

Sammenligning av biologisk aktive
lavmolekylære substanser fra
forskjellige subspecies av arten
Aronia melanocarpa

Viktorija Nikolic



Masteroppgave for graden Master i farmasi
Avdeling for farmasøytisk kjemi,
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2012

Sammenligning av biologisk aktive
lavmolekylære substanser fra
forskjellige subspecies av arten
Aronia melanocarpa

Viktoria Nikolic

Masteroppgave for graden master i farmasi
Avdeling for farmasøytisk kjemi,
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2012

Veiledere

Førsteamanuensis Hilde Barsett
Førsteamanuensis Helle Wangenstein
Professor emeritus Karl Egil Malterud
Stipendiat Paula Marie Bräunlich

© Viktoria Nikolic

Mai, 2012

Sammenligning av biologisk aktive lavmolekylære substanser fra forskjellige subspecies av arten *Aronia melanocarpa*

Viktoria Nikolic

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Innholdsfortegnelse

Forord	1
Sammendrag	2
1 Innledning.....	4
1.1 Farmakologisk aktivitet	8
1.1.1 Antimutagen og anticancer aktivitet	9
1.1.2 Hjerterbeskyttende aktivitet.....	9
1.1.3 Leverbeskyttende aktivitet	9
1.1.4 Gastrobeskyttende aktivitet	10
1.1.5 Antidiabetisk aktivitet	10
1.1.6 Anti-inflammatorisk aktivitet	11
1.1.7 Antibakteriell og antiviral aktivitet	11
1.1.8 Strålebeskyttende og immmodulerende aktivitet	11
1.1.9 Sikkerhet.....	11
1.2 Botanisk beskrivelse	12
1.3 Voksested.....	12
1.4 Bruk og utbredelse.....	13
1.5 Innholdsstoffer.....	14
1.6 Antioksidanter	17
1.6.1 Antioksidantforsvar	17
1.7 Frie radikaler og reaktive oksygen species (ROS)	18
1.7.1 Dannelse av frie radikaler og ROS.....	19
1.7.2 Oksidativt stress	19
1.8 Lipidperoksidering.....	19
2 Oppgavens mål.....	21
3 Eksperimentelt.....	22
3.1 Materiale	22
3.1.1 Kjemikalier	22
3.2 Generelle metoder.....	23
3.2.1 Innveiing.....	23
3.2.2 Vannkvalitet	23
3.2.3 Filtrering.....	23

3.2.4	Sentrifugering.....	24
3.2.5	Blanding av løsninger.....	24
3.2.6	Inndamping.....	24
3.2.7	Frysetørking	24
3.2.8	Absorbansmåling.....	25
3.3	Preparering og ekstraksjon av bærmateriale.....	25
3.3.1	Preparering aroniabær materiale	25
3.3.2	Ekstraksjon av anthocyaniner fra aroniabær	27
3.3.3	HPLC-høytrykksvæskekromatografi	27
3.3.4	Ekstraksjon med 80 % etanol	32
3.4	Metoder for måling av biologisk aktivitet	33
3.4.1	DPPH-scavenging	33
3.4.2	15-Lipoksygenasehemming	35
3.4.3	Xantin oksidasehemming	38
3.4.4	Total fenolinnhold, Folin Ciocalteu metode	42
3.4.5	Immunomodulerende aktivitet	44
3.4.6	Inhibitorisk effekt av α -glucosidase	50
3.4.7	Total proanthocyanidininnhold (Porter assay)	53
4	Resultater og diskusjon	56
4.1	Ekstraksjon av aroniabær.....	56
4.2	HPLC analyse av aroniabær	57
4.3	Alfa -glucosidase hemming	60
4.4	Radikalskavenging test (DPPH-test)	62
4.5	15-lipoksygenasehemming av aroniabær ekstrakter (15-LO)	63
4.6	Xantinoksidasehemming av aroniabær ekstrakter(XO)	64
4.7	Analyse av total fenol (Folin-Ciocalteu) i aroniabær ekstrakter	65
4.8	Total proanthocyanidin i aroniabær ekstrakter	66
4.9	Komplementmodulering.....	69
5	Konklusjon	72
	Forkortelser	74
	Referanseliste	75

Figurer:

Figur 1-1. Bilde av <i>Aronia melanocarpa</i> Hugin	5
Figur 1-2. Bilde av <i>Aronia melanocarpa</i> Hugin på grenen.....	5
Figur 1-3. Bilde av <i>Aronia melanocarpa</i> Moskva bær og løv	6
Figur 1-4. Fire typer av aroniabær.....	6
Figur 1-5. Formel av polymersk procyanidin med C4-C8 bind (B-type)	15
Figur 1-6. Formeler av anthocyaniner fra <i>Aronia melanocarpa</i> og <i>Aronia prunifolia</i>	16
Figur 3-1. Til sammen ble det analysert 300 prøverør med forskjellige konsentrasjoner av aroniabær.....	32
Figur 3-2. Omdannelse av DPPH til DPPH-H ved hjelp av en radikalfanger.....	33
Figur 3-3. Peroksidering av linolsyre til 13-HPODE (Funk og Cyrus 2001).....	36
Figur 3-4. Degradering av hypoxantin og xantin til urinsyre (Patcher et al. 2006)	40
Figur 3-5. Aktiveringstrinn av komplementsystemet.....	45
Figur 4-1. Standardkurve HPLC cyanidin-3-galaktosid.....	58
Figur 4-2. HPLC kromatogrammer av surt metanolekstrakt fra aroniabær. a: Moskva; b: Hugin; c: Nero og d: Viking. Anthocyaninene er 1: cyanidin-3-galaktosid; 2: cyanidin-3-glukosid; 3: cyanidin-3-arabinosid og 4: cyanidin-3-xylosid.	59
Figur 4-3. Standard kurve galle-syre	66
Figur 4-4. % -innhold av proanthocyanidiner i frysetørkede aroniabær som cyanidin ekvivalenter	68
Figur 4-5. Komplementmodulerende aktivitet for forskjellige aroniabær ekstrakter.....	70

Tabeller:

Tabell 1. Taksonomisk klassifisering av aroniabær (Wikipedia, 2009):.....	12
Tabell 2. Prosedyre for måling av total fenolinhold.....	42
Tabell 3. Fortynningsrekke for prøvene og BP II- standarden.....	48
Tabell 4. Titreringskurve for koplement	48
Tabell 5. Gjennomsnittsdiameter av bær fra de forskjellige kultivarer	56
Tabell 6. Reelt innhold av anthocyaniner	58
Tabell 7. Gjennomsnittlig innhold av antocyaniner i friske bær.....	59
Tabell 8. % inhibition av α -glucosidase	61
Tabell 9. DPPH scavenging av aronia bær ekstrakter	62
Tabell 10. 15-LO-hemming av 0,5 % TFA i metanolekstraktet og 80 % etanolekstrakt av aroniabær.....	63
Tabell 11. XO hemming av aroniabær ekstrakter	65
Tabell 12. Innhold av galle-syre ekvivalenter per gram ekstrakt og innhold av galle-syre ekvivalenter per 100 g frosne bær	66
Tabell 13. Metode1: Måling av løselig proanthocyanidininnhold i Aroniabær.....	67
Tabell 14. Metode 2: Måling av løselig proanthocyanidininnhold i aroniabær cv. Hugin	68
Tabell 15. IC50-verdier av komplementmodulering.....	69

Forord

Jeg ønsker først og fremst å takke mine veiledere, førsteamanuensis Hilde Barsett, førsteamanuensis Helle Wangensteen, professor emeritus Karl Egil Malterud og stipendiat Paula Marie Bräunlich for all praktisk og faglig råd og engasjerende veiledning under arbeidet med masteroppgaven. Gjennom god oppfølging og høy faglig kompetanse har dere bidratt til å gjøre dette til et lærerikt år.

Jeg vil takke avdelingsingeniør for farmakognosi Suthajini Jogarajah for nyttige og praktiske råd og hjelp på laboratoriet. Stipendiat Anne Catherine Vestrheim for tilrettelegging og veiledning i forbindelse med forsøk utført ved Folkehelseinstituttet. Jeg vil også takke alle ansatte ved avdelingen for stor hjelpsomhet og et trivelig år på instituttet.

Tilslutt vil jeg takke familien min for all støtte som jeg fikk under hele studien.

Viktorija Nikolic,

Mai 2012

Sammendrag

Arona melanocarpa og Aronia prunifolia, eller svartsurbær er planter som har sin opprinnelse fra Nord-Amerika. Aroniabær har blitt brukt ved mange ulike indikasjoner som blant annet forkjølelse og ved sårbehandling. Bær inneholder fenolske substanser som anthocyaniner og proanthocyanidiner, og har høy antioksidant effekt. I dag brukes aroniabær på mange ulike måter på grunn av sine antatte helsebringende effekter.

I denne studien ble det utført kjemisk og biologisk karakterisering av fire kultivarer av aroniabær ekstrakter. Kultivarer som ble analysert var Aronia melanocarpa Moskva, Aronia melanocarpa Hugin, Aronia melanocarpa Nero og Aronia prunifolia Viking. Tørkede og pulveriserte bær ble ekstrahert med 0,5 % TFA i metanol og med 80 % etanol. Det ble påvist anthocyaniner og proanthocyanidiner i ekstraktene, og anthocyaniner ble kvantifisert.

Både metanolekstraktene og etanolekstraktene av de forskjellige bærtypene ble undersøkt for DPPH radikalscavenger aktivitet, 15-lipoksygenasehemmende aktivitet, xantinoksidasehemmende aktivitet, α -glukosidasehemmende aktivitet og komplementmodulerende aktivitet. I tillegg ble innhold av total fenol og total proanthocyanidin bestemt i etanolekstraktene.

Resultatene viste dessuten metanolekstraktene hadde høyere aroniabærene har en høyt innhold av anthocyaniner, spesielt cyanidin-3-galaktosid. Etanolekstraktene har påvist høyere DPPH radikalscavenger aktivitet enn metanolekstraktene, noe som viser at substansene i etanolekstraktene er mer aktive enn substansene i metanol ekstraktene. Resultatene viste lave verdier for 15-lipidoksydase hemmingsaktivitet og hemmingen av xantinoksydase, for både metanol ekstraktene og etanolekstraktene av aroniabær. Resultatene viste dessuten metanolekstraktene hadde høyere α -glukosidase-hemminde aktivitet enn etanolekstraktene, noe som tyder på anthocyaniner kan være effektive til å indusere anti-hyperglykemisk effekt. Metanolekstraktene har lavt potensiale til å påvirke komplement. Etanolekstraktene viste høyere komplementmodulerende aktivitet enn metanolekstraktene. Aronia prunifolia Viking og Aronia melanocarpa Nero var de med høyest komplementmodulerende aktivitet. Høye verdier av total fenol ble observert i aroniabær etanolekstrakter.

Likheter og ulikheter i innhold og aktivitet mellom de fire kultivarer av aroniabær som ble vist og diskutert.

Bærene fra de fire kultivarene av aroniabær hadde omtrent like stort %- innhold av proanthocyanidiner. Bærene fra *Aronia prunifolia* Viking hadde omtrent tre ganger så høyt innhold av anthocyanidiner og *Aronia melanocarpa* Nero noe under to ganger så høyt innhold i forhold til *Aronia melanocarpa* Moskva og *Aronia melanocarpa* Hugin som hadde ganske likt innhold. Total fenol analyse viste at bærne fra *Aronia prunifolia* Viking omtrent tre ganger så høyt innhold og *Aronia melanocarpa* Nero hadde omtrent to ganger så høyt innhold av total fenol i forhold til *Aronia melanocarpa* Moskva og *Aronia melanocarpa* Hugin som hadde ganske likt innhold.

1 Innledning

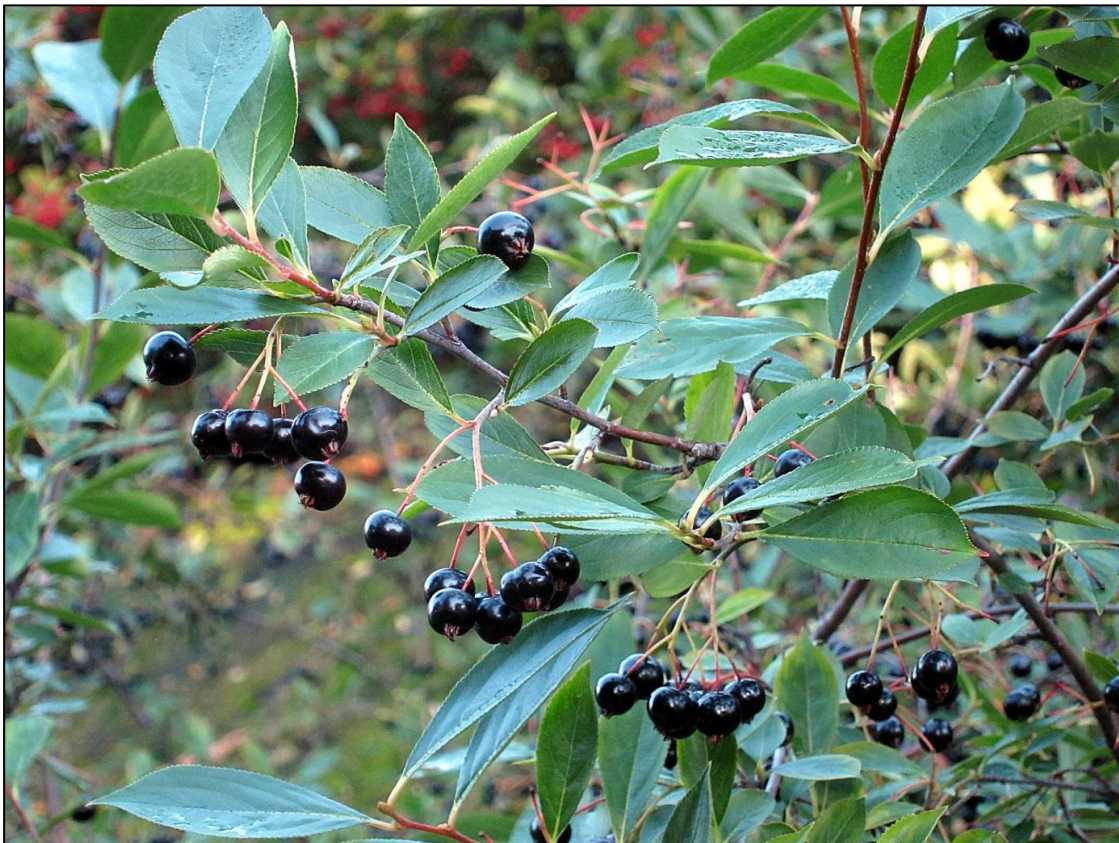
Aronia melanocarpa er en plante som opprinnelig kommer fra det nordamerikanske kontinentet og er kalt svartsurbær på norsk. Frukten kalles superfrukt på grunn av sitt innhold av antioksidanter og vitamin C. Svartsurbær eller aroniabær, har blitt populær i Øst Europa, Russland og Tyskland og er dyrket for kommersiell bruk.

Aronia prunifolia (blåsurbær) er en hybrid mellom *Aronia melanocarpa* (svartsurbær) og *Aronia arbutifolia* (rødsurbær) (www.duke.edu) og har egenskaper fra begge artene. *Aronia prunifolia* vokser på de samme områder som *Aronia melanocarpa* og *Aronia arbutifolia*. Den har blå bær og samme farge på bladene som *Aronia melanocarpa* og *Aronia arbutifolia* (Kokotiewicz 2010).

Aronia melanocarpa vokser oftest i våte skogsområder og sumper. I Norge er planten dyrket som hekk og som prydbusk, men bær brukes også fordi de inneholder høye verdier av antioksidanter (anthocyaniner). Det finnes produksjon av svartsurbær i Lier (Buskerud) og Jæren (Rogaland)(Svendsen 2006). Navnet svartsurbær kommer av bærenes adstringerende effekt og sur smak som gjør at de er lite spiselige når de er ferske. Derfor blir ikke bærene spist av fugler. Beplantningen av aroniabær er relativt lett på grunn av motstandsdyktighet mot sykdom.



Figur 1-1. Bilde av *Aronia melanocarpa* Hugin



Figur 1-2. Bilde av *Aronia melanocarpa* Hugin på grenen



Figur 1-3. Bilde av *Aronia melanocarpa* Moskva bær og løv



Figur 1-4. Fire typer av aroniabær

Svartsurbær har høyt innhold av anthocyaniner. Anthocyaniner er sammensatt av at aglykon (anthocyanidin), sukker og i mange tilfeller en acyl gruppe. Anthocyaniner er pigmenter som er vannoppløselige og er ansvarlig for en mørk rød til mørk blå/svart farge av bær.(Jordheim 2007).

Det har vært påvist at alkaliske gjødningsstoffer (Natrium, Kalium og Silisium) gir økt størrelse og fasthet av frukt (Skupień et al. 2008). Behandling av planter med klorocholine klorid har resultert i økt konsentrasjon av polysakkarider og anthocyaniner i frukt (Stroev og Martinov 1979 og 1979-1). Eksperimentell applikasjon av ornithine decarboxylasehemmer (ethanolaminfosfat) gir mye høyere innhold av anthocyaniner i bær og induisert transformasjon av sakkarider til fenoler.

Optimal tid for høsting av bær er i begynnelsen av september når det gjelder vekt av bær og innhold av anthocyaniner. Etter denne perioden forekommer oksidering av anthocyaniner og frukt får uønsket brunaktig farge (Jeppsson og Johansson 2000; Bober og Oszmiański 2004). For å stabilisere farge og innhold av anthocyaniner i aroniabær juice, kan *Scutellaria baicalensis* rot som er flavone-rik, bli tilsatt i aroniajuiceproduksjonen. Denne prosessen kalles kopigmentasjon som forbedrer aronia juicens kvalitet betydelig når det gjelder fargestabilitet og innhold av anthocyanins (Oszmiański 2002, Malien-Aubert et al. 2001).

Antioksidanter fra svartsurbær kan virke positivt i menneskekroppen. Det er vist at *Aronia melanocarpa* juice beskytter flerumettede fettsyrer i fosfatidylholin mot peroksidering i et system hvor liposomer ble behandlet med det peroksidierende reagens DPPH (1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl). I tillegg viste *Aronia melanocarpa* juice en synergistisk effekt med α -tokoferol(vitamin E) i dette systemet (Graversen 2008). I et eksperiment med rotter ble en forhøyet mengde av oksidert fettsyre tilsatt maten. Dette resulterte i forhøyet nivå av thiobarbitur syre - reaktive substanser (TBARS) i blodet hos rotter. Konsentrasjon av TBARS var betydelig lavere i rotter som fikk ekstrakt av aroniabær sammen med maten med forhøyet oksidert fettsyre. Dette indikerer et viktig potensial av svartsurbær mot peroksidering (Frejnagel og Zduńczyk 2008). En annen studie utført på rotter med eksperimentelt induisert oksidativt stress (høy fruktosediett og streptozotocyninjeksjon), har påvisst at inntak av aroniaekstrakt fører til betydelige forbedringer av antioksidantstatus i lever, nyrer og lunger målt som nivå av TBARS (Jurgoński et al. 2008).

Antioksidativ virkning av aroniabær har blitt undersøkt hos mennesker i forbindelse med oksidativt stress. Det har blitt påvist positiv virkning mot oksidativt stress hos mennesker med forhøyet kolesterol og diabetes. Det har blitt in påvist *in vitro* at aroniabær ekstrakter påvirker funksjon av menneskelige blodplater betydelig. Blodplatesuperoksidproduksjon var betydelig forhøyet hos pasienter med risiko for hjerte og kar lidelser (høyt blodtrykk, høyt kolesterolnivå, røyking og diabetes). Ved behandling av blodplater med aroniabærekstrakt har det blitt påvist betydelig senkning i superoksid nivå i pasienter med hjerte og kar lidelser, mens ingen effekt var påvist i kontrollgruppe som ikke har tatt aroniaekstrakt (Ryszawa et al. 2006).

Det er også vist nedgang i kolesterol nivå hos pasienter som har hatt diett med svartsurbær i 30 dager (Kowalczyk et al. 2005). Oksidativt stress blir induisert også med forhøyet fysisk aktivitet (Melikoglu et al. 2008; Powers og Jackson 2008). Kosttilskudd med svartsurbær til roere førte i løpet av 1 måned til betydelig senking i glutathione peroksidase og superoksid dismutase sammenlignet med kontroll gruppe (Frankiewicz-Józko og Faff 1999; Faff og Frankiewicz- Józko 2003).

1.1 Farmakologisk aktivitet

Dokumentasjon viser at det i løpet av de siste 15 år er utført økende mengder forskning på fruktjuice og på anthocyaniner fra frukt av *Aronia melanocarpa*. Det er påvist at polyfenoler som inkluderer anthocyaniner fra forskjellige bær har vist flere helseforbedrende egenskaper som antimutagene egenskaper, lipidsenkende egenskaper og risikominskende virkinger for hjerte og kar lidelser. Aroniabær og aroniabærekstrakt har i stor utstrekning også blitt utforsket for disse egenskaper. Ingen giftige stoffer ble påvist i aroniabærekstrakten (Niedworok og Brzozowski 2001). Resultater fra *in vitro* tester var betydelig forskjellige fra resultater fra *in vivo* tester. Dette er på grunnen av at anthocyaniner fra aroniabær lett degraderes i fordøyelsesystemet (Bermúdez-Soto et al. 2007).

En oversikt over aroniabærs farmakologiske aktiviteter er gitt i de følgende avsnittene.

1.1.1 Antimutagen og anticancer aktivitet

Det er vist at anthocyaniner fra aroniabær har antimutagen aktivitet in vitro, og at de er ansvarlige for radikalfangende egenskaper og hemming av enzymer som er ansvarlige for promutagen aktivering.

Aronia ekstrakt har vist gode resultater hos human colon tumor HT29 kloner 19A celler, som er utført ved bruk av mikrogel elektroforesis essay (komet test). H₂O₂-indusert brudd på DNA kjeden var betydelig lavere ved bruk av aronia ekstrakt (Pool-Zobel et al. 1999). Disse resultatene viser at kreftforebyggende potensiale av anthocyaniner som kan tilskrives systembeskyttelse f.eks. fri radikalfangende egenskaper i blod og antimutagen aktivitet i spesifikke vev.

1.1.2 Hjerterbeskyttende aktivitet

Hjerterbeskyttendeaktivitet av aroniabær kan være tilskrevet lipidsenkende, anti-aggregat og vasoaktiv virkning fra antocyaninrike ekstrakter. Aroniabær inneholder også niacin som er godt kjent for sin lipidsenkende virkning (Ganji et al. 2003).

Rotter med forhøyet kolesterol, som fikk aronia juice i 30 dager hadde betydelig lavere nivå av total kolesterol TC, low- density lipoprotein kolesterol (LDL kolesterol) og triglycerider TG, sammenlignet med rotter som ikke fikk svartsurbær juice. High density lipoprotein kolesterol (HDL kolesterol) var ikke forandret med inntak av svartsurbær juice (Valcheva-Kuzmanova et al. 2007; Valcheva-Kuzmanova et al. 2007-1). Pasienter med mild hyperkolesterolemia og som ikke tok medisiner, fikk aronia juice i mer enn 6 uker. Det ble påvist senket TC, senket LDL og senket TG og forhøyet HDL-chol konsentrasjon (Skoczyńska et al. 2007).

1.1.3 Leverbeskyttende aktivitet

Et eksperiment ble utført på rotter som fikk sin lever skadet av CCl₄. Det førte til leverforandringer som nekrose, ballooning degenerasjon og inflammatorisk infiltrasjon av lymfocytter. De av rottene som fikk svartsurbær juice før de fikk CCl₄ hadde redusert histopatologiske forandringer i lever. Aroniabær juices beskyttende virkning er relatert til antioksidative egenskaper og scavenging av frie radikaler som var dannet i løpet av CCl₄ forgiftning (Valcheva-Kuzmanova et al. 2004).

I et annet eksperiment er det påvist at inntak av anthocyaniner fra svartsurbær juice kan forhindre effekter av kadmium klorid i lever og nyrer i rotter. Effekten av juicen medfører en lavere akkumulasjon av kadmium i lever og nyrer, senket konsentrasjon av bilirubin og urea i blodserum og redusert aktivitet av aminotransferaser (Kowalczyk et al. 2003).

1.1.4 Gastrobekyttende aktivitet

Rotter som hadde kjemisk induisert gastriske lesjoner fikk svartsurbær juice før de fikk indometacin. Det førte til at antall, areal og alvorlighet av lesjoner var redusert i forhold til rotter som ikke fikk svartsurbær juice men fikk indometacin. Mulig grunn for det er forsterket produksjon av gastrisk mucus etter inntak av aronia juice og nøytralisering av det oksidativ stress som ble forårsaket av indometacin (Valcheva-Kuzmanova et al. 2005).

1.1.5 Antidiabetisk aktivitet

Antidiabetisk aktivitet av *Aronia melanocarpa* er eksperimentelt påvist hos både dyr og mennesker.

Rotter som var diabetesindusert med streptozotocin, ble delt i to grupper. Første gruppe fikk høyt inntak av svartsurbær ekstrakt mens andre gruppe fikk vanlig føde. Resultatene viste at nivå av blodglucose sank etter inntak av svartsurbær ekstrakt (Jurgoński et al. 2008). Denne antidiabetiske aktiviteten kan være resultat av senking av mukosal maltase og sukrase aktivitet i tarmene. Stimulering av glukose opptak, forhøyet insulin sekresjon og reduksjon av oksidativt stress kunne også ha vært involvert (Jurgoński et al. 2008; Valcheva-Kuzmanova et al. 2007-3).

En annen studie ble utført på en gruppe mennesker med diabetes mellitus type II, som har hatt daglig inntak av 200 ml juice av svartsurbær uten sukker i en periode på 3 måneder. En betydelig antidiabetisk effekt ble påvist, sammenlignet med tilsvarende pasienter i en kontrollgruppe som ikke fikk svartsurbær juice. Dette kan bety at aronia juice kan ha positiv tilleggseffekt hos pasienter som har sukkersyke (Simeonov et al. 2002).

1.1.6 Anti-inflammatorisk aktivitet

Det er vist betydelig anti-inflammatorisk effekt etter intravenøs injisering av aronia ekstrakt hos endotoksinindusert uveit (øyebetennelse) hos rotter. Veldig sterk antiinflammatorisk virkning var demonstrert med 100 mg svartsurbær ekstrakt som kan sammenlignes med 10 mg prednisolon (Ohgami et al. 2005).

1.1.7 Antibakteriell og antiviral aktivitet

Antimikrobielle egenskaper av fenoliske substanser fra forskjellige bærarter er demonstrert *in vitro*. Ekstrakt fra *Aronia melanocarpa* bær viste frem bakteriostatisk effekt *in vitro* mot *Staphilococcus aureus* og *Escherichia coli*. Dessuten, antiviral effekt ble påvist mot influensa A virus. Studien viste at redusering av virusets hemagglutinasjon ble oppnådd ved inkubasjon av svartsurbærsaft sammen med virussuspensjon. Virusets celleoverflateabsorberende evne ble minsket fordi antocyaniner fra svartsurbærsaft dannet et kompleks med viruspartikkel, virion (Valcheva-Kuzmanova og Belcheva 2006).

Det er observert sterk inhibitorisk effekt av aronia bær mot patogener som er i slekt med *Staphilococcus* og *Salmonella* fra tarmene hos mennesker (Puupponen-Pimiä et al. 2005 og 2005-2).

1.1.8 Strålebeskyttende og immmodulerende aktivitet

Ekstrakt av *Aronia melanocarpa* har visst positive effekter hos rotter med eksperimentelt induerte strålingsykdomer. Overlevelse av dyr som var matet med svartsurbær var betydelig høyere enn av de som ikke fikk ekstrakt av svartsurbær. Det ble også vist at anthocyaniner motvirker lipid peroksidering og senker nivå av hvite blodceller hos gammabestrålte rotter (Andryskowski et al. 1998 og 1998-1).

1.1.9 Sikkerhet

For øyeblikket finnes det ikke data om noen giftig og uønsket effekt i *Aronia melanocarpa* frukt, juice og ekstrakter.

1.2 Botanisk beskrivelse

Aronia slekt inkluderer to arter av nordamerikanske busker: *Aronia melanocarpa* (svartsurbær) og *Aronia arbutifolia* (rødsurbær).

Aronia prunifolia (blåsurbær) er en hybrid mellom *Aronia melanocarpa* (svartsurbær) og *Aronia arbutifolia* (rødsurbær).

Rike:	Planterike
Divisjon:	Magnoliophyta
Klasse:	Magnoliopsida
Orden:	Rosales
Familie:	Rosaceae
Slekt:	Aronia
Art:	Melanocarpa, Prunifolia
Subtypen av art:	Moskva, Hugin, Nero for art Melanocarpa, Viking for art Prunifolia

Tabell 1. Taksonomisk klassifisering av aroniabær (Wikipedia, 2009):

Svartsurbær er en busk som er 1,5 - 2 m høy. Veksten er først opprett, men blir etter hvert bred og noe overhengende. Blomstene som kommer i mai - juni, er hvite med små røde prikker innerst på kronbladene, og sitter i ca. 5 cm brede knipper. Hver busk kan årlig gi opptil 10 kg bær, spesielt hvis busken står på en solrik plass. Utover høsten får busken glinsende mørkeblå eller svarte, spiselige frukter (bær) som er mellom 8-13 cm i diameter. Bær er samlet i gruppene som inneholder fra 8 til 14 frukt på røde stilker.

Frukt fra aroniabær har tørr og syrlig smak, men bær kan brukes som juice, saft, syltetøy, vin eller som naturlig fargestoff. Bær henger på lenge etter bladfall. Bladene er glatte og glinsende mørkegrønne, uten torner eller tagger. Bladene får vakker røde og oransje farge på høsten (Hjemstad 2007).

1.3 Voksested

I Norge er aronia plante i bruk som enkelt busk i beplantning, som prydbusk, som hekk eller som beplantning i rundkjøringer og ved rasteplasser. *Aronia melanocarpa* kan plantes over store deler av Norge, inkludert enkelte steder i Nord Norge. *Aronia melanocarpa* er lite utsatt for skadedyr og sykdommer og grunnen til det kan være sur smak av bær.

Aronia prunifolia er en busk som kan vokse opp til 3 m. Blomstene kommer fra juli til august. Blomsten er hermafrodit og er pollinert av insekter. Mellom oktober og desember blir fargen

på bærene lilla til svart. Planten foretrekker sand-, silt- eller leieraktig jordart og krever godt drenert jord. Silt er en finkornet jordart med en kornstørrelse som er mellom 0,002 og 0,06 mm. Andre betegnelser for silt er kvabb, mo og mjele. Siltfraksjonen er den nest fineste fraksjonen som vi får ved sikting av sedimenter. Fraksjonen som har kornstørrelse under 0,002 mm kalles leire (<http://no.wikipedia.org/wiki/Silt>).

Planten foretrekker sur, nøytral og alkalisk jord. Planten kan vokse i halv skygge (skogsområde) eller uten skygge. Planten trenger fuktig eller tørr jord (Hjemstad 2007; Urtekildens planteleksikon).

1.4 Bruk og utbredelse

Hos Nord Amerikas indianere var tradisjonell bruk av svartsurbær utbredt og bærene var i bruk både som friske bær og som tørkede bær. Bærene ble brukt for å lage næringsrik mat som for eksempel en rett laget av fett, tørket pulverisert kjøtt og frukt (Erichsen-Brown 1989). Indianernes medisinske bruk av bær var i form av te mot forkjølelse, mens kolonistene oppdaget at bærene virket vevadstringerende og begynte å bruke dem for sårbehandling (Smith 1933).

I forrige århundre ble bruk av aroniabær utbredt i Sovjet Unionen og østeuropeiske land. I dag er den dyrket også i Tyskland for eksport til det nord amerikanske helsemarkedet.

Bærene hadde et bredt bruksområde, fra rik kilde av naturlige matfargestoffer til produksjon av juice, syltetøy og vin (Jeppsson 2000; Scott og Skirvin 2007). Aroniabær har ikke bare blitt populær som mat ingrediens men også som plantemedisin og ble brukt som naturmedisin mot høyt blodtrykk og mot åreforkalkning (Jaroniewski 1998; Domarew et al 2002). Aroniabær er også brukt mot vitaminmangel og som medisin mot hemoroider (Jaroniewski 1998; Sarwa og Ciołkowska-Paluch 1990).

Siden bær er ganske sure, blander man bær med epler for å få mildere smak på saft og syltetøy. Aroniabær kan brukes som fyll i pai, gelé og puré, vin eller likør. *Aronia melanocarpa* og *Aronia prunifolia* har sterk farge som kan brukes for å gi andre matvarer kraftigere farge. Fargen kan også brukes til farging av tekstiler (Jurgoński et al. 2008).

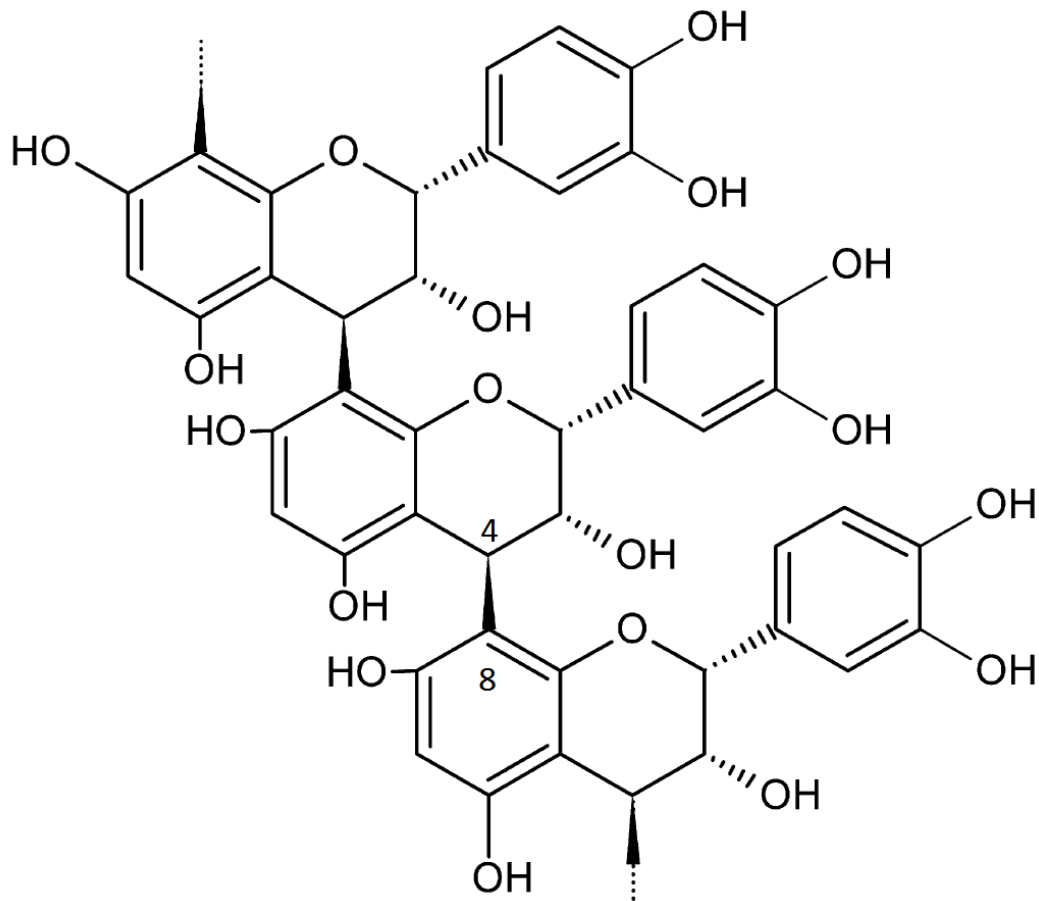
1.5 Innholdsstoffer

Innholdsstoffer i svartsurbær og blåsurbær er avhengige av mange faktorer (bl.a. dyrkning, modning, høsting og habitat) som gjør at innholdsstoffer kan variere. Bærene inneholder: fenolske substanser, kostfiber, sukker, fett, protein, mineraler, vitaminer, triterpener og aromatiske substanser.

Fenoliske substanser omfatter procyanidiner, anthocyaniner og fenolisk syre, dette utgjør totalt 7,5 % av bærenes vekt. De er ansvarlig for antioksidantegenskaper og oftest er forbundet med de medisinske egenskaper, som svartsurbær har. Fenolske substanser inkluderer også klorogen og neoklorogen syre og noe tanniner. Mengde av fenolisk syre i svartsurbær er høy sammenlignet med andre bær.

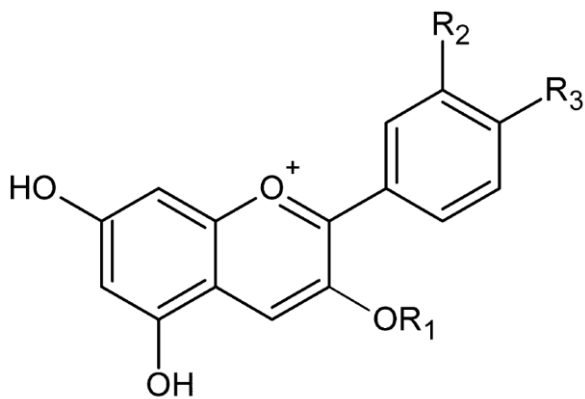
Procyanidiner er den dominerende fenoliske substansen i svartsurbær. Stoffet foreligger ofte som oligomere eller polymere (epi) catechiner, som er subenheter av flavan-3-ol, bundet med C4-C6 og C4-C8 (B-type) binding (Kulling og Rawel 2008; Krenn et al. 2006).

Polymerisasjonsgrad av svartsurbærs procyanidiner kan variere fra 2 til 23 (Oszmiański og Wojdyło 2005; Wu et al. 2004).



Figur 1-5. Formel av polymersk procyanidin med C4-C8 bind (B-type)

I aroniabær er anthocyaniner nest største gruppe av fenoler. Anthocyaniner er flavonoider, og de gir bær den fra mørk rød til mørk blå farge. De finnes som en blanding av cyanidin glykosider: cyanidin 3-O-galaktosid, cyanidin 3-O-arabinosid, cyanidin 3-O-xylosid og cyanidin 3-glukosid (Oszmiański og Wojdyło 2005; Wu et al. 2004; Oszmiański og Sapis 1988; Jakobek et al. 2007).



Cyanidin-3-O-galaktosid	R ₁ = galaktose	R ₂ = OH	R ₃ = OH
Cyanidin-3-O-glukosid	R ₁ = glukose	R ₂ = OH	R ₃ = OH
Cyanidin-3-O-xylosid	R ₁ = xylose	R ₂ = OH	R ₃ = OH
Cyanidin-3-O-arabinosid	R ₁ = arabinose	R ₂ = OH	R ₃ = OH

Figur 1-6. Formeler av anthocyaniner fra *Aronia melanocarpa* og *Aronia prunifolia*

Kostfiber i friske bær er ca. 5,6 % (w/w). Det er beskrevet at kostfiberpulver fra svartsurbær har innhold av mikrokrystallinske cellulose, pektiner, ligniner og konservert tannin.

Innhold av organisk syre er kun 1-1,5 % (w/w) i friske bær, og er relativt lav sammenlignet med andre bær.

Sukkerinnhold er funnet å være mellom 16–18 % (w/w). Glukose og fruktose er identifisert, men ikke sukrose. Sorbitol brukes i spesielle dietter, og er kjent som et svakt laksativ stimulan. Den finnes i høy mengde i svartsurbær sammenlignet med andre bær.

Fett og protein: små mengde av fett som utgjør ca 0,14 % var rapportert i bær. Fettet er sammensatt av linolsyre glycosider og fosfatidylinositol (Kane et al. 1991; Zlatanov 1999). Det var også rapportert små mengde av protein 0,7 % (w/w).

Mineraler som kalium og sink var påvist i relativt høy mengde, samt natrium, kalsium, magnesium og jern (Kane 1991; Ognik 2006).

Vitaminer B1, B2, B6 og C, pantotensyre, niacin, folsyre, α og β tokoferoler (vitamin E) og karotenoider som inkluderer β -karoten og β -cryptoksantine, er også påvist (Kane et al. 1991; Stralsjo et al. 2003; Razungles et al. 1989).

Triterpener: Aroniabær inneholder triterpener β -sitosterol og campesterol (Zlatanov 1999). Det var også påvist derivater av betulin syre, 23-hydroksibetulin syre og 2 α -hydroksioleanol-syre. (Yu et al. 2006)

Aromatiske substanser: Amygdalin, et cyanogen-glykosid som gir bitter smak, er identifisert i bærene. Ved hjelp av gaskromatografi og massespektrometri ble det påvist 48 flyktige komponenter i svartsurbær. De tre hovedkomponentene er benzaldehyd cyanohydrin, benzaldehyd og hydrocyansyre (Hirvi og Honkanen 1985).

1.6 Antioksidanter

En antioksidant er enhver substans som forsinker eller signifikant hindrer oksidasjonen av et oksiderbart substrat når antioksidanten foreligger i vesentlig lavere konsentrasjon enn det oksiderbare substratet (Halliwell 2005).

De fleste molekyller i kroppen kan være oksiderbare substrater. Eksempler på oksiderbare substrater er karbohydrater, fettsyrer, proteiner og DNA (Gutteridge og Halliwell 1994).

Ifølge analyser har aroniabær innhold av proanthocyanidiner og total fenol, som er betydelig høyere (2-3 ganger) enn solbar, ripsbær, stikkelsbær og hyllebær (Wu et al. 2004).

1.6.1 Antioksidantforsvar

Antioksidantforsvar består av naturlige antioksidanter i kroppen og antioksidanter fra kosten. Naturlige antioksidanter i kroppen er:

- Superoksid dismutase(SOD) som fjerner O_2
- Catalase som omdaner H_2O_2 til O_2 og H_2O

- Gluthation peroxidase som fjerner H_2O_2
- Gluthation(GSH) som scavenger frie radikaler og reaktive oksygen species (ROS)
- α -lipoinsyre, scavenger frie radikaler og ROS

Antioksidanter som finnes i kosten er (Halliwell 2007):

- Vitamin C, scavenger frie radikaler og ROS
- Vitamin E, scavenger lipidperoksy radikaler
- Flavonoider, scavenger frie radikaler og ROS
- Karotenoider, deaktiverer singlet oksygen

Antioksidantenes funksjon er å beskytte kroppen mot frie radikaler som lages i kroppen eller som kommer fra eksogene faktorer (luft forurensing, ioniserte stråling, røyking, UV lys) og påvirker oss (www.lef.org). Dette gjøres for eksempel ved at antioksidanter reagerer og uskadeliggjør frie radikaler, ved å hemme genereringen av peroksidingsprosesser og reparere oksidative skader (Halliwell og Gutterige 2007).

1.7 Frie radikaler og reaktive oksygen species (ROS)

Et fritt radikal er et atom med ett eller flere uparede elektroner som har evnen til å eksistere uavhengig.

Radikalenes unike kjemiske struktur medfører at de vanligvis er ustabile, har kort halveringstid og er svært reaktive (Halliwell 2005). Reaktive oksygen species (ROS) omfatter både oksygensentrerte radikaler (superoksid, $O_2 \cdot^-$; hydrokyl, $OH \cdot$; peroksy, $ROO \cdot$; alkoksy, $RO \cdot$) og ikke-radikale derivater av oksygen(H_2O_2 ; O_3) (Halliwell 2005).

1.7.1 Dannelse av frie radikaler og ROS

Frie radikaler og andre reaktive oksygenforbindelser kan dannes som et resultat av en normal oksidativ metabolisme. Økt dannelse av ROS kan skje ved skader på mitokondriene. Noen radikaler og ROS kan også bli syntetisert av ulike typer av celler i kroppen. Men selv om de har skadelige virkninger, er de viktige signalmolekyler og har betydning i kroppens forsvar mot blant annet bakterielle infeksjoner (Sies 1991; Halliwell 2001).

1.7.2 Oksidativt stress

Oksidativt stress er forskyving av peroksidant/antioksidant balansen mot økt peroksidering. Oksidativt stress oppstår når kroppens antioksidant forsvar ikke lenger klarer å fjerne frie radikaler og ROS. Dette kan skyldes et lavt nivå av antioksidanter eller en overproduksjon av ROS. Oksidativt stress er også implisert i mange sykdommer, men som en følge av sykdommen og ikke en utløsende faktor. (Halliwell og Gutteridge 2007).

1.8 Lipidperoksidering

Celler og organeller er omgitt av membraner som inneholder store mengder flerumettede fettsyrer. Ved lipidperoksidering blir flerumettede fettsyrer oksidert og degradert.

Lipidperoksidering kan skje på to måter: ved en enzymatisk eller ikke-enzymatisk reaksjon. En enzymatisk reaksjon foregår ved at enzymer (cyklooksygenaser og lipoksygenaser) katalyserer peroksidering av flerumettede fettsyrer (Halliwell og Gutteridge 2007).

En ikke-enzymatisk lipidperoksidering starter ved at en reaktiv species, for eksempel OH[•] radikalet, fjerner et hydrogenatom fra en metylengruppe i sidekjeden. Dette fører til dannelsen av et ustabil karbontatom i membranen. I flerumettede fettsyrer gjennomgår ustabile karbontomer molekylær omleiring og danner et konjugert dien. Ved reaksjon med oksygen dannes det et peroksy radikal (ROO[•]). Dette radikalet er reaktivt nok til å angripe nærliggende fettsyresidekjeder. Når peroksy radikalet tar opp et hydrogen blir lipidhydroperoksid (ROOH) dannet. Dette fører til kjedereaksjon (Halliwell 1991).

Akkumulering av lipidhydroperoksider i en membran kan forstyrre membranfunksjonen og føre til at membranen kollapser. I tillegg kan lipidhydroperoksider nedbrytes og gi opphav til

en rekke cytotoxiske produkter som malondialdehyd og 4-hydroksynonenal (Halliwell og Gutteridge 2007).

2 Oppgavens mål

Målet for denne oppgaven er todelt:

1. Ekstraksjon av forskjellige kultivarer av *Aronia melanocarpa* og *Aronia prunifolia* Viking bær og kvantifisering av anthocyaniner ved bruk av HPLC metode.
2. Biologisk karakterisering av de ulike kultivarene.

3 Eksperimentelt

3.1 Materiale

3.1.1 Kjemikalier

Aceton (Chemi-Teknik AS, Oslo, Norge)

Acetonitril (Merck, Darmstadt, Tyskland)

1-Butanol (Merck, Darmstadt, Tyskland)

Dimetylsufoksid (DMSO) (Merck, Darmstadt, Tyskland)

DPPH (1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl)(Sigma-Aldrich, St.Louis,USA)

Etanol (Farmasøytisk institutt, Oslo, Norge)

Gallesyre (Sigma-Aldrich, St.Louis ,USA)

α -glucosidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Jern III klorid FeCl_3 (Merck, Darmstadt, Tyskland)

Metanol purum (Chemi-Teknik AS, Oslo, Norge)

Natriumhydroksid NaOH(Merck, Darmstadt, Tyskland)

Natriumklorid NaCl(AnalaR, Normapur, VWR, Belgium)

Nariumkarbonat Na_2CO_3 (Merck, Darmstadt, Tyskland)

PGP (4-nitrophenyl-2-D-glucopyranoside) (Sigma-Aldrich, St.Louis ,USA)

TRIS (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sverige)

Trifloureddiksyre (TFA) (Merck, Hohenbrunn, Tyskland)

Xantin oksidase fra kumelk (Sigma-Aldrich, St.Louis ,USA)

Quercetin (Sigma-Aldrich, St.Louis ,USA)

Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Darmstadt, Tyskland)

Hypoxantin (Sigma-Aldrich, St.Louis ,USA)

Natriumdihydrogenfosfat Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, Tyskland)

Kaliummonohydrogenfosfat KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Tyskland)

Natriummonohydrogenfosfat NaH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Tyskland)

Ferriamoniumsulfat ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (NMD, Oslo, Norge)

Destilert vann (Farmasøytisk institutt, Oslo, Norge)

Linolsyre (Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland)

Nitrogengass (N_2) (AGA, Oslo, Norge)

3.2 Generelle metoder

3.2.1 Innveing

Analysevekt ED224S ble brukt ved totallvekt under 220 g og skålsvekt CT 1200V(OHAUS Corporation) ble brukt ved total vekt over 220 g.

3.2.2 Vannkvalitet

Destillert vann fra Elix® millipore Progard®2 w/o polyfenol filter ble brukt i alle metoder.

3.2.3 Filtrering

Sprøytefilter eller papirfilter ble brukt avhengig av hvilken separasjonsmetode som ble benyttet. Filter papir som ble brukt: Whatman® Qualitative 1 (Schleicher & Schuell), Små væskemengder ble filtrert med sprøyte og sprøytefilter Phenomenex RC Membrane 0,45 µm 4 mm Syringe Filters, non sterile, PP Housing, Luer/Slip.

3.2.4 Sentrifugering

Løsninger ble sentrifugert i Multifuge 4KR (Heraeus Sepatech) for å fjerne partikler og for å lette filtrering og separasjon, Multifuge 3SR (Heraeus Sepatech).

3.2.5 Blanding av løsninger

Løsninger i prøverør ble blandet på MS2 Minishaker (IKA), Minishaker Heidolph Relax 2000.

3.2.6 Inndamping

For å fjerne alt eller deler av løsemiddelet, brukes inndampings metode. Dette gjøres for å oppnå en oppkonsentrering av stoffet i løsningen.

Utstyr:

- Rundkolbe
- Rotavapor: IKA RV 10 basic VWR

Løsning overføres over i en rundkolbe. Løsningen oppkonsentreres på rotavapor under vakuum med rotasjon. Temperaturen i vannbadet i destillert vann var rundt 40 °C.

3.2.7 Frysetørking

For å bestemme mengde tørrstoff i en løsning og for å oppbevare det tørkede stoffet til senere analyse, brukes frysetørking som metode. Vann i løsningen blir frosset og fjernet ved sublimasjon.

Utstyr:

- Metanolbad: Hetofrig (Heto Birkerød Danmark)
- Frysetørker: ALFA 1-4 Christ®

Prosedyre:

- Rundkolbe tareres
- Løsning blir overført til rundkolbe og frosset ned under rotasjon i metanolbad ved -40 C° .
- Rundkolben med den frosne løsningen blir plassert i eller utenpå frysetørkeren under vakuu i ca.24–48 timer.
- Etter tørkingen blir mengden av stoffet i løsningen veid.
- Tørrstoffet blir oppbevart til senere bruk.

3.2.8 Absorbansmåling

Absorbansmålingen ble utført med spektro Biochrom Libra S32PC.

3.3 Preparering og ekstraksjon av bærmateriale

Den generelle regelen er at liktløser likt, hvor upolare stoffer vil løse seg best i upolare løsemidler og polare stoffer vil løse seg best i polare løsemidler. I tillegg til oppløselighet er det viktig å ta hensyn til viskositet, tetthet og kokepunkt ved valg av løsemiddel for ekstraksjon. For å få tilstrekkelig utbytte er det viktig å ekstrahere samme prøve flere ganger. Gjentatte ekstraksjoner med små løsemiddelvolum gir større utbytte enn ved én gangs ekstraksjon med et større løsemiddelvolum (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

Anthocyaniner har ulike likevektsformer avhengig av pH og syren tilsettes for å sikre at anthocyaniner foreligger på den ønskede flavyliumionformen. Hvilken syre som brukes er avgjørende for resultatet. TFA fungerer fint til ekstraksjon samtidig som den gir mildere betingelser og er dermed en godt egnet syre til arbeid med antocyaner (Andersen 1999; Andersen 1988).

3.3.1 Preparering aroniabær materiale

Det ble benyttet frosne aroniabær til ekstraksjonen. Ekstraksjonsmiddelet var metanol tilsatt 0,5 % TFA. Materialet ble ekstrahert i fire omganger. Ekstraktet ble hele tiden oppbevart mørkt og kjølig for å minimalisere nedbryting av pigmentene.

Materiale

Aronia melanocarpa Moskva ble plukket fra Særheim, Klepp av Rune Slimestad, Plantchem, Norge, august 2010.

Aronia melanocarpa Hugin ble plukket i Botanisk hage på Tøyen 30.august 2011.

Aronia melanocarpa Nero ble plukket 02.09.2011 på en plantasje kalt "Ostbau GbR, Volker Görnitz und Sohn", Adresse: Cliebener Straße 99, 01640 Coswig, Tyskland.

Aronia prunifolia Viking ble plukket 06.09.2011. i privat hage. Adresse:

Parkstrasse 19, 12529 Schönefeld, Tyskland. Tyskland

Aroniabær ble oppbevart i fryseskapet i -20 C^o.

Reagenser og utstyr

- TFA
- metanol
- Morter og pistil
- Trakt og filterpapir
- Magnet og magnetrøret
- Vekt Sartorius TE313S
- Metanol bad
- Frysetørker
- Pærekolbe

Prosedyre

Anthocyaniner fra svartsurbær, ble analysert i 4 typer av aroniabær som er: *Aronia melanocarpa* Moskva, *Aronia melanocarpa* Hugin, *Aronia melanocarpa* Nero og *Aronia prunifolia* Viking.

Kultivarer av ferske aroniabær ble veid. Det var veid opp 5 paralleller med 10 g av hvert bærtype.

Bærne ble fryst og kontrollveid. Daretter ble bær knust i en morter. Knuste bær ble frosset ned ved -40 °C på metanol bad og frysetørket. Vekten av det tørre materialet ble notert.

3.3.2 Ekstraksjon av anthocyaniner fra aroniabær

Prosedure

Hver prøve ble tilsatt 10 ml 0,5 % TFA i metanol. Prøvene ble satt i kjølerommet ved 4 °C i 40 minutter på magnetrøret. Ekstrakten ble filtrert gjennom filterpapir og ble løsningen ble satt i kjøleskap. Rester av bær fra første ekstraksjonen ble tilsatt nye 10 ml 0,5 % TFA i metanol. Ekstraksjon og filtrering ble utført fire ganger til sammen. Ekstraktene fra de fire ekstraksjoner for hver kultivar ble blandet sammen og volumet ble bestemt i målesylinder. Ekstraktene ble oppbevart i kjøleskapet.

3.3.3 HPLC-høytrykksvæskekromatografi

Prinsipp

Væskekromatografi (HPLC - High Performance Liquid Chromatography), baserer seg på at mobilfase som er en væske og prøveløsningen, presses ved hjelp av en pumpe, gjennom en kolonne, pakket med et materiale som retarderer stoffene i prøveløsningen (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004). Den blir utført ved høyt trykk på grunn av kolonnens fysiske egenskaper. En HPLC- kolonne er ofte en 10-25 cm langt kolonne pakket med stasjonærfase. Små, runde og like store partikler er nødvendig for å få god separasjon, men vil medføre et mottrykk på 30-300 bar (Pedersen- Bjergaard og Rasmussen 2004). Pumpa må derfor være i stand til å pumpe mobilfasen med konstant hastighet mot et slikt høyt mottrykk. Når prøveløsningen kommer til kolonnen, blir stoffene separerte. Deretter blir stoffene detektert med en detektor. UV-detektor er det vanligste. (Pedersen- Bjergaard og Rasmussen 2004).

Separasjonsprinsippet kan være normalfasekromatografi eller omvendtfase- kromatografi, med henholdsvis normalfase-silika eller C₂-, C₈- og C₁₈-bundet silika som mulig kolonnemateriale. Vanligst benyttes C₁₈-bundet silika. (www.sigmaaldrich.com).

Avhengig av stoffenes egenskaper, man kan separere og isolere stoffer ved bruk av normalfase eller omvendtfase kromatografi.

Chromolith HPLC RP 18 kolonne har egenskaper som gir opptil 4 ganger lavere mottrykk enn andre kolonnemateriale med 5 µm partikkelstørrelse og samme lengde. Den har også egenskaper som kan gi en dobling i separasjonsmuligheter (Chrombook 2008/2009: www.chromatography.merck.de).

Reagenser

- TFA
- Metanol av HPLC-kvalitet
- Destilert vann
- Acetonitril

Utstyr

- Vekt
- Prøverør
- Pipetter og pipettespisser
- Sprøyte-drevet filter
- Chromolith HPLC RP-18 kolonne med 2 mm diameter partikel størrelse
- HPLC-system La Chrom Elite fra VWR-Hitachi med tilhørende utstyr:

VWR Hitachi La Chrom Elite Organiser, brukes som beholder for trygg oppbevaring av oppløsning og for tilførsel til pumpe som har integrert strømforsyning.

VWR Hitachi Pump L-2130, seriekobling av to pumper som er selvaspirerende og mikroprosessorkontrollert. Pumpen har høy stabilitet av elueringshastighet og innebygd kontroll av påliteligheten. Chromolith koloner kan brukes for høyhastighetskromatografi selv ved normal

trykk. Elueringshastighet kan justeres mellom 0,001 og 10 ml/min; maksimalt trykk 400 bar (5 ml/min), 200 bar (5-10 ml/min).

VWR Hitachi L-2200 Autosampler er autosampler med direkte injisering av testprøveløsningen. Injeksjon volum er fra 0,1 til 90 µl, med standard sprøyte opp till 4,5 ml. Injeksjon av prøveløsningen er synkront med pumpe syklus (PASS system).

VWR Hitachi L-2130 Oven er kolonne termostat med varming og kjøling funksjoner. Temperatur område fra -15 til +65 C^o.

VWR Hitachi L-2455 Diode Array Detector er veldig sensitiv detektor med høy frekvensoppløsning. Bølgelengde område fra 190-900 nm.

VWR Hitachi EZChrom Elite Software Chromatography Data System, som er enkelt i bruk, har instrument kontroll, har mulighet til å behandle data.

EZChrom Elite er moderne programvare som tilfredsstillere analytiske krav både for enkle arbeidsstasjoner og for klient/server systemer. Den er utviklet etter kravene fra farmasøytisk og kjemisk industri og er brukervennlig og intuitiv i bruk. Programvare inkluderer spesielle verktøy for tilfredsstillelse av lovpålagte kravene som f.eks. FDA 21CFR11.(www.VWR .com).

Prosedyre for analytisk HPLC

Kvantifisering av anthocyaniner i aronia ekstraktene

Det ble veid inn 1 mg av 4 anthocyaniner isolert fra *Aronia melanocarpa*.

(Isolert av Rune Slimestad fra Plantchem, Norge).

Disse ble benyttet til å kvantifisere innhold av anthocyaniner i forskjellige bæertyper.

De 4 anthocyaninene som ble brukt var:

- cyanidin-3-galaktosid,
- cyanidin-3-glukosid,
- cyanidin-3-arabinosid,
- cyanidin-3-xylosid.

De ble løst opp i 0,5 % TFA i metanol i konsentrasjon av 0,5 mg/ml.

Det ble blandet 0,5 ml av hver oppløsning av opprensede anthocyaniner for å sette opp gradient.

Metode for HPLC analyse som ble brukt for å separere anthocyaniner:

Mobilfase:

A: Destillert vann med 0,5 % TFA

B: Acetonitril med 0,5 % TFA

Gradient:

0-1 min: 10 % B

1-3 min: 10- 20 % B

3-7 min: 20- 30 % B

7-9 min: 30- 85 % B

9-10 min: 85 % B

10-11 min: 85- 10 % B

11-16 min: 10 % B

UV-deteksjon som ble brukt i analyse av aronia bær ekstrakter var 520 nm. Aronia bær ekstrakter som ble analysert i HPLC apparatur, hadde mobilfasehastighet som var 3 ml/min. Volum av prøveløsningen som ble injisert var 10 µl. Chromolith RP-18 kolonne ble brukt ved HPLC analyse.

For å bestemme retensjonstid for hvert anthocyanin ble det først lagd en oppløsning som inneholder alle fire anthocyaniner i konsentrasjon av 0,5 mg/ml. Fra den blandingen ble 1 ml filtrert over i et prøverør for HPLC analyse for å tilse at mobilfasegradienten var i stand til å separere anthocyaninene og at retensjonstiden kunne bestemmes for hvert enkelt anthocyanin. Deretter ble hvert enkelt anthocyanin, oppløsning med 0,5 % TFA i metanol, filtrert med Chrompack filter ned i prøverørene for HPLC analyse. Dette ble gjort for å finne

retensjonstiden for hver enkelt anthocyanin. I tillegg ble cyanidinklorid analysert med samme betingelser.

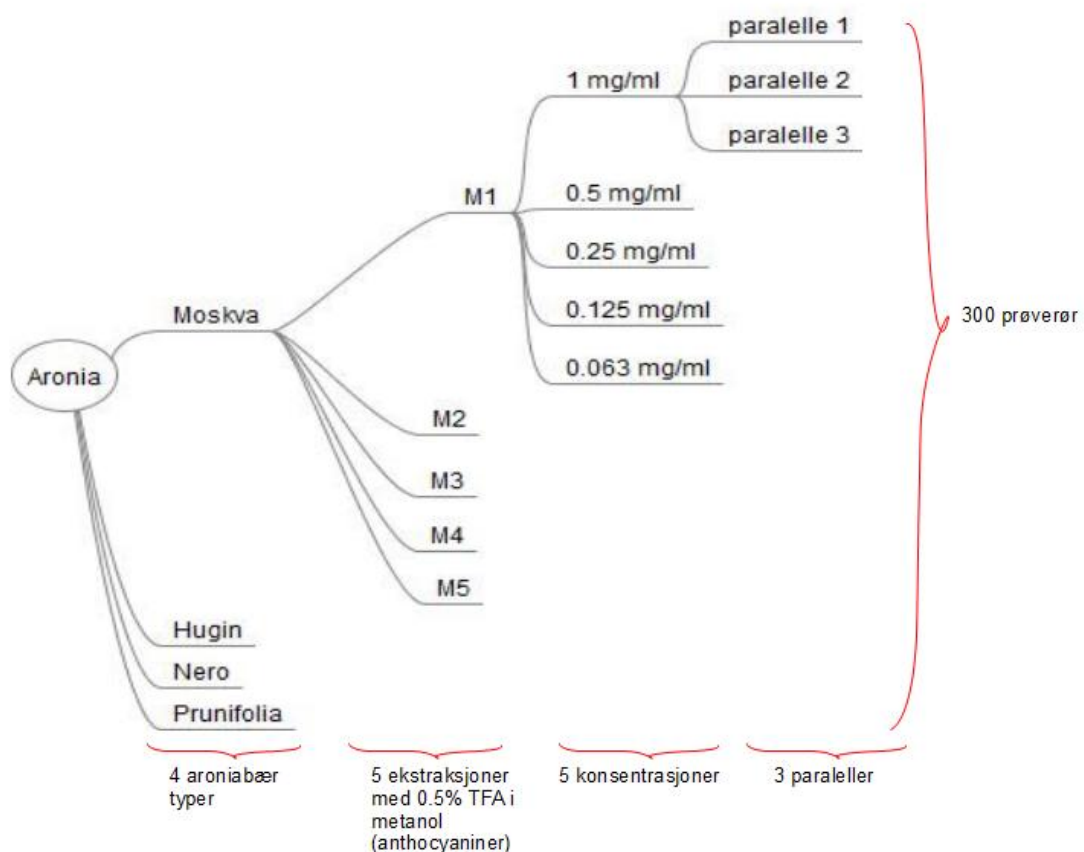
Cyanidin-3-galaktosid ble valgt som substans for å beregne standardkurven siden aronia bærene er rikest på cyanidin-3-galaktosid.

Cyanidin-3-galaktosid ble oppløst i 0,5 % TFA i metanol og ble analysert i HPLC apparatur for å få standard kurven. Det ble lagd 5 konsentrasjoner: 1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,063 mg/ml. Det ble lagd 2 paralleller av hver konsentrasjon av cyanidin-3-galaktosid.

Standard kurve ble beregnet fra formelen:

$$y=3E+0,7X+892934$$

Ekstrakter fra 4 typer av aroniabær som var ekstrahert med 0,5 % TFA i metanol og som inneholder anthocyaniner, ble analysert med HPLC. Hver av de 4 typene av aroniabærekstrakter ble utført i fem paralleller. For hver parallell, ble de lagd 5 konsentrasjoner: 1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,063 mg/ml. For hver av konsentrasjonene ble det igjen laget 3 paralleller. Hver parallell ble filtret med sprøyte filter i et prøverør og analysert med HPLC.



Figur 3-1. Til sammen ble det analysert 300 prøverør med forskjellige konsentrasjoner av aroniabær

3.3.4 Ekstraksjon med 80 % etanol

500 g frosne bær fra *Aronia melanocarpa* Moskva, *Aronia melanocarpa* Hugin, *Aronia melanocarpa* Nero og *Aronia prunifolia* Viking ble veid i rundkolber som var 2 l i volum. Det ble tilsatt 1,5 l av 80 % etanol i hver rundkolbe.

Rundkolber ble satt i mantel og ble tilkoblet med tilbakkeløpskjøler. Aroniabær ble satt til koking i 80 % etanol i 2 timer. Oppløsningen kjøles ned og filtreres. Ekstraksjon og filtrering gjentas tre ganger til sammen. Første, andre og tredje ekstraksjon av hver type av aroniabær ble slått sammen.

Ekstraktene fra hver aroniabær type ble inndampet på rotavapor til all etanolen var fordampet. Rest i ekstraktene ble fryst -40 °C og frysetørker i 48 timer. Vekt av fordampete materiale ble notert.

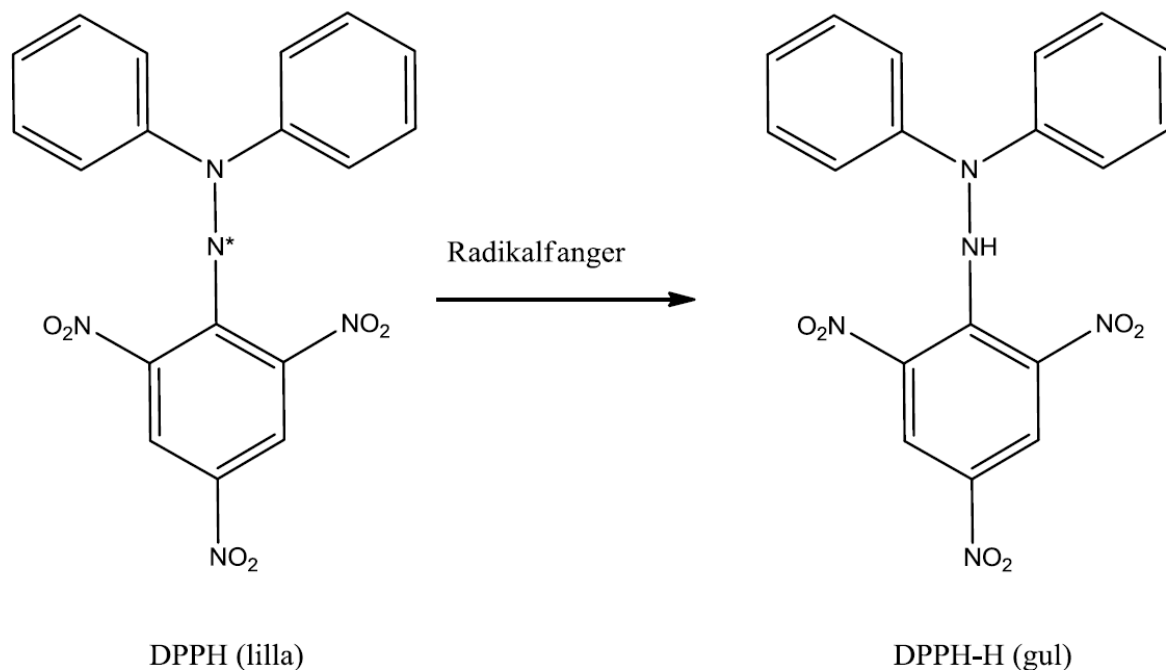
Frysetørkede materialet fra de fire kultivarer av aronia bær er utgangsmaterialet ved bestemmelse av total fenol, total proanthocyanidin, hemming av lipoksygenase og xantinoksidase, DPPH scavenging til bestemmelse av antioksidant effekt, hemming av α -glucosidase og bestemmelse av komplement modulering.

3.4 Metoder for måling av biologisk aktivitet

3.4.1 DPPH-scavenging

Prinsipp

DPPH-scavenging er en metode som brukes til bestemmelse av antioksidanteffekten til en forbindelse. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) er et stabilt fritt radikal som på grunn av dets uparede elektron har sterk absorpsjon ved 517 nm. I løsningsmiddel har radikalet en mørk fiolett farge. Ved reaksjon med en radikalscavenger vil det uparede elektronet i DPPH bli parett. Det omdannes DPPH til DPPH-H. Dette gjør at absorpsjonen reduseres. Dette kan også detekteres visuelt ved at fargen skifter fra fiolett til gult (Malterud et al. 1993).



Figur 3-2. Omdannelse av DPPH til DPPH-H ved hjelp av en radikalfanger

Dette prinsippet kan utnyttes til å måle scavenger aktivitet til en substans. Absorbansen måles ved 517 nm før og etter tilsetting av prøven til DPPH. Ved radikalscavengereffekt vil vi se en nedgang i absorbans. Nedgangen i absorbans er relatert til mengde og aktivitet av radikalscavenger. Hvor mange prosent radikalscavenging testsubstans gir, kan beregnes ved hjelp av formelen:

$$100 \times (A_0 - A_t) / (A_0 - A_p)$$

hvor:

A_0 = startabsorbans (korrigert for egenabsorbans av testsubstans og fortynning),

A_t = sluttabsorbans etter reaksjon med testabsorbansen

A_p = Egenabsorbans av sluttproduktet DPPH-H. A_p ofte settes til 0 (Malterud 2008).

Reagenser

- Metanol
- DPPH
- DMSO
- Quercetin

Utstyr

- UV-spektrofotometer
- Kyvetter
- Plastspatel
- Beger
- Pipetter og pipettespisser

- Plastspalter
- Magnet og Magnetrører

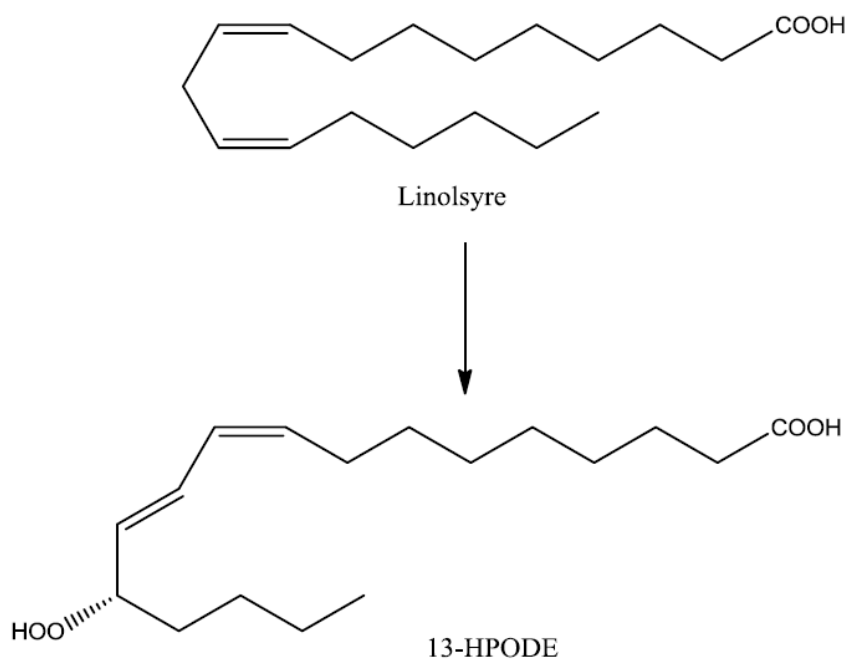
Prosedyre

1. DPPH løses i metanol (ca. 0,04 mg/ml) og blandes ved hjelp av magnet og magnetrører. Løsningen skal gi en konsentrasjon som gir en absorbans på ca. 1 ved 517 nm.
2. Prøver som skal testes løses i dimetylsulfoksid (DMSO) i ønsket konsentrasjon. Konsentrasjoner på prøveløsningene var 5 mg/ml; 2,5 mg/ml; 1,25 mg/ml; 0,625 mg/ml. Vi brukte quercetin som løses i DMSO og brukes som positiv kontroll. Fortynningsrekke lages av startkonsentrasjonene.
3. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve bestående av ca. 3 ml metanol.
4. Startabsorbans måles i 2,95 ml DPPH-løsning før tilsetning av prøve ved 517 nm. Dette gjøres i 3 paralleller.
5. 50 µl av prøveløsningen tilsettes i hver parallell, og omrøres med plastspatel.
6. Registrering av absorbans startes 30 sekunder etter tilsetning av prøve, og absorbansen måles hvert 60. sekund i totalt 5 minutter.

3.4.2 15-Lipoksygenasehemming

Prinsipp

Lipoksygenaser er enzymer i arakidonsyremetabolismen som katalyserer peroksidering av flerumettede fettsyrer på en selektiv måte (Malterud 1998).



Figur 3-3. Peroksidering av linolsyre til 13-HPODE (Funk og Cyrus 2001)

Hemming av 15-lipoksygenase er av stor interesse, ettersom enzymet inngår i oksidering av LDL (low density lipoprotein).

Denne prosessen antas å være et viktig trinn i forbindelse med utvikling av aterosklerose (Lyckander og Malterud 1996).

Metoden er basert på den 15-lipoksygenase (15-LO) katalyserte reaksjonen mellom oksygen og en flerumettet fettsyre med 1,4-dien-type struktur med dobbeltbinding i posisjon 6 fra metylenden. Både arakidonsyre og linolsyre har en 1,4-dienstruktur, og er dermed egnet som substrat. Linolsyre brukes i stedet for arakidonsyre, da den er billigere og mer stabil. Fordi hemmingsverdier med disse to substratene ser ut til å være sammenlignbare, er linolsyre en god modellsubstans ved testing av stoffers hemmingseffekt på 15-LO peroksidering av arakidonsyre (Malterud 1998). Målingen av enzymaktivitet er basert på dannelsen av konjugerte dobbeltbindinger i lipoksygeneringsreaksjonen, noe som fører til økt absorbans ved 234 nm (Malterud 1993). Denne økningen brukes for å bestemme mengde av produktet som dannes. Dette kan følges spektroskopisk ved å måle A_{234} . Det vil derfor være mulig å måle hemming av 15-LO ved å måle hvor mye absorbansøkningen reduseres i forhold til en blankprøve ved tilsetning av prøveløsning.

Peroksidering av linolsyre ved 15-LO

Prosent enzymhemming kan beregnes etter følgende formel:

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

der

A₁ og A₂ er absorbansøkning per tidsenhet med og uten testsubstans tilsatt (Malterud 2008).

Reagenser

A: Boratbuffer: 0,2 M, pH = 9,00, lagd av borsyre og natriumhydroksid.

B: Substratløsning: 50 µl linolsyre og 150 µl etanol blandes, og A tilsettes til 50 ml.

B1: Bruksferdig substratløsning bestående av 15 ml B og 225 ml A lages rett før bruk.

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

D: DMSO

Utstyr

UV-spektrofotometer

kvartskyvetter

plastspatel

Prosedyre

1. Prøver som skal testes løses i DMSO i ønsket konsentrasjon: 5 mg/ml; 2,5mg/ml;

1,25 mg/ml; 0,625mg/ml.

2. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve bestående av 0,95 ml A; 2,00 ml B1 og 0,05 ml DMSO. Løsningen blandes godt med plastspatel. Kyvetten blir stående i blindprøveholderen under hele forsøket.
3. Blankprøver bestående av 0,90 ml A; 2,00 ml B1 og 0,05 ml DMSO (3 paralleller) omrøres godt med plastspatel. 0,05 ml C tilsettes med påfølgende omrøring. Absorbansøkning måles i perioden 30-90 sekunder etter tilsetting av C ved 234 nm.
4. Testløsning bestående av 0,90 ml A; 2,00 ml B1 og 0,05 ml prøveløsning (3 paralleller) omrøres godt med plastspatel. 0,05 ml C tilsettes med påfølgende omrøring. Absorbansøkning måles i perioden 30-90 sekunder etter tilsetting av C ved 234 nm.
5. Punkt 3 gjentas etter hver tredje måleserie med testløsninger. Dette gjøres for å sikre at enzymaktiviteten holder seg stabil under forsøket.

3.4.3 Xantin oksidasehemming

Prinsipp

Xantin oksidase (XO) er et enzym som oksiderer hypoxantin til xantin og videre til urinsyre. Økt konsentrasjon av urinsyre i blodet kan forårsake hyperurikemi som kan forårsake gikt (Noro et al. 1983) og nyrestein (Akowuah et al. 2006). I løpet av denne oksiderings prosesen, dannes også superoksid radikaler. Superoksid radikaler kan omdanes til andre oksygen species (ROS), for eksempel OH⁻, som er i stand til å initiere lipid peroksidering ved å fjerne allyliske protoner fra flermettede fettsyrer. Denne prosessen fører til lipid peroksidering produkter, som kan videre føre til cellulære skader. (Akowuah et al. 2006). Noen studier antyder at XO kan føre til forselige tilstander som hepatitt, inflammasjon og kronisk hjertesvikt. (Akowuah et al. 2006).

Derfor kan hemming av XO-aktivitet være betydningsfull i hindring av mekanismer av oksidativt stress som er relatert til degenerative sykdommer, samt at det kan være fordelaktig i terapeutisk behandling av gikt og andre inflammasjonssykdommer. Det finnes i dag et legemiddel, allopurinol, som er en hemmer av urinsyreproduksjonen gjennom hemming av XO. Allopurinol brukes klinisk mot urinsyregikt, men på grunn av uønskede bivirkninger og

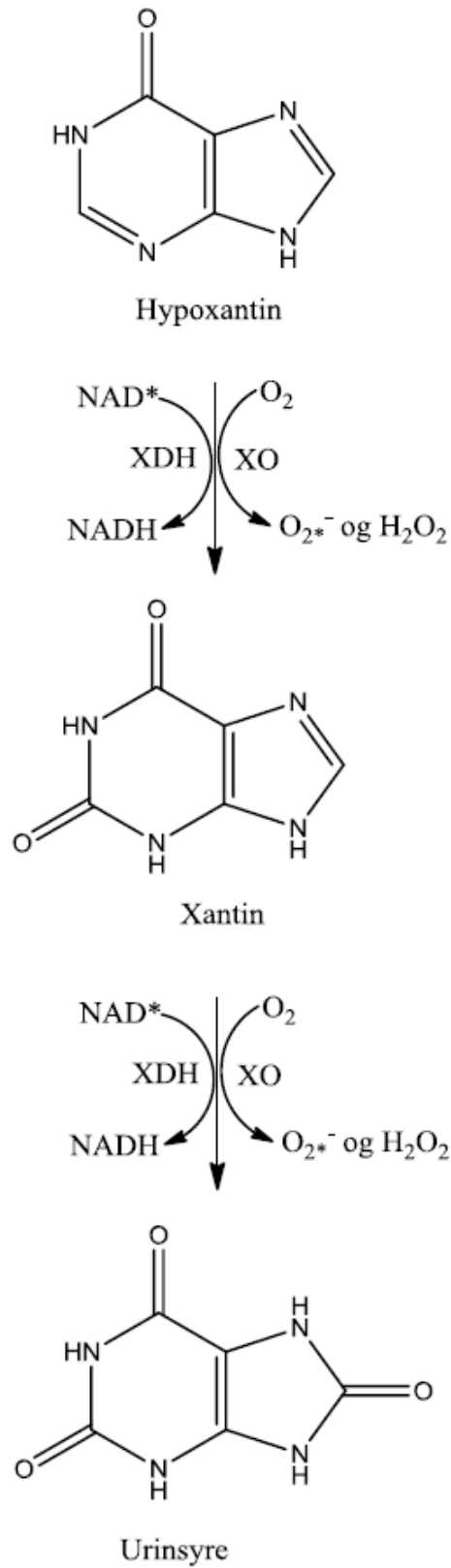
allergiske reaksjoner er det ønskelig med alternativer med økt terapeutisk effekt og mindre bivirkninger (Pacher et al. 2006).

Hemming av XO kan beregnes etter formelen:

$$\%XO \text{ hemming} = 100 \times (A2-A1)/A2$$

A1 er absorbansøkning per tidsenhet med testsubstans tilsatt

A2 er absorbansøkning per tidsenhet uten testsubstans tilsatt (Malterud 1998).



Figur 3-4. Degradering av hypoxantin og xantin til urinsyre (Patcher et al. 2006)

Reagenser og utstyr

A: Natriumkaliumfosfatbuffer, 0,05 M, pH 7,5. Laget av kaliumdihydrogenfosfat (KH_2PO_4) og natriumhydrogenfosfat (Na_2HPO_4).

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

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

DMSO

Quercetin

Test substans

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Pipetter og pipettespisser

Plastpatler

Prosedyre

1. Prøver som skal testes løses i DMSO til 5 mg/ml; 2,5mg/ml; 1,25 mg/ml; 0,625mg/ml. Fortynningsrekke lages av startkonsentrasjonene.
2. Quercetin løses i DMSO til passende konsentrasjon og brukes som positiv kontroll.
3. Spektrofotometeret nullstilles med en blindprøve bestående av 1,85 ml A, 0,05 ml DMSO, 1,0 ml destillert vann og 0,1 ml C. Løsningen blandes godt med plastspatel og kyvetten blir stående i blindprøveholderen under hele forsøket.

4. Blankprøver bestående av 1,85 ml A, 0,1 ml C og 0,05 ml DMSO (3 paralleller) settes i prøveholderne og omrøres godt med plastspatel. 1,0 ml B tilsettes med påfølgende omrøring. Absorbansøkning måles 30 sekunder etter tilsetning av B og deretter hvert 30. sekund i 5 minutter ved 290 nm.

5. Prøveløsning bestående av 1,85 ml A, 0,01 ml C og 0,05 ml prøveløsning (3 paralleller) settes i prøveholderne og omrøres godt med plastspatel. 1,0 ml B tilsettes med påfølgende omrøring. Absorbansøkning måles 30 sekunder etter tilsetning av B og deretter hvert 30. sekund i 5 minutter ved 290 nm.

6. Punkt 4 gjentas etter hver tredje måleserie med testløsninger.

3.4.4 Total fenolinnhold, Folin Ciocalteu metode

The Folin–Ciocalteu reagent (FCR) eller Folin's phenol reagent eller Folin–Denis reagent, også kjent som Gallic Acid Equivalence method (GAE), er mikstur av phosphomolybdate og phosphotungstate brukt for kolorimetrisk assay av fenol og polyphenolic antioxidants (Singleton et al 1999).

Reaksjonen er basert på reduksjon av fosfomolybdat / fosfotungstic av fenolske OH-grupper og det dannes et blått kompleks som kan måles spektrofotometrisk v/ 765 nm.

Standard/Prøveløsning	40mcl	Blandes i reagensglass
Dest.vann	3 160 mcl	Med minishaker
Folin-Ciocalteu løsning	200 mcl	Tilsettes testløsning, blandes, la stå 5 minutter
20 % Natriumkarbonat løsning (20 g Na ₂ CO ₃ anhydrid løses i 100 ml destillert vann)	600 mcl	Tilsettes testløsning, blandes, la stå 2 timer i romtemperatur UV abs. v/ 765 nm måles

Tabell 2. Prosedyre for måling av total fenolinnhold

Prøveløsning: Bær ekstrakt 5 og 10 mg/ml (slutt konsentrasjon 0,05 og 0,1 mg/ml)

Standardløsning: Gallesyre 0-5 mg/ml (slutt konsentrasjon 0-0,05 mg/ml)

Løsningsmiddel: Vann/MeOH/DMSO

Referanse: Singleton V.L. and Rossi ,J.A.Am J Enol Vitic. 16, 144(1965).

Reagenser

Folin-Ciocalteu løsning,

Natriumkarbonat

Metanol

Destilert vann

Gallesyre

Utstyr

UV-spektrofotometer,

Kyvetter,

Plastspatel,

Magnet og magnetrører,

Minishaker,

Reagensrør

Prosedyre

1. Av hver frysetørkede type av ekstrakt av aroniabær, ble det lagt oppløsning med metanol i konsentrasjon av 5 mg/ml og 10 mg/ml og analysert i tre paralleller.

2. Det ble lagd 20 % oppløsning av natriumkarbonat i en erlenmayerkolbe. Det ble oppløst 20 g av anhydrert natriumkarbonat i 100 g destillert vann og lot det blandes på magnetrøret med magnet.

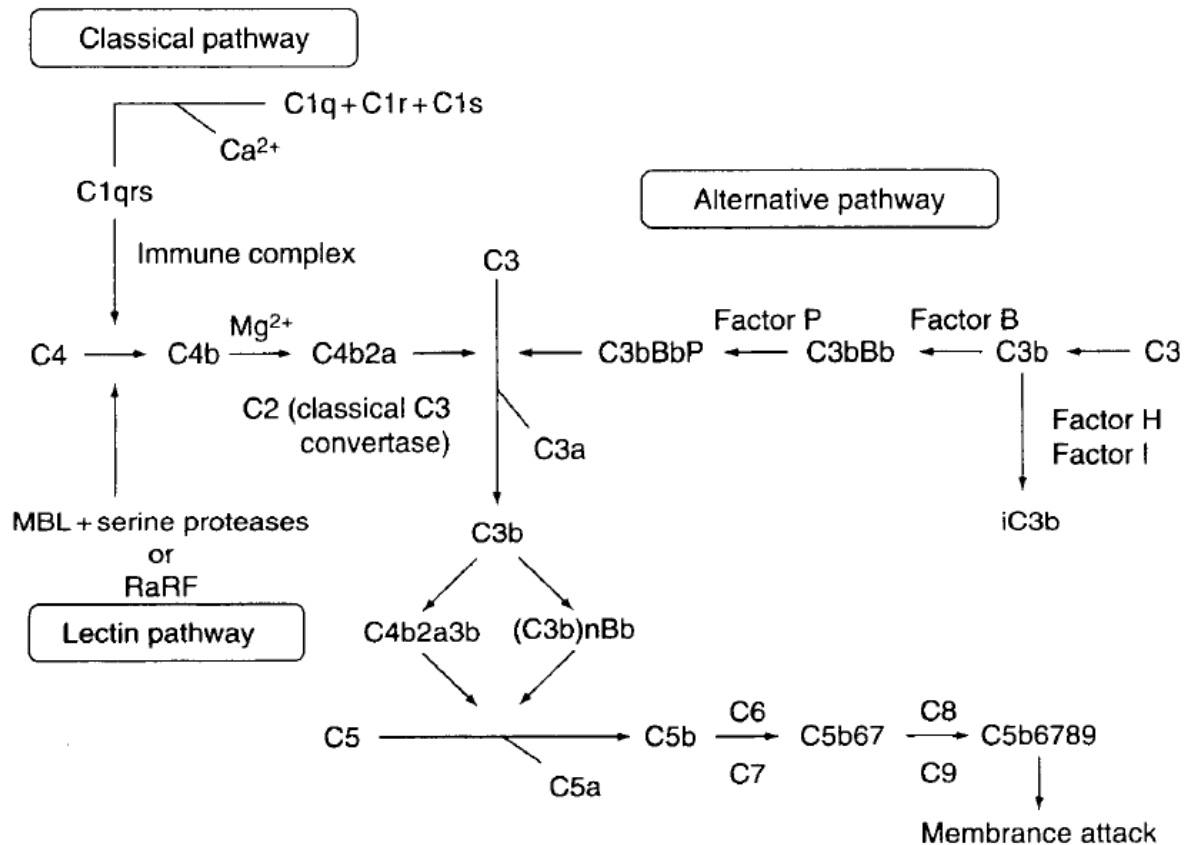
3. 3160 µl destillert vann og 40 µl prøveløsning ble blandet sammen med minishaker.
4. Det ble tilsatt 200 µl Folin-Ciocalteu reagens, blandet igjen med minishaker og lot det ligge i 5 minutter.
5. Etterpå ble det tilsatt jeg 600 µl forhånds lagt 20 % natriumkarbonat og lott det stå i 2 timer i rom temperatur.
6. Samme prosedyre ble gjentatt med gallesyre som standard oppløsning istedenfor prøveløsningen, ble lagd i konsentrasjoner av 5mg/ml; 2,5mg/ml; 1,25mg/ml; 0,63mg/ml; 0,32mg/ml, og en blind prøve med metanol.
7. UV-Spektrofotometar ble justert til null med blind prøve som består av ca.2 ml metanol i kyvette.
8. Registrering av absorbans startes 30 sekunder etter tilsetting av hvert prøve, og absorbansen måles ved 765 nm.

3.4.5 Immunomodulerende aktivitet

Det har blitt rapportert noen polysakarider fra planter er involvert i modulering av immun system og kan påvirke komplementsystemet, proliferasjon av lymfocytter, antistoff produksjon og immunitet fra tynn tarm. (Yamada 1999)

Komplement er betegnelsen på en samling proteinmolekyler som man blant annet finner i blodplasma. Proteinmolekyler som sirkulerer i kroppen er innaktive prekursorer og er kalt pro-enzym. Når disse prekursorer er stimulert fra en eller flere triggers, proteaser i systemet binder spesialiserte proteiner for å utløse cytokiner og starte en kaskade reaksjon, hvor de forskjellige plasmaproteinene virker både sammen og på hverandre. Totalt sett inngår det mer enn 25 ulike proteiner i komplementkaskaden.(wikipedia)

Komplement er en viktig del av vårt medfødte immunforsvar. Komplement proteiner kan bli aktivert på tre ulike måter, det er klassisk vei, alternativ vei og lektin aktiveringsvei. Se figur 3-5: Aktiveringstrinn av komplementsystemet (Law og Reid 1995; Thiel et al. 1997; Turner 1996).



Figur 3-5. Aktiveringstrinn av komplementsystemet

Etter aktivering kan noen av proteinene som inngår i komplementsystemet få enzymaktivitet (Lea 2000).

Klassisk aktiveringsvei krever en interaksjon mellom immunkomplekser (IgM og IgG) og komplement komponent C1. Alternativ vei er direkte aktivert fra komplement komponent C3 som blir aktivert av fra mikroorganismer eller fra aktivatorer som lipopolysaccharide (LPS) fra et anti-stoff uavhengig mekanisme. (Turner 1996). Leatinaktiveringsveien er aktivert fra komplement komponent C4 ved at mannosebindende lektin i blodplasma bindes til manoseinnholdende peptidoglykaner på overflaten av mikroorganismen (Parham 2009).

Det er vanligvis den alternative- og lektinaktiveringsveien som opptrer tidligst i immunresponsen (Thiel et al. 1997; Turner 1996). Klassisk aktiveringsvei krever, at det på forhånd er dannet antistoffer mot den aktuelle mikroorganismen, dette er en prosess som tar noe tid (Lea 2000).

Prinsipp

Komplement aktivatorer fører til minskning av hemolyse på grunnen av reduksjon av komplement titer ved aktivering av komplementsystemet. Komplement inhibitorer fører til inhibisjon av hemolyse på grunnen av inhibering av ett visst trinn i komplementaktiveringskaskade ved koeksistering av inhibitorer i assay system. Derfor antikomplementerende aktivitet ved hemolyse inkluderer aktivasjon og inhibisjon av komplementet (Yamada og Kiyohara 1999).

Polysakkarider kan interferere med komplementsystemet som er en viktig del av det medfødte immunsystemet. Komplementfikseringstesten kan brukes for å undersøke om polysakkarider har immunologisk aktivitet. Ved denne testen benytter man røde blodceller fra sau, som blir sensibilisert og dekket med antistoff fra kanin. Komplement som er intakt vil føre til en hemolyse av blodcellene. Ved utførelsen av testen får polysakkaridene i prøven tid til å reagere med komplement, før blodcellene tilsettes. Det som måles er reduksjon av hemolyse av de sensitiviserte blodcellene, som en følge av at testsubstansen enten aktiverer eller hemmer komplement. Testen sier ingenting om komplementsystemet er inhibert eller aktivert, fordi begge vil resultere i redusert lyse. Ved en aktivering forbrukes komplement, mens en inhibering hemmer komplement, i begge tilfeller fører det til at hemolysen av blodcellene avtar.

Reagenser

- Fosfatbuffer
- Destilert vann
- Saueblod: hvit; sau 7001 tapedato 10. 01. 2012.
- Veronal / BSA-buffer: Veronalbuffer (CFT pH 7,2) med mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin 30%) og 0,02 % natriumazid
- Antistoff: Virion 9020 Amboceptor, fortynnet 1:10 i veronalbuffer
- Komplement: Serum fra ECG (humant)
- Standard: BP II (*Biophytum Petersianum*)

Utstyr

- Finnpipetter med spisser
- Reagensrør
- Blank tape
- Sentrifuge: Martin Christ Typ 901
- Thermo Scientific, Heraeus Multifuge 3SR+ Centrifuge
- Mikrotiterplate med 96 broner, rund eller flat bunn
- Varmeskap (37 C) med ristepate; varmeskap: Memmart, ristepate: Flow Laboratories
Titertek
- Mikroplateleser, Heidolph REAX 2000

Prosedure

A) Vasking av sau blod før sensibilisering

1. En mengde blod tas ut (ca 700 mikroliter) til 4 plater.
2. Blodcellene vaskes 2 ganger med fosfatbuffer og 1 gang med veronal/BSA buffer. Det sentrifugeres mellom hver vask og vaskevannet fjernes.

B) Sensibilisering av sau blodceller

1. 15 mikroliter Virion 9020 Amboceptor, 60 mikroliter pakkede blodceller og 5,925 ml veronal/BSA buffer innkuberes med rister ved 37 C i 30 minutter.
2. Løsninger vaskes 2 ganger med fosfatbuffer og 1 gang med veronal/BSA buffer, det sentrifugeres mellom hver vask

3. Vaskevannet fjernes og blodet fortynnes med 5,940 ml veronal/BSA buffer, dermed er en 1 % løsning av blodceller blitt laget.

C) Fortynning av prøvene

1. 1 mg prøvemateriale ble løst i veronal/BSA (1 ml) til en stamløsning med en utgangskonsentrasjon på 1 mg/ml. Det samme ble gjort med standarden, BP II.

2. En 2-folds fortynningsrekke lages

Rør	Konsentrasjon(μ l/ml)	
Rør 1	500	300 μ l veronal/BSA buffer +300 μ l stamløsning
Rør 2	250	300 μ l veronal/BSA buffer +300 μ l fra rør 1
Rør 3	125	300 μ l veronal/BSA buffer +300 μ l fra rør 2
Rør 4	62,5	300 μ l veronal/BSA buffer+ 300 μ l fra rør 3
Rør 5	31,25	300 μ l veronal/BSA buffer + 300 μ l fra rør 4
Rør 6	15,625	300 μ l veronal/BSA buffer +300 μ l fra rør 5

Tabell 3. Fortynningsrekke for prøvene og BP II- standarden

D) Titreringskurve for komplementkilden

1. 6 brønner på mikrotiter platen ble fylt med 100 mikroliter destillert vann og 24 brønner med 50 mikroliter veronal/BSA buffer (4 brønner per fortynning av komplement/buffer).

2. Fortynningsrekken av komplement og buffer lages etter tabell 3.

Komplement:buffer	Komplement(mikroliter)	Veronal/BSA buffer (mikroliter)
1:40	10	390
1:50	10	490
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890
1:100	10	990
1:110	10	1090

Tabell 4. Titreringskurve for koplement

3. 50 mikroliter komplement/buffer tilsettes brønnene med veronal/BSA buffer
4. Platen dekkes med tape og settes på risting i 30 minutter ved 37 °C.
5. 50 mikroliter 1 % SRBC tilsettes hver brønn og innkuberes ved risting i 30 minutter ved 37°C.
6. Platen sentrifugeres i 5 minutter ved 1000 rpm.
7. 100 mikroliter fra hver brønn overføres til et flatbunnet mikrotiter plate, og sentrifugeres for å bli kvitt luft som kan dannes ved overføring.

Absorbansen avleses ved 405 nm på en mikroplaterister.

9. Den fortyningen som ga 50 % lyse SRBC ble brukt videre i utførelsen av komplementfikseringstesten.

E) Utføring av testen

1. 50 mikroliter av hver fortyning av prøven (2 paralleller av hver fortyning) tilsettes en brønn i en mikrotiter plate med runde bunner (96 brønner)
2. 4 brønner tilsettes 100 mikroliter destillert vann (100 % lysekontroll) og 4 brønner tilsettes 50 mikroliter veronal/ BSA buffer (kontroll)
3. 50 mikroliter komplement tilsettes hver brønn, bortsett fra 100 % lysekontrollbrønnene
4. Platen dekkes med blank tape slik at ikke noe kan fordampe og settes på risting i 30 minutter ved 37 °C
5. 50 mikroliter 1 % sensibiliserte sau blodceller tilsettes hver brønn og innkuberes ved risting i 30 minutter i 37 °C.
6. Platen sentrifugeres i 5 minutter ved 1000 rpm.
7. 100 mikroliter fra hver brønn overføres til en flatbunnet mikrotiterplate.
8. Platen sentrifugeres en gang til for å bli kvitt luft som kan dannes ved overføringen.
9. Absorbansen avleses ved 405 nm.

F) Lyseringsgrad

Lyseringsgraden som forteller hvor mye komplement i seg selv ødelegger systemet ble beregnet ut fra følgende formel:

$$\text{LYSERINGSGRAD} = (\text{Abs}_{\text{kontroll}} / \text{Abs}_{\text{dest vann}}) \times 100 \%$$

(Det er anbefalt at lyseringsgraden skal ligge på ca. 50 %)

Komplementfikserende effekt

Komplementfikserende effekt ble beregnet for å bestemme prøvens effekt på komplementsystemet. Høy grad av komplementfiksering vil gi redusert hemolyse og lavere absorpsjon.

$$\text{KOMPLEMENTFIKSERENDE EFFEKT} = ((\text{Abs}_{\text{kontroll}} / \text{Abs}_{\text{prøve}}) / \text{Abs}_{\text{kontroll}}) \times 100 \%$$

3.4.6 Inhibitorisk effekt av α -glucosidase

Det er stor interesse for hemmere av glucosidase verden øker på grunn av at den har implikasjon i styring av diabetes mellitus (DM), som påvirker mellom 4-5 % av verdens befolkning (Yao et al. 2008). Diabetes mellitus er en metabolsk sykdom, som er karakterisert med kronisk hyperglykemia med forstyrrelser av karbohydrater, fett og protein metabolisme som er resultat av defekter i enten insulin sekresjon, virkning av insulin eller begge.

Årsaken til type 2 diabetes er enten predominant insulinresistens med relativ insulinmangel eller predominant insulinsekresjon defekt med eller uten insulinresistens (WHO, 1999). Dette resulterer med forhøyet nivå av glucose i blodet som kan forårsake retinopati, nephropathy, neuropathy and angiopathy (Sharma 1993).

α -Amylase og α -glucosidase er enzymer som er involvert i metabolisme av karbohydrater. α -amylase degraderer karbohydrater fra maten til oligo-sakkarider og disakkarider, som videre fram nedbrytes med α -glycosidase. α -Glucosidase, øker postprandial hyperglycemia, som er høy sukkerinnhold i blod etter måltid. Inhibering av α -glucosidase fra tarmene, senker opptak av glucose samt reduserer postprandial hyperglycemia (Puls 1977).

α -glucosidase er membrane-bound enzym lokalisert i epitel av tynn tarm og er klasifisert i 2 grupper: familie GH 13 og familie GH 31 (Kimura et al. 2004; Henrissat og Bairoch 1993). Human α -glucosidase er i familie GH 31 (Frandsen og Svensson 1998).

Det er påvist at pasienter med diabetes mellitus produserer mer frie radikaler enn andre pasienter og er under oksidativt stress, som kan forårsake komplikasjoner assosiert med diabetes (Maritim et al. 2003; Jin et al. 2008).

Forskning har vist at enkelte polyfenoler fra planter er effektive inhibitorer av α -glucosidase aktivitet (Matsui et al. 2001). Mest effektive hemmende agenter mot α -glucosidase er påvist å være diacetyleret anthocyaniner (Matsui et al. 2001-1) som kan indusere anti-glycemisk effekt i rotter (Matsui et al. 2001).

α -glucosidase hemming ble beregnet fra formula:

$$\% \text{ hemming} = (\text{Ablank} - \text{Asample}) / \text{Ablank} \times 100\%$$

Reagenser og utstyr

- TRIS
- PGP
- α -glucosidase fra *Saccharomyces Cerevisiae*; 750 U; 15,8 mg solid
- buffer
- metanol
- destilert vann
- vekt
- magnet og magnetrøret
- erlenmayer
- is
- NaCl

- NaOH
- NaH₂PO₄
- nitrogen gas
- varmskap
- kyvetter
- Plastspatel,
- pipette og pipettespisser
- pH-meter
- UV-spektrofotometer

Prosedure

1. Både tørket 80 % etanolekstrakt og anthocyanin ekstrakt i syr metanol ble veid og fordampet med nitrogen gas.
2. Metanol ble tilsatt til hver type av fordampet aroniabær ekstrakt, for å få 5 mg/ml konsentrasjoner og deretter fortynnet den til 1,25 mg/ml; 0,3125 mg/ml; 0,028 mg/ml i 3 paralleller av hver
3. 1 L av Buffer av 50 mM NaH₂PO₄ ble lagd
4. 12 g TRIS ble oppløst i 200 ml destillert vann og satt på magnetrøret
5. 42 mg avPGP ble oppløst i 200 ml av 50 mM NaH₂PO₄ buffer
6. 1,4 mg av enzym α -glucosidase ble oppløst i 30 ml av 50 mM NaH₂PO₄ buffer og satt på is
7. Blindprøve med 20 μ l og enzymløsning ble lagd og inkubert 5 minutter i 37 °C i varmskap
8. Reaksjonen ble startet med 1,9 ml av substrat oppløsning (0,7 mM PNP-G i buffer) og ble lagt og innkubert 15 minutter i 37 C i varmskap.

9. Reaksjonen ble stoppet med tilsetning 2,0 ml av 0,5 mM TRIS oppløsning.

10. Absorbansen ble målt i 400 nm.

11. Punkter 7-10 ble gjentatt med ekstrakter med anthocyaniner (blindprøver ble erstattet med ekstraktene av anthocyaniner fra fire forskjellige typer av aroniabær) i tre paralleller

12. Punkter 7-10 ble gjentatt med frysetørkede ekstrakter med 80 % etanol som ble løst opp i etanol og nødvendige konsentrasjoner ble lagd i tre paralleller.

3.4.7 Total proanthocyanidininnhold (Porter assay)

Proanthocyanidiner er kondenserte tanniner som er polyhydroxyflavan oligomerer eller polymerer . Mengde proanthocyanidiner ble opprinnelig bestemt ved spalting til anthocyanidiner i kokende n-butanol-2M saltsyre (95:5 v/v) (Swain og Hillis 1959). Anthocyanidiner er kvantifisert spektroskopisk.

En forbedret kolorimetrisk test, kalles Porter Assay eller butanol-HCl-jern metode (Porter et al. 1986). Porter assay er en test som kan bestemme proanthocyanidiner kvantitativt. Proanthocyanidiner spaltes oksidativt fra oligomere til monomere anthocyanidiner. Dette fører til endring av farge, som kan måles med UV-spektrofotometer. Absorbansmaksimum blir funnet og absorbans bestemt.

Reagenser og utstyr

HCl

$\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$

Butanol

Prøverør med lokk

Glassbeger

Termometer

Kokeplate

Pipetter og pipettespisser

Kyvetter

UV-Spektrofotometer

Prosedyre:

Det har blitt gjort to forsøk for å analysere total proantocyanidin innhold. Begge disse baserer seg på oksidativ spalting til anthocyanidiner og spektrofotometrisk bestemmelse, men de avviker noe i opparbeidelse. Metode 1 er basert på (Arrantz et al 2009), metode 2 er basert på et analyseforslag fra Rune Slimestad fra Plantchem.

Metode 1:

1. Ca 0,5 g, nøyaktig utveid, frysetørkede og knuste aroniabær ble tilsatt 20 ml metanol/vann (1:1, justert til pH 2 med 2M HCl).
2. Etter 1 times rysting i rystemaskin ble løsningen sentrifugert ved 3500 rpm i 10 minutter. Supernatanten ble dekantert fra 20 ml aceton/vann (70:30) tilsatt resten av plantematerialet. Løsningen ble rystet og sentrifugert. De kombinerte ekstraktene og planterestene ble satt i kjøleskap.
3. Neste dag ble planterestene behandlet med 10 ml butanol-2M HCl (97.5:2.5) og 0,7 g FeCl₃ og oppvarmet til 100 °C i 60 minutter i et lukket prøveglass.
4. Etter avkjøling og sentrifugering ved 2500 rpm i 10 minutter ble væskefasen dekantert fra og planterestene vasket med 2x5 ml butanol.
5. Supernatanten fra ekstraksjon med metanol/vann og aceton/vann ble tilsatt 6 ml butanol-saltsyreagens og 0,2 ml jernreagens og oppvarmet til 100 °C i 40 minutter i et lukket prøveglass.
6. De samlede væskefaser fra supernatant og ekstrakt av planterester ble fortynnet med butanol til 100 ml.
7. Absorbansen ble målt i spektrum fra 520 nm til 580 nm.

8. Som blindprøve ble benyttet supernatant som var tilsatt butanol-saltsyrereagens og jernreagens, men ikke oppvarmet.

Metode 2:

1. Til nøyaktig utveid, frysetørkede og knuste *Aronia melanocarpa* Hugin bær ble tilsatt 20 ml vann, ristet og oppbevart i romtemperatur.

2. Løsningen ble tilsatt 58 ml aceton og satt på magnetrører i 1 time og deretter filtrert med filterpapir.

3. Rester på filteret ble vasket med 2×5 ml 70 % vann og aceton.

4. Alle de tre filtratene ble samlet opp og oppkonsentrert på rotavapor til ca 10 ml volum.

5. Oppkonsentrert løsning ble satt på Sephadex LH-20 kolonne som var 2,5×6,5 cm som var pakket i metanol-vann-TFA (30:70:0,1).

6. Antocyaniner ble eluert med 200 ml metanol-vann-TFA blanding (70:30:0,1), men proanthocyanidiner ble eluert med 200 ml aceton-vann (70:30).

7. Proanthocyanidiner ble oppkonsentrert i rotavapor og deretter ble 1 ml metanol tilsatt.

8. 6 ml 5 % kons. (vanndig) saltsyre i butanol og 0,2ml 2 % $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ ble tilsatt i 2M aq.salt syre. Oppløsningen ble ristet og oppvarmet i vannbad i ca.85 °C i 45 minutter.

9. Absorbansen ble målt ved 520 nm til 580 nm.

10. Som blindprøve ble brukt oppløsning med metanol istedenfor proanthocyanidiner.

4 Resultater og diskusjon

I denne masteroppgaven ble fire kultivarer av aroniabær analysert for å sammenligne biologisk aktive substanser av fenolisk karakter. For å analysere enkeltsubstanser med potensiell aktivitet, som antioksidant effekte, enzymhemmende aktivitet og immunmodulerende egenskaper, ble aroniabær ekstrahert med 0,5 % TFA i metanol og 80 % etanol. Målet var å finne ut om forskjellige kultivarer av aroniabær har forskjellig innhold av aktive forbindelser.

Fraksjonering, isolering og identifisering av lavmolekylære bioaktive substanser ble utført med avansert kromatografisk og spektroskopiske metoder.

Bær fra forskjellige arter har forskjellig størrelse og av den grunn vil mengde og innhold av overhud og bløte deler av bær, variere. Størrelse av bær er vist i tabellen under.

<i>Aronia melanocarpa</i> Moskva	12,912 mm - ca. 12,9 mm
<i>Aronia melanocarpa</i> Hugin	9,552 mm - ca. 9,6 mm
<i>Aronia melanocarpa</i> Nero	12,574 mm - ca. 12,6 mm
<i>Aronia prunifolia</i> Viking	8,414 mm - ca. 8,4 mm

Tabell 5. Gjennomsnittsdiameter av bær fra de forskjellige kultivarer

4.1 Ekstraksjon av aroniabær

Det ble veid 10 g av hver kultivar av aroniabær. Aroniabær ble ekstrahert fire ganger i fem paralleller med 0,5 % TFA i metanol og filtrert. Alle fire ekstraktene av hver type aroniabær, ble samlet og volum ble målt i målesylinder for senere beregning av anthocyaniner. Volum som ble målt i gjennomsnittet er:

Aronia melanocarpa Moskva: 23 ml

Aronia melanocarpa Hugin: 22,4 ml

Aronia melanocarpa Nero: 20,1 ml

Aronia prunifolia Viking: 19,1 ml

4.2 HPLC analyse av aroniabær

Innhold av anthocyaniner i aroniabær kultivarer ble analysert i ekstrakter som var ekstrahert med 0,5 % TFA i metanol. Ekstraktene ble analysert opp med HPLC på C18 omvendt-fase kolonnen, for å identifisere anthocyaniner. Absorbanstoppene var høye og de var tydelig separert i kromatogrammet, som er viktig for å bestemme retensjons tid og areal under kurven. Resultater ble angitt i mg per 100 g friske bær, og som relativt innhold av anthocyaniner i friske aroniabær. Det er det samme forholdet mellom innhold i ekstrakt som i friske bær.

Standard kurve ble beregnet for cyanidin-3-galaktosid som er det anthocyaninet det finnes mest av i aroniabær.

Standard kurve ble beregnet fra formell:

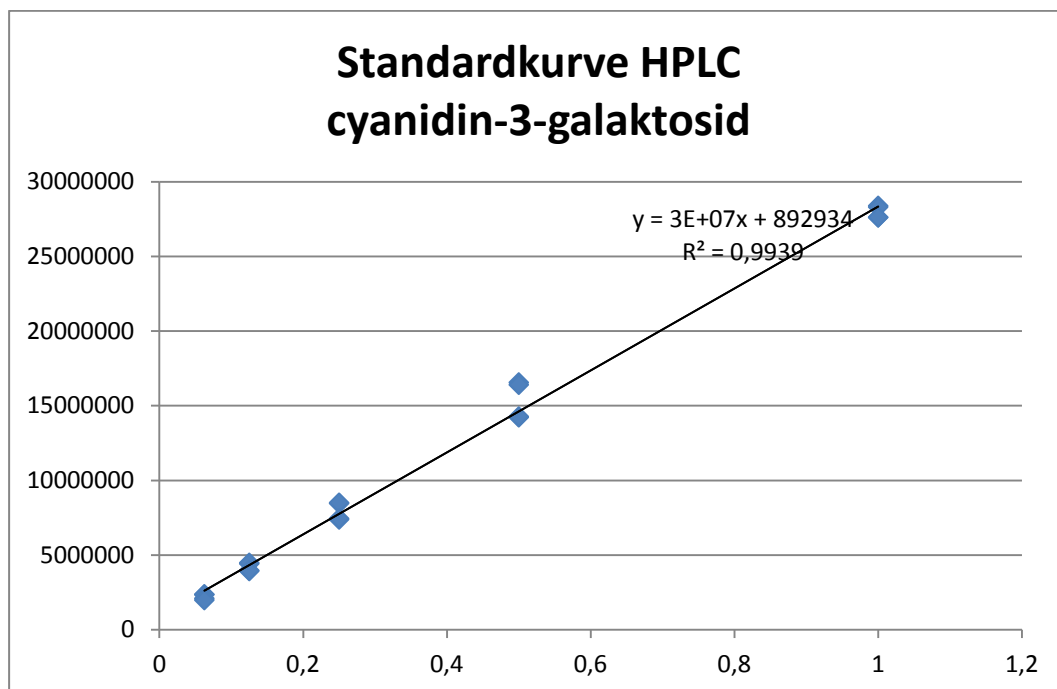
$$y=3E+0,7x+892934$$

hvor x står for anthocyanin konsentrasjon

y står for areal under kurven

R^2 er et mål for hvor nærme standardkurven er linear. Dersom R^2 er 1, standardkurven er linear. I dette tilfelle er R^2 0,9939. For å bestemme konsentrasjon i løsningen som analyseres brukes formell $y=3E+0,7x+892934$ når areal under kurven er kjent.

Cyanidin-3-galaktosid ble valgt som substans for å beregne standardkurve siden aroniabærene er rikest på cyanidin-3-galaktosid. Vi antok at molar ekstinksjonskoeffisientene er tilnærmet lik for cyanidin-3-galaktosid, cyanidin-3-arabinosid, cyanidin-3-glukosid og cyanidin-3-xylosid og beregnet innhold av disse fire anthocyaninene i de ulike aroniabær kultivarene basert på standardkurven for cyanidin-3-galaktosid som er vist i figur 4.2.

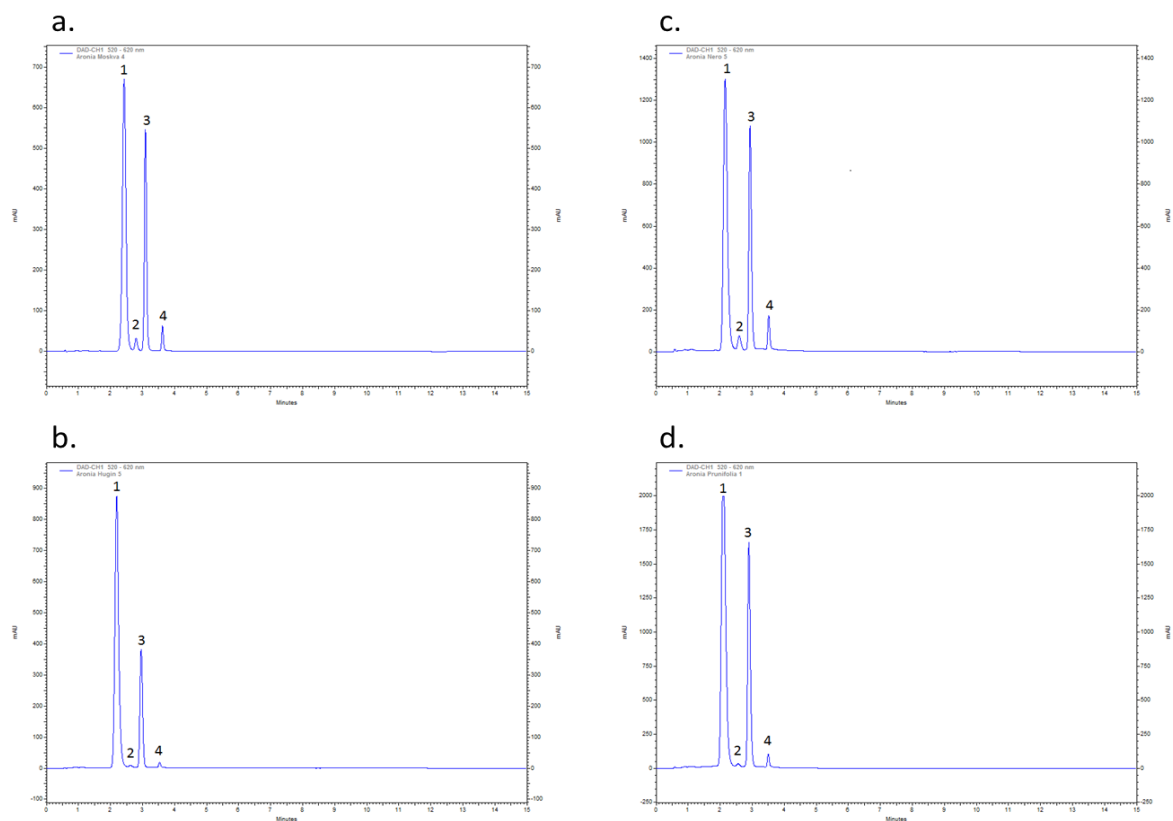


Figur 4-1. Standardkurve HPLC cyanidin-3-galaktosid

I beregningen av konsentrasjonen av hvert anthocyanin i 100 g friske bær ble tatt hensyn hvor mye bær som ble veid inn og hvor stort slutt volum det var av ekstrakt.

		Gj snitt	St. dev	Total
Hugin	Cya-3-gal	76,3	0,3	100
Hugin	Cya-3-glc	0,4	0,03	
Hugin	Cya-3-ara	22,7	0,3	
Hugin	Cya-3-xyl	0,6	0,02	
Moskva	Cya-3-gal	63,0	0,4	100
Moskva	Cya-3-glc	1,9	0,1	
Moskva	Cya-3-ara	32,2	0,4	
Moskva	Cya-3-xyl	2,9	0,1	
Nero	Cya-3-gal	61,0	0,4	100
Nero	Cya-3-glc	2,3	0,0	
Nero	Cya-3-ara	32,9	0,4	
Nero	Cya-3-xyl	3,8	0,1	
Prunifolia	Cya-3-gal	66,6	0,6	100
Prunifolia	Cya-3-glc	0,4	0,04	
Prunifolia	Cya-3-ara	31,8	0,6	
Prunifolia	Cya-3-xyl	1,3	0,05	

Tabell 6. Realtivt innhold av anthocyaniner



Figur 4-2. HPLC kromatogrammer av surt metanolekstrakt fra aroniabær. a: Moskva; b: Hugin; c: Nero og d: Viking. Anthocyaninene er 1: cyanidin-3-galaktosid; 2: cyanidin-3-glukosid; 3: cyanidin-3-arabinosid og 4: cyanidin-3-xylosid.

Antocyanin	Prøve	Gjennomsnittlig innhold av antocyaniner i friske bær ^a	Standardavvik
Cya-3-galaktosid	Hugin	196.9	15.5
	Moskva	168.4	11.9
	Nero	281.7	25.3
	Prunifolia	496.8	19.9
Cya-3-glukosid	Hugin	Tr	
	Moskva	Tr	
	Nero	4.7	0.4
	Prunifolia	Tr	
Cya-3-arabinosid	Hugin	51.6	5.9
	Moskva	83.0	6.6
	Nero	149.2	14.7
	Prunifolia	236.2	13.2
Cya-3-xylosid	Hugin	Tr	
	Moskva	2.7	0.8
	Nero	11.7	1.0
	Prunifolia	3.8	0.7

^a mg cyanidin-3-galaktosid ekvivalenter/100g friske bær,

Tabell 7. Gjennomsnittlig innhold av antocyaniner i friske bær

Cyanidin-3-galaktosid er mest utbredt anthocyanin i aroniabær. Cyanidin-3-arabinoside er den neste mest utbredte anthocyanin i aroniabær. Mengde av cyanidin-3-arabinoside er to ganger mindre i gjennomsnittet enn i cyanidin-3-galaktosid. Cyanidin-3-xyloside finnes relativt lite og cyanidin-3-glukosid finnes bare i spormengder.

Fra tabell 7. kan man beregne total gjennomsnittlig innhold av anthocyaniner i ferske bær. *Aronia prunifolia* Viking har påvist betydelig høyst innhold av anthocyaniner. *Aronia melanocarpa* Nero har også veldig høy innhold av anthocyaniner men lavere enn *Aronia prunifolia* Viking. *Aronia melanocarpa* Moskva og *Aronia melanocarpa* Hugin har nesten likt total innhold av anthocyaniner.

Aronia prunifolia Viking bærene har minst diameter, som er vist i tabell 5, noe som kan tyde på, en sammenheng mellom bærstørrelse og anthocyaniner. *Aronia melanocarpa* Nero som også har høyt innhold av anthocyaniner har mye større diameter av bær. Dette tyder på at det ikke er noen direkte sammenheng hos *Aronia melanocarpa* Nero. Begge de to typene av bær ble plukket i Tyskland. *Aronia melanocarpa* Moskva har størst diameter av fire bær typer og mye mindre innhold av anthocyaniner sammenlignet med *Aronia prunifolia* Viking. *Aronia melanocarpa* Hugin har også mindre diameter av bær men nesten likt total innhold av anthocyaniner med *Aronia melanocarpa* Moskva. Dette tyder på at det ikke er en sammenheng mellom bær diameter og innhold av anthocyaniner i de bærene som ble undersøkt. Begge to typer av aroniabær ble plukket i Norge.

4.3 Alfa -glucosidase hemming

Bio-assay for alfa-glucosidase hemming ble utført på 0,5 % TFA i metanol ekstraktet av aroniabær og på 80 % etanolekstrakt av aroniabær. Resultatene er vist i Tabell 8. Målingen for hver konsentrasjon i kyvetter ble gjentatt tre ganger og gjennomsnittet ble skrevet i tabellen. Absorbansen ble målt ved 400 nm. Glucosidase hemming ble beregnet fra formel:

$$\% \text{ hemming} = (\text{Ablank} - \text{Asample}) / \text{Ablank} \times 100\%$$

Material	% inhibition									
	50 µg/ml	12,5 µg/ml	3125 ng/ml	1563 ng/ml	781 ng/ml	391 ng/ml	98 ng/ml	49 ng/ml	24 ng/ml	IC50 ng/ml
80%EtOH Moskva	87,9 ± 1,9	84,5 ± 4,3	82,0 ± 3,8		58,1 ± 9,6	9,8 ± 6,0				695,4 ± 78,6
80%EtOH Hugin				88,1 ± 1,9	46,7 ± 9,0	37,8 ± 9,1				825,4 ± 100,0
80%EtOH Nero				95,1 ± 0,5	40,8 ± 7,7	0,3 ± 0,2				878,4 ± 80,0
80%EtOH Prunifolia				92,3 ± 1,9	40,8 ± 8,5	0,4 ± 0,1				884,1 ± 80,7
0.5% TFA i MeOH Moskva						95,7 ± 0,6	93,4 ± 2,3	49,7 ± 2,1		49,2 ± 1,7
0.5% TFA i MeOH Hugin						97,2 ± 0,3	83,2 ± 1,0	78,9 ± 0,4	38,0 ± 6,7	29,6 ± 2,8
0.5% TFA i MeOH Nero						92,9 ± 0,1	92,6 ± 0,1	54,8 ± 10,0	25,3 ± 0,5	43,6 ± 6,2
0.5% TFA i MeOH Prunifolia						97,7 ± 0,2	87,9 ± 0,2	65,2 ± 1,1	42,4 ± 10,0	30,4 ± 5,3

Tabell 8. % inhibition av α -glucosidase

IC 50 verdi er en konsentrasjon av aroniabær ekstraktene som gir 50 % av inhibisjon av α -glukosidase.

Lavere verdi av IC 50 indikerer at prøvene som ble analysert var mer aktive.

Etanolekstraktene viste relativt høye IC50-verdier, og Tabell 8 viser at etanolekstraktet av *Aronia melanocarpa* Moskva har høyest α -glukosidasehemmende effekt, deretter følger *Aronia melanocarpa* Hugin, *Aronia melanocarpa* Nero og *Aronia Prunifolia* Viking.

Metanolekstraktene viste en ganske lave IC50-verdier, og tabell 8 viser at metanolekstraktet av *Aronia melanocarpa* Hugin har høyest α -glukosidasehemmende effekt, deretter følger *Aronia prunifolia* Viking, *Aronia melanocarpa* Nero og sist *Aronia melanocarpa* Moskva.

Glucosidase hemming har påvist betydelig høyere aktivitet hos metanol ekstraktene som inneholder anthocyaniner, enn hos etanol ekstraktene. Dette tyder på at metanol ekstraktene er mere effektive inhibitorer av α -glukosidase enn etanol ekstraktene. Inhibitorisk effekt av ekstrakter mot α -glukosidase er relatert til innhold av anthocyaniner i ekstraktene av aronia bær. Dette tyder på at anthocyaniner kan være effektive mot α -glukosidase og mulig inducere anti hyperglykemisk effekt.

4.4 Radikalskavenging test (DPPH-test)

Bio-assay for radikalskavenging test-DPPH-test (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ble utført på 0,5 % TFA i metanolekstraktet av aroniabær og på 80 % etanolekstrakt av aroniabær. Quercetin ($IC_{50} = 3,3 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$) ble brukt som positiv kontroll. Resultatene er vist i Tabell 9. Målingen for hver konsentrasjon ble gjentatt tre ganger og gjennomsnittet ble skrevet i tabelen. Absorbansen ble målt ved 517 nm. Egenabsorbansen til sterkt fargede stoffer ble korrigert.

Material	% DPPH scavenging				IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
	83,3 $\mu\text{g/ml}$	41,7 $\mu\text{g/ml}$	20,8 $\mu\text{g/ml}$	10,4 $\mu\text{g/ml}$	
80%EtOH Moskva	83,5 \pm 2,7	56,5 \pm 1,7	27,4 \pm 2,1	nt	35,7 \pm 1,5
80%EtOH Hugin	88,4 \pm 0,8	85,1 \pm 0,4	57,0 \pm 0,6	37,4 \pm 0,9	16,2 \pm 0,4
80%EtOH Nero	87,4 \pm 0,1	56,3 \pm 1,6	29,3 \pm 1,1	nt	35,5 \pm 1,4
80%EtOH Prunifolia	87,0 \pm 0,1	85,1 \pm 0,8	48,9 \pm 1,6	24,4 \pm 0,3	21,2 \pm 0,7
0.5% TFA i MeOH Moskva	61,5 \pm 1,1	35,4 \pm 0,8	Nt	nt	61,4 \pm 1,6
0.5% TFA i MeOH Hugin	85,6 \pm 0,2	51,6 \pm 1,1	28,5 \pm 0,5	nt	39,7 \pm 1,4
0.5% TFA i MeOH Nero	69,0 \pm 1,6	38,3 \pm 1,1	Nt	nt	54,3 \pm 1,6
0.5% TFA i MeOH prunifolia	92,0 \pm 0,4	58,3 \pm 1,4	33,0 \pm 1,5	nt	33,2 \pm 1,3
nt: not tested					

Tabell 9. DPPH scavenging av aronia bær ekstrakter

IC50-verdi er konsentrasjonen av prøven som må til for å gi en reduksjon på 50 % av DPPH-aktivitet.

Lavere verdi av IC50 indikerer at prøvene som ble analysert var mer aktive.

Metanolekstraktet viste en ganske høy radikalskavenger effekt hos *Aronia prunifolia* Viking og *Aronia melanocarpa* Hugin og noe mindre hos *Aronia melanocarpa* Nero og *Aronia melanocarpa* Moskva.

Etanolekstraktet viste en ganske høy radikalskavenger aktivitet med en lav IC50-verdi hos *Aronia melanocarpa* Hugin, *Aronia prunifolia* Viking, og nesten likt radikalskavenger aktivitet hos *Aronia melanocarpa* Nero og *Aronia melanocarpa* Moskva.

Mange fenoliske substanser, både syntetiske og naturlige har vist antioksidant- og radikal skavenger aktivitet (Malterud et al. 1993). Svartsurbær har et høyt innhold av fenoliske substanser og er dermed forventet å ha DPPH radikal skavenger aktivitet. Etanolekstrakter av

aroniabær har påvist høyere radikalskavenger effekt enn metanolekstrakter av aronia bær. Dette kan tyde på at etanolekstrakter av aroniabær inneholder mer aktive stoffer.

De respektive ekstrakter av *Aronia melanocarpa* Hugin og *Aronia prunifolia* Viking hadde høyere radikalskavenger aktivitet enn *Aronia melanocarpa* Moskva og *Aronia melanocarpa* Nero, noe som kan ha en sammenheng med størrelsen på bærene.

4.5 15-lipoksygenasehemming av aroniabær ekstrakter (15-LO)

Det ble utført test for hemming av 15-LO på 0,5 % TFA i metanolekstraktene av aroniabær og 80 % etanol ekstraktene av aroniabær med quercetin som positiv kontroll (IC50 = 87,8 ± 3,3 µM/ml). Prosent enzymhemming kan beregnes etter følgende formel:

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

der

A₁ og A₂ er absorbansøkning per tidsenhet med og uten testsubstans tilsatt (Malterud 2008).

Material	% hemming ved 83,3 µg/ml
80%EtOH Moskva	4,0 ± 2,7
80%EtOH Hugin	10,9 ± 2,9
80%EtOH Nero	8,9 ± 3,1
80%EtOH Prunifolia	5,7 ± 3,4
0.5% TFA i MeOH Moskva	8,5 ± 4,7
0.5% TFA i MeOH Hugin	12,8 ± 5,7
0.5% TFA i MeOH Nero	17,4 ± 5,2
0.5% TFA i MeOH prunifolia	14,7 ± 5,0

Tabell 10. 15-LO-hemming av 0,5 % TFA i metanolekstraktet og 80 % etanolekstrakt av aroniabær

Metanolekstraktet av aroniabær viste lav 15-LO hemmingsaktivitet. Høyest % hemming ga *Aronia melanocarpa* Nero, deretter *Aronia prunifolia* Viking, *Aronia melanocarpa* Hugin og *Aronia melanocarpa* Moskva.

Etanolekstraktet av aroniabær viste lav 15-LO hemming aktivitet. Høyest % av hemmingen ga *Aronia melanocarpa* Hugin, *Aronia melanocarpa* Nero, *Aronia prunifolia* Viking og *Aronia melanocarpa* Moskva.

1M Quercetin=302 mg/ml

1mM Quercetin=302µg/ml

87,8µM=X

X=26,52 µg/ml er IC50 verdi av quercetin

IC 50 av quercetin var 26,52 µl/ml. Hemmings aktiviteten for aroniabær ekstraktene var mye svakere enn for quercetin.

Begge typer av ekstraktene av aronia bær har påvist svak % hemming av 15-LO. Det ble ikke beregnet IC50-verdi for aronia bær ekstraktene fordi hemmings aktiviteten ved høyeste målte konsentrasjon, 83,3 µg/l, ikke nådde 50 %. Dette betyr at hvis vi går opp i konsentrasjonen av aroniabær ekstraktene, resultatene blir ikke biologisk relevante.

4.6 Xantinoksidasehemming av aroniabær ekstrakter(XO)

Det ble utført XO-hemming på 0,5 % TFA i metanolekstrakt av aroniabær og 80 % etanolekstrakt av aroniabær. Quercetin ble brukt som positiv kontroll. IC50 verdi av positiv kontroll quercetin var på $0,6 \pm 0,1$ µg/ml. Dette er konsentrasjonen av ekstraktet som gir 50 % hemming av xantin oksidase.

Hemming av XO kan beragnes etter formelen:

$$\% \text{XO hemming} = 100 \times (A_2 - A_1) / A_2$$

A₁ er absorbansøkning per tidsenhet med testsubstans tilsatt

A₂ er absorbansøkning per tidsenhet uten testsubstans tilsatt (Malterud 1998).

Hemmingen er konsentrasjonsavhengig. Hemmingen av XO er svakere enn hemmingsaktiviteten av den positive kontrollen quercetin. Resultatene er vist i tabel 11.

Material	% hemming ved 83,3 µg/ml
80%EtOH Moskva	25,5 ± 3,0
80%EtOH Hugin	34,5 ± 2,0
80%EtOH Nero	23,7 ± 4,1
80%EtOH Prunifolia	26,3 ± 2,7
0.5% TFA i MeOH Moskva	2,7 ± 1,6
0.5% TFA i MeOH Hugin	14,7 ± 1,8
0.5% TFA i MeOH Nero	13,0 ± 3,8
0.5% TFA i MeOH prunifolia	18,0 ± 5,5

Tabell 11. XO hemming av aroniabær ekstrakter

Metanolekstraktet av aroniabær viste svak XO hemming aktivitet. Høyst % hemming ga *Aronia prunifolia* Viking, deretter *Aronia melanocarpa* Hugin, *Aronia melanocarpa* Nero og til sist *Aronia melanocarpa* Moskva.

Etanolekstraktene av aroniabær viste noe høyere XO hemmings-aktivitet enn metanol ekstraktene. Høyst % hemming av XO ga *Aronia melanocarpa* Hugin, deretter *Aronia prunifolia* Viking, *Aronia melanocarpa* Moskva og til sist *Aronia melanocarpa* Nero.

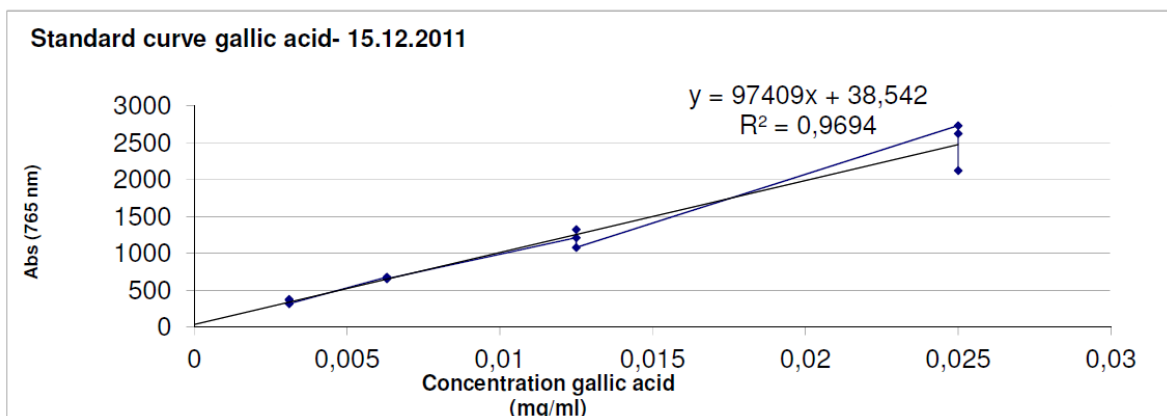
Både metanol og etanolekstraktene av aroniabær var svake XO hemmere sammenliknet med quercetin.

4.7 Analyse av total fenol (Folin-Ciocalteu) i aroniabær ekstrakter

Folin-Ciocalteu metoden, er basert på reduksjonen av fosfomolybdat / fosfotungstic av fenoliske OH-grupper og det dannes et blått kompleks som kan måles spektrofotometrisk v/ 765 nm. Denne metode er også kjent som Galle syre ekvivalent (GAE) metode. Gallesyre brukes som standard for å bestemme innhold av total fenol i Folin-Ciocalteu assay.

Resultatene vises i gallesyre ekvivalenter (GAE).

Standard kurve viser sammenheng mellom absorbansen og konsentrasjonen av gallesyre. Det betyr at høyere konsentrasjoner av gallesyre danner mer kompleks som har blå farge og absorbansen er på grunn av det høyere. Standard kurve er vist i figuren 4.3. under



Figur 4-3. Standard kurve galle-syre

	mg GAE/g ekstrakt		mg GAE/100 g frosne bær	
	Gjennomsnitt	Standardavvik	Gjennomsnitt	Standardavvik
Moskva	101,1	5,6	1078,9	60,0
Hugin	147,6	5,6	1389,4	53,2
Nero	97,5	15,0	1921,3	296,4
Prunifolia	175,3	10,1	2995,6	171,9

Tabell 12. Innhold av galle-syreekvivalenter per gram ekstrakt og innhold av galle-syreekvivalenter per 100 g frosne bær

Høyest total fenol innhold, angitt som konsentrasjon av galle syre per 100 g frosne bær, var *Aronia prunifolia* Viking. Neste bær var *Aronia melanocarpa* Nero, deretter *Aronia melanocarpa* Hugin og til sist *Aronia melanocarpa* Moskva.

Høye verdier av total fenol ble observert i aroniabær ekstrakter. Dette kan tyde på korrelasjon mellom total fenol i aronia bær ekstrakter og antioksidant effekt.

4.8 Total proanthocyanidin i aroniabær ekstrakter

Porter Assay eller butanol-HCl-jern metode er en kolorimetrisk test som fører til spalting av proanthocyanidiner fra oligomere til monomere anthocyanidiner og endring av farge. Dette måles spektrofotometrisk. Høyere absorbans målt på UV-spektrofotometer betyr høyere konsentrasjon av total proanthocyanidin i aronia bær ekstrakter.

Absorbansmaksimum i metode 1, ble fra 577 nm for *Aronia melanocarpa* Hugin til 584 nm for *Aronia prunifolia* Viking.

Total proanthocyanidin ble analysert to ganger. Første gang ble det brukt en metode foreslått av Arrantz et al.(2009) og andre gang ble metode foreslått av Rune Sliestad fra Plantchem

Norge brukt. Enheter som ble brukt for måling av konsentrasjon av proanthocyanidiner er cyanidinekvivalenter.

Metode1: Måling av løselig proanthocyanidininnhold i Aroniabær

Porter et al, Phytochemistry 25:223 (kvantifisering)

Arranz et al, J Agr Fd Chem 57:7298 (ekstraksjon)

Blank: Som prøve, men ikke varmet

Beregning basert på prøveløsninger fra 500 mg tørkede bær/40 ml ekstr.vol. og 1 ml prøveløsning fortynnet til 7.2 ml totalvolum, med følgende verdier for cyanidin:

$\epsilon = 35000$ (molar ekstinksjonskoeffisient for cyanidin) og

$M = 287$ (molar masse for cyanidin)

fås følgende verdier for konsentrasjon av proanthocyanidiner som cyanidinekvivalenter:

Prøve	Amax	Konsentrasjon i prøve		Mengde i ekstrakt	
		(mg/ml)	(mg)	% innhold i bær	
Moskva	1,584	0,0130	3,741	0,75	
Hugin	1,659	0,0136	3,918	0,78	
Nero	1,444	0,0118	3,410	0,68	
A. prunifolia	1,356	0,0111	3,202	0,64	

Tabell 13. Metode1: Måling av løselig proanthocyanidininnhold i Aroniabær

Metode 2: Måling av løselig proanthocyanidininnhold i Aroniabær cv. Hugin

Metode: Porter et al, Phytochemistry 25:223 (kvantifisering)

Rune Slimestads metodeforslag (ekstraksjon)

Blank: Som prøve, men med MeOH i stedet for prøveløsning

Funnet absorbansmaksimum: 547 nm

Prøve	Amax	Innveid mengde (mg)	Konsentrasjon i prøve (mg/ml)	Mengde i ekstrakt	
				mg	% innhold i bær
parallell 1	0,978	187	0,0722	0,520	0,28
parallell 2	1,280	218	0,0945	0,680	0,31
parallell 3	0,764	108	0,0564	0,406	0,38

Tabell 14. Metode 2: Måling av løselig proanthocyanidininnhold i aroniabær cv. Hugin

Beregning basert på ovennevnte prøvemengder av tørkede bær og 1 ml prøveløsning fortynnet til 7.2 ml totalvolum 250 μ l av denne fortynnet til 2,25 ml før måling.

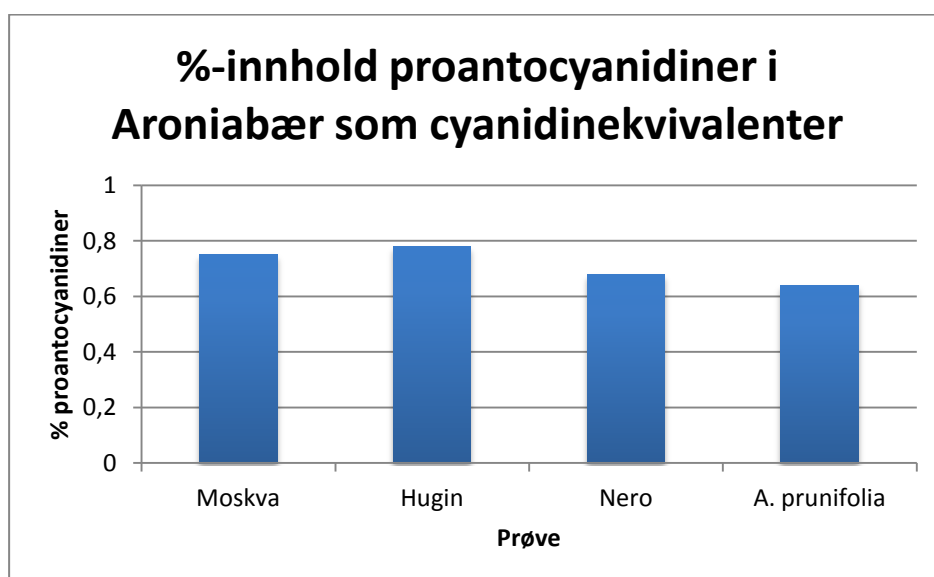
Med følgende verdier for cyanidin: $\epsilon = 35000$, $M = 287$

fås følgende verdier for konsentrasjon av proanthocyanidiner som cyanidinekvivalenter:

% Konsentrasjon	Avg	SD
0,28	0,32	0,04
0,31		
0,38		

Metode 1 har påvist mye høyere resultater i % av konsentrasjon av proanthocyanidiner enn metode 2. Grunnen til det kan være at i metode 1 er både proanthocyanidiner og anthocyaniner ble analysert.

Figur 4-4. viser at *Aronia melanocarpa* Hugin har høyest % av proanthocyanidiner i frysetørkede aroniabær ekstrakter. Deretter er % av proanthocyanidiner utbredt hos *Aronia melanocarpa* Moskva, deretter følger *Aronia melanocarpa* Nero og til sist *Aronia prunifolia* Viking.



Figur 4-4. %-innhold av proanthocyanidiner i frysetørkede aroniabær som cyanidin ekvivalenter

4.9 Komplementmodulering

Komplementmoduleringstesten ble brukt for å undersøke om 0,5 % TFA i metanolekstrakter og 80 % etanol ekstrakter av aroniabær ha en immunmodulerende aktivitet. Substanser i et ekstrakt i kan påvirke komplementfaktorer som vil føre til redusert hemolyse av sensibiliserte røde blodceller fra sau. Aktiviteten måles i prosentvis hemming av hemolyse. IC50 er den konsentrasjonen av en prøve som gir 50 % hemming av hemolyse. Den sammenlignes med standarden BPII, fraksjon II. Testen skiller ikke mellom komplementaktivering- og hemming, da begge vil føre til redusert hemolyse. BPII er et isolert polysakkarid og noen polysakkarider har vist å aktivere komplement både via den klassiske og den alternative reaksjonsvei (Michaelsen et al. 2000).

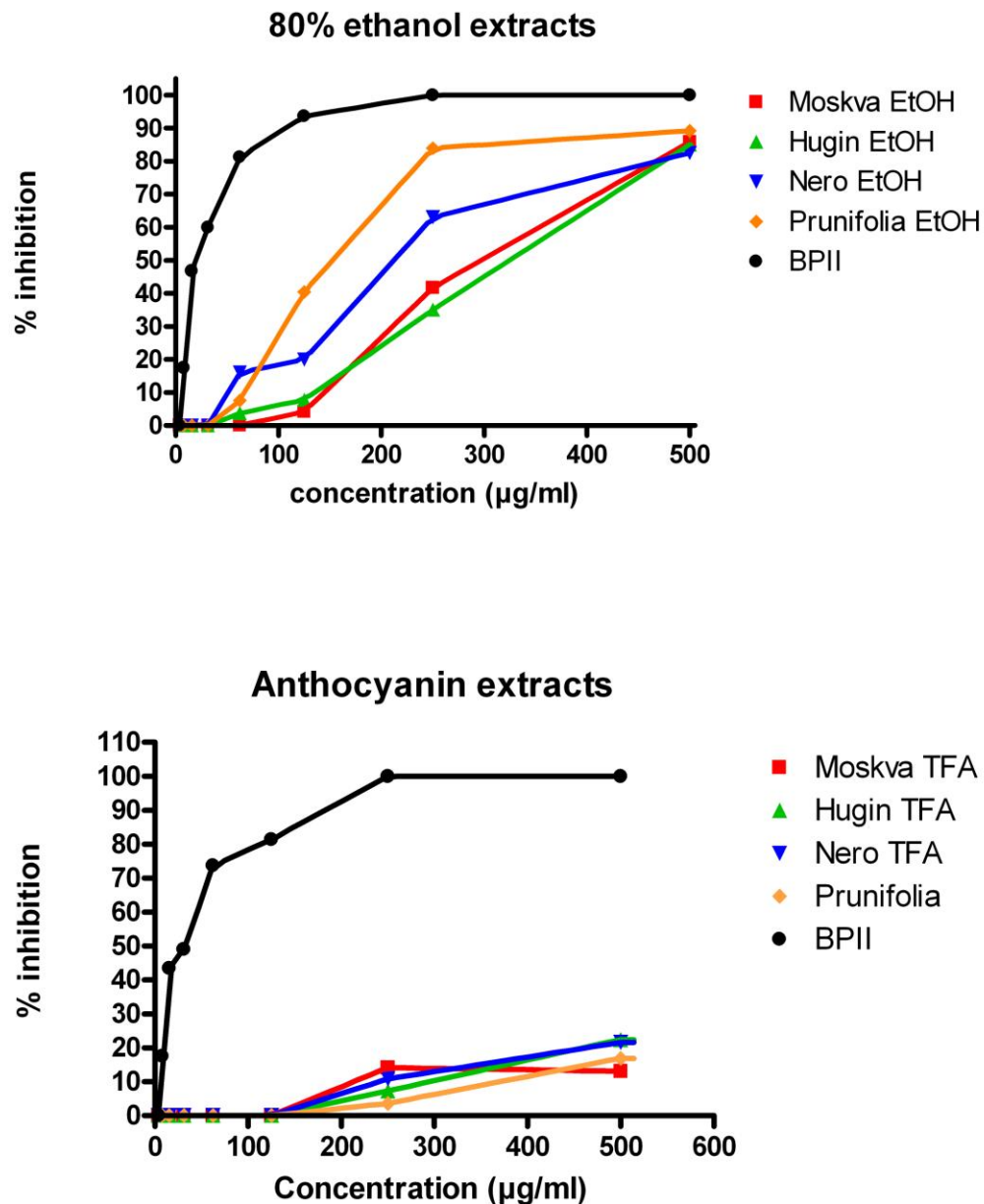
IC50-verdier av komplementmodulering	
Ekstrakt	IC50-verdi (µg/ml)
Moskva 80%EtOH	297.112
Hugin 80%EtOH	324.749
Nero 80%EtOH	212.184
Prunifolia 80%EtOH	152.430
BPII (for 80%EtOH)	19.526
Moskva 0,5%TFA i MeOH	> 500
Hugin 0,5%TFA i MeOH	> 500
Nero 0,5%TFA i MeOH	> 500
Prunifolia 0,5%TFA i MeOH	> 500
BPII (for 0,5%TFA i MeOH)	32.548

Tabell 15. IC50-verdier av komplementmodulering

Figur 4.5 og tabell15 viser komplementmodulerende aktivitet av 0,5 % TFA i metanolekstrakter og 80 % etanolekstrakter av aroniabær og BPII (*Biophytum petersianum*). Alle ekstrakter har høyere IC50-verdi enn BPII, dette tyder på lavere komplementmodulerende aktivitet. Alle aronia bær ekstraktene har et potensiale til å påvirke komplement. Metanolekstrakter har veldig høy IC50-verdi sammenlignet med BP II, som betyr at de har påvist veldig lav aktivitet dvs.lavt potensiale til å påvirke komplement. Etanolekstrakter er mer aktive enn metanol ekstrakter. *Aronia prunifolia* Viking som har lavest IC50-verdi som betyr at den har mest aktivitet, men har lavere aktivitet enn BPII. *Aronia prunifolia* Viking har derfor størst potensiale til å påvirke komplement. *Aronia melanocarpa* Nero har litt høyere IC50-verdi som betyr litt svakere aktivitet, deretter følger *Aronia melanocarpa* Moskva og *Aronia melanocarpa* Hugin, med minst potensiale av etanol ekstrakter til å påvirke komplement.

BPII er et polysakkarid isolert fra *Biophytum petersianum*. Dette er et av de polysakkarider som har vist høyest aktivitet, målt ved fagområdet farmakogonsi, Farmasøytisk institut, UIO. BPII (Grønhaug et al. 2011) tilsvarer BP100III (Inngjerdingen et al. 2006).

Komplementmodulerende aktivitet ble bestemt for alle aroniabær ekstrakter. Figur 4.5 viser komplementmodulerende aktivitet av 80 % etanol ekstrakter og 0,5 % TFA i metanol ekstrakter av aroniabær.



Figur 4-5. Komplementmodulerende aktivitet for forskjellige aroniabær ekstrakter

Y viser % hemming av hemolyse, X viser konsentrasjonen av aroniabær ekstrakter

Aroniabær ekstrakter av metanol og etanol, har vist stor forskjell i % inhibisjon av hemolyse. Etanolekstrakter inneholder proanthocyanidiner som kan ha ganske høy molekyl vekt og disse kan være ansvarlig for en høyere % hemolyse. Anthocyaniner har lavere molekylvekt og det kan være grunnen til at % hemolyse er lavere hos metanolekstrakter av aroniabær.

5 Konklusjon

Målet med oppgaven var å isolere anthocyaniner og proanthocyanidiner i fire forskjellige kultivarer av aroniabær (*Aronia melanocarpa* Moskva, *Aronia melanocarpa* Hugin, *Aronia melanocarpa* Nero og *Aronia prunifolia* Viking).

Anthocyaniner fra aroniabær ble ekstrahert med metanol tilsatt 0,5 % TFA og isolere lavmolekylære og fenoliske substanser deriblant proanthocyanidiner fra de samme kultivarene av aroniabær, med 80 % etanol. Anthocyaninene i de forskjellige bærtypene ble kvantifisert og ekstraktene ble undersøkt for antioksidant, enzymhemmende og immunmodulerende aktivitet. Det ble benyttet avansert kromatografisk og spektrofotometriske metoder og resultatene fra de forskjellige ekstraktene og bærtypene ble sammenlignet.

Den kvantitative analysen av anthocyanininnholdet i de forskjellige bærtypene viste at alle bærtypene inneholdt omtrent dobbelt så mye cyanidin-3-galaktosid i forhold til cyanidin-3-arabinosid. Alle bærtypene hadde relativt lave forekomster av cyanidin-3-xylosid og cyanidin-3-glukosid. Forholdet mellom de identifiserte anthocyaninene varierte noe i de forskjellige bærtypene.

Alle ekstraktene viste relativt høy DPPH radikalskavenger aktivitet, men etanolekstraktene hadde noe høyere aktivitet enn metanolekstraktene. De respektive ekstrakter av *Aronia melanocarpa* Hugin og *Aronia prunifolia* Viking hadde høyere radikalskavenger aktivitet enn *Aronia melanocarpa* Moskva og *Aronia melanocarpa* Nero, noe som kan ha en sammenheng med størrelsen på bærene.

Både etanolekstrakter og metanolekstrakter viste lav 15-lipoksygenase hemmingsaktivitet slik at hemmingen ikke kan regnes som biologisk relevant.

Etanolekstraktene hadde noe høyere xantinoksidasehemmende effekt enn metanolekstraktene, men var svake hemmere sammenliknet med quercetin.

Resultatene fra α -glukosidase hemmingstesten viste at metanolekstraktene hadde betydelig mer hemmende effekt enn etanolekstraktene. Dette kan tyde på at anthocyaniner har et potensiale til å indusere anti-hyperglykemisk effekt.

Metanolekstraktene har så lav komplementmodulerende aktivitet at det ikke kan regnes som biologisk relevant. Etanolekstraktene har en del høyere komplementmodulerende aktivitet, og av disse har *Aronia prunifolia* Viking høyere aktivitet enn *Aronia melanocarpa* Nero og begge høyere aktivitet enn de andre to bærtyperne.

Aronia prunifolia Viking hadde omtrent 3 ganger så høyt innhold av anthocyaniner og *Aronia melanocarpa* Nero noe under 2 ganger så høyt innhold i forhold til *Aronia melanocarpa* Moskva og *Aronia melanocarpa* Hugin som hadde ganske likt innhold.

Alle bærtyperne hadde omtrent like høyt innhold av proanthocyanidiner.

Total fenolanalyse viste at *Aronia prunifolia* Viking hadde omtrent 3 ganger så høyt innhold og *Aronia melanocarpa* Nero hadde omtrent 2 ganger så høyt innhold av fenol i forhold til *Aronia melanocarpa* Moskva og *Aronia melanocarpa* Hugin som hadde ganske likt innhold.

Forkortelser

µl	Mikroliter
EtOH	etanol
MeOH	metanol
TFA	trifluoroeddik syre
Cya-3-glc	cyanidin-3-glukosid
Cya-3-gal	cyanidin-3-galaktosid
cya-3-Xyl	cyanidin-3-xylosid
cya-3-ara	cyanidin-3-arabinosid
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
15-LO	15-lipoksygenase
XO	xantinoksygenase
GAE	Gallesyre ekvivalenter
Me	Metylgruppe
mM	Millimolar
UV	ultraviolet
Abs	absorbans
OH	Hydroksylgruppe
BP II	<i>Biophytum petersianum</i>
rpm	Rotasjoner per minut
CCl ₄	Tetraklormetan

Referanseliste

Andersen Ø. M., (1988), "*Chemical studies of anthocyanins in plants*", Doktoravhandling ved Universitetet i Bergen

Andersen Ø. M., (1999), "*Encyclopedia of Life Sciences. Anthocyanins*", Macmillan Reference Ltd,

Andryskowski G, Niedworok J, Maziarz Z, Małkowski B. (1998), "*The effect of natural anthocyanin dye on experimental radiation sickness*", Acta Pol Toxicol;6:155.

Andryskowski G, Niedworok J, Maziarz Z, Małkowski B. (1998-1), "*The effect of natural anthocyanin dye on superoxide radical generation and chemiluminescens in animal after absorbed 4Gy dose of g radiation*", Pol J Environ Stud;7:357.

Arranz, S., Saura-Calixto, F., Shaha, S. og Kroon, P.A., (2009), "*High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated*". J. Agric. Food Chem. 57, 7298-7303.

Bermúdez-Soto MJ, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT. (2007), "*Stability of polyphenols in chokeberry (Aronia melanocarpa), subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion*", Food Chem;102:865–874.

Bober I, Oszmiański J (2004), "*The use of chokeberry's pomace to infusion of fruit tea*" [in Polish], Acta Sci Pol; 3: 67–72.

Domarew CA, Holt RR, Goodman-Snitkoff G. (2002), "*A study of Russian phytomedicine and commonly used herbal remedies*", J Herb Pharmacother; 2:31–48.

Erichsen-Brown C (1989), "*Medicinal and Other Uses of North American Plants: A Historical Survey with Special Reference to the Eastern Indian Tribes*", Courier Dover Publications, Mineola, NY, , p. 162.

Faff J., Frankiewicz- Józko A., (2003), "*Effect of anthocyanins from Aronia melanocarpa on the exercise-induced oxidative stress in rat tissues*", Biol Sport;20:15–23.

- Frandsen, T.P.; Svensson, B., (1998), "*Plant alpha-glucosidases of the glycoside hydrolase family 31, Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin*", *Plant Mol.Biol.*, 37, 1-13
- Frankiewicz-Józko A, Faff J (1999), "Effect of anthocyanin pigments from fruits of *Aronia melanocarpa* on the exercise-induced increase in lipid peroxidation marker in rat tissues", *Biol Sport*;16:31–38.
- Frejnagel SS, Zduńczyk Z (2008), "Chokeberry polyphenols reduce prooxidative influence of oxidized fats in rat diets", *Pol J Vet Sci*; 11:125–132.
- Funk, C.D, Cyrus, T. (2001), "12/15-lipoxygenase, oxidative modification of LDL and atherogenesis". *Trends in Cardiovascular Medicine* 11, 116-124.
- Ganji SH, Kamanna VS, Kashyap ML. (2003), "Niacin and cholesterol: role in cardiovascular disease", *J Nutr Biochem*;14: 298–305.
- Graversen H. B., (2008), "*Antioxidant synergism between fruit juice and a-tocopherol. A comparison between high phenolic black chokeberry (Aronia melanocarpa) and high ascorbic blackcurrant (Ribes nigrum)*", *Eur Food Res Technol*; 226:737–743.
- Grønhaug, T. E., Kiyohara, H., Sveaass, A., Diallo, D., Yamada, H., Paulsen, B. S., (2011), "*Beta-D-(1→4)-galactan-containing side chains in RG-1 regions of pectic polysaccharides from *Biophytum petersianum* Klotzsch. contribute to expression of immunomodulating activity against intestinal Peyer's patch cells and macrophages*", *Phytochemistry* 72, 2139-2147
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., (1994), "Antioxidants in nutrition, health, and disease", Oxford University Press, Oxford.
- Halliwell, B, (2005), "Free radicals and other reactive species in disease", <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0003913/full>.
- Halliwell, B., (2001), "Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment". *Drugs and Aging* 18, 685-716
- Henrissat, B.; Bairoch, A., (1993), "*New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities*", *Biochem J.*, 293, 781-788

- Hirvi T, Honkanen E, (1985), "*Analysis of the volatile constituents of black chokeberry (Aronia melanocarpa)*". J Sci Food Agric;36:808–810.
- Hjemstad, R (2007), "*Svartsurbær – Aronia melanocarpa*",
http://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/aron_mel.htm
- Inngjerdingen, K. T., Coulibaly, A., Diallo, D., Michaelsen, T. E., Paulsen, B. S., (2006), "*A Complement Fixing Polysaccharide from Biophytum petersianum Klotzsch, a Medical plant from Mali, West Africa*", Biomacromolecules, 7, 48-53
- Jakobek L, Seruga M, Medvidovic-Kosanovic M, Novak I, (2007), "*Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices*". Dtsch Lebensm Rundsch;103:58–64.
- Jaroniewski W., (1998), "*Aronia czarnoowocowa w lecznictwie i dietetyce*", Wiad Zielar; 40:20.
- Jeppsson N., (2000), "*The effect of cultivar and cracking on fruit quality in black chokeberry (Aronia melanocarpa) and hybrids between chokeberry and rowan (Sorbus)*",
Gartenbauwissenschaft; 65:93–98.
- Jeppsson N., Johansson R., (2000), "*Changes in fruit quality in black chokeberry (Aronia melanocarpa) during maturation*", J Hort Sci Biotechnol 75:340–345.
- Jin, L.; Xue, H.Y.; Jin, L, J.; Li, S. Y.; Xu, Y.P., (2008), "*Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes*". Eur. J. Pharmacol. 582, 162-167
- Jordheim, M., (2007), "*Isolation, Identification and Properties of Pyranoanthocyanins and anthocyanin forms*", Dissertation of the degree of philosophiae doctor (PhD), University of Bergen, Norway; p.2
- Jurgoński A, Juskiwicz J, Zdunczyk Z. (2008), "*Ingestion of black chokeberry fruit extracts leads to intestinal and systemic changes in a rat model of prediabetes and hyperlipidemia*", Plant Food Hum Nutr;4:176–182.
- Kane ME, Dehgan B, Sheehan TJ. (1991), "*In vitro propagation of Florida native plants: Aronia arbutifolia*". Proc Fla State Hort Soc;104:287–290.

Kimura, A.; Lee, J.H.; Lee, I.S.; Lee, H.S.; Park, K.H.; Chiba, S.; Kim, D., (2004), "Two potent comparative inhibitors discriminating α -glucosidase family I from family II". *Carbohydr. Res.*, 339, 1035-1040

Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, and Luczkiewicz M., (2010), "Aronia Plants: A Review of Traditional Use, Biological Activities, and Perspectives for Modern Medicine", *J Med Food* 13 (2), 255-269

Kowalczyk E, Fijałkowski P, Kura M, Krzesinski P, Błaszczuk J, Kowalski J, Smigielski J, Rutkowski M, Kopff M. (2005), "The influence of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* on selected parameters of oxidative stress and microelements contents in men with hypercholesterolaemia" [in Polish]. *Pol Merkuriusz Lekarski* 2005;19:651–653.

Kowalczyk E, Kopff A, Fijałkowski P, Kopff M, Niedworok J, Błaszczuk J, Kedziora J, Tyslerowicz P. (2003), "Effect of anthocyanins on selected biochemical parameters in rats exposed to cadmium", *Acta Biochim Pol*;50:543–548.

Krenn L, Steitz M, Schlicht C, Kurth H, Gaedcke F. (2006), "Anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts of berries in food supplements—analysis with problems". *Pharmazie*; 62: 803–812.

Kulling SE, Rawel HM, (2008), "Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)—a review on the characteristic components and potential health effects", *Planta Med*;74:1625–1634.

Law, S. K. A., Reid, K. B. M, (1995), "Complement; 2nd ed.", IRL Press: Oxford.

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

Malien-Aubert C, Dangles O, Amiot MJ. (2001), "Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation", *J Agric Food Chem*; 49:170–176.

Malterud, K. E. (1998). "Procedure for assay of 15-lipoxygenase inhibition". Internat notat, Farmasøytisk Institutt, Seksjon for Farmakognosi, Universitetet i Oslo.

- Malterud, K. E. (2008). *"Bioassay metoder"*. Forelesningsnotater i FRM4030, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.
- Malterud, K. E., Farbrot, T. L., Huse, A. E. og Sund, R. B. (1993). *"Antioxidant and Radical Scavenging Effects of Anthraquinones and Anthrones."* Pharmacology 47: 77-85.
- Maritim, A.C.; Samders, R.A.; Waitkins, J.B., (2003), *"Effect of α lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats"*, J. Nutr. Biochem., 14, 288-294
- Matsui T, Ebuchi S, Kobayashi M, Fukui K, Sugita K, Terahara N, Matsumoto K., (2002), *"Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action"*, J. Agric Food Chem. Dec 4;50(25):7244-8.
- Matsui, T.; Ueda, T.; Oki, T.; Sugita, K.; Terahara, N.; Matsumoto, K., (2001), *" α -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity"*, J Agric Food Chem. Apr;49(4):1948-51.
- Matsui, T.; Ueda, T.; Oki, T.; Sugita, K.; Terahara, N.; Matsumoto, K., (2001), *" α -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. alpha-Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins"*, J Agric Food Chem. Apr;49(4):1952-6.
- Melikoglu MA, Kaldirimci M, Katkat D, Sen I, Kaplan I, Senel K. (2008), *"The effect of regular long term training on antioxidant enzymatic activities"*, J Sports Med Phys Fit; 48:388– 390.
- Niedworok J, Brzozowski F (2001), *"The investigation of a biological and phytotherapeutical properties of the Aronia melanocarpa E anthocyanins"* [in Polish]. Post Fitoter;1:20–24.
- Niedworok J, Gwardys A, Jankowski A, Kowalczyk E, Oszmianski J, Skoskiewicz J. (1999), *"Badania nad protekcyjnym wpływem _zelu antocyjaninowego na fototoksyczne działanie promieni UV"*, Ochr Srod Zas Nat;18:83–87.
- Ognik K, Rusinek E, Sembratowicz I, Truchlinski J., (2006), *"Contents of heavy metals, nitrate (V), and nitrate (III) in fruits of elderberry and black chokeberry depending on harvest site and vegetation period"*, [in Polish]. Rocz Panstw Zakl Hig;57:235–241.

Ohgami K, Ilieva I, Shiratori K, Koyama Y, Jin X, Yoshida K, Kase S, Kitaichi N, Suzuki Y, Tanaka T, Ohno S. (2005), "*Antiinflammatory effects of Aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis*", Invest Ophthalmol Vis Sci;46:275–281.

Oszmiański J (2002), "*Stabilization and application of anthocyanin chokeberry dye to colouring of beverages*" [in Polish], Acta Sci Pol; 1:37–45.

Oszmiański J, Sapis JC, (1988), "*Anthocyanins in fruits of Aronia melanocarpa (chokeberry)*". J Food Sci;53:1241–1242.

Oszmiański J, Wojdyło A (2005), "*Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity*", Eur Food Res Technol;221:809– 813.

Pacher P, Alex Nivorozhkin, Csaba Szabó. (2006), "*Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of Allopurinol*". Pharmacology Reviews 58, 87-114.

Parham, P., (2009), "*The immune system*", Garland Science, Taylor & Francis Group, London

Pool-Zobel BL, Bub A, Schroeder N, Rechkemmer G. (1999), "*Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells*", Eur J Nutr;38:227– 234.

Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G., (1986), "*The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin*". Phytochemistry 25, 223-230

Powers SK, Jackson MJ (2008), "*Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production*", Physiol Rev; 88: 1243–1276.

Puls, W; Keup, U.; Krause, H.P.; Thomas, G.; Hofmeister, F., (1977), "*Glucosidase Inhibition: A new approach to the treatment of diabetse, obesity and hyperlipoproteinaemia*", Naturwissenschaften, 64, 536-537

Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Alakomi HL, Oksman-Caldentey KM. (2005), "*Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens*", Appl Microbiol Biotechnol; 67: 8-18.

Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Alakomi HL, Oksman-Caldentey KM. (2005), "*The action of berry phenolics against human intestinal pathogens*", *Biofactors*;23:243–251.

Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Hartmann-Schmidlin S, Kahkonen M, Heinonen M, Maatta-Riihinen K, Oksman-Caldentey KM. (2005), "*Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens*", *J Appl Microbiol*;98:991–1000.

Razungles A, Oszmianski J, Sapis JC. (1989), "*Determination of carotenoids in fruit of Rosa sp. (Rosa canina and Rosa rugosa) and of chokeberry (Aronia melanocarpa)*". *J Food Sci*;54:774– 775.

Ryszawa A, Kawczynska-Drozd J, Pryjma J, Czesnikiewicz-Guzik M, Adamek-Guzik T, Naruszewicz M, Korbut R, Guzik TJ. (2006), "*Effects of novel plant antioxidants on platelet superoxide production and aggregation in atherosclerosis*", *J Physiol Pharmacol*; 57: 611–626.

Sarwa A, Ciołkowska-Paluch G (1990), "*Aronia czarnoowocowa*", *Wiad Zielar*;9: 22–23.

Scott R. W., Skirvin R. M., (2007), "*Black chokeberry (Aronia melanocarpa Minchx.): a semi-edible fruit with no pests*", *J Am Pomol Soc*;61:135–137.

Sharma, A. K. In: Galadari, E. O., Behara, I., Manchandra, M., Abdulrazzaq, S. K, Mehra, M. K. Eds., (1993), "*Diabetes Mellitus and its complications: an update*", 1st ed. Macmillan, New Delhi

Sies, H. ed., (1991) "*Oxidative stress. Oxidants and Antioxidants*", New York: Academic Press

Simeonov SB, Botushanov NP, Karahanian EB, Pavlova MB, Husianitis HK, Troev DM. (2002), "*Effects of Aronia melanocarpa juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus*", *Folia Med (Plovdiv)*;44:20–23.

Singleton, V. L.; Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M., (1999), "*Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent*"

Skoczyńska A, Jedrychowska I, Poreba R, Affelska-Jercha A, Turczyn B, Wojakowska A, Andrzejak R. (2007), "*Influence of chokeberry juice on arterial blood pressure and lipid parameters in men with mild hypercholesterolemia*", *Pharmacol Rep*;59: 177–182.

Skupień K, Ochman I, Grajkowski J., (2008), "*Influence of mineral fertilization on selected physical features and chemical composition of aronia fruit*", *Acta Agrophys* 11:213–226.

Smith HH (1933), "*Ethnobotany of the Forest Potawatomi Indians*", *Bull Pub Museum City Milwaukee*;7:75.

Stralsjo L, Ahlin H, Witthoft CM, Jastrebova J. (2003), "*Folate determination in Swedish berries by radioprotein-binding assay (RPBA) and high performance liquid chromatography (HPLC)*". *Eur Food Res Technol*;216:264–269.

Stroev E. A., Martynov E. G., (1979), "*Accumulation of polysaccharides under the influence of chlorocholine chloride in Aronia melanocarpa*", *Chem Nat Compd* 15:523–526.

Stroev E. A., Martynov E. G., (1979-1), "*Influence of chlorocholine chloride on the amount of anthocyanins in the fruit of Aronia melanocarpa*", *Chem Nat Prod*;15:359.

Swain, T., Hillis, W. E., (1959), "*J. Sci. Food Agric.*", 10. 63.

Thiel, S., Vorup-Jensen, T, Stover, C. M., Schwaeble, W., Laursen, S. B., Paulsen, K., Willis, A. C., Eggleton, P., Hamsen, S., Holmskov, U., (1997), "*Nature*", 386, 506-510.

Turner, W. T., (1996), "*Immunol. Today*", 17, 532-540

Urtekildens planteleksikon, http://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/aron_mel.htm

Valcheva-Kuzmanova S, Borisova P, Galunska B, Krasnaliev I, Belcheva A. (2004), "*Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from Aronia melanocarpa on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats*", *Exp Toxicol Pathol*;56:195– 201.

Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Mihova V, Krasnaliev I, Borisova P, Belcheva A. (2007), "*Antihyperlipidemic effect of Aronia melanocarpa fruit juice in rats fed a high cholesterol diet*", *Plant Food Hum Nutr*;62:19–24.

- Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Tancheva S, Belcheva A. (2007), "*Hypoglycemic effects of Aronia melanocarpa fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats*", *Methods Find Exp Clin*;29:101–105.
- Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Tsanova-Savova S, Mihova V, Krasnaliev I, Borisova P, Belcheva A. (2007), "*Lipid-lowering effects of Aronia melanocarpa fruit juice in rats fed cholesterolcontaining diets*", *J Food Biochem*;31:589–602.
- Valcheva-Kuzmanova S, Marazova K, Krasnaliev I, Galunska B, Borisova P, Belcheva A. (2005), "*Effect of Aronia melanocarpa fruit juice on indomethacin-induced gastric mucosal damage and oxidative stress in rats*", *Exp Toxicol Pathol*;56:385– 392.
- Valcheva-Kuzmanova SV, Belcheva A (2006), "*Current knowledge of Aronia melanocarpa as a medicinal plant*", *Folia Med (Plovdiv)*;48:11–17.
- Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S. (2004), "*Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia and Sambucus and their antioxidant capacity*". *J Agric Food Chem*;52:7846–7856.
- Yamada, H., (1999), "*The role of hioactive polysaccharides in kampo. In Pharmacological Research on traditional Herbal Medicine*"; Watanabe, H., Shibuya, T., Eds.; Harwood Academic Publisher: Amsterdam, The Netherlands, pp 179-196.
- Yamada, H.; Kiyohara, H., (1999), "*Complement activating polysaccharides from medicinal herbs. In Immiinomodulatory Agents from Plants*", Wagner, H., Ed.; Birkhauser Publishing: Basel, Switzerland, pp 161-202.
- Yao Y., Chen F., Wang M., Wang J., Ren G., (2008), "*Antidiabetic activity of Mung bean extracts in diabetic KK-Ay mice*", *J. Agric. Food Chem.* 56, 8869-8873
- Yu M, Li X, Zhano CC, Xu J, Zhang P. (2006), "*Triterpene constituents from seedlings of Aronia melanocarpa*", *J Asian Nat Prod Res*;9:365–372.
- Zlatanov MD, (1999), "*Lipid composition of Bulgarian chokeberry, black currants and rose hip seed oil*". *J Sci Food Agric*;79: 1620–1624.