

# Ekstrakter av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær hemmer CYP3A4 *in vitro*

Stine Karen Bjøringsøy



Masteroppgave i farmasi  
Avdeling for farmasøytisk kjemi og farmasøytisk  
biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2013



---

# Ekstrakter av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær hemmer CYP3A4 *in vitro*

Stine Karen Bjøringsøy



Masteroppgave i farmasi  
Avdeling for farmasøytisk kjemi og farmasøytisk biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2013

Veiledere:

Førsteamanuensis Hilde Barsett  
Professor Hege Christensen

---

© Forfatter Stine Karen Bjøringsøy

År 2013

Tittel Ekstrakter av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær hemmer CYP3A4 *in vitro*

Forfatter Stine Karen Bjøringsøy

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

---

# Forord

Denne masteroppgaven ble utført i høstsemesteret 2012 og vårsemesteret 2013. Først vil jeg rette en stor takk til veilederene mine Hilde Barsett og Hege Christensen for god veiledning og råd underveis og spesielt i den intense slutfasen. Deres engasjement, oppmuntring og vilje til å stille opp har hatt stor betydning.

Tusen takk også til:

- Overingeniør Siri Johannesen for hyggelig samarbeid og hjelp til praktisk tilrettelegging av CYP3A4-forsøk og LC-MS kjøring.
- Karl Egil Malterud for hjelp til DPPH-scavenging og utførelse av <sup>1</sup>HNMR-spektroskopi.
- Mamma og pappa for god hjelp og støtte, dere er enestående.
- Rolf Hjelmstad for tillatelse til å anvende flotte bilder av bær fra nettstedet hans.
- Jentene som jeg har delt kontor med for en minneverdig og hyggelig masterperiode.

Oslo, mai 2013

*Stine Karen Bjøringsøy*

---

# Innholdsfortegnelse

1	Sammendrag .....	8
2	Innledning.....	10
2.1	Generell innledning .....	10
2.1.1	Blåbær, <i>Vaccinium corymbosum</i> og <i>Vaccinium myrtillus</i> .....	13
2.1.2	Amerikanske tranebær, <i>Vaccinium macrocarpon</i> .....	15
2.1.3	Tyttebær, <i>Vaccinium vitis-idaea</i> .....	16
2.2	Legemiddelmetabolisme.....	17
2.2.1	Metabolisme .....	17
2.2.2	Cytokrom P450 (CYP) systemet .....	17
2.2.3	CYP3A-enzymmer .....	19
2.3	Legemiddelinteraksjoner .....	20
2.4	Rekombinant <i>in vitro</i> modell.....	20
2.4.1	Midazolam som CYP3A4-modellsubstrat .....	21
2.5	Hensikt.....	21
3	Materialer og metoder .....	22
3.1	Tilberedning av bærmateriale .....	22
3.1.1	Frysetørking .....	23
3.1.2	Varmeskap.....	23
3.1.3	Pulverisering av de tørkede bærene .....	24
3.2	Ekstraksjonsmetoder.....	25
3.2.1	Ekstraksjon av bærmateriale med organiske løsemidler ved hjelp av Soxhlet ..	25
3.2.2	Ekstraksjon med diklormetan.....	26
3.2.3	Ekstraksjon med 96%-etanol.....	27
3.2.4	Ekstraksjon med 50%-etanol.....	28
3.2.5	Ekstraksjon med vann .....	28
3.2.6	Filtrering.....	29
3.2.7	Sentrifugering.....	30
3.2.8	Inndamping på rotavapor .....	30
3.3	Undersøkelse av CYP3A4-inhiberende aktivitet.....	31
3.4	DPPH-Scavenging .....	35
3.5	<sup>1</sup> H NMR.....	37

---

4	Resultater og diskusjon .....	38
4.1	Bærekstraktene .....	38
4.2	Undersøkelse av CYP3A4-inhiberende aktivitet av ulike bærekstrakter .....	38
4.3	Radikalscavenging aktivitet.....	45
4.4	<sup>1</sup> H NMR.....	48
5	Konklusjon .....	51
6	Vedlegg – <sup>1</sup> H NMR spektra .....	52
	Kilder.....	55

---

# 1 Sammendrag

**Introduksjon:** I de senere år har det vært et stort fokus på et sunt kosthold bestående av mye frukt og bær og de helsebringende effektene dette medfører. Det er imidlertid holdepunkter for at inntak av visse typer frukt og bær kan forårsake interaksjoner med legemidler som metaboliseres av cytokrom P450 (CYP) 3A4. Mest kjent er grapefruktjuice som inneholder furanokoumariner og som har vist å hemme CYP3A4. Hensikten med denne oppgaven var å ekstrahere hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær med ulike løsemidler, -for videre å undersøke om de ulike bærekstraktene påvirker CYP3A4 *in vitro*.

**Metoder:** For å isolere forskjellige typer substanser i hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær ble bærene ekstrahert med ulike løsemidler; diklormetan, 96%-etanol, 50%-etanol og vann. Videre ble de ulike ekstraktene undersøkt for inhibering av CYP3A4-aktivitet. Dette ble gjort ved å inkubere prøvene med mikrosomer som uttrykker CYP3A4 og midazolam som CYP3A4 modellsubstrat. LC-MS ble brukt til å analysere dannelsen av midazolams to hovedmetabolitter 1'-OH-MDZ og 4'-OH-MDZ. DPPH-scavenging ble brukt til å teste innholdet av antioksidanter i bærene. Ved hjelp av <sup>1</sup>H NMR ble det foretatt en identifikasjon av ulike substanser i diklormetaneekstraktet, 96%-etanolekstraktet og 50%-etanolekstraktet.

**Resultater:** Innledende screening av de ulike bærekstraktenes evne til å hemme CYP3A4 viste at diklormetaneekstraktene og 50%-etanolekstraktene hemmet metabolismen i størst grad. Diklormetaneekstraktene av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær hadde IC<sub>50</sub>-verdier på henholdsvis 56±25 µg/ml, 72±19 µg/ml, 64±54 µg/ml og 62±10 µg/ml. IC<sub>50</sub>-verdier for 50%-etanolekstraktene av hageblåbær og skogsblåbær var 425±229 µg/ml og 367± 247 µg/ml. DPPH-scavenging aktivitet viste at 50%-etanolekstraktet av skogsblåbær hadde det høyeste innholdet av antioksidanter med en IC<sub>50</sub>-verdi for DPPH-aktivitet på 36±2 µg/ml. Videre hadde hageblåbærs 50%-etanolekstrakt en IC<sub>50</sub>-verdi på 45±2 µg/ml og tranebærs 50%-etanolekstraktet en IC<sub>50</sub>-verdi på 48±2 µg/ml med henhold til DPPH-aktivitet. Aromater og fettstoffer ble påvist i diklormetaneekstraktene ved hjelp av <sup>1</sup>H NMR. Hageblåbærs, skogsblåbærs, tranebærs og tyttebærs 50%-etanolekstrakter inneholdt proantocyanidiner.



---

**Konklusjon:** Diklormetaneekstraktene og 50%-etanolekstraktene av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær hemmet CYP3A4 *in vitro*. De ekstraktene som viste høyest DPPH-radikalscavenger aktivitet var 50%-etanolekstraktene av hageblåbær, skogsblåbær og tranebær. <sup>1</sup>H NMR-spektroskopi viste innhold av proantocyanidiner i 50%-etanolekstraktene og disse kan ha bidratt til CYP3A4-hemming.

---

## 2 Innledning

### 2.1 Generell innledning

Det har i de siste årene vært økt fokus på de positive helseeffektene av frukt og bær. I takt med økt oppmerksomhet rundt frukt og bær har også inntaket økt. Regelmessig inntak blir stadig mer aktuelt som helsebringende tiltak.

Tall fra 2012 viser at bærforbruket har skutt i været. Bær er den store vinneren på frukt og grønt fronten. Driker av most frukt og bær er blitt en populær måte å få i seg ernæring på. Både blåbær, bringebær og jordbær er nå tilgjengelig hele året. Å etterstrebe sunnhet og helse er blitt et stadig mer fremtredende tegn i dagens samfunn. Gjennom de senere årene har man sett en betydelig økning i vektleggingen av å oppnå de sunne verdiene i dagliglivet. Oppfatningene om hva og hvordan man bør oppnå dette gjennom f.eks spisevaner og treningsvaner er blitt et krevende prosjekt. Et av tiltakene er å investere i sunnhet og helse i form av bær (grønt 2013).

Frukt og bær kan forårsake interaksjoner med legemidler. Det mest kjente eksempelet er interaksjoner mellom legemidler og grapefruktjuice, siden denne inneholder substanser som hemmer aktiviteten til cytokrom P450 (CYP) enzymet CYP3A4 (Bailey et al. 1989). Dette enzymet er det kvantitativt viktigste legemiddelmetaboliserende enzymet i kroppen.

Kostholdet er en av mange faktorer som kan påvirke farmakokinetikken til legemidler vi inntar. Tradisjonelt er påvirkningen av kostholdet blitt assosiert til endret absorpsjon fra gastrointestinal lumen, men forskning viser at matvarer også kan endre legemiddelmetabolismen.

Frukt og bærs evner til å påvirke legemiddelmetabolismen fikk oppmerksomhet på slutten av 1980-årene etter et overraskende funn i forbindelse med inntak av grapefruktjuice (Bailey et al. 1989) Det ble utført en interaksjonsstudie hvor en testet om alkohol påvirket kalsiumantagonisten felodipin. Grapefruktjuice ble benyttet for å maskere alkoholsmaken. Det ble observert langt høyere serumkonsentrasjoner av felodipin hos pasientene som fikk alkohol enn de som inntok legemidlet med vann. Det ble mistenkt at det var grapefruktjuicen som økte serumkonsentrasjonen av felodipin-, noe som senere er blitt bekreftet (Malhotra et

---

al. 2001). I industriell juiceproduksjon er det vanlig å presse frukten uskrelt. Bakgrunnen for interaksjonen er furanokoumariner i grapefrukt som hemmer enzymet CYP3A4 (Fukuda et al. 1997). Siden skallet inneholder høyere konsentrasjoner av furanokoumariner enn fruktkjøttet, vil man vente sterkere interaksjon med juice enn med skrelt frukt (Molden and Spigset 2007).

I etterkant av det oppsiktsvekkende grapefruktjuicefunnet er det blitt undersøkt om dette også gjelder for andre sitrusfrukter. Studier viser at vanlig appelsinjuice ikke påvirker CYP3A4, men at enzymet kan hemmes av juice laget av bitterappelsin (*Citrus aurantium*). Graden av CYP3A4-hemmende effekt av substanser i grapefrukt- og bitterappelsinjuice er omtrent den samme (Malhotra et al. 2001). Det grønne kjøttet i bitterappelsinene er for surt og bittert til å kunne spises, men av det gulaktige skallet utvinnes det en olje som brukes som smaksingrediens i kaker, konditorvarer og te. Bitterappelsiner anvendes ofte hermetisert eller kokt i marmelade, syltetøy og sauser. Det er uvisst om bitterappelsiner brukt i næringsmidler kan forårsake interaksjon med legemidler. Pomelo (*Citrus maxima*) er en stor sitrusfrukt med grønt skal. Pomelo slekter på grapefrukt, men den er søtere og har tørrere konsistens samt at den ikke er fullt så besk i smak. I likhet med grapefrukt og bitterappelsiner inneholder pomelo stoffer som hemmer CYP3A4. Hemmingen ser ut til å være omtrent like sterk som for grapefrukt (Egashira et al. 2004). Sitron og lime er i liten grad blitt undersøkt som potensielle hemmere av metaboliserende enzymer. I en studie ble det observert en økning i serumkonsentrasjonen av felodipin etter inntak av 250 ml fortynnet limejuice hos to av åtte friske forsøkspersoner, men den ikke ble påvirket hos de seks andre (Bailey et al. 2003).

*In vitro* studier indikerer at stjernefrukt (*Averrhoa carambola*) inneholder stoffer som hemmer CYP3A4 (Hidaka et al. 2004). I rotter er det vist at samtidig administrering av stjernefruktjuice øker serumkonsentrasjonen av CYP3A4-substratet karbamazepin med gjennomsnittlig 30 % (Hidaka et al. 2006). Granateple (*Punica granatum*) finnes i ulike varianter med forskjellig innhold av antocyaniner som gir fruktkjøttet rundt frøene i kjernen den intense rødfargen. Frukten inneholder høye konsentrasjoner av antioksidanter. Det er kommet rapporter som viser at granateple inneholder stoffer med hemmende effekt overfor CYP3A4 og CYP2C9 (Hidaka et al. 2005) (Nagata et al. 2007). Når det gjelder effekten på CYP3A4 er det rapportert motstridende data (Farkas et al. 2007). Skallet på røde druer inneholder substanser med hemmende aktivitet overfor CYP3A4. Kliniske studier har gitt motstridende resultater, noe som kan skyldes at innholdet med stoffer som påvirker CYP3A4 varierer avhengig av druetype, dyrkested eller tidspunkt for innhøstning (Chan et al. 1998).

---

En type bær som er blitt studert i forhold til eventuell hemming av CYP-enzymmer er tranebær (*Vaccinium macrocarpon*). Tranebær har lenge blitt brukt i folkemedisinen til forebygging og behandling av urinveisinfeksjon. I litteraturen er det beskrevet flere tilfeller av økt INR-nivå og blødning hos pasienter som går på warfarin samtidig med inntak av tranebær. Det mistenkes at enzymet CYP2C9 hemmes *in vitro*, -hvilket man ikke har klart å vise i kliniske studier (Rindone and Murphy 2006). *In vitro* studier er utført for aroniabær med midazolam som testsubstans og rekombinant CYP3A4 som enzym (Braunlich et al. 2013). Ekstrakter, subfraksjoner, isolerte antocyaniner og procyanidiner og to fenoliske syrer fra aroniabær ble undersøkt for CYP3A4 inhibitorisk effekt. Procyanidin B5 var en sterkere CYP3A4 hemmer enn den isomeriske procyanidin B2 og kan sammenlignes med bergamottin som er en kjent CYP3A4 hemmer i grapefruktjuice. Lignede aktivitet ble funnet i 50%-etanolekstraktet og fire subfraksjoner av dem. Av antocyaninene viste cyanidin 3-arabinoside sterkere CYP3A4 effekt enn cyanidin 3-galactoside og cyanidin 3-glucoside. Den CYP3A4 inhibitoriske effekten ser ut til å avhenge av sukkeret som er koblet til antocyanidin. Disse substansene i aroniabær kan potensielt føre til en interaksjon med legemidler ved å hemme CYP3A4, men dette er ikke foreløpig rapportert *in vivo* (Braunlich et al. 2013).

Interaksjoner mellom bær- og frukttyper og legemidler er et område som det stadig blir større interesse for. Det stilles ikke krav om interaksjonsstudier med næringsmidler for legemidler, og det er en mulig grunn til at det ikke forskes så mye på dette. I tillegg må man være oppmerksom på at motstridende data kan skyldes at den potensielle substansen som forårsaker interaksjon kan variere avhengig av sort, dyrkested og tidspunkt for innhøstning av de aktuelle frukt- og bærtyper (Molden and Spigset 2007).

---

### 2.1.1 Blåbær, *Vaccinium corymbosum* og *Vaccinium myrtillus*



Figur 1. *Vaccinium myrtillus* (Foto ©: Rolf Hjelmstad).

Blåbær deles hovedsakelig inn i to hovedgrupper: skogsblåbær (*Vaccinium myrtillus*) (Figur 1) og hageblåbær (*Vaccinium corymbosum*) (Figur 2). Skogsblåbær er klassifisert som handelsvare i urtelisten (Lovdata 2013). Hageblåbær er ikke nevnt i urtelisten og kan dermed kun ansees som et næringsmiddel. Skogsblåbær (*Vaccinium myrtillus*) tilhører lyngfamilien (*Ericaceae*) og er en krypende busk. Den har lysegrønne til rosa eller rødaktige krukkeformede blomster som utover i juli blir til runde, blåsvarte bær. Skogsblåbær vokser naturlig i Europa, Vest-Asia og Rocky Mountains i Nord-Amerika (Hjelmstad 2011).



Figur 2. *Vaccinium corymbosum* (Foto: Bama 2013).

---

Hageblåbær (*Vaccinium corymbosum*) tilhører også lyngfamilien (*Ericaceae*) og er en busk på 1-3 meter. Den har store grønne blader og klokkeformede hvite eller lyserosa blomster. Bærene er store, mellom 6,4-13mm (Wikipedia 2013). I engelskspråklige land går hageblåbær under navnet «blueberry», mens skogsblåbær går under navnet «bilberry», «huckleberry», «hurtleberry» eller «whortleberry» (Hjelmstad 2011).

I Norge er blåbær mest kjent som de viltvoksende bærene vi finner i skogen på sensommeren og som gjør oss blå i munnen, på tungen og leppene når vi spiser dem. Dette bæret har et rødblått fruktkjøtt. Mest omsatt i næringsmiddelbransjen er blåbær dyrket på busk, - såkalte hageblåbær. Sammenlignet med skogsblåbær er de større, søtere og med en mildere aroma. Blåfargen er begrenset til skinnen (man blir ikke blå på tungen, leppene og tennene av å spise hageblåbær).

Tradisjonelt er blåbær blitt brukt mot diarè, dysenteri, betennelser i magen, skjorbuk, influensa og øyesykdommer i folkemedisinen (Myskja 2006). Blåbær inneholder antocyanidiner (hovedsakelig galaktosider og glukosider av cyanidin, delfidin og malvidin) og askorbinsyre (C-vitamin).

I dag brukes blåbær til mer enn pannekaker, og omsetningen av blåbærprodukter har skutt i været. Det er mye fokus på hvor sunt blåbær er grunnet det høye innholdet av antioksidanter. I dag anvendes blåbær også i stor grad i næringsmidler. I tillegg til viltvoksende skogsblåbær, finnes det en rekke fristende skogsblåbærprodukter på markedet som juice, saft, syltetøy, yoghurt og bærblandinger. Hageblåbær fås kjøpt ferske året rundt. Fra bær til kapsel på kosttilskuddsmarkedet finnes det et preparat-Medox som blant annet inneholder skogsblåbær. Skogsblåbærene kommer fra Nord-Sverige. Hver kapsel inneholder 80 mg antocyaner. De to typene antocyanene brukes finns også i solbær. Solbærene som benyttes i produksjonen kommer enten fra Norge eller New Zealand (Medox 2013).

---

## 2.1.2 Amerikanske tranebær, *Vaccinium macrocarpon*



**Figur 3.** *Vaccinium macrocarpon* (Foto©:Wikimedia).

Amerikanske tranebær (*Vaccinium macrocarpon*) (Figur 3) tilhører også lyngfamilien (*Ericaceae*) og er en lavtvoksende busk. Den har små læraktige blader og røde bær som kan bli opptil 2 cm i diameter. Amerikanske tranebær er naturlig utbredt i østlige Nord-Amerika. I tillegg dyrkes det i stor grad i de nordvestlige delene av USA (Hjelmstad 2012).

*Vaccinium macrocarpon* er ikke klassifisert som et legemiddel i urtelisten, men som en handelsvare (Lovdata 2013). På det norske markedet finnes tranebær i kosttilskudd som både kapsler og saft. Som næringsmiddel finnes det i juiceform, i nøtteblandinger, frossen tilstand og som tørkede bær. Tranebær brukes ofte i mat, spesielt som gele og stuffing til kalkun, og tranebærjuice er populært å blande med vodka (som i drinken cosmopolitan).

Tradisjonelt er tranebær blitt brukt til å behandle og forebygge urinveisinfeksjon. Tranebær er også blitt brukt mot nyrestein. Bærene inneholder proantocyanidiner som muligens er viktige for den antibakterielle effekten. I tillegg inneholder bærene antocyanidiner, syrer (sitronsyre, malinsyre og quininsyre) og karbohydrater i tranebær (Heinrich et al. 2004).

Et helt nytt kosttilskudd på markedet er Nycoplus ® Tranebær med blåbær som er et høykonsentrert tranebær- og blåbærekstrakt. Tranebærekstraktet inneholder 36 mg proantocyanidiner, og blåbærekstraktet inneholder 12,5 mg antocyaner. Indikasjonen for kosttilskuddet er at det kan være godt for urinveiene og at det kan hjelpe ved lette symptomer på blærekatarr (Nycomed 2013).

---

### 2.1.3 Tyttebær, *Vaccinium vitis-idaea*

Også tyttebær (*Vaccinium vitis-idaea*) (Figur 4) tilhører lyngfamilien (Ericaceae) og er en 5-30 cm høy og vintergrønn dvergbusk. Tyttebær har klokkeformede, hvite, eller svakt rødlige blomster som blomstrer i mai/juni (Hjelmstad 2011). Tyttebærene er mørkerøde som modne bær i august/september med en frisk smak. Tyttebær inneholder askorbinsyre og retinolsyre (A-vitamin), glykosidene arbutin og vaccininin, pektin og organiske syrer som benzoesyre og salisylsyre. *Vaccinium vitis-idaea* er klassifisert som en handelsvare i urtelisten (Lovdata 2013). Den syrlige, friske smaken gjør tyttebær velegnet som tilbehør til middagsmåltid. Tyttebær benyttes da gjerne som syltetøy eller tyttebærrømme. I Norge er trollkrem en tradisjonsrik dessert med tyttebær i hovedrollen.



Figur 4. *Vaccinium vitis-idaea* (Foto©: Rolf Hjelmstad).



---

## 2.2 Legemiddelmetabolisme

### 2.2.1 Metabolisme

Når et legemiddel administreres peroralt vil det i varierende grad nå systemiske kretsløp grunnet flere prosesser på veien som kan eliminere legemidlet, dette kalles førstepassasjemetabolisme. Leveren er hovedorganet for slik metabolisme på grunn av sitt høye innhold av legemiddelmetaboliserende enzymer. Til tross for dette er tynntarmen sentral for begrensning av biotilgjengeligheten på grunn av at den metaboliserer legemidler og andre xenobiotika før systemisk opptak. På denne måten reduseres legemidlets biotilgjengelighet i første instans. Årsaken til dette er at legemidler som tas oralt må passere fra gastrointestinal lumen, gjennom tarmveggen, for deretter å passere leveren før det når det systemiske kretsløp (Rowland and Tozer 1995).

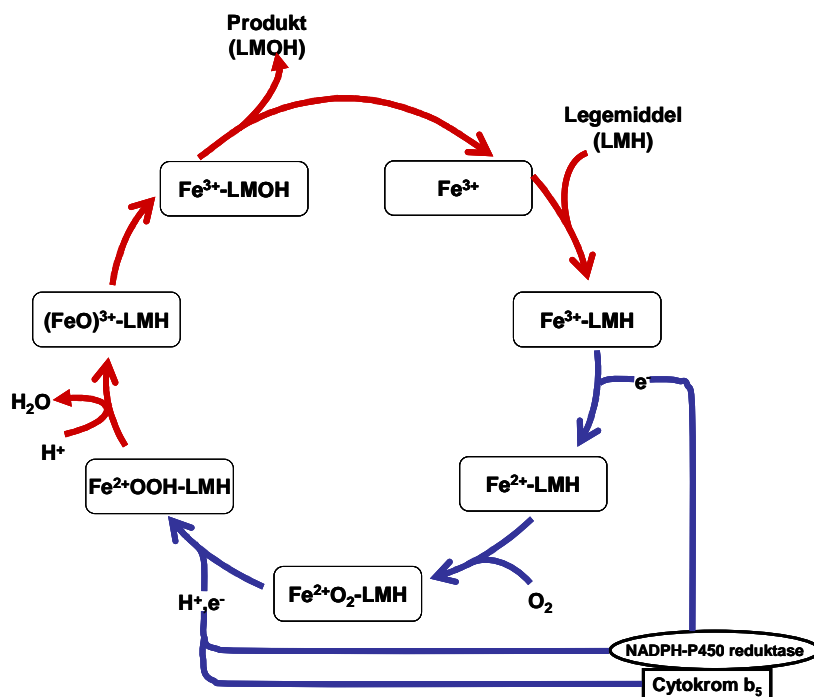
Legemiddelmetabolisme deles inn i to ulike biokjemiske reaksjoner som klassifiseres som fase 1 eller fase 2 reaksjoner. Fase 1-reaksjoner introduserer en funksjonell gruppe på legemidlet via oksidasjon, reduksjon eller hydrolyse. Denne typen reaksjoner fører generelt til tap av farmakologisk aktivitet. I enkelte tilfeller kan det dannes metabolitter med potent biologisk aktivitet eller toksiske egenskaper. Fase 2-reaksjoner konjugerer legemiddel eller metabolitter med polare grupper for å gjøre det mer vannløselig så det lettere blir eliminert fra kroppen (Goodman et al. 2011).

### 2.2.2 Cytokrom P450 (CYP) systemet

Den første delen av navnet, cytokrom, skyldes enzymenes fargepigment som gir leveren dens karakteristiske brune farge. Den andre delen, P-450, kommer av at enzymene absorberer lys med en bølgelengde på rundt 450 nm. Det humane CYP-enzymssystemet består av heme-tiolat enzymer (Lewis 2004), hvor enzymene klassifiseres i undergrupper basert på hvor lik aminosyrefrekvensen er. Enzymer med mer en 40 % likhet i aminosyrefrekvens havner i samme familie karakterisert ved et arabisk nummer etter forkortelsen CYP, for eksempel CYP<sub>3</sub>. Ved mer enn 60 % likhet er enzymene i samme subfamilie karakterisert ved en latinsk bokstav, CYP<sub>3A</sub>. Deretter blir hvert enkelt isoenzym karakterisert ved et nytt arabisk nummer CYP<sub>3A</sub><sub>4</sub> (Anzenbacher and Anzenbacherova 2001).

CYP-enzymfamiliene 1-3 metaboliserer legemidler og andre eksogene stoffer og inneholder det største antallet av enzymer (Lewis 2004). De gjenstående enzymfamiliene er hovedsakelig involvert i metabolisme av endogene forbindelser som steroider, fettsyrer og prostaglandiner (Lewis 2004).

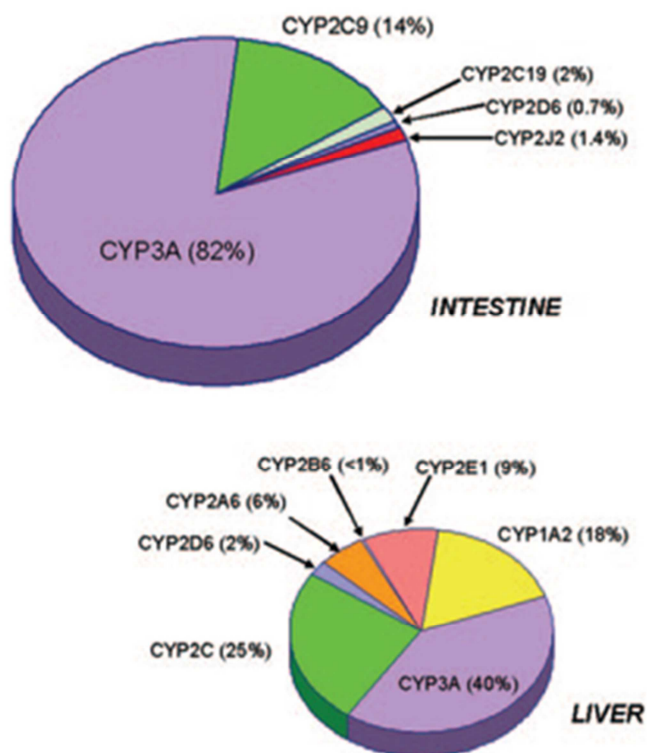
CYP-enzymmer er hovedansvarlig for legemiddelmetabolismen som primært finner sted i lever og tarm. Mange legemidler er fettløselig og må derfor metaboliseres til mer vannløselige substanser før de kan skilles ut i nyrene. Omdannelsen av legemiddel (LMH) skjer ved at det binder seg til CYP-enzymets heme-gruppe ( $\text{Fe}^{3+}$ ) som gjør at det skjer en konformasjonsendring av enzymet (Figur 5). Konformasjonsendringen gjør at det skjer en elektronoverføring fra NADPH via NADPH-P450-reduktase, til  $\text{Fe}^{3+}$ -LMH-komplekset som fører til at  $\text{Fe}^{3+}$  reduseres til  $\text{Fe}^{2+}$ . Molekylært  $\text{O}_2$  binder seg til det reduserte komplekset og dekomponerer det til  $\text{H}_2\text{O}$  og  $(\text{FeO})^{3+}$ -LMH. Dekomponeringen skjer på grunn av en ny elektronoverføring fra NADPH-P450-reduktase eller cytokrom  $b_5$  i tillegg til overføring av to protoner. Til slutt blir legemidlet hydrolysert og enzymet regenereres (Lin and Lu 2001).



Figur 5. Katalytisk syklus for CYP-enzymmer (Rang and Dale 2007).

### 2.2.3 CYP3A-enzymmer

CYP3A-enzymene representerer den kvantitativt viktigste subfamilien innen CYP-enzymssystemet, både med tanke på utbredelse i tarm og lever, men også med hensyn på metabolismegraden. Leveren er det organet med mest CYP-enzymmer deretter kommer tarmen. CYP3A utgjør 40% av mengden CYP-enzymmer i leveren og 80% av mengden i tarmen (Figur 6) (Paine et al. 2006). Mye tyder på at tarmen utgjør en viktig rolle i presystemisk CYP3A-mediert metabolisme siden mengden CYP3A av totalinnholdet av CYP i tarm er det dobbelte av det samme forholdet i lever (Paine et al. 2006). CYP3A metaboliserer halvparten av legemidlene som er i klinisk bruk (Goodman et al. 2011). Biotilgjengeligheten til legemidler som inntas peroralt vil først påvirkes av CYP3A i tarmen, før biotilgjengeligheten påvirkes av CYP3A i lever. Den humane CYP3A-subfamilien består av isoenzymene CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 og CYP3A43 (Lewis 2004).



Figur 6. Oversikt over CYP3A bidrag til totalt CYP-innhold i tarm og lever (Paine et al. 2006).

CYP3A4 er som tidligere nevnt det kvantitativt viktigste isoenzymet i CYP3A-subfamilien. Det er rapportert store interindividuelle variasjoner i hepatisk CYP3A4-uttrykk med 37 ganger forskjell i konsentrasjon (Shimada et al. 1994, Thummel et al. 1994). Den interindividuelle forskjellen i evnen til å metabolisere legemidler skyldes miljømessige og

---

genetiske variasjoner (Thummel et al. 1994). Enzymaktiviteten påvirkes av faktorer som mat, drikke, infeksjoner, hormoner og bruk av andre legemidler. I 2011 ble det oppdaget at allelvarianten CYP3A4\*22 er assosiert med lavt hepatisk CYP3A4-uttrykk og CYP3A4-aktivitet (Wang et al. 2011).

## 2.3 Legemiddelinteraksjoner

Interaksjoner oppstår når et legemiddel eller næringsmiddel som påvirker aktiviteten til et CYP-enzym kombineres med et annet legemiddel som brytes ned av samme enzymet. Farmakokinetiske interaksjoner oppstår når et legemiddel eller næringsmiddel forandrer absorpsjonen, distribusjonen eller eliminasjonen til et annet legemiddel slik at plasmakonsentrasjonen i kroppen endres. Det kan skje en induksjon eller inhibisjon av CYP-enzymene. Ved induksjon øker CYP-aktiviteten slik at legemiddelet metaboliseres raskere enn vanlig. Dette kan redusere konsentrasjonen av legemiddelet i kroppen slik at dosen blir for lav. Ved en inhibisjon reduseres CYP-aktiviteten slik at legemiddelet metaboliseres saktere enn før og pasienten vil få økt konsentrasjon av legemiddel i kroppen. Den forhøyede legemiddelkonsentrasjonen kan medføre økt risiko for bivirkninger og toksiske effekter. I prinsippet kan en alltid ved en farmakokinetisk interaksjon justere ned eller opp dosen slik at plasmakonsentrasjonen blir den samme som før inntak av CYP3A4-hemmer.

## 2.4 Rekombinant *in vitro* modell

Hensikten med *in vitro* metabolismestudier er å predikere farmakokinetiske forhold *in vivo*. Rekombinante *in vitro* modeller, der cDNA for de ønskede enzymene er transfektert inn i insektsceller, kan benyttes i metabolismestudier siden insektsceller hverken har endogent CYP eller UGT. Et *in vitro* system som dette kalles gjerne for baculosomer, skjønt den vanligste betegnelsen er supersomer etter handelsnavnet Supersomes™ (Brandon et al. 2003).

---

### 2.4.1 Midazolam som CYP3A4-modellsubstrat

Midazolam (MDZ) er et lipofilt, basisk og korttidsvirkende benzodiazepin med en molekylvekt på 325,8 g/mol (Olkkola and Ahonen 2008). Midazolam metaboliseres hovedsakelig av CYP3A4, men også av CYP3A5 i en svært liten grad. Det første trinnet i metabolismen er at det skjer en hydroksylering av midazolam til 1-hydroksymidazolam (1'-OH) og 4-hydroksymidazolam(4'-OH). Hovedmetabolitten 1-hydroksymidazolam er farmakologisk aktiv, men 4-hydroksymidazolam er inaktiv (Olkkola and Ahonen 2008). Midazolam er en anerkjent probe på CYP3A aktivitet siden den metaboliseres utelukkende av CYP3A4 og CYP3A5 og er ingen hemmer av disse enzymene. Metabolismen av midazolam kan dessuten korreleres til CYP3A-aktivitet i både tarm og lever, og kan påvirkes av hemming, induksjon og interindividuell variasjon (Chung et al. 2006).

## 2.5 Hensikt

Omtrent halvparten av legemidlene på markedet metaboliseres via CYP3A4. Det har i de senere årene vært økt fokus på interaksjoner mellom frukt/bær og legemidler etter at det ble oppdaget at furanokoumariner i grapefrukt er en potent hemmer av CYP3A4. I dagens samfunn er det økt fokus på en sunn livsstil med høyt inntak av frukt og bær.

Målet med denne oppgaven var å ekstrahere hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær med ulike løsemidler for deretter å undersøke ekstraktene for CYP3A4-hemming og antioksidant aktivitet. Samt få informasjon om innholdsstoffer i de forskjellige ekstraktene, sammenligne innhold av substanser i de forskjellige bærtypene og om mulig relatere CYP3A4-hemming til innholdsstoffer.

---

## 3 Materialer og metoder

### 3.1 Tilberedning av bærmateriale

#### Prinsipp

Bærene må knuses og tørkes før bærene blir pulverisert og ekstrahert med ulike løsemidler. Dette gjøres for å få en mest mulig effektiv ekstraksjon hvor man trekker ut ønskede stoffer.

#### Materiale

Tabell 1. Oversikt over de ulike bærene som har blitt benyttet til ekstraksjon.

Bærmateriale	Produsent	Opprinnelsesland	Mengde (g)
Hageblåbær	Bama	Nederland	635
Skogsblåbær	Bama	Sverige	453
Tranebær	Habelman Bros Company	USA	1031
Tyttebær	Bama	Sverige	924

#### Utstyr

Stor morter og pistill

Liten morter og pistill

Rundkolber

#### Prosedyre

1. Frosne bær ble knust i morter med pistill og overført til rundkolber.
2. Det knuste bærmaterialet ble satt til innfrysning fram til frysetørking.

---

### **3.1.1 Frysetørking**

#### **Prinsipp**

Frysetørking er en metode som benyttes for å fjerne vann fra nedfrost materiale. Dette skjer ved en temperatur under 0 °C og trykket må være lavere enn metningstrykket til is.

Vanndampen som blir dannet, fjernes ofte ved utfrysning på en kald overflate (Lorentzen 2013).

#### **Materiale**

Frosne og knuste bær av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær

Ekstrakter av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær

#### **Utstyr**

Fryser -20° C

Metanolbad - 40 °C, Hetofrig (Heo Birkerød, Danmark)

Frysetørker, Alpha 1-4 CHRIST (Vakuüm-Service AS, Lørenskog)

Rundkolbe

#### **Prosedyre for frysetørking av bær**

1. Rundkolbe med fryst og knust bærmateriale ble satt på frysetørker og ble stående til det var tørt eller til det ikke ble tørrere.

#### **Prosedyre for frysetørking av løsninger**

1. Bærekstraktløsningene ble overført til rundkolber og fryst ned på metanolbad.

2. Rundkolbe med fryst bærekstraktløsning ble satt på frysetørker og ble stående til det var tørt eller til det ikke ble tørrere.

### **3.1.2 Varmeskap**

#### **Prinsipp**

Et varmeskap har regulerbar varme og kan brukes til å tørke plantemateriale. Ikke alle bærtypene virket helt tørre etter frysetørking, så de ble ytterligere tørket i varmeskap.

---

## **Materiale**

Tyttebær

Skogsblåbær

## **Utstyr**

Varmeskap: Termaks, temperatur mellom 40-44 °C i ca 24 timer.

Aluminiumsfolie

## **Prosedyre**

1. Bærene ble fordelt utover på en aluminiumsfolie og satt i varmeskap til de var tørre.

### **3.1.3 Pulverisering av de tørkede bærene**

#### **Prinsipp:**

Bærene pulveriseres før ekstraksjon for å få et størst mulig utbytte.

## **Materiale**

Tørket hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær

## **Utsyr**

Hansker

Liten morter og pistill

Stor morter og pistill

## **Prosedyre**

1. Bærene ble først grovknust ved hjelp av hanskekledde hender.

2. Deretter ble bærene pulverisert med morter og pistill.



## 3.2 Ekstraksjonsmetoder

Ved å benytte ulike ekstraksjonsmidler basert på “ likt løser likt” prinsippet vil ulike forbindelser ekstraheres ut fra bærmaterialene.

Det ble benyttet fire typer ekstraksjonsmidler diklormetan, 96%-etanol, 50%-etanol og vann.

### 3.2.1 Ekstraksjon av bærmateriale med organiske løsemidler ved hjelp av Soxhlet



Figur 7. Soxhletoppsett.

#### Prinsipp

Ved ekstraksjon med Soxhlet er det mulig å trekke ut ikke-flyktige, kjemiske komponenter fra faste stoffer. Figur 7 viser hvordan et Soxhletoppsett ser ut. Organiske løsemidler blir varmet opp til kokepunktet hvor de fordamper. Deretter avkjøles dampen i en tilbakeløpskjøler (1) og renner ned i beholderen med bærmateriale. Væsken samles opp i en Soxhletekstraktor (2)

---

hvor filteret med bærmaterialet er plassert. Slik blir stoffer som er løselig i det aktuelle løsemiddelet ekstrahert. Ekstraksjonen kan utføres med lipofile løsemidler som ekstraherer lipofile stoffer eller polare løsemidler som løser polare stoffer. Ekstraktet samles opp i rundkolben (3) som i utgangspunktet inneholdt rent løsemiddel. Oppvarmet løsemiddel fordampes kontinuerlig og resirkuleres. Siden det er et lukket system vil ekstraksjonen gå kontinuerlig så lenge det tilføres varme (Jensen 2007).

### **Materiale**

Tørket hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær

### **Utstyr**

Soxhletekstraktor med tilbakeløpskjøler

Filter til Soxhletekstraktor

Varmemantel

Rundkolbe, 2000 ml

Aluminiumsfolie

### **Prosedyre**

1. Filteret til Soxhletekstraktor med innveid bærmengde ble plassert i Soxhletekstraktoren, og rundkolben ble fylt opp med løsemiddel.
2. Rundkolben ble satt opp i varmemantelen.
3. Kjølevannet og varmen ble skrudd på, og materialet ble ekstrahert over en tilstrekkelig tidsperiode, ofte til ekstraksjonsløsningen var fargeløs, avhengig av løsemiddel og materialet som ble ekstrahert.

### **3.2.2 Ekstraksjon med diklormetan**

Diklormetan er et lipofilt løsemiddel og vil ekstrahere ut de upolare, lipofile stoffene fra bærene.

### **Materiale**

Tørt materiale fra hageblåbær. Mengde: 58,92g

Tørt materiale fra skogsblåbær. Mengde: 36,81g

Tørt materiale fra tranebær. Mengde: 60g.

Tørt materiale fra tyttebær. Mengde: 60g.

---

## Reagens

Diklormetan (Sigma-Aldrich), 1500 ml

## Utstyr

Soxhletutstyr se under Soxhletekstraksjon

## Prosedyre

1. En rundkolbe på 2000 ml ble fylt med 1500 ml diklormetan og plassert i varmemantel.
2. Innveid materiale ble ekstrahert ved hjelp av Soxhletekstraktor.
3. Ekstraheringen foregikk til løsningen som ble ekstrahert ut av materialet var fargeløs.
4. Ekstraktet ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og vannbad.

### 3.2.3 Ekstraksjon med 96%-etanol

Etanol er mindre polart enn vann, men samtidig blandbar med vann i alle forhold. 96%-etanol er både lipofil og hydrofilt. Dermed vil upolare komponenter som ikke ble ekstrahert ut i diklormetanekestret bli ekstrahert ut her.

## Materiale

Tørt restmateriale etter ekstraksjon med diklormetan

## Reagens

96%-etanol (Farmasøytisk Institutt (FI)), 1500 ml

## Utstyr

Soxhletutstyr se under Soxhletekstraksjon

## Prosedyre

1. En rundkolbe på 2000 ml ble fylt med ml 96%-etanol og plassert i varmemantel.
2. Restmateriale fra diklormetanekestret ble ekstrahert ved hjelp av Soxhletekstraktor
3. Ekstraheringen foregikk til løsningen som ble ekstrahert ut av materialet var fargeløs.
4. Ekstraktet ble dampet inn til et lite volum på rotavapor og vannbad.
5. Resten av væsken overføres til en mindre rundkolbe som er tarert på forhånd.

- 
6. Den store kolben etterskylles med litt 96%-etanol som overføres til liten rundkolbe.
  7. All væsken dampes inn til tørrhet og veies.

### **3.2.4 Ekstraksjon med 50%-etanol**

50%-etanol inneholder mer vann enn 96%-etanol og vil derfor kunne ekstrahere ut mer polare forbindelser enn 96%-etanol.

#### **Materiale**

Tørt restmateriale etter ekstraksjon med 96%-etanol

#### **Reagens**

96%-etanol (FI), 500 ml

Destillert vann (FI), 500 ml

#### **Utstyr**

Tilbakeløpskjøler

Varmemantel

Rundkolbe, 2000 ml

#### **Prosedyre**

1. Restmaterialet etter ekstraksjon med 96%-etanol ble overført til en rundkolbe på 2000 ml og 1000 ml 50%-etanol ble tilsatt.
2. Rundkolben ble plassert i varmemantel og tilbakeløpskjøler koblet til.
3. Restmaterialet ble ekstrahert i 2 timer

### **3.2.5 Ekstraksjon med vann**

De mest polare forbindelsene som ikke er ekstrahert ut vil ekstraheres ut med vann.

#### **Materiale**

Tørt restmateriale etter ekstraksjon med 50%-etanol

#### **Reagens**

Destillert vann (FI), 1000 ml

---

## Utstyr

Tilbakekøpskjøler

Varmemantel

Rundkolbe, 2000 ml

## Prosedyre

1. Restmaterialet etter ekstraksjonen med 50%-etanol ble overført til en rundkolbe på 2000 ml, og 1000 ml destillert vann ble tilsatt.
2. Rundkolben ble plassert i varmemantel, og tilbakekøpskjøler ble koblet til.
3. Restmaterialet ble ekstrahert i 2 timer.

## 3.2.6 Filtrering

Filtrering er en metode som benyttes for å fjerne små, uløste partikler fra en løsning

## Materiale

Bærekstrakter

## Utstyr

Erlenmeyerkolbe med utløp for vannsug

Filterpapir Whatman, qualitative 1

Foldefilter

Glasstrakt

Nutsj med vannsug

## Prosedyre

1. Bærekstraktene av diklormetan og 96%-etanol ble filtrert ved hjelp av glasstrakt og foldefilter.
2. 50%-etanolekstraktet og vannekstraktet ble filtrert ved hjelp av nutsj med vannsug.
3. Filtratet ble overført til glasskolbe.

---

### 3.2.7 Sentrifugering

Sentrifugering benyttes for å sedimentere uløst materiale i en løsning. Dette skjer i en sentrifuge med rotasjon i svært høy hastighet i en lukket beholder.

#### Materiale

50%-etanolekstrakt av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær

Vannekstrakt av de samme bærtypene

#### Utstyr

Sentrifugebeholder med skrukork, 1000 ml

Sentrifuge, Multifuge Heraeus Kendro (Tamro)

#### Prosedyre

1. Ekstraktene ble overført til hver sin sentrifugebeholder med skrulokk.
2. Hvert ekstrakt ble sentrifugert i 10 minutter med 4500 omdreininger på 20° C.
3. Supernatanten ble tatt vare på.

### 3.2.8 Inndamping på rotavapor

Rotavapor benyttes til inndamping av løsninger og ekstrakter for å redusere væskemengden og oppkonsentrere løsningen, eller å dampe inn til tørrstoff. Dette skjer under vakuum og ved oppvarming av det som skal dampes inn i et lukket system. Når trykket senkes fordamper løsemiddelet. Dampen avkjøles i en tilbakeløpskjøler og renner ned i en samlekolbe.

#### Materiale

Bærekstraktløsninger

#### Prosedyre

1. Bærekstraktløsningene ble overført til en tarert kolbe, 50%-etanolekstraktet og vannekstraktet ble dampet inn til cirka litt under halvparten av opprinnelig væskevolum.
2. Diklormetaneekstraktet ble dampet inn til tørrhet.
3. 96 %-etanolekstraktet ble dampet inn til minimal etanolrest. Resten i kolben ble satt i fryseren, men lot seg ikke frysetørke. Det ble derfor tilsatt vann og forsøkt dampet inn på nytt.
4. Alle kolbene med bærekstrakt ble fryst ned på metanolbad og satt på frysetørker.

---

## 3.3 Undersøkelse av CYP3A4-inhiberende aktivitet

### Prinsipp

Midazolam brukes ofte som CYP3A4-modellsubstrat i *in vitro* og *in vivo* studier.

Metabolismen av midazolam skjer via av CYP3A4 og CYP3A5, og metabolittene som dannes er 1`-hydroksy-midazolam (1`-OH-MDZ) og 4`-hydroksy-midazolam (4`-OH-MDZ). I disse forsøkene studeres ulike bærekstrakters evne til å hemme CYP3A4.

### Bærmateriale

Frysetørket materiale fra diklormetaneekstrakt, 96%-etanolekstrakt, 50%-etanolekstrakt og vannekstrakt av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær

### Tilberedning av prøvene

Frysetørket materiale fra diklormetaneekstraktene og 96%-etanolekstraktene ble løst i metanol. Til å løse materiale fra frysetørkede 50%-etanolekstrakter ble det brukt metanol og vann i forholdet 1:1. De frysetørkede vannekstraktene ble løst i vann.

### Screening

Diklormetaneekstrakt, 96%-etanolekstrakt, 50%-etanolekstrakt og vannekstrakt av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær i konsentrasjon 5 mg/ml og 0,5 mg/ml

### Fortynninger

**Tabell 2. Fortynningsrekke tranebær diklormetaneekstrakt i konsentrasjon (mg/ml).**

---

0,5	0,25	0,05	0,025	0,005	0,0005
-----	------	------	-------	-------	--------

---

For å bestemme  $IC_{50}$ -verdien som er den konsentrasjonen som gir 50% reduksjon av CYP3A4-aktiviten, ble det lagd en fortynningsrekke av diklormetaneekstraktet av tranebær (Tabell 2). Årsaken til at dette ekstraktet ble valgt er at det er utført studier tidligere som viser at lipofile ekstrakter fra tranebær hemmer CYP3A4 (Kim et al. 2011). Utifra denne kurven ble det lagd inn flere punkter i fortynningsrekken (Tabell 3).

---

**Tabell 3. Fortynningsrekker av diklormetan- og 50%-etanolekstrakter av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær i konsentrasjonen (mg/ml).**

---

0,5	0,25	0,2	0,125	0,1	0,05	0,025	0,005	0,0005
-----	------	-----	-------	-----	------	-------	-------	--------

---

### **Reagenser**

Bufferblandingsløsning:

200 mM Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 7,4)

20 mM MgSO<sub>4</sub>

10 mM NADPH

Midazolamløsning:

20 µM midazolam i bufferblandingsløsning

Internstandard (I.S.):

44 nM diazepam (DIA) i etylacetat

Mikrosomer:

Insektmikrosomer som uttrykker human CYP3A4 + cytokrom b<sub>5</sub> (BD Gentest)

Fortynning 1:64 (mikrosom:Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Etylacetat

Mobilfase til å reløse prøven i

74 µl vann

50 µl acetonitrill

### **Utstyr**

Reagensglass

Stoppeklokke

LC-MS rør

Knust is til avkjøling av etylacetat

Vannbad med risting (Jubilee)



---

## Prosedyre

1. Ønsket konsentrasjon av bærekstraktene ble løst i egnet løsemiddel.
2. Et volum på 10 µl av prøven ble pipettert ut i et reagensrør uten avdamping av prøve. Et volum på 139 µl bufferblandingsløsning ble tilsatt (tilsammen 149 µl). I hvert forsøk ble det benyttet en kontrollprøve bestående av 139 µl bufferblandingsløsning og 10 µl av det løsemiddelet prøven er ekstrahert i, i tillegg til en kontrollprøve bestående av 149 µl bufferblandingsløsning.
3. Det ble tilsatt 50 µl mikrosomer. Rørene ble preinkubert i 15 minutter ved 37° C på svak risting.
4. Rørene ble tilsatt 22 µl 20 µM og inkubert i 7,5 minutter ved 37° C på svak risting.
5. Etter 7,5 minutter ble rørene tatt ut av vannbadet og tilsatt 220 µl iskald etylacetat tilsatt DIA som I.S. Ved tilsetning av etylacetat vil det dannes to faser; en polar og en upolar fase. Proteiner og sukker vil løse seg i vannfasen, mens midazolam, metabolitter og I.S. løses i etylacetat. DIA brukes som I.S. for å korrigere for variasjoner under LC-MS kjøringene.
6. Reagensrøret ble ristet forsiktig på for å danne to faser. Etylactetatfasen ble pipettert av og overført til et LC-MS rør.
7. Vannfasen som var igjen i reagensrøret ble tilsatt 220 µl etylacetat på nytt for å få med enda mer av metabolittene som er løselig i etylacetat.
8. Etylacetatfasen ble dampet inn til tørrhet under nitrogengass og reløst i mobilfase. Prøvene ble blandet godt på whirlmixer.
9. Prøvene ble satt i fryseren med parafilm over til de skulle analyseres.

## LC-MS

LC-MS (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry) er en kromatografisk analysemetode som består av en væskrokromatograf som er koblet med et massespektrometer. LC brukes for å separere stoffene i en prøveløsning, mens MS brukes som detektor (Pedersen-Bjergaard and Rasmussen 2010). LC-MS ble benyttet for å analysere de hydroksylerte metabolittene av midazolam, 1-hydrokso-midazolam og 4-hydrokso-midazolam.

## Apparatur LC-MS

Autosampler/injector. Type Sil-10AD VP, Leverandør Shimadzu Japan

Blandekammer, FCV-10ALVP, Shimadzu Japan

Degasser, DGU-14A, Shimadzu Japan

---

Massespektrometer, LC-MS-2010 A, Shimadzu Japan

Kolonne, Intertsil C8, 50 mm lengde 3 mm indre diameter, 5  $\mu$ M partikkelstørrelse, Varian, USA

### **Reagenser**

#### **Mobilfase A:**

0,05 M ammoniumformiat-buffer pH 4,4

NH<sub>3</sub> 25% 4,036ml

Konsentrert HCOOH 2,125 ml

Ionebyttet vann 1 liter

#### **Mobilfase B:**

95% Acetonitril

5% Metanol

### **Prosedyre**

Kromatografisk metode ble tatt i bruk for å separere metabolittene 1`-OH-MDZ og 4`-OH-MDZ som har samme masse/ladningsforhold. For å oppnå dette ble det benyttet gradienteluering.

### **Beregning av CYP3A4-inhiberende aktivitet**

Ved hjelp av dataprogrammet LCMS-solution ble topphøydene og retensjonstidene til 1`-OH-MDZ og 4`-OH-MDZ beregnet. Deretter ble hemmingen av dannelsen av 1`-OH-MDZ (som mål på CYP3A4-aktivitet) beregnet på følgende måte:

Gjenværende CYP3A4-aktivitet(%)= ((topphøyde1`-OH-MDZ/topphøydeI.S.)/(topphøydekontroll/topphøydeI.S. kontroll) \* 100%

Hvor topphøydene i forsøkene mellom metabolitt og internstandard ble sammenlignet med kontrollprøven. Alle grafene ble lagd ved å benytte ikke lineær kurvetilpasning i dataprogrammet GraphPad Prism® (versjon 5.01; GraphPad Software). IC<sub>50</sub>- verdi og regresjonskoeffisient (R<sup>2</sup>) av fortynningsrekkene ble beregnet. Standardavvik (SD) ble beregnet ved hjelp av Windows Excel.

---

## 3.4 DPPH-Scavenging

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)-scavenging er en metode som brukes til å bestemme antioksidanteffekten til en forbindelse. DPPH er et stabilt fritt radikal som på grunn av det uparede elektronet har sterk absorpsjon ved 517 nm. I løsningsmedie har radikalet en mørk fiolett farge. Ved reaksjon med en radikalscavenger vil det uparede elektronet i DPPH bli parett. DPPH-radikalet omdannes 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).

Dette prinsippet kan utnyttes til å måle radikalscavengeraktiviteten til en substans. Absorpsjonen måles ved 517 nm før og etter tilsetning av prøven til DPPH. Ved radikalscavenger-effekt vil det bli observert en nedgang i absorpsjon. Nedgang i absorpsjon er relatert til mengde og aktivitet av radikalscavenger.

Hvor mange prosent radikalscavenging testsubstansen gir kan beregnes ved hjelp av denne formelen:

$$100\% * (A_0 - A_t) / (A_0 - A_p)$$

hvor  $A_0$  = startabsorpsjon (korrigert for egenabsorpsjon av testsubstans og fortykning)

$A_t$  = sluttabsorpsjon etter reaksjon med testsubstans

$A_p$  = egenabsorpsjon ved sluttproduktet DPPH-H.  $A_p$  settes ofte til 0.

### Materiale

Frysetørkede diklormetaneekstrakter, 96%-etanolekstrakter, 50%-etanolekstrakter og vanneekstrakter av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær.

### Kjemikalier

DPPH (1,1-Difenyl-2-pikrylhydrazyl)-pulver

Metanol

Dimetyl sulfoksid (DMSO)

Destillert vann (FI)

### Utstyr

UV-spektrometer Libra S32 PC

Kuvetter av kvarts

Plastikkspatler

---

Multipipette 0,05ml

Pipette 2,95 ml

Erlenmeyerkolbe

Magnetrører

Magnet

Begerglass

Pipettespisser

Erlenmeyerkolbe

### **Tilberedning av prøvene**

Diklormetaneekstraktene og 96 % etanolekstraktene ble løst i DMSO, 50 % etanolekstraktene ble løst i DMSO og destillert vann i forholdet 1:1 og vannekstraktene ble løst i destillert vann. Diklormetaneekstraktet av tranebær ble ikke fullstendig løst, og prøvene ble sonikert på ultralydbad for å løse opp mer av stoffet. Utgangskonsentrasjonen på prøvene var  $167\mu\text{g/ml}$ . Når ekstraktet var aktivt, ble det lagd en fortykning på halvparten av konsentrasjonen  $47,7\mu\text{g/ml}$  og videre nedover til ekstraktet ikke lenger var aktivt lenger.

### **Prosedyre**

1. DPPH-pulver løses i metanol (ca  $0,04\text{ mg/ml}$ ) i en erlenmeyerkolbe og blandes ved hjelp av magnet og magnetrører. Løsningen skal gi en konsentrasjon som gir en absorbans på ca 1 ved  $517\text{ nm}$ .
2. Et volum på  $2,95\text{ ml}$  DPPH ble tilsatt i tre kyvetter, og absorbansen ble målt ved  $517\text{ nm}$  i UV-apparatet. Absorbansen ble notert.
3. Ved hjelp av multipipette ble det tilsatt  $50\mu\text{l}$  av testløsningen til hver kyvette. Det ble rørt godt i alle 3 prøvene med en plastikkspatel. 5 minutter etter tilsetning av testløsningen ble absorbansen målt på nytt. Absorbansen ble notert.
4. Innholdet i kuvetten ble tømt i et begerglass. Kuvetten ble vasket med metanol tre ganger og satt ned på papir for å tørke slik at de var klare til neste måling.
5. Prosedyren overfor ble gjentatt på resten av prøvene.

---

## 3.5 $^1\text{H}$ NMR

### Prinsipp

NMR (Nukleær Magnetisk Resonans) er en spektroskopisk metode som benyttes til å bestemme den kjemiske strukturen på ukjente organiske forbindelser. Det er atomkjernenes absorpsjon av elektromagnetisk stråling som måles i NMR. Signalene i et  $^1\text{H}$  NMR-spekter ligger i området 0-15 ppm.

### Materiale

Frysetørket materiale av diklormetaneekstrakt, 96 %-etanolekstrakt og 50 %-etanolekstrakt av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær

### Kjemikalier

Deuterert vann (tungtvann)

Deuterert metanol

Deuterert kloroform

### Tilberedning av prøvene

Frysetørket materiale av diklormetaneekstraktene ble løst i deuterert kloroform. Deuterert metanol ble brukt til å løse materiale fra 96%-etanolekstraktene. Prøvene av 50%-etanolekstraktene ble løst i deuterert vann.

### Utstyr

$^1\text{H}$  NMR-apparat Bruker DPX 300

NMR-prøveglass

Engangspipetter av glass

Smokk

### Prosedyre

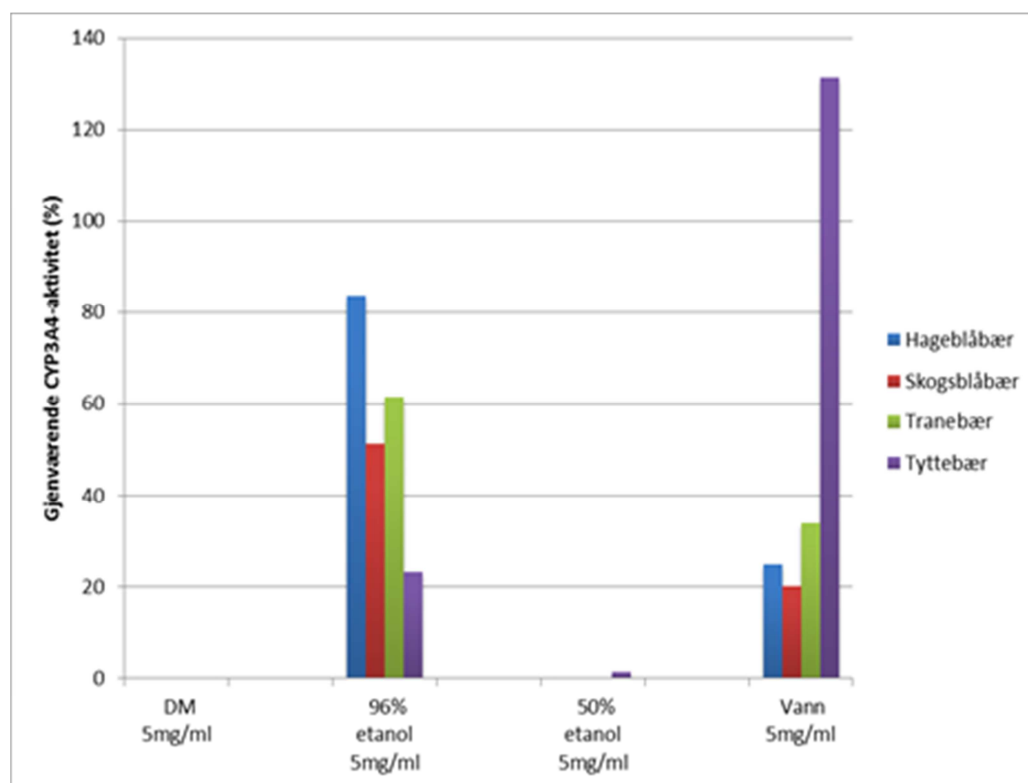
1. Frysetørket materiale ble tilsatt egnet løsemiddel.
2. Prøvene ble overført til NMR-prøveglass og kork og lapp med merking ble satt på.
3. Prøvene ble kjørt på  $^1\text{H}$  NMR-apparat.

## 4 Resultater og diskusjon

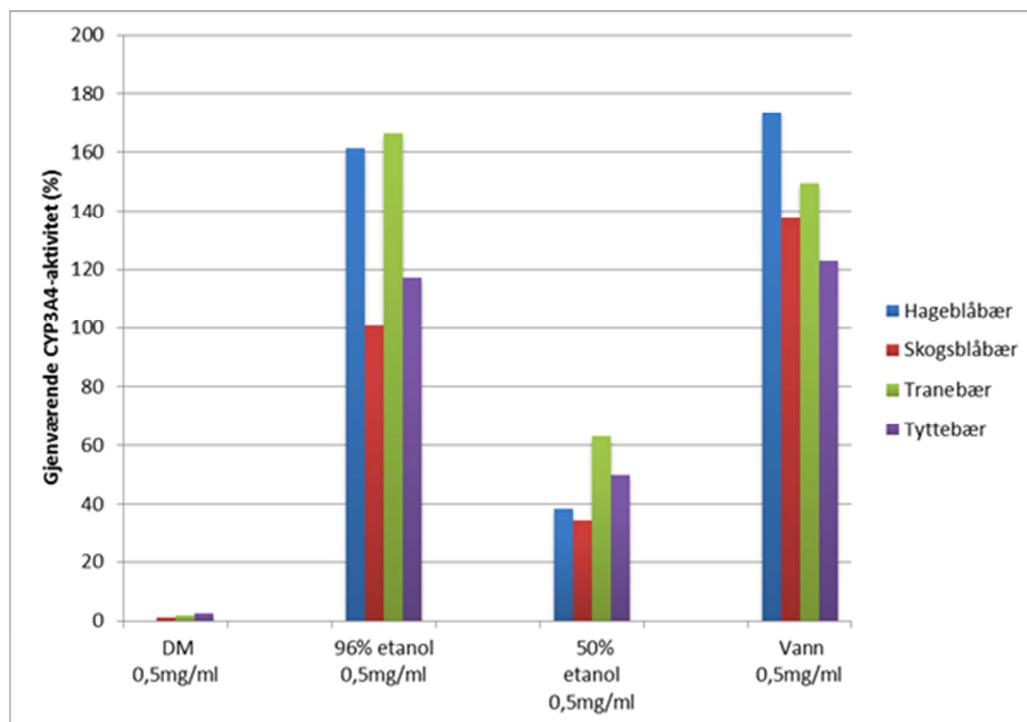
### 4.1 Bærekstraktene

Hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær ble ekstrahert i fire trinn med diklormetan, 96%-etanol, 50%-etanol og vann. Ekstraktene ble undersøkt for CYP3A4-inhiberende aktivitet og for antioksidant effekt.  $^1\text{H}$  NMR ble utført for å få informasjon om innholdsstoffer i de forskjellige ekstraktene, og sammenligne innhold av substanser i de forskjellige bærtype og om mulig kunne relatere aktivitet til innholdsstoffer.

### 4.2 Undersøkelse av CYP3A4-inhiberende aktivitet av ulike bærekstrakter



Figur 8. Gjenværende CYP3A4-aktivitet (%). Effekt av ulike ekstrakter i konsentrasjonen 5 mg/ml fra hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær. Det ble kun utført en parallell for å screene hvilke bær som var aktive.



**Figur 9. Gjenværende CYP3A4-aktivitet (%). Effekt av ulike ekstrakter i konsentrasjonen 0,5 mg/ml fra hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær. Det ble kun utført en parallell for å screene hvilke bær som var aktive.**

Den innledende screeningen viste at alle fire diklormetaneekstraktene hemmet CYP3A4-aktiviteten fullstendig i en konsentrasjon på 5 mg/ml (Figur 8). Screening av diklormetaneekstraktene i konsentrasjonen 0,5 mg/ml (Figur 9) viste en tilsvarende tendens som for den høyere konsentrasjonen med hemming av CYP3A4. Oppsummert viste alle diklormetaneekstraktene lignende grad av CYP3A4-hemming. Som tidligere beskrevet, ble det lagt fortynningsrekker for å bestemme  $IC_{50}$ -verdier, som er den konsentrasjonen som gir 50% reduksjon av CYP-aktiviteten.

Diklormetaneekstraktet av tranebær (Figur 10C) viste en CYP3A4-hemmende effekt med en  $IC_{50}$ -verdi på  $64 \pm 54 \mu\text{g/ml}$  (Tabell 4). Dette er i samsvar med Kim et al. som nylig rapporterte hemming av CYP3A4 *in vitro* av substanser i tranebær, og maslininsyre, corosolinsyre og ursolinsyre ble isolert og identifisert som *in vitro* CYP3A4-hemmere (Kim et al. 2011). Maslininsyre og corosolinsyre ble isolert fra kloroformekstrakt, og ursolinsyre ble isolert fra hexaneekstrakt, som begge er lipofile ekstrakter. En *in vivo* studie utført på rotter har tidligere vist at tranebærjuice hemmet første passasje metabolismen i tarmen av nifedipin som er et CYP3A4-substrat, men en klinisk studie viste ingen interaksjoner med tranebærjuice og CYP3A4 i mennesker (Lilja et al. 2007). De aktive substansene som hemmer CYP3A4 i

---

tranebær kan variere avhengig av sort, dyrkested og tidspunkt for innhøstning. I en studie ble fem forskjellige tranebærjuicer undersøkt *in vitro* for å finne ut om noen av typene var i stand til å hemme CYP3A4. Den mest potente juicen ble fraksjonert, og det viste seg at de lipofile ekstraktene ga sterkest CYP3A4-hemming. Den mest potente tranebærjuicen ble gitt til 16 friske, frivillige, og det ble observert en økning på 30% av arealet under kurven (AUC) av midazolam. Økningen i AUC var sannsynligvis et resultat av CYP3A4-hemming i tarm (Ngo et al. 2009).

Diklormetaneekstraktet av skogsblåbær (Figur 10B) hemmet CYP3A4 med en  $IC_{50}$ -verdi på  $72 \pm 19$   $\mu\text{g/ml}$  (Tabell 4). Det har også blitt funnet i en tidligere masteroppgave at diklormetaneekstrakt av skogsblåbær hemmet CYP3A4 (Nguyen 2010). Hageblåbærs diklormetaneekstrakt (Figur 10A) hemmet CYP3A4 med en  $IC_{50}$ -verdi på  $56 \pm 25$   $\mu\text{g/ml}$  (Tabell 4). Det er interessant å observere at hageblåbær og skogsblåbær har forskjellige  $IC_{50}$ -verdier, idet hageblåbær har noe lavere  $IC_{50}$ -verdi for hemming av CYP3A4 enn skogsblåbær. Det bør imidlertid nevnes at standardavviket i disse forsøkene er relativt høyt, så det er uvisst om det er en forskjell på de to bærekstraktene i å hemme CYP3A4. Ytterligere studier med hageblåbær og skogsblåbær må utføres før en kan konkludere. Fra før fins det ingen studier på CYP3A4-hemming av hageblåbær. Diklormetaneekstraktet av tyttebær (Figur 10D) hadde en  $IC_{50}$ -verdi for hemming av CYP3A4 på  $62 \pm 10$   $\mu\text{g/ml}$  (Tabell 4). Det foreligger heller ingen studier på CYP3A4-hemming av tyttebær.

En tilsvarende tendens som hos diklormetaneekstraktene med hemming av CYP3A4 ble vist hos 50%-etanolekstraktene. Alle 50%-etanolekstraktene hemmet CYP3A4 fullstendig (Figur 8). Screeningen av 50%-etanolekstraktene i konsentrasjonen 0,5 mg/ml (Figur 9) viste at bærene hemmet CYP3A4 i ulik grad. Hageblåbær og skogsblåbær hemmet CYP3A4 i større grad enn tranebær og tyttebær. Hageblåbærs 50%-etanolekstrakt (Figur 11A) hadde en  $IC_{50}$ -verdi for hemming av CYP3A4 på  $425 \pm 229$   $\mu\text{g/ml}$  (Tabell 4). Skogsblåbærs 50%-etanolekstrakt (Figur 11B) hemmet CYP3A4 med en  $IC_{50}$ -verdi på  $367 \pm 247$   $\mu\text{g/ml}$  (Tabell 4). Tranebærs og tyttebærs 50%-etanolekstrakt (Figur 11C og D) hemmet ikke CYP3A4 i testkonsentrasjonene. Ut ifra screeningen hemmet ikke tranebær og tyttebær CYP3A4 i så grad som hageblåbær og skogsblåbær, og konsentrasjonsområdet burde vært høyere for å kunne bestemme eventuelle  $IC_{50}$ -verdier. På grunn av problemer med analysen (LC-MS maskinen) ble analyseresultatene sent ferdig. Dessverre var det derfor ikke mulighet til å gjøre



forsøkene med tranebær og tyttebær i høyere konsentrasjoner.

Resultater fra screeningen viste at CYP3A4 ble hemmet i varierende grad av 96%-etanolekstraktene i en konsentrasjon på 5 mg/ml (Figur 8). Tyttebærekstraktet viste større grad av hemming enn de andre ekstraktene. I konsentrasjonen 0,5 mg/ml (Figur 9) viste ikke 96%-etanolekstraktene inhiberende effekt på CYP3A4. Vannekstraktene fra alle bærene, bortsett fra tyttebær hemmet CYP3A4 i konsentrasjonen 5 mg/ml (Figur 8). I konsentrasjonen 0,5 mg/ml (Figur 9) viste vannekstraktene ingen inhiberende effekt på CYP3A4.

**Tabell 4. IC<sub>50</sub>-verdier for CYP3A4-hemming av ulike bærekstrakter med den tilhørende R<sup>2</sup>-verdien. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt ±SD (n=3).**

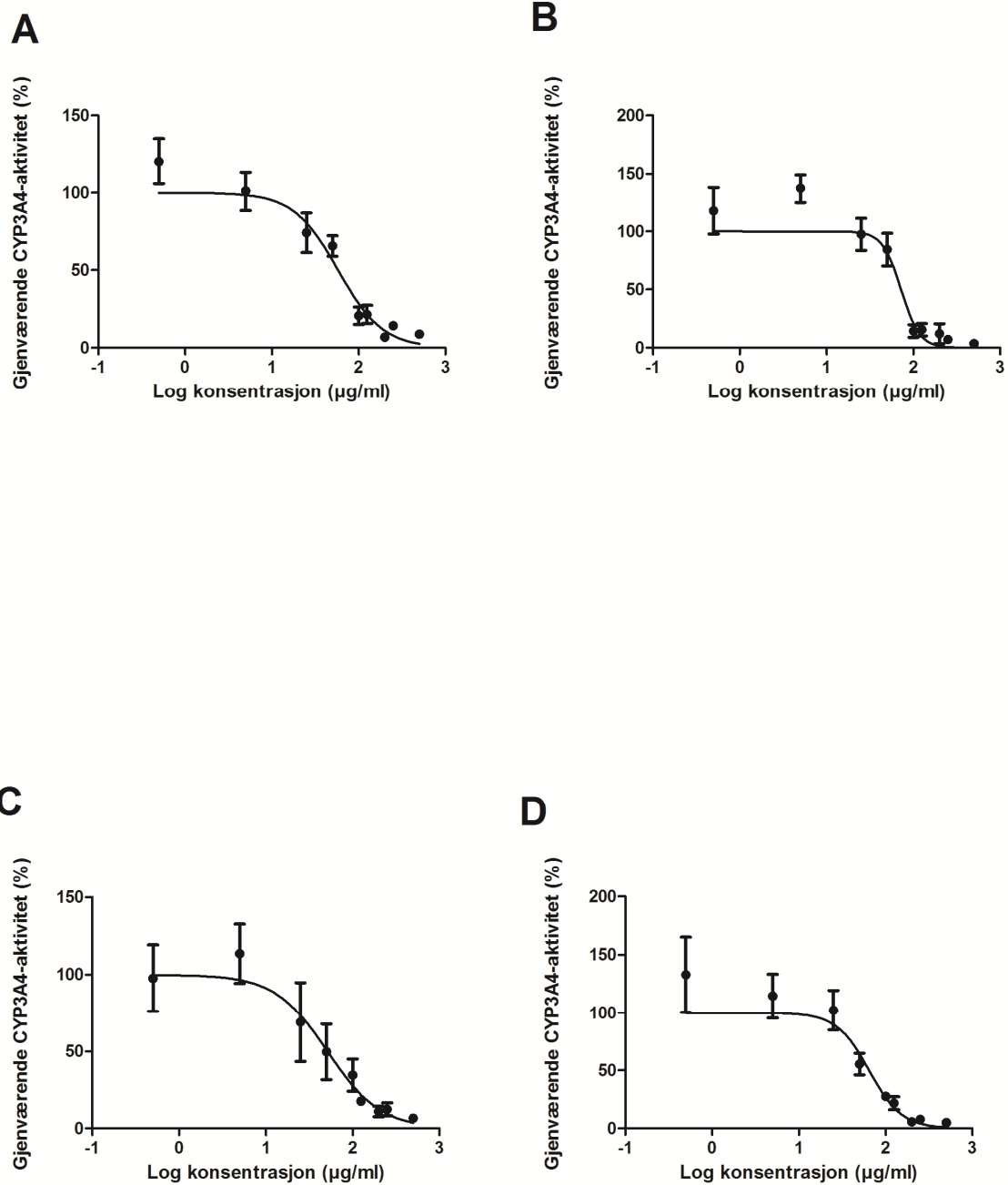
<b>Materiale</b>	<b>1'-OH-MDZ IC<sub>50</sub> (µg/ml)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Hageblåbær-DM</b>	56±25	0,91
<b>Skogsblåbær-DM</b>	72±19	0,86
<b>Tranebær-DM</b>	64±54	0,86
<b>Tyttebær-DM</b>	62±10	0,85
<b>Hageblåbær- 50 % EtOH</b>	425±229	0,42
<b>Skogsblåbær-50 % EtOH</b>	367±247	0,39

Som nevnt tidligere fins det CYP3A4 i tarmen som metaboliserer legemidler og andre xenobiotika i kroppen. I første omgang vil muligens de CYP3A4-inhiberende stoffene i bærekstraktene hemme CYP3A4 i tarm, og dermed blir det mer legemiddel tilgjengelig. Neste trinn som påvirker biotilgjengeligheten til legemiddelet er metabolisme i leveren. Om de CYP3A4-inhiberende stoffene kommer til leveren og kan hemme CYP3A4, vil også dette bidra til en høyere plasmakonsentrasjon av legemiddelet dersom det er substrat for CYP3A4. Forsøkene er kun utført *in vitro*. Det vites ikke om de studerte bærekstraktene hemmer CYP3A4 i kroppen, og *in vivo* studier må utføres for å si noe om funnene er klinisk relevante. Imidlertid har det som nevnt ovenfor tidligere vært vist at tranebær økte AUC av midazolam *in vivo*, sannsynligvis ved hemming av CYP3A4 (Ngo et al. 2009).

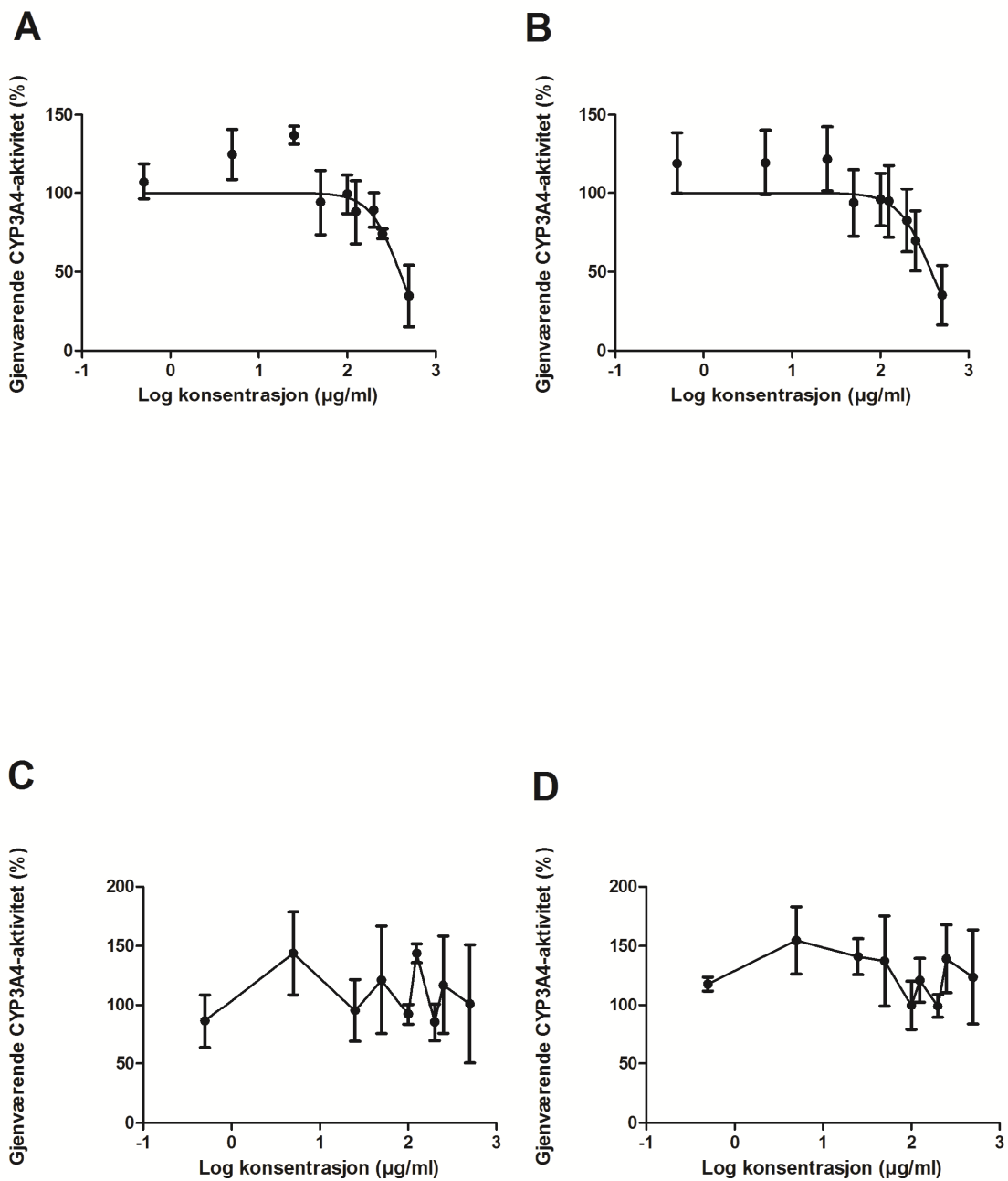
---

Et annet forhold som er avgjørende for relevansen av CYP3A4-hemmingen, er hvilken døgndose av bær som gir en relevant konsentrasjon i kroppen som kan hemme CYP3A4. Det sier seg selv at dersom døgndosen av bær som må inntas for å oppnå CYP3A4-hemming er lav, har funnet større betydning, enn om døgndosen av bær som må inntas er veldig høy.

Ut ifra de ulike ekstraksjonene som inneholder substanser som hemmer CYP3A4, ser vi at de har forskjellig løselighet. Måten bærene er tilberedt på kan muligens ha betydning for den hemmende effekten. Ved inntak av hele bær vil en få i seg alle substansene som hemmer CYP3A4. I juice og saft vil en for eksempel bare få i seg de vannløselige stoffene. I juiceproduksjon av bær er det vanlig å presse bærene slik at en ikke får med skallet i juicen. Hos grapefrukt er det observert at det er avgjørende for CYP3A4-hemmingen hvilken del av frukten som inntas, idet furanokoumariner sitter i skallet på grapefrukten (Molden and Spigset 2007).



Figur 10. Hemming av CYP3A4 av diklormetaneekstrakter av A: Hageblåbær, B: Skogsblåbær, C: Tranebær og D: Tyttebær. Ikke lineær tilpasset kurve ble brukt til å lage hemmingskurver. Hvert punkt representerer gjennomsnitt $\pm$ SD (n=3).



**Figur 11. Hemming av CYP3A4 av 50%-etanolekstrakter av A: Hageblåbær, B: Skogsblåbær, C: Tranebær og D: Tyttebær. Ikke lineær tilpasset kurve ble brukt til å lage hemmingskurver i A og B. Hvert punkt representerer gjennomsnitt $\pm$ SD (n=3).**

---

### 4.3 Radikalscavenging aktivitet

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) er et stabilt radikal som kan benyttes for å måle om en substans har antioksiderende aktivitet. Substansene viser da en evne til å scavenge eller fange det uparede elektronet.  $IC_{50}$ -verdien er konsentrasjonen av prøven som må til for å gi en reduksjon på 50% av DPPH-aktivitet. Jo lavere  $IC_{50}$ -verdi desto høyere antioksidant aktivitet har prøven.

Skogsblåbærs 50%-etanolekstrakt viste den høyeste radikalscavenger aktiviteten med en  $IC_{50}$ -verdi på 36  $\mu\text{g/ml}$  (Tabell 5). Radikalscavenging aktiviteten til skogsblåbær er konsentrasjonsavhengig, se grafisk fremstilling av resultat (Figur 12B). Dette er i tråd med at skogsblåbær er kjent for sitt høye innhold av antioksidanter (Savikin et al. 2009).

Hageblåbærs 50%-etanolekstrakt viste en radikalscavenger aktivitet med en  $IC_{50}$ -verdi på  $45 \pm 2$   $\mu\text{g/ml}$  (Tabell 6). Jo høyere bærkonsentrasjon desto høyere radikalscavenger aktivitet har hageblåbær (Figur 12A). Sammenlignet med skogsblåbær er det interessant å se at hageblåbær inneholdt mindre antioksidanter.

Tranebærs 50%-etanolekstrakt viste også en radikalscavenger aktivitet med en  $IC_{50}$ -verdi på  $48 \pm 2$   $\mu\text{g/ml}$  (Tabell 7). Radikalscavenging aktiviteten til tranebær er konsentrasjonsavhengig, se grafisk fremstilling av resultat (Figur 12C). Alle 50%-etanolekstraktene viste en lignende radikalscavenger aktivitet bortsett fra tyttebær som var inaktivt (Tabell 8). Tatt i betraktning at 50%-etanolekstraktene hemmet CYP3A4 kan muligens de substansene i ekstraktet som hemmer CYP3A4 være antioksidanter. Dette er i samsvar med en ny studie som viste at 50%-etanolekstrakt av aroniabær som hemmet CYP3A4, hadde en radikalscavenger aktivitet på  $25 \pm 5$   $\mu\text{g/ml}$  (Braunlich et al. 2013). Videre ble 50%-etanolekstraktet fraksjonert på kolonne med metanol og hadde en radikalscavenger effekt på  $3,8 \pm 2$   $\mu\text{g/ml}$  (Braunlich et al. 2013). En slik fraksjonering ville vært interessant å utføre med tranebær også.

Diklormetane-ekstraktene fra samtlige bær var inaktive (Tabell 5,6,7 og 8). Både 96%-etanolekstraktene og vannekstraktene av alle bærene viste en moderat radikalscavenger aktivitet (Tabell 5,6,7 og 8).

Tabell 5. DPPH-scavenging (%) av skogsblåbær. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt±SD (n=3).

Bærekstrakt	167 µg/ml	83,3 µg/ml	41,7 µg/ml	20,8 µg/ml	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Diklormetane­kstrakt	-10,6±0,8	-	-	-	-
96%-etanolekstrakt	57,9±1,6	-	-	-	-
50%-etanolekstrakt	89,4±0,6	76,1±3,2	55,4±2,3	27,5±1,2	36±2
Vannekstrakt	27,8±4,6	-	-	-	-

Tabell 6. DPPH-scavenging (%) av hageblåbær. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt±SD (n=3).

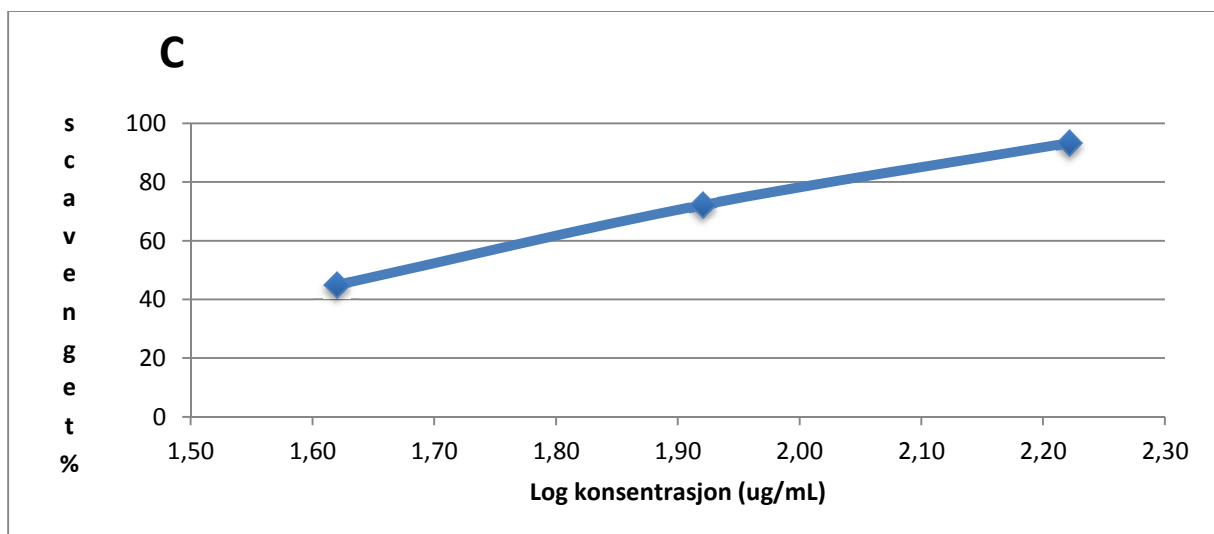
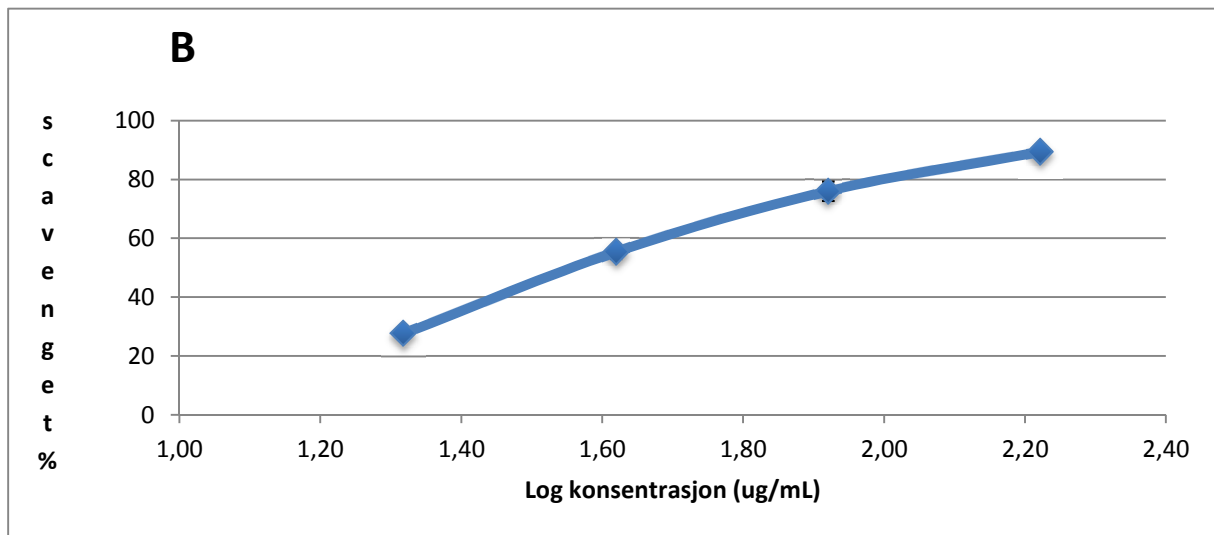
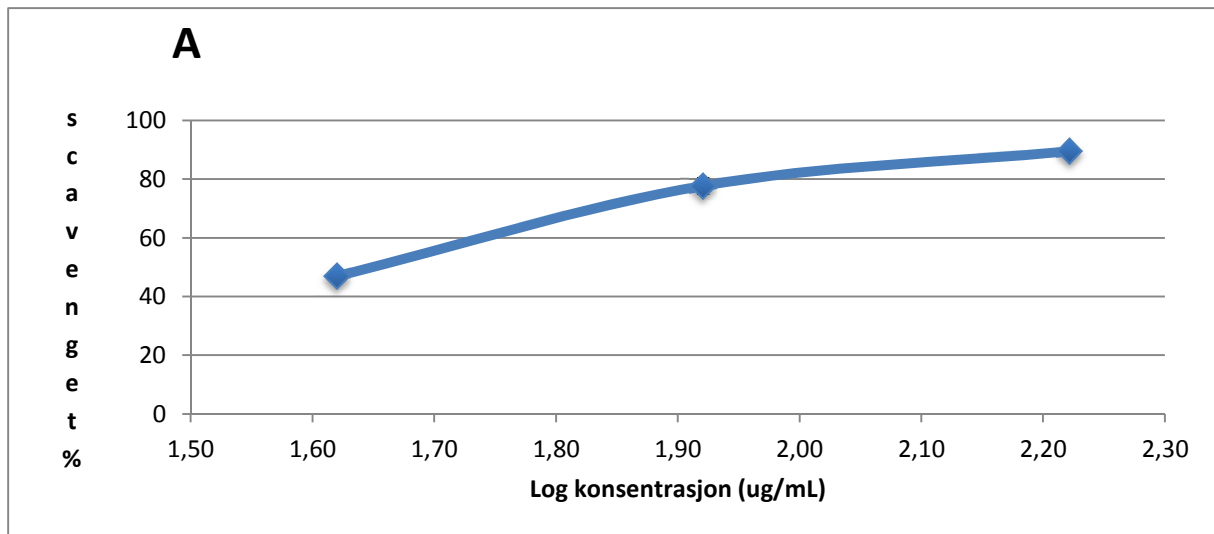
Bærekstrakt	167 µg/ml	83,3 µg/ml	41,7 µg/ml	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Diklormetane­kstrakt	-0,3±0,8	-	-	-
96%-etanolekstrakt	30,9±1,1	-	-	-
50%-etanolekstrakt	89,5±0,7	77,7±2,6	46,9±0,9	45±2
Vannekstrakt	10,9±2,2	-	-	-

Tabell 7. DPPH-scavenging (%) av tranebær. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt±SD (n=3).

Bærekstrakt	167 µg/ml	83,3 µg/ml	41,7 µg/ml	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Diklormetane­kstrakt	-6,1±1,1	-	-	-
96%-etanolekstrakt	2,1±0,5	-	-	-
50%-etanolekstrakt	93,3±1,2	72,2±0,1	44,9±1,5	48±2
Vannekstrakt	17,1±8,2	-	-	-

Tabell 8. DPPH-scavenging (%) av tyttebær. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt±SD (n=3).

Bærekstrakt	167µg/ml	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Diklormetane­kstrakt	-2,7±1,6	-
96%-etanolekstrakt	26,2±0,4	-
50%-etanolekstrakt	1,5±0,2	-
Vannekstrakt	5±1,5	-



Figur 12. DPPH-scavenging aktivitet (%) av 50%-etanolekstrakter A: Hageblåbær, B: Skogsblåbær og C: Tranebær.

## 4.4 $^1\text{H}$ NMR

For å få informasjon om hvilke substanser som var i de ulike ekstraktene, ble det utført  $^1\text{H}$  NMR. Spesielt ønskelig var det å undersøke diklormetaneekstraktene og 50%-etanolekstraktene som hemmet CYP3A4 *in vitro*.

$^1\text{H}$  NMR spektra av diklormetaneekstraktene av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær (Vedlegg 6) inneholdt alle  $\text{CH}_3$ -grupper og  $\text{CH}_2$ -grupper fra dobbeltbindinger som kom fra fettstoffer, glyserol og aromater (Tabell 9). Tranebær og tyttebær hadde sterkere aromatsignaler enn hageblåbær og skogsblåbær. Det kan muligens skyldes benzosyre, og signalene ser ut til å stemme med publiserte verdier for benzosyre (AIST 2013).  $^1\text{H}$  NMR spektra av de forskjellige bærene var veldig like. Funnet av fettstoffer og aromater i de mest lipofile ekstraktene var i samsvar med «likt løser likt» prinsippet. For å kunne si noe mer om hvilke substanser i diklormetaneekstraktene som hemmer CYP3A4, må det gjøres en videre opprensing og fraksjonering av ekstraktene.

Tabell 9. Avleste signaler fra  $^1\text{H}$  NMR spektra av diklormetaneekstraktene.

Signaler (ppm)	Hageblåbær	Skogsblåbær	Tranebær	Tyttebær
$\text{CH}_3$ (metyl)	0,89	0,89	0,88	0,88
$\text{CH}_2$	1,29-2,29	1,26-2,34	1,26-2,31	1,26-2,31
Glyserol	4,15-4,33	4,15-4,31	4,16-4,31	4,16-4,31
Dobbeltbinding	5,5-skarpt signal	5,23-5,29	5,26-5,36	5,35
Aromat	7,54-7,73	7,51-7,71	7,27-8,09	7,27-8,08



<sup>1</sup>H NMR spektra av 96%-etanolekstraktene av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær (Vedlegg 6) inneholdt CH<sub>2</sub>-grupper, etanolrester og sukker (Tabell 10). Tranebær og tyttebær inneholdt aromater, noe som er i samsvar med at det også var høyere nivå av aromater i diklormetaneekstraktene.

Tabell 10. Avleste signaler fra <sup>1</sup>H NMR spektra av 96%-etanolekstraktene.

Signaler (ppm)	Hageblåbær	Skogsblåbær	Tranebær	Tyttebær
CH <sub>2</sub>	1,15-1,28	1,13-1,28	1,15-1,28	1,13-1,28
etanolrester	2,0	2,5	1,85-2,10	2,05
sukker	2,76-4,04	2,82-4,05	2,82-4,11	2,82-4,50
anomerproton	4,5	4,47-4,50	4,47-4,50	4,47-4,50
anomerproton	4,89-5,12	4,89-5,12	4,95-5,12	4,99-5,12
aromat			7,51-8,11	7,5-8,11

<sup>1</sup>H NMR spektra av 50%-etanolekstraktene av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær (Vedlegg 6) inneholdt alifatiske forbindelser, sukker og proantocyanidiner (Tabell 11). Spektra av alle 50%-etanolekstraktene lignet på hverandre. Dermed burde de gitt tilsvarende radikalscavenger aktivitet. Tyttebær viste ingen radikalscavenger aktivitet, og ut ifra at tyttebær inneholdt de samme stoffene som de andre 50%-etanolekstraktene, burde DPPH-scavengingen blitt utført på nytt for å utelukke om resultatet skyldtes metoden eller ikke. Radikalscavenger aktiviteten kan skyldes proantocyanidiner, som er antioksidanter. Det kan muligens være proantocyanidiner som er antioksidantene i ekstraktene, og som også hemmer CYP3A4. En studie utført på aroniabær viste at 50%-etanolekstraktet inneholdt proantocyanidiner med epicatechin stereokjemi som hemmet CYP3A4 *in vitro* (Braunlich et al. 2013). På bakgrunn av dette hadde det vært interessant i videre arbeid å oppfraksjonere 50%-etanolekstraktet og identifisere substanser som hemmet CYP3A4.

Tabell 11. Avleste signaler fra  $^1\text{H}$  NMR spektra av 50%-etanolekstraktene.

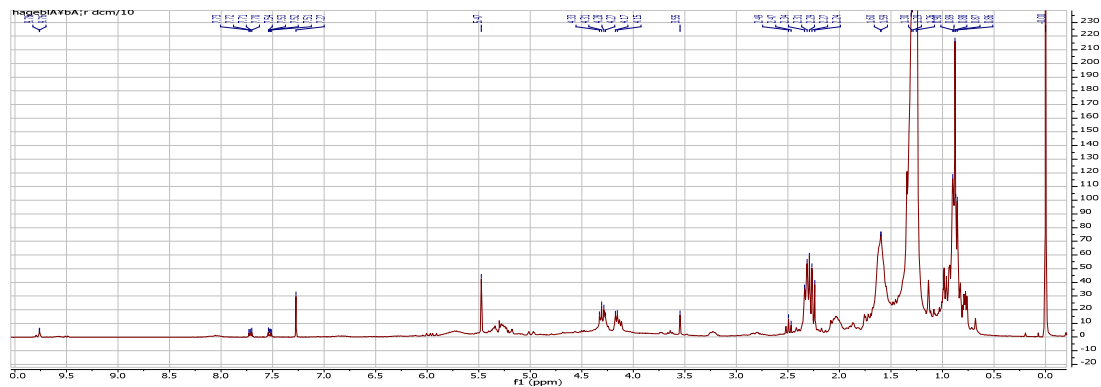
<b>Signaler(ppm)</b>	<b>Hageblåbær</b>	<b>Skogsblåbær</b>	<b>Tranebær</b>	<b>Tyttebær</b>
<b>Alifatisk forbindelse</b>	1,17-1,21	1,20	1,16-1,22	1,19
<b>Sukker</b>	2,68-4,06	2,03-4,13	2,67-4,06	1,98-4,07
<b>Proantocyanidin</b>	6,85	6,8	6,87	6,83

---

## 5 Konklusjon

Diklormetane- og 50%-etanolekstraktene av hageblåbær, skogsblåbær, tranebær og tyttebær hemmet CYP3A4 *in vitro*. De ekstraktene som viste høyest DPPH-radikalscavenger aktivitet var hageblåbærs 50%-etanolekstrakt, skogsblåbærs 50%-etanolekstrakt og tranebærs 50%-etanolekstrakt. Skogsblåbær hadde høyest antioksidant innhold med en IC<sub>50</sub>-verdi på 36±2 µg/ml. <sup>1</sup>H NMR-spektroskopi viste innhold av proantocyanidiner i 50%-etanolekstraktene og disse kan ha bidratt til CYP3A4-hemming.

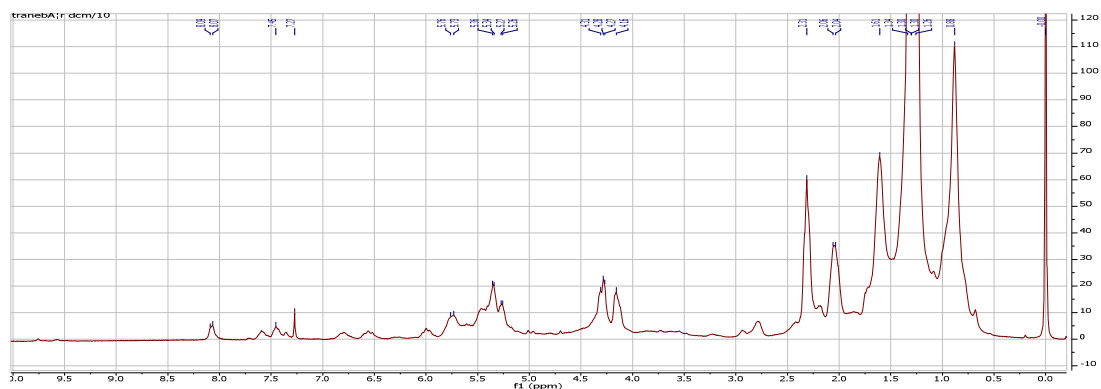
# 6 Vedlegg – $^1\text{H}$ NMR spektra



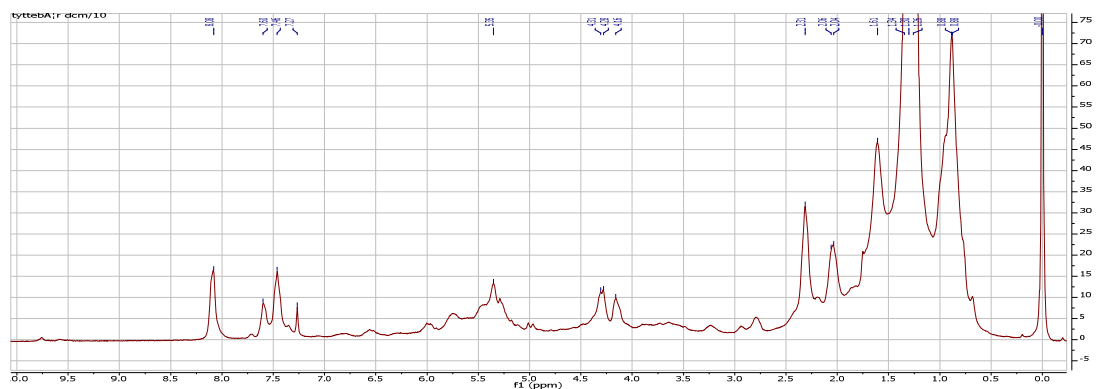
Diklormetaneekstrakt hageblåbær



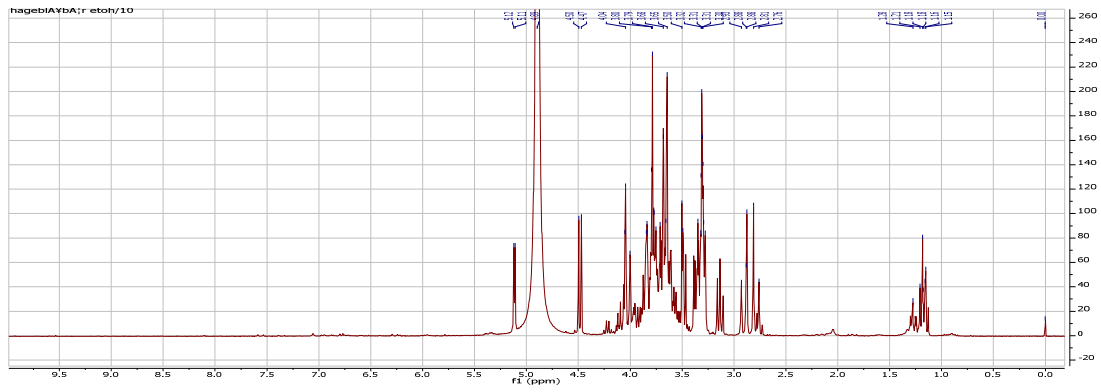
Diklormetaneekstrakt skogsblåbær



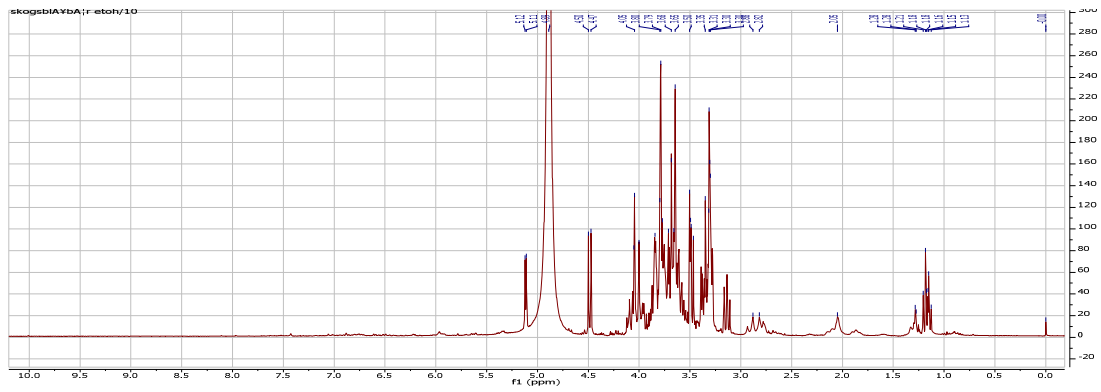
Diklormetaneekstrakt tranebær



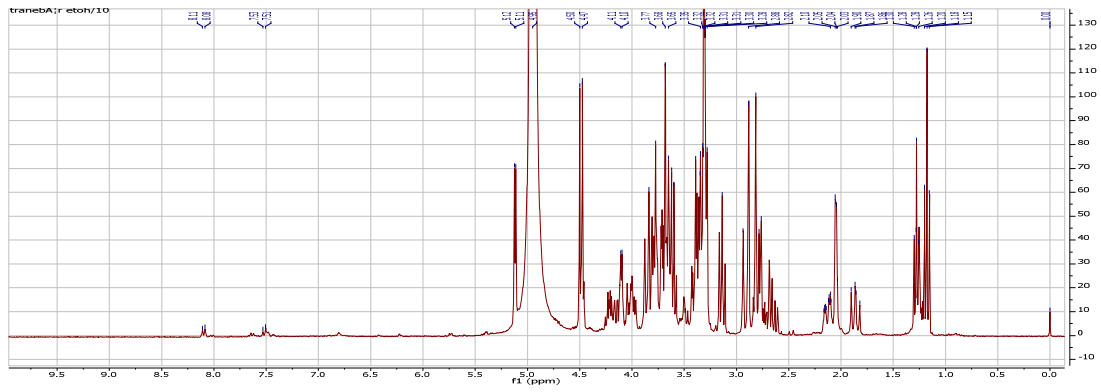
Diklormetaneekstrakt tyttebær



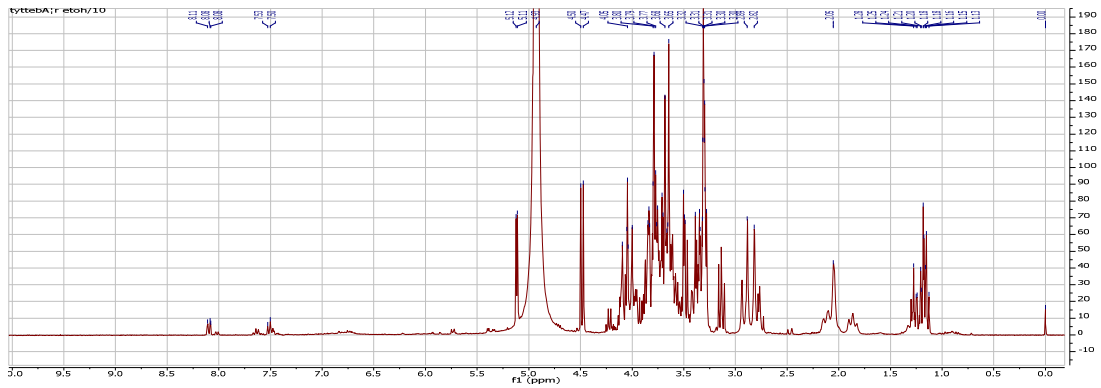
**96%-etanolekstrakt hageblåbær**



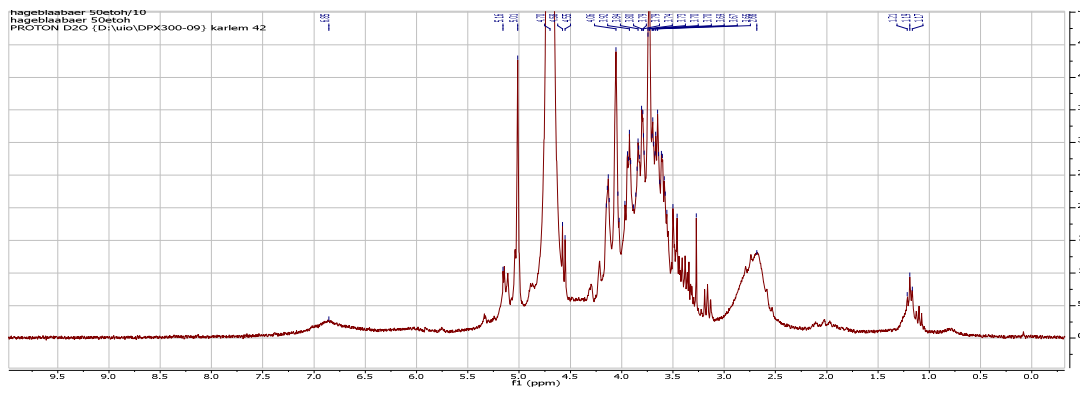
**96%-etanolekstrakt skogsblåbær**



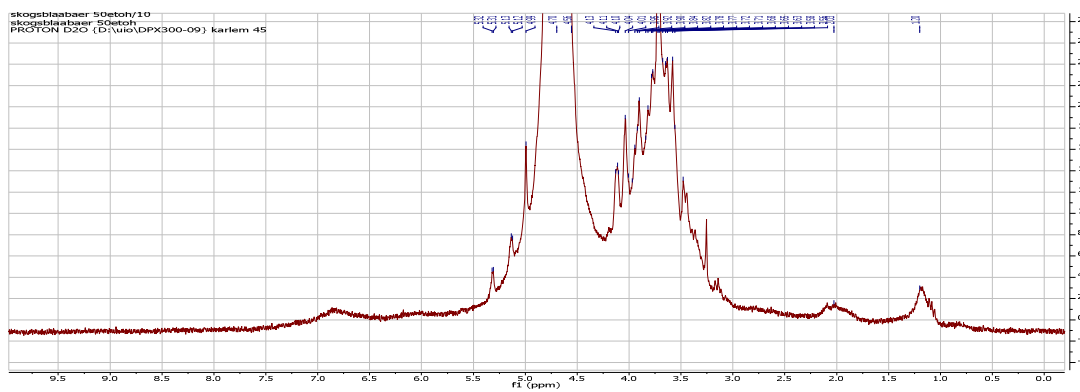
**96%-etanolekstrakt tranebær**



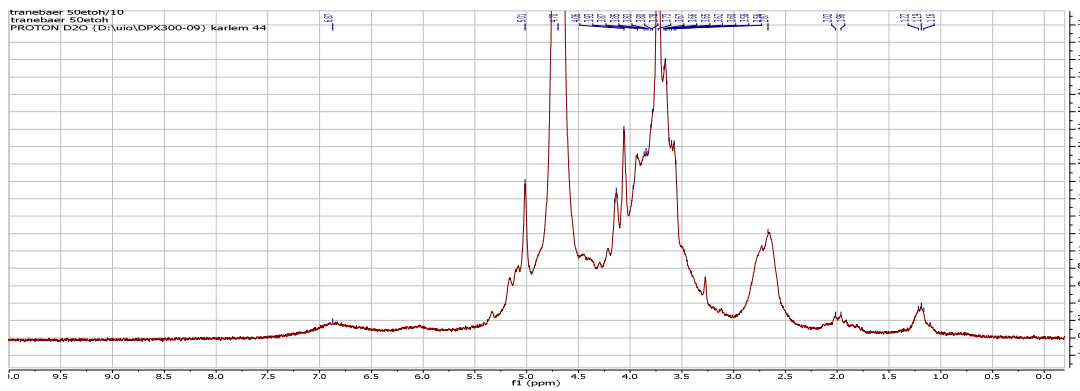
**96%-etanolekstrakt tyttebær**



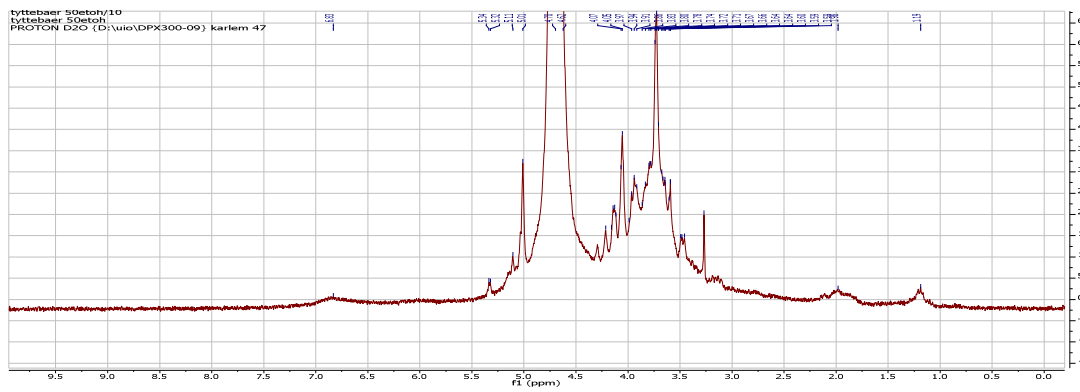
**50%-etanolekstrakt hageblåbær**



**50%-etanolekstrakt skogsblåbær**



**50%-etanolekstrakt tranebær**



**50%-etanolekstrakt tyttebær**

---

# Kilder

AIST (2013). Integrated Spectral Database System of Organic Compounds.

Anzenbacher, P. and E. Anzenbacherova (2001). "Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics." Cell Mol Life Sci 58(5-6): 737-747.

Bailey, D. G., G. K. Dresser and J. R. Bend (2003). "Bergamottin, lime juice, and red wine as inhibitors of cytochrome P450 3A4 activity: comparison with grapefruit juice." Clin Pharmacol Ther 73(6): 529-537.

Bailey, D. G., J. D. Spence, B. Edgar, C. D. Bayliff and J. M. Arnold (1989). "Ethanol enhances the hemodynamic effects of felodipine." Clin Invest Med 12(6): 357-362.

Brandon, E. F., C. D. Raap, I. Meijerman, J. H. Beijnen and J. H. Schellens (2003). "An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons." Toxicol Appl Pharmacol 189(3): 233-246.

Braunlich, M., H. Christensen, S. Johannesen, R. Slimestad, H. Wangensteen, K. E. Malterud and H. Barsett (2013). "In vitro inhibition of cytochrome P450 3A4 by Aronia melanocarpa constituents." Planta Med 79(2): 137-141.

Braunlich, M., R. Slimestad, H. Wangensteen, C. Brede, K. E. Malterud and H. Barsett (2013). "Extracts, anthocyanins and procyanidins from Aronia melanocarpa as radical scavengers and enzyme inhibitors." Nutrients 5(3): 663-678.

Chan, W. K., L. T. Nguyen, V. P. Miller and R. Z. Harris (1998). "Mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 3A4 by grapefruit juice and red wine." Life Sci 62(10): PL135-142.

Chung, E., A. N. Nafziger, D. J. Kazierad and J. S. Bertino, Jr. (2006). "Comparison of midazolam and simvastatin as cytochrome P450 3A probes." Clin Pharmacol Ther 79(4): 350-361.

Egashira, K., H. Ohtani, S. Itoh, N. Koyabu, M. Tsujimoto, H. Murakami and Y. Sawada (2004). "Inhibitory effects of pomelo on the metabolism of tacrolimus and the activities of CYP3A4 and P-glycoprotein." Drug Metab Dispos 32(8): 828-833.

Farkas, D., L. E. Oleson, Y. Zhao, J. S. Harmatz, M. A. Zinny, M. H. Court and D. J. Greenblatt (2007). "Pomegranate juice does not impair clearance of oral or intravenous midazolam, a probe for cytochrome P450-3A activity: comparison with grapefruit juice." J Clin Pharmacol 47(3): 286-294.

Fukuda, K., T. Ohta, Y. Oshima, N. Ohashi, M. Yoshikawa and Y. Yamazoe (1997). "Specific CYP3A4 inhibitors in grapefruit juice: furocoumarin dimers as components of drug interaction." Pharmacogenetics 7(5): 391-396.

Goodman, L. S., A. Gilman, L. L. Brunton, B. A. Chabner and B. C. Knollmann (2011). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York, McGraw-Hill Medical.

grønt, O. f. f. o. (2013). "Totaloversikten- Frisk frukt, bær, grønnsaker og poteter 2003-2012

---

" Retrieved 17.04

2013, from [http://www.frukt.no/sitefiles/1/vedlegg/ofg\\_total2012.pdf](http://www.frukt.no/sitefiles/1/vedlegg/ofg_total2012.pdf).

Heinrich, M., A. D. Kinghorn, J. D. Phillipson, D. Maizels and S. Gibbons (2004). Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy, Churchill Livingstone Elsevier, UK.

Hidaka, M., K. Fujita, T. Ogikubo, K. Yamasaki, T. Iwakiri, M. Okumura, H. Kodama and K. Arimori (2004). "Potent inhibition by star fruit of human cytochrome P450 3A (CYP3A) activity." Drug Metab Dispos 32(6): 581-583.

Hidaka, M., M. Okumura, K. Fujita, T. Ogikubo, K. Yamasaki, T. Iwakiri, N. Setoguchi and K. Arimori (2005). "Effects of pomegranate juice on human cytochrome p450 3A (CYP3A) and carbamazepine pharmacokinetics in rats." Drug Metab Dispos 33(5): 644-648.

Hidaka, M., M. Okumura, T. Ogikubo, H. Kai, K. Fujita, T. Iwakiri, K. Yamasaki, N. Setoguchi, N. Matsunaga and K. Arimori (2006). "Transient inhibition of cyp3a in rats by star fruit juice." Drug Metab Dispos 34(3): 343-345.

Hjelmstad, R. (2011). "Blåbær-*Vaccinium myrtillus*." Retrieved 08.04, 2013, from [http://www.rolv.no/urtemedisn/medisinplanter/vacc\\_myrt.htm](http://www.rolv.no/urtemedisn/medisinplanter/vacc_myrt.htm).

Hjelmstad, R. (2011). "Tyttebær-*Vaccinium vitis-idaea*." Retrieved 08.04, 2013, from [http://www.rolv.no/urtemedisn/medisinplanter/vacc\\_vit.htm](http://www.rolv.no/urtemedisn/medisinplanter/vacc_vit.htm).

Hjelmstad, R. (2012). "Amerikansk tranebær-*Vaccinium macrocarpon*." Retrieved 08. april, 2013, from [http://www.rolv.no/urtemedisn/medisinplanter/vacc\\_mac.htm](http://www.rolv.no/urtemedisn/medisinplanter/vacc_mac.htm).

Jensen, W. B. (2007). "The origin of the Soxhlet extractor." Journal of Chemical Education 84(12): 1913.

Kim, E., A. Sy-Cordero, T. N. Graf, S. J. Brantley, M. F. Paine and N. H. Oberlies (2011). "Isolation and identification of intestinal CYP3A inhibitors from cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) using human intestinal microsomes." Planta Med 77(3): 265-270.

Lewis, D. F. (2004). "57 varieties: the human cytochromes P450." Pharmacogenomics 5(3): 305-318.

Lilja, J. J., J. T. Backman and P. J. Neuvonen (2007). "Effects of daily ingestion of cranberry juice on the pharmacokinetics of warfarin, tizanidine, and midazolam--probes of CYP2C9, CYP1A2, and CYP3A4." Clin Pharmacol Ther 81(6): 833-839.

Lin, J. H. and A. Y. Lu (2001). "Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes." Annu Rev Pharmacol Toxicol 41: 535-567.

Lorentzen, G. (2013). "Frysetørking." Retrieved 08.04.13, 2013, from <http://snl.no/frysetørking>.

Lovdata. (2013). "Forskrift om legemiddelklassifisering ( legemiddellisten, unntakslisten og urtelisten)." Retrieved 08.04, 2013, from <http://lovdata.no/for/sf/ho/to-19991227-1565-0.html#4>.



- 
- Malhotra, S., D. G. Bailey, M. F. Paine and P. B. Watkins (2001). "Seville orange juice-felodipine interaction: comparison with dilute grapefruit juice and involvement of furocoumarins." Clin Pharmacol Ther 69(1): 14-23.
- Malterud, K. E., T. L. Farbrot, A. E. Huse and R. B. Sund (1993). "Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones." Pharmacology 47 Suppl 1: 77-85.
- Medox. (2013). "Om Medox." Retrieved 08.04.13, 2013, from [www.medox.no/om-medox.no](http://www.medox.no/om-medox.no).
- Molden, E. and O. Spigset (2007). "Legemidler i praksis-Frukt og baer--interaksjoner med legemidler." Tidsskrift for den Norske Lægeforening 127(24): 3218-3220.
- Myskja, A. (2006). Blåbær-smakfull antioksidant. Oslo, Noras ark.
- Nagata, M., M. Hidaka, H. Sekiya, Y. Kawano, K. Yamasaki, M. Okumura and K. Arimori (2007). "Effects of pomegranate juice on human cytochrome P450 2C9 and tolbutamide pharmacokinetics in rats." Drug Metab Dispos 35(2): 302-305.
- Ngo, N., Z. Yan, T. N. Graf, D. R. Carrizosa, A. D. Kashuba, E. C. Dees, N. H. Oberlies and M. F. Paine (2009). "Identification of a cranberry juice product that inhibits enteric CYP3A-mediated first-pass metabolism in humans." Drug Metab Dispos 37(3): 514-522.
- Nguyen, M. (2010). Hemming av CYP3A4-metabolisme av ulike bærekstrakter. Oslo, Farmasøytisk Institutt.
- Nycomed. (2013). "Nycoplus-Tranebær med blåbær." Retrieved 08.04, 2013, from <http://www.nycomed.no/nycoplus-tranebar-med-blabar>.
- Olkkola, K. and J. Ahonen (2008). Midazolam and other benzodiazepines. Modern Anesthetics, Springer: 335-360.
- Paine, M. F., H. L. Hart, S. S. Ludington, R. L. Haining, A. E. Rettie and D. C. Zeldin (2006). "The human intestinal cytochrome P450 "pie"." Drug Metab Dispos 34(5): 880-886.
- Pedersen-Bjergaard, S. and K. E. Rasmussen (2010). Legemiddelanalyse. Bergen, Fagbokforlaget.
- Rang, H. P. and M. M. Dale (2007). Rang and Dale's pharmacology / H.P. Rang ... [et al.]. Edinburgh, Churchill Livingstone Elsevier.
- Rindone, J. P. and T. W. Murphy (2006). "Warfarin-cranberry juice interaction resulting in profound hypoprothrombinemia and bleeding." Am J Ther 13(3): 283-284.
- Rowland, M. and T. N. Tozer (1995). Clinical pharmacokinetics : concepts and applications. Baltimore Williams & Wilkins.

- 
- Savikin, K., G. Zdunic, T. Jankovic, S. Tasic, N. Menkovic, T. Stevic and B. Dordevic (2009). "Phenolic content and radical scavenging capacity of berries and related jams from certificated area in Serbia." Plant Foods Hum Nutr 64(3): 212-217.
- Shimada, T., H. Yamazaki, M. Mimura, Y. Inui and F. P. Guengerich (1994). "Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians." J Pharmacol Exp Ther 270(1): 414-423.
- Thummel, K. E., D. D. Shen, T. D. Podoll, K. L. Kunze, W. F. Trager, C. E. Bacchi, C. L. Marsh, J. P. McVicar, D. M. Barr, J. D. Perkins and et al. (1994). "Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: II. Characterization of inter- and intraindividual hepatic CYP3A variability after liver transplantation." J Pharmacol Exp Ther 271(1): 557-566.
- Thummel, K. E., D. D. Shen, T. D. Podoll, K. L. Kunze, W. F. Trager, P. S. Hartwell, V. A. Raisys, C. L. Marsh, J. P. McVicar, D. M. Barr and et al. (1994). "Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients." J Pharmacol Exp Ther 271(1): 549-556.
- Wang, D., Y. Guo, S. A. Wrighton, G. E. Cooke and W. Sadee (2011). "Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs." Pharmacogenomics J 11(4): 274-286.
- Wikipedia. (2013). "*Vaccinium corymbosum*." Retrieved 28.04.13, 2013, from [http://en.wikipedia.org/wiki/Vaccinium\\_corymbosum](http://en.wikipedia.org/wiki/Vaccinium_corymbosum).