

## BALANOCARPOL AND AMPELOPSIN H, TWO OLIGOESVERATROLS FROM STEM BARK OF *Hopea odorata* (DIPTEROCARPACEAE)

### *Balanokarpol dan Ampelopsin H, Dua Oligoesveratrol dari Kulit Batang Hopea odorata (Dipterocarpaceae)*

Sri Atun<sup>a,\*</sup>, Nurfina Aznam<sup>a</sup>, Retno Arianingrum<sup>a</sup> and Masatake Niwa<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Yogyakarta, Karangmalang, Yogyakarta, 55281, Indonesia

<sup>b</sup> Faculty of Pharmacy, Meijo University, Tempaku, Nagoya, Japan, 468-8503  
Phone: +81-52-832-1781; Fax: +81-52-834-8090

Received 23 August 2006; Accepted 24 September 2006

### ABSTRACT

Two oligoesveratrol, namely balanocarpol (**2**) and ampelopsin H (**3**) had been isolated from the steam bark of *Hopea odorata* (Dipterocarpaceae). The structures of these compounds were elucidated based on physical and spectroscopic data (MS, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR 1D and 2D). The activity of these compounds was evaluated against the 2-deoxyribose degradation induced by the hydroxyl radical generated via a Fenton-type reaction. The result showed that activity each compounds as radical hydroxyl scavenger of balanocarpol, and ampelopsin H with an IC<sub>50</sub> 1802.3 and 4840.0 µg/mL, respectively. Each compound showed low activity. Vitamin C (IC<sub>50</sub> 83.9 µg/mL) and butylated hydroxyl toluene (1328.0 µg/mL) were used as positif controls. These results suggest that oligoesveratrols from stem bark of *H. odorata* may be useful as potential sources of natural antioxidants.

**Keywords:** balanocarpol, ampelopsin H, antioxidant, Dipterocarpaceae.

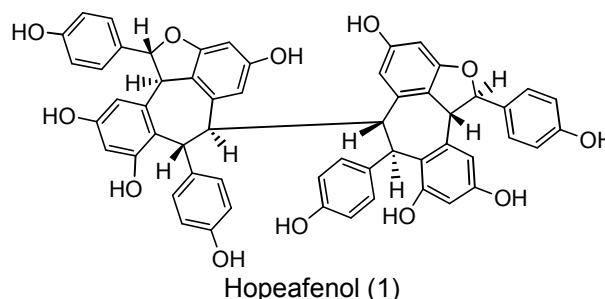
### PENDAHULUAN

Salah satu kelompok tumbuhan hutan tropis yang endemik Indonesia adalah famili Dipterocarpaceae. Kelompok tumbuhan ini merupakan pohon kayu utama dari hutan hujan tropis bagian barat Indonesia. Penyebaran tumbuhan ini meliputi bagian barat Indonesia sampai papua dan yang terbanyak terdapat di Kalimantan [1]. Diperkirakan famili Dipterocarpaceae terdiri dari 16 genus dan 600 spesies [2].

Penelitian kimia yang telah dilakukan terhadap Dipterocarpaceae menunjukkan adanya beberapa senyawa kimia yang termasuk dalam kelompok terpenoid, aril propanoid, benzofuran, flavonoid, dan oligostilbenoid. Kelompok oligostilbenoid merupakan senyawa yang banyak dilaporkan, karena memiliki struktur molekul yang bervariasi [3 –15], dan menunjukkan aktivitas biologi yang menarik, misalnya antibakteri [11; 12], antihepatotoksik [17], antikanker [16], dan anti-HIV [3].

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi, menentukan struktur, dan uji aktivitas oligostilbenoid dari *H. odorata*, yang belum tuntas diteliti, oleh karena baru dilaporkan satu senyawa yaitu hopeafenol (**1**) yang dapat diisolasi dari spesies ini [10].

Dalam artikel ini akan dilaporkan tentang isolasi, penentuan struktur dan aktivitasnya sebagai pencegah degradasi 2-deoksiribosa dua senyawa oligoesveratrol, yaitu balanokarpol (**2**) dan ampelopsin H (**3**) dari fraksi



relatif nonpolar ekstrak aseton kulit batang *H. odorata*. Struktur senyawa tersebut ditetapkan berdasarkan analisis spektrum UV, IR, MS dan NMR termasuk spektroskopi ID dan 2D NMR (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, HMBC dan NOESY)

### METODE PENELITIAN

#### Bahan

Bahan kulit batang *H. odorata* yang digunakan dalam penelitian ini dikumpulkan pada bulan Desember 2003 dari Kebun Percobaan Carita, Banten. Specimen tumbuhan ini diidentifikasi oleh Herbarium Bogorienses, Kebun Raya Bogor, Bogor.

#### Instrumentasi

Spektrum UV dan IR diukur masing-masing dengan spektrofotometer varian cary 100 Conc dan

\* Corresponding author.  
Email address : atun\_1210@yahoo.com

FTIR 8300 Shimadzu, spektrum  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR diukur dengan menggunakan spektrometer Jeol JNM A-5000 yang bekerja pada 600,0 MHz ( $^1\text{H}$ ) dan 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) dengan menggunakan puncak residu dan pelarut terdeuterasi sebagai standar. Spektrum massa FAB-MS diperoleh dengan menggunakan Jeol JMS-AM 20. Kromatografi cair vakum (KCV) dilakukan dengan menggunakan si-gel Merck 60 GF<sub>254</sub> (230-400 mesh), kromatografi kolom gravitasi menggunakan Si-gel Merk 60 (200-400 mesh), dan analisis kromatografi lapis tipis (KLT) pada plat aluminium berlapis si-gel Merk Kiesegel 60 F<sub>254</sub> 0,25 mm.

### Prosedur Kerja

#### Ekstraksi dan isolasi

Sebanyak 3,8 Kg serbuk kulit batang *H. odorata* dimaserasi dengan aseton (10 L) selama 24 jam, selanjutnya disaring, residu ditambahkan aseton dan dimaserasi lagi (2 x). Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan dengan evaporator vakum, sehingga diperoleh ekstrak kental dan ditambahkan dietil eter (200 mL) diaduk dan didekantasi, endapan dipisahkan. Selanjutnya ekstrak dipekatkan kembali dan diperoleh ekstrak yang hampir kering sebanyak 450 g (rendemen 1,1%). Sebagian ekstrak aseton *H. odorata* (40 g) difraksinasi dengan kromatografi cair vakum (silika gel GF 60 Merk 250 g;  $\phi$  : 10 cm, t = 10 cm), dengan pengelusi berturut-turut campuran *n*-heksana-EtOAc (5:5); (4:6); (3:7); (2:8), EtOAc; Me<sub>2</sub>O; dan MeOH. Hasil pemisahan secara kromatografi cair vakum tersebut selanjutnya dikelompokkan sesuai kemiripan R<sub>f</sub> dan jumlah komponen dari data TLC dan dikeringkan, sehingga diperoleh fraksi A (1-5, 0,5 g); B (6-13, 13,5 g), dan C (14-18, 10,2 g). Fraksi B (13, 5 g atau 33,75 %) selanjutnya disebut fraksi relatif non polar, sedangkan fraksi C (10,2 g atau 25,5%) disebut fraksi relatif polar. Pemisahan lebih lanjut terhadap fraksi B menggunakan kromatografi cair vakum (silika gel GF 60 Merk 250 g;  $\phi$  : 10 cm, t = 10 cm), menggunakan eluen campuran *n*-heksana-EtOAc (5:5); (4:6); (3:7); (2:8), EtOAc; Me<sub>2</sub>O; dan MeOH, menghasilkan dua kelompok fraksi yaitu fraksi B1 (7-15, 3,5 g) dan B2 (16-20, 4,6 g). Fraksi B1 (3,5 g) selanjutnya dipisahkan secara kromatografi gravitasi menggunakan pelarut kloroform-metanol (9 :1) secara berulang kali (3 x) sehingga diperoleh senyawa murni hasil isolat 1 sebanyak 300 mg. Fraksi B2 (4,6 g) setelah dipisahkan dan dimurnikan lebih lanjut secara kromatografi gravitasi menggunakan eluen kloroform-metanol (9:1) diperoleh senyawa murni hasil isolat 2 sebanyak 250 mg.

#### Uji aktivitas sebagai pencegah degradasi 2-deoksiribosa

Uji aktivitas sebagai pencegah degradasi deoksiribosa dilakukan dengan metode Halliwell *et al* [18]

, yaitu dengan cara sebagai berikut : Dalam tabung reaksi dimasukkan larutan 0,1 ml larutan deoksiribosa 3 mM; 0,01 mL larutan sampel pada berbagai variasi konsentrasi; 0,1 mL asam askorbat 0.01 mM; 0,1 mL hidrogen peroksida 0,1 mM, dan 0,59 mL larutan buffer fosfat pH 7,4 kemudian dihomogenkan. Reaksi dimulai dengan penambahan larutan besi (II) sulfat 0,1 mM. Campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C. Hal yang sama juga dilakukan pada blanko yang mengandung reagen yang sama tetapi tidak mengandung senyawa yang dianalisis. Reaksi dihentikan dengan penambahan 3 mL larutan asam tiobarbiturat. Kemudian dipanaskan selama 15 menit pada suhu 80 °C. Warna merah dari larutan yang terbentuk diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 532 nm. Kemampuan untuk mencegah degradasi deoksiribosa dihitung sebagai persentase berkurangnya serapan larutan yang mengandung senyawa bioaktif dibandingkan dengan larutan blanko, dengan rumus sebagai berikut :

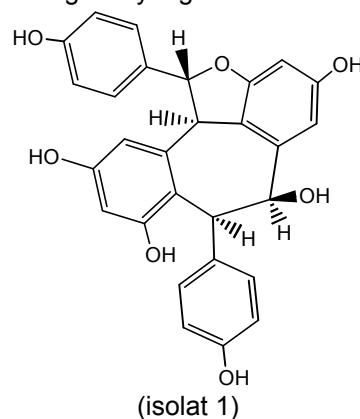
$$\% \text{ penangkap radikal hidroksil} = \frac{A_{tp} - A_p}{A_{tp}} \times 100 \%$$

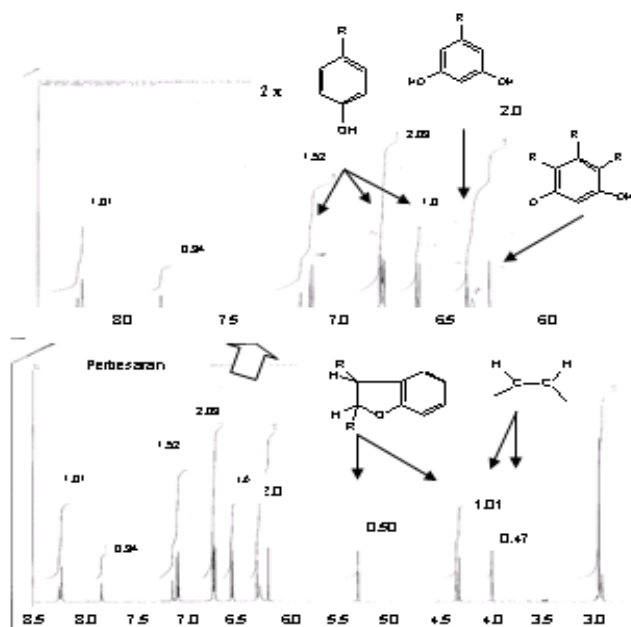
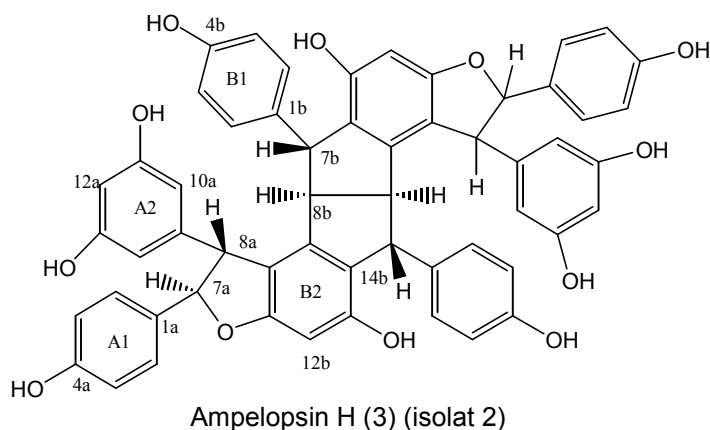
$A_{tp}$  = serapan tanpa sampel

$A_p$  = serapan dengan sampel

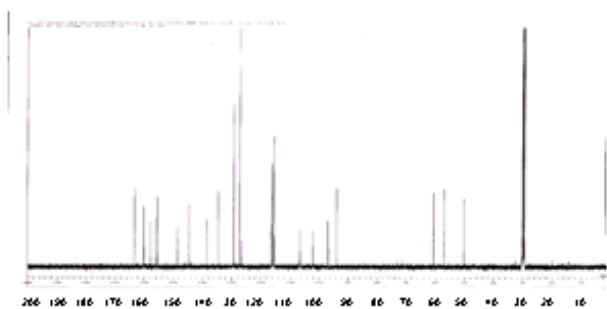
### HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat 1 diperoleh sebagai padatan berwarna kuning kecoklatan, yang terurai pada 230 °C. Spektrum UV senyawa isolat 1 memperlihatkan serapan pada  $\lambda_{maks}$  227 dan 283 nm, IR (KBr)  $\nu$  : 3384; 1608; 1405; 1350; 1240; 1132; 1037; 995; dan 833  $\text{cm}^{-1}$ . Senyawa hasil isolat 1 dari ekstrak aseton *H. odorata* tersebut mempunyai data-data UV dan IR yang identik dengan senyawa balanokarpol (2) yang telah ditemukan sebelumnya dari ekstrak aseton *H. mengarawan* [7]. Untuk memastikan bahwa kedua senyawa tersebut adalah identik dilakukan KLT dengan menggunakan eluen kloroform-metanol (8:2); diklorometana-aseton (1:1); dan diklorometana-metanol (8:2) yang menunjukkan harga R<sub>f</sub> yang sama.





**Gambar 1.** Spektrum  $^1\text{H}$  NMR senyawa 2 dalam aseton- $\text{d}_6$  600 MHz



**Gambar 2.** Spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR senyawa 2 dalam aseton- $\text{d}_6$  (150 MHz)

Ampelopsin H (2) diperoleh sebagai padatan berwarna kuning kecoklatan, yang terurai pada  $230\text{ }^\circ\text{C}$ . Spektrum UV senyawa isolat 2 memperlihatkan serapan pada  $\lambda_{\text{maks}}$  228 dan 282 nm, spektrum IR memperlihatkan adanya gugus  $-\text{OH}$  ( $3274\text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{C}=\text{C}$

**Tabel 1.** Data spektrum NMR senyawa isolat 2 hasil isolasi dari *H. odorata*

No	$\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz) ppm	$\delta_{\text{C}}$ ppm	HMBC (H→C)	H-H Cosy
1a	-	134,8	-	-
2a,6a	7,11 (d, 8,4)	127,3	C-7a, C-4a,	H-3a,5a
3a,5a	6,74 (d, 8,4)	116,1	C-1a, C-4a	H-2a,6a
4a	-	157,9	-	-
7a	5,31 (d, 2,0)	93,8	C-2a,6a, C-8a, C-1a, C-14a, C-9a	H-8a
8a	4,33 (d, 2,0)	57,1	C-9a, C-10b, C-14b, C-9b, C-7a, C-1a	H-7a
9a	-	148,6	-	-
10a	6,29 (br s)	106,6	-	-
11a	-	160,0	-	-
12a	6,32 (t, 2,1; 2,1)	102,2	C-10a, C-14a, C-11a, C-13a	-
13a	-	160,0	-	-
14a	6,29 (br s)	106,6	-	-
1b	-	138,8	-	-
2b,6b	6,73 (d, 8,4)	129,2	C-2b,6b, C-7b, C-4b, C-1b	H-3b,5b
3b,5b	6,56 (d, 8,4)	115,5	C-1b, C-4b	H-2b,6b
4b	-	155,9	-	-
7b	4,29 (s)	50,2	C-10a, C-2b,6b, C-1b, C-8b, C-9b	-
8b	3,85 (s)	60,5	C-10b, C-1b, C-9b	-
9b	-	144,6	-	-
10b	-	126,4	-	-
11b	-	155,5	-	-
12b	6,21 (s)	96,7	C-14b, C-10b, C-11b, C-13b	-
13b	-	163,2	-	-
14b	-	116,2	-	-

aromatik ( $1608$  dan  $1454\text{ cm}^{-1}$ ), dan 1,4-disubstitusi-benzena ( $833\text{ cm}^{-1}$ ). Spektrum massa FABMS senyawa isolat 2 menunjukkan ion molekul pada  $m/z$   $906\text{ [M]}^+$ , sesuai dengan rumus molekul  $\text{C}_{56}\text{H}_{42}\text{O}_{12}$ , sedangkan data NMR ( $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$ ) (Gambar 1 dan 2) menunjukkan data setengah jumlah proton dan karbon dari rumus molekul tersebut, sehingga dapat disarankan senyawa isolat 2 disusun oleh dua unit struktur yang simetris, yang masing-masing unit adalah dimer resveratrol. Rincian mengenai unit-unit struktur yang terdapat dalam senyawa 2 selanjutnya diperoleh dari analisis spektrum  $^1\text{H}$  NMR dan spektrum korelasi 2-dimensi HSQC, HMBC dan COSY yang terdapat pada Tabel 1.

Spektrum  $^1\text{H}$  NMR menunjukkan adanya sederetan sinyal proton di daerah aromatik dan alifatik yang diidentifikasi sesuai dengan dua unit cincin 4-

hidroksifenil pada daerah  $\delta$  7,11 (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz) dan 6,74 (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz) ppm, serta pada  $\delta$  6,73 (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz) dan 6,56 (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz) ppm. Sinyal proton pada daerah  $\delta$  6,32 (1H, *t*, *J* = 2,1; 2,1 Hz) ppm dan 6,29 (2H, *br s*) ppm menunjukkan adanya cincin 3,5-dihidroksifenil. Selanjutnya sinyal proton aromatik pada  $\delta$  6,21 (1H, *s*) ppm menunjukkan adanya cincin pentasubstitusibenzena. Selanjutnya dua sinyal proton pada  $\delta$  5,31 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz) ppm dan  $\delta$  4,33 (1H, *d*, *J* = 2,0) ppm menunjukkan adanya cincin *trans*-dihidrobenzofuran. Dua sinyal proton pada daerah alifatik yaitu pada  $\delta$  4,29 (*s*) ppm dan  $\delta$  3,85 (*s*) ppm menunjukkan bahwa kedua proton tersebut berada pada posisi yang berbeda. Namun dari data HMBC (Tabel 1.) menunjukkan bahwa kedua proton tersebut berdampingan.

Sinyal-sinyal  $^{13}\text{C}$  NMR (Gambar 2) untuk karbon yang bukan kuarterner dapat teridentifikasi secara tepat dengan bantuan spektrum HMQC, sebagaimana tercantum pada Tabel 2. Disamping itu, spektrum HMQC juga menunjukkan adanya sinyal-sinyal proton dari lima gugus hidroksil fenol pada  $\delta$  7,2 - 8,4 ppm. Selanjutnya, hubungan antar unit struktur sebagaimana diperlihatkan oleh struktur senyawa isolat **2** diperoleh dari pengukuran HMBC yang memperlihatkan adanya korelasi  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  jarak jauh antara H-7a dengan C-2a,6a, C-8a, C-1a, C-14a, C-9a, serta korelasi antara H-8a dengan C-9a, C-10b, C-14b, C-9b, C-7a, C-1a, dan adanya korelasi antara H-12b dengan C-14b, C-10b, C-11b, C-13b yang menunjukkan bahwa unit resveratrol A berkondensasi dengan unit resveratrol B melalui pembentukan cincin *trans*-dihidrobenzofuran. Selanjutnya, sinyal proton H-7b (4,29 ppm) dan H-8b (3,85 ppm) yang masing-masing terikat pada atom C metin mengindikasikan kedua atom C tersebut harus terikat pada atom C unit yang lain. Hal ini didukung oleh data FABMS yang menunjukkan ion molekul *m/z* 906, yang menunjukkan bahwa senyawa isolat **2** adalah tetramer resveratrol, yang disusun oleh dua unit yang simetris. Dengan demikian, data HMBC tersebut mendukung struktur senyawa isolat **2**, yaitu suatu tetramer resveratrol yang dikenal sebagai ampelopsin H (**3**), yang telah ditemukan sebelumnya dari *Ampelopsis brevipedunculata* Var. *Hancei* [17].

Bukti selanjutnya mengenai struktur senyawa isolat **2** diperoleh dari perbandingan data geseran kimia NMR ( $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$ ) dengan yang dilaporkan untuk ampelopsin H (**12**) dari *Ampelopsis brevipedunculata* Var. *Hancei* [17], yang menunjukkan tingkat kesesuaian yang tinggi.

Hasil uji aktivitas dari ekstrak aseton total, fraksi relatif non polar, fraksi relatif polar, balanokarpol (**2**), ampelopsin H (**3**), dan kontrol positif terdapat pada Tabel 2. Perhitungan harga  $\text{IC}_{50}$  aktivitas pencegah 2-deoksiribosa ekstrak total aseton, fraksi non polar, hasil isolasi fraksi non polar, yaitu balanokarpol (**2**) dan ampelopsin H (**3**) menunjukkan aktivitas rendah, dengan harga  $\text{IC}_{50}$  berturut-turut 3611,1; 1542,4; 1802,3; dan

**Tabel 2.** Hasil uji aktivitas sebagai pencegah degradasi 2-deoksiribosa dari beberapa fraksi *H. odorata* dan senyawa hasil isolasi

No	Jenis sampel dari fraksi	Konsentrasi $\mu\text{g/mL}$	Rerata % aktivitas	$\text{IC}_{50}$ $\mu\text{g/mL}$	Keterangan
1	Fraksi aseton total	1000	34,4	3611,1	Aktivitas rendah
		500	32,8		
		250	30,9		
		125	28,1		
2	Fraksi relatif non polar	1000	40,6	1542,4	Aktivitas rendah
		500	37,5		
		250	34,4		
		125	28,1		
3	Fraksi relatif polar	1000	57,8	352,9	Aktif
		500	56,2		
		250	53,1		
		125	56,2		
4	Balanokarpol ( <b>2</b> )	1000	31,3	1802,3	Aktivitas rendah
		500	29,8		
		250	24,2		
		125	12,1		
4	Ampelopsin H ( <b>3</b> )	1000	15,7	4840,0	Aktivitas rendah
		500	11,6		
		250	12,1		
		125	8,6		
5	Vitamin C	500	3,19	83,9	Sangat aktif
		250	37,76		
		125	45,21		
		62,5	49,46		
6	BHT ( <i>Butylated Hydroxyl Toluena</i> )	1000	51,59	1328,1	Aktivitas rendah
		500	60,64		
		250	60,10		
		125	60,10		
		62,5	60,64		

Keterangan :

Keterangan :  $\text{IC}_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ : sangat aktif;  $100 - 1000 \mu\text{g/mL}$ : aktif; dan  $1000 - 5000 \mu\text{g/mL}$ : aktivitas rendah;  $> 5000 \mu\text{g/mL}$ : tidak aktif

4840,0  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan fraksi relatif polar menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi dengan  $\text{IC}_{50}$  352,9  $\mu\text{g/mL}$  meskipun aktivitasnya lebih rendah dibanding vitamin C ( $\text{IC}_{50}$  83,9  $\mu\text{g/mL}$ ). Balanokarpol (**2**) dan ampelopsin H (**3**) yang diperoleh dari fraksi relatif non polar menunjukkan aktivitas yang rendah sebagai pencegah degradasi 2-deoksiribosa, dibandingkan dengan vitamin C, hal ini mungkin disebabkan karena struktur molekul kedua senyawa tersebut lebih meruah dan relatif stabil dibanding vitamin C. Namun demikian dari hasil penelitian sebelumnya balanokarpol (**2**) menunjukkan aktivitas yang tinggi untuk membunuh virus HIV dan toksik terhadap beberapa jenis sel kanker [14].

## KESIMPULAN

Dari fraksi relatif non polar ekstrak aseton *H. odorata* dapat diisolasi dan diidentifikasi struktur dua senyawa oligoresveratrol yaitu balanokarpol (**2**) dan ampelopsin H (**3**). Kedua senyawa yang diperoleh tersebut menunjukkan aktivitas yang relatif rendah sebagai pencegah degradasi 2-deoksiribosa, dibandingkan dengan vitamin C.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Dirjen DIKTI yang telah membiayai penelitian ini dari dana Penelitian fundamental Tahun 2006.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Newman M,F, 1999, *Pedoman Identifikasi Pohon-Pohon Dipterocarpaceae*, Bogor : Prosea Indonesia.
2. Cronquist A, 1981, *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, New York : Columbia In Press.
3. Dai, J.R., Hallock Y.F., Cardellina J.H., and Boyd M.R., 1998, *J. Nat. Prod.* 61, 351-353.
4. Eun-Kyoung, Chai S. H., Constant H.L., Santisuk V.R., Vichai R., Christopher W.W., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Pezzuto J.M., and Kinghorn A.D., 1999, *J. Org. Chem.*, 64, 6976-6983.
5. Atun, S., Achmad, S.A., Hakim, E.H., Syah, Y.M., Emilio, Ghisalberti, L., Juliawaty,L.D., and Makmur, L., 2004, *Biochem. Syst. and Ecol.*, 32, 1051-1053.
6. Atun, S., Sjamsul A.A, Niwa.M, Retno A, and Nurfina A., 2006, *Biochem. Syst. And Ecol*, 34, 642-644.
7. Atun, S., Aznam, N., Arianingrum, R., and Niwa, M., 2006, *Indo. J. Chem.* 6 (1), 75-78.
8. Ito T., Tanaka T., Ido Y., Nakaya K., Linuma M., and Riswan S., 2000, *J. Chem. Pharm. Bull.* 48 (7), 1001-1005.
9. Ito T., Tanaka T., Ido Y., Nakaya K., linuma M., Takashi Y., Naganawa H., Ohyama M., Nakanishi Y., Bastow K.F., and Lee K.H., 2001, *Tetrahedron*, 57, 7309-7314.
10. Sotheswaran S., Sultanbawa M.U.S., Surendrakumar S., and Bladon P.,1983, *J. Chem. Soc.*, (4), 699-702.
11. Sotheswaran S., Sultanbawa M.U.S., Surendrakumar S., and Bladon P.,1985, *J. Chem. Soc.* (4), 159-162.
12. Sultanbawa M.U.S., Surendrakumar S., and Bladon P., 1987, *Phytochemistry*, 26 (3), 799-801.
13. Sultanbawa M.U.S., Surendrakumar S., and Wazeer M., 1981, *J. Chem. Soc.* 1204-1206.
14. Tanaka T., Ito T., Ido Y., Son T. K., Nakaya K., Linuma M., Ohyama M., and Chelladurai V., 2000, *Phytochemistry*, 53, 1015 –1019.
15. Tanaka T, Ito T., Nakaya K., Linuma M., and Riswan S., 2000, *Phytochemistry*, 54, 63-69.
16. Ohyama M., Tanaka T., Linuma M., and Burandt C.I., 1998, *Chem. Pharm. Bull.*, 46 (4), 663-668.
17. Oshima Y., and Ueno Y., 1993, *Phytochemistry*, 33 (1), 179-182
18. Halliwell B, Gutteridge J M C, and Aruoma O I. 1987. *Anal. Biochem.* 165, 215-219