

Hydrolysoituvien tanniinien rakenteen vaikutus niiden makromolekyyliaffiniteettiin

Joona Arvola

Pro gradu -tutkielma

Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä

Kemian laitos

Turun yliopisto

Joulukuu 2019

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

ARVOLA, JOONA: Hydrolysoituvien tanniinien rakenteen vaikutus niiden makromolekyyliaffiniteettiin

Pro gradu -tutkielma, 80 s., liitteet 10 s.

Kemia

Joulukuu 2019

Hydrolysoituvat tanniinit ovat rakenteiltaan hyvin monipuolinen joukko luonnonyhdisteitä, joilla on havaittu olevan kyky sitoutua makromolekyyliin. Eniten on tutkittu niiden kykyä sitoutua proteiineihin, mutta myös mm. polysakkaridien kanssa on tehty tutkimuksia. Kun hydrolysoituvat tanniinit sitoutuvat makromolekyyliin, muodostavat ne liukoisia ja liukenemattomia tanniini-makromolekyyli -komplekseja, joita voidaan tutkia monilla erilaisilla menetelmillä.

Eniten on tutkittu tanniini-proteiini -komplekseja, jotka ovat muodostuneet heikkojen vuorovaikutusten johdosta. Heikkoja vuorovaikutuksia ovat hydrofobiset voimat ja vetysidokset, jotka muodostuvat hydrolysoituvien tanniinien fenolisten ryhmien ja proteiinien hydrofobisten ja hydrofiilisten kohtien välille. Hydrolysoituvien tanniinien proteiiniaffiniteettiin vaikuttavat eniten fenolisten ryhmien lukumäärä niiden rakenteessa, mutta erilaiset fenoliset ryhmät vaikuttavat kuitenkin eri tavoin yhdisteiden affiniteettiin. Yhdisteiden korkea molekyylipaino ja mahdollisimman joustava rakenne vaikuttavat niiden proteiiniaffiniteettiin kasvattavasti. Pienempiä eroja proteiiniaffiniteeteissa voidaan havaita esimerkiksi galloyyliryhmien sijoittumisella yhdisteen rakenteessa ja stereoisomeriolla. Kun näiden eri tekijöiden vaikutusta yhdisteiden proteiiniaffiniteettiin arvioidaan, tehdään rakenne-aktiivisuus -tutkimusta.

Tämän tutkielman kirjallisessa osassa käytiin läpi hydrolysoituvien tanniinien rakenteita ja tutkittiin, mitkä tekijät vaikuttivat tanniinien sitoutumiseen proteiineihin. Tässä osassa keskityttiin erityisesti löytämään ne rakenteelliset tekijät hydrolysoituviissa tanniineissa, jotka vaikuttivat niiden proteiiniaffiniteettiin kasvattavasti. Sen lisäksi havaittiin, että esimerkiksi yhdisteiden vesiliukoisuudella ja Sephadex LH-20 -geelikromatografialla voitiin ennustaa niiden proteiiniaffiniteettiä. Lopuksi tarkasteltiin vielä erikseen tanniini-polysakkaridi -vuorovaikutuksia. Tutkielman kokeellisessa osassa mitattiin, kuinka 28 hydrolysoituvaa tanniinia muodostivat liukenemattomia tanniini-makromolekyyli -komplekseja naudan seerumin albumiinin ja polyetyleeniglykolin kanssa. Sen lisäksi yhdisteille määritettiin kolme kemiallista ominaisuutta: Sephadex LH-20 -pidäytyminen ja jakautumiskertoimet kahdella eri liuotinparilla. Lopputuloksissa saatuja bioaktiivisuustuloksia perusteltiin hydrolysoituvien tanniinien rakenteilla ja niille mitatuilla kemiallisilla ominaisuuksilla.

Asiasanat: *hydrolysoituva tanniini, makromolekyyli, tanniini-makromolekyyli -kompleksi, proteiiniaffiniteetti, rakenne-aktiivisuus -tutkimus*

Sisällys

1. Johdanto	1
KIRJALLINEN OSA	
2. Hydrolysoituvat tanniinit	4
2.1. Yleistä tanniineista.....	4
2.2. Galloyyyliglukoosit ja gallotanniinit.....	4
2.3. Ellagitanniinit.....	6
3. Makromolekyylit	7
4. Hydrolysoituvien tanniinien ja proteiinien väliset vuorovaikutukset	9
4.1. Yleistä hydrolysoituvien tanniinien ja proteiinien välisistä vuorovaikutuksista.....	9
4.2. Hydrolysoituvien tanniinien rakenteen vaikutus proteiiniaffiniteettiin	12
4.2.1. Galloyyyliglukoosien rakenteen vaikutus proteiiniaffiniteettiin.....	12
4.2.2. Gallotanniinien rakenteen vaikutus proteiiniaffiniteettiin	16
4.2.3. Ellagitanniinien rakenteen vaikutus proteiiniaffiniteettiin.....	18
4.3. Hydrolysoituvien tanniinien vesiliukoisuuden vaikutus proteiiniaffiniteettiin.....	26
4.4. Proteiinien rakenteen vaikutus affiniteettiin	28
5. Hydrolysoituvien tanniinien ja polysakkaridien välinen vuorovaikutus	29
5.1. Yleistä hydrolysoituvien tanniinien ja polysakkaridien välisistä vuorovaikutuksista	29
5.2. Hydrolysoituvien tanniinien rakenteen vaikutus Sephadex-kromatografiaan	30
5.3. Hydrolysoituvien tanniinien rakenteen vaikutus vuorovaikutukseen selluloosan kanssa	32
KOKEELLINEN OSA	
6. Materiaalit ja menetelmät	36
6.1. Reagenssit	36

6.2. Puhdasaineet.....	36
6.3. Nestekromatografia ja massaspektrometria	40
6.4. Sephadex LH-20 -kromatografia	40
6.5. Neste-nesteutot.....	42
6.6. Hydrolysoituvien tanniinien ja naudan seerumin albumiinin väliset liukenemattomat kompleksit.....	44
6.7. Hydrolysoituvien tanniinien ja polyetyleeniglykolin väliset liukenemattomat kompleksit.....	46
7. Tulokset ja niiden tarkastelu	48
7.1. Sephadex LH-20 -kromatografia	48
7.2. Neste-nesteutot.....	50
7.3. Hydrolysoituvien tanniinien ja naudan seerumin albumiinin väliset liukenemattomat kompleksit.....	53
7.4. Hydrolysoituvien tanniinien ja polyetyleeniglykolin väliset liukenemattomat kompleksit.....	62
7.5. Hydrolysoituvien tanniinien bioaktiivisuuksien ja kemiallisten ominaisuuksien vertailu	68
8. Johtopäätökset.....	73
Viitteet.....	76
Liite 1.	81
Liite 2.	82
Liite 3.	83
Liite 4.	84
Liite 5.	85
Liite 6.	86
Liite 7.	87

Liite 8.	88
Liite 9.	89
Liite 10.	90

Lyhenteet

BSA	bovine serum albumin naudan seerumin albumiini
DAD	diode array detector diodirividetektori
DHHD	dehydrohexahydroxydiphenoyl dehydroheksahydroksidifenoyyli
HHDP	hexahydroxydiphenoyl heksahydroksidifenoyyli
HPLC	high-performance liquid chromatography korkean erotuskyvyn nestekromatografia
HSA	human serum albumin ihmisen seerumin albumiini
LC	liquid chromatography nestekromatografia
MS	mass spectrometry massaspektrometria
NHTP	nonahydroxytriphenoyl nonahydroksitriphenoyyli
PEG	polyethylene glycol polyetyleeniglykoli
PGG	pentagalloylglucose pentagalloyyyliglukoosi
UHPLC	ultrahigh performance liquid chromatography ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia
UV	ultraviolet ultravioletti

1. Johdanto

Kasvit tuottavat aineenvaihdunnassaan primääri- ja sekundäärimetaboliitteja. Primäärimetaboliitit ovat luonnossa esiintyviä yhdisteitä ja niitä ovat esimerkiksi suurikokoiset makromolekyylit kuten proteiinit, polysakkaridit, lipidit ja nukleiinihapot, jotka ovat kasveille elintärkeitä, sillä ne vastaavat mm. kasvien kehityksestä ja energiatuotannosta. Sekundäärimetaboliitit eivät ole kasvien kehitykselle yhtä merkittäviä yhdisteitä kuin primäärimetaboliitit, mutta niihin kuuluvat tanniinit ovat kuitenkin tärkeitä yhdisteitä kasvien selviämisen kannalta, sillä ne toimivat mm. kasvien puolustusyhdisteinä (Salminen ja Karonen, 2011).

Tanniineilla on havaittu olevan kyky muodostaa komplekseja edellä mainittujen makromolekyylien kanssa heikoilla vuorovaikutuksilla. Tanniinit voivat muodostaa sekä liukenevia että liukenemattomia komplekseja, riippuen niiden konsentraatioista ja ympäristön olosuhteista. Näiden kompleksien havaitsemiseen ja mittaamiseen on kehitetty monia niin suoria kuin epäsuoriaakin menetelmiä (Haslam ja Lilley, 1988; Le Bourvellec ja Renard, 2012). Eniten on tutkittu tanniini–proteiini -komplekseja, sillä näillä komplekseilla on osoitettu olevan yhteys esimerkiksi suun kuivahtavaan ja karvaaseen tuntemukseen tanniinipitoisia juomia nauttiessa (Bajec ja Pickering, 2008). Toisaalta tanniini–proteiini -kompleksit ovat alkaneet kiinnostaa enemmän myös märehtijätutkimukseen erikoistuneita tutkijoita (Patra ja Saxena, 2011).

Tämä työ tehtiin osana OptiFeed-projektia, jossa pyritään mm. ymmärtämään, miten tanniinien rakenne ja kemialliset ominaisuudet vaikuttavat niiden kompleksinmuodostuskykyyn proteiinien kanssa muuttuvissa kemiallisissa ja biologisissa olosuhteissa. Toisaalta projektissa pyritään löytämään myös ne yhdisteet, jotka yksin tai yhdessä muiden yhdisteiden kanssa vähentävät parhaiten sekä märehtijöiden metaanipäästöjä, että niiden ruoansulatuskanavan loisia. Aikaisemmissa tutkimuksissa on osoitettu, että tanniinien oligomerisaatioasteen kasvaessa, niiden sitoutumiskyky proteiineihin paranee (Karonen et al., 2015). Toisaalta on osoitettu myös, että tanniinien spesifinen tai epäspesifinen vaikutus märehtijöiden pötsin metanogeenibakteereihin vähentää metaanipäästöjä *in vitro* (Baert et al., 2016). Lisäksi tanniinit voivat suojata proteiineja pötsikäymiseltä (Baert et al., 2016); tällöin proteiinit eivät hajoa pötsissä ja muodosta metaania, vaan jatkavat pidemmällä märehtijän suolistoon, jossa niiden on havaittu torjuvan

loisia *in vitro* (Engström et al., 2016). Tanniini–proteiini -kompleksien mittaaminen *in vivo* on kuitenkin hyvin hankalaa, sillä märehitjoiden ruoansulatuksessa vaikuttavat monet kemialliset ja biologiset tekijät, jolloin ei voida tarkalleen tietää, mitkä tekijät oikeasti vaikuttavat tanniini–proteiini -kompleksien syntyyn märehitjän ruoansulatuksessa. Sen takia tämän työn kaltaiset *in vitro* -tutkimukset ovat välttämättömiä, jotta saataisiin tietää, että millaiset tanniinit oikeasti muodostavat komplekseja märehitjän ruoansulatusta muistuttavissa olosuhteissa.

Tämän Pro gradu -tutkielman kirjallisessa osassa tutustutaan ensin hydrolysoituviin tanniineihin ja erityisesti niiden rakenteisiin, minkä jälkeen käydään läpi niitä makromolekyylejä, joiden kanssa on tehty affiniteettitutkimuksia hydrolysoituville tanniineille. Tämän jälkeen tutkitaan, että mitkä tekijät vaikuttavat hydrolysoituvien tanniinien ja proteiinien välisten kompleksien muodostumiseen ja keskitytään erityisesti siihen, mitkä rakenteelliset tekijät hydrolysoituviissa tanniineissa edesauttavat niiden sitoutumista proteiineihin. Lopuksi tarkastellaan vielä erikseen hydrolysoituvien tanniinien ja polysakkaridien välisiä vuorovaikutuksia. Tämän työn kokeellisessa osassa tutkittiin, kuinka 28 puhdistettua hydrolysoituvaa tanniinia muodostivat liukenemattomia komplekseja kahden eri makromolekyylin kanssa. Naudan seerumin albumiini (*bovine serum albumin*, BSA) on proteiini, kun taas polyetyleeniglykoli (*polyethylene glycol*, PEG) on märehitjätutkimuksissa usein käytetty tanniineja sitova makromolekyylä. Työn yhdisteille mitattiin kahden edellä mainitun bioaktiivisuuden lisäksi myös kolme kemiallista ominaisuutta: pidättyminen Sephadex LH-20 -geeliin ja jakautumiskertoimet neste-nesteuutoissa kahdella eri liuotinparilla. Lopputuloksissa BSA- ja PEG-mittauksista saatuja tuloksia pyrittiin perustelemaan hydrolysoituvien tanniinien rakenteilla ja niille mitatuilla kemiallisilla ominaisuuksilla.

KIRJALLINEN OSA

2. Hydrolysoituvat tanniinit

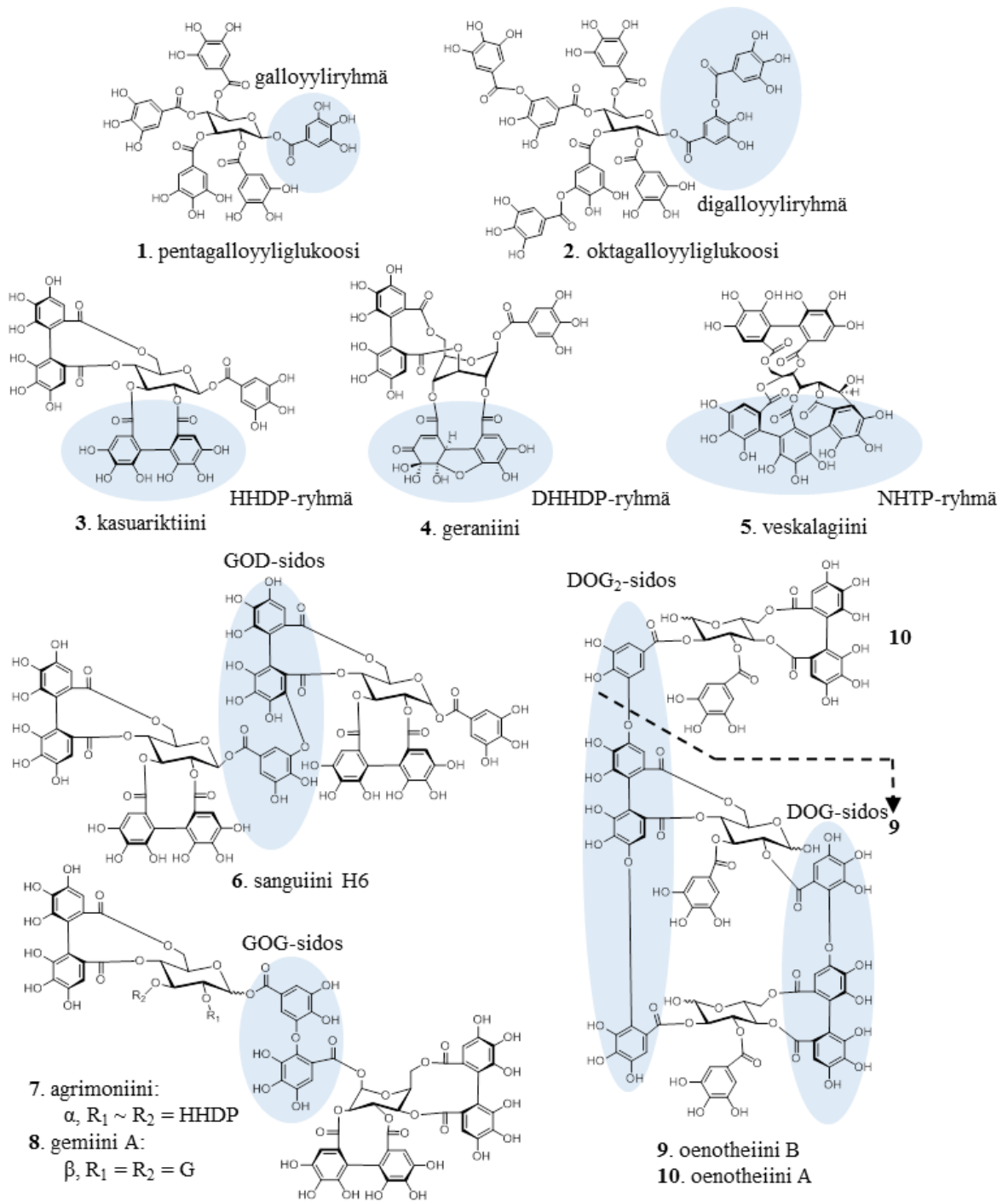
2.1. Yleistä tanniineista

Tanniinit voidaan jakaa kolmeen pääryhmään, jotka ovat hydrolysoituvat tanniinit, proantosyanidiinit ja florotanniinit. Hydrolysoituvat tanniinit ovat näistä tanniiniryhmistä rakenteidensa perusteella kaikkein monipuolisin (Salminen ja Karonen, 2011). Niillä on rakenteissaan vähintään yksi keskuspolyoli, joka on luonnossa yleensä β -D-glukoosi, mutta esimerkiksi myös kviinihappo voi korvata glukoosin keskuspolyolina. Kun keskussokeriin on liittynyt vähintään yksi fenolinen ryhmä, voidaan puhua hydrolysoituvista tanniineista. Sokeriin liittyneiden fenolisten ryhmien perusteella hydrolysoituvat tanniinit voidaan jakaa vielä edelleen kolmeen alaryhmään, jotka ovat yksinkertaiset gallushappojohdannaiset, gallotanniinit ja ellagitanniinit (Salminen ja Karonen, 2011).

2.2. Galloyyyliglukoosit ja gallotanniinit

Hydrolysoituvista tanniineista galloyyyliglukoosit ovat rakenteeltaan kaiken yksinkertaisimpia. Niillä on keskussokeriin liittyneenä yhdestä viiteen galloyyliryhmää (Salminen ja Karonen, 2011). Yksinkertaisin galloyyyliglukoosi on 1-*O*-galloyyli- β -D-glukoosi, jonka sokerin anomeeriseen asemaan on kiinnittynyt galloyyliryhmä esterisidoksella. Kasvien luonnollisessa aineenvaihdunnassa galloyyliryhmät kiinnittyvät glukoosin eri asemiin seuraavassa järjestyksessä: 1, 6, 2, 3 ja 4. Kun viisi galloyyliryhmää on kiinnittynyt glukoosiin, on kyseessä 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyyli- β -D-glukoosi (PGG), joka on kasvien aineenvaihdunnassa gallo- ja ellagitanniinien valmistuksen lähtöaine (Kuva 1).

Gallotanniineilla on vähintään kuusi galloyyliryhmää niiden rakenteessa. Gallotanniinit eroavat galloyyyliglukooseista, sillä niillä kaikki galloyyliryhmät eivät ole suoraan sokerissa kiinni, vaan osa niiden galloyyliryhmistä ovat sitoutuneet toisiinsa kiinni depsidi-sidoksilla, jolloin muodostuu gallotanniineille ominaisia digalloyyliryhmiä (Kuva 1). Yleensä galloyyliryhmä sitoutuu keskussokerissa kiinni olevan galloyyliryhmän *meta*-asemaan, mutta myös *para*-asema on mahdollinen. Gallotanniineja ei pystytä puhdistamaan niin hyvin kuin galloyyyliglukooseja tai ellagitanniineja, joten useissa tutkimuksissa käytetyt gallotanniinit ovat tietystä kasvista puhdistettuja gallotanniiniseoksia.



Kuva 1. Esimerkki yhdisteitä hydrolysoituvista tanniineista, joita on käytetty puhdasaineina tanniini–makromolekyylit-kompleksien tutkimisessa. HHDP = heksahydroksidifenyyli, DHHDP = dehydroheksahydroksidifenyyli, NHTP = nonahydroksitrifenyylit.

2.3. Ellagitanniinit

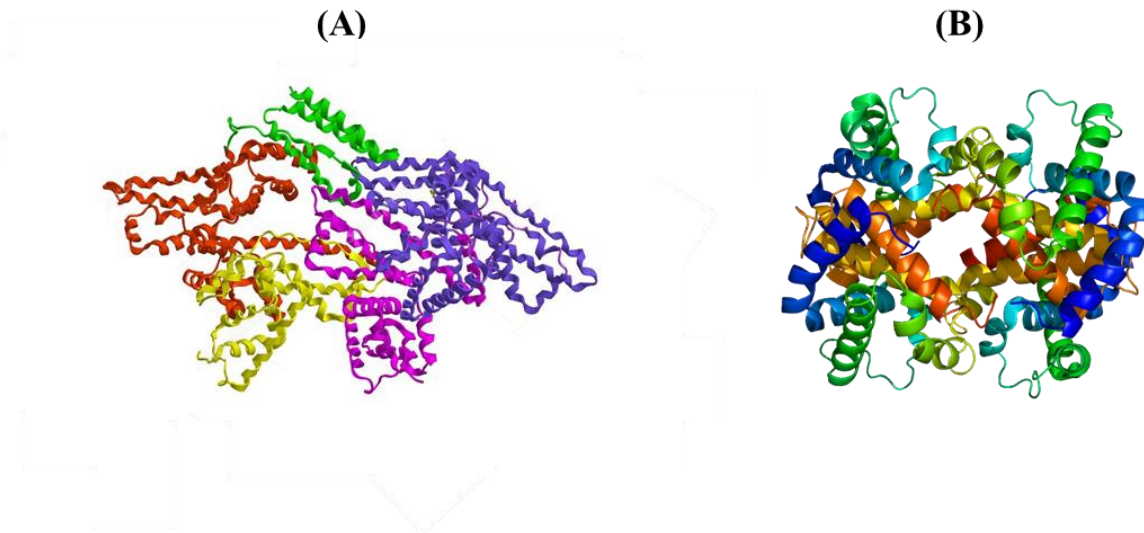
Ellagitanniinit ovat hydrolysoituvista tanniineista rakenteeltaan kaikkein monipuolisin ryhmä (Quideau ja Feldman, 1996). Galloyyliryhmien välille voi muodostua intramolekulaarinen C–C-sidos, jolloin muodostuu heksahydroksidifenoyyliryhmä (HHDP), joka on ellagitanniineille tunnusomainen fenolinen ryhmä. HHDP-ryhmä voi muodostua esimerkiksi PGG:n sokerin 4- ja 6-asemien galloyyliryhmistä, jolloin muodostunut yhdiste on tellimagrandiini II. Mikäli tellimagrandiini II:n 2- ja 3-asemien galloyyliryhmistä muodostuu myös HHDP-ryhmä, muodostunut yhdiste on kasuariktiini (Kuva 1). Mikäli kasuariktiinin 2,3-*O*-HHDP-ryhmään hajoaa etsymaattisesti ja siihen lisätään vielä vettä, voi hapettumisen myötä muodostua dehydroheksahydroksidifenoyyliryhmä (DHHDP). Esimerkki tällaisesta yhdisteestä on geraniini (Kuva 1), jonka DHHDP-ryhmä voi edelleen modifioitua monella eri tavalla, jolloin saadaan erilaisia modifioituja ellagitanniineja.

Ellagitanniineilla voi olla myös avoketjuinen keskuspolyoli, jolloin puhutaan avoketjuisista ellagitanniineista (Quideau ja Feldman, 1996). Nonahydroksitrifenyyliryhmä (NHTP) on avoketjuisille ellagitanniineille yleinen ryhmä, josta esimerkkiyhdisteenä on veskalagiini (Kuva 1). Avoketjuisten ellagitanniinien sokerin anomeerisessa asemassa kiinni oleva hydroksyyli-ryhmä voi olla joko α - tai β -konfiguraatiossa, mikä vaikuttaa myös näiden yhdisteiden bioaktiivisuuksiin ja kemiallisiin ominaisuuksiin. Ellagitanniineja esiintyy luonnossa myös oligomeereina, jotka muodostuvat toisiinsa kiinni sitoutuneista monomeereista. Monomeeriosien välisiä sidoksia on monenlaisia, mutta yleisimpiä niistä ovat sidokset, joissa donorina ja akseptorina ovat galloyyli- ja HHDP-ryhmät (Okuda et al., 1993). Tällainen sidos on esimerkiksi GOG-sidos, jossa galloyyliryhmä toimii sekä donorina että akseptorina. GOD-sidoksessa galloyyliryhmä toimii puolestaan donorina ja HHDP-ryhmä akseptorina, kun taas DOG-sidoksessa HHDP-ryhmä toimii donorina ja galloyyliryhmä akseptorina. Sen lisäksi D(OG)₂-sidoksessa monomeeriosien välissä on kaksi DOG-sidosta peräkkäin (Kuva 1).

3. Makromolekyylit

Hydrolysoituville tanniineille on tehty kaikista makromolekyyliluokista eniten affiniteettitutkimuksia proteiinien kanssa. Proteiinit ovat hyvin suuria makromolekyylejä, jotka muodostuvat pienemmistä rakenneyksiköistä eli aminohapoista kovalenttisilla peptidisidoksilla. Proteiineille on tyypillistä, että niissä toistuu tietynlainen jakso niiden rakenneyksiköiden välillä, jota kutsutaan niiden aminohapposekvenssiksi. Aminohapposekvenssi on myös proteiinin primäärirakenne. Sekundäärirakenne muodostuu, kun peptidiketjun sisällä muodostuu intramolekulaarisia heikkoja vuorovaikutuksia, minkä johdosta peptidiketju laskostuu yleensä joko α -kierteeksi tai β -laskokseksi. Proteiinien tertiäärinen rakenne muodostuu, kun sekundäärinen rakenne hakeutuu tietynlaiseen kolmiulotteiseen rakenteeseen heikkojen vuorovaikutusten johdosta. Useilla proteiineilla esiintyy vielä kvaternäärirakenteita, joissa useita eri peptidiketjuja sitoutuu toisiinsa intermolekulaarisien heikkojen vuorovaikutusten avulla.

Proteiinit voidaan jakaa niiden kolmiulotteisen rakenteen perusteella kolmeen ryhmään. Globulaarisiin eli pallomaisiin proteiineihin kuuluvat esimerkiksi BSA (Kuva 2), jota on käytetty malliproteiinina hyvin monissa eri tutkimuksissa (Beart et al., 1985; Ozawa et al., 1987; Kawamoto et al., 1995; Feldman et al., 1999; Deaville et al., 2007; Dobrev et al., 2014; Shimozu et al., 2018). Sen lisäksi pallomaisiin proteiineihin kuuluvat esimerkiksi ihmisen seerumin albumiini (*human serum albumin*, HSA) (Sekowski et al., 2014; Sekowski et al., 2018) ja hemoglobiini (Okuda et al., 1985; Ozawa et al., 1987), joiden sitoutumista hydrolysoituviiin tanniineihin on myös tutkittu. Tanniinien vuorovaikutusta kuitumaisten proteiinien kanssa on puolestaan tutkittu esimerkiksi gelatiinilla ja kollageenilla (Tang et al., 2003; Hofmann et al., 2006; Deaville et al., 2007) ja ne ovat rakenteiltaan hyvin avoimia ja joustavia proteiineja. Kaikista vähiten tutkimuksia on tehty solujen kalvoproteiineille, koska niitä on hyvin vaikea eristää ja puhdistaa tutkimuskäyttöön. Hydrolysoituvilla tanniineilla on tehty tutkimuksia myös ihmisen syljen proteiinien kanssa (Charlton et al., 1996; Bacon ja Rhodes, 1998; Bacon ja Rhodes, 2000), mutta syljen proteiinit ovat seos useita proteiineja tai fraktioita proteiiniseoksesta. Lisäksi hydrolysoituvien tanniinien ja proteiinien välistä sitoutumista on tutkittu epäsuorasti esimerkiksi tutkimalla, miten tanniinit inaktivoivat entsyymejä (Haslam, 1974; Ozawa et al., 1987; Toda et al., 2001) tai tutkimalla miten tanniinit reagoivat Bradfordin reagenssin kanssa (Kilkowski ja Gross, 1999).



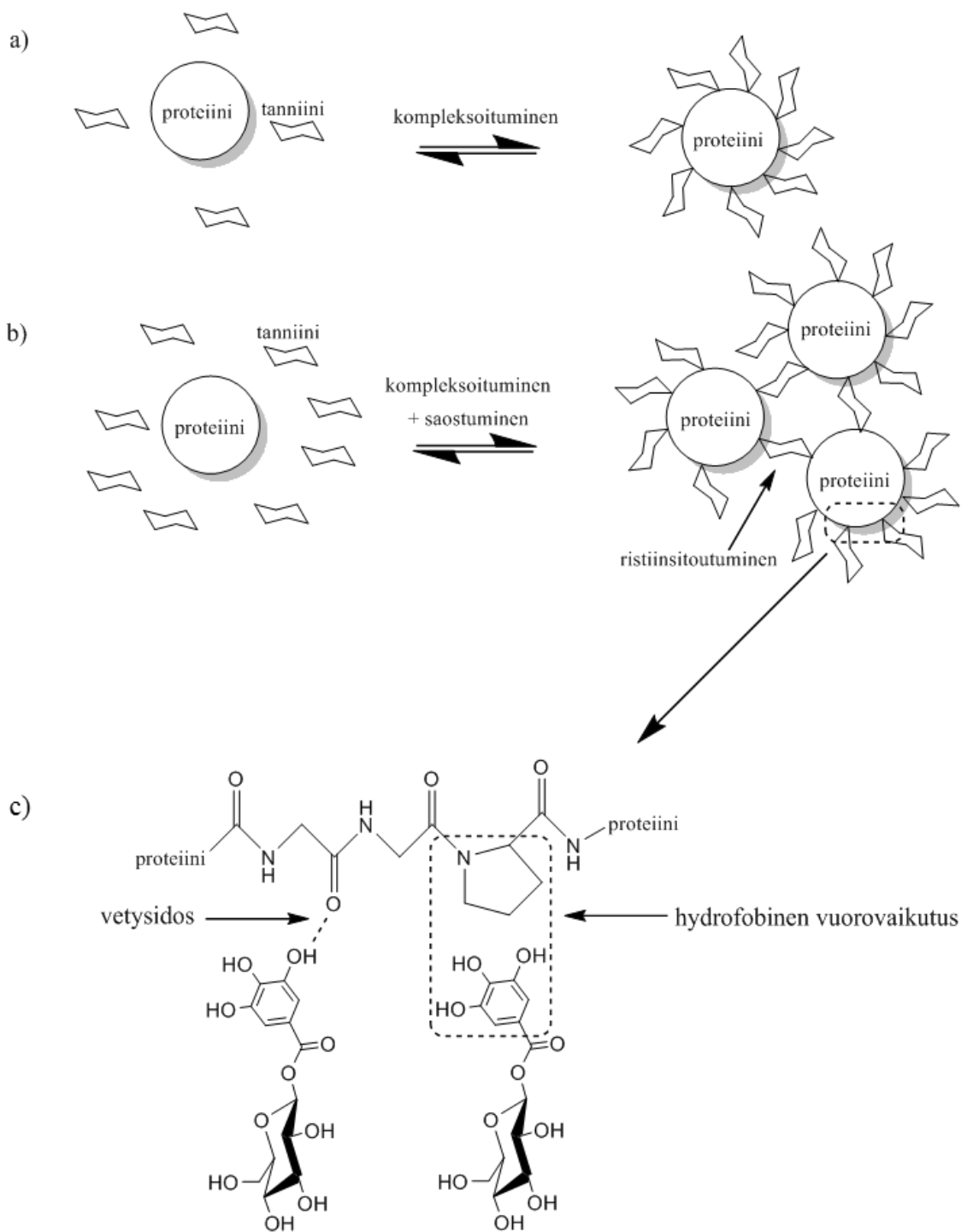
Kuva 2. BSA:n (A) ja hemoglobiinin (B) molekyyliarakenteet. Kuva muokattu nettisivulta: www.rcsb.org (protein data bank).

Proteiinien jälkeen toiseksi eniten on tutkittu tanniinien ja polysakkaridien välisiä vuorovaikutuksia ja niiden muodostamia komplekseja. Polysakkaridit ovat useista sokereista glykosidisidosten avulla muodostuneita makromolekyylejä, jotka ovat muodoltaan joko pitkiä ja ketjumaisia tai hyvin haarautuneita molekyylejä. Polysakkarideista eniten tutkittuja molekyylejä hydrolysoituvien tanniinien affiniteetin kannalta ovat dekstraanit ja selluloosa, joita on tutkittu lähinnä kromatografisin menetelmin (McManus et al., 1985; Tang et al., 2003). Proteiinien ja polysakkaridien lisäksi hydrolysoituvien tanniinien vuorovaikutusta on tutkittu mm. fosfolipidien, nukleiinihappojen ja lyhempien peptidiketjujen kanssa (Takechi ja Tanaka, 1987; He et al., 2006; Richard et al., 2006).

4. Hydrolysoituvien tanniinien ja proteiinien väliset vuorovaikutukset

4.1. Yleistä hydrolysoituvien tanniinien ja proteiinien välisistä vuorovaikutuksista

Hydrolysoituvat tanniinit voivat muodostaa komplekseja proteiinien kanssa joko heikoilla vuorovaikutuksilla, joita ovat hydrofobiset voimat ja vetysidokset tai vahvoilla vuorovaikutuksilla, kuten esimerkiksi kovalenttisilla sidoksilla. Heikoilla vuorovaikutuksilla muodostuneita komplekseja, joihin tässäkin työssä keskitytään, on tutkittu huomattavasti enemmän kuin kovalenttisilla sidoksilla muodostuneita komplekseja (Kuva 3). Monissa tutkimuksissa hydrofobiset voimat on nimetty todennäköiseksi päätekijäksi hydrolysoituvien tanniinien ja proteiinien välisten kompleksien muodostumisessa, joita vetysidokset tehostavat (Haslam, 1996). Kuitenkin yhdisteestä riippuen kumpi vain heikoista vuorovaikutuksista voi olla hallitsevampi tekijä proteiiniaffiniteetin kannalta (Hagerman et al., 1998). Hagerman työryhmineen (Hagerman et al., 1998) havaitsi, että hyvin pooliton yhdiste PGG muodosti liukenemattomia komplekseja BSA:n kanssa hydrofobisten voimien välityksellä, kun taas epikatekiini sitoutui BSA:han lähinnä vetysidosten avulla. Tanniinit saattavat myös vuorovaikuttaa eri proteiinien kanssa eri tavoin, mikä näkyy myös tutkimustuloksissa. Esimerkiksi tetragalloyyliglukoosilla on mitattu tellimagrandiini II:ta korkeampi affiniteetti hemoglobiiniin (Okuda et al., 1985), mutta niille määritetyt BSA-affiniteetit ovat puolestaan päinvastaiset (McManus et al., 1985).



Kuva 3. Hydrolysoituvien tanniinien ja proteiinien välisiä komplekseja muodostuu sekä matalassa (a) että korkeassa (b) tanniinikonsentraatiossa. Liukenemattomia komplekseja muodostuu kuitenkin vain tarpeeksi korkeassa tanniinikonsentraatiossa (b). Tanniinien ja proteiinien väliset heikot vuorovaikutukset ovat puolestaan kuvattu kohdassa (c). Kuva on muokattu julkaisusta (Haslam, 1989).

Hydrofobiset vuorovaikutukset muodostuvat hydrolysoituvien tanniinien aromaattisten renkaiden ja proteiinien hydrofobisten kohtien, kuten niiden pyrrolidiinirenkaiden välille, jolloin puhutaan aromaattisesta pinoutumisesta (Charlton et al., 1996; Baxter et al., 1997). Vetysidokset muodostuvat puolestaan hydrolysoituvien tanniinien hydroksyyliiryhmien ja proteiinien hydrofiilisten kohtien, kuten karbonyyliiryhmien välille (McManus et al., 1985; Haslam, 1996; Baxter et al., 1997). Hydrolysoituvien tanniinien ja proteiinien välisten kompleksien muodostumiseen vaikuttavat lisäksi niiden konsentraatiot, käytetty liuotin, ionivahvuus, lämpötila ja pH (Kawamoto ja Nakatsubo, 1997). Erityisesti pH:lla on vaikutusta kompleksien syntyyn, sillä sen pitää olla lähellä proteiinin isoelektronista pistettä, jotta kompleksienmuodostuminen olisi optimaalista (Naczka et al., 1996). Korkeammalla lämpötilalla on puolestaan havaittu olevan positiivinen vaikutus kompleksien syntyyn, sillä korkea lämpötila denaturoi proteiinin rakenteen, mikä vapauttaa proteiinista uusia sitoutumiskohtia tanniineille (Hofmann et al., 2006). Sitoutumiskohtien lukumäärän määrittäminen hydrolysoituvista tanniineista kertoo puolestaan niiden proteiiniaffiniteetista (Haslam, 1974). Tanniinien sitoutumiskohdat ovat yleensä niiden rakenteen fenolisia ryhmiä ottaen kuitenkin huomioon sen, että kaikki fenoliset ryhmät eivät sitoudu proteiineihin yhtä tehokkaasti. Suuri sitoutumiskohtien määrä tanniinissa lisää ristiinsitoutumisen mahdollisuutta proteiinien kanssa, mikä vaikuttaa positiivisesti yhdisteen proteiiniaffiniteettiin ja kompleksien muodostumiseen (Haslam, 1974).

Hydrolysoituvien tanniinien ja proteiinien muodostamia liukoisia komplekseja on tutkittu useilla erilaisilla menetelmillä. Käytetyin menetelmä on isoterminen titrauskalometria, jota on käytetty useissa eri tutkimuksissa (Frazier et al., 2003; Deaville et al., 2007; Dobрева et al., 2014; Karonen et al., 2015). Muita käytettyjä menetelmiä ovat esimerkiksi tasapainodialyysi ja mikrokalorimetria (Beart et al., 1985; McManus et al., 1985; Feldman et al., 1999), kokoeksklusiokromatografia (Hatano et al., 2003), native- ja SDS-PAGE -elektroforeesimenetelmät (Shimozu et al., 2017; Shimozu et al., 2018), fluoresenssispektroskopia (Sekowski et al., 2014; Sekowski et al., 2018) ja massaspektrometria (Chen ja Hagerman, 2004). Sen lisäksi tanniinien ja peptidien välistä vuorovaikutusta on tutkittu NMR:llä (Richard et al., 2006), jolla voidaan tutkia tarkemmin tanniinien ja proteiinien välisiä sitoutumiskohtia.

Myös hydrolysoituvien tanniinien ja proteiinien muodostamia liukenemattomia komplekseja on tutkittu monilla eri menetelmillä. Yksinkertaisimmissa turbidimetrisissä menetelmissä proteiiniliuokseen lisätään tunnettu määrä tanniinia, jolloin muodostuneet liukenemattomat kompleksit voidaan havaita mittaamalla absorbanssi spektrofotometrisesti (Okuda et al., 1985). Muita tapoja on käyttää esimerkiksi radioleimattua proteiinia, minkä jälkeen liukenemattomia komplekseja voidaan tutkia geigermittarilla (Hofmann et al., 2006). Yksi tapa tutkia liukenemattomia komplekseja on puolestaan käyttää kilpailutestiä, jossa tanniini kilpailee sitoutumisesta proteiineihin standardiyhdistettä vastaan (Bacon ja Rhodes, 1998; Bacon ja Rhodes, 2000). Lisäksi liukenemattomien kompleksien mittaamiseen on käytetty dynaamista valonsirontaa (Charlton et al., 1996) ja epäsuorasti myös nestekromatografiaa (Kawamoto et al., 1995; Kawamoto et al., 1996a).

Proteiiniaffiniteettitutkimuksissa on havaittu kaksi selvää päätekijää, jotka vaikuttavat hydrolysoituvien tanniinien sitoutumiseen proteiineihin: yhdisteiden molekyylipaino ja rakenteen joustavuus, joka puolestaan riippuu voimakkaasti yhdisteiden sisältämistä fenolisista ryhmistä (McManus et al., 1985; Haslam, 1996). Molekyylipaino on tärkein yksittäinen tanniinien proteiiniaffiniteettiin vaikuttava tekijä, mikä havaitaan esimerkiksi tutkimuksista, joissa on tutkittu sekä monomeereja että oligomeerejä (McManus et al., 1985; Okuda et al., 1985; Ozawa et al., 1987; Dobрева et al., 2014; Karonen et al., 2015; Shimozu et al., 2017; Shimozu et al., 2018). Kuitenkaan kaikissa tutkimuksissa dimeeri ei aina sitoudu proteiiniin paremmin kuin monomeeri (Okuda et al., 1985), mikä viittaa siihen, että hydrolysoituvien tanniinien fenolisilla ryhmillä on myös suuri merkitys niiden sitoutumisessa proteiineihin. Tanniinin absoluuttinen proteiiniaffiniteetti muodostuu näiden kahden tekijän yhteisvaikutuksesta. Edellä mainittujen tekijöiden lisäksi tanniinien vesiliukoisuudella on havaittu olevan selvä yhteys niiden proteiiniaffiniteettiin, joten myös sen avulla voidaan arvioida tanniinien proteiiniaffiniteettiä (Tanaka et al., 1997).

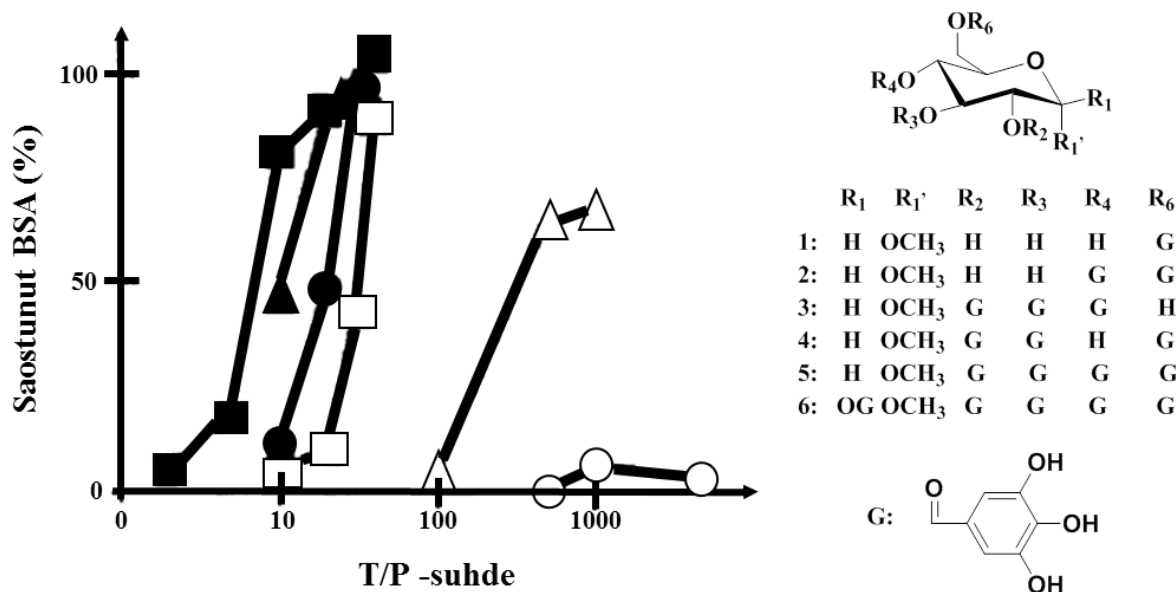
4.2. Hydrolysoituvien tanniinien rakenteen vaikutus proteiiniaffiniteettiin

4.2.1. Galloyyyliglukoosien rakenteen vaikutus proteiiniaffiniteettiin

Yksinkertaisilla galloyyyliglukooseilla sitoutuminen proteiineihin paranee galloyyliryhmien määrän kasvaessa niiden rakenteessa, sillä tällöin yhdisteiden molekyylipaino kasvaa ja galloyyliryhmät lisäävät myös yhdisteiden joustavuutta, mikä parantaa niiden sitoutumista

proteiineihin edelleen (Haslam, 1974; McManus et al., 1985; Okuda et al., 1985; Ozawa et al., 1987; Kilkowski ja Gross, 1999; Okuda et al., 1985). Näin ollen PGG sitoutuu paremmin proteiineihin kuin tetragalloyyyliglukoosi, joka sitoutuu puolestaan paremmin kuin trigalloyyyliglukoosi ja niin edelleen. Ainoastaan yhdessä julkaisussa tetragalloyyyliglukoosi oli sitoutunut proteiineihin paremmin kuin PGG (Bacon ja Rhodes, 2000). Tähän saattaa vaikuttaa myös se, että kyseisessä tutkimuksessa oli käytetty proteiiniseosta, eikä puhdistettua proteiinia.

Trigalloyyyliglukoosi on useissa tutkimuksissa galloyyyliglukoosisarjan ensimmäinen yhdiste, joka on sitoutunut kunnolla proteiiniin ja antanut vasteen käytetyllä menetelmällä (Kawamoto, et al., 1996a; Kilkowski ja Gross, 1999). Tämä väite on tutkimuksissa perusteltu yleensä sillä, että mono- ja digalloyyyliglukoosi eivät vielä pysty muodostamaan ristikkäissidoksia proteiinin kanssa niiden vähäisten galloyyliryhmien takia toisin kuin trigalloyyyliglukoosi (Haslam, 1974). Tämä on havaittavissa myös Kawamoton työryhmineen (Kawamoto et al., 1996a) tekemässä tutkimuksessa, jossa vähintään kolme galloyyliryhmää sisältävät galloyyyliglukoosit pystyivät saostamaan BSA:n lähes sataprosenttisesti toisin kuin mono- ja digalloyyyliglukoosit (Kuva 4). Yhden galloyyliryhmän lisääminen yhdisteen rakenteeseen ei kuitenkaan kasvata yhdisteen proteiiniaffiniteettia aina saman verran (Kilkowski ja Gross, 1999). Tämä saattaa johtua edellä mainitusta ristiinsitoutumisesta tai siitä, että galloyyliryhmät lisäävät sekä yhdisteen kokoa, että joustavuutta, mutta nämä kaksi proteiiniaffiniteettiin vaikuttavaa tekijää eivät kuitenkaan kasva yhtä nopeasti suhteessa toisiinsa. Tämän takia esimerkiksi trigalloyyyliglukoosin ja tetragalloyyyliglukoosin välillä havaitaan tutkimuksissa paljon suurempi ero proteiiniaffiniteetissa kuin esimerkiksi tetragalloyyyliglukoosin ja PGG:n välillä.



Kuva 4. Saostuneen BSA:n määrä verrattuna tanniini–proteiini -suhteeseen (T/P): ○, yhdiste 1; △, yhdiste 2; □, yhdiste 3; ●, yhdiste 4; ▲, yhdiste 5; ■, yhdiste 6. Kuva on muokattu julkaisusta (Kawamoto et al., 1996a).

Kawamoto tutkimusryhmineen (Kawamoto et al., 1995) on tehnyt galloyyyliglukoosisarjan yhdisteiden kanssa monipuolisempaa tutkimusta, sillä he tutkivat liukenemattomia galloyyyliglukoosi–BSA -komplekseja yhdisteillä, joiden galloyyliryhmät sijaitsivat eri kohdissa sokeria. He havaitsivat 4,6-*O*-digalloyyyliglukoosin olevan parempi muodostamaan liukenemattomia komplekseja BSA:n kanssa kuin 2,3-*O*-digalloyyyliglukoosi. Samoin he havaitsivat, että 2,3,6-*O*-trigalloyyyliglukoosi muodosti enemmän liukenemattomia komplekseja kuin 2,3,4-*O*-trigalloyyyliglukoosi (Kawamoto et al., 1996a). Heidän mukaansa molemmissa tapauksissa 6-asemaan kiinnittynyt galloyyliryhmä ei ole sterisesti niin estynyt ja pystyy siksi sitoutumaan paremmin BSA:han kuin esimerkiksi 3- tai 4-asemaan kiinnittynyt galloyyliryhmä. He perustelivat väitteen sillä, että molekyylissä mahdollisimman kaukana toisistaan olevat galloyyliryhmät edesauttavat risitiinsitoutumista enemmän BSA:n kanssa kuin vierekkäin olevat galloyyliryhmät. Tätä he olivat testanneet erilaisilla di- ja trigalloyylioksibentseeneillä, jotka saostivat BSA:ta paremmin, kun galloyyliryhmät olivat mahdollisimman kaukana toisistaan bentseenirenkaassa (Kawamoto et al., 1996a). Kuitenkin toisessa tutkimuksessa 1,2,6-*O*-trigalloyyyliglukoosi sitoutui huonommin hemoglobiiniin kuin 1,2,3-*O*-trigalloyyyliglukoosi, vaikka sen galloyyliryhmät

sijaitsivat kauempana toisistaan (Okuda et al., 1985). Kawamoton tutkimusryhmineen tekemissä tutkimuksissa (Kawamoto et al., 1995; Kawamoto et al., 1996a) pitää myös huomioida se yksityiskohta, että heidän käyttämänsä yhdisteet eivät ole luonnollisia galloyyyliglukooseja, vaan sokerin anomeeriseen asemaan on liittynyt metyyliiryhmä (Kawamoto et al., 1996b). Tämä saattoi vaikuttaa heidän saamiinsa tuloksiin, sillä toisessa tutkimuksessa sokerin anomeeriseen asemaan liittynyt metyyliiryhmä pienensi tetragalloyyyliglukoosin kykyä sitoutua β -glukosidaasiin (Haslam, 1974).

Myös Feldman tutkimusryhmineen (Feldman et al., 1999) on tehnyt tutkimusta galloyyyliglukooseilla, edelleen pienempiin yksityiskohtiin keskittyen. Heidän tutkimuksessaan mitattiin β -D-PGG:n ja sen kolmen eri isomeerin proteiiniaffiniteetit BSA:han tasapainodialyysillä ja mikrokalorimetrialla. Tutkimuksessa havaittiin, että luonnollinen β -D-PGG muodosti komplekseja BSA:n kanssa yhtä hyvin kuin sen epäluonnollinen enantiomeeri β -L-PGG. Tämä tulos johti päätelmään, että proteiiniaffiniteetti ei ole kiinni näin pienestä muutoksesta galloyyyliglukoosien rakenteessa. Sen sijaan PGG:n diastereomeeri α -D-PGG muodosti jo huomattavasti paremmin komplekseja BSA:n kanssa kuin sen luonnollinen stereoisomeeri. Tämä tulos perusteltiin sillä, että α -D-PGG:n sokerin anomeerisessa asemassa kiinni oleva aksiaalinen galloyyliiryhmä lisää BSA-affiniteettia ja samalla parantaa myös sokerin 2-asemassa kiinni olevan galloyyliiryhmän sitoutumista verrattuna β -D-PGG:hen, jolla kaikki galloyyliiryhmät ovat ekvatoriaalisessa asemassa.

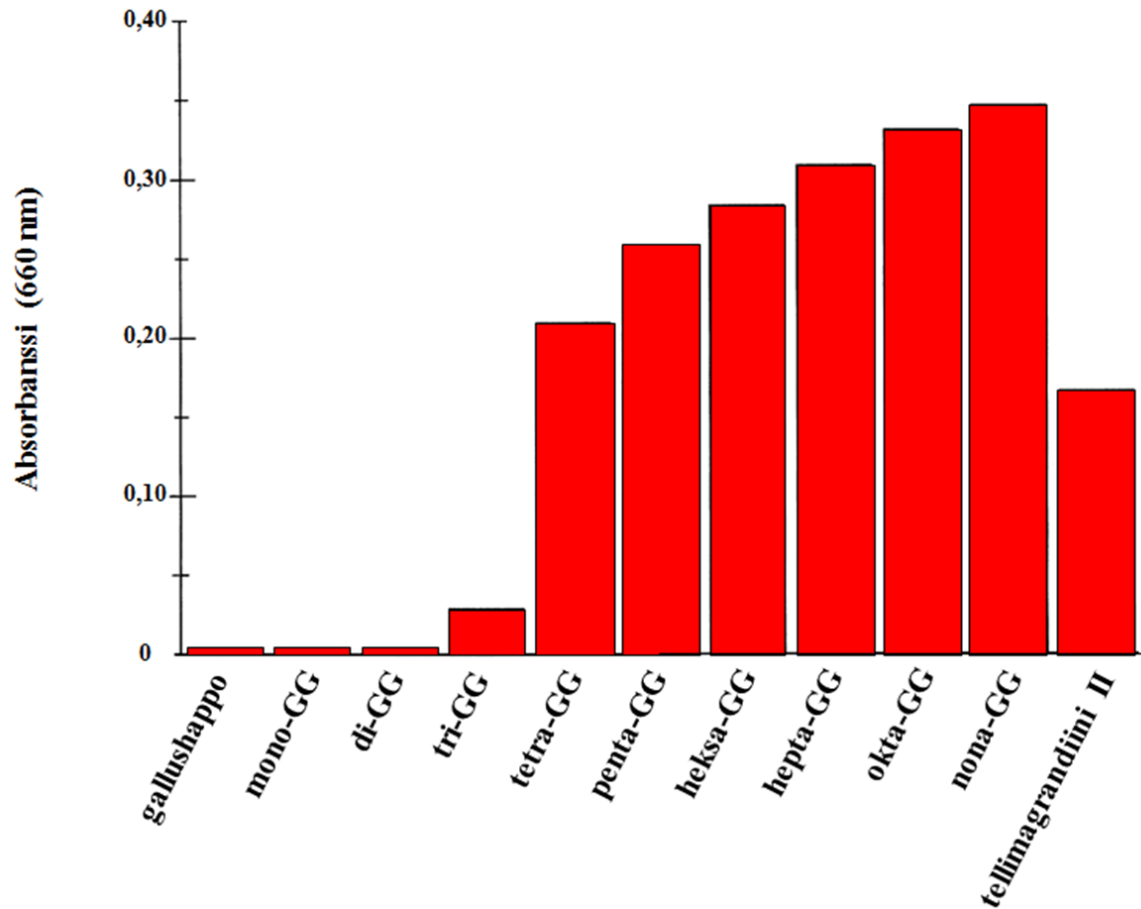
Tutkimuksessa verrattiin PGG:tä myös β -D-penta-(3,5-dihydroksibentsoyyli)-glukoosiin, joka eroaa PGG:stä vain siinä, että sen galloyyliiryhmät olivat korvattu ryhmillä, joissa on vain kaksi hydroksyyliiryhmää bentseenirenkaan 3- ja 5-asemissa. Kyseinen yhdiste muodosti komplekseja paremmin kuin PGG, mikä perusteltiin tutkimuksessa sillä, että 3,5-dihydroksibentsoyyliiryhmä lisää sitoutumista BSA:han hydrofobisten vuorovaikutusten takia. Tämä tulos osoitti myös sen, että hydrofobiset voimat ovat PGG:n ja BSA:n välisessä vuorovaikutuksista tärkeämpiä kuin vetysidokset (Feldman et al., 1999), minkä myös Hagerman tutkimusryhmineen havaitsivat (Hagerman et al., 1998). Galloyyyliglukooseilla pystytään tekemään hyvin yksityiskohtaista rakenneaktiivisuus -tutkimusta, koska rakenteissa esiintyy vain galloyyliiryhmiä, joiden lukumäärät ja paikat vaihtelevat yhdisteissä. Näin ollen rakenneaktiivisuus -tutkimuksen kannalta

voidaan tehdä hyvinkin tarkkoja päätelmiä verrattuna esimerkiksi ellagitanniineihin, joiden rakenteet ovat paljon monipuolisempia ja aktiivisuudet saattavat johtua näin ollen monesta eri tekijästä.

4.2.2. Gallotanniinien rakenteen vaikutus proteiiniaffiniteettiin

Gallotanniinien proteiiniaffiniteettia ei ole tutkittu niin laajasti ja niin pieniin yksityiskohtiin keskittyen kuin galloyyyliglukoosien, mutta kahdessa tutkimuksessa on kuitenkin käytetty puhdistettuja gallotanniineja (Kilkowski ja Gross, 1999; Engström et al., 2019). Kilkowski työryhmineen (Kilkowski ja Gross, 1999) mittasivat heksa-, hepta-, okta- ja nonagalloyyyliglukoosin proteiiniaffiniteetit Bradfordin reagenssilla. Tuloksista havaittiin, että digalloyyliryhmien lisääntyminen gallotanniinien rakenteessa kasvattaa niiden proteiiniaffiniteettia, mutta muutokset absorbansseissa eivät ole niin suuria kuin galloyyliryhmien sitoutuminen suoraan sokeriin, mikä havaitaan galloyyyliglukoosien kohdalla.

Engström tutkimusryhmineen (Engström et al., 2019) mittasivat heksa-, hepta- ja oktagalloyyyliglukoosien proteiiniaffiniteetit BSA:han. Myös tässä tutkimuksessa digalloyyliryhmien määrän kasvaessa gallotanniinien rakenteessa niiden proteiiniaffiniteetti kasvoi. Tässäkään tutkimuksessa digalloyyliryhmät eivät kuitenkaan kasvattaneet proteiiniaffiniteettia niin paljon kuin suoraan sokeriin liittyneet galloyyliryhmät galloyyyliglukooseilla (Engström et al., 2019). Tämä saattoi johtua siitä, että gallotanniinien digalloyyliryhmät lisäävät yhdisteiden joustavuutta, mutta ne eivät kuitenkaan lisää yhdisteiden mahdollisia sitoutumiskohtia PGG:hen verrattuna (Haslam, 1974) ja tämän takia ne eivät lisää yhdisteiden sitoutumista BSA:han yhtä paljon kuin pelkät galloyyliryhmät. Toisesta näkökulmasta tarkasteltuna galloyyyliglukoosien ja gallotanniinien välinen ero saattaa johtua myös niiden erilaisista vuorovaikutusmekanismeista proteiinien kanssa, sillä PGG sitoutuu proteiinien kanssa lähinnä hydrofobisin vuorovaikutuksin (Hagerman et al., 1998), kun taas hydrofiilisemmat gallotanniinit muodostavat proteiinien kanssa mieluummin myös vetysidoksia. Kuvassa 5 on esitetty galloyyyliglukoosien ja gallotanniinien mitattuja proteiiniaffiniteetteja Bradfordin reagenssilla.



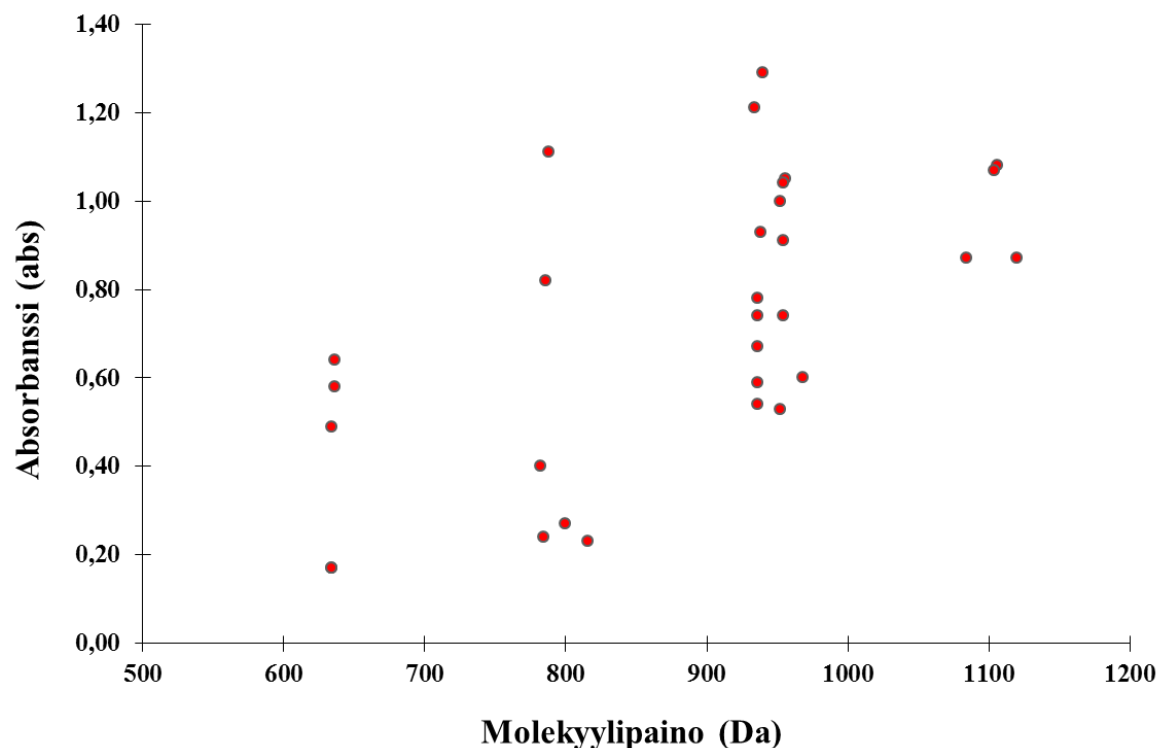
Kuva 5. Viiden galloyyyliglukoosin, neljän gallotanniinin ja yhden ellagitanniinin mitatut absorbanssit Bradfordin reagenssilla. GG = galloyyyliglukoosi. Kuva on muokattu julkaisusta (Kilkowski ja Gross, 1999).

Puhdistettujen gallotanniinien lisäksi myös gallotanniiniseoksien proteiiniaffiniteettia on tutkittu kahdessa eri tutkimuksessa (Haslam, 1974; Deaville et al., 2007). Tutkitut gallotanniiniseokset olivat eri kasvilajeista puhdistettuja ja niitä olivat mm. tara-gallotanniinit ja kiinalaiset gallotanniinit (Haslam et al., 1962; Britton et al., 1966). Näiden tutkimusten tuloksista voitiin tehdä johtopäätös, että helpoin tapa arvioida gallotanniiniseosten proteiiniaffiniteettia on määrittää seoksen keskimääräinen molekyylipaino. Enemmän kuitenkin tarvittaisiin tutkimuksia, joissa on käytetty puhdistettuja gallotanniineja, jotta niille voitaisiin tehdä yksityiskohtaisempaa rakenneaktiivisuus -tutkimusta. Gallotanniinien puhdistaminen kuitenkin on hankalaa ja puhdistetut gallotanniinit eivät ole vastaus kaikkiin kysymyksiin, sillä esimerkiksi puhdistetussa

oktagalloyyliglukoosissa digalloyyliryhmien paikat voivat vaihdella yhdisteen rakenteessa, joten digalloyyliryhmien paikkojen vaikutusta gallotanniinien proteiiniaffiniteettiin ei voida arvioida samoin kuin galloyyliryhmien vaikutusta galloyyliglukoosien proteiiniaffiniteettiin.

4.2.3. Ellagitanniinien rakenteen vaikutus proteiiniaffiniteettiin

Aivan kuten galloyyliglukooseilla ja gallotanniineilla aiemmin havaittiin, myös ellagitanniineilla molekyylipaino vaikuttaa yhdisteiden proteiiniaffiniteettiin, mutta se ei ole niin yksiselitteistä kuin galloyyliglukooseilla tai gallotanniineilla, sillä ellagitanniinien rakenteet ovat paljon monipuolisempia (Kuva 6). Tosin molekyylipainolla vaikuttaisi olevan eri proteiinien kohdalla erilainen vaikutus, sillä ellagitanniinien molekyylipainolla ei vaikuttaisi olevan niin suurta merkitystä hemoglobiiniaffiniteettiin (Okuda et al., 1985), kun taas BSA:han sitoutumisessa sillä on havaittu selkeä vaikutus (McManus et al., 1985).



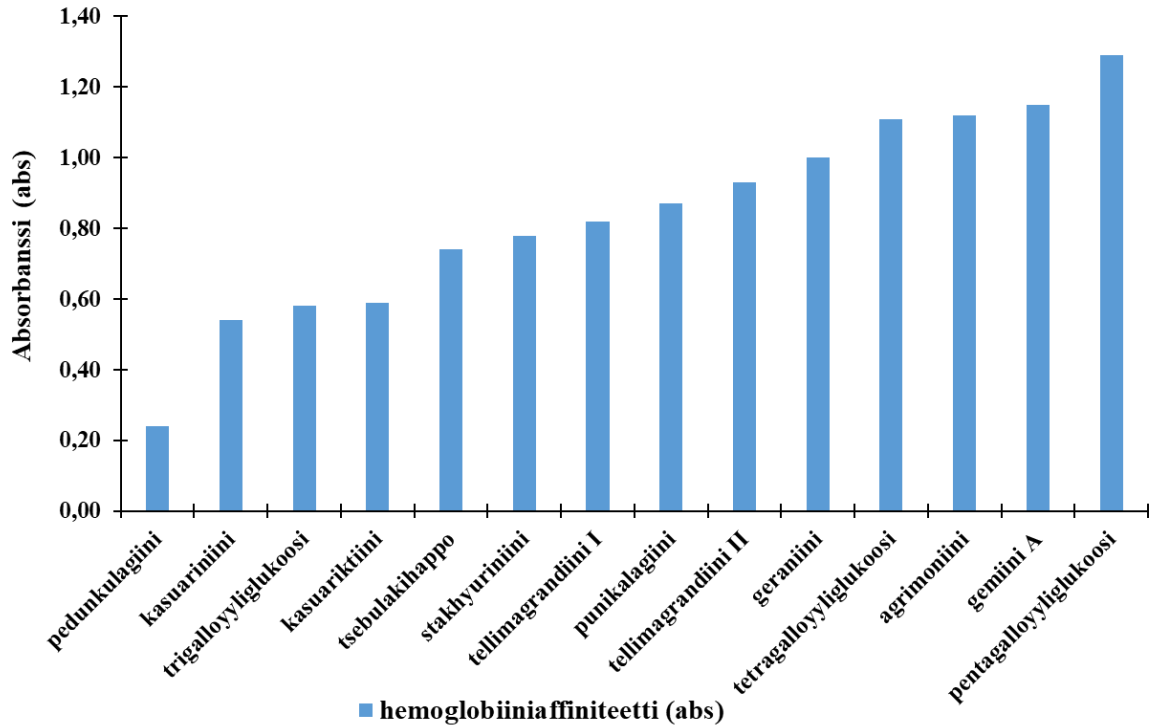
Kuva 6. Hydrolysoituvien tanniinien molekyylipainon vaikutus niiden absorbanssiin. Kuva on muokattu julkaisusta (Okuda et al., 1985).

Ellagitanniineille tunnusomaisen HHDP-ryhmän muodostuminen kahdesta galloyyliryhmästä pienentää yhdisteen proteiiniaffiniteettia. Esimerkiksi kun PGG:n 4- ja 6- asemissa kiinni olevat galloyyliryhmät muodostavat HHDP-ryhmän, muodostuneen tellimagrandiini II:n proteiiniaffiniteetti on jo selvästi pienempi kuin PGG:n (Okuda et al., 1985; Kilkowski ja Gross, 1999). Itse asiassa näissä tutkimuksissa tellimagrandiini II:lle mitattu proteiiniaffiniteetti sijoittuu tri- ja tetragalloyylyglukoosien väliin. HHDP-ryhmän heikompi kyky vuorovaikuttaa proteiinien kanssa verrattuna galloyyliryhmään on näissä tutkimuksissa perusteltu sillä, että HHDP-ryhmä jäykistää tanniinin rakennetta. Yleisesti siis tanniinien proteiiniaffiniteetti laskee, kun galloyyliryhmien määrä pienenee ja samanaikaisesti HHDP-ryhmien määrä lisääntyy yhdisteen rakenteessa. Tanniinin molekyylipainon merkitystä proteiiniaffiniteettiin ei voida kuitenkaan kokonaan unohtaa, sillä suurempi galloyyliryhmien lukumäärä yhdisteessä ei aina takaa korkeampaa proteiiniaffiniteettia, sillä esimerkiksi McManus työryhmineen (McManus et al., 1985) mittasi tellimagrandiini II:lle korkeamman BSA-affiniteetin kuin tetragalloyylyglukoosille, vaikka sillä on yksi galloyyliryhmä vähemmän rakenteessa. Tämä tulos voidaan kuitenkin perustella tellimagrandiini II:n korkeammalla molekyylipainolla. Ozawa työryhmineen (Ozawa et al., 1987) havaitsi puolestaan, että tetragalloyylyglukoosi sitoutuu paremmin β -glukosidaasiin kuin kasuariktiini, vaikka sen molekyylipaino on pienempi, joten tässä tapauksessa kaksi HHDP-ryhmää ja yksi galloyyliryhmä ei sitoutunut yhtä hyvin proteiiniin kuin neljä galloyyliryhmää.

Myös ellagitanniineilla kaikista pienimmät yhdisteet omaavat hyvin alhaisen proteiiniaffiniteetin. Tällaisia yhdisteitä ovat esimerkiksi HHDP-glukoosi, striktiniini, korilagiini ja pedunkulagiini (Okuda et al., 1985). Striktiniinillä ja korilagiinilla on molemmilla rakenteissaan yksi galloyyliryhmä ja yksi HHDP-ryhmä ja niille mitattiinkin sama proteiiniaffiniteetti hemoglobiinia kohtaan (0,19) (Okuda et al., 1985). Pedunkulagiinille mitattiin hieman korkeampi affiniteetti (0,24) kuin striktiniinille ja korilagiinille, vaikka sillä on kaksi HHDP-ryhmää eikä ollenkaan galloyyliryhmiä. Tämäkin tulos on selitettävissä pedunkulagiinin korkeammalla molekyylipainolla. Tellimagrandiini I:lle mitattiin jo huomattavasti korkeampi affiniteetti hemoglobiiniin (0,82), vaikka sen rakenteessa on striktiniiniin ja korilagiiniin verrattuna vain yksi galloyyliryhmä enemmän. Näiden tulosten perusteella vaikuttaisi siltä, että galloyylyglukoosien tapaan vain kaksi

fenolista ryhmää sitoutumiskohtina yhdisteessä ei ole ellagitanniinelle riittävästi, jotta ne voisivat ristiinsitoutua proteiinin kanssa. Tellimagrandiini I:llä on kuitenkin jo kolme fenolista ryhmää sitoutumiskohtina, joten se pystyy jo paremmin ristiinsitoutumaan proteiinien kanssa, mikä näkyy myös sen proteiiniaffiniteetissa (Okuda et al., 1985).

Aivan kuten galloyyyliglukooseilla aiemmin havaittiin (Feldman et al., 1999), myös ellagitanniinien proteiiniaffiniteettiin vaikuttavat pienetkin muutokset niiden rakenteessa. Okudan työryhmineen tekemässä tutkimuksessa (Okuda et al., 1985) havaittiin, että kasuariktiinin ja sen kahden isomeerin proteiiniaffiniteetit erosivat toisistaan, vaikka ne rakenteellisesti eroavat toisistaan vain hyvin vähän. Heidän tutkimuksessaan kasuariktiini antoi näistä yhdisteistä pienimmän proteiiniaffiniteetin (0,59), kun taas sen isomeeri 1-*O*-galloyyli-2,4:3,6-*bis-O*-HHDP- β -D-glukoosi antoi korkeamman proteiiniaffiniteetin (0,67). Tämä tulos viittaisi siihen, että geraniinille tyypillinen glukoosin 1C_4 -konformaatio tehostaisi tanniinin sitoutumista hemoglobiiniin hydrolysoituville tanniineille tyypillisempään 4C_1 -konformaatioon verrattuna. Edellisestä tuloksesta huolimatta korkeimman proteiiniaffiniteetin antoi kuitenkin potentilliini (0,74), joka eroaa kasuariktiinistä vain siinä, että sen anomeerisen aseman galloyyliryhmä on α -konfiguraatiossa. Tämä tulos vahvisti myös Feldmanin työryhmineen (Feldman et al., 1999) tekemän päätelmän siitä, että aksiaalisesti suuntautuneet galloyyliryhmät sitoutuvat tehokkaammin proteiiniin kuin ekvatoriaaliset galloyyliryhmät. Kuitenkin näiden ellagitanniinien proteiiniaffiniteetit olivat matalammat kuin tellimagrandiini I:llä, jolla ei ole galloyyliryhmää sokerin anomeerisessa asemassa ollenkaan. Tämä on yllättävää, sillä anomeerisen aseman galloyyliryhmä vaikuttaisi olevan tärkeä tekijä proteiineihin sitoutumisessa, mikä saattaa johtua siitä, että tässä asemassa galloyyliryhmä on vapaammassa asemassa muihin ryhmiin verrattuna vuorovaikuttaa proteiinien kanssa. Hemoglobiiniin sitoutumisessa anomeerisen aseman galloyyliryhmä ei kuitenkaan vaikuta olevan niin tärkeä tekijä (Kuva 7).



Kuva 7. Hydrolysoituvien tanniinien mitatut absorbanssit 14 yhdisteelle. Kuva on muokattu julkaisusta (Okuda et al., 1985).

DHHDP-ryhmän vaikutus hemoglobiiniin sitoutumisessa vaikuttaa olevan hyvinkin suuri, sillä geraniini (1,00) sitoutui hemoglobiiniin huomattavasti paremmin kuin kasuariktiini tai sen isomeerit (Okuda et al., 1985). 3,6-*O*-HHDP-ryhmän muuttuminen 3,6-*O*-DHHDP-ryhmäksi kuitenkin pienensi proteiiniaffiniteettiä huomattavasti, sillä dehydrogeraniinin (0,60) affiniteetti hemoglobiinia kohtaan oli huomattavasti pienempi kuin geraniinilla (Okuda et al., 1985). Modifioitu DHHDP-ryhmä ei sitoutunut hemoglobiiniin yhtä hyvin kuin DHHDP-ryhmä, sillä tsebulakihappo (0,74) antoi pienemmän proteiiniaffiniteetin mittauksessa kuin geraniini (Okuda et al., 1985). 3,6-*O*-HHDP-ryhmän avaaminen kahdeksi galloyyliryhmäksi puolestaan lisäsi proteiiniaffiniteettiä selvästi, sillä tsebuliinihappo (1,05) sitoutui tsebulakihappoa paremmin hemoglobiiniin (Okuda et al., 1985). Hemoglobiiniin sitoutui hyvin myös muutama hieman tuntemattomampi monomeerinen ellagitanniini, joita olivat mm. alnusiini (1,21), tershebiini (1,04) sekä rugosiini A (1,08) ja B (1,07) (Okuda et al., 1980; Okuda et al., 1982a; Yoshida et al., 1989).

Avoketjuisten ellagitanniinien proteiiniaffiniteetti hemoglobiinia kohtaan vaikuttaisi olevan samalla tasolla kuin glukopyranoosisokerin omaavilla ellagitanniineilla, mikäli niiden molekyylipainot vain vastaavat toisiaan. Tästä esimerkkinä ovat stakhuyriini ja kasuariini, jotka antoivat yhtä suuret proteiiniaffiniteetit tutkimuksessa kuin kasuariktiini (Okuda et al., 1985). Avoketjuiset ellagitanniinit joiden sokerin anomeerisen aseman hydroksyyli-ryhmä on β -konfiguraatiossa, sitoutui paremmin hemoglobiiniin kuin yhdiste, jonka hydroksyyli-ryhmä on α -konfiguraatiossa (Okuda et al., 1985). Avoketjuisista ellagitanniineista veskalagiinia ja kastalagiinia on tutkittu monissa tutkimuksissa (Beart et al., 1985; McManus et al., 1985; Bacon ja Rhodes, 2000; Hofmann et al., 2006; Dobreva et al., 2014). Näissä kaikissa tutkimuksissa veskalagiinille ja kastalagiinille mitattiin heikommat proteiiniaffiniteetit kuin PGG:lle, mutta monessa tutkimuksessa niille mitattiin kuitenkin parempi affiniteetti kuin trigalloyyliglukoosille (Beart et al., 1985; McManus et al., 1985; Bacon ja Rhodes, 2000). Veskalagiinin ja kastalagiinin heikompi proteiiniaffiniteetti verrattuna PGG:hen on perusteltu sillä, että NHTP-ryhmä lisää tanniinin jäykkyyttä verrattuna galloyyli-ryhmiin, mikä vaikuttaa näin ollen myös negatiivisesti niiden proteiiniaffiniteettiin.

Sekowski tutkimusryhmineen (Sekowski et al., 2014) sai muista tutkimusryhmistä poikkeavia tuloksia monomeerisille ellagitanniineille. He mittasivat, että 1-*O*-galloyyli-4,6-*O*-HHDP-glukoosi sitoutui HSA:han paremmin kuin 1-*O*-trigalloyyli-2,4:3,6-*bis-O*-HHDP-glukoosi, vaikka yleensä suuremman molekyyli- ja painon omaavan yhdisteen pitäisi sitoutua paremmin proteiiniin. Samoin voisi olettaa, että sokerin anomeerisen aseman trigalloyyli-ryhmä lisäisi yhdisteen joustavuutta ja näin ollen myös HSA-affiniteettia, mutta tässä tapauksessa näin ei kuitenkaan käynyt. Sekowski tutkimusryhmineen (Sekowski et al., 2014) perustelivat tulokset sillä, että pienempi ellagitanniini pystyi paremmin ympäröimään HSA:n ja siten myös lävistämään sen pintarakenteet, mikä edesauttoi yhdisteen sitoutumista siihen. Sekowski tutkimusryhmineen sai myös toisessa tutkimuksessaan (Sekowski et al., 2018) samansuuntaisia tuloksia, kun he tutkivat valoneoyyli-ryhmän vaikutusta proteiiniaffiniteettiin kolmella yhdisteellä. Myös tässä tutkimuksessa suurimmalle yhdisteelle 1,2-*O*-digalloyyli-4,6-*O*-valoneoyyli-glukoosille mitattiin alhaisin affiniteetti HSA:han, mikä tässäkin tutkimuksessa perusteltiin sillä, että suuri yhdiste ei pysty niin hyvin läpäisemään HSA:n pintarakenteita. Tutkimuksen kaksi muuta yhdistettä olivat toistensa isomeerejä ja näistä yhdisteistä korkeamman proteiiniaffiniteetin sai yhdiste, jonka

valoneoyyliryhmä oli sitoutunut glukoosin 1,2-asemaan 4,6-aseman sijaan. Sekowskin tutkimusryhmineen tekemien tutkimusten (Sekowski et al., 2014; Sekowski et al., 2018) eroavat tulokset muista tutkimusryhmistä saattaa johtua siitä, että he ovat käyttäneet ainoana tutkimusryhmänä HSA:ta malliproteiinina, jonka sitoutumiskohdat ovat erilaiset kuin BSA:lla. He ovat myös ainoita, jotka käyttävät tanniini–proteiini -vuorovaikutuksen tutkimiseen fluoresenssispektroskopiaa, jolloin heidän tuloksia ei voida suoraan verrata muiden tutkimusryhmien tuloksiin, koska he saattavat mitata hieman erilaista vuorovaikutusta tanniinien ja proteiinien välillä kuin muut ryhmät.

Aivan kuten monomeerisille hydrolysoituville tanniineille myös oligomeerisille ellagitanniineille molekyylipaino on tärkeä tekijä proteiineihin sitoutumisen kannalta (Karonen et al., 2015). Oligomeerisia ellagitanniineja on tutkittu monissa eri tutkimuksissa ja erityisesti sanguini H6 sekä rugosiini D esiintyvät monissa tutkimuksissa (Beart et al., 1985; McManus et al., 1985; Ozawa et al., 1987; Bacon ja Rhodes, 2000). Näiden dimeerien erona on se, että sanguini H6:lla monomeeriosina on kasuariktiini, kun taas rugosiini D:llä monomeeriosina on tellimagrandiini II. Tämän perusteella voidaan siis olettaa, että rugosiini D:n pitäisi sitoutua paremmin proteiineihin näistä yhdisteistä, mikäli dimeerit käyttäytyvät proteiiniaffiniteetin kannalta samoin kuin niiden monomeeriosien summa käyttäytyisi. Ozawa tutkimusryhmineen (Ozawa et al., 1987) mittasivat näiden yhdisteiden affiniteetin BSA:ta ja β -glukosidaasia kohtaan ja saivat tulokseksi, että rugosiini D sitoutuu molempiin proteiineihin paremmin (Taulukko 1). Samankaltaisia tuloksia saivat BSA:n kanssa myös muut tutkimusryhmät (Beart et al., 1985; McManus et al., 1985), joten oligomeereille vaikuttaisi pätevän melko samat rakenteelliset säännöt kuin monomeereillekin, sillä tanniinien galloyyli- ja HHDP-ryhmien suhde vaikuttaa tärkeältä tekijältä myös oligomeerien tapauksessa. Toisin kuin sanguini H6:den niin rugosiini D:n sitoutumista hemoglobiiniin on tutkittu myös toisessa tutkimuksessa (Okuda et al., 1985). Se sitoutui hemoglobiiniin yhtä hyvin kuin rugosiini E, vaikka sillä on yksi ylimääräinen galloyyliryhmä sokerin anomeerisessa asemassa verrattuna rugosiini E:hen (Okuda et al., 1982b; Okuda et al., 1985). Tämä tulos viittaisi taas siihen, että anomeerisen aseman galloyyliryhmällä ei ole suurta vaikutusta hemoglobiiniin sitoutumisessa. Sen sijaan rugosiini F antoi pienemmän affiniteetin hemoglobiinimittauksessa kuin rugosiini D tai E, vaikka sen rakenne erosi

rugosiini D:stä vain siinä, että sillä oli HHDP-ryhmä kahden galloyyliryhmän sijaan toisessa monomeeriosassa kiinni.

Taulukko 1. Kuuden hydrolysoituvan tanniinin mitatut proteiiniaffiniteetit kolmella eri menetelmällä. Taulukko on muokattu julkaisusta (Ozawa et al., 1987). GG = galloyyliglukoosi.

Yhdiste	Molekyylipaino (Da)	β -glukosidaasi inhibiitio K_i (10^{-4} M) ^a	BSA $-\Delta G^{\theta, tr}$ (kJ/mol) ^b	Hemoglobiinin saostus (RA) ^c
triGG	636	10,80	0,9	0,20
tetraGG	788	2,50	9,1	0,58
PGG	940	0,85	26,9	1,00
kasuariktiini	936	1,57	–	–
rugosiini D	1874	0,08	58,7	2,40
sanguiini H6	1870	0,40	11,3	–

^a β -glukosidaasin inhibiitio mitattiin samoin kuin Haslam 1974 julkaisussa.

^b Vapaan energian muutos mitattiin samoin kuin McManus työryhmineen 1985 julkaisussa.

^c Assosiaatio hemoglobiiniin ilmoitettu suhteessa PGG:n assosiaatioon hemoglobiinin kanssa.

Hemoglobiinitutkimuksessa mitattiin myös monia muita oligomeerisia ellagitanniineja, kuten esimerkiksi koriariini A:n ja kornusiini A:n affiniteetit. Koriariini A muodostuu samoista monomeeriyksiköistä kuin rugosiini D, mutta niiden monomeeriosien väliset sidokset ovat erilaiset: koriariini A:lla monomeeriosat ovat kiinnittyneet toisiinsa GOG-sidoksella (Hatano et al., 1986), kun taas rugosiini D:llä ne ovat kiinnittyneet toisiinsa DOG-sidoksilla. Koriariini A (0,95) antoi mittauksissa hieman pienemmän proteiiniaffiniteetin kuin rugosiini D (1,02), joten DOG-sidos vaikuttaa näin ollen paremmalta vaihtoehdolta hemoglobiiniin sitoutumiseen kuin GOG-sidos. Tätä väitettä puoltaa myös se, että dimeereistä korkeimman proteiiniaffiniteetin antoi kornusiini A (1,19), jonka monomeeriosat ovat myös kiinnittyneet toisiinsa DOG-sidoksen avulla (Okuda et al., 1984). Erikoista oli kuitenkin, että kornusiini A:n molekyylipaino oli kaikista dimeereistä pienin (1572 Da), mutta sille mitattiin silti oligomeereistä korkein hemoglobiiniaffiniteetti.

Dobreva tutkimusryhmineen (Dobreva et al., 2014) mittasi puolestaan oligomeeristen ellagitanniinien affiniteetteja BSA:han ja he havaitsivat, että gemiini A sitoutui kaikista yhdisteistä parhaiten BSA:han yhdessä PGG:n kanssa. Muita tutkittuja oligomeerejä tässä

tutkimuksessa olivat oenothiini B ja roburiini A, jotka sitoutuivat kuitenkin huomattavasti heikommin BSA:han kuin gemiini A. Oenothiini B:n heikko sitoutuminen BSA:han havaittiin toisessakin tutkimuksessa, jossa oenothiini B antoi kaikista yhdisteistä alhaisimman BSA-affiniteetin (Karonen et al., 2015). Tässä tutkimuksessa oenothiini B:n heikko sitoutuminen BSA:han perusteltiin sen jäykällä makrosyklisellä rakenteella. Roburiini A:n heikko sitoutuminen BSA:han perusteltiin puolestaan sillä, että se muodostuu kahdesta jäykästä monomeeriosasta, jolloin niiden dimeerinkin rakenne on jäykkä (Dobrova et al., 2014).

Shimozu työryhmineen (Shimozu et al., 2017; Shimozu et al., 2018) ovat viime aikoina tutkineet myös oligomeeristen ellagitanniinien affiniteettia BSA:han. He tutkivat kuinka suuria komplekseja isorugosiinit ja koriariinit muodostavat BSA:n kanssa. Molemmassa tutkimuksessa molekyylipainolla oli selkeä vaikutus yhdisteiden sitoutumisessa BSA:han, sillä oligomeerit muodostivat selkeästi suurempia komplekseja kuin monomeerit näissä tutkimuksissa. Isorugosiini oligomeerit muodostivat komplekseja, joissa oli maksimissaan neljä BSA-molekyyliä, kun taas monomeerien muodostamissa kompleksissa oli noin kaksi BSA-molekyyliä keskimäärin. PPG oli tässäkin tutkimuksessa poikkeus, sillä se muodosti komplekseja, joissa oli peräti kolmetoista BSA-molekyyliä yhdessä kompleksissa (Shimozu et al., 2017).

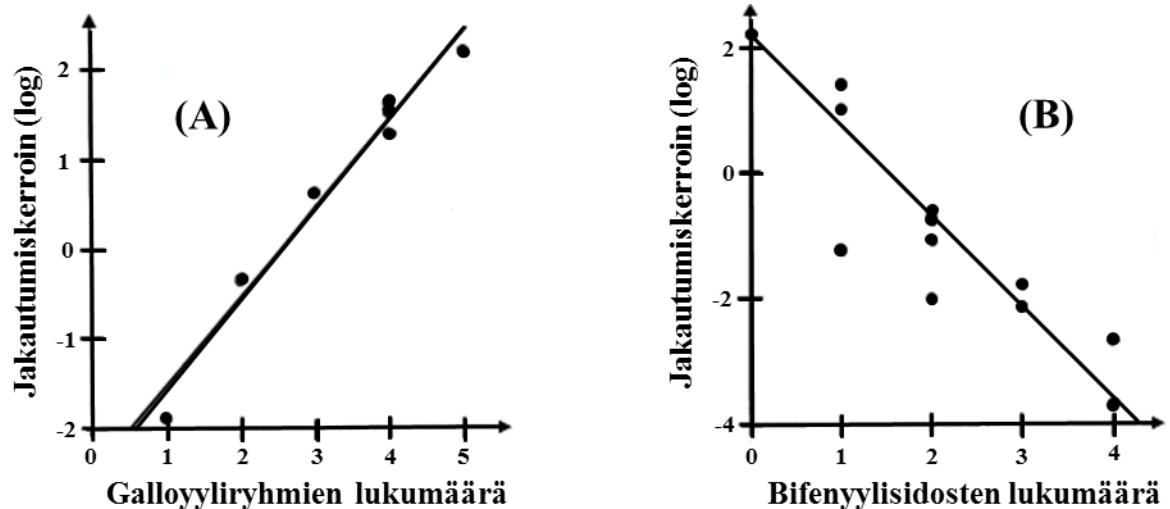
Toisin kuin galloyyyliglukooseilla ja gallotanniineilla, ellagitanniineilla rakenteiden monipuolisuus tekee niiden rakenne–aktiivisuus -tutkimuksesta mielenkiintoisempaa, mutta se samalla myös vaikeuttaa tulkintojen tekemistä siitä, mitkä rakenteelliset tekijät oikeasti vaikuttavat ellagitanniinien proteiiniaffiniteettiin. Hyvin monissa tutkimuksissa molekyylipaino ja yhdisteiden joustavuus ovat mainittu proteiiniaffiniteettiin vaikuttaviksi tekijöiksi menemättä sen syvemmälle rakenne–aktiivisuus -tutkimukseen. Potentiaalia tehdä tarkempaa rakenne–aktiivisuus -vertailua on monissa tutkimuksissa, mutta vain yhdessä tutkimuksessa (Okuda et al., 1985) käytettiin tarpeeksi suurta joukkoa yhdisteitä, jotta vertailua voitiin tehdä kunnolla. Vaikka Okudan työryhmineen (Okuda et al., 1985) tekemässä tutkimuksessa on käytetty monia erilaisia ellagitanniineja, niiden vertailu ei aina siltikään onnistu, sillä yhdisteet eroavat toisistaan enemmän kuin vain yhdellä rakenteellisella tekijällä, jolloin ei voida sanoa tarkasti, mitkä tekijät vaikuttavat nimenomaan

proteiiniaffiniteettiin. Toisaalta eri tutkimusten vertailu keskenään on myös hyvin haastavaa, sillä niissä on käytetty hyvin monia erilaisia menetelmiä.

4.3. Hydrolysoituvien tanniinien vesiliukoisuuden vaikutus proteiiniaffiniteettiin

Hydrolysoituvien tanniinien vesiliukoisuutta on tutkittu lähinnä neste-nesteuutoilla, joissa liuottimina on käytetty vettä ja oktanolia. Kahdessa eri tutkimuksessa on tutkittu useiden hydrolysoituvien tanniinien vesiliukoisuutta kyseisillä liuottimilla (Tanaka et al., 1997; Mueller-Harvey et al., 2007). Tanaka työryhmineen (Tanaka et al., 1997) havaitsi, että galloyyliryhmien määrän lisääntyessä galloyyliglukoosien rakenteessa, niiden rasvaliukoisuus kasvaa ja yhdisteistä korkein rasvaliukoisuus oli PGG:llä. He havaitsivat myös, että galloyyliryhmä anomeerisessa asemassa otti enemmän osaa hydrofobiseen vuorovaikutukseen ja tämän myötä vaikutti enemmän myös yhdisteen vesiliukoisuuteen, kuin muissa asemassa kiinni olevat galloyyliryhmät.

Tanaka työryhmineen (Tanaka et al., 1997) osoitti myös, että bifenyylisidosten lisääntyessä ellagitanniinien rakenteessa, niiden vesiliukoisuus kasvaa (Kuva 8). Tutkimuksessa havaittiin, että etenkin jäykät avoketjuiset ellagitanniinit olivat paljon vesiliukoisempia kuin joustavat galloyyliglukoosit. Mueller-Harvey työryhmineen (Mueller-Harvey et al., 2007) määrittivät kasuariinille kuitenkin paljon suuremman rasvaliukoisuuden kuin muille avoketjuisille ellagitanniineille ja se oli jopa rasvaliukoisempi kuin tellimagrandiini II, joten aivan yksiselitteisiä hydrolysoituvien tanniinien vesiliukoisuus ei ole. Näissä tutkimuksissa saadut tulokset olivat kuitenkin melko suoraan verrannollisia hydrolysoituvien tanniinien proteiiniaffiniteetista saatuihin tuloksiin, sillä galloyyli- ja HHDP-ryhmien suhteella voidaan arvioida melko hyvin sekä yhdisteen vesiliukoisuutta, että proteiiniaffiniteettia ja anomeerisen aseman galloyyliryhmän tärkeys havaittiin myös molemmissa tapauksissa (Tanaka et al., 1997). Oligomeeristen ellagitanniinien kohdalla neste-nesteuutosta saatu tulos ei kuitenkaan korreloinut proteiiniaffiniteettimittauksista saatuihin tuloksiin niin hyvin kuin monomeereilla, sillä sanguiini H6 oli molemmissa tutkimuksissa kaikkein vesiliukoisin yhdiste (Tanaka et al., 1997; Mueller-Harvey et al., 2007) ja sille mitattiin kuitenkin korkeita proteiiniaffiniteetteja (Ozawa et al., 1987; Bacon ja Rhodes, 2000).



Kuva 8. Galloyyliryhmien (A) ja bifenyylisidosten (B) lukumäärän vaikutus hydrolysoituvien tanniinien vesiliukoisuuteen. Kuva muokattu julkaisusta (Tanaka et al., 1997).

Hydrolysoituvien tanniinien vesiliukoisuutta on proteiiniaffiniteettitutkimusten tapaan tutkittu melko paljon, mutta ei kuitenkaan tarpeeksi suurella joukolla hydrolysoituvia tanniineja, jotta tuloksia voisi soveltaa suoraan niiden rakenne-aktiivisuus -tutkimukseen. Tanniinien vesiliukoisuuden yhteys niiden proteiiniaffiniteettiin on mainittu monissa tutkimuksissa, mutta tutkimustulokset, joissa tämä yhteys osoitettaisiin selkeästi, puuttuu kuitenkin kokonaan. Monomeerisillä hydrolysoituvilla tanniineilla on kuitenkin selkeästi havaittavissa, että vesiliukoiset yhdisteet antavat alhaisia proteiiniaffiniteetteja ja vastaavasti rasvaliukoiset yhdisteet korkeita proteiiniaffiniteetteja. Jakautumiskertoimien määrittäminen neste-nesteuutoilla on myös hyvin yksinkertaista ja vesi-oktanoli -jakautumiskerroin antaa vain yhden näkökulman tarkastella yhdisteiden vesiliukoisuutta, joten erilaisten liuotinparien testaus voisi tässä kohtaa antaa uusia näkökulmia hydrolysoituvien tanniinien vesiliukoisuuden ja samalla myös niiden rakenne-aktiivisuus -tutkimuksen tarkasteluun.

4.4. Proteiinien rakenteen vaikutus affiniteettiin

Proteiinien rakenteen vaikutusta niiden vuorovaikuttamiseen hydrolysoituvien tanniinien kanssa ei ole tutkittu niin yksityiskohtaisesti kuin hydrolysoituvien tanniinien rakenteen vaikutusta. Tehdyissä tutkimuksissa on kuitenkin todettu, että proteiinien osalta eniten kompleksien syntyyn vaikuttavat niiden koko ja rakenne. Tanniinit sitoutuvat paremmin suurikokoisiin proteiineihin, sillä tällaisella proteiinilla on enemmän sitoutumispinta-alaa. Tanniini-proteiini -kompleksien muodostumisen kannalta proteiinin kolmiulotteinen rakenne on sen tarkkaa aminohapposekvenssiä tärkeämpi. Proteiinin rakenne pitää olla mahdollisimman avoin ja löyhä, jotta tanniinit sitoutuisivat proteiiniin mahdollisimman tehokkaasti (Haslam et al., 1989). Tällaiset avoimet ja löyhät proteiimirakenteet ovat esimerkiksi kollageenilla ja gelatiinilla. Tanniinit sitoutuvat puolestaan heikommin proteiineihin, joiden rakenne on pallomainen ja tiivis. Tällöin tanniinit pystyvät sitoutumaan vain proteiinin pinnalle, mikä heikentää niiden proteiiniaffiniteettia. Sekä BSA että hemoglobiini ovat pallomaisia proteiineja, mutta ne ovat kuitenkin melko löyhiä rakenteita, mikä helpottaa tanniinien sitoutumista myös muualle kuin vain niiden pintarakenteisiin. PGG:n sitoutumista eri proteiineihin on tutkittu ja esimerkiksi He tutkimusryhmineen (He et al., 2006) saivat selville, että PGG sitoutui BSA:ta paremmin gelatiiniin ja kaseiiniin, kun taas BSA:ta huonommin se sitoutui histoniin, pepsiiniin ja α -amylaasiin. Takechi ja Tanaka (Takechi ja Tanaka, 1987) saivat puolestaan selville, että PGG sitoutui heidän malliproteiineistaan ainoastaan hemoglobiiniin paremmin kuin BSA:han.

NMR:llä on pystytty paikallistamaan tarkemmin, mihin kohtiin tanniinit proteiineissa sitoutuvat. Malliproteiinina on kuitenkin näissä tutkimuksissa aina käytetty lyhyitä peptidiketjuja, sillä niistä sitoutumiskohdan paikallistaminen on helpompaa kuin proteiinista (Richard et al., 2006). Proteiinin primäärirakenteessa tärkeitä tekijöitä tanniinisitoutumisen kannalta ovat mahdollisimman hydrofobinen ja emäspitoinen aminohappokoostumus. Monissa tutkimuksissa on havaittu, että erityisesti proteiinit, jotka sisältävät paljon proliinia sitoutuvat hyvin tanniinien kanssa (Baxter et al., 1997). Tämä johtuu siitä, että aminohappo proliini estää α -kierteiden muodostumisen proteiinissa, jolloin proteiinin rakenne on avoimempi ja tanniinit pystyvät paremmin sitoutumaan siihen. Proliinin rakenteen pyrrolidiinirenkään on havaittu olevan erityisen tärkeä tekijä tanniineihin sitoutumisen kannalta. Pienille tanniineille riittää yksi proliini sitoutumiseen, kun taas suurempi tanniini

vaatii sitoutumiseen enemmän vierekkäisiä proliineja (Baxter et al., 1997). Muita tärkeitä aminohappoja, joiden on havaittu lisäävän tanniinien sitoutumista proteiineihin, ovat emäksiset aminohapot, joita ovat arginiini, histidiini ja lysiini.

5. Hydrolysoituvien tanniinien ja polysakkaridien välinen vuorovaikutus

5.1. Yleistä hydrolysoituvien tanniinien ja polysakkaridien välisistä vuorovaikutuksista

Hydrolysoituvien tanniinien vuorovaikutusta polysakkaridien kanssa ei ole tutkittu niin paljon kuin niiden vuorovaikutusta proteiinien kanssa. Muutamia tutkimuksia on kuitenkin tehty, joissa on käytetty useita erilaisia hydrolysoituvia tanniineja tanniini-polysakkaridi -vuorovaikutusten tutkimiseen. Hydrolysoituvat tanniinit sitoutuvat heikosti avoimiin ja ketjumaisiin polysakkarideihin, kun taas haaroittuneisiin polysakkarideihin ne sitoutuvat paremmin (Haslam et al., 1989). Takechi ja Tanaka (Takechi ja Tanaka, 1987) ovat osoittaneet, että PGG sitoutuu paremmin tärkkelykseen ja glykogeeniin kuin selluloosaan. Sen lisäksi polysakkaridien huokoinen kolmiulotteinen rakenne lisää tanniineille mahdollisia sitoutumiskohtia. Hydrolysoituvien tanniinien kohdalla samat tekijät vaikuttavat niiden sitoutumiseen polysakkarideihin kuin proteiineihin, joten molekyyliaino ja rakenteen joustavuus ovat tärkeitä tekijöitä myös hydrolysoituvien tanniinien ja polysakkaridien välisten vuorovaikutusten kannalta (Haslam et al., 1989).

Heikoista vuorovaikutuksista hydrofobiset voimat ja vetysidokset ovat mainittu myös polysakkaridien kohdalla tärkeimmiksi vuorovaikutusta ylläpitäviksi voimiksi. Näistä hydrofobiset on havaittu tärkeämmäksi heikoksi vuorovaikutukseksi kuin vetysidokset (Tang et al., 2003). Hydrolysoituvien tanniinien ja polysakkaridien välisten vuorovaikutusten tutkimisessa on ongelmana se, että ei ole löydetty sopivia vesiliukoisia mallipolysakkarideja, joilla voitaisiin tutkia näitä vuorovaikutuksia. Hydrolysoituvien tanniinien vuorovaikutusta polysakkaridien kanssa onkin tutkittu lähinnä kromatografisesti kiinteässä muodossa olevien polysakkaridien kanssa (Haslam et al., 1989). Tällaisia polysakkarideja ovat esimerkiksi paljon käytetyt Sephadex-geelit, jotka ovat mikrobeilla ristiinsidottuja haaroittunutta dekstraanipolymeeriketjua (McManus et al., 1985). Tämän lisäksi vuorovaikutuksia on

tutkittu mm. paperi- ja TLC-kromatografian avulla (Tang et al., 2003). Tuloksien tarkastelussa pitää huomioida se yksityiskohta, että näissä kromatografisissa menetelmissä myös käytetty eluentti vaikuttaa lopputuloksiin.

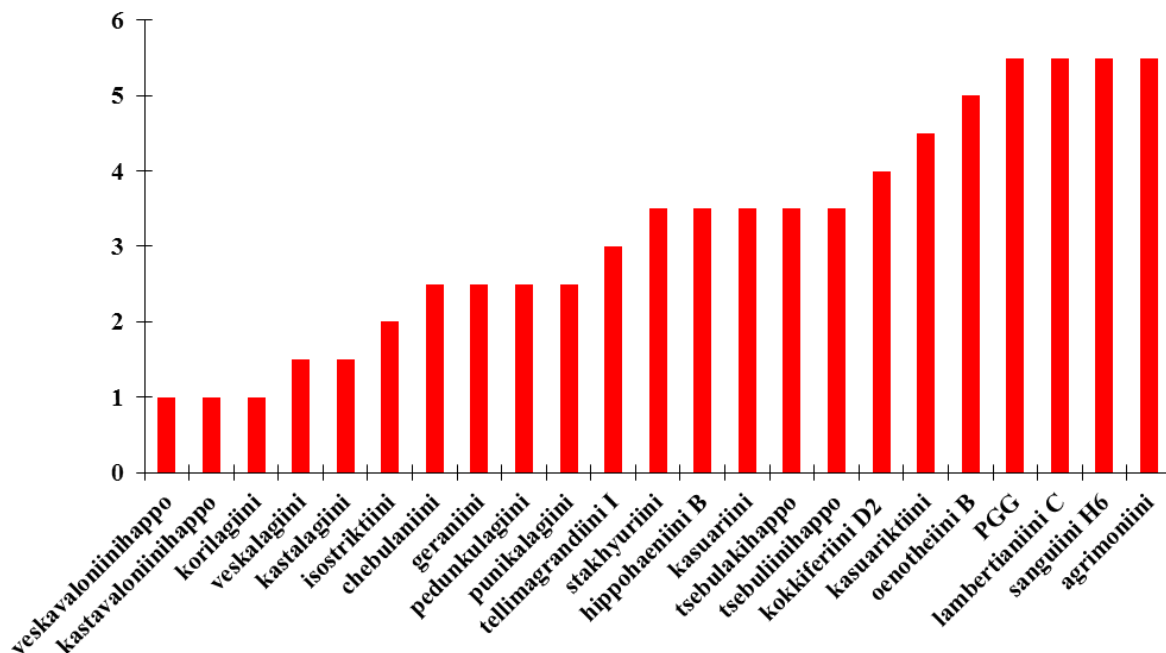
5.2. Hydrolysoituvien tanniinien rakenteen vaikutus Sephadex-kromatografiaan

McManus (McManus et al., 1985) ja Moilanen (Moilanen et al., 2013) tutkimusryhmineen ovat tutkineet hydrolysoituvien tanniinien affiniteettia Sephadex-geeleihin monipuolisimmin. McManus tutkimusryhmineen käyttivät kahta erilaista Sephadex-geeliä, joista G-25 oli hydrofobisempi ja LH-20 hydrofiilisempi geeli. Sephadex G-25 -geelille he käyttivät eluenttina pH 2,22 Cl⁻-puskuria, kun taas LH-20 geelille he käyttivät eluenttina MeOH/H₂O 19/1 (v/v) -liuosta. Tutkimuksessa mitattiin yhdisteiden pidättyminen geeliin käyttäen vain yhtä eluenttia geeliä kohti, kun taas Moilasen tutkimusryhmineen tekemässä tutkimuksessa käytettiin LH-20 -geeliä, mutta fraktiointiin käytettiin eripitoisia metanolin sekä asetonin liuoksia ja lopputuloksissa ilmoitettiin, millä eluentilla/eluenteilla yhdiste eluoitui geelistä ulos.

G-25 -geelin osalta havaittiin ensinnäkin, että galloyyylglukoosisarjan yhdisteet sitoutuivat sitä paremmin geeliin mitä enemmän niillä oli galloyyliryhmiä rakenteissaan (McManus et al., 1985). Toinen havainto oli se, että PGG, sanguiniini H6 ja rugosiini D eivät eluoituneet G-25 -geelin läpi käytetyllä eluentilla, mistä pystyttiin päättelemään, että molekyylipainolla ja rakenteen joustavuudella on merkitystä hydrolysoituvien tanniinien vuorovaikuttamisessa Sephadex-geelien kanssa. Avoketjuinen ellagitanniini kastalagiini oli ainoa yhdiste, jonka osana rakennetta oli NHTP-ryhmä ja se eluoitui ensimmäisenä ulos geelistä. McManus tutkimusryhmineen (McManus et al., 1985) teki myös mielenkiintoisen havainnon siitä, että yhdisteet joiden glukoosi oli ⁴C₁-konformaatioissa, pidättyi geeliin huomattavasti pidempään kuin yhdisteet, joiden glukoosi oli ¹C₄-konformaatioissa. Tämän havainnon he perustelivat vertailemalla geraniinin ja davidiinidin pidättymisiä tellimagrandiini II ja kasuariktiinin antamiin pidättymisiin. Vertaamalla puolestaan davidiinidin ja dihydrogeraniinin pidättymisiä tellimagrandiini II:n ja kasuariktiinin pidättymisiin, he havaitsivat myös, että HHDP-ryhmän aukeaminen kahdeksi galloyyliryhmäksi vaikutti huomattavasti enemmän ⁴C₁-glukoosin omaavien yhdisteiden pidättymiseen geelissä.

Sephadex LH-20 -geelillä yhdisteiden pidättymisjärjestys geeliin ei eronnut G-25 geeliin verrattuna, mutta yhdisteet eluoutuivat yleisesti LH-20 -geelistä nopeammin ulos kuin G-25 geelistä, mikä saattoi johtua geelin hydrofiilisuudesta tai käytetystä eluentista (McManus et al., 1985). LH-20 -geelillä myös PGG ja dimeerit saatiin eluoitumaan geelin läpi käytetyllä eluentilla. Hydrolysoituvien tanniinien molekyylipainolla vaikutti olevan tämänkin geelin kohdalla vaikutusta lopputulokseen, sillä sanguiini H6 ja rugosiini D mitattiin selvästi suurempi pidättyminen geeliin kuin PGG:lle (McManus et al., 1985). Dimeereistä rugosiini D pidättyi geeliin sanguiini H6:ta huomattavasti pidempään, mikä saattoi johtua sen suuremmasta galloyyliryhmien määrästä rakenteessa.

Toisessa tutkimuksessa (Moilanen et al., 2013) PGG eluotui myöhemmin kuin osa oligomeerisista ellagitaniineista (Kuva 9), joten ainoastaan hydrolysoituvien tanniinien molekyylipainolla ei pystytä ennustamaan niiden pidättymistä geeliin, vaan myös yhdisteiden joustavuudella ja fenolisilla ryhmillä on vaikutusta niiden pidättymiseen (Moilanen et al., 2013). Sephadex-kromatografialla on tutkittu hydrolysoituvien tanniinien vuorovaikuttamisena dekstraanien kanssa (McManus et al., 1985), mutta sillä voidaan myös ennustaa yhdisteiden proteiiniaffiniteettia samoin kuin vesiliukoisuudella (Moilanen et al., 2013). Vesiliukoisuuteen nähden Sephadex-kromatografialla on se etu, että myös oligomeerien proteiiniaffiniteetit voidaan ennustaa sen avulla melko hyvin, sillä oligomeerit eluoutuvat PGG:n tapaan hyvin myöhään (Kuva 9), jolla voidaan näin ollen ennustaa niiden korkea proteiiniaffiniteetti. Tämän takia Sephadex-kromatografia vaikuttaa myös luotettavammalta menetelmältä kuin vesi-oktanoli -jakautumiskerroin, arvioida kaikkien hydrolysoituvien tanniinien proteiiniaffiniteettia.



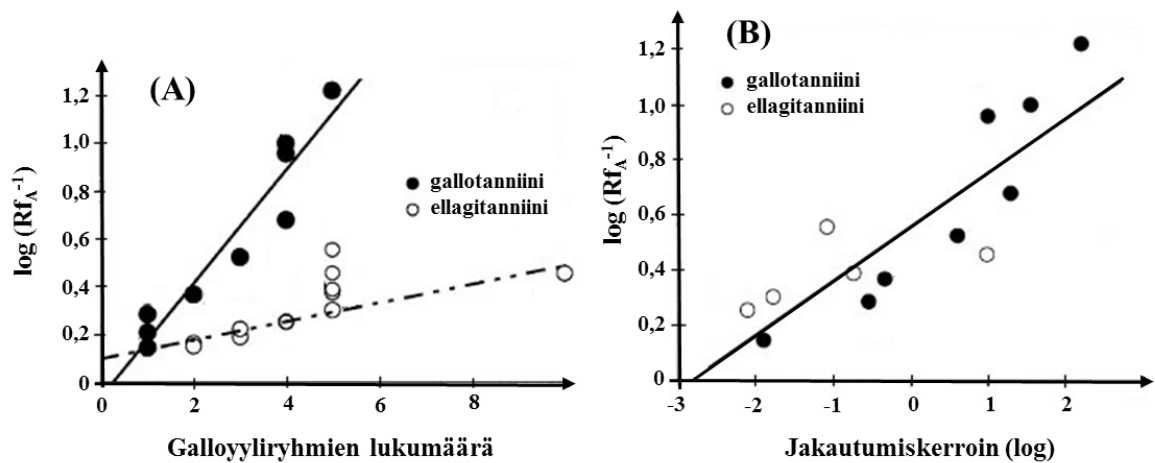
Kuva 9. Hydrolysoituvien tanniinien Sephadex LH-20 -pidättymisiä. 0 = vesi, 1 = 30 % MeOH, 2 = 50 % MeOH, 3 = 10 % Me₂CO, 4 = 30 % Me₂CO, 5 = 50 % Me₂CO ja 6 = 75 % Me₂CO (v/v). Kuva on muokattu julkaisusta (Moilanen et al., 2013).

5.3. Hydrolysoituvien tanniinien rakenteen vaikutus vuorovaikutukseen selluloosan kanssa

Hydrolysoituvien tanniinien vuorovaikutusta selluloosan kanssa on tutkittu kahdessa tutkimuksessa (McManus et al., 1985; Tang et al., 2003). Molemmissa tutkimuksissa käytettiin myös samoja eluenteja, mutta tutkimusten tulokset erosivat silti toisistaan jonkin verran. Käytetyt eluentit antoivat samansuuntaisia tuloksia eri yhdisteille, mutta näillä eluenteilla saadut tulokset olivat kääntäen verrannollisia toisiinsa nähden. Tutkimuksissa käytettiin eluenteina hydrofiilisempää 6 % etikkahappoa (v/v) ja hydrofobisempää isobutanoli/etikkahappo/vettä (14/1/5) (v/v/v).

Galloyyyliglukooseilla galloyyliryhmien määrän lisääntyminen rakenteessa vaikutti molemmassa tutkimuksessa positiivisesti niiden selluloosa-affiniteettiin (McManus et al., 1985; Tang et al., 2003). Galloyyyliglukooseilla oli yllättävän hyvä selluloosa-affiniteetti verrattuna ellagitanniineihin, sillä trigalloyyyliglukoosikin antoi hyvin korkean affiniteetin verrattuna esimerkiksi tellimagrandiini I:den ja kasuariktiinin affiniteetteihin. Tästä voitiin

päätellä, että galloyyliryhmät ovat tärkeämpiä selluloosaan sitoutumisessa kuin HHDP-ryhmät (Kuva 10). Toisen tutkimuksen kolmesta tetragalloyyliglukoosista puolestaan selvästi huonoimman affiniteetin antoi yhdiste, jolla ei ollut glukoosin anomeerisessa asemassa galloyyliryhmää (Tang et al., 2003). Tästä voitiin päätellä, että anomeerisen aseman galloyyliryhmän puuttuminen heikentää tanniinien sitoutumista selluloosaan. Kyseisessä tutkimuksessa testattiin myös yhdisteitä, joiden keskuspolyolit eivät olleet glukooseja. Näitä yhdisteitä olivat digalloyylietyleeniglykoli, trigalloyyliglyseroli, tetragalloyylierytritoli, pentagalloyyliadonitoli ja heksagalloyylidusitoli. Niiden selluloosa-affiniteetti oli selkeästi korkeampi kuin niitä vastaavilla galloyyliglukooseilla, mikä saattoi johtua niiden avoketjuisesta rakenteesta. (Tang et al., 2003)



Kuva 10. Yhdisteiden galloyyliryhmien lukumäärän (A) ja oktanoli-
vesi -jakautumiskertoimen (B) vaikutus niiden selluloosa-affiniteettiin. Kuva on muokattu
julkaisusta (Tang et al., 2003).

Monomeerisista ellagitanniineista ⁴C₁-glukoosin omaavilla yhdisteillä oli parempi selluloosa-affiniteetti, kun eluentina oli 6 % etikkahappo (v/v), kun taas ¹C₄-glukoosin omaavilla yhdisteillä oli isobutanoli/etikkahappo/veden (14/1/5) (v/v/v) kanssa parempi affiniteetti (McManus et al., 1985; Tang et al., 2003). Tämä tulos oli havaittavissa esimerkiksi vertaamalla kasuriktiinin affiniteettia sen isomeerin 1-*O*-galloyyli-2,4:3,6-*O*-HHDP-glukoosin. Sen lisäksi avoketjuisilla ellagitanniineilla anomeerisen aseman hydroksyyliiryhmän α -konfiguraatio antoi paremman affiniteetin kuin β -konfiguraatio (Tang et al., 2003), mikä oli havaittavissa siitä, että kastalagiini ja kastaliini antoivat paremmat

affiniteetit kuin veskalagiini ja veskaliini. Tutkimusten ainoat dimeeriset ellagitanniinit olivat roburiini A, sanguiini H6 ja rugosiini D, jotka saivat melko heikkoja affiniteetteja verrattuna monomeereihin. Tästä syystä hydrolysoituvien tanniinien molekyylipainolla ei vaikuttaisi olevan niin paljon merkitystä selluloosaan sitoutumisessa kuin esimerkiksi dekstraaneihin tai proteiineihin sitoutumisessa. Hydrolysoituvien tanniinien selluloosa-affiniteetin tulokset muistuttavatkin melko paljon niiden vesiliukoisuustuloksia, mikä on nähtävissä myös Kuvasta 10. Selluloosa-affiniteetilla voidaan siis melko hyvin arvioida monomeeristen hydrolysoituvien tanniinien proteiiniaffiniteetteja, mutta oligomeeristen ellagitanniinien proteiiniaffiniteettia sen avulla ei kannata yrittää arvioida.

KOKEELLINEN OSA

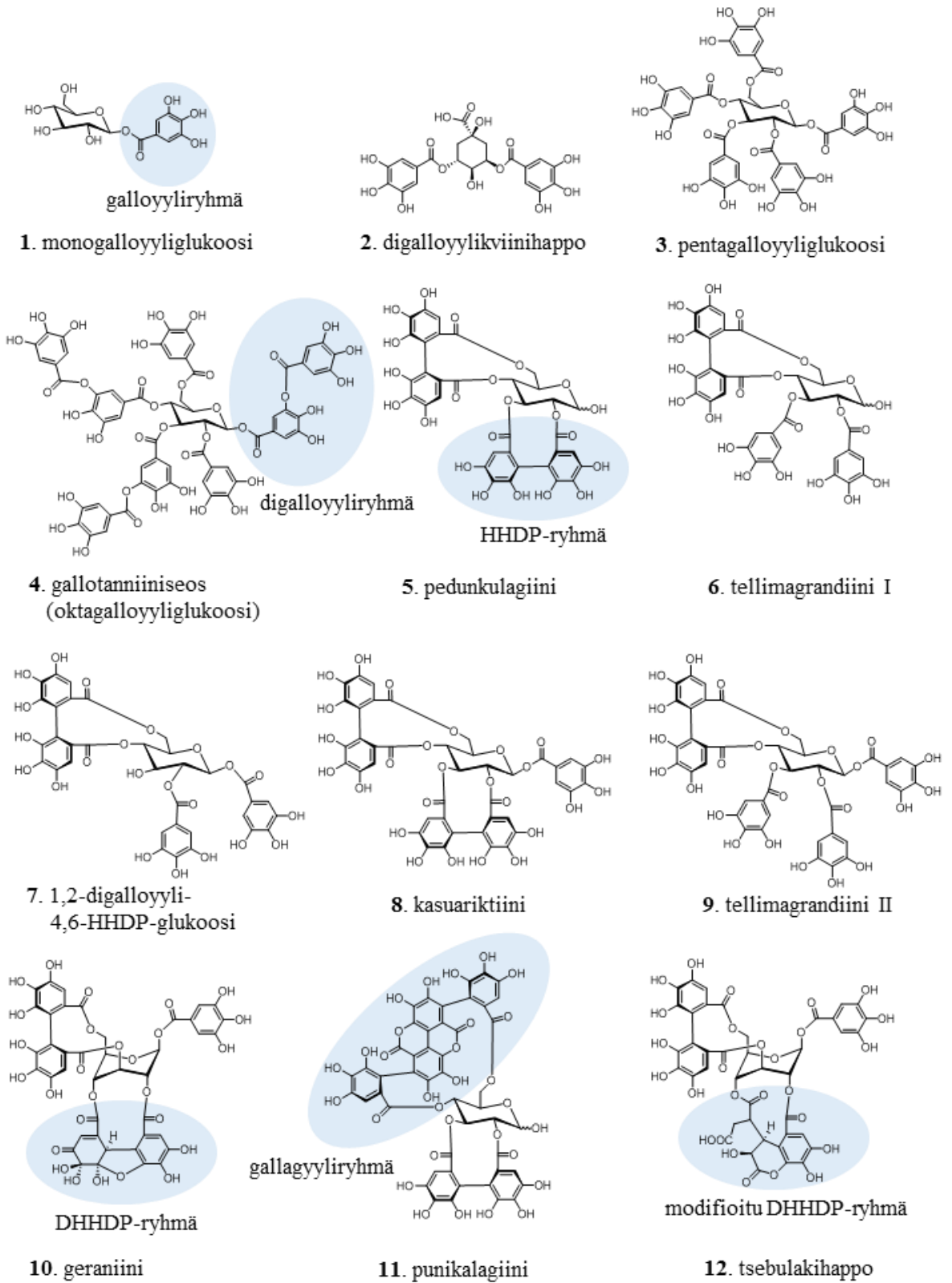
6. Materiaalit ja menetelmät

6.1. Reagenssit

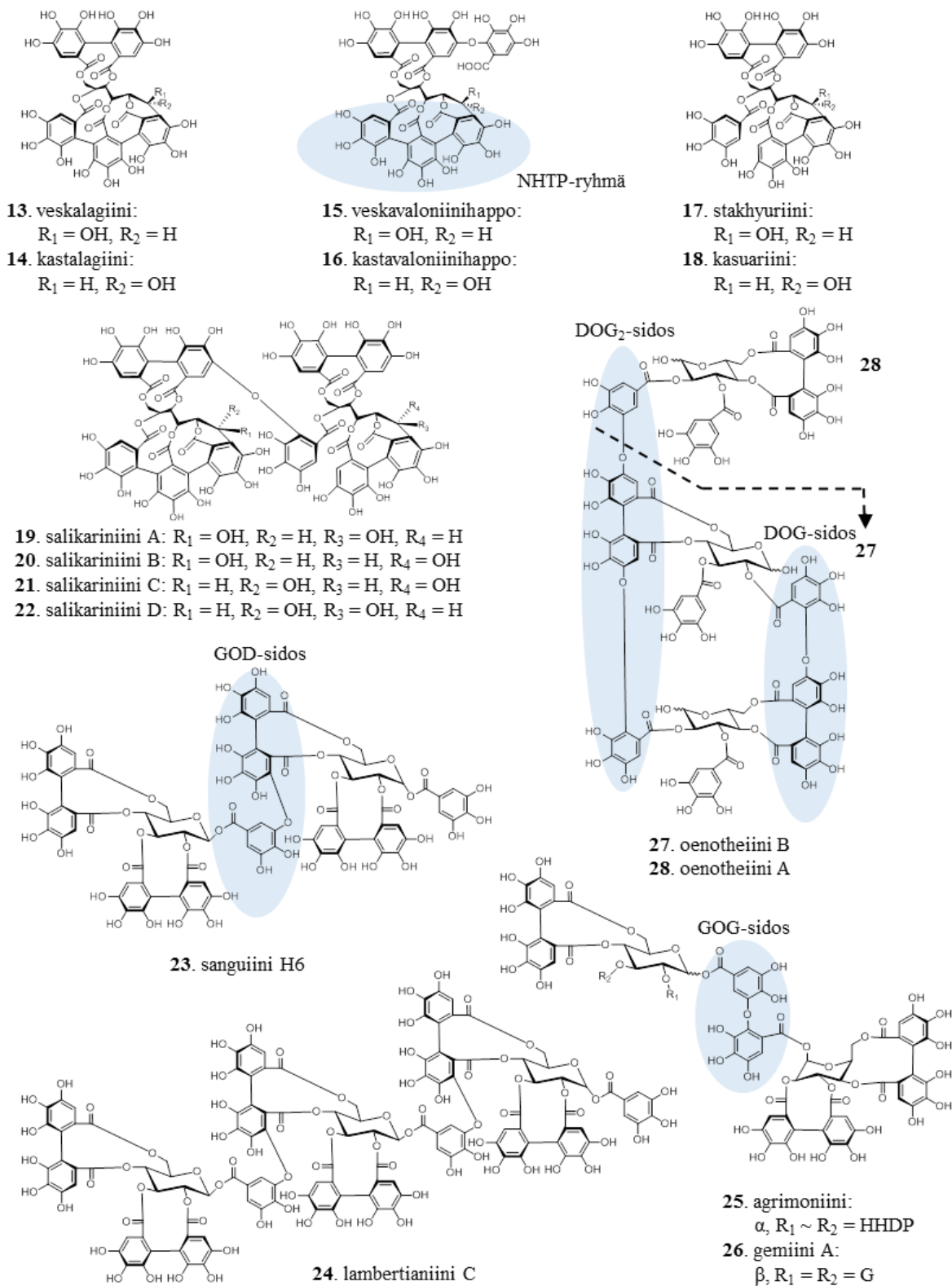
Reagensseista sitruunahappo ($\geq 99,5$ %), natriumdivetyfosfaattimonohydraatti ($\geq 99,0$ %), natriumvetyfosfaattiheptahydraatti ($\geq 99,0$ %) ja etikkahappo ($\geq 99,8$ %) olivat Merck KGaA:n valmistamia. Sigma-Aldrichin valmistamia reagensseja olivat askorbiinihappo ($\geq 99,0$ %), natriumhydroksidi (≥ 97 %), HPLC-laatuinen etyyliasettaatti ($\geq 99,7$ %) ja LC-MS-laatuinen muurahaishappo (100 %). Analyyttinen asetoni ($\geq 99,8$ %), analyttinen metanoli ($\geq 99,8$ %), HPLC-laatuinen metyyli-*tert*-butyylieetteri (*methyl tert-butyl ether*, MTBE) ($\geq 99,5$ %) ja LC-MS-laatuinen asetonitriili ($\geq 99,9$ %) olivat VWR internationalen valmistamia liuottimia. Lisäksi analyttinen 1-butanoli ($\geq 99,0$ %) oli Fisher chemicalsin valmistama ja etanoli ($\geq 99,5$ %) oli Altia Oyj:n valmistama. Pylväskromatografiassa käytetty Sephadex LH-20 -geeli oli Amersham Pharmacia Biotek AB:n valmistama ja Toyopearl HW-40F ja HW-55F -geelit olivat TOSOH:hin valmistamia. Bioaktiivisuusmittauksissa käytetty BSA (valmistettu agarosigeelielektroforeesilla, ≥ 96 %) ja PEG 6000 olivat Sigma-Aldrichin valmistamia. Vesi puhdistettiin Millipore Synergy -laitteistolla, joka oli Merck KGaA:n valmistama.

6.2. Puhdasaineet

Puhdasaineet olivat eri kasvilajeista puhdistettuja hydrolysoituvia tanniineja, joiden nimet, numerointi ja rakennekaavat ovat esitetty Kuvissa 11 ja 12. Yhdisteiden molekyyli­massat, puhtausprosentit ja kasvilajit, joista tanniinit puhdistettiin, ovat puolestaan esitetty Taulukossa 2. Työssä tutkittiin yhteensä 28 hydrolysoituvaa tanniinia, joista 18 oli monomeerejä, kahdeksan dimeerejä ja kaksi trimeerejä. Yhdisteistä saatiin työn aikana tarkempia tietoja LC-MS -analyyseistä (Liite 1), joita käytettiin apuna mm. yhdisteiden tunnistamisessa.



Kuva 11. Monomeeristen hydrolysoituvien tanniinien nimet, numerointi ja rakennekaavat.



Kuva 12. Avoketjuisten ellagitanniinien ja oligomeerien nimet, numerointi ja rakennekaavat.

Taulukko 2. Työssä käytettyjen yhdisteiden molekyyli­massat, puhtausprosentit ja kasvilajit, joista yhdisteet puhdistettiin.

Yhdiste	Molekyyli­ massa (Da)	Puhtauspro­ sentti (%) ^a	Kasvilaji
monogalloyy­liglukoosi (1)	332	95,2	Hieskoivu
digalloyylikviinihappo (2) ^b	496	87,9	-
pentagalloyy­liglukoosi (3) ^c	940	97,4	-
gallotanniiniseos (4) ^d	1396	88,0	-
pedunkulagiini (5)	784	91,0	Ketohanhikki
tellimagrandiini I (6)	786	87,0	Mesiangervo
1,2-digalloyy­li-4,6-HHDP- glukoosi (7)	786	97,7	Metsäkurjenpolvi
kasuariktiini (8)	936	95,0	Tyrni
tellimagrandiini II (9)	938	96,4	Mesiangervo
geraniini (10)	952	98,6	Metsäkurjenpolvi
punikalagiini (11)	1084	97,6	Rohtoketapani
tsebulakihappo (12)	954	93,8	Rohtoketapani
veskalagiini (13)	934	95,5	Tammerterho
kastalagiini (14)	934	96,1	Tammerterho
veskavaloniinihappo (15)	1102	95,8	Tammerterho
kastavaloniinihappo (16)	1102	93,9	Tammerterho
stakhuyriini (17)	936	87,2	Tyrni
kasuariini (18)	936	80,1	Tyrni
salikariiniini A (19)	1868	94,4	Rantakukka
salikariiniini B (20)	1868	95,1	Rantakukka
salikariiniini C (21)	1868	92,5	Rantakukka
salikariiniini D (22)	1868	74,8	Rantakukka
sanguiini H6 (23)	1870	92,0	Vadelma
lambertianiini C (24)	2804	96,9	Vadelma
agrimoniini (25)	1870	99,0	Ketohanhikki
gemiini A (26)	1872	97,3	Kyläkellukka
oenotheiini B (27)	1568	95,9	Maitohorsma
oenotheiini A (28)	2352	86,0	Maitohorsma

^a Yhdisteiden puhtausprosentit ovat määritetty TargetLynx -ohjelmalla niiden UV-kromatogrammeista 280 nm aallonpituudella.

^b Puhdistettiin J.T. Bakerin parkkihaposta.

^c Valmistettiin metanolyysillä J.T. Bakerin parkkihaposta ja puhdistettiin edelleen Sephadex LH-20 -geelillä.

^d Puhdistettiin J.T. Bakerin parkkihaposta. Gallotanniiniseokseen kuuluivat kaikki yhdisteet, jotka eluoituivat käänteisfaasikromatografiassa pentagalloyy­liglukoosin jälkeen ja sen puhtausprosentti on määritetty tämän oletuksen perusteella.

6.3. Nestekromatografia ja massaspektrometria

Kaikki Sephadex LH-20 -kromatografiasta ja neste-nesteuutoista valmistetut näytteet analysoitiin ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografilla (UHPLC, engl. ultrahigh performance liquid chromatography), joka oli liitetty Xevo TQ -kolmoiskvadrupolimassaspektrometriin (Waters Corp., Milford, MA). Acquity UHPLC -laitteisto (Waters Corp., Milford, MA) koostui näytteensyöttäjästä, binäärisestä pumpusta, kolonnista ja diodirividetektorista (DAD, engl. diode array detector). Kolonnina käytettiin 100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm, Acquity UHPLC BEH Phenyl -kolonnia (Waters Corp., Wexford, Irlanti). Näytteet analysoitiin 9,5 minuutin pituisella ohjelmalla, josta ultravioletti (UV, engl. ultraviolet) ja massaspektrometri (MS, engl. mass spectrometry) -data kerättiin 0–6 minuutin väliltä. Eluenteina käytettiin asetonitriiliä (A) ja 0,1 % muurahaishapon vesiliuosta (v/v) (B). Eluenttien suhteet vaihtelivat toisiinsa nähden seuraavasti: 0,0–0,5 min, 0,1 % A:ta B:ssä (isokraattinen); 0,5–5,0 min, 0,1–30,0 % A:ta B:ssä (lineaarinen gradientti); 5,0–6,0 min, 30,0–35,0 % A:ta B:ssä (lineaarinen gradientti) 6,0–9,5 min, kolonnin pesu ja stabilointi. Eluenttien virtausnopeudet olivat 0,5 ml/min. Massaspektrometrillä käytettiin negatiivista sähkösumutus-ionisaatiota ja siihen asetettiin seuraavat arvot: kapillaarijännite 2,4 kV, desolvaatiolämpötila 650 °C ja ionilähteen lämpötila 150 °C. Desolvaatio- ja kartiokaasuna käytettiin typpeä, jonka virtausnopeudet olivat 1000 ja 100 l/h.

6.4. Sephadex LH-20 -kromatografia

Sephadex LH-20 -geeliä valmistettiin punnitsemalla 30 g Sephadex LH-20 -jauhetta ja lisäämällä siihen 130 ml ultrapuhdasta vettä. Geeli sekoitettiin tasaiseksi ja se jätettiin turpoamaan vuorokaudeksi. Valmis geeli dekantoiitiin pylvääseen, jonka pituus oli 20 cm, säde 0,8 cm ja tilavuus 40 ml. Pylväs liitettiin Merckin Hitachi L-6200A pumppuun, jolla pylväs stabiloitiin pumppaamalla ultrapuhdasta vettä 5 ml/min nopeudella tunnin ajan. Pylväässä oleva geeli pakkaantui niin, että geelin tilavuus oli noin puolet pylvään tilavuudesta.

Sephadex LH-20 -geeliä testattiin maitohorsmauutteella, johon lisättiin gallushappoa ja pentagalloyyliglukoosia (PGG, engl. pentagalloylglucose). Näyte injektoitiin pylvääseen pumpun injektorin avulla ja pylvään läpi eluoituneet fraktiot kerättiin käsin lasipulloihin. Yhdellä fraktiointikerralla kerättiin kuusi fraktiota, joissa eluenteina käytettiin ultrapuhdasta

vettä, 3/7 ja 1/1 metanoli/vesiliuoksia (v/v) sekä 1/4, 1/1 ja 4/1 asetoni/vesiliuoksia (v/v). Jokaisesta fraktiosta valmistettiin näytteet UHPLC-DAD-MS -laitteistolle. Yrityser ehdys -periaatteella kehitettiin kahdeksan testifraktioinnin jälkeen protokolla hydrolysoituvien tanniinien fraktioimiseen pienellä Sephadex LH-20 -pylväällä (Taulukko 3). UHPLC-datasta määritettiin yhdisteiden määrät eri fraktioissa, integroimalla UV-kromatogrammista yhdisteiden pitoisuutta vastaavat pinta-alat aallonpituudella 280 nm. Integroiminen tehtiin TargetLynx -ohjelmalla.

Taulukko 3. Fraktiointiprotokolla hydrolysoituville tanniineille Sephadex LH-20 -pylväällä.

Fraktion numero	Eluentti	Kerätty tilavuus (ml)	Aika (min) ^a
0	vesi	100	20
1	metanoli/vesi 3/7 (v/v)	100	20
2	metanoli/vesi 1/1 (v/v)	100	20
3	asetoni/vesi 1/4 (v/v)	50	10
4	asetoni/vesi 1/1 (v/v)	50	10
5	asetoni/vesi 4/1 (v/v) ^b	50	10

^a Edellistä fraktiota kerättiin kolme minuuttia eluutin vaihdon jälkeen.

^b Viimeisen kerätyn fraktion jälkeen pylvästä pestiin 50 ml 4/1 asetoni/vedellä (v/v) ja stabiloitiin ultrapuhtaalla vedellä.

Sephadex LH-20 -pidättymistä kuvattiin lukuarvolla 0–5, missä luku kertoo sen fraktion numeron, jossa yhdiste eluoitui ulos pylvästä (Taulukko 3). Esimerkiksi yhdiste joka eluoitui pylvästä ulos täysin vedellä sai pidättymiseksi lukuarvon nolla, kun taas yhdiste joka eluoitui täysin metanoli/vedellä 3/7 (v/v) sai lukuarvon yksi ja niin edelleen. Sephadex LH-20 -pidättymisen ei tarvinnut kuitenkaan olla kokonaisluku, vaan mikäli yhdiste eluoitui kahdessa tai useammassa eri fraktiossa, määritettiin TargetLynx -ohjelmalla yhdisteiden antamien UV-kromatogrammien pinta-alojen suhteesta lukuarvo kuvaamaan sen eluoitumista ulos pylvästä. Esimerkiksi yhdiste joka eluoitui puoliksi asetoni/vedellä 1/4 ja 1/1 (v/v) sai pidättymiseksi lukuarvon 3,5.

Valmiilla menetelmällä fraktioitiin kaikki 28 puhdasainetta. Puhdasaineet fraktioitiin kahdessa ryhmässä, jotka määritettiin yhdisteiden retentioaikojen perusteella. Jokaisen puhdasaineen 1,0 mM liuksesta otettiin 100 µl näyte, joka sekoitettiin muiden samaan yhdisteseokseen valittujen yhdisteiden kanssa keskenään. Yhdisteseokset injektioitiin pylväaseen erikseen ja fraktiot kerättiin Taulukon 2 protokollalla. Jokaisesta fraktiosta

otettiin 5 ml näyte, josta haihdutettiin orgaaninen faasi pois eppendorf-konsentraattorilla, pakastettiin ja kylmäkuivattiin. Kylmäkuivattuihin näytteisiin lisättiin 500 µl ultrapuhdasta vettä, suodatettiin 0,20 µm huokoskoon PTFE-suodattimella ja analysoitiin UHPLC-DAD-MS -laitteistolla.

Puhdasaineiden lisäksi myös 10 eri kasvilajin kasviuutteet fraktioitiin Sephadex LH-20 -pylväällä. Kasvilajeja olivat tammenterhot, maitohorsman kukat, mesiangervon, ketohanhikin, rohdoketapanin ja vadelman lehdet sekä rantakukan ja metsäkurjenpolven lehdet ja kukat. Kasviuutteita punnittiin 100 mg, lisättiin 2 ml ultrapuhdasta vettä ja ravistettiin. Kasviuutteet injektioitiin pylvääseen yksitellen ja fraktiot kerättiin Taulukon 2 protokollalla. Jokaisesta fraktiosta otettiin 1 ml näyte, joka haihdutettiin, pakastettiin ja kylmäkuivattiin, kuten edellä kuvattiin. Näytteisiin lisättiin 1 ml ultrapuhdasta vettä, ne suodatettiin ja analysoitiin samoin, kuten yhdisteseokset.

Sephadex LH-20 -geelin lisäksi testattiin Toyopearl HW-40F ja HW-55F -geelejä. Toyopearl-geelit valmistettiin lisäämällä 60 ml:aan geelejä 180 ml ultrapuhdasta vettä ja sekoittamalla. Geelien annettiin seisoa tunnin ajan, minkä jälkeen niistä dekantoiitiin ylimääräinen vesi pois. Veden lisääminen, sekoittaminen ja dekantointi toistettiin vielä kaksi kertaa. Geelit siirrettiin mittalaseihin, missä niiden annettiin asettua kolme tuntia. Ylimääräinen vesi kaadettiin pois niin, että geelien tilavuudet mittalaseissa oli puolet nestefaasin kokonaistilavuuksista. Valmiit geelit pakattiin pylvääseen samoin kuin Sephadex LH-20 -geeli. Molemmat Toyopearl-geelit testattiin samalla protokollalla ja testinäytteillä kuin Sephadex LH-20 -geeli.

6.5. Neste-nesteuutot

Neste-nesteuutot tehtiin kahdella liuotinparilla 28 puhdasaineelle ja 10 kasviuutteelle. Molemmissa liuotinpareissa vesi oli toisena faasina. Orgaanisena faasina oli etyyliasettaatti/1-butanoli 1/1 (v/v) tai MTBE/1-butanoli 1/1 (v/v). Orgaanisen faasin liuotinparit valmistettiin pipetoimalla 50 ml 1-butanolia 100 ml:n mittapulloon, täyttämällä se merkkiin etyyliasettaatilla tai MTBE:llä ja ravistamalla.

Neste-nesteuutot tehtiin 2 ml:n eppendorf-putkissa. Puhdasaineet jaettiin seitsemään eri ryhmään niiden retentioaikojen perusteella. Jokaista puhdasainetta otettiin 100 µl niiden 1,0 mM liuoksista ja sekoitettiin ne omassa yhdisteseoksessa keskenään. Seokset

pakastettiin, kylmäkuivattiin ja niihin lisättiin 1 ml ultrapuhdasta vettä. Yhdisteseokset jaettiin vielä kuuteen uuteen eppendorf-putkeen pipetoimalla niihin 100 µl seoksia, minkä jälkeen ne pakastettiin ja kylmäkuivattiin jälleen. PGG:stä ja oenothiini B:stä valmistettiin vielä erikseen näytteet, joissa ei ollut muita yhdisteitä sekoitettuna mukaan.

Neste-nesteuutot tehtiin kolmella toistolla. Kaikkien seoksien sekä erikseen PGG:n ja oenothiini B:n kuuteen eppendorf-putkeen pipetoitiin 1 ml ultrapuhdasta vettä. Kolmeen ensimmäiseen putkeen pipetoitiin 1 ml etyyliasettaatti/1-butanoli 1/1 (v/v) -liuosta ja kolmeen seuraavaan putkeen pipetoitiin 1 ml MTBE/1-butanoli 1/1 (v/v) -liuosta. Kaikki eppendorf-putket laitettiin ravistumaan tunnin ajaksi, minkä jälkeen faasien annettiin erottua ja stabiloitua 30 minuuttia. Jokaisesta putkesta siirrettiin 500 µl vesifaasia ja 500 µl orgaanista faasia uusiin eppendorf-putkiin, minkä jälkeen putkista haihdutettiin orgaaninen faasi pois eppendorf-konsentraattorilla. Orgaanista faasia sisältäviin putkiin lisättiin 500 µl ultrapuhdasta vettä kuivumisen estämiseksi. Haihdutetut, vesifaasissa olevat näytteet pakastettiin ja kylmäkuivattiin. Kylmäkuivattuihin näytteisiin lisättiin 500 µl ultrapuhdasta vettä, minkä jälkeen ne suodatettiin ja analysoitiin UHPLC-DAD-MS -laitteistolla.

Kasviuutteista valmistettiin kantaliuokset punnitsemalla uutteita 20,0 mg eppendorf-putkiin, lisäämällä niihin 1 ml ultrapuhdasta vettä ja ravistamalla. Jokaiselle kasviuutteelle valmistettiin kuusi uutta eppendorf-putkea, joihin pipetoitiin 100 µl kantaliuosta. Eppendorf-putket pakastettiin ja kylmäkuivattiin, minkä jälkeen niihin lisättiin ultrapuhdasta vettä ja orgaanisia liuottimia samoin kuin yhdisteseoksille edellä kuvattiin. Neste-nesteuutot tehtiin kasviuutteille samalla tavalla kuin yhdisteseoksillekin. Lopuksi näytteet haihdutettiin, pakastettiin ja kylmäkuivattiin, minkä jälkeen ne analysoitiin, kuten yhdisteseokset. Neste-nesteuuttojen UHPLC-data analysoitiin samalla tavalla kuin Sephadex LH-20 -kromatografiasta saadut tulokset TargetLynx -ohjelmalla.

Jakautumiskertoimet määritettiin TargetLynx -ohjelmalla yhdisteiden antamien UV-kromatogrammien (280 nm) piikkien pinta-alojen suhteesta niin, että yhdisteen orgaanisen faasin piikin pinta-alaa verrattiin sen vesifaasin piikin pinta-alaan. Jakautumiskertoimille määritettiin logaritminen asteikko välille 0,01–100. Mikäli yhdistettä oli toisessa faasissa yli satakertainen määrä toiseen faasiin verrattuna, yhdisteen integroiminen UV-kromatogrammista ei olisi ollut enää luotettavaa pienien pitoisuuksien vuoksi ja tällöin yhdiste oli joko täysin vesi- tai orgaanisessa faasissa. Logaritmisella asteikolla täysin

vesifaasiin menneet yhdisteet saivat jakautumiskertoimen 0,01 ja täysin orgaaniseen faasiin menneet yhdisteet saivat kertoimen 100. Näin ollen yhdisteet, jotka menivät puoliksi molempiin faaseihin, saivat jakautumiskertoimen yksi.

6.6. Hydrolysoituvien tanniinien ja naudan seerumin albumiinin väliset liukenemattomat kompleksit

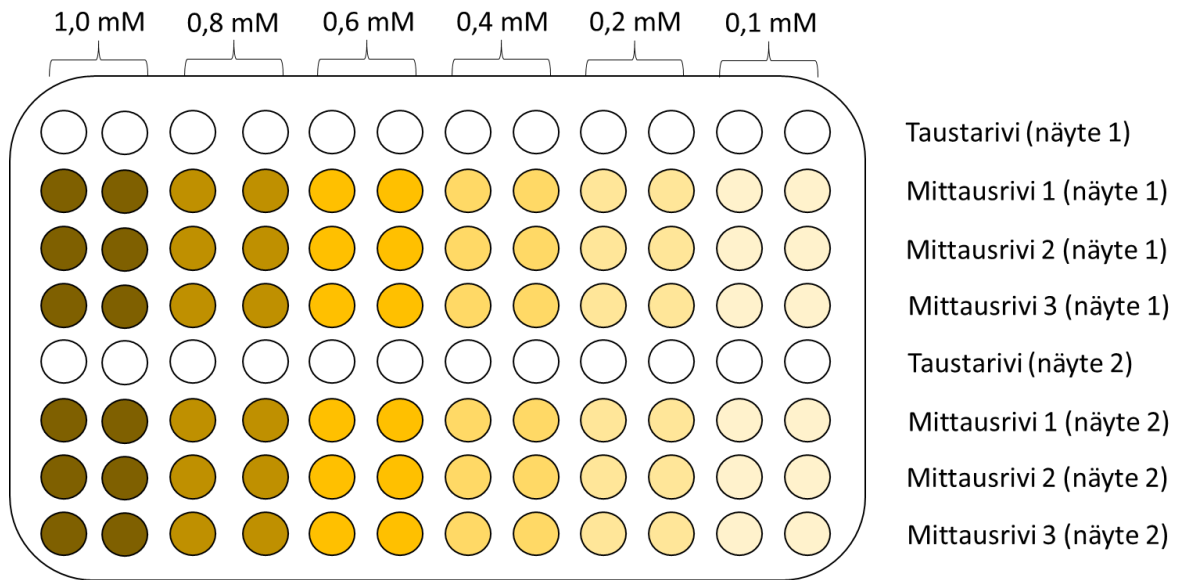
BSA-mittaukset tehtiin Thermo Multiskan Ascent -kuoppalevylukijalla, jolla liukenemattomien kompleksien muodostuminen mitattiin spektrofotometrisesti aallonpituuksilla 370 ja 414 nm. BSA-menetelmä oli valmiiksi kehitetty ja sen mittaamiseen tarvittiin puhtasaineiden laimennossarjat, pH 5 -puskuria ja 200 μ M BSA-puskuria. Puhtasaineiden kantaliuokset valmistettiin punnitsemalla yhdisteitä eppendorf-putkiin (Liite 2) niin, että kantaliuoksista tuli 1,0 mM, kun niihin lisättiin 3,5 ml 1/9 etanoli/vettä (v/v). Kantaliuoksista valmistettiin laimennokset Taulukon 4 mukaisesti. BSA-mittauksessa käytetty pH 5 -puskuri valmistettiin lisäämällä 2,85 ml etikkahappoa 800 ml:aan ultrapuhdasta vettä, johon lisättiin vielä 10,6 mg askorbiinihappoa. Liuoksen pH säädettiin viiteen 2 M NaOH-liuoksella. Lopuksi lisättiin ultrapuhdasta vettä merkkiin saakka 1,0 l mittapullossa ja ravistettiin. BSA-puskuri valmistettiin punnitsemalla 3,32 g BSA:ta 250 ml mittapulloon, täyttämällä se merkkiin edellä kuvatulla pH 5 -puskurilla ja ravistamalla.

Taulukko 4. Kuoppalevymittauksia varten valmistetut laimennossarjat puhtasaineiden 1,0 mM kantaliuoksista.

Laimennos (mM)	Lisätty kantaliuos (μ l)	Lisätty etanoli/vesi 1/9 (v/v) (μ l)
0,8	800	200
0,6	600	400
0,4	400	600
0,2	200	800
0,1	100	900

BSA-menetelmällä pystyttiin mittaamaan kahden eri yhdisteen liukenemattomien tanniini–BSA -kompleksien antamat absorbanssit yhdellä kuoppalevyllä. Yhdisteitä pipetoitiin neljälle eri riville kuudessa eri konsentraatiossa niin, että jokaisen yhdisteen ensimmäisellä rivillä mitattiin tausta-absorbanssi, ja kolmella seuraavalla rivillä mitattiin kompleksinmuodostuminen (Kuva 13). Yhdisteitä pipetoitiin levyille 100 μ l/kuoppa

suurimmista konsentraatioista pienimpään niin, että jokaiselle riville tuli kaksi toistoa konsentraatiota kohti. Taustariveille lisättiin ensin pH 5 -puskuriliuosta 100 μ l/kuoppa 12-kanavaisella pipetillä ja mittausriveille lisättiin 100 μ l/kuoppa BSA-puskuria. Kuoppalevyn kaikkien kuoppien absorbanssit mitattiin tämän jälkeen yhdellä mittauksella. Mittaus kesti 30 minuuttia ja se sisälsi alkuun yhden minuutin ravistuksen ja viiden sekunnin ravistukset mittausten välissä. Kaikkien 28 yhdisteen liukenemattoman kompleksinmuodostuskyky BSA:n kanssa mitattiin edellä kuvatulla menetelmällä.



Kuva 13. Havainnekuva spektrofotometriseen mittaukseen käytetystä kuoppalevystä. Tausta-absorbanssiriville lisättiin puhdasaine ja puskuri, jolloin mitattiin vain taustan aiheuttama absorbanssi. Mittausriveille lisättiin puhdasaineen lisäksi 200 μ M BSA-puskuri, jolloin muodostuneiden liukenemattomien kompleksien absorbanssit saatiin määritettyä.

Varsinaisten BSA-mittausten lisäksi testattiin myös, miten pH ja lämpötila vaikuttivat menetelmään. Testeissä malliyhdisteenä käytettiin PGG:tä. BSA-menetelmää testattiin pH:n osalta neljällä eri testillä, joita varten valmistettiin puskuriliuokset kuudessa eri pH:ssa. Liuokset joiden pH oli 3–5, valmistettiin sitraatti/fosfaatti -puskurilla ja liuokset, joiden pH oli 6–8, valmistettiin natriumfosfaattipuskurilla (Liite 3 ja 4).

Ensimmäistä testiä varten punnittiin 133 mg BSA:ta kuuteen 10 ml:n mittapulloon ja täytettiin ne merkkiin edellä mainituilla puskuriliuoksilla ja ravistettiin. Kuoppalevylukijalla testattiin, kuinka PGG muodosti kompleksin kyseisten BSA-liuosten kanssa näissä kuudessa

pH:ssa. Aluksi PGG-liuokset pipetoitiin levyille, minkä jälkeen 12-kanavaisella pipetillä lisättiin taustariveille kyseisen pH:n puskuria ja mittausriveille BSA kyseisissä puskuriliuoksissa. Yhdellä kuoppalevyllä mitattiin PGG:n sitoutuminen BSA:han kahdessa eri pH:ssa. Toinen testi erosi ensimmäisestä vain siinä, että BSA-liuos valmistettiin ultrapuhdasteeseen veteen, ei suoraan puskuriliuokseen. Mittauksissa levyille pipetoitiin ensin PGG-liuokset ja sen jälkeen erikseen puskuriliuokset, jotta kuoppien pH saatiin oikeiksi. Lopuksi lisättiin veteen valmistetut BSA-liuokset 12-kanavaisella pipetillä. Taustariville pipetoitiin tässä tapauksessa sekä kyseistä puskuriliuosta, että ultrapuhdasta vettä.

Kolmas testi erosi edellisestä testistä vain siinä, että BSA-liuos valmistettiin edellä mainittuun pH 5 -puskuriin, ei veteen. Kolmannessa testissä eri pH:n puskurit pipetoitiin PGG:n jälkeen levyille 12-kanavaisella pipetillä ja vasta lopuksi pipetoitiin BSA-puskurit. Neljäs testi erosi muista, sillä siinä ei käytetty lainkaan sitraatti/fosfaatti- tai natriumfosfaattipuskureita, vaan ainoastaan pH 5 -puskuria, jonka pH:ta muutettiin natriumhydroksidin avulla. Testissä ei myöskään tutkittu koko pH-aluetta, vaan alue rajattiin tarkemmin välille 4–6, jossa liukenemattoman PGG-BSA -kompleksin muodostuminen mitattiin seitsemässä eri pH:ssa.

Lämpötilan vaikutus BSA-mittauksiin testattiin kahdessa lämpötilassa: huoneenlämpötilassa ja märehtijän ruumiinlämpötilassa. Huoneenlämpötilassa liukenemattomat kompleksit mitattiin normaalisti alkuperäisellä BSA-menetelmällä. Märehtijän ruumiinlämpötilan kuvaamiseen käytettiin lämpötilaa 39 °C, mihin kuoppalevylukijan kammio säädätettiin ennen mittausta. Uuni lämmitettiin myös kyseiseen lämpötilaan ja sinne laitettiin testissä käytettävät liuokset lämpenemään tunti ennen mittausta. Mittaus tehtiin muuten samoin kuin huoneenlämpötilassa.

6.7. Hydrolysoituvien tanniinien ja polyetyleeniglykolin väliset liukenemattomat kompleksit

PEG-mittaukset tehtiin Labsystems Multiskan Ascent -kuoppalevylukijalla, jolla liukenemattomien kompleksien muodostuminen mitattiin spektrofotometrisesti aallonpituuksilla 340 ja 415 nm. PEG-menetelmä oli valmiiksi kehitetty ja sen mittaamiseen tarvittiin puhdasaineiden laimennossarjat, ultrapuhdasta vettä ja 1 mg/ml PEG-vesiliuos. Puhdasaineiden 1,0 mM kantaliuoksia varten niitä punnittiin eppendorf-putkiin (Liite 2) ja

lisättiin vielä 3,1 ml etanoli/vettä 1/9 (v/v). Laimennossarjat valmistettiin samoin kuin BSA-mittauksiakin varten (Taulukko 4). PEG-kantaliuos valmistettiin punnitsemalla 1,0 g PEG:tä 100 ml:n mittapulloon, täyttämällä se merkkiin ultrapuhtaalla vedellä ja ravistamalla. Kantaliuosta laimennettiin vielä kymmenkertaisesti ultrapuhtaalla vedellä, jotta saatiin 1 mg/ml PEG-liuos.

Ennen varsinaisia PEG-mittauksia testattiin yhdisteiden 1,0 mM kantaliuoksilla, mitkä niistä ylipäättään sitoutuivat PEG:hen. Yhdisteet jotka antoivat PEG-vasteen, mitattiin tarkemmin varsinaisissa PEG-mittauksissa. PEG-menetelmällä pystyttiin mittaamaan neljän yhdisteen PEG-vasteet kerralla kahdella kuoppalevyllä. PEG-mittaus erosi BSA-mittauksesta, sillä siinä mitattiin vain yksi rivi kuoppalevystä kerrallaan. Samalla kun ensimmäistä kuoppalevyä mitattiin, niin toiseen levyyn voitiin pipetoida jo seuraava puhdasainenäyte. Yhdisteitä pipetoitiin levyille 100 µl/kuoppa suurimmasta konsentraatiosta pienimpään. PEG-mittauksessa ensimmäisellä rivillä mitattiin tausta-absorbanssi ja kolmella seuraavalla rivillä yhdisteen liukenemattoman kompleksinmuodostaminen aivan kuten BSA-mittauksessakin (Kuva 13), mutta BSA-puskurin sijaan mittausriveille pipetoitiin 1 mg/ml PEG-liuosta. PEG-mittaus laitettiin välittömästi käyntiin, kun puhdasaineen päälle pipetoitiin PEG-liuosta 12-kanavaisella pipetillä 100 µl/kuoppa. Yhden rivin mittaus kesti 10 minuuttia ja se ei sisältänyt ravistelua.

Yhdisteille tehtyjen PEG-mittausten lisäksi, testattiin miten pH:n muutos ja lämpötila vaikuttivat menetelmään. PEG-menetelmää testattiin pH:n muutosta kahdella eri testillä. Malliyhdisteenä käytettiin PGG:tä ja puskuriliuoksina käytettiin samoja liuoksia kuin BSA-menetelmää testatessa (Liite 3 ja 4). Ensimmäisessä testissä tutkittiin PGG:n sitoutumista PEG:hen, kun PEG-liuokset oli valmistettu suoraan puskuriliuoksiin pH-alueella 3–8. PEG-puskuriliuokset valmistettiin punnitsemalla 100 mg PEG:tä 10 ml:n mittapulloihin, täyttämällä ne merkkeihin kyseisillä puskuriliuoksilla ja ravistamalla. Liuoksia laimennettiin vielä kymmenkertaisesti, jotta saatiin 1 mg/ml PEG-puskuriliuokset. PGG:n sitoutuminen PEG:hen mitattiin normaalin protokollan mukaan, mutta käyttäen edellä mainittuja PEG-puskuriliuoksia. Taustariveille pipetoitiin tässä tapauksessa kyseisiä puskuriliuoksia. Lopuksi mitattiin vielä tarkemmin PGG:n sitoutuminen PEG:hen pH-alueelle 4–6 seitsemässä eri pH:ssa.

Toisessa testissä käytettiin alkuperäisen menetelmän PEG-vesiliuosta ja pH säädettiin erikseen puskuriliuoksilla. Mittaus erosi ensimmäisen testin mittauksesta vain siinä, että PGG-liuosten päälle pipetoitiin ensin vain puskuriliuokset ja vasta sen jälkeen PEG-vesiliuokset, minkä jälkeen mittaus aloitettiin. Tällä metodilla testattiin myös pH-alue 4–6 tarkemmin seitsemässä pH:ssa. Lämpötilan vaikutus PEG-menetelmään testattiin samalla tavalla kuin BSA-menetelmään, mutta puhdasaine- ja PEG-liuokset laitettiin myös mittausten ja pipetointien välissä takaisin uuniin.

7. Tulokset ja niiden tarkastelu

7.1. Sephadex LH-20 -kromatografia

Sephadex LH-20 -geelillä kehitettiin nopea protokolla hydrolysoituvien tanniinien fraktioimiseen. Fraktiointiprotokollan kehittämiseksi pyrittiin siihen, että hydrolysoituvia tanniineja voitaisiin erotella toisistaan nopeasti ja samalla jokaisen yhdisteen kohdalla havaittaisiin, kuinka ne vuorovaikuttavat geelin kanssa. Jokaiselle yhdisteelle määritettiin lukuarvo, joka kuvasi niiden vuorovaikuttamista geelin kanssa eli niille määritettiin Sephadex LH-20 -pidätykset.

Suurin osa hydrolysoituvista tanniineista eluoiutui asetoni/vedellä 1/1 (v/v), eli niiden Sephadex LH-20 -pidätykset olivat noin neljä (Taulukko 5). Vain monogalloyyliglukoosi, digalloyylikviinihappo, suurin osa monomeerisista avoketjuisista ellagitanniineista, punikalagiini ja tsebulakihappo eluoiutuvat pylvästä ulos selvästi tätä aikaisemmin. Monogalloyyliglukoosin ja digalloyylikviinihapon aikaisen eluotumisen selitti niiden vähäinen galloyyliryhmien määrä. Monomeeristen avoketjuisten ellagitanniinien aikainen eluotuminen oli myös odotettavissa niiden korkean vesiliukoisuuden ja jäykän rakenteen takia (McManus et al., 1985), mutta stakhyuriini ja kasuariniini eluoiutivat kuitenkin muita huomattavasti myöhemmin, mikä johtui todennäköisesti niiden 5-aseman galloyyliryhmästä. Gallotanniinit olivat ainoita yhdisteitä, jotka eluoiutivat selvästi myöhemmin, kuin muut yhdisteet.

Taulukko 5. Yhdisteille mitatut Sephadex LH-20 -pidätykset. Osalla yhdisteistä määritettiin kaksi pidätystä: ensimmäinen puhdasaineena ja toinen osana kasviuutetta.

Yhdiste^a	Sephadex LH-20 -pidätyminen puhdasaineena^b	Sephadex LH-20 -pidätyminen kasviuuteessa^b
1 (2)	0,05	-
2 (2)	0,04	-
3 (2)	4,00	-
4 (1)	5,00	-
5 (1)	3,81	-
6 (1)	4,00	3,99
7 (2)	4,00	-
8 (1)	4,00	3,99
9 (2)	4,00	3,99
10 (1)	4,00	3,98
11 (2)	2,45	-
12 (1)	3,07	3,98
13 (1)	1,78	2,00
14 (1)	2,00	2,55
15 (1)	0,71	-
16 (1)	1,03	-
17 (2)	3,99	-
18 (2)	4,00	-
19 (2)	3,93	-
20 (2)	3,99	-
21 (2)	4,00	4,01
22 (2)	3,98	4,00
23 (2)	4,02	4,00
24 (2)	4,03	4,00
25 (1)	4,09	4,00
26 (1)	4,15	-
27 (1)	3,93	4,02
28 (2)	4,01	-

^a Yhdisteen perässä on sulkeissa ilmoitettu, että kummassa yhdisteseoksessa puhdasaine fraktioitiin.

^b Sephadex LH-20 -pidätyksiä kuvattiin lukuarvolla asteikoilla 0–5, missä luku kertoi sen fraktion, jossa yhdiste eluoi pylvästä ulos (Taulukko 3). Mikäli yhdiste eluoi kahdessa tai useammassa eri fraktiossa, määritettiin sille fraktioiden antamien UV-kromatogrammien (280 nm) pinta-alojen suhteesta lukuarvo kuvaamaan sitä, miten yhdiste eluoi pylvästä ulos.

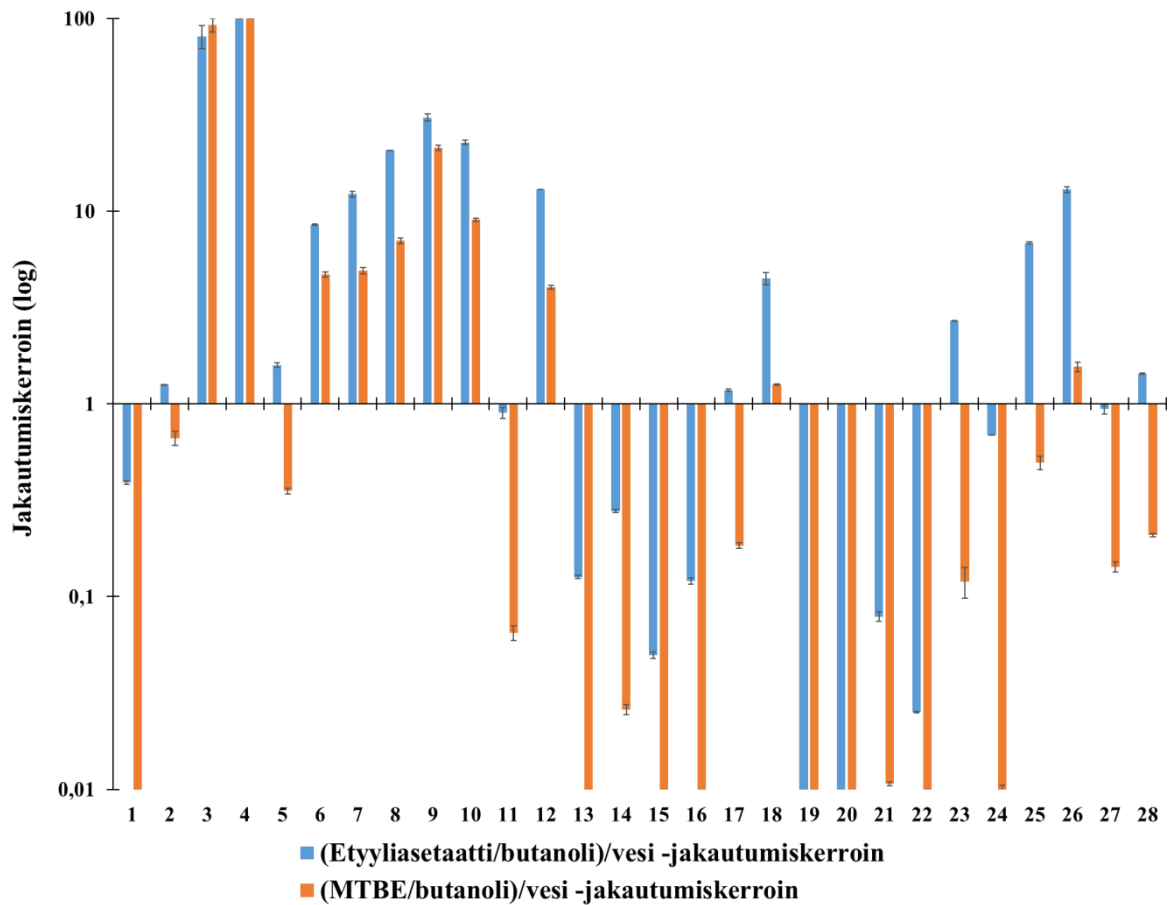
Mikäli yhdisteen piikin pinta-ala pystyttiin luotettavasti integroimaan kasviuutteen UV-kromatogrammista, saatiin Sephadex LH-20 -pidättyminen määritettyä myös uutteesta. Tällöin pystyttiin vertailemaan puhdasaineen pidättymistä saman yhdisteen pidättymiseen, kun se oli osana kasviuutetta. Veskalagiini, kastalagiini ja tsebulakihappo eluoituivat myöhemmin, kun ne olivat osana kasviuutteita, mutta muuten yhdisteet saivat melko samat Sephadex LH-20 -pidättymiset sekä puhdasaineena, että osana kasviuutetta.

Hyvin monelle yhdisteellä ei saatu kunnan erottumista aikaan, mikä johtui pienestä kerättyjen fraktioiden määrästä. Parempi erottuminen olisi vaatinut eluenteina enemmän asetoni/vesiliuoksia, joissa olisi ollut pienempi asetoni/vesipitoisuus kuin 1/1 (v/v), mutta se olisi kuitenkin vaatinut myös enemmän aikaa fraktiointiin. Aika oli rajoittavana tekijänä myös toistojen suhteen, sillä rinnakkaismittauksia ei tehty. Tuloksia tarkastellessa on myös hyvä huomioda se, että yhdisteet fraktioitiin yhdisteseoksina eikä yksittäisinä yhdisteinä, jolloin niiden pidättymiset geelissä olisivat voineet olla hieman erilaiset. Pidättymiseen saattoi myös vaikuttaa yhdisteiden pitoisuudet näytteissä, kun verrattiin yhdistettä puhdasaineen ja osana kasviuutetta. Toyopearl -geelit eivät tuoneet alkutestien perusteella mitään uutta verrattuna Sephadex LH-20 -geeliin, joten niiden tarkemmilta testauksilta päätettiin tämän työn osalta luopua.

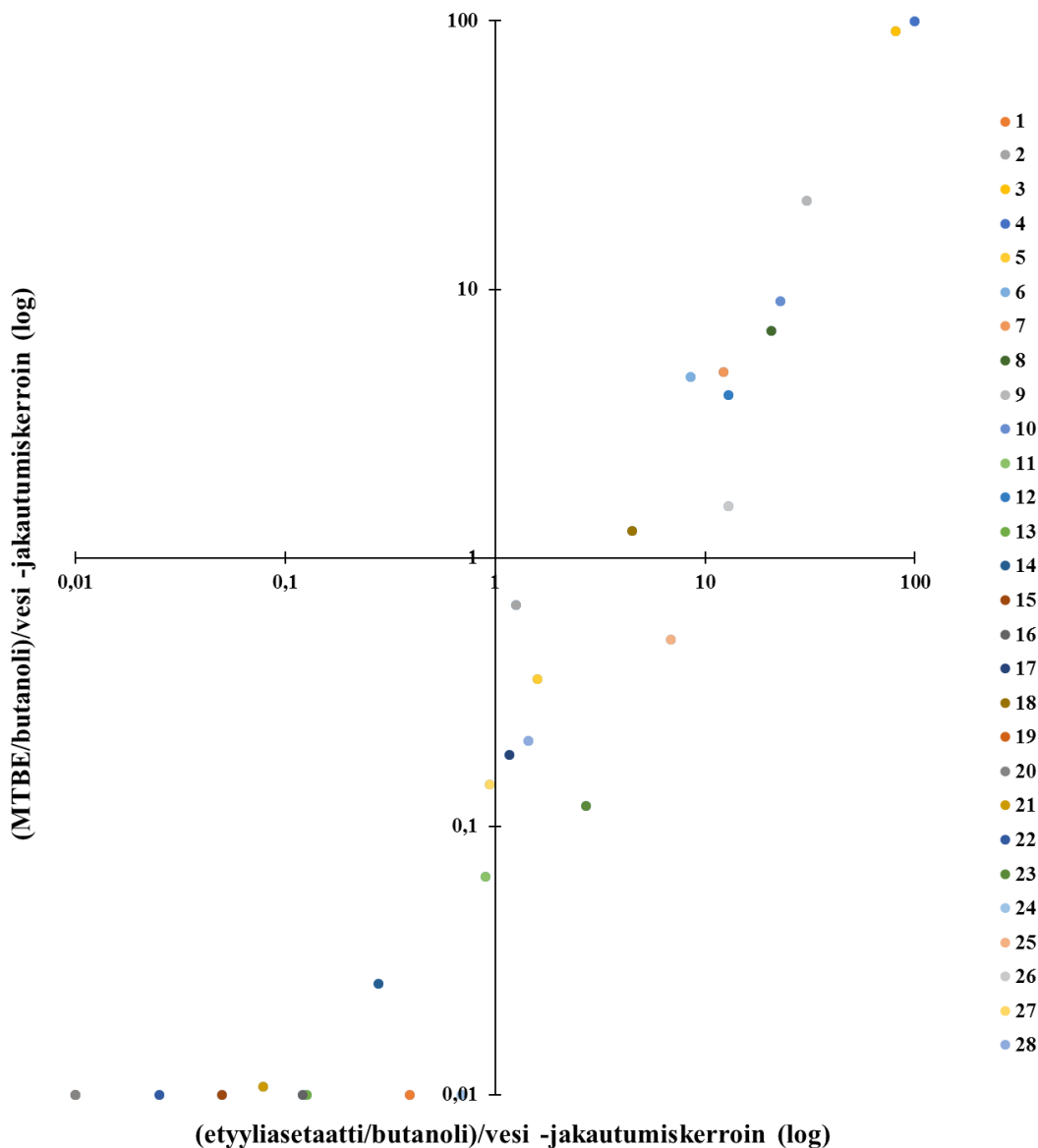
7.2. Neste-nesteuutot

Neste-nesteuutoista määritettiin hydrolysoituville tanniineille kaksi jakautumiskerointia: (etyyliasetatti/1-butanoli 1/1)/vesi 1/1 (v/v) ja (MTBE/1-butanoli 1/1)/vesi 1/1 (v/v) (Kuva 14 ja Liite 5). Jakautumiskertoimista voitiin käytännössä nähdä yhdisteiden suhteellinen vesiliukoisuus. Molemmat neste-nesteuuttojen liuotinpareista antoi samansuuntaisia tuloksia samoille yhdisteille. Orgaanisista liuottimista etyyliasetattia sisältävä liuotin oli kuitenkin hieman poolisempi kuin MTBE:tä sisältävä liuotin, sillä yhdisteet menivät tässä uutossa helpommin myös orgaaniseen faasiin (Kuva 15). Kaikista vesiliukoisempia yhdisteitä olivat niin monomeereissa kuin oligomeereissakin avoketjuiset ellagitanniinit. Kaikista rasvaliukoisempia yhdisteitä olivat puolestaan monomeereista PGG ja gallotanniinit, kun taas oligomeereistä rasvaliukoisimpia olivat agrimoniini ja gemiini A. Huomioitavaa oli myös, että kuusi monomeeria oli rasvaliukoisempia kuin kaikista oligomeereistä

rasvaliukoisin yhdiste, gemiini A. Monet oligomeerit olivat myös toisissa tutkimuksissa havaittu hyvin vesiliukoisiksi yhdisteiksi (Tanaka et al., 1997)



Kuva 14. Yhdisteiden neste-nesteuutoista määritetyt jakautumiskertoimet kahdella liuotinparilla virherajoineen. Tulokset ovat esitetty logaritmisella asteikolla, jossa jakautumiskerroin 0,01 tarkoittaa sitä, että yhdiste meni täysin vesifaasiin ja kerroin 100 sitä, että yhdiste meni täysin orgaaniseen faasiin. Jakautumiskertoimella yksi kuvataan tilannetta, jossa yhdiste meni puoliksi molempiin faaseihin.



Kuva 15. Yhdisteiden neste-nesteuutoista määritetyt jakautumiskertoimet esitetty (etyyliasettaatti/butanoli)/vesi- ja (MTBE/butanoli)/vesi -jakautumiskertoimien koordinaatistossa.

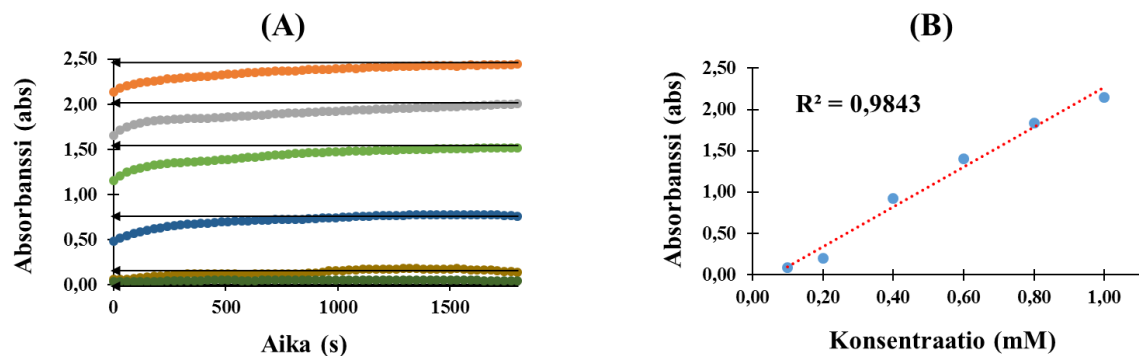
Vertailua voitiin tehdä myös yhdisteiden välillä, joille jakautumiskertoimet määritettiin sekä puhtasaineena että osana kasviuutetta (Liite 5). Suurin osa yhdisteistä olivat puhtasaineina rasvaliukoisempia, kuin mitä ne olivat osana kasviuutetta, joten kasviuute yleisesti siis lisäsi yhdisteiden vesiliukoisuutta. Poikkeuksia olivat kuitenkin tsebulakihappo,

lambertianiini C ja oenothiini B, joiden rasvaliukoisuus kasvoi yhdisteiden ollessa kasviuutteessa.

PGG:lle ja oenothiini B:lle tehtiin neste-nesteuutot myös puhdasaineina yksittäin, ei osana yhdisteseosta. PGG meni molemmissa neste-nesteuutoissa kokonaan orgaaniseen faasiin eli se sai jakautumiskertoimiksi 100, joka oli suurempi kuin 81 tai 92, mitkä olivat PGG:n jakautumiskertoimet seoksessa. Näin ollen yhdisteseoksessa PGG:n vesiliukoisuus kasvoi, mikä johtui todennäköisesti salikariniini A:n ja B:n vaikutuksesta seoksessa. Oenothiini B:n yksittäiset neste-nesteuutoista saadut jakautumiskertoimet olivat 1,0 ja 0,027, jotka erosivat vain hieman yhdisteseoksessa saaduista jakautumiskertoimista (0,94 ja 0,078). Molempien yhdisteiden jakautumiskertoimet siis muuttuivat, kun niille tehtiin neste-nesteuutot puhdasaineena, mutta muutokset eivät silti olleet niin suuria, etteikö seoksista saatuja tuloksia voisi pitää luotettavina tai ainakin suuntaa antavina.

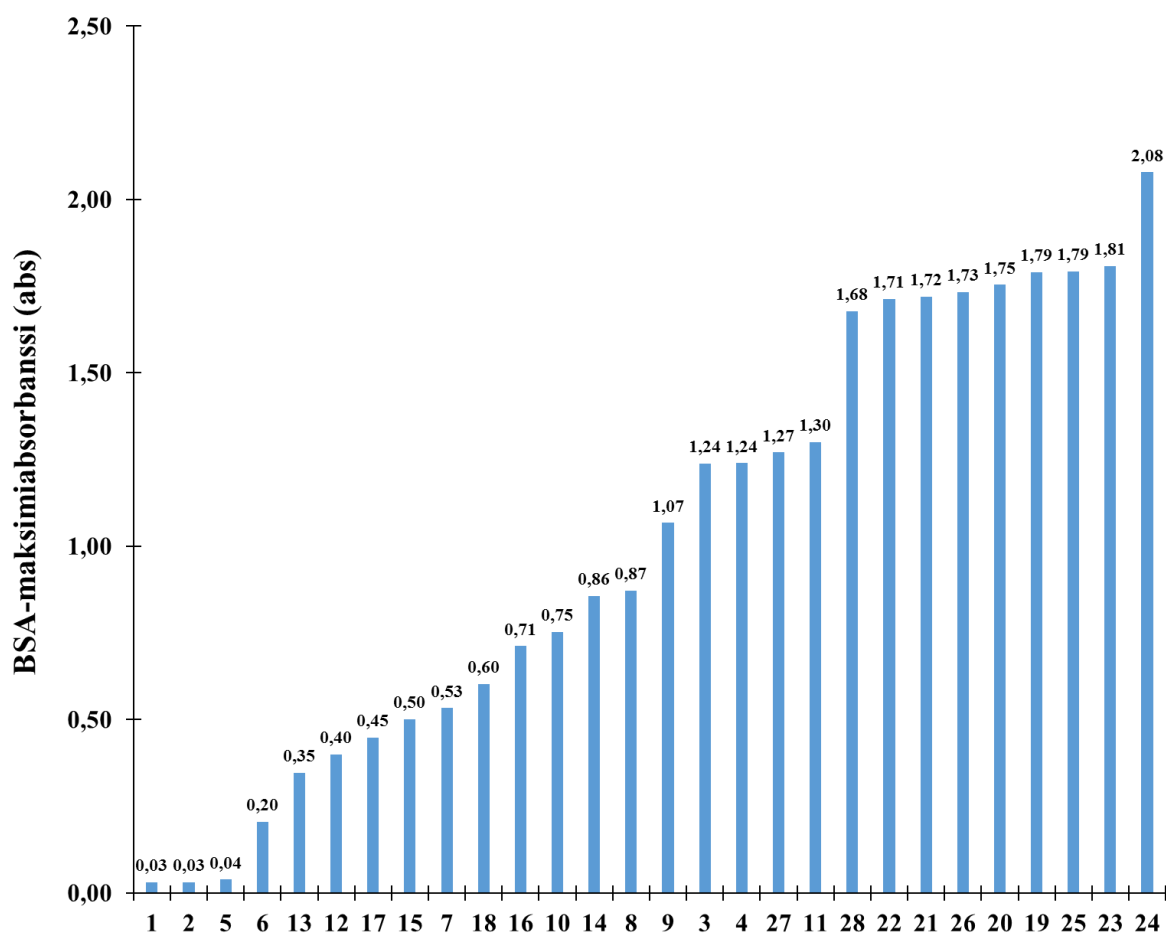
7.3. Hydrolysoituvien tanniinien ja naudan seerumin albumiinin väliset liukenemattomat kompleksit

BSA-mittauksissa jokaisella yhdisteellä seurattiin niiden antamia BSA-absorbansseja ajan funktiona kuudessa eri konsentraatiossa. Jokaiselle yhdisteelle määritettiin niiden maksimaaliset sitoutumiset BSA:han kuudessa eri konsentraatiossa, joista saatiin edelleen määritettyä suorat tämän konsentraatioalueen sisällä. Maksimiabsorbanssi määritettiin jokaisen konsentraation kohdalla erikseen niiden antamista korkeimmista absorbansseista mittauksen aikana (Kuva 16).

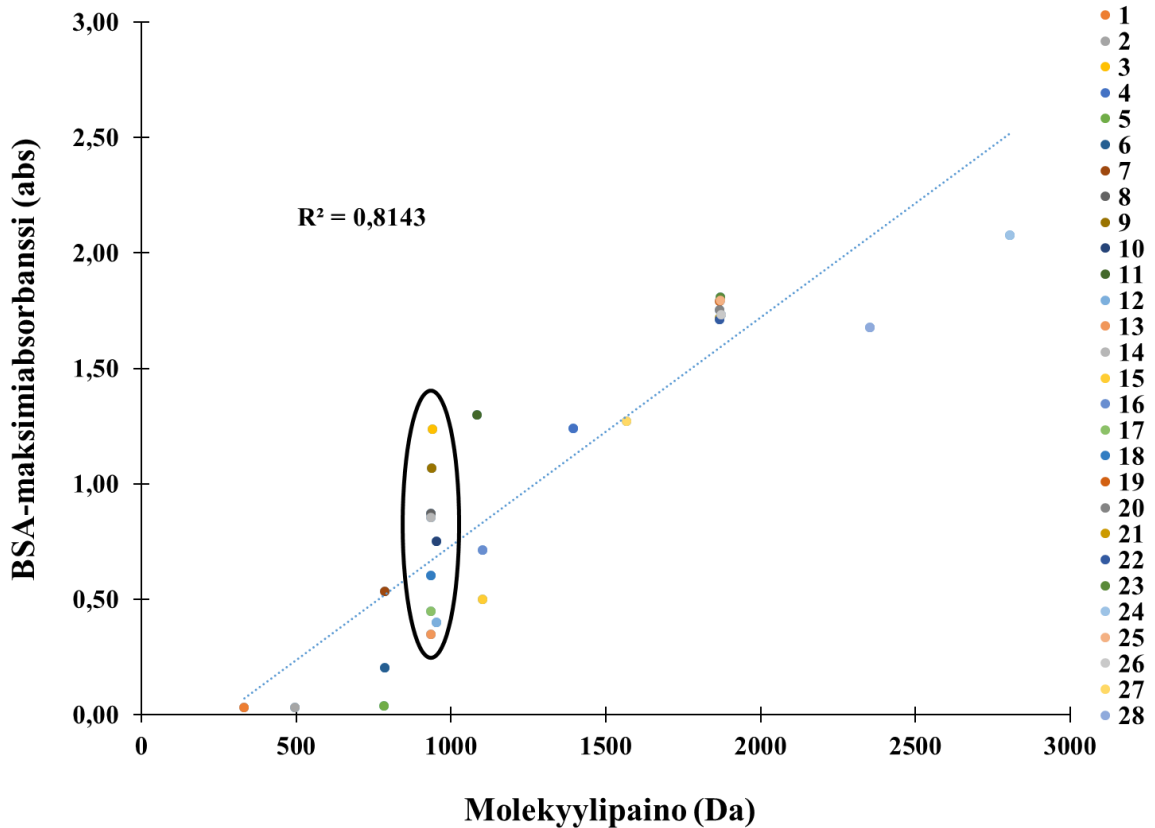


Kuva 16. PGG:n BSA-absorbanssit ajan suhteen kuudessa eri konsentraatiossa (A). PGG:n kuvaajan A maksimiabsorbansseista määritetty suora konsentraation funktiona (B).

Maksimiabsorbanssi kasvoi suoraan verrannollisesti konsentraatioihin nähden, joten jokaisen yhdisteen maksimiabsorbanssit voitiin esittää kuuden konsentraation keskiarvoina (Kuva 17, Liite 6). Yhdisteistä vain monogalloyyylglukoosi, digalloyylikviinihappo ja pedunkulagiini eivät antaneet kunnon vastetta mittauksissa. Molekyylipaino oli suurin yksittäinen tekijä, joka vaikutti yhdisteiden sitoutumiseen BSA:han (Kuva 18). Suuremmat yhdisteet sitoutuivat selvästi paremmin BSA:han kuin pienemmät yhdisteet. Esimerkiksi kasuariktiini antoi BSA-maksimiabsorbanssiksi 0,87 abs, kun taas sen dimeeri sanguiniini H6 antoi vasteeksi 1,81 abs ja edelleen trimeeri lambertianiini C 2,08 abs. Sama nähtiin myös avoketjuisten ellagitanniinien kohdalla, kun monomeerinen veskalagiini antoi BSA-vasteeksi 0,35 abs ja siitä muodostunut dimeeri, salikariniini A antoi vasteeksi 1,79 abs. Molekyylipainon lisäksi pienempiä muutoksia liukenemattomien kompleksien muodostumiseen voitiin selittää yhdisteiden rakenteellisilla eroilla.



Kuva 17. Hydrolysoituvien tanniinien BSA-mittauksista kuuden konsentraation keskiarvoina lasketut maksimiabsorbanssit, jotka ovat esitetty kasvavan absorbanssin mukaan.



Kuva 18. Hydrolysoituvien tanniinien kuuden konsentraation keskiarvona laskettu BSA-maksimiabsorbanssi esitetty molekyylipainon funktiona. Kuvaajaan on merkitty kohta, jossa moni yhdiste antoi lähes samalla molekyylipainoilla hyvin erilaisia BSA-vasteita.

Yksinkertaisin esimerkki yhdisteiden rakenteen vaikutuksesta BSA-maksimiabsorbanssiin havaittiin glukopyranoosisokerin omaavilla monomeerisilla hydrolysoituvilla tanniineilla. Näillä yhdisteillä galloyyliryhmien määrän kasvaessa rakenteessa verrattuna HHDP-ryhmiin, kasvoi myös niiden kyky muodostaa liukenemattomia komplekseja: pedunkulagiini (0,04 abs), tellimagrandiini I (0,20 abs), tellimagrandiini II (1,07 abs) ja PGG (1,24 abs). Tämä johtui siitä, että galloyyliryhmä on taipuisampi kuin HHDP-ryhmä, mikä on hyvä ominaisuus proteiiniaffiniteetin kannalta.

Kasuariktiini on edellisestä esimerkistä poikkeus, sillä se antoi korkeamman maksimiabsorbanssin (0,87 abs) kuin tellimagrandiini I, vaikka sillä on rakenteessa yksi galloyyliryhmä vähemmän. Kasuariktiinin korkeamman maksimiabsorbanssin pystyi silti selittämään sen suuremmalla molekyylipainolla. Toisaalta kun verrattiin tellimagrandiini I:tä ja sen isomeeria eli 1,2-digalloyyli-4,6-HHDP-glukoosia, havaittiin, että niiden rakenteissa

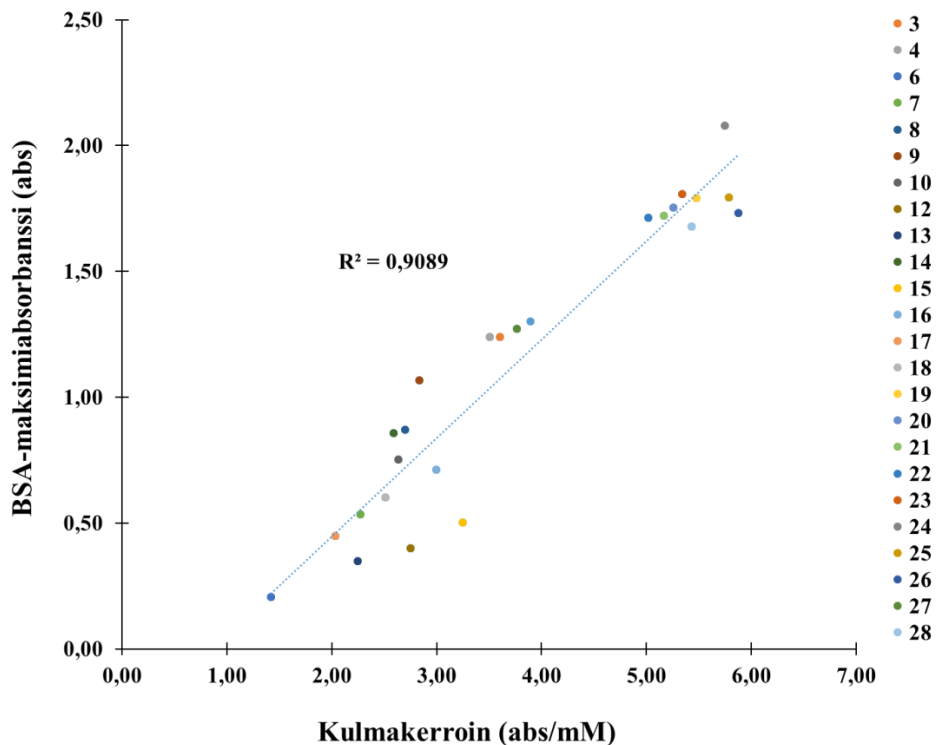
oli yhtä monta fenolista ryhmää ja niiden molekyylipainot olivat samat, mutta tellimagrandiini I antoi silti pienemmän maksimiabsorbanssin kuin sen isomeeri (0,53 abs), mikä johtui siitä, että tellimagrandiini I:n isomeerillä oli galloyyliryhmä kiinnittynyt sokerin anomeeriseen asemaan. Galloyyliryhmän kiinnittyessä sokerin anomeeriseen asemaan, ottaa se enemmän osaa vetysidosten muodostamiseen ja hydrofobisiin vuorovaikutuksiin, sillä siihen kiinnittyneenä se on vapaammassa asemassa kuin muihin sokerin hiiliin kiinnittyneenä.

Avoketjuisilla ellagitanniineilla rakenteen vaikutus BSA-vasteeseen ei ollut aivan yhtä selkeä kuin glukopyranoosisokerin omaavilla hydrolysoituvilla tanniineilla. Niiden NHTP-ryhmä ei muodostanut sidoksia yhtä tehokkaasti kuin galloyyli- ja HHDP-ryhmä yhdessä. Tämä johtui siitä, että NHTP-ryhmä on jäykempi rakenne kuin galloyyli- tai HHDP-ryhmä. Esimerkiksi veskalagiini antoi tästä syystä 0,35 abs maksimiabsorbanssin, kun taas stakhyuriini antoi korkeamman maksimiabsorbanssin (0,45 abs). Samoin voitiin havaita, että veskavaloniinihapon HHDP-ryhmään kiinnittynyt gallushapporyhmä nosti maksimiabsorbanssia (0,50 abs) verrattuna veskalagiiniin.

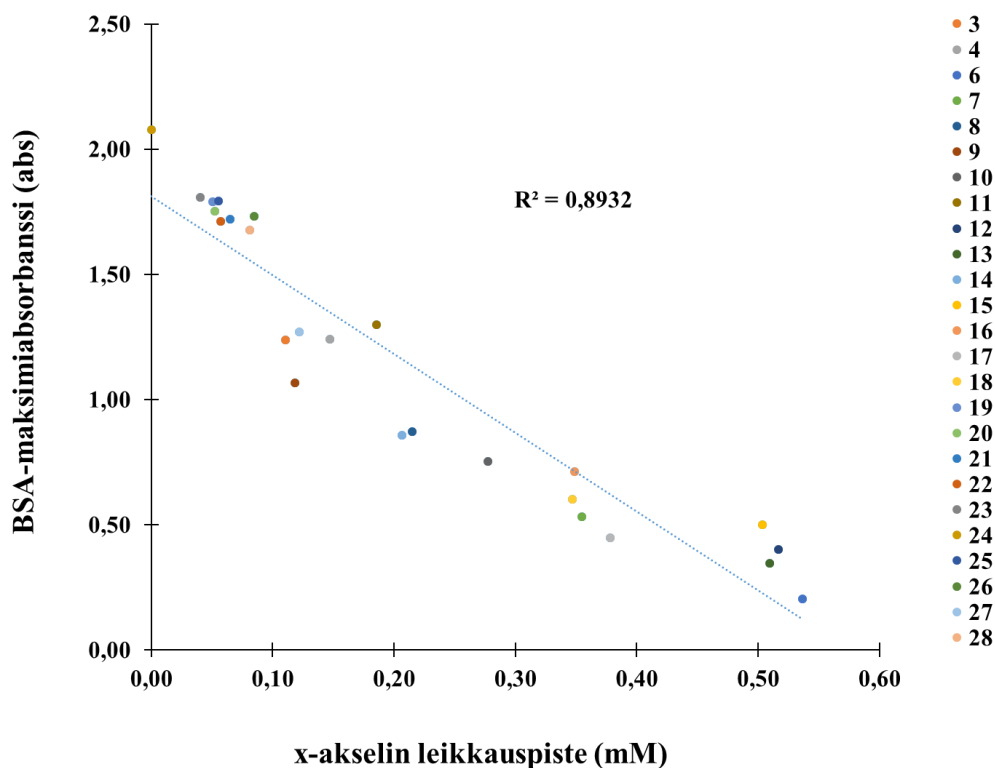
Avoketjuisten ellagitanniinien rakenteen tärkein yksittäinen tekijä sitoutumisessa BSA:han oli kuitenkin sokerin anomeerisen aseman hydroksyyliiryhmän suuntautuminen. Esimerkiksi kastalagiini antoi huomattavasti korkeamman BSA-vasteen (0,86 abs) kuin veskalagiini, koska sen anomeerisen aseman hydroksyyliiryhmä oli α -asemassa, kun taas veskalagiinilla se oli β -asemassa. Hydroksyyliiryhmän suuntautuminen ei ollut kuitenkaan ainoa selittävä tekijä, vaan myös sillä oli väliä, kuinka hyvin hydroksyyliiryhmä pystyi muodostamaan vetysidoksia. Kastalagiini pystyi esimerkiksi muodostamaan paremmin vetysidoksia α -asemassa olevan hydroksyyliiryhmän kanssa kuin kastavaloniinihappo (0,71 abs), sillä kastavaloniinihapon OH-ryhmä oli enemmän suojassa sen gallushapporyhmän takia. Saman ilmiön havaitsi myös, mikäli vertasi kastalagiinin antamaa maksimiabsorbanssia kasuariinin maksimiabsorbanssiin (0,60 abs). Tässä tilanteessa kasuariinin galloyyliryhmä puolestaan häiritsi, sen α -asemassa olevan hydroksyyliiryhmää muodostamasta yhtä paljon vetysidoksia kuin kastalagiinin vastaava ryhmä.

BSA-maksimiabsorbanssien lisäksi yhdisteille saatiin määritettyä niiden lineaarisen osan suoran kulmakerroin ja x-akselin leikkauspiste (Liite 6). Kulmakerroin kertoi käytännössä, kuinka paljon maksimiabsorbanssi muuttui konsentraation muuttuessa, kun taas

x-akselin leikkauspiste kertoi käytännössä pienimmän konsentraation, jolla yhdiste ylipäättään antoi vasteen mittauksessa. Niiden avulla yhdisteiden sitoutumista BSA:han voitiin tarkastella hieman eri näkökulmasta verrattuna maksimabsorbansseihin. Esimerkiksi kastalagiini antoi kaikista monomeerisista avoketjuisista ellagitanniineista korkeimman BSA-maksimiabsorbanssin kuuden konsentraation keskiarvona. Kastalagiinin suoran kulmakerroin oli 2,59 abs/mM, joka oli kuitenkin pienempi kuin esimerkiksi kastavaloniinihapon vastaava kulmakerroin 3,00 abs/mM ja vastaavasti niiden x-akselin leikkauspisteet olivat 0,21 ja 0,35 mM. Näin ollen kastavaloniinihappo ei sitoutunut BSA:han pienemmillä konsentraatioilla niin hyvin kuin kastalagiini, mutta konsentraation kasvaessa se alkoi kuitenkin sitoutua BSA:han nopeammin, mikä nähtiin kulmakertoimesta. Edellisestä esimerkistä huolimatta yhdisteiden antamat kulmakertoimet ja x-akselin leikkauspisteet olivat kuitenkin melko suoraan verrannollisia niiden antamiin maksimabsorbansseihin (Kuvat 19 ja 20).



Kuva 19. Yhdisteiden BSA-mittauksista kuuden konsentraation keskiarvona lasketut maksimabsorbanssit esitetty mittauksen konsentraatioalueen lineaariselta osalta määritetyn suoran kulmakertoimen funktiona.



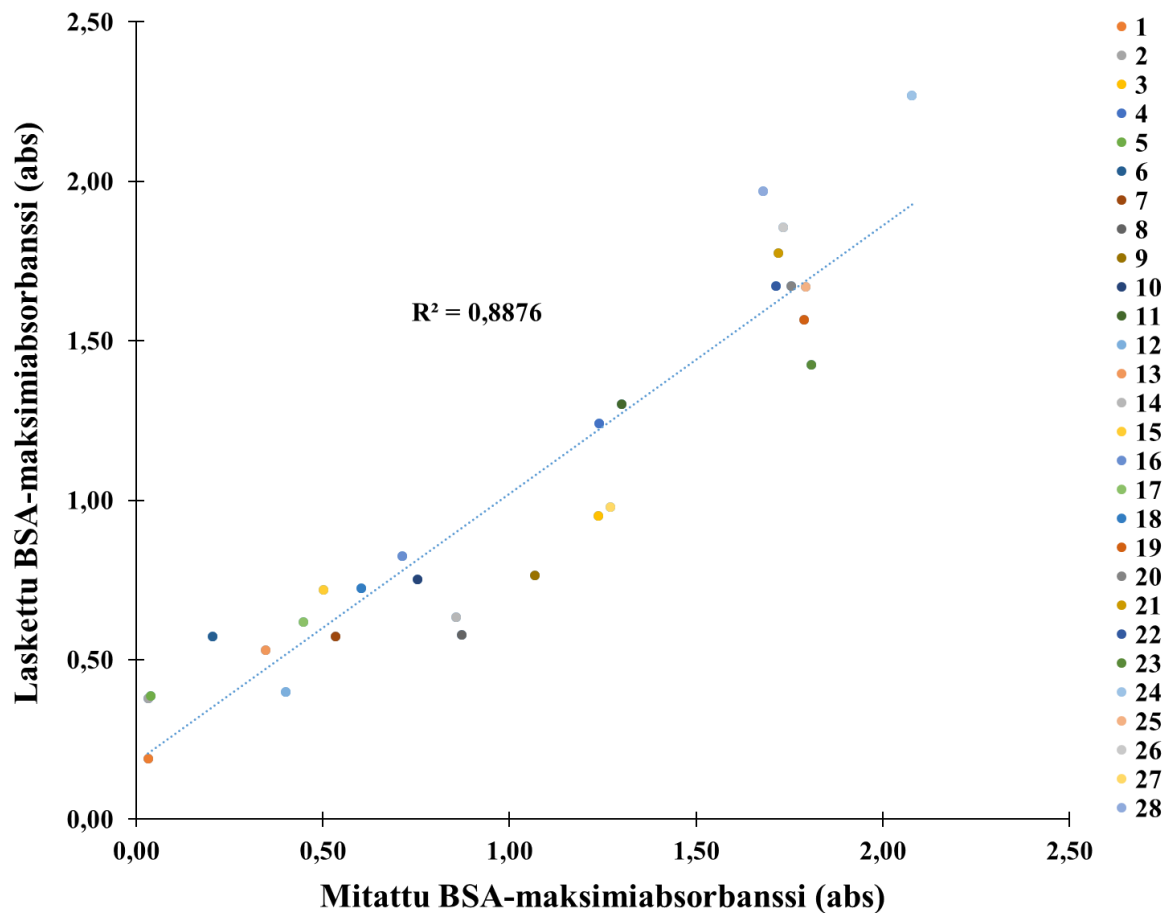
Kuva 20. Yhdisteiden BSA-mittauksista kuuden konsentraation keskiarvona lasketut maksimiabsorbanssit esitetty mittauksen konsentraatioalueen lineaariselta osalta määritetyn suoran x-akselin leikkauspisteen funktiona.

Yhdisteiden antamia BSA-maksimiabsorbansseja tarkasteltiin myös tilastollisesta näkökulmasta lineaarisella regressioanalyysillä, jossa otantana oli mitatut 28 yhdistettä. Regressioanalyysi tehtiin Microsoft Excel -ohjelmalla. Analyysissä ei otettu huomioon molekyyli­massaa, sillä se olisi ollut liian dominoiva tekijä muiden muuttujien joukossa. Sen sijaan informatiivisempaa oli tarkastella, miten erilaiset fenoliset ryhmät vaikuttivat yhdisteiden maksimiabsorbanssien kasvuun. Lisäksi oligomeerien kohdalla otettiin huomioon monomeeriyksiköiden väliset sidostyypit ja avoketjuisilla ellagitanniineilla sokerin anomeerisen aseman hydroksyyli­ryhmän suuntautuminen, sillä niillä oli selkeä vaikutus yhdisteiden sitoutumiseen BSA:han. Kaikkia yksityiskohtia ei kuitenkaan voitu ottaa huomioon tilastollisessa tarkastelussa, kuten esimerkiksi missä sokerin hiilissä fenoliset ryhmät olivat kiinni. Tilastollisen tarkastelun tavoitteena oli pystyä arvioimaan yhdisteiden mitatut maksimiabsorbanssit laskukaavalla (1) ja samalla tarkastella miten erilaiset fenoliset

ryhmät vaikuttivat BSA:han sitoutumiseen. Regressioanalyysin tuloksista saatiin myös vahvistuksia omiin päätelmiin.

(1) Yhdisteen BSA-maksimiabsorbanssi (abs) =
 $0,19A + 0,29B + 0,15C + 0,04D + 0,37E + 0,02F + 1,11G + 0,51H + 0,42I + 0,27J - 0,17K$
 missä A = galloyyli- ja HHDP-ryhmien lukumäärä, B = digalloyyli- ja NHTP-ryhmien lukumäärä, C = α -tyypin sokerien lukumäärä, D = β -tyypin sokerien lukumäärä, E = DHHDP-ryhmien lukumäärä, F = modifioitujen DHHDP-ryhmien lukumäärä, G = gallagyliryhmien lukumäärä, H = GOG-sidosten lukumäärä, I = DOG-sidosten lukumäärä, J = GOD-sidosten lukumäärä ja K = makrosyklisen renkaiden lukumäärä yhdisteessä.

Lineaarisen regressioanalyysillä määritettiin, kuinka paljon erilaiset fenoliset ryhmät nostivat maksimiabsorbanssia keskimäärin ja määritettiin tämän perusteella jokaiselle yhdisteelle laskettu BSA-maksimiabsorbanssi, jota verrattiin niiden mitattuihin maksimiabsorbansseihin (Kuva 21). Yksi galloyyli- tai HHDP-ryhmä yhdisteiden rakenteissa nosti maksimiabsorbanssia analyysin mukaan keskimäärin 0,19 abs. Tämä ei kuitenkaan kertonut koko totuutta, sillä glukopyranoosisokerin omaavilla hydrolysoituvilla tanniineilla sokerin anomeerisessa asemassa oleva galloyyliryhmä nosti absorbanssia useasti paljon enemmän kuin muissa sokerin hiilissä kiinni ollut ryhmä, mitä ei laskennallisessa mallissa otettu huomioon. Tämä havaittiin esimerkiksi vertaillen tellimagrandiini I ja sen isomeerin maksimiabsorbansseja, jotka antoivat laskennallisesti samat BSA-maksimiabsorbanssit, mutta isomeeri antoi huomattavasti korkeamman maksimiabsorbanssin mittauksissa. Gallotanniinien digalloyyliryhmä nosti keskimäärin 0,29 abs, eli enemmän kuin galloyyli- tai HHDP-ryhmä, mutta tämä ryhmä oli vain gallotanniiniseoksen yhdisteillä, joten tulosta ei voida pitää täysin luotettavana. Digalloyyliryhmän pitäisi kuitenkin kasvattaa proteiinisitoutumista enemmän, sillä se on hyvin taipuisa fenolinen ryhmä, joten analyysin tulos on siten järkevä (Kilkowski ja Gross, 1999).



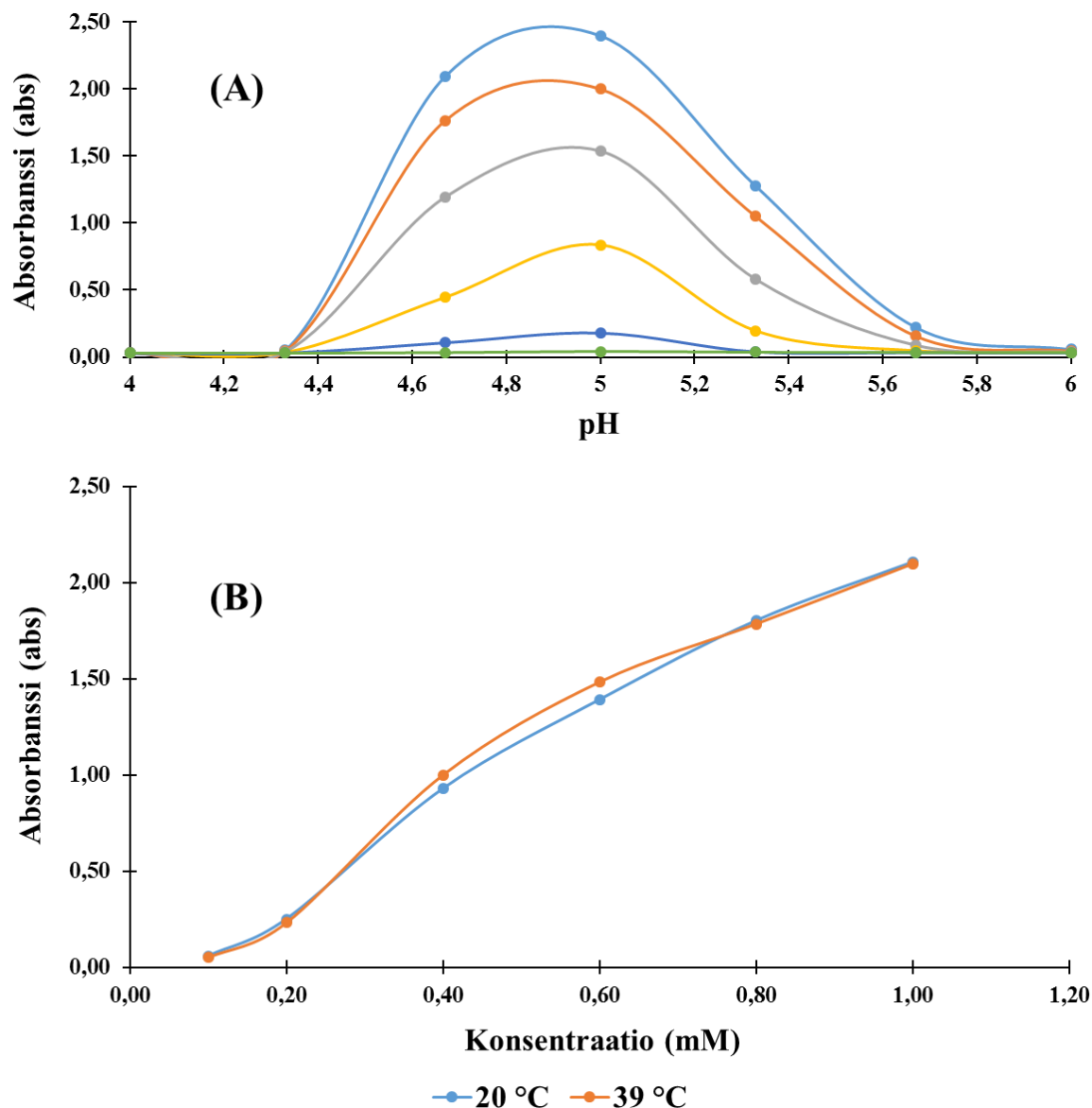
Kuva 21. Hydrolysoituvien tanniinien lasketut BSA-maksimiabsorbanssit esitetty mitattujen maksimiabsorbanssien funktiona.

Avoketjuisten ellagitanniinien NHTP-ryhmä nosti maksimiabsorbanssia analyysin mukaan keskimäärin 0,29 abs, eli se kohotti absorbanssia enemmän kuin galloyyli- tai HHDP-ryhmä yksittäin. Regressioanalyysi vahvisti myös tuloksen, että α -OH nosti maksimiabsorbanssia enemmän kuin β -OH, sillä analyysin antamat kertoimet niille olivat 0,15 ja 0,04 abs. Geraniinin ja tsebulakihapon DHHDP- ja modifioitu DHHDP-ryhmä nostivat maksimiabsorbanssia keskimäärin 0,37 ja 0,02 abs, joten DHHDP-ryhmä näyttäisi osallistuvan enemmän BSA:han sitoutumiseen kuin modifioitu DHHDP-ryhmä. Molemmille ryhmille oli kuitenkin vain yksi malliyhdiste, joten mitään varmoja päätelmiä ei tässä tapauksessa voitu tehdä. Sama tilanne oli punikalagiinin gallagyyli-ryhmällä, joka nosti maksimiabsorbanssia 1,11 abs, joka oli kaikista fenolisista ryhmistä eniten. Viimeiseksi mainituille yhdisteille mitatut ja lasketut maksimiabsorbanssit vastasivat myös todella hyvin

toisiaan, sillä niiden rakenteissa oli hyvin spesifisiä fenolisia ryhmiä, joten regressiosuoran sovitus oli niihin helppoa.

Oligomeereillä ei riittänyt ainoastaan niiden fenolisten ryhmien tarkastelu, sillä niiden avulla niiden avulla ei saatu tarpeeksi eroja yhdisteille. Sen takia oligomeerien osalta tarkasteltiin myös niiden sisältämien monomeeriosien välisiä sidostyyppejä, jotka jaettiin kolmeen osaan: DOG-, GOD- ja GOG-sidokset. Regressioanalyysin mukaan agrimoniinin ja gemiini A:n GOG-sidokset olivat kaikin suotuisimpia sidoksia BSA:han sitoutumisen kannalta, sillä analyysi antoi sille tuloksen 0,51 abs. Tämä oli odotettavissa, sillä sidokseen osallistui kaksi galloyyliryhmää, jotka voivat liikkua toistensa suhteen vapaammin kuin sidos, jossa on HHDP-ryhmä osana sidosta. Agrimoniinin ja gemiini A:n rakenteet ovat siis sellaiset, että ne voivat taipua enemmän kuin muut oligomeerit. Salikariniinien DOG-sidos antoi sidoksista toiseksi korkeimman tuloksen (0,42 abs) ja sanguiini H6:n ja lambertiaani C:n sisältämät GOD-sidokset nostivat maksimiabsorbanssia kolmanneksi eniten (0,27 abs). Näiden sidostyyppien välillä oli vaikeampaa kertoa, mistä niiden välinen ero johtui ja se vaatisi todennäköisesti näiden yhdisteiden kolmiulotteisen rakenteen tarkastelua. Huonoiten BSA-sitoutumista edesauttoi oenotheiinien DOG-sidokset, jolle regressioanalyysi antoi ainoan negatiivisen tuloksen (-0,17 abs). Tämä tulos oli selitettävissä sillä, että oenotheiinien DOG-sidos jäykistää niiden rakennetta tekemällä yhden ylimääräisen renkaan rakenteeseen lisää, mikä on taas epäsuotuisaa proteiiniaffiniteetin kannalta.

Varsinaisten BSA-mittausten lisäksi työssä tutkittiin myös pH:n ja lämpötilan vaikutusta menetelmään. Tutkiessa pH:n vaikutusta neljällä eri testillä huomattiin, että BSA ei muodostanut pysyviä komplekseja sitraatti/fosfaatti- tai natriumfosfaattipuskureissa, joita alun perin oli tarkoitus käyttää pH:n vaikutuksen tutkimiseen. Neljästä testistä vain kahdessa viimeisessä BSA-liuos valmistettiin pH 5 -puskuriin, missä BSA:n huomattiin muodostavan pysyviä komplekseja. Kuvassa 12 on esitetty neljännen testin päätulos, jossa havaittiin, että BSA muodosti komplekseja PGG:n kanssa vain hyvin lähellä pH:ta viisi. Lämpötilalla ei huomattu olevan vaikutusta PGG-BSA -kompleksien muodostumiseen huoneenlämpötila vs. märehitjän ruumiinlämpötila -asettelussa (Kuva 22).

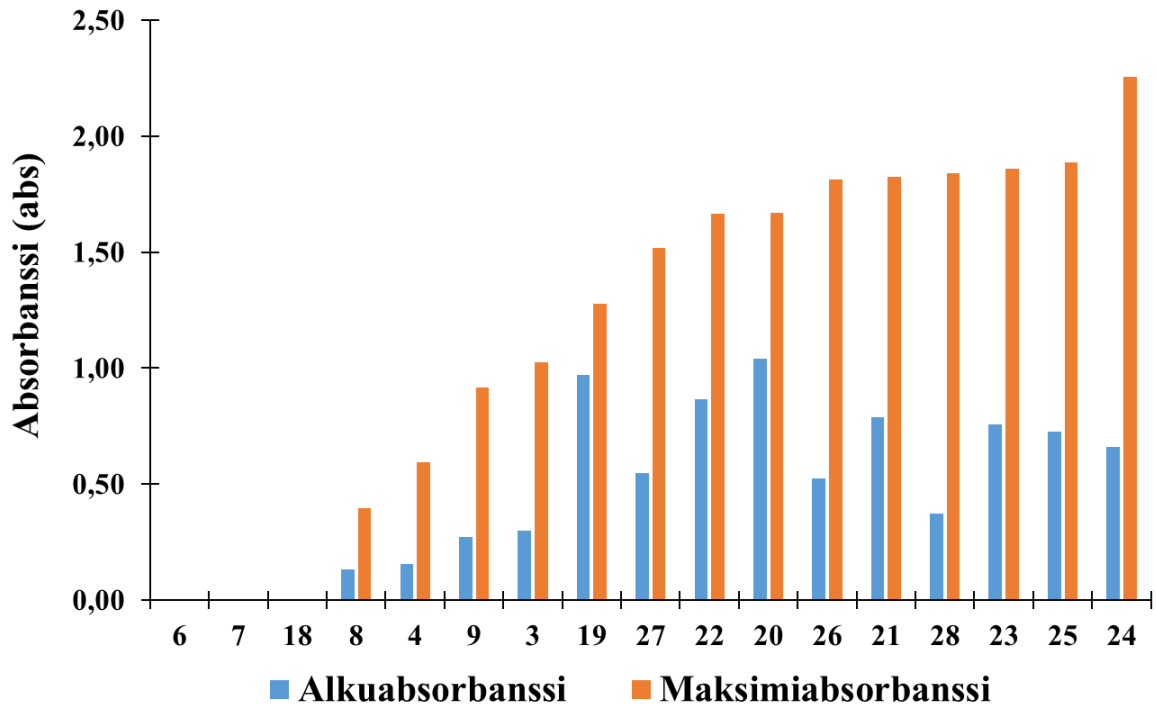


Kuva 22. PGG–BSA -kompleksien antamat maksimiabsorbanssit konsentraatioalueella 0,1–1,0 mM seitsemässä mittapisteessä pH-alueella 4–6 (A). PGG–BSA -kompleksien antamat maksimiabsorbanssit huoneenlämpötilassa ja märehtijän ruumiinlämpötilassa (B).

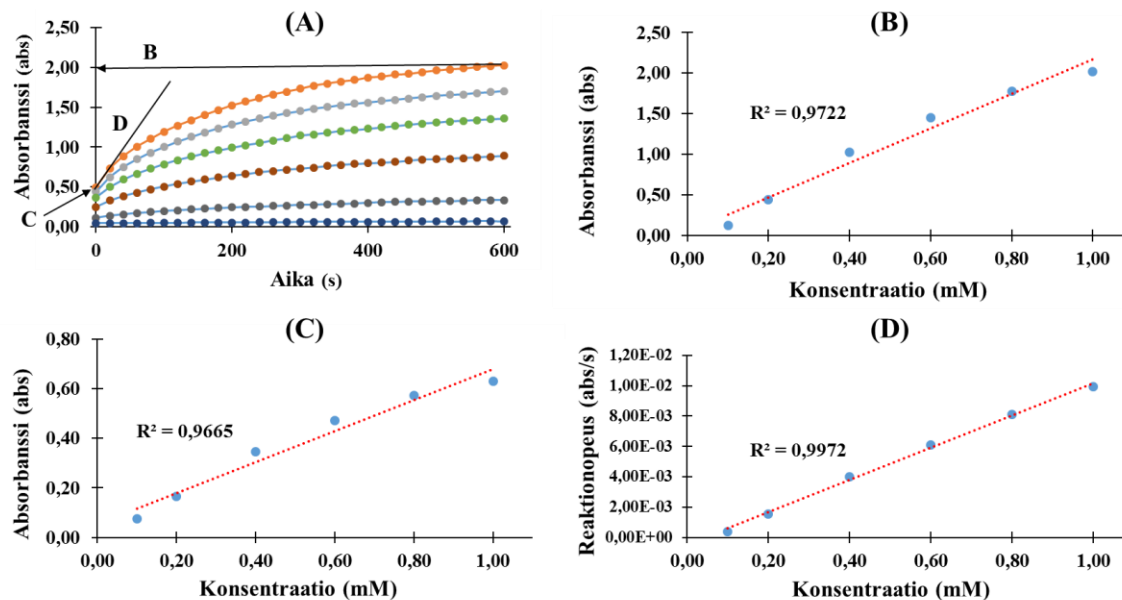
7.4. Hydrolysoituvien tanniinien ja polyetyleeniglykolin väliset liukenemattomat kompleksit

Ennen varsinaisia PEG-mittauksia tehtiin nopea testi, jonka perusteella havaittiin, että 28 yhdisteestä 17 sitoutui PEG:hen niin, että ne muodostivat liukenemattoman kompleksin. Pikatestien jälkeen mitattiin 17 yhdisteen varsinaiset PEG-mittaukset. Mittauksissa

yhdisteiden kompleksien muodostumista seurattiin ajan suhteen kuudessa eri konsentraatiossa. Mittausten perusteella voitiin yhdisteille määrittää maksimiabsorbanssit ja alkuabsorbanssit (Kuva 23, Liite 7). Maksimiabsorbanssi määritettiin samoin kuin BSA:n tapauksessa. Alkuabsorbanssi otettiin mittauksen ensimmäisestä mittapistestä, joka oli tässä tapauksessa myös yhdisteiden alhaisin antama absorbanssiarvo mittauksen aikana. Alkuabsorbanssin avulla voitiin kuvata yhdisteiden välitöntä sitoutumista PEG:hen. Alkuabsorbanssin lisäksi myös reaktionopeus määritettiin aivan mittauksen alusta (Liite 7), mutta sillä kuvattiin taas maksiminopeutta, jolla liukenemattoman kompleksinmuodostuminen tapahtui. Jokaiselle yhdisteelle määritettiin myös kolmen edellä mainitun mitattavan arvon suhteen suorat (Kuva 24), joista edelleen määritettiin kulmakertoimet ja x-akselin leikkauspisteet (Liite 8 ja 9).



Kuva 23. Yhdisteiden PEG-mittauksista määritetyt alkuabsorbanssit ja maksimiabsorbanssit 0,4 mM konsentraatiossa. Tätä suuremmissa konsentraatioissa tapahtui kompleksien uudelleenliukoistumista, jolloin keskiarvon ottaminen kaikista konsentraatioista olisi vääristänyt tuloksia. Tulokset ovat esitetty yhdisteiden kasvavan maksimiabsorbanssin mukaan.



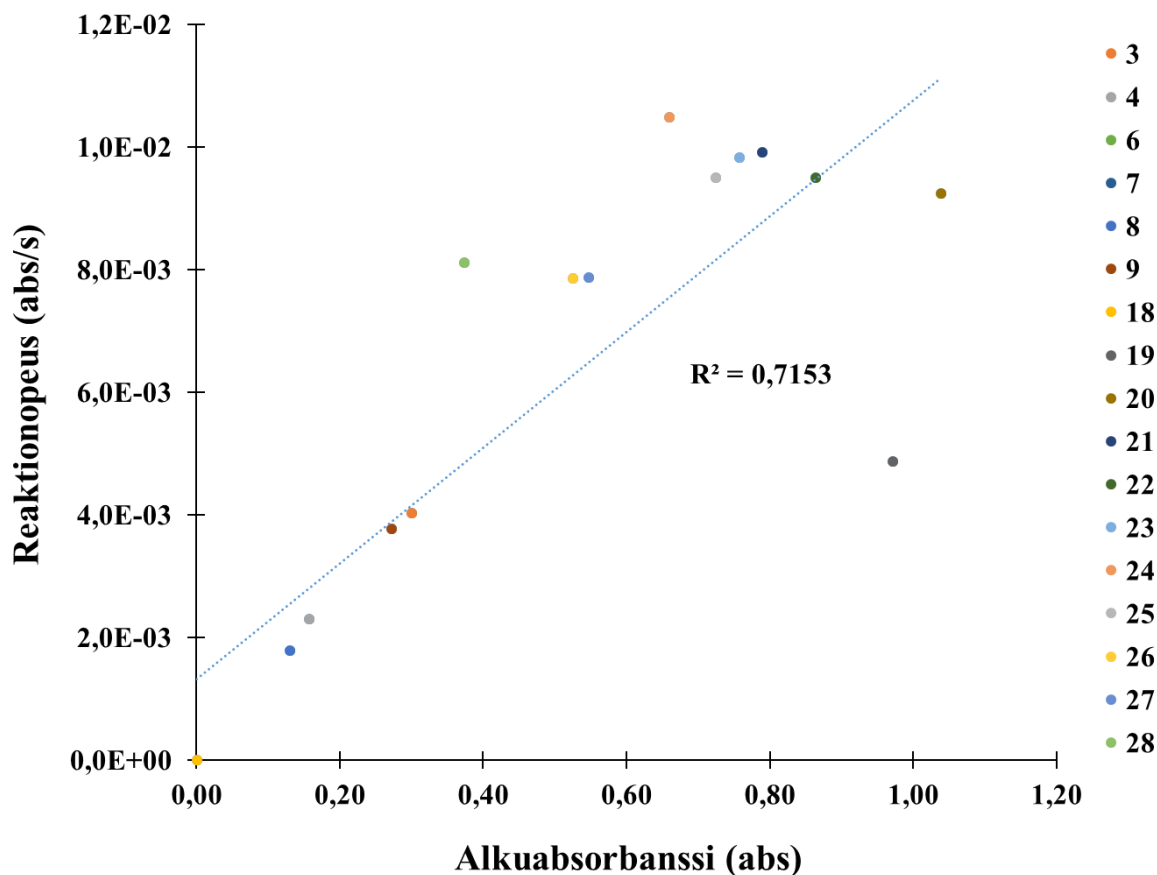
Kuva 24. PGG:n PEG-mittauksessa antamat absorbanssit ajan funktiona (A), mistä määritettiin maksimiabsorbanssi suora (B), alkuabsorbanssi suora (C) ja reaktionopeuden suora (D).

PEG-mittauksista kävi ilmi, että hydrolysoituvien tanniinien molekyylipaino oli tärkeä tekijä myös PEG:hen sitoutumisessa. Kaikki oligomeeriset yhdisteet muodostivat liukenemattoman kompleksin PEG:n kanssa, mutta monomeerisistä hydrolysoituvista tanniineista vain seitsemän yhdistettä muodosti liukenemattoman kompleksin. Monomeeriset avoketjuiset ellagitanniinit eivät kasuariniinia lukuun ottamatta muodostaneet liukenematonta kompleksia. Yhdisteiden funktionaalisten ryhmien vaikutus niiden antamiin PEG-maksimiabsorbanssiin oli melko samanlaista kuin BSA:n tapauksessa. Yksinkertaisin esimerkki oli tässäkin tapauksessa monomeeriset glukopyranoosisokerin omaavat hydrolysoituvat tanniinit, jotka muodostivat liukenemattomia komplekseja PEG:n kanssa samalla logiikalla kuin BSA:kin kanssa. Gallotanniinit antoivat kuitenkin BSA-tuloksiin verrattaessa huomattavasti pienemmän vasteen.

Mielenkiintoisin vertailu voitiin tehdä PEG:n kanssa salikariniineille, jotka BSA-mittauksissa eivät erottuneet toisistaan selvästi. PEG-mittauksissa salikariniini A antoi matalimman maksimiabsorbanssivasteen (1,28 abs), kun taas salikariniini C antoi korkeimman (1,83 abs). Salikariniinit B ja D antoivat vasteet näiden kahden yhdisteen välille (1,67 abs molemmat). Erona salikariniinien rakenteissa on vain niiden sokerin anomeerisen aseman

hydroksyyliiryhmän suuntautuminen. Salikariniini A:lla molemmat hydroksyyliiryhmät olivat β -konfiguraatiossa, kun taas salikariniini C:llä ne olivat α -konfiguraatiossa. Salikariineilla B ja D toinen hydroksyyliiryhmä oli α - ja toinen β -konfiguraatiossa. Tämä osoitti sen, että α -asemassa ollut hydroksyyliiryhmä edesauttaa tanniinien sitoutumista PEG:hen, mutta tätä asiaa ei voitu kuitenkaan varmistaa monomeerien osalta. Maksimiabsorbanssin lisäksi myös alkuabsorbanssin ja reaktionopeuden avulla voitiin tarkastella yhdisteiden erilaisia ominaisuuksia PEG:hen sitoutumisessa.

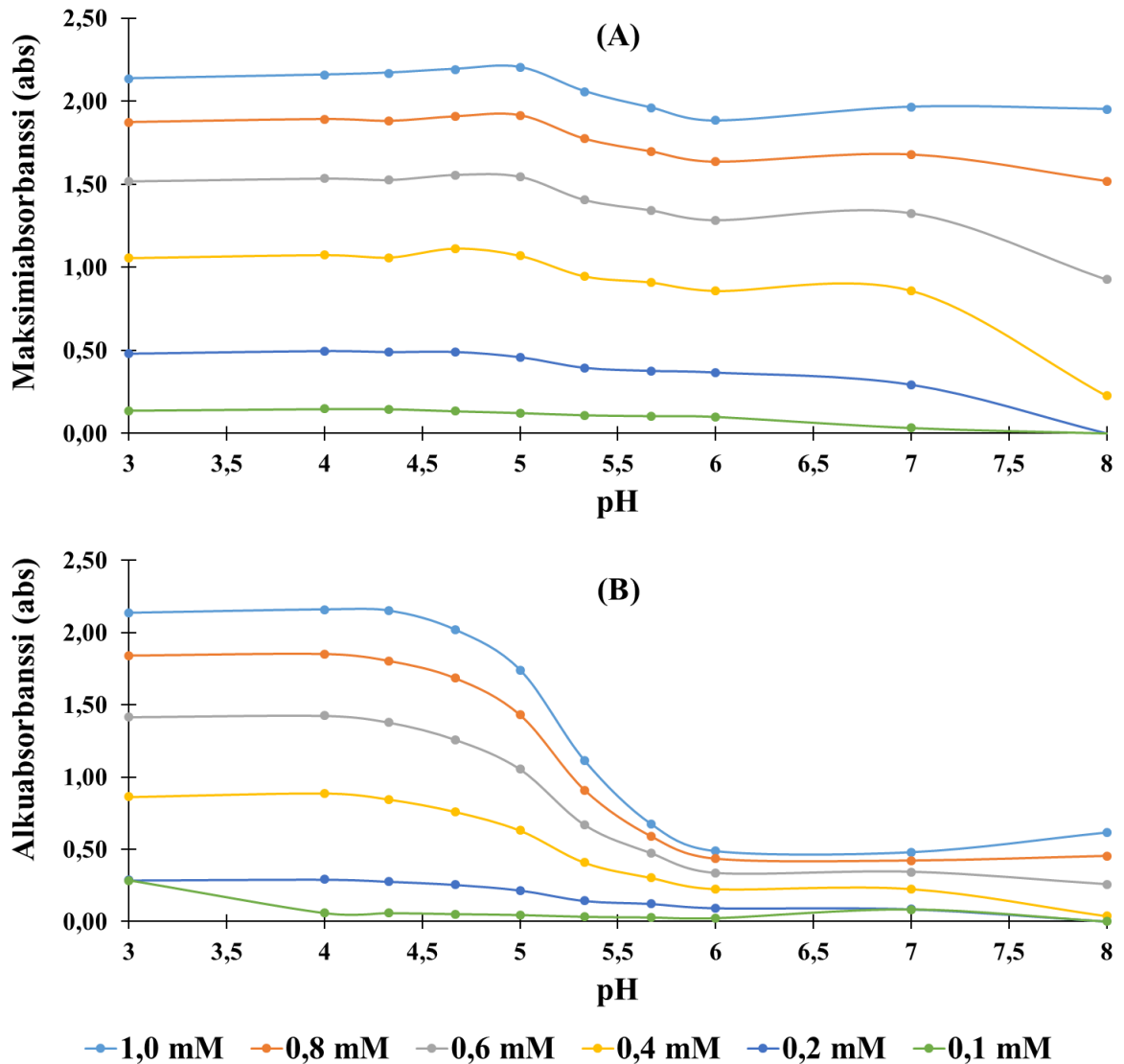
Alkuabsorbanssi ja reaktionopeus kertoivat osittain saman asian yhdisteistä, eli sen kuinka nopeasti ne sitoutuivat PEG:hen, mutta etenkin alkuabsorbanssin tarkastelu oli välttämätöntä, sillä osa yhdisteistä reagoi niin nopeasti PEG:n kanssa, ettei reaktionopeutta ehditty luotettavasti mittaamaan. Kuvassa 25 on yhdisteiden reaktionopeudet esitetty alkuabsorbanssin funktiona. Kaikista suurimman reaktionopeuden antoi lambertianiini C ($1,05E^{-2}$ abs/s), mutta alkuabsorbanssin perusteella salikariniinit reagoivat kuitenkin nopeimmin PEG:n kanssa. Lambertianiini C:n alkuabsorbanssi oli 0,66 abs, kun taas salikariniinien antamat absorbanssit vaihtelivat välillä 0,79–1,04 abs. Salikariniinien keskinäisessä vertailussa salikariniini B:llä oli suurin alkuabsorbanssi (1,04 abs) ja salikariniini C:llä pienin (0,79 abs). Reaktionopeuden mukaan taas salikariniini A olisi muodostanut liukenemattomia komplekseja hitaimmin ($4,87E^{-3}$ abs/s), kun muilla salikariniineilla reaktionopeus oli välillä $9,25E^{-3}$ – $9,91E^{-3}$ abs/s. Yhdisteitä ei voitu siis selkeästi järjestää niiden kompleksinmuodostamisnopeuden mukaan, mutta tulosten perusteella alkuabsorbanssin käyttö tässä kohtaa varmempi vaihtoehto, sillä se saatiin jokaiselle yhdisteelle luotettavasti määritettyä.



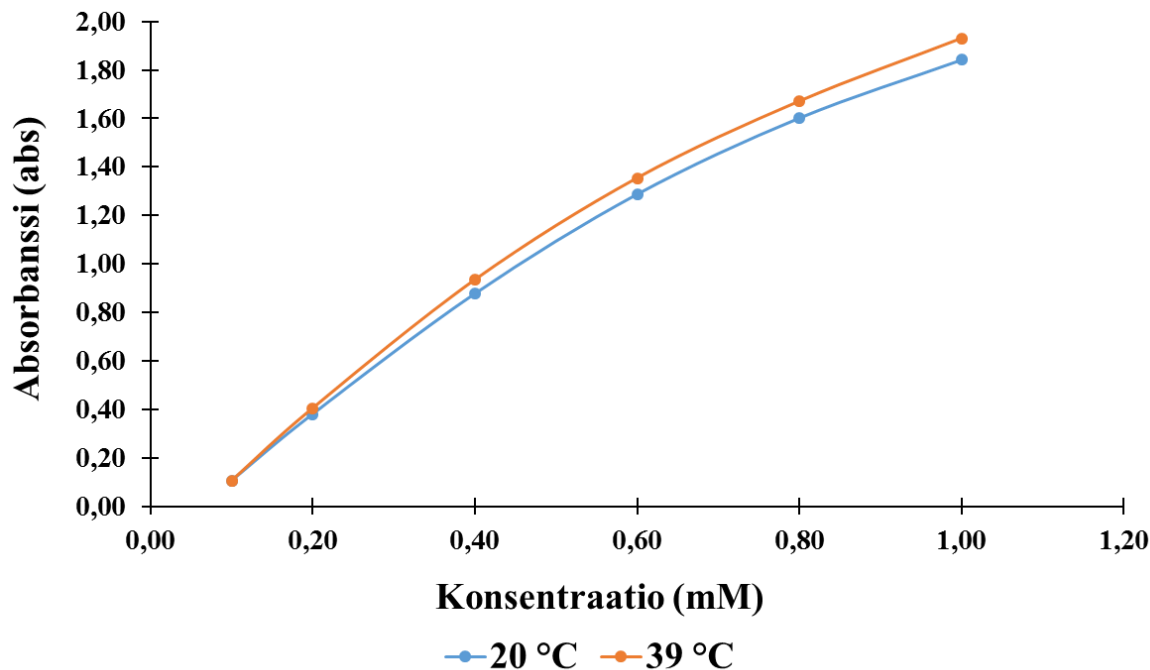
Kuva 25. PEG-mittauksista määritettyjen alkuabsorbanssin ja reaktionopeuden vertailu 0,4 mM konsentraatioissa.

PEG-mittausten lisäksi testattiin pH:n ja lämpötilan vaikutusta menetelmään. Verratessa pH:n vaikutusta PGG-mittausten tuloksiin huomattiin, että pH:n muutos ei vaikuta liukenemattomien kompleksien syntyyn niin paljon kuin BSA:n tapauksessa. Menetelmää testattiin kahdella eri metodilla, joilla ei havaittu suuria eroja. Liukenemattomia PGG-PEG -komplekseja muodostui kaikissa käytetyissä pH:ssa ja vasta pH:n ollessa kahdeksan kompleksien muodostuminen pieniä alhaisissa konsentraatioissa (Kuva 26). Maksimiabsorbanssiin pH:lla ei ollut niin suurta vaikutusta kuin BSA:n tapauksessa, mutta alkuabsorbanssiin ja reaktionopeuteen pH:lla sen sijaan oli vaikutusta, mikä näkyi esimerkiksi alkuabsorbanssin pH-kuvaajassa (Kuva 26). Happamissa olosuhteissa liukenemattoman kompleksin muodostuminen tapahtui huomattavasti nopeammin kuin neutraalissa pH:ssa, missä varsinaiset mittaukset tehtiin. Lämpötila puolestaan hieman kasvatti maksimiabsorbansseja (Kuva 27) ja nopeutti kompleksinmuodostumisreaktiota (Liite

10). Lämpötilalla oli PEG-mittauksiin enemmän vaikutusta kuin BSA-mittauksiin, mutta erot eivät tässäkään tapauksessa olleet niin suuria, etteivätkö tulokset olisi ollut luetettavia huonelämpötilassa tehtyinä. Päinvastoin PEG-mittaukset olisi ollut vaikea toteuttaa toistettavasti märehitjän ruumiinlämpötilassa ja hajonta olisi tässä tapauksessa kasvanut.



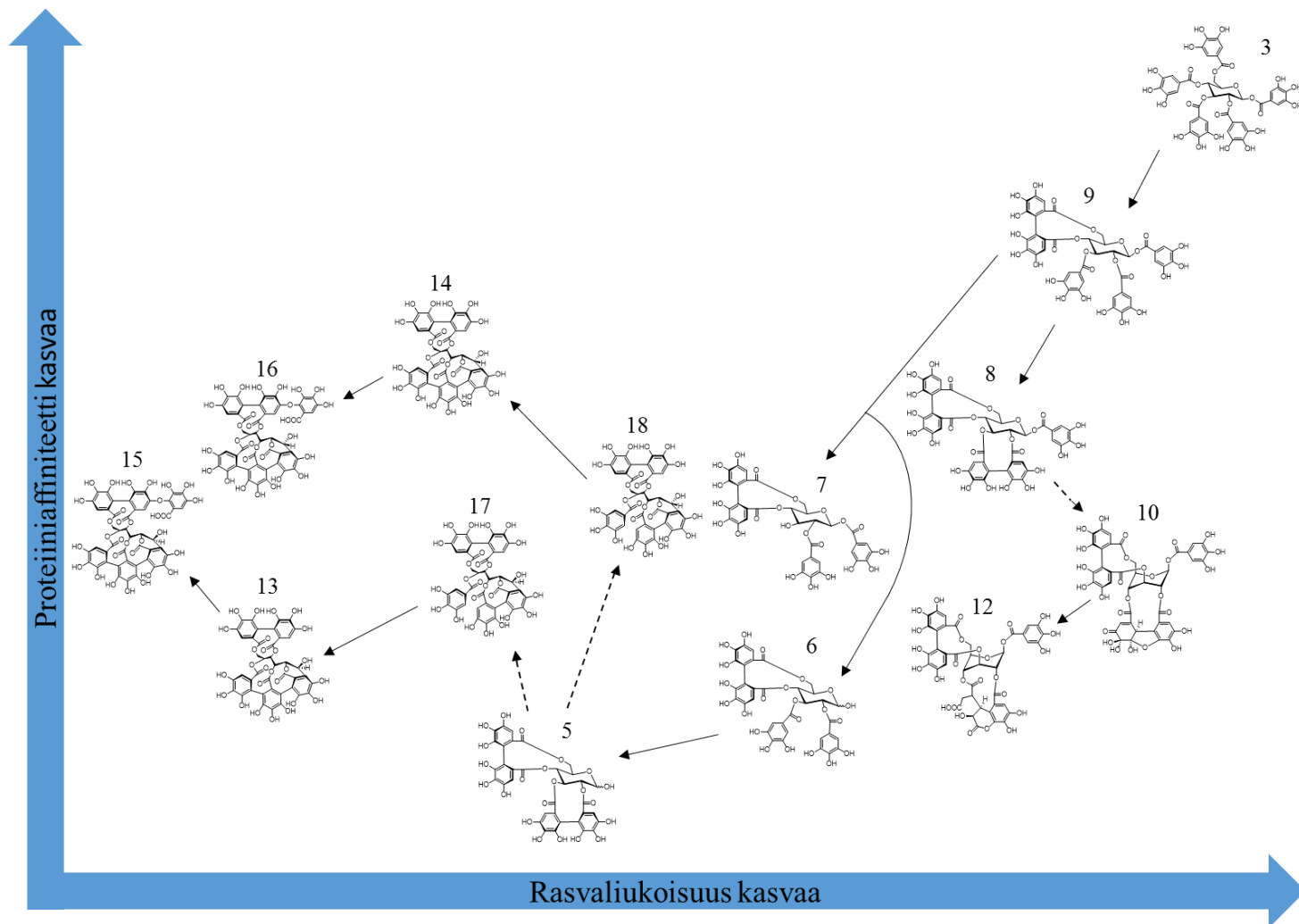
Kuva 26. Liukenemattomien PGG-PEG -kompleksien antamat maksimiabsorbanssit kuudessa konsentraatiossa, kymmenessä pH:ssa pH-alueella 3–8 (A). Samojen kompleksien antamat alkuabsorbanssit kuudessa konsentraatiossa, kymmenessä pH:ssa pH-alueella 3–8 (B).



Kuva 27. Lämpötilan vaikutus liukenemattomien PGG-PEG -kompleksien maksimiabsorbanssivasteisiin.

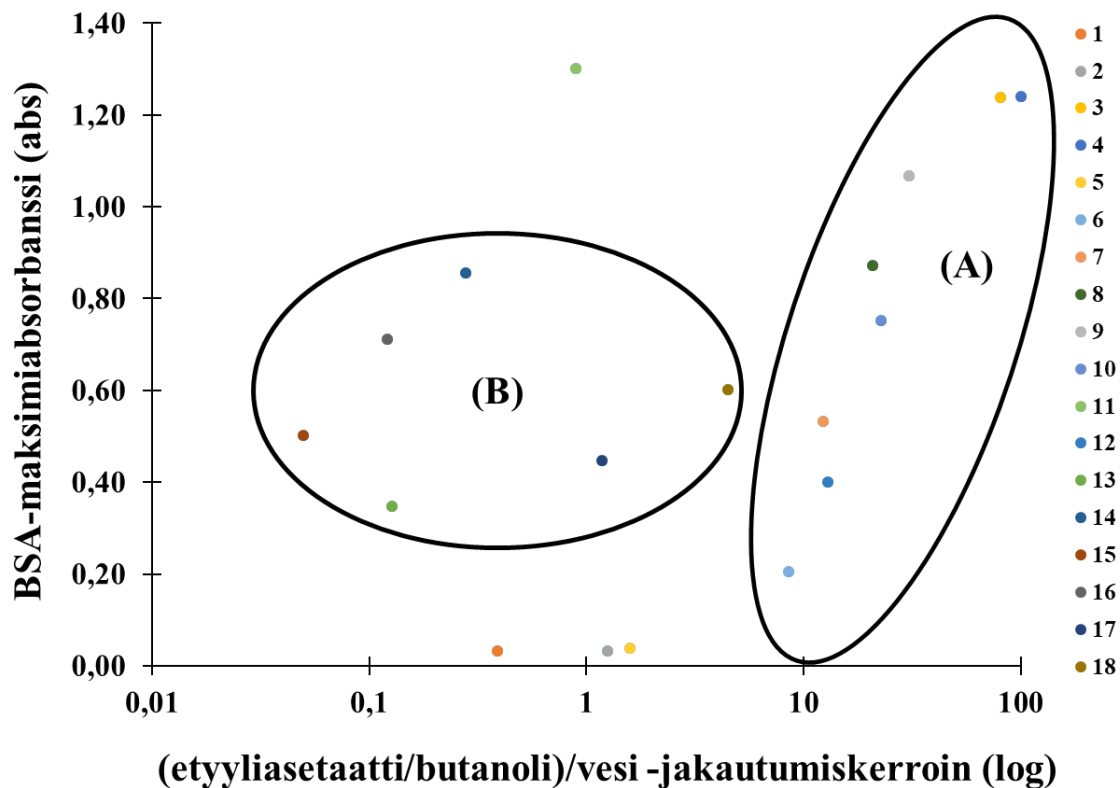
7.5. Hydrolysoituvien tanniinien bioaktiivisuuksien ja kemiallisten ominaisuuksien vertailu

Aikaisemmissa luvuissa tutkittujen hydrolysoituvien tanniinien bioaktiivisuudet ja kemialliset ominaisuudet käsiteltiin erikseen omina kokonaisuuksinaan, mutta tässä luvussa nämä tulokset pyrittiin yhdistämään. Tulosten tarkastelua helpottaakseen hydrolysoituvat tanniinit ovat jaettu erikseen monomeereihin ja oligomeereihin. Monomeerien bioaktiivisuuspolku on esitetty Kuvassa 28. Bioaktiivisuuspolulla pyrittiin helpottamaan yhdisteiden rakenteiden liittämistä niiden mitattuihin bioaktiivisuuksiin ja kemiallisiin ominaisuuksiin. Muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta niin bioaktiivisuuksien kuin kemiallisten ominaisuuksien tulokset olivat loogisia. Loogisella tarkoitettiin oletusta siitä, että PGG:stä poispäin mentäessä bioaktiivisuuspolussa yhdisteiden rasvaliukoisuus ja proteiiniaffiniteetti pienentyvät, sillä galloyyliryhmien määrä yhdisteiden rakenteessa pienenee (Haslam, 1974; McManus et al., 1985).



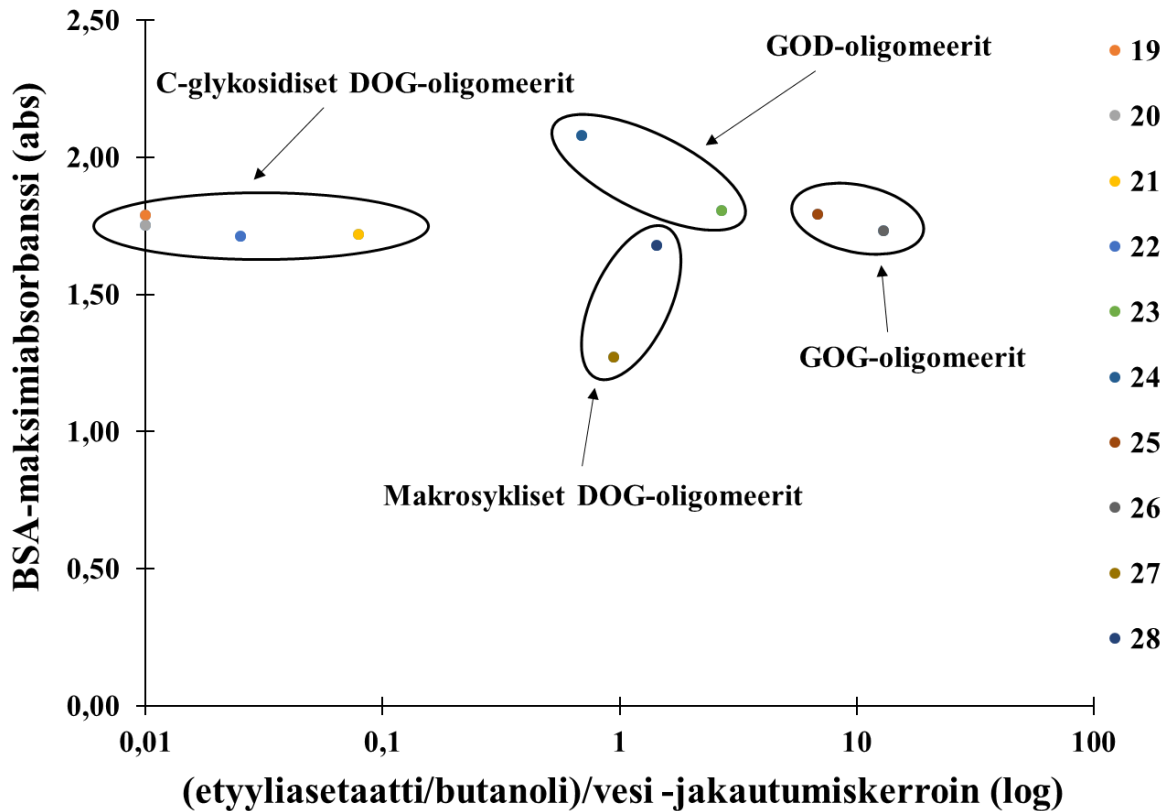
Kuva 28. Monomeeristen hydrolysoituvien tanniinien bioaktiivisuuspolku, jossa yhdisteiden rakennekaavat ovat merkitty BSA-maksimiabsorbanssi-(etyyliasetatti/butanoli)/vesi -koordinaatistoon niiden oletetun biosynteesipolun mukaan.

Paras bioaktiivisuuden ja kemiallisen ominaisuuden välinen korrelaatio saatiin BSA-maksimiabsorbanssilla ja (etyyliasettaatti/butanoli)/vesi -jakautumiskertoimella (Kuva 29). Kuvaajaan on merkitty kaksi aluetta, joista ryhmä A oli glukopyranoosisokerin omaavien hydrolysoituvien tanniinien ryhmä, jossa ryhmän sisällä oli havaittavissa selkeää korrelaatiota BSA-vasteen ja rasvaliukoisuuden välillä. Ryhmässä B kaikki yhdisteet olivat puolestaan avoketjuisia ellagitanniineja, joiden ryhmässä ei ollut samanlaista korrelaatiota havaittavissa. Ryhmien ulkopuolella jäi punikalagiini, joka antoi hyvin korkean BSA-maksimiabsorbanssin kuuden konsentraation keskiarvona, vaikka se oli melko vesiliukoinen yhdiste. Lisäksi monogalloyyyliglukoosi, digalloyylikviinihappo ja pedunkulagiini eivät antaneet kunnon BSA-vastetta ja ne olivat myös huomattavasti vesiliukoisempia kuin muut glukopyranoosisokerin omaavat hydrolysoituvat tanniinit.



Kuva 29. Monomeerien BSA-mittauksista kuuden konsentraation keskiarvona lasketut maksimiabsorbanssit esitetty (etyyliasettaatti/butanoli)/vesi -jakautumiskertoimen funktiona. Kuvaajaan on merkitty glukopyranoosisokerin omaavien hydrolysoituvien tanniinien ryhmä (A) ja avoketjuisten ellagitanniinien ryhmä (B).

Oligomeerejä pyrittiin vertailemaan toisiinsa samoin kuin monomeerejä, mutta niille ei pystytty rakentamaan samanlaista bioaktiivisuuspolkua kuin monomeereille. Niitä voitiin kuitenkin vertailla keskenään neljässä eri ryhmässä, jotka olivat määritetty niiden monomeeriosien välisten sidosten mukaan (Kuva 30).

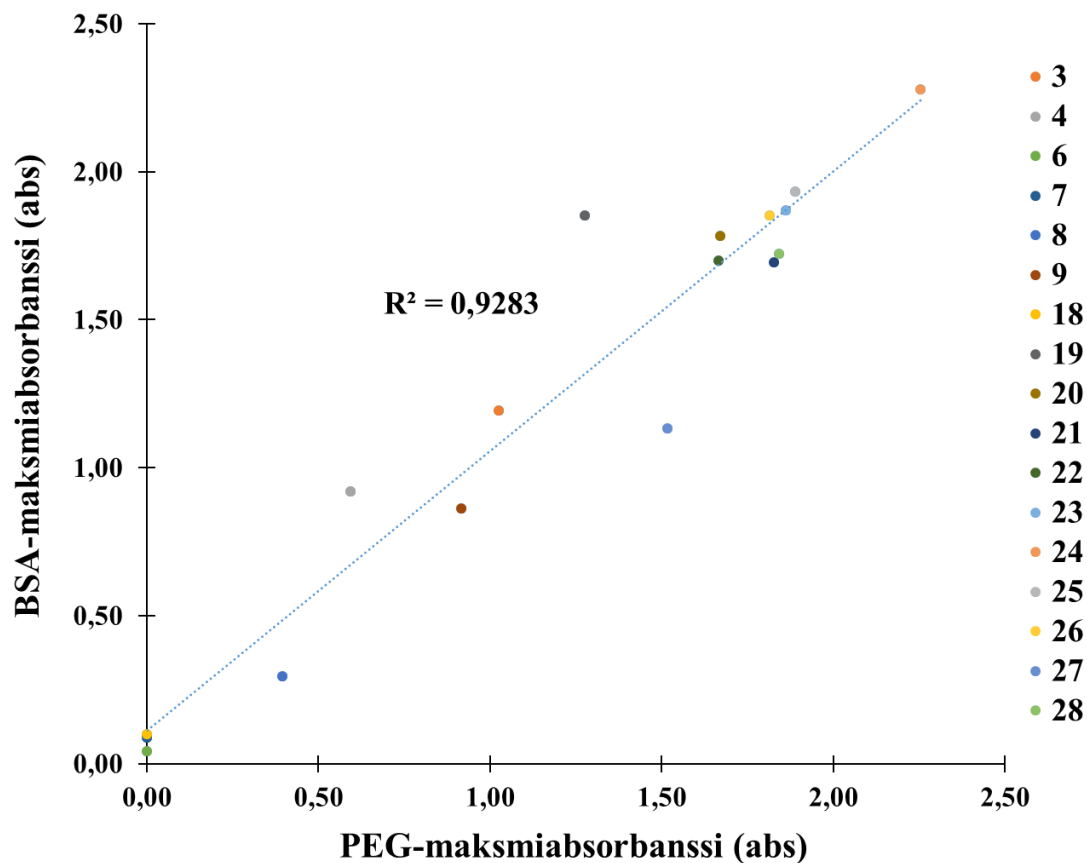


Kuva 30. Oligomeeristen hydrolysoituvien tanniinien BSA-mittausten kuuden konsentraation keskiarvoista lasketut maksimiabsorbanssit esitetty (etyyliasettaatti/butanoli)/vesi -jakautumiskertoimen funktiona. Kuvaajaan on merkitty oligomeerien neljä ryhmää, jotka ovat määritetty niiden monomeeriosien välisten sidosten mukaan.

Oligomeerien rasvaliukoisuudella ei ollut samanlaista vaikutusta liukenemattomien kompleksien muodostumiseen kuin monomeereilla. Gemiini A oli rasvaliukoisin oligomeeri neste-nesteuuttojen perusteella ja se pidättyi myös pisimpään Sephadex LH-20 -geelissä, mutta se ei kuitenkaan antanut korkeimpia BSA-maksimiabsorbansseja muihin oligomeereihin verrattuna. Itse asiassa oligomeereistä vain oenothiini B muodosti liukenemattomia komplekseja selvästi huonommin ja lambertianiini C selvästi paremmin kuin muut oligomeerit, vaikka molempien yhdisteiden

(etyyliasettaatti/butanoli)/vesi -jakautumiskerroin oli noin yksi. Tästä voitiin päätellä, että yhdisteiden rasvaliukoisuudella ei oligomeerien tapauksessa kannata yrittää arvioida, kuinka hyvin ne muodostavat liukenemattomia komplekseja. Parempi tapa arvioida oligomeerien liukenemattomien kompleksien muodostuskykyä on tarkastella niiden oligomerisointumistasetta ja selvittää millaisia fenolisia ryhmiä sekä monomeeriosien välisiä sidoksia oligomeerissa on.

Oligomeerit eivät korreloineet rasvaliukoisuuden kanssa niin hyvin kuin monomeerit, mutta niistä mitatut bioaktiivisuudet korreloivat kuitenkin melko hyvin toistensa kanssa. Kuvassa 31 on esitetty BSA-maksimiabsorbanssit PEG-maksimiabsorbanssien funktiona konsentraatiossa 0,4 mM. Kuvaajaan on merkitty kaikki yhdisteet, jotka antoivat sekä BSA- että PEG-vasteen.



Kuva 31. BSA- ja PEG-maksimiabsorbanssien vertailu 0,4 mM konsentraatiossa. Kuvaajassa on esitetty vain ne yhdisteet, jotka antoivat sekä BSA- että PEG-vasteet.

Monomeereista kasuariktiini ja tellimagrandiini II antoivat suhteessa korkeamman maksimikonsentraation PEG-mittauksessa kuin BSA-mittauksessa. Korkeamman PEG-vasteen antoivat oligomeereistä puolestaan oenothiini B ja A sekä salikariniini C. BSA-maksimiabsorbanssi oli taas selvästi korkeampi kuin PEG-maksimiabsorbanssi monomeereistä PGG:llä sekä gallotanniiniseoksella ja oligomeereistä salikariniini A:lla. Muut yhdisteet antoivat melko saman suuruiset vasteet sekä BSA- että PEG-mittauksissa 0,4 mM konsentraatiossa.

8. Johtopäätökset

Tanniinien ja proteiinien välinen vuorovaikutus on tunnettu jo pitkään ja aiheesta on tehty monia tutkimuksia vuosien varrella. Melko vähän on kuitenkin tehty tutkimuksia, joissa useiden hydrolysoituvien tanniinien proteiiniaffiniteettia on tutkittu samassa tutkimuksessa tietyllä metodilla. Etenkin tarvittaisiin lisää tutkimuksia, joissa on tutkittu useita hydrolysoituvia tanniineja, jotka eroavat toisistaan vain pienillä rakenteellisilla eroilla. Rakenne-aktiivisuus -tutkimus on paikoin hyvin haastavaa, kun vertailua joudutaan tekemään yhdisteiden kesken, jotka eroavat toisistaan useammalla kuin vain yhdellä rakenteellisella erolla. Tällöin saatetaan nostaa tiettyä rakenteellista yksityiskohtaa tärkeäksi tekijäksi proteiiniaffiniteetin kannalta, vaikka ero affiniteeteissa saattaakin johtua aivan toisesta syystä. Edelleen haastavammaksi rakenne-aktiivisuus -tutkimuksen tekee se, että hydrolysoituvien tanniinien ja proteiinien välistä vuorovaikutusta on tutkittu hyvin monilla eri menetelmillä, jolloin tutkimusten välillä ei voida tehdä vertailua suoraviivaisesti yhdisteiden kesken. Muutamia tutkimuksia on kuitenkin tehty, joissa on käytetty hyvin laajaa joukkoa erilaisia hydrolysoituvia tanniineja ja nämä tutkimukset ovatkin elintärkeitä rakenne-aktiivisuus -tutkimuksen kannalta (Okuda et al., 1985).

Tämän työn kirjallisessa osassa havaittiin, että hydrolysoituvien tanniinien ja proteiinien välistä vuorovaikutusta on tutkittu huomattavasti enemmän kuin niiden vuorovaikutuksia muiden makromolekyylien kanssa. Hydrolysoituvien tanniinien rakenteessa samat tekijät olivat tärkeitä makromolekyyliin sitoutumisessa, oli kyse sitten proteiineista tai muista makromolekyyleistä. Tärkeitä tekijöitä olivat yhdisteiden molekyylipaino sekä rakenteen joustavuus ja fenoliset ryhmät. Molekyylipainolla oli selkeä vaikutus proteiiniin sitoutumisessa (Karonen et al., 2015), mutta hyvin pienilläkin

rakenteellisilla tekijöillä saattoi olla vaikutusta yhdisteiden proteiiniaffiniteettiin (Feldman et al., 1999). Sen lisäksi mm. hydrolysoituvien tanniinien vesiliukoisuudella ja Sephadex-kromatografialla voitiin arvioida melko hyvin niiden proteiiniaffiniteettia (Tanaka et al., 1997; Moilanen et al., 2013;). PGG:lle on tehty tutkimuksia myös usealla eri makromolekyylillä samassa tutkimuksessa (Takechi ja Tanaka, 1987; He et al., 2006) ja sen affiniteettia eri makromolekyyleihin on tutkittu tarkemmin. Ozawan tutkimusryhmineen (Ozawa et al., 1987) tekemän tutkimuksen lisäksi puuttuvat kuitenkin kokonaan julkaisut, joissa olisi käytetty useita hydrolysoituvia tanniineja ja testattu näitä yhdisteitä useilla makromolekyyleillä, jolloin saataisiin selkeämpi kuva siitä, miten PGG:n lisäksi myös muut yhdisteet sitoutuvat laajaan joukkoon erilaisia makromolekyylejä.

Tämän työn kokeellisessa osassa saatiin spektrofotometrisesti määritettyä, kuinka hyvin hydrolysoituvat tanniinit muodostivat liukenemattomia komplekseja BSA:n ja PEG:n kanssa. Näille oli yhteistä se, että hydrolysoituvien tanniinien molekyylipaino oli molemmissa tapauksissa suurin selittävä tekijä liukenemattomien kompleksien muodostumiseen. BSA:n tulokset olivat muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta selkeitä ja ne voitiin yhdistää melko helposti yhdisteiden rakenteisiin ja kemiallisiin ominaisuuksiin. BSA:n tuloksista muodostettiin laskukaava, jolla pystyttiin melko hyvin ennustamaan yhdisteiden antamat BSA-maksimiabsorbanssit. PEG:n tulokset olivat BSA:n tuloksia moniulotteisempia, sillä hyvin moni monomeeri ei muodostanut liukenematonta kompleksia ja mittausten aikana tapahtui myös kompleksien uudelleenliukoistumista, mikä vaikeutti tuloksien tulkintaa. PEG:n tuloksista kävi kuitenkin ilmi, että se ei muodosta liukenemattomia komplekseja hydrolysoituvien tanniinien kanssa samalla tavalla kuin BSA, vaikka useissa märehtijätutkimuksissa näin kuitenkin oletetaan. BSA- ja PEG-vasteiden lisäksi työssä määritettiin hydrolysoituville tanniineille (etyyliasetatti/butanoli 1/1)/vesi 1/1 (v/v) ja (MTBE/butanoli 1/1)/vesi 1/1 (v/v) -jakautumiskertoimet sekä niiden pidätykset Sephadex LH-20 -geeliin. Etenkin jakautumiskertoimista saatiin tietoa yhdisteiden suhteellisesta vesiliukoisuudesta, jota voitiin edelleen käyttää hyväksi bioaktiivisuustuloksien tulkinnassa ja selittämisessä. Lämpötilan ja pH:n vaikutus liukenemattomien kompleksien muodostumiseen saatiin myös tutkittua PGG:n kanssa, mutta edelleen jäi epäselväksi, miten muut hydrolysoituvat tanniinit muodostavat liukenemattomia komplekseja esimerkiksi muuttuvissa pH-olosuhteissa.

Kirjallisen ja kokeellisen osan tuloksia vertaillen voitiin havaita, että tässä tutkimuksessa tehtiin ensimmäistä kertaa liukenemattomia tanniini-BSA -kompleksoitumismittauksia kattavalla joukolla hydrolysoituvia tanniineja ja näiden tulosten perusteella tehtiin myös tulkintoja rakenne-aktiivisuus -näkölmästä, jotka useasta aikaisemmasta tutkimuksesta puuttuivat, vaikka tuloksista niitä olisi voitukin tehdä. Tuloksista voitiin havaita myös, että kokeellisesti mitatut BSA-vasteet vastasivat melko hyvin aikaisempia tuloksia kirjallisuudesta, kun taas PEG:llä mitattiin vasta ensimmäistä kertaa liukenemattomia komplekseja puhdasaineiden kanssa. Joka tapauksessa OptiFeed-projekti sai tästä työstä paljon arvokasta tietoa hydrolysoituvien tanniinien rakenne-aktiivisuus -tutkimukseen, kun samassa tutkimuksessa määritettiin yhdisteille sekä bioaktiivisuuksia, että kemiallisia ominaisuuksia ja pohdittiin näiden tekijöiden välisiä yhteyksiä.

Viitteet

Bacon, J. R.; Rhodes, M. Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 838-843.

Bacon, J. R.; Rhodes, M. Development of a competition assay for the evaluation of the binding of human parotid salivary proteins to dietary complex phenols and tannins using a peroxidase-labeled tannin. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5083-5088.

Baert, N.; Pellikaan, W. F.; Karonen, M.; Salminen, J.-P. A study of the structure-activity relationship of oligomeric ellagitannins on ruminal fermentation in vitro. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 8041-8052.

Bajec, M. R.; Pickering, G. J. Astringency: Mechanisms and perception. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, *48*, 858-875.

Baxter, N. J.; Lilley, T. H.; Haslam, E.; Williamson, M. P. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry* **1997**, *36*, 5566-5577.

Beart, J. E.; Lilley, T. H.; Haslam, E. Plant Polyphenols - Secondary Metabolism and Chemical Defense - some Observations. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 33-38.

Britton, G.; Crabtree, P. W.; Haslam, E.; Stangroo, J. E. Gallotannins. Structure of Chinese Gallotannin - Evidence for a Polygalloyl Chain. *Journal of the Chemical Society C-Organic* **1966**.

Charlton, A. J.; Baxter, N. J.; Lilley, T. H.; Haslam, E.; McDonald, C. J.; Williamson, M. P. Tannin interactions with a full-length human salivary proline-rich protein display a stronger affinity than with single proline-rich repeats. *FEBS Lett.* **1996**, *382*, 289-292.

Chen, Y. M.; Hagerman, A. E. Characterization of soluble non-covalent complexes between bovine serum albumin and beta-1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-D-glucopyranose by MALDI-TOF MS. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4008-4011.

Deaville, E. R.; Green, R. J.; Mueller-Harvey, I.; Willoughby, I.; Frazier, R. A. Hydrolyzable tannin structures influence relative globular and random coil protein binding strengths. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4554-4561.

Dobreva, M. A.; Green, R. J.; Mueller-Harvey, I.; Salminen, J.-P.; Howlin, B. J.; Frazier, R. A. Size and Molecular Flexibility Affect the Binding of Ellagitannins to Bovine Serum Albumin. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 9186-9194.

Engström, M.T.; Arvola, J.; Nenonen, S.; Virtanen, V.; Leppä, M.M.; Salminen, J.-P. Structural features of hydrolysable tannins determine their ability to form insoluble complexes with bovine serum albumin. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *24*, 6798-6808.

Engström, M. T.; Karonen, M.; Ahern, J. R.; Baert, N.; Payre, B.; Hoste, H.; Salminen, J.-P. Chemical Structures of Plant Hydrolyzable Tannins Reveal Their in Vitro Activity against Egg Hatching and Motility of *Haemonchus contortus* Nematodes. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 840-851.

Feldman, K. S.; Sambandam, A.; Lemon, S. T.; Nicewonger, R. B.; Long, G. S.; Battaglia, D. F.; Ensel, S. M.; Laci, M. A. Binding affinities of gallotannin analogs with bovine serum albumin: ramifications for polyphenol-protein molecular recognition. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 867-872.

Frazier, R. A.; Papadopoulou, A.; Mueller-Harvey, I.; Kisson, D.; Green, R. J. Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5189-5195.

Hagerman, A. E.; Rice, M. E.; Ritchard, N. T. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin (16) (4 -> 8) catechin (procyanidin). *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2590-2595.

Haslam, E. Polyphenol-Protein Interactions. *Biochem. J.* **1974**, *139*, 285-288.

Haslam, E.; Keen, P. C.; Haworth, R. D. Gallotannins. Tara Gallotannin. *Journal of the Chemical Society* **1962**.

Haslam, E.; Lilley, T. H. Natural Astringency in Foodstuffs - a Molecular Interpretation. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1988**, *27*, 1-40.

Haslam, E.; Lilley, T. H.; Cai, Y.; Martin, R.; Magnolato, D. Traditional Herbal Medicines - the Role of Polyphenols. *Planta Med.* **1989**, 1-8.

Hatano, T.; Hattori, S.; Okuda, T. Tannins of *Coriaria-Japonica* a Gray .1. Coriariin-a and Coriariin-B, New Dimeric and Monomeric Hydrolyzable Tannins. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 4092-4097.

Hatano, T.; Hori, M.; Hemingway, R. W.; Yoshida, T. Size exclusion chromatographic analysis of polyphenol-serum albumin complexes. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 817-823.

He, Q.; Shi, B.; Yao, K. Interactions of gallotannins with proteins, amino acids, phospholipids and sugars. *Food Chem.* **2006**, *95*, 250-254.

Hofmann, T.; Glabasnia, A.; Schwarz, B.; Wisman, K. N.; Gangwer, K. A.; Hagerman, A. E. Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9503-9509.

Karonen, M.; Oraviita, M.; Mueller-Harvey, I.; Salminen, J.- P.; Green, R. J. Binding of an Oligomeric Ellagitannin Series to Bovine Serum Albumin (BSA): Analysis by Isothermal Titration Calorimetry (ITC). *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 10647-10654.

Kawamoto, H.; Iwatsuru, S.; Nakatsubo, F.; Murakami, K. Convenient synthesis of galloylglucoses. *Mokuzai Gakkaishi* **1996**, *42*, 868-874.

Kawamoto, H.; Nakatsubo, F. Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 479-483.

Kawamoto, H.; Nakatsubo, F.; Murakami, K. Quantitative-Determination of Tannin and Protein in the Precipitates by High-Performance Liquid-Chromatography. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1503-1505.

Kawamoto, H.; Nakatsubo, F.; Murakami, K. Stoichiometric studies of tannin-protein co-precipitation. *Phytochemistry* **1996a**, *41*, 1427-1431.

Kilkowski, W. J.; Gross, G. G. Color reaction of hydrolyzable tannins with Bradford reagent, Coomassie brilliant blue. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 363-366.

Le Bourvellec, C.; Renard, C. M. Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2012**, *52*, 213-248.

McManus, J. P.; Davis, K. G.; Beart, J. E.; Gaffney, S. H.; Lilley, T. H.; Haslam, E. Polyphenol Interactions. Introduction - some Observations on the Reversible Complexation of Polyphenols with Proteins and Polysaccharides. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **1985**, 1429-1438.

Moilanen, J.; Sinkkonen, J.; Salminen, J.-P. Characterization of bioactive plant ellagitannins by chromatographic, spectroscopic and mass spectrometric methods. *Chemoecology* **2013**, *23*, 165-179.

Mueller-Harvey, I.; Mlambo, V.; Sikosana, J. L. N.; Smith, T.; Owen, E.; Brown, R. H. Octanol-water partition coefficients for predicting the effects of tannins in ruminant nutrition. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5436-5444.

Naczki, M.; Oickle, D.; Pink, D.; Shahidi, F. Protein precipitating capacity of crude canola tannins: Effect of pH, tannin, and protein concentrations. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2144-2148.

Okuda, T.; Hatano, T.; Nitta, H.; Fujii, R. Hydrolyzable Tannins having Enantiomeric Dehydrohexahydroxydiphenoyl Group - Revised Structure of Terchebin and Structure of Granatin-B. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 4361-4364.

Okuda, T.; Hatano, T.; Ogawa, N. Rugosin-D, Rugosin-E, Rugosin-F and Rugosin-G, Dimeric and Trimeric Hydrolyzable Tannins. *Chem. Pharm. Bull.* **1982b**, *30*, 4234-4237.

Okuda, T.; Hatano, T.; Ogawa, N.; Kira, R.; Matsuda, M. Cornusiiin-A, a Dimeric Ellagitannin Forming 4 Tautomers, and Accompanying New Tannins in Cornus-Officinalis. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 4662-4665.

Okuda, T.; Hatano, T.; Yazaki, K.; Ogawa, N. Rugosin-A, Rugosin-B, Rugosin-C and Praecoxin-A, Tannins having a Valoneoyl Group. *Chem. Pharm. Bull.* **1982a**, *30*, 4230-4233.

Okuda, T.; Mori, K.; Hatano, T. Effects of the Interaction of Tannins with Coexisting Substances. Relationship of the Structures of Tannins to the Binding Activities with Hemoglobin and Methylene-Blue. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 1424-1433.

Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T. Classification of Oligomeric Hydrolyzable Tannins and Specificity of their Occurrence in Plants. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 507-521.

Ozawa, T.; Lilley, T. H.; Haslam, E. Polyphenol Interactions. Polyphenol Interactions - Astringency and the Loss of Astringency in Ripening Fruit. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2937-2942.

Patra, A. K.; Saxena, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*, 24-37.

Quideau, S.; Feldman, K. S. Ellagitannin chemistry. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 475-503.

Richard, T.; Lefeuvre, D.; Descendit, A.; Quideau, S.; Monti, J. P. Recognition characters in peptide-polyphenol complex formation. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2006**, *1760*, 951-958.

Salminen, J.-P.; Karonen, M. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Funct. Ecol.* **2011**, *25*, 325-338.

Sekowski, S.; Bitiucki, M.; Ionov, M.; Zdeb, M.; Abdulladjanova, N.; Rakhimov, R.; Mavlyanov, S.; Bryszewska, M.; Zamaraeva, M. Influence of valoneoyl groups on the interactions between Euphorbia tannins and human serum albumin. *J Lumin* **2018**, *194*, 170-178.

Sekowski, S.; Ionov, M.; Kaszuba, M.; Mavlyanov, S.; Bryszewska, M.; Zamaraeva, M. Biophysical studies of interaction between hydrolysable tannins isolated from *Oenothera gigas* and *Geranium sanguineum* with human serum albumin. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2014**, *123*, 623-628.

Shimozu, Y.; Hirai, T.; Hatano, T. Coriariin M, a trimeric hydrolysable tannin with dehydrodigalloyl and valoneoyl groups as linking units, and accompanying dimeric hydrolysable tannins from *Coriaria japonica*. *Phytochemistry* **2018**, *151*, 110-118.

Shimozu, Y.; Kuroda, T.; Tsuchiya, T.; Hatano, T. Structures and Antibacterial Properties of Isorugosins H-J, Oligomeric Ellagitannins from *Liquidambar formosana* with Characteristic Bridging Groups between Sugar Moieties. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2723-2733.

Takechi, M.; Tanaka, Y. Binding of 1,2,3,4,6-Pentagalloylglucose to Proteins, Lipids, Nucleic-Acids and Sugars. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 95-97.

Haslam, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 205-215.

Tanaka, T.; Zhang, H.; Jiang, Z. H.; Kouno, I. Relationship between hydrophobicity and structure of hydrolyzable tannins, and association of tannins with crude drug constituents in aqueous solution. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1891-1897.

Tang, H. R.; Covington, A. D.; Hancock, R. A. Structure-activity relationships in the hydrophobic interactions of polyphenols with cellulose and collagen. *Biopolymers* **2003**, *70*, 403-413.

Toda, M.; Kawabata, J.; Kasai, T. Inhibitory effects of ellagi- and gallotannins on rat intestinal alpha-glucosidase complexes. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2001**, *65*, 542-547.

Yoshida, T.; Yazaki, K.; Memon, M. U.; Maruyama, I.; Kurokawa, K.; Shingu, T.; Okuda, T. Structures of Alnusiin and Bicornin, New Hydrolyzable Tannins having a Monolactonized Tergalloyl Group. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2655-2660.

Liite 1. Yhdisteiden UHPLC-DAD-MS -menetelmällä määritetyt molekyyli­massat, retentioajat, UV-maksimit ja MS-ionit.

Yhdiste	Molekyyli­massa (Da)	Retentioaika (min)	λ_{\max} (nm)	Havaitut ionit (m/z)
1	332	1,24	217, 277	331 [M-H] ⁻
2	496	2,78	219, 275	495 [M-H] ⁻
3	940	4,33	223, 279	939 [M-H] ⁻ , 469 [M-2H] ²⁻
4	1396	5,00	-	1091 [M-H] ⁻ , 1243 [M-H] ⁻ , 1395 [M-H] ⁻
5	784	2,69	229	783 [M-H] ⁻ , 391 [M-2H] ²⁻
6	786	3,22	220, 273	785 [M-H] ⁻ , 392 [M-2H] ²⁻
7	786	3,67	223, 276	785 [M-H] ⁻
8	936	3,80	226	935 [M-H] ⁻ , 467 [M-2H] ²⁻
9	938	3,99	223, 278	937 [M-H] ⁻ , 468 [M-2H] ²⁻
10	952	3,41	224, 276	951 [M-H] ⁻ , 933 [M-H ₂ O-H] ⁻
11	1084	2,83	226, 258, 379	1083 [M-H] ⁻ , 541 [M-2H] ²⁻
12	954	3,91	228, 275	953 [M-H] ⁻ , 476 [M-2H] ²⁻
13	934	2,26	231	933 [M-H] ⁻ , 915 [M-H ₂ O-H] ⁻ , 457 [M-H ₂ O-2H] ²⁻
14	934	2,61	231	933 [M-H] ⁻ , 466 [M-2H] ²⁻
15	1102	2,01	231	1101 [M-H] ⁻ , 1083 [M-H ₂ O-H] ⁻
16	1102	2,21	231	1101 [M-H] ⁻
17	936	3,06	227	935 [M-H] ⁻ , 917 [M-H ₂ O-H] ⁻ , 467 [M-2H] ²⁻
18	936	3,19	226	935 [M-H] ⁻ , 467 [M-2H] ²⁻
19	1868	2,27	238	1867 [M-H] ⁻ , 924 [M-H ₂ O-2H] ²⁻ , 915 [M-2H ₂ O-2H] ²⁻
20	1868	2,59	238	1867 [M-H] ⁻ , 933 [M-2H] ²⁻ , 924 [M-H ₂ O-2H] ²⁻
21	1868	2,75	235	1867 [M-H] ⁻ , 933 [M-2H] ²⁻
22	1868	2,51	235	1867 [M-H] ⁻ , 933 [M-2H] ²⁻ , 924 [M-H ₂ O-2H] ²⁻
23	1870	3,87	226	1869 [M-H] ⁻ , 934 [M-2H] ²⁻
24	2804	3,79	226	1401 [M-2H] ²⁻
25	1870	4,15	229	1869 [M-H] ⁻ , 934 [M-2H] ²⁻
26	1872	4,05	225, 272	1871 [M-H] ⁻ , 935 [M-2H] ²⁻
27	1568	2,93	226, 261	1567 [M-H] ⁻ , 783 [M-2H] ²⁻
28	2352	3,27	225, 261	1175 [M-H] ⁻

Liite 2.

Puhdasaineiden punnitut massat kuoppalevymittauksiin.

Yhdiste	BSA-mittaukseen punnittu massa (mg)	PEG-mittaukseen punnittu massa (mg)
1	1,16	-
2	1,74	-
3	3,29	2,91
4	4,88	4,33
5	2,74	-
6	2,75	2,44
7	2,75	2,44
8	3,28	2,90
9	3,28	2,91
10	3,33	-
11	3,79	-
12	3,34	-
13	3,27	-
14	3,27	-
15	3,86	-
16	3,86	-
17	3,28	-
18	3,28	2,90
19	6,54	5,79
20	6,54	5,79
21	6,54	5,79
22	6,54	5,79
23	6,55	5,80
24	9,81	8,69
25	6,55	5,80
26	6,55	5,80
27	5,48	4,86
28	8,23	7,29

Liite 3.

Sitraatti-fosfaattipuskurin valmistusohjeet. Liuos A sisälsi 19,21g/l sitruunahappoa ja liuos B sisälsi 53,65 g/l natriumvetyfosfaattiheptahydraattia. Halutun pH:n aikaansaamiseksi sekoitettiin liuoksia A ja B taulukon mukaiset määrät 100 ml:n mittalasissa, täytettiin se merkkiin ultrapuhtaalla vedellä ja ravisteltiin. Tarkistettiin pH-mittarilla liuoksen oikea pH ja titrattiin se oikeaksi liuoksella A.

pH	Liuos A (ml)	Liuos B (ml)
2,6	44,6	5,4
2,8	44,2	7,8
3,0	39,8	10,2
3,2	37,7	12,3
3,4	35,9	14,1
3,6	33,9	16,1
3,8	32,3	17,7
4,0	30,7	19,3
4,2	29,4	20,6
4,4	27,8	22,2
4,6	26,7	23,3
4,8	25,2	24,8
5,0	24,3	25,7
5,2	23,3	26,7
5,4	22,2	27,8
5,6	21,0	29,0
5,8	19,7	30,3
6,0	17,9	32,1
6,2	16,9	33,1
6,4	15,4	34,6
6,6	13,6	36,4
6,8	9,1	40,9
7,0	6,5	43,6

Liite 4.

Natriumfosfaattipuskurin valmistusohjeet. Liuos A sisälsi 27,6 g/l natriumdivetyfosfaattimonohydraattia ja liuos B sisälsi 53,65 g natriumvetyfosfaattiheptahydraattia. Halutun pH:n aikaansaamiseksi sekoitettiin liuoksia A ja B taulukon mukaiset määrät 200 ml:n mittalasissa, täytettiin se merkkiin ultrapuhtaalla vedellä ja ravisteltiin. Tarkistettiin pH-mittarilla liuoksen oikea pH ja titrattiin se oikeaksi liuoksella A.

pH	Liuos A (ml)	Liuos B (ml)
5,7	93,5	6,5
5,8	92,0	8,0
5,9	90,0	10,0
6,0	87,7	12,3
6,1	85,0	15,0
6,2	81,5	18,5
6,3	77,5	22,5
6,4	73,5	26,5
6,5	68,5	31,5
6,6	62,5	37,5
6,7	56,5	43,5
6,8	51,0	49,0
6,9	45,0	55,0
7,0	39,0	61,0
7,1	33,0	67,0
7,2	28,0	72,0
7,3	23,0	77,0
7,4	19,0	81,0
7,5	16,0	84,0
7,6	13,0	87,0
7,7	10,5	90,5
7,8	8,5	91,5
7,9	7,0	93,0
8,0	5,3	94,7

Liite 5.

Yhdisteiden neste-nesteuutoista määritetyt jakautumiskertoimet. Osalle yhdisteistä määritettiin jakautumiskertoimet sekä puhdasaineena, että osana kasviuutetta. Kasviuutteista määritetyt jakautumiskertoimet ovat ilmoitettu puhdasaineista määritettyjen jakautumiskertoimien jälkeen sulkeissa.

Yhdiste ^a	(Etyyliasettaatti/butanoli)/vesi 1/1 (v/v) -jakautumiskerroin ^b	(MTBE/butanoli)/vesi 1/1 (v/v) -jakautumiskerroin ^b
1 (5)	0,39 ± 0,01	0,01 ± 0,00
2 (2)	1,26 ± 0,00	0,67 ± 0,05
3 (3)	80,65 ± 10,95	92,42 ± 7,36
4 (6)	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
5 (5)	1,59 ± 0,04; (0,36 ± 0,00)	0,35 ± 0,01; (0,09 ± 0,00)
6 (7)	8,51 ± 0,05; (7,32 ± 0,14)	4,71 ± 0,14; (3,78 ± 0,02)
7 (5)	12,26 ± 0,39	4,92 ± 0,20
8 (7)	20,70 ± 0,02	7,02 ± 0,25
9 (6)	30,62 ± 1,28; (22,13 ± 1,43)	21,33 ± 0,59; (13,14 ± 0,02)
10 (3)	22,75 ± 0,55; (6,35 ± 0,07)	9,06 ± 0,18; (2,70 ± 0,10)
11 (6)	0,90 ± 0,06	0,07 ± 0,01
12 (4)	12,98 ± 0,09; (20,40 ± 1,98)	4,04 ± 0,09; (5,17 ± 0,15)
13 (1)	0,13 ± 0,00; (0,12 ± 0,00)	0,00 ± 0,00; (0,01 ± 0,00)
14 (1)	0,28 ± 0,00; (0,22 ± 0,01)	0,03 ± 0,00; (0,02 ± 0,00)
15 (2)	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00
16 (2)	0,12 ± 0,00	0,01 ± 0,00
17 (5)	1,17 ± 0,02	0,18 ± 0,01
18 (6)	4,49 ± 0,33	1,26 ± 0,01
19 (3)	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
20 (3)	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
21 (4)	0,08 ± 0,00; (0,10 ± 0,00)	0,01 ± 0,00; (0,00 ± 0,00)
22 (4)	0,03 ± 0,00; (0,00 ± 0,00)	0,01 ± 0,00; (0,00 ± 0,00)
23 (1)	2,70 ± 0,01; (0,65 ± 0,00)	0,12 ± 0,02; (0,05 ± 0,00)
24 (2)	0,69 ± 0,01; (0,99 ± 0,00)	0,01 ± 0,00; (0,40 ± 0,00)
25 (7)	6,84 ± 0,08; (1,62 ± 0,04)	0,50 ± 0,04; (0,22 ± 0,01)
26 (7)	12,94 ± 0,47	1,59 ± 0,09
27 (1)	0,94 ± 0,05; (1,09 ± 0,01)	0,08 ± 0,01; (0,23 ± 0,00)
28 (4)	1,44 ± 0,01	0,08 ± 0,00

^a Puhdasaineen perään on sulkeissa ilmoitettu, missä yhdisteseoksessa neste-nesteuutot tehtiin puhdasaineelle.

^b Jakautumiskertoimia kuvattiin logaritmisella asteikolla 0,01–100 niin, että täysin vesifaasiin menneet yhdisteet saivat jakautumiskertoimen 0,01 ja täysin orgaaniseen faasiin menneet yhdisteet saivat kertoimen 100. Yhdisteet, jotka menivät puoliksi veteen ja orgaaniseen faasiin, saivat jakautumiskertoimen yksi.

Liite 6.

Yhdisteiden kuuden konsentraation keskiarvona määritetyt BSA-maksimiabsorbanssit ja konsentraatioalueiden lineaariselta osalta määritetyt suoran yhtälön kulmakertoimet ja x-akselien leikkauspisteet virherajoihin.

Yhdiste	Maksimiabsorbanssi (abs)	Lineaarisen osan kulmakerroin (abs/mM) ^a	Lineaarisen osan x- akselin leikkauspiste (mM) ^b
1	0,03 ± 0,00	-	-
2	0,03 ± 0,00	-	-
3	1,24 ± 0,02	3,61 ± 0,03	0,11 ± 0,00
4	1,24 ± 0,03	3,51 ± 0,07	0,15 ± 0,01
5	0,04 ± 0,00	-	-
6	0,21 ± 0,01	1,42 ± 0,01	0,54 ± 0,01
7	0,53 ± 0,01	2,27 ± 0,02	0,36 ± 0,00
8	0,87 ± 0,02	2,70 ± 0,02	0,22 ± 0,00
9	1,07 ± 0,01	2,83 ± 0,01	0,12 ± 0,00
10	0,75 ± 0,03	2,64 ± 0,12	0,28 ± 0,02
11	1,30 ± 0,01	3,90 ± 0,03	0,19 ± 0,00
12	0,40 ± 0,04	2,75 ± 0,27	0,52 ± 0,05
13	0,35 ± 0,01	2,25 ± 0,12	0,51 ± 0,01
14	0,86 ± 0,02	2,59 ± 0,01	0,21 ± 0,01
15	0,50 ± 0,01	3,25 ± 0,12	0,50 ± 0,02
16	0,71 ± 0,03	3,00 ± 0,17	0,35 ± 0,03
17	0,45 ± 0,01	2,04 ± 0,03	0,38 ± 0,00
18	0,60 ± 0,01	2,51 ± 0,05	0,35 ± 0,00
19	1,79 ± 0,01	5,47 ± 0,06	0,05 ± 0,00
20	1,75 ± 0,02	5,25 ± 0,12	0,05 ± 0,00
21	1,72 ± 0,01	5,16 ± 0,14	0,06 ± 0,01
22	1,71 ± 0,03	5,02 ± 0,12	0,06 ± 0,01
23	1,81 ± 0,04	5,34 ± 0,35	0,04 ± 0,02
24	2,08 ± 0,03	5,75 ± 0,23	0,00 ± 0,00
25	1,79 ± 0,02	5,79 ± 0,22	0,06 ± 0,01
26	1,73 ± 0,02	5,87 ± 0,06	0,08 ± 0,00
27	1,27 ± 0,01	3,77 ± 0,05	0,12 ± 0,00
28	1,68 ± 0,04	5,43 ± 0,21	0,08 ± 0,00

^a Lineaarinen alue määritettiin jokaisen puhtasaineen kohdalla erikseen niin, että siinä oli vähintään kolmen eri konsentraation mittauspisteet. Suoran yhtälön kulmakerroin kertoi käytännössä yhdisteen maksimiabsorbanssin muutoksen konsentraation muuttuessa.

^b Lineaarisen alueen x-akselin leikkauspiste kertoi käytännössä pienimmän konsentraation, jolla yhdiste ylipäättään antoi vasteen mittauksessa.

Liite 7.

Yhdisteiden PEG-mittauksista määritetyt maksimiabsorbanssit, alkuabsorbanssit ja reaktionopeudet.

Yhdiste	Maksimiabsorbanssi 0,4 mM (abs) ^a	Alkuabsorbanssi 0,4 mM (abs) ^a	Reaktionopeus 0,4 mM (abs/s) ^a
3	1,03 ± 0,00	0,30 ± 0,01	4,04E-3 ± 5,4E-5
4	0,59 ± 0,00	0,16 ± 0,00	2,31E-3 ± 1,4E-5
6	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
7	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
8	0,40 ± 0,01	0,13 ± 0,00	1,79E-3 ± 1,8E-5
9	0,92 ± 0,01	0,27 ± 0,00	3,78E-3 ± 5,8E-5
18	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
19	1,28 ± 0,02	0,97 ± 0,03	4,87E-3 ± 7,8E-5
20	1,67 ± 0,01	1,04 ± 0,03	9,25E-3 ± 8,0E-4
21	1,83 ± 0,01	0,79 ± 0,03	9,91E-3 ± 7,0E-5
22	1,67 ± 0,00	0,87 ± 0,01	9,51E-3 ± 5,4E-5
23	1,86 ± 0,01	0,76 ± 0,01	9,83E-3 ± 1,6E-4
24	2,25 ± 0,01	0,66 ± 0,02	1,05E-2 ± 1,3E-4
25	1,89 ± 0,00	0,73 ± 0,00	9,51E-3 ± 2,2E-5
26	1,81 ± 0,03	0,53 ± 0,01	7,86E-3 ± 5,1E-4
27	1,52 ± 0,00	0,55 ± 0,01	7,87E-3 ± 1,2E-4
28	1,84 ± 0,00	0,37 ± 0,00	8,12E-3 ± 8,4E-5

^a Kaikki taulukossa esitetyt tulokset ovat mitattu 0,4 mM konsentraatiossa, sillä sitä suuremmissa konsentraatioissa osalla yhdisteistä tapahtui kompleksin uudelleenliukoistumista, jolloin keskiarvon ottaminen kuudesta konsentraatiosta olisi vääristänyt tuloksia.

Liite 8.

PEG-mittauksista yhdisteiden konsentraatioalueen lineaariselta osalta määritetyt maksimiabsorbanssin, alkuabsorbanssin ja reaktionopeuden suoran kulmakertoimet.

Yhdiste	Maksimiabsorbanssin lineaarisen osan kulmakerroin (abs/mM)	Alkuabsorbanssin lineaarisen osan kulmakerroin (abs/mM)	Reaktionopeuden lineaarisen osan kulmakerroin (abs/s/mM)
3	2,68 ± 0,01	0,80 ± 0,00	1,15E-2 ± 1,7E-4
4	1,37 ± 0,02	0,40 ± 0,02	5,76E-3 ± 4,0E-5
6	2,43 ± 0,01	1,73 ± 0,01	1,12E-2 ± 4,1E-4
7	-	-	-
8	2,71 ± 0,01	1,41 ± 0,05	1,71E-2 ± 7,4E-4
9	2,75 ± 0,02	0,86 ± 0,02	1,23E-2 ± 9,6E-5
18	2,52 ± 0,02	2,06 ± 0,07	1,63E-2 ± 4,8E-4
19	4,12 ± 0,12	3,55 ± 0,18	1,21E-2 ± 9,8E-4
20	4,28 ± 0,02	3,18 ± 0,08	2,29E-2 ± 1,6E-3
21	4,12 ± 0,01	2,20 ± 0,05	2,56E-2 ± 2,0E-4
22	4,31 ± 0,01	2,74 ± 0,05	2,65E-2 ± 4,7E-4
23	4,99 ± 0,02	2,20 ± 0,04	2,84E-2 ± 5,4E-4
24	4,86 ± 0,03	1,57 ± 0,05	2,51E-2 ± 6,0E-4
25	4,77 ± 0,02	2,01 ± 0,01	2,63E-2 ± 1,3E-4
26	4,34 ± 0,08	1,33 ± 0,05	1,99E-2 ± 1,8E-3
27	4,04 ± 0,02	1,73 ± 0,03	2,38E-2 ± 5,0E-5
28	4,74 ± 0,00	0,99 ± 0,00	2,17E-2 ± 2,6E-4

Liite 9.

PEG-mittauksista yhdisteiden konsentraatioalueen lineaariselta osalta määritetyt maksimiabsorbanssin, alkuabsorbanssin ja reaktionopeuden suoran x-akselin leikkauspisteet.

Yhdiste	Maksimiabsorbanssin lineaarisen osan x-akselin leikkauspiste (mM)	Alkuabsorbanssin lineaarisen osan x- akselin leikkauspiste (mM)	Reaktionopeuden lineaarisen osan x- akselin leikkauspiste (mM)
3	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	5,86E-2 ± 2,5E-3
4	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,00	1,83E-2 ± 3,0E-3
6	0,35 ± 0,00	0,57 ± 0,00	5,83E-1 ± 5,2E-3
7	-	-	-
8	0,22 ± 0,00	0,30 ± 0,00	2,73E-1 ± 6,3E-3
9	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	9,65E-2 ± 7,2E-4
18	0,44 ± 0,00	0,50 ± 0,02	5,49E-1 ± 9,7E-3
19	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	1,14E-1 ± 2,4E-3
20	0,06 ± 0,00	0,09 ± 0,00	6,84E-2 ± 8,6E-3
21	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,00	4,72E-2 ± 2,0E-3
22	0,06 ± 0,00	0,10 ± 0,00	8,26E-2 ± 3,4E-3
23	0,02 ± 0,00	0,06 ± 0,00	5,11E-2 ± 1,4E-3
24	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
25	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,00	3,60E-2 ± 1,2E-3
26	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	8,67E-3 ± 7,7E-4
27	0,07 ± 0,00	0,10 ± 0,00	9,12E-2 ± 1,4E-3
28	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	2,25E-2 ± 1,0E-3

Liite 10.

Lämpötilan vaikutus PEG-mittauksissa reaktionopeuteen (A) ja alkuabsorbanssiin (B).

