

# Kjemisk og biologisk karakterisering av ekstrakter fra forskjellige typer løk, *Allium cepa* subsp.

*Gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)*

Anne Ragnhild Skogly



Masteroppgave

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det Matematisk-Naturvitenskapelige Fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

2009



**Kjemisk og biologisk karakterisering av  
ekstrakter fra forskjellige typer løk,  
*Allium cepa* subsp.**

*Gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)*

Masteroppgave

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det Matematisk-Naturvitenskapelige Fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Anne Ragnhild Skogly

2009

Veileder:

Hilde Barsett



## Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo og Folkehelseinstituttet.

Først vil jeg takke min veileder Hilde Barsett, for veldig god faglig og praktisk veiledning under arbeidet med masteroppgaven. Dette har vært et faglig inspirerende og minnerikt år.

Takk til Anne Cathrine Vestrheim, Hege Christensen, Siri Johannesen og Ellen Hanne Cohen for veiledning og hjelp ved utføring av ulike tester. Jeg vil også takke Terje E. Michaelsen for tilrettelegging av arbeid utført på Folkehelseinstituttet.

Atle Haugen fortjener en stor takk for god hjelp under utføring av gasskromatografisk analyse.

Takk til Ingunn M. Vågen for hjelp til å finne artikler.

Videre vil jeg takke Christina, Luan og alle andre medstudenter for et trivelig hovedfagsår og godt samarbeid. I tillegg vil jeg takke alle ansatte ved avdelingen for å ha bidratt til et fantastisk hovedfagsår.

Jeg vil også takke familie og venner for all støtte og oppmuntring gjennom alle studieårene.

En stor takk til Gunnar, for enestående støtte, tålmodighet og lange telefonsamtaler med oppmuntrende ord.

*Oslo, mai 2009*

*Anne Ragnhild Skogly*



# Innhold

<b>FORORD</b> .....	<b>5</b>
<b>INNHold</b> .....	<b>7</b>
<b>1. FORKORTELSER</b> .....	<b>13</b>
<b>2. SAMMENDRAG</b> .....	<b>19</b>
<b>3. INNLEDNING</b> .....	<b>21</b>
3.1 LØK, <i>ALLIUM CEPA</i> L. ....	21
3.1.1 Taksonomisk klassifisering .....	21
3.1.2 Botanikk og utbredelse.....	21
3.1.3 Myter og gammel folketro.....	22
3.1.4 <i>Innholdsstoffer</i> .....	22
Organiske svovelforbindelser .....	23
Flavonoider .....	24
Karbohydrater i løk .....	24
3.1.5 <i>Medisinske effekter</i> .....	25
Kreft .....	25
Kardiovaskulære sykdommer .....	25
Antioksidant effekt.....	26
Antidiabetisk effekt .....	26
Astma .....	26
Antibiotisk effekt.....	26
Prebiotisk effekt .....	26
Kommentar til de ulike studiene .....	27
3.2 POLYSAKKARIDER.....	28
3.2.1 <i>Generelt</i> .....	28

---

3.2.2	<i>Plantecelleveggen</i> .....	28
3.2.3	<i>Pektiner</i> .....	29
	Generelt om pektiner .....	29
	Homogalakturonan.....	30
	Rhamnogalakturonan I (RG-I) .....	30
	Rhamnogalakturonan II (RG-II) .....	30
	Arabinaner .....	31
	Galaktaner og arabinogalaktaner .....	31
	Arabinogalaktaner type I (AG-I).....	31
	Arabinogalaktaner type II (AG-II).....	31
3.2.4	<i>Biologisk og immunmodulerende aktivitet</i> .....	32
3.2.5	<i>Komplementsystemet</i> .....	32
3.2.6	<i>Cytokrom P-450 systemet</i> .....	33
<b>4.</b>	<b>OPPGAVENS MÅL</b> .....	<b>35</b>
<b>5.</b>	<b>METODER</b> .....	<b>37</b>
5.1	GENERELLE METODER .....	37
5.1.1	<i>Vannkvalitet</i> .....	37
5.1.2	<i>Innveiging av stoff</i> .....	37
5.1.3	<i>Volumreduksjon</i> .....	37
5.1.4	<i>Filtrering</i> .....	37
5.1.5	<i>Ultrafiltrering</i> .....	37
5.1.6	<i>Sentrifugering</i> .....	39
5.1.7	<i>Frysetørking</i> .....	39
5.1.8	<i>Syrevasking av utstyr</i> .....	39
5.1.9	<i>Dialyse</i> .....	40



---

5.1.10	<i>Fenol-svovelsyretest</i> .....	41
	EKSTRAKSJON AV LØK.....	43
5.1.11	<i>Ekstraksjon med diklormetan</i> .....	43
5.1.12	<i>Ekstraksjon med 96 % etanol</i> .....	44
5.1.13	<i>Ekstraksjon med 50 % etanol</i> .....	45
5.1.14	<i>Ekstraksjon med 50 °C vann</i> .....	46
5.1.15	<i>Ekstraksjon med 100 °C vann</i> .....	46
5.2	GELFILTRERING MED BIO-GEL P-6 POLYACRYLAMIDE GEL.....	47
	Bio-Gel P-6 Desalting Gel.....	47
5.3	IONEBYTTERKROMATOGRAFI MED ANX SEPHAROSE.....	49
	ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub).....	50
5.4	MONOSAKKARIDBESTEMMELSE.....	52
5.4.1	<i>Metanolyse</i> .....	52
	TMS-derivatisering.....	53
	Gasskromatografi (GC-FID).....	55
5.4.2	<i>Bestemmelse av fruktose og frukto-oligosakkarider</i> .....	56
5.5	BIOLOGISK AKTIVITET.....	57
5.5.1	<i>Komplementfikseringstest</i> .....	57
5.5.2	<i>Mikrosomforsøk med midazolam</i> .....	62
	LC-MS analyse.....	64
5.5.3	<i>Antimikrobiell aktivitet</i> .....	65
<b>6.</b>	<b>RESULTATER OG DISKUSJON</b> .....	<b>69</b>
6.1	EKSTRAKSJON, OPPRENSING OG ISOLERING AV POLYSAKKARIDER.....	69
6.1.1	<i>Ekstraksjon av løk</i> .....	70
6.1.2	<i>Isolering og opprensing av polysakkarider</i> .....	70

---

6.1.3	<i>Gelfiltrering: Bio-Gel P-6 DG</i> .....	71
6.1.4	<i>Ionebytterkromatografi: ANX Sepharose 4 Fast Flow</i> .....	73
6.2	MONOSAKKARIDBESTEMMELSE .....	76
6.2.1	<i>Monosakkaridinnhold i 50 % etanolekstrakter og gelfiltreringsfraksjoner</i> .....	77
6.2.2	<i>Monosakkaridinnhold i 50 °C vannekstrakter og fraksjoner fra gelfiltrering og ionebytterkromatografi</i> .....	78
	Kommentar til monosakkaridinnhold i 50 °C vannekstrakter og fraksjoner fra gelfiltrering og ionebytterkromatografi .....	79
6.2.3	<i>Monosakkaridinnhold i 100 °C vannekstrakter og fraksjoner fra gelfiltrering og ionebytterkromatografi</i> .....	80
	Kommentar til monosakkaridinnhold i 100 °C vannekstrakter og fraksjoner fra gelfiltrering og ionebytterkromatografi .....	81
6.3	BESTEMMELSE AV FRUKTOSE OG FRUKTO-OLIGOSAKKARIDER .....	82
6.4	BIOLOGISK AKTIVITET .....	86
6.4.1	<i>Komplementfikseringstest</i> .....	86
	Råekstrakter .....	86
	Gelfiltrering .....	88
	Ionebytter.....	90
	Gul løk (vanlig):.....	91
	Gul løk (mild):.....	92
	Rød løk: .....	94
	ICH <sub>50</sub> -verdier.....	94
	Sammenheng mellom monosakkaridinnhold og høy komplementfikerende aktivitet .....	96
	Kommentar til komplementfikseringstesten: .....	98
6.4.2	<i>Mikrosomforsøk med midazolam</i> .....	98
6.4.3	<i>Antimikrobiell aktivitet</i> .....	101

---

<b>7. KONKLUSJON.....</b>	<b>104</b>
<b>KILDELISTE.....</b>	<b>106</b>



## 1. Forkortelser

$\alpha$	Alfa posisjon: OH-gruppen ved C-1 er trans konfigurasjon til CH <sub>2</sub> OH-substituenten ved C-5
AG-I	Arabinogalaktan type I
AG-II	Arabinogalaktan type II
AgNO <sub>3</sub>	Sølvnitrat
Ara	Arabinose
$\beta$	Beta posisjon: OH-gruppen ved C-1 er cis konfigurasjon til CH <sub>2</sub> OH-substituenten ved C-5
BSA	Bovine Serum Albumin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CYP450	Cytokrom P450
d	diameter
D	D-sukker
Da	Dalton
DP	Grad av polymerisering
<i>E. coli</i>	<i>Escheria coli</i>
FID	Flammeionisasjonsdetektor
G+	Gram positiv
G-	Gram negativ
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsyre
GC	Gasskromatografi
GlcA	Glukuronsyre
Glu	Glukose
h	Høyde
HCl	Hydrogenklorid
HCOOH	Maursyre
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Svovelsyre
HMDS	Heksametyldisilasan
ICH <sub>50</sub>	Konsentrasjon som gir 50 % hemming av hemolyse
IgG	Immunoglobulin G

IgM	Immunoglobulin M
LC	Liquid Chromatography
L	L-sukker
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
Man	Mannose
MDZ	Midazolam
Me	Metyl
MeOH	Metanol
MS	Massespektrometer
Mw	Molekylvekt
MWCO	Molecular Cut Off: porestørrelse i dialyseslanger
NaCl	Natriumklorid
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaOH	Natriumhydroksid
NaOAc	Natriumacetat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NH <sub>3</sub>	Ammoniakk
OH	Hydroksyl
1-OH-MDZ	1-OH-midazolam
4-OH-MDZ	4-OH-midazolam
PM II	<i>Plantago Major</i> L., fraksjon II
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
r	Radius
RG-I	Rhamnogalakturonan type I
RG-II	Rhamnogalakturonan type II
Rha	Rhamnose
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SRBC	Sensibiliserte røde blodceller (fra sau)
TMCS	Trimetylklorasilan
TMS	TMCS+HMDS+Pyridin
V	Volum
Xyl	Xylose

---

**Ekstrakter og fraksjoner fra *Allium Cepa*:**

G(v)-96%-rå	96 % etanolekstrakt fra gul løk (vanlig)
R-96%-rå	96 % etanolekstrakt fra rød løk
G(m)-96%-rå	96 % etanolekstrakt fra gul løk (mild)
G(v)-50%-rå	50 % etanolekstrakt fra gul løk (vanlig)
R-50%-rå	50 % etanolekstrakt fra rød løk
G(m)-50%-rå	50 % etanolekstrakt fra gul løk (mild)
G(v)-50-rå	50 °C vannekstrakt fra gul løk (vanlig)
R-50-rå	50 °C vannekstrakt fra rød løk
G(m)-50-rå	50 °C vannekstrakt fra gul løk (mild)
G(v)-100-rå	100 °C vannekstrakt fra gul løk (vanlig)
R-100-rå	100 °C vannekstrakt fra rød løk
G(m)-100-rå	100 °C vannekstrakt fra gul løk (mild)
G(v)-50%-I	Fraksjon fra gul løk (vanlig) 50 % etanolekstrakt, første del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG
R-50%-I	Fraksjon fra rød løk 50 % etanolekstrakt, første del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG
G(m)-50%-I	Fraksjon fra gul løk (mild) 50 % etanolekstrakt, første del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG
G(v)-50-I	Fraksjon fra gul løk (vanlig) 50 °C vannekstrakt, første del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG
G(v)-50-II	Fraksjon fra gul løk (vanlig) 50 °C vannekstrakt, andre del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG
R-50-I	Fraksjon fra rød løk 50 °C vannekstrakt, første del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG
R-50-II	Fraksjon fra rød løk 50 °C vannekstrakt, andre del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG
G(m)-50-I	Fraksjon fra gul løk (mild) 50 °C vannekstrakt, første del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG
G(m)-50-II	Fraksjon fra gul løk (mild) 50 °C vannekstrakt, andre del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG
G(v)-100-I	Fraksjon fra gul løk (vanlig) 100 °C vannekstrakt, første del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG

G(v)-100-II	Fraksjon fra gul løk (vanlig) 100 °C vannekstrakt, andre del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG
R-100-I	Fraksjon fra rød løk 100 °C vannekstrakt, første del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG
R-100-II	Fraksjon fra rød løk 100 °C vannekstrakt, andre del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG
G(m)-100-I	Fraksjon fra gul løk (mild) 100 °C vannekstrakt, første del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG
G(m)-100-II	Fraksjon fra gul løk (mild) 100 °C vannekstrakt, andre del isolert etter gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG
G(v)-50-I-1	Fraksjon 1 etter fraksjonering av G(v)-50-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(v)-50-I-2	Fraksjon 2 etter fraksjonering av G(v)-50-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(v)-50-I-3	Fraksjon 3 etter fraksjonering av G(v)-50-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(v)-50-II-1	Fraksjon 1 etter fraksjonering av G(v)-50-II på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(v)-50-II-2	Fraksjon 2 etter fraksjonering av G(v)-50-II på ANX Sepharose 4 Fast Flow
R-50-I-1	Fraksjon 1 etter fraksjonering av R-50-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
R-50-I-2	Fraksjon 2 etter fraksjonering av R-50-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
R-50-I-3	Fraksjon 3 etter fraksjonering av R-50-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
R-50-II-1	Fraksjon 1 etter fraksjonering av R-50-II på ANX Sepharose 4 Fast Flow
R-50-II-2	Fraksjon 2 etter fraksjonering av R-50-II på ANX Sepharose 4 Fast Flow
R-50-II-3	Fraksjon 3 etter fraksjonering av R-50-II på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(m)-50-I-1	Fraksjon 1 etter fraksjonering av G(m)-50-I på



---

	ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(m)-50-I-2	Fraksjon 2 etter fraksjonering av G(m)-50-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(m)-50-I-3	Fraksjon 3 etter fraksjonering av G(m)-50-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(m)-50-II-1	Fraksjon 1 etter fraksjonering av G(m)-50-II på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(m)-50-II-2	Fraksjon 2 etter fraksjonering av G(m)-50-II på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(v)-100-I-1	Fraksjon 1 etter fraksjonering av G(v)-100-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(v)-100-I-2	Fraksjon 2 etter fraksjonering av G(v)-100-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(v)-100-3	Fraksjon 3 etter fraksjonering av G(v)-100-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(v)-100-II-1	Fraksjon 1 etter fraksjonering av G(v)-100-II på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(v)-100-II-2	Fraksjon 2 etter fraksjonering av G(v)-100-II på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(v)-100-II-3	Fraksjon 3 etter fraksjonering av G(v)-100-II på ANX Sepharose 4 Fast Flow
R-100-I-1	Fraksjon 1 etter fraksjonering av R-100-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
R-100-I-2	Fraksjon 2 etter fraksjonering av R-100-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
R-100-I-3	Fraksjon 3 etter fraksjonering av R-100-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
R-100-II-1	Fraksjon 1 etter fraksjonering av R-100-II på ANX Sepharose 4 Fast Flow
R-100-II-2	Fraksjon 2 etter fraksjonering av R-100-II på ANX Sepharose 4 Fast Flow
R-100-II-3	Fraksjon 3 etter fraksjonering av R-100-II på ANX Sepharose 4 Fast Flow

G(m)-100-I-1	Fraksjon 1 etter fraksjonering av G(m)-100-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(m)-100-I-2	Fraksjon 2 etter fraksjonering av G(m)-100-I på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(m)-100-II-1	Fraksjon 1 etter fraksjonering av G(m)-100-II på ANX Sepharose 4 Fast Flow
G(m)-100-II-2	Fraksjon 2 etter fraksjonering av G(m)-100-II på ANX Sepharose 4 Fast Flow

## 2. Sammendrag

*Allium cepa* L., løk, har en lang tradisjon innen folkemedisinen og mat. Løkens innhold av lavmolekylære substanser og frukto-oligosakkarider er noe undersøkt, men det er ikke utført studier på høymolekylære pektintype polysakkarider fra løk.

I denne oppgaven ble gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild) studert. Disse ble ekstrahert med diklormetan, 96 % etanol, 50 % etanol, 50 °C vann og 100 °C vann. Ved hjelp av gelfiltrering ble høymolekylære stoffer skilt fra lavmolekylære stoffer. Videre ble det benyttet ionebytterkromatografi for å separere sure- og nøytrale polysakkarider. Ekstraksjon, isolering og opprensing av de tre løkene resulterte i 12 råekstrakt og 47 fraksjoner.

Monosakkaridinnhold i ekstrakter og fraksjoner ble bestemt ved hjelp av metanalyse, TMS-derivatisering og gasskromatografisk analyse. Dette er en kvalitativ og kvantitativ bestemmelse. Generelt viste løkekstraktene og fraksjonene høyt prosentvis innhold av galaktose og galakturonsyre, med noen unntak. Alle fraksjonene inneholdt i tillegg arabinose og rhamnose. Analysen av monosakkaridsammensetningen tyder på innhold av pektintype polysakkarider. En spennende observasjon var at G(v)-50-I-1, R-50-I-1, G(m)-50-I-1 og R-100-II-1 skilte seg fra alle de andre vannfraksjonene ved at de inneholdt en prosentvis liten andel galakturonsyre. Disse fraksjonene inneholdt prosentvis mer mannose og glukose, i tillegg til mye galaktose sammenlignet med alle andre vannfraksjoner. I tillegg var de nevnte fire fraksjoner av de som hadde høyest komplementfikserende aktivitet.

Alle 96 % etanolekstrakter fra de tre løktypene og 50 % etanolekstraktet fra gul løk (mild) viste innhold av fri glukose og fruktose. 50 % etanolekstrakter fra gul løk (vanlig) og rød løk, i tillegg til alle 50 °C og 100 °C vannekstrakter fra de ulike løkene, viste innhold frukto-oligosakkarider i varierende grad.

Råekstrakter og isolerte fraksjoner fra de ulike løkene ble testet for komplementfikserende aktivitet. Resultatene viste at 4 fraksjoner fra gul løk (vanlig), 2 fraksjoner fra rød løk og 5 fraksjoner fra gul løk (mild) hadde en høyere komplementfikserende aktivitet enn standarden PM II. Alle råekstrakter ble i tillegg testet for CYP-hemmende effekt. Resultatene fra denne testen viste at etanolekstraktene fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild) hadde høyere CYP-hemmende effekt enn vannekstraktene. Råekstraktene ble også testet for antimikrobiell aktivitet ved agar-diffusjon. Resultatene viste at 96 % etanolekstraktene fra de ulike

løktypene reduserte veksten av *P. aeruginosa* noe. Alle testene må bekreftes med flere studier.

## 3. Innledning

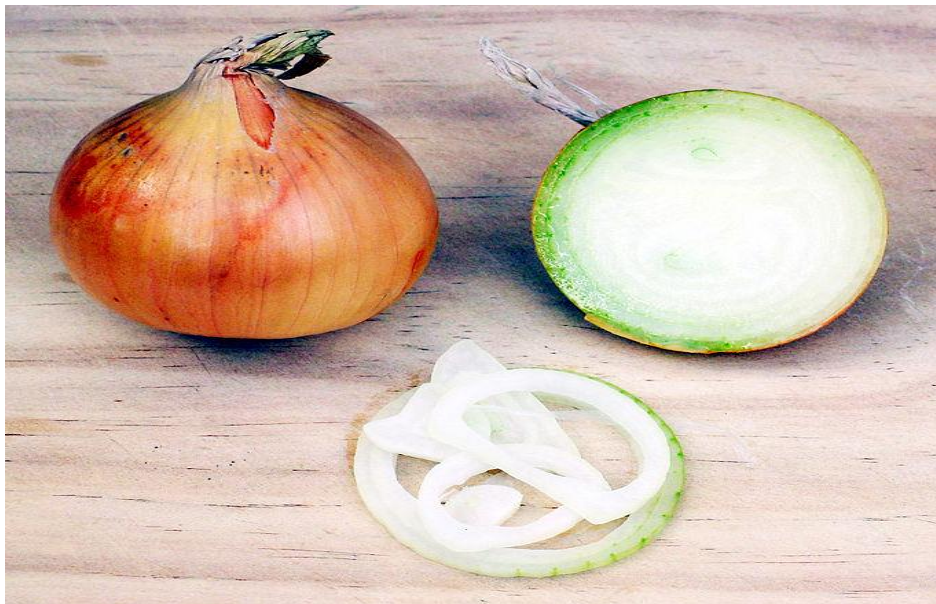
### 3.1 Løk, *Allium cepa* L.

#### 3.1.1 Taksonomisk klassifisering

Klasse	Monocotyledones
Orden	Asparagales
Familie	Alliaceae
Slekt	<i>Allium</i>
Art	<i>Allium cepa</i>

(Brewster 2008)

Løkfamilien ble tidligere plassert i Lilliaceae-familien, men i dag tilhører løk Alliaceae-familien. Vanlig løk blir også kalt kepaløk eller matløk.



Figur 3-1: *Allium cepa* (Wikipedia 2009)

#### 3.1.2 Botanikk og utbredelse

Løken har halv-sylindriske blad som vokser fra en knoll der røttene så vidt stikker ned i jorden. Røttene vokser fra bunnen av knollen. Den ytre delen av løken kan variere i farge, den kan blant annet være gul eller rød. Størrelse og form på knollen kan variere. Den kan være 2-20 cm i stor, og formen kan være flat, rund eller pæreformet. Planten har normalt en

livssyklus på to sesonger. Løken blomstrer vanligvis den andre sesongen. En rett stilk holder en skjerm av hvite eller lilla blomster på toppen. Blomstene springer ut i fra samme punkt, og disse kan bli ca 5 cm i diameter (Floridata 2008).

*Allium cepa* ser ut til å stamme fra sør-vest Asia (Botanical-online 2009). I dag vokser løk i de fleste klimasoner rundt om i verden, fra tropiske til kalde tempererte klima (Slimestad et al. 2007). Vilde *Allium*-arter er blant annet å finne en rekke plasser i Europa, Asia, Nord-Amerika og Afrika (Griffiths et al. 2002). Løk er en av de mest produserte grønnsakene i verden (Brewster 2008). Løk dyrkes også i Norge (Lid et al. 2005).

### **3.1.3 Myter og gammel folketro**

Løk er en av de eldste nyttevekstene som er kjent i Norge. Den har vært brukt mye i mat, men også som legeplante og trolldomsplante. Løk, gammelnorsk laukr, er en av de første plantene som det finnes nedtegnelser om. Den nevnes blant annet i en runeinnskrift fra det fjerde århundre etter Kristus. Løk nevnes også i flere av kvadene i eldre Edda. I Olav den helliges saga er det nevnt en legekyndig kvinne som brukte en grøt av løk til å lege sår. Våre forfedre tilga også løken magiske krefter fordi de trodde at løken hadde en konserverende egenskap. Løken ble blant annet lagt i ølet for å beskytte mot gift. I tillegg skulle løk verne mot det onde øyet, ved å beskytte mot sykdommer som var forårsaket av trolldom. I sagatiden ble det dyrket løkhager, og disse var svært viktige for innbyggerne. Mest sannsynlig inneholdt disse hagene flere løkarter (Mørkved 1998).

Løk har lang tradisjon innen folkemedisinen. Den har blant annet blitt brukt mot ulike plager som brannså, sår, hodepine, hoste og reumatisme (Nishimura et al. 2006). Løk har også blitt brukt for sin diuretiske virkning, i tillegg til at løk har vist seg å være antiseptisk. Den kinesiske farmakope nevner bruk av løk i behandling av angina pectories, dyspesi og infeksjoner, særlig dysenteri (Blumenthal et al. 2000).

### **3.1.4 Innholdsstoffer**

Løk inneholder blant annet flere organiske svovelforbindelser, flavonoider, fenoliske syrer, steroler, saponiner, karbohydrater og spor av flyktige oljer sammensatt av svovelforbindelser (Blumenthal et al. 2000).

## Organiske svovelforbindelser

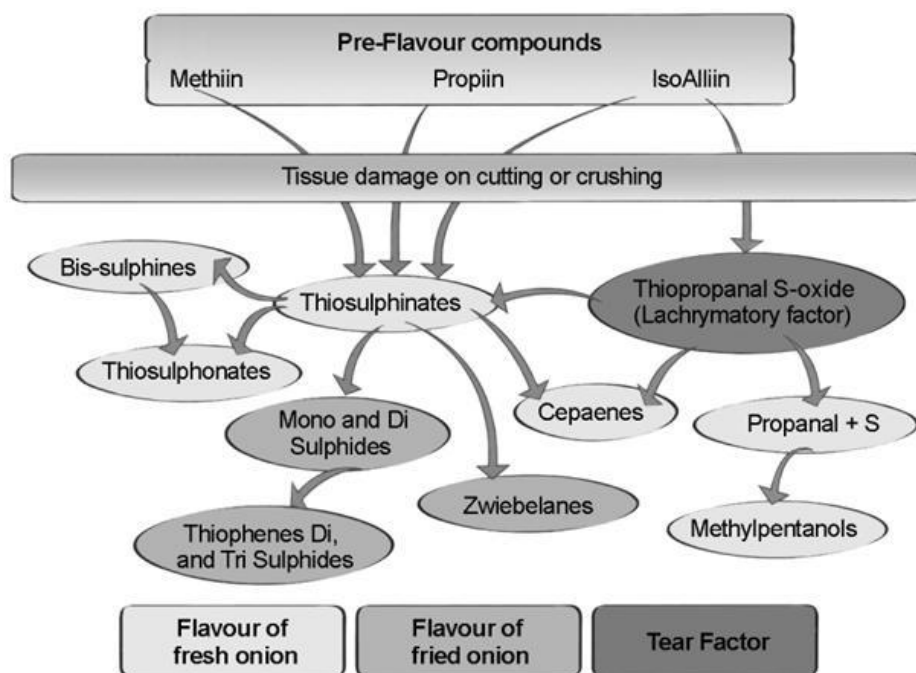
(Vågen 2004; Nishimura et al. 2006; Brewster 2008)

Løk har en karakteristisk smak og lukt. Smaken i løk domineres av flyktige og ikke-flyktige svovelforbindelser, og til en viss grad av løselige sukker. Det er de flyktige svovelholdige komponentene som gir opphav til den skarpe smaken i løk.

Når løkcellene ødelegges ved skjæring eller knusing, vil det dannes aromastoffer under kontroll av enzymet alliinase. Enzymet vil hydrolysere flere aminosyrer, som samlet kalles Alk(en)yl cystein sulfoksid. Under denne prosessen frigjøres det blant annet thiopropanal-S oksid, puryvat og ammonium.

Ulike løkarter vil inneholde ulik mengde aminosyrer, dette er forløperne til de forskjellige smaksforbindelsene. Det finnes flere ulike former av alliinase, og disse vil ha ulik affinitet for de ulike Alk(en)yl cystein sulfoksidene.

Kepaløk inneholder mye 1-Propenyl cystein sulfoksid. Dette stoffet vil raskt gjennomgå en reaksjon som katalyseres av et enzym som heter lakrymatorisk faktor syntase, dette vil gi opphav til thiopropanal-S oksid. Dette produktet fremkaller tåreproduksjon. Alk(en)yl cystein sulfoksidene kan i tillegg brytes ned til en rekke andre svovelholdige forbindelser som for eksempel cepaener, thiosulfinater, metyl- og propyl sulfoksid (se figur 3-2).



Figur 3-2: Generering av smaksforbindelsene i løk (Griffiths et al. 2002)

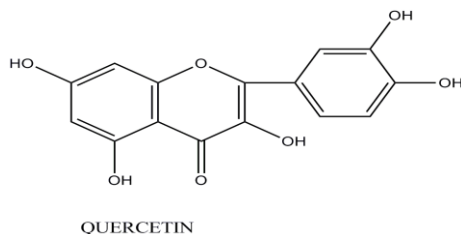
## Flavonoider

Det finnes to typer flavonoider av særlig interesse i løk:

- Anthocyaninene
- Flavonolene

**Anthocyaninene** er røde, lilla eller blå pigmenter. Disse er ansvarlig for rødfargen på skinnet til løken. Anthocyaninene har alle den samme ringstrukturen, med ulike grupper bundet. Dette er grunnen til de ulike fargene. Sukkergrupper (vanligvis glukose) er bundet til bestemte posisjoner i ringstrukturen. Ringstrukturen uten sukker bundet kalles anthocyanidiner. Det dominerende anthocyanidinet i rød løk er cyanidin. I noen tilfeller kan også peonidin og pelargonidin forekomme (Brewster 2008).

**Flavonoler** har nesten lik ringstruktur som anthocyaninene. Disse er normalt også bundet til suktermolekyler og danner glykosider i løk. Flavonoler er antioksidanter, dette betyr at de har potensielle helseeffekter. 14 flavonoler har blitt funnet i løk som kan spises. Det viktigste flavonolet i løk er quercetin. Nesten all quercetin eksisterer i kombinasjon med enten ett eller to glukosemolekyl. Konsentrasjonen er høyest i rød løk, og ca halvparten i gul løk (Brewster 2008).



Figur 3-3: Strukturen til quercetin

### Karbohydrater i løk

Karbohydrater som glukose, fruktose, sukrose og fruktaner finnes i løk. Fruktaner er lineære eller forgrenede polymerer av fruktose. Fruktaner i løk består hovedsakelig av enkle sukroseenheter bundet til kjeder av fruktose. Antall fruktoseenheter, pluss den enkle glukoseenheten, gir grad av polymerisering (DP). Fruktaner med lav DP kalles frukto-oligosakkarider. Løk inneholder frukto-oligosakkarider med en DP opp til 20 (Brewster 2008).



### 3.1.5 Medisinske effekter

Løk har blant annet vist gunstige effekter når det gjelder kreft, kardiovaskulære sykdommer, astma og diabetes. Det har også blitt vist at løk har en antimikrobiell effekt. Blant annet har derivater av Alk(en)yl cystein sulfoksider, flavonoider og frukto-oligosakkarider/fruktaner vist seg å være av terapeutisk interesse (Brewster 2008).

#### *Kreft*

Epidemiologiske studier har vist en sammenheng mellom inntak av løk og redusert forekomst av ulike kreftformer. Quercetin og svovelholdige forbindelsene i løk antas å utøve den beskyttende effekten mot kreft (Griffiths et al. 2002). En studie utført i Italia og Sveits viste at moderat inntak av løk reduserte risikoen for flere typer kreftformer som kolon-, livmor-, spiserør- og munnkreft (Galeone et al. 2006). Lignende korrelasjon ble også observert i en studie i Kina der sammenhengen mellom inntak løk og hjerne- og magekreft ble studert (Hu et al. 1999). Flere studier har senere støttet at inntak av løk gir en redusert forekomst av kreft. Mest studert er tarm- og magekreft (Bianchini og Vainio 2001; Rose et al. 2005). Risikoen for prostatakreft og brystkreft har også vist seg å bli redusert ved inntak av løk i noen studier (Challier et al. 1998; Grant 2004). De nevnte studiene viser en positiv korrelasjon mellom inntak av løk og redusert forekomst av ulike kreftformer, men det har også blitt utført flere studier der det ikke har blitt påvist noen korrelasjon. I en stor undersøkelse utført i Nederland ble det ikke funnet noen sammenheng mellom inntak av løk og brystkreft (Dorant et al. 1995).

#### *Kardiovaskulære sykdommer*

Løk inneholder flere bioaktive molekyler som ser ut til å redusere risikoen for kardiovaskulære sykdommer. Når det dannes aggregater av blodplater i blodårene øker risikoen for trombose og hjerteinfarkt. Ekstrakter av løk har vist seg å hemme human blodplateaggregering *in vitro*, *in vivo* og *ex vivo* (Osmont et al. 2003). Løk har vært foreslått å hemme tromboksen dannelse via flere mekanismer, blant annet via hemming av fosfolipase 2 og tromboksen syntetase. Dette ser ut til å være noe av grunnen til at løk kan føre til en signifikant reduksjon i blodplateaggregering (Moon et al. 2000). Den blodplatehemmende effekten ser ut til å bli redusert etter koking av løken. Cepaener i løk har også vist seg å ha en potent antitrombotisk effekt ved at de hemmer dannelse av blodplateaggregater. Løk har i tillegg vist seg å senke LDL-kolesterol, lipoproteiner og blodtrykk (Ali et al. 2000; Brewster 2008).

### ***Antioksidant effekt***

Løk har vist en antioksidant effekt i flere studier. Dette er noe av grunnen til at løk beskytter mot blant annet kreft og kardiovaskulære sykdommer som for eksempel aterosklerose. Den antioksidative effekten skyldes blant annet flavonoidet quercetin (Shon et al. 2004; Nishimura et al. 2006).

### ***Antidiabetisk effekt***

Løk har vist en hypoglykemisk effekt i ulike dyremodeller og menneske studier. Effekten har vist seg å skyldes de svovelholdige forbindelsene i løken (Srinivasan 2005).

### ***Astma***

Det har blitt foreslått at løk har antiinflammatoriske og anti-astmatiske egenskaper. Thiosulfinater i løk har vist beskyttelse mot bronkial astma. Denne antiinflammatoriske aktiviteten er mediert gjennom en suppresjon av både cyclooxygenase og 5-lipoxygenase. En blokkering av disse veiene i arakedonsyremetabolismen vil resultere i en redusert biosyntese av svært aktive inflammasjonsmediatorer. Cypaener er også kjent for å være aktive hemmere av cyclooxygenase og 5-lipoxygenase (Wagner et al. 1990; Griffiths et al. 2002).

### ***Antibiotisk effekt***

Tidligere studier har vist at løkekstrakter hemmer vekst av en rekke plantepatogene sopp. En studie viste at løk blant annet hadde antifungal effekt mot *Aspergillus niger*, *A. flavus* og *A. fumigatus*. Effekten var temperatur avhengig (Yin og Tsao 1999).

Det har også blitt vist at løkekstrakter har en antimikrobiell effekt mot ulike mikroorganismer, inkludert gram-positive og gram-negative bakterier. Denne effekten skyldes blant annet de flyktige svovelforbindelsene (thiosulfinater) utvinnet fra S-Alk(en)yl cystein sulfoksider (Kyung og Lee 2001). I tillegg har det blitt vist at proteiner, saponiner og fenoliske forbindelser i løk bidrar til antimikrobiell effekt (Griffiths et al. 2002).

### ***Prebiotisk effekt***

I løk finnes fruktanet inulin. Inulin-type fruktaner er kostfiber som ikke brytes ned i magesystemet hos mennesker. Dette gir en gunstig helseeffekt, siden fruktaner fremmer vekst av gunstige *Lactobacilli*- og *Bifido*-bakterier. Det gunstige miljøet i tarmen gjør at vekst av patogene og farlige bakterier hemmes. Neokestose, et annet fruktan funnet i løk, har også

vist seg å ha en god effekt på vekst av gunstige bakterier (Kilian et al. 2002; Ritsema og Smeekens 2003).

En diett rik på fruktaner har blant annet vist seg å senke konsentrasjonen av kolesterol, fosfolipider, glukose og insulin i blodet til middelaldrene menn og kvinner (Jackson et al. 1999).

### *Kommentar til de ulike studiene*

Selv om mange studier har vist at løk har medisinske effekter, finnes der også noen studier som viser at løk ikke har det. Mengde inntak av løk kan være en viktig påvirkende faktor. Andre faktorer som kan påvirke utfallet er blant annet hvordan løken er tilberedt. Dette er viktig siden noen av de farmakologiske aktive stoffene dekomponeres under varme.

Generelle matvaner kan også påvirke resultatet, siden mange som spiser løk også spiser andre frukt og grønnsaker (Brewster 2008).

## 3.2 Polysakkarider

### 3.2.1 Generelt

Karbohydrater er organiske forbindelser som er svært utbredt i naturen. Levende organismer bruker karbohydrater som energikilde. En kjede med 2-10 monosakkarider kalles oligosakkarider, mens en kjede med flere enn 10 monosakkarider kalles polysakkarider.

Polysakkarider er til stede i ulike former og i ulike deler av planter. Polysakkarider er komplekse sukre som kan bestå av flere hundre monosakkarideneheter, disse er bundet sammen med glykosidbindinger. Bindingene kan ha  $\alpha$ - eller  $\beta$ -konfigurasjon. Monosakkaridene kan også være bundet sammen i ulike posisjoner. Dette gjør at polysakkarider er en gruppe med enormt mange variasjonsmuligheter.

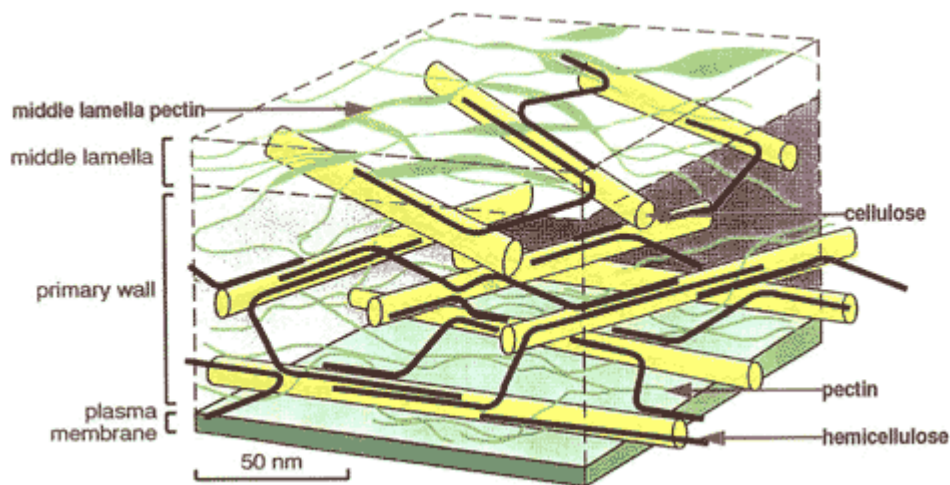
Polysakkaridene kan deles inn i homopolysakkarider og heteropolysakkarider. Homopolysakkarider består av kun en type monosakkarid, mens heteropolysakkarider består av to eller flere ulike monosakkarid. Polysakkarider kan også være nøytrale eller sure. Nøytrale polysakkarider vil inneholde nøytrale monosakkarider, mens sure polysakkarider vil inneholde uronsyre med negativ ladning. Polysakkarider kan både være lineære eller forgrenet av struktur. De kan i tillegg være substituert med ulike organiske grupper som for eksempel metyl eller acetyl grupper. Molekylvekten til polysakkaridene varierer, derfor deles de ofte inn i høymolekylære- og lavmolekylære polysakkarider (Izydorczyk 2005).

### 3.2.2 Plantecelleveggen

Planteceller er omgitt av en tynn, men mekanisk sterk cellevegg. Gjennom denne celleveggen kan blant annet vann og ioner passere. Celleveggen består av tre lag: en primær cellevegg, en sekundær cellevegg og en midtlemell. Ikke alle celletyper har sekundær cellevegg.

Cellulose er hovedkomponenten i celleveggen. Cellulose mikrofibriller er organisert i et nettverk i en svært hydratisert matriks. Nettverket gir celleveggen både styrke og fleksibilitet. Matriksen i celleveggen består hovedsakelig av polysakkaridene hemicellulose og pektin. Hemicellulose bidrar blant annet til å binde cellulose mikrofibrillene sammen. Pektiner er sure polysakkarider som danner en hydratisert gel som omgir cellulose-

hemicellulose nettverket. De oppfører seg som et hydrofilt fyllstoff, og hindrer at nettverket aggregerer eller kollapser, se figur 3-4. (Taiz og Zeiger 2006).



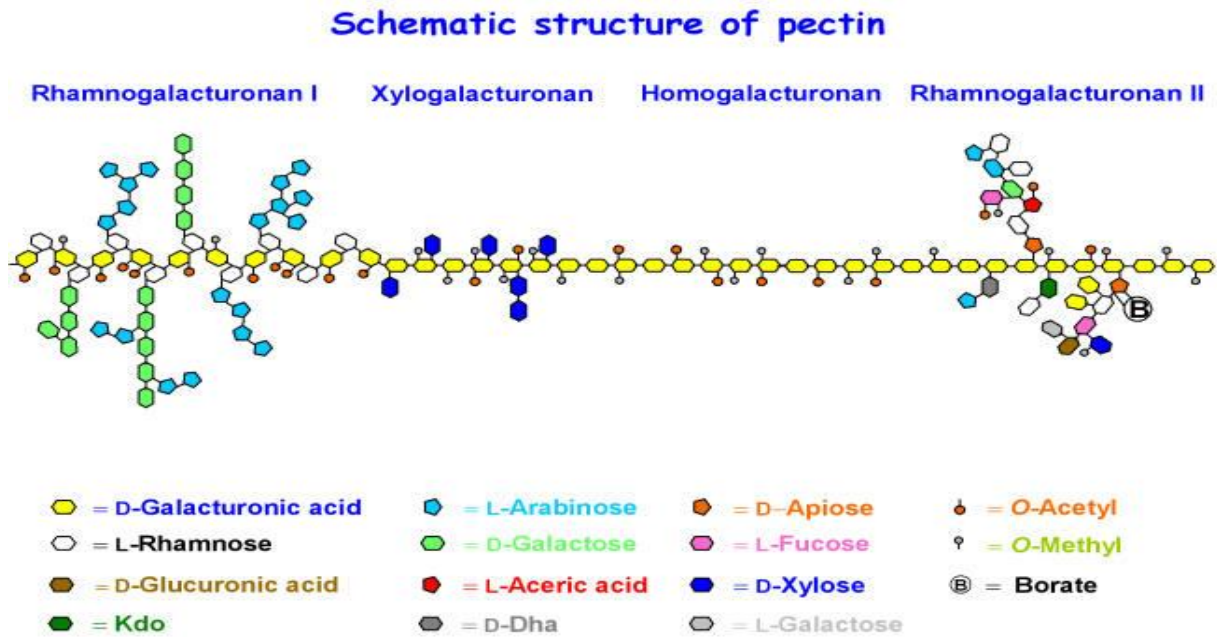
Figur 3-4: Utsnitt av en plantecellevegg. Her vises cellulose-hemicellulose nettverket, der pektiner fyller tomrommet og hindrer kompresjon (Cell\_Biology 2009).

### 3.2.3 Pektiner

#### *Generelt om pektiner*

Pektiner omfatter en mangfoldig gruppe polysakkarider som tidligere nevnt finnes mellom celler (midtlamellen) og i primær celleveggen hos de fleste planter. Pektin er også involvert i forsvarsmekanismer mot plantepatogener. Under plantevekst, modning, høsting og lagring vil pektinet utsettes for enzymatisk og kjemisk modifisering (Schols og Voragen 2002).

Pektin består av såkalte ”glatte” og ”hårete” områder. De glatte områdene består hovedsakelig av en homogalakturonan hovedkjede. Hovedkjeden har også områder med høy grad av forgreninger, dette kalles hårete områder. Forgreningene består oftest av arabinaner, galaktaner og arabinogalaktaner. Figur 3-5 viser en skjematisk struktur av pektin.



Figur 3-5: Skjematisk struktur av pektin (Scheller 2007).

### Homogalakturonan

Homogalakturonan består av lineære  $\alpha$ -1,4-bundet galakturonsyreenheter. Disse kan utgjøre lange uforgrenede sekvenser i pektinet. I dette såkalte glatte området kan galakturonsyren være esterifisert med metyl- og acetylerstergrupper. Homogalakturonan kan også i noen tilfeller være substituert med xyloseenheter bundet til posisjon 3 på galakturonsyreenhetene (Schols og Voragen 2002).

### Rhamnogalakturonan I (RG-I)

Rhamnogalakturonan I består av annenhver  $\alpha$ -1,4 bundet D-galakturonsyre og  $\alpha$ -1,2 bundet L-rhamnoseenheter. Posisjon 4 i rhamnoseenhetene er hovedsakelig forgreningspunkter. I noen tilfeller kan også rhamnose være forgrenet i posisjon 3. Her kan galaktan og arabinan sidekjeder av varierende struktur være bundet. Arabinogalaktaner bundet til RG-I er oftest av typen AG-II, men kan i noen tilfeller også være av type AG-I (se under). RG-I med de ulike sidekjedene blir sett på som det "hårete området" i pektinet (Paulsen og Barsett 2005).

### Rhamnogalakturonan II (RG-II)

Rhamnogalakturonan II utgjør kun en liten del av pektinet. RG-II består av en homogalakturonan hovedkjede. Hovedkjeden er sammensatt av 9-10 D-galakturonsyreenheter, disse er  $\alpha$ -1,4 bundet. Fire ulike oligosakkarid kjeder er bundet til hovedkjeden via posisjon 3 eller 4. Den mest karakteristiske delen av RG-II er tilstedeværelsen av sjeldne sukker som for eksempel 2-O-metylfucose, 2-O-metylxylose, apiose, aceric acid, 2-keto-3-

---

deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO) og 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid (DHA). RG-II finnes i primærcelleveggen hos de fleste planter. RG-II kan i tillegg danne en dimer ved at to apioser kryssbindes av en 1:2 borat-diol ester (Paulsen og Barsett 2005).

### *Arabinaner*

Arabinaner består hovedsakelig av en hovedkjede med  $\alpha$ -1,5 bundet L-arabinofuranosylenheter. Disse kan ha en lineær eller en forgrenet struktur, med sidekjeder vanligvis bundet i posisjon 2 eller 3. Arabinanene er mest sannsynlig forbundet til galaktaner i pektinene (Paulsen og Barsett 2005).

### *Galaktaner og arabinogalaktaner*

Galaktaner og arabinogalaktaner der galaktan hovedkjeden er substituert med ulike mengder galaktose og arabinose finnes i mange høyerestående planter. Arabinogalaktanene kan deles inn i to typer: arabinogalaktan type I (AG-I) og arabinogalaktan type II (AG-II) (Schols og Voragen 2002). I mange testsystemer har arabinogalaktaner vist biologisk aktivitet. En enkel metode å skille mellom AG-I og AG-II er utfelling med Yariv reagens. Kun AG-II har evnen til å danne et rødt kompleks med Yariv reagenset (Paulsen og Barsett 2005).

#### *Arabinogalaktaner type I (AG-I)*

Arabinogalaktan I finnes i ulik grad i celleveggen. Hovedkjeden er sammensatt av  $\beta$ -1,4 bundet galaktan, med sidekjeder av arabinan bundet i posisjon 3 i galaktoseenhetene. AG-I finnes ofte som en bestanddel i pektinkomplekset RG-I (Paulsen og Barsett 2005).

#### *Arabinogalaktaner type II (AG-II)*

Arabinogalaktan II er høyt forgrenede polysakkarider. Hovedkjeden består av  $\beta$ -1,3 bundet D-galaktan, denne er høyt forgrenet med  $\beta$ -1,6 bundet galaktose sidekjeder. Arabinaner kan være 1,3 bundet til galaktoseenhetene.

Både AG-I og AG-II finnes som sidekjeder i pektinpolymere. AG-II forekommer noe oftere enn AG-I. Arabinogalaktanene er bundet til rhamnoseenhetene i RG-I, oftest i posisjon 4 (Paulsen og Barsett 2005).

### 3.2.4 Biologisk og immunmodulerende aktivitet

Mange planter som har vært brukt innen tradisjonell medisin har i senere tid vist innhold av polysakkarider med ulik biologisk aktivitet. Dette har medført økt interesse for bioaktive polysakkarider.

Strukturelle studier har vist at ”hårete områder” i pektiner er viktig for biologisk aktivitet. Aktive pektiner inneholder ofte en hovedkjede av RG-I, med sidekjeder av AG-II. Flere biologiske aktive pektiner har vist seg å påvirke immunsystemet, i tillegg til å ha en rekke andre ulike effekter. Ikke alle pektintype polymerer har biologisk aktivitet. Dette kan tyde på at spesifikke strukturelle aspekter må være til stede for å få aktivitet. Mye tyder på at strukturen må ha mer enn ett bindingssete, i tillegg ser det ut som størrelsen av polymeren også er viktig for biologisk aktivitet (Paulsen og Barsett 2005).

### 3.2.5 Komplementsystemet

Komplementsystemet består av over 20 serumproteiner, hvorav ni er såkalte komplementkomponenter (C1-C9), og resten er deres regulatorer. Komplementproteinene sirkulerer vanligvis i blodet i en inaktiv form (Yamada og Kiyohara 1999).

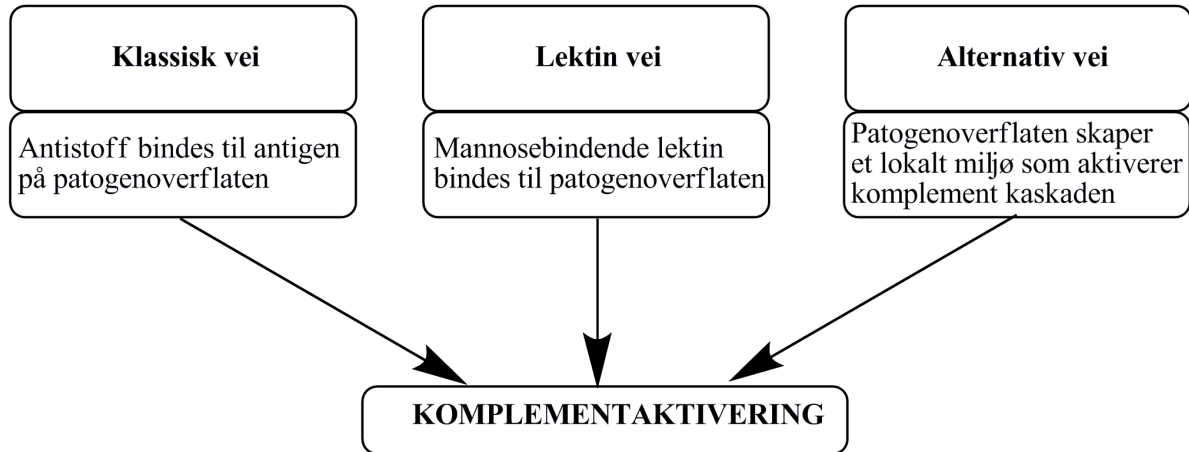
Ved bekjempelse av infeksjoner utgjør komplementsystemet en viktig del av immunsystemet. Når et patogen eller et antigen blir identifisert som fremmed, vil komplementsystemet merke det for ødeleggelse. Dette oppnås ved en aktivering av komplementsystemet. En aktivering innleder en rekke enzymatiske reaksjoner. Proteolytisk kløyving og aktivering av komplementkomponenter fører til en kovalent binding, eller fiksering, av komplementfragmenter på patogenoverflaten (Parham 2005).

Komplementsystemet kan aktiveres via tre ulike veier:

- Den klassiske veien
- Lektinveien
- Den alternative veien



Den klassiske veien aktiveres ved at antistoffer av typen IgM eller IgG binder seg til patogenoverflaten. Lektinveien aktiveres når mannosebindende lektin fra plasma binder seg til karbohydrater på patogenoverflaten. Den alternative veien aktiveres ved at patogenoverflaten skaper et lokalt fysiokjemisk miljø som aktiverer komplementsystemet (Parham 2005).



Figur 3-6: Aktivering av komplementsystemet

De tre veiene for komplementaktivering trigges forskjellig, men alle veiene ender opp i samme reaksjon. Komplementkomponenten C3 kløyves til fragmentene C3a og C3b, hvor C3b bindes kovalent til overflaten på patogenet. Binding av C3b til overflaten på patogenet er en av de viktigste funksjonene til komplementsystemet, og kalles komplementfiksering. C3b merker patogenet for fagocytose. I tillegg vil det dannes proteinkomplekser som lyserer patogenets cellemembran (Parham 2005).

### 3.2.6 Cytokrom P-450 systemet

Fettløselige legemidler må først metaboliseres til mer vannløselige substanser før de kan skilles ut i nyrene. Denne prosessen skjer hovedsakelig i leveren. Det viktigste enzymsystemet for legemiddelmetabolisme er cytokrom P-450 (CYP)-systemet. Dette systemet består av en rekke enzymer som blant annet CYP-1A2, CYP-2B6, CYP-2C8, CYP-2C9, CYP-2C19, CYP-2D6 og CYP-3A4. Disse er de mest sentrale enzymene i metabolismen av legemidler. Aktiviteten av enzymene er i større eller mindre grad genetisk bestemt.

Ved samtidig inntak av to legemidler som metaboliseres av samme enzym kan interaksjoner oppstå. Mange legemidler har vist å påvirke metabolismen til andre legemidler, enten ved å

stimulere eller hemme effekten til CYP-enzymmer. Stimuleres aktiviteten til CYP-enzymene kan resultatet bli en lavere konsentrasjon av legemidlet som har fått sin metabolisme indukert. Dette vil gi en nedsatt terapeutisk effekt av legemidlet. Enzyminduksjonen vil opptre i løpet av noen dager, og være maksimal etter ca. 1-2 uker. Hemmes aktiviteten til CYP-enzymene, kan dette føre til en økt konsentrasjon av det legemidlet som har fått sin metabolisme hemmet. Dette kan føre til økt risiko for bivirkninger og toksiske effekter. Enzymhemmingen inntreffer vanligvis momentant.

Det er ikke bare legemidler som kan påvirke aktiviteten til CYP-enzymmer. Visse grønnsaker, som for eksempel brokkoli og rosenkål, har vist å indukere CYP-1A2. Grapefruktjuice har vist å inneholde substanser som hemmer aktiviteten til CYP-3A4. Etter inntak av juicen vil konsentrasjonen av legemidler som brytes ned av samme enzym stige til dels dramatisk. Dette kan blant annet føre til toksiske effekter (Norsk\_legemiddelhåndbok 2007).

## 4. Oppgavens mål

Målet med oppgaven var å isolere forskjellige ekstrakter etter polaritet.

Polysakkaridfraksjoner fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild) skulle videre fraksjoneres på grunnlag av molekylstørrelse og ladning. Deretter skulle det utføres en kjemisk karakterisering av karbohydratfraksjonene, og en biologisk karakterisering av ekstrakter og fraksjoner.

Det er ikke tidligere blitt utført studier på høymolekylære pektintype substanser fra *Allium cepa* subspp.



## 5. Metoder

### 5.1 Generelle metoder

#### 5.1.1 Vannkvalitet

Det ble benyttet destillert vann rensert med Elix® millipore med Progard® 2 w/o polyfenol filter. Ved gelfiltrering og ionebytterkromatografi ble det rensende vannet i tillegg degasset ved hjelp av heliumgass.

#### 5.1.2 Innveiging av stoff

All innveiging ble utført på Sartorius BP 221S analysevekt.

#### 5.1.3 Volumreduksjon

Volumreduksjon er en oppkonsentrering av løsningene ved fordamping på Buchi rotavapor med vannbad.

#### 5.1.4 Filtrering

Råekstraktene ble filtrert gjennom S&S Rundfilter (Schleicher & Schull) ved hjelp av vannsug og nutsal. Før gelfiltrering og ionebytterkromatografi ble prøvene filtrert gjennom Acrodisc® Syringe Filters med 1µm glassfibermembran (Pall Life Sciences) ved hjelp av Plastipak engangssprøyte (50ml).

#### 5.1.5 Ultrafiltrering

##### Prinsipp:

Volum til prøveløsningene ble redusert ved at løsningen ble pumpet mot et filter. Den lavmolekylære delen (under 5K) passerte gjennom filteret og ut gjennom den ene slangen, i mens den høymolekylære delen ble resirkulert. Dette var en effektiv måte å redusere volumet av løsningene på, og samtidig fjerne lavmolekylære substanser. Volumet til de ulike vannekstraktene ble redusert på denne måten.

**Reagenser:**

Destillert vann

0,3 M NaOH-løsning (Prolabo)

**Utstyr:**

Pumpe: Watson Marlow 520s

Filter: Ultrasette™ Omega 5 K PALL Corporation suspended screen channel

Slangeklemme

Erlenmeyerkolber

**Prosedyre:**

1. Filteret ble vasket med destillert vann over natten.
2. Midtre filtratutgang ble stengt med en slangeklemme, og prøveløsningen pumpet gjennom filteret i noen minutter. Denne filtratutgangen ble så åpnet forsiktig. Den lavmolekylære delen av løsningen kom da ut her, og ble samlet i en egen kolbe.
3. Den høymolekylære filtratutgangen ble også lukket med en slangeklemme, på denne måten ble det oppnådd et trykk over filteret. Fra denne filtratutgangen skulle det kun dryppe prøveløsning. Den høymolekylære delen ble resirkulert tilbake i prøveløsningen.
4. Filtreringen ble avsluttet når prøveløsningen hadde fått et passende volum.

**Vask og oppbevaring:**

1. Filteret ble først vasket med destillert vann i ca 10 minutter, begge utgangene ble også vasket.
2. Ultrasetten ble så vasket med ca 1 liter 0,3 M NaOH-løsning. Denne løsningen ble ikke resirkulert. Filteret ble videre vasket med 2 liter 0,3 M NaOH-løsning i ca 15 minutter, denne løsningen ble resirkulert.
3. Filteret ble vasket med destillert vann til NaOH-løsningen var fjernet fra systemet. Det ble kontrollert at det som kom ut av begge utgangene var nøytralt med et pH-papir.
4. Filteret ble konservert med natriumazid og oppbevart ved 4°C frem til senere bruk.

---

### 5.1.6 Sentrifugering

Sentrifuge: Multifuge 4 KR (Heraeus)

### 5.1.7 Frysetørking

#### Prinsipp:

Ved frysetørking fjernes vann i fra prøvene. Først ble prøvene fryst ned, for deretter å bli utsatt for vakuum. Is vil da sublimere, og prøvene blir omdannet til tørrstoff. Et bestemt antall milliliter av isolerte fraksjoner ble frysetørket, og tørket materiale ble veid. På denne måten kunne konsentrasjonen av de ulike løsningene bestemmes.

#### Utstyr:

Frysetørker: Alpha I-6 (Christ) eller Alpha I-4 (Christ)

Vakuumpumpe: Trivac D4B

Metanolbad: Hetofrig

Rundkolber

#### Prosedyre:

1. Prøveløsningene ble overført til rundkolber og fryst ned på metanolbad (-40°C).
2. Rundkolbene ble satt på frysetørkeren og de frosne løsningene ble tørket i løpet av 1-2 dager.

### 5.1.8 Syrevasking av utstyr

#### Prinsipp:

Glassutstyr som er oppbevart i papp og papir kan inneholde spor av cellulose. Dette kan påvirke karbohydratanalyser. Det er derfor nødvendig å syrevaske alt glassutstyr som benyttes ved metanolyse med konsentrert saltsyre. I konsentrert saltsyre vil polysakkaridene hydrolyseres, og etterfølgende skylling med vann vil fjerne dem.

#### Reagenser:

Destillert vann

37 % HCl (Merck)

**Utstyr:**

Begerglass (5L)

Varmeskap: Heraeus

**Prosedyre:**

1. Glassutstyret ble plassert i et begerglass og dekket med konsentrert saltsyre.
2. Etter 30 minutter ble glassutstyret skylt grundig i springvann, deretter med destillert vann.
3. Glassutstyret ble til slutt satt til tørk i varmeskap ved 80°C.

**5.1.9 Dialyse****Prinsipp:**

Ved dialyse vil salter og andre lavmolekylære forbindelser fjernes fra prøveløsninger i dialyseslanger. Dialyseslangene består av en semipermeabel membran, denne har en gitt porestørrelse. De lavmolekylære forbindelsene vil diffundere ut i gjennom porene, samtidig som vann vil diffundere inn. Når likevekt oppnås vil diffusjonen stoppe. Det er derfor viktig å skifte dialysevann ofte, slik at en ny likevekt kan oppnås.

**Reagenser:**

Destillert vann

2 % NaOH-løsning (Prolabo)

0,05 % NaN<sub>3</sub>-løsning (Merck)

AgNO<sub>3</sub>, mettet (Merck)

**Utstyr:**

Dialyseslanger: Spectra/Por®, MWCO: 3,500 Da, d:29mm  
(Spectrum laboratories Inc, USA)

Magnetrørere: IKA-COMBIMAG RCO, RCT og RCH

Dialyseklemmer

Bøtte (10 L)

Magnet



---

Glasstaver

### Vasking av dialyseslanger:

1. Slangene ble klippet opp i ønsket lengde og skylt godt i springvann, både utvending og innvending.
2. Dialyseslangene ble kokt i en 2 % NaOH-løsning i 10 minutter.
3. Etter koking ble slagene skylt godt i springvann og deretter i destillert vann.
4. Slagene ble kokt på nytt i destillert vann i 10 minutter, etterfulgt av skylling med destillert vann.
5. Dialyseslangene ble oppbevart ved 4°C i en 0,05 % natriumazidløsning frem til bruk.

### Dialyse:

1. Før bruk ble dialyseslangene vasket godt i destillert vann.
2. De ble deretter lagt i destillert vann i 30 minutter for å fjerne rester av natriumazid
3. Slangene ble knyttet i den ene enden.
4. Dialyseslangene ble fylt opp med prøveløsning og luftbobler ble fjernet. Slangen ble lukket med en knute og klemme på toppen.
5. Slangene ble lagt i en bøtte med destillert vann. Bøtten ble plassert på en magnetrører og prøvene ble dialysert ved 4°C. Det ble skiftet vann flere ganger.
6. Dialysen ble avsluttet når 2 ml av dialysevannet ikke ble blakket av 1 dråpe AgNO<sub>3</sub>.

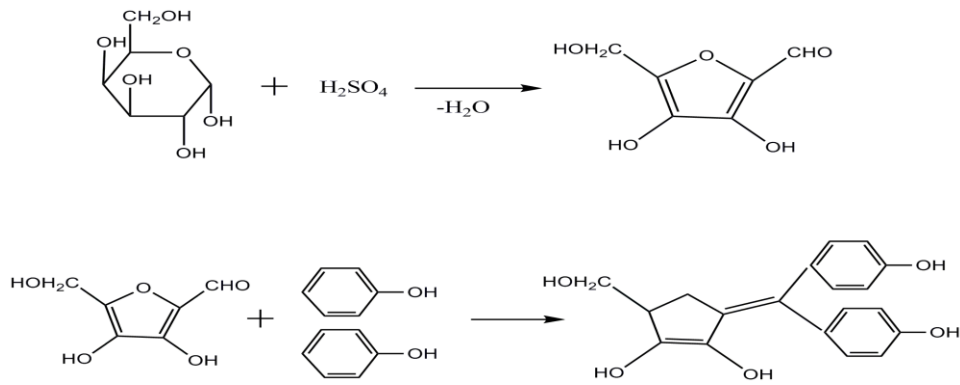
## 5.1.10 Fenol-svovelsyretest

### Prinsipp:

(Dubois et al. 1956; Cui og Brummer 2005)

Testen benyttes for å teste mengde karbohydratinnhold i en prøve. Konsentrert svovelsyre hydrolyserer glykosidbindingene i polysakkaridene, og monosakkaridene omdannes videre til furfuraldehyder (androsukker). Disse vil kondensere med to fenolmolekyler, og danne et stabilt gulfarget kompleks (se figur 5-1). Gulfargen til komplekset vil være proporsjonal med mengde karbohydrat i prøven. Komplekset absorberer UV-lys ved 490 nm.

Denne testen ble utført for å finne karbohydratprofilene av eluatet etter gelfiltrering og ionebytterkromatografi. Ved å plote absorbans mot eluert volum, ble det bestemt hvilke fraksjoner som kunne slås sammen.



Figur 5-1: Reaksjon mellom et monosakkarid og svovelsyre til et androsukker. Dette kondenserer med to fenolmolekyler til et gulfarget kompleks (Inngjerdingen 2000).

### Reagenser:

4 % fenol (Merck)

Konsentrert svovelsyre,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Merck)

### Utstyr:

Reagensrør av glass

Pipette: Gilson microman

Whirlimixer: Fisons

Microtestplate: 96-well, flatbunnet (Sarstedt)

Microplate Reader 3350: BioRad

### Prosedyre:

1. 100  $\mu\text{l}$  av de forskjellige fraksjonene ble overført til reagensrør.
2. 200  $\mu\text{l}$  4 % fenol og 1 ml konsentrert  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ble tilsatt rørene.
3. Løsningene ble mikset godt og satt til henstand i  $\frac{1}{2}$  time ved romtemperatur.
4. Løsningene ble mikset på nytt.
5. 100  $\mu\text{l}$  fra hvert rør ble overført til en mikrotiterplate.
6. Absorbans ble målt ved 490 nm.

---

## Ekstraksjon av løk

Diklormetan ble benyttet for å fjerne de mest upolare substansene i løken, som blant annet lavmolekylære fenoliske syrer, fargestoffer og lipidsubstanser.

Ved å benytte etanol ble upolare forbindelser og lavmolekylære organiske stoffer ekstrahert ut fra plantematerialet, som ikke ble løst i diklormetan. Materialet ble ekstrahert med 96 % etanol og 50 % etanol. Ved å benytte to ulike styrker av etanol, vil substanser med ulik polaritet ekstraheres ut. 50 % etanolekstraksjon vil trekke ut noe mer polare forbindelser, blant annet enkelte typer polysakkarider, sammenlignet med 96 % etanolekstraksjon.

Vann ble benyttet for å ekstrahere ut polare forbindelser i fra løkene. Løseligheten til polysakkarider i vann er temperaturavhengig, derfor ble det benyttet vann med ulik temperatur. Siden polysakkarider har noe forskjellig løselighet, vil ulike polysakkarider løse seg i 50°C og 100°C vann. Sure og nøytrale polysakkarider som i sitter løst i midtlamellen og primærcelleveggen vil ekstraheres ut i forskjellig grad med vann med ulik temperatur.

Det ble utført ekstraksjon av gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild).

### 5.1.11 Ekstraksjon med diklormetan

#### Reagenser:

Diklormetan (Fluka)

#### Utstyr:

Blender: Waring

Vekt: Mettler PM 4800 DeltaRange

Trakt og filter

Erlenmeyerkolber (5L)

#### Prosedyre:

1. Løkene var dypfrost, så disse ble tint før bruk.
2. 1515 g gul løk (vanlig), 1426 g rød løk og 1261 g gul løk (mild) ble knust i en blender og overført til erlenmeyerkolber.
3. Ca 2,0 liter diklormetan ble tilsatt kolbene.

4. Det ble rørt et par ganger i kolbene, og blandingen ble satt til henstand i 3 dager.
5. Diklormetan ble dekantert fra og filtrert.
6. Ny diklormetan ble tilsatt.
7. Etter 48 timer ble diklormetan dekantert fra og filtrert.
8. Løkematerialet ble lagt til tork i avtrekkskap i 24 timer.

### 5.1.12 Ekstraksjon med 96 % etanol

96 % etanolekstraksjon ble utført ved å benytte en Soxhletekstraktor der etanolen resirkuleres i et lukket system.

#### Reagenser:

Etanol 96 % (Farmasøytisk institutt)

#### Utstyr:

Soxhletekstraktor

Soxhletfilter

Rundkolbe (5 liter)

Tilbakeløpskjøler

Varmemantel



Figur 5-2: Oppsett for ekstraksjon med soxhletekstraktor.

**Prosedyre:**

1. Løkmaterialet fra diklormetaneekstrasjonen (metode 5.1.11) ble overført til et soxhletfilter.
2. Ca 3 liter 96 % etanol ble overført til en rundkolbe. Rundkolben ble plassert i en varmemantel og systemet ble koblet sammen.
3. Løkmaterialet ble ekstrahert i det lukkede systemet i 2 dager til ekstraktet var fargeløs. Systemet ble slått av om kvelden.
4. Løkmaterialet ble tørket på aluminiumsfolie.
5. Etanolekstraktet ble oppkonsentrert og konsentrasjonen bestemt.

Samme prosedyre ble fulgt for gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild).

**5.1.13 Ekstraksjon med 50 % etanol****Reagenser:**

Etanol 50 % (Farmasøytisk institutt)

**Utstyr:**

Rundkolbe (5 liter)

Tilbakekøpskjøler

Varmemantel

Trakt og filter

**Prosedyre:**

1. Løkmaterialet fra 96 % etanolekstrasjonen (metode 5.1.12) ble tilsatt en rundkolbe og ca 2 liter 50 % etanol ble tilsatt.
2. Rundkolben ble plassert i en varmemantel og tilbakekøpskjøler ble tilkoblet.
3. Løken ble kokt i 1 time.
4. Etter avkjøling ble etanolekstraktet dekantert fra og filtrert.
5. Trinn 1-4 ble gjentatt.
6. Ekstaktene ble slått sammen, oppkonsentrert og konsentrasjonen bestemt.

Samme prosedyre ble fulgt for gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild).

### 5.1.14 Ekstraksjon med 50°C vann

**Reagenser:**

Destillert vann

**Utstyr:**

Begerglass (5 liter)

Kokeplate med magnetrører

Magnet

Termometer

Trakt med filter

**Prosedyre:**

1. Løkmaterialet fra 50 % etanolekstraksjonen (metode 5.1.13) ble overført til et beerglass.
2. 3 liter destillert vann ble tilsatt beerglasset.
3. Løkmaterialet ble ekstrahert ved 50°C på magnetrøring i 1 time med nøye temperaturkontroll.
4. Etter avkjølig ble vannekstraktet dekantert fra og filtrert.
5. Trinn 1-4 ble gjentatt.
6. Ekstraktene ble slått sammen, oppkonsentrert og konsentrasjonen bestemt.

Samme prosedyre ble utført for gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild).

### 5.1.15 Ekstraksjon med 100°C vann

**Reagenser:**

Destillert vann

**Utstyr:**

Rundkolbe

Tilbakeløpskjøler

Varmemantel

Sentrifuge: Heraeus Multifuge 4KR

## Prosedyre

1. Løkmaterialet i fra 50°C vannekstraksjonen (metode 5.1.14) ble overført til en rundkolbe og ca 2 liter destillert vann ble tilsatt.
2. Rundkolben ble plassert i en varmemantel og tilbakeløpskjøler ble tilkoblet.
3. Løken ble ekstrahert i 1 time ved 100°C.
4. Etter avkjøling ble vannekstraktet grovfiltrert fra løkmaterialet ved pressing gjennom et grovvevd tøyestykke. Vannekstaktet ble deretter filtrert som tidligere beskrevet.
5. Løkmaterialet ble videre sentrifugert, og supernatant dekantert fra og filtrert.
6. Etter sentrifugering ble trinn 1-5 gjentatt.
7. Ekstraktene ble slått sammen, oppkonsentrert og konsentrasjonen bestemt.

Samme prosedyre ble utført for gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild).

## 5.2 Gelfiltrering med Bio-Gel P-6 Polyacrylamide Gel

### Prinsipp:

(Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004)

Ved gelfiltrering blir molekylene i en løsning separert etter størrelse når de passerer gjennom en kolonne fylt med gel. Gelen har porer med en bestemt porestørrelse. Prøveløsningene elueres gjennom kolonnen med en mobilfase, i denne oppgaven benyttes det vann. Gelen vil være inert, og ikke gi interaksjon med stoffene. Når molekylene transporteres gjennom kolonnen, vil molekyler som er for store til å gå inn i porene bli ekskludert. Disse vil da komme først ut, med samme hastighet som mobilfasen. Mindre molekyler vil diffundere inn i porene, og det vil ta lengre tid før disse elueres ut. På grunnlag av molekylstørrelse og diffusjonsevne vil molekylene elueres ut etter synkende molekylstørrelse.

### *Bio-Gel P-6 Desalting Gel*

(Bio-Rad-Laboratories 2000)

Bio-Gel P-6 gel består av polyacrylamidpartikler, disse er hydrofile og ladningsfrie. Fraksjoneringsområdet er 1000 – 6000 Da. Forbindelser med molekylstørrelse innenfor dette området vil bli separert. På denne måten kan høymolekulære og lavmolekulære forbindelser separeres.

## Standarder

Dekstran T500, Mw: 500 000 (Pharmacia)

D (+) – raffinose pentahydrate, Mw: 600 (Sigma)

## Betingelser

Elueringshastighet: 1 ml/min

Fraksjonssamler: 180 rør (10 ml per rør)

Elueringsmiddel: destillert vann

Alle løsningene som ble applisert på kolonnen ble filtrert.

## Utstyr

Kolonne: XK50: h = 28 cm

(GE Healthcare) r = 2,5

V = 550 ml

Pakkemateriale: Bio-Gel P-6 DG (Bio-Rad)

Pumpe: Perimax (Spetec)

Fraksjonssamler: Superfrac (GE Healthcare)

Rør Sentrifugerør RB, 14 ml (Heger)

Sprøyte og filter

## Prosedyre

### Pakking av kolonne:

1. Fra kolonnevolum og tabell 2 (Bio-Rad-Laboratories 2000) ble riktig mengde kolonnemateriale beregnet og innveid (84,65g).
2. Kolonnematerialet ble tilsatt 1,1 L destillert vann i en erlenmeyerkolbe, og satt til svelling over natten på kjølerommet.
3. Væsken over gelen ble dekantert fra. Ca 2 kolonnevolum destillert vann ble tilsatt og blandet med gelen. Erlenmeyerkolben ble satt til henstand, slik at gelmaterialet fikk synke. Dette ble gjentatt 4 ganger.



4. Kolonnematerialet ble koblet til vakuum og degasset i 10 minutter under forsiktig omrøring av kolben.
5. Det ferdige kolonnematerialet ble forsiktig overført til kolonnen ved å helle langs en glasstav, dette for å unngå luftbobler.
6. Kolonnen ble pakket og eluert med 2 kolonnevolum vann (1ml/min).

#### **Eluering av standarder:**

1. Dekstran (25 mg) og raffinose (50 mg) ble løst i 100 ml destillert vann. Løsningen ble applisert på kolonnen og eluert med destillert vann.
2. En fraksjonssamler med sentrifugerør samlet opp eluatet, og karbohydratinnholdet ble bestemt ved hjelp av fenol-svovelsyretesten (metode 5.1.10).
3. En karbohydratprofil av fraksjonene ble laget ved å plote absorbans mot eluert volum.

#### **Eluering av prøver:**

1. 100 ml av prøveløsningen ble filtrert, applisert på kolonnen og eluert med vann.
2. En fraksjonssamler med sentrifugerør samlet opp eluatet. Fraksjonenes karbohydratinnhold ble bestemt ved hjelp av fenol-svovelsyretesten.
3. Fraksjonenes karbohydratprofil ble sammenlignet med karbohydratprofilen til standardene, og rørene ble slått sammen i større fraksjoner på bakgrunn av dette.
4. Kolonnen ble vasket med 2 kolonnevolum vann mellom hver kjøring.
5. Trinn 1-4 ble gjentatt.

200 ml av gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild) ble fraksjonert.

## **5.3 Ionebytterkromatografi med ANX sepharose**

### **Prinsipp:**

(Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004)

Ionebytterkromatografi er basert på en reversibel adsorpsjon mellom ladete molekyler. Ionebytteren består av en uløselig matriske som er kovalent bundet til en ionisk eller en ioniserbar gruppe. Til denne gruppen er det elektrostatiske knyttet et motion med motsatt ladning. Dette motionet kan byttes ut med andre ioner. Det finnes både anionbyttende og

kationbyttere. En anionbytter er en positiv ladet ionebytter, med negative ladede motioner. Motsatt er en kationbytter negativt ladet, med positive ladede motioner. Begge disse gruppene kan deles inn i sterke og svake ionebyttere. Ionebytterkromatografi kan benyttes for å separere stoffer med liten forskjell i ladning. En forutsetning for å få retensjon er at prøven inneholder ladede grupper. Interaksjonen kan kontrolleres ved å endre betingelser som ionestyrke og pH.

I denne oppgaven ble det benyttet en anionbytter. Polysakkarider med negativ ladning vil bli adsorbent avhengig av deres affinitet til ionebytteren, og på denne måten bli separert. Som mobilfase ble det benyttet en vandig løsning av salter.

### *ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)*

(Amersham-Pharmacia-Biotech 2000)

ANX Sepharose 4 Fast Flow er en svak anionbytter basert på sterkt kryssbundet agarose med dietylaminogrupper bundet til seg. Dietylaminogruppene er positivt ladet, og vil ha kloridioner bundet til seg som motion siden disse er negativt ladet. Når prøvematerialet appliseres på kolonnen, vil negativt ladede polysakkarider bytte plass med kloridionene. Disse vil dermed bli retardert på kolonnen. Ved å benytte en saltgradient kan disse elueres ut etter økende surhetsgrad, ettersom saltgradienten øker. Nøytrale polysakkarider vil passere i gjennom kolonnen uten å feste seg, disse elueres ut med vann. På denne måten kan sure og nøytrale polysakkarider separeres.

#### **Betingelser:**

Elueringshastighet fra saltløsning til blandekar: 1 ml/min

Elueringshastighet fra blandekar til kolonne: 2 ml/min

Fraksjonssamler: 180 rør (10 ml per rør)

Alle løsningene som ble applisert på kolonnen ble degasset og filtrert

#### **Reagenser:**

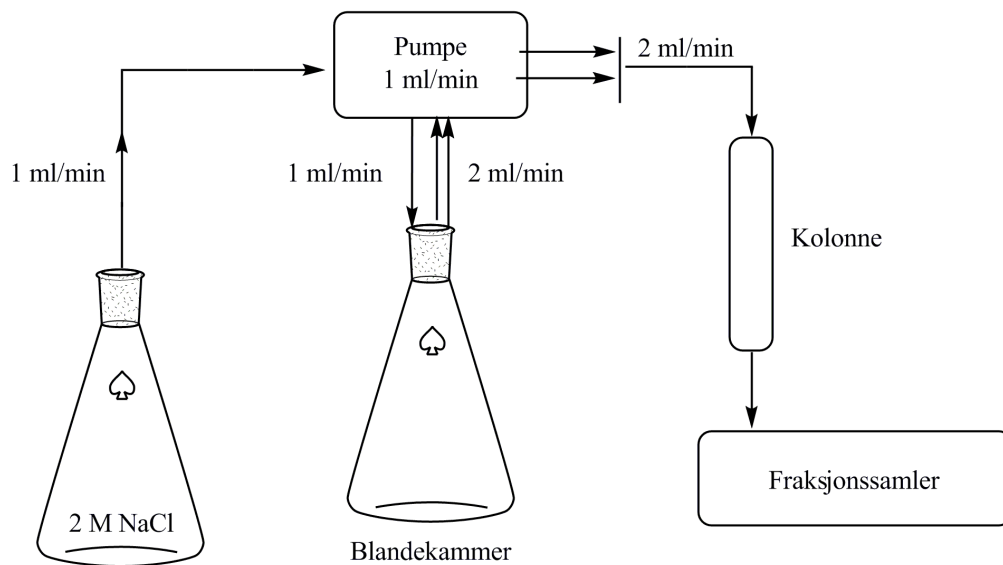
Destillert vann

2 M NaCl-løsning (Prolabo)

AgNO<sub>3</sub>

**Utstyr:**

Kolonne:	XK50 (GE Healthcare)
Pakkemateriale:	ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub) (GE healthcare)
Pumpe:	Perimax (Spetec)
Fraksjonssamler:	Pharmacia LKB – superfrac
Rør:	Sentrifugerør RB, 14 ml (Heger)
Sprøyte og filter	



Figur 5-3: Oppsett for ionebytterkromatografi med saltgradient 0-2 M.

**Prosedyre****Pakking av kolonne:**

1. 500 ml ferdigsvullet kolonnemateriale ble degasset ved hjelp av en vakuumpumpe.
2. Kolonnematerialet ble overført til kolonnen ved å helle langs en glasstav for å unngå luftbobler.
3. Kolonnen ble vasket med 2 kolonnevolum degasset vann.

**Eluering av prøver:**

1. Prøvevolum ble degasset, filtrert og applisert på kolonnen med hastighet 2 ml/min.
2. Nøytrale molekyler ble eluert ut med 1,5 kolonnevolum destillert vann.

3. Sure polysakkarider ble eluert ut med gradienteluering 0-2 M NaCl i 15 timer (2ml/min).
4. En fraksjonssamler med sentrifugerør samlet opp eluatet, og karbohydratinnholdet i fraksjonene ble bestemt ved hjelp av fenol-svovelsyretesten (metode 5.1.10). Rørene ble på grunnlag av dette slått sammen i større fraksjoner. Disse isolerte fraksjonene ble senere dialysert og frysetørket.

### Rensing og regenerering av kolonne:

1. Kolonnen ble eluert med ett kolonnevolum 2 M NaCl.
2. Kolonnen ble vasket med ca. 5 kolonnevolum destillert vann til 2 ml av vaskevannet ikke ble blakket av 2 dråper AgNO<sub>3</sub>.

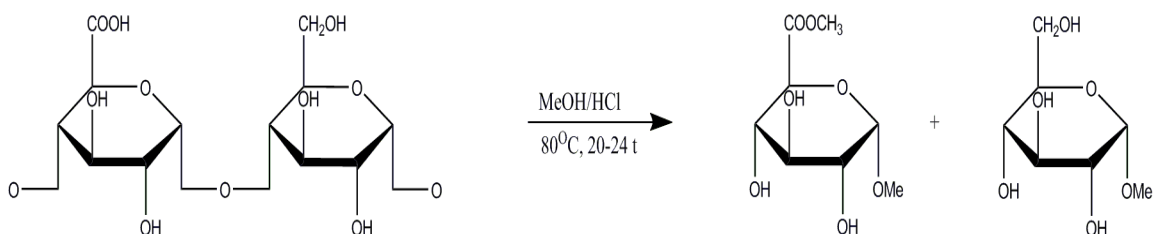
## 5.4 Monosakkaridbestemmelse

### 5.4.1 Metanolyse

#### Prinsipp:

(Chambers og Clamp 1971; Cui 2005)

Metanolyse er en metode som benyttes for å få informasjon om polysakkaridenes monosakkaridsammensetning. Polysakkaridene metanolyses ved å benytte sterk syre i vannfri metanol. Glykosidbindingene vil da kløyves, og det blir dannet metylglykosider av monosakkaridene. I tillegg dannes det metylestere av uronsyrene. Det må ikke skje en hydrolyse, så det er viktig at metoden utføres i et vannfritt miljø.



Figur 5-4: Metanolyse av et surt polysakkarid til metylester og metylglykosid (Inngjerdingen 2000)

---

**Reagenser:**

4 M HCl i vannfri metanol

Vannfri metanol

Intern standard: 1 µg/µl mannitol i 1 M HCl i vannfri metanol

**Utstyr:**

Supelcorør med teflonbelagt skrukork (4 ml)

Pasteurpipette 1 ml og peleusballong

Syreresistent glasspipette

SMI rør (blå)

P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> vakuumeksikator

Varmeskap (Heraeus)

**Prosedyre:**

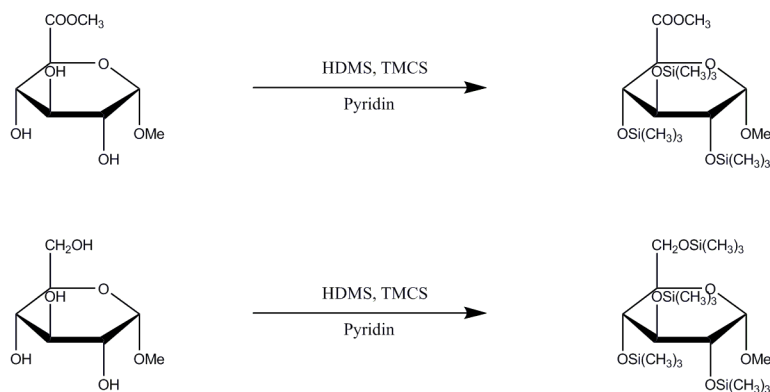
1. 1 mg frysetørket prøve ble veid inn i et syrevasket supelcorør.
2. Prøvene ble dekket med perforert parafilm og tørket i vakuumeksikator i 24 timer.
3. 1 ml 4 M HCl i metanol ble tilsatt.
4. 100 µl mannitol ble tilsatt som intern standard.
5. Prøvene ble satt i varmeskap i 20-24 timer (80°C). Etter 10 minutter ble korken skrudd godt til for å hindre fordamping.
6. Prøvene ble dampet inn til tørrhet under nitrogengass ved 40°C.
7. 200 µl vannfri metanol ble tilsatt.
8. Prøvene ble på ny dampet inn til tørrhet under nitrogengass ved 40°C.
9. Trinn 7-8 ble gjentatt 2 ganger.
10. Prøvene ble dekket med perforert parafilm og tørket i eksikator i minimum en time før TMS-derivatisering.

***TMS-derivatisering*****Prisipp:**

(Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004)

Mange forbindelser er lite flyktige, dette gjelder blant annet monosakkarider. Disse har ofte polare funksjonelle grupper som gjør at de har vanskelig for å fordampe. I tillegg kan de

forårsake adsorpsjon til overflater, noe som kan resultere i at stoffene elueres som brede topper med haledannelse. Hensikten med derivatiseringen er å lage flyktige og termisk stabile derivater av monosakkaridene. Dette vil gjøre dem bedre egnet for gasskromatografi. Under derivatiseringen omdannes polare grupper til upolare grupper, det vil si frie hydroksylgrupper reagerer med trimetylklorsilan og heksametyldisilasan til pertrimetylsilyleter (TMS-derivater). Pyridin benyttes om løsningsmiddel.



Figur 5-5: Reaksjon mellom metylglykosid med og uten metylestergruppe med TMS-reagens (Inngjerdingen 2000)

### Reagenser:

TMS-reagens:

- 1 ml Trimetylklorsilan (TMCS)
- 2 ml Heksametyldisilasan (HDMS)
- 5 ml Pyridin, vannfri

### Utstyr:

- Transferpettor® 100 µl
- SMI glassrør (blå)
- Whirlimixer (Fisons)

### Prosedyre:

1. 200 µl TMS ble tilsatt de metanolyserte prøvene og mikset godt.
2. Etter 30 minutter ble prøven injisert på GC.

## Gasskromatografi (GC-FID)

### Prinsipp:

(Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004)

Gasskromatografi (GC) er en separasjonsmetode for å separere stoffer i gassform. Mobilfasen, som kalles bæregass, strømmer gjennom en oppvarmet kolonne under trykk. Stoffene blir injisert i en oppvarmet injektor ved inngangen til kolonnen, her fordampes de. Bæregassen vil bringe dem gjennom kolonnen i gassform. Siden stoffene vil fordele seg ulikt mellom stasjonærfasen og bæregassen, vil de strømme med ulik hastighet gjennom kolonnen. Stoffenes hastighet vil være avhengig av deres flyktighet og løselighet i stasjonærfasen. En detektor ved utgangen av kolonnen vil detektere stoffene. GC egner seg for separasjon av flyktige og termisk stabile stoffer, eller stoffer som kan omdannes til flyktige og termisk stabile derivater. Temperatur er den viktigste parameteren som styrer retensjonen i GC. Ved å benytte en velegnet temperaturprogrammering kan en ønsket separasjon av stoffene oppnås.

Flammeionisasjonsdetektoren (FID) er en ionisasjonsdetektor som blir mye brukt. Detektoren måler elektrisk strøm fra ladede partikler (ioner) som oppstår når organiske stoffer brenner i en flamme. Det blir så skrevet ut et kromatogram, der ulike monosakkarider kan identifiseres ved å se på retensjonstider, antall topper og forholdet mellom dem. Det er vanlig å velge en intern standard, i denne oppgaven benyttes mannitol.

### Utstyr og betingelser:

Gasskromatograf:	Carlo Erba 6000 Vega Series 2
Programmeringsenhet:	ICU 600
Integrator:	Chrom-Card (datamaskin styrt)
Detektor:	Flammeionisasjonsdetektor (FID) med H <sub>2</sub> og luft til flammen
Injektor:	Splitt:splittless
Kolonne: DB-5 (J & W Scientific), "Fused silica"	Lengde: 30 m Indre diameter: 0,32 mm Filmtykkelse: 0,25 µm
kapillærkolonne	
Bæregass:	Helium
Flow:	Gjennom kolonnen: 1,8 ml/min Splitt flow: 11 ml/min

	Splittforhold 1:6
Injiseringvolum:	1,0 $\mu$ l
Injektortemperatur:	260 °C
Detektortemperatur:	310 °C
Temperaturprogram:	140 °C $\xrightarrow{1\text{ °C/min}}$ 170 °C $\xrightarrow{6\text{ °C/min}}$ 250 °C

**Prosedyre:**

1. 1  $\mu$ l TMS-derivatisert prøve ble injisert.
2. Sprøyte ble vasket med pyridin mellom hver prøvopåsetting.
3. Hver kjøring tok ca. 1 time.

### 5.4.2 Bestemmelse av fruktose og frukto-oligosakkarider

Testen ble utført ved avdeling for Farmasøytisk kjemi, Farmakognosi, under veiledning av Ellen Hanne Cohen.

Tilstedeværelse av fruktose i prøvene vil ikke bli oppdaget ved metanalyse. Derfor ble fruktose identifisert ved kromatografi i Dionex systemet, ICS-3000. Løk er i tillegg kjent for å inneholde frukto-oligosakkarider, så disse ble også identifisert ved denne metoden.

Råekstraktene som ble testet for innhold av fruktose og frukto-oligosakkarider var:

- 96 % etanolekstrakt fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)
- 50 % etanolekstrakt fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)
- 50°C vannekstrakt fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)
- 100°C vannekstraktene fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)

**Reagenser:**

Destillert vann

Metanol (Merck)

NaOH (J.T. Baker)

NaOAc (Riedel-de Haen)



**Utstyr og betingelser:**

System:	Dionex, ICS-3000 (Ion Chromatography System)
Deteksjon:	Pulsed Amperometric Detection (PAD)
Kolonne:	CarboPac PA-100 Analytisk (4x250mm)
Eluent komposisjon:	%A: 100 mM NaOH %B: 100 mM NaOH/500 mM NaOAc
Flow:	1 ml/min

Eluent profil	Tid (minutt)	%A	%B
Start	0	98	2
	50	60	40
Slutt	60	98	2

Tabell 5-1: Eluent profil for kjøring på Dionex ICS-3000

**Prosedyre:**

1. 1 mg prøve ble løst i destillert vann (1 mg/ml).
2. Prøvene ble analysert ved Dionex ICS-3000.

## 5.5 Biologisk aktivitet

### 5.5.1 Komplementfikseringstest

Denne testen ble utført på Folkehelseinstituttet, under veiledning av Anne Cathrine Vestrheim og Terje Michaelsen.

Råekstrakter og isolerte fraksjoner ble testet for komplementfikserende aktivitet, med unntak av ionebytterfraksjonen: R-50-II-1. Det ble for liten mengde av stoffet etter dialyse.

**Prinsipp** (Yamada og Kiyohara 1999; Michaelsen et al. 2000):

Denne testen viser om prøvematerialet har en komplementfikserende aktivitet. Dette gjøres ved å se på grad av hemolyse av antistoffsensibiliserte saueerytrocytter (SRBC).

Komplementfikserende aktivitet kan være forbruk av komplement (komplement aktivering), eller påvirkning av enkelte komplementfaktorer slik at disse hemmes eller inaktiveres.

Testen viser ikke på hvilken måte komplement blir påvirket, en redusert hemolyse er kun en indikasjon på at prøven påvirker komplement.

Erytocyter fra sau sensibiliseres med antistoff fra kanin. Prøvematerialet inkuberes først sammen med komplement. På denne måten får prøven tid til å reagere med komplementet før blodet tilsettes. Hemolyse av de røde blodcellene vil avta dersom prøven hemmer eller aktiverer komplementet.

PM II brukes som standard. Dette er en polysakkaridfraksjon isolert fra bladene fra groblad (*Plantago Major* L). Groblad har lenge vært kjent i tradisjonell medisin som en sårhelende plante. PM II har vist seg å ha en komplementaktiverende effekt, både via den klassiske og den alternative aktiveringsveien.

### **Reagenser:**

Veronal/BSA-buffer:	Veronalbuffer (CFT pH 7,2) med 2 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin 30 %) og 0,02 % natriumazid
Blodceller fra sau:	Hvit 147, tappet 30/10-08 Hvit 131, tappet 15/01-09
Komplementkilde:	ECG (14/02-08), 1:80, 1:90
Standard:	<i>Plantago major</i> L, fraksjon II (PMII), 1 mg/ml
Antistoff:	Virion 9020 Amboceptor

### **Utstyr:**

Sentrifuge: Heraeus Multifuge 3 SR+ Centrifuge

Varmeskap med ristepate: Termaks, 37 °C

Mikrotiterplater med flat bunn (NUNC™)

Mikrotiterplater med rund bunn (NUNK™)

Mikroplateleser: Thermomax

Whirlimixer: Fisons

Finn-pipetter med spisser

---

## Prosedyre

### Vasking av saueblodceller før sensibilisering:

1. En mengde blodceller ble tatt ut, 100 µl per plate.
2. Disse ble vasket to ganger med fosfatbuffer og en gang med veronal/BSA-buffer.  
Mellom hver vask ble blodet sentrifugert og vaskevannet fjernet.

### Sensibilisering av saueblodceller:

1. 15 µl Virion 9020 Amboceptor, 60 µl pakkede blodceller og 5,925 ml veronal/BSA-buffer ble inkubert under risting ved 37°C i 30 min.
2. Blodet ble vasket 2 ganger med fosfatbuffer og en gang med veronal/BSA-buffer.  
Mellom hver vask ble blodet sentrifugert og vaskevannet fjernet.
3. 5,940 ml veronal/BSA-buffer ble tilsatt blodet, og resultatet ble da en 1 % suspensjon av sensibiliserte blodceller (SRBC)

### Titreringskurve for komplementkilden:

1. 50 µl buffer ble tilsatt 30 brønner i en rundbunnet mikrotiterplate
2. Det ble laget ulike fortynninger av komplement og buffer, se tabell 5-2.
3. 50 µl av hver fortynning ble tilsatt brønnene med 50 µl buffer. Det ble benyttet 3 paralleller av hver fortynning
4. Platen ble dekket med bred teip og satt på risting ved 37°C i 30 minutter
5. 50 µl SRBC ble tilsatt alle brønnene (totalvolum i hver brønn er da 150 µl)
6. Som kontroll ble det benyttet 6 brønner med 100 µl destillert vann + 50 µl SRBC, 6 brønner med 100 µl buffer + 50 µl SRBC og 6 brønner med 150 µl buffer
7. Platen ble dekket med bred teip og satt på risting ved 37°C i 30 minutter før sentrifugering
8. 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet plate, og luftbobler ble fjernet ved sentrifugering
9. Absorbans ble målt ved 405 nm

Forhold komplement:buffer	Komplement ( $\mu$ l)	Buffer ( $\mu$ l)
1:40	10	390
1:50	10	490
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890
1:100	10	990
1:110	10	1090
1:120	10	1190
1:130	10	1290
1:140	10	1390

*Tabell 5-2: Forhold mellom komplement og buffer*

Den fortyningen av komplement og buffer som ga 50 % lyseringsgrad ble benyttet videre i testen. Testen ble utført ulike dager og med ulikt blod. Hvit 147 ga 50 % lyseringsgrad ved forholdet 1:80, hvit 131 ved forholdet 1:90.

#### **Fortynning av prøver og standard:**

1. Prøvene ble løst i veronal/BSA-buffer slik at konsentrasjonen ble 1 mg/ml.
2. Det samme ble gjort med PM II
3. Det ble videre laget en fortynningsrekke av prøvene og PM II (tabell 5-3)

Rør	Konsentrasjon	Innhold
1	1000 $\mu$ g/ml	Stamløsning (1 mg/ml)
2	500 $\mu$ g/ml	300 $\mu$ l buffer + 300 $\mu$ l stamløsning
3	125 $\mu$ g/ml	300 $\mu$ l buffer + 100 $\mu$ l fra rør 2
4	31 $\mu$ g/ml	300 $\mu$ l buffer + 100 $\mu$ l fra rør 3
5	8 $\mu$ g/ml	300 $\mu$ l buffer + 100 $\mu$ l fra rør 4
6	2 $\mu$ g/ml	300 $\mu$ l buffer + 100 $\mu$ l fra rør 5

*Tabell 5-3: Fortynning av prøver og standard*

**Utføring av test:**

1. 50 µl av hver fortynning av prøve og PMII ble overført til en rundbunnet mikrotiterplate. Det ble benyttet to paralleller av hver
2. Komplement ble tint og fortynnet med buffer (1:80 eller 1:90)
3. 50 µl komplement ble tilsatt alle brønnene, unntatt i blank og 100 % lyse brønnene.
4. Platen ble dekket med teip, og satt på risting i varmeskap ved 37°C i 30 minutter
5. 50 µl blodceller ble tilsatt alle brønnene, unntatt i blank
6. Som kontroll ble det benyttet:
  - blank (150 µl buffer i 4 brønner)
  - 100 % lyse (100 µl vann + 50 µl SRBC i 4 brønner)
  - 50 % lyse (50 µl buffer + 50 µl komplement + 50 µl SRBC i 4 brønner)
7. Platen ble dekket med teip, og satt på risting i varmeskap ved 37°C i 30 minutter før sentrifugering
8. 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet plate. Det ble sentrifugert på nytt for å fjerne luftbobler
9. Absorbans ble målt ved 405 nm.

**Beregninger:**

Lyseringsgraden:  $(Abs_{\text{kontroll}}/Abs_{\text{vann}}) * 100 \%$

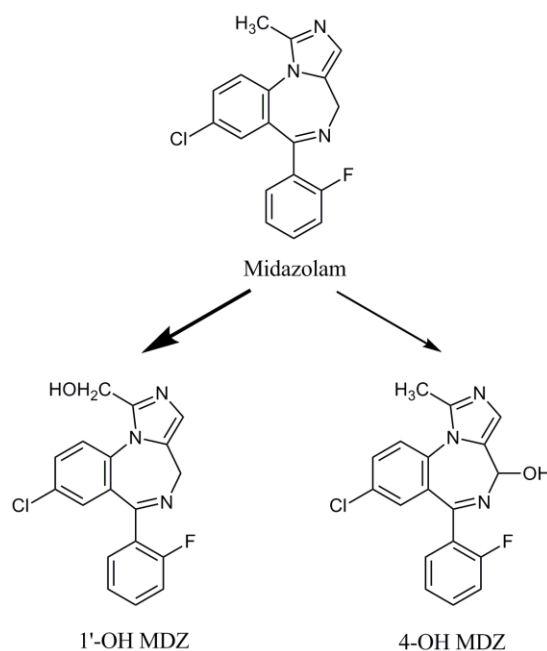
% hemming fra ekstrakt:  $((Abs_{\text{kontroll}} - Abs_{\text{prøve}})/Abs_{\text{kontroll}}) * 100 \%$

## 5.5.2 Mikrosomforsøk med midazolam

Testen ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk biovitenskap, Universitet i Oslo, under veiledning av Hege Christensen og Siri Johannesen.

**Prinsipp:** (Postvoll 2006)

Midazolam er et benzodiazepin som hovedsakelig metaboliseres til metabolitten 1-hydroksy-midazolam (1-OH-MDZ), og til en inaktiv sekundær metabolitt 4-hydroksy-midazolam (4-OH-MDZ). 1-OH-MDZ har lignende farmakologiske egenskaper som midazolam.



Figur 5-6: Metabolisme av midazolam via CYP3A-enzymet. Det dannes mer av 1-OH-MDZ sammenlignet med 4-OH-MDZ (Postvoll 2006).

Metabolismen av midazolam skjer nesten utelukkende via CYP3A-enzymet. Dette gjør at midazolam er mye brukt som CYP3A-modellsubstrat både *in vivo* og *in vitro*. I dette forsøket undersøkes det om prøvene påvirker metabolismen av midazolam. En redusert dannelse av metabolittene vil være en indikasjon på at prøven er en potensiell hemmer av CYP3A4. Ved å kjøre LC-MS kan mengde metabolitter måles. Diazepam ble brukt som intern standard. Prøvenes evne til å påvirke CYP3A4-enzymene beskrives som prosentvis hemming av dannelse av metabolittene 1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ.

---

**Utstyr:**

Vannbad med risting (Gallenkamp)

Whirlmikser (Fisons)

Reagensrør

**Råekstrakter som ble testet:****Prøver løst i metanol (1 mg/ml):**

- 96 % etanolekstrakt fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)

**Prøver løst i buffer (1 mg/ml):**

- 50 % etanolekstrakt fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)
- 50°C vannekstrakt fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)
- 100°C vannekstrakt av gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)

**Mikrosom-batch:**

Supersomer CYP3A4 + b5, fortykning 1:64 (25 µl + 1575 µl Lise Madsen buffer)

**Reagenser:**

Metanol (Merk)

Bufferløsning: Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (200 mM)

MgSO<sub>4</sub> (20 mM)

NADPH (10 mM)

Mobilfase A: 0,05 M ammoniumformiat-buffer pH 4,4

25 % NH<sub>3</sub> : 4,036 ml

Konsentrert HCOOH: 2,125 ml

Ionebyttet vann: 1 L

Mobilfase B: 95 % acetonitril

5 % metanol

Intern standard Diazepam 0,044 µM i acetonitril

**Prosedyre:**

1. 96 % etanolekstraktene ble løst i metanol (1 mg/ml). 100 µl ble overført til reagensrør og dampet av under nitrogen-gass. Deretter ble det tilsatt 149 µl bufferløsning
2. De vandige prøvene ble løst i trisbuffer (1 mg/ml). 100 µl ble overført til reagensrør og tilsatt 13 µl tris-H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 5 µl MgSO<sub>4</sub> og 30 µl NADPH
3. 22 µl av en 20 µM midazolamløsning i bufferblanding ble tilsatt alle rørene. Disse ble mikset godt og preinkubert i 5 minutter ved 37°C på vannbad
4. 50 µl mikrosomer per rør ble tilsatt prøvene på vannbad ved 37°C med risting i 7,5 minutter
5. Rørene ble så tilsatt 220 µl kald etylacetat for å stoppe reaksjonen.
6. Rørene ble vippet forsiktig slik at det ble dannet to faser. Det øverste laget ble overført til et nytt rør.
7. Trinn 5 og 6 ble gjentatt
8. Fasene av etylacetat ble samlet og dampet inn til tørrhet under nitrogen-gass, og løst i 74 µl mobilfase A. 50 µl acetonitril med diazepam ble tilsatt som intern standard, og løsningen ble blandet godt.
9. Prøvene ble lagt i fyser fram til analyse på LC-MS.

**LC-MS analyse****Prinsipp** (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004)

Væskerkromatografi kombinert med massespektrometri (LC-MS) er en metode der stoffene først separeres kromatografisk ved å passere gjennom en kolonne. Stasjonærfasen vil retardere stoffene i ulik grad, og på denne måten separeres de. Når stoffene når massespektrometeret vil de ioniseres og detekteres. Kromatogrammet vil vise en topp for hvert stoff som er separert, disse toppene vil ha tilhørende massespektre der fragmenteringen vises. På denne måten kan de ulike stoffene identifiseres. Gradienteluring med mobilfase A og mobilfase B ble benyttet.



---

**Spesifikasjoner for metoden (LC-MS):**

Liquid Chromatograph (Schimadzu)

Kolonne (Varian):	Inerstil C8
	lengde: 50 mm, indre diameter: 3 mm
	partikkelstørrelse: 5 µM
Injeksjonsvolum:	10 µl
Eluering:	Gradienteluering 17 minutter, mobilfase A og mobilfase B
Hastighet:	0,5 ml/min
Massespektrometer	LC-MS-2010 A (Schimadzu)

**5.5.3 Antimikrobiell aktivitet****Prinsipp:**

Bakterier og sopp ble dyrket på agarskåler. Disse ble plassert i et varmeskap i 24 timer (bakterier) og 48 timer (sopp). Et par kolonier av disse ble løst i fysiologisk saltvann og så sådd ut på nye agarskåler. Prøver som var løst i metanol ble applisert på filterpapir og plassert direkte på agarskålene. Vandige prøver ble tilsatt i brønner i agaren. Agarskålene ble innkubert og hemningssoner avlest etter ett døgn (bakterier) eller to døgn (sopp). Hemningssonene ble sammenlignet med kontroller. På denne måten kunne antimikrobiell aktivitet bestemmes.

**Reagenser:**

Destillert vann  
Metanol (Merck)  
NaCl (Prolabo)

**Utstyr:**

Varmeskap: Termaks  
Agarskåler: Muller Hinton medium (til bakterier)  
Sabouraud medium (til sopp)  
Filterpapir BBL™ Blank Paper Discs, diameter 6 mm

Pasteurpipetter

Sprøyte og filter

Målesylinder

Begerglass

Metyleringsrør med skrukork

Utstansingsrør

Oxoid culti-loop

Høstepinner

### Råekstrakter som ble testet:

#### Prøver løst i metanol (20 mg/ml):

- 96 % etanolekstrakt fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)

#### Prøver løst i destillert vann (10 mg/ml):

- 50 % etanolekstrakt fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)
- 50°C vannekstrakt fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)
- 100°C vannekstrakt fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)

### Mikroorganismer:

Mikroorganisme	Type	Positiv kontroll	Negativ kontroll
Escheria coli (Remel)	Bakterie, G-	Gentamicin	Metanol
Staphylococcus aureus (Remel)	Bakterie, G+	Gentamicin	Metanol
Pseudomonas aeruginosa (Remel)	Bakterie, G-	Gentamicin	Metanol
Candida albicans (Remel)	Sopp	Amphotericin	Metanol

Tabell 5-4: Oversikt over mikroorganismer brukt i testen, med tilhørende kontroller

### Kontroll-løsninger:

- Positiv kontroll: Gentamicin: 0,2 mg/ml (bakterier), Amphotericin: 0,5 mg/ml (sopp)
- Negativ kontroll: Metanol (både for bakterier og sopp)
- Mc Farland standard nr. 2 (standard til å måle bakterietetthet)

**Prosedyre:****Utsåing av mikroorganismene:**

1. Agarskålene ble satt i varmeskap ved 37°C i 30 minutter
2. En Oxoid culti-loop ble fuktet på varm agarskål i 10-15 sekunder, deretter ble mikroorganismen strøket utover skålen. Skålene ble plassert i varmeskap med lokket ned i 24 timer (bakterier) og 48 timer (sopp) ved 37°C.

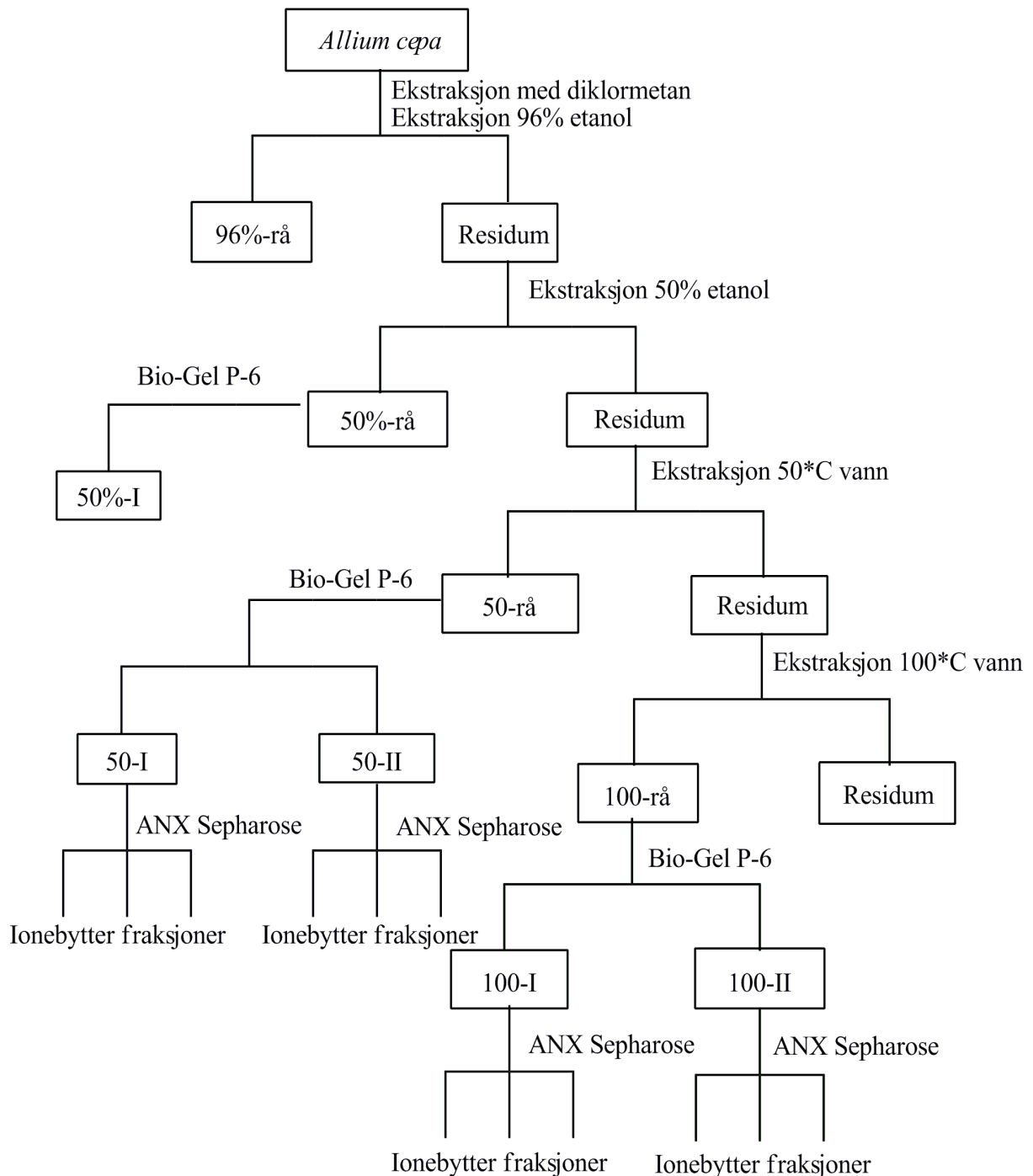
**Påsetting av prøver:**

1. 9 g NaCl ble tilsatt 1 liter vann og sterilfiltrert (0,22µm). Resultatet ble da fysiologisk saltvann 0,9 %.
2. Noen kolonier med bakterier eller sopp ble skrapet av og suspendert i 2 ml fysiologisk saltvann. Tettheten ble sammenlignet med Mc Farland standard nr. 2.
3. 120 µl av suspensjonen ble overført til 25 ml fysiologisk saltvann og blandet godt.
4. 2 ml av inokulatet ble overført til en ny agarskål. Skålen ble vendt slik at hele overflaten ble fuktet. Overskuddet av inokulatet ble fjernet, og skålen satt til tørking med lokket delvis på i 15 minutter til overflaten var tørr.
5. 50 µl av prøvene som ble løst i metanol og positiv kontroll for sopp (Amphotericin) ble applisert på filterpapir og satt til tørking. Disse ble deretter lagt direkte på agarskålene.
6. Det ble trykket ut brønner i agaren til prøvene som var løst i vann og positiv kontroll for bakterier (Gentamicin). 50 µl av hver av disse ble tilsatt brønnene.
7. Skålene ble oppbevart i romtemperatur (bakterier) eller kjøleskap (sopp) i nøyaktig 1 time. De ble deretter innkubert i varmeskap ved 37°C.
8. Hemmingssoner ble avlest med linjal etter 24 timer (bakterier) og 48 timer (sopp)



## 6. Resultater og diskusjon

### 6.1 Ekstraksjon, opprensning og isolering av polysakkarider



Figur 6-1: Flytskjema for opprensning og isolering av polysakkarider fra *Allium cepa* L, løk. Ekstraktene og fraksjonene oppgis som forkortelser. Samme prosedyre ble benyttet for gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild).

### 6.1.1 Ekstraksjon av løk

Løkene som ble benyttet i denne oppgaven var produsert i Landvik i Grimstad hos Bioforsk Øst. Løkene var dypfrost, så disse ble tint før ekstraksjon. Utgangsmaterialet var 1,5 kg gul løk (vanlig), 1,4 kg rød løk og 1,3 kg gul løk (mild). Løkene ble først ekstrahert med diklormetan, deretter med 96 % etanol. Dette ble gjort for å ekstrahere ut lavmolekylære og lipofile substanser. Etter tørking ble løkene ekstrahert med 50 % etanol. Både 96 % og 50 % etanolekstraktene var sterkt farget. Videre ble det ekstrahert med 50 °C vann og 100 °C vann. Vann ble benyttet for å ekstrahere ut mer polare forbindelser, blant annet enkelte typer polysakkarider. 100 °C vannekstraktene ble viskøse, og det var vanskelig å filtrere fra disse (se metode-del). Ekstraksjon av gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild) resulterte i 12 ulike råekstrakt, se tabell 6-1 og flytskjema. 200 ml av 96 % etanolekstraktene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og veid inn. Konsentrasjonen til de andre råekstraktene ble beregnet ut fra 100 ml frysetørket prøve.

Råekstrakt	Type løk	Kons. (mg/ml)	Utbytte (g)
<b>96 % etanolekstrakter</b>	G(v)-96%-rå	77,00	47,28
	R-96%-rå	66,50	43,89
	G(m)-96%-rå	58,00	46,98
<b>50 % etanolekstrakter</b>	G(v)-50%-rå	7,71	3,34
	R-50%-rå	17,17	7,14
	G(m)-50%-rå	9,13	5,99
<b>50 °C vannekstrakter</b>	G(v)-50-rå	2,87	2,03
	R-50-rå	33,11	1,52
	G(m)-50-rå	4,66	2,29
<b>100 °C vannekstrakter</b>	G(v)-100-rå	9,89	5,70
	R-100-rå	9,01	4,23
	G(m)-100-rå	4,07	2,69

Tabell 6-1: Konsentrasjon og utbytte av råekstraktene

### 6.1.2 Isolering og opprensing av polysakkarider

Alle råekstraktene, med unntak av 96 % etanolekstraktene, ble fraksjonert og høymolekylære fraksjoner isolert ved hjelp av gelfiltrering. Deretter ble gelfiltreringsfraksjonene fra 50 °C vann og 100 °C vannekstraktene rensert og fraksjonert videre ved hjelp av ionebytterkromatografi. Fenol-svovelsyretesten ble benyttet for å teste karbohydratinnhold i fraksjonene, og karbohydratprofilen til hver eluering ble bestemt. Profilen dannet grunnlag

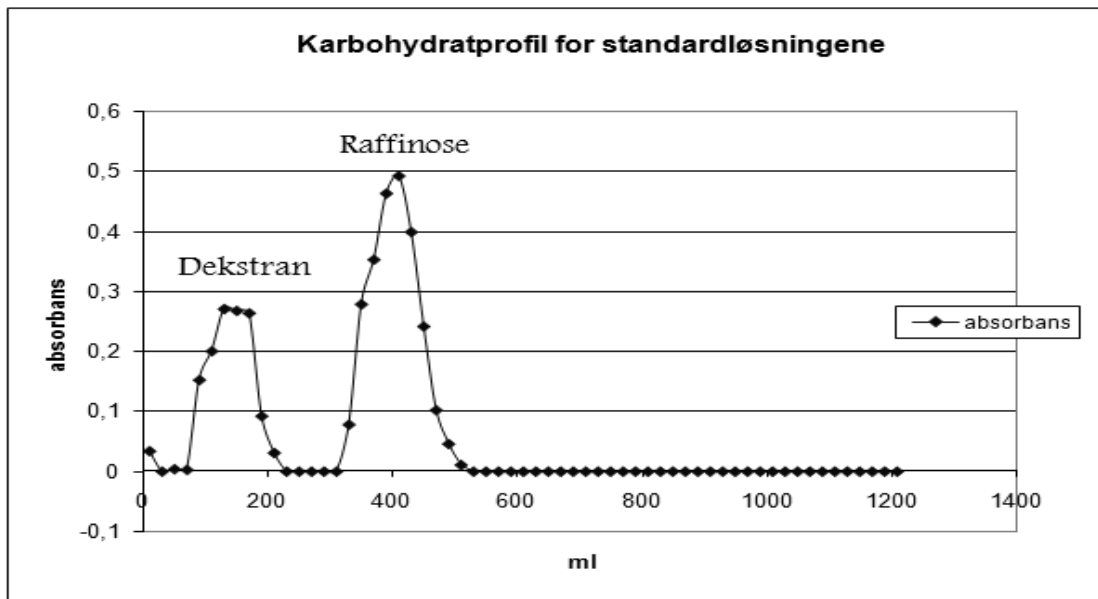
for sammenslåing av ulike fraksjoner. Tabell 6-2 viser en oversikt over råekstrakter, gelfiltreringsfraksjoner og ionebytterfraksjoner.

Råekstrakt	Gelfiltrering	Ionebytterkromatografi
<b>Gul løk (vanlig):</b>		
G(v)-96%-rå		
G(v)-50%-rå	G(v)-50%-I	
G(v)-50-rå	G(v)-50-I	G(v)-50-I-1, G(v)-50-I-2, G(v)-50-I-3
	G(v)-50-II	G(v)-50-II-1, G(v)-50-II-2
G(v)-100-rå	G(v)-100-I	G(v)-100-I-1, G(v)-100-I-2, G(v)-100-I-3
	G(v)-100-II	G(v)-100-II-1, G(v)-100-II-2, G(v)-100-II-3
<b>Rød løk:</b>		
R-96%-rå		
R-50%-rå	R-50%-I	
R-50-rå	R-50-I	R-50-I-1, R-50-I-2, R-50-I-3
	R-50-II	R-50-II-1, R-50-II-2, R-50-II-3
R-100-rå	R-100-I	R-100-I-1, R-100-I-2, R-100-I-3
	R-100-II	R-100-II-1, R-100-II-2, R-100-II-3
<b>Gul løk (mild):</b>		
G(m)-96%-rå		
G(m)-50%-rå	G(m)-50%-I	
G(m)-50-rå	G(m)-50-I	G(m)-50-I-1, G(m)-50-I-2, G(m)-50-I-3
	G(m)-50-II	G(m)-50-II-1, G(m)-50-II-2
G(m)-100-rå	G(m)-100-I	G(m)-100-I-1, G(m)-100-I-2
	G(m)-100-II	G(m)-100-II-1, G(m)-100-II-2

Tabell 6-2: Oversikt over råekstrakter, gelfiltrering- og ionebytterfraksjoner

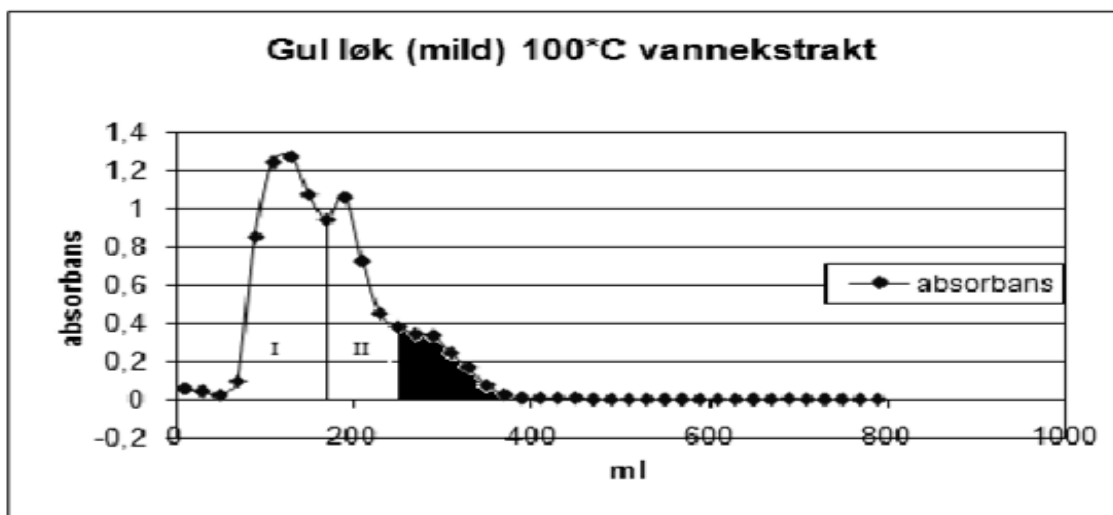
### 6.1.3 Gelfiltrering: Bio-Gel P-6 DG

Ved gelfiltrering separeres stoffene etter molekylstørrelse (metode 5.2). De høymolekulære substansene elueres ut tidligere enn de lavmolekulære substansene. På denne måten ble de høymolekulære stoffene i løkfraksjonene skilt i fra de lavmolekulære stoffene. Kolonne ble først eluert med standardene dekstran og raffinose. Ved å benytte fenol-svovelsyretesten ble karbohydratprofilen til standardene bestemt (figur 6-2).



Figur 6-2: Karbohydratprofil for standardløsningene Dekstran ( $M_w$ : 500 000) og Raffinose ( $M_w$ : 600)

Gelfiltrering ble utført på alle råekstrakter, med unntak av 96 % etanolekstraktene. På bakgrunn av karbohydratprofilen til standardene, ble de høymolekulære polysakkaridene i de ulike ekstraktene slått sammen i fraksjoner.



Figur 6-3: Karbohydratprofil for Gul løk (mild), 100 °C vannekstrakt. Her ble det delt inn i to fraksjoner, disse ble kalt G(m)-100-I og G(m)-100-II.



Figur 6-3 er et eksempel på karbohydratprofil til en av prøvene. Gelfiltrering av alle råekstraktene resulterte i to karbohydratfraksjoner, fraksjon I og II. Med unntak av 50 % etanolekstraktene der det bare ble delt inn i en høymolekylærfraksjon (I), se tabell 6-3. Fraksjon I inneholder polymere med høyere molekylvekt enn Fraksjon II.

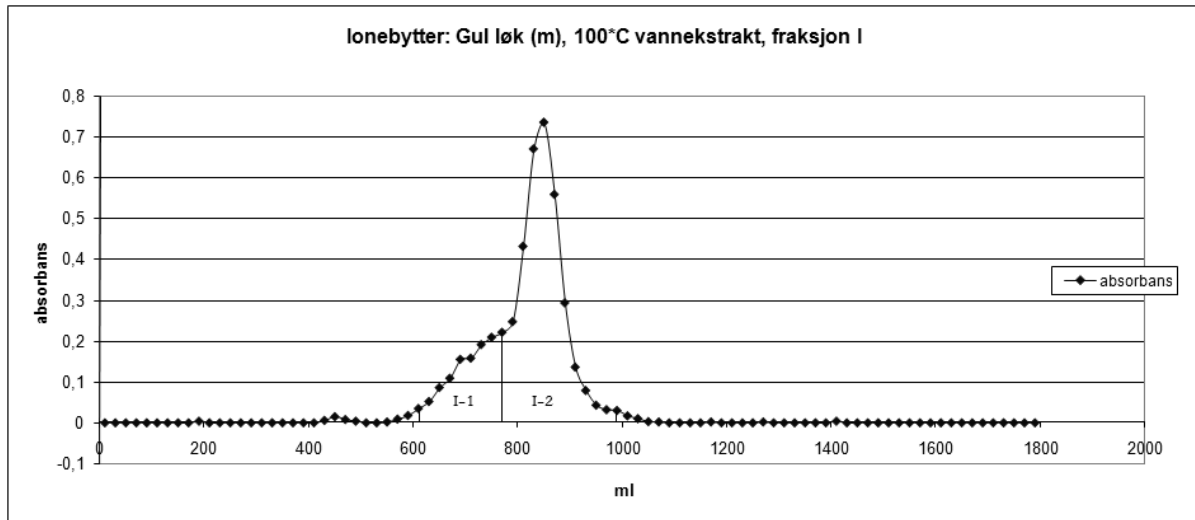
Gelfiltreringsfraksjon	Kons. (mg/ml)	Utbytte (mg)
G(v)-50%-I	0,66	264,0
G(v)-50-I	0,68	299,2
G(v)-50-II	0,35	140,0
G(v)-100-I	3,11	901,9
G(v)-100-II	2,06	597,4
R-50%-I	0,57	228,0
R-50-I	1,27	330,2
R-50-II	0,80	160,0
R-100-I	3,12	748,8
R-100-II	1,98	684,0
G(m)-50%-I	0,29	133,4
G(m)-50-I	1,44	475,2
G(m)-50-II	1,08	334,8
G(m)-100-I	1,75	420,0
G(m)-100-II	1,33	239,4

Tabell 6-3: Konsentrasjon og utbytte av gelfiltreringsfraksjonene. Konsentrasjonen ble beregnet ut fra 20 ml prøve.

#### 6.1.4 Ionebytterkromatografi: ANX Sepharose 4 Fast Flow

Fraksjonene i fra gelfiltrering ble videre fraksjonert på en ionebytterkolonne (metode 5.3), med unntak av 50 % etanolfraksjonene.

Ved hjelp av ionebytterkromatografi ble sure- og nøytrale polysakkarider separert. I tillegg ble de sure polysakkaridene skilt fra hverandre etter ladningsstyrke. Nøytrale polysakkarider ble eluert ut med destillert vann, disse ble ikke videre undersøkt. Sure polysakkarider med negativ ladning ble retardert på kolonnen. Disse ble eluert ut etter økende surhetsgrad ved hjelp av gradienteluering med NaCl (0-2 M). Ved å benytte fenol-svovelsyretesten ble karbohydratprofilen av hver eluering bestemt. Elueringene resulterte i to eller tre forskjellige polysakkaridfraksjoner. Figur 6-4 viser et eksempel på ionebytterkromatografi av en av fraksjonene etter gelfiltrering. I dette eksempelet dannet karbohydratprofilen grunnlag for sammenslåing til to sure polysakkaridfraksjoner.



Figur 6-4: Karbohydratprofil for Gul løk (mild), 100 °C vannekstrakt, fraksjon I. Her ble det delt inn i to nye fraksjoner, disse ble kalt G(m)-100-I-1 og G(m)-100-I-2.

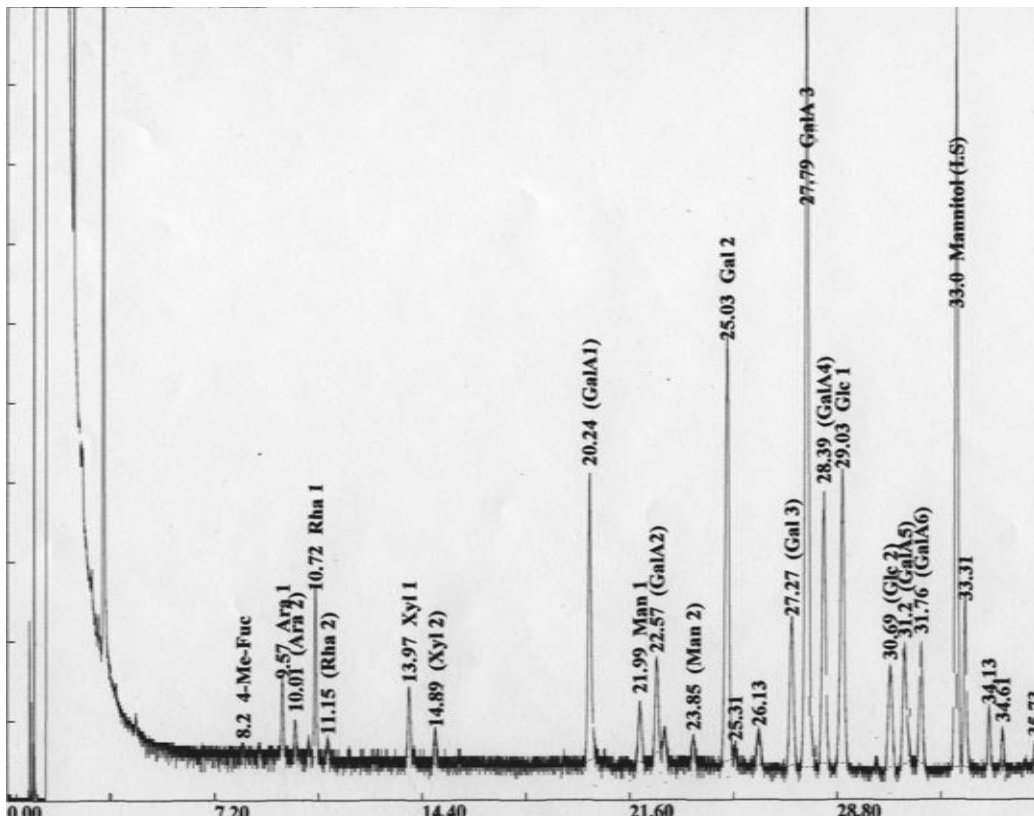
Ionebytterfraksjonene ble videre dialysert og frysetørket. På denne måten kunne konsentrasjon og utbytte bestemmes. Tabell 6-4 viser alle ionebytterfraksjonene og deres konsentrasjon.

<b>Ionebytterfraksjoner</b>	<b>Konsentrasjon (mg/ml)</b>	<b>Utbytte (mg)</b>
G(v)-50-I-1	0,031	4,3
G(v)-50-I-2	0,074	13,8
G(v)-50-I-3	0,219	40,8
G(v)-50-II-1	0,025	3,4
G(v)-50-II-2	0,140	21,9
G(v)-100-I-1	0,339	72,5
G(v)-100-I-2	0,700	166,5
G(v)-100-I-3	0,200	19,6
G(v)-100-II-1	0,137	33,6
G(v)-100-II-2	0,789	141,9
G(v)-100-II-3	0,102	22,2
R-50-I-1	0,016	1,6
R-50-I-2	0,077	13,5
R-50-I-3	0,312	61,2
R-50-II-1	0,004	0,3
R-50-II-2	0,028	4,0
R-50-II-3	0,264	51,8
R-100-I-1	0,380	84,3
R-100-I-2	0,402	91,6
R-100-I-3	0,541	112,6
R-100-II-1	0,084	14,0
R-100-II-2	0,395	90,0
R-100-II-3	0,599	137,7
G(m)-50-I-1	0,021	4,2
G(m)-50-I-2	0,093	18,5
G(m)-50-I-3	0,356	67,0
G(m)-50-II-1	0,043	8,7
G(m)-50-II-2	0,302	63,4
G(m)-100-I-1	0,173	37,1
G(m)-100-I-2	0,389	96,5
G(m)-100-II-1	0,081	15,2
G(m)-100-II-2	0,343	67,9

Tabell 6-4: Konsentrasjon og utbytte av de ulike ionebytterfraksjonene etter dialyse

## 6.2 Monosakkaridbestemmelse

Ved hjelp av metanolyse, TMS-derivatisering og gasskromatografisk analyse ble monosakkaridinnhold i de ulike råekstraktene og fraksjonene bestemt. Dette ga kvantitative og kvalitative resultater. Monosakkaridene ble identifisert ved å se på retensjonstider, antall topper og forholdet mellom dem i kromatogrammene. Mannitol ble benyttet som intern standard. Intern standard ble tilsatt for å korrigere for eventuelle tap under prøveopparbeidelsen og variasjon i injisering. De relative retensjonstidene til monosakkaridene ble oppgitt i henhold til den interne standarden. Mengde monosakkarid ble beregnet ved å se på arealet under bestemte topper for de forskjellige monosakkaridene. Dette arealet var relatert til arealet av den interne standarden. Figur 6-5 viser et eksempel på et kromatogram der monosakkaridinnholdet i en av prøvene ble bestemt. Tabellene 6-5, 6-6 og 6-7 viser prosentvis fordeling av de ulike monosakkaridene i de ulike prøvene. Dersom det prosentvise innholdet av et monosakkarid var under en prosent, ble det oppført som spor i tabellene.



Figur 6-5: Bestemmelse av monosakkaridinnhold i G(v)-50-II.

## 6.2.1 Monosakkaridinnhold i 50 % etanolekstrakter og gelfiltreringsfraksjoner

Fraksjon 50 % etanol	Ara	Rha	Xyl	Man	Gal	Glc	GlcA	GalA	karbohydrat i prøven (%)
<b>G(v)-50%-rå</b>	3,7	2,4	0,0	2,8	11,1	67,8	0,0	12,2	60
<b>G(v)-50%-I</b>	11,3	5,8	spor	3,0	23,1	spor	spor	56,9	100
<b>R-50%-rå</b>	spor	spor	0,0	spor	6,9	93,1	0,0	spor	38
<b>R-50%-I</b>	13,6	6,2	2,4	5,8	42,4	5,2	spor	24,5	63
<b>G(m)-50%-rå</b>	2,9	2,3	1,0	4,3	12,6	70,6	0,0	6,4	65
<b>G(m)-50%-I</b>	14,2	10,3	2,1	6,6	42,7	3,1	spor	20,9	100

Tabell 6-5: Monosakkaridinnhold i 50 % etanolekstrakter og fraksjoner. Tallene er oppgitt i prosent.

Alle 50 % etanol råekstrakter fra de ulike løkene inneholder forholdsvis store mengder glukose, og relativt lite galakturonsyre. Tabell 6-5 viser at total mengde karbohydrat i prøvene øker etter gelfiltrering. Dette tyder på at råekstraktene også inneholder andre substanser enn karbohydrater, som blant annet lavmolekylære substanser. Etter gelfiltrering minker prosentvis innhold av glukose drastisk. Derimot øker prosentvis innhold av arabinose, rhamnose, xylose, mannose og galaktose. Spor av glukuronsyre ses også i gelfiltreringsfraksjonene. G(v)-50%-rå inneholder noe galakturonsyre, denne prosenten øker veldig etter gelfiltrering. Monosakkaridfordelingen til fraksjonene R-50%-I og G(m)-50%-I ligner på hverandre, mens G(v)-50%-I skiller seg noe ut. G(v)-50%-I inneholder forholdsvis mye mer galakturonsyre sammenlignet med de to andre. Generelt inneholder gelfiltreringsfraksjonene fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild) prosentvis mye galaktose og galakturonsyre, i tillegg til å inneholde en del arabinose og rhamnose. Dette kan tyde på at de høymolekylære polysakkaridfraksjonene inneholder pektintype polysakkarid.

## 6.2.2 Monosakkaridinnhold i 50 °C vannekstrakter og fraksjoner fra gelfiltrering og ionebytterkromatografi

Fraksjon 50°C vann	Ara	Rha	Xyl	Man	Gal	Glc	GlcA	GalA	karbohydrat i prøven (%)
G(v)-50-rå	2,5	3,4	1,4	1,4	29,6	4,8	0,0	56,8	100
G(v)-50-I	2,0	3,5	1,0	spor	33,1	1,5	0,0	58,4	100
G(v)-50-II	1,4	2,5	1,8	2,4	18,4	13,1	0,0	60,6	100
G(v)-50-I-1	1,5	spor	2,9	0,0	89,7	1,8	0,0	3,5	98
G(v)-50-I-2	7,1	5,2	2,0	0,0	59,5	spor	1,5	24,4	100
G(v)-50-I-3	2,5	7,1	spor	spor	33,4	1,1	spor	54,1	100
G(v)-50-II-1	4,4	2,2	7,2	2,0	21,5	1,6	spor	59,9	94
G(v)-50-II-2	1,9	4,5	spor	0,0	18,0	spor	0,0	74,3	100
R-50-rå	2,1	3,7	1,2	spor	34,0	2,0	0,0	56,5	100
R-50-I	2,8	4,3	1,1	spor	41,5	1,6	0,0	48,3	100
R-50-II	1,8	2,8	1,5	spor	26,4	1,9	0,0	65,1	100
R-50-I-1	1,9	spor	3,1	15,3	65,6	7,1	0,0	6,1	74
R-50-I-2	9,3	7,7	2,5	spor	53,8	1,3	1,3	23,5	100
R-50-I-3	2,9	7,1	1,1	0,0	40,8	spor	0,0	47,2	100
R-50-II-1	1,0	spor	4,5	7,8	70,4	3,6	0,0	12,3	62
R-50-II-2	7,9	6,3	4,5	spor	51,4	1,6	0,0	27,5	95
R-50-II-3	2,3	4,6	0,0	0,0	37,5	1,6	0,0	54,1	100
G(m)-50-rå	1,4	3,9	1,0	1,5	16,0	3,8	0,0	72,4	100
G(m)-50-I	1,9	5,6	1,0	1,6	19,9	3,0	0,0	66,9	100
G(m)-50-II	spor	2,6	1,0	spor	12,4	1,6	0,0	80,8	100
G(m)-50-I-1	4,6	3,2	7,3	29,9	30,8	16,3	6,4	spor	100
G(m)-50-I-2	8,7	9,8	3,5	1,8	34,5	3,0	0,0	38,7	100
G(m)-50-I-3	2,4	10,4	1,4	spor	31,1	1,3	0,0	53,2	100
G(m)-50-II-1	6,5	8,4	5,6	2,3	26,3	3,9	2,0	45,0	100
G(m)-50-II-2	1,8	7,0	1,0	spor	24,1	1,4	0,0	64,6	100

Tabell 6-6: Monosakkaridinnhold i 50 °C vannekstrakter og fraksjoner. Tallene er oppgitt i prosent.

### Gul løk (vanlig):

Gelfiltreringsfraksjonene G(v)-50-I og G(v)-50-II inneholder prosentvis ganske like mengder av monosakkaridene arabinose, rhamnose, xylose, mannose og galakturonsyre. Forskjellen mellom disse to fraksjonene er at G(v)-50-I inneholder forholdsvis mye mer galaktose, mens G(v)-50-II inneholder forholdsvis mye mer glukose. G(v)-50-I inneholder polymere som er noe mer høymolekylære sammenlignet med G(v)-50-II. Dette fordi G(v)-50-I ble eluert ut før G(v)-50-II ved gelfiltrering.

Ionebytterkromatografi av G(v)-50-I resulterte i 3 fraksjoner og ionebytterkromatografi av G(v)-50-II resulterte i 2 fraksjoner. Her skiller G(v)-50-I-1 seg ut. Denne fraksjonen inneholder forholdsvis lite galakturonsyre, og veldig mye galaktose. G(v)-50-II-1 inneholder forholdsvis mye mer galakturonsyre og mindre galaktose sammenlignet med G(v)-50-I-1. Tabell 6-6 viser også at G(v)-50-II-1 og G(v)-50-II-2 som i utgangspunktet har noe lavere molekylvekt enn de tre isolerte fraksjonene fra G(v)-50-I, inneholder forholdsvis mer galakturonsyre og mindre galaktose. Selv om mengde galakturonsyre i G(v)-50-I-3 og G(v)-50-II-1 er ganske lik, er ikke forholdene mellom de andre monosakkaridene like. Ionebytterfraksjonene inneholder generelt mye galaktose og galakturonsyre. Prosentvis mengde galakturonsyre øker jo senere fraksjonene elueres ut av ionebytterkolonnen, mens prosentvis innhold av galaktose minker.

#### **Rød løk:**

Råekstrakt, gelfiltrering- og ionebytterfraksjoner fra rød løk viser alle at de forholdsvis inneholder mye galaktose og galakturonsyre. R-50-I ser ut til å inneholde prosentvis mer galaktose og mindre galakturonsyre sammenlignet med R-50-II. De tre ionebytterfraksjonene R-50-I-1, R-50-I-2 og R-50-I-3 har nesten lik prosentvis fordeling av monosakkarider som henholdsvis R-50-II-1, R-50-II-2 og R-50-II-3. Fraksjonen R-50-I-1 er spesiell ved at den inneholder prosentvis lite galakturonsyre sammenlignet med de andre fraksjonene.

#### **Gul løk (mild):**

Gelfiltreringsfraksjonene G(m)-50-I og G(m)-50-II har ganske lik prosentvis fordeling av monosakkarider, men G(m)-50-II inneholder forholdsvis mer galakturonsyre og mindre galaktose enn G(m)-50-I. Av ionebytterfraksjonene skiller G(m)-50-I-1 og G(m)-50-II-1 seg ut ved at begge fraksjonene inneholder glukuronsyre. G(m)-50-I-1 inneholder også bare spor av galakturonsyre, mens G(m)-50-II-1 inneholder prosentvis mye galakturonsyre. I tillegg inneholder G(m)-50-I-1 forholdsvis mer mannose og glukose sammenlignet med de andre ionebytterfraksjonene. Generelt inneholder ionebytterfraksjonene fra gul løk (mild) prosentvis mye galaktose og galakturonsyre.

#### ***Kommentar til monosakkaridinnhold i 50 °C vannekstrakter og fraksjoner fra gelfiltrering og ionebytterkromatografi***

De ulike fraksjonene fra både gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild) inneholder generelt forholdsvis mye galaktose og galakturonsyre, se tabell 6-6. Det observeres også mindre

variasjoner i prosentvis fordeling av arabinose, rhamnose og xylose i løkfraksjonene. En spennende observasjon er at G(v)-50-I-1, R-50-I-1 og G(m)-50-I-1 skiller seg fra de andre fraksjonene ved at de alle inneholder en prosentvis liten andel galakturonsyre. R-50-I-1 og G(m)-50-I-1 er også ulike ved at de inneholder prosentvis mer mannose og glukose sammenlignet med alle andre vannfraksjoner. Det kan nevnes at fraksjoner fra gul løk (mild) stort sett inneholder prosentvis noe mindre galaktose enn de andre løkfraksjonene.

### 6.2.3 Monosakkaridinnhold i 100 °C vannekstrakter og fraksjoner fra gelfiltrering og ionebytterkromatografi

Fraksjon 100°C vann	Ara	Rha	Xyl	Man	Gal	Glc	GlcA	GalA	karbohydrat i prøven (%)
G(v)-100-rå	2,4	4,4	spor	0,0	35,3	spor	0,0	58,0	100
G(v)-100-I	2,7	4,8	spor	spor	55,4	spor	0,0	35,8	100
G(v)-100-II	2,3	4,2	spor	0,0	38,8	1,4	0,0	52,5	100
G(v)-100-I-1	4,3	4,3	spor	0,0	79,1	spor	0,0	11,3	100
G(v)-100-I-2	3,6	7,4	spor	0,0	57,9	spor	0,0	30,5	100
G(v)-100-I-3	3,1	5,9	spor	0,0	67,3	spor	0,0	23,1	100
G(v)-100-II-1	5,9	5,8	2,4	0,0	55,1	spor	0,0	30,7	100
G(v)-100-II-2	2,8	6,4	spor	0,0	48,5	spor	0,0	41,9	100
G(v)-100-II-3	2,9	5,2	spor	0,0	59,7	spor	0,0	31,6	100
R-100-rå	2,7	4,6	spor	0,0	45,0	1,3	0,0	45,7	100
R-100-I	2,8	4,6	spor	0,0	58,7	1,8	0,0	31,4	100
R-100-II	2,4	4,4	spor	0,0	39,1	1,5	0,0	52,4	97
R-100-I-1	spor	5,4	spor	spor	80,0	1,0	0,0	11,4	100
R-100-I-2	4,5	5,5	spor	0,0	78,0	spor	0,0	11,3	100
R-100-I-3	2,6	7,1	spor	0,0	45,8	1,5	0,0	42,2	100
R-100-II-1	5,3	7,4	4,1	1,8	73,7	1,3	0,0	6,3	100
R-100-II-2	4,5	6,6	spor	0,0	63,6	spor	0,0	24,5	100
R-100-II-3	2,8	6,7	spor	0,0	43,8	spor	0,0	45,6	100
G(m)-100-rå	2,7	5,9	1,4	0,0	42,0	2,3	0,0	45,7	100
G(m)-100-I	2,9	6,3	1,2	0,0	50,3	1,8	0,0	37,4	100
G(m)-100-II	2,3	5,0	1,0	0,0	32,7	2,3	0,0	56,6	100
G(m)-100-I-1	5,5	6,6	2,4	0,0	62,7	1,4	0,0	21,5	100
G(m)-100-I-2	3,0	9,6	1,6	0,0	55,4	1,1	0,0	29,2	100
G(m)-100-II-1	4,7	5,9	2,4	spor	49,9	1,4	0,0	35,5	100
G(m)-100-II-2	1,7	7,2	spor	0,0	29,7	spor	0,0	60,5	100

Tabell 6-7: Monosakkaridinnhold i 100 °C vannekstrakter og fraksjoner. Tallene er oppgitt i prosent.



**Gul løk (vanlig):**

Råekstraktet og gelfiltreringsfraksjonene fra gul løk (vanlig) inneholder prosentvis mye galaktose og galakturonsyre. G(v)-100-I inneholder forholdsvis noe mindre galakturonsyre enn G(v)-100-II. Dette ses også ved at ionebytterfraksjonene G(v)-100-I-1, G(v)-100-I-2 og G(v)-100-I-3 inneholder en prosentvis mindre mengde galakturonsyre sammenlignet med henholdsvis G(v)-100-II-1, G(v)-100-II-2 og G(v)-100-II-3. Det observeres at G(v)-100-I-2 og G(v)-100-II-2 inneholder mer galakturonsyre enn G(v)-100-I-3 og G(v)-II-3. Dette er spesielt, siden det antas at mengde galakturonsyre som kommer ut av ionebytterkolonnen øker i takt med saltkonsentrasjonen. Det kan derfor antas at G(v)-100-I-2 og G(v)-100-II-2 inneholder galakturonsyre som er metylforetret.

**Rød løk:**

Råekstraktet og isolerte fraksjoner fra rød løk inneholder prosentvis mye galaktose og galakturonsyre. Gelfiltreringsfraksjonen R-100-I inneholder forholdsvis mindre galakturonsyre og mer galaktose enn R-100-II. Ionebytterfraksjonen R-100-II-1 skiller seg ut fra de andre fraksjonene ved at den inneholder prosentvis lite galakturonsyre. Denne fraksjonen inneholder derimot mye galaktose, i tillegg til mer xylose, mannose og glukose enn de andre fraksjonene fra rød løk.

**Gul løk (mild)**

Råekstrakt og isolerte fraksjoner fra gul løk (mild) inneholder forholdsvis mye galaktose og galakturonsyre. Svært små mengder xylose og glukose er til stede i nesten alle fraksjonene, i tillegg til arabinose og rhamnose.

***Kommentar til monosakkaridinnhold i 100 °C vannekstrakter og fraksjoner fra gelfiltrering og ionebytterkromatografi***

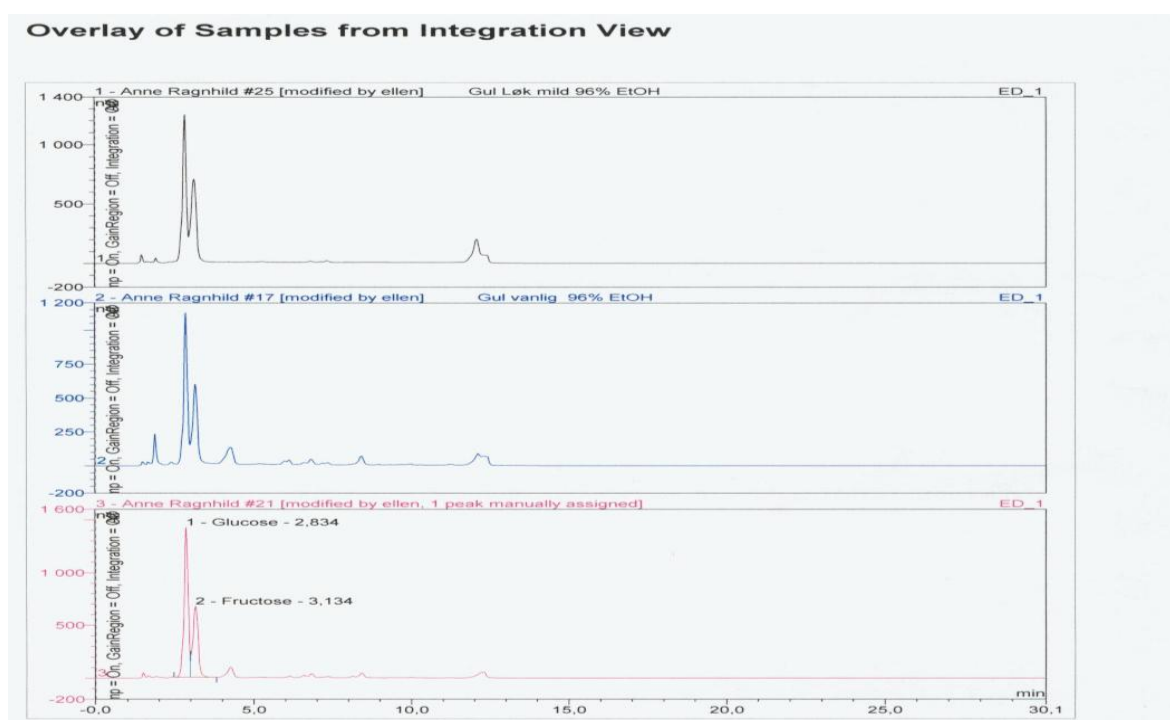
Generelt inneholder råekstraktene og de ulike fraksjonene fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild) prosentvis mye galaktose og galakturonsyre. Tabell 6-7 viser at alle fraksjonene fra de ulike løktypene inneholder en prosentvis lav andel av monosakkaridene arabinose og rhamnose. Xylose, mannose og glukose finnes i veldig liten grad, men noe i gul løk (mild) fraksjonene. En fraksjon som skiller seg ut fra alle de andre fraksjonene er R-100-II-1. Denne fraksjonen inneholder prosentvis mye mindre galakturonsyre sammenlignet med de andre, i tillegg til å inneholde noe xylose, mannose og glukose.

Arabinose, rhamnose, galaktose og galakturonsyre finnes i alle fraksjoner. Den prosentvise høye mengden av galakturonsyre, i tillegg til arabinose, rhamnose og galaktose kan tyde på at fraksjonene inneholder polysakkarider av pektintype. Det er spesielt at alle fraksjonene inneholder en høy andel galaktose, dette er noe uvanlig.

### 6.3 Bestemmelse av fruktose og frukto-oligosakkarider

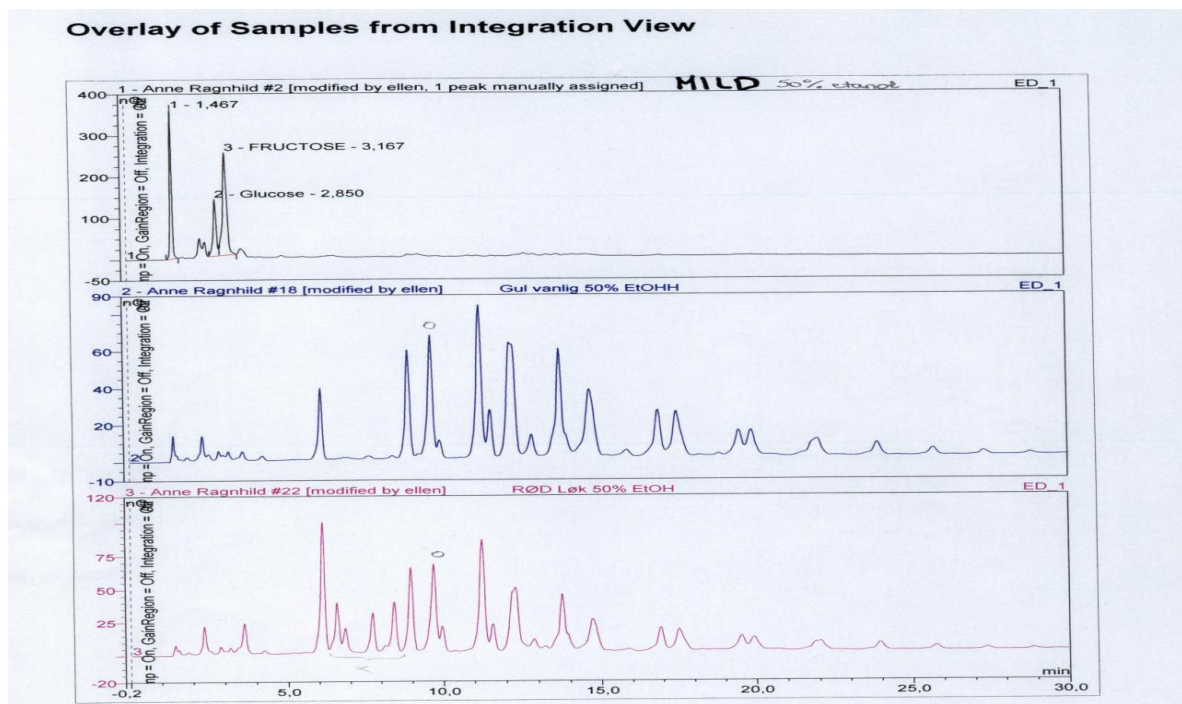
Fruktose kan ikke identifiseres ved metanalyse. Derfor ble fruktose identifisert ved kromatografi i Dionex systemet, ICS-3000. Løk er kjent for å inneholde frukto-oligosakkarider, så disse ble også identifisert ved denne metoden. Råekstraktene som ble testet var:

- G(v)-96%-rå, R-96%-rå og G(m)-96%-rå
- G(v)-50%-rå, R-50%-rå og G(m)-50%-rå
- G(v)-50-rå, R-50-rå, G(m)-50-rå
- G(v)-100-rå, R-100-rå, G(m)-100-rå



Figur 6-6: Kromatogram for 96 % etanolekstrakter. Øverst vises G(m)-96%-rå, i midten G(v)-96%-rå og nederst R-96%-rå.

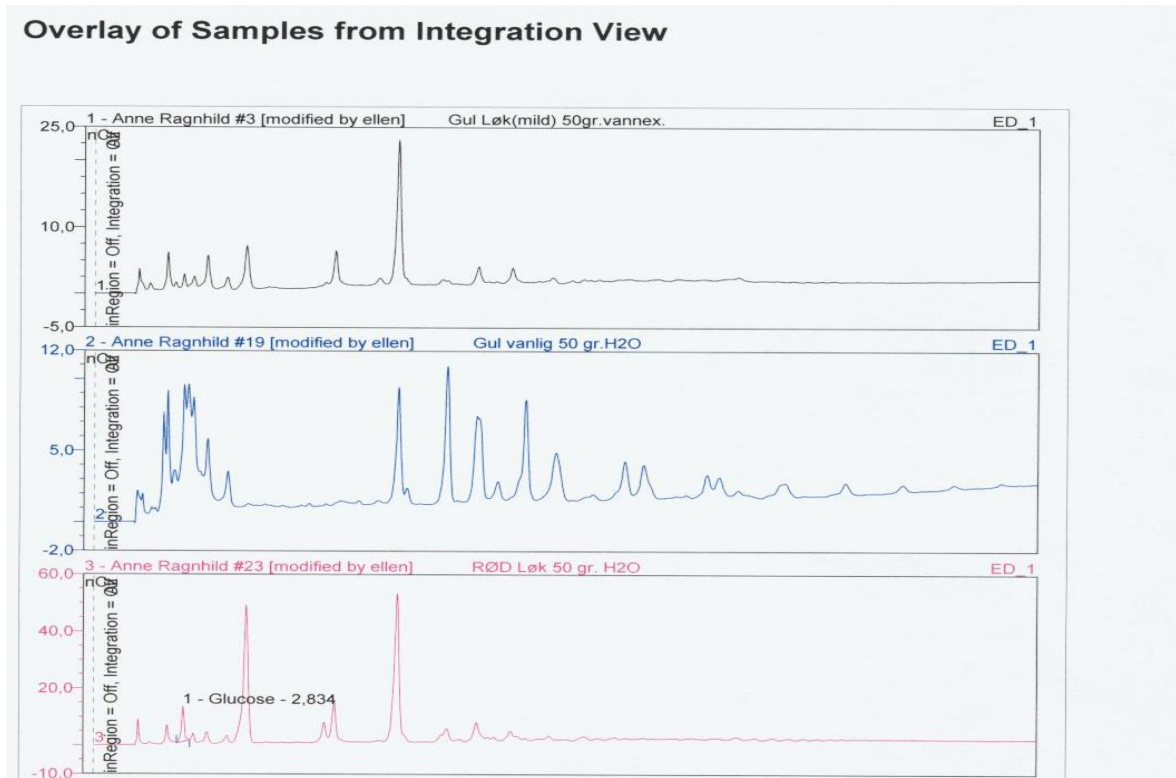
I kromatogrammene for G(m)-96%-rå, G(v)-96%-rå og R-96%-rå vises topper for glukose og fruktose (figur 6-6). Forholdet mellom glukose-toppen og fruktose-toppen er likt for alle løkekstraktene. Toppene har en høy intensitet, og det ser ut til å være like mengder av glukose og fruktose i de ulike ekstraktene. Få topper i kromatogrammene kan tyde på at det er lite frukto-oligosakkarider til stede. Siden 96 % etanolekstraktene inneholder mest upolare og lavmolekylære substanser var dette forventet.



Figur 6-7: Kromatogram for 50 % etanolekstrakter. Øverst vises G(m)-50%-rå, i midten G(v)-50%-rå og nederst R-50%-rå.

I kromatogrammet for G(m)-50%-rå (figur 6-7) vises topper for glukose og fruktose i et annet forhold sammenlignet med toppene i kromatogrammene for 96 % etanolekstrakter (figur 6-6). Fruktose-toppen i kromatogrammet for gul løk (mild) er større enn glukose-toppen, dette er motsatt av hva som var tilfellet for 96 % etanolekstraktene. I kromatogrammene for G(v)-50%-rå og R-50%-rå vises mange topper, disse toppene kan tyde på at det er frukto-oligosakkarider til stede i disse ekstraktene. Intensiteten til toppene er mye lavere sammenlignet med intensiteten til toppene i kromatogrammene for 96 % etanolekstrakter. I kromatogrammet for G(m)-50%-rå vises lite topper. Dette kan skyldes at

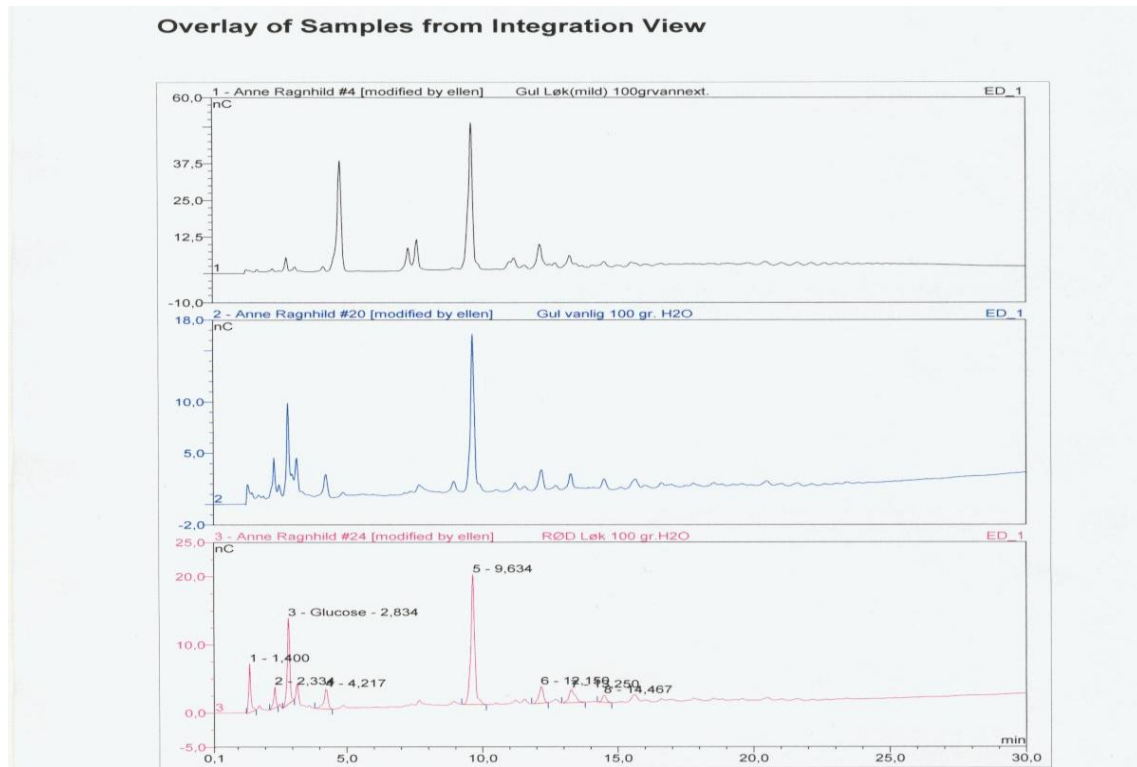
det ikke er frukto-oligosakkarider til stede i dette ekstraktet, eller at det kan ha skjedd en enzymatisk eller kjemisk degradering under opparbeidelse av ekstraktet.



Figur 6-8: Kromatogram for 50 °C vannekstrakter. Øverst vises G(m)-50-rå, i midten G(v)-50-rå og nederst R-50-rå.

I kromatogrammene for 50 °C vannekstrakter vises relativt få topper med lav intensitet (figur 6-8). Dette kan tyde på at det er lite fruktose og glukose til stede i disse ekstraktene.

Kromatogrammet for G(m)-50-rå er ganske likt kromatogrammet for R-50-rå, men intensiteten til toppene er forskjellig. G(v)-50-rå ser ut til å inneholde flere typer frukto-oligosakkarider enn de andre to, men innholdet er lavt siden intensiteten på toppene er lave.



Figur 6-9: Kromatogram for 100 °C vannekstrakter. Øverst vises G(m)-100-rå, i midten G(v)-100-rå og nederst R-100-rå.

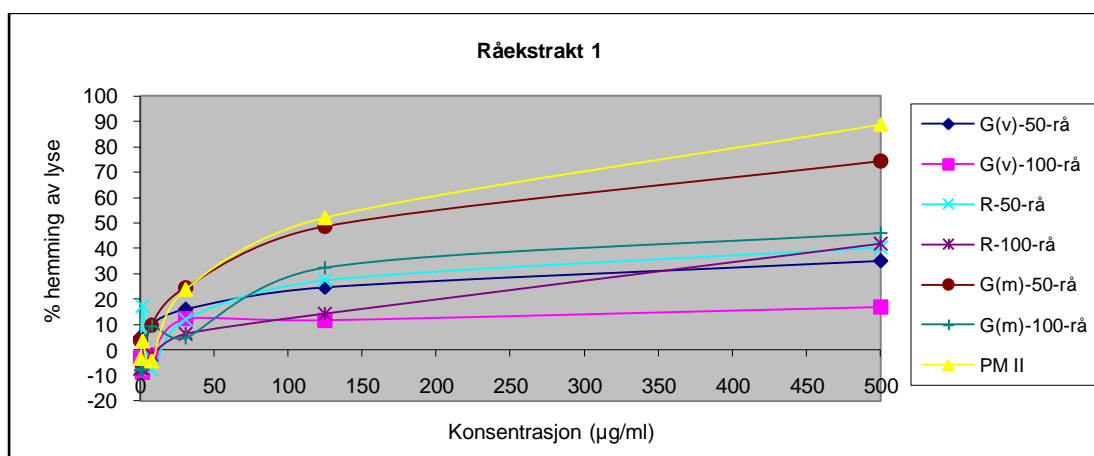
Kromatogrammene for G(m)-100-rå, G(v)-100-rå og R-100-rå viser at disse ekstraktene inneholder lite fruktose og glukose siden intensiteten til toppene er svært lav (figur 6-9). Kromatogrammene for alle 100 °C vannekstraktene, i tillegg til kromatogrammene for G(m)-50-rå, R-50-rå, er ganske like. Alle ekstraktene domineres av en topp selv om intensiteten er forskjellig. Denne toppen er ukjent, men antas å være en type frukto-oligosakkarid. Det ble også observert at kromatogrammet for G(m)-100-rå og kromatogrammet for R-50-rå var veldig like.

## 6.4 Biologisk aktivitet

### 6.4.1 Komplementfikseringstest

Alle fraksjoner, med unntak av R-50-II-1, ble testet for komplementfikserende aktivitet (metode 5.5.1). Denne testen viste om de ulike fraksjonene påvirker komplementsystemet. Testen sier ikke noe om komplement aktiveres eller hemmes. Testen måler i hvilken grad fraksjonene hemmer hemolyse av røde blodceller fra sau. Aktiviteten ble målt i prosent hemming av lyse. I tillegg ble  $ICH_{50}$ -verdien for hver fraksjon beregnet. Denne verdien er den laveste konsentrasjonen av prøve som gir 50 % hemming av hemolyse. Lave  $ICH_{50}$ -verdier viser at prøven har høy komplementfikserende aktivitet. PM II, som er et polysakkarid med definert aktivitet, ble brukt som standard (Michaelsen et al. 2000).

#### Råekstrakter



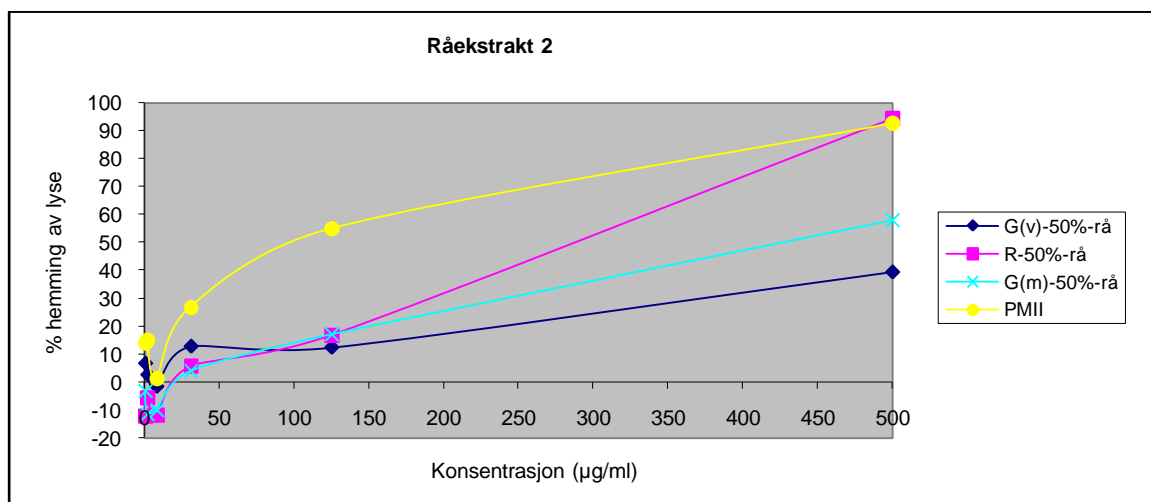
Figur 6-10: Komplementfikserende aktivitet for prøver fra råekstrakt 1

Råekstrakt 1	$ICH_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>G(v)-50-rå</b>	>500
<b>G(v)-100-rå</b>	>500
<b>R-50-rå</b>	>500
<b>R-100-rå</b>	>500
<b>G(m)-50-rå</b>	139
<b>G(m)-100-rå</b>	>500
<b>PM II</b>	112

Tabell 6-8:  $ICH_{50}$ -verdier for prøver fra råekstrakt 1

### 50 °C og 100 °C vannekstrakter:

På denne platen viste G(m)-50-rå høyest aktivitet (figur 6-10). Tabell 6-8 viser at  $ICH_{50}$ -verdien til G(m)-50-rå var 139  $\mu\text{g/ml}$ .  $ICH_{50}$ -verdien til de andre råekstraktene kunne ikke bestemmes, dette fordi konsentrasjonen som ble benyttet ikke var høy nok til å gi 50 % hemming av lyse. Siden 500  $\mu\text{g/ml}$  ikke var en høy nok konsentrasjon for å få 50 % lyse ble det senere benyttet en startkonsentrasjon på 1000  $\mu\text{g/ml}$ .



Figur 6-11: Komplementfikserende aktivitet for prøver fra råekstrakt 2

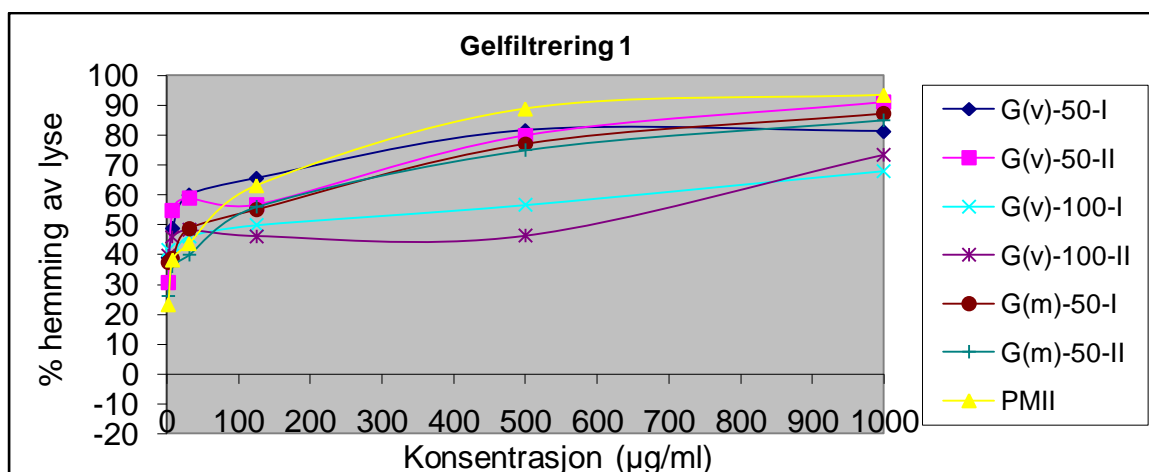
Råekstrakt 2	$ICH_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>G(v)-50%-rå</b>	>500
<b>R-50%-rå</b>	288
<b>G(m)-50-rå</b>	427
<b>PM II</b>	98

Tabell 6-9:  $ICH_{50}$ -verdier for prøver fra råekstrakt 2

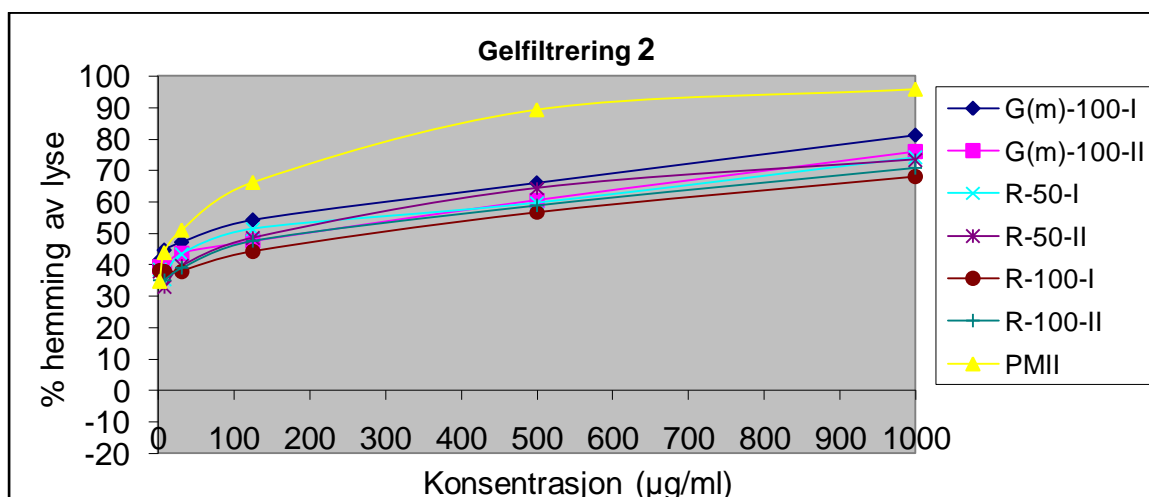
### 50 % etanolekstrakter:

Ingen av etanolekstraktene viste høyere aktivitet enn PM II (figur 6-11). Tabell 6-9 viser at  $ICH_{50}$ -verdiene til de ulike prøvene er mye høyere enn for PM II. Ved konsentrasjon fra ca 100  $\mu\text{g/ml}$  og oppover kan det se ut som R-50%-rå har høyere aktivitet sammenlignet med etanolekstraktene fra de to andre løkene.

## Gelfiltrering



Figur 6-12: Komplementfikserende aktivitet for prøver fra gelfiltrering 1



Figur 6-13: Komplementfikserende aktivitet for prøver fra gelfiltrering 2

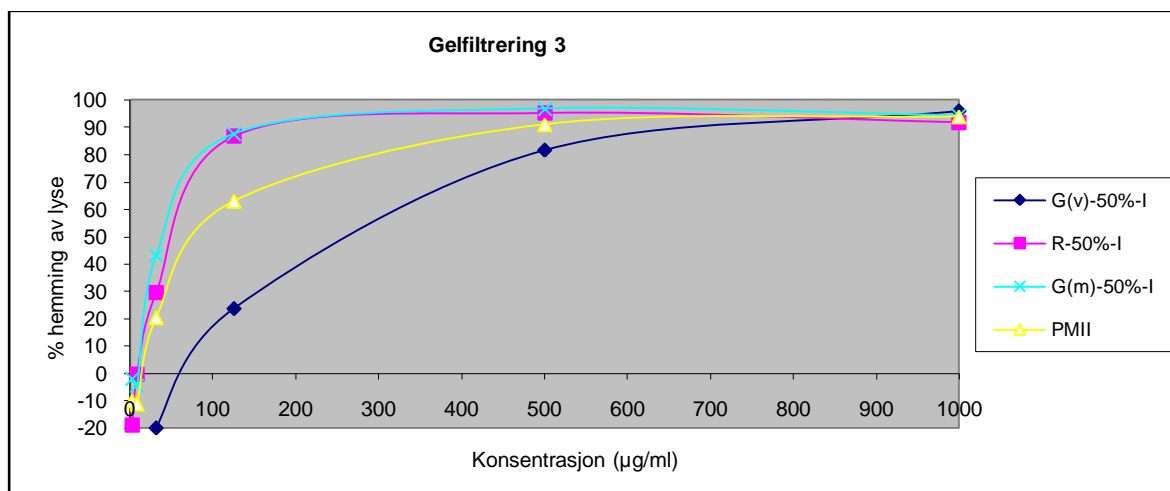
Gelfiltrering 1	ICH <sub>50</sub> (µg/ml)	Gelfiltrering 2	ICH <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>G(v)-50-I</b>	10	<b>G(m)-100-I</b>	62
<b>G(v)-50-II</b>	5	<b>G(m)-100-II</b>	196
<b>G(v)-100-I</b>	135	<b>R-50-I</b>	96
<b>G(v)-100-II</b>	595	<b>R-50-II</b>	154
<b>G(m)-50-I</b>	46	<b>R-100-I</b>	285
<b>G(m)-50-II</b>	80	<b>R-100-II</b>	191
<b>PM II</b>	55	<b>PM II</b>	26

Tabell 6-10: ICH<sub>50</sub>-verdier for prøver fra gelfiltrering 1 og gelfiltrering 2



### Gelfiltreringsfraksjoner fra 50 °C og 100 °C vannekstrakter:

Etter gelfiltrering av råkstraktene har aktiviteten økt for alle tre løkene (figur 6-12, 6-13 og tabell 6-10). Dette kan tyde på at ved gelfiltrering ble det rensset og fraksjonert mer aktive forbindelser. Resultatene viser at gelfiltreringsfraksjonene fra 50 °C vannekstraktene fra gul løk (vanlig) og rød løk har høyere aktivitet enn fraksjonene fra 100 °C vannekstraktene. Når det gjelder gul løk (mild), viser fraksjoner fra 50 °C vannekstraktet, i tillegg til G(m)-100-I høy aktivitet.



Figur 6-14: Komplementfikserende aktivitet for prøver fra gelfiltrering 3

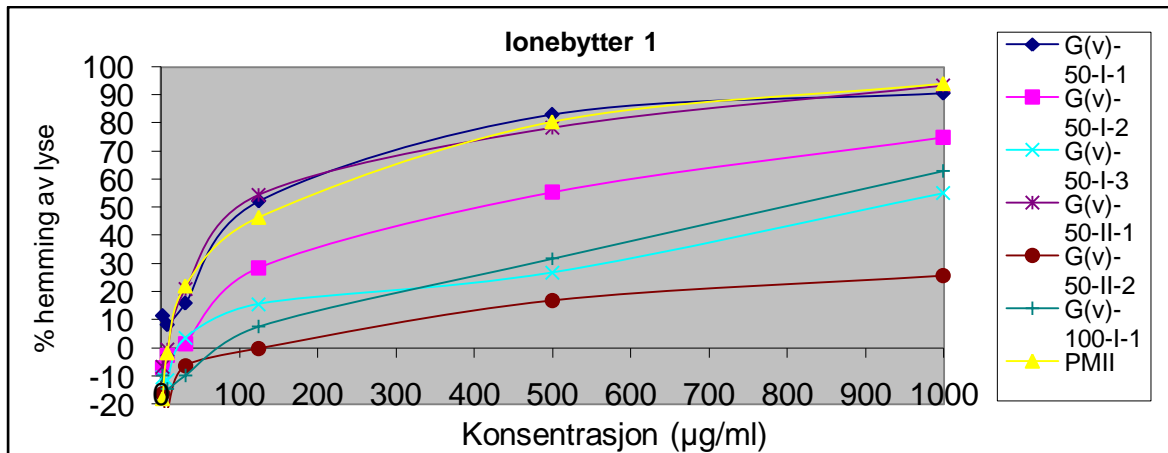
Gelfiltrering 3	ICH <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>G(v)-50%-I</b>	260
<b>R-50%-I</b>	53
<b>G(m)-50%-I</b>	40
<b>PM II</b>	81

Tabell 6-11: ICH<sub>50</sub>-verdier for prøver fra gelfiltrering 3

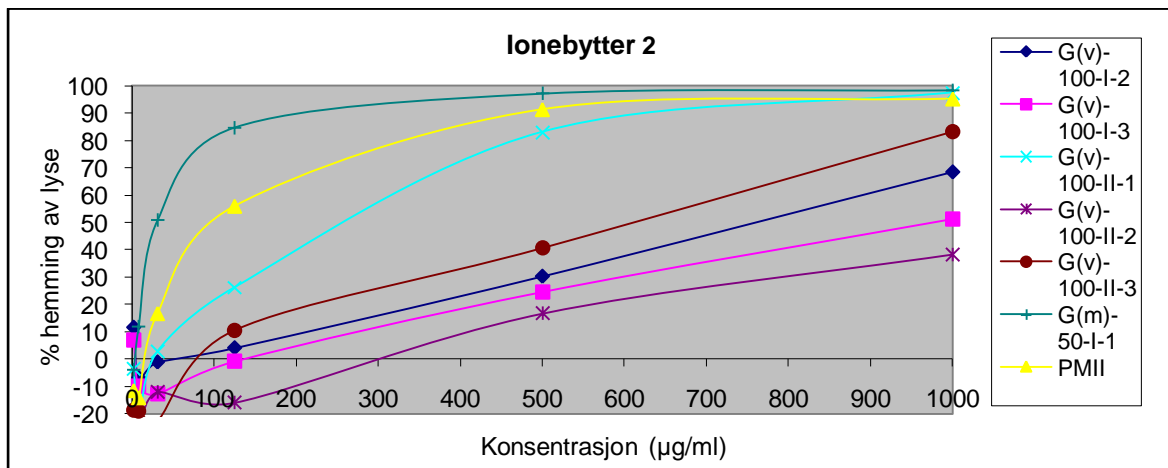
### Gelfiltreringsfraksjoner fra 50 % etanolekstrakter:

Resultatene viser at aktiviteten til 50 % etanolekstraktene etter gelfiltrering har økt veldig (figur 6-14, tabell 6-11). Både G(m)-50%-I og R-50%-I viser en høyere aktivitet enn PM II. G(v)-50%-I viser også økt aktivitet etter gelfiltrering, men denne aktiviteten er noe lavere enn PM II.

## Ionebytter



Figur 6-15: Komplementfikserende aktivitet for prøver fra ionebytter 1



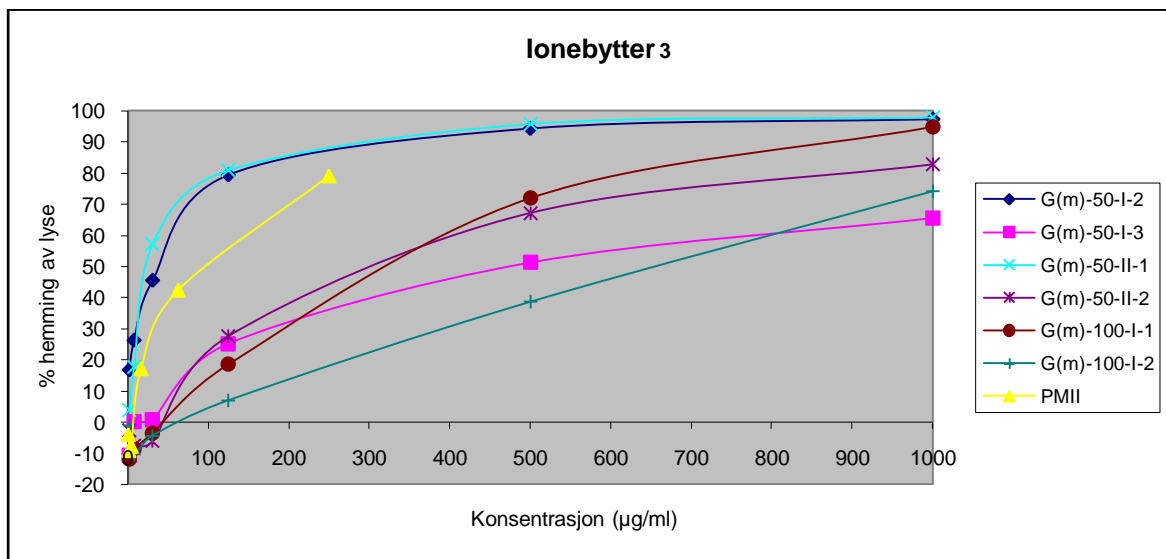
Figur 6-16: Komplementfikserende aktivitet for prøver fra ionebytter 2

Ionebytter 1	ICH <sub>50</sub> (µg/ml)	Ionebytter 2	ICH <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>G(v)-50-I-1</b>	112	<b>G(v)-100-I-2</b>	761
<b>G(v)-50-I-2</b>	406	<b>G(v)-100-I-3</b>	978
<b>G(v)-50-I-3</b>	910	<b>G(v)-100-II-1</b>	257
<b>G(v)-50-II-1</b>	101	<b>G(v)-100-II-2</b>	>1000
<b>G(v)-50-II-2</b>	>1000	<b>G(v)-100-II-3</b>	612
<b>G(v)-100-I-1</b>	793	<b>G(m)-50-I-1</b>	30
<b>PM II</b>	154	<b>PM II</b>	99

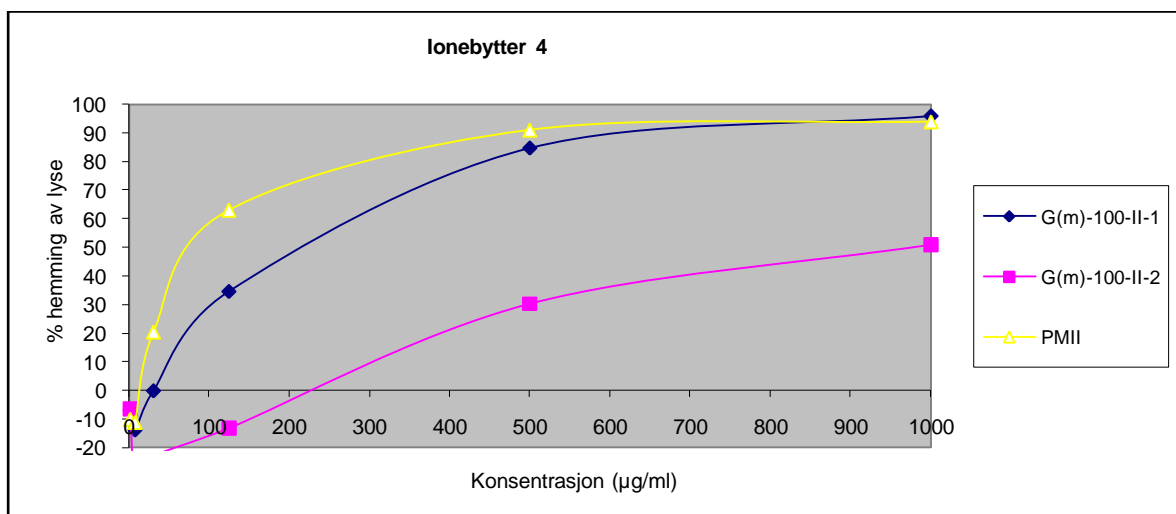
Tabell 6-12: ICH<sub>50</sub>-verdier for prøver fra ionebytter 1 og ionebytter 2

### Gul løk (vanlig):

Ionebytterfraksjonene G(v)-50-I-1 og G(v)-50-II-1 viser begge høy komplementfikserende aktivitet (figur 6-15, tabell 6-12). Disse ser ut til å være like aktive som PM II. I tillegg viser G(v)-50-I-2 aktivitet, men denne aktivitet er lavere enn PM II. Resultatene viser at ionebytterfraksjoner fra 50 °C vannekstraktet har noe høyere aktivitet enn fraksjoner fra 100 °C vannekstraktet. Av 100 °C vannfraksjonene viser G(v)-100-II-1 høyest aktivitet (figur 6-16).



Figur 6-17: Komplementfikserende aktivitet for prøver fra ionebytter 3



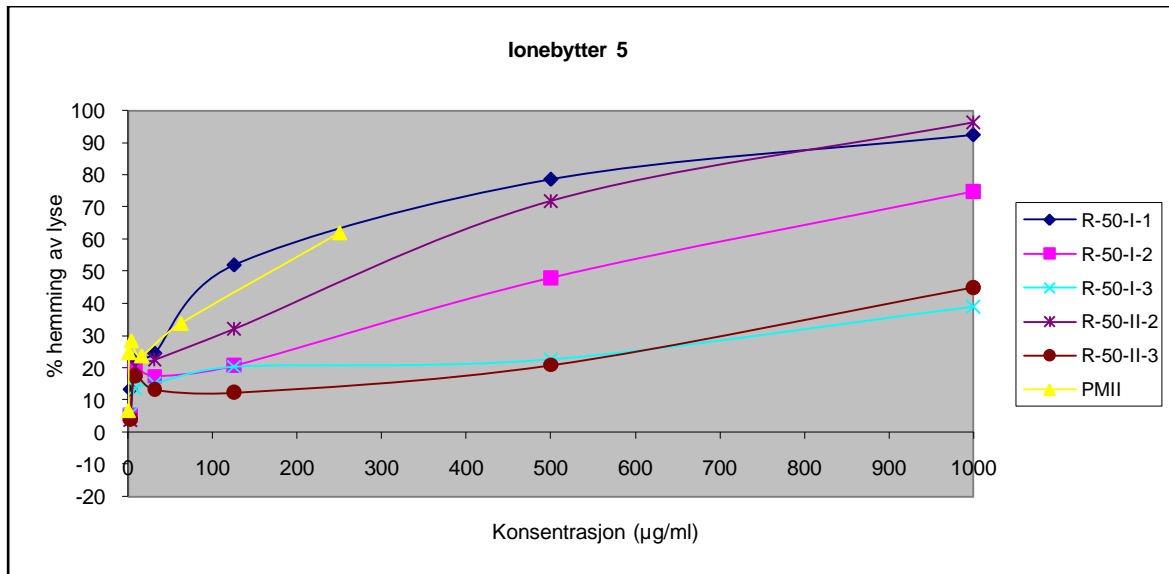
Figur 6-18: Komplementfikserende aktivitet for prøver fra ionebytter 4

Ionebytter 3	ICH <sub>50</sub> (µg/ml)	Ionebytter 4	ICH <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>G(m)-50-I-2</b>	39	<b>G(m)-100-II-1</b>	215
<b>G(m)-50-I-3</b>	471	<b>G(m)-100-II-2</b>	975
<b>G(m)-50-II-1</b>	23	<b>PM II</b>	81
<b>G(m)-50-II-2</b>	301		
<b>G(m)-100-I-1</b>	319		
<b>G(m)-100-I-2</b>	654		
<b>PM II</b>	95		

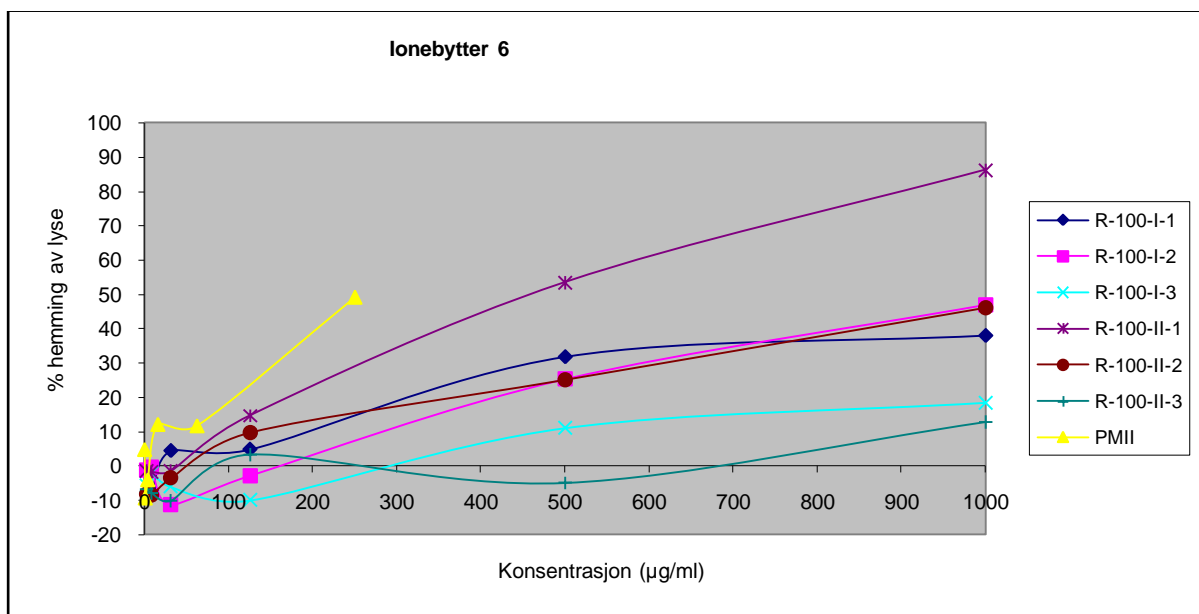
Tabell 6-13: ICH<sub>50</sub>-verdier for prøver fra ionebytter 3 og ionebytter 4

### ***Gul løk (mild):***

Mange av ionebytterfraksjonene fra gul løk (mild) viser høy komplementfikserende aktivitet, særlig G(m)-50-I-1 (figur 6-16), G(m)-50-I-2 og G(m)-50-II-1 (figur 6-17). Disse tre fraksjonene viser en høyere aktivitet enn PM II. Av ionebytterfraksjonene fra 100 °C vannekstraktet viser G(m)-100-I-1 (figur 6-17) og G(m)-100-II-1 (figur 6-18) høyere aktivitet enn G(m)-100-I-2 og G(m)-100-II-2. Alle fraksjonene fra 100 °C vannekstraktet viser en lavere aktivitet enn PM II.



Figur 6-19: Komplementfikserende aktivitet for prøver fra lonebytter 5



Figur 6-20: Komplementfikserende aktivitet for prøver fra lonebytter 6

Ionebytter 5	ICH <sub>50</sub> (µg/ml)	Ionebytter 6	ICH <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>R-50-I-1</b>	111	<b>R-100-I-1</b>	>1000
<b>R-50-I-2</b>	531	<b>R-100-I-2</b>	>1000
<b>R-50-I-3</b>	>1000	<b>R-100-I-3</b>	>1000
<b>R-50-II-2</b>	277	<b>R-100-II-1</b>	459
<b>R-50-II-3</b>	>1000	<b>R-100-II-2</b>	>1000
<b>PM II</b>	169	<b>R-100-II-3</b>	>1000
		<b>PM II</b>	250

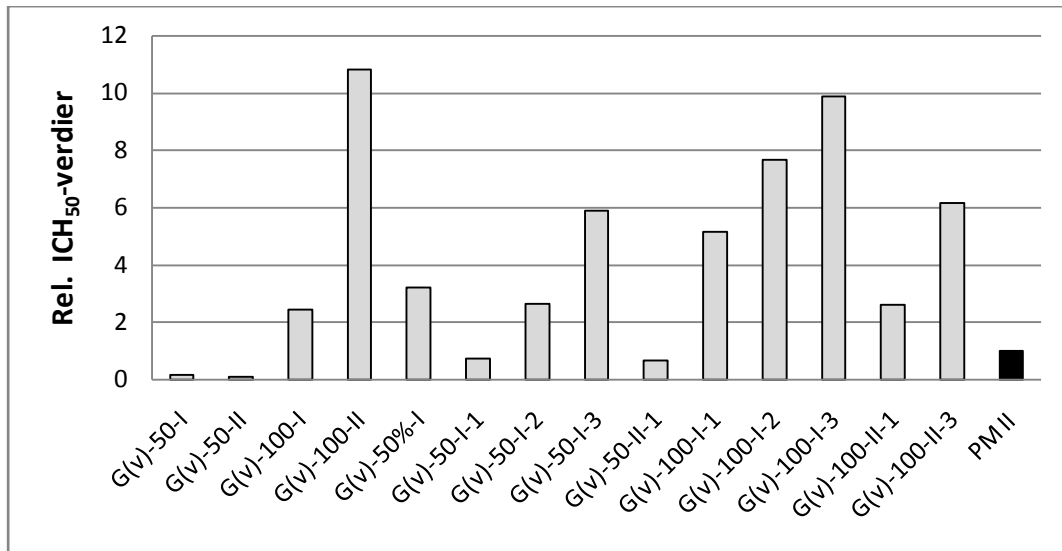
Tabell 6-14: ICH<sub>50</sub>-verdier for prøver fra ionebytter 5 og ionebytter 6

### Rød løk:

Fraksjonen R-50-I-1 viser høyest aktivitet av ionebytterfraksjonene fra rød løk (figur 6-19, tabell 6-14). Denne fraksjonen viser høyere aktivitet enn PM II. Når det gjelder ionebytterfraksjonene fra 100 °C vannekstraktet ga ingen av disse en 50 % hemming av lyse, med unntak av R-100-I-1 (figur 6-20).

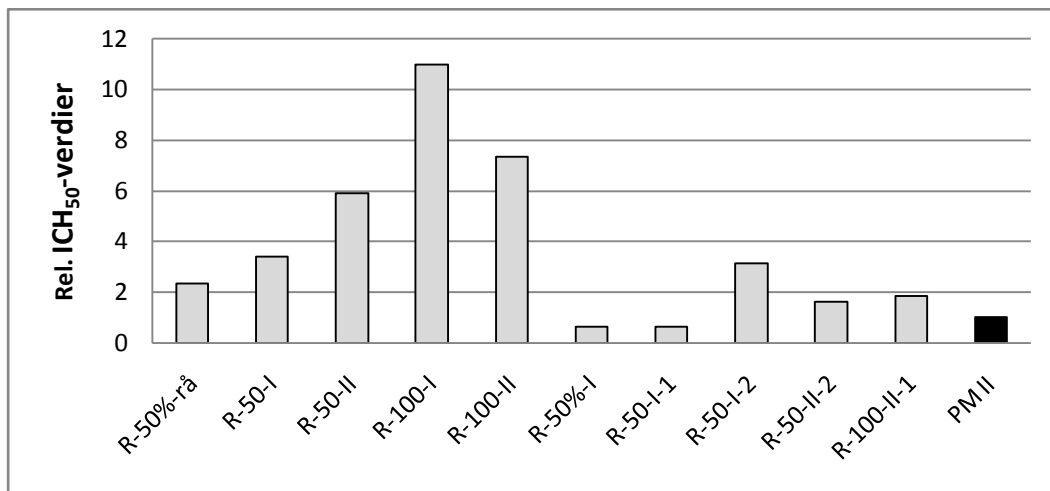
### ICH<sub>50</sub>-verdier

Ved å se på ICH<sub>50</sub>-verdier kan komplementfikserende aktivitet for ulike fraksjoner sammenlignes. Relative ICH<sub>50</sub>-verdier for de ulike fraksjonene er relatert til konsentrasjonen til PM II på den enkelte plate. På denne måten kan resultater fra ulike plater sammenlignes. Verdier under 1 (lave stolper) betyr at prøven har en høyere komplementfikserende aktivitet enn PM II. Det vil si at det trengs en lavere konsentrasjon av prøven for å få 50 % hemming av lyse sammenlignet med PM II. Verdier over 1 (høye stolper) betyr at prøven har en lavere aktivitet enn PM II, ettersom det må høyere konsentrasjon til for å hemme lyseringen. De fraksjonene som ikke ga 50 % hemming av lyse er ikke tatt med i figurene 6-21, 6-22, 6-23.



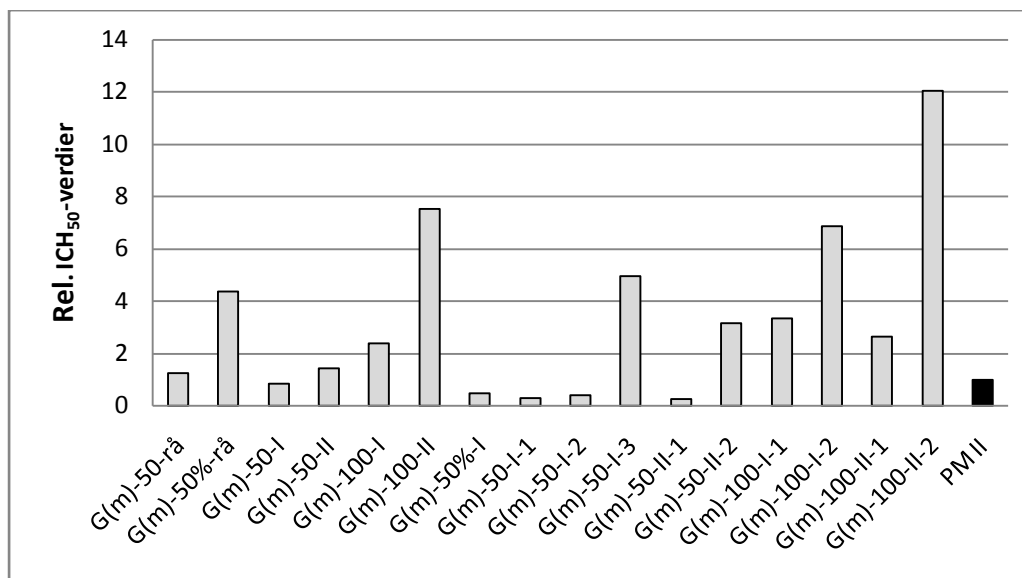
Figur 6-21: Relative ICH<sub>50</sub>-verdier for gul løk (vanlig).

Figur 6-21 viser at G(v)-50-I, G(v)-50-II, G(v)-50-I-1 og G(v)-50-II-1 har en høyere komplementfikserende aktivitet enn PM II. Gelfiltreringsfraksjonene G(v)-50-I og G(v)-50-II er de mest aktive fraksjonene.



Figur 6-22: Relative ICH<sub>50</sub>-verdier for rød løk

Figur 6-22 viser at R-50%-I og R-50-I-1 har en høyere komplementfikserende aktivitet enn PM II.



Figur 6-23: Relative ICH<sub>50</sub>-verdier for gul løk (mild).

Figur 6-23 viser at G(m)-50-I, G(m)-50%-I, G(m)-50-I-1, G(m)-50-I-2 og G(m)-50-II-1 har en høyere komplementfikserende aktivitet enn PM II.

### *Sammenheng mellom monosakkaridinnhold og høy komplementfikserende aktivitet*

#### **Råekstrakt**

Når det gjelder råekstraktene viser G(m)-50-rå en høyere aktivitet sammenlignet med G(v)-50-rå og R-50-rå. Alle disse råekstraktene har en ganske lik monosakkaridsammensetning, men G(m)-50-rå inneholder noe mer galakturonsyre og noe mindre galaktose enn de to andre. I tillegg viser også G(m)-100-rå høyere aktivitet enn G(v)-100-rå og R-100-rå. Monosakkaridinnholdet i dette råekstraktet har omtrent lik fordeling av monosakkarider som i de andre to løkene.

#### **Gelfiltreringsfraksjoner**

Begge gelfiltreringsfraksjonene fra gul løk (vanlig) viser en høyere komplementfikserende aktivitet enn PM II. G(v)-50-I og G(v)-50-II inneholder prosentvis mye galakturonsyre, og prosentvis lite arabinose, rhamnose, xylose og mannose. Fraksjonene er ulike ved at G(v)-50-I inneholder forholdsvis mye mer galaktose, mens G(v)-50-II inneholder forholdsvis mye mer glukose. Gelfiltreringsfraksjonene fra gul løk (vanlig) viser en høyere aktivitet sammenlignet med gelfiltreringsfraksjonene fra rød løk og gul løk (mild).



---

Gelfiltreringsfraksjonene fra gul løk (mild) viser også høy aktivitet. Disse to fraksjonene inneholder forholdsvis mye galakturonsyre, i tillegg til en del galaktose.

Høymolekylær fraksjon fra 50 % etanolekstrakter fra de ulike løkene viste noe forskjell i biologisk aktivitet. R-50%-I og G(m)-50%-I viste en mye høyere aktivitet enn G(v)-50%-I. Sammenligning av monosakkaridinnhold viser at de to mest aktive fraksjonene, R-50%-I og G(m)-50%-I, inneholder mer galaktose og mindre galakturonsyre enn G(v)-50%-I.

### **Ionebytterfraksjoner**

Ionebytterfraksjonene G(v)-50-I-1 og G(v)-50-II-1 viser en høy komplementfikserende aktivitet. Begge disse fraksjonene ble eluert ut tidlig ved ionebytterkromatografi, det vil si at de elueres ut ved lav saltkonsentrasjon. Disse to fraksjonene er ganske ulike i monosakkaridsammensetning. G(v)-50-I-1 inneholder prosentvis lite galakturonsyre og mye galaktose. Motsatt inneholder G(v)-50-II-1 prosentvis mye galakturonsyre og lite galaktose sammenlignet med G(v)-50-I-1. I tillegg inneholder også G(v)-50-II-1 en relativt høy mengde av de andre nøytrale monosakkaridene.

Når det gjelder rød løk viser R-50-I-1 en høyere komplementfikserende aktivitet enn PM II. R-50-I-1 inneholder prosentvis mye galaktose og lite galakturonsyre. I tillegg inneholder denne fraksjonen mye mer mannose og glukose sammenlignet med de andre vannfraksjonene fra rød løk.

Flere ionebytterfraksjoner fra gul løk (mild) viser høy komplementfikserende aktivitet. G(m)-50-I-1, G(m)-50-I-2 og G(m)-50-II-1 viser alle en høyere aktivitet enn PM II. Ionebytterfraksjonen G(m)-50-I-1 viser noe høyere aktivitet enn tilsvarende fraksjon fra de andre løkene, G(v)-50-I-1 og R-50-I-1. Ionebytterfraksjonen G(m)-50-I-1 skiller seg fra de andre vannfraksjonene ved at den inneholder kun spor av galakturonsyre, i tillegg til høyt innhold av mannose, galaktose og glukose. Denne fraksjonen viste en høy komplementfikserende aktivitet. G(m)-50-I-2 og G(m)-50-II-1 ligner mye på hverandre i monosakkaridsammensetning. Begge inneholder stort sett like mye av alle typer monosakkarider.

Det er store ulikheter med hensyn på monosakkaridinnhold i de aktive fraksjonene. Det må derfor utføres videre strukturstudier for å kunne si noe om sammenhengen mellom monosakkaridinnhold og aktivitet.

### ***Kommentar til komplementfikseringstesten:***

Det finnes mange feilkilder i dette forsøket. Forsøket består av mange trinn, og dette øker sjansen for å gjøre feil. I tillegg var det vanskelig å få løst opp løk-tørrstoffet i bufferen. Forsøkene ble utført på forskjellige dager ved Folkehelseinstituttet. Blodcellene som er benyttet i testen har blitt tappet på forskjellige datoer i fra to ulike sauer. Siden det benyttes et biologisk system kan variasjoner i systemet påvirke resultatene. Titreringskurvene og lysningsgradene de ulike dagene var ulike, og dette bidrar til usikkerhet når resultatene skal sammenlignes.

PM II som ble benyttet i testen ble vanligvis veid inn og løst i buffer. Denne løsingen ble fortynnet på samme måte som prøvene. Siden det begynte å bli lite av PM II på Folkehelseinstituttet ble det på tre plater brukt en standardløsning av PM II. Standardløsningen var en ferdiglaget løsning som tidligere hadde blitt laget ved Folkehelseinstituttet. Denne standardløsningen ble fortynnet fra 250 µg/ml og nedover. ICH<sub>50</sub>-verdien for PM II på de nevnte tre plater ble høyere sammenlignet med de andre platene. Særlig gjelder dette ICH<sub>50</sub>-verdien til PM II på platen ionebytter 6 (figur 6-20), der ICH<sub>50</sub>-verdien ble 250 µg/ml. Det vil si at konsentrasjonen av standarden var veldig høy for å få 50 % hemming av lyse. Det er usikkert om dette har hatt noen innvirkning på resultatene til de tre platene (Ionebytter 3, 5 og 6) der standardløsningen av PM II ble benyttet.

### **6.4.2 Mikrosomforsøk med midazolam**

CYP-3A4 omdanner midazolam til hovedmetabolittene 1-OH-MDZ og 4-OH MDZ. Det dannes mindre mengder av 4-OH-MDZ sammenlignet med 1-OH-MDZ.

Høymolekylære polysakkarider kan ikke injiseres direkte på LC-MS, dette fordi disse forbindelsene kan karamelliseres i LC-kolonnen og dermed ødelegge systemet. For å hindre at dette skjer ble prøvene ekstrahert med iskald etylacetat. Ved å tilsette etylacetat ble proteiner felt ut og reaksjonen mellom prøven og mikrosomene stoppet. Når etylacetat ble tilsatt den vandige prøveløsningen ble det dannet to faser, en polar og en upolar. Proteiner og vannløselige forbindelser, deriblant polysakkarider, ble i vannfasen. Metabolitter og positiv kontroll ble derimot ekstrahert over i den upolare delen, etylacetatfasen. Vannfasen inneholdende proteiner og sukre ble så fjernet. Etylacetatfasen inneholdende metabolitter og kontroll ble så dampet inn til tørrhet under nitrogengass, og løst i mobilfase. Diazepam ble tilsatt som intern standard, og tilsatt til slutt i prosedyren for å unngå at den ble metabolisert.

Toppene til metabolittene som detekteres av massespektrometeret relateres til diazepam-toppen. Forholdet mellom metabolittene og diazepam-toppen i prøvene sammenlignes med positiv kontroll (100 % metabolisme av midazolam). Ved å relatere resultatene til en positiv kontroll, korrigeres det for tilfeldigheter og feil som kan oppstå under prøveoppbeidelsen. Prøvenes evne til å påvirke CYP3A4-enzymene beskrives som prosentvis hemming av dannelse av metabolittene 1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ.

Råekstraktene som ble testet var:

- 96 % etanolekstrakt fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)
- 50 % etanolekstrakt fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)
- 50 °C vannekstrakt fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)
- 100 °C vannekstrakt fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild)

<b>Prøve</b>	<b>% hemming av dannelse av 1-OH-MDZ</b>	<b>% hemming av dannelse av 4-OH-MDZ</b>
G(v)-96%-rå	48,3	65,1
R-96%-rå	59,5	60,3
G(m)-96%-rå	55,3	56,3
G(v)-50%-rå	26,2	28,6
R-50%-rå	35,1	4,7
G(m)-50%-rå	31,3	44,6
G(v)-50-rå	25,0	20,2
R-50-rå	14,4	12,3
G(m)-50-rå	-13,6*	3,5
G(v)-100-rå	13,7	-20,7*
R-100-rå	16,7	-15,0*
G(m)-100-rå	15,0	-4,1*

Tabell 6-15: Prosentvis hemming av dannelse av metabolittene 1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ i forhold til positiv kontroll. \* : Tallet er negativt, dette kan tyde på en svak stimulerende effekt.

Resultatene viser at etanolekstraktene G(v)-96%-rå, R-96%-rå og G(m)-96%-rå hemmer CYP3A4-metabolismen av midazolam mest, dette gjelder både 1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ. Disse 3 fraksjonene viste en 48-60 % hemming av dannelsen av den primære metabolitten 1-OH-MDZ via CYP-3A4 (tabell 6-15). Prøvene hadde en kraftig farge og inneholdt en del upolare og lavmolekylære substanser. Det kan se ut som en eller flere av disse forbindelsene er aktive CYP3A4-hemmere. Det har ikke i denne oppgaven blitt utført noen tester for å undersøke hva disse ekstraktene inneholder. Resultatene viser også at G(v)-50%-rå, R-50%-rå og G(m)-50%-rå hemmer midazolammets metabolisme, men hemmingen er noe lavere sammenlignet med 96 % etanolekstraktene (tabell 6-15). Ut i fra resultatene viser R-50%-rå en sterkere hemming av 1-OH-MDZ sammenlignet med 4-OH-MDZ.

Resultatene viser at vannekstraktene G(v)-50-rå, R-50-rå og G(m)-50-rå hemmer metabolismen til midazolam i en mindre grad sammenlignet med etanolekstraktene. Tabell 6-15 viser at G(m)-50-rå har en svak stimulerende effekt på dannelsen av 1-OH-MDZ. Det vil si at det ble dannet mer av denne metabolitten i prøven enn i positiv kontroll. Dette kan bety at denne fraksjonen inneholder substanser som har stimulerende effekt på CYP-3A4 slik at midazolam omdannes i større grad til 1-OH-MDZ. Vannekstraktene G(v)-100-rå, R-100-rå og G(m)-100-rå ser alle ut til å ha en hemmende effekt på dannelse av 1-OH-MDZ, mens de har en svak stimulerende effekt på metabolismen av 4-OH-MDZ.

Det kan være flere årsaker til endret midazolammets metabolisme i dette forsøket. En hemming av CYP-3A4 aktivitet kan forekomme når en forbindelse binder seg til det aktive setet på enzymet enten reversibelt eller irreversibelt (inaktiverer enzymet). En stimulering av CYP-3A4 aktivitet (induksjon) kan skje ved øket DNA transkripsjon, og denne prosessen tar flere dager. Det er derfor vanskelig å forklare den stimulerende effekten observert i noen av prøvene i dette forsøket. En teori kan være at noen forbindelser i løkekstraktene bindes til CYP-enzymet på en allosterisk måte, som resulterer i konformasjonsendring og mulig økt enzymaktivitet (Christensen 2009).

Resultatene viser at etanolekstraktene utøver en sterkere hemming på CYP3A4-enzymene sammenlignet med de vandige ekstraktene. Forsøket ble kun utført en gang, og det ble ikke benyttet flere paralleller. Dette gjør at det er vanskelig å trekke noen konklusjon ut i fra dette ene forsøket. Det bør derfor utføres flere forsøk på løkene før det kan sies noen om deres effekt på CYP3A-enzymene.

### 6.4.3 Antimikrobiell aktivitet

Råekstraktene fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild) ble testet for antimikrobiell aktivitet ved agar-diffusjon (metode 5.5.3). I testen ble bakteriene *E. coli*, *S. aureus* og *P. aeruginosa* benyttet, i tillegg til soppen *C. albicans*. Som positiv kontroll ble Gentamicin (0,2 mg/ml) for bakterier og Amphotericin (0,5 mg/ml) for sopp benyttet. I tillegg ble metanol brukt som negativ kontroll. Hemmingssoner ble avlest med linjal etter 24 timer (bakterier) og 48 timer (sopp). Det ble benyttet 3 paralleller av hver prøve. Jo større diameter, jo lavere konsentrasjon av prøve kreves for bakteriostatisk effekt.

Råekstrakt	<i>E.coli</i>			<i>S.aureus</i>			<i>P.aeruginosa</i>			<i>C.albicans</i>		
G(v)-96%-rå	-	-	-	-	-	-	1,4	1,6	1,6	-	-	-
R-96%-rå	-	-	-	-	-	-	1,4	1,4	1,4	-	-	-
G(m)-96%-rå	-	-	-	-	-	-	1,8	1,8	2,0	-	-	-
G(v)-50%-rå	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R-50%-rå	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G(m)-50%-rå	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G(v)-50-rå	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R-50-rå	-	-	-	-	-	-	-	-	-	r.v	r.v.	r.v
G(m)-50-rå	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G(v)-100-rå	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R-100-rå	-	-	-	-	-	-	-	-	-	r.v	r.v	r.v
G(m)-100-rå	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabell 6-16: Hemmingssoner (diameter målt i cm) observert for de ulike råekstraktene. - : Ingen hemming av vekst, r.v.: Redusert vekst

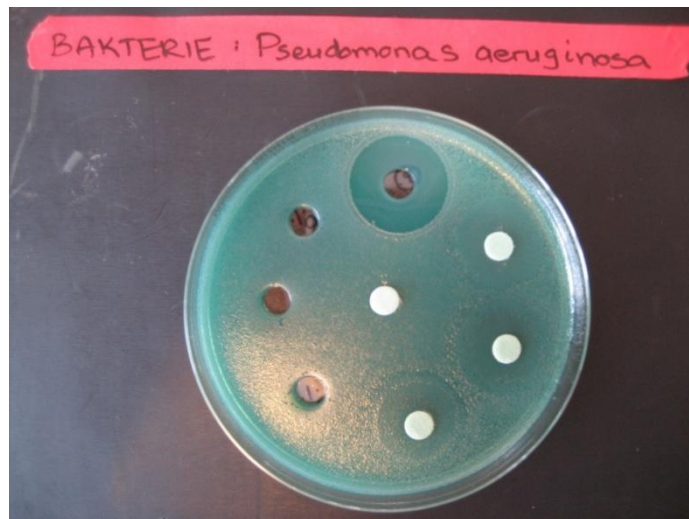
Gjennomsnittlig diameter for hemmingssoner rundt positiv kontroll var; *E. coli*: 1,6 cm, *S. aureus*: 2,0 cm, *P. aeruginosa*: 2,2 cm og *C. albicans*: 0,8 cm. Det ble ikke observert noen hemming av vekst rundt de negative kontrollene.

Denne testen viste at råekstraktene fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild) påvirket veksten til de utvalgte mikroorganismene lite. Ingen av ekstraktene hadde en hemmende effekt på veksten, men noen ekstrakter viste at de reduserte veksten noe. 96 % etanolekstraktene til alle tre løkene reduserte veksten av *P.aeruginosa* (tabell 6-16). Gul løk

(mild) så ut til å redusere veksten mest, men alle ekstraktene hadde en mindre diameter sammenlignet med positiv kontroll. 96 % etanolekstraktene til gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild) var alle veldig farget. Det har ikke i denne oppgaven blitt undersøkt hvilke forbindelser som finnes i 96 % etanolekstraktene, men det kan antas at disse ekstraktene inneholder lavmolekylære og upolare forbindelser. Tidligere studier har vist at den antimikrobielle effekten til løk skyldes blant annet svovelholdige forbindelser. Det er mulig at disse forbindelsene ble ekstrahert ut med diklormetan. Ekstraktene av diklormetan ble ikke testet for antimikrobiell aktivitet. Dette kan være noe av grunnen til at det ble påvist lite antimikrobiell aktivitet i denne testen.

50 °C og 100 °C vannekstrakter fra rød løk viste noe redusert vekt av *Candida albicans* (tabell 6-16). Det kunne sees litt redusert vekst rundt kanten på brønnene. Konsentrasjonen til vannekstraktene var 10 mg/ml, mens konsentrasjonen til etanolekstraktene var 20 mg/ml. Dette kan ha vært med på å påvirke resultatene. Grunnen til at det ble brukt en lavere konsentrasjon av vannekstraktene var at løk-tørrstoffet ikke løste seg så godt i vann.

Dette forsøket ble bare utført en gang, derfor trengs det flere forsøk for å kunne trekke noen konklusjon om den antimikrobielle aktiviteten til gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild) i denne oppgaven.



Figur 6-24: Bildet viser skålen der *P. aeruginosa* ble testet. Rundt lappene der 96 % etanolekstraktene ble applisert ses en redusert vekst av bakterien



Figur 6-25: Bildet viser skålen der *C. albicans* ble testet. Rundt brønnene til 50 °C vannekstrakt og 100 °C vannekstrakt fra rød løk observeres litt redusert vekst. Den reduserte veksten var så liten at den ikke kunne måles i centimeter.

## 7. Konklusjon

Gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild) ble ekstrahert med diklormetan, 96 % etanol, 50 % etanol, 50 °C vann og 100 °C vann. Ved hjelp av gelfiltrering og ionebytterkromatografi ble polysakkaridfraksjoner isolert etter størrelse og ladning. Monosakkaridinnhold i alle ekstrakter og fraksjoner, med unntak av 96 % etanolekstrakter, ble bestemt. I tillegg ble råekstraktene testet for innhold av fruktose og frukto-oligosakkarider. Biologisk aktivitet ble studert ved å undersøke komplementfikserende aktivitet, CYP-hemmende effekt og antimikrobiell aktivitet.

Analyse av monosakkaridinnhold viste at G(v)-50%-I, R-50%-I og G(m)-50%-I inneholdt forholdsvis mye mer arabinose, rhamnose, xylose, mannose, galaktose og galakturonsyre enn 50 % etanol råekstraktene. Dette kan tyde på at de høymolekylære fraksjonene etter gelfiltrering inneholder pektintype polysakkarid. De nevnte gelfiltreringsfraksjoner viste også en mye høyere komplementfikserende aktivitet enn etanolekstraktene. 50 °C vannekstrakter og fraksjoner fra de tre løkene inneholdt forholdsvis mye galaktose og galakturonsyre. Fraksjonene G(v)-50-I-1, R-50-I-1 og G(m)-50-I-1 skilte seg fra de andre 50 °C vannfraksjoner ved at de inneholdt prosentvis lite galakturonsyre. Disse fraksjonene inneholdt også noe mer mannose og glukose enn de andre. De nevnte tre fraksjoner viste en høyere komplementfikserende aktivitet enn PM II. 100 °C vannekstrakter og fraksjoner fra de tre løktypene viste også høyt innhold av galaktose og galakturonsyre, i tillegg til arabinose og rhamnose. Disse fraksjonene viste lite komplementfikserende aktivitet. De fleste 12 råekstrakter og 44 fraksjoner fra gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild) inneholdt altså mye galaktose og galakturonsyre. Monosakkaridene arabinose og rhamnose var også til stede i alle fraksjoner. Enkelte fraksjoner viste i tillegg innhold av xylose, mannose og glukose. Den prosentvise høye mengden av galakturonsyre, i tillegg til arabinose, rhamnose og galaktose kan tyde på at fraksjonene inneholder polysakkarider av pektintype. Det spesielle med alle løkfraksjonene er at de inneholder en svært høy andel galaktose, dette er noe uvanlig. Det kan også nevnes at fraksjoner fra gul løk (mild) stort sett inneholdt noe mindre galaktose enn de andre løkfraksjonene.

Det ble også undersøkt om gul løk (vanlig), rød løk og gul løk (mild) inneholdt fruktose og frukto-oligosakkarider. Resultatene viste at 96 % etanolekstrakter fra alle tre løker, i tillegg til 50 % etanolekstraktet fra gul løk (mild), inneholdt fri glukose og fruktose.



---

50 % etanolekstrakter fra gul løk (vanlig) og rød løk, i tillegg til alle 50 °C og 100 °C vannekstrakter fra de ulike løktypene, viste innhold av frukto-oligosakkarider i varierende grad.

Råekstrakter og isolerte fraksjoner fra de ulike løkene ble testet for komplementfikserende aktivitet. Resultatene viste at 4 fraksjoner fra gul løk (vanlig), 2 fraksjoner fra rød løk og 5 fraksjoner fra gul løk (mild) hadde en høyere komplementfikserende aktivitet enn standardfraksjonen PM II. Generelt viste 50 °C vannekstrakter og fraksjoner høyere komplementfikserende aktivitet enn 100 °C vannekstrakter og fraksjoner. Det er store ulikheter med hensyn på monosakkaridinnhold i de aktive fraksjonene. Det må derfor utføres videre strukturstudier for å kunne si noe om sammenhengen mellom monosakkaridinnhold og aktivitet.

Mikrosomforsøk med midazolam viste at 96 % og 50 % etanolekstraktene utøvde en sterkere hemming på CYP3A4-enzymene enn de vandige ekstraktene. Løkenes antimikrobielle aktivitet ble også undersøkt. Fraksjonene G(v)-96%-rå, R-96%-rå og G(m)-96%-rå viste å redusere veksten av bakterien *P. aeruginosa* noe. Alle testene må bekreftes med flere studier.

## Kildeliste

- Ali, M., Thomson, M. og Afzal, M. (2000). "Garlic and onions: their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance." Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids **62**: 55-73.
- Amersham-Pharmacia-Biotech (2000). ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub). Instruksjonshefte: 1-20.
- Bianchini, F. og Vainio, H. (2001). "Allium vegetables and organosulfur compounds: Do they help prevent cancer?" Environmental Health Perspectives **109**: 893-902.
- Bio-Rad-Laboratories (2000). Bio-Gel P Polyamidacrylamid Gel. Instruksjonhefte: 1-21.
- Blumenthal, M., Goldberg, A. og Brinckmann, J. (2000). Onion. Herbal medicine: expanded commission E monographs. Austin, American Botanical Council: 283-285.
- Botanical-online. (2009). "Allium cepa L., Onion." fra <http://www.botanical-online.com/medicinalsalliumcepaangles.htm>. Hentet 16.04.09
- Brewster, J. L. (2008). Biochemistry, Health Benefits and Food Science of Alliums. Onions and other vegetable alliums. Wallingford, CABI: 347-372.
- Brewster, J. L. (2008). The Classification, Origins, Distribution and Economic Importance of the Major Vegetable Crops. Onions and other vegetable alliums. Wallingford, CABI: 2-26.
- Cell\_Biology. (2009). "Plant cell wall structure." fra <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/C/cellwall.html>. Hentet 18.04.09
- Challier, B., Perarnau, J. M. og Viel, J. F. (1998). "Garlic, onion and cereal fibre as protective factors for breast cancer: A French case-control study." European Journal of Epidemiology **14**: 737-747.
- Chambers, R. E. og Clamp, J. R. (1971). "Assessment of Methanolysis and Other Factors Used in Analysis of Carbohydrate-Containing Materials." Biochemical Journal **125**: 1009-1018.
- Christensen, H. (2009). Muntlig meddelelse.
- Cui, S. W. (2005). Structural Analysis of Polysaccharides. Fodd Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Application. Cui, S. W. Boca Raton, Taylor & Francis Group: 123.
- Cui, S. W. og Brummer, Y. (2005). Understanding Carbohydrat Analysis. Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications. Cui, S. W. Boca Raton, Taylor & Francis Group: 68-99.

- 
- Dorant, E., Vandenbrandt, P. A. og Goldbohm, R. A. (1995). "Allium vegetable consumption, garlic supplement intake, and female breast carcinoma incidence." Breast Cancer Research and Treatment **33**: 163-170.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. og Smith, F. (1956). "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." Analytical Chemistry **28**: 350-356.
- Floridata. (2008). "Allium cepa Cepa Group." fra [http://www.floridata.com/ref/A/alli\\_cep.cfm](http://www.floridata.com/ref/A/alli_cep.cfm). Hentet 16.04.09
- Galeone, C., Pelucchi, C., Levi, F., Negri, E., Franceschi, S., Talamini, R., Giacosa, A. og La Vecchia, C. (2006). "Onion and garlic use and human cancer." American Journal of Clinical Nutrition **84**: 1027-1032.
- Grant, W. B. (2004). "A multicountry ecologic study of risk and risk reduction factors for prostate cancer mortality." European Urology **45**: 271-279.
- Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B. og Smith, B. (2002). "Onions - A global benefit to health." Phytotherapy Research **16**: 603-615.
- Hu, J. F., La Vecchia, C., Negri, E., Chatenoud, L., Bosetti, C., Jia, X. Y., Liu, R. Z., Huang, G. R., Bi, D. Z. og Wang, C. X. (1999). "Diet and brain cancer in adults: A case-control study in northeast China." International Journal of Cancer **81**: 20-23.
- Inngjerdningen, K. (2000). Sårhelende planter i Mali: A. videre studier over *Glinus oppositifolius*/ B. feltarbeid i Dogonland og Sikasso. Oslo, Hovedfagsoppgave i farmakognosi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo: 39-43.
- Izydorczyk, M. (2005). Understanding the Chemistry og Food carbohydrates. Food carbohydrates - Chemistry, Physical properties and Application. Cui, S. W., Taylor & Francis group: 1-63.
- Jackson, K. G., Taylor, G. R. J., Clohessy, A. M. og Williams, C. M. (1999). "The effect of the daily intake of inulin on fasting lipid, insulin and glucose concentrations in middle-aged men and women." British Journal of Nutrition **82**: 23-30.
- Kilian, S., Kritzinger, S., Rycroft, C., Gibson, G. og du Preez, J. (2002). "The effects of the novel bifidogenic trisaccharide, neokestose, on the human colonic microbiota." World Journal of Microbiology & Biotechnology **18**: 637-644.
- Kyung, K. H. og Lee, Y. C. (2001). "Antimicrobial activities of sulfur compounds derived from S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides in *Allium* and *Brassica*." Food Reviews International **17**: 183-198.
- Lid, D. T., Lid, D. T., Elven, R. og Alm, T. (2005). Alliaceae-laukfamilien. Norsk flora. Oslo, Samlaget: 892-895.

- Michaelsen, T. E., Gilje, A., Samuelsen, A. B., Hogasen, K. og Paulsen, B. S. (2000). "Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L." Scandinavian Journal of Immunology **52**: 483-490.
- Moon, C. H., Jung, Y. S., Kim, M. H., Lee, S. H., Baik, E. J. og Park, S. W. (2000). "Mechanism for antiplatelet effect of onion: AA release inhibition, thromboxane A(2) synthase inhibition and TXA(2)/PGH(2) receptor blockade." Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids **62**: 277-283.
- Mørkved, B. (1998). Løk - vår eldste kulturplanter. Ottar, Medisinplanter. Tromsø, Tromsø museum: 38-42.
- Nishimura, H., Higuchi, O., Tateshita, K., Tomobe, K., Okuma, Y. og Nomura, Y. (2006). "Antioxidative activity and ameliorative effects of memory impairment of sulfur-containing compounds in *Allium* species." Biofactors **26**: 135-146.
- Norsk\_legemiddelhandbok. (2007). "Interaksjoner." fra <http://www.legemiddelhandboka.no/xml/>. Hentet 17.04.09
- Osmont, K. S., Arnt, C. R. og Goldman, I. L. (2003). "Temporal aspects of onion-induced antiplatelet activity." Plant Foods for Human Nutrition **58**: 27-40.
- Parham, P. (2005). The antigen-antibody mediated pathway of complement activation. The immune system. New York, Garland: 203-207.
- Paulsen, B. S. og Barsett, H. (2005). Bioactive pectic polysaccharides. Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use. Berlin, Springer-Verlag Berlin. **186**: 69-101.
- Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K. E. (2004). Apparatur for væsekromatografi (HPLC). Legemiddelanalyse. Bergen, Fagbokforlaget: 167-182.
- Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K. E. (2004). Eksklusjonskromatografi. Legemiddelanalyse. Bergen, Fagbokforlaget: 164-166.
- Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K. E. (2004). Gasskromatografi. Legemiddelanalyse. Bergen, Fagbokforlaget: 191-211.
- Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K. E. (2004). Ionebytterekstraksjon. Legemiddelanalyse. Bergen, Fagbokforlaget: 295-297.
- Postvoll, L. W. g. (2006). Midazolam som CYP3A-modellsubstrat. . Metabolisme av midazolam via CYP3A4 og CYP3A5 in vitro -Utvikling av LC/MS-metode for analyse av hydroksylerte metabolitter. Oslo, Hovedfagsoppgave i farmakologi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo: 13.
- Ritsema, T. og Smeekens, S. (2003). "Fructans: beneficial for plants and humans." Current Opinion in Plant Biology **6**: 223-230.

- 
- Rose, P., Whiteman, M., Moore, P. K. og Zhu, Y. Z. (2005). "Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents." Natural Product Reports **22**: 351-368.
- Scheller, H. V. (2007). "Biosynthesis of Cell Wall Polysaccharides." fra <http://www.uk.plbio.kvl.dk/plbio/cellwall.htm>. Hentet 25.04.09
- Schols, H. A. og Voragen, A. G. J. (2002). The Chemical Structures of Pectins. Pectins and their Manipulations. Seymour, G. B. og Knox, J. P. Oxford, Blackwell Publishing & CRC Press: 1-25.
- Shon, M. Y., Choi, S. D., Kahng, G. G., Nam, S. H. og Sung, N. J. (2004). "Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions." Food and Chemical Toxicology **42**: 659-666.
- Slimestad, R., Fossen, T. og Vagen, I. M. (2007). "Onions: A source of unique dietary flavonoids." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**: 10067-10080.
- Srinivasan, K. (2005). "Plant foods in the management of diabetes mellitus: Spices as beneficial antidiabetic food adjuncts." International Journal of Food Sciences and Nutrition **56**: 399-414.
- Taiz, L. og Zeiger, E. (2006). Cell Walls; Structure, Biogenesis, and Expansion. Plant Physiology. Sunderland, Mass., Sinauer Associates: s 350-355.
- Vågen, I. (2004). "Smaksdammelse i løk." Bioforsk Grønn kunnskap: 270-273.
- Wagner, H., Dorsch, W., Bayer, T., Breu, W. og Willer, F. (1990). "Antiasthmatic effects of onions - inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase in vitro by thiosulfinates and cepaenes." Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids **39**: 59-62.
- Wikipedia. (2009). "Løkfamilien." fra <http://no.wikipedia.org/wiki/Løk>. Hentet 15.04.09
- Yamada, H. og Kiyohara, H. (1999). Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. Immunomodulatory agents from plants. Wagner, H. Basel, Birkhäuser Verlag: 161-202.
- Yin, M. C. og Tsao, S. M. (1999). "Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species." International Journal of Food Microbiology **49**: 49-56.