



HOVEDFAGSOPPGAVE I FARMAKOGNOSI
FOR GRADEN CAND. PHARM.

**RADIKALFANGERE OG ANTIOKSIDANTER
I SMALKJEMPE
(*PLANTAGO LANCEOLATA* L.)**

Av
Marit Solås

Avdeling for farmakognosi
Farmasøytisk institutt
Universitetet i Oslo

2003

FORORD

Denne oppgaven er utført ved Avdeling for farmakognosi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Jeg vil takke alle på avdelingen for en hyggelig tid under hovedfaget, og bibliotekarene for god hjelp med litteraturen. Spesielt vil jeg takke min hovedveileder, professor Karl Egil Malterud, for eminent veiledning og god oppfølging.

En takk rettes også til familie og venner for deres tålmodighet og støtte underveis.

Oslo, august 2003

Marit Solås

INNHOLDSFORTEGNELSE

1 SAMMENDRAG	1
2 HENSIKT MED OPPGAVEN	2
3 BAKGRUNN	3
3.1 Tidligere undersøkelser av <i>Plantago lanceolata</i> L.	3
3.1.1 Botaniske forhold	3
3.1.2 Tidligere bruk og biologisk aktivitet	3
3.1.3 Tidligere funn av innholds-/virkestoffer	4
3.2 Antioksidanter og frie radikaler	13
3.2.1 Radikaler og reaktive oksygenforbindelser (ROS)	14
3.2.2 Peroksidasjon av lipider	17
3.2.3 Kroppens forsvarssystem og antioksidanters virkningsmekanisme	19
3.2.4 ROS-relaterte sykdommer og aldring	21
3.3 Arakidonsyremetabolismen og 15-lipoksygenase	24
3.4 Flavonoider, fenyletanoider og iridoier	26
3.4.1 Flavonoider	26
3.4.2 Fenyletanoidglykosider	27
3.4.3 Iridoier	27
3.5 Testmetoder	28
3.5.1 DPPH-test, radikalscavengeraktivitet	28
3.5.2 Modulering av 15-lipoksygenase	29
3.5.3 Hemming av jernindusert, ikke-enzymatisk peroksidasjon av fosfolipider fra grisehjerne (TBA-test)	30
3.6 NMR-spektroskopi	32
4 EKSPERIMENTELT	34
4.1 Radikalscavenging; DPPH-test	34
4.1.1 Løsninger og reagenser	34
4.1.2 Utførelse	34
4.2 Modulering av enzymet 15-lipoksygenase	35
4.2.1 Løsninger og reagenser	35
4.2.2 Utførelse	35
4.2.3 Kontrollforsøk ved tilsynelatende aktivering	36
4.3 Hemming av jernindusert, ikke-enzymatisk peroksidasjon av fosfolipider fra grisehjerne	37
4.3.1 Isolering av fosfolipider	37
4.3.2 Løsninger og reagenser	37
4.3.3 Utførelse	38
4.3.4 Kontrollforsøk med butanol fase (B) 20 mg/mL og 10 mg/mL	38
4.4 Tynnsjikt-kromatografi (TLC) av F-serien og S5	38
4.5 Ekstraksjon av plantematerialet	39
4.6 Fraksjonering av råekstraktet	39

4.7	Fraksjonering av råfraksjoner	40
4.7.1	Fraksjonering av etylacetatfasen, råfraksjon A	40
4.7.2	Fraksjonering av butanolfasen, råfraksjon B	40
4.8	Fraksjonering av underfraksjoner	41
4.8.1	Fraksjonering av B3 + B4 (sammenslått)	41
4.8.2	Fraksjonering av S4	42
4.8.3	Fraksjonering av S11	42
5	RESULTATER	44
5.1	Beregninger	44
5.2	Råekstrakt	44
5.3	Råfraksjoner	45
5.4	Underfraksjoner av A (etylacetatfraksjon)	49
5.5	Underfraksjoner av B (n-butanolfraksjon)	50
5.6	S-serien (underfraksjoner av B3 + B4)	52
5.7	M-serien (underfraksjoner av S4)	57
5.8	F-serien (underfraksjoner av S11)	59
5.9	Tynnsjiktromatografi (TLC) av F-serien og S5	60
6	DISKUSJON	61
6.1	Ekstraksjon og fraksjonering	61
6.1.1	Ekstraksjon	61
6.1.2	Fraksjonering av råfraksjon A (etylacetatfraksjon)	62
6.1.3	Fraksjonering av råfraksjon B (n-butanolfraksjon) og underfraksjoner	62
6.2	Tolkning av NMR-spektre	64
6.2.1	Råekstrakt	64
6.2.2	Råfraksjoner	64
6.2.3	Underfraksjoner av A	65
6.2.4	Underfraksjoner av B	69
6.2.5	S-serien	69
6.2.6	M-serien	71
6.2.7	F-serien	72
6.3	Radikalscavenging; DPPH-test	73
6.3.1	Aktiviteten av fraksjonene	74
6.4	Modulering av enzymet 15-lipoksygenase	75
6.4.1	Aktiviteten av fraksjonene	75
6.5	Hemming av jernindusert, ikke-enzymatisk peroksidasjon av fosfolipider fra grisehjerne	76
7	KONKLUSJON	77
7.1	Forslag til videre arbeid	77
	LITTERATURLISTE	78

VEDLEGG A Flytskjema 1 og 2	A-1
VEDLEGG B Utstyr og kjemikalier	B-1
VEDLEGG C NMR-spektre	C-1

1 SAMMENDRAG

Smalkjempe, *Plantaginis lanceolatae herba*, ble ekstrahert med 80 % etanol. Det resulterende råekstraktet (99 g, 40 % utbytte) ble suspendert i vann og fraksjonert ved væske-væske-ekstraksjon med en serie organiske løsemidler (eter, etylacetat og n-butanol). Dette ga fire råfraksjoner (E, A, B og V), hvorav to (A og B) viste klart størst radikalscavengeraktivitet (se under), og disse to ble separert videre med kolonnekromatografi. Enkelte av underfraksjonene ble også separert med kolonnekromatografi. Diaion[®] HP-20, Sephadex[®] LH-20 og MCI-gel CHP20P ble benyttet som kolonne-materiale. Alle fraksjonene ble testet spektrofotometrisk for radikalscavengeraktivitet overfor DPPH-radikalet (1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl). I tillegg ble noen fraksjoner testet for evne til å hemme 15-lipoksygenase (et enzym i arakidonsyremetabolismen) og eventuelt for antioksidativ effekt på ikke-enzymatisk, jernindusert peroksidasjon av fosfolipider fra grisehjerne. Innholdet i fraksjonene ble forsøkt utredet ved hjelp av NMR-spektroskopi (kjernemagnetisk resonans).

Råekstraktet viste konsentrasjonsavhengig radikalscavengeraktivitet, med $IC_{50} = 148 \pm 20 \mu\text{g/mL}$. Råfraksjonene A og B var mest aktive som radikalfangere (IC_{50} -verdi henholdsvis $26 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ og $27 \pm 2 \mu\text{g/mL}$), mens råfraksjonene E og V var lite aktive. Ingen av hovedfraksjonene hemmet enzymet 15-lipoksygenase, men de testede underfraksjonene S4, S7 og S11 (fra råfraksjon B) viste 15-lipoksygenasehemming. IC_{50} -verdiene for S4, S7 og S11 var henholdsvis $106 \pm 5 \mu\text{g/mL}$, $124 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ og $71 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ i dette forsøket. Råfraksjonene A og B hemmet også jernindusert oksidasjon av fosfolipider fra grisehjerne, med IC_{50} -verdier på henholdsvis $0,76 \pm 0,07 \text{ mg/mL}$ og $1,6 \pm 0,9 \text{ mg/mL}$.

Fraksjon S7 bestod av tilnærmet ren verbascosid, et fenyletanoid som også tidligere er påvist i smalkjempe. Denne forbindelsen dominerte også flere av de øvrige underfraksjonene, og stod sannsynligvis for en betydelig andel av radikalscavengeraktiviteten. Imidlertid bidro også andre, uidentifiserte forbindelser til denne aktiviteten, og ikke minst til lipoksygenasehemmingen, der fraksjonene S4 og S11, som inneholdt mindre verbascosid, var mer aktive enn S7. IC_{50} -verdiene for de mest aktive underfraksjonene i DPPH-testen er angitt i tabell 1.

Tabell 1: DPPH-scavenging; IC_{50} -verdier for underfraksjoner

Fraksjon	Konsentrasjon (IC_{50})
S4	$10,9 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$
S7	$8,8 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$
S11	$7,3 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$
M3	$10,7 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$
F4	$4,4 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$

M3 er en underfraksjon av S4, og F4 er en underfraksjon av S11.

For øvrig ble fenyletanoidene isoverbascosid og plantamajosid antatt å foreligge i hver sin underfraksjon (henholdsvis S9 og S5), om enn ikke i ren form. Begge disse forbindelsene er også påvist i smalkjempe tidligere. Det så dessuten ut til at noen underfraksjoner kunne inneholde metoksyler(e) flavonoid(er), og slike forbindelser er tilsynelatende ikke tidligere rapportert i *Plantago lanceolata*.

2 HENSIKT MED OPPGAVEN

Hensikten med oppgaven var å undersøke smalkjempe, *Plantaginis lanceolatae herba*, med hensyn til antioksidant- og radikalfangeraktiviteter, eventuelt også lipoksygenasehemming, og om mulig å påvise og isolere eventuelle virksomme stoffer.

3 BAKGRUNN

3.1 Tidligere undersøkelser av *Plantago lanceolata* L.

3.1.1 Botaniske forhold

- Familie; Plantaginaceae
- Slekt; *Plantago*
- Art; *lanceolata* (L.)

Omtrentlig høyde; 2-5 dm

Beskrivelse: Flerårig urt med en basal rosett av lansettlignende blader. Bladene har flere (3 – 7) tydelig markerte parallelle nerver. Stengelen er femkantet og lodden. Arten blomstrer i mai – september, avhengig av voksested (mai – juli i Norge), med uanselige blomster som sitter samlet i et kort aks. Kronbladene er fireflikete og hvitaktige med brune midtnerver. Frøene utsondrer slim i væske.

Utbredelse: Tørre enger, i Norge særlig langs kysten til Tromsø. På Østlandet til Fåberg. I Sverige vanlig opp til søndre Norrland, men forekommer også sparsomt lenger nord. Ellers vidt utbredt i Europa og Asia (Blumenthal & al. 2000). Forekommer først og fremst i Mellom-Europa, sjeldnere i Nord- og Sentral-Asia, Nord- og Sør-Afrika, i Nord-, Mellom- og Sør-Amerika, samt i New Zealand og Australia (Marchesan & al. 1998, Wegener og Kraft 1999). (Berg 1970, Blumenthal & al. 2000, Anderberg & Anderberg 2002)

3.1.2 Tidligere bruk og biologisk aktivitet

Smalkjempe har blitt brukt i europeisk medisin siden antikken som et diuretisk, antiinflammatorisk og antiastmatisk middel. (Murai & al. 1995, Blumenthal & al. 2000) I assyriske medisin ble plantagoarter brukt mot hevelser. I middelalderen ble planten brukt som styptikum, ved brannså, mot betente sår/verkebyller, etter hundebitt og ved såre føtter. (Marchesan & al. 1998)

Smalkjempe blir brukt innvortes som hostedempende i forbindelse med bronkitt, forkjølelse og øvre luftveisinflammasjon. Flere antitussive og ekspektorerende midler har smalkjempe som en komponent. (Kraft 1998, Marchesan & al. 1998, Wegener & Kraft 1999, Blumenthal & al. 2000) Det finnes få kliniske data, men forskningsresultater bekrefter for eksempel antiinflammatorisk, antimikrobiell, spasmolytisk og immunstimulerende virkning. (Kraft 1998, Wegener og Kraft 1999) Det er gjort studier på mennesker om bruk av planten ved kronisk bronkitt og av dens diuretiske effekt. (Blumenthal & al. 2000) Wegener og Kraft (1999) konkluderer med at smalkjempe kan anbefales ved irritasjonshoste, også til barn.

Planten brukes også utvortes som antiflogistisk, antibakterielt og adstringerende middel for å redusere hudinflammasjon, til hjelp ved sårtilheling og på myggstikk for å unngå pusteldannelse og rødhet. (Willuhn 1995, Kraft 1998, Marchesan & al. 1998, Blumenthal & al. 2000)

Den tyske Kommission E (under Bundesgesundheitsamt) har godkjent kjempe ("plantain"; *P. lanceolata* og *P. major*) til bruk innvortes ved luftveiskatarr og inflammatoriske forandringer av slimhinner i munn og svelg (oral + faryngal mucosa). Utvortes gjelder godkjenningen bruk ved inflammatoriske reaksjoner i huden. Kommission E har rapportert astringerende og antibakteriell aktivitet. *In vitro* bakteriostatisk og baktericid aktivitet er vist for kaldt vandig ekstrakt. Denne virkningen ødelegges imidlertid av varme, så det kalde maseratet brukes som rensevann, gurglevann og/eller grøtomslag (kataplasma) for antibakteriell effekt. (Blumenthal & al. 2000) Ukontrollerte eller kontrollerte studier som beviser virkning(er) foreligger ennå ikke, så bruken av smalkjempeurt-preparasjoner beror hittil på den tradisjonelle erfaringen og anbefalingene i monografien og markedsføringstillatelsen. (Wegener & Kraft 1999)

Farmakologiske virkninger:

In vitro og tildels også *in vivo* er det påvist blant annet antiinflammatoriske, antibakterielle (pressafter og vandige ekstrakter) og immunstimulerende (polysakkarider/vandig bladekstrakt) virkninger både for smalkjempe-ekstrakt ("Spitzwegerich-Gesamtextrakt") og for enkelte innholdsstoffer (se pkt. 3.1.3 under). Disse effektene er åpenbart det farmakologiske grunnlaget for den tradisjonelle bruken. (Marchesan & al. 1998, Paper & Marchesan 1999, Wegener & Kraft 1999) Det er dessuten rapportert fremskyndelse av blodkoagulasjonen og epiteliserende virkning av vandige ekstrakter. Det er mulig at ekstrakter av smalkjempe kan redusere den toksiske virkningen av cytostatika. Det er rapportert antitoksisk virkning av en press-saft fra *P. lanceolata* på de skadelige virkningene av 5-fluorouracil på tynntarmmucosa i mus med Ehrlich-tumorer. (Paper & Marchesan 1999, Wegener & Kraft 1999) I laboratorietester har kjempe (*P. lanceolata* og *P. major*) redusert plasmalipid-, kolesterol-, β -lipoprotein- og triglyserid-konsentrasjoner i kaniner med aterosklerose. Dessuten økte kjempe tonus i isolerte glatte muskler fra marsvin- og kaninlivmor. (Blumenthal & al. 2000) Et etanolekstrakt av smalkjempeurt virket *spasmolytisk* på isolert marsvinileum og -trakea, mens en eldre undersøkelse fortalte om *spasmogene* virkninger. (Wegener & Kraft 1999) Det er også rapportert at vevsresponsiviteten overfor insulin ble økt av kjempe ("plantain")-diett hos sauer. (Tamura & Nishibe 2002)

Anmerkninger om *Plantago major* (groblad):

På grunn av sammenlignbarheten av innholdstoffspektrene til *Plantaginis majoris herba* og smalkjempeurt, nevnes her at også for et vandig ekstrakt av groblad-urt ble spasmolytiske virkninger påvist på marsvintrakea kontrahert med ulike agonister. I forskjellige modeller, for eksempel karrageenan-indusert rottepoteødemtest, ble antiinflammatoriske virkninger observert. Det er dessuten rapportert om lipidsenkende virkninger. Det foreligger i tillegg data om klinisk anvendelse av preparasjoner av *Plantaginis majoris herba*, og effektive virkninger ved bronkitt ble observert. Bivirkninger opptrådte ikke under behandlingen. (Wegener & Kraft 1999)

3.1.3 Tidligere funn av innholds-/virkestoffer

Iridoidglykosider, blad- og frøslimstoffer og fenolkarbonsyrer er typisk for slekten *Plantago*. For drogen *Plantaginis lanceolatae herba* er følgende innholdsstoffer beskrevet (Wegener & Kraft 1999):

- Iridoidglykosider;

Kvalitativt godt drogemateriale inneholder inntil 2,4 % iridoidglykosider, ifølge Wegener & Kraft (1999). Rischer & al. (1998) rapporterer om ca. 1 – 4 % (av drogens tørrvekt) iridoidglykosider i forskjellige ekstrakter av *Plantago lanceolata* L. Hittil er fem ulike iridoidglykosider påvist. (Marchesan & al. 1998) De mengdemessig viktigste er **aucubin** [0,5 – 1,6 % ifølge Bräutigam & Franz (1985), 1 – 3 % i tørket droge ifølge Marchesan & al. (1998), Rischer & al. (1998) og Paper & Marchesan (1999)] og **catalpol** [0 – 1 % i tørket droge ifølge Marchesan & al. (1998), Rischer & al. (1998) og Paper & Marchesan (1999)]. I tillegg er mindre mengder av **asperulosid**, **globularin** [= 10-cinnamoylcatalpol (Rønsted & al. 2000)] og **metylesteren av desacetylasperulosid-syre** påvist. (Handjieva & al. 1991, Marchesan & al. 1998, Paper & Marchesan 1999, Wegener & Kraft 1999, Rønsted & al. 2000) De absolutte mengdene er avhengige av bladenes alder, mest i de yngste bladene (opptil 9 % iridoidglykosider). Yngre blader inneholder overveiende catalpol, mens eldre har mest av aucubin. Ved utilstrekkelig eller for langsom tørking av den friske drogen, kan iridoidglykosidene spaltes av β -glukosidase, med påfølgende polymerisasjon av aglykonet. Dette fører til en mørkebrun farge. (Rischer & al. 1998, Wegener & Kraft 1999)

- Slimpolysakkarider;

Drogen inneholder omtrent 2 – 6,5 % slim med følgende sammensetning: 30 – 35 % **galakturonsyre**, 28 – 44 % **galaktose**, 20 – 32 % **arabinose**, 6 – 7 % **glukuronsyre**, 6 – 9 % **glukose**, 4 – 7 % **rhamnose**, 2 – 4 % **mannose**, samt små mengder **fukose** og **xylose**. I polysakkaridfraksjonen er et arabinogalaktan, et glukomannan, et rhamnogalakturonan med en arabinogalaktan-sidekjede, et rhamnoarabinogalaktan og et (1-6)- α -D-glukan identifisert. (Marchesan & al. 1998, Wegener & Kraft 1999)

- Fenylpropanderivater og produkter av disse;

Ved siden av **kaffesyre** og kaffesyrederivatene **klorogen-** og **neoklorogensyre** er **para-hydroksybenzosyre**, **ferulasyre**, **protokatechusyre** og **gentisinsyre** påvist. I tillegg er fem fenyletanoider, alle kaffesyreestere med glukose, isolert; som hovedkomponent **verbascosid** (= acteosid) (3 – 8 %), dessuten **cistanosid F**, **lavandulifoliosid**, **plantamajosid** [ca. 1 % ifølge Marchesan & al. (1998)] og **isoverbascosid** (= isoacteosid). (Murai & al. 1995, Marchesan & al. 1998, Paper & Marchesan 1999, Wegener & Kraft 1999, Rønsted & al. 2000) Kumarinet **aesculetin** er også påvist. (Marchesan & al. 1998, Paper & Marchesan 1999, Wegener & Kraft 1999) Verbascosid er funnet både i rot og blader, mens plantamajosid er påvist i blader fra *Plantago lanceolata*. (Jiménez & Riguera 1994)

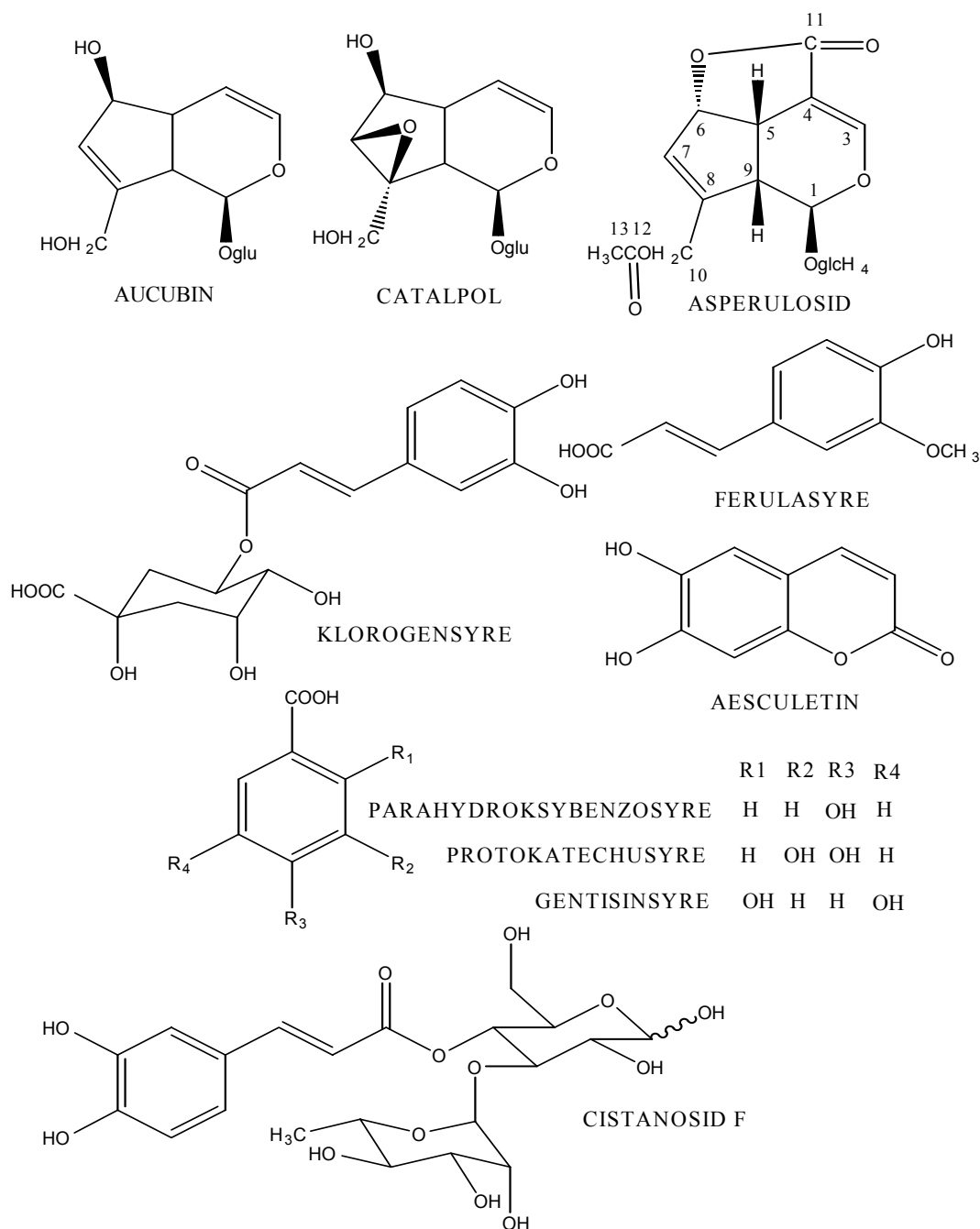
- Flavonoider;

Bladene inneholder aglykonene **apigenin** og **luteolin** samt glykosider av disse; apigenin-7-O-glukosid, apigenin-6,8-di-C-glukosid, apigenin-7-O-glukuronid, luteolin-7-O-glukosid, luteolin-7-O-glukuronid, luteolin-7-O-glukuronid-3'-O-glukosid, samt 7-O-glukuronylglukosidet av apigenin og luteolin. (Háznagy & al. 1976, Kawashty & al. 1994, Marchesan & al. 1998, Paper & Marchesan 1999, Wegener & Kraft 1999) Kawashty & al. (1994) angir luteolin-7-glukuronid og apigenin-6,8-di-C-glukosid som hovedflavonoidene i *P. lanceolata*, mens luteolin-7-glukosid og luteolin-7-glukuronid-3'-glukosid også er sterkt til stede.

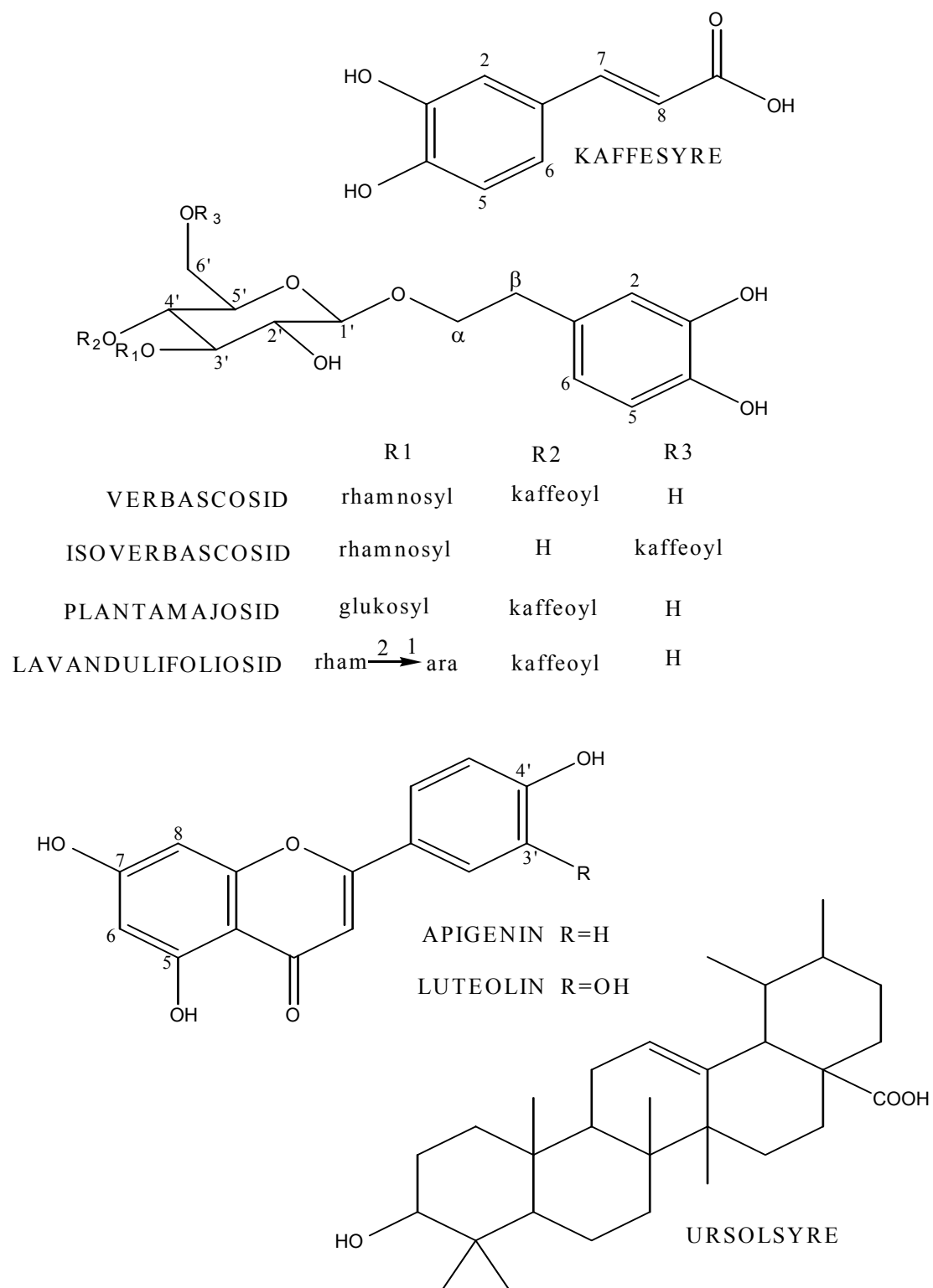
- Øvrige innholdsstoffer;

Videre inneholder drogen omtrent 6,5 % **garvestoffer**, 2,1 % **sorbitol**

(Marchesan & al. 1998), små mengder av et **saponin**, **kiselsyre** (> 1 % ifølge Wegener & Kraft 1999, 1,35 % ifølge Bräutigam & Franz 1985 og Marchesan & al. 1998), **vitamin C**, triterpenet **ursolsyre**, **nikotinsyre**, **heksitol** (Bräutigam & Franz 1985), **loliolid (digiprolakton)** (Marchesan & al. 1998, Paper & Marchesan 1999) samt mineraler, spesielt en høy andel **sink** og **kalium**. (Bräutigam & Franz 1985, Wegener & Kraft 1999)



Figur 3.1-A Strukturer for noen innholdsstoffer i *Plantago lanceolata*



Figur 3.1-B Struktur for noen innholdsstoffer i *Plantago lanceolata*

Farmakologiske virkninger av AUCUBIN og CATALPOL (iridoidglykosider)

- Antibakteriell:

Aucubin spaltes av β -glukosidase til glukose og **aucubigenin** (aglykonet til aucubin). Aucubigenin er svært ustabil, men later likevel til å være ansvarlig for den påviste *in vitro* antibakterielle aktiviteten til smalkjempeekstrakter. (Marchesan & al. 1998, Rischer & al. 1998, Paper & Marchesan 1999) Dette støttes av at vandige ekstrakter der β -glukosidase inaktiveres ved koking, er uvirksomme. Det er rapportert at en 2 % vandig aucubinløsning tilsatt β -glukosidase viste antibakteriell virkning mot 20 ulike bakteriestammer, herunder grampositive og gramnegative, patogene og apatogene kimer. (Paper & Marchesan 1999) Rischer & al. (1998) angir at 1 mL av en 2 % løsning av aucubin kombinert med β -glukosidase har samme aktivitet mot *Staphylococcus aureus* som 600 IE penicillin. Davini & al. (1986) fant at aucubigenin hadde antimikrobiell aktivitet mot muggsopper, men ikke mot gjær. Det er tydelig at hydrolyse til aucubigenin er en forutsetning for den antibakterielle virkningen av aucubin, da aucubin, og også polymerer av aucubigenin, ikke er antibakterielt virksomme. Aucubinfri pressaft og ekstrakt av *Plantago* er uten antibakteriell virkning. (Wegener & Kraft 1999)

- Antihepatotoksisk:

Aucubin viser i dyr en sterk leverbeskyttende effekt mot karbontetraklorid (CCl_4)-indusert hepatitt. (Marchesan & al. 1998, Paper & Marchesan 1999, Wegener & Kraft 1999) **Aucubin** viser også beskyttende aktivitet mot α -amanitinforgiftning i mus (Chang & Yamaura 1993, Marchesan & al. 1998, Tamura & Nishibe 2002) og beaglehunder. (Chang & Yamaura 1993) Denne beskyttelsen skyldes delvis en beskyttende effekt av aucubin overfor nedgangen i mRNA-biosyntese i leveren pga. α -amanitin-forgiftning. (Chang & Yamaura 1993) En kompetitiv fortrenningsmekanisme for aucubin og giftstoffene i den hepatiske mRNA-biosyntesen ble foreslått som forklaring på leverbeskyttelsen mot henholdsvis CCl_4 - og α -amanitin-forgiftning. (Wegener & Kraft 1999) Også Suh & al. (1991) opplyser at aucubin (80 mg/kg intraperitonealt) beskytter mot leverskade indusert av CCl_4 eller α -amanitin i mus og rotter, dessuten at aucubin hemmer syntesen av RNA og proteiner i muselever. I tillegg er choleretisk¹ effekt rapportert. (Suh & al. 1991) **Catalpol** (6 mg/kg kroppsvekt per dag) i.p. førte i mus som mottok tioacetamid subkutant (s.c.), til normalisering av de tidligere patologiske leververdiene. (Wegener & Kraft 1999)

- Antiinflammatorisk:

Aucubin har i doser på 100 mg/kg p.o. vist antiinflammatorisk effekt ved karra-geenan-indusert muse-/rottepotteødem. I motsetning til aucubin viste **catalpol** ingen entydig virkning. Ved TPA (12-O-tetradecanoylphorbolacetat)-indusert øreødem i mus bevirket aucubin (1 mg/øre topikalt) en hemming av øreødemet på 80 %. Med samme dose viste catalpol en hemming på kun 20 %. Indometacin (0,5 mg/øre) ga til sammenligning 87 % hemming av ødemet. (Recio & al. 1994, Marchesan & al. 1998, Paper & Marchesan 1999, Wegener & Kraft 1999)

- Spasmolytisk:

Aucubin og **catalpol** har god spasmolytisk aktivitet. Peracetyllert hemmer disse iridoidglykosidene *in vitro* kontraksjon av uterusmuskulatur fra rotte. (Ortiz de Urbina & al. 1994, Paper & Marchesan 1999, Wegener & Kraft 1999)

¹ **choleretisk:** som øker galledannelsen i leveren (Øyri 1996)

- Antiviral:

Aucubin hemmer *in vitro* DNA-replikasjonen til hepatitt-B-virus. Også her fungerer aucubin med stor sannsynlighet som prodrug, da aucubin selv ikke innehar noen antiviral aktivitet. Den virksomme formen er **aucubigenin** (kfr. "Antibakteriell" over). **Catalpol** viser god aktivitet mot hepatitt-B-virusantigener (HbsAg) i HbsAg-positivt serum. (Paper & Marchesan 1999)

- Immunstimulerende:

Intraperitonealt administrert **catalpol** viste immunstimulerende virkning hos mus, målt bl. a. ved makrofagaktivering ("macrophage migration index") og "plaque forming cell (PFC) assay". (Wegener & Kraft 1999)

- Diuretisk:

Catalpol antas vanligvis å være det viktigste diuretiske prinsipp i frukt fra *Catalpa ovata* G. Don. (Tamura & Nishibe 2002)

- **Aucubin** stimulerer fjerning av urinsyre fra vev over i blodet, samt utskillelse av urinsyre fra nyrene. (Tamura & Nishibe 2002)

- Farmakokinetikk:

En farmakokinetisk studie av **aucubin** i rotter anga halveringstiden i post-distributiv fase ($t_{1/2,\beta}$) til 42,5 minutter. Biotilgjengeligheten av aucubin (100 mg/kg) peroralt (p.o.) var 19,3 %. (Se for øvrig Suh & al. 1991.)

Farmakologiske virkninger av VERBASCOSID (= acteosid) (og isoverbascosid) (fenyletanoid(er))

Verbascosid er påvist i 20 plantefamilier (>200 plantearter) hittil, og har flere farmakologiske aktiviteter. (Deepak & al. 1999)

- Antihepatotoksisk:

Verbascosid innehar svært gode antihepatotoksiske (Jiménez & Riguera 1994, Deepak & al. 1999) egenskaper *in vivo*. I en konsentrasjon på 200 μ M hemmer verbascosid CCl₄-indusert aminotransferase-aspartat-frisetting fra rottelever opptil 82 %. Denne virkningen forsterkes gjennom at verbascosid forhindrer skadene av NADPH/CCl₄-indusert lipidperoksidasjon i levermikrosomer isolert fra rotte ($IC_{50} = 3,8 \mu$ M). Effekten her er sterkere enn de kjente antioksidantene α -tokoferol ($IC_{50} \geq 1$ mM) og kaffesyre ($IC_{50} = 116,4 \mu$ M). (Paper & Marchesan 1999) Verbascosid har også en anti-inflammatorisk effekt mot D-galaktosamin/ lipopolysakkarid-indusert hepatitt i mus. (Xiong & al. 2000) (Se også under "Antiinflammatorisk" under.)

- Kardiovaskulær:

Verbascosid viste antihypertensive egenskaper (Jiménez & Riguera 1994) ved en dose på 10 mg/kg gitt til rotter. (Paper & Marchesan 1999) Struktur-aktivitet-forhold-studier indikerte at aromatiske OH-grupper var nødvendig for den hypotensive virkningen av forbindelsen. Relativt nylig er også stimulatoriske kardiovaskulære effekter av verbascosid i isolert rottehjerte observert, så som økt hjerterate, kontraksjonskraft og økning i koronar perfusjonsrate. (Deepak & al. 1999)

- Antiinflammatorisk:

Verbascosid har vist både antiinflammatorisk og analgetisk aktivitet. (Jiménez & Riguera 1994, Deepak & al. 1999) Forbindelsen hemmer dannelsen av 5-hydroksy-6,8,11,14-eikosatetraensyre (5-HETE) (Jiménez & Riguera 1994) ($IC_{50} = 4,85 \mu M$) og leukotrien B₄ (LTB₄), ($IC_{50} = 2,93 \mu M$) som begge er sterkt delaktige i betennelsesprosesser. Derfor kan inhibisjon av produksjonen av disse forbindelsene fremkalle en antiinflammatorisk virkning. Dannelsen av 5-HETE og LTB₄ skjer gjennom enzymet 5-lipoksygenase (5-LO) (se også pkt. 3.3, s. 24), som synes å bli hemmet av verbascosid. (Marchesan & al. 1998, Deepak & al. 1999, Paper & Marchesan 1999) Verbascosid har også inhibitoriske effekter *in vitro* på 5-LO ($IC_{50} = 1,36 \mu M$ med 5-LO fra RBL-1-celler) (Ravn & al. 1990, Murai & al. 1995, Wegener & Kraft 1999), cAMP-fosfodiesterase ($IC_{50} > 5 \times 10^{-4} M$) (Ravn & al. 1990, Murai & al. 1995, Marchesan & al. 1998, Wegener & Kraft 1999) og (linse-) aldose reduktase² ($IC_{50} = 1,51 \times 10^{-5} M$). (Ravn & al. 1990, Jiménez & Riguera 1994, Deepak & al. 1999, Marchesan & al. 1998)

Denne antiinflammatoriske virkningen er også delvis bekreftet *in vivo*. Eksempelvis reduserer verbascosid dannelsen av arakidonsyreindusert øreødem hos mus. (Murai & al. 1995, Marchesan & al. 1998, Paper & Marchesan 1999, Wegener & Kraft 1999, Xiong & al. 2000, Tamura & Nishibe 2002) Imidlertid virker ikke verbascosid spesielt aktivt i denne modellen; med en topikal dose på 3 mg/øre ble ødemet bare hemmet 14 %. (Murai & al. 1995, Paper & Marchesan 1999, Wegener & Kraft 1999) Verbascosid har heller ikke vist signifikant effekt på biosyntese av TXA₂ indusert ved inkubasjon av arakidonsyre med blodplatemikrosomer fra hest. Fravær av cyklo-oksigenase-hemming kan være en faktor som bidrar til at verbascosid *in vivo* ikke hemmer arakidonsyreindusert museøreødem signifikant. (Deepak & al. 1999) Deepak & al. (1999) opplyser også at verbascosid ikke utøver signifikant hemming av karrageenanindusert pote-inflamasjon, mens Paper & Marchesan (1999) rapporterer at verbascosid (p.o.) reduserte karrageenanindusert rottepotteødem etter fire timer opptil 93 %. Andre undersøkelser av verbascosids antiinflammatoriske aktivitet viser at verbascosid *in vivo* senker infiltrasjonen av leukocytter i nefrittiske glomeruli hos rotter. (Marchesan & al. 1998, Deepak & al. 1999) I tillegg reduseres proliferasjonen av humane leukocytter *in vitro*. Denne immunsuppressive aktiviteten (Jiménez & Riguera 1994, Murai & al. 1995, Deepak & al. 1999) ble bekreftet med HPFC-assay ("hemolytic plaque-forming cells"). (Marchesan & al. 1998, Paper & Marchesan 1999) Verbascosid senker også den immunologiske responsen i humane leukocytter *in vitro*. (Marchesan & al. 1998)

Både verbascosid (Pan & Hori 1996, Paper & Marchesan 1999, Tamura & Nishibe 2002) og de fleste andre fenyletanoider har også interessante **antioksidative** egenskaper. (Jiménez & Riguera 1994) *In vitro* ble antioksidative virkninger i mitokondrier (rottehepatocytter) beskrevet for **verbascosid**. (Wegener & Kraft 1999) Verbascosid (og **cistanosid F** (Pan & Hori 1996)) hemmer doseavhengig den Fe²⁺/ADP-induserte lipidperoksidasjonen av mitokondrie- og liposomlipider fra rottelever (Pan & Hori 1996, Marchesan & al. 1998, Deepak & al. 1999, Paper & Marchesan 1999), samt (for verbascosid) peroksidasjon av muselevermikrosomer og autooksidasjon av linolsyre i miceller. (Deepak & al. 1999) Radikalfangeraktivitetene overfor DPPH (se under) til verbascosid og cistanosid F fulgte ikke deres antiperoksidative aktiviteter og deres evne til å beskytte mot at GSH (redusert glutation) ble oppbrukt under lipidperoksidasjon. Pan & Horis (1996) data stemmer likevel overens med

² **aldose reduktase**: enzym som katalyserer reduksjon av glukose til sorbitol; ved glukoseoverskudd vil økt sorbitol hemme Na⁺K⁺-ATPase, dette kan være en årsak til diabeteskomplikasjoner (Øyri 1996), som katarakt og sekundære neuropatier (Jiménez & Riguera 1994)

tanken om at fenyletanoidenes inhibitoriske aktiviteter hovedsakelig skyldes en radikal-kjede-brytende mekanisme. Sukkerdelene, og/eller konformasjonsstrukturen, til verbascosid og cistanosid F synes også å spille en viktig rolle i deres hemming av lipidperoksidasjon. (Pan & Hori 1996) Verbascosids evne til å danne fysiologisk stabile chelateringskomplekser med Fe^{2+} kan være ansvarlig for *in vivo* lipidperoksidasjonshemmingen. Struktur-aktivitet-forhold-studier har vist at to nærliggende ("adjacent") fenoliske hydroksylgrupper i verbascosid er nødvendig for dets potente hemming av dannelsen av 5-LO-produkter og for dets "scavenging"-virkninger. (Deepak & al. 1999) Den antioksidative virkningen ble bekreftet *in vitro* gjennom hemming av oksidativ hemolyse. (Marchesan & al. 1998, Deepak & al. 1999, Paper & Marchesan 1999)

Den antioksidative aktiviteten av verbascosid underbygges gjennom radikalfangeraktiviteten overfor superoksidanionradikalet ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ("half-scavenging concentration" $\text{SC}_{50} = 0,063 \text{ mM}$) og overfor hydroksylradikalet ($\cdot\text{OH}$) ($\text{SC}_{50} = 0,434 \text{ nM}$) (Marchesan & al. 1998, Deepak & al. 1999, Gao & al. 1999, Paper & Marchesan 1999, Xiong & al. 2000) Også isomeren **isoverbascosid** har sterk radikalfangeraktivitet mot hydroksyl- og superoksidanionradikalene. (Gao & al. 1999) I tillegg kan verbascosid tilbakedanne dGMP som er hydroksylert vha. hydroksylradikal, til dGMP (reparasjonsprosess). (Paper & Marchesan 1999) Det er dessuten påvist potent radikalfangeraktivitet mot DPPH (1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl) (Gao & al. 1999) og nitrogenoksid (NO)-radikalfangeraktivitet (Xiong & al. 2000) for begge isomerene. "Scavenging"-effekten av antioksidanter på DPPH-radikalet antas å skyldes stoffenes hydrogenondonevne. Verbascosid og isoverbascosid har fire fenoliske hydroksylgrupper, og fenoliske antioksidanter anses å fungere som elektron- eller hydrogenondorer. Dermed kan DPPH-radikalfangeraktiviteten til disse forbindelsene først og fremst være relatert til deres fenoliske hydroksylgrupper. (Gao & al. 1999) Økt antall fenolgrupper forsterker også NO-radikalfangeraktiviteten til et molekyl. (Xiong & al. 2000) Superoksidanion-, hydroksyl-, NO-radikal og andre radikaler spiller en viktig rolle i betennelsesprosesser. Den antioksidative aktiviteten til verbascosid og andre fenyletanoider tyder på mulige antiinflammatoriske egenskaper. (Marchesan & al. 1998, Deepak & al. 1999, Paper & Marchesan 1999, Xiong & al. 2000) NO kan utøve cytoprotektive eller cytotoksiske effekter, og har blitt implisert i signaloverføringen av patofysiologien ved IgE-mediert allergisk hudreaksjon, nefritt og hepatitt. Fenyletanoiders interaksjon med NO i aktiverte makrofager spiller muligens en rolle i deres antiinflammatoriske effekter mot arakidonsyreindusert museøreødem, nefritt ("crescentic-type anti-glomerular basement membrane nephritis") hos rotter og D-galaktosamin/lipopolysakkarid-indusert hepatitt hos mus, der signaloverføring av NO er involvert. (Xiong & al. 2000)

- Spasmolytisk:

Verbascosid innehar en spasmolytisk virkning på bradykinin- og histamin-induserte kontraksjoner av isolert marsvinileum. (Paper & Marchesan 1999)

- Antitoksisk:

Verbascosid inhiberer KCN-indusert mortalitet (anoksi) i mus. Denne anti-toksiske aktiviteten kan sannsynligvis tilbakeføres til de antioksidative egenskapene til verbascosid. (Pan & Hori 1996, Deepak & al. 1999, Paper & Marchesan 1999)

- Antibakteriell:

Verbascosid har vist antibakteriell aktivitet (Jiménez & Riguera 1994), antiplasmid-effekter og hemmet kanamycinresistensoverføring i *E. coli*. Men den antibakterielle aktiviteten til verbascosid er svak i forhold til et annet fenylpropanoid, campneosid I, som har metoksylygrupper, som er postulert å være nødvendige for den

antibakterielle aktiviteten. Dette støttes av funnet av signifikant antibakteriell aktivitet for trans-p-metoksy-kaneltsyre sammenlignet med verbascosid. (Deepak & al. 1999)

- Antiviral:

En sterk antiviral (Deepak & al. 1999) virkning av **verbascosid** *in vitro* ble påvist mot "respiratory syncytial virus" ($EC_{50} = 0,8 \mu\text{g/mL}$) og en lettere antiviral effekt mot Aujesky-virus. (Paper & Marchesan 1999)

- Cytotoksisk:

Verbascosid er cytotoxisk/cytostatisk mot forskjellige tumorceller. (Jiménez & Riguera 1994, Deepak & al. 1999, Paper & Marchesan 1999) Oppdagelsen av at verbascosid induserer apoptose i humane promyelocytiske leukocytter er også interessant. (Deepak & al. 1999, Paper & Marchesan 1999) Anticanceraktivitet i *in vitro*-modeller på hepatom 5 MMC 7721, lunge-adenokarsinom L342, magesekk-adenokarsinom MCG 803 cellelinjer og L1210 celler er studert. Verbascosid viste en potent antiproliferativ effekt mot L1210 celler ($IC_{50} = 13 \mu\text{M}$). Stoffet er en sterk hemmer av proteinkinase C (PKC) (IC_{50} i området 20 – 25 μM). Det at forbindelsens cytotoxisitet var moderat til svak på flere cellelinjer sammenlignet med dens potente PKC-inhibisjon tyder på at mekanismen for antitumorvirkningen i hvert fall delvis kan skyldes hemmingen av PKC. Struktur-aktivitet-forhold-studier av fenylpropanoider har vist at fenoliske hydroksylgrupper, spesielt ortodihydroksylgruppene, øker effekten, og metylering av disse gruppene fører til tap av aktivitet. Verbascosids sterke topoisomerase II-hemmende aktivitet er også av interesse med hensyn til virkningsmekanisme. (Deepak & al. 1999)

- Effekt på kollagennettverksdannelse:

Rask dannelse av kollagen i den tidlige fasen av sårtilheling, og resorpsjon av overflødig kollagen i den senere fasen, er påkrevd. M-celler danner kollagenfibrer-nettverk *in vitro*, og Sudo & al. (1999) fant at **verbascosid** fremmet kollagennettverksdannelse i disse cellene. Den stimulatoriske aktiviteten viste seg ved et mer komplekst nettverk av kollagenfibere. Fiberne var tettere fordelt og tynnere, sammenlignet med kontrollen som dannet spredte, ganske tykke fibere. Struktur-aktivitet-forhold-studier indikerte at katekolgruppene i både aglykonet og acyldelen er nødvendige for den biologiske aktiviteten. Verbascosid kan være et effektivt middel for sårtilheling, siden produksjon av detaljerte nettverk med tynne kollagenfibere er fordelaktig for rask granulasjon og for å unngå dannelse av stygge arr som blir resultatet av tykke kollagenfibere.

- Annet:

Verbascosid er også rapportert å ha antinefrittisk (Murai & al. 1995, Deepak & al. 1999, Xiong & al. 2000), antidiabetisk, neuroleptisk og leucin aminopeptidase-hemmende effekt. (Deepak & al. 1999) **Isoverbascosid** har dessuten cytotoxisk, immunsuppressiv og 5-LO-hemmende aktivitet i tillegg til antioksidant-effekten. (Jiménez & Riguera 1994) (Se også under "Antiinflammatorisk" over.)

Farmakologiske virkninger av andre fenyletanoider og fenolkarbonsyrer

- **Plantamajosid** hemmer 5-lipoksygenase (5-LO) (Jiménez & Riguera 1994, Marchesan & al. 1998), $IC_{50} = 3,73 \times 10^{-7}$ M, og cAMP fosfodiesterase, $IC_{50} = 1,60 \times 10^{-4}$ M. (Ravn & al. 1990, Murai & al. 1995, Wegener & Kraft 1999) Topikalt gir plantamajosid hemming av arakidonsyreindusert museøreødem (Murai & al. 1995, Wegener & Kraft 1999), og har i tillegg antibakteriell (Ravn & al. 1990, Jiménez & Riguera 1994) og antioksidant aktivitet. (Jiménez & Riguera 1994)
- **Cistanosid F** reduserer lipidperoksidasjonen. (Se også under Verbascosid, "Anti-inflammatorisk", s. 10.)
- **Kaffesyre** hemmer selektivt 5-LO og utviser antioksidativ aktivitet *in vitro*.
- **Klorogensyre** har antioksidativ aktivitet *in vitro*. (Marchesan & al. 1998)

Andre virkestoffer

- **Immunstimulerende polysakkarider:** *In vitro* bevirker **polysakkaridene** fra smalkjempe en økning av fagocytoseaktiviteten til granulocytter. (Wegener & Kraft 1999)
- **Antimikrobielt saponin:** I bladene ble det i tillegg til aucubin (se s. 8) påvist en liten mengde av et antimikrobielt virksomt **saponin**. (Wegener & Kraft 1999)
- **Antiinflammatoriske garvestoffer:** **Garvestoffer** som finnes i smalkjempe har blant annet almene antiinflammatoriske effekter. Man må gå ut fra at denne fraksjonen, som utgjør opptil 6,5 %, bidrar til den totale virkningen, men det foreligger ingen data om dens kvalitative sammensetning. (Wegener & Kraft 1999)

3.2 Antioksidanter og frie radikaler

En *antioksidant* er en hvilken som helst substans som, i lave konsentrasjoner i forhold til konsentrasjonen av et oksiderbart substrat, signifikant forsinker eller hindrer oksidasjon av substratet. (Halliwell & Gutteridge 1989, Halliwell & al. 1995) En antioksidant kan hindre skadelige effekter av frie radikaler (spesielt oksygenradikaler) og reaktive oksygenforbindelser (ROS, reaktive oksygenspecies). Karotenoider, askorbinsyre (vitamin C), tokoferoler (vitamin E) og flavonoider er viktige antioksidanter. (Blomhoff 1999)

Den sikreste måten å tilføre kroppen de stoffer den trenger for å opprettholde antioksidantforsvaret (se pkt. 3.2.3, s. 19), er gjennom kosten (særlig kornprodukter, frukt og grønnsaker), ikke gjennom piller og preparater. Dette er særlig viktig fordi mange av stoffene det er snakk om, kan opptre som pro-oksideranter dersom de tilføres kroppen i for store mengder. (Strømme 1999) Dessuten kan både askorbat og flere plantefenoler utvise pro-oksiderant-effekter i nærvær av overgangsmetallioner (jern og kobber) *in vitro*, men betydningen av dette *in vivo* er uvis. (Halliwell 1994a)

Det er en tilnærmet balanse mellom dannelse av ROS og antioksidantforsvar, og derfor er det lett å tippe over mot ROS slik at det oppstår oksidativt stress. Oksidativt stress kan forårsakes av at antioksidanter "brukes opp" pga. feil-/underernæring, eller av overdreven produksjon av ROS. Vevsskade fører vanligvis til økt ROS-dannelse og oksidativt stress. I noen tilfeller bidrar det oksidative stresset i betydelig grad til sykdomsaktivitet, blant annet ved reumatoid artritt, aterosklerose, ulcerøs kolitt, neurotraume, familiær dominant form av ALS (amyotrofisk lateralsklerose) og muligens noen andre neurodegenerative sykdommer. (Halliwell 1994a) Det er også mistanke om at oksidativt stress kan være involvert i noen kreftformer. (Turker 2000) (Se også pkt. 3.2.4, s. 21.)

3.2.1 Radikaler og reaktive oksygenforbindelser (ROS)

Et *fritt radikal* er definert som et atom eller molekyl som inneholder et eller flere uparede elektroner (dvs. elektroner som er alene i en orbital), og som har evne til uavhengig eksistens. (Halliwell & Chirico 1993, Halliwell 1994a, Halliwell 1994b, Blomhoff 1999) Tilstedeværelsen av uparede elektroner endrer den kjemiske reaktiviteten til et molekyl slik at det vanligvis blir mer reaktivt enn det tilsvarende ikke-radikalet. Det er imidlertid stor forskjell på de frie radikalenes kjemiske reaktivitet, for eksempel er nitrogenoksid ganske stabilt. (Halliwell 1994b, Blomhoff 1999)

Radikaler kan dannes ved tap av et enkelt elektron fra et ikke-radikal, eller ved tillegg av et enkelt elektron til et ikke-radikal. (Halliwell & Gutteridge 1989) Frie radikaler og andre ROS produseres kontinuerlig *in vivo*, både med hensikt og ved "kjemiske uhell". (Halliwell & Chirico 1993, Halliwell 1994b, Kerr & al. 1996) Derfor har organismer utviklet både antioksidantforsvarssystemer og reparasjonssystemer som forebygger akkumulasjon av oksidativt skadede molekyler. (Halliwell & Chirico 1993, Kerr & al. 1996) (Se også pkt. 3.2.3, s. 19.)

Hvis to radikaler reagerer med hverandre, vil de to uparede elektronene danne et elektronpar (en kovalent binding). De fleste molekylene i kroppen er imidlertid ikke radikaler. Når et fritt radikal reagerer med et molekyl som ikke er et radikal, startes en kjedereaksjon slik at nye radikaler dannes. (Halliwell & Chirico 1993, Halliwell 1994a, Halliwell 1994b, Blomhoff 1999) Frie radikaler kan således ødelegge både proteiner, nukleinsyrer og lipider. Reaksjoner med DNA i cellekjernen kan forårsake mutasjoner og dermed bidra til en transformasjon av cellen. (Halliwell 1994b, Kerr & al. 1996, Blomhoff 1999) Frie radikalers angrep på membraner eller lipoproteiner starter lipidperoksidasjon, som antas å være implisert i utvikling av aterosklerose. (Se pkt. 3.2.2, s. 17, og 3.2.4, s. 21.) (Halliwell 1994b, Kerr & al. 1996)

Noen frie radikaler og ROS har også nyttige roller (Halliwell & Chirico 1993, Halliwell 1994a), blant annet er de involvert i høy-reaktive ferrylspecies i aktive seter på cytochrom P450 og peroksidase-enzymmer, superoksid er involvert i mekanismen for dioksygenaser, og radikaler/ROS inngår i flere enzymatiske reaksjoner, ved fagocytose og eikosanoidsyntese. (Halliwell & Gutteridge 1989) H_2O_2 kan synes å virke som et metabolsk signal under visse omstendigheter, muligens ved å oksidere spesifikke protein-tiolgrupper og utløse intracellulære hendelser. (Halliwell & Chirico 1993)

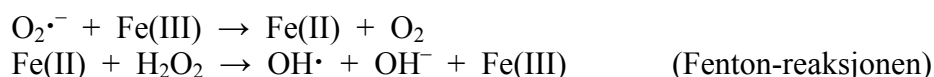
Nedenfor er noen av de antatt viktigste radikaler/ROS som dannes i kroppen beskrevet nærmere.

Hydroksylradikal

Et av de mest reaktive radikalene er *hydroksylradikalet* ($\text{OH}\cdot$). Mennesker utsettes kontinuerlig for stråling fra omgivelsene (f.eks. radon og kosmisk stråling). Slik elektromagnetisk stråling med liten bølgelengde (ioniserende stråling) kan splitte vannmolekyler i kroppen og generere $\text{OH}\cdot$. Dette radikalet reagerer med en diffusjonskontrollert hastighet og vil reagere med nesten alle molekyler i levende celler. (Halliwell & Chirico 1993, Halliwell 1994a, Halliwell 1994b, Halliwell & al. 1995, Kerr & al. 1996, Blomhoff 1999) Derfor vil $\text{OH}\cdot$ som dannes *in vivo* skade hva som helst som er i nærheten, da radikalet ikke rekker å bevege seg over noen betydelig avstand inne i cellen. (Halliwell 1994a) Hydroksylradikal kan også dannes i kroppen ved flere ulike mekanismer, blant annet ved homolytisk fisjon av H_2O_2 [i reaksjon med overgangsmetallioner (Halliwell & Chirico 1993)] og fra $\text{O}_2\cdot^-$. (Halliwell & Gutteridge 1989, Halliwell & al. 1995) På grunn av hydroksylradikalets korte levetid, har ingen spesifikke forsvarssystemer mulighet til å uskadeliggjøre radikalet før det reagerer med et molekyl. Hvis det er en høy konsentrasjon av antioksidanter i området, er det imidlertid en viss sannsynlighet for at radikalet vil reagere med et av disse molekylerne. Likevel er det mer sannsynlig at antioksidantene vil virke ved å fjerne eller blokkere dannelsen av forløperne til $\text{OH}\cdot$. (Halliwell 1994a, Halliwell & al. 1995) (Se også under superoksidradikal.)

Superoksidradikal anion

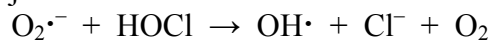
Kroppen lager også *superoksidradikal anion* ($\text{O}_2\cdot^-$), som vanligvis er lite reaktivt. Slike superoksidradikaler dannes som en "bivirkning" av at oksygen brukes i kroppens metabolisme. Det er beregnet at mellom 1 og 3 % av det oksygenet som pustes inn, blir omdannet til slike radikaler. I tillegg dannes superoksidradikaler med hensikt av aktiverte fagocytter (som nøytrofile og eosinofile granulocytter, monocytter og makrofager) for å drepe bakterier og andre mikroorganismer. (Halliwell & Chirico 1993, Halliwell 1994a, Halliwell 1994b, Blomhoff 1999) I mindre grad produseres $\text{O}_2\cdot^-$ også av ulike celletyper som fibroblaster og lymfocytter. (Halliwell & Chirico 1993) Hvis denne produksjonen overstimuleres, som ved sykdom (f.eks. reumatoid artritt eller andre kroniske inflammasjonstilstander), kan cellene imidlertid ødelegge friskt vev. (Halliwell 1994b, Blomhoff 1999) Superoksidradikalet kan være svært reaktivt i organisk miljø, mens det i vandig miljø hovedsakelig virker som et moderat reduksjonsmiddel. Imidlertid kan superoksid reagere veldig raskt med noen få mål-molekyler, bl.a. noen bakterielle jernsvovel-proteiner. Et viktig molekyl i mennesker som reagerer med $\text{O}_2\cdot^-$ er $\text{NO}\cdot$ (se under). (Halliwell 1994a) Overdreven vaskulær superoksidproduksjon kan medføre hypertensjon (ved å fjerne $\text{NO}\cdot$) (Halliwell & Chirico 1993, Halliwell 1994a) og er implisert i utviklingen av aterosklerose. Videre kan $\text{O}_2\cdot^-$ og $\text{NO}\cdot$ (via *peroksynitritt*, ONOO^-) føre til dannelse av flere skadelige produkter, inkludert nitrogendioksid ($\text{NO}_2\cdot$), en kraftig igangsetter av lipidperoksidasjon i biologiske løsninger, $\text{OH}\cdot$ og nitroniumion (NO_2^+), et stoff som er aktivt i nitring av aromatiske ringer, f.eks. i fenylalanin og tyrosin. (Halliwell 1994a, Halliwell & al. 1995) Peroksynitritt er toksisk (Stewart & Heales 2003) og er en kraftfull oksidant av $-\text{SH}$ -grupper. (Halliwell & Chirico 1993, Halliwell & al. 1995) Superoksid kan dessuten omdannes til hydroksylradikal via følgende reaksjon (Haber-Weiss-reaksjonen katalysert av spormengder av jern eller kobber):



Netto: $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$

(Halliwell & Gutteridge 1989, Halliwell & Chirico 1993, Halliwell 1994a, Halliwell & al. 1995)

En tredje mekanisme for $\text{OH}\cdot$ -dannelse er reaksjonen mellom $\text{O}_2^{\cdot-}$ og hypoklorsyring:



(Halliwell 1994a, Halliwell & al. 1995)

Singlet oksygen

Singlet oksygen ($^1\text{O}_2$) er også en reaktiv form av oksygen, men ikke et radikal, da det ikke inneholder uparede elektroner. (Halliwell & Gutteridge 1989) $^1\text{O}_2$ produseres blant annet når visse forbindelser (fotosensitiserende stoffer, f.eks. tetracykliner, vitaminet riboflavin, porfyriner og gallepigmentet bilirubin) belyses i nærvær av oksygen; de absorberer lyset, går inn i en høyere elektron-eksitasjonstilstand og overfører den overflødig energien til oksygen, som dermed omdannes til singlet-formen. (Halliwell & Chirico 1993) Singlet oksygen kan reagere med andre molekyler på to måter; det kan enten forenes kjemisk med dem, eller overføre sin eksitasjonsenergi til dem, slik at oksygenmolekylet går tilbake til grunntilstanden, mens det andre molekylet går inn i en eksitert tilstand. Det sistnevnte kalles "quenching" (*eng.*). De kjemiske reaksjonene med singlet oksygen som er best studert, involverer forbindelser med karbon-karbon kovalente dobbeltbindinger. Forbindelser med konjugerte dobbeltbindinger (to dobbeltbindinger med en enkeltbinding mellom) reagerer ofte til endoperoksider. Dette er av betydning i lipidperoksidasjon. (Se pkt. 3.2.2, s. 17.) (Halliwell & Gutteridge 1989)

Hydrogenperoksid

Mesteparten av $\text{O}_2^{\cdot-}$ som dannes *in vivo* gjennomgår sannsynligvis en ikke-enzymatisk eller SOD (superoksid dismutase)-katalysert dismutasjon (nettoligning; se under pkt. 3.2.3, s. 19). Dette genererer ikke-radikalet *hydrogenperoksid* (H_2O_2), som diffunderer lett i og mellom celler. I tillegg til å dannes fra $\text{O}_2^{\cdot-}$, produseres H_2O_2 av flere oksidase-enzymmer *in vivo*, inkludert aminosyreoksidaser og xantin oksidase. (Halliwell 1994a, Halliwell & al. 1995) Hydrogenperoksid produseres under fotosyntese og under fagocytose. (Halliwell & Gutteridge 1989) H_2O_2 er mye mindre reaktivt enn $\text{OH}\cdot$, men kan ikke anses som helt ufarlig. (Halliwell & Chirico 1993) Det er et svakt oksidasjonsmiddel og kan inaktivere noen få enzymer direkte, vanligvis ved å oksidere essensielle tiol(-SH)-grupper. Inne i cellen kan H_2O_2 sannsynligvis reagere med Fe^{2+} , og muligens Cu^+ , og gi hydroksylradikal (se under superoksidradikal). (Halliwell & Gutteridge 1989) H_2O_2 kan kanskje oppregulere ekspresjonen av visse gener (direkte eller indirekte). I cellekultursystemer kan H_2O_2 indusere den genetiske ekspresjonen av proviruset humant immunsvikt-virus-1 (HIV-1). Dette viruset er den vanligste årsaken til AIDS ("acquired immunodeficiency syndrome"), og ekspresjonen av det kan forhindres av visse antioksidanter. (Halliwell 1994a)

Nitrogenoksid

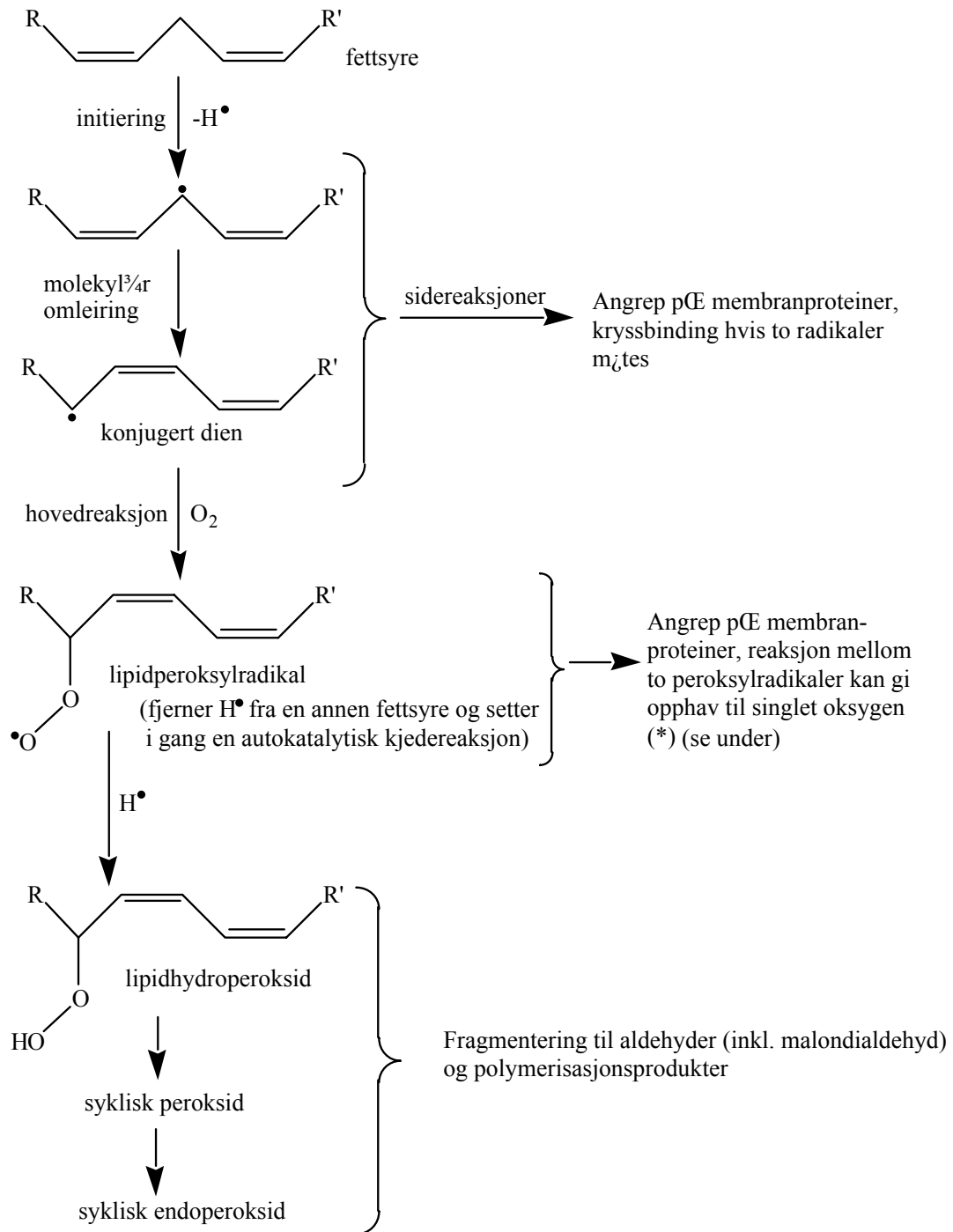
Et annet (lite reaktivt) fritt radikal er *nitrogenoksid* ($\text{NO}\cdot$) (Halliwell 1994b), der det uparede elektronet er delokalisert mellom de to atomene. (Halliwell & Chirico 1993) Nitrogenoksid produseres av vaskulært endotel som en relakserende faktor ("relaxing factor"), og også av fagocytter (Halliwell & Chirico 1993, Halliwell 1994a, Halliwell 1994b, Blomhoff 1999), visse celler i hjernen og mange andre celletyper. $\text{NO}\cdot$ utøver

mange fysiologiske funksjoner som å regulere blodtrykk og intracellulær signalering, men for mye nitrogenoksid kan bli toksisk. For stor produksjon av nitrogenoksid kan også være en mekanisme for at vev skades i enkelte sykdommer, som septisk sjokk (Halliwell 1994a, Halliwell 1994b, Blomhoff 1999), og er blitt implisert i patogenesen til flere neurodegenerative sykdommer. (Stewart & Heales 2003)

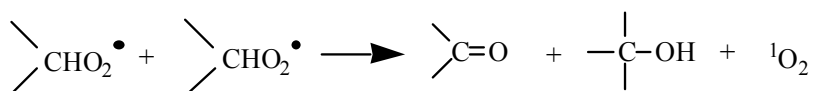
3.2.2 Peroksidasjon av lipider

Både isolerte flerumettede fettsyrer og de som er inkorporert i lipider angripes lett av frie radikaler, og oksideres dermed til lipidperoksider. (Gutteridge 1986, Gutteridge & Halliwell 1990, Halliwell & Chirico 1993) Til sammenligning er både enumettede og mettede fettsyrer mer resistente mot angrep av frie radikaler. Lipidperoksider er toksiske og i stand til å skade de fleste celler i kroppen. (Halliwell & Chirico 1993)

Lipidperoksidasjon starter ved at en diallylisk metylengruppe i en flerumettet fettsyre angripes av en kjemisk forbindelse som er tilstrekkelig reaktiv til å fjerne et hydrogenatom. (Gutteridge 1986, Gutteridge & Halliwell 1990, Halliwell & Chirico 1993) Jo flere dobbeltbindinger det er i en fettsyre/sidekjede, desto lettere er det å fjerne et hydrogenatom. Derfor er flerumettede fettsyrer spesielt utsatt for peroksidasjon. (Halliwell & Chirico 1993) Peroksylradikalene som dannes under lipidperoksidasjon i aerobe celler, kan fjerne hydrogen fra nærliggende fettsyresidekjeder og dermed forplante kjedereaksjonen. (Se fig. 3.2-A under.) (Gutteridge 1986, Gutteridge & Halliwell 1990, Halliwell & Chirico 1993)



(*)



Figur 3.2-A Lipidperoksidasjon (Gutteridge 1986, Gutteridge & Halliwell 1990)

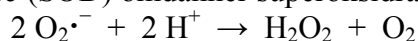
Kjedereaksjonen kan avbrytes av antioksidanter, som leverer et lett donerbart hydrogen som kan reagere med peroksyldikaler ($A-H + LO_2^{\bullet} \rightarrow LO_2H + A^{\bullet}$). (Gutteridge & Halliwell 1990, Halliwell & Chirico 1993) Bare en liten mengde antioksidant trengs for å stoppe kjedereaksjonen og beskytte en rekke molekyler av substratet. Antioksidantene gjør dette ved å danne en alternativ reaksjonsvei for oksidasjonen som ikke involverer substratet. Antioksidanten vil derfor brukes opp i prosessen. (Blomhoff 1999) (Se også pkt. 3.2.3 under.)

Lipidperoksidasjon i biologiske membraner forårsaker skade/svekkelse av membranfunksjonen, endringer i fluiditeten, inaktivering av membranbundne reseptorer og enzymer, og økt uspesifikk permeabilitet av ioner som f.eks. Ca^{2+} . (Gutteridge & Halliwell 1990, Halliwell & Chirico 1993, Halliwell 1994a) Proteiner er spesielt sensitive overfor radikalskade som er initiert av lipidperoksidasjon. (Kerr & al. 1996) Lipidperoksidasjon kan oppstå som en konsekvens av vevsskade ved mange sykdomstilstander, og kan noen ganger bidra i betydelig grad til å forverre vevsskaden, f.eks. antas det at lipidperoksidasjon i aterosklerotiske lesjoner fører til denaturering av apolipoprotein B i LDL, som gir økt opptak i makrofagenes scavengerreseptor, skumcelledannelse og dermed vekst av lesjonen. (Gutteridge & Halliwell 1990)

Matvarer som er rike på flerumettede fettsyrer er også utsatt for peroksidasjon. Dette leder til sluttprodukter med ubehagelig smak og lukt, endring av farge og potensiell toksisitet. (Gutteridge & Halliwell 1990, Halliwell & Chirico 1993) Mat som tilberedes med peroksiderte planteoljer får en harsk smak pga. epoksider, ketoner, syrer og aldehyder, som dannes når lipidperoksider dekomponerer ved høye temperaturer. (Halliwell & Chirico 1993)

3.2.3 Kroppens forsvarssystem og antioksidanters virkningsmekanisme

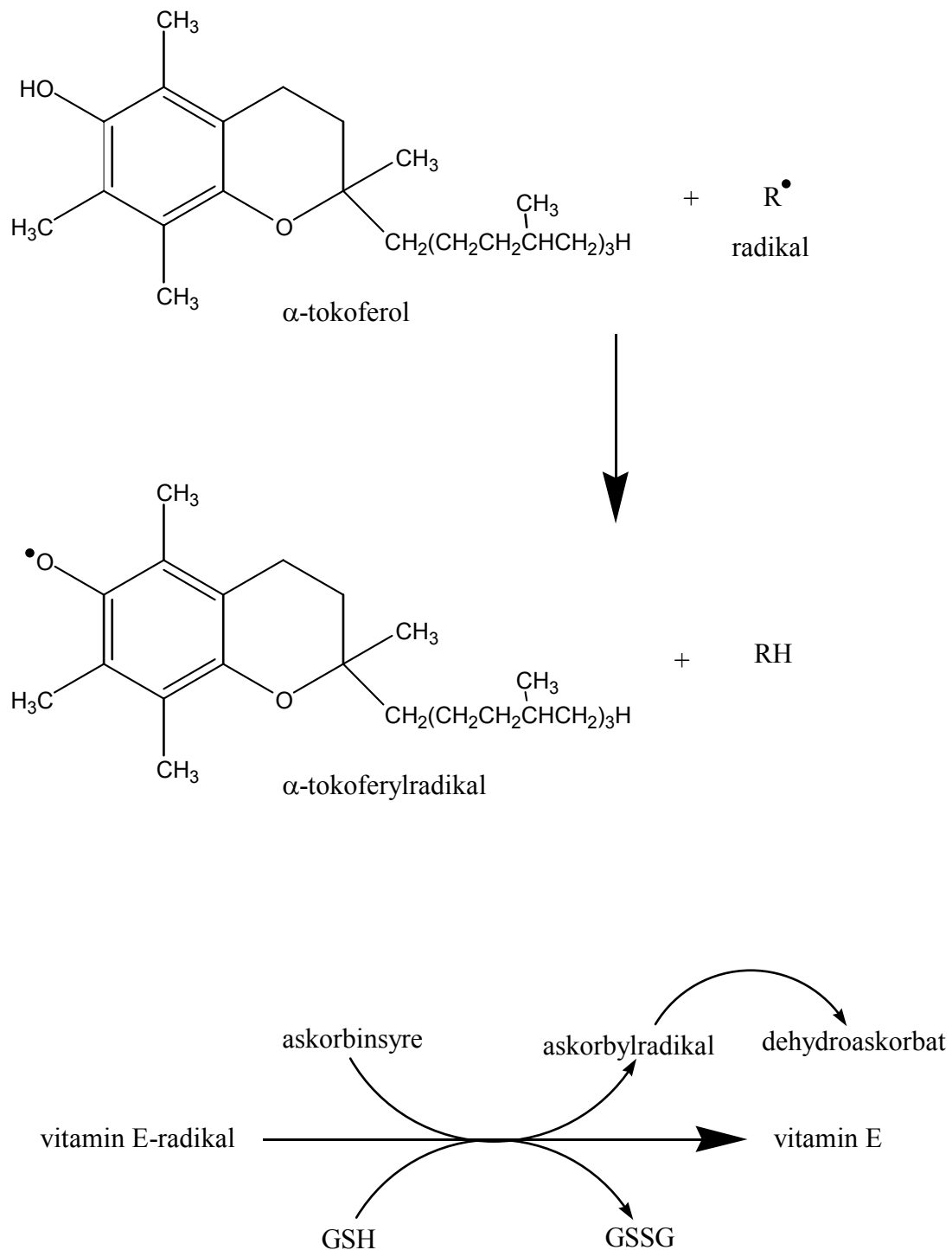
Siden frie radikaler dannes ustanselig, er det utviklet et antioksidantforsvar. (Halliwell 1994a, Halliwell 1994b, Blomhoff 1999) Radikaler nøytraliseres av enzymatisk aktivitet eller naturlige antioksidanter som stopper den innledende produksjonen av radikaler, begrenser dannelsen av frie radikaler under kjedereaksjoner, reparerer radikalskade og motvirker eller forebygger radikalreaksjonen. (Kerr & al. 1996) Enzymet *superoksid dismutase* (SOD) omdanner superoksidradikal anion til hydrogenperoksid,



som igjen uskadeliggjøres av enzymene *katalase* og *glutathion peroksidase*. Jern- og kobberioner fremmer dannelsen av frie radikaler. Disse ionene er derfor bundet til lagrings- og transportproteiner, slik at de sjelden foreligger i "fri" form. Det finnes også molekyler som fjerner oksygenradikaler ved å reagere med dem direkte i en ikke-katalytisk reaksjon. (Halliwell 1994a, Halliwell 1994b, Blomhoff 1999) Dette gjelder f.eks. antioksidantene α -tokoferol og askorbinsyre, samt muligens flere karotenoider, flavonoider, fenoler, indoler og isotiocyanater. (Halliwell 1994b, Blomhoff 1999) I tillegg kommer endogene antioksidanter/ radikalfangere som glutathion og urinsyre. (Halliwell & Gutteridge 1989, Halliwell 1994a, Halliwell 1994b)

α -Tokoferol er trolig den viktigste kjedebrytende antioksidanten i membraner hos mennesker. Mye tyder på at det mindre reaktive α -tokoferylradikalet som dannes ved reaksjon med radikaler, kan tilbakedannes til tokoferol ved reduksjon med askorbinsyre

på overflaten av biologiske membraner. (Gutteridge & Halliwell 1990, Halliwell & Chirico 1993, Halliwell 1994a) Redusert glutation (GSH) og ubiquinol (CoQH₂, i mitokondrier) kan også tenkes å bidra noe til regenerering av α -tokoferol. (Halliwell & Chirico 1993, Halliwell 1994a)



Figur 3.2-B Reaksjon mellom α -tokoferol (vitamin E) og radikal, samt gjenvinning av vitamin E (Halliwell & Gutteridge 1989, Bjørneboe 1999)

Antioksidantforsvaret er ikke 100 % effektivt, kanskje fordi noen frie radikaler og ROS også har nyttige roller *in vivo* (se også pkt. 3.2.1, s. 14). Derfor er det viktig med reparasjonssystemer (først og fremst enzymer), som kan utbedre oksidativ DNA-skade, reparere eller fjerne ødelagte proteiner og ta bort peroksid og skadede lipider fra membranen. (Halliwell 1994a)

Generelt kan antioksidanter virke på flere nivåer i den oksidative prosessen. For det første kan de reagere med/"scavenge" radikaler/ROS slik at initiering av kjedereaksjoner forhindres og pågående kjedereaksjoner brytes. Antioksidantradikalene som dannes vil vanligvis være mindre reaktive og derfor i mindre grad starte nye peroksidasjonskjedereaksjoner. En annen mulig mekanisme er å reagere med forbindelser som fører til dannelse av ROS, og dermed forhindre dette. Et viktig eksempel er metallchelatorer, som binder frie metallioner slik at disse ikke kan medvirke i dannelsen av ROS og/eller andre radikaler (f.eks. nedbryting av lipidperoksider til peroksy- eller alkoksyradikaler). En tredje mulighet er at antioksidantene, som ofte er spesifikke reduksjonsmidler, direkte reduserer de oksiderte produktene som dannes. Et siste alternativ er at de antatte antioksidantene i virkeligheten er svake oksidasjonsmidler som aktiverer det endogene forsvaret og fører til en økning i mengden av blant annet enzymene SOD og katalase. Ut fra dette er det opplagt at ulike forbindelser kan ha antioksidant-virkning i enkelte systemer, men ikke i andre, avhengig av deres virkningsmekanisme. Forskjellig effekt i forskjellige systemer kan også være avhengig av antioksidantens lipofilisitet. Mange antioksidanter har dessuten flere virkningsmekanismer. (Halliwell & Gutteridge 1989, Engvik 2000)

3.2.4 ROS-relaterte sykdommer og aldring

Siden antioksidantforsvaret ikke alltid er fullstendig effektivt, kan konsentrasjonen av frie radikaler øke ved visse omstendigheter. Uttrykket oksidativt stress refererer ofte til en slik tilstand. Ved et mildt oksidativt stress vil celler ofte svare ved å produsere ekstra antioksidanter. I mer alvorlige tilfeller vil oksidativt stress indusere celledød ved nekrose eller apoptose. (Halliwell 1994b, Blomhoff 1999)

Flere studier har vist at røyking øker forbruket av antioksidanter, og at røykere derfor har lavere nivåer av antioksidanter i blodet enn ikke-røykere. Mange medikamenter øker også det oksidative stresset. (Blomhoff 1999) Det er gode holdepunkter for at oksidativt stress og oksygenradikaler er involvert i patogenesen til både kreft og hjerte-karsykdommer, og at antioksidanter kan forhindre eller hemme utviklingen av noen slike sykdommer. (Halliwell 1994b, Blomhoff 1999)

Oksidativ skade kan like gjerne være en konsekvens av vevsskade som en årsak til det. Uansett hvordan en vevsskade er forvoldt, fører den nesten sikkert til oksidativt stress. Det oksidative stresset kan så bidra signifikant til forverring av vevsskaden, eller det kan være irrelevant. (Halliwell 1994b) I de fleste sykdommer hos mennesker er oksidativt stress et sekundært fenomen, en konsekvens av sykdomsaktiviteten. Dette betyr likevel ikke at det ikke er viktig; viktigheten varierer i ulike sykdomstilstander. For eksempel synes oksidativ skade på lipider i blodårevegger å medvirke vesentlig til utviklingen av aterosklerose. Oksidativ DNA-skade kan tenkes å bidra til kreft og aldring. (Halliwell 1994a) Det er også økende bevis for at oksidativ/fri-radikal-skade inntreffer i neurodegenerative sykdommer og etter traumatisk hjerneskade. Det oksidative stresset

som finner sted spiller tilsynelatende en betydelig rolle for sykdomsaktiviteten i reumatoid artritt, familiær dominant form av ALS (amyotrofisk lateralsklerose) og kanskje noen andre neurodegenerative sykdommer, neurotrauma, aterosklerose, iskemisk reperfusjonsskade, kreft og ulcerøs kolitt. (Halliwell 1994a, Halliwell 1994b, Gao & al. 1999)

Noen av de aktuelle tilstandene er beskrevet nærmere nedenfor.

Aterosklerose

Aterosklerose er karakterisert ved en lokal fortykning av intima, den innerste delen av blodårene, med opphopning av makrofager, glatt muskel-celler og lipoprotein-derivert kolesterylester. (Halliwell & Gutteridge 1989, Kerr & al. 1996) Mekanismene bak utviklingen av aterosklerose er ikke fullstendig klarlagt, men det antas at makrofager i arterieveggen tidlig i prosessen tar opp modifisert LDL fra plasma (uavhengig av LDL-reseptoren) via en såkalt scavenger-reseptor, som bare gjenkjenner modifisert, f.eks. oksidert, LDL. Det opprinnelige LDL kan modifiseres av alle de vanligste celletypene i blodårene, inkludert endotelceller, glatt muskel-celler og makrofager. Det er mulig at cellulært produsert 15-lipoksygenase er involvert i prosessen. (Se også pkt. 3.3, s. 24.) Oksidert LDL tiltrekker monocytter og hindrer makrofagene i å migrere tilbake til plasma. Dette fører til akkumulasjon av makrofager, mettet med kolesterylestere, i intima. Gradvis omdannes makrofagene til skumceller, som igjen kan utvikle seg til fettstreker. Disse kan videre avstedkomme fibrøse plakk, som blir forkalket og medfører reduksjon av lumen. Oksidert LDL er også cytotoxisk, og kan skade endotelceller. Dette ledsages av frisetting av faktorer som stimulerer plateaggregasjon og tidlig vekst av trombose. Stoffer som beskytter mot oksidasjon av LDL og stoffer med antitrombotiske egenskaper er derfor interessante i forbindelse med forebygging og behandling av hjerte-karsykdom. (Halliwell & Gutteridge 1989, Meltzer & Malterud 1997) Studier har vist at antioksidanter kan redusere graden av modifisering og degradering av LDL i makrofager. I enkelte studier er det holdepunkter for at vitamin E i farmakologiske doser kan føre til redusert risiko for utvikling av hjerte- og karsykdom. (Bjørneboe 1999) (Se også pkt. 3.3, s. 24.)

Kreft

Det har lenge vært kjent at å utsette organismer for ioniserende stråling kan medføre utvikling av kreft. Noe av DNA-skaden ved stråling skjer ved at molekylet absorberer energien direkte, men mesteparten medieres ved ionisering av vann og dannelse av høyreaktive forbindelser, som f.eks. hydroksylradikal (se pkt. 3.2.1, s. 14). Det er imidlertid mulig at mangelfull reparasjon av OH[•]-induserte skader er ansvarlig for effekten, og ikke nødvendigvis den opprinnelige DNA-skaden. (Halliwell & Gutteridge 1989, Kerr & al. 1996) Det er uansett liten tvil om at oksidativt stress kan forårsake DNA-skade i celler. Det kan derfor tenkes (med mindre det oksidative stresset er så alvorlig at cellen dør) at oksidanter kan være involvert i alle trinn i kreftutviklingen. (Halliwell & Gutteridge 1989) Opphopning av skader på DNA over tid og kronisk eksponering for genotoksiske krefter, inkludert oksidativt stress, er en mulig årsak til aldersrelatert kreft. (Turker 2000) Det er fortsatt stor usikkerhet rundt hvilken rolle frie radikaler spiller i utviklingen av ulike kreftformer, men de er spesielt satt i forbindelse med utvikling av kreft i lungene og i magesekken. Epidemiologiske studier har vist at det er en negativ korrelasjon mellom kostinntaket av vitamin A, E og C og selen og utvikling av lungekreft. Vitamin C har dessuten en beskyttende effekt når det gjelder utviklingen av magekreft. (Bjørneboe 1999)

Kroniske inflammasjonssykdommer

Frie radikaler er av stor betydning for de fagocytterende cellers mulighet til å nøytralisere mikrober. De medfører også aktivisering av andre kjemiske mediatorer i den inflammatoriske prosess, noe som ledsages av økt kjemotaksi og økt kapillær-permeabilitet. (Bjørneboe 1999) Overdreven produksjon av radikaler medvirker sannsynligvis signifikant til vevsskade ved reumatoid artritt (RA) og ved inflammatoriske tarmsykdommer, som Crohns sykdom og ulcerøs kolitt. (Halliwell 1994a) Menneskers synovialvæske inneholder lite eller ikke noe katalase, glutation peroksidase og GSH, og bare spor av SOD-aktivitet. Dermed vil ikke $O_2\cdot^-$ og H_2O_2 som produseres av fagocytter i reumatoide ledd bli effektivt scavenged, og $OH\cdot$ kan dannes hvis en jernkilde er tilgjengelig. Noen få rapporter om individuelle tilfeller er fremlagt angående nytten av oksygenradikalfangere i behandlingen av mennesker med autoimmun sykdom, men det er ikke gjort ordentlig kontrollerte forsøk. (Halliwell & Gutteridge 1989)

Iskemi/reperfusjonsskade

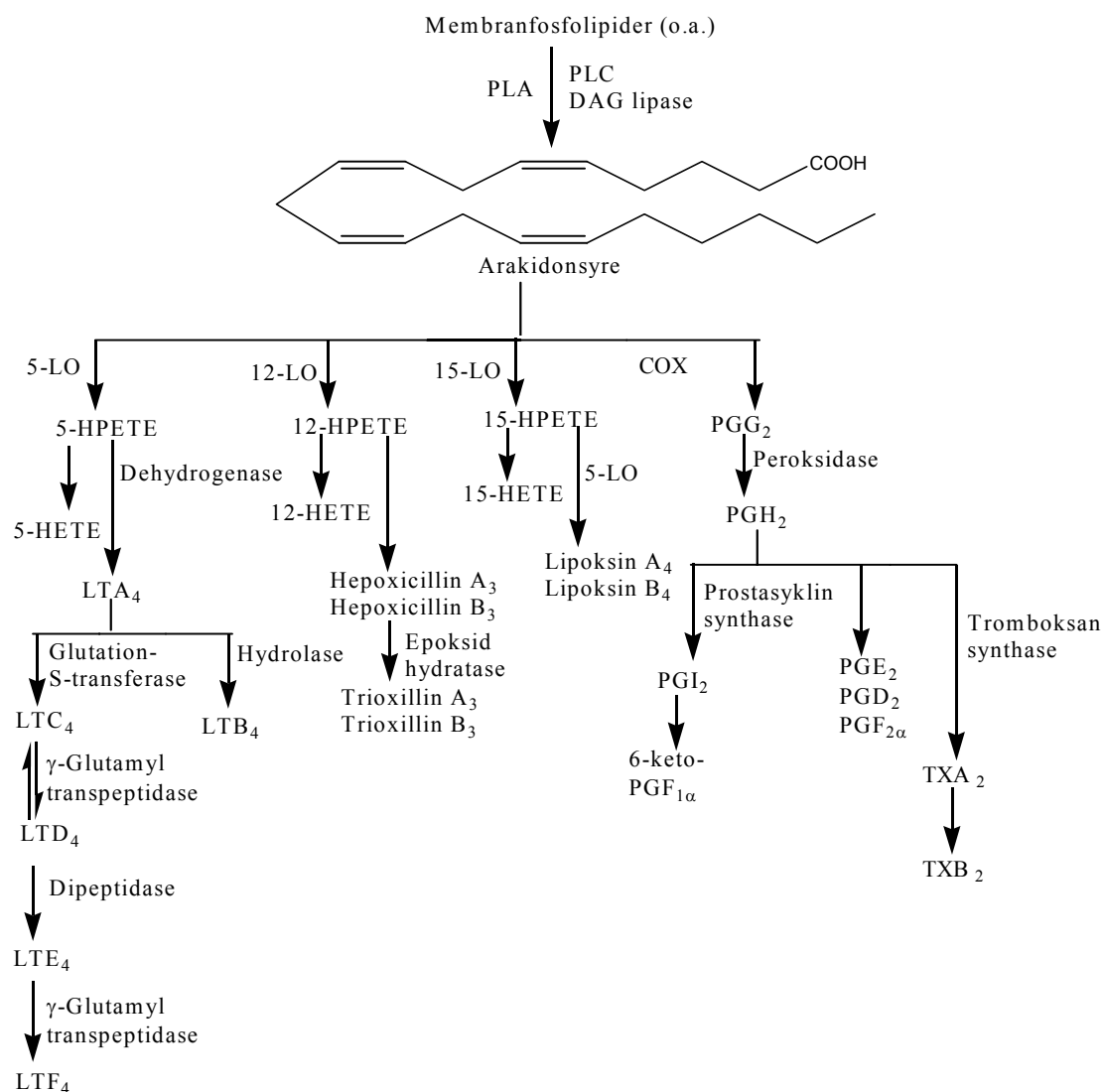
Iskemi medfører oksygenmangel i vevet som rammes. Dette forårsaker i seg selv liten grad av vevsskade, mens reperfusjon av vevet gjør større skade. Frie radikaler er satt i forbindelse med reperfusjonsskade av myokard, nyre, mage-tarmkanal, lunger og hjerne. I dyreforsøk er det vist at hypoxantin akkumuleres i vev ved hypoksi. Enzymet xantin dehydrogenase oksiderer xantin eller hypoxantin til urinsyre. I det iskemiske/hypoksiske vevet omdannes dette enzymet til xantin oksidase, som i tillegg til urinsyre produserer $O_2\cdot^-$ og H_2O_2 når xantin eller hypoxantin oksideres. Dette kan skje når vevet reoksygeneres, og dannelsen av ROS kan føre til alvorlig vevsskade. (Halliwell & Gutteridge 1989, Bjørneboe 1999) Det foreligger også en "nøytrofil-teori"; at etter iskemi og reoksygenering skades celleveggen, med påfølgende lokal nøytrofil aktivitet. De skadede cellene frisetter aktiverte oksygenforbindelser som skader cellemembranen ytterligere og skaper ødem. (Kerr & al. 1996)

Aldring

Det finnes mange teorier som prøver å forklare mekanismene for aldring. En av dem er fri-radikal-teorien. (Halliwell & Gutteridge 1989) Det er holdepunkter for at generering av frie radikaler og akkumulasjon av frie radikalskader gjennom levetiden kan være av betydning for den normale aldringsprosessen. (Halliwell 1994a, Bjørneboe 1999) Det er rapportert at arter som lever lenger har bedre antioksidant-beskyttelsesmekanismer (spesielt SOD) i forhold til graden av radikaldannelse enn arter som lever kortere. (Halliwell & Gutteridge 1989) Arter med høy basalmetabolisme viser en raskere aldringsprosess enn arter med lavere basalmetabolisme. (Bjørneboe 1999, Halliwell & Gutteridge 1989) Jo raskere O_2 forbrukes av en organisme, desto mer radikaler er det sannsynlig at den produserer. Imidlertid har forsøk vist små eller ingen effekter av administrerte antioksidanter på livslengden til pattedyr, men dette kan tenkes å skyldes nedgang i hastigheten på syntesen av "naturlige" antioksidanter, slik at vevets totale "antioksidant-potensial" forblir uendret. (Halliwell & Gutteridge 1989)

3.3 Arakidonsyremetabolismen og 15-lipoksygenase

Eikosanoider er derivater av arakidonsyre (5Z, 8Z, 11Z, 14Z-eikosatetraensyre), og omfatter i hovedsak prostanoider (prostaglandiner og tromboksaner) og leukotriener. De er implisert i kontrollen av mange fysiologiske prosesser og er blant de viktigste mediatorene og modulatorene av inflammasjonsreaksjonen.



Figur 3.3 Arakidonsyremetabolismen
(Rang & al. 1995, Engvik 2000, Moncada & al. 1985)

Eikosanoidene finnes ikke ferdiglaget i vev, men dannes ved at arakidonsyre frigis fra fosfolipider som svar på ulike stimuli. Frigjøringen av arakidonsyre kan skje i ett trinn med en fosfolipase A₂ (PLA₂)-reaksjon, eller i to trinn med PLC etterfulgt av diacylglycerol (DAG) lipase, eventuelt PLD etterfulgt av PLA₂. Den frie arakidonsyren metaboliseres videre via flere reaksjonsveier. Cyklooksigenaser (COX) setter i gang biosyntesen av prostaglandiner (PG), prostasyklin (PGI₂) og tromboksaner (TX), og ulike lipoksygenaser (LO) starter syntesen av leukotriener (LT), lipoksiner og andre forbindelser. De videre trinn i arakidonsyremetabolismen varierer mellom forskjellige

celletyper. For eksempel foregår TXA_2 -syntese i blodplater, PGI_2 -syntese i vaskulært endotel, mens PGE_2 dannes i makrofager og mastceller produserer PGD_2 . LTB_4 produseres hovedsakelig av nøytrofiler, mens LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 og LTF_4 (cysteinyl-leukotrienene) overveiende dannes i eosinofiler, mastceller, basofiler og makrofager.

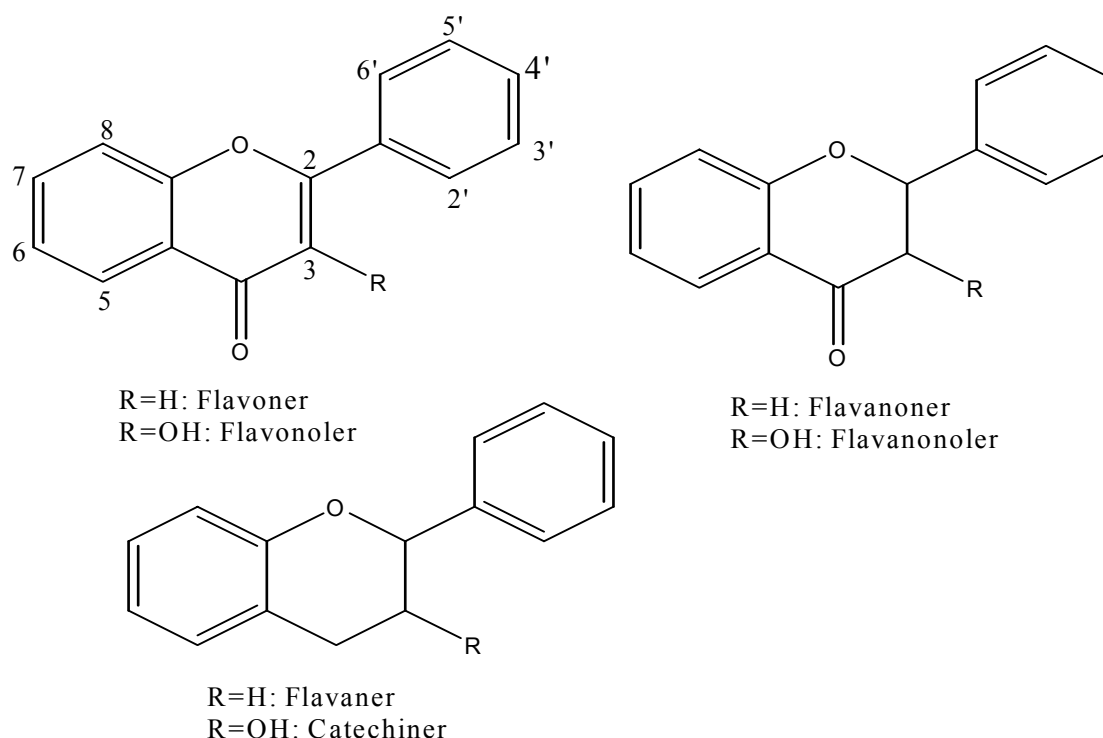
Eikosanoidene har en rekke ulike virkninger, avhengig av hvilke vevstyper og reseptorer de reagerer med. Prostaglandiner bevirker blant annet effekter som vasodilatasjon (PGI_2 , PGD_2), hemming av plateaggregasjon (PGI_2 , PGD_2), kontraksjon eller relaksasjon av glatt muskulatur (PGE_2), hemming av magesyresekresjon (PGE_2) og økt utskillelse av slim i magesekken (PGE_2). Tromboksans (TXA_2) hovedeffekter er plateaggregasjon og vasokonstriksjon. Leukotriener forårsaker kontraksjon av bronkial muskulatur, vasodilatasjon i de fleste kar, men koronar vasokonstriksjon, kjemotakse og aktivering av granulocytter (polymorfonukleære leukocytter) og monocytter, m.m. LTB_4 er en viktig faktor i alle typer inflammasjon, mens cysteinyl-leukotrienene (se over) er spesielt viktige ved astma. (Rang & al. 1995) Lipoksinene spiller muligens en betydelig rolle i inflammatoriske responser og immunresponser, og de hemmer aktiviteten til "natural killer"-celler. (Fierro & Serhan 2001)

Lipoksygenaser og cyklooksygenaser kan aktiveres ved celledskade. For eksempel er det foreslått at skade på endotelcellene i blodårene aktiverer en lipoksygenase som fører til peroksid dannelse i LDL (low density lipoprotein) og bidrar til utviklingen av aterosklerotiske lesjoner. (Gutteridge & Halliwell 1990) I tillegg til at 15-lipoksygenase (15-LO) er foreslått å ha en rolle i oksidasjonen av LDL, et antatt viktig trinn i dannelsen av aterosklerotiske lesjoner, hemmer 15-HPETE (15-hydroperoksy-(5Z, 8Z, 11Z, 13E)-eikosatetraensyre), et intermediat i produksjonen av lipoksiner, dannelsen av prostasyklin, som fremmer vasodilatasjon og motvirker plateaggregasjon. (El Tahir & Williams 1980) 15-LO har, foruten aterosklerose, blitt implisert i blant annet lungebetennelse, endotelcelleproliferasjon, arteriell vasokonstriksjon og –relaksasjon og psoriasis. (Gleason & al. 1995)

3.4 Flavonoider, fenyletanoider og iridoider

3.4.1 Flavonoider

Flavonoidene er bygget opp av to aromatringer med en tre-karbon-bro (ofte i form av en heterosyklisk pyran- eller pyronring) mellom. Så godt som alle flavonoider har flere oksygenatomer bundet til karbonskjelettet. (Meltzer & Malterud 1997, Malterud 1998)

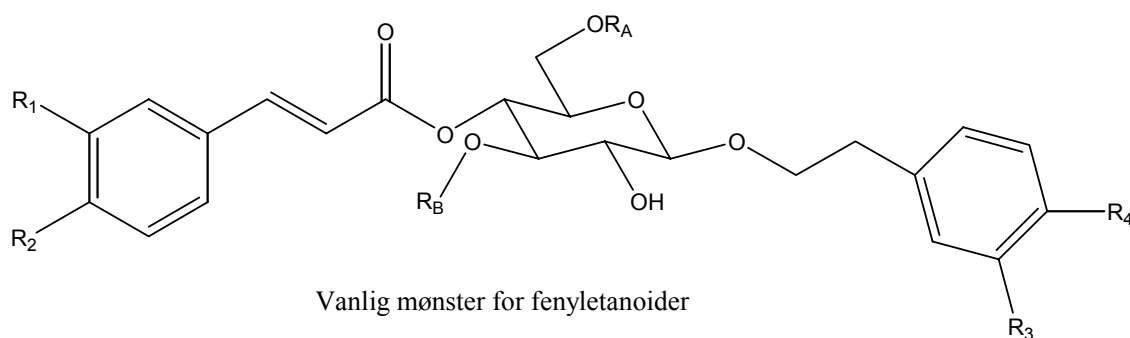


Figur 3.4-A Flavonoidstrukturer (Meltzer & Malterud 1997)

Flavonoidene er vidt utbredt og finnes i omtrent alle høyere planter. (Meltzer & Malterud 1997, Malterud 1998) Trolig vet ingen nøyaktig hvor mange flavonoider som er kjent, anslagene varierer fra ca. 2500 til over 8000. (Malterud 1998) I planteriket fungerer flavonoider som pigmenter. De inngår trolig også i plantenes forsvar mot angrep av mikroorganismer; en rekke flavonoider hemmer sopp, bakterier og virus. (Meltzer & Malterud 1997, Malterud 1999a) Mange flavonoider er sterke antioksidanter (Halliwell 1994a, Meltzer & Malterud 1997) og radikalfangere. Hos mennesker og dyr styrker flavonoider karveggene i blodkapillærene, og minsker dermed karpermeabilitet. De kan hemme enzymer som spalter mukopolysakkarider (hyaluronidase, β -glukuronidase), innvirke på arakidonsyremetabolisme (hemming av cyklooksygenase, lipoksygenase, fosfolipase), fange opp/destruere skadelige ROS (reaktive oksygenspecies) (se pkt. 3.2.1, s. 14) og hemme enzymaktivitet/frisetting av proteaser (elastase m. fl.). (Meltzer & Malterud 1997, Malterud 1999a) Noen andre biologiske effekter av flavonoider som er blitt rapportert (hovedsakelig *in vitro*), er antiastmatisk og antiallergisk effekt, østrogenaktivitet, effekter på mutagenese og karsinogenese, samt leverbeskyttende aktivitet. (Meltzer & Malterud 1997) Imidlertid er biotilgjengeligheten deres i mennesker og betydningen av deres eventuelle rolle(r) ikke klart fastslått, selv om forskningen på dette området er økende. (Halliwell 1994a, Middleton & al. 2000)

3.4.2 Fenyletanoidglykosider

Fenyletanoidglykosider er en gruppe vannløselige naturprodukter som er utbredt i flere plantefamilier. De fleste er isolert fra medisinske planter. Strukturelt er de karakterisert ved kanelsyre ("cinnamic acid") og fenyletanol bundet til en β -glukopyranose via henholdsvis ester- og glykosidbindinger. Fenyletanoidglykosider har blitt isolert fra planterøtter, bark, blader, overjordiske deler, osv., samt fra callus³-vev og suspensjonskulturer. (Jiménez & Riguera 1994)



$R_{1,2,3,4}$: OH, OCH₃, (H)

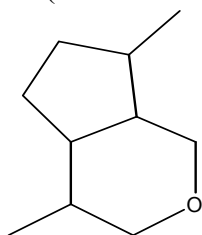
$R_{A,B}$: H eller sukker (rhamnose, glukose, andre sukkere)

Figur 3.4-B Vanlig mønster for fenyletanoidstruktur

Det er kjent at fenyletanoidglykosider har blant annet antibakteriell og immun-suppressiv aktivitet. (Ravn & al. 1990, Xiong & al. 2000) Noen fenyletanoider har også vist cytostatisk, kardioaktiv og hepatocyttoprotektiv effekt, samt antioksidative, enzym-hemmende, antiinflammatoriske og antistress-egenskaper. (Xiong & al. 2000)

3.4.3 Iridoider

Iridoider utgjør en stor gruppe syklopentano[*c*]pyran monoterpenoider og finnes i et stort antall plantefamilier, vanligvis som glukosider. De har vist ulike aktiviteter, blant annet antiinflammatorisk, antimikrobiell, antitumoral, hemodynamisk, choleretisk⁴ og leverbeskyttende. (Recio & al. 1994)



iridoidskjelett

Figur 3.4-C Iridoidskjelett (Malterud 1999a)

³ **callus**: i planter; sårvev, av relativt udiffereensiert proliferativ cellemasse, bevares ofte i cellekultur (Purves & al. 1995)

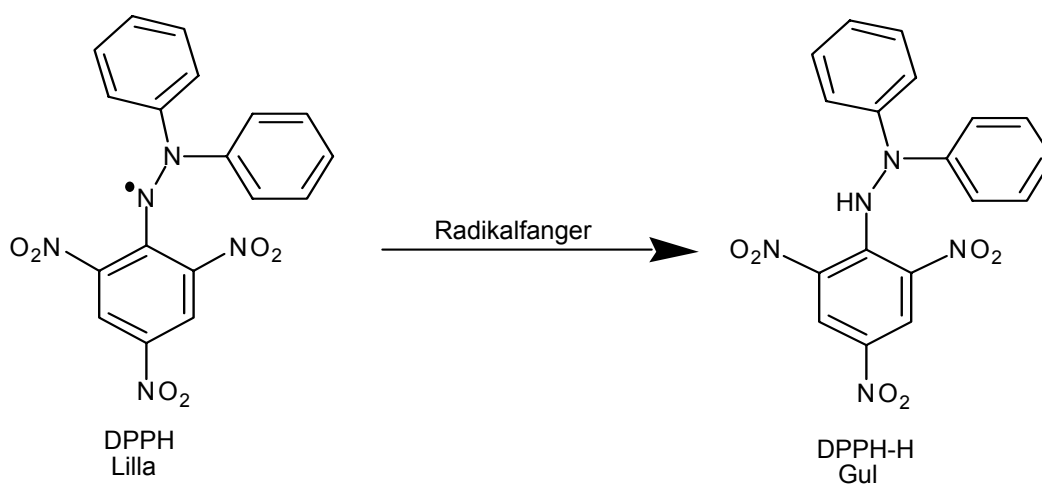
⁴ **choleretisk**: som øker galledannelsen i leveren (Øyri 1996)

3.5 Testmetoder

3.5.1 DPPH-test, radikalscavengeraktivitet

(Utførelse; se pkt. 4.1, s. 34.)

DPPH (1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl) er et stabilt radikal som løst i (f. eks.) metanol gir en dypt lilla løsning med sterk absorbans ved 517 nm. (Størrelsen på radikalets absorbans ved 517 nm avhenger av løsemidlet, så det er viktig å bruke samme løsemiddel når man vil sammenligne verdier.) Ved reaksjon med en radikalscavenger dannes DPPH-H (1,1-difenyl-2-picrylhydrazin) som kun har svak absorbans ved 517 nm, og løsningen blir gul. (Blois 1958, Glavind 1963, Glavind & Hølmer 1967, Brand-Williams & al. 1995)



Figur 3.5-A Endring av DPPH-radikalet under reaksjon med radikalfanger (Sæther 1999)

Absorbansnedgangen er relatert til mengde og aktivitet av radikalscavengeren, og avfargingen er støkiometrisk med hensyn til antall elektroner som tas opp. (Blois 1958, Glavind & Hølmer 1967) På grunn av DPPH-radikalets sterke absorbans ved 517 nm, kan det anvendes løsninger med så lav konsentrasjon at Lambert-Beers lov kan benyttes. (Blois 1958) Absorbansen blir da proporsjonal med konsentrasjonen av radikalet. En prøves eller forbindelses evner som radikalscavenger kan dermed kvantifiseres ved å måle nedgangen i absorbans over et gitt tidsrom.

Fordi prøveløsningen ble fortynnet 1:59 ved tilsetting til DPPH-løsningen, ble startabsorbansen multiplisert med 0,983 (=2,95/3,00) for å korrigere for dette. Dermed kunne DPPH-scavenging, i prosent, beregnes etter følgende formel:

$$[(A_0 \times 0,983 - A_t) / A_0 \times 0,983] \times 100$$

der A_0 = startabsorbans (før tilsetting av prøveløsning)

og A_t = sluttabsorbans (absorbans av kvitteløsningen etter endt måletid). (Engvik 2000)

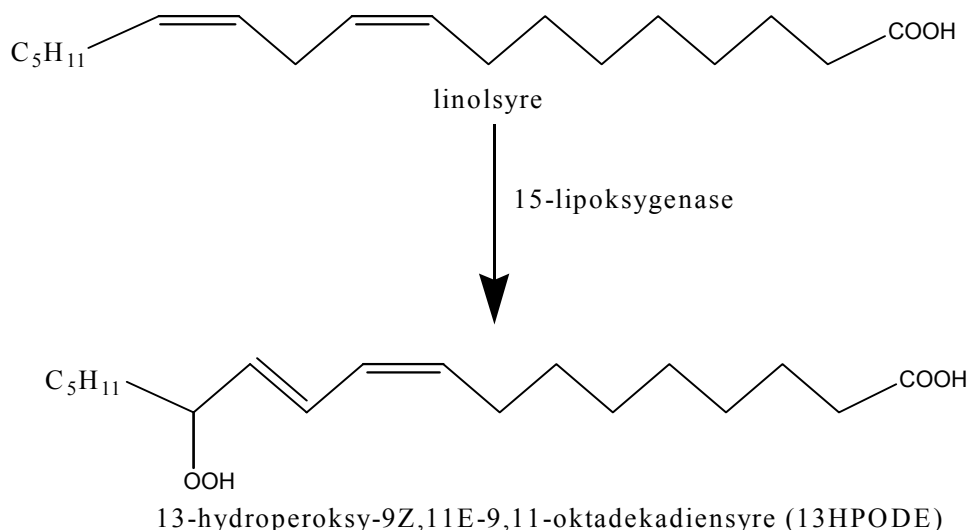
Ved vurdering av kolonnefraksjoner på tynnsjiktplater med silika (se pkt. 4.7, s. 40, og pkt. 4.8, s. 41) ble det benyttet en metanolisk DPPH-løsning sterk nok til å gi tydelig fiolett farge på platen (mye høyere konsentrasjon enn i forsøket beskrevet over). Etter spraying med denne DPPH-løsningen kommer appliserte prøver med radikalscavengeraktivitet til syne som gule flekker på den fiolette bakgrunnen. (Glavind & Hølmer 1967)

3.5.2 Modulering av 15-lipoksygenase

(Utførelse; se pkt. 4.2, s. 35.)

Lipoksygenaser er enzymer i arakidonsyre-reaksjonsveien som katalyserer peroksidasjon av flerumettede fettsyrer på en selektiv måte. 15-lipoksygenase (15-LO) er interessant pga. dens mulige rolle i utvikling av aterosklerose, foruten lungeinflammasjon, endotelcelleproliferasjon, arteriell vasokonstriksjon og -relaksasjon, samt psoriasis. (Gleason & al. 1995, Steinberg 1999, Malterud 1999b) I denne testen ble det benyttet 15-LO fra soyabønner i stedet for mammalsk 15-LO. Disse er ikke identiske, men det er funnet at 15-LO fra soyabønner er godt egnet som testenzym, da hemmingen av de to enzymversjonene er relativt godt korrelert. Dessuten er 15-LO fra soyabønner billig og lett tilgjengelig. (Langner & Bekemeier 1987, Nuhn & al. 1991, Gleason & al. 1995)

Denne testen er basert på en 15-LO-katalysert reaksjon mellom oksygen og en flerumettet fettsyre med en 1,4-dien-type struktur. Linolsyre er et egnet substrat, og billigere og mer stabil enn arakidonsyre. Tidligere forsøk har vist at resultatene for disse to substratene synes sammenlignbare. (Lyckander & Malterud 1990 & 1992, Malterud 1999b)



Figur 3.5-B 15-LO-katalysert peroksidasjon av linolsyre til 13-hydroperoksy-9Z,11E-9,11-oktadekadiensyre (13-HPODE) (Sæther 1999)

I peroksidasjonsreaksjonen dannes et konjugert dobbeltbindingssystem, som fører til en absorbansøkning ved 234 nm. (Gutteridge & Halliwell 1990) Dette benyttes til kvantifisering av reaksjonsproduktene. Hemming av peroksidasjonen (dvs. 15-LO-hemming)

fører til at absorbansøkningen blir mindre. Ved å måle økningen i absorbans for prøver henholdsvis med og uten testsubstans (potensiell(e) modulator(er) av 15-LO) over et gitt tidsrom, kan prosentvis enzymhemming beregnes ut fra følgende formel:

$$100 \times (A_b - A_h) / A_b$$

der A_b = beregnet enzymaktivitet (absorbansøkning per tidsenhet) uten testsubstans og A_h = enzymaktivitet med testsubstans. (Engvik 2000, Malterud 1999b)

For å kunne måle riktig absorbans, er det nødvendig med en klar løsning. Dette ble oppnådd ved å bruke en boratbuffer med pH 9, slik at linolsyre, i de lave konsentrasjonene som ble anvendt, fikk en relativt god løselighet. Soyabønne 15-LO har også aktivitetsmaksimum ved pH 9.

En forutsetning for at 15-LO skal kunne peroksidere linolsyre er at det er spormengder av peroksid til stede på forhånd. Dette kan oppnås ved autooksidasjon. Forseglede ampuller med linolsyre ble anbrutt og "luftet" i romtemperatur over natten før de ble tillukket og oppbevart i en fryser. Dermed fikk man en lett grad av preoksidasjon.

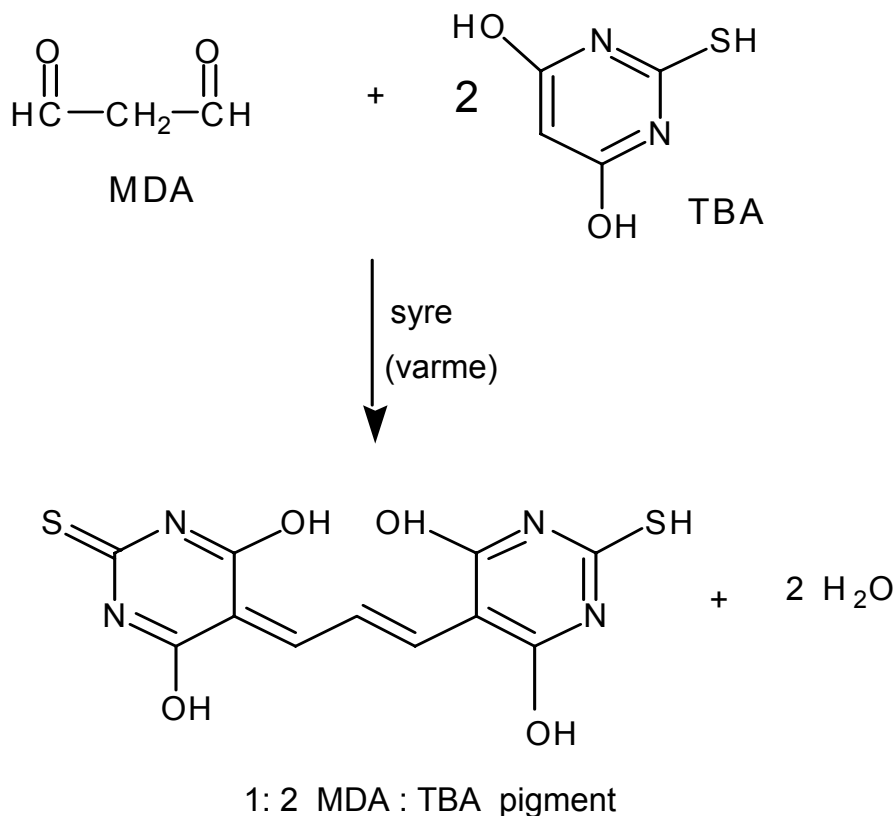
Lipoksygenasen mister gradvis sin aktivitet over tid, trolig på grunn av oksidasjon i kontakt med oksygen fra luften. For å prøve å redusere denne effekten under forsøket, ble enzymløsningen hele tiden oppbevart på is.

3.5.3 Hemming av jernindusert, ikke-enzymatisk peroksidasjon av fosfolipider fra grisehjerne (TBA-test)

(Utførelse; se pkt. 4.3, s. 37.)

Peroksidasjon av lipider kan måles ved ulike trinn i oksidasjonsprosessen, inkludert (1) tap av umettede fettsyrer, (2) måling av primære peroksidasjonsprodukter og (3) måling av sekundære karbonylforbindelser og hydrokarbongasser. Det finnes flere ulike metoder og teknikker, men TBA-(tiobarbitursyre)-testen er trolig den mest brukte enkeltmetoden til måling av lipidperoksidasjon. Lipidmaterialet varmes opp med TBA ved lav pH, og dannelsen av et rosa kromogen måles ved absorbans ved eller i nærheten av 532 nm (absorpsjonsmaksimum), eller ved fluorescens ved 553 nm. (Gutteridge 1986, Gutteridge & Halliwell 1990, Janero 1990, Halliwell & Chirico 1993)

Kromogenet dannes ved reaksjon mellom ett molekyl av malondialdehyd (MDA) og to molekyler av TBA:



Figur 3.5-C Syrekatalysert dannelse av det røde 1:2 MDA:TBA-pigmentet (Janero 1990)

Flere andre aldehyder som produseres i peroksidende lipidsystemer danner ulike kromogener med TBA, og kan gi noe absorpsjon ved 532 nm. De fleste av aldehydene som reagerer med TBA avledes fra peroksid og umettede fettsyrer i løpet av testprosedyren. Noe av malondialdehydet som detekteres i TBA-testen dannes under selve peroksidasjonsprosessen, men mesteparten genereres ved dekomposisjon av lipidperoksid i syreoppvarmingsstadiet i testen, en prosess som akselereres av overgangsmetallioner som jern eller kobber. Derfor måler egentlig ikke TBA-testen mengden malondialdehyd som dannes i peroksidasjonssystemet, og det mer korrekte begrepet TBARS [TBA-reaktiv(e) substans(er)] brukes i stedet. (Gutteridge 1986, Gutteridge & Halliwell 1990, Janero 1990)

Det finnes utallige varianter av TBA-testen, tilpasset ulike behov. Jerntilskudd er nødvendig for maksimal TBARS-dannelse fra lipidhydroperoksid under TBA-testbetingelser, og stimulerer både peroksidasjon av flerumettede fettsyrer og dekomposisjon av lipidhydroperoksid. Metallchelatorer kan hemme denne effekten. (Gutteridge 1986, Janero 1990) (1:2) MDA-TBA-komplekset kan bare dannes ved sur pH. (Gutteridge 1986, Janero 1990) I denne oppgaven ble trikloreddiksyre (TCA) benyttet både for å stoppe peroksidasjonen (Malterud & al. 1996) og for å gi tilstrekkelig lav pH for utvikling av kromogener. Maksimal fargeutvikling i TBA-testen krever også at den surgjorte prøven utsettes for sterk varme (80 – 120 °C) i tidsperioder som strekker seg fra ti minutter til over en time. Dette synes å støtte lipidavledet TBARS-dannelse ved å frembringe termisk dekomponering av lipidhydroperoksid. (Janero 1990) Reaksjonen ble stoppet ved å sette prøverørerne på is. (Engvik 2000) Surgjøringen av prøven kan

medføre turbiditet eller utfelling, og prøvene klargjøres vanligvis ved sentrifugering (eller ekstraksjon av TBA-avledet pigment) før absorpsjonsmåling. (Janero 1990)

Det er flere forhold som kompliserer bruken av TBA-testen, bl.a. at (1) MDA-utbyttet som resultat av lipidperoksidasjon varierer med egenskapene til de(n) flerumettete fettsyren(e) som blir peroksidert (spesielt graden av umettethet) og peroksidasjonsstimulusen, (2) bare visse lipidoksidasjonsprodukter dekomponerer til MDA, (3) MDA er bare ett av flere (aldehyd-) sluttprodukter ved lipidperoksiddannelse og –dekomposisjon, (4) peroksidasjonsmiljøet påvirker både dannelsen av lipideriverte MDA-forløpere og deres dekomponering til MDA, (5) MDA er selv reaktiv og kan nedbrytes oksidativt og metabolsk, (6) oksidativ skade på ikke-lipid-biomolekyler har potensial til å generere MDA. (Janero 1990) Det er også antydning at det finnes flere TBARS i plantevev som ikke er relatert til produkter av lipidperoksidasjon. (Janero 1990, Merzlyak & al. 1992) TBA-testen er med andre ord ikke spesifikk for MDA, og en positiv TBA-testrespons er kun indikativ for tilstedeværelse av TBARS i prøven og gir i seg selv ingen kvantitativ eller kjemisk informasjon om kilden til eller beskaffenheten av TBARSene. (Janero 1990)

Hemming av dannelsen av TBARS (i prosent) ble beregnet etter følgende formel (Malterud & al. 1996):

$$100 \times (A_1 - A_t) / (A_1 - A_2)$$

der A_1 = absorpsjonsverdi for kontroll uten hemmer (bare oksidant)

A_2 = absorpsjonsverdi for blank (uten oksidant/hemmer/prøve)

A_t = absorpsjonsverdi for prøve med testmateriale (oksidant + prøve)

3.6 NMR-spektroskopi (kjernemagnetisk resonansspektroskopi)

NMR (nuclear magnetic resonance)-spektroskopi er en av de viktigste teknikkene for strukturoppklaring av både organiske og uorganiske forbindelser. Det brukes også til kvantitative undersøkelser. NMR-spektroskopi er basert på måling av absorpsjon av elektromagnetisk stråling fra et roterende magnetfelt i radiofrekvensområdet omkring 4 – 600 MHz. Atomkjernene er involvert i absorpsjonsprosessen, og for å få kjernene til å utvikle de energitilstandene som er nødvendige for absorpsjon, må analytten plasseres i et intenst magnetfelt. (Skoog & Leary 1992)

Kjernene i atomer som hydrogen (^1H) og karbon-13 (^{13}C) oppfører seg som små magneter. Hvis en prøve med en forbindelse som inneholder disse elementene plasseres i et sterkt magnetfelt, stiller litt mer enn halvparten av kjernenes magnetiske momentvektor seg på linje med feltet. Kjerner i denne tilstanden absorberer stråling (se over) og overføres til en høyere energitilstand, der de inntar en stilling mot det ytre magnetfeltet. Registreringen av disse overgangene gir et NMR-spektrum.

Frekvensen av det roterende elektromagnetiske feltet som er nødvendig for å få en kerne til å overføres fra en lavere energitilstand til en høyere, avhenger av styrken på det statiske magnetfeltet som benyttes og atomets omgivelser i et molekyl. Ved proton

(¹H)-NMR vil hver "type" hydrogenatom derfor absorbere ved en bestemt frekvens. Et ¹H-NMR-spektrum har dermed et antall topper som tilsvarer de ulike "typene" hydrogenatomer i molekylet. Et ¹³C-NMR-spektrum gir tilsvarende informasjon om de ulike "typene" karbonatomer i molekylet.

En hydrogenatomkjernes absorpsjon av stråling med en gitt radiofrekvens er avhengig av det effektive statiske magnetfeltet den utsettes for. Hydrogenatomer som er bundet til karbonatomer med elektronegativ(e) substituent(er) er mindre skjermet ("deshielded") i forhold til f.eks. hydrogenatomene i TMS. Dette reflekteres i større δ-verdier (se under); atomkjernene absorberer energi ved lavere felt. Det samme gjelder for hydrogenatomer som er bundet til *sp*²-hybridiserte karbonatomer, f.eks. i dobbeltbindinger eller aromatiske ringer. (Ege 1994)

Et NMR-spektrum gir fire forskjellige typer informasjon:

(1) Kjemisk skift (δ-verdier) angir hvor mange ulike typer hydrogen- eller karbonatomer som finnes i forbindelsen og sier noe om deres omgivelser. Kjemisk skift angis vanligvis i forhold til referansesubstansen tetrametylsilan (TMS; (CH₃)₄Si), som opptrer ved δ 0. Enheten for δ-verdier er ppm (parts per million). Området for kjemisk skift-verdier for hydrogenatomer strekker seg over omtrent 20 ppm og for karbonatomer over omtrent 220 ppm (Ege 1994), men for det meste ligger signalene for ¹H i området 1 – 10 ppm og for ¹³C i området 0 – 210 ppm. (Engvik 2000)

(2) ¹H-NMR-spektra kan integreres (dvs. at relativt areal av de ulike signaler bestemmes), noe som viser de relative antall av de ulike hydrogenatomene i forbindelsen.

(3) Splittingsmønstrene (¹H-NMR) forteller hvilke atomer som er nær nok (to eller tre bindingers avstand) til at kjernene deres kan interagere. Interaksjonene mellom kjernene i ulike hydrogenatomer kalles spinn-spinn-kobling, og styrken på interaksjonene måles ved koblingskonstanten, *J*, som angis i Hz.

(4) Størrelsen på koblingskonstantene gir informasjon om de relative posisjonene til hydrogenatomene. I spektrene fremkommer koblingskonstanten som avstanden mellom toppene i multipletten. Antallet topper i en multipllett er N+1 i et 1. ordens spektrum, der N er antallet nabohydrogenatomer som er kjemisk skift ekvivalente eller har ekvivalente koblingskonstanter. I høyere ordens spektra splittes toppene etter mer kompliserte regler.

I ¹³C-NMR-spektra kan kobling mellom kjernen til et karbonatom og kjernene til hydrogenatomene på det gi et splittingsmønster som kan brukes til å identifisere metyl-, metylen- og metin⁵-karbonatomer, samt de som ikke har noen hydrogenatomer på seg. Som oftest er nabokarbonkjernene imidlertid protondekoblet, slik at koblinger mellom ¹³C og ¹H fjernes. (Ege 1994) Man ser derfor ikke multiplerter. (Engvik 2000)

⁵ **metin**: tertiært karbon med et hydrogen (Ege 1994)

4 EKSPERIMENTELT

For utstyr og kjemikalier, se vedlegg B (s. B-1 og B-2).

4.1 Radikalscavenging; DPPH-test

4.1.1 Løsninger og reagenser

Prøvene (se pkt. 4.5, s. 39, til pkt. 4.8, s. 41) ble løst i DMSO (dimetylsulfoksid) eller metanol, og evnen til å fange opp ("scavenge") DPPH-radikaler ble testet spektrofotometrisk.

DPPH (1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl) ble løst i metanol til en konsentrasjon som ga en absorpsjon på ca. 1 ved 517 nm (absorpsjonsmaksimum for DPPH).

Prøveløsninger:

Råekstrakt (R), samt råfraksjonene [eterfase (E), etylacetatfase (A), vannfase (V) og butanolfase(B)] i DMSO;

20, 10, 5,0, 2,5, 1,3, 0,63 og 0,31 mg/mL (seriefortynnet), som tilsvarer henholdsvis 333, 167, 83,3, 41,7, 20,8, 10,4 og 5,2 µg/mL i kyvette

A1 – A11 i metanol; 1,2 mg/mL, som tilsvarer 20 µg/mL i kyvette

B1 – B9 i metanol; 1,7 mg/mL, som tilsvarer 28 µg/mL i kyvette

S1 – S11 i metanol; alle fraksjonene ble testet ved 1,0 mg/mL, tilsvarende

16,7 µg/mL i kyvette, samt ved 3,4 µg/mL i kyvette, dessuten ble

S4, S7 og S11 testet ved 1,0, 0,5, 0,25, 0,125 og 0,06 mg/mL (seriefortynnet) (tilsvarende henholdsvis 16,7, 8,4, 4,2, 2,1 og 1,0 µg/mL i kyvette)

M1 – M9 i metanol; 0,66, 0,33, 0,17, 0,08 og 0,04 mg/mL (seriefortynnet), som tilsvarer henholdsvis 11, 5,5, 2,8, 1,4 og 0,69 µg/mL i kyvette

F1 – F9 i metanol; alle fraksjonene ble testet ved 0,44 mg/mL

(tilsvarende 7,3 µg/mL i kyvette), dessuten ble

F4 testet ved 0,22, 0,11, 0,06 og 0,03 mg/mL (seriefortynnet)

(tilsvarende henholdsvis 3,7, 1,8, 0,91 og 0,46 µg/mL i kyvette),

F5 ved 0,22, 0,11 og 0,06 mg/mL (seriefortynnet),

F6 ved 0,22, 0,11, 0,06 og 0,03 mg/mL (seriefortynnet),

F7 og F8 ved 0,22 og 0,11 mg/mL (seriefortynnet) og

F9 ved 0,22 mg/mL

4.1.2 Utførelse

Blindprøve (for bakgrunnskorreksjon av spektrofotometer): Isopropanol

Egenabsorpsjonsmåling: 2,95 mL metanol + 0,05 mL prøve

Det ble brukt 2,95 mL av DPPH-løsningen i hver kyvette. Utgangsabsorpsjonen ble notert, hvorpå 0,05 mL av prøveløsningen ble tilsatt, og kyvettens innhold ble omrørt med en plastspatel. Absorpsjonen ble målt over et tidsrom på totalt ca. 5 minutter. Det

ble brukt tre paralleller av hver prøve og konsentrasjon, eventuelt flere paralleller hvis én verdi var sterkt avvikende fra de andre.

4.2 Modulering av enzymet 15-lipoksygenase (15-LO)

4.2.1 Løsninger og reagenser

- A: Boratbuffer, 0,2 M, pH 9,00.
Innhold per liter: 12,4 g borsyre utrørt i ca. 0,5 L destillert vann, vandig NaOH (50 % og 10 %) til pH 9,00, destillert vann til 1 L.
- B: Stamløsning av substrat.
Innhold: 50 µL linolsyre og 150 µL etanol, tilsatt 50 mL A (boratbuffer).
- B₁: Bruksferdig substratløsning.
Innhold: 10 mL B fortynnet med 150 mL A. Løsningen ble laget kort tid før bruk.
- C: Enzymløsning.
Innhold: Soyabønnelipoksygenase, ca. 10 000 enheter/mL, i buffer A.
Løsningen ble laget rett før bruk og oppbevart på is under hele forsøket.
- D: Prøveløsning.
Alle prøvesubstanser (se pkt. 4.5, s. 39, til pkt. 4.6, s. 39 og pkt. 4.8, s. 41) ble løst i metanol.
- Råekstraktet ble testet ved 10 mg/mL (tilsvarer 167 µg/mL i kyvette).
 - Butanolfasen (B) ble testet ved 10 og 5 mg/mL (tilsvarer hhv. 167 og 83 µg/mL i kyvette).
 - Etylacetatfasen (A) ble testet ved 5 mg/mL (tilsvarer 83 µg/mL i kyvette).
 - Eterfasen (E) ble testet ved 10, 5 og 2,5 mg/mL (tilsvarer hhv. 167, 83 og 42 µg/mL i kyvette).
 - Vannfasen (V) ble testet ved 10 og 5 mg/mL (tilsvarer hhv. 167 og 83 µg/mL i kyvette).
 - S4, S7 og S11 ble testet ved 10, 5, 2,5 og 1,25 mg/mL (seriefortynnet) (tilsvarer hhv. 167, 83, 42 og 21 µg/mL i kyvette).

4.2.2 Utførelse

Alle løsningene, unntatt C (enzymløsning), hadde romtemperatur under forsøket. Kvartskyvetter ble brukt til alle løsninger.

Blank: 0,95 mL A, 2,00 mL B₁ og 0,05 mL metanol ble omrørt med en plastspatel i en kyvette. Denne ble stående i spektrofotometerets blankprøveholder under hele forsøket.

- Prøve uten testsubstans: 0,90 mL A, 2,00 mL B₁ og 0,05 mL metanol ble blandet med en plastspatel i en kyvette. Ved $t = 0$ ble 0,05 mL C tilsatt, og blandingen omrørt. Kyvetten ble så plassert i spektrofotometerets prøveholder, og absorbansøkningen ved 234 nm ble målt fra 30 til 90 sekunder etter enzym tilsetning. Det ble utført minst seks paralleller fordelt over hele forsøket varighet, som en kontroll av konstant enzymaktivitet.
- Prøve med testsubstans: 0,90 mL A, 2,00 mL B₁ og 0,05 mL prøveløsning, for øvrig som for prøve uten testsubstans. Det ble utført tre paralleller av hver prøveløsning. Ved store avvik i aktiviteten, ble en fjerde parallell foretatt. Ved testing av rækstraktet, ble absorbansen målt fra 120 til 180 sekunder etter enzymtilsetning fordi linolsyren ikke var nok preoksidert.

4.2.3 Kontrollforsøk ved tilsynelatende aktivering

Kontrollforsøk ble utført for å undersøke om tilsynelatende aktivering av 15-LO skyldtes at prøven inneholdt aktiverende stoffer eller bare stoffer som fungerte som substrat for enzymet. Kontrollforsøkene ble utført som beskrevet over, men med to variasjoner når det gjelder "prøve med testsubstans":

1. **Uten substratløsning:** 2,90 mL A og 0,05 mL prøveløsning; blanding og tilsetning av enzymløsning C som beskrevet over. Eventuell absorbansøkning antyder at prøven inneholder noe som fungerer som substrat for enzymet, og som gir oksidasjonsprodukt(er) som absorberer lys med $\lambda = 234$ nm. Prøvene som ble testet slik var Eterfase (E) (se pkt. 4.6, s. 39) (i metanol) 5, 2,5 og 1,25 mg/mL (tilsvarende henholdsvis 83, 42 og 21 $\mu\text{g/mL}$ i kyvette).
2. **Uten enzymløsning:** 0,90 mL A, 2,00 mL B₁ og 0,05 mL prøveløsning ble blandet med plastspatel i en kyvette. I stedet for C, ble 0,05 mL A (buffer) tilsatt ved $t = 0$. Forøvrig som beskrevet over. Eventuell absorbansøkning tyder på ikke-enzymatisk oksidasjon, og indikerer at prøven inneholder pro-oksidativt(/e) stoff(er). Prøven som ble testet på denne måten var Eterfase (E) (i metanol) 5 mg/mL (tilsvarende 83 $\mu\text{g/mL}$ i kyvette).

Hvis ingen av disse to forsøkene gir absorbansøkning, tyder det på at prøven inneholder stoff(er) som aktiverer enzymet 15-LO.

4.3 Hemming av jernindusert, ikke-enzymatisk peroksidasjon av fosfolipider fra grisehjerne (TBA-test)

4.3.1 Isolering av fosfolipider

Grisehjerne fra et lokalt slakteri, ca. 70 g, ble homogenisert i ca. 200 mL aceton i et begerglass ved hjelp av en Ultra-Turrax homogenisator i 3 × ca. 20 sekunder. Etter ca. 10 minutters henstand, ble blandingen filtrert på nutsj med glassfiberfilter. Det uløste ble tilbakeført til begerglasset, tilsatt ca. 100 mL aceton og homogenisert i 3 × ca. 20 sekunder. Etter henstand i ca. 5 minutter, ble blandingen igjen filtrert på nutsj. Begerglasset ble skylt med ca. 50 mL aceton, som ble helt gjennom filterkaken.

Den acetonuløselige delen (filterkaken) ble overført til et begerglass og ekstrahert med 3 × ca. 200 mL dietyleter ved omrøring med glasstav i ca. 5 minutter. Etter hver runde med ekstraksjon, ble blandingen filtrert på nutsj med glassfiberfilter. Det samlede filtratet ble overført til en rundkolbe og konsentrert på rotavapor til ca. 40 – 50 mL. Konsentratet ble helt oppi ca. 200 mL aceton i et begerglass og omrørt med glasstav. Fosfolipidene ble dermed felt ut fra løsningen, som ble filtrert på glassfilterdigel. Filterkaken (fosfolipidene) ble overført til en tarert rundkolbe og løst i kloroform. Løsningen ble dampet inn til tørrhet på rotavapor, kolben ble veid og utbyttet beregnet. En stamløsning, 50 mg/mL i kloroform, ble laget, og denne ble oppbevart i kjøleskap.

4.3.2 Løsninger og reagenser

Fosfolipidløsning (PL):	25 mg/mL i kloroform/metanol (2:1), laget av 3 deler stamløsning (se over), 2 deler metanol og 1 del kloroform
Jern(II)løsning:	FeSO ₄ •(NH ₄) ₂ SO ₄ •6H ₂ O, 10 mM i vann. Oppbevart under N ₂ (g) for å hindre luftoksidasjon av Fe(II).
Tiobarbitursyre (TBA):	2 % i vann, omrørt under forsøket
Trikløreddiksyre (TCA):	10 % i vann
Butylert hydroksytoluen (BHT):	5 mM i metanol (positiv kontroll)
Prøveløsninger:	Alle prøvesubstanser ble løst i metanol. Butanolfasen (B) og etylacetatfasen (A) (se pkt. 4.6, s. 39) ble begge testet ved 20, 10, 5,0, 2,5, 1,3, 0,63 og 0,32 mg/mL (seriefortynnet), som tilsvarer henholdsvis 1,8, 0,90, 0,45, 0,23, 0,11, 0,056 og 0,028 mg/mL i kyvette.

4.3.3 Utførelse

Blank:	0,5 mL metanol, 0,5 mL vann og 0,05 mL PL
Oksidant:	0,5 mL metanol, 0,5 mL jernløsning og 0,05 mL PL; kontroll uten hemmer
Antioksidant:	0,5 mL BHT-løsning, 0,5 mL jernløsning og 0,05 mL PL; kontroll med hemmer
Prøve + oksidant:	0,5 mL prøveløsning, 0,5 mL jernløsning og 0,05 mL PL

Det ble utført tre paralleller av hver. Prøvene ble dekket med aluminiumsfolie og inkubert på vannbad ved 37 °C i ca. 35 – 40 minutter. Deretter ble 4 mL TCA og 0,5 mL TBA tilsatt, prøvene tildekket med aluminiumsfolie igjen og inkubert på kokende vannbad i ca. 15 minutter. Etter avkjøling på is, ble prøvene sentrifugert på en bord-sentrifuge (MSE) i ca. 5 minutter på hastighet 3. Absorbansen ble målt ved 532 nm, og hemming av oksidasjon ble regnet ut.

4.3.4 Kontrollforsøk med butanolfase (B) 20 mg/mL og 10 mg/mL

Det ble undersøkt om grønnfargen som oppstod i prøvene med B 20 mg/mL og B 10 mg/mL kunne skyldes kompleksing med Fe^{2+} . Det ble utført tre paralleller for hver konsentrasjon;

- 1: 0,5 mL B + 0,5 mL jernløsning, i romtemperatur
- 2: 0,5 mL B + 0,5 mL jernløsning, oppvarming på vannbad
- 3: 0,5 mL B + 0,5 mL jernløsning + 4,00 mL TCA, først i romtemperatur, hvis ingen reaksjon; oppvarming på vannbad.

Alle prøvene ble dekket med aluminiumsfolie, og eventuelle fargeendringer observert i inntil ½ time. Grønnfarge tyder på kompleksdannelse mellom Fe-ionene og stoffer i B, sannsynligvis katekoler (nabohydroksylgrupper på aromatrings), muligens flavonoider.

4.4 Tynnsjikt-kromatografi (TLC) av F-serien og S5

Alle prøvesubstanser ble løst i metanol.

Det ble utført analytisk TLC av F-serien og S5 med standarder av plantamajosid og verbascosid. TLC-platen som ble brukt var av aluminium med silikagel 60 F₂₅₄, og eluenten bestod av 80 volumdeler etylacetat, 20 deler metanol og 1 del eddiksyre. Etter prøvepåsetting ble platen eluert i lukket beholder, tørket og undersøkt i kort- (254 nm) og lang- (366 nm) bølget UV-lys.

4.5 Ekstraksjon av plantematerialet

Det ble brukt 250 g *Plantaginis lanceolatae herba* (4 mm, Norsk Medisinaldepot (NMD), batchnr. 8H122/1). En liten del av plantematerialet ble tatt av til herbarium, og resten ble ekstrahert med 80 % (v/v) vandig etanol i romtemperatur som følger:

- 2,5 L i 3 døgn, deretter
- 2,0 L i 1 døgn, så
- 2,0 L i 1 døgn og til slutt
- 2,0 L i 1 døgn.

De ulike løsningene ble filtrert fra, slått sammen og dampet inn til tørrhet først på rotavapor, deretter på oljepumpe. Utbyttet ble 99,15 g råekstrakt (40 % av totalvekt plantemateriale). Det ble tatt ^1H - og ^{13}C -NMR-spektre av råekstraktet. Det ble dessuten utført DPPH-test (se pkt. 4.1, s. 34, og pkt. 3.5.1, s. 28) og 15-LO-test (se pkt. 4.2, s. 35, og pkt. 3.5.2, s. 29) av ekstraktet.

4.6 Fraksjonering av råekstraktet

For oversikt, se flytskjema, vedlegg A (s. A-1 og A-2).

Råekstraktet ble suspendert i 1000 mL destillert vann ved hjelp av sonikering, og ekstrahert med 6 x 250 mL dietyleter. Eterekstraktene ble slått sammen, filtrert med faseparasjonsfilter, dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe og veid. Resultatet ble 20,06 g råfraksjon **E**. Det ble tatt ^1H - og ^{13}C -NMR-spektre av E.

Resten av vannfasen ble ekstrahert med 6 x 250 mL etylacetat. Etylacetatekstraktene ble slått sammen, filtrert med faseparasjonsfilter, inndampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe og veid. Resultatet ble 1,12 g råfraksjon **A**. Det ble tatt ^1H - og ^{13}C -NMR-spektre av A.

Den resterende vannfasen ble ekstrahert med 10 x 250 mL n-butanol. Butanol-ekstraktene ble slått sammen, filtrert med faseparasjonsfilter, dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe og veid. Resultatet ble 15,11 g råfraksjon **B**. Det ble tatt ^1H - og ^{13}C -NMR-spektre av B.

Den gjenværende vannfasen ble inndampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe og veid. Resultatet ble 69,63 g råfraksjon **V**. Det ble tatt ^1H - og ^{13}C -NMR-spektre av V.

Det ble utført DPPH-test (se pkt. 4.1, s. 34, og pkt. 3.5.1, s. 28) og 15-LO-test (se pkt. 4.2, s. 35, og pkt. 3.5.2, s. 29) av alle de fire råfraksjonene, samt ikke-enzymatisk peroksidasjonstest (se pkt. 4.3, s. 37, og pkt. 3.5.3, s. 30) av A og B.

4.7 Fraksjonering av råfraksjoner

For oversikt, se flytskjema, vedlegg A (s. A-1 og A-2).
Alle inndampinger ble foretatt på rotavapor og oljepumpe.

4.7.1 Fraksjonering av etylacetatfasen, råfraksjon A

Etylacetatfasen (A) ble fraksjonert ved kolonnekromatografi på en 54 cm kolonne med I.D. (indre diameter) 4,5 cm. Diaion[®] HP-20 (en polystyren-divinylbenzen kopolymer) ble brukt som kolonnemateriale, og gradienteluering ble utført med metanol/vannblandinger. Prøven ble løst i 3 mL metanol og tilsatt 3 mL destillert vann, før den ble påsatt kolonnen. Starteluenter var 10 % vandig metanol, etter hvert ble metanolinnholdet økt gradvis opp til 100 %.

Tabell 4.7-1: Forbruk av eluent til kolonnekromatografi av råfraksjon A

Eluent	Volum anvendt
10 % vandig metanol	290 mL
20 % vandig metanol	500 mL
40 % vandig metanol	255 mL
60 % vandig metanol	120 mL
100 % metanol	1100 mL

Etter eluering ble 20 µL av hver kolonnefraksjon avsatt på en tynnsjiktplate (Si gel 60 F₂₅₄) og observert i kortbølget (254 nm) og langbølget (366 nm) UV-lys. Platen ble så sprayet med en metanolisk DPPH-løsning sterk nok til å gi tydelig fiolett farge på platen. Sammenslåing av kolonnefraksjoner ga på dette grunnlaget fraksjonene **A1 – A11**.

Det ble tatt ¹H-NMR-spektre av alle A-fraksjonene (A1 – A11), og ¹³C-NMR-spektre av fraksjonene A5, A6, A7 og A8. DPPH-test (se pkt. 4.1, s. 34 og pkt. 3.5.1, s. 28) ble utført med alle fraksjonene A1 – A11.

4.7.2 Fraksjonering av butanolfasen, råfraksjon B

Butanolfasen (B) ble fraksjonert ved kolonnekromatografi på en 87 cm kolonne med I.D. 6,0 cm. Diaion[®] HP-20 ble brukt som kolonnemateriale, og gradienteluering ble utført med metanol/vannblandinger. Prøven ble løst i 30 mL metanol ved hjelp av ultralyd, og etter ca. 2 timer henstand ble 20 mL destillert vann tilsatt. Prøven ble blandet og påsatt kolonnen. Starteluenter var 20 % vandig metanol, etter hvert ble metanolinnholdet økt gradvis opp til 100 %.

Tabell 4.7-2: Forbruk av eluent til kolonnekromatografi av råfraksjon B

Eluent	Volum anvendt
20 % vandig metanol	500 mL
40 % vandig metanol	860 mL
60 % vandig metanol	1000 mL
100 % metanol	3300 mL

Etter eluering ble 20 μL av hver kolonnefraksjon avsatt på en tynnsjiktplate (Si gel 60 F₂₅₄) og observert i kortbølget og langbølget UV-lys. Platen ble så sprayet med DPPH-løsning. (Kfr. pkt. 4.7.1, s. 40.) Deretter ble fem av de aktive kolonnefraksjonene (20 μL av hver) kromatografert på en ny tynnsjiktplate (Si gel 60 F₂₅₄). Eluenten bestod av 18 volumdeler etylacetat, 3 deler eddiksyre, 1 del maursyre og 4 deler vann. Etter eluering og tørking ble platen undersøkt i UV-lys, og sprayet med DPPH-løsning. På grunnlag av alt dette, ble kolonnefraksjonene slått sammen til fraksjonene **B1 – B9**.

Det ble tatt ¹H-NMR-spektre av alle B-fraksjonene, samt ¹³C-NMR-spektre av fraksjonene B2, B3, B5 og B6. Det ble utført DPPH-test (se pkt. 4.1, s. 34, og pkt. 3.5.1, s. 28) for alle fraksjonene (B1 – B9).

4.8 Fraksjonering av underfraksjoner

For oversikt, se flytskjema 2, s. A-2 i vedlegg A.
Alle inndampinger ble foretatt på rotavapor og oljepumpe.

4.8.1 Fraksjonering av B3 + B4 (sammenslått)

Fraksjonene B3 og B4 ble slått sammen og fraksjonert ved kolonnekromatografi på en 85 cm kolonne med I.D. 2,5 cm. Kolonnematerialet var Sephadex[®] LH-20 (en hydroksypropylert dekstrangel), og gradienteluering ble utført med metanol/vannblandinger. Det ble benyttet en pumpe (FMI LAB PUMP) under elueringen. B3 ble løst i 8,0 mL metanol, tilsatt 8,0 mL destillert vann og blandet. B4 ble løst i 5,5 mL metanol, tilsatt 5,5 mL destillert vann og blandet. Begge prøvene ble påsatt kolonnen ved hjelp av pumpen. Starteluenten var 50 % vandig metanol, etter hvert ble metanolinnholdet økt gradvis opp til 100 %.

Tabell 4.8-1: Forbruk av eluent til kolonnekromatografi av B3 + B4

Eluent	Volum anvendt
50 % vandig metanol	600 – 650 mL
70 % vandig metanol	600 mL
100 % metanol	950 mL

Etter eluering ble 20 μL av hver kolonnefraksjon avsatt på en tynnsjiktplate (Si gel 60 F₂₅₄) og observert i kortbølget og langbølget UV-lys. Platen ble så sprayet med DPPH-løsning. (Kfr. pkt. 4.7.1, s. 40) Sammenslåing av kolonnefraksjoner på dette grunnlaget ga fraksjonene **S1 – S11**.

Det ble tatt ¹H-NMR-spektre av alle S-fraksjonene, samt ¹³C-NMR-spektre av alle fraksjonene *unntatt* S10. Det ble utført DPPH-test (se pkt. 4.1, s. 34, og pkt. 3.5.1, s. 28) for alle fraksjonene (S1 – S11) og 15-LO-test (se pkt. 4.2, s. 35, og pkt. 3.5.2, s. 29) for S4, S7 og S11.

4.8.2 Fraksjonering av S4

Fraksjon S4 ble fraksjonert ved kolonnekromatografi på en 35 cm kolonne med I.D. ca. 1,5 – 2,0 cm. Kolonnematerialet var MCI-gel CHP20P (polystyren-divinylbenzen kopolymer, mer finkornet og finporet enn Diaion[®] HP-20), og gradienteluering ble utført med metanol/ vann-blandinger. Elueringen foregikk ved hjelp av litt trykk (N₂-gass). Prøven ble løst i 2,00 mL metanol, tilsatt 2,00 mL destillert vann, blandet og påsatt kolonnen. Starteluenten var 100 % destillert vann, etter hvert ble metanolinnholdet økt gradvis opp til 100 %.

Tabell 4.8-2: Forbruk av eluent til kolonnekromatografi av fraksjon S4

Eluent	Volum anvendt
100 % destillert vann	50 mL
10 % vandig metanol	100 mL
20 % vandig metanol	100 mL
40 % vandig metanol	150 mL
70 % vandig metanol	265 mL
100 % metanol	230 mL

Etter eluering ble 20 µL av hver kolonnefraksjon avsatt på en tynnsjiktplate (Si gel 60 F₂₅₄) og observert i kortbølget og langbølget UV-lys. Platen ble så sprayet med DPPH-løsning. (Kfr. pkt. 4.7.1, s. 40.) På dette grunnlaget ble kolonnefraksjonene slått sammen til fraksjonene **M1 – M9**.

Det ble tatt ¹H-NMR-spektre av alle M-fraksjonene. DPPH-test (se pkt. 4.1, s. 34, og pkt. 3.5.1, s. 28) ble utført med alle fraksjonene (M1 – M9).

4.8.3 Fraksjonering av S11

Fraksjon S11 ble fraksjonert ved kolonnekromatografi på en 34 cm kolonne med I.D. ca. 1,5 – 2,0 cm. MCI-gel CHP20P (polystyren-divinylbenzen kopolymer, mer finkornet og finporet enn Diaion[®] HP-20) ble brukt som kolonnemateriale, og gradienteluering ble utført med metanol/vann-blandinger. Prøven ble løst i 1,00 mL metanol, tilsatt 1,00 mL vann, blandet og påsatt kolonnen. Starteluenten var 100 % destillert vann, etter hvert ble metanolinnholdet økt gradvis opp til 100 %.

Tabell 4.8-3: Forbruk av eluent til kolonnekromatografi av fraksjon S11

Eluent	Volum anvendt
100 % destillert vann	50 mL
10 % vandig metanol	100 mL
20 % vandig metanol	100 mL
40 % vandig metanol	100 mL
70 % vandig metanol	135 mL
100 % metanol	200 mL

Etter eluering ble 20 μL av hver kolonnefraksjon avsatt på en tynnsjiktplate (Si gel 60 F_{254}) og observert i kortbølget og langbølget UV-lys. Platen ble så sprayet med DPPH-løsning. (Kfr. pkt. 4.7.1, s. 40.) Sammenslåing av kolonnefraksjoner på dette grunnlaget ga fraksjonene **F1 – F9**.

Det ble tatt ^1H -NMR-spektre av fraksjonene F1, F2, F4, F5, F6, F7 og F9. (Noen av fraksjonene var for små til at det kunne tas NMR-spektre av dem.) Det ble også utført DPPH-test (se pkt. 4.1, s. 34, og pkt. 3.5.1, s. 28) for alle fraksjonene (F1 – F9).

5 RESULTATER

5.1 Beregninger

Beregning av radikalscavenging, av hemming av lipidperoksidasjon, av enzymhemming og av statistisk signifikans ble utført med programvare utviklet ved Avdeling for farmakognosi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo. Students t-test ble brukt for beregning av signifikans, og en P-verdi $\leq 0,05$ ble satt som signifikanskrav.

5.2 Råekstrakt

Ekstraksjon av 250 g *Plantaginis lanceolatae herba* (se pkt. 4.5, s. 39) med 80 % etanol ga et utbytte på 99,15 g råekstrakt (40 % av totalvekt plantemateriale).

Råekstraktet viste konsentrasjonsavhengig (signifikant lineær korrelasjon, $P < 0,1$ %) radikalscavengeraktivitet i DPPH-testen (se pkt. 3.5.1, s. 28, og pkt. 4.1, s. 34), med $IC_{50} = 148 \pm 20 \mu\text{g/mL}$ (effektiv konsentrasjon). For fullstendige resultater, se tabell 5.2-1.

Tabell 5.2-1 Radikalscavenging, råekstrakt:

DPPH-SCAVENGING, <i>Plantago lanceolata</i> RÅEKSTRAKT		
Konsentrasjon, $\mu\text{g/mL}$	% scavenget (etter 5 min.)	Standardavvik (SD)
333	96,8	1,5
167	54,6	4,9
83	27,4	3,7
42	15,9	0,2
21	7,8	0,5
10,4	4,3	0,3
5,2	2,0	0,4

Råekstraktet viste ingen signifikant hemming ($-0,9$ % hemming, SD 9,9 %) av 15-LO (15-lipoksygenase) (testbeskrivelse; se pkt. 3.5.2, s. 29, og pkt. 4.2, s. 35) ved 167 $\mu\text{g/mL}$ (effektiv konsentrasjon).

5.3 Råfraksjoner

Råekstraktet ble suspendert i vann og fraksjonert ved væske-væske-ekstraksjon med en serie organiske løsemidler; se pkt. 4.6, s. 39, samt flytskjema 1, s. A-1 i vedlegg A.

Tabell 5.3-1 Utbytte av råfraksjoner:

FRAKSJON	UTBYTTE
E (eterfraksjon)	20,06 g (18,9 %)
A (etylacetatfraksjon)	1,12 g (1,1 %)
B (n-butanolfaksjon)	15,11 g (14,3 %)
V (vannfasefraksjon)	69,63 g (65,7 %)
SUM råfraksjoner	105,92 g (100 %)

Årsaken til at summen av utbyttene av råfraksjonene er litt større enn utbyttet for råekstraktet (se pkt. 5.2, s. 44) er trolig at ikke alt løsemiddel ble fullstendig dampet vekk. Dette kan også sees i NMR-spektrene (figurene C3 – C10, s. C-2 til C-5 i vedlegg C).

Råfraksjonene A og B var like aktive, med betydelig radikalscavengeraktivitet, i DPPH-testen, mens fraksjonene E og V var lite aktive. (Se tabell 5.3-2.) IC₅₀-verdien var 26 ± 3 µg/mL for råfraksjon A og 27 ± 2 µg/mL for råfraksjon B.

Tabell 5.3-2 Radikalscavenging, råfraksjoner:

RÅFRAKSJONER	% DPPH scavenget (etter 5 minutter) ± SD			
Kons., µg/mL	E	A	B	V
333	24,7 ± 2,1	97,3 ± 1,0	95,8 ± 0,3	12,0 ± 0,6
167	11,2 ± 1,1	91,7 ± 1,5	91,8 ± 1,1	9,5 ± 0,4
83	6,6 ± 0,4	81,8 ± 0,5	93,6 ± 1,3	8,1 ± 0,6
42	3,1 ± 0,1	65,0 ± 4,3	67,6 ± 5,3	5,7 ± 0,2
21	2,2 ± 0,2	43,2 ± 3,5	39,8 ± 1,0	4,2 ± 0,0
10,4	10,7 ± 0,5	35,2 ± 1,8	26,7 ± 2,2	6,3 ± 1,9
5,2	5,2 ± 0,5	24,8 ± 2,2	13,9 ± 2,5	6,7 ± 1,6

Tabell 5.3-3 15-LO-modulering, råfraksjoner:

NS = ikke signifikant

MODULERING AV 15-LO AV RÅFRAKSJONER				
Fraksjon	Kons., µg/mL	Hemming (%)	SD	P< (%)
E	167	18,1	3,3	0,1
	83	-6,6	4,1	2,5
	41	-8,1	3,6	0,5
A	83	-8,6	10,4	NS
B	167	8,9	9,0	NS
	83	-7,4	8,3	NS
V	167	-2,9	5,0	NS
	83	-6,6	5,4	2,5

Råfraksjonene A, B og V var inaktive overfor 15-LO. (Den tilsynelatende lille aktivering for vannfasefraksjonen ved 83 µg/mL var antakeligvis ikke egentlig signifikant, og ble ikke tatt hensyn til.) Råfraksjon E bevirket øyensynlig en liten

aktivering av enzymet. Dette ble testet (se pkt. 4.2.3, s. 36), uten at det ble funnet prooksidanteffekt. Det så ut til at råfraksjon E hadde substrateffekt, det vil si at den inneholdt stoff(er) som lar seg oksidere av 15-LO under dannelse av konjugerte dobbeltbindinger. Dette samsvarte med NMR-spektret, som viste innhold av fettstoffer (kfr. pkt. 6.2.2, s. 64).

Tabell 5.3-4 Kontrollforsøk, 15-LO-test:

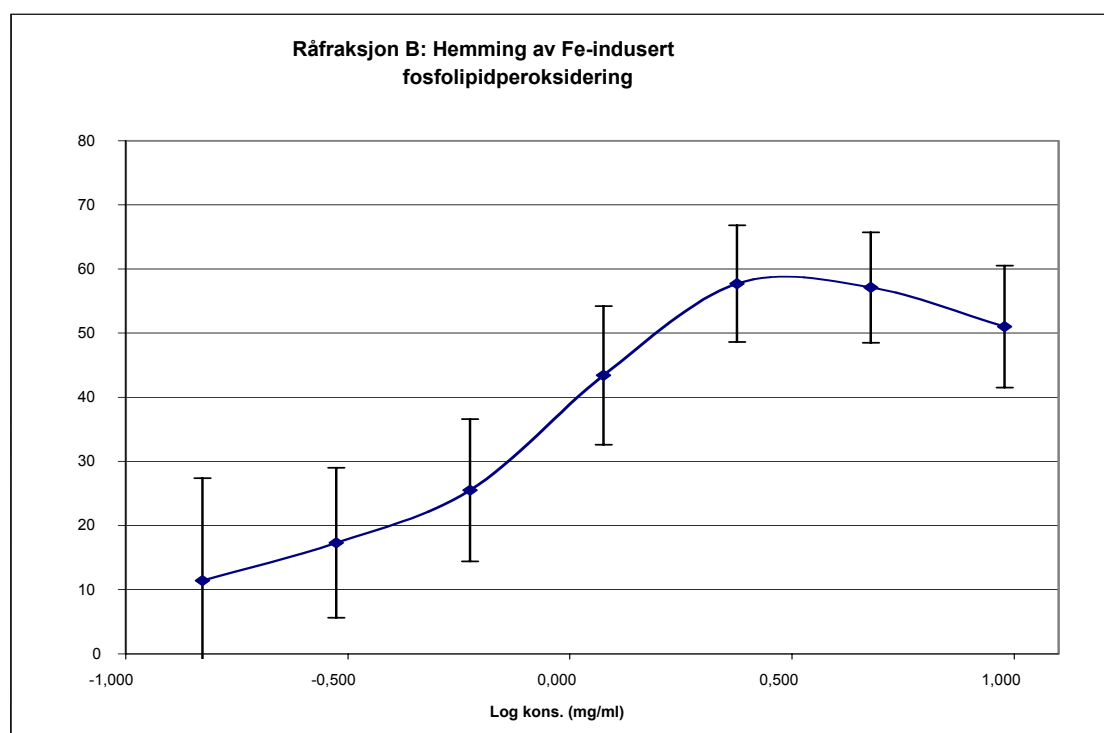
KONTROLLFORSØK AD 15-LO				
Fraksjon E	Kons., µg/mL	Hemming (%)	SD	P< (%)
"Vanlig" forsøk	83	-23,3	6,7	0,5
Forsøk uten substrat	83	81,9	1,5	
	42	88,6	1,0	
	21	94,4	0,5	
Forsøk uten enzym	83	100,5	0,1	

Råfraksjon B hemmet jernindusert oksidasjon av fosfolipider fra grisehjerne (se pkt. 4.3, s. 37), med $IC_{50} = 1,6 \pm 0,9$ mg/mL.

Tabell 5.3-5 Ikke-enzymatisk peroksidasjonstest, råfraksjon B: NS = ikke signifikant

HEMMING AV Fe-INDUSERT OKS. AV FOSFOLIPIDER, RÅFRAKSJON B				
Kons. prøveløsning, mg/mL	Kons. assayløsn. mg/mL	% hemming	SD	P<, %
20	9,52	51,0	9,5	0,5
10	4,76	57,1	8,6	0,1
5	2,38	57,7	9,1	0,1
2,5	1,19	43,4	10,8	0,5
1,25	0,60	25,5	11,1	1
0,63	0,30	17,3	11,7	2,5
0,31	0,15	11,4	16,0	NS

De to sterkeste prøveløsningene ga tilsynelatende uforholdsmessig lav hemming, noe som kan tenkes å skyldes forstyrrelse av absorpsjonsmålingene på grunn av egenabsorpsjon av prøve med jern, da disse fikk en mørk grønn farge. Det ble testet om dette kunne være forårsaket av kompleksing med Fe^{2+} (se pkt. 4.3.4, s. 37). Prøveløsningene (tilsatt jern) ble mørkegrønne etter et par minutter med oppvarming på vannbad og gulgrønne etter 10 – 20 minutter i romtemperatur. Prøvene med både jern og syre (TCA) tilsatt endret ikke farge i romtemperatur (30 minutter), men etter påfølgende oppvarming på vannbad i 5 minutter, ble de lys blå/turkis. Disse resultatene tyder på kompleksdannelse/chelatering mellom Fe^{2+} og stoffer i råfraksjon B, sannsynligvis nabohydroksylgrupper på en aromatring, det vil si katekoler, muligens flavonoider. Kompleksing mellom jern og katekolgrupper er kjent tidligere. (Smith 1959, Leake & Reynolds 1965, Mentasti & Pelizzetti 1973, Mentasti & al. 1976)



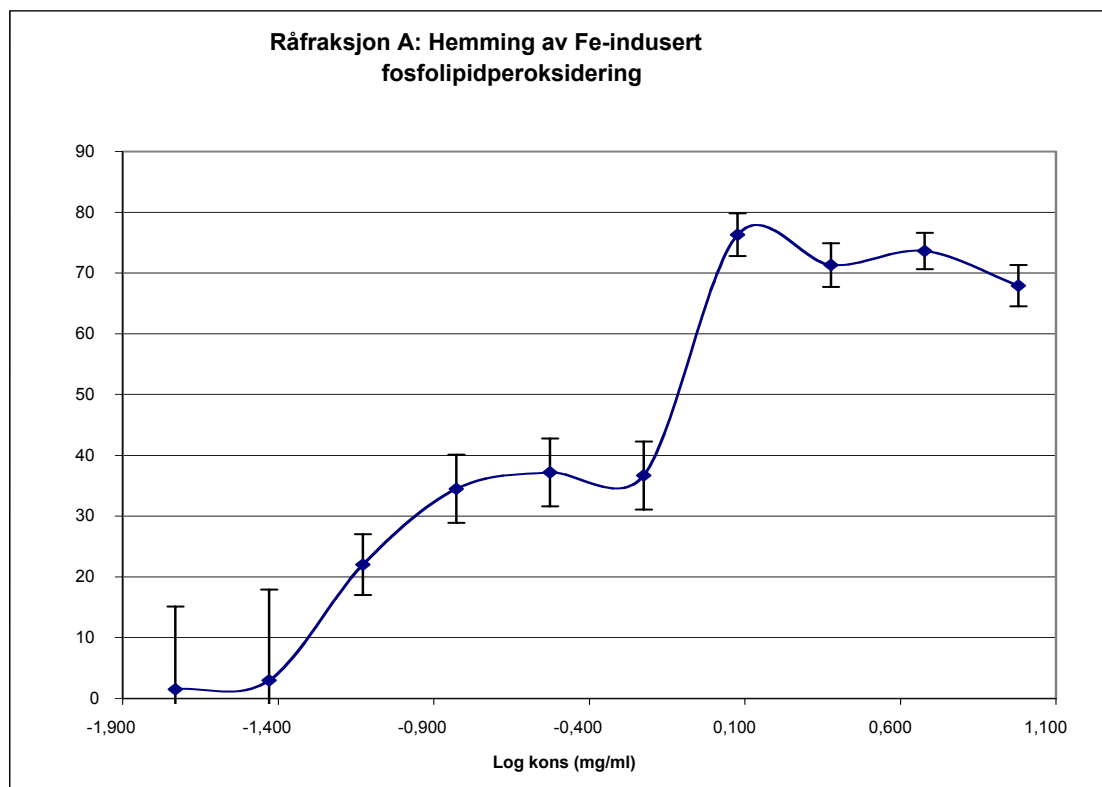
Figur 5.3-A Råfraksjon B: Hemming (i prosent) av jernindusert fosfolipidperoksidasjon

Råfraksjon A hemmet også jernindusert oksidasjon av fosfolipider fra grisehjerne, med $IC_{50} = 0,76 \pm 0,07$ mg/mL.

Tabell 5.3-6 Ikke-enzymatisk peroksidasjonstest, råfraksjon A: NS = ikke signifikant

HEMMING AV Fe-INDUSERT OKS. AV FOSFOLIPIDER, RÅFRAKSJON A				
Kons. prøveløsning, mg/mL	Kons. assayløsn. mg/mL	% hemming	SD	P<, %
20	9,52	67,9	3,4	0,1
10	4,76	73,6	3,0	0,1
5	2,38	71,3	3,6	0,1
2,5	1,19	76,3	3,5	0,1
1,25	0,60	36,7	5,6	0,5
0,63	0,30	37,2	5,0	0,5
0,31	0,15	34,5	5,6	0,1
0,31	0,15	38,5	12,9	2,5
0,16	0,074	22,0	12,7	NS (10)
0,08	0,037	3,0	14,9	NS
0,04	0,019	1,5	13,6	NS

De tre sterkeste konsentrasjonene av fraksjon A så ut til å ha noe av den samme egenabsorbans-"forstyrrelsen" som fraksjon B, med brunlig sluttffarge. Det ble imidlertid ikke utført kontrollforsøk med fraksjon A. Da råfraksjon A viste signifikant aktivitet selv ved konsentrasjonen 0,31 mg/mL (0,15 mg/mL i assayløsning), ble det foretatt videre seriefortynning og testing av disse prøvekonsentrasjonene. Derfor er konsentrasjonen 0,31 mg/mL testet to ganger. (Kfr. tabell 5.3-6.)



Figur 5.3-B Råfraksjon A: Hemming (i prosent) av jernindusert fosfolipidperoksidasjon

Råfraksjonene E og V ble ikke testet med hensyn til jernindusert oksidasjon av fosfolipider fra grisehjerne, da de var lite reaktive i DPPH-testen.

På bakgrunn av resultatene i de ulike testene ble det besluttet å arbeide videre med råfraksjonene A og B.

5.4 Underfraksjoner av A (etylacetatfraksjon)

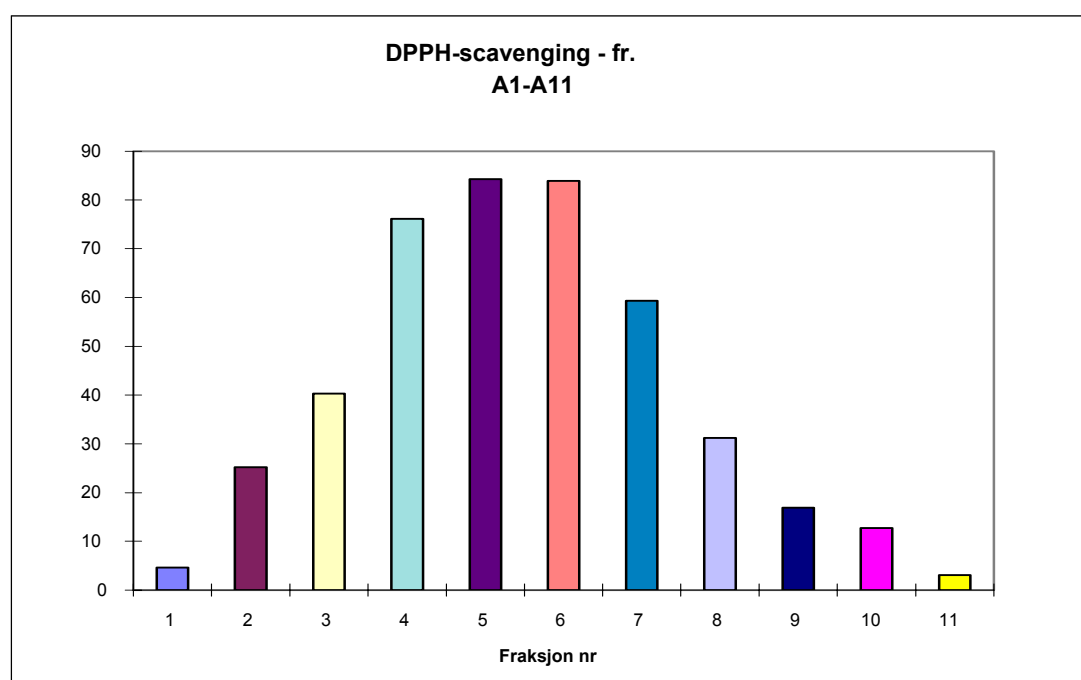
Etylacetatfraksjonen (A) ble fraksjonert med kolonnekromatografi; se også pkt. 4.7.1, s. 40 og flytskjema 1, s. A-1 i vedlegg A.

Tabell 5.4-1 Fraksjonering av råfraksjon A, samt scavengeraktivitet av A-serien:

Kolonnekromatografi av A på Diaion (omvendt fase), gradienteluering			Aktivitet av fr. A1 – A11
Fraksjon	Kolonnefraksjoner	Utbytte ($\Sigma = 689,5$ mg)	% DPPH scavenget (etter 5 min.) \pm SD
A1	1 – 9	71,1 mg (10,3 %)	4,6 \pm 0,4
A2	10 – 16	22,4 mg (3,2 %)	25,2 \pm 1,9
A3	17 – 18	8,8 mg (1,3 %)	40,3 \pm 0,7
A4	19	4,7 mg (0,7 %)	76,1 \pm 6,5
A5	20	38,1 mg (5,5 %)	84,3 \pm 0,4
A6	21	162,7 mg (23,6 %)	83,9 \pm 0,3
A7	22	221,9 mg (32,2 %)	59,3 \pm 7,6
A8	23	108,0 mg (15,7 %)	31,2 \pm 3,9
A9	24	29,0 mg (4,2 %)	16,9 \pm 0,8
A10	25	6,4 mg (0,9 %)	12,7 \pm 0,9
A11	26 – 31	16,4 mg (2,4 %)	3,1 \pm 0,1

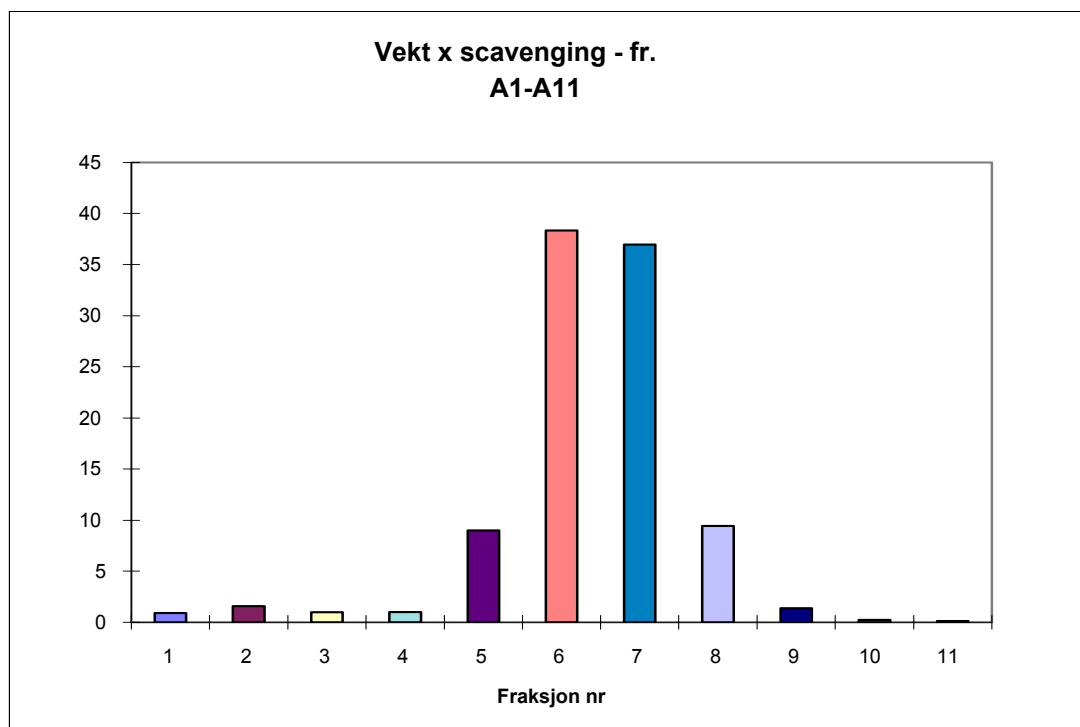
Årsaken til at summen av utbyttene av fraksjonene A1 – A11 er noe mindre enn utbyttet av A kan være at litt stoff ble holdt av til referanse, samt at en del av vekten (av A) trolig var fuktighet. (Kfr. pkt. 5.3, s. 45.)

A-serien (fraksjon A1 – A11) ble undersøkt ved en konsentrasjon på 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i DPPH-testen (se pkt. 4.1, s. 34). Aktiviteten var stigende til fraksjon A5 og A6, som var de mest aktive, og deretter synkende. (Se tabell 5.4-1 og figur 5.4-A.)



Figur 5.4-A DPPH-scavenging ved 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fraksjon A1 – A11

Tas det også hensyn til fraksjonenes vekt, ser man at A5 har mye aktivitet, men lite stoff, A6 har mye aktivitet og mye stoff, mens A7 er nokså aktiv, med mye stoff. Ved å gange vekten av hver fraksjon med dennes respektive aktivitet (% scavenging), fremkommer det hvilken fraksjon mesteparten av aktiviteten sitter i. Det meste av aktiviteten finnes således i A6 og A7, samt i A5 og A8. (Se figur 5.4-B.)



Figur 5.4-B DPPH-scavenging (ved 20 µg/mL) x vekt, fraksjon A1 – A11

5.5 Underfraksjoner av B (n-butanolfraksjon)

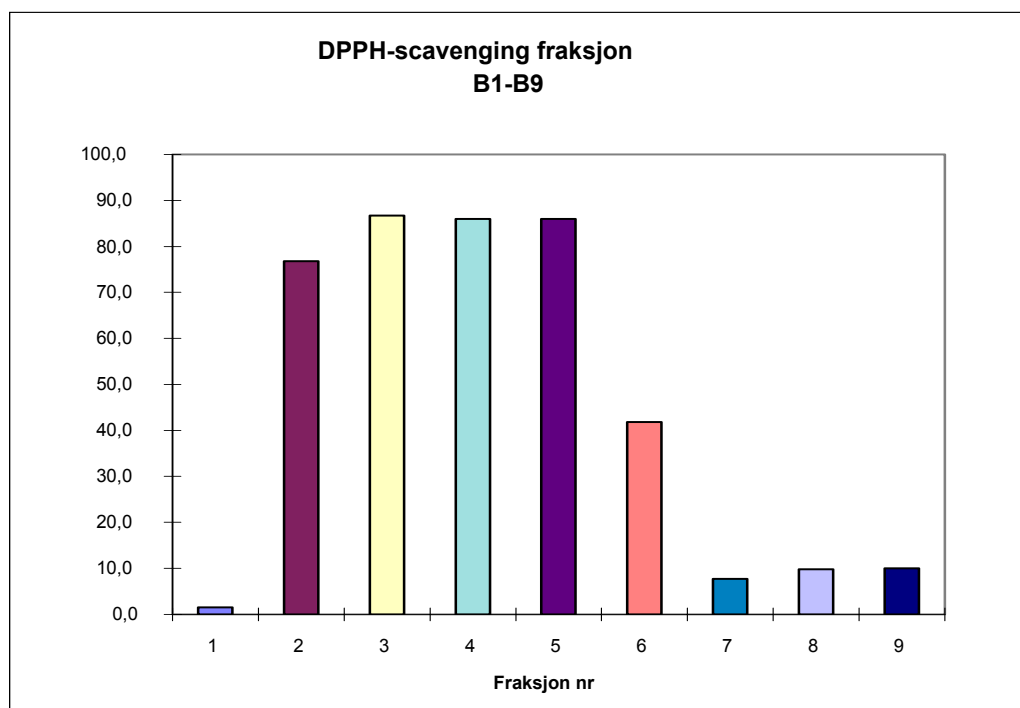
n-Butanolfraksjonen (B) ble fraksjonert med kolonnekromatografi; se også pkt. 4.7.2, s. 40 og flytskjema 2, s. A-2 i vedlegg A.

Tabell 5.5-1 Fraksjonering av råfraksjon B, samt radikalscavengeraktivitet av B-serien:

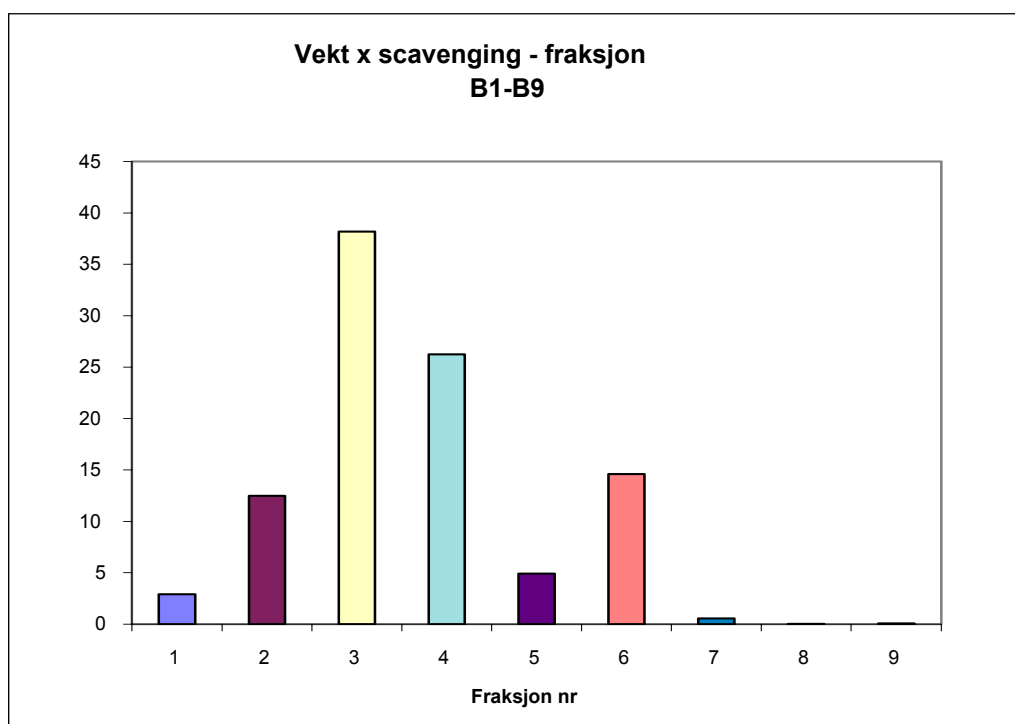
Kolonnekromatografi av B på Diaion (omvendt fase), gradienteluering			Aktivitet av fr. B1 – B9
Fraksjon	Kolonnefraksjoner	Utbytte (Σ = 10415,2 mg = 10,4 g)	% DPPH scavenget (etter 5 min.) ± SD
B1	0 – 12	6050,7 mg (58,10 %)	1,5 ± 0,3
B2	13 – 14	485,4 mg (4,66 %)	76,8 ± 3,9
B3	15 – 16	1458,3 mg (14,00 %)	86,7 ± 0,3
B4	17 – 18	939,5 mg (9,02 %)	86,0 ± 0,1
B5	19	169,1 mg (1,62 %)	86,0 ± 0,2
B6	20 – 21	1076,1 mg (10,33 %)	41,8 ± 3,2
B7	22 – 32	214,2 mg (2,06 %)	7,7 ± 0,7
B8	33	4,0 mg (0,04 %)	9,8 ± 0,7
B9	34 – 37	17,9 mg (0,17 %)	10,0 ± 0,9

Årsaken til at summen av utbyttene av fraksjonene B1 – B9 er noe mindre enn utbyttet av B kan være at litt stoff ble holdt av til referanse, samt at en del av vekten (av B) trolig var fuktighet. (Kfr. pkt. 5.3, s. 45.)

B-serien (fraksjon B1 – B9) ble undersøkt ved en konsentrasjon på 28 µg/mL i DPPH-testen (se pkt. 4.1, s. 34). Fraksjonene B2 – B5 hadde høyest spesifikk aktivitet, B6 middels og de øvrige fraksjonene lav aktivitet. (Se tabell 5.5-1 over og figur 5.5-A.)



Figur 5.5-A DPPH-scavenging ved 28 µg/mL, fraksjon B1 – B9



Figur 5.5-B DPPH-scavenging (ved 28 µg/mL) x vekt, fraksjon B1 – B9

B3 og B4 er hovedfraksjonene, og har til sammen >60 % av den totale scavenger-aktiviteten. (Kfr. figur 5.5-B over.) Disse to fraksjonene ble derfor slått sammen og kromatografert for videre undersøkelse. (Se pkt. 4.8.1, s. 41, og pkt. 5.6, s. 52.)

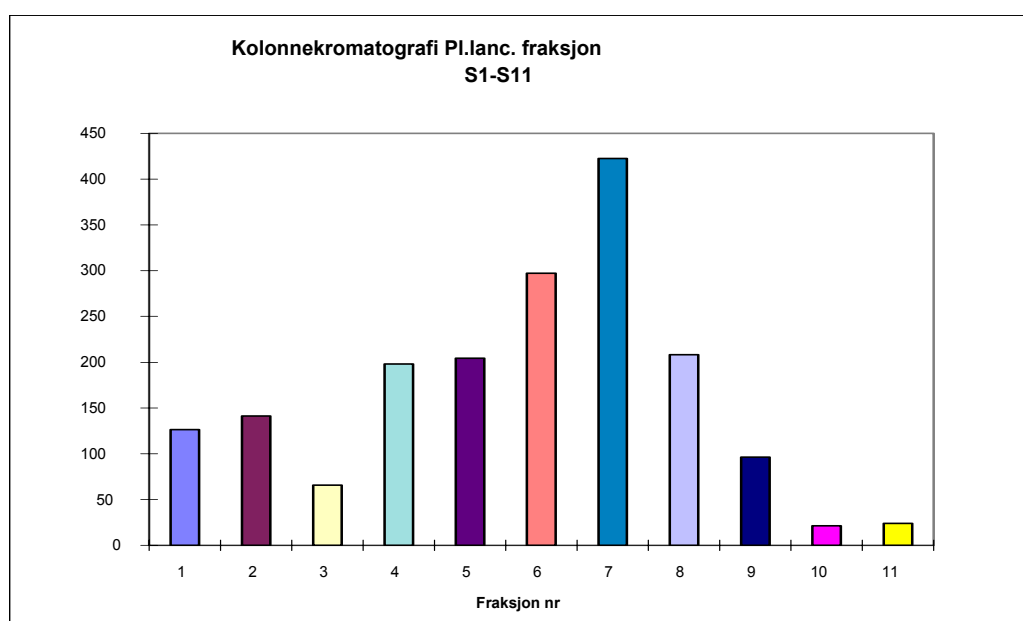
5.6 S-serien (underfraksjoner av B3 + B4)

Fraksjonene B3 og B4 (se over) ble slått sammen og deretter fraksjonert med kolonnekromatografi; se også pkt. 4.8.1, s. 41, og flytskjema 2, s. A-2 i vedlegg A.

Tabell 5.6-1 Fraksjonering av B3 + B4 og utbytte for S-serien:

Kolonnekromatografi av B3 + B4 på Sephadex LH-20 (omvendt fase), gradienteluering		
Fraksjon	Kolonnefraksjoner	Utbytte ($\Sigma = 1805,7$ mg)
S1	1 – 4	126,5 mg (7,01 %)
S2	5 – 8	141,2 mg (7,82 %)
S3	9 – 12	65,8 mg (3,64 %)
S4	13 – 15	198,2 mg (10,98 %)
S5	16 – 17	204,5 mg (11,33 %)
S6	18	297,1 mg (16,45 %)
S7	19	422,7 mg (23,41 %)
S8	20	208,2 mg (11,53 %)
S9	21 – 22	96,4 mg (5,34 %)
S10	23 – 24	21,2 mg (1,17 %)
S11	25 – 28	23,9 mg (1,32 %)

Årsaken til at summen av utbyttene av fraksjonene S1 – S11 er noe mindre enn utbyttet av B3 + B4 (2397,8 mg) kan være at litt stoff ble holdt av til referanse, samt at en del av vekten (av B3 + B4) trolig var fuktighet. (Kfr. pkt. 5.3, s. 45.)

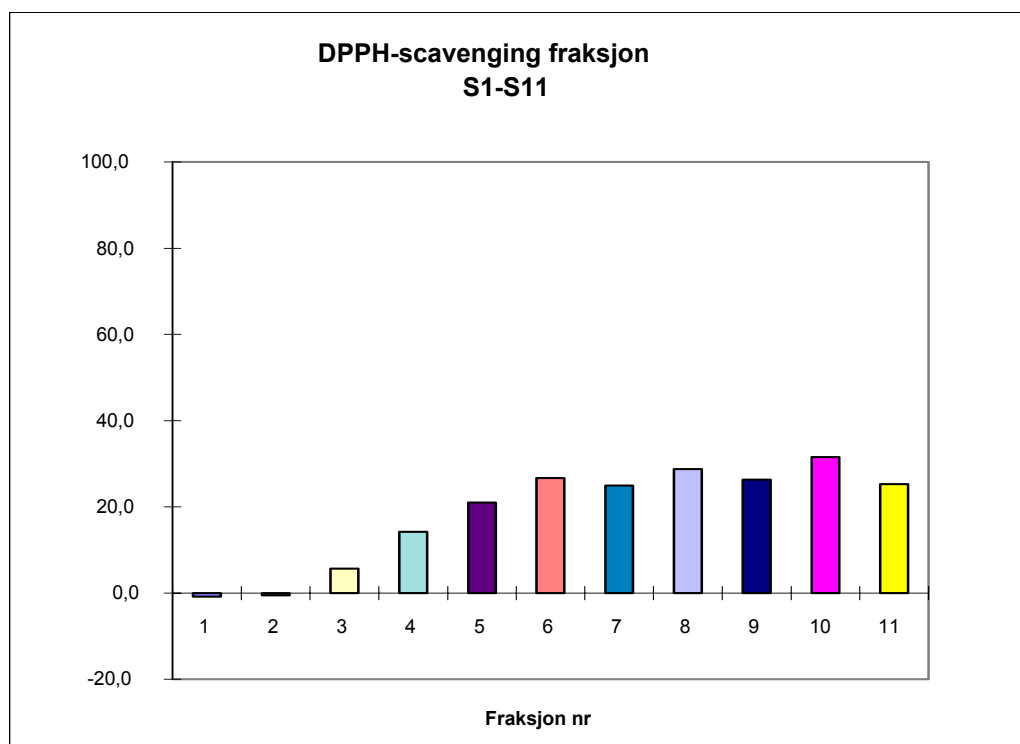


Figur 5.6-A Vekt (mg) av fraksjonene S1 – S11

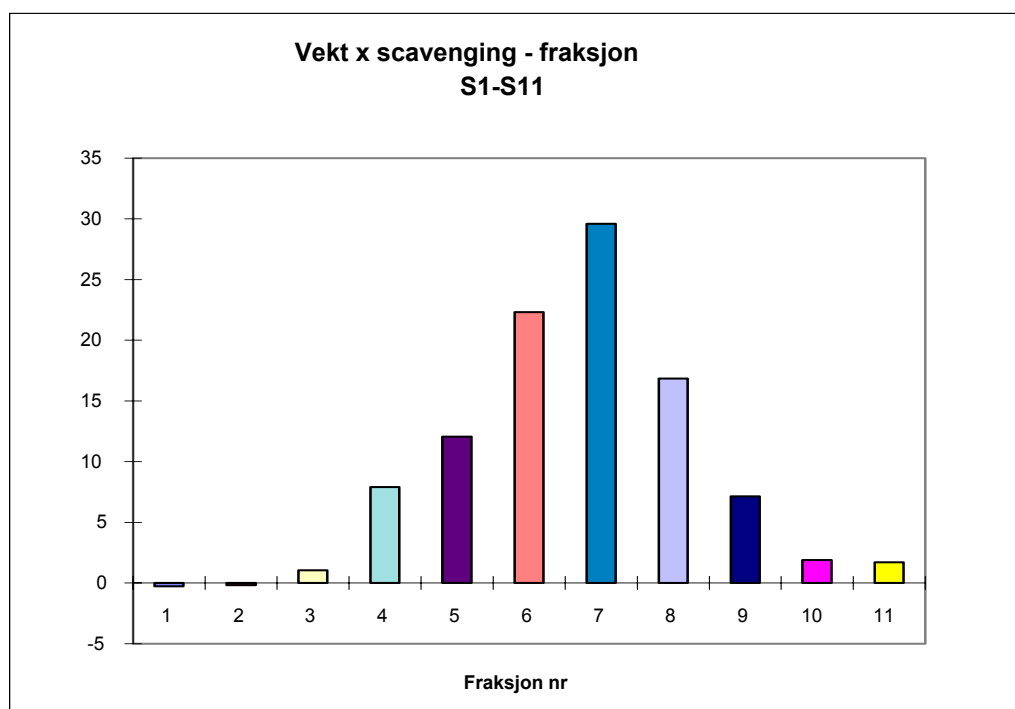
Tabell 5.6-2 Radikalscavenging, S-serien:

Aktivitet av fr. S1 – S11: % DPPH scavenget (etter 5 min.) ± SD						
Fraksjon	3,4 µg/mL	16,7 µg/mL	8,4 µg/mL	4,2 µg/mL	2,1 µg/mL	1,0 µg/mL
S1	-0,8 ± 0,5	1,9 ± 0,2	-	-	-	-
S2	-0,5 ± 1,4	4,2 ± 0,1	-	-	-	-
S3	5,7 ± 2,0	36,9 ± 0,7	-	-	-	-
S4	14,2 ± 1,6	67,2 ± 0,6 72,5 ± 2,9	35,8 ± 0,9	18,2 ± 1,2	11,7 ± 2,0	7,8 ± 0,5
S5	21,0 ± 2,5	87,9 ± 0,4	-	-	-	-
S6	26,7 ± 3,7	88,4 ± 0,2	-	-	-	-
S7	24,9 ± 1,5	88,0 ± 0,5 81,4 ± 0,2	47,5 ± 2,3	-	12,0 ± 0,2	6,7 ± 0,3
S8	28,8 ± 6,5	87,9 ± 0,4	-	-	-	-
S9	26,3 ± 21,0	87,5 ± 0,3	-	-	-	-
S10	31,6 ± 3,5	87,2 ± 0,2	-	-	-	-
S11	25,3 ± 4,2	87,2 ± 0,5 80,0 ± 0,2	55,8 ± 2,8	26,3 ± 1,3	14,3 ± 0,5	6,7 ± 0,2

S-serien (S1 – S11) ble undersøkt i DPPH-testen (se pkt. 4.1, s. 34). Alle fraksjonene ble testet ved 3,4 og 16,7 µg/mL. Aktiviteten var stigende til fraksjon S5/S6, og deretter nokså konstant. Utvalgte fraksjoner (kfr. pkt. 6.3.1, s. 74) ble også målt ved en del andre konsentrasjoner. (Kfr. tabell 5.6-2.)

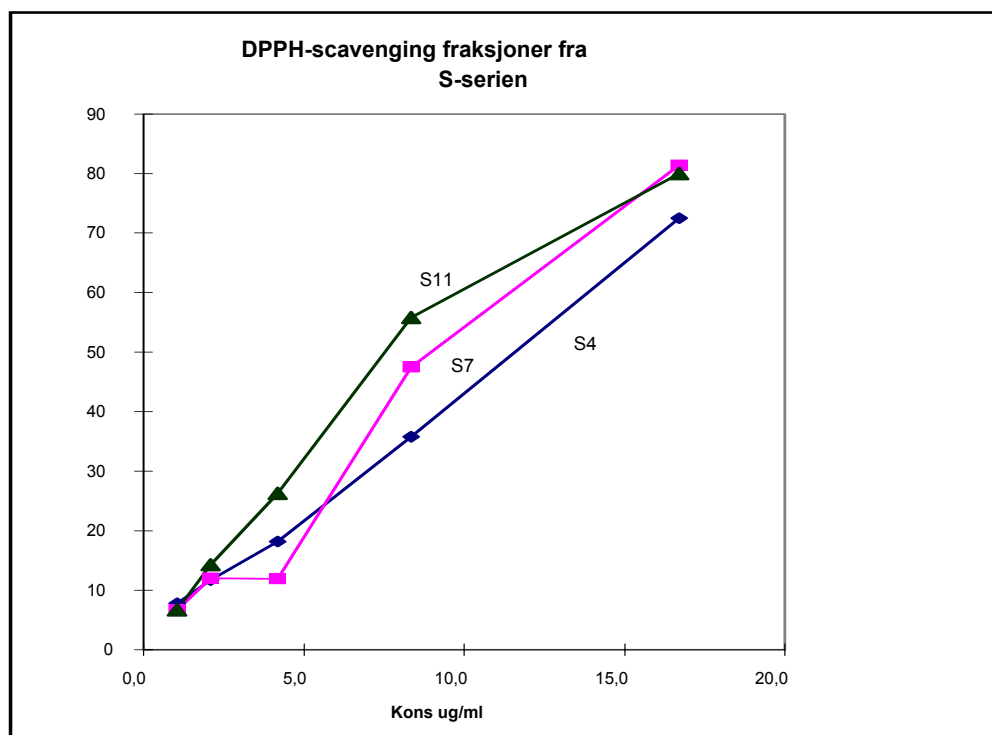


Figur 5.6-B DPPH-scavenging ved 3,4 µg/mL, fraksjon S1 – S11



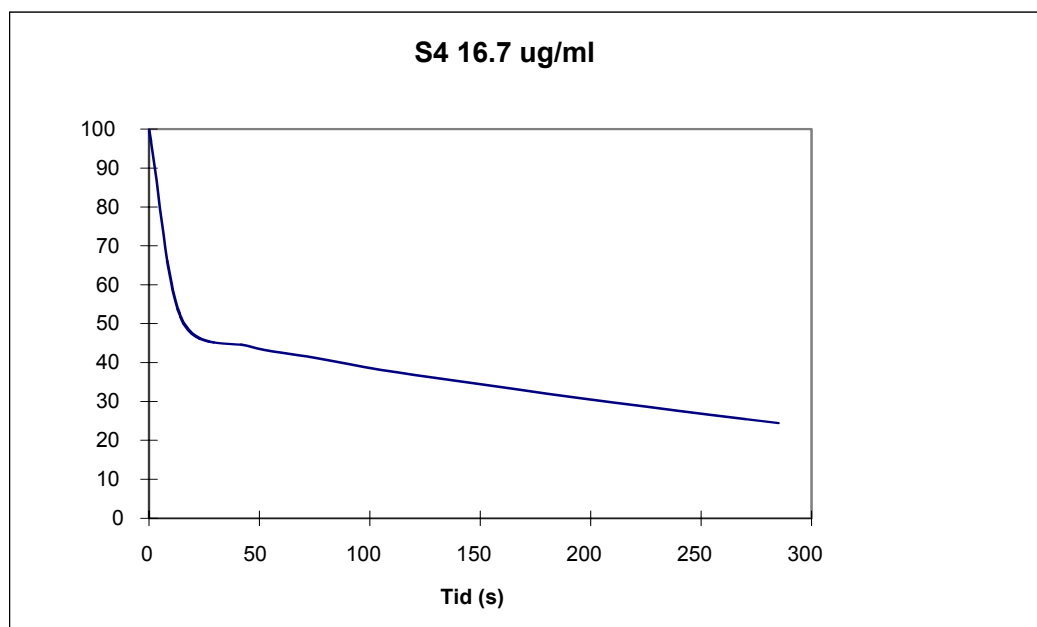
Figur 5.6-C DPPH-scavenging (ved 3,4 µg/mL) x vekt, fraksjon S1 – S11

Det ble testet fortynningsserier av S4, S7 og S11 for å se hvilken fraksjon som var mest aktiv og sjekke om andre stoffer enn verbascosid (S7, kfr. pkt. 6.2.5, s. 69) bidro til scavengeraktiviteten. (Kfr. tabell 5.6-2, s. 53.) IC₅₀-verdiene for S4, S7 og S11 var henholdsvis 10,9 ± 0,4 µg/mL, 8,8 ± 0,4 µg/mL og 7,3 ± 0,5 µg/mL, det vil si noenlunde i samme område. Det er dermed sannsynlig at også andre stoffer enn verbascosid bidrar til scavengeraktiviteten. (Se også pkt. 6.3.1, s. 74.)

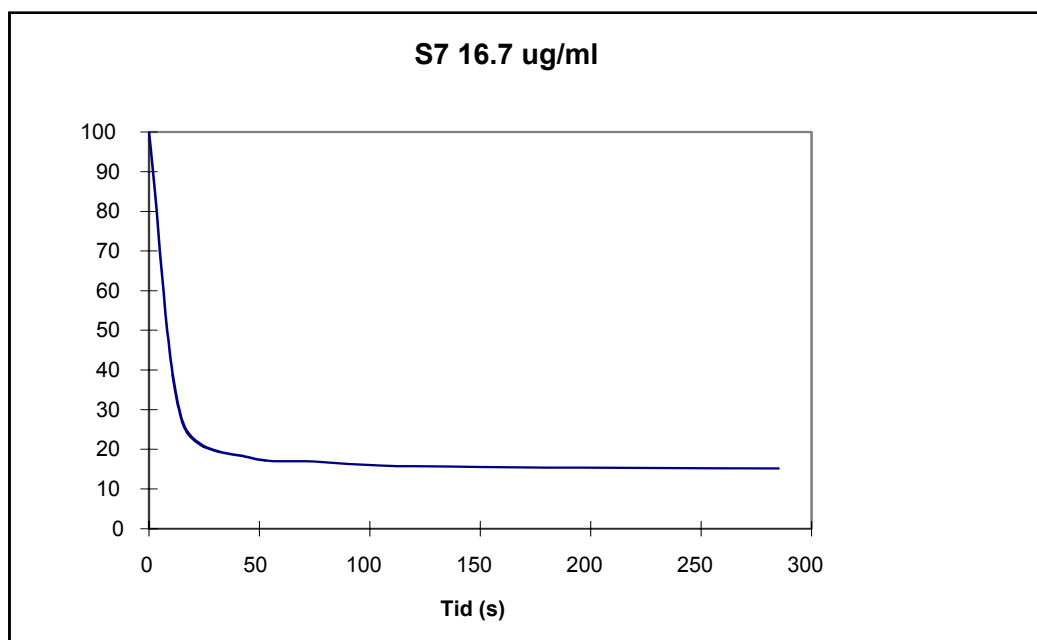


Figur 5.6-D DPPH-scavenging, fortynninger av S4, S7 og S11

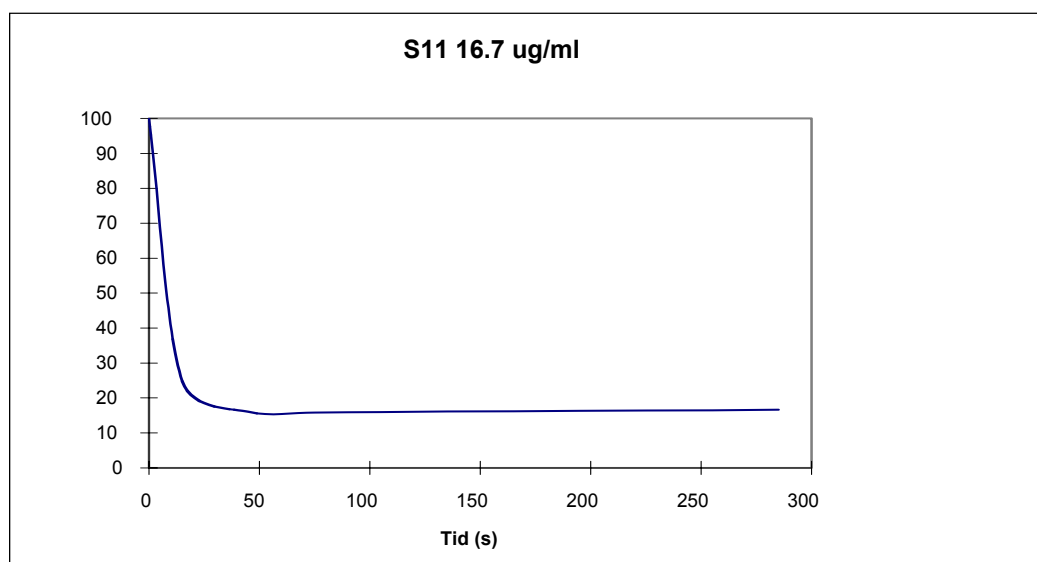
I tillegg ble det laget tidskurver (% scavenging vs. tid) for S4, S7 og S11 ved 16,7 $\mu\text{g/mL}$. Det så ut til at S4 hadde en bifasisk kurve, med en rask scavenger og en langsommere som overtok når denne var oppbrukt, mens S7 og S11 hadde monofasiske kurver, med kun en rask scavenger. (Se figurene 5.6-E til 5.6-G.)



Figur 5.6-E Tidskurve, DPPH-scavenging, fraksjon S4



Figur 5.6-F Tidskurve, DPPH-scavenging, fraksjon S7

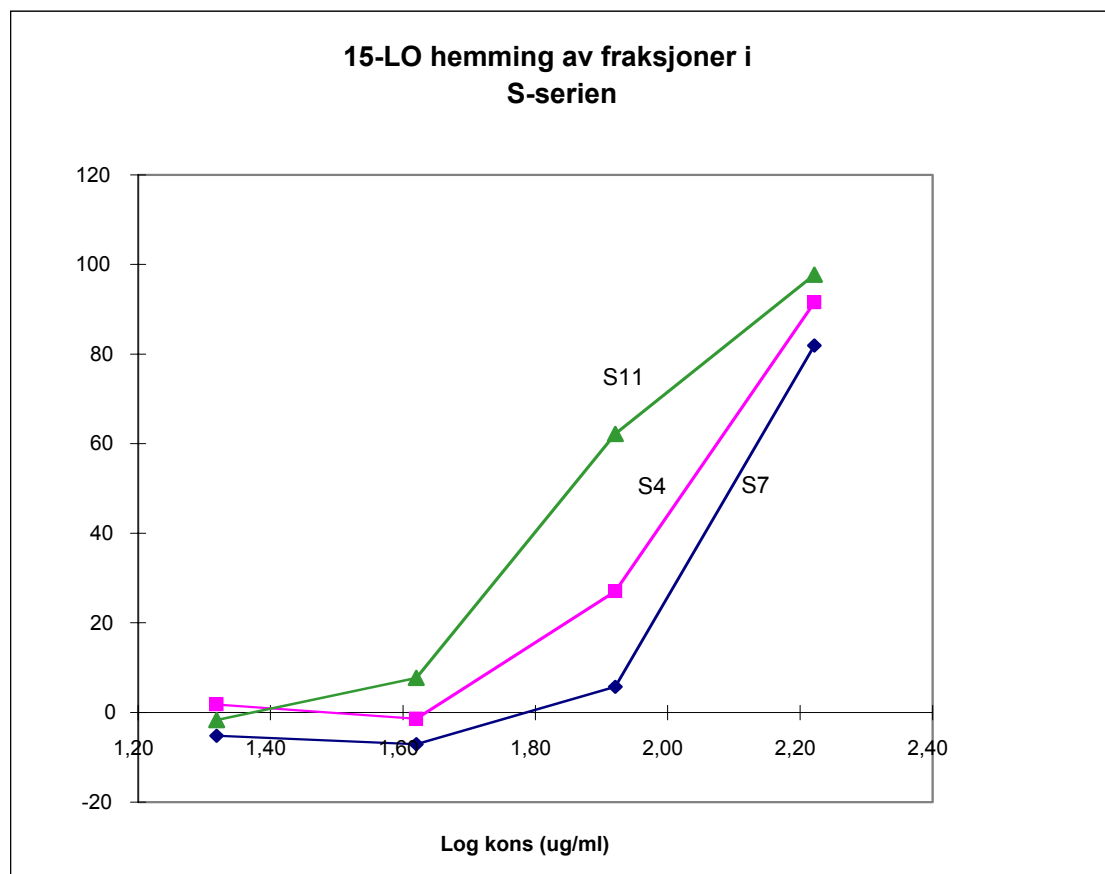


Figur 5.6-G Tidskurve, DPPH-scavenging, fraksjon S11

Tabell 5.6-3 15-LO-modulering, S4, S7 og S11: (NS = ikke signifikant)

MODULERING AV 15-LO AV UTVALGTE FRAKSJONER I S-SERIEN				
Fraksjon	Kons., µg/mL	Hemming (%)	SD	P< (%)
S4	167	91,5	1,6	0,1
	83	27,0	5,5	0,1
	42	-1,4	6,1	NS
	21	1,8	5,7	NS
S7	167	81,9	1,9	0,1
	83	5,7	4,3	5,0
	42	-7,1	7,6	NS
	21	-5,2	7,0	NS
S11	167	97,7	1,1	0,1
	83	62,2	2,1	0,1
	42	7,7	5,4	2,5
	21	-1,7	5,2	NS

Alle de tre testede S-fraksjonene (S4, S7 og S11) hemmet 15-LO i testen (se pkt. 4.2, s. 35). IC₅₀-verdiene for S4, S7 og S11 var henholdsvis 106 ± 5 µg/mL, 124 ± 4 µg/mL og 71 ± 2 µg/mL. Fraksjonen S7 inneholdt tilnærmet ren verbascosid (kfr. pkt. 6.2.5, s. 69) og var den minst aktive av de tre testede fraksjonene i 15-LO-testen. Fraksjon S4 inneholdt noe annet i tillegg til verbascosid, og var mer aktiv enn S7. Det betyr at dette "andre" i S4 må ha vært mer aktivt enn verbascosid med hensyn til 15-LO-hemming. Det samme er tilfellet med fraksjon S11, som inneholdt små mengder verbascosid, men mest annet, blant annet muligens flavonoider. (Se også pkt. 6.2.5, s. 69.)



Figur 5.6-H 15-LO-hemming, fraksjon S4, S7 og S11

Det ble besluttet å gå videre med fraksjonene S4 og S11 for å forsøke å finne andre stoffer enn verbasosid som bidro til den observerte aktiviteten.

5.7 M-serien (underfraksjoner av S4)

Fraksjon S4 ble fraksjonert med kolonnekromatografi; se også pkt. 4.8.2, s. 42, og flytskjema 2, s. A-2, vedlegg A.

Tabell 5.7-1 Fraksjonering av S4 og utbytte for M-serien:

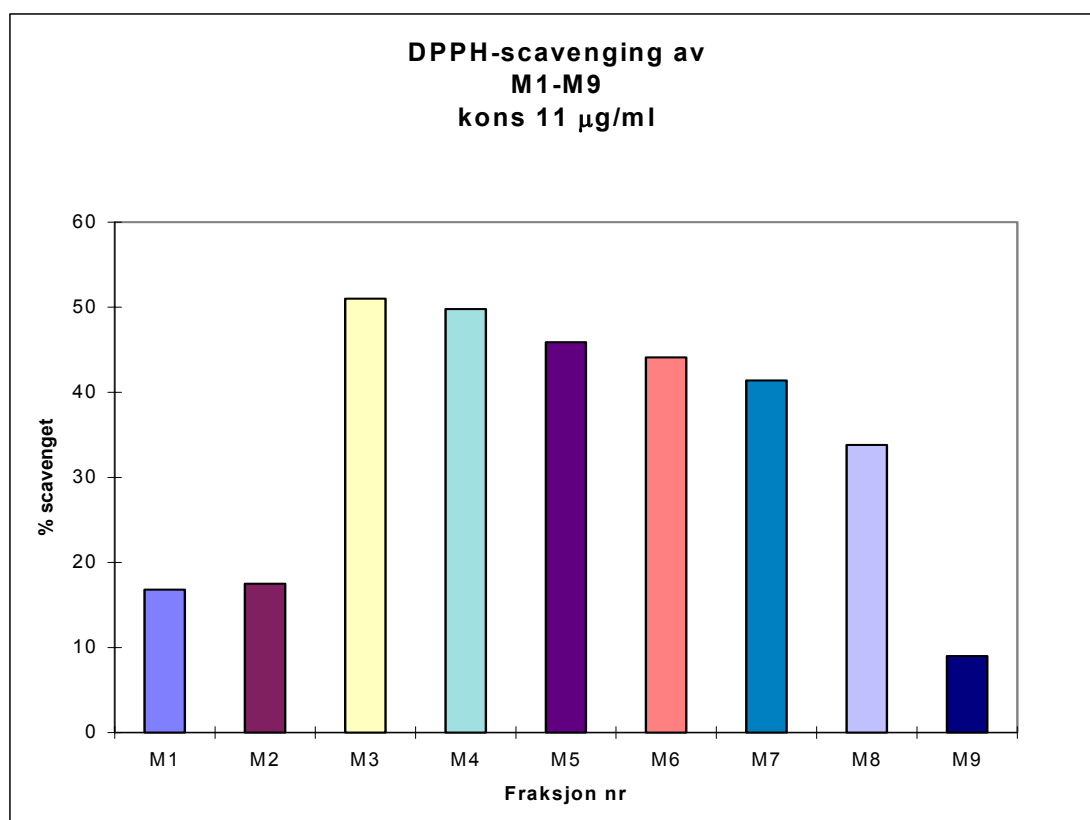
Kolonnekromatografi av S4 på MCI-gel CHP20P (omvendt fase), gradienteluering		
Fraksjon	Kolonnefraksjoner	Utbytte ($\Sigma = 181,5$ mg)
M1	0 – 7	5,6 mg (3,09 %)
M2	8 – 14	15,1 mg (8,32 %)
M3	15	20,7 mg (11,40 %)
M4	16	70,1 mg (38,62 %)
M5	17	38,8 mg (21,38 %)
M6	18	13,2 mg (7,27 %)
M7	19 – 20	6,3 mg (3,47 %)
M8	21 – 30	5,6 mg (3,09 %)
M9	31 – 40	6,1 mg (3,36 %)

Summen av utbyttene av fraksjonene M1 – M9 stemmer godt overens med den mengden S4 som ble påsatt kolonnen (ca. 180 mg). (Se for øvrig pkt. 5.8, s. 59, og pkt. 5.3, s. 45.)

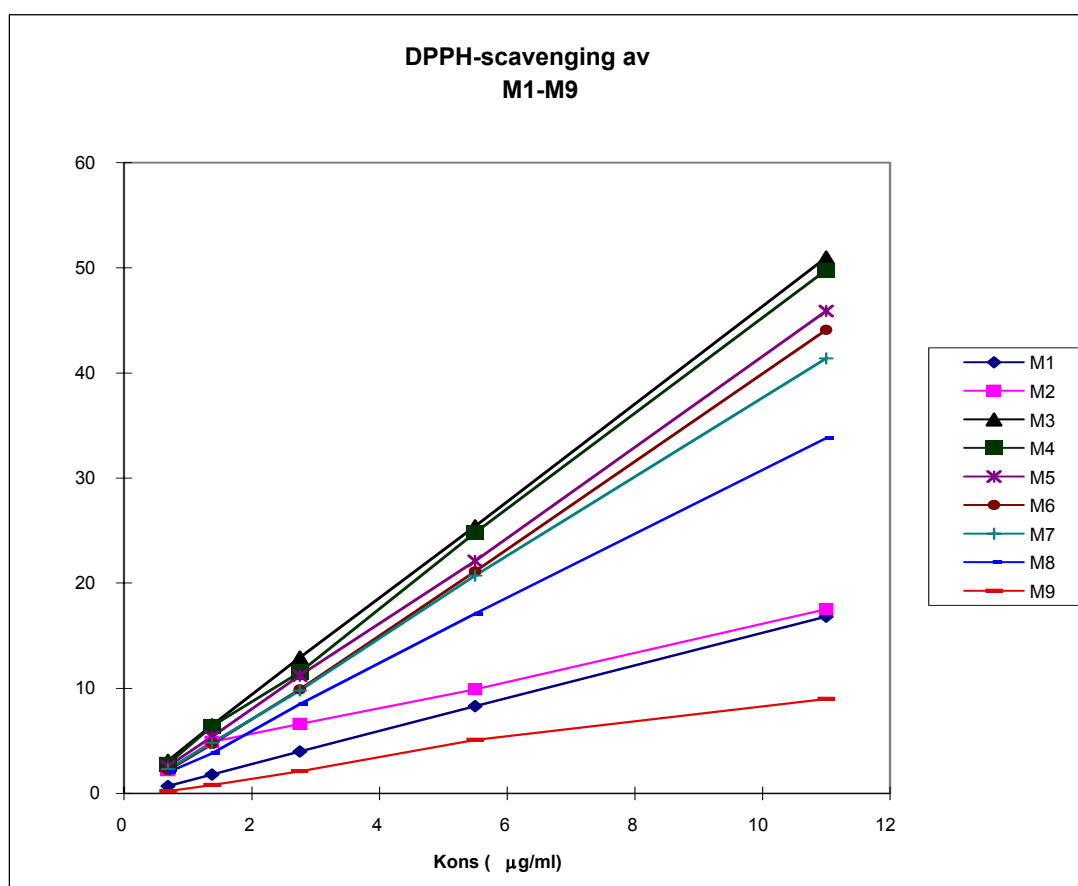
Tabell 5.7-2 Radikalscavenging, M-serien:

Aktivitet av fr. M1 – M9: % DPPH scavenget (etter 5 min.) ± SD					
Fraksjon	11 µg/mL	5,5 µg/mL	2,8 µg/mL	1,4 µg/mL	0,7 µg/mL
M1	16,8 ± 0,8	8,3 ± 0,2	4,0 ± 0,3	1,8 ± 0,4	0,7 ± 0,1
M2	17,5 ± 5,0	9,9 ± 0,8	6,6 ± 0,3	4,9 ± 0,3	2,2 ± 0,1
M3	51,0 ± 0,4	25,4 ± 0,6	12,9 ± 0,6	6,5 ± 0,2	3,1 ± 0,2
M4	49,8 ± 2,0	24,8 ± 1,2	11,5 ± 0,2	6,4 ± 0,9	2,8 ± 0,1
M5	45,9 ± 1,2	22,1 ± 0,6	11,2 ± 0,4	5,4 ± 0,1	2,6 ± 0,6
M6	44,1 ± 2,4	21,1 ± 1,1	9,9 ± 0,5	4,7 ± 0,4	2,2 ± 0,3
M7	41,4 ± 1,5	20,7 ± 1,2	9,8 ± 0,3	4,8 ± 0,2	2,3 ± 0,1
M8	33,8 ± 2,1	17,1 ± 0,2	8,5 ± 0,3	3,8 ± 0,4	2,0 ± 0,1
M9	9,0 ± 0,0	5,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,2 ± 0,2

M-serien (M1 – M9) ble undersøkt i DPPH-testen (se pkt. 4.1, s. 34). Alle fraksjonene ble testet i fortynningsserier, kfr. tabell 5.7-2. Fraksjonene M1, M2 og M9 var lite aktive. Aktiviteten var størst i M3, $IC_{50} = 10,7 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$, og M4, og deretter synkende.



Figur 5.7-A DPPH-scavenging, fraksjon M1 – M9



Figur 5.7-B DPPH-scavenging, fraksjon M1 – M9

5.8 F-serien (underfraksjoner av S11)

Fraksjon S11 ble fraksjonert med kolonnekromatografi; se også pkt. 4.8.3, s. 42, og flyt-skjema 2, s. A-2, vedlegg A.

Tabell 5.8-1 Fraksjonering av S11 og utbytte for F-serien:

Kolonnekromatografi av S11 på MCI-gel CHP20P (omvendt fase), gradienteluering		
Fraksjon	Kolonnefraksjoner	Utbytte ($\Sigma = 21,6$ mg)
F1	0 – 9	8,0 mg (37,04 %)
F2	10 – 17	2,8 mg (12,96 %)
F3	18	0,6 mg (2,78 %)
F4	19	0,8 mg (3,70 %)
F5	20	3,2 mg (14,82 %)
F6	21 – 22	1,8 mg (8,33 %)
F7	23 – 27	1,6 mg (7,41 %)
F8	28 – 29	1,0 mg (4,63 %)
F9	30 – 35	1,8 mg (8,33 %)

Summen av utbyttene av fraksjonene F1 – F9 stemmer noenlunde overens med utbyttet av S11. (Litt stoff ble holdt av til referanse, og litt av vekten kan ha vært fuktighet. (Kfr.

pkt. 5.3, s. 45.) I dette tilfellet er forskjellen svært liten (2,5 mg), så en del kan også skyldes måleusikkerhet.)

Tabell 5.8-2 Radikalscavenging, F-serien:

Aktivitet av fr. F1 – F9: % DPPH scavenget (etter 5 min.) ± SD					
Fraksjon	7,3 µg/mL	3,7 µg/mL	1,8 µg/mL	0,9 µg/mL	0,5 µg/mL
F1	-0,2 ± 0,2	-	-	-	-
F2	2,0 ± 0,2	-	-	-	-
F3	1,1 ± 0,1	-	-	-	-
F4	79,6 ± 3,8	39,4 ± 0,3	19,6 ± 1,2	8,8 ± 0,8	4,2 ± 0,2
F5	44,5 ± 1,5	21,2 ± 1,1	11,5 ± 0,5	4,9 ± 0,2	-
F6	45,7 ± 1,9	25,8 ± 1,1	12,1 ± 0,3	6,5 ± 0,4	3,0 ± 0,1
F7	10,9 ± 0,9	6,2 ± 0,1	5,1 ± 0,3	-	-
F8	12,6 ± 0,6	6,8 ± 0,3	3,3 ± 0,1	-	-
F9	3,2 ± 0,4	1,6 ± 0,3	-	-	-

F-serien (F1 – F9) ble undersøkt i DPPH-testen (se pkt. 4.1, s. 34). Alle fraksjonene ble testet ved 7,3 µg/mL. Det ble også testet fortynningsserier av F4 – F9, og beregnet IC₅₀-verdi der det var mulig. De tre første fraksjonene (F1 – F3) og den siste fraksjonen (F9) var tilnærmet inaktive ved de(n) anvendte konsentrasjonen(e). Aktiviteten var klart størst i fraksjon F4, med en IC₅₀-verdi på 4,4 ± 0,1 µg/mL. Fraksjonene F5 og F6 var middels aktive, mens F7 og F8 var litt aktive. (Kfr. tabell 5.8-2.)

5.9 Tynnsjikt-kromatografi (TLC) av F-serien og S5

Det ble utført analytisk TLC av F-serien (F1 – F9) og S5 med standarder av plantamajosid og verbascosid. (Kfr. pkt. 4.4, s. 38.) Fraksjonene F1 – F4 og F7 – F9 inneholdt ikke påviselige mengder verbascosid eller plantamajosid, mens S5 så ut til å inneholde begge disse forbindelsene. De to fraksjonene F5 og F6 var nokså like. Ut fra TLC-analysen var det vanskelig å se om disse prøvene inneholdt verbascosid eller plantamajosid, men NMR-spektrene (se figurene C47 og C48, s. C-25, samt figurene C70 – C76, s. C-37 til C-40, vedlegg C) indikerte at de ikke inneholdt disse stoffene.

6 DISKUSJON

6.1 Ekstraksjon og fraksjonering

For utførelse, se kap. 4, s. 34.

For oversikt over fraksjonene, se flytskjemaer, s. A-1 og A-2 i vedlegg A.

6.1.1 Ekstraksjon

Plantaginis lanceolatae herba ble ekstrahert med 80 % (v/v) vandig etanol. Dette ga et rækstrakt med en variert sammensetning av hydrofile og lipofile stoffer, dog mest karbohydrater (kfr. pkt. 6.2.1, s. 64). Rækstraktet viste konsentrasjonsavhengig radikal-scavengeraktivitet, men påvirket ikke aktiviteten til enzymet 15-lipoksygenase (15-LO) ved den anvendte konsentrasjonen på 167 µg/mL (se pkt. 5.2, s. 44). Radikal-scavengeraktiviteten er i overensstemmelse med aktivitet i de videre fraksjoner, mens manglende aktivitet overfor 15-LO kan tenkes å bunne i for lav konsentrasjon av rækstraktet (kfr. aktivitet av S-fraksjoner, se pkt. 6.4.1, s. 75). Det var imidlertid vanskelig å benytte høyere konsentrasjon(er) på grunn av løselighetsproblemer.

Rækstraktet ble videre suspendert i vann og grovseparert ved væske-væske-ekstraksjon med en serie organiske løsemidler av økende polaritet. Innledningsvis ble de mest lipofile stoffene ekstrahert over i eterfasen, deretter ble stoffer av midlere polaritet ekstrahert først over i etylacetatfasen og så over i n-butanolfasen. De mest polare stoffene ble igjen i vannfasen til slutt. Vannfasen var den klart største fraksjonen, med nesten 2/3 av det totale utbyttet. Dette samsvarer med rækstraktets store karbohydratinnhold (kfr. over og pkt. 6.2.1, s. 64). Etylacetatfasen var minst, med bare 1 % av utbyttet. Eterfasen utgjorde 19 % og n-butanolfasen 14 %.

Råfraksjonene A (etylacetatfraksjonen) og B (n-butanolfaksjonen) viste begge betydelig og like stor radikal-scavengeraktivitet, mens fraksjonene E (eterfraksjonen) og V (vannfasefraksjonen) var lite aktive. (Kfr. pkt. 5.3, s. 45.) Dette var som forventet på bakgrunn av innholdet i de ulike råfraksjonene (se pkt. 6.2.2, s. 64). Se for øvrig pkt. 6.3, s. 73.

Råfraksjonene A, B og V var inaktive overfor enzymet 15-LO ved de testede konsentrasjoner (se pkt. 5.3, s. 45 og over). Råfraksjon E hadde øyensynlig en substrateffekt, som lot seg forklare med fraksjonens innhold av fettstoffer (kfr. pkt. 6.2.2, s. 64) som kunne oksideres av 15-LO under dannelse av konjugerte dobbeltbindinger. Den høyeste konsentrasjonen av råfraksjon E bevirket en liten hemming av enzymet. (Se pkt. 5.3, s. 45.) Det kan tenkes at denne fraksjonen muligens inneholder noe hemmende stoff(er) i tillegg til fettstoffer som fungerer som substrat for enzymet, og at hvilken effekt som dominerer avhenger av konsentrasjonen. (Se for øvrig pkt. 6.4, s. 75.)

Råfraksjonene A og B hemmet jernindusert oksidasjon av fosfolipider fra grisehjerne i sammenlignbar grad (se pkt. 5.3, s. 45). Råfraksjonene E og V ble ikke undersøkt, da de ikke hadde vist nevneverdig aktivitet i de foregående testene. Det var visse problemer

med absorpsjonsmålingen, trolig på grunn av kompleksdannelse, ved de høyeste konsentrasjonene; se pkt. 6.5, s. 76.

På bakgrunn av testresultatene og NMR-data (kfr. pkt. 6.2.2, s. 64) ble råfraksjonene A og B utvalgt til videre separasjon og undersøkelser.

6.1.2 Fraksjonering av råfraksjon A (etylacetatfraksjon)

For utførelse, se pkt. 4.7.1, s. 40.

For resultater, se pkt. 5.4, s. 49.

For oversikt over fraksjonene, se flytskjema 1, s. A-1, vedlegg A.

Råfraksjon A ble fraksjonert ved kolonnekromatografi på en Diaion[®] HP-20-kolonne (en polystyren-divinylbenzen kopolymer; omvendt fase) med gradienteluering med metanol/vann-blandinger (10 – 100 % metanol). Kolonnematerialet og eluenten ble valgt på bakgrunn av tidligere erfaringer ved Avdeling for farmakognosi, Farmasøytisk institutt, og viste seg å fungere rimelig tilfredsstillende også for den aktuelle prøven. Fenyletanoidet verbascosid [tidligere påvist i smalkjempe (kfr. pkt. 3.1.3, s. 4)] ble isolert, trolig med ganske bra renhet (kfr. pkt. 6.2.3, s. 65). Prøveløsningen var mørk brun i fargen, så progresjonen nedover kolonnen kunne til dels følges visuelt. De mest aktive fraksjonene (radikalscavengeraktivitet) viste seg å være de som ble eluert ut med 100 % metanol. Se for øvrig pkt. 6.3, s. 73.

6.1.3 Fraksjonering av råfraksjon B (n-butanolfaksjon) og underfraksjoner

For utførelse, se pkt. 4.7.2, s. 40, og 4.8, s. 41.

For resultater, se pkt. 5.5, s. 50, til 5.8, s. 59.

For oversikt over fraksjonene, se flytskjema 2, s. A-2, vedlegg A.

Råfraksjon B ble også fraksjonert ved kolonnekromatografi på en Diaion[®] HP-20-kolonne med gradienteluering med metanol/vann-blandinger (20 – 100 % metanol) (kfr. pkt. 6.1.2, s. 62). Prøveløsningen som ble påsatt var mørk (rød)brun, og flere av kolonnefraksjonene hadde farge fra gul til rødlig. De mest aktive fraksjonene (radikalscavengeraktivitet) viste seg også her å være de som ble eluert ut med 100 % metanol. Se for øvrig pkt. 6.3, s. 73. Verbascosid dominerte flere av fraksjonene (kfr. pkt. 6.2.4, s. 69), men bortsett fra B3 (som inneholdt ganske ren verbascosid) lyktes det ikke å isolere renstoffer. Fraksjon B6 syntes interessant ut fra NMR-spektre (det var også kolonnefraksjonene som ble B6 som hadde den røde fargen), og kunne godt vært forsøkt fraksjonert ytterligere. Dette ble det imidlertid ikke tid til, da det ble valgt å gå videre med sammenslåing og påfølgende fraksjonering av hovedfraksjonene B3 og B4 først.

Fraksjonene B3 og B4 (sammenslått) ble fraksjonert ved kolonnekromatografi på en Sephadex[®] LH-20-kolonne med gradienteluering med metanol/vann-blandinger (50 – 100 % metanol). Sephadex[®] LH-20 er en hydroksypropylert dekstrangel, som separerer dels ved gelfiltrering, dels ved adsorpsjon, og kan benyttes både med organiske

løsemidler og med vann. Verbascosid fluorescerer (lyseblått) ved belysning med langbølget UV-lys (366 nm), og dette gjorde det mulig å følge progresjonen nedover kolonnen. Foran "verbascosid-båndet" på kolonnen var det for øvrig et gult bånd. Det gule båndet fra kolonnen havnet i fraksjon S2, mens det fluorescerende (lyseblå) båndet havnet i fraksjonene S3 og S4. Etter avsetting av kolonnefraksjoner på tynnsljiktplate og undersøkelse av denne i UV-lys viste det seg imidlertid at det var fraksjonene som ble S4 – S8 (S9) som fluorescerte med lys blålig farge, mens fraksjonene som ble S3 var lyst fiolette. De fleste fraksjonene (S1 – S11) var mer eller mindre gule i fargen (prøveløsningen som ble påsatt var brunlig), med den sterkeste gulfargen i fraksjonene S6 – S8. Disse tre fraksjonene hadde også den største andelen verbascosid, med tilnærmet renstoff i S7. For øvrig inneholdt fraksjon S5 muligens litt plantamajosid og fraksjon S9 kanskje noe isoverbascosid (begge tidligere påvist i smalkjempe, kfr. pkt. 3.1.3, s. 4), i tillegg til at de fleste fraksjonene inneholdt verbascosid i større eller mindre grad. (Kfr. pkt. 6.2.5, s. 69.) Det lyktes heller ikke her å separere og påvise andre renstoffer. Aktivitet i de ulike testene er diskutert i pkt. 6.3, s. 73, til pkt. 6.5, s. 76.

Fraksjonene S4 og S11 ble valgt ut til videre undersøkelser og separasjon fordi de var de aktive fraksjonene i S-serien som var "lengst unna" S7 (tilnærmet ren verbascosid), og dermed inneholdt mindre verbascosid. Det var ønskelig å forsøke å finne ut hvilke andre substanser som var aktive i disse fraksjonene. Det kunne også vært interessant å prøve å separere plantamajosid og verbascosid fra fraksjon S5, men dette ble det ikke tid til i denne omgang.

Fraksjonene S4 og S11 ble således fraksjonert ved kolonnekromatografi på hver sin MCI-gel CHP20P-kolonne med gradienteluering med metanol/vann-blandinger (100 % vann – 100 % metanol). MCI-gel er en polystyren-divinylbenzen kopolymer (omvendt fase), mer finkornet og finporet enn Diaion[®] (se over). S4 ga fraksjonene M1 – M9, mens S11 ga fraksjonene F1 – F9. De midterste fraksjonene i M-serien (M3 – M6) var gule av farge i vanlig lys, lilla i kortbølget UV-lys (254 nm) og fluorescerte med lyseblå farge når de ble belyst med langbølget UV-lys (366 nm). Disse fraksjonene viste seg å inneholde verbascosid i større eller mindre grad. M2 og M6 rommet dessuten kanskje metoksyflavonoidglykosid(er) (kfr. pkt. 6.2.6, s. 71). Det ser ikke ut som metoksyflavonoider er rapportert tidligere i *P. lanceolata*. For øvrig lyktes det ikke å separere eller påvise andre renstoffer. Heller ikke i F-serien ble det registrert noen renstoffer. Fraksjon F3 hadde en svakt fiolett farge, mens F4, F5 og til dels F6 var lysegule. Disse lysegule fraksjonene (F4 – F6) kunne muligens inneholde fenyletanoider, i tillegg til andre stoffer. (Se pkt. 6.2.7, s. 72.) Aktivitet i de ulike testene er diskutert i pkt. 6.3, s. 73, til pkt. 6.5, s. 76.

6.2 Tolkning av NMR-spektre

For spektre, se vedlegg C, s. C-1 til C-40.

6.2.1 Råekstrakt

Både ^1H -NMR- og ^{13}C -NMR- spektret (figur C1 og C2, s. C-1, vedlegg C) viste at råekstraktet inneholdt mest karbohydrater (signaler rundt 3,0 – 5,0 ppm i ^1H -NMR og ca. 60 – 70 (for C-6), ca. 70 – 80 (for C-2 – C-5) samt ca. 90 – 110 (for C-1) ppm i ^{13}C -NMR). I tillegg var det et lite signal som tydet på lipidinnhold (ca. 1,2 – 1,4 ppm i ^1H -NMR og ca. 30 ppm i ^{13}C -NMR) og noen enda mindre signaler i aromat-/alken (olefin)-området (ca. 5 – 7 i ^1H -NMR og ca. 110 – 160 ppm i ^{13}C -NMR) og karbonyl-området (\geq ca. 170 ppm i ^{13}C -NMR).

6.2.2 Råfraksjoner

Råfraksjon E (eterfraksjon): Råfraksjon E inneholdt stort sett fett.

Tabell 6.2.2-1 Signaler i ^1H -NMR-spektret for råfraksjon E

^1H -NMR, råfraksjon E	
Signal (ppm)	Innhold
Ca. 0,8 – 1,0	CH_3 (ende av fettsyre)
Ca. 1,2 – 1,6	CH_2 (mettet hydrokarbon) (1,3 – asyklisk, 1,5 – syklisk)
Ca. 1,8 – 3,0	CH_2 nabo til dobbeltbinding ($\text{C}=\text{C}$ eller $\text{C}=\text{O}$), mellom to dobbeltbindinger eller "nestnabo" til karbonyl
Ca. 4,0 – 4,4	glyseroidel av triglyserid
Ca. 5,2 – 5,4	alken ($\text{RCH}=\text{CR}_2$)

Det største signalet i ^1H -NMR-spektret (figur C3, s. C-2, vedlegg C) var rundt 1,3 ppm (kfr. tabell 6.2.2-1). ^{13}C -NMR-spektret (figur C4, s. C-2, vedlegg C) hadde også signaler samsvarende med alifatiske hydrokarboner (ca. i området 10 – 40 ppm) og alkener/aromater (se pkt. 6.2.1 over).

Råfraksjon A (etylacetatfraksjon): Denne fraksjonen så ut til å inneholde blant annet fenyletanoider (tidligere kjent i smalkjempe, kfr. pkt. 3.1.3, s. 4). ^1H -NMR-spektret (figur C5, s. C-3, vedlegg C) hadde en rekke signaler både i alifatområdet (ca. 0,8 – 2,8 ppm), i sukkerområdet (ca. 3,0 – 5,2 ppm) og i aromat-/alken-området (ca. 6 – 8 ppm). ^{13}C -NMR-spektret (figur C6, s. C-3, vedlegg C) viste likeledes signaler i området for alifatiske hydrokarboner (ca. 10 – 40 ppm), i karbohydratområdet (kfr. pkt. 6.2.1 over) og i aromat-/alken-området (ca. 110 – 160 ppm), samt karbonylsignaler (ca. 160 – 180 ppm).

Råfraksjon B (n-butanolfaksjon): (Spektre; se figur C7 og C8, s. C-4, vedlegg C.) Butanolfaksjonen inneholdt en del løsemiddel (butanol; ^1H -NMR-signaler rundt 0,8 – 1,6 ppm og rundt 3,5 ppm, vann; ^1H -NMR ca. 5 ppm) (^{13}C -NMR-signaler ved ca. 14, ca. 20, ca. 35 og ca. 62 – 63 ppm). Signaler ved ca. 47 – 51 ppm (^{13}C -NMR) skyldes

NMR-løsemidlet deuterometanol. Øvrige signaler, spesielt noe som kunne se ut som flere delvis overlappende dubletter ved ca. 6,3 og 7,6 ppm ($^1\text{H-NMR}$), lignet spektret for kaffesyre og kaffesyrederivater (f.eks. fenyletanoider, kfr. Råfraksjon A over). Disse dublettene kan i så fall stamme fra de to alkenhydrogenatomene i kaffesyre. Både kaffesyre og derivater av denne forbindelsen er tidligere påvist i smalkjempe (kfr. pkt. 3.1.3, s. 4). Det var også et ^1H -signal ved ca. 2,6 ppm i alifatområdet (trolig CH_2 i fenyletanoid). $^{13}\text{C-NMR}$ -spektret hadde enkelte signaler i alifatområdet (se over), og ellers i karbohydratområdet (se over) og aromat-/alken-området (se over), samt karbonyl-signaler (se over).

Råfraksjon V (vannfasefraksjon): (Spektre; se figur C9 og C10, s. C-5, vedlegg C.) Denne fraksjonen inneholdt stort sett karbohydrater/sukker (signaler fra rundt 3 til ca. 5,2 ppm i $^1\text{H-NMR}$ og ca. 60 – 70 (for C-6), ca. 70 – 90 (for C-2 – C-5) samt rundt 100 (for C-1) ppm i $^{13}\text{C-NMR}$). Det var dessuten et signal ved ca. 6,3 – 6,4 ppm i $^1\text{H-NMR}$ og ved ca. 137 ppm i $^{13}\text{C-NMR}$. Dette kan kanskje tenkes å stamme fra et iridoid. Iridoider er tidligere påvist i smalkjempe (kfr. pkt. 3.1.3, s. 4). De observerte signalene ser imidlertid ut til å stemme dårlig med strukturene av aucubin og catalpol.

6.2.3 Underfraksjoner av A

Det foreligger $^1\text{H-NMR}$ -spektre for alle fraksjonene (A1 – A11), mens bare A5 – A8 har $^{13}\text{C-NMR}$ -spektre. (Spektre; se figur C11 – C25, s. C-6 til C-13, vedlegg C.) Kun enkelte fraksjoner er kommentert. De spektrene som ikke er beskrevet er av liten interesse.

- **A2:** $^1\text{H-NMR}$ -spektret hadde en rekke signaler både i alifatområdet (ca. 1 – 3 ppm), i sukkerområdet (ca. 3 – 5 ppm) og i aromat-/alken-området (ca. 5 – 8 ppm). Dette var en relativt polar fraksjon (tidlig ut på omvendt fase), så innholdsstoffene her finnes trolig i større mengde i butanolfasefraksjonene.

- **A3 og A4** inneholdt antakelig mest verbascosid, men det var urent og lite stoff. Verbascosid er tidligere påvist i smalkjempe (kfr. pkt. 3.1.3). Mulige verbascosid-signaler (kfr. tabell 6.2.3-4, s. 67); se tabell 6.2.3-1.

Tabell 6.2.3-1 Mulige verbascosidsignaler i $^1\text{H-NMR}$ -spektrene for fr. A3 og A4

Signal (ppm)	Mulig innhold
ca. 1,1	C6 i rhamnose (CH_3)
2,78	Ar- CH_2 i dihydroksyfenyletanoldel
3,30	C4 i rhamnose (overlapping)
3,54 – 3,55	glukose-/rhamnosesignaler
ca. 3,7 – 3,8	glukosesignaler
4,35	C1 i glukose
ca. 6,7	aromatprotoner i dihydroksyfenyletanoldel
ca. 7,6, 7,06, 6,95, ca. 6,8 og 6,28	kaffeoyldel

- **A5** inneholdt formodentlig en del verbascosid, trolig i tillegg til noe annet. Mulige verbascosidsignaler (kfr. tabellene 6.2.3-4, s. 67, og 6.2.3-5, s. 68); se tabellene 6.2.3-2 og 6.2.3-3 under.

Tabell 6.2.3-2 Mulige verbascosidsignaler i ^1H -NMR-spektret for fraksjon A5

Signal (ppm)	Mulig innhold
ca. 1,1	C6 i rhamnose (CH_3)
ca. 2,8	Ar- CH_2 i dihydroksyfenyletanoldel
ca. 3,3 – 4,9	glukose-/rhamnosesignaler
ca. 6,6 – 6,7	aromatprotoner i dihydroksyfenyletanoldel
ca. 7,6, 7,06, 6,99 og 6,29	kaffeoyldel

Tabell 6.2.3-3 Mulige verbascosidsignaler i ^{13}C -NMR-spektret for fraksjon A5

Signal (ppm)	Mulig innhold
18,5	C6 i rhamnose (CH_3)
36,6	Ar- CH_2 i dihydroksyfenyletanoldel
62,4	C6 i glukose
70,5	glukose-/rhamnosesignal
72,3	C8/ α i dihydroksyfenyletanoldel
73,8	C4 i rhamnose
76,2 og 81,7	glukosesignaler
103,0	C1 i rhamnose
104,2	C1 i glukose
114,8	C8 i kaffeoyldel
115,3	C2 (aromat) i kaffeoyldel
116,4	aromatsignal i dihydroksyfenyletanoldel eller kaffeoyldel
117,2	aromatsignal i dihydroksyfenyletanoldel
121,3	C6 (aromat) i dihydroksyfenyletanoldel
123,3	C6 (aromat) i kaffeoyldel
127,7	C1 (aromat) i kaffeoyldel
131,5	C1 (aromat) i dihydroksyfenyletanoldel
148,1	kaffeoylsignal(er) (C7)
168,4	karbonyl i kaffeoyldel

- **A6** inneholdt verbascosid, trolig av ganske bra renhet.

^1H -NMR-signaler (kfr. tabell 6.2.3-4, s. 67, og A3 – A5): 1,1, 2,8, 3,3 – 5,2, 6,28 (kaffeoyl), 6,6 – 6,7 (dihydroksyfenyletanoldel), 6,95, 7,07 og 7,6 ppm

^{13}C -NMR-signaler (kfr. tabell 6.2.3-5, s. 68, og A5): 18,4, 36,5, 62,3, 70,4, 72,3, 73,8, 75,9 (glukose), 81,7, 103,0, 104,1, 114,7, 115,3, 116,4, 116,6 (aromat), 117,2, 121,3, 123,3, 127,7, 131,5, 144,6 og 146,0 (aromat i dihydroksyfenyletanoldel), 146,7 (aromat i kaffeoyldel), 148,1, 149,7 (aromat i kaffeoyldel) og 168,4 ppm.

- **A7** inneholdt sannsynligvis stort sett verbascosid. (Signaler kfr. tabellene 6.2.3-4, s. 67, og 6.2.3-5, s. 68, og A3 – A6.)

- **A8** lignet A7.

- **A9** var en kompleks blanding, og ikke alt stoff ble oppløst. ^1H -NMR-spektret hadde en rekke signaler både i alifatområdet (ca. 0,8 – 3 ppm), i sukkerområdet (ca. 3 – 5 ppm) og i aromat-/alken-området (ca. 5 – 8 ppm).

Tabell 6.2.3-4 ¹H-NMR-data for verbascosid, isoverbascosid og plantamajosid
(i CD₃OD) (G = Gao & al. 1999, K = Kobayashi & al. 1987, R = Ravn & al. 1990)

H	Verbascosid	Isoverbascosid	Plantamajosid
Aglykon/ Dihydroksyfenetyl-del:			
2	6,70 (d, 2,0) (G)	6,67 (d, 1,9) (G)	
5	6,68 (d, 8,0) (G)	6,63 (d, 8,3) (G)	
6	6,56 (dd, 8,0, 2,0) (G)	6,53 (d, 8,3, 1,9) (G)	
α		3,71 m, 3,95 m (G)	
β (G) / Ar-CH ₂ - (K)/ H-7 (R)	2,78 (K) / 2,77 (R) (2H, t, <i>J</i> = 7 Hz) (K/R)	2,78 m (G) / 2,77 (2H, t, <i>J</i> = 7 Hz) (K)	2,79 (2H, t, <i>J</i> = 7 Hz) (R)
Glukose (inter) (= mellom dihydroksyfenyletanoldel og kaffesyre):			
1'	4,37 (d, 7,8) (G) / 4,36 (K) / 4,35 (R) (1H, d, <i>J</i> = 8 Hz) (K/R)	4,34 (d, 7,8) (G) / 4,33 (3H, d, <i>J</i> = 8 Hz) (K)	4,42 (1H, d, <i>J</i> = 8 Hz) (R)
2'	3,39 (dd, 9,3, 7,8) (G)	3,34* (G)	
3'	3,81 (t, 9,3) (G)	3,53 (t, 9,3) (G)	
4'	4,94 (t, 9,3) (G)	3,40 (t, 9,3) (G)	
5'	3,54 (m) (G)	3,51 (m) (G)	
6'	3,53 (dd, 12,2, 2,0) (G), 3,71 (dd, 12,2, 2,0) (G)	4,49 (dd, 12,2, 2,0) (G) 4,35 (dd, 12,2, 5,8) (G)	
Rhamnose:			Glukose (ytre):
1''	5,18 (d, 2,0) (G) / 5,17 (K/R) (1H, d, <i>J</i> = 1 Hz) (K) / (1H, br s) (R)	5,18 (d, 2,0) (G) / 5,18 (1H, br s) (K)	4,54 (1H, d, <i>J</i> = 7 Hz) (R)
2''	3,92 (dd, 3,4, 2,0) (G)	3,94 (dd, 3,4, 2,0) (G)	
3''	3,68* (G)	3,71 (dd, 9,7, 3,4) (G)	
4''	3,30* (G)	3,38 (t, 9,3) (G)	
5''	3,55 m (G)	3,97 m (G)	
6'' (CH ₃)	1,09 (d, 6,4) (G) / 1,10 (3H, d, <i>J</i> = 6 Hz) (K/R)	1,22 (d, 6,4) (G) / 1,26 (3H, d, <i>J</i> = 6 Hz) (K)	
Ester-/kaffeoyldel:			
2	7,06 (d, 2,0) (G)	7,04 (d, 2,0) (G)	
5	6,78 (d, 8,3) (G)	6,77 (d, 8,3) (G)	
6	6,95 (dd, 8,3, 2,0) (G)	6,88 (dd, 8,3, 2,0) (G)	
7 (G) / Ar-CH=CH- (K) / H-7' (R)	7,59 (d, 16,0) (G) / 7,58 (K) / 7,55 (R) (1H, d, <i>J</i> = 16 Hz) (K/R)	7,56 (d, 16,0) (G) / 7,54 (1H, d, <i>J</i> = 16 Hz) (K)	7,58 (1H, d, <i>J</i> = 16 Hz) (R)
8 (G) / Ar-CH=CH- (K) / H-8' (R)	6,28 (d, 16,0) (G) / 6,25 (K) / 6,23 (R) (1H, d, <i>J</i> = 16 Hz) (K/R)	6,29 (d, 16,1) (G) / 6,28 (1H, d, <i>J</i> = 16 Hz) (K)	6,31 (1H, d, <i>J</i> = 16 Hz) (R)

* = overlapper med annet signal

Aromatisk H (K): 6,4 – 7,1 (6H) (K) (verbascosid og isoverbascosid)
(Strukturer; se fig. 3.1-B, s. 7.)

Tabell 6.2.3-5 ^{13}C -NMR-data for verbascosid, isoverbascosid og plantamajosid (i CD_3OD) (G = Gao & al. 1999, K = Kobayashi & al. 1987, R = Ravn & al. 1990)

C	Verbascosid	Isoverbascosid	Plantamajosid
Aglykon (G/K) / 3,4-Dihydroksyfenetyl-del (R):			
1	131,3 (G) / 131,4 (K/R)	131,6 (G) / 131,4 (K)	131,5 (R)
2	117,0 (G) / 117,1 (K) / 116,2 (R)	117,2 (G) / 117,1 (K)	116,3 (R)
3	144,2 (G) / 145,9 (K/R)	144,9 (G) / 146,0 (K)	146,0 (R)
4	145,6 (G) / 144,4 (K/R)	145,3 (G) / 144,6 (K)	144,5 (R)
5	116,2 (G) / 116,3 (K) / 117,0 (R)	116,6 (G) / 116,3 (K)	117,2 (R)
6	121,1 (G/R) / 121,3 (K)	121,5 (G) / 121,3 (K)	121,2 (R)
α (G/K) / 8 (R)	72,3 (G) / 72,2 (K) / 72,0 (R)	72,4 (G) / 72,3 (K)	72,2 (R)
β (G/K) / 7 (R)	36,5 (G) / 36,4 (K) / 36,3 (R)	36,8 (G) / 36,6 (K)	36,4 (R)
Glukose (inter) (= mellom dihydroksyfenyletanoldel og kaffesyre):			
1'	104,1 (G) / 104,0 (K/R)	104,6 (G) / 104,3 (K)	103,9 (R)
2'	76,2 (G) / 75,8 (K/R)	75,9 (G) / 75,4 (K)	75,9 (R)
3'	81,6 (G/K) / 81,5 (R)	84,1 (G) / 84,0 (K)	84,2 (R)
4'	70,3 (G/K) / 70,2 (R)	70,6 (G) / 70,0 (K)	70,8 (R)
5'	75,8 (G/R) / 76,0 (K)	75,6 (G/K)	75,9 (R)
6'	62,3 (G/K) / 62,2 (R)	64,8 (G) / 64,6 (K)	62,3 (R)
Rhamnose:			Glukose (ytre):
1''	102,3 (G) / 102,8 (K/R)	102,3 (G) / 102,7 (K)	105,7 (R)
2''	71,7 (G) / 72,0 (K/R)	70,6 (G) / 72,3 (K)	75,9 (R)
3''	71,5 (G) / 72,0 (K/R)	70,5 (G) / 72,3 (K)	77,6 (R)
4''	73,7 (G/K/R)	74,2 (G) / 74,0 (K)	71,2 (R)
5''	70,2 (G/R) / 70,5 (K)	70,2 (G) / 70,4 (K)	77,7 (R)
6''	18,3 (G) / 18,4 (K) / 18,2 (R)	18,0 (G) / 17,8 (K)	62,3 (R)
Ester-/kaffeoyldel:			
1	127,5 (G/R) / 127,6 (K)	127,7 (G/K)	127,7 (R)
2	115,1 (G) / 115,3 (K) / 115,2 (R)	115,4 (G) / 115,1 (K)	115,3 (R)
3	149,6 (G) / 146,6 (K/R)	149,8 (G) / 146,7 (K)	146,7 (R)
4	146,7 (G) / 149,5 (K/R)	146,8 (G) / 149,5 (K)	149,6 (R)
5	116,4 (G/R) / 116,5 (K)	116,7 (G) / 116,5 (K)	116,6 (R)
6	123,2 (G/K) / 123,0 (R)	123,4 (G) / 123,1 (K)	123,1 (R)
7 (G/R) / γ (K)	147,8 (G/R) / 147,9 (K)	148,2 (G) / 147,2 (K)	147,3 (R)
8 (G/R) / β (K)	114,6 (G/K/R)	114,7 (G) / 114,9 (K)	115,3 (R)
CO (G) / α (K) / 9 (R)	168,2 (K/R)	168,4 (G) / 169,1 (K)	168,5 (R)

(Strukturer; se fig. 3.1-B, s. 7.)

6.2.4 Underfraksjoner av B

Det foreligger $^1\text{H-NMR}$ -spektre for alle fraksjonene (B1 – B9), mens bare B2, B3, B5 og B6 har $^{13}\text{C-NMR}$ -spektre. (Spektre; se figur C26 – C38, s. C-13 til C-20, vedlegg C.) Kun enkelte fraksjoner er kommentert. De spektrene som ikke er beskrevet er av liten interesse.

- **B2** inneholdt antakeligvis mest verbascosid. Mulige verbascosidsignaler (kfr. pkt. 6.2.3, s. 65, og tabellene 6.2.3-4, s. 67, og 6.2.3-5, s. 68):

$^1\text{H-NMR}$: 1,1, 2,8, 3,3 – 5,2, 6,3, 6,6, 6,7, 6,8, 7,0, 7,1 og 7,6 ppm

$^{13}\text{C-NMR}$: 18,4, 36,4, 62,3, 70,4, 71,5, 72,2, 73,8, 75,9, 102,9, 104,0, 114,7, 115,3, 116,4 – 117,2, 121,3, 123,3, 127,6, 131,5, 144,5 – 146,0, 146,7 – 149,6 og 168,3 ppm

- **B3** bestod av ganske ren verbascosid. Mulige verbascosidsignaler (kfr. pkt. 6.2.3, s. 65, og tabellene 6.2.3-4, s. 67, og 6.2.3-5, s. 68): $^1\text{H-NMR}$: Se B2. Dublettene ved henholdsvis 6,3 og 7,6 ppm stammer sannsynligvis fra de to alkenprotonene (på C7 og C8) i kaffeoyldelen. $^{13}\text{C-NMR}$: 18,4, 36,3, 62,2, 70,3, 71,9, 72,1, 73,6, 75,7, 81,7, 102,9, 103,9, 114,6, 115,3, 116,4, 116,6, 117,2, 121,3, 123,3, 127,5, 131,5, 144,4, 145,8, 146,6, 148,0, 149,5 og 168,4 ppm

- **B4** inneholdt også verbascosid, men ikke så rent som B3. (Signaler; se B2.)

- **B5** bestod stort sett av verbascosid. (Se B3. Dublettene ved hhv. ca. 6,3 og 7,6 ppm er synlige også i dette spektret.)

- **B6** ga et komplekst spektrum, og *kan* inneholde verbascosid, men inneholdt i tillegg mye annet (karbohydrater, lipider, aromatiske/fenoliske forbindelser). Foruten mulige verbascosidsignaler (se over), var det signaler i alifatområdet (ca. 0,8 – 2,8 ppm i $^1\text{H-NMR}$ / ca. 10 – 40 ppm i $^{13}\text{C-NMR}$), karbohydratområdet (ca. 3,5 – 5,2 ppm i $^1\text{H-NMR}$ / ca. 60 – 110 ppm i $^{13}\text{C-NMR}$) og aromat-/alken-området (ca. 6 – 8 ppm i $^1\text{H-NMR}$ / ca. 110 – 160 ppm i $^{13}\text{C-NMR}$).

- **B7** hadde et interessant, men ukjent innhold. De fleste store signalene i $^1\text{H-NMR}$ -spektret var i alifatområdet (ca. 0,8 – 2,6 ppm). Det var også noen mindre karbohydrat-signaler (ca. 3 – 5 ppm). Dessuten var det en del mindre signaler (7,2 – 7,9 ppm) i aromat-/alken-området.

6.2.5 S-serien (S1 – S11)

Det foreligger både $^1\text{H-NMR}$ - og $^{13}\text{C-NMR}$ -spektre for alle fraksjonene, unntatt S10, som kun har $^1\text{H-NMR}$ -spektrum. Dette spektret er ikke beskrevet, da det var urent og lite stoff. (Spektre; se figur C39 – C60, s. C-21 til C-31, vedlegg C.)

- **S1**: Begge spektrene hadde en rekke signaler i alifatområdet (ca. 1 – 3 ppm i $^1\text{H-NMR}$, ca. 14 – 42 ppm i $^{13}\text{C-NMR}$) og i karbohydratområdet (ca. 3 – 5 ppm i $^1\text{H-NMR}$, ca. 60 – 106 ppm i $^{13}\text{C-NMR}$). Det var også noen signaler i alken-/aromat-området (ca. 5 – 8 ppm i $^1\text{H-NMR}$, ca. 125 – 175 ppm $^{13}\text{C-NMR}$). Det kan tenkes å være iridoider i denne fraksjonen, men spektrene stemmer dårlig overens med litteraturdata for aucubin, som angitt hos Görler & al. (1985).

- **S2** lignet S1, men med litt flere og mer intense signaler i alken-/aromat-området.

- **S3**: Løsningen inneholdt noe utfelt materiale. Spektrene viste noen få signaler i alifat-området, store utslag i karbohydratområdet og en hel del signaler i alken-/aromat-området.

- **S4** inneholdt sannsynligvis verbascosid, i tillegg til andre forbindelser. Mulige verbascosidsignaler (kfr. tabellene 6.2.3-4, s. 67, og 6.2.3-5, s. 68); se tabellene 6.2.5-1 og 6.2.5-2. En mulig dublett ved 6,3 ppm (6,26 og 6,34) i $^1\text{H-NMR}$ har $J = 15,8$ Hz, noe som samsvarer med tabellverdien (Ar-CH=CH-) (se tabell 6.2.3-4, s. 67).

Tabell 6.2.5-1 Mulige verbascosidsignaler i $^1\text{H-NMR}$ -spektret for fraksjon S4

Signal (ppm)	Mulig innhold
ca. 1,1	C6 i rhamnose (CH_3)
ca. 2,8	Ar-CH_2 i dihydroksyfenyletanoldel
ca. 3,3 – 4,9	glukose-/rhamnosesignaler
ca. 6,6 – 6,7	aromatprotoner i dihydroksyfenyletanoldel
ca. 7,6, 7,1, 6,96 og 6,3	kaffeoyldel

Tabell 6.2.5-2 Mulige verbascosidsignaler i $^{13}\text{C-NMR}$ -spektret for fraksjon S4

Signal (ppm)	Mulig innhold
18,4	C6 i rhamnose (CH_3)
36,4	Ar-CH_2 i dihydroksyfenyletanoldel
62,2	C6 i glukose
70,4	glukose-/rhamnosesignal
72,1	C8/ α i dihydroksyfenyletanoldel
73,7	C4 i rhamnose
75,8 og 82,3	glukosesignaler
101,8	C1 i rhamnose
103,9	C1 i glukose
114,5	C8 i kaffeoyldel
115,2	C2 (aromat) i kaffeoyldel
116,3 – 117,1	aromatsignaler i dihydroksyfenyletanoldel eller kaffeoyldel
121,3	C6 (aromat) i dihydroksyfenyletanoldel
123,2	C6 (aromat) i kaffeoyldel
127,5	C1 (aromat) i kaffeoyldel
131,4	C1 (aromat) i dihydroksyfenyletanoldel
144,4 – 145,8	aromatsignaler i dihydroksyfenyletanoldel
146,5 – 149,5	aromatsignaler i kaffeoyldel (bl.a. C7)
168,2	karbonyl i kaffeoyldel

- **S5** inneholdt verbascosid og muligens litt plantamajosid (tidligere påvist i smalkjempe, kfr. pkt. 3.1.3, s. 4). (Mulige verbascosidsignaler; se over.) Mulige plantamajosidsignaler (kfr. tabell 6.2.3-4, s. 67, og tabell 6.2.3-5, s. 68); se tabellene 6.2.5-3 og 6.2.5-4.

Tabell 6.2.5-3 Mulige plantamajosidsignaler i $^1\text{H-NMR}$ -spektret for fraksjon S5

Signal (ppm)	Mulig innhold
4,42	C1, inter*-glukose
4,55	C1, ytre glukose
6,31	Ar-CH=CH- i kaffeoyldel

* inter-glukose = glukose mellom dihydroksyfenyletanoldel og kaffesyre

Ar-CH=CH- i verbascosid gir en dublett ($J = 15,8$ Hz) ved 6,27 og 6,35 ppm i $^1\text{H-NMR}$, mens den tilsvarende dubletten i plantamajosid kan ses ved 6,31 og 6,39 ppm ($J = 15,9$ Hz). (Kfr. tabell 6.2.3-4, s. 67.)

Tabell 6.2.5-4 Mulige plantamajosidsignaler i $^{13}\text{C-NMR}$ -spektret for fraksjon S5

Signal (ppm)	Mulig innhold
70,8	C4, inter*-glukose
77,6	ytre glukose
84,3	C3, inter*-glukose
105,6	C1, ytre glukose
147,3	Ar-CH=CH- i kaffeoyldel
168,5	karbonyl i kaffeoyldel

* inter-glukose = glukose mellom dihydroksyfenyletanoldel og kaffesyre

- **S6** inneholdt stort sett verbascosid. (Signaler; se over. Dublettene ved henholdsvis 6,3 og 7,6 ppm ($^1\text{H-NMR}$) stammer sannsynligvis fra de to alkenprotonene (på C7 og C8) i kaffeoyldelen. Kfr. S5 og pkt. 6.2.4, s 69.)
- **S7** bestod av tilnærmet ren verbascosid. (Signaler; se over. Dubletter ved 6,3 og 7,6 ppm; se S6.)
- **S8** var nokså lik S7 (se denne).
- **S9** inneholdt muligens både verbascosid og isoverbascosid, i tillegg til andre substanser. $^1\text{H-NMR}$ -spektrene fra to påfølgende dager er litt forskjellige. Det kan tenkes at isoverbascosid hadde blitt omdannet til verbascosid ved henstand av løsningen. Isoverbascosid er tidligere påvist i smalkjempe, kfr. pkt. 3.1.3, s. 4. (Mulige verbascosid-signaler; se over.) Mulige isoverbascosidsignaler ($^1\text{H-NMR}$, kfr. tabell 6.2.3-4, s. 67); se tabell 6.2.5-5.

Tabell 6.2.5-5 Mulige isoverbascosidsignaler i $^1\text{H-NMR}$ -spektret for S9

Signal (ppm)	Mulig innhold
3,35 og 3,51	glukosesignaler
1,27, 3,73 og 3,95	rhamnosesignaler
6,54	aromatsignal i dihydroksyfenyletanoldel
7,56	Ar-CH=CH- i kaffeoyldel

- **S11** så ut til å inneholde en liten mengde fenyletanoid, samt muligens andre glykosylerte forbindelser. Intense singletter rundt 3,8 – 3,9 ppm i $^1\text{H-NMR}$ -spektret kan skyldes aromatiske metoksylder.

6.2.6 M-serien (M1 – M9)

Det foreligger $^1\text{H-NMR}$ -spektre (se figur C61 – C69, s. C-32 til C-36, vedlegg C) for alle fraksjonene (M1 – M9). Kun enkelte fraksjoner er kommentert. De spektrene som ikke er beskrevet er av liten interesse (eventuelt lite stoff).

- **M2** inneholdt muligens metoksyflavonoidglykosid(er) (skarpe singletter i området 3,5 – 4 ppm). Det ser ikke ut som metoksyflavonoider er rapportert tidligere i *P. lanceolata*. Spektret hadde flest signaler i aromat-/alken-området (ca. 5 – 8 ppm), samt

noen signaler i karbohydratområdet (ca. 3 – 5 ppm) og rundt 2 ppm i alifatområdet (ca. 1 – 3 ppm).

- **M3** omfattet trolig for det meste verbascosid. Mulige verbascosidsignaler (kfr. tabell 6.2.3-4, s. 67, og pkt. 6.2.3 – 6.2.5, s. 65 - 69); 1,09, 2,8, 3,3 – 5,2, 6,3 (mulig dublett ved 6,25 og 6,33 ppm, $J = 15,8$ Hz), 6,6 – 6,7, 6,96, 7,08 og 7,6 ppm (mulig dublett ved 7,57 og 7,65 ppm, $J = 15,9$ Hz)
- **M4** bestod formodentlig av nokså ren verbascosid. (Signaler; se over.) Forholdet mellom integralene av signalene ved hhv. 2,8 og 1,1 ppm var 2 : 3, noe som indikerer at fraksjonen inneholdt verbascosid og ikke plantamajosid (som i motsetning til verbascosid ikke har CH₃ fra rhamnose).
- **M5** rommet, som M3, trolig mest verbascosid. (Signaler; se over.)
- **M6** inneholdt sannsynligvis litt verbascosid i tillegg til andre forbindelser, kanskje metoksyflavonoidglykosid(er) (se M2). (Mulige verbascosidsignaler; se over.)
- **M7** innbefattet noe fenyletanoid (signaler; se "mulige verbascosidsignaler" over) og noe annet stoff, muligens med aromatiske metoksylder (ca. 3,9 ppm). Et lite signal ved 8,05 ppm stammer sannsynligvis ikke fra fenyletanoid.

6.2.7 F-serien (F1 – F9)

Det foreligger ¹H-NMR-spektre (se figur C70 – C76, s. C-37 til C-40, vedlegg C) for fraksjonene F1, F2, F4 – F7 og F9. Fraksjonene F3 og F8 var for små til at det var mulig å ta NMR-spektre av dem.

- **F1** bestod for det meste av karbohydrater (ca. 3 – 5 ppm), men det var også noen små signaler i alifatområdet (ca. 1 – 3 ppm) og i alken-/aromat-området (ca. 5 – 8 ppm).
- **F2**: De største signalene i spektret lå rundt 1,3 ppm (alifatområdet), i karbohydratområdet (ca. 3 – 5 ppm), samt rundt 7,4 og 8 ppm (alken-/aromat-området).
- **F4** omfattet sannsynligvis fenolisk(e) glykosid(er), kanskje fenyletanoid(er). Det var dessuten et signal av ukjent opphav ved 8,5 ppm (sannsynligvis ikke fra fenyletanoid).
- **F5** kunne muligens også inneholde fenyletanoid(er), i tillegg til andre, uidentifiserte forbindelser. Spektret viste en rekke signaler i alken-/aromat-området (se over) og i karbohydratområdet (se over), samt enkelte signaler i alifatområdet (se over).
- **F6** kunne tenkes å romme en blanding av fenyletanoider, i tillegg til andre stoffer. Dette spektret hadde også signaler rundt 8 ppm.
- **F7**: Spektret hadde signaler ved ca. 1 – 1,5 og 2,6 ppm i alifatområdet, omkring 3,6 ppm i karbohydratområdet, samt mellom 7 og 8 ppm i alken-/aromat-området.
- **F9**: Det var en rekke signaler i alifatområdet (se over) og i aromat-/alkenområdet (se over), spesielt ca. 7 – 8 ppm, samt noen signaler i karbohydratområdet (se over).

6.3 Radikalscavenging; DPPH-test

For beskrivelse av DPPH-testen, se pkt. 3.5.1, s. 28.

For utførelse, se pkt. 4.1, s. 34, og for resultater, se kap. 5, s. 44.

Modellen med scavenging av stabile, frie DPPH-radikaler har blitt brukt til å bestemme fri radikalscavenger-aktivitet på relativt kort tid, og er en enkel metode sammenlignet med andre assaymodeller. Antioksidanters effekt på DPPH-radikalscavenging antas å skyldes forbindelsenes hydrogendonor-egenskaper. Strukturene til verbascosid og isoverbascosid inneholder fire fenoliske hydroksylgrupper i form av to katekolgrupper (kfr. fig. 3.1-B, s. 7), og det er kjent at fenoliske antioksidanter med katekolstruktur fungerer som elektron- eller hydrogendonorer. Dermed er det mulig at disse forbindelsenes DPPH-radikalscavengeraktivitet hovedsakelig er relatert til deres fenoliske hydroksylgrupper. Både verbascosid og isoverbascosid (og andre fenyletanoidglykosider) er tidligere rapportert å ha sterk radikalscavengeraktivitet overfor DPPH-, hydroksyl- og superoksidanion-radikaler. (Gao & al. 1999)

En potensiell antioksidants interaksjon med DPPH avhenger av dens strukturelle konformasjon. Visse forbindelser reagerer veldig raskt med DPPH-radikalet, og reduserer et antall DPPH-radikalmolekyler som tilsvarer antallet tilgjengelige hydroksylgrupper. Imidlertid er mekanismen mer kompleks for mange forbindelser, og det kan ta flere timer å oppnå "steady state". (Brand-Williams & al. 1995)

Råekstraktet av smalkjempe og alle fraksjonene ble testet spektrofotometrisk for scavenging av DPPH (se pkt. 3.5.1, s. 28, og pkt. 4.1, s. 34). På grunnlag av tidligere erfaringer ved Avdeling for farmakognosi, Farmasøytisk institutt, ble 5 minutter benyttet som måletid i forsøket. Dette fungerte tilfredsstillende, da de fleste fraksjonene viste aktivitet allerede etter denne korte tiden (de mest aktive fraksjonene nærmest umiddelbart), slik at det var mulig å sammenligne fraksjonenes effekt. Det er mulig at en lengre måletid hadde gitt mer nyanserte resultater og tydeliggjøring av mer saktevirkende radikalscavengere. Dette ble imidlertid ikke ansett som nødvendig i denne oppgaven, der det viktigste var å finne ut hvilke fraksjoner som var mest aktive, for om mulig å forsøke å påvise hvilke substanser som var ansvarlige for den observerte aktiviteten.

Konsentrasjonene av råekstraktet og råfraksjonene ble valgt noe tilfeldig, mens de øvrige konsentrasjonene ble valgt ut fra resultatene for de(n) foregående fraksjon(e). Når det gjelder valg av løsemiddel, ble DMSO (dimetylsulfoksid) benyttet for råekstraktet og råfraksjonene. DMSO har ingen radikalscavengeraktivitet i dette systemet (Malterud & al. 1996), og har et høyt kokepunkt som gjør at konsentrasjonen holdes konstant i prøveløsningene (Engvik 2000). For underfraksjonene ble metanol benyttet som løsemiddel, da det her var mindre stoff og det kunne være behov for å dampe inn det gjenværende av prøvene etter forsøket. Dette ville ikke være mulig med DMSO, på grunn av dets nevnte høye kokepunkt. Med den relativt korte måleperioden i denne testen fungerte også metanol greit som løsemiddel for prøvene.

6.3.1 Aktiviteten av fraksjonene

Råekstraktet og råfraksjonene er diskutert i pkt. 6.1.1, s. 61.

For oversikt over fraksjonene, se flytskjemaer, s. A-1 og A-2 i vedlegg A.

Råfraksjon A (etylacetatfraksjonen) var som nevnt høyaktiv som scavenger av DPPH-radikalet, og de fleste av underfraksjonene i A-serien (A1 – A11) var også aktive. Det meste av aktiviteten ble funnet i A6 og A7, samt i A5 og A8. (Se også pkt. 5.4, s. 49.) Dette samsvarer med fraksjonene som inneholdt mye verbascosid (kfr. pkt. 6.2.3, s. 65). Det ligger derfor nær å anta at denne substansen står for mye av scavenging-aktiviteten i råfraksjon A. Verbascosid er tidligere kjent som en potent scavenger av DPPH-radikalet (se over, pkt. 6.3, s. 73).

Råfraksjon B (n-butanolfraksjonen) var like aktiv som A, og flesteparten av underfraksjonene i B-serien (B1 – B9) var likeledes aktive. (Kfr. pkt. 5.5, s. 50.) Det var dessuten også her fraksjonene med høyest spesifikk aktivitet, B2 – B5, samt B6 med middels aktivitet, som inneholdt verbascosid (kfr. pkt. 6.2.4, s. 69). Det ligger derfor nær å anta at denne substansen står for mye av scavenging-aktiviteten også i råfraksjon B. (Kfr. over.)

S-serien (S1 – S11, underfraksjoner av B3 + B4) viste stigende aktivitet til fraksjon S5/S6, og deretter nokså konstant aktivitet for de videre fraksjonene. Fraksjonene S4, S7 og S11 ble testet i fortynningsserier, og IC_{50} ble beregnet. (Kfr. pkt. 5.6, s. 52.) Disse tre fraksjonene ble utvalgt fordi de hadde noe ulik sammensetning. Fraksjon S7 inneholdt tilnærmet ren verbascosid, mens S4 og S11 var de aktive fraksjonene i S-serien som var "lengst unna" S7, og dermed inneholdt mindre verbascosid. (Kfr. pkt. 6.2.5, s. 69.) IC_{50} -verdiene for S4, S7 og S11 var i noenlunde samme område. Det er dermed sannsynlig at også andre stoffer enn verbascosid bidrar til scavengeraktiviteten. Det lyktes imidlertid ikke å identifisere disse andre forbindelsene. Det ble også laget tidskurver (% scavenget vs. tid) for S4, S7 og S11. (Se pkt. 5.6, s. 52.) Disse indikerte at S4 inneholdt både rask(e) og langsommere scavengere, mens S7 og S11 kun omfattet rask(e) scavenger(e). Dette antyder at verbascosid er en rask scavenger av DPPH-radikalet.

I M-serien (M1 – M9, underfraksjoner av S4) var aktiviteten størst i fraksjonene M3 og M4, og deretter synkende. (Kfr. pkt. 5.7, s. 57.) IC_{50} -verdiene for den mest aktive fraksjonen M3 og utgangsfraksjonen S4 var like store. Igjen var det overensstemmelse mellom radikalscavengeraktivitet og innhold av verbascosid i fraksjonene. (Kfr. pkt. 6.2.6, s. 71.)

Blant underfraksjonene av S11 (F1 – F9) var aktiviteten klart størst i fraksjon F4, som faktisk hadde en lavere IC_{50} -verdi enn utgangsfraksjonen (S11). Fraksjonene F5 og F6 var middels aktive. (Kfr. pkt. 5.8, s. 59, og pkt. 5.6, s. 52.) For fraksjonene i F-serien lyktes det ikke å identifisere renstoffer, men også her så det ut til at de mest aktive fraksjonene kanskje kunne inneholde fenyletanoider. (Kfr. pkt. 6.2.7, s. 72.)

6.4 Modulering av enzymet 15-lipoksygenase (15-LO)

For beskrivelse av 15-LO-testen, se pkt. 3.5.2, s. 29.

For utførelse, se pkt. 4.2, s. 35, og for resultater, se kap. 5, s. 44.

Denne testen er basert på en 15-LO-katalysert reaksjon mellom oksygen og linolsyre. Det dannes et konjugert dobbeltbindingssystem, som fører til en absorbansøkning ved 234 nm. Ved å måle økningen i absorbans for prøver henholdsvis med og uten testsubstans (potensiell(e) modulator(er) av 15-LO) over et gitt tidsrom, kan prosentvis enzymhemming beregnes. (Se pkt. 3.5.2, s. 29.)

Lipoksygenaseenzymene inneholder et ikke-hem-jernatom som er avgjørende for enzymaktiviteten. Dette jernatomet kan befinne seg i to oksidasjonstilstander, Fe^{2+} og Fe^{3+} , hvorav den treverdige formen er den katalytisk aktive. (Boyington & al. 1993) 15-LO kan således hemmes av substanser som reduserer jern fra den aktive treverdige formen til den inaktive toverdige. Jern (III)-chelatorer kan også hemme enzymet. Noen hemmere kan virke gjennom begge disse mekanismene. En tredje inhibitorisk mekanisme er denaturering ved alkylering av en essensiell metionin i eller nær enzymets katalytisk aktive sete. Det er foreslått at radikalscavengere kan tenkes å virke som hemmere ved å fjerne peroksyintermediatet som regenererer jernet til det katalytisk aktive Fe^{3+} . Det er imidlertid funnet at radikalscavengeraktivitet og hemming av 15-LO er ukorrelerte effekter. (Malterud & al. 1993)

Prøvene som skulle testes ble først forsøkt løst i DMSO (dimetylsulfoksid), men da det viste seg at dette (DMSO sammen med flere av testsubstansene) ga altfor høy absorpsjon ved 234 nm, slik at man kom utenfor det lineære området (kfr. Lambert-Beers lov), ble metanol i stedet benyttet som løsemiddel for testsubstansene. Dette fungerte tilfredsstillende. Konsentrasjonene av prøveløsningene ble i utgangspunktet valgt noe tilfeldig, men resultatene fra en utgangsfraksjon ble vurdert ved valg av testkonsentrasjon(er) for dennes underfraksjoner.

6.4.1 Aktiviteten av fraksjonene

Råekstraktet og råfraksjonene er diskutert i pkt. 6.1.1, s. 61.

For oversikt over fraksjonene, se flytskjemaer, s. A-1 og A-2 i vedlegg A.

Da verken råekstraktet eller råfraksjonene viste noen betydelig hemming av 15-LO ble denne testen lite benyttet for de videre fraksjonene. Imidlertid ble S4, S7 og S11 testet. Som tidligere nevnt, inneholdt fraksjon S7 tilnærmet ren verbascosid, en forbindelse som ved tidligere forsøk ved Avdeling for farmakognosi, Farmasøytisk institutt, er funnet å hemme 15-LO. (Skari & al. 1999) Dessuten er det rapportert 5-LO-hemming for verbascosid, isoverbascosid og plantamajosid (kfr. pkt. 3.1.3, s. 4). Strukturaktivitet-forhold-studier har vist at to nærliggende ("adjacent") fenoliske hydroksylgrupper i verbascosid er nødvendig for dets potente hemming av dannelsen av 5-LO-produkter og for dets "scavenging"-virkninger. (Deepak & al. 1999) (Valg av S4 og S11 til sammenligning; se pkt. 6.3.1, s. 74.)

Alle de tre testede S-fraksjonene (S4, S7 og S11) hemmet 15-LO (kfr. pkt. 5.6, s. 52). Fraksjon S11 viste høyest aktivitet, fulgt av S4, mens S7 var den minst aktive av de tre

fraksjonene. Dette betyr at en eller flere av de forskjellige ukjente forbindelsene som S11 og S4 inneholdt i tillegg til verbascosid, var mer aktive enn verbascosid med hensyn til 15-LO-hemming. Når de testede S-fraksjonene, som stammet fra råfraksjon B, hemmet 15-LO, selv om ingen av råfraksjonene eller råekstraktet viste noen nevneverdig aktivitet i så måte, kan det ha sammenheng med konsentrasjonsforhold. De aktive substansene i S-fraksjonene var sannsynligvis til stede i for små mengder i de tidligere fraksjonene til å kunne hemme enzymet tilstrekkelig til å gi utslag ved de anvendte konsentrasjonene av råfraksjon B/råekstrakt.

6.5 Hemming av jernindusert, ikke-enzymatisk peroksidasjon av fosfolipider fra grisehjerne (TBA-test)

For beskrivelse av testen, se pkt. 3.5.3, s. 30.

For utførelse, se pkt. 4.3, s. 37, og for resultater, se kap. 5, s. 44.

For oversikt over fraksjonene, se flytskjemaer, s. A-1 og A-2 i vedlegg A.

I denne testen kan linolensyre eller fosfolipidfraksjonen fra grisehjerne benyttes som "substrat". Linolensyre er enklere å bruke, men da det anvendes surfaktant (og vandig løsning), vil hydrofile antioksidanter få en kunstig forhøyet effekt på lipidene. Grisehjernefosfolipider blir mer farmakologisk "riktig" (mer likt "virkeligheten"), og gir dessuten gjerne mindre standardavvik. Fosfolipidene ble derfor valgt ved utførelse av testen.

Råfraksjonene A (etylacetatfraksjonen) og B (butanolfraksjonen) hemmet i sammenlignbar grad jernindusert, ikke-enzymatisk oksidasjon av fosfolipider fra grisehjerne i TBA-testen. (Se pkt. 5.3, s. 45.) Det ble for begge råfraksjonene observert tilsynelatende uforholdsmessig lav hemming i de sterkeste (mest konsentrerte) prøveløsningene. Disse fikk en mørk grønn eller brunlig farge som kan ha forstyrret absorpsjonsmålingene. Resultatene av kontrollforsøk indikerte kompleksdannelse/chelatering mellom Fe^{2+} og stoffer i prøvene, sannsynligvis nabohydroksylgrupper på en aromatrings, det vil si katekoler. (Kompleksering mellom jern og katekolgrupper er kjent tidligere, kfr. pkt. 5.3, s. 45.) Dette kan tenkes å være fenyletanoider (for eksempel verbascosid, kfr. pkt. 3.1.3, s. 4/ Deepak & al. 1999) eller muligens flavonoider. Det er tenkelig at kompleksbinding av Fe^{2+} faktisk er en virkningsmekanisme for hemmende stoffer i prøvene. Ved forstyrrelse av absorpsjonsmålingen er imidlertid metoden uegnet, og denne testen ble ikke benyttet i det videre arbeidet.

7 KONKLUSJON

Smalkjempe, *Plantaginis lanceolatae herba*, ser ut til å inneholde stoffer med antioksidant- og radikalfangeraktiviteter, samt lipoksygenasehemmende forbindelser. Fenyletanoidet verbascosid ble påvist og isolert, og stod tilsynelatende for hoveddelen av den observerte radikalfangeraktiviteten. Denne forbindelsen er tidligere påvist i smalkjempe, og er rapportert å være en potent scavenger av flere radikaler. Imidlertid bidro sannsynligvis også andre, uidentifiserte substanser til radikalfangeraktiviteten, og ikke minst til lipoksygenasehemmingen som ble konstatert. Den ikke-enzymatiske antioksidant-testen (hemming av jernindusert, ikke-enzymatisk peroksidasjon av fosfolipider fra grisehjerne) syntes uegnet, selv om de testede fraksjonene viste aktivitet. (Kfr. pkt. 6.5, s. 76.) Foruten det nevnte verbascosid og muligens de beslektede forbindelsene isoverbascosid og plantamajosid, alle tidligere påvist i smalkjempe, ble det ikke identifisert noen renstoffer.

7.1 Forslag til videre arbeid

Det kunne være interessant å se nærmere på flere av fraksjonene i denne oppgaven, spesielt aktive underfraksjoner av råfraksjon B (butanolfraksjonen). [Råfraksjon A (etylacetatfraksjonen) så etter fraksjonering ut til å inneholde over 50 % verbascosid, som etter alt å dømme stod for det meste av aktiviteten, og dessuten utgjorde A kun 1 % av det ekstraherte materialet (råekstraktet), noe som gjør A-serien mindre aktuell for videre arbeid.] Videre opprensing av fraksjon B6 for om mulig å påvise og eventuelt isolere innholdsstoffer, samt å teste disse i de aktuelle assaysystemene kunne være relevant. (Se også pkt. 6.1.3, s. 62.) Det kunne også være interessant å forsøke å isolere plantamajosid fra S5 og isoverbascosid fra S9. Andre aktuelle fraksjoner å undersøke nærmere kan for eksempel være M2 og M6 (eventuelt også M7), som kanskje kan inneholde metoksyflavonoider. Det ser ikke ut til at metoksyflavonoider er rapportert tidligere i *P. lanceolata*. For øvrig kunne en opprensing av råfraksjon E (eterfraksjonen) med tanke på å finne eventuelle hemmere av lipoksygenase (kfr. pkt. 6.1.1, s. 61) være aktuelt. Hvis isolering av renstoffer fra ulike fraksjoner lykkes, kan det også være mulig å studere struktur-aktivitet-forhold.

LITTERATURLISTE

- Anderberg, A & Anderberg, A-L: Den virtuella floran, 2002, <http://linnaeus.nrm.se/flora/di/plantagina/plant/planlan.html>
- Berg, GA: Floraen i farger, 3. opplag, Aschehoug, Oslo 1970, s. 172
- Bjørneboe, G-EAa: Vitamin E og andre antioksidanter. I: Bjørneboe, G-EAa & Drevon, CA (red.): Mat og medisin, 4. utgave, Høyskoleforlaget, Oslo, 1999, s. 249 – 269
- Blois, MS: Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1958, 1199 – 1200
- Blomhoff, R: Kosthold og kreft. I: Bjørneboe, G-EAa & Drevon, CA (red.): Mat og medisin, 4. utgave, Høyskoleforlaget, Oslo, 1999, s. 569 – 584
- Blumenthal, M, Goldberg, A & Brinckmann, J (red.): Herbal Medicine. Expanded Commission E Monographs, Integrative Medicine Communications, Newton, Massachusetts 2000, s. 307 – 310
- Boyington, JC, Gaffney, BJ & Amzel, LM: The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science*, 260, 1993, 1482 – 1486
- Brand-Williams, W, Cuvelier, ME & Berset, C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*, 28, 1995, 25 – 30
- Bräutigam, M & Franz, G: Schleimpolysaccharide aus Spitzwegerichblättern. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 125, 1985, 58 – 62
- Chang, IM & Yamaura, Y: Aucubin; a new antidote for poisonous *Amanita* mushrooms. *Phytotherapy Research*, 7, 1993, 53 – 56
- Davini, E, Iavarone, C, Trogolo, C, Aureli, P & Pasolini, B: The quantitative isolation and antimicrobial activity of the aglycone of aucubin. *Phytochemistry*, 25, 1986, 2420 – 2422
- Deepak, M, Umashankar, DC & Handa, SS: Verbascoside – a promising phenylpropanoid. *Indian Drugs*, 36, 1999, 336 – 345
- Ege, SN: Organic chemistry – structure and reactivity, 3. utgave, D. C. Heath & Co, Lexington, Massachusetts, 1994
- El Tahir, KEH & Williams, KI: Factors affecting prostacyclin formation by the rat pregnant myometrium. *British Journal of Pharmacology*, 71, 1980, 641 – 649
- Engvik, GF: Radikalscavengere og antioksidanter i ved fra selje (*Salix caprea* L.). Hovedoppgave i farmakognosi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, 2000

- Fierro, IM & Serhan, CN: Mechanisms in anti-inflammation and resolution; the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34, 2001, 555 – 566
- Gao, J-J, Igalashi, K & Nukina, M: Radical scavenging activity of phenylpropanoid glycosides in *Caryopteris incana*. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 63, 1999, 983 – 988
- Glavind, J: Antioxidants in animal tissue. *Acta Chemica Scandinavica*, 17, 1963, 1635 – 1640
- Glavind, J & Hølmer, G: Thin-layer chromatographic determination of antioxidants by the stable free radical α , α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 44, 1967, 539 – 542
- Gleason, MM, Rojas, CJ, Learn, KS, Perrone, MH & Bilder, GE: Characterization and inhibition of 15-lipoxygenase in human monocytes; comparison with soybean 15-lipoxygenase. *American Journal of Physiology*, 268, 1995, C1301 – C1307
- Gutteridge, JMC: Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation. *Free Radical Research Communications*, 1, 1986, 173 – 184
- Gutteridge, JMC og Halliwell, B: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 15, 1990, 129 – 135
- Görler, K, Oehlke, D & Soicke, H: Iridoidführung von *Vitex agnus-castus*. *Planta Medica*, 51, 1985, 530 – 531
- Halliwell, B: Free radicals and antioxidants; a personal view. *Nutrition Reviews*, 52, 1994a, 253 – 265
- Halliwell, B: Free radicals, antioxidants, and human disease; curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344, 1994b, 721 – 724
- Halliwell, B, Aeschbach, R, Löliger, J & Aruoma, OI: The characterization of antioxidants. *Food & Chemical Toxicology*, 33, 1995, 601 – 617
- Halliwell, B & Chirico, S: Lipid peroxidation; its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 1993, 715S – 725S
- Halliwell, B & Gutteridge, JMC: *Free radicals in biology and medicine*, 2. utg., Clarendon Press/ Oxford University Press, Oxford, 1989
- Handjieva, N, Saadi, H & Evstatieva, L: Iridoid glucosides from *Plantago altissima* L., *Plantago lanceolata* L., *Plantago atrata* Hoppe and *Plantago argentea* Chaix. *Zeitschrift für Naturforschung*, 46c, 1991, 963 – 965
- Háznagy, A, Tóth, G & Bula, E: Apigenin-7-O-monoglucosid im Kraut von *Plantago lanceolata*. *Pharmazie*, 31, 1976, 482 – 483

- Janero, DR: Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 1990, 515 – 540
- Jiménez, C & Riguera, R: Phenylethanoid glycosides in plants; structure and biological activity. *Natural Product Reports*, 11, 1994, 591 – 606
- Kawashty, SA, Gamal-El-Din, E, Abdalla, MF & Saleh, NAM: Flavonoids of *Plantago* species in Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology*, 22, 1994, 729 – 733
- Kobayashi, H, Oguchi, H, Takizawa, N, Miyase, T, Ueno, A, Usmanghani, K & Ahmad, M: New phenylethanoid glycosides from *Cistanche tubulosa* (SCHRENK) HOOK. f. I. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 35, 1987, 3309 – 3314
- Kerr, ME, Bender, CM & Monti, EJ: An introduction to oxygen free radicals. *Heart and Lung*, 25, 1996, 200 – 209
- Kraft, K: Spitzwegerich-Fluidextrakt als Antitussivum. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 19, 1998, 219
- Langner, A & Bekemeier, H: Vergleich der Wirksamkeit von Lipoxygenaseinhibitoren an Sojabohnen- und Kaninchenretikulozytenlipoxygenase. *Pharmazie*, 42, 1987, 351
- Leake, LR & Reynolds, GF: Determination of catechol by indirect polarography using an iron complex. *Journal of the Polarographic Society*, 11, 1965, 58 – 63, kfr. *Chemical Abstracts* 64, 79713 (1966)
- Lyckander, IM & Malterud, KE: Lipoxygenase inhibiting flavonoids from *Orthosiphon spicatus*. I Das, NP (red.): *Flavonoids in Biology & Medicine III: Current Issues in Flavonoid Research*, National University of Singapore, Singapore 1990, s. 469 – 474
- Lyckander, IM & Malterud, KE: Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* as inhibitors of 15-lipoxygenase. *Acta Pharmaceutica Nordica*, 4, 1992, 159 – 166
- Malterud, KE: Flavonoider og helse. *Norges apotekerforenings tidsskrift*, 106, 4/1998, 10 – 13
- Malterud, KE: Forelesningsnotater, PBB 281 farmakognosi, Farmasøytisk institutt, Oslo 1999a
- Malterud, KE: Procedure for assay of 15-lipoxygenase inhibition. Internt notat, Farmasøytisk institutt, Oslo 1999b, 6 sider
- Malterud, KE, Diep, OH & Sund, RB: C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* L.; effects as antioxidants and as scavengers of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Pharmacology and Toxicology*, 78, 1996, 111 – 116
- Malterud, KE, Farbrot, TL, Huse, AE & Sund, RB: Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. *Pharmacology*, 47 (suppl. 1), 1993, 77 – 85

- Marchesan, M, Hose, S, Paper, D & Franz, G: Spitzwegerich; neue Untersuchungen zur antiinflammatorischen Wirkung. Deutsche Apotheker Zeitung, 138, 1998, 2987 – 2992
- Meltzer, HM & Malterud, KE: Can dietary flavonoids influence the development of coronary heart disease? Scandinavian Journal of Nutrition/ Näringsforskning, 41, 1997, 50 – 57
- Mentasti, E & Pelizzetti, E: Reactions between iron (III) and catechol (*o*-dihydroxybenzene), Part I; Equilibria and kinetics of complex formation in aqueous acid solution. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, Inorganic Chemistry, 23, 1973, 2605 – 2608
- Mentasti, E, Pelizzetti, E & Saini, G: Interactions of iron (III) with adrenaline, L-dopa and other catechol derivatives. Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, 38, 1976, 785 – 788
- Merzlyak, MN, Zhigalova, TV & Shevyryova, VV: Assay of the thiobarbituric acid-reactive products of lipid peroxidation in plants using derivative absorption spectroscopy. Phytochemical Analysis, 3, 1992, 105 – 109
- Middleton, E, Kandaswami, C & Theoharides, TC: The effects of plant flavonoids on mammalian cells; implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacological Reviews, 52, 2000, 673 – 751
- Moncada, S, Flower, RJ & Vane, JR: Prostaglandins, prostacyclin, thromboxane A₂, and leukotrienes. I: Goodman, LS & Gilman, A (red.): Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7. utgave, MacMillan Publishing company, New York, 1985, s. 660 – 673
- Murai, M, Tamayama, Y & Nishibe, S: Phenylethanoids in the herb of *Plantago lanceolata* and inhibitory effect on arachidonic acid-induced mouse ear edema. Planta Medica, 61, 1995, 479 – 480
- Nuhn, P, Büge, A, Köhler, T, Lettau, H & Schneider, R: Trends bei der Entwicklung von Lipoxygenase-Hemmern. Pharmazie, 46, 1991, 81 – 88
- Ortiz de Urbina, AV, Martín, ML, Fernández, B, San Román, L & Cubillo, L: *In vitro* antispasmodic activity of peracetylated penstemonoside, aucubin and catalpol. Planta Medica, 60, 1994, 512 – 515
- Pan, N, Hori, H: Antioxidant action of acteoside and its analogs on lipid peroxidation. Redox Report, 2, 1996, 149 – 154
- Paper, D & Marchesan, M: Spitzwegerich (*Plantago lanceolata* L.); Inhaltsstoffe, Analytik, Pharmakologie, Standardisierung. Zeitschrift für Phytotherapie, 20, 1999, 231 – 238
- Purves, WK, Orians, GH, Heller, HC: Life; the science of biology, 4. opplag, Sinauer associates Inc., Sunderland, Massachusetts, 1995, s. G5
- Rang, HP, Dale, MM & Ritter, JM: Pharmacology, 3. utgave, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1995, s. 229 – 237

- Ravn, H, Nishibe, S, Sasahara, M & Xuebo, L: Phenolic compounds from *Plantago asiatica*. *Phytochemistry*, 29, 1990, 3627 – 3631
- Recio, MC, Giner, RM, Máñez, S & Ríos, JL: Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Medica*, 60, 1994, 232 – 234
- Rischer, M, Adamczyk, M, Ratz, H, Hose, S, Marchesan, M, Paper, DH, Franz, G, Wolf-Heuss, E & Engel, J: Quantitative determination of the iridoid glycosides aucubin and catalpol in *Plantago lanceolata* L. extracts by HPTLC and HPLC. *Journal of Planar Chromatography*, 11, 1998, 374 – 378
- Rønsted, N, Göbel, E, Franzyk, H, Jensen, SR & Olsen, CE: Chemotaxonomy of *Plantago*, iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides. *Phytochemistry*, 55, 2000, 337 – 348
- Skari, KP, Malterud, KE & Haugli, T: Radical scavengers and inhibitors of enzymatic lipid peroxidation from *Plantago major*, a medicinal plant. I: Kumpulainen, JT & Salonen, JT (red.): *Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease*, Royal Society of Chemistry, London, 1999, s. 200 – 202
- Skoog, DA & Leary, JJ: *Principles of instrumental analysis*, 4. utgave, Saunders College Publishing, Fort Worth, 1992
- Smith, AN: The photometric determination of ferric iron by catechol. *The Analyst*, 84, 1959, 516
- Steinberg, D: At last, direct evidence that lipoxygenases play a role in atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 103, 1999, 1487 – 1488
- Stewart, VC & Heales, SJR: Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, 34, 2003, 287 – 303
- Strømme, SB: Fysisk aktivitet. I: Bjørneboe, G-EAa & Drevon, CA (red.): *Mat og medisin*, 4. utgave, Høyskoleforlaget, Oslo, 1999, s. 451 – 475
- Sudo, H, Kijima, K, Otsuka, H, Ide, T, Hirata, E, Takeda, Y, Isaji, M & Kurashina, Y: A collagen network formation effector from leaves of *Premna subscandens*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 47, 1999, 1341 – 1343
- Suh, N-J, Shim, C-K, Lee, MH, Kim, SK & Chang, I-M: Pharmacokinetic study of an iridoid glucoside; aucubin. *Pharmaceutical Research*, 8, 1991, 1059 – 1063
- Sæther, PA: *Radikalfangere og antioksidanter fra rogneved*. Hovedoppgave i farmakognosi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, 1999
- Tamura, Y & Nishibe, S: Changes in the concentrations of bioactive compounds in plantain leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2002, 2514 – 2518

Turker, MS: Somatic cell mutations: can they provide a link between aging and cancer? *Mechanisms of Ageing and Development*, 117, 2000, 1 – 19

Wegener, T & Kraft, K: Der Spitzwegerich (*Plantago lanceolata* L.): Reizlinderung bei Infektionen der oberen Atemwege. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 149, 1999, 211 – 216

Willuhn, G: Phytofarmaka in der Dermatologie. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 16, 1995, 325 – 342

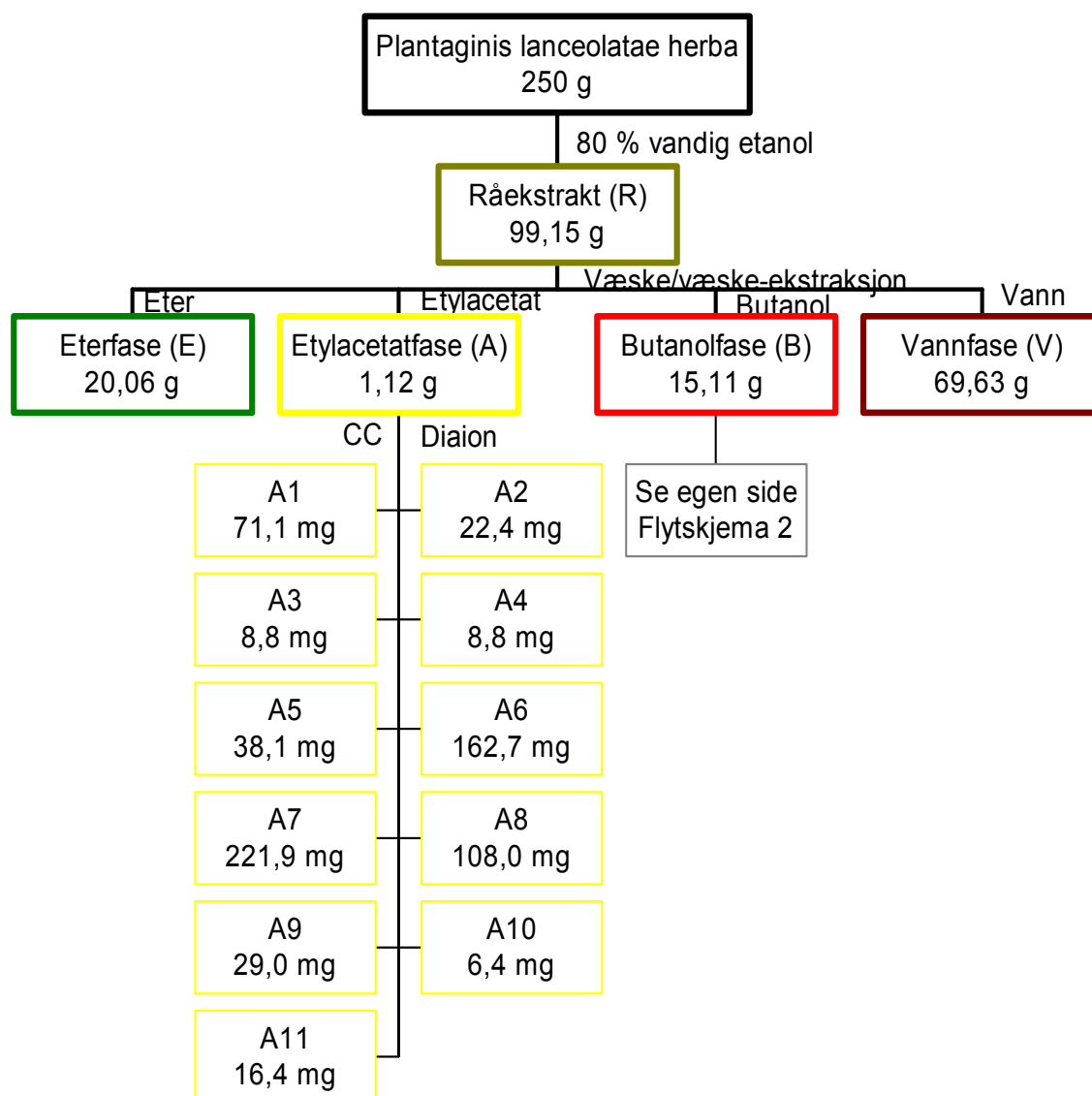
Xiong, Q, Tezuka, Y, Kaneko, T, Li, H, Tran, LQ, Hase, K, Namba, T & Kadota, S: Inhibition of nitric oxide by phenylethanoids in activated macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 400, 2000, 137 – 144

Øyri, A: *Norsk medisinsk ordbok*, 4. utgave, Det Norske Samlaget, Oslo 1996

VEDLEGG A

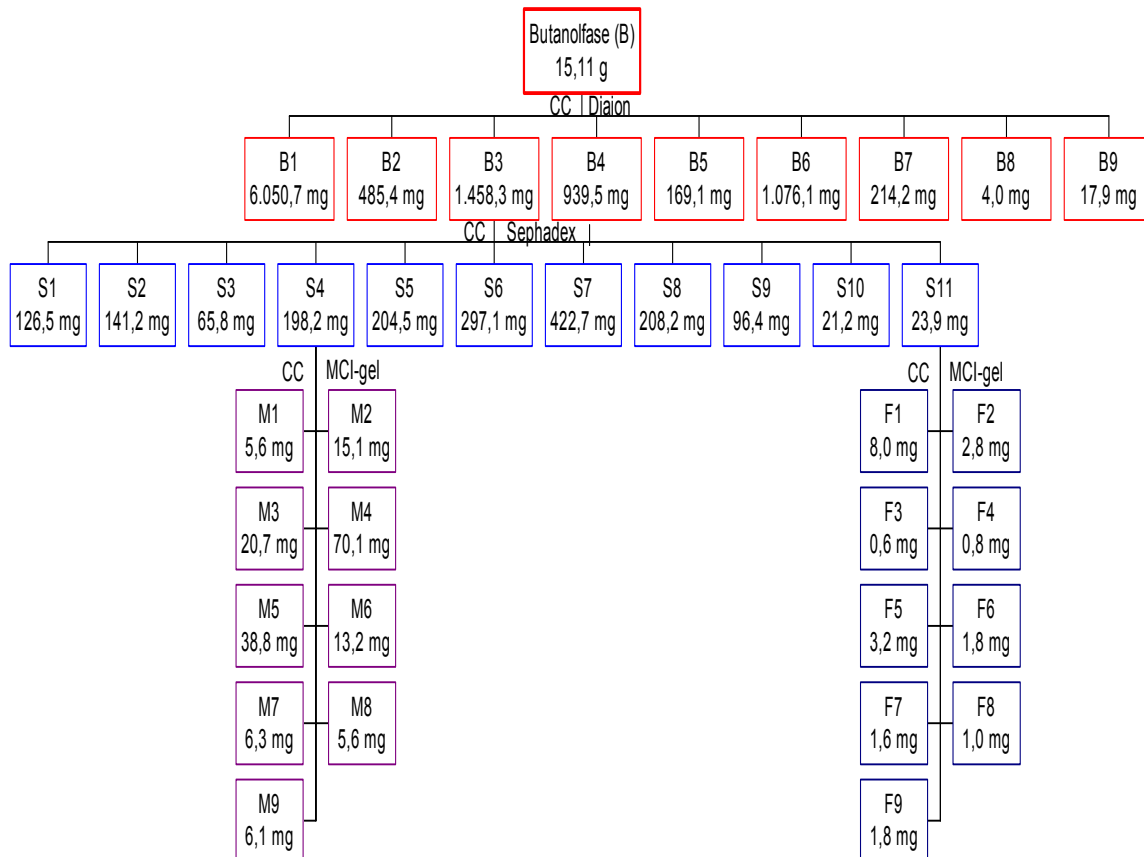
FLYTSKJEMAER

Flytskjema 1



CC = kolonnekromatografi

Flytskjema 2



CC = kolonnekromatografi kolonnekromatografi

VEDLEGG B

UTSTYR OG KJEMIKALIER

UTSTYR

Automatpipetter:	Finnpipette, Labsystems, Helsinki, Finland
Faseseparasjonspapir:	Faseseparator 1PS, Whatman Ltd., England
Glassfiberfilter:	Glasfaser No. 8, Schleicher & Schüll, Dassel, Tyskland
Kapillærpipetter:	Blodcaps, KEBO-lab, Stockholm/ Oslo/ København
Multipipette:	Modell 8100, Nichiryo, Tokyo, Japan
Nitrogengass:	AGA, Oslo
NMR-spektrometer:	Gemini-200 instrument, Varian, Palo Alto, CA, USA
Oljepumpe:	Modell E-LAB 2 med Oil mist filter EMF10, Edwards high vacuum international, Crawley, Sussex, England
pH-meter:	Modell 420A, Orion, Boston, MA, USA
Pumpe:	FMI lab pump modell RP-G150, Fluid Metering Inc., Oyster Bay, NY, USA
Rotavaporer:	Rotavapor-R, Büchi, Flawil, Sveits med vannstrålevakuum eller Vacuubran membranvakuumpumpe
Sentrifuge:	MSE, England
Separasjonsmateriale:	Diaion [®] HP-20; Supelco, Bellefonte, PA, USA MCI gel CHP20P; Supelco, Bellefonte, PA, USA Sephadex [®] LH-20; Pharmacia, Uppsala, Sverige
SMI-pipette:	Micro/pettor, Scientific manufacturing industries Inc., Emeryville, CA, USA
Spektrofotometer:	Shimadzu UV-160 A, Shimadzu, Kyoto, Japan med Shimadzu CPS-240 A cell positioner
TLC-plater:	TLC aluminium sheet silica gel 60 F ₂₅₄ , Merck, Darmstadt, Tyskland
TLC-sprayer:	TLC sprayer, Camag, Muttenz, Sveits
Ultralydbad:	Bransonic 220, Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA
UV-lampe:	UVSL-58, Mineralight lamp, Multiband UV-254/366 nm, Ultra Violet Products, San Gabriel, CA, USA
Vekter:	Mettler Toledo PB 3002, Mettler, Nänikon, Sveits Sartorius Analytic A200S, Sartorius, Göttingen, Tyskland Sartorius BP221S, Sartorius

KJEMIKALIER

Aceton (HPLC/p.a.); Prolabo, Fontenay S/Bois, Frankrike

Borsyre (p.a.); Merck, Darmstadt, Tyskland

1-butanol; Prolabo, Fontenay S/Bois, Frankrike
May & Baker Ltd., Manchester, England
Merck eurolab, Briare le Canal, Frankrike
KEBO-lab, Oslo

Butylert hydroksytoluen (BHT) (2,[6]-di-tert-butyl-p-cresol); Sigma, St. Louis, MO, USA

Dietyleter (p.a.); AS Den norske eterfabrikk, Oslo

1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH); Sigma, St. Louis, MO, USA

Dimetylsulfoksid (DMSO); Merck, Darmstadt, Tyskland

Eddiksyre (p.a.); Prolabo, Fontenay S/Bois, Frankrike

Etanol (96%); Arcus, Oslo

Etylacetat (p.a.); Prolabo, Fontenay S/Bois, Frankrike

Jernammoniumsulfat (ferro-ammonium sulfuricum p.a.); Merck, Darmstadt, Tyskland

Kloroform; Norsk medisinaldepot

Linolsyre; Sigma, St. Louis, MO, USA

Lipoksidase (15-lipoksygenase); Sigma, St. Louis, MO, USA

Maursyre; Merck, Darmstadt, Tyskland

Metanol (p.a.); Merck eurolab, Briare le Canal, Frankrike
Prolabo, Fontenay S/Bois, Frankrike

Natriumhydroksid (p.a.); Prolabo, Fontenay S/Bois, Frankrike

2-tiobarbitursyre (TBA) (4,6-dihydroksypyrimidin-2-tiol); Sigma, St. Louis, MO, USA

Triklorediksyre (p.a.); Merck, Darmstadt, Tyskland