

Antikolinerg aktivitet i lupinbønner og antikolinerg belastning i hoftebruddspasienter

Anna Armika Tussilago Nyman



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap og Avdeling for farmasøytisk
kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det Matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

September 2012

Masteroppgave i farmasi

**Antikolinerg aktivitet i lupinbønner og antikolinerg
belastning i hoftebruddspasienter**

Anna Armika Tussilago Nyman

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap og
Avdeling for farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk Institutt
Det Matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo

Veiledere:

Professor Espen Molden

Førsteamanuensis Hilde Barsett

September 2012

Forord

Denne masteroppgave ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap og Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, under veiledning av professor Espen Molden og førsteamanuensis Hilde Barsett.

Jeg vil takke mine to veiledere, Hilde Barsett og Espen Molden, for enestående hjelp til å utføre oppgaven både praktisk og i skrivefasen. Takk for deres store faglige kunnskap og gode oppfølging. Dere har vært der for meg i en vanskelig tid og dere er en stor grunn til at jeg kom i mål med denne oppgaven. Tusen takk for at dere begge er fantastiske mennesker, som har hatt forståelse og støttet meg, pushet meg og ikke minst snakket med meg om vanskelige ting. Takk til Hoai Thi Nguyen Aas for dine kunnskaper om analyseringsmetoder, hjelp med GC-analyser og utvikling av GC-metode. Takk til alle dere på farmakognosi som har bidratt med deres kunnskaper og hyggelige omgivelser, spesielt takk til Ingvild Austarheim for din støtte.

Jeg vil også takke familie og venner for at dere alltid stiller opp. En særlig takk til Mamma og Pappa som nesten kjørt verden rundt mellom Eskilstuna og Oslo for å støtte meg. Takk Cecilie for din vennskap og omtanke til August, og Hilde Marie for dine faglige kunnskaper og innspill til skriving.

Til min älskade August, du lyser opp dagen og gjør livet verdt å leve.

Til min Magnus, du finnes alltid med meg.

Oslo, september 2012.

Anna Armika Tussilago Nyman

Innhold

Innhold	7
Forkortelser	9
Sammendrag	11
1. Innledning	12
1.1 Kolinerg transmisjon	12
1.1.1 Acetylkolin	12
1.1.2 Muskarinerge reseptorer	13
1.2 Antikolinerg belastning og risiko for bivirkninger	15
1.3 Måling av antikolinerg aktivitet i serum	17
1.4 Planter og næringsmidler med antikolinerg aktivitet	17
1.4.1 Lupin	18
1.4.1.1 Alkaloider	19
2. Hensikten med oppgaven	21
3. Metode	22
3.1 Antikolinerg aktivitet i ekstrakter og rensstoffer fra lupinbønner	22
3.1.1 Opparbeidelse av lupinbønnefraksjoner	22
3.1.1.1 Vasking av bønner etter forskrift fra produsent	22
3.1.1.2 Frysetørring	23
3.1.1.3 Soxhlet ekstraksjon; avfetting og fraksjonering av lupinmel	23
3.1.1.3.1 Ekstraksjon med diklormetan	24
3.1.1.3.2 Ekstraksjon med 96 % etanol	24
3.1.1.4 Rotavapor	25
3.1.1.5 Ekstraksjon med 50 % etanol	25
3.1.1.6 Ekstraksjon med eter – opprensning og isolering av alkaloider	26
3.1.1.7 Flytskjema for lupinbønnefraksjoner	27
3.1.2 Tynnsjiktskromatografi, TLC	28
3.1.2.1 Sprayreagens – kaliumjodvismutatløsning	29
3.1.2.2 Løpemediel; Aceton: Vann: Ammoniakk [90 : 7 : 3]	29
3.1.3 Gasskromatografi, GC	30
3.1.3.1 Kalibrering	30
3.1.3.2 GC-målinger	32
3.1.3.3 GC-MS-målinger	32
3.1.4 Måling av antikolinerg aktivitet	33
3.1.4.1 Fosfatbuffer 50mM	34
3.1.4.1.1 Fosfatbuffer med 3 % Bovine Serum Albumin, BSA	35
3.1.4.2 Muskarinergt reseptorpreparat	35
3.1.4.3 [³ H]QNB-løsning	36
3.1.4.4 Standardkurve, kontrollprøver og referanseløsninger	36
3.1.4.5 Prøver av lupinbønneekstrakter	38
3.1.4.6 Databehandling	39
3.1.5 Vannkvalitet	39
3.2 Antikolinerg belastning hos hoftebruddpasienter	39
3.2.1 Pasientmateriale	39

3.2.2	Vurdering av antikolinerg legemiddelskåre	39
3.2.3	Måling av antikolinerg aktivitet i serum- og cerebrospinalvæskeprøver	40
3.2.3.1	Kontrollprøver	40
3.2.4	Målvariable og statistiske analyser	40
4.	Resultater	42
4.1	Alkaloider og antikolinerg aktivitet i ekstrakter og rensustanser fra lupinbønner	42
4.1.1	Opparbeidelse av lupinbønnefraksjoner	42
4.1.2	Identifikasjon med TLC	42
4.1.3	GC og GC-MS målinger	43
4.1.3.1	Kalibrering av GC-metode	43
4.1.3.2	GC-målinger	44
4.1.3.3	GC-MS-målinger	47
4.1.4	Antikolinerge målinger i ekstrakter og rensustanser fra lupinbønner	50
4.1.4.1	Standardkurve og kontrollprøver	50
4.1.4.2	Antikolinerg aktivitet i råekstrakter fra lupinbønner	51
4.1.4.3	Antikolinerg aktivitet i rensede alkaloidekstrakter fra lupinbønner	52
4.1.4.4	Antikolinerg aktivitet av rensustansene lupanin og 13-OH-lupanin	55
4.2	Antikolinerg belastning hos hoftebruddpasienter	56
4.2.1	Pasientkarakteristika	56
4.2.2	Antikolinerg legemiddelskåre	56
4.2.3	Antikolinerg aktivitet	58
5.	Diskusjon	61
5.1	Alkaloider og antikolinerg aktivitet i ekstrakter og rensustanser fra lupinbønner	61
5.2	Antikolinerg belastning hos hoftebruddpasienter	65
5.3	Begrensninger ved oppgaven	68
6.	Oppsummering og konklusjon	69
6.1	Antikolinerg aktivitet i lupinbønner	69
6.2	Antikolinerg belastning hos hoftebruddpasienter	69
	Referanseliste	71
	Appendiks	74

Forkortelser

50et	50 % etanol-ekstrakt
96et	96 % etanol-ekstrakt
AA	antikolinerg aktivitet
ACB	anticholinergic cognitive burden
ACB-skåre	antikolinergt legemiddelskåre
ACh	acetylkolin
Alk	alkaloid
BBB	blod-hjernebarriæren
BSA	bovine serum albumin
cAMP	syklisk adenosin monofosfat
CCPM	radioaktivitet, telletall (correlated counts per minute)
CNS	sentrale nervesystemet
CSF	cerebrospinalvæske
DAG	diacylglycerol
DM	diklormetan
DMSO	dimetylsulfoksid
EC ₅₀	konsentrasjon som gitt 50 % hemming av radioligand
Et	etanol
FI	farmasøytisk institutt
FID	flammeionsisasjonsdetektor
GC	gasskromatografi
IP3	inositol trifosfat 3
IS	internstandard
mAChr	muskarinerge reseptorer
MMSE	mini-mental state examination
m/w	molekylvekt
m/z	masse/ladning
NaOH	natriumhydroksid
OH	hydroksid
PLA ₂	fosfolipase A ₂
PLC	fosfolipase C
PNS	perifer nervesystemet
QNB	[³ H]quinuclidinylbenzilat

r^2	korrelasjonskoeffisient
Rest	restmateriale fra ekstraksjon
R_f	retensjonsfaktor
SAA	serum antikolinerg aktivitet
TLC	tynnsjiktskromatografi
VF	vannfase
VRE	vandig restfase etter eterekstraksjon

Sammendrag

Introduksjon: Høy antikolinerg belastning er knyttet til nedgang i kognitiv funksjon og risiko for delirium. Det er vist at mange legemidler uthever antikolinerge effekter, som er lite ønsket i en eldre populasjon, men lite er kjent omkring mulig påvirkning av næringsmidler/naturmidler. Hensikten med denne oppgave var to-delt: i) å karakterisere antikolinerg aktivitet (AA) i lupinbønner, og ii) å undersøke antikolinerg belastning hos hoftebruddspasienter.

Metode: Lupinfraksjoner ble opparbeidet fra lupinbønner gjennom vasking og ekstrahering med ulike løsemidler. Karakterisering og identifisering ble utført med tynnsjiktskromatografi (TLC), gasskromatografi (GC) og gasskromatografi-massespektrometri (GC-MS) og sammenlignet med aktuelle referansesubstanser. Blant hoftebruddspasientene (n=154) ble antikolinerg legemiddelskåre beregnet (ACB-skåre) og AA målt i serum og cerebrospinalvæske (CSF)-prøver. Det ble gjort korrelasjonsanalyser mellom ACB-skåre og AA-målinger, samt AA-målinger i serum og CSF. Videre ble AA sammenlignet mellom pasienter med eller uten demens/delirium. Til måling av AA i lupinfraksjoner og rensstanser *in vitro*, og serum- og CSF-prøver *ex vivo* ble det benyttet et radioreseptor-bioassay.

Resultater: Det ble påvist høy AA i lupinbønner, noe som kunne tilskrives høyt innhold av alkaloider. Hovedalkaloidet lupanin (82-88 %), var en potent antimuskarinerg substans. Det ble observert en signifikant sammenheng mellom pasientenes totale ACB-skåre og AA i serum ($p < 0.01$). AA i serum og CSF korrelerte signifikant ($p = 0.034$), og det ble observert høyere AA i serum hos pasienter med delirium mot de uten delirium ($p = 0.059$). Videre var AA i serum hos demente signifikant høyere enn hos ikke-demente ($p < 0.01$).

Konklusjon: Oppgaven dokumenterte en betydelig antikolinerg aktivitet i vaskede lupinbønner. Inntak av vaskede lupinbønnene kan medføre risiko for antikolinerge (kognitive) bivirkninger. Blant hoftebruddspasienter, som er en sårbar gruppe for kognitive bivirkninger, er det en sammenheng mellom antikolinergt legemiddelskåre og antikolinerg aktivitet i serum. Redusert bruk av antikolinerge substanser kan dermed potensielt bedre symptomer hos denne pasientgruppen, der demens og delirium er hyppig forekommende tilstander.

1. Innledning

1.1 Kolinerg transmisjon

Kolinerg transmisjon omfatter både det perifere nervesystemet (PNS), det sentrale nervesystemet (CNS) og det enteriske nervesystemet. Acetylcholin (ACh) er en neurotransmitter i det kolinerge systemet og styrer all aktivitet i preganglionære autonome fibre, de fleste postganglionære parasymptatiske fibre og i noen postganglionære sympatiske fibre [1]. ACh forekommer også i motoriske nerver i det somatiske nervesystemet og noen nerver i CNS [1]. Perifert gir kolinerg transmisjon en reduksjon i hjertefrekvens, stimulering av sekresjon fra kjertler og kontraksjon i glattmuskulatur og skjelettmuskulatur. I CNS blir sensoriske, kognitive og motoriske funksjoner styrt av det kolinerge systemet, men systemet styrer også atferd og autonomi [1].

1.1.1 Acetylkolin

I 1907 viste Dixon at alkaloidet muskarin, fra soppen *Amanita muscaria*, gav lik effekt som ved vagus stimulasjon og at et muskarinlignende stoff fungerte som transmitter for impulser på vagusnerven [1]. Samtidig beskrev Hunt at de endogene stoffene som forårsaket blodtrykksfall var kolin-estere, og senere påviste samme mann at stoffet var ACh [1]. I 1914 undersøkte Dale de farmakologiske funksjonene til ACh [1, 2]. Han beskrev ACh som et parasymptomimetika og fant etter sammenligning med alkaloider fra *Amanita muscaria* og *Nicotiana tabacum* ut at ACh hadde to forskjellige effekter, muskarin- og nikotinlignende effekter [2].

ACh er en transmittersubstans som syntetiseres i cytoplasma i nerveterminalen via enzymet kolinacetyltransferase [1, 2]. Syntetisert ACh blir oppbevart i synaptiske vesikler og frigjøres ved eksocytose. Etter frigjøring bindes ACh til pre- eller postsynaptiske reseptorer. Frisatt ACh blir raskt hydrolysert i synapsespalten av acetylkolinesterase til acetat og kolin. ACh utøver effekt på to ulike kolinerge reseptortyper, nikotinerge og muskarinerge, som medierer ACh-responser henholdsvis via ione kanaler og G-proteiner [1, 2]. I forhold til antikolinerg

belastning og metoden for måling av antikolinerg aktivitet, AA, er det i denne oppgaven de muskarinerge reseptorene som er av interesse.

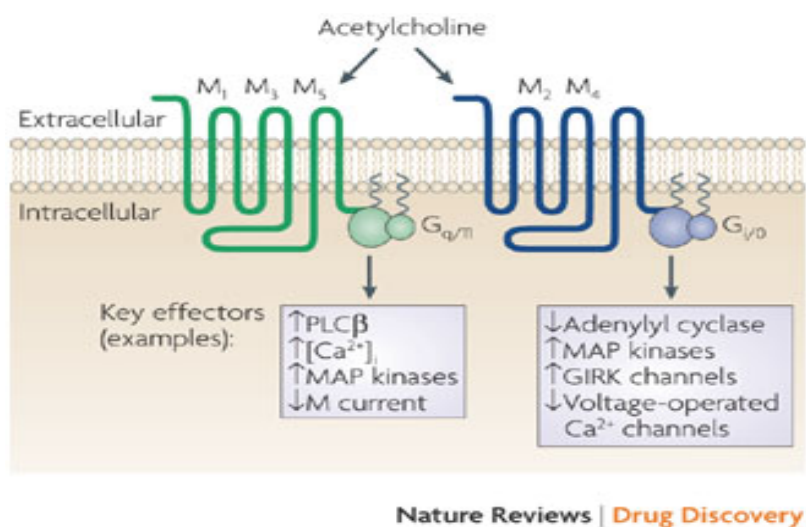
1.1.2 Muskarinerge reseptorer

Det finnes fem ulike typer muskarinerge reseptorer (mAChR), M_1 - M_5 [1]. Perifert er de lokalisert i autonome effektorceller, men de forekommer også i autonome ganglia og i binyremargen. I CNS er de hovedsakelig lokalisert i hippocampus, cortex og thalamus [1]. Muskarinerge reseptorer er som nevnt tidligere til stede i nesten hele kroppen og det finnes ofte flere av de ulike subtypene i samme vev [3]. Den fysiologiske effekten til ACh skyldes medvirkningene fra alle de ulike reseptorene til sammen [4]. Selv om cellene ofte har flere subtyper av mAChR er som regel en subtype dominerende [1].

M_1 -reseptorer er i stor grad uttrykt i forhjernen, spesielt i cerebrale korteks, hippocampus, thalamus og striatum [1, 4]. Den er dermed involvert i lærings- og hukommelses- prosesser. M_2 -reseptorer finnes både i CNS og perifert. I perifere vev er M_2 -reseptorer blant annet mye uttrykt i hjertemuskelen, der stimulering gir lav hjertefrekvens [1]. Sentralt finnes M_2 -reseptorer i cerebral korteks, hippocampus, ved dopaminerge nevroner og i hypothalamus-hypofyse-binyrebark-aksen og er involvert i kognitive prosesser, atferds-endringer og i frigjøringen av dopamin og kortikosteroider [1, 4]. Stimulering av M_2 -reseptorer sentralt gir, i likhet med M_4 -reseptorer, en analgetisk virkning ved å hemme smerteimpulser [4]. M_3 -reseptorer er uttrykt i hele CNS, men er mindre utbredt enn de andre subtypene [1]. Perifert forekommer M_3 -reseptorer i glatt muskulatur, særlig i urinblæren, der stimulering har en kontraherende effekt. I CNS er M_4 -reseptorer lokalisert i striatum der de medierer en hemmende effekt på frigjøringen av dopamin. Perifert forekommer M_4 -reseptorer presynaptisk, og stimulering her medfører hemmet parasymptisk og sympatisk transmisjon [1, 4]. M_5 -reseptoren er den eneste subtypen som blir uttrykt i dopaminerge nevroner i substantia nigra der stimulering medfører økt dopaminerg aktivitet. M_5 -reseptorer forekommer også i det ventrale tegmentale området, som via dopamin fører til de 'belønnende' effektene av narkotikamisbruk [4]. Perifert er M_5 -reseptorer uttrykt i iris, sirkulasjonssystemet, og i spyttkjertler (sammen med M_3). Den regulerer blant annet dilatasjon av pupiller og cerebrale blodårer, samt spyttsekresjon [1, 4].

Kunnskap om de ulike muskarinerge reseptorenes lokalisering og funksjoner kommer fra immunohistokjemiske-studier, mRNA hybridisering av mAChR og gen-studier på knockoutmus [1, 3, 4]. Studiene på knockoutmus har bidratt til god innsikt i funksjonene og effektene til de ulike subtypene av mAChR [1, 3]. Det er et komplekst samspill fordi flere av subtypene forekommer i samme vev og har ulike effekter, hemmende og/-eller eksitatoriske, ved ACh-stimulering [1]. Det streves fremdeles med å finne spesifikke agonister og antagonister for de ulike reseptor-subtypene, som potensielt vil kunne brukes terapeutisk uten alt for stor bivirkningsproblematikk. Noen kommende, aktuelle terapeutiske områder for bruk av muskarinerge legemidler er Alzheimers sykdom (M_1 - og M_5 -agonister, M_4 -antagonister), Parkinsons sykdom (M_1 - og M_4 -antagonister), schizofreni (M_1 - og M_4 -agonister), type 2 diabetes (M_3 -agonister), fedme (M_3 -antagonister), irritabel tarm (M_3 - og M_2 -antagonister), rusmiddelavhengighet og abstinenssymptomer ved seponering av rusmidler (M_5 -antagonister) [3, 4].

Muskarinerge reseptorer er G-protein-koblede og deles inn i to grupper ut i fra hvilke G-proteiner de interagerer med (figur 1). De eksitatoriske subtypene M_1 , M_3 og M_5 er koblet til $G_{q/11}$ og stimulerer til økt fosfolipase C (PLC)- og fosfolipase A_2 (PLA_2)- aktivitet. PLC aktiverer inositol trifosfat 3 (IP3) og diacylglycerol (DAG). Dannelsen av IP3 fører til frigjøring av intracellulær Ca^{2+} som igjen resulterer i kontraksjon av glatt muskulatur og sekresjon av kjertler. DAG sammen med Ca^{2+} aktiverer fosfokinase C som igjen fører til fosforylering av flere proteiner og flere fysiologiske responser. Aktivering av PLA_2 gir økt syklisk adenosin monofosfat (cAMP) via frigjøring av arakidonsyre. De inhibitoriske subtypene M_2 og M_4 er koblet til $G_{i/o}$ som igjen hemmer adenylat syklase og fører til en nedgang i cAMP, aktivering av K^+ kanaler og hemming av spennings-styrte Ca^{2+} kanaler. Dette fører til hyperpolarisering av cellemembranen [1-4].



Figur 1.1. Acetylkolin virker på fem muskarinerge reseptorer som kobler til to ulike typer G-proteiner. M_1 -, M_3 - og M_5 -reseptorer via $G_{q/11}$ og M_2 - og M_4 -reseptorer via $G_{i/o}$. Den intracellulære responsen er ulik for de to G-protein typene. [3] Hentet fra: Wess, J., R. M. Eglén, *et al.* (2007). "Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development." *Nat Rev Drug Discov* 6(9): 721-733.

1.2 Antikolinerg belastning og risiko for bivirkninger

I dag benyttes antikolinerge legemidler til behandling av Parkinsons sykdom, inkontinens, kvalme, astma og noen øyesykdommer [1, 5]. De har ofte en bred påvirkning av muskarinerge reseptortyper og er derfor assosiert med uttalte bivirkninger. Flere legemidler som ikke utøver sin primære virkning via kolinerge reseptorer, kan også ha antikolinerge bivirkninger grunnet sekundære antikolinerge effekter [5, 6], noe som er særlig aktuelt for mange psykofarmaka og første-generasjons antihistaminer. For å kunne estimere en pasients totale antikolinerge belastning eksisterer det et verktøy som rangerer og summerer antikolinerg skåre av legemidler, blant annet den såkalte 'Anticholinergic Cognitive Burden' (ACB)-skaleringsmodellen. Denne baserer seg delvis på målt antikolinerg aktivitet *in vitro* [7], men også på systematiske gjennomganger av litteratur vedrørende dokumenterte antikolinerge bivirkninger ved klinisk bruk av de aktuelle legemidlene [5]. Modellen bruker en skala fra 0 til 3, der '0' er lik ingen antikolinerg aktivitet, og '1' til '3' uttrykker økende antikolinerg aktivitet. ACB-listen er ikke komplett og det finnes andre varianter av antikolinerge legemiddellister. Disse listene varierer delvis i skåre-angivelser, men også inklusjon av ulike legemidler, noe som skyldes nasjonale forskjeller i tilgjengelighet og bruk av ulike legemidler [5].

Høy antikolinerg belastning (ACB-skåre) er knyttet til både perifere og sentrale bivirkninger [6]. I PNS vil blokkade av kolinerg transmisjon kunne forårsake redusert sekresjon av spytt, neseseekret, øyevæske og svette. Andre blokkeringseffekter er hypertermi, uskarpt syn og pupilledilatasjon, urinretensjon, GI-symptomer som redusert motilitet, obstipasjon, kvalme og oppkast, takykardi, arytmi og flushing [1]. I CNS vil blokkade kunne resultere i nedsatt kognitiv funksjon, forvirring, uro, orienteringssvikt, atferdsmessig eksitasjon, hallusinasjoner, delirium og i verste fall koma og respirasjonstans [1, 5, 6].

Effekten til antikolinerge legemidler er kumulativ. Det er den samlede antikolinerge belastningen av legemidler, både foreskrevne og reseptfrie, og endogene stoffer som gir opphav til antikolinerg effekt [5, 6, 8]. Noen personer vil også være mer utsatte på grunn av sykdom som gir større permeabilitet over blod-hjernebarriæren (BBB) eller nedsatt kolinerg transmisjon, slik som ved psykisk sykdom eller sentrale vaskulære sykdommer [5, 6, 8, 9]. Eldre mennesker kan være særlig utsatte for antikolinerge bivirkninger som en følge av nedsatt renal og hepatisk eliminasjon av legemidler, økt BBB-permeabilitet og lavere aktivitet i kolinerge nevroner [5, 6, 8, 9]. Eldre mennesker er også generelt mer sårbare for bivirkninger på grunn av polyfarmasi, inkludert bruk av antikolinerge legemidler [5, 6, 8, 9].

Ved vedvarende antikolinerge bivirkninger er en nedsatt kognitiv funksjon et stort problem. Det kan ofte være vanskelig å oppdage de antikolinerge bivirkningene hos en eldre populasjon av legemiddelbrukere, ettersom nedsatt kognitiv funksjon også er *et aldersrelatert* symptom i seg selv. Det er vist at antikolinerge legemidler kan forårsake kognitiv svikt, først og fremst gjennom blokkering av M₁-reseptorer, men også av M₂- og M₅-reseptorer [3]. Studier på knockout-mus har vist at fravær av nettopp M₁-reseptorer gir nedgang i kognitive funksjoner, og at det ved langvarig antagonisme av disse oppstår en økning av amyloide plakk i hjernen [3, 5, 10]. Plakket er en viktig årsak til utvikling av Alzheimers sykdom.

Flere langvarige studier på eldre pasienter med bruk av ACB-modellen og 'mini-mental state examination' (MMSE), har vist en korrelasjon mellom antikolinerg legemiddelbelastning og kognitiv funksjon [8, 10-12]. Nylig ble det publisert en studie som viste at høy ACB-skåre var assosiert med økt dødelighet blant eldre pasienter [10]. Høy ACB-skåre har også vært knyttet

til risiko for å utvikle delirium hos eldre [5], men kunnskapen/litteraturen på dette område er begrenset.

1.3 Måling av antikolinerg aktivitet i serum

En metode for måling av antikolinerg aktivitet i serum (SAA) fra pasienter ble først utviklet i 1980 av Tune og Coyle [12]. Den har senere blitt optimalisert for å kunne brukes på små volum og større kvanta (96-brønns plater) av Jakobsen [13, 14]. Med denne metoden kan man måle den totale antikolinerge aktiviteten i en pasients serum *ex vivo*, samt antikolinerg aktivitet av ekstrakter eller rensstanser *in vitro*. Prinsippet for metoden er at en radiomerket ligand konkurrerer med andre stoffer om binding til muskarinerge reseptorer fra et rottehjerne-homogenat/preparat. Ved å måle radioaktiviteten som har bundet seg til preparatet, vil man dermed få et uttrykk for antikolinerg aktivitet (høy måling av radioaktivitet = lav antikolinerg aktivitet, og omvendt) [5, 13].

Det finnes flere studier som har sett på sammenhengen mellom SAA og ACB-skåre hos pasienter, og foreliggende data der er noe motstridende [5]. I en studie fra 2003 er det vist en tydelig sammenheng mellom SAA og nedgang i kognitiv funksjon, men ingen korrelasjon mellom SAA og inntak av antikolinerge legemidler [15]. En senere studie fra 2006 viste derimot en klar korrelasjon mellom SAA og total ACB-skåre [16].

1.4 Planter og næringsmidler med antikolinerg aktivitet

Flere kjente planter inneholder stoffer som virker på muskarinerge reseptorer. Tidligere er *Amanita muscaria* nevnt. Den inneholder alkaloidet muskarin, en kolinerg agonist. *Atropa belladonna*, belladonna urt, er en av de mest kjente antikolinerge plantene og den inneholder alkaloidene skopolamin og atropin. Atropin består av rasemiske blandinger av (+ og -)-hyoscyamin. *Hyoscyamus niger*, bulmeurt, og *Datura stramonium*, piggeple, er planter som inneholder de samme typer alkaloider [1, 17]. Atropin er et legemiddel som brukes ved operasjoner for å utvide pupillen, motvirke bradykardi og for å nedsette spytt- og slimsekresjon. Det brukes også som antidot ved forgiftning med kolinerge stoffer [18].

I dag er økt levealder og polyfarmasi tilfellet for stadig flere mennesker. Samtidig øker bruken av kosttilskudd, helsetilskudd og helsebringende midler for å øke kognitive funksjoner. Fordi antikolinerg belastning fungerer additivt vil midler som har en ikke dokumentert antikolinerg aktivitet være til belastning for personer som inntar andre antikolinerge midler eller som av andre årsaker allerede har svekkede kognitive funksjoner. Når man i dag ser på antikolinerg belastning tar man kun hensyn til legemiddelbruk. Svært lite er undersøkt av andre komponenter man tilfører kroppen som også kan ha en antikolinerg aktivitet. Ved bruk av en tilpasset SAA-metode for antikolinerg måling utenom serum viste Lynum at kosttilskuddet VitaePro og dets innhold av antioksidanter har antikolinerg aktivitet [19]. Hun viste også at planten lupin, *Lupinus*, som benyttes stadig mer i matproduksjon har antikolinerg aktivitet, men hvilke stoffer i planten som har affinitet til mAChR og forårsaket den effekten ble ikke påvist [19].

1.4.1 Lupin

Det finnes over 400 arter av genus *Lupinus*, *L.*, fire av disse, *L. albus*, *L. luteus*, *L. mutabilis* og *L. angustifolius* (figur 1.2), brukes innen landbruk. Lupin er en belgfrukt og tilhører slekten erteblomstfamilien, *Leguminosae/Fabaceae*. Lupiner har store blomster og danner spiselige bønner. Næringsmessig er de like brukbare som soyabønner, men de viltvoksende plantene inneholder ofte bittersmakende, toksiske alkaloider [17, 20, 21].



Lupinus albus



Lupinus luteus



Lupinus mutabilis



Lupinus angustifolius

Figur 1.2. Disse fire artene finnes som søte varianter av Lupin og dyrkes for bruk i matindustri og til dyrefor.

Hentet fra: www.lupins.org [20]

Lupiner har vært brukt innen landbruket og som mat i over 2000 år. På begynnelsen av 1900-tallet ble det fremavlet en "søt" variant av bitter lupin av tyske forskere. Den inneholdt lave konsentrasjoner av de bitre alkaloidene. Det er den søte varianten av ovennevnte arter som først og fremst dyrkes til dyrefor og matindustri [20]. I Sør-Amerika og i Syd-Europa spises

lupinbønnene som snacks. Dette er en langvarig tradisjon og bønnene fremstilles av den bitre varianten av lupin. For at lupinbønner skal kunne spises av mennesker og dyr må størsteparten av alkaloidinnholdet fjernes. Det gjøres under repeterende vaskeprosesser [22]. I dag brukes lupinbønner i matindustrien som mel eller isolert proteinmel i alle slags bakervarer, som vegetarisk substitutt for kjøtt og melk og som hele bønner. I motsetning til soyabønner er ingen av de dyrkede lupinbønnene genetisk modifiserte [20, 21, 23]. Lupinbønner har et høyt innhold av protein og olje og er næringsmessig veldig gunstige og energirike, men de inneholder, i likhet med andre matvekster, også anti-nærings-komponenter som saponiner, tanniner og flavonoider [20, 24, 25]. Lupinbønner har vist å gi kryssallergi for dem som er allergiske mot peanøtter. I desember 2006 kom det EU-krav om merking av produkter som inneholder lupin [26, 27].

1.4.1.1 Alkaloider

Alkaloider er nitrogenholdige stoffer som produseres av planter og andre organismer og har en fysiologisk respons hos mennesker eller dyr. Alkaloider dannes av aminosyrer men inneholder også andre biokjemiske forløpere. Det er stor variasjon i strukturen i ringsystemet og de deles inn i grupper deretter. De fleste er frie baser i sin naturlige form. Noen kjente alkaloider er atropin, morfin, nikotin, koffein og kokain. Alkaloider syntetiseres av planter for å utgjøre en forsvarsmekanisme mot planteetere og mikroorganismer [17].

Bitre eller semi-søte varianter av lupin har et høyt innhold av alkaloider (2-3 %), søte varianter har et lavt innhold (0.001%) [28-30]. De ulike artene av lupin kan inneholde opp til 70 ulike alkaloider, de mest forekommende er spartein, lupanin, hydroksylupanin, lupinin og angustifolin. Det forekommer også flere andre alkaloider i viltvoksende lupin, blant annet teratogent anagyrin [28, 30]. Quinolizidinalkaloider er i høye konsentrasjoner toksiske for mennesker, der spartein og lupanin er de mest toksiske [30]. Flere tilfeller av akutte forgiftninger er beskrevet i litteraturen og noen få dødsfall hos barn er rapportert etter inntak av lupinbønner [30-33]. Inntak av bitter lupinbønner, vaskevann fra utvasking av alkaloider og søt-lupinmel som er kontaminert med bitre varianter av lupin, forårsaket forgiftningene. Forgiftningene er beskrevet som antikolinerg toksisitet med symptomer som munntørhet, uskarpt syn, flushing, takykardi, lav aktivitet i GI-systemet, angst, forvirring og utilpasshet [30-33]. Toksikologiske studier på dyr og mennesker og tilfeller av forgiftninger hos

mennesker indikerer at den akutte dødelige dosen er ca 30 mg/kg kroppsvekt/dag [30]. Det er anslått at en dose på 2-3 mg gir en forgiftning, men den er sjelden eller aldri dødelig hos voksne. En farmakokinetisk studie av lupanin og 13-OH-lupanin hos mennesker viste at stoffene ble utskilt uforandret i urin, over 90 % av utgangskomponentene ble gjenfunnet her, noe som tydet på at ingen metabolisme av stoffene trengtes for eliminasjon. Stoffenes halveringstid var omtrent 6-7 timer [30].

Helsemyndighetene i Storbritannia, Frankrike og Australia og New Zealand har satt en maksimal tillatt grense på 200 mg/kg næringsmiddel for totalt innhold av quinolizidinalkaloider i lupinmel og mat som inneholder lupiningredienser [28, 30]. Matvarer som er produsert av lupin og som finnes på markedet i dag blir analysert for alkaloidinnhold. Flere studier har vist at de har et lavt innhold og holder seg godt under den tillatte grensen på 200 mg/kg næringsmiddel [21, 29, 30]. I ristede lupinbønner, som brukes som kaffesurrogat, ble det imidlertid påvist alkaloidinnhold opp mot den tillatte grensen [21].

Lupinbønner har et innhold på 10-20 g alkaloider/kg plantedel. De ferdig vaskede, lupinbønnene har et alkaloidinnhold på ca 500 mg/kg plantedel [28, 30]. Ved bruk av lupinbønner må derfor en grundig og tilstrekkelig utvaskingsmetode benyttes for å sikre et lavt inntak av alkaloider. Tradisjonell bruk av lupinbønner som snacks i Europa har vist at voksne mennesker over lenger tid kan innta en dose av lupinalkaloider på opptil 0.35 mg/kg kroppsvekt/dag uten bivirkninger [30]. Det er imidlertid sikre data på at toksikologiske reaksjoner kan oppstå ved inntak av høye doser, i tillegg til at tradisjonell bruk er dårlig dokumentert. Helsemyndighetene i Australia og New Zealand har derfor satt en lavere grense på inntak av quinolizidinalkaloider over lengre tid for å sikre at det ikke oppstår skadelige effekter. Det er også en sannsynlig variasjon på toleranse hos mennesker. Grensen i Australia og New Zealand er satt til 0.035 mg/kg kroppsvekt/dag over lenger tid for inntak av quinolizidinalkaloider [30].

2. Hensikten med oppgaven

Hensikten med denne oppgaven var ved bruk av radioreseptor-bioassay

- i) å karakterisere antikolinerg aktivitet i lupinbønner, og
- ii) å undersøke antikolinerg belastning i kliniske prøver (serum og cerebrospinalvæske) i en kohort av hoftebruddspasienter.

3. Metode

3.1 Antikolinerg aktivitet i ekstrakter og rensustanser fra lupinbønner

3.1.1 Opparbeidelse av lupinbønnefraksjoner

3.1.1.1 Vasking av bønner etter forskrift fra produsent

Lupinbønner ble kjøpt fra en amerikansk produsent, *Purcell Mountain Farms*. Det fulgte med en tilberedningsmetode for å få vekk den bitre smaken og gjøre bønnene spiselige, *se vedlegg 1*. Bønnene skal først trekke i vann, kokes og deretter vaskes. Vann skal hele tiden dekke bønnene og skiftes ut mellom hvert trinn.

Stoffer og løsninger

Lupinbønner, Purcell Mountain Farms
Destillert vann, FI
Metanol, Chemi-Teknik AS

Utstyr og materiale

Vekt, Mettler toledo PB 3002
Vekt, Acculab Sartorius group
Kokeplate, Elektra
Ss-filterpapir, Aldrich
Metanolbad -40 °C, Hetofrig
Frysetørker Alpha 1-4 LO plus, CHRIST
Kvern, Alpine Augsburg

Prosedyre

100 g bønner ble tilsatt 250 ml destillert vann og satt til svelling i 24 timer. Vaskevannet ble dekantert av og oppbevart i kjøleskap. Bønnene ble tilsatt 250 ml destillert vann og kokt på svak varme i 2 timer og deretter avkjølt. Vann fra koking ble dekantert av og oppbevart i kjøleskap. Bønnene ble overført til begerglass, tilsatt 250 ml destillert vann og plassert i kjøleskap i et døgn. Prosedyren ble gjentatt 3 ganger. Det samlede vannekstraktet, 1500 ml, ble filtrert gjennom SS-filterpapir, deretter fryst på metanolbad og frysetørket. Tørt vannekstrakt ble veid og oppbevart i romtemperatur. De vaskede bønnene ble delt i mindre biter med en saks, fryst ned i fryser og frysetørket. Tørket materiale ble kvernet opp til mel, veid og oppbevart i romtemperatur.

3.1.1.2 Frysetørking

Prinsipp

Frosset materiale behandles ved lavt trykk i en beholder ved -20 °C, dette vil få vannet i materialet til å sublimere. Frysetørkingsprosessen reduserer vanninnholdet i materialet og stoffet vil på denne måte bli tørt.

Prosedyre

Plantemateriale ble fryst ned ved -20 °C i 100-250 ml rundkolber. Vandige løsninger ble nedfrosset på metanolbad ved -40 °C. Frosne prøver ble satt på frysetørker til materialet i kolbene var tørt.

3.1.1.3 Soxhlet ekstraksjon, avfetting og fraksjonering av lupinmel

Prinsipp

Soxhletsekstraksjon er en metode som går ut på å ekstrahere stoffer fra et fast materiale i oppvarmet løsemiddel i et lukket system. En stor rundkolbe med løsningsmiddel, 3 til 4 ganger volumet av soxhletkammeret, er plassert i en varmemantel, koblet til soxhlet og tilbakeløpskjøler. Fast stoff plasseres i et u-formet soxhletfilter. Løsningsmidlet varmes opp og fordampes, deretter kondenseres det i kjøleren og drypper ned og samles opp i kammeret med soxhletfiltret. Når kammeret er fullt tømmes ekstraktet automatisk tilbake ned i kolben via et siphonrør. Dette gjentas til væsken rundt soxhletfiltret er klar i fargen. På grunn av det lukkede systemet vil en konstant mengde løsemiddel kunne gjenbrukes. Ved at det faste materialet er fraskilt reservoaret med løsemiddel vil det kun være i kontakt med rent løsemiddel og en likevekt for ekstraksjonen vil opprettholdes.

Man velger løsemiddel ut i fra hvilke stoffer man ønsker å fjerne eller utvinne fra materialet. Stoffet som er upolare vil løse seg i upolart løsemiddel som ekstraherer det faste prøvematerialet. Polare stoffer vil forbli i det faste materialet.

Utstyr og materiale

Vekt, Acculab Sartorius group
Soxhletapparat
Soxhletfilter
Ss-filterpapir, Aldrich
Isopad varmemantel, Kebolab AB
Tilbakeløpskjøler
Rotavapor, IKA

3.1.1.3.1 Ekstraksjon med diklormetan

Stoffer og løsninger

Lupinmel
Diklormetan, Sigma Aldrich

Prosedyre

50.0 g mel av kverne vaskede bitter lupin bønner ble overført til et soxhletfilter. Ss-filterpapir ble lagt over tørrstoffet i soxhletfiltret og det hele ble plassert i soxhletapparatet. En 2 l rundkolbe ble fylt opp med 1.5 l diklormetan og koblet til soxhletapparatet. Diklormetanen ble holdt kokende på svak varme i 3 timer til ekstraksjonsmidlet i kammeret med soxhletfilter ble klart i fargen. Det samlede ekstraktet ble deretter dampet inn i en mindre kolbe på rotavapor. Ekstraktet ble oppbevart i kjøleskap. Restmateriale av bitter lupin mel i soxhletfilteret ble tørket i avtrekkskap.

3.1.1.3.2 Ekstraksjon med 96 % etanol

Stoffer og løsninger

Lupinmel fra ekstraksjon med diklormetan
96 % etanol, FI

Prosedyre

Soxhletfilter med tørt restmateriale fra ekstraksjon med diklormetan ble satt i soxhletapparatet med ss-filterpapir over. En 2 l rundkolbe ble fylt opp med 1.5 l 96 % etanol og koblet til soxhletapparatet. Etanolen ble holdt kokende i 3 timer til at ekstraksjonsmiddel i kammeret med soxhletfiltret ble klart i fargen. Ekstraktet ble deretter dampet inn i en mindre kolbe på

rotavapor. Ekstraktet ble oppbevart i kjøleskap. Restmateriale av bitter lupin mel i soxhletfilteret ble tørket i avtrekkskap.

3.1.1.4 Rotavapor

Prinsipp

Løsemiddel fjernes ved bruk av rotavapor. Løsningen i en rundkolbe blir varmet opp på vannbad i et lukket system under lavt trykk. Dette vil få væsker å koke på en lavere temperatur enn kokepunkt. Løsemidlet fordamper opp til en tilbakeløpskjøler og kondenserer ned i et oppsamlingsreservoar. Prosessen fortsetter til løsemiddel er inndampet og kun fast stoff er igjen i rundkolben.

Prosedyre

50 ml av totalt 1.5 l løsning ble overført til 250 ml rundkolbe og satt på rotavapor med vannbad 40 °C. Ved skumdannelse ble luft sluppet inn i systemet. Da det kun var rester igjen i kolben ble den fylt med ytterligere 50 ml løsning. Dette gjentok seg til all løsning var overført til rundkolben og alt løsemiddel var dampet inn. Det faste stoffet i kolben ble veid og løst i metanol.

3.1.1.5 Ekstraksjon med 50 % etanol

Stoffer og løsninger

Lupinmel fra ekstraksjon med 96 % etanol
50 % etanol, FI
Destillert vann, FI

Utstyr og materiale

Tilbakeløpskjøler
Isopad varmemantel, Kebolab AB
Ss-filterpapir, Aldrich
Metanolbad -40 °C, Hetofrig
Frysetørker Alpha 1-4 LO plus, CHRIST

Prosedyre

Tørt restmateriale fra ekstraksjonen med 96 % etanol ble overført til en 2 l rundkolbe. 1500 ml 50 % etanol ble tilsatt. Rundkolben ble plassert i varmemantel med tilbakeløpskjøler. Løsningen ble holdt kokende på svak varme i 4 timer. Ekstraktet ble filtrert over ss-filterpapir

og deretter avkjølt på metanolbad, fryst ned i fryser og frysetørket. Ekstraktet ble veid og oppbevart i romtemperatur. Restmateriale av lupinmel ble oppbevart i fryser.

3.1.1.6 Ekstraksjon med eter – opprensning og isolering av alkaloider

Prinsipp

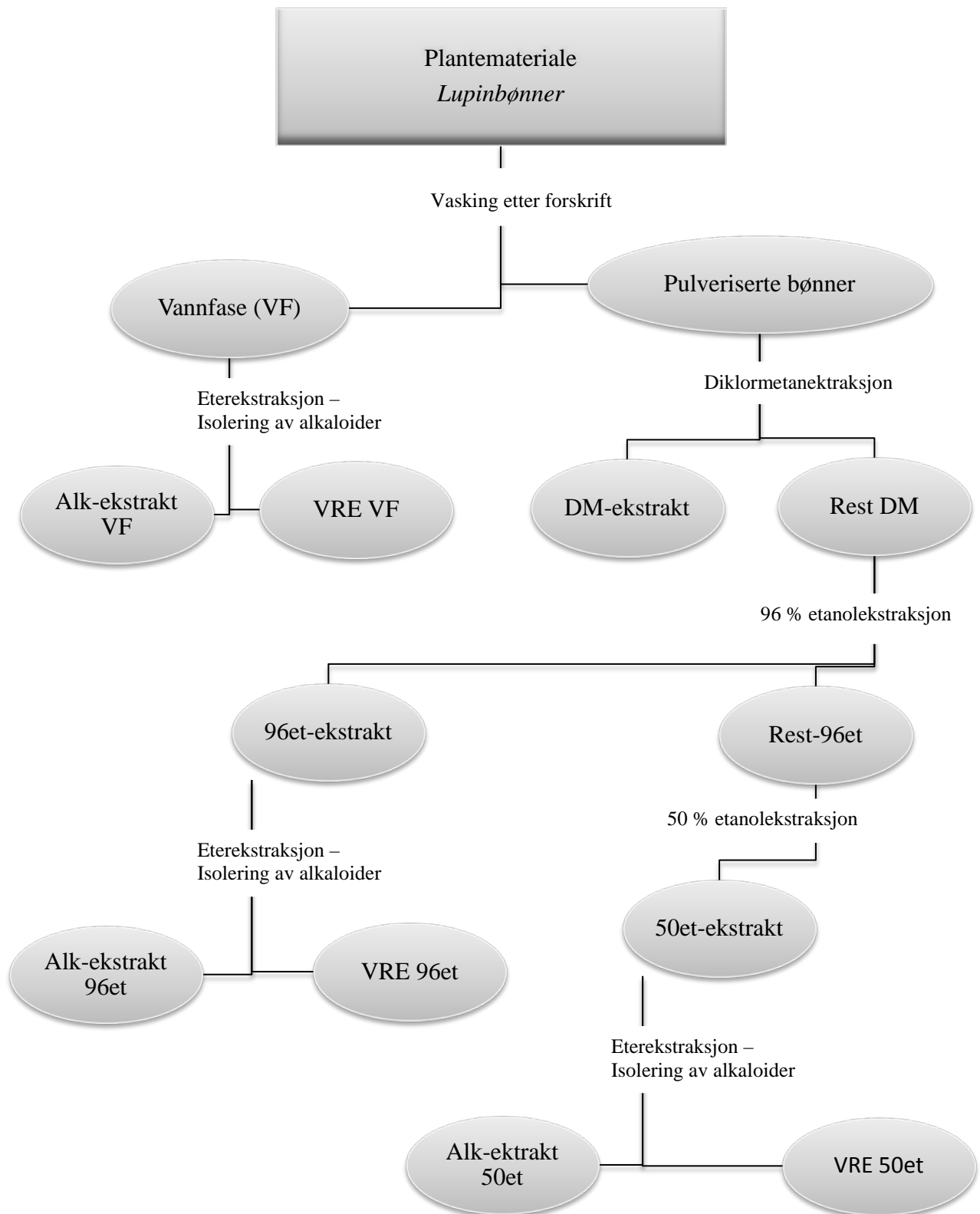
Alkaloider er nitrogenholdige stoffer. De vil forekomme som salter i et surt miljø og da være vannløselige. Ved å tilsette en base vil stoffene gjøres upolare å kunne ekstraheres over i en organisk fase.

<u>Stoffer og løsninger</u>	<u>Utsyr og materiale</u>
Ammoniakk, VWR International AS	Skilletrakt
Eter, den norske Eterfabrikk	Silicon treated phaseseparations paper, Whatman
Methanol, Chemi –Teknik AS	Inndamper, Reacti-Therm III Heating module,
Svovelsyre, Fluka Sigma Aldrich	Pierce
Lupinfraksjoner	

Prosedyre

Prøvemateriale fra alle lupinfraksjoner (figur 3.1) utenom DM (VF, 96et og 50et) ble løst i 0.05 M svovelsyre i forhold 1:10. Hver av løsningene ble overført til en 100 ml skilletrakt. Vandig ammoniakk i forhold 10:1 ble tilsatt i avtrekk. Blandingene ble forsiktig rystet og ekstrahert 2 ganger med eter i forhold 2:1. Væskene ble varsomt blandet, da det var fare for emulsjons dannelse. Skilletrakten ble snudd opp ned 5 ganger. Korken ble åpnet noen ganger for å slippe ut overtrykk. Eterekstraktene ble filtrert gjennom faseseparatoringspapir ned i et begerglass. Eteren ble dampet av med nitrogengass under svak oppvarming i avtrekkskap. Inndampningsrester fra eterekstraksjonen (Alk-VF, Alk-96et og Alk-50et) ble løst i metanol og satt i kjøleskap for videre testing med TLC, GC og til måling av antikolinerg aktivitet. Vannekstraktene ble satt i avtrekkskap for avdamping av mulige eterrester og deretter fryst på metanolbad og tørket på frysetørker. Tørt materiale (VRE-VF, VRE-96et og VRE-50et) ble oppbevart i romtemperatur for videre måling av antikolinerg aktivitet.

3.1.1.7 Flytskjema for lupinbønnefraksjoner



Figur 3.1. Viser et flytskjema for lupinbønnefraksjoner. **DM**: diklormetan. **Alk**: alkaloid. **Et**: etanol. **VRE**: vannfase fra eterekstraksjon. **Rest**: restmateriale fra ekstraksjon.

3.1.2 Tynnsjikt-kromotografi, TLC

Prinsipp

TLC er en separasjons og identifiseringsmetode. Silikabelagte glassplater brukes som stasjonærfase. Prøver blir applisert 2,5 cm fra nedre kant av platen og en mobilfase trekker med seg stoffene oppover platen i en lukket beholder. Når mobilfasen har kommet 1-2 cm fra den øvre kanten tas platen opp og tørkes. En spesifikk påvisningsmetode i form av en sprayreagens som gir oransje farge med alkaloider påføres platen og identifisering av alkaloider kan gjøres visuelt. Man sammenligner flekkenes retensjonsfaktor, R_f – verdi, flekkenes farge, størrelse og intensitet med referansesubstanser. R_f – verdien regnes ut fra lengden fra applikasjonsstedet av prøve til senter av vandret prøve / lengden av mobilfasevandring [34].

Stoffene vandrer oppover platen i henhold til deres fordeling mellom organisk mobilfase og den polare stasjonærfasen. Retensjonen er sterkere for stoffer med høy polaritet og de får en lav R_f – verdi [34].

<u>Stoffer og løsninger</u>	<u>Utstyr og materiale</u>
Alkaloidekstrakter	TLC-silikagel F ₂₅₄ , Merck
Mobilfase	Mikrorør, Vitrex medical A/S
Kaliumjodvismutatløsning	Elueringskar
Lupanin, Quality Phytochemicals LLC	Varmeovn, Heraeus, Thermo Scientific
13-OH-lupanin, Quality Phytochemicals LLC	Spraymaskin, Merck

Prosedyre

Det ble applisert 10 µl prøve med alkaloidekstrakt, 30 µl lupanin og 2 µl 13-OH-lupanin på tynnsjiktplate (5*10 cm). Appliseringsstedene ble merket med blyant. Platen ble plassert i elueringskaret med mobilfase. Når den hadde trukket opp til ¾ deler av platene ble de tatt ut og løpemiddelsfronten ble merket. Platen ble tørket i ovn ved 100 °C i 10 min.

Kaliumjodvismutatløsning ble sprayet på platen og oransje soner ble merket.

3.1.2.1 Sprayreagens – kaliumjodvismutatløsning

Stoffer

Vinsyre, Merck
Vismutsubnitrit, Sigma-Aldrich
Kaliumjodid, Chemi-Teknik AS
Destillert vann, FI

Utstyr og materiale

Vekt, Sartorius BP
Magnetrorer, IKA
Ss-filterpapir, Aldrich

Prosedyre

20.0 g vinsyre og 1.70 g vismut ble tilsatt et begerglass og løst i 40 ml vann med magnetrorer. 16.0 g kaliumjodid ble løst i 40 ml vann, litt av vannet ble holdt igjen for å vaske begeret. Kaliumjodidløsningen ble overført til vinsyre-vismutløsningen og ble rørt med magnetrorer i 1 time. Løsningen ble deretter filtrert på ss-filterpapir til et begerglass. Rett før bruk ble 5 ml løsning filtrert ned i en brun glassflaske, 15 ml vann ble tilsatt og flasken ble koblet til spraymaskinen.

3.1.2.2 Mobilfase; Aceton: Vann: Ammoniakk [90 : 7 : 3]

Stoffer

Ammoniakk løsning, VWR International AS
Aceton, Prolabo VWR International AS
Destillert vann, FI

Prosedyre

180 ml aceton og 14 ml vann ble blandet i et begerglass. 6 ml konsentrert vandig ammoniakk ble tilsatt løsningen og rørt om. 100 ml ble overført til elueringskaret 1 time før eluering.

3.1.3 Gasskromotografi, GC

Prinsipp

GC er en separasjonsmetode der stoffer overføres til gassform og separeres i gassfasen. En prøve injiseres i en injektor med høy temperatur og fordampes. Bæregassen, mobilfasen, en inert gass, leder stoffene gjennom en oppvarmet kolonne med en tynn film av stasjonærfase på innsiden og videre til en detektor. Stoffet fordeler seg ulikt mellom stasjonærfase og bærerergass og separeres dermed. Ved utgangen av kolonnen detekteres stoffene av en ionisasjonsdetektor, FID. Den måler mengden av ladede partikler som dannes av stoffene når de brenner i en flamme [34].

Separasjonen og retensjonen styres av temperaturen og løseligheten til analyttene i en polar stasjonærfase. Ved en økning i temperatur, øker flyktigheten og retensjonen minker. Polare stoffer retarderes mer på grunn av interaksjon med den polare stasjonærfasen [34].

3.1.3.1 Kalibrering

Prøver ble injisert på gasskromatograf med flammeionisasjonsdetektor, FID, og Chromeleon, Dionex, software for instrument kontroll og datastyring ble benyttet. Videre ble resultater analysert og beregninger utført i Excel 2010, Microsoft Office.

Analyseparametere:

Bæregass:	Helium
Kolonne:	Restek 5 (30m; 0.25mm; 0.25µm)
Injektortemperatur:	280 °C
Detektortemperatur:	300 °C
Flow mode:	Pressure kontroll 0.85 bar
Injeksjonsmetode:	Split (1/10)
Injeksjonsvolum:	1µl
Temperaturprogram:	50 °C initielt, holdes 1 min,

(rate 19 °C/min)
 250 °C, holdes 4 min,
 (rate 10 °C/min)
 275 °C, holdes 5 min,
 (rate 7 °C/min)
 300 °C, holdes 2 min

Kalibreringen ble utført ved lineær regresjonsanalyse med 6 kalibreringspunkter etter ligningen $y = a \cdot x - b$. Data ble analysert i Excel 2010, Microsoft Office. Lupanin og 13-OH-lupanin ble benyttet som referansesubstanser og koffein som internstandard. Det ble laget to mellomfortynninger med standardløsning med ulikt forhold av referansesubstanser og internstandard. Standard 5 og 6 er direkte mellomfortynninger, mens standard 1-4 ble laget med et uttak av de forskjellige mellomfortynningene og videre fortynnet med internstandard (IS), se tabell 3.1.

Tabell 3.1 Oversikt over konsentrasjoner av standarder brukt i kalibrering av GC-metode

Analytt	Standard 1 (mg/ml)	Standard 2 (mg/ml)	Standard 3 (mg/ml)	Standard 4 (mg/ml)	Standard 5 (mg/ml)	Standard 6 (mg/ml)
Lupanin	0.03	0.27	0.40	1.00	2.68	4.00
13-OH-lupanin	0.02	0.25	0.36	0.90	2.50	3.60
Koffein	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03

Stoffer og løsninger

Koffein bruksløsning, Sigma-Aldrich
 Lupanin, Quality Phytochemicals LLC
 13-OH-lupanin, Quality Phytochemicals LLC

Utstyr og materiale

GC, Fockus GC, Thermo Scientific
 Micropipetter, model CR-700, Hamilton
 Inndamper, Reacti-Therm III Heating
 module, Pierce

Prosedyre

10 mg av referansesubstansene lupanin og 13-OH-lupanin ble løst i 2 ml metanol hver for seg. To løsninger med lupanin og 13-OH-lupanin ble laget, standard 5 og 6, se tabell 3.1. Løsemiddelet ble dampet av med nitrogen-gass. Det ble tilsatt 1 ml bruksløsning (1.032 mg/ml) av koffein løst i diklormetan til standard 5 og 6. Standard 1-4 ble laget via

fortynninger av standard 5 og 6 med bruksløsning av koffein. 1 µl prøve ble injisert i injektoren for GC-analyse.

3.1.3.2 GC-målinger

Det ble benyttet samme metode som beskrevet i *avsnitt 3.1.3.1*.

<u>Stoffer og løsninger</u>	<u>Utstyr og materiale</u>
Diklormetan, Sigma-Aldrich	GC, Fockus GC, Thermo Scientific
Koffein, Sigma-Aldrich	Inndamper, Reacti-Therm III Heating module, Pierce
Alkaloidekstrakter av lupinbønner	Micropipetter, model CR-700, Hamilton

Prosedyre

Koffein ble brukt som internstandard. Den ble løst i diklormetan og det ble laget en stamløsning i konsentrasjon 2,58 mg/ml, og en bruksløsning i konsentrasjon 1,032 mg/ml. Alkaloidekstraktene var løst i metanol. Det ble tilsatt en eksakt mengde internstandard til hver og en av prøvene, slik at eksakt forhold mellom internstandard og prøveløsning var kjent. Løsemidlet ble dampet av med nitrogengass under svak oppvarming og ekstraktene ble løst i diklormetan. 1 µl prøve ble injisert i injektoren for GC-analyse.

3.1.3.3 GC-MS-målinger

Prinsipp

I massespektrometeret, MS, blir de separerte stoffene fra gasskromatograferingen bombardert med elektroner i vakuum. Det dannes ioner av molekylene og fragmenter av molekylene som også ioniseres. Ioniserte molekyler og fragmenter analyseres via separasjon etter forhold mellom masse (m) og ladning (z), m/z, og via deteksjon av ionenes mengde og masse. Et massespektrum vil gi strukturinformasjon om stoffer i prøven og kan dermed brukes til identifisering og kvantifisering [34].

Prosedyre

Det ble benyttet samme metode og kolonne som ved GC-analyser med FID detektor, *se beskrivelse under avsnitt 3.1.3.1 og 3.1.3.2*.

3.1.4 Måling av antikolinerg aktivitet

Prinsipp

Analysemetoden for måling av antikolinerg aktivitet, AA, er basert på fortregning av en radioaktivt merket ligand til et muskarinergt reseptorpreparat isolert fra rottehjerne (cortex). Når stoffer i en gitt prøve fortrenger liganden [³H]quinuclidinylbenzilat (QNB) fra å binde seg til muskarinerge hjernereseptorer, vil dette være et uttrykk for AA [13]. I metoden måles mengden QNB som, etter tilsetning av prøveløsningen, fortsatt er bundet til reseptorpreparatet. Målingen gjøres ved væskescintillasjonstilling. Radioaktiviteten måles via en detektor i form av scintillasjonsvæske, tellevæske, som tilsettes prøvematerialet. Tellevæsken absorberer ioniserende stråling og omdanner den til lysenergi som måles av en fotomultiplikator i telleren [35]. Et lavt radioaktivt signal (CCPM) vil reflektere sterk AA og omvendt. Grad av AA kalibreres mot en standardkurve med atropin og uttrykkes som pmol atropinekvivalenter per ml [13, 14].

Metoden for å måle AA i et 96-brønnsformat på Multiscreen-plater med små prøvevolumer ble utviklet av Stine Mjåvatn Jakobsen, masteroppgave i farmasi, Senter for farmasi, Universitetet i Bergen våren 2009 [14]. Metoden ble videre tilpasset for å brukes på matriks uten innhold av serum av Berit Lynum, masteroppgave i farmasi, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap og Avdeling for farmasøytisk kjemi, Universitetet i Oslo våren 2010 [19].

Stoffer og løsninger

Fosfatbuffer 50mM
Muskarinergt reseptorpreparat
[³H]QNB-løsning
Lupinprøver
Atropinløsning
Tellevæske, OptiPhase Supermix Coctail, Perkin Elmer
Lupanin, Quality Phytochemicals LLC
13OH-Lupanin, Quality Phytochemicals LLC

Utstyr og materiale

Multiscreen, HTS, Millipore AS
ToppSeal, Perkin Elmer
Vacumcontroll, Millipore AS
We Warm 1, Denley
Bellydancer, Alfa-lab A/S
1450 Microbeta Plus, Wallac AB

Prosedyre

Prøveekstraktene ble tint opp til romtemperatur og resterende løsninger ble holdt kaldt på is under hele forsøket. Brønnene på Multiscreen platen ble fuktet 2 ganger med 100 µl fosfatbuffer i hver brønn i 1 minutt for hver gang og vakuumfiltrert. ToppSeal tape ble festet på undersiden av platen. Inkubasjonsmiksturen ble tilsatt hver brønn i følgende rekkefølge:

-
- 1. Fosfatbuffer 50 mM, 60 µl*
 - 2. Prøve i fosfatbuffer med 3 % BSA, 20 µl*
 - 3. [³H]QNB-løsning 1.8 pmol/ml, 80 µl*
 - 4. Muskarinergt reseptorpreparat, 80 µl*
-

Platen ble dekket med tape på oversiden og satt til inkubasjon på We Warm 1 shaker i 60 minutter i romtemperatur. Deretter ble tapen fjernet og platen med inkubasjonsmikstur ble vakuumfiltrert. Brønner som ikke ble brukt ble fylt med 240 µl fosfatbuffer eller dekket med tape for å opprettholde vakuum ved filtrering. Hver brønn ble vasket med 100 µl fosfatbuffer i 1 minutt og vakuumfiltrert. Prosessen ble gjentatt 6 ganger. Etter den siste vasken sto vakuumet på i 5 minutter til at filtret på platen nesten var tørt. Tape ble festet på undersiden av platen og 30 µl tellevæske ble tilsatt hver brønn. Platen ble dekket med tape på oversiden og satt til risting på bellydancer i 30 minutter. Tapen ble tørket med etanol og platen ble så talt i Microbeta Plus.

3.1.4.1 Fosfatbuffer 50mM

<u>Stoffer</u>	<u>Utstyr og materiale</u>
NaH ₂ PO ₄ * 2H ₂ O, AnalaR	Vandig filterpapir 0,22µm, Millipore As
NaOH, AnalaR	Magnetrører, IKA
Destillert vann, FI	pH-måler, Mettler Toledo

Prosedyre

7.8005 g natrium dihydrogenfosfat ble veid in og løst i 400 ml destillert vann. pH ble justert til 7.7 med konsentrert NaOH løsning og filtrert med vannsug over vandig filterpapir. Bufferløsningen ble overført til målebeger og tilsatt vann til 1000 ml sluttvolum. Bufferen ble oppbevart i kjøleskap.

3.1.4.1.1 Fosfatbuffer med 3 % Bovine Serum Albumin, BSA

Som matriks til prøveløsningene som ble analysert i denne oppgaven ble det benyttet BSA i en konsentrasjon av 3 % løst i fosfatbuffer. Dette gav samsvarende resultat som ved bruk av serum som matriks.

Stoffer og løsninger

Fosfatbuffer 50 mM

Albumin from Bovine Serum, Essentially fatty acid free, Sigma-Aldrich

Prosedyre

3 g BSA ble overført til 100 ml fosfatbuffer. Løsningen ble satt i kjøleskap over natt og forsiktig rørt, for å få økt løselighet og minsket skumdannelse. Ferdig løsning ble oppbevart i fryser ved -20 °C.

3.1.4.2 Muskarinergt reseptorpreparat

Preparering av muskarinergt reseptorpreparat ble utført av personale ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Universitetet i Oslo.

Muskarinergt reseptorpreparat ble fremstilt av rottehjerner. Vev og løsninger ble holdt kaldt på is under hele prosessen. 10-15 minutter etter at rottene ble avlivet ble alt vev utom lillehjernen tatt ut med pinsett. 50 mM fosfatbuffer ble tilsatt i forhold 10 ml buffer per 1 g hjernevev. Massen ble sonikert i 40-45 sekunder med en amplitude på 50 og overført til plastrør. Reseptorpreparatet ble oppbevart i fryser ved -70 °C.

Stoffer og løsninger

Fosfatbuffer 50 mM

Muskarinergt reseptorpreparat

Prosedyre

3 ml muskarinergt reseptorpreparat ble tilsatt 27 ml fosfatbuffer og blandet på whirlmikser og fortynnet i forhold 1:10. Preparatet ble oppbevart i fryser ved -20 °C.

3.1.4.3 [³H]QNB-løsning

Stoffer og løsninger

Fosfatbuffer 50 mM

l-Quinuclidinyl[phenyl-4-³H]benzilate, GE Healthcare Amersham

QNB hadde i konsentrert løsning en radioaktiv konsentrasjon på 1.0 mCi/ml og en spesifikk aktivitet på 48.0 Ci/mmol, noe som gav en konsentrasjon på 20833 pmol/ml. Løsningen ble oppbevart ved -20 °C.

Prosedyre

17 µl konsentrert løsning ble tilsatt 1983 µl fosfatbuffer og blandet på whirlmikser. 100 µl mellomløsning med en konsentrasjon på 180 pmol/ml ble videre fortynnet med 9900 µl fosfatbuffer og blandet på whirlmikser. Bruksløsningen hadde en konsentrasjon på 1.8 pmol/ml og en spesifikk aktivitet på 50.5 Ci/mmol. Begge løsningene ble oppbevart ved -70 °C.

3.1.4.4 Standardkurve, kontrollprøver og referanseløsninger

Det ble laget en standardkurve for fortregning av radiomerket ligand med atropin, løst i fosfatbuffer med 3 % BSA, i 12 ulike konsentrasjoner i intervall 0.05 til 100 nM (tabell 3.2). To paralleller av 4 standardkurver ble analysert. For å ha kontroll over variasjoner mellom hver måling ble det for hver plate innlemmet 3 positive kontrollprøver med atropin (50, 3 og 0.1 nM), løst i fosfatbuffer med 3% BSA. Det tilsvarer bunn, topp og EC₅₀ i konsentrasjonsintervallet for standardkurven.

Det valgte konsentrasjonsintervallet er tidligere testet ut av Jakobsen [14] og dekker krav for intervall utenfor rekkevidden for kvantifisering, topp- og bunnkonsentrasjoner.

Tabell 3.2 Oversikt over konsentrasjonsintervall for standardkurver med atropin

Atropinløsning	Konsentrasjon i: mellomløsning (μM)	inkubasjonsmiksturen (nM)
Standard 1	120	100
Standard 2	60	50
Standard 3	30	25
Standard 4	14.4	12
Standard 5	7.2	6
Standard 6	3.6	3
Standard 7	1.8	1.5
Standard 8	0.9	0.75
Standard 9	0.48	0.4
Standard 10	0.24	0.2
Standard 11	0.12	0.1
Standard 12	0.06	0.05

Det ble kjøpt inn renstoffer av lupanin og 13-OH-lupanin fra Quality Phytochemicals LLC, disse ble brukt som referansestoffer. Stoffene var løst i metanol en konsentrasjon på 5 mg/ml. Videre ble det benyttet dimetylsulfoksid (DMSO) som løsemiddel til fortynninger av referansestoffene. For å lett kunne sammenligne aktiviteten til lupanin og 13-OH-lupanin med atropin ble det laget standardløsninger med omtrent likt konsentrasjonsintervall som referansestoffene. Det ble analysert standardkurver med 2 paralleller av hver standard.

Ved antikolinerg måling av lupinbønneekstrakter ble prøvene løst i egnede løsemidler. For å korrigere for innvirkning av løsemiddelet ble det kjørt blanke kontrollprøver med 2 paralleller for hvert løsemiddel i forhold 20:80 med løsemiddel/fosfatbuffer med 3 % BSA hver gang en prøve med det aktuelle løsemidlet ble målt.

3.1.4.5 Prøver av lupinbønneekstrakter

Det ble målt AA på flere ulike fraksjoner av lupinbønneekstrakter, *se flytskjema under 3.1.4.7 og tabell 3.3*. Ekstraktene ble løst i egnet løsemiddel og fortynnet i 3-5 ulike konsentrasjoner, *se tabell 3.3 og 3.4*, i forhold 20:80 prøve/ fosfatbuffer med 3 % BSA.

Tabell 3.3 Oversikt over fraksjoner med lupinekstrakter

Ekstrakt	Fraksjoner			
Rå-ekstrakter	<u>VF</u>	<u>DM</u>	96et	<u>50et</u>
Alkaloidekstrakter	VF		96et	50et
VRE	VRE VF		VRE 96et	VRE 50et

VF: vannfase, **DM:** diklormetan, **et:** etanol, **VRE:** vannfase etter eter-ekstraksjon. Prøver løst i fosfatbuffer 50mM, dimetylsulfoksid (DMSO), metanol.

Tabell 3.4 Oversikt over konsentrasjoner av lupinprøver i inkubasjonsmiksturen

Bitter lupin-ekstrakt	Prøve 1 (µg/ml)	Prøve 2 (µg/ml)	Prøve 3 (µg/ml)	Prøve 4 (µg/ml)	Prøve 5 (µg/ml)
Rå-ekstrakter	1670	167	16.7		
Alkaloidekstrakter	8.33	0.833	0.0833	0.00833	0.000833
VRE	200	100	50	25	12.5

VRE: vannfase etter eter-ekstraksjon

Prosedyre

Ekstraktene ble løst i egnede løsemiddel i eppendorfrør. De ble behandlet med svak oppvarming på vannbad og deretter godt blandet på whirlmikser og så fortynnet til mellomløsninger. 40 µl av hver mellomløsning ble blandet med 160 µl fosfatbuffer med 3 % BSA i eppendorfrør og mikset på whirlmikser. Prøveløsningene ble oppbevart i fryser ved – 20 °C.

3.1.4.6 Databehandling

Resultatene fra tellingen av Multiscreen platene ble først lagt in i Excel 2010, Microsoft Office, for behandling og siden overført til GraphPad Prism 4, GraphPad Software. Data for standardkurvene ble analysert ved hjelp av XY-nonlinear regresjonsanalyse og ble presentert i grafer der kurvene ble tilpasset ligningen "one site competition". Data for bitter lupin prøver ble presentert i stolpediagram med grad av hemming i forhold til kontrollprøve.

Ligningen for one site competition:

$$y = \frac{Bunn \cdot (Topp - Bunn)}{1 + 10^{x - \log EC50}}$$

3.1.5 Vannkvalitet

I alle forsøkene ble det brukt destillert vann, rensert med Elix Millipore/Progard 2 w/o polyfenolfilter.

3.2 Antikolinerg belastning hos hoftebruddpasienter

3.2.1 Pasientmateriale

Prøvematerialet for måling av antikolinerg aktivitet ble samlet in via Dr Leiv Otto Watne, fra pasienter som var med i en hoftebruddstudie ved Oslo Universitetssykehus (Ullevål), i samarbeid med Dr Roanna Hall, Clinical Research Fellow, Geriatric Medicine Department, Edinburgh University Hospital. Serum og CSF-prøver ble tatt fra 106 pasienter fra Oslo og 52 pasienter fra Edinburgh etter sykehusinnleggelse, men før operasjon. Lister over legemidler som pasientene ble behandlet med ved innleggelse eller som var seponert i løpet av 10 siste dager ble brukt som grunnlag for beregning av ACB-skåre.

3.2.2 Vurdering av antikolinergt legemiddelskåre

ACB-skåre ble beregnet med utgangspunkt i den amerikanske ACB-listen fra Anticholinergic Cognitive Burden List [7] som ble publisert av Boustani *et al* i 2008 [5]. Listen ble videre supplert med den engelske ADS-listen, 'Anticholinergic Drug Scale Score' [16], som ble publisert av Carnahan *et al* i 2006 [36], informasjon i Norsk Legemiddelhandbok, og med

vurdering fra artikkel om urologiske spasmolytika som ble publisert av Jakobsen *et al* [37]. Liste med endringer kan ses i *vedlegg 2*.

Den enkelte pasients totale antikolinerge legemiddelskåre ble beregnet ved å summere de enkelte legemidlenes skåre. Klassifiseringen av skåre til enkeltlegemidler fulgte følgende definisjoner: '0' = ingen antikolinerg aktivitet, '1' = mulig antikolinerg aktivitet, '2' = antikolinerge bivirkninger rapportert ved klinisk bruk, og '3' = uttalte antikolinerge bivirkninger ved klinisk bruk.

3.2.3 Måling av antikolinerg aktivitet i serum- og cerebrospinalvæskeprøver

Metodens prinsipp og utførelse er beskrevet i *kapittel 3.1.4*. I stedet for prøvemateriale fra bitter lupin ble det benyttet serum- og CSF-prøver fra pasienter som nevnt i *kapittel 3.2.1*. Løsningene som ble benyttet i målingene er beskrevet i *kapittel 3.1.4.1, 3.1.4.2 og 3.1.4.3*.

3.2.3.1 Kontrollprøver

For å kontrollere variasjoner mellom hver måling ble det for hver dag inkludert kalibreringsprøver til en kalibreringskurve. Disse bestod av atropin som var løst i legemiddelfritt serum. Konsentrasjonsintervallet inkluderte 10 ulike konsentrasjonsnivå fra 0.001 nM til 1000 nM [14].

3.2.4 Målvariable og statistiske analyser

Antikolinerg totalskåre og antikolinerg aktivitet i serum/CSF på gruppenivå ble angitt som medianverdier med spredning. Målinger av antikolinerg aktivitet i serum og CSF ble vurdert mot pasientenes totale ACB-skåre, pasientenes sykdomstilstand og forskjeller mellom pasientgruppene fra Oslo og Edinburgh. Det ble også vurdert om det var forskjeller i antikolinerg aktivitet hos pasienter med lav ACB-skåre og høy ACB-skåre. Ved sammenligning mellom antikolinerg legemiddelskåre og antikolinerg aktivitet ble data analysert ved hjelp av enkel lineær regresjonsanalyse. Samme metode ble brukt for å vurdere eventuell korrelasjon mellom antikolinerg aktivitet i serum og CFS. Ved sammenligning av

kliniske symptomer (delirium og demens) med antikolinerg aktivitet og ACB-skåre ble Mann Whitneys test benyttet. Mann Whitneys test ble også benyttet for å vurdere forskjeller mellom lav og høy ACB-skåre. Ved sammenligning mellom pasientgruppene fra Oslo og Edinburgh ble det benyttet Mann Whitneys test for å se på forskjeller i antikolinerge målinger, alder, antall legemidler og ACB-skåre. Fishers test ble benyttet for å se på forskjeller i karakteristikk for demens og kjønn.

Signifikansnivået ble satt til $p < 0.05$. P-verdier fra 0.01 til 0.1 er spesifisert i oppgaven, verdier utenom dette er oppgitt som < 0.01 og > 0.1 . Alle sentralmål ble oppgitt som medianverdi og variansen ble oppgitt som range og intervall. Dataene ble bearbeidet i Excel 2010, Microsoft Office. Statistiske analyser ble utført med GraphPad Prism 4, GraphPad Software.

4 Resultater

4.1 Antikolinerg aktivitet i ekstrakter og rensustanser fra lupinbønner

4.1.1 Opparbeidelse av lupinbønnefraksjoner

Lupinbønnefraksjoner ble opparbeidet som beskrevet i metode 3.1.1 og presentert i tabell 4.1.

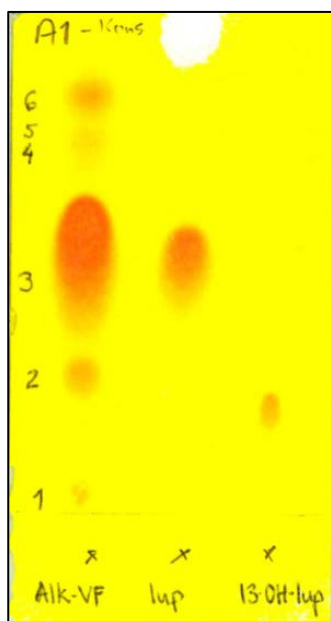
Tabell 4.1. Fraksjoner fra opparbeidelse av lupinbønner. **VF**: vannfase, **DM**: diklormetan, **et**: etanol, **Alk**: alkaloid, **VRE**: vandig restfase fra eterekstraksjon.

Ekstraksjon	Fraksjon		
Vasking etter forskrift	VF		
Diklormetan	DM		
96 % etanol	96et		
50 % etanol	50et		
Eter	Alk-VF	Alk-96et	Alk-50et
Vandig rest fra eter	VRE-VF	VRE-96et	VRE-50et

4.1.2 Identifikasjon med TLC

Som en preliminær test ble alkaloider i eterfraksjonen (Alk-VF) separert og delvis identifisert med TLC. Det ble påvist minst seks ulike alkaloider. Ved sammenligning mellom fraksjon Alk-VF med rensustansene lupanin og 13-OH-lupanin ble det identifisert store mengder lupanin i alkaloidekstraktet fra lupinbønner (figur 4.1). Oransje flekker påviser alkaloider i prøven. Seks ulike flekker er påvist i fraksjon Alk-VF. Flekk nummer tre i figur 4.1 samsvarer med flekk for lupanin med lik R_f -verdi på 0.50. Det var ingen av flekkene i Alk-VF som var identiske med 13-OH-lupanin. I fraksjonene Alk-VF, Alk-96et og Alk-50et ble det påvist

alkaloider i alle ekstraktene (ikke vist i figur). Det ble identifisert tre alkaloider i Alk-50et som samstemte med flekk nr 6, 5 og 3 for Alk-VF. I Alk-96et ble det identifisert fire alkaloider som samstemte med flekk nr 6, 5, 3 og 1 for Alk-VF. Flekk nummer 3 som ble identifisert som lupanin var altså forkommende i alle fraksjoner (Alk-VF, Alk-96et og Alk-50et).

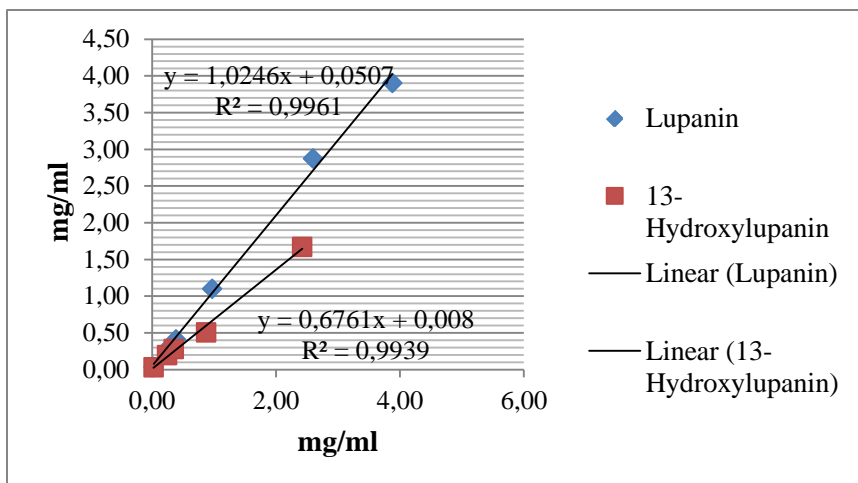


Figur 4.1. Tynnsjikt-kromatografiplate med fraksjon Alk-VF til venstre, lupanin rens substans i midten og 13-OH-lupanin rens substans til høyre. **Alk**: alkaloid, **VF**: vannfase.

4.1.3 GC og GC-MS målinger

4.1.3.1 Kalibrering av GC-metode

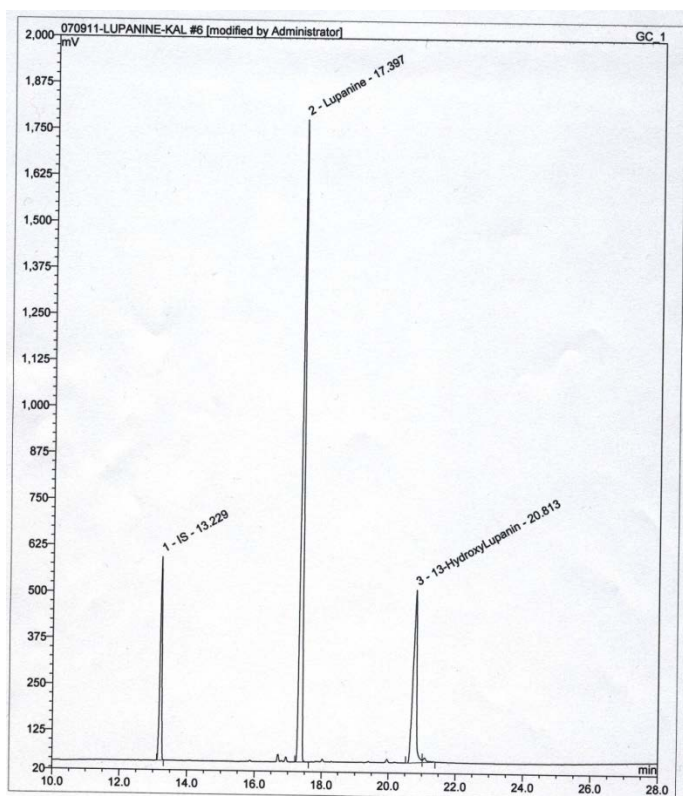
Kalibreringen av GC-metoden ble utført som beskrevet i 3.1.3.2. På grunn av for lite stoffmengde ble standard 4 ikke brukt i analysen. Lineær regresjonsanalyse viste god korrelasjon med korrelasjonskoeffisient (r^2) lik 0.996 for lupanin og r^2 lik 0.994 for 13-OH-lupanin (figur 4.7).



Figur 4.7. Kalibreringskurver for lupanin ($r^2 = 0.996$) og 13-OH-lupanin ($r^2 = 0.994$).

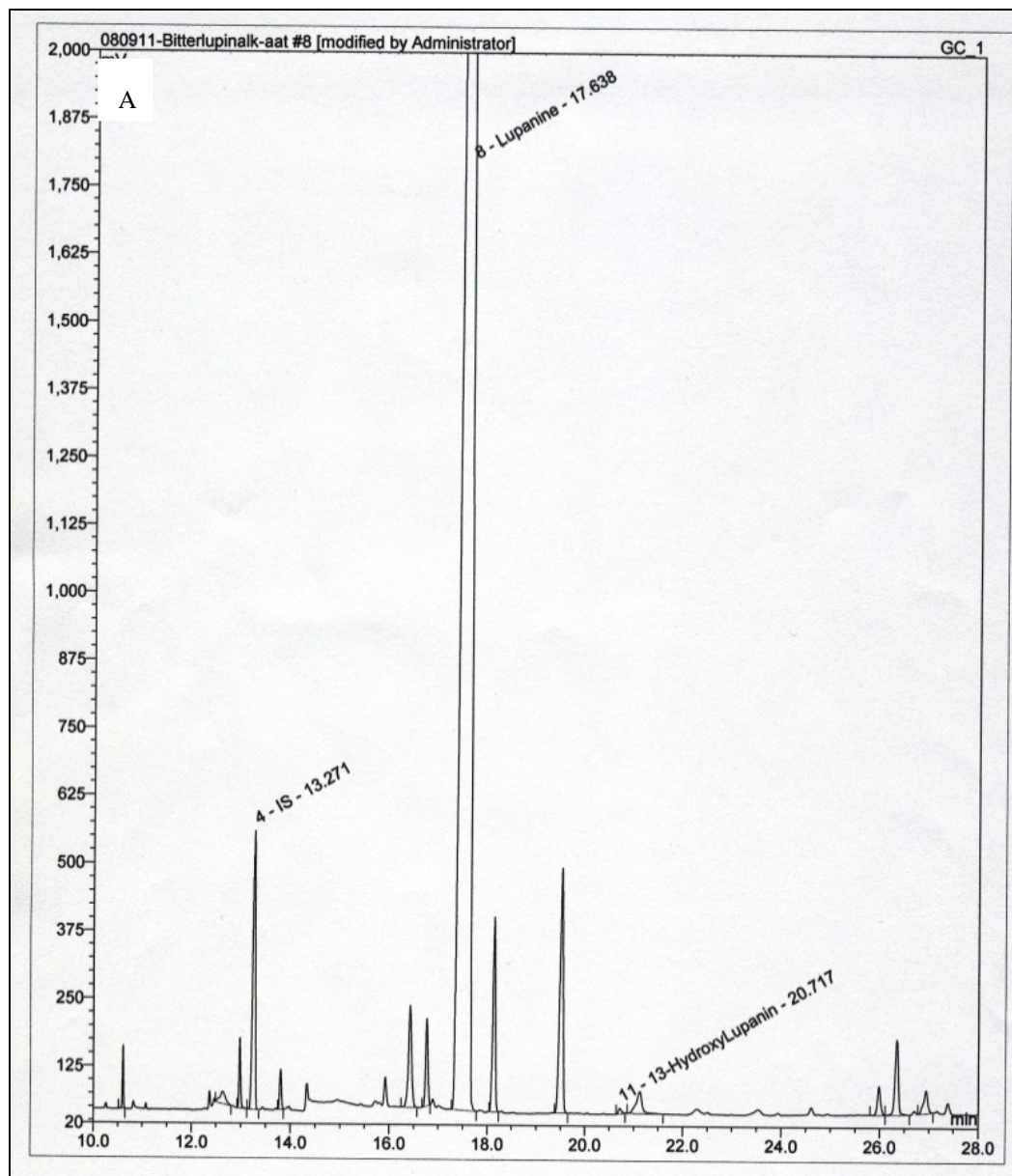
4.1.3.2 GC-målinger

Figur 4.2 viser et GC-kromatogram av en standardløsning som inneholdt intern standard (koffein) og referansesubstansene lupanin og 13-OH-lupanin. Kromatogrammet viste en topp ved 13.229 min som ble identifisert som koffein. Toppen med retensjonstiden på 17.397 min ble identifisert som lupanin og toppen med 20.813 min som 13-OH-lupanin.

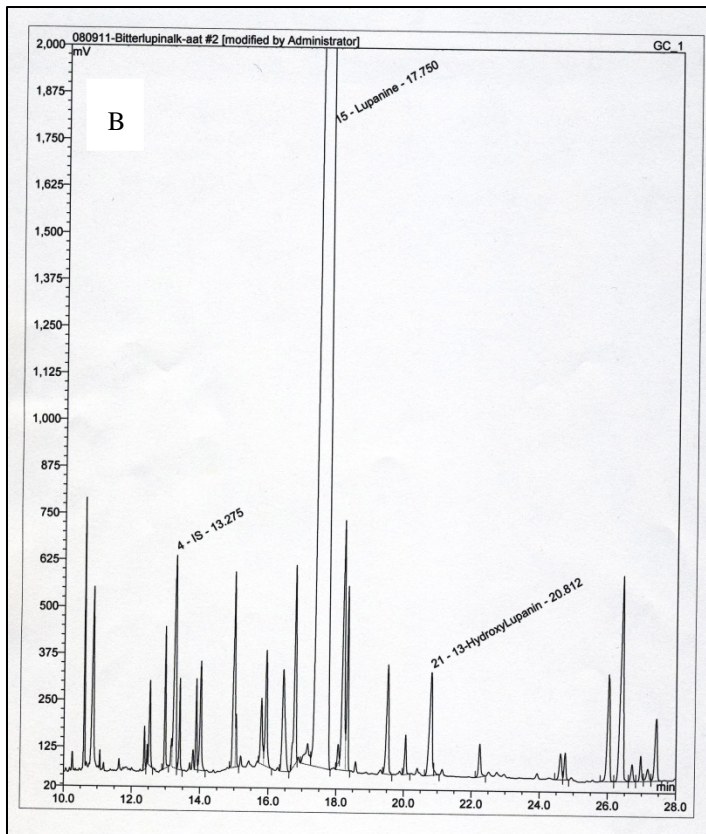


Figur 4.2. GC-kromatogram over standardprøve av koffein (internstandard [IS]; retensjonstid 13.229 min), lupanin (retensjonstid 17.397 min), og 13-OH-lupanin (retensjonstid 20.813 min).

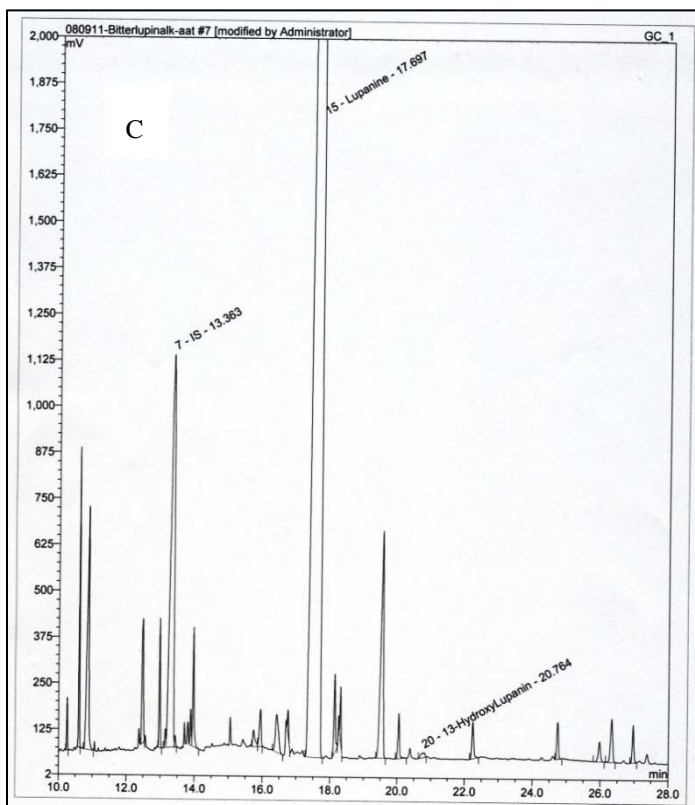
GC-analyser ble foretatt på fraksjon Alk-VF, Alk-96et og Alk-50et (figur 4.3 A-C). Både lupanin og 13-OH-lupanin ble identifisert i alle de testede fraksjonene, i tillegg til et stort antall uidentifiserte topper. Flest antall topper ble funnet i Alk-96et (figur 4.3 B).



Figur 4.3. A: GC-kromatogram Alk-VF. IS (retensjonstid 13.271 min), lupanin (retensjonstid 17.638 min), og 13-OH-lupanin (retensjonstid 20.717 min).



B: GC-kromatogram Alk-96 et. IS (retensjonstid 13.275 min), lupanin (retensjonstid 17.750 min), og 13-OH-lupanin (retensjonstid 20.812 min).



C: GC-kromatogram. Alk-50 et. IS (retensjonstid 13.363 min), lupanin (retensjonstid 17.697 min), og 13-OH-lupanin (retensjonstid 20.764 min).

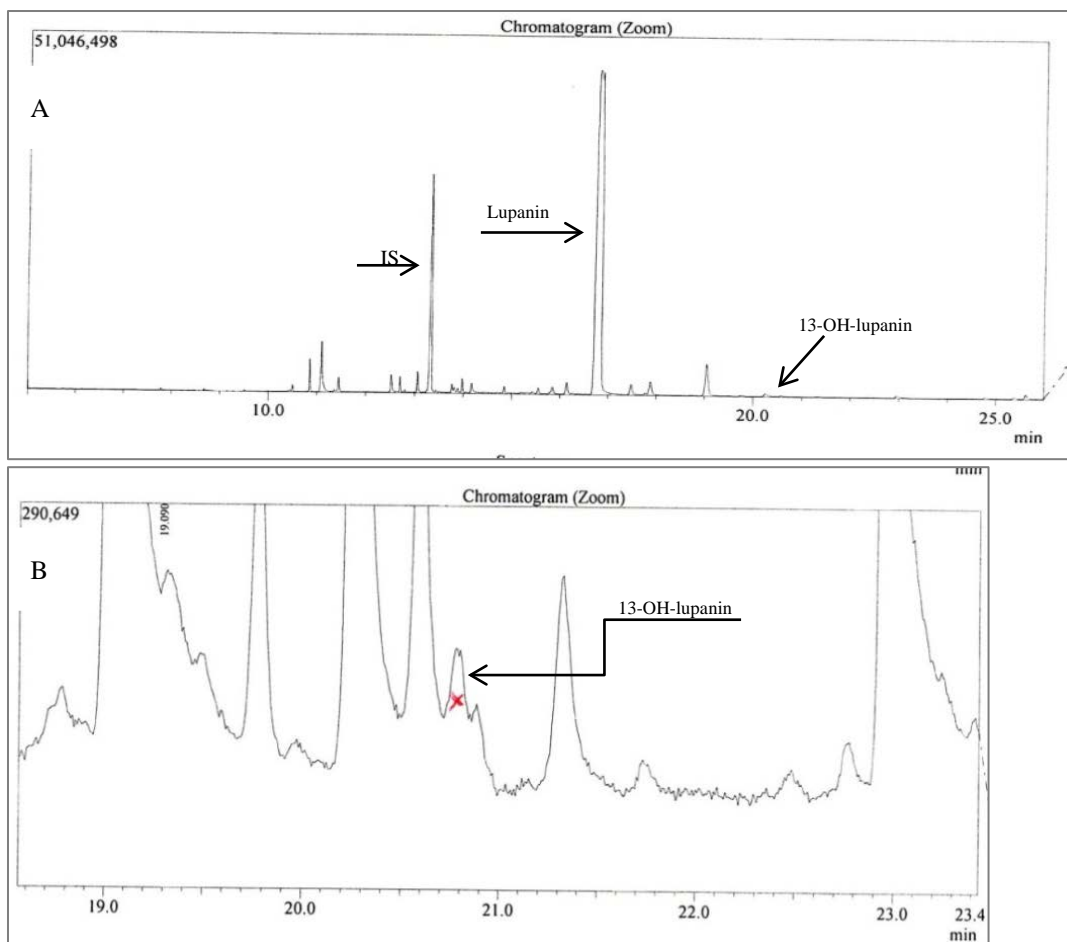
Konsentrasjonen av 13-OH-lupanin i fraksjonene var for lav til å kunne foreta en kvantitativ bestemmelse, men den var tilstrekkelig til sikker identifisering. Forholdet mellom GC-toppene av lupanin og 13-OH-lupanin var ca 1250 i Alk-VF, ca 260 i Alk-96et og ca 800 i Alk-50et. Mengdebestemmelse av lupanin i de ulike alkaloidfraksjonene og relativt alkaloidinnhold i råekstraktene fra lupinbønner er vist i tabell 4.2.

Tabell 4.2. Prosentvis mengde av lupanin og det relative alkaloidinnholdet i fraksjoner og utgangsmateriale. **VF**: vannfase, **et**: etanol,

Fraksjon:	Innhold av lupanin i alkaloidekstraktene (Alk-)	Relativt alkaloidinnhold i råekstraktene
VF	87.7 %	1
99et	81.9 %	0.04
50et	81.5 %	0.03

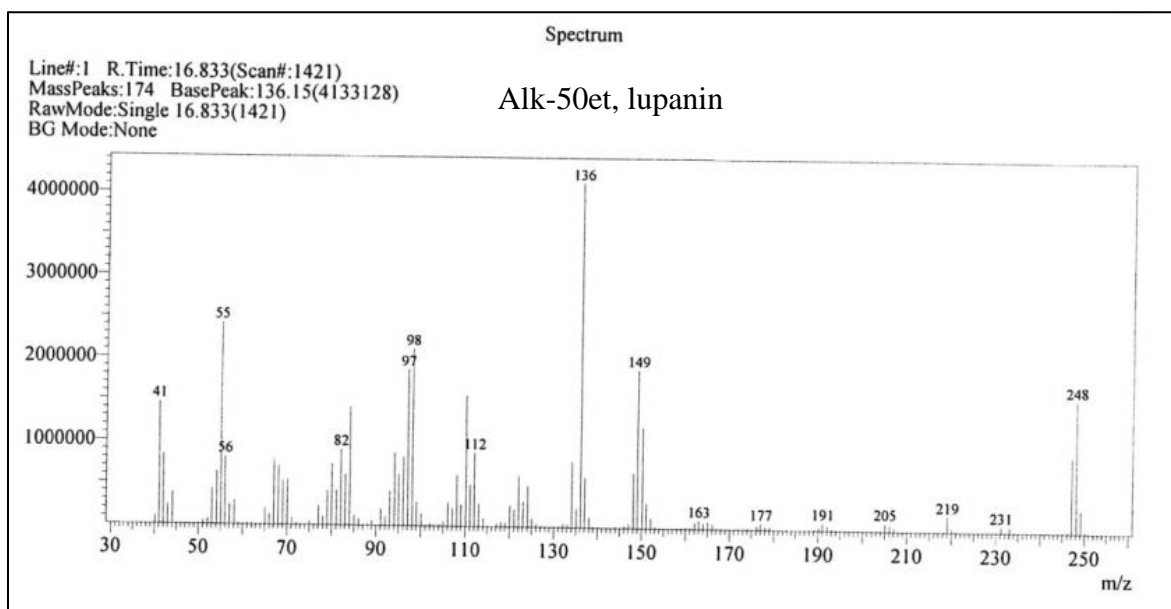
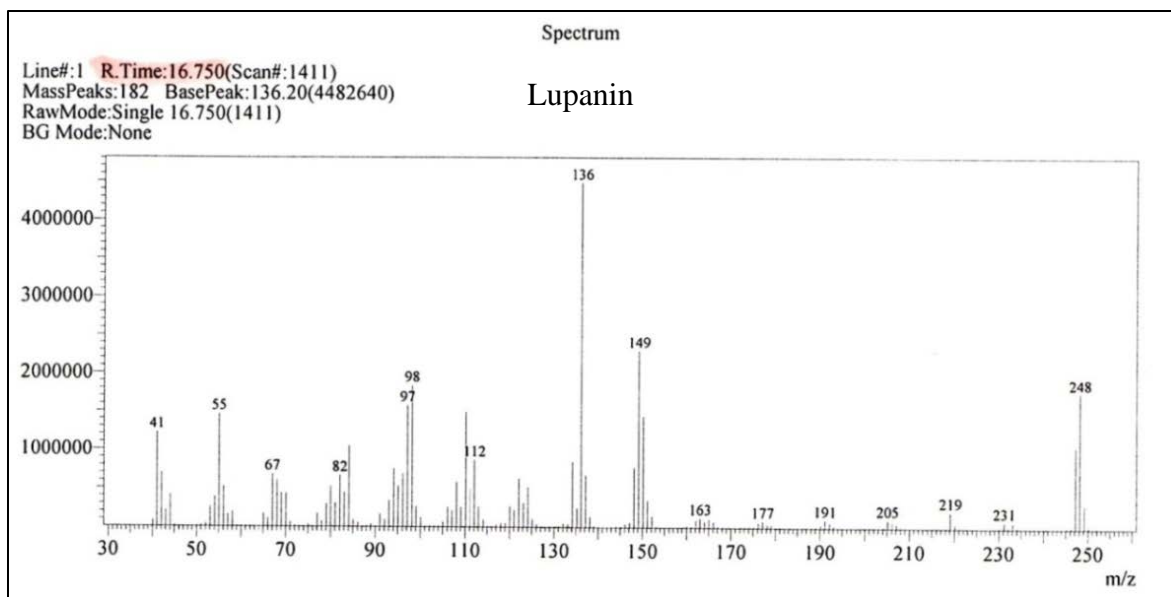
4.1.3.3 GC-MS-målinger

GC-MS-analyse ble utført på fraksjonen Alk-50et og sammenlignet med alkaloidene lupanin, 13-OH-lupanin med tilsetning av IS. Figur 4.4 A viser GC-kromatogrammet av Alk-50et, analysert i GC-MS systemet. Toppen med retensjonstid 16.833 min ble identifisert som lupanin. Det ble separert flere uidentifiserte topper, men ingen med høyden/arealet til lupanin. Lupanin forekom som en fullstendig separert topp uten haledannelse. Ved retensjonstid 20.775 min ble det observert en topp som ikke var fullstendig separert, den ble identifisert som 13-OH-lupanin som hadde teoretisk retensjonstid på 20.800 min. Figur 4.4 B viser et forstørret kromatogram ved retensjonstid 19-23 min og forstørrelse av topp for 13-OH-lupanin.

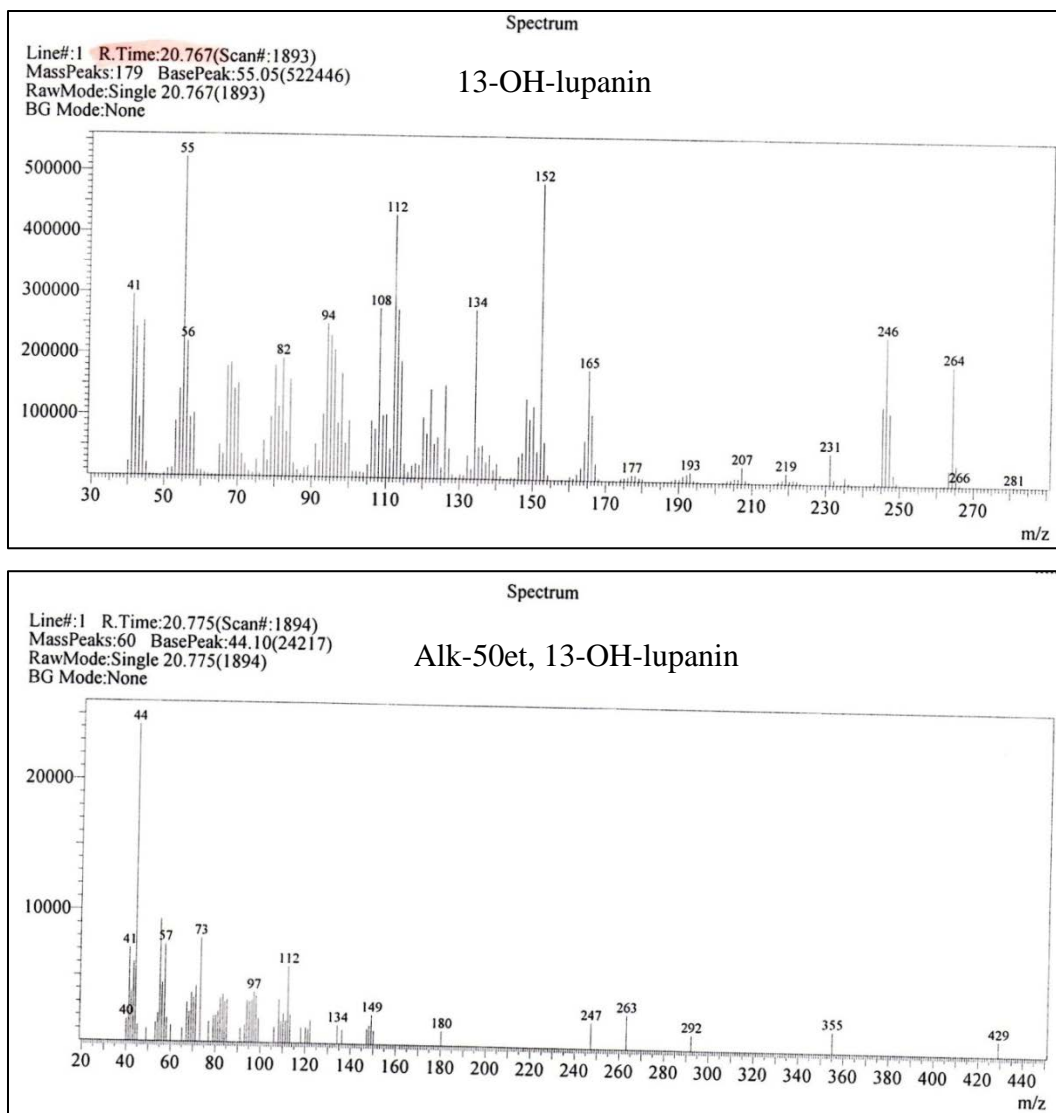


Figur 4.4. A: GC-kromatogram over Alk-50et med IS. Topp for IS (13.220 min), lupanin (16.833 min) og 13-OH-lupanin (20.775 min). B: Zoom av kromatogram, identifisert topp av 13-OH-lupanin.

Massespektrummet for lupanin med retensjonstid 16.833 min i Alk-50et overensstemte godt med massespektrummet for referansesubstansen lupanin med retensjonstid 16.750 min (figur 4.5). Molekylvekten på 248, og alle de signifikante fragmentene til lupanin med m/z 248, 149, 136, 98, 84, fantes i massespekter for Alk-50et og ga dermed en sikker identifikasjon [38]. Massespektrum for 13-OH-lupanin-toppen med retensjonstiden 20.775 min i Alk-50et overensstemte til dels med massespektrum for referansesubstans 13-OH-lupanin med retensjonstiden 20.767 min (figur 4.6). Flere av gruppene (41-44, 54-58, 70, 80-84, 90-100, 110, 134, 150, 246, 264 m/z) med fragmenter som fantes i spekter for referansesubstans ble gjenfunnet i massespekter for 13-OH-lupanin i Alk-50et. Det var noe ulikt fra de mest signifikante fragmentene 264, 246, 165, 152, 134 [38].



Figur 4.5. Massespektrum for referansesubstans lupanin (m/w 248) over og lupanin i Alk-50et under.



Figur 4.6. Massespektrum av referansesubstans 13-OH-lupanin (m/w 264) over og 13-OH-lupanin i Alk-50et under.

4.1.4 Antikolinerge målinger i ekstrakter og rensustanser fra lupinbønner

4.1.4.1 Standardkurve og kontrollprøver

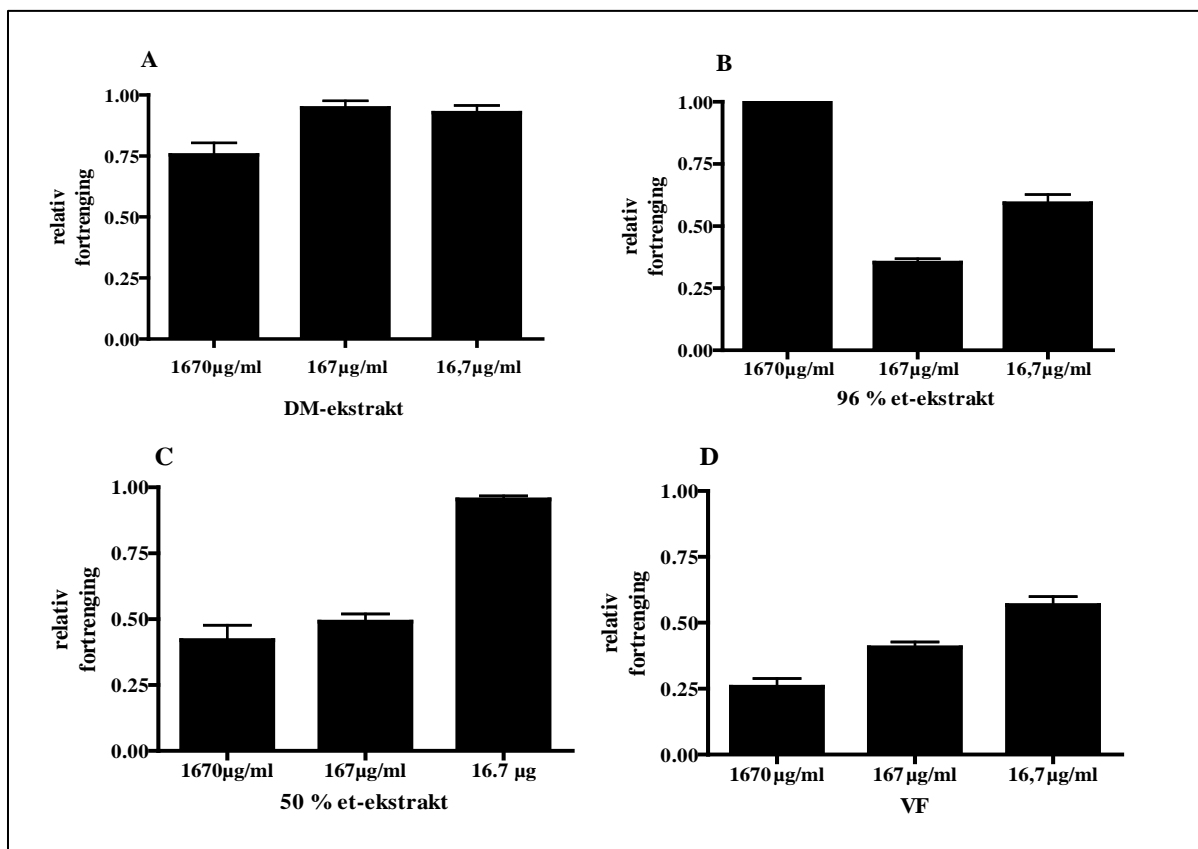
Atropin ble analysert ved ti ulike konsentrasjoner i intervallet 0.05-100 nM.

Korrelasjonskoeffisienten (r^2) for standardkurven for atropin var på 0.869, mens EC_{50} -verdien ble estimert til å være 1.25 nM (figur 4.13 A). For å korrigere for mulig hemmende aktivitet av løsemiddel, ble radioaktivitet (correlated counts per minute, CCPM) i prøvene fra lupinekstraktene justert i forhold til blanke kontrollprøver (bare løsemiddel). Den

antikolinerg aktiviteten i ekstraktene ble følgelig beregnet som prosentvis hemming, i forhold til respektive løsemiddel.

4.1.4.2 Antikolinerg aktivitet i rækstrakter fra lupinbønner

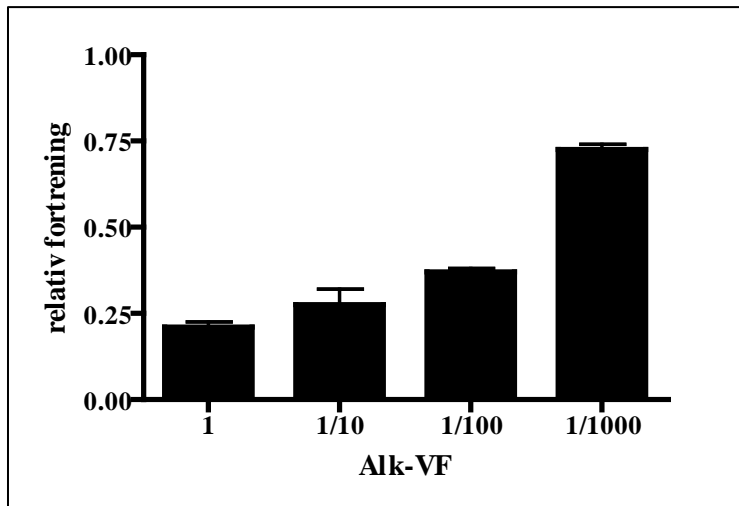
Alle rækstraktene fra lupinbønnene viste antikolinerg aktivitet i konsentrasjonsintervallet 16,7 -1670 $\mu\text{g/ml}$ (figur 4.8). For DM-ekstraktet var det imidlertid bare en liten forskjell i hemming ved høy konsentrasjon sammenlignet med lave konsentrasjoner, i motsetning til fraksjonene 50et og VF der det ble målt betydelig forskjell i hemming ved høye og lave konsentrasjoner. Det ble ikke detektert noen hemming i den høyeste konsentrasjonen av 96et, noe som trolig ble forårsaket av utfelling av fast stoff i løsningen. Det ble vist sterk hemming ved de lavere konsentrasjonene av fraksjon 96et. De antikolinerge målingene viste doseavhengig aktivitet i fraksjon 96et, 50et og VF.



Figur 4.8. Antikolinerg måling av rækstrakter fra lupinbønner. Stolpediagrammene viser relativ antikolinerg aktivitet ved ulike konsentrasjoner av rækstrakter justert for type løsemiddel. Resultat under 1.0 viser hemming, dess lavere tall, jo høyere fortregning/aktivitet. VF: vannfase, DM: diklormetan, et: etanol.

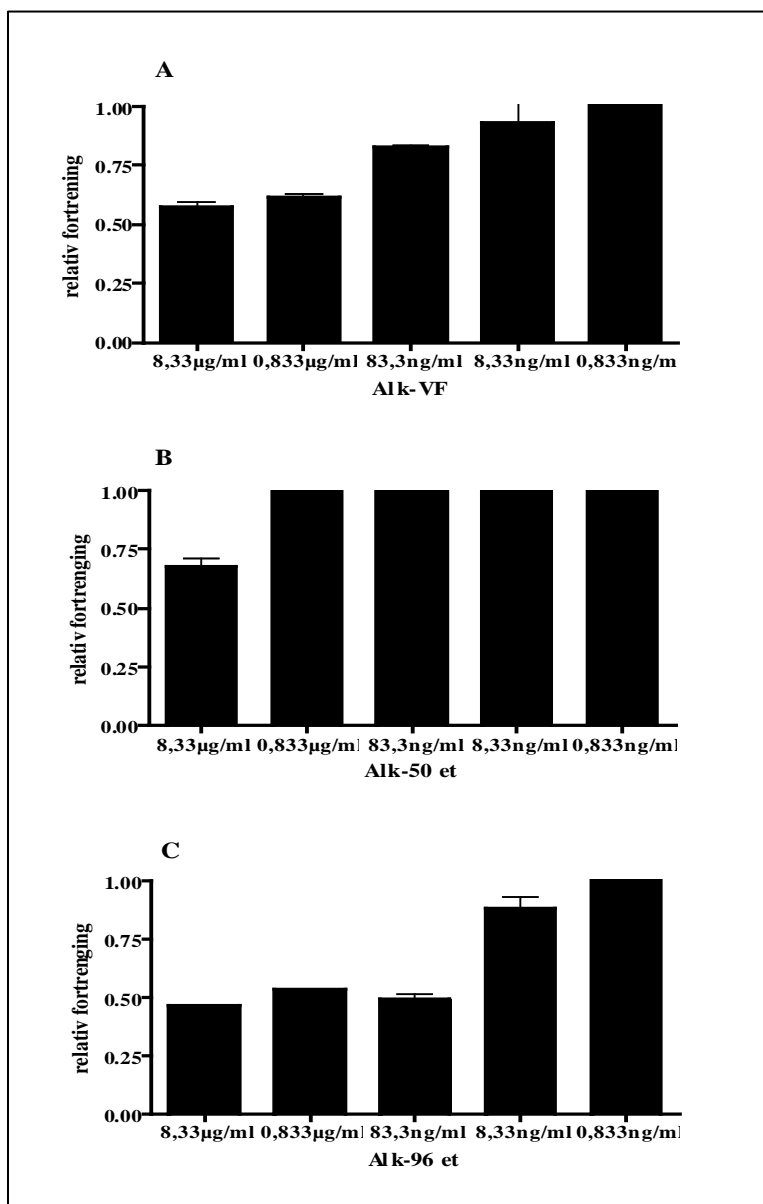
4.1.4.3 Antikolinerg aktivitet i rensede alkaloidekstrakter fra lupinbønner

En preliminær måling av antikolinerg aktivitet i alkaloidekstraktet fra den opprinnelige vaskevannsfaksjonen (Alk-VF) ble testet med en fortynningsrekke fra 1-1/1000. Det ble vist sterk hemming i alle fortyningene og det var en klar doseavhengig respons (figur 4.9).



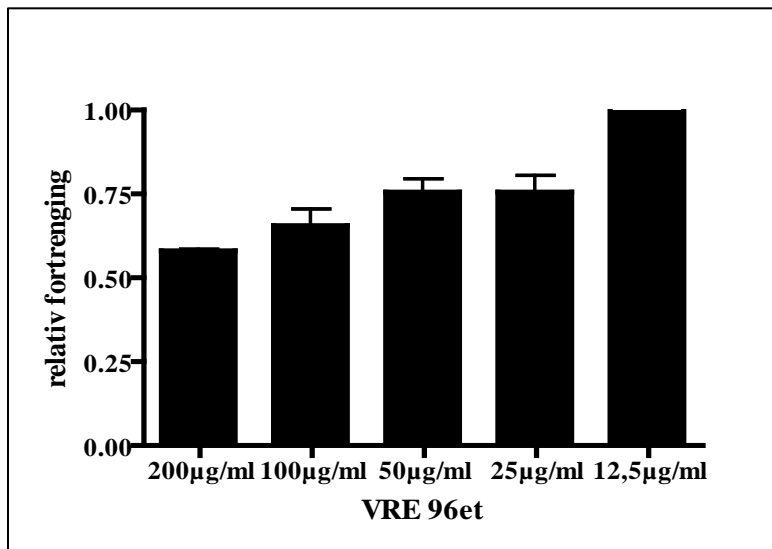
Figur 4.9. Antikolinerg måling av alkaloidekstrakt fra vaskevannsfaksjonen (Alk-VF), i fortynningsrekke 1-1/1000. Stolpediagrammet viser relativ antikolinerg aktivitet ved ulike konsentrasjoner av Alk-VF justert for løsemiddel. Resultat under 1.0 viser hemming, dess lavere tall, jo høyere fortrening/aktivitet. **Alk**: alkaloid, **VF**: vannfase.

Videre ble antikolinerg aktivitet målt i fraksjonene Alk-VF, Alk-96et og Alk-50et i et konsentrasjonsintervall på 8.33 μ g/ml – 0.000833 μ g/ml. En konsentrasjonsavhengig hemming i Alk-VF og Alk-96et ble observert (figur 4.10 A, C), men hemmingen i Alk-VF var sterkere enn i Alk-96et. Fraksjon Alk-50et viste hemming i høyeste konsentrasjon, 8.33 μ g/ml, men ikke i lavere konsentrasjoner (figur 4.10 B). Omtrentlig EC₅₀-verdi for Alk-VF var 8.33 μ g/ml og mellom 0.833 μ g/ml – 0.0833 μ g/ml for Alk-96et.



Figur 4.10. Antikolinerg måling av rensede alkaloidekstrakter fra lupinbønner. A: Alk-VF, B: Alk-50et, C: Alk-96et. Stolpediagrammene viser relativ antikolinerg aktivitet ved ulike konsentrasjoner av råekstrakter justert for type løsemiddel. Resultat under 1.0 viser hemming, dess lavere tall, jo høyere fortrengning/aktivitet. **Alk**: alkaloid, **VF**: vannfase, **et**: etanol.

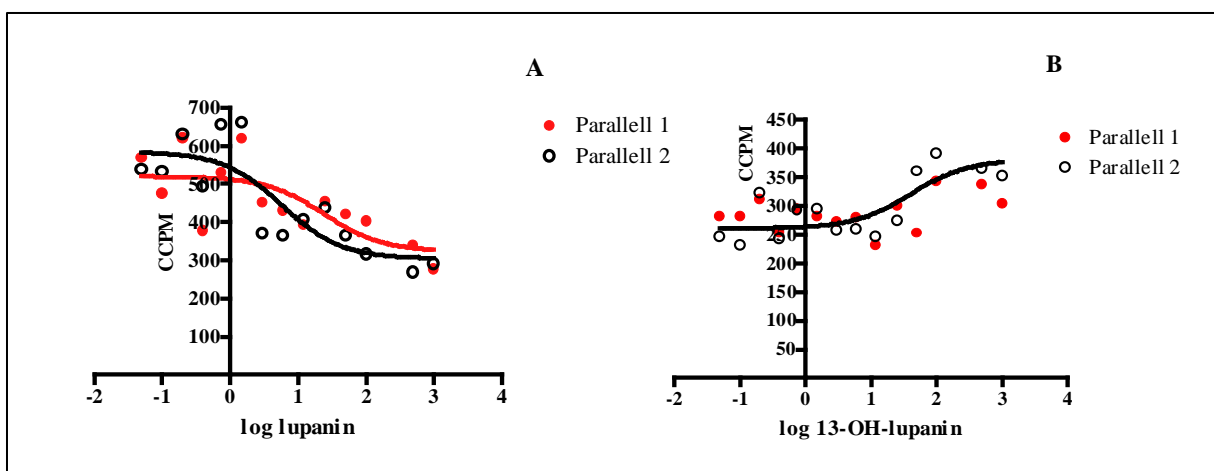
Det ble undersøkt om det var antikolinerg aktivitet i den vandige restfasen fra eterekstraksjonen (VRE VF, VRE 96et og VRE 50et). Fraksjonene ble analysert ved fem ulike konsentrasjoner, i intervallet 12.5-200 µg/ml. Alle fraksjonene viste tegn til antikolinerg aktivitet. Sterkest hemming ble observert i VRE 96et (figur 4.11), og denne var også doseavhengig i motsetning til de vandige restfasene av VRE 50et og VRE VF.



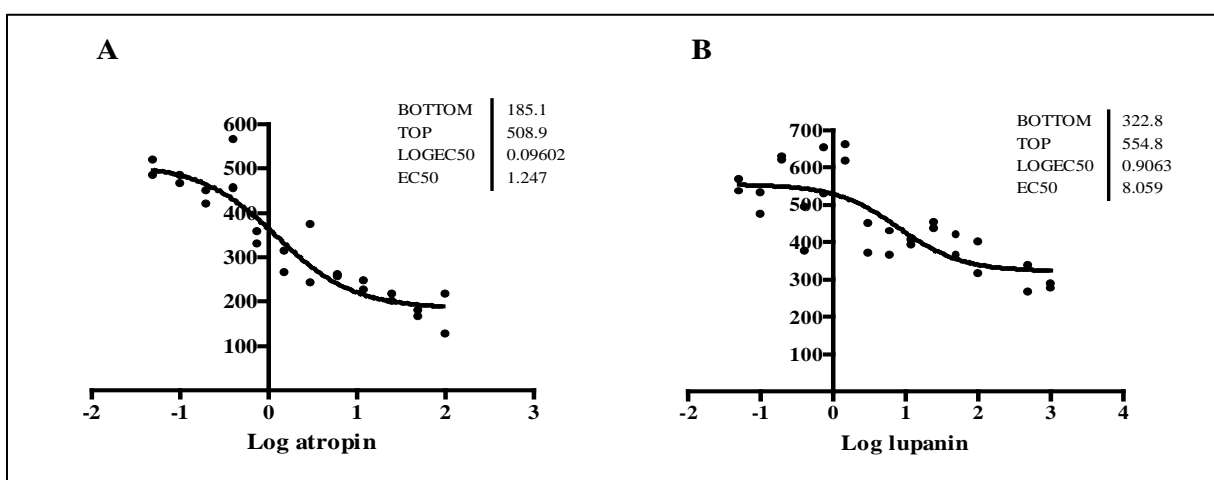
Figur 4.11. Antikolinerg måling av vandig restfase (VRE 96et) fra eterekstraksjon av ALK-96 et. Stolpediagrammet viser relativ fortregning der grad av hemming er presentert i prosent, korrigert med løsemiddel. Resultat under 1.0 viser hemming. **VRE**: vandig restfase fra eterekstraksjon, **et**: etanol.

4.1.4.4 Antikolinerg aktivitet av rensubstansene lupanin og 13-OH-lupanin

Måling av antikolinerg aktivitet av lupanin og 13-OH-lupanin ble gjort ved 14 ulike konsentrasjoner med 2 paralleller i intervallet 0.005-130 nM (figur 4.12 A, B). Lupanin gav i likhet med atropin en doseavhengig fortregning av den spesifikke liganden (figur 4.13). Bindingskurven til lupanin viste en tydelig topp og bunn og at konsentrasjonsintervallet dekket et tilstrekkelig område (figur 4.12 A). Estimert EC_{50} -verdien til lupanin viste seg å være 6.5 ganger høyere enn atropin. Hemmingen med 13-OH-lupanin var ikke konsentrasjonsavhengig (figur 4.12 B), og EC_{50} -verdien kunne ikke estimeres.



Figur 4.12. Antikolinerg måling av rensubstanser. Konsentrasjonskurvene viser intervall fra 0.005-130 nM. A: lupanin, B: 13-OH-lupanin.



Figur 4.13. Antikolinerg måling. Konsentrasjonskurver til A: atropin (0.05-100 nM), og B: lupanin (0.005-130 nM).

4.2 Antikolinerg belastning hos hoftebruddpasienter

4.2.1 Pasientkarakteristika

Tabell 4.3 viser fordelingen av kjønn, alder, demens, antall legemidler og total ACB-skåre blant hoftebruddspasienter som ble inkludert til måling av antikolinerg aktivitet i serum- og CSF-prøver. Denne delstudien omfattet 154 deltakere hvorav 73 % var kvinner (n = 112). Medianverdien for alder i utvalget var 84 år, mens medianverdien for antall faste, foreskrevne legemidler til pasientene var fire. Vitaminer og kosttilskudd var inkludert her. Det var signifikant forskjell i utbredelsen av demens mellom pasientgruppene fra Oslo og Edinburgh. I Oslo var det en andel på 55 % pasienter med demens, mens tilsvarende andel i Edinburgh var på 10 %. For øvrig var det ingen statistiske forskjeller i demografiske variable mellom pasienter inkludert fra Oslo og Edinburgh (tabell 4.3)

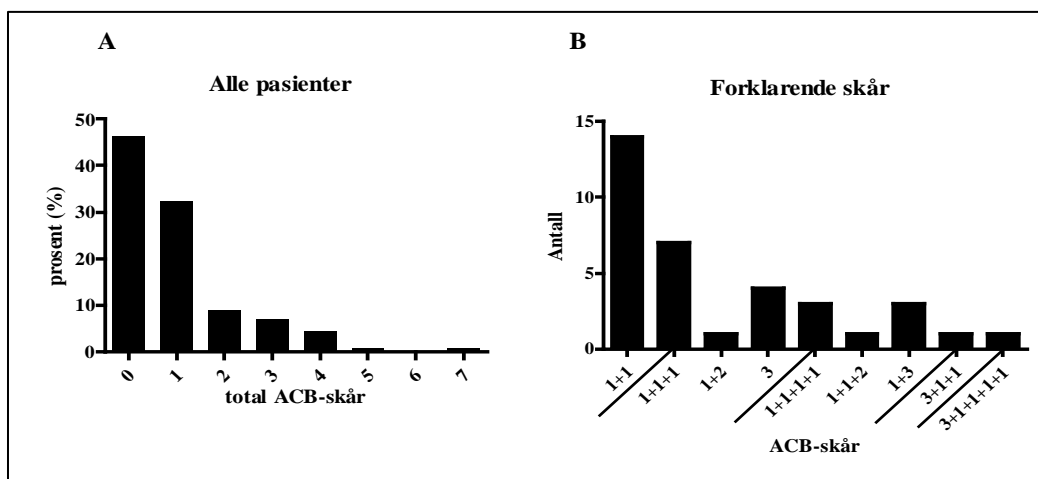
Tabell 4.3. Karakteristika for hoftebruddspasienter inkludert fra hhv. Oslo og Edinburgh til måling av antikolinerg aktivitet i serum- og CFS-prøver. Tall er oppgitt som medianverdi [intervall] eller antall %. P-verdier ble basert på statistiske sammenligninger mellom pasientene fra Oslo og Edinburgh estimert ved bruk av Mann Withney- eller Fisher`s-tester. **ACB**: anticholinergic cognitive burden.

	Alle, n=154	Oslo, n=102	Edinburgh, n=52	P-verdi
Alder, år	84 [57-96]	84 [57-96]	83.5 [61-95]	>0.1
Kvinner, n (%)	112 (73)	76 (74.5)	36 (69)	>0.1
Antall legemidler	4 [0-16]	4 [0-16]	4 [0-13]	>0.1
ACB-skåre	1 [0-7]	1 [0-5]	1 [0-7]	>0.1
Demens, n (%)	62 (40)	56 (55)	5 (10)	<0.01

4.2.2 Antikolinerg legemiddelskåre

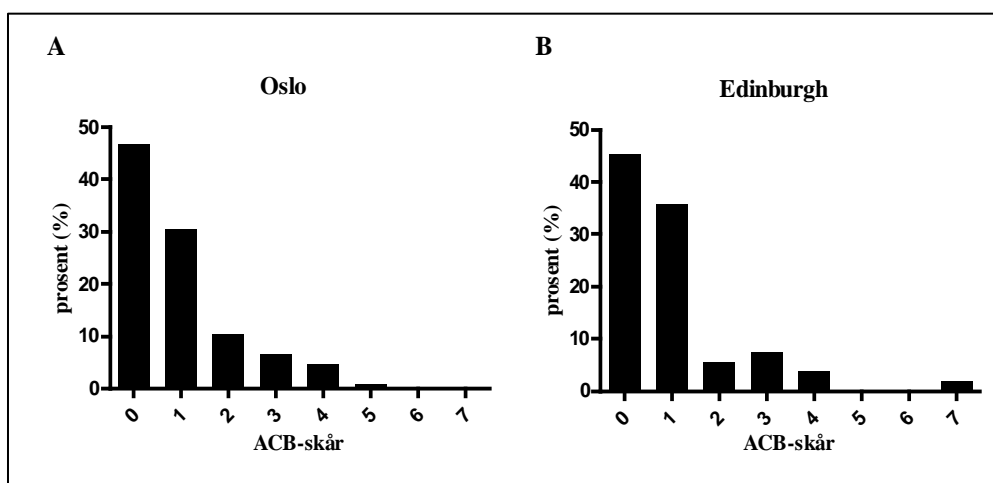
Medianverdien for total ABC-skåre var lik 1 i hele hoftebruddspopulasjonen (tabell 4.3), men det var stor spredning i skåre mellom pasientene (intervall 0-7). Den største andelen av pasientene (n = 73, 46 %) hadde en total ABC-skåre lik 0 (figur 4.14 A). Til sammenligning hadde 32 % (n = 50) av pasientene en ACB-skåre lik ,1 mens 22 % (n = 35) hadde en total

ACB-skåre på ≥ 2 . Blant de siste nevnte var det 11 pasienter (7 %) som brukte et legemiddel med 'sikker' antikolinerg effekt, dvs. $ACB \geq 2$ (figur 4.14 B). Den høyeste målte totalskåreen var på 7. Ingen av pasientene ble behandlet med flere enn ett legemiddel med $ACB \geq 2$.



Figur 4.14. A: Prosentvis fordeling av ACB-skåre blant alle de inkluderte pasientene (n = 158). B: Fordeling av ulike skåre-summeringer blant pasientene som hadde en antikolinerg belastningsskåre (ACB-skåre) på 2 eller høyere. **ACB**: anticholinergic cognitive burden.

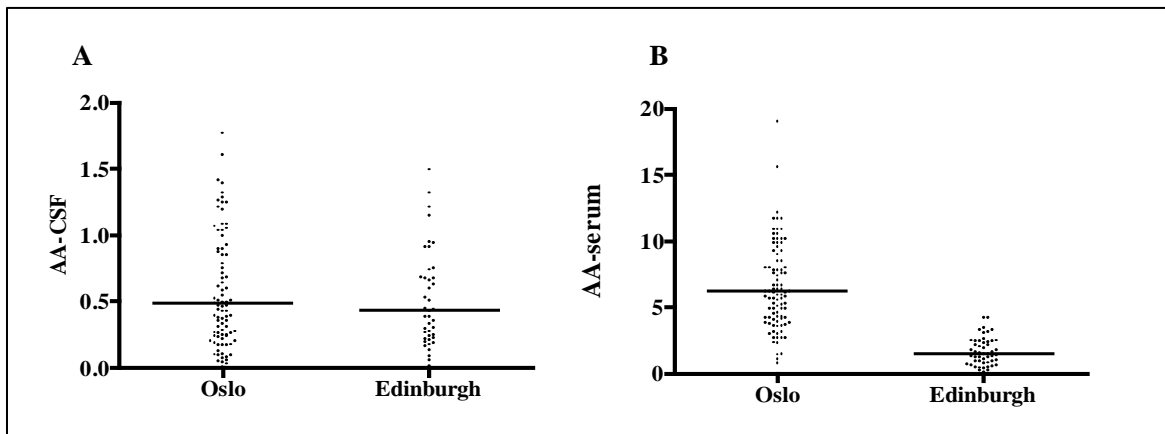
Det var ingen forskjeller i median ACB-skåre til pasientene som ble inkludert fra Oslo og Edinburgh (tabell 4.3), og det var samme trender når det gjaldt fordeling av ACB-skåre innad de ulike subpopulasjonene (figur 4.15). Antikolinerg belastning målt i total ACB-skåre viste ingen signifikant sammenheng i forhold til delirium eller demens for hele pasientpopuleringen ($p > 0.1$), men de observerte medianverdiene var høyere blant pasientene med disse tilstandene (tabell 4.4).



Figur 4.15. Fordeling av ACB-skåre i prosent i Oslo (A) og Edinburgh (B). **ACB**: anticholinergic cognitive burden.

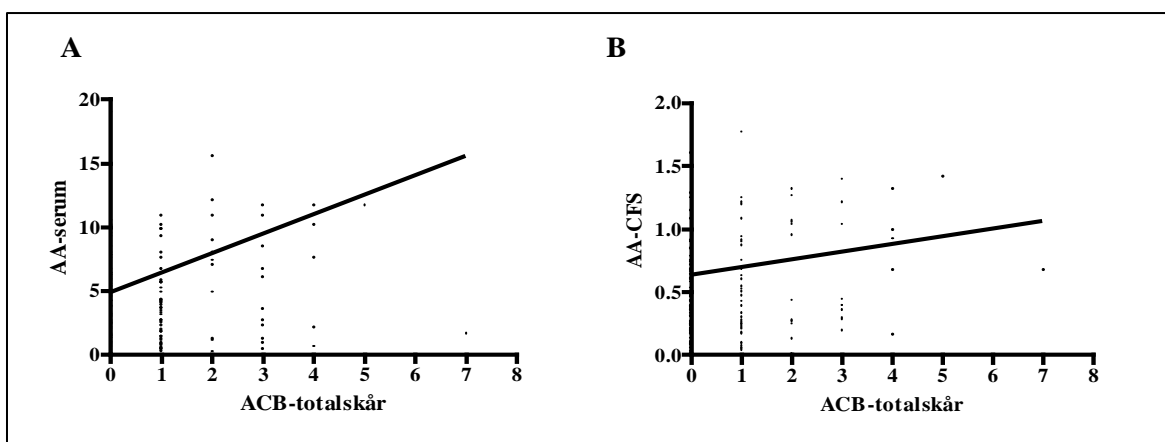
4.2.3 Antikolinerg aktivitet

Ved sammenligning mellom pasientgruppene i Oslo og Edinburgh viste det seg at antikolinerg aktivitet i serum var signifikant høyere hos pasientene i Oslo enn i Edinburgh (figur 4.16 B, $p < 0.01$). Måling av antikolinerg aktivitet i CSF (figur 4.16 A) viste derimot ingen forskjell mellom Oslo og Edinburgh.



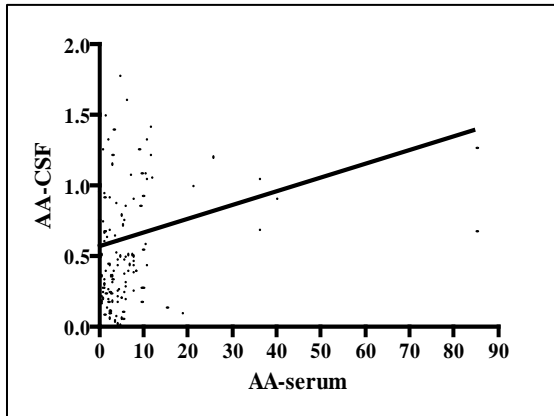
Figur 4.16. Sammenligning av antikolinerg måling i A: cerebrospinalvæske ($p > 0.1$). B: serum ($p < 0.01$) fra pasientene i Oslo og Edinburgh. AA er oppgitt i pmol/ml atropinekvivalenter (uteliggere er ikke inkludert i figurene; $n = 17$). AA: antikolinerg aktivitet, CSF: cerebrospinalvæske.

Enkel lineær regresjonsanalyse viste at det var en signifikant, positiv sammenheng mellom total ABC-skåre og antikolinerg aktivitet i serum (figur 4.17 A, $p < 0.01$). Det var derimot ingen signifikant sammenheng mellom total ACB-skåre og antikolinerg aktivitet i CFS (figur 4.17 B, $p = 0.012$).



Figur 4.17. Lineær regresjonsanalyse for A: antikolinerg aktivitet i serum og total ABC-skåre ($r^2 = 0.047$, $p < 0.01$). Uteliggere $n = 6$. B: antikolinerg aktivitet i CFS og total ACB-skåre ($r^2 = 0.012$, $p > 0.1$). Uteliggere $n = 9$. AA-serum/CFS er oppgitt i pmol/ml atropinekvivalenter. AA: antikolinerg aktivitet, CSF: cerebrospinalvæske, ACB: anticholinergic cognitive burden.

Medianverdiene for antikolinerg aktivitet i serum og CSF var på henholdsvis 4.20 og 0.47 pmol/ml atropinekvivalenter for alle pasientene totalt. Lineær regresjon viste en signifikant positiv korrelasjon mellom antikolinerg aktivitet i serum og CFS (figur 4.18, $p < 0.05$).

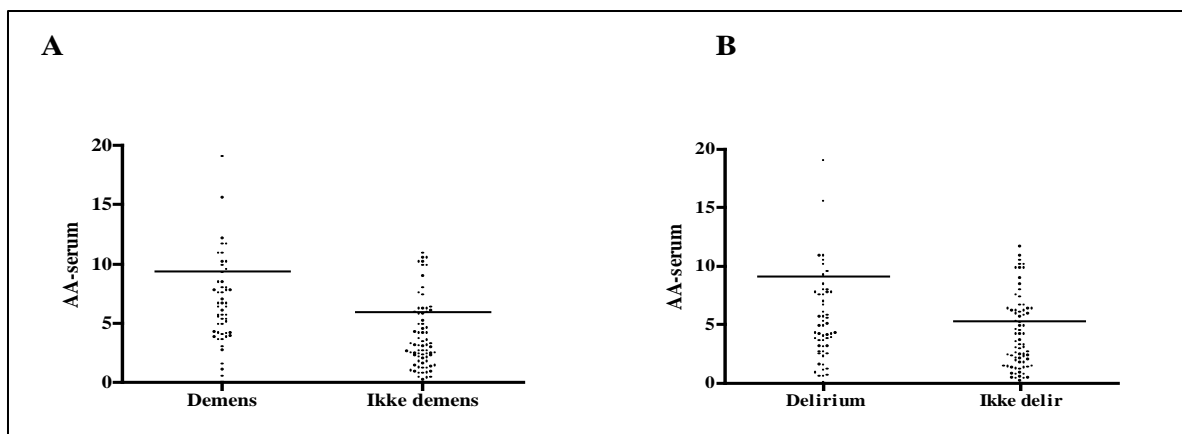


Figur 4.18. Lineær regresjonsanalyse for antikolinerg aktivitet i CFS og serum. AA er oppgitt i pmol/ml atropinekvivalenter ($r^2 = 0.034$, P-verdi = 0.034). Uteliggere $n = 8$. **AA**: antikolinerg aktivitet, **CSF**: cerebrospinalvæske.

Antikolinerg aktivitet i serum var signifikant høyere hos demente enn ikke-demente pasienter (tabell 4.4, $p < 0.01$). Det var også en tendens til høyere antikolinerg aktivitet hos pasienter med delirium versus ikke-delirium (figur 4.19, $p = 0.059$). Antikolinerg måling i CSF viste ingen sammenheng med noen av sykdomstilstandene demens ($p > 0.1$) og delirium ($p > 0.1$). Tabell 4.4 viser resultater for sammenligningene.

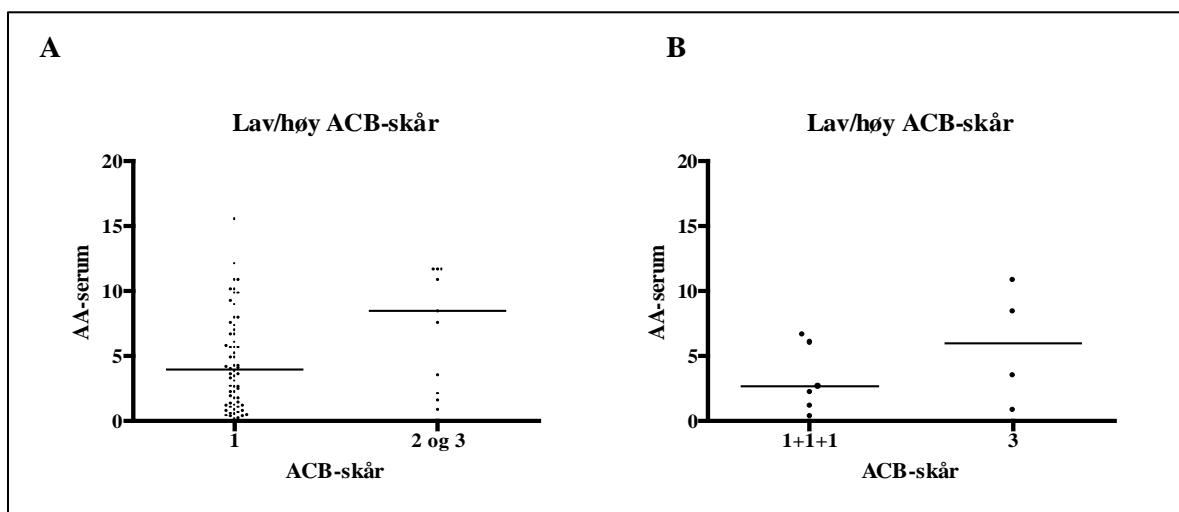
Tabell 4.4. Resultater for sammenligning mellom ACB-skåre og antikolinerg aktivitet i serum og CSF ved demens og delirium. P-verdi ble estimert ved bruk av Mann Withney test. AA er oppgitt i pmol/ml atropinekvivalenter, median (spredning). **ACB**: anticholinergic cognitive burden, **AA**: antikolinerg aktivitet, **CSF**: cerebrospinalvæske.

	Demens	Ikke demens	P-verdi	Delirium	Ikke delirium	P-verdi
ACB-skåre	1 (0-5)	0.5 (0-7)	> 0.1	1 (0-4)	0 (0-5)	> 0.1
AA-Serum	6.7 [4.2-9.6]	3.2 [1.9-6.2]	< 0.01	4.9 [3.1-8.0]	3.7 [1.8-6.4]	0.059
AA-CSF	0.5 [0.3-1.0]	0.4 [0.2-0.9]	> 0.1	0.4 [0.2-0.9]	0.5 [0.2-0.9]	> 0.1



Figur 4.19. Sammenligning av serum antikolinerg aktivitet i forhold til demens (A) og delirium (B). Uteliggere n = 13. AA: antikolinerg aktivitet

Det var en tydelig tendens til at pasienter behandlede med enkeltlegemidler med ACB-skåre ≥ 2 hadde en høyere antikolinerg aktivitet i serum enn pasienter behandlet med bare skåre 1-legemidler (figur 4.20 A, $p = 0.076$). Videre ble det observert en høyere medianverdi av serum antikolinerg aktivitet blant pasienter behandlet med et skåre 3-legemiddel enn de som ble behandlet med tre skåre 1-legemidler, men spredningen innad i gruppene var store og forskjellen mellom dem var ikke statistisk signifikant (figur 4.20 B, $p > 0.1$).



Figur 4.20. Total ACB-skåre 1 mot ≥ 2 , $p = 0.076$ (A). Total ACB-skåre lik 3 inndelt i tre legemidler med ACB-skåre lik 1 mot et legemiddel med ACB-skåre lik 3, $p > 0.1$ (B). Uteliggere ABC-skåre (1) = 4, (2 og 3) = 1, (1+1+1) = 1. AA: antikolinerg aktivitet, ACB: anticholinergic cognitive burden.

5 Diskusjon

5.1 Antikolinerg aktivitet i ekstrakter og rensustanser fra lupinbønner

Lupinbønner som er kommersielt tilgjengelig som næringsmiddel i flere land, har vedlagt en anbefalt vaskeprosedyre for å unngå potensielt toksiske effekter ved bruk i matlaging. I denne oppgaven ble vaskevann og forskjellige typer ekstrakter av de ferdige vaskede bønnene undersøkt for antikolinerg aktivitet. Opprensede alkaloidfraksjoner fra disse ekstraktene, og fra vaskevannet, ble også undersøkt for antikolinerg aktivitet for å stadfeste om bønnenes innhold av alkaloider var avgjørende for denne effekten. Etersom det fra litteraturen er kjent at lupanin og 13-OH-lupanin er to vanlig forekommende alkaloider i lupinbønner, ble i tillegg rensustanser av disse innkjøpt og undersøkt for antikolinerg aktivitet.

Med antikolinerg måling ble det påvist antikolinerg aktivitet i både vaskede, tilberedte lupinbønner og i vaskevannet som bønnene ble rensset med. At vaskevannet viste sterk antikolinerg aktivitet var ventet fordi tilberedningsprosessen som fulgte bønnene var nødvendig for å gjøre dem spiselige. I litteraturen beskrives prosessen som en "debittering" -metode for å fjerne alkaloider fra lupinbønner og metoden går ut på at de toksiske alkaloidene skal "vaskes ut"[28, 39]. Den antikolinerge aktiviteten i vaskevannfasen (VF), viste en reduksjon med økende fortynningsgrad. Det samme var tilfellet for råekstraktene fra de tilberedte lupinbønnene, utenom DM-ekstraktet som kun viste lav hemming ved sterkeste konsentrasjon. Fraksjonen 96et hadde tilnærmet lik antikolinerg aktivitet som VF, noe som indikerer at det var en vesentlig andel stoffer med antikolinerg aktivitet igjen i bønnene etter vask.

Råekstraktene fra lupinbønnene som viste antikolinerg aktivitet (VF, 96et og 50et) ble videre fraksjonert og opprensede alkaloidfraksjoner ble isolert ved utvasking med eter ved høy pH. Alkaloidekstraktene (Alk-VF, Alk-96et og Alk-50et) viste sterk antikolinerg effekt. Alk-VF og Alk-96et gav høyest hemming noe som samsvarer med resultatene fra målingene på råekstraktene. Den sterke antikolinerge aktiviteten i alkaloidekstraktene var målt i lavere konsentrasjonsintervall enn ved måling av råekstraktene og ved sammenligning kan det

konkluderes at det var innholdet av alkaloidene som gav opphav til den antikolinerge aktiviteten i rækstraktene.

Den vandige restfasen fra eterekstraksjonen viste også antikolinerg aktivitet. Dette illustrerer at det totale innholdet av alkaloider i lupinbønner er vanskelig å fjerne fra bønnene. Som vist ved antikolinerge målinger av rækstrakter og alkaloidekstrakter fra lupinbønner gir den første polare ekstraksjonsfasen (96 % etanol) noe høyere utbytte av alkaloider.

Tilberedningsprosessen for å vaske de bitre variantene av lupinbønner baserer seg på vann som ekstraksjonsmiddel. Resultatene fra denne oppgave stemte overens med at alkaloidene lettest ekstraheres i polare løsningsmiddel, som reflekterer at alkaloidene oftest er på saltform i plantematerialet. 50et-ekstraktet gav mindre antikolinerg aktivitet enn 96et-ekstraktet, noe som viser at alkaloidkonsentrasjonen i 50et-ekstraktet kan være lavere enn i 96et-ekstraktet. Den rensede alkaloidfraksjonen Alk-50et har også lavere antikolinerg aktivitet enn Alk-96et, noe som kan skyldes at Alk-50et har en annen alkaloidsammensetning eller at denne fraksjonen fortsatt inneholder mindre mengde alkaloider. Tidligere er det beskrevet at vaskeprosessen fjerner alkaloidene [28, 30]. Australia New Zealand Food Authority rapporterte at alkaloidinnholdet går fra 10-20 g/kg plantedel i lupinbønner til et alkaloidinnhold på ca 500 mg/kg plantedel for de ferdig vaskede, bitre lupinbønnene og dermed sikrer et lavt inntak av alkaloider [30]. Dette tilsvarer et forhold 1:0.025-0.05, det var noe lavere enn det vi fant (1: 0.08). Alkaloidene i både Alk-96et og Alk-50et har potent antikolinerg aktivitet, og det er altså grunn til å tro at det er en tilstrekkelig mengde alkaloider igjen i de tilberedte lupinbønnene for å få en merkbar, potensielt uheldig antikolinerg aktivitet ved inntak.

Det ble foretatt antikolinerg måling av rensesubstanser for alkaloidene lupanin og 13-OH-lupanin. Lupanin gav en konsentrasjonsavhengig respons og hadde sammenlignet med atropin 6.5 ganger så høy EC_{50} -verdi. Hemmingsgraden til lupanin er følgelig ca 1/6 av atropins. I motsetning til lupanin viste derivatet 13-OH-lupanin i forsøkene ingen konsentrasjonsavhengig antikolinerg aktivitet. Alle konsentrasjonene viste imidlertid antikolinerg aktivitet, noe som kan indikere løselighetsproblemer av stoffet i inkubasjonsløsningen

Alkaloidekstraktene (Alk-VF, Alk-96et og Alk-50et) ble preliminært analysert ved tynnsjiktskromatografi (TLC). Det ble funnet seks alkaloider i det rensede alkaloidekstraktet fra vaskevannsfasen. Ved sammenligning med referansesubstansene lupanin og 13-OH-lupanin ble lupanin identifisert i alle de rensede alkaloidekstraktene. Flekken som var identifisert som lupanin i prøvene viste at stoffet forekom i store mengder.

Ved GC-analyser ble både lupanin og 13-OH-lupanin identifisert i alle lupin-fraksjonene som viste antikolinerg aktivitet (ALK-VF, ALK-96et og ALK-50et). Det ble funnet flere uidentifiserte topper i GC-analysene, som trolig representerte andre alkaloider fra ekstraktene. Det samstemmer med en tidligere publisert studie som rapporterte om inntil 70 ulike quinolizidinalkaloider i lupinbønner har vært observert[30]. Lupanin var i størst mengde i alle analyserte alkaloidekstraktene, 13-OH-lupanin ble ikke fullstendig separert men kunne identifiseres med GC. Lupanin er det alkaloidet som tidligere er beskrevet med nikotinerge, og antatt sterkest antikolinerge effekter i lupinbønner [40, 41], og derfor av størst interesse å studere i denne oppgave. Innholdet av lupanin i alkaloidekstraktene utgjorde rundt 88 % i Alk-VF og rundt 82 % i ALK-96et og Alk-50et. I forhold til lupanin og andre uidentifiserte topper i alkaloidekstraktene var innholdet av 13-OH-lupanin så lite at det ikke vil utgjøre en særlig effekt ved inntak av disse lupinbønnene.

Identifiseringen av lupanin i ALK-50et med GC-MS ble gjort med høy grad av sikkerhet. MS-spekteret viste meget god overensstemmelse med referansespekteret. 13-OH-lupanin ble identifisert med GS-MS og MS-spekteret stemte til dels med massespekteret for referansesubstansen. Dette kan skyldes at 13-OH-lupanin i ALK-50et ikke var fullstendig separert og fragmenteringen inneholdt spor av andre substanser.

At både rensesubstansen lupanin og ekstrakter fra lupinbønner viste seg å ha doseavhengig antikolinerg aktivitet *in vitro* bekrefter at alkaloidet lupanin har antimuskarinerge egenskaper. Lupanin ble vist å ha en antikolinerg potens opp mot en 1/6 av atropin, som regnes blant de aller sterkeste antimuskarinerge substansene. Dette funnet står i kontrast til en tidligere reseptorbinding-studie gjort på quinolizidinalkaloider fra lupin [41]. Studien viste at lupanin hadde større affinitet til nikotinerge reseptorer og oppga en EC_{50} -verdi lik 140 μ M for lupanin på muskarinerge reseptorer. Estimert EC_{50} -verdi i denne oppgaven (8.1 nM), er ca 10 000

ganger lavere enn den som ble rapportert i den tidligere studien. Grunnen til denne forskjellen er usikker, men en mulig forklaring kan være at den tidligere studien benyttet lupanin isolert fra plantemateriale, og ikke rens substans [41]. Et eventuelt urent planteprodukt kan bidra til en betydelig overestimering av EC₅₀-verdi, da innveid mengde inneholder mindre mengde enn det man tror.

Tidligere er alkaloidinnholdet i enkelte lupinarter vist å medføre toksiske reaksjoner ved høyt inntak, og toksisiteten antas primært å skyldes stoffene spartein og lupanin [30]. Spartein har klinisk vist nevrologiske effekter, som fører til tap av motorisk koordinasjon og muskelkontroll på grunn av ganglionær blokade, og i mindre grad antimuskarinerge effekter [30, 40]. Farmakologiske effekter av lupanin er svært lite beskrevet, men det er i en toksikologistudie med mus vist å gi CNS effekter som ved høye doser beskrives som nikotinlignende og ved lave doser som beroligende [40]. Ved rapporterte tilfeller av forgiftninger etter inntak av lupin har man antatt ut fra symptomene at alkaloidene i lupin har en antikolinerg virkning, som kunne være årsaket av alkaloidet lupanin [30-33]. En antimuskarinerg virkningsmekanisme av lupanin er også i tråd med sentrale, 'deliriøse' symptomer hos pasienter ved forgiftninger med lupinbønner [31-33]. Det er ikke rapportert om nikotinerge symptomer hos disse pasientene, hvilket motsetter seg funn i tidligere omtalte reseptorbindings-studien om at lupanin har en høyere affinitet til nikotinerge reseptorer enn muskarinerge reseptorer [41].

Som en følge av utbredt handel over internett, er lupinbønner i dag mer tilgjengelig for de som ønsker alternativ mat. Det selges både søte, semi-søte og bitre varianter av lupinbønner. Som utgangsmateriale til denne oppgaven, ble det kjøpt inn lupinbønner fra et amerikansk foretak, Purcell Mountain Farms. Disse ble markedsført som lupinbønner av søt variant med behov for koking og bløtlegging før spising. I følge klassifisering fra myndighetene i Australia og New Zealand, inneholder imidlertid ikke søte varianter av lupinbønner alkaloider i slike mengder at de trengs å behandles før de er spiselige [28, 30]. Dette virker dermed forvirrende, og kan medføre alvorlige mistolkninger i forbindelse med kjøp av denne typen bønner som ble undersøkt i denne oppgaven.

De fleste arter av den bitre varianten av lupin som blir brukt til matproduksjon inneholder lupanin [28, 38, 42]. Funn i ekstrakter fra tilberedte lupinbønner i denne oppgaven viser tydelig at bønnene, innehar en antikolinerg aktivitet som i stor grad antas å være mediert av lupanin. For eldre personer med redusert kognitiv funksjon, og ikke minst pasienter med Alzheimers sykdom, vil dermed inntak av alkaloidrike lupinbønner kunne medføre alvorlige symptomer/bivirkninger. Det vil ved vedvarende inntak av alkaloidrike lupinbønner også være en risiko for nedgang i kognitive funksjoner. Det er tidligere vist ved studier med mus at det ved langvarig antagonisme av M_1 -, M_2 - og M_5 -reseptorer kan oppstå en økning av amyloide plakk i hjernen og at det kan forårsake kognitiv svikt [3, 5, 10]. Grensen i Australia og New Zealand er satt til 0.035 mg/kg kroppsvekt/dag over lenger tid for inntak av quinolizidinalkaloider [30]. Denne anbefalingen burde eventuelt revurderes etter at det i dag finnes studier som viser at langvarig inntak av antimuskarinerge stoffer kan gi varige skader og at resultater i denne oppgaven viser at alkaloidene i lupinbønner innehar antikolinerg aktivitet.

5.2 Antikolinerg belastning hos hoftebruddpasienter

Et interessant funn var at det ble målt signifikant høyere AA i serum hos demente enn ikke-demente hoftebruddpasienter, uten at det var noen forskjeller i AA i CSF. Så vidt kjent, er denne observasjonen ikke tidligere beskrevet i litteraturen. Årsaken til høyere antikolinerg aktivitet blant de demente pasientene er usikker, men en mulig forklaring kan være at demente har et høyere nivå av endogene antikolinerge substanser i sirkulasjonssystemet. Ettersom ABC-skåre var tilnærmet lik hos demente og ikke-demente pasienter, kan funnene eventuelt indikere at det skjer en frisetting av endogene antikolinerge substanser som en mekanisme eller årsak til demenstilstanden. Dette funnet bør imidlertid bekreftes i nye, større studier før man kan konkludere med sikkerhet at det er en kobling mellom antikolinerg aktivitet i serum og demens.

Populasjonen som ble testet i denne oppgaven var innlagte på sykehus for en hoftebruddsoperasjon. Hyperkortisolemi er ofte forekommende ved skader og operasjoner. En studie har vist en sammenheng mellom høye blodkonsentrasjoner av kortisol og økende AA i serum og CSF [43]. Høyere utskillelse av kortisol hos demente enn ikke-demente kan være en

mulig forklaring på forskjellen i antikolinerg aktivitet i serum mellom disse subgruppene. I vår studie var det imidlertid ingen forskjell i AA i CSF hos demente og ikke-demente, noe som ikke styrker denne forklaringen.

Antikolinerge legemidler er kjent for å gi nedgang i kolinerg aktivitet og det er vist en sammenheng mellom antikolinerge legemidler og AA i serum [5, 10, 11, 16]. Demente pasienter i populasjonen bruker i snitt flere antikolinerge legemidler, men ut i fra pasientpopulasjonen i denne oppgaven var det ingen signifikant sammenheng mellom ACB-skåre for demente og ikke-demente. Det var en svak tendens til høyere ACB-skåre hos demente, men tendensen var ikke holdbar som forklaring på den forskjellen som ble sett i AA hos demente versus ikke-demente.

Et annet funn beskrevet i oppgaven var tendensen til høyere AA i serum hos de med delirium enn hos de uten delirium ($p = 0.059$). Høyere SAA-verdier i delirium-gruppen ble også presentert i en tidligere studie, men resultatene i denne studien kunne ikke brukes til å korrelere for risikoen for å utvikle delirium [44]. Forstyrrelser i det kolinerge systemet er en av de mest sannsynlige teoriene bak delirium. Høye AA verdier har tidligere vært diskutert som en mulig mekanisme bak delirium og, flere studier har vist en positiv sammenheng mellom økt AA i serum og delirium [8]. Det er vist at det ofte foreligger høy ACB-skåre ved høye AA målinger i serum og demente har som vist i denne oppgaven høyere AA i serum enn ikke-demente. Demens er en sterk risikofaktor for å utvikle delirium. Hva som er mekanismen bak delirium er uvisst etter resultatene som ble oppnådd i denne oppgaven. En multivariatanalyse kunne ha avslørt en tydeligere sammenheng mellom målevariablene eller om demens er en konfounder til høy SAA som i sin tur disponerer for delirium.

I denne oppgaven ble det funnet en signifikant sammenheng mellom ACB-skåre og AA. Dette funnet samsvarer med resultat fra en tidligere studie, som viste en klar positiv korrelasjon mellom antikolinerg legemiddelskåre og serum AA [16]. Det finnes imidlertid enkelte studier som ikke har vist en signifikant sammenheng mellom høy antikolinerg legemiddelskåre og AA i serum [15]. Delvis motstridende funn i litteraturen når det gjelder sammenhengen mellom AA i serum og antikolinerg legemiddelskåre, kan skyldes ulikheter i populasjonene som har vært undersøkt. Hvordan legemidlene skårees, og hvilken skåre-modell som har blitt

benyttet kan også være en grunn til studiene varierer noe når det gjelder korrelasjonsgrad mellom antikolinerg legemiddelskåre SAA. En annen mulig årsak kan være ulikheter i antikolinerge potens for legemidler innen samme kategori, som i modellene gis lik antikolinerg skåre. Dette viste Jakobsen *et al.* tydelig i en studie av med urologiske spasmolytika. Ved *in vitro* forsøk ble det påvist 10 ganger så høy SAA for tolterodin enn for de andre substansene i samme legemiddelgruppe [37].

Selve prinsippet med simpel summering av antikolinerg legemiddelskåre, kan også være forbundet med svakheter når det gjelder sammenhengen med serum AA. Ved en nærmere analyse av ACB-skåre for pasientene i denne studien ble det observert en tendens til høyere serum AA blant pasientene som benyttet enkeltlegemidler med ABC-skåre ≥ 2 enn de som utelukkende ble behandlet med legemidler med ABC-skåre = 1. Tilsvarende var det en tendens til at de som benyttet enkeltlegemidler med skåre = 3 hadde høyere serum AA enn de som ble behandlet med tre separate legemidler med ABC-skåre = 1 (sumskåre = 3). Sammen kan dette indikere svakheter i den antikolinerge skåre-modellen når den skal fungere som grunnlag for kvantitativ estimering av AA som den enkelte pasient eksponeres for. I større skala kan man derfor tenke seg at en populasjon med overveiende bruk av legemidler med lav ACB-skåre (1), vil kunne få dårligere korrelasjon mellom totalskåre og SAA enn en populasjon der bruk av enkeltlegemidler med ABC-skåre ≥ 2 er mer utstrakt. Dette overensstemmer med tidligere studier som viser at et legemiddel med skåre = 3 bidrar betydelig med enn legemiddel med skåre = 1 til SAA [15, 16].

Resultater i oppgaven viste en signifikant korrelasjon mellom AA målinger i serum og CSF hos hoftebruddspasientene, noe som samsvarer med det som tidligere har vært rapportert i en studie [45]. Dette styrker teorien om at AA i serum er en perifer markør som kan reflektere situasjonen i CNS. Antikolinerg aktivitet i serum var om lag 10 ganger høyere enn i CSF hos de undersøkte pasientene i denne oppgaven. Denne observasjonen er i motsetning til en tidligere studie av Plaschke *et al.*, der det ble målt 2.5 ganger høyere AA i CSF enn i serum [45]. I studien til Plaschke *et al.* var imidlertid alle pasientene behandlet med midazolam, et legemiddel med antikolinerge egenskaper og høygradig fordeling til CNS. Dette var et moment som også forfatterne av artikkelen selv diskuterte som en mulig årsak til de høye målte verdiene av AA i CSF.

Det ble i denne oppgaven målt en signifikant høyere AA i norske versus skotske serumprøver, mens det ikke var noen forskjell i AA mellom CSF-prøvene. Forskjellen i SAA mellom de to byene kan ikke forklares med ulikt legemiddelbruk, det var ikke en høyere ACB-skåre hos norske enn hos skotske pasienter. En mulig grunn til forskjellen kan imidlertid være den signifikante høyere andelen av demente i den norske sammenlignet med den skotske delen av populasjonen (55 % mot 10 %). Grunnen til at det var relativt flere demente med hoftebrudd i Oslo enn i Edinburgh er imidlertid usikker, og bør følges opp med nye studier.

5.3 Begrensninger ved oppgaven

Grunnet høye kostnader og liten tilgang til rensstoffer av alkaloider kunne ikke flere av alkaloidene i lupinbønne-ekstraktene identifiseres, og eventuelt undersøkes med tanke på antikolinerg aktivitet. Ved opparbeiding av prøver fra lupinbønne-ekstrakter til måling av antikolinerg aktivitet, var det videre problemer med løseligheten av ekstraktene. Under utprøving av egnede løsemidler, ble det observert bunnfall i flere løsninger, særlig i de høyeste konsentrasjonene av ekstraktene. Etter å ha funnet passende løsemiddel, ble det likevel observert bunnfall i høyeste konsentrasjon av 96et i den endelige metoden. Dette bidro til usikkerhet i vurderingen av antikolinerg aktivitet i dette ekstraktet.

I databehandling knyttet antikolinerg belastning hos hoftebruddpasientene, ble økt antikolinerg aktivitet assosiert til forekomst av demens og delirium i univariatanalyser (Mann-Whitney-tester). En multivariatanalyse ville imidlertid kunne avklart om det er demens, høy SAA, eller evt. begge faktorer, som var assosiert til risiko for delirium. Før en eventuell videre publisering av disse funnene, bør derfor de statistiske analysene repeteres med multivariat-tester.

6. Oppsummering og konklusjon

6.1. Antikolinerg aktivitet i lupinbønner

Ved måling av antikolinerg aktivitet i ekstrakter fra lupinbønner og vaskevannsfas ble det påvist høy grad av hemming. Etter opprensning og isolering av alkaloider fra ekstraktene kunne den antikolinerge effekten tilskrives alkaloidene. Dette ble videre bekreftet med antikolinerg måling av rensubstansen lupanin, den viste seg å gi en doseavhengig fortrenning i likhet med atropin av den spesifikke liganden.

Det ble funnet flere alkaloider i ekstraktene av lupinbønner. Ved GC og GC-MS analyser ble alkaloidene lupanin og 13-OH-lupanin identifisert med hjelp av referansesubstanser, både i ekstraktene fra lupinbønnene og i vaskevannsfasen. Relativt alkaloidinnhold var 1:0.08 for henholdsvis vaskevannsfasen og vaskede bønneekstrakter. Lupanin var det mest forekommende alkaloidet med opptil 88 % av den totale alkaloidmengden.

Den antikolinerge effekten av lupinbønner var betydelig. Vaskeprosessen for å tilberede lupinbønnene var ikke tilstrekkelig for å fjerne alkaloidene. Inntak av disse lupinbønnene kan være med å øke risikoen for antikolinerge (kognitive) bivirkninger, spesielt for pasienter som allerede bruker flere antikolinerge legemidler eller andre preparater da det er den totale antikolinerge belastningen som er skadelig. Belastningen er dessuten kumulativ og vil hos mennesker med vedvarende bruk av lupinbønner kunne være utalt.

6.2 Antikolinerg belastning hos hoftebruddpasienter

Det var en signifikant sammenheng mellom pasientenes totale ACB-skåre og AA i serum, og en tendens til at AA i serum for enkeltlegemidler med ACB-skåre ≥ 2 var høyere enn ved enkeltlegemidler med ACB-skåre = 1. Dette indikerer at redusert bruk av substanser med antikolinerg aktivitet, spesielt de med skåre >1 , kan bidra til å redusere kognitive bivirkninger blant hoftebruddspasienter. Dette er en sårbar pasientgruppe, der forekomsten av demens og

delirium er høy. I denne oppgaven ble det observert en tendens til høyere AA i serum hos pasienter med delirium mot de uten delirium, samt signifikant høyere serum AA hos demente enn ikke-demente. Dette kan være uttrykk for endogene prosesser, men det kan heller ikke utelukkes at det skyldes ulikt inntak av antikolinerge substanser.

Referanseliste

1. Brunton L.L., C.B.A., Knollman B.C., , *Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. 12th edition ed2011: McGraw Hill.
2. Rang H.P, D.M.M., Ritter J.M., Moore P.K., *Pharmacology*. 5th edition ed2003: Churchill Livingstone, Elsevier Limited.
3. Wess, J., R.M. Eglén, and D. Gautam, *Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development*. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(9): p. 721-33.
4. Eglén R.M., *4 Muscarinic Receptor Subtype Pharmacology and Physiology*. *Progress in Medical Chemistry*. Vol. 43. 2005: Elsevier B.V.
5. Boustani M. A., C.N.L., Munger S., Maidment I., Fox G. C., *Impact of anticholinergics on the aging brain: a review and practical application*. *Aging Health*, 2008. **4**(3): p. 311-20.
6. Mintzer, J. and A. Burns, *Anticholinergic side-effects of drugs in elderly people*. *J R Soc Med*, 2000. **93**(9): p. 457-462.
7. Boustani, M.A., Campbell, N.L., Munger, S., Maidment, .I, Fox, G.C.,. *Anticholinergic Cognitive Burden Scale* 2008 [cited 2012 21.05]; Available from: <http://www.indydiscoverynetwork.org/AnticholinergicCognitiveBurdenScale.html>.
8. Campbell, N., et al., *The cognitive impact of anticholinergics: a clinical review*. *Clin Interv Aging*, 2009. **4**: p. 225-33.
9. Pakulski C., D.L., Millo B.,, *Age and sex as factors modifying the function of the blood-cerebrospinal fluid barrier*. *Med Sci Monit*, 2000. **6**((2)): p. 314-8.
10. Fox, C., et al., *Anticholinergic Medication Use and Cognitive Impairment in the Older Population: The Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study*. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2011. **59**(8): p. 1477-1483.
11. Campbell, N.L., et al., *Use of anticholinergics and the risk of cognitive impairment in an African American population*. *Neurology*, 2010. **75**(2): p. 152-159.
12. Han, L., J.V. Agostini, and H.G. Allore, *Cumulative Anticholinergic Exposure Is Associated with Poor Memory and Executive Function in Older Men*. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2008. **56**(12): p. 2203-2210.
13. Tune, L. and J.T. Coyle, *Serum Levels of Anticholinergic Drugs in Treatment of Acute Extrapyramidal Side-Effects*. *Archives of General Psychiatry*, 1980. **37**(3): p. 293-297.
14. Jakobsen S.M., *Bestemmelse av antikolinerg aktivitet i serum*, in *Senter for farmasi*2009, Univeristetet i Bergen.
15. Mulsant, B.H., et al., *Serum anticholinergic activity in a community-based sample of older adults - Relationship with cognitive performance*. *Archives of General Psychiatry*, 2003. **60**(2): p. 198-203.
16. Carnahan, R.M., Lund, B.C., Perry, P.J., Pollock, B.G., Culp, K.R.,. *The Anticholinergic Drug Scale as a Measure of Drug-Related Anticholinergic Burden: Associations With Serum Anticholinergic Activity* 2006 [cited 2012 21.05]; Available from: <http://jcp.sagepub.com/content/suppl/2006/11/17/46.12.1481.DC1/Appendix.pdf>.

17. Samuelsson G., B.L., *Drugs of Natural Origin*. 6th edition ed2009: Apotekarsocieteten, Swedish Pharmaceutical Press.
18. Norsk Legemiddelhåndbok. L22.4.1 *Atropin*. 2010 18.04.2012]; Available from: <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/søker/atropin/81212>.
19. Lynum B., *Antikolinerg aktivitet i utvalgte naturpreparater og næringsmidler*, in *Avdeling for farmasøytisk biovitenskap og Avdeling for farmasøytisk kjemi*2010, Universitet i Oslo.
20. Pulse Western Australia. *About lupins*. 2012 19.04.2012]; Available from: www.lupins.org.
21. Reinhard, H., et al., *Quinolizidine alkaloids and phomopsins in lupin seeds and lupin containing food*. J Chromatogr A, 2006. **1112**(1-2): p. 353-60.
22. Gross, U., R.G. Galindo, and H. Schoeneberger, *The Development and Acceptability of Lupine (Lupinus-Mutabilis) Products*. *Qualitas Plantarum-Plant Foods for Human Nutrition*, 1983. **32**(2): p. 155-164.
23. Department of Agriculture and Food. *Australian sweet lupin (Lupinus angustifolius)*. 19.04.2012]; Available from: http://www.agric.wa.gov.au/PC_92144.html.
24. Jansman A.J.M., H.G.D., Huisman J., van der Poel A.F.B., *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and rapeseed*1998: Wageningen Pers.
25. Jimenez-Martinez, C., H. Hernandez-Sanchez, and G. Davila-Ortiz, *Diminution of quinolizidine alkaloids, oligosaccharides and phenolic compounds from two species of Lupinus and soybean seeds by the effect of Rhizopus oligosporus*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007. **87**(7): p. 1315-1322.
26. Moneret-Vautrin, D.A., et al., *Cross-allergenicity of peanut and lupine: The risk of lupine allergy in patients allergic to peanuts*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1999. **104**(4): p. 883-888.
27. European Commission, *Commission Directive 2006/241/XE*, 2006, Off J Eur Union.
28. Boschini, G., et al., *Quinolizidine alkaloids in seeds of lupin genotypes of different origins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(10): p. 3657-3663.
29. Resta, D., et al., *Evaluation of total quinolizidine alkaloids content in lupin flours, lupin-based ingredients, and foods*. Molecular Nutrition & Food Research, 2008. **52**(4): p. 490-495.
30. Australia New Zealand Food Authority, *Lupin alkaloids in food, a toxicological review and risk assessment*, A. Australia New Zealand Food Authority, Editor 2001, Australia New Zealand Food Authority, ANZFA: Canberra.
31. Di Grande, A., et al., *Anticholinergic toxicity associated with lupin seed ingestion: case report*. Eur J Emerg Med, 2004. **11**(2): p. 119-20.
32. Litkey, J. and M.W. Dailey, *Anticholinergic toxicity associated with the ingestion of lupini beans*. American Journal of Emergency Medicine, 2007. **25**(2): p. 215-217.
33. Pingault, N.M., et al., *Two cases of anticholinergic syndrome associated with consumption of bitter lupin flour*. Medical Journal of Australia, 2009. **191**(3): p. 173-174.
34. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E., *Legemiddelanalyse*2004: Fagbokforlaget.
35. Gomme, J. *Kursus i Radioaktive isotoper og ioniserende stråling*. 2005-2009 [cited 2012 21.05]; Available from: http://www2.bio.ku.dk/isotopkursus/Kursus/Undervisningsmateriale/Oevelsesvejledning/PDF/Isotopkursus_Vejledning_09.pdf.


36. Carnahan, R.M., et al., *The relationship of an anticholinergic rating scale with serum anticholinergic activity in elderly nursing home residents*. *Pharmacotherapy*, 2002. **22**(10): p. 1341-1341.
37. Jakobsen, S.M., Kersten, H. and Molden, E., , *Evaluation of Brain Anticholinergic Activities of Urinary Spasmolytic Drugs Using a High-Throughput Radio Receptor Bioassay*. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2011. **59**(3): p. 501-505.
38. Planchueloravelo, A., L. Witte, and M. Wink, *Quinolizidine Alkaloid Profiles of South-American Lupins - *Lupinus-Linearis* and the *Lupinus-Gibertianus* Complex*. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 1993. **48**(9-10): p. 702-706.
39. Carmali, S., et al., *Recovery of lupanine from *Lupinus albus* L. leaching waters*. *Separation and Purification Technology*, 2010. **74**(1): p. 38-43.
40. Pothier, J., et al., *A comparative study of the effects of sparteine, lupanine and lupin extract on the central nervous system of the mouse*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1998. **50**(8): p. 949-954.
41. Schmeller, T., et al., *Binding of Quinolizidine Alkaloids to Nicotinic and Muscarinic Acetylcholine-Receptors*. *Journal of Natural Products*, 1994. **57**(9): p. 1316-1319.
42. Muzquiz, M., et al., *Variation of Alkaloid Components of Lupin Seeds in 49 Genotypes of *Lupinus-Albus* L from Different Countries and Locations*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994. **42**(7): p. 1447-1450.
43. Plaschke, K., et al., *Increased Cortisol Levels and Anticholinergic Activity in Cognitively Unimpaired Patients*. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 2010. **22**(4): p. 433-441.
44. Plaschke, K., et al., *EEG changes and serum anticholinergic activity measured in patients with delirium in the intensive care unit*. *Anaesthesia*, 2007. **62**(12): p. 1217-1223.
45. Plaschke, K., et al., *Significant correlation between plasma and CSF anticholinergic activity in presurgical patients*. *Neuroscience Letters*, 2007. **417**(1): p. 16-20.

Appendiks

Vedlegg 1

Vaskeprosedyre og tilberedningsmetode for lupinbønner fra *Purcell Mountain Farms*.

Purcell Mountain Farms .com



QUALITY FOOD
FOR
THE CULINARY FRIEND

Lupini Beans

cooking instructions:

**Place the Beans in a container and fill with water.
Let it soak for 24 hours, make sure the water covers the
beans as it soaks.**

**Let it cook for 2 hours. After 2 hours let it cool off.
After the beans have cooled off place them in a container
with cold water and let it soak.**

**Change water each day until bitterness goes away.
5 days should be sufficient.**

**You can add a little salt to it now or you can add it later
when you place them in the jars.**

**Once you are satisfied with the taste place the beans in
jars add water and little salt if you wish.**

Vedlegg 2

Antikolinerg legemiddelsliste (ACB-skåree).

ACB = 1 (mulig AA)	ACB = 2 (AA ved klinisk bruk)	ACB = 3 (uttalt AA)
Alprazolam	Amantidine	Alimemazin*
Alverine	Belladonna	Amitriptylin
Atenolol	Carbamazepin	Amoxapine
Bupropion	Cyclobenzaprine	Atropin
Captopril	Cyproheptadine	Benztropine
Chlorthalidone	Darifenacin#	Brompheniramine
Cimetidin	Loxapine	Carbinoxamine
Clorazepat	Meperidine	Chlorpheniramine
Colchicine	Molindone	Chlorpromazine
Diazepam	Oxcarbazepin	Chlorprotixen*
Digoxin/Digitoxin	Paroxetin*	Clemastin
Dipyridamol	Pimozid	Clomipramin
Fentanyl	Quetiapin*	Clozapin
Fluvoxamin	Solifenacin#	Desipramine
Furosemid		Dicyclomine
Haloperidol		Dimenhydrinate
Hydralazin		Diphenhydramin
Hydrokortison		Doxepin
Isosorbid nitrater		Fesoterodin#
Ipratropiumbromid*		Flavoxat
Kodein		Hydroxyzin
Loperamid		Hyoscyamin
Metoprolol		Imipramin
Morfin		Levopromazin*
Nifedipin		Meclizine
Quinidine		Methocarbamol
Prednison/Prednisolon		Nortriptylin
Ranitidin		Olanzapin
Risperidon		Orphenadrin
Theofyllin		Oxybutynin
Trazadone		Perphenazin
Triamterene		Prometazin
Warfarin		Propentelin
		Skopolamin
		Thioridazine
		Tolterodin
		Trifluoperazine
		Trihexyphenidyl
		Trimipramine

Listen er hentet fra Boustani *et al.*, Anticholinergic Cognitive Burden List (7).

[* = endret i forhold til Norsk legemiddelhandbok og Carnahal *et al.*, (36), # = endret i forhold til Jakobsen *et al.*, (37)]. AA: antikolinerg aktivitet.