

Polysakkarider med biologisk aktivitet isolert fra en tradisjonell medisinplante fra Mali

Fagara zanthoxyloides Lam.

Gunhild Hoås



Masteroppgave for graden Master i farmasi
Avdeling for farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelig fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2014

Polysakkarider med biologisk
aktivitet isolert fra en tradisjonell
medisinplante fra Mali

Fagara zanthoxyloides Lam.

Gunhild Hoås

Masteroppgave for graden Master i farmasi

Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Mai 2014

Veileder:

Professor Berit Smestad Paulsen

© Gunhild Hoås

2014

Polysakkarider med biologisk aktivitet isolert fra en tradisjonell medisiplante fra Mali.
Fagara zanthoxyloides Lam.

Gunhild Hoås

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Sammendrag

Fagara zanthoxyloides er en viktig medisinplante innenfor tradisjonell medisin i Vest-Afrika og Kamerun. Den brukes til daglig som tyggestilk av mange, særlig i Nigeria. Planten har en lang rekke andre bruksområder blant annet som anti-helmintikum, malaria inkludert. Malaria er en utbredt sykdom som rammer et stort antall mennesker i Mali og på verdensbasis hvert år. Ved stimulering av immunsystemet kan malaria-rammede føle seg bedre.

Polysakkarider har i mange studier vist en immunologisk aktivitet. Målet med oppgaven var derfor å isolere polysakkarider og undersøke de med henblikk på struktur og biologisk aktivitet. I tillegg var det et mål å finne ut om bladene er så aktive at de kan brukes istedenfor bark og rotbark, da planten skades ved innhøsting av de sistnevnte.

Det ble isolert polysakkarider fra blader, bark og rotbark. Dette ble gjort ved at tørket og fint pulverisert materiale fra de tre plantedelene ble ekstrahert med ulike organiske løsemidler for å fjerne lavmolekylære og upolare forbindelser. Polysakkaridene ble så isolert ved ekstraksjon både i etanol og vann i forholdet 1:1 ved 70 °C og i 100 °C vann. Råekstraktene fra 100 °C vann ble behandlet med α -amylase for å fjerne stivelse.

De seks råekstraktene ble rensert ved dialyse og polysakkaridene ble separert etter ionestyrke ved ionebytterkromatografi med ANX Sepharose Fast Flow (high sub). Det ble først eluert med vann og deretter med NaCl i økende ionestyrke slik at man fikk nøytrale og ulike sure fraksjoner. Fraksjonene ble analysert på GC og testet med komplementfikseringstest. De fraksjonene som var mest interessante med hensyn til struktur og aktivitet ble gelfiltrert. Gelfiltreringen er en videre måte å rense prøven på og i tillegg en måte å separere polysakkarider etter molekylær størrelse.

Hos 7 fraksjoner ble det sett nærmere på bindingsforholdene mellom suktermolekylene ved hjelp av GC-MS. Det var de med mest interessant monosakkaridsammensetning og høyest komplementfikserende aktivitet som ble undersøkt. Det ble valgt ut en fraksjon fra hver av de seks «råekstraktene». I tillegg ble det undersøkt en svært biologisk aktiv nøytral fraksjon som kom fra rotbark - ekstraktet 50% et. i vann. Alle de sju fraksjonene så ut til å inneholde arabinogalaktaner type II, som i flere studier har vist å være viktig for biologisk aktivitet.

Tilstedeværelse av AGII ble bekreftet for alle fraksjonene, med unntak av RB50%Ne2, ved hjelp av Yariv reagens-test. I tillegg hadde alle fraksjonene andre typiske strukturelementer som man forbinder med pektiner.

Nesten alle de gelfiltrerte fraksjonene fra bark og rotbark viste høyere komplementfikserende aktivitet enn den positive kontrollen BP II. RBWNe2, BA50%1.2 og BA50%Ne1 visten ingen komplementfikserende aktivitet. Fraksjonene fra bladene var også biologisk aktive, men ikke like aktive som den positive kontrollen. Det kan se ut som om det kan være en sammenheng mellom molekylær størrelse og biologisk aktivitet. RB50%Ne1 og RB50%2.1 var de mest aktive fraksjonene fra rotbark og også de med størst molekylær størrelse av fraksjonene fra rotbark. Også hos bark og blader var det den fraksjonen med størst molekylær størrelse som var mest aktiv i forhold til de andre fraksjonene fra bark og blader.

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, i perioden mars 2013 til mai 2014.

Først vil jeg rette en kjempestor takk til min veileder Berit Smestad Paulsen for all den gode faglige og praktiske veiledningen og oppfølgingen underveis i året som har gått.

Vil også gi stipendiaten Yuanfeng Zou en særdeles stor takk for masse praktisk hjelp på laboratoriet og for å ha vært tilgjengelig når jeg har trengt svar på alle mine spørsmål. Hoai Thi Nguyen Aas fortjener en takk for god opplæring og veiledning i GC og GC-MS.

En takk til Johanne som har vært en uvurderlig lunsj-kamerat på Blinderen i 5 år, og til Arne for et fint år sammen!

Til slutt vil jeg takke alle de andre ansatte og studenter ved avdelingen for Farmasøytisk kjemi for å ha gjort dette til et hyggelig og lærerikt avslutningsår!

Gunhild Hoås, mai 2014

Innholdsfortegnelse

1	Forkortelser	1
2	Innledning.....	5
2.1	Polysakkarider	5
2.1.1	Planters cellevegg.....	5
2.1.1	Ulike typer polysakkarider i planter	7
2.1.2	Pektiner.....	9
2.1.3	Polysakkarider med biologisk aktivitet	12
2.2	<i>Fagara zanthoxyloides</i> (Lam.)	13
2.2.1	Navn.....	13
2.2.2	Taksonomi.....	14
2.2.3	Habitat og Botanikk	14
2.2.4	Tradisjonell bruk	15
2.2.5	Tidligere forskning på <i>Fagara zanthoxyloides</i>	15
2.3	Immunologi	18
3	Målet med oppgaven	20
4	Metoder	21
4.1	Generelle metoder	21
4.1.1	Vannkvalitet	21
4.1.2	Avgassing og evakuering av luft.....	21
4.1.3	Innveing.....	21
4.1.4	Volumreduksjon.....	21
4.1.5	Frysetørrking	22
4.1.6	Sentrifugering.....	22
4.1.7	Filtrering.....	23
4.1.8	Måling av pH.....	23
4.1.9	Syrevasking av glassutstyr	23
4.1.10	Forberedelse av dialyseslanger.....	24
4.1.11	Påvise stivelse	25
4.1.12	Dialyse.....	26
4.2	Isolering av polysakkarider	27
4.2.1	Ekstraksjon av plantematerialet på Dionex Model ASE®350	27

4.2.2	Ekstraksjon 100 °C vann	30
4.2.3	Nedbrytelse av stivelse med α – amylase	30
4.2.4	Ionebytter-kromatografi	32
4.2.5	Gelfiltrering	35
4.3	Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold	37
4.3.1	Fenol-svovelsyre-test	37
4.4	Strukturoppklaring	39
4.4.1	Metanolyse	39
4.4.2	TMS-derivatisering	41
4.4.3	Gasskromatografi (GC)	42
4.4.4	IR- Spektroskopi	44
4.4.5	Prøveopparbeidelse til bestemmelse av bindingstyper på GC-MS	45
4.4.6	GC-MS	53
4.4.7	Yariv reagens-test	54
4.5	Immunomodulerende effekt	57
4.5.1	Komplementfikseringstest	57
5	Resultater og diskusjon	63
5.1	Isolering av polysakkaridene	63
5.1.1	Ekstraksjon	63
5.1.2	Ionebytter	68
5.1.1	Gelfiltrering	71
5.2	Struktur- og aktivitetsbestemmelse av polysakkaridene i bladene	76
5.2.1	Monosakkaridsammensetning	76
5.2.2	Bindingsforhold	77
5.2.3	Aktivitet i komplementfikseringstesten	80
5.3	Struktur- aktivitetsbestemmelse av polysakkaridene i rotbark	82
5.3.1	Monosakkaridsammensetning	82
5.3.2	Bindingsforhold	84
5.3.3	Aktivitet i komplementfikseringstesten	86
5.4	Struktur- og aktivitetsbestemmelse av polysakkaridene i bark	88
5.4.1	Monosakkaridsammensetning	88
5.4.2	Bindingsforhold	89
5.4.3	Aktivitet i komplementfikseringstesten	91

5.5	Identifikasjon av arabinogalaktan type II ved hjelp av Yariv reagens	92
5.6	Sammenligning komplementfikserende aktivitet	94
6	Konklusjon	97
7	Reagensliste	99
	Litteraturliste	101

1 Forkortelser

50% et. i vann	Etanol og vann i forholdet 1:1
4-O-Me-GlcA	4-oksygenmetyl-glukuronsyre
α	Alfa posisjon viser at -OH på C1 har samme posisjon som -OH på C6
AG I	Arabinogalaktan type I
AG II	Arabinogalaktan type II
Ara	Arabinose
ASE	Accelerated Solvent Extraction (ekstraksjons-maskin)
β	Betaposisjon, indikerer at -OH på C1 har motsatt posisjon som -OH på C6.
BPII	<i>Biophytum petersianum</i> II
BSA	Bovine Serum Albumin
Da, kDa	Dalton, kilodalton
DE	Diatomaceous Earth
DKM	Diklormetan
DMSO	Dimetylsulfoksid
f	Furanoseform, 5 ring
Fuc	Fucose
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsyre
GC	Gasskroamtografi
GC-MS	Gasskroamtografi med massespektroskopi
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre
HCl	Saltsyre

HG	Homogalakturonan
IC50	Konsentrasjon som inhiberer 50%
ICH50	Konsentrasjon som gir 50% hemolyse
IR	Infrarød
LD50	Konsentrasjon som gir 50% dødsfall
Man	Mannose
MeI	Metyljodid
MeOH	Metanol
N2	Nitrogen-gass
NaCl	Natriumklorid
NaOH	Natriumhydroksid
Nm	nanometer
PBS	Fosfatbuffer
p	Pyranoseform, 6 ring
PMAA	Delvis metylerte alditol acetater
PSI	Pund per kvadrattomme (Måleenhet for trykk)
RG I, RG II	Rhamnogalakturonan type I og II
Rha	Rhamnose
rpm	Antall rotasjoner per minutt
TFA	Trifluoreddiksyre
TMS	Trimetylsilyl
XG	Xylogalakturonan
Xyl	Xylose

Fraksjoner fra *Fagara zanthoxyloides*:

BAW	Råekstrakt fra bark ekstrahert i 100 °C vann
BAW1	Sur fraksjon etter ionebytter-kromatografi av BAW
BAW1.1, BAW1.2	Fraksjoner etter gelfiltrering av BAW1
BAWNe	Nøytral fraksjon etter ionebytter-kromatografi av BAW
BAWNe1	Fraksjon etter gelfiltrering av BAWNe
BA50%	Råekstrakt fra bark ekstrahert i etanol vann i forholdet 1:1 ved 70°C
BA50% 1	Sur fraksjon etter ionebytter-kromatografi av BA50%
BA50%Ne	Nøytral fraksjon etter ionebytter-kromatografi av BA50%
BA50% 1.1, BA50% 1.2	Fraksjoner etter gelfiltrering av BA50% 1
BA50%Ne1	Fraksjon etter gelfiltrering av BA50%Ne
BLW	Råekstrakt fra blader ekstrahert i 100 °C vann
BLW1, BLW2, BLW3	Sure fraksjoner etter ionebytter-kromatografi av BLW
BLW1.1, BLW2.1	Fraksjoner etter gelfiltrering av BLW1
BLW3.1, BLW3.2	Fraksjoner etter gelfiltrering av BLW3
BLW.S.G.O	Sur fraksjon etter ionebytterkromatografi av nøytralt eluat fra BLW
BLWNe	Nøytral fraksjon etter ionebytterkromatografi av BLW
BL50%	Råekstrakt fra blader ekstrahert i etanol vann i forholdet 1:1 ved 70°C
BL50% 1	Sur fraksjon etter ionebytter-kromatografi av BL50%
BL50% 1.1	Fraksjon etter gelfiltrering av BL50% 1
BL50%Ne	Nøytral fraksjon etter ionebytterkromatografi av BL50%
RBW	Råekstrakt fra rotbark ekstrahert i 100 °C vann
RBWNe	Nøytral fraksjon etter ionebytterkromatografi av RBW
RBW1, RBW2	Sure fraksjoner etter ionebytter-kromatografi av RBW
RBW2.1	Fraksjon etter gelfiltrering av RBW2

RBWNe1, RBWNe2	Fraksjoner etter gelfiltrering av RBWNe
RB50%	Råekstrakt fra rotbark ekstrahert i etanol vann i forholdet 1:1 ved 70°C
RB50%1, RB50%2,	Sure fraksjoner etter ionebytter-kromatografi av RB50%
RB50%2.1, RB50%2.2	Fraksjoner etter gelfiltrering av RBW50%2
RB50%3.1	Fraksjon etter gelfiltrering av RBW50%3
RB50%Ne	Nøytral fraksjon etter ionebytterkromatografi av RB50%
RB50%Ne1, RB50%Ne2	Fraksjoner etter gelfiltrering av RBW50%Ne

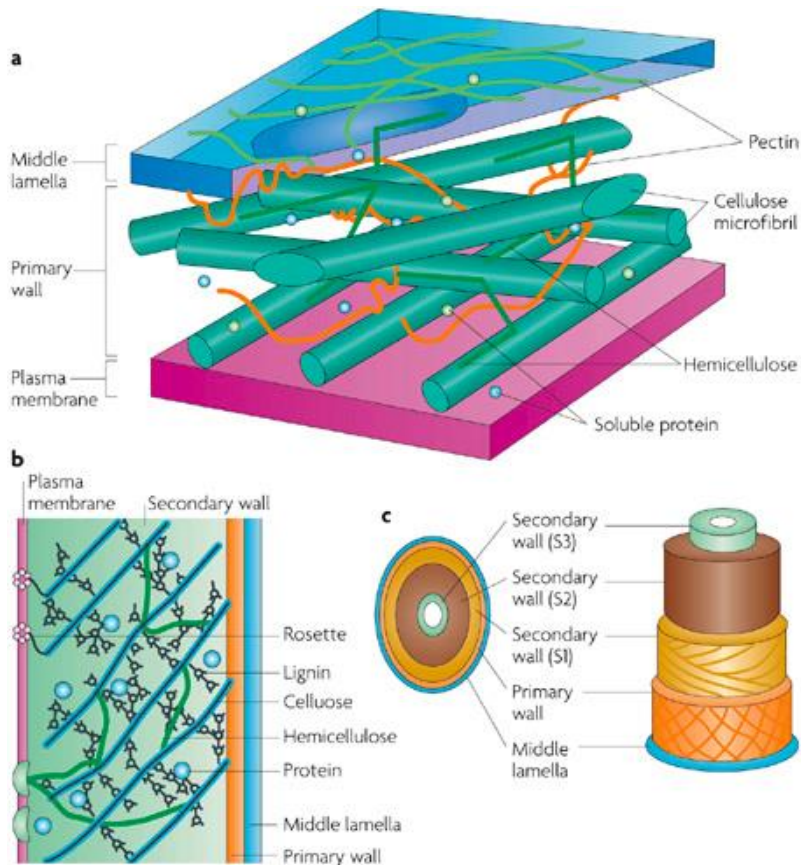
2 Innledning

2.1 Polysakkarider

Polysakkarider er en meget variert kjemisk gruppe med sukkermolekyler som basis. Polysakkaridene er karbohydrater bundet sammen med glykosidbindinger og de kan bestå av alt fra ti til noen tusen monosakkarider. Den store kjeden kan bestå av helt like monosakkarider, eller en lang rekke forskjellige. Polysakkaridene har mange ulike egenskaper basert på hvordan de er bygget opp. De kan fungere som en lagringskilde for energi, både i dyr og planter. Polysakkaridene er også viktige for plantenes struktur og form, i tillegg til at de har mange andre funksjoner i plantene. Det har vist seg at polysakkarider kan utøve farmakologiske effekter på mennesker, både som funksjonell mat, men også som fytomedisin. Polysakkarider er så store og komplekse i form og egenskaper at det er mye igjen å kartlegge før man har dannet seg et stort nok bilde av de funksjonene de utøver.

2.1.1 Planters cellevegg

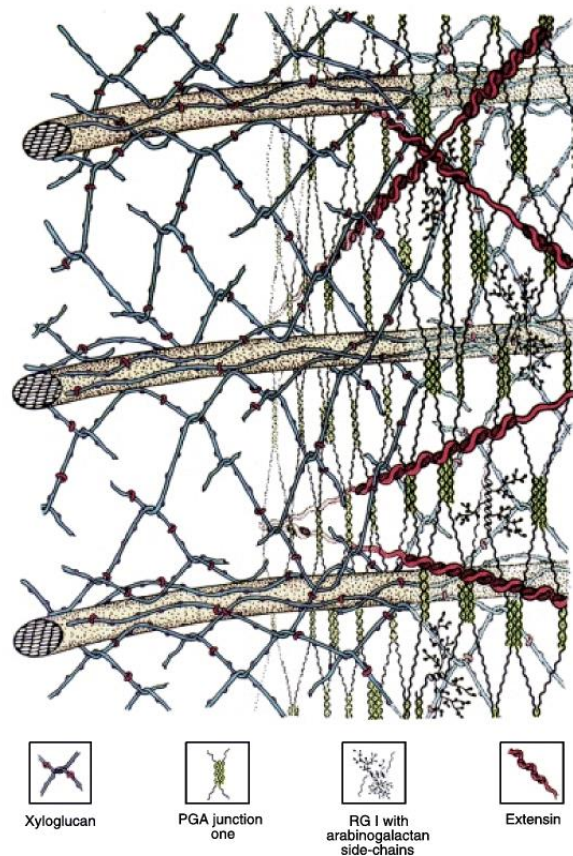
Både dyre- og plante-celler består av cytoplasma omgitt av en plasma-membran. Planter har i tillegg en cellevegg som omgir plasma-membranen. Denne celleveggen er viktig av mange grunner, blant annet for å motstå det indre trykket i cellen, som utøves av vakuolen som har osmotisk opptak av vann. (O'Neill og York, 2003, s 2-4) Celleveggen er en komplisert struktur som for det meste består av polysakkarider, glykosylerte proteiner, lignin, enzymer, mineraler og fenoliske estere. (Sommerville et al, 2004, O'Neill & York, 2003, s 2-4)



Nature Reviews | Genetics

Figur 2-1. Illustrasjon over de ulike delene av plantecelleveggen. (Sticklen, 2008)

Midtlamellen er det første laget i celleveggen som dannes under vekst, og består for det meste av pektiner. Midtlamellen er det som binder plantecellene sammen og fungerer nesten som lim mellom cellene. Den er ofte svært tynn. Deretter dannes primærveggen som stort sett består av polysakkaridene hemicellulose, cellulose og pektin. En modell av hvordan de inngår i ett tredimensjonalt nettverk er beskrevet i figur 2-2. Bunter av cellulose er bundet via hydrogenbindinger til kryssbundet hemicellulose (i figuren vist som xyloglucan). Denne strukturen ligger inne i en hydratisert gel-aktig matriks av pektiner som er rik på sur galakturonsyre. I tillegg består celleveggen av andre typer strukturer som proteiner og enzymer. (Brett & Waldron, 1996, s. 4-29)



Figur 2-2. De tykke buntene som ligger horisontalt er mikrofibriller av cellulose. (Carpita & Gibeaut, 1993)

Under cellevekst utvikler cellen seg ved å stadig inkorporere flere polysakkarider i veggen ved hjelp av enzymer (Chrispeels, 1999, kap 20). Ikke alle planteceller har en sekundær cellevegg. Men hos de som har det utvikler den seg etter at cellen har sluttet å vokse og dele seg, og det skjer ved at det avsettes polysakkarider. Sekundærveggen er mye tykkere og sterkere enn den primære celleveggen. Både den primære, men særlig den sekundære veggen er meget robust og har høy strekkstyrke og trykkfasthet. (Cosgrove, 2008)

2.1.1 Ulike typer polysakkarider i planter

Stivelse

Stivelse er et polysakkarid som dannes under plantenes fotosyntese. Polysakkaridet består kun av glukose-enheter bundet sammen på to forskjellige måter. Avhengig av hvordan de er bundet sammen navnes de som enten amylose eller amylopektin. Amylose har ingen forgreininger og er bundet sammen i alpha (1,4) - bindinger. Amylopektin har i likhet med

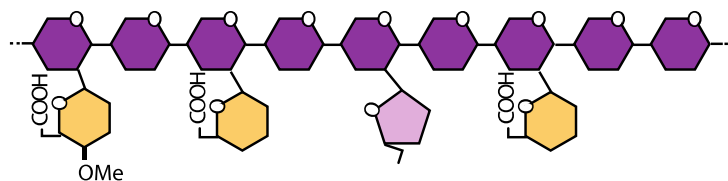
amylose alpha (1,4)-bindinger i den rettkjede delen, men har i tillegg mange forgreininger som er bundet til den rettkjede delen i alpha (1,6)-bindinger. Stivelse er for planten en måte å lagre energi på. I kontakt med jod farges stivelse blått. (Stivelse, 2011)

Cellulose

Cellulose er ett annet polysakkarid som består av glukose-enheter. Cellulose har ingen forgreininger og består av en rettkjedet β (1,4)-glukose-kjede med mellom 8000-15000 glukoseenheter. Cellulose er ikke løselig i vann. (Gleason & Chollet, 2012, s. 53-55)

Hemicellulose

Hemicellulose har som hovedfunksjon å være med å gi plantecelleveggen styrke og rigiditet ved å knytte seg til cellulose eller lignin. Hemicellulose kan kalles både xyloglukaner, glukomannaner, xylaner, mannaner eller glukuronoarabinoxylan alt ettersom hva de består mest av. Men det de har til felles er at all hemicellulose består av β (1,4) som "backbone" i ekvatorial posisjon. (Scheller & Ulskov, 2010)



Glucuronoxyylan, typical dicot structure.

Figur 2-3. Eksempel på et utdrag av en hemicellulose-struktur kalt glukuronoxyylan. Med xylose som β (1,4)-bundet "backbone" og glukuronsyre og arabinose som sidekjeder.

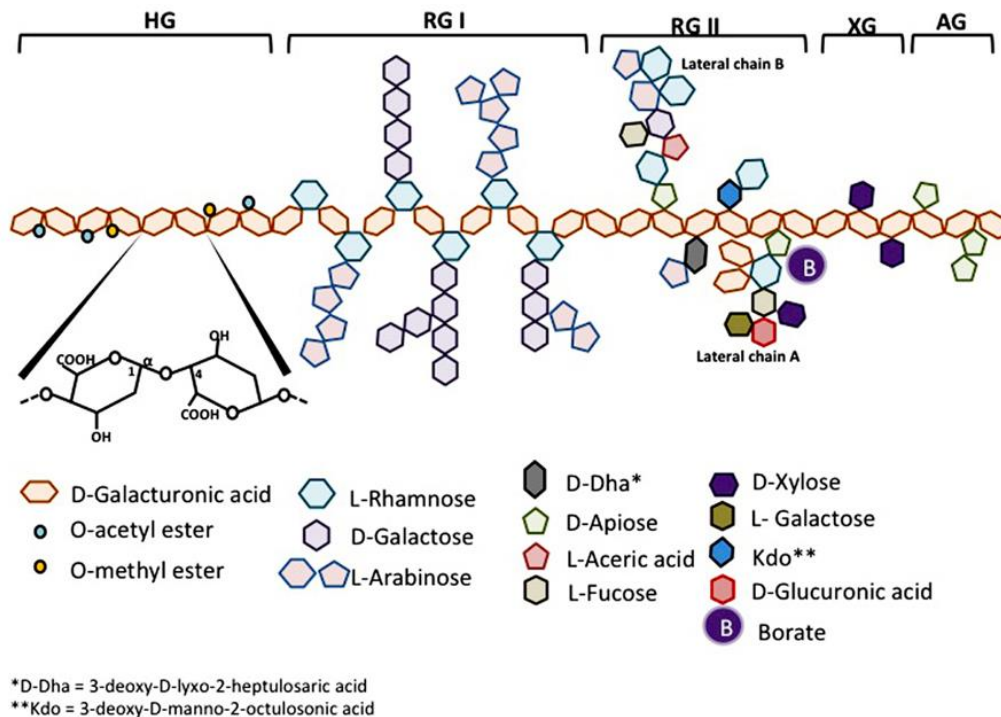
Arabinaner

Arabinaner er en type homoglykan som finnes i plantecelleveggen og består hovedsakelig av L-arabinofuranosider bundet (1 \rightarrow 5). Kjeden med arabinan kan være lineær eller forgrenet, og da gjerne gjennom posisjon 3 eller 5. Antageligvis er arabinan-kjedene knyttet sammen med galaktaner i pektinet, men at de enzymatisk eller hydrolytisk klippes av under ekstraksjon av plantematerialet. (Paulsen & Barslett, 2005)

2.1.2 Pektiner

Pektiner er de mest avanserte polysakkaridene som befinner seg i celleveggen. Biosyntesen av pektiner krever for eksempel minst 67 ulike transferaser. Det som definerer pektiner er at de er rike på galakturonsyre. Galakturonsyre er en essensiell bestanddel i to ulike typer strukturer som utgjør "backbone" for 3 forskjellige polysakkaridene som man mener befinner seg i alle pektiner. Homogalakturonan, rhamnogalakturonan I (RG-I) og substituerte galakturonaner; rhamnogalakturonan II (RG-II) og xylogalakturonan. Homogalakturonan, RG-I, RG-II og xylogalakturonan har kovalente bindinger seg imellom og danner pektinmatriksen som finnes i midtflammen, og i den primære- og sekundære celleveggen. De delene av pektinet som består av HG kalles "smooth-region", mens de som består av RG I og II kalles hårete områder. Nettverket av polysakkarider i pektinet kan forandre seg betydelig ved hjelp av en lang rekke enzymer som befinner i plantens cellevegg. (Mohnen, 2008, Sommerville et al, 2004)

Pektiner har mange ulike roller i cellen. Forskning frem til nå tyder på at den er involvert i plantens vekst og utvikling, signalering i planten, modning av frukt, celleveggstruktur, porøsitet, ionebinding, celledifferensiering i tillegg til mange andre funksjoner. Pektiner kan også nyttiggjøres i kosmetikk- og matindustri, i tillegg til at den har biologiske effekter hos mennesker. (Mohnen, 2008)



Figur 2- 4. Oversikt over pektin-struktur. RG-I og RG-II kalles hårete regioner, HG og XG kalles "smooth-region". (Leclere et al, 2013)

Homogalakturonan

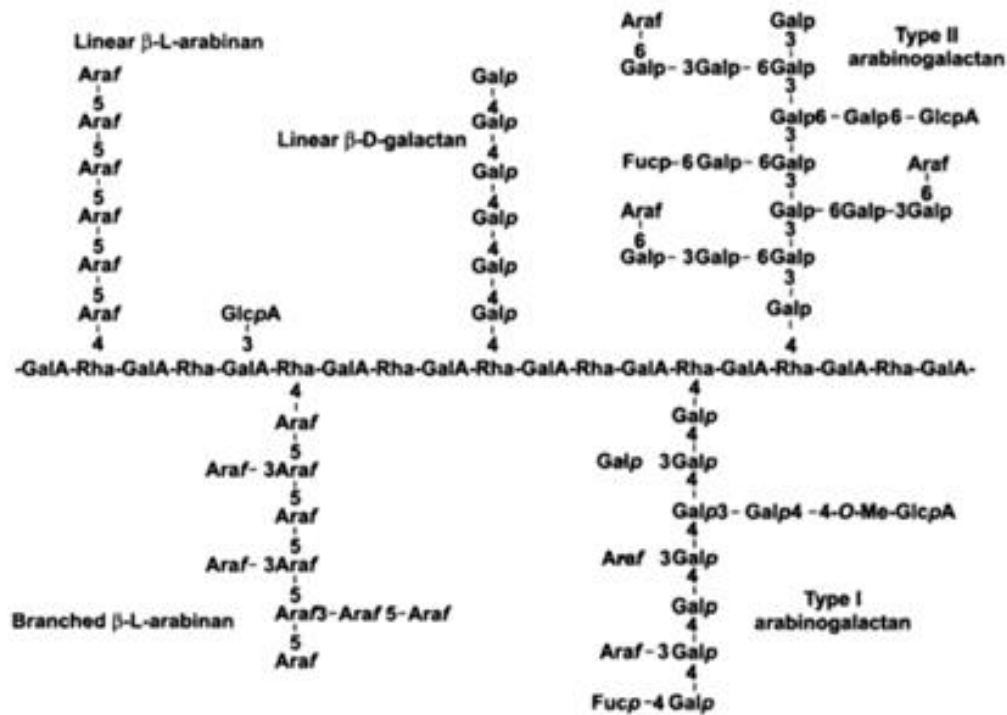
Homogalakturonan er den delen det er mest av i pektinet. Som navnet tilsier består den kun av galakturonsyre. HG er en lineær polymer hvor galakturonsyre-molekylene er α -1,4- bundet til hverandre. En del av sukkermolekylene er metyl-esterifisert ved C₆ eller O-acetylet ved O₂ eller O₃. (Mohnen, 2008)

Rhamnogalakturonan I

Rhamnogalakturonan type I har en lineær kjede som består av alternerende rhamnose og galakturonsyre som kan beskrives med denne formelen: $[-\alpha\text{-D-GalA-1,2-}\alpha\text{-L-Rha-1-4-}]_n$. RG-I har sidekjeder, som oftest bundet i posisjon 4 på rhamnose. Sidekjedene består av galaktan eller arabinan i ulike varianter, og kalles arabinogalaktaner dersom de består av begge to.

Det er hittil klassifisert tre typer arabinogalaktaner. Type I består av arabinose og galaktose bundet i 1-4 posisjon, type II er arabino -3-6 galaktaner og type III er polysakkarider med arabinogalaktan-sidekjeder. Arabinogalaktaner type I og II er ofte funnet som opphav til biologisk effekt i struktur-aktivitetsstudier. AG II lar seg påvise av beta-glucosyl-Yariv

antigen [1,3,5-tri-(4-b-D-glucopyranosyl-oxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene], og man får rødfarge ved tilstedeværelse av AG II. (Paulsen & Barsett, 2005, Yamada & Kiyohara, 2007, s.664-669)



Figur 2-5. Illustrasjon over de ulike sidekjedene til rhamnogalakturonan type I; arabinogalaktan type I og II, arabinaner og galaktan-sidekjer. (O'Neill & York, 2003, s 23)

Rhamnogalakturonan II

Rhamnogalakturonan type II har samme "backbone" som HG, men lange, kompliserte sidekjer gjør RG II til den mest avanserte strukturen i pektiner. RG II kan ha opptil 12 ulike sukker i sidekjedene, bundet på opptil 20 forskjellige måter. (Mohnen, 2008) RG II finnes i den primære celleveggen, og noe av det som gjør strukturen spesiell er at den inneholder mange typer sjeldne sukker slik som apiose, 2-O-methylfucose, 2-O-methylxylose og 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosar-syre. (Paulsen & Barsett, 2005)

2.1.3 Polysakkarider med biologisk aktivitet

Polysakkarider har vist seg å stå for en rekke farmakologiske effekter. Isolerte pektiner, pektiske polysakkarider og hemicellulose har blant annet vist blodsukker-regulerende effekt, senkning av kolesterol-nivået, immunomodulerende effekt, behandler magesår, anti-metastase egenskaper, og apoptose-induserende effekt på kreftceller. Den mest sentrale effekten polysakkaridene ser ut til å spille er den immunomodulerende effekten ved at polysakkaridene påvirker ulike deler av immunsystemet. Så langt har isolerte polysakkarider vist komplement-fikserende aktivitet, effekt på makrofager, antistoff-produksjon, det intestinale immunsystemet og innvirkning på lymfocytene. (Yamada & Kiyohara, 2007, s.664-669)

Tilstedeværelse av arabinogalaktaner type II ser ut til å være viktigst for høy komplementfikserende-aktivitet i et polysakkarid. Arabinogalaktan type II befinner seg blant annet i de hårete områdene av RG I og i pektiske arabinogalaktaner. Pektiner med anti-komplement-aktivitet har blitt isolert fra mange medisinske planter. I tillegg har noen arabinaner og heteroglykaner vist sterk antikomplementær-effekt. Beta-glukaner fra *Lentinus edodes* har for eksempel vist anti-tumor-egenskaper. (Yamada & Kiyohara, 2007, s. 664-669)

2.2 *Fagara zanthoxyloides* (Lam.)



Figur 2- 6. Bilde av gren av *Fagara zanthoxyloides*. (Thiombiano, 2006)

2.2.1 Navn

Synonymer: *Fagara zanthoxyloides* Lam., *Zanthoxylum zanthoxyloides*, *Zanthoxylum senegalense* DC

Fellesnavn: toothache bark, candlewood, Senegal Prickly Ash

Bambara: wo, gozo ngua

Fulani: fasakorihi

(Iwu, 1993, Schmelzer & Gurib-Fakim, 2013)

2.2.2 Taksonomi

Taksonomisk klassifisering

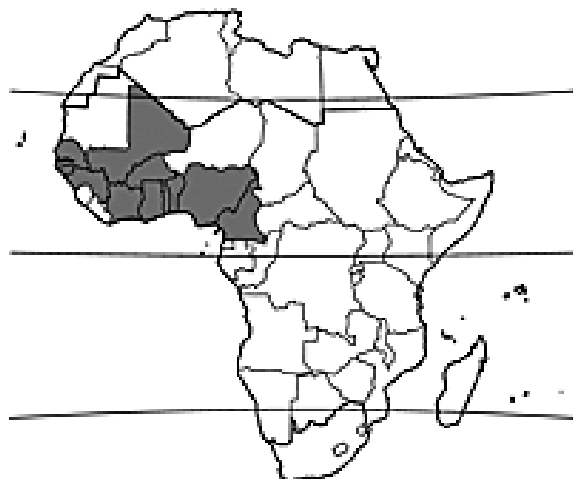
Rike:	Plantae
Subrike:	Tracheophyta
Superdivisjon:	Spermatophyte
Divisjon:	Magnoliaphyta
Klasse:	Magnoliopsida
Subklasse:	Rosidae
Orden:	Sapindales
Familie:	Rutaceae
Slekt:	Fagara
Art:	<i>Fagara zanthoxyloides</i> (Lam.)

Tabell 2-1. Taksonomisk klassifisering for *F.zanthoxyloides*. (Fagara zanthoxyloides Lam., 2013)

2.2.3 Habitat og Botanikk

Fagara zanthoxyloides er et tre som vokser i tropiske områder i hele Vest-Afrika, og Kamerun i Sentral-Afrika. Den vokser i regnskogene i lavlandet og er avhengig av veldrenert jord. *F. zanthoxyloides* strekker seg ofte som ett belte langs elvebredden inn mot tilstøtende savanner. Den vokser også ved kysten, hvor den enkelte steder er rikelig utbredt (Arbonnier, 2004, Taxon: *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepern. & Timler, 2003) Treet kan bli 6-8 meter høyt, og blomstrer to ganger i året, i starten av tørketiden og under regntiden.

F.zanthoxyloides har dessverre blitt klassifisert som en truet art. Den har utstrakt bruk i mange lokalsamfunn, og særlig røttene brukes mye i tradisjonell medisin, noe som gjør at treet blir skadelidende når man drar de opp av jorda. (Etse, Aidam, de Souza, Creche & Lanoue, 2011)



Figur 2-7. Illustrasjon over hvor *F. zanthoxyloides* vokser vilt. (Matu, 2011)

2.2.4 Tradisjonell bruk

Som tradisjonell medisinplante har den en lang rekke med bruksområder. Blant annet brukes roten mot hevelser, hemorroider, magesår, sigdcelle-anemi, reumatisme, feber og slangebitt. Barken og roten brukes som antihelminetikum, og både bark og blader brukes mot migrene, råtne tenner og gingivitt. Andre bruksområder er å behandle syfilis-sår med bladene, utflod (leukhorrea), og spedalskhet. Planten har også en utstrakt bruk som religiøst middel, beskytte mot ånder, som fakkell under seremonier osv. Treet har også andre viktige bruksområder, for eksempel er den mye brukt som tyggestilk / tannkost, dette er særlig utbredt i Nigeria. (Arbonnier, 2004)

2.2.5 Tidligere forskning på *Fagara zanthoxyloides*

Malaria

Forsøk gjort med råkstrakt av rotbark fra *Fagara zanthoxyloides* viser at den in-vitro hemmer veksten av *Plasmodium falciparum*. Råkstraktet ga for eksempel en IC50-verdi for *P. falciparum* ved en konsentrasjon på 4.90 µg/ml. Ved mikroskopering så man at det nesten ikke var noen av parasittene som hadde nådd schizont-stadiet. Dette tyder på at aktive

innholdstoffer trolig er toksiske mot trophozitten, slik at den ikke utvikles videre. Aktivt virkestoff foreslås å være fagaronine, som blant annet også har vist cytotoxiske effekter ved kreft. (Kassim et al, 2005)

I en lignende studie ble det gjort forsøk med stammebark fra Burkina Faso, og der så man på IC50-verdien til forskjellige fraksjoner mot en resistent *Plasmodium falciparum* – stamme. Fraksjonene kom fra ett delvis rensset ekstrakt og besto av alkaloider som var separert med hensyn til polaritet. De mest polare fraksjonene viste høyest toksisk effekt på parasittene. Cirka halvparten av fraksjonene hadde effekt og det tyder på at det er en synergistisk effekt mellom flere ulike alkaloider. Dragendorffs reagens påviste kinin for eksempel, som er ett velkjent virkestoff mot malaria. (Gansane et al, 2010)

Antibakterielt middel

I Vest-Afrika er det mange som bruker pinner eller stilker som ett middel for å rense tennene ved å tygge de til de fungerer som en børste. *Fagara zanthoxyloides* brukes blant annet som dette, både røtter og stilker. To ekstrakter av *F. zanthoxyloides* ekstrahert i metanol-vann (3:2) og fosfatbuffer (PBS) viste antibakteriell effekt mot 3 av 4 testede kariogene og enteriske bakterier. Best effekt hadde den mot *E.coli*. (Adefisoye, AjibadeAko-Nai & Bisi-Johnson, 2012) Flere studier bekrefter den antibakterielle effekten mot ulike bakterie-arter (Queiroz et al, 2006, Ngassoum et al, 2003)

Antihelmintikum

Fagara zanthoxyloides brukes tradisjonelt i Elfenbenskysten mot parasitt-sykdommen som gir sovesyke. Mus påført parasitten *Trypanosoma brucei gambiense* behandlet med *Fagara zanthoxyloides* viste ingen tegn til bedring, og ingen av musene overlevde eksperimentet i mer enn 3 dager. *Trypanosoma brucei gambiense* fører til sovesyke og er utbredt i Sub-Sahara og smittes via tsetse-fluen. (Youan, Coulibaly, Miezán, Doua & Bamba, 1997)

Et forsøk i Mali med MeOH-, DKM- og vann-ekstrakt av *F. zanthoxyloides* testet på et antileishmanial-assay viste spennende resultater. *Leishmania major* er en parasitt som smitter mennesker via sandfluer, og leishmaniasis er en utbredt parasitt-sykdom i en rekke utviklingsland. Effekten ble testet både på intra- og ekstracellulære former av parasitten. Planten brukes ikke tradisjonelt i Mali mot leishmaniasis. (Ahuaa et al, 2007)

Blader fra *F. zanthoxyloides* brukes tradisjonelt for å behandle husdyr mot *Trichostrongylus colubriformis* blant bønder i Benin. Et forsøk på egg fra infiserte sauer ble testet in-vitro med ekstrakt fra blad, men det ble ikke vist noen signifikant antihelminatisk effekt mot denne parasitten. (Hounzangbe-adote, Fouraste, Moutairou & Hoste, 2005) Derimot viste et ekstrakt av essensielle oljer fra frø relativt høy effekt in vitro mot *Strongyloides ratti*. Frøene var høstet i Benin, og eggene av *S.Ratti* som ble brukt i forsøket ble høstet fra infiserte sauer. (Olounladé, 2012)

Sigdcelle-anemi

Fagara zanthoxyloides har en utbredt bruk i Vest-Afrika som et middel mot sigdcelle-anemi. Burkinabin A, B og C som er isolerte divanilloylquinic syre-derivater viste in vitro like god effekt mot sigdcelle-formede erythrocytter som referansepreparatet kromoglykat. Disse derivatene er påvist både i *F. zanthoxyloides* fra Burkina Faso og Mali. (Outtara et al, 2009), Queiroz et al, 2006) Flere andre fenoliske fettsyrer isolert fra planten har også effekt mot sigdcelle-anemi. (Evans, 2009) En annen studie rapporterer at effekten mot sigdcelle-anemi kommer fra xanthoxylol. (Abu, Anyaibe & Headings, 1981)

Det har blitt utviklet kommersielle produkteter fra *F. zanthoxyloides* som selges lokalt i Afrika. Drepanostat® er ett ekstrakt fra *Fagara* som selges i Togo og Benin. I Burkina Faso og enkelte naboland selges FACA© som består av «*Fagara*» og *Calotropis procera* begge preparatene med indikasjon mot sigdcelleanemi (Evans, 2009).

Toksisitet

I forbindelse med at *Fagara zanthoxyloides* bruk som medisin mot sigdcelle-anemi er det foretatt en toksisitetsstudie med vannekstrakt fra en tyggestilk på and-og kylling-embryoer og fullvoksne mus. Artikkelen inkluderte også og en klinisk studie på over 50 barn i alderen 2-10 år som led av sigdcelle-anemi. Toksisitetstestene viste at planten er lite toksisk (Isaacs-Sodeye et al, 1975). En annen toksisitets-studie gjort med et metanol-ekstrakt fra rotbark utført på mus viste at planten er litt toksisk. Dersom man overførte dataene fra mus til menneske ville LD50-verdien tilsvare 300 g plantemateriale gitt til en voksen mann. (Ogwal-Okeng, Obua & Anokbonggo, 2003)

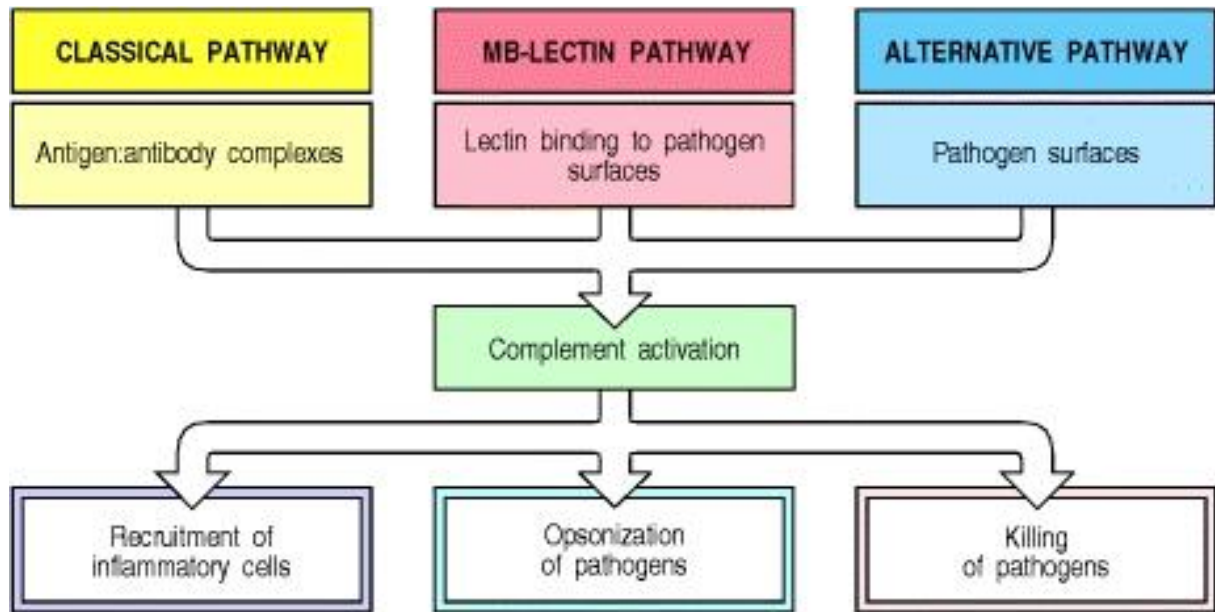
2.3 Immunologi

Kroppens kompliserte immunsystem består av blant annet komplementssystemet.

Komplementssystemet er 11 forskjellige proteiner i plasma som er med på å effektivisere immunsystemets mekanismer mot virus og bakterier. Proteinene reagerer med hverandre og gjør slik at patogenene opsoniseres. Forløperne til proteinene, zymogenene, finnes overalt i plasma, og trigges lokalt ved en infeksjon. Komplementssystemet aktiveres gjennom en kaskade av enzymer.

Ved en infeksjon kløyves et zymogen av et allerede aktivert enzym. Det kløyvde zymogenet kløyver igjen sitt tilhørende substrat, en annen forløper, og slik utvikler kaskaden seg i rask tempo. Komplementssystemet kan aktiveres på tre forskjellige måter på patogenets overflate, og systemet bekjemper infeksjonen med tre forskjellige slags responser. For det første lager den et stort antall med aktiverte enzymer som habiliterer for opsonisering av patogenen. I tillegg virker noen av de som kjemoattraktanter som får flere fagocytter til å strømme til infeksjonsstedet. Og det er også noen deler av systemet som skader enkelte av bakteriene ved å lage porer slik at de blir ødelagt.

De tre veiene komplementssystemet kan aktiveres via er den klassiske veien, MB-Lectin – veien og den alternative veien. Den klassiske trigges av antigener eller en direkte binding til overflaten på bakterien eller viruset. MB-Lectin-veien utløses av mannan-bindende lectin som er ett stoff i serum som binder noen typer bakterie. Til sist har man den alternative veien som direkte trigges ved patogenets overflate. (Janeway, Travers, Walport & Shlomchik, 2001, kap. 2)



Figur 2-8. Oversikt over de ulike måtene komplementsystemet aktiveres og hva det gjør. (Janeway et al, 2001)

3 Målet med oppgaven

Fagara zanthoxyloides er en tradisjonell medisinplante som brukes i store deler av Vest-Afrika. Den har en blant annet en utbredt bruk som middel mot sigdcelle-anemi, antibakterielt middel og anti-helmintikum. Det er hvert år ca 25 % av befolkningen i Mali som smittes av malaria. (FN-sambandet, 2013). Sykdommen er særlig utbredt i rurale strøk, hvor det er lavere tilgang til konvensjonell medisin. I tillegg er det en utbredt resistensproblematikk mot de fleste legemidlene som brukes mot malaria. Det er derfor viktig å finne nye lege - eller naturmidler som kan brukes mot malaria, og se på om de som allerede brukes er effektive.

Hensikten med denne oppgaven er å ekstrahere og isolere polysakkarider fra rotbark, stammebark og blader fra *Fagara zanthoxyloides*. Det skal isoleres polysakkarider fra to ulike typer ekstrakter. Det ene hvor plantedelene er ekstrahert i etanol og vann i forholdet 1:1 ved 70 °C og det andre hvor ekstraksjon foregår ved 100 °C i destillert vann. Det er av interesse å isolere og undersøke polysakkaridene fordi de tidligere ikke har blitt undersøkt i noen publiserte studier. Polysakkaridene skal analyseres med hensyn til monosakkarid-sammensetning og bindingsforholdene mellom disse.

I tillegg er målet med oppgaven å undersøke biologisk aktivitet i polysakkaridene ved å undersøke deres komplementfikserende aktivitet. Dette er interessant fordi resultatet blant annet kan være en indikasjon på om polysakkaridene også kan ha biologisk aktivitet mot malaria. De tre plantedelene som undersøkes i denne oppgaven brukes alle som tradisjonell medisin, hvorav rotbark og bark har mest utbredt bruk. Innhøsting av rotbark og bark gjør at treet kan bli skadelidende, og derfor er også *Fagara zanthoxyloides* en truet art i områder hvor den brukes mye. Et av målene med oppgaven er derfor å se på hvor biologisk aktive bladene slik at man videre kan vurdere og undersøke om de kan brukes fremfor rot- og stammebark.

4 Metoder

4.1 Generelle metoder

4.1.1 Vannkvalitet

Det ble brukt destillert vann til alle forsøkene.

4.1.2 Avgassing og evakuering av luft

Avgassing av luft i løsninger ble enten gjort ved hjelp under vakuum ved hjelp av pumpe eller ved gjennombobling av helium-gass i 15 minutter.

4.1.3 Innveing

Til innveing ble det brukt finvekt til alle innveinger under 1 gram.

Finvekt: Sartorius Extend ED224S

Vekt 1 – 10 g: Sartorius Analytic A200S

Grov-vekt: Ohaus Portable Advanced

4.1.4 Volumreduksjon

Av praktiske årsaker ble prøveløsninger av stort volum dampet inn på rotavapor til et volum på 500 ml eller mindre. Inndampingen skjedde i ett vannbad på maksimalt 40 °C og under lavt trykk.

Utstyr

IKA® RV 10 Basic V Rotavapor

Rundkolbe

4.1.5 Frysetørring

Prinsipp

Frysetørring er en prosess der man fjerner vann fra nedfrost prøvemateriale ved sublimasjon. Dette krever lave temperaturer (-10 °C -20 °C) og lavt trykk. Trykket må være lavere enn metningstrykket over isen. Fordelen med å tørke materiale med frysetørring er at prøven lettere reløses i vann og at struktur og form bevares bedre enn ved andre tørkemethoder. (Oetjen, 1999, s 1-3)

Utstyr

Rundkolber

Glassull

Overganger

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

Metanolbad: HETOFRIG (Heto Birkerød, Danmark)

Prosedyre

1. Før frysetørring ble det utført volumreduksjon på materialet som skulle frysetørkes, slik at prøven fikk plass i en liten rundkolbe.
2. Prøven ble fryst i metanolbad (-40 °C) eller plassert i frysenskap natten over.
3. Den nedfryste prøven ble koblet til klargjorte frysetørreren. En overgang med glassull var mellom prøven og frysetørreren.
4. Etter 18- 48 timer var alt vannet sublimert, og prøven ble tatt av maskinen og innholdet ble veid.

4.1.6 Sentrifugering

Sentrifugering brukes for å separere væske fra faste partikler, eller væsker med ulik tetthet. Hvor lang tid og hvor kraftig sentrifugering som trengs varierer fra situasjon til situasjon.

Utstyr:

Heraus Multifuge 4 KR, Labnet Spectrafuge mini

4.1.7 Filtrering

Filtrering utføres for å fjerne forurensninger eller faste partikler fra en løsning. Man kan benytte ulike filter for ulikt nivå av filtrering. Det ble filtrert ved hjelp av vannsug eller manuelt via en sprøyte med påsatt filter.

Utstyr:

Acro® 50A, 5 µm, Pall Corporation

Acrodisc syringe filter, 5 µm, Versapor® membrane

Acrodisc syringe filter, 0,2 µm, Supor® membrane

Water-filter, 0,22 µm, Durapore® membrane filter, Millipore

4.1.8 Måling av pH

PH ble målt ved hjelp av pH-papir.

Fisherbrand pH-Fix 0-14, Fisherbrand pH-Fix 0-7

4.1.9 Syrevasking av glassutstyr

Prinsipp

Utstyr laget av glass kan være forurenset av cellulose grunnet at det er oppbevart i papp etc. Kontaminasjon av cellulose vil påvirke analyser av karbohydrater. Glassutstyr må derfor vaskes i saltsyre før analytisk bruk.

Reagenser

37 % HCl

Springvann

Destillert vann

Utstyr:

Glasskolbe

Glasspipette

Varmeskap Heraeus Instruments, Function line

pH-papir

Verneutstyr: Briller og hansker

Prosedyre

1. Utstyret som skal syrevasket legges i en passende stor glasskolbe mellom 1000 ml – 3000 ml.
2. 37 % HCl helles over, slik at syren dekker alt utstyret. Glasspipetten brukes til å fylle syre i utstyr som ikke er fullstendig dekket, dersom det trengs.
3. Utstyret står i avtrekkskap i 30 minutter.
4. Syren helles tilbake i beholderen, og brukes senere syrevask.
5. Utstyret skylles i flere runder med springvann.
6. Deretter skylles det grundig i destillert vann før det plasseres i varmeskap til tørk på 80 °C.
7. Når det er tørt legges det i en glasskolbe og dekkes med aluminiumsfolie til det skal brukes.

4.1.10 Forberedelse av dialyseslanger

Prinsipp

Dialyseslangene kan inneholde rester av cellulose, og man må derfor behandle slangene før bruk for unngå en eventuell forurensning av cellulose i prøvene.

Reagenser

2 % NaOH-løsning

0,05 % Natriumazid-løsning

Destillert vann

Utstyr

Kokeplate: Kika labortechnik RCT basic

Kjele

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

Prosedyre

1. Dialyseslangen ble klippet opp slik at hver lengde ble ca 50 cm. De ble så skylt godt inn- og utvendig i springvann.
2. Kokte de i 10 minutter i en 2 % lut-løsning.
3. Slangene ble så skylt godt ut- og innvendig, både med springvann og destillert vann.
4. De ble så kokt på nytt i 10 minutter, denne gang i destillert vann. Til sist ble de skylt godt i destillert vann.
5. Dialyseslangene oppbevares i en 0,05 % natriumazid løsning ved 4 °C for å unngå bakteriell vekst.

4.1.11 Påvise stivelse

Prinsipp

Dersom man har en prøve med stivelse hvor man tilsetter jod får blandingen en kraftig blåfarge. Jod er svært lite løselig i vann, men mye mer løselig dersom det er jodid-ioner tilstede i løsningen. Man bruker derfor en jod-jodkalium-løsning til å påvise om det er stivelse tilstede i en prøve. (Amylose, 2011)

Reagenser

3,3 % jod løst i 6,7 % kaliumjodid-løsning

Utstyr:

Hvit porselensplate med 12 flate brønner

Pipette

Prosedyre

1. Tok noen dråper fra de forskjellige ekstraktene i hver sin flate brønn.
2. Dryppet noen dråper med jod-jodkalium over, nok til å se om blandingen fikk ett fargeutslag. Eventuell fargeendring ble notert.

4.1.12 Dialyse

Prinsipp

Under en dialyse vil de molekylene med lavere molekylvekt enn cutoff-verdien til dialyseslangen diffundere fra slangen og ut i det destillerte vannet, så lenge det er en konsentrasjonsgradient. Dialysen vil derfor gå raskere dess oftere man bytter vann.

Dialyseslangene som ble brukt har en cutoff på 3500 dalton, noe som betyr at alle molekyler med en lavere molekylvekt enn 3500 dalton dialyseres vekk.

Reagenser

Destillert vann

Toluen

AgNO_3

Utstyr

Vaskede dialyseslanger, Spectra / Por 3, MWCO 3,500 d

Klemmer

Magnet og magnetrører

3 glasstaver

Plastbøtte

Prosedyre

1. Dialyseslangene legges i et beger med destillert vann i en halv time for å fjerne natriumazid.
2. Dialyseklemme settes på i den ene enden og litt destillert vann helles oppi for å sjekke at slangen er tett i den ene enden.
3. Prøven helles i slangen til slangen er 1/2- 2/3 full.
4. Det dryppes noen dråper toluen oppi, for å hindre bakteriell vekst.
5. Fjerner luft som er i slangen og lukker den andre enden med en klemme.
6. Legges i destillert vann, med magnetrøring, og glasstaver for å unngå at slangen blir ødelagt av magneten.
7. Bytter vann jevnlig og avslutter dialysen når 1 ml av dialysevannet ikke blakkes av 1-2 dråper mettet AgNO₃-løsning.

4.2 Isolering av polysakkarider

4.2.1 Ekstraksjon av plantematerialet på Dionex Model ASE®350

Prinsipp

Hensikten med ekstraksjonen er å separere upolare og lavmolekylære innholdsstoffer fra høymolekylære, polare polysakkarider ved hjelp av løsningsmidler med økende polaritet. Det

blir først ekstrahert med forskjellige organiske løsemidler for å få ekstrahert ut lavmolekylære forbindelser. Deretter blir det ekstrahert med en blanding av 50 % etanol og 50 % vann. Til dette ble det brukt en ASE- maskin (acelerated solvent extraction). Ekstraktet i 50 % etanol i vann inneholder polysakkarider som senere skal opparbeides videre.



Figur 4-2. Bilde av ASE- maskinen, med to flasker med ekstrakt fra to runder på samme celle. Runde 1 har mørkere eluat enn runde 2.

Reagenser

Heksan

Etylacetat

Etanol

Destillert vann

Betingelser

Trykk: Ekstraksjon ved ca 1500 PSI

Temperatur: Heksan og etylacetat ved 65 °C, etanol ved 70 °C og etanol og vann i forholdet 1:1 ved 70 °C.

Mengde ekstraksjonsmiddel for hver plantedel á 200 gram for de forskjellige løsningsmidlene: 2400- 7000 ml

Utstyr

Dionex Model ASE®350

Ekstraksjons-celler tilhørende maskinen

Oppsamlingsflasker á 200 ml

Filter 30 mm

DE (Diatomaceous Earth, Dionex ASE™ Prep DE)

Prosedyre

1. 200 gram plantemateriale fra hver plantedel ble innveid og homogent blandet med 50 gram granuleringsmateriale DE.
2. Skrudde igjen bunnen på cellene og trykket ett filter ned i bunnen. La deretter 1-2 skjeer med DE opp i cellen og fylte så etter med plantematerialet nesten helt til toppen. Banket på røret for å få plass til mer. Helt øverst ble det igjen fylt på med 1-2 skjeer med granulering.
3. Programmerte inn hva slags løsemiddel, temperatur, hvilke celler og antall runder med ekstraksjon det skulle være på ASE-maskinen.
4. Ekstraherte så mange runder som skulle til for at mye av fargemateriale var ekstrahert ut. Når man fikk et relativt lys klart ekstrakt, gikk man over til neste løsningsmiddel.
5. Etter ekstraksjon ble mengden ekstrakt volumredusert på rotavapor.

4.2.2 Ekstraksjon 100 °C vann

Prinsipp

Polysakkarider er vannløselige og ekstraheres derfor godt over i kokende vann.

Reagenser

Vann

Utstyr

Kjele

Kokeplate: Kika labortechnik RCT basic

Sentrifuge: Heraeus Multifuge 4 KR

Prosedyre

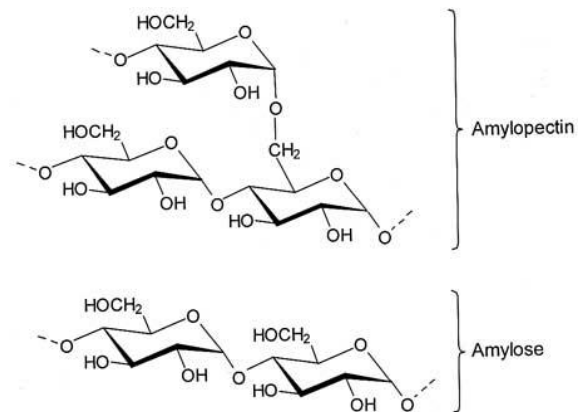
1. Kokte plantematerialet i destillert vann i 2 timer.
2. Sentrifugerte løsningen ved 2000 rpm i 3 minutter.
3. Supernatanten ble tatt vekk og bunnfallet ble kokt på ny i 1 time.
4. Ekstraktet ble på nytt sentrifugert ved 2000 rpm i 3 min. og supernatantene ble slått sammen til ett ekstrakt.
5. Ekstraktet ble inndampet på rotavapor til 500 ml.

4.2.3 Nedbrytelse av stivelse med α – amylase

Prinsipp

Stivelse kan bestå av både amylose og amylopektiner. Forskjellen på disse to er at amylose er glukaner med 1,4 -bindinger. Amylopektiner er forgrenet i 1,6 - bindinger. 1 enhet α -amylase vil frigjøre 1 mg maltose fra stivelse etter 3 minutter ved en pH på 6,9 ved 20 °C. α -amylase hydrolyserer kun α -bindingen mellom glukaner med 1,4-binding der det er tre eller flere α - 1,4 - bundet D-glucose-enheter. Amylopektiner, glukaner med α - 1,6 - bindinger blir ikke hydrolysert. (Sigma, 2003)

Amylasen som brukes i denne metoden er isolert fra byggmal, kalt type VIIIA. Den er en endohydrolase som tilfeldig klipper opp (1→4)- α -D-glykosid-bindinger i polysakkarider der det er tre eller flere (1→4)- α -bundet D-glukose - enheter. (EC 3.2.1.1, 1961)



Figur 4-2. Amylopektin lar seg ikke hydrolysere av α -amylase, det gjør derimot amylose.

Reagenser

Svovelsyre

Fenol 4%

α -amylase fra bygg-malt, Sigma Aldrich

Jod-jodkalium

Utstyr

Kjele

Varmeskap: Heraus Instruments, Kelvitron®

Spektrofometer: Helios epsilon spektrofometer, Thermo

Betingelser

α -amylase er effektiv i pH- området 5,5-8.

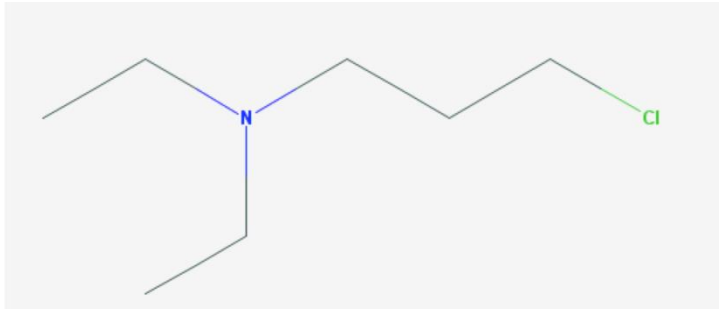
Prosedyre

1. Tok 50 μ l prøvemateriale og blandet med 1 ml fenol og 5 ml sovelsyre.
2. Blandet blandingen lett på minishaker og prøven fikk stå i henstand i 30 minutter.
3. Absorbansen ble lest av på spektrofometer ved 480 nm. Absorbans 1 tilsvarer 100 μ g karbohydrat i prøven.
4. Beregnet mengden α -amylase som trengtes for hvert rå-ekstrakt (1,5 enhet amylase per mg karbohydrat). Tilsatte en overskuddsmengde og rørte enzymet godt inn.
5. Satte ekstraktet tilsatt enzym i varmeskap på 37 °C i 2 timer.
6. Testet med jod-jodkalium-test for å sjekke at all stivelsen var brutt ned til glukose.
7. Kokte opp ekstraktet for å deaktivere amylasen.
8. Kjølte ned ekstraktet som så ble sentrifugert 15000 rpm i 15 min.
9. Dialyserte ekstraktet for å bli kvitt glukose.

4.2.4 Ionebytter-kromatografi

Prinsipp

Polysakkarider kan enten være nøytrale eller negativt ladde. ANX Sepharose Fast Flow er ett kolonnemateriale som består av kryssbundede agarosekuler 4 % (90 μ m store). Disse kulene har diethylaminopropyl som funksjonell gruppe. Diethylaminopropyl er positivt ladd og binder seg til negativt ladde molekyler. Negativt ladde polysakkarider vil derfor binde seg til agarosematerialet, og man kan eluere ut polysakkaridene ved å eluere med NaCl i økende ionestyrke. Nøytrale polysakkarider vil ikke interagere med kolonnematerialet og man kan derfor eluere ut de først med degasset vann. Under elueringen med NaCl vil de aller sureste polysakkaridene komme ut til sist og man har da separert polysakkaridene i prøven etter økende surhetsgrad. (Lagerlund, Larsson, Gustavsson, Färenmark & Heijbel, 1998)



Figur 4-3. Funksjonell gruppe diethylaminopropyl, her bundet til klor.

Reagenser

Destillert, degasset vann

3 M NaCl, degasset

AgNO₃ (mettet-løsning)

1 M NaOH

1 M natriumacetat, pH 3

Utstyr

Kolonne: XK 50, Pharmacia Biotech

Kolonnematriks: ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub), GE Healthcare

Kolonnevolum: høyde 16 cm * 2,5 cm bredde * $\pi \approx 300$ ml

Fraksjonssamler: SuperFrac Fraction Collector, GE Healthcare

Peristaltisk pumpe: Perimax 16

Rør til fraksjonsamleren, 10 ml

Acrodisc syringe filter, 5 μ m Versapor® membrane

Målekolber

Magnetrorer + magnet

Hule glassrør

Sentrifuge: Heraus multifuge 4KR

Prosedyre

1. Matriksen var ferdigpakket i kolonnen, så begynte med å vaske matriksen med totalt 2 liter vann med en hastighet på 2ml/min, for å fjerne konserveringsmiddel.
2. Ekstraktene ble tatt opp fra fryser, tint og sentrifugert før ionebytter-kromatografi. Bunnfallet ble kastet og ekstraktet ble filtrert gjennom ett filter på 5 µm før påsetting på kolonnen.
3. Cirka 125-200 ml prøve ble satt på kolonnen med en flowhastighet på 2 ml/min.
4. Etter prøvepåsetting, ble de nøytrale polysakkaridene eluert ut med cirka 2 kolonnevolum med degasset vann. Eluering med vann ble avsluttet når fenol-svovelsyre-testen påviste at det ikke kom karbohydrater ut fra kolonnen lenger.
5. Deretter ble de negativt ladde polysakkaridene eluert ut med en saltgradient fra 0,1-1,5 M NaCl. Fraksjonssamlere fylte 180 rør med 10 ml prøve i hver.
6. Innholdet i rørene ble så vurdert med fenol-svovelsyre-test, og rørene ble slått sammen til en eller flere fraksjoner, med bakgrunn i karbohydrat-profilen fra testen.
7. Når hele mengden ekstrakt var kjørt gjennom kolonnen, dette tok 2-3 runder, ble de tilhørende fraksjonene slått sammen. De nøytrale polysakkaridene ble oppkonsentrert og frysetørket. De sure polysakkarid-fraksjonene ble oppkonsentrert, dialysert for å fjerne NaCl og til sist frysetørket.

Vasking av kolonnen

1. Etter hver runde med saltgradient ble kolonnen vasket ved at den ble snudd opp ned og renses med 2 kolonnevolum 2 M NaCl.
2. Deretter ble den snudd riktig vei og vasket med vann til det som kom ut fra kolonnen ikke lenger ble blakket med mettet AgNO₃. Dette krevde 3-5 kolonnevolum med vann.

3. Dersom kolonnen var veldig skitten på toppen ble noe av det øverste laget fjernet før vasking. Dersom den i tillegg var relativt skitten ble den snudd opp ned og vasket med 1,5 kolonnevolum 1 M NaOH. Deretter 2 kolonnevolum 2 M NaOH for å regenerere matriksen. Og til sist vasket med 3-5 kolonnevolum vann til alt saltet var vasket ut av kolonnen.
4. Var kolonnematriksen svært farget ble kolonnen snudd 180 grader og vasket med ett kolonnevolum 1M natriumacetat med en pH på 3. Deretter 1 kolonnevolum 1 M NaOH og så 1,5 kolonnevolum natriumacetat. Så ble 2 kolonnevolum 2M NaCl eluert for å regenerere matriksen, og til sist ble det vasket med 3-5 kolonnevolum degasset vann. Til alle trinnene var hastigheten på pumpa 2 ml/min.

Beregninger

Beregning av volum i blandekammeret ved start

$$\frac{C}{t} = \frac{C_0 \cdot R_1}{V_0}$$

C: konsentrasjonsgradient ved tiden t

V₀: volum i blandekammeret v/start

C₀: Utgangskonsentrasjonen i saltkammeret

R₂: hastighet gjennom kolonne (R₂ = 2·R₁)

R₁: hastighet mellom salt- og blandekammeret

Har 180 rør à 10 ml, og flowhastighet gjennom kolonnen er 2ml/min.

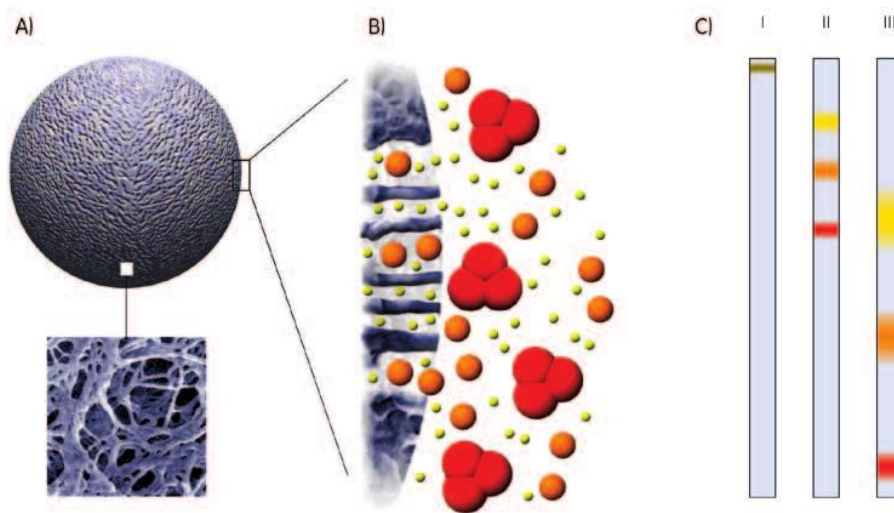
4.2.5 Gelfiltrering

Prinsipp

Gelfiltrering er en kromatografisk separasjonsmetode som separerer molekyler med hensyn til deres molekylære størrelse. Kolonnematerialet består av en matriks av dekstran og kryssbundet agarose. Denne matriksen er porøs, veldig stabil og inert i møte med

prøvematerialet. Molekylene beveger seg i ulik hastighet gjennom kolonnen og de små molekylene bruker lengre tid fordi de lettere stopper opp inne i den porøse matriksen.

Kolonnematriksen som er brukt her egner seg for å separere molekyler i området 100 000 - 600 000. (GE Healthcare, 2000)



Figur 4-4. Prinsippene for gelfiltrering, der de små partiklene kommer sist ut, og det er ingen bindinger mellom matriks og prøvematerialet. (GE Healthcare, 2000)

Reagenser

Destillert vann

Utstyr

Kolonne:

High Load Superdex prep grade 200, størrelse 26/60, GE Healthcare

High Load Superdex prep grade 200, størrelse 16/60, GE Healthcare

Fraksjonssamler: SuperFrac Fraction Collector, GE Healthcare

Peristaltisk pumpe: Perimax 16

Rør til fraksjonsamleren, 5 ml

Filter: Acrodisc syringe filter, 0,2 µm Supor® membrane

Sprøyte, 5 ml

Prosedyre

1. Prøvematerialet løses i destillert vann, ca 4 ml. Mindre dersom prøven er lett løselig, mer hvis den er vanskeligere å løse opp.
2. Løsningen filtreres gjennom ett filter med 0,2 µm størrelse.
3. Løsningen appliseres på kolonnen, som er koblet til en fraksjonssamler.
4. Løsningen elueres gjennom kolonnen med destillert og degasset vann som elueringsmiddel med en hastighet på 1ml/min

4.3 Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold

4.3.1 Fenol-svovelsyre-test

Prinsipp

I nærvær av syre danner karbohydrater furanderivater. Dette er en dehydreringsprosess hvor suktermolekylene mister vann. Det dannes da aromatiske forbindelser istedenfor ved at de kan kondensere med seg selv eller fenol og man får da ett gulfarget kompleks.

Fargeintensiteten brukes som ett mål på mengden karbohydrat i løsningen. Absorbansen måles best ved 480-490 nm. (Brummer & Cui, 2005, kap. 2)

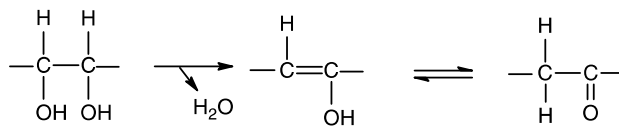


FIGURE 2.1
Dehydration reaction.

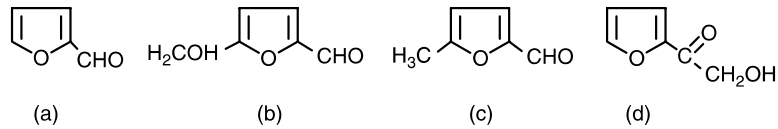


FIGURE 2.2
Furan derivatives from (a) pentoses and hexuronic acids, (b) hexoses, (c) 6-deoxyhexoses, and (d) keto-hexoses, respectively.

Figur 4-5. Figuren viser hvordan sukkeret mister vann og danner furan-derivater istedenfor. (Brummer & Cui, 2005, s. 71)

Reagenser

Fenol 4%

Svovelsyre

Utstyr

Glassrør

Pipette

Gilson Microman® pipette 100 µl

Mikroplate-leser: BIO-RAD iMark™ Microplate Absorbance Reader

Flatbunnet mikrotiterplate, 96 brønner, FALCON eller WWR

WhirliMixer (Fisons)

Verneutstyr: hansker og vernebriller

Prosedyre

1. 100-200 µl av løsningen som skulle analyseres ble pipetert i ett glassrør.

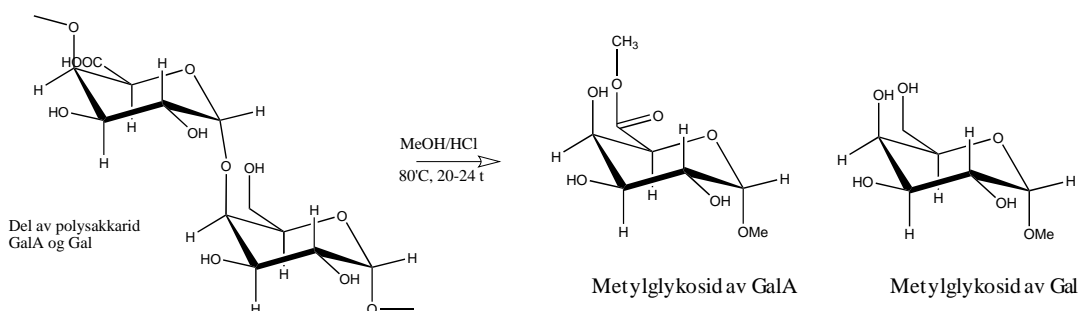
- 0,1 ml 4 % -fenol ble tilsatt, og løsningen ble blandet på wortex-mikser.
- 1 ml konsentert svovelsyre ble tilsatt og løsningen ble på ny mikset, løsningen fikk så stå i 30 minutter eller til fargen hadde fått utvikle seg.
- 100 µl fra hvert rør ble pipettert i en flatbunnet plate.
- Absorbansen ble målt ved 490 nm.

4.4 Strukturoppklaring

4.4.1 Metanolyse

Prinsipp

For å kunne analysere prøver med karbohydrat på GC er man avhengig av å spalte polysakkaridene til monosakkarider. Dette gjøres ved hjelp av saltsyre løst i vannfri metanol. Under metanolyse kløyves glykosid-bindingene i polysakkaridene slik at man får metylglykosider, og metylestere av uronsyrene. Mannitol tilsettes prøven som intern standard, og den er fullstendig stabil under metanolyse, noe som er viktig da den brukes kvantitativt for å regne ut mengde karbohydrat i prøven. (Chambers & Clamp, 1971)



Figur 4-6. Metanolyse med HCl i varmeskap. (Austarheim, 2007)

Reagenser

3 M vannfri HCL

Vannfri metanol

Intern standard: 1 µg/ ml mannitol i vannfri metanol

Utstyr

Vekt

Parafilm

Kanyle

Vakuumsikator med P₂O₅ som tørkemiddel

SMI- pipette, 100 µl

Syrevaskede supelcorør m/ kork

Syrevaskede glasspipetter

Varmeskap: Heraeus Instruments, Function line

Oppsett for inndamping under N₂

Prosedyre

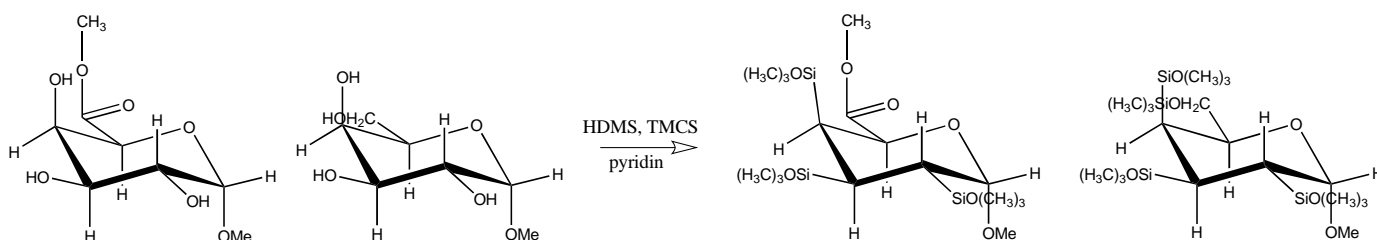
1. Ca 1 mg frysetørket plantemateriale ble veid ut i et syrevasket supelco-rør.
2. Røret ble dekket med parafilm, som ble gjennomhullet med en kanyle, og satt i vakuumsikator med P₂O₅ som tørkemiddel i ca 1 døgn.
3. Etter ett døgn ble det tilsatt 100 µl mannitol som intern standard og 1 ml vannfri 3M saltsyre til metanolysen.
4. Supelco-rør m/igjennskrudd kork ble satt i varmeskap på 80 °C i 20-24 timer. Etter 10-15 minutter fjernet man overtrykk ved å skru opp korken, og skrudde den godt igjen etterpå for å unngå fordamping.

5. Prøven ble dampet inn til tørrhet under nitrogen-gass.
6. Prøven ble så vasket tre ganger med 200 µl vannfri metanol. Mellom hver vask ble prøven dampet inn til tørrhet.
7. Deretter ble prøven dekket med perforert parafilm og satt til tørk i vakuumeksikator i minst 1 time før TMS-derivatisering.

4.4.2 TMS-derivatisering

Prinsipp

Karbohydrater har en mengde polare funksjonelle grupper som nedsetter flyktigheten til disse stoffene. I tillegg vil slike polare grupper ha høyere adsorpsjon til overflater, og under gaskromatografi med prøver med polare grupper vil man eluere ut topper med bred haledannelse. For å øke flyktigheten og gjøre de mer termisk stabile derivatiseres polare grupper med upolare grupper. Ved TMS-derivatisering på monosakkarider derivatiseres OH-gruppene i monosakkaridene. De aktive H-atomene byttes ut med upolare trimetylsilyl-grupper.



Figur 4-7. TMS-derivatisering (Austarheim, 2007)

Reagenser

TMS- reagens:

Trimetylklorosilan (TMCS) 1 ml

Heksametyldisilazan 2 ml

Pyridin (vannfritt) 5 ml

Utstyr

Syrevasket glasspipette

Minishaker IKA®, MS3 Basic

Sentrifuge: Labnet Spectrafuge mini

Eppendorf-rør

Prosedyre

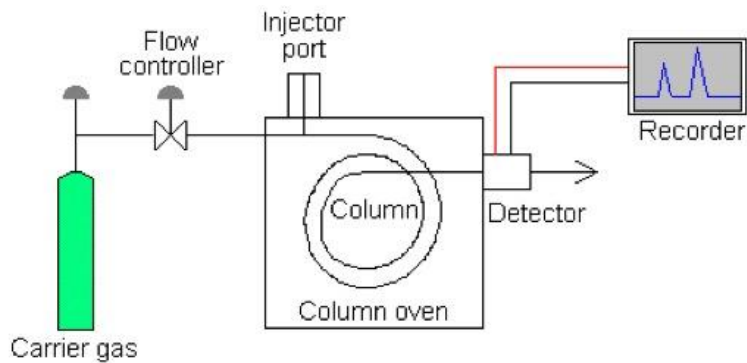
1. Avmerket 100 µl på en syrevasket glasspipette.
2. Målte opp 100 µl TMS-reagens som ble tilsatt prøven.
3. Blandet sammen løsningen på minishaker.
4. Lot løsningen stå i henstand i minst 15 minutter, og overførte løsningen til et eppendorf-rør og sentrifugerte til man hadde en klar supernatant.
5. Dersom løsningen ikke skulle sentrifugeres fikk den stå i henstand i 30 minutter.
- 6.

4.4.3 Gasskromatografi (GC)

Prinsipp

Gasskromatografi er en kromatografisk separasjonsmetode som fungerer på flyktige, hydrofobe og termisk stabile prøver. Prøven injiseres inn i injektoren som har så høy temperatur at den fordamper umiddelbart. Fra injektoren fraktes den inn og gjennom kolonnen i en mobilfase som er en inert bæregass. På innsiden av kolonnen er det stasjonær fase og stoffene i prøven fordeler seg ulikt mellom bæregass og stasjonær fase, alt ettersom hvor høy affinitet molekylene har til den stasjonære fasen. De med høyest affinitet bruker lengst til gjennom kolonnen og man får slik separert de ulike monosakkaridene. Ved utgangen

av kolonnen er det en detektor som påviser stoffene som kommer ut av den. (Brummer & Cui, 2005, kap. 2)



Figur 4-8. Oppsett av en gasskromatograf.

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)

Prosedyre

1 µl klar prøveløsning ble injisert på GC-kolonnen.

1. Sprøyten ble vasket grundig med heksan og metanol etter og før bruk.
2. Programmet ble startet og resultatet analysert i etterkant.

4.4.4 IR- Spektroskopi

Prinsipp

Bindinger i molekyler vibrerer ved ulike frekvenser på grunn av frastøtningskrefter mellom positive atomkjerner og negativt ladde elektroner. De fleste av disse frekvensene vibrerer innenfor det infrarøde spekteret. Ved infrarød spektroskopi sendes mange infrarøde lysbølger på likt mot en prøve. De frekvensene som er lik frekvensen fra molekylets vibrasjoner absorberes av molekylet eller hindres i å trenge gjennom. Dette endrer intensiteten på den infrarøde lysbølgen. Ved å måle endringen i lysintensitet kan man få ett unikt spektra for hvert molekyl. Dette kan brukes til identifisering av molekyler og funksjonelle grupper. Bestemmelse av ulike funksjonelle grupper gjøres i bølgetall-området mellom 1200-3600 cm⁻¹. (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2010, kap 5 og 7)

Utstyr

IR- spektrofometer

Spatel

Prosedyre

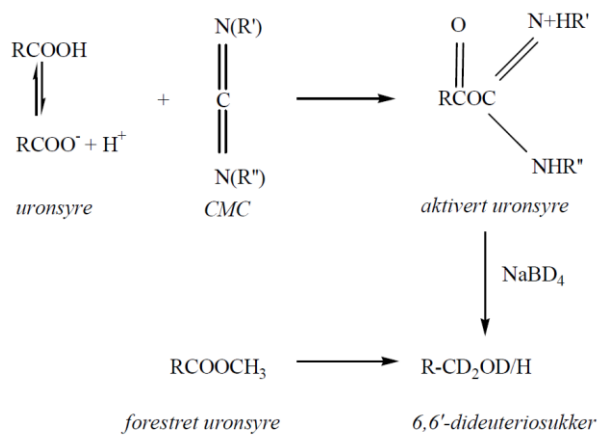
1. En liten spatelsspiss med stoff legges på platen under lyskilden, og skrur fast maskinen.
2. Starter avleseren, og resultatet printes ut.

4.4.5 Prøveopparbeidelse til bestemmelse av bindingstyper på GC-MS

Karboksylderuksjon

Prinsipp

Det er vanskelig å hydrolysere glykosid-bindinger knyttet til en uronsyre. Derfor må de først reduseres til nøytrale sukker med NaBD₄ som reduksjonsmiddel. Forestrede uronsyrer kan reduseres direkte, mens frie uronsyrer må aktiveres med carbodiimide først. Etter reduksjonen blir alle uronsyrene til 6,6 dideuteriosukker som kan skilles fra de nøytrale sukkerene ved at fragmentene fra uronsyrene har en molekylvekt på 2+. Med denne metoden får man derimot ikke skilt mellom andelen forestrede- og frie uronsyrer. (Pettolino, Walsh, Fincher & Basic, 2012)



Figur 4-9. Uronsyrer reduseres til 6,6- dideuteriosukker. Forestrede uronsyrer reduseres direkte, mens frie må aktiveres av carbodiimide. (Sagberg, 2006)

Utstyr

Pipetter

Metyleringsrør i små størrelser

Minishaker IKA®, MS2

PD-10 kolonne, Sephadex™ G-25M, GE Healthcare

Speed-vacuum – tørker:

Vapornet VN100, Savant

Refrigerated vaporetrap RVT4104

Speedpressure dryer SP 121P

Vacuume pumpe OFP 400

Reagenser

MES

Carbodiimide

0,05 M NaOH

Destillert vann

TRIZMA

NaBD₄

Iseddik

Natriumazid

Prosedyre

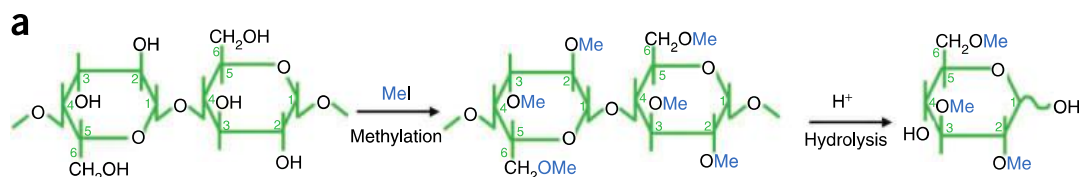
- 1) Vei inn ca 1 mg prøve i et glassrør.
- 2) Løs prøven i 1 ml destillert vann, og tilsett 200 µl MES og 400 µl med 500 mg/ml carbodiimide som er nylig løst i vann. Inkuberes i romtemperatur i 3 timer.
- 3) Tilsett 1 ml 2M TRIZMA, og kjøøl løsningen på is i ca 5 minutter. Deretter tilsettes 1 ml med 70 mg/ml natriumbordeuteride (nylig løst i 0,05 M NaOH)
- 4) Prøvene inkuberes ved 4 °C over natten.

- 5) 5 X 100 µl iseddik tilsettes for å ødelegge det som er i overskudd av NABD₄ i løsningen. Røret ristes mellom hver tilsetning slik at man sikrer at man får fjernet alt av reduktanten.
- 6) 2,5 ml fra løsningen settes på PD-10 kolonne. Når løsningen har rent igjennom tilsettes 3,5 ml vann. Vannløsningen som kommer ut samles opp og frysetørkes på Speed Vacuum-tørkeren.

Metylering med MeI i basisk miljø

Prinsipp

Metylering utføres for å kunne fastslå hva slags bindinger de ulike sukkerene har. Frie hydroksylgrupper ioniseres ved hjelp av et kraftig basisk miljø og metyleres så med metyljodid som metyleringsreagens. I og med at det er kun de frie hydroksyl-gruppene som metyleres vil de som inngår i en glykosid-binding ikke gjøre det. Slik kan man differensiere mellom de og fåstslå hvilke posisjoner i suktermolekylet som inngår i en binding med et annet molekyl. (Ciucanu & Kerek, 1984)



Figur 4-10. De frie hydroksyl-gruppene metyleres, slik at de blir ulike hydroksylgruppene som inngår i en glykosid-binding. (Pettolino et al, 2012)

Utstyr

Nitrogen-tørker

Glasspipetter med korte og lange spisser

Vortex-mikser

Sentrifuge

Risteapparat

Morter og pistill

Reagenser

MeOH

DMSO – dimetylsulfoksid

NaOH – pellets

CH₃I - metyl-jodid

Natriumtiosulfat

Diklormetan

Prosedyre

- 1) Tilsett 100-200 µl MeOH i hver prøve, og tørk inn igjen under nitrogen-gass.
- 2) Tilsett 500 µl DMSO og rist prøven ved hjelp av orbital-risteren i ca 20 minutter.
- 3) Knus NaOH-pellets i en mortar og tilsett DMSO. Bruker 2 pellets per ml DMSO (≈ 120 mg/ml)
- 4) Tilsett 500 µl av blandingen til hver prøve ved hjelp av en glasspipette der store deler av spissen er fjernet (500 µl merkes av på forhånd). Prøv å få mest mulig direkte ned i prøveløsningen.
- 5) Røret fylles med nitrogen-gass (for å erstatte oksygen) i ca 30 sekunder. Ristes så med lokket på i 30-50 minutter.
- 6) Tilsett 100 µl metyljodid og rist i 10 minutter.
- 7) Tilsett på ny 100 µl metyljodid og rist i 10 minutter.
- 8) Tilsett 200 µl metyljodid og rist i 20 minutter.

9) Prøven overføres til et stort glassrør og tilsettes 10 ml nylaget 100mg/ml tiosulfat i vann og 2 ml diklormetan. Mikses godt på vortex-mikser i minimum 40 sekunder. Prøvene sentrifugeres og man tar vare på diklormetan-fasen.

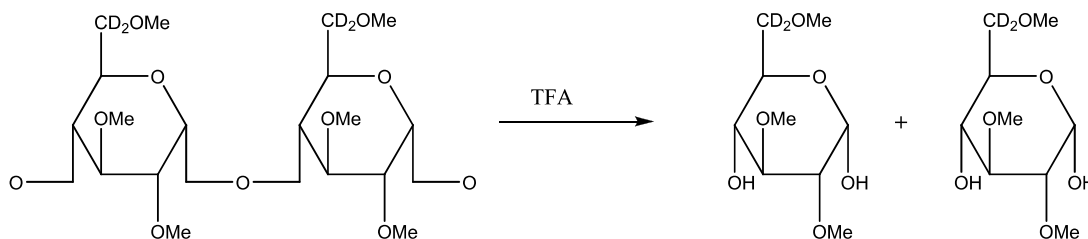
10) Diklormetan-fasen vaskes 4 ganger med 5 ml vann, prøvene blandes godt og sentrifugeres for hver vask.

11) DKM-fasen dampes av under nitrogen-gass.

Hydrolyse

Prinsipp

Polysakkaridene må hydrolyseres før analyse på GC. Dette skjer ved hydrolyse av glykosidbindingene i surt miljø med TFA som reagens. TFA er både flyktig og effektiv og er derfor velegnet til bruk i metoden. (Pettolino et al, 2012)



Figur. 4-11. Hydrolyse av glykosidbindinger med TFA (Glæserud, 2008)

Utstyr

Nitrogen-tørker

Varmeskap Heraeus Instruments, Function line

Pipetter

Speed-vacuum

Reagenser

TFA

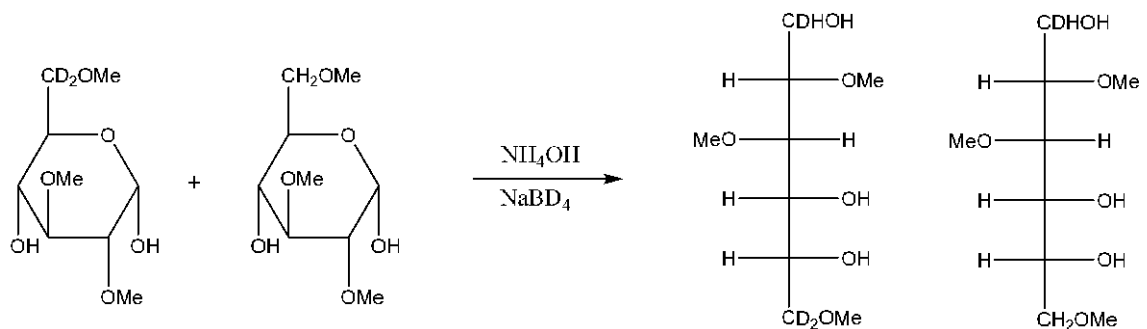
Prosedyre

- 1.) Tilsett 500 µl 2.5 M TFA til hver prøve og fyll røret med nitrogen-gass i mellom 20-30 sekunder.
- 2.) Sett prøvene i varmeskap ved 100-102 °C i 2 timer.
- 3.) Nedkjøl prøven og tørk i speedvacuum til den er helt inntørket.

Reduksjon

Prinsipp

Etter hydrolyse utsettes prøven for reduksjon med NaBD₄ og NH₄OH. Reduksjonen gjør at ringstrukturen åpner seg. NaBD₄ gjør at C1- atomet merkes med deuterium. Det at man åpner ringstrukturen gjør at man ikke kan vite om molekylet har α - eller β -konfigurasjon. (Pettolino et al, 2012)



Figur 4-12. Reduksjon av monosakkaridene, slik at de blir åpne ringstrukturer, og C1-atomet merkes med deuterium. (Glæserud, 2008)

Utstyr

Pipetter

Speed-vacuum

Ultralydbad

Reagenser

Vannfri MeOH

NH₄OH – ammoniumhydroksid

NaBD₄

5 % eddiksyre løst i MeOH

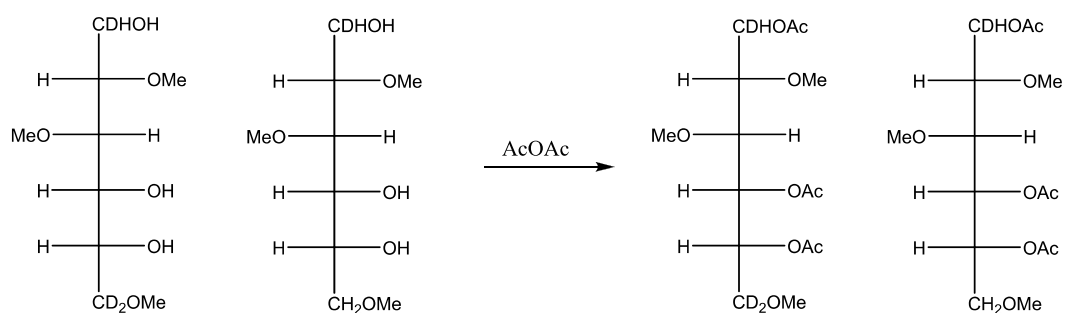
Prosedyre

- 1) Løs prøven i 500 µl 2 M NH₄OH og tilsett 500 µl nylig tillaget 1 M natriumbordeuteride. Sett prøven i ultralydbad i 1 minutt og la den så inkubere i 60 minutter.
- 2) Tilsett 50 µl iseddik 3 ganger for å fjerne overskuddet av reduktanten. Rist røret med prøve mellom hver gang. Prøven tørkes inn i speed-vacuum-maskinen.
- 3) Tilsett 2* 2,5 ml 5 % eddiksyre i MeOH og 2* 2,5 ml vannfri metanol for å fjerne borsyre. Tørkes i speedvacuum-maskinen mellom hver tilsetning. I alt 4 ganger.

Acetylering

Prinsipp

Acetylering er det siste trinnet i prøveopparbeidelse og gjøres for å øke flyktigheten til de delvis metylerte alditolene. Dette gjøres med eddiksyreanhydrid og 1-metylimidazol som katalysator. Etter acetylering har man såkalte PMAA eller delvis metylerte alditol acetater. De gruppene som er acetylerede var tidligere involvert i en glykosidbinding.



Figur 4-13. Acetylering av delvis metylerte alditoler. (Glaserud, 2008)

Utstyr

Nitrogen-tørker

Sentrifuge

Pipette

Vortex-mikser

Metyleringsrør i store størrelse

Reagenser

1-metylimidazol

Eddiksyre- anhydrid

Diklormetan

Prosedyre

1. Acetyler prøven ved å tilsette 200 µl 1-metylimidazol og 2 ml eddiksyre-anhydrid. Blandes godt på vortex og får stå i 10 minutter. Dersom krystallene ikke lar seg løse, sett prøvene litt i ultralydbad.
2. Tilsett så 10 ml vann for å fjerne overskudd av eddikanhydrid. Bland løsningen på vortex-mikser og la den få stå i 10 minutter.
3. Ekstraher løsningen i to runder med 1 ml diklormetan for hver gang. Bland i minimum ett halvt minutt på vortex og sentrifuger. Diklormetan-fasen tas vare på (den nederste) og slås sammen.
4. Når de er slått sammen vaskes de i to runder med 5 ml vann.
5. Ta diklormetan-fasen over i ett lite supelco-rør og tørk den forsiktig under nitrogen.
6. Før man skal bruke prøven løses den i passe mengde diklormetan, blandes godt og overføres til et mindre rør.

7. De prøvene som ikke skal brukes umiddelbart oppbevares ved -20 °C i tørket tilstand.

4.4.6 GC-MS

Prinsipp

GC-MS er en metode som brukes til å bestemme bindingsforholdene mellom suktermolekylene i et polysakkarid både kvalitativt og kvantitativt. Metoden har mye til felles med metode 4.4.3 (Gasskromatografi), men GC-MS har et massespektrometer som detektor istedenfor en flammeionisasjonsdetektor.

Monosakkaridene blir separert i gasskromatografen ved at de har ulik affinitet for den stasjonære fasen. De mest flyktige monosakkaridene går raskest gjennom kolonnen og inn i detektoren. I massespektrometeret ioniseres molekylene ved hjelp av en elektronstråle under vakuum. Disse ioniserte molekylene brytes så ned til ulike, mer stabile fragmenter, som har ulik masse/ ladningsforhold (m/z). I massespektretet får ionene ulik intensitet utifra molekylær størrelse og hvor mye det kvantitativt er tilstede i prøven.

Man kan identifisere de ulike monosakkaridene og hvordan bindingstyper de inngår i ved at man vet i hvilken rekke monosakkarider kommer ut av gasskromatografen, og at hver bindingstype har et unikt sett av fragmenter. Hvor mye det er av hver bindingstype kan kvantitativt bestemmes utifra intensitet av ionene. Det må justeres for at molekylær størrelse gir større intensitet i massespektretet. (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2010, kap 17)

Hoai Thi Nguyen Aas ved Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo, utførte hele prosedyren.

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

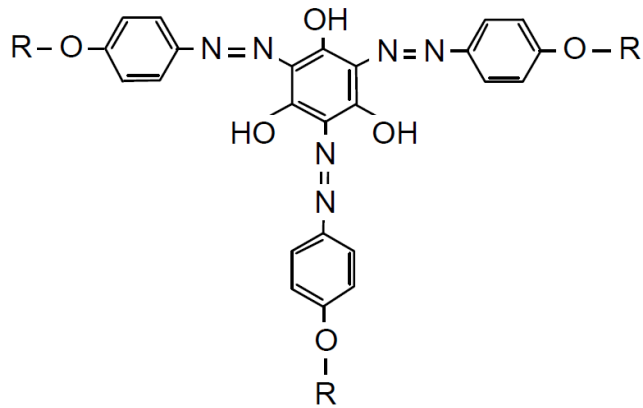
Prosedyre

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

4.4.7 Yariv reagens-test

Prinsipp

AG II lar seg påvise av beta-glucosyl-Yariv antigen [1,3,5-tri-(4-b-D-glucopyranosyl-oxypheylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene] også kalt β -D-glukosyl Yariv reagens. Dette skjer ved at man får en tydelig rødfarget utfelling ved kontakt mellom Yariv reagens og AGII. Denne metoden er svært enkel og sensitiv og er derfor en enkel måte å kvalitativt påvise tilstedeværelse av AGII. (Van Holst & Clarke, 1985)



Figur 4-14. β -D-glukosyl Yariv reagens. R = β -D-glukosyl. (Biosupplies Australia Pty Ltd)

Reagenser

Yariv reagens, 2 mg/ml

Positiv kontroll: Gum Arabica, 1 mg/ml

Destillert vann

Gel: Til en plate (ca 5*7 cm) trenger man:

35 mg agarose

30 mg NaCl

0,7 mg natriumazid

3,5 ml destillert vann

Utstyr

Justerbar plate

Vater

Gelbondfilm: Gelbond® film for agarosegel, GE Healthcare

Begerglass

2 Glassplater

Whatmanpapir

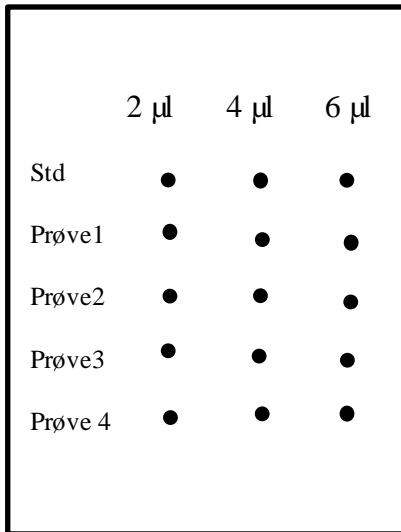
Kokeplate

Cellepapir

Kar med lokk

Prosedyre

1. 1 mg prøvemateriale, løses i 125 μ l destillert vann, slik at man får en konsentrasjon på 8 mg/ml
2. Gelbondfilm klippes ut slik at man får en plate på ca 5*7 cm. Den hydrofile siden legges i vater oppå en glassplate.
3. Ingrediensene til gelen veies ut i et lite begerglass, som varmes opp til kokepunktet.
4. Umiddelbart når det koker tas begerglasset til siden, og det tilsettes 50 μ l Yariv reagens. Løsningen helles så utover gelbondplaten og skal spre seg jevnt utover.
5. Når gelen har stivnet, lages det små brønner ved hjelp av vannsug. For hver prøve og for standarden lages det 3 brønner.
6. Det pipetteres ut prøve i de tre brønnene, forholdsvis 2, 4 og 6 μ l i hver sin brønn.
7. I bunnen av et kar legges det noen fuktete filterpapir. Deretter legges gelplaten i og det settes på et lokk. Dette skal stå i ro i ca 24 timer ved romtemperatur.
8. Etter 24 timer presses platen med en glassplate over vått whatman-papir og ti lag med cellepapir. En tung gjenstand brukes til å øve press.
9. Laget med cellepapir vendes og presses i nye ti minutter.
10. Der det har blitt utfelling kan man se en tydelig rød ring. Platen scannes eller kopieres med farger.



Figur 4-15. Eksempel på hvordan lage gelbondfilm-plate for fire fraksjoner + standard.

4.5 Immunomodulerende effekt

4.5.1 Komplementfikseringstest

Prinsipp

Pektiner og polysakkarider i plantecelleveggen kan ha innvirkning på immunsystemet. Dette kan undersøkes ved å se om de har innvirkning på komplementsystemet som er en del av det medfødte immunforsvaret. Måten man gjør dette på er at man sensibiliserer erythrocytter fra sau med antistoff fra kanin. I tillegg har man humant serum /komplement hvor man har fjernet de naturlige antistoffene mot saueblodceller. Så tar man de prøvene man vil undersøke og lar de interagere med humant serum. Deretter tilsetter man de sensibiliserte erythrocyttene.

Dersom polysakkaridene ikke har immunologisk aktivitet vil saueblodcellene hemolyseres av komplementet pga antistoffene fra kanin. Om de derimot har effekt vil hemolyse-graden gå ned. Man har ingen mulighet til å vite om polysakkaridene stimulerer eller hemmer komplementsystemet fordi uavhengig av hvem av de det er får man samme resultat. Ved en aktivering av komplementsystemet vil aktiveringen "bruke opp" komplementet, og ved en hemming vil de ikke få mulighet til å starte kaskaden som fører til hemolyse. (Michaelsen, Gilje, Samuelsen, Høgåsen & Paulsen, 2008)

Reagenser

Veronal / BSA- buffer:

Veronalbuffer (med en pH på 7,2), 2 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin 30%), og 0,02% natriumazid.

Fosfatbuffer (PBS)

Erytrocytter fra sau 10010, tappet 21.02.2014 og 28.04.14

Humant serum: ECG, tappet 18.12.2013

Antistoff: Virion 9020 Amboceptor fortynnet 1:10 i Veronal/BSA-bufferen

Standard: BP II

Destillert vann

Utstyr

Mikrotiterplate, 96 brønner, runde og flate brønner, Falcon eller WVR

Pipetter

Eppendorf – rør 1.5 ml

Teip

Glassørør

Whirlimixer, Heidolph REAX top

Sentrifuge

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

Mikroplate-leser: BIO-RAD iMark™ Microplate Absorbance Reader

Prosedyre

1. Vasking av blodceller

- Fjerner midlertidig supernatanten over erytrocyttene, og tar ut blod. Beregner 100 μ l blod per plate, inkludert platen for titeringskurven og prøvene.
- Blodcellene vaskes og sentrifugeres i to omganger med fosfatbuffer og en gang med Veronal/BSA-buffer. For hver vask tilsettes ca 5-6 ml med buffer, og blod og buffer blandes ved hjelp av pipetten.
- Det sentrifugeres mellom hver vask og supernatanten kastes.

2. Sensibilisering av blodceller

- 15 μ l Virion 9020 amboceptor, 60 μ l blodceller og 5,925 ml Veronal/BSA-buffer blandes i glassrør og inkuberes i varmeskap med risting i 30 minutter.
- Blandingen sentrifugeres når den er ferdig inkubert. Vaskes så i to omganger med fosfat-buffer og en gang med veronal/BSA-buffer.
- De pakkede blodcellene blandes så i 5,940 ml med Veronal/BSA-buffer og settes i kjøleskap til det skal brukes.

3. Fortynning av prøvene

- Ca 1 mg av hver prøve ble veid inn og løst i Veronal/BSA-buffer slik at den fikk en konsentrasjon på 1mg/ml.
- Prøvene ble enten fortynnet i en 2-folds fortynning fra 125 mg/ml, en 4-folds fortynning fra 125mg/ml eller 4-folds fortynning fra 500 mg/ml og nedover. Valg av fortynningsrekke blir gjort på bakgrunn av tidligere observert immunomodulerende effekt fra prøvene.

Rør	Konsentrasjon i prøveløsningen	Forhold prøveløsning og buffer
	1 mg / ml	Stamløsning
Rør 1	250 µg / ml	250 µl fra stamløsning + 750 µl Veronalbuffer
Rør 2	62,5 µg / ml	250 µl fra rør 1 + 750 µl Veronalbuffer
Rør 3	15,6 µg / ml	250 µl fra rør 2 + 750 µl Veronalbuffer
Rør 4	3,9 µg / ml	250 µl fra rør 3 + 750 µl Veronalbuffer
Rør 5	0,98 µg / ml	250 µl fra rør 4 + 750 µl Veronalbuffer
Rør 6	0,25 µg / ml	250 µl fra rør 5 + 750 µl Veronalbuffer

Tabell 4-1. Viser en 4-folds fortynningsrekke som ble brukt for de gelfiltrerte fraksjonene fra bark og rotbark.

Rør	Konsentrasjon i prøveløsningen	Forhold prøveløsning og buffer
	1 mg / ml	Stamløsning
Rør 1	250 µg / ml	250 µl fra stamløsning + 750 µl Veronalbuffer
Rør 2	125 µg / ml	500 µl fra rør 1 + 500 µl Veronalbuffer
Rør 3	62,5 µg / ml	500 µl fra rør 2 + 500 µl Veronalbuffer
Rør 4	31,25 µg / ml	500 µl fra rør 3 + 500 µl Veronalbuffer
Rør 5	15,6 µg / ml	250 µl fra rør 4 + 750 µl Veronalbuffer
Rør 6	7,8 µg / ml	250 µl fra rør 5 + 750 µl Veronalbuffer

Tabell 4-2. Viser en 2-folds fortynningsrekke som ble brukt for de gelfiltrerte fraksjonene fra blader.

Rør	Konsentrasjon	Forhold prøveløsning og buffer
	500 µg / ml	Stamløsning
Rør 1	125 µg / ml	250 µl fra stamløsning + 750 µl Veronalbuffer
Rør 2	62,5 µg / ml	500 µl fra rør 1 + 500 µl Veronalbuffer
Rør 3	31,25 µg / ml	500 µl fra rør 2 + 500 µl Veronalbuffer
Rør 4	15,6 µg / ml	500 µl fra rør 3 + 500 µl Veronalbuffer
Rør 5	7,8 µg / ml	250 µl fra rør 4 + 750 µl Veronalbuffer
Rør 6	3,9 µg / ml	250 µl fra rør 5 + 750 µl Veronalbuffer

Tabell 4-3. Viser en 2-folds fortynningsrekke som ble brukt for den positive kontrollen BP II.

4. Titreringskurve for komplement

- 50 µl Veronal/BSA-buffer pipetteres i 4 brønner for hver fortynning, i alt 28 brønner. 4 brønner fylles med 100 µl destillert vann.
- Lages en fortynningsrekke for komplementet med Veronal/BSA-buffer og komplement i forholdene 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40 og 1:30. Se tabell 4-1.
- 50 µl komplement / buffer pipetteres i de brønnene med buffer i. Platen inkuberes med risting i varmeskapet i 30 minutter.
- 50 µl sensibiliserte blodceller tilsettes alle brønnene med buffer eller vann i. Inkuberes på ny i 30 minutter, med risting.
- Platen sentrifugeres, og 100 µl fra hver brønn overføres til en flatbunnet plate.
- Platen sentrifugeres for å fjerne luftbobler, og resultatet leses så av i en mikroplateleser ved absorbans 405 nm. Den fortynningen av komplement som ga hemolysegrad nærmest 50 % brukes videre i selve testen.

Komplement: buffer	Komplement (µl)	Veronalbuffer (µl)
1:30	10	290
1:40	10	390
1:50	10	490
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890

Tabell 4-4. Tabell for hvordan titreringsrekken fortynnes.

5. Prosedyre for testen

- 50 µl fra hver fortynning ble pipettert i en rundbunnet brønn, med to paralleller for hver fortynning.
- 4 brønner ble tilsatt 100 µl destillert vann og 4 brønner ble tilsatt 50 µl Veronal/BSA-buffer.
- 50 µl komplement fortynnet i Veronal/BSA-buffer ble tilsatt alle brønnene med enten prøve eller buffer i. Platen ble inkubert med risting i 30 minutter.

- 50 µl sensibiliserte blodceller ble tilsatt alle brønnene med innhold, og inkubert med risting i 30 minutter.
- Platen ble sentrifugert og 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet plate.
- Platen ble sentrifugert for å fjerne luftbobler og absorbansen ble avlest ved 405nm.

Beregninger

Lyseringsgrad:

Absorbans-kontroll / Absorbans – vann * 100%

%-hemming fra de ulike prøve-fortynningene

(Absorbans – kontroll – Absorbans- prøve)/ Abs kontroll * 100%

Betingelser

Absorbansen leses av ved 415 nm.

Alle platene er tildekket med plast under inkubering for å unngå fordamping.

Sentrifugering: 3 min, 1000 rpm

5 Resultater og diskusjon

5.1 Isolering av polysakkaridene

5.1.1 Ekstraksjon

Plantedeler av rotbark, bark og blader fra planten *Fagara zanthoxyloides* ble høstet og tørket i Mali. 200 mg fra hver plantedel; blader, bark og rotbark, ble ekstrahert ved hjelp av ASE. Det ble først ekstrahert med organiske løsningsmidler med økende polaritet for å fjerne lavmolekylære og upolare forbindelser. Løsningsmidlene som ble brukt var heksan, etylacetat og etanol. (metode 4.2.1 Ekstraksjon av plantematerialet på Dionex Model ASE@350) Ekstraktene ble oppkonsentrert og tatt vare på i tilfelle man ønsker å bruke de i en senere studie. Deretter ble det ekstrahert med etanol og vann i forholdet 1:1. Polysakkarider er som kjent løselig i vann og ekstraktene fra de plantedelene ble brukt videre. Ved flere forsøk på ekstraksjon med 100 °C vann ved hjelp av ASE tettet cellene seg på grunn av svelling av plantematerialet. Ekstraksjon med vann ble derfor utført ved koking i kjele (metode 5.2.2 Ekstraksjon med vann). Etter ekstraksjon ble ekstraktene dialysert for å fjerne fargestoffer og andre lavmolekylære forurensninger.

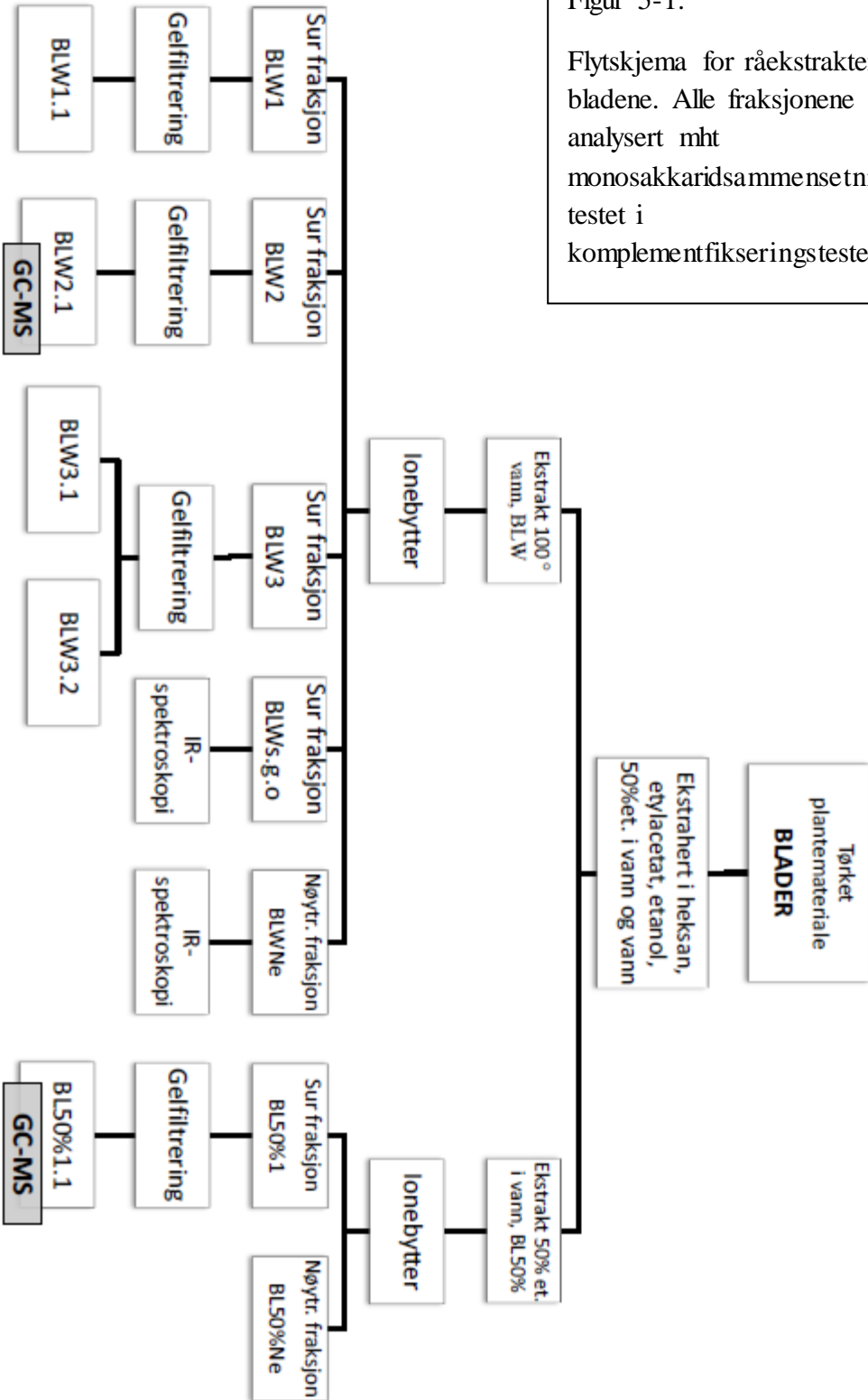
Stivelse består av kjedede glukosemolekyler og er ikke av interesse for senere karbohydratanalyser, hverken i strukturanalyser eller immunologiske tester. Det er særlig ved struktur-analyser at stivelse kan føre til misvisende resultater. Stivelse består av terminale 4- og 4-6 bundede glukosemolekyler. Tilsvarende bindinger kan finnes både i xyloglukaner, cellulose, og (1,3-1,4)- beta-glukaner og stivelse bør derfor fjernes for å unngå feiltolkning i størst mulig grad. (Pettolino et al, 2012)

De 6 råekstraktene fra vann og 50% et. i vann ble testet med jod-jod-kalium (metode 5.1.12), og alle de tre vannekstraktene testet positivt på innhold av stivelse. Dette ble fjernet ved hjelp av enzymet α -amylase (metode 5.2.3), som er en endohydrolase som klipper opp stivelse til glukose. De tre vannekstraktene ble deretter filtrert ved hjelp av vannsug gjennom ett filter på 5 μ m og dialysert for å fjerne glukose. Før dialysen ble 50 ml fra vannekstraktene og 25 ml fra 50% et. i vann-ekstraktene frysetørket og analysert med gasskromatografi.

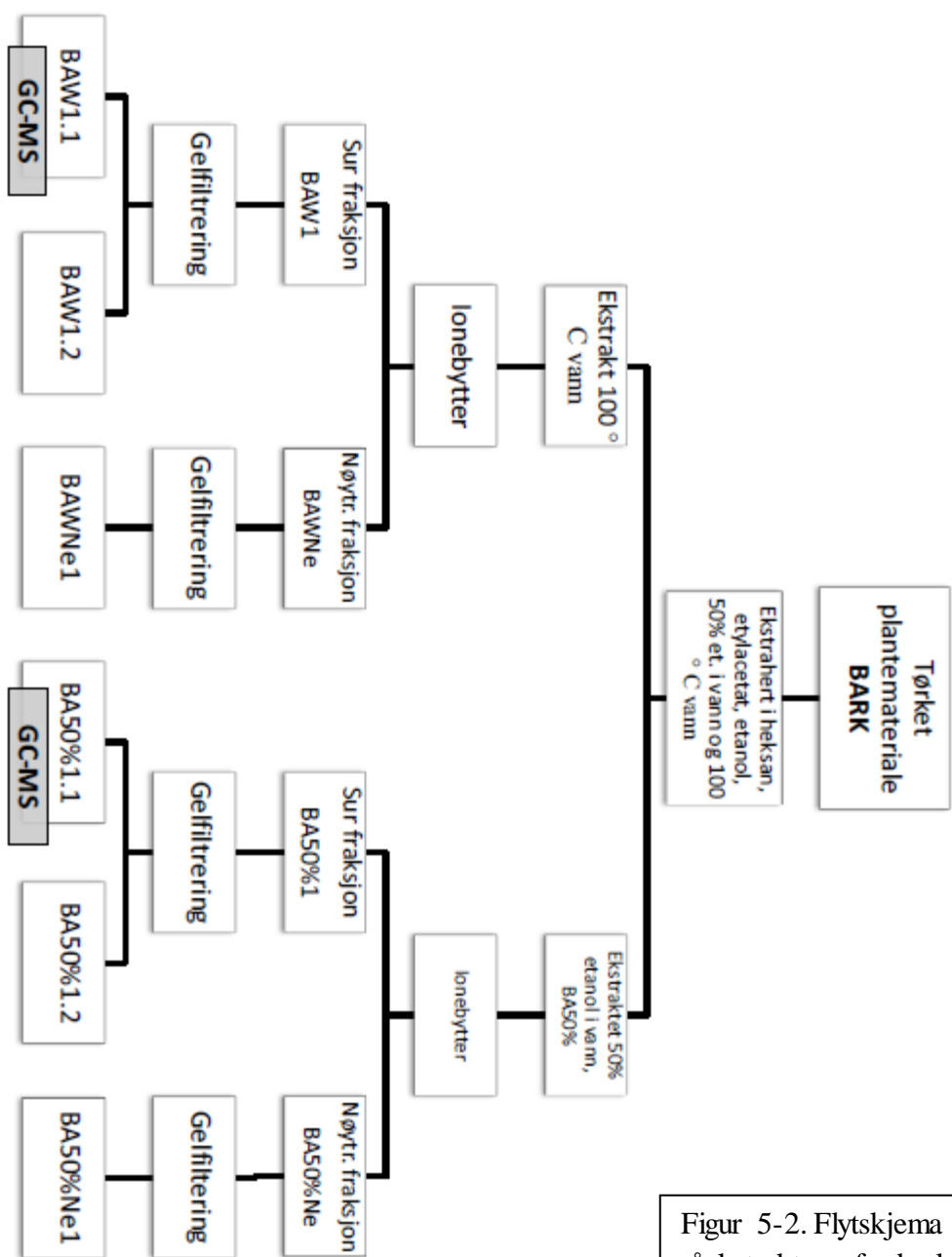
Fraksjon	Stivelse	Mengde karbohydrat totalt i råekstraktene
Blader vann	Ja	3,95 gram
Blader 50% et.og vann	Nei	
Bark vann	Ja	7,46 gram
Bark 50% et.og vann	Nei	
Rotbark vann	Ja	14 gram
Rotbark 50% et.og vann	Nei	

Tabell 5-1. Oversikt over hvilke ekstrakter som har stivelse, og hvor mye karbohydrat det totalt er tilstede i de ekstraktene som testet positivt.

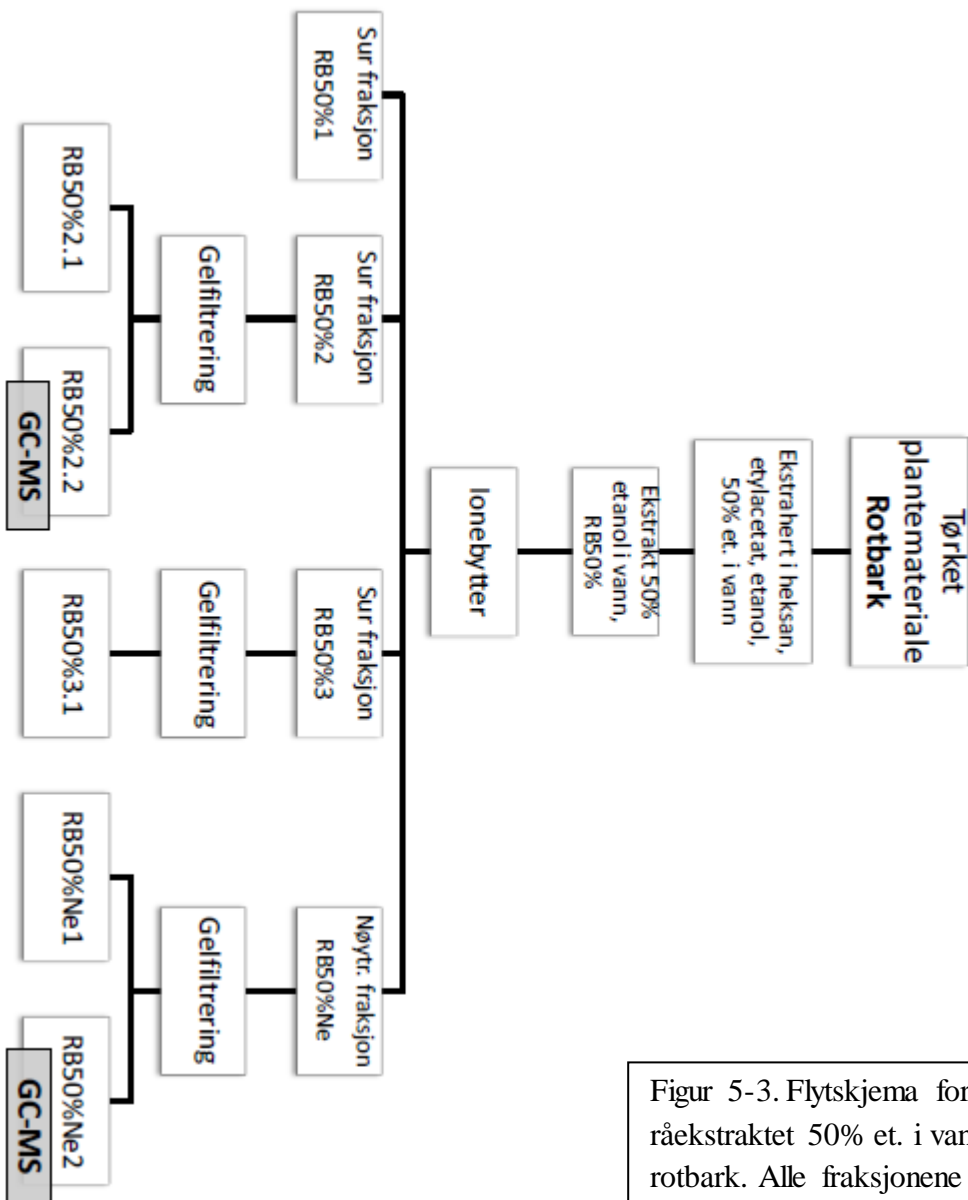
Etter degradering av stivelse og dialysering for å fjerne glukosen ble ekstraktene ble oppkonsentrert. Vannekstraktene ble inndampet til ca 500 ml og 50%-etanol-vann ekstraktene til ca 250 ml.



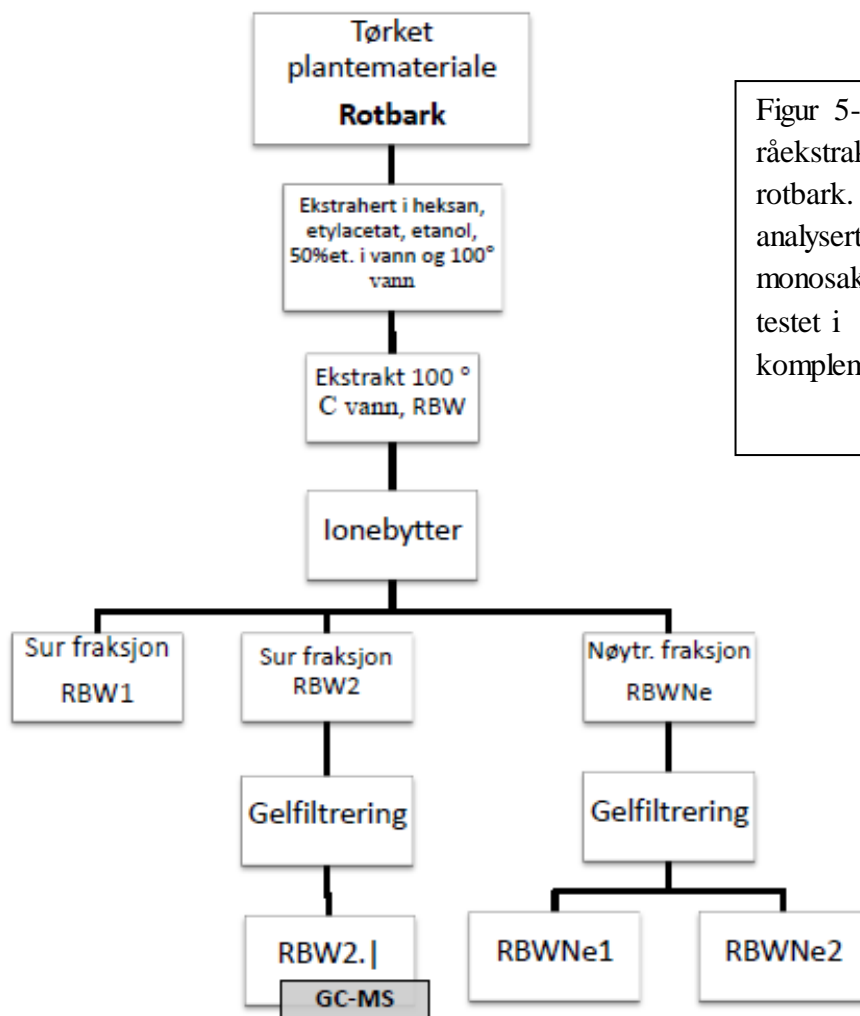
Figur 5-1.
 Flytskjema for rækstraktene fra bladene. Alle fraksjonene er analysert mht monosakkaridsammensetning og testet i komplementfikseringstesten.



Figur 5-2. Flytskjema for råekstraktene fra bark. Alle fraksjonene er analysert mht monosakkaridsammensetning og testet i komplementfikseringstesten.



Figur 5-3. Flytskjema for råekstraktet 50% et. i vann fra rotbark. Alle fraksjonene er analysert mht monosakkaridsammensetning og testet i komplementfikseringstesten.



Figur 5-4. Flytskjema for råekstraktet 100 °C vann fra rotbark. Alle fraksjonene er analysert mht monosakkaridsammensetning og testet i komplementfikseringstesten.

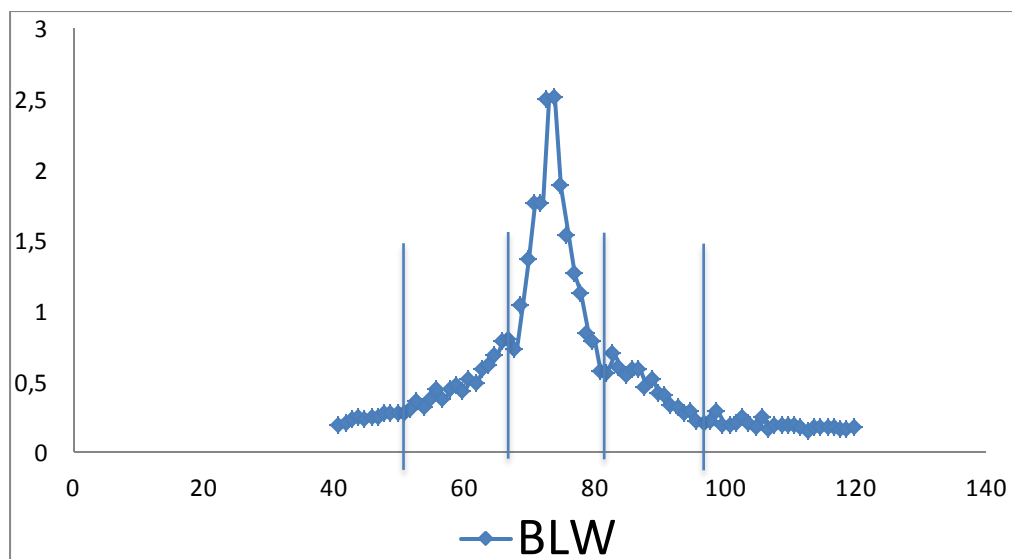
Flytskjemaene for rotbark er delt i to skjemaer, figur 5-4 og 5-5 fordi det var så mange fraksjoner fra ekstraktet 50% et. i vann at man trengte to for at de skulle være lette å lese.

5.1.2 Ionebytter

De 6 ekstraktene RBW, RB50%, BLW, BL50%, BAW og BA50% ble eluert gjennom en ionebytterkolonne med ANX Sepharose Fast Flow og separert etter hvor sterk ionestyrke de hadde (metode 5.2.4.). Ekstraktene ble filtrert før applisering, og det ble påsatt ca 100-150 ml for hver runde. For ekstraktene fra 50% etanol i vann tok det 2 runder for hvert ekstrakt, og for vannekstraktene tok det 3 runder.

De nøytrale fraksjonene ble først eluert ut med destillert vann, og de sure fraksjoner med NaCl i økende ionestyrke (0,1-1,5 M). Til sist ble kolonnen renses for de aller sureste polysakkaridene og fargestoffer som fremdeles satt fast i kolonnen med 2M NaCl. Dette eluatet ble kastet til tross for at det inneholder polysakkarider. Det er fordi alle sureste fraksjonene sjelden er spesielt biologisk aktive. Noen av ekstraktene gjorde kolonnen så skitten at 2 M NaCl ikke fjernet alle fargestoffene, og den ble da ytterligere renses med NaOH og natriumacetat.

Etter hver runde ble utbyttet analysert med fenol-svovelsyre-testen (metode 5.3.1), og ulike fraksjoner ble slått sammen ut i fra karbohydratprofilen til ekstraktet. De ulike fraksjonene ble fryst ned underveis til alle rundene for ett ekstrakt var utført. De tilhørende fraksjonene fra de to eller tre rundene ble slått sammen. De ble dialysert for å fjerne salter, oppkonsentrert og frysetørket.

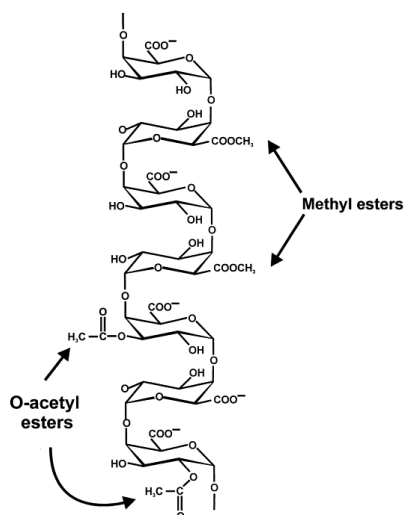


Figur 5-5. Eksempel på resultat fra karbohydratanalyse BLW etter ionebytter. Disse ble delt inn i tre fraksjoner som vist i figuren.

Plantedel	Vekt før ekstraksjon	Fraksjon	Utbytte	Nøytrale fraksjoner	Sure fraksjoner
Blader	200 g	100 °C H ₂ O	3390 mg	1783 mg BLWNe	214 mg BLW1 1207 mg BLW2 179 mg BLW3 4,3 mg BLW.s.g.o
		50% ETOH 50% H ₂ O i 70 °C	1010 mg	451 mg BL50%Ne	561 mg BL50%1
Rotbark	200 g	100 °C H ₂ O	370 mg	98 mg RBWNe	14 mg RBW1 255 mg RBW2
		50% EtOH 50% H ₂ O i 70 °C	700 mg	346 mg RBWNe	6,9 mg RB50%1 270 mg RB50%2 46 mg RB50%3
Bark	200 g	100 °C H ₂ O	420 mg	131 mg BAWNe	287 mg BAW1
		50% EtOH 50% H ₂ O i 70 °C	640 mg	357 mg BA50%Ne	285,3 mg BA50%1

Tabell 5-2. Tabellen viser utbytte etter ionebytter for de ulike rækstraktene.

Eluatet fra de nøytrale polysakkaridene til BLW så veldig tyktflytende ut, og hadde i tillegg en uklar, lys farge. Det ble derfor diskutert om galakturonsyrene kunne være metylforestret slik at de kom ut sammen med de andre nøytrale polysakkaridene. Ved en slik metylforestring vil de sure gruppene bli nøytrale, slik som det er vist i figur 5-6. Det tyktflytende eluatet kunne også skyldes en overbelastning av kolonnen slik at en del av de sure polysakkaridene gikk rett igjennom. Eluatet ble derfor oppkonsentrert og applisert kolonnen på ny. Det ble først eluert med destillert vann, slik at man på ny fikk ut de nøytrale polysakkaridene. Så ble det eluert med NaCl fra 0,1 M- 1,5 M slik at man fikk ut de sure polysakkaridene som eventuelt kunne være tilstede. Ved analyse av karbohydratprofilen med fenol-svovelsyre-test kunne man se at det var en sur fraksjon tilstede. Ved frysetørking fikk man ett utbytte av denne sure fraksjonen, BLWs.g.o på 4,3 mg.



Figur 5-6. De sure gruppene fremstår nøytrale pga metylforestring. (Ridley, O'Neill & Mohnen, 2001)

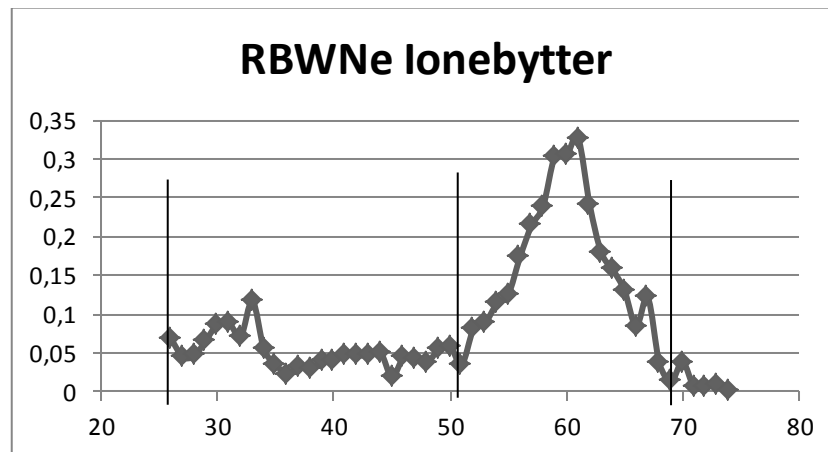
Når man sammenligner resultatene fra monosakkarid-analysen ser man at BLWs.g.o er svært lik i sammensetningen med BLW2, noe som tilsier at det var en overbelastning av kolonnen. I tillegg ble både BLWNe og BLWs.g.o undersøkt med IR-spektroskopi med det formål å avdekke ester-grupper i prøven. Begge prøvene ga negativt resultat.

Alle de 18 fraksjonene ble testet med komplementfikserings-testen i flere omganger og av ulike og delvis ukjente årsaker var ikke alle resultatene helt entydige. Men testene viste at BL50%Ne og BLWNe hadde svært liten eller ingen komplementfikserende effekt, noe som ofte er forbundet med nøytrale polysakkarider. Det ble derfor bestemt at de ikke skulle opparbeides videre. BLWs.g.o, RB50%1 og RBW1 hadde alle et utbytte på under 15 mg. Da dette er svært liten mengde å jobbe videre med ble det besluttet å ikke gelfiltrere disse tre prøvene.

5.1.1 Gelfiltrering

Gelfiltrering er en nyttig metode for å separere stoffer med hensyn til molekylvekt, og kan derfor brukes til separasjon, opprensning og til å bestemme molekylvekt. 13 fraksjoner ble opprenset på gelfiltreringskolonnen. (metode 5.2.5) Hvilke fraksjoner som skulle gelfiltreres ble bestemt ut ifra resultater i komplementfikseringstesten, innholdet av monosakkarider og hvor stor mengde med prøvemateriale som var igjen.

Det frysetørkede prøvematerialet ble oppløst i ca 4 ml destillert vann, eller så mye som var nødvendig for at det løste seg helt opp. De ble filtrert med et filter på 0,2 µm før påsetting på kolonnen. BLW1 og BL50%1 ble applisert på en mindre kolonne, "High Load Superdex 200 16/60", mens de andre ble applisert på en større kolonne, "High Load Superdex 200 26/60". Destillert og degasset vann ble brukt som elueringsmiddel for alle prøvene, og en fraksjonssamler ble brukt for å separere eluatet som kom ut av kolonnen. På den lille kolonnen var det nødvendig med to runder med 40 mg hver gang for begge prøve, mens den store kolonnen hadde nok kapasitet til å ta opptil 100 mg av gangen. 5 av 13 prøver viste to tydelige topper, eller hadde en slik karbohydrat- profil i fenol-svovelsyre-testen at det var naturlig å dele den inn i to fraksjoner.



Figur 5-7. Eksempel på karbohydrat-profil med fenol-svovelsyre-test for RBWNe

I figuren ser man et eksempel på hvordan fraksjonene ble inndelt. Mellom rør 50 og 70 har man en tydelig topp som har blitt kalt fraksjon RBWNe2. Fra rør 28 og frem til 50 har man også polysakkarider men i mindre mengder, de gir derfor fra seg mindre intensitet i farge. Disse har derfor blitt samlet i en egen fraksjon kalt RBWNe1.

Etter gelfiltrering og inndeling i fraksjoner ble prøvene oppkonsentrert og frysetørket. Siden elueringsmiddelet som ble brukt var destillert vann, behøvdtes det ikke dialyse i etterkant. Som man kan se av tabellen hadde BLW1 og BL50%1 som ble påsatt den minste kolonnen lavt prosentvis utbytte i forhold til de andre prøvene. Under filtrering av BA50%1 veltet begerglasset med oppløst prøvemateriale slik at ca halvparten forsvant. Så usikkert hvor mye som egentlig ble påsatt kolonnen.

Tabell over utbytte i forhold til applisert mengde prøvemateriale:

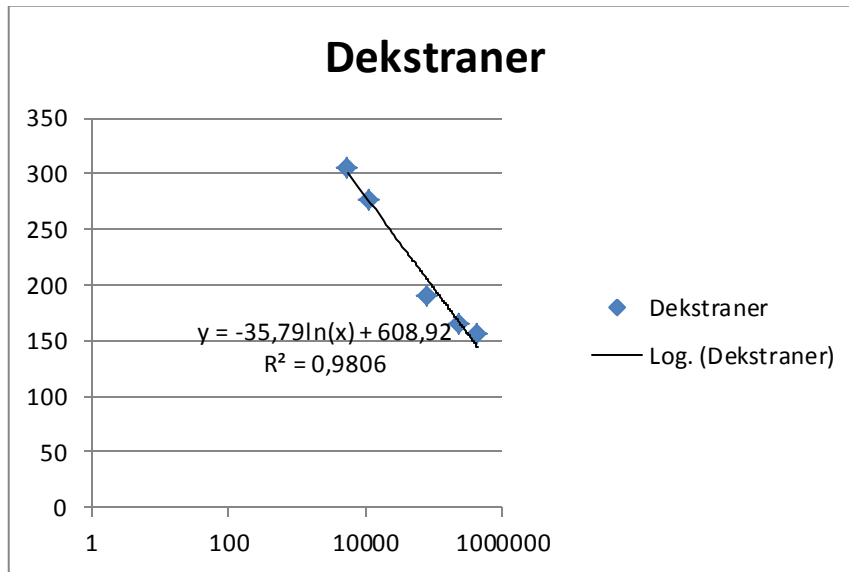
	På satt mengde	Fraksjon	Utbytte	Utbytte %
BLW1	80 mg	BLW1.1	4 mg	5
BLW2	100 mg	BLW2.1	79,1 mg	79
BLW3	100 mg	BLW3.1	2,5 mg	61
		BLW3.2	58,1 mg	
BL50%1	80 mg	BL50%1.1	22,3 mg	28
RBW2	100 mg	RBW2.1	53,8 mg	54
RBWNe	98 mg	RBWNe1	18 mg	47
		RBWNe2	28 mg	
RB50%2	45 mg	RB50%2.1	12,5 mg	62
		RB50%2.2	15,6 mg	
RB50%3	26 mg	RB50%3.1	15,3 mg	59
RB50%Ne	100 mg	RB50%Ne1	18 mg	44
		RB50%Ne2	25,5 mg	
BAW1	100 mg	BAW1.1	36,7 mg	58
		BAW1.2	20,8 mg	
BAWNe	100 mg	BAWNe1	28 mg	28
BA50%1	100 mg	BA50%1.1	12,6 mg	13*
BA50%Ne	100 mg	BA50%Ne1	51 mg	51

Tabell 5-3. Utbytte etter gelfiltrering i mg og %.

* Glasset med oppløst BA50%1 veltet før prøvepåsetting, og mye av løsningen forsvant. Derfor bare 13 % "utbytte".

BLW1 og BL50%1 som ble eluert gjennom den minste kolonnen hadde et lavt utbytte på 5 og 28%, sammenlignet med de andre fraksjonene. Dette skyldes trolig noe teknisk med den minste kolonnen.

Gelfiltrering kan være en metode for å anslå polysakkaridets størrelse angitt i molekylvekt. Dette er fordi kolonnen separerer molekyler med hensyn til størrelse, der de største molekylene beveger seg lettere og raskere gjennom kolonnen. Siden det var flest prøver filtrert på den store kolonnen ble det for denne laget en standardkurve. Kurven ble laget ved å gelfiltrere 5 ulike dekstraner med kjent molekylvekt, for så å se på hvor toppen kom ut i karbohydrat-profilen. De fem standardene ble plottet inn i ett diagram der y-aksen var antall milliliter som gikk gjennom kolonnen før toppen kom ut og x-aksen var molekylvekt i log-skala. Det ble beregnet en regresjonslinje med r^2 -verdi 0,98. En r^2 -verdi så nærme tallet 1 vil si at regresjonslinjen er en relativt nøyaktig måte å anslå molekylvekt til polysakkarider av ukjent størrelse.



Figur 5-8. Standardkurve for dekstraner med kjent molekylvekt for High Load superdex200 26/60. X-aksen viser molekylvekten i dalton (Da)

Tabell over spredning i molekylvekt i kDa for de ulike gelfiltrerte fraksjonene

	Fra	Til	Hovedtopp	Sekundærtopp
BLW 1.1 (liten kol.)*				
BLW 2.1	3	212	60	10
BLW 3.1	4	121	52	
BLW 3.2	139	244	184	
BL50%1.1 liten kol.*				
RBW 2.1	3	184	26	
RBWNe1	23	489	244	
RBWNe2	2	20	5	
RB50%2.1	23	322	92	
RB50%2.2	0,3	20	15	
RB 50%3.1	80	211	11	
RB50%Ne1	105	1303	160	426
RB50%Ne2	15	92	23	
BAW1.1	60	648	212	
BAW1.2	15	52	20	
BAWNe1	2	23	6	
BA50%1.1	184	564	280	
BA50%1.2	2	159	79	
BA50%Ne1	2	160	5	

Tabell 5-4. Oversikt over molekylvekten i kDa til de ulike fraksjonene etter gelfiltrering

* Har ikke dekstrankurven for prøver gelfiltrert på High Load Superdex prep grade 200, størrelse 16/60.

Tabellen over de gelfiltrerte prøvenes molekylvekt viser en stor spredning i størrelsen på polysakkaridene. Den fraksjonen med aller høyest molekylvekt er RB50%Ne1, som går opp til 1,3 mill Da i str. Det er stor spredning innenfor de ulike plantedelene. Fraksjoner fra blader varierer fra 3- 24 kDa, rotbark fra 0,3- 130 kDa og bark fra 2- 64 kDa. Bladene har generelt sett lavere molekylvekt enn rotbark og bark. Rotbark har den største spredningen innad i molekylvekt for de ulike fraksjonene.

5.2 Struktur- og aktivitetsbestemmelse av polysakkaridene i bladene

5.2.1 Monosakkaridsammensetning

Alle fraksjoner har blitt undersøkt med gasskromatografi etter metanolyse og TMS-derivatisering (metode 5.4.1 og 5.4.2).

Sample-ID	BLW	BLW1	BLW2	BLW3	BLNe	BLWS.G	BL50%	BL50%1	BL50%Ne
Ara	8,7	8,6	3,5	4,3	10,9	3,2	34,4	25,3	31,6
Rha	18,7	7,5	31,8	35,1	24,2	38,1	4,8	3,0	1,2
Fuc	<DL	3,4	1,0	1,4	3,5	0,9	<DL	7,1	5,8
Xyl	<DL	0,5	<DL	0,1	<DL	0,7	0,0	0,4	<DL
Man	0,1	<DL	<DL		0,2	<DL	1,8	<DL	7,0
Gal	17,2	8,2	4,8	6,4	11,4	4,8	34,1	30,3	20,6
Glc	15,9	3,1	2,3	<DL	1,2	2,3	12,6	1,4	29,4
GlcA	0,8	12,4	<DL	<DL		4,1	0,3	0,7	
GalA	38,6	55,4	56,2	52,0	48,6	45,6	12,1	19,7	4,4
4-O-Me-GlcA		0,9	0,5	0,7		0,3		12,0	

Tabell 5-5. Monosakkaridsammensetning i bladene før og etter ionebytter, for vannekstraktet og ekstraktet i 50% etanol i vann

Som tidligere beskrevet ble vannekstraktet behandlet med amylase for å bryte ned stivelse. I den prøven, BLW, som ble analysert på GC er ikke degraderingsproduktet glukose dialysert vekk. Man kan også se stor prosentvis forskjell mellom innholdet av glukose i BLW sammenlignet med BLW1, BLW2, BLW3, BLW.s.g.o og BLWNe.

Alle prøvene inneholder arabinose, rhamnose, galaktose og galakturonsyre som er typiske sukker i pektiner. Fraksjonene fra vannekstraktet har høy andel GalA og relativt høy andel Rha og mindre arabinose og galaktose. Dette kan tyde på at det er mye hairy regions i pektinene i prøvene, enten med RGI og eller RGII. Hairy regions inneholder ofte strukturelle elementer som er viktige for biologisk effekt fra pektinene.

Prøvene fra ekstraktet 50 % etanol i vann skiller seg tydelig strukturelt fra prøvene fra vannekstraktet. Både BL50%, BL50%1 og BL50%Ne inneholder lite GalA sammenlignet med prøvene fra vannekstraktet. De inneholder derimot mellom 25-35 % arabinose og 20-34 %

galaktose. Arabinose og galaktose kan komme fra hemicellulose eller arabinogalaktaner som er en del av pektinet i området RGI. Arabinose kan også komme fra arabinaner som er en homopolymer.

Sample-ID	BLW1	BLW1.1	BLW2	BLW2.1	BLW3	BLW3.1	BLW3.2	BL50%1	BL501.1
Ara	8,6	9,1	3,5	4,6	4,3	2,1	5,3	25,3	32,3
Rha	7,5	7,1	31,8	28,4	35,1	27,4	29,0	3,0	2,8
Fuc	3,4	0,7	1,0	0,5	1,4	0,7	0,4	7,1	0,4
Xyl	0,5	0,7	<DL	0,3	0,1	0,4	0,6	0,4	0,9
Man	<DL	0,2	<DL	0,1		0,0	0,1	<DL	0,4
Gal	8,2	10,6	4,8	6,8	6,4	3,2	7,7	30,3	48,7
Glc	3,1	1,3	2,3	1,0	<DL	2,5	1,6	1,4	1,3
GlcA	12,4	3,5	<DL	0,7	<DL	16,1	2,8	0,7	3,3
GalA	55,4	66,9	56,2	56,9	52,0	46,3	52,5	19,7	6,6
4-O-Me-GlcA	0,9		0,5	0,7	0,7	1,2		12,0	2,7

Tabell 5-6. Monosakkaridsammensetningen i prøvene fra bladene etter ionebytter og etter gelfiltrering. Både for vannekstraktet og ekstraktet 50% et. i vann.

Etter opprensning på gelfiltreringskolonnen er monosakkaridsammensetningen relativt lik før og etter slik man kan se av tabell 5-6. Størst forskjell ser man på BLW3, der det etter gelfiltrering har blitt delt inn i to ulike topper BLW3.1 og BLW3.2. BLW3.1 har et veldig høyt nivå av GlcA i forhold til BLW3. Noen av toppene på kromatogrammet overlapper veldig, dette gjelder for eksempel GalA og GlcA. Den store forskjellen mellom BLW3 og BLW3.1 kan derfor skyldes overlapping, og at det trolig reelt sett er mindre GlcA tilstede i BLW3.1 enn det som er oppgitt i tabellen.

5.2.2 Bindingsforhold

Det ble valgt ut en fraksjon fra de gelfiltrerte fraksjonene fra både vannekstraktet og ekstraktet 50 % etanol i vann til å undersøke bindingsforholdene på GC-MS. De to fraksjonene ble prøveoppbeholdt med karboksylreduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon og acetylering før injeksjon og analyse på GC-MS (metode 5.4.5 og 5.4.6)

BLW2.1 ble valgt ut som fraksjon av de fire aktuelle prøvene fra vannekstraktet. Bare BLW2.1 og BLW3.2 hadde nok utbytte til å jobbe videre med. Monosakkaridsammensetningen var svært lik mellom de to, og foreløpige resultater fra

komplementfikseringstesten viste at de hadde noenlunde like høy aktivitet. Derfor ble BLW2.1 valgt ut.

Fra BL50% var det kun BL50%1 som ble opparbeidet med gelfiltrering, da BL50%Ne viste liten effekt i komplementfikserings-testen. Fra BL50%1 var det kun en fraksjon etter gelfiltrering, BL50%1.1, og denne ble valgt ut til å analyseres på GC-MS.

Mengden av hver bindingstype ble beregnet ut i fra arealet fragmentene ga i kromatogrammet i forhold til arealet for det spesifikke monosakkaridet totalt i hver prøve. Dette forholdstallet ble så multiplisert med mengden monosakkarider som ble detektert i metode fra tidligere gasskromatografi (metode 4.4.3 Gasskromatografi). Det ble også tatt hensyn til at arealet i massespekteret avhenger av molekylstørrelsen til monosakkaridene. Dette gjelder generelt for alle prøvene analysert fra blader, bark og rotbark.

Monoskarider og bindingstypene		BLW2.1	BL50%1.1
Ara	<i>Terminalf</i>	4,3	16,8
	1,2f	0,1	1,8
	1,3f	n.d	0,5
	1,5f	n.d	7,7
	1,2,5	n.d	6,7
	1,3,5	0,2	0,6
	Rha	<i>Terminal</i>	3
	1,2	22,2	n.d
	1,2,4	3,3	n.d
Xyl	1,4	n.d	0,9
Glc	<i>Terminal</i>	0,6	0,5
	1,3	n.d	0,3
	1,4,6	n.d	0,5
	1,2,3	n.d	0,1
GlcA	<i>Terminal</i>	0,7	3,5
Gal	<i>Terminalp</i>	2,6	0,3
	1,3	0,2	9,4
	1,6p	0,1	7
	1,2,4	1,1	0,1
	1,3,4	2,4	n.d
	1,3,6	0,4	30,5
GalA	<i>Terminal</i>	6	4,4
	1,2	n.d	1,3
	1,4	48,3	1,3
	1,3,4	2,6	n.d
Terminale		16,2	28,1
Forgreininger		13,1	40,1
Ratio		1,2	0,7

Tabell 5-7. Bindingsforholdene mellom sukker i BLW2.1 og BL50%1.1 N.d betyr at denne bindingstypen ikke er tilstede i prøven.

BLW2.1 er behandlet med α -amylase og degraderingsproduktet 1-4 Glc er dialysert ut av prøven. Tabellen bekrefter at det ikke lenger er 1-4 bundet glukose tilstede i prøven.

Pektiner har 1 \rightarrow 4 bundet GalA som «backbone», med unntak av den delen av pektinet kalt rhamnogalakturonan type I som har alternerende rhamnose og galakturonsyre som primærkjede. BLW2.1 inneholder en stor andel 1 \rightarrow 4 bundet GalA noe som betyr at store deler av strukturen er pektiner. I tillegg inneholder den cirka 22 % 1 \rightarrow 2 bundet Rha som tyder på en god andel RGI i BLW2.1. BLW2.1 har en del forgreinger i 4-posisjon på RGI-delen.

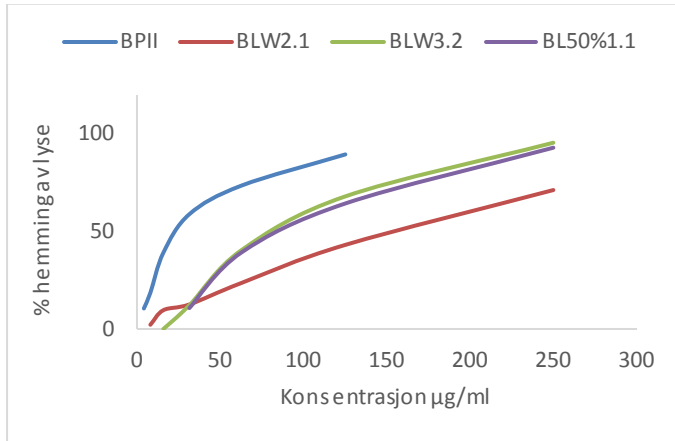
BLW2.1 har en liten andel 1 \rightarrow 3 - og 1 \rightarrow 3,6 bundet galaktose, som kommer fra arabinogalaktan type II. I tillegg har BLW2.1 spor av 1,4 Gal og noen prosent 1 \rightarrow 3,4 Gal i prøven som kan være en del av arabinogalaktan type I - struktur. De terminale glukuronsyrene kan være bundet til primærkjeden med homogalakturonan i 3-posisjon på galakturonene. (Renard, Crépeau & Thibault, 1999)

BL50%1.1 har en veldig liten andel 1 \rightarrow 4 - GalA og det er ikke detektert noe 1 \rightarrow 2- rha. BL50%1.1 har derfor ingen andel RGI i sin struktur. BL50%1.1 har likevel en veldig høy andel, 1 \rightarrow 6-, 1 \rightarrow 3- og 1 \rightarrow 3,6 - Gal tilstede i prøven som er en del av arabinogalaktan type II- struktur. BL50%1.1 består av en god del arabinan med terminal arabinose, 1 \rightarrow 5 bundet arabinose som kan inngå i lineær β -L-arabinan eller arabinan med forgreininger i posisjon 2 og/ eller 3.

5.2.3 Aktivitet i komplementfikseringstesten

Alle de gelfiltrerte ekstraktene ble testet for komplementfikserende aktivitet (metode 5.5.1). Aktiviteten ble sammenlignet med en positiv kontroll, *Biophytum petersianum* Klotzsch (Grønhaug et al, 2011), som har høy immunologisk aktivitet. Det var så lavt utbytte av BLW1.1 og BLW3.1 at det ikke var nok til å undersøkes i testen.

Den komplementfikserende aktiviteten måles utifra hvor mye fraksjonene inhiberer lyses av erythrocytter. Erythrocyttene er tilsatt komplement som uten påvirkning fra prøvene lyses erythrocyttene ca 50%.



Figur 5-9. Komplementfikserende aktivitet for 3 fraksjoner isolert fra bladene.

ICH-50 verdi

BPII	23,7
BLW2.1	149
BLW3.2	75,6
BL50%1.1	83,9

Tabell 5-8. ICH-50 verdi for tre fraksjoner fra bladene og for BP II.

BLW3.2 hadde dobbelt så høy aktivitet som BLW2.1 og burde derfor heller vært undersøkt på GC-MS istedenfor BLW2.1. Dette til tross for at monosakkaridsammensetningen fremsto svært lik mellom de to. Ingen av de undersøkte fraksjonene viste høyere aktivitet enn den positive kontrollen BPII. Bladene er lite brukt som tradisjonell medisin, men er blant annet i bruk som antihelminetikum hos infiserte husdyr i Benin. (Hounzangbe-adote et al, 2005) Forsøk gjort for å teste effekten av bladene i denne sammenhengen viste at de ikke var særlig effektive. Komplementfikseringstesten bekrefter muligens at de ikke er særskilt aktive, selv om det nødvendigvis ikke trenger være noen sammenheng mellom immunlogisk og antihelmentisk aktivitet.

5.3 Struktur- aktivitetsbestemmelse av polysakkaridene i rotbark

5.3.1 Monosakkaridsammensetning

Alle fraksjonene ble undersøkt på GC etter metanolyse og TMS-derivatisering (metode 5.4.1 og 5.4.2).

Sample-ID	RBW	RBW1	RBW2	RBWNe	RB 50%	RB50%1	RB50%2	RB50%3	RB50%Ne
Ara	0,8	16,6	7,8	23,7	11,3	20,7	33,3	6,6	11,3
Rha	0,3	5,0	10,1	1,2	7,8	5,6	2,3	10,1	3,4
Fuc	0,2	0,4	2,6	1,8	4,4	4,7	0,4	6,2	4,1
Xyl	0,2	7,0	1,2	12,0	0,1	0,3	0,6	<DL	<DL
Man	0,1	1,6	0,6	2,3	1,9	0,9	1,4	1,1	1,3
Gal	11,0	23,6	29,8	8,2	21,9	26,9	22,2	23,6	21,0
Glc	85,9	18,3	20,0	47,9	28,9	17,0	19,3	30,5	39,8
GlcA	0,3	1,2			3,7	0,3	0,6	7,5	5,6
GalA	0,8	25,8	27,1	2,2	20,1	23,5	19,0	14,3	12,3
4-O-Me-GlcA	<DL	0,6	0,9	0,6			0,9		1,2

Tabell 5-9. Monosakkaridsammensetning i bladene før og etter ionebytter, for vannekstraktet og ekstraktet i 50% etanol i vann

I RBW er ikke glukose dialysert vekk før monosakkaridanalysen og utgjør hele 85 % av innholdet. Likevel observerer man relativt høyt innhold av glukose i RBW1, RBW2 og RBWNe. Det samme gjelder prøvene fra RB50%, som ikke tester positivt på stivelse. Denne glukosen kommer enten fra andre typer polysakkarider som inneholder glukose eller så er ikke glukosen fullstendig fjernet etter degradingen av amylose.

De forskjellige fraksjonene etter ionebytter inneholder typiske sukker som er å finne i pektiner; arabinose, rhamnose, galaktose og galakturonsyre. Den fraksjonen som skiller seg tydeligst ut er RBWNe som har veldig høy andel med glukose, og lavere andel rhamnose, galaktose og galakturonsyre sammenlignet med de andre fraksjonene. Den inneholder derimot mer arabinose, xylose og mannose noe som er typisk for hemicelluloser.

Nesten alle de andre fraksjonene både de fra RBW og de fra RB50% inneholder også xylose og mannose som sammen med arabinose, glukose, galaktose som er sukkertyper som blant annet befinner seg i hemicellulose.

Sample-ID	RBW2	RBW2.1	RBWNe	RBWNe1	RBWNe2
Ara	7,8	6,9	23,7	22,0	19,1
Rha	10,1	7,9	1,2	1,5	1,0
Fuc	2,6	2,6	1,8	10,3	1,2
Xyl	1,2	1,5	12,0	21,2	11,0
Man	0,6	1,2	2,3	7,4	2,3
Gal	29,8	28,6	8,2	14,0	6,5
Glc	20,0	18,5	47,9	23,6	58,9
GlcA					
GalA	27,1	32,8	2,2		
4-O-Me-GlcA	0,9		0,6		

Tabell 5-10. Monosakkaridsammensetningen for fraksjonene fra vann-ekstraktet til rotbark etter ionebytter og etter gelfiltrering.

Monosakkarid-innholdet i prøvene fra rotbark vann er svært lik før og etter gelfiltrering. De to fraksjonene fra RBWNe skiller seg ut fra hverandre ved at RBWNe2 har høyere glukose-innhold, men lavere mannose, fucose, xylose og galaktose-innhold. Men begge prøvene har fremdeles størst andel sukker som er typiske for hemicelluloser.

Sample-ID	RB50%2	RB502.1	RB502.2	RB50%3	RB503.1	RB50%Ne	RB50Ne1	RB50Ne2
Ara	33,3	17,9	19,6	6,6	6,8	11,3	6,7	11,7
Rha	2,3	5,8	6,1	10,1	7,5	3,4	3,8	2,4
Fuc	0,4	5,1	6,3	6,2	6,5	4,1	7,3	5,1
Xyl	0,6	0,9	1,0	<DL	0,9	<DL	1,5	1,0
Man	1,4	0,2	2,3	1,1	2,8	1,3	2,6	2,5
Gal	22,2	31,4	34,2	23,6	25,5	21,0	22,3	19,7
Glc	19,3	18,6	22,8	30,5	29,6	39,8	28,6	43,2
GlcA	0,6	12,7		7,5	15,8	5,6	16,4	10,1
GalA	19,0	6,7	6,5	14,3	4,6	12,3	4,7	1,8
4-O-Me-GlcA	0,9					1,2	3,4	2,5

Tabell 5-11. Monosakkaridsammensetningen for fraksjonene fra rotbark-ekstraktet 50% etanol i vann etter ionebytter og etter gelfiltrering.

Monosakkaridsammensetningen for gelfiltrerte prøver for fraksjonene fra ekstraktet 50 % et. i vann er også temmelig lik før og etter gelfiltrering. GalA innholdet i RB50%2 - fraksjonene har blitt lavere, mens GlcA- nivået har steget. Trolig har GalA og GlcA -toppene vært så overlappet i RB50%2- prøvene at sammensetningen er mer riktig for RB50%2.1 og RB50%2.2. Ellers er det fremdeles mange monosakkarider tilstede som er typiske for pektiner.

5.3.2 Bindingsforhold

Til opparbeidelse til GC-MS ble det valgt ut tre gelfiltrerte fraksjoner fra rotbark-ekstraktet. RBW2.1 og RB50%2.2 ble valgt fra vannekstraktet og ekstraktet 50%et. i vann. Dette ble de fordi de viste høy aktivitet i komplementfikseringstesten og fordi sure fraksjoner ofte er mer interessante enn nøytrale fraksjoner. RB50%Ne2 ble likevel valgt ut som en nøytral fraksjon fordi den viste veldig høy aktivitet i komplementfikseringstesten. I tillegg viste monosakkaridsammensetningen for RB50%Ne2 et innhold som tyder på at det er en viss andel pektiner tilstede.

Monoskarider og bindingstypene		RBW2.1	RB50%2.2	RB50%Ne2
Ara	<i>Terminalf</i>	3,9	8	4,8
	1,2f	0,2	0,6	0,3
	1,3f	0,2	n.d	n.d
	1,5f	2,6	7	4,8
	1,2,5	n.d	n.d	0,5
	1,3,5	0,2	1,2	1,3
	Rha	<i>Terminal</i>	2,2	1,6
1,2		3,1	n.d	n.d
1,3		spor	0,1	0,9
1,2,3		n.d	2,6	n.d
1,2,4		1,7	0,9	n.d
Xyl	1,4	1,5	0,9	n.d
Glc	<i>Terminal</i>	8,6	10,1	25,5
	1,3	1,3	n.d	2,9
	1,4	n.d	n.d	9,5
	1,6	4,4	5,6	3,6
	1,4,6	4,4	3,8	1,1
	1,2,3	n.d	n.d	0,6
GlcA	<i>Terminal</i>	0,5	14,5	n.d
	1,4	15,3	n.d	10,1
Gal	<i>Terminal_p</i>	27,76	1,7	1,6
	1,3	8,9	3,2	3,4
	1,4	spor	n.d	0,7
	1,6 _p	2,4	3,3	1,3
	1,2,4	spor	9,5	11,4
	1,3,4	8,1	n.d	n.d
	1,3,6	4	9,6	1
	1,3,4,6	0,5	2	0,3
GalA	<i>Terminal</i>	2,5	n.d	n.d
	1,4	15	5,4	1,8
Terminale		21,5	27,9	33,4
Forgreininger		19,0	29,6	16,2
Ratio		1,1	0,94	2

Tabell 5-12. Bindingstypene i RBW2.1, RB50%2.2 og RB50%Ne2. N.d betyr at denne bindingstypen ikke er tilstede.

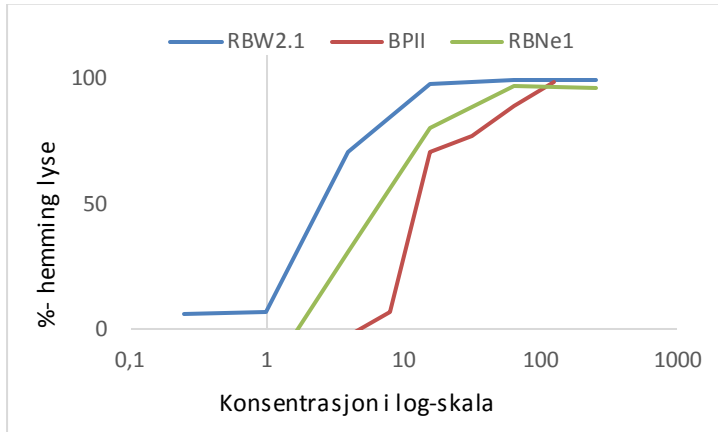
Alle tre fraksjonene inneholder 1→4 bundet galakturonsyre som er grunnstrukturen i pektiner. Kun RBW2.1 inneholder 1→2 bundet rhamnose, som er en del av RGI. RBW2.1 inneholder også 1→2, 4 Rha som er forgreninger fra RGI. Alle tre fraksjonene inneholder også en del 1→3- og 1→3,6-bundet galaktose som er en del av arabinogalaktan type II - struktur. AG-II er ofte forbundet med proteiner og trenger ikke være en del av pektin-strukturen. (Vincken et al, 2003). I RB50%2.2 og RB50%Ne2 er AG-II en selvstendig struktur, men hos RBW2.1 kan den være en del av RG-I strukturen. RBW2.1 har spor av 1→4 gal og ca 8 % 1→3, 4 gal som er elementer i AG-I.

Alle prøvene inneholder arabinaner som er 1→5 -bundet. Arabinan-kjeden har også hos alle forgreininger i 3- posisjon og RB50%Ne2 har også forgreininger i 2- posisjon noe som er mindre vanlig. (Paulsen & Barsett, 2005)

RB50%Ne2 har en ratio mellom terminale og forgrenede sukker på 2. Dette kan blant annet skyldes av RB50%Ne2 har en svært lav renhet. Bare 14 % av prøveinnholdet var karbohydrat viste analysen på GC. Dette kan ha gjort at hydrolysen ikke ble fullstendig under prøveopparbeidelsen til GC-MS-analysen.

5.3.3 Aktivitet i komplementfikseringstesten

Alle de gelfiltrerte fraksjonene ble testet med komplementfikseringstesten (metode 5.5.1). RBWNe2 viste svært lite aktivitet i denne metoden. Nøytrale fraksjoner har generelt sett ofte mye lavere aktivitet enn sure polysakkarider, og i tillegg er RBWNe2 den fraksjonen med lavest molekyl-vekt av alle de gelfiltrerte prøvene. Dette er to faktorer som kan forklare den lave aktiviteten. (Grønhaug, 2010)

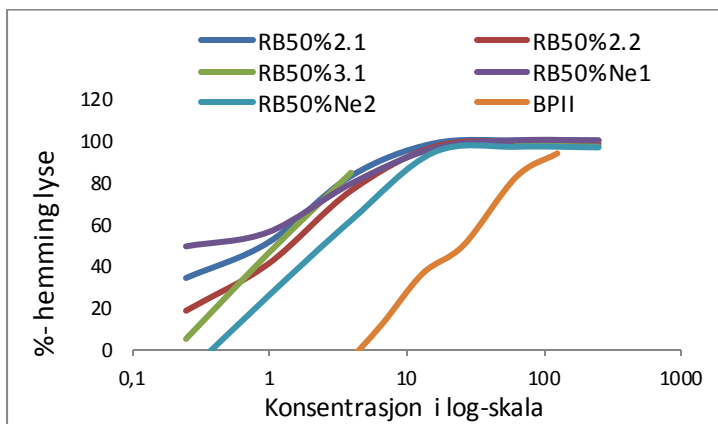


Figur 5-10. Komplementfikserende aktivitet fra to fraksjoner isolert fra ekstraktet RBW.

ICH-50 verdi

BPII	17,8
RBW2.1	3,3
RBWNe1	10,46

Tabell 5-13. ICH-50- verdi for RBW2.1, RBWNe1 og BPII.



Figur 5-11. Komplementfikserende aktivitet for 5 fraksjoner isolert fra ekstraktet RB50%.

ICH-50 verdi

BPII	26
RB50%2.1	0,2
RB50%2.2	1,33
RB50%3.1	2
RB50%Ne1	0,2
RB50%Ne2	4

Tabell 5-14. ICH-50- verdi for alle fraksjonene fra RB50%

Både RBW2.1 og RBWNe1 var 3 og 10 ganger så aktive som den positive kontrollen (se figur 5-10) Roten på *F. zanthoxyloides* er den delen av planten som er mest brukt i tradisjonell medisin, og derfor også den som kanskje logisk nok utviser høyest biologisk aktivitet.

Fraksjonene fra rotbark 50% etanol og vann er generelt noe mer aktiv enn fraksjonene fra RBW. Noen av fraksjonene fra disse to ekstraktene er så aktive i komplementfikseringstesten at man kun kan anslå cirka-verdier for 50 % lyse. Som man ser i figur 5-11 har de ulike fraksjonene nesten helt overlappende grafer. I tillegg stiger de så bratt at man ikke får et nøyaktig nok inntrykk av hvor ICH-50-verdien reelt ligger.

5.4 Struktur- og aktivitetsbestemmelse av polysakkaridene i bark

5.4.1 Monosakkaridsammensetning

I likhet med prøvene fra rotbark og blader ble også alle fraksjonene fra bark analysert på GC etter metanolyse og TMS-derivatisering. (metode 5.4.1 og 5.4.2).

Sample-ID	BAW	BAW1	BAWNeP	BA50%	BA50%1	BA50%Ne
Ara	1,5	16,9	32,5	17,6	22,2	24,23
Rha	0,5	10,4	0,2	10,9	11,0	1,80
Fuc	0,2	0,7	1,2	<DL	1,1	1,64
Xyl	0,5	2,7	7,6	2,6	6,1	2,24
Mann	0,2	0,6	5,3	0,5	2,6	2,94
Gal	14,1	15,9	8,1	11,7	24,3	9,51
Glc	79,5	3,3	42,5	36,0	21,5	55,32
GlcA	0,4	9,1		1,3	1,8	
GalA	3,1	39,9	2,7	19,3	9,4	<DL
4-O-Me-GlcA		<DL			0,0	

Tabell 5-15. Monosakkaridsammensetning i bladene før og etter ionebytter, for vanneksraktet og ekstraktet i 50% etanol i vann

BAW ble i likhet med de andre vannekstraktene behandlet med amylase. Når man ser på glukose-innholdet i BAW1 i forhold til BAW ser man at det meste glukose-innholdet var ren amylose. Den nøytrale fraksjonen inneholder fremdeles nesten 40 % glukose, som sannsynligvis ikke kommer fra stivelse.

Ellers inneholder BAW1 typiske strukturelementer for pektiner, med mye GalA, Ara, Rha og Gal. BAWNe inneholder svært lite galakturonsyre og rhamnose som er hovedbestanddelene i pektiner. Den høye andelen med arabinose og glukose kan komme fra hemicellulose og eller arabinaner.

Sample-ID	BAW1	BAW1.1	BAW1.2	BAWNeP	BAWNe1	BA50%Ne	BA50%Ne1	BA50%1	BA50%1.1	BA50%1.2
Ara	16,9	18,5	10,8	32,5	28,1	57,1	14,9	22,2	30,2	16,4
Rha	10,4	12,6	8,3	0,2	0,3	4,2	1,3	11,0	7,3	10,9
Fuc	0,7	1,3	1,3	1,2	0,9	3,9	1,3	1,1	0,9	1,0
Xyl	2,7	0,8	7,2	7,6	6,4	5,3	1,7	6,1	0,6	8,3
Mann	0,6	0,2	0,1	5,3	5,5	7,1	3,2	2,6	<DL	3,0
Gal	15,9	23,3	10,2	8,1	8,2	22,4	8,5	24,3	43,8	12,0
Glc	3,3	3,8	4,5	42,5	49,2		63,1	21,5		29,3
GlcA	9,1	6,2	3,4		0,6		1,1	1,8	2,1	3,1
GalA	39,9	33,3	54,1	2,7	0,6		1,2	9,4	13,8	11,5
4-O-Me-GlcA	<DL						3,7		1,3	

Tabell 5-16. Monosakkaridsammensetningen for fraksjonene fra bark etter ionebytter og etter gelfiltrering.

Når man sammenlikner de gelfiltrerte fraksjonene med de etter ionebytter er de svært like. De sure fraksjonene inneholder i sterkest grad elementer som er typiske for pektiner.

5.4.2 Bindingsforhold

Fra fraksjonene av bark valgt ut en fraksjon med opphav i hvert av rækstraktene. BAW1.1 ble valgt fremfor BAW2.1 fordi den hadde en større andel rhamnose, galaktose og arabinose i forhold til mengden galakturonsyre. BA50%1.1 ble valgt ut til å analysere på GC-MS fordi de inneholdt typiske trekk for polysakkarider med mye pektin-struktur.

Monosakkarider og bindingstypene		BAW1.1	BA50%1.1
Ara	<i>Terminalf</i>	6,7	n.d
	1,3f	0,3	n.d
	1,5f	8,7	3,2
	1,3,5 Ara	2,7	11,7
Rha	<i>Terminal</i>	3,7	2,8
	1,2	0,7	n.d
	1,3	0,3	0,2
	1,2,4	7,9	4,0
Xyl	1,4	0,9	0,5
Glc	<i>Terminal</i>	2,1	n.d
	1,3	n.d	1,6
	1,6	0,9	1,9
	1,4,6	0,8	1,1
	1,2,3	0,1	0,2
GlcA	<i>Terminal</i>	4,1	2
	1,4	2,2	n.d
Gal	<i>Terminal_p</i>	5,9	1
	1,3	3,7	7,1
	1,6 _p	3,7	9,3
	1,3,4	0,8	0,7
	1,3,6	9,7	23,5
GalA	<i>Terminal</i>	3,9	8,3
	1,4	29,3	5,1
Terminale		24,5	28,0
Forgreininger		21,4	32,6
Ratio		1,1	0,9

Tabell 5-17. Bindingstypene mellom sukker i BAW1.1 og BA50% 1.1. N.d betyr at denne bindingstypen ikke er tilstede i prøven.

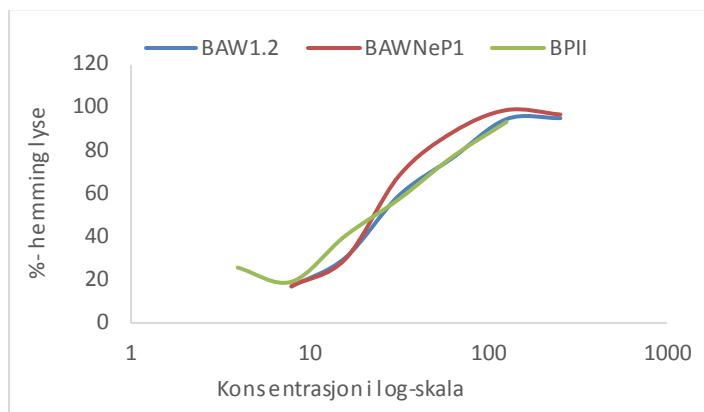
Tabellen viser at begge fraksjonene inneholder pektin med 1,4 GalA som «backbone». Kun BAW1.1 har 1,2 rhamnose tilstede og det er derfor kun den som har RGI i pektinet. Begge har 1,3,4 gal, men ingen av de 1,4 gal. Det er derfor lite sannsynlig at AGI er tilstede med 1,4 gal

som hovedkjede med forgreininger i 3-posisjon. Begge fraksjonene har en relativt høy andel 1→6-, 1→3- og 1→3,6-gal tilstede, som tidligere nevnt er strukturen til AG II.

BAW1.1 og BA50%1.1 har til felles en viss andel arabinose, begge har 1,5 arabinan med forgreininger i 3-posisjon. BAW1.1 har også terminal arabinose i arabinanstrukturen.

5.4.3 Aktivitet i komplementfikseringstesten

Alle de gelfiltrerte fraksjonene fra ekstraktene fra bark ble testet i komplementfikseringstesten. *Biophytum petersianum* Klotzsch ble brukt som positiv kontroll (Grønhaug et al, 2011)

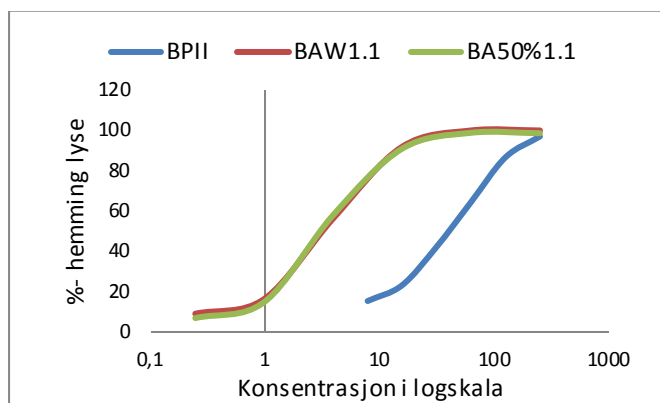


Figur 5-12. Komplementfikserende aktivitet for to fraksjoner isolert fra BAW.

ICH-50 verdi

BPII	20,1
BAWNe1	23,3
BAW1.2	27,3

Tabell 5-18. ICH-50 verdi for BPII, BAWNe1 og BAW1.2.



Figur 5-13. Komplementfikserende aktivitet hos BAW1.1 og BA50%1.1

ICH-50- verdi

BPII	36,6
BAW1.1	3,5
BA50%1.1	3,7

Tabell 5-19. ICH- 50 verdi for BP II, BAW1.1 og BA50%1.1

Bark har i likhet med rotbark en utstrakt bruk i tradisjonell medisin.

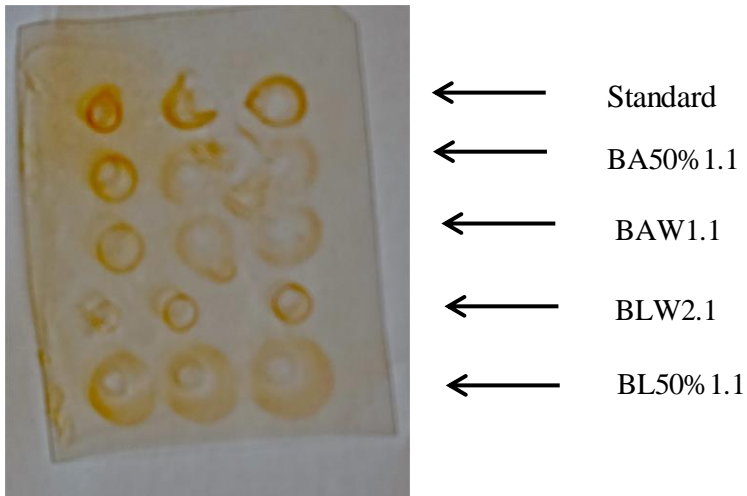
Komplementfikseringstesten viser at polysakkarider isolert fra bark har biologisk aktivitet.

Dette gjelder særlig for fraksjonene fra vannekstraktet der alle tre fraksjoner har høyere aktivitet enn den positive kontrollen. Fra fraksjonene fra ekstraktet 50% et. i vann, har kun en fraksjon immunologisk aktivitet, BA50%1.1. De to andre gelfiltrerte fraksjonene BA50%1.2 og BA50%Ne1 viste svært lav komplementfikserende aktivitet. Det er vanskelig å si noe om hvorfor, siden BA50%Ne1 for eksempel er svært lik i monosakkaridsammensetningen som BAWNe1, og i tillegg også har relativt lik molekylvekt fordeling.

5.5 Identifikasjon av arabinogalaktan type II ved hjelp av Yariv reagens

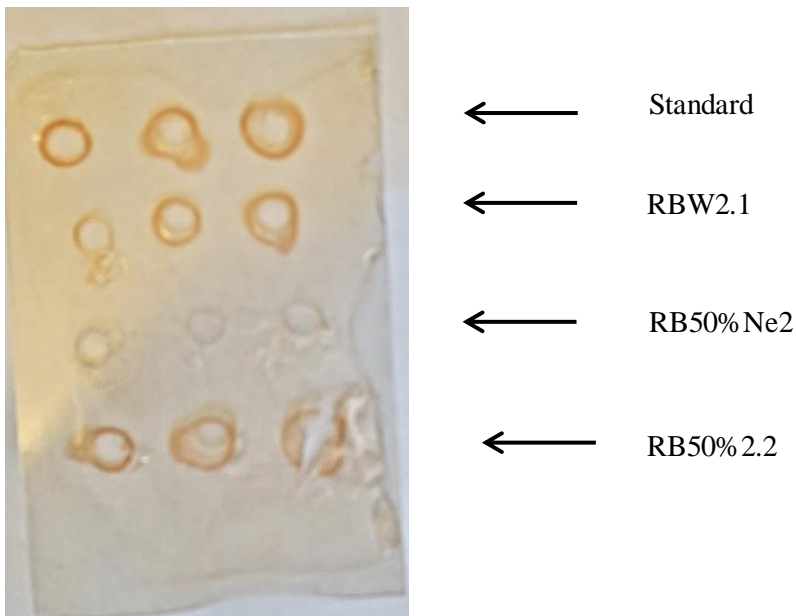
Yariv reagens-test er en effektiv måte for kvalitativ påvisning av tilstedeværelse av arabinogalaktan type II – struktur i en prøve (metode 4.4.7 Yariv reagens- test). De syv prøvene som gjennomgikk analyse på GC-MS, ble også undersøkt med Yariv reagens.

Analysen av bindingsforholdene viste at alle trolig har AGII tilstede og testen ble gjort for å bekrefte dette.



Figur 5-14. Resultatet for BA50% 1.1, BAW1.1, BLW2.1 og BL50% 1.1

Resultatet fra testen viser at både BA50% 1.1, BAW1.1, BLW2.1 og BL50% 1.1 gir en tydelig utfelling med Yariv reagens, og bekrefter tilstedeværelsen av AGII i fraksjonene.



Figur 5-15. Resultatet for RBW2.1, RB50% Ne2 og RB50% 2.2.

Resultatene vist i figur 5-14 bekrefter at AGII er tilstede i prøvene RBW2.1 og RB50%2.2. Hos RB50%Ne2 kan man derimot ikke se noen utfelling til tross for at alt tyder på at den inneholder arabinogalaktan type II –struktur.

Selv om β -d-Glukosyl-Yariv reagens har vært brukt i mange år, har man fremdeles ikke helt skjønnet hvordan den molekylært binder seg med alle arabinogalaktan –proteiner, og man vet heller ikke mye om hvor i strukturen til AGII den binder seg. Det er ikke alle polysakkarider med 3,6 bundet gal som gir presipitering med Yariv reagens (Zou et al, 2014). Noen har for eksempel foreslått at protein-struktur er viktig for interaksjon mellom prøve og reagens, men også AGII-struktur uten proteinbinding har gitt utfelling. Det ser også ut til at det kreves en viss lengde med 3- bundet Gal for å få binding med Yariv reagens. (Paulsen, Craik, Dunstan, Stone & Bacic, 2014)

Det finnes ikke nok grunnlag til å si hvorfor RB50%Ne2 ikke presipiterer med reagenset. Det kan tenkes at siden prøven bare besto av 14 % polysakkarider at det er noen forurensninger i prøven som hindrer utfellingen, men det kan også godt være noe strukturelt i AGII-strukturen, som diskutert ovenfor.

5.6 Sammenligning komplementfikserende aktivitet

Alle fraksjoner etter ionebytter og gelfiltrering har blitt undersøkt i komplementfikseringstesten. Av ulike årsaker ga ikke resultatene fra fraksjonene etter ionebytter entydige nok resultater til å kunne presenteres. Dette skyldes blant annet at det ble brukt serum fra en annen kilde enn tidligere noe som førte til at ICH-50 verdien til BPII ble mye høyere enn den tidligere har vært. Det var i tillegg problemer med blod fra sau som ikke lot seg sentrifugere som det skulle og med blod som var for gammelt til å kunne brukes. Det ble også oppdaget at veronal-bufferen under en test var dobbelt så konsentrert som den skulle slik at cellene lyserte.

Man kunne likevel bruke resultatene fra testene med "fraksjonene etter ionebytter" til å se hvilke fraksjoner som trolig var veldig aktive og ikke. Dette ble brukt til å bestemme hvem av de som skulle opparbeides videre med gelfiltrering. Men det er vanskelig å sammenligne

hvorvidt fraksjonene er mer eller mindre aktive etter ionebytter sammenlignet med etter gelfiltrering.

Det har under alle testene blitt brukt serum fra kilde ECG og blod tappet fra sau 10010, tappet den 21.02.2014 eller 28.04.14.

ICH-50 verdi BPII / ICH-50 verdi prøve	
BLW2.1	0,16
BLW3.2	0,3
BL50%1.1	0,28
BAW1.1	10
BAW1.2	0,73
BAWNe1	0,86
BA50%1.1	10
RBW2.1	5,4
RBWNe1	1,7
RB50%2.1	130
RB50%2.2	19,5
RB50%3.1	13
RB50%Ne1	130
RB50%Ne2	6,5

Tabell 5-20. ICH-50 verdien til BP II i forhold til ICH50 verdi for de ulike fraksjonene.

Når man sammenligner komplementfikserende aktivitet i de ulike fraksjonene i forhold til den positive kontrollen, er det tydelig at fraksjonene fra bark og rotbark har høyest aktivitet. De to mest aktive fraksjonene, RB50%Ne1 og RB50%2.1 har nesten 130 ganger så høy aktivitet som BPII. Dersom rotbark og stammebark innhøstes på en lite bærekraftig og feil måte blir trærne skadelidende eller dør. *Fagaria zanthoxyloides* er klassifisert som en truet art i lokalsamfunn der den er hyppig brukt (Etse et al, 2011). Det er derfor negativt at bladene ikke har høyere komplementfikserende effekt enn de har, slik at de kunne vært hyppigere brukt istedenfor rot- og stammebark.

I flere artikler har det vært foreslått en sammenheng mellom høy molekylvekt og komplementfikserende aktivitet (Nergård et al, 2005, Grønhaug, 2010), mens i andre tilfeller

er det stikk motsatt (Zou et al, 2014). Når man sammenligner fraksjonene fra de tre plantedelene ser det ut til at de med høyest molekylvekt også har høyest komplementfikserende effekt, men dette gjelder kun innenfor de ulike rækstraktene.

RB50%Ne1 og RB50%2.1 med molekylvekt på henholdsvis 160 og 92 kDa er som nevnt ca 130 ganger så aktiv som BPII. De andre fraksjonene fra RB50% har molekylvekt i området 15-23 kDa og er 6,5-19 ganger så aktiv som BPII. Også for BAW-fraksjonene har den med høyest molekylvekt, høyest effekt. BAW1.1 har ti ganger så høy molekylvekt som BAW1.2 og BAWNe1 og har også ti ganger så høy komplementfikserende aktivitet som de to. Til tross for at det ser ut til å være en sammenheng mellom molekylvekt og effekt ser dette ikke ut til å være tilfellet mellom fraksjonene fra RBW-fraksjonene. BA50%1.1 er den eneste fraksjonen som ser ut til å biologisk aktivitet av fraksjonene isolert fra bark 50% et. i vann. Den har også en mye høyere molekylvekt enn BA50%1.2 og BA50%Ne.

Selv om BLW3.2 har høy molekylvekt, 184 kDa, har den en svært liten effekt sammenlignet med andre fraksjoner fra stamme- og rotbark av tilsvarende lik størrelse. Så selv om det skulle være en sammenheng mellom størrelse og effekt er det andre strukturelle elementer som er viktigst for aktiviteten.

Alle de sju fraksjonene som ble analysert på GC-MS inneholdt typiske strukturelementer som er en del av arabinogalaktan type II som ofte bidrar til immunlogisk effekt. Dette ble bekreftet for seks av fraksjonene ved hjelp av Yariv reagens-test.

6 Konklusjon

Målet med denne oppgaven var å isolere polysakkarider fra treet *Fagara zanthoxyloides*, og undersøke de med hensyn til biologisk aktivitet og struktur. Polysakkaridene skulle isoleres fra tre plantedeler; rotbark, stammebark og blader. Polysakkaridene ble ekstrahert i to ulike ekstrakter 100 °C vann og 50% etanol i vann ved 70 °C. Råekstraktene fra 100 °C vann ble behandlet med α -amylase for å fjerne stivelse.

Monosakkaridanalyser viser at alle de tre plantedelene inneholder sukker som er typiske for pektin-struktur. Fraksjonene isolert fra BLW inneholder mye GalA (ca 50%) og Rha i forhold til de andre plantedelene, noe som tyder på store regioner med HG og RG-I. Fraksjonene fra BL50% inneholder mindre GalA og mer Ara og Gal sammenlignet med BLW. Fraksjonene isolert fra de to råekstraktene fra rotbark inneholder i snitt ca 20% GalA og 5% Rha, noe som tyder på mindre andel pektin-struktur og forholdsvis små områder med RG-I-struktur. Fraksjonene har ellers relativt mye Gal og Ara, og forholdsvis mye glukose, selv etter dialysen. De to fraksjonene isolert fra BA50% består for det meste av Glu og Ara, noe som kanskje kommer fra arabinoglukaner. Den sure fraksjonen isolert fra BAW er mer lik RBW, med lite GalA, en del Rha, Gal og Ara.

Ytterligere analyse gjort av bindingsforholdene til BLW2.1, BL50%1,1, RBW2.1, RB50%2.2, RB50%Ne2, BAW1,1, BA50%1.1 bekrefter mye av det som var observert i monosakkaridanalysene. Kun de fraksjonene som er isolert fra vandige ekstrakt; BLW2.1, RBW2.1 og BA1.1 inneholder RG-I. Men alle inneholder AG-II-struktur, som har vist seg å være viktig for biologisk aktivitet. Kun BLW2.1 ser ut til å inneholde en liten andel AG-I. Fraksjonene fra rotbark inneholder mye glukose og arabinaner. Ellers er det generelt for alle at de inneholder typiske sukker fra pektiner.

En bekreftende test gjort med Yariv reagens bekreftet innholdet av AG-II i seks av prøvene undersøkt på GC-MS. RB50%Ne2 testet negativt i testen, men inneholder også trolig AG-II. Grunnen til at man ikke får utfelling kan ha sammenheng med noe strukturelt med AG-II-strukturen hindrer utfelling, eller at det er en forurensning i prøven som hindrer det samme.

Tester gjort på fraksjonenes komplementfikserende aktivitet viser at de fleste fraksjonene fra de tre plantedelene er biologisk aktive. Aller høyest aktivitet har flere av de gelfiltrerte fraksjonene fra rotbark. Kun en fraksjon isolert fra BA50% er aktiv, men fra BAW er alle ca

like aktive som den positive kontrollen, BPII. Fraksjonene fra blader er de som er minst aktive, men alle de gelfiltrerte fraksjonene har biologisk aktivitet. For å vite om bladene også er aktive mot malaria, må de undersøkes nærmere. Men foreløpige resultater viser at rotbark eller bark trolig vil være mer effektiv, basert på deres komplementfikserende aktivitet. Dette er et negativt resultat med tanke på at innhøsting av blader fremfor stammebark og rotbark er mye mer bærekraftig for treet.

7 Reagensliste

1 metyl-imidazol	Fluka
3,3% jod løst i 6,7% kalium-jodid-løsning	
37% - saltsyre (HCl)	VWR
α -amylase type VIII-A Barley Malt	Sigma Aldrich
Agarose	Bio-rad laboratories
Ammoniumhydroksid (NH ₄ OH)	
Hemolytisk Amboceptor, Virion 9020	Virion\Serion GmbH
<i>Biophytum petersianum</i> (BP11)	
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma Aldrich
Blod fra sau 10010, tappet 21.02.2014	
Carbodiimide*	Sigma Aldrich
CFT buffer	Virion\Serion GmbH
Diklormetan (DKM)	Sigma Aldrich
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck
Eddiksyreanhydrid	Merck
Etanol	Fischer Chemicals
Etylacetat	Fischer Chemicals
Fenol	Merck
Fosfatbuffer (PBS)	Sigma Aldrich
Gum Arabica 1 mg/ml	
Heksan	Fischer Chemicals
Humant serum: ECG, tappet 18.12.2013	
Iseddik	Merck

MES	Sigma Aldrich
Metanol	Fischer Chemicals
Metyljodid (CH ₃ I)	Fluka
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumbordeuteride (NaBD ₄)	Sigma Aldrich
Natriumhydroksid (NaOH)	Merck
Natriumklorid (NaCl)	VWR Chemicals
Natrimklorid (NaCl)	Prolabo
Natriumtiosulfat-5 hydrat	Merck
Svovelsyre 95% (H ₂ SO ₄)	VWR
Sølvnitrat (AgNO ₃)	Merck
TMS-reagens	
Toluen	VWR
Trifluoreddiksyre (TFA)	Pierce
TRIZMA	Sigma
Yariv-reagens	Biosupplies

*N-cyclohexyl-N'- (2 morpholinoethyl) carbodiimide methyl-p-toluensulfonate

Litteraturliste

Abu, S., Anyaibe, A.S., Headings, V. (1981). Chromatographic fractionation of anti-sickling agents in *Fagara xanthoxyloides*. *Acta Haematologica*. 66 (1), 19-26

Adefisoye, M. A., AjibadeAko-Nai, K., Bisi-Johnson, M.A. (2012) Phytochemical and antibacterial activity of the extracts of *Fagara zanthoxyloides* on selected cariogenic and enteric bacterial isolates. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 1 (1), 1-6. doi:10.5455/jice.55-1333123486

Ahuua, K.M., Ioseta, J-R., Ioseta, K.N., Diallo, D., Mael, J., Hostettmanna, K. (2007). Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 110 (1), 99–104.

Amylose (2011). *I botanisk- og plantefysiologisk leksikon*. Hentet fra <http://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/a/amylose.html>

Arbonnier, M. (2004). *Trees, Shrubs and Lianas of West African Dry Zones*. Wageningen: Margraf Publishers GMBH

Austarheim, I. (2007). *Biologisk aktive polysakkarider fra Glinus oppositifolius (L.) Aug. DC. II. Ethnopharmacological survey in Mali*. (Masteroppgave, Universitet i Oslo). Oslo: Universitetet i Oslo.

Biosupplies Australia Pty Ltd. *Yariv reagents – for detection and quantitation of arabinogalactan-proteins*. Hentet fra: http://www.biosupplies.com.au/docs/100-2_3_4_5_6_8.pdf

Brett, C., Waldron, K. (1996). *Physiology and biochemistry of plant cell walls* (2. utg). London: Chapman & Hall

Brummer, Y., Cui, S.W. (2005). *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications*. Florida: Francis & Taylor

Carpita, N.C., Gibeaut, D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*, 3 (1), 1-30. DOI: 10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x

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 (4), 1009-1018.

Chrispeels, M.J. (1999). Glycobiology of Plant Cells. Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J (Red), *Essentials of Glycobiology*. (kap. 20). New York: Cold Spring Harbor

Ciucanu, I., Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131 (2), 209-217.

Cosgrove, D. J. (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (11), 850-861. doi:10.1038/nrm1746

EC 3.2.1.1 (1961). I *International Union Of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)*. Hentet fra: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/1.html>

Etse, K.D., Aidam, A.V., de Souza, C., Creche, J., Lanoue, A. (2011). In vitro propagation of *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam., an endangered African medicinal plant. *Acta Botanica Gallica*, 158(1), 47-55. DOI:10.1080/12538078.2011.10516253

Evans, W. (2009). *Trease and Evans pharmacognosy* (16. utg). Philadelphia: Saunders Elsevier.

Fagara zanthoxyloides Lam. (2013) I *The Global Biodiversity Information Facility: GBIF Backbone Taxonomy*. Hentet fra URL: <http://www.gbif.org/species/5594335> on 2014-02-20

FN-sambandet (2013, 16.01). Statistikk, Helse. Hentet fra URL: [http://globalis.no/Land/Mali/\(show\)/indicators](http://globalis.no/Land/Mali/(show)/indicators)

Gansane A., Sanon, S., Outtara, P.L., Hutter, S., Ollivier, E., Azas, N., Traore, A., Traore, A.S., Guissou, I.P., Nebie, I., Sirima, B.S. (2010). Antiplasmodial Activity and

Cytotoxicity of Semi Purified Fractions from *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam. Bark of Trunk. *International Journal of Pharmacology*, 6 (6), 921-925. DOI: 10.3923/ijp.2010.921.925

GE Healthcare (2000, desember). Gel filtration, principles and methods. Hentet fra: https://www.gelifesciences.com/gehcsls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc18102218_20131220222557.pdf

Gleason, F.K., Chollet, R. (2012). *Plant Biochemistry*. Sudbury: Jones & Bartlett Learning

Glæserud, S. (2008) *Immunmodulerende polysakkarider isolert fra en sårhelende plante fra Mali*. (Masteroppgave, Universitetet i Oslo) Oslo: Universitet i Oslo

Grønhaug, T.E., Kiyohara, H., Sveaass, A.M., Diallo, D., Yamada, H., Paulsen, B.S. (2011) Beta-D-(1(4)-galactan-containing side chains in RG-I regions of pectic polysaccharides from *Biophytum petersianum* Klotzsch contribute to expression of immunomodulating activity against intestinal Peyer's patch cells and macrophages. *Phytochemistry*, 72 (17), 2139-2147. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.08.011

Grønhaug, T.E., Ghildyal, P., Barsett, H., Michaelsen, T.E., Morris, G., Diallo, D., Inngjerdingen, M., Paulsen, B.S. (2010). Bioactive arabinogalactans from the leaves of *Opilia celtidifolia* Endl. ex Walp. (Opiliaceae). *Oxford Jouranls*, 20 (12), 1654-1664.

Hounzangbe-adote, S., Fouraste, I., Moutairou, K., Hoste, H.(2005). In vitro effects of four tropical plants on the activity and development of the parasitic nematode, *Trichostrongylus colubriformis*. *Journal of Helminthology*, 79(1), 29-33.

Isaacs-Sodeye, W.A., Sofowora, E.A., Williams, A.O., Marquis, V.O., Adekunle, A.A., Anderson, C.O. (1975). Extract of *Fagara zanthoxyloides* root in sickle cell anemia. *Acta haematologica*. 53, 158-164.

Iwu, M.M. (1993). *Handbook of African Medicinal Plants*. Florida: CRC Press

Janeway, C.A Jr., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (5. utg.) New York: Garland Science

Kassim, O.O., Loyevsky, M., Elliott, B., Geall, A., Amonoo, H., Gordeuk, V.R. (2005). Effects of Root Extracts of *Fagara zanthoxyloides* on the In Vitro Growth and Stage Distribution of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 49 (1), 264-268. doi:10.1128/AAC.49.1.264-268.2005

Lagerlund, I., Larsson, E., Gustavsson, J., Färenmark, J., Heijbel, A. (1998). Characterisation of ANX Sepharose® 4 Fast Flow media. *Journal of Chromatography A*, 796 (1), 129-140.

Leclere, L., Van Cutsem, P., Michiels, C. (2013), Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. *Frontiers in Pharmacology*, 4 (128). doi: 10.3389/fphar.2013.00128

Matu, E.N. (2011). *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepern. & Timler. Record from PROTA4U. Schmelzer, G.H. & Gurib-Fakim, A. (Red), *Plant Resources of Tropical Africa*. Hentet fra URL: <http://www.prota4u.org/protav8.asp?h=M4&t=Zanthoxylum,zanthoxyloides&p=Zanthoxylum+zanthoxyloides>

Michaelsen, T.E., Gilje, A., Samuelsen, A.B., Høgåsen, K., Paulsen, B.S. (2008) Interaction Between Human Complement and a Pectin Type Polysaccharide Fraction, PMII, from the Leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian journal of immunology*, 52 (5), 483-490. DOI: 10.1046/j.1365-3083.2000.00801.x

Mohnen, D. (2008), Pectin structure and biosynthesis, *Current Opinion in Plant Biology*, 11 (3), 266–277. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>

Nergård, C.S., Matsumoto, T., Inngjerdingen, M., Inngjerdingen, K., Hokputsa, S., Harding, S.E., Michaelsen, T.E., Diallo, D., Kiyohara, H., Paulsen, B.S., Yamada, H. (2005.) Structural and immunological studies of a pectin and a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. (Asteraceae). *Carbohydrate Research*, 340 (1), 115 - 130

Ngassoum, M.B., Essia-Ngang, J.J., Tatsadjieu, L.N., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Adjoudj, O. (2003). Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. *Fitoterapia*. 74 (3), 284–287 [http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X\(03\)00035-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X(03)00035-2)

Oetjen, G.W. (1999). *Freeze drying*. Weinheim: Wiley VCH Verlag

Ogwal-Okeng, J.W., Obua, C., Anokbonggo, W.W. (2003). Acute toxicity effects of the methanolic extract of *Fagara zanthoxyloides* (Lam.) root-bark. *African Health Sciences*, 3 (3), 124-126.

Olounladé, P. A., Azando, E. V., Hounzangbe - Adote, M.S., Ha, T. B., Leroy, E., Moulis, C., Fabre, N., Magnaval, J. F., Hoste, H., Valentin, A. (2012). In vitro anthelmintic activity of the essential oils of *Zanthoxylum zanthoxyloides* and *Newbouldia laevis* against *Strongyloides ratti*. *Parasitology Research*, 110(4), 1427

O'Neill, M.A., York, S.J. (2003). The composition and structure of plant primary cell walls. J.K., Rose (Red.), *The plant cell wall* (s 1-23). Oxford: Blackwell Publishing Ltd

Ouattara, B.O., Jansen, L., Angenot, I.P., Guissou, M., Frédérick, P., Fondou, M.T. (2009). Antisickling properties of divanilloylquinic acids isolated from *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae). *Phytomedicine*. 16 (2-3), 125–129. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2008.10.013>

Paulsen, B. S., Barsett, H. (2005). Bioactive Pectic Polysaccharides. *Advances in Polymer Science*, 186, 69- 101. DOI: 10.1007/b136817

Paulsen, B.S., Craik, D.J., Dunstan, D.E., Stone, B.A., Bacic, A. (2014). The Yariv reagent: Behaviour in different solvents and interaction with a gum arabic arabinogalactanprotein. *Carbohydrate Polymers*, 106, 460-468. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.009>

Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E. (2010). *Legemiddelanalyse* (2. utg). Bergen: Fagbokforlaget

Pettolino, F.A., Walsh C., Fincher G.B., Bacic A. (2012). Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. *Nature protocols*, 7 (9), 1590-160. doi:10.1038/nprot.2012.081

Queiroz, F.E., Hay, A-E., Chaaib, F., Diemen van D., Diallo, D., Hostettmann, K. (2006). New and Bioactive Aromatic Compounds from *Zanthoxylum zanthoxyloides*. *Planta Medica*, 72(8), 746-750. DOI: 10.1055/s-2006-941504

Renard, M.G.C., Creâpeau, M.-J., Thibault, J.-F. (1999). Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins. *European journal of Biochemistry*, 266 (2), 566- 574. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00896.x

Ridley, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57 (6), 929–967. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00113-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00113-3)

Sagberg, K.M. (2006). *Nye stoffer med effekt på immunsystemet isolert fra sårhelende planter i Mali; polysakkarider fra Combretum glutinosum : etnofarmakologiske studier i Mali med fokus på viktige medisplanter, Kolokani og Dioila, Combretum glutinosum.* (Masteroppgave, Universitetet i Oslo). Oslo: Universitetet i Oslo.

Scheller, H.V., Ulkskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61 (1), 263–89. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112315

Schmelzer, G.H., Gurib-Fakim, A. (2013) *Ressources végétales de l'Afrique tropicales* (11. Utg. 2.vol.). Wageningen: Fondation PROTA

Sigma (2003, mars). Product information α -Amylase from barley malt. Hentet fra: http://www.sigmaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a2771pis.pdf

Sommerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., Youngs, H. (2004). Toward a system approach to understanding plant cell walls. *Science*, 306 (5705), 2206-2211. doi: 10.1126/science.1102765

Sticklen, M.B. (2008). Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews Genetics*, 9, 433-443. doi:10.1038/nrg2336

Stivelse. (2011). I *Botanisk-og plantefysiologisk leksikon*. Hentet fra URL: <http://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/s/stivelse.html>

Taxon: *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepern. & Timler. (2003) I *Germplasm Resources Information Network*. Hentet fra URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?417587>

Thiombiano, A. (2006). I "West African Plants. A photo guide." Hentet fra URL: http://www.westafricanplants.senckenberg.de/images/pictures/Fagara_zanthoxyloides_AT_05144_1896_c792b7.JPG

Van Holst, G-J., Clarke, A. (1985). Quantification of Arabinogalactan-Protein in Plant Extracts by Single Radial Gel Diffusion. *Analytical biochemistry*, 148 (2), 446-450. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90251-9](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(85)90251-9)

Vincken, J-P., Schols, H.A., Oomen, J.F.J. McCann, M.C., Ulvskov, P., Voragen, A.G.J., Visser, G.F.R. (2003). If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. *Plant physiology*, 132 (4), 1781-1789. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.022350>

Yamada, H., Kiyohara, H. (2007). Immunomodulating Activity of Plant Polysaccharide Structures. Kamerling, P.J. (Red.), *Comprehensive glycoscience: from chemistry to systems biology. Cell glycobiology and development. Health and disease in glycomedicine. Vol. 4.* (s. 663-694). Amsterdam: Elsevier.

Youan, B.B.C., Coulibaly, S., Miezán, T.B., Doua, F., Bamba, M. (1997) In vivo evaluation of sixteen plant extracts on mice inoculated with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Bulletin of the World Health Organization*. 75(4), 343–348.

Zou, Y-F., Zhang, B-Z., Inngjerdigen, K.T., Barsett, H., Diallo, D., Michaelsen, T.E., El-Zoubair, E., Paulsen, B.S. (2014) Polysaccharides with immunomodulating properties from the bark of *Parkia biglobosa*. *Carbohydrate Polymers*, 101 (30), 457- 463

