

Struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider isolert fra tre maliske medisinplanter

Lippia chevalieri

Cassia occidentalis

Spilanthes oleracea

Mei Gi Cheung



Masteroppgave for graden Master i farmasi

Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2013

**Struktur- og aktivitetsstudier av
polysakkarider isolert fra tre
maliske medisinplanter**

Lippia chevalieri

Cassia occidentalis

Spilanthes oleracea

Mei Gi Cheung

Masteroppgave for graden Master i farmasi

Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Mai 2013

Veiledere:

Professor Berit Smestad Paulsen

Post doktor Kari Tvette Inngjerdingen

Professor II Terje E. Michaelsen

Professor II Drissa Diallo

FORORD

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, i perioden august 2012 til mai 2013.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk min veileder, professor Berit Smestad Paulsen for hennes enestående faglige og praktiske veiledning under arbeidet med masteroppgaven. Jeg vil også takke henne for å være et hyggelig og inspirerende reisefølge i Uganda.

Videre vil jeg rette en stor takk til post doktor Kari Tvete Inngjerdingen for hennes hjelp og veiledning under arbeidet med masteroppgaven.

Stipendiat Yuanfeng Zou og fortjener også en stor takk for god hjelp og veiledning under laboratoriearbeidet.

En stor takk går også til Terje E. Michaelsen, Bingzhao Zhang og Hoai Thi Nguyen Aas for faglig og praktisk veiledning.

Jeg vil også takke Anne M. Fjellestad og Adina Hassankhani for å ha vært et hyggelig reisefølge i Uganda.

Til slutt vil jeg takke alle de ansatte og master-studentene ved avdelingen for Farmasøytisk kjemi ved Farmasøytisk Institutt for å ha bidratt til at dette har vært et fint hovedfagsår.

Oslo, mai 2013

Mei Gi Cheung

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	III
1 FORKORTELSER	IX
2 SAMMENDRAG	XV
3 INNLEDNING	1
3.1 Polysakkarider	1
3.1.1 Strukturelle polysakkarider i planter	1
3.1.2 Biologiske aktive polysakkarider	7
3.2 Immunmodulerende aktivitet	8
3.2.1 Komplementsystemet	8
3.3 Malaria	10
3.3.1 Malariaparasittens livsløp	10
3.3.2 Den globale utviklingen av malaria	11
3.3.3 Tradisjonell medisin mot malaria.....	13
3.3.4 Utvikling av forbedrende tradisjonelle medisin i Mali – Improved Traditional Medicines (ITM)	14
3.3.5 Taksonomisk klassifisering	17
3.3.6 Botanikk og habitat	18
3.3.7 Tidligere forskning på Malaria.....	20
4 OPPGAVENS MÅLSETNING	22
5 METODER	23

5.1	Generelle metoder, inklusive prinsipper	24
5.1.1	Vannkvalitet	24
5.1.2	Innveiting.....	24
5.1.3	Filtrering.....	24
5.1.4	Sentrifugering.....	24
5.1.5	De-gassing av løsninger	24
5.1.6	Blanding av løsninger.....	25
5.1.7	Måling av pH.....	25
5.1.8	Tørking med N ₂ -gass.....	25
5.1.9	Volumreduksjon	25
5.1.10	Vask av dialyseslanger	26
5.1.11	Dialyse.....	27
5.1.12	Syrevask av glass-utstyr	29
5.1.13	Absorbansmålinger.....	30
5.1.14	Frysetørking	30
5.2	Isolering av polysakkarider	31
5.2.1	Ekstraksjon av polysakkarider med instrument ASE TM 350 Accelerated Solvent Extractor system.....	31
5.2.2	Ionebytterkromatografi.....	35
5.2.3	Gelfiltrering koblet til FPLC-apparatur.....	40
5.3	Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold	43
5.3.1	Fenolsvovelsyretesten	43
5.3.2	Påvisning av stivelse i rå-ekstrakt	45
5.3.3	Monosakkaridbestemmelse	46
5.4	Strukturoppklaring	51
5.4.1	Metylering	51
5.4.2	GC-MS	59
5.5	Immunmodulerende aktivitet.....	61

5.5.1	Komplementfikseringstest.....	61
6	RESULTATER OG DISKUSJON.....	69
6.1	Isolering av polysakkarider	69
6.1.1	Ekstraksjon	69
6.1.2	Ionebytterkromatografi.....	72
6.1.3	Bestemmelse av molekylvekt, gelfiltrering.....	74
6.2	Struktur- og aktivitetsforhold - <i>Lippia chevalieri</i>	77
6.2.1	Karbohydratanalyse.....	77
6.2.2	Bindingsforhold.....	79
6.2.3	Komplementfiksering.....	82
6.3	Struktur- og aktivitetsforhold- <i>Cassia occidentalis</i>.....	86
6.3.1	Karbohydratanalyse.....	86
6.3.2	Bindingsforhold.....	87
6.3.3	Komplementfiksering.....	89
6.4	Struktur- og aktivitetsforhold- <i>Spilanthes oleracea</i>.....	91
6.4.1	Karbohydratanalyse.....	91
6.4.2	Komplementfiksering.....	93
6.5	Sammenligningen av komplementfikseringstest mellom plantene	95
7	KONKLUSJON.....	97
8	REAGENSliste.....	Feil! Bokmerke er ikke definert.
9	REFERANSER.....	101

1 FORKORTELSER

4-OMe-GlcA	4-oksygenmetyl-glukuronsyre
α	Alfa-anomere monosakkarider der OH-gruppen ved C1 har samme konfigurasjon som sukkeret selv
AG-I	Arabinogalaktan type I
AG-II	Arabinogalaktan type II
AGIIa	En type arabinogalaktan II
AGIIb-1	En type arabinogalaktan II
ANX	Dietylaminopropyl
Ara	Arabinose
ACT	Artemisininbaserte kombinasjonesterapi
AUC	Areal under kurven
β	Beta-anomere monosakkarider der OH-gruppen ved C1 har motsatt konfigurasjon som sukkeret selv
BNI	Bruttonasjonalinntekt
BPII	<i>Biophytum petersianum</i>
BSA	Bovint serum albumin
C1-C6	Karbonatomene i et monosakkarid
C3	Komplement komponent C3
C3a	Fragment av komplement komponent C3
C3b	Fragment av komplement komponent C3

C3 konvertase	Enzym som spalter komplement komponent C3
C5a	Fragment av komplement komponent C5
CO50/50	<i>Cassia occidentalis</i> , rå-ekstrakt, 50 % etanol i destillert vann ved 70°C
CO50	<i>Cassia occidentalis</i> , rå-ekstrakt ved 50 °C destillert vann
CO50NØY	Nøytral fraksjon etter ionebytterkromatografi av CO50
CO50S1, CO50S2	Sure fraksjoner etter eluering av CO50 på ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub) med NaCl-gradient
CO50S2G	Fraksjon isolert fra CO50S2 etter eluering på gelfiltreringskolonne
CO100	<i>Cassia occidentalis</i> , rå-ekstrakt ved 100 °C destillert vann
CO100NØY	Nøytral fraksjon etter ionebytterkromatografi av CO100
CO100S1	Sur fraksjon etter eluering av CO100 på ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub) med NaCl-gradient
CO100S1G	Fraksjon isolert fra CO100S1 etter eluering på gelfiltreringskolonne
D	D-sukker med OH-gruppe i kiralt karbon rettet mot høyre når molekylet er tegnet i Fischer-projeksjon
Da	Dalton
DE	Diatomaceous Earth
DMT	Département de la Médecine Traditionelles
e.c.r.	Effektiv Karbon Respons
<i>f</i>	Furanoseform, 5-ring
FID	Flammeionisasjonsdetektor
FPLC	Fast protein liquid chromatography

FS-test	Fenolsvovelsyretest
Fuc	Fucose
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsyre
GC	Gasskromatografi
GC-MS	Gasskromatografi-massespektrometri
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre
HG	Homogalakturonan
HMDS	Heksametyldisilazan
ICH ₅₀	Konsentrasjon som gir 50 % hemming
IS	Intern standard
L	L-sukker med OH-gruppe i kiralt karbon rettet mot venstre når molekylet er tegnet i Fischer-projeksjon
LC50/50	<i>Lippia chevalieri</i> rå-ekstrakt, 50 % etanol i destillert vann ved 70°C
LC50%NØY	Nøytral fraksjon etter ionebytterkromatografi av LC50/50
LC50%S1, -S2, -S3	Sure fraksjoner etter eluering av LC50/50 på ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub) med NaCl-gradient
LC50%S3G	Fraksjon isolert fra LC50%S3 etter eluering på gelfiltreringskolonne
LC50	<i>Lippia chevalieri</i> rå-ekstrakt ved 50 °C destillert vann
LC50NØY	Nøytral fraksjon etter ionebytterkromatografi av LC50

LC50S1	Sur fraksjon etter eluering av LC50 på ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub) med NaCl-gradient
LC100	<i>Lippia chevalieri</i> rå-ekstrakt ved 100 °C destillert vann
LC100NØY	Nøytral fraksjon etter ionebytterkromatografi av LC100
LC100S1, -S2	Sure fraksjoner etter eluering av LC100 på ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub) med NaCl-gradient
Man	Mannose
Me	Metyl
MS	Massespektrometri
Mw	Molekylvekt
MWCO	Molecular weight cut-off
N ₂	Nitrogengass
NO	Nitrogenoksid
NO ₂ ⁻	Nitritt
O ₂	Oksyngengass
OH	Hydroksylgruppe
OMe	Metylgruppe bundet til sukker via oksygen
<i>p</i>	Pyranoseform, 6-ring
psi	Pounds per square inch, pund per kvadrattomme (trykkenhet)
RG-I	Rhamnogalakturonan type I
RG-II	Rhamnogalakturonan type II
Rha	Rhamnose
XII	

rpm	Runder per minutt
SO50/50	<i>Spilanthes oleracea</i> , rå-ekstrakt, 50 % etanol i destillert vann ved 70°C
SO50%NØY	Nøytral fraksjon etter ionebytterkromatografi av SO50/50
SO50	<i>Spilanthes oleracea</i> , rå-ekstrakt ved 50 °C destillert vann
SO50NØY	Nøytral fraksjon etter ionebytterkromatografi av SO50
SO50S, -S2	Sure fraksjoner etter eluering av SO50 på ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub) med NaCl-gradient
SO50S2G	Fraksjon isolert fra SO50S2 etter eluering på gelfiltreringskolonne
SO100	<i>Spilanthes oleracea</i> , rå-ekstrakt ved 100 °C destillert vann
SO100NØY	Nøytral fraksjon etter ionebytterkromatografi av SO100
SO100S1	Sur fraksjon etter eluering av SO100 på ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub) med NaCl-gradient
SO100S1G	Fraksjon isolert fra SO100S1 etter eluering på gelfiltreringskolonne
SRBC	Sensibiliserte røde blodceller (fra sau)
TMCS	Trimetylklorosilan
TMS	TMCS + HMDS + pyridin
V ₀	Voidvolum
WHA	World Health Assembly
WHO	World Health Organization
XG	Xylogalakturonan
Xyl	Xylose

2 SAMMENDRAG

Lippia chevalieri, *Cassia occidentalis* og *Spilanthes oleracea* er tre maliske medisinplanter som inngår i den standardiserte fytomedisinen Malarial, og er en av de syv godkjente ITM på det maliske markedet. Den anvendes til behandling mot malaria, en sykdom som har høy frekvens i det tropiske Afrika. De nevnte medisinplantene anvendes også separat innenfor tradisjonell medisin. Produksjon av standardisert fytomedisin er bærekraftig og jobber til fordel for det aktuelle landet. Den anses som trygg og effektivt, og som et rimelig alternativ til konvensjonelle legemidler.

Det er utført en begrenset mengde forskning på Malarial, og de fleste studiene som har blitt gjort har rettet fokus mot evaluering av sikkerhet og den antimalariske effekten til preparatet. Forskning på polysakkarider i Malarial har ikke vært utført tidligere, men fordi polysakkarider fra planter er kjent for å ha immunmodulerende egenskaper er det derfor relevant å utføre struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider på *L. chevalieri*, *C. occidentalis* og *S. oleracea*.

Tørkede, pulveriserte plantematerialer ble ekstrahert med organiske løsemidler for å fjerne lavmolekylære og upolare forbindelser. Polysakkaridene ble isolert ved ekstraksjon med 50 % etanol i destillert vann, 50 °C og 100 °C destillert vann. Ekstraktene ble opprenset ved ionebytterkromatografi med ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub) til sure og nøytrale fraksjoner. Noen av de sure fraksjonene som ble isolert ved ionebytterkromatografi ble ytterligere rensset på en gelfiltreringskolonne koblet til FPLC-apparatur. Metoden ble kun anvendt til bestemmelse av molekylvekt. Rå-ekstraktene og utvalgte fraksjoner ble tilslutt undersøkt i struktur- og aktivitetsstudier.

På bakgrunn av analyse av karbohydratinnhold og bindingsforhold viste det seg at alle fraksjonene inneholdt monosakkarider som er karakteristiske for pektiner. Det ble blant annet observert betydelige mengder homogalakturonan som er sammensatt av 1,4 GalA enheter i alle prøvene. En varierende mengde av RGI og AGII ble også observert i fraksjonene som ble testet. Få forgreningspunkter ble observert i Rha-enhetene i de utvalgte fraksjonene (LC50S1, LC100S2 LC50%S3, CO 50S2, CO100S1, SO50S2 og SO100S1), og i de fraksjonene (LC50S1 og LC100S2) som inneholdt 1,2,4 Rha eller 1,3,4 Rha noe som indikerer at disse prøvene inneholdt få områder med "hairy region". 1,2-, 1,3- og 1,5 Ara ble i varierende grad

detektert i de utvalgte fraksjonene. Undersøkelsene på bindingsforhold påviste at fraksjonene fra *Spilanthes oleracea* og LC50%S3 fra *Lippia chevalieri* hadde færrest bindingstyper av alle monosakkaridene.

Den biologiske aktiviteten ble undersøkt ved en komplementfikseringstest. Generelt sett viste rå-ekstraktene en bedre immunmodulerende aktivitet enn den positive standarden (BP11) og de isolerte fraksjonene, men om disse positive resultatene skyldtes polysakkarider er foreløpig ukjent. Før det kan trekkes en endelig slutning kreves det flere tester og undersøkelser som fokuserer på om andre komponenter i ekstraktene kan ha hatt innvirkning på testen.

Medisinplanten *Spilanthes oleracea* var den planten med lavest komplementfikserende aktivitet av fraksjonene. I tillegg til rå-ekstraktene viste noen av de sure fraksjonene (LC50S1, LC100S2 og CO50S2) fra *L. chevalieri* og *C. occidentalis* seg å ha en bedre biologisk aktivitet enn BP11.

3 INNLEDNING

3.1 Polysakkarider

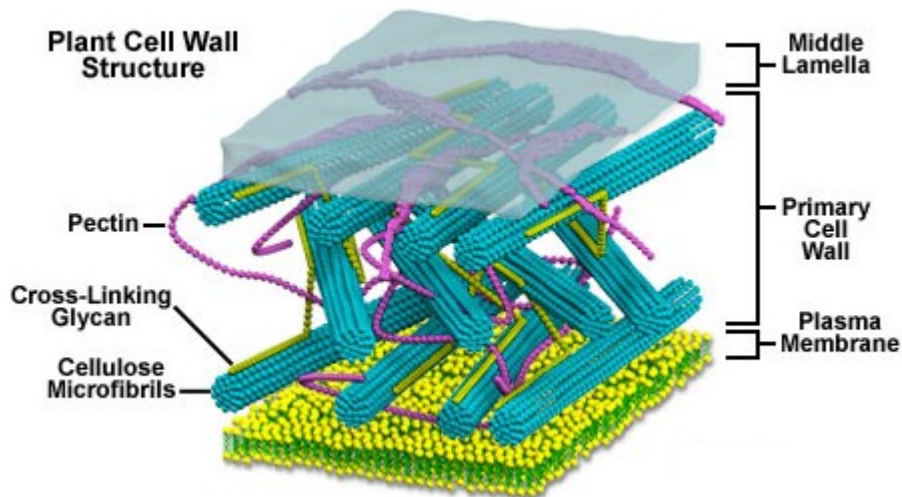
Polysakkarider er den mest tallrike og varierte kategorien av organiske forbindelser som forekommer i naturen. De er naturlige, og har mange vitale funksjoner. I planter opererer de for eksempel ofte som energireserver. Polysakkarider er makromolekyler som er bygd opp av et stort antall monosakkaridenheter. De kan være nøytrale, som for eksempel amylose og cellulose, eller sure som galakturonsyre-polymere, som på sin side er en viktig komponent i pektinet. Polymeren er sammenføyret av O-glykosidbindinger, og disse bindingene oppstår ved at glykosyl-delen av hemiacetal (eller hemiketal) reagerer med en hydroksylgruppe fra en annen sukkerenhet (aglycone). Polysakkarider kan være enkle; lineære eller ha en mer komplisert struktur; det vil si være forgrenede. De kan videre også inndeles i to ulike kategorier, basert på deres antall ulike monomere. Homogene polysakkarider består av lange kjeder med samme sukkerenheter, mens heterogene polysakkarider består av forskjellige typer monosakkarider. Den tredimensjonale strukturen til et polysakkarid bestemmes av flere faktorer, som for eksempel graden av forgrening i polymeren, substitusjon av monomere ($\alpha 1 \rightarrow 2$, $\alpha 1 \rightarrow 3$, $\alpha 1 \rightarrow 4$, eller $\beta 1 \rightarrow 2$, $\beta 1 \rightarrow 3$, $\beta 1 \rightarrow 4$ også videre), og hvilken konfigurasjon som opptrer i glykosidbindingen, α - eller β .¹

3.1.1 Strukturelle polysakkarider i planter

Plantecelleveggen

En cellevegg er bygget opp av en relativt fast struktur som omslutter og gir form til planteceller (se figur 3-1). Den beskytter cellen og gir planten nødvendig stivhet. Summen av alle plantecelleveggene utgjør skjelettet i planten, og de virker som en fysisk barriere mot inntrengere. Celleveggen består av mange komponenter som for eksempel cellulose, hemicellulose, pektin og lignin. Celleveggen kan deles inn i tre lag: midtlamell, primært og sekundært cellevegg. Midtlamellen er den første veggen som dannes, og den utgjør en kontaktflate mellom to nye celler. Midtlamellen har en tynn struktur og består hovedsakelig av pektiner. I primærveggen utgjør polysakkarider den største bestanddelen. Primærveggen er

hovedsakelig bygd opp av cellulose, pektin, protein og hemicellulose. Cellulose danner teksturer som kalles mikrofibriller, som forsterker veggen. Sekundærveggen er det innerste laget og dannes etter at en celle er ferdig utvokst. Veggens kjemiske sammensetning og struktur skiller seg noe fra primærveggen. Den er vesentlig tykkere og består av mer cellulose enn primærveggen.²

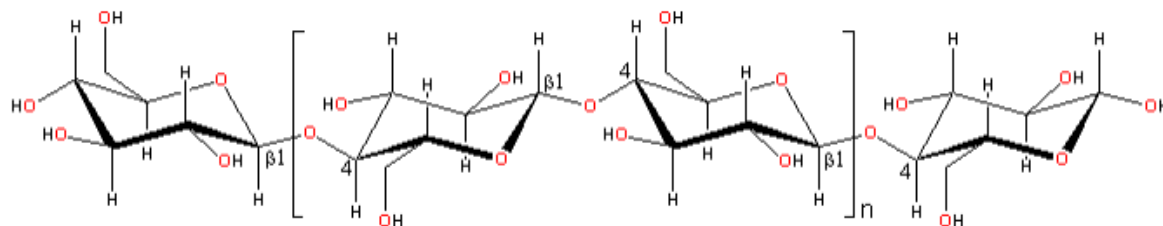


Figur 3-1 Strukturen av en plantecellevegg³

Polysakkarider i plantecellevegg

Cellulose

Cellulose er en organisk forbindelse som utgjør hovedbestanddelen i plantenes cellevegg. Polysakkaridet er bygget opp av lineære kjeder med D-glukoseenheter som er sammenføyet via β -1,4-glykosidbindinger (se figur 3-2). Mikrofibriller dannes når kjedene pakkes tett sammen parallelt, og er et resultat av at det dannes hydrogenbindinger og van der Waals krefter mellom molekylene.⁴ Disse bindingene er med på å gi egenskaper som kjemisk stabilitet, stor mekanisk styrke og gjør at polymeren er uløselig i vann.²



Figur 3-2 Struktur av cellulose⁵

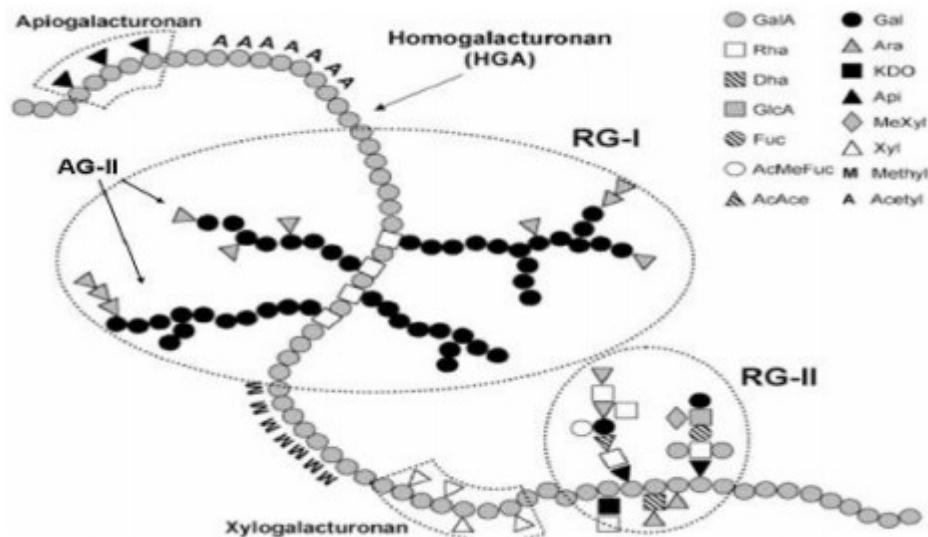
Hemicelluloser

Hemicelluloser er en heterogen gruppe polysakkarider. De forekommer i plantens cellevegger sammen med cellulose. Polymeren deles inn i forskjellige typer som for eksempel xylaner, mannaner, xyloglukaner, glukomannaner, og β 1 \rightarrow 3, β 1 \rightarrow 4 glukaner. Disse finnes i celleveggene til planter som vokser på land, bortsett fra β 1 \rightarrow 3, β 1 \rightarrow 4 glukaner som er begrenset til Poales. Sammensetningen av typene kan variere, avhengig av hvilke arter og celletyper man studerer. Den viktigste rollen til polymeren er å styrke celleveggen ved å interagere med cellulose.⁶

Pektiner

Pektiner er en heterogen gruppe polysakkarider, og de har også mange funksjoner i celleveggen. Dette inkluderer vekst, ionetransport, størrelse, rigiditeten til ulike vev, binding til vann, og beskyttelse mot infeksjoner forårsaket av plantepatogener. Pektiner deles inn i sure polymerer som homogalakturonaner, rhamnogalakturonaner I og II (RG-I og RG-II) og nøytrale polymerer som galaktaner, arabinaner, og arabinogalaktaner I og II (AG-I og AG-II). Pektiner er en del av stort sett alle planter, og de befinner seg hovedsakelig intercellulært og i primærceleveggen. Det har også vist seg at de er ansvarlig for ulike former for biologiske aktiviteter som har vært verdsatt i tradisjonell medisin. Pektiner består av en kompleks gruppe med polysakkarider. Den karakteriske strukturen til polymeren består av lange sekvenser med polygalakturonaner som også kjent som homogalakturonan eller “smooth regions”. Dette er den enkleste formen for sammensetning av pektinet, som består av en lineær kjede med α -(1 \rightarrow 4)-bundet D-galakturonsyre-enheter. Disse enhetene utgjør pektinstammen. Galakturonsyre-enheter kan så erstattes med α -(1 \rightarrow 2) bundet L-rhamnose (Rha). Områder med alternerende rhamnose- og galakturonsyre-enheter kalles for “hairy regions” eller rhamnogalakturonan I. I denne regionen har strukturen ulike sidekjeder som er forankret i

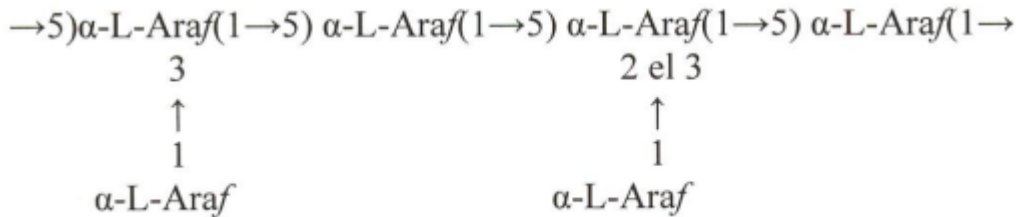
rhamnosenhetene, som består av nøytrale polymerer som arabinaner, galaktaner, xylaner og arabinogalaktaner. L-rhamnosenhetene er ofte forgrenet i C4-posisjon, hvor sidekjedene består av arabinogalaktan, galaktan og arabinan (se figur 3-3).⁷



Figur 3-3 Skjematiske presentasjon av primære pektinstrukturer⁸

Arabinaner

Arabinaner fra planter består av lineære eller forgrenede L-arabinofuranosider. De er hovedsakelig bundet i C-3 eller C-5 posisjon. Forgreninger i posisjon C-2 har også blitt observert, men de er generelt sett mindre frekvente enn C-3 forgreninger. Arabinanstammen er sammensatt av 1→5 bindinger, mens forgreninger opptrer i posisjon C-3 eller C-2 (se figur 3-4). Det er ikke gitt at arabinaner eksisterer på denne måten i naturen, hvor de mest sannsynlig er bundet til galaktaner i pektinkomplekset. Disse kan enten frigjøres ved enzymatiske reaksjoner eller gjennom svak syrehydrolyse under ekstraksjonsprosesser. Cellevegger som inneholder arabinaner er også rik på både exo- og endoglykanaser.⁷



Figur 3-4 Eksempel på en arabinanstruktur⁷

Arabinogalaktan Type I og II (AG-I og AG-II)

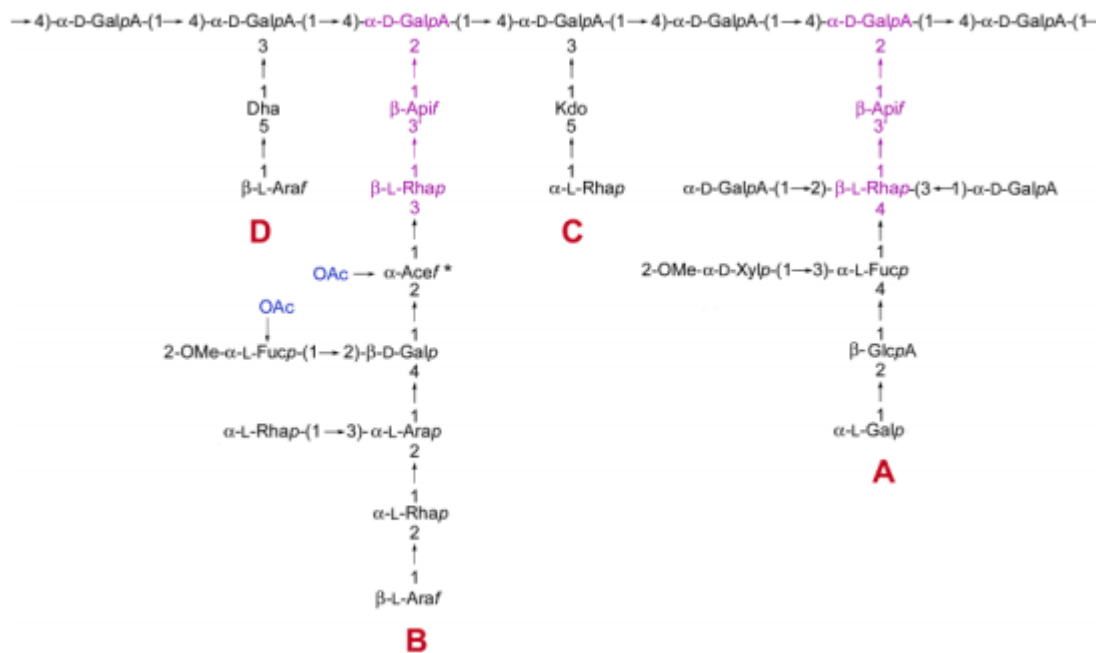
Arabinogalaktaner har vist seg å ha effekt i flere ulike biologiske systemer. De inndeles ofte i tre grupper: arabino-4-galaktaner (Type I); arabino-3,6-galaktaner (Type II); og polysakkarider med arabinogalaktan sidekjeder (type III). Sistnevnte kalles ofte for ekte pektin. AG-I finnes i forskjellige mengder i celleveggen og de er sammensatt av en kjede med β -1,4-bundet galaktan, med sidekjeder av arabinose bundet til posisjon C-3 i galaktoseenhetene. AG-II har en stamme bestående av galaktan som er bundet sammen i enten i C-3 eller C-6 posisjon. Forgreningspunktene foreligger i posisjon 1,3 og 6 på galaktoseenheten. Begge typene er funnet som strukturenheter i RG-I, og de er bundet via rhamnose i posisjon C-4 i pektinkjeden. AG-II kan detekteres ved en enkel metode med Yariv- reagens, og resulterer i at AG-II felles ut og at et rødt bunnfall dannes.⁷

Rhamnogalakturonan I (RG-I, RhaGalA-I)

RG-I består av alternerende α -1,4-bundet D-galakturonsyre og α -1,2-bunde L-rhamnoseenheter. Rhamnose-enhetene er hovedsakelig forgrenet i posisjon C-4 med sidekjeder av arabinogalaktaner, arabinaner og galaktaner. Ved enkelte tilfeller kan rhamnose være forgrenet i posisjon C-3. Arabinogalaktanene som er bundet til rhamnose er ofte av Type II, selv om Type I også forekommer. Disse områdene med alternerende rhamnose- og galakturonsyreneheter kalles for “hairy-” eller “ramified regions”.⁷

Rhamnogalakturonan II (RG-II, RhaGalA-II)

RG-II er en kompleks pektinstruktur som kun omfatter en liten del av den totale mengden pektiner som finnes i plantecellevæggen. Den er sammensatt av en homogalakturonanstamme som består av 9-10 D-galakturonsyreenheter som er α -1,4-bundet, og fire forskjellige oligosakkaridkjeder som er bundet via posisjon C-3 eller C-4 (se figur 3-5). RGII kjennetegnes ved at sjeldne monosakkarider som 2-O-metylfucose, 2-O-metylxylose, KDO, DHA og apiose, forekommer i strukturen. Navnet rhamnogalakturonan II ble bestemt før strukturen var fullstendig kjent. Betegnelsen er egentlig ikke passende for denne polymeren, da stammen bare består av galakturonsyreenheter.⁷



Figur 3-5 Foreslått RG-II struktur med homogalakturonan-stamme og oligosakkarider bundet til (A-D).⁹

Xylogalakturonan (XG)

Xylogalakturonan er sammensatt av en lineær homogalakturonankjede (α -1,4-bundet). Polymeren er substituert med β -D-xylose i C3 posisjon. Mengden av β -xylose i molekylstrukturen vil variere, og dette avhenger av hvilket naturprodukt man undersøker.¹⁰

3.1.2 Biologiske aktive polysakkarider

Polysakkarider fra planter har lenge vært et tema i moderne medisin og fokuset har ligget på deres fysiske egenskaper, deres kjemiske og fysiske modifiseringer og deres anvendelse. I senere tid har interessen for polysakkaridets biologiske aktivitet steget betraktelig. Dette skyldes den moderne vitenskapelige utviklingen på teknologiske metoder som inkluderer isolasjon, opprensing, strukturbestemmelse samt en relativ enkel *in vitro* analyse for å kunne evaluere polysakkaridets effekt på det humane immunsystemet. Nye, moderne teknikker har vist at ulike typer polysakkarider isolert fra medisinplanter er biologisk aktive. En rekke farmakologiske effekter har blitt tilskrevet polysakkarider. De kan være immunstimulerende, ha anti-ulcer, anti-tumor, og anti-inflammatorisk effekter, eller være kolesterolsenkende. Polysakkarider med biologisk aktivitet er ofte sure og har negativ ladning. Et eksempel på dette er polymerer med uronsyrer som D-galakturonsyre i pektinet. Man kan dermed anta at visse strukturenheter må være tilstede i pektiner hvis de skal ha biologisk aktivitet.⁷

“Hairy” eller “ramified regions” i pektiner har vist seg å være viktige områder for aktiveringen av komplementsystemet. Aktiviteten oppstår etter avspaltning fra “smooth regions”. Området består av en hovedkjede med rhamnogalakturonaner, og sidekjedene med nøytrale karbohydrater som er bundet til Rha C-4 posisjon. Ved anvendelse av enzymer til kløyving av de ulike sidekjedene på RG-I, antas det at nøytrale sidekjedene med 1,6-bundet β -D-Gal bundet til rhamnogalakturonan hovedkjede er et minimum for den komplementaktiverende aktiviteten i pektinet. Ikke alle pektiner har antikomplementære egenskaper. Derfor kan bare visse nøytrale sidekjedene være ansvarlig for uttrykket for aktivitet i “ramified region”.¹¹

3.2 Immunmodulerende aktivitet

3.2.1 Komplementsystemet

Komplementsystemet er en viktig del av det humane medfødte immunforsvaret, et forsvarssystem som trer i kraft når kroppen blir angrepet av fremmede organismer. Systemet består av en samling plasmaproteiner produsert av leveren, og forekommer i blod, lymfe og i ekstracellulære væsker. Mange av komplement-proteinene er proteolytiske enzymer eller proteaser som sirkulerer funksjonelt i en inaktiv form. Aktivering av komplementet initierer en serie med enzymatiske reaksjoner av proteolytisk kløyving samt aktivering av forskjellige faktorer som resulterer i at kovalente bindinger av spesielle fragmenter binder seg til mikrobens overflate, en prosess som kalles komplement-fiksering. Disse fragmentene markerer mikrobens overflate, noe som gjør at effektorceller lett kan komme til og tilslutt destruerer mikroben. Denne reaksjonen kalles for opsonisering. Systemet aktiveres i form av en kaskade-reaksjon via tre ulike mekanismer (se figur 3-6), alternativ, lektin, og klassisk aktiveringsveier som består av flere enn 30 proteiner.

Den alternative aktiveringsveien aktiveres ved at det skjer forandringer i det lokale fysisk-kjemiske miljøet, som er forårsaket av bakterielle overflater. Den er også aktiv under den tidligste perioden av infeksjonen. Den lektin-medierte veien initieres ved at mannosebindende lektin i blodplasma bindes til mannoseinnholdene peptidoglykaner på overflaten av mikroorganismer. Denne veien induseres av infeksjon og bidrar til å initiere immunitet. Den klassiske aktiveringsveien blir initiert av at det medfødte immunforsvaret reagerer på at C-reaktive proteiner binder seg til bakterielle overflater. Den kan også initieres i det adaptive immunforsvaret ved å binde antistoffer (IgM eller IgG) til patogenets overflate. Fellestrekk for disse tre aktiveringsveiene er at et enzym dannes; C3 konvertase, et enzym som omdanner komplement-faktor C3 til to fragmenter C3a og C3b.¹²

Når komplementsystemet aktiveres kan følgende ting skje:

1. Under aktiveringsprosessen dannes det lavmolekylære forbindelser som diffunderer ut i vevet og i vevsvæskene. De virker som anafylatoksiner og aktiverer blant annet mastceller og basofile granulocytter, slik at disse degranulerer og frigjør en rekke farmakologisk aktive forbindelser. I tillegg har C3a og C5a kjemotaktisk aktivitet, noe som tiltrekker granulocytene til betennelsesstedet.

2. Noen komplement-faktorer (C3b) virker som opsoniner ved å binde seg til cellemembraner og cellevegger. De “markerer” overflaten på mikroorganismen, slik at makrofager og granulocytter lettere kan feste seg, og fremmer en mer effektiv fagocytose.
3. Det terminale komplement-komplekset (MAC-komplekset) kan binde seg til biologiske membraner og noe som fører til at den perforeres. Dersom det blir mange hull i membranen kan cellen til slutt lysere.
4. Fragmenter fra komplementfaktor C3b på en mikroorganisme kan feste seg til overflaten av B-lymfocytter via komplementreseptor. Dette gir et ko-stimulerende signal i B-lymfocytene, og gir økt stimulering på produksjon av antistoffer.¹³

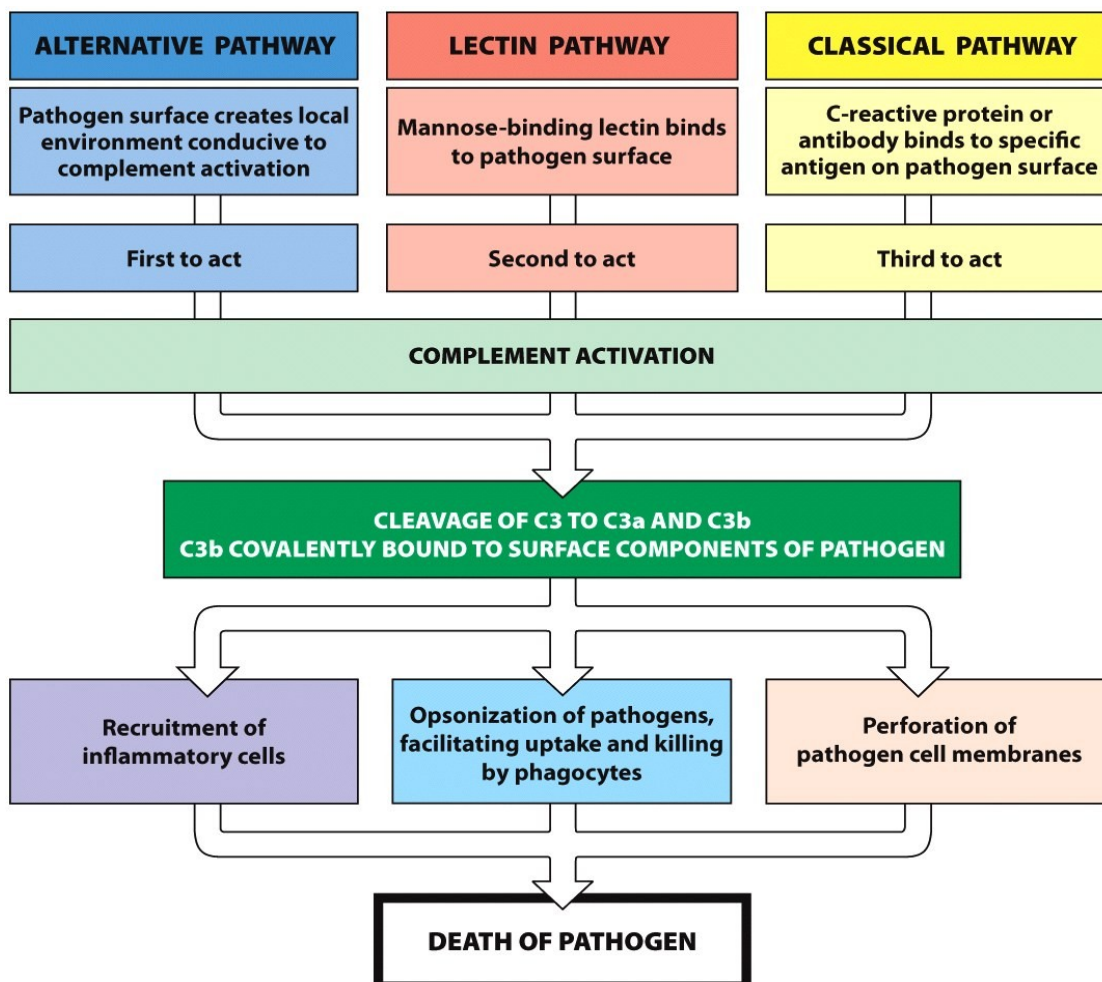


Figure 2.5 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

Figur 3-6 Oversikt over de tre aktiveringsveiene for komplementsystemet.¹²

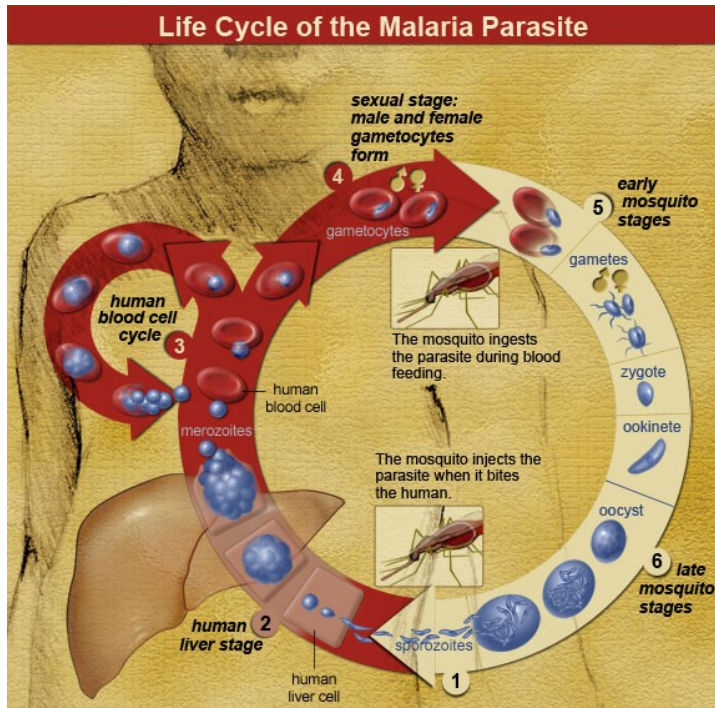
3.3 Malaria

Malaria er en infeksjonssykdom som forårsakes av *Plasmodium*-parasitten. Sykdommen overføres ved bitt fra infiserte hunn-mygg fra *Anopheles*-arten. *Plasmodium*-parasitten kan deles inn i 4 forskjellige arter som alle kan infisere mennesker: *Plasmodium falciparum*, *P. ovale*, *P. malarie* og *P. vivax*. *P. falciparum* anses som den kritiske varianten. I alvorlige tilfeller kan denne arten forårsake cerebrale infarkter. *P. falciparum* er også den mest vanlige malariaformen i det tropiske Afrika, et område som inkluderer Mali. *Anopheles gambiae* betraktes som den mest dominerende vektoren i forbindelse med overføring av malaria i Afrika.¹⁴

3.3.1 Malariaparasittens livsløp

Malaria overføres når infiserte hunn-mygg (vektor) injiserer 11-12µm lange sporozoitte fra spyttet over i blodet på verten. Sporozoitene blir transportert med blodet til leveren, hvor den første ukjønnete formering tar plass. Parasittene utvikler seg hurtig til å bli merozoitte, da de formerer seg med høy hastighet allerede i den tidligste fasen. På dette stadiet vil ikke kroppen reagere på noen som helst måte, men når merozoitene blir tømt fra leveren og ut i sirkulasjonen kan man se antydninger til symptomer. De frigjorte merozoitene går så inn i et nytt stadium, hvor de klargjør seg til å infisere blodets erythrocytter. Her formerer de seg enda en gang, og blir til ringformede trofozoitte. I en siste ukjønnet formering endrer de sin form og fasong og blir til schizonte. Når schizontene modnes, sprekker erythrocyttene, og nydannede merozoitte frigjøres i blodomløpet. Det er først nå malariainfiserte pasienter opplever den karakteristiske feberstigningen som kjennetegner infeksjonen.

En del av de frigjorte merozoitene vil reinvadere nye erythrocytter, og igjen bli til trofozoitte, mens andre utvikles til å bli hannlige og hunnlige gametocytter. Gametocytene forårsaker ikke direkte sykdom, men de spiller en viktig rolle i overføringen av malaria. Når ikke-infiserte hunn-mygg suger blod fra malariainfiserte personer, vil gametocytene gjennomgå en kjønnnet formering i myggens tarmkanal. Sluttproduktet er et stort antall sporozoitte, som er klare for et nytt kretsløp ved neste bitt og spredning (se figur 3-7). Infeksjonssykdommen kan påvises ved funn av trofozoitte og/eller schizonte i blodet til pasienten. Når en vurdering av hvilken type malaria en pasient har blir foretatt, må det bedømmes ut fra en artsdiagnostikk på særtrekk fra trofozoitte, schizonte og gametocytter.¹⁵



Figur 3-7 Livssyklus av malaria parasitten¹⁶

3.3.2 Den globale utviklingen av malaria

Malaria er sterkt assosiert med fattigdom. Dødelighet som følge av malaria er anslått å være høyest i land med lavere BNI per innbygger. Det er dokumentert at land hvor andelen fattige er høy (Hvis du har mindre enn US \$ 1,25 per person per dag regnes du som fattig) har høy dødelighet. Barn og gravide, spesielt førstegangsggravide er de mest sårbare gruppene for malaria-sykdommen.¹⁷

I 2010 ble 216 millioner tilfeller av malaria rapportert, hvorav 81 % av dem stammet fra Afrika. Det samme året var det estimerte dødstallet på 655000 personer. 86 % av ofrene var barn under 5 år. *World Health Report 2011* gir Afrika en dødsandel på 91 %, hvor Mali er et av seks spesielt utsatte land (Kongo, Burkina Faso, Mosambik, Elfenbenskysten og Nigeria) som til sammen utgjør 60 % av dødstilfellene.¹⁸

Mellom 2000 og 2010 har dødelighet av malaria blitt redusert med 26 % på verdensbasis. I den afrikanske region var nedgangen på 33 %. I denne perioden ble anslagsvis 1,1 millioner malaria-dødsfall forebygget globalt, og primært som et resultat av en oppskalering av intervensjoner. Nedgangen på insidens og dødelighet av malaria er i framgang, men det er

viktig å påpeke at det fortsatt er en lang vei å gå. WHO jobber mot en reduksjon på 75 % av tilfeller med malaria innen 2015 (sammenlignet med 2000) i et utvalg samarbeidsvillige nasjoner. Av 99 land med pågående malaria-overføring, innsendte imidlertid bare 58 av landene tilstrekkelig og konsistent data på insidens av sykdommen mellom 2000 og 2011. Basert på de rapporterte dataene ble 50 land inkludert, 9 fra den afrikanske regionen involvert i samarbeidet med WHA, hvor målet altså ble satt til en reduksjon av tilfellene av malaria med 75 % innen 2015. Ytterligere 4, mer krevende land jobber mot å oppnå en reduksjon på mellom 50 % og 75 %.

Internasjonale subsidieringer for kontroll av sykdommen har steget kraftig i løpet av de siste åtte årene, og ble anslått til US \$ 1.66 billion i 2011 og US \$ 1.84 billion i 2012. Nasjonale offentlige midler for programmer mot malaria har også vært i økning i de siste årene, og det ble estimert at US \$ 625 millioner ble brukt i 2011. Dessverre er nåværende finansiering for forebygging og kontroll av malaria langt under de ressursene som kreves for å nå det globale målet. Det har blitt estimert at det vil koste over US \$ 5.1 billioner årlig mellom 2011 og 2020 for å oppnå universal tilgang på intervensjoner mot sykdommen. I 2011 var bare US \$ 2.3 billioner tilgjengelig, et beløp som er mindre enn halvparten av det estimerte.¹⁹

En annen global utfordring er utvikling av resistens på malariamidler. Et tema som skaper global bekymring er hvordan utvalget av medikamenter begrenses betydelig flere steder i verden, noe som i kombinasjon med resistensproblematikken skaper utfordringer. I dag finnes følgende legemidler til behandling av malaria; kinin, klorokinfosfat, meflokin, primakin, proguanil, doxycyclin, atovakvon/ proguanil og derivater av artemisinin. Dessverre har *P. falciparum* utviklet resistens mot medikamenter som inneholder kinin, klorokinfosfat, meflokin, proguanil og artemisinin. *P. falciparum*s resistens mot malariamidler har steget mye raskere enn arbeidet for å utvikle nye legemidler. Dette har ført til at kombinasjoner av flere medikamenter har blitt svært vanlig under behandlingen. Faren for utvikling av resistens kan også reduseres ved å kombinere to aktive stoffer med forskjellige virkningsmekanismer, en effekt du ikke får hvis du behandler med monoterapi. I dag anbefaler WHO artemisininbaserte kombinasjonsterapi (ACT) som førstelinjebehandling mot ukomplisert malaria forårsaket av *P. falciparum*. ACT regnes som det mest effektive antimalariamiddelet som finnes tilgjengelig på markedet i dag, og WHO anbefaler fem ACT for behandling mot *P. falciparum* malaria. Valget av ACT bør være basert på resultatene av terapeutiske effektstudier mot lokale varianter av *P. falciparum* malaria.²⁰

På grunn av økende resistens mot antimalariamidler, kommer det stadig nye legemiddel på markedet. Å få tak i og kunne benytte seg av disse er selvfølgelig uoverkommelig for flertallet av den berørte befolkningen. I Afrika sør for Sahara, dør for eksempel mange av mangel på behandling, uten at dette skyldes mangelen på tilgjengelige og effektive legemidler. Mange har rett og slett ikke råd til nyutviklede legemidler med høye prislapper.

Vaksine mot malaria kan være det neste banebrytende kontrollredskapet på sykdommen. De kan inndeles i tre varianter. Den første vaksinen forebygger infeksjon ved å virke mot sporozoitten eller parasittens utvikling i levercellene. Den andre forebygger sykdom ved å virke mot merozoitten i erytrocyttene, og den siste forebygger transmisjon ved å hemme den kjønnede formering i myggen. Forskningen på vaksinen har så langt lyktes på dyremodeller, men det har imidlertid ennå ikke lyktes noen å utvikle en humanvaksine mot malaria. Mer forskning og finansiell støtte er alfa omega for utviklingen på området, men det er vanskelig å se det skje i forbindelse med den sviktende kommersielle interessen rundt malaria.²¹

3.3.3 Tradisjonell medisin mot malaria

Anvendelse av medisinske planter ved behandling mot malaria har en lang tradisjon. Den strekker seg tilbake til det tidlige 1600-tallet, hvor barken til *Cinchona*-treet ble anvendt ved behandling av sykdommen. Barken fra *Cinchona*-treet ble tørket, deretter pulverisert, og tilslutt blandet i væske før den skulle drikkes. Barken ble anvendt frem til 1820, da alkaloidet *Quinine* ble oppdaget av Pierre Joseph Pelletier og Joseph Caventou. Alkaloidet ble ekstrahert fra barken og videre isolert. I dag regnes *Quinine* som det eldste legemiddelet mot malaria.²²

Studier som fokuserer på tradisjonell plantemedisin ved behandling av malaria har spilt en viktig rolle i utvikling av nye, moderne legemidler. To av de mest effektive antimalariamidlene stammer fra tradisjonell medisin som *Artemisia annua* med sitt opphav fra Kina, og *Quinin*; Kinin, som ble nevnt tidligere. Planter som anvendes i tradisjonell medisin kan være den hemmelige nøkkelen til å åpne nye porter for forskning på mulige potente midler mot malaria. Farmakologiske studier har også vist at de mange medisinske plantene som anvendes ved behandling mot malaria er effektive, og at noen av dem er enda mer effektive enn de nåværende midlene.

Medisinske planter har stadfestet sin posisjon i de tropiske landene. Årsakene er nok den lette tilgangen, og at den er kulturelt og sosioøkonomisk akseptert i samfunnet. Tilliten fra

tradisjonelle healere spiller også en viktig rolle ved anvendelse av medisinske planter. Det har blitt anslått at hele 80 % av pasienter med malaria behandles i lokalsamfunnet og at de aldri har vært på noen formell helseinstitusjon.²³ Dette skyldes nok at adgang til offentlig helseinstitusjoner er begrenset, og at healere er deres primære helse/omsorgspersonell i de avsidesliggende områdene hvor malaria forekommer hyppig. Tradisjonelle healere har en høy anseelse i fellesskapet. En person som har en god forståelse av fellesskapet og samtidig er godt kjent med pasientens bakgrunn får gjerne mer tillitt fra pasienten enn noen som kommer utenfra. I motsetning til moderne medisin som praktiseres av leger med dårlig kjennskap til pasientenes bakgrunn og familie, skaper kombinasjonen av det spirituelle og den fysiske omsorgen en nærhet som er høyt verdsatt i lokalsamfunnet.¹⁷

3.3.4 Utvikling av forbedrende tradisjonelle medisin i Mali – Improved Traditional Medicines (ITM)

Ved å dyrke medisinske planter på et lokalt nivå i samarbeid med frivillige organisasjoner, kan dette bidra til å styrke det lokale samfunnet slik at de blir mer selvstendige. Dette promoterer med at det er billig i drift, tilgjengelig ved behov og at det blir utført på en bærekraftig måte. En annen metode er å produsere standardiserte fytomedisin på et nasjonalt nivå, enda en bærekraftig metode som jobber til fordel for det aktuelle landet. Baksiden kan være at man til tross for dette og at distribusjonen i teorien burde bli enklere, fortsatt kan ende opp med et sluttprodukt som er mer kostbart enn de importerte medisinene. Standardiserte fytomedisin utvikles oftest i samarbeid med statlig organisasjoner. Disse fytomedisinene kalles ofte forbedrende tradisjonelle medisiner, og kan til fordel utvikles og markedsføres mye raskere enn de konvensjonelle legemidlene. En av årsakene til dette er at det ikke er noen krav til preklinisk toksisitet-testing, men at det heller er tilstrekkelig med dokumentasjoner av tradisjonell bruk og kliniske erfaringer. I WHO's retningslinjer fremgår følgende:

«If the product has been traditionally used without demonstrated harm, no specific restrictive regulatory action should be undertaken unless new evidence demands a revised risk - benefit assessment».²⁴

Standardisert fytomedisin anses som trygt og effektivt, og som et rimelig alternativ til importerte legemidlene, men dette forutsetter at infrastrukturen i det lokale samfunnet er velutviklet. Fremstillingen og doseringen er standardisert, selv om det ikke alltid er i henhold til konsentrasjonen av de aktive forbindelsene. Kvalitetskontroll er også implementert.

Fremstillingen er ofte kompleks, og kan enten være en blanding av planter eller et resultat av en komplisert ekstraksjonsmetode.²⁵

I Mali er The Department For Traditional Medicine (DMT) et samarbeidssenter for WHO's forskning innen tradisjonell medisin. Departementet ble grunnlagt 1968, og er en del av helsesektoren. Siden 1979 har ett av deres hovedmål vært å utvikle standardiserte forbedrende tradisjonelle medisiner. I Mali reguleres tradisjonell medisin ved The Commission Nationale d'Autorisation de Mise sur le marché of the Ministry of Health, og den kan deles inn i fire kategorier:

1. Tradisjonell medisin utarbeidet av tradisjonelle helseutøvere med friske eller tørkede råmaterialer, med en kort halveringstid.
2. Tradisjonell medisin som anvendes av det nåværende samfunnet. Den er fremstilt på forhånd, og består av råmaterialer.
3. Standardiserte ekstrakter som er fremstilt på forhånd etter vitenskapelig forskning.
4. Molekyler opprenset fra tradisjonelle medisiner etter vitenskapelig forskning.

ITM har siden 1990 blitt regnet som en del the Malian National Formulary, og i dag finnes det syv godkjente ITM på det maliske markedet som alle distribueres til apotek sammen med de konvensjonelle medikamentene.²⁶ Et av dem er Malarial som er en plantemedisin til behandling av malaria. Sykdommen er fortsatt et stort helseproblem i landet, og regnes som en av de viktigste årsakene til død og sykdom av befolkningen. Cerebral malaria står for 51,7 % av pediatrike innleggelser og er årsaken til 42 % av barnedødsfall.²⁷

Malarial ble først formulert av Professor Mamadou Koumaré basert på hans familieoppskrift, og produseres nå som en standardisert fytomedisin av DMT. Den markedsføres i dag som en pakke med 11 enkeltdoser av 10 gram medisinplanter. Medisinen klargjøres ved å koke en ferdig dosert pose med planter sammen med en skive steinfri sitron i 500 ml vann. Blandingen kokes i 10 minutter, deretter fileteres den før den drikkes lunkent. Sukker kan anvendes som smakstilsetning. Den angitte doseringen for voksne er en pose to ganger daglig i 4 dager, etterfulgt med en pose engang daglig i 3 dager. Til barn halveres dosen, og den er konstatert til å være kontraindisert til barn på under 5 år.²⁶

Fytomedisinen består av tre forskjellige plantearter:

1. Blader av *Cassia occidentalis* L. (Caesalpinaceae): 64 % fra original-formuleringen, men den er nå endret til 62 % i Malarial.
2. Blader av *Lippia chevalieri* Mold.(Verbenaceae): 34 %
3. Blomsterhoder av *Spilanthes oleracea* L. (*Asteraceae*): 4 % fra original formuleringen, men den er nå endret til 6 %.

Plantene som er nevnt over anvendes også separat innenfor tradisjonell medisin. Pasienter som behandles med Malarial føles symptomatisk bedre fra 48 timer etter innsetting av behandling, og mengden av parasitter reduseres uten at de blir helt fjernet.



Figur 3-8 Bildet av Malarial²⁸

3.3.5 Taksonomisk klassifisering

Tabell 3-1 Oversikt over taksonomisk klassifisering.

<i>Senna occidentalis</i> (L.) Link²⁹	
Rike:	<i>Plantae</i> – planteriket
Subrike:	<i>Tracheobionta</i> – karplanter
Superdivisjon:	<i>Spermatophyta</i> – frøplanter
Divisjon:	<i>Magnoliophyta</i> – blomstrendeplanter
Klasse:	<i>Magnoliopsida</i> – tofrøbladede
Subklasse:	<i>Rosidae</i>
Orden:	<i>Fabales</i>
Familie:	<i>Fabaceae</i> – ert familie
Slekt:	<i>Senna</i> Mill.
Art:	<i>Senna occidentalis</i> (L.) Link

<i>Spilanthes oleracea</i> L.³⁰	
Rike:	<i>Plantae</i> – planteriket
Subrike:	<i>Tracheobionta</i> – karplanter
Superdivisjon:	<i>Spermatophyta</i> – frøplanter
Divisjon:	<i>Magnoliophyta</i> – blomstrendeplanter
Klasse:	<i>Magnoliopsida</i> – tofrøbladede
Subklasse:	<i>Asteridae</i>
Orden:	<i>Asterales</i>
Familie:	<i>Asteraceae</i>
Slekt:	<i>Spilanthes</i> Jacq.
Art:	<i>Spilanthes oleracea</i> L.

<i>Lippia chevalieri</i> Mould³¹	
Rike:	<i>Plantae</i> – planteriket
Divisjon:	<i>Magnoliophyta</i> – blomstrendeplanter
Klasse:	<i>Magnoliopsida</i> – tofrøbladede
Orden:	<i>Lamiales</i>
Familie:	<i>Verbenaceae</i>
Art:	<i>Lippia chevalieri</i> Mould

3.3.6 Botanikk og habitat

***Spilanthes oleracea* L. (Asteracrae)**

Lokalt bamanan navn: Farimani

Spilanthes oleracea L. er en viltvoksende plante som fornyes årlig. Stammen er sylindrisk og bladene er enkle, formet som et lansehode (lanceolate) med taggete kanter (dentate). Planten har gule rørformede blomster gruppert i et kjegleformet blomsterhode som er plassert på en lang blomsterstilk. Arten stammer fra kultivering av *Acmella Alba* (L'Hér.) R.K. Jansen og har sitt opphav i Brasil og Peru.³²

I Afrika og India er blomsten først og fremst kjent som en lokalt bedøvende fytomedisin for tannpine, men den har også vært tradisjonelt anvendt mot malaria. Utover dette blir den brukt til å fremme fordøyelsen, ved at den stimulerer spyttkjertlene og øker spyttsekresjonen. På Filippinene anvendes den derimot som lotion til reumatiske plager. Blomsterhodene administreres i form av avkok, infusjon eller ved tygging. Det mest interessante stoffet i blomsten er i denne sammenhengen det skarpt smakende spilanthol, som er et isobutylamid i tillegg til steroler, tanniner, garvestoffer, alkaloider, og triterpener. Stoffet spilanthol er kjent for sin lokalt bedøvende virkning, men er også et effektivt parasittdrepende middel mot malaria.³³

***Cassia occidentalis* L. (Caesalpinaceae)**

Lokalt bamanan navn: Balambalan Kassa Go

Denne busken er distribuert i distriktet Bamako, Mali, men også i Afrika, Asia og Latin Amerika. Busken kan bli opptil 0,5-2 m høy og er beryktet for sine antipyretiske, diuretiske, og diaforetiske egenskaper. Den er ofte anvendt som antimalarisk og antipyretisk i tropiske land. Bladene er spredtstilte, alternerende og sammensatt av 3-7 småblader. Den har gule blomster med fem kronblader som blir båret i små klyster. Frukten til planten er flat og svakt buet.³⁴ Bladene av planten har blitt testet ut av DMT, og testene har vist at de består av en rekke interessante kjemiske substanser som triterpener, saponiner, tanniner, steroler og frie antrakinoner.³³

***Lippia chevalieri* Mould (Verbenaceae)**

Lokalt bamanan navn: Nganniba

Lippia chevalieri Mould er et aromatisk urt som kan bli opptil 2,5 m høy. Bladene er kranstilte og er i en elliptisk form med taggete kanter. Planten har hvite blomster som har en umbel eller sylindrelignende form. I Sentral-Amerika er urten kjent for sin virkning mot bronkitt, astma, hoste og influensa. I Afrika anvender de bladene som te til behandling av en rekke sykdomstilstander som for eksempel malaria, hypertensjon, diaré³⁵ og som et munnnesinfiserende middel.³⁶ Bladene anvendes også som smakstilsetning for te i Senegal. Urten har blitt testet ut av DMT, hvor bladene var i hovedfokus. De består av en rekke interessante kjemiske substanser. Det vandige ekstraktet består av saponiner, tanniner og polyuronider. Utover dette inneholder planten adskillige flere substanser: steroler, triterpener og spor av alkaloider.³³



Figur 3-9 *Lippia chevalieri*³⁷



Figur 3-10 *Cassia occidentalis*³⁸



Figur 3-11 *Spilanthes oleracea*³⁹

3.3.7 Tidligere forskning på Malarial

Malarial er ikke toksisk på mus. To toksikologiske studier har blitt utført. Den ene studien baserte seg på 3 grupper av 5 mus. Gnagerne fikk ulike doser for å undersøke om og eventuelt i hvilken grad medisinen kunne være akutt toksiske. Dosene som ble gitt til musene var som følger: terapeutisk dose (0,33g/kg), 3 ganger så stor som den terapeutiske dosen (0,99g/kg), og 90 ganger så stor som den terapeutiske dosen (30g/kg). Fytomedisinen ble løst i vann og administrert oralt ved hjelp av en sprøyte. Musene var fastet i 12 timer på forhånd.

Observasjonstiden varte i sju dager, og i løpet av denne tiden ble ingen negative tegn observert. Obduksjon og histopatologiske undersøkelser ble ikke utført i denne studien. I den andre dyrestudien ble histopatologiske undersøkelser studert. Gnagerne ble behandlet oralt med forskjellige ekstrakter (frysetørket vannekstrakt, diklormetan og etanol) av rotbarken fra *Cassia occidentalis* med en dose på 500mg/kg. Det var ingen tegn til lesjoner.⁴⁰ Andre dyr som kyr og sauer har også blitt matet med store mengder blader. Dette resulterte i gastrointestinale bivirkninger, men disse var forbigående.⁴¹

For å kunne evaluere den antimalariske aktiviteten i Malarial ble det utført et *in vivo* eksperiment med *P. berghei* og et *in vitro* eksperiment med to *P. falciparum* kulturer. Malarial ble studert i sin helhet, men også hver enkelt plante ble analysert. *C.occidentalis* i *in*

vitro-analysen viste at dette er den minst aktive planten, med høyest IC₅₀- verdi. Malarial og *C.occidentalis* viste en lignende IC₅₀- verdi og lå på mellom 500 og 700 µg/ml. *L.chevalieri* var derimot dobbelt så aktiv, mens *S.oleraceae* var trippelt så aktiv som Malarial. Analysen bekreftet også at komponentene ikke viste store forskjeller på IC₅₀- verdi mellom den klorokin resistente- og klorokin sensitive *P. falciparum* kulturen. I *in vivo* analysen ble mus infisert med *P. berghei*, og behandlet med de ulike komponentene. Det ble observert nedgangen i parasittmengden, men ingen ble kuret. Musene som ble behandlet overlevde 2 til 3 dager lenger enn kontrollmusene. Klorokin (60 mg/kg) som ble gitt oralt over 5 dager, kurete de infiserte musene.⁴²

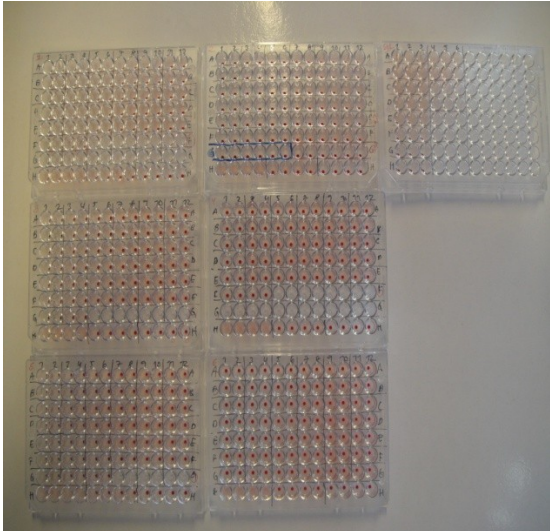
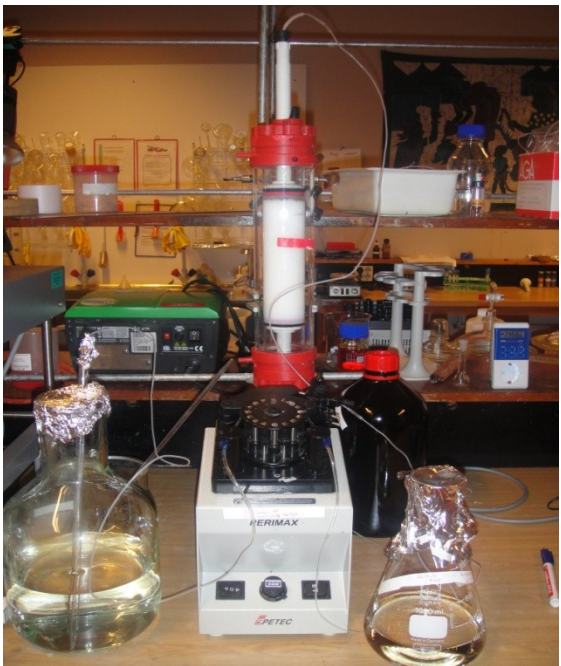
Tre kliniske studier har blitt utført for å evaluere sikkerheten og effektiviteten av Malarial. Den første studien fant sted i Baguineda i 1987-1985, og var en randomisert kontrollert studie av Malarial i forhold til klorokin.⁴³ I den andre studien ble Malarial sammenlignet med klorokin. 53 pasienter var involvert, og av disse fikk 36 pasienter behandling med Malarial mens 17 ble behandlet med klorokin. Oppfølgingsprosessen ble et problem, og dette gjaldt spesielt gruppen som ble behandlet med klorokin. Dette skyldtes at parasittene ble eliminert hos pasientene allerede på den 5. dagen, noe som førte til stort frafall blant deltagerne. *Fever clearance* var lik mellom gruppene, mens *parasite clearance* var bedre i klorokin-gruppen. Det var færre bivirkninger på Malarial enn på klorokin. Mengden av *S.oleraceae* i Malarial anses som utilstrekkelig for effektiv schizontocidal-aktivitet.⁴⁴ Derfor ble mengden av *S.oleraceae* i Malarial økt til 6 %. Den nye formuleringen ble så analysert i en kohort studie på pasienter med ukomplisert malaria, uten kontrollgruppe. 30 pasienter fra og med fem år, med en temperatur på > 37°C, og en parasittmengde på > 3000/µl var inkludert i studiet. Parasittmengden ble redusert og symptomene ble forbedret, men pasientene i alderen 8-19 hadde en høyere mengde parasitter enn de eldre på dag 7. Dette tyder på at pasientens immunforsvar kan ha innvirkning på evnen til å eliminere parasittene.⁴⁵

4 OPPGAVENS MÅLSETNING

Oppgavens hensikt:

Det skulle gjennomføres studier på polysakkarider fra de maliske medisinplantene *Lippia chevalieri*, *Cassia occidentalis* og *Spilanthes oleracea*, som inngår i det registrerte preparatet Malarial. Polysakkaridene skulle isoleres og analyseres med hensyn til karbohydratinnhold og struktur. I tillegg skulle den biologiske aktiviteten undersøkes sammen med struktur- og aktivitetsforhold.

5 METODER



5.1 Generelle metoder, inklusive prinsipper

5.1.1 Vannkvalitet

Destillert ble anvendt til alle metoder.

5.1.2 Innveiging

Overskålsvekt: OHAUS[®] PORTABLE Advanced, Model No. CT1200V

Analysevekt: Mettler Toledo PB 3002

Analysevekt: Sartorius ED2245 Extend

5.1.3 Filtrering

Membranfilter: Whatman[®] filterpapir 12,5cm

PALL[®], Acrodisc[®] Syringe Filter med 5 µm Supor[®] Membrane

Millipore, Durapore[®], type 0,45µm hylp.

5.1.4 Sentrifugering

Multifuge 4 KR Heraeus

Sentrifuge, MSE

5.1.5 De-gassing av løsninger

Oppløst luft i løsninger ble fjernet med en av disse metodene:

- a) Gjennombobling med helium i 15 minutter.
- b) Ultralydbad i ca. 3 minutter.
- c) Vannstråle-vakuum i 15-20 minutter.

d) Vakuumpumpe i 15-20 minutter.

5.1.6 Blanding av løsninger

Instrument som ble anvendt til å blande løsninger:

MS2 Minishaker IKA®

RCT basic IKA labortechnik

Whirlimixer, Fison

Whirlimixer, Heidolph REAX top

5.1.7 Måling av pH

Instrument som ble anvendt til pH-måling:

S20 Seven Easy™ pH Meter, Mettler Toledo

pH-papir: pH-indicator strips, pH 0-14, Universal indicator, MERCK

5.1.8 Tørking med N₂-gass

Instrument som ble anvendt til tørking av prøver:

Pierce Reacti-Therm III TM, heating module N-18840

Prosedyre

Prøvene ble tørket under N₂-gass ved 37 °C, og et trykk på høyest 2 psi.

5.1.9 Volumreduksjon

Prinsipp

Løsninger med stort volum ble redusert, og oppkonsentrert ved å dampe inn på en rotavapor under trykk og varme.

Utstyr

IKA® RV 10 Basic V Rotavapor

Pærekolbe / rundkolbe

Prosedyre

Løsninger ble dampet inn på rotavapor ved ca. 40 °C under vakuum

5.1.10 Vask av dialyseslanger

Prinsipp

Dialyseslanger som har blitt oppbevart i papp- og papiremballasje kan inneholde spor av cellulose. Ved å rense dialyseslangene før bruk, reduseres faren for kontaminering fra karbohydrater, som kan ha en innvirkning på resultater fra andre analysemetoder.

Reagenser

2 % eller 0,5 M NaOH-løsning (Anvend hansker og briller)

0,05 % NaN₃-løsning (Konserveringsmiddel)

Destillert vann

Utstyr

Dialyseslanger: Spectra/Por® Dialysis Membrane, MWCO 3,500, d: 29 med mer

Begerglass (5 L)

Stålkjele

Kokeplate (Wilfa)

Glass-stav

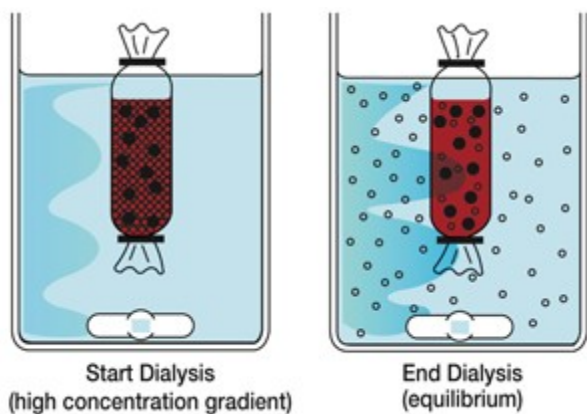
Prosedyre

1. Dialyseslangene ble klippet til en ønsket lengde (ca. 60 cm) og deretter skylt godt i springvann.
2. 2 % NaOH-løsning kokt opp i en kjele under lokk.
3. Slangene ble lagt i kokende 2 % NaOH-løsning i 10 minutter under lokk.
4. En glass-stav ble anvendt for å presse ned slangene, slik at de ikke fikk flyte over løsningen.
5. Slangene ble deretter rensset utvendig og innvendig med springvann, og deretter med destillert vann.
6. Videre ble slangene kokt i destillert vann i 10 minutter. De ble deretter rensset grundig med destillert vann.
7. Slangene ble oppbevart i 0,05 % NaN_3 -løsning ved 4 °C i kjøleskap, for å forhindre bakterievekst.

5.1.11 Dialyse

Prinsipp

Dialyse er en enkel separasjonsmetode, der molekyler med ulik størrelse blir separert gjennom en semipermeabel membran ved diffusjon (se figur 5-1). Metoden anvendes blant annet ved avsalting, opprensning av makromolekylære forbindelser og fjerning av forurensinger. Membranen er produsert av et porøst matriks med en definert porestørrelse. Lave molekylære forbindelser med en molekylvekt lavere enn membranens molekylvekts cut off-verdi vil kunne diffundere gjennom porene, og gå fra en høy konsentrasjonsløsning til en lav konsentrasjonsløsning inntil likevekt er nådd. Store molekylære forbindelser med et høyere molekylvekts cut off-verdi vil ikke kunne passere gjennom porene, og dermed vil de bli værende i dialysetuben. En effektiv separasjon kan oppnås ved å skifte ut dialysevannet stadig, slik at konsentrasjonsforskjeller kan opprettholdes i prosessen.⁴⁶



Figur 5-1 Skjematisk skisse av dialyse prosess⁴⁶

Reagenser

Toluen (konserveringsmiddel)

Destillert vann

Utstyr

Dialyseslanger: Spectra/Por[®] Dialysis Membrane, MWCO 3,500, d: 29 mm

Dialyseklyper

Trakt

Plastbøtter

Magnet og magnetrører

Glasstaver

Saltmeter SSX 210, -ebro[®]

Prosedyre

1. Dialyseslangene ble rensset med destillert vann for å fjerne rester av NaN_3 -løsning
2. Deretter ble den ene enden av tuben lukket igjen med en dialyseklype, og videre fylt med litt destillert vann for å se om den var tett.
3. Tubene ble fylt med $\frac{1}{2}$ - $\frac{2}{3}$ prøve ved hjelp av en trakt. Prøvene ble konservert med

noen dråper toluen.

4. Luften i slangene ble fjernet og enden av tuben ble brettet igjen. Deretter ble den avseilt med en dialyseklype. Det er viktig å fukte slangene med destillert vann under hele prosessen, slik at de ikke tørker ut.
5. Dialyseslangene ble overført i en ren plastbøtte med destillert vann. Bøtten ble plassert på en magnetrører og en magnet ble lagt i bøtten. Tubene ble kveilet rundt med 3 glasstaver, for å hindre og komme i kontakt med magneten. Dialysevannet ble skiftet flere ganger under dialyseprosessen
6. En saltmeter ble anvendt for å undersøke om det fortsatt foregikk diffusjon av ioner i dialysevannet. Når saltmeteren viste null var dialysen fullført.

5.1.12 Syrevask av glass-utstyr

Prinsipp

Glass-utstyr som har blitt oppbevart i papp- og papiremballasje kan inneholde spor av cellulose og glukose. Ved å rense glass-utstyret før bruk med konsentrert saltsyre, reduseres faren for kontaminering fra karbohydrater som kan ha en påvirkning på resultater fra andre karbohydratbaserte analysemetoder.

Reagenser

Konsentrert saltsyre 37 % (HCl)

Springvann

Destillert vann

Utstyr

pH-papir: pH-indicator strips, pH 0-14, Universal indicator, MERCK

Varmeskap: Heraeus Instruments, Function line

SMI-rør, supelcorør, glasspipette, diverse glass-utstyr

Verneutstyr: hansker og vernebriller

Begerglass (5 L)

Aluminiumsfolie

Prosedyre

1. Glass-utstyret ble overført til et stort begerglass, og dekket med konsentrert saltsyre.
2. Glass-utstyret ble satt til henstand i 30 minutter under avtrekk.
3. Saltsyren ble tilbakeført til originalbeholderen for fremtidig syrevask.
4. Glass-utstyret ble vasket grundig med springvann til pH-en var på omtrent 6.
5. Deretter ble utstyret vasket med destillert vann, og tørket i varmeskap ved 80 °C.
6. Utstyret ble pakket i aluminiumsfolie.

5.1.13 Absorbansmålinger

Instrument som ble anvendt til absorbansmålinger:

BIO-RAD iMarkTM Microplate Absorbance Reader

5.1.14 Frysetørking

Frysetørking er en tørkeprosess hvor vann blir fjernet fra varmesensitive materialer ved sublimasjon. Prosessen forgår under høyt vakuum, og faren for kontakt med luft og oksidering av materialet er minimalisert. Frysetørkede produkter er fordelaktig fordi de bevarer sin opprinnelige form og struktur fra den frosne løsningen.⁴⁷

Utstyr

Frysetørker: CHRIST® ALPHA 1-4, CHRIST® ALPHA 1-4 LD plus

Metanolbad: HETOFRIG (Heto Birkerød, Danmark)

Parafilm

Overganger

Rundkolber

Fryseskap

Drammeglass

Prosedyre

1. Dialysert prøve med toluen ble overført til en rundkolbe. Løsningen ble oppkonsentrert og toluen ble fjernet fra prøven ved å dampe inn på rotavapor. (metode 5.1.9).
2. Løsningen ble deretter fryst på metanolbad ved -40°C eller fryst i fryseskap (lite prøvevolum i drammeglass).
3. Prøven ble satt på frysetørkeren utvendig (via en overgang med rent glassull), eller innvendig (i drammeglass dekket med perforert parafilm) under vakuum.
4. Prøven ble fjernet fra frysetørkeren når all isen hadde blitt sublimert. Tørketiden var omtrent 24-48 timer.

5.2 Isolering av polysakkarider

5.2.1 Ekstraksjon av polysakkarider med instrument ASE™ 350 Accelerated Solvent Extractor system

Prinsipp

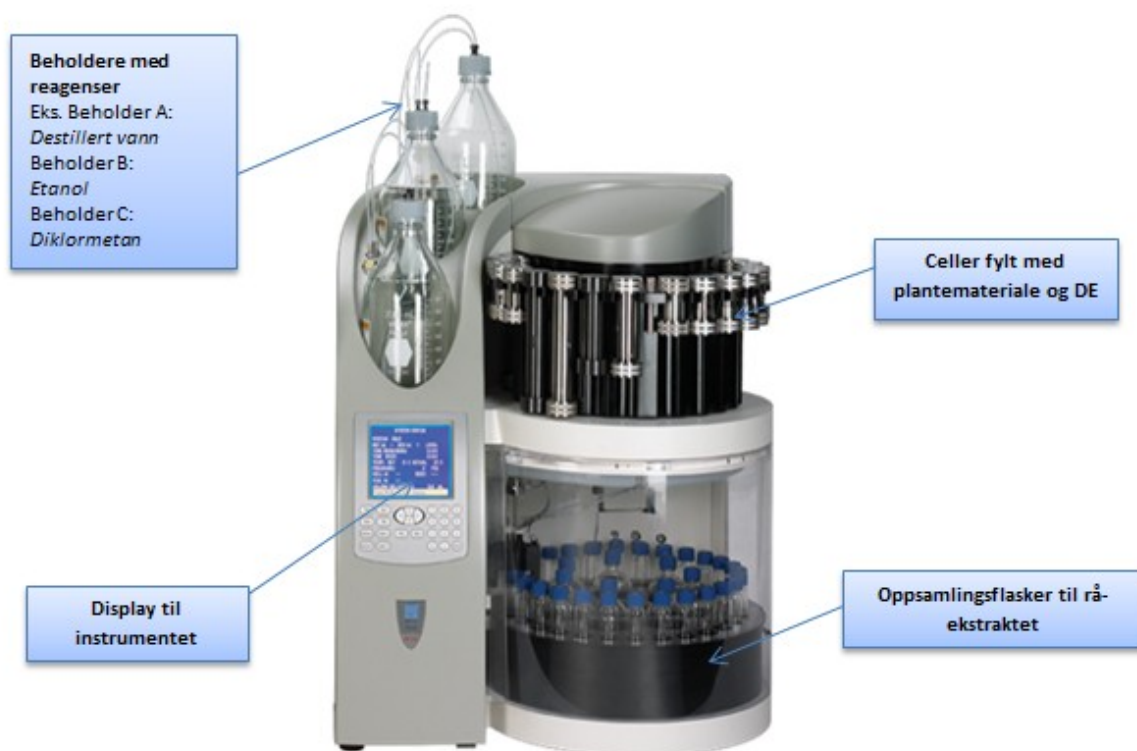
Isoleringen av polysakkaridene ble utført ved ekstraksjon. Ekstraksjon av faste stoffer er en separasjonsmetode som skjer i form av utluting. Plantematerialets kompleksitet ble separert ved ekstraksjon gjort med forskjellige løsemidler etter økende grad av polaritet (se figur 5-4). Plantenes innhold av lavmolekylære og upolare forbindelser ble ekstrahert med hjelp av organiske løsemidler, som for eksempel diklormetan, etylacetat og etanol. Saponiner og tanniner lar seg ekstrahere ut av plantematerialet med løsemidlet etanol. De upolare forbindelsene anses som forurensninger i karbohydratanalysene, og det er derfor vesentlig å ekstrahere de ut med organiske løsemidler etter økende grad av polaritet, slik at de høymolekylære og polare stoffer ikke blir "forurenset" og fjernet for tidlig i prosessen.

De høye molekylære og polare forbindelsene ble ekstrahert med destillert vann.

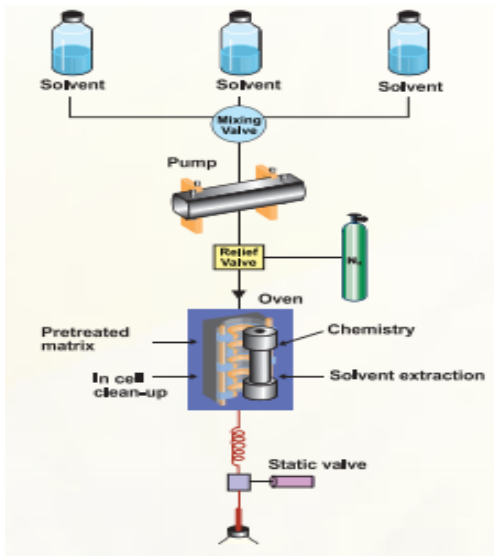
Polysakkarider er høymolekylære forbindelser med en varierende løselighetsgrad. Ved å ekstrahere disse forbindelsene med destillert vann med en temperatur på 50°C og 100°C , vil man innhente to fraksjoner av ulike typer polysakkarider.

The Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 Accelerated Solvent Extractor (se figur 5-2)

er et instrument med patentert system for ekstraksjon av faste og halvfaste stoffer. Systemet anvender en kombinasjon av forhøyet temperatur og trykk med løsemidler for å øke effektiviteten av ekstraksjonsprosessen (se figur 5-3). Resultatet utgjør en mer effektivt og raskere ekstraksjonsprosess og betydelig reduksjon i bruk av løsemiddel.⁴⁸



Figur 5-2 The Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 Accelerated Solvent Extractor⁴⁸



Figur 5-3 Skjematisk skisse av ekstraksjonsprosessen⁴⁸

Reagenser og ekstraksjonsmetode

Plantemateriale ble ekstrahert i følgende rekkefølge av løsemidler med forhåndsbestemte temperaturer:

1. Diklormetan ved romtemperatur
2. Etylacetat ved 65°C
3. 96 % Etanol ved 70°C
4. 96 % Etanol / destillert vann ved 70°C, like deler
5. Destillert vann ved 50°C
6. Destillert vann ved 100°C

Utstyr

Instrumentet som ble benyttet til ekstraksjon av plantematerialer:

The Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 Accelerated Solvent Extractor

Diverse tilhørende deler til apparaturen som kreves for å kunne gjennomføre ekstraksjon:

Oppsamlingsflasker

Trakt

Stempel

Pakkemateriale (DE)

Celler (der plantemateriale fylles i)

Filter

Morter

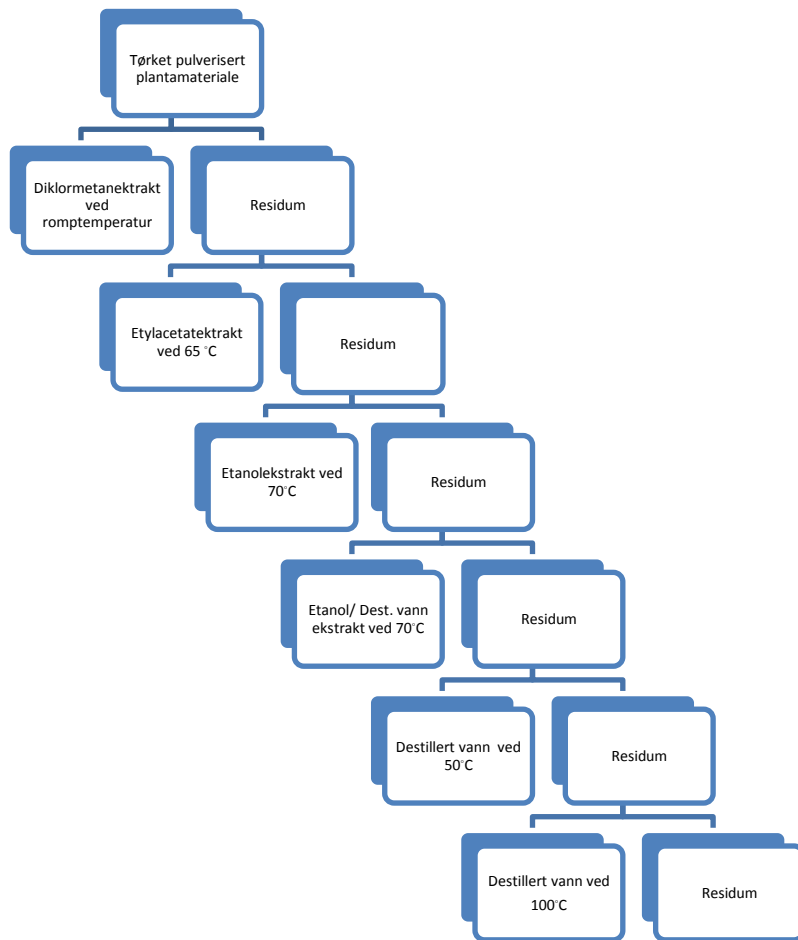
Pistill

Prosedyre

1. 100 g plantemateriale og 25 g pakkemateriale DE ble innveid, og overført til en morter. Plante- og pakkematerialet ble jevnt fordelt i morteren med en pistill. Porøst plantemateriale ble pulverisert på forhånd, før pakkemateriale ble tilsatt.
2. Et filter ble lagt bunnen av cellen, og litt DE ble tilsatt. Deretter ble den fylt med plante- og pakkemateriale.
3. Litt DE ble tilsatt på toppen av cellen. Cellen ble lukket igjen, og overført til instrumentet.
4. Metode og sekvens ble valgt etter ønske. Metodene ble endret ved valg av løsemiddel og temperatur.
5. Sekvens ble stilt inn, 2 oppsamlingsflasker per celle (ca. 1 time per celle).
6. Cellen ble fylt med løsemiddel.
7. Cellen ble oppvarmet og satt i trykk.
8. Prøven ble avholdt på 1500 psi i forhåndsbestemt temperatur.
9. Løsemiddelet ble pumpet gjennom prøven, før rå-ekstraktet ble pumpet ut av cellen og til oppsamlingsflaskene.
10. Systemet ble spylt med nitrogen
11. Når ekstraksjonen var fullført ble rå-ekstraktet dampet inn på rotavapor (metode 5.1.9).

De organiske rå-ekstraktene (diklormetan, etylacetat, etanol) ble oppbevart i kjøleskap (4°C).

De vandige rå-ekstraktene ble undersøkt videre ved andre analysemetoder.



Figur 5-4 Oversikt over ekstraksjonene

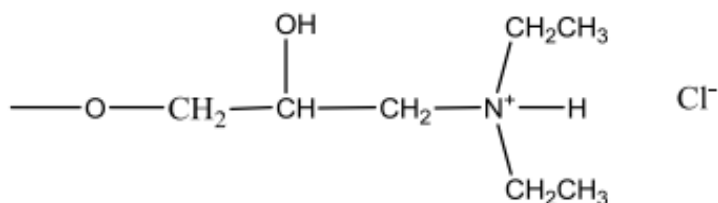
5.2.2 Ionebytterkromatografi

Ionebytterkromatografi er en kromatografisk metode for separasjon av anioner og kationer. Denne metoden benytter en ionebytter som stasjonærfase. En ionebytter består av et uløselig polymert materiale som er kovalent bundet med ioniske grupper. Denne gruppen er festet elektrostatiske til et motion med motsatt ladning. Motionet kan skiftes ut med andre ioner fra mobilfase og fra prøven. En ionebytter med kationer som motioner kalles kationbytter, og anvendes til å separere kationer. En anionbytter har derimot et kovalent bundet kation og et utskiftbart anion. Den benyttes til å separere anioner. Separasjon av ioner og ioniserbare forbindelser skjer i ulik grad grunnet affiniteten til stasjonærfasens ioniske funksjon.⁴⁹

ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)

ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub) er en svak anionbytter. Matriksen består av en sterkt kryssbundet agarose som gir høy fysisk og kjemisk stabilitet med god separasjonsbredde. Den

funksjonelle gruppen, dietylaminopropyl er et positivt ladet tertiært amin bundet til et klorid-ion med motsatt ladning (se figur 5-5). De negative kloridionene kan reversibelt skiftes ut med andre negative ioner uten at matriksen mister sin funksjonalitet.⁵⁰



Figur 5-5 Dietylaminopropyl med klorid som motion

Ved applisering av prøvemateriale vil polysakkarider med sure egenskaper (negativt ladet funksjonelle grupper) ta kloridionenes plass gjennom eluering med destillert vann, og dermed retarderes på kolonnen. Ved eluering med en gradientløsning av NaCl vil de sure polysakkaridene etter økende surhetsgrad elueres ut av kolonnen, ettersom saltkonsentrasjonen øker. De nøytrale polysakkaridene vil derimot ikke bli retardert på kolonnen, men elueres ut direkte med destillert vann.

Chelex[®] 100 Chelating Ion Exchange Resin

Chelex[®] 100 er et chelaterende middel. Materialet består av en styren-divinylbenzen kopolymer med iminodidiacetat ioner. Denne forbindelsen er som en chelaterende gruppe som virker ved at den binder seg til metall-ioner som for eksempel, Ca⁺², Mg⁺² og Fe⁺². Chelex[®] 100 ble benyttet for å fjerne divalente kationer, samt for å øke løseligheten på rå-ekstraktet før påsettingen av prøvene til ionebytterkromatografi.

Reagenser

Alle løsningene ble degasset før appliseringen i kolonnen (metode 5.1.5)

Chelex[®] 100 sodim form, 50-100 mesh

Destillert vann

2 M NaCl

1 M Natriumacetat ved pH 3

1 M NaOH

0,05 % Na-acetat

Saltmeter SSX 210, -ebro-[®]

Utstyr

Kolonne: GE Healthcare Bio-Sciences AB, XK 50, høyde 24 cm, radius 2,5 cm

Kolonnematriks: ANX Sepharose 4 Fast Flow, Ferdig pakket

Pumpe: SPETEC Perimax

Fraksjonssamler, rack B: Pharmacia LKB SuperFrac

Oppsamlingsrør: Sentrifugerør RB 15 ml, Heger AS

S20 Seven Easy™ pH Meter, Mettler Toledo

Sentrifuge, MSE

BD Plastipak™ Sprøyte 10ml luer

PALL[®], Acrodisc[®] Syringe Filter med 5 µm Supor[®] Membrane

Begerglass

Glass-stav

Erlenmeyerkolbe

Aluminiumsfolie

Magnetrører: RCT basic IKA labortechnik

Magnet

Slanger til pumpen og kolonnen

Betingelser ved gradienteluering

Flowhastighet: Fra saltløsning (2M NaCl) til blandekar: 1 ml/min.

Fra blandekar til kolonne: 2 ml/min.

Beregning av saltgradienten

Mengde av destillert vann i blandekaret ved tiden 0, ble beregnet med følgende formel:

$$v_0 = \frac{(t \times C_0 \times R)}{C}$$

t = tiden til eluering av saltgradient

C = konsentrasjon til NaCl ved tiden t

R = flowhastighet fra saltløsning til blandekammeret

V_0 = volum av destillert vann ved tiden 0

C_0 = Startkonsentrasjon til NaCl

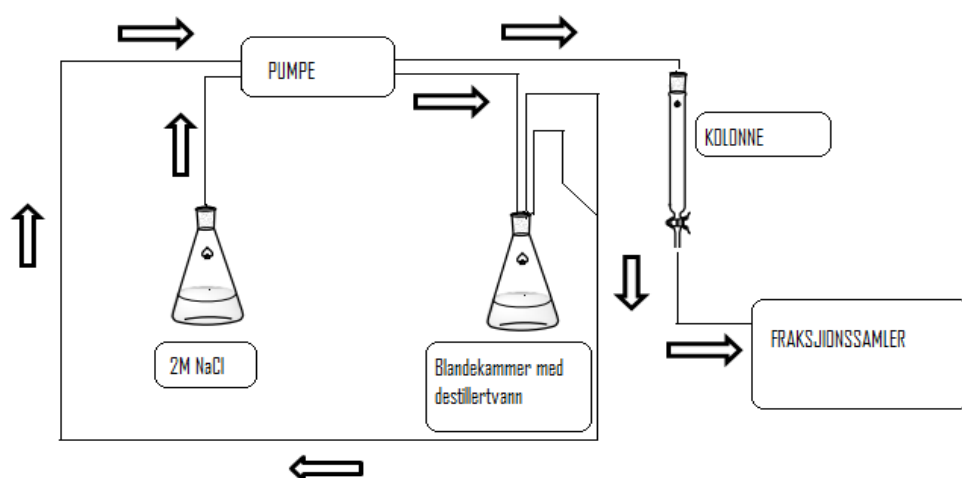
Prosedyre

Påsetting av prøve og eluering

1. Matriksen ble pakket i kolonnen, og videre vasket med 2 kolonnevolum degasset destillert vann for å fjerne rester av konserveringsmiddel. Flowhastighet: 2 ml/min.
2. 100 mg prøve ble innveid, og løst i 75 ml destillert vann. Løsningen ble dekket med et lite stykke aluminiumsfolie, og ble varmet opp. Prøveløsningen ble deretter avkjølt og sentrifugert. Supernatanten ble filteret gjennom et 0,5 μ m filter ved hjelp av en sprøyte for applisering i kolonnen. Bunnfallet ble frysetørket for videre analyse. Chelex[®] 100 ble anvendt dersom prøven var lite løselig (se trinn 3-5).
3. 3 barneskjeer med Chelex[®] 100 ble overført til et begerglass fylt med litt destillert vann. Den ble videre overført til en sintertrakt med filterpapir under vannsug.
4. Chelex-kulene ble vasket med destillert vann x 2 under vannsug. Eluatet ble kastet.
5. Prøveløsningen ble overført til Chelex-kulene, og den ble filtrert under vannsug. Eluatet ble så applisert på kolonnen.
6. Prøveløsning ble satt på kolonnen med en flowhastighet på 1 ml/min.
7. De nøytrale polysakkaridene ble eluert ut med 2 kolonnevolum degasset destillert vann. Eluatet ble så dampet inn på rotavapor, dialysert og frysetørket. Flowhastighet: 2

ml/min.

- De sure polysakkaridene ble eluert ut med NaCl-gradient (0-1,5 M NaCl) i 15 timer. Fraksjonene ble samlet opp i 180 reagensrør, hvor hvert rør inneholdt 10 ml eluat.
- Fraksjonenes karbohydratinnhold og deres profil ble bestemt av fenol- svovelsyretesten (metode 5.3.1). Deretter ble fraksjoner med ulik karbohydratsprofil slått sammen, og videre dampet inn, dialysert, og frysetørket.
- Kolonnen ble tilslutt eluert med 2M NaCl i 2 timer. Eluatet ble dampet inn, dialysert og frysetørket.



Figur 5-6 Oppsett for generering av NaCl-gradient

Vasking og regenerering av kolonnen

Hele prosedyre ble utført med en flowhastighet på 2ml/ min

- Hvis kolonnen hadde en sterk farge på toppen, ble denne delen fjernet med en pasteur-pipette
- Kolonnen ble snudd 180°.
- Kolonnen ble eluert med 1,5 kolonnevolum 1M NaOH.
- Kolonnen ble eluert med 2 kolonnevolum 2M NaCl. Dette trinnet regenererer kolonnen med klorid-ioner.
- Kolonnen ble eluert med 5 kolonnevolum destillert vann. Dette trinnet fjerner overflødige klorid-ioner.

6. Saltmeteren ble benyttet til å undersøke om eluatet var fri for ioner.
7. Kolonnen ble konservert med 1 kolonnevolum 0,05 % NaN_3 .
8. Kolonnen ble oppbevart i kjølerom (4°C) til fremtidig bruk.

Dersom kolonnen var veldig forurenset ble følgende prosedyre anvendt:

1. Hvis kolonnen hadde en sterk farge på toppen, ble denne delen fjernet med en pasteur-pipette.
2. Kolonnen ble snudd 180° .
3. Kolonnen ble eluert med 1 kolonnevolum 1 M natriumacetat ved pH 3.
4. Kolonnen ble eluert med 1,5 kolonnevolum 1 M NaOH.
5. Kolonnen ble eluert med 1,5 kolonnevolum 1 M natriumacetat ved pH 3.
6. Kolonnen ble eluert med 2 kolonnevolum 2 M NaCl.
7. Kolonnen ble eluert med 5 kolonnevolum destillert vann.
8. Saltmeteren ble benyttet til å undersøke om eluatet var fri for ioner.

Kolonnen ble konservert med 1 kolonnevolum 0,05 % NaN_3 .

Kolonnen ble oppbevart i kjølerom (4°C) til fremtidig bruk.

Vasking og regenerering av Chelex® 100

1. Brukt resin ble pakket i en ren kolonne.
2. 2 kolonnevolum 1M HCl ble eluert.
3. 5 kolonnevolum destillert vann ble eluert.
4. 2 kolonnevolum 1M NaOH ble eluert.
5. 5 kolonnevolum destillert vann ble eluert.

Chelex-kulene ble overført til en ren brun-glassbeholder, og oppbevart i kjøleskap (4°C) til fremtidig bruk.

5.2.3 Gelfiltrering koblet til FPLC-apparatur

Gelfiltrering er en kromatografisk metode for separasjon av makromolekyler etter deres molekylstørrelse. Stasjonærfasen består av en partikulært porøs matriks med en definert porestørrelse. Molekyler med en størrelse større enn porene, vil kun bevege seg i mellomrommet mellom partiklene, og elueres først ut i void volum (V_0). Molekyler med en mindre molekylstørrelse vil kunne diffundere inn og ut av porene i matriksen, og dermed retarderes de på kolonnen i ulik grad avhengig av deres molekylstørrelse, ladning og

diffusjonsevne. Resultatet er at retensjonen avtar for de store molekylene og at de ekskluderes fra stasjonærfasen.⁵³

FPLC (fast protein liquid chromatography) er en kromatografisk metode som bygger på gelfiltreringsprinsippet. Metoden ble opprinnelig utviklet for opprensing og separering av proteiner. Det har vist seg at metoden også kan benyttes for å separere og rense andre makromolekyler, for eksempel polysakkarider. Den blir også anvendt til å estimere molekylvektens distribusjon.⁵²

Hiload™ 16/60 Superdex™ 200 prep grade

Superdex 200 prep grade er en ferdig pakket gelfiltreringskolonne. Matriksen er sammensatt av dekstran, kovalent bundet til kryssbundet agarose-partikler. Komposisjonen i mediet utgjør en høy kjemisk og fysisk stabilitet, og filtreringsegenskapen blir hovedsakelig bestemt av dekstrankjedene. Separasjonsområdet i matriksen har et godt omfang, og er egnet til karbohydratanalyser. Mediet har et relativt separasjonsområde (når molekylmassen er mellom 10 000 og 600 000), men den separerer med høyest selektivitet mellom 30 000 og 250 000.⁵⁴

Reagenser

Alle løsningene ble degasset før de ble anvendt (metode 5.1.5)

10 mM NaCl

0,5 M NaOH

Destillert vann

20 % etanol (konserveringsmiddel)

Utstyr

Kolonne: XK 16/60

Diameter: 1,6 cm

Matriks: Superdex™ 200 prep grade

Kolonnevolum: 120 ml

Äkta-FPLC

Dataprogram:	UNICORN Version 4,0
Detektor:	UV, RID-10A, Shimadzu®
Skriver:	HP Deskjet 980cxi
Pumpe:	P-920, Amersham Pharmacia Biotech Inc.
Monitor:	UPC-900, Amersham Pharmacia Biotech Inc.
Injektor:	Valve Inv-907
Fraksjonssamler:	Frac-900
Oppsamlingsrør:	Trombotestrør PS, 7 ml, Heger AS
Filter:	PALL, Life Sciences, Acrodisc® Syringe Filter, 0,45 µm Supor® Membrane

BD Plastipak™ Sprøyte 10ml luer

Målekolbe, 1 L

Betingelser

Elueringshastighet:	0,5 ml/min
Fraksjonsstørrelse:	2 ml per oppsamlingsrør
Prøvemengde:	20 mg prøve løst i 2 ml 10mM NaCl
Elueringsmiddel:	10 mM NaCl
Injisert volum:	2 ml

Prosedyre

Applisering og eluering

1. 20 mg prøve ble løst i 2 ml 10 mM NaCl, og gitt en konsentrasjon på 10 mg/ml.
2. Løsningen ble filtrert gjennom et filter på 0,45 µm.

3. Filtratet ble trukket opp ved hjelp av en sprøyte, og luftbobler ble fjernet. Filtratet ble deretter applisert på kolonnen ved hjelp av superloop-prinsippet.
4. Kolonnen ble eluert med 1,5 kolonnevolum 10mM NaCl, og 90 oppsamlingsrør ble anvendt til å samle fraksjonene (2ml per rør).
5. Elueringsprofilen ble bestemt ved hjelp av fenolsvovelsyretesten (metode 5.3.1).
6. Fraksjonene ble deretter slått sammen, dialysert, dampet inn på rotavapor og frysetørket.

Vasking av kolonnen

Hele prosedyre ble utført ved en flowhastighet på 0,5 ml/ min.

1. Kolonnen ble snudd 180°.
2. Kolonnen ble eluert med 2 kolonnevolum 0,5 M NaOH.
3. Kolonnen ble eluert med 2 kolonnevolum 10mM NaCl.
4. Kolonnen ble snudd 180°.
5. Kolonnen ble eluert med 2 kolonnevolum 10mM NaCl.
6. Kolonnen ble konserverert med 2 kolonnevolum 20 % etanol
7. Kolonnen ble oppbevart i kjølerom (4°C) til fremtidig bruk.

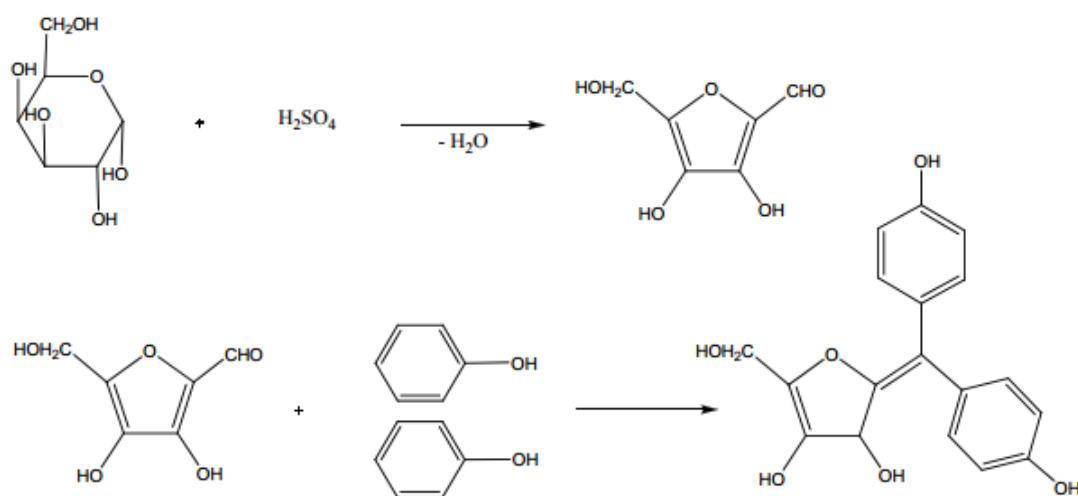
5.3 Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinhold

5.3.1 Fenolsvovelsyretesten

Prinsipp

Fenolsvovelsyretesten er en kolorimetrisk metode for å fastslå karbohydratinholdet i en løsning. Metoden er enkel, sensitiv og reproducerbar. En løsning med innhold av monosakkarider, oligosakkarider, polysakkarider og deres derivater, kan bestemmes ved å tilsette fenol og konsentrert svovelsyre. Sukkermolekylene vil bli hydrolysert i syre, og omdannes til anhydrosukkere, før de blir kondensert med fenolmolekyler. Resultatet av

reaksjonene er dannelse av et gul-farget, stabilt kompleks (se figur 5-7). Dette komplekset kan detekteres spektrofotometrisk ved 490 nm.⁵⁵



Figur 5-7 Reaksjon mellom monosakkarid og svovelsyre til et anhydrosukker, som deretter kondenserer med to fenol molekyler til et gul-farget kompleks⁶²

Reagenser

4 % fenol i vann

Konsentrert svovelsyre

Utstyr

Hansker

Vernebriller

Reagensrør i glass

Finnpipette[®] 40-200 µl

Gilson Microman[®] pipette 100 µl

Gilson Microman[®] pistons og spisser

Whirlimixer, Fisons

96 brønners mikrotiterplate med flat bunn

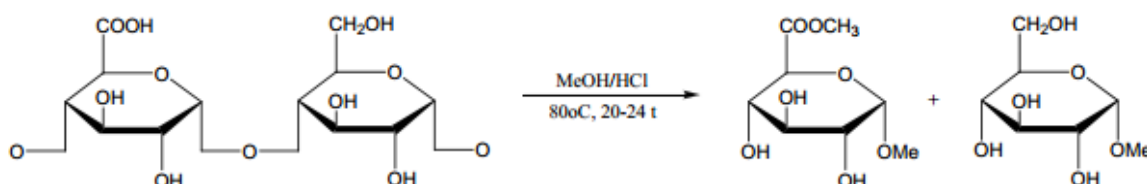
3. Blindprøven, 2 ml ble tilsatt samme mengde reagens
4. Fargen på løsningen ble sammenlignet visuelt

5.3.3 Monosakkaridbestemmelse

Metanolyse

Prinsipp

Sammensetningen av polysakkarider blir bestemt ved metanolyse. En analysemetode for å studere monosakkarider i sammensetningen. Glykosidbindingene mellom monomere i polysakkaridet blir spaltet til metylglykosider (C 1) og metylforestrede uronsyrer (C 6). Metylforestrede uronsyrer omdannes fra sure monosakkarideneheter (se figur 5-8). For å unngå hydrolyse av metylglykosidene i reaksjonen blir prosessen utført i et surt, vannfritt metanolholdig miljø. Internstandard blir også benyttet for å korrigere eventuelle tap under utførelsen. Etter metanolysen blir monomerene derivatisert til flyktige forbindelser med TMS-reagens før de blir analysert i gasskromatografi.⁵⁶



Figur 5-8 Metanolyse av en glykosidbinding mellom et surt og et nøytralt monosakkarid i en polysakkaridkjede⁶²

Reagenser

3N HCl i vannfritt metanol

1 µg/µl mannitol i vannfritt metanol (intern standard)

Vannfri metanol

Utstyr

Hansker

Vernebriller

Supelcorør (syrevaskede) med teflonbelagt skrukork

Parafilm

P₂O₅-evakuert vakuumsiktor

SMI-pipette 100 µl

SMI Capillaries, blå (syrevaskede)

Pasteurpipette 5 ml med peleusballong

Varmeskap: Heraeus Instruments, Function line

Apparatur til tørking under N₂-gass: Pierce, Reacti-Therm III TM, Heating Module

Prosedyre

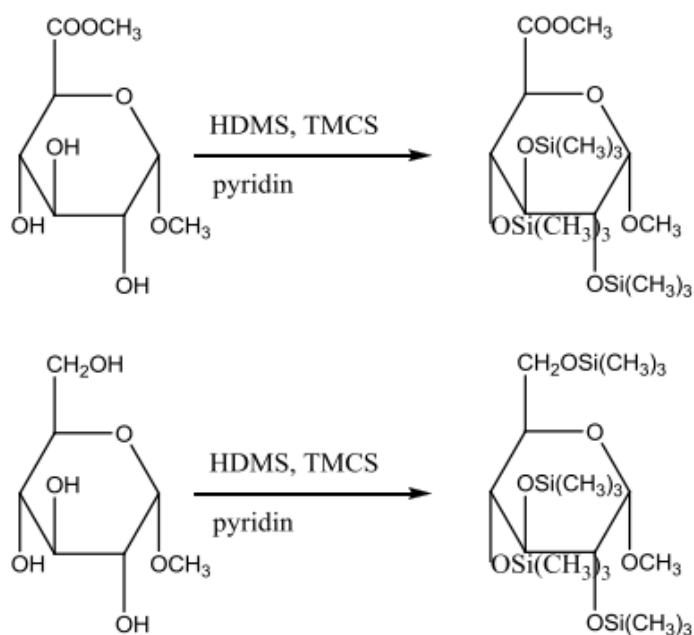
1. 1 mg frysetørket plantemateriale ble innveid i et syrevaskede supelcorør.
2. Supelcorøret ble dekket med perforert parafilm. Prøvematerialet ble tørket under vakuum i P₂O₅ vakuumsiktor i ca. 24 timer.
3. 1 ml 3 N HCl i vannfritt metanol og 100 µl mannitollosning (IS) ble tilsatt i prøven. Prøvene ble overført til et varmeskap på 80 °C i 20-24 timer. Etter 15 minutter ble korkene skrudd godt igjen for å hindre fordampning.
4. Prøvene ble dampet tørr med N₂-gass ved 37 °C.
5. 200 µl vannfri metanol ble tilsatt og prøven ble igjen tørket med N₂-gass.
6. Trinn 4 ble gjentatt 2 ganger.
7. Prøvene ble dekket med perforert parafilm og overført til en evakuert P₂O₅ vakuumsiktor i minst 1 time for å opprettholde tørrheten før TMS-derivatisering.

TMS-derivatisering

Prinsipp

Stoffer med polare funksjonelle grupper som fenolgrupper, aminogrupeer, karboksylsyregrupper, og hydroksylgrupper vil nedsette stoffets flyktighet. Videre forårsaker de adsorpsjon til overflater, og stoffene elueres som brede toppar med haledannelser.

Problemet kan elimineres ved derivatisering, gjennom at stoffet blir gjort mer flyktige og samtidig termisk stabile. Metylglykosider er lite flyktige med hydroksylgrupper. Ved å derivatisere de frie OH-gruppene i metyglykosidene med trimetyklorsilan og heksametyldisilazan, blir de omdannet til flyktige og termisk stabile pertrimetylsilyleter (TMSderivater), som er velegnet til GC-analyse (se figur 5-9).⁵⁷



Figur 5-9 Reaksjonen mellom TMS-reagens og et metylforestret metyglykosid (øverst) og et metyglykosid (nederst)⁶²

Reagenser

TMS-reagens: Trimetyklorsilan (TMCS) 1 ml

Heksametyldisilazan (HMDS) 2 ml

Pyridin (vannfritt) 5 ml

Utstyr

SMI-pipette 100µl

Whirlimixer, Fisons

Prosedyre

1. De metanoliserte prøvene fra metanolyse ble tilsatt 100 µl TMS-reagens og blandet godt.
2. Prøvene ble satt til henstand i minst 30 minutter i romtemperatur før den gasskromatografiske analysen ble utført.

Gasskromatografi (GC)

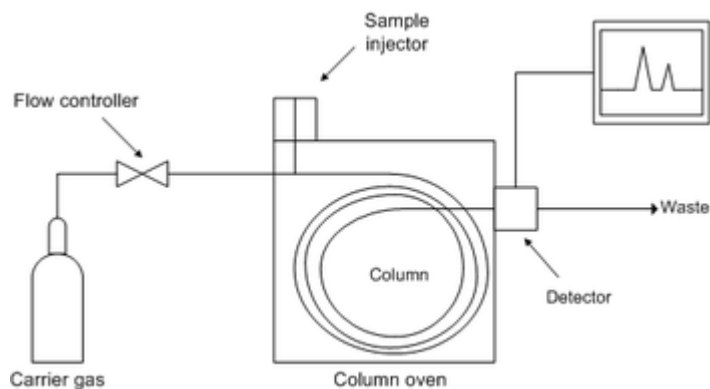
Gasskromatografi (GC) er en separasjonsmetode for stoffer i gassform. Mobilfasen er en inert bæregass under trykk, som transporterer flyktige stoffer gjennom en oppvarmet kolonne.

Gasskromatografi er kun velegnet til separasjon av flyktige og termisk stabile stoffer.

Flyktigheten til stoffene er temperaturavhengige, dess høyere temperatur, desto mer flyktige blir stoffene. Temperaturen kan heller ikke bli for høy, for da vil stoffer bli dekomponert.⁵⁸

Prøven som skal analyseres blir injisert ved hjelp av en gasstettsprøyte, og det vanlige injeksjonsvolumet er på 0,5-2 µl. Prøven injiseres i en fordampingsinjektor, og bæregassen frakter stoffene i form av gass gjennom kolonnen, hvor stoffene separeres. Stoffene vil vandre gjennom kolonnen med forskjellig hastighet avhengig av stoffets flyktighet, interaksjon med stasjonærfase, og temperatur under analysen. Stoffene blir til slutt detektert av en flammeionisasjonsdetektor (FID), en ionisasjonsdetektor som måler elektrisk strøm fra ladede partikler (ioner). Gasskromatografi kan benyttes til identifisering av sammensetningen av polysakkarider fordi hvert enkelt monosakkarid har et særegent mønster ved gitte betingelser. Det forutsettes en likevekt mellom de ulike formene til sukkerderivatene. Monosakkarider kan foreligge i forskjellige former, som pyranose, furanose, åpen kjede form, og de kan igjen opptre i α - og β - konfigurasjon.

Monosakkaridene fra analysen ble kvalifisert og kvantifisert ved hjelp av retensjonstider, arealforhold, intern standard og standardkurver.



Figur 5-10 Skisse av oppsett til GC

Reagenser

Heksan

Metanol

Utstyr

Gasskromatograf: THERMO SCIENTIFIC FOCUS GC

Injektor: Splitt: splittless

Autosampler: Fison AS-800

Detektor: Flammeionisasjonsdetektor (FID) med H₂ og luft til flammen

Bæregass: Helium

Kolonne: Restek-Rxi 5MS. "Fused silica" kapillærkolonne

Lengde: 30 m. Indre Ø: 0,32 mm, Filmtykkelse: 0,25mm

Injektor temperatur: 250 °C

Detektor temperatur: 300 °C

Splitt forhold: 1:10

Injiseringvolum: 1 µl

Flow mode: Konstant trykk (0,70 bar)

1 °C/min 6 °C/min 30 °C/min

Temperaturprogram: 140 °C $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ 170 °C $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ 250 °C $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ 300 °C

Etter hver injisering ble nålen vasket med metanol og heksan.

Prosedyre

1. Gass-strømmene til GC ble åpnet og integrator ble programmert.
2. Sprøyten ble vasket med heksan og metanol.
3. 1,0 µl av den TMS-derivatiserte prøven ble injisert.
4. Sprøyten ble vasket med heksan og metanol etter hver prøveinjeksjon, og etter siste injeksjon.
5. Kromatogrammet ble tilpasset ved å justere innstillingene på integratoren.

Hele kjøringen tok ca. 50 minutter per prøve. Gassen til FID ble skrudd av etter siste kjøring.

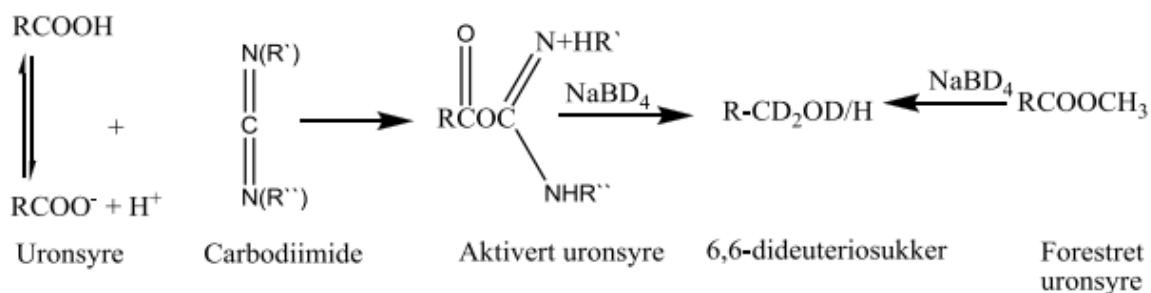
5.4 Strukturoppklaring

5.4.1 Metylering

Karboksylyrereduksjon

Prinsipp

Før metylering av uronsyreholdige polysakkarider, må karboksylsyregruppen reduseres med NaBD₄. Forestrede uronsyrer reduseres direkte til primære alkoholer. Frie uronsyrer derimot må aktiveres først med carbodiimide før de kan reduseres. Produktet som dannes er i begge reaksjonene et 6,6-dideuteriosukker, og utgjør en total mengde av uronsyrer, både frie og esterbundne i sukkeret ved GC-MS analyse (se figur 5-11). Uronsyrene kan skilles fra de nøytrale sukkene i GC-MS ved påvisning av fragmenter med molekylvekt M +2.⁵⁹



Figur 5-11 Aktivering av fri urnsyre med etterfølgende reduksjon, og reduksjon av forestret urnsyre⁶²

Reagenser

0,2 M MES (2-[N-morpholino]etan svovelsyre)

Carbodiimide (1-cyclohexyl-3-(2-morpholino) carbodiimide-metho-p-toluene sulphonate)

2 M TRIZMA (tris [hydroksymetyl] aminometan)

Natriumbordeuterid (NaBD₄)

0,05 M NaOH

1-oktanol

Iseddik

Destillert vann

Utstyr

Syrevaskede metyleringsrør med skrukork

PD-10 Desalting Columns

Begerglass

SMI-pipetter (100 µl)

Glasspipetter og ballong

Is

Minishaker MS2, IKA®

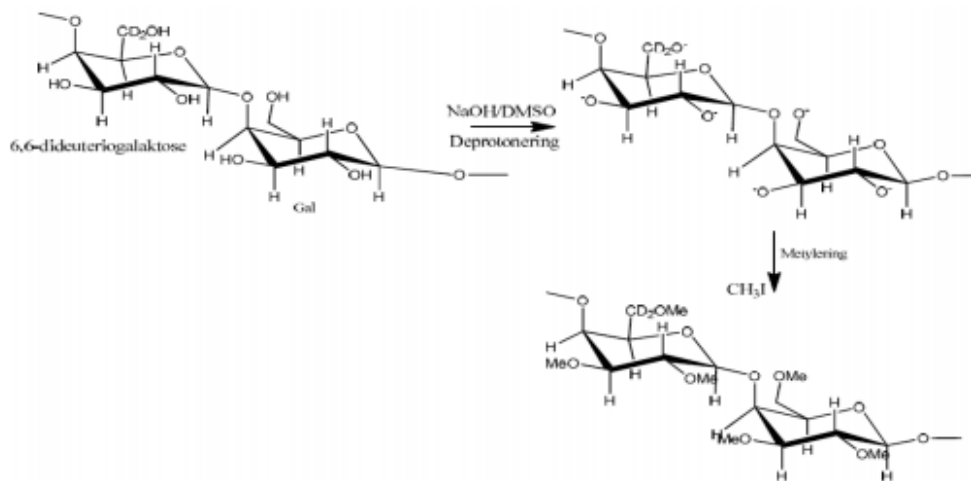
Prosedyre

1. 1 mg prøve ble innveid i mellomlange metyleringsrør.
2. Prøven ble løst i 1 ml destillert vann. Deretter ble det tilsatt 200 µl 0,2 M MES og 400 µl nylaget 500 mg/ml carbodiimide i destillert vann.
3. Løsningen ble ristet godt og satt til inkubering ved 25-30 °C i 3 timer. Løsninger som var vanskelige å løse, ble sonikert med ultralyd eller satt i vannbad til de ble løst.
4. 1 ml 2 M TRIZMA ble tilsatt og prøven ble avkjølt på is.
5. 1 ml nylaget 70 mg/ml NaBD4 i 0,05 M NaOH ble tilsatt. Prøven ble inkubert over natten ved 4 °C.
6. Overskudd reduktant ble destruert ved langsom tilsetning av iseddik (5 x 100 µl).
7. Prøveløsningen ble dialysert i en PD 10 kolonne.
8. Etter endt dialyse ble prøven tørket ved bruk av Speed Vacuum Dryer.

Metylering

Prinsipp

Etter karboksylsyre-reduksjonen blir de frie hydroksylgruppene i polysakkaridene metylert med metyljodid. Under basisk miljø dannes det et karbanion av DMSO og OH⁻, som videre ioniserer de frie hydroksylgruppene. Deretter blir de substituert med metylgrupper fra CH₃I ved hjelp av en nukleofil substitusjonsreaksjon (se figur 5-12). Hydroksylgrupper som fortsatt er bundet i glykosidbindinger vil ikke bli metylert, men heller bli acetylet etter hydrolyse av polysakkaridet.⁶⁰



Figur 5-12 Metylering av frie hydroksylgrupper i polysakkaridet⁶³

Reagenser

Dimetylsulfoksid (DMSO)

Pellets av NaOH

Metyljodid (CH₃I)

Natriumthiosulfat-5-hydrat (Na-thiosulfat)

Diklormetan

Destillert vann

Utstyr

Ristemaskin: IKA-Vibrax-VXR

Agatmorter og pistill

SMI-pipette (100 µl) med kapillærer

N₂-gassoppsett med varmeenhet: Reacti Therm III, Pierce

Minishaker MS2, IKA

Sentrifuge Multifuge 4 KR Heraeus

Målesylinder

Pasteurpipette

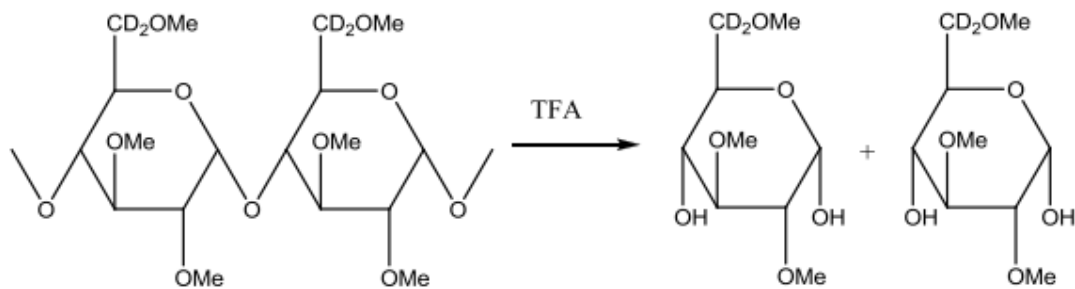
Prosedyre

1. Prøven fra karboksylsyre-reduksjonen ble tilsatt 500 μ l DMSO og ble satt på risting i ca. 30 minutter.
2. Tørre NaOH pellets ble knust i DMSO, 2 pellets per ml, slik at konsentrasjonen ble ca. 120 mg/ml. Suspensjonen ble laget ved hjelp av agatmorter og pistill. Verneutstyr ble anvendt.
3. 500 μ l av suspensjonen ble tilsatt prøvene ved hjelp av SMI-pipette. Pass på at den kommer i kontakt med prøven.
4. Prøvene ble blåst med nitrogengass og satt på ristemaskin i 50 minutter.
5. 100 μ l CH_3I ble tilsatt under avtrekk og videre ristet på maskin i 10 minutter.
6. Punkt 5 ble gjentatt.
7. 200 μ l CH_3I ble tilsatt i avtrekk og ristet på maskin i 20 minutter.
8. 10 ml nylaget 100 mg/ml Na-thiosulfat i destillert vann og 2 ml diklormetan ble tilsatt, og løsningen ble blandet på en minishaker.
9. Prøvene ble sentrifugert ved 1000 rpm i 3 minutter for å separere fasene.
10. Vannfasen ble fjernet og kastet.
11. Diklormetan fasen ble vasket med 4 x 5 ml destillert vann, ristet og sentrifugert. Vannfasen og mellomsjiktet ble fjernet med en pasteurpipette.
12. Den upolare fasen ble overført til et nytt metyleringsrør for å unngå å få med den polare fasen.
13. Diklormetan fasen ble tørket under N_2 -gass.

Hydrolyse

Prinsipp

Glykosidbindingene i de metylerte polysakkaridene spaltes til monosakkarider ved hydrolyse under sure betingelser.⁵⁹



Figur 5-13 Hydrolyse av metylerte polysakkarider med trifluoredikksyre⁶²

Reagenser

2,5 M Trifluorediksyre (TFA)

Utsyr

N₂-gassoppsett

Varmeskap: Functionline, Hereaus Instruments

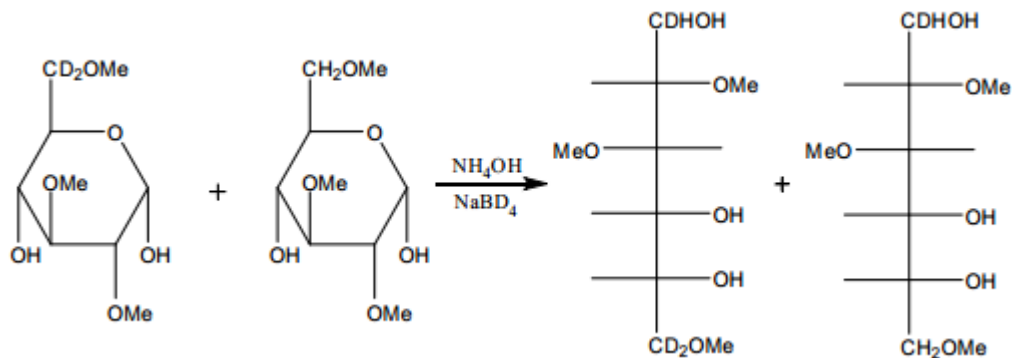
SMI-pipette (100 µl) med kapillærer

Prosedyre

1. 500 µl 2,5 M TFA ble tilsatt i de metylerte prøvene og videre gjennomblåst med N₂-gass.
2. Prøven ble hydrolysert i 2 timer ved 100-102 °C i varmeskap. Etter ca. 15 minutter ble korken skrudd ytterligere til.
3. Prøven ble avkjølt og avdampet med N₂-gass.

Reduksjon

Ringstrukturen i monosakkaridene brytes under basiske betingelser ved at det sykliske hemiacetalet ved C1 reduseres med NaBD₄ til alditol.⁴⁸ Et deuterid atom blir introdusert av NaBD₄ ved C1 som vist på figur 5-14.



Figur 5-14 Reduksjon av karboksylsyre reduserte og hydrolyserte polysakkarider⁶²

Reagenser

2 M ammoniumhydroksyd (NH₄OH)

Natriumbordeuterid (NaBD₄)

Iseddik

5 % eddiksyre i metanol

Vannfri metanol

Utstyr

Ultralydbad (VWR, Ultrasonic Cleaner)

Varmeskap (Heraeus Instruments, Function line)

Speed Vacuum Dryer

SMI-pipette (100 µl og 50 µl) med kapillærer

Finnpipetter med spisser

Prosedyre

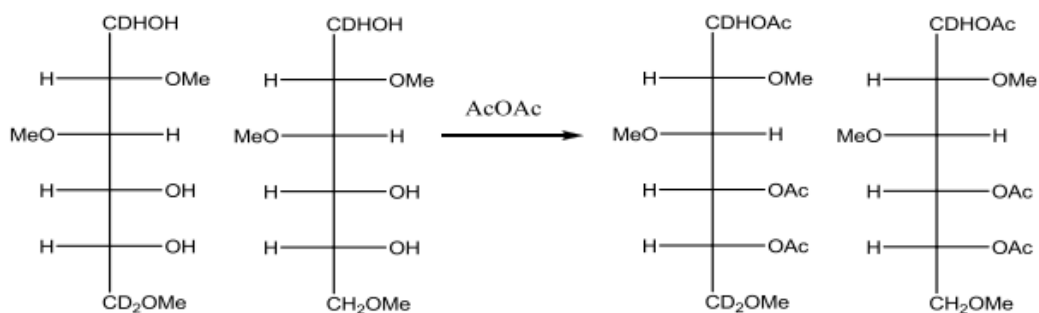
1. Prøvene fra hydrolysen ble løst i 500 µl 2 M NH₄OH og 500 µl 1 M nylaget NaBD₄ i 2 M NH₄OH ble tilsatt.
2. Løsningen ble sonikert i 1 minutt og inkubert ved 60 °C i 1 time.
3. Overskudd reduktant ble destruert med 3 x 50 µl iseddik.

4. Prøvene ble tørket i Speed Vacuum Dryer.
5. 2,5 ml 5 % eddiksyre i metanol ble tilsatt og tørket i Speed Vacuum Dryer.
6. Punkt 5 ble gjentatt.
7. 2,5 ml vannfri metanol ble tilsatt og tørket i Speed Vacuum Dryer.
8. Punkt 7 ble gjentatt

Acetylering

Prinsipp

Hydroksylgruppene som ble dannet etter hydrolyse og reduksjon acetyleres med eddiksyreanhydrid, slik at monosakkaridene blir bedre egnet for analyse i GC-MS.⁵⁹



Figur 5-15 Acetylering med eddiksyreanhydrid⁶²

Reagenser

1-metylimidazol

Eddiksyreanhydrid

Diklormetan

Destillert vann

Vannfri metanol

Utstyr

Finnpipetter med spisser

SMI-pipette (100 µl og 50 µl) med kapillærer

Ultralydbad (VWR, Ultrasonic Cleaner)

Minishaker MS2, IKA

Sentrifuge, MSE

Syrevaskede supelcorør med kork

N₂-gassoppsett for inndamping

Prosedyre

1. 200 µl 1-metylimidazol ble tilsatt i residuet fra reduksjonen, etterfulgt av 2 ml eddiksyreanhydrid.
2. Prøvene ble blandet godt på minishakeren, og hvis nødvendig, sonikert med ultralyd for å løse opp residuet. Prøven ble satt til henstand i 10 minutter.
3. Overskudd av eddiksyreanhydridet ble destruert ved tilsetning av 10 ml destillert vann. Løsningen ble blandet godt og satt til henstand i 10 minutter.
4. De delvis metylerte og acetylerede sukkerne ble ekstrahert med 2 x 1 ml diklormetan, og ble deretter blandet i 30 sekunder og sentrifugert. Den nederste fasen ble samlet hver gang.
5. Ekstraktene ble samlet og tilbake-vasket med 2 x 5 ml destillert vann.
6. Den upolare diklormetanfasen ble overført til supelcorør og tørket med N₂-gass. Det er viktig å fjerne alt vann ved overføring til supelcorør, da polare stoffer forurenses GC-MS apparatet. Mellomsjiktet ble derfor fjernet før en ny pipette ble benyttet for å overføre diklormetanfasen.
7. Residuet ble løst i 2 ml diklormetan.
8. Prøven ble analysert ved GC-MS (metode 5.4.2)

5.4.2 GC-MS

Prinsipp

Kombinasjonen av gasskromatografi (GC) med et massespektrometer (MS) gjør at man både kan studere bindingsmønstre og kvantifisere analysesubstansene. Stoffene blir separert i GC-kolonnen og deretter ledet inn i massespektrometeret. I MS-detektoren ioniseres stoffene ved

at de bombarderes av en elektronstråle under vakuum. De ioniserte molekylene brytes ned i mindre, mer stabile fragmenter. Både primære og sekundære fragmenter vil bli detektert i detektoren. Massen til de ioniserte molekylene og de eventuelle fragmentene bestemmes ved at de først separeres etter deres masse/ladningsforhold (m/z), og deretter detekteres av en detektor. Et massespektrum er et plot av relativ intensitet av ionene som funksjon av deres m/z -verdi. Massespekteret er svært karakteristisk, og kan sies å være stoffets fingeravtrykk.⁵⁷

GC-MS- analysen ble utført av Hoai Thi Nguyen Aas ved Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo

Reagenser

Pyridin

Utstyr og betingelser

GC-MS: GC 8000 series

Detektor: Fisons Instruments, MD 800

Injektor: Splitt (1:10)

Kolonne: FactorFOUR™, VF-1ms

Filmtykkelse: 0,25 μm

Indre diameter: 0,25 mm

Lengde: 30 m

Temperaturområdet: 80-280°C

Injektortemperatur: 250°C

Dataprogram: Masslab

Viktige primærfragmenter: 45, 47, 117, 118, 131, 161, 162, 163, 175, 189, 190, 203, 205, 207, 233, 234, 235, 261, 262, 305, 307

20 °C/min 0,5 °C/min 30 °C/min

Temperaturprogram: 80 °C_(5 min) $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ 170 °C $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ 250 °C $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ 300 °C_(20 min)

Prosedyre

1. Det ble åpnet for gass-strømmene, GC og integrator ble programmert.
2. Sprøyten ble først skylt med pyridin, deretter ble prøven injisert.

5.5 Immunmodulerende aktivitet

5.5.1 Komplementfikseringstest

Polysakkarider kan interferere med komplementsystemet, som er en viktig del av det medfødte immunsystemet. De kan påvirke komplementsystemet via den klassiske og/eller den alternative aktiveringsveien. Komplementfikseringstesten kan brukes for å undersøke om polysakkarider har en innvirkning på det humane immunsystemet.

Komplementfikseringstesten måles ved graden av hemolyse på antistoffsensibiliserte saueerythrocytter (SRBC). Erythrocytter fra sau sensibiliseres, og dekkes med antistoffer fra kanin. Dersom komplement er intakt vil en kaskaderekke gjennomgå som resulterer i hemolyse av erythrocyttene. Polysakkaridene i prøven blir først inkubert med komplement før blodceller blir tilsatt. Dette gir prøven tid til å modulere komplementet, enten ved å interagere med enkelte komplement-faktorer slik at disse inaktiveres eller ved at de aktiveres gjennom konsumpsjon. Begge utfallene vil resultere i nedgang av hemolyse. I denne testen vil graden av lyse indikere gjenværende komplement-aktivitet, og positiv aktivitet i testen vil resultere i hemming av lyse.⁶¹

Reagenser

Blod fra sau 7001, tappet 31.08.2012 og sau 10010, tappet 23.10.2013

Antistoff: Virion 9020 Amboceptor: Fortynnet 1:10 i veronalbuffer/BSA/NaN₃

Fosfatbuffer (PBS)

Veronal/BSA-buffer: Veronalbuffer (CFT pH 7,2) med 2mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin 30 %) og 0,02 % Natriumazid (10 %)

Komplement: Serum fra ECG (humant)

Standard: BP II, isolert fra *Biophytum petersianum* med utgangskonsentrasjon 500 µg/ml

Prøveløsninger: Alle løsningene hadde en utgangskonsentrasjon på 500 µg/ml

Destillert vann

Utstyr

Mikrotiterplate 96 brønner, flat- og rundbunnet

Glassrør

Varmeskap med risteplate: Labnet 211DS Shaking Incubator 37 °C

Blank teip

Parafilm

Whirlimixer, Heidolph REAX top

Sentrifuge

BIO-RAD iMarkTM Microplate Absorbance Reader

Pipetter, Ranin Pipet-LiteTM XLS

Prosedyre

A)Vasking av saueblodceller før sensibilisering

1. Blodet ble tatt ut og overført til et glassrør. 500 µl er nok til standardkurv og 2 eller 3 mikrotiterplater.

2. Blodcellene ble vasket 2 ganger med 5 ml fosfatbuffer og 1 gang med 5 ml veronal/BSA buffer. De ble sentrifugert mellom hver vask og vaskevannet ble fjernet.

B) Sensibilisering av saeblodceller

1. 15 μ l Virion 9020 Amboceptor, 60 μ l pakkede blodceller og 5,925 ml veronal/BSA buffer ble inkubert ved risting ved 37 °C i 30 minutter.
2. Løsningen ble vasket 2 ganger med 5 ml fosfatbuffer og 1 gang med 5 ml veronal/BSA buffer, og sentrifugert mellom hver vask.
3. Vaskevannet ble fjernet og blodet ble fortynnet med 5,940 ml veronal/BSA buffer. 1 % løsning av blodceller ble laget.

C) Titreringskurve for komplementkilden

6 brønner på en rundbunnet mikrotiterplate ble fylt med 100 μ l destillert vann, 6 brønner med 150 μ l veronal/BSA buffer, 6 brønner med 100 μ l veronal/BSA buffer (blank), og 24 brønner med 50 μ l veronal/BSA buffer (3 brønner per fortynning av komplement/buffer).

1. Fortynningsrekken av komplement og buffer ble laget etter tabell.1
2. 50 μ l komplement/buffer ble tilsatt brønnene med 50 μ l veronal/BSA buffer.
3. Platen ble dekket med tape og satt på risting i 30 minutter ved 37 °C.
4. 50 μ l 1 % SRBC ble tilsatt hver brønn og inkuberes ved risting i 30 minutter ved 37 °C.
5. Platen ble sentrifugert i 5 minutter ved 1000 rpm.
6. 100 μ l fra hver brønn ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate, og sentrifugert for å bli kvitt luft som kan dannes ved overføring.
7. Absorbansen ble avlest ved 405 nm på en mikroplateleser.
8. Den fortynningen som ga 50 % lyse av SRBC ble anvendt videre i utførselen av komplementfikseringstesten.

Fortynning	Komplementserum (µl)	Veronal/BSA buffer (µl)
1:30	10 µl	290 µl
1:40	10 µl	390 µl
1:50	10 µl	490 µl
1:60	10 µl	590 µl
1:70	10 µl	690 µl
1:80	10 µl	790 µl
1:90	10 µl	890 µl
1:100	10 µl	990 µl

Tabell 5-1 Fortynningsrekke til bruk for bestemmelse av 50 % hemolyse.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:50	1:50	1:50	100 µl komplementserum 100 µl Veronal/BSA buffer	100 µl komplementserum 100 µl Veronal/BSA buffer	100 µl komplementserum 100 µl Veronal/BSA buffer						
B	1:60	1:60	1:60	100 µl komplementserum 100 µl Veronal/BSA buffer	100 µl komplementserum 100 µl Veronal/BSA buffer	100 µl komplementserum 100 µl Veronal/BSA buffer						
C	1:70	1:70	1:70	100 µl komplementserum 100 µl Veronal/BSA buffer	100 µl komplementserum 100 µl Veronal/BSA buffer	100 µl komplementserum 100 µl Veronal/BSA buffer						
D	1:80	1:80	1:80	100 µl komplementserum 100 µl Veronal/BSA buffer	100 µl komplementserum 100 µl Veronal/BSA buffer	100 µl komplementserum 100 µl Veronal/BSA buffer						
E	1:90	1:90	1:90									
F	1:100	1:100	1:100									
G	1:110	1:110	1:110									
H	1:120	1:120	1:120									

Positiv kontroll/ 100% hemolyse.
100µl destillert vann + 50µl blodceller.

50µl blodceller
10µl komplementserum+ buffer
Totalt volum 150µl

Blank/ staybakgrunn
100µl buffer + 50µl blodceller

Figur 5-16 Skjematisk skisse for utførelse til bestemmelse av 50 % hemolyse.

D) Fortynning av prøven

1 mg prøvemateriale ble løst i veronal/BSA buffer (2 ml) til en stamløsning med en utgangskonsentrasjon på 500 µg/ml. Det samme ble gjort med standarden, BPII.

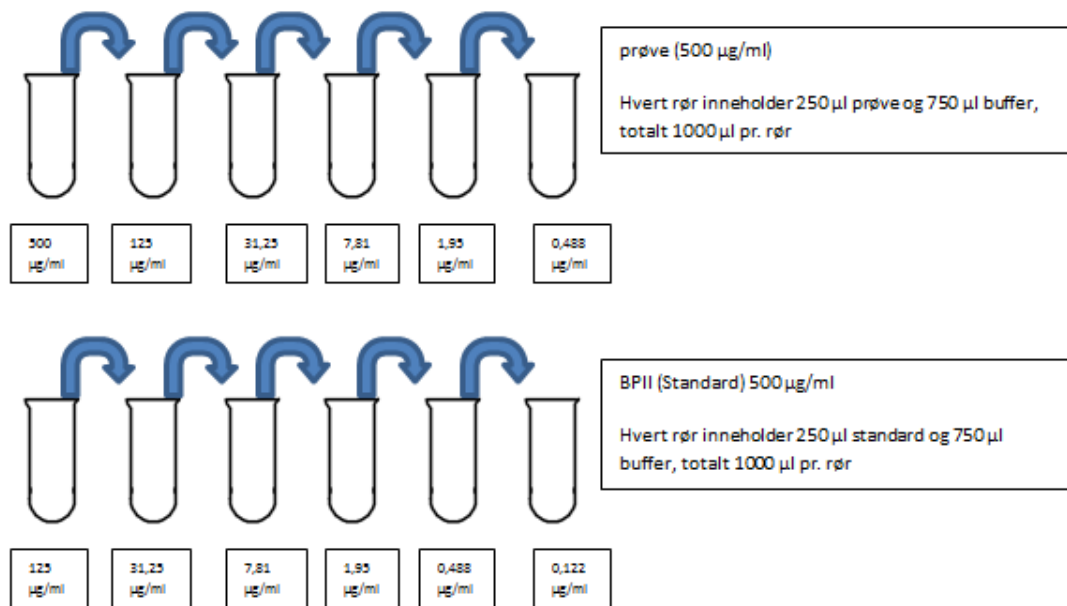
En 4-folds fortynningsrekke ble laget (6 fortynninger av hver prøve og av standarden). Se tabell 5-2 og 5-3.

Rør	Konsentrasjon (µg/ml)	
1	500 µg/ml	1000 µl fra stamløsningen
2	125 µg/ml	750 µl veronal/BSA buffer + 250 µl fra rør 1
3	31,25 µg/ml	750 µl veronal/BSA buffer + 250 µl fra rør 2
4	7,81 µg/ml	750 µl veronal/BSA buffer + 250 µl fra rør 3
5	1,95 µg/ml	750 µl veronal/BSA buffer + 250 µl fra rør 4
6	0,48 µg/ml	750 µl veronal/BSA buffer + 250 µl fra rør 5

Tabell 5-2 4-folds fortynningsrekke av prøvene

Rør	Konsentrasjon (µg/ml)	
1	500 µg/ml	1000 µl fra stamløsningen
2	125 µg/ml Startkonsentrasjon BPII	750 µl veronal/BSA buffer + 250 µl fra rør 1
3	31,25 µg/ml	750 µl veronal/BSA buffer + 250 µl fra rør 2
4	7,81 µg/ml	750 µl veronal/BSA buffer + 250 µl fra rør 3
5	1,95 µg/ml	750 µl veronal/BSA buffer + 250 µl fra rør 4
6	0,48 µg/ml	750 µl veronal/BSA buffer + 250 µl fra rør 5
7	0,12 µg/ml	750 µl veronal/BSA buffer + 250 µl fra rør 6

Tabell 5-3 4-folds fortynningsrekke av BPII.



Figur 5-17 Skisse over 4-foldsfortynning av prøve og standard

E) Utføring av testen

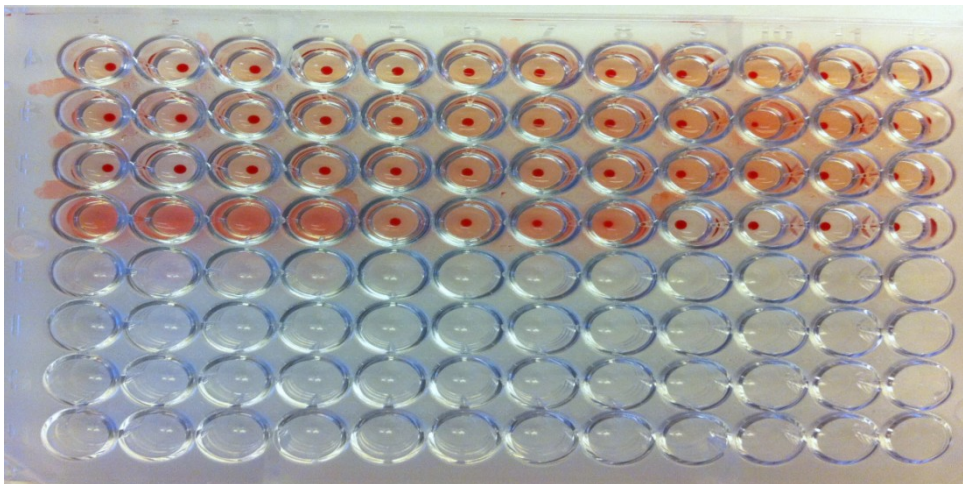
1. 50 µl av hver fortynning (4 folds) av prøvene ble tilsatt i en rundbunnet mikrotiterplate (2 paralleller).
2. 4 brønner ble tilsatt 100 µl destillert vann (100 % hemolyse), og 4 brønner tilsettes 50 µl veronal/BSA buffer (50 % hemolyse), 4 brønner tilsettes 100 µl veronal/BSA buffer (blank).
3. 50 µl komplement tilsettes hver brønn, bortsett fra 100 % lysekontrollbrønnene og blankbrønnene.
4. Platen ble dekket med blank tape slik at ikke noe kunne fordampe, og satt på risting i 30 minutter ved 37 °C.
5. 50 µl 1 % sensibiliserte saueblodceller ble tilsatt hver brønn og inkubert ved risting i 30 minutter ved 37 °C.
6. Platen ble sentrifugert i 5 minutter ved 1000 rpm.
7. 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate.
8. Platen ble sentrifugert en gang til for å bli kvitt luft som kan dannes under overføringen.
9. Absorbansen ble avlest ved 405 nm.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Prøve 1	A	500 µg/µl	500 µg/µl	125 µg/µl	125 µg/µl	31,25 µg/µl	31,25 µg/µl	7,81 µg/µl	7,81 µg/µl	1,95 µg/µl	1,95 µg/µl	0,48 µg/µl	0,48 µg/µl
Prøve 2	B	500 µg/µl	500 µg/µl	125 µg/µl	125 µg/µl	31,25 µg/µl	31,25 µg/µl	7,81 µg/µl	7,81 µg/µl	1,95 µg/µl	1,95 µg/µl	0,48 µg/µl	0,48 µg/µl
BP II	C	125 µg/µl	125 µg/µl	31,25 µg/µl	31,25 µg/µl	7,81 µg/µl	7,81 µg/µl	1,95 µg/µl	1,95 µg/µl	0,48 µg/µl	0,48 µg/µl	0,12 µg/µl	0,12 µg/µl
	D	100 µl H ₂ O + 50 µl blod	100 µl H ₂ O + 50 µl blod	100 µl H ₂ O + 50 µl blod	100 µl H ₂ O + 50 µl blod	50 µl blod + 50 µl buffer + 50 µl serum	50 µl blod + 50 µl buffer + 50 µl serum	50 µl blod + 50 µl buffer + 50 µl serum	50 µl blod + 50 µl buffer + 50 µl serum	100 µl buffer + 50 µl blod	100 µl buffer + 50 µl blod	100 µl buffer + 50 µl blod	100 µl buffer + 50 µl blod
	E												
	F												
	G												
	H												Blank

100 % Hemolyse

50 % Hemolyse

Figur 5-18 Skjematisk skisse over utførelsen av testen



Figur 5-19 Bildet fra utførelsen. Blodceller tilsatt, og sentrifugert

F) Beregninger

Lyseringsgraden forteller hvor mye komplement som i seg selv kan lysere de røde blodcellene.

$$\text{Lyseringsgrad} = \frac{\text{Abs kontroll}}{\text{Abs dest. vann}} \times 100 \%$$

(Lyseringsgraden må ligge på opp mot 50 % for å få et pålitelig resultat).

For å finne % hemming fra planteekstrakt benyttes følgende formel:

$$\% \text{ hemming} = \frac{\text{Abs kontroll} - \text{Abs prøve}}{\text{Abs kontroll}} \times 100 \%$$

Jo lavere absorbans på brønnene, desto bedre da færre blodceller har blitt lysert. Det betyr også at komplementet har blitt konsumert av prøven

6 RESULTATER OG DISKUSJON

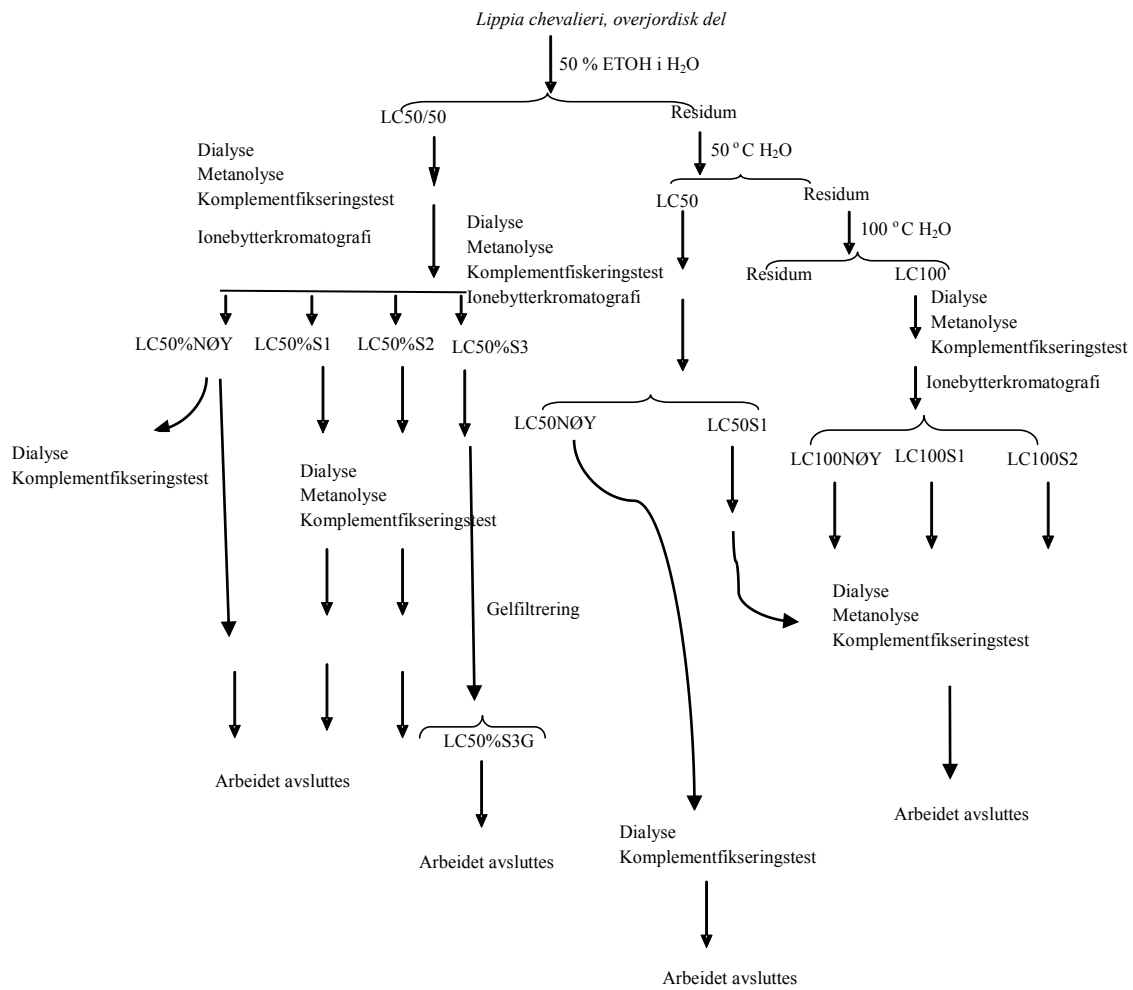
6.1 Isolering av polysakkarider

6.1.1 Ekstraksjon

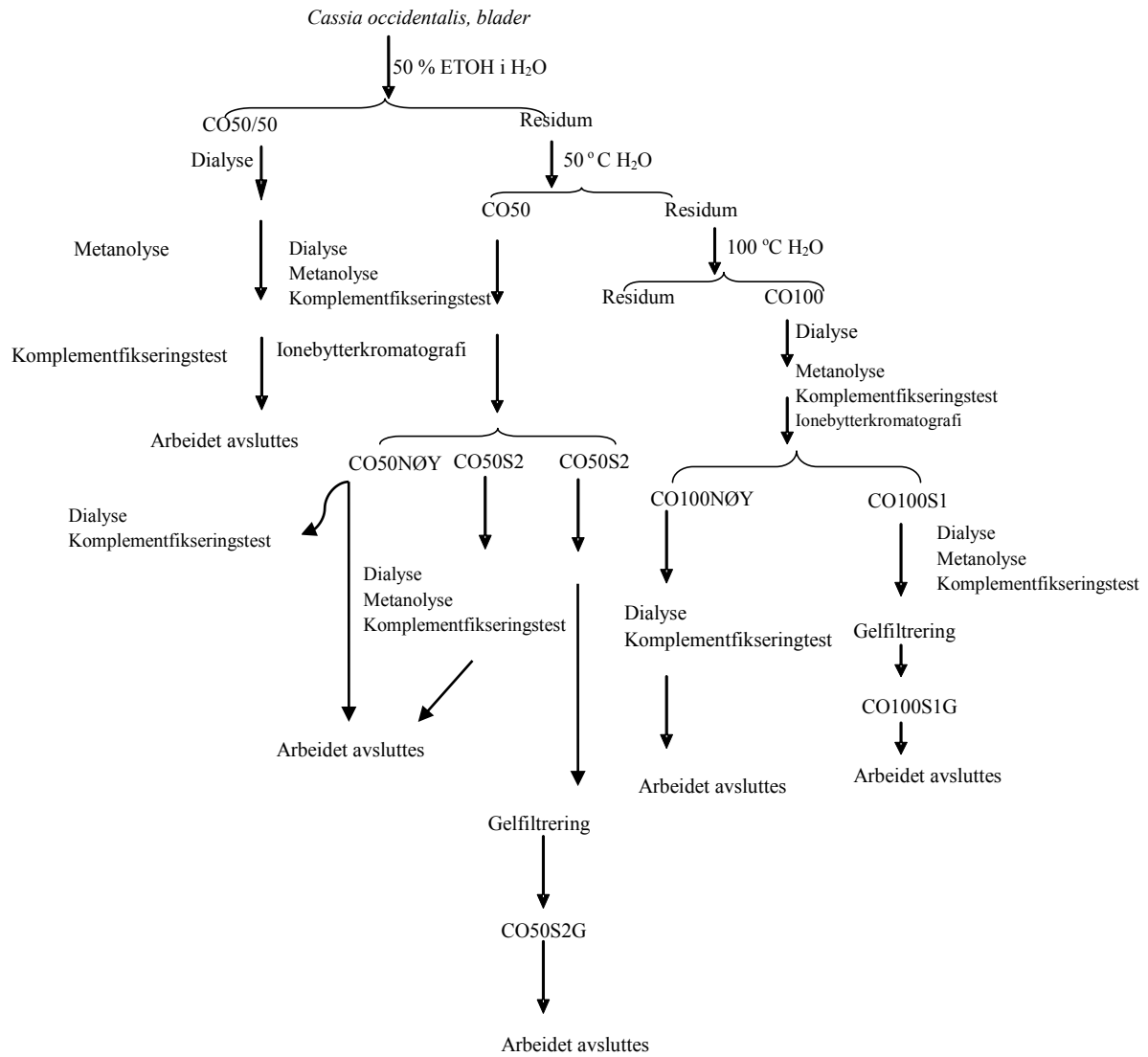
100 g tørket plantemateriale av *Lippia chevalieri* (overjordisk del) og *Cassia occidentalis* (blader), og 95 g av *Spilanthus oleracea* (blomsterhoder) ble anvendt i forbindelse med denne oppgaven. Plantematerialet ble ekstrahert med forskjellige løsemidler etter økende grad av polaritet (metode 5.2.1). Plantenes innhold av lavmolekylære og upolare forbindelser ble ekstrahert av organiske løsemidler som diklormetan, etylacetat og etanol. Komponenter i disse ekstraktene anses som forurensninger i karbohydratanalysene, og det er derfor vesentlig at de blir ekstrahert ut med organiske løsemidler etter deres grad av polaritet, slik at de høymolekylære og polare stoffer ikke blir forurenset eller forsvinner tidlig i prosessen. Polysakkaridene ble isolert ved ekstraksjon gjort med 50 % etanol i destillert vann, og destillert vann på henholdsvis 50 °C og 100 °C. Ved å ekstrahere plantematerialet med en temperatur på 50 °C og 100 °C vil man kunne innhente forskjellige fraksjoner av polysakkarider. Etter ekstraksjonen ble rå-ekstraktene dampet inn på rotavapor (metode 5.1.9) og frysetørket (metode 5.1.14). Rå-ekstraktene ble videre undersøkt ved hjelp av karbohydratanalyser. Utbyttet ble beregnet i forhold til innveid mengde tørket plantemateriale (se tabell 6-1).

Rå-ekstrakter	LC50/50	LC50	LC100	CO50/50	CO50	CO100	SO50/50	SO50	SO100
%Utbytte	1,8 %	0,7 %	0,9 %	2,0 %	0,3 %	0,4 %	1,1 %	0,7 %	2,1 %

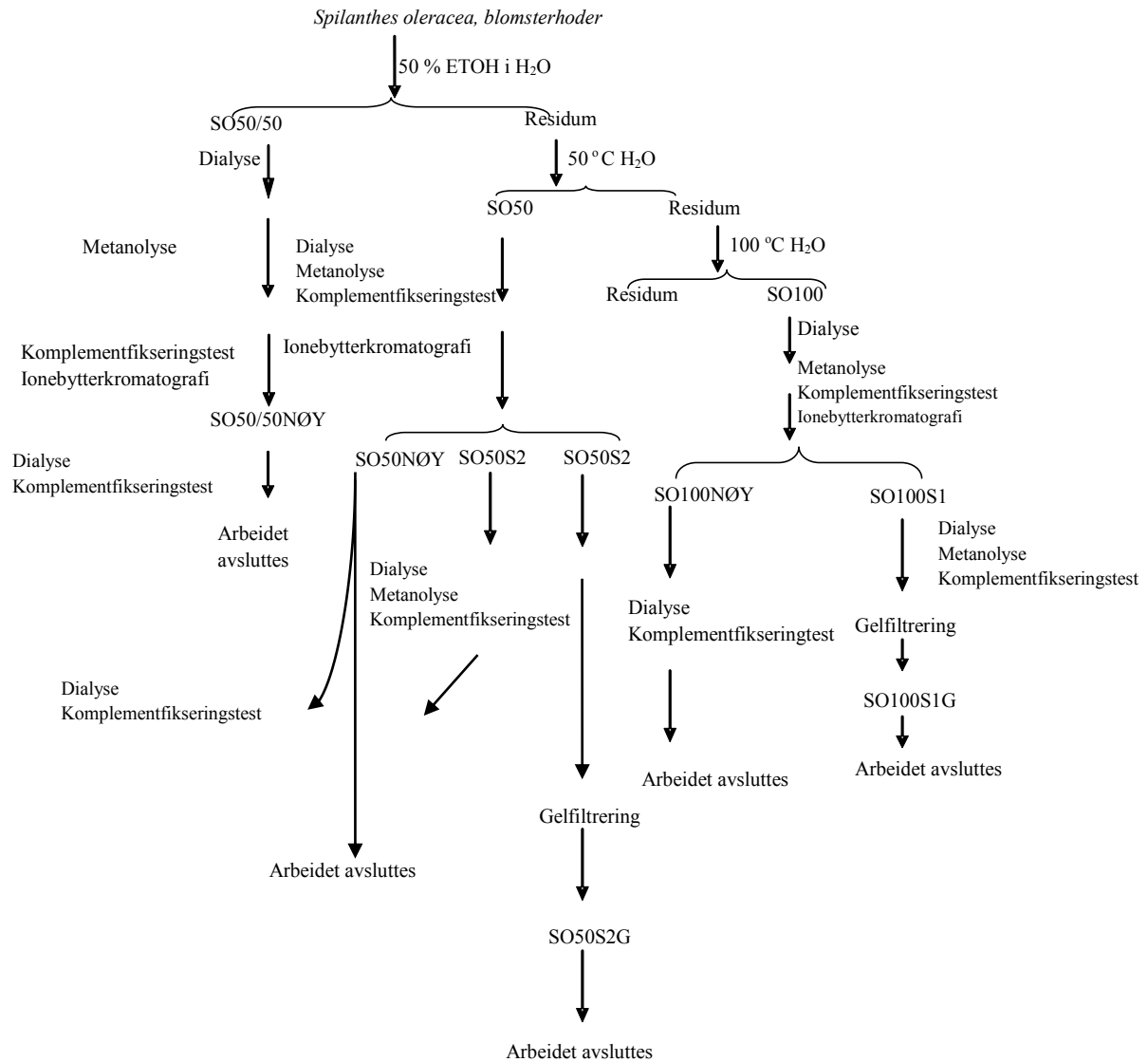
Tabell 1-6 Utbytte etter vandig ekstraksjon, angitt i % av innveid plantemateriale



Figur 6-1 Enkel oversikt over utført arbeid på *Lippia chevalieri*



Figur 6-2 Enkel oversikt over utført arbeid på *Cassia occidentalis*



Figur 6-3 Enkel oversikt over utført arbeid på *Spilanthes oleracea*

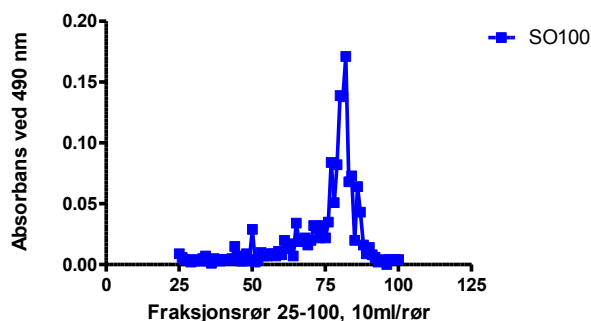
6.1.2 Ionebytterkromatografi

Rå-ekstraktene ble separert etter deres ionestyrke ved eluering på ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub) ionebytterkolonne (metode 5.2.2). Prøveløsningen som ble applisert var ca. 75 ml ved hver kjøring. Den nøytrale fraksjonen ble eluert med destillert vann, og de sure polysakkaridene ble eluert ut etter økende surhetsgrad med en NaCl-gradient fra 0–1,5 M. Til slutt ble kolonnen eluert med 2 M NaCl, en prosess som eluerer de resterende sure polysakkaridene. Det ble kun utført én kjøring på hvert plantemateriale.

På bakgrunn av resultatene fra fenolsvovelsyretesten (metode 5.3.1) ble de sure fraksjonene slått sammen (se figur 6-4). De samlede fraksjonene ble dialysert og frysetørket. Utbyttet er vist i tabell 6-2. De sure fraksjonene ble videre undersøkt for biologisk aktivitet og karbohydratsammensetning. De nøytrale fraksjonene ble som følge av det lave utbyttet etter ionebytterkromatografi kun undersøkt for biologisk aktivitet, og ikke for karbohydratsammensetning.

Chelex[®]100 ble brukt for å øke løseligheten i prøveløsningene. Den ble spesielt anvendt i 50 % etanol i H₂O-ekstraktene, hvor felling hadde blitt observert. Felling kan skyldes at pektiner i prøveløsningen inneholder et stort antall av koblings-soner, som igjen gjør at uronsyrer i “smooth region” kan interagere med divalente kalsiumioner. Dermed dannes det en rigid gel, og polysakkarider kan felles ut.⁶³ Tanken bak anvendelsen av Chelex[®]100 var å fjerne disse divalente ionene slik at prøveløsningen ble mer løselig, og samtidig kunne gi et høyere utbytte av polysakkarider fra fraksjonene. Det oppstod problemer under elueringen av CO50/50 og SO50/50 på ionebytterkolonnen, som gjorde at rå-ekstraktene ikke ble videre opprenset. Årsaken til dette er fortsatt ukjent, men det kan tenkes at prøvene ble bundet på overflaten til kolonnematriksen, og at de derfor ikke lot seg eluere ut sammen med elueringsmiddelet. Det kan også skyldes at strukturene i rå-ekstraktene er sammensatte eller at komponenter i ekstraktet som ga sterk farge på prøveløsningene har en påvirkning på elueringen av rå-ekstraktene. Et moment som kunne ha vært interessant å undersøke er om elueringsprofilene til polysakkaridene er reproducerbare ved gjentatt eluering under samme de betingelsene og metodene. Med det kunne et mer nøyaktig estimat bli gjort, noe som kunne gi oversikt over den relative mengden sure og nøytrale polysakkaridene i de ulike prøvene.

Fenolsvovelsyretest SO100 etter ionebytterkromatografi



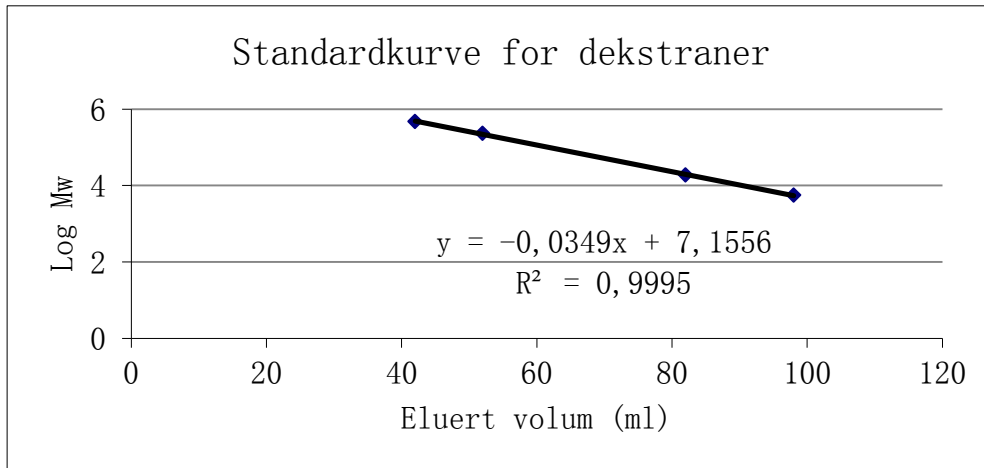
Figur 6-4. Eksempel på karbohydratprofil. SO100 eluert med 0-1,5 M NaCl-gradient på en ANX Sepharose 4 Fast Flow kolonne. Absorbansen ble målt ved 490nm etter at en FS-test ble utført. Fraksjonen fra 600-900 ml ble slått sammen og kalt SO100S1.

Plante	Utgangs-plantemateriale for ekstraksjon	Rå-ekstrakter	Utbytte av rå-ekstrakter	Vekt av rå-ekstrakter til ionebytterkromatografi	Utbytte av <i>nøytrale</i> polysakkarider etter ionebytterkromatografi	Utbytte av <i>sure</i> polysakkarider etter ionebytterkromatografi	
<i>Lippia chevalieri</i> (overjordisk del)	100 gram	50 % ETOH	1800 mg	100 mg	0,7 mg	3,7mg LC50%S1	
		50 % H ₂ O ved 70 °C				7,6mg LC50%S2	
		50 °C H ₂ O				38,3mg LC50%S3	
		50 °C H ₂ O	700 mg	100mg	3,3mg	13,3 mg LC50S1	
		100 °C H ₂ O	900 mg	100mg	9,3 mg	9,5mg LC100S1 13,1mg LC100S2	
<i>Cassia occidentalis</i> , (blader)	100 gram	50 % ETOH	2097,5 mg	100mg	Ingen resultat, stoffet sitter igjen på matriks overflaten. Bunnfallet ble fjernet, og løsningen ble filtret med 5 µm før applisering i kolonnen.	Ingen resultat, stoffet sitter igjen på matriks overflaten. Bunnfallet ble fjernet, og løsningen ble filtret med 5 µm før applisering i kolonnen.	
		50 % H ₂ O ved 70 °C					
		50 °C H ₂ O					357,4 mg
		100 °C H ₂ O	437,5 mg	100 mg	2,1mg	33,1mg CO100S1	
<i>Spilanthes oleracea</i> (blomsterhoder)	95 gram	50 % ETOH	1070 mg	100mg	18,8mg	Anvendt Chelex, men ingen resultat	
		50 % H ₂ O ved 70 °C					
		50 °C H ₂ O					725,9 mg
		100 °C H ₂ O	2051,5 mg	100mg	273,8 mg	47,5 mg SO100S1	

Tabell 6-2 Utbytte i mg etter dialyse og frysetørring av sure og nøytrale ekstrakter etter ionebytterkromatografi

6.1.3 Bestemmelse av molekylvekt, gelfiltrering

Molekylvektfordelingen ble bestemt ved å anvende en SuperdexTM 200 prep kolonne koblet til FPLC-apparatur. Elueringsprofilene fra metode 5.2.3 ble benyttet for å estimere molekylvektfordelingen til fraksjonene CO50S2, CO100S1, LC50%S3, SO50S2 og SO100S1. En forhåndslaget standardkurve for dekstraner med kjent molekylvekt (M_w) ble anvendt til å estimere den lineære regresjonslinjen. Funksjonen fra regresjonslinjen ble brukt til å beregne molekylvektfordelingen for de utvalgte fraksjonene. Figur 6-5 viser standardkurven og funksjonen av regresjonslinjen. En godt tilpasset lineær regresjonslinje ble fastslått og satt til en verdi på 0,9995.



Figur 6-5 Standardkurve for dekstraner med kjent molekylvekt

På grunn de lave utbyttene etter ionebytterkromatografien ble bare utvalgte fraksjoner rensset ytterligere ved hjelp av en gelfiltreringskolonne. På bakgrunn av resultatene fra fenolsvovelsyretesten (metode 5.3.1) ble de ulike fraksjonene slått sammen. Disse fraksjonene ble deretter dialysert, frysetørket, og utbyttet ble bestemt i forhold til den innveide mengden av prøve-materiale. Fraksjonene ble ikke videre anvendt til analyser av biologisk aktivitet og struktur- og aktivitetsforhold på grunn av mangel på tid. Det hadde imidlertid vært interessant å kunne ha sammenlignet den biologiske aktiviteten og struktur-aktivitetsforholdene med fraksjonene fra ionebytterkromatografi. Fordi disse fraksjonene ble videre opprenset, ville en nærmere undersøkelse av disse kunne bidra til en bedre forståelse av struktur- og aktivitetsforhold. Tabell 6-3 viser et veldig lavt utbytte av LC50%S3 i forhold til de andre fraksjonene. Dette skyldes nok at mye av fraksjonen inneholder andre forbindelser enn polysakkarider, da det totale innholdet av karbohydrat i prøven var lav.

	CO50S2G	CO100S1G	LC50%S3G	SO50S2G	SO100S1G
% utbytte	52,5	45,5	3,0	48,0	55,5

Tabell 6-3 Utbytte etter gelfiltrering på utvalgte fraksjoner. Utbytte er angitt i % av påsatt prøvemengde på gelfiltrerings-kolonnen.

Tabell 6-4 viser en oversikt over de estimerte molekylvektintervallene for de ulike fraksjonene, alle basert på funksjonen fra standardkurven. Elueringsmiddelet som ble brukt i metoden var en 10 mM NaCl-løsning. Molekylvekten ved toppmaksimum indikerer hvilken molekylvekt hovedtyngden av karbohydratene som ble eluert ut av kolonnen har. Mw til Mw viser intervallet for bredden av hele grafen.

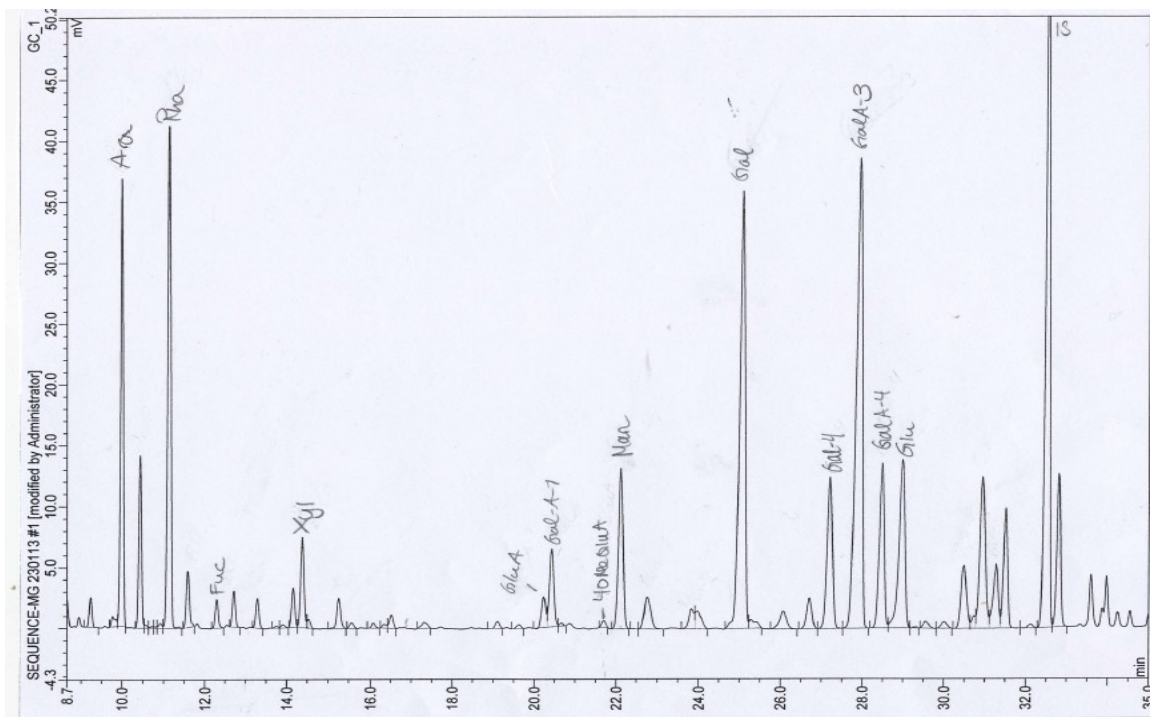
	Fra Mw (Da)	Til Mw (Da)	Mw toppmaksimum for topp 1 (Da)	Mw toppmaksimum for topp 2 (Da)	Mw toppmaksimum for topp 3 (Da)
CO50S2	575000	4000	417000	83000	12000
CO100S1	575000	4000	98000	17000	-
LC50%S3	575000	4000	489000	10000	-
SO50S2	575000	4000	71000	10000	-
SO100S1	575000	4000	71000	27000	-

Tabell 6-4 Oversikt over estimerte molekylvektstintervaller for CO50S2, CO100S1, LC50%S3, SO50S2 og SO100S1. 10 mM NaCl-løsning ble benyttet som eluent

Ut fra resultatene i tabell 6-4 strekker molekylvektintervallene seg fra 4000 til 575000 Da. Dette er et stort intervall med god spredning, noe som gjør at vi kan anta at det finnes ulike strukturer av høymolekylære forbindelser i prøvene. Den anvendte metoden kan ikke brukes til å gi absolutte resultater. Molekylvektene som har blitt oppgitt i tabellen kan kun brukes som et estimat på hvilke molekylvektstintervaller som forekommer i strukturene i disse fraksjonene.

6.2 Struktur- og aktivitetsforhold - *Lippia chevalieri*

6.2.1 Karbohydratanalyse



Figur 6-6 Eksempel på et GC-kromatogram. Dette er monosakkaridsammensetningen for LC50S1. IS er intern standard av mannitol.

Monosakkaridsammensetningen av rå-ekstraktene og fraksjonene isolert etter ionebytterkromatografi ble bestemt ved hjelp av GC etter metanolyse og TMS-derivatisering. Et monosakkarid kan opptre i flere former, noe som kan gi opphav til flere karakteriske topper i kromatogrammet. Ved å anvende en forhåndslaget standardkurve av alle monosakkaridene, er det mulig å identifisere hvilke sukre som finnes i testsubstansen.

<i>Lippia chevalieri</i>	LC50/50	LC50%S1	LC50%S2	LC50%S3	LC50	LC50S1	LC100	LC100S1	LC100S2
Ara	11,4	29,0	13,4	-	5,8	10,2	3,2	2,6	2,1
Rha	25,8	7,3	16,1	1,8	19,8	7,6	15,5	4,2	4,7
Fuc	spor	2,2	spor	-	2,2	spor	spor	-	0,4
Xyl	1,5	2,2	1,2	-	3,1	1,4	1,5	-	-
Man	spor	5,0	2,8	-	2,0	2,3	1,3	spor	-
Gal	8,9	27,5	24,9	-	12,0	16,8	7,3	4,7	4,0
Glc	43,7	15,6	23,3	75,5	26,1	5,5	21,3	3,9	2,5
GlcA	4,7	spor	2,7	-	4,1	3,6	1,5	spor	spor
GalA	2,8	9,1	13,5	22,6	24,9	51,2	47,4	83,5	84,9
4-O-Me-GlcA	-	1,0	1,6	-	-	spor	-	spor	spor

Tabell 6-5 Karbohydratsammensetning før og etter ionebytterkromatografi av *Lippia chevalieri* 50 % etanol i H₂O og vannekstrakter ved 50°C og 100°C

Rå-ekstraktene og alle fraksjonene bortsett fra LC50%S3 inneholdt både Ara, Gal, Rha og GalA, som alle er karakteriske for pektiner. Mengden monosakkarider varierte fra prøve til prøve, og sett i forhold til rå-ekstraktene økte andelen av enkelte sukkerarter etter ionebytterkromatografi (tabell 6-5). Dette kan skyldes at man ved å rense rå-ekstraktene på en ionebytterkolonne isolerte de sure og nøytrale polysakkaridene, samtidig som en del uønskede lavmolekylære stoffer ble fjernet fra fraksjonene. Kombinasjonen av disse faktorene kan ha resultert i en større andel av sukkerenheter.

Stivelse ble påvist i alle rå-ekstraktene. Jod-jod kalium ble anvendt som reagens for å identifisere om hvorvidt rå-ekstraktene inneholdt amylopektin eller amylose som er bygget opp av glukose med α (1→4) bindinger. Den høye mengden av glukose som ble observert etter gasskromatografi, var mest sannsynlig stivelse fra rå-ekstraktene, som anses for å være forurensinger i karbohydratanalyser. Glukose kan også opptre i flere former som for eksempel i β konfigurasjonen. Det kan også tenkes at noe av den høye mengden kan ha vært bundet til xylose, som danner hemicellulose: xyloglukan.

Fraksjonene LC50%S1, LC50%S2 og LC50S1 viste et høyt innhold av Ara og Gal, noe som kan tyde på at disse fraksjoner består av arabinogalaktaner, men Ara kan også forekomme i områder med arabinaner. GalA ble observert i alle prøver, men med mindre forekomst i LC50/50 og LC50%S1. Forekomsten av GalA kan forklares ved at prøvene inneholder homogalakturonan, den såkalte “smooth region” som utgjør en del av strukturen til pektinene.

I tillegg ble Rha observert, noe som indikerer at rå-ekstraktene og fraksjonene også kan inneholde rhamnogalakturonaner.

Fraksjonene LC50S1, LC100S1 og LC100S2 viste en betydelig større prosentandel GalA enn Ara, Rha og Gal. De isolerte, sure fraksjonene fra 50 % i H₂O ekstraktet hadde derimot større innhold av Ara, Rha og Gal. Det kan derfor tyde på at homogalakturonan er mer fremtredende i LC50S1, LC100S1 og LC100S2 fraksjonene. Små mengder av GlcA og 4-OMe-GlcA ble også identifisert i noen av fraksjonene. For å få et nærmere innsyn i polysakkaridene i prøvene, ble bindingsforholdene til de ulike monosakkaridene undersøkt. Denne metoden kan gi et bedre bilde på strukturen til polysakkaridene i testsubstansene, og bidra til å gi en bedre forståelse av hvilke bestanddeler i strukturen som er viktig for den biologiske aktiviteten.

6.2.2 Bindingsforhold

Bindingsforholdene mellom monosakkaridene i fraksjonene (LC50S1, LC50%S3, LC100S2) isolert etter ionebytterkromatografi ble bestemt etter karboksylsyre-reduksjon, med påfølgende metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og tilslutt GC-MS analyse. Valget av hvilke sure fraksjoner som skulle undersøkes for bindingsfold, ble bestemt ut i fra utbyttene på disse fraksjonene etter ionebytterkromatografi. Metoden gir en overordnet oversikt over hvilke bindingstyper av monosakkarider som finnes i prøvene.

Tabell 6-6 viser fordelingen mellom monosakkaridene og deres bindingstyper. Mengden av hver bindingstype ble beregnet ut fra arealet under kurvetoppene (AUC) i kromatogrammet og i forhold til den totale AUC for monosakkaridene i hver prøve. Forholdstallet ble deretter multiplisert med mengden monosakkarider som ble detektert etter gasskromatografi. Responsfaktorer for flammeionisasjonsdetektor (e.c.r) ble tatt i betraktning under beregningen av AUC for hver topp, noe som gir bedre nøyaktighet på kvantifiseringen av prøvene.⁶⁴

Det ble observert forurensinger i kromatogrammene, og noen av toppene i MS-spekteret inneholdt andre fragmenter, noe som kan komme av kontakt med plast under opparbeidelsen. I tillegg til dette kan noen av monosakkaridene med bestemte bindingstyper retarderes på omtrent samme retensjonstid, noe som resulterer i overlapping, som igjen fører til at flere enn én type sukkerenhet ble liggende under én og samme topp. Ved denne typen

tilfeller trenger ikke resultatet fra beregningen av mengden spesifikke bindinger på monosakkaridene være helt presise.

Monosakkarid og deres bindingstyper		LC50%S3	LC50S1	LC100S2
Ara	<i>Terminal_f</i>	n.d.	5	1,7
	<i>1,2_f</i>	n.d.	0,8	spor
	<i>1,3_f</i>	n.d.	2,6	spor
	<i>1,5_f</i>	n.d.	1,8	0,4
Rha	<i>Terminal</i>	1,8	3,8	1,8
	<i>1,2</i>	n.d.	2,9	1,3
	<i>1,3</i>	n.d.	0,6	0,6
	<i>1,3,4</i>	n.d.	0,3	0,4
	<i>1,2,4</i>	n.d.	n.d.	0,6
Xyl	<i>1,4</i>	n.d.	1,4	n.d.
Fuc	<i>Terminal</i>	n.d.	0,7	0,4
Glc	<i>Terminal</i>	7,5	1,5	0,2
	<i>1,4</i>	10,5	3	1
	<i>1,6</i>	7,7	1	0,4
	<i>1,4,6</i>	38,2	n.d.	0,9
	<i>1,3,6</i>	11,5	n.d.	n.d.
GlcA	<i>Terminal</i>	n.d.	0,6	0,9
	<i>1,4</i>	n.d.	2,7	n.d.
Gal	<i>Terminal_p</i>	n.d.	0,6	1,3
	<i>Terminal_f</i>	n.d.	spor	n.d.
	<i>1,3</i>	n.d.	n.d.	0,6
	<i>1,6_p</i>	n.d.	2,1	0,4
	<i>1,6_f</i>	n.d.	spor	n.d.
	<i>1,2,4</i>	n.d.	11,4	1,3
	<i>1,3,4</i>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>1,3,6</i>	n.d.	2,5	0,4	
GalA	<i>Terminal</i>	n.d.	1,2	2,1
	<i>1,4</i>	22,6	39,9	80,4
	<i>1,2,4</i>	n.d.	8,1	0,6
	<i>1,3,4</i>	n.d.	2,1	1,8

Tabell 6-6 Prosentvis (mol %) fordeling av de forskjellige monosakkaridene og bindingstypene av LC50%S3, LC50S1 og LC100S2. n.d står for ikke detektert

Fraksjonene inneholder betydelige mengder av 1,4-bunder GalA, og da spesielt LC100S2 med en prosentandel på 80,4. Denne typen binding indikerer at fraksjonene inneholder betydelige områder med homogalakturonan, eller såkalte “smooth regions”. Små mengder av 1,3,4 GalA ble observert i LC50S1 og LC100S2, noe som peker mot at det i en kjede med homogalakturonan finnes få områder med GalA- enheter som er forgrenet i C3, men på grunn av fravær av terminal xylose i disse fraksjonene, inneholdt de mest sannsynlig ikke xylogalakturonan. 1,4 Xyl ble observert i LC50S1, og kan tenkes å være en del av en xylan-struktur.

RG I består av alternerende 1,4 GalA og 1,2 Rha-enheter, samt noen områder med 1,2,4 og 1,3,4 Rha enheter.⁷ LC50S1 og LC100S2 inneholder relativt lite 1,2 – bundet Rha, noe som tyder på at det finnes kun få områder med “hairy region” i strukturen. LC100S2 inneholder veldig små mengder 1,2,4 Rha, noe som peker mot at det er veldig få forgreiningspunkter i Rha-enhetene. Noen 1,3,4 Rha enheter (0,3 % og 0,4 %) ble også observert i LC50S1 og LC100S2.

RGII er sammensatt av 1,4 GalA og 1,3,4 GalA,⁷ hvor terminal Ara og Rha, 1,2 Rha og 1,3 Rha kan være bundet til forgreiningspunktene.⁹ Ut i fra resultatene i tabellen, kan man anta at LC50S1 og LC100S2 har noen få områder i pektinstrukturen som består av RG-II.

LC50%S3 inneholdt stort sett bare 1,4 GalA og Glc. I MS- spektrene ble andre sukkerenheter observert, som for eksempel xylose og galaktose i ulike bindingstyper, men fordi disse monosakkaridene var under deteksjonsnivået på GC-en, ble de ikke tatt med i kvantifiseringen.

Fraksjonene LC50S1 og LC100S2 hadde en høy andel terminale monosakkarider i forhold til forgreiningspunktene. Dette kan skyldes at hydrolysen under metyleringsprosessen ikke var tilstrekkelig, noe som igjen førte til at bindingene til polysakkaridene ikke ble spaltet fullstendig.⁶⁵ Hvis andelen av terminale monosakkarider er liten kan dette skyldes at metyleringsprosessen ikke har vært fullstendig.

Fraksjonene LC50S1 og LC100S2 bestod av et varierende innhold av Gal og Ara. 1,6 Gal, 1,3,6 Gal, terminal arabinose og 1,5 Ara. En liten andel av 1,3 Gal ble bare observert i LC100S2. Tilstedeværelsen av denne typen bindinger tyder på at AGII finnes i strukturen, og

vi kan da anta at den er bundet som sidekjeder på RGI. Det ble også observert 1,2,4 Gal (11,4 %, 1,3 %) i begge prøvene, og det kan derfor tyde på at AGI finnes i strukturen. En annen metode som også kan anvendes til identifikasjon av AGII er Yariv-testen, hvor man observerer felling gjennom å se på tilstedeværelse av AGII.

LC50S1 og LC100S2 inneholder små mengder av 1,4-bundet Glc og terminal Glc. Dette er mest sannsynligvis forurensninger som kommer fra stivelse. LC50%S3 inneholder med sine 75,4 % store mengder Glc, og har hyppige forekomster av 1,4-, 1,6- og 1,4,6- bundet Glc. Denne typen bindinger indikerer at fraksjonen inneholder betydelige mengder av amylose og amylopektin, som har forgreningspunkter i C6 posisjonen. Dette samsvarer godt med testresultatet, som påviste stivelse i rå-ekstraktene. Stivelsen burde vært fjernet før metyleringsprosessen, da tilstedeværelse kan komplisere tolkning av MS-spektrene. Dette skyldes at de har samme bindingsmønstre som for eksempel xyloglukaner og glukomannaner. For å fjerne stivelse fra rå-ekstraktene kunne man ha anvendt mammalske α -amylase fra svin. Dette er et bedre valg enn mikrobiologiske α -amylase, fordi denne kan inneholde andre enzymer som kan hydrolysere andre polysakkarider fra celleveggen.⁶⁶

6.2.3 Komplementfiksering

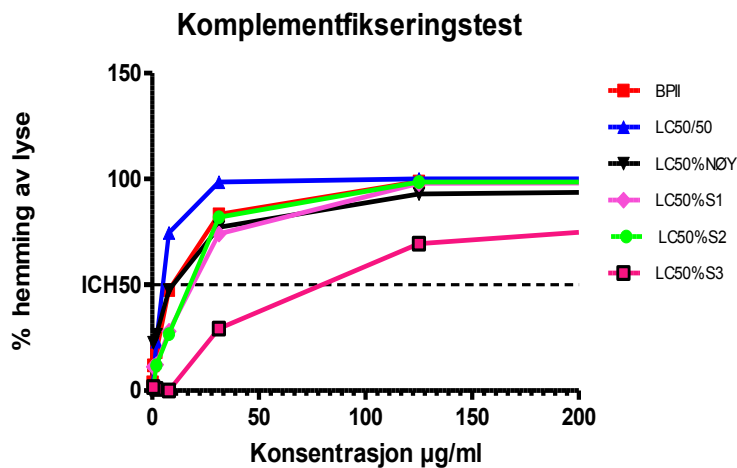
Komplementfikseringstesten ble benyttet for å undersøke om rå-ekstraktene og fraksjonene etter ionebytterkromatografi har biologisk aktivitet. Karbohydrater i testsubstansene kan påvirke komplementfaktorene, noe som resulterer i en nedgang av hemolyse av sensibiliserte erythrocytter fra sau (SRBC). Aktiviteten måles i prosentvis hemming av hemolyse, som er en viktig parameter for testen. ICH_{50} – verdien er den konsentrasjonen av en prøve som gir 50 % hemming av hemolyse.⁶¹ Denne verdien bør ses i sammenheng med standarden BPII. Grunnen til dette er at faktorene i det biologiske systemet kan variere fra dag til dag. Testen skiller ikke mellom komplementaktivering- eller hemming, da begge vil føre til redusert hemolyse. *Biophytum petersianum* (BPII) ble brukt som positiv kontroll i analysen. BPII har vist seg å ha høy aktivitet på komplementsystemet, og vanligvis viser ICH_{50} -verdien mellom 10-20 $\mu\text{g/ml}$.⁶⁷

Rå-ekstraktene og fraksjonene etter ionebytterkromatografi ble sammenlignet og undersøkt for å finne deres biologiske aktivitet i komplementsystemet. Resultatene på de ulike ekstraktene og fraksjonene er vist i figurer 6-7, 6-8 og 6-9

Ut i fra resultatene presentert i figur 6-7 og tabell 6-7 viser rå-ekstraktet LC50/50 en høyere komplementfikserende aktivitet enn fraksjonene etter separasjon ved ionebytterkromatografi. Den høye aktiviteten i rå-ekstraktet kan skyldes at andre komponenter har interferert med testen. Vi kan derfor ikke si med sikkerhet at det positive resultatet kommer fra polysakkaridene, men at det kan komme av at andre komponenter som er tilstede i planten er aktive, er det fortsatt interessant for helheten. Komponenter som for eksempel tanniner⁶⁸, fenoliske forbindelser, og andre forbindelser som er løselig i etanol kan bidra til å påvirke analysen. I tillegg til dette kan prøver med sterke farger interferere med testen, siden graden av hemolyse på erythrocytter blir målt på et spektrometer. Derfor ble absorbans i prøver som var sterkt fargede trukket fra i testen, noe som sikrer at dette elementet ikke vil påvirke resultatet. Dette ble utført ved å teste den fargede prøven i to separate rader på en mikrotiterplate, hvor den ene raden deretter tilsettes veronalbuffer istedenfor komplement-serum. Absorbansen fra den fargede prøven uten komplement-serum kan dermed bli trukket fra den prøven med serum i. På den måten vil ikke fargen på prøven ha noen innvirkning på graden av hemolysen.

Man kan også tenke seg at den høye aktiviteten skyldes samspillet mellom fraksjonene, siden rå-ekstraktet tross alt består av sure og nøytrale polysakkarider. Om den biologiske aktiviteten skyldes samspillet mellom fraksjonene eller om det finnes andre komponenter som har påvirket analysen er usikkert. Det kreves flere studier på planten hvis man skal avklare disse hypotesene. Det kunne ha vært interessant å undersøke mengden av tanniner i prøvene, og om disse kan interferere med komplementsystemet. I tidligere studier har DMT vist at planten *Lippia chevalieri* inneholder kondenserte tanniner.³³

Ut i fra resultatene og figur 6-7 kan vi tydelig se at testsubstansene har generelt høy komplementfikserende aktivitet, bortsett fra LC50%S3. Den lavere biologiske aktiviteten kan skyldes at fraksjonen stort sett består av Glc, en del GalA og spor av Rha. Dette kan indikere at strukturen i fraksjonen består av homogalakturonaner som utgjør stammen i pektiner. Vi ser altså et fravær av Gal, Ara og Xyl som er en del av "hairy region". LC50%NØY viste seg å være "dobbelt" så aktiv i forhold til de sure fraksjonene. Dette kunne vært svært interessant å undersøke videre, men på grunn av lite utbytte ble ikke strukturoppklaringen og monosakkaridsammensettingen studert.



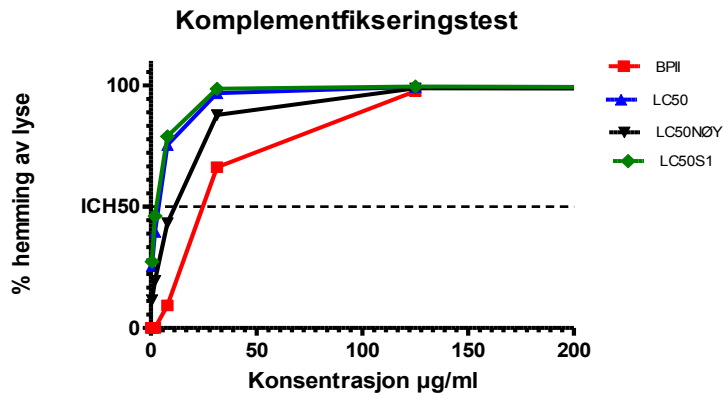
Figur 6-7 Komplementfikserende aktivitet av LC50/50 og dets fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi. Stiplet linje viser 50 % hemming av hemolyse

<i>Lippia chevalieri</i>	LC50/50	LC50%NØY	LC50%S1	LC50%S2	LC50%S3	BPII
ICH ₅₀ (µg/ml)	4,8	9,6	19,0	17,6	79,1	9,4

Tabell 6-7 ICH₅₀-verdier for LC50/50 og fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi

Figur 6-8 og tabell 6-8 viser resultater av komplementfikseringstesten på LC50 og isolerte fraksjoner etter ionebytterkromatografi. I dette vandige ekstraktet viser LC50NØY en lavere komplementfikserende aktivitet enn den sure fraksjonen og rå-ekstraktet. Igjen kan den høye aktiviteten som vises for rå-ekstraktet diskuteres, og noen faktorer som ble nevnt i forrige avsnitt kan tenkes å være årsaken til den høye aktiviteten. Rå-ekstraktet og LC50S1 har vist en høyere aktivitet enn BPII. LC50S1 inneholder områder med RGI som har vist seg å aktivere komplementsystemet.

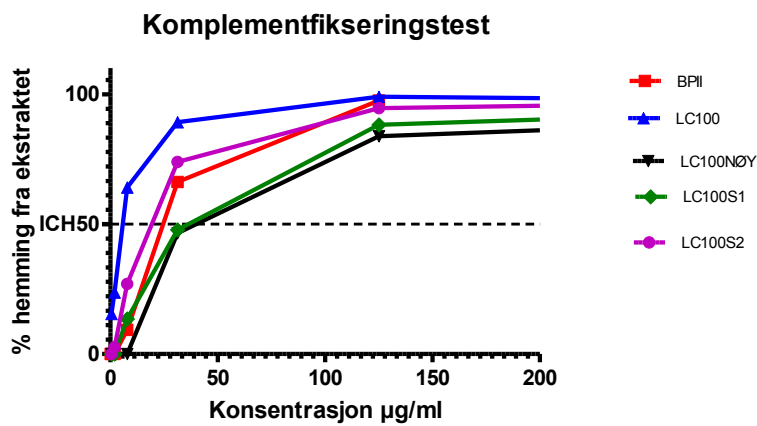
Figur 6-9 og tabell 6-9 viser resultatene for komplementfikseringstesten på LC100 og isolerte fraksjoner etter ionebytterkromatografi. I dette vandige ekstraktet viser LC100NØY en lavere komplementfikserende aktivitet enn de sure fraksjonene og rå-ekstraktet. Den høye aktiviteten som sees for rå-ekstraktet kan skyldes synergi-effekt mellom fraksjonene, og eventuelt også andre mulige faktorer som jeg har nevnt tidligere. Generelt sett har dette vandige ekstraktet og dets fraksjoner høy komplementfikserende aktivitet.



Figur 6-8 Komplementfikserende aktivitet for LC50 og dets fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi. Stiplet linje viser 50 % hemming av hemolyse

<i>Lippia chevalieri</i>	LC50	LC50NØY	LC50S1	BPII
ICH ₅₀ (µg/ml)	3,6	11,2	2,6	24,0

Tabell 6-8 ICH₅₀-verdier for LC50 og fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi



Figur 6-9 Komplementfikserende aktivitet for LC100 og dets fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi. Stiplet linje viser 50 % hemming av hemolyse

<i>Lippia chevalieri</i>	LC100	LC100NØY	LC100S1	LC100S2	BPII
ICH ₅₀ (µg/ml)	5,6	39	35	19,3	24,5

Tabell 6-9 ICH₅₀-verdier for LC100 og fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi

6.3 Struktur- og aktivitetsforhold- *Cassia occidentalis*

6.3.1 Karbohydratanalyse

<i>Cassia occidentalis</i>	CO50/50	CO50	CO50S1	CO50S2	CO100	CO100S1
Ara	20,6	17,9	28,7	12,3	11,6	6,1
Rha	1,6	8,6	spor	8,0	5,5	7,3
Fuc	spor	spor	spor	2,6	spor	0,2
Xvl	1,5	spor	spor	spor	0,6	-
Man	spor	spor	1,2	spor	1,7	-
Gal	27,2	31,6	44,6	24,3	21,5	11,1
Glc	21,9	5,5	1,6	2,0	5,6	1,3
GlcA	spor	spor	spor	spor	spor	spor
GalA	23,0	30,9	20,6	48,0	49,8	71,2
4-O-Me-GlcA	1,4	3,4	2,0	1,9	2,5	2,1

Tabell 6-10 Karbohydratsammensetning før og etter ionebytterkromatografi av *Cassia Occidentalis* 50 % etanol i H₂O og vannekstrakter ved 50° C og 100° C

Rå-ekstraktene og alle fraksjonene inneholder Ara, Gal, Rha og GalA, som er karakteriske for pektiner. Kun spormengder av Rha ble imidlertid påvist i CO50/50 og CO50S1, men det var en høy andel av Gal og Ara i CO50S1 enn i CO50. Det kan derfor tyde på at denne fraksjonen inneholder arabinogalaktaner, og/eller arabinaner. GalA ble observert i alle prøvene, men i større grad i CO50S2, CO100 og CO100S1. Dette indikerer at fraksjonene inneholder homogalakturonan som også er kjent som stammen av pektinene eller “smooth region”. Rhamnose ble også observert i de sure fraksjonene, noe som kan tyde på at de inneholder rhamnogalakturonaner. Små mengder av 4-OMe-GlcA ble også observert og identifisert i alle

prøvene.

Sammenligningen mellom CO50/50 og de sure fraksjonene var ikke gjennomførbar. Dette kan skyldes at polysakkarider i ekstraktet ikke ble eluert ut av ionebytter-kolonnen (metode 5.2.2). Men hva som egentlig ligger til grunn for dette er fortsatt ukjent. Man kan anta at stoffet ble sittende fast på kolonnen, og det samme problemet har også blitt observert for de andre rå-ekstraktene gjort med samme type ekstraksjonsmiddel. Dette kan skyldes prøvenes struktur, eller ha sammenheng med hvordan de sure polysakkaridene er bundet til hverandre. Komponenter med den sterke fargen på ekstraktet kan også ha påvirket polysakkaridene slik at de ikke lot seg eluere ut av kolonnen.

6.3.2 Bindingsforhold

Bindingsforholdene mellom monosakkaridene i fraksjonene (CO50S2 og CO100S1) isolert etter ionebytterkromatografi ble bestemt etter karboksylsyre-reduksjon, påfulgt av metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og tilslutt GC-MS analyse. Valget av hvilke sure fraksjoner som skulle brukes til å undersøke bindingsforholdene med, ble bestemt ut i fra utbyttet på disse fraksjonene etter ionebytterkromatografi.

Monosakkarid og deres bindingstyper		CO50S2	CO100S1
Ara	<i>Terminal_f</i>	8,9	3,5
	<i>1,2_f</i>	1,1	0,3
	<i>1,3_f</i>	2,3	0,8
	<i>1,5_f</i>	n.d.	1,4
Rha	<i>Terminal</i>	1,6	2,4
	<i>1,2</i>	6,2	4,2
	<i>1,3</i>	0,2	0,7
Xyl	<i>1,4</i>	n.d.	Spor
Fuc	<i>Terminal</i>	2,6	n.d
Glc	<i>1,4</i>	2	n.d
GlcA	<i>Terminal</i>	0,3	0,5
	<i>1,4</i>	spor	n.d.
Gal	<i>Terminal_p</i>	1,5	1,9
	<i>Terminal_f</i>	0,3	n.d
	<i>1,3</i>	3,7	1,4
	<i>1,6</i>	2,5	1,1
	<i>1,2,4</i>	0,6	1
	<i>1,3,6</i>	15,7	5,7
GalA	<i>Terminal</i>	4,4	1,4
	<i>1,4</i>	40,4	66,3
	<i>1,2,4</i>	1,3	0,9
	<i>1,3,4</i>	2	2,5

Tabell 6-11 Prosentvis (mol %) fordeling av de forskjellige monosakkaridene og bindingstypene i CO50S2 og CO100S1. n.d står for ikke detektert

Begge fraksjonene inneholder store mengder 1,4 GalA (40,4 %, 66,3 %), noe som indikerer at strukturen har betydelige områder med “smooth region”, som er sammensatt av homogalakturonan i pektinmolekylet. RGII er sammensatt av 1,4 GalA og 1,3,4 GalA, hvor terminal Ara og Rha, 1,2 Rha og 1,3 Rha kan være bundet i forgreningspunktene.⁷ Med utgangspunkt i resultatene fra tabell 6-11 kan vi anta at CO50S2 og CO100S1 har enkelte områder i pektinstrukturen som består av RG-II.

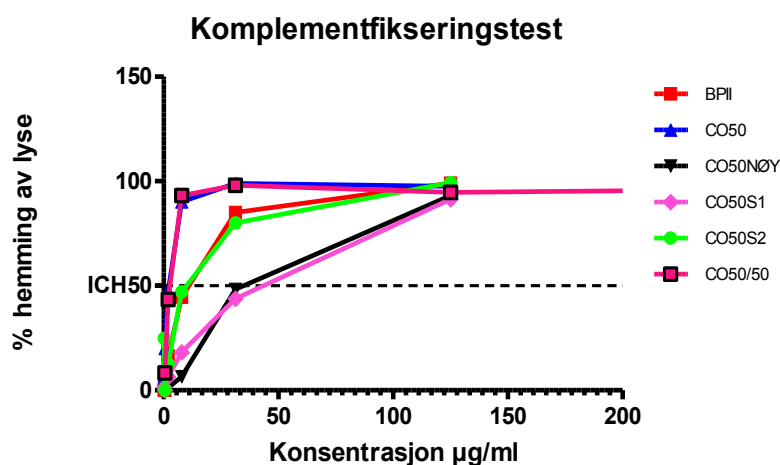
RG I ble observert, og den består vekselvis av 1,4 GalA og 1,2 Rha-enheter, men har også noen områder med 1,2,4 og 1,3,4 Rha enheter. Ut i fra resultatene inneholder begge

fraksjonene av 1,2 Rha (6,2 % og 4,2 %), noe som indikerer at disse fraksjonene har områder med RGI i strukturen. Hverken 1,2, 4- eller 1,3,4 Rha ble detektert i prøvene.

CO50S2 har en større prosentandel av arabinose (12,3 %), enn CO100S1 som bare inneholder halvparten så mye. 1,5 Ara hovedkjeden i arabinaner ble ikke detektert i CO50S2. Ellers består fraksjonene av en varierende grad av 1,3 Gal, 1,6 Gal, 1,3,6 Gal og terminal Ara, noe som tyder på at fraksjonene inneholder AGII. 1,4 Gal og 1,3,4 Gal ble ikke detektert i fraksjonene, noe som tyder på at fraksjonene ikke inneholder AGI.

6.3.3 Komplementfiksering

Rå-ekstraktene og fraksjonene ble undersøkt for sin komplement-fikserende aktivitet. Målet var å kunne sammenligne rå-ekstraktene og fraksjonene etter ionebytterkromatografi. Dette gjør at det er mulig å kartlegge om det er andre stoffer enn polysakkarider som kan ha påvirket den biologiske aktiviteten til de respektive rå-ekstraktene. Man ville også kunne se om fraksjonene eventuelt kunne ha en forsterkende effekt på den biologiske aktiviteten.

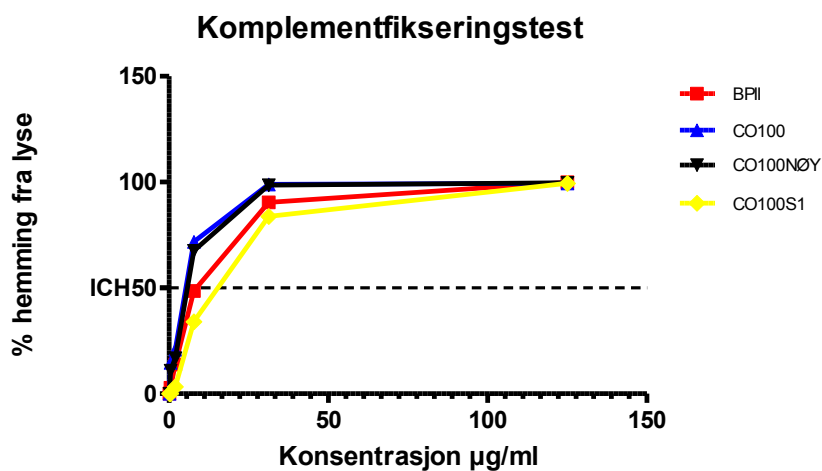


Figur 6-10 Komplementfikserende aktivitet på CO50/50 og CO50 og dets fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi. Stiplet linje viser 50 % hemming av hemolyse

<i>Cassia occidentalis</i>	CO50	CO50NØY	CO50S1	CO50S2	CO50/50	BPII
ICH ₅₀ (µg/ml)	2,2	34,3	42,7	9,7	2,6	10,9

Tabell 6-12 ICH₅₀-verdier for CO50/50 og CO50 og fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi.

Ut i fra resultatene på figur 6-10 og tabell 6-12 ser vi at testsubstansene har en generelt høy komplementfikserende aktivitet, og at rå-ekstraktenes høye aktivitet i forhold til fraksjonene er gjentakende. Som nevnt tidligere kan denne høye aktiviteten skyldes mange faktorer, og om det skyldes andre aktive komponenter som ikke er pektiner eller om det er synergi-effekter kan diskuteres. CO50NØY og CO50S1 er de minst potente i analysen med ICH₅₀-verdier på 34,3 µg/ml og 42,7 µg/ml. Dette kan være på grunn av at CO50S1 inneholder spor av Rha som er en viktig del av RGI som har vist seg å være viktig for den biologiske aktiviteten. CO50, CO50S2 og CO50/50 viste seg å være mer aktiv enn standarden. I tillegg til Rha og GalA inneholdt disse prøvene Ara og Gal. Sammenligningen mellom CO50 og CO50/50 var svært utfordrende i dette tilfellet, da det ikke ble utført komplementfikseringstest av de sure fraksjoner fra CO50/50. Når vi ikke kjenner til graden av lyse på de sure og nøytrale fraksjonene, kan vi ikke sammenligne ekstraktenes biologisk aktivitet. Men ut i fra de tilgjengelige ICH₅₀-verdiene var begge to veldig aktive med en verdi på henholdsvis 2,2 µg/ml og 2,6 µg/ml.



Figur 6-11 Komplementfikserende aktivitet på CO100 og dets fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi. Stiplet linje viser 50 % hemming av hemolyse

<i>Cassia occidentalis</i>	CO100	CO100NØY	CO100S1	BPII
ICH ₅₀ (µg/ml)	5,2	5,7	15,3	8,3

Tabell 6-13 ICH₅₀-verdier for CO100 og fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi

Figur 6-11 og tabell 6-13 viser resultatene på komplementfikseringstesten på CO100 og dets fraksjoner etter ionebytterkromatografi. I dette vandige ekstraktet viser CO100S1 en lavere komplementfikserende aktivitet i forhold til CO100NØY og BPII. Polysakkarider med biologisk aktivitet er ofte sure og de har negativ ladning. Et eksempel på dette er polymere med uronsyrer som D-galakturonsyre i pektinet⁷, men i dette tilfellet ser det ut til å være motsatt, fordi CO100NØY har en lavere ICH₅₀-verdi enn antatt. Det hadde vært interessant å kunne undersøke hvilke type sukkerenheter CO100NØY består av, men på grunn mangel på stoff lot ikke dette seg gjøre.

6.4 Struktur- og aktivitetsforhold- *Spilanthus oleracea*

6.4.1 Karbohydratanalyse

<i>Spilanthus oleracea</i>	SO50/50	SO50	SO50S1	SO50S2	SO100	SO100S1
Ara	33,1	13,6	40,9	3,4	4	1,1
Rha	2,5	3,1	spor	4,0	2,3	1,8
Fuc	1,1	1,1	1,3	-	spor	spor
Xyl	1,2	1,4	6,2	spor	0,7	spor
Man	3,0	1,3	2,4	-	-	-
Gal	26,9	10,9	24,7	4,4	5	2,5
Glc	15,5	6,2	4,4	1,7	3,3	spor
GlcA	1,5	spor	spor	spor	0,3	spor
GalA	12,6	59,9	15,4	84,6	83,4	92,7
4-O-Me-GlcA	2,5	1,5	3,1	spor	0,8	spor

Tabell 6-14 Karbohydratsammensetning før og etter ionebytterkromatografi av *Spilanthus oleracea* 50 % etanol i H₂O og vannekstrakter ved 50° C og 100° C

Generelt sett inneholder rå-ekstraktene og fraksjonene av Ara, Rha, GalA, og Gal, samt Glc i rå-ekstraktene. Andelen av de ulike monosakkaridene varierer fra prøve til prøve. SO50, SO100, SO50S2 og SO100S1 består hovedsakelig av GalA, men har mindre innhold av andre monosakkarider som Ara, Rha og Gal. Arabinose og galaktose forekommer begge i arabinogalaktaner. Det er forholdsvis store mengder av dem i SO50/50 og SO50S1. Det ble

også observert en mindre forekomst av xylose i noen av prøvene. Monosakkaridet kan forekomme i strukturenheter som xylogalakturonaner, xyloglukaner og xylaner. Alle prøvene inneholdt lite 4-OMe-GlcA og GlcA.

Monosakkarid og deres bindingstyper		SO50S2	SO100S1
Ara	<i>Terminal</i> _f	2,2	1,1
	1,5 _f	1,2	n.d.
Rha	<i>Terminal</i>	1	1,4
	1,2	3	0,2
	1,3	n.d.	0,2
Fuc	<i>Terminal</i>	n.d.	0,1
Glu	<i>Terminal</i>	0,6	0,2
	1,4	1,1	0,6
Gal	<i>Terminal</i> _p	0,8	0,7
	1,3	spor	0,2
	1,6	1	n.d.
	1,2,4	n.d.	1
	1,3,6	2,6	0,5
GalA	<i>Terminal</i>	2,7	1,4
	1,4	77,2	89,1
	1,2,4	3,6	0,7
	1,3,4	1,2	1,4

Tabell 6-15 Prosentvis (mol %) fordeling av de forskjellige monosakkaridene og bindingstypene av SO50S2 og SO100S1. n.d står for ikke detektert

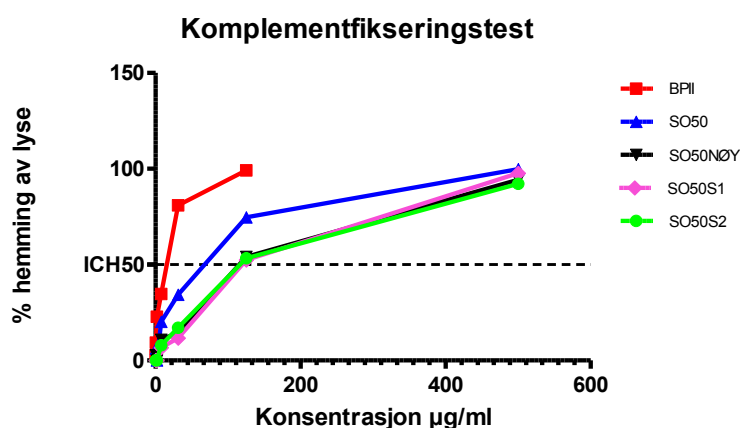
Ut i fra tabell 6-15 kan man se at SO50S2 og SO100 inneholder betydelig mindre sukkerenheter enn de andre plantene som er nevnt tidligere. Fellestrekket til disse to fraksjonene er at de hovedsakelig består av 1,4 GalA- enheter, som representerer hovedstammen til pektinet. RGII kan også antas til å være tilstede i begge fraksjonene, da 1,3,4- og 1,4 GalA, terminal Ara, Rha, 1,2 Rha og 1,3 Rha også ble observert. 1,3 Rha ble derimot ikke detektert i SO50S2. Begge prøvene inneholdt 1,4 GalA og 1,2 Rha-enheter

(ekstremt lite i SO100S1), noe som indikerer forekomst av RGI.

Fraksjonene inneholder en liten andel 1,3 Gal, 1,3,6 Gal, i tillegg til terminal Ara.

Forekomsten av disse bindingene i fraksjonene peker mot at AGII finnes i små mengder i fraksjonene.

6.4.2 Komplementfiksering



Figur 6-12 Komplementfikserende aktivitet på SO50 og dets fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi. Stiplet linje viser 50 % hemming av hemolyse

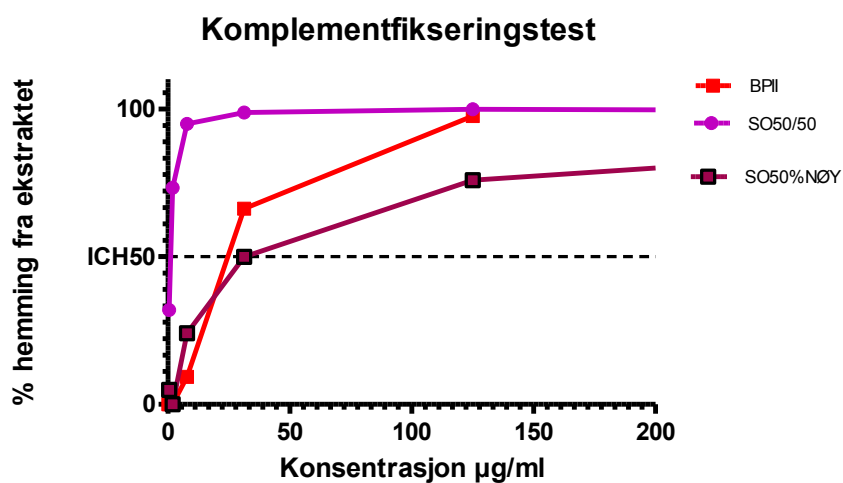
<i>Spilanthes oleracea</i>	SO50	SO50NØY	SO50S1	SO50S2	BPII
ICH ₅₀ (µg/ml)	67,2	115,0	119,0	116,0	15,6

Tabell 6-16 ICH₅₀-verdier for SO50 og fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi

Figur 6-12 og tabell 6-16 viser resultater for komplementfikseringstesten på SO50 og dets fraksjoner etter ionebytterkromatografi. Generelt sett har BPII en høyere biologisk aktivitet enn prøvene fra *Spilanthes oleracea*. Sure og nøytrale fraksjoner hadde omtrent lik ICH₅₀-verdi, og igjen hadde rå-ekstraktet høyest aktivitet.

Sure fraksjoner av SO50/50 ble ikke opparbeidet. Årsaken til dette er nok at de sure polysakkaridene ikke lot seg eluere ut av ionebytter-kolonnen slik tidligere nevnt. Både rå-ekstraktet og fraksjonen av nøytrale polysakkarider hadde høy komplement-fikserende

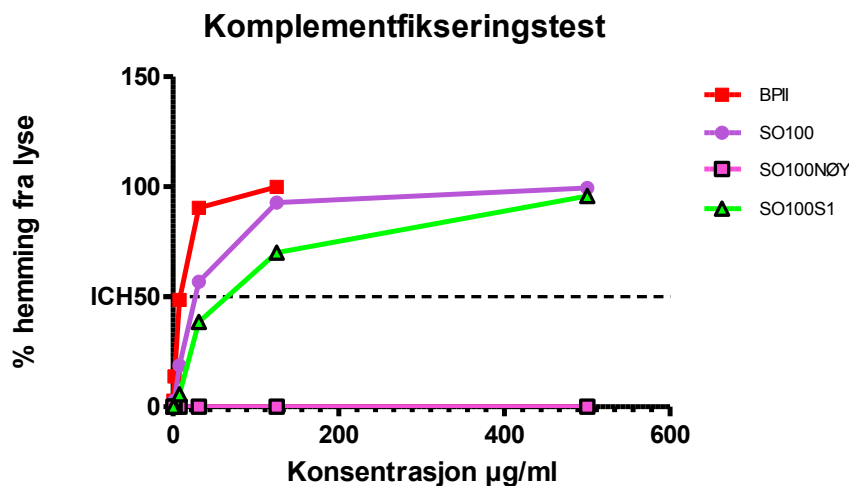
aktivitet. Men SO50/50 skiller seg ut med en ICH₅₀- verdi på 1,1 µg/ml. 30 ganger mer potent enn SO50%NØY (se figur 6-13 og tabell 6-17). GC-resultatet viser at SO50/50 i hovedsak består av Ara og Gal, og vi kan anta at det er disse monosakkaridene som skaper den biologiske aktiviteten. Igjen kan også andre faktorer, som for eksempel tanniner være med å interferere analysen.



Figur 6-13 Komplementfikserende aktivitet på SO50/50 og SO50%NØY. Stiplet linje viser 50 % hemming av hemolyse

<i>Spilanthes oleracea</i>	SO50/50	SO%NØY	BPII
ICH ₅₀ (µg/ml)	1,1	31,9	24,0

Tabell 6-17 ICH₅₀-verdier for SO50/50 og fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi



Figur 6-14 Komplementfikserende aktivitet på SO100 og dets fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi. Stiplet linje viser 50 % hemming av hemolyse

<i>Spilanthes oleracea</i>	SO100	SO100NØY	SO100S1	BPII
ICH ₅₀ (µg/ml)	26,7	Ingen aktivitet	67,6	8,3

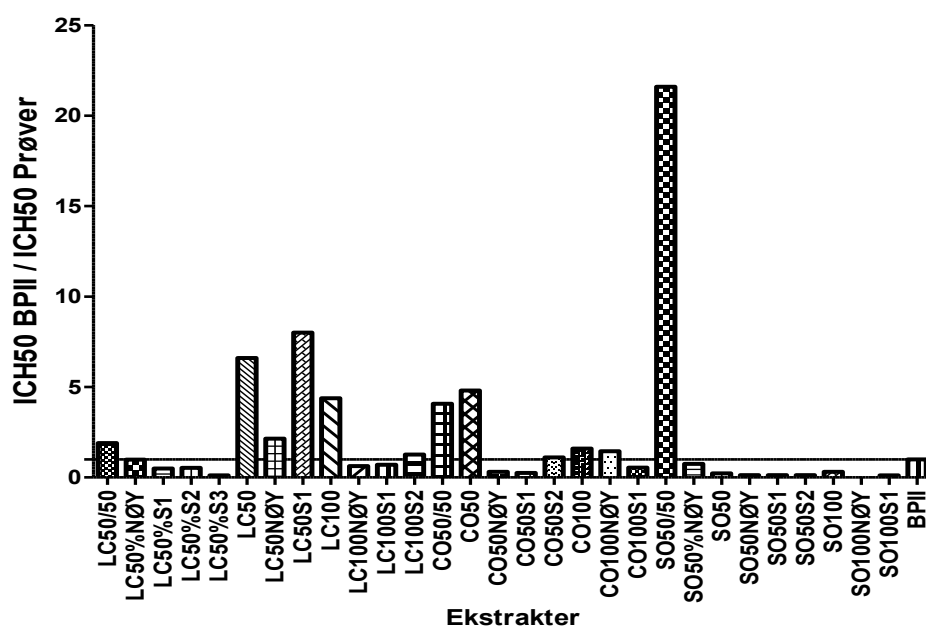
Tabell 6-18 ICH₅₀-verdier for SO100 og fraksjoner isolert etter ionebytterkromatografi

Ut i fra resultatene på figur 6-14 kan vi tydelig se at SO100S1 har mye lavere komplementfikserende aktivitet enn SO100. Den sure fraksjonen har en større andel av GalA som er en viktig bestanddel av stammen til pektiner. Andelen av Ara, Gal, Rha som er viktige bestanddeler av “hairy region”, ble betydelig redusert etter ionebytterkromatografi. SO100NØY viste ingen aktivitet på komplement-testen.

6.5 Sammenligningen av komplementfikseringstest mellom plantene

Ekstraktene fra de ulike plantene ble sammenlignet, noe som bidro til å gi et bedre bilde av hvilke ekstraktene som hadde den høyeste komplementfikserende aktivitet. Med tanke på at resultatene måtte sees i forhold til BPII, og at aktiviteten til BPII varierer fra måling til

måling, måtte BPII tas i betraktning ved å beregne $ICH_{50}BPII$ dividert med ICH_{50} prøvene. Disse forholdstallene ble sammenlignet med BPII, som ble satt til 1. Søylene som er over 1 i figur 6-15 indikerer en høyere aktivitet enn BPII.



Figur 6-15 Forholdet mellom ICH_{50} BPII og ICH_{50} prøver for alle ekstraktene fra de ulike plantene.

Spilanthes oleracea prøvene er, til tross for at det tidligere er påvist høy antimalariske effekt i *in vitro* studier, minst biologisk aktive, men SO50/50 skiller seg ut som veldig aktiv. Men det trenger ikke å bety at det er en sammenheng mellom schizonticidal-aktivitet og stimulering i det humane immunsystemet.

Generelt sett har rå-ekstraktene en høyere komplementfikserende aktivitet enn fraksjonene, unntatt LC50S1 som er mest potent av alle de sure fraksjonene. Den høye aktiviteten kan som nevnt skyldes at prøven inneholder andre komponenter som kan ha interferert med testen. De sure fraksjonene LC50S1, CO50S2, LC100S2 viste en høyere biologisk aktivitet enn standarden. Ut fra figuren 6-15 kan man sammenligne aktiviteten mellom LC50 og SO50/50, en sammenligning som viser at SO50/50 har høyere aktivitet enn LC50. På de nøytrale fraksjonene ser vi motsatt resultat.

7 KONKLUSJON

Målet i denne oppgaven var å utføre struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider isolert fra de maliske plantene *Lippia chevalieri*, *Cassia occidentalis* og *Spilanthes oleracea*, planter som også inngår i det registrerte preparatet Malarial. Polysakkaridene fra medisinsplanter skulle først isoleres, og deretter undersøkes for karbohydratinnhold, struktur og biologisk aktivitet.

Rå-ekstraktene fra medisinsplanter ble opprenset ved ionebytterkromatografi med ANX Sepharose 4 Fast Flow. Rå-ekstraktene og de ulike fraksjonene ble deretter testet for deres komplementfikserende aktivitet. En sammenligning mellom plantene ble så utført. Generelt sett viste det seg at rå-ekstraktene hadde en bedre biologisk aktivitet enn den positive standarden (BPII) og de isolerte fraksjonene, men om disse positive resultatene skyldes polysakkarider er foreløpig ukjent. Før man kan trekke en endelig konklusjon kreves det flere tester og undersøkelser for å undersøke om andre komponenter i ekstraktene kan ha hatt innvirkning på testen. Et eksempel på dette kan være tanniner, en organisk forbindelse som også er kjent for sin innvirkning på komplementfikseringstesten.

Medisinsplanten *Spilanthes oleracea* var den planten med lavest komplementfikserende aktivitet av fraksjonene, tillegg til rå-ekstraktene viste noen av de sure fraksjonene (LC50S1, LC100S2 og CO50S2) å ha en bedre biologisk aktivitet enn BPII. Det hadde vært interessant å teste disse medisinsplanter i andre bioassays, som igjen ville gitt et bedre bilde på den mulige biologiske aktiviteten skapt av plantene. Et eksempel på en bioassay man kunne ha utført er måling av NO-frigjøringen fra makrofager. Dette er en test som kartlegger om plantene kan ha innvirkning på stimuleringen av makrofagaktiviteten.

Karbohydratanalysene viste at ekstraktene inneholdt monosakkarider som er typiske for pektiner. Det ble blant annet observert at alle prøvene inneholdt betydelige mengder homogalakturonan som er sammensatt av 1,4 GalA enheter. En varierende mengde av RGI og AGII ble også observert i fraksjonene som ble testet. Rhamnogalakturonanene er sammensatt av 1,4 GalA, 1,2 og 1,2,4- bundet Rha i kjeden. AGII består hovedsakelig av en hovedkjede med 1,3- bundet Gal, som er forgrenet både til Ara₇ og andre substituenten ved C6. 1,2-, 1,3- og 1,5 Ara ble i varierende grad detektert i plantene, noe som indikerer at disse arabinanstrukturene er bundet som sidekjeder på arabinogalaktanene. Med utgangspunkt i

disse strukturenheterne kan man konkludere med at prøvene inneholder lite “hairy regions”, ettersom prosentandelen til de respektive monosakkaridene varierer fra prøve til prøve. 1,4 Gal ble ikke detektert i noen av test-fraksjonene, noe som forteller oss at disse ikke inneholder AGI. Undersøkelsen på bindingsforholdene påviste at fraksjonene fra *Spilanthes oleracea* og LC50%S3 fra *Lippia chevalieri* hadde den minst varierende graden av bindingstyper for de ulike monosakkaridene. De er altså minst biologisk aktive av i forhold til de andre ekstraktene som ble testet.

Jeg vil avslutningsvis nevne at diverse problemer som oppstod underveis i masteroppgaven må tas i betraktning i den konkluderende fasen, problemer som enkelte steder gjør det vanskelig å trekke endelige slutninger. Et eksempel på dette er at rå-ekstrakter av 50 % etanol i vann ikke lot seg eluere ut av ionebrytter-kolonnen, og dermed ikke lot seg opprense, noe som igjen resulterte i at sammenligningen mellom plantene ikke ble fullstendig. Problemet ble riktignok forsøkt rettet gjennom anvendelse av chelaterende middel, men det var ingen tegn til forbedring. Det er i etterkant vanskelig å si hva som kunne vært gjort annerledes, men det er uansett viktig å ha dette i bakhodet når vi ser på resultatene fra prøvene.

Jeg vil også skyte inn at noen av de nøytrale fraksjonene hadde en betydelig bedre aktivitet enn de sure, og hvis jeg hadde mer tid, ville deres monosakkaridsammensetninger og bindingsforhold bli undersøkt nærmere. Dette kunne gitt en bedre forståelse for den komplementfikserende aktiviteten.

8 REAGENSLISTE

1-metylimidazol	Fluka
1-oktanol	Merck
Ammoniakk (NH ₃)	Prolabo
Antistoff (Virion 9020 amboceptor)	Fra kanin
Bovint serum albumin	Sigma
<i>Biophytum petersianum</i> , BPII	
Carbodiimide	Aldrich
Diklormetan (CH ₂ Cl ₂)	Fluka Chemie GmbH
Diatomaceous Earth	Thermo scientific
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck
Eddiksyre (CH ₃ COOH)	AnalaR®
Eddiksyreanhydrid	Merck
Etanol (CH ₃ CH ₂ OH)	Sigma-Aldrich Norway AS
Fenol	Merck
Fosfat bufret Salin (PBS)	Sigma®
Iseddik	Merck
Kloroform (CHCl ₃)	Prolabo
Komplement Serum	Fra ECG (humant)
Konsentrert saltsyre (HCl)	Merck

Konsentrert svovelsyre (H ₂ SO ₄)	Merck
Mannitol (1 µg/µl i 1M HCl i metanol)	
MES (2-[N-morpholino]etan svovelsyre)	Sigma
Metanol (CH ₃ OH)	Chemi-Technik AS
Metyljodid (CH ₃ I)	Fluka
Natriumacetat	Chemi-teknik as (Prolabo)
Natriumazid (NaN ₃)	Merck
Natriumbordeuterid (NaBD ₄)	ISOTEC
Natriumhydroksid (NaOH)	Chemi-teknik AS
Natriumklorid (NaCl)	Chemi-teknik AS/ Analytical Reagent
Natruimthiosulfat-5-hydrat	Merck
Pyridin	Merck
Blod fra sau 7001, tappet 31.08.2012 og sau 10010, tappet 23.10.2013	
Sølvnitrat (AgNO ₃)	Merck
TMS-reagens	
Toluen	Prolabo
Trifluoreddiksyre (TFA) (CF ₃ COOH)	Pierce, PERBIO
TRIZMA (tris[hydroksymetyl]aminometan)	Sigma

9 REFERANSER

- ¹ Cui, Steve W., (2005), "*Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties, and Applications*", CRC Press Taylor & Francis Group, s 1-51
- ² Taiz, L., Zeiger, E., (2002), "*Plant Physiology*", Cell Walls: Structure, Biogenesis, and Expansion, 3. utgave, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, s 313-338
- ³ Molecular Expressions™ Cell Biology and Microscopy Structure and Function of Cells & Viruses (2005) "*Plant cell wall*" URL: <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>, aksessert 26.4.2013
- ⁴ Samuelsson, G., (1999), "*Drugs of Natural Origin*", Carbohydrates, Kristianstads Boktryckeri AB, Kristianstad, Sweden, s114-115
- ⁵ London South Bank University (2012), "*Cellulose*", URL: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hycel.html>, aksessert 26.4.2013
- ⁶ Scheller, H.V., Ulvskov, P., (2010), "*Hemicelluloses*", Annuals Reviews Plant Biology **61**, 263-289
- ⁷ Paulsen, B.S., Barsett, H., (2005), "*Polysaccharides I, Structure, Characterization and Use*", Bioactive Pectic Polysaccharides, Springer Verlag Berlin Heidelberg
- ⁸ Pérez, S., Rodriguez-Carvajal, M.A., Doco, T., (2003), "*A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function.*" Biochimie **85**, 109-121
- ⁹ Vidal, S., Doco. T., Williams, P., Pellerin, P., York, W.S., O'Neill, M.A., Glushka, J., Darvill, A.G., Albersheim, P., (2000), "Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain" Carbohydrate Research **326**, 277-294
- ¹⁰ Schols, H.A., Voragen, A.G.J., (2002), "Pectins and their Manipulation", The chemical structure of pectins, Blackwell Publishing, CRC press, Oxford, s 10

- ¹¹ Yamada, H., Kiyohara, H., (2007), “*Immunomodulating Activity of Plant Polysaccharide Structures*” *Comprehensive Glycoscience: from Chemistry to Systems Biology*, Elsevier Ltd. **4**, 670-671
- ¹² Parham, P., (2009), “*The immune system*”, 3. utgave, Garland Science, Taylor & Francis Group, London, s 33-42
- ¹³ Lea, T., (2000), “*Basal og klinisk immunologi-prinsipper for molekylære mekanismer*”, Løselige molekyler og naturlig immunitet, Fagbokforlaget, Vigmostad & Bjørke AS, Bergen, s 25-38
- ¹⁴ Folkehelseinstitutt, (2013), “*Malaria*” (smittevernboka), URL: http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=239&trg=Content_6493&Main_6157=6287:0:25,5499&MainContent_6287=6493:0:25,6833&Content_6493=6441:82817::0:6446:77:::0:0, aksessert 15.4.2013
- ¹⁵ Myrvang B., (2000), “*Malaria i Norge – diagnostikk, behandling og profylakse*”, Tidsskrift for norske lægeforening, **120**, 1648-1652
- ¹⁶ National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, (2012), “*Malaria*” (Life cycle of the Malaria Parasite), URL: <http://www.niaid.nih.gov/topics/malaria/pages/lifecycle.aspx>, aksessert 15.4.2013
- ¹⁷ Merlin Willcox, M., Bodeker, G., Rasoanaivo P., Addae-Kyereme, J., (2004) “*Traditional medicinal plants and malaria*”, CRC Press LLC, s 3-10
- ¹⁸ World Health Organization, (2011), “*World Malaria Report 2011 FACT SHEET*”, URL: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/WMR2011_factsheet.pdf, aksessert 15.4.2013
- ¹⁹ World Health Organization, (2012), “*World Malaria Report 2012*”, (Executive summary and key points), URL: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_summary_and_keypoint.pdf, aksessert 15.4.2013
- ²⁰ World Health Organization, (2013), “*Overview of malaria treatment*”, URL: <http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/en/>, aksessert 11.4.2013

- ²¹Jebsen S., (2000) “*Malariavaksiner - hvilke vaksiner til hvem?*”, Tidsskrift for norske lægeforening **120**, 1665-1668
- ²²Achan, J., Talisuna, A.O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J.K., Baliraine, F.N., Rosenthal, P.J., D’Alessandro, U., (2011), “*Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria*”, Malaria Journal **10**:144, 1
- ²³Breman JG., (2011), “*The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden*”, Am J Trop Med Hyg, **64**, 1-11
- ²⁴World Health Organization, (1997), “Quality Assurance of Pharmaceuticals - A Compendium of Guidelines and Related Materials” Guidelines for the assessment of herbal medicines, Volume 1.
- ²⁵Willcox M., (2011), “*Improved traditional phytomedicines in current use for the clinical treatment of malaria*”, Planta Med, **77**, 662-671
- ²⁶Willcox, M, Sanogo R., Diakite C., Giani S., Paulsen, B.S., Diallo, D., (2012), “*Improved Traditional Medicines in Mali*”, J Altern Complement Med. March; **18** (3), 212–220.
- ²⁷Doumbia, S., (1997). “*Etude des plantes antipaludiques au Mali*”, Thèse Pharmacie, Bamako, Mali, 78.
- ²⁸Universitet i Oslo,(2012), “*Malaria!*”, URL: <http://www.mn.uio.no/farmasi/english/research/projects/maliplants/itm/malarial.html>, aksessert 11.4.2013
- ²⁹USDA (United States Department of Agriculture), (2013),“*Plants Profile- Senna occidentalis (L.) Link*”, URL: <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=SEOC2>, aksessert 12.4.2013
- ³⁰USDA (United States Department of Agriculture), (2013), “*Plants Profile- Spilanthes oleracea L*”, URL: <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=SPOL3>, aksessert 12.4.2013
- ³¹The Global Biodiversity Information Facility, “*Classification of Species: Lippia*

chevalierii Moldenke”,

URL:<http://data.gbif.org/species/browse/taxon/4085380?qs=Lippia%20chevalierii>, aksessert 12.4.2013

³² Grubben, G.J.H., Denton, O.A., (2004), “*Plant Resources of Tropical Africa: Vegetables*”, (PROTA 2), s 35

³³ Merlin Willcox, M., Bodeker, G., Rasoanaivo P., Addae-Kyereme, J., (2004), “*Traditional medicinal plants and malaria*”, CRC Press LLC, s 117-130

³⁴ BioNET-EAFRINET-Keys and Fact Sheets, (2011), “*Senna occidentalis (Coffee Senna)*”, URL:[http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Senna_occidentalis_\(Coffee_Senna\).htm](http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Senna_occidentalis_(Coffee_Senna).htm), aksessert 12.4.2013

³⁵ Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., Villar, A., (2001), “*Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review*”, *Journal of Ethnopharmacology* **76**, 201-214.

³⁶ Kerharo, J., Adam, J.G., (1974). “*La Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle: Plantes Medicinales et Toxiques*”, Vigot Frères, Paris.

³⁷ Fleurs d’Afrique tropicale et fleurs d’Europe, (2005), “*Lippia chevalieri Mold -Cirad*”, URL : http://fleurs.cirad.fr/fleurs_d_afrique_tropicale/l/lippia_chevalieri, aksessert 12.4.2013

³⁸ Fleurs d’Afrique tropicale et fleurs d’Europe, (2005), “*Cassia occidentalis -Cirad*”, URL : http://fleurs.cirad.fr/fleurs_d_afrique_tropicale/c/cassia_occidentalis, aksessert 12.4.2013

³⁹ AlsaGarden, (2013) “*Spilanthus oleracea "Cresson de Pará" Graines*”, URL : <http://www.alsagarden.com/en/53-spilanthus-oleracea-cresson-de-par%C3%A1-graines.html#sthash.Xohbtbli.dpbs>, aksessert 12.4.2013

⁴⁰ Tona, L., Mesia, K., Ngimbi, N.P., et al., (2001), “*In-vivo antimalarial activity of Cassia occidentalis, Morinda morindoides and Phyllanthus niruri*”, *Annals of tropical medicine and parasitology* **95**, 47-57.

⁴¹ Watt, J.M. and Breyer-Brandwijk, M., (1962), “*The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa*”, E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh.

- ⁴² Gasquet, M., Delmas, F., Timon-David, P., Keita, A., Guindo, M., Koita, N., Diallo, D., Duoumbo, O., (1993), “*Evaluation in vitro and in vivo of traditional antimalarial Malarial 5*”, *Filoterpia*, **64**, 423-426
- ⁴³ Koita, N. (1989). “*A Comparative Study of the Traditional Remedy “Suma-Kala” and Chloroquine as a Treatment for Malaria in Rural Area of Mali*”, Dissertation for M.Sc.CHDC, London School of Hygiene and Tropical Medicine, University of London.
- ⁴⁴ Koita, N. (1991). “*A comparative study of the traditional remedy “Suma-Kala” and chloroquine as a treatment for malaria in rural areas*”. In *Proceeding of an International Conference of Experts from Developing Countries on Traditional Medicinal Plants*, Arusha, Tanzania, February (1990)18-23, Mshigeni, K.E., Nkunya, M.H.H., Fupi, V., Mahunnah, R.L.A., and Mshiu, E., Eds. Dar Es Salaam University Press Tanzania.
- ⁴⁵ Doumbia, S. (1997). “*Etude des plantes antipaludiques au Mali*”, Thèse Pharmacie, Bamako, Mali, 78
- ⁴⁶ Spectrumlabs.com, (2013), “*Fundamentals of Membrane Dialysis*, URL: <http://www.spectrumlabs.com/dialysis/Fund.html>, aksessert 15.4.2013
- ⁴⁷ Aulton, M. E., (2007)“ *Aulton’s pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines*”, 3.utgave, Churchill Livingstone, Edinburgh, s 435-37
- ⁴⁸ Thermo Scientific Dionex, (2012) “*ASE 150 and 350 Systems*”, URL: http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4035-Bro-ASE-150-350-25May2012-BR70084_E.pdf, aksessert 15.4.2013
- ⁴⁹ Greibrokk, T., Lundanes, E., Rasmussen, K. E., (1998), “*Kromatografi: separasjon og deteksjon*”, 3. utgave, Universitetsforlaget, Oslo, s 225-226
- ⁵⁰ Amersham Biosciences, (2000), “*ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)*”, URL: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc18114225AA_20110830185138.pdf, aksessert 15.4.2013
- ⁵¹ Bio-Rad Laboratories, (2000), “*Chelex® 100 and Chelex 20Chelating Ion Exchange ResiInstruction Manual*”, URL: http://www.bio-rad.com/webmaster/pdfs/9184_Chelex.PDF, aksessert 15.4.2013

- ⁵² Amersham Pharmacia Biotech AB, (2000), “*AKTA FPLC-system manual*”, URL: <http://www.hhmi.umbc.edu/toolkit/aktadesign.pdf>, aksessert 17.4.2013
- ⁵³ Greibrokk, T., Lundanes, E., Rasmussen, K. E., (1998), “*Kromatografi: separasjon og deteksjon*”, 3. utgave, Universitetsforlaget, Oslo, s 80-100
- ⁵⁴ GE HealthcareLife Sciences, (2011), “*HiLoad™ Superdex™ 30 prep grade, HiLoad Superdex 75 prep grade, HiLoad Superdex 200 prep grade*”, URL: <http://www.gelifesciences.co.jp/catalog/pdf/18110052.pdf>, aksessert 17.4.2013
- ⁵⁵ Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., (1956), “*Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*”, Analytical Chemistry **28**, 350-356
- ⁵⁶ Chambers, R. E., Clamp, J., R., (1971), “*An Assessment of Methanolysis and Other Factors Used in the Analysis of Carbohydrate-Containing Materials*”, Biochemical Journal **125**, 1009-1018
- ⁵⁷ Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., (2004), “*Legemiddelanalyse*”, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS s 208-209
- ⁵⁸ Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., (2004), “*Legemiddelanalyse*”, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS s 192
- ⁵⁹ Kim, J-B., Carpita, N.C. (1992) “*Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of CellWall Polysaccharides During Elongation of Maize Coleoptiles*”, Plant physiology **98**, 646-653
- ⁶⁰ Ciucanu, I., Kerek, F., (1984), “*A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates*”, Carbohydrate research **131**, 209-217
- ⁶¹ Michaelsen, T. E., Gilje, A., Samuelsen, A. B., Høgåsen, K., Paulsen, B. S., (2000), “*Interaction Between Human Complement and a Pectin Type Polysaccharide Fraction, PMII, from the Leaves of Plantago major L.*”, Scandinavian Journal of Immunology **52**, 483-490
- ⁶² Glæserud, S., (2008), “*Immunmodulerende polysakkarider isolert fra en sårhelende plante fra Mali- Combretum glutinosum*”, Universitetet i Oslo

⁶³Meskini, S., (2011), “*Kjemisk og biologisk karakterisering av polysakkarider fra ville og kultiverte røtter fra Vernonia kotschyana, Etnofarmakologiske studier i Mali*”, Universitetet i Oslo

⁶³Bruneton, J., (1999), “*Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*”, Polysaccharides, 2.utgave, Lavoisier Publishing, Paris

⁶⁴Sweet, P. D., Shapiro, H. R., Albersheim, P., (1975), “*Quantitative analysis by various G.L.C response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates*”, Carbohydrate research, ©Elsevier Scientific Publishing Company, **40**, 217-225

⁶⁵ Berglind , P. (2007). “*A modified method for methylation analysis of lichen polysaccharides using formolysis*”. Abstract submission form, Nordic Natural Products Conference 2007, Island.

⁶⁶Pettolino, F. A., Walsh, C., Fincher, G. B., Bacic, A., (2012), “*Determining the polysaccharide composition of plant cell walls*”, Nature Protocols, **7**, 1590-1607

⁶⁷ Inngjerdingen, K.T., Coulibaly, A., Diallo, D., Michaelsen, T. E., Paulsen, B.S., (2006), “*A complement fixing polysaccharide from Biophytum petersianum Klotzsch, a medicinal plant from Mali, West Africa*”, Biomacromolecules **7**, 48–53.

⁶⁸ Wagner, H., Kraus, S., Jurcic, K., (1999), “*Search or potent immunostimulating agents from plants and other natural sources.*” In: Wagner, H. (Ed.), Immunomodulatory Agents rom Plants. Birkhäuser Verlag, Berlin, pp. 1–39.

⁶⁹ Yu, X., Houtman, C., Atalla, R.H., (1996), “*The Complex of Amylose and Iodine*”, Carbohydrate Research, **292**, 129-141

