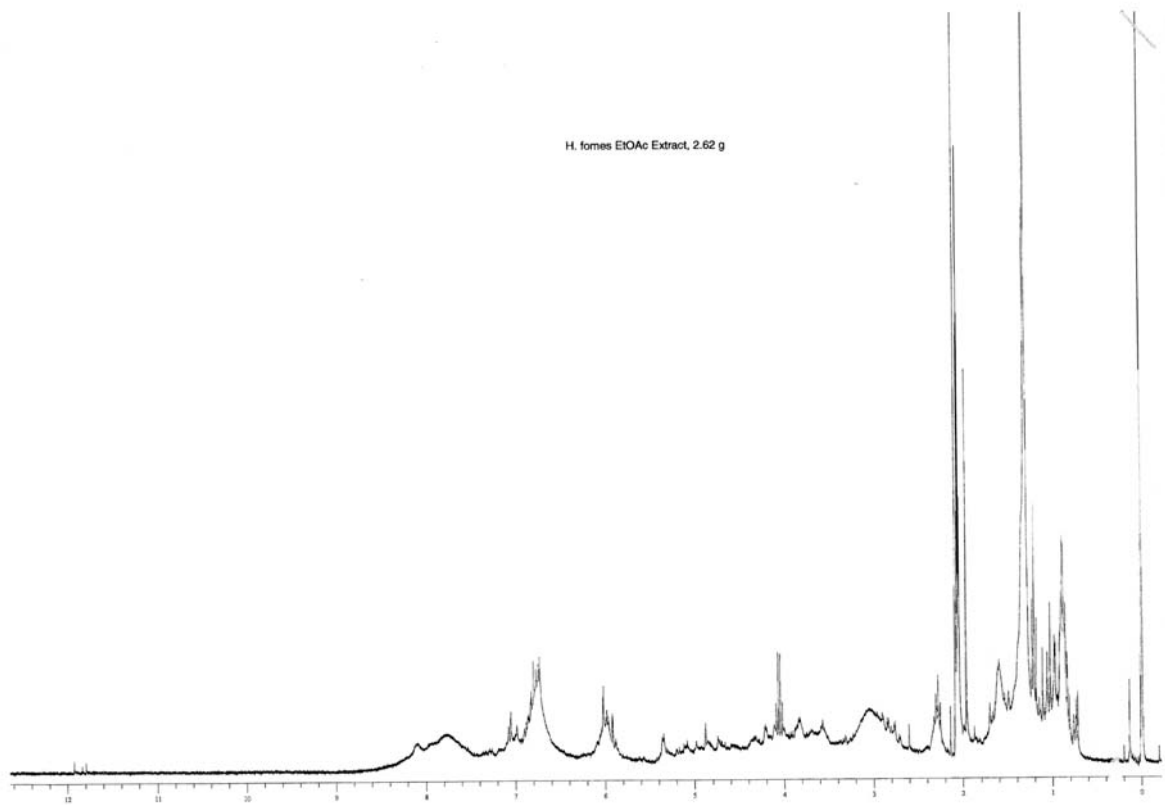
8.3 NMR-Spektra



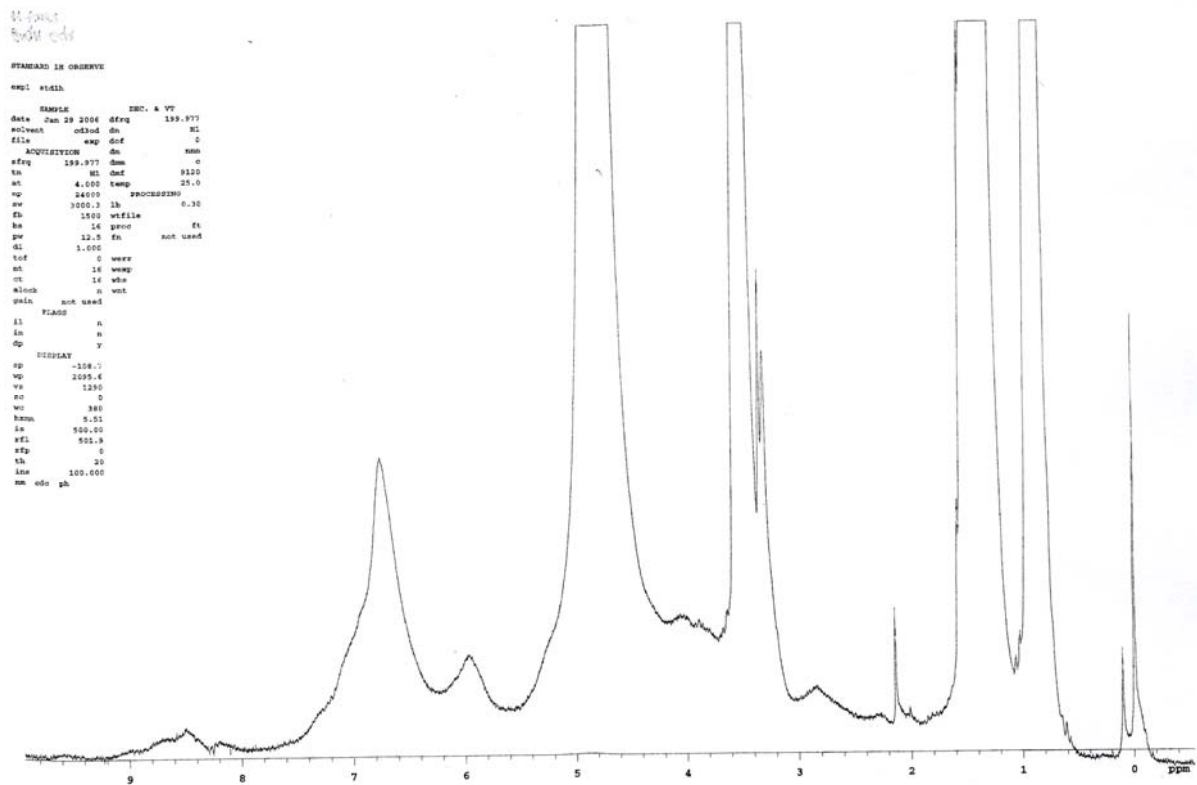
NMR-spektrum 8.3.1 ^1H -NMR-spektrum av primært EtOH-ekstrakt



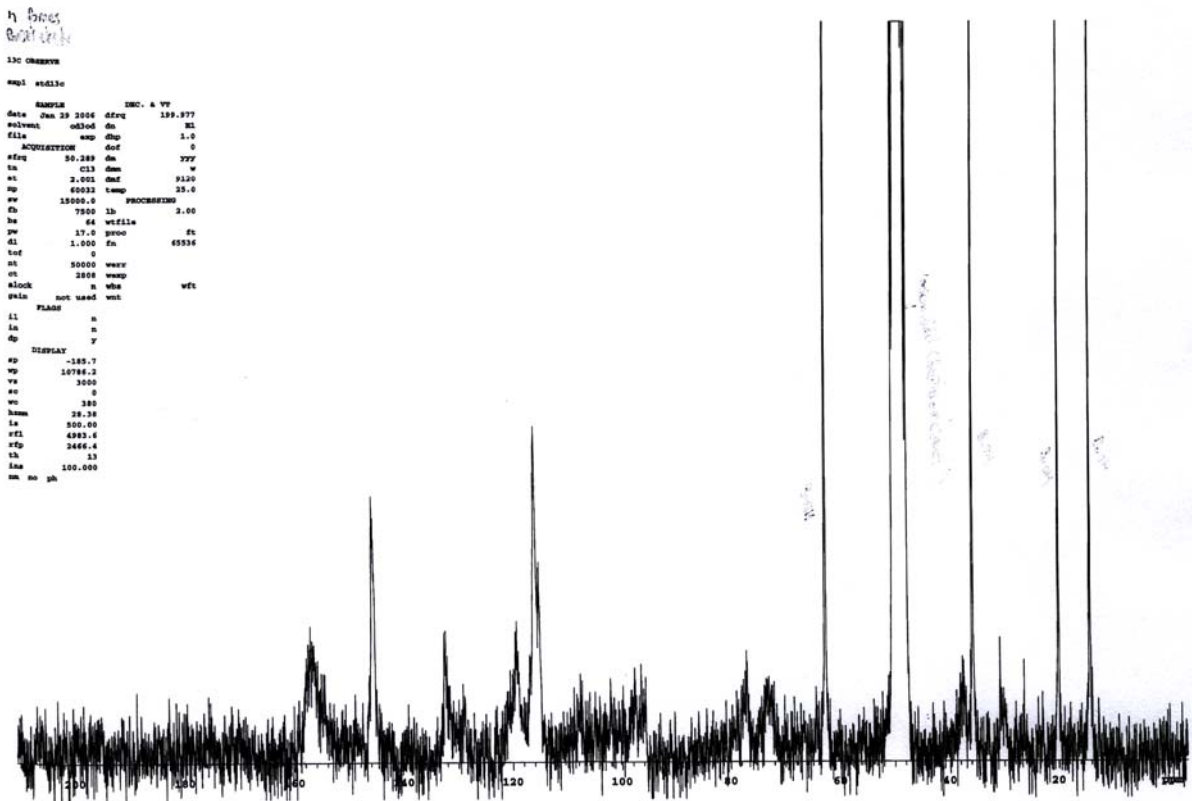
NMR-spektrum 8.3.2 ^1H -NMR-spektrum av CHCl_3 -ekstrakt



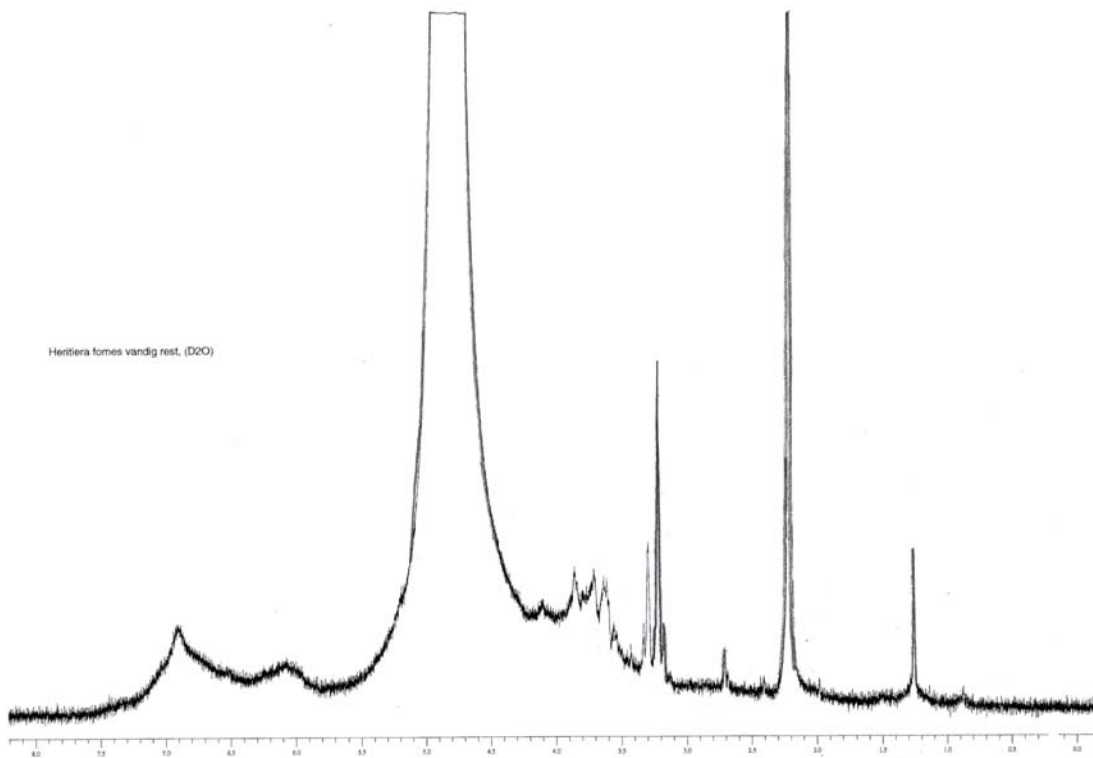
NMR-spektrum 8.3.3 ^1H -NMR-spektrum av EtOAc-ekstrakt



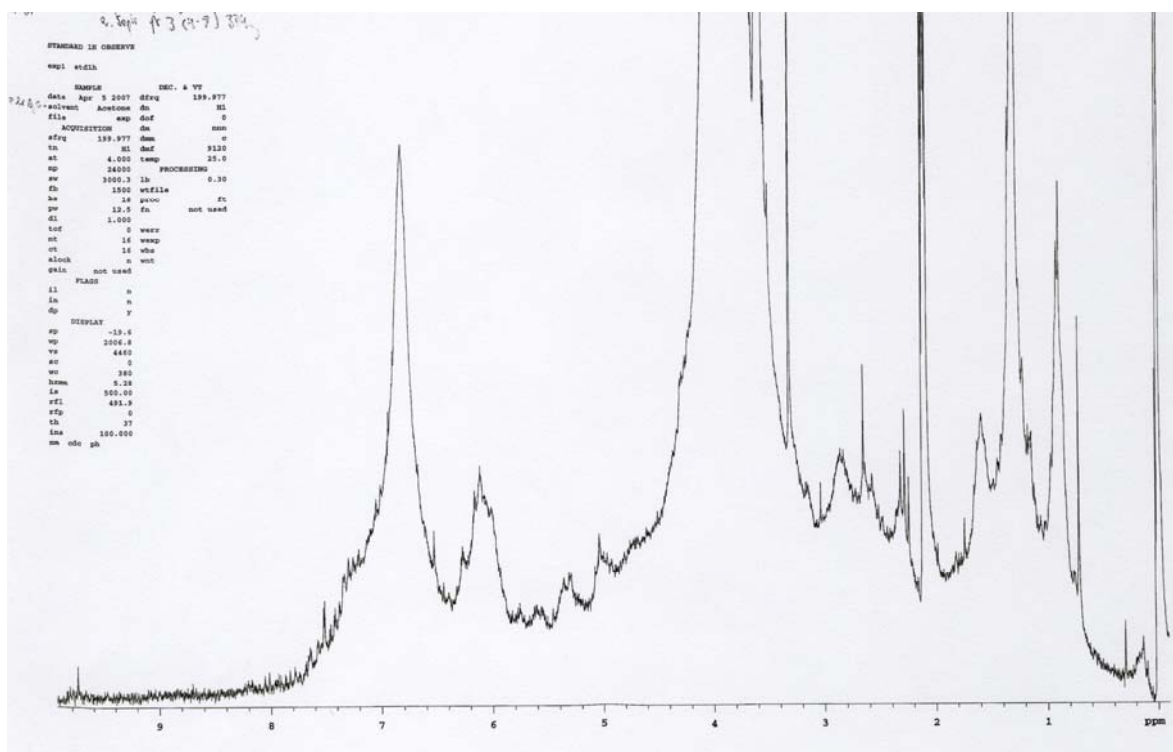
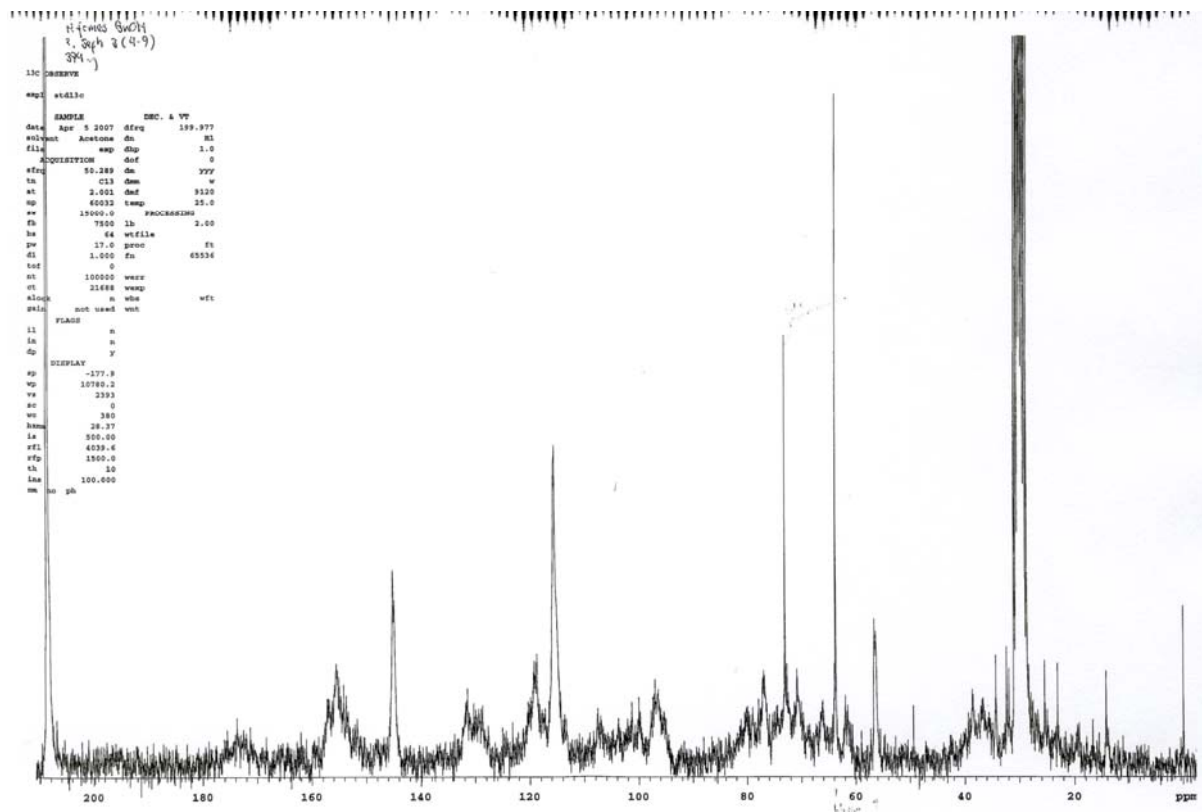
NMR-spektrum 8.3.4 ^1H -NMR-spektrum av BuOH-ekstrakt

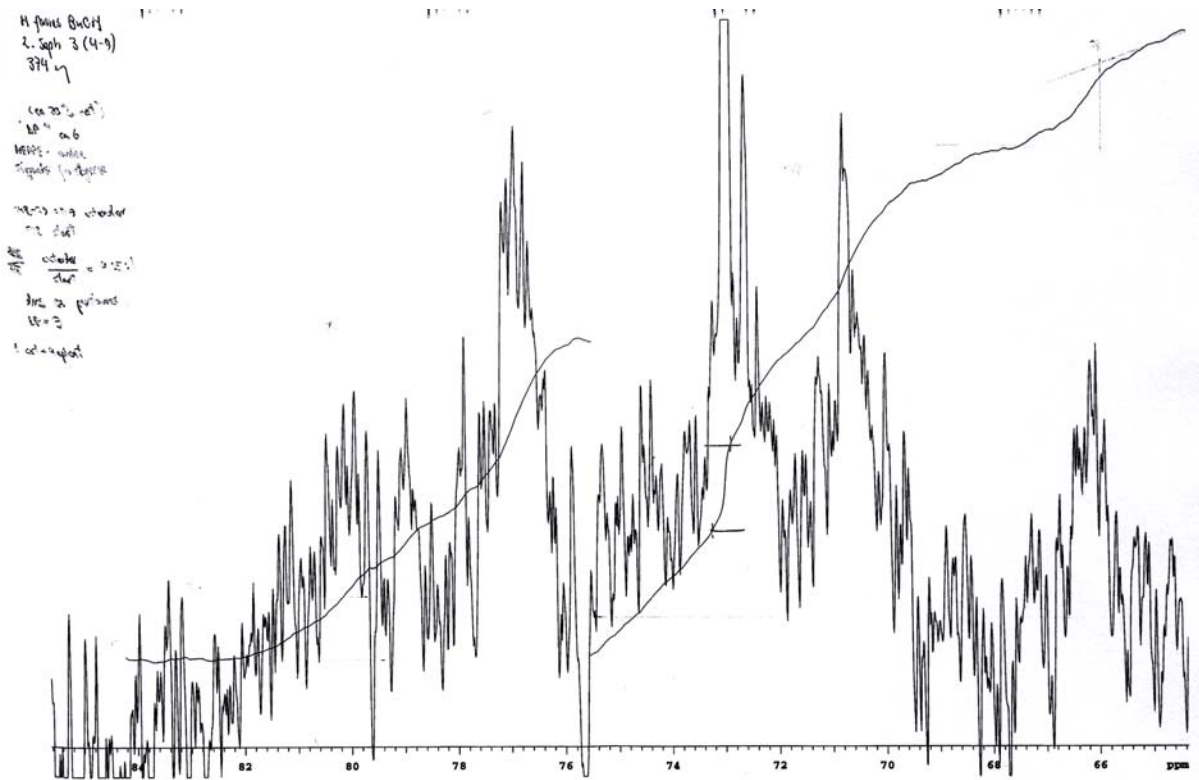


NMR-spektrum 8.3.5 ^{13}C -NMR-spektrum av BuOH-ekstrakt

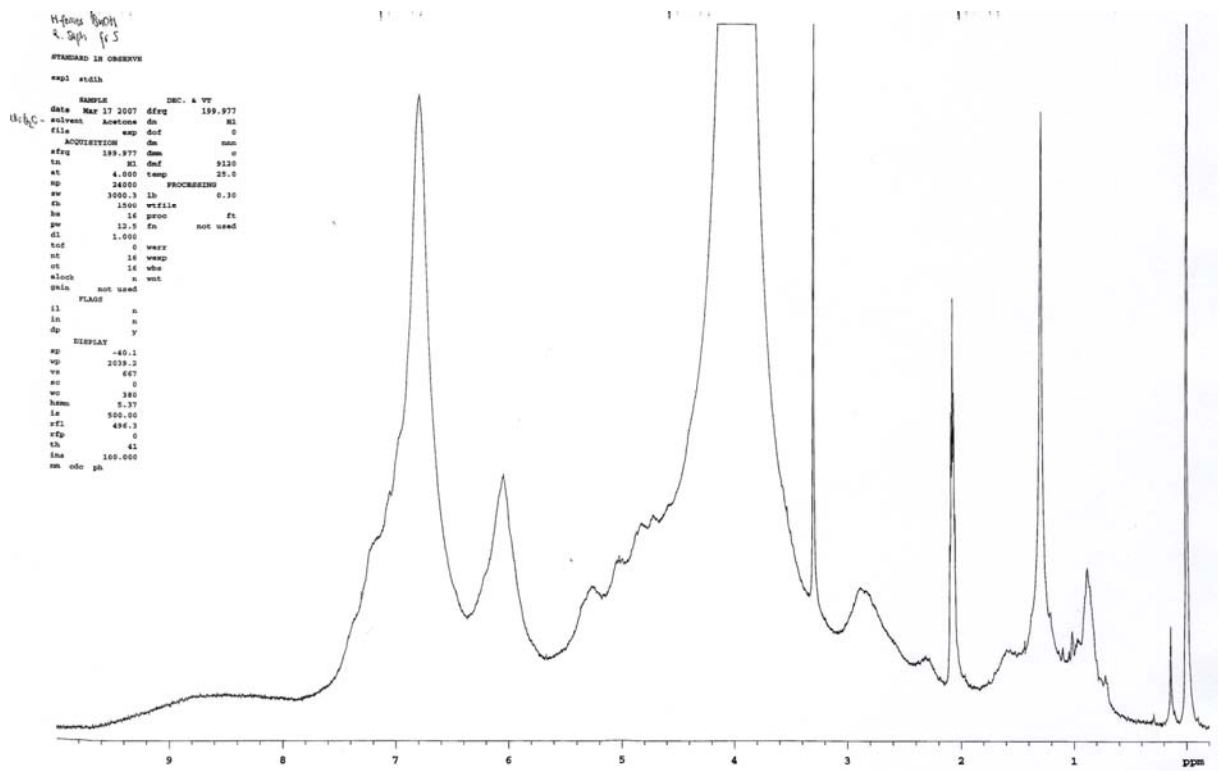


NMR-spektrum 8.3.6 ^1H -NMR-spektrum av vandig rest

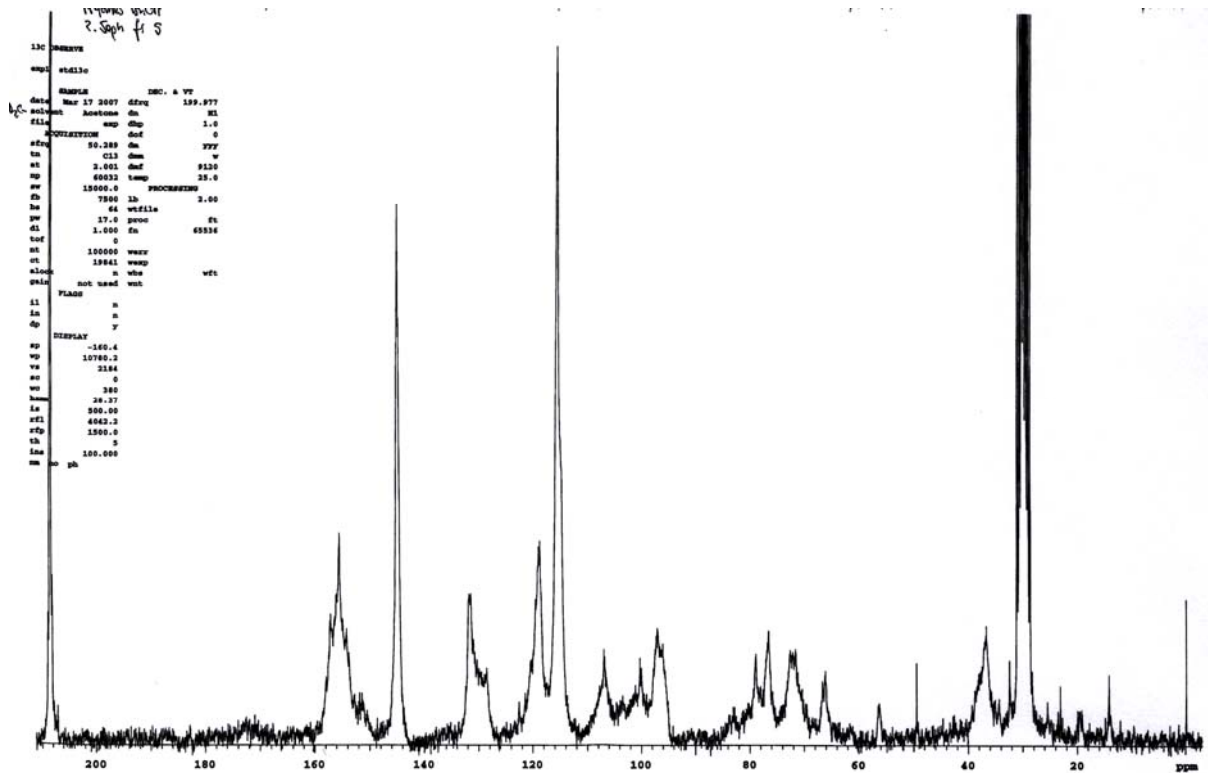
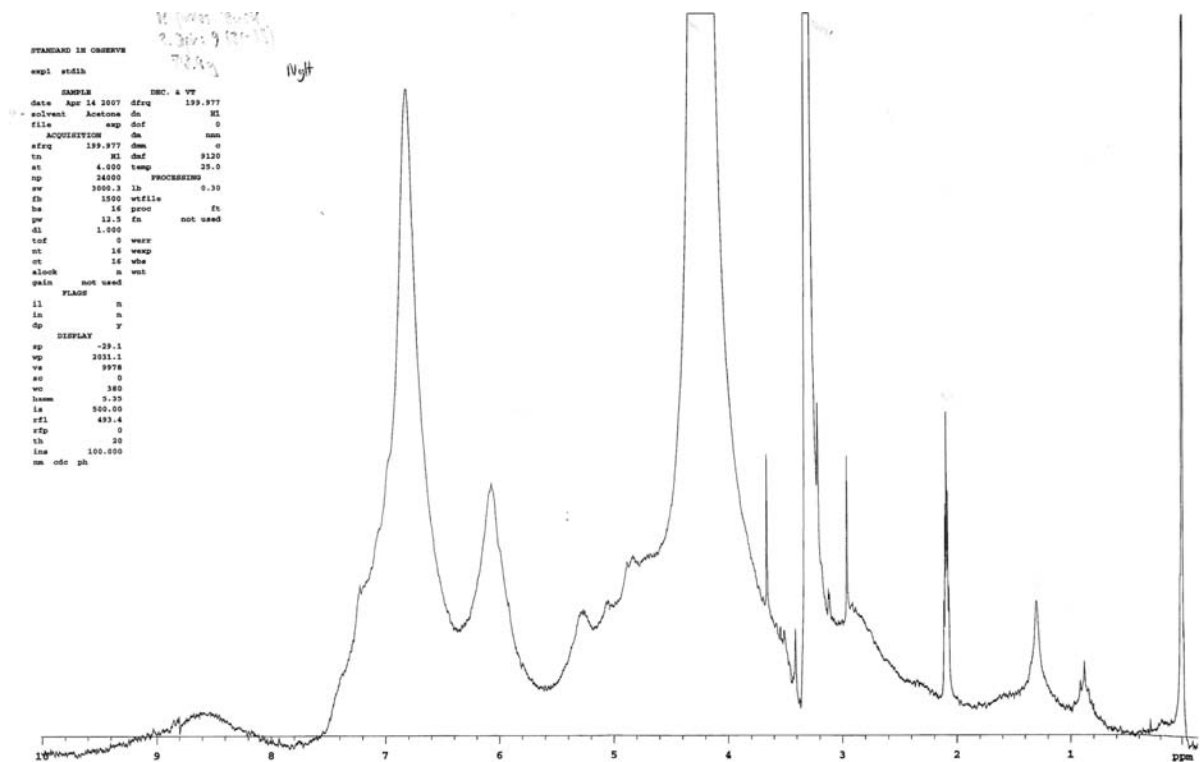
NMR-spektrum 8.3.9 ¹H-NMR-spektrum av B3NMR-spektrum 8.3.10 ¹³C-NMR-spektrum av B3

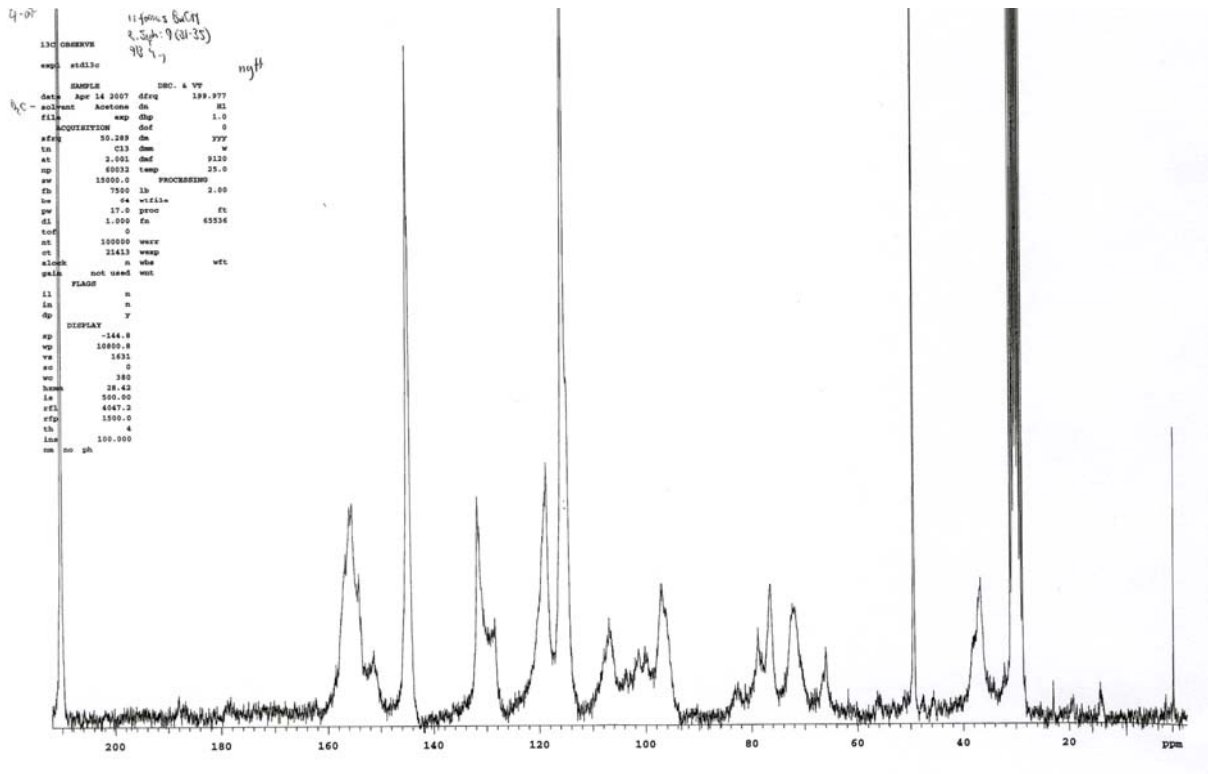


NMR-spektrum 8.3.11 Utsnitt og integral av B3

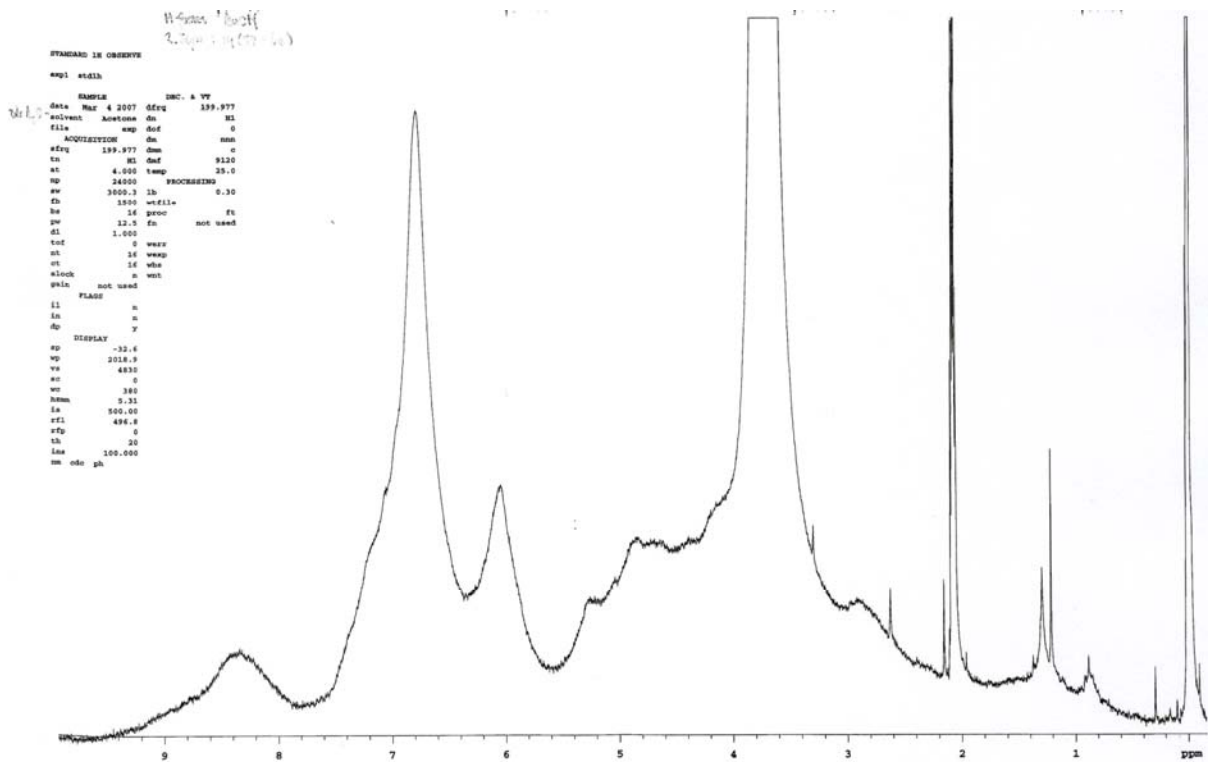


NMR-spektrum 8.3.12 ¹H-NMR-spektrum av B5

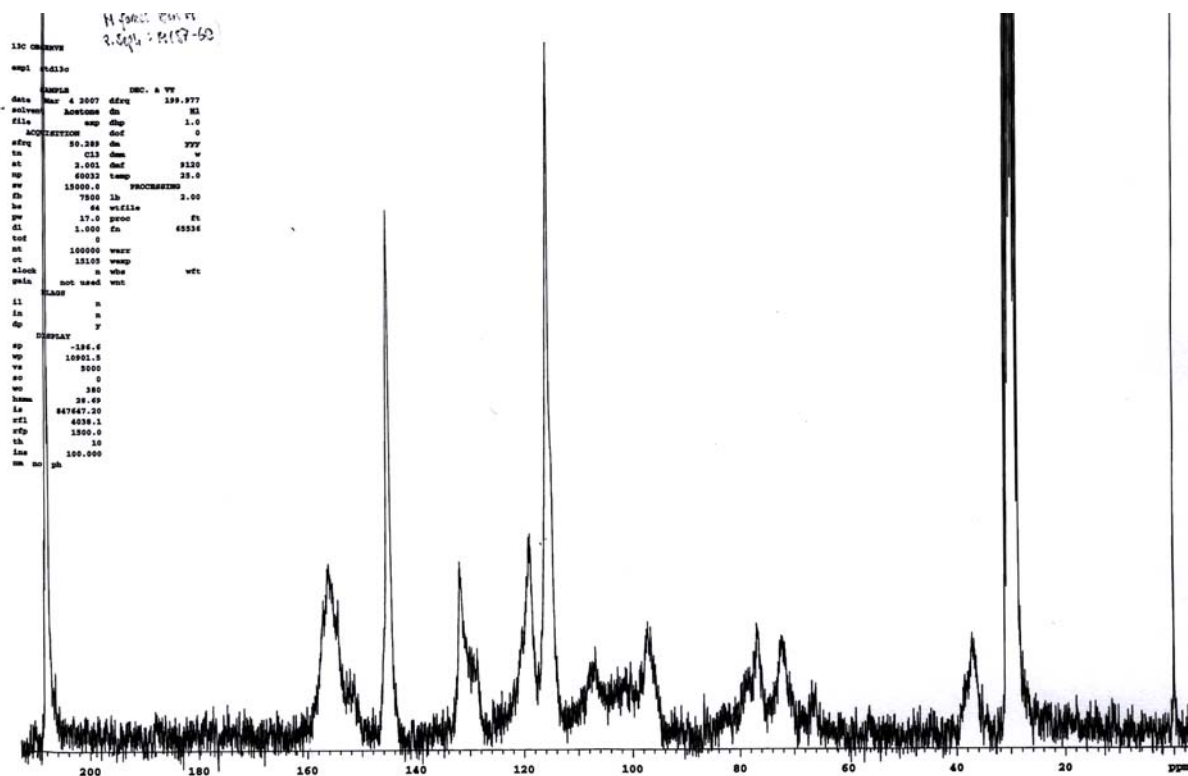
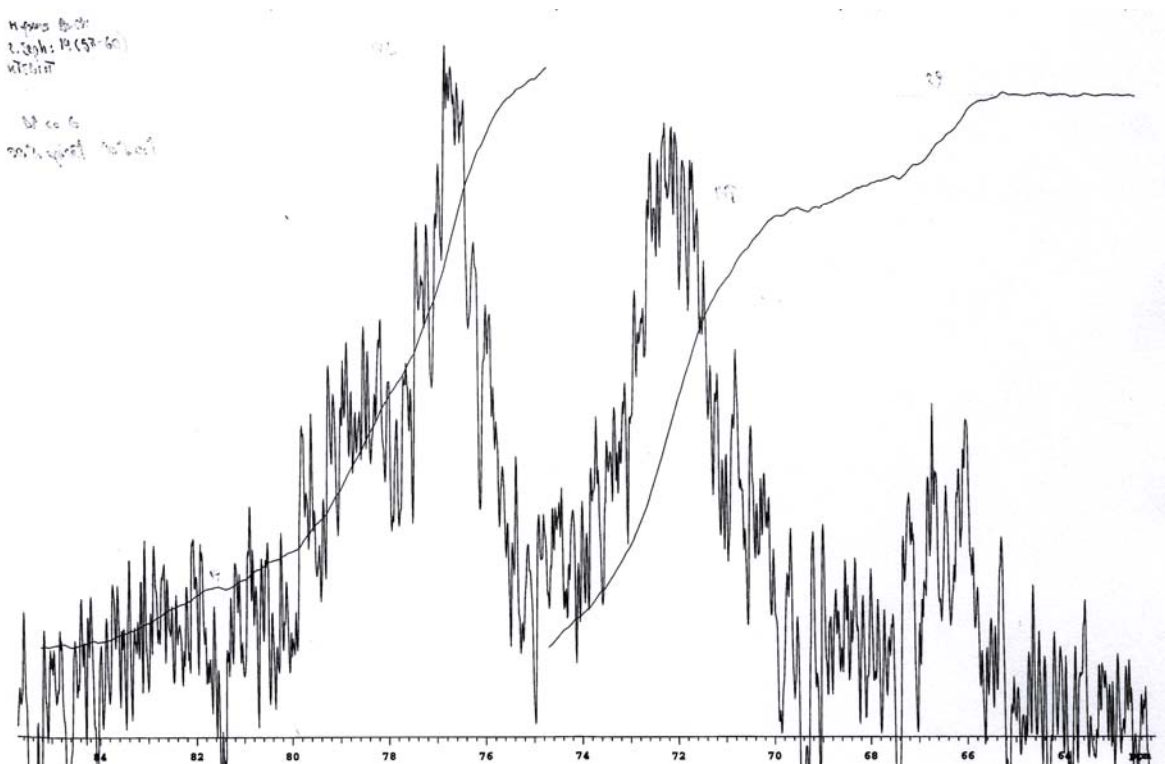
NMR-spektrum 8.3.13 ^{13}C -NMR-spektrum av B5NMR-spektrum 8.3.14 ^1H -NMR-spektrum av B9



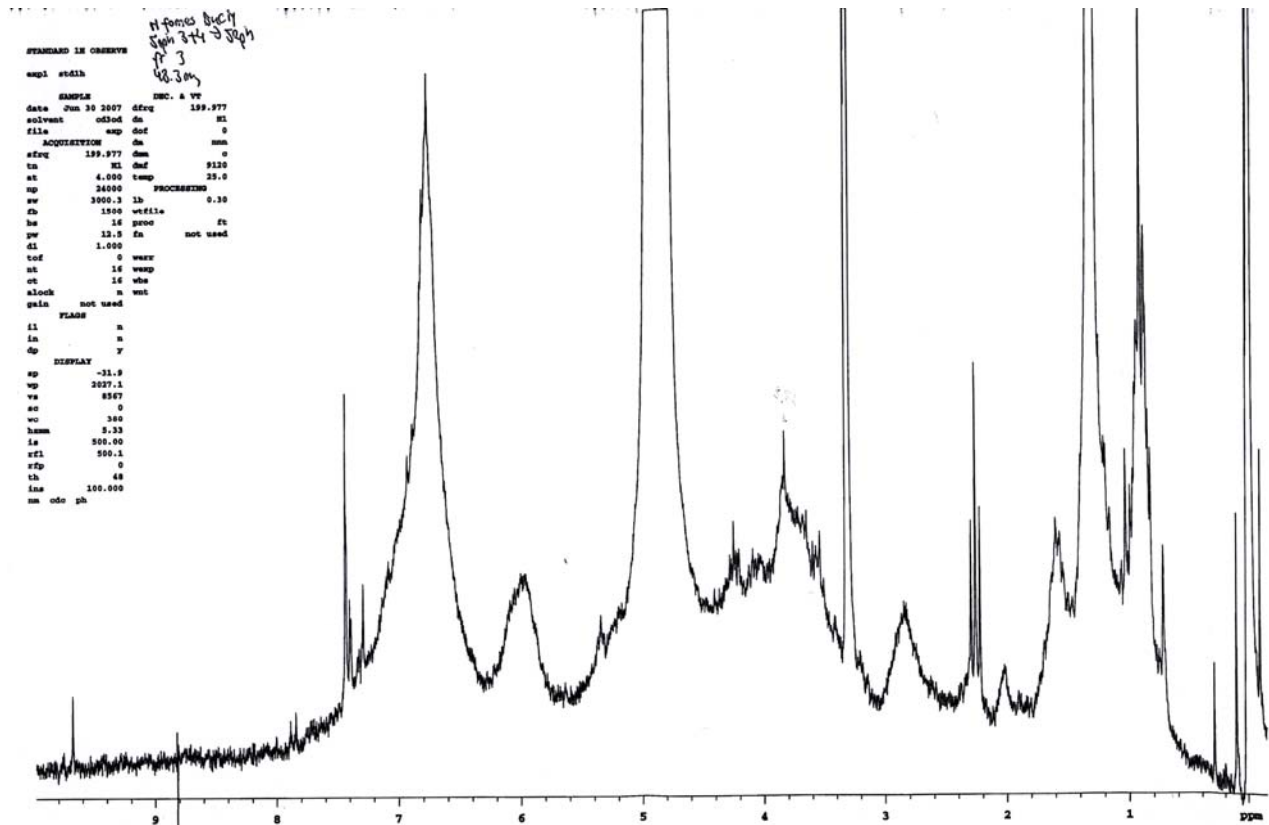
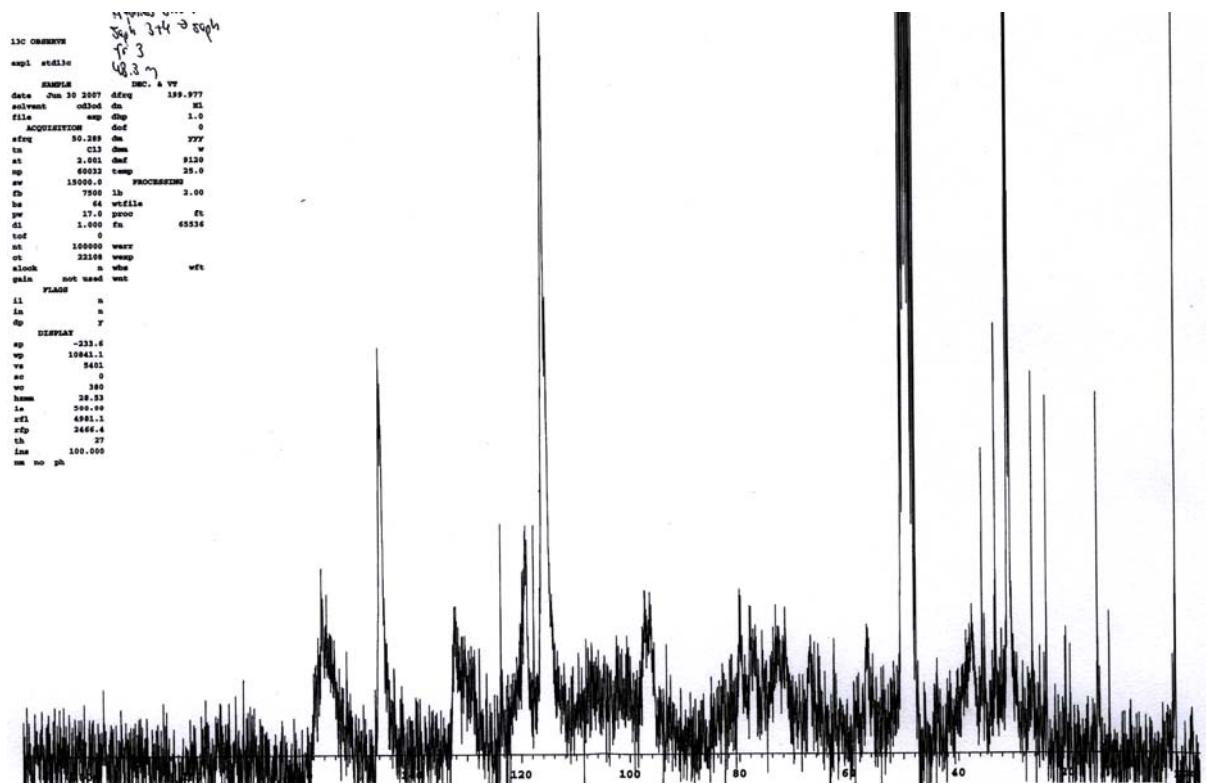
NMR-spektrum 8.3.15 ¹³C-NMR-spektrum av B9

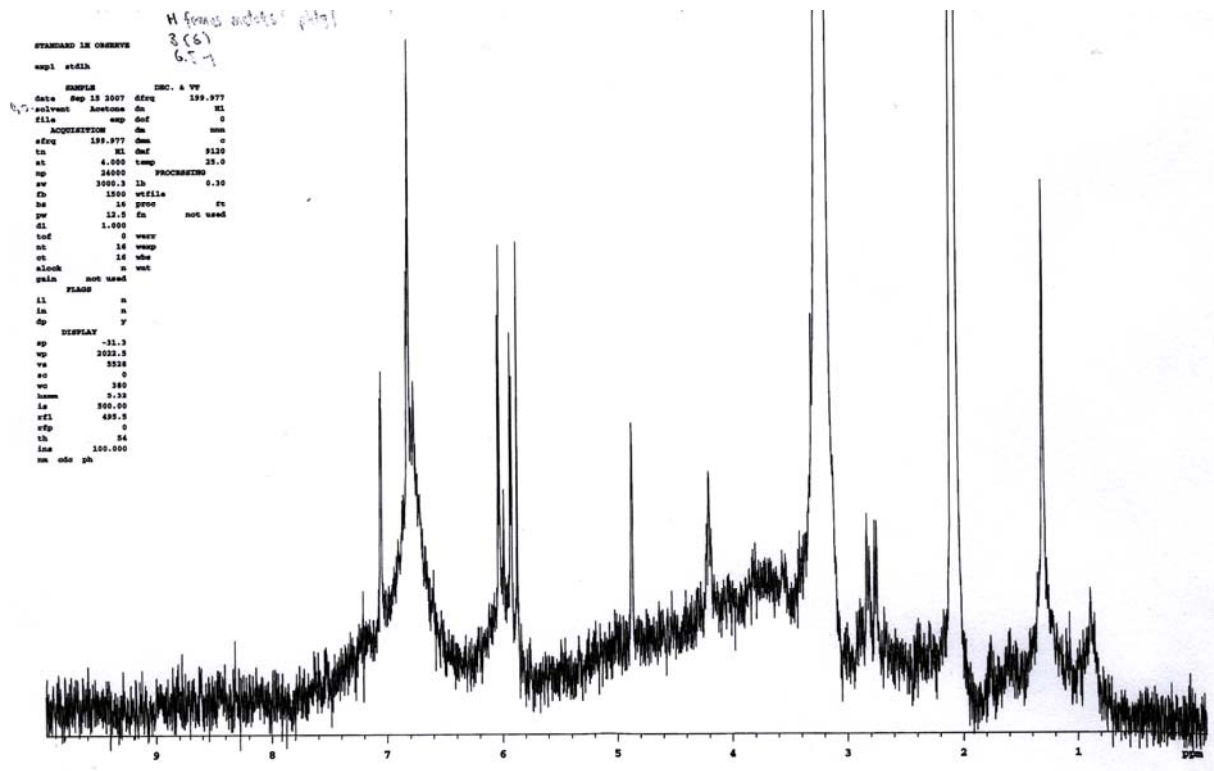
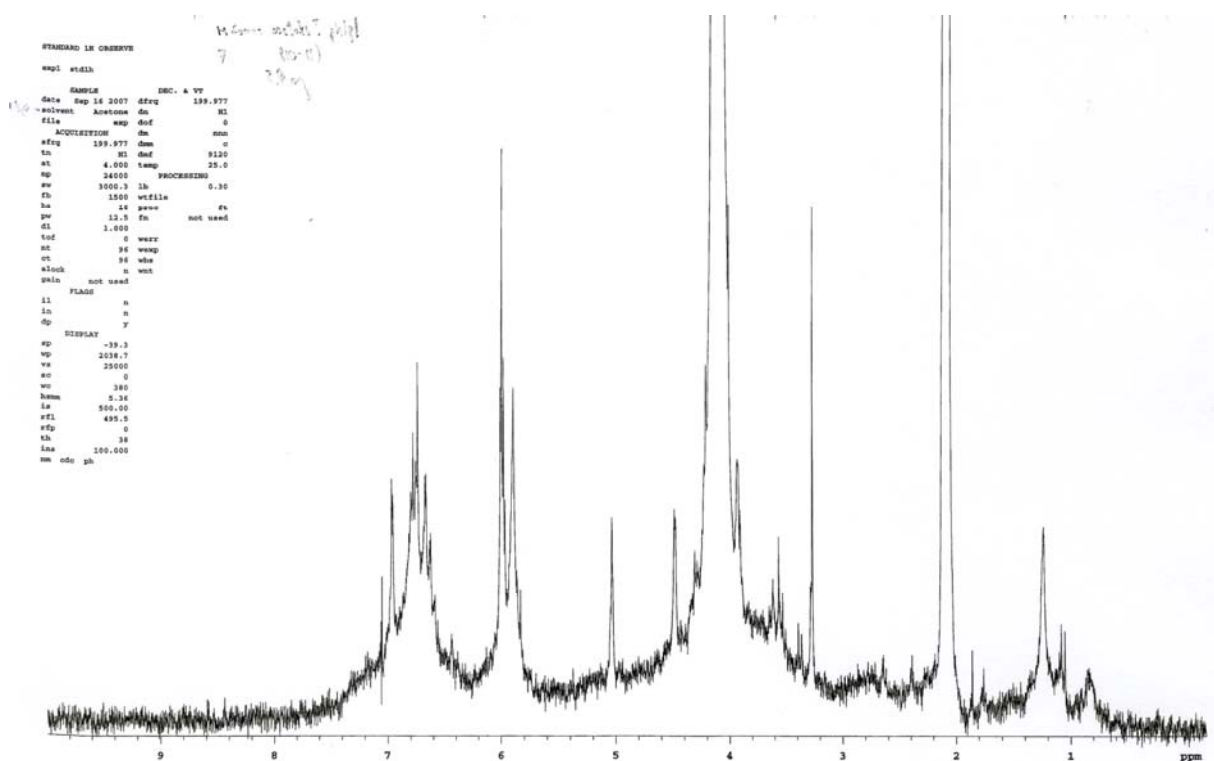


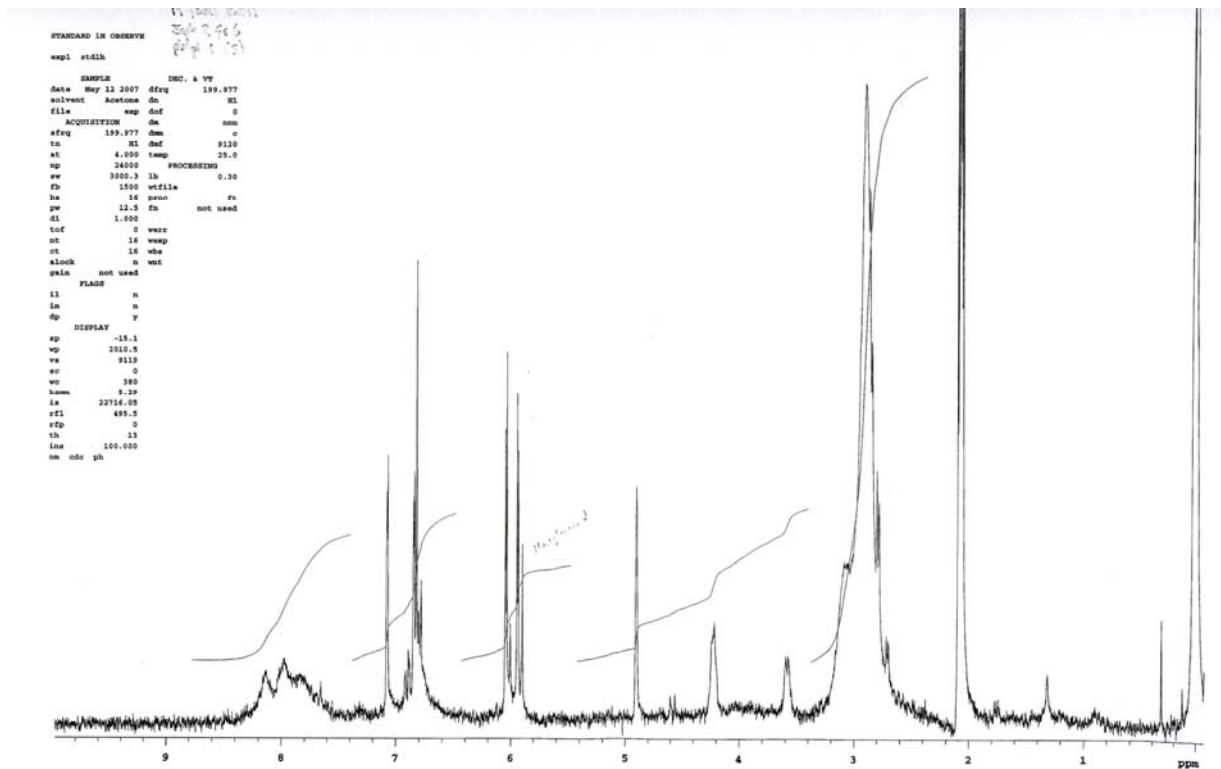
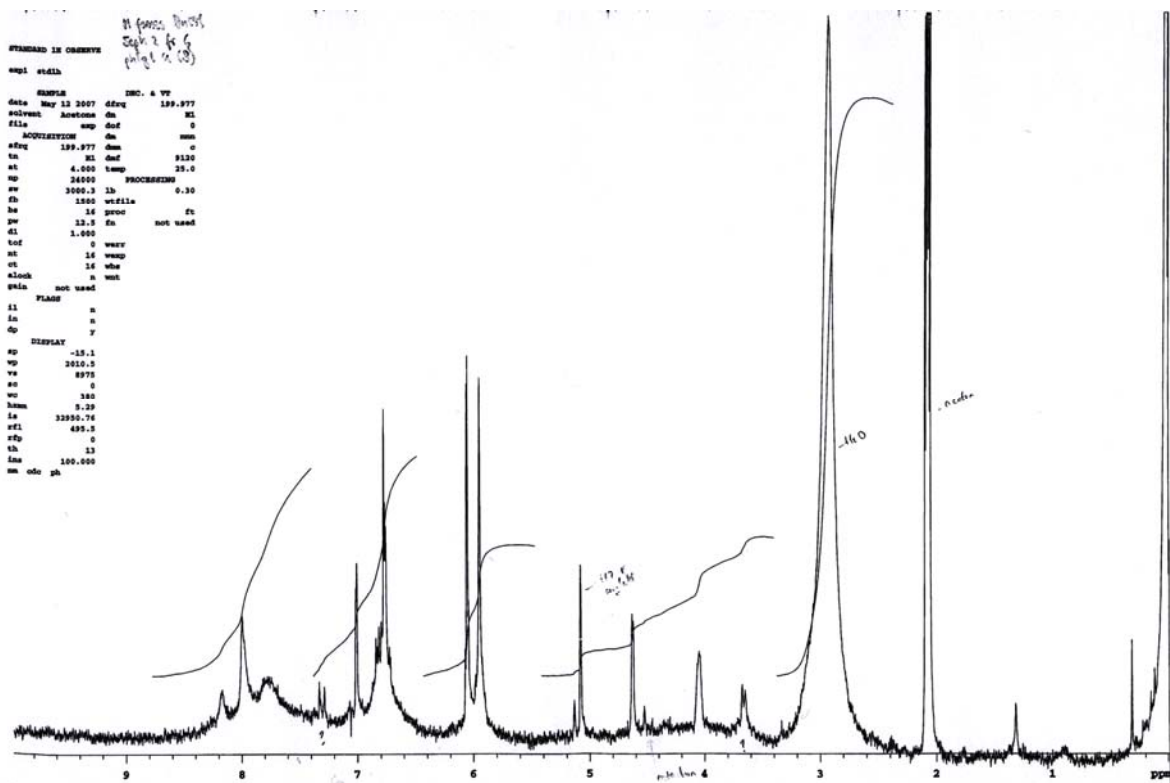
NMR-spektrum 8.3.16 ¹H-NMR-spektrum av B14

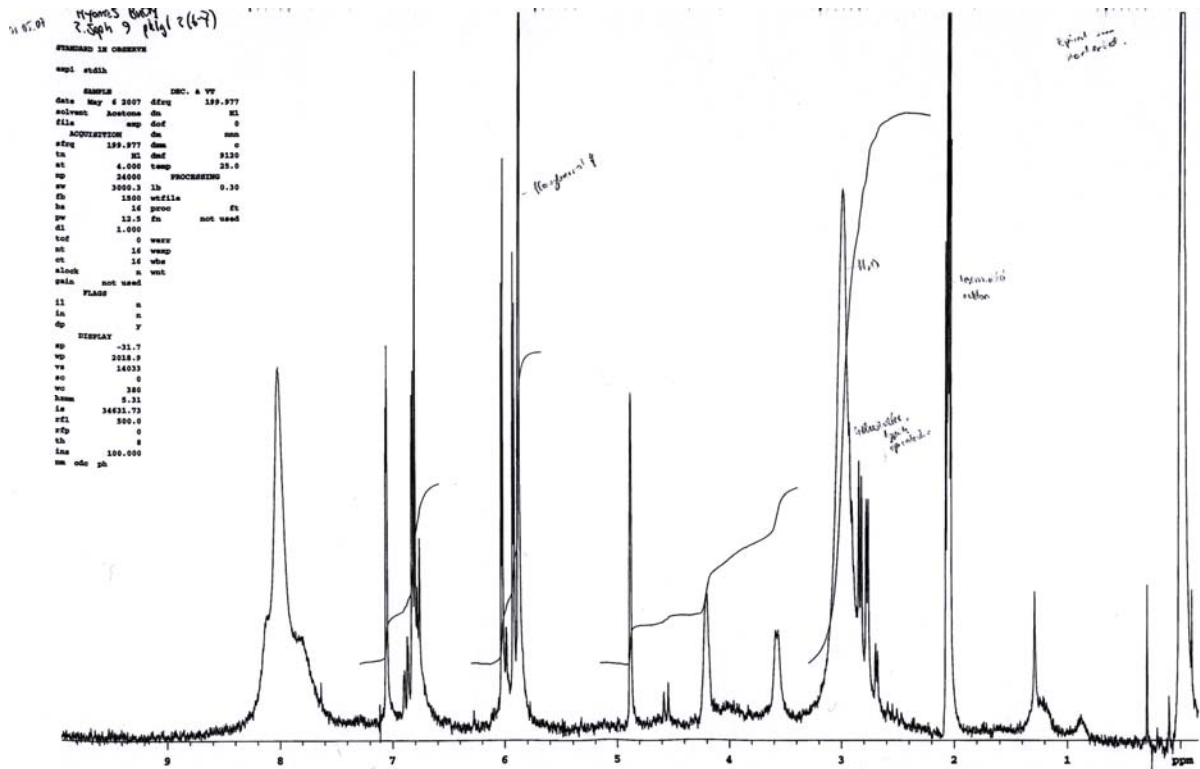
NMR-spektrum 8.3.17 ¹³C-NMR-spektrum av B14

NMR-spektrum 8.3.18 Utsnitt og integral av B14

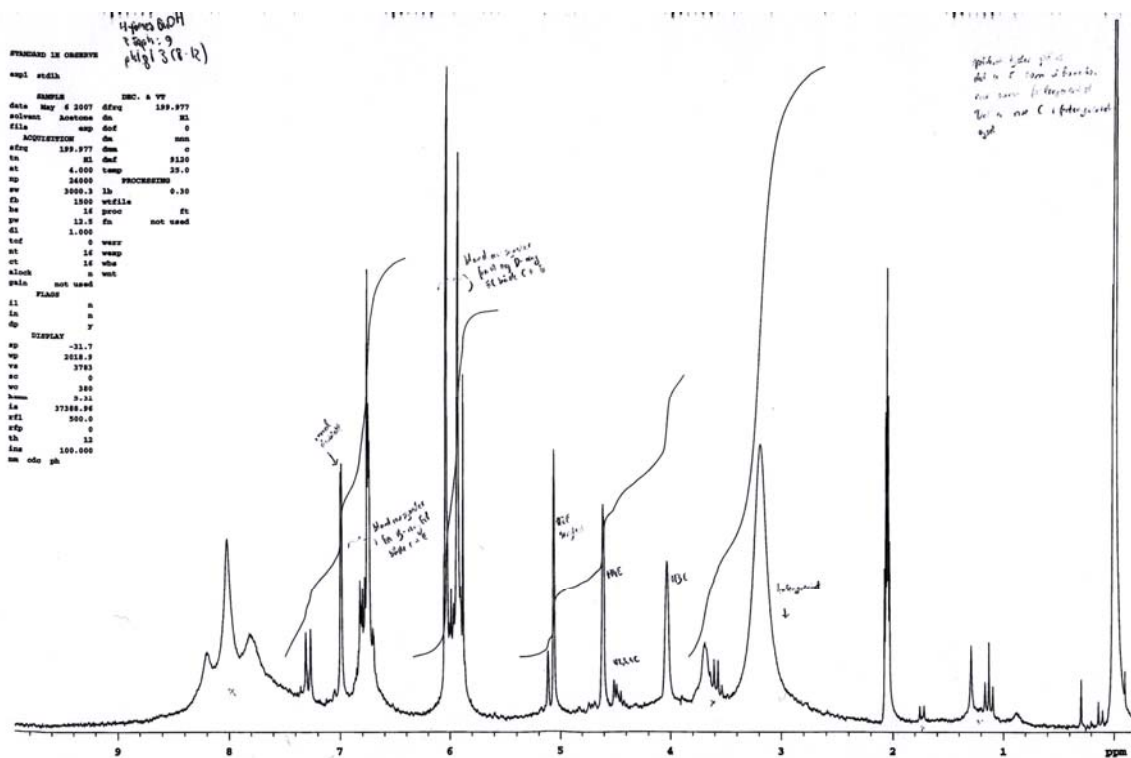
NMR-spektrum 8.3.19 ^1H -NMR-spektrum av B3-4.3NMR-spektrum 8.3.20 ^{13}C -NMR-spektrum av B3-4.3

NMR-spektrum 8.3.21 ¹H-NMR-spektrum av B3-4.3.3NMR-spektrum 8.3.22 ¹H-NMR-spektrum av B3-4.3.7

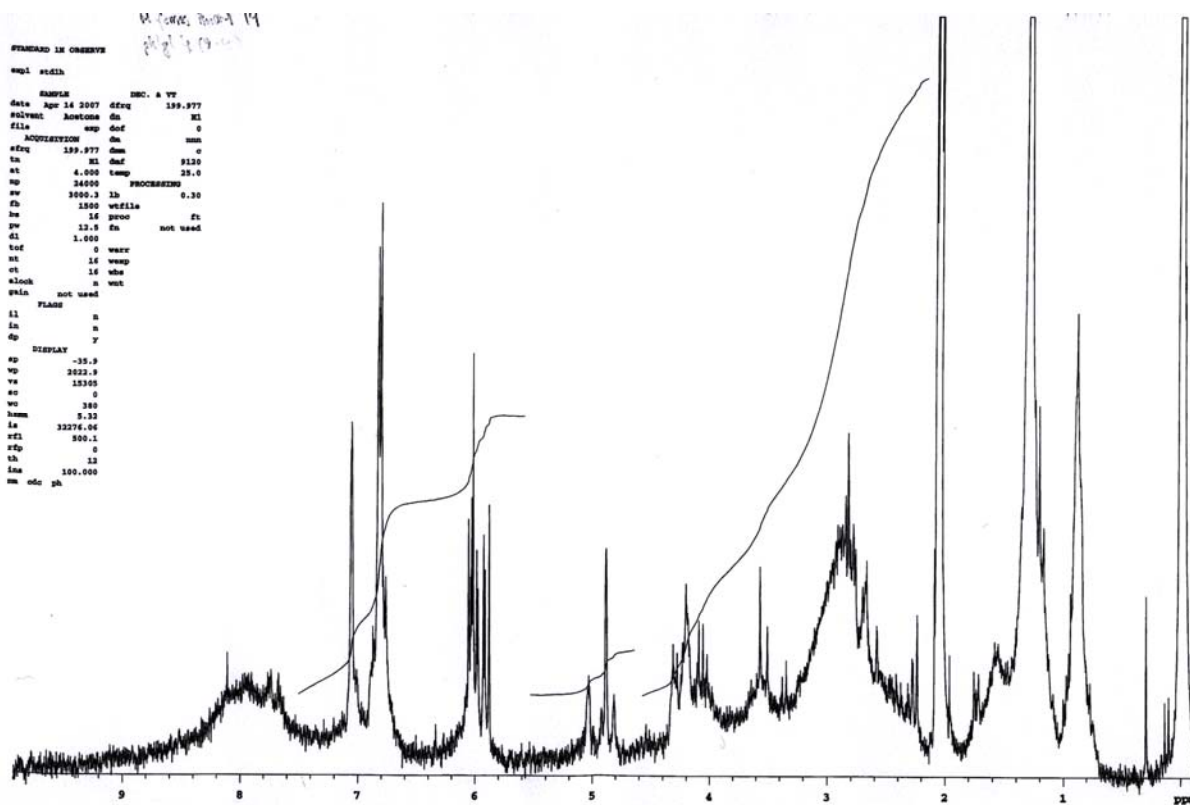
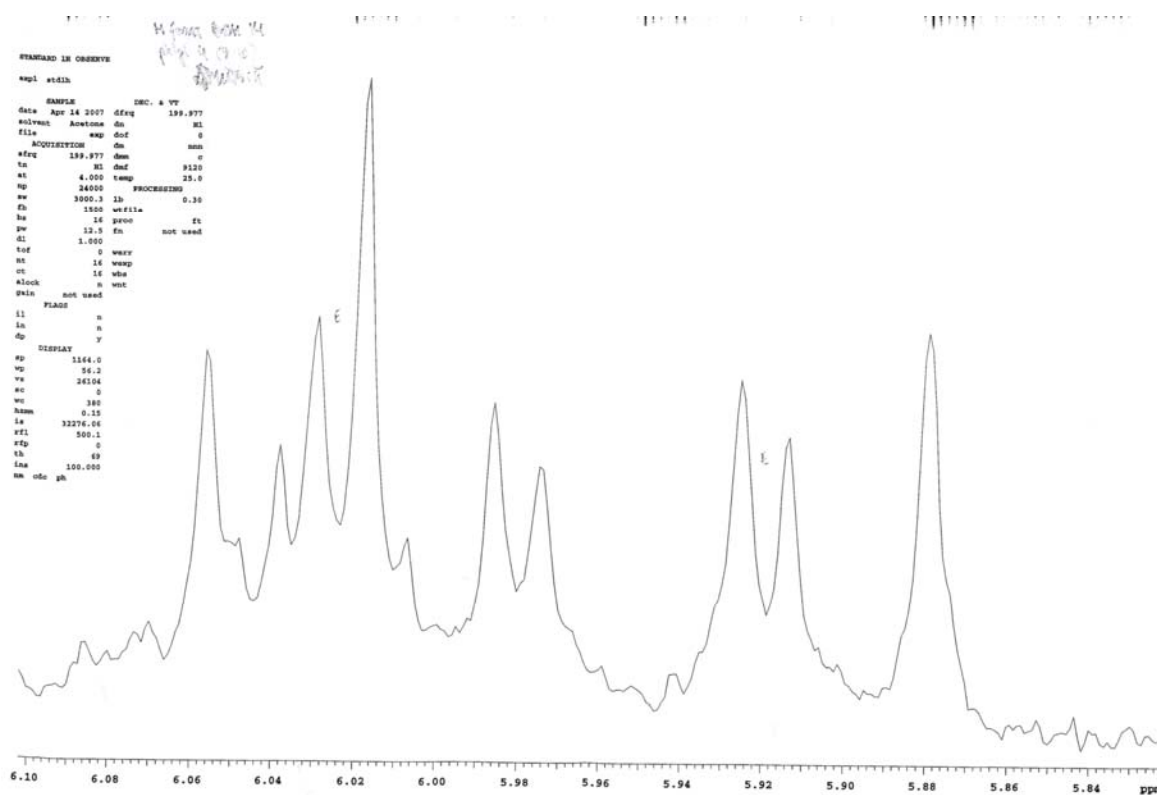
NMR-spektrum 8.3.23 ^1H -NMR-spektrum av B6.1NMR-spektrum 8.3.24 ^1H -NMR-spektrum av B6.4



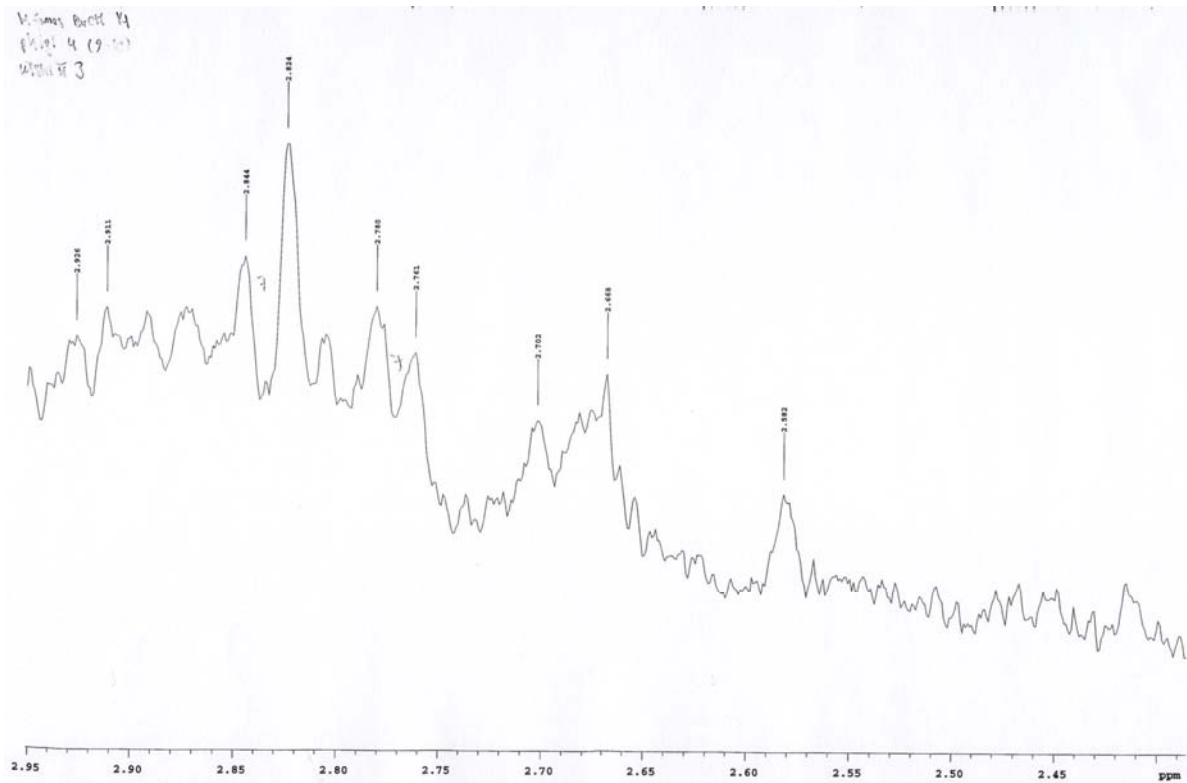
NMR-spektrum 8.3.25 ¹H-NMR-spektrum av B9.2



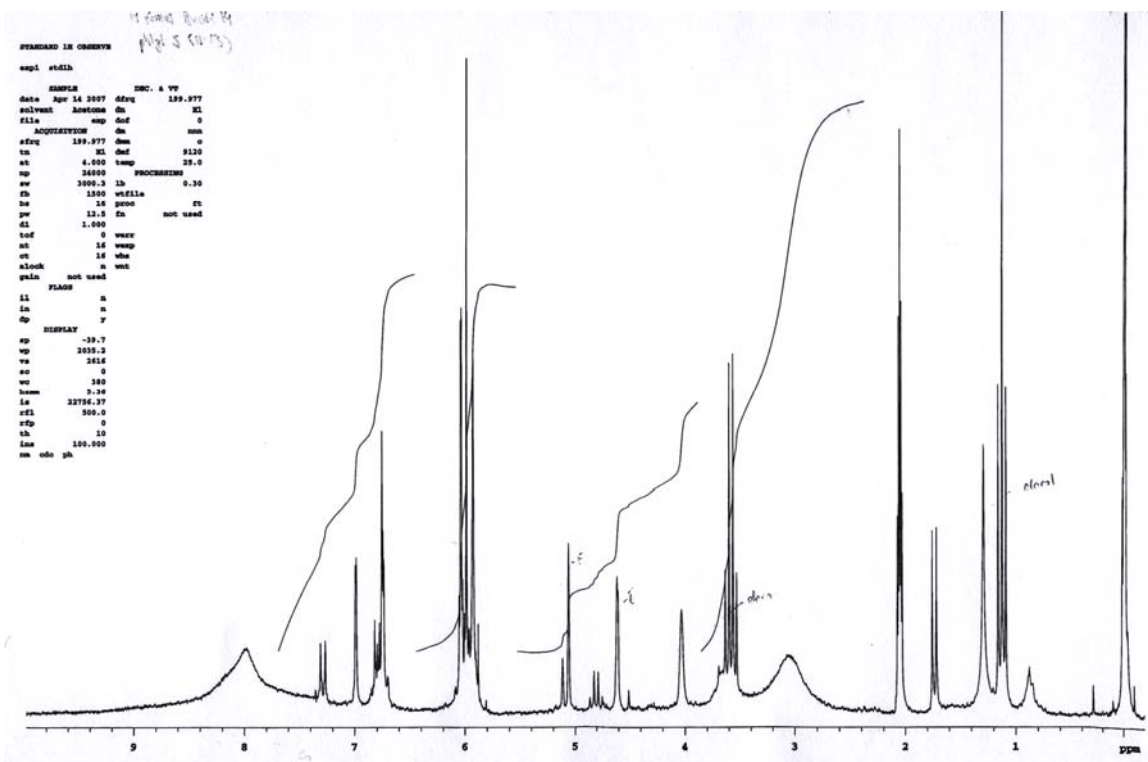
NMR-spektrum 8.3.26 ¹H-NMR-spektrum av B9.3

NMR-spektrum 8.3.27 ^1H -NMR-spektrum av B14.4

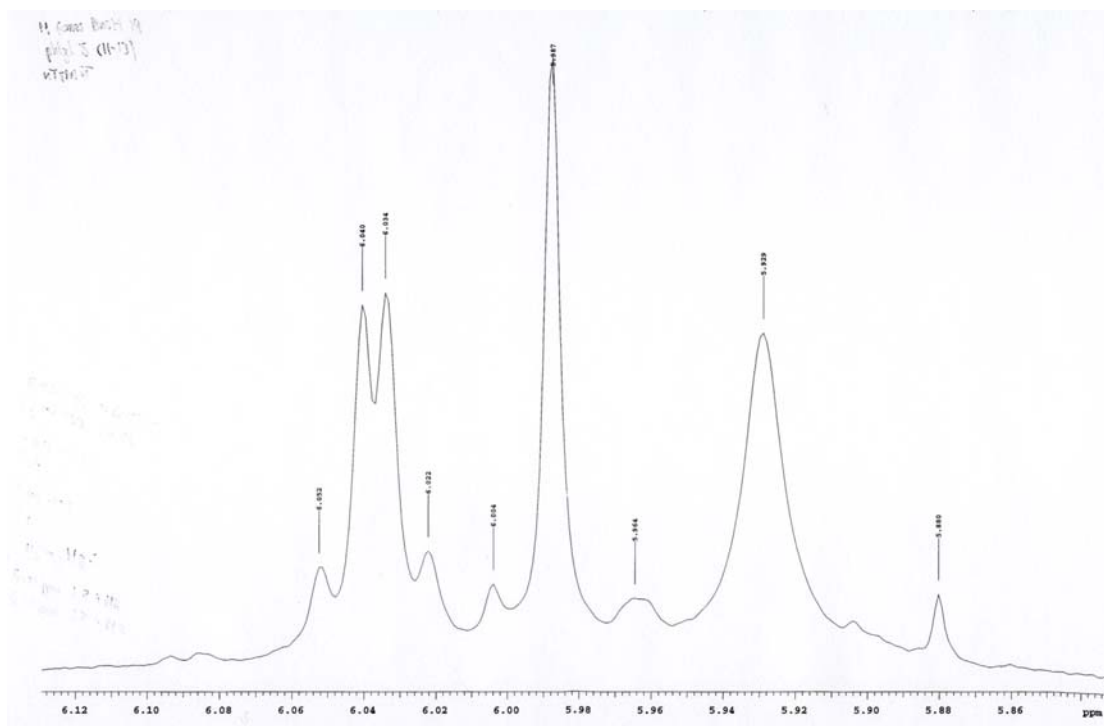
NMR-spektrum 8.3.28 Utsnitt og integral av B14.4 (5.84 – 6.10 ppm)



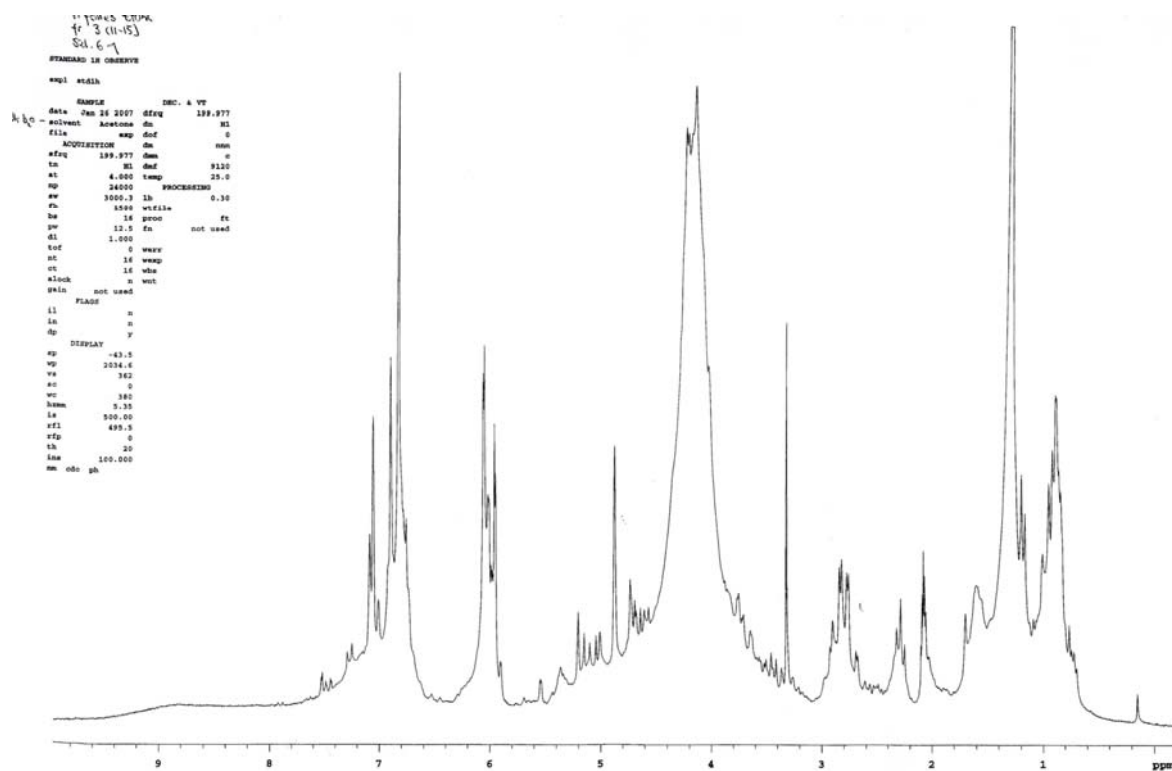
NMR-spektrum 8.3.29 Utsnitt og integral av B14.4 (2.40 – 2.95 ppm)



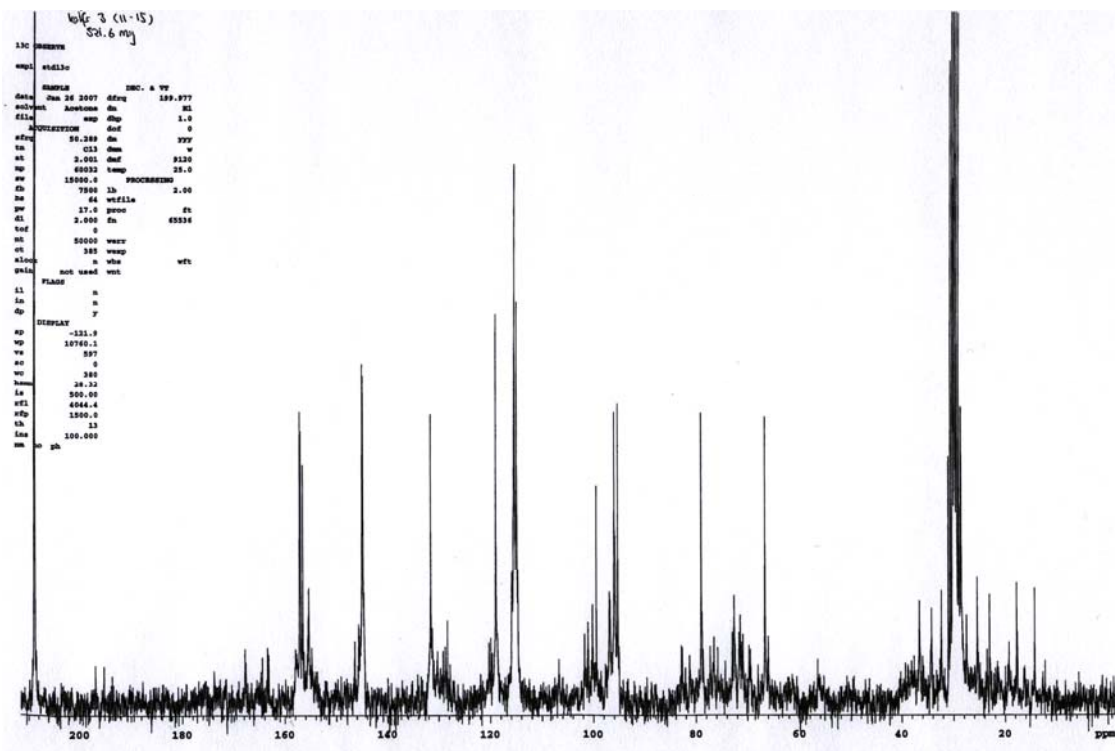
NMR-spektrum 8.3.30 ^1H -NMR-spektrum B14.5



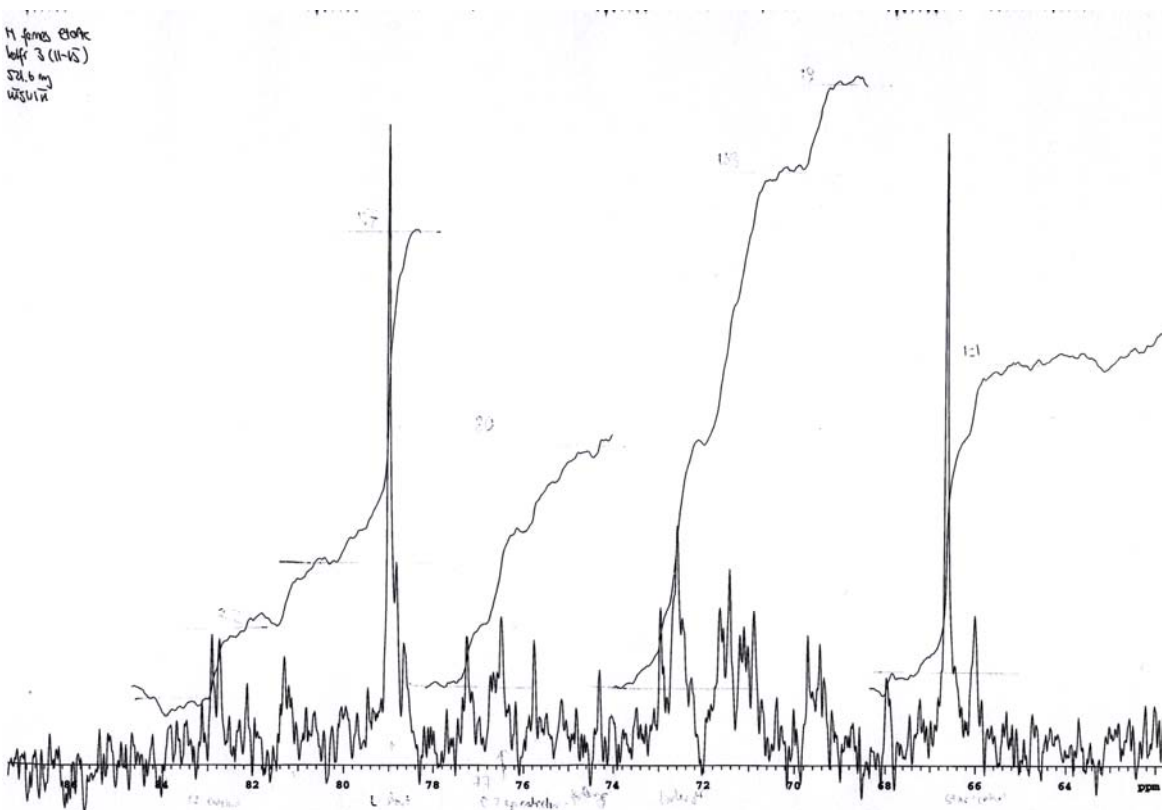
NMR-spektrum 8.3.31 Utsnitt og integral av B14.5 (5.86 – 6.12 ppm)



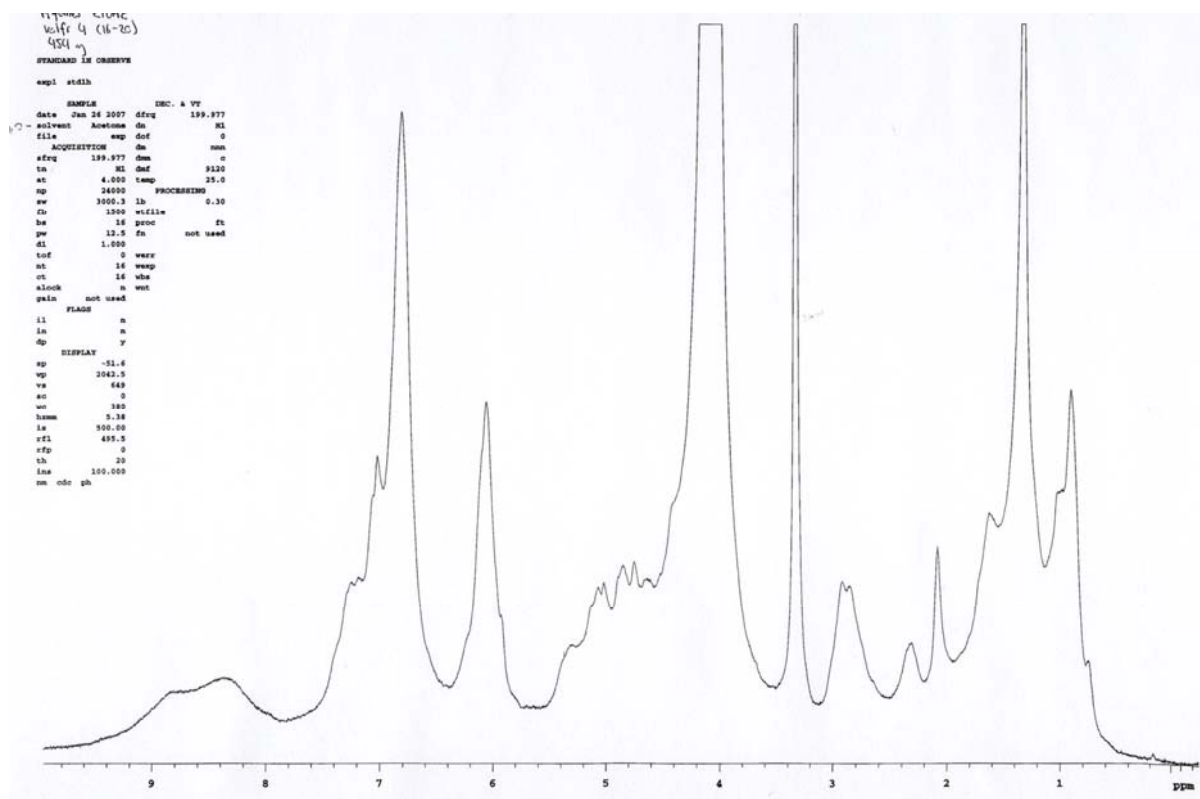
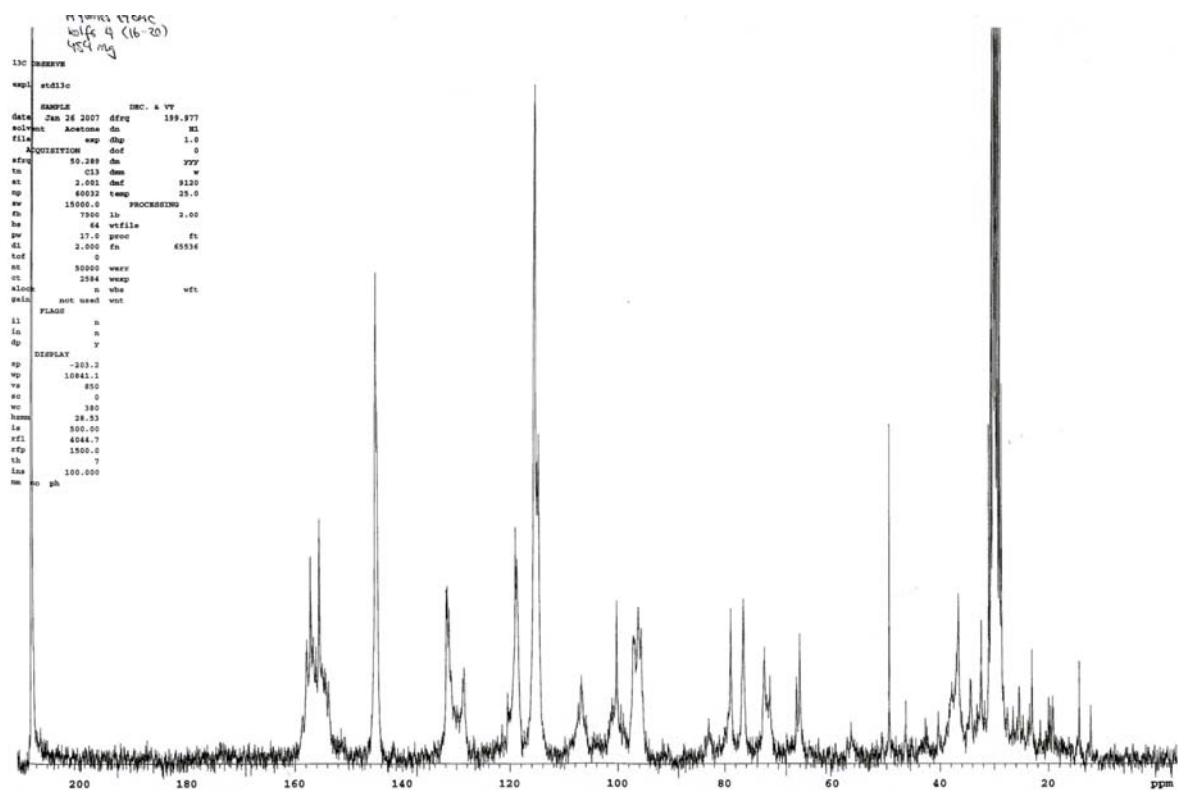
NMR-spektrum 8.3.32 ^1H -NMR-spektrum E3

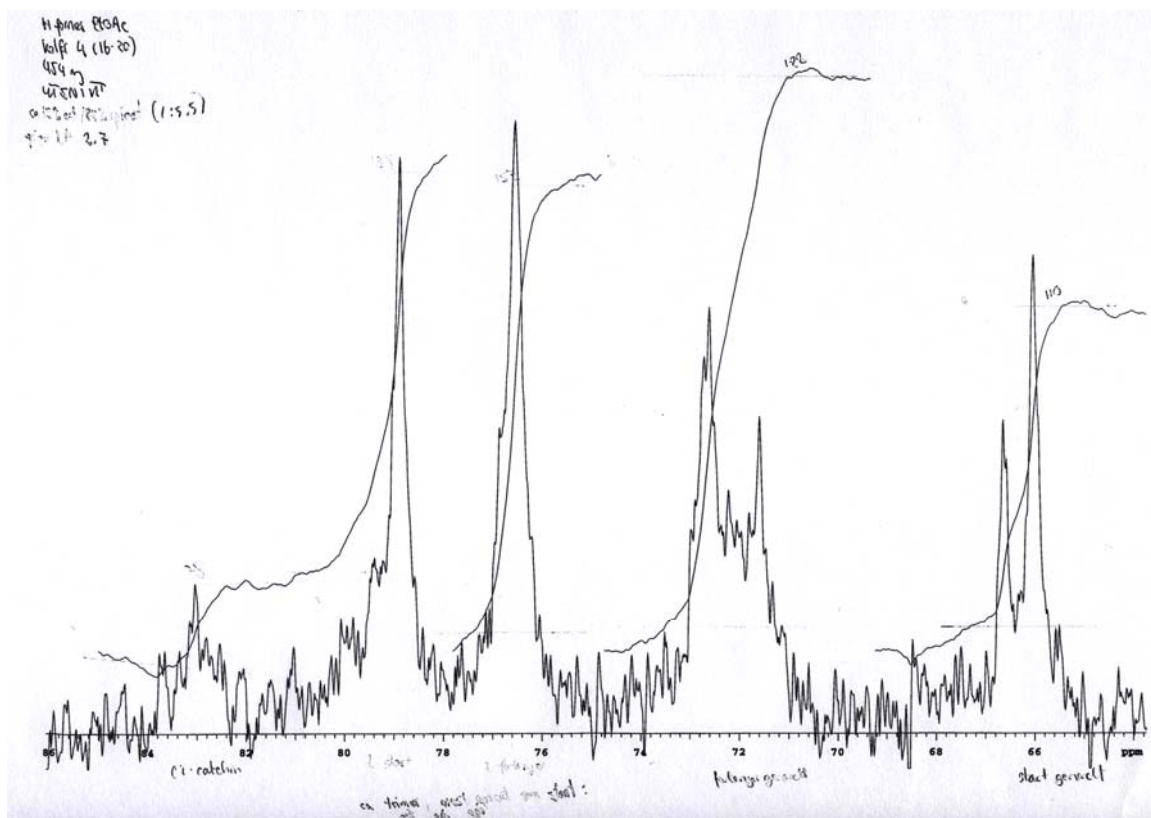


NMR-spektrum 8.3.33 ¹³C-NMR-spektrum E3

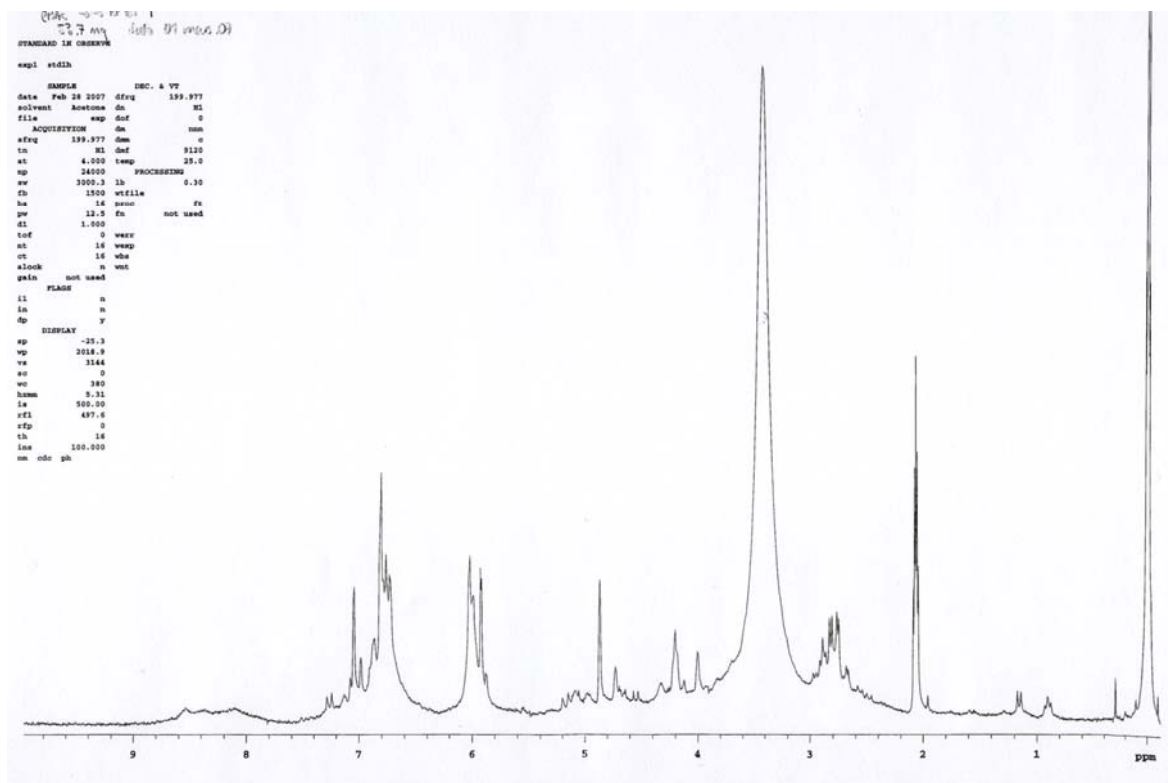


NMR-spektrum 8.3.34 Utsnitt av E3

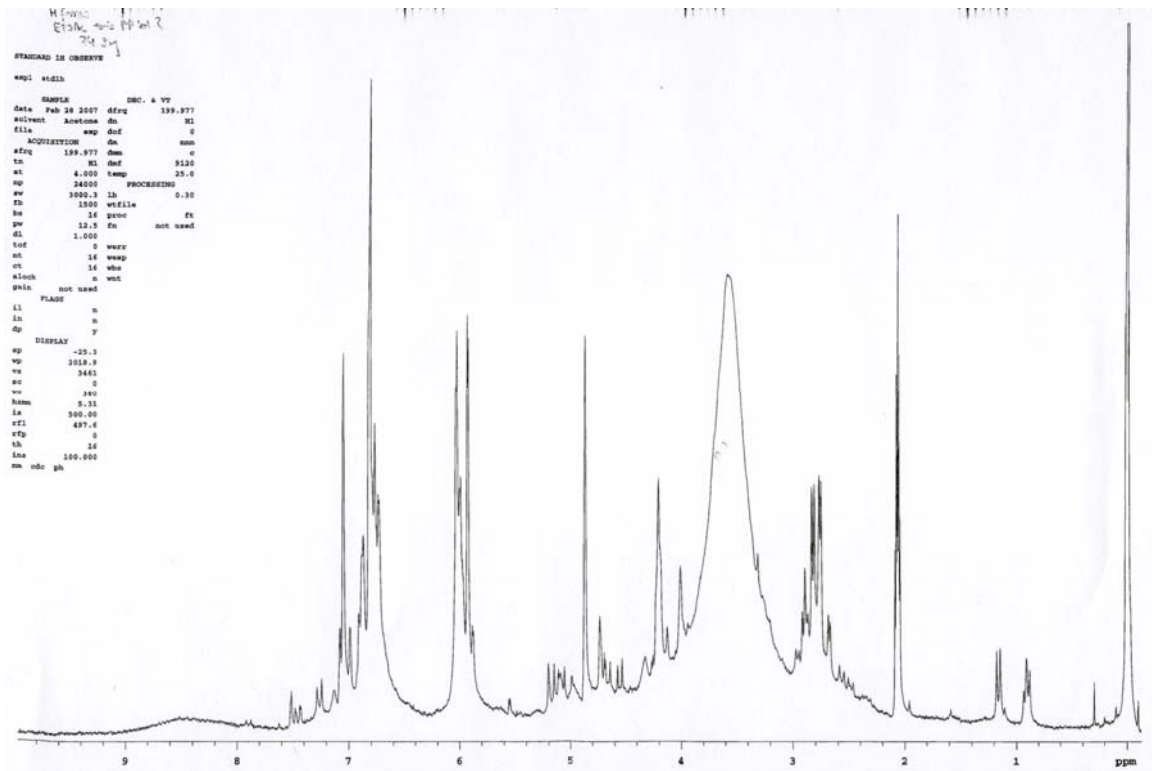
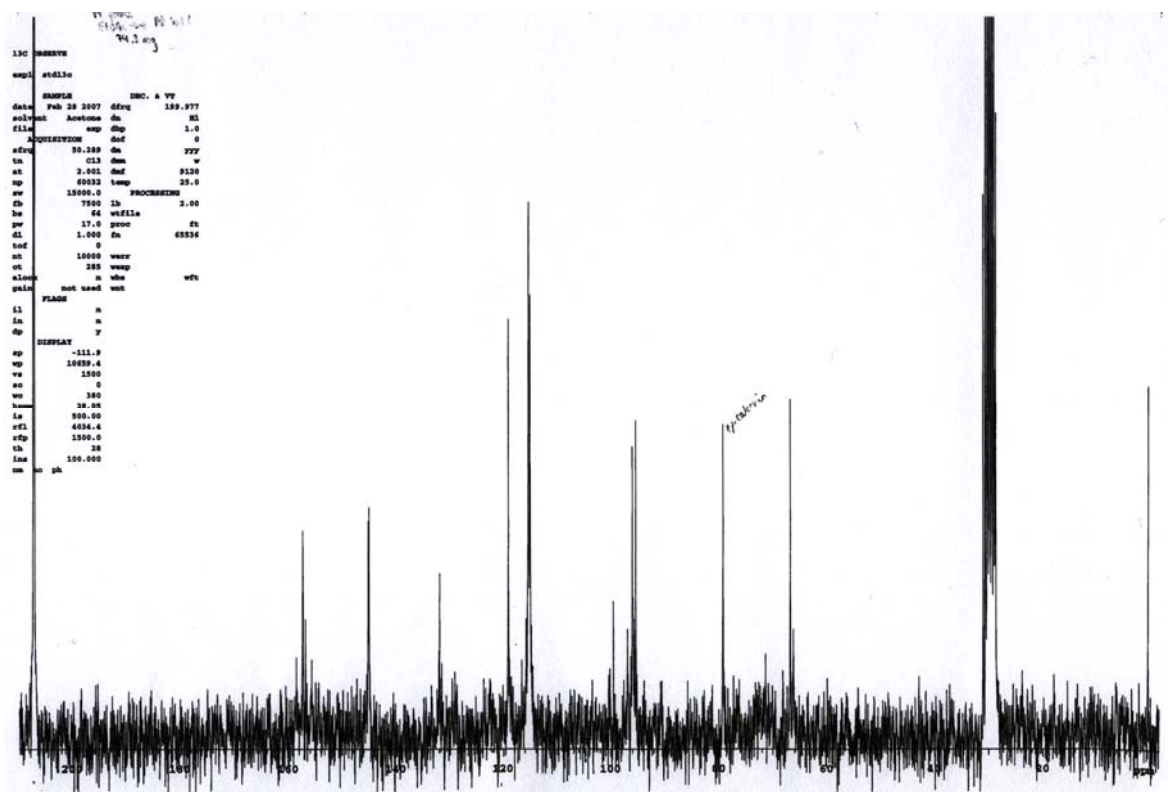
NMR-spektrum 8.3.35 ^1H -NMR-spektrum E4NMR-spektrum 8.3.36 ^{13}C -NMR-spektrum E4

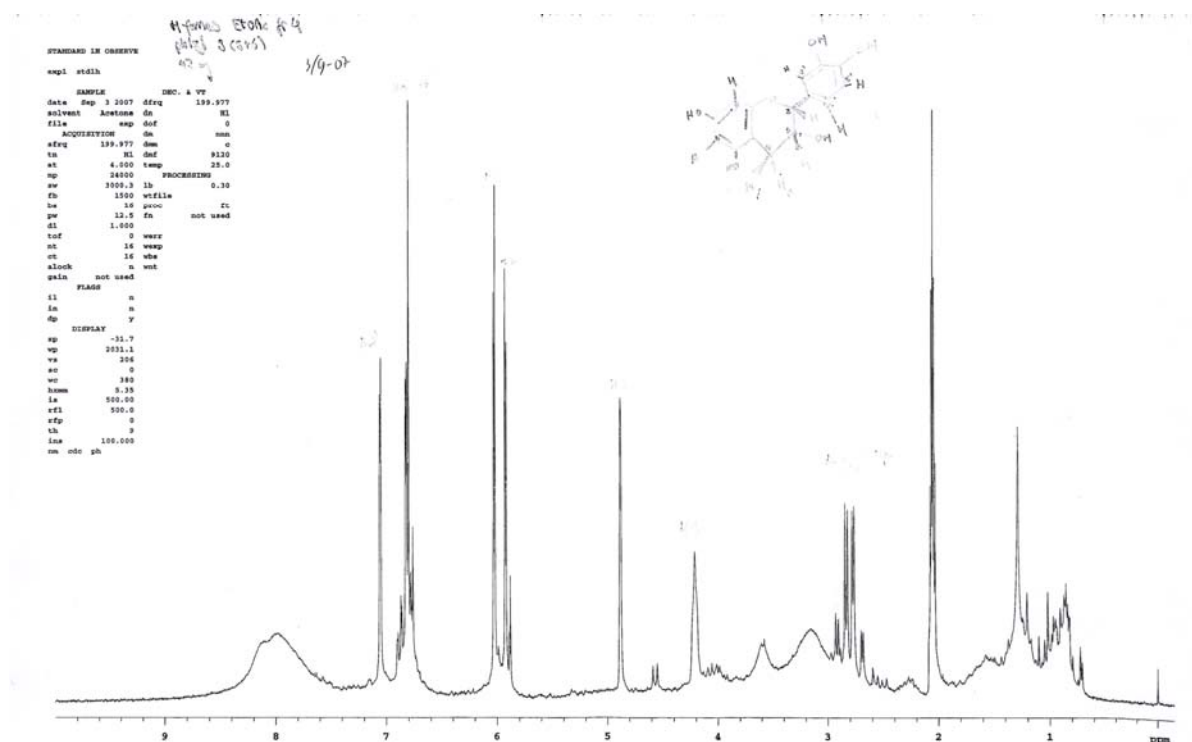
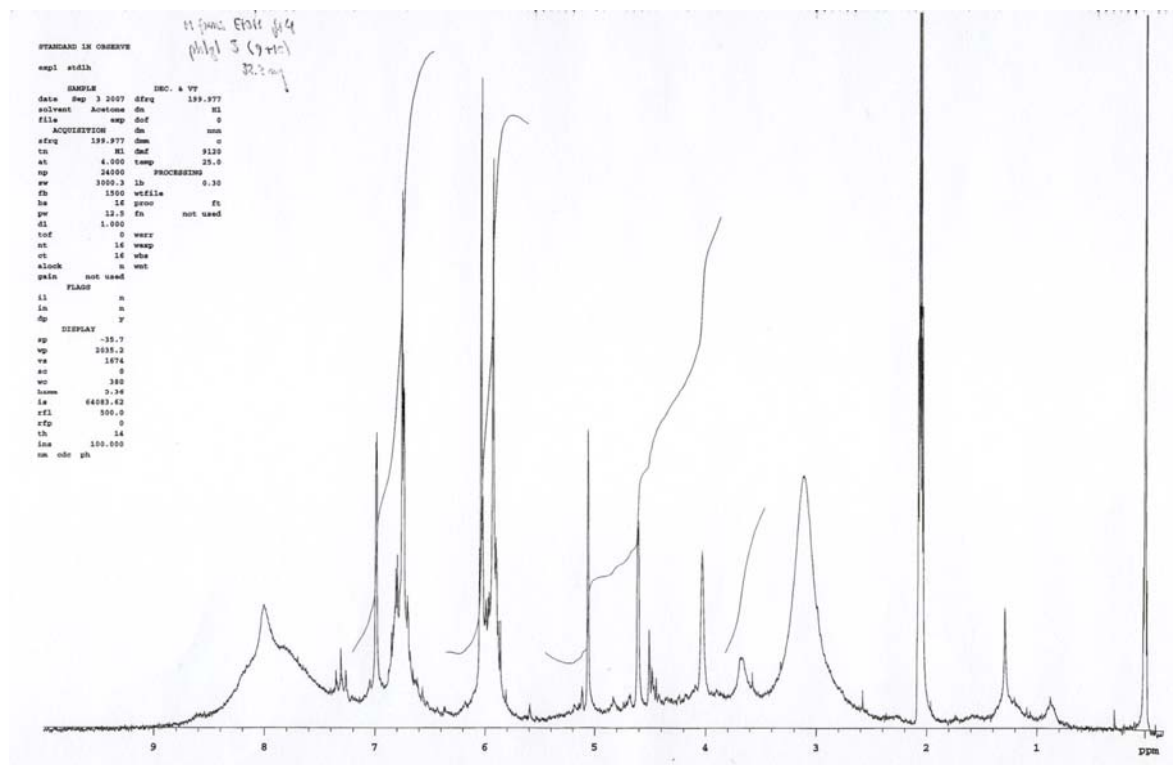


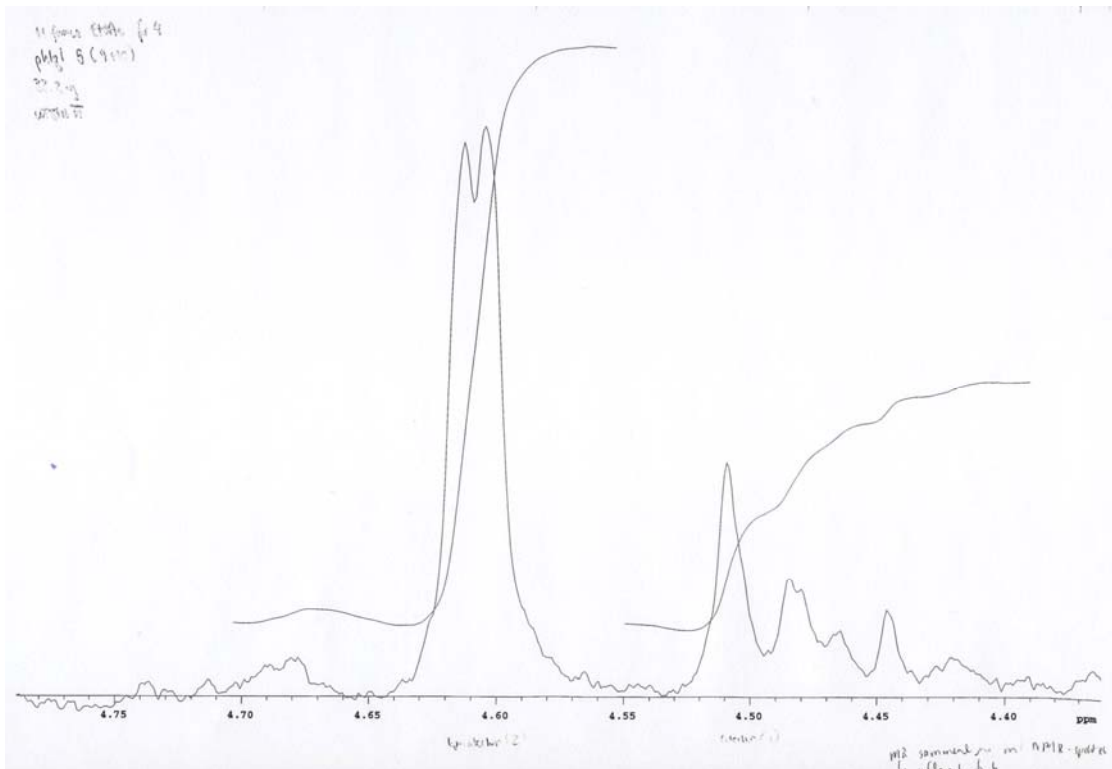
NMR-spektrum 8.3.37 Utsnitt og integral av E4



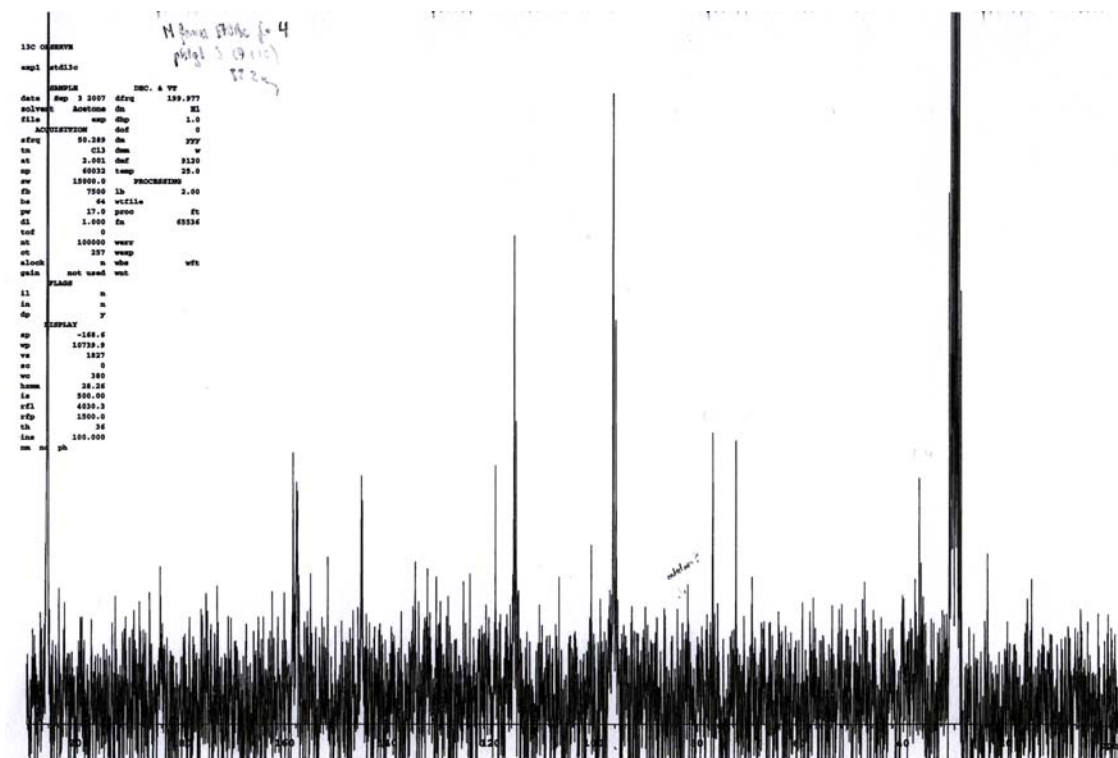
NMR-spektrum 8.3.38 ¹H-NMR-spektrum E3.1

NMR-spektrum 8.3.39 ^1H -NMR-spektrum E3.2NMR-spektrum 8.3.40 ^{13}C -NMR-spektrum E3.2

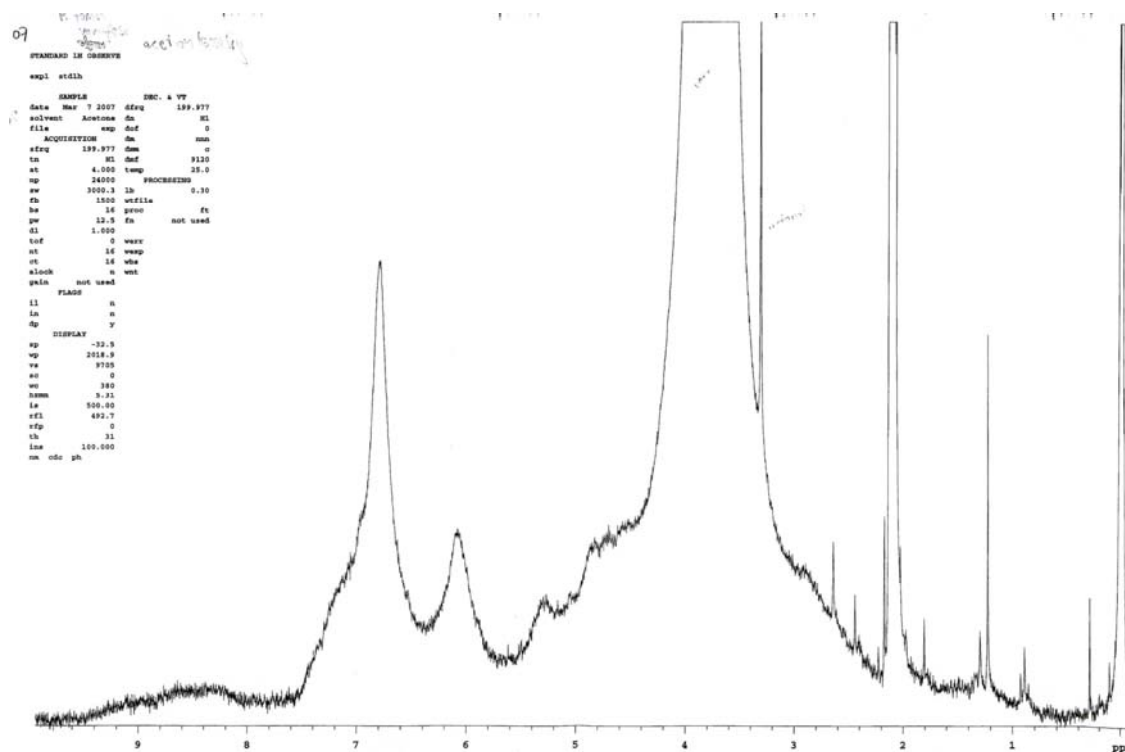
NMR-spektrum 8.3.41 ^1H -NMR-spektrum av E4.3NMR-spektrum 8.3.42 ^1H -NMR-spektrum av E4.5



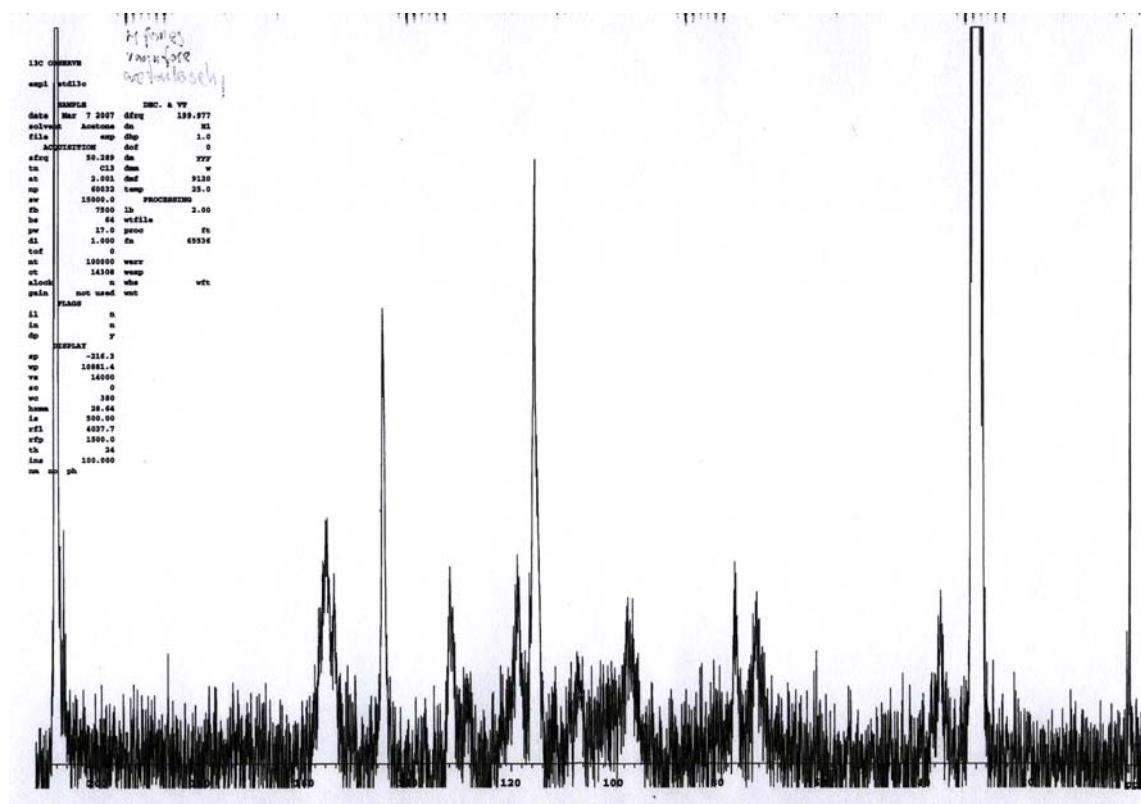
NMR-spektrum 8.3.43 Utsnitt og integral av E4.5



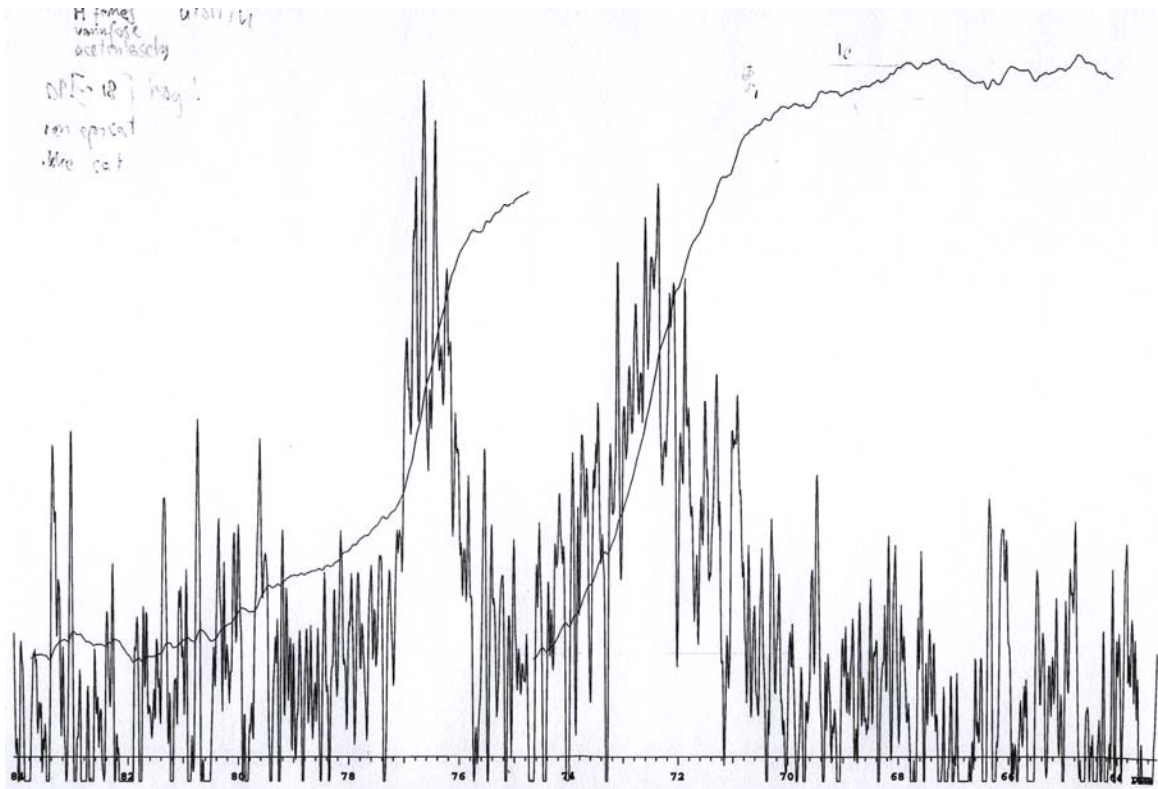
NMR-spektrum 8.3.44 ¹³C-NMR-spektrum av E4.5



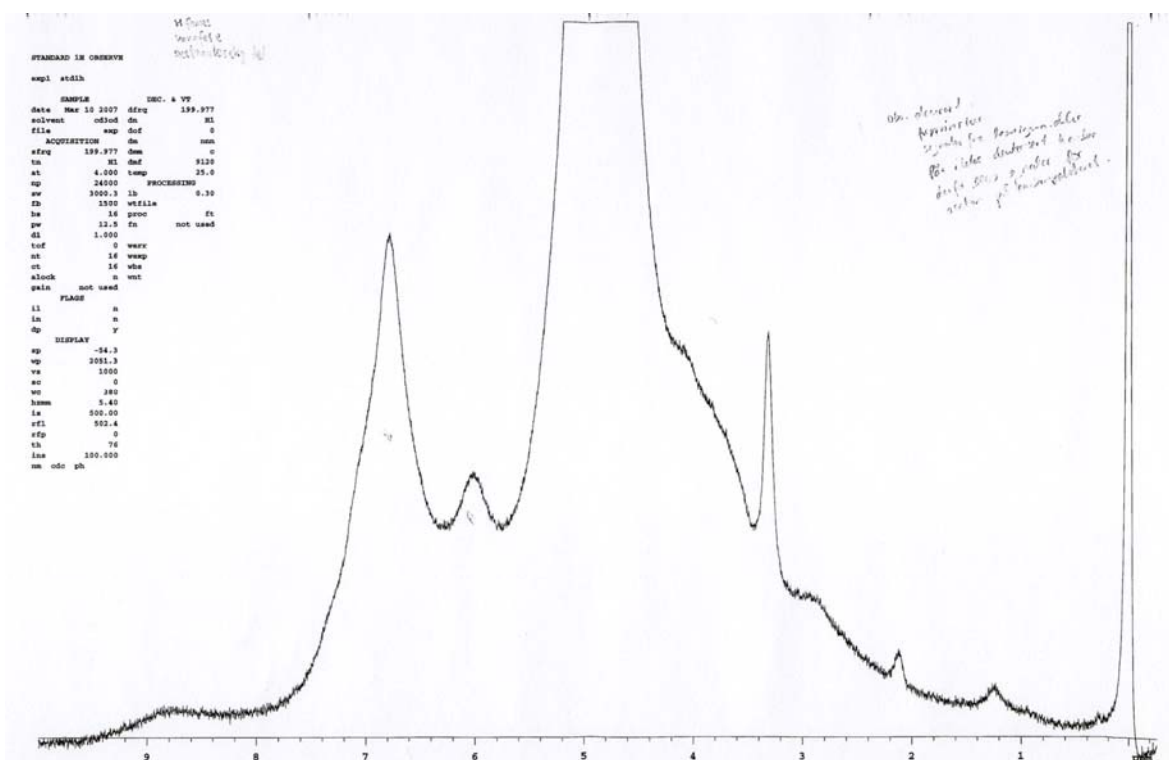
NMR-spektrum 8.3.45 ^1H -NMR-spektrum av acetonløselig del til vannfasen

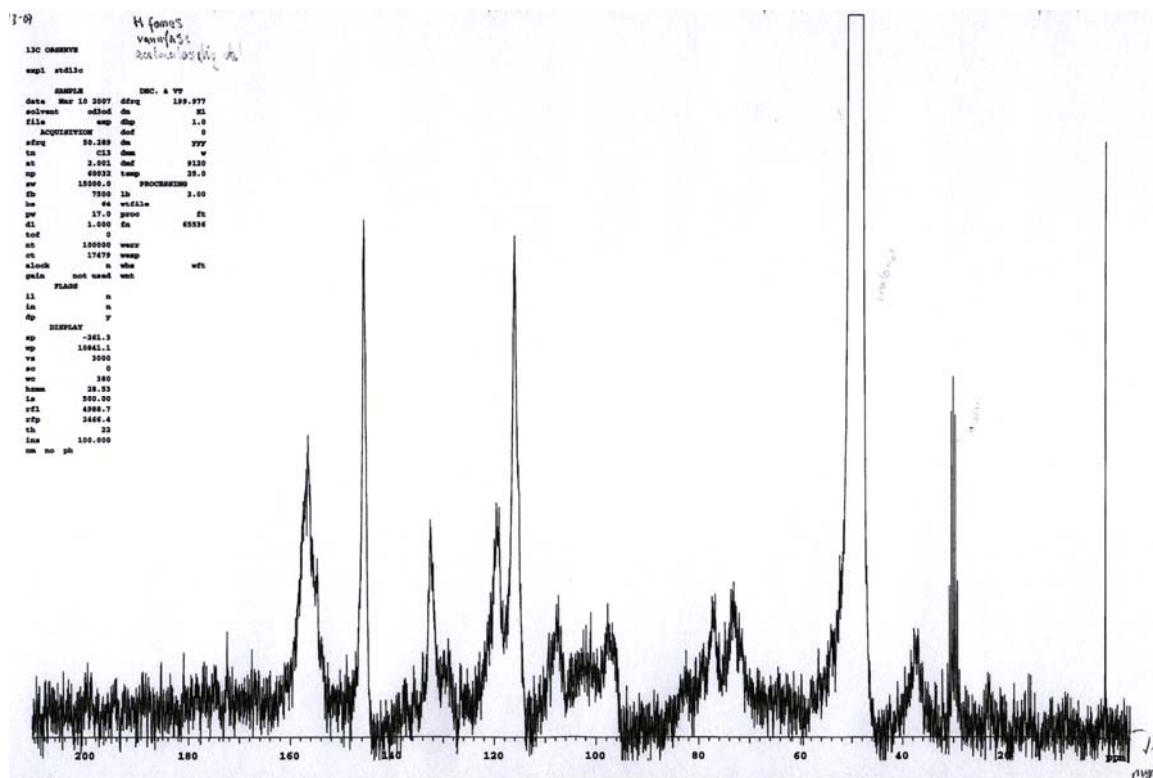


NMR-spektrum 8.3.46 ^{13}C -NMR-spektrum av acetonløselig del til vannfasen

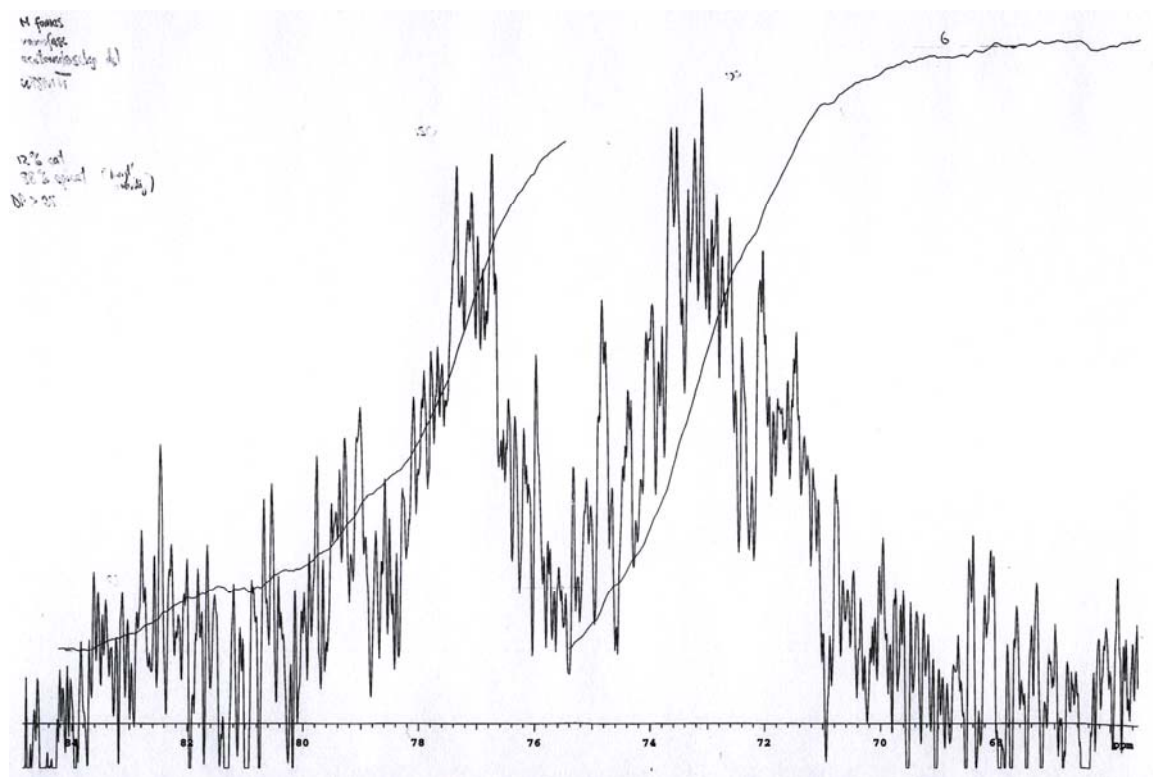


NMR-spektrum 8.3.47 Utsnitt og integral av acetonløselig del til vannfasen

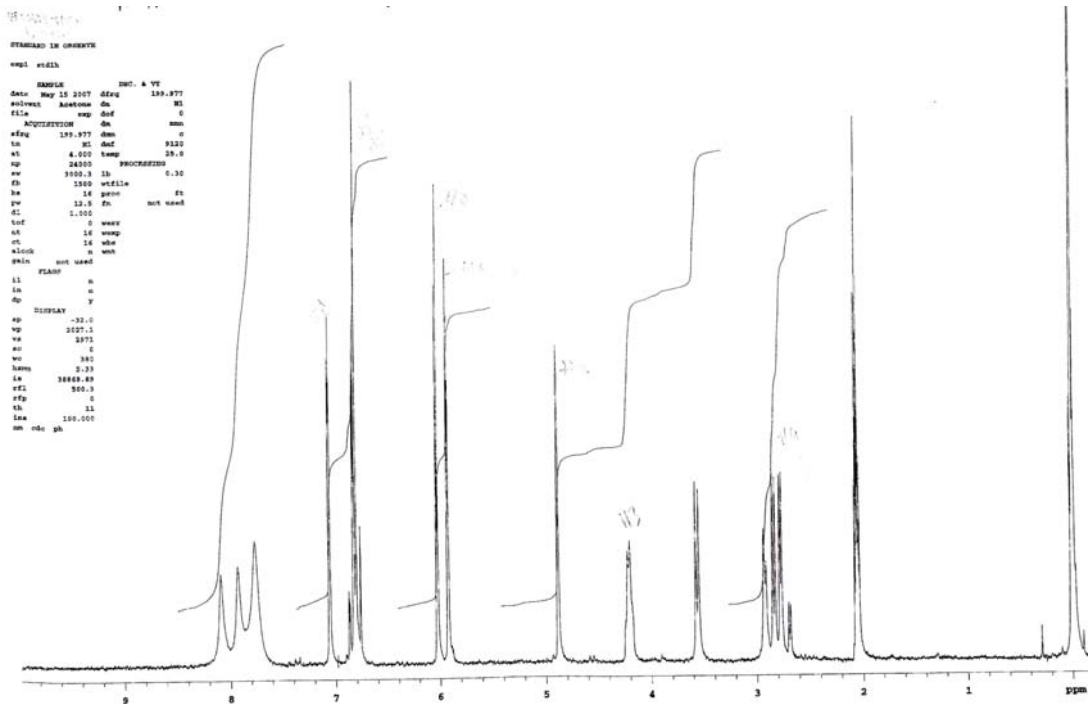
NMR-spektrum 8.3.48 ¹H-NMR-spektrum av acetonuløselig del til vannfasen



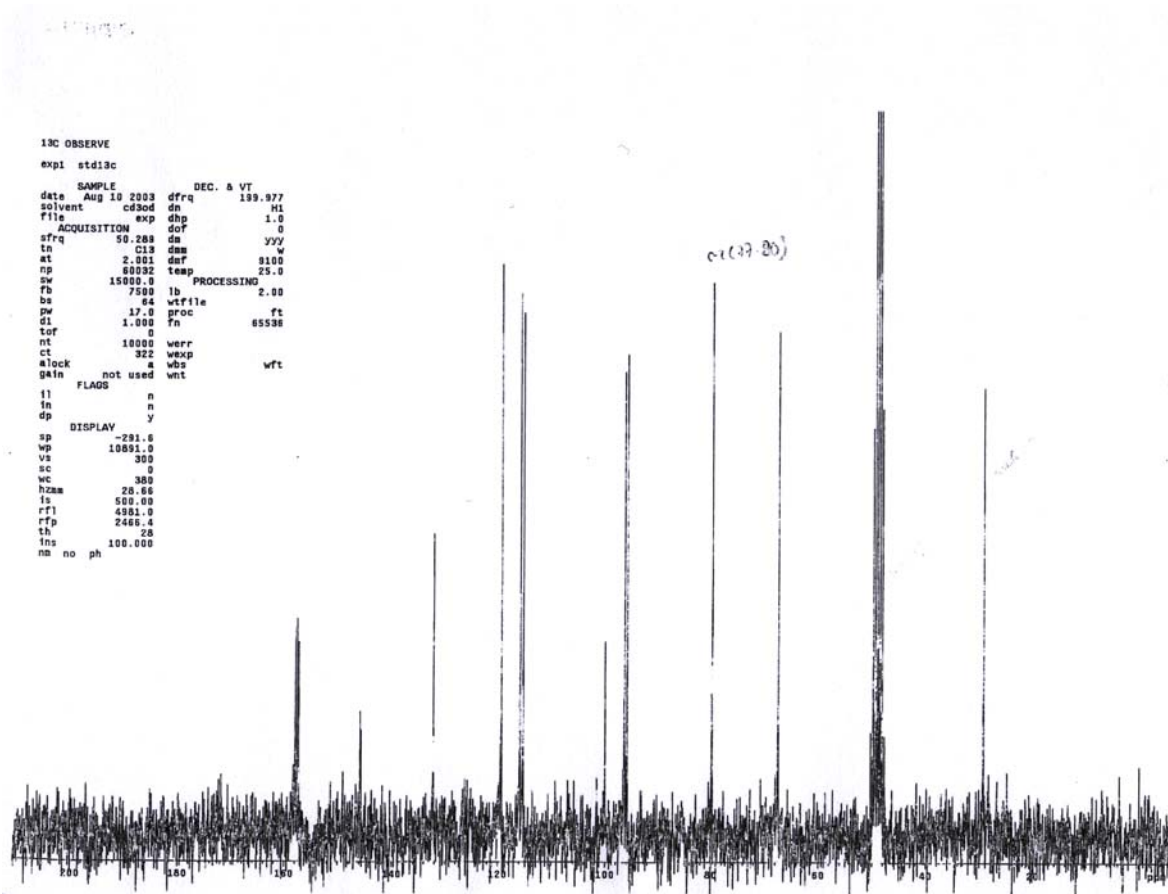
NMR-spektrum 8.3.49 ^{13}C -NMR-spektrum av acetonuløselig del til vannfasen



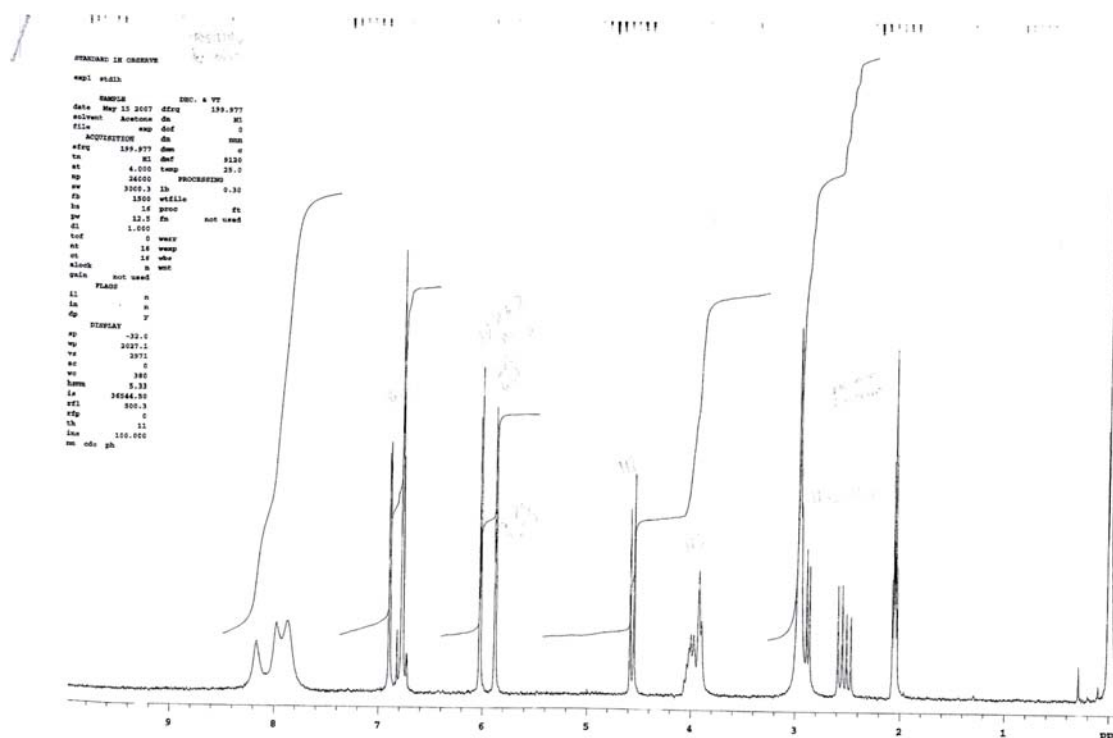
NMR-spektrum 8.3.50 Utsnitt og integral av acetonuløselig del til vannfasen



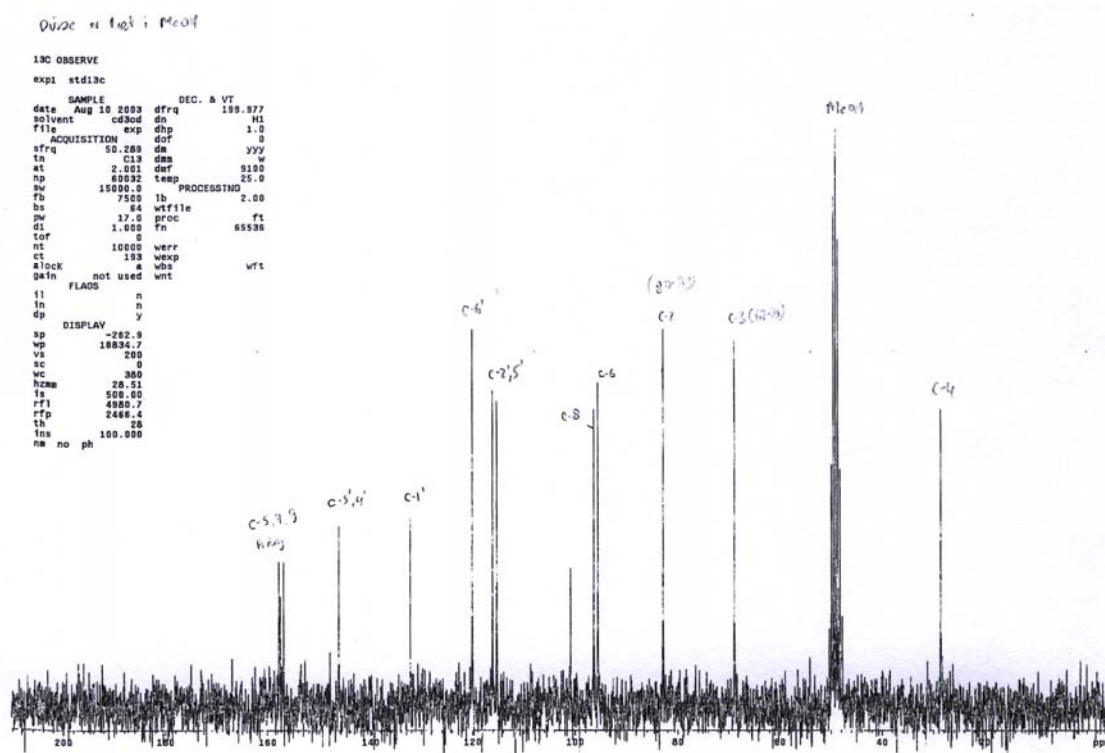
NMR-spektrum 8.3.51 ¹H-NMR-spektrum av epicatechin (acetone-d6)



NMR-spektrum 8.3.52 ¹³C-NMR-spektrum av epicatechin (d-metanol)



NMR-spektrum 8.3.53 ^1H -NMR-spektrum av catechin (aceton-d6)



NMR-spektrum 8.3.54 ^{13}C -NMR-spektrum av catechin (d-metanol)

9. REFERANSELISTE

Agarwal, R. P., T. Spector og R. E. J. Parks (1977). "Tight-binding inhibitors -IV. Inhibition of Adenosine Deaminases by various inhibitors." Biochemical Pharmacology **26**: 359-367.

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts og P. Walter (2002). *Molecular biology of the cell*. 4. utg. New York, Garland Science.

Amersham-Biosciences (2002). "Gel Filtration - Principles and Methods." <http://www.chromatography.amershambiosciences.com/>, aksessdato: april 2007

Anonym (2003). Bangladesh enlarges Sundarbans Ramsar site. http://ramsar.org/wn/w.n.bangladesh_sundarbans.htm, aksessdato: 12.10.2007.

Aviram, M. og B. Fuhrman (2003). Effects of Flavonoids on the Oxidation of Low-Density Lipoprotein and Atherosclerosis. I: C. A. Rice-Evans og L. Packer, red.: *Flavonoids in health and disease*. 2. utg. New York, Marcel Dekker Inc.

Aylward, G. og T. Findlay (2002). *SI Chemical Data*. 5. utg. Milton, John Wiley & Sons Australia.

Bandaranayake, W. M. (1998). "Traditional and medicinal uses of mangroves." Mangroves and Salt Marshes **2**: 133-148.

Bandaranayake, W. M. (2002). "Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants." Wetlands Ecology and Management **10**: 421-452.

Beecher, G. R. (2004). "Proanthocyanidins: Biological activities associated with human health." Pharmaceutical biology **42**: 2-20.

Blois, M. S. (1958). "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical." Nature **181**: 1199-2000.

Bojack, G., C. G. Earnshaw, R. Klein, S. D. Lindell, C. Lowinski og R. Preuss (2001). "Design and Synthesis of Inhibitors of Adenosine and AMP Deaminases." Organic Letters **3**: 839-842.

Christensen, B. (1983). "Mangroves what are they worth?" <http://www.fao.org/docrep/q1093e/q1093e01.htm#mangroves%20what%20are%20they%20worth>, aksessdato: 12.10.2007

Colnaghi (uten årstall). *Heritiera fomes*. <http://www.colnaghi.co.uk/DesktopDefault.aspx?tabid=7&tabindex=6&objectid=13043#>, aksessdato: 12.10.2007.

Cos, P., T. De Bruyne, N. Hermans, S. Apers, D. Vanden Berghe og A. J. Vlietinck (2004). "Proanthocyanidins in health care: Current and new trends." Current Medicinal Chemistry **10**: 1345-1359.

- Dearden, C. E. (2006). "Role of Single-Agent Purine Analogues in Therapy of Peripheral T-Cell Lymphomas." Seminars in Hematology **43**: 22-26.
- Devasagayam, T. P. A., J. C. Tilak, K. K. Boloor, K. S. Save, S. S. Ghaskadbi og R. D. Lele (2004). "Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects." Journal of Association of Physicians of India **52**: 794-804.
- Dixon, R. A., D. Xie og S. B. Sharma (2005). "Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research?" New Phytologist **165**: 9-28.
- Duong, G. M. (2005). Antioksidanter i *Xylocarpus granatum*, en medisiplante fra mangroveskogen i Bangladesh - Hovedfagsoppgave. Oslo: Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo.
- Durak, I., R. Cetin, E. Devrim og I. B. Ergüder (2005). "Effects of black grape extract on activities of DNA turn-over enzymes in cancerous and non cancerous human colon tissues." Life Sciences **76**: 2995-3000.
- Erbaqci, Z., A. B. Erbaqci, O. Köylüoqlu og A. A. Tuncel (2006). "Serum adenosine deaminase activity in monitoring disease activity and response to therapy in severe psoriasis." Acta Medica (Hradec Kralove) **49**: 101-104.
- Foo, L. Y., R. Newman, G. Waghorn, W. C. McNabb og M. J. Ulyatt (1996). "Proanthocyanidins from *Lotus Corniculatus*." Phytochemistry **41**: 617-624.
- Fridovich, I. (2001). "Oxidative stress." www.els.net, aksessdato: 16.04.2007
- Funk, C. D. (2001). "Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology." Science **294**: 1871-1875.
- Funk, C. D. og C. Tillmann (2001). "12/15-Lipoxygenase, Oxidative Modification of LDL and Atherogenesis." Trends in Cardiovascular Medicine **11**: 116-124.
- Gleason, M. M., C. J. Rojas, K. S. Learn, M. H. Perrone og A. G. E. Bilder (1995). "Characterization and inhibition of 15-lipoxygenase in human monocytes: comparison with soybean 15-lipoxygenase." American Journal of Physiology - Cell Physiology **268**: 1301-1307.
- Greibrokk, T., E. Lundanes og K. E. Rasmussen (1998). Kromatografi. 3. utg. Oslo, Universitetsforlaget.
- Grønhaug, T. E. (2006). Antioksidanter i *Xylocarpus moluccensis*, en medisiplante fra mangroveskogen i Bangladesh - Hovedfagsoppgave. Oslo: Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.
- Gutteridge, J. M. C. og B. Halliwell (1994). Antioxidants in nutrition, health, and disease. Oxford, Oxford University Press.

Halliwell, B. (1997). Antioxidants: The basics - what they are and how to evaluate them. I: H. Sies, red.: Antioxidants in disease mechanisms and therapy. utg. San Diego, Academic Press. **38**.

Halliwell, B. (2005). "Free radicals and other reactive species in disease." www.els.net, aksessdato: 16.04.2007

Halliwell, B. og J. M. C. Gutteridge (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. 3. utg. Oxford, Oxford University Press.

Harriman, G. C. B., E. Abushanab og J. Stoeckler (1994). "Adenosine Deaminase Inhibitors. Synthesis and Biological Evaluation of 4-Amino-1-(2(S)-hydroxy-3(R)-nonyl)-1*H*-imidazo[4,5-*c*]pyridine (3-Deaza-(+)-EHNA) and Certain C1'Derivatives." Journal of Medical Chemistry **37**: 305-308.

Hirway, I. og S. Goswami (2004). "Valuation of Mangroves in Gujarat." <http://www.gec.gov.in/Gecweb/PUBLICATIONS/Valuation%20of%20Magroves.pdf>, aksessdato: 12.10.2007

Ho, A. D. og M. Hensel (2006). "Pentostatin for the Treatment of Indolent Lymphoproliferative Disorders." Seminars in Hematology **43**: 2-10.

Hossain, M. K. og M. Z. U. Nizam (2004). "*Heritiera fomes* Buch.-Ham." <http://www.rngr.net/Publications/ttsm/Folder.2003-07-11.4726/PDF.2004-03-03.3400/file>, aksessdato: 12.10.2007

Kalckar, H. M. (1947). "Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes." Journal of Biological Chemistry **167**: 429-475.

Kåss, E., red.(1998). Medisinsk ordbok. Oslo, Gyldendal Norsk Forlag.

Kennedy, J. A. og G. P. Jones (2001). "Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**: 1740-1746.

Köhler, N. og P. Winterhalter (2005). "Large-scale isolation of flavan-3-ol phloroglucinol adducts by high-speed counter-current chromatography." Journal of Chromatography A **1072**: 217-222.

Maiga, A., K. E. Malterud, G. H. Mathisen, R. E. Paulsen, J. Thomas-Oates, E. Berström, L. Reubsaet, D. Diallo og B. S. Paulsen (2007). "Cell protective antioxidants from the root bark of *Lannea velutina* A. Rich., a Malian medicinal plant." Journal of Medicinal Plants Research **1**.

Malterud, K. E., T. L. Farbrot, A. L. Huse og R. B. Sund (1993). "Antioxidant and Radical Scavenging Effects of Anthraquinones and Anthrones." Pharmacology **47**: 77-85.

Malterud, K. E., T. Gjøen og A. Rishovd (2004). Procedure for assay of 15-lipoxygenase inhibition. Oslo: Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

- Malterud, K. E. og I. M. Lyckander (1992). "Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* as inhibitors of 15-lipoxygenase." Acta Pharmaceutica Nordica **4**: 159-166.
- Malterud, K. E. og K. M. Rydland (2000). "Inhibitors of 15-lipoxygenase from orange peel." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**: 5576-5580.
- Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert og C. Rémésy (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. 1. Review of 97 bioavailability studies." American Journal of Clinical Nutrition **81**: 230-242.
- McMurry, J. (2000). Organic Chemistry. 5. utg. Pacific Grove, Brooks/Cole.
- Molyneux, P. (2004). "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity." Songklanakarin Journal of Science and Technology **26**: 211-219.
- Mulder, G. J. (2006). Drug metabolism: inactivation and bioactivation of xenobiotics. I: G. J. Mulder og L. Dencker, red.: Pharmaceutical Toxicology. utg. London, Pharmaceutical Press.
- Nelson, D. L. og M. M. Cox (2000). Lehninger principles of biochemistry. 3. utg. New York, Worth Publishers.
- Nie, D. (2007). "Cyclooxygenases and lipoxygenases in prostate and breast cancers." Frontiers in Bioscience **12**: 1574-1585.
- Øyri, A. (1996). Norsk medisinsk ordbok. 4. utg. Oslo, Det norske samlaget.
- Punchard, N. A. og F. J. Kelly, red.(1996). Free radicals. A practical approach. Oxford, Oxford University Press.
- Rahman, K. (2007). "Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors." Clinical Interventions in Aging **2**: 219-236.
- Rang, H. P., M. M. Dale, J. M. Ritter og P. K. Moore (2003). Pharmacology. 5. utg. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- Samuelsson, G. (2004). Drugs of Natural Origin. 5. utg. Kristianstad, Apotekarsocieteten.
- Sau, A. (2004). "Botany and ethnobotany of *Heritiera fomes* Buch.-Ham. (Sterculiaceae)." Journal of Economic and Taxonomic Botany **28**: 653-654.
- Schneider, I. og F. Bucar (2005). "Lipoxygenase Inhibitors from Natural Plant Sources. Part 2: Medicinal Plants with Inhibitory Activity on Arachidonate 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and leukotriene Receptor Antagonists." Phytotherapy Research **19**: 263-272.
- Sirajul Islam, S. (2003). "State of forest genetic resources conservation and management in Bangladesh." <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/ad870e/ad870e00.pdf>, aksessdato: 12.10.2007
- Sokol-Letowska, A., J. Oszmianski og A. Wojdylo (2006). "Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap." Food Chemistry **103**: 853-859.

Takahashi, M., H. Fuchino, M. Satake, Y. Agatsuma og S. Sekita (2004). "*In vitro* screening of leishmanicidal activity in Myanmar timber extracts." Biological & Pharmaceutical Bulletin **27**: 921-925.

Tang, R., C. Ma, J. Dong, X. Liu og X. Liu (2006). "Does adenosine deaminase play a key role in coronary artery disease." Medical Hypotheses **67**: 371-374.

Tomlinson, P. B. (1986). The botany of mangroves. Cambridge, Cambridge University Press.

Tsai, H. H. og S. M. Hwang (1999). "Compositions of matter useful in the treatment of viral infections derived from plant extracts." U.S. Patent 5 989 556.

Wikipedia (2007a). "Sundarbans." <http://en.wikipedia.org/wiki/Sundarban>, aksessdato: 12.10.2007

Wikipedia (2007b). "Aerial root." <http://en.wikipedia.org/wiki/Pneumatophore>, http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/4/42/Mangrove_knees_Yap.jpg (Bilde), aksessdato: 12.10.2007

Williams, D. H. og I. Fleming (1987). Spectroscopic methods in organic chemistry. 4. utg. London, McGraw-Hill Book Company Europe.

Wilson, J. X. og A. W. Gelb (2002). "Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: Possible relationship to cerebral protection by anesthetics." Journal of Neurosurgical Anesthesiology **14**: 66-79.

Xie, D. og R. A. Dixon (2005). "Proanthocyanidin biosynthesis - still more questions than answers?" Phytochemistry **66**: 2127-2144.