

Isolering og karakterisering av polyfenoler fra gresk fjellte, *Sideritis scardica*

Hasina Azizullah



Masteroppgave
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2017

Isolering og karakterisering av polyfenoler fra gresk fjellte, *Sideritis scardica*

Av Hasina Azizullah

Utført ved

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Oslo, mai 2017

Veiledere:

Førsteamanuensis Helle Wangenstein

Professor emeritus Karl Egil Malterud

© Hasina Azizullah

2017

Isolering og karakterisering av polyfenoler fra gresk fjellte, *Sideritis scardica*

Hasina Azizullah

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Sammendrag

Sideritis scardica er en urt som opprinnelig vokser på Balkan og forekommer i Sørøst-Albania, Makedonia, Bulgaria, Serbia, Hellas og Tyrkia. Planten har et bredt bruksområde innen tradisjonell folkemedisin i de områdene, til den dag i dag er den veldig populær og er den mest solgte folkemedisinske te i Bulgaria.

Ut fra tidligere publiserte forsøk kan det se ut til at daglig inntak av *Sideritis* spp. kan være et alternativ for behandling av symptomer på kognitiv svikt hos eldre, f. eks. ved Alzheimers sykdom.

Overjordiske deler av *Sideritis scardica* ble først ekstrahert med 80% EtOH på et ASE instrument. Ekstraktet ble så fordelt mellom diklormetan, etylacetat, butanol og vann. Et bunnfall fra fordelingen mellom EtOAc og vann ble samlet opp separat. Butanol- og etylacetat-fasene ble videre opprenset og fraksjonert ved hjelp av kolonnekromatografi og preparativ HPLC for å isolere innholdsstoffene i teen. Elleve forbindelser ble isolert og identifisert ved hjelp av NMR-spektroskopi (^1H , ^{13}C (APT), COSY, HSQC og HMBC).

De isolerte og identifiserte stoffene var: verbascosid, klorogensyre, echinaticin, acetylallosyl-glukosyl-isoscutellarein (AAGI), acetylallosyl-glukosyl-metylisoscutellarein(AAGIMe), acetylallosyl-glukosyl-hypolaetin(AAGH), acetylallosyl-glukosyl-metylhypolaetin(AAGHMe), leucoseptosid A, acetylallosyl-acetylglukosyl-hypolaetin-4'-metyleter, acetylallosyl-acetylglukosyl-isoscutellarein-4'-metyleter, og allosyl-acetylglukosyl-isoscutellarein. Flere av disse stoffene er sjeldne naturstoffer, men alle er tidligere funnet i *S. scardica*.

For etanol (EtOH)-råekstraktet, diklormetan (DCM)-fase, etylacetat (EtOAc)-fase, etylacetat bunnfall (EtOAc-bf)-fase, butanol(BuOH)-fase, vannfase og fire av de isolerte forbindelser (verbascosid, klorogensyre, echinaticin, acetylallosyl-glukosyl-isoscutellarein og acetylallosyl-glukosyl-metylisoscutellarein) ble det målt radikalscavenging aktivitet overfor difenylpikrylhydrazyl (DPPH). I tillegg ble de testet for hemmingsaktivitet overfor det peroksidierende enzymet 15-lipoksygenase (15-LO) og det prooksidierende enzymet xantin oksidase (XO). For å sjekke de tidligere rapporterte virkningene mot Alzheimer sykdom ble det utført enzymhemmingsaktivitet test overfor acetylcholinesterase (AChE) og butyrylcholinesterase (BuChE).

EtOH-råekstraktet, DCM-, EtOAc-Bf- og vannfasen viste lav 15-LO-hemmingsaktivitet med en IC_{50} - verdi $>100 \mu\text{g/ml}$. BuOH- og EtOAc-fasene hadde en moderat hemmingsaktivitet (98 ± 6 og $65 \pm 7 \mu\text{g/ml}$). De fem isolerte renstoffene viste også lav 15-LO-hemmingsaktivitet.

Echinaticin var den eneste av de fem renstoffene som viste god XO-hemmingsaktivitet (IC_{50} $27 \pm 6 \mu\text{g/ml}$), sammen med den fasen den ble isolert fra, EtOAc-fasen ($39 \pm 4 \mu\text{g/ml}$).

Ved måling av DPPH-radikalscavenger aktivitet viste EtOH-råekstraktet (IC_{50} $41 \pm 3 \mu\text{g/ml}$), EtOAc-fase ($47 \pm 4 \mu\text{g/ml}$), EtOAc-Bf-fase ($24 \pm 1 \mu\text{g/ml}$) og BuOH-fase ($26 \pm 3 \mu\text{g/ml}$) god aktivitet, mens DCM- og vannfasene hadde lav radikalscavengeraktivitet (IC_{50} $>100 \mu\text{g/ml}$). Av de isolerte renstoffene var echinaticin lite aktivt ($>167 \mu\text{g/ml}$). Verbascosid hadde en IC_{50} -verdi på $30 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ og AAGIMe på $33 \pm 4 \mu\text{g/ml}$, mens AAGI og klorogensyre hadde noe lavere aktivitet (65 ± 15 og $92 \pm 14 \mu\text{g/ml}$).

Alle de fem isolerte renstoffene, EtOH-råekstraktet og de fem fasene hadde lav AChE- og BuChE-hemmingsaktivitet (IC_{50} $> 100 \mu\text{g/ml}$). Butanolfraksjonen hadde en viss aktivitet ($49 \pm 4\%$ hemming ved $200 \mu\text{g/ml}$), echinacosid hadde en hemming på $35 \pm 5\%$ ved $100 \mu\text{g/ml}$.

Forord

Jeg ønsker først og fremst å rette en spesiell takk til Helle Wangensteen for god veiledning og oppfølging. Videre vil jeg si tusen takk til Karl Egil Malterud for utrolig god faglig og praktisk veiledning, samt for å ha vært min støttespiller underveis gjennom masteroppgaven. Mine veilederes høye faglige kompetanse, engasjement og råd har gjort denne perioden til et lærerikt hovedfagsår.

I tillegg vil jeg takke de andre medstudentene, avdelingsingeniøren Suthajini Yogarajah, og ansatte på avdelingen for støtten og hyggelige samtaler til sent på ettermiddagen.

Jeg ønsker også å takke mine gode venner for all den oppmuntringen, motivasjonen og hjelpen jeg har fått den siste tiden. Spesielt vil jeg takke min gode venninne, Cindy Suen, for den minnerike tiden sammen her på farmasi og for å ha gjort studiedagene betydelig lettere.

Sist, men ikke minst, vil jeg rette en stor takk til min kjære mor, søster og resten av familien min for all den kjærligheten, motivasjonen og støtten jeg har fått gjennom hele studietiden, spesielt i den siste perioden.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	5
Forord	7
Innholdsfortegnelse	9
1 Forkortelser	17
2 Hensikt	19
3 Teori	20
3.1 Sideritis scardica.....	20
3.1.1 Taksonomisk klassifisering	20
3.1.2 Botaniske forhold	21
3.1.3 Habitat	22
3.1.4 Tradisjonell bruk	22
3.1.5 Tidligere funn	23
3.1.6 Hovedkomponentene i eterisk olje fra <i>S. scardica</i>	25
3.1.7 Biologisk aktivitet	26
3.2 Antioksidanter og frie radikaler.....	29
3.2.1 Antioksidanter	29
3.2.2 Antioksidantforsvar	29
3.2.3 Frie radikaler og ROS	30
3.2.4 Oksidativt stress	31
3.2.5 Lipidperoksidering	31
3.3 Arakidonsyremetabolisme og 15-lipoksygenase	32
3.4 Flavonoider.....	33
3.5 Alzheimer	35
4 Materiell og metode	36
4.1 Materialer.....	36
4.2 Generelt	38
4.2.1 Innveiing.....	38
4.2.2 Inndamping.....	39
4.2.3 Filtrering.....	39
4.2.4 Vannkvalitet	39
4.3 Separasjonsmetoder	39

4.3.1	Ekstraksjon med organiske løsemidler – ASE	39
4.3.2	Væske- væske ekstraksjon	41
4.3.3	Kromatografi	43
4.3.4	Sephadex LH-20 gel kolonnekromatografi	43
4.3.5	VershaFlash kolonnekromatografi	44
4.3.6	Tynnsjiktchromatografi (TLC, thin-layer chromatography).....	46
4.3.7	Væskerkromatografi (HPLC)	50
4.3.8	NMR-spektroskopi (Nuclear Magnetic Resonance)	52
4.3.9	¹ H NMR spektre	54
4.4	Metoder for måling av radikal scavenger, og enzymhemmingseffekter	56
4.4.1	DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl).....	56
4.4.2	15- Lipoksygenasehemming (15-LO-hemming).....	58
4.4.3	Xanthin oksidase hemming (XO-hemming)	61
4.4.4	Hemming av acetylkolinesterase (AChE) og butyrylkolinesterase (BuChE)	64
5	Ekspérimentell del.....	69
5.1	Plantemateriale	69
5.2	Ekstraksjon av <i>Sideritis scardica</i>	69
5.3	Ekstraksjon med diklormetan, DCM	69
5.4	Ekstraksjon med etylacetat, EtOAc	70
5.5	Ekstraksjon med butanol, BuOH	70
5.6	Analysering.....	70
5.6.1	NMR.....	70
5.6.2	HPLC.....	71
5.6.3	Måling av radikal scavenger, og enzymhemmingseffekter.....	71
5.7	Fraksjonering av BuOH-fasen	72
5.7.1	Sephadex LH-20 kolonneseparering	72
5.7.2	Analytisk TLC.....	73
5.7.3	Analysering	73
5.8	Separasjon av fraksjon BuOH S5	74
5.8.1	Versaflash kolonneseparasjon	74
5.8.2	TLC	74
5.8.3	Analysering	75
5.9	Separasjon av BuOH S5V7	76

5.9.1	Versaflash kolonneseparasjon	76
5.9.2	TLC	77
5.9.3	Analysering	77
5.10	Separasjon av BuOH S5V8.....	78
5.10.1	Versaflash kolonneseparasjon	78
5.10.2	TLC	78
5.10.3	Analysering	78
5.11	Separasjon av fraksjon BuOH S5V9.....	79
5.11.1	Preparativ HPLC	79
5.11.2	Analytisk HPLC	79
5.11.3	Analysering	80
5.12	Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V3.....	81
5.12.1	Preparativ HPLC	81
5.12.2	Analytisk HPLC	81
5.12.3	Analyse av fraksjoner fra preparativ HPLC.....	82
5.13	Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V4.....	82
5.13.1	Preparativ HPLC	82
5.13.2	Analytisk HPLC	82
5.13.3	Analysering	83
5.14	Separasjon av fraksjonen BuOH S5V8V2.....	83
5.14.1	Preparativ HPLC	83
5.14.2	Analytisk HPLC	83
5.14.3	Analysering	84
5.15	Separasjon av fraksjon BuOH S5V8V2H6.....	84
5.15.1	Preparativ HPLC	84
5.15.2	HPLC.....	85
5.15.3	Analysering	85
5.16	Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V3H6.....	85
5.16.1	Preparativ HPLC	85
5.16.2	Analytisk HPLC	85
5.16.3	Analysering	86
5.17	Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V3H3 og BuOH S5V7V4H3.....	86
5.17.1	Preparativ HPLC	86

5.17.2	Analytisk HPLC	86
5.17.3	Analysering	87
5.18	Videre rensing av BuOH S5V7VbH2 og BuOH S5V7VbH3	87
5.18.1	TLC	87
5.18.2	Analysering	87
5.19	Fraksjonering av EtOAc-fasen.....	88
5.19.1	Sephadex LH-20 kolonneseparering	88
5.19.2	TLC	88
5.19.3	Analysering	89
5.20	Separasjon av fraksjon EtOAc S4.....	89
5.20.1	Versaflash kolonneseparasjon	89
5.20.2	TLC	90
5.20.3	Analysering	90
5.21	Separasjon av fraksjon EtOAc S7.....	91
5.21.1	Versaflash kolonneseparasjon	91
5.21.2	Analytisk TLC.....	91
5.21.3	Analysering	92
5.22	Separasjon av fraksjonen EtOAc S4V4	92
5.22.1	Preparativ HPLC	92
5.22.2	Analysering	92
5.23	Separasjon av fraksjonen EtOAc S4V8	93
5.23.1	Preparativ HPLC	93
5.23.2	Analysering	93
5.24	Separasjon av EtOAc S7V7	94
5.24.1	Versaflash kolonneseparasjon	94
5.24.2	TLC	94
5.24.3	Analysering	95
5.25	Måling av radikal scavenger, og enzymhemmingseffekter	95
5.26	Identifisering av topper I HPLC kromatogram.....	95
6	Resultater og diskusjon	96
6.1	Ekstraksjon av plantemateriale.....	96
6.1.1	Utbyttet av EtOH-råekstraktet.....	96
6.1.2	NMR-spektroskopi	96

6.1.3	HPLC-kromatografi	96
6.1.4	Måling av radikal scavenger, og enzymhemmingseffekter.....	97
6.2	Ekstraksjon av EtOH-råekstraktet	100
6.2.1	Væske-væske-ekstraksjon	100
6.2.2	NMR-spektroskopi	101
6.2.3	HPLC-analytisk	102
6.2.4	Måling av radikal scavenger, og enzymhemmingseffekter.....	104
6.2.5	Videre arbeid	109
6.3	Fraksjonering av BuOH-fase	110
6.3.1	Sephadex LH-20 kolonneseparering	110
6.3.2	NMR-spektroskopi	110
6.3.3	Analytisk HPLC	111
6.3.4	Videre arbeid	111
6.4	Separasjon av fraksjon BuOH S5	111
6.4.1	Versaflash kolonneseparasjon	111
6.4.2	NMR-spektroskopi	112
6.4.3	Analytisk HPLC	113
6.4.4	Videre arbeid	113
6.5	Separasjon av BuOH S5V7	113
6.5.1	Versaflash kolonneseparasjon	113
6.5.2	NMR-spektroskopi	114
6.5.3	Analytisk HPLC	114
6.5.4	Videre arbeid	114
6.6	Separasjon av BuOH S5V8	115
6.6.1	Versaflash kolonneseparasjon	115
6.6.2	NMR-spektroskopi	115
6.6.3	Analytisk HPLC	115
6.6.4	Videre arbeid	116
6.7	Separasjon av fraksjon BuOH S5V9	116
6.7.1	Preparativ HPLC	116
6.7.2	NMR-spektroskopi	116
6.7.3	Analytisk HPLC	117
6.8	Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V3.....	117

6.8.1	Preparativ HPLC	117
6.8.2	NMR-spektroskopi	118
6.8.3	Videre arbeid	118
6.9	Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V4.....	118
6.9.1	Preparativ HPLC	118
6.9.2	NMR-spektroskopi	119
6.9.3	Videre arbeid	119
6.10	Separasjon av fraksjonen BuOH S5V8V2.....	119
6.10.1	Preparativ HPLC	119
6.10.2	NMR-spektroskopi	120
6.10.3	Analytisk HPLC	120
6.10.4	Videre arbeid	120
6.11	Separasjon av fraksjonen BuOH S5V8V2H6.....	120
6.11.1	Preparativ HPLC	120
6.11.2	NMR-spektroskopi	121
6.11.3	Analytisk HPLC	121
6.12	Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V3H6.....	121
6.12.1	Preparativ HPLC	121
6.12.2	NMR-spektroskopi	122
6.13	Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V3H3 og BuOH S5V7V4H3.....	122
6.13.1	Preparativ HPLC	122
6.13.2	NMR-spektroskopi	123
6.14	Videre rensing av BuOH S5V7VbH2 og BuOH S5V7VbH3	123
6.14.1	TLC	123
6.14.2	NMR-spektroskopi	124
6.15	Fraksjonering av EtOAc-fasen.....	124
6.15.1	Sephadex LH-20 kolonneseparering	124
6.15.2	NMR-spektroskopi	124
6.15.3	Analytisk HPLC	125
6.15.4	Videre arbeid	125
6.16	Separasjon av fraksjon EtOAc S4.....	125
6.16.1	Versaflash kolonneseparasjon	125
6.16.2	NMR-spektroskopi	126

6.16.3	Analytisk HPLC	126
6.16.4	Videre arbeid	128
6.17	Separasjon av fraksjon EtOAc S7	128
6.17.1	Versaflash kolonneseparasjon	128
6.17.2	NMR-spektroskopi	128
6.17.3	Videre arbeid	129
6.18	Separasjon av fraksjonen EtOAc S4V4	129
6.18.1	Preparativ HPLC	129
6.18.2	NMR-spektroskopi	129
6.19	Separasjon av fraksjonen EtOAc S4V8	130
6.19.1	Preparativ HPLC	130
6.19.2	NMR-spektroskopi	130
6.19.3	Analytisk HPLC	130
6.20	Separasjon av EtOAc S7V7	131
6.20.1	Versaflash kolonneseparasjon	131
6.20.2	NMR-spektroskopi	132
6.21	Renstoffer.....	133
6.21.1	Verbascosid	133
6.21.2	Klorogensyre	140
6.21.3	Echinaticin (apigenin 7-O-(4-O-coumaroyl)-glukosid)	145
6.21.4	Acetylallosyl-glukosyl-isoscutellarein	151
6.21.5	Acetylallosyl-glukosyl-metylisoscutellarein	157
6.22	Andre renstoffer som ble isolert	162
6.22.1	Acetylallosyl-glukosyl-hypolaetin	162
6.22.2	Acetylallosyl-glukosyl-metyl-hypolaetin.....	165
6.22.3	Leucoseptosid A	167
6.22.4	Acetylallosyl-acetylglukosyl-hypolaetin 4'-metyleter	170
6.22.5	Acetylallosyl-acetylglukosyl-isoscutellarein 4'-metyleter.....	173
6.22.6	Allosyl-acetylglukosyl-isoscutellarein	176
6.23	Generelle kommentarer.....	177
6.24	Identifisering av topper i HPLC kromatogrammer	178
6.25	Oppsummering.....	180
7	Konklusjon	181

8	Videre arbeid	182
9	Litteraturliste	183
	Vedlegg	196

1 Forkortelser

Forkortelsen	
12-/15-LO	12/15-lipoksygenase
15-HPETE	15-hydroperoksy-eikosatetraensyre
15-LO	15-Lipoksygenase
AChE	Acetylcholinesterase
AChE	Acetylkolinesterase
AD	Alzheimers sykdom
ALS	Amyotrofisk lateral sklerose
AMM	Markedsføringstillatelse
APT	Attached Proton Test
ASE	Accelerated Solvent Extraction
ATCI	Acetylthiocholine iodide
A β	Amyloid-beta
BTCI	Butyrylthiocholine iodide
BuChE	Butyrylcholinesterase
BuChE	Butyrylcholinesterase
BuOH	Butanol
CD ₃ OD	Deuterert metanol
CDCl ₃ ,	Deuterert kloroform
COSY	Correlation Spectroscopy
COX	Cyklooksygenaser
CYP	Cytokrom p-450 epoksygenaser
D ₂ O	Deuterert vann
DCM	Diklormetan
DE	Kiselgur
DMSO	Dimetylsulfoksid
DMSO-d ₆	deuterert dimetylsulfoksid
DPPH	Difenylpicrylhydrazyl
DPPH.	1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl
DPPH-H	1,1-difenyl-2-picrylhydrazin
DTNB	5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic)
EtOAc	Etylacetat
EtOH	Etanol
FAD	Flavinadenin dinukleotid
GSH	reduisert glutation
GSHPX	glutation peroksidase
GSHPX	Glutation peroksidase
GSSG	oksidert glution
H	Preparativ-HPLC
H ₂ O ₂	hydrogenperoksid
HETE	Hydroksyeikosatetraensyrer
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPETE	Hydroperoksy-eikosatetraensyrer
HPLC	Væsekromatografi

HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
JAR	Koriokarcinomcellelinje
LOX	Lipoksygenaser
MeOH	Metanol
Min	Minutt
N ₂	Nitrogengass
NMR	Kjernemagnetisk resonansspektroskopi
NO •	nitrogenoksid
NO ₂ •	nitrogendioksid
NOESY	Nuclear Overhauser Effect spectroscopy
O ₂	oksygen
O ₂ • -	superoksid
OH •	hydroksyl
OR•	alkoksylnradikal
ROO •	peroxyl
ROO•	Peroksylnradikal
ROOH	hydroperoksider
ROOH	Lipidhydroperoksid
ROS	reaktive oksygen species
ROS/RNS	Reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser
S	Sephadex
<i>S. scardica</i>	Sideritis scardica
SOD	superoksid dismutase
TFA	Trifluoreddiksyre
TLC	Tynnsjiktromatografi
TMS	Tetrametylsilan
V	VersaFlash
XDH	Xantin dehydrogenase
XO	Xanthin oksydase
XOR	Xantin oksidoreduktase

2 Hensikt

Sideritis scardica ”gresk fjellte” anvendes blant annet for å ha en forebyggende effekt mot kognitive svekkelser og Alzheimers sykdom. I tillegg har det vært rapportert at planten har antiinflammatorisk, gastrointestinal beskyttende, cytotoxisk og antimikrobiell effekt og har antioksidantaktivitet.

Hensikten med denne oppgaven var å isolere og identifisere de lavmolekylære innholdsstoffene som kunne være underliggende årsaket til plantens terapeutiske effekt. Det ble utført test av radikalscavenging og ulike enzymhemningstester for å finne mulige årsaker for de rapporterte effektene og innvirkningen på Alzheimer sykdom.

3 Teori

3.1 *Sideritis scardica*

3.1.1 Taksonomisk klassifisering

Fullstendig systematikk for *Sideritis scardica* Griseb. er som følgende [2]:

Tabell 3.1: Systematikk for *Sideritis scardica*

Rike:	Plantae (planterike)
Subrike:	Tracheobionta (karplante)
Superdivisjon:	Spermatophyta (frø plante)
Divisjon:	Magnoliophyta (blomsterplanter)
Klasse:	Magnoliopsida (tofrøbladet)
Underklasse:	Asteridae
Orden:	Lamiales
Familie:	Lamiaceae /Labiatae (mintfamilie)
Slekt:	<i>Sideritis</i>
Art:	<i>scardica</i> Griseb.

Synonymer [3]:

Navicularia scardica (Griseb.) Sojak

Sideritis florida Boiss. & Heldr.

Sideritis raeseri subsp. Florida (Boiss. & Heldr.) Papan. & Kokkini

Sideritis scardica subsp. Longibracteata Papan. & Kokkini

Lokale navn

S. scardica har en rekke forskjellige lokale navn [4]:

Tabell 3.2: Lokale navn for *S.scardica*

Språk	Lokalnavn	Språk	Lokalnavn
Bulgarsk:	Мурсалски чай, стрък	Ungarsk:	Sármányvirág virágos hajtása
Tsjekkisk:	nat`hojnìku	Italiensk:	Stregonia parti aeree fiorite
Dansk:	Kortkroneurt	Litauisk:	Timsrų žolė
Tysk:	Berufskraut	Latvisk:	Siderītu laksts
Gresk:	Πόα σιδηρίτο	Maltesisk:	ħaxixa tas-Sideritis
Engelsk:	Ironwort, Mountain Tea, Shepherd's Tea	Nederlandsk:	(Griekse) bergthee, kruid
Spansk:	Siderita, partes aéreas de	Polsk:	Ziele gojnika
Estisk:	haavarohuürt	Portugisisk:	Siderite, partes aéreas
Finsk:	raudakki, verso	Slovakisk:	xel sklepnjaka
Fransk:	Crapaudine (parties aériennes de)	Svensk:	Sårmynta, ört
Hebraisk:	očistova zelen	Norsk:	Gresk fjell te

3.1.2 Botaniske forhold

S. scardica er en flerårig urteplante og er treaktig ved basis med stilker som kan bli 15-40 cm høye. Planten kan være forgrenet eller uforgrenet og har et godt utbygget rotsystem [5]. Bladene er motstående med grå hår, avlange, og kan bli 4-9 cm lange [1]. Dekkbladene er 12-20 mm lengre enn blomsten. *S. scardica* har mange tettsittende, sitrongule blomster i en sirkel rundt stilken. Blomsterkronen er med kjertler og klokkeformet [1].

Planten reproduseres hovedsakelig ved frø, men under dyrkning kan også vegetativ forming skje ved deling av rotstokken [5].



Figur 3.1: *S.scardica* blomsterkrone [1]



Figur 3.2: Bestand av *S.scardica* [1]



Figur 3.3: *S.scardica* stengel med dekkblader og blomster [1]

3.1.3 Habitat

S. scardica er opprinnelig fra Balkan og forekommer i Sørvest-Albania, Makedonia, Bulgaria, Serbia, Hellas og Tyrkia. [1].

S. scardica er en robust, hardfør plante som kan overleve med lite vann og jord. På sine opprinnelige områder vokser den på åpne, tørre, steinete steder, på kalkstein, på grunn og erodert jord [5]. Planten vokser også i høye fjellområder og kan overleve lave temperaturer helt ned til -10°C [1].

3.1.4 Tradisjonell bruk

S. scardica har tradisjonelt blitt brukt som te, smakstilsetning og i folkemedisinen som antiinflammatorisk, antimikrobielt, og smertestillende middel. Andre bruksområder som nevnes er bruk av plantens blomster og blader som forfriskning, mot hosting ved forkjølelse - ofte forsterket med kanel og honning, og for behandling av gastrointestinale lidelser [1].

På Balkan er *S. scardica* kjent som en helbredende aromatisk urtete mot forskjellige lidelser. På antikkens tid ble planten brukt for behandling av sår som var forårsaket av jernvåpen i kamper [1]. Ellers er planten mest kjent for sin effekt mot hosting av forskjellig opprinnelse, som astma, emfysem og bronkitt. *S. scardica* har vist noe effekt i behandling prostatalidelser, angina pectoris og sår hals. Det har også blitt rapportert at teen kan øke diuresen og bidra til ødeleggelse og eliminering av små nyrestein [5].

“Pirin” urtete, som den kalles i Bulgaria, inneholder *S. scardica* og andre urter, ble brukt mot revmatisme og immunstimulerende middel. I tillegg til å bli brukt som urtete ble etanolekstraktet av *Sideritis scardica* brukt lokalt som antiseptisk etter tanntrekking og for andre sår i munnen. Knuste blader i olje brukes til å påføre kroppen ved inflammasjon eller sår hud. Planten er også populær som te med sitron og honning for forlengelse av levetid [5].

I de siste ti årene har *S. scardica* vært en av de mest populære og solgte folkemedisinske teer i Bulgaria. I folkemedisinen er urteteen laget av overjordiske deler fra planten ved avkoking eller som ekstrakt [5, 6]. På grunn av populariteten har denne arten kommet på rødlisten i Bulgaria over truede arter. I dag er det forbudt å samle denne arten, og en spesiell ordning for bevaring og bruk av denne arten har blitt utviklet. I følge denne ordningen kan bare dyrkede planter selges, noe som ikke er lett å kontrollere. Tørkede overjordiske deler blir solgt i flere bulgarske byer som medisinplante [6].

3.1.5 Tidligere funn

Et søk i databasen SciFinder, med søkeordet “*Sideritis scardica*” ga 56 treff inkludert patenter (15.mars 2017). Den første studien ble utført på 1930-tallet, og fortsatt forskes det på denne planten. I dag har en rekke innholdsstoffene blitt identifisert og strukturoppklart. I følge litteraturen inneholder planten en rekke forskjellige flavonoider, fenyletanoider, andre polyfenoler og andre komponenter. Det har blitt gjort nokså lite forskning på biologisk aktivitet på selve ekstraktet med varierte resultater, og det er få studier på mange av hovedkomponentene.

Tabell 3.3 viser en oversikt over identifiserte stoffer i *S. scardica*.

Tabell 3.3: Oversikt over identifiserte stoffer i *S.scardica*

FLAVONOIDER	
(-)-epicatechin	[15]
3'- <i>O</i> -Methylhypolaetin	[7]
3'- <i>O</i> -methylhypolaetin 7- <i>O</i> -(2''',6'''-di- <i>O</i> -acetyl)allosyl(1->2)glucosid	[10], [12]
3'- <i>O</i> -methylhypolaetin 7- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -acetyl)-allosyl(1->2)-6''- <i>O</i> -acetylglucosid	[11], [13], [14]
3'- <i>O</i> -methylhypolaetin 7- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -acetyl)allosyl(1->2)glucosid	[17], [10], [12], [14]
3'- <i>O</i> -methylhypolaetin 7- <i>O</i> -allosyl(1->2)-6''- <i>O</i> -acetylglucosid	[11]
3'- <i>O</i> -methylhypolaetin 7- <i>O</i> -allosyl(1->2)glucosid	[10], [12]
3'- <i>O</i> -methylisoscuteallarein acetylallosylglucosid	[12]
4'- <i>O</i> -methylhypolaetin 7- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -acetyl)allosyl(1->2)-(6''- <i>O</i> -acetyl)glucosid	[17], [18], [14]
4'- <i>O</i> -methylhypolaetin 7- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -acetyl)-allosyl(1->2)-glucosid	[11], [18], [14]
4'- <i>O</i> -methylisoscuteallarein 7- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -acetyl)allosyl(1->2)-(6''- <i>O</i> -acetyl)glucosid	[10], [11], [12], [14]
4'- <i>O</i> -methylisoscuteallarein 7- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -acetyl)-allosyl(1->2)-glucosid	[11], [14]
4'- <i>O</i> -methylisoscuteallarein 7- <i>O</i> -allosyl(1->2)-6''-acetylglucosid	[11]
4'- <i>O</i> -methylisoscuteallarein 7- <i>O</i> -allosyl(1->2)glucosid	[10], [11], [12]
4'- <i>O</i> -Methyluteolin 7- <i>O</i> -[6'''- <i>O</i> -acetyl]allosyl(1->2) glucosid	[14]
6-Methoxyluteolin	[19]
Apigenin	[7], [8], [9]
Apigenin 7-(4''- <i>p</i> -coumaroyl)-glucosid	[11]
Apigenin 7-(6''- <i>p</i> -coumaroyl)-glucosid	[11], [12], [13]
Apigenin 7- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -acetyl)allosyl(1->2)glucosid	[10]
Apigenin 7- <i>O</i> -allosyl(1->2)glucosid	[13], [14]
Apigenin acetylallosylglucosid	[12], [13], [14]
Apigenin-7- <i>O</i> -glucosid	[8] [9]
Chrysoeriol	[7]
Chrysoeriol 7- <i>O</i> -[6''- <i>O</i> -acetyl]allosyl(1->2) glucosid	[13]
Epicatechin gallat	[16]
Hypolaetin 7- <i>O</i> -(2''',6'''-di- <i>O</i> -acetyl)allosyl(1->2)glucosid	[10], [12]
Hypolaetin 7- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -acetyl)-allosyl(1->2)6''- <i>O</i> -acetyl-glucosid	[11], [13], [14]
Hypolaetin 7- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -acetyl)-allosyl(1->2)glucosid	[17], [10], [11], [12], [14]
Hypolaetin 7- <i>O</i> -allosyl(1->2)[6''- <i>O</i> -acetyl]glucosid	[13], [14]
Hypolaetin 7- <i>O</i> -allosyl(1->2)glucosid	[10], [11], [12], [14]
Isoscuteallarein	[7]
isoscuteallarein 7- <i>O</i> -(2''',6'''-di- <i>O</i> -acetyl)allosyl(1->2)glucosid	[10]
Isoscuteallarein 7- <i>O</i> -(6'''-di- <i>O</i> -acetyl)allosyl(1->2)6''- <i>O</i> -acetylglucosid	[10]
Isoscuteallarein 7- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -acetyl)allosyl(1->2)glucosid	[17], [11], [18], [12], [14]
Isoscuteallarein 7- <i>O</i> -(6'' \bar{O} -acetyl)-allosyl(1->2)-6''-acetylglucosid	[11], [18], [14]
Isoscuteallarein 7- <i>O</i> -allosyl(1->2)[6''- <i>O</i> -acetyl]glucosid	[13], [14]

Isoscutellarein 7- <i>O</i> -allosyl(1->2)glucosid	[17], [10], [11], [12], [14]
Luteolin	[8], [9]
Luteolin 7- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -acetyl)-allosyl(1->2)-6''- <i>O</i> -acetylglucosid	[11], [13], [14]
Luteolin 7- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -acetyl)-allosyl(1->2)-glucosid	[11], [13]
Luteolin 7- <i>O</i> -allosyl(1->2)-6''- <i>O</i> -acetylglucosid	[11], [13]
Luteolin 7- <i>O</i> -allosyl(1->2)glucosid	[10], [12]
Luteolin 7- <i>O</i> -β-glucosid	[9]
Myricetin	[16]
Quercetin	[15]
Rutin	[15]
HYDROKSYKANELSYRE DERIVATER	
Kaffesyre	[8], [9], [15]
5-kaffeoylkinasyre	[17], [10], [11]
3-kaffeoylkinasyre	[10], [11]
Klorogensyre	[8], [9], [12], [16], [20],
<i>p</i> -Kumarsure	[9]
<i>p</i> -kumarsyre 4- <i>O</i> -glucosid	[11], [13]
Feruloylkinasyre	[11], [12], [20]
Ferulasyre	[15]
Protokatekusyre	[9]
Syringasyre	[9]
Vaniljesyre	[9]
FENYLETANOIDER:	
Allyssonosid	[10], [13], [12], [20]
Echinacosid	[10], [13], [12], [20]
Forsythosid	[12]
Forsythosid A	[10], [13], [20]
Forsythosid B	[13]
Lavandulafoliosid	[17]
Leucoseptosid	[12]
Leucoseptosid A	[10], [13]
Isoleucoseptosid	[13]
Samiosid	[13]
Verbascosid	[17], [10], [13], [12]
Isoverbascosid	[13]

3.1.6 Hovedkomponentene i eterisk olje fra *S. scardica*

En studie av *S. scardica* fra forskjellige økologiske opphav ble utført for å se hvilke komponenter som var i eterisk olje. Monoterpenene α-pinen (52%), β-pinen (13%) og myrcen

(13%) var det mest av i den greske planten. I den tyrkiske varianten var det β -pinen (17,9%) og carvacrol (14,8 %) som var hovedkomponentene, mens diterpener (21.7-31.0 %) og octadecenol (23-25.3 %) var de dominerende komponenter i planter fra Bulgaria [21].

I en annen studie gjort i Bulgaria i 2013 var α -pinen (4.4-25.1%), β -pinen (2.8-18%), oct-1-en-3-ol (2.3-8%), fenylacetaldehyd (0.5-9.5%), β -bisabolen (1.3-11%), benzylbenzoat (1.1-14.3%) og m-camphorene (0.3-12.4%) hovedkomponenter [22]. I flere andre studier ble det også vist at hovedkomponentene i *S. scardica* er β -pinen, carvacrol, og α -pinen [23-25], mens en del andre studier har vist at diterpener og hydrokarboner (hentriacontane og nonacosane) er de dominerende komponentene [26, 27]. En annen komponent som finnes i *S. scardica* er caryophyllen [28-30].

Det geografiske opphavet og hovedkomponenter til *S. scardica* i den eteriske oljen har en sammenheng, for eksempel *S. scardica* plukket i Makedonia har mest α -cadinol (20%) [31], mens den fra Bulgaria er rikest på diterpener og octadecenol [21, 31].

3.1.7 Biologisk aktivitet

Flere forskjellige biologiske aktiviteter av *S. scardica* er rapportert, for eksempel antiinflammatorisk effekt, gastrobeskyttende, cytotoxisk, antimikrobiell og antioksidant.

Antimikrobiell aktivitet

Det er vist at heksanekstraktet av *S. scardica* hemmet vekst av gram-positiv bakterien *S. aureus*, men ekstraktet hadde ikke hemmende effekt mot den gram-negative bakterien *Escherichia coli* og soppen *C. albican* [27]. Etanolekstraktet og forskjellige faser fra etanolekstraktet (dietyleter, etylacetat, *n*-butanol) av *S. scardica* viste aktivitet mot *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*, og *Pseudomonas aeruginosa* [32].

Antioksidantaktivitet

Etanolekstraktet av *S. scardica* hadde en antioksidantaktivitet målt som scavenging av DPPH- (difenylpicrylhydrazyl) radikalet med en IC₅₀ verdi for forskjellige plantematerialer mellom 3.2 og 16.6 mg/ml [26]. Et annet sted er IC₅₀ verdier på 31.5±0.4 µg/ml for etanolekstraktet, 5.7 µg/ml for *n*-butanolfasen, 20.1±0.4 µg/ml for etylacetatfasen og 147.3±1.8 µg/ml for dietyleterfasen rapportert [9].

Antiinflammatorisk aktivitet

Etanolekstraktet og fraksjonene av *S. scardica* ble undersøkt for antiinflammatorisk aktivitet ved hjelp av rottepoteødemtest med doser på 50, 100 og 200 mg/kg (carrageenan-induced rat's paw oedema test). De viste en signifikant reduksjon av rottepoteødem med dose på 100 og 200 mg/kg som var sammenlignbar med indometacin (4mg/kg; positiv kontroll) [9]. Dietylerekstraktet og *n*-butanolekstraktet var de mest aktive.

Cytotoksisk aktivitet

I en cytotoksisk test på et musemelanom cellelinje (B16) utført av Tadic et al. 2012 viste bare dietyleter ekstraktet en signifikant doseavhengig cytotoksisk aktivitet, der det reduserte celleviabiliteten med 51.3 % ved en konsentrasjon på 100 µg/mL. De komponentene i ekstraktet som viste en signifikant cytotoksisk aktivitet var fenoliske forbindelser; luteolin, apigenin-7-O-β-glycosid, apigenin, og luteolin-7-O-β-glycosid. På en human promyelocytisk leukemicellelinje (HL-60) viste både dietyleter og *n*-butanol fraksjonene fra *S.scardica* ekstraktet signifikant cytotoksisk aktivitet, ved en konsentrasjon på 100 µg/mL, de mest toksiske komponentene for HL-60 celler var apigenin (34.4%) og luteolin (47.1%) [9].

Gastrobeskyttende effekt

Etanolekstraktet og de forskjellige fraksjonene ga en signifikant beskyttende aktivitet mot etanolindusert magesår hos rotter. Butanolfraksjonen var den mest aktive fraksjonen, og ga mer effekt enn ranitidin (5 – 20 mg/kg) ved en dose på 100 mg/kg. Dette kan komme av det høye innholdet av fenoliske komponenter [9].

Antiglioma aktivitet

Dietyleter og etylacetat ekstrakter av *S. scardica* viste en cytotoksisk effekt på C6 rotte glioma celler med en IC₅₀ på 81.6 µg/mL og 109.4 µg/mL. Den oppnådde cytotoksiske aktiviteten kan være på grunn av flavonoidene apigenin og luteolin [33].

Trippelt monoamin reopptak hemming

Ulike *S. scardica* ekstrakter (vann, metanol og 70 % etanol) ble studert for opptak av serotonin, noradrenalin og dopamin i synaptosomer i rottehjerne og serotoninopptak i humane JAR (koriokarcinomcellelinje). Det viste seg at alle ekstraktene hemmet opptaket av alle de tre monoaminer i rottens hjernesynaptosomer, fra sine transportører (EC₅₀ 30-40 µg/mL).

Hemmingen av MeOH ekstraktet på humane serotonintransportører var sterkere (1.4 µg/mL) enn på rottenes hjernesynaptosomer. De farmakologiske egenskapene antyder at disse ekstraktene kan være brukbare i fytoterapi av psykiske lidelser forbundet med en feil i monoaminerg neurotransmisjon, som for eksempel angstlidelser, depresjon, oppmerksomhetssvikt, hyperaktivitetsforstyrrelse, mental svekkelse, eller neurodegenerative sykdommer [34].

Alzheimers sykdom

Det har vært gjort forskning på *S. scardica* påvirkning av hukommelsesferdigheter av mus i Morris vannlabyrint etter administrering av *S. scardica* ekstrakt. Det viste seg at adferden til testgruppen av transgene «Alzheimer» mus, behandlet med *S. scardica* ekstrakt, lignet på kontrollgruppen med friske ubehandlede mus. Dette var korrelert med histopatologiske funn, der *S. scardica* ekstrakt ga en reduksjon av total β-amyloid mengde på 55 % vs. kontrollgruppen med «Alzheimer» mus [35].

Ut fra forsøk i mus med et etanol-vannekstrakt (20% etanol) er det foreslått at daglig inntak med *Sideritis* spp. ekstrakter kan være et potent, godt tolerert alternativ for behandling av symptomene på kognitiv svikt hos eldre, med hensyn på Alzheimers sykdom. Altså ved å påvirke de mest fremtredende kjennetegnene, amyloid β patologi og kognitiv svikt [36].

Det har også blitt gjort en klinisk studie på 64 friske menn og kvinner over 6 uker ved inntak av et kosttilskudd som inneholdt en vandig etanol ekstrakt av *S. scardica* og utvalgte B-vitaminer. Det viste seg at denne kombinasjonen kan lindre stressforbedre funksjoner i forhold til arbeidshukommelse, kognitiv fleksibilitet og adferdskontroll etter inntak [37].

3.2 Antioksidanter og frie radikaler

3.2.1 Antioksidanter

Begrepet antioksidanter brukes i mange forskjellige sammenhenger og er vanskelig å definere. En foreslått definisjon for alle antioksidanter er:

“En antioksidant er enhver substans som når den foreligger i en lavere konsentrasjon i forhold til et oksiderbart substratet, signifikant forsinker eller forhindre oksidasjon av det substratet” [38]

Begrepet “oksiderbart substrat” omfatter ethvert molekyl som finnes i levende celler, for eksempel DNA, proteiner, lipider, karbohydrater og urinsyre. Det er ingen universell beste antioksidant, bare forskjellige antioksidanter som beskytter forskjellige biomolekyler *in vivo* mot forskjellige typer oksidativt angrep [38]. Derfor trenges det mange ulike antioksidanter for å optimal beskyttelse.

3.2.2 Antioksidantforsvar

Kroppen har flere mekanismer for å motvirke oksidativt stress ved produksjon av antioksidanter [39]. Kroppens antioksidantnettverk er sammensatt og omfatter både endogene stoffer og eksogene (gjennom kostholdet). Eksempler på endogene antioksidanter er superoksid dismutase (SOD), katalase, og glutation peroksidase (GSH-PX). Dette forsvarssystemet kan redusere dannelsen av frie radikaler og fjerner reaktive oksygen species (ROS) ved å reagere med og uskadeliggjøre dem, reparere oksidative skader og hemme peroksideringsprosesser [38]. Antioksidanter beskytter celler mot radikalenes toksiske effekter og antas å bidra til forebygging av sykdommer assosiert med oksidativt stress [39].

Naturlige antioksidanter i kroppen:

- Enzymet superoksid dismutase (SOD) fjerner effektivt superoksid radikal anion $O_2^{\cdot-}$ ved å omdanne det til hydrogenperoksid (H_2O_2) og oksygen (O_2) [39]
- Katalase katalyser spalting av H_2O_2 til vann (H_2O) og O_2 [38]
- Glutation reduktase reduserer oksidert glution (GSSG) til redusert glutation (GSH) [39]

- Glutation peroksidase (GSHPX) reduserer H_2O_2 til H_2O og andre hydroperoksider (ROOH) til ROH [38]

Antioksidanter fra kosten:

- Vitamin C reduser frie radikaler og ROS, og virker synergistisk med vitamin E [39]
- Vitamin E (hovedsakelig α - tokoferol) scavenger lipidperoksyldikaler og hemmer lipidperoksidering [38]
- Karotenoider deaktiverer singlet oksygen [39]
- Polyfenoler, for eksempel flavonoider, reduserer frie radikaler og ROS, og kan hemme prooksidative (f.eks. xanthin oksidase) og peroksidende enzymer (f.eks. lipoksygenaser) [39]

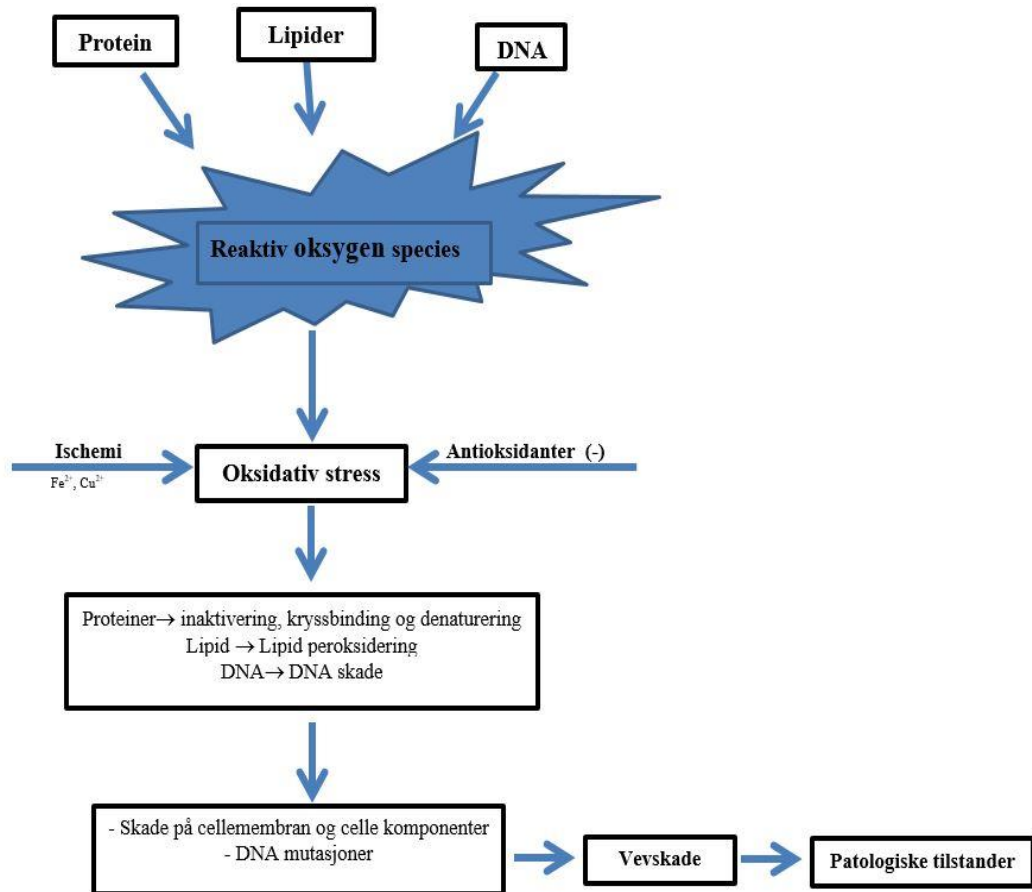
3.2.3 Frie radikaler og ROS

Et fritt radikal kan defineres som et molekyl eller enhver spesie som inneholder ett eller flere uparede elektroner i sin ytterste atom- eller molekyl orbital. Noen frie radikaler, som $OH\cdot$, er svært reaktive og kan starte en kjedereaksjon med gang de er dannet [39].

ROS er et samlebegrep som omfatter både frie oksygenbaserte radikaler og ikke-radikale reaktive oksygenforbindelser, også kalt oksidanter. Radikaler er vanligvis mindre stabile (mer reaktive) enn ikke-radikale forbindelser [40].

Eksempler på frie radikaler er hydroksyl ($OH\cdot$), superoksid ($O_2\cdot^-$), nitrogenoksid ($NO\cdot$), nitrogendioksid ($NO_2\cdot$), peroxy ($ROO\cdot$) og hydrogenperoksid (H_2O_2). H_2O_2 er egentlig ikke et fritt radikal, men omtales som en ROS. Frie radikaler har uparede elektroner som er tilgjengelige for å reagere med forskjellige organiske substrater, slik som lipider, proteiner og DNA [40].

Frie radikaler og andre ROS blir dannet i kroppen kontinuerlig som et resultat av oksidativ metabolisme. De kan gi skadelige virkninger, som for eksempel på mitokondriene. Men frie radikaler og ROS er også viktige signalmolekyler. Blant annet er nitrogenoksid med på å regulere blodtrykket og kan motvirke andre patologiske prosesser, f.eks. ved å inngå i kroppens forsvar mot infeksjoner og inflammasjoner [38].



Figur 3 4: Fra frie radikaler til patologiske tilstander [39]

3.2.4 Oksidativt stress

En alvorlig ubalanse mellom produksjon av ROS og antioksidantforsvar kalles ofte oksidativt stress. Dette kan skyldes overproduksjon av ROS eller lave nivåer av antioksidanter. Oksidativt stress kan skade biologiske molekyler, det kan blant annet føre til celledød og celledskader, og antas å være involvert i mange sykdommer som for eksempel neurodegenerative sykdommer som Alzheimer kreft, aterosklerose og diabetes [38].

3.2.5 Lipidperoksidering

Frie radikaler i nærvær av oksygen kan føre til nedbrytning, peroksidering, av lipider i plasma og membraner. Ved lipidperoksidering blir flerumettede fettsyrer oksidert og degradert. Det er på to forskjellige måter lipidperoksidering kan skje: ved enzymatisk eller ikke-enzymatisk reaksjon. Oksidativ skade starter ved at dobbeltbindingene i umettede fettsyrer av membranlipider blir angrepet av oksygenavledete frie radikaler, for eksempel $\text{OH} \cdot$ [38].

Ved en enzymatisk reaksjon katalyserer enzymer, for eksempel cyklooksygenaser og lipoksygenaser peroksideringen av flerumettede fettsyrer, mens ved en ikke-enzymatisk lipidperoksidering vil et reaktivt species, ofte $\text{OH} \cdot$ radikalet eller $\text{OR} \cdot$ radikalet (alkoksyldradikal), fjerne et hydrogenatom fra en metylengruppe mellom to dobbeltbindinger i en fettsyrekjede. Dette fører til dannelsen av et ustabil karbonsentrert radikal, som gjennomgår omleiring til et konjugert dien. Ved reaksjon med oksygen dannes det et peroksyldradikal ($\text{ROO} \cdot$) som er reaktivt nok til å angripe nærliggende fettsyrekjeder og skade membranproteiner. Lipidhydroperoksid (ROOH) blir dannet ved at peroksyldradikalet tar opp et H-atom fra en ny fettsyre. Da har det blitt dannet et nytt ustabil karbonsentrert radikal, som fører til kjedereaksjon [38].

3.3 Arakidonsyremetabolisme og 15-lipoksygenase

Arakidonsyre er en flerumettet (C_{20}) fettsyre i fosfolipider i cellemembranen som frigjøres enten i en ettrinnsprosess eller en totrinnsprosess, som en respons til ulike cytokiner, peptider og vekstfaktorer under inflammatoriske reaksjoner. I ettrinnsprosessen blir arakidonsyre avspaltet ved hjelp av enzymet fosfolipase A_2 og i totrinnsprosessen av enzymene fosfolipase C og diacylglycerol lipase. Arakidonsyre er forløper til eikosanoidene. Eikosanoidene har ulike fysiologiske funksjoner og spiller en viktig rolle i humane sykdommer, blant annet diabetes, aterosklerose, nevrologiske sykdommer som Parkinson og Alzheimer. Eikosanoider blir dannet enzymatisk fra arakidonsyre via flere reaksjonsveier [41, 42]:

- Arakidonsyrer blir oksidert av cyklooksygenaser (COX) til prostaglandiner, tromboksaner og prostacykliner
- Arakidonsyrer blir oksidert av lipoksygenaser (LOX) til leukotriener, lipoksiner, hydroperoksy-eikosatetraensyrer (HPETE) og hydroksyeikosatetraensyrer (HETE)
- Arakidonsyrer blir oksidert av cytokrom p-450 epoksygenaser (CYP) til epoksider

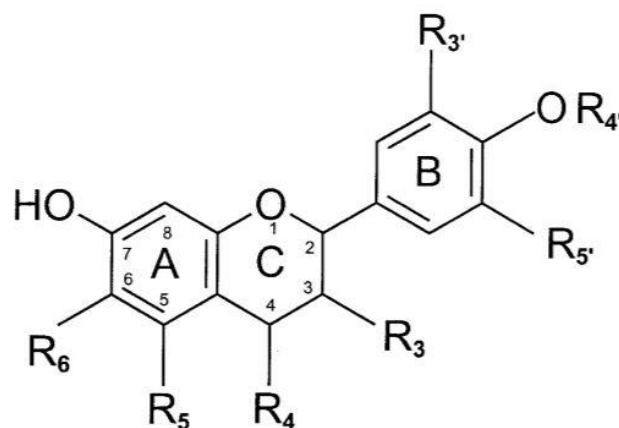
De ulike substratene til LOX, 5-LOX, 12-LOX og 15-LOX, finnes både i mennesker og dyr, og er navngitt etter posisjonen til det C-atomet i arakidonsyren som oksideres. 15-Lipoksygenase (15-LOX) gir blant annet metabolitten 15-hydroperoksy-eikosatetraensyre (15-HPETE). 15-LOX kan oksidere forestret arakidonsyre og linolsyre, og forårsake direkte lipidperoksidering og føre til aterosklerose. I tillegg er den vist å kunne bidra til utvikling av insulinresistens og diabetes [42-44].

Det er vist at 12/15-LOX – enzymer kan bidra til neuronal celledød og vaskulær skade, derfor kan man ved hemming av de to enzymene unngå flere skadelige reaksjonsveier, samt beskytte mot ischemisk skade [44].

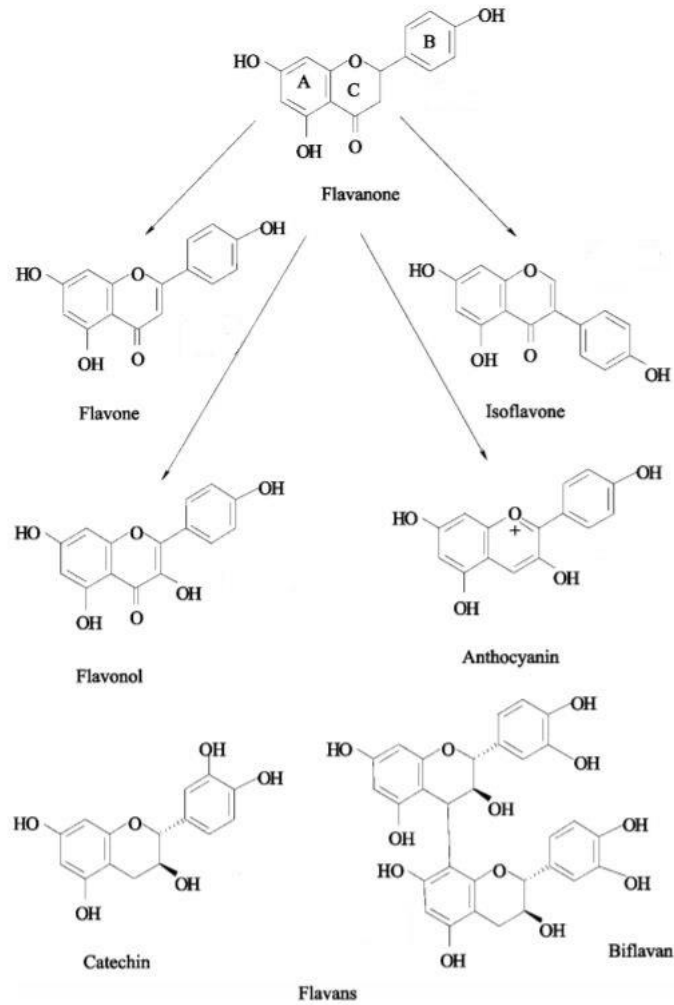
3.4 Flavonoider

Flavonoider utgjør den største gruppen av polyfenoler, og finnes i forskjellige frukter og grønnsaker. Mange medisinplanter inneholder store mengder flavonoider. Flavonoider spiller en viktig rolle i menneskers helse på grunn av høy farmakologiske aktivitet, og de er ofte gode antioksidanter. En del epidemiologiske undersøkelser tyder på at flavonoider har en beskyttende effekt mot kardiovaskulære sykdommer, kreft, og andre aldersrelaterte sykdommer. Men mer forskning er nødvendig for å avklare sammenhengen mellom flavonoider og sykdommer, blant annet hvor effektive flavonoidene vil være i praksis for reduksjon av kreftrisikoen og andre lidelser [45].

Flavonoider kan deles inn i flere undergrupper som flavoner, flavanoler, flavonoler, flavanoner, isoflavoner og anthocyaniner. Disse inneholder to aromatiske ringer, vanligvis med minst en aromatisk hydroksyl (OH-gruppe), og er koblet sammen via en bro [46]. Denne broen består av tre karbonatomer som kombinert med et oksygenatom på en av de aromatiske ringer (A-ringen) danner en tredje 6-ring (C-ringen) (se figur 3.5). Flavonoider er inndelt i underklasser basert på forbindelsen fra B-ringen til C-ringen, i tillegg til konjugeringsmønstre, hydroksylering og de funksjonelle gruppene på C-ringen [46].



Figur 3.5: Generell struktur og nummereringsmønster for vanlige flavonoider[46]



Figur3. 6: Klassifisering av flavonoider[45]

Den gode antioksidant/antiradikaleffekten skyldes delvis substitusjoner i B-ringene, ved 3'-og 4'-posisjonene (katekolstruktur), som har vist hemmingseffekt mot lipidperoksidering. OH-gruppene i B-ringene donerer et proton og et elektron til hydroksyl, peroksy og peroksynitritt radikaler og danner et relativt stabilt flavonoidradikal. OH-gruppene har vist mest signifikant scavengereffekt på ROS. A-ring substitusjon har vanligvis liten betydning for antioksidantaktiviteten, mens C-ring bidrar til antioksidantaktivitet når den har en OH-gruppe i 3-posisjonen og er konjugert til B-ringene ved en dobbeltbinding mellom C-2 og C-3. Det er vist at flavonoidaglykoner har sterkere antioksidanteffekt enn deres korresponderende glykosider, og at antioksidant aktiviteten til flavonolglykosider reduseres med økende antall glykosidenheter. Det har også blitt rapportert at posisjonen og strukturen av sukkeret kan spille en viktig rolle [47].

Ettersom det finnes ulike typer av LOX som katalyserer lipidperoksidereaksjonen, kan de forskjellige flavonoider ha ulike hemmingsaktiviteter på disse enzymene. For eksempel vil

flavonolet quercetin hemme 15-LOX induisert peroksidering, mens flavon vil ikke virke på samme måte. Den antatt viktigste mekanismen kan være at flavonoider hemmer LOX gjennom reduksjon av Fe^{3+} eller ved chelatering. Andre måter flavonoider kan virke på er via scavenging av LOX-aktiverende hydroperoksider eller andre ROS oksidanter [48].

Xanthin oksydase (XO) enzymet kan være en kilde til superoksid radikalanion, som kan reagere videre til frie radikaler som fører til skade i nærliggende vev. Noen flavonoider er kompetitive hemmere av XO-enzymet, selv om effekten ikke er like sterk som den kjente XO-hemmeren allopurinol. Et fravær av 2,3-dobbeltbindingen i C-ringen vil oppheve hemmingsaktiviteten av flavonoider på XO, mens hydroksylsubstitusjon i 3-posisjon i C-ringen ikke har betydning for hemmingsaktiviteten. Aktiviteten vil reduseres ved glykosylering av flavonoidene [48].

3.5 Alzheimer

Et økende antall studier viser at oksidativt stress er involvert i neurodegenerative sykdommer, som for eksempel Alzheimer, Parkinsons og amyotrofisk lateral sklerose (ALS). Det har vært foreslått at dette kan skje ved at de forskjellige enzymene, peroksidierende enzymer, blir aktivert (blant annet XO), og danner reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser (ROS/RNS) [49]. Alzheimer sykdom er den mest utbredte epifenomenet hos de eldre i befolkningen. Selv om det antas at amyloid- β er den utløsende årsaken til sykdommen, er det fortsatt ingen terapeutisk tilnærming som er i stand til å stoppe den [36]. Flere studier har vist at hemming av XO-enzymet kan redusere dannelsen av frie radikaler og forhindre skader på de ulike cellene, og redusere risikoen for Alzheimer [50].

12/15-lipoksygenase (12-/15-LO) enzymene uttrykkes i sentralnervesystemet, hvor de også har vært foreslått å være involvert i Alzheimers sykdom, ettersom de modulerer metabolismen av amyloid-beta ($\text{A}\beta$ - og proteinet tau, som begge er implisert i Alzheimer [51, 52]. In vitro studier har vist at hemming av enzymene acetylkolinesterase (AChE) og butyrylkolinesterase (BuChE), som nedbryter acetylkolin og butyrylkoline, kan være en annen behandlingsmetode av Alzheimers sykdom [53]. Det antas at AChE kan interagere med $\text{A}\beta$ og fremmer akkumulering av amyloidplakk i hjernen hos pasienter med Alzheimers sykdom [54].

4 Materieell og metode

4.1 Materialer

Tabell 4.1 Liste over kjemikalier

Kjemikalier	Produsent
2,2-Difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic) (DTNB)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Aceton purum	Chemi-Teknik AS, Oslo, Norge
Acetylcholinesterase fra elektrisk ål	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Acetylthiocholine iodide	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Boratbuffer (0,2 M natriumborat, pH 9)	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Butanol (BuOH)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Butyrylcholinesterase fra hesteserum	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Butyrylthiocholineiodide	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Cerium(IV)sulfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Destillert vann , MilliQ	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Deuterert kloroform (CDCl ₃)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Deuterert metanol (CD ₃ OD)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Deuterert vann (D ₂ O)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Diklormetan (DCM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Etanol (EtOH)	Arcus, Oslo, Norge
Etylacetat (EtOAc)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Fosfatbuffer (0,1 M natriumhydrogenfosfat, pH 7,4)	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Galantamin (Galantamine Hydrobromide)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Hypoxantin	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Kiselgur (Diatomaceous earth, DE)	Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA
Komprimert luft	AGA, Oslo, Norge
Linolsyre	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Lipoksygenase (type 1-B fra soyabønne)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Metanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumkaliumfosfatbuffer (0,05 M, pH 7,5)	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge

Nitrogengass	AGA, Oslo, Norge
Quercetin	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Sephadex LH-20 gel	Pharmacia Biotech, Uppsala, Sverige
Tacrin (9-amino-1,2,3,4-tetra-hydroacridine hydrochloride hydrate)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Trifluoreddiksyre (TFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Xantin oksidase (XO) fra kumelk	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA

Tabell 4.2: Liste over apparatur

Apparatur	Produsent
Analytisk tynnsjikt-kromatografi (TLC)	
RP-18 F254 S, aluminiumsplater	Merck, Darmstadt, Tyskland
Silikagel 60 F254, glassplater	Merck, Darmstadt, Tyskland
Elueringskar, glass	Camag, Muttenz, Sveits
End-to-End pipetter, 10 µl	Modulohm, Herlev, Danmark
Blandemaskin	
High Performance Blender Machine Raw Pro X1500	RAW, Høvik, Norge
Ekstraktor	
ASE 350	Dionex, Sunnyvale, CA, USA
Filter	
Millex sprøytefilter	Millipore, Billerica, MA, USA
Acrodisc Syringe Filters 0.45µm Supor membrane, 4 mm	Pall Corporation, Port Washington, MI, USA
Inndamping	
E-LAB 2 Oljepumpe	Edwards High Vacuum, Crawley, England
miVac vakuumsentrifuge	Genevac, Ipswich, England
Rotavapor med varmebad HB10/RV10	IKA, Staufen, Tyskland
Mikroplateleser	
iMark Microplate absorbance reader	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
NMR-spektroskopi	
AV II 400	Bruker, Rheinstetten, Tyskland
AV III 400	Bruker, Rheinstetten, Tyskland

AV II 600	Bruker, Rheinstetten, Tyskland
Analytisk HPLC	
Chromolith RP-18e 100 x 4.6 mm kolonne	Merck, Darmstadt, Tyskland
Elite LaChrome Pumpe 1-2130	Hitachi, Tokyo, Japan
Elite LaChrome Autosampler 1-2000	Hitachi, Tokyo, Japan
Elite LaChrome Kolonneovn 1-2300	Hitachi, Tokyo, Japan
Elite LaChrome Diodearray detector	Phenomenex, Torrance, CA, USA
Elite LaChrome Organizer	Hitachi, Tokyo, Japan
Kinetex 5u C ₁₈ 100A, 150 x 4.6 mm kolonne	Phenomenex, Torrance, CA, USA
Preprativ HPLC	
Kinetex 5u C ₁₈ 100A AXIA (150 x 21,2 mm kolonne)	Varian, Palo Alto, CA, USA
Varian Prostar detektor, modell 210 pumpe	Hitachi, Tokyo, Japan
Chromolith Semiprep RP-18e (100 x 10 mm kolonne)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ultralydbad	
Ultrasonic cleaner USC300T	VWR, Leuven, Belgia
UV-lampe	
Mineralight lamp modell UVGL-58	Ultra-Violet Products, Upland, CA, USA
UV-spektroskopi	
Libra S32 PC	Biochrom, Cambridge, England
Kvartskyvetter	Starna, Hainault, England
Vekt	
Sartorius BP 221S	Sartorius, Goettingen, Tyskland
Sartorius ED 224S	Sartorius, Goettingen, Tyskland
Varmeskap	
Thermo electron T6	Heraeus, Hanau, Tyskland
Versaflash kolonnekromatografi	
Accu Metering Pump MP-30	SciLog, Madison, WI, USA
Kromatografi pumpe Büchi 681	Flawil, Sveits
Versapak C ₁₈ -kolonne (40 x 150mm)	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Versapak C ₁₈ -kolonne (23 x 110mm)	Supelco, Bellefonte, PA, USA

4.2 Generelt

4.2.1 Innveing

Overskålsvekt ble brukt for innveing av store mengder (>10 g) og analysevekt for innveing av mindre mengder (<10 g).

4.2.2 Inndamping

Inndampingen av løsemiddel i ulike ekstrakter, fraksjoner og delfraksjoner ble utført på rotavapor. Dette foregikk ved 40 – 60 °C under vakuüm. Løsemiddelrester ble fjernet ved bruk av oljepumpe.

4.2.3 Filtrering

Filterpapir og sprøytefilter ble brukt ved ulike separasjonsmetoder.

4.2.4 Vannkvalitet

Vann fra Millipore-reanseanlegg ble benyttet til alle metoder.

4.3 Separasjonsmetoder

Før oppstart ble bladene av *Sideritis scardica* pulverisert på kommersiell blender RAW Pro X1500, siktet på 1 mm sikt og veid.

4.3.1 Ekstraksjon med organiske løsemidler – ASE

Prinsipp

En automatisert ekstraksjonsteknikk, Accelerated Solvent Extraction (ASE), ble brukt for å utføre organisk ekstraksjon. Denne ekstraksjonsmetoden bruker kortere ekstraksjonstid og bruker lite løsemiddel i forhold til klassiske ekstraksjonsmetoder som f.eks. maserering. Ekstraksjon ved høy temperatur og høyt trykk er de to viktigste parameterer som spiller en viktig rolle og øker effektiviteten av ekstraheringen [55].

Ved bruk av høy temperatur vil løsemidlets kapasitet for å løse opp prøven økes i tillegg til diffusjonshastigheten. Temperaturen påvirker likevekter som forekommer på faste overflater. Med en høy temperatur vil stoffer fjernes fra matriksen lettere siden løsemiddel-matriks interaksjoner brytes som følger av van der Waals krefter, hydrogenbindinger, og dipolbindinger. Viskositeten av løsemidlet vil bli redusert, og matriksen penetreres lettere [56].

Med høyt trykk vil det være mulig å oppnå temperaturer over kokepunktet, som er en fordel for løsemidler med lave kokepunkter. Det høye trykket vil la løsemidlet pumpes gjennom

matriksen lettere, og løsemidlet tvinges inn i porene i matriksen. Da vil det bli en god kontakt mellom matriks og løsemiddelet [56].



Figur 4. 1: ASE instrument ved FI

Prosedyre

Utstyr:

Ekstraksjonsceller tilhørende apparatur
Filter til cellene, 30 mm
Stempel
5 L rundkolbe
Dionex Model ASE 350
Oppsamlingsflasker tilhørende apparatur, a 200 ml
Trakt
Skje

Reagenser:

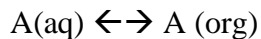
Destillert vann
Nitrogengass
Kiseligur (DE)
Komprimert luft
Etanol

1. Plantemateriale (ca vekt) blandes med granuleringsmateriale, kiselgur, i forhold 4:1 (plantemateriell: DE)
2. Cellene merkes med bunnkapsel og toppkapsel, og bunnkapselen skrues på
3. 30 mm filter trykkes ned i bunnen av cellen ved hjelp av stempel
4. 1 skje DE tilsettes i cellen, og plantemateriell/DE-blandingen fylles til ca. 2 cm under toppen. Unngår å pakke for tett.
5. 1 skje DE tilsettes på toppen av cellen, og toppkapselen skrues godt igjen.
6. Gassene (komprimert luft og N₂) skrues på og maskinen slås på.
7. Ønsket ekstraksjonsmetode blir stilt inn
8. Pakkede celler med plantemateriale plasseres i apparatet.
9. Tomme oppsamlingsflasker plasseres i apparatet, 3 for hver celle.
10. 2 tomme flasker settes også i posisjon R1 og R2 for oppsamling av avfall.
11. Reservoir med etanol (B) og vann (A) som ekstraksjonsmiddel koples til maskinen, ekstraksjonen skjer med 80% vandig etanol.
12. Systemet renses 1 gang med løsemiddelet før start
13. Samlede EtOH ekstrakter overføres til forhåndsveid rundkolbe og dampes til tørrhet på rotavapor og deretter på oljepumpe.

4.3.2 Væske- væske ekstraksjon

Prinsipp

Væske-væske ekstraksjon brukes til å separere stoffer ved å basere seg på egenskapen stoffer har til å fordele seg i to ikke-blandbare væsker. Den ene væsken er vanligvis en vandig suspensjon av stoffer, og den andre væsken er et organisk løsemiddel som ikke er blandbart med vann [57]. Når en vandig løsning som inneholder et organisk stoff A blir rystet med et organisk løsemiddel, vil det raskt innstille seg en likevekt som kan beskrives med ligningen:



Hvor $A(aq)$ og $A(\text{org})$ beskriver hvordan A fordeles mellom vandig og organisk fase [57]. Stoffets hydrofilisitet/ lipofilisitet, samt løsemidlets egenskaper, bestemmer fordelingen av et stoff mellom vandig og organisk fase. Den generelle regelen er at "likt løser likt". Polare stoffer vil løse seg i polare løsemidler og upolare stoffer i upolare løsemidler. Ved valg av løsemiddel for ekstraksjon bør man også ta hensyn til viskositet, tetthet og kokepunkt. Flere ekstraksjoner med små løsemiddelvolum gir bedre separasjon enn ved å ekstrahere bare en gang med et større løsemiddelvolum [57].

Prosedyre

Utstyr:

Skilletrakt
Stativ til skilletrakt
Begerglass
Filterpapir
Pærekolber
Erlenmeyerkolber

Reagenser:

Butanol (BuOH)
Destillert vann
Etylacetat (EtOAc)
Diklormetan (DCM)

1. Stoffet suspenderes i et egnet løsemiddel og overføres til skilletrakt.
2. Suspensjonen ekstraheres med 3x200 ml løsemiddel.
3. Suspensjonen ekstraheres så med 3x200 ml av et annet løsemiddel. Dette gjentas eventuelt med flere løsemidler.
4. Under hver ekstraksjon blir skilletrakten rystet eller snudd opp ned flere ganger før fasene separeres.
5. Ekstraktene filtreres om nødvendig.
6. Ekstraktene overføres til forhåndsveide pærekolber.
7. Ekstraktene dampes inn til tørrhet på rotavapor og deretter på vakuum oljepumpe

4.3.3 Kromatografi

Generelt

Ekstrakter inneholder komplekse blandinger av forskjellige kjemiske forbindelser, derfor trenger man egnede isolerings- og rensemetoder for å oppnå rene forbindelser. Forskjellige kromatografiske metoder kan brukes til å separere forbindelsene [56]. Kromatografi er et samleavn på separasjonsmetoder som baserer seg på prinsippet at stoffene som skal separeres fordeles mellom to faser, hvor den ene fasen er mobil (beveger seg), mens den andre er stasjonær (står stille) [58]. Mobilfasen kan enten være gass (gasskromatografi) eller væske (væskrokromatografi), til å transportere stoffblandingen over enten en væske eller et faststoff som ligger i ro. Det er ofte polariteten til de forskjellige forbindelser som bestemmer affinitet til kolonnematerialet, og stoffer med ulik polaritet vil da komme ut på forskjellige tidspunkter. Forbindelser som interagerer med aktive grupper på overflaten retarderes og får en langsommere fart enn mobilfasen [57]. For å få en vellykket separasjon er det viktig at forbindelsene har ulik grad av interaksjon med stasjonærfasen, og kommer ut på forskjellige tidspunkter [58]. I væskrokromatografi finnes det tre separasjonsprinsipper: normalfasekromatografi, omvendt-fase-kromatografi og eksklusjonskromatografi.

4.3.4 Sephadex LH-20 gel kolonnekromatografi

Sephadex LH-20 gel er fremstilt av hydroksypropylert dekstran som har blitt kryssbundet til dannelsen av et polysakkaridnettverk. Mediet kan svelles i vann og organiske løsningsmidler [59]. Denne metoden blir ofte brukt for separasjon av stoffer fra råekstrakter.

Prinsipp:

Sephadex LH-20 er basert på eksklusjonskromatografi, og separerer stoffene etter molekylstørrelse. Separasjonen forutsetter at det ikke er interaksjon mellom stoffene og stasjonærfasen [57]. Til dette systemet benyttes materiale med en gitt porestørrelse som stasjonærfase [58]. Store molekyler blir lite retardert i porene i stasjonærfasen, og mobilfasen transporterer de ut av kolonnen, mens små molekyler penetrerer porene og retarderes på kolonnen [57]. LH-gelene kan brukes for blandinger av vann og organiske løsningsmidler eller utelukkende i organiske løsningsmidler og får da ofte betydelig karakter av omvendt fase kromatografi, avhengig av løsemiddel. Sephadex LH-20 er ofte velegnet for aromatiske forbindelser siden den har sterkt adsorptive egenskaper.

Prosedyre:

Utstyr:

Sephadex TM LH-20 gel

Stativ

Glass Pasteurpipette

Glasstrakt

Kolonne

Erlenmeyerkolbe

Glassull

Reagenser:

Destillert vann

Metanol

Aceton

1. Sephadex LH-20 gel, kolonnematriks, suspenderes og svelles i passende starteluent.
2. Glassull legges i bunnen av kolonnen og kolonnen monteres vertikalt på stativet.
3. Kolonnen fylles med oppsvullet kolonnematriks. For å få god separasjon er det viktig at kolonnematriksen er pakket jevnt i kolonnen.
4. Kolonnen kondisjoneres med starteluent.
5. Prøven løses i et lite volum løsemiddel, med sammensetning som starteluenten, og appliseres forsiktig på toppen av kolonneveggen med en pipette.
6. For å eluere ut stoffene blir det brukt elueringsmiddel med økende løsemiddelstyrke.
7. Fraksjonene blir samlet opp i passende erlenmeyerkolber.
8. Til slutt vaskes kolonnen med 100% metanol og 70% vandig aceton

4.3.5 VershaFlash kolonnekromatografi

Prinsipp

Versaflash kolonnekromatografi kan enten være basert på normalfasekromatografi eller omvendt fase-kromatografi. Denne metoden anvendes til å separere stoffer med forskjellige polariteter. Til VersaFlash kolonnekromatografi brukes ferdigpakkede Versapak kolonner med polar eller upolar stasjonærfase [60].

Omvendt fase-kromatografi brukes for å separere og rense polare eller semipolare stoffblandinger. Ekstraksjonen i denne metoden er basert på interaksjoner mellom karbon-hydrogen bindingene i stoffene og karbon-hydrogen bindingene på sorbenten, og de viktigste kreftene er van der Waals-krefter [58]. Stasjonærfasen i denne metoden er hydrofob og binder hydrofobe grupper til alkylsilanolgrupper på silika. I omvendt fase-kromatografi er den mest brukte stasjonærfase silikabaserte C18-materiale som har en hydrokarbonkjede med 18 karbonatomer. Mobilfasen består vanligvis av vann blandet med en organisk modifikator som metanol eller acetonitril [57]. Blandinger av metanol og vann som elueringsmiddel pleier ofte å ha høy elueringsstyrke, så aktuelle stoffer vil elueres i et lite volum av løsningsmidlet, og de upolare interaksjoner mellom stoffet og sorbent reduseres [58]. De minst hydrofobe stoffer i en stoffblanding vil ha minst retensjon og derfor kortest retensjonstid. Umettede forbindelser har mindre retensjon enn mettede forbindelser. For ioniserbare stoffer vil retensjonen være avhengig av om disse gruppene er ionisert eller ikke, og retensjonen vil da avta med økende ionisering [57].

Normalfasekromatografi brukes for å separere upolare stoffer i ikke vandige løsninger [58]. Metoden bruker porøse partikler med polar overflate som stasjonærfase, mens mobilfasen er et organisk løsningsmiddel eller en blanding av flere organiske løsemidler. Den viktigste stasjonærfasen er silikagel, som er et adsorpsjonsmiddel. Silika adsorberer stoffer til overflaten, og er en delvis avvannet form av polymerisert kolloidal kiselsyre. Når silika kommer i kontakt med mobilfasen vil stoffer bli eksponert til aktive silanolgrupper (Si-OH), og gjør overflaten polar og svakt sur. Interaksjonen mellom silanolgruppene avgjør separasjonen av stoffene. Hydrogenbindingsinteraksjon er den sterkeste interaksjonen, så aminer og karboksylsyrer vil komme ut fra kolonnen sist, ettersom de gir sterk interaksjon med silika og vil adsorberes. Retensjonstiden er et samspill mellom egenskapene til stoffet, stasjonærfasen og mobilfasen [57].

Prosedyre

Utstyr:

Versapak C₁₈- kolonne

Kromatografpumpe

Begerglass

Dramsglass

VersaFlash stativ

5 ml plastsprøyte

Reagenser:

Metanol

Destillert vann

1. Kolonnen settes opp, pumpen slås på, og kolonnen kondisjoneres med 2 kolonnevolum med startelueringsmiddel.
2. Prøven løses i en liten mengde (1-2 ml) egnet løsemiddel, ofte MeOH eller MeOH-vannblandinger.
3. Prøveløsningen appliseres på kolonnen med plastsprøyte.
4. Den appliserte prøven elueres med en MeOH-vannblanding, med økende konsentrasjon av MeOH. Konsentrasjonsforholdet avhenger av polariteten på stoffene i prøveløsningen.
5. Styrken på mobilfasen økes ved gradvis minking av polariteten, f.eks. ved tilsetning av MeOH i passende mengde til MeOH-vannblandinger, og tilsettes til løsemiddelreservoaret, så alle stoffer blir eluert.
6. Fraksjonene samles opp i dramsglass (20-60 ml).
7. Kolonnen vaskes til slutt med en sterk eluent , MeOH, for å fjerne eventuelle rester av påsatt materiale.

4.3.6 Tynnsjiktchromatografi (TLC, thin-layer chromatography)

Prinsipp

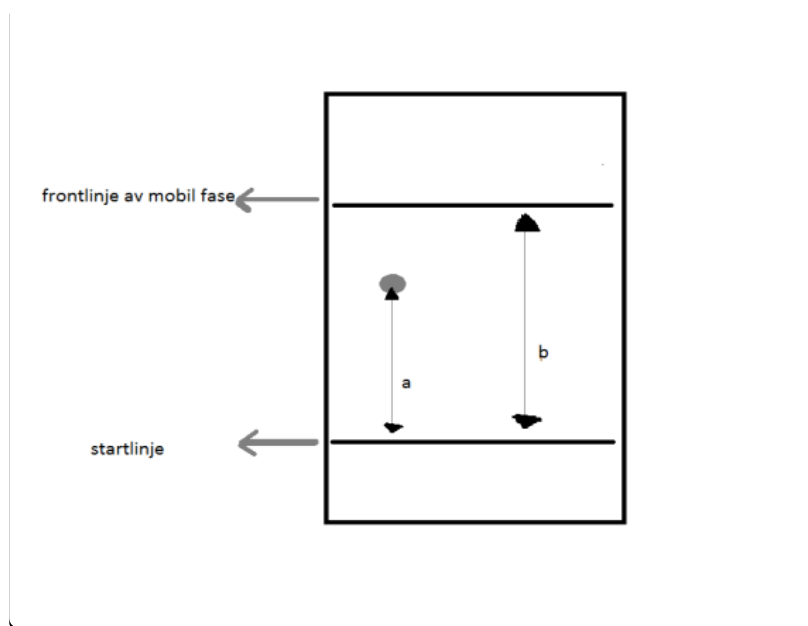
Tynnsjiktchromatografi er en væskechromatografisk separasjonsmetode som er en rask og enkel metode til å påvise stoffer og deres forurensninger. Den krever ikke ekstra apparatur for å få mobilfasen til å bevege seg gjennom stasjonærfasen [57]. Stasjonærfaser er vanligvis silika eller

kjemisk bundne silikabaserte faser. Ved valg av mobilfasen er det få begrensninger. Det kan brukes mobilfaser som vil interfere i en kolonnekromatografisk separasjon og det kan brukes mobilfaser med relativt høyt damptrykk, som vil være lette å fjerne etter endt separasjon [58]. Kommersielle plater som brukes ved TLC metoden har et underlag som kan være av glass, plast eller metall for sjiktet av stasjonærfasen. Platene kan deles i to kategorier etter hva slags belegg de har, silika eller silanisert silika. Plater med et sjikt av ren silika brukes i normalfasekromatografi, mens plater for omvendt-fase-kromatografi har et sjikt av silanisert silika [57].

Prinsippet baseres på adsorpsjonskromatografi, der stoffer med sterkest interaksjon med stasjonærfase får størst retensjon og lavest retensjonsfaktor (R_f -verdi). R_f -verdien kan defineres som

$$R_f = a/b$$

der a er avstanden fra startlinjen til midten av flekken og b er avstanden mellom startlinjen og frontlinjen av mobilfase (figur 4.2) [57].



Figur 4. 2: Parametere til bestemmelse av stoffers R_f -verdi

Prøvene løses i et flyktig løsemiddel og settes som flekker på platen parallelt ca. 1 cm fra den nederste platekanten. Etter at løsemidlet har fordampet settes platen ned i et lukket kar med mobilfase i bunnen av karet. Da vil mobilfasen vandre oppover platen ved hjelp av kapillærkrefter. Når mobilfasen har migrert et passende stykke opp mot toppen, tas platen ut,

væskefronten markeres, og mobilfasen fordamper. Stoffene vil da ha migrert oppover platen, styrt av fordelingen mellom mobilfase og stasjonærfase, og avhengig av om det er normalfase- eller omvendt-fase-kromatografi. Stoff med egenfarge vil være umiddelbart synlige, mens andre stoffer som absorberer UV-lys eller fluorescerer kan ses ved hjelp av UV-lampe [57]. Platen kan også bli sprayet med reagens, for eksempel Ceric spray, cerium(IV)sulfat, som vil reagere med stoffene og danne fargede forbindelser.

Prosedyre for preparativ TLC

Utstyr:

RP-18 TLC-plate
Objektglass
Glassinterfilter
Elueringskar med tett lokk
Pasteurpipette
UV-lampe med lyskasse
Vakuum

Reagenser:

Metanol
Destillert vann

1. Egnet mobilfase fylles i et elueringskar med tett lokk i ca. 10 min for å få en mett atmosfære. I et annet elueringskar kan man ha sterkere mobilfase, for eksempel 100% MeOH eller aceton.
2. Prøven løses i en liten mengde egnet løsemiddel.
3. En vannrett linje tegnes med blyant på TLC-platen, ca. 2 cm fra nedre kant, hvor prøven skal påføres.
4. Prøven appliseres på oppmerket linje med pasteurpipette, flere omganger oppå den samme merkede linjen, mellom hver påsetting bør løsemidlet fordampe.
5. Etter at alt løsemiddel har tørket bort settes TLC-platen i den sterke mobilfasen til den har migrert litt over påsettingsstedet, så alt påsatt stoff følger fronten og konsentreres til en konsentrert sone.
6. TLC-platen tas ut fra elueringskaret med sterk mobilfase, lufttørkes, og settes ned i elueringskaret med egnet mobilfase med prøvekannten nederst, slik at mobilfasen i karet er lavere enn høyden på de appliserte prøvene på platen. Lokket settes på.

7. TLC-platen tas ut fra karet når mobilfasen har migrert ca. 1-2 cm fra toppen, og frontlinjen markeres.
8. Mobilfasen dampes av ved lufttørking.
9. Platen settes under en UV-lampe og observeres med langbølget (366 nm) og kortbølget (254 nm) UV-stråling. Fargede stoffer vil være synlige uten UV-stråling.
10. De ønskede sonene skrapes fra TLC-platen med et objektglass, 1-2 ml løsemiddel tilsettes det avskrapte materiale og væsken suges av gjennom glassinterfilter. Dette gjentas om nødvendig. Løsemidlet fjernes på rotavapor.

Prosedyre for analytisk TLC

Utstyr:

18-RP TLC-plate
 Mikropipette (10µl)
 Elueringskar med tett lokk
 UV-lampe med lyskasse

Reagenser:

Metanol
 Destillert vann
 Aceton

1. Egnert mobilfase overføres til et elueringskar og lokket settes på i ca. 10 min for å få en mett atmosfære.
2. Det markeres på TLC-platen hvor prøvene skal påføres med ca. 1 cm avstand mellom hver prøve.
3. Prøvene, som er løst i egnert løsemiddel, appliseres på platen med mikropipette.
4. Etter at alt løsemidlet har tørket bort settes platen ned i elueringskaret med prøvekannten nederst, slik at mobilfasen i karet er lavere enn høyden på de appliserte prøvene på platen. Lokket settes på.
5. TLC-platen tas ut fra karet når mobilfasen har migrert ca. 1-2 cm fra toppen, og frontlinjen markeres.
6. Mobilfasen dampes av ved lufttørking.

7. Platen settes under en UV-lampe og observeres med langbølget (366 nm) og kortbølget (254 nm) UVstråling. Fargede stoffer vil være synlige uten UV-lys.
8. Flekkene markeres og kan eventuelt sprayeres med fargereagens, eks. Ceric-spraying, for påvisning av ikke-synlige stoffer.

4.3.7 Væskekromatografi (HPLC)

Prinsippet i væskekromatografi (high performance liquid chromatography; HPLC) er relativt likt som for Versaflash kolonnekromatografi og gel kromatografi, bare at her brukes det et mye høyere trykk ettersom kolonnens fysiske egenskaper tåler det. Kolonnene pleier å være 5-25 cm lange stål- eller plastikkør som er pakket med stasjonærfase for normalfasekromatografi, omvendt-fase-kromatografi eller eksklusjonskromatografi. Stasjonærfasen består av 3-4 μm silikapartikler med en hydrofil eller hydrofob overflate. Prøveløsningen injiseres via injektor, vanlig injeksjonsvolumer for analytisk HPLC er 5-100 μl . Deretter vil mobilfasen og prøveløsningen bli presset gjennom systemet ved hjelp av en pumpe, og vil gi et mottrykk på 30-300 bar. På kolonnen vil stoffmolekylene i prøveløsningen bli separert og retardert. De stoffene som kommer ut av kolonnen vil bli detektert av en detektor, for eksempel UV-detektor [57, 58].

Mobilfasen kan bestå av ett eller flere løsemidler, og det stilles forskjellige krav til væsker som skal benyttes til mobilfaser. Det er viktig at mobilfasen er transparent, så den gir ikke forstyrrende signal, og har en tilfredsstillende renhetsgrad. Samtidig må den ha en lav viskositet, så det blir så lavt trykk som mulig, og den bør ha lav toksisitet. Under analysen elueres mobilfasen på to måter, isokratisk eller gradient eluering. Ved isokratisk eluering vil mobilfasen ha en konstant sammensetning, mens i gradient eluering vil styrken på mobilfasen endres underveis, og den brukes når prøveløsningen inneholder stoffer med stor forskjell i retensjonstid. Stasjonærfasen i kolonnen i samspill med mobilfasen separerer stoffene i prøveløsningen i ulik grad avhengig av stoffenes affinitet til den stasjonære fasen [57, 58].

HPLC kan brukes analytisk eller preparativt. Analytisk HPLC kan bli brukt for å kontrollere renheten av en prøve eller for å finne en passende sammensetning av mobilfasen og optimalisere betingelsene for preparativ HPLC. Analytisk HPLC blir også brukt for å detektere bestemte stoffer ved ulike bølgelengder eller for kvantifisering [57, 58].

Preparativ HPLC

Prosedyre

Utstyr:

HPLC med UV detektor, fraksjonssamler og tilhørende utstyr

Kolonner

Vialer

Reagensrør

Sprøyte

Sprøytefilter

Reagenser:

Destillert vann

Metanol av HPLC kvalitet

Trifluoreddiksyre (TFA)

1. Eventuelle luftbobler som kan sitte igjen i pumpene fjernes ved å «purge» hver av pumpene i 1 min.
2. Kolonnen kondisjoneres i 20-30 minutter med tilpasset mobilfase (lik starteluent).
3. En metode tilpasses med hensyn til fraksjonssamleren, kolonnen, pumpen, mobilfasen, detektor osv.
4. Prøven løses i minst mulig volum (<1 ml).
5. Prøveløsningen filtreres med et sprøytefilter over til en vial for å fjerne partikler.
6. Den filtrerte prøveløsningen injiseres (<1ml) i injeksjonsloopen.
7. Injektorknappen vrir samtidig som man starter «single sample» i programmet.
8. Fraksjoner samles ved hjelp av fraksjonssamler i reagensrør, automatisk eller manuelt som ønsket.
9. Kolonnen vaskes til slutt i 30 min med 80 % MeOH-vann eller med løsemidler lik slutteluenten.

Analytisk HPLC

Prosedyre

Utstyr:

HPLC apparat tilkoblet DAD-detektor og tilhørende utstyr
Kolonner
Vialer
Sprøyte
Sprøytefilter

Reagenser:

Destillert vann
Metanol av HPLC kvalitet
Trifluoreddiksyre (TFA)

1. Eventuelle luftbobler som kan sitte igjen i pumpene fjernes ved å «purge» hver av pumpene i 1 min.
2. Kolonnen kondisjoneres i 20-30 minutter med tilpasset mobilfase (lik starteluent).
3. En metode tilpasses med hensyn til kolonnen, pumpen, mobilfasen, detektor osv.
4. Prøven løses i ca 1 ml løsemiddel, med en konsentrasjon mellom 0.2-2 mg/ml avhengig av hvor sammensatt prøven er.
5. Prøveløsningen filtreres med et sprøytefilter over til vial for å fjerne partikler.
6. Vialen plasseres i autosampleren.
7. Metoden startes ved å trykke «single run» i programmet.
8. Stoffene blir detektert av DAD-detektor.
9. Kolonnen vaskes til slutt i 30 min med 70 % MeOH-vann eller med løsemidler lik slutteluenten.

4.3.8 NMR-spektroskopi (Nuclear Magnetic Resonance)

Kjernemagnetisk resonansspektroskopi (NMR) er den mest anvendte metoden til strukturoppklaring av organiske forbindelser. Metoden er basert på interaksjoner mellom


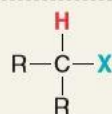

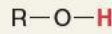



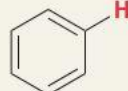

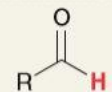
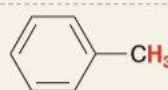
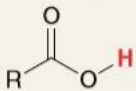
elektromagnetisk stråling og atomkjerner. En lang rekke kjerner kan studeres ved hjelp av denne metoden, som ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{15}N og ^{31}P . Disse kjernene og andre isotoper har kjernespin og oppfører seg som små magneter, og et magnetisk moment eksisterer da vinkelrett på spinnaksen til kjernen. Når kjernene blir utsatt for et ytre magnetfelt, kan de orientere seg på to måter i forhold til det ytre magnetfeltet, enten med feltet (α -spinn-tilstand) eller mot feltet (β -spinn-tilstand). Kjerner som orienterer seg ved α -spinn-tilstand har lavere energi enn de som orienterer seg ved β -spinn-tilstand. Hvis det blir tilført energi i form av et roterende elektromagnetisk felt til kjerner i α -spinn-tilstand, vil disse kjernene absorbere energien og hoppe opp fra et lavt energinivå til et høyere, til β -spinn-tilstanden. Kjernene er da i resonans med den elektromagnetiske strålingen, derfor kalles metoden for kjernemagnetisk resonans. Etter kort tid relaxerer disse kjernene tilbake til α -spinn-tilstand og avgir elektromagnetisk stråling, som detekteres av instrumentet og danner grunnlaget for NMR-spekteret. Det er viktig å bestråle med spesifikk frekvens, for ulike kjerner har ulike absorpsjonsfrekvenser i et gitt magnetfelt, ettersom bevegelsen og fordelingen til elektronene rundt kjerneprotonene er forskjellige [61].

Posisjonen i spekteret langs x-aksen, hvor en kjerne gir et signal kalles for kjemisk skift (δ), og angis i enheten parts per million (ppm). Når det er kjerner i ulike magnetiske miljøer vil de gi flere signaler med ulike δ -verdier. Et signal med høy frekvens ligger mer mot venstre på x-aksen, og sies å være mer «downfield». Mens et signal med lav frekvens ligger mer mot høyre på x-aksen, og sies å være mer «upfield». Downfield signal vil få en høy ppm-verdi og upfield en lav ppm-verdi. Jo høyere elektrontetthet det er rundt en kjerne, desto mindre vil det føle det ytre magnetfeltet. Elektrontettheten rundt en kjerne er avhengig av nærvær av grupper som kan tiltrekke elektroner fra kjernen, spesielt hvis de er bundet til samme karbon. Elektronene kan gi protonet en skjermingseffekt (shielding) mot det ytre magnetfeltet, eller mindre skjerming (deshielding). Protoner kan bli skiftet downfield når et nærliggende elektronegativt atom trekker på elektroner. Effekten avtar med økende avstand til elektronegative atomer. Altså jo mindre elektrontetthet, desto mindre blir skjermingen, og det blir høyere frekvens på NMR-signalet [61].

4.3.9 ^1H NMR spektre

Når et ^1H NMR spekter skal tolkes er det fire egenskaper som er viktig å se på [61]:

- Integreringskurve: arealet under hvert signal sier noe om størrelsen på signalet, og den er proporsjonal med antall hydrogenatomer i hvert signal. Høyden av integralkurven er proporsjonal med arealet under signalet.
- Signalsplitting (multiplisitet): Nabokjerner kan påvirke hverandre med sine magnetiske felt og danner spin-splitting. Dermed vil signalet fra et gitt proton splittes i to eller flere topper. Dette oppnås når to protoner har ulikt kjemisk skift og er separert med 3 eller færre σ -bindinger. Et signal splittes i $n+1$ topper, hvor n er antall nærliggende identiske naboprotoner. For kjerner med nærliggende resonansfrekvenser vil det bli dannet mer kompliserte splittings, ”høyere ordens spektra”. En enkelt topp kalles singlett, signal med to topper for dublett, tre topper for triplett og flere topper enn fire kalles vanligvis for multipllett. Signaler som splitter hverandre i flere topper sies å være koblet med hverandre. Signalsplitting kan bidra til å identifisere molekylstrukturen.
- Koblingskonstant: Hvis et signal er splittet i flere topper, kalles avstanden mellom de toppene for koblingskonstant, J , og måles i Hertz. Koblingskonstanten ligger i området 0-18 Hz, og er lik i kjerner som kobler med hverandre. I tillegg kan koblingskonstanten fortelle om hvilke protoner som ligger i nabostillinger, dermed kan kompliserte spektrene lettere identifiseres.
- Kjemisk skift verdi: Plasseringen av signalet, kalles for dens kjemiske skift, som er definert i forhold til frekvensen for absorpsjon av en intern standard, tetrametylsilan (TMS), og posisjonen for TMS-signalet defineres som 0 ppm. Verdien for kjemiske skift gir opplysninger om protonenes magnetiske miljø og kan vise hvilke kjemiske grupper det er i molekylet.

TYPE OF PROTON	CHEMICAL SHIFT (δ)	TYPE OF PROTON	CHEMICAL SHIFT (δ)
Methyl 	~ 0.9	Alkyl halide 	2-4
Methylene 	~ 1.2	Alcohol 	2-5
Methine 	~ 1.7	Vinylic 	4.5-6.5
Allylic 	~ 2	Aryl 	6.5-8
Alkynyl 	~ 2.5	Aldehyde 	~ 10
Aromatic methyl 	~ 2.5	Carboxylic acid 	~ 12

Figur 4. 3: Typisk $^1\text{H-NMR}$ kjemisk skift verdier [61]

^{13}C NMR spektra kan være lettere å tolke enn $^1\text{H-NMR}$, hvis signalsplitting på grunn av $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ koblinger blir eliminert. Da vil spekteret bestå av kun et signal for hvert C-atom i et vanlig organisk molekyl, og signalene vil ligge i δ -skalaen fra 0 til ca. 220 ppm. Den kjemiske skiftverdien for ^{13}C NMR vil også være avhengig av elektrontettheten rundt kjernen.

APT (Attached Proton Test) er en ^{13}C NMR metode som blir brukt for å bestemme CH multiplisiteten for karbonatomer. Det vil si kategorisere karboner etter antall hydrogenatomer bundet til dem. Signaler for CH og CH_3 vil peke nedover langs y-aksen og gi et negativt signal, mens CH_2 - og kvaternært karbon (uten hydrogen bundet til seg) gir positivt signal og peker oppover.

NMR-spekter kan foreligge som endimensjonalt og todimensjonalt spekter. $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ og APT er eksempler på endimensjonal NMR-spektroskopi, mens COSY (Correlation Spectroscopy), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), NOESY (Nuclear Overhauser Effect spectroscopy) og HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), er eksempler på todimensjonale spektra.

COSY er et proton-proton-korrelasjons spekter som gir informasjon om hvilke protoner som kobler med hverandre uten at det trengs å identifisere koblingskonstanter. Signalene vil vises langs den horisontale og vertikale aksene, som punkter i et diagonalt mønster. To protoner som

er koblet til hverandre vil gi et signal som står utenfor diagonallinjen, vertikalt til det ene koblende signalet og horisontalt til det andre.

HMBC er en metode hvor det observeres heteronukleær interaksjon (^1H - ^{13}C) over lengre distanser, 3-4 bindingslengder, mens ved NOESY metoden observeres koblinger gjennom rommet i stedet for gjennom bindinger. HSQC ligner på HMBC, men viser bare bindinger mellom protoner som og de karboner de er bundet til, der proton-spektret vises på den ene aksene og karbon-spektret på den andre aksene [61].

Prosedyre

Utstyr:

NMR-spektrometer

NMR-rør med lokk

Pasteurpipette

Linjal

Reagenser:

TMS (intern standard)

Deutererte løsemidler (CD_3OD , CDCl_3 ,

DMSO-d_6)

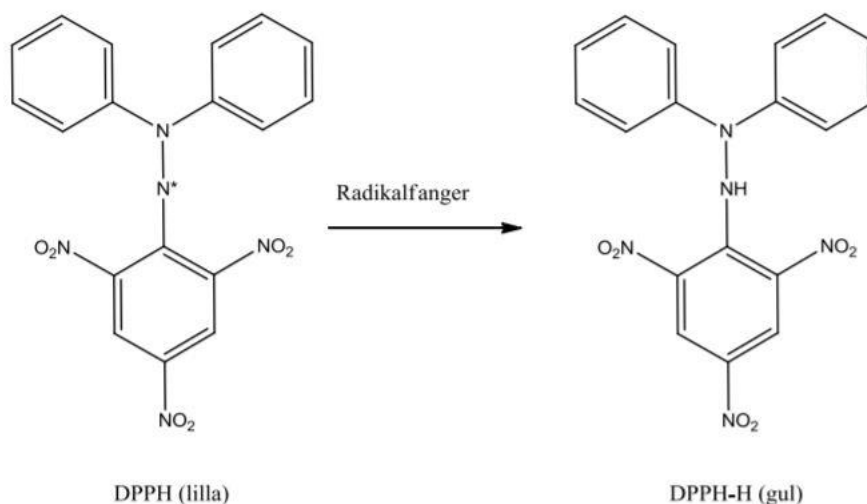
1. ca. 1 ml deuterert løsemiddel pipetteres over til en liten mengde prøve (ca 1-50 mg).
2. Oppløst prøve overføres til et NMR-rør, ca 4 cm opp i røret, og lokket settes på.
3. Prøven analyseres i NMR-spektrometer.

4.4 Metoder for måling av radikal scavenger, og enzymhemmingeffekter

4.4.1 DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl)

Det er en økende interesse for å finne antioksidanter, spesielt de som kan hindre antatte skadelige frie radikaler i menneskekroppen. En vanlig brukt metode er basert på det stabile frie radikalet 1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH. Det uparete elektronet i DPPH kan delokaliseres, og fører til at molekylet ikke dimeriseres. På grunn av delokaliseringen av det uparede elektronet gir DPPH en dyp fiolett farge i løsning og viser et sterkt absorpsjonsbånd ved 517 nm. Når det blir tilsatt en radikalscavenger som vil donere et hydrogenatom eller elektron til DPPH-løsningen, vil DPPH radikalet reduseres, og løsningen vil da skifte farge fra fiolett til gul. Det blir dannet 1,1-difenyl-2-picrylhydrazin (DPPH-H) som har lav absorpsjon ved 517

nm, og absorbansnedgangen har en sammenheng med mengden og aktiviteten av radikalscavenger (se figur 4.4). Quercetin er en god scavenger som er stabil og rimelig, derfor blir den ofte brukt som positiv kontroll [62, 63].



Figur 4. 4: Omdannelse av DPPH til DPPH-H[62]

Ved hjelp av følgende formel kan prosent radikalscavenging beregnes [63]:

$$100 \times ((A_0 \times 2.95/3.00) - A_t) / ((A_0 \times 2.95/3.00) - A_p)$$

A_0 : startabsorbans (absorbans før tilsetning av testløsning/positiv kontroll)

A_t : absorbans med testløsning/positiv kontroll etter 5 minutter reaksjonstid

A_p : absorbans etter 5 minutter reaksjonstid hvis alt DPPH er blitt scavengert, settes ofte lik 0 (men kan korrigeres for i svært nøyaktig arbeid).

(Denne formelen er basert på at 2.95 ml DPPH-løsning tilsettes 0.05 ml testløsning. Når testløsning har egenabsorbans ved 517 nm, må denne absorbansen korrigeres for.)

Aktiviteten oftest angis som IC_{50} , det vil si konsentrasjonen som gir 50% scavenging [63].

Prosedyre:

Utstyr:

UV-spektrofotometer
Kyvetter
Plastspatler
Magnet
Magnetrører
Pipetter og multipipette
Erlenmeyerkolbe

Reagenser:

Metanol
DPPH
Dimetylsulfoksid (DMSO)
Quercetin
Testsubstans

1. Ca 4 mg DPPH-pulver løses i 100 ml MeOH (ca. 0,04 mg/ml) i en erlenmeyerkolbe og blandes ved hjelp av en magnet og magnetrører.
2. Absorbansverdien av løsningen måles. Den bør ligge ved 1.00 ± 0.05 AU ved 517 nm.
3. Prøvene løses i DMSO eller MeOH til ønsket konsentrasjon.
4. Quercetin, positiv kontroll, løses i DMSO eller MeOH til ønsket konsentrasjon.
5. Blindprøven består av 3 ml MeOH i en kvarts- eller glasskyvette, og brukes for å nullstille spektrofotometeret. Blindprøven skal stå i blindprøvebeholderen under hele prosedyren.
6. 2.95 ml DPPH løsning pipetteres i 3 kvarts- eller glasskyvetter og startabsorbansen A_0 ved 517 nm måles.
7. Ved $t=0$ tilsettes 50 μ l av prøveløsningen med en multipipette til hver av parallellene, og hver av parallellene omrøres med plastspatel.
8. Absorbansmåling starter 30 sekunder etter tilsetning av prøveløsningen, og absorbansen måles i 5 minutter. Sluttabsorbansen er A_p .
9. Innholdet i kyvettene kastes etter hver måling. Kyvettene skylles godt med MeOH.

4.4.2 15- Lipoksygenasehemming (15-LO-hemming)

Lipoksygenaser (LO) er enzymer som er involvert i arakidonsyremetabolismen. LO katalyserer peroksidering av flerumettede fettsyrer. 5-LO, 12-LO og 15-LO er viktige lipoksygenaser. Tallet angir hvilken posisjon i arakidonsyre som peroksideres. 15-LO enzymet inngår i LDL-oksidering (low density lipoprotein), som anses å spille en viktig rolle for utvikling av

aterosklerose, og er i tillegg antatt å være involvert i mange andre sykdommer (diabetes, nyresykdommer, osv.) [64]. Som tidligere nevnt (avsnitt 3.3) er 15-LO også satt i forbindelse med utvikling av Alzheimers sykdom. 15-LO hemming metoden er basert på den 15-LO katalyserte reaksjonen mellom oksygen og en flerumettet fettsyre med en 1,4-dien-type struktur. Arakidonsyre og linolsyre er egnet som substrat ettersom de har en 1,4-dien-type struktur, men linolsyre er mest brukt. Linolsyre er billigere og mer stabil enn arakidonsyre, selv om de gir lik enzymhemningsverdi [65].

15-LO kan både finnes i dyr og planter, men den kan lett utvinnes fra soyabønner. Enzymet fra dyr er mindre stabilt og mer sensitivt overfor hemming enn det fra planter. 15-LO fra soya har lignende struktur og høy korrelasjon i hemmingsaktivitet med 15-LO fra dyr, derfor brukes den oftest i bestemmelse av 15-LO-hemming [64, 65].

Absorbans ved 234 nm øker når det blir dannet et konjugert dobbeltbindingssystem ved oksidasjon på flerumettede forbindelser, dette brukes som et mål på grad av peroksidering, dvs. mengde reaksjonsproduktet som blir dannet. Når det blir tilsatt en prøvesubstans som hemmer 15-LO vil absorbansøkningen reduseres. Ved å sammenligne absorbansøkningen i nærvær og fravær av en hemmer bestemmes da hemmingsgraden av enzymet [64].

Ved hjelp av denne formelen kan enzymhemmingsgraden beregnes [64]:

$$\% \text{ hemming} = 100 \times [(dA_1/dt) - (dA_2/dt)] / (dA_1/dt)$$

dA_1/dt : verdi for absorbansøkning ved 234 nm per tidsenhet uten testsubstans tilsatt.

dA_2/dt : verdi for absorbansøkning ved 234 nm per tidsenhet med testsubstans tilsatt.

Reagenser:

A: 0.2 M Boratbuffer med pH 9.00 (av borsyre og natriumhydroksid)

B: Substratløsning: 50 μ l linolsyre og 150 μ l etanol blandes tilsetter 50 ml av reagens A □ 10 ml av blandingen fortynnes med 150 ml av reagens A (bør lages kort tid før bruk)

C: Enzymløsning: 15-Lipoksygenase (15-LO) løses i reagens A til en konsentrasjon på ca. 10 000 enheter/ml (lages rett før bruk og oppbevares på is under hele forsøket)

D: Testløsning: Testsubstans løses i DMSO til ønsket konsentrasjon.

Quercetin løst i DMSO (positiv kontroll)

DMSO

Is

Utstyr:

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Plastspatel

Pipetter/multipipette

Isbeholder

Prosedyre

1. Spektrofotometer nullstilles ved 234 nm med en blindprøve ved å tilsette i en kvartskyvette:
 - 0.95 ml reagens A
 - 2.00 ml reagens B
 - 0.05 ml DMSO
2. Blandingen omrøres godt med plastspatel. Kyvetten settes i blindprøveholderen og står der under hele forsøket.
3. Blank prøve (uten hemmer) blandes i kvartskyvette (3 paralleller):
 - 0.90 ml reagens A
 - 2.00 ml reagens B
 - 0.05 ml DMSO
4. Ved tid=0 tilsettes 0.05 ml reagens C (enzymløsningen) med en multipipette og blandningene omrøres godt med en plastspatel.

5. Absorbans måles ved 234 nm fra 30 til 90 sekunder etter tilsetningen av reagens C. Økningen i absorbans bør være mellom 0,3-0,5 AU/min. For å kontrollere stabiliteten av enzymaktiviteten, bør dette punktet gjentas etter hver 3.måleserie med testløsninger.
6. Testløsning (med hemmer) blandes i kvartskyvette (3 paralleller):
 - 0.90 ml reagens A
 - 2.00 ml reagens B
 - 0.05 ml reagens D
7. Ved tid=0 tilsetter reagens C (enzymet) med en multipipette og blandingen omrøres godt med plastspatel. Absorbansøkning måles ved 234 nm fra 30 til 90 sekunder etter tilsetningen av C.
8. Quercetin brukes som positiv kontroll og testes som under punkt 7, men D byttes ut med en DMSO-løsning av quercetin
9. Innholdet i kvartskyvettene kastes etter hver måling, og kyvettene skylles med reagens A.

4.4.3 Xanthin oksidase hemming (XO-hemming)

Enzymformene xantin oksidase (XO) og xantin dehydrogenase (XDH) kan gå over i hverandre, og er kjent som xantin oksidoreduktase (XOR). XDH forekommer mest i cellene, men blir syntetisert og omdannet til XO ved oksidasjon eller proteolyse. XOR har som hovedrolle å omdanne hypoxantin til xantin og xantin til urinsyre. Ved bruk av oksygen som substrat kan både XO og XDH katalysere dannelsen av urinsyre. Når mengden urinsyre økes i blodet kan det føre til hyperurikemi, og hvis urinsyre felles ut i vev kan det forårsake urinsyregikt. Når XDH binder seg til flavinadenin dinukleotid (FAD) reaksjonssete på NAD^+ kan den redusere NAD^+ . XO har evne til å produsere superoksid anionradikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) under degradering av hypoxantin og xantin, og superoksid kan reagere med NO og danne peroksynitritt. Peroksynitritt kan føre til oksidative skader på proteiner, lipider og DNA. $\text{O}_2^{\bullet-}$ er involvert i forskjellige patologiske tilstander som inflammatoriske sykdommer, vevs- og karskader, hepatitt, ulike former av iskemi og aldring [66, 67].

Mot forhøyet urinsyrekonsentrasjon i blodet kan legemidlet allopurinol brukes. Allopurinol er en aktiv XO hemmer, og den kan lett bli oksidert av XO til den aktive metabolitten oxypurinol, som er også en hemmer av XO. Legemidlet har vist positive resultater på reduksjon av urinsyre konsentrasjon, både i dyreeksperimenter og i kliniske studier. Men på grunn av bivirkningsprofilen er det å utvikle nye og effektive legemidler med mindre bivirkninger [67].

Ved hjelp av spektrofotometri kan aktiviteten av xantin oksidase måles med hypoxantin som substrat. XO vil oksidere xantin eller hypoxantin til urinsyre, og dannelsen av urinsyre kan observeres ved bølgelengde 290 nm [66].

XO-hemmingsaktiviteten kan beregnes ved hjelp av denne formelen [66]:

$$\% \text{ hemming} = 100 \times [(dA_1/d_t) - (dA_2/d_t)] / (dA_1/d_t)$$

dA_1/d_t : verdi for absorbansøkning ved 290 nm per tidsenhet uten testsubstans tilsatt.

dA_2/d_t : verdi for absorbansøkning ved 290 nm per tidsenhet med testsubstans tilsatt.

Reagenser

A: 0.05 M Natriumkaliumfosfatbuffer, med pH= 7.5 (av kaliumdihydrogenfosfat og natriumhydrogenfosfat)

B: Substratløsning – 10 mg hypoxantin løses i 500 ml destillert vann

C: Enzymløsning – XO løses i reagens A til en konsentrasjon på ca. 1.8 enheter/ml (lages rett før bruk og oppbevares på isen under hele forsøket)

Testløsning: Testsubstans løses i DMSO til ønsket konsentrasjon.

Quercetin (positiv kontroll)

DMSO

Destillert vann

Is

Utstyr

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Pipetter/multipipette

Plastspatel

Isbeholder

Prosedyre

1. Testsubstans og quercetin løses i DMSO til ønsket konsentrasjon
2. UV spektrofotometeret nullstilles ved 290 nm med en blindprøve ved å tilsette i en kvartskyvette:
 - 1.85 ml reagens A
 - 0.1 ml reagens C
 - 1.0 ml destillert vann
 - 0.05 ml DMSO
3. Blandingen omrøres godt med plastspatel. Kyvetten settes i blindprøveholderen og står der under hele forsøket.
4. Blank prøve (uten hemmer) blandes i kvartskyvette (3 paralleller):
 - 1.85 ml reagens A
 - 0.1 ml reagens C
 - 0.05 ml DMSO
5. Ved tid=0 tilsettes 1.00 ml reagens B med en multipipette og blandingene omrøres med en plastspatel.
6. Absorbans måles ved 290 nm hvert 30. sekunder i 5 minutter, og absorbansøkningen måles fra 30 sekunder etter tilsetningen av reagens B. Økningen i absorbans bør være mellom 0,03-0,05 AU/min. For å kontrollere stabiliteten av enzymaktiviteten, bør dette punktet gjentas etter hver 3.måleserie med testløsninger.
7. Testløsning (med hemmer) blandes i kvartskyvette (3 paralleller):

- 1.85 ml reagens A
 - 0.1 ml reagens C
 - 0.05 ml prøveløsning
8. 1.00 ml reagens B tilsettes med en multipipette og blandingene omrøres med en plastspatel.
 9. Absorbans måles ved 290 nm hvert 30. sekunder i 5 minutter, og absorbansøkningen måles fra 30 sekunder etter tilsetningen av reagens B.
 10. Quercetin brukes som positiv kontroll og testes som under punkt 7, men 0.05 ml prøveløsningen byttes ut med quercetinløsning.
 11. Innholdet i kvartskyvettene kastes etter hver måling, og kvettene skylles med destillert vann.

4.4.4 Hemming av acetylkolinesterase (AChE) og butyrylkolinesterase (BuChE)

Neurodegenerative forstyrrelser, som Alzheimers sykdom (AD), er et resultat av flere patofysiologiske reaksjonsveier som bidrar til den neurodegenerative skaden. Av denne grunnen er det mye forskning for å finne forbindelser som er i stand til å samhandle med hjernens biotargets som kolinesteraser (AChE og BuChE) [68]. AChE sin fysiologiske oppgave er å hydrolysere acetylkolin, og ved Alzheimers sykdom er det redusert nivå av acetylkolin [69]. Hemming av AChE er et mål innen legemiddeldesign. Ifølge Commission de la Transparence de la Haute Autorité de la Santé, er det bare fire legemidler som i 2014 har markedsføringstillatelse (AMM) i symptomatisk behandling av AD. Tre av dem er AChE-inhibitorer, og to av dem er fra naturlige kilder: galantamin, et naturstoff og rivastigmin en syntetisk analog av naturstoffet fysostigmin [70]

Prinsippet går ut på å måle mengden thiokolin produksjon. Acetylkolin blir hydrolysert av AChE til eddiksyre og thiokolin (figur 4.5). Etter hydrolyseringen vil thiokolin reagere med dithiobisnitrobenzoesyre (DTNB) og det produseres anionet 5-thio-2-nitrobenzoesyre. Anionet har en gulfarge med maksabsorbans ved 412 nm [69].

Testløsning: Testsubstans løses i DMSO til ønsket konsentrasjon.

Tacrin eller galantamine løst i DMSO (positiv kontroll)

DMSO

Destillert vann

Is

Utstyr

Pipetter/multipipette

Isbeholder

96-brønn plate

Mikroplater

Mikroplate spektrofotometer

Prosedyre

1. 227 μL reagens B tilsettes i hver brønn med multipipette.
2. 2.7 μL DMSO tilsettes i blankprøvebrønnene (3 paralleller) med pipette
3. 2.7 μL prøveløsning/positiv kontroll tilsettes på tilsvarende måte som for punkt 3 med 3 paralleller for hver løsning.
4. Egenabsorbansen måles i mikroplate spektrofotometeret ved 415 nm.
5. 20 μL av reagens D tilsettes i hver brønn med multipipette.
6. 20 μL av reagens C tilsettes i hver brønn med multipipette.
7. Prøvene inkuberes ved romtemperatur i 6 minutter.
8. Sluttabsorbansen måles i mikroplate spektrofotometeret ved 415 nm.

BuChE-hemmings prosedyre:

Reagenser:

A: 0.1 M fosfatbuffer, pH 7.4 (av $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (natriumhydrogenfosfat) + $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (natriumdihydrogenfosfat))

B: 0.18 mM Ellman's reagens (DTNB) – 35.3 mg 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) i 500 ml reagens A (kan oppbevares opptil 4 uker ved 4 °C)

C: 4.42 mM butyrylthiocholine iodide (BTCI) – 12.8 mg BTCI i 10 ml destillert vann (kan oppbevares opptil 1 uke ved 4 °C)

D: 1 UI/ml butyrylcholinesterase (BuChE) – fortynnes i reagens A til 1 UI/ml (lages rett før bruk og oppbevares på isen under hele forsøket)

Testløsning: Testsubstans løses i DMSO til ønsket konsentrasjon.

Tacrin eller galantamine løst i DMSO (positiv kontroll)

DMSO

Destillert vann

Is

Utstyr

Pipetter/multipipette

Isbeholder

96-brønn plate

Mikroplate spektrofotometer

Prosedyre

1. 227 μL reagens B tilsettes i hver brønn med multipipette.
2. 2,7 μL DMSO tilsettes i blankprøvebrønnene (3 paralleller) med pipette
3. 2,7 μL prøveløsning/positiv kontroll tilsettes på tilsvarende måte som for punkt 3 med 3 paralleller for hver løsning.
4. Egenabsorbansen måles i mikroplate spektrofotometeret ved 415 nm.
5. 20 μL av reagens D tilsettes i hver brønn med multipipette.
6. 20 μL av reagens C tilsettes i hver brønn med multipipette.
7. Prøvene inkuberes ved romtemperatur i 6 minutter.
8. Sluttabsorbansen måles i mikroplate spektrofotometeret ved 415 nm.

5 Eksperimentell del

5.1 Plantemateriale

Råmaterialet var tørkede blader av *S.scardica* i pose, «Griechischer Bergtee» (charge nummer 121402843) fra Greuther Teeladen, 91487 Vestenbergsgreuth, Tyskland, som veiet 100 g hver pose, i alt 4 poser. En prøve av plantematerialet er deponert ved Farmasøytisk institutt, seksjon farmakognosi, Universitetet i Oslo.



Figur 5. 1: "Griechischer Bergtee"-tepose

5.2 Ekstraksjon av *Sideritis scardica*

Plantematerialet ble oppmalt på kommersiell blender RAW Pro X1500 og siktet på 1 mm sikt. Vekt etter sikting: 393 g.

Det ble deretter utført ekstraksjon med 80% EtOH som ekstraksjonsmiddel på ASE instrumentet. Først ble hele det siktete plantematerialet (393 g) blandet med DE (kiselgur) i 4:1 volumforhold før ekstraksjonen (1600 ml plantemateriale med 400 ml DE). Det ble brukt 4 celler med 3 oppsamlingsflasker per celle (ca. 250 ml per flaske) ved hver kjøring. Hver ekstraksjon tok ca. 20 minutter, og det ble kjørt tre ekstraksjoner per celle.

Etter ekstraksjonene ble løsemidlet dampet vekk på rotavapor og oljepumpe i en forhåndsveid rundkolbe.

5.3 Ekstraksjon med diklormetan, DCM

EtOH-råekstraktet ble tilsatt 400 ml destillert vann og 200 ml DCM, blandingen ble rystet godt og overført til skilletrakt. DCM-fasen ble tappet ut og filtrert med faseparasjonsfilter over i en kolbe. I vannfasen igjen ble det tilsatt 200 ml DCM til, som etter rysting ble tappet ut. Prosessen ble gjentatt en gang til, til sammen ble det ekstrahert 3 ganger med 200 ml DCM hver gang. Etter ekstraksjonene ble DCM-fasen overført til forhåndsveid rundkolbe, dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

5.4 Ekstraksjon med etylacetat, EtOAc

I vannfasen som var igjen ble det tilsatt 200 ml EtOAc og ekstrahert i skilletrakt ved å snu skilletrakten opp ned flere ganger. EtOAc-fasen ble tappet ut og filtrert med faseparasjonsfilter over i en kolbe. I vannfasen ble det tilsatt 200 ml EtOAc til, som ble tappet ut. Prosessen ble gjentatt en gang til, til sammen ble det ekstrahert 3 ganger med 200 ml EtOAc. I vannfasen utfelte det seg et bunnfall, dette ble skilt fra vannfasen og dampet inn til tørrhet. EtOAc - fasen ble overført til forhåndsveid rundkolbe, dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

5.5 Ekstraksjon med butanol, BuOH

I vannfasen som var igjen ble det tilsatt 200 ml BuOH og ekstrahert i skilletrakt. Deretter ble BuOH-fasen tappet ut og filtrert med faseparasjonsfilter over i en kolbe. Prosessen ble gjentatt to ganger, til sammen ble det ekstrahert 3 ganger med 200 ml BuOH. Etter ekstraksjonene ble BuOH-fasen overført til forhåndsveid rundkolbe, dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. Den resterende vannfasen ble overført til forhåndsveid rundkolbe, dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

5.6 Analysering

5.6.1 NMR

Det ble opptatt NMR spektra av råekstrakt og samtlige faser etter fordeling av råekstraktet mellom forskjellige løsemidler. NMR-spektrene er gjengitt i vedleggsdelen (NMR-spekter 1-6).

Tabell 5. 1: NMR-analyser av de fem fasene og råekstraktet

Prøve	Løsemiddel for NMR	NMR-spektra opptatt
Råekstrakt	CD ₃ OD	¹ H, ¹³ C
DCM	CDCl ₃	¹ H
EtOAc	CD ₃ OD	¹ H
EtOAc bf	CD ₃ OD	¹ H
BuOH	CD ₃ OD	¹ H
Vann	D ₂ O	¹ H

5.6.2 HPLC

Alle de fem fasene og EtOH-råekstraktet ble undersøkt med analytisk HPLC. En liten mengde ble løst i MeOH-vann (1:1) til en konsentrasjon på 200 µg/ml og filtrert med sprøytefilter. Chromolith omvendt-fase C18-kolonne (100x 4.6 mm) ble benyttet, og deteksjon ble foretatt ved 230 nm, 280 nm og 320 nm.

Mobilfasen bestod av en gradient av 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) i vann (A) og metanol (B). (se tabell 5.2).

Tabell 5. 2: Gradientsystem for analytisk HPLC av de råekstrakt og væske-væske ekstraherte faser

Tid (min)	% 0.1% TFA-vann (A)	% MeOH (B)	Flowhastighet (ml/min)
0	98	2	3
2	98	2	3
30	10	90	3
35	10	90	3
36	98	2	3
41	98	2	3

5.6.3 Måling av radikal scavenger, og enzymhemmingseffekter

5.6.2.1 DPPH-scavenging

Måling av DPPH-scavenging ble utført på alle de fem fasene og EtOH-råekstraktet. De ble testet ved forskjellige konsentrasjoner: 333,3 µg/ml, 166,7 µg/ml, 83,3 µg/ml, 41,7 µg/ml, 20,8 µg/ml og 10,4 µg/ml i DMSO løsning, etter nødvendighet. Quercetin ble anvendt som positiv kontroll.

5.6.2.2 Lipoksygenasehemming

Det ble utført 15-LO-hemmings test EtOH-råekstraktet og de andre fem fasene. De ble testet ved forskjellige konsentrasjoner: 333,3 µg/ml, 166,7 µg/ml, 83,3 µg/ml, 41,7 µg/ml, 20,8 µg/ml og 10,4 µg/ml i DMSO løsning, og testing ble foretatt ved synkende konsentrasjoner inntil aktiviteten var forsvunnet. Quercetin ble anvendt som positiv kontroll.

5.6.2.3 Xanthin oksidase hemming

Det ble utført XO-hemmings test på alle de fem fasene og EtOH-råekstraktet. De ble testet som over ved samme konsentrasjoner (avsnitt 5.6.2.2) og quercetin som positiv kontroll.

5.6.2.4 Acetylkolinesterase-hemming

Det ble utført AChE-hemmings test på alle de fem fasene og EtOH-råekstraktet. De ble testet ved forskjellige konsentrasjoner: 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml og 6,25 µg/ml i DMSO løsning. Tacrin ble brukt som positiv kontroll.

5.6.2.5 Butyrylkolinesterase-hemming

Det ble utført BuChE-hemmings test på alle de fem fasene og EtOH-råekstraktet, ved samme konsentrasjoner som AChE-hemmings test. Tacrin ble også her brukt som positiv kontroll.

5.7 Fraksjonering av BuOH-fasen

5.7.1 Sephadex LH-20 kolonne separering

Sephadex LH-20, 4.5 X 30 cm kolonne ble benyttet for fraksjonering av 10 g av *S.scardica* BuOH fasen. Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (1:4) som også var starteluent. BuOH-fasen ble løst i 40 ml MeOH-vann (1:1), alt ble løst opp og applisert på kolonnen. Mobilfasen var i blandinger av MeOH og vann. Gradienteluering ble brukt med en økende mengde MeOH, og til sist ble det brukt en blanding av aceton-vann (tabellen 5.3). Til sammen ble det samlet opp totalt 20 kolonnefraksjoner.

Tabell 5. 3: Mobilfaser benyttet ved Sephadex LH-20 separasjon av BuOH-fasen

Mobilfase	Kolonnefraksjoner	Mengde (ml)
MeOH-vann (1:4)	1-5	1140
MeOH-vann (3:7)	6-7	400
MeOH-vann (2:3)	8-9	520
MeOH-vann (1:1)	10-11	175
MeOH-vann (7:3)	12-14	450
MeOH	15-17	375
Aceton-vann (7:3)	18-20	450

5.7.2 Analytisk TLC

De forskjellige kolonnefraksjonene ble applisert på en RP18-TLC-plate (silikagel 60 RP-18) med ulike mobilfaser av en vandig MeOH-vann blanding (tabell 5.4).

Tabell 5. 4: Mobilfase benyttet ved TLC analyse

Mobilfase	Kolonnefraksjoner
MeOH-vann (2:3)	1-7
MeOH-vann (3:2)	7-11
MeOH-vann (7:3)	11-19

Etter at TLC-platene var tatt ut fra elueringskarene, betraktet i kortbølget og langbølget UV-stråling og sprayet med ceric-reagens ble de lagt i varmeskapet ved 105 °C i ca 15 minutter. På bakgrunnen av TLC-resultatene ble kolonnefraksjonene slått sammen og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe (5.5).

Tabell 5. 5: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av BuOH-fasen

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
BuOH S1	1
BuOH S2	2
BuOH S3	3-5
BuOH S4	6-8
BuOH S5	9-11
BuOH S6	12-13
BuOH S7	14-20

5.7.3 Analysering

5.7.3.1 NMR

Det ble opptatt ¹H NMR spektra av fraksjonene BuOH S1-S7 i CD₃OD. NMR-spekteret for fraksjonen BuOH S5 er gjengitt i vedleggsdelen (NMR-spekter 7).

5.7.3.2 HPLC

Fraksjonene ble undersøkt med analytisk HPLC. Alle de syv fraksjoner (BuOH S1-S7) ble løst i MeOH-vann (1:1) til en konsentrasjon på 200 µg/ml, og metoden ble utført på samme måte som i avsnitt HPLC 5.6.2. Mobilfasen bestod av en gradient av 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) i vann (A) og metanol (B) (se tabell 5.2).

Etter NMR- og HPLC-analyse ble fraksjon S5 valgt ut til videre arbeid.

5.8 Separasjon av fraksjon BuOH S5

5.8.1 Versaflash kolonneseparasjon

Fraksjon BuOH S5 (1240 mg) ble løst opp i ca 6 ml MeOH-vann (1:4). Versapak kolonne (150 x 40 mm) pakket med C18-materiale ble benyttet for fraksjonering. Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (1:9) som også var starteluent. BuOH S5-fraksjonen ble deretter applisert på kolonnen. Mobilfasen var MeOH og vann i ulike blandingsforhold. Gradienteluering ble brukt med en økende mengde MeOH (tabellen 5.6). Til sammen ble det samlet opp totalt 27 kolonnefraksjoner.

Tabell 5. 6: Mobilfaser benyttet ved Versaflash C18 separasjon av fraksjon BuOH S5

Mobilfase	Kolonnefraksjoner	Mengde (ml)
MeOH-vann (1:9)	1-3	60
MeOH-vann (1:4)	4-5	60
MeOH-vann (2:3)	6-9	150
MeOH-vann (3:2)	10-15	180
MeOH-vann (7:3)	16-21	180
MeOH	22-27	180

5.8.2 TLC

De forskjellige kolonnefraksjonene ble applisert på en RP18 TLC-plate (silikagel 60 RP-18) med en mobilfase av MeOH-vann (1:1). På bakgrunnen av TLC-resultatet ble kolonnefraksjonene slått sammen og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe (tabell 5.7).

Tabell 5. 7: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av BuOH S5

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
BuOH S5V1	1-9
BuOH S5V2	10
BuOH S5V3	11
BuOH S5V4	12-13
BuOH S5V5	14
BuOH S5V6	15
BuOH S5V7	16
BuOH S5V8	17-18
BuOH S5V9	19-21
BuOH S5V10	22-27

5.8.3 Analysering

5.8.3.1 NMR

Det ble opptatt ^1H NMR-spektra av fraksjonene BuOH S5V2-S5V10 i CD_3OD . De mest interessante fraksjoner ble også analysert med ^{13}C -NMR, COSY, HMBC, HSQC. NMR-spektrene av BuOH S5V1 og BuOH S5V4 er i gjengitt i vedleggsdelen (spektrum 8 og 9).

Tabell 5. 8: NMR-analyse av BuOH S5 fraksjoner

Prøve	NMR
BuOH S5V2	^1H
BuOH S5V3	^1H
BuOH S5V4	^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC
BuOH S5V5	^1H
BuOH S5V6	^1H , ^{13}C , HSQC
BuOH S5V7	^1H , ^{13}C
BuOH S5V8	^1H , ^{13}C
BuOH S5V9	^1H
BuOH S5V10	^1H

5.8.3.2 HPLC

Fraksjonene S5V1, S5V2, S5V3, S5V4, S5V7, S5V8 og S5V9 ble undersøkt ved analytisk HPLC. Alle de syv fraksjoner ble løst i MeOH-vann (1:1) til en konsentrasjon på 200 $\mu\text{g/ml}$. Prøveløsningene ble filtrert med et sprøytefilter for å fjerne eventuelle partikler. Chromolith

omvendt-fase C18-kolonne (100x 4.6 mm) kolonne, ble benyttet og deteksjonene ble foretatt ved 230 nm, 280 nm og 320.

Mobilfasen bestod av en gradient av 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) i vann (A) og metanol (B). (se tabell 5.9).

Tabell 5. 9: Gradientsystem for analytisk HPLC av fraksjonene S5V1, S5V2, S5V3, S5V4, S5V7, S5V8

Tid (min)	% 0.1% TFA-vann (A)	% MeOH (B)	Flowhastighet (ml/min)
0	98	2	3
2	98	2	3
20	40	60	3
23	40	60	3
24	98	2	3
30	98	2	3

5.9 Separasjon av BuOH S5V7

5.9.1 Versaflash kolonne-separasjon

Fraksjonen BuOH S5V7, 130 mg, ble løst i ca 4 ml MeOH-vann (3:1). Versapak C18 kolonne (150 x 40 mm) ble benyttet for fraksjonering. Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (1:1) som også var starteluent. BuOH S5V7-fraksjonen ble deretter applisert på kolonnen. Mobilfasen var ulike blandingsforhold mellom MeOH og vann. Gradienteluering ble brukt med en økende mengde MeOH (tabell 5.10). Til sammen ble det samlet opp totalt 20 kolonnefraksjoner.

Tabell 5. 10: Mobilfaser benyttet ved Versaflash C18 separasjon av fraksjon BuOH S5V7

Mobilfase	Kolonnefraksjoner	Mengde (ml)
MeOH-vann (1:1)	0-6	240
MeOH-vann (3:2)	7-12	180
MeOH-vann (7:3)	13-18	180
MeOH-vann	19-20	90

5.9.2 TLC

X De forskjellige kolonnefraksjonene ble applisert på en RP18 TLC-plate (silikagel 60 RP-18) med en mobilfase av MeOH-vann (7:3). På bakgrunnen av TLC-resultatet ble kolonnefraksjonene slått sammen og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. (tabell 5.11)

Tabell 5. 11: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av BuOH S5V7

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
BuOH S5V7V1	0-3
BuOH S5V7V2	4-5
BuOH S5V7V3	6-8
BuOH S5V7V4	9-12
BuOH S5V7V5	13-20

5.9.3 Analysering

5.9.3.1 NMR

Det ble tatt opp ^1H NMR-spektra av fraksjonene BuOH S5V7V1-S5V7V5 i CD_3OD .

5.9.3.2 HPLC

Fraksjonene S5V7V1-V3 og V5 ble løst i MeOH-vann (1:1) til en konsentrasjon på 200 $\mu\text{g/ml}$. Prøveløsningene ble filtrert med et sprøytefilter for å fjerne eventuelle partikler. Kinetex 5u C18 100A, 150x 4,6 mm kolonne, ble benyttet og deteksjonene ble foretatt ved 230 nm, 280 nm og 320 nm.

Mobilfasen bestod av en gradient av 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) i vann (A) og metanol (B) (se tabell 5.12)

Tabell 5. 12: Gradientsystem for analytisk HPLC av fraksjonene S5V7V1-V3 og V5

Tid (min)	% 0.1% TFA-vann (A)	% MeOH (B)	Flowhastighet (ml/min)
0	80	20	1
2	80	20	1
20	30	70	1
23	30	70	1
24	80	20	1
30	80	20	1

5.10 Separasjon av BuOH S5V8

5.10.1 Versaflash kolonne separasjon

Fraksjone BuOH S5V8, 88 mg, ble løst opp i ca. 3 ml MeOH-vann (2:1). Versapak C18 kolonne (150 x 40 mm) ble benyttet for fraksjonering. Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (1:1) som også var starteluent. BuOH S5V8-fraksjonen ble deretter applisert på kolonnen. Mobilfasen var MeOH og vann i ulike blandingsforhold. Gradienteluering ble brukt med en økende mengde MeOH (tabellen 5.13). Til sammen ble det samlet opp 20 kolonnefraksjoner.

Tabell 5. 13: Mobilfaser benyttet ved Versaflash C18 separasjon av fraksjon BuOH S5V8

Mobilfase	Kolonnefraksjoner	Mengde (ml)
MeOH-vann (1:1)	0-5	210
MeOH-vann (3:2)	6-12	210
MeOH-vann (7:3)	13-17	150
MeOH	18-20	120

5.10.2 TLC

De forskjellige kolonnefraksjonene ble applisert på en RP18 TLC-plate (silikagel 60 RP-18) med en mobilfase av MeOH-vann (7:3). På bakgrunnen av TLC-resultatet ble kolonnefraksjonene slått sammen og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. (tabell 5.14)

Tabell 5. 14: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av BuOH S5V8

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
BuOH S5V8V1	0-6
BuOH S5V8V2	7-11
BuOH S5V8V3	12-13
BuOH S5V8V4	14-15
BuOH S5V8V5	16-20

5.10.3 Analysering

5.10.3.1 NMR

Det ble tatt opp ^1H NMR spektra av fraksjonene BuOH S5V8V1-S5V8V5 i CD_3OD . Noen av fraksjonene ble også analysert med ^{13}C -NMR og HSQC

Tabell 5. 15: NMR analyse av BuOH S5V8 fraksjoner

Prøve	NMR
BuOH S5V8V1	¹ H, ¹³ C, HSQC
BuOH S5V8V2	¹ H
BuOH S5V8V3	¹ H, ¹³ C, HSQC
BuOH S5V8V4	¹ H, ¹³ C, HSQC
BuOH S5V8V5	¹ H, ¹³ C, HSQC

5.10.3.2 HPLC

Fraksjonene S5V8V1-V5 ble undersøkt ved analytisk HPLC. Det ble gjennomført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.9.3.2 Analytisk HPLC). Mobilfasen bestod av en gradient av 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) i vann (A) og metanol (B) (se tabell 5.12).

5.11 Separasjon av fraksjon BuOH S5V9

5.11.1 Preparativ HPLC

Fraksjon BuOH S5V9 ble rensert opp ved preparativ HPLC. 23.8 mg av fraksjonen ble løst i ca.2 ml MeOH-vann (9:1). Kinetex 5u C18 100A 150x 21.2 mm kolonne ble benyttet under denne kromatograferingen. Prøveløsningen ble filtrert og injisert på kolonnen og detektert ved 320 nm. Flowhastigheten var 10 ml/min og det ble brukt gradienteluering (tabell 5.16). Totalt ble det tatt imot eluat i 51 kolonnerør med 10 ml hver.

Tabell 5. 16: Gradientsystem for preparativ HPLC av BuOH S5V9

Tid (min)	% 0.1% TFA-vann (A)	% MeOH (B)	Flowhastighet (ml/min)
0	80	20	10
20	20	80	10
25	20	20	10

5.11.2 Analytisk HPLC

De mest interessante kolonnefraksjonene ble undersøkt ved analytisk HPLC og som hjelp for å slå sammen eluatet i kolonnerørene til fraksjoner. Det ble tatt ut ca. 0.5 ml fra kolonnerørene og filtrert med et sprøytefilter. Kinetex 5u C18 100A, 150x 4,6 mm kolonne, ble benyttet og deteksjonene ble foretatt ved 230 nm, 280 nm og 320 nm.

Mobilfasen bestod av en gradient av 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) i vann (A) og metanol (B) (se tabell 5.12).

Kolonnefraksjonene ble sammenslått til 12 fraksjoner, basert på absorbanstopper visualisert i kromatogrammet fra preparativ HPLC og fra analytisk HPLC (tabell 5.17). Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

Tabell 5. 17: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av BuOH S5V9

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
BuOH S5V9H0	1-15
BuOH S5V9H1	16-17
BuOH S5V9H2	18-28
BuOH S5V9H3	29-30
BuOH S5V9H4a	31-32
BuOH S5V9H4b	33-36
BuOH S5V9H5	37
BuOH S5V9H6	38-39
BuOH S5V9H7	40
BuOH S5V9H8	41-42
BuOH S5V9H9	43-44
BuOH S5V9H10	45-51

5.11.3 Analysering

5.11.3.1 NMR

Det ble tatt opp ^1H NMR-spektra av de mest interessante fraksjonene i CD_3OD . Fraksjonene BuOH S5V9H6 og H8 ble analysert også med ^{13}C NMR. NMR-spektrene av disse to er lagt i gjengitt i vedleggsdelen (se spektrum 14 og 15).

Tabell 5. 18: NMR analyse av BuOH S5V9 fraksjoner

Prøve	NMR
BuOH S5V9H0	^1H
BuOH S5V9H1	^1H
BuOH S5V9H2	^1H
BuOH S5V9H3	^1H
BuOH S5V9H4b	^1H
BuOH S5V9H5	^1H
BuOH S5V9H6	^1H , ^{13}C
BuOH S5V9H8	^1H , ^{13}C

5.12 Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V3

5.12.1 Preparativ HPLC

Fraksjon BuOH S5V7V3 ble rensert opp ved preparativ HPLC. 40 mg av fraksjonen ble løst i ca. 2,5 ml MeOH-vann (4:1). Det ble gjennomført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.11.1). Prøvematerialet ble fordelt på tre kjøring. Totalt ble det 41x3 kolonnerør med 10 ml i hver.

5.12.2 Analytisk HPLC

De mest interessante kolonnefraksjonene ble undersøkt ved analytisk HPLC som hjelp for å slå sammen innholdet i kolonnerørene til fraksjoner. Det ble gjennomført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.11.2) Mobilfasen bestod av en gradient av 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) i vann (A) og metanol (B) (se tabell 5.12).

Kolonnefraksjonene ble sammenslått til 9 fraksjoner, basert på absorbanstopper visualisert i kromatogrammet fra preprativ HPLC og fra analytisk HPLC (tabell 5.19). Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

Tabell 5. 19: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av BuOH S5V7V3

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner		
	Fra Parallell I	Fra Parallell II	Fra Parallell III
BuOH S5V7V3H0	1-14	1-14	1-14
BuOH S5V7V3H1	15	16	15
BuOH S5V7V3H2	16+0+16	-	16
BuOH S5V7V3H3	17	17-18	17
BuOH S5V7V3H4	18	19	18
BuOH S5V7V3H5	19-20	20	19-20
BuOH S5V7V3H6	21	21-22	21
BuOH S5V7V3H7	22-24	23-24	22-24
BuOH S5V7V3H8	25-41	25-41	25-41

5.12.3 Analyse av fraksjoner fra preparativ HPLC

5.12.3.1 NMR

De mest interessante fraksjonene ble løst i CD₃OD og analysert med ¹H-NMR, ¹³C-NMR og HSQC. NMR-spektrene av H3-fraksjonen er gjengitt i vedleggsdelen (spektrum 10).

Tabell 5. 20: NMR- analyse av S5V7V3 fraksjoner

Prøve	NMR
BuOH S5V7V3H0	¹ H, ¹³ C, HSQC
BuOH S5V7V3H3	¹ H, ¹³ C, HSQC
BuOH S5V7V3H6	¹ H, ¹³ C, HSQC
BuOH S5V7V3H7	¹ H, ¹³ C, HSQC
BuOH S5V7V3H8	¹ H, ¹³ C

5.13 Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V4

5.13.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen BuOH S5V7V4 ble rensert opp ved preparativ HPLC. 64 mg av fraksjonen ble løst i ca. 3 ml 85% MeOH-vann (17:3), med samme betingelser som tidligere (se avsnitt 5.11.1). Prøven ble fordelt på tre injeksjoner. Totalt ble det 37x2+ 39 kolonnerør med 10 ml hver.

5.13.2 Analytisk HPLC

Noen av kolonnerørene ble undersøkt ved analytisk HPLC på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.11.2). Mobilfasen bestod av en gradient av 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) i vann (A) og metanol (B) (se tabell 5.12).

Eluatet i kolonnerørene ble sammenslått til 9 fraksjoner, basert på absorbanstopper visualisert i kromatogrammet fra preprativ HPLC og fra analytisk HPLC (tabell 5.21). Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

Tabell 5. 21: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av BuOH S5V7V4

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner		
	Fra Parallell I	Fra Parallell II	Fra Parallell III
BuOH S5V7V4H0	1-14	1-14	1-14
BuOH S5V7V4H1	16-18	15-17	15-17
BuOH S5V7V4H2	19-20	18	18
BuOH S5V7V4H3	21	19-21	19-21
BuOH S5V7V4H4	23	22	22
BuOH S5V7V4H5	31-32	30-31	30
BuOH S5V7V4H6	22	-	-
BuOH S5V7V4H7	-	-	21
BuOH S5V7V4H8	33-39	32-37	31-37

5.13.3 Analysering

5.13.3.1 NMR

Fraksjonene H1-H6 i CD₃OD ble analysert med ¹H-NMR, ¹³C-NMR og HSQC. Fraksjonen BuOH S5V7V4H3 ble også analysert med HMBC.

5.14 Separasjon av fraksjonen BuOH S5V8V2

5.14.1 Preparativ HPLC

C Fraksjonen BuOH S5V8V2 ble rensert opp ved preparativ HPLC. 63 mg av fraksjonen ble løst i ca. 3 ml MeOH-vann (4:1), med samme betingelser som tidligere (se avsnitt 5.11.1). Prøven ble fordelt på tre injeksjoner. Totalt ble det 40x3 kolonnerør med 10 ml hver samlet opp.

5.14.2 Analytisk HPLC

Noen av kolonnerørene ble undersøkt ved analytisk HPLC på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.11.2).

Innholdet i kolonnerørene ble sammenslått til 9 fraksjoner, basert på absorbanstopper visualisert i kromatogrammet fra preparativ HPLC og fra analytisk HPLC (tabell 5.22). Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

Tabell 5. 22: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av BuOH S5V8V2

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner		
	Fra Parallell I	Fra Parallell II	Fra Parallell III
BuOH S5V8V2H1	1-11	1-11	1-11
BuOH S5V8V2H2	12-13	12-13	13
BuOH S5V8V2H3	14	14-15	15
BuOH S5V8V2H5	18	18-19	19
BuOH S5V8V2H6	20-21	20-21	20-21
BuOH S5V8V2H7	22	23	23
BuOH S5V8V2H8	23	-	-
BuOH S5V8V2H9	19	-	-

5.14.3 Analysering

5.14.3.1 NMR

Fraksjonene S5V8V2H2-H3, H5-H7 og H9 ble løst i CD₃OD og analysert med ¹H-NMR og ¹³C-NMR, noen av dem også med COSY, HSQC og HMBC. NMR-spektrene av S5V8V2H5 og H2 er gjengitt i vedleggsdelen (spektrum 12 og 18).

Tabell 5. 23: NMR- analyse av S5V8V2 fraksjoner

Prøve	NMR
BuOH S5V8V2H2	¹ H, ¹³ C, HSQC
BuOH S5V8V2H3	¹ H, ¹³ C, HSQC
BuOH S5V8V2H5	¹ H, ¹³ C, HSQC, HMBC, COSY
BuOH S5V8V2H6	¹ H, ¹³ C
BuOH S5V8V2H7	¹ H, ¹³ C, HSQC
BuOH S5V8V2H9	¹ H, ¹³ C, HSQC

5.15 Separasjon av fraksjon BuOH S5V8V2H6

5.15.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen BuOH S5V8V2H6 ble rensert opp ved preparativ HPLC. 9.9 mg av fraksjonen ble løst i ca. 1 ml MeOH-vann (4:1), med samme betingelser som tidligere (avsnitt 5.11.1) Totalt ble det 41 kolonnerør med 10 ml i hvert.

5.15.2 HPLC

De mest interessante kolonnerørene ble undersøkt ved analytisk HPLC på samme måte som tidligere (avsnitt 5.11.2). Mobilfasen bestod av en gradient av 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) i vann (A) og metanol (B) (se tabell 5.12).

Innholdet i kolonnerørene ble sammenslått til fraksjoner, basert på absorbanstopper visualisert i kromatogrammet fra preparativ HPLC og fra analytisk HPLC (tabell 5.24). Resten ble slått sammen. Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

Tabell 5. 24: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av BuOH S5V8V2H6

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
BuOH S5V8V2H6H1	22-23
BuOH S5V8V2H6Hrest	Resten av rørene

5.15.3 Analysering

5.15.3.1 NMR

Det ble tatt opp NMR-spektra (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HSQC) av fraksjon BuOH S5V8V2H6H1 i CD_3OD . NMR-spektrene er vist i vedleggsdelen (spektrum 13).

5.16 Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V3H6

5.16.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen BuOH S5V7V3H6 ble rensert opp ved preparativ HPLC. Ca.14 mg av fraksjonen ble løst i ca. 1 ml MeOH-vann (4:1), på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.11.1). Totalt ble det 37 kolonnerør med 10 ml i hvert.

5.16.2 Analytisk HPLC

De mest interessante kolonnefraksjonene ble undersøkt ved analytisk HPLC som hjelp for å slå sammen innholdet i kolonnerørene til fraksjoner, på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.11.2)

Kolonnerørene ble sammenslått til 3 fraksjoner, basert på absorbanstopper visualisert i kromatogrammet fra preparativ HPLC og fra analytisk HPLC (tabell under). Fraksjonen ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

Tabell 5. 25: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av BuOH S5V7V3H6

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
BuOH S5V7V3H6H1	15-19
BuOH S5V7V3H6H2	20-23
BuOH S5V7V3H6Hrest	Resten av rørene

5.16.3 Analysering

5.16.3.1 NMR

Det ble tatt opp NMR-spektra (^1H -NMR, ^{13}C -NMR og HSQC) av de to hovedfraksjonene (H1 og H2) i CD_3OD .

5.17 Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V3H3 og BuOH S5V7V4H3

5.17.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen BuOH S5V7V3H3 og BuOH S5V7V4H3 ble ved feiltagelse slått sammen, dermed ble de to rensert opp ved preparativ HPLC. Ca.17 mg av fraksjonen ble løst i 1.1 ml MeOH-vann (17:3), med samme betingelser som tidligere (se avsnitt 5.11.1) Totalt ble det 38 kolonnerør med 10 ml i hvert.

5.17.2 Analytisk HPLC

Noen av kolonnerørene ble undersøkt ved analytisk HPLC på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.11.2).

Innholdet i kolonnerørene ble sammenslått til 3 hovedfraksjoner og resten ble slått sammen, basert på absorbanstopper visualisert i kromatogrammet fra preparativ HPLC og fra analytisk HPLC (tabell 5.26). Fraksjonene ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

Tabell 5. 26: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av BuOH S5V7V3H3 og BuOH S5V7V4H3

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
BuOH S5V7VbH1	20-21
BuOH S5V7VbH2	16-17
BuOH S5V7VbH3	18-19
BuOH S5V7VbHrest	Resten av rørene

5.17.3 Analysering

5.17.3.1 NMR

Fraksjonen BuOH S5V7VbH1, løst i CD₃OD, ble analysert med ¹H-NMR, ¹³C-NMR og HSQC.

5.18 Videre rensing av BuOH S5V7VbH2 og BuOH S5V7VbH3

5.18.1 TLC

Fraksjonene BuOH S5V7VbH2 og BuOH S5V7VbH3 ble forsøkt videre rensing ved hjelp av preparativ TLC. Begge fraksjonene ble løst i ca. 1 ml 100% MeOH og applisert på en RP-TLC-plate i smal, vannrett sone litt overfor nederste kan av platen. Først ble sonen konsentrert til en smal strek med 100% MeOH. Deretter ble platen utviklet med MeOH-vann (1:1). Etter at TLC-platen var tatt ut fra elueringskaret ble de to synlige sonene skrapet av hver for seg, tilsatt 1.5 ml 100% MeOH og filtrert i vakuum. Løsemidlet ble så dampet inn på rotavapor. Det ble to fraksjoner S5V7VbHa og S5V7VbHb

5.18.2 Analysering

5.18.2.1 NMR

Fraksjonene S5V7VbHa og S5V7VbHb løst i CD₃OD ble analysert med ¹H-NMR, ¹³C-NMR og HSQC.

5.19 Fraksjonering av EtOAc-fasen

5.19.1 Sephadex LH-20 kolonne separering

Sephadex LH-20, 4.5 X 20 cm kolonne ble benyttet for fraksjonering av 1.4 g av *S.scardica* EtOAc-fasen. Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (2:3) som starteluent. EtOAc-fasen ble løst i 14 ml MeOH og forsiktig applisert på kolonnen. Mobilfasen var ulike blandingsforhold mellom MeOH og vann. Gradienteluering ble brukt med en økende mengde MeOH, og til sist brukt en blanding av aceton-vann (tabellen 5.27). Til sammen ble det samlet opp totalt 16 kolonnefraksjoner. I tillegg ble et lag av tungløselig materiale på toppen av kolonnen tatt ut og analysert.

Tabell 5. 27: Mobilfaser benyttet ved Sephadex LH-20 separasjon av EtOAc-fasen

Mobilfase	Kolonnefraksjoner	Mengde (ml)
MeOH-vann (2:3)	1-7	324
MeOH-vann (3:2)	8-10	140
MeOH	11-15	235
Aceton-vann (7:3)	16	250

5.19.2 TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på en RP-18-TLC-plate (silikagel 60 RP-18) med MeOH-vann (1:1) som mobilfase. Etter at TLC-platen var utviklet og tørket ble den betraktet i kortbølget og langbølget UV-maksima, sprayet med ceric-reagens og lagt i varmeskap ved 105 °C i ca 15 minutter. På bakgrunn av TLC-resultatene ble kolonnefraksjonene slått sammen og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. (tabell 5.28)

Tabell 5. 28: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av EtOAc-fasen

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
EtOAc S1	1-2
EtOAc S2	3-4
EtOAc S3	5-9
EtOAc S4	10
EtOAc S5	11
EtOAc S6	12
EtOAc S7	13-15
EtOAc S8	16
EtOAc S9	«Tungtløselig-lag-på toppen»

5.19.3 Analysering

5.19.2.1 NMR

Fraksjonene EtOAc S9 løst i CD₃OD ble analysert med ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HMBC og HSQC (se vedlegg spektrum 16).

5.20 Separasjon av fraksjon EtOAc S4

5.20.1 Versaflash kolonneseparasjon

Fraksjonen EtOAc S4, 169 mg, ble løst opp i ca. 1 ml MeOH. Versapak kolonne (2.3 x 11 cm) pakket med C18-materiale ble benyttet for fraksjonering. Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (1:4) som starteluent. EtOAc S4-fraksjonen ble deretter applisert på kolonnen. Mobilfasen var MeOH og vann i ulike blandingsforhold. Gradienteluering ble brukt med en økende mengde MeOH (tabellen 5.29). Til sammen ble det samlet opp totalt 21 kolonnefraksjoner.

Tabell 5. 29: Mobilfaser benyttet ved Versaflash C18 separasjon av fraksjon EtOAc S4

Mobilfase	Kolonnefraksjoner	Mengde (ml)
MeOH-vann (1:4)	1-3	90
MeOH-vann (2:3)	4-7	120
MeOH-vann (3:2)	8-10	90
MeOH-vann (7:3)	11-13	90
MeOH-vann (4:1)	14-17	120
MeOH	18-21	150

5.20.2 TLC

De forskjellige kolonnefraksjonene ble applisert på en RP-18-TLC-plate (silikagel 60 RP-18) med en mobilfase av MeOH-vann (1:1). TLC-resultatet ble kolonnefraksjonene slått sammen og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. (tabell 5.30)

Tabell 5. 30: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av EtOAc S4

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
EtOAc S4V1	1
EtOAc S4V2	2
EtOAc S4V3	3-5
EtOAc S4V4	6-7
EtOAc S4V5	8
EtOAc S4V6	9
EtOAc S4V7	10
EtOAc S4V8	11-13
EtOAc S4V9	14-17
EtOAc S4V10	18-21

5.20.3 Analysering

5.20.3.1 NMR

Det ble opptatt ^1H NMR spektra av fraksjonene EtOAc S4V1-S4V10 løst i CD_3OD og ^{13}C (APT) spektra av S4V4 og S4V8. NMR-spektrene av EtOAc S4V4 er gjengitt i vedleggsdelen (spektrum 17).

5.20.3.2 Analytisk HPLC

De mest interessante fraksjonene ble undersøkt ved analytisk HPLC. Fraksjonene ble løst i MeOH-vann (1:1) til en konsentrasjon på 200 $\mu\text{g/ml}$.

Mobilfasen bestod av en gradient av 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) i vann (A) og metanol (B). (se tabell 5.12).

5.21 Separasjon av fraksjon EtOAc S7

5.21.1 Versaflash kolonne separasjon

Fraksjonen EtOAc S7, 290 mg, ble løst opp i ca. 2 ml MeOH. Versapak kolonne (2.3 x 11 cm) pakket med C18-materiale ble benyttet for fraksjonering. Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (1:2) som starteluent. EtOAc S7-fraksjonen ble deretter applisert på kolonnen. Mobilfasen var ulike blandingsforhold mellom MeOH og vann. Gradienteluering ble brukt med en økende mengde MeOH (tabellen 5.31). Til sammen ble det samlet opp totalt 34 kolonnefraksjoner

Tabell 5. 31: Mobilfaser benyttet ved Versaflash C18 separasjon av fraksjon EtOAc S7

Mobilfase	Kolonnefraksjoner	Mengde (ml)
MeOH-vann (1:2)	0-5	70
MeOH-vann (2:3)	6-11	60
MeOH-vann (1:1)	12-18	80
MeOH-vann (3:2)	19-25	95
MeOH-vann (7:3)	26-33	100
MeOH	34	300

5.21.2 Analytisk TLC

De forskjellige kolonnefraksjonene ble applisert på en RP-18-TLC-plate (silikagel 60 RP-18) med en mobilfase av MeOH-vann (1:1). På bakgrunnen av TLC-resultatet ble kolonnefraksjonene slått sammen og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe. (tabell 5.32).

Tabell 5. 32: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av EtOAc S7

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
EtOAc S7V1	1
EtOAc S7V2	2-4
EtOAc S7V3	5-14
EtOAc S7V4	15-18
EtOAc S7V5	19-20
EtOAc S7V6	21-22
EtOAc S7V7	23-25
EtOAc S7V8	26-28
EtOAc S7V9	29-34
EtIAc S7V10	Bunnfall

5.21.3 Analysering

5.21.3.1 NMR

Det ble tatt opp ¹H NMR-spektra av fraksjonene EtOAc S7V1-S7V10 i CD₃OD. Fraksjonene S7V6 og S7V7 ble også analysert med ¹³C-NMR.

5.22 Separasjon av fraksjonen EtOAc S4V4

5.22.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen EtOAc S4V4 ble rensert opp ved preparativ HPLC. Ca.42 mg av fraksjonen ble løst i ca. 1 ml MeOH, og ble gjennomført på samme måte som tidligere (se avsnitt 5.11.1). Totalt ble det 23 kolonnerør med 10 ml hver.. Mobilfasen bestod av en gradient av 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) i vann (A) og metanol (B) (se tabell 5.12).

Innholdet i kolonnerørene ble sammenslått til 7 fraksjoner, basert på absorbanstopper visualisert i kromatogrammet fra preparativ HPLC (tabell 5.33). Fraksjonen ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

Tabell 5. 33: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av EtOAc S4V4

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
EtOAc S4V4H1	0
EtOAc S4V4H2	1-5
EtOAc S4V4H3	6
EtOAc S4V4H4	7-9
EtOAc S4V4H5	10
EtOAc S4V4H6	11-14
EtOAc S4V4H7	15-23

5.22.2 Analysering

5.22.2.1 NMR

Det ble tatt opp ¹H NMR-spektra av fraksjonene EtOAc S4V4H1-S4V4H7 i CD₃OD. Fraksjonene S4V4H3 og S4V4H4 ble også analysert med ¹³C-NMR.

5.23 Separasjon av fraksjonen EtOAc S4V8

5.23.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen EtOAc S4V8 ble renset opp ved preparativ HPLC. Fraksjonen ble løst i 1.6 ml MeOH-vann (1:1), og gjennomført på samme måte som tidlig (se avsnitt 5.11.1). Totalt ble det 36 (I) + 20 (II) kolonnerør med 10 ml hver.

Kolonnerørene fra begge parallellene ble sammenslått til 11 fraksjoner, basert på absorbanstopper visualisert i kromatogrammet fra preparativ HPLC. Fraksjonen ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

Tabell 5. 34: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av EtOAc S4V8

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
EtOAc S4V8H1	1-24 (I) + 1-15(II)
EtOAc S4V8H2	25 (I)
EtOAc S4V8H3	26-27 (I)
EtOAc S4V8H4	28-30 (I)
EtOAc S4V8H5	31-32 (I)
EtOAc S4V8H6	33-36 (I) + 22-24(II)
EtOAc S4V8H7	16 (II)
EtOAc S4V8H8	17 (II)
EtOAc S4V8H9	18 (II)
EtOAc S4V8H10	21 (II)
EtOAc S4V8H11	19+20 (II)

5.23.2 Analysering

5.23.2.1 NMR

Det ble tatt opp ^1H NMR-spektra av fraksjoner som så interessante ut i CD_3OD . Noen fraksjoner ble også analysert med ^{13}C -NMR. NMR-spektrene av EtOAc S4V8H5 er gjengitt i vedleggsdelen (spektrum 11).

Tabell 5. 35: NMR- analyse av EtOAc fraksjoner (S4V8H-S4V8H)

Prøve	NMR
EtOAc S4V8H3	¹ H, ¹³ C
EtOAc S4V8H5	¹ H, ¹³ C
EtOAc S4V8H7	¹ H
EtOAc S4V8H8	¹ H
EtOAc S4V8H9	¹ H
EtOAc S4V8H10	¹ H

5.24 Separasjon av EtOAc S7V7

5.24.1 Versaflash kolonne separasjon

Fraksjon EtOAc S7V7, ca. 35 mg, ble løst opp i ca. 3 ml MeOH-vann (1:1). Versapak kolonne (2.3 x 11 cm) pakket med C18-materiale ble benyttet for fraksjonering. Kolonnen ble kondisjonert med MeOH-vann (1:1) som starteluent. EtOAc S7S7-fraksjonen ble deretter applisert på kolonnen. Mobilfasen var to forskjellige blandingsforhold mellom MeOH og vann. Til sammen ble det samlet opp totalt 8 kolonnefraksjoner.

Tabell 5. 36: Mobilfaser benyttet ved Versaflash C18 separasjon av fraksjon EtOAc S7V7

Mobilfase	Kolonnefraksjoner	Mengde (ml)
MeOH-vann (1:1)	1-5	25
MeOH	6-8	60

5.24.2 TLC

Kolonnefraksjonene ble applisert på en RP-18-TLC-plate (silikagel 60 RP-18) med en mobilfase av MeOH-vann (2:1). På bakgrunnen av TLC-resultatet ble kolonnefraksjonene slått sammen og dampet til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

Tabell 5. 37: Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av EtOAc S7V7

Fraksjoner	Kolonnefraksjoner
EtOAc S7V7V1	1
EtOAc S7V7V2	2-3
EtOAc S7V7V3	4-5
EtOAc S7V/V4	6-8

5.24.3 Analysering

5.24.3.1 NMR

Fraksjonene EtOAc S7V7V1-S7V7V4, løst i CD₃OD, ble analysert med ¹H-NMR. Fraksjonen S7V7V2 ble også analysert med ¹³C-NMR.

5.25 Måling av radikal scavenger, og enzymhemmingseffekter

Fraksjonene som så ut til å inneholde bare ett stoff, og hvor stoffet var identifisert, ble undersøkt for DPPH-scavenging, 15-LO hemming, XO-hemming, AChE hemming og BuChE hemming som beskrevet i punkt 5.6.3.

5.26 Identifisering av topper I HPLC kromatogram

De isolerte stoffene ble enkeltvis injisert sammen med etanol råekstraktet, EtOAc- og BuOH fasene for å identifisere toppene i HPLC kromatogrammet., samt ble EtOH-råekstraktet, EtOAc- og BuOH-fasen kjørt på nytt med samme metode. En liten mengde av hver ble løst i MeOH-vann (1:1) til en konsentrasjon på 200 µg/ml. Kinetex 5u C18 100A, 150x 4,6 mm kolonne, ble benyttet og deteksjonene ble foretatt ved 230 nm, 280 nm og 320 nm.

Mobilfasen bestod av en gradient av 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) i vann (A) og metanol (se tabell 5.38)

Tabell 5. 38: Gradientsystem for analytisk HPLC for identifisering av toppene i EtOH-råekstraktet, EtOAc- og BuOH-fasene

Tid (min)	% 0.1% TFA-vann (A)	% MeOH (B)	Flowhastighet (ml/min)
0	98	2	1
2	98	2	1
20	30	70	1
23	30	70	1
24	98	2	1
30	98	2	1

6 Resultater og diskusjon

6.1 Ekstraksjon av plantemateriale

6.1.1 Utbyttet av EtOH-råekstraktet

Ekstraksjon av malt plantemateriale fra *S. scardica* med 80 % EtOH ga et ekstrakt med en mørk grønn-brun farge, og utbytte av ekstraktet ble 22 % (86 g fra 393 g plantemateriale).

6.1.2 NMR-spektroskopi

^1H NMR-spektret av EtOH-råekstraktet hadde en del signaler i område mellom 0.7 og 3 ppm. Dette tyder på at det er en del alifatiske forbindelser (CH , CH_2 og CH_3) i EtOH-råekstraktet. De store signalene ved 3.20-4.50 ppm tyder på at det er mange karbohydrat- og metoksylogrupper (H-C-O -strukturer). Anomerprotoner i karbohydrater gir signaler mellom 4.5-5.5 ppm, som det var signaler av i spekteret. Det var også små signaler mellom 5.7-8 ppm som er typisk for aromatiske og olefiniske protoner.

^{13}C NMR-spektret stemmer godt overens med ^1H -NMR-spekteret. Det var signaler ved 12-42 ppm som tyder på alifatiske karboner, og signaler ved 50-110 ppm er typisk for karbohydrater og andre oksygenerte karbonatomer. I området 110-172 ppm var det også en del signaler, trolig fra aromat-, karbonyl- og olefingrupper. Se vedlegg, spektrum1.

Signalet ved ca. 3.3 ppm er signalet for protoner i CD_3OD som ikke er fullstendig deuterert, og vannsignalet er ved ca. 4.8 ppm.

6.1.3 HPLC-kromatografi

Analytisk HPLC ble benyttet med UV-deteksjon på 230, 280, og 320 nm, ettersom flavonoider og andre polyfenoler absorberer UV-stråling i dette området. Flavoner med langbølgelengde absorberer UV-stråling ved 310-350 nm, mens flavonoler (OH -gruppe i posisjon 3) har langbølgelengde absorbans ved 350-385 nm. Flavonoler med andre grupper i posisjon 3 (O -alkyl eller O -sukker) vil da ha absorpsjon ved 330-360 nm ved langbølgelengde [72].

På HPLC-kromatogrammet til EtOH-råekstraktet ble det observert store signaler/topper med retensjonstid på 7.56, 12.43, 12.63, 13.81, 15.49, 15.79, 17.81 og 18.43 min ved 320 nm. De fleste av de toppene ga en UV-ståling ved 310-340 nm (se figur 6.4).

6.1.4 Måling av radikal scavenger, og enzymhemmingseffekter

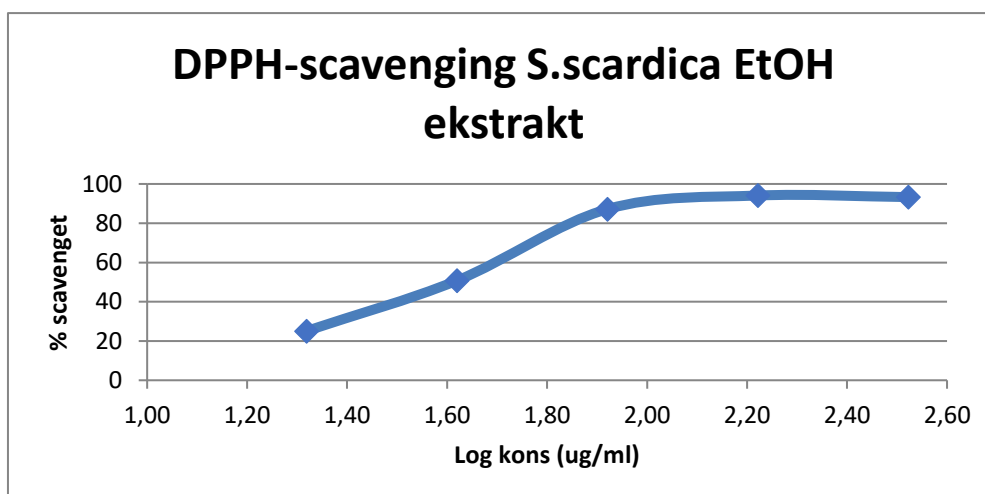
DPPH-test

Det ble testet for radikalscavenging av EtOH-råekstraktet (Tabell 6.1). Quercetin ble brukt som positiv kontroll.

Tabell 6. 1: DPPH-test av EtOH-råekstraktet

Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
333.3	93.3	1.2	40.8±2.5
166.7	94.1	1.2	
83.3	87.2	6.1	
41.7	50.8	2.2	
20.8	25.1	1.6	

EtOH-råekstraktet ga en IC₅₀-verdi på 40.8±2.5 µg/ml og viste god radikalscavenger aktivitet (Figur 6.1). Aktiviteten var doseavhengig. Det ga allikevel lavere radikalscavenger aktivitet enn den positive kontrollen, quercetin (IC₅₀ 3.6±0.6 µg/ml eller 11.8± 0.5 µM).



Figur 6. 1: Radikalscavenger aktivitet av EtOH-råekstraktet

15-LO-hemming

EtOH-råekstraktet ble testet for 15-LO-hemming (Tabell 6.2). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 27 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ eller $89.0 \pm 3.3 \mu\text{M}$).

Tabell 6. 2:15-LO hemming av EtOH-råekstraktet

Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
333.3	90.8	2.4	232 \pm 9
166.7	12.7	5.9	

15-LO-hemmings effekten av EtOH-råekstraktet ga en IC_{50} -verdi på 232 $\mu\text{g/ml}$. Hemmingsaktiviteten var mye lavere enn for quercetin, nesten inaktiv.

XO-hemming

Bestemmelsen av XO-hemming ble testet for EtOH-råekstraktet (tabellen 6.3). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($5.5 \pm 1.1 \mu\text{g/ml}$ eller $18.1 \pm 3.6 \mu\text{M}$).

Tabell 6. 3: XO-hemming av EtOH-råekstraktet

Konsentrasjon mg/ml	Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
20	333.3	56.5	4.8	238 \pm 74
10	166.7	43.1	3.3	

EtOH-råekstraktet ga en IC_{50} -verdi på 238 $\mu\text{g/ml}$, mye lavere aktivitet enn quercetin (>40 ganger). Ekstraktet var tilnærmet inaktivt, og hemmingen virket ikke konsentrasjonsavhengig.

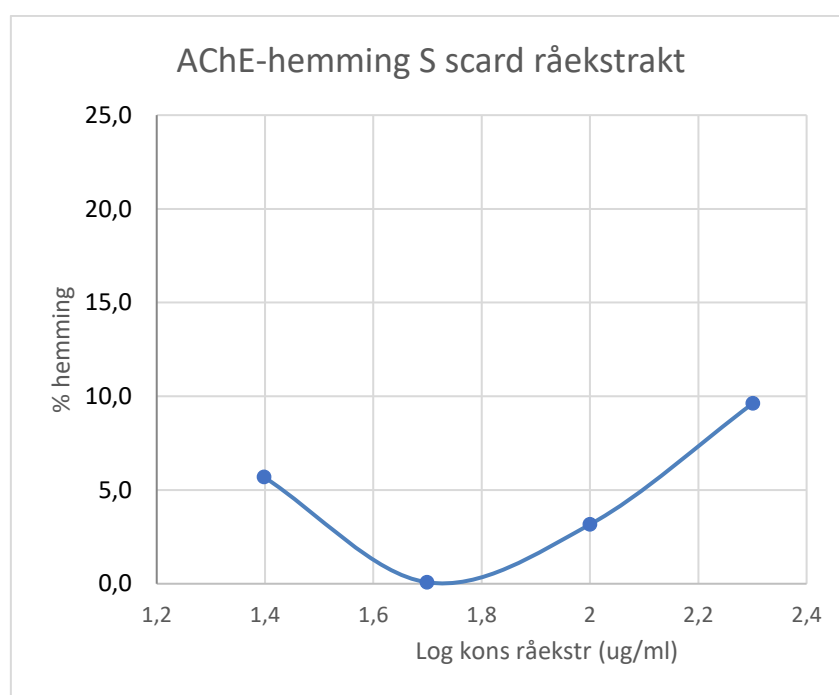
AChE-hemming

Det ble testet for AChE-hemming av EtOH-råekstraktet (tabell 6.4). Tacrin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 75 \pm 2 \text{ nM}$ eller $15 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$).

Tabell 6. 4: AChE-hemming av EtOH-råekstraktet

Konsentrasjon i brønnen (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
200	9.6	3.6	>200
100	3.2	2.7	
50	0.1	2.7	
2.5	5.7	3.1	

AChE-hemming av EtOH-råekstraktet viste en IC₅₀-verdi høyere enn 200 µg/ml, og tyder på at ekstraktet er inaktivt i dette assayet.



Figur 6.2: AChE-hemming av EtOH-råekstraktet

BuChE-hemming

EtOH-råekstraktet ble testet for BuChE-hemming (tabell 6.5). Tacrin ble brukt som positiv kontroll (IC₅₀= 69±5 nM eller 14 ±1 µg/mL)

Tabell 6. 5: BuChE-hemming av EtOH-råekstraktet

Konsentrasjon i brønnen (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
200	16.1	2.6	>200
100	5.6	11.2	
50	0.8	10.1	
2.5	-0.5	14.1	

EtOH-råekstraktet viste en IC₅₀-verdi større enn 200 µg/mL, altså tilnærmet inaktiv effekt på AChE-hemming. Det viste mye mindre effekt enn tacrin.

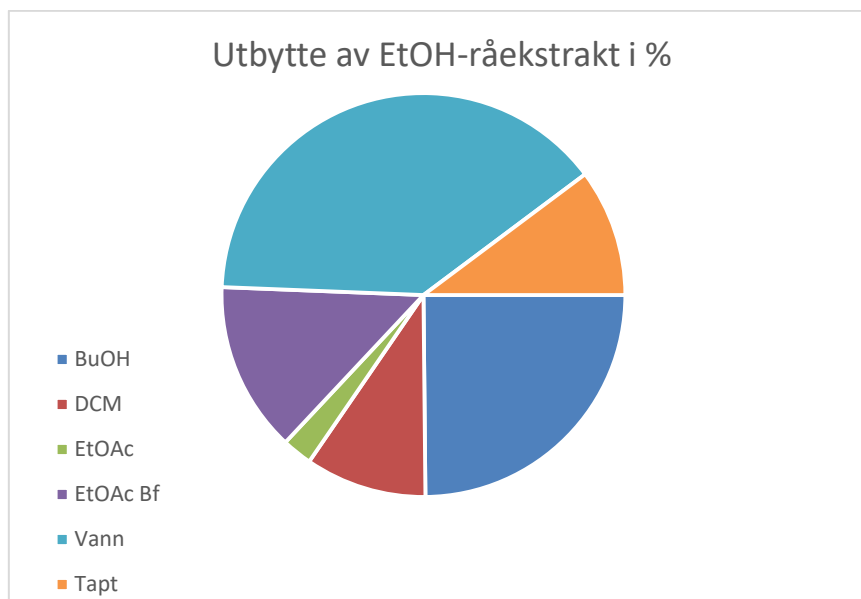
6.2 Ekstraksjon av EtOH-råekstraktet

6.2.1 Væske-væske-ekstraksjon

EtOH-råekstraktet veide 86 g etter ASE-ekstraksjon og ble videre ekstrahert med løsemidler av forskjellig polaritet (DCM, EtOAc, BuOH og vann). DCM var det mest upolare løsemidlet, etterfulgt av EtOAc som er middels polar og BuOH enda mer polar. Vann var det mest polare løsemidlet. Tallene fra tabell 6.6 viser at det er mer av polare forbindelser enn det er av upolare forbindelser i råekstraktet. Vannfasen (40.5%) er den største, deretter BuOH fasen (25.7%), bunnfall fra EtOAc-ekstraksjon (14.1%), DCM-fasen (10.1%) og EtOAc fasen (2.5%). Totalt utbytte av alle de fem fasene ble 92.9 %. De resterende 7.1 % gikk tapt, noe som kan skyldes at det ble holdt igjen i filterpapiret ved filtrering (se vedlegg; Flytskjema 1 for ekstraheringen av EtOH-råekstraktet).

Tabell 6. 6: Utbytte av faser fra råekstraktet etter ekstraksjon

Fasene	Utbytte (g)	Utbytte (%)
DCM	8.66	10.1
EtOAc	2.15	2.5
EtOAc bf	12.14	14.1
BuOH	22.11	25.7
Vannfasen	34.85	40.5
Sum	79.91	92.9



Figur 6. 3: Utbytte av EtOH-råekstrakt i %

6.2.2 NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spekteret for DCM-fasen inneholdt mest alifatiske protonsignaler, og nesten ingen signaler for sukker-protoner og olefin/aromatiske-protoner. Etersom DCM-fasen er den mest upolare fasen inneholder den mest sannsynlig hovedsakelig mettede alifater og terpenoider. Signalet ved ca. 5.30 ppm kan muligens stamme fra protonet i umettede fettsyrekjeder.

^1H -NMR-spekteret til EtOAc-Bf-fasen inneholder mye av de samme signalene som EtOH-råekstraktet. BuOH og EtOAc er nokså like, utenom noen signaler som er tilstede i BuOH-fasen og ikke i EtOAc-fasen.

^1H -NMR-spekteret til BuOH-fasen var det to dubletter med koblingskonstant ca 16 Hz ved 6.30 ppm og 7.55 ppm. De kan muligens tilhøre signaler for fenyletanoid-olefinprotoner. Noe annet som er karakteristisk for fenyletanoider er sidekjedeproton signaler i alifat-området i ^1H -NMR-spekteret som ses ved ca. 2.60 ppm. I tillegg er det to signaler i sukkerdelen ved ca. 3.90 ppm som er intense i BuOH-fasen mens de er nesten ikke å se i EtOAc-fasen. Disse signalene tilhører muligens protoner i OCH_3 -grupper.

^1H -NMR-spekteret for vannfasen har minimalt med signaler i aromat og alifat-området. Det er mest sukker proton-signaler.

For spektra av disse fraksjonene, se vedlegg, spektra 2-6.

6.2.3 HPLC-analytisk

Analytisk HPLC ble benyttet med UV-absorbans på 230, 280, og 320 nm, ettersom flavonoider og andre polyfenoler absorberer UV-stråling i dette området. HPLC-kromatogrammet av DCM-fasen med UV-absorbans på 230, 280 og 320 nm ga få signaler. Dette kan komme av at DCM-fasen inneholder forbindelser som ikke absorberer ved disse bølgelengdene, for eksempel terpenoider og mettede alifater. På ¹H-NMR-spekteret så det også ut til at det var mye mer av de stoffene enn av flavonoider og andre polyfenoler; dette stemmer godt overens med HPLC-kromatogrammet.

HPLC-kromatogrammet med UV-absorbans på 320 nm av EtOAc-fasen hadde bare en hovedtopp (18.46 min) som skilte seg ut fra de andre toppene i kromatogrammet. Denne toppen er lavere i de andre fasene, hvis det blir forutsatt at det har ikke skjedd store endring på retensjonstider av fasene. På HPLC-kromatogrammet ved samme absorbans av EtOAc-bunnfallfasen var det nesten de samme toppene som på EtOH-råekstraktet (se figur 6.4 for kromatogrammer av råekstrakt og faser). Det tyder da på at de fleste forbindelser som er i råekstraktet befinner seg i denne fasen også. Toppen med retensjonstid på 17.79 min skilte seg ut fra de andre toppene.

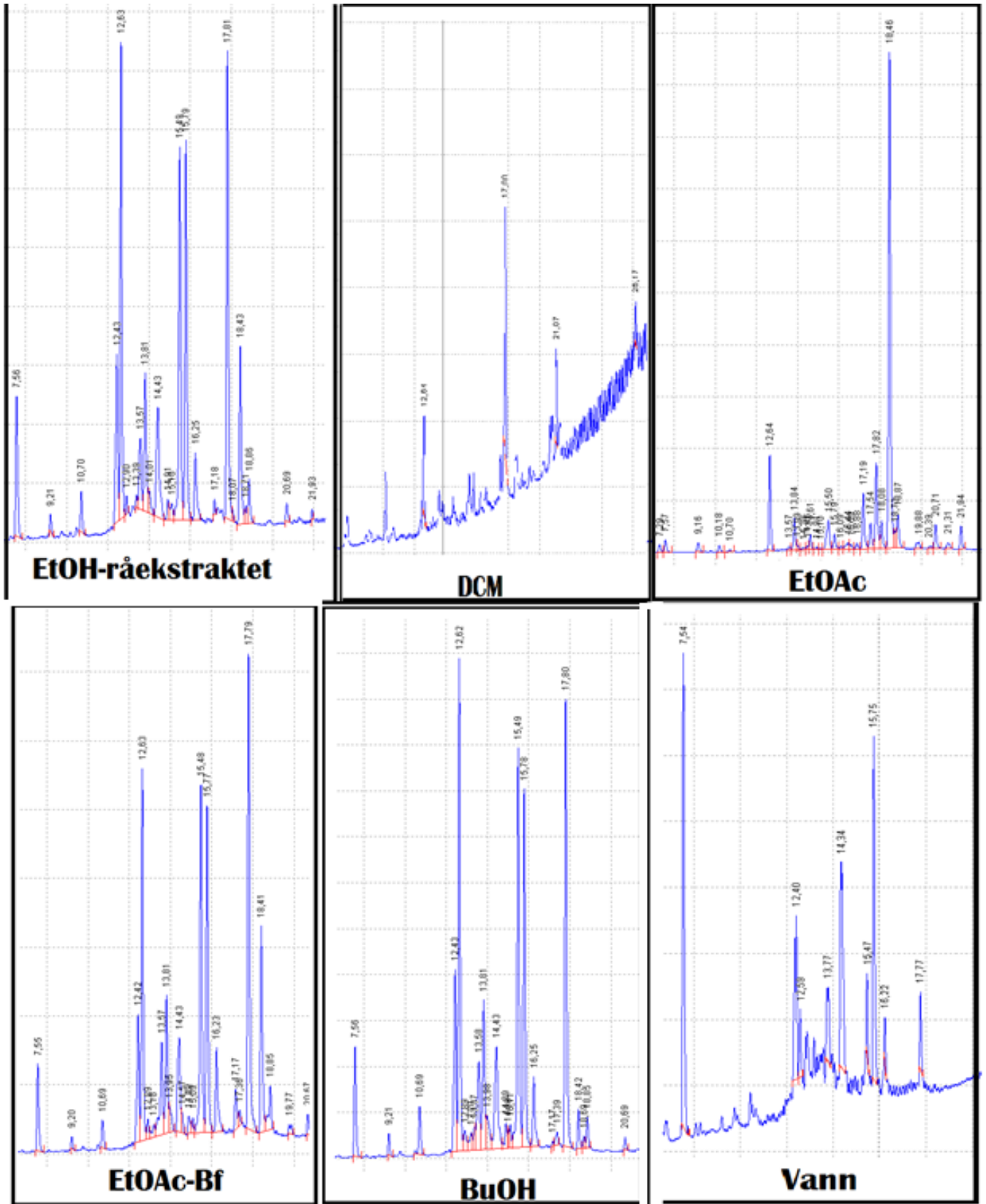
I BuOH-fasen ved samme absorbans var det fire sterke signaler og en del andre små signaler. Hovedtoppene i denne fasen var de to med retensjonstid på 12.62 og 17.80 min.

På vannfasens HPLC-kromatogram har hovedtoppen en retensjonstid på 7.54 min. Dette stemmer godt med at her fantes de mest hydrofile forbindelser, og de vil da komme ut av kolonnen tidligst.

Tabell 6. 7: Hovedtoppenes retensjonstider av EtOH-råekstraktet og de fem fasene

Fase	Retensjonstid									
EtOH	7.56	12.43	12.62	13.81	14.43	15.49	15.79	17.19	17.81	18.43
DCM		12.64							17.80	
EtOAc			12.69					17.19	17.82	18.46
EtOAc Bf	7.55	12.42	12.63	13.81		15.48	15.77		17.79	18.41
BuOH	7.56	12.43	12.62	13.81		15.49	15.78		17.80	
Vann	7.54	12.40			14.34	15.47	15.75		17.77	

Tabellen 6.7 viser retensjonstidene til de høyeste toppene i HPLC-kromatogrammene av de forskjellige fasene.



Figur 6. 4: HPLC-kromatogrammer av EtOH-rækstraktet og de fem fasene

6.2.4 Måling av radikal scavenger, og enzymhemmingseffekter

DPPH-test

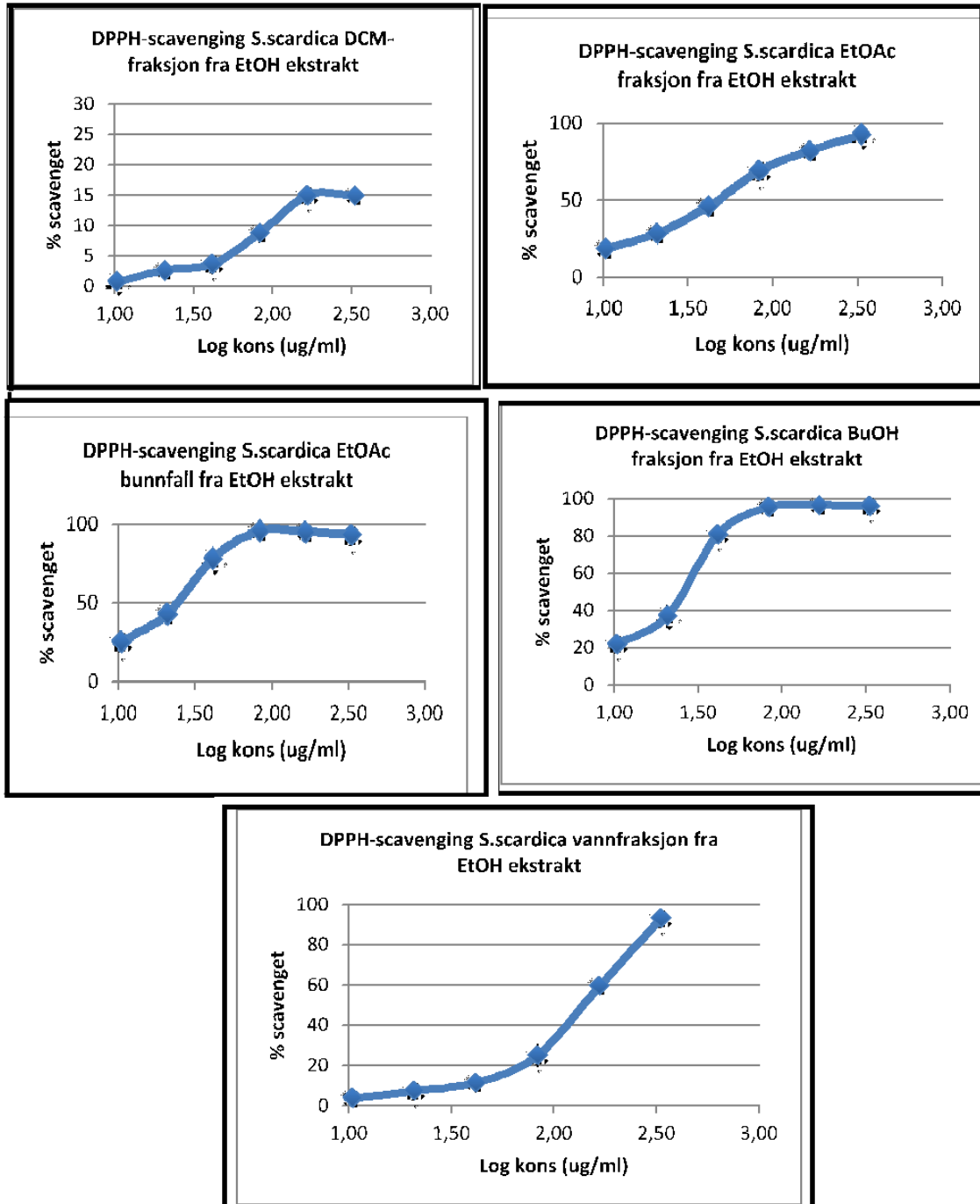
Det ble testet for DPPH radikalscavenging av DCM-, EtOAc-, EtOAc-Bf-, BuOH-, og vannfasen. (tabell 6.8). Quercetin ble brukt som positiv kontroll.

Tabell 6. 8: DPPH-test av BuOH-, DCM-, EtOAc-, EtOAc-Bf- og vannfasen

Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
DCM			
333.3	14.9	0.6	>333
166.7	15.0	0.9	
83.3	8.8	1.6	
41.7	3.7	1.7	
20.8	2.6	0.6	
10.4	0.8	1.3	
EtOAc-fase			
333.3	93.0	0.9	47±4
166.7	82.1	1.7	
83.3	69.5	3.9	
41.7	46.1	2.3	
20.8	28.8	1.3	
10.4	18.9	1.6	
EtOAc-Bf-fase			
333.3	93.5	1.0	23.8±1.0
166.7	95.2	0.8	
83.3	96.0	0.4	
41.7	78.3	1.1	
20.8	43.2	2.5	
10.4	25.6	1.1	
BuOH			
333.3	96.2	0.5	26±3
166.7	96.5	0.4	
83.3	95.6	0.3	
41.7	81.0	3.2	
20.8	37.2	6.1	
10.4	22.0	0.7	
Vannfase			
333.3	93.5	0.9	137±13
166.7	59.8	4.0	
83.3	25.1	5.5	
41.7	11.6	4.9	
20.8	7.6	0.8	
10.4	3.9	0.5	

Tabellen 6.8 viser at EtOAc-Bf-fasen (IC₅₀ 23.8 ±1.0 µg/ml) og BuOH-fasen (26±3 µg/ml) hadde høyere radikalscavenger aktiviteter enn de andre fasene og bedre enn EtOH-råekstraktet (40.8 ±2.5 µg/ml). EtOAc-fasen ga IC₅₀- verdi på 47 ±4 µg/ml, litt høyere IC₅₀-verdi enn råekstraktet og med lavere radikalscavenger aktivitet enn EtOAc-Bf-, og BuOH-fasene.

Vannfasen med en konsentrasjon på $137 \pm 13 \mu\text{g/ml}$ ga atskillig lavere radicalscavengeraktivitet, og DCM-fasen hadde svært lav scavenger aktivitet selv ved den høyeste konsentrasjon.



Figur 6.5: DPPH-scavenging av DCM-, EtOAc-, EtOAc-Bf-, BuOH- og vannfase

15-LO-hemming

DCM-, EtOAc-, EtOAc-Bf-, BuOH-, og Vann-faser ble testet for 15-LO-hemming (Tabell 6.9). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 27 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ eller $89 \pm 3.3 \mu\text{M}$).

Tabell 6.9: 15-LO hemming av DCM-, EtOAc-, EtOAc-Bf- BuOH-, og vannfase

Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
DCM			
333.3	82.4	1.0	249±7
166.7	5.0	6.0	
EtOAc-fase			
333.3	104.1	0.8	65±6
166.7	103.6	2.6	
83.3	73.8	8.0	
41.7	7.0	10.7	
EtOAc-Bf-fase			
166.7	74.8	2.6	120±5
83.3	22.7	8.0	
41.7	11.3	2.5	
BuOH			
166.7	97.2	2.0	98±6
83.3	35.7	6.2	
41.7	5.6	0.3	
Vannfase			
333.3	13.6	9.2	>333

EtOAc-fasen hadde lavere IC_{50} -verdi enn de andre fasene som vist i tabellen 6.9. Den hadde også bedre 15-LO hemmingsaktivitet enn EtOH-råekstraktet ($IC_{50} 232 \pm 9 \mu\text{g/ml}$), men mindre effekt enn quercetin. Vannfasen hadde svært lav hemmingseffekt selv ved høyeste konsentrasjon, og ble derfor ikke målt ved lavere konsentrasjoner.

Tabell 6.10: Andel av total 15-LO hemming av DCM-, EtOAc-, EtOAc-Bf- BuOH-, og vannfase

Fraksjoner	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	SD	Vekt mg	Vekt/ IC_{50}	% av total hemmingsaktivitet
DCM	249	7	8660	35	10
EtOAc	65	6	2150	33	9
EtOAc Bf	120	5	12140	101	28
BuOH	98	6	22110	226	63
Vann	Inaktiv	-	34850	-	-

Tabellen over viser at selv om BuOH-fasen hadde en IC₅₀-verdi på 98±6 µg/ml, står den for 63 % av hemmingseffekten i EtOH-råekstraktet ettersom den veier mer enn de andre aktive faser. EtOAc-fasen, som var den mest aktive fasen, står for bare 9 % av total hemmingsaktivitet.

XO-hemming

Bestemmelsen av XO-hemming ble testet av DCM-, EtOAc-, EtOAc-Bf-, BuOH-, og Vann-faser (tabell 6.11). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (5.5±1.1 µg/ml eller 18.1 ± 3.6 µM).

Tabell 6.11: XO hemming av DCM-, EtOAc-, EtOAc-Bf-, BuOH-, og vannfase

Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
DCM			
333.3	26.5	6.1	>333
166.7	19.4	3.5	
EtOAc-fase			
333.3	143.5	12.8	39±4
166.7	138.4	4.2	
83.3	68.7	8.1	
41.7	51.5	2.4	
20.8	33.1	3.0	
EtOAc-Bf-fase			
333.3	154.2	10.8	>166.7
166.7	38.5	3.1	
BuOH			
333.3	165.4	6.0	>166.7
166.7	18.2	5.9	
83.3	6.2	1.3	
Vann-fase			
333.3	16.2	3.1	>333
166.7	8.9	4.0	

Tabellen 6.11 viser at EtOAc-fasen (39±4 µg/ml) er den eneste aktive fasen av alle de fem fasene og vesentlig mer aktiv enn EtOH-råekstraktet (238±74).

AChE-hemming

Det ble testet for AChE-hemming av DCM-, EtOAc-, EtOAc-Bf-, BuOH-, og vann-faser (tabell 6.12). Tacrin ble brukt som positiv kontroll (IC₅₀= 75±2 nM. eller 15 ± 0.4 µg/mL).

Tabell 6.12: AChE hemming av, DCM-, EtOAc-, EtOAc-Bf-, BuOH- og vannfase

Konsentrasjon i brønnen (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
DCM			
200	-3.5	9.3	>200
100	7.4	8.8	
50	13.7	4.6	
25	15.9	10.9	
EtOAc-fase			
200	18.6	3.2	>200
100	9.7	5.5	
50	5.6	3.8	
25	-0.3	2.8	
EtOAc-Bf-fase			
200	17.6	5.2	>200
100	15.3	4.9	
50	3.8	2.3	
25	1.1	0.7	
BuOH			
200	48.8	3.7	>200
100	28.9	2.5	
50	19.5	3.8	
25	7.2	3.5	
Vann-fase			
200	1.1	1.9	>200
100	1.4	4.4	
50	9.6	10.8	
25	12.5	9.8	

Verdiene i tabellen 6.12 viser at ingen av fasene hadde særlig hemmingsaktivitet av AChE, selv ved høyeste målte konsentrasjon. Butanolfasen hadde noe aktivitet, med IC₅₀ litt over 200 µg/ml.

BuChE-hemming

DCM-, EtOAc-, EtOAc-Bf-, BuOH-, og vann-fasen ble testet for BuChE-hemming (tabell 6.13). Tacrin ble brukt som positiv kontroll (IC₅₀= 69±5 nM eller 14 ± 1µg/mL)

Tabell 6.13: BuChE hemming av DCM-, EtOAc-, EtOAc-Bf-, BuOH-, og vannfase

Konsentrasjon i brønnen (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
DCM			
200	32.6	2.5	>200
100	23.9	1.5	
50	20.5	3.9	
EtOAc-fase			
200	45.2	2.1	>200
100	37.6	9.3	
50	30.8	3.4	
25	16.4	3.7	
EtOAc-Bf-fase			
200	7.1	5.9	>200
100	10.1	5.6	
50	3.7	8.7	
25	-8.3	10.7	
BuOH			
200	11.8	6.5	>200
100	9.4	6.5	
50	1.9	4.0	
25	-3.3	6.3	
Vann-fase			
200	-4.5	3.1	>200
100	1.0	3.7	
50	9.9	3.7	
25	9.8	2.4	

Tabellen 6.13 viser at i likhet med rækstraktet ga ingen av fasene noe særlig hemmingseffekt av BuChE, selv ved høyeste målte konsentrasjon. EtOAc-fasen ga ca. 45 % BuChE-hemmingsaktivitet ved en konsentrasjon på 200 µg/ml, som er en svært høy konsentrasjon i forhold til den positive kontrollen tacrin.

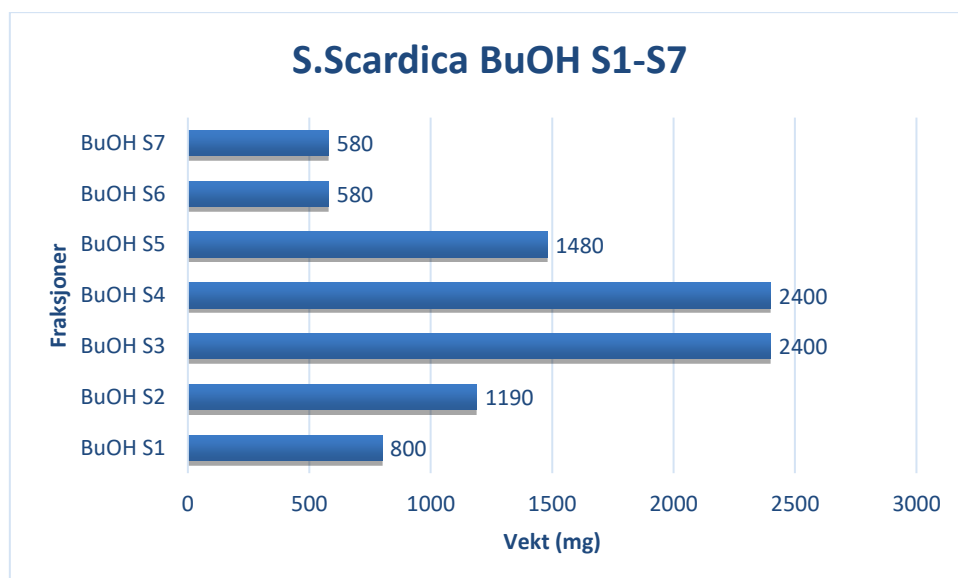
6.2.5 Videre arbeid

HPLC-kromatogrammene til BuOH-fasen og EtOAc-fasen viste en del interessante signaler som gjorde det aktuelt å gå videre med disse fasene. I tillegg viste NMR-spektrene og resultatene av bioassay også interessante resultater for disse to fasene. På bakgrunn av disse resultatene ble BuOH- og EtOAc-fasen valgt ut for videre opprensing.

6.3 Fraksjonering av BuOH-fase

6.3.1 Sephadex LH-20 kolonne-separering

Ved videre fraksjonering av BuOH-fasen ble Sephadex LH-20 kolonne benyttet, der det ble applisert 10 g av *S. scardica* BuOH-fase. Etersom gradienteluering ble brukt med en økende mengde MeOH i vann, ble de mest polare forbindelser eluert ut først, etterfulgt av mindre polare forbindelser. På slutten av separeringen ble det brukt 70% vandig aceton så de upolare forbindelser og andre forbindelser som satt igjen ble vasket ut av kolonnen. Det ble samlet 20 kolonnefraksjoner og på bakgrunnen av TLC-resultatene ble de slått sammen til 7 fraksjoner (S1-S7), figur 6.6. Det samlede utbyttet var 9.43 g (94%). Den tapte mengden kan skyldes at noe ble igjen i kolonnen (se vedlegg; Flytskjema 2 for fraksjonering av BuOH-fasen).



Figur 6.6: Vekt av fraksjoner BuOH S1-S7

6.3.2 NMR-spektroskopi

Alle fraksjonene BuOH S1-S7 ble analysert med ^1H -NMR. BuOH S1- og S2-fraksjonene så ut til å inneholde mest sukker, ettersom det var mest signaler mellom 3.0 og 4.8 ppm og få signaler i aromatområdet og alifat området. Spektrene for S3 og S4 viste mer aromat og alifat signaler. Ut i fra spektrene kan det se ut som disse to fraksjonene inneholder mer glukosid-proton-signaler enn frie sukker-proton-signaler siden aromat/olefinsignalene er sterkere i forhold til

sukkersignalene, og det virker rimelig at de frie sukkerne var i de tidligere fraksjonene (S1 og S2).

¹H-NMR-spekteret til BuOH S5 (vedlegg, spektrum 7) så ut til å ligne spektrene av S3 og S4, men syntes renere. Spekteret så ut til å inneholde mer av interessante signaler/forbindelser.

6.3.3 Analytisk HPLC

HPLC-kromatogrammet med UV-absorbans på 320 nm for BuOH S5 så ut til å skille seg ut fra de andre fraksjonene, med en høy topp med retensjonstid på 12.61 min. I tillegg forelå hovedtoppene med samme retensjonstid som i selve BuOH-fasen og EtOH-råekstraktet.

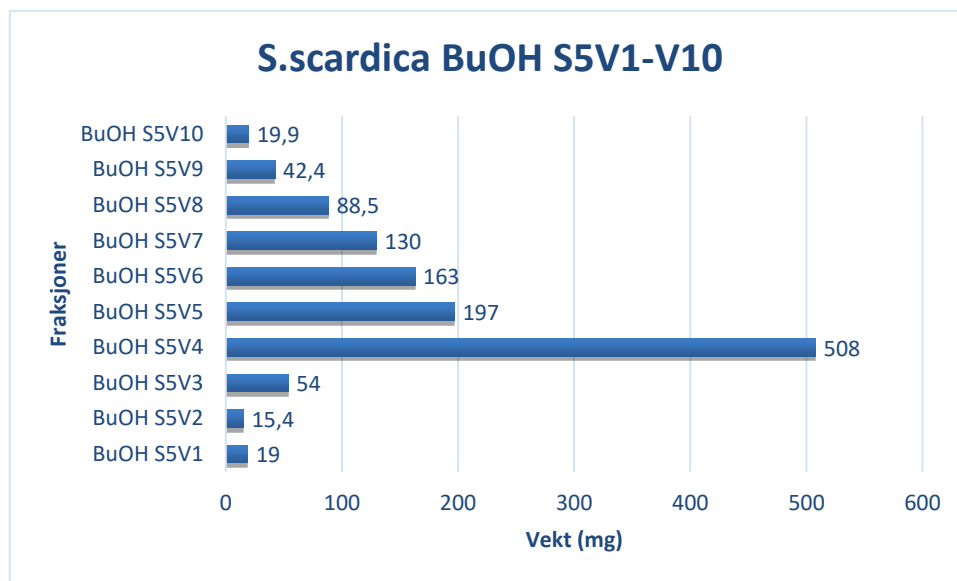
6.3.4 Videre arbeid

¹H-NMR-spekteret og HPLC-kromatogrammet for BuOH S5 så ut til å være litt renere enn de andre fraksjonene og til å inneholde en del interessante signaler. På bakgrunn av dette ble denne fraksjonen valgt for videre opprensing.

6.4 Separasjon av fraksjon BuOH S5

6.4.1 Versaflash kolonneseparasjon

S.scardica BuOH S5 ble videre fraksjonert med Versaflash kromatografi, det det ble applisert 1240 mg på kolonnen. Det ble samlet 27 kolonnefraksjoner som ble slått sammen til 10 fraksjoner (S5V1-S5V10) på bakgrunn av TLC-resultater, fraksjonsvektene er vist i figur 6.7. Det samlede utbyttet ble 1237 mg (99.7%) (se vedlegg; Flytskjema 3 for fraksjonering av BuOH S5 og videre arbeid).



Figur 6.7: Vekt av fraksjoner BuOH S5V1-5V10

6.4.2 NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spekteret til BuOH S5V1 og S5V2 så ut til å være relativt rent (vedlegg, spektrum 8), med dubletter (J 16 Hz) for olefin-protoner ved 7.56 og 6.28 ppm. I tillegg var det aromatprotoner i et ABX-mønster ved 7.04, 6.94 og 6.78 ppm. Disse signalene kunne tyde på at denne fraksjonen kunne være kaffesyrederivat. Det var ingen signaler for karbohydratprotoner; signaler ved 5.36, 4.58, 4.14 og 3.70 ppm sammen med signaler i det alifatiske området (2.02-2.18 ppm) stemmer godt med tidligere data for klorogensyre, som også er tidligere rapportert i planten (se mer i avsnitt 6.21.2) [73].

For BuOH S5V3 viste ^1H -NMR-spekteret innhold av flere aromatprotoner i tillegg til olefinproton-signaler. I alifatområdet var det en dublett ved ca. 1.1 ppm (J 6.2 Hz), som kan være CH_3 -gruppe i rhamnose. Fraksjonen S5V4 hadde et renere spekter enn S5V3, men mye av de samme signalene, og så ut til å kunne være samme stoff. Signalene kunne stemme godt med tidligere data over verbascosid, som er tidligere rapportert i planten (se mer om verbascosid i avsnitt 6.21.1) [73]. ^{13}C -NMR-spekteret til BuOH S5V4 stemte også godt overens med litteraturdata. Se vedlegg, spektrum 9.

^1H -NMR-spekteret til BuOH S5V5 så ut til å inneholde mye av de samme signalene som S5V4, men var mindre rent. S5V6 så ut til å være veldig blandet. Fraksjonen S5V7 hadde mindre alifatiske signaler, mer sukker og aromatiske signaler. Denne fraksjonen kunne se ut til å

inneholde flavonoider. Det samme med BuOH S5V8 fraksjonen, mens S5V9 så ut å inneholde litt renere flavonoider og hadde et sterkt signal som kunne tyde på OCH₃- signal, til forskjell fra S5V7 og S5V8 fraksjoner.

6.4.3 Analytisk HPLC

HPLC-kromatogrammet for BuOH S5V1 og S5V2 viste en markert topp med retensjonstid 7.57 min, som tidligere var sett i kromatogrammer av BuOH-fasen og EtOH rækstrakten. Fraksjon S5V2 hadde ved denne retensjonstiden et UV-spektrum med absorpsjonstopper ved 218, 238 og 326 nm. På kromatogrammet for fraksjon S5V3 fraksjon var det en hovedtopp med retensjonstid på 12.30 min, ellers noen få andre mindre topper. Fraksjon S5V4 hadde en høy topp med samme retensjonstid som S5V3 og et UV-spektrum med absorpsjonsmaksima ved 222 og 331 nm. HPLC- kromatogrammene for fraksjonene BuOH S5V7 og S5V8 hadde topper med andre retensjonstider og noen flere topper. Fraksjon S5V9 ga en markert topp med retensjonstid på 17.47 min og noen få mindre topper.

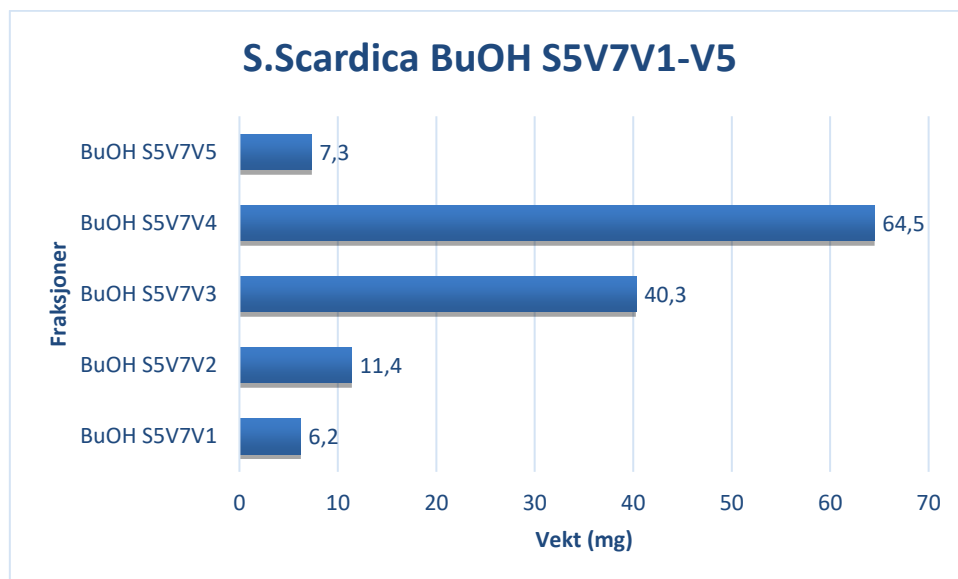
6.4.4 Videre arbeid

Ut fra NMR-spektrene og HPLC-kromatogrammer så det ut til at BuOH S5V1, S5V2 og S5V4 var relativt rene fraksjoner, mens fraksjonene S5V7-V9 inneholdt blandinger av andre stoffer.

6.5 Separasjon av BuOH S5V7

6.5.1 Versaflash kolonneseparasjon

Fraksjon BuOH S5V7 ble videre fraksjonert med Versaflash, der det ble applisert 130 mg på kolonnen. Det ble samlet 20 kolonnefraksjoner som ble slått sammen til 5 fraksjoner (S5V7V1-S5V7V5) på bakgrunn av TLC-resultater, figur 6.8. Det samlede utbyttet ble 129.7 mg (99.9%).



Figur 6.8: Vekt av fraksjoner BuOH S5V7V1-S5V7V5

6.5.2 NMR-spektroskopi

^1H NMR-spekteret til fraksjonene BuOH S5V7V3 og S5V7V4 var nokså like og så ut til å inneholde mest flavonoider. Aromatprotoner, karbohydratprotoner og signaler fra acetylgrupper var fremtredende.

6.5.3 Analytisk HPLC

HPLC-kromatogrammene med UV-absorbans 320 nm til fraksjonen BuOH S5V7V2 og S5V7V5 inneholdt flere topper. Fraksjonen S5V7V3 hadde to topper med retensjonstid 14.26 min og 15.70 min. Den ene toppen var også i fraksjonen S5V7V4 med retensjonstid 15.68 min, mens den andre toppen var med retensjonstid 16.00 min.

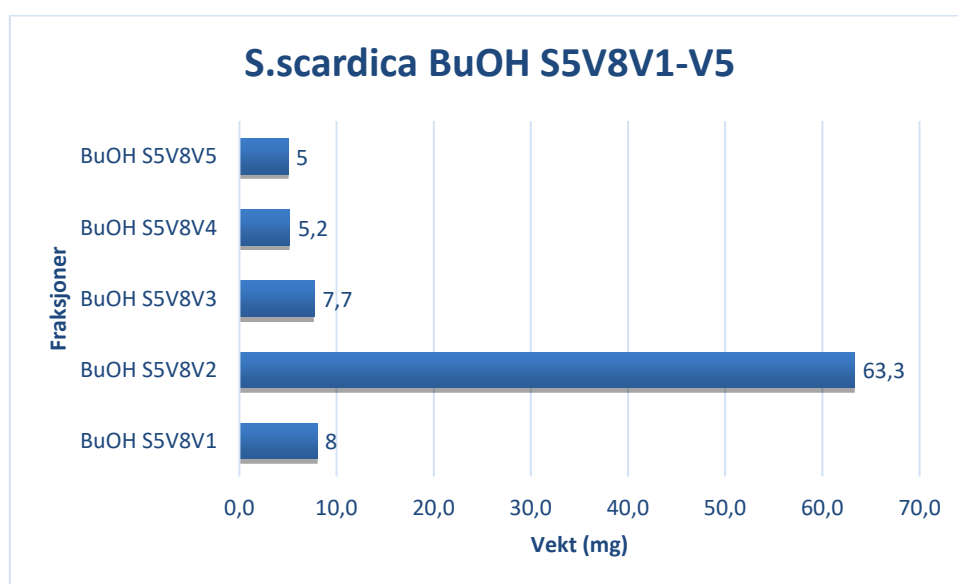
6.5.4 Videre arbeid

På bakgrunn av resultatene fra utbyttet, NMR-spekteret og HPLC-kromatogrammet ble fraksjonene S5V7V3 og S5V7V4 valgt ut for videre opprensing.

6.6 Separasjon av BuOH S5V8

6.6.1 Versaflash kolonneseparasjon

Fraksjonen BuOH S5V8 ble videre opprenset med Versaflash kolonneseparering, der det ble applisert 88 mg på kolonnen. Det ble totalt samlet 20 kolonnefraksjoner som ble slått sammen til 5 fraksjoner (S5V8V1-S5V8V5) på bakgrunn av TLC-resultater. Det samlede utbyttet ble 89,2 mg (101%), figur 6.9 (se vedlegg; Flytskjema 5 for fraksjonering av BuOH S5V8 og videre arbeid).



Figur 6.9: Vekt av fraksjoner BuOH S5V8V1-S5V8V5

6.6.2 NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret til fraksjonene BuOH S5V8V2 så ut til å inneholde flavonoider. Det var noen karbohydrat-signaler og noen olefin/aromat-proton-signaler. I tillegg var det to signaler i alifatområdet ved ca. 2 ppm.

6.6.3 Analytisk HPLC

HPLC-kromatogrammet for fraksjonen S5V8V2 hadde to store topper ved retensjonstid på 15.64 og 15.97 min.

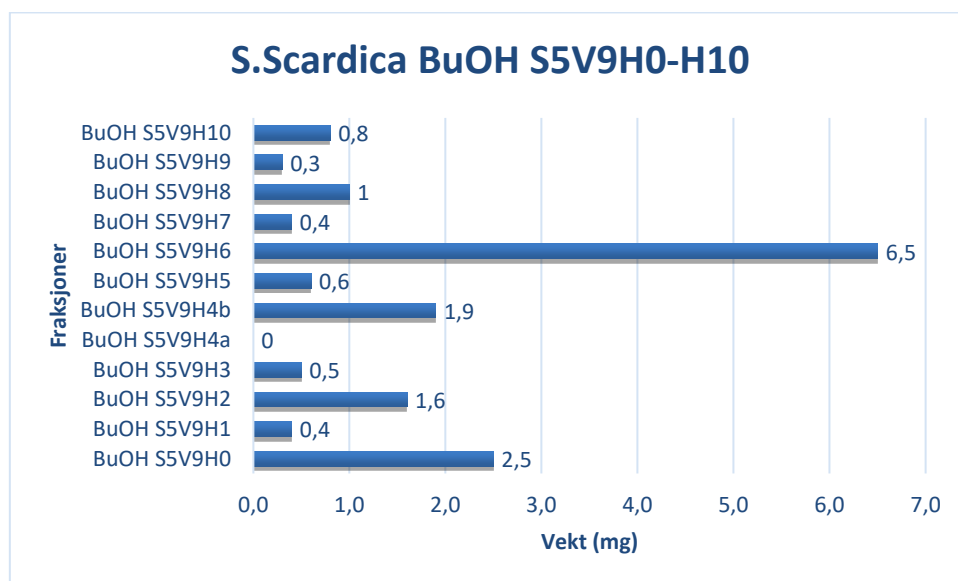
6.6.4 Videre arbeid

På bakgrunn av resultatene fra utbyttet, NMR-spekteret og HPLC-kromatogrammet ble fraksjonen S5V8V2 valgt ut for videre opprensing.

6.7 Separasjon av fraksjon BuOH S5V9

6.7.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen BuOH S5V9 ble videre rensert ved preparativ HPLC, metoden ble tilpasset på bakgrunn av analytisk HPLC. Det ble applisert 23.8 mg på kolonnen. På bakgrunn av analytisk HPLC ble innholdet i de oppsamlede fraksjonsrørene slått sammen til 12 fraksjoner. Det samlede utbyttet ble 16.5 mg (69.3%), figur 6.10. Tap av stoff kan skyldes at noe stoff ble igjen i sprøyten og filteret som ble brukt ved filtrering og applisering, eller at noe av stoff hadde irreversibel adsorpsjon til stasjonærfasen. Veieusikkerhet ved så små mengder kan også være mulig.



Figur 6.10: Vekt av utvalgte fraksjoner BuOH S5V9H0-S5V9H9

6.7.2 NMR-spektroskopi

^1H NMR og ^{13}C NMR spektrene for fraksjonen S5V9H6 (vedlegg, spektrum 14) tydet på en nokså ren substans og så ut til å ha signaler for forbindelsen acetylallosyl-glukosyl-4-*O*'-metylisoscutellarein (se mer i avsnitt over renstoffer 6.21.5). Fraksjon S5V9H8 så også relativt

ren ut og hadde spektra som kunne tyde på acetyllallosyl-acetylglukosyl-4-*O*'-metylhyloaetin (se mer i avsnitt over renstoffer 6.22.4, og vedlegg, spektrum 15).

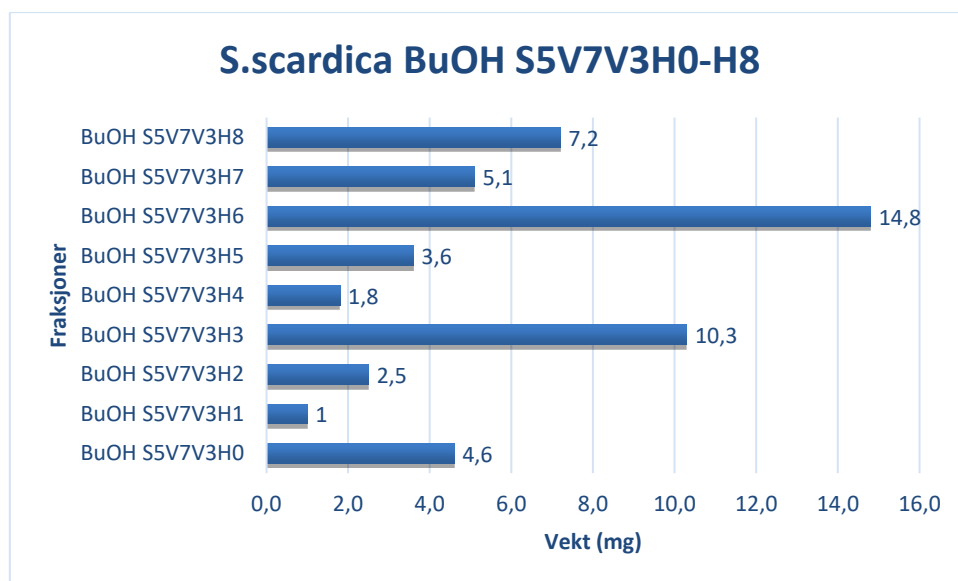
6.7.3 Analytisk HPLC

HPLC-kromatogrammet for fraksjonen S5V9H6 ga en topp ved retensjonstid 20.41 min som hadde et UV-spektrum med absorpsjonsmaksima ved 228, 278 og 307 nm. Fraksjonen S5V9H8 ga også en høy topp ved retensjonstid 20.95 min med absorpsjonsmaksima ved 256, 276 og 341 nm.

6.8 Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V3

6.8.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen BuOH S5V7V3 ble videre rensert ved preparativ HPLC, metoden ble tilpasset på bakgrunn av tidligere analytisk HPLC-kromatogram. Det ble applisert 40 mg på kolonnen. Innholdet i kolonnerørene ble slått sammen til 9 fraksjoner etter analytisk HPLC. Samlet utbytte ble 50.9 mg (125.5 %). Utbyttet ble over 100 %, det kan komme av veifeil ved veiing av små mengder og tomkolbene, eller ikke godt nok avdamping av løsemidlet (se vedlegg; Flytskjema 6 for fraksjonering av BuOH S5V7V3).



Figur 6.11: Vekt av fraksjoner BuOH S5V7V3H0-S5V7V3H8

6.8.2 NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret for fraksjonen S5V7V3H3 (vedlegg, spektrum 10) så ut til å inneholde et hypolaetinderivat, mens fraksjonen H6 så ut til å være et isoscutellareinderivat.

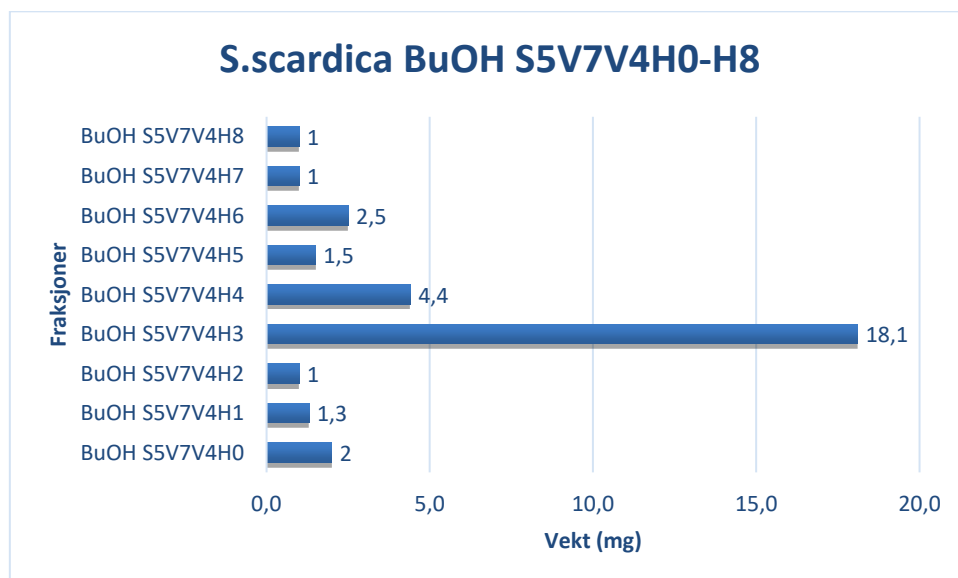
6.8.3 Videre arbeid

På bakgrunn av resultatene fra NMR ble fraksjonene S5V7V3H3 og S5V7V3H6 valgt ut for videre opprensing.

6.9 Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V4

6.9.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen BuOH S5V7V4 ble videre rensert ved preparativ HPLC, og det ble applisert 64 mg av fraksjonen på kolonnen. Innholdet i kolonnerørene ble slått sammen til 9 fraksjoner etter analytisk HPLC. Samlet utbytte ble 32,8 mg (51 %), figur 6.12 (se vedlegg; Flytskjema 7 for fraksjonering av BuOH S5V7V4).



Figur 6.12: Vekt av fraksjoner BuOH S5V7V4H0-S5V7V4H8

6.9.2 NMR-spektroskopi

^1H NMR-spekteret til fraksjonen BuOH S5V7V4H3 så ut til å inneholde flavonoider. Aromatprotoner, karbohydratprotoner og signaler fra acetylgrupper var fremtredende.

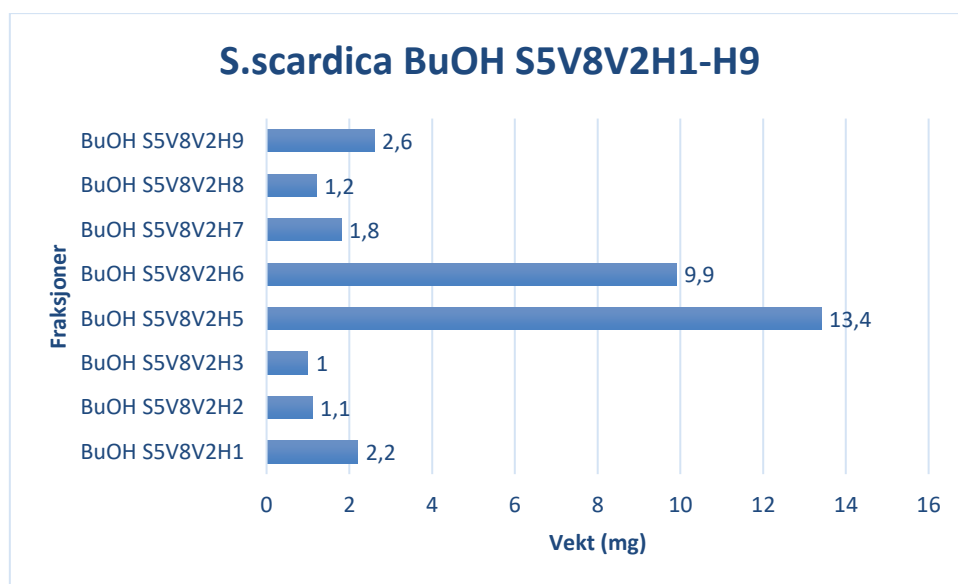
6.9.3 Videre arbeid

På bakgrunn av vekt av fraksjoner og NMR-spekteret ble fraksjonen S5V7V4H3 valgt ut for videre opprensing.

6.10 Separasjon av fraksjonen BuOH S5V8V2

6.10.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen BuOH S5V8V2 ble videre rensert ved preparativ HPLC. Det ble applisert 63 mg av fraksjonen på kolonnen. Innholdet i kolonnerørene ble slått sammen til 9 fraksjoner etter analytisk HPLC. Samlet utbytte ble 33.2 mg (53 %), figur 6.13.



Figur 6.13: Vekt av fraksjoner BuOH S5V8V2H1-S5V8V2H9

6.10.2 NMR-spektroskopi

^1H NMR og ^{13}C NMR spektrene for fraksjonen S5V8V2H5 (vedlegg, spektrum 12) tydet på en nokså ren substans og så ut til å ha signaler for forbindelsen acetylallosyl-glukosyl-isoscutellarein (se mer i avsnitt over renstoffer, kapittel 6.21.4).

Fraksjonen BuOH S5V8V2H2 så ut til å inneholde litt uren substans og hadde signaler for forbindelsen allosyl-acetylglukosyl-isoscutellarein (se vedlegg spektrum 18 og kapittel over 6.22.6). Mens fraksjonen H3 hadde uren forbindelse actylallosyl-glukosyl-hypolaetin. Fraksjonene veide knapt ett mg, derfor ble de ikke fulgt opp videre. Fraksjonen S5V8V2H6 derimot så ut til å inneholde signaler for hypolaetin-derivater.

6.10.3 Analytisk HPLC

HPLC-kromatogrammet for fraksjonen S5V8V2H5 ga en topp ved retensjonstid 18.40 min som hadde et UV-spektrum med absorpsjonsmaksima ved 278, 306 og 327 nm.

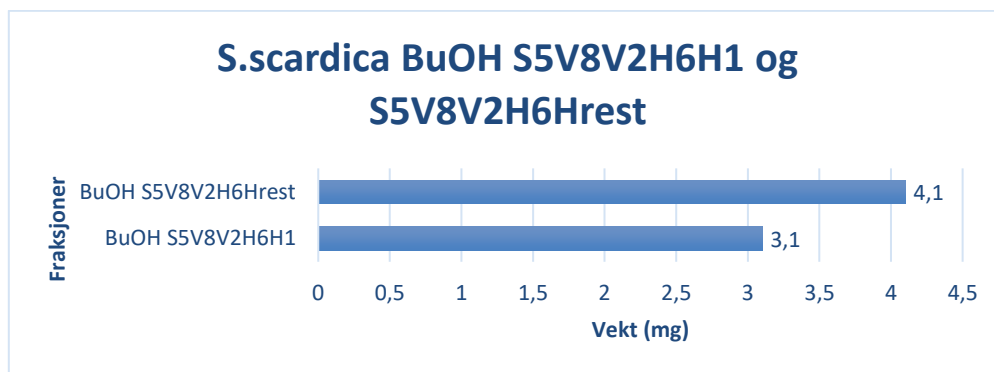
6.10.4 Videre arbeid

Ut fra NMR-spektrene og HPLC-kromatogrammer så det ut til at BuOH S5V8V2H5 var en relativt ren forbindelse, mens fraksjonen S5V8V2H6 inneholdt et annet flavonoid/stoff og trengte mer opprensing.

6.11 Separasjon av fraksjonen BuOH S5V8V2H6

6.11.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen BuOH S5V8V2H6 ble videre rensert ved preparativ HPLC. Det ble applisert 9.9 mg av fraksjonen på kolonnen. Innholdet i kolonnerørene ble slått sammen til 2 fraksjoner etter analytisk HPLC. Samlet utbytte ble 7.2 mg (72.7 %), figur 6.14.



Figur 6.14: Vekt av fraksjoner BuOH S5V8V2H6H1-S5V8V2H6H1

6.11.2 NMR-spektroskopi

^1H NMR og ^{13}C NMR spektrene for fraksjonen S5V8V2H6H1 (vedlegg, spektrum 13) tydet på en nokså ren substans og så ut til å ha signaler for forbindelsen acetylallosyl-glukosyl-4'-O-metylhypolaetin (se mer i avsnitt over renstoffer, kapittel 6.22.2).

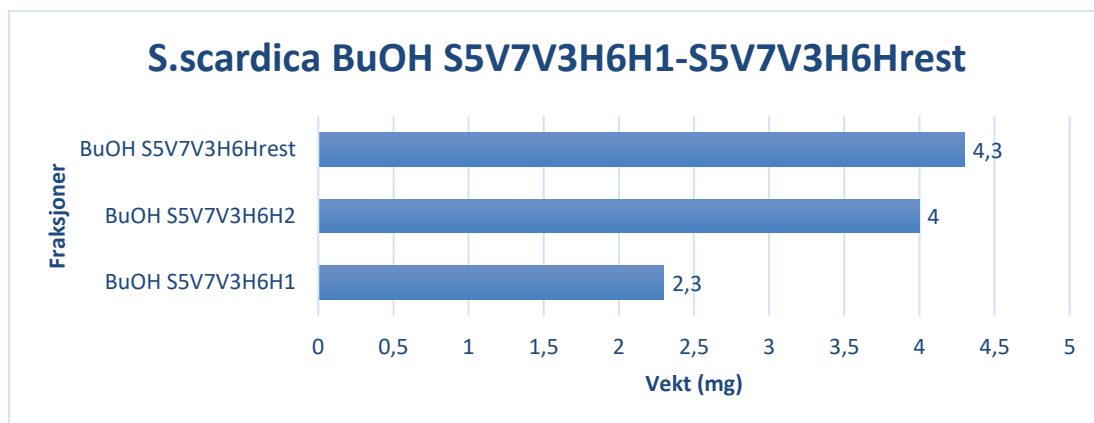
6.11.3 Analytisk HPLC

HPLC-kromatogrammet for fraksjonen S5V8V2H6H1 ga en topp ved retensjonstid 18.61 min som hadde et UV-spektrum med absorpsjonsmaksima ved 227, 276 og 341 nm.

6.12 Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V3H6

6.12.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen BuOH S5V7V3H6 ble videre rensert ved preparativ HPLC. Det ble applisert 14 mg av fraksjonen på kolonnen. Innholdet i kolonnerørene ble slått sammen til 3 fraksjoner etter analytisk HPLC. Samlet utbytte ble 10.6 mg (75.7 %), figur 6.15.



Figur 6.15: Vekt av fraksjoner BuOH S5V7V3H6H1-S5V7V3H6Hrest

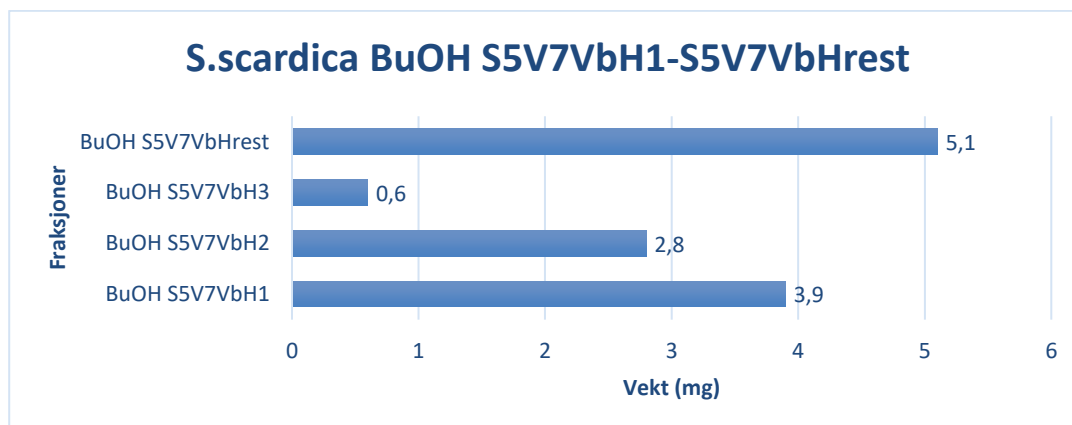
6.12.2 NMR-spektroskopi

^1H NMR og ^{13}C NMR spektrene for fraksjonen S5V7V3H6H2 tydet på en nokså ren substans og så ut til å ha signaler for forbindelsen acetylallosyl-glukosyl-isoscutellarein som også var funnet i fraksjonen S5V8V2H5.

6.13 Separasjon av fraksjonen BuOH S5V7V3H3 og BuOH S5V7V4H3

6.13.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen BuOH S5V7V3H3 og S5V7V4H3 ble ved feiltagelse slått sammen, og videre separeringen ble gjort ved hjelp av preparativ HPLC. Det ble applisert 17 mg av fraksjonen på kolonnen. Innholdet i kolonnerørene ble slått sammen til 4 fraksjoner etter analytisk HPLC. Samlet utbytte ble 12,4 mg (72.9 %), figur 6.16 (se vedlegg; Flytskjema 8 for fraksjonering av BuOH S5V7V3H3+V4H3).



Figur 6.16: Vekt av fraksjoner BuOH S5V7VbH1-S5V7VbHrest

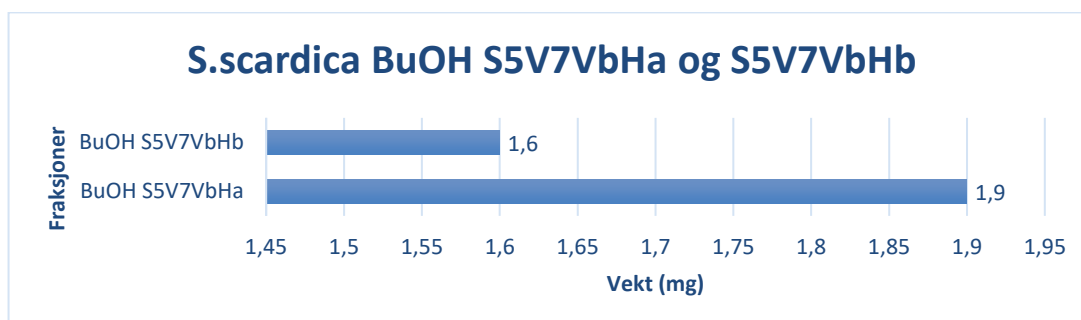
6.13.2 NMR-spektroskopi

Fraksjonen BuOH S5V7VbH1 ble analysert med ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HSQC. Fraksjonen inneholdt en nokså ren forbindelse, acetylallosyl-glukosyl-isoscutellarein, som to tidligere fraksjoner (S5V7V3H6H2 og S5V8V2H5).

6.14 Videre rensing av BuOH S5V7VbH2 og BuOH S5V7VbH3

6.14.1 TLC

Fraksjonene S5V7VbH2 og S5V7VbH3 ble forsøkt videre opprenset med preparativ TLC der det ble brukt RP-plate, så det mest polare stoffet hadde høyest R_f -verdi (hadde trukket seg lengre opp på platen). To fraksjoner ble skrapet av platen med utbytte på tilsammen 3.5 mg (103 %), figur 6.17.



Figur 6.17: Vekt av fraksjoner BuOH S5V7VbHa-S5V7VbHb

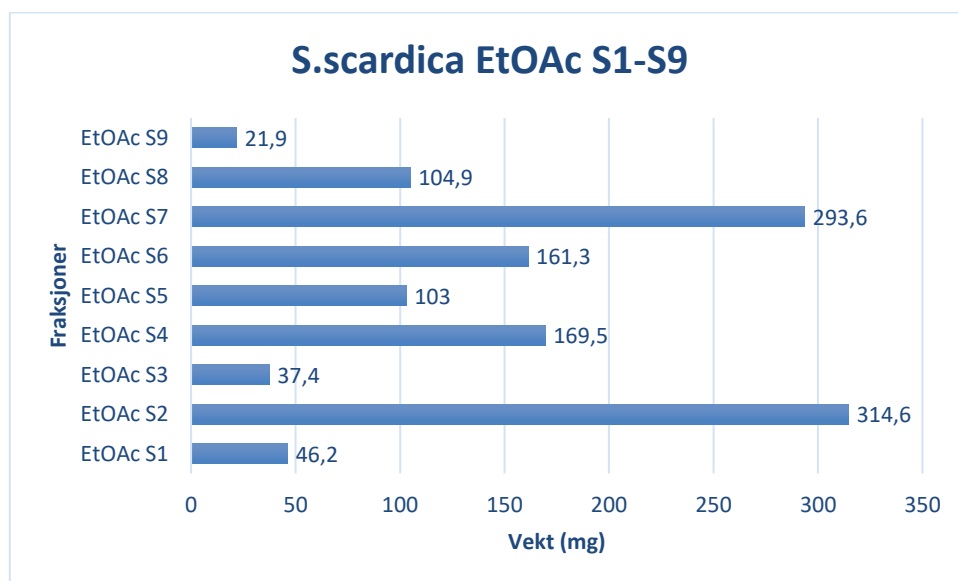
6.14.2 NMR-spektroskopi

De to fraksjonene (S5V7VbHa og S5V7VbHb) ble analysert med ^1H -NMR, ^{13}C -NMR og HSQC. De så fortsatt ut til å inneholde blanding av to forskjellige forbindelser. Utbyttet av fraksjonene var lite for videre rensing.

6.15 Fraksjonering av EtOAc-fasen

6.15.1 Sephadex LH-20 kolonne separering

Ved videre fraksjonering av EtOAc-fasen ble Sephadex LH-20 kolonne benyttet, der det ble applisert 1.4 g. Under elueringen ble det dannet en tungtløselig topplag som ble tatt ut før tilsetning av 70 % vandig aceton. Det ble samlet 16 kolonnefraksjoner og det tungt løselige topplaget. På bakgrunnen av TLC-resultatene ble de slått sammen til 9 fraksjoner (S1-S9), figur 6.18. Det samlede utbyttet var 1.25 g (89.3%) (se vedlegg; Flytskjema 9 for fraksjonering av EtOAc og videre arbeid).



Figur 6.18: Vekt av fraksjoner EtOAc S1-S9

6.15.2 NMR-spektroskopi

^1H -NMR –spektret av fraksjonen EtOAc S9 (vedlegg, spektrum 16), som var det tungt løselige topplaget, så ut til å inneholde flere aromatprotoner og sukkerproton signaler, mens bare et alifatisk protonsignal ved 1.28 ppm. Dette signalet antas å være en forurensning (langkjedet

CH₂CH₂-kjede i fett). Signalene stemte godt med tidligere data over echinaticin, som er tidligere rapportert i planten [13]. ¹H og ¹³C-NMR-spekteret til fraksjonen stemte også godt overens med litteraturdata [67].

¹H-NMR -spektrene for fraksjonene S4 og S7 så ut til å inneholde signaler fra flavonoider. De hadde en del aromat-, karbohydrat-, og lite alifatproton signaler.

6.15.3 Analytisk HPLC

HPLC-kromatogrammet for fraksjonen EtOAc S9 ga en topp ved retensjonstid 20.58 min som hadde et UV-spektrum med absorpsjonsmaksima ved 237, 269 og 319 nm.

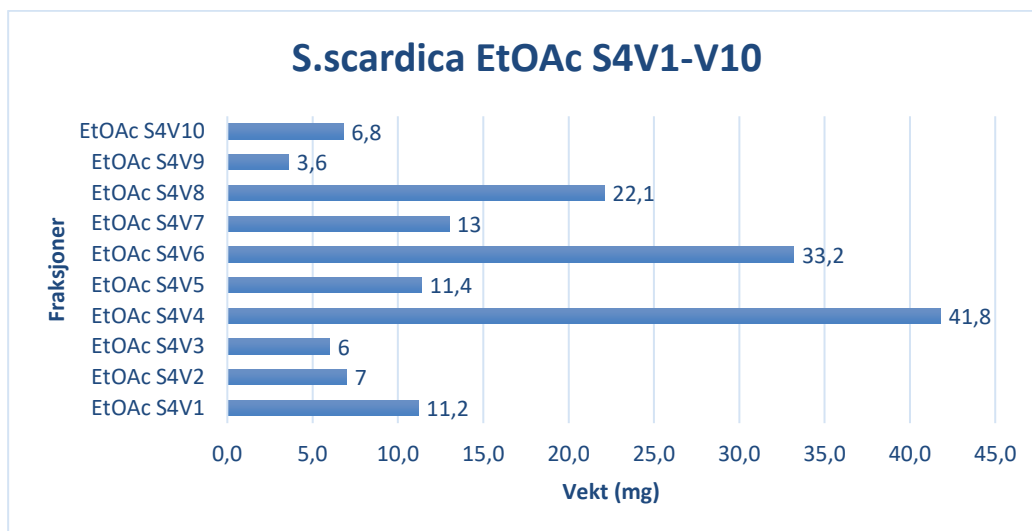
6.15.4 Videre arbeid

Ut fra NMR-spektrene og HPLC-kromatogrammer så det ut til at fraksjonen EtOAc S9 var en relativt ren forbindelse, mens fraksjonene S4 og S7 inneholdt andre flavonoider/stoffer og trengte mer opprensing. De andre fraksjonene var mindre og så ut til å ha en komplisert sammensetning.

6.16 Separasjon av fraksjon EtOAc S4

6.16.1 Versaflash kolonneseparasjon

Fraksjonen EtOAc S4 ble videre opprenset med Versaflash kolonneseparering, der det ble applisert 169 mg på kolonnen. Det ble totalt samlet 21 kolonnefraksjoner som ble slått sammen til 10 fraksjoner (S4V1-S4V10) på bakgrunn av TLC-resultater. Det samlede utbyttet ble 156.1 mg (94.1%) (se vedlegg; Flytskjema 10 for fraksjonering av EtOAc S4).



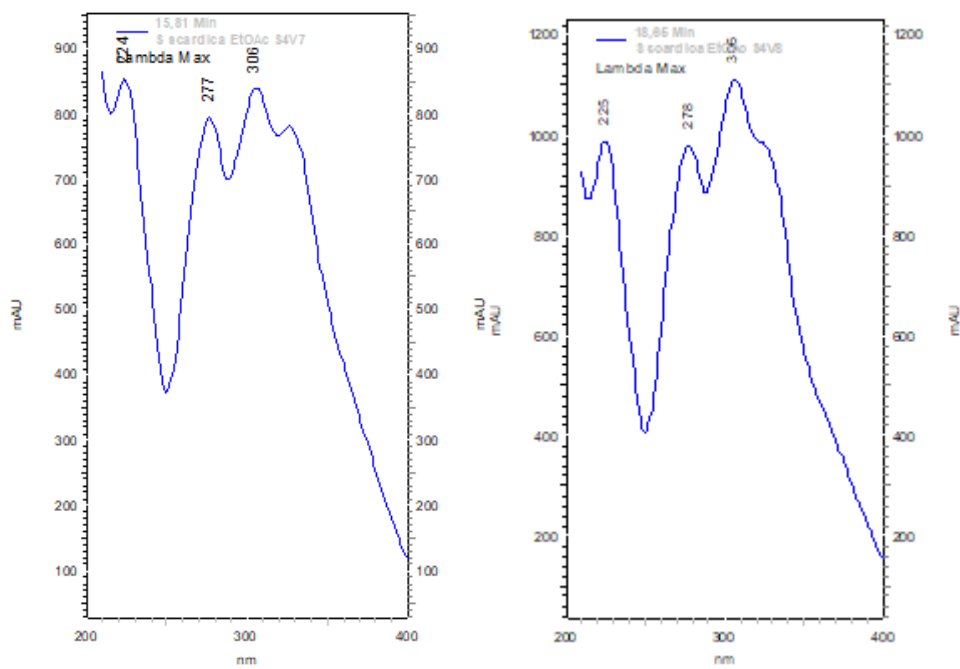
Figur 6.19: Vekt av utvalgte fraksjoner EtOAc S4V1-S4V10

6.16.2 NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret for fraksjonen S4 inneholdt flere aromat- og karbohydratsignaler, i tillegg til en dublett ved ca. 1.10 ppm med $J=6.1$ Hz. Mens fraksjonene S7 og S8 inneholdt mindre signaler ved aromat og karbohydratområder.

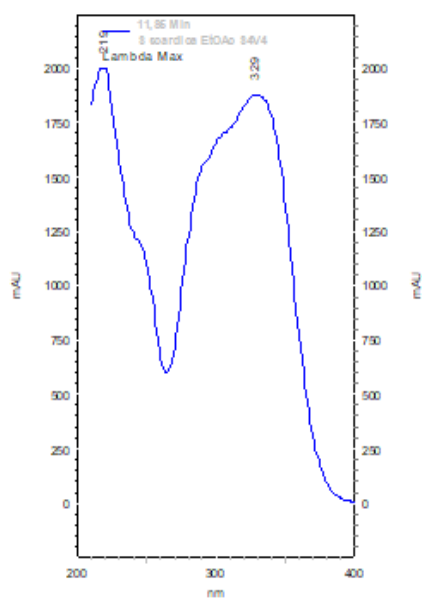
6.16.3 Analytisk HPLC

HPLC-kromatogrammet for fraksjon S4V7 viste flere topper, den høyeste toppen med retensjonstid 15.81 min hadde et UV-spektrum med absorpsjonstopper ved 224, 277 og 306 nm (Figur 6.20). EtOAc S4V8 ga to høye topper med retensjonstider 17.42 og 18.63 min som hadde et UV-spektrum med absorpsjonsmaksima ved henholdsvis 223, 299 og 310 nm og 225, 278 og 306 nm (Figur 6.20).



Figur 6.20: UV-spektra av fraksjon EtOAc S4V7 og S4V8

HPLC kromatogrammet til S4V4 viste endominerende topp med retensjonstid 11.86 min som ga et UV-spektrum med absorpsjonsmaksima ved 218 og 329 (Figur 6.21).



Figur 6.21: UV-spektra av fraksjon EtOAc S4V4

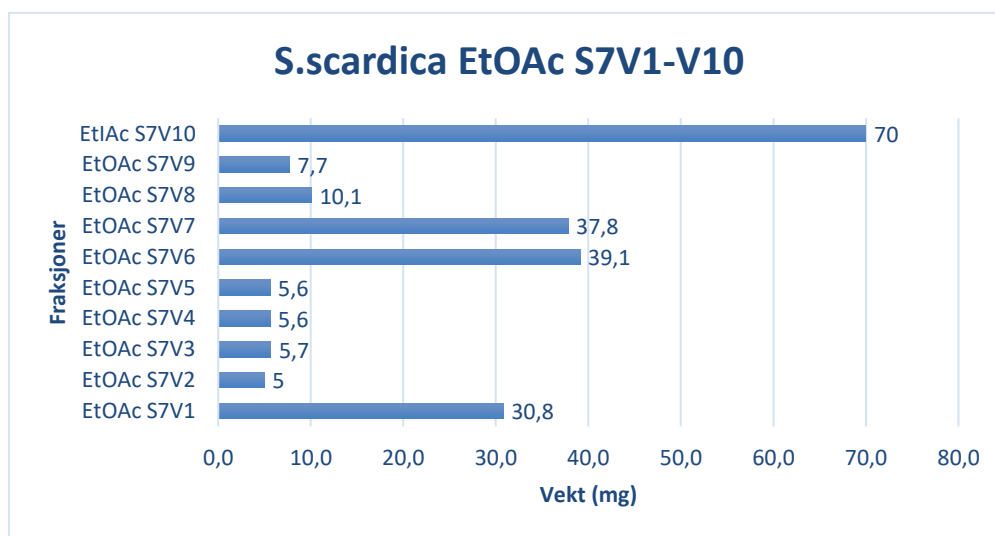
6.16.4 Videre arbeid

På bakgrunn av fraksjonsvekter, HPLC-kromatogram og NMR-spekteret ble fraksjonene S4, S7 og S8 valgt ut for videre opprensing.

6.17 Separasjon av fraksjon EtOAc S7

6.17.1 Versaflash kolonne separasjon

Fraksjonen EtOAc S7 ble videre opprenset med Versaflash kolonne separering, der det ble applisert 290 mg på kolonnen. Det ble totalt samlet 34 kolonnefraksjoner som ble slått sammen til 10 fraksjoner (S7V1-S7V10) på bakgrunn av TLC-resultater. Det samlede utbyttet ble 217,4 mg (74.9%).



Figur 6.22: Vekt av fraksjoner EtOAc S7V1-S7V10

6.17.2 NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spekteret til S7V6, S7V7 og S7V10 hadde noen av de samme signaler som EtOAc S9 fraksjonen, og så ut til å inneholde echinaticin.

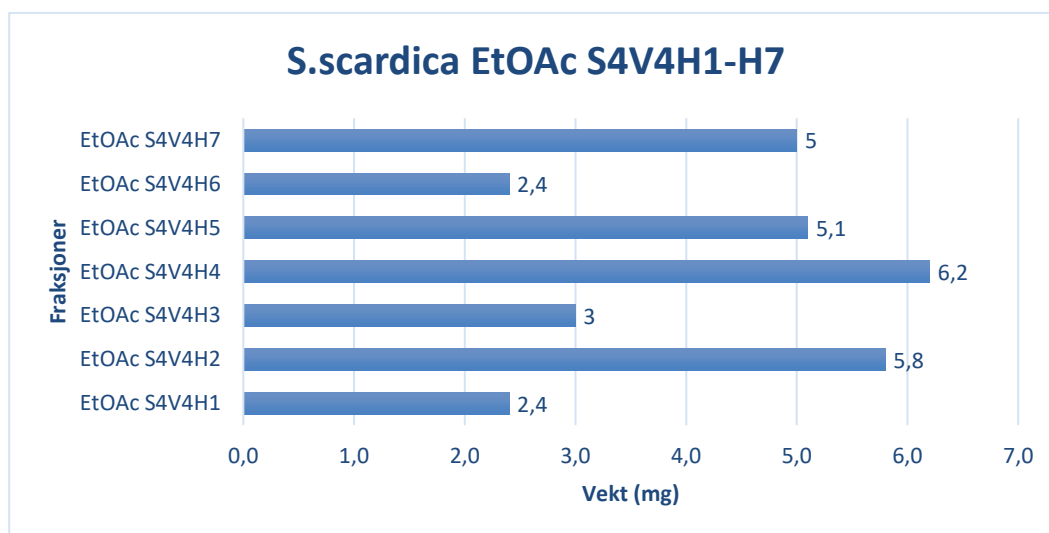
6.17.3 Videre arbeid

Ut fra NMR-spektrene og utbyttet så det ut til at fraksjonen EtOAc S7V7 hadde litt mindre urene forbindelser. Denne fraksjonen ble tatt ut til videre rensing.

6.18 Separasjon av fraksjonen EtOAc S4V4

6.18.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen EtOAc S4V4 ble videre rensert ved preparativ HPLC. Det ble applisert 42 mg av fraksjonen på kolonnen. Innholdet i kolonnerørene ble slått sammen til 7 fraksjoner etter analytisk HPLC. Samlet utbytte ble 29,9 mg (71.2 %) (se vedlegg; Flytskjema 11 for fraksjonering av EtOAc S4V4).



Figur 6.23: Vekt av fraksjoner EtOAc S4V4H1-S4V4H7

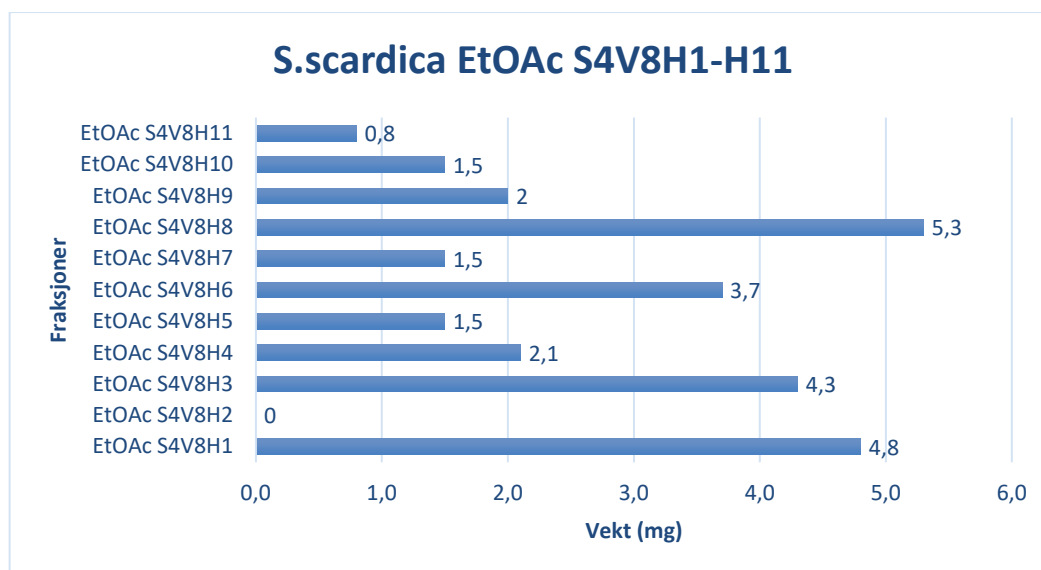
6.18.2 NMR-spektroskopi

^1H NMR og ^{13}C NMR spektrene for fraksjonen EtOAc S4V4H4 (vedlegg, spektrum 17) tydet på en nokså ren substans og så ut til å ha signaler for forbindelsen leucoseptoside A (se mer i avsnitt over renstoffer, kapittel 6.22.3).

6.19 Separasjon av fraksjonen EtOAc S4V8

6.19.1 Preparativ HPLC

Fraksjonen EtOAc S4V8 ble videre rensert ved preparativ HPLC. Det ble applisert 22 mg av fraksjonen på kolonnen. Innholdet i kolonnerørene ble slått sammen til 11 fraksjoner etter analytisk HPLC. Samlede utbyttet ble 27.5 mg (125 %).



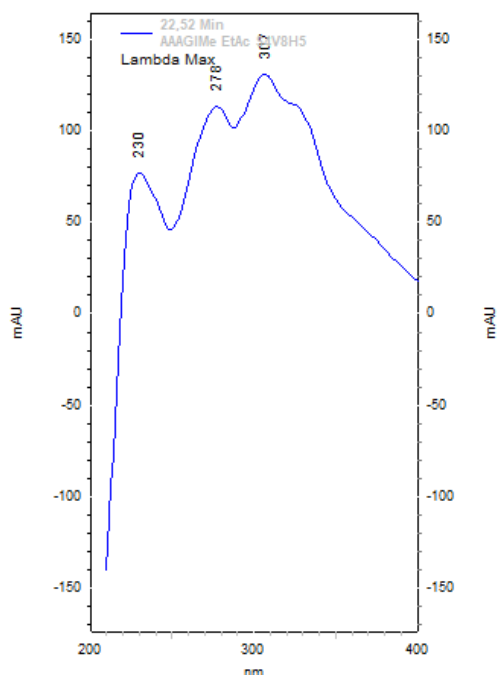
Figur 6.24: Vekt av fraksjoner EtOAc S4V8H1-S4V8H11

6.19.2 NMR-spektroskopi

Fraksjonene EtOAc S4V8H3, H5, H8, H9 og H10 ble analysert med ^1H -NMR. Fraksjonen H8 tydet på en nokså ren forbindelse, acetylallosyl-glukosyl-metylisoscutellarein, som tidligere var funnet i fraksjon BuOH S5V9H6, mens fraksjon H3 var litt uren. Ut fra spektrene for fraksjonene H5, H9 og H10 så de ut til å ha forbindelsen acetylallosyl-acetylglukosyl-4'-O-metylisoscutellarein, som tidligere var funnet i fraksjon BuOH S5V7V3H6H1. Spektrene til H5 og H10 så ut til å være ganske rene, mens fraksjonene H9 var litt uren (Spektra av H5: vedlegg, spektrum 11).

6.19.3 Analytisk HPLC

HPLC-kromatogrammet for fraksjonen EtOAc S4V8H5 ga en høy topp med retensjonstid 22.49 min som hadde et UV-spektrum med absorpsjonsmaksima ved 230, 278 og 307 nm (figur 6.25).

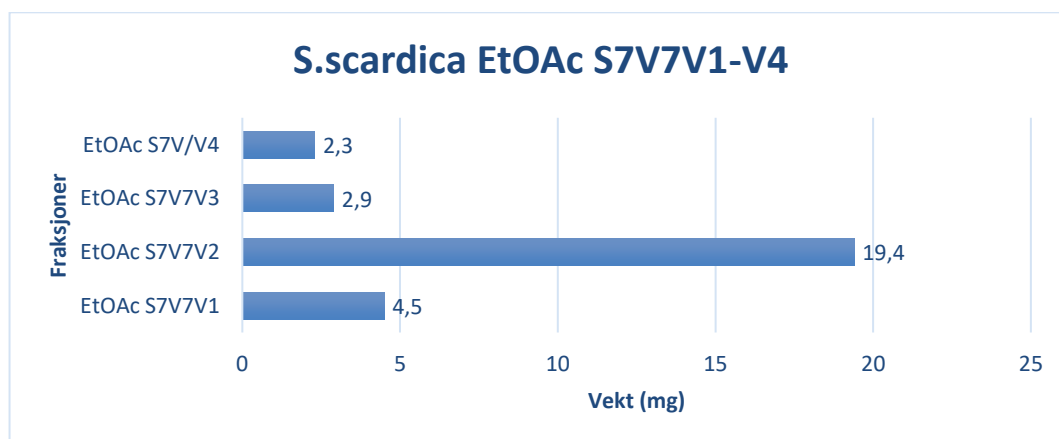


Figur 6.25: UV-spektrum av fraksjon EtOAc S4V8H5

6.20 Separasjon av EtOAc S7V7

6.20.1 Versaflash kolonne separasjon

Fraksjonen EtOAc S7V7 ble videre opprenset med Versaflash kolonne separering, der det ble applisert 35 mg på kolonnen. Det ble totalt samlet 8 kolonnefraksjoner som ble slått sammen til 4 fraksjoner (S7V7V1-S7V7V4) på bakgrunn av TLC-resultater. Det samlede utbyttet ble 29,1 mg (83.1%).



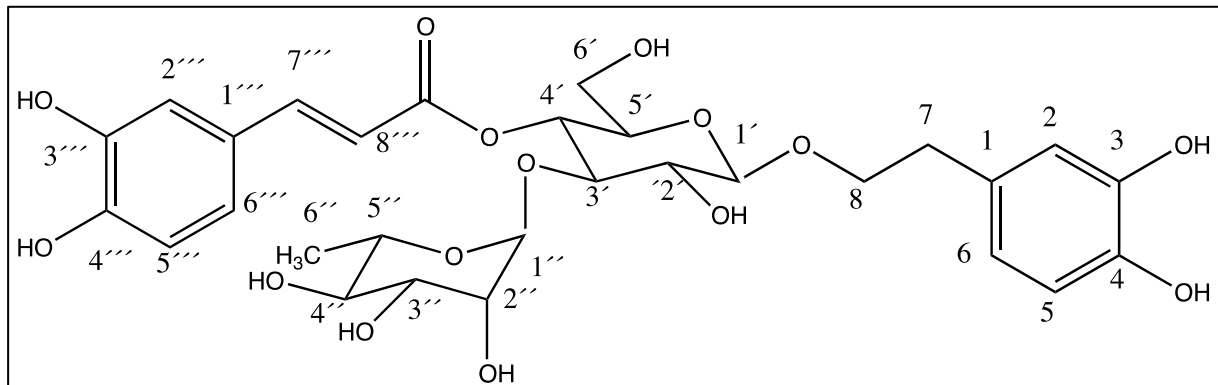
Figur 6.26: Vekt av fraksjoner EtOAc S7V7V1-S7V7V4

6.20.2 NMR-spektroskopi

^1H -NMR-spekteret til S7V7V2 tydet på flavonoid, med få alifatiske signaler, men flere signaler i aromat- og sukkerområdet. Fraksjonen så til å være fortsatt en blanding av flere flavonoider.

6.21 Renstoffer

6.21.1 VERBASCOSID



Figur 6.27: Verbascosid (β -D-Glucopyranoside, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl 3-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)-, 4-[(2E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoate]

Verbascosid, også kalt acteosid, er et kaffeoyl-fenyletanoid glukosid, som er fenyletanoidet hydroxytyrosol som er glykosidisk bundet, fenylpropanoidet kaffesyre som er esterbundet, og en sukkerdel (α -L-rhamnopyranosyl-(1->3)- β -D-glukopyranose). Fraksjonen i *S. scardica* som innehold mest og renest verbascosid var BuOH S5V4, ca. 500 mg. I følge PubChem databasen har verbascosid immunmodulerende, anti-inflammatoriske, cytotoxiske og antioksidant effekter. I tillegg har den blitt testet for ulike andre biologiske aktiviteter; i 51 av 561 tester har den vist aktivitet ifølge PubChem [74]. Det har også blitt gjort en del studier på verbascosids effekt på Alzheimers sykdom. Den har vist å ha en beskyttende effekt mot β -amyloid-indusert celledskade [75] og hemming av β -amyloid aggregering [76]. Det nyeste studiet har vist at den beskyttende effekten av verbascosid mot kognitiv dysfunksjon kan være på grunn av blokkering av amyloid-avleiring ved å hindre oligomerisering av amyloid og motvirke amyloid cytotoxicitet [77]

Verbascosid er funnet flere ganger tidligere i *S. scardica* [11, 14, 73].

NMR data og tolkning for fraksjon *S. scardica* S5V4 (vedlegg, spektrum 9 - 400/100 MHz, CD₃OD):

Posisjon	δ_H (J i Hz)	δ_C
1	---	131.5
2	6.67 (1H, overlappet)	116.3
3	---	146.1
4	---	144.7
5	6.68 (1H, overlappet)	117.2
6	6.57 (1H, dd, J= 8.2,1.8)	121.3
7	2.79 (2H, m)	36.6
8	4.05 (1H,m), 3.73 (1H,m)	72.3
1'	4.38 (1H, d, J=7.8)	104.2
2'	3.40 (1H,dd, J=8.5,8.5)	76.2
3'	3.82 (1H,dd, J=9.2,9.2)	81.7
4'	4.93 (1H,dd, J=9.2,9.2)	70.6
5'	3.54 (1H, overlappet)	76.0
6'	3.54 (1H, overlappet), 3.62 (1H, overlappet)	62.4
1''	---	127.7
2''	7.06 (1H, d, J=2.0)	115.3
3''	---	146.8
4''	---	149.8
5''	6.78 (1H, d, J=8.2)	116.6
6''	6.96 (1H, dd, J=8.2,1.9)	123.3
7''	7.60 (1H, d, J=15.9)	148.0
8''	6.28 (1H, d, J=15.9)	114.7
9''	---	168.3
1'''	5.19 (1H, d, J=1.7)	103.1
2'''	3.93 (1H, dd, J=1.7,3.3)	72.4
3'''	3.59 (1H, overlappet)	72.1
4'''	3.30 (1H, overlappet)	73.8
5'''	3.57 (1H, overlappet)	70.5
6'''	1.10 (3H, d, J=6.2)	18.5

Tilordning av signaler er foretatt ut fra ¹H, ¹³C (APT), COSY, HSQC og HMBC spektra.

Litteraturdata (i CD₃OD) [78, 79]:

Posisjon	δ_H (J i Hz) [78]	δ_C [78]	δ_H (J i Hz) [79]	δ_C [79]
1	---	131.4	---	131.5
2	6.96 (dd, J=8.1, 1.8)	116.3	6.70 (1H, d, J=2.0)	117.1
3	---	146.1	---	146.1
4	---	144.6	---	144.7
5	6.67 (d, J=8.0)	117.1	6.68 (1H, d, J=8.1)	116.3
6	6.56 (dd, J= 8.0, 2.0)	121.2		121.3
7	2.79 (d, J=7.4)	36.6	2.79 (2H, m)	36.6
8		72.0	4.04,3.73 (2H, m)	72.2
1'	4.387(d, J=7.8)	104.2	4.38 (1H, d, J=7.9)	104.2
2'		76.2		76
3'		81.6		81.6
4'		70.6		70.6
5'		76.0		76.2
6'		62.3		62.4
1''		127.6		127.7
2''	7.05 (d, J=1.8)	115.2	7.06 (1H, d, J=2.0)	115.3
3''	---	146.8	---	146.8
4''	---	149.8	---	149.8
5''	6.77 (d, J=8.0)	116.5	6.78 (1H, d, J=8.2)	116.5
6''		123.2	6.96 (1H, dd, J=2.0, 8.2)	123.2
7''	7.59 (d, J=15.9)	148.0	7.59 (1H, d, J=15.9)	147.9
8''	6.27 (d, J=15.9)	114.7	6.57 (1H, d, J=15.9) TRYKKFEIL?	114.8
9''	---	168.3	---	168.3
1'''	5.18 (d, J=1.3)	103.0	5.19 (1H, d, J=1.6)	103
2'''		72.4		72.4
3'''		72.3		72.1
4'''		73.8		73.8
5'''		70.4		70.4
6'''	1.09 (d, J=6.1)	18.5	1.09 (3H,s)	18.4

Begge litteraturreferansene ser ut til å inneholde en del feil, og mangler tilordninger av protonsignaler i karbohydratdelen.

6.21.1.1 Måling av radikal scavenger, og enzymhemmingseffekter

AChE-hemming av verbascosid

Det ble testet for AChE-hemming av verbascosid (tabell 6.14). Tacrin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 75 \pm 2$ nM eller 15 ± 0.4 ng/ml).

Tabell 6.14 AChE hemming av verbascosid

Konsentrasjon i brønnen ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
100	-12.1	4.4	>100
50	-12.4	7.6	
25	-3.8	7.7	

Verdiene i tabellen 6.14 viser at verbascosid ikke hadde hemmingsaktivitet av AChE, selv ved høyeste målte konsentrasjon.

Det har blitt gjort en del studier på AChE-hemming, der det var store variasjoner mellom resultatene. Noen av resultatene i tabellen 6.15 stemmer med mine data, at verbascosid var inaktiv ved konsentrasjon på $100 \mu\text{g/ml}$ ($160 \mu\text{M}$).

Tabell 6.15 AChE hemming av verbascosid – litteraturdata

Aktivitet	År
$>320 \mu\text{M}$ ($47.9 \% \pm 1.13$)	2011 [80]
$303.7 \mu\text{M}$, kompetitiv hemming	2013 [81]
$197 \pm 1.97 \mu\text{M}$	2013 [82]
Inaktiv	2012 [83]
inaktiv	2016 [84]

BuChE-hemming av verbascosid

Verbascosid ble testet for BuChE-hemming (tabell 6.16). Tacrin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 69 \pm 5$ nM eller 14 ± 1 ng/ml).

Tabell 6.16 BuChE hemming av verbascosid

Konsentrasjon i brønnen (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
100	-13,5	9,3	>100
50	-4,3	15,2	
25	-7,6	13,8	
12.5	-6,3	7,2	

Tabellen 6.16 viser at i likhet med råekstraktet ga verbascosid ikke noe hemmingseffekt av BuChE, selv ved høyeste målte konsentrasjon.

Resultatene fra de publiserte BuChE-hemmings studiene som har blitt gjort på verbascosid har vist store variasjoner. Noen av resultatene samsvarte med mine data.

Tabell 6.17 BuChE hemming av verbascosid - litteraturdata

Aktivitet	År
>320 µM (39.19 % ±0.25)	2011 [80]
169 µM	2013 [81]
Inaktiv	2012 [83]
inaktiv	2016 [84]

15-LO-hemming av verbascosid

Verbascosid ble testet for 15-LO-hemming (Tabell 6.18). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC₅₀ =27±1 µg/ml eller 89 ±3.3 µM).

Tabell 6.18 15-LO hemming av verbascosid

Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
166.7	15.6	8.1	>166.7
41.7	2.0	11.5	
20.8	2.9	3.6	

Verdiene på tabellen 6.18 viser at verbascosid hadde en IC₅₀ over 166.7 µg/ml (>266.9 µM), svært lav hemmingseffekt selv ved høyeste konsentrasjon.

Det har blitt gjort noen få studier på 15-LO hemming av verbascosid. Resultatene varierer sterkt, som vist i tabell 6.19.

Tabell 6.19: 15-LO hemming av verbascosid – litteraturdata

Aktivitet	År
IC ₅₀ 117 µM	1999 [85]
IC ₅₀ 1.76±0.25 µM	2015 [86]
94.0±3.6 % hemming ved 500 µM	2016 [87]

Mine data stemte ikke særlig godt med litteraturen. Ettersom det er sterk variasjon mellom alle disse resultatene inkludert mine, kan det ikke konkluderes om aktiviteten av verbascosid på 15-LO-hemming. Ulikheten i resultater kan kanskje skyldes ulikheter i utførelsen av assayet.

XO-hemming av verbascosid

Verbascosid ble testet for XO-hemming (tabell 6.20). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (5.5±1.1 µg/ml eller 18.1 ± 3.6 µM).

Tabell 6.20: XO hemming av verbascosid

Konsentrasjon mg/ml	Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
10	166.7	-9.1	4.6	>166.7
5	83.3	-13.7	0.3	

Tabellen 6.20 viser at verbascosid er inaktiv ved konsentrasjon 166.7 µg/ml.

Det har blitt gjort endel studier på hemming av xanthin oksidase (XO) av verbascosid der det er store variasjoner mellom resultatene, fra ingen aktivitet til IC₅₀ på 20 µM. Tabellen 6.21 viser studier som har blitt gjort:

Tabell 6.21: XO hemming av verbascosid – litteraturdata

Aktivitet	År
Ingen aktivitet ved 200 µM	1996 [88]
IC ₅₀ 20 µM	2006 [89]
IC ₅₀ 447±5.8 µM	2007 [90]
IC ₅₀ 230 µM/kg mus	2008 [91]
Ingen aktivitet	2011 [92]
IC ₅₀ 115.1± 0.3 µM	2015 [93]
Ingen aktivitet ved 200 µM/kg mus	2015 [94]
IC ₅₀ mellom 99.2 og 150.4 µM	2016 [95]

Noe av dette stemmer med mine data, at verbascosid har lite aktivitet på hemming av XO.

DPPH scavenging verbascosid

Det ble testet for DPPH radikalscavenging av verbascosid (tabell 6.22). Quercetin ble brukt som positiv kontroll.

Tabell 6.22: DPPH scavenging av verbascosid

Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
166.7	96.1	0.8	29.6±1.7
83.3	94.3	2	
41.7	67.8	4.7	
20.8	31.6	1.9	

Tabellen 6.22 viser at verbascosid har 50% scavengeraktivitet på DPPH ved en konsentrasjon på 29.6 $\mu\text{g/ml}$, tilsvarende 47 μM .

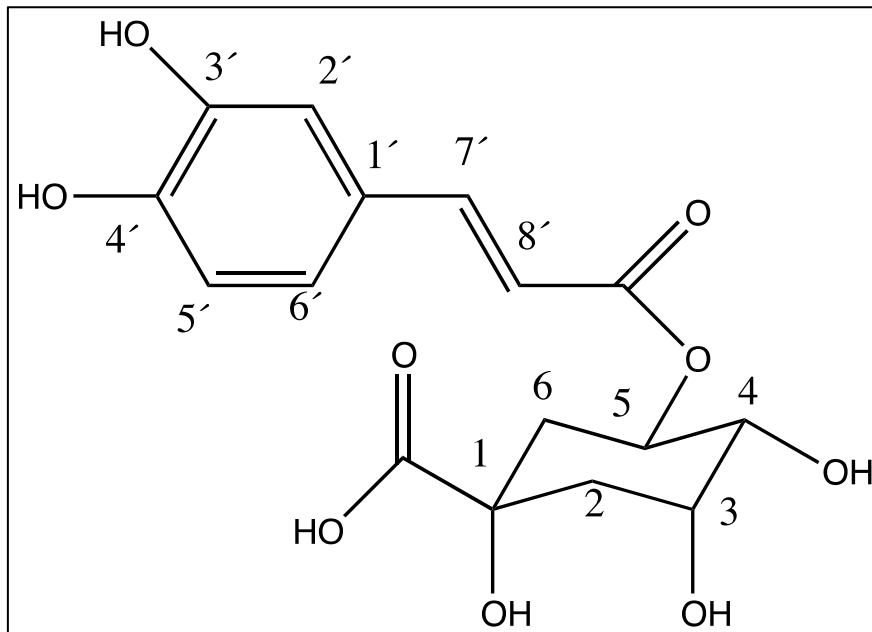
Det har blitt gjort mange studier på DPPH scavenger aktivitet av verbascosid der det har vist aktivitet. Tabellen 6.23 viser resultatene av noen studier som er gjort.

Tabell 6.23 DPPH scavenging av verbascosid – litteraturdata

Aktivitet	År
IC ₅₀ 19.89 $\mu\text{g/ml}$ (31.8 μM)	2009 [79]
17.12 ± 0.30 μM	2012 [96]
48 μM	2014 [97]

Mine data stemmer godt med noen av litteraturdata.

6.21.2 Klorogensyre



Figur 6.28: Klorogensyre (Cyclohexanecarboxylic acid, 3-[[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propen-1-yl]oxy]-1,4,5-trihydroxy-, (1S,3R,4R,5R)-)

Klorogensyre er en ester av kaffesyre og kinasyre. Klorogensyre er den viktigste fenoliske forbindelse i kaffe, og er ofte funnet i bladene og fruktene av dikotyledonøse (tofrøbladede) planter. Denne forbindelsen har vært lenge kjent som en antioksidant, og kan senke konsentrasjonen av glukose i blodet etter et måltid. Tidligere forskning har vist at kaffeholdige produkter kan bidra til å forhindre flere kroniske sykdommer, inkludert type 2 diabetes, Parkinsons sykdom og leversykdommer [98]. I *S.scardica* BuOH fraksjon S5V1 og S5V2 ble det funnet relativt ren klorogensyre. Ut fra NMR-spektrene og HLPC-kromatogrammene kunne det se ut til at klorogensyre fantes også i noen andre faser og fraksjoner.

Klorogensyre er flere ganger tidligere rapportert fra *S. scardica* [11, 73]

NMR data og tolkning for fraksjon *S. scardica* BuOH S5V1 (vedlegg, spektrum 8 - 400/100 MHz, CD₃OD):

Posisjon	δ_H (J i Hz)	δ_C
1	---	ikke observert
2	2.04-2.10 (2H, m)	39.1
3	4.18 (1H, d, J=3.8)	73.5
4	3.74 (1H, dd, J=8.5, 3.0)	73.6
5	5.34 (1H, d, J=4.6)	71.6
6	2.15-2.23 (2H, m)	38.2
COOH	---	Ikke observert
1'	---	127.8
2'	7.05 (1H, d, J=2.4)	115.2
3'	---	146.8
4'	---	149.6
5'	6.78 (1H, d, J=7.9)	116.5
6'	6.95 (1H, dd, J=8.2, 2.0)	123.0
7'	7.56 (1H, d, J=15.4)	147.2
8'	6.27 (1H, d, J=15.8)	115.3
9'		168.8

Litteratordata [99]:

Posisjon	δ_H (J i Hz)	δ_C
1	----	76.2
2	2.05 (ddd, J=2.2, 5.4, 14.2) 2.18 (dd, J= 3.4, 14.2)	38.1
3	4.17 (ddd, J=3.4, 14.2)	71.3
4	3.73 (dd, J=3.2, 8.5)	73.6
5	5.3 (m)	71.9
6	2.16-2.25 (m)	38.9
COOH	---	176.9
1'	---	127.8
2'	7.05 (d, J=2.1)	115.3
3'	---	146.8
4'	---	149.6
5'	6.78 (d, J=8.2)	116.5
6'	6.96 (dd, J=2.1, 8.3)	123.0
7'	7.56 (d, J=15.8)	147.1
8'	6.26 (d, J=15.9)	115.3
9'	---	168.7

Litteraturdata og mine data samsvarte godt med hverandre.

AChE-hemming av klorogensyre

Det ble testet for AChE-hemming av klorogensyre (tabell 6.24). Tacrin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 75 \pm 2$ nM eller 15 ± 0.4 ng/ml).

Tabell 6.24 AChE hemming av klorogensyre

Konsentrasjon i brønnen ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
100	-41.5	40.8	>100
50	-32.3	26.7	
25	-27.3	22.8	
12.5	-43.6	34.6	

Verdiene i tabellen 6.24 tyder på at klorogensyre ikke hadde hemmingsaktivitet på AChE, selv ved høyeste målte konsentrasjon ($282 \mu\text{M}$). Standardavvikene er imidlertid svært store.

Det har blitt gjort en del studier på AChE-hemming av klorogensyre. I en studie viste klorogensyre seg å ha en AChE-hemmingseffekt med IC_{50} på $0.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ [100], noe som ikke stemmer med mine data. De fleste andre undersøkelser sier imidlertid at klorogensyre er inaktiv som AChE-hemmer [101-103].

BuChE-hemming av klorogensyre

Klorogensyre ble testet for BuChE-hemming (tabell 6.25). Tacrin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 69 \pm 5$ nM eller 14 ± 1 ng/ml).

Tabell 6.25 BuChE hemming av klorogensyre

Konsentrasjon i brønnen ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
100	-6,9	13,1	>100
50	-4,7	21,4	
25	6,3	10,9	
12.5	7,8	6,6	

Tabellen 6.25 viser at i likhet med råekstraktet ga klorogensyre ikke noe særlig hemmingseffekt av BuChE, selv ved høyeste målte konsentrasjon.

På den samme studien som for AChE-hemming viste klorogensyre seg å ha en BuChE-hemmingseffekt med IC₅₀ på 1.6 ± 0.1 µM [100]. En annen studie [102] viste 30% hemming ved 1000 µg/ml, altså tilnærmet ingen hemming.

15-LO-hemming av klorogensyre

Klorogensyre ble testet for 15-LO-hemming (Tabell 6.26). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC₅₀ = 27 ± 1 µg/ml eller 89 ± 3.3 µM).

Tabell 6.26: 15-LO hemming av klorogensyre

Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
41.7	2.6	7.7	>41.7
20.8	-4.0	10.5	

Verdiene i tabellen 6.26 viser at klorogensyre hadde en IC₅₀ over 41.7 µg/ml (>117.6 µM), svært lav hemmingseffekt selv ved høyeste konsentrasjon. På grunn av mangel på klorogensyre og tid var det ikke mulig å måle ved høyere konsentrasjoner.

Det har blitt gjort flere studier på 15-lipoksygenase (15-LO) hemming av klorogensyre. Tabellen 6.27 viser endel av studiene som har blitt gjort:

Tabell 6.27: 15-LO hemming av klorogensyre - litteraturdata

Aktivitet	År
IC ₅₀ 75 µM	1988 [104]
10.9 % hemming (eller 31 % hemming? – uklart angitt) ved 35.3 µM	1987 [105]
8.8 % hemming ved 1250 µM	1990 [106]
32.3 % hemming ved 200 µM	1995 [107]
32.7 ± 0.7 % hemming ved 100 µM	2011 [108]

De fleste publiserte verdier tyder på svak hemmingseffekt og kan derfor se ut til å stemme bra overens med mine resultater.

XO-hemming av klorogensyre

XO-hemming ble testet for klorogensyre (tabell 6.28). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC_{50} 5.5 ± 1.1 $\mu\text{g/ml}$ eller 18.1 ± 3.6 μM).

Tabell 6.28: XO hemming av klorogensyre

Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
83.3	2.2	10.3	>83.3

Tabellen 6.28 viser at klorogensyre ikke hadde aktivitet ved konsentrasjon på 83.3 $\mu\text{g/ml}$ (235 μM). Her også var det mangel på klorogensyre og tid, og det var grunnen til få målinger.

Det finnes svært mange studier for aktiviteten av klorogensyre på XO hemming. Det er store variasjoner på aktiviteten. Tabellen 6.29 oppsummer noen av studiene:

Tabell 6.29 XO hemming av klorogensyre - litteraturdata

Aktivitet	År
IC_{50} 20.1 ± 0.5 μM	2001 [109]
IC_{50} >100 μM	2008 [110]
IC_{50} 26.4 ± 2.8 μM	2009 [111]
IC_{50} 2.14 μM	2009 [112]
IC_{50} 56.2 ± 2.7 μM	2011 [113]
IC_{50} >1000 μM	2014 [114]

Med stor variasjon på aktivitetsdata i litteraturen kan det ikke trekkes en ordentlig konklusjon om aktiviteten.

DPPH scavenging av klorogensyre

Det ble testet for DPPH radikalscavenging av klorogensyre (tabell 6.30). Quercetin ble brukt som positiv kontroll.

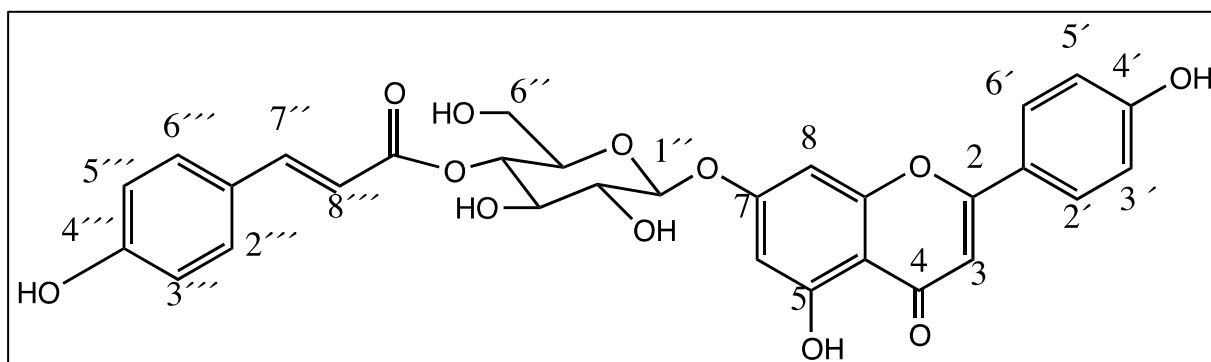
Tabell 6.30 DPPH scavenging av klorogensyre

Konsentrasjon i kyvette ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
166.7	64.4	2	92 \pm 14
83.3	47.4	4	
41.7	27.8	1.8	
20.8	16.7	1.6	

Tabellen 6.30 viser at klorogensyre ved $92 \pm 14 \mu\text{g/ml}$ ($240 \pm 40 \mu\text{M}$) konsentrasjon har 50% DPPH scavengeraktivitet

Det har blitt gjort svært mange studier på DPPH scavengeraktivitet av klorogensyre.. En studie som virker representativ angir en IC_{50} verdi på $42 \pm 4 \mu\text{g/ml}$ ($118 \mu\text{M}$) [115].

6.21.3 Echinaticin (apigenin 7-O-(4-O-coumaroyl)-glukosid)



Figur 6.29: Echinaticin (7-((4-E-coumaroyl)-O-glucosyl)-apigenin; 4H-1-Benzopyran-4-one, 5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-[[4-O-[(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxo-2-propen-1-yl]-β-D-glucopyranosyl]oxy]-)

Echinaticin er et derivat av apigenin 7-O-β-D-glukosid, som finnes blant annet i løvetann og i firtannslekta (*Teucrium*). I en studie fra 2016 [116] ble echinaticin vist både *in vitro* og *in vivo* å ha en nervebeskyttende effekt mot cerebral iskemisk skade.

Ut fra NMR-spektrene og HPLC-kromatogrammene så det ut som det var flere fraksjoner som inneholdt echinaticin. De fraksjonene vi fikk nokså rene forbindelse fra var EtOAc S9, EtOAc S7V6, S7V7, S7V10. Echinaticin så ut til å være en tungtløselig forbindelse i *S. scardica* og felte ut i de forskjellige fraksjonene som den ble isolert fra.

Echinaticin er tidligere rapportert i *S. scardica* [11]

NMR data for fraksjonen *S. scardica* EtOAc S9 (vedlegg, spektrum 16 - 400/100 MHz, CD₃OD):

Posisjon	δ_H (J i Hz)	δ_C	Multiplisitet (HSQC)
1			C
2		164.8	C
3	6.65 (1H, s)	104.3	CH
4		184.2	C=O
5		163	C
6	6.51 (1H, d, J=2.1)	101.3	CH
7			C
8	6.83 (1H, d, J=2.1)	96.2	CH
9		159.0	C
10			C
1'			C
2'/6'	7.87 (2H, d, J=8.8)	129.7	CH
3'/5'	6.93 (2H, d, J=8.8)	117.1	CH
4'		163.0	CH
1''	5.16 (1H, d, J=7.8)	101.6	CH
2''	4.97 (1H, t, J=9.6)	72.2	CH
3''	3.80	75.7	CH
4''	3.63	75.0	CH
5''	3.80	76.6	CH
6''	3.61 (1H) 3.69 (1H)	62.3	CH
1'''		168.6	C
2'''	6.40 (1H, d, J=15.9)	114.8	CH
3'''	7.70 (1H, d, J=15.9)	147.4	CH
4'''		127.2	C
5'''	7.50 (2H, d, J=8.7)	131.3	CH
6'''	6.82 (2H, d, J=8.6)	116.9	CH
7'''		161.5	C
8'''	6.82 (2H, d, J=8.6)	116.9	CH
9'''	7.50 (7.50, 2H, d, J=8.7)	131.3	CH

Litteraturdata [73]

Posisjon	δ_H (J i Hz)	δ_C
1		
2	-	164.7
3	6.66 (1H, s)	104.2
4	-	184.1
5	-	163
6	6.53 (1H, d, J=2.0)	101.5
7	-	-
8	6.84 (1H, d, J=2.0)	96.1
9	-	159
10	-	-
1'	-	123.1
2'/6'	7.89 (2H, d, J=8.5)	129.7
3'/5'	6.94 (2H, d, J=9.0)	117.1
4'	-	163.0
1''	5.16 (1H, d, J=8)	101.2
2''	4.96 (1H, t, J=9.5)	-
3''	-	75.6
4''	-	74.9
5''	3.81 (1H, m) 3.78 (1H, m)	76.5
6''	3.68 (2H, m) 3.61 (2H, m)	62.3
1'''	5.07 (d, J=8.1)	168.5
2'''	6.41 (1H, d, J=15.5)	114.7
3'''	7.71 (1H, d, J=16)	147.4
4'''	-	127.1
5'''	7.49 ((2H, d, J=8.5)	131.3
6'''	6.82 (2H, d, J=9.0)	116.9
7'''	-	161.5
8'''	6.82 (2H, d, J=9.0)	116.9
9'''	7.49 (2H, d, J=8.5)	131.3

¹³C- NMR-dataene fra litteratur og min hadde noen avvikelser og samsvarte ikke fullstendig, mens ¹H-NMR-data stemte bedre. Det kan kanskje komme av en forskyvning ved innstilling av TMS-toppen.

AChE-hemming av echinaticin

Det ble testet for AChE-hemming av echinaticin (tabell 6.31). Tacrin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 75 \pm 2$ nM eller 15 ± 0.4 ng/ml).

Tabell 6.31 AChE hemming av echinaticin

Konsentrasjon i brønnen ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
100	-2.2	6.4	>100
50	-2.1	2.8	
25	-3.6	4.4	
12.5	-0.6	7.0	

Verdiene i tabellen 6.31 viser at echinaticin hadde ikke særlig hemmingsaktivitet av AChE, selv ved høyeste målte konsentrasjon. Dette stemmer bra med litteraturdata [117].

BuChE-hemming av echinaticin

Echinaticin ble testet for BuChE-hemming (tabell 6.32). Tacrin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 69 \pm 5$ nM eller 14 ± 1 ng/ml).

Tabell 6.32 BuChE hemming av echinaticin

Konsentrasjon i brønnen ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
100	34,9	5,1	>100
50	27,2	2,8	
25	24,7	6,9	
12.5	22,1	3,5	

Tabellen 6.32 viser at echinaticin hadde 35 ± 5 % BuChE hemmingsaktivitet ved konsentrasjon på $100 \mu\text{g/ml}$ ($172,8 \mu\text{M}$).

15-LO-hemming av echinaticin

Echinaticin ble testet for 15-LO-hemming (Tabell 6.33). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 27 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ eller $89 \pm 3.3 \mu\text{M}$).

Tabell 6.33 15-LO hemming av echinaticin

Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
166.7	64.8	7.0	137±12
83.3	12.8	4.8	
41.7	1.9	8.5	

Verdiene i tabellen 6.33 viser at echinaticin hadde en IC₅₀-verdi på 137±12 µg/ml (237±21 µM).

XO-hemming av echinaticin

XO-hemming av echinaticin ble testet (tabell 6.34). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (5.5±1.1 µg/ml eller 18.1 ± 3.6 µM).

Tabell 6.34 XO hemming av echinaticin

Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
166.7	84.2	2.8	27±6
83.3	71.2	1.9	
41.7	58.3	0.9	
20.8	44.9	5.2	
10.4	18.2	8.1	

Tabellen 6.34 viser at echinaticin hadde en IC₅₀-verdi på 27±6 µg/ml (47±10 µM).

DPPH scavenging av echinaticin

Det ble testet for DPPH radikalscavenging av echinaticin (tabell 6.35). Quercetin ble brukt som positiv kontroll.

Tabell 6.35 DPPH scavenging av echinaticin

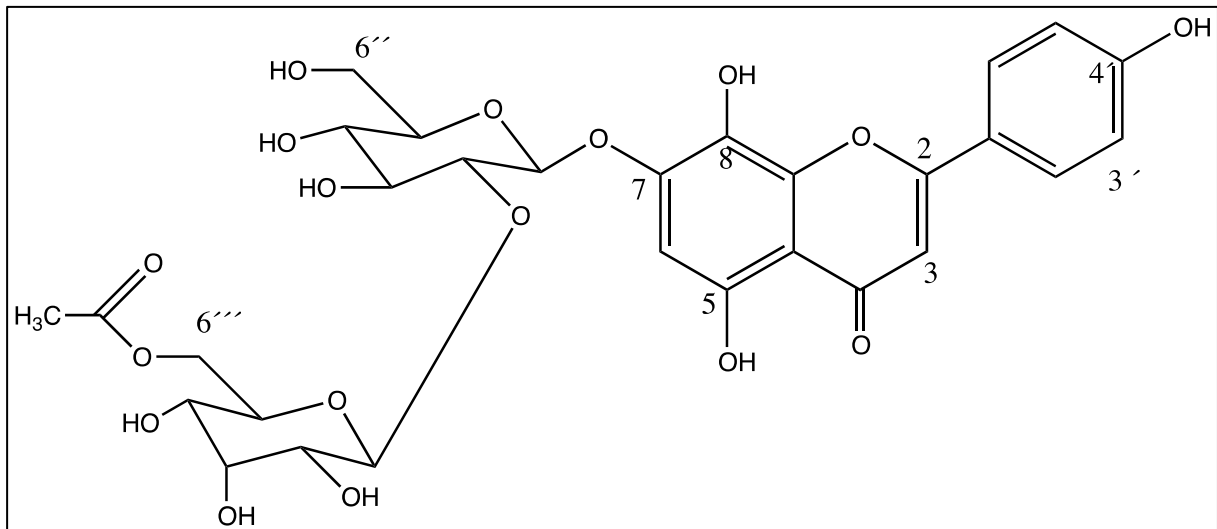
Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
166.7	12	1.1	> 166.7
83.3	5.8	0.8	
41.7	3.2	0.7	
20.8	0	0	

Tabellen 6.35 viser at echinaticin er inaktiv selv ved høyeste konsentrasjon (288.4 μM).

Tidligere studier på echinaticin

Det har ikke blitt gjort noen studier tidligere av XO-hemming av echinaticin, og det er bare en studie på 15-LO-hemming. Echinaticin ser ut til å ha god hemmingseffekt på XO. Den tidligere studien viste at echinaticin hadde en IC_{50} verdi som 15-LO hemmer på $48.2 \pm 0.3 \mu\text{M}$ [117]. Mine data viser mindre aktivitet enn litteraturdata. Ut fra så få studier med avvikende resultater kan man ikke være sikker på hemmingsaktiviteten av echinaticin på 15-LO. Den samme studien viste at echinaticin var nær inaktivt som DPPH-scavenger [117] (24.1 % scavengert ved 500 μM), på lik linje som mine data. En annen studie fremstilte resultatet av DPPH-testingen grafisk der man kan anslå at den hadde 30% scavengeraktivitet ved 1.7 mM [118], altså at den var inaktiv. Det har også blitt målt acetylcholinesterase (AChE) og butyrylcholinesterase (BuChE) hemming der echinaticin hadde en IC_{50} verdi på henholdsvis $>400 \mu\text{M}$ (53.4 ± 0.2 % hemming ved 500 μM) og $96.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ [117]. Disse resultatene viste noe mer hemmingsaktivitet enn mine data, men tyder i likhet med mine verdier på at echinaticin er en sterkere hemmer av BuChE enn av AChE.

6.21.4 Acetylallosyl-glukosyl-isoscutellarein



Figur 6.30: 7-(2-(6-O-Acetylallosyl)glucosyl)-isoscutellarein (7-2-O-(6-O-Acetyl- β -D-allopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy-5,8-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one)

Acetylallosyl-glukosyl-isoscutellarein (AAGI) er en glykosylert forbindelse av flavonet isoscutellarein som finnes i forskjellige planter.

Ut fra NMR-spektrene og HPLC-kromatogrammene så det ut som det var flere fraksjoner som besto av AAGI. Fraksjonene BuOH S5V8V2H5, S5V7VbH1 og S5V7V3H6H2 så renest ut. Fraksjon S5V8V4 så også ut til å inneholde litt uren AAGI.

AAGI er tidligere kjent i *S. scardica* [11, 14]

¹H og ¹³C NMR data for fraksjon *S. scardica* BuOH S5V8V2H5 (vedlegg, spektrum 12 - 400/100 MHz, CD₃OD):

Posisjon	δ _H (J i Hz)	δ _C	Multiplisitet (HSQC)
1			
2	-	166.7	C
3	6.77(1H, s)	102.9	CH
4	-	184.5	C
5	-	152.0	C
6	6.62 (1H, s)	103.8	CH
7	-	154.1	C
8	-	129.8	C
9	-	145.3	C
10	-	107.8	C
1'	-	123.2	C
2'/6'	7.91 (2H, d, J=8.6)	129.9	CH
3'/5'	6.94 (2H, d, J=8.4)	117.1	CH
4'	-	163.0	C
1''	4.94 (1H, d, J=7.5)	101.8	CH
2''	3.71 (1H,m)	84.1	CH
3''	3.67 (1H,overlapp med H4''')	77.6	CH
4''	3.50 (1H, overlapp med H5''')	70.8	CH
5''	3.50 (1H,overlapp med H4''')	78.5	CH
6''	3.78 (2H, dd, J=4.0, 12.1) 3.96 (2Hd, J=12.2)	62.3	CH ₂
1'''	5.07 (1Hd, J=8.1)	104.3	CH
2'''	3.47 (1H, dd, J=2.8,7.8)	73.5	CH
3'''	4.12 (1H, dd, J=3.0,8.0)	72.6	CH
4'''	3.64 (1H, overlapp med H3''')	68.5	CH
5'''	4.04 (1H, m)	73.1	CH
6'''	4.25 (1H, dd, J=5.1, 12.1) 4.33 (1H, dd, J=2.1, 12.1)	65.1	CH ₂
C=O	-	173.0	C
Me	1.98	20.9	CH ₃

Litteraturdata [119]:

Posisjon	δ_H (J i Hz)	δ_C
1		
2		166.50
3	6.74 (s)	102.80
4		184.39
5		151.80
6	6.57(s)	103.70
7		154.00
8		127.60
9		145.20
10		107.70
1'		123.10
2'	7.86 (d, J=8.9)	129.80
3'	6.91 (d, J=8.9)	116.90
4'		162.80
5'	6.91 (d, J=8.9)	116.90
6'	7.86 (d, J=8.9)	129.80
1''	4.91 (d, J=7.5)	101.70
2''		84.00
3''		77.50
4''		70.80
5''		78.40
6''		62.30
1'''	5.06 (d, J=7.9)	104.30
2'''		73.40
3'''		72.60
4'''		68.40
5'''		73.00
6'''	4.04 (dd, J=10.9, 5.9) 3.96 (d, J=12.0)	65.00
C=O		173.00
Me	1.98	20.90

AChE-hemming av AAGI

Det ble testet for AChE-hemming av AAGI (tabell 6.36). Tacrin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 75 \pm 2$ nM eller 15 ± 0.4 ng/ml).

Tabell 6.36 AChE hemming av AAGI

Konsentrasjon i brønnen ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
100	-3.6	10.8	>100
50	7.9	13.5	
25	-0.5	12.8	
12.5	2.8	1.6	

Verdiene i tabellen 6.36 viser at AAGI ikke hemmet AChE, selv ved høyeste målte konsentrasjon.

BuChE-hemming av AAGI

AAGI ble testet for BuChE-hemming (tabell 6.37). Tacrin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 69 \pm 5$ nM eller 14 ± 1 ng/ml).

Tabell 6.37 AChE hemming av AAGI

Konsentrasjon i brønnen ($\mu\text{g/ml}$)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
100	-18,8	11,3	>100
50	-15,9	15,8	
25	-19,3	8,1	

Tabellen 6.37 viser at i likhet med råekstraktet ga AAGI ikke hemmingseffekt av BuChE, selv ved høyeste målte konsentrasjon.

15-LO-hemming av AAGI

AAGI ble testet for 15-LO-hemming (Tabell 6.38). Quercetin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 27 \pm 1$ $\mu\text{g/ml}$ eller 89 ± 3.3 μM).

Tabell 6.38 15-LO hemming av AAGI

Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
83.3	2.8	-14.7	>83.3
41.7	-20.1	6.5	
20.8	-8.2	15.6	

Verdiene i tabellen 6.38 viser at AAGI hadde svært lav hemmingseffekt, selv ved høyeste målte konsentrasjon.

XO-hemming av AAGI

Bestemmelsen av XO-hemming ble testet av AAGI (tabell 6.39). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (5.5±1.1 µg/ml eller 18.1 ± 3.6 µM).

Tabell 6.39 XO hemming av AAGI

Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
166.7	17.0	2.5	>166.7
83.3	11.5	7.2	

Tabellen 6.39 viser at AAGI har lav aktivitet ved konsentrasjon 166.7 µg/ml.

DPPH scavenging av AAGI

Det ble testet for DPPH radikalscavenging av AAGI (tabell 6.40). Quercetin ble brukt som positiv kontroll.

Tabell 6.40 DPPH scavenging av AAGI

Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
166.7	93.9	2.1	65±15
83.3	67.8	15.6	
41.7	19.5	8.8	
20.8	12	1.5	

Tabellen 6.40 viser at AAGI har 50% DPPH scavenger aktivitet ved en konsentrasjon på 65±15 µg/ml (100±23 µM).

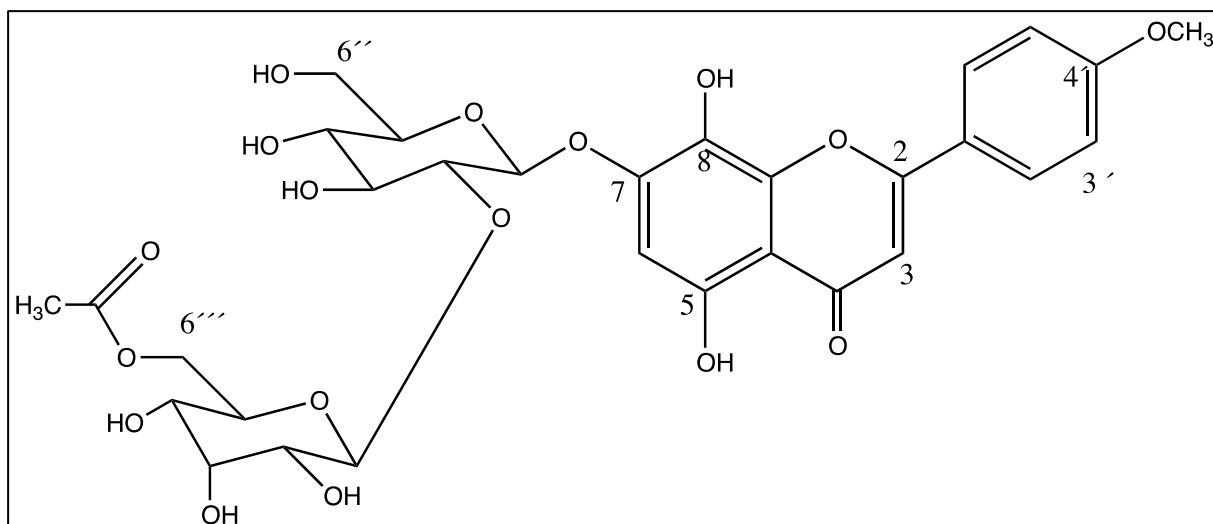
Tidligere studier på AAGI

Det har blitt gjort noen studier på DPPH scavenger aktiviteten til AAGI [120-122], men ingen studier er funnet på XO-, AChE- eller BuChE-hemmingsaktiviteten. Resultatene for DPPH scavenging er svært sprikende; våre resultater stemmer best overens med [122].

Den eneste studien [123] som har blitt funnet på 15-LO-hemming har et resultat som virker lite sannsynlig – quercetin, som ble brukt som positiv kontroll, ble angitt å ha en IC₅₀ verdi på 216 nM, flere tierpotenser lavere enn andre studier [124-126]. Tabellen under oppsummerer resultatene:

Tester	Resultater
15-LO hemming	IC ₅₀ 312 nM [123]
XO hemming	Ingen data funnet
DPPH scavenging	IC ₅₀ 9.0 ± 0.1 μM [120] IC ₅₀ 67.8 ± 1.5 μM [121] IC ₅₀ 120 μM [122]
AchE hemming	Ingen data funnet
BuChE hemming	Ingen data funnet

6.21.5 Acetylallosyl-glukosyl-metylisoscutellarein



Figur 6.31: 4'-O-methylisoscutellarein-7-O-[6''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside, 4*H*-1-Benzopyran-4-one, 7-[[2-O-(6-O-acetyl- β -D-allopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]-5,8-dihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-

Acetylallosyl-glukosyl-metyl-isoscutellarein (AAGIME) er også en glykosylert forbindelse av isoscutellarein og er tidligere kjent i *S. scardica* [11, 14, 73]

Ut fra NMR-spektrene og HPLC-kromatogrammene så det ut som det var flere fraksjoner som besto av AAGIME. De reneste fraksjonene var BuOH S5V9H6, EtOAc S4V8H8 og EtOAc S4V8H3.

^1H og ^{13}C NMR data for fraksjonen *S. scardica* BuOH S5V9H6 (vedlegg, spektrum 14 - 400/150 MHz, CD_3OD):

Posisjon	δ_{H} (J i Hz)	δ_{C}
1		
2		166.3
3	6.79 (1H, s)	104.3
4		184.5
5		152.1
6	6.68 (1H, s)	102.9
7		154.2
8		-
9		145.4
10		107.8
1'		124.5
2'	8.02 (2H, d, J=8.6)	129.7
3'	7.10 (2H, d, J= 8.5)	115.7
4'		164.6
5'	7.10 (2H, d, J= 8.5)	115.7
6'	8.02 (2H, d, J=8.6)	129.7
1''	5.07 (1H, d, J=8.1)	101.8
2''		84.0
3''		77.6
4''		70.8
5''		73.1
6''		62.3
1'''	4.95 (1H, d, 7.4)	104.2
2'''		73.4
3'''		72.6
4'''		65.5
5'''		73.4
6'''		65.1
C=O		173.1
Me	1.98 (s)	20.9
4'-OCH ₃	3.90 (3H, s)	56.1

Littraturdata [127]:

Posisjon	δ_H (J i Hz)	δ_C
1		
2		163.6
3	6.89 (s)	103.3
4		182.4
5	12.32 (s)	150.6
6	6.67 (s)	99.5
7		152.2
8		127.6
9		143.8
10		105.6
1'		122.8
2'	8.08 (d, J=8.8 Hz)	128.4
3'	7.12 (d, J=8.8 Hz)	114.5
4'		162.4
5'	7.12 (d, J=8.8 Hz)	114.5
6'	8.08 (d, J=8.8 Hz)	128.4
1''	5.05 (d, J= 7.4 HZ)	100.1
2''		80.5
3''		75.6
4''		69.3
5''		77.2
6''		60.5
1'''	4.91 (d, J=8 Hz)	102.5
2'''		70.8
3'''		71.5
4'''		66.9
5'''		71.5
6'''		63.5
C=O		170.4
Me	1.89 (s)	20.5
4'-OCH ₃	3.86 (s)	55.5

AChE-hemming av AAGIMe

Det ble testet for AChE-hemming av AAGIMe (tabell 6.41). Tacrin ble brukt som positiv kontroll ($IC_{50} = 75 \pm 2$ nM eller 15 ± 0.4 μ g/ml).

Tabell 6.41 AChE hemming av AAGIMe

Konsentrasjon i brønnen (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
100	2.2	3.5	>100
50	-3.0	5.9	
25	-6.3	5.1	

Verdiene i tabellen 6.41 viser at AAGIMe ikke hadde hemmingsaktivitet av AChE, selv ved høyeste målte konsentrasjon.

BuChE-hemming av AAGIME

AAGIMe ble testet for BuChE-hemming (tabell 6.42). Tacrin ble brukt som positiv kontroll (IC₅₀= 69±5 nM eller 14±1 µg/ml).

Tabell 6.42 BuChE hemming av AAGIME

Konsentrasjon i brønnen (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
100	-0,6	5,6	>100
50	-0,2	7,7	
25	6,9	10,2	

Tabellen 6.24 viser at i likhet med rækstraktet ga AAGIMe ikke hemmingseffekt av BuChE, selv ved høyeste målte konsentrasjon.

15-LO-hemming av AAGIME

AAGIMe ble testet for 15-LO-hemming (Tabell 6.43). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (IC₅₀ =27±1 µg/ml eller 89 ±3.3 µM).

Tabell 6.43 15-LO hemming av AAGIME

Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
166.7	37.9	6.2	>166.7
41.7	10.8	3.9	
20.8	2.3	5.8	

Verdiene på tabellen 6.43 viser at AAGIMe hadde en IC₅₀ over 166.7 µg/ml (>250 µM), lav hemmingseffekt selv ved høyeste konsentrasjon.

XO-hemming av AAGIMe

Bestemmelsen av XO-hemming ble testet av AAGIMe (tabell 6.44). Quercetin ble brukt som positiv kontroll (5.5±1.1 µg/ml eller 18.1 ± 3.6 µM).

Tabell 6.44 XO hemming av AAGIMe

Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
83.3	14.6	7.1	>83.3
41.7	12.7	2.3	

Tabellen 6.44 viser at AAGIMe har lav aktivitet ved høyeste målte konsentrasjon, 83.3 µg/ml (125 µM).

DPPH scavenging av AAGIMe

Det ble testet for DPPH radikalscavenging av AAGIMe (tabell 6.45). Quercetin ble brukt som positiv kontroll.

Tabell 6.45 AChE hemming av AAGIMe

Konsentrasjon i kyvette (µg/ml)	Hemming (%)	Standardavvik (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
166.7	96.7	0.3	33±4
83.3	96.1	1	
41.7	59.3	5.6	
20.8	30.3	3.3	

Tabellen 6.45 viser at ved 33±4 µg/ml (50±6 µM) har AAGIMe 50% DPPH scavenger aktivitet.

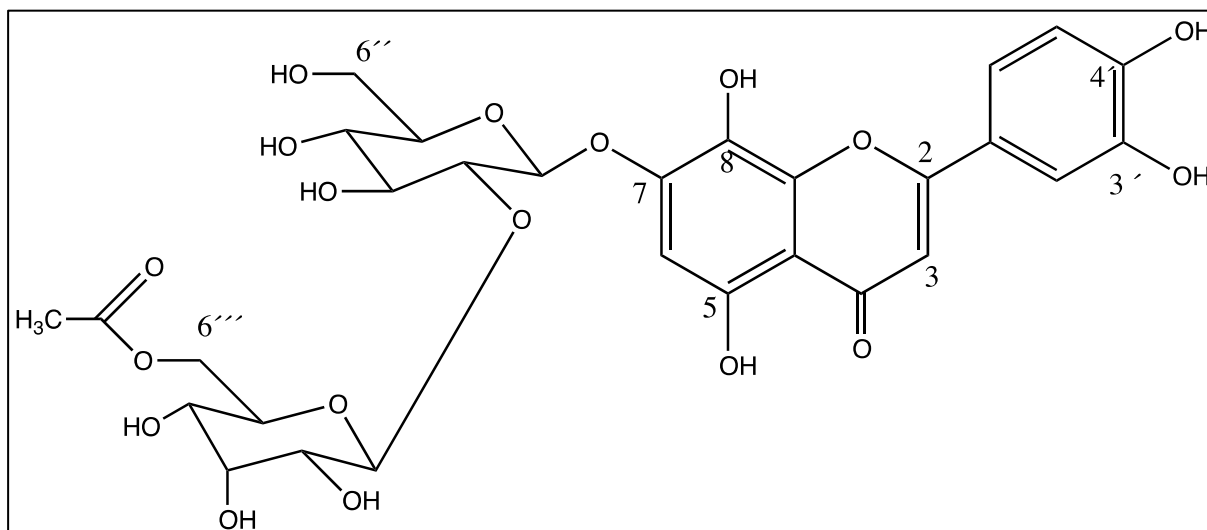
Tidligere studier på AAGIMe

Det er nesten ingen studier utført på AAGIMe. Det er bare en studie på 15-LO-hemming som virker merkelig [123], med IC₅₀ 312 nM. Denne studien hadde merkelige resultater for AAGI også, og er diskutert der. DPPH scavenging er beskrevet i denne studien, men IC₅₀ verdi er ikke angitt.

6.22 Andre renstoffer som ble isolert

På grunn av tidsnød og stoffmangel ble det ikke utført bioassay på disse stoffene.

6.22.1 Acetylallosyl-glukosyl-hypolaetin



Figur 6.32: 7-(2-(6-O-acetylallosyl)glukosyl)-hypolaetin), 4H-1-Benzopyran-4-one, 7-[(6-O-acetyl-2-O- β -D-allopyranosyl- β -D-glucopyranosyl)oxy]-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,8-dihydroxy-

Acetylallosyl-glukosyl-hypolaetin (AAGH) er et flavon som tidligere har også blitt funnet i *S.scardica* [11, 14, 73]

Ut fra NMR-spektrene og HPLC-kromatogrammene så det ut som fraksjonene BuOH S5V7V3H3 og S5V8V2H3 var AAGH.

^1H og ^{13}C NMR data for fraksjonen *S. scardica* BuOH S5V7V3H3 (vedlegg, spektrum 10 - 600/150 MHz, CD_3OD):

Posisjon	δ_{H} (J i Hz)	δ_{C}	Multiplisitet (HSQC/APT)
1	-		
2	-	166.5	C
3	6.58 (1H, s)	104.2	CH
4	-	184.5	C
5	-	152.0	C
6	6.77 (1H, s)	101.8	CH
7	-	154.1	C
8	-	129.8	C
9	-	145.4	C
10	-	107.8	C
1'	-	123.7	C
2'	7.45 (1H, overlapp med H6')	114.4	CH
3'	-	147.0	C
4'		151.2	C
5'	6.92 (1H, d, J = 8.2)	117.1	CH
6'	7.46 (1H, overlapp med H2')	120.8	CH
1''	4.93 (1H, d, J= 7.6)	103.0	C
2''	3.74 (1H, m)	83.9	CH
3''	3.69 (1H, overlapp med H4''')	77.6	CH
4''	3.50 (1H, overlapp med H5'')	70.8	CH
5''	3.50 (1H, overlapp med H4'')	78.2	CH
6a''	3.78 (1H, m)	62.3	CH_2
6b''	3.95 (1H, m)		
1'''	5.07 (1H, d, J= 8.1)	104.2	CH
2'''	3.46 (1H, dd, J=2.9,8.0)	72.6	CH
3'''	4.12 (1H, dd, J=3.0,3.0)	73.1	CH
4'''	3.65 (1H, overlapp med H3''')	68.5	CH
5'''	4.04 (1H, m)	73.4	CH
6a'''	4.24 (1H, dd, J= 4.9, 12.2)	64.5	CH_2
6b'''	4.33 (1H, dd, J= 2.2, 12.2)		
C=O	-	173.5	C
Me	2.00(3H,s)	20.9	CH_3

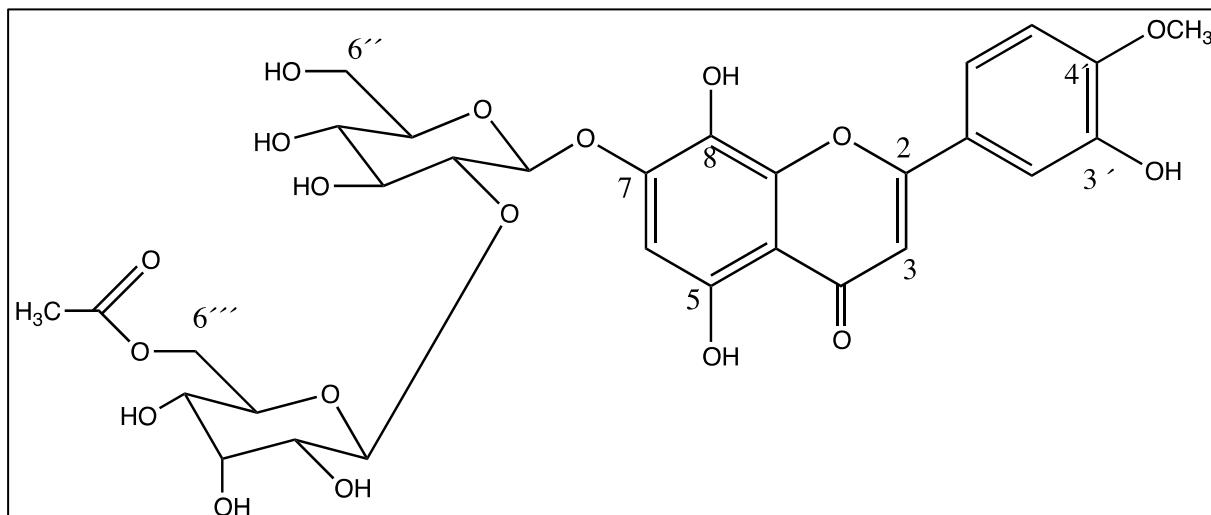
Tilordning av signaler ble gjort ut fra ^1H , ^{13}C (APT), og HSQC spektra.

Litteraturdata: (CD₃OD) [128]:

Posisjon	δ_H (J i Hz)	δ_C
1	-	
2	-	167.0
3	6.57(s)	104.6
4	-	184.8
5	-	152.0
6	6.76(s)	102.0
7	-	154.3
8	-	130.1
9	-	145.6
10	-	108.1
1'	-	123.8
2'	7.44 (d, J=2.2)	114.7
3'	-	147.3
4'	-	151.7
5'	6.90 (d, J=9.0)	117.2
6'	7.45	121.1
1''	4.91 (d, J=7.5)	102.1
2''	3.71 (d, J= 9.2)	84.3
3''	3.67	77.9
4''	3.49	71.2
5''	3.49 (d, J= 1.5)	78.8
6''	3.94 (dd, J= 5.0, 12.1) 3.77	62.7
1'''	5.05 (d, J=8.1)	104.1
2'''	3.45 (d, J=2.9)	73.4
3'''	4.12 (d, J=2.8)	73.0
4'''	3.64 (d, 9.9)	68.8
5'''	4.03 (d, 2.0)	73.7
6'''	4.34 (dd, J= 5.1, 12.1) 4.24	65.4
C=O	-	173.9
Me	2.0	21.3

Det er ikke funnet litteraturdata for tester av acetylallosylglukosyl-hypolaetin 4'-metyleter.

6.22.2 Acetylallosyl-glukosyl-metyl-hypolaetin



Figur 6.33: 7-O-[(6-O-acetylallosyl)(1->2)-O-(glukosyl)]-hypolaetin 4'-metyleter, 4H-1-Benzopyran-4-one, 7-[[6-O-acetyl-2-O-(6-O-acetyl- β -D-allopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]-5,8-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-

Et annet flavon som ble isolert fra *S. scardica* fraksjon BuOH S5V8V2H6H1 var acetylallosyl-glukosyl-metylhypolaetin (AAGHMe). Dette stoffet er tidligere kjent i *S. scardica* [11].

Spektraldata for AAGHMe (vedlegg, spektrum 13 - 600 MHz/150 MHz, CD₃OD):

Posisjon	δ_H (J i Hz)	δ_C
1	-	
2	-	166.5
3	6.65(1H, s)	103.0
4	-	184.6
5	-	152.2
6	6.79(1H, s)	101.8
7	-	152.9
8	-	129.8
9	-	Ikke obs.
10	-	107.8
1'	-	125.0
2'	7.48 ((1H, d, J=2.3)	114.2
3'	-	145.4
4'	-	148.3
5'	7.10 (1H, d, J=8.6)	112.7

6'	7.59 (1H, dd, J=8.5, 2.3)	120.5
1''	4.95 (1H, d, J=7.7)	103.0
2''	3.73 (1H, dd, J= 7.7, 9.2)	83.7
3''	3.66 (1H, overlapp)	77.6
4''	3.49 (1H, m)	70.8
5''	3.49 (1H, m)	78.5
6''	3.93 (2H, d, J=1.5) 3.77 (2H, overlapp)	62.3
1'''	5.07 (1H, d, J=8.0)	104.1
2'''	3.46 (1H, overlapp)	72.7
3'''	4.12 (1H, t, J=2.9)	72.7
4'''	3.65 (1H, dd, J=3.0, 10.0)	68.6
5'''	4.03 (1H, m)	73.1
6'''	4.32 (2H, dd, J= 2.2, 12.1) 4.24 (2H, dd, J=5.1, 12.1)	65.0
C=O	-	173.3
Me	2.00 (3H, s)	20.9
4'-OCH ₃	3.95 (3H, s)	56.6

Svake signaler ved 2.15 ppm og 1.30 ppm antas å skyldes forurensninger.

Litteraturdata [129]

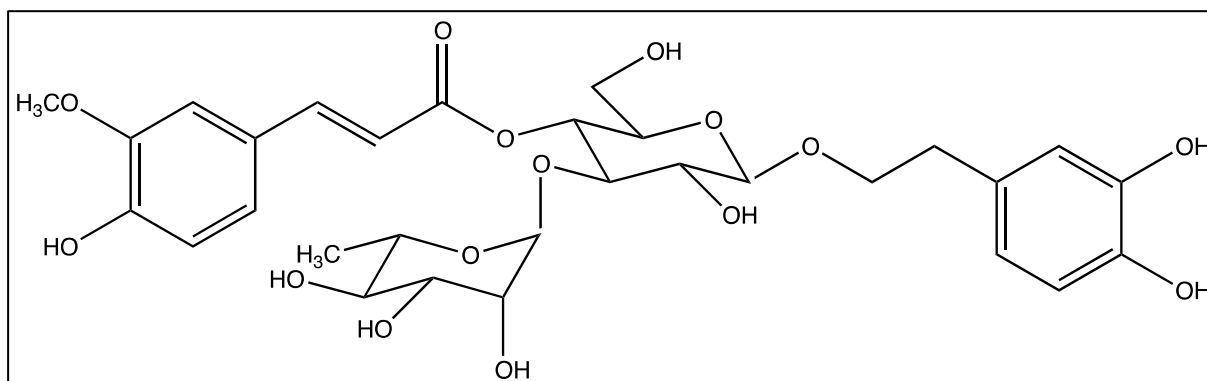
Posisjon	δ_H (J i Hz)	δ_C
1	-	
2	-	165.3
3	6.64(s)	103.2
4	-	183.3
5	-	151.7
6	6.78(s)	100.6
7	-	152.9
8	-	128.5
9	-	142.6
10	-	106.6
1'	-	123.8
2'	7.48 (d, J=2.3)	113.0
3'	-	147.0
4'	-	150.9
5'	7.10 (d, J=8.6)	111.5
6'	7.59 (dd, J=8.6, 2.3)	119.3
1''	4.94 (d, J=7.8)	101.8
2''	3.73 (dd, J= 7.6, 9.2)	82.5
3''	3.67	76.4
4''	3.49	69.6

5''	3.49	77.3
6''	3.93	61.1
1'''	5.07 (d, J=7.8)	102.8
2'''	3.46 (d, J=2.7)	72.0
3'''	4.12 (d, J=2.7)	71.2
4'''	3.64 (dd, J=2.7, 10.1)	67.0
5'''	4.03 (ddd, 2.3, 5.1, 9.9)	71.6
6'''	4.33 (dd, J= 2.2, 12.1) 4.24 (dd, J=5.1, 12.1)	63.6
C=O	-	171.6
Me	2.0 (s)	19.5
4'-OCH ₃	3.95	55.3

¹H NMR spektret av AAGHMe stemmer godt med litteraturdata, ¹³C spektret ikke fullt så godt, men likevel brukbart.

Tidligere bestemmelser av XO hemming, AChE hemming og BuChE hemming er ikke funnet. IC₅₀ for 15-LO hemming er rapportert til 312 nM, men det er i samme artikkel som har merkelige verdier for AAGI og AAGIME [123]. DPPH-scavenging er nevnt i samme artikkel, men uten noen IC₅₀ verdi.

6.22.3 Leucoseptosid A



Figur 6.34: Leucoseptosid A (β -D-Glucopyranoside, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl 3-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)-, 4-[(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoate])

Et fenyletanoid som ble isolert fra *S. scardica* var leucoseptosid A (verbascosid 3'-metyleter), i fraksjon EtOAc S4V4H4. Dette stoffet er tidligere kjent i *S. scardica* [11, 73]

NMR data og tolkning for fraksjon *S. scardica* S5V4 (vedlegg, spektrum 17 - 400 MHz/100 MHz, CD₃OD):

Posisjon	δ_H (J i Hz)	δ_C
1	---	131.5
2	(6.5-7.3, overlappet)	116.2
3	---	146.1
4	---	144.7
5	(6.5-7.3, overlappet)	117.2
6	(6.5-7.3, overlappet)	121.3
7	2.80 (2H, t, J=6.9)	36.6
8	4.05 (1H,dd, J=2.0,9.8), (3.35-3.95, overlappet)	72.3
1'	4.38 (1H, d, J=7.8)	104.2
2'	(3.35-3.95, overlappet)	76.2
3'	(3.35-3.95, overlappet)	81.7
4'	4.93 (1H,dd, J=9.2,9.2)	70.6
5'	(3.35-3.95, overlappet)	76.0
6'	(3.35-3.95, overlappet)	62.4
1''	---	127.7
2''	(6.5-7.3, overlappet)	115.3
3''	---	146.8
4''	---	149.8
5''	(6.5-7.3, overlappet)	116.6
6''	(6.5-7.3, overlappet)	123.7
7''	7.60 (1H, d, J=15.9)	148.0
8''	6.28 (1H, d, J=15.9)	114.8
9''	---	168.3
1'''	5.20 (1H, s)	103.0
2'''	(3.35-3.95, overlappet)	72.4
3'''	(3.35-3.95, overlappet)	72.1
4'''	(3.35-3.95, overlappet)	73.8
5'''	(3.35-3.95, overlappet)	70.4
6'''	1.10 (3H, d, J=6.2)	18.5
OCH ₃	3.88 (3H, s)	56.8

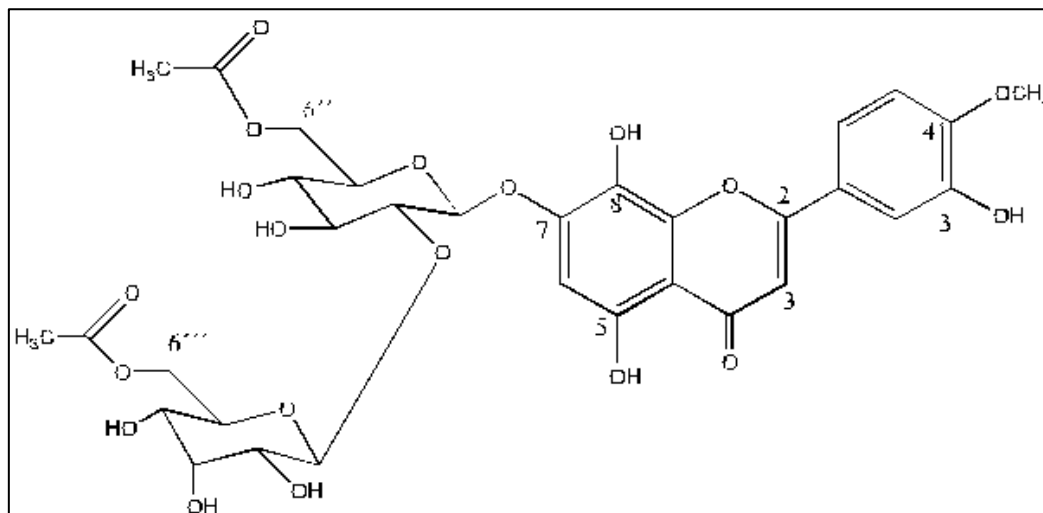
Tilordning av signaler er foretatt ut fra ¹H, ¹³C (APT) spektra og ved sammenligning med data for verbascosid. Verdiene som er funnet, stemmer godt overens med litteraturdata [130].

Litteraturdata (90 MHz/22.5 MHz, CD₃OD) [130]:

Posisjon	δ_H (J i Hz)	δ_C
1	---	131.5
2	(6.5-7.3, overlappet)	116.5
3	---	144.4
4	---	145.9
5	(6.5-7.3, overlappet)	117.1
6	(6.5-7.3, overlappet)	121.3
7	2.78 (t, J=7)	36.4
8	Ikke angitt	72.1
1'	4.38(d, J=8)	104.0
2'	Ikke angitt	75.8
3'	Ikke angitt	81.4
4'	Ikke angitt	70.3
5'	Ikke angitt	76.0
6'	Ikke angitt	62.3
1''	---	127.6
2''	(6.5-7.3, overlappet)	115.2
3''	---	146.8
4''	---	149.8
5''	6.77 (d, J=8.0)	116.5
6''	(6.5-7.3, overlappet)	123.2
7''	7.67 (d, J=15)	148.0
8''	6.36 (d, J=15)	114.7
9''	---	168.3
1'''	5.23 (s)	102.8
2'''	Ikke angitt	72.1
3'''	Ikke angitt	72.1
4'''	Ikke angitt	73.7
5'''	Ikke angitt	70.6
6'''	1.10 (d, J=6)	18.4
OCH ₃	3.89 (s)	56.5

DPPH-scavenging av leucoseptosid A er tidligere rapportert, med IC₅₀ verdier varierende fra 14.2 µg/ml [131] til nær inaktivt (IC₅₀ >127 µg/ml) [132]. Andre bioassay er ikke funnet rapportert.

6.22.4 Acetylallosyl-acetylglukosyl-hypolaetin 4'-metyleter



Figur 6.35 7-O-[(6-O-acetylallosyl)(1->2)-O-(6-O-acetylglukosyl)]-hypolaetin 4'-metyleter (4H-1-Benzopyran-4-one, 7-[[6-O-acetyl-2-O-(6-O-acetyl- β -D-allopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]-5,8-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-)

Acetylallosyl- acetylglukosyl-metylhypolaetin (AcAlAcGHMe) ble isolert fra BuOH S5V9H8. Det er tidligere rapportert i *S. scardica* [11].

Spektraldata for AcAlAcGHMe (vedlegg, spektrum 15 - 400 MHz/150 CD₃OD):

Posisjon	δ_H (J i Hz)	δ_C
1	-	
2	-	165.0
3	6.64(s)	103.0
4	-	183.1
5	-	151.5
6	6.72(s)	100.3
7	-	152.7
8	-	128.4
9	-	144.0
10	-	106.4
1'	-	123.5
2'	7.47 (d, J=1.9)	111.3
3'	-	146.8
4'	-	150.4
5'	7.08 (d, J=8.6)	112.8
6'	7.59 (dd, J=8.5, 1.8)	119.1

1''	4.94 (d)	102.7
2''	(3.4-4.0, overlappet)	82.3
3''	(3.4-4.0, overlappet)	Ikke obs.
4''	(3.4-4.0, overlappet)	70.0
5''	(3.4-4.0, overlappet)	74.3
6''	4.47 (dd, J=9.9, 1.7) 4.32 (m)	63.6
1'''	5.07 (d, J=8.0)	101.2
2'''	(3.4-4.0, overlappet)	72.0
3'''	4.12 (d, J=3.2)	71.7
4'''	(3.4-4.0, overlappet)	67.1
5'''	4.05 (dd, J=0.0, 7.0)	71.2
6'''	4.33 (m) 4.24 (dd, J=4.7, 11.4)	63.3
C=O	-	171.3, 171.8
Me	2.00 (s), 2.14 (s)	19.4
4'-OCH ₃	3.95 (s)	55.1

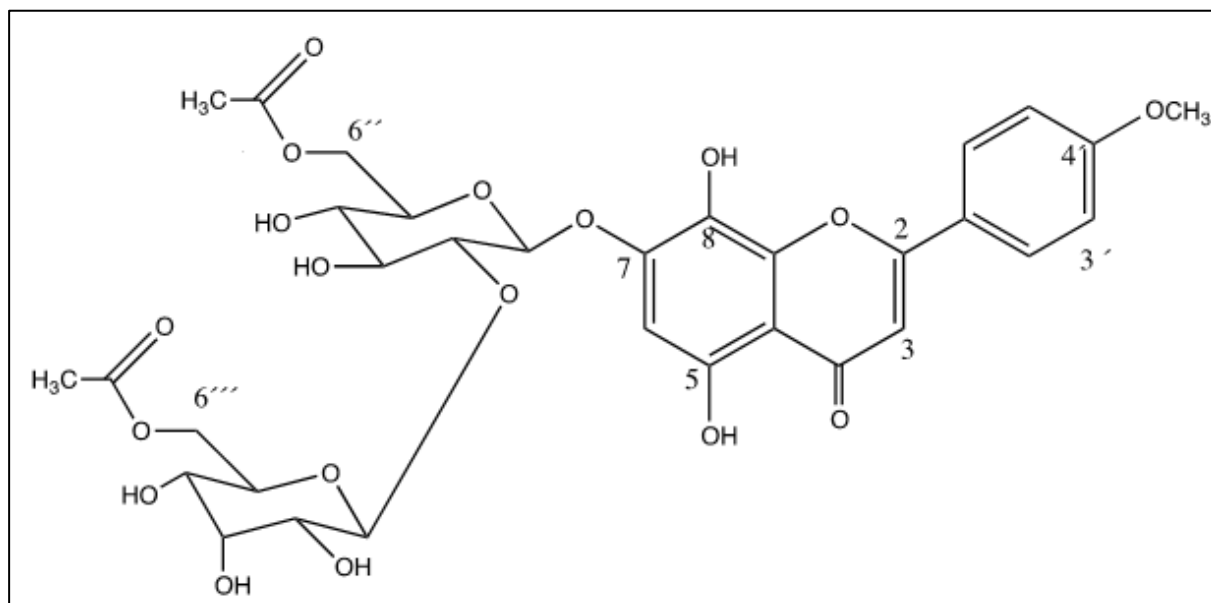
Litteraturdata (CD₃OD) [129]:

Posisjon	δ_H (J i Hz)	δ_C
1	-	
2	-	164.3
3	6.64(s)	103.1
4	-	183.2
5	-	151.4
6	6.71(s)	101.0
7	-	152.6
8	-	128.0
9	-	144.1
10	-	105.2
1'	-	122.1
2'	7.47 (d, J=2.3)	111.3
3'	-	147.0
4'	-	150.4
5'	7.09 (d, J=9.0)	112.7
6'	7.59 (dd, J=9.0, 2.3)	119.0
1''	4.92 (d, J=7.6)	102.5
2''	3.73 (dd, J= 9.6, 7.6)	83.8
3''	3.69 (dd, J=9.6, 9.2)	76.2
4''	3.44 (dd, J=10.0, 9.2)	70.3

5''	3.67 (t, J=9.2)	74.6
6''	4.47 (dd, J=2.0, 2.0) 4.30 (dd, J=4.8, 2.0)	63.8
1'''	5.06 (d, J=8.4)	103.0
2'''	3.46 (d, J=2.7)	72.0
3'''	4.12 (d, J=2.7)	71.6
4'''	3.64 (dd, J=2.7, 10.1)	67.1
5'''	4.03 (ddd, 2.3, 5.1, 9.9)	71.2
6'''	4.33 (dd, J= 2.2, 12.1) 4.24 (dd, J=5.1, 12.1)	63.6
C=O	-	172.3, 172.5
Me	2.00, 2.14 (s)	19.5
4'-OCH ₃	3.95 (s)	55.1

15-LO hemming for dette stoffet er rapportert til 312 nM [123], men denne verdien synes tvilsom (se kommentarer under AAGI og AAGIMe). I samme artikkel [123] er DPPH-scavenging beskrevet, men uten data for IC₅₀ verdi. Data for hemming av XO, AChE og BuChE er ikke funnet.

6.22.5 Acetylallosyl-acetylglukosyl-isoscutellarein 4'-metyleter



Figur 6.36: Acetylallosyl-acetylglukosyl-isoscutellarein 4'-metyleter (4H-1-Benzopyran-4-one, 7-[[6-O-acetyl-2-O-(6-O-acetyl- β -D-allopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]-5,8-dihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-)

Acetylallosyl-acetylglukosyl-isoscutellarein 4'-metyleter (AcAlAcGIME) ble isolert fra fraksjon EtOAc S4V8H5, S4V8H9 og S4V8H10. Det er tidligere funnet i *S. scardica* [11, 14]

^1H og ^{13}C NMR data for fraksjonen *S. scardica* EtOAc S4V8H5 (vedlegg, spektrum 11 - 400/150 MHz, CD_3OD):

Posisjon	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	-	-
2	-	166.4
3	6.70 (1H, s)	102.6
4	-	184.6
5	-	Ikke sett
6	6.73 (1H, s)	101.8
7	-	151.9
8	-	Ikke sett
9	-	Ikke sett
10	-	107.9
1'	-	124.6
2'	7.98 (2H, d, J=8.9)	129.7
3'	7.10 (2H, d, J= 8.9)	115.7
4'	-	164.7

5'	7.10 (2H, d, J= 8.9)	115.7
6'	7.98 (2H, d, J=8.9)	129.7
1''	4.94 (1H, d, J=8.2)	101.8
2''	(3.62-3.75, overlappet)	84.1
3''	(3.62-3.75, overlappet)	75.8
4''	(3.40-3.47, overlappet)	70.8
5''	(3.62-3.75, overlappet)	Ikke identifisert
6''	4.47 (1H, dd, J=11.8, 2.1) 4.33 (1H, dd, J 12.1, 2.2)	64.7
1'''	5.06 (1H, d, J=8.1)	104.4
2'''	(3.40-3.47, overlappet)	73.1
3'''	4.12 (1H, t, J=3.8)	72.6
4'''	(3.62-3.75, overlappet)	68.5
5'''	4.06 (1H, m)	71.4
6'''	4.33 (1H, dd, J 12.1, 2.2) 4.24 (1H, m)	65.1
OCH ₃	3.90 (3H, s)	56.1
OCOCH ₃	1.98 (3H, s), 2.15 (3H, s)	20.9
C=O	-	173.1

Litteraturdata (CD₃OD) [129]:

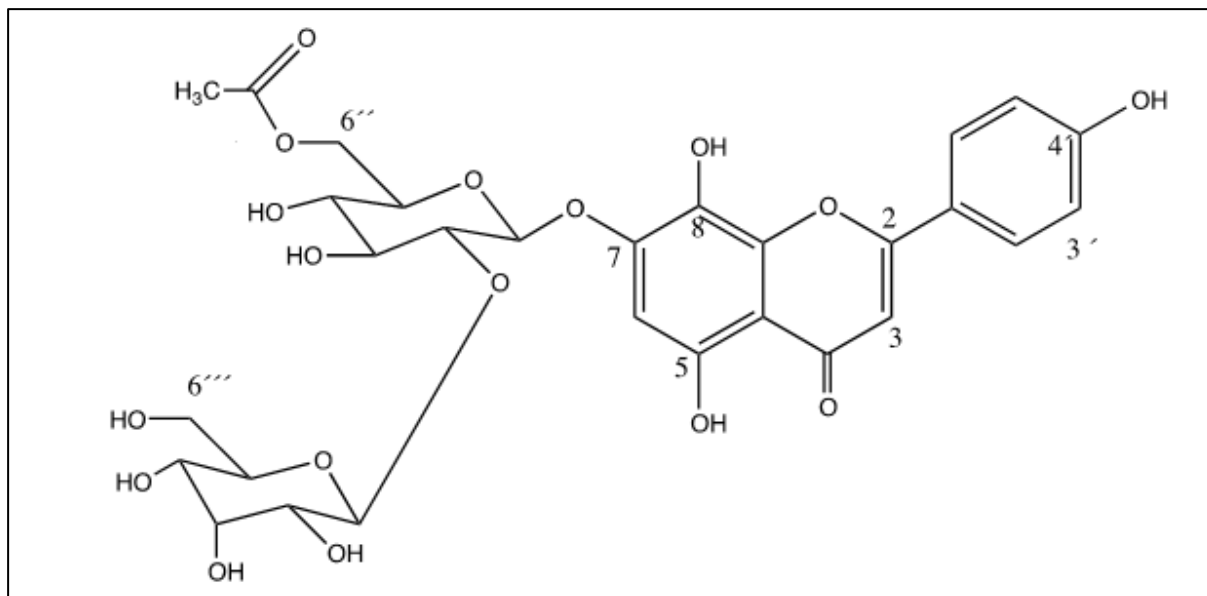
Posisjon	δ_H (J i Hz)	δ_C
1	-	-
2	-	165.9
3	6.65 (s)	102.1
4	-	183.8
5	-	151.1
6	6.75 (s)	100.8
7	-	152.0
8	-	130.9
9	-	Ikke sett
10	-	106.8
1'	-	123.3
2'	7.98 (d, J=8.6)	128.5
3'	7.06 (d, J=9.0)	114.5
4'	-	163.7
5'	7.06 (d, J=9.0)	114.5
6'	7.98 (d, J=9.0)	128.5
1''	4.95 (d, J=7.8)	102.5
2''	3.70 (m)	83.8
3''	3.74 (m)	76.2

4''	3.40 (dd, J=9.8, 8.9)	70.3
5''	3.68 (ddd, J= 9.8, 5.2, 2.0)	74.6
6''	4.48 (dd, J=2.0, 11.7) 4.32 (dd, J=5.2, 11.7)	63.8
1'''	5.05 (d, J=8.0)	103.1
2'''	3.46 (dd, J=9.6, 8.0)	72.2
3'''	4.12 (t, J=3.6)	71.9
4'''	3.64 (dd, J=9.8, 3.4)	67.4
5'''	4.05 (ddd, J= 9.9, 5.2, 2.3)	71.4
6'''	4.33 (dd, J=12.1, 2.2) 4.24 (dd, J=12.1, 5.1)	63.9
OCH ₃	3.86 (s)	54.9
OCOCH ₃	1.98 (s), 2.14 (s)	19.9
C=O	-	172.5, 172.3

I hovedsak stemmer data for det isolerte stoff med litteraturverdien, selv om det er en del mindre avvik.

Det er ikke funnet noen data i litteraturen for DPPH scavenging, 15-LO hemming, XO hemming, AChE hemming eller BuChE hemming for dette stoffet.

6.22.6 Allosyl-acetylglukosyl-isoscutellarein



Figur 6.37: Allosyl-acetylglukosyl-isoscutellarein (4H-1-Benzopyran-4-one, 7-[(6-O-acetyl-2-O- β -D-allopyranosyl- β -D-glucopyranosyl)oxy]-5,8-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-)

Allosyl- acetylglukosyl-isoscutellarein (AlAcGI) ble isolert fra fraksjon BuOH S5V8V2H2. Det er tidligere funnet i *S. scardica* [11, 14].

^1H og ^{13}C NMR data for fraksjon *S. scardica* BuOH S5V8V2H2 (600/150 MHz, CD_3OD):

Posisjon	δ_{H} (J i Hz)	δ_{C}
1	-	-
2	-	-
3	6.75(1H, s)	-
4	-	-
5	-	-
6	6.66 (1H, s)	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2'/6'	7.95 (2H, d, J=8.8)	-
3'/5'	6.95 (2H, d, J=8.5)	-
4'	-	-
1''	5.04 (1H, d, J=7.7)	-

2''	(overlapp, 3.4-4.3)	-
3''	3.68*	77.3
4''	3.49*	70.6
5''	(overlapp, 3.4-4.3)	-
6''	(overlapp, 3.4-4.3)	-
1'''	5.07 (d, J=8.1)	-
2'''	(overlapp, 3.4-4.3)	-
3'''	4.10*	72.6
4'''	(overlapp, 3.4-4.3)	-
5'''	(overlapp, 3.4-4.3)	-
6'''	(overlapp, 3.4-4.3)	-
C=O	-	-
COCH ₃	2.15	-

Dette stoffet er ikke rent, men ut fra spektrene ser det ut til at AlAcGI er hovedsubstansen. Spektrene er av nokså dårlig kvalitet, men signalene er forsøkt tilordnet ut fra ¹H og HSQC-spektra og sammenligning med spektra av lignende stoffer. Protonsignaler merket med * har posisjon betemt ut fra HSQC-spektret.

Spektraldata for dette stoffet er funnet ett sted i litteraturen [121], men stoffet er angitt med forskjellige navn forskjellige steder i artikkelen, så det er uklart hvilket stoff som egentlig er rapportert.

Det er ikke funnet noen data for DPPH scavenging, 15-LO hemming, XO hemming, AChE hemming eller BuChE hemming for dette stoffet.

6.23 Generelle kommentarer

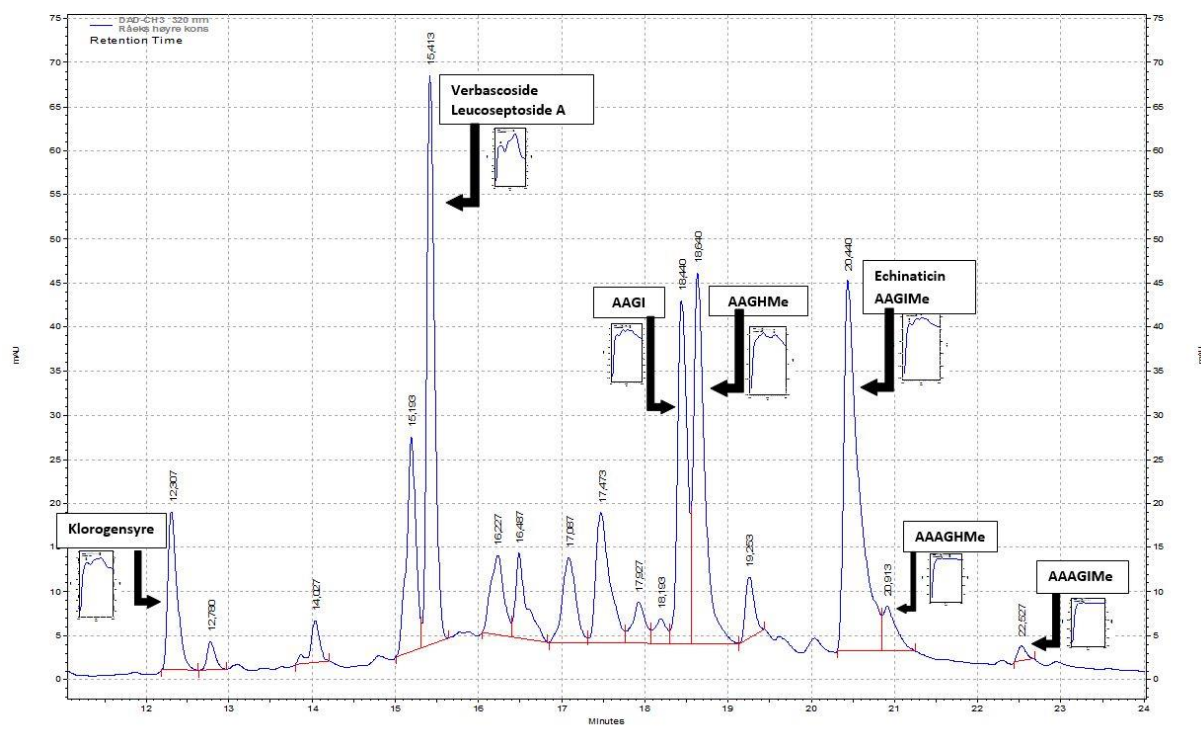
Ut fra våre spektra ser det ut som acetylgruppen på allose i isoscutellareinbaserte flavonoider har et signal i ¹H NMR ved 1.98 ppm, mens dette signalet ligger ved 2.00 ppm i hypolaetinbaserte flavonoider. Forskjellen er liten, men virker å finnes i alle de undersøkte stoffene. Metylsignalet i acetylgruppe på glukose ligger ved 2.15 ppm.

6.24 Identifisering av topper i HPLC kromatogrammer

De isolerte renstoffene ble koeluert med råekstraktet, BuOH- og EtOAc-fasen for å finne ut hvilke topper i ekstraktene som kom fra de isolerte stoffene og i hvor stor grad de befant seg i de forskjellige fasene.

Verbascosid var en av hovedkomponentene i *S.scardica* og utgjør den høyeste toppen i kromatogrammet av EtOH-råekstraktet, sammen med leucoseptosid A. Leucoseptosid A hadde samme retensjonstid (15.41 min) og UV-spektrum ved koeluering, men ettersom den er i mindre mengde i *S.scardica* er toppen skjult under toppen til verbascosid. Klorogensyre hadde den laveste retensjonstid (12.3 min), som stemmer godt ettersom den var et av de mest polare renstoffene som ble isolert. Echinaticin og AAGIMe hadde også samme retensjonstid, men her igjen var det mye mer av echinaticin i *S.scardica* EtOH-råekstraktet enn av AAGIMe. Felles for alle disse toppene var UV-maksimumet som lå mellom 280-350 nm. Dette er kjennetegnet for flavoner og fenyletanoider, på grunn av det konjugerte systemet.

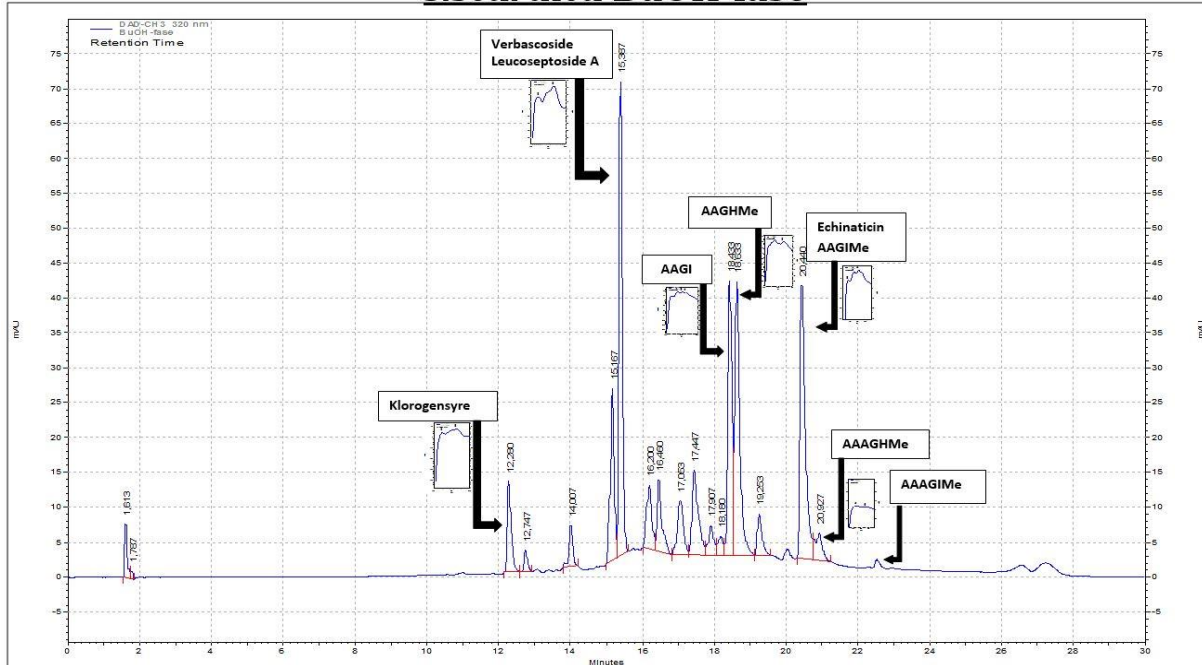
S.scardica EtOH- råekstraktet



Figur 6.38: HPLC kromatogram (320 nm) av EtOH-råekstraktet med identifiserte innholdsstoffer

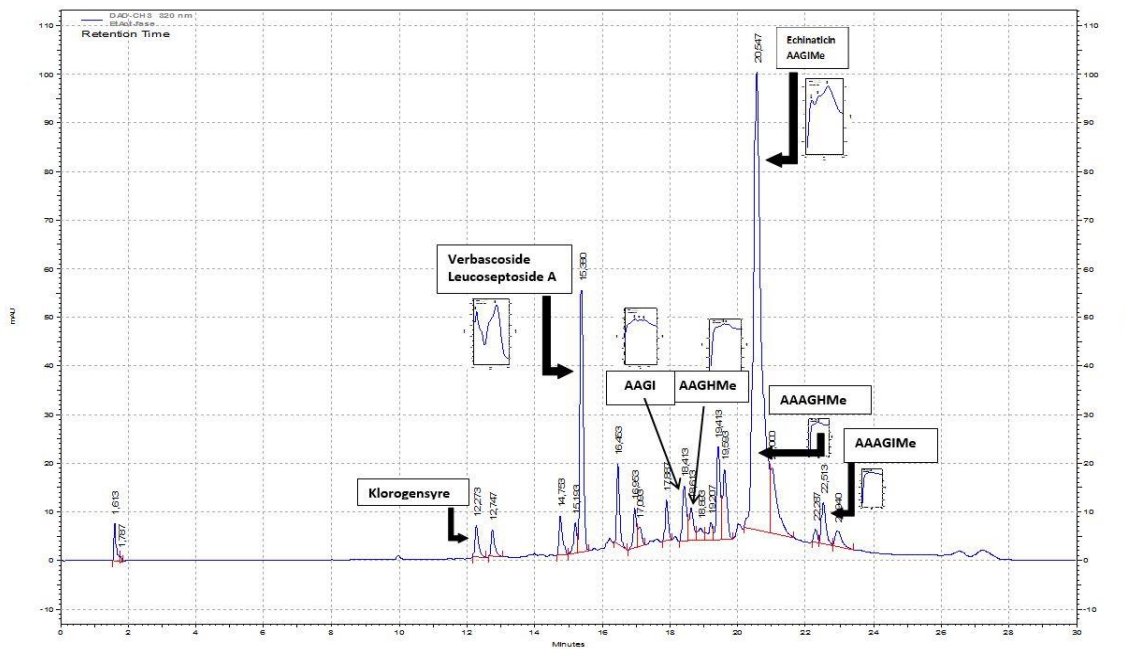
Det var mer echinaticin i EtOAc-fasen enn i BuOH-fasen, mens det var mest verbascosid i BuOH-fasen, og dette synes godt på HPLC-kromatogrammene for disse to fasene (figur 6.39 og 6.40). Alle renstoffene befant seg i begge fasene.

S.scardica BuOH-fase



Figur 6.39: HPLC kromatogram (320 nm) av BuOH-fase med identifiserte innholdsstoffer

S.scardica EtOAc-fase



Figur 6.40: HPLC kromatogram (320 nm) av EtOAc-fase med identifiserte innholdsstoffer

6.25 Oppsummering

Tabellen under viser resultatverdiene for alle de prøvene det ble tatt radikalscavenger og enzymhemmingsaktivitets målinger.

Tabell 6.46: Målingsresultatene av radikalscavenger og enzymhemmingsaktivitet

	IC ₅₀ 15-LO inhibering µg/ml	IC ₅₀ XO inhibering µg/ml	IC ₅₀ DPPH scavenging µg/ml	IC ₅₀ AChE inhibering µg/ml	IC ₅₀ BuChE inhibering µg/ml
Råekstrakt (EtOH)	232±9	238±74	41±3	>100	>100
DCM fraksjon	249±7	>167	>333	>100	>100
EtOAc fraksjon	65±6	39±4	47±4	>100	>100
EtOAc bunnfall	120±5	>167	24±1	>100	>100
BuOH fraksjon	98±6	>167	26±3	>100	>100
Vannfraksjon	>333	>333	137±13	>100	>100
Verbascosid	>167	>167	30±2	>100	>100
Klorogensyre*	>42	>83	92±14	>100	>100
Echinaticin	137±12	27±6	>167	>100	>100
Acetylallylglukosyl- isoscuteallarein	>83	>167	65±15	>100	>100
Acetylallylglukosyl- isoscuteallarein 4'- metyleter	>167	>83	33±4	>100	>100

*På grunn av stoffmangel kunne ikke 15-LO inhibering og XO inhibering måles ved høyere konsentrasjoner for klorogensyre

7 Konklusjon

EtOH-råekstraktet fra *S.scardica* inneholdt mest flavon-glykosider og fenyletanoider. Det viste lav hemming av 15-LO og XO, men hadde god radikalscavenger aktivitet. I tillegg viste den ganske lav AChE- og BuChE-hemmende aktivitet.

EtOAc-fasen hadde mest aktivitet ved både XO- og 15-LO-hemming og hadde god radikalscavenger aktivitet. Fra denne fasen ble det isolert echinaticin, leucoseptosid A, acetylallosyl-acetylglukosyl-metyl-isoscutellarein og acetylallosyl-glukosyl-metyl-isoscutellarein (AAGIMe). AAGIMe viste lav aktivitet ved de fire enzymhemmingstestene (15-LO-, XO-, AChE- og BuChE-hemming), mens det hadde god radikalscavenger aktivitet. Echinaticin derimot viste bare god XO-hemmings aktivitet.

Fra butanol fasen ble det isolert klorogensyre, verbascosid, acetylallosyl-glukosyl-metyl-isoscutellarein (AAGIMe), acetylallosyl-glukosyl-isoscutellarein, acetylallosyl-acetylglukosyl-metyl-hypolaetin, acetylallosyl-glukosyl-hypolaetin, allosyl-acetylglukosyl-isoscutellarein og acetylallosyl-glukosyl-metyl-hypolatin. Verbascosid hadde, som AAGIMe, lite hemmingsaktivitet overfor enzymene, men god radikalscavenger aktivitet.

Resultatene tyder på at anti-Alzheimer effekten av *S.scardica* som tidligere har blitt rapportert, sannsynligvis ikke skyldes AChE og BuChE-hemmingsaktiviteten

8 Videre arbeid

Det gjenstod flere faser og fraksjoner som ikke ble arbeidet videre med for isolering og identifisering av innholdsstoffer, noe som er interessant å undersøke:

- EtOAc-Bf- fasen ble det ikke gjort noe med, og den så ut til å inneholde endel interessante signaler i NMR-spekteret og HPLC-kromatogrammet. Den bør derfor renses videre og det bør undersøkes hvilke stoffer som finnes i den.
- Flere av fraksjonene fra BuOH-fasen bør studeres videre.
- Identifisere flere av toppene i HPLC-kromatogrammene av EtOH-råekstraktet, BuOH-fasen og EtOAc-fasen.
- Etersom det var for lite av flere av de isolerte renstoffene for å utføre måling av radikalscavenger, 15-LO, XO-, AChE og BuChE-hemming, bør dette eventuelt gjennomføres.
- Selv om DCM-fasen og vannfasen ikke så ut til å ha særlig aktivitet i våre bioassay, bør de undersøkes videre.
- -Test av ekstrakter, fraksjoner og renstoffer i samarbeid med våre partnere ved Med. Fak., UiO (prof. Jens Pahnkes gruppe) for effekt mot utvikling av Alzheimer i dyreforsøk bør gjøres. Slike forsøk er påbegynt.
- Andre relevante tester (f. eks. membrantransport av amyloid-beta) i samarbeid med Pahnkes gruppe for å få bedre innsikt i den eventuelle anti-Alzheimer effekten vil være svært interessant.

9 Litteraturliste

1. Lim, T.K., Edible medicinal and non medicinal plants : volume 8, flowers. 2014, New York: Springer.
2. USDA. 2017 Sideritis L. ironwort. Aksessert 05.03.2017 fra: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=SIDER>.
3. IUCN. 2017 Sideritis scardica. Aksessert 05.mars 2017 fra: <http://www.iucnredlist.org/details/summary/203271/0>.
4. EMA. 2015 European Union list entry on Sideritis scardica Griseb.,herba. Aksessert 05.mars 2017 fra: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_List_entry/2015/07/WC500190614.pdf.
5. Todorova, M. og Trendafilova, A., Sideritis scardica Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. Journal of ethnopharmacology, 2014. **152**(2): 256-65.
6. Dogan, Y. og Nedelcheva, A., Wild plants from open markets on both sides of the Bulgarian-Turkish border. Indian Journal of Traditional Knowledge, 2015. **14**(3): 351-358.
7. Janeska, B., Stefova, M., og Alipieva, K., Assay of flavonoid aglycones from the species of genus Sideritis (Lamiaceae) from Macedonia with HPLC-UV DAD. Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia), 2007. **57**(3): 371-377.
8. Tadić, V.M, Markovic, G., Jeremic, I. , et al. Antiglioma action of Sideritis scardica extracts. Planta Medica, 2009. **75**(9): abstract PE67.
9. Tadic, V.M., Jeremic, I., Dobric, S. et al., Anti-inflammatory, gastroprotective, and cytotoxic effects of Sideritis scardica extracts. Planta Medica, 2012. **78**(5): 415-427.
10. Petreska, J., Stefova, M., Ferreres, F. et al., Potential bioactive phenolics of Macedonian Sideritis species used for medicinal "Mountain Tea". Food Chemistry, 2011. **125**(1): 13-20.
11. Stanoeva, J.P., Bagashovska, D., og Stefova, M., Characterization of urinary bioactive phenolic metabolites excreted after consumption of a cup of mountain tea (Sideritis scardica) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 2012. **31**(2): 229-243.
12. Danesi, F., Saha, S., Kroon, P.A. et al., Bioactive-rich Sideritis scardica tea (mountain tea) is as potent as Camellia sinensis tea at inducing cellular antioxidant defences and

- preventing oxidative stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013. **93**(14): 3558-3564.
13. Petreska, J., Stefkov, G., Kulevanova, S., Alipieva, K., Bankova, S., og Stefova, M., Phenolic compounds of mountain tea from the Balkans: LC/DAD/ESI/MSn profile and content. *Natural Product Communications*, 2011. **6**(1): 21-30.
 14. Stanoeva, J.P. og Stefova, M., Evaluation of the ion trap MS performance for quantification of flavonoids and comparison to UV detection. *Journal of Mass Spectrometry*, 2012. **47**(11): 1395-1406.
 15. Charalampos Proestos, P.Z., Vassileia J. Sinanoglou, Determination of Plant Bioactive Compounds. Antioxidant Capacity and Antimicrobial Screening. Focusing on Modern Food Industry, 2013. **2**(1): 26-35.
 16. Samanidou, V., Tsagiannidis, A., og Sarakatsianos, I., Simultaneous determination of polyphenols and major purine alkaloids in Greek *Sideritis* species, herbal extracts, green tea, black tea, and coffee by high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Separation Science*, 2012. **35**(4): 608-615.
 17. Stanoeva, J.P., Stefova, M., Stefkov, G. et al., Chemotaxonomic contribution to the *Sideritis* species dilemma on the Balkans. *Biochememical Systematics and Ecology*, 2015. **61**: 477-487.
 18. Taskova, R., Mitova, .M., Evstatieva, L. et al., Iridoids, flavonoids and terpenoids as taxonomic markers in Lamiaceae, Scrophulariaceae, and Rubiaceae. *Bocconea*, 1997. **5**: 631-636.
 19. Nikolova, M. og Dzhurmanski, A., Evaluation of Free Radical Scavenging Capacity of Extracts from Cultivated Plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2009. **23**(suppl 1): 109-111.
 20. Konic-Ristic, A., Srdic-Rajic, T., Kardum, N. et al., Effects of bioactive-rich extracts of pomegranate, persimmon, nettle, dill, kale and *Sideritis* and isolated bioactives on arachidonic acid induced markers of platelet activation and aggregation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013. **93**(14): 3581-3587.
 21. Todorova, M., Trendafilova, A., Evstatieva, L., og Antonova, D., Volatile components in *Sideritis scardica* Griseb. cultivar. *Comptes Rendus de l' Academie Bulgare des Sciences*, 2013. **66**(4): 507-512.

22. Trendafilova, A.B., Todorova, M.N., Evstatieva, L.N., og Antonova, D.V., Variability in the Essential-Oil Composition of *Sideritis scardica* Griseb. from Native Bulgarian Populations. *Chemistry and Biodiversity*, 2013. **10**(3): 484-492.
23. Bojovic, D., Jankovic, S., Potpara, Z., og Tadic, V., Summary of the phytochemical research performed to date on *Sideritis* species. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 2011. **12**: 109-122.
24. Baser, K.H.C., Kirimer, N., og Tumen, G., Essential oil of *Sideritis scardica* Griseb. subsp. *scardica*. *Journal of Essential Oil Research*, 1997. **9**(2): 205-207.
25. Kirimer, N., Baser, K.H.C., Demirci, B., og Duman, H., Essential Oils of *Sideritis* Species of Turkey Belonging to the Section *Empedoclia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 2004. **40**(1): 19-23.
26. Karapandzova, M., Qazimi, B., Stefkov, G. et al., Chemical characterization, mineral content and radical scavenging activity of *Sideritis scardica* and *S. raeseri* from R. Macedonia and R. Albania. *Natural Product Communications*, 2013. **8**(5): 639-644.
27. Kostadinova, E., Alipieva, K., Stefova, M. et al., Influence of cultivation on the chemical composition and antimicrobial activity of *Sideritis* spp. *Pharmacognosy Magazine*, 2008. **4**(14): 102-106.
28. Qazimi, B., Stefkov, G., Karapandzova, M., Cvetkovikj, I., og Kulevanova, S., Aroma compounds of mountain tea (*Sideritis scardica* and *S. raeseri*) from western Balkan. *Natural Product Communications*, 2014. **9**(9): 1369-1372.
29. Tadic, V., Bojovic, D., Arsic, I. et al., Chemical and antimicrobial evaluation of supercritical and conventional *Sideritis scardica* Griseb., *Lamiaceae* extracts. *Molecules*, 2012. **17**: 2683-2703.
30. Todorova, M.N., Christov, R.C., og Evstatieva, L.N., Essential oil composition of three *Sideritis* species from Bulgaria. *Journal of Essential Oil Research*, 2000. **12**(4): 418-420.
31. Kostadinova, E., Nikolova, D., Alipieva, K. et al., Chemical constituents of the essential oils of *Sideritis scardica* Griseb. and *Sideritis raeseri* Boiss and Heldr. from Bulgaria and Macedonia. *Natural Product Research*, 2007. **21**(9): 819-823.
32. Todorova, M. og Trendafilova, A., *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014. **152**(2): 256-65.

33. Jeremic, I., Tadic, V., Isakovic, A. et al., The mechanisms of in vitro cytotoxicity of mountain tea, *Sideritis scardica*, against the C6 glioma cell line. *Planta Medica*, 2013. **79**(16): 1516-1524.
34. Knoerle, R., Extracts of *Sideritis scardica* as triple monoamine reuptake inhibitors. *Journal of Neural Transmission*, 2012. **119**(12): 1477-1482.
35. Feistel, B., Walbroel, B. og Pahnke, J., Extract preparation from *Sideritis scardica* enhances memorizing skills of mice in Morris water maze. *Planta Medica*, 2013. **79**(13): abstract PB9.
36. Hofrichter, J., Krohn, M., Schumacher, T. et al., *Sideritis* spp. Extracts Enhance Memory and Learning in Alzheimer's β -Amyloidosis Mouse Models and Aged C57Bl/6 Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2016. **53**(3): 967-80.
37. Behrendt, I., Schneider, I., Schuchardt, J.P., Bitterlich, N., Hahn, A., Effect of an herbal extract of *Sideritis scardica* and B-vitamins on cognitive performance under stress: A pilot study. *International Journal of Phytomedicine*, 2016. **8**: 95-103.
38. Halliwell, B., Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *Aksessert* 5.3.2017 fra <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0002269.pub3/full>
39. Rao, S.P., Kalva, S., Yerramilli, A., og Mamidi, S., Free radicals and tissue damage: role of antioxidants. *Free Radicals and Antioxidants*, 2011. **1**(4): 2-7.
40. Pham-Huy, L.A., He, H., og Pham-Huy, C., Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 2008. **4**(2): 89-96.
41. Dobrian, A.D., Lieb, D.C., Cole, B.K., Taylor-Fishwick, D.A. Chakrabarti, S.K. og Nadler, J.L., Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Progress in Lipid Research*, 2011. **50**(1): 115-31.
42. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., et al. , *Pharmacology*, 6. utgave. 2007, Churchill Livingstone, Edinburgh, Skottland.
43. Cole, B.K., Lieb, D.C., Dobrian, A.D., og Nadler, J.L., 12- and 15-lipoxygenases in adipose tissue inflammation. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2013. **104–105**: 84-92.
44. van Leyen, K., Lipoxygenase: an emerging target for stroke therapy. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 2013. **12**(2): 191-9.

45. Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomás-Barberán, T., Datta, N., Singanusong, R. og Chen, S.S., Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2004. **59**(3): 113-122.
46. Beecher, G.R., Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence, and intake. *Journal of Nutrition*, 2003. **133**(10): 3248S-3254S.
47. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., og Bobilya, D.J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002. **13**(10): 572-584.
48. Mladěnka, P., Zatloukalová, L., Filipský, T., og Hrdina, R., Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010. **49**(6): 963-975.
49. Shibata, N. og Kobayashi, M., The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Brain Nerve*, 2008. **60**(2): 157-170.
50. Fong, P., Kuok, C., og Chao, C., Molecular docking and ADMET studies on traditional Chinese medicines ingredients and xanthine oxidase. *Jisuanji Yu Yingyong Huaxue*, 2013. **30**(1): 8-12.
51. Giannopoulos, P.F., Joshi, Y.B., Chu, J., og Pratico, D., The 12-15-lipoxygenase is a modulator of Alzheimer's-related tau pathology in vivo. *Aging Cell*, 2013. **12**(6): 1082-1090.
52. Joshi, Y.B., Giannopoulos, P.F., og Pratico, D., The 12/15-lipoxygenase as an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2015. **36**(3): 181-6.
53. Saleem, H., Ahmad, I. Shahid, M.N. et al., In vitro acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory potentials of *Jatropha gossypifolia* plant extracts. *Acta Poloniae Pharmaceuticae*, 2016. **73**(2): 419-23.
54. Rees, T., Hammond, P.I., Soreq, H., Younkin, S., og Brimijoin, S., Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiology of Aging*, 2003. **24**(6): 777-87.
55. Dionex Corporation, *Dionex ASE 350 Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual*. Document No. 065220, Revision 3. 2011, Sunnyvale, CA, USA: Dionex.
56. Rostagno, M.A. og Prado, J.M., *Natural Product Extraction : Principles and Applications*. Green Chemistry Series. Vol. v.21. 2013, Cambridge: Royal Society of Chemistry.

57. Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K.E., Legemiddelanalyse. 2. utg., 2010, Bergen: Fagbokforlaget.
58. Greibrokk, T., Lundanes, E., Rasmussen, K.E., og Karlsen, J., Kromatografi : separasjon og deteksjon. 3. utg. 1994, Oslo: Universitetsforlaget.
59. Wu, C.-s., Handbook of size exclusion chromatography and related techniques. 2. utg. Chromatographic science series. 2004, New York: Marcel Dekker. xiv, 694 p.
60. Sigma-Aldrich. 2005 VersaFlash™ High Throughput Flash Purification. Aksessert fra: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Brochure/1/t403110.pdf>.
61. Klein, D.R., Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, i Organic Chemistry 2. 2014, John Wiley & Sons, Hoboken, USA, s. 731-772.
62. Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 2004. **26**(2): 211-219.
63. Malterud, K.E., 2009, Procedure for DPPH assay for radical scavenging. Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.
64. Lyckander, I.M. og Malterud, K.E., Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* prevent oxidative inactivation of 15-lipoxygenase. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 1996. **54**(4): 239-46.
65. Utenova, B.T., Malterud, K.E., og Rise, F., Antioxidant activity of O-protected derivatives of (-)-epigallocatechin-3-gallate: inhibition of soybean and rabbit 15-lipoxygenases. Arkivoc 2007(9): 6-16.
66. Pham, A.T., Malterud, K.E., Paulsen, B.S., Diallo, D., og Wangensteen, H., DPPH radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity of *Terminalia macroptera* leaves. Natural Product Communications, 2011. **6**(8): 1125-1128.
67. Pacher, P., Nivorozhkin, A., og Szabo, C., Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. Pharmacological Reviews, 2006. **58**(1): 87-114.
68. Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., og Thongnoi, W., Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. Journal of Ethnopharmacology, 2003. **89**(2-3): 261-4.

69. Atta-ur-Rahman, Choudhary, M.I., Thomsen, W.J., Enzyme Assays, i Bioassay Techniques for Drug Development. 2001, Harwood Academic: Amsterdam, Nederland. s. 133-136.
70. Landreau, A., Bertrand. S., Simoes-Pires,C. et al., Normal phase HPLC-based activity profiling of non-polar crude plant extracts - acetylcholinesterase inhibiting guttiferones from Montrouziera cauliflora as a case study. Natural Product Research **30**(24): 2754-2759.
71. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr., og Featherstone, R.M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, 1961. **7**: 88-95.
72. Bohm, B., Introduction to flavonoids. 1998, Harwood Academic Publishers: Singapore.
73. Petreska, J., Stefova, M., Ferreres, F. et al., Potential bioactive phenolics of Macedonian Sideritis species used for medicinal “Mountain Tea”. . Food Chemistry, 2011. **125**: 13-20.
74. Acteoside. PubChem Compound Database, aksessert 2.5.2017 fra: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281800>
75. Wen, Y., Huo, S., Zhang, W. et al., Pharmacokinetics, Biodistribution, Excretion and Plasma Protein Binding Studies of Acteoside in Rats. Drug Research, 2016. **66**(3): 148-53.
76. Kurisu, M., Miyamae, Y., Murakami, K. et al., Inhibition of amyloid beta aggregation by acteoside, a phenylethanoid glycoside. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2013. **77**(6): 1329-32.
77. Shiao, Y.J., Su, M.H., Lin, H.C., og Wu, C.R., Acteoside and Isoacteoside Protect Amyloid beta Peptide Induced Cytotoxicity, Cognitive Deficit and Neurochemical Disturbances In Vitro and In Vivo. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(4): 895.
78. Venditti, A., Frezza, C., Celona, D. et al., Polar constituents, protection against reactive oxygen species, and nutritional value of Chinese artichoke (*Stachys affinis* Bunge). Food Chemistry, 2017. **221**: 473-481.
79. Kim, K.H., Kim, S., Jung, M.Y., Ham, I.H., og Whang, W.K., Anti-inflammatory phenylpropanoid glycosides from Clerodendron trichotomum leaves. Archives of Pharmacal Research, 2009. **32**(1): 7-13.

80. Georgiev, M., Alipieva, K., Orham I., Abrashev, R., Denev, P. og Angelova, M., Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. *Food Chemistry*, 2011. **128**(1): 100-5.
81. Cespedes, C.L., Munoz, E., Salazar, J.R. et al., Inhibition of cholinesterase activity by extracts, fractions and compounds from *Calceolaria talcana* and *C. integrifolia* (Calceolariaceae: Scrophulariaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 2013. **62**: 929-926.
82. Pendota, S.C., Aderogba, M.A., Ndhkala, A.R., og Van Staden, J., Antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Buddleja salviifolia* (L.) Lam. leaf extracts and isolated compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013. **148**(2): 515-20.
83. Filho, A.G., Morel, A.F., Adolpho, L. et al., Inhibitory effect of verbascoside isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng on prolyl oligopeptidase activity. *Phytotherapy Research*, 2012. **26**(10): 1472-5.
84. Tang, H.-Y., Bai, M.-M., Tian, J.-M. et al., Chemical components from the seeds of *Catalpa bungei* and their inhibitions of soluble epoxide hydrolase, cholinesterase and nuclear factor kappa B activities. *RSC Advances*, 2016. **6**(47): 40706-40716.
85. Skari, K.P., Malterud, K.E., og Haugli, T., Radical scavengers and inhibitors of enzymatic lipid peroxidation from *Plantago major*, a medicinal plant. *Spec. Publ. - R. Soc. Chem.*, 1999. **240**(Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease): 200-202.
86. Alvarenga, T.A., Bertanha, C.S., de Oliveira, P.F. et al., Lipoxygenase inhibitory activity of *Cuspidaria pulchra* and isolated compounds. *Natural Product Research*, 2015. **29**(11): 1083-1086.
87. Furusawa, C., Yasuda, C., Tsuji, H. et al., A new triterpenoid glycoside from the leaves and stems of *Duranta repens*. *Natural Product Research*, 2016. **30**(2): 246-250.
88. Xiong, Q., Kadota, S., Tani, T., og Namba, T., Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 1996. **19**(12): 1580-1585.
89. Shang, Y.-J., LI, Y.-M., Jiang, S.-H. et al., The effect of phenylpropanoid glycosides Acteoside of *Scrophularia ningpoensis* on mouse hyperuricemia. *Jiefangjun Yaoxue Xuebao*, 2006. **22**(1): 30-32.

90. Mostafa, M., Nahar, N., Mosihuzzaman, M., Makhmoor, T., Choudhary, M.I. og Attar-Rahman, Free radical scavenging phenylethanoid glycosides from *Leucas indica* Linn. *Natural Product Research*, 2007. **21**(4): 354-361.
91. Huang, C.G., Shang, Y.J., Zhang, J., Zhang, J.R., Li, W.J. og Jiao B.H., Hypouricemic Effects of Phenylpropanoid Glycosides Acteoside of *Scrophularia ningpoensis* on Serum Uric Acid Levels in Potassium Oxonate-Pretreated Mice. *American Journal of Chinese Medicine*, 2008. **36**(1): 149-157.
92. Flemmig, J., Kuchta, K., Arnhold, J., og Rauwald, H.W., *Olea europaea* leaf (Ph.Eur.) extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase. *Phytomedicine*, 2011. **18**(7): 561-566.
93. Cheng, L.-C., Murugaiyah, V., og Chan, K.-L., In vitro Xanthine Oxidase Inhibitory Studies of *Lippia nodiflora* and Isolated Flavonoids and Phenylethanoid Glycosides as Potential Uric Acid-lowering Agents. *Natural Product Communications*, 2015. **10**(6): 945-8.
94. Cheng, L.-C., Murugaiyah, V., og Chan, K.-L., Flavonoids and phenylethanoid glycosides from *Lippia nodiflora* as promising antihyperuricemic agents and elucidation of their mechanism of action. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015. **176**: 485-493.
95. Wan, Y., Zou, B., Zeng, H., Zhang, H., Chen, M. og Fu, G., Inhibitory effect of verbascoside on xanthine oxidase activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016. **93**(Part_A): 609-614.
96. Huan, S.K-H., Wang, K-T., Lee, C.-J., Sung, C.-H., Chien, T.-Y. og Wang, C.-C., Wu-Chia-Pi solution attenuates carbon tetrachloride-induced hepatic injury through the antioxidative abilities of its components acteoside and quercetin. *Molecules*, 2012. **17**(12): 14673-84.
97. Malheiro, R., Mendes, P., Fernandes, F., Rodrigues, N., Bento, A. og Pereira, J.A., Bioactivity and phenolic composition from natural fermented table olives. *Food & Function*, 2014. **5**(12): 3132-42.
98. Chlorogenic acid. PubChem Compound Database Aksessert 01.mai 2017 fra: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1794427>
99. Pauli, G.F., Kuczkowiak, U., og Nahrstedt, A., Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 1999. **37**(11): 827-836.

100. Szwajgier, D., Anticholinesterase activity of selected phenolic acids and flavonoids - interaction testing in model solutions. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2015. **22**(4): 690-4.
101. Zhou, Z.-Q., et alXiao, J., Fan, H.-X. et al ., Polyphenols from wolfberry and their bioactivities. *Food Chemistry*, 2017. **214**: 644-54.
102. Orhan, I., Kartal, M., Tosun, F., og Sener, B., Screening of various phenolic acids and flavonoid derivatives for their anticholinesterase potential. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2007. **62**(11-12): 829-32.
103. Mira, A., Yamashita, S., Katakura, Y., og Shimizu, K., In vitro neuroprotective activities of compounds from *Angelica shikokiana* Makino. *Molecules*, 2015. **20**(3): 4813-32.
104. Fujita, Y., Uehara, I., Morimoto, Y., Nakashima, M., Hatano, T. og Okuda, T., [Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. II. Inhibition mechanism of caffeetannins isolated from leaves of *Artemisia* species on lipoxygenase dependent lipid peroxidation]. *Yakugaku Zasshi*, 1988. **108**(2): 129-35.
105. King, D.L. og Klein, B.P., Effect of flavonoids and related compounds on soybean lipoxygenase-1 activity. *Journal of Food Science*, 1987. **52**(1): 220-1.
106. Oszmianski, J. og Lee, C.Y., Inhibitory effect of phenolics on carotene bleaching in vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990. **38**(3): 688-90.
107. Theerakulkait, C. og Barrett, D.M., Partial purification and characterization of sweet corn germ lipoxygenase. *Journal of Food Biochemistry*, 1995. **18**(5): 355-72.
108. Shingai, Y., Fujimoto, A., Nakamura, M., og Masuda, T., Structure and function of the oxidation products of polyphenols and identification of potent lipoxygenase inhibitors from Fe-catalyzed oxidation of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. **59**(15): 8180-6.
109. Kweon, M.H., Hwang, H.J., og Sung, H.C., Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. **49**(10): 4646-55.
110. Sarawek, S., Feistel, B., Pischel, I., og Butterweck, V., Flavonoids of *Cynara scolymus* possess potent xanthinoxidase inhibitory activity in vitro but are devoid of hypouricemic effects in rats after oral application. *Planta Medica*, 2008. **74**(3): 221-7.

111. Wang, S.H., Chen, C.-S., Huang, S.-H. et al., Hydrophilic ester-bearing chlorogenic acid binds to a novel domain to inhibit xanthine oxidase. *Planta Medica*, 2009. **75**(11): 1237-40.
112. Özyürek, M., Bektaşoğlu, B., Güçlü, K., og Apak, R., Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Analytica Chimica Acta*, 2009. **636**(1): 42-50.
113. Chen, L., Yin, H., Lan Z. et al., Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of *Smilax china* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011. **135**(2): 399-405.
114. Honda, S., Miura, Y., Masuda, A., og Masuda, T., Identification of crypto- and neochlorogenic lactones as potent xanthine oxidase inhibitors in roasted coffee beans. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2014. **78**(12): 2110-6.
115. Simirgiotis, M.J., Ramirez, J.E., Schmeda Hirschmann, G., og Kennelly, E.J., Bioactive coumarins and HPLC-PDA-ESI-ToF-MS metabolic profiling of edible queule fruits (*Gomortega keule*), an endangered endemic Chilean species. *Food Research International*, 2013. **54**(1): 532-543.
116. Cai, M., Ma, Y., Zhang, W. et al., Apigenin-7-O- β -D-(6"-p-coumaroyl)-Glucopyranoside Treatment Elicits Neuroprotective Effect against Experimental Ischemic Stroke. *International Journal of Biological Sciences*, 2016. **12**(1): 42-52.
117. Parveen, S., Riaz, N., Saleem, M. et al., Bioactive phenolics from *Launaea intybacea*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 2012. **34**(6): 1513-1519.
118. Tofighi, Z., Alipour, F., Hadavinia, H., Abdollahi, M., Hadjiakhoondi, A. og Yassa, N., Effective antidiabetic and antioxidant fractions of *Otostegia persica* extract and their constituents. *Pharmaceutical Biology*, 2014. **52**(8): 961-6.
119. Venditti, A., Bianco, A., Nicoletti, M. et al., Characterization of secondary metabolites, biological activity and glandular trichomes of *Stachys tymphaea* Hausskn. from the Monti Sibillini National Park (Central Apennines, Italy). *Chemistry & Biodiversity*, 2014. **11**(2): 245-261.
120. Abdel-Sattar, E., El-Gayed, S.H., Shehata, I., Ashour, O.M., Nagy, A.A. og Mohamadin, A.M., Antioxidant and cardioprotective activity of *Stachys schimperii* Vatke against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 2012. **50**(1): 41-47.

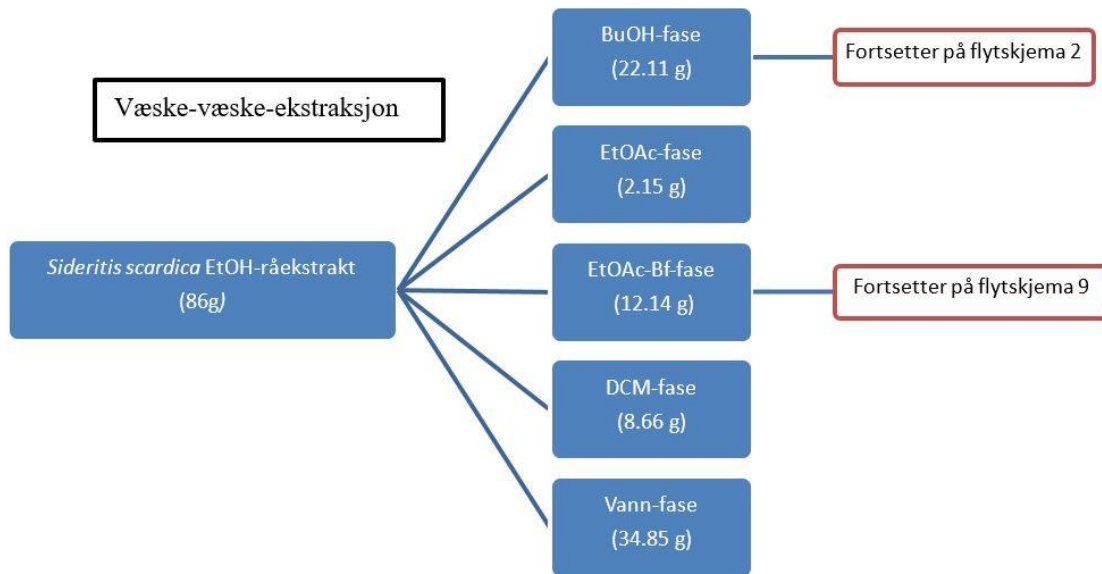
121. Mohamadi, S., Zhao, M., Amrani, A. et al., On-line screening and identification of antioxidant phenolic compounds of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. *Industrial Crops and Products*, 2015. **76**: 910-919.
122. Laggoune, S., Brouard, I., Leon, F. et al., Lignans and an abundant flavone glycoside with free-radical scavenging activity from the roots of the endemic species *Stachys mialhesi* de Noe. *Records of Natural Products*, 2011. **5**(3): 238-241.
123. Charami, M.T., Lazari, D., Karioti, A., Skaltsa, H., Hadjipavlou-Litina, D. og Souleles, C., Antioxidant and antiinflammatory activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (Lamiaceae). *Phytotherapy Research*, 2008. **22**(4): 450-4.
124. Chompoo, J., Upadhyay, A., Gima, S., Fukuta, M., og Tawata, S., Antiatherogenic properties of acetone extract of *Alpinia zerumbet* seeds. *Molecules*, 2012. **17**(6): 6237-48.
125. Pham, A.T., Malterud, K.E., Paulsen, B.S., Diallo, D., og Wangensteen, H., α -Glucosidase inhibition, 15-lipoxygenase inhibition, and brine shrimp toxicity of extracts and isolated compounds from *Terminalia macroptera* leaves. *Pharmaceutical Biology*, 2014. **52**(9): 1166-1169.
126. Teklu, S., Gundersen, L.-L., Larsen, T., Malterud, K.E., og Rise, F., Indolizine 1-sulfonates as potent inhibitors of 15-lipoxygenase from soybeans. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2005. **13**(9): 3127-3139.
127. Ezer, N., Sakar, M.K., Rodriguez, B., og De la Torre, M.C., Flavonoid glycosides and a phenylpropanoid glycoside from *Sideritis perfoliata*. *International Journal of Pharmacognosy*, 1992. **30**(1): 61-65.
128. Rodriguez-Lyon, M.L., Diaz-Lanza, A.M., Bernabe, M., og Villaescusa-Castillo, L., Flavone glycosides containing acetylated sugars from *Sideritis hyssopifolia*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2000. **38**(8): 684-687.
129. Halfon, B., Ciftci, E., og Topcu, G., Flavonoid constituents of *Sideritis caesarea*. *Turkish Journal of Chemistry*, 2013. **37**(3): 464-472.
130. Miyase, T., Koizumi, A., Ueno, A. et al., Studies on the Acyl Glycosides from *Leucoseptum japonicum* (MIQ.) Kitamura et Murata. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1982. **30**(8): 2732-2737.
131. Delazar, A., Shoeb, M., Kumarasamy, Y. et al., Two bioactive ferulic acid derivatives from *Eremostachys glabra*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004. **12**(2): 49-53.

132. Harput, Ü.Ş., Çalis, İ., Saracoglu, İ., Donmez, A.A., og Nagatsu, A., Secondary metabolites from *Phlomis syriaca* and their antioxidant activities. *Turkish Journal of Chemistry*, 2006. **30**(3): 383-390.

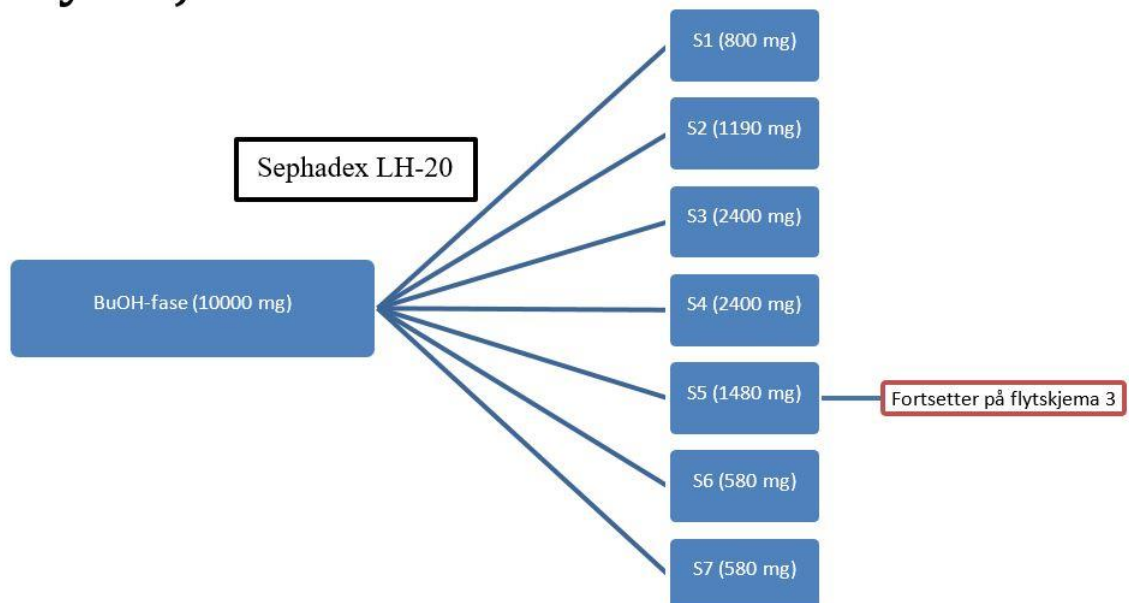
Vedlegg

1. Flytskjemaer 1-12

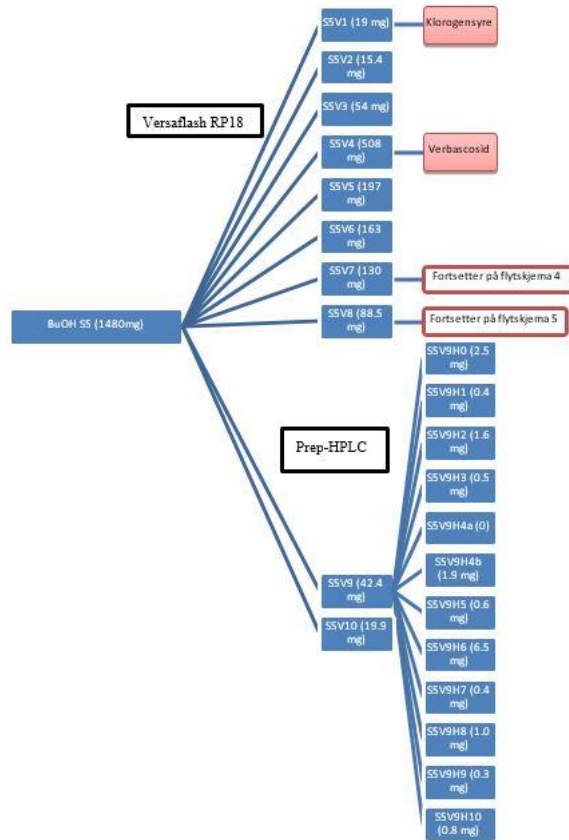
Flytskjema 1



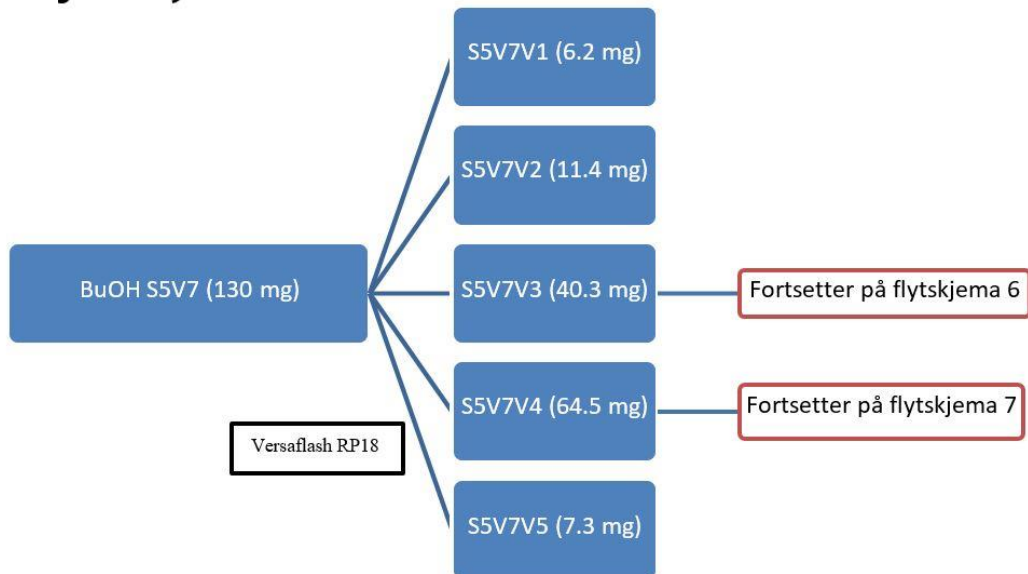
Flytskjema 2



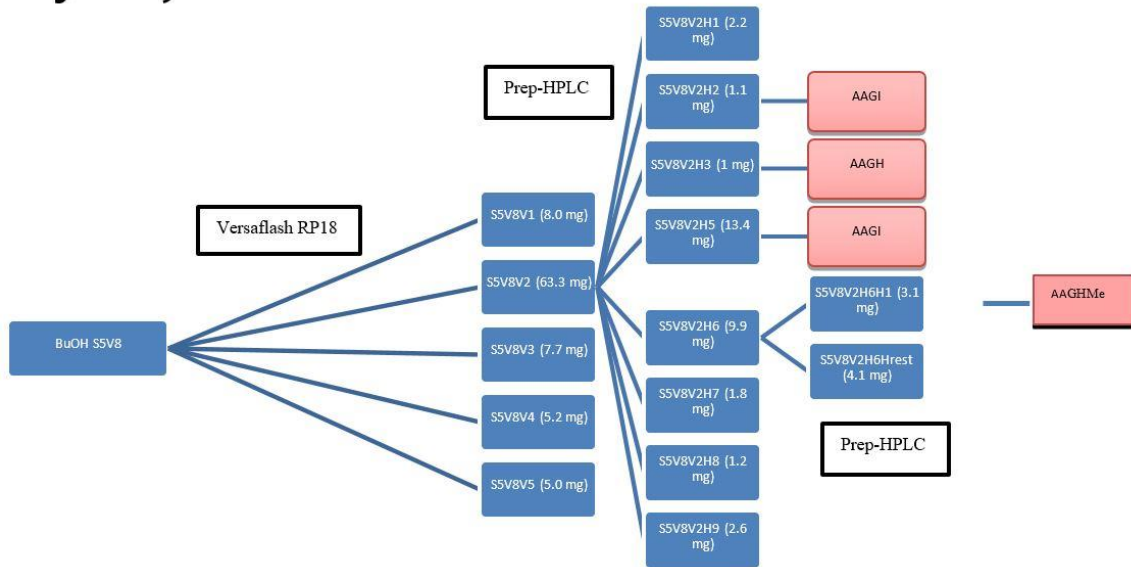
Flytskjema 3



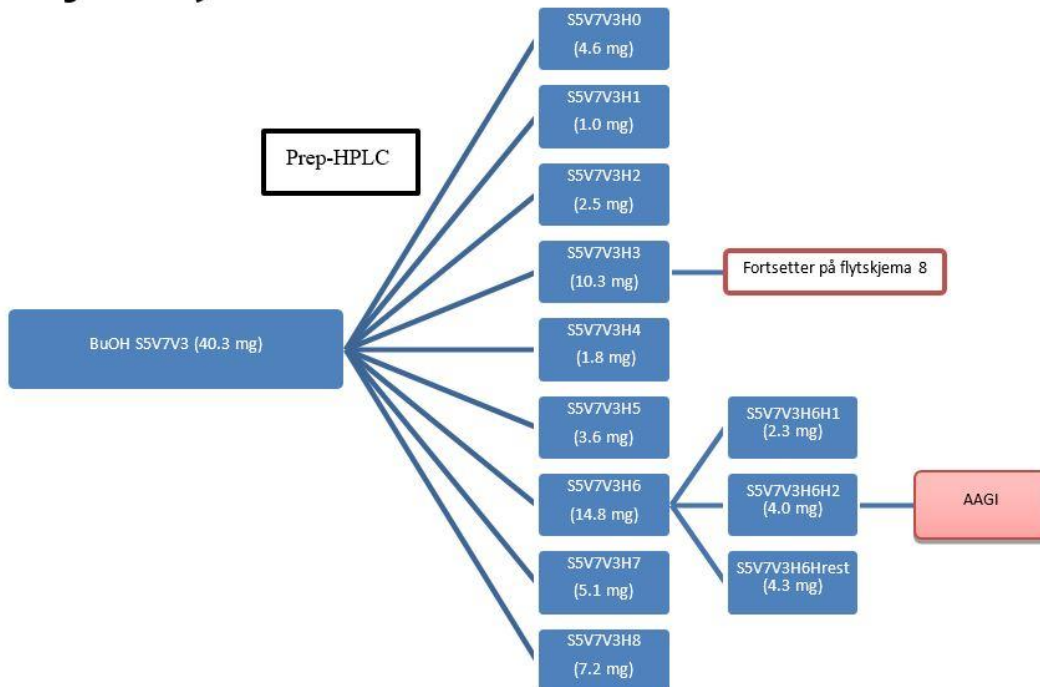
Flytskjema 4



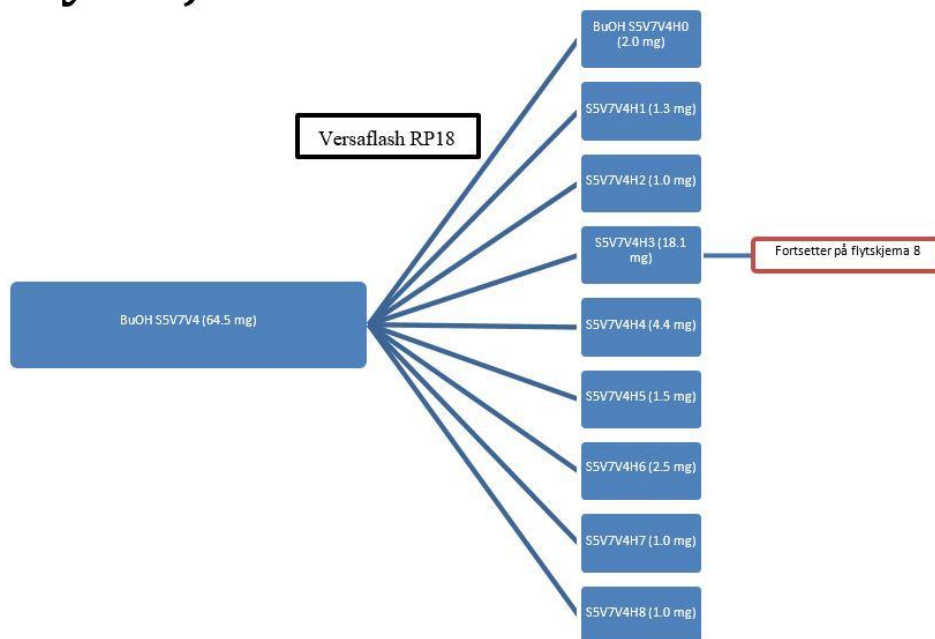
Flytskjema 5



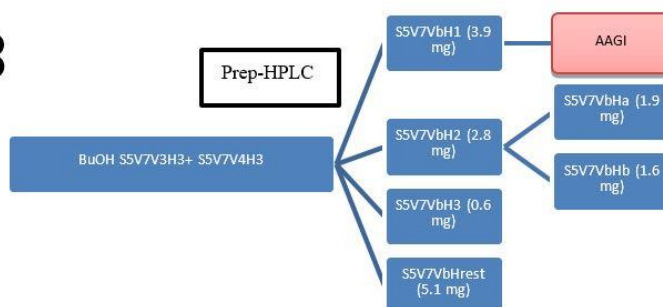
Flytskjema 6



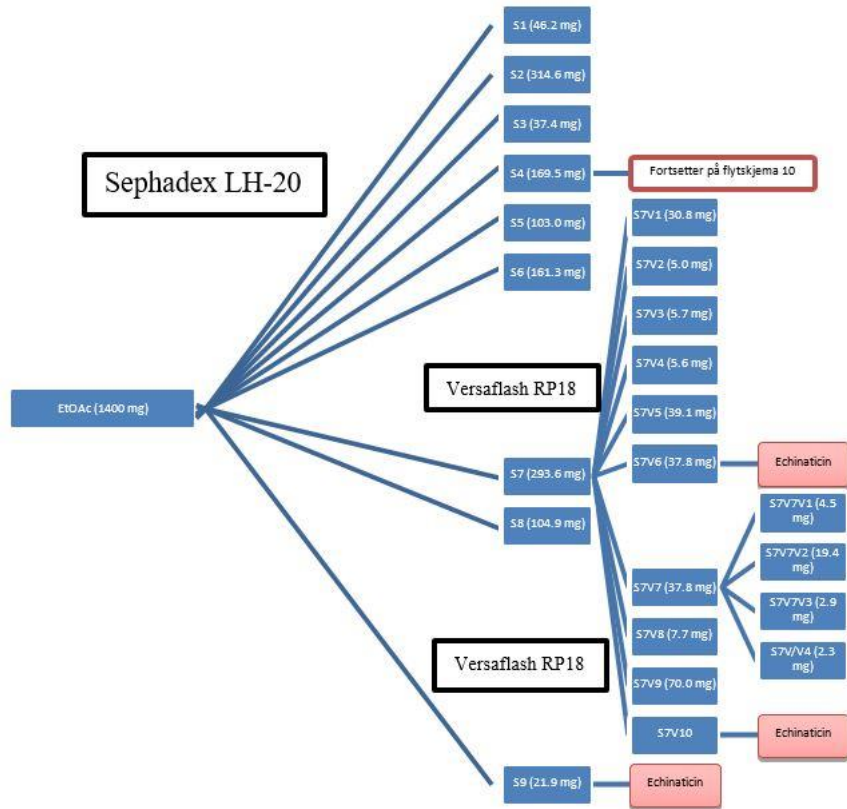
Flytskjema 7



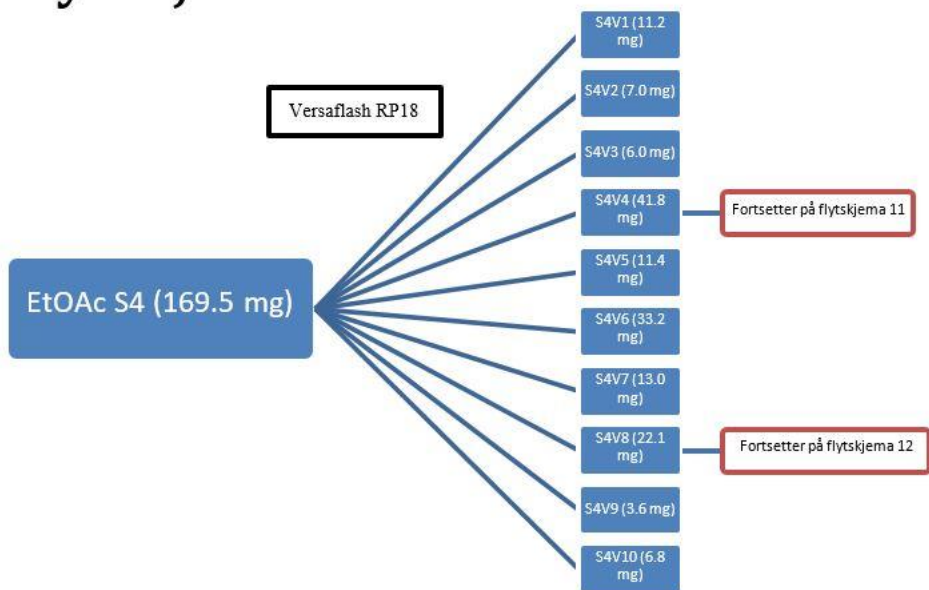
Flytskjema 8



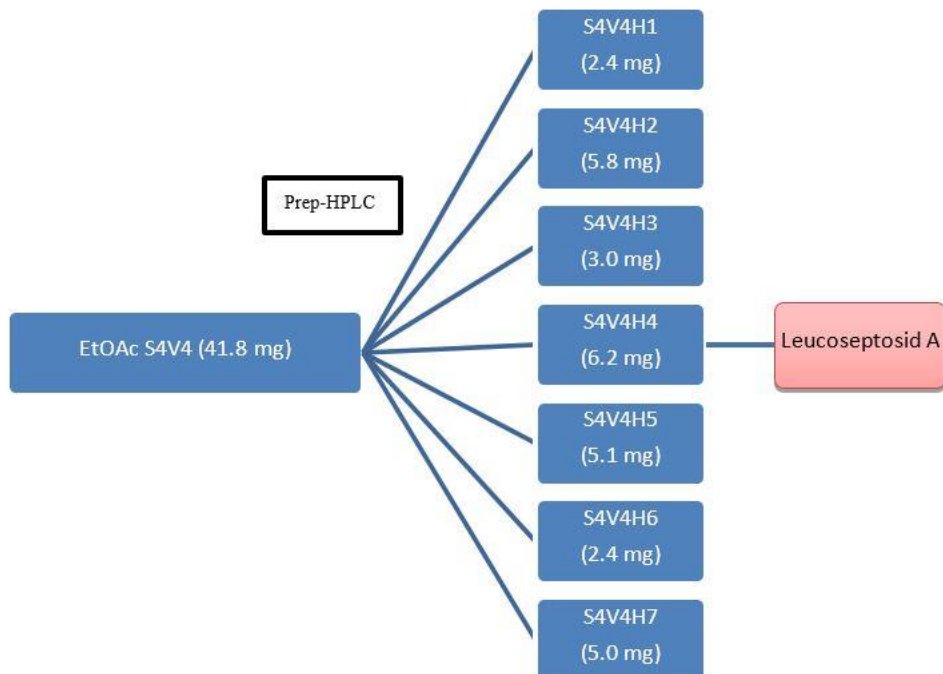
Flytskjema 9



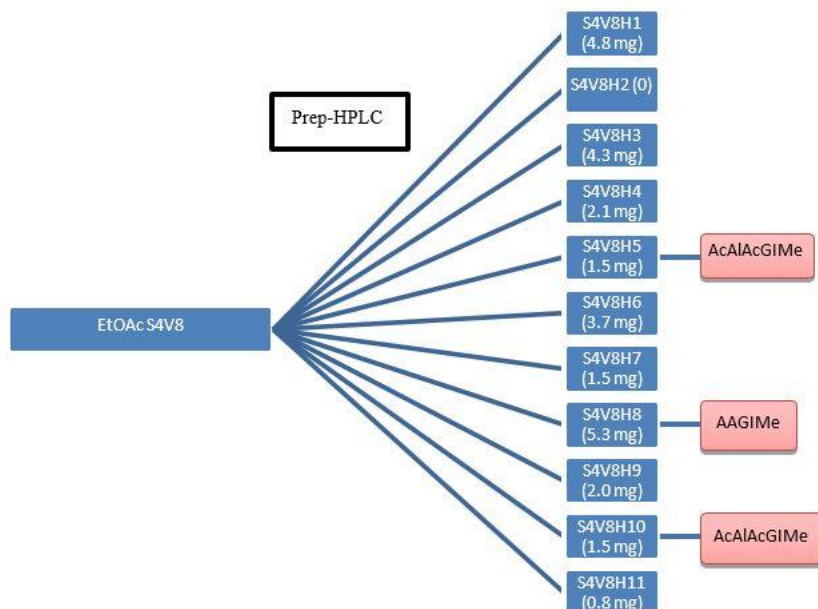
Flytskjema 10

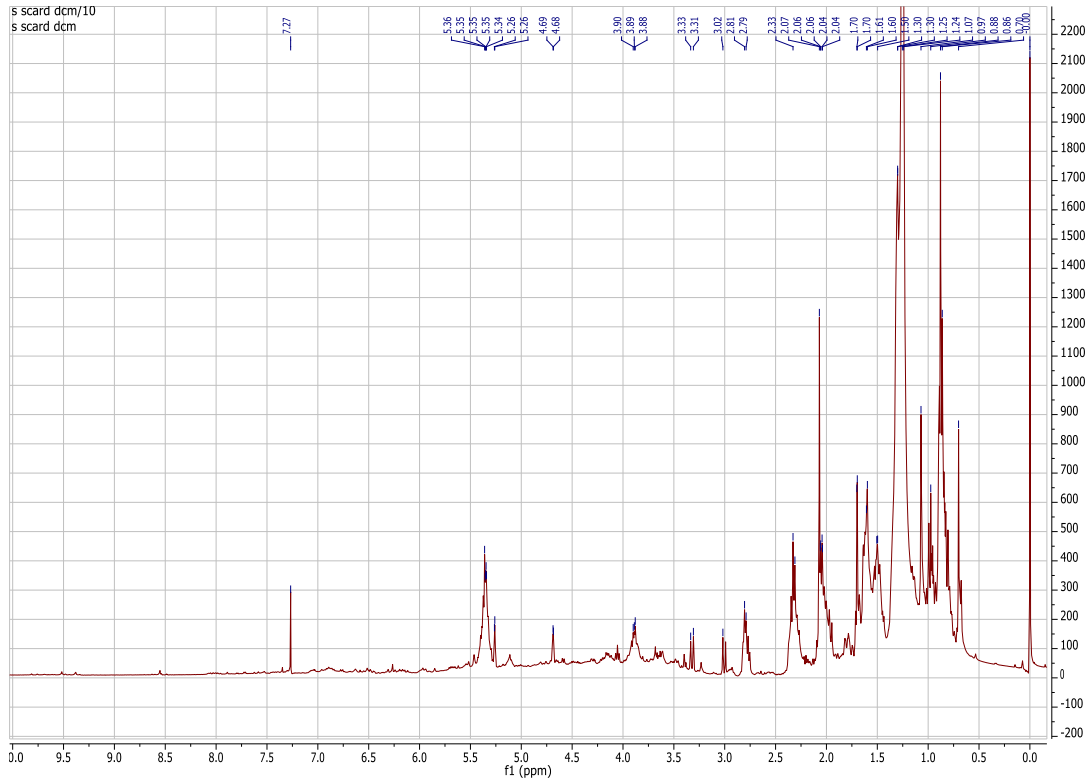


Flytskjema 11

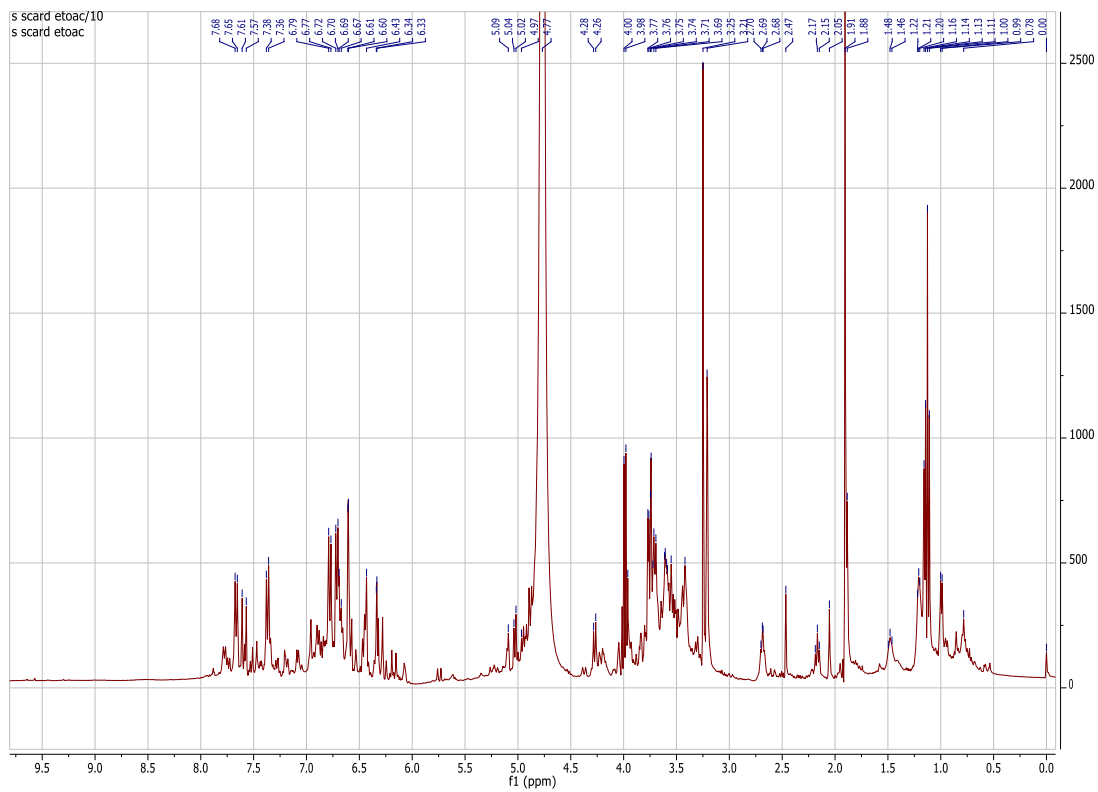


Flytskjema 12

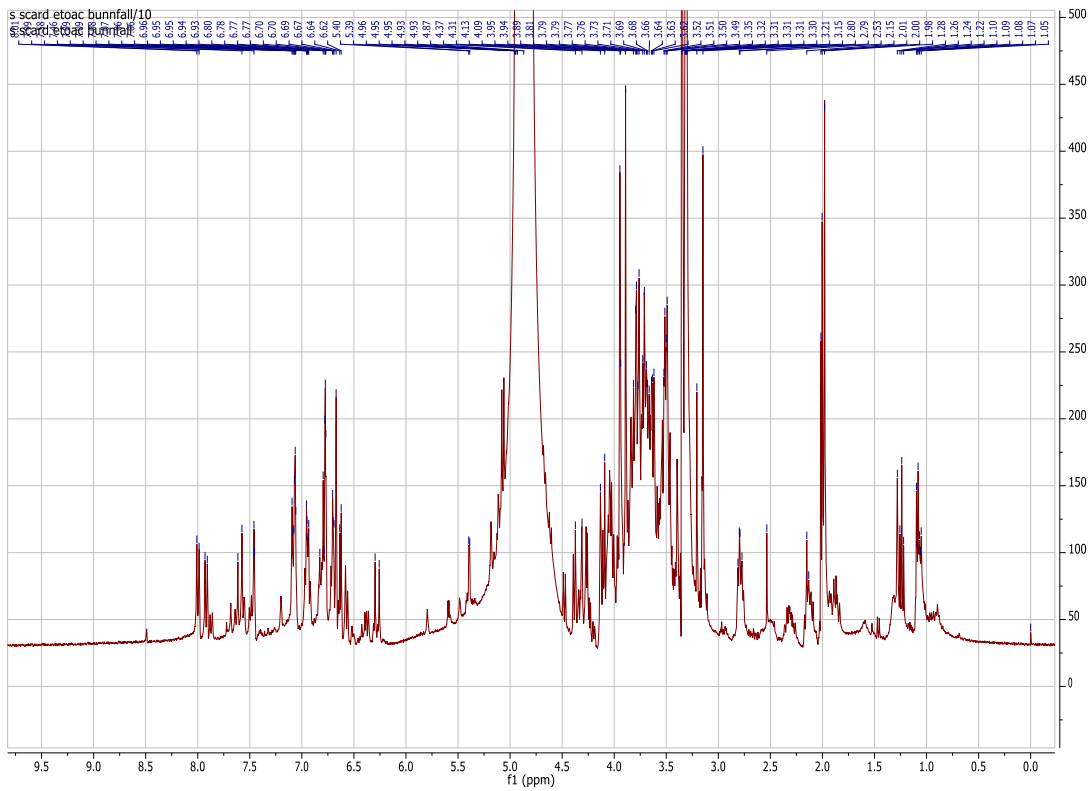




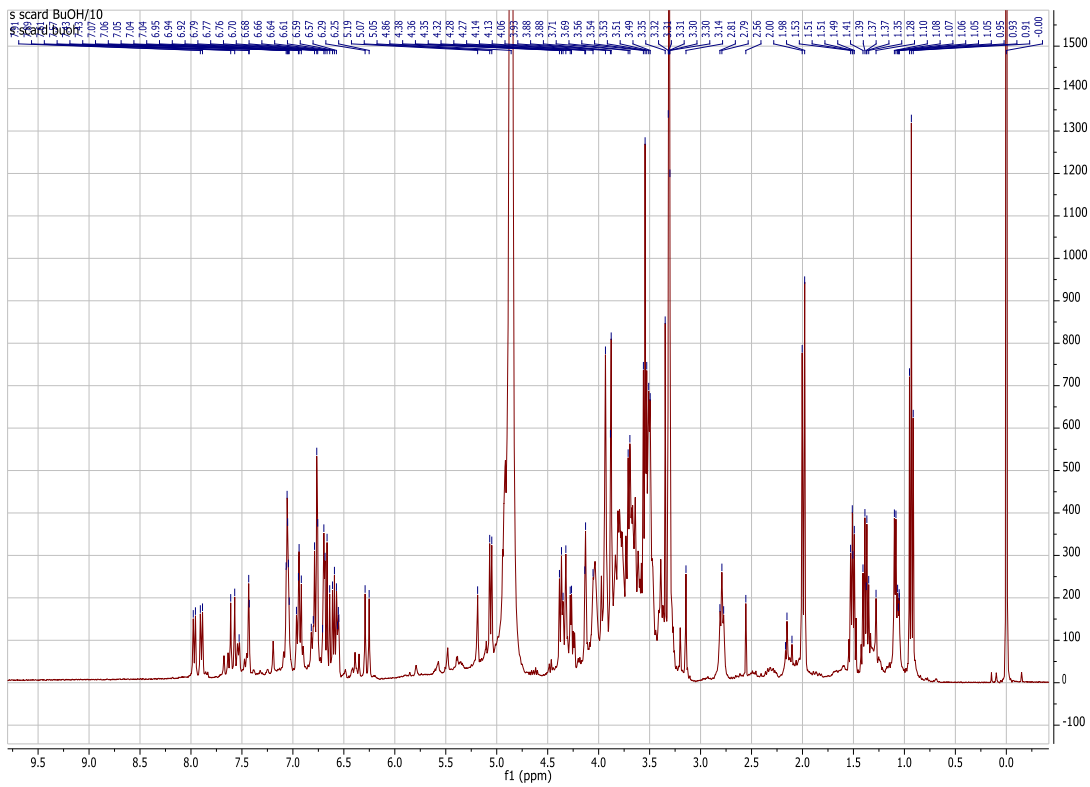
Spektrum 2: *S. scardica* DCM fraksjon 1H 400MHz



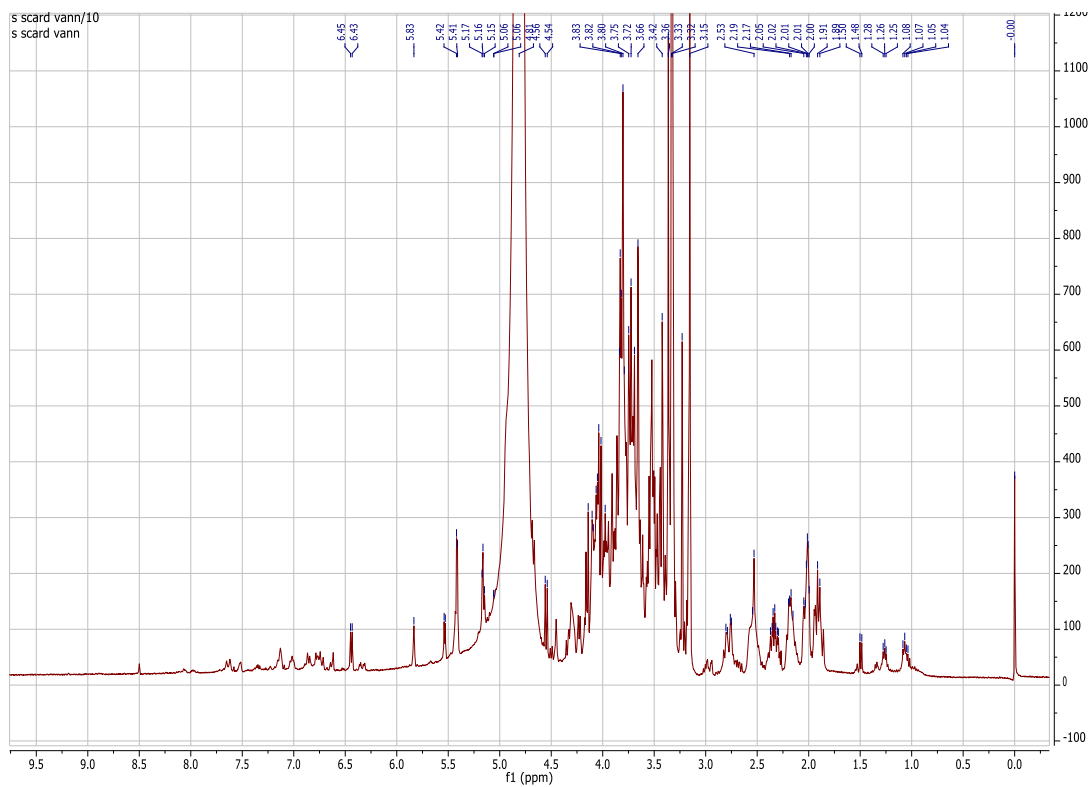
Spektrum 3: *S. scardica* EtOAc fraksjon 1H 400MHz



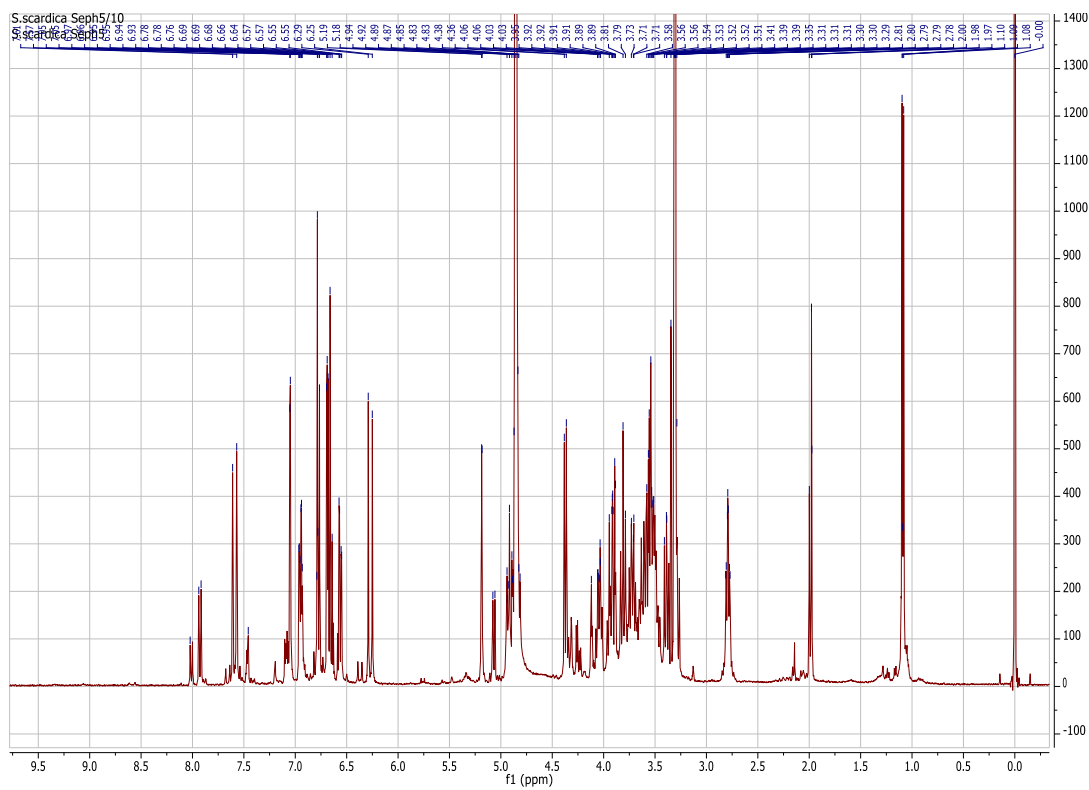
Spektrum 4: *S. scardica* bunnfall fra EtOAc fraksjon 1H 400MHz



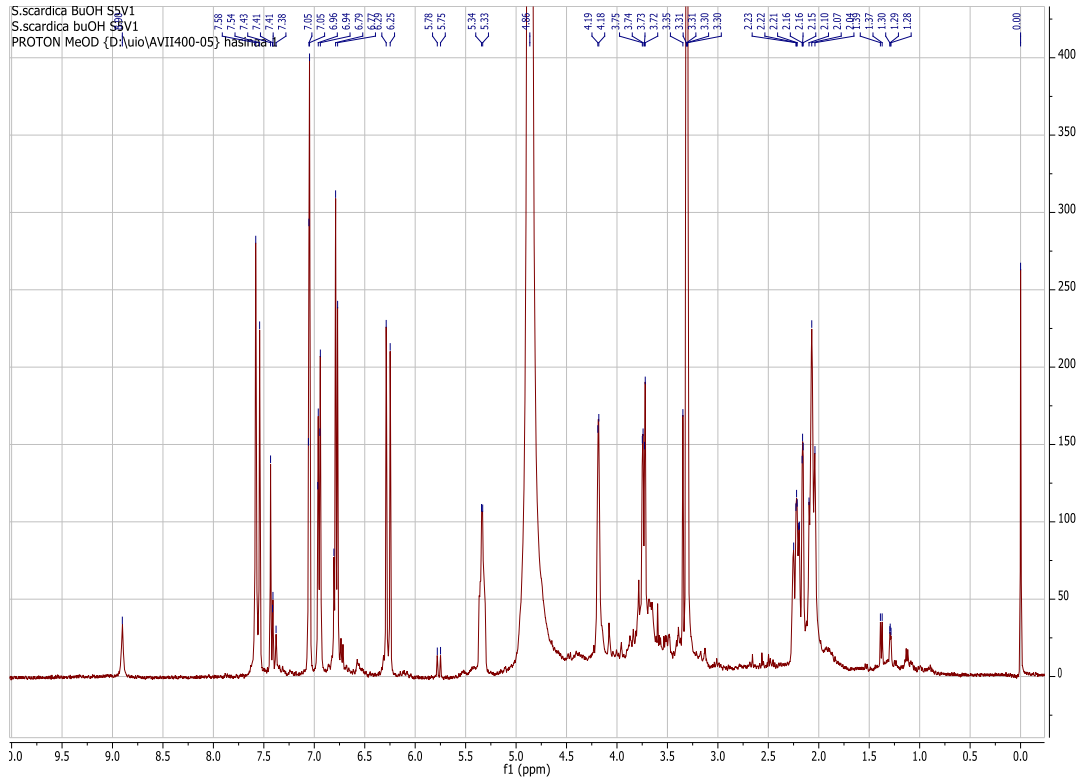
Spektrum 5: *S. scardica* BuOH fraksjon 1H 400MHz



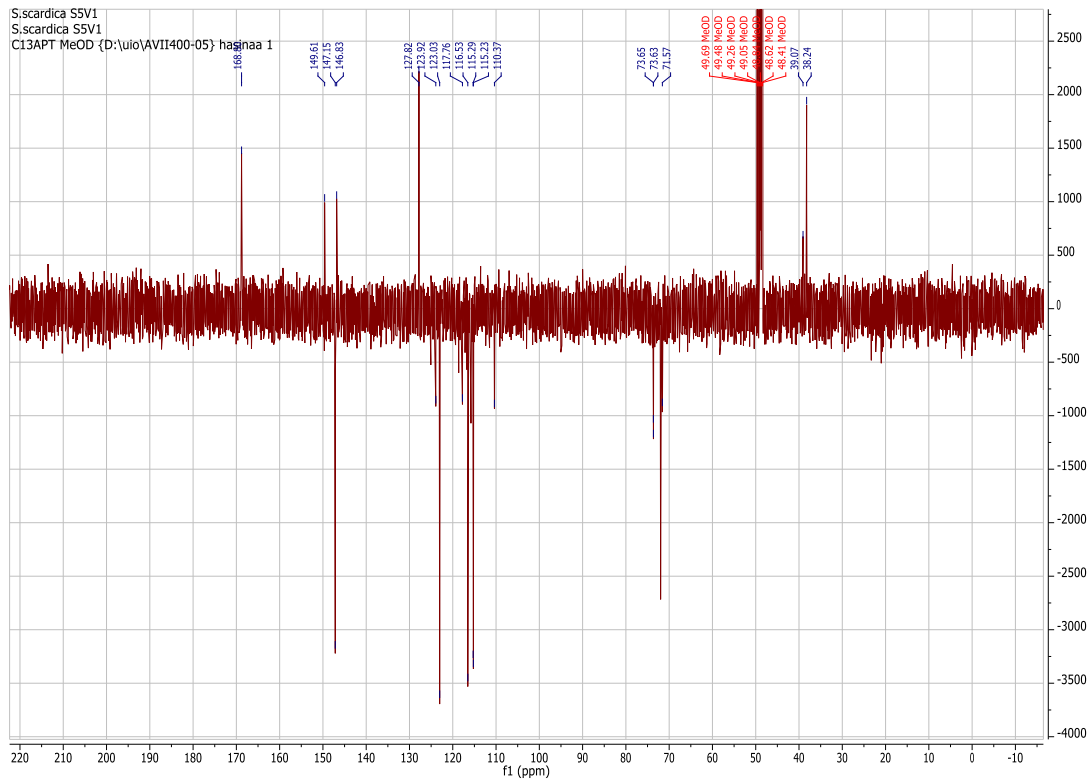
Spektrum 6: *S. scardica* vannfraksjon 1H 400MHz



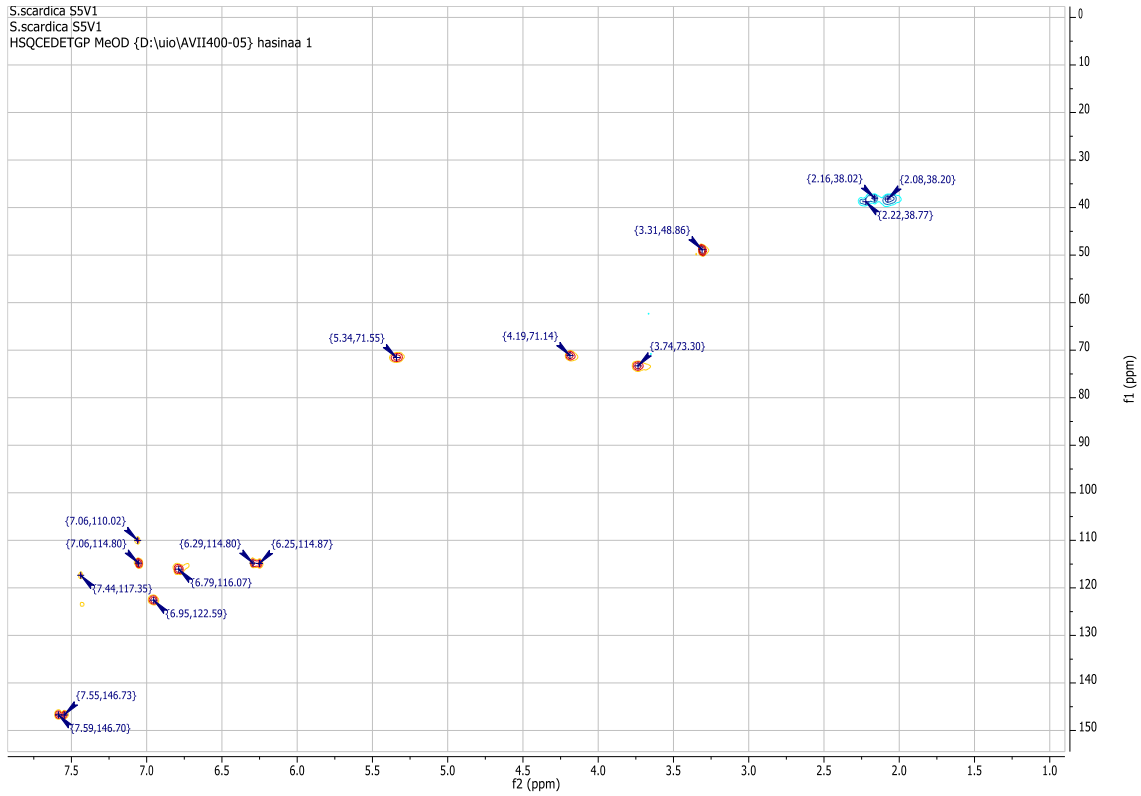
Spektrum 7: *S. scardica* BuOH S5 1H 400MHz



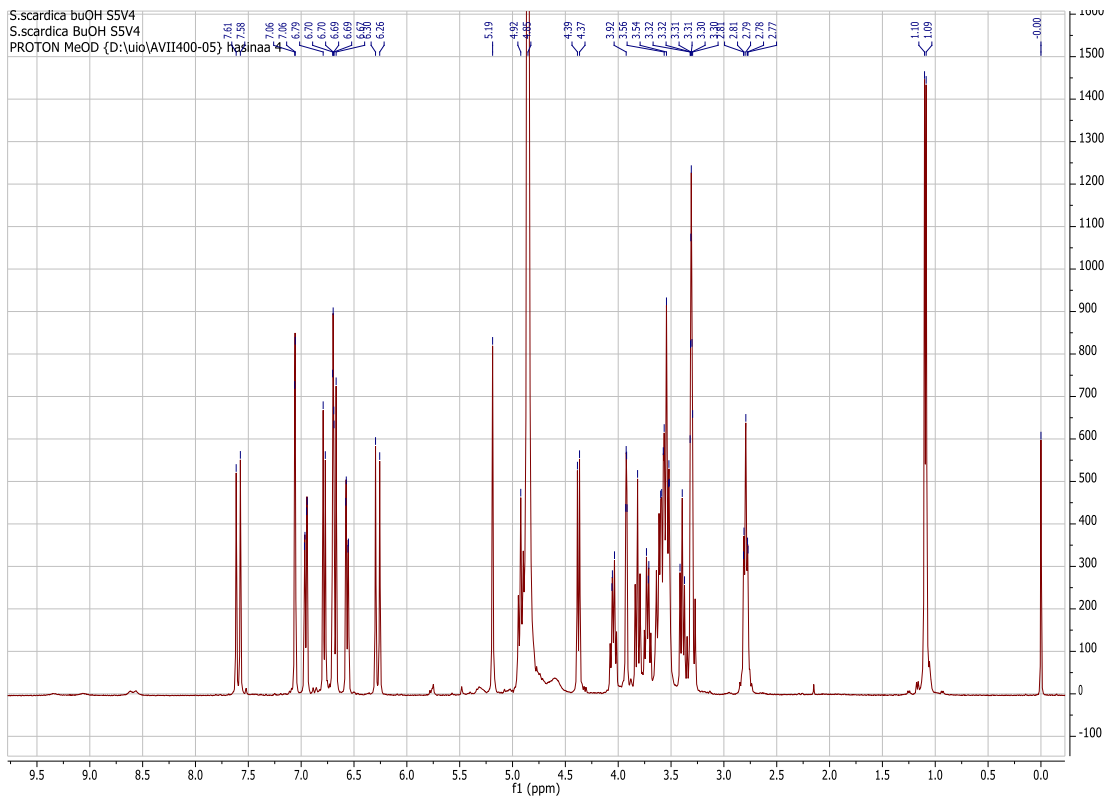
Spektrum 8H: S. scardica BuOH S5V1 1H 400MHz, klorogensyre



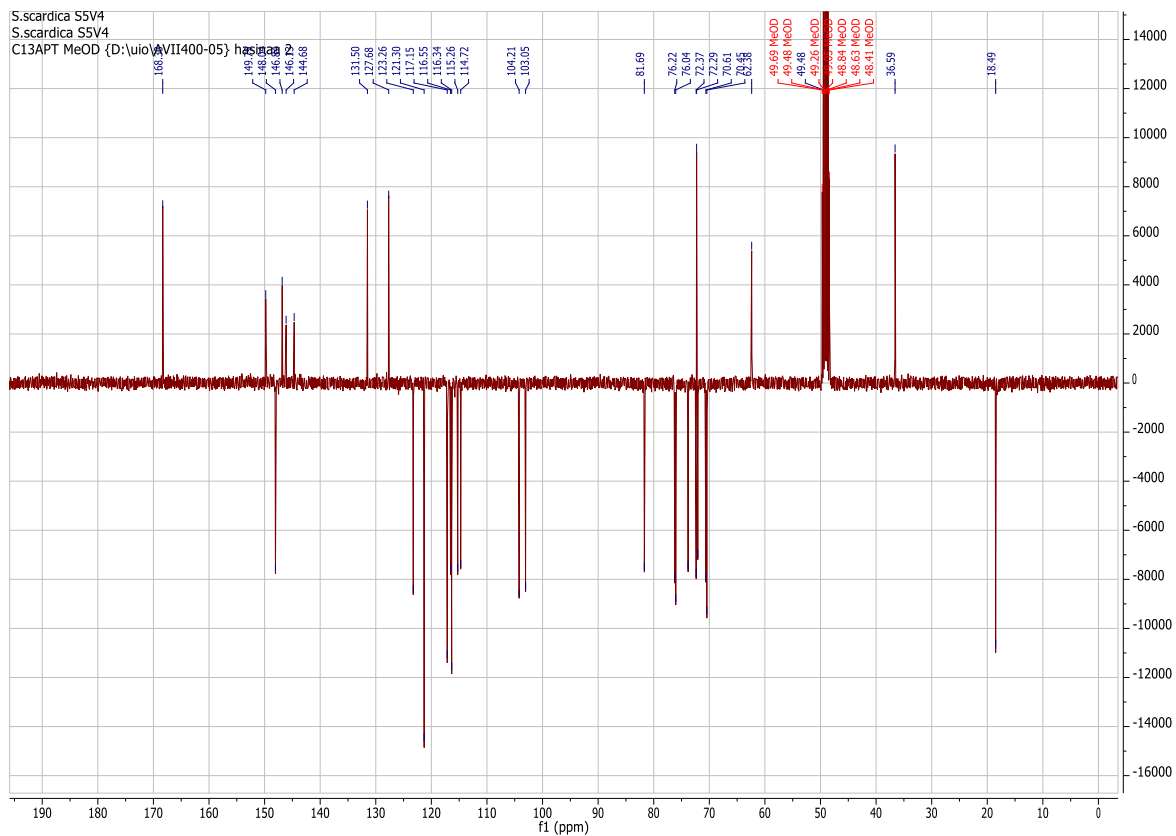
Spektrum 8C: S.scardica BuOH S5V1 APT 100MHz, klorogensyre



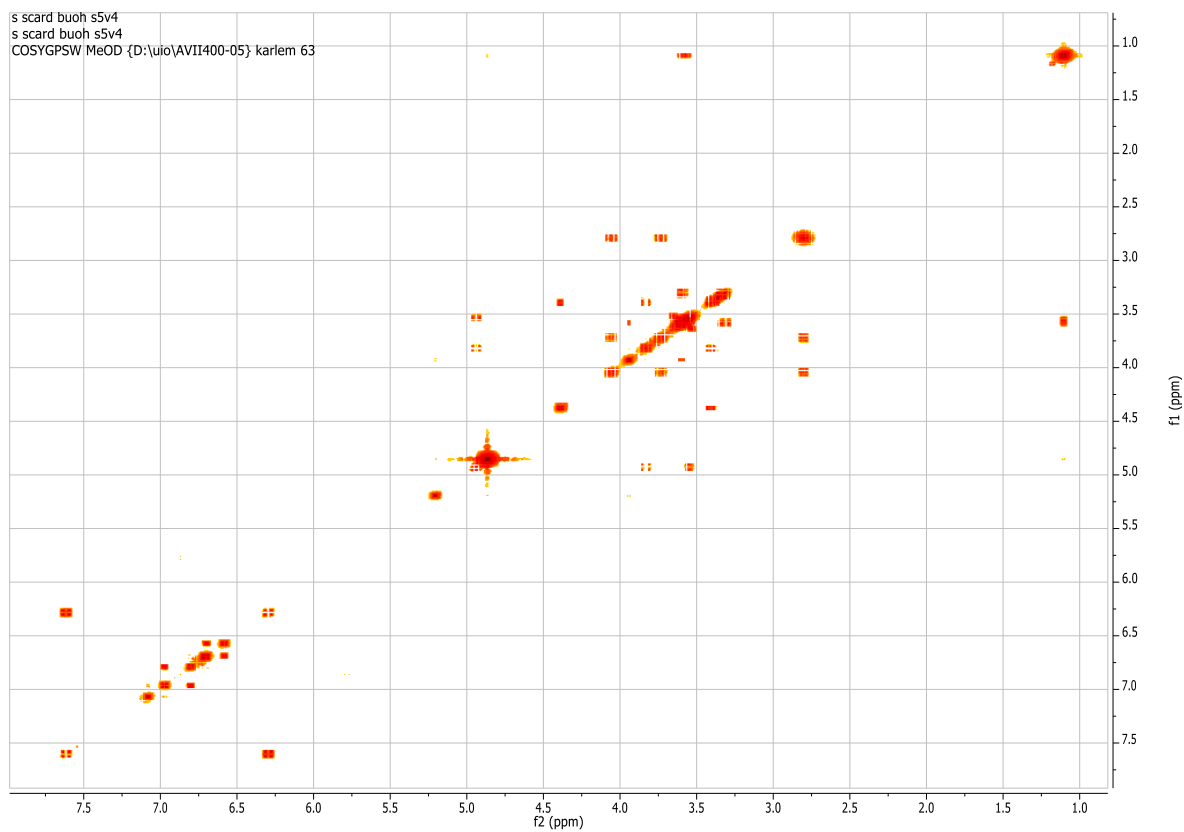
Spektrum 8HSQC: S. scardica BuOH S5V1 HSQC 400MHz, klorogensyre



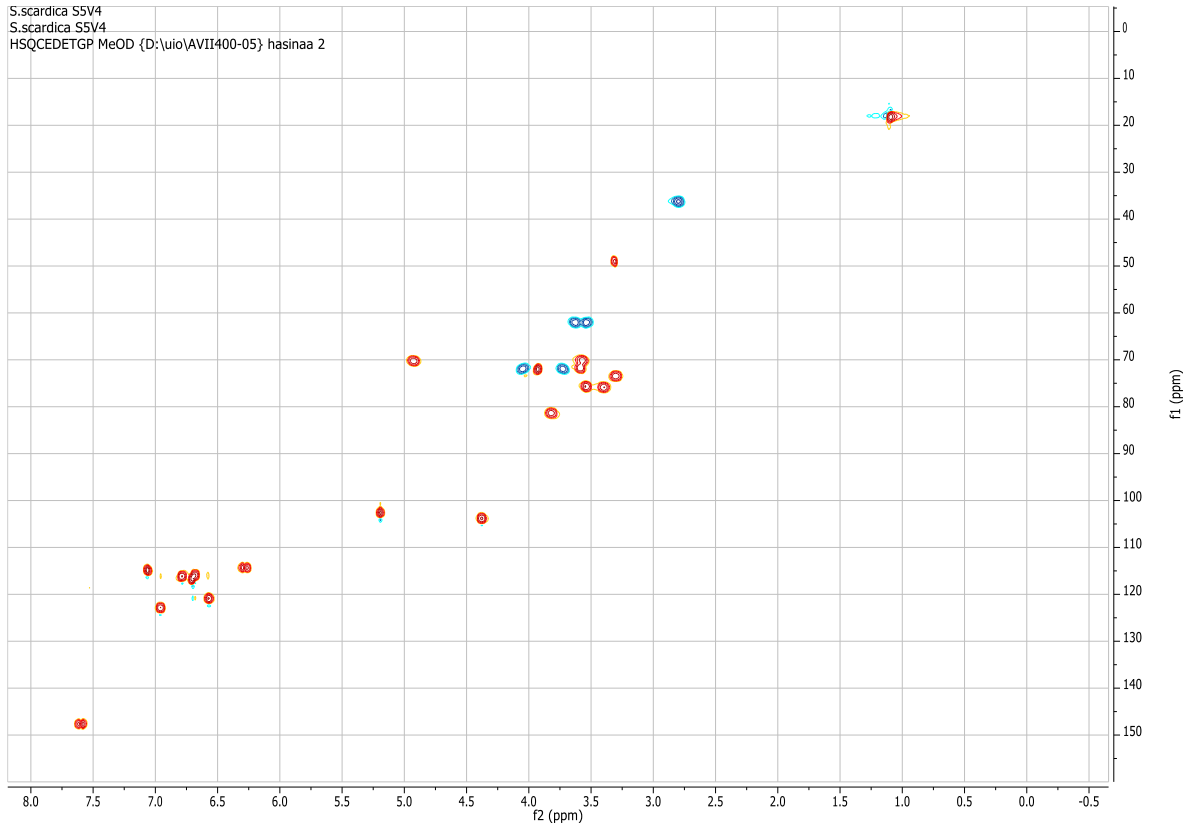
Spektrum 9H: S. scardica BuOH S5V4 1H 400MHz, verbascosid



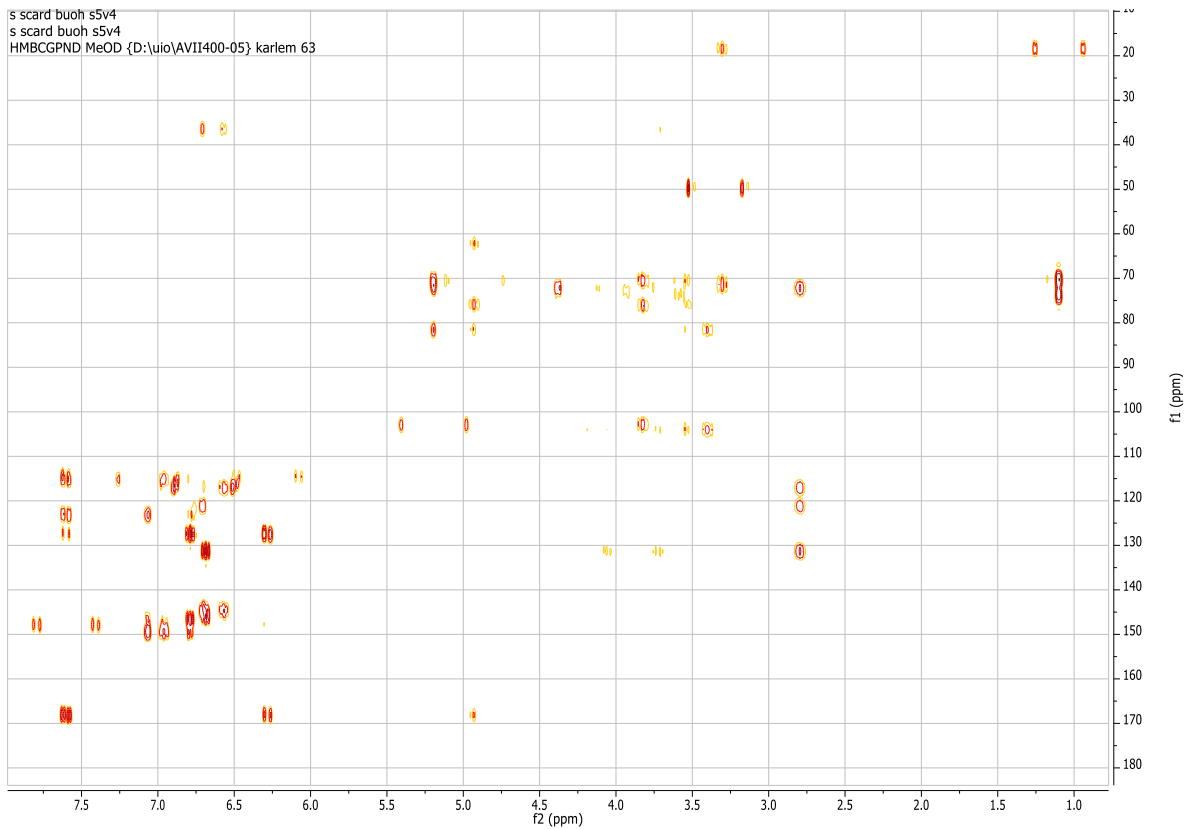
Spektrum 9C: S.scardica BuOH S5V4 APT 100MHz, verbascosid



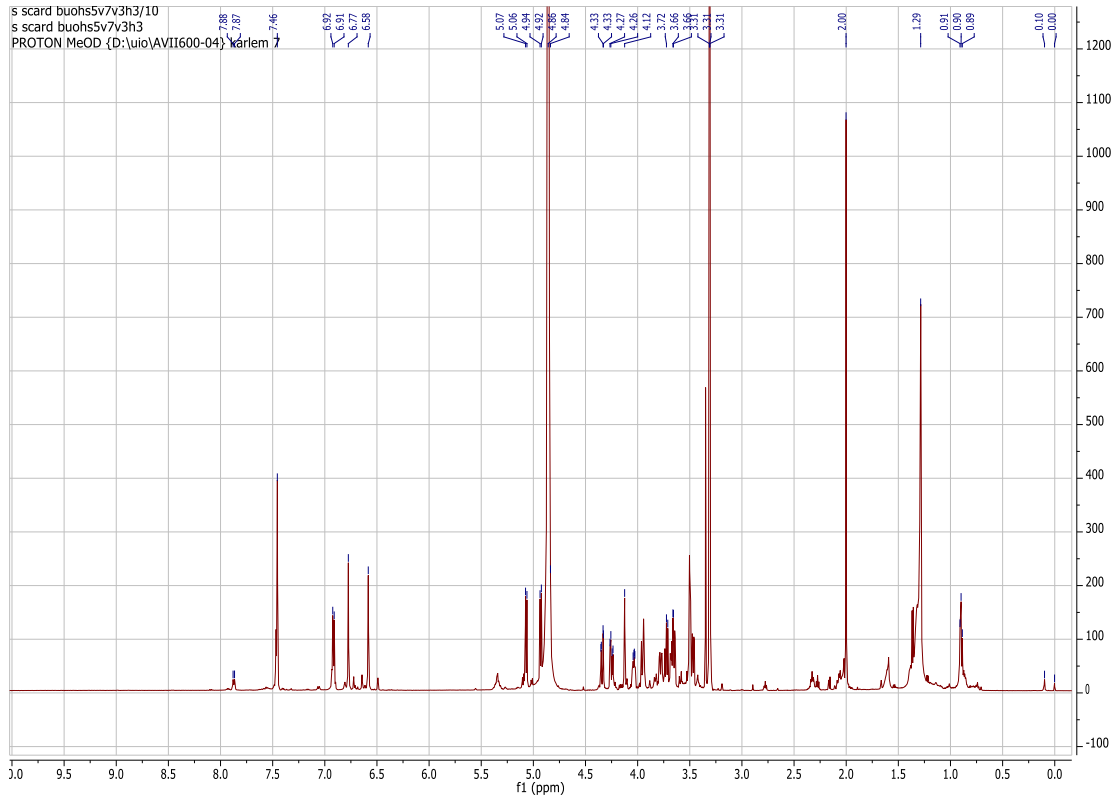
Spektrum 9COSY: S. scardica BuOH S5V4 COSY 400MHz, verbascosid



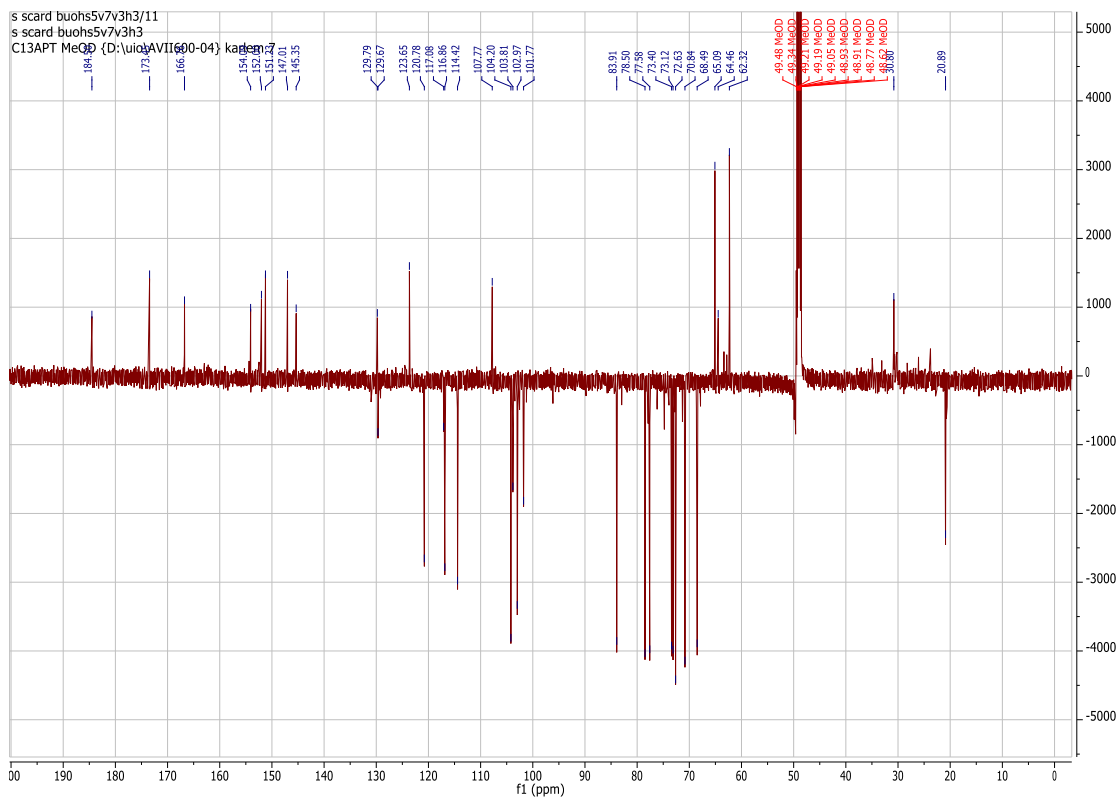
Spektrum 9HSQC: *S. scardica* BuOH S5V4 HSQC 400 MHz, verbascosid



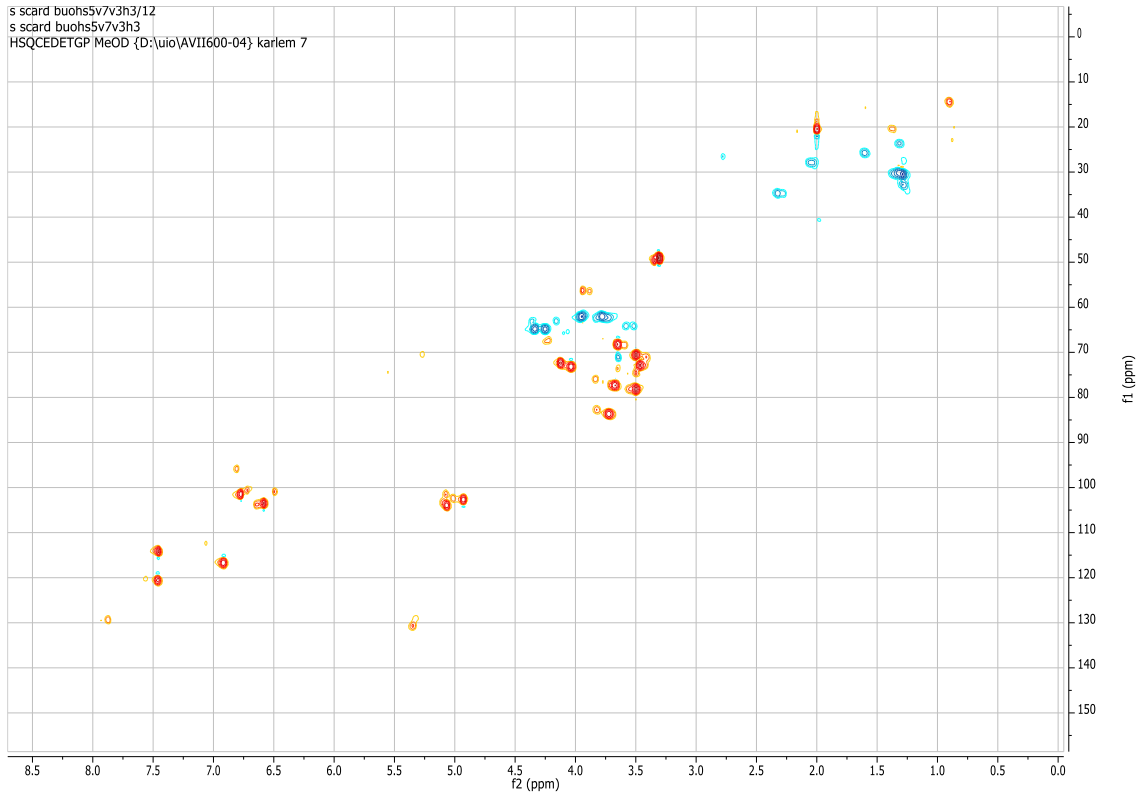
Spektrum 9HMBC: *S. scardica* BuOH S5V4 HMBC 400MHZ, verbascosid



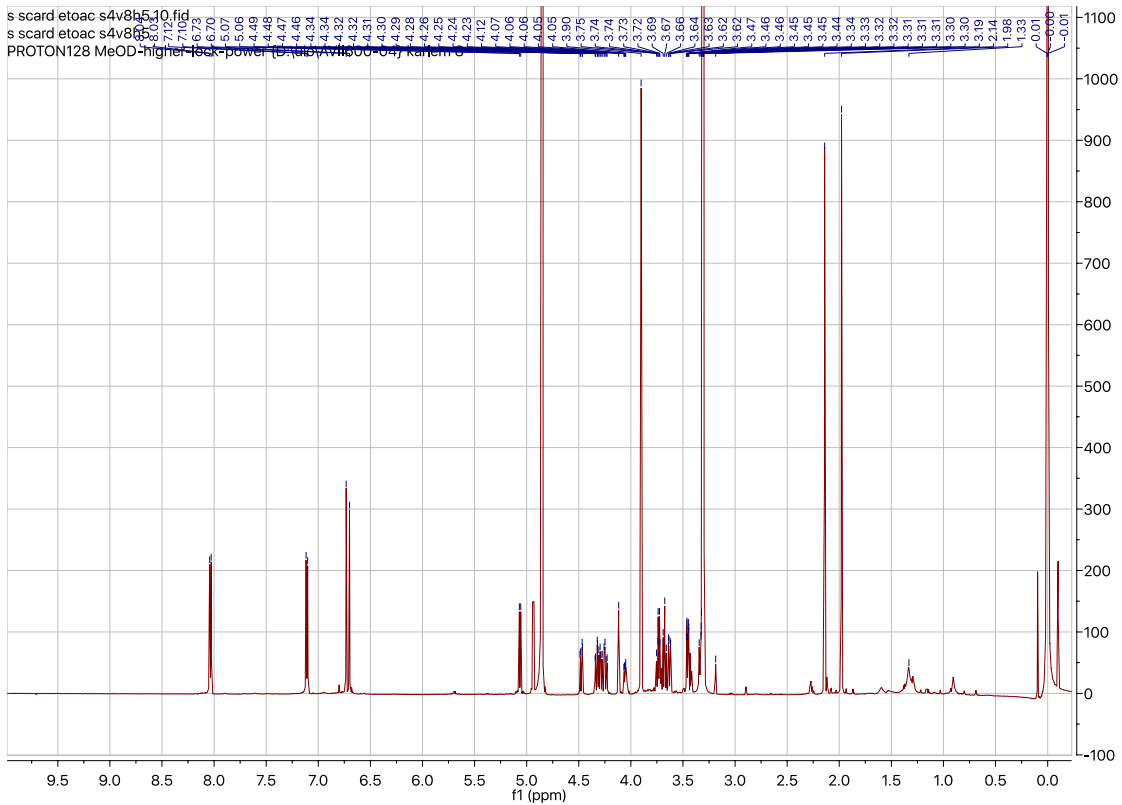
Spektrum 10H: *S. scardica* S5V7V3H3 1H 600mhz, 7-*O*-(Acetylallosylglukosyl)-hypolaetin



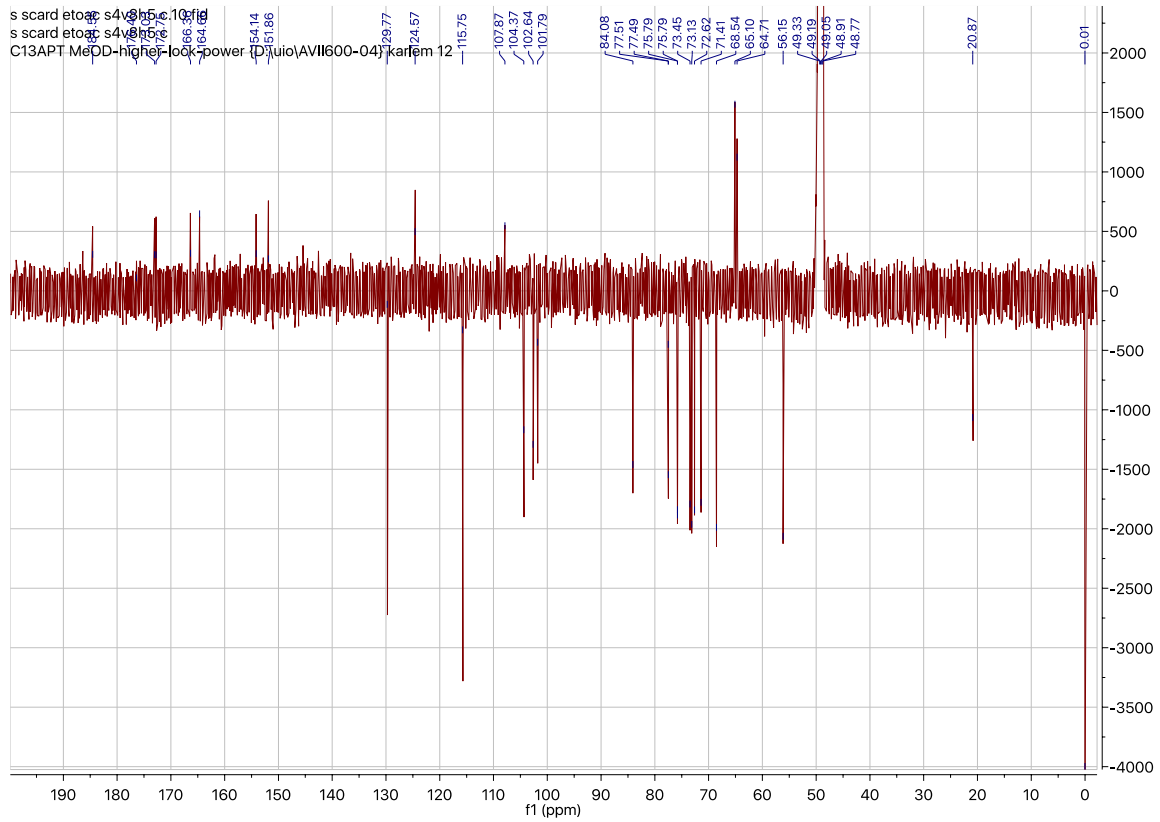
Spektrum 10C: *S. scardica* S5V7V3H3 APT 150 MHz, 7-*O*-(Acetylallosylglukosyl)-hypolaetin



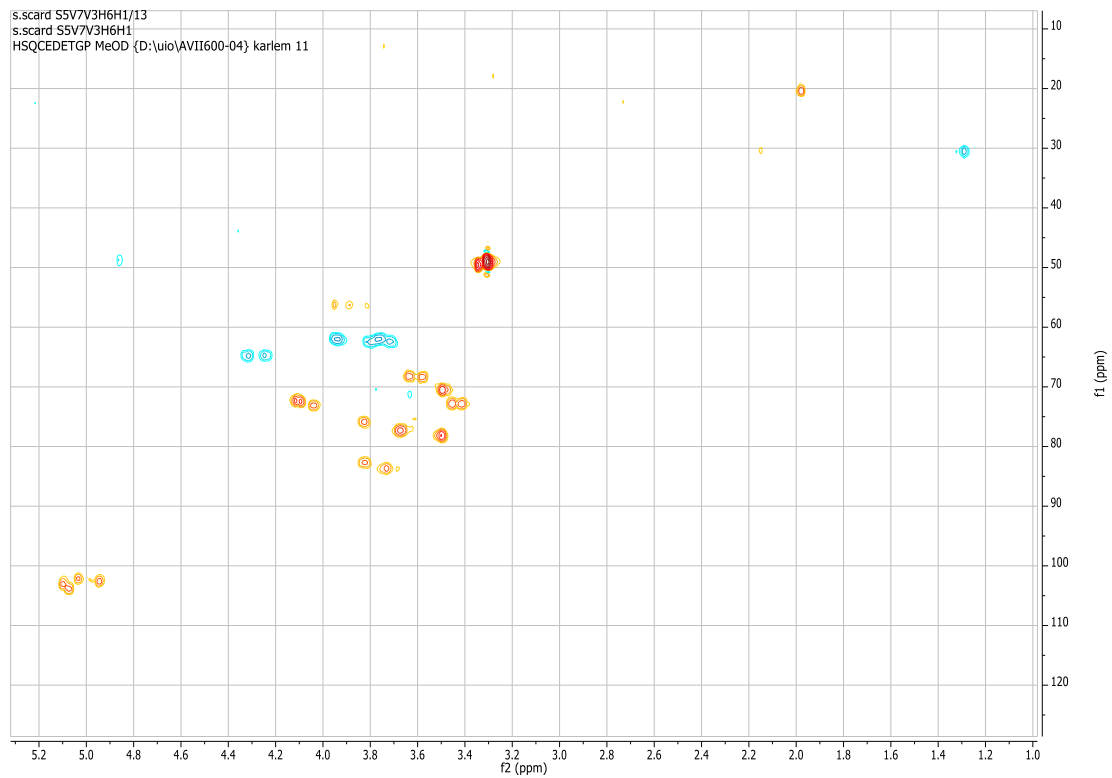
Spektrum 10HSQC: *S. scardica* S5V7V3H3 HSQC 600MHz, 7-*O*-(Acetylallosyl)glukosyl-hypolaetin



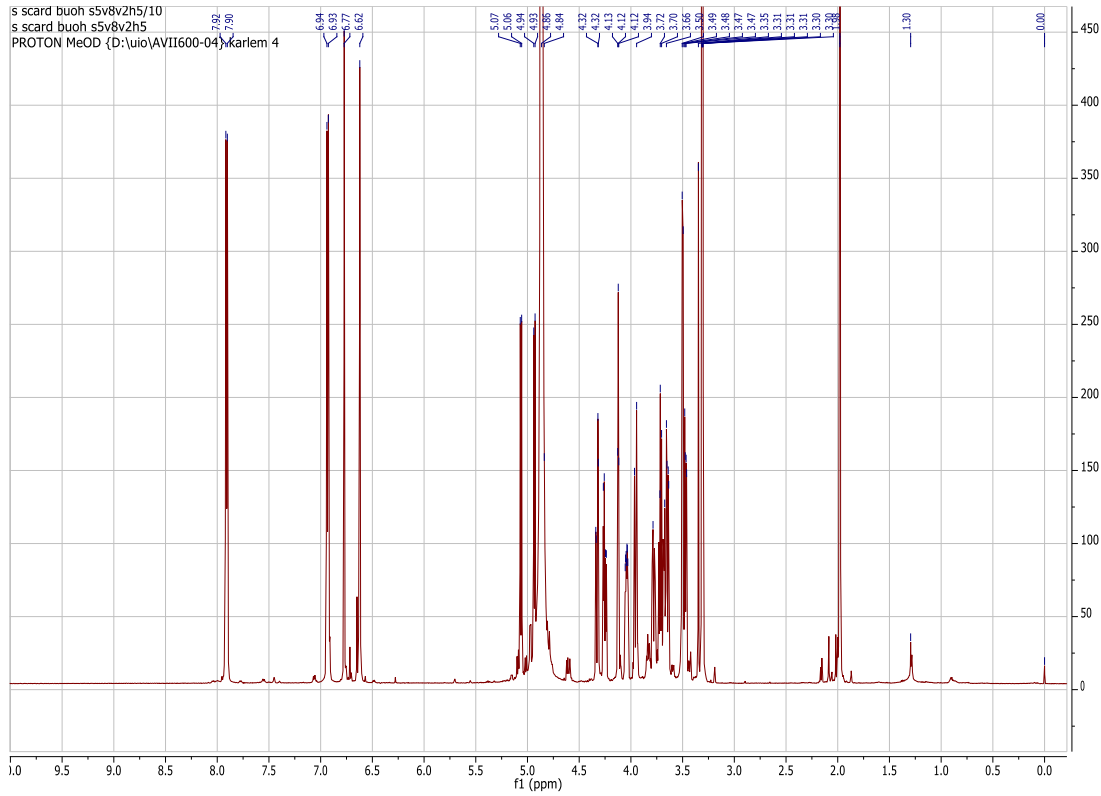
Spektrum 11H: *S. scardica* EtOAc S4V8H5 1H 600MHz, 7-*O*-(Acetylallosyl-acetylglukosyl)-4'-*O*-metyl-isoscutellarein



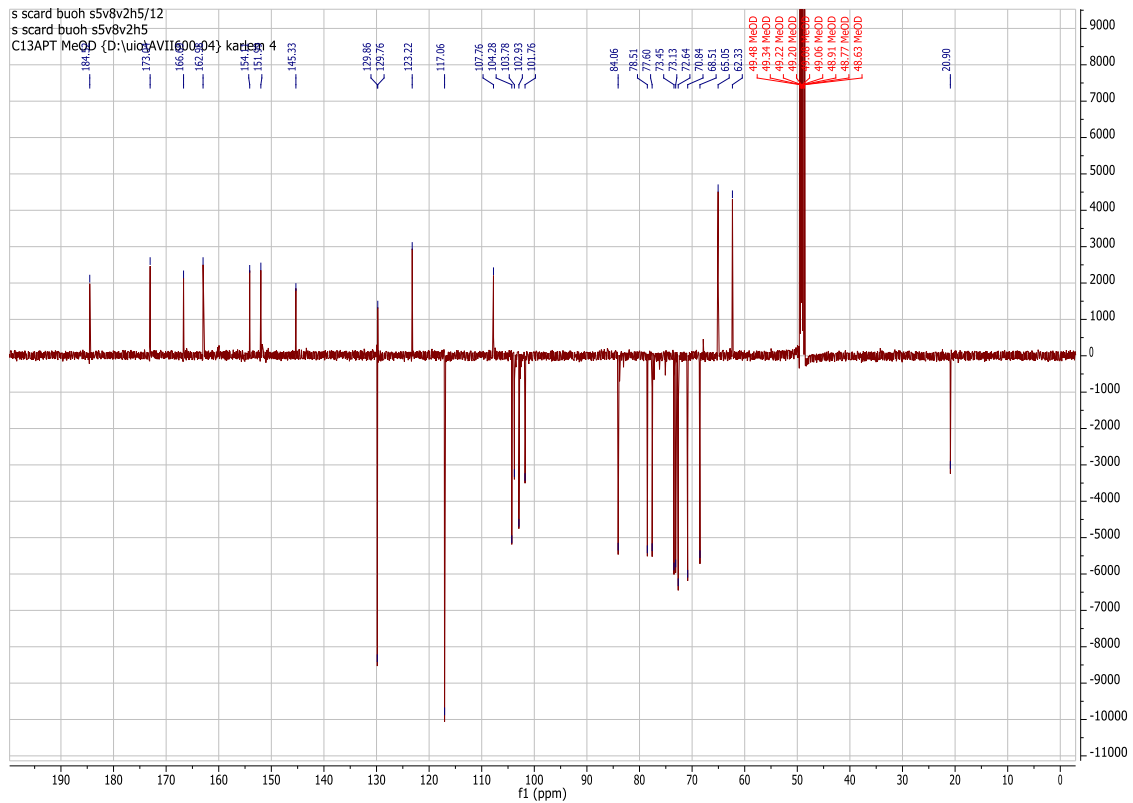
Spektrum 11C: *S. scardica* EtOAc S4V8H5 APT, 150 MHz: 7-*O*-(Acetylallosyl-acetylglukosyl)-isoscuteallarein



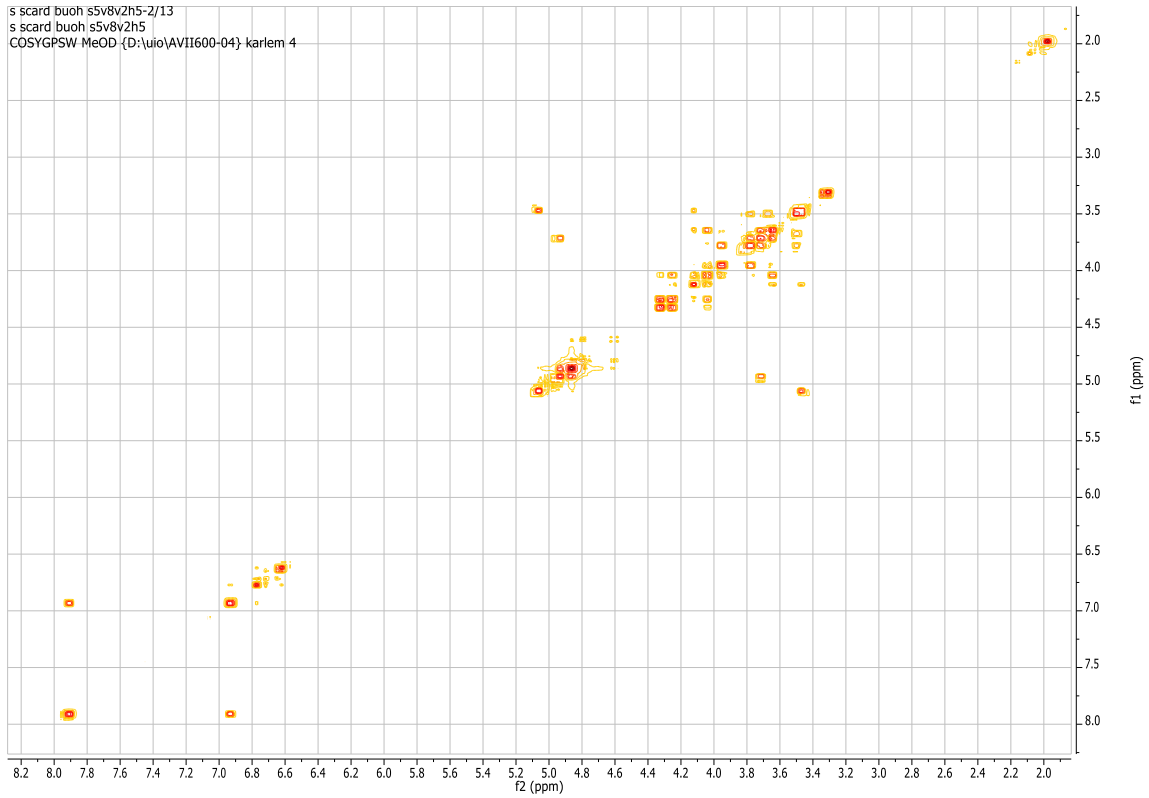
Spektrum 11HSQC: *S. scardica* BuOH S5V7V3H6H1 HSQC 600MHz: 7-*O*-(Acetylallosyl-acetylglukosyl)-isoscuteallarein



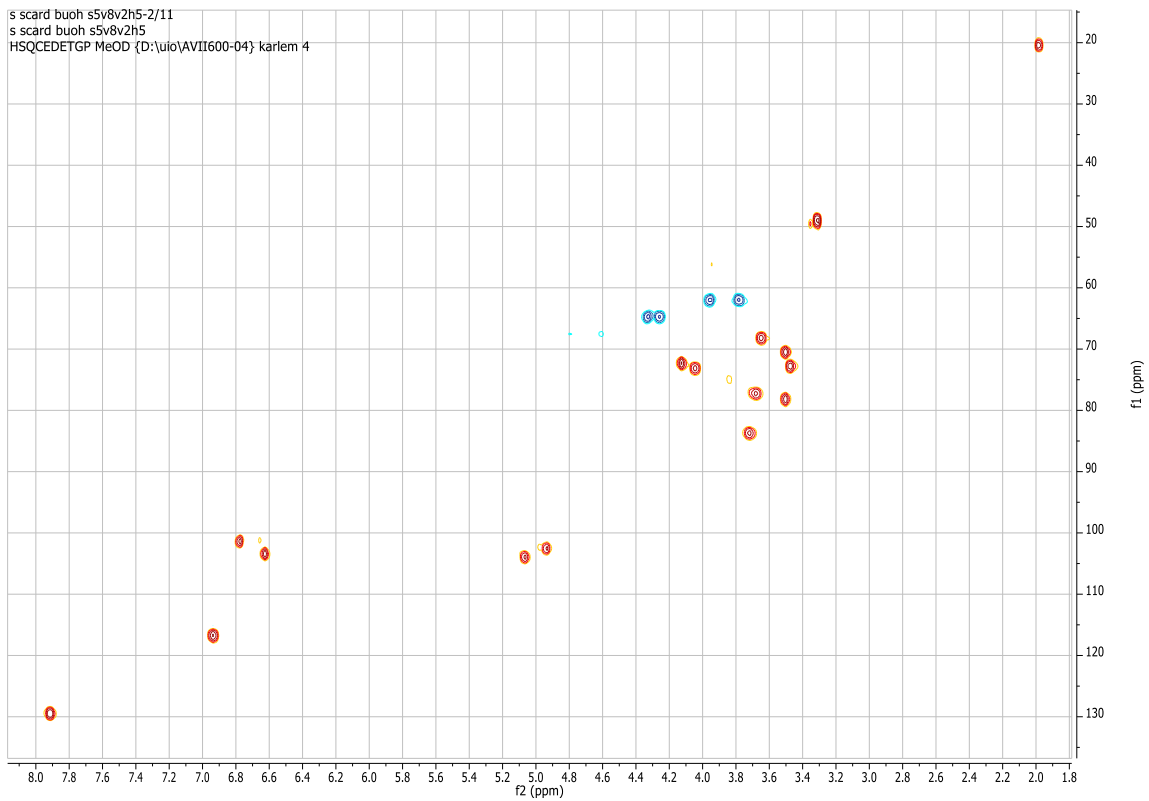
Spektrum 12H: *S. scardica* BuOH S5V8V2H5 1H 600 MHz, 7-*O*-(Acetylallosylglukosyl)-isoscutellarein



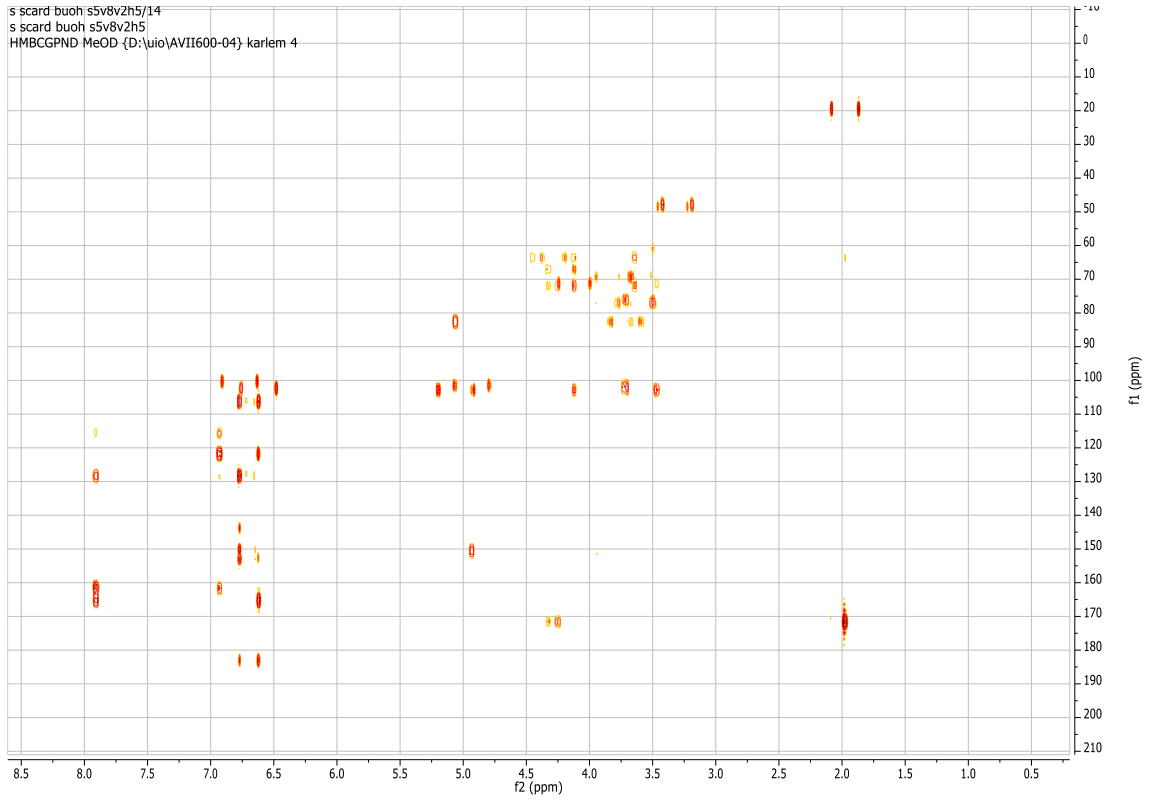
Spektrum 12C: *S. scardica* BuOH S5V8V2H5 APT 150 MHz, 7-*O*-(Acetylallosylglukosyl)-isoscutellarein



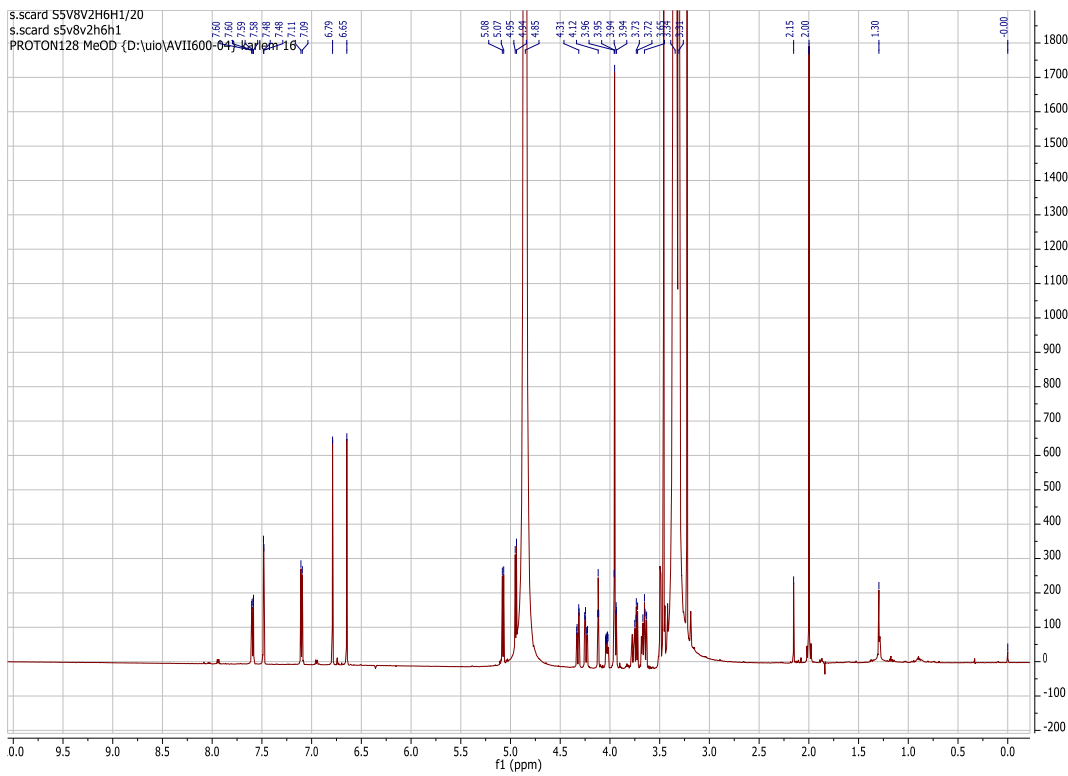
Spektrum 12COSY: *S. scardica* BuOH S5V8V2H5 COSY 600 MHz, 7-*O*-
(Acetylallosylglukosyl)-isoscutezarein



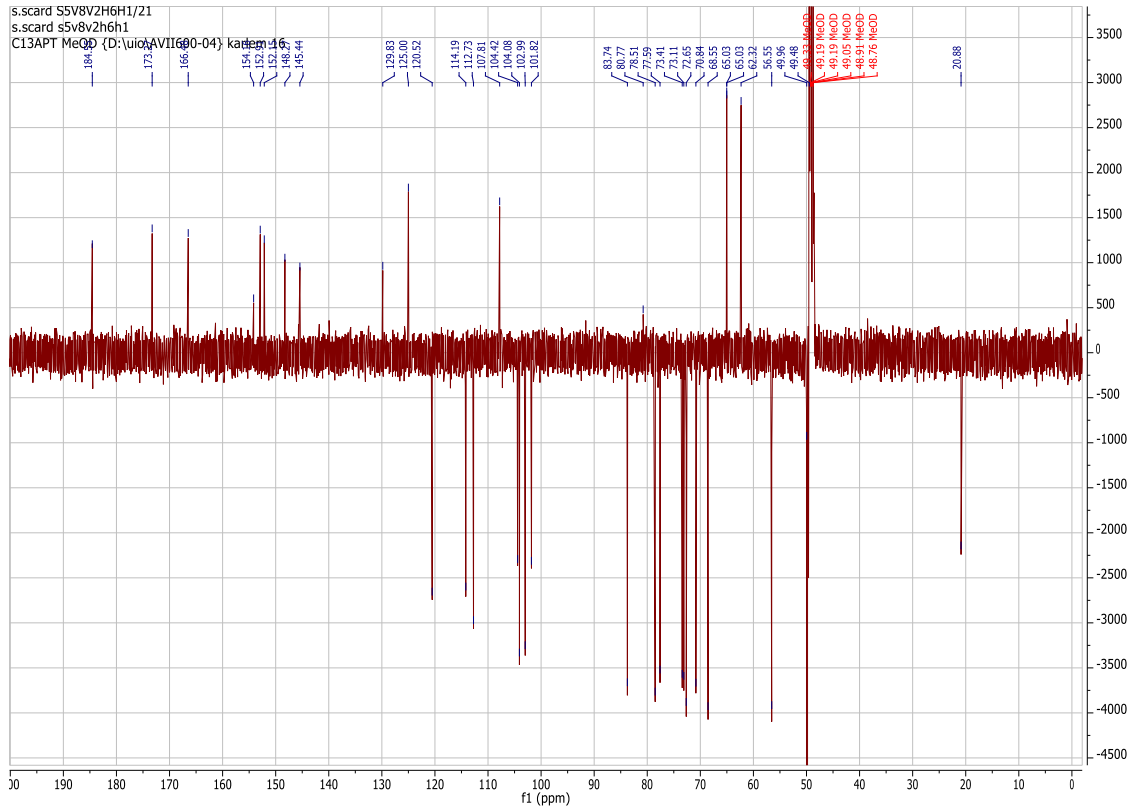
Spektrum 12HSQC: *S. scardica* BuOH S5V8V2H5 HSQC 600 MHz, 7-*O*-
(Acetylallosylglukosyl)-isoscutezarein



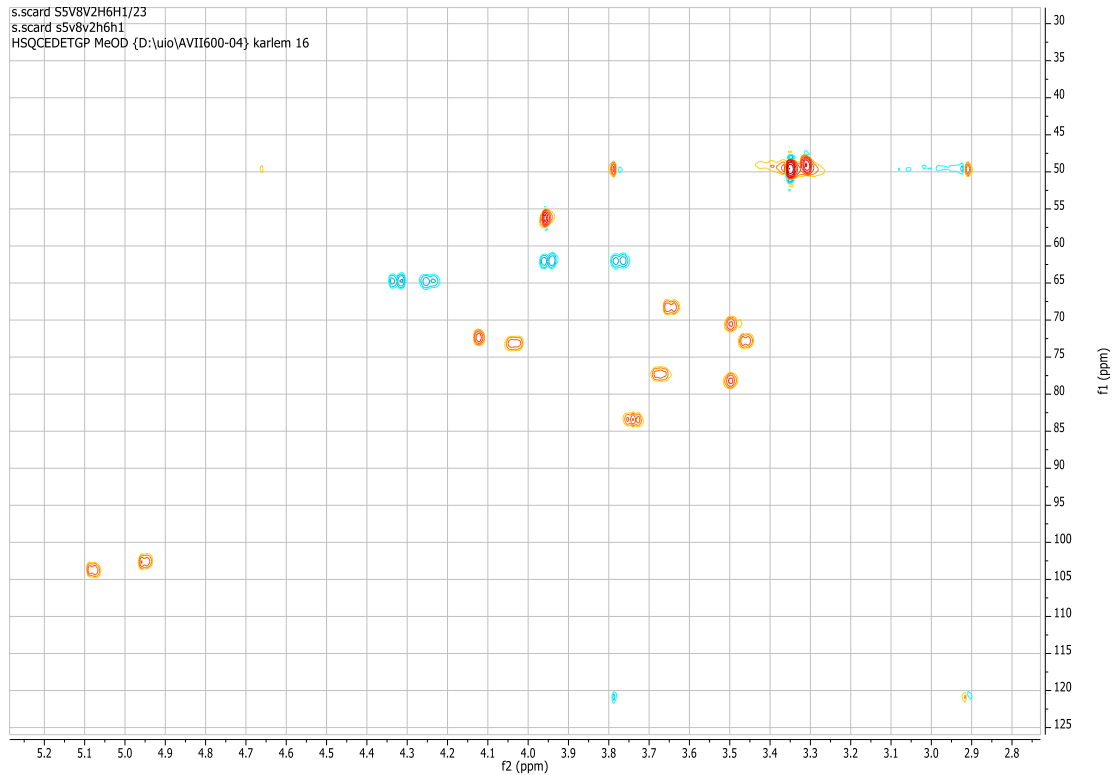
Spektrum 12HMBC, *S. scardica* BuOH S5V8V2H5 HMBC 600 MHz, 7-*O*-
(Acetylallosylglukosyl)-isoscuteallarein



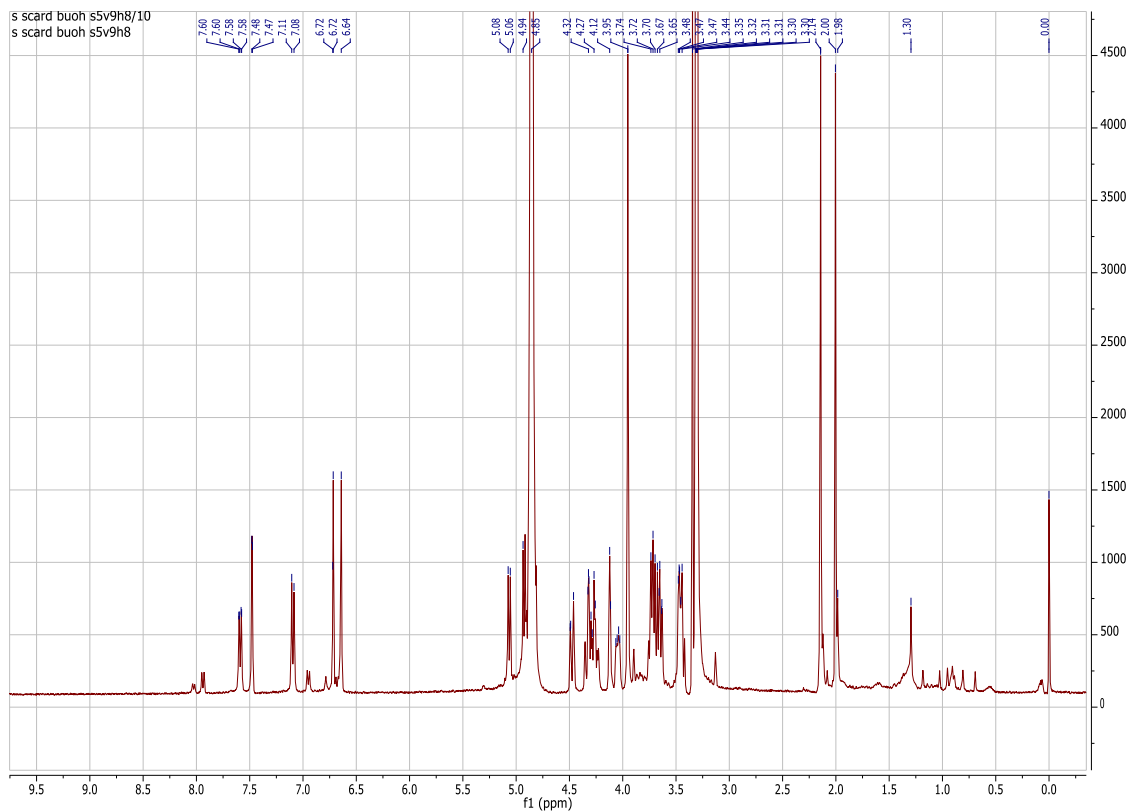
Spektrum 13H: *S. scardica* BuOH S5V8V2H6H1 1H 600 MHz, 7-*O*-(Acetylallosylglukosyl)-
4'-*O*-methylhypolaetin



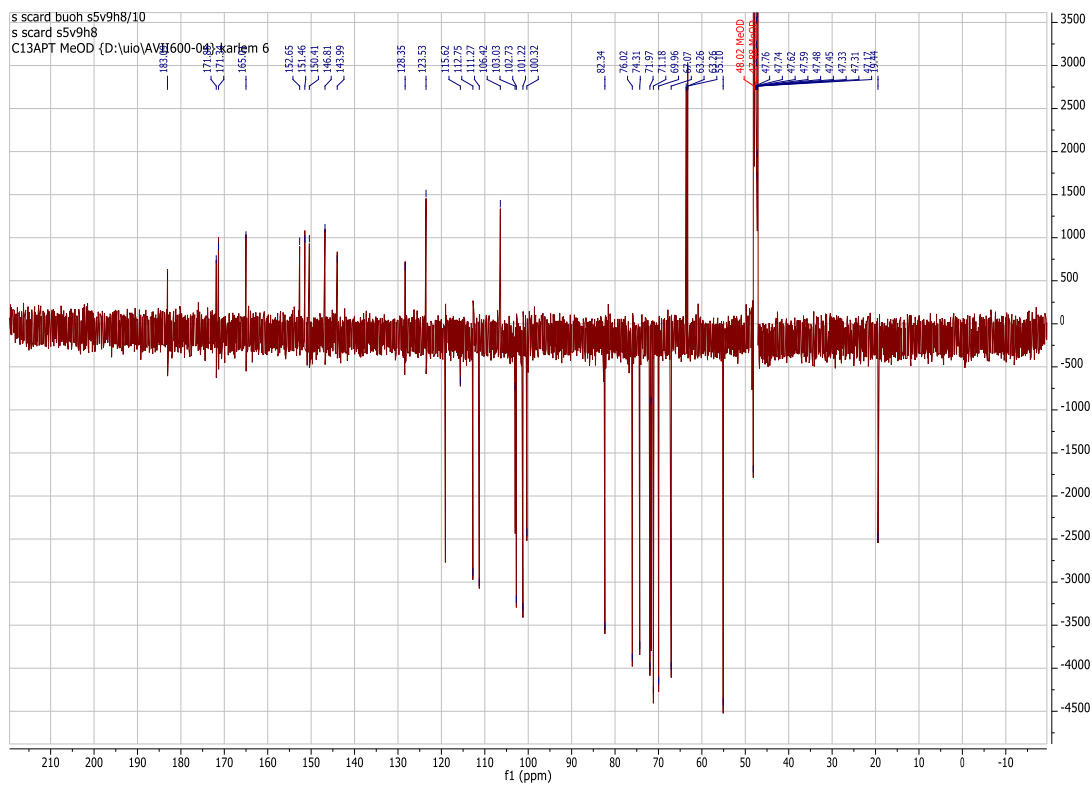
Spektrum ^{13}C : *S. scardica* BuOH S5V8V2H6H1 APT 150 MHz, 7-*O*-(Acetylallosylglukosyl)-4'-*O*-methylhypolaetin



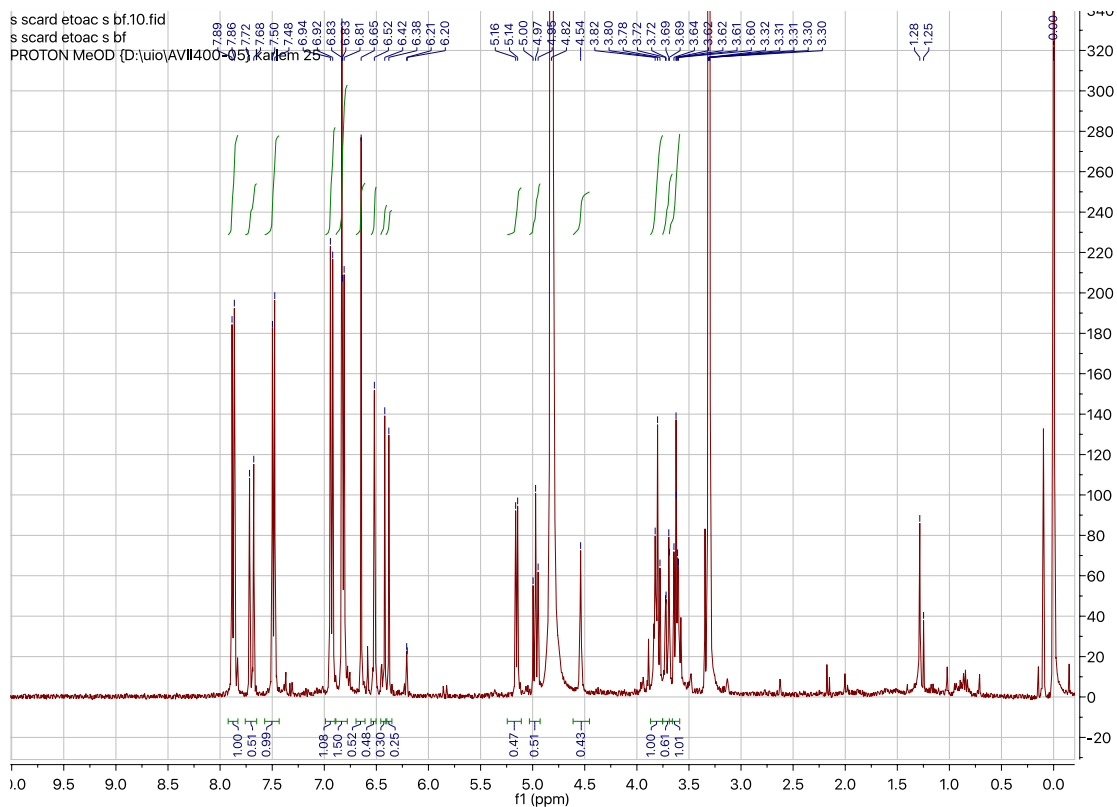
Spektrum $^{13}\text{HSQC}$: *S. scardica* BuOH S5V8V2H6H1 HSQC 600MHz, 7-*O*-(Acetylallosylglukosyl)-4'-*O*-methylhypolaetin



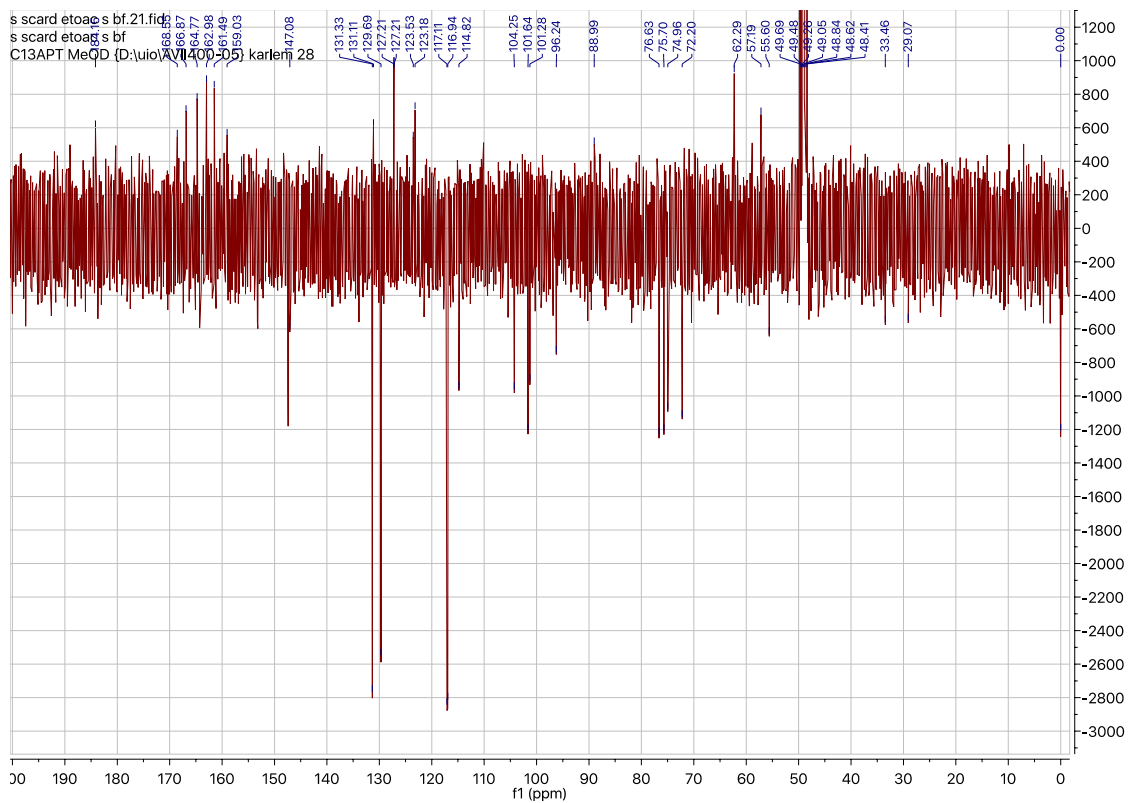
Spektrum 15H: *S. scardica* BuOH S5V9H8 1H 400 MHz, 7-*O*-(Acetylallosylacetylglukosyl)-4'-*O*-methylhypolaetin



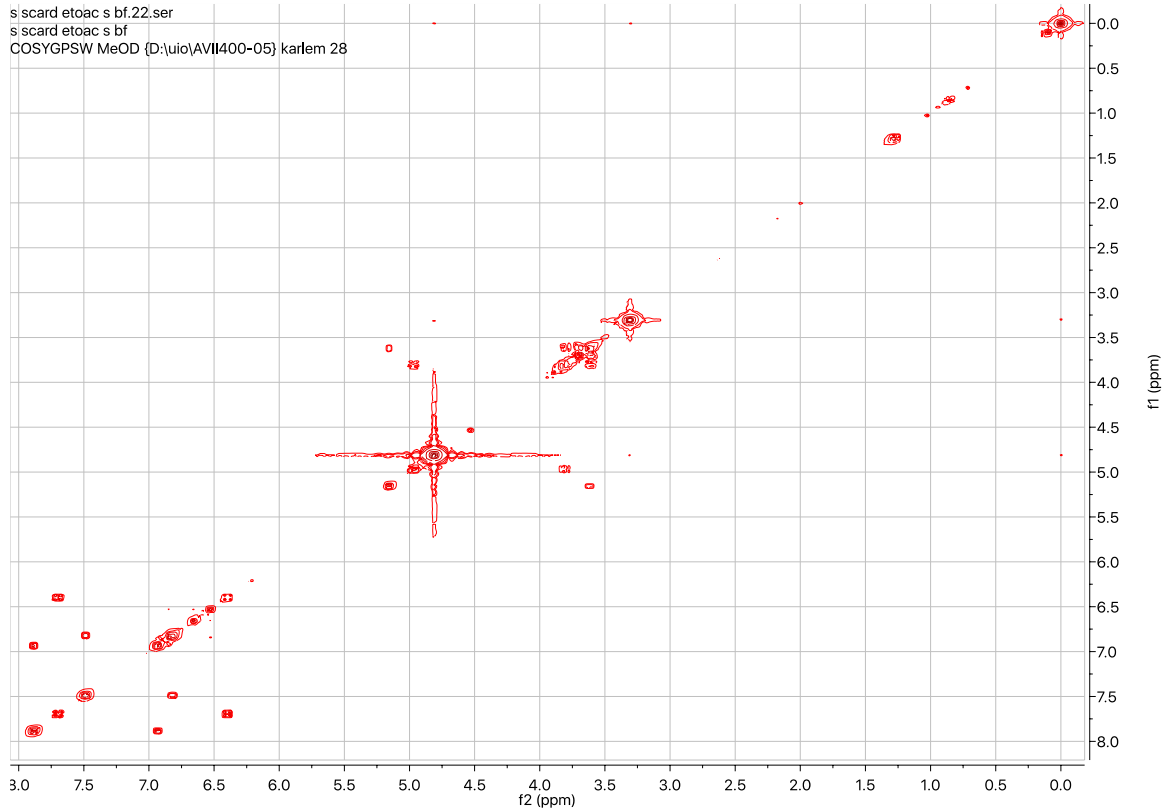
Spektrum 15C: *S. scardica* BuOH S5V9H8 APT 100 MHz, 7-*O*-(Acetylallosylacetylglukosyl)-4'-*O*-methylhypolaetin



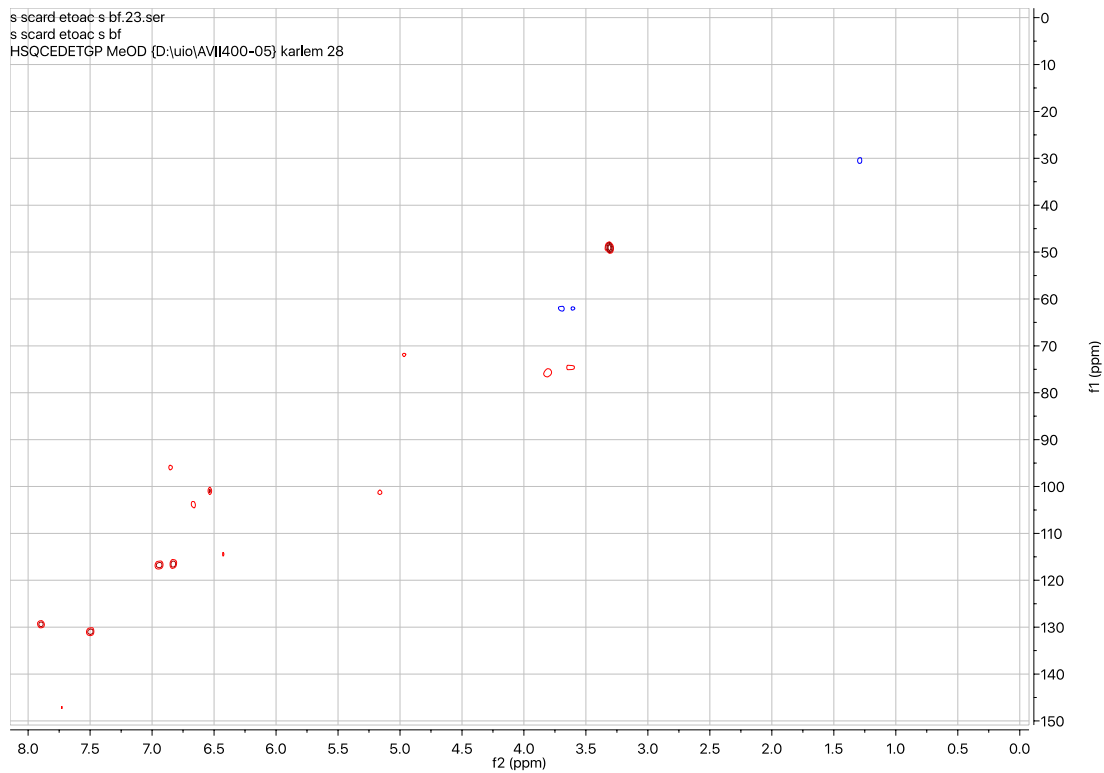
Spektrum 16H: *S. scardica* EtOAc S-utfelt 1H 400 MHz, Echinaticin ((7-*O*-(4'-*O*-coumaroyl)glukosyl)-apigenin)



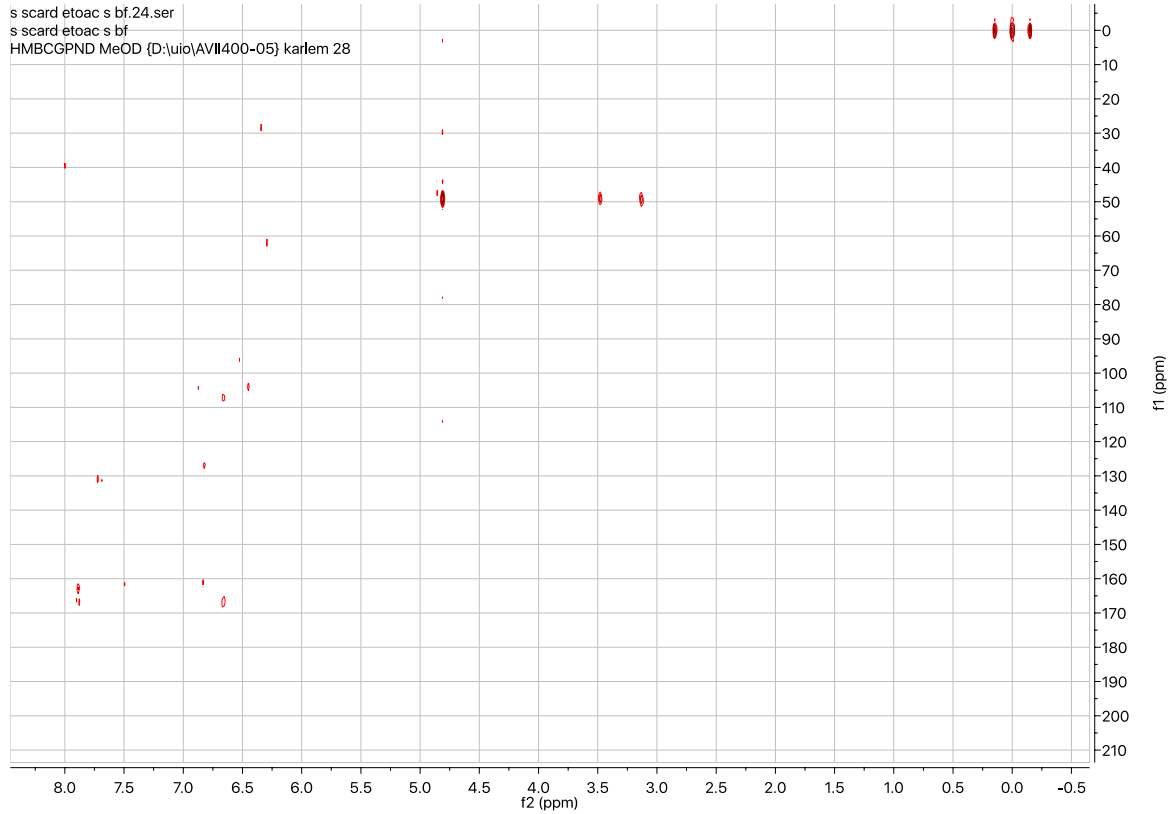
Spektrum 16C: *S. scardica* EtOAc S-utfelt APT 100 MHz, Echinaticin ((7-*O*-(4'-*O*-coumaroyl)glukosyl)-apigenin)



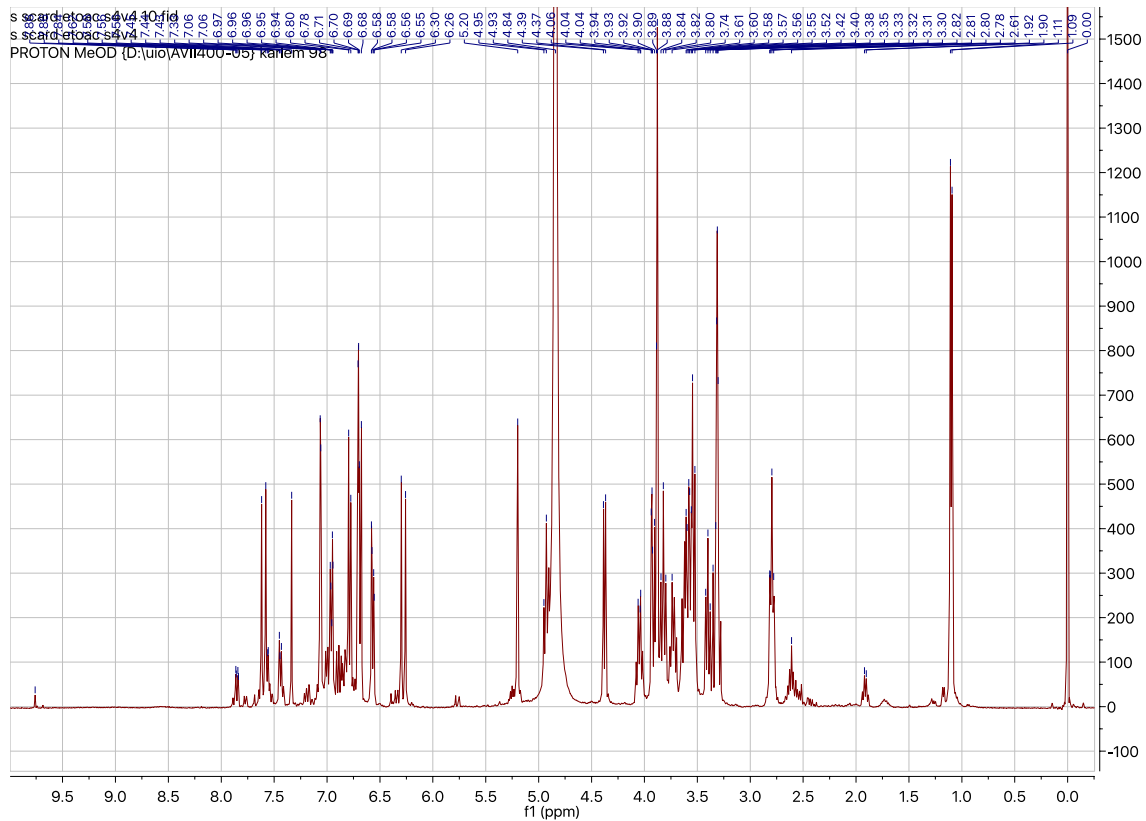
Spektrum 16COSY: *S. scardica* EtOAc S-utfelt COSY 400 MHz, Echinaticin ((7-*O*-(4'-*O*-coumaroyl)glukosyl)-apigenin



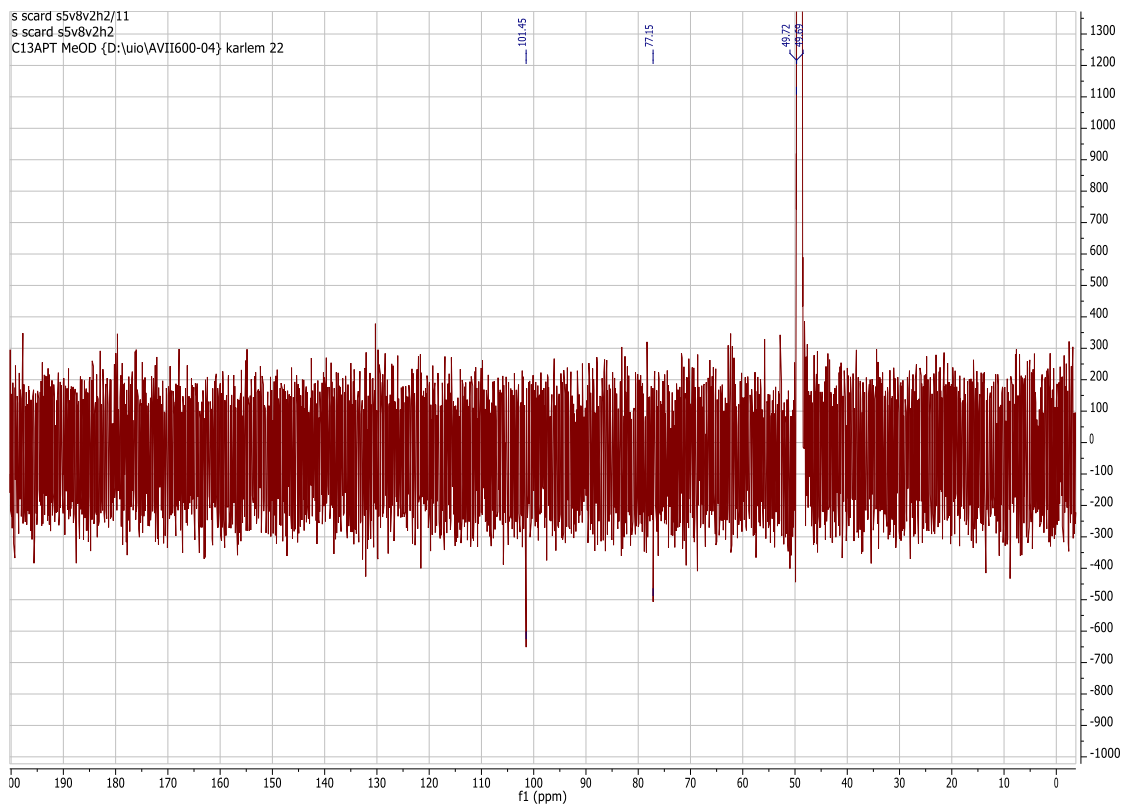
Spektrum 16HSQC: *S. scardica* EtOAc S-utfelt HSQC 400 MHz, Echinaticin ((7-*O*-(4'-*O*-coumaroyl)glukosyl)-apigenin



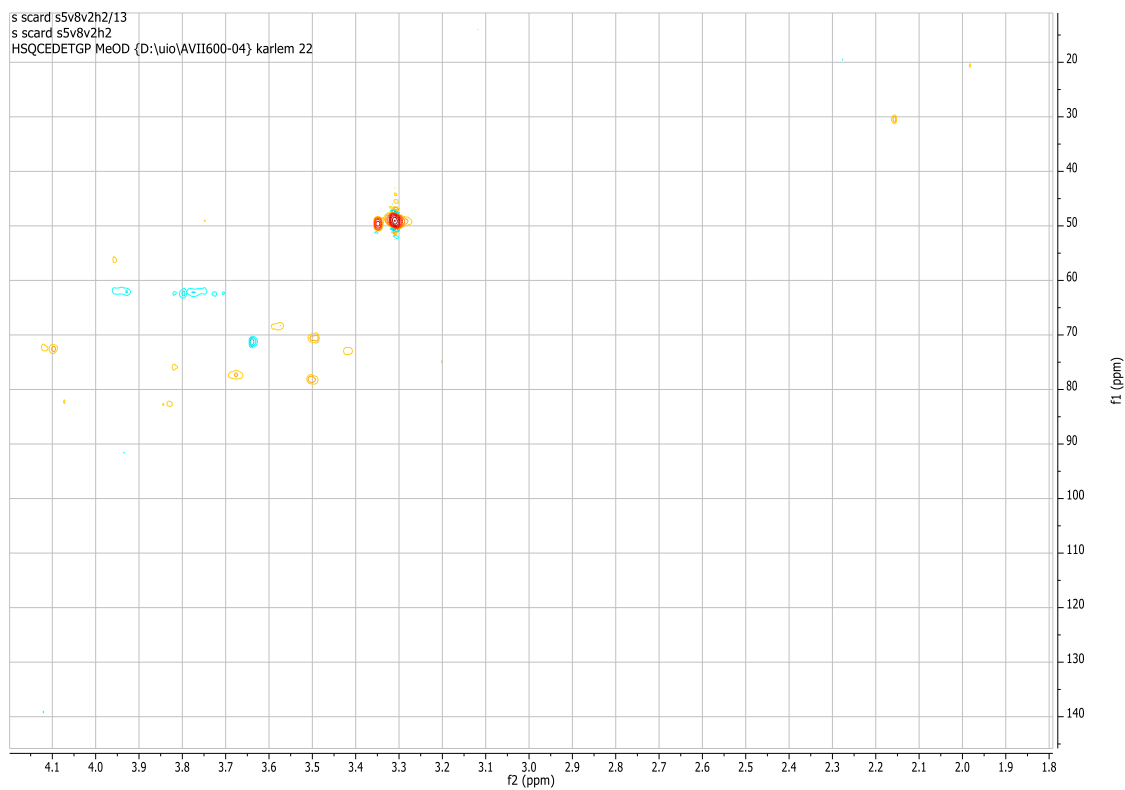
Spektrum 16HMBC: *S. scardica* EtOAc S-utfelt HMBC 400 MHz, Echinaticin ((7-*O*-(4'-*O*-coumaroyl)glukosyl)-apigenin



Spektrum 17H: *S. scardica* EtOAc S4V4 1H 400 MHz: Leucoseptosid A



Spektrum 18C: *S. scardica* BuOH S5V8V2H2 APT 150 MHz: 7-O-(Allosyl-6-O-acetylglucosyl)-isoscuteallarein



Spektrum 18HSQC: *S. scardica* BuOH S5V8V2H2 1H 600 MHz: 7-O-(Allosyl-6-O-acetylglucosyl)-isoscuteallarein