

Immunmodulerende polysakkarider fra *E.senegalensis*, en medisinsplante fra Mali brukt mot malaria

Anne Moseidjord Fjellestad



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

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2013

Immunmodulerende polysakkarider fra
E.senegalensis, en medisinsplante fra
Mali brukt mot malaria

Masteroppgave for graden Master i farmasi
Avdeling for farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo

Anne Moseidjord Fjellestad

Oslo, mai 2013

Veiledere:

Professor Berit Smestad Paulsen
Post.doc Kari T. Inngjerdingen
Professor Terje E. Michaelsen
Professor Drissa Diallo

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo. Jeg vil rette en stor takk til alle ved farmakognosiavdeling for hyggelig selskap i året som har gått.

Jeg vil særlig takke min veileder Berit Smestad Paulsen for all praktisk og faglig veiledning under arbeidet med masteroppgaven. Stipendiatene Zou Yuanfeng og Zhang Bingzhao fortjener også en særskilt takk for god hjelp på laboratoriet.

Jeg vil takke Kari T. Inngjerdingen for god faglig veiledning underveis. Terje E. Michaelsen vil jeg takke for innføring i immunologikunnskap og Drissa Diallo for innføring i etnofarmakologiske studier. Hoai Aas har vært til stor praktisk hjelp med GC- og GC-MS.

Takk til reisefølget mitt i Uganda; Mei Gi Cheung, Adina Hassankhani og Berit Smestad Paulsen for en uforglemmelig og læringsrik tur.

Til slutt vil jeg ikke minst takke mamma og pappa for mange gode og motiverende ord gjennom hele studiet og masteroppgaven.

Oslo, mai 2013

Anne Moseidjord Fjellestad

Innholdsfortegnelse

FORORD	V
INNHOLDSFORTEGNELSE	VII
1. FORKORTELSER	1
2. SAMMENDRAG	5
3. INNLEDNING	7
3.1 POLYSAKKARIDER.....	7
3.1.1 Strukturelle polysakkarider i planter.....	7
3.1.2 Struktur og aktivitet hos pektiner.....	13
3.2 IMMUNMODULERENDE AKTIVITET PÅ KOMPLEMENTSYSTEMET.....	15
3.2.1 Introduksjon.....	15
3.2.2 Komplementsystemet.....	15
3.3 <i>ERYTHRINA SENEGALENSIS</i>	20
3.3.1 Taksonomisk klassifisering av <i>Erythrina senegalensis</i> og lokale navn.....	20
3.3.2 Botaniske forhold.....	21
3.3.3 Tradisjonell bruk.....	21
3.3.4 Tidligere forskning på <i>Erythrina senegalensis</i>	22
4. HENSIKT MED OPPGAVEN	33
5. METODER, INKLUSIV DERES PRINSIPPER	34
5.1 GENERELLE METODER.....	34
5.1.1 Vannkvalitet.....	34
5.1.2 Innveiging.....	34
5.1.3 Filtrering.....	34
5.1.4 Sentrifugering.....	34
5.1.5 Volumreduksjon.....	35

5.1.6 Blanding av løsninger.....	35
5.1.7 Degassing av løsninger.....	35
5.1.8 Vask av dialyseslanger.....	36
5.1.9 Dialyse.....	36
5.1.10 Frysetørking.....	38
5.1.11 Absorbansmålinger.....	38
5.1.12 Syrevask av utstyr.....	38
5.2 ISOLERING AV POLYSAKKARIDER.....	39
5.2.1 Ekstraksjon av plantematerialet.....	39
5.2.2 Ionebytterkromatografi.....	42
5.2.3 Chelexfiltrering.....	47
5.2.4 α -Amylase.....	48
5.2.5 Jod-jod-kalium testen.....	50
5.2.6 Gelfiltrering.....	50
5.3 KVALITATIV OG KVANTITATIV BESTEMMELSE AV KARBOHYDRATINNHOLD.....	53
5.3.1 Fenol-svovelsyretesten.....	53
5.3.2 Monosakkaridbestemmelse.....	55
5.4 STRUKTUROPPKLARING.....	60
5.4.1 Metylering.....	60
5.4.2 GC-MS.....	69
5.5 IMMUNMODULERENDE AKTIVITET PÅ KOMLEMENTSYSTEMET.....	70
5.5.1 Komplementfikseringstest.....	70
6. RESULTATER OG DISKUSJON.....	77
6.1 ISOLERING AV POLYSAKKARIDER.....	77
6.1.1 Ekstraksjon.....	77

6.1.2 Isolering og fraksjonering av polysakkarider.....	80
6.1.2.1 Ionebytterkromatografi.....	80
6.1.2.2 Gelfiltrering.....	82
6.2 KARBOHYDRATANALYSE.....	86
6.2.1 Monosakkaridsammensetning.....	86
6.2.2 Bindingsforhold.....	90
6.3 IMMUNMODULERENDE AKTIVITET.....	95
6.3.1 Komplementfikseringstesten.....	95
7. KONKLUSJON.....	105
8. FORSLAG TIL VIDERE ARBEID.....	107
9. REFERANSER.....	108

1. Forkortelser

α	Alfa-anomere monosakkarider der OH gruppen har samme konfigurasjon som sukkeret selv
Ac	Acetylgruppe
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ANX	Dietylaminopropyl
Ara	Arabinose
AG-I	Arabinogalaktan type I
AG-II	Arabinogalaktan type II
β	Beta.anomere monosakkarider der OH-gruppen ved C-1 har motsatt konfigurasjon som sukkeret selv
β -CLAMS	β -carotene-Lonoteic Acid Model System
b	Bredde
BPII	Polysakkaridet BPII isolert fra <i>Biophytum petersianum</i>
BSA	Bovine serum albumin
$^{\circ}$ C	Celsius
C-1-C-6	Karbonatomene i et monosakkarid
C3	Komplement komponent C3
C3a	Fragment av komplement komponent C3
C3b	Fragment av komplement komponent C3
C3 konvertase	Enzym som spalter komplement komponent C3
C5a	Fragment av komplement komponent C5
CH ₃ I	Metyljodid
d	Diameter
D	D-sukker med OH-gruppe i kiralt karbon rettet mot høyre når molekylet er tegnet i Fischer-projeksjon
Da	Dalton
DCM	Diklormetan
DHA	3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid
DMSO	Dimetylsulfoksid
DPPH	2,4-dinitrophenyl-1-picrylhydrazyl
DGAT	acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase

EBV-EA	Epsen-Barr virus early antigens
EDTA, natriumsaltet	Ehtylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate 99+ %
EIKN-S-50%EtOH	Nøytral fraksjon etter ionebytterkromatografi av 50 % etanolekstrakt av stammebarken til <i>E.Senegalensis</i>
EIKN-S-50	Nøytral fraksjon etter ionebytterkromatografi av 50 °C vannekstrakt av stammebarken til <i>E. senegalensis</i>
EIKN-S-100	Nøytral fraksjon etter ionebytterkromatografi av 100 °C vannekstrakt av stammebarken til <i>E. senegalensis</i>
EIKS-S-50%EtOH	Sur fraksjon etter ionebytterkromatografi av 50 % etanolekstrakt av stammebarken til <i>E. senegalensis</i>
EIKS-S-50	Sur fraksjon etter ionebytterkromatografi av 50 °C vannekstrakt av stammebarken til <i>E. senegalensis</i>
EIKS-S-100	Sur fraksjon etter ionebytterkromatografi av 100 °C vannekstrakt av stammebarken til <i>E. senegalensis</i>
EIKS-R-50%EtOH	Sur fraksjon etter ionebytterkromatografi av 50 % etanolekstrakt fra rotbarken til <i>E. senegalensis</i>
EIKS-R-50	Sur fraksjon etter ionebytterkromatografi av 50 °C vannekstrakt fra rotbarken til <i>E. senegalensis</i>
EIKS-R-100	Sur fraksjon etter ionebytterkromatografi av 100 °C vannekstrakt fra rotbarken til <i>E. senegalensis</i>
EIKS-S-50%EtOHG	Fraksjon etter gelfiltrering av EIKS-S-50%EtOH
EIKS-S-50IG	Fraksjon I etter gelfiltrering av EIKS-S-50
EIKS-S-50IIG	Fraksjon II etter gelfiltrering av EIKS-S-50
EIKS-S-100G	Fraksjon etter gelfiltrering av EIKS-S-100
EIKS-R-50%EtOHG	Fraksjon etter gelfiltrering av EIKS-R-50%EtOH
EIKS-R-100G	Fraksjon etter gelfiltrering av EIKS-R-100
FID	Flammeionisasjonsdetektor
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FRAP	Ferric-Reducing Antioxidant Power
<i>f</i>	Furanoseform, 5-ring
FS-test	Fenol-svovelsyretest
Fuc	Fukose
Gal	Galaktose

GalA	Galakturonsyre
GC	Gasskromatografi
GC-MS	Gasskromatografi koblet med massespekter
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre
h	Høyde
HG	Homogalakturonan
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMS	Heksametyldisilazan
ICH ₅₀	Konsentrasjon som gir 50 % hemming av hemolyse
Ipt	Inositol fosfat
kDa	Kilodalton
KDO	2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid
LPS	Lipopolysakkarid
MAC	Membrane Attack Complex
Man	Mannose
MAO	Monoamin oksidase
Me	Metylgruppe
MES	2-[N-morpholino]etan svovelsyre
mg	Milligram
min	Minutt
ml	Milliliter
mm	Millimolar
MRSA	Multiresistente <i>Staphylococcus aureus</i>
Mw	Molekylvekt
m/z	Masse- og ladningsforholdet til et ion i MS-spekter
N ₂	Nitrogengass
O ₂	Oksyngengass
OH	Hydroksylgruppe
PLC	Fosfolipase C
PLC γ 1	Fosfolipase C γ 1
PTP1B	Protein tyrosin fosfatase 1B
PBS	Fosfatbuffer

NIH ₃ Ts	Fibroblastcelle
NK celle	Natural killer celle
nm	Nanometer
Rha	Rhamnose
rpm	Rotasjoner per minutt
RG-I	Rhamnogalakturonan type I
RG-II	Rhamnogalakturonan type II
SRBC	Sensibiliserte sueblodsceller
T	Terminal
TFA	Trifluoreddiksyre
TRIZMA	tris [hydriksymetyl]aminometan
TMCS	trimetylklorasilan
TMS	TMCS + HMDS+ Pyridin
VRE	Vancomycin resistente enterococci
WHO	World health organisation
XG	Xylogalakturonan
Xyl	Xylose
UV	Ultrafiolett
µg	Mikrogram
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

2. Sammendrag

E.senegalensis er en plante som vokser i det tropiske Vest-Afrika. Den brukes mye i tradisjonell medisin blant annet mot malaria. Ved malaria nedsettes immunsystemet og en immunstimulering kan således gjøre at pasienten føler seg bedre. Flere studier har vist at polysakkarider kan ha immunmodulerende egenskaper. Målet med oppgaven var å isolere polysakkarider fra stammebarken og rotbarken fra *E.senegalensis* for deretter å undersøke struktur og biologisk aktivitet relatert til immunsystemet.

Tørket bark fra stammen og roten ble først ekstrahert med organiske løsningsmidler for å fjerne lavmolekylære og upolare forbindelser. Polysakkaridene ble isolert ved ekstraksjon med 50 % etanol, 50°C vann og 100°C vann. Ekstraktene ble dampet inn og frysetørket før de ble applisert på ANX Sepharose 4 Fast Flow ionebytterkolonne. Dette ble gjort for å rense ekstraktet og isolere nøytrale og sure fraksjoner. De sure fraksjonene (EIKS-S-50%EtOH, EIKS-S-50, EIKS-S-100, EIKS-R-50%EtOH, EIKS-R-50 og EIKS-R-100) ble ytterligere separert etter molekylstørrelse på en HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200 gelfiltreringskolonne. Fraksjonene fra denne separasjonen ble EIKS-S-50%EtOHG, EIKS-S-50IG, EIKS-S-50IIG, EIKS-S-100G, EIKS-R-50%EtOHG og EIKS-R-100G.

Både før og etter ionekromatografi og gelfiltrering ble det utført karbohydratanalyser ved hjelp av metanolyse og påfølgende GC. Fraksjonene fra gelfiltreringen ble metylert og bindingsforhold ble kartlagt ved hjelp av GC-MS. Resultatene for GC og GC-MS viste at alle fraksjonene inneholdt monosakkarider og bindingsforhold som er typiske for pektiner. EIKS-S-50IIG, EIKS-R-50G og EIKS-R-100G inneholder trolig størst områder med rhamnogalakturonaner og homogalakturonaner. Monosakkaridfordelingen tydet på at fraksjonene fra rotbarken inneholdt mer homogalakturonaner, såkalt smooth regions, enn fraksjonene fra stammebarken. Alle fraksjonene så ut til å ha små områder med tett forgrenet RG I. EIKS-R-100G viste størst innhold sammenlignet med de andre fraksjonene. AG-II opptrer som sidekjeder på RG-I. Bindingsforholdene tydet på at det var AG-II strukturer i alle fraksjonene. Særlig EIKS-S-50%EtOHG og EIKS-R-50%EtOHG viste høyt innhold av disse bindingstypene.

Komplement fikserings-testen ble benyttet for å kartlegge biologisk aktivitet for fraksjonene. Testen ble utført på råekstraktene og på fraksjonene etter ionebytterkromatografi og gelfiltrering. Bortsett fra EIKS-S-50%EtOH, EIKS-S-50IIG og EIKS-R-50 viste alle

fraksjonene en høyere komplementfikserende aktivitet enn positiv kontrollen BPII. Alle fraksjonene bortsett fra EIKS-S-50%EtOH ble mer aktive etter opprensning på gelfiltreringskolonnen. Flere av fraksjonene som ble isolert etter ionebytterkromatografi viste derimot lavere komplementfikserende aktivitet enn råekstraktene. Dette kan tyde på at aktive komponenter har blitt ekskludert ved ionebytterkromatografi. EIKS-S-50IG og EIKS-R-50%EtOHG utpekte seg som de mest potente fraksjonene med henholdsvis 49 og 106 ganger høyere komplementfikserende aktivitet enn BPII.

Hairy region i pektiner er forbundet med komplementfikserende aktivitet. EIKS-R-50%EtOHG var den fraksjonen som viste best komplementfikserende aktivitet og var en av fraksjonene som tilsynelatende inneholdt mest forgreinede AG-II strukturer. EIKS-S-50IG så ut til å inneholde minst AG-II av fraksjonene og var den fraksjonen som viste dårligst komplementfikserende aktivitet. For flere av de andre fraksjonene finner man ikke denne sammenhengen.

FIK-S-50 og FIK-R-50%EtOH var de mest potente råekstraktene og vil være mest aktuelle å jobbe videre med mot en eventuell improved traditional medicine. FIK-S-50 fra stammebarken vil være den enkleste metoden da det benyttes vann. Bruk av stammebark vil også være mer gunstig for en bærekraftig høsting av plantemateriale enn bruk av rotbark vil.

3. Innledning

3.1 Polysakkarider

Karbohydrater er samlebetegnelsen på monosakkarider, oligosakkarider, polysakkarider og derivater av disse. Oligosakkarider består av 2-10 monosakkaridenheter, mens polysakkarider består av minst 10 monomerenheter. Polysakkaridene kan være homogene og bestå da av samme monosakkarid eller det kan bestå av forskjellige typer monosakkarider og være heterogen. De kan være lineære eller forgrenede, ha nøytral eller negativ ladning og være substituert med metyl eller acetylgrupper. Sammensetningen av monosakkarider og bindingene mellom dem avgjør struktur og biologiske egenskaper. (Bruneton 1999)(Paulsen og Barsett 2005)

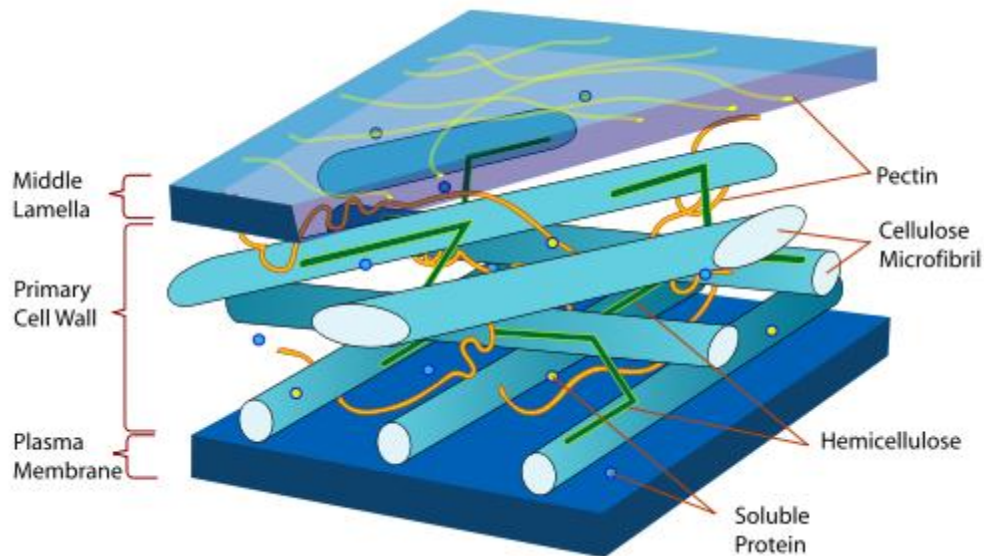
Polysakkarider har mange funksjoner i naturen. De er en viktig bestanddel av celleveggen i både planter, insekter og skalldyr. De er også viktige som energilager (stivelse og andre polysakkarider i planter, glykogen i dyr) og som en del av planters forsvarsmekanismer mot mikroorganismer.(Bruneton 1999)(Paulsen og Barsett 2005)(Reid 1997)

3.3.1 Strukturelle polysakkarider i planter

I planter finner man polysakkarider i mange ulike former og med ulik lokasjon. De er til stede i alle organer, både inni celler og mellom celler, samt som byggestein i matriksen til celler. (Paulsen og Barsett 2005)

Plantecelleveggen

Planteceller er omgitt av en tynn, men mekanisk sterk cellevegg. Plantecelleveggen er dynamisk og endres gjennom hele plantecellens liv. Den inneholder en rekke ulike polysakkarider, proteiner og aromatiske forbindelser. Celleveggen kan deles inn i tre lag; primær cellevegg, sekundær cellevegg og midtlamellen. Primærceleveggen dannes når cellen er i vekst, den er lite spesialisert og er relativt lik i alle celletyper. Den er hovedsakelig bygd opp av polysakkarider i form av pektiner, cellulose og hemicellulose. Sekundærveggen er det innerste laget av celleveggen og dannes først når cellen har stoppet å vokse. Denne veggen kan være spesialisert i struktur og komposisjon og inneholder store mengder cellulose og ligning. Midtlamellen er det ytterste laget som holder cellen sammen og som er i kontakt med nabocellene. Den inneholder mye pektiner. (Taiz og Zeiger 2002)(Carpita et al. 2000)



Figur 3.1 Strukturen av en plantecellevegg (Wikipedia 2013)

Polysakkarider i plantecelleveggen

Cellulose

Cellulose er hovedkomponenten i celleveggen hos de fleste planter. Den er bygd opp av D-glukoseenheter som er bundet sammen gjennom β -1,4-bindinger i lange lineære kjeder. Kjedenes danner sammen strukturer, kalt mikrofibriller, som forsterker celleveggen. Cellulose er ikke løselig i vann og har stor motstandsdyktighet mot kjemisk og enzymatisk degradering. (Taiz og Zeiger 2002)

Hemicellulose

Hemicellulosepolysakkarider dekker celluloseoverflaten, og binder mikrofibrillene sammen. De skiller seg fra cellulose ved at de i tillegg til å inneholde glukose også kan inneholde flere typer sukker-monomere som xylose (Xyl), mannose (Man), galactose (Gal), rhamnose (Rha), og arabinose (Ara). Hemicellulose har kortere kjeder enn cellulose, men kan i motsetning til cellulose ha forgreininger på hovedkjeden. Det finnes en rekke ulike typer hemicellulose og sammensetningen av de ulike typene vil variere avhengig av hvilken art og hvilket vev i planten man undersøker. (Taiz og Zeiger 2002)

Pektiner

Pektiner finnes hovedsakelig mellom celler og i primærceleveggen. Karakteristisk for pektiner er deres innhold og sammensetning av sure sukkere som galakturonsyre (GalA), og nøytrale sukkere som Rha, Gal og Ara. Molekylstørrelsen er rundt 100 kDa. Pektiner er den mest vannløselige polysakkaridkomponenten i celleveggen. Det gjør at de lett kan ekstraheres med varmt vann. De er derfor lette å utvinne for bruk i tradisjonell medisin. (Taiz og Zeiger 2002)

Pektiner består ofte av en lang hovedkjede kalt "smooth region" som er galakturonanregioner bestående av α -1,4-D-GalA. Denne kjeden kan bære metylestergrupper og være acetyllert i posisjon 2 og/eller 3. Galakturonsyrene kan også være substituert med enkle xylose-enheter, da kalt xylogalakturonan (XG). Smooth region er stedvis avbrutt av forgrenede rhamnogalakturonan-områder kalt "hairy region". Her vil hovedkjeden ofte være bygget opp av alternerende α -1,2-L-Rha og α -1,4-D-GalA-enheter, kalt Rhamnogalakturonan I (RG-I). Sidekjeder med arabinaner, galaktaner og arabinogalaktaner er festet til rhamnose-enheten. (Paulsen og Barsett 2005)(Taiz og Zeiger 2002). Disse er beskrevet i den neste avsnittene.

Andelen av smooth region og hairy region varierer avhengig av vevstype og plantens modning. De viktigste pektinforbindelsene er rhamnogalakturonan I og II (RG-I og RG-II), arabinaner, galaktaner, xylogalakturonaner (XG) og arabinogalaktaner type I og II (AG-I og AG-II) (Voragen et al. 2000)

Arabinogalaktaner type I og II (AG-I og AG-II)

Arabinogalaktaner klassifiseres inn i tre hovedgrupper: Arabino-4-galaktaner (Type I), arabino-3,6-glaktaner (Type II) og polysakkarider med arabinogalaktan sidekjeder (Type III). Type III kalles ofte ekte pektin og deles videre inn i Rhamnogalakturonan I (RG-I) og Rhamnogalakturonan II (RG-II) som vil bli beskrevet i neste avsnitt. (Paulsen og Barsett 2005)

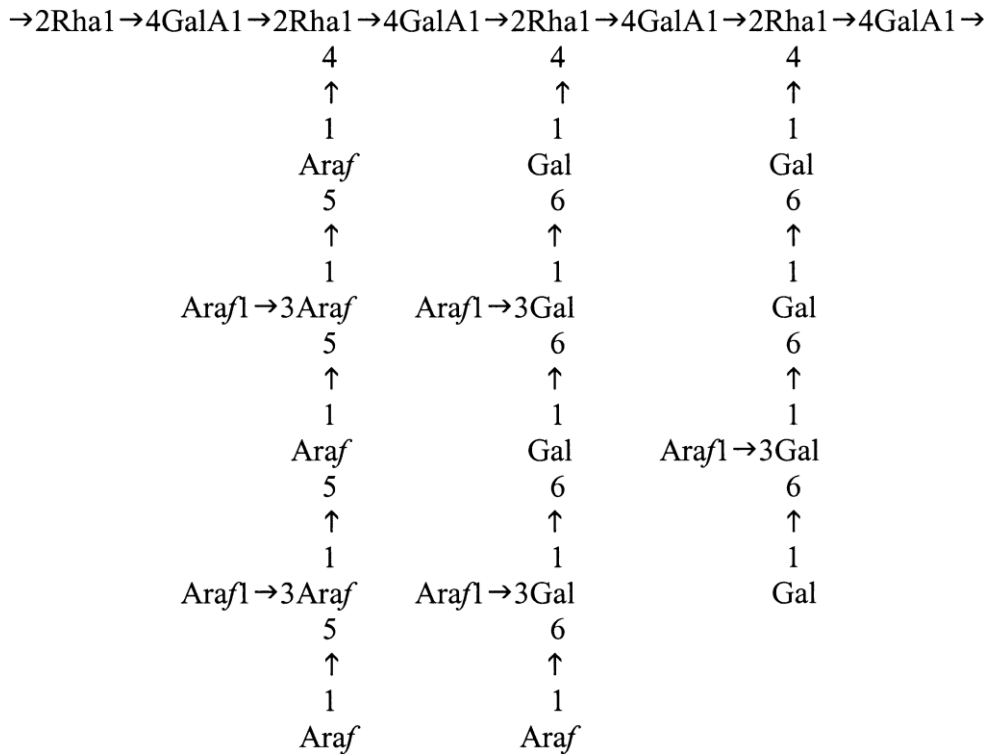
AG-I stammen består av en kjede med β -1,4 bundet galaktan som har sidekjeder av arabinose. Arabinose er hovedsakelig bundet i posisjon 3 til galaktoseenhetene. AG-I strukturer finnes særlig som byggestein i RG-I. (Paulsen og Barsett 2005)

AG-II stammen består av β -D-galaktopyranose som er bundet sammen enten i C-3 eller C-6 posisjon og sidekjeder som er 1,3,6-bundet på galaktoseenheter. β -1-6 bundne galaktopyranosyl enheter termineres ofte med en α -arabinosepyranosylenhet. AG-II finnes ofte i RG-I. Både AG-I og AG-II er bundet gjennom posisjon 4 til rhamnose-enheten i pektinkjeden i RG-I. (Paulsen og Barsett 2005)

Rhamnogalakturonan I (RG-I)

RG-I består av alternerende α -1,4-bundet D-galakturonsyre og α -1,2-bunde L-rhamnoseenheter. Sidekjeder med arabinaner og galaktaner er bundet hovedsakelig til C-4 posisjon på rhamnose-enheten. C-3 forgrening kan også forekomme.

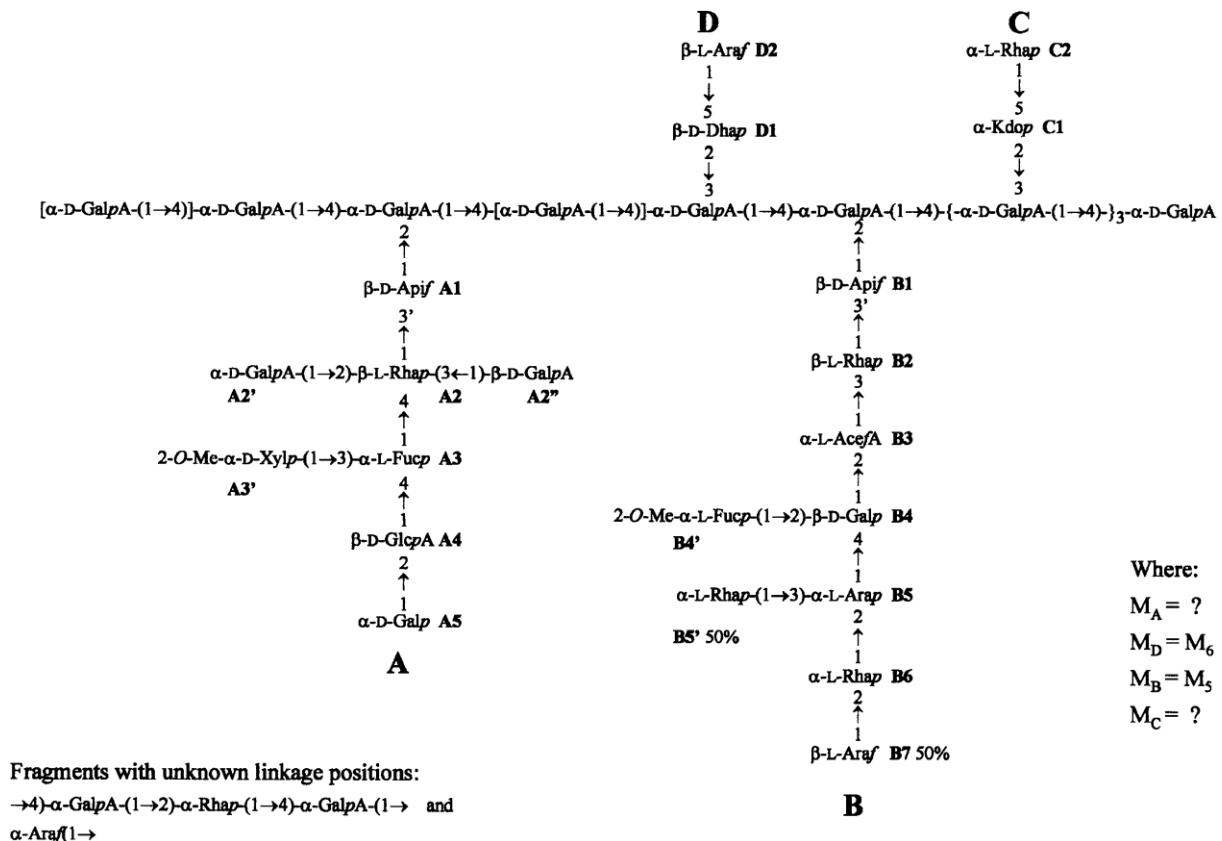
Arabinogalaktanförgreininger består oftest av type II, men type I finnes også. Områdene med sidekjeder kalles som nevnt tidligere hairy region. (Paulsen og Barsett 2005)



Figur 3.4 Eksempel på en struktur med hairy regions. Stammen består av RG-I som er substituert i posisjon C-4 på rhamnose-enheten med arabinan og AG-II sidekjedener. (Paulsen og Barsett 2005)

Rhamnogalakturonan II

RG-II er en kompleks pektinstruktur og inneholder egentlig ikke rhamnose i hovedkjeden som navnet tilsier. Den har en homogalakturonanstamme som består av 9-10 α -1,4-bundne D-galakturonsyre-enheter som er substituert med fire ulike oligosakkaridkjeder bundet via posisjon C-3 eller C-4. I tillegg til Ara og Gal har sidekjedene sjeldne sukkerer som 2-O-metylfucose, 2-O-metylxylose, KDO, DHA og apiose. Dette er særegent for RG-II og den antas å spille en rolle i cellegjenkjennelses- og celleoverføringsmekanismen. (Reid 1997) (Paulsen og Barsett 2005).



Figur 3.5 Foreslått struktur for RG-II. (Perez et al. 2003)

Xylogalakturonaner (XG)

Xylogalakturonaner består av en lineær homogalakturonankjede som er substituert med β -xylose i posisjon 3 på galakturonsyreenheten. (Schols og Voragen 2002)

3.1.2 Struktur og aktivitet hos pektiner

Biologisk aktive polysakkarider er som regel svært komplekse, men har ofte som fellestrekk at de er negativt ladet på grunn av uronsyreinnhold. Flere polysakkarider som er isolert fra planter brukt i tradisjonell medisin har vist immunmodulerende aktivitet på komplementsystemet, makrofager, T-lymfocytter og NK-celler. Eksempler på disse er arabinaner, arabinogalaktaner og rhamnogalakturonaner som alle er en bestanddel i pektiner. (Paulsen og Barsett)(Yamada og Kiyohara 2007)

Selv om det er isolert mange ulike polysakkarider fra sopp, bakterier og planter er det fremdeles mye som er ukjent når det kommer til struktur-aktivitetsforhold. Forskning har likevel ledet frem til noen pekepinner. For at det skal være bioaktivitet må bestemte strukturer

være tilstede. Siden funksjonene til pektiner ser ut til å være mange er det mye som tyder på at det må være flere enn ett aktivt sete. (Paulsen og Barsett 2005)

Polysakkarider med biologisk aktivitet er ofte ladet, det vil si at de inneholder uronsyrer som D-galakturonsyre i pektinpolymerer. Hairy region har vist å være komplement aktiverende etter avspaltning fra smooth regions. Polysakkarider med komplement aktiverende aktivitet ses ofte å ha andre immunologiske aktiviteter også, som stimulering av granulocytter og makrofager. Enkelte har vist seg å være toksiske mot tumorceller eller ha biologisk aktivitet mot mikroorganismer. (Yamada og Kiyohara 1999)

Flertallet av de aktive polysakkaridene som er identifisert har RG-I som hovedkjede og AG-II som sidekjede. Noen få har AG-I som sidekjede. (Inngjerdingen 2007)

Hairy region fra rhamnogalakturonan har vist å aktivere både den klassiske og den alternative veien i komplementsystemet, men smooth region med galakturonankjedene ser også ut til å kunne påvirke komplementsystemet. (Hokputsa et al. 2004)(Yamada og Kiyohara 1999)

Studier viser at hairy region strukturer med nøytrale sidekjedener som inneholder 1,6-bundet β -D-Gal festet til en rhamnogalakturonstamme i posisjon C-4 ser ut til å være et minimum for komplement aktiverende aktivitet. (Yamada og Kiyohara 1999).

Metylforestring og forgreining i galakturonanområdene nedregulerer aktiviteten av hairy region. Denne sammenhengen kan være et tegn på at tredimensjonal struktur og molekylvekt kan påvirke komplementaktivitet. (Kiyohara et al. 1997)(Nergård 2006)(Yamada og Kiyohara 1999) Flere studier har vist at molekylstørrelse er viktig for aktivitet. Årsaken antas å være at større og mer forgrenede molekyler har konformasjoner som gir bedre bindingssteder. (Nergård 2005)

Det er også vist at O-acetylte polysakkarider kan påvirke evnen til aktivering av det klassiske komplementsystemet, mens karboksylsyrer ansees som essensielle for aktivering av alternativ vei. (Yamada et al. 1986)

3.2 Immunmodulerende aktiviteter

3.2.1 Introduksjon

Immunforsvaret består av en ytre del og en indre del. Den ytre delen består av hud, slimhinner og kroppsvæsker. Huden er tett og vannfast så lenge den ikke er skadet. Slimhinnene inneholder antistoffer og flimmerhår i halsen, nesen og lungene gjør det vanskelig for mikrober å komme inn i kroppen. Magesyren dreper de fleste mikrogener som vi får i oss gjennom mat og drikke. Kroppsvæsker som tårer, hudolje og spytt inneholder antibakterielle enzymer som kan redusere infeksjonsrisikoen.

Det indre immunsystemet trer i kraft hvis en mikroorganismen trenger inn i kroppen vår. Man kan dele det indre immunsystemet inn i to deler; det medfødte og det adaptive. Det medfødte immunsystemet reagerer så snart kroppen blir angrepet av en mikroorganisme. I tillegg til å kjenne igjen og uskadeliggjøre fremmede mikroorganismer kan det medfødte immunsystemet kjenne igjen og uskadeliggjøre egne celler som det er noe galt med. Eksempel på dette kan være kreftceller eller virusinfiserte celler. Det adaptive immunsystemet er minst like viktig som det medfødte og bygges opp gjennom hele livet. Det gjør kroppen i stand til å kjenne igjen mikroorganismer og ved neste angrep reagere raskere og mer effektivt. (Parham 2009)(Norsk Helseinformatikk-for helsepersonell 2010)

Polysakkarider fra planter ser ut til å kunne modulere immunsystemet ved å påvirke komplementsystemet, lymfocytproliferasjonen, produksjon av antistoffer, makrofagfunksjon og immunitet.(Yamada og Kiyohara 2007)

3.2.2 Komplementsystemet

(Den store danske 2013)(Lea 2000)(Parham 2009)

Komplement er en fellesbetegnelse på plasmaproteiner og celleoverflateproteiner som inngår i immunsystemets funksjoner. Det forbindes primært med det medfødte immunsystemet men interagerer også med det adaptive immunsystemet. Systemet virker i form av en reaksjonskaskade slik at en aktivert komponent aktiverer den neste i kjeden. De ulike proteinene virker sammen og på hverandre. I et friskt individ befinner komplementkomponentene seg stort sett i inaktiv form. Komplementkaskaden kan aktiveres på tre ulike måter;

1. Den klassiske aktiveringsvei

Den klassiske aktiveringsvei finner sted når antistoffer bindes til antigen på overflaten av mikroorganismen.

2. Den alternative aktiveringsvei

Den alternative aktiveringsvei aktiveres ved at komplementfaktorer gjenkjenner lokale miljøer på overflaten av mikroorganismer. Lokale miljøer består blant annet av LPS, zymosan (cellevegg fra sopp), peptider, teichoinsyre, inulin og enkelte celleoverflater som inneholder karbohydrater og lipider som finnes på den patogene celleoverflaten.

3. Lektin aktiveringsvei.

Lektin aktiveringsvei igangsettes når mannosebindene lektin i blodplasma bindes til peptidoglykaner på overflaten av mikroorganismer som inneholder mannose. Se figur 3.6.

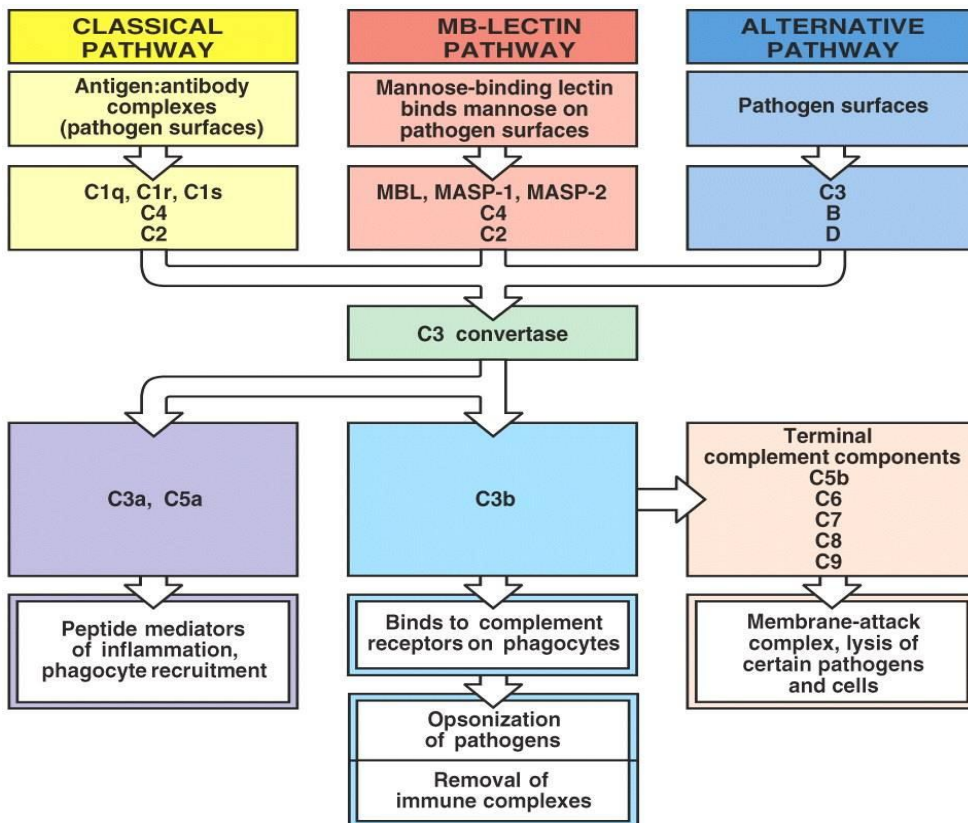


Figure 2-19 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Figur 3.6 Oversikt over de tre aktiveringsveiene for komplement. (Davidson College 2013)

Det som er felles for alle de tre aktiveringsveiene er at de danner en C3 konvertase som omdanner komplementfaktor C3 til C3a og C3b. Resten av kaskadesystemet er litt forskjellig for de ulike aktiveringsveiene. (Den store danske 2013)

Det er fire viktige hovedvirkninger av komplementaktivering

1. Det dannes lavmolekylære forbindelser under aktiveringsprosessen av komplement som diffunderer ut i vevet og i vevsvæsken. Disse forbindelsene fungerer om anafylatoksiner og aktiverer blant annet mastceller og basofile granulocytter slik at de degranulerer og frigjør en rekke farmakologiske aktive forbindelser. C3a og C5a har kjemotaksisk aktivitet slik at de leder granulocytene til betennelsesstedet.
2. Noen av komplementproduktene som dannes kan ”merke” mikroorganismer ved å feste seg til cellemembraner og cellevegger. Merkingen gjenkjennes av reseptorer på makrofager og granulocytter. Dette gjør at de lettere kan binde seg og binde seg sterkere. Fagocytosen blir da mer effektiv.
3. Det terminale ”Membrane Attack Complex” (MAC) initieres av C5b som sammen med C6-C9 danner en membranpore i biologiske membraner. MAC kan lage porer i både prokaryote og eukaryote celler. Poren fører til at celleinnholdet vil lekke ut og hvis det blir mange nok porer vil cellen sprekke og lysere. Se figur 3.7.
4. Komplementfaktor C3b som er bundet på overflaten av mikroorganismer kan binde seg til komplementreseptor 2 på overflaten av B-lymfocytter. Når B-cellen bindes til antigen, vil binding av C3b fungere som et ko-stimulerende signal som stimulerer til økt antistoffproduksjon.

(Lea 2000) (Parham 2009)

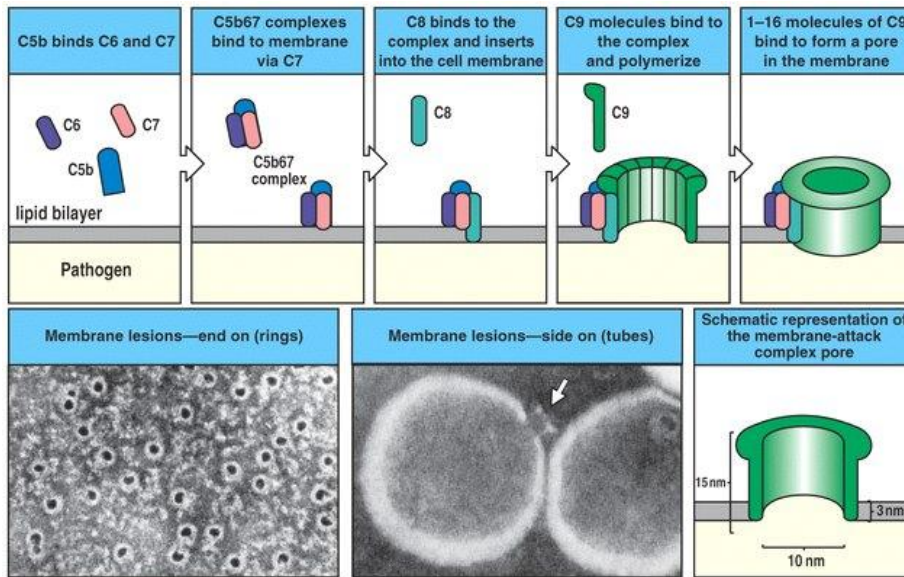


Figure 2-35 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Figur 3.7 Dannelse og effekt av MAC. (Janeway et al. 2005)

Komplement aktiverende/komplementinhiberende aktivitet

Både komplement aktivatorer og komplement inhibitorer har en komplementfikserende aktivitet som begge fører til redusert hemolyse i et indikatorsystem. Komplementaktivatorer forbraker komplement og det blir dermed mindre tilgjengelig. Komplement inhibitorer hemmer enkelte trinn i kaskaden slik at komplement faktorene som fører til hemolyse ikke blir dannet. Det er derfor ikke mulig å skille mekanismene fra hverandre i hemolytiske forsøk. (Yamada og Kiyohara 2007)

Ved komplementaktivering genereres biologisk aktive komplementfragmenter som C3a og C5a. Disse fører som tidligere nevnt til en rekke biologiske aktiviteter som økt vaskulær permeabilitet, kjemotaksisk tiltrekning av leukocytter, immunadherens og modulering av antistoffproduksjon. Komplementaktivering fører på denne måten også til inflammatoriske responser. (Yamada og Kiyohara 2007)

Komplementaktivering er en del av patogenesen ved inflammatoriske og immunologiske sykdommer, som sepsis, akutt respiratorisk stress syndrom, reumatoid artritt, glomerulonefritt, multipel sklerose, iskemiske reperfusjonskader, og astma. Aktivering av C3a og C5a er trolig ingen utløsende årsak til inflammatoriske sykdommer, men det ser ut til å fremme og forverre inflammatoriske reaksjoner (Guo og Word 2005). En

komplementinhibitor vil således kunne være en god terapeutisk strategi blant annet for behandling av inflammatoriske sykdommer, ved organtransplantasjon for å redusere vevsskade og for reduksjon av reperfusjonsskade ved ischemi. (Inngjerdingen 2007)(Alban et al. 2002) En komplementaktivator vil på den andre siden være nyttig for å styrke kroppens forsvar mot patogene mikroorganismer, stimulere sårheling og antitumoraktivitet. (Alban et al. 2002)

Flere polysakkarider som er isolert fra vannekstrakter av ulike medisinerplanter har vist en komplement aktiverende effekt. (Yamada og Kiyohara 2007)

3.3 *Erythrina senegalensis*



3.3.1 Taksonomisk klassifisering av *Erythrina senegalensis* og lokale navn

(Beentje 2006)(Hedding 2007)

Tabell 3.1 Viser taksonomisk klassifisering av *E. senegalensis*.

Rike	Plantea (planterike)
Subrike	Tracheobionta (karplanter)
Divisjon	Magnoliophyta (blomsterplanter, dekkfrøet)
Klasse	Magnoliopsida (tofrøbladet)
Orden	Fabales
Familie	Fabaceae
Subfamilie	Faboideae
Slekt	<i>Erythrina</i>
Art	<i>Erythrina senegalensis</i>

Lokale navn

Mali: N`tè, n`tièmè, furudolen, surudolen, turudolen, siridolen, zoroblen, muso-n`tièmè, zemen, zemeba, n`gumè, donitulu, sindian

Fransk: Arbre corail, Erythrine du Sènègal

Engelsk: Coral tree, coral flower

(Beentje 2013)(Hedding 2007)

3.3.2 Botaniske forhold

Erythrina senegalensis er et savanne tre som vokser i det tropiske Vest-Afrika. Det er vanlig at det blir 7 meter høyt, men kan bli helt opptil 15 meter. Barken er furete og tykk. Den robuste barken gjør treet godt beskyttet mot savannebranner som er vanlige i Vest- Afrika. Både grenene og barken har torner på ca. 1 cm. Bladene består av tre deler med størrelse på 5-15 cm lange og 4-10 cm brede. (Beentje 2013)

E. senegalensis blomstrer i den første halvdel av den tørre årstiden når treet er uten blader. Blomstene er samlet i store grupper på enden av grenene. De er lyserøde og 4-5 cm lange. Det er disse som gir opphav til det engelske navnet Coral tree. Frukten er hårete og innsnevret mellom frøene. (Beentje 2013)

Reproduksjon kan skje ved både frø og stiklinger.

3.3.3 Tradisjonell bruk

Anvendelsesområdene for *Erythrina senegalensis* er mange og varierer alt etter hvilket område i Vest-Sahara det vokser. I Nord-Nigeria plantes treet for å markere gravplasser, mens andre mener det har magiske egenskaper. Det er vanlig å bruke *E.senegalensis* som hekk rundt eiendommer både på grunn av de vakre blomstene og på grunn av de skarpe tornene som kan holde inntrengere ute. (Burkill 1985)

Frøene inneholder β -erytroidin som har curare-lignende giftig effekt. Saften fra frøene har derfor tradisjonelt blitt brukt som pilgift. De andre delene av planten blir brukt til medisinske formål. (Burkill 1985)

Som medisinplante brukes *E.senegalensis* for en rekke ulike indikasjoner. I Gambia og Senegal brukes bladene for sårheling. Dekokt av bladene brukes mot amenorè i Mali, mens i Senegal brukes macerat av stammebarken mot samme indikasjon. En suppe av bark og blader brukes for å kurere barnløshet i Ghana og Nigeria. Fisk tilberedt i dekokt av bark blir brukt mot dysenteri i Sierra Leone og Nigeria. I Nigeria brukes også kjerneved mot gulsott. Et

dekokt av bark brukes som styrkedrikk og tygget ved som afrodisium i Elfenbenskysten. Her brukes også dekokt av bark og røtter mot spedalskhet.

Det er rapportert om bruk blant annet mot malaria, bronkitt, feber, rakitt, infeksjoner, amenore, kroppssmerter, gastrointestinale plager, onchocercosis og som prevensjonsmiddel. (Burkill 1985) (Maydell 1990) (Togola et al. 2008)

I etnofarmakologiske studier utført i Dioila, Kolaksni og Koutiala i Mali var de hyppigste indikasjonene for *E. senegalensis* malaria, amenorrhoea og som styrkedrikk. De plantedelene som ble mest anvendt var røttene og stammebarken. (Togola et al. 2008) (Hedding 2007)

3.3.4 Tidligere forskning på *Erythrina senegalensis*

Det er utført mange studier på *Erythrina senegalensis* som har ført til at en rekke innholdsstoffer er identifisert og strukturoppklart. Stoffer som er identifisert er vist i oversikten under. Oversikten er hentet fra Berte Heddings masteroppgave fra 2007 og tilføyd stoffer som er kommet i ettertid og nye referanser som bekrefter tidligere funn. Stoffene er sortert etter hvilken stoffgruppe de tilhører.

Identifiserte innholdsstoffer

Alkaloider:

Erysodine

-Frø (Folkers et al. 1941) (Wandji et al. 1995c)

Erysopine

-Frø (Folkers et al. 1941)

Hypaphorine

-Frø (Folkers et al. 1941), (Wandji et al. 1995c)

Glucoerysodine

-Frø (Wandji et al. 1995c)

Isoflavonoider:

Warangalone

-Stammebark (Fomum et al. 1985)

(Wandji et al. 1994a)

2,3-Dihydroauriculatin

-Stammebark (Taylor et al. 1986)

Auriculatin

-Stammebark (Taylor et al. 1986) (Wandji et al. 1994a),
(Wandji *et al.* 1994c) (Oh et al. 1998),
(Oh et al. 1999 (Oh et al. 2009)

6,8-Diprenylgenistein (5,7,4-Trihydroxy-6,8-diprenylisoflavone)

-Stammebark (Taylor *et al.* 1986) (Fomum et al. 1986a)
(Wandji *et al.* 1994b) (Oh *et al.* 1999)
(Oh *et al.* 2005)

Senegalensin

-Stammebark (Wandji et al. 1990) (Wandji et al. 1994c)

Erysenegalensein D

-Stammebark (Wandji et al. 1994b) (Oh et al. 1999)
(Oh et al. 2005)

Erysenegalensein E

-Stammebark (Wandji et al. 1994b)

8-Prenylluteone

-Stammebark (Wandji et al. 1994b) (Oh et al. 1998)(Oh et al. 2009)

Erysenegalensein F

Erysenegalensein G

-Stammebark (Wandji et al. 1994a)

Erysenegalensein H

Erysenegalensein I

Stammebark (Wandji et al. 1994c)

Erysenegalensein B

Erysenegalensein C

-Stammebark (Wandji et al. 1995a)

Erysenegalensein J

Erysenegalensein K

-Stammebark (Wandji et al. 1995b)

Erysenegalensein L

Erysenegalensein M

-Stammebark (Wandji et al. 1995c)

Erysenegalensein N

Erysenegalensein O

Erysenegalensein D

Derrone

Alpinumisoflavone

-Alle: Stammebark (Oh et al. 1999 (Oh et al. 2005)

Erybraedin A

Shinpterocarpin/Phaseollin

-Rotbark (Theis 2006)

Erybraedin C

Erybraedin D

Erybraedin K

Erybraedin F

-Alle: Stammebark (Hedding 2007)

Flavanoner:

Erythrisenegalone

-Stammebark (Fomum et al. 1985) (Wandji et al. 1994c)

Senegalensein

-Stammebark (Fomum et al. 1987)

Lupinifolin

-Stammebark (Wandji et al. 1994c)

Triterpener:

β -amyrin

Maniladiol

Erythrodiol

Oleanolic acid

Cornulacic acid

-Alle: Stammebark (Wandji et al. 1995b)

Estere:

Erythrinasinat

-Stammebark (Fomum et al. 1986b)

n-Triacontyl 4-cinnamat

Langkjedet ester av ferula syre

-Stammebark (Wandji et al. 1990)

N-nitrosaminer:

N-nitrosodimethylamine (Atawodi 2003)

Biologisk aktivitet

Det er identifisert flere aktive forbindelser fra *E.senegalensis*, både stoffer som er kjente fra andre planter og nye som har vist seg aktive. Av disse er alkaloider med curare-lignende effekt og ulike flavonoider og isoflavonoider. Det er ikke tidligere gjort studier på polysakkarider isolert fra *E.senegalensis*. Dette er tema for denne masteroppgaven.

Under er en oversikt over de biologiske aktivitetene som er påvist for *E.senegalensis*.

Antibakteriell og antifungal aktivitet

Infeksjoner er et større problem i mange afrikanske land enn i vesten. Forurenset drikke- og vaskevann, dårlig utbygd helsesystem og liten tilgang til medisiner kan gjøre at en infeksjon får utvikle seg alvorlig. *E.senegalensis* har tradisjonelt blitt brukt mot ulike typer infeksjoner i flere av områdene hvor det er utført etnofarmakologiske studier.(Togola et al. 2005)(Magassouba et al. 2007)(Togola et al. 2008)

Enkelt stoffer som har vist antibakteriell effekt er også identifisert i *E. senegalensis*. Ulike ekstrakter fra planten har vist effekt som tyder på innhold av antibakterielle komponenter.

Etanolekstrakt av roten til *E.senegalensis* har vist antibakteriell aktivitet overfor stamme av *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* og *Bacillus subtilis*,, inkludert bakteriestammer som er resistente mot visse typer antibiotika som aminosider, penicillin M, makrolider, lincosamide og streptogramin B. (Kone et al. 2004) Etanolekstraktet har også vist aktivitet ovenfor *Streptococcus pneumonia*.(Kone et al. 2006)

E.senegalensis preparert etter oppskrift fra tradisjonelle healere i Guinea viste aktivitet mot *Bacillus cereus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Staphylococcus aureus* og *Candida albicans*. (Minimal inhibitory concentration<125µg/ml).(Matsuda et al 2007)

2,3 dihydroauriculatin har vist moderat aktivitet mot de orale mikroorganismene *Streptococcus mutans*, *Prophyromonas gingivalis* og *Actinomyces actinomycetemcomitans*.(Inuma et al. 1994)

Erybraedin A har en sterk aktivitet mot soppsporer og har også vist en sterk vekst hemmende potensiale mot vancomycin resistente *enterococci* (VRE) og multiresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Disse antibakterielle aktivitetene er basert på bakteriostatisk aktivitet. (Wanjala et al. 2002)(Sato et al. 2004)

6-8-diprenylgenistein isolert fra stammebarken av *E.senegalensis* (Oh et al. 1999) viste *in vitro* inhibering av 36 ulike stammer av *Staphylococcus aureus* ved mindre enn 200µg/ml, 29 stammer av *Shigella spp* og 27 stammer av *Salmonellae spp*. i konsentrasjoner mellom 25-200 µg/ml. *Pseudomonas spp* og *Klebsiella spp* viste litt sensitivitet mot 6-8-diprenylgenistein løsningen. (Dastidar et al. 2004)

Senegalensin (Lonchocarpol A) som også er isolert fra stammebarken til *E.senegalensis* (Fomum et al. 1987) viste en antibakteriell aktivitet mot methicillin resistent *Staphylococcus aureus* og vancomycin resistent *Enterococcus faecium*. Minimal inhibitorisk konsentrasjon var mellom 0,78-1,56 µg/ml for begge bakteriene. (Salvatore et al. 1998)

I en artikkel av Witabouna et al. blir *E.senegalensis* utpekt som en av de mest lovende medisinsplanter mot multiresistente bakterier på bakgrunn av aktivitetsmålinger utført på vancomycin resistente *enterococci* (VRE), *Escherichia coli* ESBL, *Klebsiella pneumoniae* ESBL og MDR (multi-drug resistant)-*Salmonella* varianter. (Witabouna og Kagoyire 2008)

Antiparasittisk aktivitet

Antiplasmodial aktivitet

Malaria har stor utbredelse i sub-Sahariske land. I 2010 ble det estimert at ca. 219 millioner ble smittet med malaria og ca. 660 000 døde. Dødeligheten er høyest blant barn.

Protozoparasittene *Plasmodium species* er årsaken til malaria. De lever i *anopheles* myggen og smittes via myggstikk. (WHO 2013a)

Vandig ekstrakt av stammebarken av *E.senegalensis* viste liten antiplasmodial aktivitet i en studie utført av Saidu et al (Saidu et al. 2000). Etanol råkstrakt av stammebarken har derimot vist antiplasmodial aktivitet *in vitro* (Atindehou et al. 2004). Metanolekstrakt av stammebarken viste antiplasmodial aktivitet mot en multidrug resistent stamme av *Plasmodium falciparum* (Ajaiyeoba et al 2004).

Antitrypanosomal aktivitet

Trypanosoma gambiense og *Trypanosoma rhodesiense* er protozoparasitter som lever i tsetsefluer. Disse er årsaken til sykdommen afrikansk sovesyke som er utbredt i mange afrikanske land. Uten behandling vil sykdommen ha dødelig utfall. I mange av de områdene som er mest utsatt for smitte er det et dårlig utviklet helsevesen. (WHO 2012)

Etanol råkstrakt av stammebarken til *E. senegalensis* har vist antitrypanosomal aktivitet *in vitro*.(Ajaiyeoba et al. 2004)(Atindehou et al. 2004)

Antischistosomal aktivitet

Alpumisoflavone er isolert fra etanolekstrakt gjort av stammebarken til *E.senegalensis* (Oh et al 1999). Stoffet har vist å ha effekt som forebygging mot schistosomiasis infeksjon (Perrett et al. 1995).

HIV-inhiberende aktivitet

Ved utgangen av 2011 var det 34,2 millioner mennesker med HIV. 2,5 millioner ble smittet dette året og 1,7 millioner døde av AIDS. Deriblant 230 000 barn. Mer enn 2/3 av alle nye tilfeller er i sub-Sahara i Afrika. (WHO 2013b). Utfordringer er blant annet dyre medisiner og resistensutvikling.

Senegalensein har i tillegg til å ha antibakteriell effekt, vist HIV-inhiberende aktivitet med en IC_{50} på 2,7 $\mu\text{g/ml}$. (Salvatore et al. 1998)

Åtte stoffer ble isolert og identifisert fra diklormetaneekstrakt av stammebarken på *E.senegalensis* og testet for HIV-1 protease inhiberende aktivitet. De identifiserte stoffene var 8-prenylluteone, auriculatin, erysenegalensein O, erysenegalensein D, erysenegalensein N, derrone, alpinumisoflavone og 6, 8-diprenylgenistein. 6,8-diprenylgenistein var den komponenten som klart viste mest potent inhiberende aktivitet på HIV-1 protease med en IC_{50} verdi på 0,5 μM . Alle stoffene viste lik eller bedre inhiberende aktivitet sammenlignet med tidligere beskrevne inhibitorer. Auriculatin, erysenegalensein O, erysenegalensein D og erysenegalensein N hadde en IC_{50} -verdi mellom 2,5-5 μM . Derrone og alpinumisoflavone viste lavest inhiberende effekt med IC_{50} -verdier på henholdsvis 18,2 og 30,1 μM . (Lee et al. 2009)

Antiinflammatorisk effekt

Vandig ekstrakt av *E. senegalensis* stammebark viste *in vivo* anti-inflammatorisk effekt. (Saidu et al 2000)

Smertestillende effekt

Vandig ekstrakt av *E.senegalensis* stammebark viste *in vivo* smertestillende effekt. (Saidu et al 2000)

Hemming av fosfolipase C γ 1 aktivitet

Fosfolipase C (PLC) spiller en viktig rolle i transmembran signaloverføring. Den katalyserer reaksjoner som induserer en serie hendelser som til slutt fører til DNA syntese, cellevekst og celledifferensiering. Mye tyder på at onkogene produkter relatert til fosfolipase C kaskaden og overuttrykking av disse fører til kreft hos mennesker. (Oh et al. 2005)

Erysenegalensein O, erysenegalensein D, erysenegalensein N, derrone og 6,8-diprenylgenistein som alle finnes i roten til *E.senegalensis* har *in vitro* vist hemming av enzymet fosfolipase C γ 1 (PLC γ 1). De viste også hemming av dannelsen av inositol fosfater (Ipt) i NIH3Ts fibroblastceller med overuttrykking av PLC γ 1. (Oh et al. 2005)

Auricultin og 8-prenylluteone har også vist *in vitro* at de hemmer enzymet PLC γ 1 og dannelsen av Ipt i overuttrykkende NIH3T3 fibroblastceller. (Oh et al. 2008)

Cytotoksisitet

Auricultin og 8-prenylluteone fra *E.senegalensis* viste moderat cytotoksisitet mot flere humane tumorcellelinjer i *in vitro* forsøk. (OH et al. 2008)

Alpinumisoflavone isolert fra *Erythrina indica* viste sterk cytotoksisitet mot humane faste tumor celler. Denne komponenten er også funnet i stammebarken til *E.senegalensis*. (Oh et al. 1999)(Oh et al. 2005) Erysenegalensein E er enda et stoff som er isolert fra stammebarken (Wandji et al 1994) og har vist en viss toksisitet mot tumorceller. (Nkengfack et al. 2001)

Erythrisenegalone og Senegalensein er begge isolert fra stammebarken til *E.senegalensis* (6) og har vist anti-svulst fremmede aktivitet *in vitro* i "Epstein-Barr virus early antigens (EBV-EA) inhibering test. Evaluering av EBV-EA inhibering brukes som en primær *in vitro* screening for anti-tumor fremmede aktivitet. Ved konsentrasjoner på 1×10^3 mol viste både erythrisenegalone og senegalensein 100 % hemmende aktivitet, men ingen tegn til cytotoksisitet. (Itoigawa et al. 2002)

Alpinumisoflavone og derrone finnes i stammebarken til *E.senegalensis* (Oh et al. 1999)(Oh et al. 2005) Begge stoffene viste moderat spredningshemmende aktivitet mot human leukemi U937 celler. (Matsuda et al. 2007)

Antioksidant aktivitet

Antioksidanter kan beskytte mot frie radikaler som ellers kan gjøre skade på kroppen vår. Sykdommer som er assosiert med dette er blant annet kreft og hjerte- og karsykdommer.

Erybraedin F, erybraedin A, erybraedin D, erybraedin C, eryvarin K, phaseollin, shinpterocarpin og carpachromene er isolert fra stammebarken og rotbarken til *E.senegalensis*. De viste alle en sterk inhiberende aktivitet på 15-lipxygenase. Erybraedin D var den meste effektive hemmeren og viste bedre aktivitet enn Quercetin som ble brukt som positiv kontrollen. (Togola et al. 2009)

2, 3-dihydro-2'-hydroxyosajin, osajin og 6,8-diprenylgenistein er isolert fra stammebarken av *E.senegalensis* og viste antioksidantaktivitet i fire ulike testsystemer. (2, 4-dinitrophenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities, β -Carotene-Linoleic Acid Model System (β -CLAMS), Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay og microsomal lipid peroxidation). (Donfack et al. 2008)

Inhiberinga av microsomal lipid peroksidering og protein oksidasjon.

Lipid peroksidering og protein oksidering er rapportert å være involvert i etiologien av sykdommer som aterosklerose, ischemi perfusjonsskader, aldring og leverrelaterte sykdommer.

Metanol- metylen klorid ekstrakt av *E.senegalensis* viste inhibering av både lipid peroksidering og protein oksidasjon. Det blir spekulert i om antioksidantaktiviteten til ekstrakt av planten skyldes evnen til å eliminere frie radikaler som er involvert i både lipid peroksidering og protein oksidasjon. (Njyou et al. 2008)

Hepatoprotektiv aktivitet

Osajin og 6,8-diprenylgenistein isolert fra stammebarken av *E.senegalensis* viste å ha leverbeskyttende aktivitet mot karbon tetraklorid-indusert hepatitt i rottelever. (Donfack et al. 2008)

Diacylglycerol acyltransferase aktivitet

Inhibering av acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) er foreslått som legemiddeltarget for behandling av overvekt og type 2 diabetes.

8-prenylleutone, auriculatin, erysenegalensein O, erysenegalensein D, derrone og 6,8-diprenylgenistein er isolert fra diklormetaneekstrakt av stammebarken til *E.senegalensis* og viste DGAT inhiberende aktivitet i konsentrasjonene 1.1 +/- 0.3 til 15.1 +/- 1.1 µg/ml. (Oh et al. 2009)

Inhibering av protein tyrosin fosfatase 1 B

Det er blitt foreslått at protein tyrosin fosfatase 1 B (PTP1B) kan være et terapeutisk target for behandling av diabetes type 2 og overvekt.

2,3-dihydroauriculatin som finnes i stammebarken til *E.senegalensis* har vist å være signifikant inhiberende på PTP1B. (Bae et al. 2006)

Inhibering av monoamin oksidase (MAO) aktivitet

MAO inhibitorer kan være aktuelle i behandling av depressive lidelser, angst lidelser, Parkinson og Alzheimers.

Alpinumisoflavone finnes i stammebarken av *E. Senegalensis* og har vist signifikant hemming av total MAO aktivitet i musehjerne. (Han et al. 2005)

Oppsummering biologisk aktivitet

I tradisjonell medisin vil svært mye av behandlingen være symptombehandling, da healere ikke kjenner sykdomspatogenesen. Mange av de biologiske studiene som er utført viser til aktiviteter som ikke er nevnt i etnofarmakologiske studier. Blant disse er kreft, AIDS/HIV, diabetes, overvekt, Parkinson og Alzheimer. Som beskrevet er det gjort særlig mange forsøk for på å kartlegge *E. senegalensis* sine antibakterielle effekter. Flere av innholdsstoffene som er identifisert viste aktivitet mot en rekke ulike bakteriestammer, deriblant en del multiresistente. Ekstrakter viste også å ha antiparasittisk aktivitet. Dette kan forklare bruken av *E.senegalensis* i sårbehandling og mot mage- og tarmproblemer hvor patogener ofte kan være årsaken. Anti-inflammatorisk effekt og smertestillende effekt ble også påvist for vandig ekstrakt og kan forklare tradisjonell bruk mot ulike typer smerte..

Til tross for omfattende forskning på *E.senegalensis* er det fremdeles flere av indikasjonene som er oppgitt i tradisjonell medisinsk bruk som det ikke er gjort rede for gjennom forskning. Mange av studiene er utført på stoffer isolert fra organiske ekstrakter av *E.senegalensis*, mens det hovedsakelig er vandige ekstrakter som blir brukt i tradisjonell bruk. (Togola et al. 2008)

4. Hensikt med oppgaven

Opgaven inngår som del av farmakognosiavdelingen ved Farmasøytisk institutt (UiO) sin store satsing på ”Medisinplanter fra Mali”, i Glyconor-satsingen på MN-fakultetet og er også en del av EU-prosjektet MUTHI (Multi-disciplinary University Traditional Health Initiative: Building Sustainable Research Capacity on Plants for Better Public Health in Africa).

Målet med denne masteroppgaven var å isolere polysakkarider fra 50 %etanolekstrakt, 50 °C og 100 °C vandige ekstrakter av *Erythrina senegalensis* rotbark og stammebark. Det ble gjort for å bestemme monosakkaridsammensetningen og struktur, samt struktur- og aktivitetsforhold av polysakkaridene ved hjelp av komplementtesten.

Malaria er oppgitt som indikasjon for *E. senegalensis* i flere av områdene hvor det er utført etnofarmakologiske studier. Det er for tiden stor interesse for vannekstrakter av planter som brukes mot malaria og om disse kan inneholde immunstimulerende substanser. Ved malaria svekkes immunforsvaret og det kan derfor tenkes at en stimulering av immunforsvaret kan gjøre at pasienten føler seg bedre. Studier på polysakkarider fra *E. senegalensis* er ikke gjort tidligere. Resultatene fra denne oppgaven kan være med å gi svar på hvilken del av planten som inneholder de mest aktive polysakkaridene, og hvordan disse best mulig kan utvinnes fra planten ved hjelp av ekstraksjoner. Dette vil kunne forbedre metoder for bruk av planten i tradisjonell medisin og kanskje danne grunnlag for utvikling av ”Improved Traditional medicine”.

5. Metoder, inklusiv deres prinsipper

5.1 Generelle metoder

5.1.1 Vannkvalitet

Det ble brukt deionisert vann til alle metodene.

5.1.2 Innveing

Overskålsvekt: OHAUS®PORTABLE Advanced, Model No.CT1200V

Analysevekt: Sartorius Extend, ED2245

Analysevekt: Mettler Toledo PB 3002

Analysevekt: Sartorius analytic

5.1.3 Filtrering

Millipore TYPE HVLP 0,45 µm

Millex®GC filter Unit 0,22 µm, Millipore Express PES Membrane

PALL Corporation Acrodisc® 25 mm Syringe Filters, 5 µm Versapor® Membrane

PALL Corporation Acrodisc® 25 mm Syringe Filters, 0,2 µm Supor® Membrane

PALL Corporation Acrodisc® 32 mm Syringe Filters, 0,45 µm Supor® Membrane

5.1.4 Sentrifugering

Sentrifuge, MSE

Multifuge 4 KR Heraeus

5.1.5 Volumreduksjon

Prinsipp

Oppkonsentrering og reduksjon av volumet på løsninger ble gjort ved hjelp av rotavapor. Varme og vakuuim gjør at løsningen dampes inn.

Utstyr

VWR, IKA®RV10 basic rotavapor med vakuumpumpe og kjøling.

Pærekolbe og rundkolbe

Prosedyre

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

5.1.6 Blanding av løsninger

Utstyr som ble brukt for å blande løsninger:

Whirlimixer, Fison

Whirlimixer, Heidolph REAX TOP

Minishaker, MS2 Minishaker, KIKA

5.1.7 Degassing av løsninger

Oppløst luft i løsninger ble fjernet med en av følgende metoder:

- 1) Gjennombobling med helium i ca.15 minutter
- 2) Ultralydbad i ca. 3 minutter.

5.1.8 Vask av dialyseslanger

Prinsipp

Slangene ble vasket før bruk for å fjerne eventuelle rester av cellulose.

Reagenser

0,5 M NaOH-løsning (Bruk hansker og briller)

0,05 % natriumazidløsning (NaN_3)

Deionisert vann

Utstyr

Gryte

Kokeplate (Wilfa)

Verneutstyr: Hansker og briller

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

Prosedyre

1. Dialyseslangene ble klippet opp i lengder på ca. 60 cm og skylt godt i vann.
2. 0,5 % NaOH løsning ble kokt opp før dialyseslangene ble lagt oppi og kokt i ca. 10 minutter.
3. Slangene ble deretter skylt godt innvendig og utvendig, 2 ganger med springvann og 2 ganger med deionisert vann.
4. For å unngå bakterievekst ble slangene ble oppbevart i 0,05 % natriumazidløsning ved 4 °C (kjøleskap).

5.1.9 Dialyse

Prinsipp

Dialyse utføres for å fjerne lavmolekylære forbindelser og salter som er uønsket i den videre prosessen. Molekyler med lavere molekylvekt enn cut-off-verdien på dialyseslangens porer vil diffundere ut av slangen og over i væsken rundt på grunn av konsentrasjonsforskjeller. Det

er viktig å opprettholde denne konsentrasjonsforskjellen ved å skifte dialysevannet regelmessig under prosessen.

Reagenser

Toluen

Mettet AgNO₃-løsning (10 %)

Utstyr

Dialyseklyper

Bøtte

Trakt

Magnet

Glass-stav/ pipetter

Magnetrører: Kika Labortechnik, RCT basic

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

Prosedyre

1. Dialyseslangene ble skylt med deionisert vann inni og utenpå.
2. Slangene ble lukket med klype i den ene enden.
3. Slangene ble fylt 1/2-2/3 fulle med prøveløsning.
4. Noen dråper toluen ble tilsatt som konserveringsmiddel.
5. Luft ble presset ut, og slangene ble tettet med klemme på toppen.
6. Slangene ble lagt i en bøtte med deionisert vann. Det ble brukt magnetrører for å holde sirkulasjon i vannet og slangene ble holdt unna magneten ved hjelp av glass-staver/pipetter. Vannet ble skiftet regelmessig, med noen timers mellomrom, frem til det ikke lenger var salt å spore i dialysevannet.

5.1.10 Frysetørking

Prinsipp

Vann fjernes ved sublimasjon når prøven nedkjøles og settes under vakuum.

Utstyr

Glasskolber

Supelcorør

Metanolbad: Hetofrig, helo birkerød Danmark

Fryseskap: ITT Polar de Luxe

Frysetørker: CHRIST ALPHA 1-4

CHRIST ALPHA 1-4 LD Plus

5.1.11 Absorbansmålinger

Microplate Reader, Bio-Rad iMark

5.1.12 Syrevask av utstyr

Prinsipp

Glassutstyr som ble brukt til karbohydratanalyser ble vasket med syre for å forhindre eventuelle forurensninger fra cellulose eller andre karbohydratforurensninger. Syren spalter polysakkaridene og vask med deionisert vann fjerner restene.

Reagenser

Konsentrert saltsyre (HCl)

Utstyr

Varmeskap: Heraeus Instruments, Function line

Verneutstyr: Hansker og vernebriller

Prosedyre

1. Glassutstyret ble fylt og dekket med konsentrert saltsyre og satt til henstand i minst 30 minutter.
2. Utstyret ble vasket grundig med deionisert vann og tørket i varmeskap ved 80 °C til utstyret var tørt.

5.2 Isolering av polysakkarider

5.2.1 Ekstraksjon av plantemateriale

Prinsipp.

For å fjerne upolare og lavmolekylære forbindelser ble plantematerialet ekstrahert med ulike organiske løsemidler først. Deretter ble det ekstrahert med 50 % etanol før vannekstrakter på henholdsvis 50 °C grader og 100 °C ble opparbeidet. Disse ekstraktene var interessante for denne oppgaven hvor målet var å isolere polysakkarider. Det ble brukt et ASE apparatur for ekstraheringen. Plantematerialet ble fylt i celler som løsningsmiddelet ble pumpet inn i ved hjelp av gasstrykk og deretter ekstrahert ut ved hjelp av trykkøkning. Hele prosessen ble styrt automatisk av maskinen etter at ønskede innstillinger var programmert.

Reagenser

Diklormetan

Etylacetat

Etanol

Deionisert vann

DE (Diatomaceous Earth, Dionex ASE™ Prep DE)

Utstyr

Dionex Model ASE®350

Oppsamlingsflasker tilhørende apparatur

Ekstraksjonsceller tilhørende apparatur

Filter til cellene

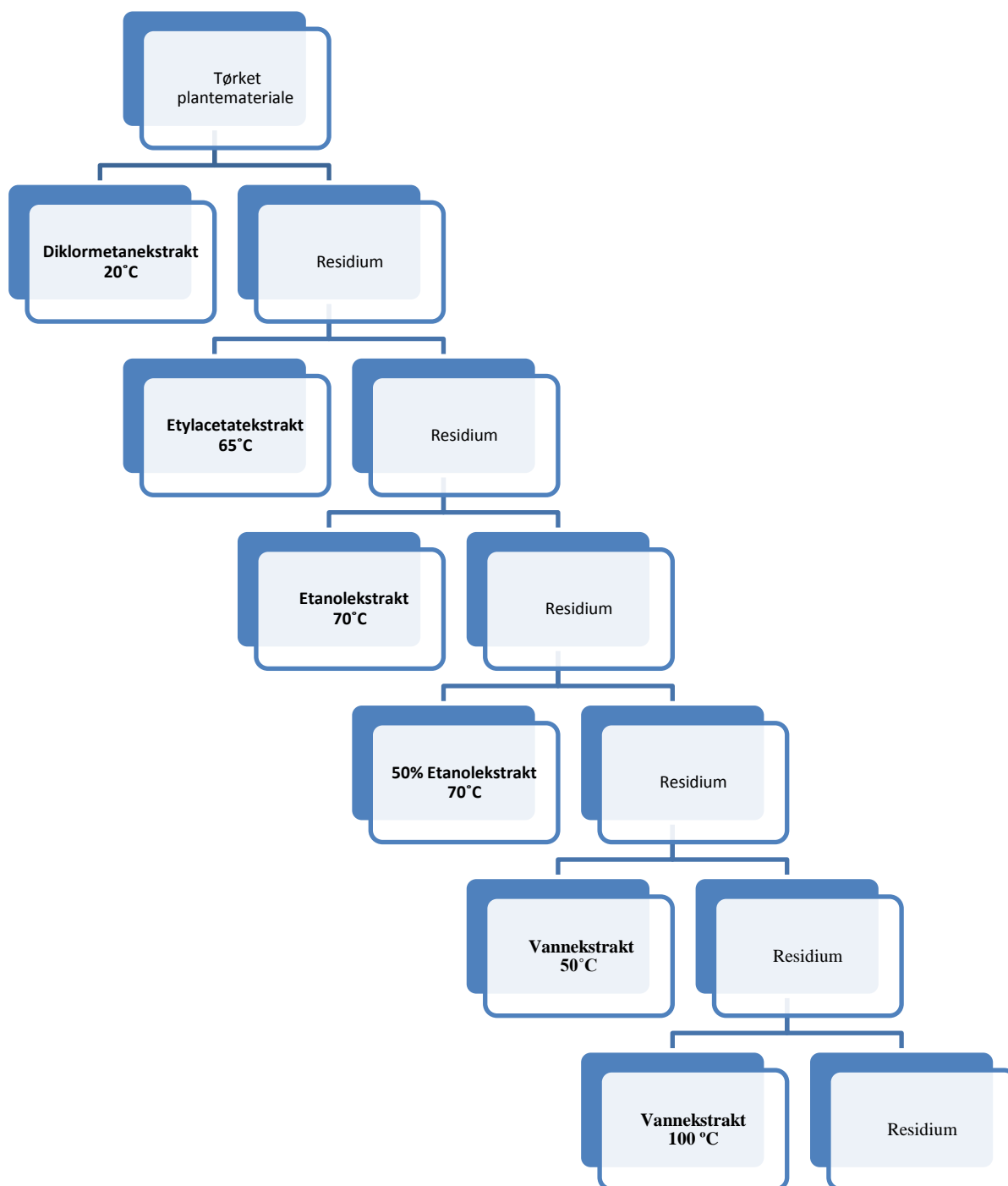
Betingelser

Trykk: ca. 0-1700 PSI

Mengde ekstrahert fra hver celle per løsningsmiddel: 150-300 ml

Prosedyre

1. Det tørre plantematerialet ble veid ut og blandet med en mengde DE tilsvarende ca 25 % av plantematerialet. DE er et porøst fyllstoff som brukes for at plantematerialet ikke skal pakkes for tett til at væsken kan ekstraheres gjennom.
2. Det ble lagt et filter i bunnen av hver celle og fylt litt DE over for å skape en porøs bunn. Deretter ble cellen fylt med blandingen av plantemateriale og DE. Litt DE ble strødd på toppen før cellen ble skrudd godt igjen.
3. Maskinen ble stilt inn på ønsket temperaturprogram (se flytskjema i figur 5.1), hvor mange celler som skulle ekstraheres og hvor mange ekstraksjoner som skulle gjennomføres.
4. Eluatet ble dampet inn. 50 % etanolekstraktet, 50 °C vannekstrakt og 100 °C vannekstrakt ble brukt videre i oppgaven og ble derfor frysetørket. De andre ekstraktene ble satt til oppbevaring i svært oppkonsentrert form.



Figur 5.1 Oversikt over ekstraksjonene som ble utført ved hjelp av ASE både for *E.senegalensis* rotbark og stammebark.

5.2.2 Ionebytterkromatografi

(Greibrokk et al. 1994)

Prinsipp:

En ionebytter er et polymert materiale eller silika som har en ioniserbar gruppe kovalent bundet til seg. Et motion med motsatt ladning er festet til den ioniske gruppen. Motionet kan byttes ut med ioner som finnes i prøver man setter på materialet. I dette tilfelle består prøvematerialet av polysakkarider. Polysakkarider har negative ladninger og de vil kunne adsorberes til anionbytter. Hvor godt de adsorberes, avhenger av ladning og ladningstetthet. Elueringen skjer med økende ionestyrke og slik vil man separere polysakkaridfragmentene fra hverandre, samtidig som man blir kvitt uinteressante molekyler.

ANX Sepharose 4 Fast Flow

Prinsipp

Det ble brukt en ANX Sepharose 4 Fast Flow kolonne. Den består av en svak anionebytter som er bygd opp av kryssbundet agarose. Den har god kjemisk og fysisk stabilitet. Den funksjonelle gruppen er dietylaminopropyl som har en positiv ladning og et kloridion bundet til seg som motion. Materialet har høy porøsitet. Dette gjør det særlig egnet til opprensning av proteiner med høymolekylær masse og til opprensning når ulik selektivitet er nødvendig.

(Ge Healthcare 2013)

Etter at prøven er satt på kolonnen elueres de nøytrale polysakkaridene ut med deionisert vann gjennom kolonnen. De nøytrale polysakkaridene har ingen affinitet til kolonnen, mens de sure polysakkaridene vil ha en negativ ladning og bindes reversibelt til de positivt ladede dietylaminopropyl-gruppene og dermed bytte ut kloridioner. Man eluerer ut de sure polysakkaridene ved å bruke en saltgradient. Når man øker ionestyrken i elueringsvæsken vil det svekke interaksjonen mellom kolonnen og de sure polysakkaridene, slik får man separert polysakkarider avhengig av surhetsgrad, det vil si mengde sure grupper.

Reagenser:

2 M NaCl

1 M NaOH

1 M natriumacetat med pH 3

0,05 % Natriumazid løsning

EDTA, Natriumsaltet (Ehtylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate 99+ %)

Betingelser:

Elueringsvæsker og væsker til vask ble degasset med H₂-gass før de ble applisert på kolonne.

Utstyr:

Kolonne 1: GE Healthcare Bio-Sciences AS

Radius: 2,5 cm

Høyde: 15,5 cm

Kolonnevolum: ca 300 ml

Kolonne 2: GE Healthcare Bio-Sciences AS

Radius: 2,5 cm

Høyde: 13,5 cm

Kolonnevolum: ca 265 ml

Kolonnemateriale: ANX Sepharose 4 Fast Flow

Pumpe: Perimax Spetec

Fraksjonssamler: Pharmacia LKB SuperFrac (med rack B)

Magnetrorer: Kika laborateknick RCT basic

Sentrifuge: MSE

Heraeus Multifuge 4 KR

Oppsamlingsrør: Sentrifugerør, rund bunn, 15 ml, Heger AS

Trombotestrør, rund bunn, 7 ml, Heger AS

Filter: Pall Corporation Acrodisc 25 mm Syringe Filters, 5 µm, Versapor®
Membrane

pH-papir: Fisher brand pH-Fix 0-14

Sprøyte, 10 ml

BD Falcon, 15 ml High- Clarity Polypropylene Conical tube (Til sentrifugering)

Prosedyre:

Prøvepåsetting og eluering

1. Kolonnen ble vasket med to kolonnevolum deionisert vann før bruk.
2. Ekstraktene ble løst i deionisert vann og varmet opp.
3. Prøvene ble så sentrifugert og supernatanten ble brukt videre. Det ble tatt vare på bunnfallet for de første prøvene og testet med GC-analyse. FIK-S-100 ble forsøkt løst ved hjelp av EDTA, natriumsaltet. Chelex ble brukt på flere av prøvene for å bedre løseligheten. (Beskrevet i seksjon 5.2.3)
4. For de prøvene det var mulig ble løsningen filtrert med 0,5 µm filter.
5. Prøven (100-200 ml) ble deretter satt på kolonnen med flowhastighet 2 ml/min.
6. De nøytrale fraksjonene ble eluert ut med 2 kolonnevolum deionisert vann. Flowhastighet 2 ml/ min. Fraksjonene fra stammebarken ble så dampet inn, dialysert og frysetørket. Fraksjonene fra rotbarken ble dampet inn og fryst ned.
7. De sure polysakkaridene ble eluert ut med NaCl-gradient (0-1,5 M) i 15 timer.(Se figur 5.2)

Flowhastighet fra saltløsning til blandekar: 1 ml/min

Flowhastighet fra blandekar til kolonnen: 2 ml/min

Fraksjonene ble samlet opp i 180 TT-rør på fraksjonssamler

Fraksjonsstørrelse, 10 ml

Saltgradienten på 0-1,5 M ble regnet ut ved hjelp av følgende ligning:

$$C/T = (C_0 * R) / V_0$$

C= konsentrasjon NaCl ved tiden T

T= hvor lang tid forsøket skal ta

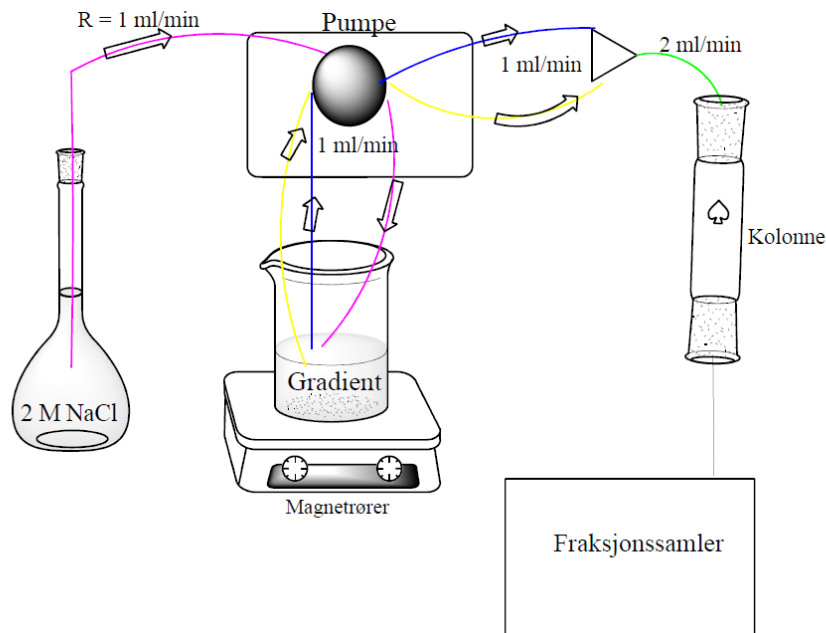
C₀= Startkonsentrasjonen av NaCl i saltløsningen

R= Flowhastigheten fra saltløsningen til blandekar

V₀ =Menge vann i blandekaret ved tiden T=0

Fenol-Svovelsyretest (beskrevet i seksjon 5.3.1) ble utført på fraksjonene for å måle karbohydratinnholdet. Rør som viste innhold av karbohydrat ble slått sammen og dannet en fraksjon. Fraksjonene ble dampet inn, dialysert og frysetørket.

- Til slutt ble kolonnen eluert med 2 M NaCl i ca. 2 timer. For ekstraktene fra stammebarken ble dette eluatet dampet inn, dialysert og frysetørket. Dette ble ikke gjort for eluatet etter ekstraktene fra rotbarken.



Figur 5.2 Figuren viser oppsettet for laging av saltgradienten for elueringen gjennom ANX Sepharose 4 Fast Flow. (Hussain 2010)

Vask og regenerering av kolonne:

1. Hvis kolonnen ble brukt til ekstrakt fra samme plante ble kolonnen vasket med 2 M NaCl og deretter med deionisert vann for å fjerne Cl-ioner mellom hver applisering.
2. Hvis kolonnen var sterkt farget på toppen, ble det øverste laget fjernet.
3. Kolonnen ble snudd 180°.
4. 1,5 kolonnevolum 1 M NaOH ble eluert.
5. 2 kolonnevolum med 2 M NaCl ble eluert for å regenerere kolonnen med klorid-ioner.
6. Kolonnen ble så vasket med deionisert vann helt til eluatet ikke gav utslag på saltmeteret. (Ca. 5 kolonnevolum) Da vil alle overflødige klorid-ioner være fjernet fra kolonnematerialet..

Hvis kolonnen var veldig skitten ble det i tillegg vasket med natriumacetat. Prosedyren var da som følger:

1. Hvis kolonnen var sterkt farget på toppen, ble dette laget fjernet.
2. Kolonnen ble snudd 180°
3. 1 kolonnevolum 1 M natriumacetat pH 3 ble eluert.
4. 1,5 kolonnevolum 1 M NaOH ble eluert.
5. 1,5 kolonnevolum natriumacetat pH 3 ble eluert.
6. 2 kolonnevolum 2 M NaCl ble eluert.
7. Kolonnen ble så vasket med deionisert vann helt til eluatet ikke gav utslag på saltmeteret. (ca. 5 kolonnevolum) Da vil alle overflødige klorid-ioner være fjernet.

5.2.3 Chelexfiltrering

(Bio-Rad Laboratories 2013)

Prinsipp

Chelex 100 er spesial-resin som binder flerverdige metaller. Det er en ionebytter som består av styrene divinylbenzen kopolymerer som inneholder koblete iminodiacetate ioner. Disse virker som chelaterende grupper som binder polyvalent med metallioner. I dette tilfelle ble chelex brukt for å fjerne kalsium fra løsningen for å løse prøvematerialet bedre og gjøre løsningen mindre viskøs.

Reagenser

Chelex 100, 100-200 mesh sodium form

Utstyr

Vakuumpumpe

Sintertrakt

Erlenmeyerkolbe med uttak til vakuumpumpe

Glass-stav til røring

Oppsett for kolonne

Pumpe: Perimax Spetec

Kolonne: Pharmacia Fine Chemicals

Radius: 0,8 cm

Høyde: 25 cm

Kolonnevolum: ca. 50 ml

Prosedyre

1. Chelexen ble først vasket godt med deionisert vann. Vannet ble så filtrert av chelexen.
2. Løsningen av prøve og deionisert vann ble blandet godt med den vaskede chelexen..

3. Prøveløsningen ble filtrert fra chelex på sintertrakt under vakuumsug. Løsningen ble filtrert gjennom chelexmaterialet flere ganger.
4. Chelexmaterialet ble vasket etter prosedyre beskrevet under.

Vask og regenerering av Chelex

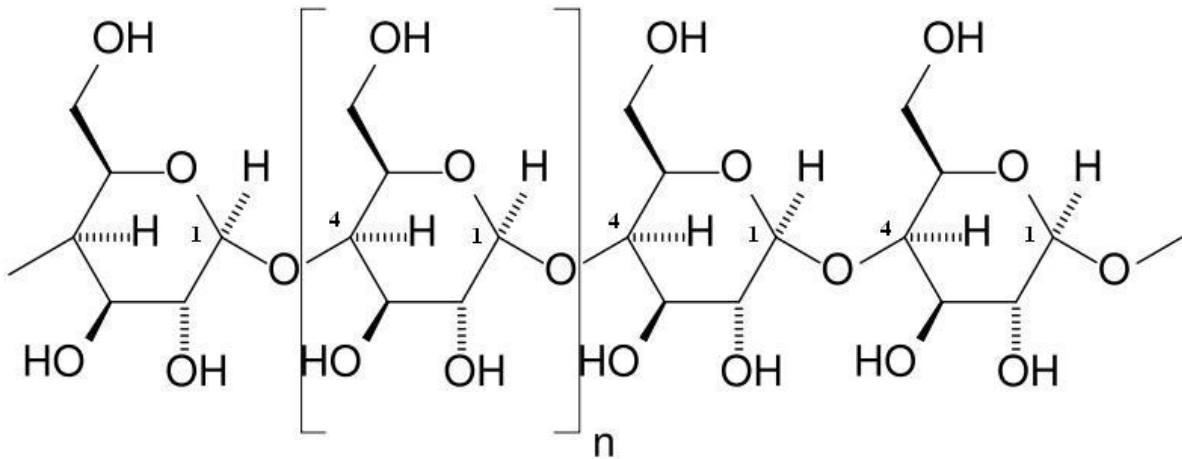
1. Det ble brukt en Pharmacia Fine Chemicals kolonne for å vaske Chelexmaterialet. 2 kolonnevolum 1 M HCl ble pumpet gjennom kolonnen. Syren omdanner resinene til hydrogenform.
2. 5 kolonnevolum deionisert vann ble brukt til å skylle bort restene av syre og metaller.
3. 2 kolonnevolumer med 1 M NaOH ble deretter eluert. Hydroksidet av ønsket kation får chelexen tilbake til ønsket ionisk form.
4. 5 kolonnevolum deionisert vann ble til slutt eluert gjennom kolonnen for å skylle bort restene av NaOH.

5.2.4 α -Amylase

(Det matematisk- naturfaglige fakultet, UiO 2011)

Prinsipp

α -Amylase er et enzym som hydrolyserer alfa-bindinger i store alfa-bundede polysakkarider, som stivelse og glykogen. Det bryter alfa-1,4 og alfa-1,6 bindinger slik at det store polysakkaridet brytes ned i mindre enheter som dextriner, maltose og glukose. Se figur 5.3. Glukose kan detekteres ved hjelp av GC og høyt innhold i et planteekstrakt kan tyde på mye stivelse. Stivelse kan også detekteres ved hjelp av jod-jod-kalium testen (se seksjon 5.2.5). Stivelse er av liten interesse med tanke på biologisk aktivitet og kan interferere med resultatene.



Figur 5.3 Figuren viser en kjede av amylose som er bygd opp av glukosemolekyler som er bundet til hverandre gjennom et oksygen fra C-1 i den ene ringen til C-4 i den andre ringen. Denne bindingen bryter α -amylase. (Marshall Science 2013)

Reagenser

α -amylase

Utstyr

Kokeplate: Kika laborateknick RCT basic

Sentrifuge: Heraeus Multifuge 4 KR

Vekt: Sartorius Extend

Prosedyre

1. Mengde α -amylase som var nødvendig ble beregnet ut ifra produktinformasjon om at 1 enhet α -amylase vil frigjøre 1 mg maltose fra stivelse etter 3 minutter ved en pH på 6,9 ved 20 °C. Det var 1,5 enheter α -amylase per mg stoff. Det ble beregnet overskuddsmengde.
2. α -amylase ble tilsatt prøven og satt et par timer i varmeovn ved 37 °C. Løsningen ble så kokt opp, avkjølt og sentrifugert. Supernatanten ble brukt videre.

5.2.5 Jod-jod-kalium testen

Prinsipp

Jod-jod-kalium er en oppløsning som brukes til å påvise stivelse. Oppløsningen danner sammen med amylase i stivelse en mørkeblå farge. Hvis prøven ikke inneholder stivelse vil løsningen være gul.

Reagenser

Jod-jod-kalium (3,3 % jod og 6,7 % Kaliumjodid løst i deionisert vann)

Utstyr

Porselensplate med flere små brønner

Rørespatel

Prosedyre

1. En liten mengde jod-jod-kalium ble dryppet i hver brønn og blandet med en liten mengde prøve.
2. Eventuell fargeendring ble notert.

5.2.5 Gelfiltrering

(Store norske leksikon 2013)(Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004)

Prinsipp

Gelfiltrering er en kromatografisk metode for å separere stoffer etter molekylvektstørrelse. Prøvene separeres på kolonnen for å estimere molekylvektsdistribusjonen til karbohydratstrukturene i prøven. Stasjonærfasen er et finkornet porøst pakkematerial med definert porestørrelse. De store molekylene vil bevege seg i mellomrommet mellom partiklene og ha samme hastighet som mobilfasen. Molekyler i denne størrelsesordenen kan ikke separeres fra hverandre. Det kan heller ikke stoffer som er så små at alle går inn i porene. Partikkelstørrelsen bestemmer hvilke molekyler som vil diffunderer ut og inn av porene og derved forsinkes. Resultatet er at molekyler innenfor et bestemt molekylvektområde

separeres. De store molekylene kommer ut før de små. En forhåndsprogrammert standardkurve for dekstraner med kjent molekylvekt ble brukt til å beregne en regresjonslinje for log Mw. Den ble benyttet til å regne ut molekylvektsfordelingen for prøvene

HiLoad™ Superdex™ 16/600 200 prep grade (GE Healthcare)

Kolonnen som ble benyttet var HiLoad Superdex 16/600 200 prep grade fra GE Healthcare. Matriksen består av dekstran og kryssbundet agarose. Gjennomsnittlig partikkelstørrelse er 34 µm og kolonnen egner seg for separasjon av molekyler i molekylvektsområdet fra 10 000 til 600 000 Mw. (GE Healthcare Bio-Sciences 2011)

Reagenser

10 mM NaCl-løsning

20 % etanol

0,5 M NaOH-løsning

Utsyr

Kolonnevolum: Ca. 120 ml

Matriks: HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare)

Äkta system: FPLC, Pharmacia Äkta, Amersham Pharmacia Biotech

Dataprogram: UNICORN Version 4,0

Detektor: UV, RID-10A, Shimadzu

Skriver: hpdeskjet 980 cxi

Pumpe: P-920

Monitor: UPC-900

Injektor: Valve Inv-900

Fraksjonssamler: Frac-900

Oppsamlingsrør: Trombotestrør, rund bunn, 7 ml, Heger AS

Filter: Millex ®GC Filter Unit 0,22 µm, Millipore Express® PES Membrane

Plastsprøyte: BD, 2 ml

Begerglass

Målekolbe, 1 L

Betingelser

Elueringshastighet: 0,5 ml/min

Fraksjonsstørrelse: 2 ml per oppsamlingsrør

Prøvemengde: 9-40 mg løst i 2 ml eluent, slik at konsentrasjonen ble fra 4,5-20 mg/ml

Elueringsmiddel: 10 mM NaCl-løsning

Injisert volum: 2 ml

Prosedyre:

Applisering og eluering

1. Oppveid mengde stoff ble løst i 2 ml 10 mM NaCl-løsning slik at konsentrasjonene ble 4,5-20 mg/ml.
2. Løsningen ble filtrert gjennom et sprøytefilter på 0,22 µm.
3. Løsningen ble trukket opp i injeksjonssprøyten, eventuell luft ble fjernet og løsningen ble injisert og applisert på kolonnen ved hjelp av loop-prinsippet.
4. Selve kjøringen ble styrt av PC med dataprogrammet UNICORN.
5. Elueringsprofilen ble bestemt ved hjelp av fenolsvovelsyretesten (se metode 5.3.1)

Vask av kolonnen og konservering

A. Ved oppstart

1. Det ble vasket med deionisert og degasset vann, 2 kolonnevolumer, med en flowhastighet på 0,5 ml/min.

B. Vasking og konservering av kolonnen

1. Kolonnen ble snudd 180°C.
2. Det ble vasket med ca. 2 kolonnevolum 0,5 M NaOH-løsning, flowhastighet: 0,5 ml/min.
3. Kolonnen ble konserverert med 1,5 kolonnevolum 0,05 % natriumazidløsning etter bruk.

5.3 Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold

5.3.1 Fenol-svovelsyretesten

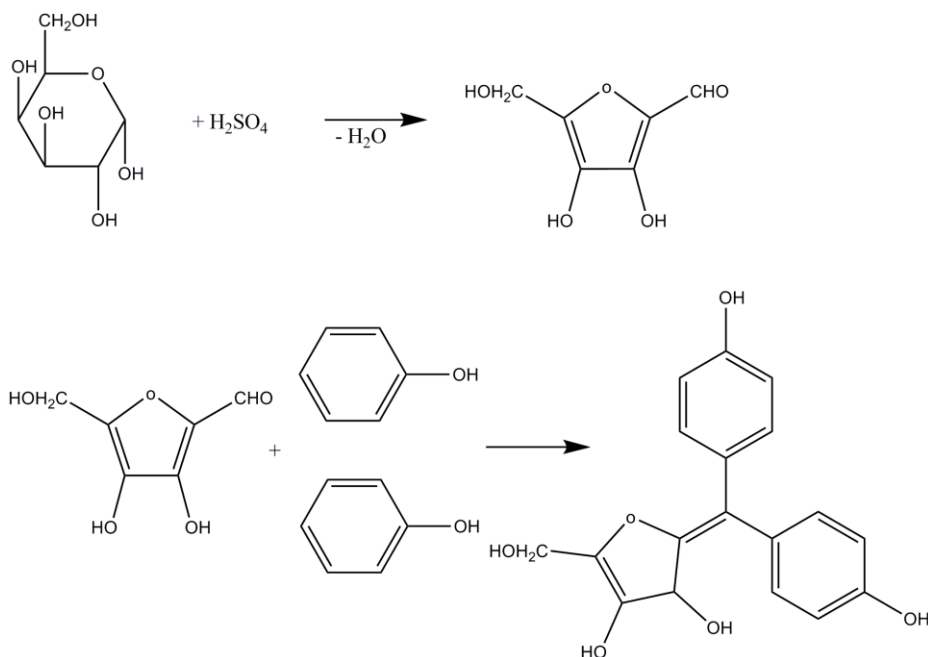
(Dubois et al 1956)(Sturgeon 1990)

Prinsipp

Fenol-svovelsyretesten benyttes for å bestemme karbohydratinnhold i en løsning. Prinsippet for denne testen er at monosakkarider, oligosakkarider og polysakkarider spaltes på grunn av varmeutveksling. Disse spaltes til furfuraldehyder. Karbohydrater danner sammen med fenol et kompleks som gjør løsningen gul. Denne løsningen vil absorbere lys ved 490 nm.

Karbohydratinnholdet kan slik måles spektrofotometrisk. Det kan kvantitativt detektere selv små mengder karbohydrater. Testen er enkel, reproducerbar og sensitiv, samt at fargen er stabil.

Testen kan benyttes for å bestemme hvilke fraksjoner som inneholder karbohydrater etter separasjon på gel- og ionebytterkolonne. Gulfargingen og absorbansmålingen brukes til å bestemme hvilke fraksjoner som eventuelt kan slås sammen.



Figur 5.4 Reaksjon mellom monosakkarid og svovelsyre til et anhydrosukker, som deretter kondenserer med to fenolmolekyler til et gul farget kompleks (Inngjerdingen 2000)

Reagenser

4 % fenol i vann

Konsentrert svovelsyre

Utstyr

Finnpipette 100 μl

Glassrør

Whirlmixer Fisons, Scientific Equipment

Mikroplater med flat og rund bunn

iMark Microplate Reader, BIO-RAD

Briller, hansker, labfrakk og beskyttelsesforkle

Prosedyre

1. 100 μ l prøveløsning fra hver fraksjon ble overført til hvert sitt glassrør og tilsatt 200 μ l 4 % fenol og 1 ml konsentrert svovelsyre.
2. Blandingen ble mikset kort på whirlmixer.
3. Blandingen fikk stå ved romtemperatur i 30 minutter.
4. Blandingene ble mikset kort på whirlmixer, og 100 μ l fra hvert rør ble overført til brønner på en mikroplate.
5. Absorbansen ble målt spektrofotometrisk ved 490 nm, og plottet mot elueringsvolum/rørnummer.

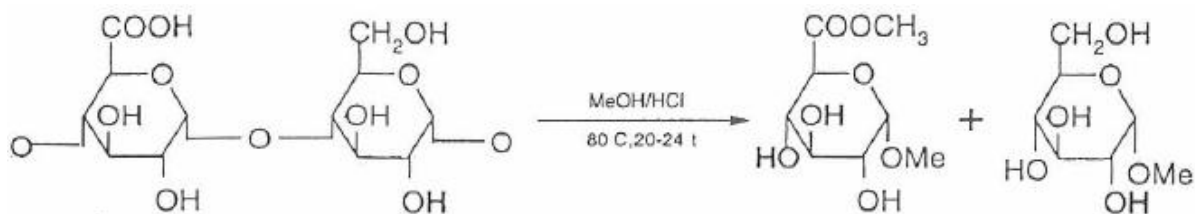
5.3.2 Monosakkaridbestemmelse

Metanolyse

(Chambers og Clamp 1971)(Sturgeon 1990)(UiO 2013)

Prinsipp

Det første man ønsker å gjøre i metanolyseprosessen er å kløye polysakkaridene til enkelte monosakkarider. Det er viktig at metanolysen foregår i et vannfritt miljø for å unngå hydrolyse av metylglykosidene som er dannet. Metanolyse fører til at glykosidbindingen mellom monomere brytes og det dannes metylglykosider på OH-gruppen ved C-1 og syregruppen på uronsyrer i posisjon C-6 forestres til en metylester. Se figur 5.5.



Figur 5.5 Metanolyse av et surt polysakkarid til metylester og metylglykosid (Inngjerdingen 2000)

Reagenser

3 M HCl i metanol

1 µg/µl mannitol i 1 M HCl i metanol (intern standard)

Vannfri metanol

Utstyr

Syrevaskede supelcorør, med teflonbelagt skrukork

Parafilm

P₂O₅-evakuert vakuumeksikator

SMI-pipette (100 µl)

SMI Cappillaries, blå, syrevaskede

Pasteur pipette (1ml) med peleus ballong

Varmeskap: Heraeus Instruments, Function Line)

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

Oppsett til tørking med N₂-gass: Thermo Scientific, Reacti-Vap III™

Prosedyre

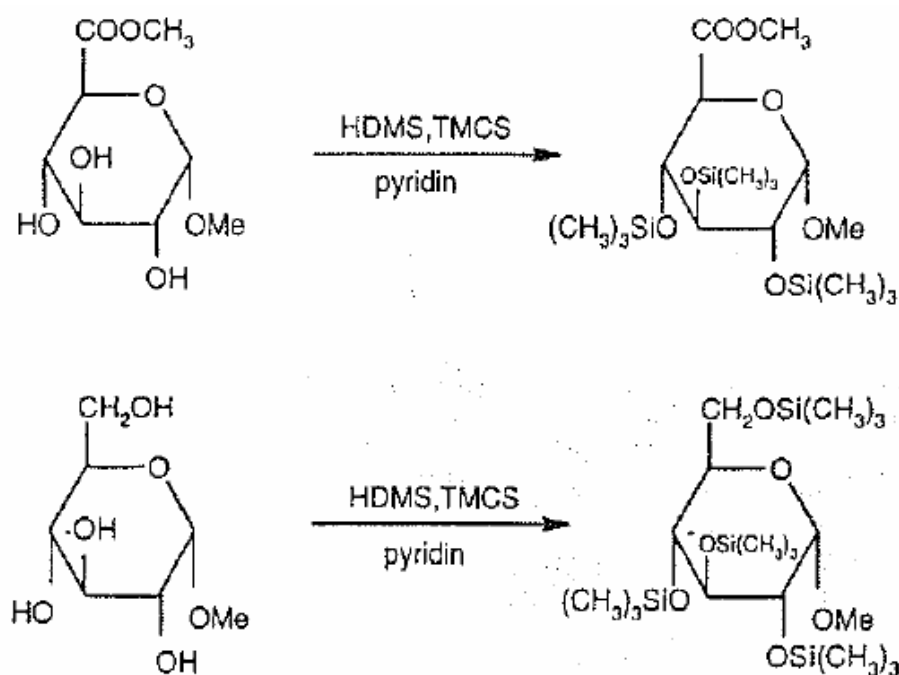
1. 1 mg frysetørket plantemateriale ble veid ut i syrevaskede supelcorør
2. Supelcorøret ble dekket med perforert parafilm og prøvematerialet ble tørket under vakuum i P₂O₅ vakuumeksikator i ca. 20 timer.
3. Prøven ble tilsatt 1 ml 3 M HCl i metanol og 100 µl mannitoløsning før den ble satt i varmeskap ved 80 °C i 20-24 timer. Etter ca. 15 minutter ble korkene skrudd godt til for å unngå fordampning.
4. Prøvene ble dampet inn til tørrhet med N₂-gass.
5. 200 µl vannfri metanol ble tilsatt og prøvene ble igjen tørket med N₂-gass til tørrhet.
6. Trinn 5 ble gjentatt 2 ganger til.
7. Prøven ble dekket med perforert parafilm og satt til tørking i P₂O₅-vakuumeksikator i minst 1 time før TMS-derivatisering.

TMS-derivatisering

(Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004a)

Prinsipp

Gasskromatografi er en separasjonsmetode for stoffer i gassform. Derfor er man avhengig av at forbindelsene man skal separere er flyktige. Monosakkarider er polare og derfor lite flyktige. Funksjonelle grupper som hydroksylgrupper, fenolgrupper, aminogrupeer og karboksylsyregrupper nedsetter stoffenes flyktighet og forårsaker adsorpsjon til overflater slik at stoffene elueres ut som brede topper med haledannelse. For å gjøre monosakkarider egnet for gasskromatografi derivatiserer man dem. Ved derivatisering omdannes polare grupper til upolare grupper. De frie hydroksylgruppene reagerer med trimetylklorosilan og heksametyldisilazan og danner flyktige og termisk stabile pertrimetylsilyleter (TMS-derivater). Se figur 5.6.



Figur 5.6 Reaksjon mellom metylglykosid med og uten metylestergruppe med TMS-reagens (Inngjerdingen 2000)

Reagenser

TMS-reagens: Trimetylklorosilan (TMCS) 1 ml

Heksametyldisilazan 2 ml

Pyridin (vannfritt) 5 ml

Utstyr

SMI-pipette (200 µl)

Minishaker MS2, kika

Prosedyre

1. Den metanolyserte prøven ble tilsatt 100 µl TMS-reagens og blandet godt.
2. Prøvene ble satt til henstand i minst 30 minutter i romtemperatur før gasskromatografisk analyse.

Gasskromatografi (GC)

(Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004)(Ciucanu og Kerek 1984)(UiO 2012)

Prinsipp

GC er en separasjonsmetode som separerer stoffer på bakgrunn av kokepunkt og interaksjon med stasjonærfase. Metoden egner seg derfor for flyktige og termisk stabile stoffer.

Mobilfasen, som kalles bæregass, er inert både i forhold til prøven og stasjonærfase.

Stasjonærfase er ofte en tynn film av væske på kolonnen som ikke er flyktig.

Prøven som skal analyseres blir injisert ved hjelp av en sprøyte og føres inn i en oppvarmet injektor hvor den fordamper. Bæregassen bringer den i gassform gjennom kolonnen til detektoren. Hvor lang tid stoffene bruker fra injeksjon til de når detektor kalles retensjonstid og bestemmes av deres flyktighet, løselighet i stasjonærfase og temperatur.

Det finnes mange typer detektorer for GC-analyse. I dette tilfelle ble flammeionisasjonsdetektor (FID) brukt. Den regnes som den mest vanlige GC-detektoren. En flamme av ren hydrogen og oksygen forbrenner organisk materiale i prøven. Det dannes da ioner som detekteres som elektrisk strøm. Mengden av ladede partikler som produseres, og dermed også signalstyrken, er proporsjonal med mengde stoff som forbrennes.

Monosakkarider kan foreligge på pyranose- og furanoseform, og hver av disse kan igjen ha α - eller β -konfigurasjon. Strukturen kan i tillegg til å være i ringstruktur også opptre i åpen form. Det innstiller seg en likevekt mellom disse 5 ulike formene. Hver form vil interagere forskjellig med stasjonærfaser og i kromatogrammet vil det dermed dannes et karakteristisk mønster av topper som benyttes til identifikasjon av monosakkarider. Det kan også gjøres kvantitative bestemmelser ved hjelp av toppareal fra kromatogrammet, forhånds lagde standardkurver og internstandarder som korrigerer for tap under prøveopparbeidelse.

Reagenser

Pyridin

Utstyr

Gasskromatografi apparatur: Focus GC, Thermo Scientific:

Detektor: AS 800, Fisons Instruments

Kolonne: Restek, Rxi®-5 ms, 30 m, 0,32 med mer ID, 0,25 μ m Filter

Bæregass: Helium

Betingelser for GC-systemet

Flow mode: Konstant trykk

Injection mode: Splitt

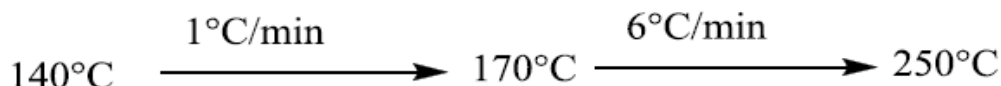
Splitt ratio: 1:10

Injiseringvolum: 1,0 μ l

Injektortemperatur: 260 °C

Detektortemperatur: 310 °C

Temperaturprogram.



Prosedyre

1. Det ble åpnet for gass-strømmene, og GC og integrator ble programmert.
2. Sprøyten ble vasket med heksan.
3. 1,0 μl av den TMS-derivatiserte prøven ble injisert.
4. Sprøyten ble vasket godt med heksan etter hver prøveinjeksjon.
5. Kromatogrammet ble tilpasset ved å justere innstillingene på integratoren.
6. Hele kjøringen av en prøve tok ca. 50 minutter. Gassen til FID ble skrudd av etter siste kjøring.

5.4 Strukturoppklaring

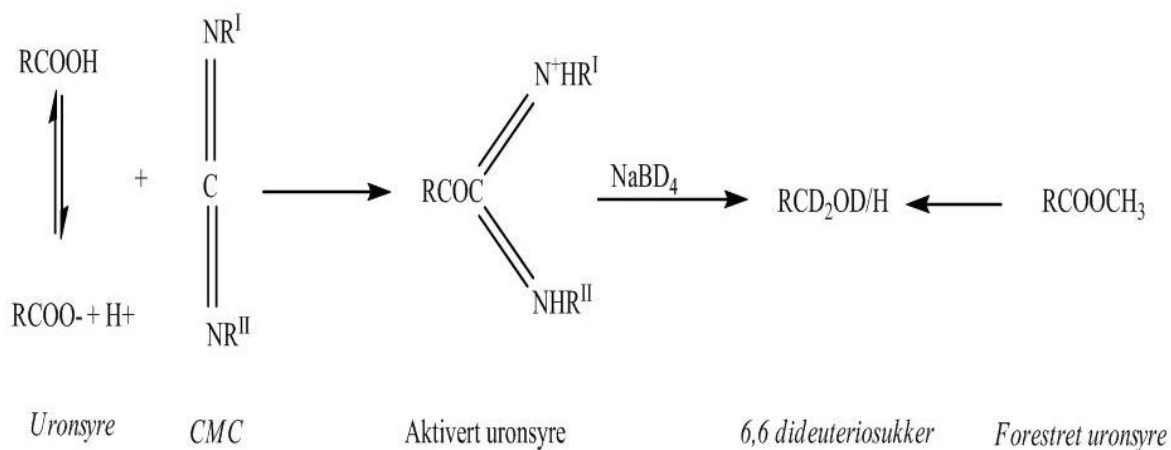
5.4.1 Metylering

Karboksylysrereduksjon

(UiO 2013)

Prinsipp

Karboksylysyregruppene i polysakkaridene må reduseres med NaBD_4 før metylering kan utføres. Uronsyreer som er forestret vil reduseres direkte til alkoholer, men frie uronsyreer må aktiveres først med carbodiimide. I begge tilfellene er produktet som dannes 6,6-dideuteriosukker. Disse sukkerne vil ved GC-MS analyse ha fragmenter med masse $M+2$. Slik kan de skilles fra nøytrale sukke.



Figur 5.7 Aktivering og reduksjon av karboksylsyregruppe i uronsyre, og reduksjon av forestret uronsyre (Inngjerdingen 2000)

Reagenser

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

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

2 M TRIZMA (tris[hydroksymetyl]aminometan)

NaBD₄ (Natriumbordeuterid)

0,05 M NaOH

Iseddik

Utstyr

PD 10 kolonne, GE healthcare

Syrevaskede metyleringsrør med skrukork

Minishaker MS2, Kika®

Is

Pipetter (100 µl, 200 µl, 400 µl og 1 ml)

Speed Vacuum Dryer: Thermo Electron Corporation SPD12IP
Thermo Electron Corporation RVT4104, Refrigerated Vapor Trap

Prosedyre

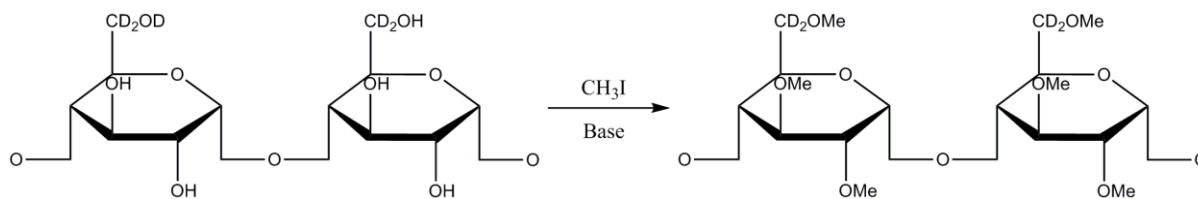
1. 1 mg prøve (eller mindre hvis lavt utbytte) ble løst i 1 ml deionisert deionisert vann. Det ble tilsatt 200 µl 0,2 M MES og 400 µl nylaget 500 mg/ml carbodiimide i deionisert vann.
2. Løsningen ble mikset godt og satt til inkubering ved romtemperatur i 3 timer.
3. 1 ml 2 M TRIZMA ble tilsatt og prøven ble avkjølt på is.
4. 1 ml nylaget 70 mg/ml NaBD₄ i 0,05 M NaOH ble tilsatt prøven. Løsningen ble inkubert over natten ved 4 °C.
5. Overskudd av reduktant NaBD₄ ble ødelagt ved langsom tilsetning av iseddik (5 x 100 µl).
6. Løsningen ble deretter applisert på en PD 10 kolonne og eluert ut med 3,5 ml deionisert vann for å fjerne salter fra løsningen.
7. Prøveløsningen ble frysetørket ved hjelp av Speed Vacuum Dryer.

Metylering

(Ciucanu og Kerek 1984)(UiO 2013)

Prinsipp

Et sterkt basisk miljø ioniserer (deprotonerer) hydroksylgruppene som ble dannet etter karboksylsyre-reduksjonen. Disse gruppene metyleres deretter ved tilsetning av metyljodid. Se figur 5.8.



Figur 5.8 Metylering av frie hydroksylsyregrupper (Inngjerdingen 2000)

Reagenser

MeOH (BHD Aristar)

DMSO (Dimetylsulfoksid)

Pellets av NaOH

CH₃I (Metyljodid)

Na-thiosulfat (Natriumthiosulfat-5-hydrat)

DCM (Diklormetan)

Deionisert vann

Utstyr

Verneutstyr: Hansker og briller

Ristemaskin IKA-Vibrax-VXR

Gallenkamp Flask Shaker

Sentrifuge: Multifuge 4 KR Heraeus

N₂-gassoppsett med varmeenhet: Pierce, Reacti Therm III™, Heating Module

Thermo Scientific, Reacti-Vap III™

Minishaker MS2, Kika

SMI-pipette (100 µl) med kapillærer

Agatmorter og pistill

Målesylinder

Pasteur pipette

Prosedyre

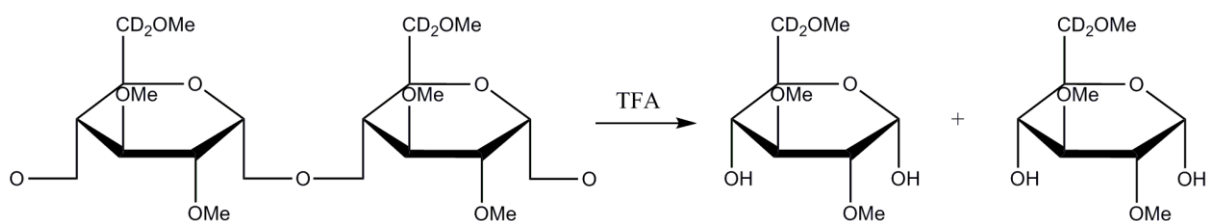
1. Prøven fra karboksylsyre-reduksjonen ble tilsatt 100 μ l MeOH og tørket til tørrhet ved hjelp av Speed Vacuum Dryer eller N_2 -gass for å dehydrere prøven.
2. 500 μ l DMSO ble tilsatt prøven og flushet med nitrogen for å fjerne luft i røret.
3. En suspensjon av tørre NaOH pellets og DMSO ble laget med en konsentrasjon på ca. 120 mg/ml. Det ble regnet 2 pellets per ml DMSO. Agatmørtor og pistill ble brukt. (NB! Hansker og briller)
4. 500 μ l av suspensjonen ble tilsatt prøvene ved hjelp av SMI-pipette.
5. Prøven ble blåst med nitrogen, kork ble satt på og prøven satt på ristemaskin i 20 minutter.
6. 100 μ l CH_3I ble tilsatt i avtrekk og ristet i 10 minutter.
7. Punkt 6 ble gjentatt.
8. 200 μ l CH_3I ble tilsatt i avtrekk og ristet på maskin i 20 minutter.
9. En løsning med 100 mg/ml natriumtiosulfat i deionisert vann ble laget. 10 ml av denne løsningen ble tilsatt prøven sammen med 2 ml DCM. Kork ble satt på og løsningen ble blandet godt på whirlmixer før den ble sentrifugert ved 1000 rpm i 3 minutter for å separere fasene.
10. Vannfasen ble fjernet og kastet. Den nedre DCM-fasen ble vasket med 4 x 5 ml deionisert vann, ristet og sentrifugert. På slutten ble den upolare fasen overført til et nytt metyleringsrør for å unngå å få med noe av vannfasen.
11. DCM-fasen ble tørket under N_2 -gass.

Hydrolyse

(Kim og Carpita 1992)

Prinsipp

Ved hydrolyse i surt miljø spaltes de metylerte polysakkaridene til monosakkarider.



Figur 5.9 Hydrolyse av metylerte polysakkarider med TFA (Inngjerdingen 2000)

Reagenser

2,5 M Trifluoreddiksyre (TFA)

Utstyr

Varmeskap: Heraeus Instruments, Function Line

N₂-gassoppsett med varmeenhet: Pierce, Reacti Therm III™, Heating Module

Thermo Scientific, Reacti-Vap III™

SMI-pipette (100µl) med kapillærer

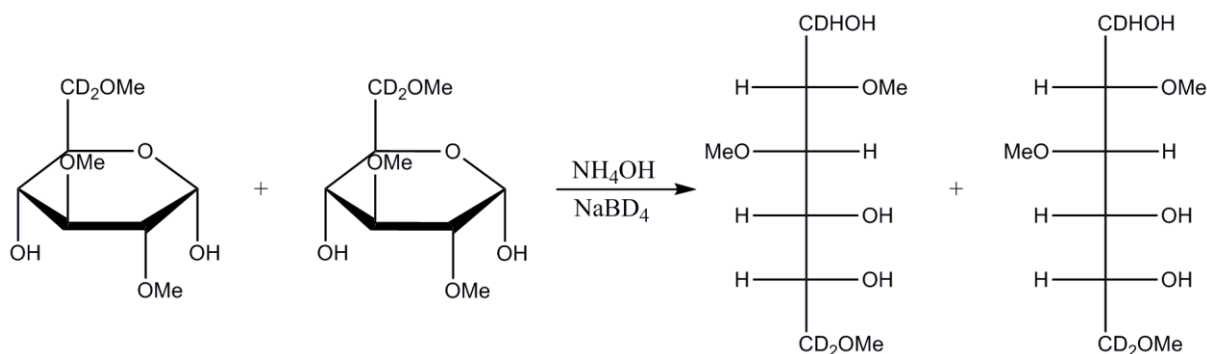
Prosedyre

1. 500 µl 2,5 M TFA ble tilsatt metylert prøve og gjennomblåst med N₂-gass.
2. Prøven ble hydrolysert i 2 timer ved 102°C i varmeskap. Etter ca. 15 minutter ble korken skrudd ytterligere til.
3. Prøven ble avkjølt og evaporert til tørrhet ved hjelp av N₂-gass.

Reduksjon

Prinsipp

Ringstrukturen i monosakkaridene brytes ved at sykliske hemiacetaler ved C-1 reduseres til alditol. (Figur 5.10)



Figur 5.10 Reduksjon av hydroksylgrupper ved C1. (Inngjerdingen 2000)

Reagenser

2 M NH₄OH

NaBD₄ (Natriumbordeuterid)

Iseddik

5 % eddiksyre i metanol

Vannfri metanol

Utstyr

Ultralydbad: VWR, Ultrasonic Cleaner

Varmeskap: Heraeus Instruments, Function line

N₂-gassoppsett med varmeeinheit: Pierce, Reacti Therm III™, Heating Module

Thermo Scientific, Reacti-Vap III™

SMI-pipette (50 µl og 500 µl) med kapillærer

Finnpipetter med spisser

Prosedyre

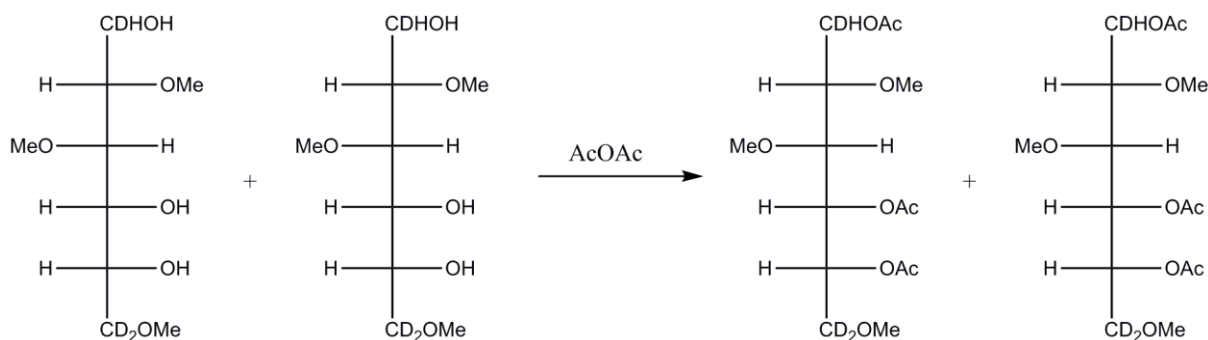
1. Prøve fra hydrolysen ble løst i 500 μ l 2 M NH_4OH og tilsatt 500 μ l 1 M nylaget NaBD_4 i 2 M NH_4OH .
2. Løsningen ble sonikert i 1 minutt og inkubert ved 60 $^\circ\text{C}$ i 1 time.
3. Overskudd reduktant ble ødelagt med tilsetning av 3 x 50 μ l iseddik.
4. Prøvene ble tørket ved hjelp av Speed Vacuum Dryer.
5. 2,5 ml 5 % eddiksyre i metanol ble tilsatt og tørket under N_2 -gass.
6. Punkt 5 ble gjentatt.
7. 2,5 ml vannfri metanol ble tilsatt og tørket under N_2 -gass.
8. Punkt 7 ble gjentatt.

Acetylering

(Kim og Carpita 1992)

Prinsipp

Etter hydrolyse og reduksjon er det dannet hydroksylgrupper som acetyleres med eddiksyreanhydrid slik at komponentene blir bedre egnet for GC-MS analyse.



Figur 5.11. Acetylering med eddiksyreanhydrid. (Inngjerdingen 2000)

Reagenser

1-metylimidazol

Eddiksyreanhydrid

DCM (Diklormetan)

Vannfri metanol

Utstyr

Ultralydbad: VWR, Ultrasonic cleaner

Minishaker: Heidolph

Sentrifuge: Heraeus Multifuge 4 KR

N₂-gassoppsett med varmeeenhet: Pierce, Reacti Therm III™, Heating Module

Thermo Scientific, Reacti-Vap III™

Syrevaskede supelcorør med kork

Finnpipetter med spisser

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

Prosedyre

1. 200 µl 1-metylimidazol ble tilsatt residuet fra reduksjonen, etterfulgt av 2 ml eddiksyreanhydrid.
2. Overflødig eddiksyreanhydrid ble ødelagt ved tilsetting av 10 ml deionisert vann. Løsningen ble blandet godt og satt til henstand i 10 minutter.
3. De delvis metylerte og acetylerede sukkerne ble så ekstrahert porsjonsvis med 2 x 1 ml diklormetan (i avtrekk), mikset i 30 sekunder og sentrifugert. Den nederste fasen ble samlet hver gang.
4. Ekstraktene ble samlet og tilbakevasket porsjonsvis med 2 x 5 ml deionisert vann. DCM-fasen ble overført til et supelcorør og tørket med strøm av nitrogen-gass. Det ble

passet på å ikke tørke for mye da flyktige derivater kan gå tapt, samtidig som det er viktig å fjerne alt vann for at ikke polare stoffer forurenses GC-MS apparatet.

5. Produktet fra punkt 4 ble løst i nødvendig mengde DCM (for eksempel 500 µg prøve i 1 ml a DCM)
6. Prøven ble analysert ved GC-MS.

5.4.2 GC-MS

(Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004) (Greibrokk et al. 1994)

Prinsipp

Gasskromatografi (GC) kombinert med massespektrometer (MS) som detektor kan gi strukturinformasjon om analyttene som ble dannet under metyleringsmetoden (seksjon 5.4.1). GC-kolonnen separerer stoffene og de blir deretter ledet inn i massespektrometeret. I MS-detektoren ioniseres stoffene ved at de bombarderes av en elektronstråle under vakuum. De ioniserte molekylene brytes ned i mindre fragmentdeler. De ioniserte molekylene og eventuelle fragmenter separeres etter deres masse/ladningsforhold (m/z), og detekteres av en detektor. Man får et massespektrum som er et plot av relativ intensitet av ionene som funksjon av deres m/z -verdi. Slik kan man bestemme massen deres. Massespekteret er svært karakteristisk og kan sies å være stoffets fingeravtrykk.

GC-MS av prøvene ble utført av Hoai Aas ved Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Reagenser

Pyridin

Utstyr og betingelser

GC-MS: GC 8000 series

Detektor: Fisons Instruments, MD 800

Injektor: Splitt (1:10)

Kolonne: FactorFOUR™, VF-1 ms

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

Temperaturprogram:

80°C (5 min) $\xrightarrow{20^\circ\text{C}/\text{min}}$ 170°C $\xrightarrow{0,5^\circ\text{C}/\text{min}}$ 200°C $\xrightarrow{30^\circ\text{C}/\text{min}}$ 280°C (20min)

Prosedyre

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

5.5 Immunmodulerende aktivitet

5.5.1 Komplementfikseringstest

(Wagner 1999)(Michaelsen et al. 2000)(Folkehelseinstituttet 2012)

Prinsipp

Komplementsystemet er en viktig del av det medfødte immunsystemet. Som nevnt i innledningen kan polysakkarider interferere med dette systemet. Komplementfikseringstesten brukes til å undersøke om polysakkaridet har en immunmodulerende effekt. Det blir brukt røde blodceller fra sau. Disse blir sensibilisert og dekket med antistoff fra kanin. Komplement som er intakt vil gjennom MAC (membrane attack complex) føre til hemolyse av blodcellene. Polysakkaridene i prøven får tid til å reagere med komplement før blodcellene tilsettes. Etter tilsetning av blodceller får blandingen igjen tid til å reagere sammen, og man måler deretter

om det har vært en reduksjon i hemolyse av de sensitiviserte blodcellene. Målingen gjør man ved å sammenligne med en kjent positiv kontroll.

En reduksjon av hemolyse vil skje som følge av at testsubstansen enten aktiverer eller hemmer komplement. Testen sier derfor ingenting om komplementsystemet er inhibert eller aktivert, fordi begge vil redusere lyse. Ved en aktivering forbrukes komplement, mens ved en inhibering hemmes komplement. I begge tilfellene fører det til at hemolysen av blodceller hemmes.

Reagenser

Fosfatbuffer (PBS)

Saueblod: Sau 7001, 31.08.12, Sau 7001, 14.11.12, Sau 7001, jan13

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

Antistoff: Virion 9020 Amboceptor, fortynnet 1:10 i veronalbuffer

Komplement: Serum fra ECG (humant)

Standard: Polysakkaridet BPII isolert fra *Biophytum petersianum*

Utstyr

Finnpipetter/nye med spisser

Reagensrør

Tape

Sentrifuge: Heraeus Multifuge 4 KR

Mikroplateleser: Heiga, Molecular Device

Whirlmixer: Heidolph

Varmeskap med ristepate: Labnet International, Inc 211DS

Mikrotiterplate med 96 brønner, rund og flat bunn

Prosedyre

A) Vasking av saueblodceller

1. En mengde blod tilsvarende ca. 100 μ l per plate ble tatt ut.
2. Blodcellene ble vasket 2 ganger med PBS og 1 gang med veronal/BSA buffer.
Mellom hver vask ble løsningen sentrifugert og vaskevannet ble fjernet fra toppen.

B) Sensibilisering av saueblodceller

1. 15 μ l Virion 9020 Amboceptor, 60 μ l pakkede blodceller og 5,925 ml veronal/BSA buffer ble inkubert med risting ved 37°C i 30 minutter.
2. Løsningen ble vasket 2 ganger med fosfatbuffer og 1 gang med veronal/BSA buffer. Mellom hver vask ble løsningen sentrifugert og vaskevannet fjernet.
3. Når vaskevannet var fjernet etter siste vask ble blodet fortynnet med 5,940 ml veronal/BSA buffer slik at en 1 % løsning ble laget.

C) Titreringskurve for komplementkilden

1. 6 brønner på mikrotiterplaten ble fylt med 100 μ l deionisert vann og 24 brønner med 50 μ l veronal/BSA buffer (3 brønner per fortynning av komplement/buffer)
2. Fortynningsrekken av komplement og buffer ble laget etter tabell 5.1.

Tabell 5.1 Titreringskurve for komplement

Komplement: buffer	Komplement (μl)	Veronal/BSA buffer (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
1:10	10	990

3. 50 μ l komplement/buffer ble tilsatt brønnene med veronal/BSA buffer.
4. Platen ble dekket med plastfilm for å unngå fordamping og satt på risting i 30 minutter ved 37 °C.
5. 50 μ l 1 % SRBC (sensibiliserte saueblodceller) ble tilsatt alle brønnene utenom blankbrønnene med 150 μ l veronal/BSA buffer. Platen ble dekket med plastfilm og inkubert med risting i 30 minutter ved 37°C.
6. 100 μ l fra hver brønn ble overført til en flatbunnet plate. Det ble unngått å få med blodbunnfall.
7. Platen ble sentrifugert ved 1000 g i 3-5 minutter for å bli kvitt eventuell luft.
8. Absorbans ble lest av ved 405 nm på en mikroplateleser.
9. Den fortynningen som gav ca. 50 % lyse av SRBC sammenlignet med 100 % lyse ble brukt videre i utførelsen av komplementfikseringstesten.

D) Fortynning av prøvene

1. 1 mg prøvematerialet (mindre mengde ble også brukt hvis det var lite utbytte) ble løst i 2 ml veronal/BSA buffer slik at stamløsningen fikk konsentrasjonen 500 μ g/ml. Det samme ble gjort med standarden.

2. En fortynningsrekke på 4-folds eller 3-folds ble laget. 6 fortynninger fra fortynningsrekken ble brukt for hver prøve og samme fortynningskonsentrasjon for standarden. Se tabell 5.2, 5.3 og 5.4.

Tabell 5.2 Viser fortynningskonsentrasjoner for fraksjoner og BPII som ble brukt i noen av komplementfikseringstestene.

Rør	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	
Rør 1	500 $\mu\text{g/ml}$	Stamløsning
Rør 2	125 $\mu\text{g/ml}$	0,250 ml fra rør 1 (stamløsning)+ 0,750 ml veronal/BSA buffer
Rør 3	31 $\mu\text{g/ml}$	0,250 ml fra rør 2 + 0,750 ml veronal/BSA buffer
Rør 4	8 $\mu\text{g/ml}$	0,250 ml fra rør 3+ 0,750 ml veronal/BSA buffer
Rør 5	2 $\mu\text{g/ml}$	0,250 ml fra rør 4 + 0,750 ml veronal/BSA buffer
Rør 6	0,5 $\mu\text{g/ml}$	0,250 ml fra rør 5 + 0,750 ml veronal/BSA buffer

Tabell 5.3 Viser fortynningskonsentrasjoner for fraksjoner og BPII som ble brukt i noen av komplementfikseringstestene.

Rør	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	
Rør 1	7,810 $\mu\text{l/ml}$	0,250 ml fra fortynning nr 4 i 4-foldsfortynning med utgangskonsentrasjon på 500 μl
Rør 2	1,950 $\mu\text{g/ml}$	0,250 ml fra rør 1 + 0,750 ml veronal/BSA buffer
Rør 3	0,490 $\mu\text{g/ml}$	0,250 ml fra rør 2 + 0,750 ml veronal/BSA buffer
Rør 4	0,120 $\mu\text{g/ml}$	0,250 ml fra rør 3+ 0,750 ml veronal/BSA buffer
Rør 5	0,031 $\mu\text{g/ml}$	0,250 ml fra rør 4 + 0,750 ml veronal/BSA buffer
Rør 6	0,008 $\mu\text{g/ml}$	0,250 ml fra rør 5 + 0,750 ml veronal/BSA buffer

Tabell 5.4 Viser fortynningskonsentrasjoner av prøven og BPII som ble brukt i noen av komplementfikseringstestene.

Rør	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	
Rør 1	54,5 $\mu\text{g/ml}$	Stamløsning
Rør 2	18 $\mu\text{g/ml}$	0,330 ml fra rør 1 (stamløsning)+ 0,670 ml veronal/BSA buffer
Rør 3	5,9 $\mu\text{g/ml}$	0,330 ml fra rør 2 + 0,670 ml veronal/BSA buffer
Rør 4	2 $\mu\text{g/ml}$	0,330 ml fra rør 3+ 0,670 ml veronal/BSA buffer
Rør 5	0,6 $\mu\text{g/ml}$	0,330 ml fra rør 4 + 0,670 ml veronal/BSA buffer
Rør 6	0,2 $\mu\text{g/ml}$	0,330 ml fra rør 5 + 0,670 ml veronal/BSA buffer

E) Utføring av testen

1. 50 μl av hver fortynning av prøven, i to paralleller, ble satt på en rundbunnet ELISA plate.
2. 100 μl deionisert vann ble tilsatt 4 brønner (100 % lysekontroll).
3. 50 μl buffer ble tilsatt 4 brønner (kontroll)
4. 100 μl buffer ble tilsatt 4 brønner (Blank)
5. 50 μl komplement (i konsentrasjon bestemt av titreringkurven) tilsatt brønnene med prøvefortynninger og kontrollbrønnene.
6. Platen ble dekket med plastfilm og satt i varmeskap på 37°C med risting i 30 min.
7. 50 μl (1 %) sensibiliserte sauceller ble tilsatt alle brønnene og platen ble satt i varmeskap på 37°C med risting i 30 min
8. Platen ble sentrifugert i 3-5 minutter ved 1000 g.
9. 100 μl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet plate.
10. Platen ble sentrifugert i 3- 5 minutter ved 1000 g for å bli kvitt eventuell luft som ble dannet i løsningene ved overføringen.
11. Absorbansen ble lest av ved 405 nm på en mikroplateleser. "Blankbrønnene" ble trukket fra.

F) Beregninger

Lyseringsgrad

Lyseringsgraden som forteller hvor mye komplement i seg selv ødelegger systemet ble beregnet ut fra følgende formel:

$$\text{Lyseringsgrad} = (\text{Absorbans kontroll} / \text{Absorbans deionisert vann}) \times 100 \%$$

Anbefalt lyseringsgrad er ca. 50 %

Komplementfikserende effekt

Høy grad av komplementfiksering vil gi redusert hemolyse og lavere absorbans.

Komplementfikserende effekt beregnes for å bestemme prøvens effekt på komplementsystemet.

Komplementfikserende effekt=

$$[(\text{Absorbans kontroll} - \text{Absorbans prøve}) / \text{Absorbans kontroll}] \times 100 \%$$

6. Resultater og diskusjon

6.1 Isolering av polysakkarider

6.1.1 Ekstraksjon

Det ble brukt 100 g tørt plantemateriale av *Erythrina senegalensis* rotbark og 100 g av stammebark. Plantematerialet ble høstet og tørket i Mali. Det ble veid ut, blandet med DE og fylt i ASE-celler for ekstraksjon. Cellene med plantemateriale ble først ekstrahert med diklormetan ved romtemperatur, deretter med etylacetat ved 65 °C og etanol ved 70°C. Disse tre ekstraheringene fjerner uønskede forbindelser, upolare og lavmolekylære, som kan interferere med analysemetodene. Ekstraktene ble dampet inn og oppbevart for eventuell fremtidig forskning, men ble ikke brukt i denne studien.

Plantematerialet ble deretter ekstrahert med 50 % etanol, 50 °C vann og 100 °C vann. Alle ekstraktene ble hver for seg dampet inn til mindre mengder og frysetørket. Utbytte er vist i tabell 6.1 og 6.2. Råekstraktene ble brukt for videre polysakkaridanalyser. Flytskjemaene i figur 6.1 og 6.2 gir en oversikt over fraksjonene som ble opparbeidet fra stammebarken (figur 6.1) og fra rotbarken (figur 6.2).

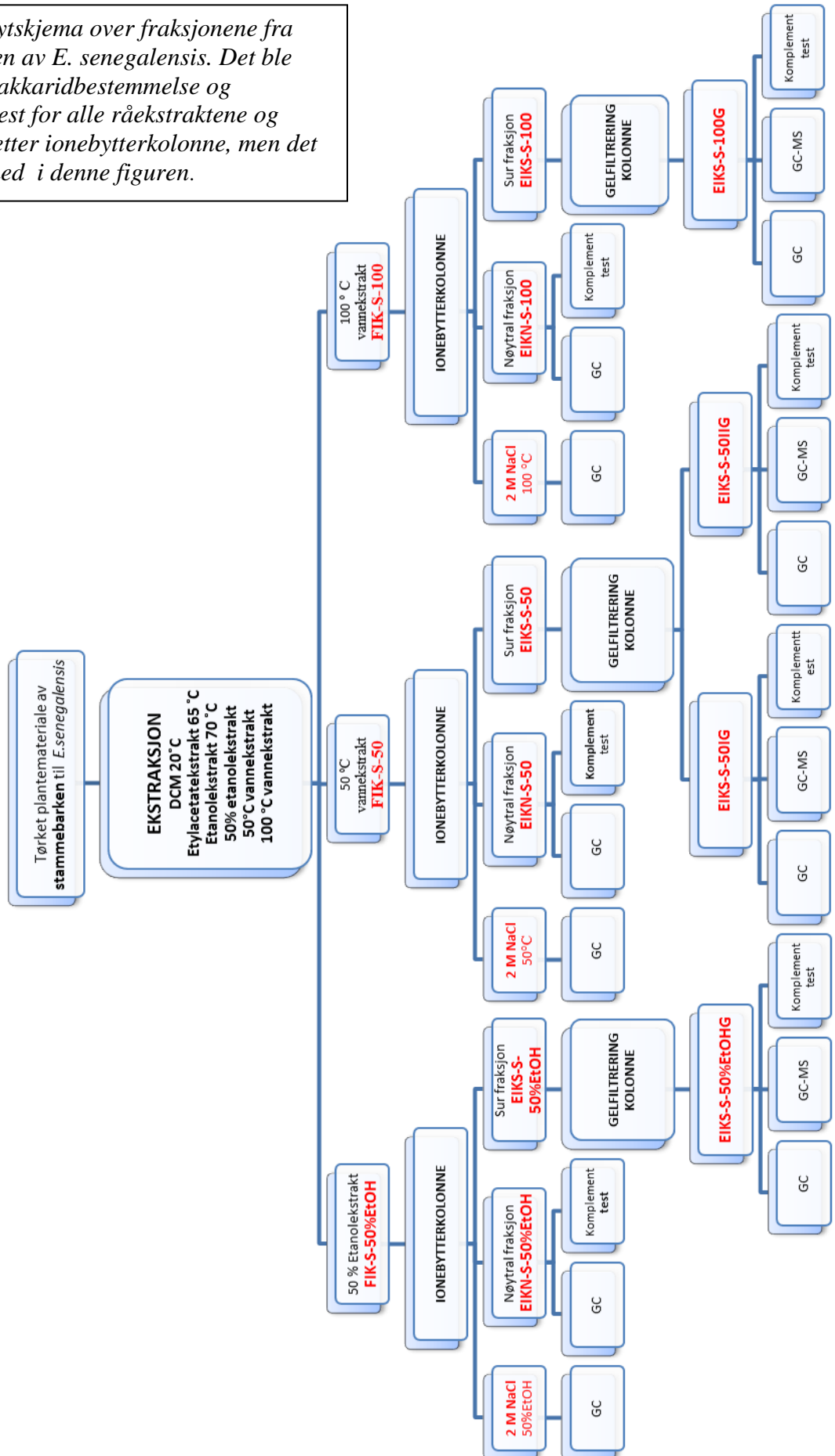
Tabellen 6.1 Utbytte av ekstraksjonene gjort på plantematerialet av stammebarken.

Fraksjon <i>E. senegalensis</i> stammebark	Utbytte
Etanol 50 % (FIK-S-50%EtOH)	3300 mg (3,3 %)
H ₂ O 50°C (FIK-S-50)	423,5 mg (0,42 %)
H ₂ O 100 °C (FIK-S-100)	338 mg (0,34 %)

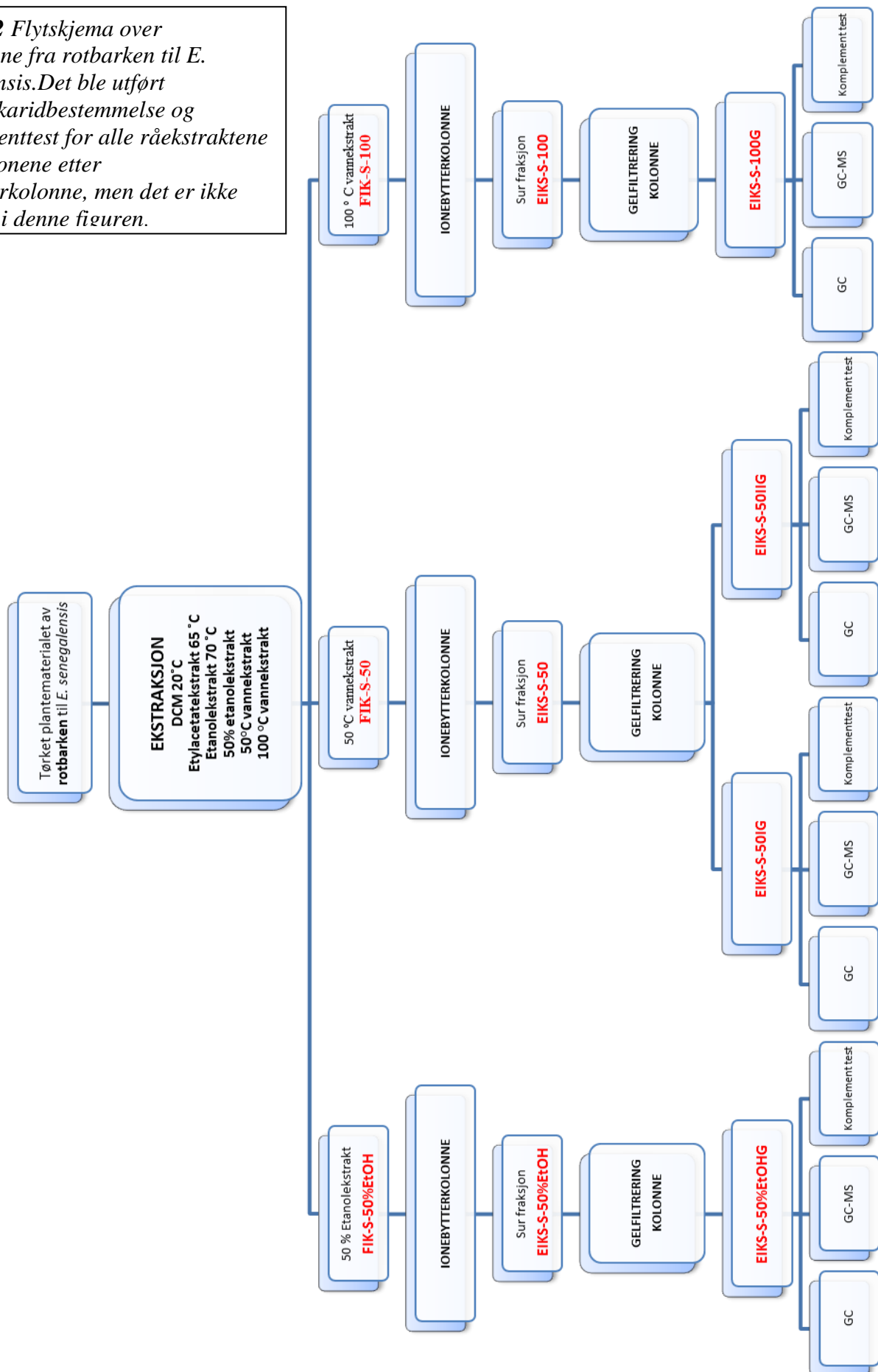
Tabell 6.2 Utbytte av ekstraksjonene gjort på plantematerialet av rotbarken.

Fraksjon <i>E. senegalensis</i> rotbark	Utbytte
Etanol 50 % (FIK-R-50%EtOH)	213,3 mg (0,21 %)
H ₂ O 50°C (FIK-R-50)	269,3 mg (0,27 %)
H ₂ O 100 °C (FIK-R-100)	1383 mg (1,38 %)

Figur 6.1 Flytskjema over fraksjonene fra stammebarken av *E. senegalensis*. Det ble utført monosakkaridbestemmelse og komplementtest for alle råekstraktene og fraksjonene etter ionebytterkolonne, men det er ikke tatt med i denne figuren.



Figur 6.2 Flytskjema over fraksjonene fra rotbarken til *E. senegalensis*. Det ble utført monosakkaridbestemmelse og komplementtest for alle råekstraktene og fraksjonene etter ionebytterkolonne, men det er ikke tatt med i denne figuren.



6.1.2 Isolering og fraksjonering av polysakkarider

6.1.2.1 Ionebytterkromatografi

I første omgang ble 100 mg av rækstraktene fra stammebarken av *E. senegalensis* løst i 50-100 ml deionisert vann. Denne mengden viste seg å gi for lite utbytte av FIK-S-50 og FIK-S-100. Det måtte derfor gjøres ytterligere en applisering på ionebytterkolonnen (ANX-Sepharose 4 Fast Flow) for hver av disse rækstraktene.

Det var problemer med å løse stoffene fullstendig, selv etter oppkok av løsningen. Ved første applisering på kolonnen av stammebarkekstraktene (FIK-S-50%EtOH, FIK-S-50 og FIK-S-100), ble derfor løsningene sentrifugert og supernatanten ble filtrert og brukt videre. Da FIK-S-100 skulle appliseres for andre gang, ble det svært mye bunnfall etter sentrifugeringen, samtidig som løsningen formet en gel. Løsningen ble forsøkt behandlet med EDTA, natriumsaltet (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate 99+ %) for at stoffet skulle løses bedre. Det gav lite resultater og løsningen ble da forsøkt blandet med spesialresin Chelex for å prøve å fjerne flerverdige metaller. Chelex-behandlingen gav en fin oppløsning og den filtrerte løsningen ble applisert på ionebytterkolonnen. Bunnfallet fra første runde ble frysetørket og senere analysert ved GC-analyse.

Chelex ble også brukt for FIK-S-50%EtOH, FIK-S-50 og rotbarkekstraktene FIK-R-50%EtOH, FIK-R-50, FIK-R-100.

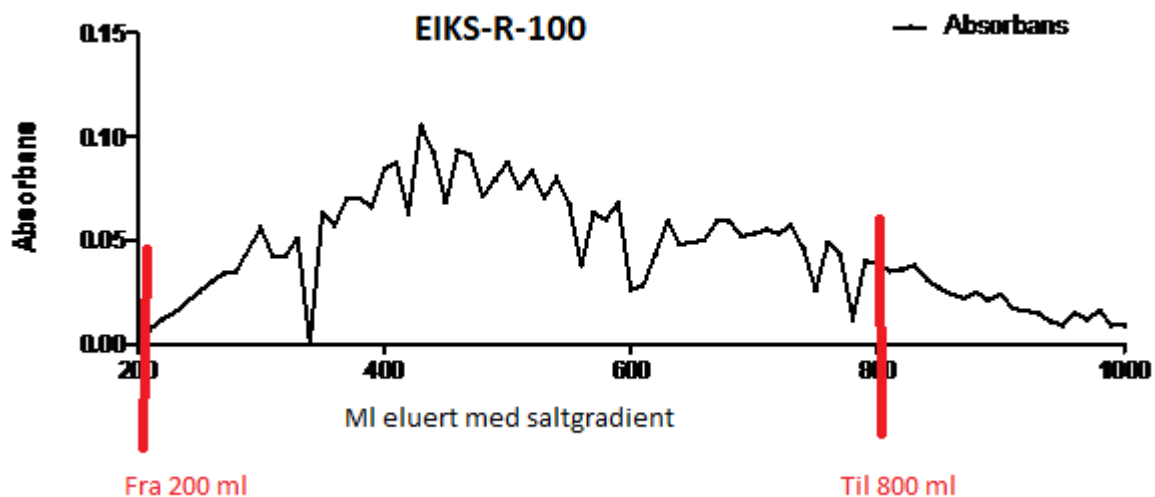
På bakgrunn av GC-resultater og jod-jod-kalium test ble det klart at det var en del stivelse i flere av fraksjonene både fra stammebarken og rotbarken. Særlig 50 °C og 100 °C vannekstrakt av rotbarken (FIK-R-50 og FIK-R-100) og 100°C vannekstrakt av stammebark, (FIK-S-100, EIKN-S-100 og EIKS-S-100) viste utslag på jod-jod-kalium testen.

Rækstraktene fra rotbarken (FIK-R-50%EtOH, FIK-R-50 og FIK-R-100) ble derfor behandlet med α -amylase før de ble applisert på ionebytterkolonnen. På grunn av litt usikkerhet i fargeendringer av 50 % etanolekstraktet i jod-jod-kalium testen ble denne også behandlet for å være på den sikre siden.

De nøytrale komponentene i prøveløsningen ble eluert ut av ionebytterkolonnen med deionisert vann. De sure polysakkaridene ble eluert ut etter økende surhetsgrad med en NaCl-gradient fra 0-1,5 M. Til slutt ble kolonnen eluert med 2 M NaCl for å få ut de mest sure sukkermolekylene. Løsningen med de nøytrale fraksjonene og 2 M NaCl fraksjonene fra

stammebarken ble dampet inn, dialysert og frysetørket. Ved fraksjonering av *E.senegalensis* rotbark ble det valgt å ikke ta vare på det nøytrale eluatet og 2 M NaCl eluatet. Dette ble gjort på grunn av begrenset tid og fordi man erfaringsmessig vet at de nøytrale polysakkaridene er mindre biologisk aktive sammenlignet med de sure gradientfraksjonene, mens 2 M NaCl eluater gir lite utbytte. Komplementfikserings-testen som ble utført på de nøytrale og sure fraksjonene fra stammebarken bekreftet dette og utbyttet av 2 M NaCl fraksjonene fra stammebarken ble svært lite.

De sure polysakkaridene ble samlet ved hjelp av en fraksjonssamler. Det ble gjort fenol-svovelsyretest på fraksjonsrørene og på bakgrunn av disse resultatene ble fraksjonene slått sammen (Figur 6.3). De ble deretter dampet inn, dialysert og frysetørket.



Figur 6.3 Eksempel på FS-test utført på fraksjon EIKS-R-100. Strekene angir hvilke volumer av saltgradient eluatet som ble inkludert i fraksjonen. Her fra 200 ml til 800 ml.

De sure fraksjonene fra stammebarken som ble isolert etter ionekromatografi ble kalt; EIKS-S-50%EtOH, EIKS-S-50 og EIKS-S-100. De nøytrale fraksjonene som ble isolert fra stammebarkestraktene ble kalt EIKN-S-50%EtOH, EIKN-S-50 og EIKN-S-100. De sure fraksjonene fra rotbarkestraktene ble kalt EIKS-R-50%EtOH, EIKS-R-50 og EIKS-R-100. Utbytte av fraksjonene etter ionebytterkromatografi er vist i Tabell 6.3 og 6.4.

Tabell 6.3 Oversikt over applisert mengde råekstrakt fra stammebarken og isolerte fraksjoner med utbytte etter ANX 4 Fast Flow ionebytterkromatografi.

Fraksjon applisert	Mengde applisert 1.gang	Mengde applisert 2.gang	Isolert fraksjon	Utbytte 1.applisering	Utbytte 2.applisering
FIK-S-50%EtOH	100 mg		EIKN-S-50%EtOH	4,5 mg	-
			EIKS-S-50%EtOH	9,5 mg	-
FIK-S-50	100 mg	192 mg	EIKN-S-50	1,2 mg	9,1 mg
			EIKS-S-50	10,8 mg	51,4 mg
			2 M NaCl -50	-	3,7 mg
FIK-S-100	100 mg	273 mg	EIKN-S-100	3,5 mg	18,9 mg
			EIKS-S-100	0,5 mg	114,7 mg
			2 M NaCl-100	-	2,4 mg

Tabell 6.4 Oversikt over applisert mengde ekstrakt fra rotbarken, og utbytte av de sure fraksjonene som ble isolert etter ANX 4 Fast Flow ionebytterkromatografi.

Fraksjon applisert	Mengde applisert	Isolert fraksjon	Utbytte
FIK-R-50%EtOH	200 mg	EIKS-2-70	77,3 mg
FIK-R-50	250 mg	EIKS-R-50	49,8 mg
FIK-R-100	500 mg	EIKS-R-100	20,2 mg

Alle fraksjonene var lyse brun/beige. FIK-R-50%EtOH var noe mørkere, men ingen av fraksjonene hadde sterk farge.

6.1.2.2 Gelfiltrering

Det ble valgt å jobbe videre med de sure fraksjonene fra både stammebarken og rotbarken. Alle disse viste signifikant aktivitet i komplementtesten.(se seksjon 6.3.1) Mengde som ble applisert varierte etter hvor mye stoff som var tilgjengelig for hver enkelt fraksjon. Tabell 6.5 viser hvor mye som ble applisert av fraksjonene og utbytte etter gelfiltrering.

Tabell 6-5 Tabellen viser mengde stoff som ble applisert av hver fraksjon og navn på fraksjonene etter gelfiltreringen, samt utbytte av dem.

Fraksjon applisert	Mengde applisert	Isolert fraksjon	Utbytte
EIKS-S-50%EtOH	9 mg	EIKS-S-50%EtOHG	1 mg
EIKS-S-50	40 mg	EIKS-S-50-IG	7,5 mg
		EIKS-S-50-IIG	4,8 mg
EIKS-S-100	60 mg	EIKS-S-100G	1,3 mg
EIKS-R-50%EtOH	20 mg	EIKS-R-50%EtOHG	1,2 mg
EIKS-R-50	20 mg	EIKS-R-50G	Lite utbytte
EIKS-R-100	15 mg	EIKS-R-100G	5,4 mg

Prøvene ble løst i 10 mM NaCl og filtrert med 0,22 µm filter før løsningen ble injisert på kolonnen. Det ble injisert 2 ml prøveløsning hver omgang. EIKS-S-100 ble applisert i 2 omganger. Elueringsprofilene for EIKS-S-100 viste det samme mønsteret i begge elueringsomgangene og fraksjonene fra de to toppene ble slått sammen. Fraksjonene fra stammebarken (EIKS-S-50%EtOH, EIKS-S-50 og EIKS-S-100) ble, som nevnt i seksjon 6.1.2, behandlet med α -amylase før de ble applisert på gelfiltreringskolonnen. Dette ble gjort for å fjerne stivelse fra prøvene slik at det ikke skulle interferere med resultatene. Som fraksjonene fra stammebarken ble også alle fraksjonene fra rotbarken behandlet med α -amylase, til tross for at det bare var 100 °C vannekstraktet (FIK-S-100, EIKN-S-100 og EIKS-S-100) som gav utslag i jod-jod-kalium testen.

Prøvene ble eluert ut av gelfiltreringskolonnen med 10 mM NaCl og fraksjonene ble slått sammen på bakgrunn av fenol-svovelsyretesten (beskrevet i seksjon 5.3.1). Disse ble så dialysert og frysetørket. Fra EIKS-S-50 ble det samlet to fraksjoner med bakgrunn i to topper; EIKS-S-50IG og EIKS-S-50IIG (se figur 6.4.) Fenolsvovelsyreprofilene og kromatogrammet tydet på at det kunne være flere topper i enkelte av de andre prøvene også. Toppene var derimot vanskelig å skille fra hverandre og det ble valgt å samle dem i samme fraksjon. Det var også begrenset med tid og det ble vurdert som mindre viktig å dele fraksjonene opp. Hensikten med oppgaven var ikke å isolere ett enkelt biologisk aktivt polysakkarid, men å

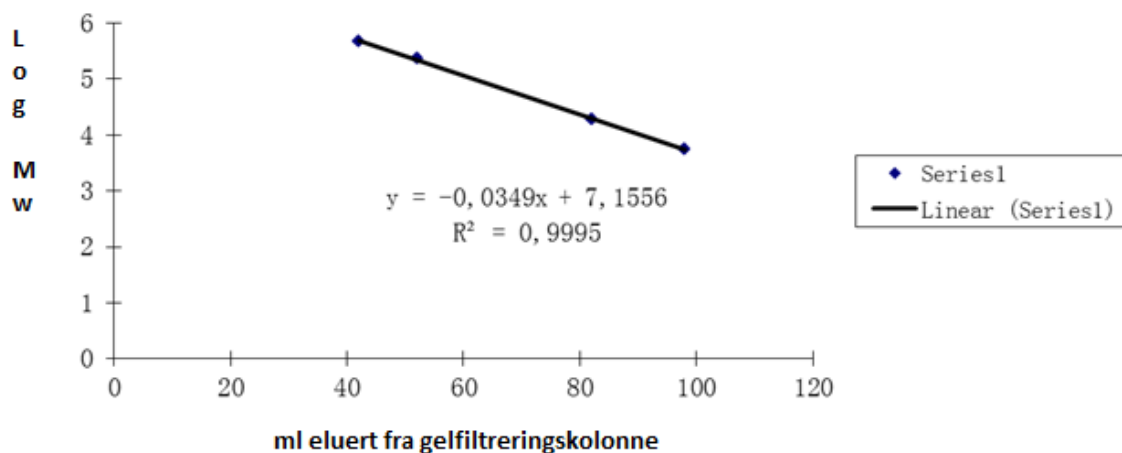
prøve å isolere en aktiv gruppe av sure polysakkarider. I tabell 6.6 og 6.7 er molekylvektstoppene angitt.



Figur 6.4 Eksempel på elueringsprofil for EIKS-S-50. Det er to tydelige topper, disse ble kalt henholdsvis EIKS-S-50IG og EIKS-S-50IIG.

Det ble benyttet en standardkurve for dekstraner med kjent molekylvekt. Standardkurven ble brukt til å finne en regresjonslinje og funksjonene til regresjonslinjen. (Figur 6.5)

Regresjonsligningen kunne brukes til å beregne molekylvektfordelingen for polysakkaridene i de ulike fraksjonene. EIKS-R-50G ble ikke tatt med i beregningene fordi utbytte ble for lite til at det kunne gjøres ytterligere tester på fraksjonen.



Figur 6.5 Standardkurve og regresjonslinje for dekstraner med kjent molekylvekt. X= ml som er eluert fra gelfiltreringskolonnen etter at prøve er applisert. Y= Log molekylvekt. $R^2=0,9996$ betyr at tilpasningen til regresjonslinjen var svært god og tilfredsstillende.

Tabell 6.6 Molekylvektfordelingen til fraksjonene fra stammebarken etter gelfiltrering. For de fraksjonene hvor det er identifisert flere toppe i samme fraksjon er hovedtoppen markert med uthevede tall. EIKS-S-50 var den eneste prøven som ble delt opp i to fraksjoner.

Stammebarkfraksjoner	Mw (Da) fra	Mw (Da) til	Max topp 1	Max topp 2
EIKS-S-50%EtOHG	575000	52000	490000	135000
EIKS-S-50G	575000	7000	159000	20000
EIKS-S-100G	575000	159000	30000	

Tabell 6.7 Molekylvektfordelingen til fraksjonene fra rotbarken etter gelfiltrering.. For de fraksjonene hvor det er identifisert flere toppe i samme fraksjon er hovedtoppen markert med uthevede tall.

Rotbarkfraksjoner	Mw (Da) fra	Mw (Da) til	Max topp 1	Max topp 2
EIKS-R-50%EtOHG	575000	51600	385000	125000
EIKS-R-100G	575000	23000	302000	44000

Tabell 6.6 og 6.7 viser at molekylvektfordelingen for fraksjonene fra stammebarken strekker seg fra ca. 7000 Da til 575000 Da, mens molekylvektfordelingen for fraksjonene fra rotbarken strekker seg fra ca. 23000 Da til 575000 Da.

6.2 Karbohydratanalyse

6.2.1 Monosakkaridsammensetning

Monosakkaridsammensetningen i fraksjonene ble bestemt ved hjelp av GC etter metanolyse og TMS-derivatisering. Det ble utført GC på fraksjonene både før og etter ionebytterkromatografi og gelfiltrering. Slik kunne kromatogrammene sammenlignes for å se om opprensningen gav endringer i monosakkaridsammensetningen.

Resultater for råekstraktene

Tabell 6.8 Monosakkaridsammensetning for råekstraktene fra stammebarken til *E.senegalensis*. Tallene er oppgitt i prosent (mol %) av totalt karbohydratinnhold. <DL= Below detection limit.

	FIK-S- 50%EtOH	FIK-S-50	FIK-S-100
Ara	14,5	4,6	7,8
Rha	13,9	12,6	5,4
Xyl	1,7	< DL	< DL
Man	< DL	4,7	1,7
Glc	27,5	32,5	41,9
GlcA	10,5	2,7	2
Gal	20,8	27,1	26,7
GalA	11,1	15,8	14,3

Tabell 6.9 Monosakkaridsammensetning for råekstraktene fra rotbarken til *E.senegalensis*. Tallene er oppgitt i prosent (mol %) av totalt karbohydratinnhold.

	FIK-R- 50%EtOH	FIK-R-50	FIK-R-100
Ara	19,8	10,2	3,4
Rha	14,5	9,3	1,9
Fuc			
Xyl	1,7	7,3	1,5
Man	1,3	1,3	0,4
Glc	16,2	20	83,1
GlcA	10,9	1,7	0,2
Gal	25,8	21,2	3,5
GalA	9,7	29,2	6

Resultater etter ionebytterkromatografi

Etter ionebytterkromatografi av stammebarkekstraktene ble monosakkaridsammensetningen bestemt for de nøytrale fraksjonene (EIKN-S-50%EtOH , EIKN-S-50 og EIKN-S-100), gradientelueringsfraksjonene (EIKS-S-50%EtOH , EIKS-S-50 og EIKS-S-100) og 2 M NaCl fraksjonene (2 M NaCl -50 og 2 M NaCl-100). Resultatene er vist i tabell 6.10.

Tabell 6.10 Monosakkaridsammensetningen for fraksjonene fra stammebarken til *E.senegalensis* etter ionebytterkromatografi. Tallene er oppgitt i prosent (mol %) av totalt karbohydratinhold

	EIKN-S- 50%EtOH	EIKS-S- 50%EtOH	EIKN-S- 50	EIKS-S- 50	2 M NaCl -50	EIKN-S- 100	EIKS-S- 100	2 M NaCl -100
Ara	39,8	31,6	92,3	8,2	0,7	3,5	12,5	4,7
Rha		6,7	0,3	8,9	5,2	8,1	8,4	3,4
Xyl	1,2	1,6	1,9	1,8	1,1	0,6	1,4	0,4
Man	0,9	1,3	0,7	4,7	7	20,2	0,3	1
Glc	47,2	7	2,3	23,2	26	37,6	16,1	36,8
GlcA		3	0,2	9,5	1,9		6,3	5,2
Gal	5,1	34,7	2	20,7	12,1	22,4	25,1	22,5
GalA	5,9	14,1	0,4	23,1	46	7,6	29,9	26,1

På bakgrunn av komplementresultatene for de nøytrale og sure gradienteluerings-fraksjonene fra stammebarken ble det klart at de sure gradienteluerings-fraksjonene viste høyere aktivitet enn de nøytrale fraksjonene fra alle ekstraktene. 2 M NaCl-50 og 2 M NaCl-100 viste interessante innhold av monosakkarider, men utbytte var for lite til at de kunne jobbes videre med. For rotbarken ble det derfor valgt å bare bruke de sure gradienteluerings-fraksjonene videre. Resultatene fra GC for rotbarkfraksjonene etter ionebytterkromatografi er vist i tabell 6.11.

Tabell 6.11 Monosakkaridsammensetningen for de sure fraksjonene fra rotbarken etter ionebytterkromatografi. Tallene er oppgitt i prosent (mol %) av totalt karbohydratinnhold-
<DL= Below detection limit.

	EIKS-R- 50%EtOH	EIKS-R-50	EIKS-R- 100
Ara	26,2	9,5	12
Rha	7,3	16,2	14,4
Xyl	<DL	1,5	4,3
Man	0,6	0,4	< DL
Glc	11,8	6,2	8,1
GlcA	4,8	3,4	3,4
Gal	37	19,3	20,9
GalA	12,4	43,6	36,9

Fraksjonene fra rotbarken ble behandlet med α -amylase før de ble applisert på ionebytterkolonne. Glukoseinnholdet er blitt mindre for alle fraksjonene, men særlig for EIKS-R-50 og EIKS-R-100 som hadde mest i utgangspunktet. Se tabell 6.9 og 6.11.

Resultater etter gelfiltrering

Etter gelfiltrering på HiLoad Superdex 16/600 200 ble de isolerte fraksjonene metanolysert og monosakkaridsammensetning ble bestemt ved GC. Fraksjonene ble kalt det samme som tidligere, men med en G på slutten av navnet; EIKS-S-50%EtOHG, EIKS-S-50IG, EIKS-S-50IIG, EIKS-S-100G, EIKS-R-50%EtOHG og EIKS-R-100G. Resultatene for stammebarkfraksjonene er vist i tabell 6.12 og resultatene for rotbarkfraksjonene er vist i 6.13. Det var som nevnt for lite utbytte av EIKS-R-50G til at videre analyser kunne utføres på denne fraksjonen.

Tabell 6.12 Monosakkaridsammensetning i de gelfiltrerte fraksjonene fra stammebarken. Tallene er oppgitt i prosent (mol %) av totalt karbohydratinnhold.

	EIKS-S- 50%EtOHG	EIKS-S- 50IG	EIKS-S- 50IIG	EIKS-S- 100G
Ara	15,6	3,3	11,3	6,4
Rha	2,9	1,5	12,5	2,1
Xyl	2,5	0,9	2,7	0,4
Man	0,8	4,4	1,7	0,6
Glc	17,0	33,3	11,9	32,7
GlcA	0,9	13,8	6,5	9,1
Gal	36,2	29,5	17,2	32,7
GalA	24,1	13,4	36,0	17,8

Tabell 6.13 Monosakkaridsammensetning i de gelfiltrerte fraksjonene fra rotbarken. Tallene er oppgitt i prosent (mol %) av totalt karbohydratinnhold

	EIKS-R- 50%EtOHG	EIKS-R- 100G
Ara	13,7	10,8
Rha	4,3	14,5
Xyl	0,1	3,5
Man	0,3	0,9
Glc	4,9	6,1
GlcA	2,6	2,5
Gal	32,1	22,7
GalA	42,1	39,1

Total mengde karbohydrat varierte mye og det ble derfor ikke tatt hensyn til i denne oppgaven. Tolkningen av GC-analysen er basert på detektering av monosakkarider ved hjelp av retensjonstid og forholdet mellom de forskjellige monosakkaridene.

Alle fraksjonene inneholder Ara, Gal, Rha og GalA. Dette er typisk for pektiner. Det er ikke noe klart mønster i hvilke monosakkarider som øker eller minker etter gelfiltrering bortsett fra at Ara ser ut til å minke for alle utenom EIKS-S-50 til EIKS-S-50IIG.

De nøytrale fraksjonene fra stammebarken viste innhold av GalA. Dette kan skyldes metylforestring på GalA som har ført til at polysakkaridet ikke har adsorbent til kolonnematerialet og derfor blitt eluert ut sammen med de nøytrale polysakkaridene.

Det er høyt innhold av Gal i alle fraksjonene, både før og etter gelfiltrering. Det er også betraktelige mengder med Ara i alle fraksjonene, men EIKS-S-50%EtOH og EIKS-R-50%EtOH utmerker seg med høyest innhold. Mye Ara og Gal kan tyde på innhold av arabinogalaktaner.

EIKS-S-50%EtOHG, EIKS-S-50, EIKS-S-50IIG, EIKS-S-100, EIKS-R-50%EtOHG, EIKS-R-50, EIKS-R-100 og EIKS-R-100G har et innhold av GalA på over 20% i forhold til totalt sukkerinnhold. GalA er monosakkaridet som homogalakturonan består av, såkalt smooth region i et pektin. Hvis Rha er til stede i tillegg til GalA, kan det bety at det er rhamnogalakturonaner i strukturen. EIKS-S-50IIG, EIKS-R-50, EIKS-R-100 og EIKS-R-100G har høyt innhold av begge. Det kan derfor se ut til at fraksjonene fra rotbarken inneholder mer rhamnogalakturonaner og homogalakturonaner, enn fraksjonene fra stammebarken.

6.2.2 Bindingsforhold

Etter isolering av fraksjonene ved gelfiltrering ble det utført karboksylsyre-reduksjon, med påfølgende metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS analyse. Resultatene av dette ble brukt til å bestemme bindingsforhold mellom monosakkaridene i de ulike fraksjonene. Ved å få informasjon om bindingsforholdene kan man identifisere ulike strukturelementer i polysakkaridene.

Tabell 6.14 gir en oversikt over fordeling mellom monosakkaridene og deres bindingstyper for de gelfiltrerte fraksjonene fra stammebarken. Tabell 6.15 gir en oversikt over fordeling mellom monosakkaridene og deres bindingstyper for de gelfiltrerte fraksjonene fra rotbarken. Prosent mengde av hver bindingstype er beregnet ut fra arealet under kurven (AUC) for hver topp i kromatogrammet i forhold til AUC for alle monosakkaridene i hver prøve. Forholdstallet ble multiplisert med mengden av det aktuelle monosakkaridet funnet etter metanalyse og GC.

Noen topper overlappet hverandre i kromatogrammet og det er da forsøkt å dele AUC etter skjønn, men dette kan gi opphav til noen unøyaktigheter. Enkelte forbindelser har samme retensjonstid i kromatogrammet. Dette gjelder galaktose og galakturonsyre i samme topp og glukose og glukuronsyre i samme topp. AUC ble da beregnet ved å finne forholdet mellom intensiteten til fraksjonene på 233 m/z og 235 m/z for 1,4 bundet Gal og 1,4 bundet GalA, mens 205 m/z og 207 m/z ble brukt for T-Glc og T-GlcA.

Tabell 6.14 Prosentvis fordeling av de ulike monosakkaridene og deres bindingstype i fraksjoner fra stammebarken, etter gelfiltrering på HiLoad Superdex 200.

Monosakkarider og deres bindingstype		EIKS-S-50%EtOHG	EIKS-S-50IG	EIKS-S-50IIG	EIKS-S-100G
Ara	Terminalf	13,3	2,1	7	6,4
	1,2f		0,7	1,4	
	1,3f	1,2	0,3	1,9	
	1,5f	1,1	0,2	1,1	
Rha	Terminal	2,6	0,1	4,5	0,3
	1,2	0,3	0,1	2,4	
	1,3		0,02		
	1,4		0,6	5,7	0,8
	1,3,4		0,6		1
Xyl	Terminal				
	1,2			1,7	
	1,4	2,5		1	
Glc	Terminal	3,3	3,1	1,1	11,7
	1,3		14,5	3,4	15,4
	1,4	2,7			3,8
	1,4,6		11,8	3,2	
	1,6	11	3,9	4,2	
GlcA	Terminal	0,2		0,4	1,9
	1,4	0,6	13,8	6,1	7,3
Gal	Terminal	1,9	2,7	0,5	1,9
	1,3	8,8	17,7		12,6
	1,4	1,5			
	1,6	4,2	1,2	4,1	1,3
	1,3,6	19,7	3,5	7,3	7,8
	1,3,4		4,4		2,1
	1,4,6				7
	1,2,4			5,3	
GalA	Terminal	3,4			1,2
	1,2				
	1,4	20,7	13,4	18,2	16,5
	1,3,4			17,9	
Man	1,2				
	1,3,6				0,6
	Terminals	24,7	8	13,5	23,4
	Branches	19,7	19,7	10,5	9,84
	Ratio	1,25	0,41	1,29	2,6

Tabell 6.15 Prosentvis fordeling av de ulike monosakkaridene og deres bindingstype i fraksjoner fra rotbarken, etter gelfiltrering på HiLoad Superdex 200. Det var ikke nok utbytte av EIKS-R-50 til å utføre metylering.

Monosakkarider	Bindingstype	EIKS-R-50%EtOHG	EIKS-R-100G
Ara	Terminalf	11,8	7,4
	1,2f		0,7
	1,3f	1,8	0,8
	1,5f	0,06	1,5
	1,3,5f		0,4
Rha	Terminal	1,6	2,6
	1,2	1,4	7,5
	1,2,4	0,6	3,7
	1,3	0,5	0,4
	1,3,4	0,3	0,3
Xyl	Terminal		
	1,4		3,5
Glc	Terminal	1,4	
	1,4,6		2,7
	1,3	1,6	
	1,4	0,7	
	1,6	1,2	3,4
GlcA	Terminal	0,5	
	1,4	2	2,5
Gal	Terminal		4,4
	1,3	7,5	6,4
	1,4	0,6	
	1,6	3,1	2,5
	1,3,6	19,1	9,3
	1,3,4	1	
GalA	1,4,6	0,7	
	Terminal		1
	1,2		
	1,4	42,1	32,1
	1,3,4		3,5
	1,2,4		2,6
	Terminals	15,30 %	15,40 %
	Branches	22,30 %	16,10 %
	Ratio	0,69	0,96

Til tross for at alle fraksjonene ble behandlet med α -amylase er det fremdeles et betydelig innhold av glukose i flere av fraksjonene fra stammebarken (EIKS-S-50%EtOHG, EIKS-S-50IG og EIKS-S-100G). Enzymet α -amylase vil bare bryte 1,4 Glc bindinger og som GC-MS

resultatene viser er det særlig andre bindingstyper for glukose som er identifisert i prøvene. Man finner 1,3 Glc i mange av fraksjonene. En mulig forklaring på dette kan være at det er glykosidbindinger mellom 1,3Glc fra hemicellulose i plantecelleveggen og polysakkaridene i fraksjonene. Denne polymeren har da blitt ekstrahert fra plantematerialet med resten av polysakkaridmolekylet.

Normalt bør antall terminale monomere være omtrent likt som antall forgreinings-monomere. EIKS-S-50IG har flere forgrenings-monomere enn terminale monomere. Dette kan skyldes konformasjonen til polysakkaridene. Hvis konformasjonen er svært forgrenet og tett kan det være vanskelig å få til en fullstendig metylering. Noen av de frie OH-gruppene kan da bli ”skjult” i konformasjonen slik at metylgrupper ikke kommer til. I GC-MS spekteret vil det da vises primærfragmenter for en monomer som forgreiningspunkt. (Berglind 2007)

EIKS-S-100G har betraktelig flere terminale monomere enn forgrenings-monomere. En årsak til dette kan være at hydrolysen har vært for svak til at alle bindingene har blitt hydrolysert.

Rhamnogalakturon I

RG-I består av alternerende 1,4-bundet GalA og 1,2-bundet Rha. Kjeden er oftest forgrenet i C-4 på Rha-enheter, men kan også være forgrenet i C-3. Dette gir forgreningspunktene 1,2,4 Rha og 1,3,4 Rha. Alle fraksjonene inneholder 1,4 GalA, men bare EIKS-R-100G og EIKS-S-50IIG har nevneverdige mengder 1,2 Rha. Fraksjonene fra rotbarken (EIKS-R-100G og EIKS-R-50%EtOHG) inneholder i tillegg forgreningspunktet 1,2,4 Rha (lite i EIKS-R-50%EtOH) og alle fraksjonene, bortsett fra EIKS-S-50IIG og EIKS-S-50%EtOHG, inneholder også små mengder 1,3,4 Rha. Dette kan tyde på at det er lite RG-I i alle fraksjonene. EIKS-R-100G er det noe mer i sammenlignet med de andre fraksjonene.. Det ser på den andre siden ut som det er mye forgreninger i de områdene som er til stede.

Arabinogalaktan II

RG-I med sidekjeder av AG-II er typisk for hairy regions i pektiner. AG-II er gjerne bygd opp av 1,3 Gal, 1,6 Gal og forgreinede 1,3,6 Gal enheter, i tillegg til T-Ara. Alle fraksjonene inneholder disse bindingstypene bortsett fra EIKS-S-50IIG som mangler 1,3 Gal. EIKS-S-50%EtOHG og EIKS-R-50%EtOHG utmerker seg med høyest innhold. Disse fraksjonene har særlig høyt innhold av 1,3,6 Gal og T-Ara som kan bety på at de inneholder svært forgreinede AG-II strukturer.

Arabinogalaktan I

AG-I kan også være bundet til rhamnose i RG-I. Den består av 1,4 Gal, med sidekjeder av arabinose bundet i C-3 på Gal. Tabell 6.7 og 6.8 viser at EIKS-R-50%EtOHG inneholder begge disse bindingstypene i svært små mengder.

Arabinaner

Arabinaner består av en hovedkjede bygd opp av 1,5 Ara, med forgreininger i posisjon 2 eller 3. Dette gir forgreiningspunktene 1,3,5 Ara og 1,2,5 Ara. Det er lite eller ingen innhold av 1,5 Ara, 1,3,5 Ara og 1,2,5 Ara i alle fraksjonene. Dette kan tyde på lite arabinaner i fraksjonene. Det er derimot relativt høyt innhold av T-Ara i alle prøvene bortsett fra EIKS-S-50IG. Disse kan stamme fra mange korte forgreiningskjeder. T-Ara kan også være del av strukturen til RG-II og AG-II.

Rhamnogalakturonan II

RG-II består av en homogalakturonanstamme som er bygd opp av 9-10 1,4 GalA enheter. Den kan være substituert i C-3 eller C-4. I forgreningspunktene kan det være T-Ara, Rha og 1-2 Rha. Som nevnt tidligere inneholder alle fraksjonene GalA, men bare EIKS-R-100G og EIKS-S-50IIG inneholder 1,3,4 GalA. Det kan bety at disse fraksjonene inneholder RG-II, men 1,3,4 GalA kan også stamme fra o-acetyleret GalA. Det finnes kolorimetrisk tester som kunne gitt svar på om fraksjonen inneholdt RG-II, men det var ikke tid til å utføre disse i denne oppgaven.

Xylanstrukturer

EIKS-R-100G og EIKS-S-50IIG har små mengder av 1,4-bundet Xyl sammen med 1,3,4 GalA. Det kan tyde på at det er xylanstrukturer i polysakkaridstrukturen.

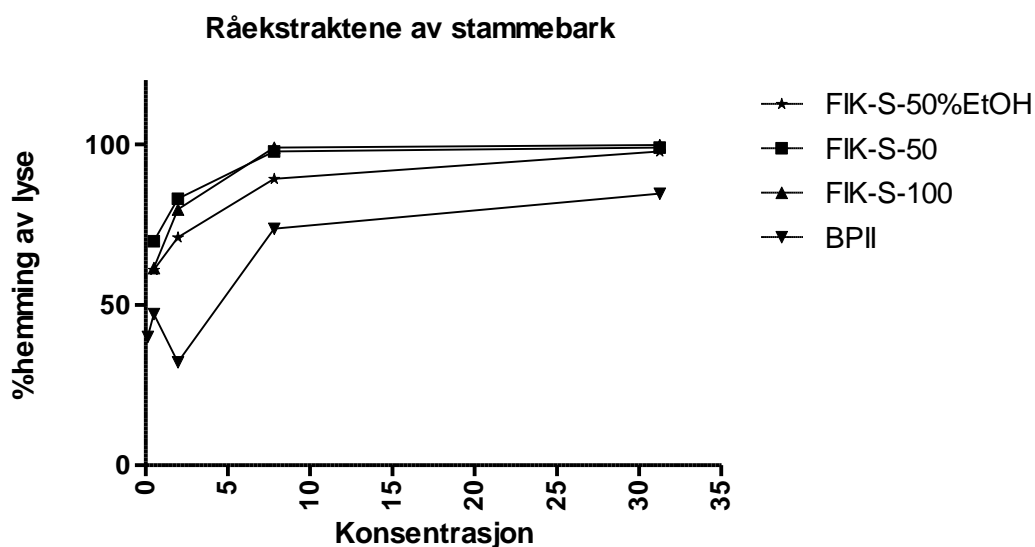
6.3 Immunmodulerende aktivitet

6.3.1 Komplementfikseringstesten

Resultatene for råekstraktene

Komplementfikseringstesten ble brukt for å undersøke om fraksjonene hadde biologisk aktivitet. Aktiviteten til polysakkaridene måles med prosentvis hemming av hemolyse av sensibiliserte røde blodceller fra sau. Ut i fra resultatene for de ulike fortyningene av polysakkaridfraksjonene, kan man lage en kurve og bestemme en ICH₅₀-verdi for hver fraksjon. ICH₅₀-verdi er den konsentrasjonen av prøven som gir 50 % hemming av hemolyse. Siden faktorene i et biologisk system ofte varierer fra dag til dag, ser man ofte ICH₅₀-verdien til prøven i forhold ICH₅₀-verdien til standarden fra samme mikrotiterplate. Standarden som ble brukt var polysakkaridet BPII isolert fra *Biophytum petersianum*. Testen skiller ikke mellom komplementaktivering og komplementhemming, da begge vil føre til redusert hemolyse. Man kan derfor bare si om fraksjonene har en innvirkning på komplementsystemet.

Testen ble utført på frysetørkede fraksjoner løst i buffer både før og etter ionebytterkromatografi og gelfiltrering. Resultatene av komplementtestene utført på råekstraktene av rotbark og stammebark, viste at det var aktivitet i alle ekstraktene. Se figur 6.6 og 6.7, samt tabell 6.16 og 6.17.

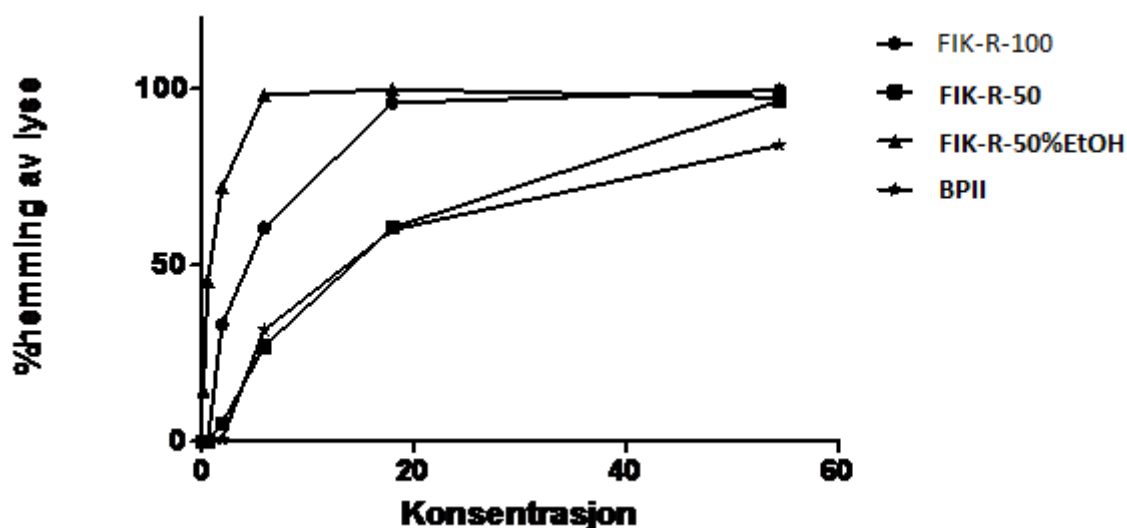


Figur 6.6 Komplementfikserende aktivitet for råekstraktene fra stammebarken og BPII. Konsentrasjon er oppgitt i µg/ml.

Tabell 6.16 ICH₅₀-verdiene for råekstraktene av stammebarken og BPII. Alle konsentrasjonene av ekstraktene hadde høyere enn 50 % hemming av hemolyse.

Ekstrakt	ICH ₅₀ -verdi (µg/ml)
FIK-S-50%EtOH	> 0,49
FIK-S-50	>0,49
FIK-S-100	>0,49
BPII	4,5

Råekstraktet fra stammebarken ble fortynnet til seks konsentrasjoner mellom 0,49 µg/ml og 500 µg/ml. Positiv kontroll BPII var fortynnet i seks fortyntninger mellom 0,21 µg/ml og 125 µg/ml (se seksjon 5.5.1). Råekstraktene av stammebarken viste svært høy komplementfikserende aktivitet. Det ble derfor valgt å ekskludere de øverste konsentrasjonsplottene på grafen slik at man lettere kunne se grafen for de lavere konsentrasjonene. Ingen av råekstraktene krysset 50 % hemming av hemolyse. Det vil si at ICH₅₀-verdien var under 0,49 µg/ml. ICH₅₀-verdien til BPII er her 4,52 µg/ml. Normalt pleier ICH₅₀- verdien å være mellom 10-30 µg/ml. Verdien ligger utenfor dette området, men resultatene viste likevel en trend på at alle råekstraktene var aktive og interessante å jobbe videre med.



Figur 6.7 Komplementfikserende aktivitet for råekstraktene fra rotbarken og BPII. Konsentrasjonen er oppgitt i µg/ml.

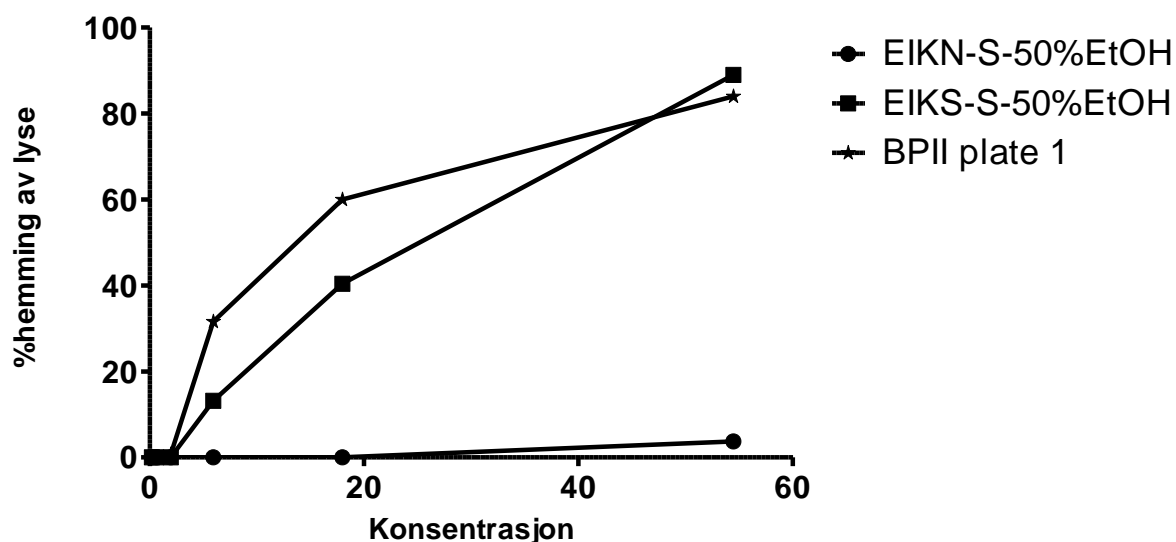
Tabell 6.17 ICH₅₀-verdiene for råekstraktene av rotbarken og BPII.

Ekstrakt	ICH ₅₀ -verdi (µg/ml)
FIK-R-50%EtOH	14,1
FIK-R-50	0,8
FIK-R-100	4,5
BPII	13,9

Konsentrasjonen for råekstraktene fra rotbark og BPII ble testet for komplementfikserende aktivitet i seks fortyndninger mellom 0,2 og 54,5 µg/ml (se seksjon 5.5.1). (Disse fortyndningene ble brukt i alle testenes beskrevet videre.) FIK-R-50%EtOH har nesten tilsvarende aktivitet som BPII her. I annen komplementtest utført på samme fraksjon viser den høyere aktivitet, mens de andre fraksjonene viser lignende ICH₅₀-verdi som i tabell 6.10.

Resultatene etter ionebytterkromatografi

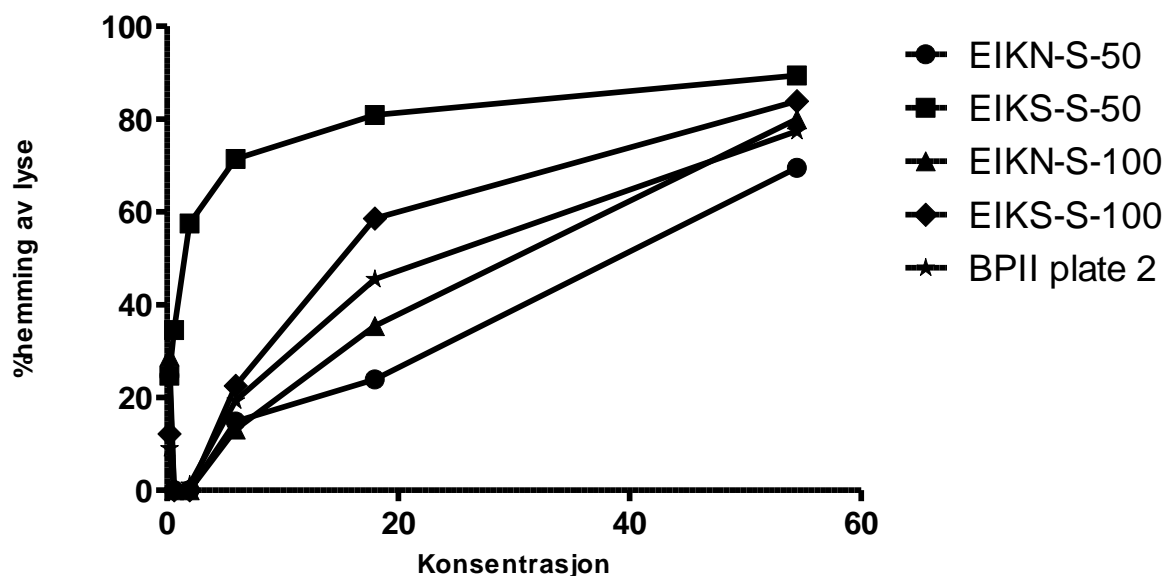
Resultatene for de nøytrale og sure fraksjonene fra stammebarken, etter ionebytterkromatografi, er vist i figur 6.8 og figur 6.9. ICH₅₀-verdiene for de samme grafene er vist i tabell 6.18 og 6.19.



Figur 6.8 Komplementfikserende aktivitet for den nøytrale og den sure fraksjonen isolert etter ionebytterkromatografi av 50% etanolekstraktet fra stammebarken. Konsentrasjonen er oppgitt i µg/ml.

Tabell 6.18 IC_{50} -verdier for den nøytrale og den sure fraksjonen fra 50 % etanolekstraktet (etter ionebytterkromatografi) og BPII.

Ekstrakt	IC_{50} -verdi ($\mu\text{g/ml}$)
EIKN-S-50%EtOH	54,45
EIKS-S-50% EtOH	25,1
BPII	13,7



Figur 6.9 Komplementfikserende aktivitet for de nøytrale og de sure fraksjonene isolert etter ionebytterkromatografi av 50°C vannekstraktet og 100 °C vannekstraktet fra stammebarken. BPII er også vist i figuren. Konsentrasjonen er oppgitt i $\mu\text{g/ml}$.

Tabell 6.19 IC_{50} -verdier for de nøytrale og sure fraksjonene fra 50°C vannekstraktet, 100 °C vannekstraktet (etter ionebytterkromatografi) og BPII.

Ekstrakt	IC_{50} -verdi ($\mu\text{g/ml}$)
EIKN-S-50	39
EIKS-S-50	1,69
EIKN-S-100	30
EIKS-S-100	14,9
BPII	23

Resultatene av komplementtesten utført på fraksjonene fra stammebarken, etter ionekromatografi, viste en klar trend mot at de sure polysakkaridene (EIKS-S-50%EtOH, EIKS-S50 og EIKS-S-100) var mer biologisk aktive enn de nøytrale polysakkaridene (EIKN-

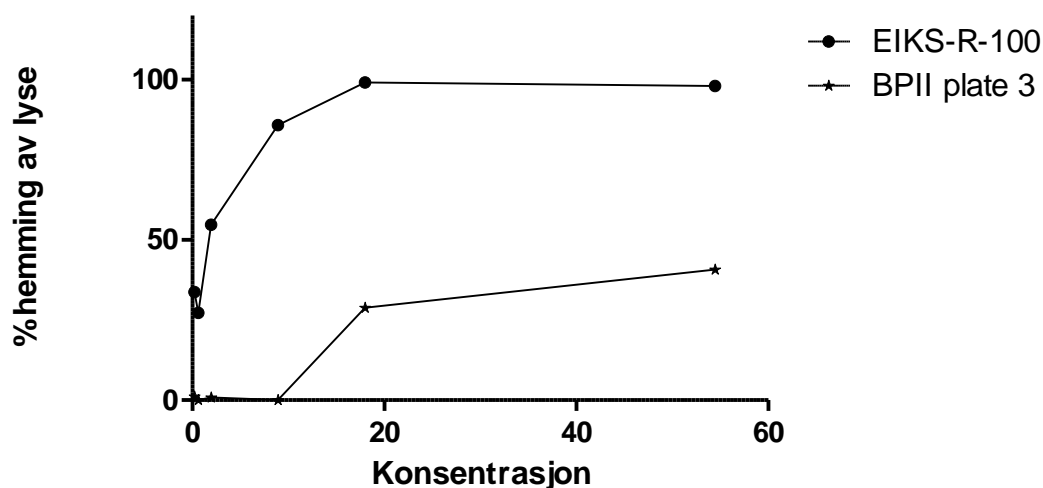
S-50%EtOH, EIKN-S-50 og EIKN-S-10). EIKS-S-50 og EIKS-S-100 har lavere ICH₅₀-verdi enn BPII, som tyder på høyere komplementfikserende aktivitet enn standarden.

Figur 6.8 og tabell 6.18 viser at EIKS-S-50% EtOH har lavere aktivitet enn BPII.

Sammenligner man ICH₅₀-verdien til BPII fra mikrotiterplate i tabell 6.18 med den i tabell 6.19 ser man at verdiene er ulike. Dette kan skyldes følsomheten i biologiske systemer.

ICH₅₀-verdi for standarden fra mikrotiterplaten i tabell 6.19 er nærmest lik ICH₅₀-verdien til EIKS-S-50%EtOH på mikrotiterplaten fra tabell 6.18. På grunn av denne usikkerheten i metoden ble det valgt å jobbe videre også med EIKS-S-50%EtOH.

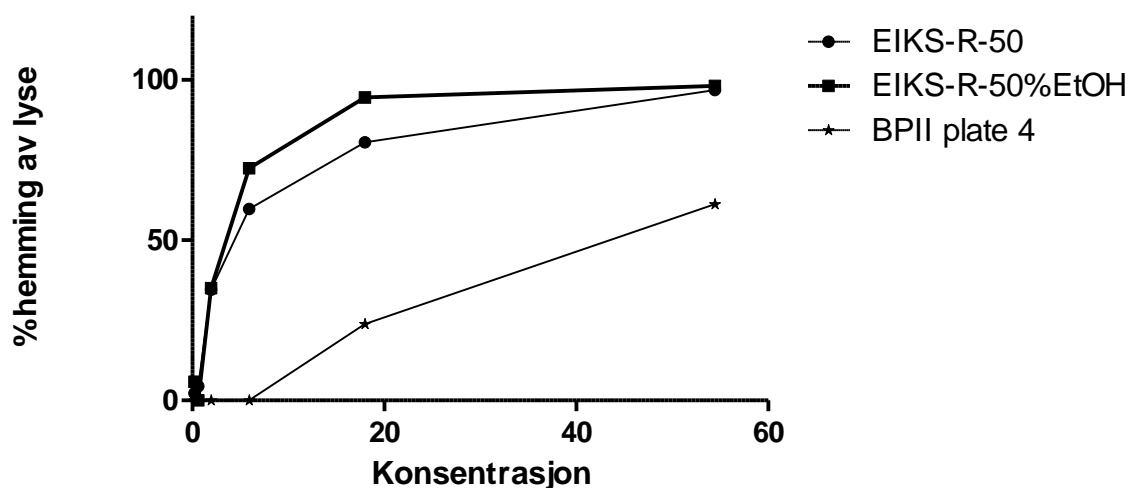
De sure fraksjonene fra rotbarken, etter ionebytterkromatografi, viste alle lavere ICH₅₀-verdi enn BPII, som tyder på bedre komplementfikserende aktivitet. Resultatene er vist i 6.10 og 6.11, samt tabell 6.20 og 6.21.



Figur 6.10 Komplementfikserende aktivitet for den sure fraksjonen isolert etter ionebytterkromatografi av 100 °C vannekstraktet fra rotbarken. BPII er også vist i figuren. Konsentrasjonen er oppgitt i µg/ml.

Tabell 6.20 ICH₅₀-verdi (µg/ml) for den sure fraksjonen isolert etter ionebytterkromatografi av 100 °C vannekstraktet fra rotbarken, og BPII.

Ekstrakt	ICH ₅₀ -verdi (µg/ml)
EIKS-R-100	1,8
BPII	>54,5



Figur 6.11 Komplementfikserende aktivitet for de sure fraksjonene isolert etter ionebytterkromatografi av 50% etanolekstraktet og 50 °C vannekstraktet fra rotbarken. BPII er også vist i figuren. Konsentrasjonen er oppgitt i µg/ml.

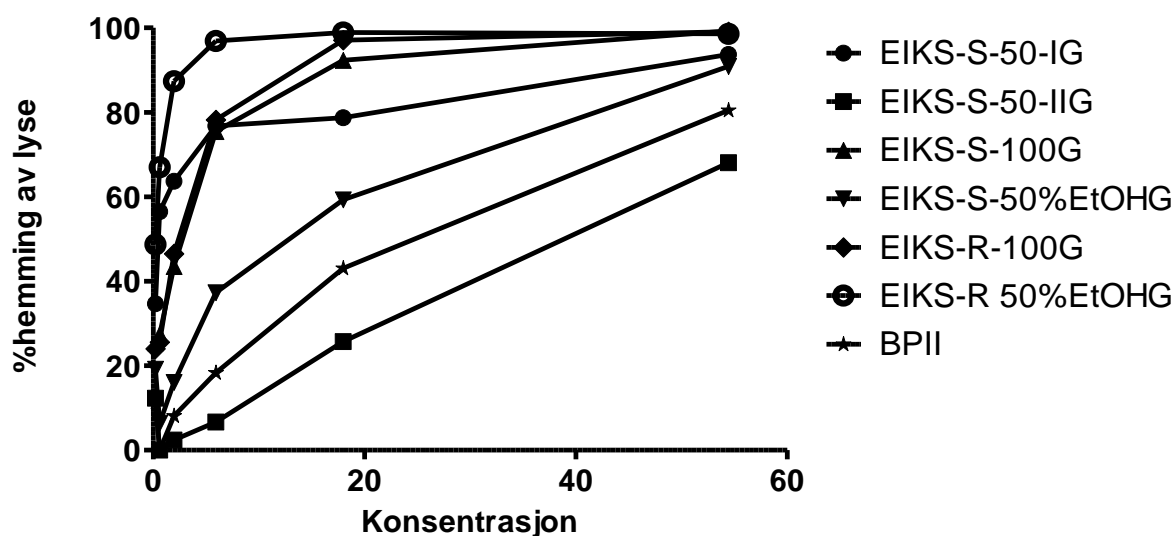
Tabell 6.21 ICH₅₀-verdi (µg/ml) for de sure fraksjonene isolert etter ionebytterkromatografi av 50% etanolekstraktet og 50 °C vannekstraktet fra rotbarken og BPII.

Ekstrakt	ICH ₅₀ -verdi (µg/ml)
EIKS-R-50%EtOH	3,4
EIKS-R-50	4,4
BPII	43,6

For de sure fraksjonene fra rotbarken (EIKS-R-50%EtOH, EIKS-R-50 og EIKS-R-100) ble komplementtesten bare utført en gang. Fraksjonene fra stammebarken ble testet minst 2 ganger med tilsvarende resultater som vist her.

Resultatene etter gelfiltrering

Etter gelfiltrering var det for lite utbytte av EIKS-R-50G til at komplementfikseringstesten kunne utføres. De andre fraksjonene som ble identifisert etter gelfiltrering ble testet. Alle fraksjonene bortsett fra EIKS-S-50IIG viste høyere aktivitet enn BPII. Resultatene er vist i figur 6.12 og tabell 6.22.



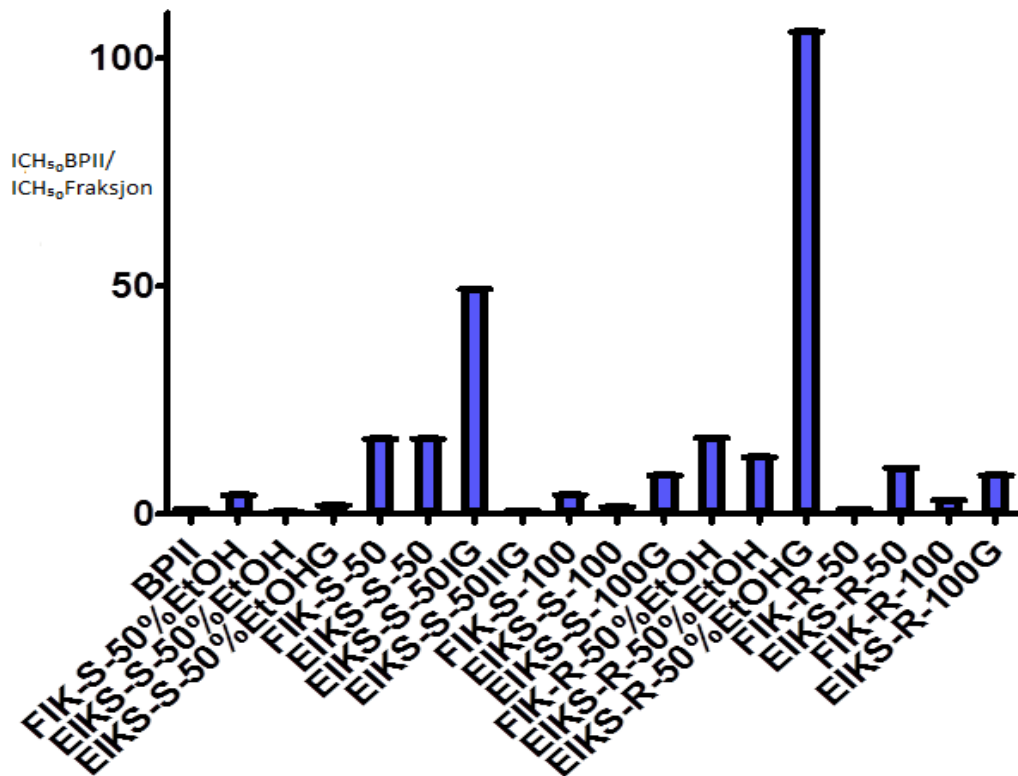
Figur 6.12 Komplementfikserende aktivitet for de gelfiltrerte fraksjonene isolert av 50% etanolekstrakt, 50°C vannekstraktet og 100 °C vannekstraktet fra både stammebark og rotbark. BPII er også vist i grafen. Konsentrasjonen er oppgitt i µg/ml.

Tabell 6.22 ICH₅₀-verdier for de gelfiltrerte fraksjonene av 50 % etanolekstraktet, 50°C vannekstraktet og 100 °C vannekstraktet fra både stammebarken og rotbarken, samt den positive kontrollen BPII.

Ekstrakt	ICH ₅₀ -verdi (µg/ml)
EIKS-S-50%EtOHG	12,6
EIKS-S-50IG	0,5
EIKS-S-50IIG	38,9
EIKS-S-100G	2,9
EIKS-R-50%EtOHG	0,2
EIKS-R-100G	2,3
BPII	24,7

I figur 6.12 og tabell 6.22 er en oversikt over ICH₅₀-verdiene til alle fraksjonene sammenlignet med ICH₅₀-verdien for BPII fra samme mikrotiterplate. EIKS-R-100 er ikke tatt med fordi BPII fra samme mikrotiterplate ikke krysset ICH₅₀. Dette kan tyde på at resultatene fra denne mikrotiterplaten ikke er troverdige. ICH₅₀ verdiene for de andre fraksjonene på samme plate viste derimot lignende resultater som i tidligere forsøk utført på samme fraksjoner. Det antas derfor at ICH₅₀-verdien som er oppgitt i tabell 6.13 er representativ.

I figur 6.13 er det laget et søyle-diagram over den komplementfikserende aktiviteten til alle fraksjonene sammenlignet med aktiviteten til BPII. IC_{50} -verdien til BPII er delt på IC_{50} -verdien til fraksjonene. Verdiene for hver enkelt søyle er oppgitt i tabell 6.23.



Figur 6.13 IC_{50} -verdi for alle fraksjonene sammenlignet med IC_{50} -verdi for BPII fra tilhørende mikrotiterplate.

Tabell 6.23 ICH_{50} -verdi for alle fraksjonene sammenlignet med ICH_{50} -verdi for BPII fra tilhørende mikrotiterplate.

Fraksjon	$ICH_{50}BPII/ICH_{50}$ fraksjon
BPII	1
FIK-S-50%EtOH	4,1
EIKS-S-50%EtOH	0,6
EIKS-S-50%EtOHG	2
FIK-S-50	16,5
EIKS-S-50	16,5
EIKS-S-50IG	49,4
EIKS-S-50IIG	0,6
FIK-S-100	4,3
EIKS-S-100	1,6
EIKS-S-100G	8,5
FIK-R-50%EtOH	16,7
EIKS-R-50%EtOH	12,5
EIKS-R-50%EtOHG	106
FIK-R-50	1
EIKS-R-50	10,1
FIK-R-100	3,1
EIKS-R-100G	8,5

Resultatene viser at EIKS-R-50%EtOHG er den mest potente fraksjonen, hele 106 ganger mer aktiv enn BPII. Bare EIKS-S-50%EtOH og EIKS-S-50IIG viste lavere aktivitet enn BPII.

Av stammebarkekstraktene viste fraksjonene fra 50 °C vannekstraktet seg mest aktive sammenlignet med fraksjonene fra de andre ekstraktene. Fraksjonene fra 50 % etanolekstraktet var mest aktive av fraksjonene fra rotbarkekstraktene.

Etter gelfiltrering viste alle fraksjonene, bortsett fra EIKS-S-50%EtOHG, bedre komplementfikserende aktiviteten sammenlignet med fraksjonene før. Det kan tyde på en vellykket oppkonsentrering av sure bioaktive polysakkarider. Etter ionekromatografi viste derimot flere av fraksjonene lavere komplementfikserende aktivitet enn rækstraktene før ionebytterkromatografi. Dette kan tyde på at noen aktive komponenter i ekstraktet har blitt ekskludert ved ionebytterkromatografi. Det kan være stoffer som er aktive i komplementsystemet, men som ikke er polysakkarider.

Som beskrevet i innledningen har innhold av hairy region med AG-II vist å ha sammenheng med biologisk aktivitet. EIKS-R-50%EtOHG var den fraksjonen som viste best

komplementfikserende aktivitet og var også en av fraksjonene som tilsynelatende inneholdt mest forgreinde AG-II strukturer . EIKS-S-50IIG er den fraksjonen som tilsynelatende inneholder minst AG-II og det var også denne fraksjonen som viste dårligst komplementfikserende aktivitet. Denne sammenhengen ses ikke for alle fraksjonene.

Forgreininger i galakturonanområdene kan nedregulere aktiviteten til hairy region. Resultatene fra GC-MS kan tyde på at EIKS-S-50IIG inneholder xylanstrukturer. Kanskje kan dette ha bidratt til at EIKS-S-50IIG viste dårligere komplementfikserende aktivitet enn de andre fraksjonene. Polysakkaridene i denne fraksjonen var også de med lavest estimert molekylvekt. Som nevnt i innledningen av oppgaven kan molekylstørrelse ha betydning for biologisk aktivitet. Kanskje kan den lave molekylvekten ha noe å si for den komplementfikserende aktiviteten.

Resultatene viser at alle rækstraktene er like potente eller mer potente enn BPII. 50 °C vannekstrakt av stammebarken er det mest aktive rækstraktet fra stammebarken. Av ekstraksjonene gjort fra rotbarken, viste 50 % etanolekstraktet seg som det mest aktive. For å optimalisere bruken i tradisjonell behandling blant healere vil det være enklest å bruke vannekstrakt. Etanol kan være vanskeligere å få tilgang til, er dyrere og mer kontroversiell å bruke i mange kulturer. De gelfiltrerte fraksjonene viste seg å være betraktelig mer potente enn rækstraktene, men gelfiltrering en omfattende prosess som krever store mengder utstyr, samtidig som det gir lite fraksjonsutbytte. Å bruke stammebarken fremfor rotbarken vil også være en fordel da fjerning av rotbark forbindes med mer ødeleggelse på planten enn fjerning av stammebarken. Man må likevel være oppmerksom på at fjerning av for mye av stammebark kan føre til at planten ikke overlever.

7. Konklusjon

Målet med oppgaven var å utføre struktur- og aktivitetsstudier på polysakkarider isolert fra rotbarken og stammebarken til medisinsplanen *Erythrina senegalensis*. Polysakkaridene skulle først isoleres, og deretter undersøkes for karbohydratinnhold, struktur og biologisk aktivitet relatert til immunsystemet.

Plantematerialene ble ekstrahert med 50 % etanol, 50°C vann og 100 °C vann. Råekstraktene fra *E. senegalensis* ble testet for komplementfikserende aktivitet. Alle råekstraktene fra både rotbark og stammebark viste lik eller høyere komplementfikserende aktivitet enn den positive kontrollen BPII. FIK-S-50 og FIK-R-50%EtOH var mest potente.

Råekstraktene ble opprenset ved ionebytterkromatografi med ANX Sepharose 4 Fast Flow. De nøytrale og sure fraksjonene fra stammebarken ble testet for komplementfikserende aktivitet. De sure fraksjonene viste seg klart mer aktive enn de nøytrale. Bare de sure fraksjonene fra rotbarkekstraktene ble testet. Bortsett fra EIKS-S-50%EtOH viste alle de sure fraksjonene høyere komplementfikserende aktivitet enn BPII. Flere av fraksjonene viste derimot lavere aktivitet enn råekstraktene. Det kan tyde på at aktive komponenter i ekstraktet har blitt ekskludert ved ionebytterkromatografi.

De sure fraksjonene ble ytterligere separert etter molekylstørrelse på en HiLoad Superdex 16/600 200 kolonne og deretter testet for komplementfikserende aktivitet. Alle de gelfiltrerte fraksjonene bortsett fra EIKS-S-50IIG viste høyere aktivitet enn BPII. Bare EIKS.S-50IIG og EIKS-S-50%EtOHG viste lavere aktivitet enn råekstraktene. EIKS-R-50%EtOHG fra rotbarken var mest potent, med 106 ganger så høy antikomplementær aktivitet som BPII. EIKS-S-50IG fra stammebarken var også svært potent med 49 ganger høyere komplementfikserende aktivitet enn BPII.

Karbohydratanalysene og bindingsforholdene viste at alle fraksjonene inneholdt monosakkarider som er typiske for pektiner. EIKS-S-50IIG, EIKS-R-50G og EIKS-R-100G inneholder trolig størst områder med rhamnogalakturonaner og homogalakturonaner. Monosakkaridfordelingen tydet på at fraksjonene fra rotbarken inneholdt mer homogalakturonaner, såkalt smooth regions, enn fraksjonene fra stammebarken. Undersøkelse av bindingsforholdene viste at alle fraksjonene, bortsett fra EIKS-R-100G, hadde lite innhold av RG-1. Områdene så derimot ut til å være tett forgrenet. Alle fraksjonene har bindingstyper

som tyder på innhold av AG-II, men EIKS-S-50%EtOH og EIKS-R-50% EtOH utmerker seg med høyest innhold. AG-II har vist sammenheng med biologisk aktivitet i tidligere studier. For fraksjon EIKS-R-50%EtOHG kan det være en sammenheng, da denne fraksjonen viste best komplementfikserende aktivitet og inneholdt tilsynelatende mest AG-II. EIKS-S-50IIG var den fraksjonen som tilsynelatende inneholdt minst AG-II og var også denne fraksjonen som viste dårligst komplementfikserende aktivitet. For flere av de andre ekstraktene finner man ikke denne sammenhengen.

Resultatene fra komplementfikseringstestene viste at fraksjonene fra både rotbarken og stammebarken av *E.senegalensis* er svært interresante å jobbe videre med. Det bør utføres flere forsøk relatert til struktur- og aktivitetsforhold. FIK-S-50 og FIK-R-50%EtOH var de mest potente råekstraktene og disse ekstraktene vil være mest aktuelle å jobbe videre med mot en eventuell improved traditional medicine. FIK-S-50 fra stammebarken vil være den enkleste metoden da det benyttes vann. Bruk av stammebarken vil også være mer gunstig for en bærekraftig høsting av plantemateriale enn bruk av rotbarken.

.

8. Forslag til videre arbeid

- Komplementfikseringstesten som er utført i denne oppgaven har gitt informasjon om at samtlige av fraksjonene har komplementfikserende aktivitet, men forteller ikke om polysakkaridene er inhiberende eller aktiverende på komplementsystemet. For at planten skal være effektiv i behandling av Malaria er det viktig at planten er immunstimulerende. Ved eventuell videre studier på fraksjonene er dette noe som bør forskes på.
- Lignende polymerstrukturer som har vist aktivitet i komplementsystemet har vist effekter på makrofager, T-lymfocytter og NK celler. Det hadde vært interessant å utføre tester på fraksjonene fra denne oppgaven for å se etter slike aktiviteter.
- Stammebarken og roten er oppgitt som mest brukt i de etnofarmakologiske studiene som er utført på *E.senegalensis*. Hvis ikke høsting av rot og bark skjer på riktig måte står planten i fare for og utryddes hvis forbruket blir stort. Det kunne derfor vært nyttig å se nærmere på bladene fra *E.senegalensis* for å se om også disse kan inneholde aktive polysakkarider. Bladene kan høstes hele året og høstingen vil ikke påvirke veksten av planten.
- EIKS-R-50 viste lovende resultater i komplementfikseringstesten. Den ble applisert på gelfiltreringskolonne, men gav lite utbytte. På grunn av lite tid ble det ikke gjort en ny applisering. Det kunne vært interessant å gelfiltrere fraksjonen på nytt for å teste den komplementfikserende aktiviteten og utføre GC-MS.
- Enzymdegradering, Yariv-test og kolorimetrisk tester kunne blitt utført for å få vite mer om den strukturelle oppbygningen til polysakkaridene. Etter enzymdegradering kunne fraksjonene testes for komplementfikserende aktivitet i et forsøk på å kartlegge bioaktive strukturer.
- De sure fraksjonene fra ekstraktene fra rotbarken (EIKS-R50%EtOH, EIKS-R-50 og EIKS-R-100) ble bare testet én gang for komplementfikserende aktivitet. For at resultatene skal bli mer troverdige, bør testen utføres flere ganger for disse fraksjonene.

9. Referanseliste

- Ajaiyeoba, E., Ashidi, J., Abiodun, O., Okpako, L., Ogbole, O., Akinboye, D., Falade, C., Bolaji, O., Gbotosho, G., Falade, M., Itiola, O., Houghton, P., Wright, C., Oduola, A. (2004). Antimalarial ethnobotany: In vitro antiplosmodial Activity of Seven Plants Identified in the Nigerian Middle Belt. *Pharmaceutical Biology* 42, 588
- Alban, S. Classen, B., Brunner, G., Blaschek, W. (2002). Differentiation between the complement modulating effects of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin. *Planta medica*, 68(12), 1118.
- Atawodi, S. (2003). Occurrence of preformed volatile nitrosamines in preparations of some Nigerian medicinal plants: a preliminary report. *Food and chemical toxicology*, 41(4), 551.
- Atindehou, K.K., Schmid, C., Brun, R., Kone, M.W., Traore, D. (2004). Antitrypanosomal og antiplamodial activity of medicinal plants from Cote d`Ivoire. *Journal of Etnopharmacology*, 90(2-3), 221.
- Bae, E.Y., Na, M., Njamen, D., Mbafor, J.T., Fomum, Z.T., Cui, L., Choung, D.H., Kim, B.Y., Oh, W.K., Ahn, J.S. (2006). Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by prenylated isoflavonoids isolated from the stem bark of *Erythrina addisoniae*. *Planta medica*, 72(10), 945.
- Beentje, H. *Erythrina senegalensis* (coral tree). Royal Botanic Gardens, Aksessert 25.09. 2012, fra <http://www.kew.org/plants-fungi/Erythrina-senegalensis.htm>
- Berglind , P. (2007). A modified method for methylation analysis of lichen polysaccharides using formolysi. Abstrakt fra poster ved Nordic Natural Products Conference 2007, Island.
- Biermann, C. J., McGinnis, G. D. (1989). *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*: CRC PressI Llc.
- Bio-Rad Laboratories. (2013). Chelex 100 og Chelex 20 Chelatin Ion, Exchange Resin, Instruction Manual CA 94547
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosy: Phytochemistry Medicinal Plants, Second Edition*.
- Burkill, H. M. (1985). The usefull plants of West Tropical Africa Bind 3. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Chambers, R., Clamp, J. (1971). An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials. *Biochemical Journal*, 125(4), 1009.
- Ciucanu, I., Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131(2), 209-217.

- Dastidar, S.G., Mannaa, A., Kumara, K., Mazumdara, K., Duttaa, N.K., Chakrabarty, A.N., Motohashic, N., Shiratakid, Y., (2004). Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *International journal of antimicrobial agents*, 23(1), 99.
- Davidson College. (2006). C3: Complement Opsonin and Inflammatory Mediator. Aksessert 10.04.2013, fra <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Immunology/Students/spring2006/Finley/C3.html>
- Den store danske.(2013). Komplementsystemet. Aksessert 09.04, 2013, fra http://www.denstoredanske.dk/Krop,_psyke_og_sundhed/Sundhedsvidenskab/Immunologi/komplementsystemet
- Det matematisk- naturfaglige fakultet. (2011). Amylase. Aksessert 30.04.2013, fra <http://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/a/amylase.html>
- Donfack, J.H., Nico, F.N., Ngameni, B., Tchana, A., Chuisseu, P.D., Finzi, P.V., Ngadjui, B.T., Moundipa, P.F. (2008). In vitro hepatoprotective and antioxidant activities of diprenylated isoflavonoids from *Erythrina senegalensis* (Fabaceae). *Asian Journal of Traditional Medicines*, 3(5), 172.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Folkehelseinstituttet (2012) Interne papirer om prosedyre og prinsipp for komplementtest, (2012), Oslo
- Folkers, K., Shavel, J., Koniuszy, F. (1941). Erythrina alkaloids. X. Isolation and characterization of erysonine and other liberated alkaloids. *Journal of the American Chemical Society*, 63(6), 1544.
- Fomum, Z.T., Ayafor, J.F., Wandji, J. (1985). Erythrina studies. Part 4. Erythrisenegalone, a prenylated-flavanone from *Erythrina senegalensis*. *Phytochemistry*, 24(12), 3075.
- Fomum, Z.T., Ayafor, J. F., Ifeadike, P.N., Nkengfack, A.E og Wandji, J. (1986a). Erythrina studies 3. Isolation of an isoflavone from *Erythrina senegalensis* and *Erythrina excelsa*. *Planta Medica*: 341.
- Fonum, Z.T., Ayafor, J., F., Wandji, J., Gana Fomban, W. og Nkengfack, A., E (1986b). Erythrininate, an ester from three Erythrina species. *Phytochemistry*, 25, 757
- Fomum, Z.T., Ayafor, J.F., Wandji, J. (1987). Erythrina studies. Part 10. Senegalensein, a novel prenylated flavanone from *Erythrina senegalensis*. *Journal of natural products*, 50(5), 921.
- GE Healthcare.(2013). ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub), Instructions 71-5017-28 AC
- Greibrokk, T., Lundanes, E., Rasmussen, K. E., Karlsen, J. (1994). *Kromatografi- Separasjon og deteksjon*. Oslo: Universitetsforlaget AS

- Guo, R.F., Word, P.(2005). Role of C5a in inflammatory responses. *Annual review of immunology*, 23(1), 821.
- Han, X., Hong, S.S., Hwang, J.S., Jeong, S.H., Hwang, J.H., Lee, M.H., Lee, M.K., Lee, D., Ro, J.S., Hwang, B.Y. (2005). Monoamine oxidase inhibitory constituents from the fruits of *Cudrania tricuspidata*. *Archives of pharmacal research*, 28(12), 1324.
- Hokputsa, S., Gerritb, W., Pongsamart, S., Inngjerdingen, K.T., Heinzed, T., Koschellad, A., Hardinga, S.E., Paulsen, B.S. (2004). Water-soluble polysaccharides with pharmaceutical importance from *Durian rinds* (*Durio zibethinus* Murr.): isolation, fractionation, characterization and bioactivity. *Carbohydrate polymers*, 56(4), 471.
- Hedding, B. (2007). *Erythrina senegalensis*- En medisiplante fra Mal,i Del A: Identifisering av bioaktive komponenter i rotbark, Del B: Etnofamakologiske studier. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Hovedfagsoppgave i farmakognosi
- Hussain S.S. (2010). Struktur og aktivivtetsstudier på polysakkarider isolert fra *Hypoxis Hemerocallidea*. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Hovedfagsoppgave i farmakognosi
- Iinuma, M., Okawa, Y., Tanaka, T., Ho, F.C., Kobayashi, Y., Miyauchi, K.I. (1994). Anti-oral microbial activity of isoflavonoids in root bark of *Ormosia monosperma*. *Phytochemistry*, 37(3), 889
- Inngjerdingen, K.T. (2000.) Sårhelende planter i Mali, A: Videre studier over *Glinus oppositifolus*. B: Feltarbeid i Dogonland og Sikasso. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Hovedfagsoppgave i farmakognosi
- Inngjerdingen, K.T. (2007.) Bioactive pectic polymers from Malian medicinal plants. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Doktorgradavhandling
- Itoigawa, M. (2002). Cancer chemopreventive activity of flavanones on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer letters*, 176(1), 25.
- Janeway CA, Traver P, Walport M, Shlomchik MJ. (2005). Immunobiology. 6th Edition. New Yourk: Garland Science
- Kim, J.B., Carpita, N.C., (1992), "Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles", *Plant Physiology* 98, 646-653
- Kiyohara, H., Yongwen Z., Yamada H. (1997). Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. Part XIV. Effect of exo- β -D-(1 \rightarrow 3)-galactanase digestion on complement activating activity of neutral arabinogalactan unit in a pectic arabinogalactan from roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydrate polymers*, 32(3/4), 249.
- Koné, W. M., Atindehou, K. K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traoré, D., Dosso, M. (2004) Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, s. 43-49.

- Konè, W. M., Atindehou, K. K., Kacou-N'douba, A., Dosso, M., Kone, W. M. (2006). Evaluation of 17 medicinal plants from Northern Côte- d'Ivoire for their in vitro activity against *Streptococcus pneumoniae*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 4(1), 17-22.
- Lea, T., (2000). Basal og klinisk immunologi-prinsipper for molekylære mekanismer, Løselige molekyler og naturlig immunitet, Fagforlaget, Vigmostad & Bjørke AS, Bergen, s25-38
- Lee, J., Oh, W.K., Ahn, J.S., Kim, Y.H., Mbafor, J.T., Wandji, J., Fomum, Z.T. (2009). Prenylisoflavonoids from *Erythrina senegalensis* as novel HIV-1 protease inhibitors. *Planta medica*, 75(03), 268
- Magassouba, F.B., Diallo, A., Kouyaté, M., Mara, F., Mara, O., Bangoura, O., Camara, A., Traoré, S., Diallo, A.K., Zaoro, M., Lamah, K., Diallo, S., Camara, G., Traoré, S., Kéita, A., Camara, M.K., Barry, R., Kéita, S., Oularé, K., Barry, M.S., Donzo, M., Camara, K., Toté, K., Berghe, D.V., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Baldé, A.M. (2007). Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 114(1), 44.
- Marshall Science (2013) Alpha Amylase. Aksessert 20.04. 2013, fra http://science.marshall.edu/murraye/alpha_amylase.htm
- Matsuda, H. Yoshida, K., Miyagawa, K., Asao, Y., Takayama, S., Nakashima, S., Xu, F., Yoshikawa, M. (2007). Rotenoids and flavonoids with anti-invasion of HT1080, anti-proliferation of U937, and differentiation-inducing activity in HL-60 from *Erycibe expansa*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(3), 1539.
- Maydell, H.J. (1990). Trees and shrubs of the Sahel: their characteristics and uses Bind 1. Wikersheim, Verlag Josef Margraf.
- Michaelsen, T.E., Gilje, A., Samuelsen, A.B., Høgåsen, K., Paulsen, B.S. (2000). Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian journal of immunology*, 52(5), 483.
- Nergård, C.S. (2005). Immunomodulating Pectic Polymers, A: An Ethnopharmacological Survey of Wound Healing Plants used in Mali, West-Africa, B: Structures and Immunological Studies of Polysaccharides from Wound Healing Plants. Doktoravhandling, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo
- Nergard, C. S., Kiyohara, H., Reynolds, J.(2006). Structures and Structure-Activity Relationships of Three Mitogenic and Complement Fixing Pectic Arabinogalactans from the Malian Antiulcer Plants *Cochlospermum tinctorium* A. Rich and *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. *Biomacromolecules*, 7(1), 71.
- Njayou, F., Moundipa, P.F., Tchana, A.N., Ngadjui, B.T., Tchouanguep, F.M (2008). Inhibition of microsomal lipid peroxidation and protein oxidation by extracts from plants used in Bamun Folk Medicine (Cameroon) against hepatitis. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 5(3), 278.

- Nkengfack, A.E., Azebaze, A.G., Waffo, A.K., Fomum, Z.T., Meyer, M., van Heerden, F.R. (2001). Cytotoxic isoflavones from *Erythrina indica*. *Phytochemistry*, 58(7), 1113.
- Norsk helseinformatikk- for helsepersonell. (2010). Immunsystemet-Immunforsvaret. Aksessert 10.05.2013, fra <http://nhi.no/livsstil/livsstil/diverse/immunsystemet-29146.html>
- Oh, W.K., Lee, H.S., Kim, B.Y, Chang, H.K, Kim, Y.H., Wandji, J., Mbafor, J.T., Fomum, Z.T. , Ahn, J.S. (1998). Inhibition of phospholipase C activity by auriculatin and 8-prenylluteone isolated from *Erythrina senegalensis*. *PTR. Phytotherapy research*, 12(1), 9.
- Oh, W.K., Kim, B.Y., Oh, H., Kim,B.B, Ahn, J.S. (2005). Phospholipase C γ 1 inhibitory activities of prenylated flavonoids isolated from *Erythrina senegalensis*. *Planta medica*, 71(8), 780.
- Oh, W. (2009). Diacylglycerol acyltransferase-inhibitory compounds from *Erythrina senegalensis*. *Archives of pharmacal research*, 32(1), 43.
- Oh, W.K., Lee, H.S., Ahn, S.C., Ahn.J.S., Mbafor, J.T., Wandji.J, Fomum, Z.T., Chang, H.K., Kim, Y.H. (1999). Prenylated isoflavonoids from *Erythrina senegalensis*. *Phytochemistry*, 51(8), 1147.
- Parham, O., (2009), "The immune system", Garland Science, Taylor & Francis Group, London
- Paulsen, B.S., Barsett, H. (2005). Polysaccharides I, Structure, Characterization and Use", *Bioactive pectic polysaccharides Polysaccharides* , Springer Verlagen Berlin Heidelberg
- Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E. (2004a). *Legemiddelanalyse, Gasskromatografi: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS.*
- Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E. (2004b). *Legemiddelanalyse, Eksklusjonskromatografi: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS.*
- Perez, S., Rodriguez-Carvajal, M.A., Doco, T. (2003). A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, 85(1/2), 109.
- Perrett, S., Whitfield, P.J., Sanderson, L., Bartlett, A. (1995). The plant molluscicide *Millettia thonningii* (Leguminosae) as a topical antischistosomal agent. *Journal of ethnopharmacology*, 47(1), 49.
- Reid, J. G. (1997). Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. *Plant biochemistry. Academic Press, London*, 205
- Saidu K, Onah. J., Orisadipe, A., Olusola, A., Wambebe, C., Gamaniel, K. (2000). Antiplasmodial, analgesic, and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the stem bark of *Erythrina senegalensis*. *Journal of ethnopharmacology*, 71(1-2), 275.

- Salvatore, M.J., King, A.B., Graham, A.C., Onishi, R.H., Bartizal, K.F., Abruzzo, G.K., Gill, C.J., Ramjit, H.G., Pitzenberger, S.M., Witherup, K.M. (1998). Antibacterial Activity of Lonchocarpol A. *Journal of natural products*, 61(5), 640.
- Sato, M., Tanaka, H., Oh-Uchi, T., Fukai, T., Etoh, H., Yamaguchi, R. (2004). Antibacterial activity of phytochemicals isolated from *Erythrina zeyheri* against vancomycin-resistant enterococci and their combinations with vancomycin. *PTR. Phytotherapy research*, 18(11), 906.
- Schols, H.A., Voragen, A.G.J., (2002). Pectins and their Manipulation. The chemical structure of pectins. Blackwell Publishing, CRC press, Oxford, s 10
- Store norske leksikon (2005-2007) Gelfiltrering. Aksessert 14.04.2013, fra <http://snl.no/gelfiltrering>
- Sturgeon, R. J. (1990). *Monosaccharides Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press Inc, San Diego, CA 92101.2: 4
- Taiz, L., Zeiger, E. (2002). Cell Walls: Structure, Biogenesis and Expansion. *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts, 3, 313
- Taylor, R.B., Corley, D.G., Tempesta, M.S., Fomum, Z.T., Ayafor, J.F., Wandji, J., Ifeadike, P.N. (1986). *Erythrina* studies. Part 7. 2,3-Dihydroauriculatin, a new prenylated isoflavanone from *Erythrina senegalensis*. Application of the selective INEPT technique. *Journal of natural products*, 49(4), 670.
- Theis, A. (2006). *Erythrina senegalensis* - en medisiplante fra Mali : undersøkelse av antifungale komponenter ; etnofarmakologiske studier. Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Hovedfagsoppgave i farmakognosi
- Togola, A., Diallo, D., Dembèle, S., Barsett, H., Paulsen, B.S. (2005). Ethnopharmacological survey of different uses of seven medicinal plants from Mali, (West Africa) in the regions Doila, Kolokani and Siby. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 1(1), 7.
- Togola, A., Austarheim I, Theis, A., Diallo, D., Paulsen, B.S. (2008). Ethnopharmacological uses of *Erythrina senegalensis*: a comparison of three areas in Mali, and a link between traditional knowledge and modern biological science. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 4(1), 6.
- Togola, A. Hedding, B., Theis, A., Wangenstein, H., Rise, F., Paulsen, B.S., Diallo, D., Malterud, K.E. (2009). 15-Lipoxygenase inhibitory effects of prenylated flavonoids from *Erythrina senegalensis*. *Planta medica*, 75(10), 1168.
- Togola A., A. I. (2011). "*Erythrina senegalensis* A.rich [FABACEAE]". Retrieved 25.09, 2012, from <http://www.mn.uio.no/farmasi/english/research/projects/maliplants/medicinal-plants/studied-in-norway/erythrina-senegalensis.html>

- UiO. (2012). Intern prosedyre for metanolyse og GC. Farmasøytisk Institutt, seksjon for farmakognosi, Universitetet i Oslo
- UiO. (2013). Intern prosedyre for Karboksylsyre-reduksjon, Metylering, Hydrolyse, Reduksjon og Acetylering. Farmasøytisk Institutt, seksjon for farmakognosi, Universitetet i Oslo
- Voragen, A.G.J., Daas, P.J.H., Schols, H.A. (2000). Enzymes as tools for structural studies of pectins. *Annual proceedings of the Phytochemical Society*, 44(Bioactive Carbohydrate Polymers), 129.
- Wagner, H. (1999). *Immunomodulatory Agents from Plants*", Birkhäuser Verlag
- Wandji, J., Nkenfack, A.E., Fomun, Z.T, Ubillas, R., Killday, K.B., Tempesta, M.S. (1990). A new prenylated isoflavone and long chain esters from two *Erythrina* species. *Journal of natural products*, 53(6), 1425.
- Wandji, J., Fomun, Z.T., Tillequin, F., Baudouin, G., Kock, M. (1994a). Part 27. Epoxyisoflavones from *Erythrina senegalensis*. *Phytochemistry*, 35(6), 1573.
- Wandji, J., Fomun, Z.T., Tillequin, F., Sequin, E., Kock, M. (1994b). *Erythrina* studies. Part 24. Two isoflavones from *Erythrina senegalensis*. *Phytochemistry*, 35(1), 245.
- Wandji, J., Skaltsounis, A.L., Tillequin, F., Koch, M., Fomun, Z.T. (1994c). *Erythrina* studies. Part 26. Erysenegalenseins H and I: two new isoflavones from *Erythrina senegalensis*. *Planta medica*, 60(02), 178.
- Wandji, J., Fomun, Z.T., Tillequin, F., Libot, F., Kock, M. (1995a). Erysenegalenseins B and C, two new prenylated isoflavanones from *Erythrina senegalensis*. *Journal of natural products*, 58(1), 105.
- Wandji, J., Awanchiri, S., Fomun, Z.T., Tillequin, F., Michel-Daniwicz, S (1995b). Prenylated isoflavonoids from *Erythrina senegalensis*. *Phytochemistry*, 38(5), 1309.
- Wandji, J., Awanchiri, S., Fomun, Z.T., Tillequin, F., Libot, F.(1995c). Isoflavones and alkaloids from the stem bark and seeds of *Erythrina senegalensis*. *Phytochemistry*, 39(3), 677.
- Wanjala, C. Juma, B.F., Bojase, G., Gashe, B.G., Majinda, R.R.T. (2002). Erythrinaline alkaloids and antimicrobial flavonoids from *Erythrina latissima*. *Planta medica*, 68(7), 640.
- Wikipedia. (2013). Cell Wall. Bilde av strukturen av en plantecellevegg, Aksessert 25.04.13, fra http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_wall
- WHO. (2013a). Malaria-Fact sheet N°94. Aksessert 05.04, 2013, fra <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>
- WHO. (2012). Trypanosomiasis, Human African (sleeping sickness)-Fact sheet N°259, Aksessert 05.04.2013, fra <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>

- WHO. (2013b). MDG 6: combat HIV/AIDS, malaria and other diseases. Aksessert 05.04. 2013, fra http://www.who.int/topics/millennium_development_goals/diseases/en/
- Witabouna, K.M., Kagoyire, K. A. (2008). West African plants and related phytochemicals with anti-multidrug-resistance activity. New strategies combating bacterial infection. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA* , s. 137-164
- Yamada, H., Nagai, T., Cyong, J.-C., Otsuka, Y., Tomoda, M., Shimizu, N., Gonda, R. (1986). Relationship between chemical structure and activating potencies of complement by an acidic polysaccharide, *plantago-mucilage A*, from the seed of *Plantago asiatica*. *Carbohydrate research*, 156, 137-145.
- Yamada, H., Kiyohara, H. (1999). Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. Immunomodulatory agents from plants. *Birkhäuser, Basel*, 161
- Yamada, H., Kiyohara, H. (2007). Immunomodulating activity of plant polysaccharide structures. *Comprehensive Glycoscience: From chemistry to systems Biology.*, 4, 663