



Háskólinn  
á Akureyri  
University  
of Akureyri

---

VIÐSKIPTA- OG RAUNVÍSINDASVIÐ

# Háskólinn á Akureyri

## Viðskipta- og raunvísindasvið

Námskeið	LOK 1126 & LOK 1226
Heiti verkefnis	Lífvirkni í rót rabarbara
Verktími	Janúar 2016 – apríl 2016
Fyrirtæki	Rabarbararæktun Eddu Kamillu Örnólfsdóttur
Tengiliður	Edda Kamilla Örnólfsdóttir
Nemandi	Snæfríður Arnardóttir
Leiðbeinandi	Rannveig Björnsdóttir
Upplag	4
Blaðsíðufjöldi	47
Fjöldi viðauka	3
Fylgigögn	Engin
Útgáfu- og notkunarréttur	Opið verkefni. Verkefnið má ekki fjölfalda, hvorki í heild né að hluta til nema með leyfi höfundar.

# Yfirlýsingar

„Ég lýsi því yfir að ég ein er höfundur þessa verkefnis og að það er afrakstur eigin rannsókna“

---

Snæfríður Arnardóttir

„Það staðfestist að verkefni þetta fullnægir að mínum dómi kröfum til prófs í námskeiðunum *LOK1126* og *LOK1226*“

---

Rannveig Björnsdóttir, starfandi forseti  
viðskipta- og raunvísindasviðs

## Abstract

Rhubarb root (*Rheum rhabarbum*) has long been known as a medicinal herb in China because of positive effects for human. Rhubarb grows all over Iceland but is mainly used in jams and deserts, but the root is not used at all. The objective of the project is to determine if the root has antioxidant-, wound healing- or antihypertensive activity with the aim to use products in cosmetics, food supplement or even medicine. The root was air dried at different temperatures and extraction carried out using two different methods, with water as compared with ethanol. A protocol for measuring antihypertensive activity was organized and tested in the project. Antioxidant activity was measured using two different approach and antihypertensive activity using two different protocols. Wound healing activity was measured by determining the concentration of FGF2 growth factor in the samples. The main result showed that the rhubarb root contains all the activities measured but treatment of the samples clearly affected the activity. Overall, air drying at 60°C and extraction with ethanol showed highest activity.

**Key words:** Rhubarb root, biological activity, biotechnology, by-product.

## **Þakkarorð**

Ég vil þakka leiðbeinenda mínum Rannveigu Björnsdóttur, starfandi forseta viðskipta- og raunvísindasviðs fyrir góða leiðsögn í verkefninu, stuðning og góðar ábendingar við yfirllestur þess. Eddu Kamillu Örnólfsdóttur vil ég þakka fyrir rabarbarann sem hún útvegaði fyrir rannsóknina. Árný Ingveldi Brynjarsdóttur vil ég þakka fyrir hjálpina við verklega hluta verkefnisins og aðstoð við úrvinnslu niðurstaðna. Ég vil þakka stelpunum í Matís ohf. á Sauðárkróki fyrir aðstoðina við framkvæmd á lífvirknimælingum.

Ég vil þakka samnemendum mínum og vinum fyrir skemmtileg þrjú ár, en það var aldrei langt í hláturinn sem bjargaði oft á álagstímum. Síðast en ekki síst vil ég þakka fjölskyldunni minni sem alltaf hefur verið til staðar og að hafa alltaf trú á mér.

Akureyri 11. Apríl 2016  
Snæfríður Arnardóttir

# Útdráttur

Rabarbararót hefur lengi verið þekkt lækningarjurt í Kína og hefur hún marga eftirsóknarverða eiginleika. Rabarbari hefur lengi verið ræktaður hérlendis en er hann aðallega notaður í sultur og grauta, en rótin ekki nýtt. Markmið verkefnisins er að kanna hvort rótin hafi andoxunar-, blóðþrýstingslækkandi- og/eða græðandi virkni með það í huga að nýta þá eiginleika í snyrtivörur, fæðubótarefni eða jafnvel lyf. Rótin var loftþurrkuð við mismunandi hitastig og útdráttur gerður með tveim aðferðum og tveimur mismunandi leysum. Andoxunarvirkni var mæld með tveimur aðferðum, blóðþrýstingslækkandi virkni var mæld með tveim útfærslum af sömu aðferðinni, önnur þeirra var sett upp í verkefninu og græðandi virkni var athuguð með mælingum á vaxtarþættinum FGF2. Helstu niðurstöður sýna að þá lífvirkni sem mæld var sé að finna í rabarbararót en meðferð sýna og aðferðir við útdrátt virkni hefur áhrif. Útdráttur með bleyti aðferð og etanóli sem leysi gaf besta niðurstöðu og var rótin þá þurrkuð við 60°C.

**Lykilorð:** Rabarbararót, lífvirkni, líftækni, hliðarafurð.

# Efnisyfirlit

1. Inngangur .....	1
1.1 Rabarbari (Rheum rhabarbum) .....	1
1.2 Lífvirkni í plöntum.....	1
1.2.1 Andoxunavirkni.....	2
1.2.2 Blóðþrýstingslækkandi virkni .....	4
1.2.3 Græðandi virkni – Vaxtarþátturinn FGF2 .....	5
1.3 Markmið og rannsóknarspurningar verkefnis.....	6
2. Efni og aðferðir .....	7
2.1 Undirbúningur sýna.....	8
2.1.1 Útdráttur lífvirkni .....	8
2.2 Andoxunarpróf.....	10
2.2.1 DPPH aðferð (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil) .....	10
2.2.2 Heildar andoxunavirkni (TAC aðferð).....	11
2.3 Blóðþrýstingslækkandi áhrif – hindrun á ACE .....	11
2.3.1 Hindrun á ACE mæld með nýuppsettri aðferð.....	11
2.3.2 Hindrun á ACE framkvæmd með aðferðarlýsingu frá Matís.....	12
2.4 Græðandi virkni – Vaxtarþátturinn FGF2 .....	13
3. Niðurstöður.....	15
3.1 Andoxunavirkni.....	15
3.1.1 DPPH aðferð .....	15
3.1.2 Heildar andoxunavirkni (TAC aðferð).....	15
3.4 Blóðþrýstingslækkandi virkni.....	16
3.4.1 Hindrun á ACE virkni .....	16
3.4.2 Hindrun á ACE mæld með aðferðarlýsingu frá Matís.....	17
3.5 Græðandi virkni.....	19
4. Umræður.....	23
5. Lokaorð og samantekt.....	27
Heimildaskrá.....	28
Viðaukar.....	32

## Myndaskrá

Mynd 1 – Renín-Angiotensín kerfið og Kínín-Kallikrein kerfið.....	5
Mynd 2 – Rabarbararót.....	6
Mynd 3 - Flæðirit verkefnisins.....	7
Mynd 4 - Þurrkun rabarbararótar.....	8
Mynd 5 - Uppsetning dreypi aðferðar.....	9
Mynd 6 - Uppsetning bleyti aðferðar.....	10
Mynd 7 – Andoxunarvirkni mæld með DPPH prófi.....	15
Mynd 8 – Hindrun á ACE (%) í sýnum.....	18
Mynd 9 – Styrkur próteina í sýnum. ....	20
Mynd 10 – Styrkur FGF2 vaxtarþáttar í sýnum.....	21
Mynd 11 - Mæling á FGF2 vaxtarþætti með ELISA.....	22
Mynd 12 - Staðall sem notaður var við mælingar á heildar andoxunarvirkni (TAC).....	33
Mynd 13 - Staðall sem notaður var við mælingar á heildar andoxunarvirkni (TAC).....	33
Mynd 14 - Staðall sem notaður var við útreikninga á Bradford próteinmælingu.....	34
Mynd 15 - Staðall sem notaður var við mælingu á ELISA.....	37
Mynd 16 - Staðall sem notaður var við útreikninga á ELISA.....	37

## Töfluskrá

Tafla 1 – Heildar andoxunarvirkni mæld með TAC aðferð.....	16
Tafla 2 – Hindrun á ACE.....	17
Tafla 3 – Hindrun á ACE (IC50) í sýnum.....	19
Tafla 4 - DPPH radikala hreinsun.....	32
Tafla 5 - Staðalfrávik ELISA mælingu.....	36



# Skilgreiningar

ACE: Angiotensin converting enzyme

BSA: Bovine Serum Albumin

dH<sub>2</sub>O: eimað vatn

DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

EtOH: etanól

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

FGF: fibroblast growth factor – fibroblast vaxtarþáttur

GAE: Gallic acid equivalent – tilsvarandi gallic sýru

IC<sub>50</sub>: the half maximal inhibitory concentration – magn sýnis sem þarf til að hindra  
hvarf um 50%

MQ H<sub>2</sub>O: ultra pure water

PBS: Phosphate buffer saline

TAC: Total antioxidant capacity – heildar andoxunarvirkni

# 1. Inngangur

## 1.1 Rabarbari (*Rheum rhabarbum*)

Rabarbari er jurt sem telst til súruættar og er hann oft nefndur tröllasúra. Þessi jurt getur vaxið nánast alls staðar þar sem henni er komið fyrir. Hann er uppruninn frá Asíu, fyrst var vitað af honum í fjalllendi Kína en heitið *Rheum* er úr persnesku. Þar var hann upphaflega ræktaður vegna rótarinnar og þá fyrst og fremst vegna hægðarlosandi eiginleika hennar. Hérlendis eru stilkarnir einungis notaðir í sultur, bökur og grauta (Bjarni E. Guðleifsson, 2006, bls 88). Hann hefur verið notaður í matreiðslu um allan heim og rótin í lækningaskyni í þúsundir ára og þá aðallega í Kína (Will & Dietrich, 2013). Enn í dag er rabarbararót mikið notuð í ýmis lyf unnin úr jurtum. (Huang, Lu, Shen, Chung, & Ong, 2007). Af afbrigðinu sem er upphaflega frá Kína hafa orðið til nokkur ræktuð afbrigði. Helstu afbrigði rabarbarans eru *Victoria*, það afbrigði er með græna stilka og gefur mikla uppskeru. *Linnaeus* er svo annað afbrigði en það er með ljósrauða og grænleita stilka og vex hann snemma. Þriðja afbrigðið er vínrabarbari, hann er rauður að utan og innan og uppskeran er frekar lítil en hann er bragðmeiri en hin afbrigðin og þekkt er að rótin sé notuð í lyf (Novak, F.A., 1965/1972, bls 174).

## 1.2 Lífvirkni í plöntum

Plöntur hafa verið notaðar í lækningaskyni frá fornöld. Í dag eru 119 hrein efnasambönd unnin úr háplöntum notuð í lækningaskyni víða um heim. Þetta eru lyf sem notuð eru til að meðhöndla ýmsa sjúkdóma í mönnum. Kínverjar hafa lengi verið fremstir í flokki þegar kemur að því að nota plöntur í lækningarskyni og treysta þeir mikið á jurtaseyði úr alls konar plöntum og hafa þeir mikinn áhuga á rannsóknum sem tengjast lífvirkni í sérstaklega háplöntum með lækningar í huga. Aukning hefur verið í slíkum rannsóknum síðastliðna áratugi og hafa fleiri verið að sýna rannsóknum á þessu sviði athygli. Ýmsar rannsóknir hafa verið gerðar og má þar nefna lyf við krabbameini og hafa sumar plöntur sýnt slík áhrif. En þessar rannsóknir eru ekki langt á veg komnar sem er frekar sorglegt þar sem lífvirkni plantna hefur verið þekkt frá byrjun nítjándu aldar og

tækni og vísindapekking hefur aukist töluvert frá þeim tíma (Wilson & Perez, 1988, bls 83-92).

Þar sem rabarbari hefur verið notuð sem lækningarjurt í Kína lengi hafa Kínverjar verið áberandi í rannsóknum á rabarbararót. Rannsóknir hafa sýnt fram á að rabarbararót hefur ýmis eftirsóknarverð áhrif en er hann t.d. hitalækkandi, örveruhindrandi, veiruhindrandi, hefur góð áhrif á magaflóru og gæti læknað magasjúkdóma, getur komið í veg fyrir fitumyndun í blóði, verndað lifrina, bólgueyðandi og hefur mikla andoxunavirkni. Einnig á rabarbari að geta komið í veg fyrir alkóhólisma og dregið úr timburmönnum (Zhou et al., 2006).

Rabarbararót hefur marga áhugaverða eiginleika og margir þeirra örugglega óljósir enn, því voru aðferðirnar sem á að nota valdar út frá fyrri rannsóknum og einnig var ákveðið að framkvæma mælingar á virkni sem ekki er þekkt að sé til staðar í rabarbararót. Andoxunavirkni er þekkt í rabarbararót og því voru framkvæmd tvö slík próf til að bera niðurstöður aðferða saman. Eiginleikar sem ekki eru þekktir í rabarbararót sem skoðaðir verða eru blóðþrýstingslækkandi virkni, en þá verður skoðað hvort sýnið geti hindrað ACE (Angiotensin-converting enzyme) sem gæti haft í för með sér lækkaðan blóðþrýsting. Einnig verður framkvæmd próteinmæling sem mælir hvort próteinið FGF2 (fibroblast vaxtarþáttur 2) sé til staðar en það prótein á að hafa græðandi áhrif.

### **1.2.1 Andoxunavirkni**

Oxun á sér stað í öllum lífverum í súrefnisríku umhverfi, þá tapar frumefni rafeind og oxunartalan hækkar. Fjöldmargir efnafræðilegir ferlar geta hindrað oxun og það kallast andoxun en þá bætir frumefni við sig rafeind og oxunartala þess lækkar (Damodaran, S., Parkin, K., Fennema, O, 2008, bls 702). Andoxunarefni mynda stöðugleika með því að para saman rafeindir. Þannig vinna þau gegn oxun með því að gefa frá sér rafeind svo sameindin komist í stöðugt ástand. En margt annað en efnaskipti hefur áhrif á oxun og má þar sem dæmi nefna umhverfisþættir eins og geislun, mengun og ýmis eiturefni sem geta flýtt fyrir oxun. Efni sem myndast við oxun kallast einu nafni sindurefni. Ónæmiskerfi líkamans reynir að gera þessi efni skaðlaus, en það virkar ekkert í öllum tilfellum. Ef of mikil framleiðsla er á þessum sindurefnum geta því myndast oxunarskemmdir, en það veldur öldrun og sjúkdómum á borð við

krabbamein, liðagigt og hjarta- og æðasjúkdóma. Því eru andoxunarefni góð sem fyrirbyggjandi til að koma í veg fyrir neikvæð áhrif sindurefna í líkamanum. Dæmi um andoxunarefni eru C og E-vítamín og  $\beta$ -karótín. Ekki er þó vitað hvaða áhrif þessi efni hafa sem forvörn, hvort þau hafi jafnvel skaðleg áhrif ef neysla er í of miklu magni. Andoxunarefni eru eins mismunandi og þau eru mörg og hafa þau mismikla virkni. En þegar þeirra er neytt í formi fæðubótarefna geta þau virkað eins og sindurefni og því er þeirra ekki neytt í forvarnarskyni eins og staðan er í dag (Ólafur Gunnar Sæmundsson, 2007, bls 271-275).

Þar sem oxun eyðileggur matvæli er andoxunarefnum oft bætt við. Andoxun kemur breytilega fram og þessi fjölbreytta mynd andoxunar gefur misgóða andoxunarvirkni. Viðurvist margra andoxara getur aukið stöðugleika oxunarinnar vegna samverkandi áhrifa á milli andoxara. (Damodaran, S., Parkin, K., Fennema, O, 2008, bls 702).

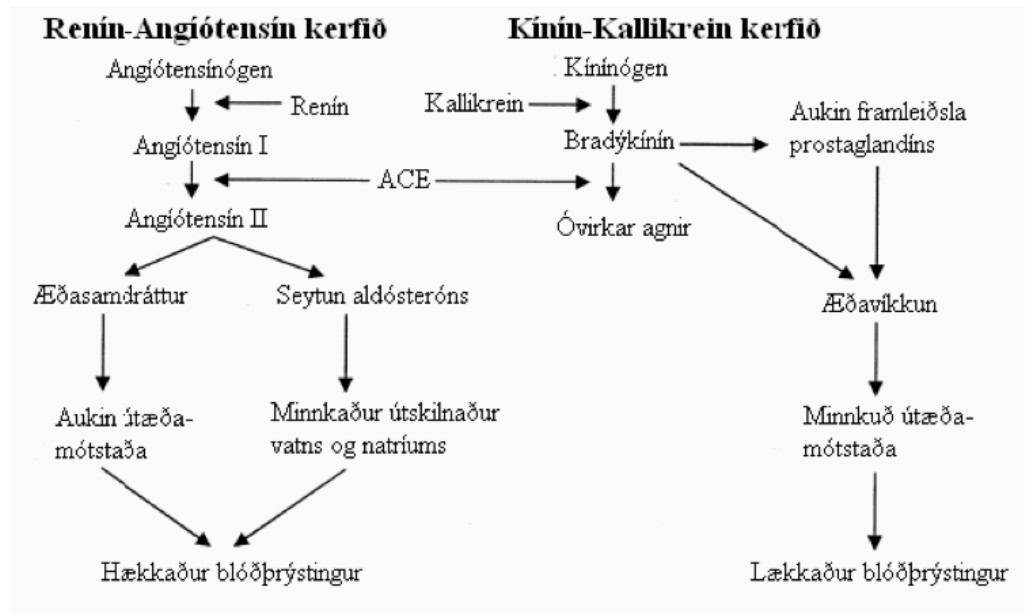
Þau andoxunarefni sem yfirleitt hafa verið notuð eru ekki náttúruleg heldur gerð samkvæmt efnaformúlum. Þau andoxunarefni sem oft eru notuð til að auka geymsluþol í mat eru BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene), PG (propyl gallate) og TBHQ (tert-butylhydroquinone). En sýnt hefur verið fram á að BHA og BHT geti valdið eitrunum og hafi ekki eins góða andoxunarvirkni og náttúruleg andoxunarefni (Moure o.fl., 2001). Margar plöntur eiga að vera öflugir andoxarar, þar sem þær innihalda mikið af C-vítamíni, E-vítamíni og karótín sem allt eru náttúrulegir andoxarar (Ndhlala, Moyo, & Van Staden, 2010).

Til eru nokkrar aðferðir til að mæla andoxunarvirkni og mælir hver aðferð andoxunarvirkni valinna sameinda. Ein aðferðin til að mæla andoxunarvirkni kallast DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Með þessu prófi er kannað hvort sýnið geti hamlað sindurefnum, en DPPH er stöðugt sindurefni. DPPH sameindin er fjólublá að lit og grípur hún ljós við 520 nm. Þegar DPPH er blandað saman við sýni sem gefur frá sér vetnisatóm, þá verður afoxun og fjólublái liturinn tapast og gulur litur myndast sem kemur úr picryl hópnum (Molyneux, 2004). Önnur aðferð til að mæla andoxunarvirkni er mæling á heildar andoxunargetu sýnis með t.d. TAC aðferð (total antioxidant capacity) en sú aðferð mælir heildar andoxunarvirkni sýnis (Ghiselli, Serafini, Natella, & Scaccini, 2000).

### 1.2.2 Blóðþrýstingslækkandi virkni

Hár blóðþrýstingur eða háþrýstingur er og hefur lengi verið vandamál í heiminum og í Bandaríkjunum er einn af hverjum þremur fullorðnum að kljást við þetta vandamál. Blóðþrýstingur er þrýstingurinn sem myndast þegar hjartað dælir blóði út í blóðrásina. En hann skiptist í tvo ferla, slagbilsþrýsting og þanbilsþrýsting. Slagbilsþrýstingur er sá þrýstingur sem myndast þegar hjartað dælir blóði og þanbilsþrýstingur er þegar hjartað er í hvíld á milli slaga. Ef þessi þrýstingur hækkar og er hár til lengri tíma getur það leitt til hjartasjúkdóma, hjartabilunar, hjartaáfalls, nýrnabilunar og annarra heilsufarsvandamála. Blóðþrýstingur á það til að hækka með aldri og því eru þeir sem eldri eru í meiri hættu en yngri einstaklingar (Anonymous, 2008).

Ensím sem kallast angiotensin converting enzyme (ACE) er lykilensím í stjórnun á blóðþrýstingi. En það er hluti af kerfi sem nefnist RAS (renín angiotensin kerfi) og spilar það stórt hlutverk í stjórnun á slagæðaðþrýstingi (mynd 1). En ACE er hluti af zink málmpróteasa sem þarfnast zink og klóríðs svo það starfi rétt. ACE er einnig þekkt sem peptidyl-dipeptidase A þar sem það fjarlægir kolefni (C) á enda dipeptidase úr mismunandi fápeptíða hvarfefnum sem hafa laus kolefni á enda. Það hefur stjórn á blóðþrýstingi í lífverum vegna þess að það klýfur angiotensin I í angiotensin II sem er öflugt æðapregjandi ensím sem einnig stuðlar að varðveislu salts. Þessi æðapregjandi áhrif valda hækkuðum blóðþrýstingi og geta því heildaráhrif ACE verið hækkun á blóðþrýstingi. Því er hindrun á þessu ensími mögulega gagnleg aðferð til að lækka blóðþrýsting. Því getur efnasamband sem fært er um að bæla ACE virkni verið farsæl aðferð til að meðhöndla háþrýsting (Sentandreu & Toldra, 2006). Þessi virkni er yfirleitt mæld í einingu sem kallast  $IC_{50}$  sem er sá styrkur af efni sem þarf til að hindra hvarfið um 50% (Vermeirssen, Van Camp, & Verstraete, 2002).



**Mynd 1 – Renín-Angiotensín kerfið og Kínín-Kallikrein kerfið.** Renín-Angiotensín kerfið felur í sér breytingu á Angiotensin I í Angiotensin II sem getur haft í för með sér hækkaðan blóðþrýsting. Með hindrun á ACE (Angiotensin converting enzyme) getur Kínín-Kallikrein séð um að lækka blóðþrýstinginn. (Lárus Freyr Þórhallson, Margrét Geirsdóttir, Guðmundur Óli Hreggviðsson, Sigurður Vilhelmsson, & Guðjón Þorkelsson, 2007)

### 1.2.3 Græðandi virkni – Vaxtarþátturinn FGF2

Vaxtarþáttur er prótein úr ákveðnum frumum sem örvar aðrar frumur til að skipta sér. (Campbell, N., Reece, J., 2005, bls 231). Vaxtarþáttur verður að vera til staðar í utanfrumuvökva svo margar tegundir af frumum vaxi, skipti sér og þroskist eðlilega (Campbell, N., Reece, J., 2005, bls 948). Fíbróblast vaxtarþættir samanstanda af stórrí og útbreiddri fjölskyldu sem samanstanda af skyldum fjölpeptíðum sem taka þátt í nokkrum lífeðlisfræðilegum tegundum. Þessir vaxtarþættir eru í þúsundum dýrategunda í heiminum. FGF spilar stórt hlutverk í frumufjölgun, sérhæfingu fruma, ræsingu frumuskipta, nýmyndun æða, upphafsmyndun fósturvís og gróanda sára. Spendýr hafa 18 tegundir FGF, FGF1-FGF10 og FGF16-FGF23. Þessum hópum hafa verið skipt í sex aðgreinda hópa byggt á þróunarferli þeirra og hversu líkir þeir eru (Teven, Farina, Rivas, & Reid, 2014). En FGF er að finna í bæði hryggdýrum og hryggleysingjum, allt frá þráðormum í menn en ekki í einfruma lífverum eins og *Escherichia Coli* og *Saccharomyces cerevisiae*. Undirhópar FGF eru allir mismunandi í næstum öllum ef ekki öllum vöðvum og er tjáning einnig ólík. Sumir hópar hafa áhrif á

frumur á fósturskeiði (FGF3,4,8,15,17,19) og aðrar á frumur í vefjum fullorðinna (FGF1,2,5-7,9-14,16,18,20-23) (Ornitz & Itoh, 2001).

Eitt af mikilvægustu próteinunum í þessari fjölskyldu er FGF2 en það spilar mikilvægt hlutverk í mörgum líffræðilegum ferlum eins og t.d. gróanda sára og vefjaviðgerðum (Gupta, Chou, Li, Yang, & Yu, 2013).

### 1.3 Markmið og rannsóknarspurningar verkefnis

Þar sem rabarbararótin hefur lengi verið þekkt lækningarjurt í Kína er hún áhugaverður efniviður sem þarf að rannsaka betur. Í Eyjafirði er rabarbararæktun nýlega hafin og leitaði ræktandi til Háskólans á Akureyri með áhuga á samstarfi um að skoða hvort rabarbarinn hefði einhverja áhugaverða eiginleika sem hægt væri að nýta í t.d. snyrtivörur, fæðubótarefni eða jafnvel lyf. Markmið verkefnisins er að skoða áhugaverða lífvirkni í rót rabarbara og er þá fyrst og fremst verið að horfa til notkunar í snyrtivörur, fæðubótarefni eða lyf í framhaldi af því.



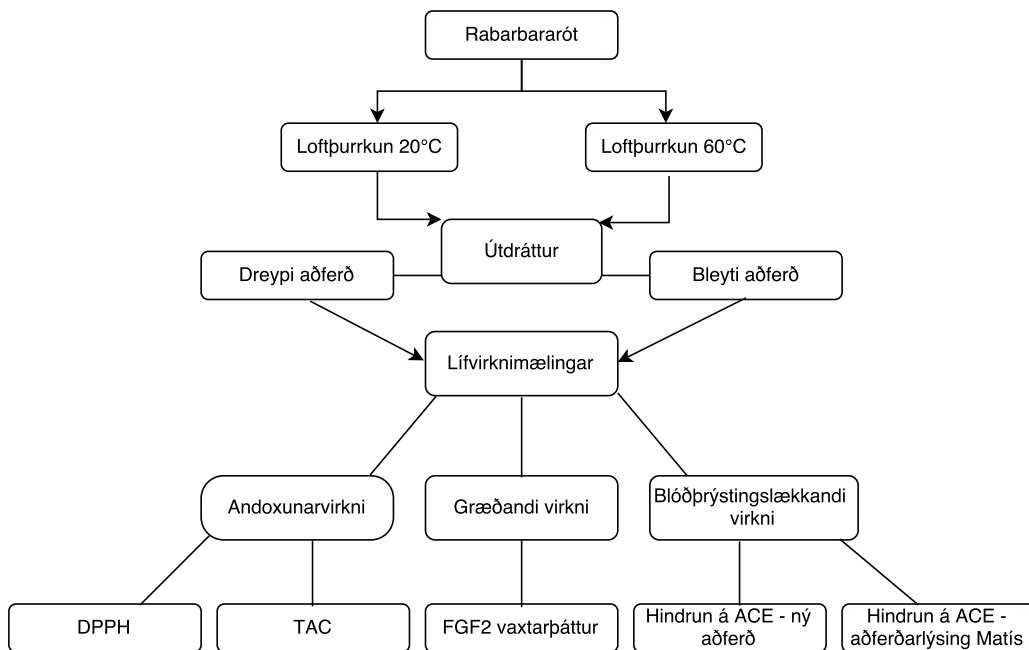
**Mynd 2 – Rabarbararót**

Þær rannsóknarspurningar sem settar voru fram eru:

1. Hefur rabarbararót blóðþrýstingslækkandi-, græðandi- og/eða andoxunarvirkni sem áhugavert væri að nota í snyrtivörur, fæðubótarefni og jafnvel lyf?
2. Hefur aðferð við útdrátt áhrif á mælda virkni?
3. Hefur hitastig við þurrkun áhrif á mælda virkni?

## 2. Efni og aðferðir

Rannsóknirnar voru framkvæmdar á rannsóknarstofu Háskólans á Akureyri og einnig fékk nemandi tækifæri til að framkvæma rannsókn á rannsóknarstofu Mátis á Sauðárkróki. Rabarbararætur voru þurrkaðar við mismunandi hitastig, 20°C og 60°C. Útdráttur sýnis var einnig framkvæmdur með tveim mismunandi aðferðum, þær kallast bleyti aðferð og dreypi aðferð og voru þær aðferðir framkvæmdar annars vegar með etanóli (EtOH) og hins vegar eimuðu vatni (dH<sub>2</sub>O). Síðan var lífvirkni mæld með fjórum mismunandi aðferðum, þar var skoðað hvort blóðþrýstingslækkandi áhrif (ACE-aðferð), græðandi virkni (mæling á FGF2 vaxtarþætti) og andoxunarvirkni (aðferðirnar DPPH og TAC) gæti verið að finna í rabarbararót.



**Mynd 3 - Flæðirit verkefnisins.** Andoxunarvirkni sýnanna var mæld með tveimur aðferðum, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) og TAC (heildar andoxunarvirkni). Blóðþrýstingslækkandi virkni var mæld með því að kanna hindrun á ACE (Angiotensin converting enzyme) og græðandi virkni var mæld með sérhæfðum mótefnum gegn FGF2 vaxtarþætti.



## 2.1 Undirbúningur sýna

Rabarbararót af yrkinu *Victoria* var þurrkuð (loftþurrkari frá Stockli) við 20°C og 60°C (mynd 4). Valið á hitastigum við loftþurrk var byggt á því að fá sem mestan mun á milli sýna og hitastigin því höfð á breiðu bili. Rótin var látin þorna á bekk yfir nótt svo hægt væri að ná moldinni betur þurri af henni. Síðan var hún skorin í litla bita svo þurrkunin væri jöfn. Þá var hún sett í þurrk og þurrkuð í 11 klukkutíma við 60°C og 47 klst við 20°C. Síðan var hún mulin í morteli í einsleitt duft og vatnsvirknin var mæld (Aqua lab). Rótin var svo geymd í frosti við -80°C þar til frekari úrvinnsla fór fram.



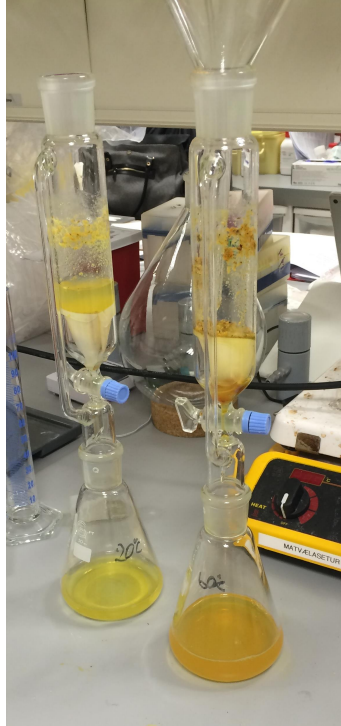
**Mynd 4** - Þurrkun rabarbararótar. Hér er búið að skera rötina niður í bita til að ná sem jafnastri þurrkun á öllum hlutum rótarinnar.

### 2.1.1 Útdráttur lífvirkni

Útdráttur var gerður með tveimur aðferðum, dreypi aðferð og bleyti aðferð. Þessar aðferðir voru valdar byggt á niðurstöðum fyrri rannsókna á þessum efnivið sem framkvæmdar voru af Söru Björk Gunnarsdóttur (2015). Notað var annars vegar eimað vatn ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) og hins vegar etanól ( $\text{EtOH}$ ) við útdráttinn.

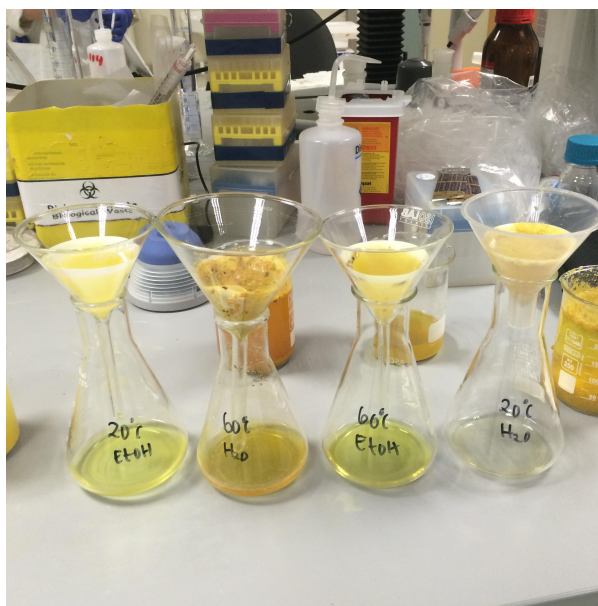
Við framkvæmd á dreypi aðferð (mynd 5) var útdráttur gerður með bæði etanóli og eimuðu vatni. Sett var 1 g sýni og 100 mL af eimuðu vatni eða etanóli

í súlu sem búið var að koma fyrir Whatman filter pappír nr. 2. Sýnið var síað í gegnum pappírinn tvisvar til að fá lausnina sem tærasta (mynd 5). Þessu var komið fyrir í eppendorf glösum og geymt við  $-80^{\circ}\text{C}$  þar til frekari rannsóknir fóru fram.



**Mynd 5** - Uppsetning dreypa aðferðar.

Bleyti aðferðin kallast einnig te-aðferð (mynd 6) þar sem 1 g af sýni og 100 mL af sjóðandi eimuðu vatni var sett í bikarglas og látið standa í fimm mínútur. Notað var bæði etanól og eimað vatn við útdráttinn. Það var síðan síað í gegnum Whatman filter pappír nr. 2 og í 350 mL kolbu (mynd 6). Sýnin voru fryst við  $-80^{\circ}\text{C}$  þangað til frekari rannsóknir fóru fram.



Mynd 6 - Uppsetning bleyti aðferðar.

## 2.2 Andoxunarpróf

Andoxunarvirkni var mæld með tveimur mismunandi aðferðum, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) aðferð og heildar andoxunarvirkni mæld með TAC aðferð (Total antioxidant capacity assay). Voru þau framkvæmd á tilraunastofu Háskólans á Akureyri sem staðsett er í Borgum.

### 2.2.1 DPPH aðferð (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil)

Aðferðin var framkvæmd samkvæmt aðferðarlýsingu Brand-Williams, Cuvelier, & Berset (1995) með lítilsháttar aðlögun að efnivið. Útbúin var stofnlausn sem innihélt 24 mg DPPH (Sigma-Aldrich) og 100 mL etanól. Úr henni var búin til vinnulausn sem innihélt 10 mL af stofnlausn og 45 mL af etanóli. Þá voru 100  $\mu$ L settir í eppendorfglas ásamt 450  $\mu$ L af vinnulausn og 450  $\mu$ L af etanóli. Var hvert sýni mælt í fjórtekningu. Eppendorfglasið var hrist örllítið með vortex og hellt yfir í kúvettu og mælt í ljósgleypnimæli við 517 nm. Sýnin voru mæld á hálf tímafresti þar til litlar breytingar voru á ljósgleypni en þess á milli voru þau geymd í myrkri við stofuhita. Viðmiðið sem notað var innihélt 450  $\mu$ L vinnulausn og 450  $\mu$ L etanól og jákvæði staðallinn var gallic sýra sem leyst var upp í eimuðu vatni og þynnt í eimuðu vatni í 10 mg/mL. Niðurstöður voru reiknaðar út með formúlunni

$$\text{Hreinsun\%} = (A_{\text{viðmið}} - A_{\text{sýni}} / A_{\text{viðmið}}) \times 100$$

### 2.2.2 Heildar andoxunarvirkni (TAC aðferð)

Stuðst var við aðferðarlýsingu Prasad & Ramakrishnan (2011) með nokkrum breytingum og aðlögun að efnivið. 100 µL af sýni var sett í 1,5 mL eppendorf glas ásamt 1 mL af nýblandaðri hvarflausn sem innihélt 0,6 M sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich), 28 mM sodium phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich) og 4 mM ammonium molybdate (Sigma-Aldrich). Þessum lausnum var blandað saman í hlutföllunum 1:1:1.

Glösin voru hituð í 90 mínútur við 95°C og hrist örlítið annað slagið. Þá voru þau látin kólna að herbergishita og ljósgleypni mæld við 695 nm. Viðmið voru útbúin, þ.e. hvarflausn, útdráttarvökvi (EtOH eða dH<sub>2</sub>O) ásamt hvarflausn og loks útdráttarvökvi (EtOH eða dH<sub>2</sub>O) ásamt hvarflausn. Útdráttarvökvinn var einnig notaður til að núllstillta tækið og þar með mínusaður frá. Gallic sýra var notuð sem staðall. Þá var 10 mg leyst í 1 mL H<sub>2</sub>O eða EtOH. 100 µL af þeirri lausn var sett í 900 µL af dH<sub>2</sub>O eða EtOH og þynnt áfram til helminga þangað til þynningarnar voru orðnar fjórar. Glösin voru hituð í 90 mínútur við 95°C og hrist örlítið annað slagið. Ljósgleypni var síðan mæld við 695 nm (Bioscreen C). Niðurstöður voru reiknaðar út með því að finna jöfnu bestu línu á jákvæða staðlinum og hún notuð til þess að finna út X út frá sýnum.

## 2.3 Blóðþrýstingslækkandi áhrif – hindrun á ACE

ACE-aðferðin var framkvæmd með tveimur mismunandi aðferðum, annars vegar með nýrri aðferð sem sett var upp á tilraunastofu Háskólans á Akureyri og hins vegar með aðferðarlýsingu frá Matis sem framkvæmd var hjá Matis á Sauðárkróki.

### 2.3.1 Hindrun á ACE mæld með nýuppsettri aðferð

Uppsetning nýrrar aðferðar til mælinga á hindrun ACE var samkvæmt lýsingu Orona-Tamayo, Valverde, Nieto-Rendón, & Paredes-López (2015). Notuð voru sýni sem þurrkuð voru við 20°C og 60°C, þar sem útdráttur var gerður með dH<sub>2</sub>O og bæði bleyti aðferð og dreypi aðferð. Sýnin voru prófuð í styrkleikunum 0,01 og 0,005 g/mL.

Byrjað var á að setja 50 µL af sýni í 2 mL eppendorf glas. Þá var bætt við 200 µL af 0,1 M sodium borate buffer [pH 8,3; 0,3 M NaCl (Sigma-Aldrich);

0,005 M HHL (Hippuryl-Histidyl-Leucine) (Sigma-Aldrich)] til að hefja hvarfið. HHL var leyst upp með 500 µL af ediksýru. Hverju sýni var síðan blandað við 50 µL (5mU) Angiotensin converting enzyme from rabbit lung (Sigma-Aldrich) og látið standa við 37°C í 30 mínútur. Svörunin var stöðvuð með 200 µL af 1 M HCl (Sigma-Aldrich). Brennisteinssýra sem myndaðist var dregin út með 1 mL af ethyl acetate (Sigma-Aldrich) og látið gufa upp við 90°C í 20-30 mínútur. Sýnin voru síðan enduruppleyst í 1 mL af MQ H<sub>2</sub>O, en eimaða vatninu var bætt við sýnin rétt áður en þau voru mæld. Ljósgeypni var síðan mæld (Bioscreen C) við 228 nm. Neikvætt viðmið innihélt allt nema sýnið sjálft og jákvæði staðallinn var Captopril í styrknum 0,1 µM. Niðurstöður voru reiknaðar út með formúlunni

$$IC50 = [(Lj\ddot{o}sgleypni_{kontr\ddot{o}ll} - Lj\ddot{o}sgleypni_{s\ddot{y}ni}) - (Lj\ddot{o}sgleypni_{kontr\ddot{o}ll} - Lj\ddot{o}sgleypni_{blank})] \times 100$$

### 2.3.2 Hindrun á ACE framkvæmd með aðferðarlýsingu frá Matís

Við framkvæmd sem gerð var á rannsóknarstofu Matís á Sauðárkróki var aðferðarlýsingu þeirra fylgt en hún er framkvæmd samkvæmt lýsingu Sentandreu & Toldra (2006). Sömu sýni voru mæld og lýst er í kafla 2.3.1. Byrjað var á því að útbúa vinnulausnir;

A: 300 mM Tris + 2 µM ZnCl<sub>2</sub> (pH 8,3)

B: 150 mM Tris (pH 8,3)

C: 150 mM Tris+1,125 mM NaCl (pH 8,3)

Flúrljómunar ljósgeypnimælir var undirbúinn (POLARstar OPTIMA frá BMG LABTECH) og stilltur á 37°C svo hann væri tilbúinn fyrir notkun á réttu hitastigi. Angiotensin converting enzyme vinnulausn (0,006 U/mL) var undirbúin og látin standa á ís. Jákvæður staðall var 1 µM Captopril (Sigma-Aldrich) sem prófaður var í nokkrum þynningum (1-0,5-0,25-0,125-0,0625-0,03125-0,015625 µM). Sýnin voru þynnt fjórum sinnum, styrkirnir voru þá 0,01–0,001-0,0001-0,00001-0,000001 mg/mL. Síðan voru 25 µL af sýni/blank/viðmið sett í viðeigandi brunna í plötu og 25 µL af ensím vinnulausn bætt út í. Þá voru 150 µL af 2000 nM Abz-Glz settir í einn brunninn til að núllstillta tækið. Platan var hrist varlega og sett í 37°C í 10 mínútur. Þá var 100

$\mu\text{L}$  af hvarflausn (Abz-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH-Trifluoroacetate salt, Bachem) bætt í hvern brunn, en hvarflausnin innihélt 30 mM stofnlausn (0,02176 g blandað í 1,5 mL Buffer C), 0,45 mM vinnulausn (150  $\mu\text{L}$  af stofnlausn þynnt í 10 mL Buffer C) og var það gert með inndælingartæki í POLARstar. Ljósgeypni var mæld (Bioscreen C) við 340 nm og 405 nm í POLARstar OPTIMA í 60 mínútur. Niðurstöður voru reiknaðar út með eftirfarandi formúlu:

ACE hindrun (%) =  $(1 - (\Delta\text{sample} / \Delta\text{blank}) \times 100)$  og út frá þessu var IC50 reiknað út með jöfnunni:  $\text{IC50} = \text{EXP}(50 - \text{skurðpunktur}) / \text{hallatala}$ .

Að lokum var flúrljómun sýnanna mæld (Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader frá BioTek) til að kanna hvort blá, græn eða rauð flúrljómun væri til staðar í sýnunum.

## 2.4 Græðandi virkni – Vaxtarþátturinn FGF2

Kannað var hvort FGF2 prótein vaxtarþáttur væri til staðar í rabarbararótinni með sérhæfðu mótefni í ELISA aðferð og samkvæmt lýsingu framleiðanda mótefnisins BioLegend (2000). Byrjað var á að ákvarða próteininnihald sýna með Bradford, þá voru 10  $\mu\text{L}$  af sýni og 300  $\mu\text{L}$  af Bradford lausn (Sigma-Aldrich) blandað saman og sett í örbrunnaplötu. Jákvæði staðallinn var BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich) og ljósgeypni mæld (Bioscreen C) við 600 nm. Reiknað var út úr þessum niðurstöðum með jöfnu bestu línu sem fékkst úr jákvæða staðlinum. Byggt á niðurstöðum mælinga á próteininnihaldi voru sýnin þynnt í hjúpunar buffur (carbonate buffer; 0,1M  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,03M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) þannig að styrkur mótefna væri 5-0,5-0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sýnin voru sett í örbrunnaplötu, 100  $\mu\text{L}$  í hvern brunn og platan látin standa yfir nótt við 4°C í lokaðri plötu í rakaboxi. Daginn eftir voru brunnarnir þvegnir þrisvar sinnum með PBS/Tween (0,5 mL/L) og 200  $\mu\text{L}$  af mettunarlausn (0,01 g/mL BSA í PBS) sett í hvern brunn. Platan var látin standa í rakaboxi við herbergishita í klukkutíma, brunnarnir síðan þvegnir þrisvar sinnum með PBS/Tween og þerraðir með því að hvolfa plötunni á þerripappír. Því næst voru 100  $\mu\text{L}$  af mótefnalausn (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sett í brunnana, en mótefnið var þynnt í 0,2% BSA í PBS. Þetta var látið standa í u.þ.b. 3 klukkutíma í lokaðri plötu í rakaboxi. Þá var vökvinn soginn úr og þvegið þrisvar sinnum með PBS/Tween og platan látin þorna á hvolfi á þerripappír. Ensímmerkt mótefni (geit anti mús IgG) gegn fyrra

mótefninu (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) var sett í brunnana, 100  $\mu\text{L}$  í hvern brunn, þynnt í 0,2% PBSA. Þá var platan látin standa í rakaboxi við herbergishita í eina klukkustund. Þvegið var með PBS/Tween þrisvar sinnum og þurrkað á þerripappír þar á eftir. Þá var hvarfefninu bætt út í, en hvarfefnið var p-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich) þynnt í hvarfefna buffer (1M dietanolamín; pH 9,8; 0,005M  $\text{MgCl}_2$ ). Jákvæði staðallinn var FGF2 prótein (Recombinant Human bFGF, Sino Biological) Þá var platan látin standa í klukkustund við herbergishita í rakaboxi og myrkri og ljósgleypni síðan mæld (Thermo Scientific Multiskan EX frá Thermo Scientific) við 405 nm eftir 30 mín og 60 mín.

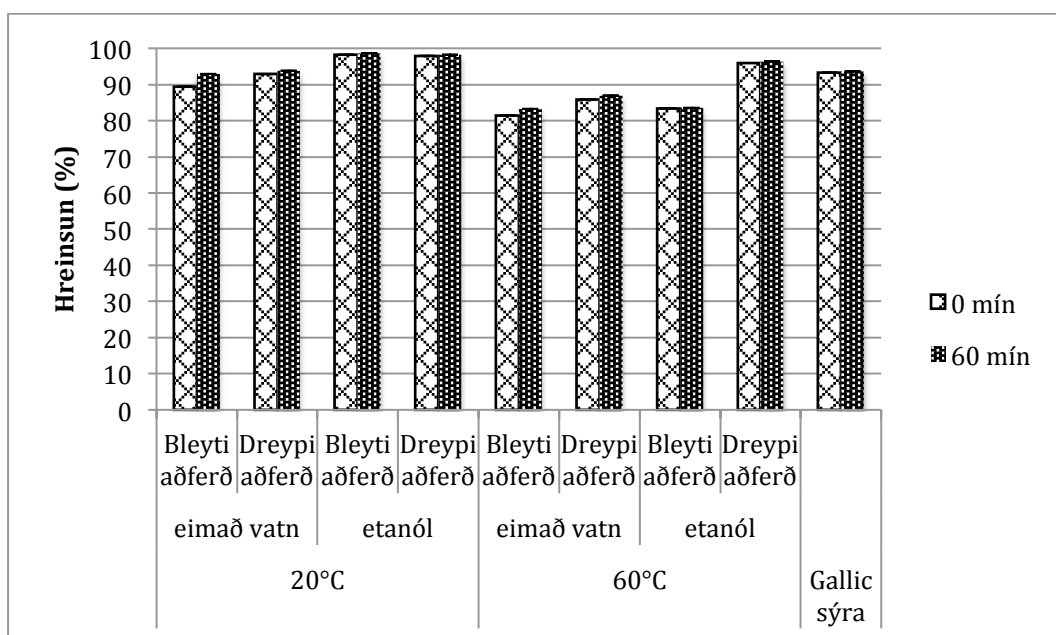
### 3. Niðurstöður

Niðurstöður mælinga á vatnsvirkni þurrkaðrar rótar við 60°C var 0,121  $a_w$  við 22,5°C og á rótinni sem þurrkuð var við 20°C var 0,158  $a_w$  við 21,6°C.

#### 3.1 Andoxunarvirkni

##### 3.1.1 DPPH aðferð

Mikil andoxunarvirkni mældist í sýnunum með þessari aðferð og hvarfið gerðist strax (mynd 7). Hæst virkni mældist í sýnum sem þurrkuð voru við 20°C og útdráttur gerður með etanóli. Ekki var mikill munur á útdráttaraðferðum í þessum sýnum. Einnig mældist mikil virkni í sýni sem þurrkað var við 60°C og útdráttur var gerður með dreypi aðferð og etanóli. Virkni annarra sýna mældist fyrir neðan gallic sýruna sem var jákvæða viðmiðið.



**Mynd 7 – Andoxunarvirkni mæld með DPPH prófi (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).** Á myndinni sést % hreinsun DPPH radikala í upphafi og eftir að hvarfið hafði gengið í 30 mínútur. Gallic sýran var notuð sem jákvætt viðmið.

##### 3.1.2 Heildar andoxunarvirkni (TAC aðferð)

Við mælingu á heildar andoxunarvirkni með TAC aðferð sást að meiri virkni mældist í þeim sýnum þar sem útdráttur var gerður með etanóli (tafla 1), en sýnin tilsvára 1 mg af gallic sýru. Einnig fengust hærri gildi við þurrkun við



60°C samanborið við þurrkun við 20°C. Bleyti aðferðin að kom einnig betur út en dreypi aðferðin í þessari mælingu. Í flestum tilfellum er staðalfrávikíð lágt svo ekki var mikil skekkja í mælingu. Sýni sem þurrkað var við 60°C og þar sem virkni var dregin út með bleyti aðferð og etanóli var að sýna mesta virkni. Í töflunni var minnsta þynning staðals tekin út, bæði þegar gallic sýran var þynnt með etanóli og eimuðu vatni þar sem sá punktur skekkti niðurstöður.

**Tafla 1 – Heildar andoxunavirkni mæld með TAC aðferð.** Taflan sýnir niðurstöðu mælinga á sýnum sem unnin voru á mismunandi hátt. Sýnin voru mæld í þrítekningu og staðalfrávik þeirra er sýnt.

	<b>Total antioxidant capacity (Avg.mg GAE/mL)</b>			
	<b>Bleyti aðferð</b>		<b>Dreypi aðferð</b>	
	<b>20°C</b>	<b>60°C</b>	<b>20°C</b>	<b>60°C</b>
<b>Eimað vatn</b>	1,050±0,037	1,068±0,100	0,560±0,038	0,794±0,067
<b>Etanól</b>	1,311±0,006	2,097±0,033	1,250±0,024	1,571±0,014

### 3.4 Blóðþrýstingslækkandi virkni

#### 3.4.1 Hindrun á ACE virkni

Niðurstöður mælinga á ACE hindrun sýnanna með nýuppsettri aðferð eru sýndar í töflu 2. Þar má sjá að ekki mikill munur á hvort sýnið er þynnt eða ekki. Virkni sýnanna var að mælast svipuð í öllum sýnum.

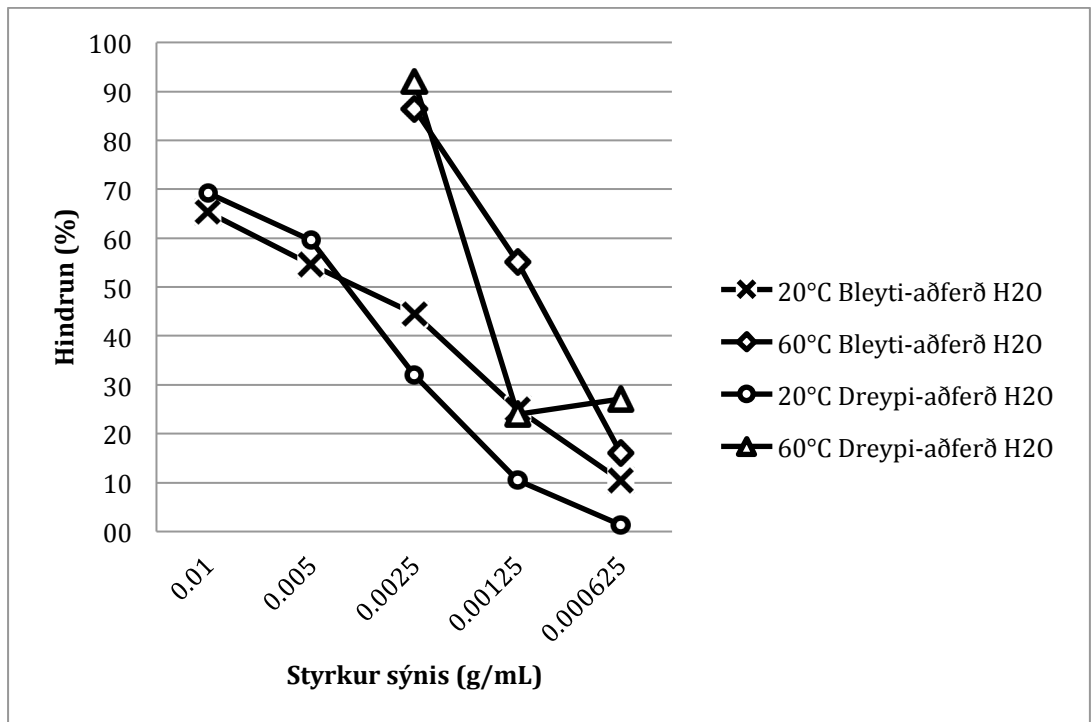
	0,01 g/mL	0,01 g/mL
20°C, bleyti aðferð, eimað vatn	2,730±0,001	
60°C, bleyti aðferð, eimað vatn	2,719±0,000	2,693±0,002
20°C, dreypti aðferð, eimað vatn	2,727±0,0009	
60°C, dreypti aðferð, eimað vatn	2,727±0,002	
60°C, bleyti aðferð, etanól		2,696±0,004

**Tafla 2 – Hindrun á ACE.** Einungis voru mæld sýni þar sem útdráttur var gerður með eimuðu vatni. Sýnin voru mæld í tvítekingu og staðalfrávik þeirra má sjá í töflunni. Í seinni dálknum er bufferinn þynntur 1/10. Í töflunni sést ekki mikill munur á milli sýna eða þynninga, en tölurnar eru í einingunni IC50 en þær eru í einingunni µg/mL.

Vegna skorts á hvarfefni var bufferinn þynntur 1/10. Mæld voru þau sýni sem komu vel út í ACE mælingunni sem gerð var á Sauðárkróki, en þar kom sýnið sem þurrkað var við 60°C og útdráttur gerður með bleyti aðferð og eimuðu vatni best út. Því var ákveðið að taka það sýni og mæla aftur og bera það saman við sama sýni sem dregið var út með etanóli til að sjá samanburð á sýnum. Þar eru niðurstöður að koma eins út en niðurstöðurnar eru nánast þær sömu eins og sjá má í töflu 3. Því má segja að þurrkun, útdráttaraðferð og útdráttarefni hafi ekkert að segja í þessari mælingu.

### 3.4.2 Hindrun á ACE mæld með aðferðarlýsingu frá Matís

ACE hindrun var mæld í sýnunum þar sem útdráttur var gerður með eimuðu vatni og samanburður gerður á sýnum eftir þurrkun við 20°C og 60°C (mynd 8). Töluverður munur var þar á en sýnin sem þurrkuð voru við 60°C voru að sýna mun meiri ACE hindrun en þau sem þurrkuð voru við 20°C. Ekki var þó mikill munur á milli útdráttaraðferða. Minnstu þynningarnar tvær voru teknar út í þeim sýnum þar sem niðurstöðurnar fóru yfir 100%. Captopril var keyrt með sýnum en þar sem lausnin var of sterk voru þær niðurstöður ekki nothæfar.



**Mynd 8 – Hindrun á ACE (%) í sýnum.** Myndin sýnir þá prósentu sem ACE er að hindra það að angiotensín I breytist í angiotensín II. Sýnin voru mæld í fimm þynningum og í þrítækningu.

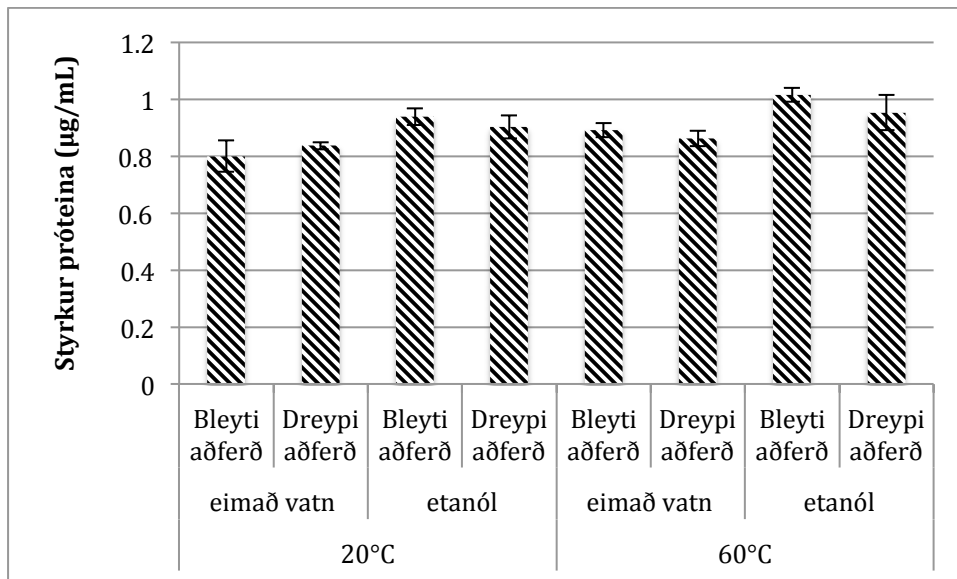
Niðurstöður mælinga með aðferðinni gefa einnig til kynna hvað þarf mikið magn af sýni til að hindra hvarfið um 50% miðað við 0,01 g/mL. Það magn er mismunandi eftir hitastigi við þurrkun (tafla 3), en munur er á hindrun ACE í sýnum sem þurrkuð voru við 20°C og 60°C. Niðurstöðurnar sýna að minna magn þarf ef rótin er þurrkuð við 60°C en 20°C.

**Tafla 3 – Hindrun á ACE (IC50) í sýnum.** Taflan sýnir IC50 niðurstöður á ACE hindrun, en það er það magn sem þarf af sýni til að hindra hvarfið um 50%. Rótin var meðhöndluð á mismunandi hátt, þurrkuð við 20°C og 60°C og útdráttur gerður með annars vegar bleyti aðferð og hins vegar dreypi aðferð og útdráttur gerður með eimuðu vatni miðað við 0,01 g/mL af sýni. Mælt var í þrítækningu og staðalfrávik má sjá í töflunni. Niðurstöðurnar eru í mælieiningunni µg/mL.

	<b>0,01 g/mL</b>
<b>20°C, bleyti aðferð, eimað vatn</b>	0,429±0,148
<b>60°C, bleyti aðferð, eimað vatn</b>	0,119±0,021
<b>20°C, dreypi aðferð, eimað vatn</b>	0,422±0,131
<b>60°C, dreypi aðferð, eimað vatn</b>	0,126±0,016

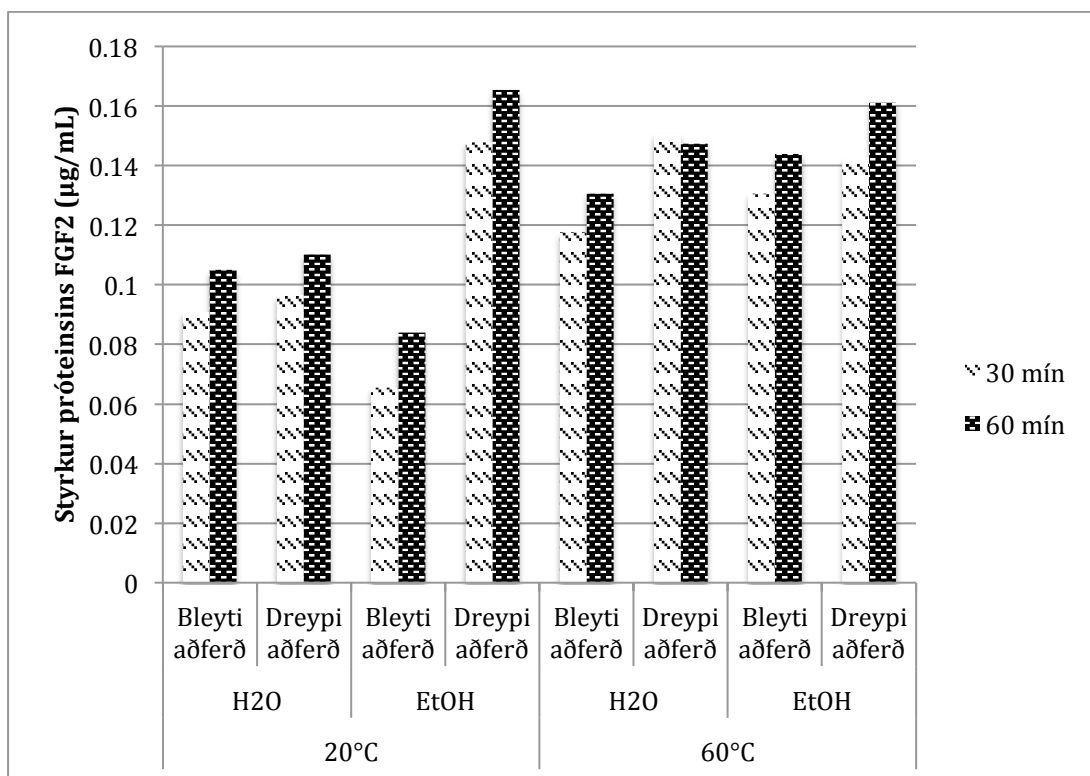
### 3.5 Græðandi virkni

Mælt var próteinmagn sýnanna með Bradford (mynd 9). Þar voru niðurstöðurnar þær að svipað magn próteina er í öllum sýnum svo útdráttaraðferð, útdráttarvökvi eða hitastig við þurrkun skiptir litlu máli hvað varðar próteinmagn. En örlítið minna magn próteina er að finna í sýnum sem þurrkuð voru við 20°C og eru þau sýni þar sem útdráttur var gerður með eimuðu vatni að sýna örlítið minni styrk próteina en þau sem dregin voru út með etanóli. Þau sýni sem sýna mestan styrk próteina eru þau sem þurrkuð voru við 60°C og dregin út með etanóli.



**Mynd 9 – Styrkur próteina í sýnum.** Hér má sjá próteinmagn í rabarbararót sem meðhöndluð var á mismunandi hátt sem mælt var með Bradford próteinmælingu. Staðalfrávik sýnanna sem mæld voru í prítekningu má sjá á myndinni.

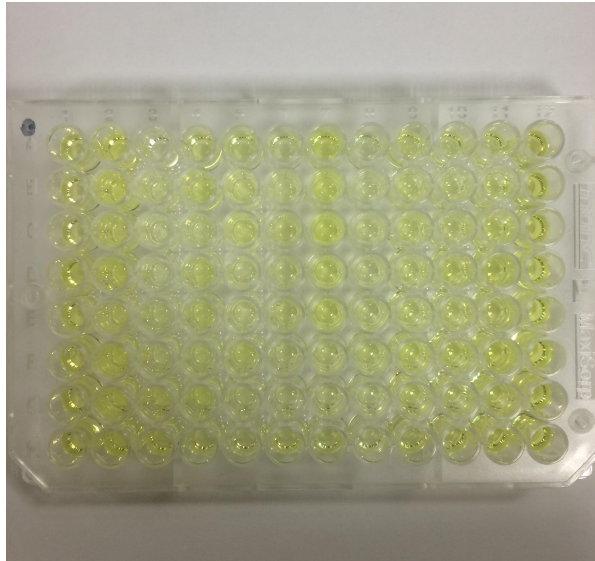
Niðurstöður á mælingu á magni próteinsins FGF2 voru að koma mismunandi út eftir sýnum (mynd 10). Sýnin voru mæld tvisvar, ein þegar platan var búin að standa í 30 mínútur og önnur þegar platan var búin að standa í 60 mínútur. Dreypi aðferðin er að skila betri niðurstöðum í þessari mælingu en bleyti aðferðin og magn próteinsins í sýnunum er örlítið meira eftir 60 mínútur en 30 mínútur. Einnig er munur á 20°C og 60°C en töluvert meira magn próteins er í þeim sýnum sem þurrkuð voru við 60°C.



**Mynd 10 – Styrkur FGF2 vaxtarþáttar í sýnum.** Sýnin voru meðhöndluð á mismunandi hátt og mæld í fjórtekningu. Voru þau mæld eftir að hafa staðið í 30 mínútur og 60 mínútur. Staðalfrávik sýnanna var það mikið að ekki var hægt að hafa það með í töflunni.

Á mynd 11 er mynd af plötunni eftir að hafa staðið í 60 mínútur í lokuðu rakaboxi. En sýnin eru töluvert gul sem merkir mikið prótein.

Í plötunni eru fyrstu fjórir brunnarnir í þynningu 5 µg/µL, næstu fjórir á eftir eru í þynningu 0,5 µg/µL og síðustu fjórir brunnarnir eru í þynningu 0,05 µg/µL. Reiknað var einungis úr þynningu 5 µg/µL þar sem ekki var munur á milli þynninga.



**Mynd 11 - Mæling á FGF2 vaxtarþætti með ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).** Hér má sjá plötuna eftir að hafa staðið í 60 mínútur í lokuðu rakaboxi. Guli liturinn táknar mikið magn próteinsins FGF2 í sýnunum.

## 4. Umræður

Í verkefninu var gerður samanburður á útdráttaraðferðum sem kallast bleyti aðferð og dreypi aðferð og var valið byggt á niðurstöðum fyrri rannsókna á efniviðnum. Báðar aðferðir eru einfaldar ef hugsað er út í framleiðslu í framhaldinu. Bleyti aðferðin er mjög auðveld í uppsetningu og í raun hægt að setja hana upp hvar sem er og því mjög notendavæn. Dreypi aðferðin er einnig auðveld í uppsetningu en örlítið flóknari en bleyti aðferðin og því ekki eins notendavæn. Einnig var gerður samanburður á notkun eimaðs vatns og etanóls við útdrátt lífvirkni úr sýnum og var valið byggt á því að í framhaldinu er hugsunin sú að nota rabarbararótina í snyrtivörur, fæðubótarefni og jafnvel lyf og ekki má nota alla lífræna leysa í svoleiðis framleiðslu. Metanól er t.d. ekki góður leysir þar sem við innöndun eða áhrifa í gegnum húð getur það valdið eituráhrifum eins og ógleði, uppköstum, svima, höfuðverk o.fl (Yi o.fl., 2011). Niðurstöður sýndu einnig mismunandi lífvirkni þegar rötin var þurrkuð við mismunandi hitastig en valið á þurrkunarhitastigum var einmitt byggt á að hitastigin væru sem ólíkust til að athuga hvort það hefði áhrif á lífvirkni.

Við mælingu á andoxunarvirkni þykir DPPH mjög hentug aðferð þar sem litabreyting sést með berum augum á sýni ef andoxunarvirkni er til staðar, en litabreyting sem verður við hvarfið breytir lit sýna úr fjólubláum í gulan. Í þeim átta sýnum úr rabarbararót sem mæld voru sást þessi litamunur strax við upphaf hvarfsins og lítil breyting varð á litnum með tíma. Radikala hreinsun sem mældist í sýnunum við upphaf hvarfsins var mjög há, oft nálægt 100% og gefa niðurstöður því vísbendingu um að andoxunarvirknin í sýnunum hafi verið mjög há. Svipuð og jafnvel hærri hreinsun var að mælast í sýnunum samanborið við gallic sýruna sem notuð var sem jákvætt viðmið og er þekkt sem öflugur andoxari (Asnaashari, Farhoosh, & Sharif, 2014). Niðurstöður mælinga á andoxunarvirkni með DPPH prófi sýndu hærri andoxun en í sambærilegum rannsóknum (Öztürk, Aydoğmuş-Öztürk, Duru, & Topçu, 2007), þar sem radikala hreinsunin á rabarbararót var um 50% þegar virknin var dregin út með metanóli. Styrkur sýnis í þeirri rannsókn var 100 µg/mL sem er hærri en notaður var í þessari rannsókn (10 µg/mL). Niðurstöður þessa verkefnis sýndu einnig að meiri radikala hreinsun fékkst þegar rötin var þurrkuð við 20°C samanborið við röt sem þurrkuð var við 60°C svo hitastig við þurrkun virðist hafa áhrif á andoxunarvirkni sýnanna. Einnig benda niðurstöður til að notkun dreypi aðferðar við útdrátt lífvirkni skili betri árangri en bleyti



aðferð en þó var ekki mikill munur. Hærri hreinsun fékkst einnig með notkun etanóls og var þar oft upp undir 5-10% munur miðað við notkun eimaðs vatns við útdráttinn. Niðurstöður fyrri rannsókna sýna þó að metanól gefi betri árangur við útdrátt lífvirkni úr mismunandi plöntuefnivið (Iqbal & Bhangar, 2007) og væri því áhugavert að skoða hvort meiri virkni fáiist við notkun metanóls samanborið við etanól.

Með mælingum á heildar andoxunarvirkni (TAC) sýna er ekki verið að mæla ákveðið stig andoxunar líkt og þegar mælt er með DPPH aðferð. Talsverð virkni mældist í öllum sýnum en þó virtist vera nokkur munur á milli sýna og mun meiri en þegar virkni var mæld með DPPH aðferð. Niðurstöður benda til að hærri virkni fáiist með útdrætti með etanóli samanborið eimað vatn, en virknin mældist allt uppí helmingi hærri þegar útdráttur var framkvæmdur með etanóli. Heildar andoxunarvirkni mældist hæst í sýni sem þurrkað var við 60°C og útdráttur gerður með bleyti aðferð og etanóli. Virkni sama sýnis er einmitt líka mest með eimuðu vatni, en með DPPH aðferð mældist andoxunarvirkni lægst í þessum sýnum. Niðurstöður benda ennfremur til þess að hærri virkni geti fengist við notkun bleyti aðferðar samanborið við dreypi aðferð en öll sýnin voru að mælast með meiri andoxunarvirkni þegar sú útdráttaraðferð var notuð samanborið við dreypi aðferðina. Bleyti aðferð getur að mörgu leiti talist hentugri og notendavænni en dreypi aðferð þar sem hér er leysinum einfaldlega hellt yfir sýnin og látið standa í ákveðinn tíma, líkt og þegar fólk hellir upp á te. Heildar andoxunarvirkni mældist lægst í rót sem þurrkuð var við 20°C og útdráttur gerður með dreypi aðferð og eimuðu vatni. Þó ber að nefna að við útreikninga mælinga á heildar andoxunarvirkni var jafna bestu línu notuð og þar sem staðallinn var ekki mældur á sama tíma og sýnin gæti það hafa skekkt niðurstöðurnar eitthvað.

Miðað við niðurstöður þessarar rannsóknar er rabarbararót greinilega með mikla andoxunarvirkni en aðferðum ber ekki saman hvaða sýni er að koma best út. Greinilegt er að meðhöndlun sýna hefur áhrif á mælda andoxunarvirkni en mismunandi var eftir aðferðum hvort þurrkunarhitastigið gæfi meiri virkni. Meiri virkni fékkst í þeim mælingum þar sem sýnin voru þurrkuð við 20°C þegar mælt var með DPPH aðferð á meðan sýni sem þurrkuð voru við 60°C sýndu meiri heildar andoxunarvirkni. Ekki virðist vera mikill munur á útdráttaraðferðunum tveim hvað varðar mælda andoxunarvirkni í sýnum en útdráttarvökvi virtist hafa mikil áhrif þar sem meiri andoxunarvirkni mældist í sýnum þar sem etanól var notað við útdráttinn samanborið við eimað vatn.

Sett var upp ný aðferð til mælinga á hindrun ACE í verkefninu og því ákveðið að mæla sýnin einnig með annarri aðferð til samanburðar sem sett hefur verið upp á tilraunastofu Matís á Sauðárkróki með góðum árangri.

Niðurstöður mælinga með þeirri aðferð sem sett var upp í verkefninu á hindrun ACE sýndu ekki mun á sýnum í styrkleikanum 0,01 og 0,005 g sýnis á mL og var því unnið með þynninguna 0,01 g/mL. Einnig var gerður samanburður á sýnum þar sem lífvirknin var dregin út með etanóli og eimuðu vatni, en með þynntum buffer og voru þær niðurstöður einnig bornar saman við upphaflega mælingu. Ekki var heldur munur á milli þeirra. Hins vegar eru IC50 þessarar aðferðar töluvert hærri en IC50 mælinga með Matís aðferð, en sú aðferð er að koma betur út þar sem minna magn þarf af sýni til að hindra hvarfið um 50% skv. mælingum. Ástæðan gæti verið sú að í nýuppsettri aðferð þarf að mæla eitt sýni í einu og getur það verið ónákvæmt þar sem ekki er hægt að mæla hvarfið á nákvæmlega sama tíma í öllum sýnum. Einnig var úrvinnsla niðurstaðna ekki eins í aðferðunum tveimur. Við mælingar með aðferð frá Matís fékkst mismunandi IC50 í sýnum sem þurrkuð voru eftir hitastigi og mældist töluvert meiri virkni í sýnum sem þurrkuð voru við 60°C samanborið við 20°C. Ekki var að mælast mikill munur á milli útdráttaraðferða. Jákvæði staðallinn (Captopril) sem mældur var á sama tíma og sýni var of sterkur og ekki nothæfur en IC50 staðall á Captopril er  $0,021 \pm 0,013 \mu\text{M}$  (Sigma Aldrich, 1987) sem tilsvavar 0,005  $\mu\text{g/mL}$  sem er töluvert minna magn sem þarf til að hindra hvarfið en af rabarbararótinni, um 80x meira þarf af rabarbararót en Captopril til að hindra hvarfið um 50%.

Með aðferð sem framkvæmd var samkvæmt aðferðarlýsingu Matís var bæði reiknuð út prósentuhindrunin á ACE og IC50 sýnanna. Þegar prósentuhindrun á ACE var reiknuð út þurfti að taka út tvær minnstu þynningar sýna sem þurrkuð voru við 60°C þar sem hindrunin fór yfir 100%. Þetta gæti mögulega verið vegna flúrljómunar í sýnum, því var ákveðið að kanna hvort flúrljómun væri til staðar. Öll sýnin sýndu bláa og græna flúrljómun en sýni sem þurrkað var við 60°C og dregið út með dreypi aðferð og eimuðu vatni sýndi einnig rauða flúrljómun, sem gæti mögulega hafa truflað mælingu á sýnunum. ACE hindrun mældist í sýnum sem þurrkuð voru við 20°C en þó minna en í sýnum sem þurrkuð voru við 60°C. Útdráttaraðferð virtist ekki hafa mælanleg áhrif á ACE hindrun í þessum sýnum. Í samantekt sýna niðurstöður að rabarbararótin hefur greinilega ACE hindrandi áhrif og aðferðin sem framkvæmd var hjá Matís gaf töluvert hærra gildi en aðferðin sem sett var upp í verkefninu. Sýnin hafa

þó minni áhrif á hindrun ACE en jákvæða viðmiðið (Captopril), en niðurstöður benda þó til að rótin geti mögulega haft blóðþrýstingslækkandi áhrif.

Niðurstöður mælinga á próteininnihaldi sýna sýndu að svipað magn próteina var í öllum sýnum og virðist meðhöndlun sýna því ekki hafa áhrif á próteininnihald þeirra. Styrkur FGF2 í sýnunum var þó mismunandi svo greinilegt er að meðhöndlun sýnanna hefur áhrif þar á. Hæstur styrkur FGF2 mældist í sýni sem þurrkað var við 20°C og dregið út með dreypi aðferð og etanóli, en lægstur styrkur í sýni þar sem útdráttur var gerður með bleyti aðferð eftir þurrkun við sömu aðstæður. En yfir allt eru sýnin sem þurrkuð voru við 60°C að sýna betri niðurstöður með hærri styrk FGF2 en þau sem þurrkuð voru við 20°C og er dreypi aðferðin að sýna betri niðurstöður, en þar er að mælast örlítið hærri styrkur FGF2 próteina en munurinn er ekki mikill á útdráttaraðferðum. Staðalfrávik var mjög hátt í sumum sýnum og gæti það tengst því að trefjamagn í rabarbara er hátt, eða um 50 g/kg í stilk (Reimer o.fl., 1997) Hátt trefjainnihald gæti því verið að hafa einhverskonar áhrif á próteinin en ekki fundust heimildir fyrir því.

## 5. Lokaorð og samantekt

Við upphaf verkefnisins voru eftirfarandi rannsóknarspurningar settar fram:

1. Hefur rabarbararót blóðþrýstingslækkandi áhrif, græðandi- og/eða andoxunarvirkni sem áhugavert væri að nota í snyrtivörur og/eða fæðubótarefni?
2. Hefur aðferð við útdrátt áhrif á mælda virkni?
3. Hefur hitastig við þurrkun áhrif á mælda virkni?

Há andoxunarvirkni mældist í sýnunum og er það áhugaverður eiginleiki sem vel er hægt að nýta bæði í snyrtivörur og fæðubótarefni. Einnig er rabarbararótin að sýna ACE hindrun sem hefur í för með sér lækkaðan blóðþrýsting og þar sem háþrýstingur er vaxandi vandamál í heiminum er það áhugaverður eiginleiki sem hægt væri að nota í fæðubótarefni og jafnvel lyf. Mælingar sýna einnig að talsvert magn vaxtarþáttarins FGF2 var til staðar í rótinni, sem hefur t.d. áhrif á nýmyndun æða, sérhæfingu fruma og þau áhrif að frumur skipta sér hraðar, en þetta flýttir allt fyrir gróanda sára og styrkir húðina og er vel hægt að nýta þá eiginleika í snyrtivörur.

Niðurstöður þessara rannsókna benda því til að rabarbararót hafi hindrandi áhrif á ACE sem getur leitt til lækkunar á blóðþrýstingi, innihaldi FGF2 vaxtarþátt sem hefur t.d. græðandi virkni og einnig mikla andoxunarvirkni. Því væri áhugavert að fara í frekari rannsóknir og nýta í framhaldi rótina í einhverskonar framleiðslu á snyrtivörum, fæðubótarefnum eða jafnvel lyfjum.

Lífvirknin mældist mismunandi þegar mismunandi aðferðir voru notaðar við útdrátt virkninnar. En yfirleitt var bleyti aðferðin að koma betur út en dreypi aðferðin sem er áhugavert þar sem hún er notendavænni í uppsetningu og því hentugri ef fara á út í einhvers konar framleiðslu. Niðurstöður rannsóknarinnar benda til að þurrkun við 60°C gefi meiri virkni, en yfirleitt var mun meiri virkni í þeim sýnum en í þeim sem þurrkuð voru við 20°C. Einnig kom betur út að nota etanol sem útdráttarvökva en eimað vatn.

Í framhaldi af þessum rannsóknum væri áhugavert að skoða fleiri eftirsóknarverða eiginleika sem hægt væri að nýta, eins og örveruhindrandi eiginleika, bólguhamlandi virkni o.fl. Þar sem rótin var að sýna mikla virkni með bleyti aðferð og sjóðandi eimuðu vatni gæti það verið áhugaverð meðhöndlun á rabarbararótinni þar sem sú aðferð er einföld og ódýr og því mjög hentug í framleiðslu.

# Heimildaskrá

Anonymous. (2008). The Circulatory System. *Journal of Practical Nursing*, 58(4), 9–14.

<http://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2758-1.50006-9>

Asnaashari, M., Farhoosh, R., & Sharif, A. (2014). Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. *Food Chemistry*, 159, 439–444. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.038>

BioLegend. (2000). Sandwich ELISA Protocol. Sótt 26. mars 2016 af

[http://www.biolegend.com/media\\_assets/support\\_protocol/BioLegend\\_Sandwich\\_ELISA\\_protocol.pdf](http://www.biolegend.com/media_assets/support_protocol/BioLegend_Sandwich_ELISA_protocol.pdf).

Bjarni E. Guðleifsson. (2006). *Náttúruskoðarinn II. Úr jurtaríkinu*. Akureyri: Bókaútgáfan Hólar.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.

[http://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Campbell, N., Reece, J. (2005). *Biology*. Seventh Edition. San Francisco: Pearson.

Damodaran, S., Parkin, K., Fennema, O. (2008). *Food Chemistry*. Boca Raton: CRC Press.

Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., & Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(11), 1106–1114. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00394-4](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00394-4)

- Gupta, A. A., Chou, R. H., Li, H., Yang, L. W., & Yu, C. (2013). Structural insights into the interaction of human S100B and basic fibroblast growth factor (FGF2): Effects on FGFR1 receptor signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1834*(12), 2606–2619. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.09.012>
- Huang, Q., Lu, G., Shen, H.-M., Chung, M. C. M., & Ong, C. N. (2007). Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. *Medicinal Research Reviews*, *27*(5), 609–30. <http://doi.org/10.1002/med.20094>
- Iqbal, S., & Bhangar, M. I. (2007). Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, *100*(1), 246–254. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.049>
- Lárus Freyr Þórhallsson, Margrét Geirsdóttir, Guðmundur Óli Hreggviðsson, Sigurður Vilhelmsson, & Guðjón Þorkelsson. (2007). Blóðþrýstingslækkandi áhrif ( Ace-hindra virkni ) í íslensku sjávarfangi – uppsetning mæliaðferða.
- Molyneux, P. (2004). The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarín Journal of Science and Technology*, *26*(December 2003), 211–219. <http://doi.org/10.1287/isre.6.2.144>
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Manuel Domínguez, J., Sineiro, J., Domínguez, H., ... Carlos Parajó, J. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, *72*(2), 145–171. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00223-5](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00223-5)
- Ndhlala, A. R., Moyo, M., & Van Staden, J. (2010). Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? *Molecules*, *15*(10), 6905–6930. <http://doi.org/10.3390/molecules15106905>
- Novak, F.A. (1972). *Stóra fjölfræðisafnið V. Blómabók* (Ingólfur Davíðsson þýddi). Reykjavík: Bókaútgáfan Fjölvi. (Upphaflega gefið út 1965)

- Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biology*, 2(3), REVIEWS3005. <http://doi.org/10.1186/gb-2001-2-3-reviews3005>
- Orona-Tamayo, D., Valverde, M. E., Nieto-Rendón, B., & Paredes-López, O. (2015). Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 236–242. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.033>
- Ólafur Gunnar Sæmundsson. (2007). *Lífspróttur*. Seltjarnarnes: Ós.
- Prasad, H. S. P., & Ramakrishnan, N. (2011). RESEARCH ARTICLE ANTIOXIDANT ASSAY OF *Rumex vesicarius* L . Retrieved March 29, 2016, from <http://search.proquest.com/docview/228046792/fulltextPDF/B457C702A0824DDFPQ/1?accountid=49537>
- Reimer, R. A., Thomson, A. B. R., Rajotte, R. V, Basu, T. K., Ooraikul, B., & McBurney, M. I. (1997). A physiological level of rhubarb fiber increases proglucagon gene expression and modulates intestinal glucose uptake in rats. *The Journal of Nutrition*, 127(10), 1923–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9311946>
- Sara Björk Gunnarsdóttir. (2015). *Eftirsóknarverð lífvirkni í rabarbara*. Óbirt BA-ritgerð: Háskólinn á Akureyri, Auðlindadeild.
- Sentandreu, M. Á., & Toldra, F. (2006). A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nature Protocols*, 1(5), 1–5. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.349>
- Sigma Aldrich. (1987). Captopril - Product Information. Sótt 21. mars 2016 af [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/c4042pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c4042pis.pdf)

- Teven, C. M., Farina, E. M., Rivas, J., & Reid, R. R. (2014). Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. *Genes & Diseases*, *1*(2), 199–213. <http://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.09.005>
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., & Verstraete, W. (2002). Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *51*(1), 75–87. [http://doi.org/10.1016/S0165-022X\(02\)00006-4](http://doi.org/10.1016/S0165-022X(02)00006-4)
- Will, F., & Dietrich, H. (2013). Processing and chemical composition of rhubarb (*Rheum rhabarbarum*) juice. *LWT - Food Science and Technology*, *50*(2), 673–678. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.029>
- Wilson, E. O., & Perez, F. M. (1988). Biodiversity. Peter, F.M. (ritstjóri). Screening plants for new medicines (bls. 83-97). Washington, D.C.: National Academy press.
- Yi, X., Guo, D., Deng, X., Li, B., Fan, X., & Zhu, J. (2011). Determination of methanol in cosmetics by headspace and multidimensional gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International*, *94*(2), 655–659.
- Zhou, X., Song, B., Jin, L., Hu, D., Diao, C., Xu, G., ... Yang, S. (2006). Isolation and inhibitory activity against ERK phosphorylation of hydroxyanthraquinones from rhubarb. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *16*(3), 563–568. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.10.047>
- Öztürk, M., Aydoğmuş-Öztürk, F., Duru, M. E., & Topçu, G. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry*, *103*(2), 623–630. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.005>



# Viðaukar

## Viðauki I – DPPH aðferð

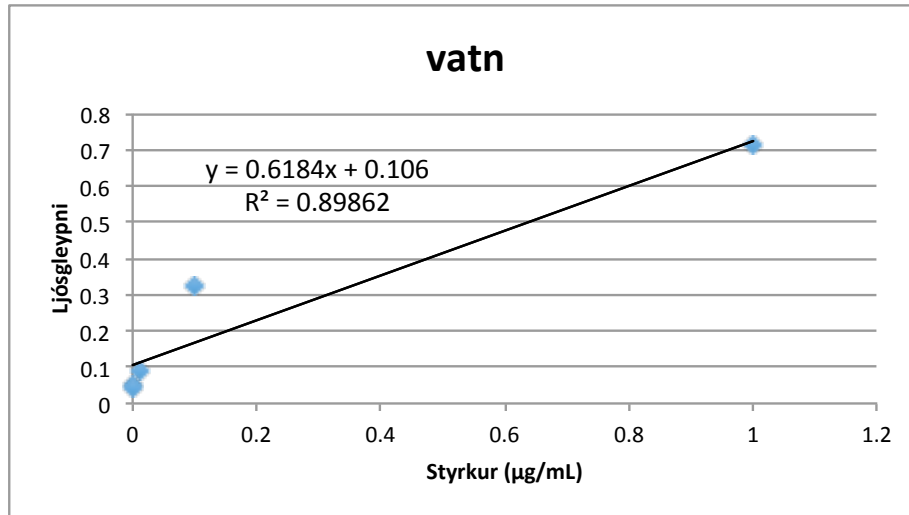
Tafla 4 sýnir niðurstöður mælinga á DPPH radikala hreinsun.

**Tafla 4 - DPPH radikala hreinsun.** Taflan sýnir hreinsunina á öllum sýnum ásamt gallic sýru sem var jákvæður staðall við 0 mín, 30 mín, 60 mín og 90 mín.

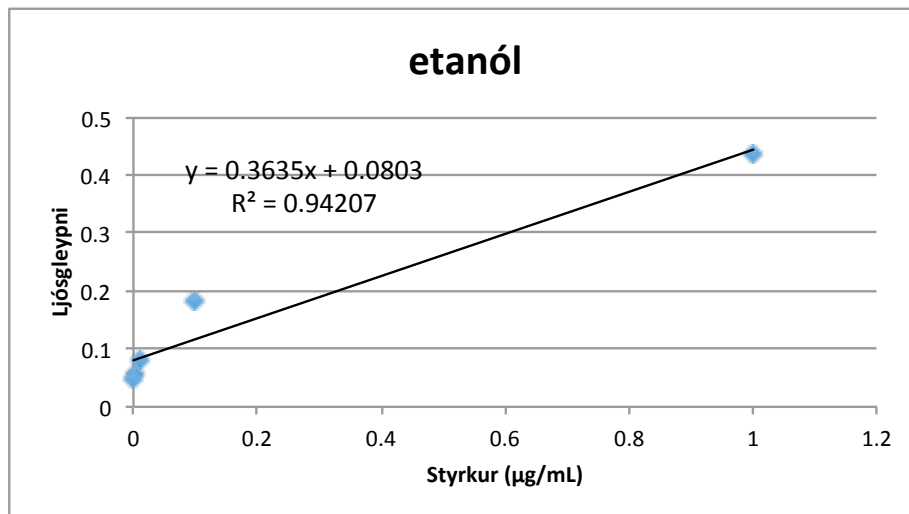
Hindrun %	0 mín	30 mín	60 mín	90 mín
<b>20°C, bleyti afðerð, eimað vatn</b>	89,442	79,838	90,905	73,307
<b>60°C, bleyti aðferð, eimað vatn</b>	81,362	67,822	83,279	84,436
<b>20°C, bleyti aðferð, etanól</b>	98,262	98,476	98,690	99,034
<b>60°C, bleyti aðferð, etanól</b>	83,454	83,200	83,561	83,818
<b>20°C, dreypi aðferð, eimað vatn</b>	92,869	84,453	93,777	93,187
<b>60°C, dreypi aðferð, eimað vatn</b>	85,859	74,902	86,952	87,889
<b>20°C, dreypi aðferð, etanól</b>	97,958	98,190	98,219	98,499
<b>60°C, dreypi aðferð, etanól</b>	95,951	95,917	96,385	96,926
<b>Gallic sýra</b>	93,291	93,291	93,638	92,481

## Viðauki II – TAC aðferð

Staðlar sem notaðir voru við mælingar á heildar andoxunarvirkni sýnanna (TAC).

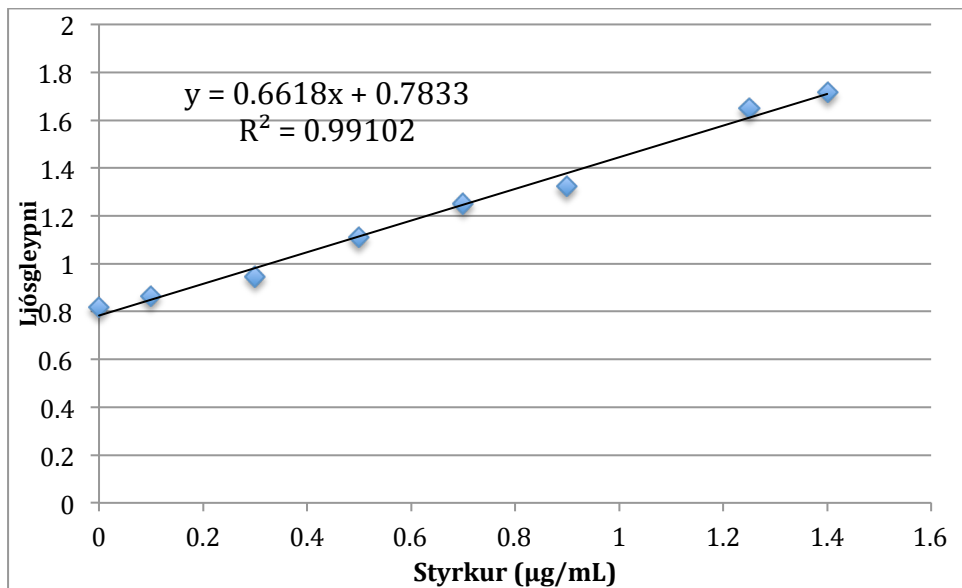


**Mynd 12 - Staðall sem notaður var við mælingar á heildar andoxunarvirkni (TAC).** Staðallinn var gallic sýra sem leyst var upp með etanóli og þynnt með vatni.



**Mynd 13 - Staðall sem notaður var við mælingar á heildar andoxunarvirkni (TAC).** Staðallinn var gallic sýra sem leyst var upp og þynnt með etanóli.

### Viðauki III – ELISA aðferð



**Mynd 14 - Staðall sem notaður var við útreiknina á Bradford próteinmælingu.**  
Staðallinn er BSA (Bovine Serum Albumin).

Nokkrir bufferar voru notaðir við framkvæmd á ELISA aðferð,  
uppskriftirnar eru:

**Carbonate coating buffer:**

8,4 g NaHCO<sub>3</sub>

3,56 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

MQ vatni bætt í upp að 1 L, pH 9,5

**Phosphate Buffered Saline (PBS):**

80 g NaCl

14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

2 g KCl

MQ vatni bætt í upp að 1 L, pH 7,2

**PBS/Tween:**

0,5 mL af Tween-20 í 1 L PBS

**Hvarfefna buffer:**

97 mL (1M) dietanolamin þynnt í 900 mL með MQ H<sub>2</sub>O, pH 9,8

100 mg MgCl<sub>2</sub>•H<sub>2</sub>O mg (0,005M) bætt við.

Geymist í dökkri flösku við 4°C í myrkri.

**Mettunarlausn:**

2% BSA leyst í 1 × TBS

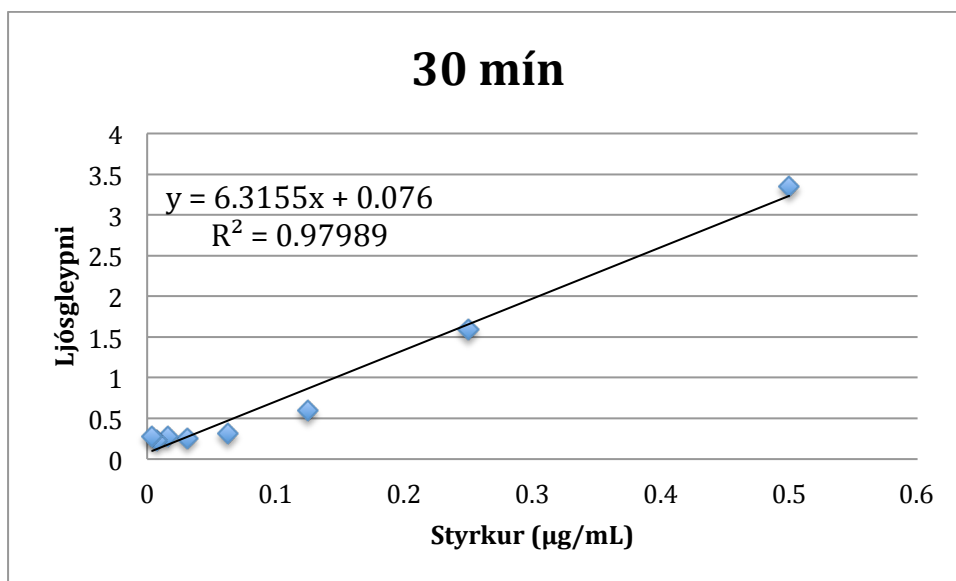
**Mótefnalausn:**

Mótefni þynnt í 0,2% TBSA (TBS og BSA)

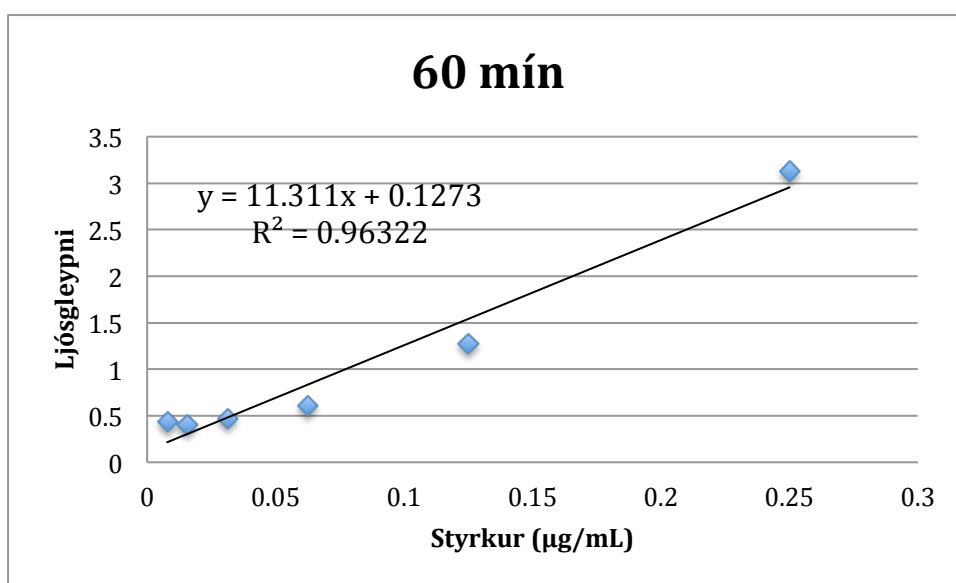
Tafla 5 sýnir staðalfrávik ELISA mælinga, en það er í viðauka þar sem það var óvenju hátt og passaði ekki inná myndina.

**Tafla 5 - Staðalfrávik ELISA mælingu.** Staðalfrávikin var mjög hátt og gat því ekki verið með á niðurstöðu myndinni.

	30 mín	60 mín
20°C, bleyti aðferð, vatn	0,444	0,909
60°C, bleyti aðferð, vatn	0,536	1,019
20°C, bleyti aðferð, etanól	0,297	0,559
60°C, bleyti aðferð, etanól	0,545	1,066
20°C, dreypi aðferð, vatn	0,208	0,483
60°C, dreypi aðferð, vatn	0,760	1,165
20°C, dreypi aðferð, etanól	0,320	0,553
60°C, dreypi aðferð, etanól	0,443	0,921



**Mynd 15 - Staðall sem notaður var við mælingu á ELISA.** En í honum var FGF2 prótein. Þessi mæling var gerð á plötunni eftir að hún hafði staðið í lokuðu rakaboxi í 30 mínútur.



**Mynd 16 - Staðall sem notaður var við útreikninga á ELISA.** Staðallinn var FGF2 prótein. Þessi mæling var gerð þegar platan hafði staðið í lokuðu rakaboxi í 60 mínútur.

