

10 PLANTER FRA TRADISJONELL ASIATISK FOLKEMEDISIN

En litteraturstudie over fytokjemi, farmakologisk effekt og
terapeutisk potensiale



Av

Mary-Ann Sommernes

Masteroppgave i farmakognosi

UNIVERSITETET I OSLO

April 2010



Innhold

INNHold	2
1. FORORD	12
2. ABSTRAKT	13
3. INTRODUKSJON	14
3.1 OPPGAVENS OPPBYGNING	14
3.2 BAKGRUNN FOR OPPGAVEN.....	15
3.2.1 <i>Kurvplantefamilien</i>	15
3.2.2 <i>Myanmar</i>	17
3.2.3 <i>Professor Arnold Nordal</i>	19
4. METODE	22
5. ARTEMISIA GLAUCA PALL. EX WILLD.	24
5.1 SAMMENDRAG.....	25
5.2 TAKSONOMISKE BETEGNELSER	25
5.3 SAMMENLIGNING AV FLORA	26
5.3.1 <i>Artemisia dracunculus L.</i>	26
5.3.2 <i>Artemisia glauca Pallas ex Willd.</i>	27
5.4 UTBREDELSE AV ESTRAGON	27
5.5 BRUKEN AV ESTRAGON	28
5.5.1 <i>Industri og hjemme bruk</i>	28
5.5.2 <i>Tradisjonell medisinsk bruk</i>	29
5.6 KJEMISKE STUDIER.....	30
5.6.1 <i>Eterisk olje</i>	30
5.6.2 <i>Biosyntese</i>	34

5.6.3	<i>Aromatiske acetylen</i>	36
5.6.4	<i>Kumariner og Isokumariner</i>	37
5.6.5	<i>Flavonoider</i>	38
5.6.6	<i>Peroksidase aktivitet</i>	40
5.6.7	<i>Amid komponenter</i>	40
5.6.8	<i>Andre komponenter</i>	41
5.7	BIOLOGISKE STUDIER.....	42
5.7.1	<i>Hypoglykemisk effekt</i>	42
5.7.2	<i>Allergiske sykdommer</i>	45
5.7.3	<i>Antikoagulant</i>	45
5.7.4	<i>Antimikrobiell aktivitet</i>	46
5.7.5	<i>Nevrologisk effekt</i>	48
5.8	DISKUSJON.....	48
5.9	KONKLUSJON.....	50
6.	<i>BLUMEA BALSAMIFERA DC.</i>	51
6.1	SAMMENDRAG.....	52
6.2	TAKSONOMISKE BETEGNELSER.....	52
6.3	FLORA.....	52
6.4	TRADISJONELL BRUK.....	53
6.5	KJEMISKE STUDIER.....	54
6.5.1	<i>Flavonoider</i>	56
6.5.2	<i>Sesquiterpenlaktoner</i>	60
6.5.3	<i>Steroler og hydrokarboner</i>	62
6.5.4	<i>Kjemiske komponenter i den eteriske oljen</i>	63

6.6	BIOLOGISKE STUDIER	64
6.6.1	<i>Antitumor aktivitet</i>	64
6.6.2	<i>Antioksidant aktivitet</i>	69
6.6.3	<i>Plasmin hemmende effekt</i>	72
6.6.4	<i>Cytotoksisitet</i>	72
6.6.5	<i>Xantin Oxidase hemmende effekt</i>	73
6.6.6	<i>Antiplasmodiske egenskaper</i>	73
6.6.7	<i>Metabolitter mot sopp</i>	73
6.6.8	<i>Spasmolytisk aktivitet</i>	74
6.6.9	<i>Blokkering av adipogenese</i>	74
6.6.10	<i>NO hemmende aktivitet</i>	75
6.7	KLINISKE STUDIER	75
6.8	DISKUSJON	75
6.9	KONKLUSJON	77
7.	CHRYSANTHEMUM CINERARIAEFOLIUM VIS	78
7.1	SAMMENDRAG.....	79
7.2	TAKSONOMISKE BETEGNELSER	79
7.3	BOTANIKK OG FLORA	79
7.4	KOMMERSIELL PRODUKSJON	80
7.5	BRUK.....	80
7.6	KJEMISKE STUDIER	81
7.6.1	<i>Pyretriner</i>	81
7.6.2	<i>Biosyntese</i>	82
7.6.3	<i>Stabilitet</i>	86

7.6.4	<i>Sesquiterpenlakter og flavonoider</i>	87
7.6.5	<i>Fenoler</i>	88
7.6.6	<i>Karotenoider</i>	89
7.6.7	<i>Fettsyrefraksjon</i>	90
7.7	KLINISKE STUDIER	91
7.7.1	<i>Skabb</i>	92
7.8	BIOLIGISKE STUDIER	92
7.8.1	<i>Antimykobakteriell aktivitet</i>	93
7.8.2	<i>Herpes simplex</i>	94
7.8.3	<i>Konserveringsmiddel</i>	94
7.9	TOKSIKOLOGI.....	94
7.10	DISKUSJON.....	96
7.11	KONKLUSJON	97
8.	<i>ELEPHANTOPUS SCABER L.</i>	98
8.1	SAMMENDRAG	99
8.2	TAKSONOMISKE BETEGNELSER	99
8.3	BOTANIKK OG FLORA	99
8.4	TRADISJONELL BRUK	100
8.5	KJEMISKE STUDIER.....	101
8.5.1	<i>Eterisk olje</i>	102
8.5.2	<i>Aurantiamider</i>	103
8.5.3	<i>Sesquiterpen lakter</i>	104
8.5.4	<i>Terpenoider</i>	106
8.6	BIOLOGISKE STUDIER	111

8.6.1	<i>Antibakteriell aktivitet</i>	112
8.6.2	<i>Antiviral aktivitet</i>	115
8.6.3	<i>Antipyretisk aktivitet</i>	115
8.6.4	<i>Antiinflammatorisk aktivitet</i>	116
8.6.5	<i>Stoppende effekt</i>	116
8.6.6	<i>Kardiovaskulære effekter</i>	117
8.6.7	<i>Antidiabetisk effekt</i>	118
8.6.8	<i>Sårhelende aktivitet</i>	119
8.6.9	<i>Antitumor effekt</i>	120
8.6.10	<i>Analgesisk effekt</i>	121
8.6.11	<i>Nyrefunksjon</i>	122
8.6.12	<i>Leverfunksjon</i>	122
8.6.13	<i>Enzymhemmende aktivitet</i>	124
8.6.14	<i>Cytotoksisitet</i>	124
8.6.15	<i>Akutt toksisitet</i>	124
8.7	KLINISKE STUDIER	125
8.8	DISKUSJON	126
8.9	KONKLUSJON	128
9.	<i>EMILIA SONCHIFOLIA DC.</i>	129
9.1	SAMMENDRAG	130
9.2	TAKSONOMISKE BETEGNELSER	130
9.3	BOTANIKK OG FLORA	130
9.4	TRADISJONELL BRUK	131
9.5	KJEMISKE STUDIER	131

9.5.1	<i>Pyrrrolizidin alkaloider</i>	134
9.6	BIOLOGISKE STUDIER.....	136
9.7	DISKUSJON.....	139
9.8	KONKLUSJON.....	139
10.	<i>EVOLVULUS ALSINOIDES L.</i>	140
10.1	SAMMENDRAG.....	140
10.2	TAKSONOMISKE BETEGNELSER.....	141
10.3	FLORA OG BOTANIKK.....	141
10.4	TRADISJONELL BRUK.....	141
10.5	KJEMISKE STUDIER.....	142
10.6	BIOLOGISKE STUDIER.....	144
10.6.1	<i>Antistress aktivitet</i>	144
10.6.2	<i>Angstdempende aktivitet</i>	145
10.6.3	<i>Antioksidant aktivitet</i>	145
10.6.4	<i>Acetylcholinesterase hemmende aktivitet</i>	146
10.6.5	<i>Antiinflammatorisk aktivitet</i>	147
10.6.6	<i>Adaptogene og anti-amnesiske egenskaper</i>	148
10.6.7	<i>Forekomst av aflatoksin i råmaterialet</i>	148
10.7	DISKUSJON.....	149
10.8	KONKLUSJON.....	150
11.	<i>GRANGEA MADERASPATANA POIR.</i>	151
11.1	SAMMENDRAG.....	151
11.2	TAKSONOMISKE BETEGNELSER.....	152
11.3	BOTANIKK OG FLORA.....	152

11.4	TRADISJONELL BRUK.....	152
11.5	KJEMISKE STUDIER.....	153
11.5.1	<i>Flavoner</i>	153
11.5.2	<i>Flavonoler</i>	154
11.5.3	<i>Diterpener og Clerodan derivater</i>	155
11.5.4	<i>Eudesmanolider</i>	159
11.5.5	<i>Steroider</i>	159
11.6	BIOLOGISKE STUDIER.....	160
11.7	DISKUSJON.....	162
11.8	KONKLUSJON.....	162
12.	<i>SIEGESBECKIA ORIENTALIS L.</i>	163
12.1	SAMMENDRAG.....	163
12.2	TAKSONOMISKE BETEGNELSER.....	163
12.3	FLORA OG BOTANIKK.....	164
12.4	TRADISJONELL BRUK.....	164
12.5	KJEMISKE STUDIER.....	165
12.5.1	<i>Diterpenoider</i>	168
12.5.2	<i>Sesquiterpenlaktoner</i>	173
12.5.3	<i>Melampolider</i>	174
12.6	BIOLOGISKE STUDIER.....	176
12.7	DISKUSJON.....	177
12.8	KONKLUSJON.....	178
13.	<i>TAGETES ERECTA L.</i>	179
13.1	SAMMENDRAG.....	179

13.2	TAKSONOMISKE BETEGNELSER	180
13.3	BOTANIKK OG FLORA	180
13.4	TRADISJONELL BRUK	180
13.5	EKSTRAKSJON AV <i>TAGETES ERECTA</i>	181
13.6	FYTOKJEMISK PROFIL.....	181
13.7	ETERISK OLJE.....	185
13.8	KAROTENOIDER	187
13.8.1	<i>Lutein</i>	187
13.8.2	<i>Fremstilling av lutein</i>	190
13.8.3	<i>Absorpsjon av lutein</i>	191
13.8.4	<i>Farmakokinetikk</i>	192
13.8.5	<i>Biotransformasjon</i>	193
13.8.6	<i>Kliniske studier og lutein</i>	194
13.8.7	<i>Epidemiologiske studier av lutein</i>	195
13.8.8	<i>Biologiske studier og lutein</i>	196
13.8.9	<i>Matinntak av lutein</i>	197
13.8.10	<i>Toksikologi og lutein</i>	198
13.8.11	<i>Biosyntese av lutein</i>	200
13.9	TIOFENER.....	203
13.9.1	<i>Kjemiske studier av tiofener</i>	203
13.9.2	<i>Biosyntese av tiofener</i>	209
13.9.3	<i>Biologiske studier av tiofener</i>	211
13.10	KLINISKE STUDIER AV <i>TAGETES ERECTA</i>	213
13.11	BIOLOGISKE STUDIER AV <i>TAGETES ERECTA</i>	213

13.11.1	<i>Toxisit og Tagetes erecta</i>	214
13.12	DISKUSJON	215
13.13	KONKLUSJON	217
14.	VERNONIA CINEREA LESS	218
14.1	SAMMENDRAG	219
14.2	TAKSONOMISKE BETEGNELSER	219
14.3	BOTANIKK OG FLORA	219
14.4	TRADISJONELL BRUK.....	220
14.5	KJEMISKE STUDIER.....	221
14.5.1	<i>Eterisk olje</i>	223
14.5.2	<i>Flavonoider</i>	223
14.5.3	<i>Triterpenoider</i>	225
14.5.4	<i>Sesquiterpenoider</i>	230
14.6	BIOLOGISKE STUDIER	233
14.6.1	<i>Cytotoksisk aktivitet</i>	233
14.6.2	<i>Insektmiddel</i>	234
14.6.3	<i>Antibakteriell effekt</i>	234
14.6.4	<i>Antiinflammatorisk aktivitet</i>	235
14.6.5	<i>Antipyretisk aktivitet</i>	236
14.6.6	<i>Antiplasmodisk aktivitet</i>	237
14.6.7	<i>Sedativ effekt</i>	238
14.6.8	<i>Diuretisk aktivitet</i>	239
14.6.9	<i>Toksisitet</i>	239
14.6.10	<i>Alkaloid produksjon</i>	240

14.7	DISKUSJON.....	241
14.8	KONKLUSJON.....	242
15.	OPPSUMMERING	243
16.	ORDLISTE	251
17.	FORKORTELSER.....	254
KILDER	256

1. Forord

Først vil jeg få lov å takke professor Berit Smestad Paulsen, avdeling for farmakognosi, for nyttig veiledning underveis dette året som arbeidet med oppgaven har pågått. Det har vært en lærerik prosess å sette seg inn i den litteratur som er gjort på plantene i forhold til kjemiske innholdsstoffer og tradisjonell bruk fra en del av verden som for meg var lite kjent fra tidligere. Takk også til Kirsten Borse Haraldsen på biologisk bibliotek for innføring og hjelp med EndNote programmet, et verktøy som jeg har lært meg å sette pris på. Mange takk også til Bente Kathrine Rasch på farmasøytisk bibliotek for å ha skaffet til veie utallige artikler fra nær og fjern som ikke var elektronisk tilgjengelige.

En stor takk også til tidligere professor i botanikk Per Sunding ved botanisk museum på Tøyen for velvillig hjelp med finne fram til plantene fra professor Nordals Burma herbarium og i floraer. Tusen takk også til termvaktene på termstua, hvor jeg har arbeidet med oppgaven, for teknisk hjelp med alle verktøyprogram. Sist men ikke minst takk til alle medstudenter og venner for en trivelig studietid.

2. Abstrakt

Hensikt:

Denne oppgaven har som formål å vurdere den vitenskapelige litteratur som er tilgjengelig på 10 planter fra Nordals Burma herbarium, for om mulig å kunne trekke konklusjoner med hensyn til om det tradisjonelle bruksområdet synes rimelig.

Metode:

Denne litteraturstudien bygger hovedsakelig på søk etter plantenavn i databasene PubMed/MEDLINE, SciFinder, EMBASE, ISI Web, IPA – International Pharmaceutical Abstracts og COCHRANE. Det er også søkt etter enkelte innholdstoffer, forfatternavn og referanser.

Resultater:

Det er gjort noen få kjemiske og biologiske studier av plantene som peker i retning av at plantene inneholder kjemiske substanser som kan ha en lindrende effekt i forhold til milde plager av mindre alvorlig art relatert til sine antiseptiske og appetittvekkende egenskaper. Det er kun gjort enkelte kliniske studier på noen av plantene, men disse er av begrenset omfang og varighet. Toksikologisk profil er manglende for samtlige planter bortsett fra for *Chrysanthemum cinerariaefolium*.

Konklusjon:

Bortsett fra pyretriner i *Chrysanthemum cinerariaefolium* og lutein i *Tagetes erecta* er det på ingen måte gjort studier som gir grunnlag for bruk av disse plantene i forhold til sikkerhet og effekt. Plantene inneholder stoffer som kan være skadelige i større mengder, men også komponenter som kan ha et potensial som virkestoffer. Det er derfor en rimelig sannsynlighet for at videre forskning på disse plantene vil kunne gi nyttige resultater med hensyn til å kartlegge eventuelle virkestoffer, sikkerhet og effekt av disse. *Chrysanthemum cinerariaefolium* inneholder pyretriner. Pyretriner og pyretroider er giftige, men i små mengder kan de brukes i myggmidler.

3. Introduksjon

Avdeling for farmakognosi, universitetet i Oslo har en database med rundt 400 planter som ble samlet inn fra Burma av professor Arnold Nordal på 60-tallet. Disse plantene var brukt i tradisjonell folkemedisin i Burma.

Hensikten med denne oppgaven er å vurdere den vitenskapelige litteratur som er tilgjengelig for 10 av de nevnte planter, for om mulig å kunne trekke konklusjoner med hensyn til om det tradisjonelle bruksområdet synes rimelig og eventuelt få brakt på det rene om det er behov for flere studier av disse plantene. Fokuset for oppgaven er om mulig å spore opp virkestoffer som kan ha en direkte sammenheng med den tradisjonelle bruken. I tillegg er det tatt med noen studier som viser hvordan mengden innholdsstoffer kan variere med voksested og abiotiske faktorer. Disse er tatt med for å belyse at både arv og miljø kan ha en betydning for den tradisjonelle bruken av planten.

Litteratur på følgende planter fra kurvplantefamilien er belyst i denne oppgaven:

(plantenavn til venstre på listen er gyldige ut fra Index Kewensis)

Artemisia glauca Pall. Ex Willd.

Blumea balsamifera DC.

Chrysanthemum cinerariifolium Vis. (tidligere *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.)

Elephantopus scaber L.

Emilia sonchifolia DC.

Grangea maderaspatana Poir.

Sigesbeckia orientalis L. (referert til som *Siegesbeckia orientalis* L. i Burma herbarium)

Tagetes erecta L.

Vernonia cinerea Less

Evolvulus alsinoides L. er en plante fra familien Convolvulaceae som også er tatt med i denne oppgaven.

3.1 Oppgavens oppbygning

Oppgaven er inndelt i kapitler for hver plante i alfabetisk rekkefølge. Hvert kapittel begynner med et sammendrag av planten der karakteristiske kjennetegn, tradisjonell bruk og de

viktigste resultater er nevnt i korte trekk i forhold til kjemiske og biologiske studier som er gjort. Deretter følger en rikt illustrert gjennomgang av kjemiske studier som er funnet, med en kort beskrivelse av metoden som er brukt og resultatene fra disse. Så følger en gjennomgang av biologiske og eventuelt kliniske studier. Studiene diskuteres i korte trekk før en konklusjon til slutt av hvert kapittel. Bakerst i oppgaven er det en liten oppsummering hvor de omtalte plantene sammenlignes i forhold til tradisjonell bruk og kjemiske innholdsstoffer. Ukjente ord og forkortelser som er brukt i oppgaven er gjengitt i en ordliste til slutt etterfulgt av litteraturlisten.

3.2 Bakgrunn for oppgaven

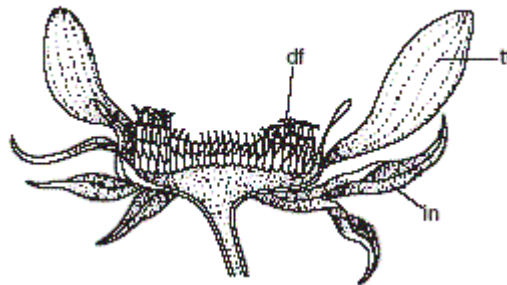
Denne masteroppgaven er en av flere litteraturstudier som tar for seg medisinske planter fra Nordals Burma herbarium for å undersøke hva man vet om disse. Mange av disse plantene er i dag blitt av stor interesse innen vestlig og tradisjonell medisin. Man har sett at også i Norge er bruken av disse plantene økende, men den kunnskap som er tilgjengelig er i liten grad til stede. Det er derfor av interesse å skaffe så mye informasjon som mulig om disse plantene. Denne kunnskapen kan også bli til nytte for farmasøyter på norske apotek. Det er også av interesse å oppdatere databasen som omhandler latinsk navn, voksested, plantedel og bruksområder om plantene.

3.2.1 Kurvplantefamilien

Kurvplantefamilien har holdt botanikere travelt opptatt i år hundreder, og fremdeles eksisterer det ikke noen universell klassifisering av denne familien. Alle medlemmer av denne familien har en kompleks blomsterstand (blomsterhode) som gav opphav til det gamle navnet til denne familien: Compositae. Når det gjelder andre karakteristika er denne familien heller variert, spesielt med hensyn til kjemiske komponenter i plantene. Det viktigste morfologiske karaktertrekket er det komplekse blomsterhodet, som består av flere eller mange små blomster. Blomsterstanden danner en kurv med flatt eller kjegleformet blomsterfeste og tallrike svøpblad som kurvdekke langs randen. Hver enkelt blomst er oversittende. Begeret er omdannet til udelte eller fjærformede hår ("hårfnokk"), noen ganger til brodder eller skjell, eller manglende. Det er fem støvbærere med knoppene sammenvokste til et rør rundt griffelen. Denne har hår på utsiden som feier ut blomsterstøvet. Det er to arr,

som spriker til sist, og som utvikler seg til små nøttefrukter, med eller uten fnokk i toppen. Fnokken kan av og til være heist opp på et nebb eller en lang stilk.

Blomstene sitter i groper på blomsterfestet. Blomsterfestet kan være glatt, håret eller kledd med skjellaktige små blad (agner). Kronene er enten rørformede med regelmessig 5-flikt krage (rørkrone), eller spaltet opp på innsiden og dradd ut i en lang tunge på utsiden (tungekrone). Av og til er alle blomstene tvekjønnede eller enkjønnede (særbu), men oftest er randblomstene sterile eller hunnlige, mens skiveblomstene er tvekjønnede og setter frukt (sambu). Kurvene kan til sammen danne et hode, en klase, halvskjerm eller topp, eller sitte enslig. Plantene formerer seg ved insektbestøving (Sørensen, 1969).



Skjematisk figur av et typisk blomsterhode fra familien Asteraceae, hentet fra (Heinrich et al., 2004). Df: skiveblomst også kalt rørkrone/rørblomst (disk flower), tf: tungekrone/tungeblomst (tubular flower), in: svøpblad (involucre).

En typisk kjemisk egenskap ved denne plantefamilien er at de flerårige plantene lagrer karbohydrater i form av polyfruktaner, spesielt inulin (i stedet for polysakkarider). Noen arter i denne familien akkumulerer sesquiterpenlaktoner, for eksempel partenolid, som er et viktig naturstoff ansvarlig for den farmakologiske effekten til flere droger så som for eksempel matrem (*Chrysanthemum parthenium*) og *Arnica montana*. Polyacetylene komponenter (polyener) og eteriske oljer er også vanlig for denne familien. Kamomille, *Matricaria chamomilla* L. er eksempel på en aromatisk plante som er brukt i tradisjonell medisin. Strandbalderbrå, *Matricaria maritima* også kalt *Matricaria inodora*, er derimot ikke en aromatisk plante og er heller ikke brukt medisinsk. Noen arter akkumulerer pyrrolizidin alkaloider som for eksempel finnes i hestehov (*Tussilago farfara*) i meget små mengder. Mange av disse alkaloidene er kjent for sin hepatotoksiske effekt. Andre arter i denne familien akkumulerer diterpenoider (Heinrich, et al., 2004).

3.2.2 Myanmar

Myanmar, som i dag er navnet på tidligere Burma, spenner mellom 9° og 29° breddegrad og fra 92° til 102° lengdegrad. I nord og nord øst grenser Myanmar til Kina, i øst og sør øst til Laos og Thailand og i sør til Andamansjøen og Bengal bukta. I øst grenser Myanmar til India. Mer enn 50 % av landets totale areal på 676.777 km² består av skog, og landet er kanskje mest kjent for sin eksport av teak trær.



Kart kopiert over Myanmar med tilgrensende land, kopiert fra (Nummeropplysningen 1881, 2010).

Myanmar omfatter et bredt økologisk spekter som varierer med snødekte fjell og tropisk regnskog til kyst og marine økosystem. I 2004 var befolkningen på 53 millioner med en vekstrate på 1,84 %. Skogen i Myanmar er av sosial og økonomisk signifikant betydning. 70 % av landets befolkning lever av skog- og landbruk. Skogssektoren bidro til 30 % av landets totale eksportnæring på 1990-talet. FAO (1994) estimerte at 1,4 % av skogsarealet i Myanmar ble ødelagt mellom 1990 og 1995. Om denne utviklingen fortsetter vil det ikke bare skade eksportmarkedet men også ha en signifikant innvirkning på miljøet med alvorlige

konsekvenser for beskyttelse av nedbørsfelt og dermed beskyttelse av jordbruk og livsbetingelser.

The Forest Department (FD) og Ministry of Forestry (MOF) er ansvarlige for å beskytte og bevare det biologiske mangfoldet og for å sørge for en bærekraftig forvaltning av landets skog ressurser. Forest Genetic Resources Conservation (FGRC) ble startet i 1984, og etter det har det blitt iverksatt tiltak for å bevare det biologiske mangfoldet på et bærekraftig grunnlag. Myanmar har en variert flora med sub alpine, tørre, fuktige og periodevise skoger, tropiske regnskoger og mangrove tre skoger. Myanmar har fortsatt en rik flora med 11.800 plante arter (Oo, 2004).

The International Plant Genetic Resources Institute er en uavhengig internasjonal vitenskapelig organisasjon som har som formål å fremme bevaring og bruk av plante genetisk mangfold til fordel for nåværende og fremtidige generasjoner. Det er en av 15 Future Harvest Centres som støttes av The Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR), en organisasjon med offentlige og private medlemmer som støtter innsats for å mobilisere innovative, nyskapende og banebrytende vitenskap for å redusere sult og fattigdom, bedre human ernæring og helse og beskytte miljøet.

Forskning på medisinplanter i den Asiatiske delen av Stillehavet ble initiert med undertegnelsen av en samarbeidsavtale for forskning på ” The Inventory and Documentation of Medicinal Plants in the Asia Pasific Region” mellom IPGRI og the Rural Development Administrartion (RDA) fra republikken Korea i 2001. Med denne avtalen gav RDA IPGRI startkapital til å implementere prosjektet i 14 land over en periode på 4 år, med start fra 2002. Kina, Malaysia, Sør Korea og Filippinene startet dette arbeidet i 2002. Bangladesh, India, Nepal, Sri Lanka, Indonesia, Vietnam, Mongolia og Laos startet i 2004. Forhandlinger pågikk fortsatt i 2004 angående medlemskap for Myanmar og Thailand. Et av målene for prosjektet er å utvikle en database over medisinplanter fra hvert enkelt land som inneholder blant annet plantenavn, karakteristiske særpreg og tradisjonell bruk (Batugal et al., 2004). Myanmar har utviklet en database over noen av landets medisinplanter, men ikke alle planter omtalt i Nordals Burma herbarium er med her (Tun & U.P., 2006). I tillegg har helsedepartementet på Myanmar utarbeidet en samling monografer ved navn ” Medical Plants of Myanmar” med ca 50 planter (MOH Myanmar, 2010b). Tradisjonell medisin er en integrert del av medisinstudiet på Myanmar siden 2003. Tradisjonelle medisinske preparater blir i dag produsert for både privat og offentlig sektor hvor departementet for tradisjonell

medisin har ansvaret for offentlig sektor. Tradisjonell medisin blir produsert på to fabrikker etter nasjonale retningslinjer og Good Manufacturing Practice (GMP) (MOH Myanmar, 2010a).

3.2.3 Professor Arnold Nordal

Professor Arnold Nordal ble født den 19.mai 1909. Han avla apotekereksamen i 1936 og tok dr. philos graden i 1947 over avhandlingen ”A phamracognostical study of *Sedum acre* L. including a comparison with other Crassulaceae”. Arnold Nordal ble tilsatt som professor i farmakognosi ved Farmasøytisk institutt, UiO I 1948 (Paulsen, 2003).

Under den andre verdenskrig led befolkningen i Burma enormt av mangel på moderne medisiner. For å unngå lignende katastrofe i fremtiden besluttet den ferske regjeringen av det uavhengige Burma å bygge en moderne farmasøytisk fabrikk for å produsere tilstrekkelig med medisiner til å dekke det essensielle behovet til hele Burmas befolkning, som den gang utgjorde ca 20 millioner mennesker. Resultatet ble Burmas farmasøytiske industri (BPI) – en av de største og mest moderne farmasøytiske industrier i sør øst Asia. Denne fabrikk ble offisielt åpnet i 1958, ledet av den Burmesiske regjeringen med 750 ansatte. I den første perioden var BPI nesten fullstendig avhengig av importert råmaterial, spesielt frø av god kvalitet.

I 1957 ble professor Arnold Nordal utnevnt som FN ekspert i Burma på bakgrunn av sin erfaring med medisin planter og sin erfaring med industrielt samarbeid. Professor Nordal var i Burma i to perioder, fra mai 1957 til september 1959 og fra mai til september 1961. Oppdraget som rådgiver var å hjelpe BPI med å skaffe råvarer til medisinproduksjon. Dette arbeidet omfattet kultivering av viktige medisinplanter, samt å kartlegge muligheten for å utnytte den medisinske floraen i Burma. Disse oppdragene innebar en god del reising på kryss og tvers av Burma hvor professor Nordal kom i kontakt med lokalbefolkningen.

På den tiden var det to anerkjente medisinske miljøer i Burma. Det ene var det vestlige systemet med doktorer og farmasøyter med bakgrunn fra universiteter og høyskoler. Det andre systemet innebar tradisjonell medisinsk kunnskap som gikk i arv fra generasjon til generasjon. Dette systemet hadde representanter med bakgrunn som buddhist munk, lokale doktorer, omreisende medisin menn, forhandlere i de lokale droge basarene og de

profesjonelle droge samlerne. Disse ble da hovedkilden til den direkte informasjonen professor Nordal samlet inn om medisiplantene. Nordal gav uttrykk for den respekt han hadde for den innfødte befolkningen og den betydningen de hadde med sin tradisjonelle kunnskap.

Religiøse folk og institusjoner som for eksempel munkene har i århundreder hatt interesse av å hjelpe lokalbefolkningen med deres helseproblemer. I Burma har den buddhistiske religionen praktisert i 2000 år, like lenge som Burma har hatt et skriftspråk. Den gamle burmesiske litteraturen omhandler for det meste religiøse tema, men også til en viss grad medisinske tradisjoner og helseproblemer. Flere munkene i Burma har spesialisert seg på å lese disse gamle skrifterne, hvorav noen få nå er oversatt til engelsk. I hagene til burmesiske klostre vokser det blant annet eksotiske planter til medisinsk bruk. Professor Nordal ble alltid vel mottatt på sine reiser, og ble ofte vist rundt av abbeden selv. I følge burmesisk horoskop skal professor Nordal ha vært født på elefantens dag, hvilket anses for å være veldig fint i Burmesiske øyne. Flere av de buddhistiske munkene professor Nordal var i kontakt med var godt bevandret i alkymistenes tenkemåter, samtidig som de i stor grad hadde tillit til den moderne medisinen, spesielt antibiotika.

De lokale doktorer var den gang de vanligste utøverne av det innfødte tradisjonelle medisinske systemet i Burma. Deres profesjonelle bakgrunn bygget delvis på lokal medisinsk tradisjon og til dels på medisinsk kunnskap hentet fra det vestlige medisinske systemet. Utdanningen til de lokale doktorer var heterogen og meget tilfeldig. Den kunne være basert på resepter som var godt bevarte familiehemmeligheter i generasjoner eller medisinsk kunnskap som gradvis var tilegnet gjennom spesielle evner. De mest prominente hadde sine egne medisinske skoler hvor de underviste i anatomi, drogevitenskap og tablettproduksjon. De lokale doktorer hadde ofte sitt eget laboratorium og gjerne et felles apotek med flere lokale doktorer hvor det ble laget medisiner og egne resepter, eller hvor folk kunne komme og få råd og medisiner uten resept. Denne tradisjonen er forandret mye de senere år ettersom lokale doktorer nå også tar i bruk fabrikkproduserte medisiner. Plantene brukes ofte i form av pulver og pulverblandinger og sjelden som infusjoner og dekokt. Plantene knuses i morter.

De omreisende medisinmennene gikk ofte til fots med medisin kofferten i hånden. De lokale drogeforhandlerne solgte et stort utvalg av droger og var alltid forberedt på å gi informasjon om alle de gode egenskapene til sine varer. De profesjonelle drogesamlerne hadde sitt

levebrød av å samle og tørke planter for salg til droge basarene, de lokale doktorene og andre. Professor Nordal kom også i kontakt med U San Pyu, en av de mest anerkjente droge samlerne som hadde pålitelig kunnskap om den medisinske floraen i Burma. Professor Nordal fikk også god hjelp av Mr. Devan Mohinder Nath Nair som var en meget dyktig foreleser i botanikk ved universitet i Rangoon.

På sine reiser gjennom Burmas varierte landskap hadde professor Nordal med seg et par tepper, en pute og et myggnett i tillegg til utrustning for å samle planter. Denne utrustningen bestod av 3-4 store plastikk poser, kniver, sakser og kroker som kunne festes på en lang stav slik at blomstrende grener og frukt kunne nås 5-6 meter over bakken, i tillegg til en hakke for å grave opp røtter. Plantene ble godt merket og gitt et nummer som ble ført opp i en bok med en kort kommentar. Plantene ble så lagt mellom to avisblad og dekket med 1-2 ark med trekkpapir. Disse arkene ble tatt ut og tørket en gang daglig, enten i sola, eller over et kullbål. Likevel var det vanskelig å beskytte plantematerialet fra å mugne. Tilbake i Rangoon ble derfor plantene tørket på nytt, bløtlagt i en løsning av HgCl_2 i etanol og fenol, og deretter tørket en gang til før de ble lagt i kartong. Nordal brakte ca 400 av disse plantene til Oslo der de i dag er godt bevart i det botaniske museum på Tøyen (Nordal, 1963).

4. Metode

Denne oppgaven er av teoretisk art og metoden bygger på litteratur søk. Det er hovedsakelig søkt etter artikler i databasene PubMed/MEDLINE, SciFinder, EMBASE, ISI Web, IPA – International Pharmaceutical Abstracts og COCHRANE. I utgangspunktet ble det søkt på samme plantenavn som referert til i Nordals Burma herbarium. I de tilfeller der dette gav svært få treff er det i tillegg søkt på synonymnavn. Det er også søkt på virkestoffer der det har vært aktuelt. Det ble kun funnet enkelte kliniske studier og COCHRANE rapporter på noen av plantene, noe som kan tyde på at det er gjort svært lite klinisk forskning på disse 10 plantene i forhold til tradisjonell bruk. Således kan det vel sies at dette er et forskningsområde som ikke har vært prioritert innenfor rammen av vestlig medisin. Derimot kan det se ut som om det fjerne Østen ligger i fronten med hensyn til å analysere plantene for kjemiske innholdsstoffer og deretter undersøke om disse kan gi en forklaring på den tradisjonelle bruken, spesielt innenfor kinesisk tradisjonell medisin. Fra søk i SciFinder er det således, ut fra abstrakt og kjemiske formler, å spore flere kjemiske substanser fra planter brukt i tradisjonell medisin som kan være opphav til patenter. Patenter er utelatt i denne oppgaven. Språket er kun begrenset til skandinavisk, engelsk, tysk, fransk, spansk og italiensk.

Med hensyn til avgrensning av oppgaven er det søkt i et fåtall databaser og det er valgt ut vitenskapelige studier som har en klar og tydelig beskrevet metode og resultat del. Fordelen med det er at det er lettere å unngå feiltolkninger og misforståelser ettersom alle studiene følger et felles mønster, er sammenlignbare og kan etterprøves. Bakdelen er at det kan være studier som er gått glipp av. I de studier som har tatt for seg flere planter er det et kriterium at resultatet for hver enkelt plante er klart definert, slik at resultatene er sammenlignbare med hensyn til innholdsstoffer fra andre planter, gjerne nært beslektede arter. Dyrkningsstudier er utelatt, med mindre de beskriver hvordan enkelte innholdsstoffer i planten varierer med de enkelte miljøfaktorer. Studier som omhandler bekjemping av skadeinsekter og skadedyr er utelatt om ikke disse er av klinisk betydning. Studier med fokus på dyrefor og dyrehelse er også utelatt der dette ikke er av terapeutisk verdi for humanmedisin. I det store og hele er det lagt vekt på å bruke primær litteratur i forhold til kjemiske og biologiske studier. I et fåtall tilfeller hvor kun abstrakt har vært tilgjengelig på et forståelig språk, men likevel har vært av stor interesse, er dette synliggjort i teksten. Enkelte studier er sporet opp ved å søke etter forfatter. Noen studier er funnet ved å søke opp referanser.

Når det gjelder morfologiske beskrivelser av plantene er det brukt sekundær litteratur, så som floraer og plantedatabasene W3TROPICOS, IPNI, ITIS og Dr Duke. Alle plantenavn er sjekket opp mot Index Kewensis. Det kan synes som om de asiatiske områdene i stor grad benytter seg av sine gamle navn slik som referert til i Nordal databasen. W3TROPICOS er brukt som taksonomisk referanse på samtlige planter, og synonymnavn er gjengitt fra denne. Flere floraer er tilgjengelige via www.efloras.org. Det botaniske museum på Tøyen har også et rikt utvalg av floraer. Tidligere professor i botanikk Per Sunding ved det botaniske museum på Tøyen, har vært til avgjørende hjelp for å finne fram i jungelen av plantenavn og morfologiske særpreg og har vært så vennlig å finne fram alle de omtalte planter fra Nordals Burma herbarium.

5. *Artemisia glauca* Pall. Ex Willd.



Bilde av *Artemisia glauca* hentet fra (Altai Home, 2009).

5.1 Sammendrag

Artemisia glauca Pall. Ex Willd. tilhører den taksonomiske gruppen *Artemisia dracunculus*, i familien Asteraceae, kurvplantefamilien. I denne gruppen er *Artemisia dracunculus* L., kjent som estragon, den mest omtalte i vitenskapelige vestlige tidsskrifter. Det er gjort en god del studier på *Artemisia glauca* i Russland og Kina, men på grunn av språk barrierer har flere av disse publikasjonene ikke vært mulige å oversette til nytte for denne oppgaven. De studier som er skrevet på engelsk har likevel vært til hjelp for å kunne sammenligne innholdsstoffer funnet i *A. glauca* med de som er funnet i *A. dracunculus*. På grunn av den store variasjonen i naturlige populasjoner av *A. dracunculus* og mangel på stabile morfologiske særpreg forblir det et problem å gjøre et skille mellom artene (Greger, 1979). *Artemisia glauca* og *Artemisia dracunculus* er to ulike arter, men dog nært beslektede arter.

Likheter i kjemisk sammensetning og biosyntese mellom *A. glauca* og *A. dracunculus* L. kan peke i retning av at disse artene inneholder farmasøytiske naturstoffer som kan være interessante å studere videre blant annet i forhold til potensielle antimikrobielle virkestoffer.

5.2 Taksonomiske betegnelser

Botanisk navn : *Artemisia glauca* Pall. ex Willd.

Burmesisk navn: Dona-ban

Klasse: Equisetopsida C. Agardh

Underklasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Overorden: Asterales Link.

Orden: Asterales Link.

Familie: Asteraceae Bercht. & J. Presl

Genus: *Artemisia* L.

Synonym: *Oligosporus dracunculus* (L.) Poljakov, *Oligosporus glaucus* (Pall.ex Willd.)

Poljakov

Kombinasjoner av denne basionym: *Artemisia dracunculoides* var. *glauca* (Pall. Ex Willd)

Munz, *Artemisia dracunculus* subsp. *glauca* (Pall. Ex Willd.) Hall & Clem., *Artemisia dracunculus* var. *glauca* (Pall. Ex Willd.) Jeps., *Oligosporus dracunculus* subsp. *glauca* (Pall. Ex Willd.) Á. Löve D.Löve, *Oligosporus glaucus* (Pall. Ex Willd.) Poljakov (Tropicos. org., 2010g).

5.3 Sammenligning av Flora

Den mest synlige forskjellen mellom artene *A. glauca* og *A. dracunculus* når man sammenligner eksemplarer fra professor Nordals Burma herbarium er bladene. Bladene til estragon er smalere sammenlignet med bladene til *Artemisia glauca*. Ser man på hva som er skrevet i den europeiske flora så kommer imidlertid denne forskjellen ikke tydelig fram. Det er usikkert hvorvidt dette har betydning for bruken av planten ettersom det er roten som oppgis i professor Nordals Burma samling å være brukt. Det foreligger ikke noen eksemplarer av roten i professor Nordals Burma herbarium og det har derfor ikke vært mulig å sammenligne disse. Biologiske karakteristika og mål av estragon er beskrevet på litt forskjellige måter i ulike litteraturkilder.

5.3.1 *Artemisia dracunculus* L.

Estragon er en flerårig plante. Den lukter godt og kan bli opp til 1,5 meter høy. Stilken er kraftig, noe rødaktig og treen lengst ned. Urten kan, men behøver ikke, være dekket med korte hår. Bladene er mørk grønne og blir 2-8 cm lange og opp til 6 mm brede. Planten blomstrer i august-september med små, grønnaktige blomster som sitter i små kranser (Hurteau & Anderson, 2006).

Roten er 0,5-1,5 cm tykk og lett bekledd med rothår. Roten kan ha vel utviklede underjordiske skudd. Unge planter har bare sporadisk forgrening. De nederste grenene har ikke blomster. Bladene er udelte, lineære og nesten lansettformede. Bladene lengst ned kan noen ganger ha treflikete spiss. Blomsterhodene er flertallige, sfæriske, stilkløse, 2-4 mm vide, samlet i klaser i toppen av stilk og grener, og danner en forgrenet blomsterstand. Dekkbladene er jevne, de ytre er langstrakte, nesten lansettformede, og de innerste er runde til ovale, vide ved randen. De små blomstene i ytterkantene har pistill og er vanligvis syv i antall, med rørformet blomsterkrone som blir videre nærmere bunnen. Bladplaten til arret er smal, lineær, litt spiss og brer seg ut fra griffelen. De små blomstene i midten av kransen har pollenbærere og er vanligvis 11-14 i antall, med kjegleformet, femtannete blomsterkrone, lineære støvknapper og avrundete med litt spisse endestilte vedheng, de basale kortere og avrundete. Arret til den utviklede pistillen er udelte og traktformet i toppen. Frøene er små,

0,6 mm lange, ganske flate, eggformede, fint riflete og brune. Frøene veier 0,3-0,5 g/1000 frø (USSR Flora, 1961; Mashanov & Pokrovskii, 1991; Aglarova et al., 2008).

Estragon er en meget forgrenet, glatt flerårig urt på 60-120 cm. De basale bladene er tre delte i tuppen, og resten er 2-10 x 0,2-1 cm, lineære til lansettformede, helt eller svakt tannete. De runde blomsterhodene har blomsterbærende stilk og er bøynd bakover. Svøpbladene er 2-3 mm, og de ytterste skjermbladene er avlange elliptiske, og nesten helt grønne, mens de innerste er ovale med en vid tynn membranøs kant. Kronbladene er gulaktige (Tutin et al., 1976).

5.3.2 *Artemisia glauca* Pallas ex Willd.

Artemisia glauca er en flerårig plante 15-70 cm høy med en krypende eller oppreist stamme, og mer eller mindre tett bekledd med korte hår. Bladene er 1-7 x 0,1-0,7 cm og helt lineære eller lineært lansettformede. De runde blomsterhodene har blomsterbærende stilk og er åpne eller bøynd bakover. Svøpbladene er 1,5-2 mm, glatte, og de ytterste skjermbladene er lansettformede, mens de innerste er ovale til avlange med en vid tynn membranøs kant. Kronbladene er gulaktige (Tutin, et al., 1976).

5.4 Utbredelse av estragon

Estragon anses å stamme fra Sør Russland, steppene i østre Sibir og Mongolia. Den ble trolig innført til Europa med korstogsridderne på 1200-tallet fra Midtøsten (Lindeberg, 1982; Hellrup & Backlund, 2006).

Estragon vokser i dag vilt i Mongolia, Nord Kina, Sibir, Sentral Asia, Lilleasia, Det Nære Østen, Kaukasus, den europeiske delen av Russland, Ukraina, på Krim, Balkan, de baltiske stater, Midtøsten, sentral Europa, Nord Afrika og Nord Amerika. I vill form vokser estragon på alkalisk eng, i nærheten av bjørkelunder, langs med elve avsatter, bratte dalskråninger og gammel brakk jord, skogkledde stepper og gress stepper, i eng skråninger, i bakker og fjell. Estragon dyrkes i USA, Tyskland, Frankrike, Holland, Bulgaria, Ungarn, Hvitrussland, Ukraina, Russland, Sentral Asia, Iran og India. Estragon vokser bra i all slags jord og er ikke

spesielt kravstor med hensyn til temperatur og lys. Likevel vil utilstrekkelige lysforhold kunne bidra til at det dannes mindre mengder med eteriske oljer og dermed redusere den aromatiske duften. Estragon tåler godt frosten vår og høst. Kultivering av estragon til produksjon av eteriske oljer gir best utbytte ved å benytte rot stiklinger ettersom frø kan gi avlinger med lavt volum olje (Stankov, 1951; Grossgeim, 1952; USSR Flora, 1961; Kucherov et al., 1976; Nuraliev, 1991; Amel'chenko et al., 1996; Kupriyanov, 1998; Yakovlev & Blinova, 1999; Aglarova, et al., 2008). Fransk estragon er steril og formerer seg bare ved rot stiklinger, mens den russiske varianten produserer mye frø (Hellrup & Backlund, 2006; Ribnicky et al., 2009).

5.5 Bruken av estragon

I den vestlige delen av verden brukes estragon nesten utelukkende som urtekrydder. Ved tilberedning av krydder tørkes bladene og blomstene. I matlaging brukes bare *Artemisia dracunculus folium*, bladene, og *Artemisia dracunculus flos*, blomstene, ettersom stilken er noe treen. I matvareindustrien brukes også *Artemisia dracunculus aetherolum*, den eteriske oljen (Hellrup & Backlund, 2006; FDA, 2009). I folke medisinen ble fersk estragon brukt til juice og som infus, ekstrakt, avkok og dekokt. Tørket estragon ble brukt som urt (Aglarova, et al., 2008).

5.5.1 Industri og hjemme bruk

De eteriske oljene som fremstilles ved hjelp av vanndamp destillasjon brukes i parfymeindustrien. Estragon blir også brukt i matvare industrien, blant annet som krydder, samt til å bedre holdbarheten til kjøtt, kylling og grønnsaker. Estragon egner seg også til ulike godteri produkter og oster.

I matlaging blir estragon brukt som konserveringsmiddel og krydder, for eksempel i marinader, vineger, sennep og forfriskende drinker. Friske blad egner seg godt som appetittvekker, garnityr til kjøtt retter og salater. I Frankrike blir estragon brukt til å preparere biff. I Ungarn, Georgia og Aserbadjan blir estragon brukt for å tillage fårekjøtt så

vel som ost. I Ukraina blir de friske bladene kombinert med surmelk; i Belarus blir de brukt til sylting av grønnsaker for vinteren (Aglarova, et al., 2008).

5.5.2 Tradisjonell medisinsk bruk

Foruten å bli brukt som urtekrydder for eksempel i bernaissaus eller vineger, har estragon hatt en rekke indikasjoner og bruksområder. Det er først og fremst *Artemisia dracunculus herba* (den delen av planten som vokser over jorden) som har vært brukt til medisinsk formål, men de nordamerikanske indianerne brukte også *Artemisia dracunculus radix*, roten (Hellrup & Backlund, 2006; Hurteau & Anderson, 2006).

Estragon ble brukt for å øke appetitten og fremme fordøyelsen, samt for å forhindre sure oppstøt. Et vannløselig ekstrakt av estragon ble brukt til behandling av kronisk cholecystitt i Tadsjisk folkemedisin (Nuraliev, 1991; Aglarova, et al., 2008).

En alkohol tinktur ble ansett for å ha beroligende og krampedempende virkning på nervesystemet. Estragon ble brukt ved epilepsi, nevroser, og i tibetansk medisin ved neurastenia og impotens. Effekten på nervesystemet er assosiert med innholdet av nitrogen baser (alkaloider og benzodiazepin derivater) i terapeutisk signifikante konsentrasjoner. I Midtøsten har estragon vært brukt mot krampeanfoll og epileptiske anfoll (Kavvadias et al., 2000; Saadali et al., 2001; Sayyah et al., 2004; Hellrup & Backlund, 2006; Aglarova, et al., 2008)

Estragon anses for å ha en antibiotisk aktivitet. I Tibetansk folkemedisin blir estragon brukt i behandling av tuberkulose, lungebetennelse og kronisk bronkitt. De arabiske legene anså estragon for å hjelpe mot pest (Lindeberg, 1982; Mashanov & Pokrovskii, 1991; Bruneton, 1995; Hellrup & Backlund, 2006; Aglarova, et al., 2008).

Indianerne brukte roten mot menstruasjonsproblem, samt for å underlette hardt arbeid. Roten ansås også for å hjelpe energiløse barn og svake gamle. Bladene ble tygget ved hjertearytmier. Planten ble brent for å holde mygg borte. Estragon i salve ble ansett for å ha legende effekt på sår (Hellrup & Backlund, 2006; Hurteau & Anderson, 2006).

I Storbritannia har man brukt estragon mot diabetes. I eldre europeiske urtebøker omtales estragon som et bra middel ved ormebitt. I følge persisk tradisjon kunne estragon rense blod.

Urten ble også ansett for å være bra for hodepine og omtåking (Swanston-Flatt et al., 1991; Ribnicky et al., 2004; Hellrup & Backlund, 2006).

Abu Mansur, Avicenna og Ibn Baitar tilkjennega estragons febernedsettende effekt, samt egenskaper som å rense de øvre respirasjonsveier for slim og lette respirasjonen, og for å underlette god søvn. Estragon ble brukt i middelalderen i Armenia ved maligne åpne sår og som juice (oralt) ved epidemiske plager. I Europa ble den brukt som middel mot gassansamling, vandrivende middel, for å stimulere appetitten, og for å bedre fordøyelsesprosessen. En tinktur ble brukt som sedativ og krampedempende ved epilepsi og anfall og som et vitamin ved skjørbuk (Nuraliev, 1991; Kupriyanov, 1998; Aglarova, et al., 2008).

Roten fra *Artemisia glauca* Pall. ex Willd. fra Burma ble ansett for å ha antiseptiske, antiasmatiske, samt styrkende medisinske egenskaper (brukt som tonikum) (NFS, 1963).

5.6 Kjemiske studier

5.6.1 Eterisk olje

Plantens innhold av eteriske oljer er størst ved begynnelsen av knoppskyting og i starten av blomstringsperioden (Aglarova, et al., 2008).

De aktive stoffene finnes i den eteriske oljen. Oljen utvinnes fra *Artemisia dracunculus herba*. De eteriske oljene kan lagres på mange vis i planten, for eksempel i kjertelhår, blomster eller stilk. Vanddampdestillasjon er den vanligste måten å isolere oljen på, men det er også mulig å gjøre det med vanlig ekstraksjon, noe som må gjøres om oljen hydrolyseres lett eller er følsom for varme. Vanddampdestillasjon kan gjøres på tre ulike måter; destillasjon med vann, destillasjon med vanndamp eller gjennom destillasjon med direkte damp. De to siste metodene er noe mer skånsomme, men ettersom *Artemisia dracunculus aetherolum* ikke er følsom for langvarig oppvarming, kan man bruke destillasjon med vann (Samuelsson, 2004; Sayyah, et al., 2004; Kordali et al., 2005; Hellrup & Backlund, 2006).

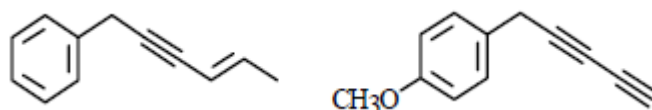
Ville planter av *A. glauca* Pall. ex Willd. fra Mongolia, samlet i august-september, ble analysert ved hjelp av gasskromatografi (GC) og massespektroskopi (MS). Urten ble preparert ved vanddampdestillasjon og gav et utbytte på 0,52 – 0,65 % eterisk olje. Hovedkomponentene i *A. glauca* ble i denne studien funnet å være metyl eugenol (46,77 %), (Z)- β -ocimen (11,27 %) og terpinolen (9,34 %) (Shatar et al., 2003). Innholdsstoffer og mengde er gjengitt i tabell 1.

Tabell 1 viser prosentvis innhold av ulike kjemiske komponenter i den eteriske oljen fra *Artemisia glauca* Pall. ex Willd. , innhøstet i august-september og fremstilt av den overjordiske delen av planten. Hentet fra Shatar et al. 2003.

Kjemisk sammensetning	prosentvis innhold i den eteriske oljen
A-pinen	2,31
Camfen	0,36
Sabinen	0,13
B-pinen	0,23
Myrcen	0,10
A-fellandren	0,10
P-cymen	0,14
Limonen	0,10
1,8-cineol	0,10
(Z)- β -ocimen	11,27
Γ -terpinen	0,10
Terpinolen	9,34
(E)- salinen hydrat	0,03
Linalool	0,21
A-thujon	0,16
Borneol	0,10
Terpin-4-ol	1,20
A-Terpineol	0,15
(E)-piperitol	0,18
Neral	0,17
Carvon	0,10
Estragol	0,53
Bornyl acetat	1,97
Eugenol	0,23
Methyl eugenol	46,77
Iso-eugenol	0,25
B-carofyllen	0,12
B-humulen	0,05
Germacren-D	0,13
Δ -sadinen	0,04
Elemicin	1,37
(E)-Nerolidol	0,12
Spathulenol	0,50
(E)-sesquiterpen hydrat	14,27

Polyanska et al. analyserte sammensetningen til den eteriske oljen fra viltvoksende *A. glauca* Pall. ex Willd. fra sørvest Sibir. Oljen ble fremstilt ved hjelp av vanddampdestillasjon av overjordisk del av planten.. Analysen ble utført ved hjelp av tynnsjiktskromatografi (TLC)

og GC-MS. Utbytte var 0,29-0,69 % eterisk olje, hvorav hovedkomponentene var acetylen derivater av capillen (11-60 %) og benzyldiacetylen (1-31 %). I tillegg ble det isolert to acetylen derivater i oljen (E)-hex-4-en-2-ynylbenzen og 1-(4-metoksyfenyl)-2,4-pentadiyn. Det totale innholdet av acetylen derivater var 41-63 %. Capillen dominerte i alle eksemplarer (Polyanskaya et al., 2007).



Figur 1: Kjemisk struktur av (E)-hex-4-en-2-ynylbenzen (til venstre) og 1-(4-metoksyfenyl)-2,4-pentadiyn (til høyre), hentet fra Polyanskaya et al. 2007.

Hvis vi sammenligner de to sistnevnte studier med hensyn til innholdsstoffer og mengden av disse, ser vi at variasjonene er store mellom planter av *A. glauca* Pall. Ex Willd fra sørvest Sibir og fra Mongolia. Capillen er ikke nevnt i listen over innholdsstoffer i *A. glauca* fra Mongolia. Innholdet av capillen i *A. glauca* fra sørvest Sibir inneholder 11-60 %. Innholdet av metyl eugenol er rapportert til hele 46,77 % i den eteriske oljen fra *A. glauca* fra Mongolia. Til sammenligning med *A. glauca* fra Sibir er innholdet av metyl eugenol rapportert til 1 %. Det er uvisst i hvor stor grad forskjeller i analysemetoder kan ha påvirket resultatene. Studien av Polyanska et al. fremlegger en tabell hvor mengden av de ulike innholdstoffene er listet opp etter forskjellige regioner i vest Sibir. Det fremkommer av denne tabellen at variasjonene er relativt store mellom regionene. Innholdet av capillen varierte mellom 11,2 - 59,6 % i de ulike regionene. Innholdet av metyl eugenol varierte på samme måte mellom ikke sporbare mengder til 1,0 % (Polyanskaya, et al., 2007).

Curini et al. analyserte den kjemiske sammensetningen av den eteriske oljen fra *A. dracunculus* fra Italia. GC og MS analyser viste innholdet av trans-anetol (53,37 %), cis-ocimen (10,61 %), cis-allo-ocimen (15,27 %), trans-ocimen (8,96 %), limonen (7,26 %) og α -pinen (2,90 %), i tillegg til små mengder av β -pinen, β -myrcen, bornyl acetat, γ -elemen, β -caryofyllen og germacren D (Curini et al., 2006).

Kordali et al. analyserte den eteriske oljen fra tyrkisk estragon (*Artemisia dracunculus*) ved hjelp av GC-MS, og identifiserte 30 komponenter tilsvarende 99,5 % av den totale oljen.

Disse var hovedsakelig (Z)-anetol (81,0 %), (Z)- β -ocimen (6,5 %), (E)- β -ocimen (3,1 %), limonen (3,1 %) og metyleugenol (1,8 %) (Kordali, et al., 2005). Sayyah et al. gjorde GC og MS analyser av den eteriske oljen fra *A. dracunculus* som viste innhold av trans-anetol (21,1 %), α -trans-ocimen (20,6 %), limonen (12,4 %), α -pinen (5,1 %), allo ocimen (4,8 %), metyl eugenol (2,2 %), β -pinen (0,8 %), α -terpinolen (0,5 %), bornyl acetat (0,5 %) og bicyclogermacren (0,5 %) som hovedkomponenter (Sayyah, et al., 2004).

Både studien av Polyanska et al. og Shatar et al. viste at innholdet av estragol var relativt lavt i *A. glauca* (respektive 0-2 % og 0,53 %). Derimot varierer innholdet av estragol i *A. dracunculus* mellom 40-60 % avhengig av hvor planten vokser (Aglarova, et al., 2008).

Werker et al. sammenlignet fransk og russisk estragon med hensyn til innholdsstoffer. Den eteriske oljen fra fransk estragon inneholder 60-80 % estragol, hvilket gjør den ettertraktet på det kommersielle markedet. Russisk estragon inneholder mindre mengder estragol.

Aromatiske komponenter i den vegetative delen av planten anses for å bli syntetisert som en forsvarsmekanisme mot forskjellige typer predatorer. Disse oljene produseres i to forskjellige sekretoriske strukturer i bladene hos *A. dracunculus*, kjertelhår og sekretoriske hulrom. Kjertelhårene frigjør sitt innhold på overflaten av bladet selv hos unge planter, mens innholdet i de sekretoriske kjertlene kun frigjøres ved fysisk skade av planten, for eksempel ved kutting. Hovedkilden til de eteriske oljene i både fransk og russisk estragon er de sekretoriske kjertlene (Werker et al., 1994).

Estragol (metyl chavicol) er hovedkomponenten i fransk estragon. Elemecin og metyl eugenol er hovedkomponenten i russisk estragon. Elemecin og metyl eugenol produseres via acetat-shikimat sporet og akkumuleres i mesofyll. De fleste andre komponenter i den ekstraherte oljen ble påvist i epidermis. Man tror at forskjellene i sammensetning mellom fransk og russisk estragon kommer av biosyntetiske mekanismer og ikke av forskjeller i sekretoriske strukturer, ettersom kjertelhår er sparsomt fordelt i både fransk og russisk estragon, og derfor ikke kan være ansvarlig for den store mengden olje ekstrahert fra bladene (Werker, et al., 1994).

Gramshaw et al. viste at estragon som vokser på agar produserte mindre mengder estragol når konsentrasjonen av hormonet 7-naftalene eddiksyre (NAA) økte. Produksjonen av estragol ble observert bare når NAA konsentrasjonen i vekstmediet var lav.

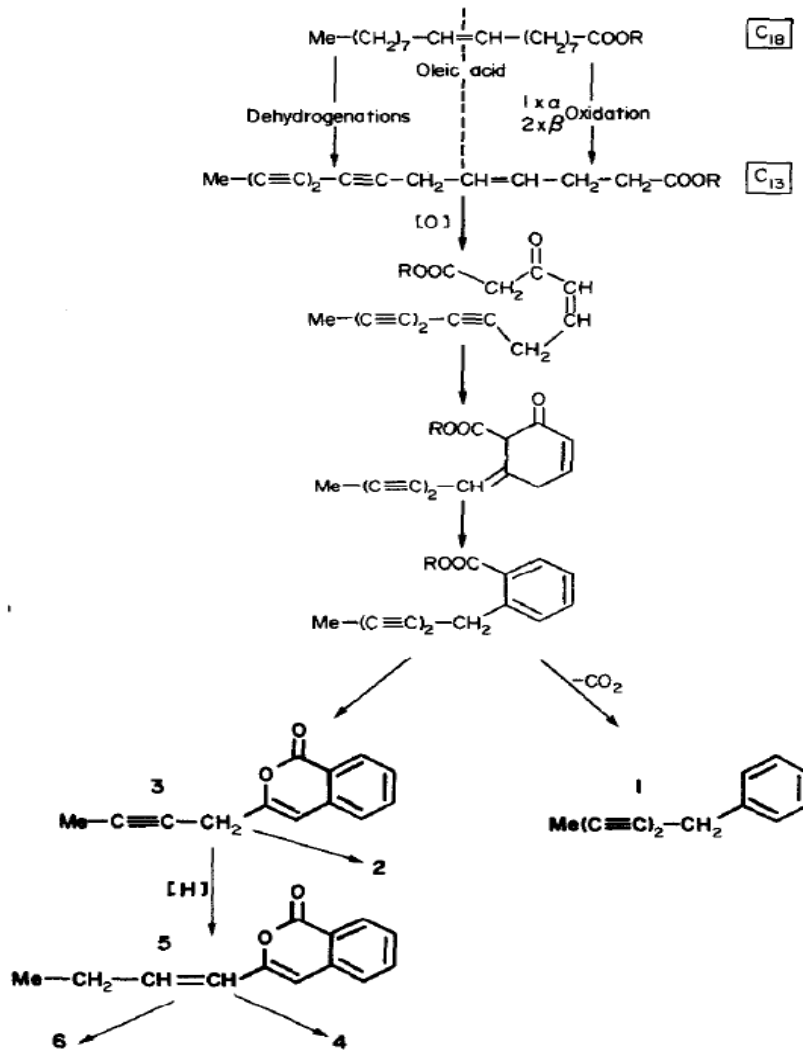
Produksjonsnivået av eugenol og metyleugenol var direkte relatert til konsentrasjonene av hormoner, NAA og benzyl aminopurin i vekstmediet (Gramshaw et al., 1988; Werker, et al., 1994).

Vienne et al. påpeker store taxonomiske forskjeller innen *A. dracunculus* L., hvor estragol, hovedkomponenten i den eteriske oljen i fransk estragon, er nesten fraværende i den russiske estragon, mens sabinen, metyleugenol og elemicin, som er hovedkomponentene i russisk estragon, nesten ikke er å påvise i fransk estragon (Vienne et al., 1989).

5.6.2 Biosyntese

Denne kjemiske analysen indikerer at *A. dracunculus* gruppen kan karakteriseres ved en overvekt av aromatiske acetylenier. En distinksjon innen *A. dracunculus* gruppen er mulig å gjøre på bakgrunn av ulike trender med hensyn til syntese spor som enten går i retning mot dannelse av capillen eller mot dannelse av isokumarin. Videre vil ytterligere biologiske avvik kunne resultere i dannelse av to forskjellige typer isokumariner. Det biosyntetiske sporet til aromatiske acetylenier, som er foreslått å være karakteristisk for *A. dracunculus* gruppen fremgår av den skjematisk fremstillingen vist i figur 2.

Av figuren ser vi at oljesyre (C18) blir α -oksidert fra start, etterfulgt av to β -oksidasjoner og etterfølgende dehydreringer som leder til et viktige biogenetiske mellomledd, en C₁₃ flerumettet (C₁₃-trien-enoic syre). Ytterligere en β -oksidasjon og påfølgende Mikael addisjon gir opphav til ringlukking og dannele av aromatiske acetylenier. Om denne hypotesen stemmer vil *A. glauca*, som er karakterisert av store mengder capillen, kunne innta en opphavlig posisjon i utviklingen av *A. dracunculus* gruppen (Greger, 1979).



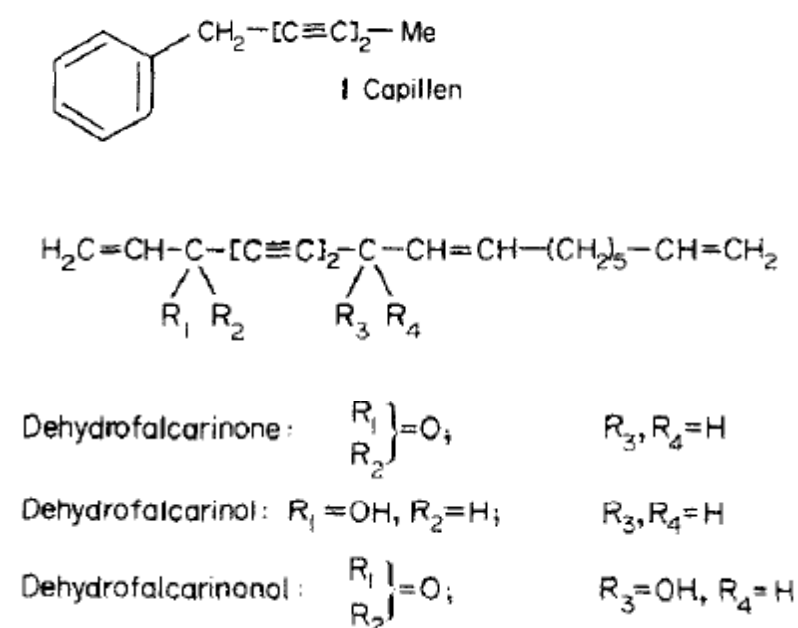
Figur2: Antatt biosyntetisk spor karakteristisk for *A .dracunculus* gruppen. Tallene representerer capillen (1), 8-hydroksy-capillarin (2), capillarin (3), 8-hydroksy-artemidin (4), artemidin (5) og artemidinol (6), hentet fra Greger 1979.

Mengde og sammensetning av den eteriske oljen varierer signifikant avhengig av økologisk nisje, noe som primært kan tilskrives estragons store utbredelsesområde og hardførhet. Analyser av den eteriske oljen fra ulike populasjoner av estragon i den sibirske flora viser til minst to hovedgrupper av variasjoner. Den ene er karakterisert av komponenter med flere trippelbindinger – polyacetylenere og estragol, mens den andre gruppen inneholder isokumariner. I de tilfeller der derivater av både acetylenere og isokumariner var til stede samtidig i den eteriske oljen, ble det observert et omvendt forhold mellom disse, jo høyere innhold av acetylenere, jo lavere innhold isokumariner og vise versa (Khanina, 1999; Aglarova, et al., 2008).

Nivået av trimetoksyallylbenzen økte med økende plantealder og økende mineralinnhold i jordsmonnet. Komparative analyser mellom den eteriske oljen fra vilt voksende populasjoner og innførte planter viste at innførselsforhold ikke påvirket den kvalitative sammensetningen. Dette anses som bevis for at syntesen av den spesifikke kvalitative sammensetningen av den eteriske oljen er genetisk bestemt (Aglarova, et al., 2008).

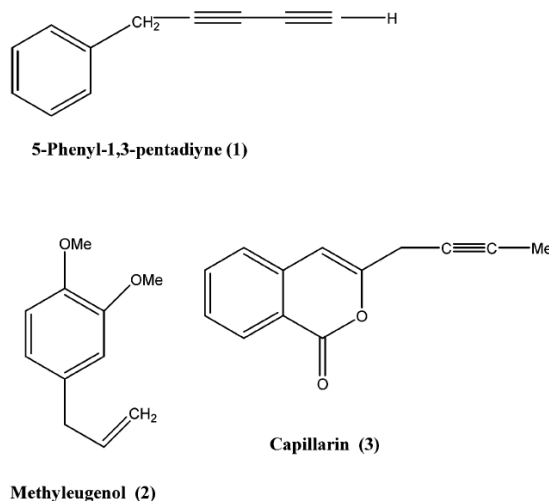
5.6.3 Aromatiske acetylene

Røtter fra *A. glauca* Pall.ex Willd., ekstrahert, fraksjonert separert og identifisert som beskrevet av Greger ble funnet å inneholde capillen, dehydrofalcarinon og beslektede oksidasjonsprodukter såsom dehydrofalcarinol og dehydrofalcarinonol (Greger, 1979).



Figur 3: Kjemisk struktur av capillen, dehydrofalcarinon, dehydrofalcarinol og dehydrofalcarinonol hentet fra Greger 1979.

Meepagala et al. isolerte flere komponenter fra *A. dracuncululus* med bioassay veiledet fraksjonering, identifisert med spektroskopiske metoder, som viste seg å ha antimikrobiell aktivitet. De aktive komponentene var 5-fenyl-1,3-pentadiyn (1), metyleugenol (2), og capillarin (3) (se figur 4). Den relative mengden av 1, 2 og 3 i den damp destillerte oljen ble bestemt ved hjelp av GC-MS til å være respektive ca 11 %, 9 % og 4 % (Meepagala et al., 2002).



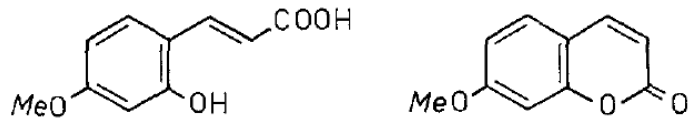
Figur 4: Kjemisk struktur av 5-fenyl-1,3-pentadiyn (1), metyleugenol (2), capillarin (3), hentet fra Meepagala et al. 2002.

Lopes-Lutz et al. identifiserte flere komponenter fra den eteriske oljen av *A. dracunculus*, hovedsakelig terpinolen (19,1 %) og fenylpropanoider som metyl chavicol (16,2 %) og metyl eugenol (35,8 %) (Lopes-Lutz et al., 2008).

5.6.4 Kumariner og Isokumariner

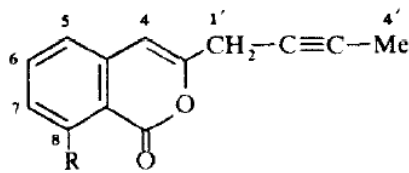
A. dracunculus L. tilhører en gruppe av familien Artemisiae som kan inneholde kumariner i mengder på mer enn 1,0 %. Kumariner finnes i den delen av planten som vokser over jorden. Syntesen av kumariner starter tidlig, og nivåene kan bli opp til 1,3 % ved 3 måneders alder. Kumarin innholdet er på sitt høyeste ved 5 års alder (opptil 6.6 %) og blir deretter gradvis mindre. Genetisk arv og biologiske karakteristika er avgjørende for hvor mye kumariner som akkumuleres i planten, og vil vedvare om planten blir kultivert. Kumarin innholdet er på sitt høyeste i den generative og produktive perioden og sammensetningen holder seg stabil i denne tiden; om noe endres, så vil det bare påvirke komponentenes ratio. Den største kvalitative variasjonen er å finne i blomsterstanden, mens stilken viser minst variasjon med hensyn til kumarin innhold. *A. dracunculus L.* er karakterisert ved signifikante nivåer av kumarin derivater (Khanina, 1999; Aglarova, et al., 2008).

Hofer et al. isolerte en meget UV-ustabil forbindelse fra en metanolekstrakt av bladene til *A. dracunculus L.* ved hjelp av TLC. Denne komponenten, ved navn 2-hydroksy-4-metoksy-trans-kanel syre, anses for å være et mellomledd i biosyntesen av herniarin (Hofer et al., 1986).



Figur 5: Strukturformler for 2-hydroksy-4-metoksy-trans-kanel syre (til venstre) og herniarin (til høyre), hentet fra Hofer et al. 1986.

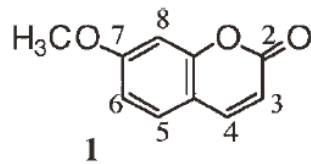
Greger et al. isolerte et derivat av capillarin, et isokumarin ved navn 8-hydroksy-capillarin fra roten til *A.dracunculus L.* (Greger & Bohlmann, 1979).



R = OH

Figur 6: Struktur 8-hydroksycapillarin hentet fra Greger & Bohlmann 1979.

Wantabe et al. isolerte den aktive komponenten 7-metoksykumarin ved hjelp av en silika gel kolonne kromatografi og TLC, fra et metanol ekstrakt av estragon. Komponenten ble deretter identifisert med MS, NMR og UV spektral analyser (Watanabe et al., 2005).



Figur 7: 7-metoksykumarin, hentet fra Wantabe et al. 2005.

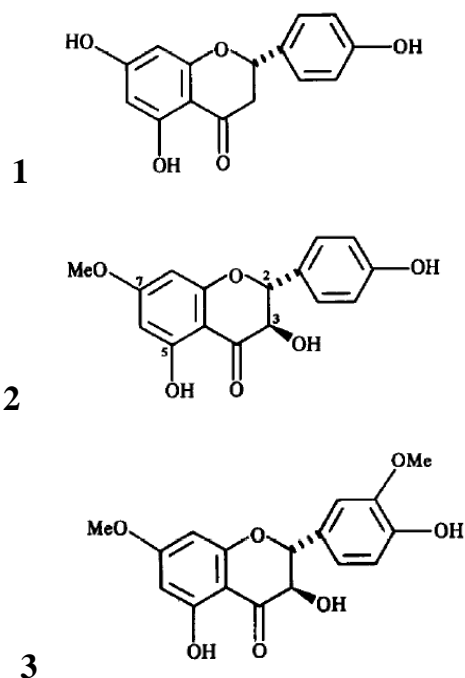
5.6.5 Flavonoider

Studier av estragon kultivert fra den novosibirske regionen og Altai som var preparert i blomstringsfasen, det vil si i juli-august, viste at den overjordiske delen inneholdt opptil 3,2 % flavonoider, inkludert quercetin, luteolin, camforol, isorhamnetin og deres tilhørende glykosider. Eksemplarer fra vilt voksende planter hadde et flavonoid innhold som varierte mellom 0,5 – 1,9 %, mens mengden flavonoider i kultiverte planter kunne komme opp i 4,9 % (Arykova, 1996; Aglarova, et al., 2008).

På grunnlag av spektralanalyser ble det funnet quercetin 3-O-glukosid, quercetin O-rhamnoglukosid og quercetin 3-O-rhamnogalaktosid i russisk og fransk estragon. I tillegg ble det funnet quercetin, patuletin 3-O-glukosid, patuletin 3-O-rhamnoglukosid og patuletin 3-O-rhamnogalaktosid i russisk estragon. Dette viser at flavonol profilen i russisk estragon skiller seg fra fransk estragon (Vienne, et al., 1989).

Et antall studier har presentert mer detaljerte analyser av flavonoid sammensetningen til den overjordiske delen av estragon, en variant som ble dyrket i Samara området. Tre flavonoider ble ekstrahert og identifisert, narigenin (5,7,4'-trihydroksyflavonon), pinocembrin (5,7-dihydroksyflavonon) og et estragonosid ved navn 8-O- α -L-rhamnopyranosid 5,6,7,8,4'-pentahydroksy-3'-metoksyflavon, samt et aglykon av estragonosidet, 5,6,7,8,4'-pentahydroksy-3'-metoksyflavon ved navn annagenin (Kurkin et al., 1996; Avdeeva, 1997; Onuchak et al., 2000; Aglarova, et al., 2008).

Balza et al. isolerte flavononet naringenin (5,7,4'-trihydroksy falvonon) og to dihydroflavonoler (3,5,4'-trihydroksy-7-metoksyflavonon og 3,5,4'-trihydroksy-7,3'-dimetoksyflavonon) fra *A.dracunculus L.* fra Britisk Columbia. Dihydro-flavonolen forekom i ikke-glykosylert form (Balza & Towers, 1984).



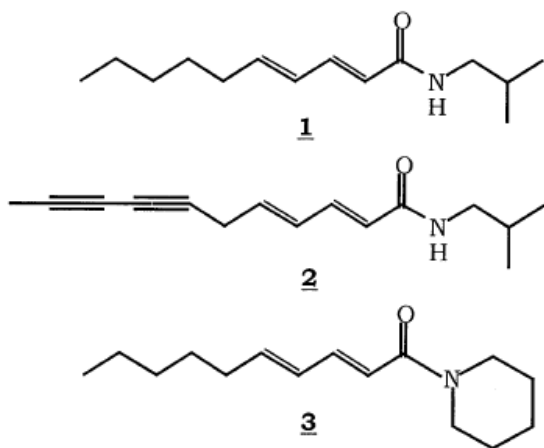
Figur 8: Kjemisk struktur av: naringenin 5,7,4'-trihydroksyflavonon (1), 3,5,4'-trihydroksy-7-metoksyflavonon (2) og 3: 3,5,4'-trihydroksy-7,3'-dimetoksyflavanon (3), hentet fra Balza & Towers 1984.

5.6.6 Peroksidase aktivitet

Rot, stilk, blader og blomster av estragon inneholder enzymet peroksidase. Dette enzymet har størst aktivitet i blomstringsfasen. Det er en sammenheng mellom peroksidase aktivitet og maksimalt innhold av fenoliske komponenter. Estragon har en peroksidase aktivitet ved pH optimum på 5,2 og oksidase aktivitet ved pH optimum på 7,0 – 8,5. Minste krav for oksidase aktivitet er tilstedeværelse av hydroksylgrupper i orto posisjon, samt fravær av en karboksylgruppe som substituent i benzenringen. Estragon peroksidase virker på quercetin til å produsere syv substanser. Oksidasjonsproduktene inkluderer heksahydroksyflavonon, fluoroglucinekarbon syre og protocatechic syre (Sadvakosova, 1981; Aglarova, et al., 2008).

5.6.7 Amid komponenter

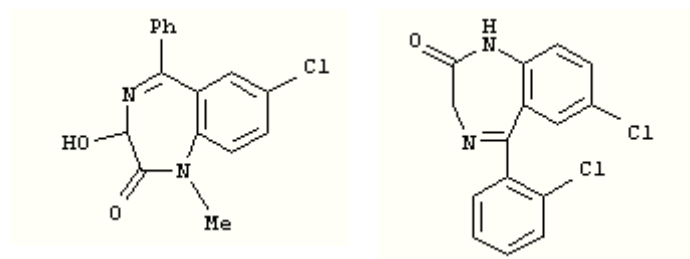
Saadali et al. fant 3 amid komponenter isolert fra en petroleum eter ekstrakt av den overjordiske delen av planten *Artemisia dracunculus*. Pellitorin, neopellitorin A og neopellitorin B ble separert ved hjelp av silica gel kromatografi (Saadali, et al., 2001; Aglarova, et al., 2008).



Figur 9: Kjemisk struktur av: pellitorin (deca-2E,4Z-dienoic acid isobutylamid) (1), neopellitorin A (undeca-2E,4Z-dien-7,9-dienoic acid isobutylamid) (2), neopellitorin B (deca-2E,4Z-dienoic acid piperidid) (3), hentet fra Saadali et al. 2001.

Kavvadias et al. isolerte ved hjelp av HPLC to benzodiazepiner ved navn delorazepam og temazepam. Disse ble funnet i ekstrakt av celle kultur fra *Artemisia dracunculus*, nærmere

bestemt fra blad og skudd, samt rot. Innholdet av delorazepam ble estimert til 100-200 ng/g kallusvev. Temazepam ble funnet i mengde på 20-30 ng/g kallus (Kavvadias, et al., 2000; Aglarova, et al., 2008).



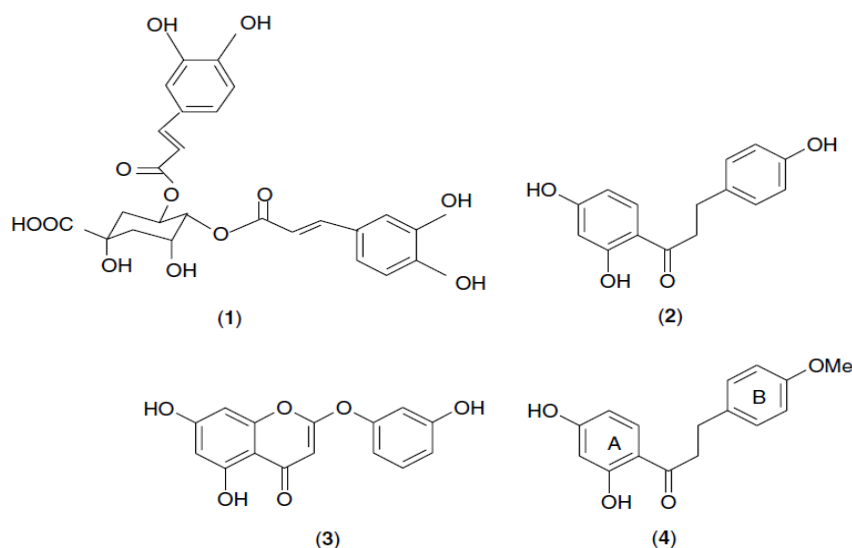
Figur 10: Kjemisk struktur av temazepam (til venstre) og delorazepam (til høyre), hentet fra Kavvadias et al. 2000 og kopiert fra SciFinder.

5.6.8 Andre komponenter

Huneck et al. analyserte tørket plantematerial av *Artemisia glauca* Pall. ex Willd. , ekstrahert med $\text{CH}_3\text{OH}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$ /petroleter og påviste følgende innholdsstoffer:

6-fenylheksa-2,4-diin (0,35 %), 3-(3,4-dimetoksyfenyl)prop-1-en (0,25 %), 3-(but-2-in)yl-isokumarin (0,17 %), heptadeka-1,8 (cis), 16-trien-11,13-diin-15-ol (0,15 %), fytol (0,11 %), spathulenol (0,07 %), α -humulen (0,0004 %), bisabolen (0,0025 %), germacren D (0,0025 %) og karofyllen (0,0008 %) (Huneck et al., 1985).

Ved hjelp av LC/MS og NMR ble det identifisert fire aktive komponenter i et etanloekstrakt som hemmet aldose reductase 2 (ALR2). Disse var 4,5-di-O-caffeoylquinic syre, davidigenin, 6-demethoxycapillarisin og 2', 4'-hydroksy-4-metoksydihydrochalcon (Logendra et al., 2006).



Figur 11: 4,5-di-O-caffeoylquinic syre (1), davidigenin (2), 6-demetoksy-capillarisin (3), 2',4'-dihydroksey-4-metoksydihydrokhalon (4), hentet fra Logendra et al. 2006.

5.7 Biologiske studier

5.7.1 Hypoglykemisk effekt

I en studie av Ribnicky et al. ble seks bioaktive komponenter identifisert i etanolekstrakt fra *Artemisia dracunculus L.* (PMI-5011). Disse viste en hypoglykemisk effekt i mus. Musene ble først fetet opp med en fettrik diett, og deretter sondet med nevnte ekstrakt tilsvarende 500 mg/kg etter fire timers matrestriksjon. Konsentrasjonen av de aktive komponentene i serum ble målt ved hjelp av elektronspray LC-MS. Maksimal konsentrasjon ble funnet 4-6 timer etter inntak av ekstraktet. En formulering av nevnte ekstrakt, tilsvarende en dose på 50-500 mg/kg/dag, i kombinasjon med Labrasol, en surfaktant, økte den hypoglykemiske aktiviteten av ekstraktet 3-5 ganger. Labrasol er en surfaktant som øker biotilgjengeligheten ved å øke løseligheten, permeabiliteten og absorpsjonen av de aktive stoffene. I tillegg hemmer Labrasol p-glykoprotein og nedsetter dermed intestinal effluks (Ribnicky, et al., 2009).

En av de aktive komponentene, 2',4'-dihydroksey-4-metoksydihydrokhalon (DMC-2) ble funnet å være minst like effektiv som metformin i doser på 200-300 mg/kg/dag. Labrasol kan således redusere den effektive dosen. Det fremgår ikke av artikkelen om metformin ble administrert i kombinasjon med Labrasol. Som ren komponent i formulering med 66 % Labrasol har DMC-2 sammenlignbar effekt med metformin ved dose 300 mg/kg og var

signifikant aktiv i doser på 50 mg/kg. En dose metformin på 150 mg/kg var mindre aktiv enn DMC-2 ekstraktet av tilsvarende dose (Ribnicky, et al., 2009).

Tarralin™ er et etanol ekstrakt av *Artemisia dracunculus L.* En studie av Ribnicky et al. viste at Tarralin™ (500 mg/kg/dag i 7 dager) senket forhøyet blodglukose med 24 % fra 479 til 352 mg/dl i genetisk diabetiske KK-A^y mus sammenlignet med kontrolldyrene. Til sammenligning senket troglitazone (30 mg/kg/dag) og metformin (300 mg/kg/dag) blod glukose konsentrasjonen med respektive 28 % og 41 %. Tarralin™ reduserte konsentrasjonen av insulin i blod hos KK-A^y mus med 33 %, mens troglitazone reduserte den med 48 % og metformin med 52 %. Behandling med Tarralin™ (500 mg/kg/dag i 7 dager) av diabetiske mus senket fosfoenolpyruvat karboksykinase (PEPCK) mRNA uttrykk signifikant med 28 %. Behandling med Tarralin™ endret ikke PEPCK uttrykk, blod glukose eller insulin konsentrasjonen signifikant hos ikke-diabetiske mus (Ribnicky et al., 2006).

Tarralin™ økte binding av glukagon lignende peptid (GLP-1) til sin reseptor *in vitro* på en dose avhengig måte. GLP-1 er et signal som frigjøres av tynntarmen som respons på nærvær av fordøyelsesprodukter. GLP-1 og dens reseptorer er uttrykt i ulike vev. GLP-1 har flere funksjoner, blant annet å øke insulin sekresjon, stimulering av gen uttrykk for proinsulin, samt å undertrykke glukagon sekresjon og tømming av magesekken. Det er mulig at GLP-1 også øker insulin sensitiviteten og stimulerer β -celle proliferasjonen i pankreas (Ribnicky, et al., 2006).

En etanol ekstrakt av *Artemisia dracunculus L.* (3,75 μ g/mL) med antidiabetisk effekt ble i en studie funnet å hemme aldose reduktase (ALR2) med 40 % til sammenligning med quercitrin, som hemmet ALR2 med 54 % (Logendra, et al., 2006).

En alkohol ekstrakt av *Artemisia dracunculus L.* (PMI 5011) er vist å gi en signifikant økning av glukoseopptaket i celle kultur med human skjelett muskulatur (HSMC).

Konsentrasjoner av PMI 5011 på 0,1 μ g/mL økte glukose opptaket og syntes å ha maksimal effekt i en konsentrasjon på 5 μ g/mL. En økning i konsentrasjonen av frie fettsyrer i medium fra 150 til 450 μ mol/L ble assosiert med redusert insulin stimulert glykogen akkumulering. Insulin stimulert glykogen akkumulering ble delvis gjenopprettet når PMI 5011 5 μ g/mL ble tilsatt medium som inneholdt frie fettsyrer, spesielt i konsentrasjoner på 150-300 μ mol/L. Gen uttrykk for glykogen syntetase i humane myotuber ble estimert ved hjelp av revers

transkriptase polymerase chain reaction (PCR). GS mRNA minket i nærvær av frie fettsyrer i medium, men ble delvis gjenopprettet ved tilsetning av PMI 5011 (Wang et al., 2008).

Proteininnholdet av fosfoinositid 3 (PI-3) kinase, IRS-1, IRS-2, insulinreseptor, Akt, AS160 og Glut-4 ble bestemt ved hjelp av Western blotting. Insulin stimulert Pi-3 kinase aktivitet økte i nærvær av PMI 5011 i medium tilsatt 100 til 450 $\mu\text{mol/L}$ frie fettsyrer. For å evaluere mekanismen bak den økte kinase aktiviteten ble mengden av insulin signal proteiner og insulin-stimulert fosforylering av Akt bestemt ved forskjellige konsentrasjoner av PMI 5011. Man fant ingen signifikant forandring i proteinmengden tilknyttet insulin reseptor, PI-kinase eller GLUT-4, mens det var en trend for økt proteinmengde tilknyttet IRS-1 og IRS-2. I tillegg antyder data en reduksjon av PTP1B mengde. Selv om det ikke ble observert noen forandring av Akt nivå, så fant man en signifikant økning av Akt fosforylering, spesielt i doser på 10 og 100 $\mu\text{g/mL}$. Inkubering av HSMC minket signifikant PTP1B innholdet i primær cellekultur avhengig av tiden.

Forsøk på mus foreslår en mekanisme for hvordan etanol ekstraktet av *Artemisia dracunculus* kan øke insulinsensitiviteten ved å øke insulin stimulert fosforylering av insulin reseptor signal proteiner og økt nedstrøms kinase aktivitet i HSMC. Dog refererer denne studien kun til skjelettmuskel. Studien foreslår at ekstraktet øker glukose opptaket og glykogen veien, samt at disse effektene er et resultat av økt insulin reseptor signalering. I tillegg foreslår data at effekten av PMI 5011 øker nedstrøms insulin reseptor signalering sekundært til modulering av PTP-aser. En bekreftelse av disse resultatene er fokus for humane forsøk som er startet (Wang, et al., 2008).

Polyfenoliske komponenter fra *Artemisia dracunculus L.* er vist å hemme genuttrykk av PEPCK og glukoneogenesis i en H4IIE hepatoma cellelinje. En etanolekstrakt av russisk estragon med antihyperglykemisk effekt i dyremodeller er rapportert å kunne senke fosfoenolpyruvat karboksykinase (PEPCK) mRNA uttrykk i streptozin-induserte (STZ-induserte) diabetiske rotter. En kvantitativ PCR (qPCR) assay ble utviklet for bioaktivitet-guided rensing av de komponentene som finnes i ekstraktet og som nedsetter uttrykket PEPCK. Assayet var basert på hemming av dexametason-stimulert PEPCK oppregulering i en H4IIE hepatoma cellelinje. To polyfenoliske komponenter som hemmet PEPCK mRNA nivå ble isolert og identifisert som 6-demethoxycapillarisin og 2', 4'-dihydroxy-4-methoxydihydrochalcone, med IC_{50} verdier på respektive 43 og 61 μM . Phosphoinositide-3-kinase (PI3K) hemmeren LY-294002 viste at 6-demetoksyapillarisin utøver sin effekt

gjennom aktivering av PI3K veien, i likhet med insulin. Effekten av 2', 4'-dihydrokso-4-metoksydihydrochalcon er ikke regulert av PI3K og er avhengig av aktivering av AMP-aktivert protein kinase (AMPK) veien. Disse resultatene indikerer at de isolerte komponentene kan være ansvarlige for mye av den glukose senkende aktiviteten til *Artemisia dracunculus* ekstrakt (Govorko et al., 2007).

5.7.2 Allergiske sykdommer

Ekstrakt fra estragon er vist å hemme frigjørelse av kjemiske mediatorer fra basofile leukocytter (RBL-2H3 celler) fra rotte. Den aktive komponenten, 7-metoksykumarin, ble isolert fra en metanol ekstrakt av estragon. Struktur-aktivitetsstudier indikerer at den oksygeninnholdende funksjonelle gruppen i 7-posisjon på kumarinstrukturen er fordelaktig for den hemmende aktiviteten. Den hemmende aktiviteten av 7-metoksykumarin ble testet på frigjørelse av Ig-E mediert β -hexosaminidase. Disse funnene kan ha betydning for fremtidig forskning, for å forebygge eller behandle allergiske sykdommer (Watanabe, et al., 2005).

5.7.3 Antikoagulant

En studie av Shahriyary et al. undersøkte effekten av en kloroform fraksjon fra en metanol ekstrakt av *Artemisia dracunculus* blad på plate aggregasjon, sekresjon og adhesjon til laminin beklede plater. Humane plater ble inkubert med ulike konsentrasjoner av prøven (tilsvarende 25-200 μg pulver av blad per ml). Platene ble deretter aktivert med trombin og adhesjon til de laminin beklede platene ble så evaluert. De behandlede platene ble sammenlignet med de ikke-behandlede platene. Observasjoner viste at metanol ekstraktet og dens kloroform fraksjon hemmet plate adhesjon til laminin beklede brønner med respektive 50 % og 60 % i en konsentrasjon på 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. I tillegg til å alternere cellens adhesive egenskaper ble også protein sekresjon og platenes evne til å klebe seg til seg selv nedsatt etter behandling med ekstraktet og dets kloroform fraksjon. Studien konkluderer med at ekstraktet fra *Artemisia dracunculus* blad hemmer plate adhesjon, aggregasjon og trombin induert protein sekresjon, men at den eksakte mekanismen bak disse effektene ikke er kjent. Disse funnene gir grunnlag for tradisjonell bruk av estragon som blodfortynnende faktor eller antikoagulant, men videre studier er nødvendige (Shahriyary & Yazdanparast, 2007).

5.7.4 Antimikrobiell aktivitet

Antimikrobiell aktivitet av *Artemisia dracunculus* L. blad ble testet av Benli et al. Et kloroform ekstrakt, et aceton ekstrakt og to forskjellige konsentrasjoner av metanol ekstrakter ble testet på ni ulike bakterier og fire sorter gjær ved hjelp av agar diffusjons metoden. Resultatene indikerer at metanol ekstraktet av *A. dracunculus* er mer effektivt mot de mikroorganismene som ble testet enn kloroform og aceton ekstraktene. Kloroform og aceton ekstraktene hadde hemmende aktivitet kun overfor *Pseudomonas aeruginosa*. Metanol ekstraktet som var fortynnet med 10 ml destillert vann viste hemningssoner mot *Shigella*, *Listeria monocytogenes* og *P.aeruginosa*. Metanol ekstraktet som ble fortynnet med 5 ml destillert vann viste hemningssoner mot to ulike typer *Escherichia coli*, *Shigella*, *L. monocytogenes* og *P.aeruginosa*. Mikroorganismene ble observert ved hjelp av scanning elektron mikroskop. Det var tydelig at cellene ble skadet etter behandling med *A.dracunculus* (Benli et al., 2007).

Meepagala et al. fant ved hjelp av TLC soppdrepende egenskaper hos flere komponenter i damp destillert fraksjon av den eteriske oljen fra *Artemisia dracunculus*. De aktive komponentene var 5-fenyl-1,3-pentadiyn, metyleugenol, og capillarin. Det skal ha vært mer enn tre soppdrepende komponenter i oljen, men disse var ikke mulige å isolere i ren form på grunn av rask degradering til komplekse blandinger. 5-fenyl-1,3-pentadiyn og capillarin viste en svak fytotoksisitet. Capillarin var den mest effektive av de tre komponentene mot *B. cinerea*. Capillarin viste en 60 % hemming av *B.cinerea* i en konsentrasjon på 30 µM, mens 5-fenyl-1,3-pentadiyn og metyleugenol hadde en effekt på 30 % ved samme konsentrasjon. Mikrobioassay indikerte også at *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* og *C.acutatum* var sensitive for alle komponentene i mikromolare konsentrasjoner (Meepagala, et al., 2002).

Lopez-Lutz et al. testet den antimikrobielle aktiviteten av den eteriske oljen fra *A. dracunculus* og fant en veksthemmende effekt på bakteriene *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* og *Staphylococcus epidermidis*, samt gjærsoppene *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* og dermatofyttene *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* og *Microsporum gypseum*, i tillegg til mikroorganismene *Fonsecaea pedrosoi* og *Aspergillus niger* (Lopes-Lutz, et al., 2008).

Curini et al. fant også en antimikrobiell aktivitet av den eteriske oljen fra *A. dracunculus*, som ble bestemt ved hjelp av medium mikrofortynningsmetoden (broth microdilution

method) og angitt som minste hemmende konsentrasjon (minimal inhibitory concentration MIC) med benevning $\mu\text{g/ml}$. Resultatene er oppsummert i tabell 2 (Curini, et al., 2006).

Tabell 2: Effekt av den eteriske oljen fra *A. dracunculus L. in vitro* på vekst av ulike mikroorganismer. * Ingen observert effekt. Hentet fra Curini et al. 2006.

Microorganism	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	40
<i>Staphylococcus aureus</i>	-*
<i>Staphylococcus epiderimidis</i>	-*
<i>Streptococcus agalactiae</i>	40
<i>Streptococcus pyogenes</i>	40
<i>Enterococcus faecium</i>	40
<i>Enterococcus faecalis</i>	40
<i>Escherichia coli</i>	40
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	0.62
<i>Proteus mirabilis</i>	1.25
<i>Candida albicans</i>	0.62
<i>Candida lusitaniae</i>	0.31
<i>Candida glabrata</i>	0.62
<i>Candida tropicalis</i>	0.62

Kordali et al. sammenlignet den soppdrepende effekten til den eteriske oljen fra *A. dracunculus* med andre Artemisia arter. Oljen fra *A. dracunculus* viste da mindre soppdrepende aktivitet enn de andre. *A. dracunculus* gav hemningssoner på skåler med 34 ulike sopparter og 35 ulike bakterier, men hemningssonene var mindre enn for penicillin. Studien konkluderer med at det er behov for mer forskning for å dokumentere toksisitet og sikkerhet ved antimikrobiell terapi og bruk av ulike Artemisia arter (Kordali, et al., 2005).

Atapour et al. testet antimikrobiell aktivitet av den eteriske oljen fra *Artemisia dracunculus* på *Helicobacter pylori*. Agar skål diffusjonsmetoden viste hemningssoner både mot metronidazol- resistente og -sensitive kulturer. Studien konkluderer med at det trengs flere studier for å undersøke effekten av plante ekstrakter som brukes i Iransk tradisjonell medisin, og identifisere de aktive komponentene som kan muliggjøre studier *in vivo* (Atapour et al., 2009).

5.7.5 Nevrologisk effekt

Artemisia dracunculus L. har vært brukt oralt som antiepileptisk middel i iransk folkemedisin. Sayyah et al. har undersøkt det krampestillende potensialet og den kjemiske sammensetningen av den eteriske oljen fremstilt fra den del av planten som vokser over jorden. Den eteriske oljen hadde en dose- og tids-avhengig anfallshemmende aktivitet i både maksimale elektrosjokk (MES) og pentylenetetrazol (PTZ) modeller for eksperimentelle anfall hos mus. ED₅₀ verdier var da respektive 0,84 og 0,26 ml/kg. I doser på 0,1 ml/kg eller mer virket den eteriske oljen sederende og hemmende på motorisk aktivitet bestemt ved såkalt rotarod test. Den observerte antikonvulsive og sedative effekten kan være relatert til innholdet av monoterpenoide i den eteriske oljen (Sayyah, et al., 2004).

Kavvadias et al. identifiserte to benzodiazepiner i celle vev fra *Artemisia dracunculus* ved hjelp av HPLC. Ekstrakt av *Artemisia dracunculus* hadde en bindings aktivitet til benzodiazepin reseptor tilsvarende IC₅₀ på 7 µg/ml. Innholdet av delorazepam var 100-200 ng/g celle vev fra *Artemisia dracunculus*. Temazepam ble funnet i mengder på 20 til 30 ng/g kallas. Delorazepam viste en 10 ganger sterkere bindingsevne til benzodiazepinreseptoren enn temazepam. Bindingskapasiteten til hele ekstraktet av *Artemisia dracunculus* var fem ganger høyere enn hver enkelt fraksjon separat, noe som kan tyde på at andre reseptor ligander kan være til stede i planten uten å bli detektert av HPLC (Kavvadias, et al., 2000).

5.8 Diskusjon

Det er ikke funnet noen studier på *Artemisia glauca* fra Burma. Derimot er det gjort studier på plantemateriale som har vært dyrket i ulike botaniske hager i Wien. Harald Greger undersøkte polyacetyleneer fra 7 ulike taxa tilhørende gruppen *Artemisia dracunculus*, deriblant *A. glauca* og *A. dracunculus*. Greger et al. fant ut at ulike tendenser til akkumulering og dannelse av capillen og isokumariner understreker skille mellom *A. glauca* fra *A. dracunculus*. I tillegg kan to ulike typer av isokumariner bidra til en intraspesifik gruppering innen disse artene.

Når man betrakter den biosyntetiske veien til aromatiske acetyleneer, så innehar den capillen inneholdende *A. glauca* en mer primitiv posisjon, mens stammene til *A. dracunculus* synes å

være mer progressivt avansert når det gjelder akkumulering av ulike isokumariner (Greger, 1979).

I en studie på den eteriske oljen fra *A. glauca* fra Mongolia var ikke capillen nevnt (Shatar, et al., 2003). En annen studie av viltvoksende *A. glauca* fra sør-øst Sibir fant derimot store andeler av capillen i den eteriske oljen (Polyanskaya, et al., 2007). Dette kan tyde på at innholdet av capillen også kan variere med voksested. På lignende måte viser analyser av den eteriske oljen fra ulike populasjoner av *A. dracunculus* fra Sibir til to typer av variasjoner, en der polyacetylene og estragol er dominerende, og en annen gruppe som inneholder isokumariner. Det ble da også observert at i de tilfeller der både isokumariner og acetylene var til stede samtidig i planten, så fant man et omvendt forhold mellom disse. Det kan da være en mulighet at forholdet mellom de ulike innholdsstoffene i *A. glauca* ikke bare avhenger av art, men også av voksested, på grunn av biosyntetiske mekanismer. Det er derfor av interesse å gjøre lignende studier med *A. glauca* som de som er gjort på *A. dracunculus* for å kartlegge hvilke faktorer som påvirker det biosyntetiske utbyttet i plantene.

Det er gjort flere studier på estragon, både kjemiske og biologiske. Estragon er en velkjent krydderplante over store deler av verden. Det er også gjort flere studier av *A. glauca* i den østlige del av verden. På grunn av språkbarrierer har det dessverre ikke vært mulig å få en oversikt over disse, men mye tyder på at den er godt kjent i land som Kina og Russland. I følge professor Nordals Burma herbarium skal roten ha vært brukt som tonikum, antiseptikum og antiastmatikum. Det er usikkert hvorfor akkurat roten ble brukt i denne sammenheng, og ikke bladene som regnes for å ha et høyt innhold av eteriske oljer. Både *A. glauca* og *A. dracunculus* inneholder forholdsvis mye eteriske oljer. Den eteriske oljen fra *A. dracunculus* er i dyrkningstudier vist å ha antimikrobiell effekt, med sitt innhold av bl.a. ocimen, limonen og metyleugenol. Dette er stoffer som også finnes i *A. glauca*, dog i andre konsentrasjoner. Det kan derfor være av interesse å gjøre studier med den eteriske oljen fra *A. glauca* for å teste antimikrobiell aktivitet. Det kunne også være av interesse å se nærmere på variasjonen av innholdsstoffer i de ulike delene av planten.

Det er også gjort studier på *A. dracunculus* med cellekultur som har vist hypoglykemisk effekt og studier med laminin bekledd plater som har vist en antikoagulant effekt. Det er også isolert og identifisert to benzodiazepiner fra *A. dracunculus* som har vist neurologisk effekt i forsøk med mus. Dette er funn som det forskes videre på.

Estragon er en hardfør plante og som derfor er tilgjengelig for store deler av befolkningen. *A. glauca* er mindre kjent i den vestlige verden og på langt nær så utbredt. Om det derfor skulle vise seg ved senere studier at disse plantene inneholder mye av de samme virkestoffene vil det være hensiktsmessig å forske videre på en plante det er størst tilgang til på. *A. glauca* er først og fremst interessant å forske videre på med sitt potensielt høyere innhold av capillen. Capillen finnes også i andre planter. Det er gjort noen studier på capillen, spesielt i Kina og Japan. Yamamoto et al. fant en hemmende effekt av capillen og capillin på transformasjon growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) i hepatocytter fra rotte. TGF- $\beta 1$ er rapportert å inneha en viktig rolle ved å indusere apoptose i lever celler. Hemming av uønsket apoptose induert av TGF- $\beta 1$ kan tenkes å være fordelaktig i behandling av ulike inflammatoriske lever sykdommer (Yamamoto et al., 1996).

Det er ikke funnet noe litteratur på *Artemisia glauca* som sier noe om antiastmatisk effekt. Ekstrakt av estragon er vist å hemme frigjørelse av kjemiske mediatorer fra basofile leukocytter, men det ikke sett noen sammenheng mellom den hemmende aktiviteten på frigjørelse av Ig-E mediert β -hexosaminidase og allergiutløst astma (Watanabe, et al., 2005). Den eteriske oljen til estragon inneholder estragol, som også finnes i anisolje. I følge Martindale er anisolje en mild ekspektorant og en vanlig brukt ingrediens i hostemiksturer. Nordals Burma herbarium oppgir at roten er brukt som tonikum. Et tonikum anses generelt for å være et styrkemiddel. Det kan også være en mulighet for at en eventuell antibakteriell effekt indirekte kan styrke organismen.

5.9 Konklusjon

Artemisia glauca inneholder varierende mengder eteriske oljer med blant annet capillen og andre aromatiske polyacetylene. Dyrkningsstudier har vist at flere innholdsstoffer i den eteriske oljen har en antimikrobiell effekt. Det kan være av interesse å studere nærmere i hvilken grad roten av *Artemisia glauca* inneholder antimikrobielle stoffer. Det er behov for forskning for å dokumentere toksisitet og sikkerhet ved bruk av Artemesia arter i mikrobiell terapi.

6. *Blumea balsamifera* DC.



Bilde av *Blumea balsamifera* hentet fra (Blanco, 1980).

6.1 Sammendrag

Databasen fra professor Nordals Burma herbarium angir at bladene fra *Blumea balsamifera* DC. ble brukt som ekspektorantia, spasmolytikum, antiseptikum og som magestyrkende middel (NFS, 1963). Flere artikler omtaler denne bruken i folkemedisinen i sørøst Asia og land som Kina, Malaysia, Filippinene og Thailand. Kjemiske studier av bladene viser at de inneholder flavonoider og sesquiterpenlaktoner. Sesquiterpenlaktoner er vist å ha en veksthemmende effekt på tumorceller i celleforsøk, men virkningsmekanismen er ikke klarlagt ettersom man ikke vet med sikkerhet hvilket eller hvilke komponenter som virker. Elementære analyser viser innhold av antioksidanter. I tillegg er det gjort studier på plasminhemmende effekt, xantin oksidase hemmende effekt, spasmolytiske egenskaper og antimikrobiell aktivitet. Nyere forskning peker i retning av at *Blumea balsamifera* inneholder stoffer som kan påvirke sentrale transkripsjonsfaktorer involvert i adipogenesen.

6.2 Taksonomiske betegnelser

Botanisk navn: *Blumea balsamifera* DC.

Burmesisk navn: Hpon-mathein

Klasse: Equisetopsida C. Agardh

Underklasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Overorden: Asterales Link

Orden: Asterales Link

Familie: Asteraceae Bercht. & J. Presl

Genus: *Blumea* DC

Synonym: *Baccharis salvia* Lour., *Blumea balsamifera* var. *microcephala* Kitam., *Conyza balsamifera* L., *Pluchea balsamifera* (L.) Less. (Tropicos. org., 2010b).

6.3 Flora

Blumea balsamifera (L.) kommer fra det latinske balsamum, som betyr en beroligende og legende balsam, og ferre, som betyr å bære, og refererer til den kamfer duftende oljen som produseres av denne urten. Ngai Camphor er det vanlige engelske navnet på denne planten. Den ligner på ekte kamfer som produseres fra *Cinnamomum camphora* (L.)

Blumea balsamifera er en busk som kan bli fire meter høy. Stammen er bekledd med myke hår. Bladene er smale og elliptiske med basis forlenget nedover akselen, det vil si at bladene fortsetter nedover bladstilken og danner en vinget stamme, med 2-6 korte sagtaggete, bladrike fliker, spisse, dekket med et hvitaktig, filtaktig indumentum (hårdekke), spesielt på undersiden, kjertellignende og med skarp lukt når den blir knust. Bladplaten er 5-20 cm lang. Hodene står i en stor rikt forgrenet, bladrik blomsterstand. Svøpbladene er 6-7 mm lange. Skjermbladene sitter i flere gradvis mindre kranser og er linjeformete og dunhårete. Blomsterbunnen er hårløs, glatt. Blomsterkronen er 5 mm lang, rødaktig ved toppen, for det meste trådlignende og utførlig tannet, noen få rørformede og 5-flikede med gul griffel. Den en-frøete frukten er 1 mm lang og kantete. Begerhår er 3 mm lange, hvite eller blir rødlige (AustralianFlora, 1993).

6.4 Tradisjonell bruk

Blad fra *Blumea balsamifera* DC. har vært brukt i folkemedisinen for forskjellige sykdommer i sørøst Asia (Nessa, Ismail, Mohamed et al., 2004). *Blumea balsamifera* DC. er en aromatisk hårbekledd urt som vokser i sørøst Asia, hvor bladene, som inneholder eteriske oljer, er vanlig brukt som urtemedisin (Osaki et al., 2005; Ishibashi & Ohtsuki, 2008). Bladene er brukt lokalt i folkemedisinen som magestyrkende middel, hosteløsende middel (ekspektorans), krampestillende middel, svettedrivende middel (diaforetisk middel) og som medisin ved fødsler. Bladene tros også å være anvendbare som behandling mot feber, lumbago, for å øke appetitten, mot hudsykdommer, sår, lever cirrhose og mot urilitiasis (steinsykdom i urinveiene) (Nessa et al., 2005).

En monograf av *Blumea balsamifera* fra Myanmar oppgir at bladene brukes ved magesykdommer, fordøyelsesbesvær, kolikk, magesår, feber, artritt, ben sykdommer og malaria. Presset juice i en dose på 2 -4 ml eller tørket pulver i en dose på 2-4 gm (uvisst om dette er en forkortelse for gram) gis oralt for magesykdommer, kolikk, feber og magesår. Knuste, friske blad brukes utvortes for artritt og ben sykdommer. Presset juice gis oralt i en dose på 20-60 ml for malaria, og brukes også som øyedråper ved malaria (MOH Myanmar, 2010a).

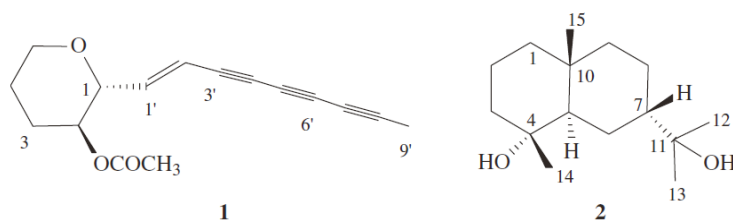
Kineserne har brukt formuleringer av denne planten som medisin mot gassansamling, som mild stimulantia, markmiddel, som lokalbehandling mot septiske sår og et forebyggende medikament ved epidemier. Formuleringer av *Blumea* blir brukt i tradisjonell medisin i

Thailand, hvor de fås kjøpt i lokale urtemedisin butikker. Sigaretter blir laget av tørkede blad fra *Blumea balsamifera* og røkt for å lindre smerte ved sinusitt. Et middel til inhalasjon blir også laget av bladene og brukt som magestyrkende middel, for å lindre gassansamling, som svettedrivende middel, slimløsende (ekspektorant) og menstruasjonsregulerende middel (emenagog). Et avkok fra friske blad brukes alene eller i kombinasjon med andre planteformuleringer og som bad for kvinner etter fødsel. Det er også rapportert om bruk av *Blumea balsamifera* som abortmiddel i gammel kinesisk litteratur (Ruangrungsi et al., 1981).

Ali et al. nevner også at busken *Blumea baslamifera* DC. regnes for å ha magestyrkende, krampestillende og svettedrivende egenskaper. Blad og rot brukes som rå droge mot beri beri, menoragi, hvit utflod, lumbago, reumatisme og lettere sykdommer (Ali et al., 2005). *Blumea baslamifera* er en vanlig medisinsplante på Filippinene. Bladene legges på pannen for å lindre hodepine. Avkok på bladene brukes mot diaré og mot magesmerter, og som aromatiske bad ved reumatisme. Et infus brukes som bad for kvinner ved fødsel (Ragasa et al., 2005). I Thailand prepareres *Blumea balsamifera* som dekokt eller som pulver blandet med honning og gis per os til personer om lider av generell svakhet, enten på grunn av sykdom eller av andre årsaker. Det er vanlig at den gis til barn for å øke appetitten (Brun & Schumacher, 1987).

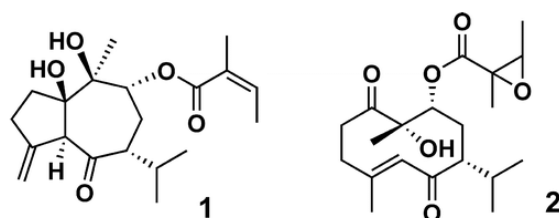
6.5 Kjemiske studier

Ragasa et al. isolerte ichthyothereol acetat og cryptomeridiol fra et diklormetaneekstrakt fra bladene til *Blumea balsamifera*. Luteolin og β -karoten ble også isolert fra planten. Strukturene til ichthyothereol acetat (1) og cryptomeridiol (2) ble klarlagt ved hjelp av 1D og 2D NMR, mens luteolin og β -karoten ble identifisert ved å sammenligne med data fra annen litteratur (Ragasa, et al., 2005). Ruangrungsi et al. isolerte og identifiserte cryptomeridiol fra bladene til *Blumea balsamifera*. Komponenten ble identifisert ved hjelp av UV spektrofotometer, H-NMR og C-NMR. Tørket plante material ble ekstrahert med etanol, deretter filtrert og videre ekstrahert med kloroform (Ruangrungsi et al., 1985).



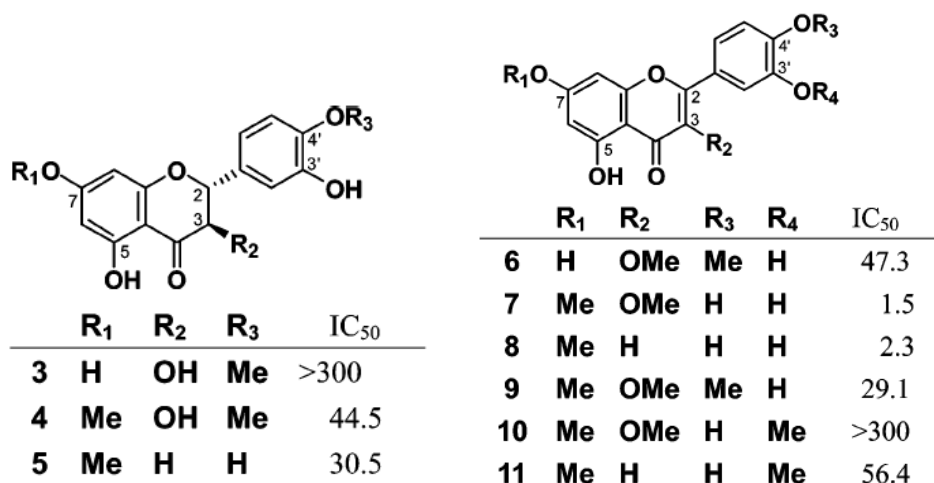
Figur 12: kjemisk struktur av ichthyothereol acetat (1) og cryptomeridiol (2) hentet fra Ragasa et al. 2005.

Osaki et al. undersøkte de kjemiske innholdsstoffene fra *Blumea balsamifera* blad, innsamlet fra Thailand. Bladene ble tørket og deretter ekstrahert med metanol og separert videre mellom heksan og vandig MeOH. Vannfasen ble ekstrahert videre med EtOAc og n-BuOH som gav fire fraksjoner. Heksan og EtOAc fasen viste nesten samme profil ved TLC og ble kombinert og kromatografert på silika gel kolonne og gradienteluert med 10-100 % EtOAc i heksan. Fraksjon B som ble eluert med 40-50 % EtOAc ble separert videre på en ODS (oktadekylsilyl) kolonne og gradienteluert med 60-100 % MeOH i H₂O. Den ene fraksjonen som ble eluert med 75 % MeOH ble så rensed ved HPLC og eluert videre med 80 % MeOH, som gav komponent 1, komponent 9, komponent 10 og 11. Fraksjon B som ble eluert med 70 % MeOH ble rensed ved HPLC og eluert videre med 65 % MeOH, som gav komponent 2 og 5. Fraksjonen A som ble eluert med 40-50 % EtOAc i heksan ble videre separert på ODS kolonne og en fraksjon av denne ble eluert med 60 % MeOH som gav komponent 3 etter rekrystallering fra MeOH. En annen fraksjon av A ble eluert med 80 % MeOH som gav komponent 4. Denne fraksjonen ble rensed videre ved HPLC og eluert med 70 % MeOH, som gav komponent 6 og en blanding av komponentene 7 og 8. Ved hjelp av HPLC, H-NMR og C-NMR ble det isolert og identifisert to sesquiterpenoider og ni flavonoider (Osaki, et al., 2005).



Figur 13: Kjemisk struktur til to sesquiterpenoid estere isolert fra *Blumea balsamifera* : 2-Butenoic syre, 2-metyl-,(3aR,4S,5R,7R,8aS)-decahydro-3a,4-dihydroksy-4-metyl-1-metylen-7-(1-metyletyl)-8-oxo-5-azulenyl ester, (2Z)-rel-(+)- (komponent1) og 2-Oxiranecarboxylic syre, 2,3-dimetyl-,(1R, 3R, 5E, 10S)-10-hydroksy-6,10-dimetyl-3-(1-

metyletyl)-4,9-dioxo-5-cyclodecen-1-yl ester, rel-(+)- (komponent2), hentet fra Osaki et al. 2005.



Figur 14: Kjemiske strukturer til flavonoider fra *Blumea balsamifera* og deres respektive plasmin hemmende aktivitet (IC₅₀ verdier, μM), hentet fra Osaki et al. 2005.

3: 4H-1-benzopyran-4-on, 2,3-dihydro-3,5,7-trihydroksy-2-(3-hydroksy-4-metoksyfenyl)-, (2R,3R)-; blumeatin A; dihydrotamarixetin.

4: 4H-1-benzopyran-4-on, 2,3-dihydro-3,5-dihydroksy-2-(3-hydroksy-4-metoksyfenyl)-7-metoksy-, (2R, 3R)-; blumeatin B

5: 4H-1-benzopyran-4-on, 2-(3,4-dihydroksyfenyl)-2,3-dihydro-5-hydroksy-7-metoksy, (2S)-; 7-metyleriodictyol; 7-O-metyleriodictyol; eriodictyol 7-metyl eter; sternbin.

6: Quercetin 3,4'-dimetyl eter.

7: Quercetin 3,7-dimetyl eter

8: Luteolin 7-metyl eter.

9: Quercetin 3,7,4'-trimetyl eter; ayarin; ayanin.

10: Quercetin 3,7,3'-trimetyl eter.

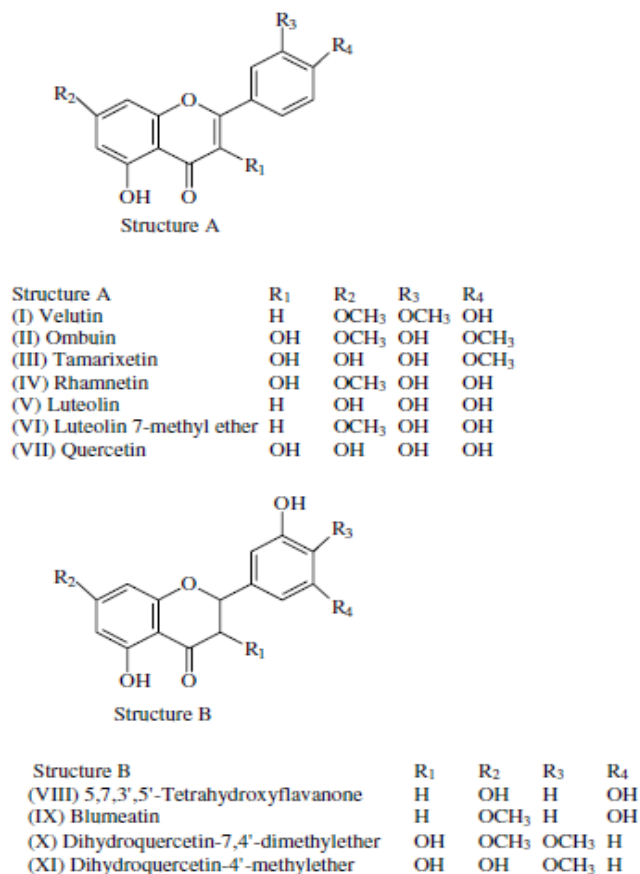
11: Luteolin 7,3'-dimetyl eter; velutin.

6.5.1 Flavonoider

Chen et al. undersøkte etanolekstraktet fra den overjordiske delen av *Blumea balsamifera* og fant 13 fra tidligere kjente flavonoider. Disse var som følger: 3,5,3', 4'-tetrahydroksy-7-metoksyflavon, 5,7-dihydroksy-3,3', 4'-trimetoksy-flavon, davidigenin, ayanin, davidiosid, catehcin, dihydroquercetin 7,4'-dimetyl-eter, blumeatin, dihydroquercetin 4'-metyl eter, 3,5,3'trihydroksy-7,4'-dimetoksyflavon, 5,7,3', 5'-tetrahydroksyflavanon, luteolin og quercetin. Disse ble isolert fra EtOAc fraksjonen av etanolekstraktet og identifisert ved hjelp av detaljerte NMR analyser og sammenligning med litteratur data (Chen et al., 2010).

Nessa et al. isolerte flere flavonoider fra bladene til *Blumea balsamifera*. Bladene ble tørket, malt til pulver og ekstrahert med petroleumseter, kloroform og metanol i påfølgende

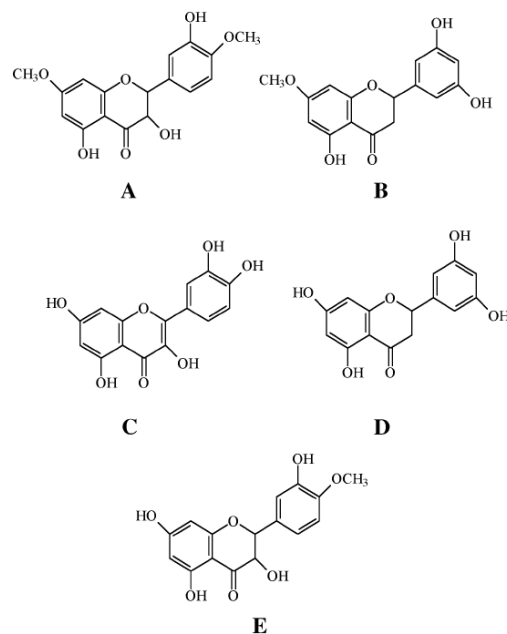
rekkefølge. Løsningsmiddelet ble så avdampet under redusert trykk. Petroleumeter ekstraktet ble separert ved vakuum væske kromatografi med petroleumeter-etylacetat som gav velutin og dihydroquercetin-7,4'-dimetyleter. Kloroformekstraktet ble separert ved væskekromatografi med petroleumeter-etylacetat-metanol som gav luteolin 7-metyl eter og blumeatin. Metanolekstraktet ble suspendert i vann og filtrert. Filtratet ble separert gjentagende ganger ved væskekromatografi med petroleumeter-etylacetat-metanol som mobilfase og på Sephadex LH-20 med kloroform-metanol som elueringsmiddel etterfulgt av TLC. Denne metoden gav komponentene ombuin, tamarixetin, rhamnnetin, luteolin, luteolin 7-metyl eter, quercetin, 5,7,3', 5'-tetrahydroksyflavanon, blumeatin og dihydroquercetin-4'-metyleter. Den kjemiske strukturen ble identifisert ved hjelp kjemiske analyser og ulike spektroskopiske metoder som UV, IR, NMR og MS (Nessa, et al., 2004).



Figur 15: Kjemisk struktur til flavonoider isolert fra *Blumea balsamifera* hentet fra Nessa et al. 2004.

Nessa et al. analyserte bladene fra *Blumea balsamifera*. Bladene ble samlet fra ulike regioner i Malaysia. Ved hjelp av HPLC ble det identifisert fem flavonoider i *Blumea balsamifera*

blad. Disse var dihydroquercetin-7,4'-dimetyl eter (DQDE), blumeatin (BL), quercetin (QN), 5,7,3', 5'-tetrahydroxyflavanon (THFE) og dihydroquercetin-4'-metyl eter (DQME) (Nessa, et al., 2005).



Figur 16: Flavonoider isolert fra *Blumea balsamifera*: DQDE (A), BL (B), QN (C), THFE (D), DQME (E), hentet fra Nessa et al. 2005.

Peak no.	Flavonoids	Sources [†]				
		A	B	C	D	E
1	DQME	1.914 ± 0.028	2.302 ± 0.029	1.685 ± 0.021	4.937 ± 0.052	0.407 ± 0.023
2	THFE	1.384 ± 0.031	1.828 ± 0.091	0.455 ± 0.006	3.165 ± .012	0.229 ± 0.011
3	QN	0.406 ± .010	0.336 ± 0.031	0.258 ± 0.023	0.958 ± 0.053	0.021 ± 0.001
4	DQDE	0.889 ± 0.019	0.796 ± 0.012	1.147 ± 0.025	2.220 ± 0.029	0.191 ± 0.002
5	BL	1.694 ± 0.025	1.263 ± 0.022	1.129 ± 0.021	2.602 ± 0.011	0.184 ± 0.001

* In mg/g of dried leaves.

[†] Each value is expressed as mean (mg flavonoids/g of dried leaves powder) ± SD ($n = 3$). Means within a row for each compound are significantly different ($p < 0.05$). Source A, HPA (Perlis); source B, Kedah; source C, Kepala Batas (Penang); source D, Botanical garden (Penang); and source E, Perak.

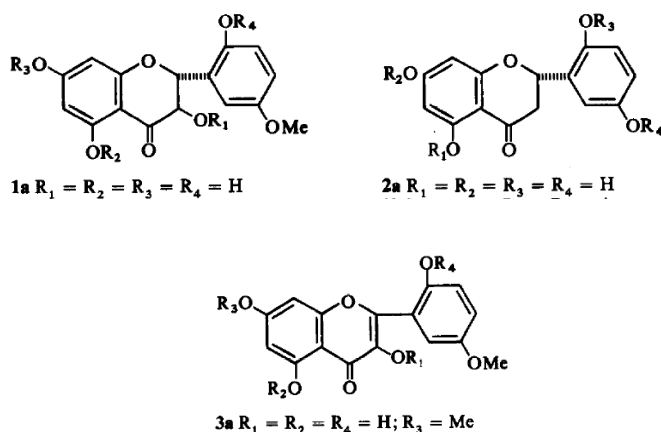
Tabell 3: Innhold av fem hoved komponenter i *Blumea balsamifera* fra ulike regioner i Malaysia, hentet fra Nessa et al. 2005.

Resultatene fra studien er gjengitt i tabell 3 som mg/g tørket pulver, og indikerer signifikante forskjeller ($p < 0,05$) i flavonoid innhold mellom de ulike regionene bladene ble samlet fra (Nessa, et al., 2005).

Ruangrungsi et al. isolerte to flavonoid derivater (2R, 3R) dihydroquercetin-4'-metyl eter og (2R,3R)-dihydroquercetin-4',7-dimetyl eter fra tørkede og pulveriserte *Blumea balsamifera* blad, som var ekstrahert med etanol (Ruangrungsi, et al., 1981). (2R, 3R) dihydroquercetin-4'-metyl eter har den samme kjemiske struktur som DQME, og (2R, 3R)-dihydroquercetin-4', 7-dimetyl eter har den samme kjemiske struktur som DQDE, bortsett fra at stereokjemien i figuren hentet fra Nessa et al. ikke er angitt.

DQDE har også samme kjemiske struktur som komponent 4 i studie av Osaki et al. og kan således enten være den samme stereoisomere formen av denne eller en annen stereoisomer form. Det er også å observerte likheter mellom komponent 3 i studien til Osaki et al. og DQME fra studien til Nessa et al.

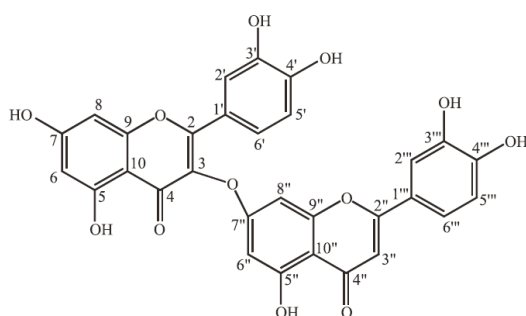
Baruah et al. isolerte og identifiserte tre flavonoider fra *Blumea balsamifera*, (2R, 3R)-5'-metoksy-3,5,7,2'-tetrahydroksyflavanon, (2S)-5,7,2', 5'-tetrahydroksyflavanon og 7,5'-dimetoksy-3,5,2'-trihydroksyflavanon (N. C. Baruah et al., 1979; Goswami et al., 1984).



Figur 17: flavonoider isolert fra *Blumea balsamifera*: (2R,3R)-5'-metoksy-3,5,7,2'-tetrahydroksyflavanon (1a), (2S)-5,7,2',5'-tetrahydroksyflavanon (2a) og 7,5'-dimetoksy-3,5,2'-trihydroksyflavanon (3a), hentet fra Baruah et al. 1979.

Baruah et al. isolerte og identifiserte også (2R, 3R)-7,5'-dimetoksy-3,5,2'-trihydroksyflavanon fra *Blumea balsamifera* (Baruah & Sharma, 1992).

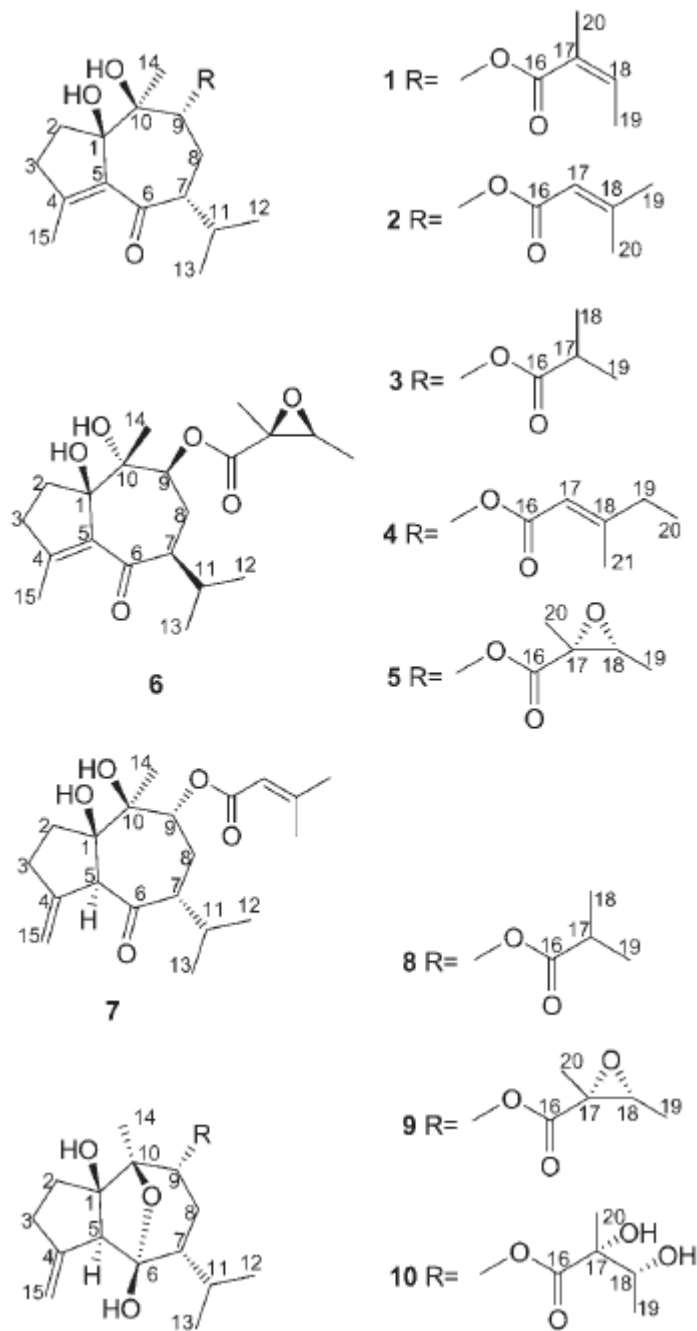
Ali et al. isolerte og identifiserte flere komponenter fra et ekstrakt av bladene til *Blumea balsamifera* ved hjelp av UV-spektroskopi, H-NMR, C-NMR og massespektroskopi. 3,4', 5-trihydroksyflavanon ble isolert fra et ligroin ekstrakt, mens 3', 4', 5-trihydroksy-7-metoksyflavanon og et biflavonoid identifisert som 3-O-7''-biluteolin ble isolert fra et aceton ekstrakt (Ali, et al., 2005).



Figur 18: kjemisk struktur av 3-O-7''-biluteolin, hentet fra Ali et al. 2005.

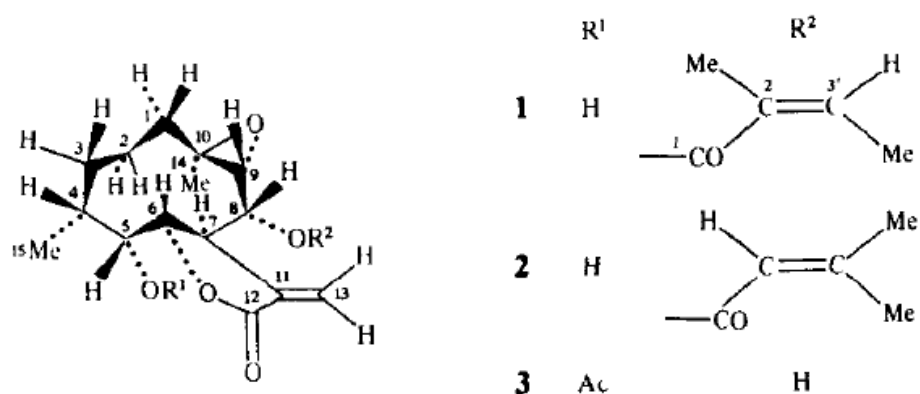
6.5.2 Sesquiterpenlaktoner

Chen et al. isolerte 10 nye blumeaner fra etanolekstraktet fra den overjordiske delen av *Blumea balsamifera* innsamlet fra Kina. De tørkede overjordiske delene ble ekstrahert med 95 % EtOH, deretter blandet med vann og skilt suksessivt med petroleum eter, CH₂Cl₂, EtOAc og n-BuOH for så og separeres ved repeterende kolonne kromatografi (inkludert SiO₂ og Sephadex LH-20) og omvendt fase HPLC som gav 10 nye sesquiterpenoid estere, blumeaner A-J fra CH₂Cl₂ fraksjonen. Strukturen til disse ble klarlagt hovedsakelig ved hjelp av 1D og 2D NMR (Chen, et al., 2010).



Figur 19: kjemisk struktur av blumean A-J (1-10), hentet fra Chen et al. 2010.

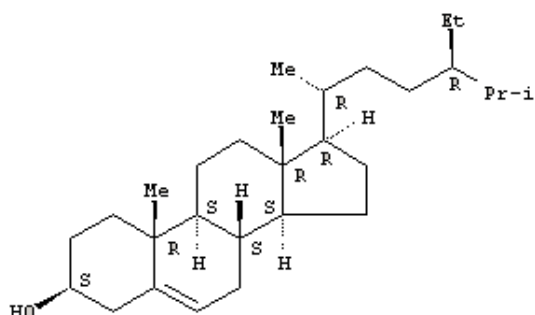
Fujimoto et al. analyserte tørkede blad fra indonesisk *Blumea balsamifera* som ble ekstrahert med etanol og deretter kromatografert. Ved hjelp av IR, H-NMR og C-NMR og MS spektral data ble det identifisert tre sesquiterpen laktoner ved navn blumealactone A, B og C (Fujimoto et al., 1988).



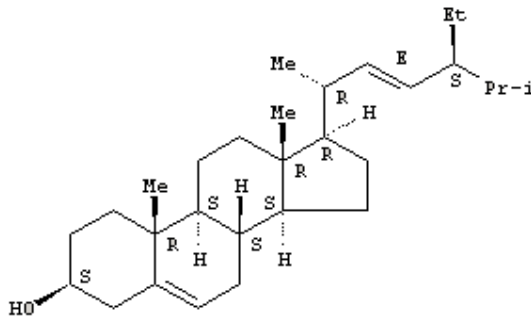
Figur 20: Sesquiterpenlaktoner isolert fra *Blumea balsamifera* ; blumealaktone A (1), blumealaktone B (2), blumealaktone C (3), hentet fra Fujimoto et al. 1988.

6.5.3 Steroler og hydrokarboner

Nessa et al isolerte to steroider β -sitosterol og stigmasterol i tillegg til 2 hydrokarboner ved navn hentriacontan og tritriacontan fra bladene av *Blumea balsamifera*. Den kjemiske strukturen til disse ble klarlagt ved hjelp av ulike analytiske metoder så som IR, NMR, MS(EI), GC-MS og elementære analyser (Nessa, Ismail, & Mohamed, 2004).



Figur 21: kjemisk struktur av β -sitosterol hentet fra Nessa et al. 2004 og kopiert fra SciFinder.



Figur 22: kjemisk struktur av stigmasterol hentet fra Nessa et al. 2004 og kopiert fra SciFinder.

6.5.4 Kjemiske komponenter i den eteriske oljen

Sl. No.	Name of chemical constituents	%	Sl. No.	Name of chemical constituents	%
1	α -pinene	0.48	26	Aromadendrene	2.91
2	Camphene	0.47	27	Patchoulene	0.11
3	β -pinene	1.16	28	α -Selinene	0.32
4	1-octen-3-ol	0.71	29	γ -Murolene	0.31
5	β -myrcene	0.06	30	δ -Cadinene	0.26
6	6-undecanol	0.11	31	Epicedrol	0.49
7	Limonene	0.19	32	Neoclovene, dihydro	0.10
8	(E) ocimene	1.16	33	β -Elemene	1.23
9	Linalool	1.31	34	Geranyl iso-valerate	0.07
10	Camphor	0.11	35	Ledol	7.12
11	Borneol	33.22	36	Germacrene -D-4-ol	0.22
12	Cuminal	0.06	37	Caryophyllene oxide	4.07
13	Perillaldehyde	0.22	38	Guaiol	3.44
14	Neryl acetate	0.40	39	Globulol	1.12
15	Perillol	0.09	40	2(1H)-naphthalene, octahydro-4-5a-methyl-7-(1-methylethyl)	0.61
16	Acetic acid	2.08	41	1,1-Dimethyl adamantane	0.86
17	Thujopsene-13	4.42	42	γ -eudesmol	3.18
18	Aromadendrene, dehydro	0.12	43	Tetracyclo [6,3,2,0,(2.5).0(1,8) tridecan-9-ol, 4,4-dimethyl]	5.18
19	Guaina-3,9-diene	0.75	44	4,4-Demethyladamanlaer-2-ol	1.10
20	ρ -selinene	0.18	45	Cycloisolongifolene, 8,9-dehydro	0.16
21	3-Adamantanecarboxylic acid, phenylester	0.28	46	Carotol	0.47
22	Cyclobexene,1-(2-methyl-2-cyclopentenyl)-1-	0.10	47	Aromadendrene oxide	0.17
23	Dimethoxydurene	3.59	48	Adamantane, cyclopropylenedene	0.11
24	Caryophyllene	8.24	49	Isopatchoulane	0.13
25	α -Caryophyllene	1.19	50	Phytol	4.63

Tabell 4: kjemiske komponenter funnet i blad fra *Blumea balsamifera*, hentet fra Bhuiyan et al. 2009.

Ragasa et al. refererer til tidligere studier som blant annet har funnet myrcene, cineol, camfen, L-borneol, β -caryofyllen, kamfer, eudesmol, gurjunen, linalool og andre komponenter i den eteriske oljen fra *Blumea balsamifera* (Ragasa, et al., 2005). Bhuiyan et al. gjorde GC-MS analyser av den eteriske oljen fra blad av *Blumea balsamifera* (L.) DC. Resultatene viser at denne oljen inneholder mer enn 50 komponenter som til sammen utgjør 99,07 % av oljen, hvorav borneol (33,22 %), karofyllen (8,24 %), ledol (7,12 %, tetrasyklo[6,3,2,0,(2,5), 0(1,8)tridekan-9-ol, 4,4- dimetyl (5,18 %), fytol (4.63 %), karofyllen oksid (4,07 %), guaiol (3,44 %), thujopsen-13 (4,42 %), dimetoksy-duren (5,59 %) og γ -eudesmol (3,18 %) er hovedkomponentene (Bhuiyan et al., 2009).

6.6 Biologiske studier

6.6.1 Antitumor aktivitet

Tørkede blad fra *Blumea balsamifera* ble ekstrahert med 90 % etanol og råekstraktet ble deretter kromatografert og eluert med respektive 40 % metanol, 60 % metanol, 80 % metanol. Den veksthemmende effekten ble så testet på Yoshida sarcoma celler. Kun fraksjonen med 80 % metanol ble funnet å være aktiv. Denne fraksjonen ble da rensset videre med HPLC og gav blumealakton A, blumealakton B og blumealakton C (Fujimoto, et al., 1988).

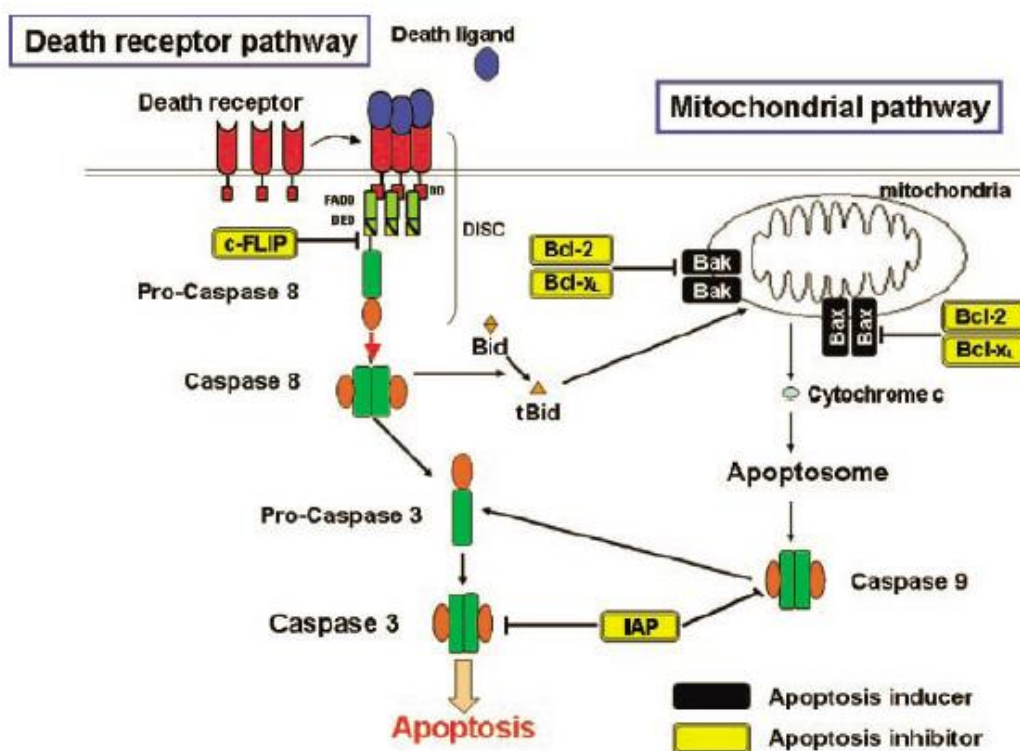
TRAIL

BB1 (= (2R, 3R)-(+)-4'-O-methyldihydroquercetin også kalt tamarixetin), et flavonoid, er vist å ha synergistisk effekt med TRAIL, mens dets 7-O metyl derivater ombuin og rhamnetin ikke har vist slik effekt (Ishibashi & Ohtsuki, 2008).

Tumor nekrose faktor (TNF) relatert apoptose induserende ligand (TRAIL) induserer apoptose i mange transformerte celler, men ikke i normale celler. TRAIL antas å være viktig for å kontrollere vekst av primær tumor og undertrykke metastaser. TRAIL kan binde seg til reseptorer (DRs) som har et apoptotisk funksjonelt draps domene. TRAIL kan også binde seg til to antiapoptotiske reseptorer som konkurrerer med DRs, men som ikke kan mediere draps signaler, såkalt "decoy" reseptorer (DcRs). Det eksisterer to essensielle apoptotiske veier, referert til som den ytre veien (draps reseptor veien eller ekstrinsisk vei) og den indre

veien (mitokondrie veien eller intrinsisk vei). TRAIL kan aktivere begge veier avhengig av celle type.

TRAIL induisert apoptose initiert ved den ytre veien involverer DR engasjement, draps induserende signal kompleks (death-inducing signaling complex, DISC) dannelse, proteolytisk aktivering av kaspase-8 og derav aktivering av kaspase-3. Proteolytisk kaspase-8 aktiverer videre Bid, som i sin tur translokerer til mitokondrium og aktiverer den indre veien. På den indre veien leder draps signaler til forandringer i permeabiliteten til mitokondrienes ytre membran, med påfølgende frigjørelse av cytokrom C, som danner en apoptosom med Apaf-1 og kaspase-9, og aktiverer en effektor kaspase, kaspase-3 (Ishibashi & Ohtsuki, 2008).



Figur 23: To essensielle apoptotiske veier; den ytre veien ("death receptor pathway") og den indre veien ("mitochondrial pathway"), hentet fra Ishibashi et al. 2008.

Et betraktelig antall cancer celler, spesielt noen tumorer med høy malignitet, er resistente mot TRAIL induisert apoptose. Resistens mot TRAIL kan skje på forskjellige steder i nevnte signal vei.

Selv om de fleste utviklede T-celle leukemi/lymfom (adult T-cell leukemia/lymphoma, ATLL) celler uttrykker DR4 og DR5, så er de resistente mot TRAIL. Hasegawa et al. forsøkte å finne naturlige produkter med evne til å overstyre TRAIL resistens. De brukte en TRAIL-resistent ATLL cellelinje KOB, som uttrykker DR4 i svak grad og uttrykker DR5 i moderat grad, men som mangler DcRs. Celleproliferasjonen til KOB celler som ble behandlet med enten TRAIL (0,5 µg/mL) alene eller BB1 (12,5 µg/mL) alene var respektive 98 % og 97 %. Celleproliferasjonen minket til 60 % med kombinert behandling av både BB1 og TRAIL. Prebehandling med BB1 etterfulgt av TRAIL, forsterket synergismen videre, og celleproliferasjons hastighet minket da til 38 %. Derneft ble annexin V og PI binding undersøkt ved hjelp av væskestrøm cytometri (flow cytometry) for å identifisere apoptotisk celle død. En kombinasjonsbehandling med BB1 (12,5 µg/mL) og TRAIL (0,5µg/mL) resulterte i apoptose, noe som ikke var mulig å observere med behandling av hver av komponentene alene. Perifere blod mononukleære celler (PBMCs) fra friske donorer ble ikke skadet av TRAIL alene, eller BB1 alene, eller en kombinasjon av TRAIL og BB1. BB1 økte nivået av uttrykt DR5 aktivitet og overflate protein uavhengig av p53. DR5 siRNA hemmet synergien, noe som indikerer at en sensitivisering ble forårsaket av økt DR5 uttrykk. Lignende effekter på eksakt de samme mekanismene ble observert i andre leukemi celle linjer så som monocytt leukemi celle linjen U-937, den kroniske myeloid leukemi celle linjen K652, og Burkitt lymfom celle linjen Ramos. Disse resultatene foreslår at en kombinert behandling med BB1 og TRAIL kan være en ny strategi for cancer terapi (Hasegawa et al., 2006; Ishibashi & Ohtsuki, 2008).

BB1 er klassifisert som en ny TRAIL forsterkende komponent i humane leukemi celler. Proapoptotiske og antiapoptotiske signalstoffer ble analysert ved hjelp av Western blot. Tidsavhengig kløyving av caspase-3 var høyere i KOB celler som fikk både BB1 og TRAIL. Avtagende bånd tetthet ble observert for full lengde kaspase-8 og FADP, muligens på grunn av økende dannelse av aktiv DISC i de celler som fikk BB1 og TRAIL samtidig, og de celler som fikk BB1 etterfulgt av TRAIL. Kaspase-8-hemmeren c-FLIP er en nøkkelregulator av draps reseptor signalering, og er ofte uttrykt som lang (c-FLIPL) og kort (c-FLIPS) form på grunn av ulik splicing. Studier har vist at c-FLIPS spiller en hovedrolle i forhold til TRAIL signalering. I studien ble det observert svakt uttrykk av full lengde (p55) og den forkortede (p43) formen av c-FLIPL i respektive kontroll celler og celler som fikk kombinert behandling. Selv om det sterke uttrykket av C-FLIPS antyder dets involvering i TRAIL resistens, så var uttrykket av c-FLIPS lite påvirket av BB1 behandling. Minket Bid uttrykk i

TRAIL behandlede og kombinert behandlede celler antyder forkortelse av full-lengde-Bid og overdragelse av apoptose signaler fra den ytre veien til mitokondrium (Hasegawa et al., 2005; Hasegawa, et al., 2006).

Apoptose i mitokondrium ble evaluert ved å måle det mitokondriske membranpotensiale ($\Delta\Psi_m$) ved hjelp av væskestrøm cytometri (FCM). Det ble observert en markert reduksjon i $\Delta\Psi_m$ i de cellene som fikk behandling med BB1 etterfulgt av TRAIL. Denne reduksjonen var tidsavhengig og ble ikke observert i de cellene som fikk kun TRAIL alene. I tillegg ble denne prosessen ledsaget av en frigjørelse av cytokrom c fra mitokondrium til cytosol. Likeens ble også kaspase-9 aktivert, og den fulle lengde formen ble redusert etter kombinert behandling. Disse resultatene antyder at den hemmende mekanismen for apoptose signalering på mitokondrienivå ble inaktivert. Nivåene av uttrykt Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP, cIAP-1 og cIAP-2 viste ingen endring, verken med kombinert behandling eller behandling med BB1. BB1 senket uttrykt survivin etter 48 timer, noe som delvis kan ha lindret TRAIL resistens, men det ser ut som om det skjedde for sent i prosessen for å kunne overstyre resistens mekanismen. Disse resultatene indikerer at kombinert behandling med BB1 og TRAIL aktiverer ytre og indre veier, spesielt når BB1 gis etterfulgt av TRAIL.

Studier av Hasegawa et al. foreslår at p65 er overuttrykt i KOB og bidrar til TRAIL resistens, men behandling med BB1 viste likevel fire ganger høyere nivå av p65 aktivitet sammenlignet med positive kontroll celler, slik at en moderat nedregulering av p65 av BB1 behandling ikke behøver hjelpe på TRAIL resistens. Resultatene indikerer også at MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellulær signal-regulert kinase) hemmer senker DR uttrykk, selv om det ikke tidligere har vært rapportert at denne hemmeren regulerer DR. Det TRAIL-R2 promotor plasmidet som ble brukt i studien inneholdt ikke noe p53 bindende sete. KOB celler innehar et inaktivert p53 gen med en punktmutasjon. Studien tyder på at BB1 oppregulerer TRAIL-R2 gjennom en p53 uavhengig mekanisme og sensitiviserer TRAIL resistente celler (Hasegawa, et al., 2005; Hasegawa, et al., 2006).

APRIL

Norikura et al. viste at et metanol ekstrakt av *Blumea balsamifera* (BME) induerte vekst hemmende aktivitet i rotte og humane hepatocellulære carcinom celler uten å vise cytotoxicitet i rotte hepatocytter, som ble brukt som kontroll modell. BME induerte stans i celle syklus i G1 fasen via en senkning i uttrykt cyclin-E og fosforylering av retinoblastom

protein (Rb) men en dose- og tids-avhengig effekt. BME reduserte nivået av proliferasjon induerende ligand, som stimulerer vekst av tumor celler. Den antiproliferative effekten av BME ble økt signifikant etter behandling med rekombinant human APRIL (rhAPRIL) (Norikura et al., 2008a, 2008b). En proliferasjon induerende ligand (APRIL) er identifisert som et nytt medlem av tumor nekrose faktor (TNF) familien. Uttrykt APRIL mRNA og protein var høyt i forskjellige tumor celle linjer og vev, men var nesten ikke detektbar i ulike normale vev (Hahne et al., 1998). Det antas at APRIL kan stimulere tumor celle vekst via autokrin og/eller parakrin signalering, men signaleringsveien er ikke helt klarlagt (Ware, 2000).

Norikura et al. ekstraherte blad fra *Blumea balsamifera* med respektive metanol og 50 % etanol, som gav et metanol ekstrakt (BME) og et etanol ekstrakt (BEE). For å sammenligne effekten mellom normale celler og tumor celler undersøkte man effekten av disse ekstraktene i rotte hepatocytter og rotte hepatocellulære carcinoma celler (McA-RH7777). Videre undersøkte man humane hepatocellulære carcinom celler (HepG2). BME senket antall levedyktige celler på en dose-avhengig måte, mens BEE ikke viste noen synlig effekt på McA-RH7777. BME senket ikke antall levedyktige celler i rotte hepatocytter. Man studerte den underliggende mekanismen til den veksthemmende effekten av BME ved å se på tumor celle vekst relaterte faktorer så som uttrykt nivå av cyclin-E og APRIL og fosforylering av Rb i HepG2. BME gav en dose avhengig senkning i antall levedyktige celler i HepG2. Cellene som ble inkubert med BME viste en dose-avhengig akkumulering av G1 fase celle syklus restriksjons punkter. Antall celler i S-fasen og videre progresjon av celle syklus i G2/M fasen minket derimot signifikant. Endringer i DNA syntesen ble evaluert ved bromodeoxyuridin (BrdU) immunhistokjemisk farging. BrdU, en analog til tymidin, kan inkorporeres i DNA i stedet for tymidin. Anti-BrdU kan så brukes for å identifisere de cellene som har DNA syntese. Etter behandling med BrdU i 24 timer var nesten alle kontroll cellene positive på BrdU, men antall per tidsenhet av BrdU positive celler i HepG2 minket etter behandling med 50 µg/mL BME (Norikura, et al., 2008a, 2008b) .

Western blotting ble brukt for å se på forandringer av intracellulær protein status og å identifisere mekanismen for den anti proliferative aktiviteten til BME. BME (50µg/mL) viste en tids avhengig senkning av ratioen for hyper fosforylert Rb (ppRb) versus hypofosforylert Rb (pRb), og effekten var mest tydelig etter 24 timer. Progresjon av celle syklus er regulert av cyclin avhengige kinaser (Cdks) som progressivt fosforylerer Rb under G1 fasen. Rb blir

inaktivert etter fosforylering og frigjør da transkripsjonsfaktorer av E2F familien, som induserer transkripsjon av gener nødvendig for å entre S-fasen. BME (50µg/mL) viste en tids- og dose-avhengig senkning av uttrykt cyclin-E.

For å identifisere den underliggende mekanismen bak den vekst hemmende effekten til BME, så man på forandringer i intracellulær APRIL status ved hjelp av Western blotting analyser. APRIL syntetiseres som et transmembran protein, og kløyves proteolytisk ved et multibasis kutte motiv før sekresjon av den biologisk aktive løselige formen (S-APRIL). BME (50µg/mL) viste en tidsavhengig senkning av uttrykt L-APRIL (uprosessert form) og S-APRIL (løselig form). BME viste også en dose avhengig senkning av disse proteinene etter 24 timer. Når både BME og rekombinant humant APRIL (rhAPRIL) ble tilsatt HepG2 cellekultur mediet samtidig i starten av inkubasjonstiden, økte antall levedyktige celler signifikant ($p < 0,01$) på en rhAPRIL dose avhengig måte.

Norikura et al. foreslå at den cancer spesifikke selektiviteten som ikke har vist noen bivirkninger i studien kan utnyttes videre, men presiserer at den eksakte rollen til BME i Hep G2 ikke er kjent fullt ut. De ulike komponentene i planten kan ha synergistisk effekt. Man forsker videre for å finne de kjemiske komponenter i planten som er ansvarlige for den observerte effekten. Fenoliske komponenter utgjør den største andelen (29 %, w/w) i BME, og anticancer aktiviteten til BME er større enn den til BEE. Derfor er det mulig at den effektive komponenten til BME består av et lipofilt og fenolisk materiale (Norikura, et al., 2008a, 2008b).

6.6.2 Antioksidant aktivitet

Antioksidant aktivitet til de organiske ekstraktene fra *Blumea balsamifera* DC. blad og til rene flavonoider isolert fra bladene ble evaluert ved hjelp av 1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl radikal (DPPH). Man plottet en dose respons kurve for å bestemme IC_{50} verdier (den konsentrasjonen som kreves for å hemme radikal dannelse med 50 %). Antioksidant aktiviteten til de testede komponentene minket i følgende rekkefølge: metanol ekstrakt > rhamnetin > luteolin > luteolin-7-metyleter > L-askorbin syre > blumeatin > butylert hydroksyanisole > 5,7,3', 5'-tetrahydroksoy-flavanone > tamarixetin > butylert hydroktytoluene > α -tocopherol > dihydroquercetin-4'metyleter > dihydroquercetin-7,4'-dimetyleter (Nessa, et al., 2004).

DPPH er et radikal som er mye brukt som modell for å fange frie radikaler i lipider. En komponent med høyt antioksidant potensial fanger radikalet og stopper dermed videre kjedereaksjoner. Den frie radikal fangende aktiviteten til ekstraktet kommer av dets hydrogen donerende egenskap. Det er vel kjent at frie radikaler forårsaker auto oksidasjon i matvarer. På den annen side tror man at antioksidanter griper inn i den frie radikal kjeden ved oksidasjon og donerer hydrogen fra den fenoliske hydroksyl gruppen, som derved danner et stabilt slutt produkt, og som igjen ikke kan initiere eller fremme videre oksidasjon av lipider. Således vil de testede ekstraktene kunne donere et hydrogen til DPPH og danne den stabile formen DPPH-H. Ved hjelp av spektroskopiske metoder måler man absorbansen til komponenten. Absorbansen synker som resultat av at fargen endres fra purpur til gult når radikalet fanges av antioksidanter på grunn av donering av hydrogen som danner det stabile DPPH-H. Jo raskere absorbansen synker, jo mer potent er antioksidant aktiviteten til komponenten. Flavonoider med frie hydroksylgrupper virker som frie radikal fangere, og multiple hydroksylgrupper, spesielt på B-ringene, øker deres antioksidant aktivitet. Flavonoler viste høyere antioksidant aktivitet enn de korresponderende flavoner (quercetin > luteolin). Derimot viste flavanon derivater sammenlignbar høyere aktivitet enn dihydroflavonol derivater (blumeatin > 5,7,3', 5'-tetrahydroksyflavanon > dihydroquercetin-4'-metyl eter > dihydroquercetin-7,4'-dimetyl eter), men viste lavere aktivitet enn flavoner og flavonoler i essayene. Det kan synes som om nærvær av 3', 4'-hydroksylgrupper er essensielle for høy antioksidant aktivitet, og at nærvær av en metoksy gruppe i C-4' posisjon reduserer denne aktiviteten mye (quercetin > rhamnetin > tamarixetin) (Nessa, et al., 2004).

Luteolin, som har fire hydroksyl grupper, viste en mindre aktivitet enn quercetin, noe som kan tyde på at nærvær av 3-hydroksylgruppen er essensiell for høy antioksidant aktivitet (quercetin > luteolin). Tilstedeværende metoksy i C-7 posisjon hadde en tendens til å redusere den frie radikal-fangende aktiviteten (Nessa, et al., 2004).

5,7,3', 5'-tetrahydroksyflavanon og blumeatin, som har en hydroksylgruppe ved C-3' og 5' og ingen C2-C3 dobbel binding, utviste en høyere antioksidant effekt sammenlignet med tamarixetin, et flavonol. Det kan synes som om C2-C3 dobbelt binding ikke er essensiell for fange DPPH radikaler. Dihydroflavonol derivater reagerte lite med DPPH radikaler sammenlignet med deres tilsvarende flavanon derivater. Disse resultatene foreslår at fravær av den umettede bindingen ved C2-C3, og nærvær av 3-OH gruppe, reduserer den DPPH radikal-fangende evnen mye. Disse resultatene stemmer imidlertid ikke med andre studier

som er gjort, og derfor er det behov for mer data for bedre å kunne forstå hvilken rolle C2-C3 bindingen spiller for den antioksidative aktiviteten.

Basert på resultatene til Nessa et al. har man sett at flavonoider fra *Blumea balsamifera* DC, unntatt dihydroflavonol derivater, hadde en mer potent hydrogen donerende evne enn butylert hydroksyanisole (BHA), butylert hydrokyltoluene (BHT) og α -tocoferol. Quercetin, rhamnetin, luteolin og luteolin-7 metyl eter viste høyere antioksidant effekt enn askorbin syre. Studien konkluderer med at de ulike ekstraktene fra *Blumea balsamifera* DC blad bidro til deres respektive antioksidant egenskaper (Nessa, et al., 2004).

Fazilatun et al. evaluerte superoksid radikal-fangende kapasitet til ulike ekstrakter av *Blumea balsamifera* DC. Blad fra *B. balsamifera* ble tørket, malt til pulver og ekstrahert med petroleumeter, metanol og kloroform. Spektroskopiske metoder ble brukt for å måle superoksid radikal-fangende aktivitet til ekstraktene og de enkelte flavonoidene, som dannet et produkt under reduksjon med nitro blå tetrazolium (NBT). Superoksid anioner ble generert i et ikke-enzymatisk system (fenazin methosulfat (PMS)/NADH). Metanol ekstraktet utviste en høyere radikal-fangende aktivitet sammenlignet med kloroform ekstraktet. De kjemiske studiene av bladene til *B. balsamifera* viste at kloroform ekstraktet (CEB) og metanol ekstraktet (MEB) inneholdt mer flavonoider enn petroleumeter ekstraktet (PEB). Forskjellen i superoksid-fangende aktivitet mellom de ulike ekstraktene kan derfor trolig tilskrives deres ulike innhold av forskjellige polyfenoliske komponenter. Scavenging kapasiteten til flavonoidene (100 μ M) minket i følgende rekkefølge: quercetin > luteolin > 5,7,3', 5'-tetrahydroksyflavanon > blumeatin > rhamnetin > tamarixetin > luteolin-7-metyl eter > dihydroquercetin-4', 7-dimetyl eter. Denne rekkefølgen er ikke helt den samme som det man så i den andre studien av Nessa et al.

Fazilatun et al. observerte at flavonoider med frie hydroksyl grupper var mer aktive enn metylerte komponenter. Nærvær av en metyl gruppe i C-7 posisjon redusere den radikalfangende aktiviteten markant, slik det ble observert med luteolin-7-metyl eter, blumeatin og dihydroquercetin-7,4'-dimetyl eter. Flavanone og dihydroflavonol derivater viste lavere aktivitet enn flavon og flavonol derivater. Det kan synes som om hydroksyl gruppen i C-5 og C-7 posisjon og dobbelbindingen mellom C-2 og C-3 er viktige for radikal-fangende aktivitet. Med en dobbel binding mellom C-2 og C-3 vil B ringen bli koplanar med ringene A og C på grunn av konjugering. Saturering av denne dobbelt bindingen vil ødelegge konjugeringen og koplanariteten. Dette kan tyde på at en plan flavonoid struktur er

viktig for radikal-fangende aktivitet. Flere andre studier derimot foreslår at dobbeltbindingen mellom C-2 og C-3 ikke har noe å si for effekten til flavonoidene som antioksidant (Nessa, et al., 2004; Fazilatun et al., 2005).

Selv om 5,7,3', 5'-tetrahydroksyflavanon og blumeatin er flavanon derivater utøver de en større scavenging aktivitet på ikke-enzymatisk genererte superoksid radikaler enn rhamnetin og tamarixetin. Dihydroflavonol derivater utøvet lavere scavenging aktivitet. Det kan tyde på at saturering av C-2 og C-3 bindingen med en 3-OH gruppe reduserer den super oksid radikal-fangende aktiviteten. Denne artikkelen konkluderte med at flavonoider med en fri hydroksyl gruppe var mer aktive enn metylerte komponenter og at flavonoid innholdet i ekstraktene bidro til den superoksid radikal-fangende aktiviteten (Fazilatun, et al., 2005).

6.6.3 Plasmin hemmende effekt

Ishibashi et al. undersøkte den kjemiske sammensetningen av bladene til *Blumea balsamifera* innsamlet fra Thailand, og isolerte to sesquiterpenoid estere sammen med noen fra tidligere kjente flavonoider, inkludert BB1 (tamarixetin), med plasmin hemmende aktivitet. BB1 viste en svak plasmin hemmende aktivitet ($IC_{50} > 200 \mu M$), mens dens 7-O-metyl derivater (ombuin og rhamnetin) var mer aktive (IC_{50} respektive 44,5 og 30,5 μM) (Ishibashi & Ohtsuki, 2008).

Osaki et al. testet den plasminhemmende effekten til to isolerte sesquiterpenlaktoner og 9 flavonoider. Disse sesquiterpenene var inaktive i en plasmin hemmende test, men noen av flavonoidene fra *Blumea balsamifera* var aktive (se figur 14). Den plasmin hemmende effekten til to flavonoider, 7 og 8 (på respektive IC_{50} på 1,5 μM og 2,3 μM) med to frie hydroksylgrupper i C3' og C4' posisjon var like sterk som den til leupeptin (IC_{50} 1,2 μM) (Osaki, et al., 2005).

6.6.4 Cytotoksisitet

Cytotoksisitets test på Jurkat humane T-celle leukemi celler viste at komponent 2 (se figur 13) var marginalt cytotoksisk med en IC_{50} verdi på 26,2 μM , mens komponent 1 var inaktiv ($IC_{50} > 70 \mu M$) (Osaki, et al., 2005).

6.6.5 Xantin Oxidase hemmende effekt

Blant 288 ekstrakter laget av 96 medisinske planter brukt i vietnamesisk tradisjonell medisin for å behandle urinsyregikt og relaterte symptomer, ble 188 funnet å ha xantin oxidase (XO) hemmende aktivitet *in vitro* i en konsentrasjon på 100 µg/mL. Metanol ekstraktet av *Blumea balsamifera* utviste en sterk XO hemmende aktivitet med IC₅₀ verdi på mindre enn 20 µg/mL. En av de mest aktive komponentene, luteolin med IC₅₀ på 1,3 µM, viste seg å være en mer potent hemmer av XO enn allopurinol med IC₅₀ på 43,8 µM. Videre ble det utført kinetiske studier hvor Lineweaver-Burk plot indikerte at luteolin var en kompetitiv hemmer, det samme som allopurinol, med hensyn til substratet xantin. Inhibisjons konstant (K_i) til luteolin var 0,92 µM, som var mindre enn til allopurinol (1,88 µM) (Nguyen et al., 2004).

6.6.6 Antiplasmodiske egenskaper

Rain et al. screenet syv medisinske planter fra Malaysia for å se på deres antiplasmodiske aktivitet *in vitro*. Disse plantene ble blant annet valgt ut på bakgrunn av deres tradisjonelle bruk mot feber. En *Plasmodium falciparum* infektet erytrocytt suspensjon som var preparert med 1,5 % parasitemi og 2 % hematocrit ble sådd ut i brønner på en test plate. Man testet den antiplasmodiske aktiviteten på en klorokinsensitiv stamme (D10) ved hjelp av parasitt laktat dehydrogensase (pLDH) essay. Cytotoxisk aktivitet ble testet på Madin-Darby nyre celler fra ku (Madi-Darby bovine kidney, MDBK) ved å bruke MTT (3-(4,5-dimetyltazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid) essay. Konsentrasjonen på ekstraktene som ble brukt til begge screening essays var fra den høyeste på 64 µg/ml, to ganger fortynnet til den laveste konsentrasjonen på 0,03 µg/ml. Den antiplasmodiske aktiviteten til *Blumea balsamifera* (det vil si % veksthemming eller IC₅₀) var 26,25 for røtter, hvilket anses for å være en meget svak aktivitet. IC₅₀ for stammen var 7,25, det vil si en god eller moderat aktivitet. *Blumea balsamifera* viste ingen cytotoxicitet mot MDBK celler (Noor Rain et al., 2007).

6.6.7 Metabolitter mot sopp

Ictyotereol acetat og cryptomeridiol ble testet for antimikrobiell aktivitet ved agar skål metoden. Resultatene viste at ictyotereol var moderat aktiv i en mengde på 30 µg mot *Candida albicans* med aktivitet index (AI) på 0,3, mot *Trichophyton mentagrophytes* med AI på 0,8 og mot *Aspergillus niger* med en AI på 0,4. Cryptomeridiol viste en lav aktivitet

mot *C. albicans* med AI på 0,2, mot *T. mentagrophytes* med AI på 0,3 og mot *A. niger* med AI på 0,2 i samme mengde. Begge komponenter var inaktive mot bakteriene *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* og *Bacillus subtilis* (Ragasa, et al., 2005).

6.6.8 Spasmolytisk aktivitet

Cryptomeridiol er den aktive komponenten i Proximol®, et renalt spasmolytisk produkt fra *Cymbopogon proximus* Stapf. (Gramineae). Denne komponenten er vidt utbredt og finnes i andre planter fra Compositae, Cupressaceae, Euphorbiaceae, Magnoliaceae, Taxodiaceae, Winteraceae og Zingiberaceae familiene (Ruangrungsi, et al., 1985).

6.6.9 Blokkering av adipogenese

Kubota et al. undersøkte aktiviteten av etanolekstrakt fra *Blumea balsamifera* i forhold til overvekt på adipocyttdifferensiering hos 3T3-L1 preadipocytter og hos 3T3-L1 adipocytter. Cellenes levedyktighet ble målt spektroskopisk og kvantitativt ved lysosomalt opptak av nøytral rødt. Ingen av ekstraktene påvirket levedyktigheten til cellene hvilket indikerer at de ikke var cytotoxiske. Effekten av *Blumea balsamifera* ekstrakt på intracellulær lipidakkumulering ble målt ved farging med "red O oil" (et fettløselig diazo fargestoff). Cellene ble inkubert med 0-40 µg/ml av ekstrakt fra *B. balsamifera*. På den 8. inkubasjonsdagen hadde de modne 3T3-L1 adipocytterne akkumulert mange rød fargede store intracellulære dråper. De fleste av kontrollcellene hadde akkumulert fett dråper. Cellene som ble behandlet med 20,30 eller 40 µg/ml av *B. balsamifera* ekstrakt akkumulerte mindre fett dråper sammenlignet med kontroll cellene, hvilket kan tyde på at ekstrakt fra *B. balsamifera* hemmer akkumulering av intracellulære triglycider i 3T3-L1 preadipocytter. Videre fant man at behandling med ekstrakt fra *B. balsamifera* undertrykket glycerol-3-fosfat dehydrogenase (GPDH, et hastighetsbegrensende enzym i triglycerid syntesen). Western blot analyser indikerer at *B. balsamifera* ekstrakt dempet uttrykket av nøkkel adipogeniske transkripsjonsfaktorer inkludert peroksisom proliferator-aktivert reseptor (PPAR) γ , CCAAT element bindende protein (C/EBPs) og leptin, men opp-regulerte adiponektin på proteinnivå i 3T3-L1 preadipocytter og adipocytter. Disse resultatene foreslår at *Blumea balsamifera* ekstrakt muligens kan blokkere adipogenesen delvis ved å minke viktige adipogenetiske transkripsjonsfaktorer i 3T3-L1 preadipocytter og kanskje har antiaterogene, antiinflammatoriske og antidiabetiske effekter via oppregulering av adiponektin i 3T3-L1

adipocytter. Det forskes videre på å finne de effektive komponentene i *Blumea balsamifera* (Kubota et al., 2009).

6.6.10 NO hemmende aktivitet

Alle sesquiterpenoid estrene isolert av Chen et al. ble testet for hemmende aktivitet på LPS-indusert NO-produksjon i RAW264,7 makrofager. Komponent 1, 4 og 5 (se figur 19) viste en liten hemmende effekt på produksjonen av NO med IC₅₀ verdier på respektive 40,06, 46,35 og 57,80 µg/mL (Chen, et al., 2010).

6.7 Kliniske studier

Det er gjort kliniske studier på *Blumea balsamifera* (sambong tablett) i forhold til behandling av nyrestein. Disse studiene er små og ikke publiserte. I tillegg er de av kort varighet. Det er slik å forstå at en tablett laget av *Blumea balsamifera* ikke ble godkjent på det amerikanske markedet av FDA som kosttilskudd ettersom data var å anse for mangelfulle blant annet i forhold til sikkerhet. Et middel mot nyrestein er å anse som legemiddel og datagrunnlaget var for lite til å kunne godkjenne denne tablett som legemiddel (Satchell, 2002).

6.8 Diskusjon

Nordals Burma herbarium indikerer at hele planten har vært brukt som hosteløsende middel, magestyrkende middel, som antispasmodikum og antiseptikum. Det er ikke funnet noen biologiske studier som har undersøkt plantens hosteløsende eller slimløsende egenskaper, men kjemiske studier av den eteriske oljen viser at planten inneholder en rekke komponenter hvorav borneol er en av hovedkomponentene. Bornyl acetat skal i følge Martindale inngå i preparasjoner for behandling av hoste og andre luftveis sykdommer. Borneol har antiseptiske og antispasmodiske egenskaper og inngår i formuleringer til behandling av gallesten og nyresten (Martindale, 2009).

Det er gjort kliniske studier på *Blumea balsamifera* i behandling av nyresten, men disse har vært små og mangelfulle. Ruangrunsi et al. isolerte cryptomeridiol fra bladene til *Blumea balsamifera* som også finnes i en del andre planter og som er den aktive komponenten i Proximol®, et renalt spasmolytisk produkt fra *Cymbopogon proximus* Stapf. (Gramineae).

Ellers er det ikke identifisert noen andre virkningsstoffer fra *Blumea balsamifera* i forhold til behandling av nyresten.

Det forskes på *Blumea balsamifera* i forhold til antitumor aktivitet. Fujimoto et al. isolerte 3 sesquiterpenlaktoner som viste veksthemmende effekt på Yoshida sarkom celler. Ishibashi isolerte blant annet BB1, et flavonoid som har vist synergistisk effekt med TRAIL, en mye studert signaleringsvei som ikke er klarlagt i detalj. Norikura et al. studerte den underliggende mekanismen til den veksthemmende effekten av BME ved å se på tumor celle vekst relaterte faktorer så som uttrykt nivå av cyclin-E og APRIL og forstyrring av Rb i HepG2. BME gav en dose avhengig senkning i antall levedyktige celler i HepG2, og BME (50µg/mL) viste en tidsavhengig senkning av uttrykt L-APRIL og S-APRIL. Det antas at APRIL kan stimulere tumor celle vekst. Norikura et al. foreslå at den cancer spesifikke selektiviteten kan utnyttes videre, men presiserer at den eksakte rollen til BME i Hep G2 ikke er kjent fullt ut. De ulike komponentene i planten kan ha synergistisk effekt og det forskes videre for å finne de kjemiske komponenter i planten som er ansvarlige for den observerte effekten. Fenoliske komponenter utgjør den største andelen (29 %, w/w) i BME. Derfor er det mulig at den effektive komponenten til BME består av et lipofilt og fenolisk materiale.

Kjemiske studier viser at *Blumea balsamifera* inneholder en rekke flavonoider. Fazilatun et al. påpeker at metanolekstraktet har størst antioksidant effekt, samt at frie hydroksylgrupper, spesielt på B-ringene, øker denne effekten. Fazilatun påpeker også at det er behov for mer data for å klarlegge hvilken rolle C2-C3 bindingen spiller for den antioksidative aktiviteten. Det forskes videre for om mulig å klarlegge hvilke kjemiske stoffer som er ansvarlige for de ulike biologiske aktivitetene som er observert fra studier på *Blumea balsamifera*. Det er mulig at flere virkningsmekanismer og potensielle virkningsstoffer er involvert i forhold til anti-tumor aktivitet.

Det er gjort noen studier av *Blumea balsamifera* i forhold til plasminhemmende aktivitet. Den plasmin hemmende effekten til to flavonoider, 7 og 8 (se figur 14) (på respektive IC₅₀ på 1,5 µM og 2,3 µM) med to frie hydroksylgrupper i C3' og C4' posisjon hadde størst plasmin hemmende aktivitet. Begge disse strukturene har en dobbeltbinding mellom posisjon 2 og 3. Det er ikke gjort noen struktur aktivitets studier som til nå har kunnet klarlegge en eventuell virkningsmekanisme. Flere av de kjemiske komponentene isolert fra *Blumea balsamifera* har flere stereogene sentre og man vet ikke forholdet mellom disse i en

blanding. Ettersom det er vist effekt på TRAIL og plasmin er det å anta at det kan foreligge en eller flere aktive konformasjoner som kan gi evne til å feste seg til aktivt sete på reseptor eller enzym.

Nguyen et al. fant at luteolin i metanolekstraktet fra *Blumea balsamifera* var en kompetitiv hemmer av xantin oksidase, samt konkurransedyktig i forhold til allopurinol. Det er gjort mange studier på luteolin. Luteolin er vidt utbredt i planteriket. En review artikkel nevner at luteolin har et kjemoterapeutisk potensial og at flere mekanismer kan være involvert i dens biologiske aktivitet (Lopez-Lazaro, 2009). En prospektiv Cochrane studie som undersøkte sammenhengen mellom daglig inntak av flavonoider i mat, deriblandt luteolin, og risikoen for å utvikle cancer, fant ingen signifikant assosiasjon mellom inntak av flavonoid rik mat og forekomst av cancer (Wang et al., 2009). Noroozi et al. undersøkte effekten av flavonoider på oksidativ DNA skade på humane lymfocytter i celleforsøk. Denne studien støtter muligheten for at bioaktive komponenter så som flavonoider kan spille en viktig rolle for den generelle helsen i befolkningen, og konkluderer med at man trenger flere studier i forhold til absorpsjon, distribusjon, metabolisme og biologiske effekter av flavonoider i kroppen (Noroozi et al., 1998). Det trengs også flere studier på luteolin i forhold til klinisk relevanse.

Resultatene fra Ragasa et al. viste at ictyoltereol var moderat aktive mot *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* og *Aspergillus niger*. Ellers er det gjort lite studier i forhold til antimikrobiell og antiseptisk aktivitet av *Blumea balsamifera*. Nyere forskning viser at etanolekstrakt fra *Blumea balsamifera* muligens kan blokkere adipogenesen delvis ved å minke viktige adipogenetiske transkripsjonsfaktorer i preadipocytter. Om slike resultater skulle vise seg å bli styrket av flere studier så vil dette kunne bety mye for forskningen innenfor overvekt.

6.9 Konklusjon

Generelt har det vært gjort få studier på *Blumea balsamifera*. Tradisjonell bruk, kjemiske og biologiske studier som viser innhold av flavonoider og sesquiterpenlaktoner peker i retning av en viss antiseptisk og spasmolytisk aktivitet. I tillegg er det gjort celleforsøk som viser en veksthemmende effekt på cancerceller. Nyere forskning tyder på at *Blumea balsamifera* kan påvirke sentrale transkripsjonsfaktorer involvert i adipogenese. Det trengs flere studier for å kartlegge eventuelle virkestoffer, virkningsmekanisme og klinisk relevans.

7. *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.



Bilde av *Chrysanthemum cinerariaefolium*, hentet fra (Lucius, 1917).

7.1 Sammendrag

Blomsten av *Chrysanthemum cinerariaefolium* brukes hovedsakelig til fremstilling av pyretrum ekstrakt, som inneholder en blanding av krysantemin syre og pyretrin syre estre (pyretrin I og II). Det er gjort flere studier med *Chrysanthemum cinerariaefolium* og det er kjent at pyretriner er de virksomme stoffene i blomsten. Pyretriner har vært brukt som insektmidler siden midten av 1800-tallet i form av pyretrum ekstrakt (Eiring, 2009).

Blomstene skal i følge professor Nordals Burma herbarium være insekticide og antiparasittiske. Man kjenner til de store trekkene i biosyntesen av pyretriner, men alle detaljer er ikke fullstendig klarlagt. Det finnes en del dokumentasjon på pyretriner. WHO og FAO har gjort en grundig evaluering av toksikologien til pyretriner som konkluderte med at ADI verdien på 0-0,04 mg/kg kroppsvekt og RfD på 0,2 mg/kg kroppsvekt understøttes av nye data. I tillegg til pyretriner inneholder *Chrysanthemum cinerariaefolium* også sesquiterpenlaktoner, flavonoider, flavoner og karotenoider.

7.2 Taksonomiske betegnelser

Botanisk navn: *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.

Klasse: Equisetopsida C. Agardh

Underklasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Overorden: Asterales Link

Orden: Asterales Link

Familie: Asteraceae Bercht. & J. Presl

Genus: *Chrysanthemum* L. (Tropicos. org., 2010j).

Vanlig navn: Pyrethrum

7.3 Botanikk og flora

Chrysanthemum cinerariaefolium er en flerårig urt, ca. en meter høy, som vokser vilt på Balkan halvøya og er dyrket mange steder i verden, blant annet i tropiske strøk og Japan. Planten vokser i klynger, har rett stamme (50-80 cm) og er karakterisert ved dypt delte blad som er dekket på begge sider med et tett ull lignende material. De uåpnede blomsterhodene brukes til fremstilling av pyretriner. Disse er ca 7 cm i diameter med kremhvite

tungeformede randblomster og gule tubeformede skiveblomster. Det er 2-3 rader med lansettformede grønn-gule, hårete skjermblad og en flat blomsterbunn (Bruneton, 1995; Heinrich, et al., 2004; Samuelsson, 2004).

7.4 Kommersiell produksjon

Den kommersielle planten *Chrysanthemum cinerariaefolium*, også kjent som Dalmatian pyrethrum, er en hovedkilde til pyretriner. Dalmatia (en region av tidligere Jugoslavia) forble den viktigste leverandøren av *Chrysanthemum cinerariaefolium* frem til første verdenskrig. Japan overtok som hovedprodusent etter Jugoslavia. Deretter overtok Kenya etter Japan i 1941, men sluttet som hovedleverandør ved starten av andre verdenskrig. Mellom 1971 og 1990 økte etterspørselen etter syntetiske pyretoider og kultivering av planten ble dermed redusert. På grunn av miljøbelastning og økende resistensutvikling er nå denne trenden reversert og etterspørselen etter naturlige pyretriner er igjen økende (Hitmi et al., 2000).

7.5 Bruk

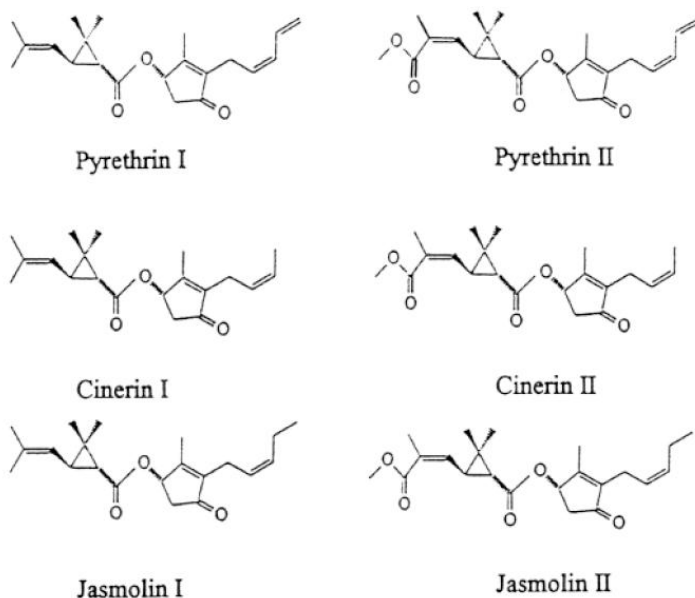
Chrysanthemum cinerariaefolium er velkjent for å virke frastøtende på mygg ved å brenne de tørkede blomstene (Adisewojo et al., 1984). De naturlige pyretrinene er effektive mot en rekke insekter med liten grad av resistensutvikling. Ekstrakt av *Chrysanthemum cinerariaefolium* er effektive mot *Lygus ssp.*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Pieris rapae*, *Aspodydia ssp.*, *Empoasca devastans*, *Leucinodes orbonalis*, *Ophiomyia reticulata*, *Anthonpmus rubi*, *Earias fabia*, bladlus, fluer, biller, kakerlakker, maur, mygg, gresshopper og tallrike larver, midd, trips og møll.

Pyretriner, som er ustabile i luft og lys, mister raskt sin insekticide aktivitet. Den raskt nedbrytende egenskapen til pyretrinene gjør de akseptable som et trygt og sikkert, miljøvennlig alternativ til andre pesticider. Pyretriner egner seg til å beskytte avlinger og kontrollere smittebærere. Pyretriner formuleres da med antioksidanter (tannin syre), stabiliserende midler (hydrokinon) og synergister (piperonyl butoxid, sesamin, myristicin) (Hitmi, et al., 2000).

7.6 Kjemiske studier

7.6.1 Pyretriner

Pyretriner er en samling av seks strukturmessig nære monoterpen estra produsert ved esterifisering av to monoterpener (krysantemin syre og pyretrin syre) med tre keton alkoholer (pyretrolon, cinerolon og jasmolon). Krysantemin syre estrene kalles respektive pyretrin I, cinerin I og jasmolin I. Samlet er disse kjent som pyretrin I fraksjonen. Pyretrin syre estrene utgjør pyretrin II fraksjonen og består av respektive pyretrin II, cinerin II og jasmolin II. Det er vanlig at kommersielle ekstrakter har like deler av pyretrin I og II, men det er observert forskjeller i ratio som rangerer fra 0,47 til 3,5 i ulike avlinger (Hitmi, et al., 2000; Martindale, 2002).



Figur 24: Kjemiske strukturer til naturlige pyretriner, hentet fra Hitmi et al. 2000.

Pyretrinene representerer to tredjedeler av de totale estrene. De to syrene til de ulike estrene har et nøkkel-strukturelement, en substituert syklopropan ring. Begge syrene har en (R) konfigurasjon på C1. Orienteringen av isobutenyl delen er trans relativ til karbonylgruppen. Syren i I serien er pyretrin syre, med en metylgruppe på C7. Syren i II serien har en karboksymetylgruppe på C7 og kalles krysantaminsyre.

Alkoholene eller retrolonene er sekundære alkoholer, har en felles metylsyklopentenolon kjerne og skiller seg fra hverandre på grunn av sidekjeden i en (2'-Z)-2', 4'-pentenyl del (pyretrolon), en (2'-Z)-2'-pentenyl del (cinerolon), eller en (2'-Z)-2'-butenyl del (jasmolon). Alle disse estrene er oljeaktige væsker, uløselige i vann og ustabile. De er mono- og diestre, og de hydrolyseres lett. De fotoisomeriseres og oksideres lett på isobutenyl delen av syren, eller på mono- eller di-umettede alkohol delen, ettersom de er umettede forbindelser. Halveringstiden til naturlige pyretriner i dagslys er estimert til ca. 10 minutter (Bruneton, 1995).

Kasaj et al. utviklet en omvendt fase HPLC (RPHPLC) metode for analyse av de seks naturlige pyretriner i pyretrum blomster. Resultatene viste at innholdet av pyretrin I varierte fra 0,12-0,49 %, av pyretrin II fra 0,048-0,34 %, av cinerin I fra 0,011-0,033%, av cinerin II fra 0,007-0,036%, av jasmolin I fra 0,007-0,033% og av jasmolin II fra 0,007-0,027% (Kasaj et al., 1999).

Rugutt et al. isolerte pyretrin I (PI) og II (PII) fra kenyansk *Chrysanthemum cinerariaefolium* ved hjelp av vakuumpvaskromatografi (VLC) og tynnsjiktskromatografi (TLC). Rugutt et al. brukte molekylær modulering (MM) og spektroskopiske metoder for å bestemme konformasjonen til PI og PII. Pyretrin estre har tre stereogene sentre og kan forekomme som en blanding av 8 stereoisomere. I tillegg er det en cis-trans dobbeltbinding (C8'-C9'). Data fra NOE (nuclear Overhauser effect) tilsier at PI og PII molekyler antar en konformasjon lik en toseters liten sofa i kloroform (CDCl₃) løsnings (Rugutt et al., 1999).

7.6.2 Biosyntese

Pyretriner finnes i alle overjordiske deler av planten. De enfrøete fruktene fra blomsterhodet inneholder 94 % pyretriner i de innerste sekresjonskanalene. Blomsterhodene akkumulerer pyretriner i et omfang av 0,8 til 2 % av blomstens tørrvekt. Martindale oppgir at de tørkede blomsterhodene inneholder ikke mindre enn 1 % pyretriner, hvorav halvparten består av pyretrin I. Innholdet av pyretriner avhenger av genotype, tid for plukking, blomstens modenhet, klima og tørkemetode. Utbytte fra frisk blomst er bestemt av genotype og klon, jordsmonn, klima og eventuelle plantesykdommer. Utbytte/avkasning av pyretriner og kvalitet på planteekstraktet bestemmes av pyretrin innhold, utbytte fra blomst og pyretrin I/pyretrin II ratio (Hitmi, et al., 2000; Martindale, 2002).

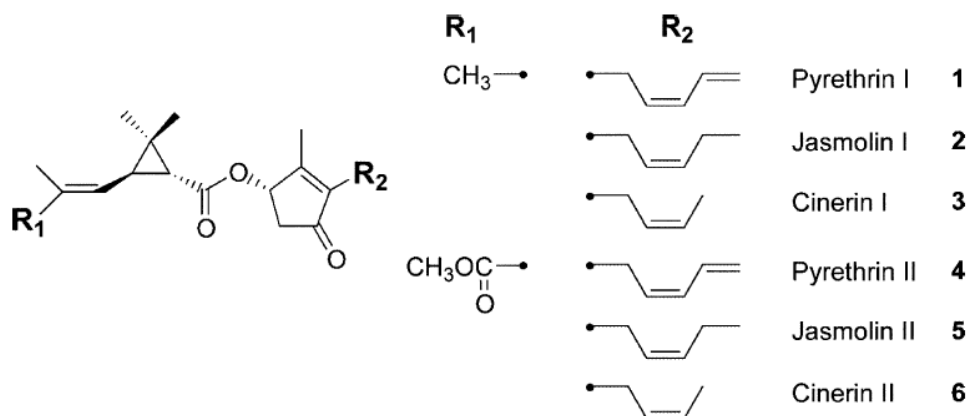
Glover undersøkte effekten av kuldestimuli for knoppskyting. Resultatene viste at avkjøling av knoppene er essensielt for utbytte av blomster (Glover, 1955).

Matsuda et al. studerte biosynteseveien til naturlige pyretriner i *Chrysanthemum cinerariaefolium*, og brukte [1-¹³C]D-glukose som grunnsubstans/forstadium til pyretrin I som ble isolert ved hjelp av HPLC fra ekstrakt av blad. ¹³C NMR spektrum av pyretrin I fra grunnsubstansen, som ble administrert til frøplanten, indikerte at syre delen ble biosyntetisert fra D-glukose via 2-C-metyl-D-erytritol 4-fosfat, mens alkoholdelen muligens ble biosyntetisert fra linolen syre (Matsuda et al., 2005).

Crowley et al., som undersøkte blomstene, konkluderte sin studie med at D-(+)[2-¹⁴C]mevalon syre ble inkorporert i både pyretrin I og pyretrin II i like store prosentandeler. Deres eksperiment viste også at acetat ble inkorporert i pyretrin I og II i nesten like store prosentandeler (Crowley et al., 1962).

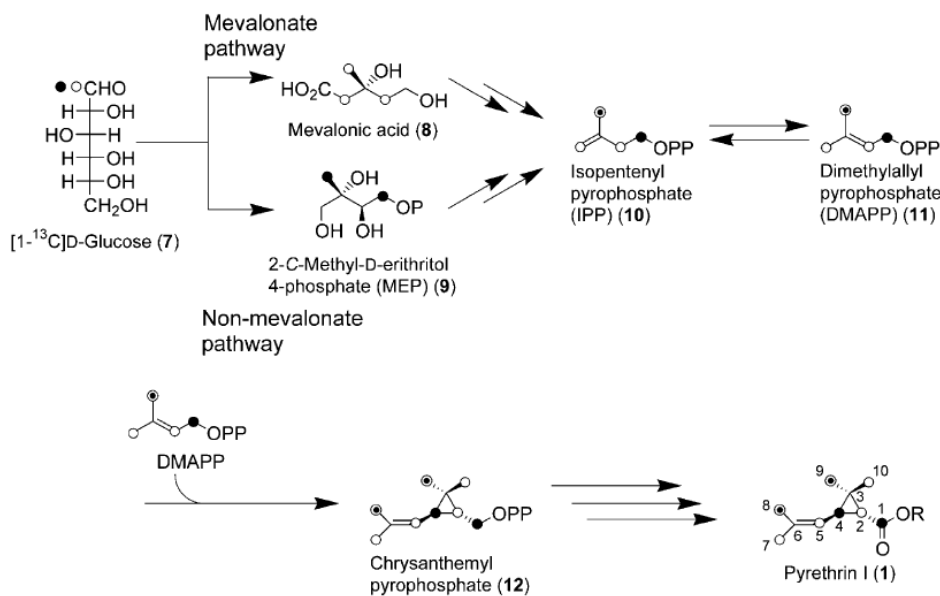
Rivera et al. har isolert krysantemyl difosfat syntase (CPPase) fra umodne krysantemum blomster. CPP er en intermediat i biosyntesen av pyretrin estre insekticider i *Chrysanthemum cinerariaefolium*. CPP ase katalyserer kondensasjonen av to molekyler dimetylallyl difosfat som gir krysantemyl difosfat (CPP), et monoterpen med en ”ikke-hode-til-hale” eller irregulær C1'-2-3 binding mellom isoprenoid enheter (Rivera et al., 2001).

Pyretriner med en ester binding klassifiseres i type I og II. Type I estere (figur 25, struktur 1-3) har en krysantemoyl del, mens type II (figur 25, struktur 4-6) har en pyretroyl del med en ekstra ester binding, metoksykarbonylgruppe. Et vanlig strukturelt trekk av syre delen er tilstedeværelse av en syklopropan ring (Matsuda, et al., 2005).



Figur 25: Kjemisk struktur til naturlige pyretriner, hentet fra Matsuda et al. 2005.

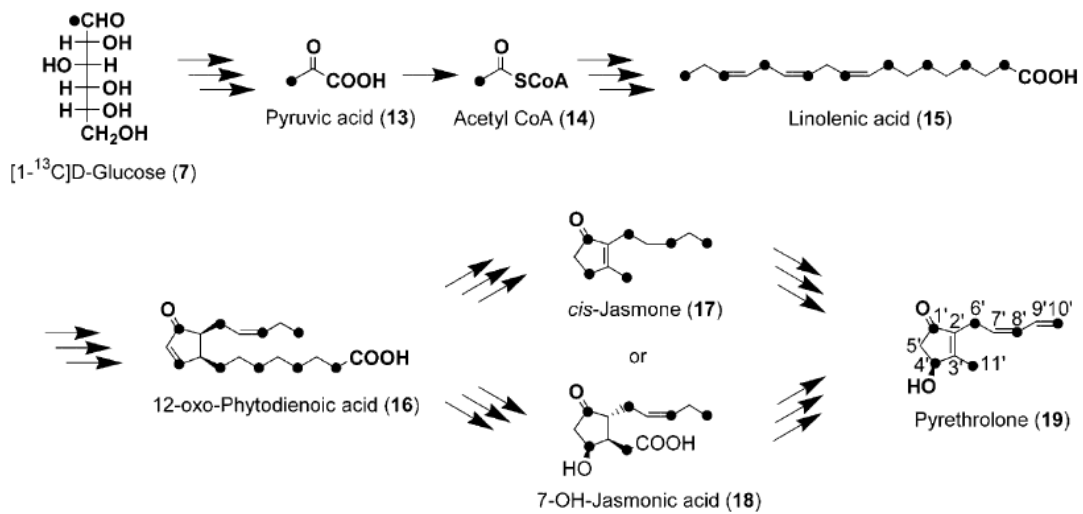
Rekombinant CPPase uttrykt i *E.coli* var i stand til å katalysere syklopropanring dannelse som gav krysantemyl pyrofosfat ved å bruke to molekyler av dimetylallyl pyrofosfat (DMAPP) med substratet generert ved isomerisering av isopentenyl pyrofosfat (IPP) (se figur 26). IPP biosyntetiseres via mevalonat i dyr, men IPP biosyntetiseres også via 1-deoksy-D-xylulose 5-fosfat (DXP) og dens metabolitt 2-C-metyl-D-erytritol 4-fosfat (MEP) i planter og mange eubakterier. En slik mevalonat uavhengig vei, som involverer DXP og MEP som intermediater, har men sett i plastider, mens mevalonatveien skjer i cytosol. Derfor tenker man seg at plastider i små planter fra *C.cinerariaefolium* spiller en nøkkelrolle i reguleringen av pyretrin biosyntese. Selv om det er vist at [^{14}C]mevalon syre (8) ble inkorporert i syredelen av pyretrinene når man undersøkte blomstene, så kan den mevalonat uavhengige veien være involvert som en hovedvei i biosyntesen av syredelen, i det minste i bladene (Rivera, et al., 2001; Matsuda, et al., 2005).



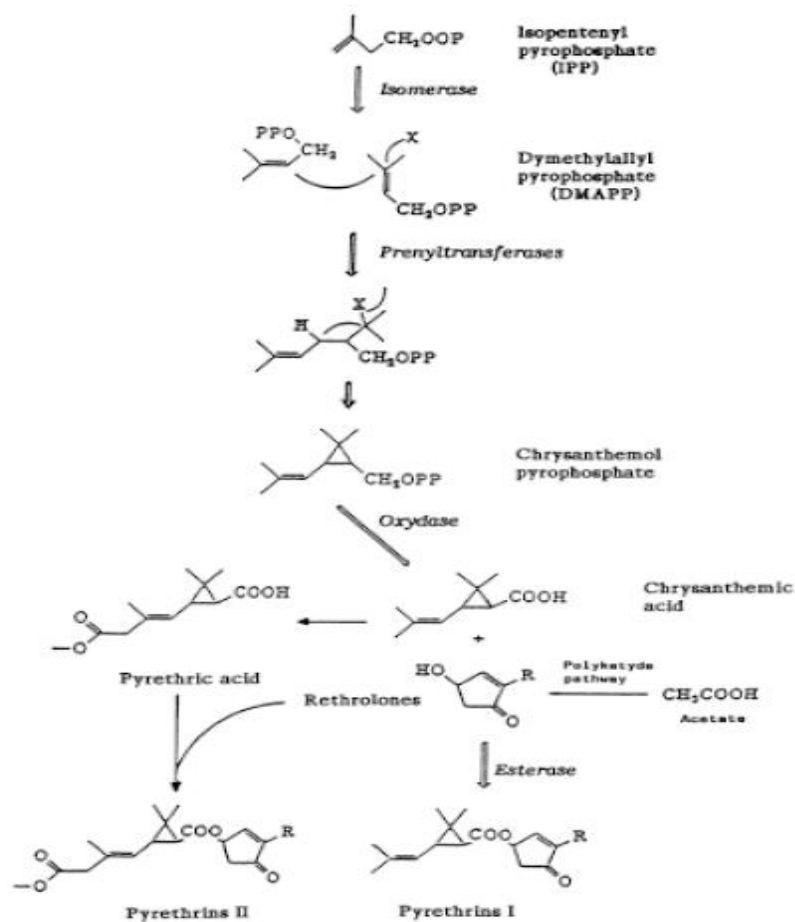
Figur 26: Biosyntese av syre delen av pyretrinI (1) via mevalonat veien og den mevalonat uavhengige veien. Åpne og lukkede symboler viser ^{13}C merke fra [^{13}C]D-glukose (7) i komponenter fra respektive mevalonat og den mevalonat uavhengige veien. Hentet fra Matsuda et al. 2005)

Pyretrolon, ketoalkohol delen av pyretrin I, tros være generert fra cis-jasmon eller fra 7-hydroksy-jasmon syre, som er umettet og dekarboksyleres videre for å gi jasmolon. Ettersom ikke bare cis-jasmon, men også oppstrøms komponentene 12-oxo-fytodienoic syre og jasmonic syre biosyntetiseres fra linolen syre, så biosyntetiseres pyretrolon trolig fra linolen syre. Imidlertid er det ikke gjort noen overbevisende studier på dette området. Resultatene til Matsuda et al. foreslår at syre delen syntetiseres fra MEP via den mevalonat uavhengige

veien, mens alkohol delen trolig stammer fra linolen syre via oktadecanoid veien (Matsuda, et al., 2005).



Figur 27: Biosyntese av alkohol delen av pyretrin I via linolen syre. Lukket ¹³C merke fra [1-¹³C]D-glukose (7), hentet fra Matsuda et al. 2005).



Figur 28: Biosyntese vei for pyretrin, hentet fra Hitmi et al. 2000.

Krysantemin syre er et monoterpen som dannes i den isoprene veien fra acetat via mevalonic lakton. Retrolon delen av pyretrinene kommer fra acetat, som man tror inkorporeres via polyketid veien. Et forslag til molekylær nøkkel er at 12-oxofytodienoic syre er et resultat av linolen syre 13-hydroksyperoksid, som danner jasmonic syre og som i sin tur gir pyretrolon og jasmolon (Crowley, et al., 1962; Hitmi, et al., 2000).

Zito et al. undersøkte innholdet av pyretriner og deres monoterpene forløpere i udifferensiert kallus, små planter og blader til tre år gamle drivhus dyrkede *Chrysanthemum cinerariaefolium* ved hjelp av gasskromatografi og massespektroskopi. Krysantemyl alkohol ble funnet i alle tre vev. Geraniol var til stede i blad og små planter, men kunne ikke detekteres i kallus. De små plantene hadde mer enn 20 ganger høyere innhold enn bladene. Nerol ble ikke funnet i noen av vevene. Det var like mye krysantem syre (CMA) og krysantemum dikarboksyll syre (CDA) i bladene og de små plantene. Kallus inneholder ca 10 ganger mer CDA enn CMA på tørrvektsbasis. Udifferensiert kallus produserte ingen detekterbare mengder av pyretriner. Blad og små planter inneholdt alle seks pyretriner. Disse resultatene indikerer at udifferensiert kallus produserer de monoterpene forløperne til pyretrinene, men mangler evne til å produsere pyretriner (Zito & Tio, 1990).

Kueh et al. studerte produksjonen av pyretriner og deres forstadium krysantemin syre i vevs kulturer fra *Chrysanthemum cinerariaefolium*, som ble analysert ved hjelp av TLC, GLC og GC-MS. Kulturer fra kallus og differensierte røtter inneholdt ikke pyretriner, mens differensiert kallus fra skudd produserte pyretriner. Krysantemin syre ble isolert fra ekstrakten av kallus kultur. ¹⁴C-mediert krysantemin syre ble tilsatt en celle suspensjon av *Chrysanthemum cinerariaefolium* og viste at denne syren akkumulerer i stor grad som glykosid ester (Kueh et al., 1985).

7.6.3 Stabilitet

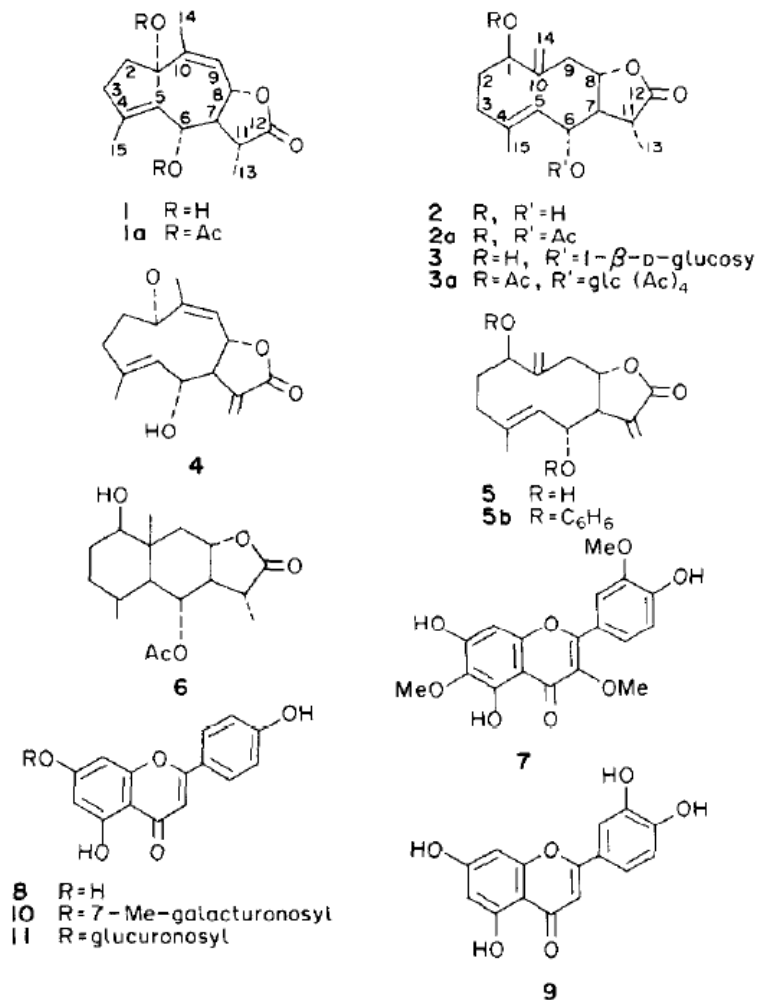
Pyretrinenes ustabilitet i lys forhindrer formulering av pyretriner av lengre varighet og deres effekt er tidsbegrenset. Akutt toksisk dose for mennesker er neglisjerbar (LD₅₀ ca. 2g/kg) og deres ustabilitet utelukker muligheten for kumulative effekter. De naturlige estrene viser ingen evne til resistensutvikling. For å øke aktiviteten og forsinke detoksifisering av insektene er det vanlig å lage formulering med pyretriner sammen med synergister så som piperonyl butoksid (Bruneton, 1995).

Atkinson et al. studerte hvilke faktorer som påvirker nedbrytningen av pyretriner ved lagring. Temperatur var den mest kritiske faktoren. Degraderingshastigheten av pyretriner økte signifikant med økning i temperaturen. Fukt og oksygen forårsaket ikke nedbrytning av pyretriner. Sterilisering med γ -stråling bidrar også til at pyretriner degraderer i signifikant grad. Denne degraderingen synes å være hemmet i nærvær av fuktighet. Mikrober ble ikke funnet å være direkte involvert i degraderingsprosessen. Tap av pyretriner var relatert til pyretrin I og II estere. Pyretriner viste seg å degradere raskt ved pulverisering av planten, hvilket kan tyde på at innholdet av pyretriner blir bevart og beskyttet, kjemisk eller fysisk, av strukturer i planten (Atkinson et al., 2004).

Staba et al. testet hvordan lysforholdene påvirket kulturer av *Chrysanthemum cinerariaefolium* skudd. Skudd som fikk vokse under lyse forhold hadde høyere innhold av pyretriner enn skudd som vokste under mørkere forhold. Studien gav ikke svar på hva som er optimale lysforhold (Staba et al., 1984).

7.6.4 Sesquiterpenlaktoner og flavonoider

Sashida et al. isolerte tre sesquiterpenlaktoner av germacranolidtypen fra blomstene til *Chrysanthemum cinerariaefolium*. I tillegg til de fra tidligere kjente sesquiterpenlaktone tartridin-A, tartridin-B, dihydro- β -cyclopyretrosin og flavonoidene jaceidin, apigenin, luteolin, apigenin-7-galakturon syre metyl ester og apigenin-7-glukuron syre. Alle de isolerte komponentene hemmet veksten av røtter til frøplanter fra kinakål. Blomsterhodene til *Chrysanthemum cinerariaefolium* ble ekstrahert med dietyl eter, varm metanol og kokende vann. Metanol ekstraktet hadde størst hemmende effekt på veksten av kinakål-frøplanter og ble videre separert ved hjelp av silika gel kromatografi som viste seg å inneholde 11 komponenter. Komponentene ble identifisert ved hjelp av IR, H-NMR og C-NMR (Sashida et al., 1983).



Figur 29: (11R)-11,13-dihydrotatrindin-A (1), (11R)-11,13-dihydrotatrindin-B (2), (11R)-6-O-β-D-glucosyl-11,13-dihydrotatrindin-B (3), tatrindin-A (4), tatrindin-B (5), dihydro-β-cyclopyretrosin (6), jaceidin (7), apigenin (8), luteolin (9), apigenin-7-galakturon syre metyl ester (10) og apigenin-7-glukuron syre (11), hentet fra Sashida et al. 1983.

7.6.5 Fenoler

Rao et al. ekstraherte tørkede *Chrysanthemum cinerariaefolium* med petroleum eter etterfulgt av alkohol. Dette ekstraktet inneholdt pyretrosin. Etter fordampning, saponifisering og kromatografering over en kolonne av silika gel ble det også isolert taraxasterol og acetat. Identiteten til disse stoffene ble bekreftet med TLC og IR. Alkoholekstraktet ble konsentrert under redusert trykk og ekstrahert videre med petroleum eter, eter og etylacetat. Eter og etyl acetat ekstraktet ble blandet, konsentrert videre og ristet med 5 % natriumkarbonat. Natriumkarbonat ekstraktet viste seg å inneholde fire fenoliske komponenter. Blandingen ble

løst i etylacetat og kromatografert over en kolonne av silika gel. Eluering med ulike løsemidler var som følger: Fraksjon A med etylacetat og benzen (5:95) inneholdt quercetagenin. Fraksjon B med etyl acetat og benzen (10:90) inneholdt apigenin. Fraksjon C med etylacetat og benzen (20:80) inneholdt luteolin. Fraksjon D med bare etylacetat inneholdt et triterpen og to flavonoide fenoliske komponenter som ved hydrolyse gav glukuron syre; en av aglykonene samstemte med luteolin ved TLC og dens glukuronid skulle derfor kunne være å finne i blomstene. Det gjenværende vandige alkoholekstraktet ble bearbeidet videre og viste seg ved hjelp av NMR å inneholde et glukuronid (Rao et al., 1973).

Videre gjorde man et eksperiment der man separerte randblomstene fra skiveblomstene. Ekstraktet av randblomstene inneholdt apigenin 4'-glukuronid og spor av fri apigenin, men ikke luteolin eller dets derivater. Ekstraktet av skiveblomstene inneholdt en blanding av glukuronider med lavt smeltepunkt, samt spor av flavoner som ble funnet i fraksjon A, men ikke apigenin eller dets glukuronid (Rao, et al., 1973).

7.6.6 Karotenoider

Head et al. undersøkte sammensetningen av karotenoider i blomsterhodene fra *Chrysanthemum cinerariaefolium* fra ulike stadier i modningsprosessen. Mer enn 90% av karotenoidfraksjonen viste seg å være relatert til cis og trans isomere av xantofyll lutein, som i hovedsak forekom som diestre, men også som monoestre og frie dioler. Minst 38% av karotenoidene som fantes i de umodne blomsterhodene var til stede i forbindelse med pollen, som var rik på cis-lutein. Karotenoid innholdet i blomsterhodene øker raskt de første 12 dagene og holder seg rimelig stabilt i ca 7 dager for deretter å avta gradvis, og hovedsakelig begrense seg til mono og diesterfraksjonen. Under den raske økningen i diester fraksjonen dannes cis komponentene fortrinnsvis framfor trans komponentene. Etter hvert som blomsterhodene utvikler seg reduseres cis/trans ratioen fra over tre til nesten en. Disseksjon av de forenede støvknappene i knopp stadiet viser at mye av karotenoidfraksjonen er assosiert med det fullt utviklede pollenet. Pollendannelse i de små blomstene er ferdig rundt dag 16, da den første raden av skiveblomster åpner seg.

Etter hvert som hver enkelt skive blomst utvikler seg, åpnes blomsterkronen og pollenet slippes ut. Tap av en mengde pollen skjer i løpet av få timer. Videre tap av karotenoider

skjer når den åpne blomsterkronen til skiveblomsten visner. Således reduseres karotenoidene både ved fysisk tap av pollen og fotolyse oksidasjon av blomsterkronen etter hvert som skiveblomstene modnes. Minst 38% av karotenoidene som var til stede var assosiert med pollen. Lutein diester fraksjonen som ble isolert fra pollen inneholdt mer enn 80% av cis isomeren. Den relative stabiliteten til cis- og trans-lutein diestrene ble sammenlignet ved å utsette de separate komponentene for sollys. Alt i alt var nedbrytningshastigheten lik for alle. 85-90% ble degradert etter 30 minutters eksponering for sollys. Degraderingsmønsteret var forskjellig mellom de to isomere. Cis formen gjennomgår ca. 50% omdannelse til trans formen. Omdannelse av trans- til cis-formen er ikke så markert. Effekten av denne forskjellen i degradering i en blanding av to isomere vil være et differensielt tap av cis komponenten framfor trans komponenten, i likhet med det som kan observeres i blomsterhodene som er under utvikling.

Etter hvert som blomsterhodene modnes øker innholdet av pyretriner, som er på sitt høyeste omtrent når halvparten av de små blomstene er åpne. Det er tydelig at innblanding av umodne blomsterhoder ikke bare senker utbyttet av pyretriner, men øker innholdet av karotenoider i oleoresinet. Karotenoidinnholdet av pyretrum oleoresin varierer mellom 1 og 2% w/w. Raffinert ekstrakt som inneholder 50% pyretriner inneholder ca. 0,04% karotenoider. Pyretrum resten, som er det materialet som blir igjen etter metanol ekstraksjon av pyretrum oleoresin, inneholder en økt mengde karoten og lutein diestre sammenlignet med oleoresin. Denne resten, som er lett tilgjengelig, representerer en verdifull kilde til lutein for karotenoid studier (Head, 1973).

7.6.7 Fettsyrefraksjon

Head isolerte fettsyrefraksjonen fra et uraffinert pyretrum ekstrakt som inneholder 30% pyretriner og metyl estrene ble separert ved hjelp av kolonne kromatografi på en silika gel i mettede eller olefine ikke-hydroksey syrer og en hydroksey syre fraksjon. Kombinerte fettsyrer representerte opp til 40% av pyretrum ekstraktet, ca 18% var ikke-hydrokseysyrer. Ikke-hydrokseysyrene ble analysert ved hjelp av gasskromatografi og det ble videre identifisert en serie normale mettede fettsyrer fra C₁₄ til C₅₀. Mesteparten av syrene var palmitin-, stearin-, olje-, linol- og linolensyre, som tilsammen utgjorde opptil 90% av ikke-hydrokseysyrene.

Pyretrum blomster fra klonalt opphav med innhold av ulike andeler av de seks insekticide komponentene hadde samme fettsyre sammensetning (Head, 1968, 1973).

Tabell 5: Fettsyresammensetningen til et kommersielt pyretrum ekstrakt som inneholder 30% pyretriner, hentet fra Head 1968.

Common Name	GLC Peak Ref.	Code	Acid, Wt. %	Distribution, %
Myristic	1	14:0	0.25	1.2
Pentadecanoic	2	15 (unsat)	0.02	0.1
	3	15 (br)	<0.01	
	4	15:0	0.05	0.25
Palmitic	5	16 (unsat)	0.04	0.2
	6	16 (br)	0.01	0.05
	7	16:0	4.64	22.8
Heptadecanoic	8	17 (unsat)	0.12	0.6
	9	17 (br)	0.02	0.1
	10	17:0	0.13	0.65
Stearic	11	18 (br)	0.04	0.2
	15	18:0	1.71	8.4
Oleic	12	18:1	2.09	10.3
Linoleic	13	18:2	6.62	32.5
Linolenic	14	18:3	2.94	14.5
Nonadecanoic	16	19 (unsat)	0.05	0.25
	17	19 (br)	0.01	0.05
	18	19:0	0.03	0.15
Arachidic	19	20 (unsat)	0.07	0.35
	20	20:0	0.34	1.7
Heneicosanoic	21	21:0	0.04	0.2
Behenic	22	22:0	0.37	1.8
Tricosanoic	23	23:0	0.07	0.35
Lignoceric	24	24:0	0.36	1.8
Pentacosanoic	25	25:0	0.05	0.25
Hexacosanoic	26	26:0	0.15	0.7
Heptacosanoic	27	27:0	0.02	0.1
Octacosanoic	28	28:0	0.07	0.35
Nonacosanoic	29	29:0	<0.01	
Triacontanoic	30	30:0	0.02	0.1
Total			20.34	

7.7 Kliniske studier

Det er funnet en klinisk studie i Sci Finder som er gjort på *Chrysanthemim cinerariaefolium*. Hadis et al. testet den frastøtende aktiviteten til oleoresin fra blant annet *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Blomstene ble tørket og pulverisert. Deretter ble oleoresiner fra pyretrum blomster ekstrahert med hexan. Oleoresin inneholder hovedsakelig eterisk olje og resin. Utbute av pyretrum fra oleoresiner var 3,7-4 %. Kokosnøtt olje ble brukt som løsningsmiddel ettersom den er bedre blandbar med oleoresin enn etanol. Subjektene ble randomisert i grupper og et egnet område på leggen ble valgt ut som stikksted og påsmørt oljen. Grad av frastøtende effekt ble målt som prosentvis beskyttelse ved å telle antall stikk

hvert andre minutt. Subjektene vekslet sitteplass for å unngå bias. Denne studien viste en 87,8-96,0 % beskyttelse av heksanekstraktet (Hadis et al., 2003).

7.7.1 Skabb

Strong et al. evaluerte randomiserte kontroll studier som omhandlet lokal og systemisk behandling for skabb. Resultatene viste en tendens til at lokal behandling med permetrin var å foretrekke med hensyn til effektivitet fremfor andre behandlingsmetoder som ble testet mot skabb. Imidlertid viste de evaluerte studiene en stor heterogenitet som i hovedsak kan tilskrives kliniske og metodiske forskjeller, og som derfor bør tolkes med forsiktighet. Permetrin er en syntetisk pyretrin analog. Studien konkluderer med at lokalbehandling med permetrin synes å være den mest effektive behandlingen mot skabb, men at det trengs å gjøres flere studier for å evaluere om blant annet permetrin er mer effektiv enn malation, samt den relative effektiviteten til behandling med urter. Den beste behandlingen mot skabb er ennå ikke klarlagt, sikkerheten tatt i betraktning (Strong & Johnstone, 2009).

7.8 Biologiske studier

Pyretrin I og II er sterkt insekticide. Cinerin I og II samt jasmolin I og II er mye mindre bioaktive (Hitmi, et al., 2000).

Pyretriner er toksiske for kaldblodige dyr så som fisk, amfibier og insekter. Pyretrin I er kjent for å ha en god lammende effekt, mens pyretrin II har en bedre dødelig effekt på insektene. Metyl estrene til komponentene i II serien degraderes raskt av nervecellene til insektene. Av denne grunn er den letale effekten svak, mens den paralyserende effekten er stor. Derimot er den lammende effekten til estrene i I serien mindre uttalt, men de har en større stabilitet som dermed øker deres letale effekt. Pyretriner har også en frastøtende effekt på insektene (Bruneton, 1995). Den frastøtende effekten kan være mer viktig enn selve den dødelige effekten når det gjelder å beskytte matvarer (Hitmi, et al., 2000). Pyretriner og pyretroider er mye mindre giftige for mennesker enn for insekter også på grunn av rask nebyrning i leveren (esterhydrolyse) (Eiring, 2009).

Naturlige pyretriner virker raskt og de virker på to måter, lammende og dødelig. Den lammende effekten inntreer innen få minutter og gir tidlig paralyse av insekter. Drap inntreer

flere timer etter behandling. Pyretriner er vist å virke på neuronale spenningsfølsomme natriumkanaler (Söderlund & Bloomquist, 1989). Pyretriner og pyretroider virker på natriumkanaler og fører til hypereksitabilitet i nervesystemet til insektene slik at de blir lammet eller dør. Pyretriner er nervegifter som virker på sensoriske så vel som på motoriske fibre, og forårsaker tap av koordinering, hyperaktivitet, paralyse og død hos insektene. Eksperimenter med aksoner fra kakerlakker viser at de holder kalsiumkanalene åpne og således forårsaker en kontinuerlig serie med aksjonspotensialer og induserer et tap av eksitabilitet som kan være irreversibel (Bruneton, 1995).

7.8.1 Antimykobakteriell aktivitet

Rugutt et al. testet antimykobakteriell aktivitet av pyretrin I og II isolert fra *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Stammløsning (10,24 mg/ml) av testkomponent ble blandet i DMSO og filtersterilisert. Like deler (50 µL) av hver løsning ble tilsatt 4 ml frisk BACTEC 12B næringsmedium som inneholdt sensitive stammer av *Mycobacterium tuberculosis* (MDR). Droge og bakterie kontroller var inkludert. Bioassayene fikk stå i 10 dager.

Antimykobakteriell aktivitet av blomsterekstraktene og rene pyretriner er uttrykt som respektive prosentvis hemming og minste hemmende konsentrasjon (MICs). MIC er definert som den laveste konsentrasjon som hemmer veksten av 99 % av bakteriene. De fraksjonene som var mest aktive ble kromatografert og viste seg å inneholde PI og PII som hovedkomponenter. Det er fra tidligere kjent at den insektiside aktiviteten til pyretrum ekstrakt primært skyldes hovedkomponentene PI og PII.

Preliminære korrelasjoner av strukturelle trekk og MIC foreslår at tilstedeværelse av en ester del i PII øker in vitro antimykobakteriell aktivitet. Forskjellene i MIC foreslår likevel at likhet i struktur ikke er en tilstrekkelig forutsetning for den antimykobakterielle effekten. Derfor behøver ikke strukturene til PI og PII representere den aktive konformasjonen i løsning. Den spesifikke potente effekten til PI og PII er interessant nok til å berettige detaljerte studier i framtiden. Videre strukturell modifisering og testing av naturlige pyretriner er på gang for å forsøke klarlegge den aktive funksjonelle gruppen (Rugutt, et al., 1999).

7.8.2 Herpes simplex

Stanberry et al. testet pyretriner som var ekstrahert fra *Chrysanthemum cinerariaefolium* på cellekulturer som var tilsatt herpes simplex virys (HSV) uten å finne noen aktivitet. Heller ikke ble det funnet noen effekt mot HSV i forsøksdyr randomisert i tre grupper som fikk enten orale pyretriner, alkohol placebo eller ingen behandling. Terapien varte i 10 dager. Resultatene viste ingen forskjell på klinisk sykdom mellom de tre ulike gruppene (Stanberry et al., 1986).

7.8.3 Konserveringsmiddel

Dunkel et al. undersøkte de estetiske egenskapene samt hardheten til kokte bønner etter at de hadde vært lagret i 2 år. Bønnene *Phaseolus vulgaris* L. fra Rwanda var blandet med et tørrekstrakt av blomstene til *Chrysanthemum cinerariaefolium* under lagringstiden for å beskytte mot skade fra insekter. Bønnene som var blandet med det inseticide ekstraktet ble sammenlignet med andre bønner som var å få kjøpt på det ordinære markedet i Rwanda, og ble ansett for å være av god kvalitet. Et trenet sensorisk panel vurderte bønnene som var lagret i blanding med *C.cinerariaefolium* som like akseptable etter 8 måneder som de andre bønnene som ble solgt på markedet i Rwanda og var behandlet med et standard insekticid bestående av 0,01% w/w pirimifos metyl i en pulverformulering. Hardhet (antall bønner av 100 bønner som krevde en punkterings kraft på mer enn 450g) var akseptabel både for bønnene som ble lagret med *C.cinerariaefolium* og for bønnene som var lagret med det konvensjonelle pirimenthos mentyl etter 20 måneders lagringstid. *C.Cinerariaefolium* hadde ingen merkbar effekt på kokeegenskapene eller hardheten til bønnene etter 24 måneders lagringstid (Dunkel et al., 1995).

7.9 Toksikologi

Kim et al. studerte toksikokinetiske egenskaper og distribusjonen av deltametrin (DLM), en syntetisk pyretroid analog, i rotter. DLM ble raskt absorbert fra GI traktus. Maks konsentrasjon i blod skjedde innen 1-2 timer, men biotilgjengeligheten var bare 18 %. 83 % av DLM i blodet var til stede i plasma. Kun 0,1-0,3 % av systemisk absorbert dose ble

gjenfunnet i hjernevev. Fett, hud og muskelvev akkumulerer store mengder av den meget lipofile kjemiske substansen og virker som slow release depot. Mye gjenstår med hensyn til å klarlegge de farmakokinetiske egenskapene til DLM og andre pyretroider i dyr og mennesker (Kim et al., 2007). Pyretroider induserer og/eller inhiberer cytokrom P450 enzymer (Anadón et al., 2009).

Anadón et al. undersøkte toksikokinetikken til permetrin i rotter. Den orale biotilgjengeligheten til permetrin ble funnet å være ca 61%. Permetrin akkumulerer i hjernevev og dens metabolitter ble detektert i plasma og hjernevev 48 timer etter administrering (Anadón et al., 1991).

Osimitz et al. undersøkte registrerte tilfeller assosiert med regulerte insekticider som inneholdt pyretriner og piperinyl butoksid (PY/PBO) fra 2001 til 2003, og som var rapportert gjennom American Association of Poison Control Centers (AAPCC) Toxic Exposure Surveillance System (TESS[®]). Spesiell oppmerksomhet ble gitt til reaksjoner fra hud og luftveier. Selv om det er knyttet begrensninger til TESS data, konkluderer studien med at

- På tross av utstrakt bruk, så var antall tilfeller av rapporterte moderate eller alvorlige hendelser relativt sjeldne (717 moderate og 23 alvorlige utfall av totalt 17873 registrerte).
- Alvorlige reaksjoner fra hud eller luftveier var meget sjeldne ved bruk etter etterfulgt bruksanvisning (hud – 17 moderate og 1 alvorlig; luftveier – 18 moderate og 0 alvorlige).
- Det ikke er uvanlig at astmatikere og personer som har overfølsomhet mot ragweed (*Ambrosia artisifolia*) også er overfølsomme for PY/PBO.

Data indikerer at PY/PBO produkter kan brukes med en relativt lav risiko for alvorlige effekter, tatt i betraktning den utstrakte bruken. Data antyder også at det er liten sannsynlighet for at disse produktene forårsaker reaksjoner hos allergikere eller astmatikere (Osimitz et al., 2009).

En evidensbasert review artikkel av antatt allergisk kontakt dermatitis konkluderte med at det ikke er bevis for at eksponering for pyretriner gir allergisk kontakt dermatitis eller

kryssreaksjoner i ragweed sensitive personer. Osimitz et al. rapporterte at dagens raffinerte ekstrakter har lavere nivå av den antatte hudsensitiviserende pyretrum sammenlignet med pulverisert pyretrum av blomster eller ekstrakter som ble brukt tidligere på 2000-tallet (Osimitz & Franzosa, 2006).

En annen evidence basert review artikkel kunne heller ikke se en klar årsakssammenheng mellom pyretriner og kontakt urikaria (type 1 hypersensitivitet) (Franzosa & Osimitz, 2007).

WHO (World Health Organization) og FAO (Food and Agriculture Organization) Joint Meetings on Pesticide Residues har gjort detaljerte reviews på toksikologien til pyretriner. Deres toksikologiske evaluering estimerer ADI (acceptable daily intake) for mennesker til å være 0-0,04 mg/kg kroppsvekt. Den estimerte akutte referansedosen (RfD) er satt til 0,2 mg/kg kroppsvekt (Solecki, 1999; Pfeil, 2003).

Pyretrum er irriterende for øyne og mucosa. Hypersensitivitets reaksjoner har vært rapportert (Martindale, 2002). Vanlige tegn på forgiftning med pyretriner og pyretroider ved svelging er magesmerter, oppkast og diaré. Bevisstløshet og kramper kan inntre ved inntak av større mengder (Giftinformasjonen, 2008). Absorpsjonen av pyretriner er lav. Pyretrinene absorberes lett og raskt etter inntak, men har liten absorpsjon gjennom huden. Den perorale toksiske dosen for pyretriner er estimert til 100-1000 mg/kg (Eiring, 2009).

7.10 Diskusjon

Blomstene fra *Chrysanthemum cinerariaefolium* skal i følge Nordals Burma herbarium ha vært brukt som insektsmiddel og som middel mot parasitter. Kjemiske studier viser at *Chrysanthemum cinerariaefolium* inneholder pyretriner. Det er gjort en del forskning på pyretriner. Man kjenner virkningsmekanismen til pyretrinene. Det er også forsket en del på hvordan man kan øke utbyttet av pyretriner i avlingen, og man vet hvilke faktorer som påvirker stabiliteten av pyretrinene ved lagring. Temperaturen er den mest kritiske faktoren for stabiliteten til pyretrinene. Pyretriner er derfor mer toksiske for insekter en for varmblodige dyr og mennesker. ADI for mennesker er 0,04 mg/kg kroppsvekt. Absorpsjon, distribusjon, metabolisme og utskillelse er ikke så godt klarlagt i mennesker ettersom det er et nevrotoksisk stoff.

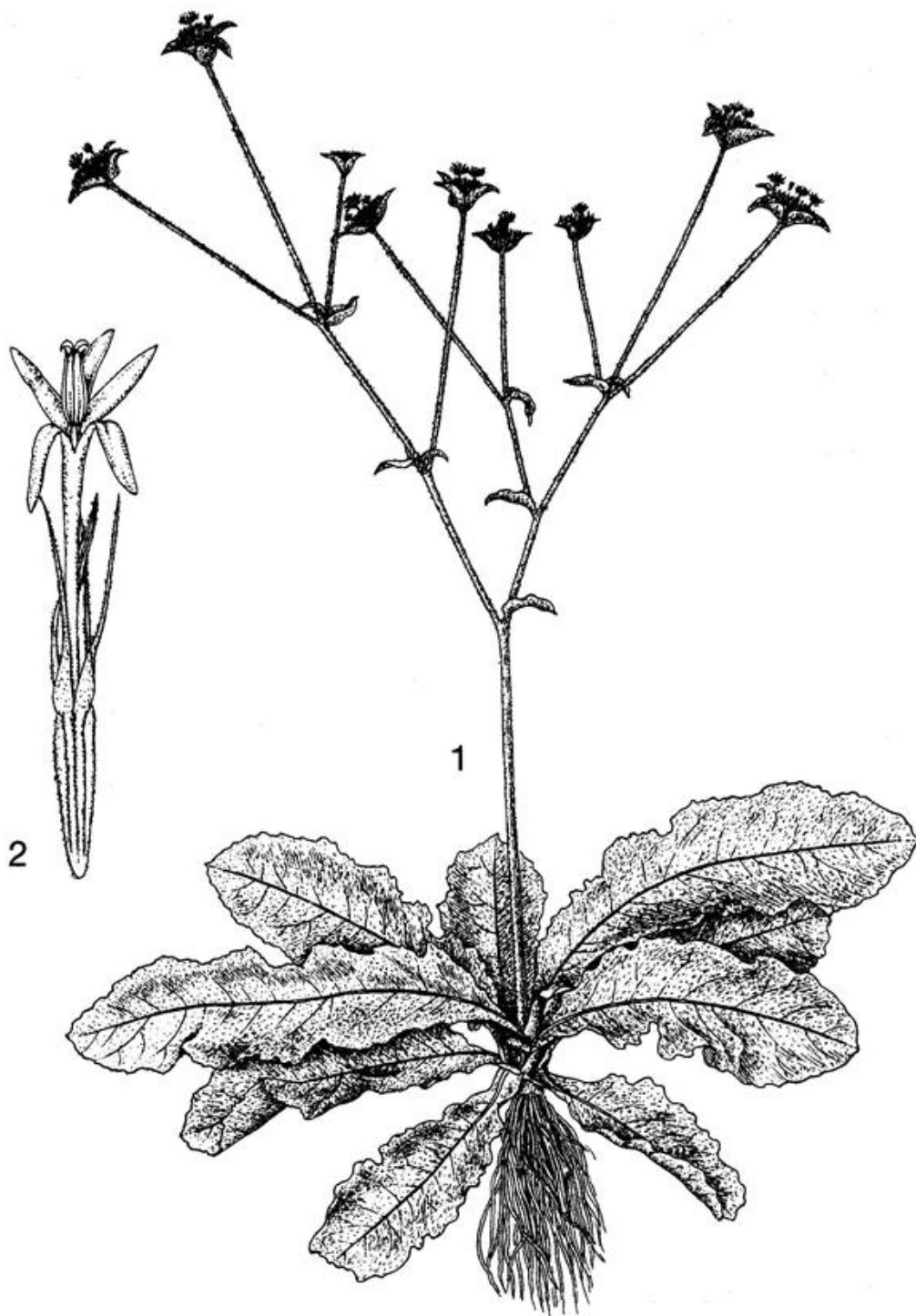
I en Cochrane rapport hvor man evaluerte lokal og systemisk behandling med ulike insektmidler mot skabb fra randomiserte kontrollerte forsøk ble det konkludert med at permetrin synes å være mest effektiv som lokalbehandling mot skabb. Denne review artikkelen har ikke konkludert i forhold til hvilket middel som er best i forhold til sikkerhet og bivirkninger.

Generelt anses pyretriner for å være mer toksiske og mer stabile enn pyriner. Den raskt nedbrytende egenskapen til pyretrinene gjør de akseptable som et trygt og sikkert alternativ til andre pesticider, men det er vanskelig å formulere stabile forbindelser som er holdbare over en lengre tidsperiode. Det gjenstår imidlertid flere studier for å undersøke om de naturlige pyretrinene er et tryggere og sikrere alternativ enn permetrin og andre insekticider, spesielt med tanke på hypersensitivitetsreaksjoner.

7.11 Konklusjon

Det er dokumentert at pyretriner og pyretroider er insekticide og virker mot skabb. Det gjenstår imidlertid å klarlegge hvilke insektmidler som er best i forhold til både effektivitet og sikkerhet.

8. *Elephantopus scaber* L.



Bilde av *Elephantopus scaber*, hentet fra (Unesco, 1998).

8.1 Sammendrag

Elephantopus scaber er en plante som er brukt i tradisjonell medisin i asiatiske land, India, Afrika og Brasil mot en rekke plager som for eksempel nefritt, smerter i brystet, og utvortes på sår. Hovedkomponentene i planten er elefantopin, triterpener, stigmasterol, epofriedelinol og lupeol. Det er funnet komponenter i planten som er vist å ha en antibakteriell og sårhelende effekt, men det er gjort få biologiske studier på dette området. Det er imidlertid en mulighet for at en eventuell antibakteriell effekt kan forklare den tradisjonelle bruken ved lidelser som er forårsaket av en bakterieinfeksjon. Det gjenstår mye forskning for å klarlegge en rekke spørsmål i forhold til bruken av denne planten i tradisjonell medisin.

8.2 Taksonomiske betegnelser

Botanisk navn: *Elephantopus scaber* L.

Klasse: Equisetopsida C. Agardh

Underklasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Orden: Asterales Link

Familie: Asteraceae Bercht. & J. Presl

Genus: *Elephantopus* L.

Synonym: *Asterocephalus cochinchinensis* Spreng., *Scabiosa cochinchinensis* Lour.
(Tropicos. org., 2010f).

Burmesisk navn: Katoopin

8.3 Botanikk og flora

Elephantopus scaber er en flerårig lodden urt med stilk fra en treen rotstokk. Røttene er tallrike og læraktige. Planten kan ha en eller flere stilker som forgrener seg oppover, er tett behårete og kan være stive på øverste del av stilken og grenene. Bladene sitter i forgreningspunktet. De basale bladene er 6-60 x 1,5-10 cm smalt eggformede eller ovale-elliptiske, avrundede i spissen, kileformede til smale under og med en midtrand som fortsetter til bladstilken. Basen av bladene omfavner stilken i mer eller mindre grad, kanten har små avrundede tenner, bladplaten er noe skurvete til nesten hårløs med spredte 1-2 mm børsteaktige hår. Bladene på den øverste delen av stammen er 1-5 i antall og mindre enn de basale bladene, sitter direkte på stilken og folder seg sammen på langs til skjermblad.

Blomsterhodet sitter i klaser på flere grener som er 3-11 cm lange. Blomsterhodene er 1,2-3 cm i diameter. Det er ca 4 små blomster samlet per blomsterhode. Dekkbladene er 7-10 x 2-3 mm, smale, eggformede til sylindriske. De små dekkbladene sitter sammen to og to med 4 dekkblad i hver bunt, og er avlange til lansettformede. Blomsterkronen er purpurfarget, 4,5 – 7 mm, smalt tunnel formet, 5- bladet, kjertelaktig ved spissen, ellers hårløs. Akenene er 3-4 mm smalt spoleformede og 10-ribbede, med små stive hår hovedsakelig på ribbene. Pappus består av 7-10 elementer med 3.5-6 mm overlappende og små stilker som smalner av (Beentje, 2000).

8.4 Tradisjonell bruk

Elephantopus scaber er brukt i Kinesisk tradisjonell medisin til behandling mot nefritt, ødem, forkjølelse, smerter i brystet, feber og hoste ved pneumoni, skabb og leddsmerter på grunn av traume. Den har også vært populær som medisinsk urt i mange sørøstasiatiske land, Latin Amerika og Afrika. I Brasil er infus og dekokt av planten brukt som vanndrivende middel, febernedsettende middel samt for å eliminere blæresten (Poli et al., 1992; Wang et al., 2005; Liang et al., 2008). Den er også brukt som styrkende middel (tonikum), mot innvollsorm og ulike mageplager (Sim & Lee, 1969). Planten er også rapportert å inneha adstringerende, antimikrobielle, hjertestyrkende og anticancer egenskaper (Pazhani et al., 2000).

Singh et al. oppgir at røttene ble brukt som antipyretikum, hjertestyrkende middel og diuretikum. Dekokt av røttene og bladene brukes som lindrende middel og gis ved dysuri, diaré, dysenteri og ved magesmerter. Vannekstraktet av bladene brukes utvortes på sår og eksem. Hele planten bløtlegges og appliseres deretter på sårflaten for å fremme sårheling (Singh et al., 2005). Planten har vært brukt i India som smertestillende middel, diuretikum, adstringerende og kvalmestillende middel, og bladene er brukt ved tilstander som bronkitt, kopper, diaré og som styrkende middel for hjernen (oversatt fra ”brain tonic”) (Avani & Neeta, 2005). Rajesh et al. oppgir at *Elephantopus scaber* virker kjølede, adstringerende og god for hjertet. Den brukes i behandling av sår, sprukne lepper, gonoré, reumatisme, tetanus, artritt, dysenteri, filariasis (en parasitt), hjerte problemer, lever plager, kolikk smerter og diaré, samt at roten brukes til behandling av lever forstyrrelser (Rajesh & Latha, 2001).

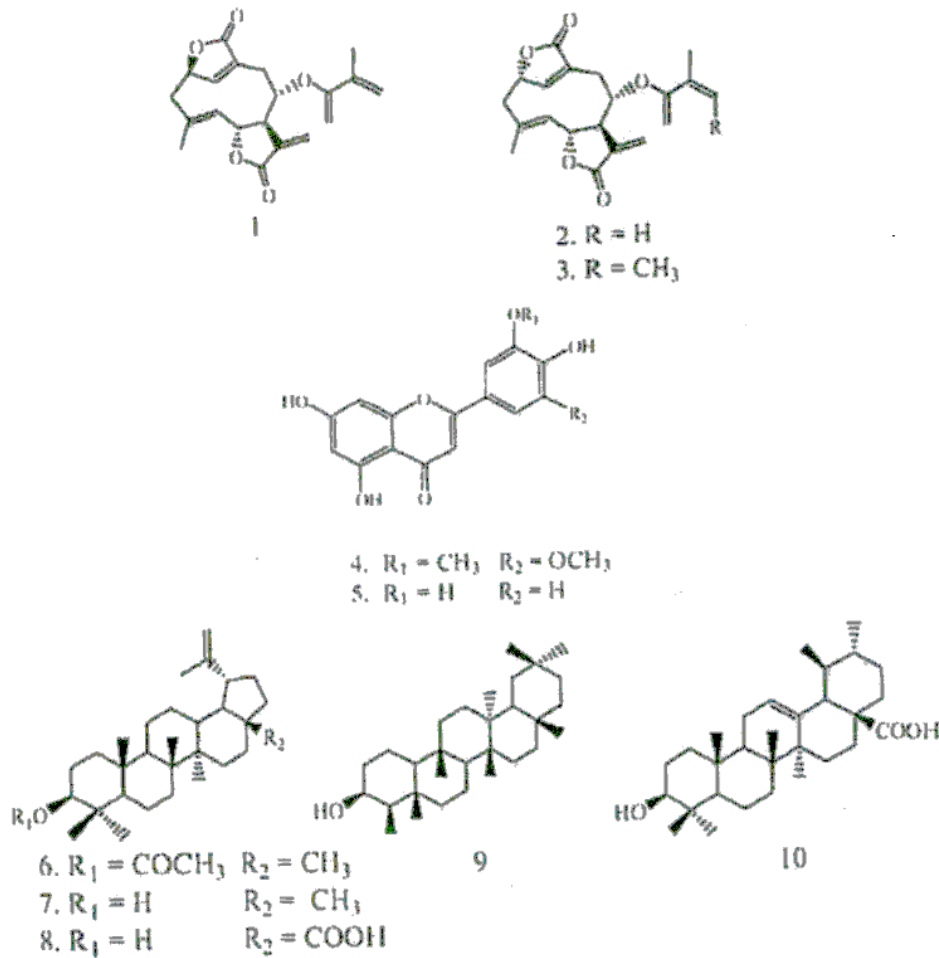
Et dekokt av bladene fra *Elephantopus scaber* drikkes varm i en mengde på en kopp tre ganger daglig ved feber. Bladene legges i kokende vann og dampen inhaleres for å lindre symptomer ved lunge katarr. Den ferske juicen av bladene drikkes ved nyresten og den ferske juicen drikke tre ganger daglig som laksantia (Hammer & Johns, 1993). Nordals Burma herbarium oppgir at rot og urt fra *Elephantopus scaber* har vært brukt som antipyretikum, analgetikum og tonikum.

8.5 Kjemiske studier

Preliminære fytokjemiske analyser av Poli et al. viste at både det vandige ekstraktet og hydroalkohol ekstraktet av *Elephantopus scaber* inneholdt alkaloider, auroner, chalconer, steroider/triterpenoider og sesquiterpen laktoner. Flavonoider ble kun observert i det vandige ekstraktet. Antocyaniner, antranoider, hjerte glykosider, kumariner, leukoantocyanidiner, saponiner og tanniner ble ikke observert i verken vannekstraktet eller hydroalkohol ekstraktet (Poli, et al., 1992).

Hammer et al. gjorde ekstraksjoner av blant annet *E.scaber* og fant triterpenoider i kloroformekstraktet og etyl acetat ekstraktet. I tillegg ble det funnet tanniner i vannekstraktet. Alkaloider, katekiner, flavonoider, hjerteglykosider, purin alkaloider og sesquiterpener ble ikke funnet verken i vannekstraktet, heksanekstraktet, kloroformekstraktet, etylacetat ekstraktet eller etanolekstraktet (Hammer & Johns, 1993).

Su et al. isolerte flere komponenter fra den virksomme fraksjonen av etanolekstraktet fra *Elephantopus scaber* (Su et al., 2009). Den kjemiske strukturen av disse er vist i figur 30.



Figur 30: Kjemiske strukturer som er isolert fra etylacetat fraksjonen fra etanolekstraktet av *Elephantopus scaber*, hentet fra Su et al. 2009. Disse er i nummerert rekkefølge: deoksyefantopin (1), isodeoksyefantopin (2), scabertopin (3), tricin (4), luteolin (5), lupeol acetat (6), lupeol (7), betulin syre (8), epifriedelanol (9) og ursol syre (10).

8.5.1 Eterisk olje

Wang et al. analyserte den eteriske oljen fra *Elephantopus scaber*. Planten ble innsamlet fra Sør-Kina, tørket og damp destillert i 3 timer. Råoljen ble deretter analysert ved hjelp av GC-MS på silika gel kolonne. Den gule eteriske oljen utgjorde ca. 0,05 % v/w. Totalt ble 21 komponenter identifisert til å utgjøre 93,3 % av oljen. Hovedkomponentene var palmitin syre (hexadecanoic acid) (42,3 %), isopropyl dimetyltetrahydro-naftalenol (14,1 %), β -sesquifelandren (8,3 %), linolsyre (octadecadienoic acid) (5,5 %) og fytol (5,2 %) (Wang et al., 2004).

Tabell 6: Kjemiske innholdsstoffer funnet i den eteriske oljen til hele planten av *Elephantopus scaber* fra Sør-Kina. Tabellen er hentet fra Wang et al. 2004.

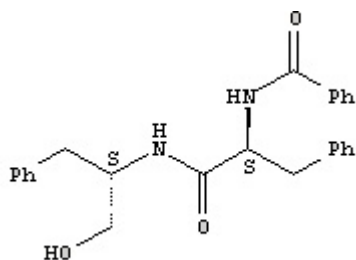
Compound	Content (%)
Cyclosativene	0.9
Copaene	0.2
Isopropyl dimethyl hexahydronaphthalene	4.2
Zingiberene	0.2
Trimethyl dimethylenedecahydronaphthalene	1.8
Caryophyllene	0.8
Dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)-2-norpinene	0.8
β -Sesquiphellandrene	8.3
β -Caryophyllene	0.8
Isocaryophyllene	1.4
α -Santalol	0.4
Ledol	1.2
α -Bisabolol	1.7
Caryophyllene oxide	1.3
Cadinol	0.7
β -Bisabolol	2.2
Isopropyl dimethyl tetrahydronaphthalenol	14.1
Hexahydrofarnesyl acetone	0.3
Hexadecanoic acid	42.3
Phytol	5.2
Octadecadienoic acid	5.5

Wang et al. undersøkte også den kjemiske sammensetningen av oljen fra bladene til *Elephantopus scaber* L. innsamlet fra 12 steder i Sør-Kina. Komponentene ble ekstrahert fra bladene med diklormetan (CH_2Cl_2) og filtrert. Identifisering av komponentene ble gjort ved å sammenligne GC-MS resultatene med data fra en spektrometer database. Det ble detektert totalt 24 komponenter hvorav 20 ble identifisert. Hovedkomponentene var palmitinsyre (8,19-39,22 %), linolsyre (spor-29,22 %), *n*-pentadekan (3,22-12,05), *n*-hexadekan (2,38-16,26 %), *n*-heptadekan (2,48-15,32 %), *n*-oktadekan (1,39-9,59 %) og tetrametylhexadecenol (2,06-4,31 %). I tillegg ble følgende komponenter identifisert i mindre mengder: dimetyldekan, trimetyldodekan, metylpropylnonan, dimetyldodekan, *n*-tetradekan, caryofyllen, β -sesquifellandren, *z*-metylheptadekan, myristin syre (myristic acid), tetrametylhexadecen, *n*-nonadekan, *n*-eikosan og fytol (Wang, et al., 2005).

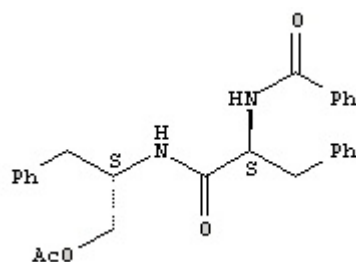
8.5.2 Aurantiamider

Lian et al. isolerte og identifiserte to dipeptider ved navn aurantiamid og aurantiamid acetat fra planten *Elephantopus scaber*. Det ble brukt en kromatografisk metode på silika gel og strukturen ble bestemt ved å sammenligne IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2D-NMR og MS

spektral analyser og fysiokjemiske egenskaper. Kun abstraktet fra denne artikkelen er tilgjengelig på engelsk (Liang et al., 2002) .



Figur 31: Kjemisk struktur av auranthamid hentet fra Liang et al. 2002 og kopiert fra Sci Finder. Andre navn for auranthamid er: Benzenepropanamid, α -(benzoylamino)-N-[(1S)-1-(hydroksymetyl)- α -fenyletyl]-, (α S)- og α -(benzoylamino)-N-[1-(hydroksymetyl)-2-fenyletyl]-,[S-(R*,R*)].

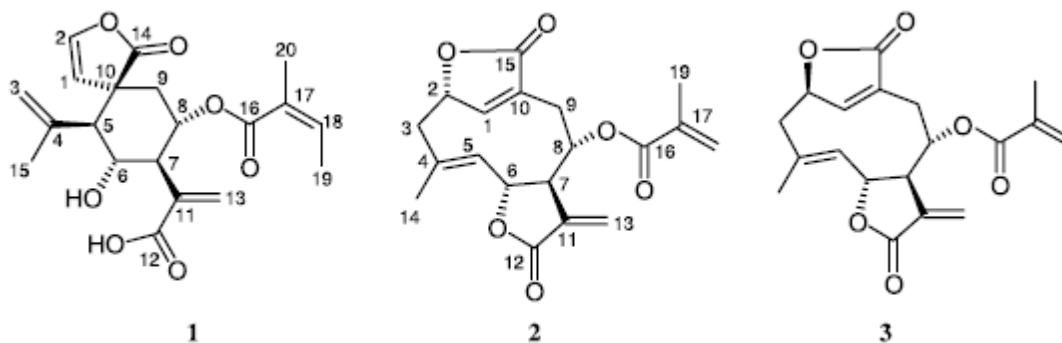


Figur 32: Kjemisk struktur av auranthamid acetat hentet fra Liang et al. 2002 og kopiert fra SciFinder. Andre navnt for auranthamid acetat er: Benzenepropanamid, N-[(1S)-1-[(acetyloksy)metyl]-2-fenyletyl]- α -(benzoylamino)-, (α S)- og N[1-[acetyloksy)metyl]-2-fenyletyl] α -(benzoylamino)-,[S-(R*,R*)]; Asperglaucid; Lyciumamid.

8.5.3 Sesquiterpen laktoner

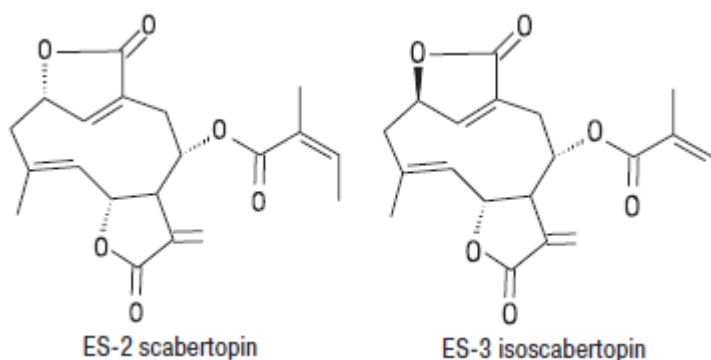
Elemanolider og Elefantopiner

Liang et al. isolerte et elemanolid sesquiterpenlaktone ved navn elescaberin, og to fra tidligere kjente komponenter isodeoksyelefantopin og deoksyelefantopin fra etanolekstraktet av planten *Elephantopus scaber*. Den kjemiske strukturen til elescaberin ble klarlagt ved hjelp av spektroskopiske analyser (HR-ESI-MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, IR, $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$, HMQC, HMBC NOESY) (Govindachari et al., 1970; Govindachari et al., 1972; Liang, et al., 2008).



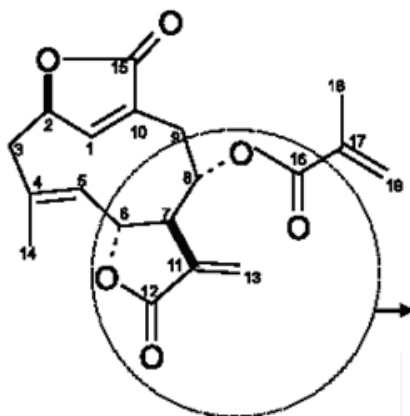
Figur 33: Kjemisk struktur av elescaberin (1), isodeoksyefantopin (2) og deoksyefantopin (3), hentet fra Liang et al. 2008.

Liang et al. identifiserte og strukturbestemte i tillegg scabertopin og isoscabertopin ved hjelp av NOESY teknikk (Liang & Shi, 2003, 2004; Xu et al., 2006).



Figur 34: Kjemisk struktur av scabertopin og isoscabertopin hentet fra Xu et al. 2006.

Singh et al. isolerte en komponent deoksyefantopin fra etanolekstraktet av den overjordiske delen av *Elephantopus scaber*. Residuet fra etanolekstraktet ble fordelt mellom vann og kloroform (1:2) og kloroformdelen ble separert og konsentrert på vannbad for å få en mørk grønn sirup. Kloroformekstraktet ble så fordelt mellom heksan og 10 % vandig metanol (2:1). Det vandige metanolekstraktet ble separert og vasket 3-4 ganger med heksan og deretter inndampet. Resten ble kromatografert på silika gel kolonne og eluert med heksan og etyl acetat med varierende ratio på 1:1, 1:2 og 1:4. En av fraksjonene ble rekrystallisert fra kloroform-heksan som gav fine nål krystaller. Den kjemiske identiteten ble bekreftet ved analytiske og spektroskopiske metoder (Singh, et al., 2005).



Figur 35: Kjemisk struktur av deoksyelefantopin. Det innsirklede område markerer alfa metylen gamma laktonet. Figuren er hentet fra Singh et al. 2005.

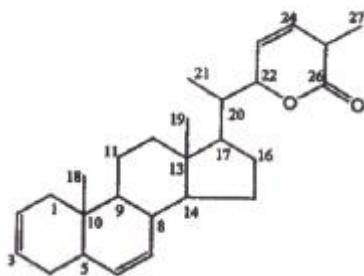
Ichikawa et al. isolerte deoksyelefantopin og isodeoksyelefantopin fra kloroformekstraktet av planten *Elephantopus scaber* Linn. ved bruk av kromatografi og økende polaritet på elueringsmiddelet som inneholdt en blanding av heksan og etylacetat. Begge komponentene ble isolert som hvite krystaller og strukturbestemt ved å sammenligne den ioniserte strålingen med spektralanalyser av $^1\text{H-NMR}$ og $^{13}\text{C-NMR}$ så vel som med smeltepunkt oppgitt i litteraturen (Ichikawa et al., 2006).

8.5.4 Terpenoider

Jasmine et al. isolerte et terpenoid fra acetonekstraktet av planten *Elephantopus scaber*. Planten ble lufttørket, pulverisert og ekstrahert. Det mest bioaktive ekstraktet, acetonekstraktet, ble kromatografert på silika gel kolonne og gradienteluert først med etylacetat og heksan, deretter med aceton og etylacetat, så med aceton og kloroform og til slutt med kloroform og heksan. TLC bioautografi av den ene fraksjonen som var mest aktiv viste innhold av terpenoider som de viktigste bioaktive substansene. Videre spektralanalyser identifiserte terpenoidet som 6-[1-(10,13-dimetyl-4,5,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[α]fenantren-17-yl)etyl]-3metyl-3,6-dihydro-2H-2-pyranon (Jasmine et al., 2007).

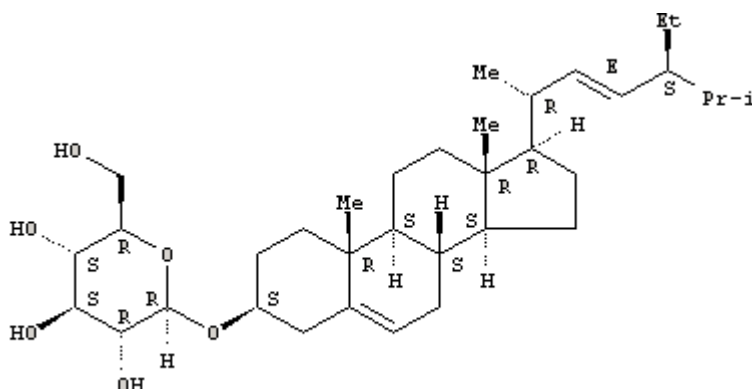
Daisy et al. isolerte det samme terpenoidet ved navn 6-[1-(10,13-dimetyl-4,5,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[α]fenantren-17yl)etyl]-3-

metyl-3,6-dihydro-2*H*-2pyranon fra aceton ekstraktet av planten *Elephantopus scaber*. Komponenten ble identifisert ved hjelp av NMR (Daisy et al., 2008). Denne komponenten blir i en annen artikkel omtalt av Daisy et al. som et steroid og identifisert som et withanolid ved navn 28nor-22(R)witha 2,6,23-trienolide, isolert fra acetonekstraktet av planten. Acetonekstraktet ble kromatografert ved TLC på en silika gel kolonne og eluert først med etylacetat og heksan, deretter med aceton og etyl acetat, så med aceton og kloroform og til slutt med kloroform og heksan. Den virksomme komponenten ble deretter identifisert ved hjelp av spektralanalyser (UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ESI- MS, FT-IR) (Daisy et al., 2009).



Figur 36: Kjemisk struktur av 6-[1-(10,13-dimetyl-4,5,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-1*H*-cyclopenta[α]fenantren-17yl)etyl]-3-metyl-3,6-dihydro-2*H*-2pyranon hentet fra Daisy et al. 2008 og 2009.

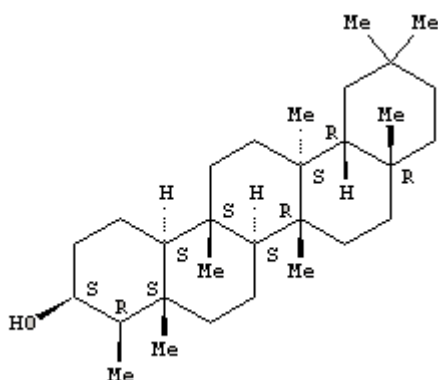
Hisham et al. isolerte stigmasteryl-3- β -glucopyranosid fra etanolekstraktet av *Elephantopus scaber* (Hisham et al., 1992).



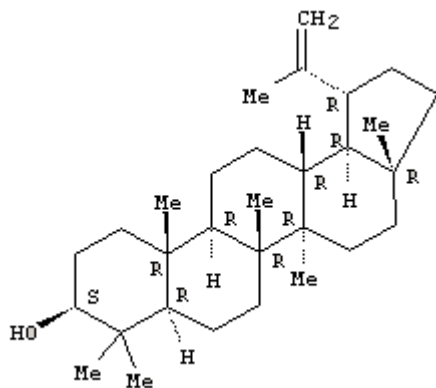
Figur 37: Kjemisk struktur av stigmasteryl-3- β -glucopyranosid hentet fra Hisham et al. 1992 og kopiert fra SciFinder. Andre navn på samme struktur er som følger: β -D-glucopyranosid,(3 β ,22*E*)-stigmasta-5,22-dien-3-yl; Stigmasta-5,22-dien, 3 β -(β -D-

glucopyranosyloksy)-(8Cl); Stigmastan, β -D-glucopyranosid deriv.; 3-O- β -D-glucopyranosylstigmasterol; Stigma-5,22-dien-3- β -D-glucopyranosid; Stigmasterol 3-O-glucoside; Stigmasterol 3-O- β -D-glucopyranosid; Stigmasterol 3-O-glucosid; Stigmasterol glucosid; Stigmasterol β -D-glucopyranosid; Stigmastrol β -D-glucopyranosid; Stigmasteryl β -glucosid; Δ^5 -Stigmasterol 3-O- β -D-glucopyranosid; β -Stigmasteryl 3-O- β -D-glucopyranosid.

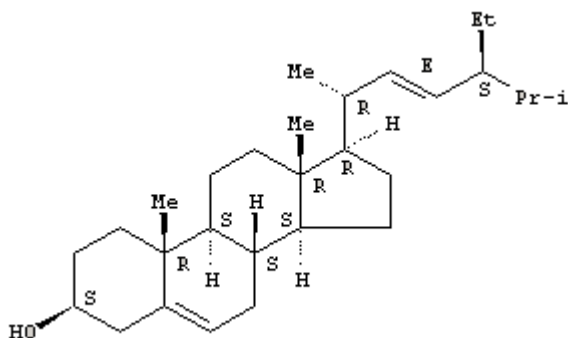
Sim et al. undersøkte tørket og pulverisert plantemateriale fra *Elephantopus scaber* L. En del av plantematerialet ble ekstrahert med petroleum eter og en annen del ble ekstrahert med etanol. Petroleum eter ekstraktet ble separert i en sur fraksjon og en nøytral fraksjon. Den nøytrale fraksjonen ble eluert med benzen- CHCl_3 (10:1) på en aluminiumkolonne og inneholdt et oransje halvfast stoff med smeltepunkt på $274\text{--}276^\circ$. IR spekteret til dette triterpenalkoholet var identisk med epifriedelinol. Eluering på kolonnen med benzen- CHCl_3 (10:3) inneholdt et annet oransje fast stoff. Denne andre komponenten dannet et acetat, med smeltepunkt $205\text{--}211^\circ$, et benzoat med smeltepunkt $258\text{--}264^\circ$. IR spekteret av dette triterpenalkoholet og dets benzoat var identiske med respektive lupeol og lupenyl benzoat. Løsningen som lupeol ble rekrystallisert fra antas også å ha inneholdt en blanding av dotriacontan-1-ol og triacontan-1-ol ut fra sammenligning av smeltepunkt, kjemiske reaksjoner, IR spektrum og data oppgitt i litteraturen. Videre eluering på kolonnen med CHCl_3 – metanol (20:1) gav enda et oransje halv fast stoff som dannet et monoacetat med smeltepunkt $134\text{--}140^\circ$. IR spekteret av dette sterolet og dets acetat var identiske med respektive stigmasterol og dets acetat. Etanolekstraktet gav utfelling av KCl ved avkjøling. Etanolekstraktet inneholdt også en fenolisk komponent som ikke ble identifisert. Det ble ikke funnet luteolin-7-glukosid (Sim & Lee, 1969).



Figur 38: Kjemisk struktur av epifriedelinol hentet fra Sim et al. 1969 og kopiert fra SciFinder.



Figur 39: Kjemisk struktur av lupeol hentet fra Sim et al.1969 og kopiert fra SciFinder.



Figur 40: Kjemisk struktur av stigmasterol hentet fra Sim et al. 1969 og kopiert fra SciFinder.

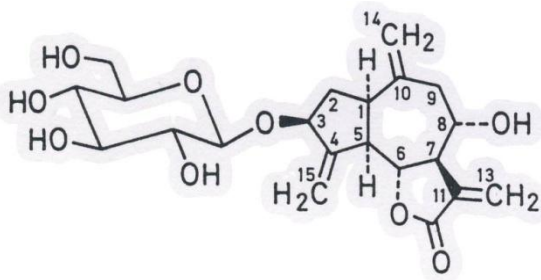
Silva et al. isolerte lupeol, stigmasterol og et germacranolid dilakton 11,13-dihydrodeoksyelfantopin fra metanolekstraktet av planten *Elephantopus scaber*. Det pulveriserte og lufttørkede plantematerialet ble ekstrahert med varm metanol og ekstraktet ble så delt mellom 10 % vandig metanol og petrol. Det vandige metanolekstraktet ble inndampet til tørrhet og resten ble kromatografert på silika gel kolonne. Lupeol og stigmasterol ble identifisert ved å sammenligne deres fysiske data (UV,IR, $^1\text{H-NMR}$) med autentiske prøver. Komponenten 11,13-dihydroksyelefantopin hadde et smeltepunkt på 234° og ble identifisert ved hjelp av MS, IR og $^1\text{H-NMR}$ (De Silva et al., 1982).

Ahmad et al. så på innholdet av stigmasterol og lupeol i heksanekstraktet og etanolekstraktet fra ulike deler av planten *Elephantopus scaber* isolert ved hjelp av GC. Det ble funnet mest stigmasterol i heksanekstraktet fra stilken til planten, mens lupeol ble funnet i størst mengde

i heksanekstraktet fra røttene. Både lupeol og stigmasterol ble funnet i rot, stilk og blad av planten (Ahmad et al., 2009).

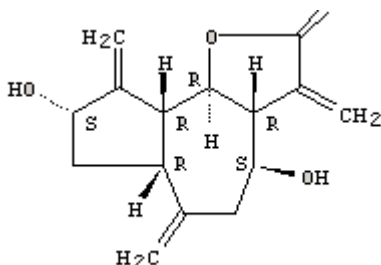
Guaianolider

Hisham et al. undersøkte røttene til *Elephantopus scaber* fra India. Den vandige fraksjonen av etanolekstraktet ble separert med kloroform og analysert ved hjelp av TLC på silika gel. Resultatet viste tre guaianolider A, B og C. Komponentene A og B ble identifisert som respektive deacylcyanaropicrin og glucozaluzanin C. Den tredje komponenten ble funnet i relativt store mengder og ble karakterisert som deacylcyanaropicrin-3- β -D-glucoopyranosid. Sekvensen av protoner bundet til guaianolid karbon skjelettet ble bekreftet ved hjelp av ^1H - ^1H -2D-COSY eksperimenter av dets pentaacetat og molekylets stereokjemi ble bestemt ved ^1H - ^{13}C -HETCOR eksperimenter (Hisham et al., 1990).



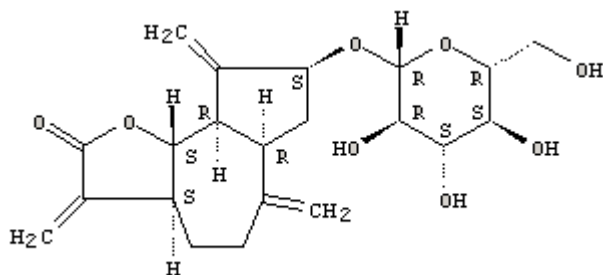
Figur 41: Kjemisk struktur av deacylcyanaropicrin-3- β -D-glucoopyranosid hentet fra Hisham et al. 1990.

Hisham et al. isolerte også deacylcyanaropicrin, glucozaluzanin-C, crepaside E, i tillegg til stigmasteryl 3- β -glucoopyranosid. Deres struktur ble detektert ved hjelp av spektroskopiske metoder og kjemiske transformasjoner (Hisham, et al., 1992).

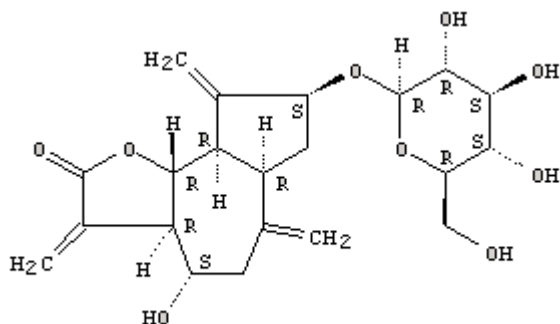


Figur 42: Kjemisk struktur av deacylcyanaropicrin hentet fra Hisham et al 1992 og kopiert fra SciFinder. Andre navn på samme struktur er som følger: Azuleno[4,5-b]furan-2(3H)-on, decahydro-4,8-dihydroksey-3,6,9-tris(metylen)-, [3aR-(3 α ,4 α ,6 α ,8 β ,9 α ,9 β)]-, Eleganin (8Cl);8-Hydroksyzaluzanin C; Deacylaguerin A; Desacylcyanaropicrin; Eleganin (guaian) og

Azuleno[4,5-b]furan-2(3H)-on, decahydro-4,8-dihydroksy-3,6,9-tris(metylen)- (3aR,4S,&aR,8S,9aR,9bR)-.



Figur 43: Kjemisk struktur av Glucozaluzanin-C hentet fra Hisham et al. 1992 og kopiert fra SciFinder. Andre navn på samme struktur er som følger: Azuleno[4,5-b]furan-2(3H)-on, 8-(β -D-glucopyranosyloksy)decahydro-3,6,9-tris(metylen)-, (3aS,6aR,8S,9aR,9bS)-; Azuleno[4,5-b]furan-2(3H)-on, 8-(β -D-glucopyranosyloksy)decahydro-3,6,9-tris(metylen)-, [3aS-(3a α ,6a α ,8 β ,9a α ,9b β)]-; 3 β -(β -D-Glucopyranosyloksy)-4(15),10(14),11(13)-guaiatrien-12,6-olid; ; Vernoflexuosid.



Figur 44: Kjemisk struktur av crepidid E hentet fra Hisham et al. 1992 og kopiert fra SciFinder. Andre navn på samme struktur er som følger: Azuleno[4,5-b]furan-2(3H-on,8-(β -D-glucopyranosyloksy)decahydro-4-hydroksy-3,6,9-tris(metylen)-, [3aR-(3a α ,4 α ,6a α ,8 β ,9a α ,9b β)]-; Azuleno[4,5-b]furan-2(3H-one,8-(β -D-glucopyranosyloksy)decahydro-4-hydroksy-3,6,9-tris(metylen)-, (3aR,4S,6aR,8S,9aR,9bR)-; (+)-Crepidid E.

8.6 Biologiske studier

Poli et al. gjorde en preliminær farmakologisk evaluering av råekstraktet fra planten *Elephantopus scaber*. Vandige og hydroalkoholiske ekstrakter av planten ble testet for akutt toksisitet, analgesisk, antipyretisk, antiinflammatorisk, kardiovaskulær, diabetisk og

stoppende aktivitet. Begge ekstrakter i doser på 0,3-6 g/kg administrert intra peritonealt induerte vridninger, tap av muskeltonus, ataksi, fullstendig utmattelse og død hos mus. Det ble ikke observert noe analgesisk effekt av ekstraktene testet ved varm plate metoden og eddiksyre induert vridning. Ingen av ekstraktene viste noen modifierende effekt på diuresen eller ødem induert ved caarageenan i rotte pote. Derimot gav begge ekstraktene, gitt intraperitonealt, en reduksjon av ølgjær induert hypertermi hos rotter. Ekstraktene gav ingen reduksjon av hypertermi gitt per oralt. Det vandige ekstraktet minket intestinal transittid hos mus, mens hydroalkoholekstraktet økte transittiden. Ekstraktene gitt intravenøst reduserte blodtrykket og pulsfrekvensen hos rotter, og disse effektene kunne blokkeres med atropin, men ikke ko-administrering av pyrilamin og cimetidin (Poli, et al., 1992).

8.6.1 Antibakteriell aktivitet

Jasmine et al. undersøkte metanolekstraktet, heksanekstraktet og acetonekstraktet av *Elephantopus scaber* for deres evne til å hemme veksten av bredspektrede β -laktamase produserende bakterier, såkalte multiresistente bakterier ved hjelp av agardiffusjonsmetoden. Acetonekstraktet viste da best resultat og ble videre fraksjonert på en silika gel kolonne. De bredspektrede β -laktamase produserende bakterie (ESBL, extended spectrum β -lactamaser) koloniene var alle multiresistente mot penicillin, ampicillin, cefotaxime, ceftazidime og cefuroxime. To forskjellige kolonier *E. coli* ble brukt som respektive positive og negative kontroller. Minste hemmende konsentrasjon (MIC) og minste baktericide konsentrasjon ble bestemt.

Den mest bioaktive fraksjonen fra acetonekstraktet av *E.scaber* ble utvalgt til preliminær screening. Fytokjemiske analyser viste tilstedeværelse av terpenoider, proteiner og spor av steroider. TLC bioautografi viste at den aktive fraksjonen inneholdt terpenoider. Fraksjonen ble testet videre for *in vivo* cytotoxicitet hos rotter uten å vise noen markert manifestasjon på dette. Det ble observert normale lever- og nyrefunksjonsprøver. Aceton ekstraktet hadde en MIC på mellom 3,12 og 12,5 mg/ml, mens de andre to ekstraktene hadde en MIC på mellom 3,12 og 50 mg/ml. Følgende bakterier ble testet: *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsellia pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Proteus mirabilis*.

Virkningsmekanismen til terpenene er ikke helt klarlagt, men det spekuleres i om den kan ha

en sammenheng med ødeleggelse av de lipofile komponentene i membranen (Jasmine, et al., 2007).

Avani et al. studerte den antimikrobielle aktiviteten til *Elephantopus scaber* Linn. Hele planten ble innsamlet i blomster stadiet og lagt i bløt (maserert) over natten med etyl acetat og petroleum eter og deretter inndampet til tørrhet. I studien ble det brukt en konsentrasjon på 1, 2 og 4 mg/ml og bakteriene ble testet ved hjelp av agar-diffusjonsmetoden. Følgende bakteriekolonier ble testet: *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli*, *Klebsellia pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Streptococcus faecalis*.

Ciprofloxacin ble brukt som standard i en konsentrasjon på 4 µg/ml som positiv kontroll.

Etyl acetat ekstraktet av planten viste en veksthemmende effekt i en konsentrasjon på 4 mg/ml i alle bakterieisolatene som ble testet unntagen for *Klebsellia pneumonia* der den viste en hemming på 75 %. Lavere konsentrasjoner på ekstraktet viste en konsentrasjonsavhengig hemmende effekt. En konsentrasjon på 2 mg/ml gav en 50 % hemming i alle bakteriekoloniene. En konsentrasjon på 1 mg/ml var ikke effektiv i det hele tatt sammenlignet med positiv kontroll (ciprofloxacin) og negativ kontroll (næringsmedium uten antibiotika eller plante ekstrakt).

Petroleum eter ekstraktet av planten hadde ingen effekt på noen bakterier unntagen for *Micrococcus luteus* der den viste en 50 % hemming i en konsentrasjon på 4 mg/ml. Resultatene av denne studien bekrefter det antimikrobielle potensialet til etyl acetat ekstraktet av *E.scaber*, men det er behov for mer detaljerte studier (Avani & Neeta, 2005)

Daisy et al. undersøkte den antibakterielle aktiviteten til terpenoidet 6-[1-(10,13-dimetyl-4,5,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[α]fenantren-17yl)etyl]-3-metyl-3,6-dihydro-2H-2pyranon fra aceton ekstraktet av planten *Elephantopus scaber*. Den tredimensjonale strukturen til dette terpenoidet ble tegnet ved hjelp av CHEMSKETCH software. En aktivitets- og strukturoppklaring av terpenoidet ved bruk av Pass Prediction til software viste at komponenten virker som en hemmer av metalloprotease gly-gly-endopeptidase enzym familien. Den antibakterielle effekten til terpenoidet ble bekreftet ved hjelp av computerteknikk såkalt Aided Drug Design (CADD) som kan simulere drogereseptor interaksjoner. Protein-ligand interaksjon spiller en signifikant rolle i struktur basert ”drug design”.

Det bakteriolytiske enzymet, autolysin, som spesifikt hydrolyserer mucopeptid polymere i bakterienes cellevegg og således fordøyer celleveggens peptidoglykan ble dokket med terpenoidet ved hjelp av HEX dokking software, og dokking score ble kalkulert med minimum energi verdi på -209,54 til -101,11. Det tyder på at terpenoidet kan hemme aktiviteten til autolysin ved å danne en sterk atomisk interaksjon med det aktive setet. På denne måten kan terpenoidet virke mot bakterieinfeksjoner. Videre studier er nødvendig for å kartlegge aktiviteten av terpenoidet på eventuelle andre targets (Daisy, et al., 2008).

Chen et al. gjorde en antibakteriell screening mot *Streptococcus mutans* ved hjelp av agardiffusjonsmetoden. Av 79 vandige ekstrakter som ble testet av ulike plantearter viste 6 droger en signifikant antibakteriell aktivitet med en minste hemmende konsentrasjon (MIC) lik eller lavere enn 7,8 mg/ml. Av disse viste *Elephantopus scaber* en MIC på mellom 7,8 og 15,6 mg/ml. Konsentrasjonen på ekstraktet var 1 g/ml (w/v) basert på vekten av det opprinnelige tørkede plantematerialet. MIC ble definert som den laveste konsentrasjonen av råekstraktet ved hvilken ingen synlig vekst av testorganismen var observert. En sterk antibakteriell aktivitet ble angitt som MIC \leq 7,8 mg/ml. Det ble testet to serotyper av *S.mutans* (serotype c og serotype d). Antibakteriell aktivitet ble testet både i nærvær og fravær av 5 % sukkrose for begge serotyper. *E. scaber* viste samme MIC (7,8 mg/ml) både i nærvær og fravær av 5 % sukkrose for serotype c. For serotype d viste *E.scaber* en MIC på 15,6 mg/ml i fravær av 5 % sukkrose og en MIC på 46,9 mg/ml i nærvær av 5 % sukkrose. Det ble også testet andre plantearter som på samme måte viste en høyere MIC i nærvær av 5 % sukkrose. Dette tyder på at *S. mutans* har tendens til å bli mer resistent mot antibiotika i nærvær av sukkrose på grunn av at cellene beskytter seg ved å syntetisere glukane og glukosyltransferase bundet til cellene. Forskjellen i følsomhet for de ulike drogeekstraktene mellom type c og d kan komme av individuelle karakteristika av glukane. Dextranukrase som syntetiseres av *S.mutans* type c er et vannløselig glukane i nærvær av sukkrose. Det er foreslått at det vannløselige glukane kan diffundere til det omkringliggende miljøet og at det kan være årsaken til at dets beskyttende aktivitet ikke er så gunstig for bakterier som det vann-uløselige glukane produsert av *S. mutans* type d (Chen et al., 1989).

8.6.2 Antiviral aktivitet

Li et al. screenet vannekstraktet av 21 planter tradisjonelt brukt i Kina for antiviral aktivitet. Ekstraktene ble testet i forhold til antiviral effekt mot humant herpes simplex virus type 1 (HSV-1) og humant respiratorisk syncytial virus (RSV) ved hjelp av en cytopatisk effekt (CPE) reduksjons test vurdert under lysmikroskop. Konsentrasjonen som reduserte CPE med 50 % i forhold til virus kontrollen ble definert som IC_{50} (50 % inhibitory concentration). Selektiv Index (SI) ble kalkulert fra ratioen CC_{50} (cytotoxicity concentration)/ IC_{50} . Ekstrakt av *Elephantopus scaber* viste en anti RSV-aktivitet med en IC_{50} på 37,5 $\mu\text{g/mL}$ selv etter eluering av polyfenoliske komponenter ved hjelp av polyamid kromatografi. Flere av plantene som ble testet inneholdt tanniner og relativt store mengder med polyfenoliske komponenter. For å estimere innflytelsen av tanniner på den antivirale aktiviteten ble ekstraktene av plantene kromatografert gjennom en polyamid kolonne for å fjerne disse. Resultatet tyder derfor på at det finnes andre komponenter i *Elephantopus scaber* i tillegg til polyfenoliske komponenter som kan bidra til den observerte anti-RSV aktiviteten. Det er imidlertid et velkjent fenomen at polyfenoliske komponenter med et mindre antall hydroksylgrupper ikke bindes så sterkt fast i kolonnen og kan derfor elueres ut. *Elephantopus scaber* viste ingen anti-HSV-1 aktivitet (Li et al., 2004).

8.6.3 Antipyretisk aktivitet

Oral administrering av 300 og 600 mg/kg av vannekstrakt og hydroalkoholekstrakt av *Elephantopus scaber* viste ingen påvirkning på hypertermi i rotter induert ved ølgjær. Imidlertid viste disse ekstraktene og dipyrone (100 mg/kg) en signifikant ($p < 0,05$) reduksjon i ølgjær induert hypertermi +1, +2 og +3 timer etter intraperitoneal administrering. Det kan således synes som om den aktive antipyretiske substansen som finnes i ekstraktene enten ikke blir absorbert fra GI traktus eller blir inaktivert av enzymer i GI traktus (Poli, et al., 1992).

8.6.4 Antiinflammatorisk aktivitet

Tsai et al. testet antiinflammatorisk aktivitet av blant annet *Elephantopus scaber* kokt i vann (300 og 500 mg/kg, p.o.) både på carrageenan induisert ødem og på CFA (complete Freund's adjuvant) induisert ødem i poten på rotter og fant en signifikant ($p < 0,005$) forskjell etter respektive +1, +2, +3, +4 +5 timer (300 mg/kg) og etter +1, +3, +6, +9, +12, +16, +21 og +25 dager (500 mg/kg) mellom de gruppene som fikk *E. scaber* og kontrollgruppene. Carrageenan induisert ødem er en vanlig metode for å teste akutt inflammasjon, mens CFA er en vanlig test på kronisk inflammasjon. Carrageenan induisert ødem kan deles i to faser. Den første fasen inntreffer en time etter carrageenan injeksjon når mastceller frigjør cytoplasmatiske enzymer og serotonin, og prostaglandin nivået øker i det inflammete området. Den andre fasen inntreffer 3-5 timer etter carrageenan injeksjon. I denne fasen frigjør makrofagene i det skadede hudområdet interleukin 1 (IL-1) for å indusere akkumulering av polymorfnukleære celler i det inflammete området. Disse cellene frigjør så lysosomale enzymer og aktivt oksygen, spesielt superoksid, for å ødelegge bindevev og indusere hevelse i poten. Resultatene tyder på at *E. scaber* har en innvirkning på begge disse fasene. Resultatene tyder også på at *E. scaber* hemmet utvikling av kronisk hevelse av leddene induisert ved CFA (Tsai & Lin, 1999).

Poli et al. testet vannekstraktet og hydroalkoholekstraktet av *Elephantopus scaber* (300 og 600 mg/kg, p.o.) og fant ingen signifikant reduksjon av carrageenan induisert ødem i poten til rotter for noen av ekstraktene (Poli, et al., 1992). De er uvisst hvorfor Tsai et al. og Poli et al. fikk forskjellige resultater. Deres studier benyttet begge seg av ANOVA som statistisk analyse, men Tsai et al. brukte i tillegg Dunnet's t-test, mens Poli et al. brukte Newman-Keuls post hoc test.

8.6.5 Stoppende effekt

Vannekstraktet av *Elephantopus scaber* (300 og 600 mg/kg, p.o.) gav en signifikant reduksjon av intestinal transport. Administrering av hydroalkoholekstrakt (600 mg/kg) gav derimot en signifikant økning av intestinal transport i mus. Både loperamid (5 mg/kg) og garvesyre (200 mg/kg) gav en signifikant reduksjon av intestinal transport sammenlignet med kontrollgruppen. Disse resultatene i tillegg til preliminære fytokjemiske studier kan peke i retning av at det finnes ulike substanser i ekstraktene som har en antagonistisk

virkning. Selv om begge ekstraktene inneholder chalconer og auroner, så ble flavonoider kun detektert i vannekstraktet. Det kan derfor være av interesse å undersøke om de flavonoider som kun ble detektert i vannekstraktet kan ha en stoppende virkning på tarmperistaltikken. Videre eksperimenter med isolert glatt muskel er underveis (Poli, et al., 1992).

Pazhani et al. studerte effekten av *Elephantopus scaber* ekstrakt på diaré induisert av lakserolje. Tørkede blad av *E.scaber* ble ekstrahert med respektive petroleum eter, kloroform og etyl acetat. Alle ekstraktene ble vakuomtørket og løst i 1 % SLS (uvisst om dette er en forkortelse for sodium-lactobionate-sucrose) løsning. Ekstraktene ble testet på 5 grupper á 6 rotter og gitt per oralt. Gruppe 1, kontrollgruppen fikk 1 ml av løsningsmiddelet. Gruppe 2 fikk 1 ml med difenoxylat hydroklorid i en dose på 5mg/kg. Gruppe 3-5 fikk respektive 1 ml med petroleum eter- kloroform- og etyl acetat ekstrakt av *E.scaber* tilsvarende en konsentrasjon på 500 mg/kg. Etter en halv time fikk hver gruppe 1 ml med lakserolje per oralt. Dyrene ble så observert i forhold til hyppighet og fuktighet av antall tømninger. Etylacetat ekstraktet viste en reduksjon i antall tømninger og løse avføringer i likhet med difenoxylat HCl (standard) sammenlignet med kontrollgruppen ($p < 0,05$).

Det ble også gjort en intestinal motilitetstest hvor rotter ble inndelt i 3 grupper. Gruppe 1 og 2 fikk respektive 1 % SLS (kontroll) oralt og atropin sulfat 5 mg/kg intramuskulært. Den tredje undergruppen fikk respektive petroleum eter-, kloroform- og etyl acetat ekstrakt i en konsentrasjon på 500 mg/kg. Etter 30 minutter ble det administrert 1 ml med 3 % deaktivert kull i 10 % vannløselig tragakant oralt til alle rottene i hver gruppe. Rottene ble drept etter 30 minutter og avstanden kullet hadde vandret fra pylorus til cøcum ble målt og uttrykt i prosent. Etylacetat ekstraktet viste en signifikant ($p < 0,05$) reduksjon i fremdrift av kull gjennom GI traktus sammenlignet med kontrollgruppen. Petroleum eter-, kloroform- og etylacetat ekstraktene av *Elephantopus scaber* blad viste alle en stoppende effekt i en konsentrasjon på 500 mg/kg sammenlignet med kontrollgruppen. Av disse ekstraktene var etylacetat ekstraktet mest effektivt (Pazhani, et al., 2000).

8.6.6 Kardiovaskulære effekter

Intravenøs injeksjon av vannekstraktet av *Elephantopus scaber* (25-200 mg/kg) gav en dose avhengig senkning av blodtrykk og puls hos rotter. Denne depressor responsen ble signifikant hemmet ved prebehandling med atropin (1 mg/kg), men ikke ved kombinert

prebehandling med antihistaminet pyrilamin (4 mg/kg, i.v.) og cimetidin (10 mg/kg, i.v.) På samme måte gav intravenøs administrering av hydroalkoholekstraktet (25-100 mg/kg) en dose avhengig senkning av blodtrykk og puls. Det var imidlertid ikke mulig å evaluere effekten av høyere doser av dette ekstraktet ettersom disse dosene induiserte et høyt antall døde mus. Prebehandling med atropin hemmet den hypotensive responsen til en enkel dose på 50 mg/kg av hydroalkoholekstraktet. En kombinert i.v. prebehandling med pyrilamin og cimetidin (respektive 4 mg/kg og 10 mg/kg) gav på den annen side ingen signifikant reduksjon av den hypotensive effekten gitt samme dose av ekstrakt. Således er det trolig at effekten av begge ekstraktene mest sannsynlig involverer cholinerg stimulering (Poli, et al., 1992).

8.6.7 Antidiabetisk effekt

Daisy et al. testet aceton ekstraktet av *E. scaber* og fant en antidiabetisk effekt hos rotter. Diabetes ble induisert ved en enkel intraperitoneal injeksjon av streptozotocin (60 mg/kg kroppsvekt) løst i 0,01M citrat buffer (pH 4,5) i et volum på 1 ml/ kg kroppsvekt. Rotter med blodsukker på 350 mg/dl eller mer 7 dager etter administrering av STZ ble ansett for å ha diabetes. Rottene ble så inndelt i 9 grupper á 5. Gruppe 1 var kontrollgruppe, gruppe 2 var den ubehandlede diabetes gruppen. Gruppe 1 og 2 fikk kun 0,1 % carboksymetylcellulose (CMC) oralt. Gruppe 3 og 4 var positive kontroller og fikk respektive humulin og glibenclamide. Gruppe 5, 6 og 7 fikk respektive heksan, aceton og metanol ekstrakt av *Elephantopus scaber* i en dose på 150 mg/kg kroppsvekt daglig via sonde. Behandlingen varte i 60 dager. Blodsukker ble målt dag 0, 15, 30 og 60. Et annet sett av lignende grupper (1-7) fikk fraksjoner (2 mg/kg kroppsvekt) i stedet for ekstrakter og blodsukkeret ble målt 2 timer etter administrering av fraksjonene.

Blodglukose nivået til ubehandlede rotter var 84,4 mg/dl. I STZ diabetiske rotter økte nivået til 534,6 mg/dl. I de diabetiske rottene som fikk behandling med aceton ekstrakt av *E. scaber* minket blodglukose nivået signifikant ($p < 0,05$) på dag 60 (86,14 mg/dl) og nådde et nivå i nærheten av de ubehandlede kontrollene (85,6 mg/dl). Heksan og metanol ekstraktet gav ingen signifikant reduksjon av blodsukkernivået. Serum insulin nivået til de ubehandlede rottene var 15,1 μ U/ml. Insulinnivået minket til 6,14 μ U/ml i STZ diabetiske rotter. I

diabetiske rotter behandlet med aceton ekstrakt økte serum insulin nivået til 17,82 $\mu\text{U/ml}$, hvilket var over verdiene til de normale ubehandlede rottene.

Oral administrering av de ulike fraksjoner av *E. scaber* i en dose på 2 mg/kg gav en signifikant reduksjon ($p < 0,05$) av hyperglykemi i STZ diabetiske rotter og maksimal reduksjon av serum glukose nivå (156,8 mg/dl) ble observert 2 timer etter behandling i diabetiske rotter som fikk komponenten 28nor-22(R)witha 2,6,23-trienolide. Denne komponenten gav en 69 % senkning av blodsukkernivået sammenlignet med diabetiske kontroller. Resultatene viser at *E. scaber* senket blodsukkeret i STZ diabetiske rotter. Fraksjoner fra acetonekstraktet og komponenten 28nor-22(R)witha 2,6,23-trienolide gav en signifikant ($p < 0,05$) reduksjon av blodsukkernivå (Daisy, et al., 2009).

8.6.8 Sårhelende aktivitet

Singh et al. evaluerte den sårhelende aktiviteten til bladekstraktet og deoksyefantopin isolert fra *Elephantopus scaber*. Den sårhelende aktiviteten ble estimert ved å se på hvor hurtig sårflaten kontraherte, perioden for epitelisering, bruddstyrke på hud, vekt av granulasjonsvev og innhold av kollagen. Det ble gjort en histologisk studie av granulasjonsvevet for å se på omfanget av kollagendannelse i sårvevet. Den sårhelende aktiviteten ble estimert ved hjelp av tre modeller, en eksisjonsmodell, en snittmodell og en nekrotisert (oversatt fra "dead space") sårmodell.

Fem grupper á 6 rotter ble brukt i respektive eksisjonsmodellen og snittmodellen. 50 mg med formulert droge ble administrert lokalt på hvert dyr en gang daglig. Gruppe 1 (kontroll) ble påsmurt 2 % w/w med tragakant. Gruppe 2 (referanse standard) ble behandlet med 0,2 % w/w nitrofurazon salve. Gruppe 3 og 4 ble behandlet med respektive et vannekstrakt og et etanol ekstrakt. Gruppe 5 fikk behandling lokalt med deoksyefantopin. Test gruppen i den nekrotiserte sårmodellen fikk behandling med vann/etanol ekstrakt (300 mg/kg kroppsvekt) eller komponenten deoksyefantopin (4 mg/kg kroppsvekt) og referanse standard ble ikke brukt.

Studien viste at etanolekstraktet og den isolerte komponenten, sesquiterpenlaktonet, deoksyefantopin fremmet en signifikant ($p < 0,01$) sår legende aktivitet ved å øke cellulær

proliferasjon, dannelse av granulasjons vev, kollagensyntese og ved å øke kontraksjonsraten sammenlignet med kontrollgruppen (Singh, et al., 2005).

8.6.9 Antitumor effekt

Liang et al. fant 3 komponenter fra etanolekstraktet av *Elephantopus scaber* som alle viste en signifikant hemmende aktivitet mot humane SMMC-772 lever cancer celler *in vitro* (IC_{50} 8,18-14,08 $\mu\text{mol/L}$) (Liang, et al., 2008).

Ichikawa et al. undersøkte effekten av deoksyelefantopin (ESD) og isodeoksyelefantopin (ESI) på NF- κ B aktivering ved hjelp av elektroforetisk mobilitet shift assays og NF- κ B regulert genuttrykk testet med Western blot analyser. ESI undertrykket NF- κ B aktivering induert av vidt forskjellige inflammatoriske midler inkludert tumor nekrose faktor (TNF), interleukin 1 β , forbøl 12-myristat 13-acetat og lipopolysakkarid. Undertrykkelsen var ikke spesifikk for celletype, og både induserbare og konstitutiv NF- κ B aktivering ble blokkert. ESI interfererte ikke med binding av NF- κ B til DNA, men hemmet heller I κ B α kinase, I κ B α fosforylering, I κ B α degradering, p65 fosforylering og etterfølgende p65 nukleær translokasjon. ESI undertrykket også uttrykket av TNF-indusert NF- κ B regulerte, proliferative, antiapoptotiske og metastatiske gen produkter. Disse effektene samsvarte med en økning av apoptose induert av TNF og undertrykking av TNF-ligand induert innvekst og reseptor aktivator av NF- κ B ligand induert osteoklastogenese. Artikkelen konkluderer med ESI hemmer NF- κ B aktivering og NF- κ B regulert gen uttrykk, hvilket kan forklare evnen ESI har til å øke apoptose og hemme invasjon (metastasering) og osteoklastogenese (Ichikawa, et al., 2006).

Xu et al. evaluerte antitumor aktivitet til fire sesquiterpen laktoner fra *Elephantopus scaber* ved navn scabertopin (ES-2), isoscabertopin (ES-3), deoksyelefantopin (ES-4) og isodeoksyelefantopin (ES-5). Aktiviteten ble evaluert *in vivo* og *in vitro*. Humane lever carcinom celler (SMMC-7721), humane colon carcinom celler (Caco-2) og humane cervical carcinom celle (HeLa) linjer ble behandlet med ES-2, 3, 4 og 5. Cellenes levedyktighet ble bestemt ved hjelp av MTT (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid løsning, 5 mg/ml) test. DNA fragmentering ble detektert ved agarose gel elektroforese. Antitumor aktivitet av ES-4 *in vivo* ble evaluert ved en eksperimentell murin tumor modell. ES-2, ES-4 og ES-5 viste en signifikant ($p < 0,05$) og konsentrasjonsavhengig antitumor

effekt *in vitro*. Effekten av ES-3 på veksten av de testede cellelinjene var imidlertid relativt svak. Det ble detektert morfologiske forandringer og DNA stige mønster som tydet på apoptose i HeLa celler eksponert for ES-4 i 48 timer. ES-4 viste en antitumor aktivitet *in vivo*. Studien konkluderer med at den anti tumor aktivitet som ble observert for de sesquiterpenlaktone som ble studert kan komme av en i det minste delvis induert apoptotisk effekt *in vitro*. ES-4 viste i tillegg en antitumor aktivitet *in vivo* (Xu, et al., 2006).

Su et al. testet flere planter brukt i tradisjonell kinesisk folkemedisin i behandling mot cancer, deriblant *Elephantopus scaber*, for deres antiproliferative aktivitet på 5 cancercellelinjer ved bruk av 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyl tatrazolum bromid (MTT). Resultatene viste at etanolekstraktene hadde en sterkere antiproliferativ aktivitet enn vannekstraktene. Etyl acetat og/eller n-heksan fraksjonen var den mest bioaktive fraksjonen av etanolekstraktet, som ved TLC analyser ble vist å inneholde terpen og/eller fenoliske komponenter. Etylacetat fraksjonen fra etanolekstraktet av *Elephantopus scaber* viste den største aktiviteten med IC₅₀ verdier på mindre enn 25 µg/mL på tre følsomme cellelinjer, PC-3 (humane prostata carcinom celler), CNE (humane nasofaryngeale carcinom epitel celler) og HL-60 (humane akutt promyelocytiske leukemi celler). Videre isolering og analyser av denne fraksjonen identifiserte tre sesquiterpenlaktoner (deoksyelefantopin, isodeoksyelefantopin og scabertopin, to flavonoider, tricinin og luteolin og fem triterpener, lupeol acetat, lupeol, betulinsyre (oversatt fra betulinsyre), epifriedelanol og ursolsyre (oversatt fra "ursolsyre"). MTT resultatene viste at sesquiterpenlaktone var mest effektive med IC₅₀ verdier på mellom 17,3-42,6 µM. Triterpenene viste en svak effekt med IC₅₀ verdier på større enn 50 µM. Deoksyelefantopin og viste størst effekt på PC-3, CNE og HL-60 celler med IC₅₀ verdier på respektive 4,6, 2,6 og 0,9 µM. Flow cytometriske analyser viste at behandling med deoksyelefantopin gav en subG-1 populasjons økning i PC-3, CNE og HL-60 celler, hvilket tyder på at apoptose ble induert i disse cellene (Su, et al., 2009).

8.6.10 Analgesisk effekt

Oral administrering av 30, 60, 100, 300 og 600 mg/kg og intraperitoneal injeksjon av 3, 10, og 30 mg/kg av vannekstrakt og hydroalkohol ekstrakt av *Elephantopus scaber* modifiserte ikke reaksjonstiden til mus i test på varm plate. Oral behandling av mus med 100 og 300 mg/kg av begge ekstrakter reduserte ikke vridning induert ved 0,6 % eddiksyre. I disse

eksperimentene ble morfin (30 mg/kg, i.p.) og dipyrone (200 mg/kg, i.p.) brukt som referanse. Dette kan tyde på at disse ekstraktene ikke har noen analgesisk effekt (Poli, et al., 1992).

Ruppelt et al. testet et vandig ekstrakt av *Elephantopus scaber* i forhold til analgesisk effekt. Planten ble preparert som te i en konsentrasjon på 20 % av frisk plante og 10 % av tørket plante. Teen ble avkjølt, filtrert og administrert oralt per sonde i en dose på 1,0 g/kg (tørket plante) og 2,0 g/kg (frisk plante, det vil si 0,1 ml av ekstrakt per 10g kroppsvekt). Grupper på 10 mus ble brukt i analysen. Kontrollgruppen fikk filtrert vann i stedet for te. Te eller vann ble gitt 2 timer før administrering av Evans blå fargestoff og eddiksyre som ble injisert i halevenen. Antall vridninger ble registrert i 30 minutter. Deretter ble musene drept. Den anti-inflammatoriske aktiviteten ble bestemt ved å måle hemming av diffusjon av Evans blå fargestoff til det peritoneale hulrommet. Men denne effekten kan ikke regnes for å være proporsjonal med den analgesiske effekten, hvilket er en stor svakhet med studien. Peritoneum ble åpnet og konsentrasjonen av ekstravasert Evans blå fargestoff ble bestemt ved hjelp av spektrometri. Resultatene viste at *Elephantopus scaber* hadde en analgesisk og/eller anti-inflammatorisk effekt, men det er uvisst om denne effekten var signifikant (Ruppelt et al., 1991).

8.6.11 Nyrefunksjon

Oral behandling av rotter med vannekstrakt og hydroalkoholekstrakt av *Elephantopus scaber* i en dose på 100 og 300 mg/kg hadde ingen innflytelse på diurese induert ved hydrering (Poli, et al., 1992).

8.6.12 Leverfunksjon

Lin et al. testet blant annet effekten av *Elephantopus scaber* på leverfunksjonsverdier i CCl₄ injiserte rotter. Tørket droge ble kokt i vann, filtrert og konsentrert til 1 mg/ml (w/v, basert på vekten av tørket droge), og deretter løst i fysiologisk saltvann (oversatt fra "normal saline") før administrering. CCl₄ ble løst i olivenolje til 50 % løsning og injisert subkutant i rotter i en dose på 3,0 ml/kg. Rottene ble delt i 7 grupper á 8. Gruppe 1 fikk ingen behandling. Gruppe 2 fikk kun olivenolje. Gruppe 3 fikk 50 % CCl₄/olivenolje og gruppe 4-

7 fikk droge ekstrakt (1 g/kg, i.p.) samtidig med CCl₄ administrering. Ekstrakt ble også administrert to ganger tilsvarende 24 og 48 timer senere.

Rottene ble anestisert og drept etter 72 timer. Det ble tatt leverbiopsi og blodprøver.

Leverfunksjonsprøver inkluderte sGOT, sGPT, total bilirubin, total protein og kolesterol.

Elephantopus scaber gav en signifikant ($p < 0,001$) reduksjon av sGOT økning forårsaket av CCl₄ og mindet sGPT nivå ($p < 0,001$). Det ble ikke observert noen signifikant forskjell i forhold til total protein, total bilirubin og total kolesterol mellom gruppene. Resultatene ble bekreftet med patologiske studier, leverbiopsi (Lin et al., 1991).

Rajesh et al. testet effekten av *Elephantopus scaber* Linn. i forhold til å forebygge CCl₄-indusert kronisk leverdysfunksjon i rotter. Leverfunksjonsmarkører aspartat amino transferase (AST), alanin amino transferase (ALT), alkalisk fosfatase (ALP) og proteiner ble evaluert. Konsentrasjonen av totale lipider, kolesterol og fosfolipider ble evaluert i serum og ulike vev. Konsentrasjonen av serumtriglyserid ble også studert. Rottene ble inndelt i 3 grupper á 6. Gruppe 1 var kontrollgruppe. Gruppe 2 fikk CCl₄ i en dose på 0,1 ml i peanøttolje (1:1 v/v) per 100 g kroppsvekt gjennom en sonde 2 ganger i uken i 2 måneder. Gruppe 3 fikk CCl₄ i tillegg til en dose på 1000 mg/kg kroppsvekt av *E.scaber* rot pulver suspendert i vann hver morgen i 60 dager.

Det ble observert en markert økning i enzymaktivitet for AST, ALT,ALP og i konsentrasjonen av totale lipider, kolesterol, fosfolipider, triglyserider og en mindring i proteininnhold i gruppe 2 sammenlignet med kontrollgruppen. I gruppe 3 forble nivået av leverfunksjonsmarkørenzymene og konsentrasjonen av totale proteiner, lipider, fosfolipider, triglyserider og kolesterol normale. Co-administrering av *E.scaber* rot pulver til gruppe 3 gav en signifikant ($p < 0,01$) forebyggende effekt på CCl₄ indusert endring av lipid profilen. Disse resultatene viser at *E.scaber* har en beskyttende effekt på CCl₄ indusert leverskade i rotter (Rajesh & Latha, 2001).

Lin et al. undersøkte den leverbeskyttende effekten av et vandig ekstrakt av *Elephantopus scaber* i rotter. Akutt hepatitt ble indusert i rottene ved injeksjon med β -D-galaktosamin og acetaminophen. Resultatene indikerte at serum glutamat oksalat transaminase (sGOT) og serum glutamat pyruvat transaminase (sGPT) nivåer i de hepatitt induserte rottene mindet signifikant ($p < 0,005$) etter behandling med ekstrakt av *E.scaber* (Lin, et al., 1991).

8.6.13 Enzymhemmende aktivitet

Hammer et al. gjorde en glukosidase test. Ferskt plantematerial (30G9) ble blandet med 150 ml vann, refluksert over vannbad ved 80 °C i 1 time, filtrert og deretter frosset. Tanniner ble fjernet på polyvinylpyrrolidon (PVP) kolonne ettersom de kunne inaktivere enzymene.

Enzymer ble hentet fra sommerfugllarver. Teorien bak modellen er følgende: hvis planteekstraktet inneholder sukker-formede polyhydroksylerte alkaloider (dvs. alkaloider som i kjemisk struktur og konformasjon ligner på karbohydrater og som derfor kan interferere med glukosidaser) så kan disse feste seg til insektenzymene og hindre dem fra å reagere med p-nitrofenyl substratene som tilsettes, noe som resulterer i en nedsatt reaksjons rate og derav en minket nitrofenol produksjon som gir seg utslag i mindre produksjon av gul farge. Dette kan da måles ved en absorpsjon på 408 nm. Selv om det ble observert en trend i retning av nedsatt reaksjons rate så var resultatene ikke signifikante. Dette kan tyde på at det ikke finnes sukker-formede polyhydroksylerte alkaloider i *E. scaber* (Hammer & Johns, 1993).

Hisham et al. testet den vandige fraksjonen av etanolekstraktet fra røtter av *Elephantopus scaber* og fant en hemmende effekt på peptidase enzymer så som dipeptidyl peptidase IV, prolin-endopeptidase, aminopeptidase I (Hisham, et al., 1990).

8.6.14 Cytotoksisitet

Komponenten deacylcyanaropicrin-3-β-D-glucopyranosid isolert og identifisert av Hisham et al. ble funnet å være cytotoksisk ved antiviral screening (Hisham, et al., 1990). Flere studier har vist cytotoksiske effekter for et antall av de sesquiterpenlaktoner som er isolert fra slekten *Elephantopus* (Poli, et al., 1992).

8.6.15 Akutt toksisitet

Oral administrering av vannekstrakt eller hydroalkohol ekstrakt av *Elephantopus scaber* i en dose på opptil 6 g/kg p.o. i mus gav ingen endring i adferd. Intreperitoneal injeksjon av vannekstraktet (0,03-3 g/kg) eller av hydroalkoholekstraktet (0,1-3 g/kg) induserte vridninger, tap av muskeltonus, ataksi, lammelse og død. Disse effektene var mer tydelige i

doser ≥ 1 g/kg. Det var ingen positiv korrelasjon mellom dose og død og det var derfor ikke mulig å estimere letal dose (LD_{50}). Imidlertid indikerte de akutte toksisitets testene at LD_{50} verdier for ekstraktene var større enn 2 g/kg gitt i.p. og høyere enn 6 g/kg gitt p.o., noe som kan tyde på en lav toksisitet (Poli, et al., 1992).

Daisy et al. gjorde et separat eksperiment for å se om *E. scaber* gav toksiske effekter på lever og nyrer. Normale rotter fastet i 12 timer og ble randomisert i droge behandlede test grupper og kontrollgrupper. Totalt var det 6 grupper á 6 rotter. *E. scaber* (0,25, 0,5, 1,0 og 2,0 g) ble administrert separat og oralt til rottene i hver testgruppe. Kontrollgruppen fikk kun løsningsmiddel (5 % CMC; 1 ml/kg kroppsvekt). Deretter fikk rottene i både testgruppe og kontrollgruppe tilgang til mat og vann og ble observert for adferdsforandringer i en periode på 24 timer som tegn på akutt toksisitet. Mortaliteten forårsaket av ekstraktet i løpet av denne perioden ble observert. Resultatene viste ingen toksisitet for aceton ekstraktet av *E. scaber*. Ingen mortalitet ble observert hos rottene og adferden syntes å være normal (Daisy, et al., 2009).

Hammer et al. testet reker i saltlake. Vannekstrakt av *E. scaber* ble testet ved 0 (kontroll), 2, 20 og 200 mg/ml konsentrasjon etter applisering på filterpapir og plassert i små flasker med saltlake og 10 små reker i hver flaske, og med 5 replikater. Overlevende ble tellet etter 24 timer og prosentvis død ble registrert for hver dose. Data ble brukt til å beregne LD_{50} . Alle rekene døde ved en konsentrasjon på 200 mg/L både for rotekstraktet og bladekstraktet (Hammer & Johns, 1993).

8.7 Kliniske studier

Laranja et al. evaluerte den diuretiske effekten av *Elephantopus scaber* sammenlignet med placebo hos 10 friske frivillige. *Elephantopus scaber* ble gitt i en dose på 7,5 g/100 ml som te. Hver dose ble gitt med syv dagers mellomrom og oppgis å ha vært 5 ganger så mye som brukt til vanlig. Subjektene var ikke klar over hvilken te de fikk. Blodprøver ble tatt i begynnelsen og slutten av studien og urin ble samlet ved to timers intervall. Total mengde urin ble målt for hver periode. Resultatene viste ingen signifikant effekt på diurese, kaliumverdier i urin eller plasma, urinsyre, kalsium, fosfat, urea eller kreatininverdier. Ingen

effekt ble observert med hensyn på elektrolytter, tubulær eller glomerulær funksjon (Laranja et al., 1991).

8.8 Diskusjon

Elephantopus scaber oppgis å ha vært brukt mot en rekke plager av ulik art. I følge professor Nordals Burma herbarium skal roten og urten ha vært brukt som antipyretikum, som smertestillende middel og som styrkende middel. Det er gjort få studier med hensyn til biologisk effekt av *Elephantopus scaber*, og de som er gjort er av begrenset omfang og gir til dels sprikende resultater. Det er funnet en rekke innholdsstoffer i planten *Elephantopus scaber* som er vist å ha et farmakologisk potensial og som derfor er av interesse å forske videre på.

Kjemiske og biologiske studier av antibakteriell effekt viser at acetonekstraktet inneholder en komponent, et terpenoid ved navn 6-[1-(10,13-dimetyl-4,5,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodekahydro-1H-cyklopenta[α]fenantren-17-yl)etyl]-3-metyl-3,6-dihydro-2 H-2-pyranon, med hemmende effekt på β -laktamase produserende bakterier (Jasmine, et al., 2007). En struktur-aktivitets studie av dette terpenoidet ble gjort ved hjelp av et dokkingprogram i software som viste at komponenten danner en sterk atomisk interaksjon med det aktive setet til autolysin, et enzym som hydrolyserer polymere i bakterienes peptidoglykan og som dermed kan virke på celleveggen i flere typer bakterier. Det er imidlertid uvisst hva ” en sterk atomisk interaksjon ” innebærer, og hva sorts binding det er tale om. Autolysiner er bakteriolytiske enzymer som fordøyer celleveggen til de bakteriene som produserer dem og er derfor potensielt dødelige. Autolysiner antas å være et vanlig enzym hos bakterier som har et peptidoglykanlag (Daisy, et al., 2008).

Terpenoidet ved navn 6-[1-(10,13-dimetyl-4,5,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodekahydro-1H-cyklopenta[α]fenantren-17-yl)etyl]-3-metyl-3,6-dihydro-2 H-2-pyranon er også omtalt som et steroid ved navn 28nor-22(R)witha 2,6,23-trienolide, med blodsukker senkende effekt hos diabetesinduserte rotter. Det er ikke funnet noen virkningsmekanisme som kan forklare den antidiabetiske aktiviteten hos rotter (Daisy, et al., 2009). Videre studier er nødvendig for å kartlegge aktiviteten til dette terpenoidet/steroidet på flere potensielle targets. Acetonekstraktet av *Elephantopus scaber* er vist å ha både en antibakteriell og en

antidiabetisk effekt i ulike biologiske studier. Flere kjemiske studier viser at acetonekstraktet inneholder flere terpenoider. Det er gjort få studier av disse komponentene med hensyn til å kartlegge deres respektive biologiske effekt.

Alkoholekstraktet av *Elephantopus scaber* er funnet å inneholde flere sesquiterpenlaktoner i tillegg til guaianolider. Etanolekstraktet av *Elephantopus scaber* og den isolerte komponenten deoksyelefantopin er vist å ha en sårlegende aktivitet (Singh, et al., 2005). I tillegg er det funnet en antitumor effekt av isodeoksyelefantopin *in vitro* og *in vivo*, samt en antitumor effekt av scabertopin, isoscabertopin og deoksyelefantopin *in vitro* (Xu, et al., 2006). Dette er kjemiske beslektede komponenter som har forskjellig stereokjemi. Det er uvisst hvilken betydning den stereokjemiske strukturen har for den biologiske aktiviteten. En biologisk studie av Xu et al. i forhold til antitumor aktivitet, viste at en *in vitro* aktivitet kan komme av en i det minste delvis apoptotisk effekt. Studier av andre planter av Asteraceae familien med lignende sesquiterpenlaktoner som har en alfa metylen lakton har rapportert om sårlegende aktivitet. Det er derfor mulig at alfa metylen laktonet har en betydning for den sårlegende aktiviteten (Singh, et al., 2005). Etanolekstraktet inneholder også andre sesquiterpenlaktoner som er funnet å være cytotoxiske. Den vannløselige delen av etanolekstraktet av planten er i tillegg vist å ha en leverbeskyttende effekt i noen få studier. Selv om studiene på dette området er få og små, så peker de i samme retning. Det er en liten teoretisk mulighet for at det finnes komponenter i *Elephantopus scaber* som har en cytobeskyttende effekt, og at dette kan være sesquiterpenlaktoner som også er rapportert å ha en antitumor effekt. Spørsmålet er da om samme komponent kan være både cytotoxisk og cytobeskyttende, men eventuelt i ulike doser og eller forskjellig administrasjonsform. Det gjenstår flere studier for å kartlegge virkningsmekanismen til disse sesquiterpenlaktone med hensyn til sårlegende aktivitet og antitumor effekt.

Hva gjelder antipyretisk effekt, antiinflammatorisk effekt og stoppende effekt så foreligger det sprikende resultater. Antipyretisk effekt er vist ved intraperitoneal administrering men ikke per oralt. Tsai et al. og Poli et al. testet den antiinflammatoriske effekten av vannekstraktet, men med ulikt resultat. Vannekstraktet av *Elephantopus scaber* er vist å redusere den intestinale transporttiden i mus, mens hydroalkoholekstraktet viste motsatt effekt. Det er derfor å anta at disse ekstraktene inneholder antagonistiske stoffer, men det er uklart hvilke disse eventuelt er. I forhold til diuretisk effekt er det heller ikke funnet noen studier som støtter den tradisjonelle bruken på dette området. Med hensyn til

kardiovaskulære effekter så er intravenøs injeksjon av vannekstraktet og av hydroalkoholekstraktet vist å gi en dose avhengig senkning av blodtrykket, en effekt som antas å involvere cholinerg stimulering, men det er mye uklar også på dette området.

Litteraturen nevner også bruken av *Elephantopus scaber* som et smertestillende middel. Det er gjort lite med studier også i forhold til dette bruksområdet, og ingen av disse har vist noen analgesisk effekt av *E.scaber*. Aurantiamidene inneholder nitrogen og kunne teoretisk sett være av interesse og teste videre i forhold til analgesisk effekt.

8.9 Konklusjon

Studier av *Elephantopus scaber* har vist en antibakteriell og antidiabetisk effekt hos rotter og tilskrives et terpenoid og steroid som det er av stor interesse å forske videre på. I tillegg peker studier i retning av at *Elephantopus scaber* har et potensiale som sårlegende middel. Det er også identifisert enkelte sesquiterpenlaktoner som har vist en antitumor effekt *in vitro*. Det er ikke funnet noen studier som støtter bruken av planten som et analgesisk middel. Det gjenstår mer forskning for å klarlegge og identifisere eventuell struktur-aktivitet for ulike kjemiske komponenter isolert fra *Elephantopus scaber*.

9. *Emilia sonchifolia* DC.



Bilde av *Emilia sonchifolia* hentet fra (Blanco, 1883a).

9.1 Sammendrag

Dette er en plante det er forsket lite på. Tradisjonelt er planten mye brukt i tropiske områder og spist som grønnsak. En studie tyder på at flavonoid fraksjonen av planten kan ha et potensial til bruk ved øyesykdommer, men det gjenstår mye forskning for å kartlegge eventuelle virkningsstoffer. Planten inneholder et pyrrolizidin alkaloid som kan være potensielt carcinogent.

9.2 Taksonomiske betegnelser

Botanisk navn: *Emilia sonchifolia* DC.

Klasse: Equisetopsida C. Agardh

Underklasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Overorden: Asterales Link

Orden: Asterales Link

Familie: Asteraceae Bercht. & J. Presl.

Genus: *Emilia* Cass.

Synonym: *Cacalia sonchifolia* L., *Crassocephalum sonchifolium* (L.) Less, *Emilia rigidula* DC., *Emilia sinica* Miq., *Senecio sonchifolius* (L.) Moench (Tropicos. org., 2010h).

Vanlig navn: red tassel-flower

9.3 Botanikk og flora

Planten *Emilia sonchifolia* vokser på jorder og ved veikanter og er vanlig i tropiske områder. Planten er 20-80 cm høy, glatt eller kan ha små hår. Stammen er rett eller kan være litt bøyd, enkel eller forgrenet. Bladene er for det meste proksimale og er festet med en liten stilk til stammen. Bladene er ovale eller omvendt lansettformede, som regel 5-12 x 1,5-4,5 cm, med en kant som ofte er avrundet og noe fliket. Støttebladene er krukkeformede, 9-12 mm, relativt smale med en lengde på 3-4 ganger diameteren. Skjermbladene sitter sammen i en gruppe på 8. De små blomstene er 15-30 (-40) mm. Kronbladene har lavendelfarge med rosa skjær, purpuraktige, sjelden med røde lapper på 0,5-0,7 mm. Griffelen er ca. 0,1 mm og 10 i antall (FNA, 2010).

9.4 Tradisjonell bruk.

Professor Nordals Burma herbarium oppgir at planten *Emilia sonchifolia* er brukt som feberstillende middel, ved øyesykdommer samt som antihelmintikum (middel mot parasitter). *Emilia sonchifolia* har vært brukt i India blant de innfødte som feberstillende middel, svettedrivende, adstringerende, antiastmatikum og mot diaré (Srinivasan & Sankara Subramanian, 1980) I kinesisk folkemedisin brukes bladene mot feber, dysenteri, meteorisme, analgetikum og antibiotikum (Cheng & Roder, 1986). Planten *Emilia sonchifolia* er spiselig og stilken og bladene kokes og brukes som en grønnsak i tropiske og subtropiske områder. Planten oppgis å ha adstringerende, antipyretiske, oftalmiske og antiastmatiske egenskaper. Den lokale befolkningen i den vestlige delen av Ghat regionen av India har brukt ekstrakt av planten ved øyesykdommer inkludert katarakt. Den tradisjonelle medisinske litteraturen beskriver dens potensielle rolle som hjemmelaget remedie for lindring av såre øyne og ører, nattblindhet og inflammasjon i øynene (Lija et al., 2006).

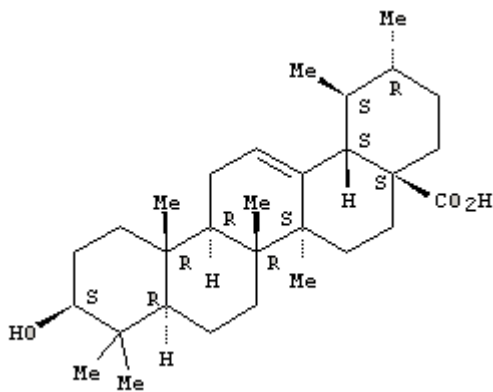
I India brukes planten som folkemedisin mot inflammasjon, reumatisme, hoste, kuttskader og sår. I Kina brukes bladene ved feber og dysenteri. Den er også brukt som analgetikum og antibiotikum (Shylesh & Padikkala, 2000). Planten oppgis å ha en noe syrlig men god, søt smak med en anelse av bitterhet. Cibin et al. nevner også dens adstringerende, termogene, antipyretisk, oftalmiske og antiastmatiske egenskaper (Cibin et al., 2006).

9.5 Kjemiske studier

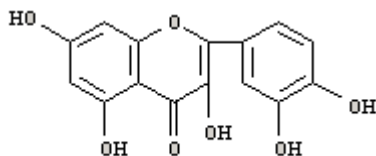
Srinivasan et al. undersøkte den kjemiske sammensetningen til *Emilia sonchifolia*. Den overjordiske delen av planten ble tørket i skyggen og deretter ekstrahert med 95 % varm etanol. Det totale ekstraktet ble konsentrert under vakuum og resten tatt opp i kloroform og satt i kjøleskap i to dager. En mengde tilsvarende ca 2 % på tørr basis felte ut som et fargeløst nåleformet fast stoff og ble identifisert som kaliumnitrat. Stoffene som var løst i kloroform ble suspendert i vann og ristet over i løsemidler av økende polaritet – n-heksan, eter og etylacetat. En andel av n-heksan fraksjonen (10g) ble kromatografert over nøytral aluminium og gradienteluert med blandinger av petrol eter, benzen og kloroform. De tre første fraksjonene fra petrol eter eluatet inneholdt hovedsakelig voks og de siste gav triacontan med et smeltepunkt på 65-66 °C.

Petrol eter fraksjonen (9:1) gav fargeløse flak med et smeltepunkt på 78-80 °C ved krystallisering fra metanol, og et krystallinsk acetat med smeltepunkt på 64-66 °C. Dette stoffet ble funnet å stemme overens med data rapportert for n-heksacosanol. Kloroform fraksjonen inneholdt et fargeløst fast stoff med smeltepunkt på 285 °C, som ble identifisert som ursol syre (ursilic acid). Eter ekstraktet viste fargereaksjoner for flavonoider og papirkromatografi (oversatt fra PC) viste en flekk tilsvarende for et glykosid som ble identifisert som kaempferol 3-β-D-galaktosid med smeltepunkt på 260-262 °C, og en annen flekk tilsvarende et aglykon og identifisert som quercetin med smeltepunkt på 314-316 °C.

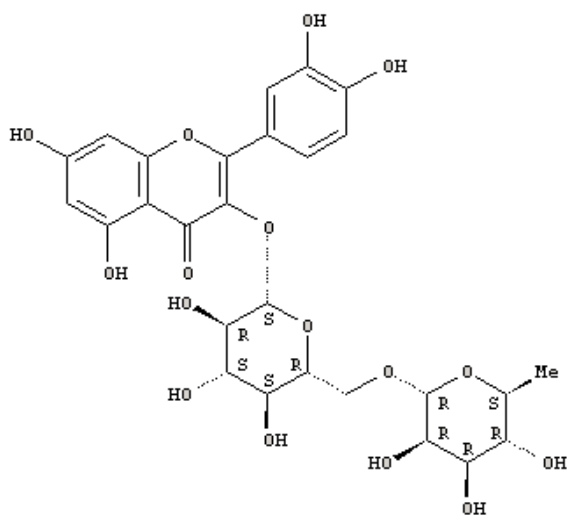
Aceton fraksjonen av etyl acetat ekstraktet ble etter syrehydrolyse funnet å inneholde quercetin og rhamnose. Glykosidet ble identifisert som quercitrin ved hjelp av spektral analyser. Metanol etylacetat (1:9) eluertet ble ved hjelp av papirkromatografi funnet å inneholde kaempferol-3-β-D-galaktosid og rutin (Srinivasan & Sankara Subramanian, 1980).



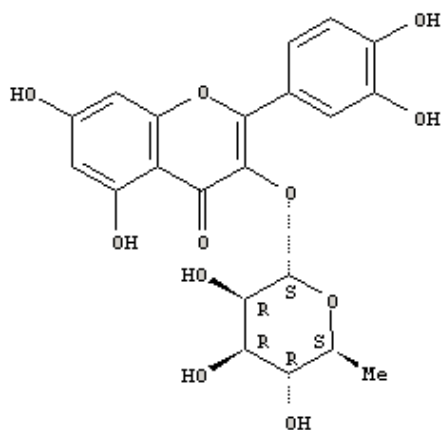
Figur 45: kjemisk struktur av ursol syre, hentet fra Srinivasan et al. 1980 og kopiert fra SciFinder.



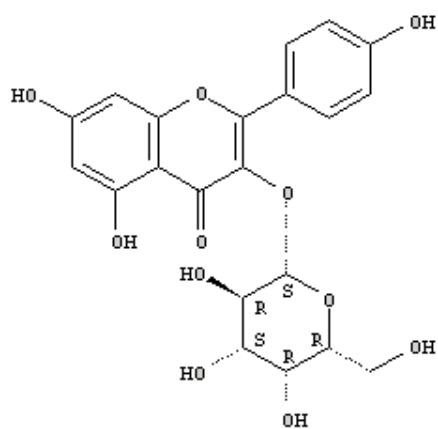
Figur 46: kjemisk struktur av quercetin, hentet fra Srinivasan et al. 1980 og kopiert fra SciFinder.



Figur 47: kjemisk struktur av rutosid (rutin), hentet fra Srinivasan et al. 1980 og kopiert fra SciFinder.

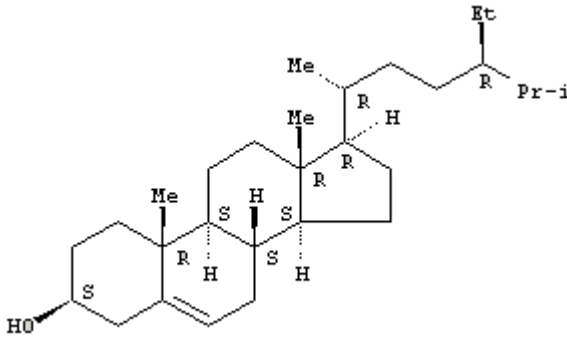


Figur 48: kjemisk struktur av quercitrin, hentet fra Srinivasan et al. 1980 og kopiert fra Sci Finder.

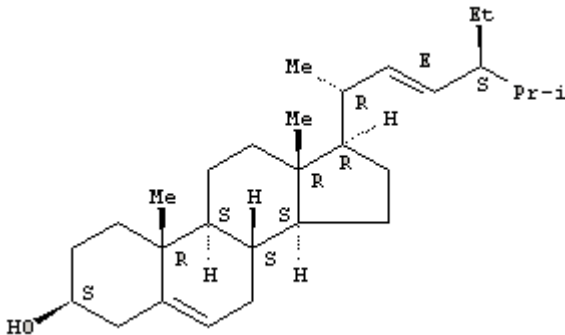


Figur 49: kjemisk struktur av kaempferol-3- β -D-galaktosid, hentet fra Srinivasan et al.1980 og kopiert fra SciFinder.

Det er gjort flere kjemiske studier av *Emilia sonchifolia* der kun abstraktet er tilgjengelig på engelsk. Ved søk i SciFinder kommer det fram at flere studier har funnet innhold av flavonoider, flavoner, flavanoner og alkaloider i *Emilia sonchifolia*. Av abstraktet kommer det fram at Gao et al. isolerte og identifiserte simiaryl, β -sitosterol, stigmasterol, palmitin syre og triacontanoin syre (oversatt fra triacontanoic acid) fra *Emilia sonchifolia* (Gao et al., 1993).



Figur 50: kjemisk struktur av β -sitosterol hentet fra Gao et al. 1993 og kopiert fra SciFinder.



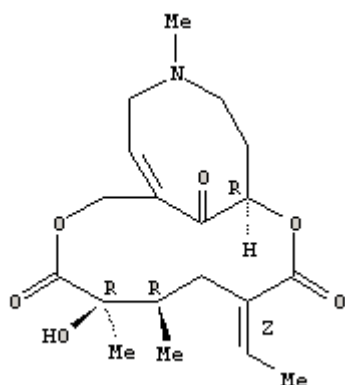
Figur 51: kjemisk struktur av stigmasterol hentet fra Gao et al. og kopiert fra SciFinder.

Preliminære fytokjemiske analyser av Muko et al. viste innhold av flavonoider og sapinoner i metanolekstraktet og vannekstraktet av soltørkede og pulveriserte blad fra *Emilia sonchifolia* (Muko & Ohiriu, 2000).

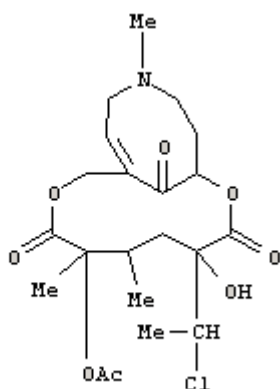
9.5.1 Pyrrolizidin alkaloider

Cheng et al. isolerte tre pyrrolizidin alkaloider av typen otonecin fra den overjordiske delen av *Emilia sonchifolia* ved hjelp av MS, IR, $^1\text{H-NMR}$ og $^{13}\text{C-NMR}$. Disse ble identifisert som

senkirkin og doronin. Det tredje pyrrolizidin alkaloidet var ikke mulig å strukturbestemme, men antas å være en isomer av et senkirkin som kun ble funnet i små mengder. Den overjordiske delen av planten ble tørket, pulverisert og ekstrahert med 96 % etanol for deretter å inndampes under vakuum. Resten ble tatt opp med HCl og de nøytrale stoffene ekstrahert med eter og metylenklorid. Vannfasen ble alkalisert med ammoniakk og ekstrahert på nytt med metylenklorid. Denne prosessen ble gjentatt og gav til slutt et rensset alkaloidrækstrakt. Acetonekstraktet ble tilsatt petroleter og gav utfelling av av senkirkin. Utgangsmaterialet ble ekstrahert med metylenklorid og kromatografert på silikakolonne som viste innhold av senkirkin, doronin og det tredje alkaloidet som ikke var mulig å identifisere (Cheng & Roder, 1986).



Figur 52: kjemisk struktur av senkirkin, hentet fra Cheng et al. 1986 og kopiert fra SciFinder.



Figur 53: kjemisk struktur av doronin, hentet fra Cheng et al. 1986 og kopiert fra SciFinder.

9.6 Biologiske studier

Lija et al. undersøkte betydningen av flavonoider fra *Emilia sonchifolia* på progresjonen av selenit induisert katarakt. Antioksidant kapasiteten til flavonoidene isolert fra *E.sonchifolia* ble estimert ved å måle evne til å hemme superoksid produksjon og serum oksidasjon *in vitro* til sammenligning med quercetin. En *in vivo* studie ble så utført på bakgrunn av disse eksperimentene for å evaluere den modulerende effekten av flavonoider mot selenit katarakt. Katarakt ble induisert ved en enkel subkutan injeksjon med kaliumselenit (4 mg/kg kroppsvekt). Behandlingsgruppen fikk flavonoider fra *E.sonchifolia* (1mg/kg) og disse resultatene ble sammenlignet med gruppen som fikk behandling med quercetin. Linse opasitet ble monitorert ved lysmikroskop og klassifisert i 6 stadier. Aktiviteten til antioksidant enzymene superoksid dismutase og katalase, og nivået av lipid peroksidasjons produktene tiobarbitur syre reagerende substanser og redusert glutation ble studert. Undersøkelser med lysmikroskop viste at flavonoidfraksjonen fra *E.sonchifolia* var i stand til å modulere progresjonen av katarakt. Aktiviteten til superoksid dismutase, katalase og redusert glutation viste en økning i den gruppen som fikk behandling med *E.sonchifolia*, mens tiobarbitur syre reagerende substanser minket til sammenligning med den selenit induerte gruppen. Studien konkluderer med at flavonoider fra *E.sonchifolia* kan modulere linse opasiteten og oksidativt stress i selenit induisert katarakt i rotter (Lija, et al., 2006).

Asije et al. undersøkte den krampestillende effekten av ekstrakt fra blad av *Emilia sonchifolia* på anfall hos kylling og mus induisert ved maksimal elektroshokk (MES) metode og stryknininduserte anfall. Etanolekstraktet, kloroformekstraktet og vannekstraktet viste en doseavhengig og markert krampestillende effekt (ED₅₀ på 4 mg/kg og 8 mg/kg hos respektive kylling og mus). Av disse var vannekstraktet mest effektivt. Den aktive komponenten er ikke identifisert, men det spekuleres i om den observerte aktiviteten kan ha en sammenheng med glycosider eller steroider som er isolert fra planten, og som antas å utøve en krampestillende aktivitet ved å blokkere GABA (gammaaminosmørsyre, en viktig hemmende transmittorsubstans i sentralnervesystemet) eller interferere med synaptisk transmisjon. Det pågår studier for å isolere den aktive kjemiske komponenten fra denne planten i forhold til den observerte krampestillende aktiviteten (Asije et al., 2006).

Metanol ekstraktet av *Emilia sonchifolia* i ulike konsentrasjoner ble funnet å være cytotoxisk mot Daltons lymfom (DL), Ehrlich ascites carcinom (EAC) og lunge fibroblast (L-929) celler fra mus, men ikke toksisk mot normale humane lymfocytter under *in vitro*

betingelser. Oral administrering av ekstrakt (100 mg/kg kroppsvekt) til mus reduserte utviklingen av både massive tumorer ($p < 0,001$) og ascites tumorer og økte livslengden signifikant ($p < 0,001$) til musene som hadde tumor. En reduksjon av tritium behandlet tymin inkorporert i DL celler under *in vitro* betingelser kan tyde på at ekstraktet hemmet DNA syntese (Shylesh & Padikkala, 2000).

Muko et al. undersøkte de antiinflammatoriske egenskapene til ekstrakt av blad fra *Emilia sonchifolia*. Vannekstraktet og metanolekstraktet reduserte begge ødem induisert ved albumininjeksjon i poten til mus. Vannekstraktet viste en mer markert effekt sammenlignet med metanol ekstraktet. Ekstraktene ble administrert i en dose på 200 mg /kg til to grupper á 5 rotter, 2 timer før administrering av albumin. Referansegruppen og kontrollgruppen fikk respektive 100 mg acetylsalisylsyre (ASA) og 3 % v/v Tween 85. Begge ekstraktene viste en relativt god antiinflammatorisk aktivitet sammenlignet med ASA.

LD₅₀ verdier ble bestemt for begge ekstrakt løst i dimetyl sulfoksid (DMSO). Fastende mus ble randomisert i grupper på 5. Til hver gruppe ble det gitt vannekstrakt eller metanolekstrakt i doser på 100, 200, 600, 800 og 1200 mg/kg ved fôring. Kontrollgruppen fikk 5 ml vann. Musene fikk deretter tilgang til mat og vann og ble observert over en periode på 24 timer i forhold til tegn på akutt toksisitet. Antall døde ble registrert og lagt til grunnlag for beregning av LD₅₀. Toksisitetstesten viste en LD₅₀ på 860 (21 mg/kg) for metanolekstraktet og en LD₅₀ på 780 (18 mg/kg) for vannekstraktet (Muko & Ohiriu, 2000).

Cibin et al. undersøkte planten *Emilia sonchifolia* (ES) for antioksidant og antitumor aktivitet. Etanolekstraktet av tørket plantematerial ble filtrert, avdampet og rensert for forurensninger av lav polaritet så som fett, terpen, klorofyll, xantofyll etc. ved gjentatte ekstraksjoner med respektive petroleum eter, benzen og etylacetat. Flavonoid fraksjonen ble isolert fra etylacetat ekstraktet og dens antioksidative kapasitet ble målt i forhold til å hemme Cu⁺ induert lipoprotein oksidasjon i humant serum og superoksid produksjon *in vitro* til sammenligning med quercetin. Tiden det tok for ES fraksjonen var 60 minutter, mens det for quercetin tok 72 minutter, hvilket tyder på at ES fraksjonen hadde bedre antioksidant effekt enn quercetin. Konsentrasjonen som hemmet superoksid produksjonen med 50 % (IC₅₀) var 48µg for flavonoidfraksjonen sammenlignet med 32 µg for quercetin. Ut fra disse resultatene ble plantens evne til å hemme proliferasjonen av humane cancer celler evaluert. ES viste en klar konsentrasjonsavhengig hemming av deres vekst. Den veksthemmende effekten ble monitorert ved å bestemme levedyktigheten til cellene basert på deres evne til å redusere

MTT (3-(4-5 dimetyltiozol-2-yl) 2-5 difenyl tetrazolium bromid, 5 mg/ml). Resultatene viste at ES hemmet veksten til hud carcinom celler (A431). For å se om den cytotoxiske effekten induisert ved flavonoid fraksjonen skyldtes apoptotiske forandringer ble cellene eksaminert i forhold til nukleær kondensasjon. Cellene ble behandlet med 200 µg/ml ES flavonoidfraksjon i 24 timer, noe som resulterte i dannelsen av nukleær kondensasjon observert under lysmikroskop. Nukleær kondensasjon var synlig 6 timer etter behandling med ulike konsentrasjoner av flavonoid fraksjonen. Resultatene støtter oppfatningen om at apoptose er en potensiell mekanisme for den observerte antiproliferative effekten. Studien konkluderer med at flavonoider fra ES har en potent anticancer effekt hvilket kan komme av dens antioksidative evne (Cibin, et al., 2006).

Shylesh et al. undersøkte *Emilia sonchifolia* for eventuell anticancer aktivitet. En anticancer effekt av heksanekstraktet ble evaluert i mus ved bruk av Dalton's lymfom ascites (DLA) celler. De aktive komponentene fra det mest aktive n-heksan ekstraktet ble separert ved hjelp av TLC og analysert ved kjemiske metoder. Cytotoksisiteten av ekstraktene og de isolerte fraksjonene ble målt i makrofager, tymocytter og DLA celler ved Trypan blå eksklusjon metode (oversatt fra Trypan blue exclusion method), MTT test, DNA stige test (oversatt fra DNA ladder assay) og DNA syntese i cellekultur. Det ble også gjort en test av den aktive fraksjonen i mus i forhold til akutt toksisitet. Heksanekstraktet viste størst aktivitet og en *in vitro* cytotoxisitet mot DLA og tymocytter, men ikke mot makrofager. Heksan ekstraktet induiserte blemmer i membranen (oversatt fra "membrane blebbing"), nukleær kondensasjon, DNA-stige dannelse og dannelse av apoptotiske kjerner, hvilket er karakteristisk for apoptotisk celledød, på en dose avhengig måte. N-heksan fraksjonen beskyttet 50 % av musene som ble innpodet intraperitonealt med DLA celler. Denne fraksjonen viste ingen suspekterte alvorlige toksiske symptomer i mus. Det ble separert en aktiv terpen fraksjon fra n-heksanekstraktet ved TLC. Denne fraksjonen induiserte apoptotisk celledød i DLA celler i en konsentrasjon på 0,8 µg/mL (Shylesh et al., 2005).

Monago et al. studerte den antidiabetiske effekten av ekstrakt fra *Emilia sonchifolia* (ES) i dithizone induisert diabetes i rotter. Tre ulike konsentrasjoner av kloroform-metanolekstrakt ble gitt per oralt til både normale og diabetiske rotter. Forskjellen var signifikant ($p < 0,01$) sammenlignet med den normale gruppen og 6 timer etter oral administrering av ekstraktet. Dithizon induiserte en signifikant ($p < 0,01$) økning av blodsukkernivået. Ekstraktet av ES viste en konsentrasjonsavhengig senkning av blodsukkeret (Monago & Ugbomeh, 2004).

Srinivasan et al. gjorde en preliminær screening av vannekstraktet fra *Emilia sonchifolia* som kun viste at *Staphylococcus aureus* og *Bacillus subtilis* var sensitive i liten grad. Det framgår ikke av artikkelen hvilke andre bakterier som ble testet eller deres respektive MIC (Srinivasan & Sankara Subramanian, 1980).

9.7 Diskusjon

I følge professor Nordals Burma herbarium skal denne planten ha vært brukt som feberstillende middel, antihelminikum og mot øyesykdommer. Det er gjort lite studier av denne planten. En studie av Lija et al. viste at flavonoidfraksjonen av *Emilia sonchifolia* var i stand til å modulere progresjonen av katarakt. En studie av Muko et al. viste en relativt god antiinflammatorisk aktivitet av vannekstraktet og metanol ekstraktet av *Emilia sonchifolia*, sammenlignet med ASA. Det er ikke funnet noen studier som har testet en eventuell antihelminisk aktivitet av *Emilia sonchifolia*. En studie har vist en krampestillende effekt hos kylling og mus. De studier som er gjort taler for seg selv, men det er ikke mulig å trekke noen konklusjon på bakgrunn av så lite forskningsmateriell. Det er imidlertid verdt å være oppmerksom på at senkirkin, et pyrrolizidin alkaloid, isolert fra etanolekstraktet av den overjordiske delen av *Emilia sonchifolia*, er funnet å inducere lever tumorer i rotter og derfor kan være potensielt carcinogent (Hirono et al., 1979).

9.8 Konklusjon

Det er gjort lite studier av planten *Emilia sonchifolia*. En studie viser at flavonoidfraksjonen var i stand til å modulere progresjonen av katarakt i rotter. Det er behov for flere studier for å kartlegge potensielle virkningsstoffer i *Emilia sonchifolia*.

10. Evolvulus alsinoides L.



Bilde av *Evolvulus alsinoides*, hentet fra (Wursten, 2004).

10.1 Sammendrag

Den første omtalen av *Evolvulus alsinoides* funnet i Amerika er fra Linné 1737, men den eldste rapporten funnet om bruken av *Evolvulus alsinoides* er fra India hvor den ble brukt mot dysenteri (Austin, 2008). Planten er vel kjent i Ayurvedisk tradisjonell bruk mot en rekke plager. Det er skrevet mye om denne planten, men kun få kjemiske og biologiske studier har vært mulig å oppspore. Resultatene fra ulike biologiske studier er til dels motsigende. Det er ikke identifisert noe virkestoff med klarlagt virkningsmekanisme. Likevel er det vist at planten inneholder scopoletin og scopolin med potensielle egenskaper i forhold til antiinflammatorisk aktivitet og AChE hemmende aktivitet. Planten inneholder

også evolvoid A som i en biologisk studie har vist en signifikant “antistress aktivitet” hos rotter.

10.2 Taksonomiske betegnelser

Botanisk navn: *Evolvulus alsinoides* L.

Klasse: Equisetopsida C. Agardh

Underklasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Asteranae Takht.

Orden: Solanales Juss. ex Bercht. & J. Presl

Familie: Convolvulaceae Juss.

Genus: *Evolvulus* L.

Synonym: *Camdenia* Scop., *Convolvulus alsinoides* L., *Convolvulus fugacissimus* Hochst. ex Choisy, *Convolvulus linifolius* L., *Convolvulus valerianoides* Blanco, *Evolvulus acapulcensis* Willd. Ex Roem. & Schult., *Evolvulus adscendens* House, med flere (Tropicos.org., 2010e).

10.3 Flora og botanikk

Evolvulus alsinoides er en flerårig plante. Den har flere stilker som er bøyd nedover eller oppreiste, smale med spredte hår som ligger flate. Bladene kan ha bladstilk eller være stilkløse og er 0,7-2,5 cm x 5-10 mm. Kvasten kan ha en eller få blomster. Den blomsterbærende stilken er trådformet, 2,5-3,5 cm. Skjermbladene er lineære til sylformede eller lansettformede, 1,5 – 4 mm. Begerbladene er lansettformede, 3-4 mm og tottete. Blomsterkronen er hjulformet, 7-10 mm i diameter. Stilken som bærer støvknappen til pollenbæreren er festet til basis av røret i blomsterkronen. Fruktknuten er glatt. Griflene er 2 i antall og frittstående. Kapselfrukten er kuleformet, 4-klaffet. Frøene er 4 i antall eller færre, svarte og myke (FOC, 1762).

10.4 Tradisjonell bruk

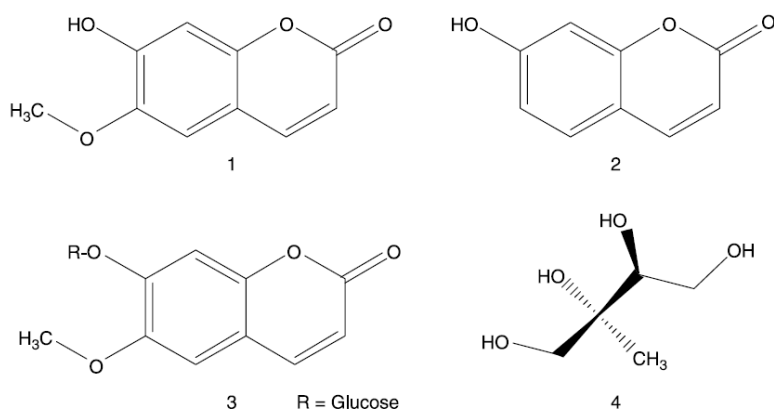
Professor Nordals Burma herbarium oppgir at blad og rot fra *Evolvulus alsinoides* ble brukt som styrkende middel mot innvollsorm og som antiastmatikum. I India er *Evolvulus alsinoides* kjent i Ayurvedisk bruk som anti epileptikum, antiflogistikum, som feberstillende

middel, som immunmodulerende middel, samt for å “styrke hjernen” ved behandling av “nevøs svakhet” og skrofulose, øke hukommelsen og som antiepileptikum. Juicen av planten hevdes å fremme sårheling og ekstrakt av bladene har vært brukt mot betent neglerot. Ekstrakt av planten er også tradisjonelt brukt mot bronkitt og astma (Ganju et al., 2003; Siripurapu et al., 2005; Gupta et al., 2007; Austin, 2008).

10.5 Kjemiske studier

Cerevenka et al. evaluerte den fytokjemiske og antioksidative aktiviteten til *Evolvulus alsinoides*. Den tørkede og pulveriserte planten ble filtrert med 95 % EtOH og konsentrert under vakuum. Råekstraktet ble løst i 80 % MeOH og skilt med Pe. MeOH sjiktet ble avdampet, løst i vann og skilt med Et₂O. Resten fra den vannløselige delen, den polare fraksjonen, ble kromatografert på en polyamid kolonne, som gav to fraksjoner. En fraksjon med ikke-fenoliske komponenter (FNC) ble eluert med vann. Fraksjonen med fenoliske komponenter (FFC) ble eluert med EtOH. FFC ble kromatografert på silika gel med CHCl₃/EtOH, hvorav to fraksjoner ble rekrystallisert i MeOH og renset og gav scopoletin og umbelliferon.

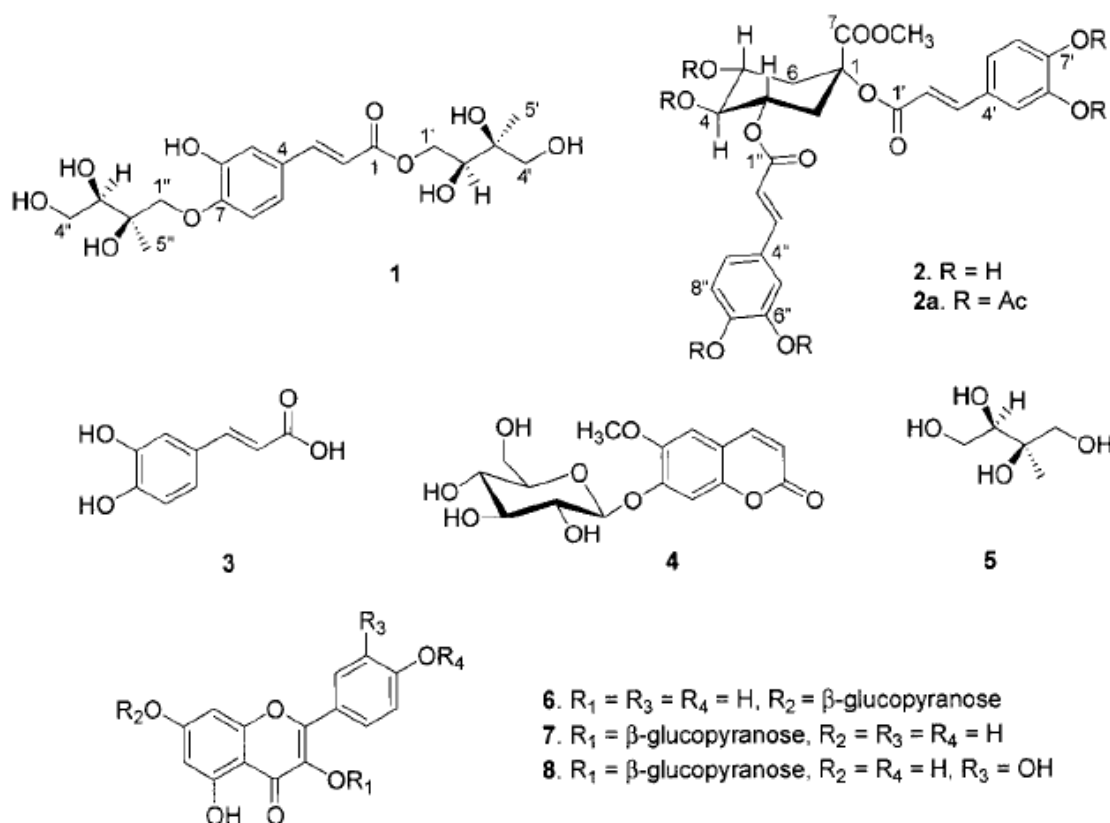
FNC ble kromatografert på silika gel med CHCl₃/EtOH, hvorav en fraksjon ble rekrystallisert i MeOH og renset som gav scopolin. En annen fraksjon av FNC ble rekrystallisert i aceton/propanol (1:1) og gav 2-metyl-1,2,3,4-butantetrol. Den kjemiske strukturen til komponentene ble bestemt ved hjelp av NMR-analyser. Mengden av de nevnte substansene ble bestemt ved hjelp av HPLC-UV og GC-FID (Cerevenka et al., 2008).



Figur 54: kjemisk struktur av scopoletin (1), umbelliferon (2), scopolin (3) og 2-metyl-1,2,3,4-butantetrol, hentet fra Cerevenka et al. 2008.

Gupta et al. gjorde en fytokjemisk undersøkelse av planten *Evolvulus alsinoides* ved bioaktivitet-veiledet rensing av n-BuOH løselige delen av etanolekstraktet, og fant to evolvoider i tillegg til 6 tidligere kjente komponenter. Strukturen til de nyoppdagede komponentene ble klarlagt ved hjelp av kjemiske og spektroskopiske analyser (FAB-MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, COSY, HSQC, HMBC) og de kjente komponentene ble bekreftet ved direkte sammenligning av deres respektive NMR data med data rapportert fra litteraturen.

Den aktive fraksjonen ble kromatografert og gav evolvoid A, karakterisert som 2,3,4-trihydroxy-3-metyl-butyl 3-[3-hydroksy-4-(2,3,4-trihydroksy-2-metyl-butoksy)-fenyl]-2-propenoat og evolvoid B. Den aktive fraksjonen inneholdt i tillegg 3-(3,4-dihydroksyfenyl)-2-propenoic syre (kaffe syre), 6-metoksy-7-O- β -glucopyranosid kumarin, 2-C-metyl erytritol, kaempferol-7-O- β -glucopyranosid, kaempferol-3-O- β -glucopyranosid og quercetin-3-O- β -glucopyranosid (Gupta, et al., 2007).



Figur 55: kjemisk struktur til evolvoid A, karakterisert som 2,3,4-trihydroksy-3-metyl-butyl 3-[3-hydroksy-4-(2,3,4-trihydroksy-2-metyl-butoksy)-fenyl]-2-propenoat (1) og evolvoid B (2), 3-(3,4-dihydroksyfenyl)-2-propenoic syre (kaffe syre) (3), 6-metoksy-7-O- β -glucopyranosid kumarin (4), 2-C-metyl erytritol (5), kaempferol-7-O- β -glucopyranosid (6),

kaempferol-3-O- β -glucopyranosid (7) og quercetin-3-O- β -glucopyranosid (8), hentet fra Gupta et al. 2007.

10.6 Biologiske studier

10.6.1 Antistress aktivitet

Gupta et al. gjorde en screening av de aktive komponentene isolert fra *Evolvulus alsinoides* i forhold til anti-stress aktivitet. Den n-BuOH løselige fraksjonen av etanolekstraktet viste en signifikant ($p < 0,05$) anti-stress aktivitet. Den CHCl_3 løselige fraksjonen viste insignificant anti-stress aktivitet. Den vannløselige fraksjonen var inaktiv. Komponentene evolvoid A og B, 3-(3,4-dihydroksyfenyl)-2-propenoic syre (kaffe syre), 6-metoksy-7-O- β -glucopyranosid kumarin, 2-C-metyl erytritol og quercetin-3-O- β -glucopyranosid ble screenet for anti-stress aktivitet i en akutt stress (AS) modell hos rotter. Biokjemiske forandringer ble induisert ved at rottene ble immobilisert i et trangt lite sylindrisk plastikk rør i 150 minutter. En suspensjon i 0,1 % natrium karboksy metyl cellulose av de aktive komponentene ble administrert oralt i en dose på 40 mg/kg daglig i 3 dager. Drogen ble preparert fersk hver dag før administrering. En fersk vandig suspensjon av pulverisert ginseng rot *Panax quinquefolium* ble brukt som standard i en dose på 100 mg/kg kroppsvekt.

Det ble observert en signifikant ($p < 0,01$) økning av adrenal vekt etter AS sammenlignet med den ikke-stressede (NS) gruppen. Evolvoid A samt standard droge pulver av *Panax quinquefolium* (PQ) rot var signifikant ($p < 0,01$) effektive i å redusere stress induisert adrenal hypertrofi. Plasma kreatinin kinase (CK) og glukose nivå økte også signifikant ($p < 0,001$) ved AS sammenlignet med NS kontrollen. Behandling i forkant med evolvoid A og evolvoid B ($p < 0,01$) og PQ ($p < 0,01$) var effektive i å redusere AS-indusert økning av CK nivået, og evolvoid A, B samt kaffesyre ($p < 0,01$) var effektive i å redusere glukose nivået. På samme måte resulterte AS ($p < 0,001$) i økt nivå av kortikosteron i plasma sammenlignet med NS kontrollen. Behandling i forkant med evolvoid A, B samt kaffesyre ($p < 0,01$) samt PQ ($p < 0,01$) gav en signifikant reduksjon av det økte kortikosteron nivået. Gupta et al. konkluderer med at evolvoid A viste en signifikant ($p < 0,01$) antistress aktivitet ved å normalisere hyperglykemi, kortikosteron nivå, kreatinin kinase og adrenal hypertrofi. Evolvoid B viste også en antistress aktivitet, men hadde ingen effekt på adrenal hypertrofi i likhet med kaffesyre som ble funnet å være effektive i forhold til enkelte av stress parametrene, men

som ikke viste noen effekt på adrenal hypertrofi og økte CK nivå. Komponentene 6-metoksy-7-O- β -glucopyranosid kumarin, 2-C-metyl erytritol og quercetin-3-O- β -glucopyranosid var totalt ineffektive. Den biologiske profilen til evolvoid A, B og kaffesyre er derfor av interesse for videre forskning for om mulig å utvikle en droge med antistress aktivitet (Gupta, et al., 2007).

10.6.2 Angstdempende aktivitet

Nahata et al. undersøkte eventuelle angstdempende egenskaper til *Evolvulus alsinoides*. Den overjordiske delen av planten ble tørket i skyggen ved romtemperatur, pulverisert og ekstrahert med petroleum eter. Den avfattede presseresten ble ekstrahert i 95% etanol. Etanolekstraktet ble blandet med destillert vann og fraksjonert med etyl acetat. Dette gav et etylacetat løselig fraksjon og en vannfraksjon. Disse fraksjonene ble brukt for å undersøke nevrofarmakologisk effekt hos rotter. CNS aktivitet ble registrert ved hjelp av en labyrint test, utforskende adferd i åpent felt og rotasjonstest.

Etylacetat fraksjonen tilsvarende 100 mg/kg administrert per oralt viste en angstdempende aktivitet, sammenlignet med kontroll gruppen, og registrert ved økt tid rottene brukte i den åpne armen av labyrinten samt antall ganger rottene gikk inn i den åpne armen av labyrinten. Rottene viste også en økning av utforskende adferd i åpent felt test. Etylacetat fraksjonen i doser på 200 mg/kg per oralt reduserte også nevromuskulær koordinasjon, hvilket er en indikasjon på en muskelrelakserende effekt. Den vandige fraksjonen viste ingen effekt. Diazepam (1,0 mg/kg) ble brukt som standard og viste større effekt sammenlignet med etyl acetatfraksjonen. Studien undersøkte også antioksidant aktivitet til etylacetat fraksjonen og vannfraksjonen av *T. erecta*, og fant at begge ekstrakter viste en signifikant antioksidant aktivitet. Studien konkluderer med at *E. alsinoides* innehar en signifikant angstdempende aktivitet, samt effekt på nevromuskulær koordinering. Studien konkluderer også med at *E. alsinoides* innehar en signifikant antioksidant aktivitet (Nahata et al., 2009).

10.6.3 Antioksidant aktivitet

Antioksidant aktivitet til de isolerte substansene scopoletin, umbelliferon, scopolin og 2-metyl-1,2,3,4-butantetrol ble registrert ved hjelp av SIA (PC-controlled sequential injection analysis) som måler minket absorbans av DPPH (2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl) relatert til

konsentrasjonen av antioksidanter i testmaterialet. De preparerte fraksjonene og isolerte substansene viste ingen statistisk signifikant aktivitet med DPPH testen. Selv om resultatene viste et høyt total innhold av fenoliske komponenter i FFC, så ble det ikke funnet noen signifikant korrelasjon mellom antioksidant styrke og innholdet av fenoliske komponenter. Disse resultatene fra DPPH testen av antioksidant aktivitet til *Evolvulus alsinoides* var ikke så høye som forventet. Cerevenka et al. påpeker at det kreves flere studier på antioksidant aktivitet som tester forskjellige virkningsmekanismer i tillegg til *in vivo* studier med *Evolvulus alsinoides* (Cerevenka, et al., 2008).

Auddy et al. testet den antioksidative aktiviteten av etanolekstraktet og av vannekstraktet fra *Evolvulus alsinoides*. Både etanolekstraktet og infusjon med tørket fersk og pulverisert plante kokt i vann ble testet for antioksidativ aktivitet ved ABTS test (2,2'-azinobis-3-etylbenzothiazolin-6-sulfon syre). Hemming av lipid peroksidasjon ble testet ved bruk av homogenat fra rotte hjerne. Infusjon av planten (500 mg/kg kroppsvekt) ble injisert i rotter og det ble tatt blodprøver etter 40-45 minutter. *Evolvulus alsinoides* viste en IC_{50} på 33,39 $\mu\text{g/ml}$ av etanolekstraktet og IC_{50} på 172,25 $\mu\text{g/ml}$ av vanninfusjonen i forhold til antioksidant aktivitet ved ABTS test, samt en IC_{50} på 89,23 $\mu\text{g/ml}$ i forhold til hemmende aktivitet av lipid peroksidasjon målt på homogenat fra rotte hjerne. Alle planteinfusjoner ble testet i forhold til cytotoxisk aktivitet i PC12 celle linjer. Det ble ikke funnet noen toksisk effekt på cellevekst i konsentrasjoner fra 25 $\mu\text{g/ml}$ til 1 mg/ml, evaluert fra MTT testen (3-4,5-dimetylthiazol-2-yl-2,5-difenyl tetrazolium bromid som reduseres av succinat dehydrogenase i levende celler til et blåfarget formazan) (Auddy et al., 2003).

10.6.4 Acetylcholinesterase hemmende aktivitet

Mukherjee et al. undersøkte den acetylcholinesterase (AChE) hemmende aktiviteten til hydrokolloidekstraktet av flere planter, deriblant *Evolvulus alsinoides*. AChE aktivitet ble målt ved hjelp av en mikroplate leser. Enzymet hydrolyserer substratet acetylthiocholin og danner produktet thiocholin som reagerer med Ellman's reagens (5,5'-dithiobis [2-nitrobenzoic acid], DTNB) og danner 2-nitrobenzoat-5-mercaptothiocholin og 5-thio-2-nitrobenzoat som kan detekteres ved 405 nm. Absorbansen ble plottet mot tiden og enzym aktiviteten ble kalkulert fra stigningstallet til linjen og uttrykt i prosent. Prosentvis hemming ble kalkulert ved å sammenligne hastighetene til prøvene med en blank prøve (10 % MeOH i buffer). Det ble brukt en serie med konsentrasjoner for å finne IC_{50} (konsentrasjon i prøven som kreves for å hemme 50% av AChE enzymet). Hydroalkohol ekstraktet av planten

Evolvulus alsinoides ble funnet å ha en IC₅₀ på 141,76 µg/mL, hvilket er en sterk hemmende effekt på AChE. Fysiostigmin, den positive kontrollen, viste en IC₅₀ på 0,076 µg/mL (Mukherjee et al., 2007).

10.6.5 Antiinflammatorisk aktivitet

Ganju et al. evaluerte de immunmodulerende egenskapene til blant annet *Evolvulus alsinoides* i adjuvant induisert artritt (AIA) hos rotter. Complete Freund's Adjuvant (CFA) ble injisert i den ene poten til rottene for å indusere en inflammasjon. Vannekstraktet av planten *E. alsinoides* ble administrert intraperitonealt etterfulgt av en repeterende behandlingsprofil. Dyrene ble inndelt i fem grupper. Gruppe 1 fikk kun PBS, gruppe 2 fikk CFA, gruppe 3 fikk ekstrakt av *Emblica officinalis* + CFA, gruppe 4 fikk ekstrakt av *Evolvulus alsinoides* + CFA og gruppe 5 fikk dexametason + CFA. Den anti-inflammatoriske responsen til ekstraktet ble bestemt ved å se på lymfocytt proliferasjon og histopatologisk alvorlighetsgrad til synovial hyperplasi. Alle rottene i gruppe 4 fikk ekstrakt av *E. alsinoides* i 8 dager.

Ekstraktet viste en markert reduksjon av inflammasjon og ødem. Intraperitoneal administrering av 25 mg/kg kroppsvekt av ekstrakt var optimal dose i forhold til en immunmodulerende egenskap. Immunsuppresjon fant sted på cellenivå under den tidlige fasen av sykdommen. Det ble observert en mild synovial hyperplasi og infiltrering av få mononukleære celler i rottene som ble behandlet med ekstrakt av *E. alsinoides*. Induksjon av nitrogen oksidase syntase (NOS) minket signifikant ($p < 0,01$) på dag 10 sammenlignet med kontrollgruppen. Behandling med *Evolvulus alsinoides* ekstrakt gav en signifikant ($p < 0,01$) undertrykkelse av lymfocyttproliferasjon observert etter 5, 10 og 15 dagers behandling. Resultatene indikerer at *Evolvulus alsinoides* har en signifikant antiinflammatorisk aktivitet i AIA rotter. Det var en signifikant reduksjon ($p < 0,05$) av hevelse og rødhet i de inflammmerte områdene. Doserings regime som ble brukt oppgis å ha dekket det klinisk relevante stadiet av immunresponsen. Det ble ikke observert noen tegn på toksisitet, anoreksi eller vekttap i noen av de behandlede dyrene. Resultatene tyder på en immun suppressering i den akutte fasen av sykdommen. Den antiinflammatoriske effekten ble assosiert med nedsatt lymfocyttproliferasjon og redusert av follikulær aggregering av lymfocytter i det inflammmerte synovium. Reduksjon av synovitt kom fram av histologien til det inflammmerte vevet. Studien påpeker at planteekstraktet var like effektivt som dexametason i behandling av AIA (Ganju, et al., 2003).

10.6.6 Adaptogene og anti-amnesiske egenskaper

Siripurapu et al. evaluerte etanolekstraktet fra *Evolvulus alsinoides* i forhold til adaptogene egenskaper og evne til å øke hukommelsen hos gnagere. Adaptogen aktivitet ble vurdert hos rotter som ble utsatt for akutt stress og kronisk stress. Den akutte stress modellen (AS) gikk ut på å immobilisere rottene i 150 minutter. Den kroniske stressmodellen (CUS) utsatte rottene for ulike typer stress hver dag i 7 dager. Stress induserte magesår og økt binyre vekt, plasma kreatinin kinase (CK) og kortikosteron nivå i begge modeller. Plasma glukose nivå økte kun i AS modellen. Rottene ble behandlet med etanolekstrakt av *Evolvulus alsinoides* (100, 200 og 400 mg/kg p.o.) i 3 dager og ble utsatt for AS dag 3, 45 minutter etter siste dose. I den kroniske modellen fikk rottene *Evolvulus alsinoides* i en dose på 200 mg/kg per oralt 45 minutter før stressregime i 7 dager. *Evolvulus alsinoides* reduserte stress indusert avvik på lignende måte som for *Panax quinquefolium* (PQ) (100 mg/kg p.o.). *Evolvulus alsinoides* (100 mg/kg) administrert oralt i 3 dager minket scopolamin induert utilstrekkelighet i en modell der rottene lærte seg å unngå stress ved å forholde seg passive. En bedring av stress markører og scopolamin induert demens gitt ved *Evolvulus alsinoides* indikerer at planten kan ha anti-amnesiske og adaptogene egenskaper (Siripurapu, et al., 2005).

10.6.7 Forekomst av aflatoxin i råmaterialet

Singh et al. undersøkte flere plantearter, deriblant *Evolvulus alsinoides* med hensyn til soppinfeksjon og kontaminering av aflatoxin β_1 . Prøver av plantene ble samlet inn etter at plantene hadde vært lagret i 6-8 måneder av lokale forhandlere etter innhøsting. Prøvene ble samlet i sterile polyten poser for å unngå videre kontaminering. Fuktighetsnivået ble målt før råmaterialet ble skylt i destillert vann. Vekten av plantene ble målt før og etter tørking ved 100 °C i 24 timer. PH ble målt i en suspensjon av planten (en del prøve i 10 deler destillert vann). En ml av hver seriefortynning (1:10) ble sådd ut i kultur medium. Potet dekstrose agar (PDA) ble brukt til analyser av mycobacterium. Platene med kulturmedium og prøvematerial ble inkubert ved 28 °C i 7 dager og undersøkt daglig. Antall ble registrert etter 4-5 dager. Etter inkubering ble platene undersøkt visuelt under mikroskop. Identifisering av sopparter ble gjort ved kultur- og morfologisk karakterisering av *Aspergillus* og *Penicillium*. Relativ tetthet av ulike sopp i prøvene ble kalkulert og frekvens av forekomst av mycobakterier ble kalkulert i prosent.

I tillegg ble det tatt prøver på *A. flavus* av randomisert utvalgte isolater av prøvematerialet som ble screenet for produksjon av aflatoksin β_1 . Isolater av sopp ble dyrket på SMKY medium (sukrose, magnesium sulfat, kalium nitrat og gjærekstrakt blandet i destillert vann) og inkubert ved 28 °C i 10 dager, deretter filtrert og tørket ved 100 °C i 12 timer. Vekten av mycelet ble deretter bestemt. Filtratet ble brukt til å estimere aflatoksin β_1 ved hjelp av TLC. Flekker med aflatoksin β_1 ble skrapet av TLC platene, løst i kald metanol, ristet og sentrifugert og mengden aflatoksin β_1 ble kalkulert ut fra optisk tetthet av supernatanten. Det ble funnet 10 sopparter i prøvematerialet fra *Evolvulus alsinoides*. Disse var som følger: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* s.p., *Cladosporium herbarum*, *Trichoderma viride*, *Alternaria alternata*, *Absidia corymbifera*, *Curvularia* s.p. *Penicillium italicum* og *Umbelopsis* s.p. Av disse var *Cladosporium herbarum* hyppigst forekommende. Funnene viste at råmaterialet var meget kontaminert med ulike sopparter. Noen av disse soppartene var toksiske. Av 6 prøver fra *Evolvulus alsinoides* var 3 prøver kontaminert med toksiske isolater av *A. flavus* og produserte i gjennomsnitt 186,77 ppb med aflatoksin β_1 . Singh et al. påpeker at resultatene er alarmerende ettersom dette er råmateriale som brukes til preparering av droger. Aflatoksiner er termotabile. Resultatene var høye sammenlignet med standarden satt av WHO på 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Høyt fuktighetsinnhold indikerer at prøvene ikke var lagret tilstrekkelig etter innhøsting. Fuktighetsinnhold og pH er to viktige faktorer som påvirker veksten av sopp. Resultatene viser hvor viktig det er med kvalitetskontroll på dette området (Singh et al., 2008).

10.7 Diskusjon

Professor Nordals Burma herbarium viser til at blad og rot er hevdet å inneha styrkende egenskaper brukt mot innvollsorm og astma. Det er ikke funnet noen biologiske studier av *Evolvulus alsinoides* som har undersøkt effekt i forhold til astma eller innvollsorm. Kjemiske studier viser at *Evolvulus alsinoides* blant annet inneholder scopoletin og dets glukosid scopolin. Disse komponentene finnes også i andre planter. Scopoletin og scopolin er vist å gi en dose avhengig respons på frigjøring av PGE_2 fra peritoneale makrofager fra mus (Silván et al., 1969). PGE_2 er et vasodilaterende prostaglandin som medierer smerte og ødem i inflammerte områder. Det er derfor ikke usannsynlig at disse komponentene kan ha en sammenheng med astmatiske plager, men det er ikke funnet noen studier som har bekreftet dette. Resultater fra Ganju et al. indikerer at vannekstraktet av planten *Evolvulus alsinoides* har en antiinflammatorisk aktivitet hos rotter med adjuvant induert artritt.

Mukherjee et al. fant AChE hemmende egenskaper til hydroalkoholekstraktet av planten *Evolvulus alsinoides*. En screening av flere naturlige produkter i forhold til acetylcholinesterase (AChE) hemmende aktivitet viste en potensiell hemmende aktivitet for scopoletin og scopolin. Disse komponentene viste potensielle AChE hemmende egenskaper ved hjelp av en struktur basert farmakofor tredimensjonal modell med computer og en 3D database (NPD). Disse komponentene viste også en moderat, men signifikant, dose-avhengig og langvarig hemmende aktivitet ved enzym test med Ellman's reagens (acetylcholin-esterase hydrolyserer acetylthiocholin og produserer thiocholin som igjen reagerer med Ellman's reagens (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzo syre)) som resulterer i 5-thio-2-nitrobenzoat og det gulfargede 2-nitrobenzoat-5-mercaptothiocholin som detekteres med TLC). I tillegg ble det gjort studier *in vivo* hvor scopoletin og scopolin økte extracellulær ACh konsentrasjon i rotte hjerne med respektive 170 % - 300 % sammenlignet med basal frigjøring (Rollinger et al., 2004). Flere artikler nevner den tradisjonelle bruken av *Evolvulus alsinoides* ved nevrologiske plager. Det er en teoretisk mulighet for at denne bruken til dels har en sammenheng med AChE hemmende egenskaper, men det er ikke gjort noen studier som kan bekrefte eller avkrefte det. Resultater fra Gupta et al. peker i retning av at evolvoid A kan ha en "antistress" aktivitet ved å normalisere hyperglykemi, kortikosteron nivå, kreatinin kinase og adrenal hypertrofi hos rotter, men at det er nødvendig med flere studier for om mulig å utvikle et produkt. Det er ikke identifisert noe virkningsmekanisme for evolvoid A eller B. *Evolvulus alsinoides* inneholder flere potensielle virkestoffer som er av interesse å forske videre på.

10.8 Konklusjon

Evolvulus alsinoides er kjent i tradisjonell indisk medisin brukt mot en rekke plager. Det er gjort noen få kjemiske og biologiske studier av planten som peker i retning av at planten inneholder scopoletin og scopolin som kan være av interesse å forske videre på i forhold til antiinflammatoriske egenskaper og AChE hemmende aktivitet. Planten inneholder også evolvoid A som er vist å ha en "antistress" aktivitet hos rotter.

11. Grangea maderaspatana Poir.



Bilde av *Grangea maderaspatana*, hentet fra (Pickering & Wild, 1975).

11.1 Sammendrag

Grangea maderaspatana er brukt i folkemedisinen blant annet i Thailand som magestyrkende middel, som et menstruasjonsregulerende middel og som sedativum. Det er funnet flere kjemiske komponenter i planten, blant annet flavoner, diterpen derivater og steroider. Det er gjort noen få studier av planten i forhold til antifertilites effekt og analgesisk effekt. Det er en mulighet for at den tradisjonelle bruken av planten kan forklares ved dets innholdsstoffer, men dette er noe som i så fall må utforskes videre.

11.2 Taksonomiske betegnelser

Botanisk navn: *Grangea maderaspatana* Poir.

Klasse: Equisetopsida C. Agardh

Underklasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Overorden: Asteranae Takht.

Orden: Asterales Link

Familie: Asteraceae Bercht. & J. Presl.

Genus: *Grangea* Adans.

Synonym: *Artemisia maderaspatana* L., *Cotula sphaeranthus* Link, *Grangea ceruanoides* Cass., *Grangea hispida* Humbert, *Grangea procumbens* DC., *Grangea sphaeranthus* (Link) K. Koch, *Tanacetum aegytiacum* Juss. Ex Jacq.(Tropicos. org., 2010d).

Burmesisk navn: Taw-ma-nyolon

11.3 Botanikk og flora

Grangea maderaspatana er en ettårig (eller noen ganger flerårig) urt, med treaktig rot, krypende eller med rette stammer til 30 cm, forgrenet, aromatisk. Stammen er dunhåret med hvite hår og spredte kjertelhår. Bladene er sittende, omvendt eggformede til avlange, 1-9,5 (-15) x 0,3-4 cm, formet som en fjær med sagtannete, riflete, rundtannete lapper, dekket med små hår på begge sider. Blomsterhodet står alene aksillært motstående bladene eller terminalt med 2-3 sammen i bladete kvaster. Hvert enkelt hode er nesten rundt, 4-12 mm lange, oppreist som blomst, noe hengende som frukt. Blomsterenhetene er bleke til gyldent gule, de ytre sitter i ca 3 rader og er 1,5-1,8 mm lange. Akenene (oversatt fra achenes) er eggformete, litt flate, 1,2-2 mm lange, og har sparsomt med kjertelhår. Pappus er formet som en krone i ring, og er frynsete i kanten, 0,3-0,5 mm lang (Aluka.org., 2008).

11.4 Tradisjonell bruk

Grangea maderaspatana brukes som folkemedisin i Thailand. Bladene brukes som magestyrkende middel, et middel som lindrer gassansamling i tarmen, diaré, som et menstruasjonsregulerende middel og som sedativum. Planten hevdes å underlette tilbakekomsten av menstruasjonen etter barnefødsel om forsinkelsen er ledsaget av smerter i nyrene (Ruangrungsi et al., 1989). Bladene er også ansett for å ha antispasmodiske

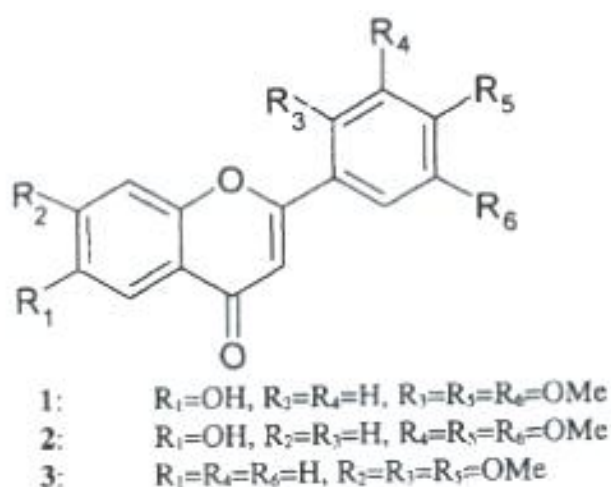
egenskaper, for å regulere menstruasjonen, være antiseptisk, smertestillende og juicen dryppes i ørene mot øreverk (Rao et al., 2009). Planten oppgis å være brukt ved smerter i øyne og ører (Ahmed et al., 2001).

11.5 Kjemiske studier

Arbeid med *Grangea maderaspatana* har gitt et antall clerodanderivater og karakteristiske diterpener så som hardwickiic syre og de korresponderende 1,2-dehydro derivater og centipedic syre, polyacetylenere, flavonoler, chondrillasterol og chondrillasteron (steroider) og sesquiterpener (Iyer & Iyer, 1978; Bohlmann & Mahanta, 1979; Pandey et al., 1984; Singh & Jain, 1990; Krishna & Singh, 2001).

11.5.1 Flavoner

Rao et al. isolerte tre flavoner fra planten *Grangea maderaspatana*, 5-deoksyflavonene 6-hydroksy-2', 4', 5'-trimetoksyflavone og 6-hydroksy-3', 4', 5'-trimetoksyflavon i tillegg til et fra tidligere kjent flavon 7,2', 4'-trimetoksyflavon. Disse komponentene ble karakterisert ved hjelp av UV, IR, MS, ¹D og ²D NMR inkludert NOESY, COSY, HSQC og HMBC studier (Rao, et al., 2009).



Figur 56: kjemisk struktur av 6-hydroksy-2', 4', 5'-trimetoksyflavon (1), 6-hydroksy-3',4',5'-trimetoksyflavon (2) og 7,2', 4'-trimetoksyflavon, hentet fra Rao et al. 2009.

11.5.2 Flavonoler

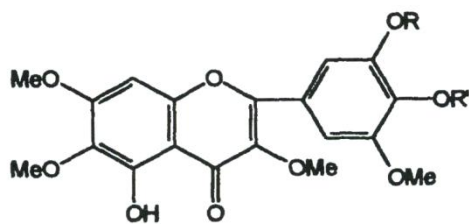
Krishna et al. undersøkte den polare fraksjonen av den overjordiske delen av *Grangea maderaspatana* og fant 5-hydroksy 3,3',4',5',6,7-hexametoksy flavon, 3',5-dihydroksy-3,4',5',6,7-pentametoksy flavon og 4',5-dihydroksy-3,3',5',6,7-pentametoksy flavon i tillegg til fra tidligere rapporterte klerodan derivater .

Planten ble lufttørket, pulverisert og ekstrahert med Et₂O-petrol-MeOH (1:1:1).

Løsningsmiddelet ble avdampet og resten løst i MeOH, deretter filtrert, konsentrert og kromatografert på silika gel kolonne. Dette gav fraksjon 1 -4. Fraksjon 1 gav α -humulen. Fraksjon 2 var en gul olje som ble separert på TLC og gav fytol, 3-hydroksy-8-acetoksy-pentadeca 1,9,14-trien-4,6-diyne, lupeol og en blandig av diterpen syrer. Påfølgende metylering av diterpen syre blandingen med eterløsning av CH₂N₂ og separering ved HPLC (MeOH-H₂O) over en omvendt fase kolonne gav metyl epinidoresedat, metyl strictiat, en blanding metyl estere av centipedic og nidrosedic syre og metyl hardwickiat.

Fraksjon 3 ble preparert på TLC (C₆H₆-CH₂Cl₂-Et₂O) og gav 3,8-dihydroksy-pentadeca-1,9-14-trien-4,6-diyne, p-hydroksybenzosyre og en kompleks blanding av diterpen laktoner som ble behandlet med CH₂N₂ med etterfølgende HPLC (MeOH-H₂O) og gav metyl estere av 15-metoksy-16-oxo-15,16H-strictic syre, 15-metoksy-16-oxo-15,16H-hardwickiic syre, 15-metoksy-16-oxo-nidrosedic syre, nor-strictic syre, nor hardwickiic syre og 2 α -acetoksy hardwickiic syre.

Fraksjon 4 ble separert på TLC (C₆H₆-CH₂Cl₂-Et₂O) som gav 5-hydroksy-3,3',4',5',6,7-heksametoksyflavon, auranamid, 16-oxo-15,16H hardwickiic syre, 3',5-dihydroksy-3,4',5',6,7-pentametoksyflavon (2), 4',5'-dihydroksy-3,3',5',6,7-pentametoksy flavon, 15-desmetoksy-16-oxo-15,16H strictic syre og 15-hydroksy-16-oxo 15,16H hardwickiic. Komponentene ble identifisert ved hjelp av IR, ¹H-NMR og ¹³C-NMR (Krishna & Singh, 2001).



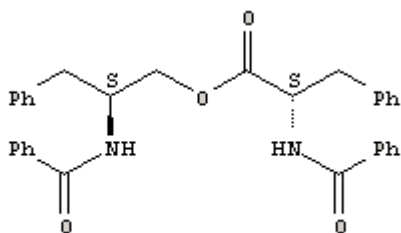
- 1** : R = R' = Me
2 : R = H, R' = Me
3 : R = Me, R' = H

Figur 57: kjemisk struktur av 5-hydroksy-3,3',4',5',6,7-heksametoksyflavon (1), 16-oxo-15,16H hardwickiic syre, 3',5-dihydroksy-3,4',5',6,7-pentametoksyflavon (2) og 4',5'dihydroksy-3,3',5',6,7-pentametoksyflavon (3), hentet fra Krishna et al. 2001.

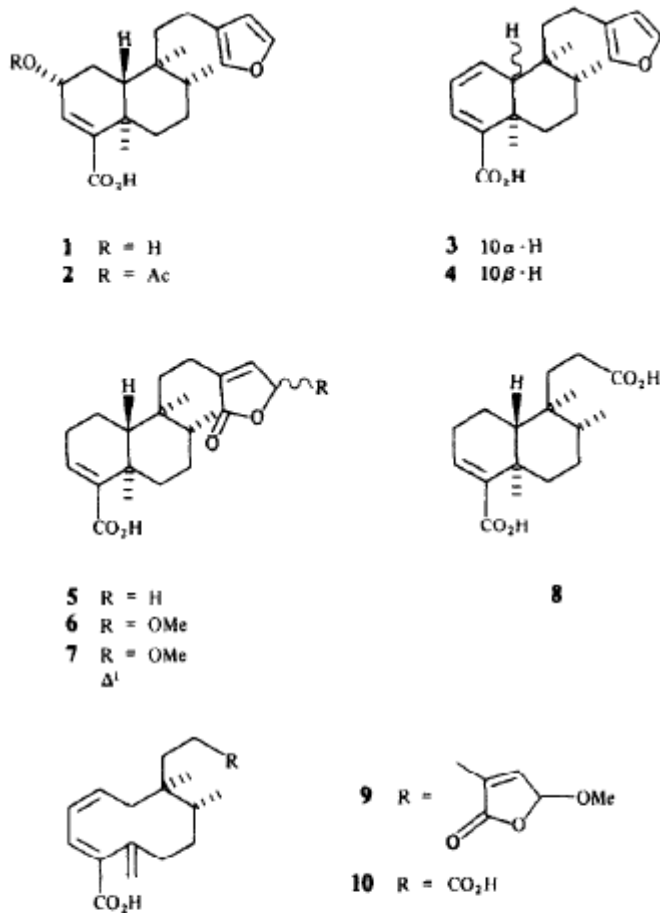
Iyer og Iyer isolerte komponenten strictic syre fra den sure fraksjonen av petroleum eter ekstraktet fra *Grangea maderaspatana*. Komponenten ble identifisert ved konvensjonelle spektral analyser og direkte sammenligning av smeltepunkt, UV og IR (Iyer & Iyer, 1979).

11.5.3 Diterpener og Clerodan derivater

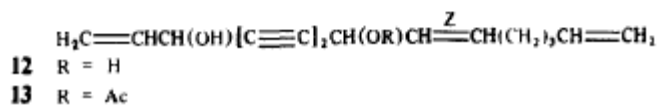
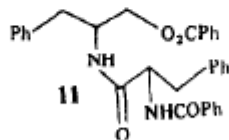
Singh et al. undersøkte den overjordiske delen av *Grangea maderaspatana* og fant flere clerodaner, nor-clerodan, seco-clerodan, nor-seco-clerodan derivater i tillegg til fenylalanin, hardwickiic og strictic syre derivater. Fenylalanin derivatet ble identifisert som auranamid, også kalt anabellamid (Talapatra et al., 1983; Singh & Jain, 1990).



Figur 58: kjemisk struktur av auranamid, hentet fra Singh et al. 1990 og kopiert fra SciFinder.



1a-10a are the corresponding methyl esters



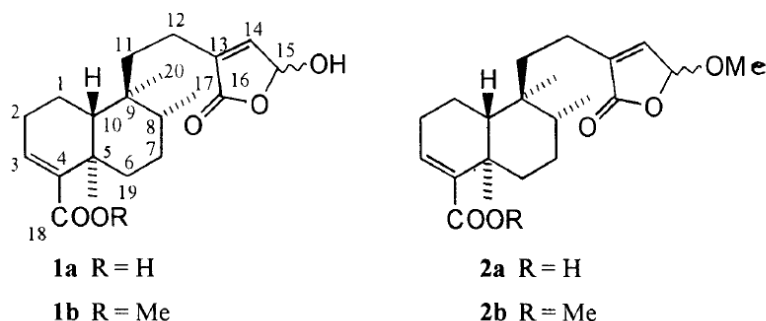
Figur 59: kjemiske strukturer av clerodan derivater isolert fra *Grangea maderaspatana*: 2 α -acetoksyhardwickiic syre (2), 10-epi-nidoresedic syre (3), 16-Oxo-15,15H-hardwickiic syre (5), 15-metoksy-16-oxo-15,16H-hardwickiic syre (6), 15-metoksy-16-oxo-nidoresedic syre (7), nor-hardwickiic syre (8), 15-metoksy-16-oxo-15,16H-strictic syre (9), nor-strictic syre (10), 3,8-dihydrokspentadeka-1,9,14-trien-4,6-diyn (12) og 3-hydrokspentadeka-1,9,14-trien-4,6-diyn (13), hentet fra Singh et al. 1988.

Den lufttørkede overjordiske delen av *Grangea maderaspatana* ble ekstrahert med Et₂O-petrol-MeOH (1:1:1) og konsentrert under redusert trykk som gav en grønn masse. Denne

ble avfettet ved å løses i MeOH. Det konsentrerte ekstraktet ble kromatografert over silika gel kolonne og gav fraksjon 1 (petrol), fraksjon 2 (petrol-Et₂O, 3:1), fraksjon 3 (petrol-Et₂O, 1:1) og fraksjon 4 (Et₂O). Fraksjon 1 gav α -humulen. Fraksjon 2 var en kompleks blanding og ble separert på PTLC (SiO₂) og eluert med C₆H₆-CH₂Cl₂ (1:1) som gav fytol, 3-hydroksey-8-acetoksey-pentadeca-1,9,14-trien-4,6-diyn, lupeol, en blanding av diterpen syrer som ved metylering med eter CH₂N₂ og HPLC separering (MeOH-H₂O, 9:1) over en omvendt fase kolonne gav metyl-10-epi-nidoresedat, metyl strictat, en blanding av metylestre av centipedic og nidoresedic syrer og metyl hardwickiat. Fraksjon 3 ble preparert ved TLC (C₆H₆-CH₂Cl₂-Et₂O) gav 3,8-dihydroksey-pentadeca-1,9,14-trien-4,6-diyn, p-hydroksey-benzosyre og en kompleks blanding av diterpen laktoner som ble behandlet med CH₂N₂ og separert ved HPLC (MeOH-H₂O, 9:1) og gav 15-metoksey-16-oxo-15,16H-strictic syre metyl ester, 15-metoksey-16-oxo-15,16H-hardwickiic syre metyl ester, 15-metoksey-16-oxonidoresedic syre metyl ester, metyl nor-strictiat, metyl nor-hardwickiat og metyl-2 α -acetokseyhardwickiat. Fraksjon 4 ble separert ved TLC (C₆H₆-CH₂Cl₂-Et₂O) og gav 5,3'-dihydroksey-3,6,7,4', 5', pentametokseyflavon, 16-oxo-15,16H-hardwickiic syre, 15-metoksey-16-oxo-15,16H-strictic syre, (-)auranamid og 5-hydroksey-3,6,7,3', 4', 5'-heksametokseyflavon. Auranamid ble identifisert ved hjelp av IR og ¹H-NMR (Singh & Jain, 1990).

Krishna et al. isolerte klerodanet 15-hydroksey-16-oxo-15,16H hardwickiic syre (15-hydrokseykleroda-3,13-dien-15,16-olide-18-oic syre) fra den overjordiske delen av *Grangea maderaspatana* i tillegg til fra tidligere kjente klerodan diterpener. Den kjemiske strukturen til 15-hydroksey-16-oxo-15,16H-hardwickiic syre (1a) og 15-metoksey-16-oxo-15,16H-hardwickiic syre ble bestemt ved hjelp av ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR og HPLC. Den tørkede overjordiske delen av planten ble ekstrahert med Et₂O-petrol-MeOH (1:1:1), avdampet og løst i MeOH, filtrert og filtratet ble konsentrert og kromatografert over silika gel. Fraksjon 1 gav α -humulen. Fraksjon 2 gav 3-hydroksey-8-acetoksey-pentadeca-1,9,14-trien-4,6-diyn, lupeol og en blanding av diterpensyrer som ved metylering gav metyl 10-epinidoresedat, metyl strictat, en blanding av metyl estre av centipedic og nidoresedic syrer og metyl estre av hardwickiic syre. Fraksjon 3 gav 3,8-dihydroksey pentadeca-1,9,14-trien-4,6-diyn, p-hydrokseybenzosyre og en kompleks blanding av diterpen laktoner. Denne blandingen ble behandlet med CH₂N₂ og kromatografert ved HPLC og gav metylestre av 15-metoksey-16-oxo-15,16H-strictic syre, 15-metoksey-16-oxo-15,16H-hardwickiic syre, 15-metoksey-16-oxonidoresedic syre, nor-strictic syre, nor-hardwickiic syre og 2 α -acetoksey hardwickiic syre.

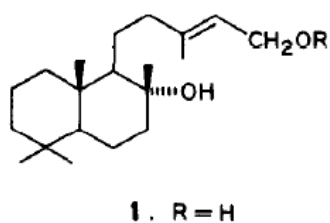
Fraksjon ble kromatografert ved TLC og behandlet med diazometan og gav metyl estre av 16,oxo-15,16H-hardwickiic syre, 16-oxo-15,16H-strictic syre, auranamid og komponent (1b) (Krishna & Singh, 1999).



Figur 60: kjemisk struktur av 15-hydroksy-16-oxo-15,16H- hardwickiic syre (1a) og 15-metoksy-16-oxo-15,16H-hardwickiic syre (2b), hentet fra Krishna et al. 1999.

Pandey et al. ekstraherte den overjordiske delen av *Grangea maderaspatana* og fant (-)-hardwickiic syre, ent-15,16-epoksy-1,3,13(16), 14-clerodatetraen-18-oic syre og 3-hydroksy-8-acetoksy-pentadeca-1,9,14-trien-4,6-diyn. Kjemisk struktur og stereokjemi ble identifisert ved hjelp av IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ og korelasjon mellom ent-2 β -hydroksy-15,16-epoksy-3,13(16), 14-clerodatrien-18-oic syre (Pandey, et al., 1984).

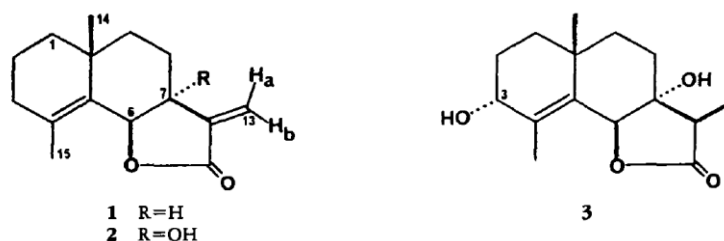
Rojatkar et al. isolerte en kjemisk komponent, et diterpenoid, ved navn 8,15-dihydroksy-13E-labdan. Kjemisk struktur ble klarlagt ved hjelp av IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ og omdanning til den fra tidligere kjente komponenten 8-hydroksy-13E-labdan-15yl- acetat. Den overjordiske delen av *Grangea maderaspatana* ble ekstrahert med MeCO_2 , kromatografert på silika gel kolonne og eluert med Me_2CO -petrol. En av fraksjonene gav komponenten 8,15-dihydroksy-13E-labdan (Rojatkar et al., 1994).



Figur 61: kjemisk struktur av 8,15-dihydroksy-13E-labdan, hentet fra Rojatkar et al. 1994.

11.5.4 Eudesmanolider

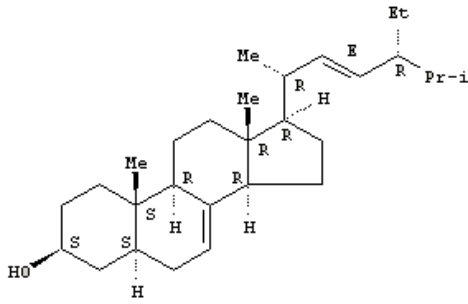
Ruangrungsi et al. isolerte og beskrev 3 komponenter fra *Grangea maderaspatana*. Tørket, pulverisert plantematerial av *G. maderaspatana* ble ekstrahert med EtOH og deretter avdampet under vakuum. Resten ble blandet med vann, ekstrahert med CHCl_3 og tørket. Ekstraktet ble kromatografert på silika gel og eluert med $\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO}$. Fraksjon 3-4 gav eudesmanolid(-)-frullanolid, en kjent allergen komponent. Fraksjon 7-11 gav (-)-7 α -hydroksyfrullanolid. Fraksjon 21-28 gav eudesmanolid (+)-grangolid. Den kjemiske strukturen til disse komponentene ble bestemt ved hjelp av $^1\text{H-NMR}$ og $^{13}\text{C-NMR}$ (Ruangrungsi, et al., 1989).



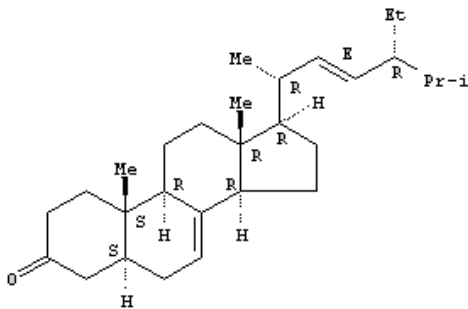
Figur 62: kjemisk struktur av eudesmanolid(-)-frullanolid (1), (-)-7 α -hydroksyfrullanolid (2) og eudesmanolid (+)-grangolid (3) hentet fra Ruangrungsi et al. 1989.

11.5.5 Steroider

Iyer og Iyer isolerte og identifiserte steroidene chondrillasterol og chondrillasteron fra planten *Grangea maderaspatana* ved hjelp av IR, NMR og MS. Resten fra petrol ekstraktet av planten ble separert i en nøytral og en sur fraksjon. Den nøytrale fraksjonen ble kromatografert over en silika gel kolonne og eluert i følgende fraksjoner: 1 (petrol), 2 (petrol- C_6H_6) og 3 (C_6H_6). Fraksjon 3 ble rekromatografert over en Al_2O_3 kolonne og eluert med $\text{C}_6\text{H}_6\text{-CHCl}_3$ og gav en alkohol identifisert som chondrillasterol. Fraksjon 2 ble rekromatografert over en Al_2O_3 kolonne og eluert med C_6H_6 som gav et keton, chondrillasteron (Iyer & Iyer, 1978).



Figur 63: kjemisk struktur av chondrillasterol hentet fra Iyer og Iyer 1978, og kopiert fra SciFinder.



Figur 64: kjemisk struktur av chondrillasteron, hentet fra Iyer og Iyer 1978, og kopiert fra SciFinder.

11.6 Biologiske studier

Ahmed et al. undersøkte den analgesiske aktiviteten av *Grangea maderaspatana* hos mus. Metanolekstraktet av planten i doser på 1 og 3g/kg per os viste en doseavhengig og signifikant ($p < 0,001$) hemming av eddiksyre induserte vridninger hos mus med respektive 50 og 80 %. Til sammenligning hemmet aminopyrin i en dose tilsvarende 50 mg/ kg vridninger med 50 %. Det testede materialet oppgis å ha vært metanol ekstrakt som inneholdt hardwickiic syre og ent-15,16-epoxy-1,3,13(16), 14-clerodatetraen-18-oic syre (Ahmed, et al., 2001).

Jain et al. undersøkte effekten av *Grangea maderaspatana* i forhold til antifertilitets aktivitet ved ulike stadier av graviditet hos mus. Den lufttørkede overjordiske delen av planten ble ekstrahert med Et₂O-petrol- MeOH (1:1:1). Løsningsmiddelet ble avdampet og resten ble løst i MeOH, filtrert, konsentrert og kromatografert over silika gel kolonne og gradienteluert med økende polaritet på elueringsmiddelet. C₆ H₆- CH₂Cl₂ -EtO -fraksjonen inneholdt en

blanding av oksygenerte flavonoider. Denne fraksjonen ble brukt til østrogenitet- og antifertilitetstest. Bilateralt ovarieektomerte mus ble brukt 10 dager etter operasjon. Bioanalysen ble utført ved å gi musene ekstrakt i en dose på 20 mg/kg kroppsvekt/ mus per os i tre påfølgende dager. Konjugert østrogen ble injisert i en dose på 0,20 µg/kg kroppsvekt/mus i tre påfølgende dager til en annen gruppe mus. Kontrollgruppen fikk oliven olje.

Administrering av konjugert østrogen forårsaket en signifikant ($p < 0,001$) økning av uterin og vaginal vekt. Administrering av flavonoider resulterte også i en signifikant ($p < 0,001$) økning i gjennomsnittlig uterin vekt, men økningen i vaginal vekt var ikke signifikant. Når flavonoider ble gitt i kombinasjon med konjugert østrogen ble det observert en statistisk signifikant minkning av gjennomsnittlig uterin og vaginal vekt sammenlignet med gruppen som kun fikk konjugert østrogen alene. Dette kan tyde på en østrogen effekt som mulig kan forklares ved en konkurrerende hemming mellom et svakt og et sterkt østrogen på reseptor nivå i uterus. Oral administrering av flavonoider fra dag 4-6 post coitum og dag 1-7 post coitum viste størst effekt (80%) i forhold til å forebygge nidasjon. Den post coitale antifertilitets effekten av flavonoidene ved ulike stadier av graviditeten kan synes å komme av dets østrogene effekt. Ekstraktet hadde en mild østrogen effekt sammenlignet med konjugert østrogen. Den østrogen antagonistiske effekten av flavonoidene støtter bruken av planten som et mildt østrogen (Jain & Sareen, 1993).

Patel et al. undersøkte den antioksidative aktiviteten til metanolekstraktet av *Grangea maderaspatana* Poir. Den antioksidative aktiviteten ble evaluert ved fem ulike *in vitro* tester og sammenlignet med en standard antioksidant (ascorbin syre). Innhold av totale fenoler ble bestemt ved bruk av Folin-Ciocalteu metoden for å evaluere forholdet mellom den antioksidative aktiviteten og det fytokjemiske innholdet. Innholdet av totale fenoler var 121,45 µg gallic syre ekvivalent til fenol. Metanolekstraktet til *Grangea maderaspatana* hadde en signifikant ($p < 0,05$) reduserende evne, 1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radikal fangende aktivitet (IC_{50} 46,55 µg/mL), nitrogen oksid skavenging aktivitet (IC_{50} 120,73 µg/mL, hydrogen peroksid skavenging aktivitet (IC_{50} 30,54 µg/mL) og hemmet β -karoten bleking (IC_{50} 209,73 µg/mL). Til sammenligning var IC_{50} verdiene for ascorbinsyre respektive 24,96 µg/mL, 236,37 µg/mL, 57,34 µg/mL og 339,16 µg/mL. Antioksidant effekten var konsentrasjonsavhengig og økte med økende mengde ekstrakt. Disse resultatene knyttes til innholdet av fenoler og flavonoider i ekstraktet (Patel et al., 2009).

Rao et al. gjorde en screening av antioksidant aktivitet og soppdrepende aktivitet til isolerte 5-deoksyflavoner *in vitro* ved respektive en superoksid fri radikal fangende aktivitet metode og agardiffusjonsmetoden. Studien viste at antioksidant aktiviteten til komponentene økte med økende antall fenoliske hydroksyl grupper. Flavonet med OH-gruppe i 6. posisjon og metoksygruppe ved 2', 4', 5'posisjon utøvet litt større aktivitet enn komponenten med metoksygruppe i 3', 4', 5'posisjon. Ettersom det kun var 3 komponenter som ble sammenlignet er det uvisst om dette prinsippet gjelder i andre sammenhenger. Det framgår ikke av artikkelen om denne forskjellen mellom komponentene i aktivitet var statistisk signifikant. Rapporten oppgir at alle komponentene hadde en soppdrepende aktivitet på *Aspergillus niger* og *Penicillium chrysogenum in vitro*. Det ble videre observert at 7,2'.4'-trimetoksyflavon viste en større hemmende aktivitet mot begge typer sopp sammenlignet med 6-hydrokylflavonene, samt at 6-hydrokyl-2', 4', 5'trimetoksyflavon viste bedre soppdrepende effekt enn 6-hydrokyl-3', 4', 5'trimetoksyflavon. Fra disse resultatene ble det konkludert at flavon ring systemet med metoksygrupper i 7,2', 4'posisjon hadde størst soppdrepende effekt (Rao, et al., 2009).

11.7 Diskusjon

I følge professor Nordals Burma herbarium skal bladene og urten ha vært brukt som antihelminatisk, antipyretisk og antispasmodisk middel. Det er ikke funnet noen studier som har undersøkt slike eventuelle egenskaper til *Grangea maderaspatana*. Det er gjort noen få studier av planten i forhold til antifertilitets effekt som henviser til plantens innhold av steroider og kobles til en østrogen effekt. Der også gjort studier i forhold til plantes antioksidative egenskaper sett i sammenheng med en soppdrepende aktivitet. En studie rapporterer også om analgesisk effekt hos mus. Likevel gir dette et lite grunnlag å forske videre på med hensyn til plantens innhold av flere identifiserte kjemiske komponenter.

11.8 Konklusjon

Det er gjort lite forskning på planten *Grangea maderaspatana*. Disse peker i retning av at planten inneholder kjemiske komponenter som kan ha et mulig potensial i forhold til en eventuell antifertilitets effekt, analgesisk effekt og soppdrepende aktivitet. Det gjenstår mye forskning for å kunne avklare eventuelle egenskaper til plantes mange komponenter.

12. *Siegesbeckia orientalis* L.



Bilde av *Siegesbeckia orientalis*, hentet fra (Lienstat, 2003).

12.1 Sammendrag

Siegesbeckia orientalis er en vanlig plante i østen som brukes i kinesisk tradisjonell medisin ved blant annet allergi og reumatisme. Blad og skudd vaskes og kokes for å fjerne bitterstoffet darutin, for deretter å spises. Det er funnet en rekke kjemiske komponenter i planten, men det er gjort kun få biologiske studier.

12.2 Taksonomiske betegnelser

Botanisk navn: *Siegesbeckia orientalis* L.

Klasse: Equisetopsida C. Agardh

Underklasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Overorden: Asteranae Takht.

Orden: Asterales Link

Familie: Asteraceae Bercht. & J. Presl.

Genus: *Siegesbeckia* L.

Synonym: *Siegesbeckia brachiata* Roxb., *Siegesbeckia gracilis* DC., *Siegesbeckia microcephala* DC., *Siegesbeckia orientalis* fo. *angustifolia* Makino, *Siegesbeckia orientalis* var. *angustifolia* Makino, *Siegesbeckia humilis* Koidz., *Siegesbeckia iberica* Willd. (Tropicos.org., 2010a).

12.3 Flora og botanikk

Planten kan bli 30-100 cm høy. Stammen er rett, enkel eller forgrenet som ribben, dekket med krøllete hår, spesielt på den øverste delen. Bladene er motstående, triangulære til eggformede eller bare eggformede, avrundede eller formet som et hjerte ved basis med smal spiss ved bladstilken, avsmalnende og spiss bladspiss, ujevn taggete langs kanten, med liggende hår, spesielt på undersiden, og glissent med små fine kjertler, noen ganger med fine oppsvulmete kuler. Blomsterhodet er lite, ca 5 mm vidt. De ytre høybladene er dekket med hår, er omvendt eggformete og mye lengre enn de innerst bladene. Hemikarp er 3 mm lang og 1,2 mm bred, er omvendt pyramideformet, mørk grå eller matt svart. Planten blomstrer fra juni til august og frukten kommer i juli til september. Planten vokser som ugress langs veier, grøftkanter og elver, i hager og i brakk jord. Planten er utbredt i tropiske og subtropiske områder i blant annet Nord Amerika, Kina, Midtøsten, Østen og Russland (Agro Atlas, 2010).

12.4 Tradisjonell bruk

I følge professor Nordals Burma herbarium skal planten ha vært brukt ved hud sykdommer og som stimulantia. I Vietnam er den overjordiske delen av planten brukt i tradisjonell medisin for behandling av reumatisme, akutt artritt, furunkulose, impetigo og menstruelle forstyrrelser (Giang et al., 2005). I Kina vokser det 3 ulike arter av *Siegesbeckia* hvor den overjordiske delen er brukt i tradisjonell kinesisk medisin til behandling ved reumatoid artritt, hypertensjon, malaria og neurastenia (Xiong et al., 1997; Xiang et al., 2004; Wang, et al., 2009). *Siegesbeckia orientalis* har vært brukt i folkemedisinen som en anti-allergisk remedie i generasjoner (Hwang et al., 2001). Yang et al. oppgir at urten brukes i kinesisk

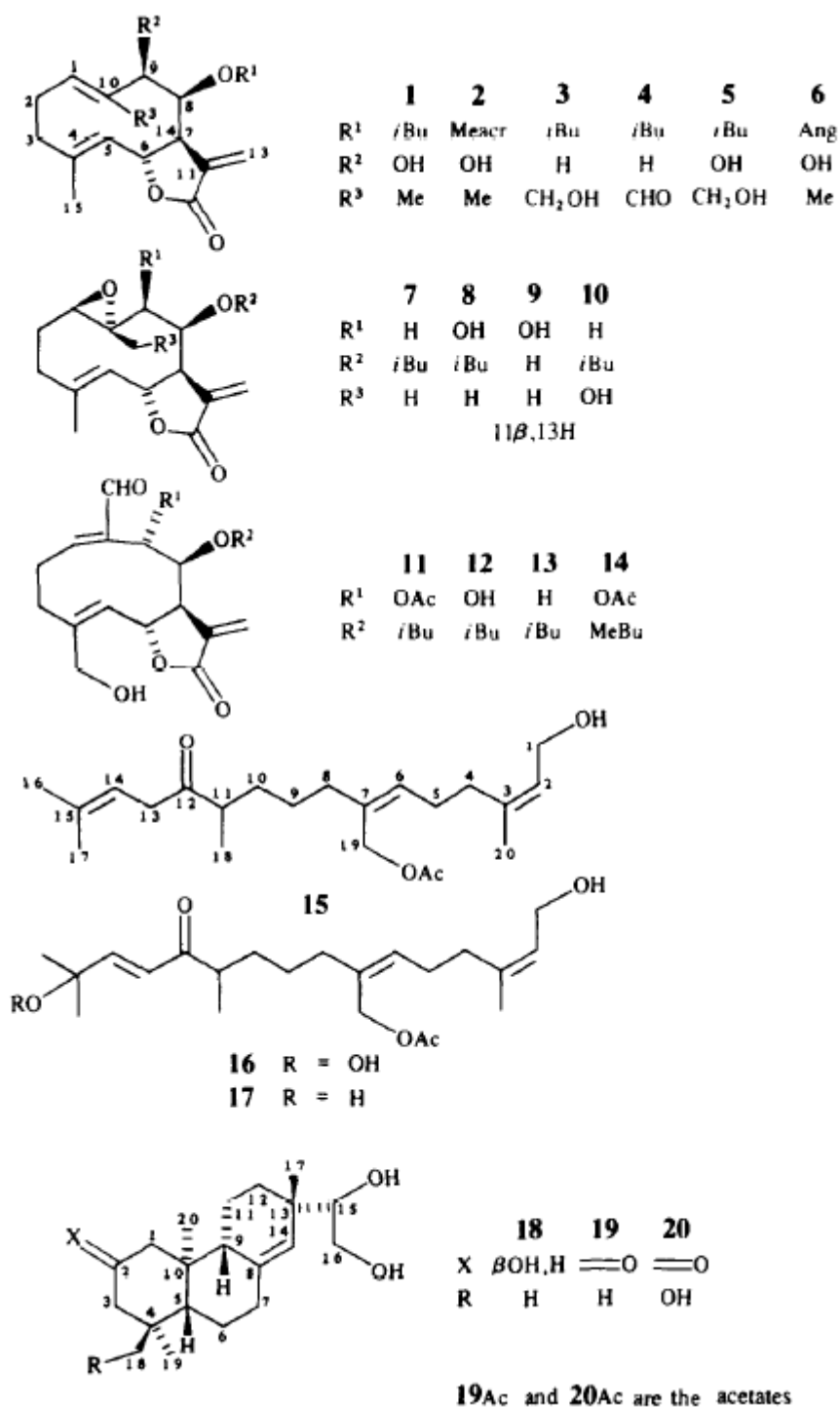
folkemedisin som styrkende motgift, smertestillende middel og ved hemiplegi samt at den har en blodtrykksenkende aktivitet (Yang et al., 1976).

12.5 Kjemiske studier

Wang et al. isolerte et ent-piraman diterpenoid ved navn β -D-glucopyranosyl-ent-2-oxo-15,16-dihydroxypimar-8(14)-en-19-oiolat og et sesquiterpenlaktone ved navn [1(10)-E, 4Z]-8 β -angeloyloksy-9 α -metoksy-6 α ,15-dihydroksy-14-oxogermacra-1(10), 4,11(13)-trien-12-oiacid 12,6-lacton i tillegg til 5 kjente ent-piraman diterpener fra de overjordiske delene av *Siegesbeckia orientalis* L. Den kjemiske strukturen til komponentene ble bekreftet ved hjelp av spektral analyse, spesielt en- og to-dimensjonale (1D og 2D) NMR spektroskopiske metoder og HR-EI-MS, IR, $^1\text{H-NMR}$ og $^{13}\text{C-NMR}$.

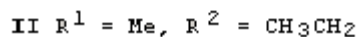
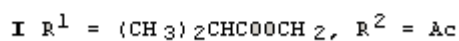
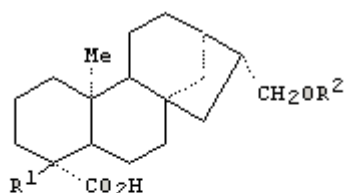
Den tørkede og pulveriserte planten ble ekstrahert med metanol, filtrert og konsentrert under redusert trykk. Konsentratet ble delt mellom vann og petroleum eter (1:1). Den vannløselige delen ble kromatografert og eluert med EtOH-H₂O som gav 3 fraksjoner (A-C). Fraksjon B som bestod av hovedkomponentene ble kromatografert på MCl gel kolonne og eluert med MeOH-H₂O som gav 3 subfraksjoner (B1-B3). Fraksjon B1 ble separert på silika gel kolonne og eluert med CHCl₃-MeOH. Hver fraksjon ble så rensset på C-18 omvendt fase silika gel kolonne og gav komponentene 1, 4, 5 og 6. Fraksjon B2 ble kromatografert på silika gel og eluert med CHCl₃-MeOH og gav subfraksjon B2' som ble rekrystalisert med aceton og gav komponent 4. Fraksjon B3 ble separert på silika gel og eluert med EtOAc-MeOH som gav subfraksjon B3'. Denne ble så rensset på en C-18 omvendt fase silika gel og gav komponent 2 og 3. Den petroleum-eter løselige resten ble kromatografert på en polyamid kolonne og eluert med MeOH-H₂O som gav 4 fraksjoner (D-G). Fraksjon E ble separert på silika gel og eluert med petroleumeter-EtOAc som gav subfraksjon E'. Denne ble så rensset på en C-18 omvendt fase silika gel og gav komponent 4 og 7 (Wang & Hu, 2006).

(17), 2 β ,15,16-trihydroxy-ent-pimar-8(14)-en (18), 15,16-dihydroksy-2-oxo-ent-pimar-8(14)-en (19) og 15,16,18-trihydroksy-2-oxo-ent-pimar-8(14)-en (20), hentet fra Zdero et al. 1991.



Yang et al. isolerte et flavonoid ved navn 3,7-dimetylquercetin, og to ukjente terpenoider med smeltepunkt på 241-242 °C og 115-120°C, i tillegg til kaliumnitrat, fra etanolekstraktet av planten *Siegesbeckia orientalis* (Yang, et al., 1976).

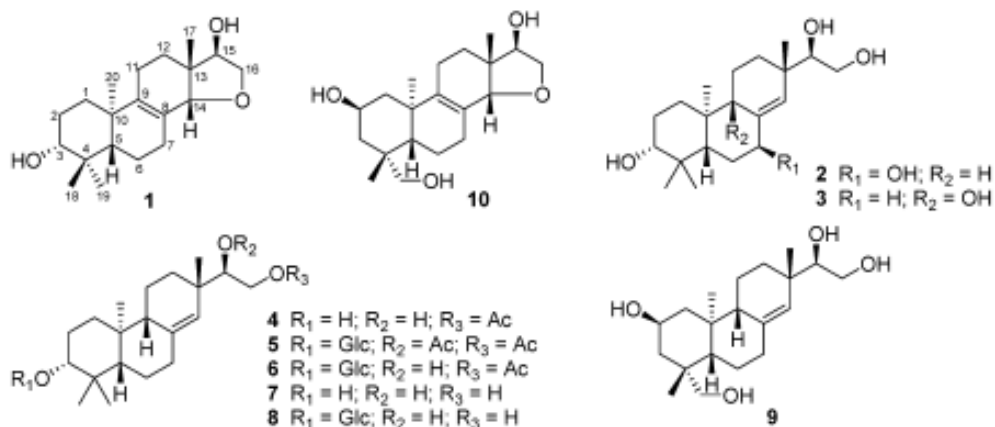
Guo et al isolerte 8 komponenter fra de overjordiske delene av *Siegesbeckia orientalis* L. Deres kjemiske struktur ble klarlagt ved hjelp av spektroskopiske metoder (IR, EI-MS, ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^1H -NOESY og ^1H - ^{13}C -COSY). Komponent I har navnet siegesesteric syre med kjemisk struktur ent-17-acetoksy-18-isobutyryloksy-16(α)-kauran-19-oic syre. Komponent II har navnet siegesetheric syre med kjemisk struktur ent-17-etoksy-16(α)-(-)-kauran-19-oic syre. Andre komponenter som fra tidligere var kjent ble også funnet, og disse var ent-16 β ,17-dihydroksy-kauran-19-oic syre, kirenol, β -sitosteryl glucosid, heneicosanol, metyl arachidat (= eicosanoic acid, arakidonsyre) og β -sitosterol. Kun abstraktet fra denne artikkelen er tilgjengelig (Guo et al., 1997).



Figur 67: kjemisk struktur av siegesesteric syre (I) og siegesetheric syre (II), hentet fra Guo et al. 1997 og kopiert fra SciFinder.

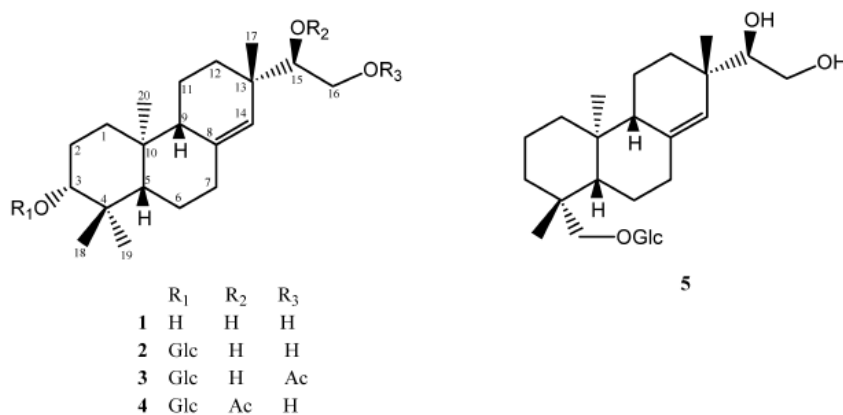
12.5.1 Diterpenoider

Wang et al. isolerte 6 ent-piraman diterpenoider (komponent 1-6) fra etanolekstraktet av *Siegesbeckia orientalis*, i tillegg til fra tidligere kjente darutigenol (7), darutosid (8) og kirenol (9). Den kjemiske strukturen til disse ble klarlagt på bakgrunn av spektroskopiske metoder (IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR). Strukturen til ent-12 β ,16-epoxy-8-piraman-2 α ,15 β ,19-triol som er isolert fra *Siegesbeckia orientalis* blir i denne artikkelen korrigert til ent-14 β ,16-epoxy-8-piraman-2 α ,15 α ,19-triol (komponent 10) (Wang, et al., 2009).



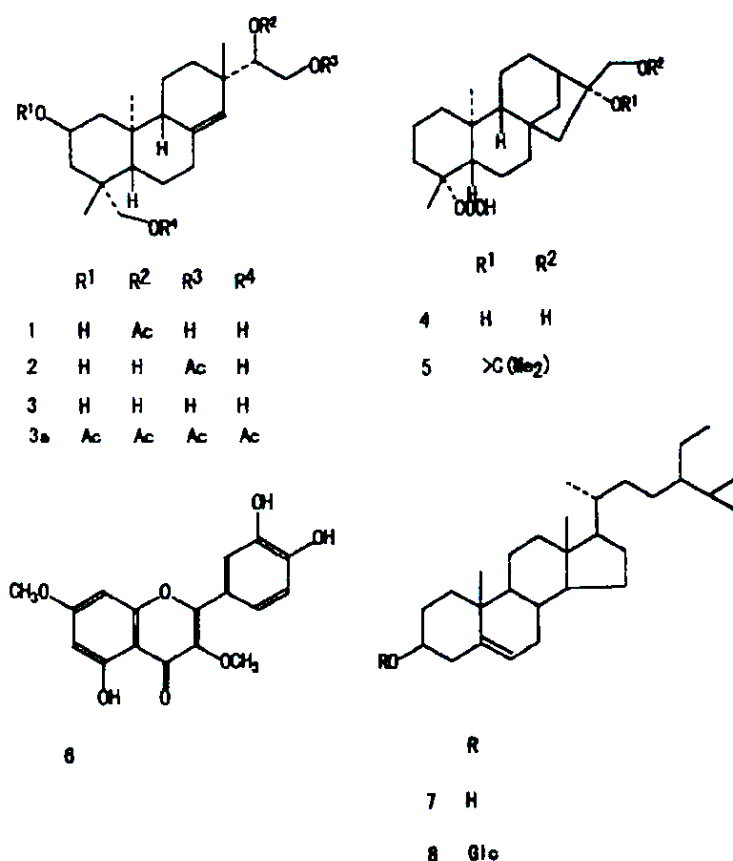
Figur 68: kjemisk struktur av ent-14 β ,16-epoksy-8-pimaren-3 β ,15 α -diol (1), 7 β -hydroksydarutigenol (2), 9 β -hydroksydarutigenol (3), 16-O-acetyldarutigenol (4), 15,16-di-O-acetyldarutosid (5), 16-O-acetyldarutosid (6), darutigenol (7), darutosid (8), kirenol (9) og ent-14 β ,16-epoksy-8-pimaren-2 α ,15 α ,19-triol (10), hentet fra Wang et al. 2009.

Giang et al. isolerte et ent-piraman glukosid ved navn hytiemosid B i tillegg til 4 fra tidligere kjente ent-piraman-type diterpenoider: darutigenol, darutosid, ent-16-acetoksympimar-8(14)-ene-3 β , (15R)-diol 3-O- β -D-glucopyranosid, som også har navnet hytiemosid A, og ent-(15R),16,19-trihydroksypimar-8(14)-ene 19-O- β -D-glucopyranosid fra metanolekstraktet av den overjordriske delen av *Siegesbeckia orientalis* L. Komponentene ble identifisert ved hjelp av spektroskopiske metoder ((HR)-FAB-MS, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, TLC, 2D-NMR), kjemiske reaksjoner og sammenligning med litteratur (Giang, et al., 2005).



Figur 69: Kjemisk struktur av ent-Piraman-type diterpenoider: darutigenol (1), darutosid (2), ent-16-acetoksympimar-8(14)-ene-3 β , (15R)-diol 3-O- β -D-glucopyranosid, som også har navnet hytiemosid A (3), hytiemosid B (4) og ent-(15R),16,19-trihydroxypimar-8(14)-en 19-O- β -D-glucopyranosid (5) isolert fra *Siegesbeckia orientalis*, hentet fra Giang et al. 2005.

Xiong et al. isolerte to diterpenoider ved navn orientalin A, med kjemisk struktur ent-15-acetoksy-2 α ,16,19-trihydroksypimar-8(14)-en, og orientalin B med kjemisk struktur ent-16-acetoksy-2 α ,15,19-trihydroksy-pimar-8(14)-en, i tillegg til 6 andre fra tidligere kjente komponenter, kirenol, ent-16 β ,17-dihydroksykauran-19-oic syre, ent-16 β ,17-dihydroksykauran-19-oic syre-16 β ,17-acetonid, 3,7-dimetylquercetin, β -sitosterol og daucosterol fra etanolekstraktet av *Siegesbeckia orientalis*. Den kjemiske strukturen ble klarlagt ved å sammenligne spektrale data (IR, $^1\text{H-NMR}$ og $^{13}\text{C-NMR}$) og kjemiske bevis. Tørkede og pulveriserte planter fra Kina ble ekstrahert med etanol under reflux. Fordampning av løsningsmiddelet gav en rest som ble løst i EtOH-H₂O (1:9) og ristet med ulike løsningsmidler i følgende rekkefølge: petrol, Et₂O og n-BuOH. Petrolekstraktet ble kromatografert over en AlO₃ kolonne og eluert med økende andeler av acetonpetrol som gav komponent 7 og 3. Eterekstraktet ble kromatografert på silika gel med aceton-petrol som gav komponent 5, 4, 6, 3 og 8. N-BuOH ekstraktet ble kromatografert på silika gel kolonne og eluert med 3-15% MeOH-CHCl₃ og gav komponent 2, 1 og 3 (Xiong, et al., 1997).



Figur 70: Kjemisk struktur av komponentene orientalin A (1), med kjemisk struktur ent-15-acetoksy-2 α ,16,19-trihydroksypimar-8(14)-en (1) og B (2) med kjemisk struktur ent-16-acetoksy-2 α ,15,19-trihydroksy-pimar-8(14)-en, kirenol (3), ent-16 β ,17-dihydroksykauran-

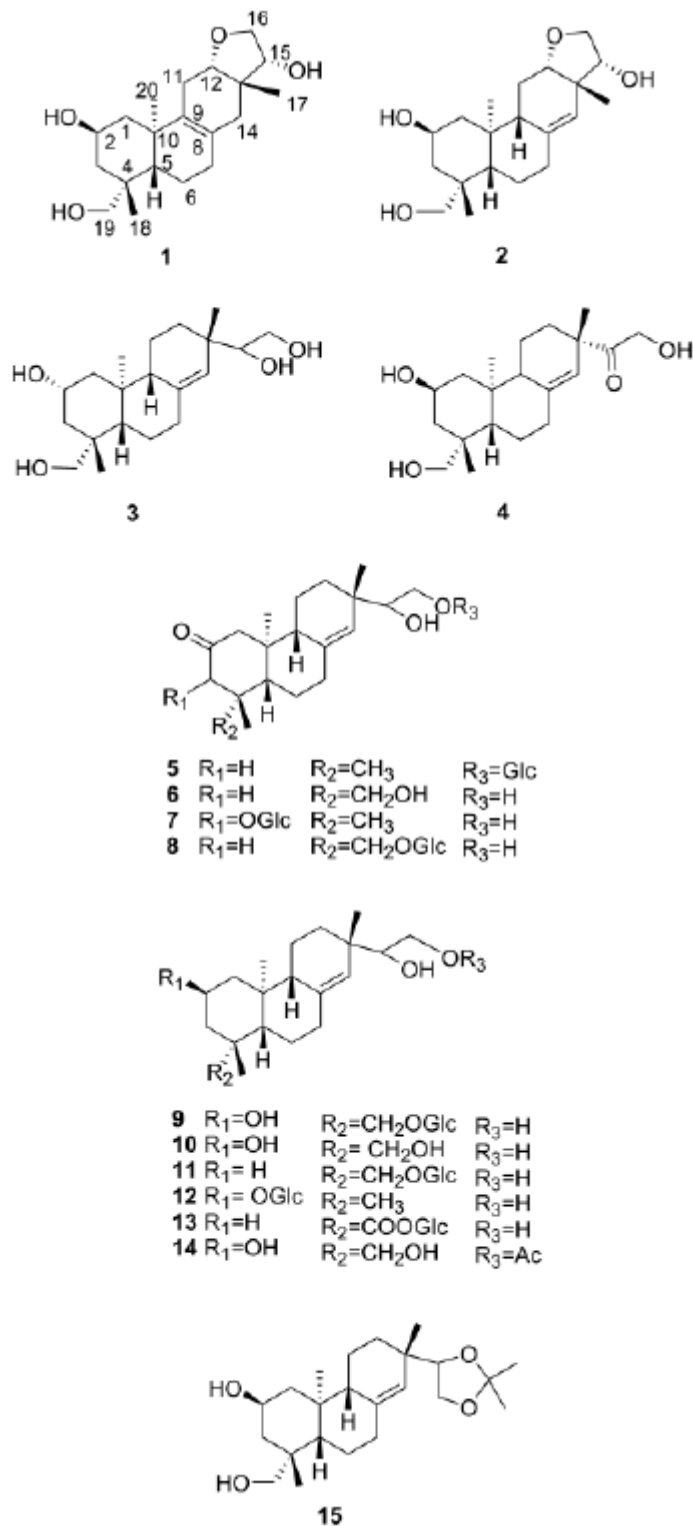
19-oic syre (4), ent-16 β ,17-dihydroksykauran-19-oic syre-16 β ,17-acetonid (5), 3,7-dimetylquercetin (6), β -sitosterol (7) og daucosterol (8), hentet fra Xiong et al. 1997. Komponent 3a har navnet tetraacetylkirenol.

Xiang et al. isolerte 15 komponenter fra den overjordiske delen av *Siegesbeckia orientalis* L. Luft tørket pulver av *S. Orientalis* ble ekstrahert med 95% EtOH. Råekstraktet ble blandet med vann for å lage en suspensjon og deretter ekstrahert med petroleum eter, EtOAc og n-BuOH.

Den EtOAc løslige delen ble kromatografert på silika gel kolonne og eluert med petroleum eter-EtOAc og CH₃OH som gav 5 fraksjoner, 1-5. Fraksjon 5 som hovedsakelig bestod av diterpenoider ble kromatografert på en MCl gel kolonne og eluert med 70 % CH₃OH i vann som gav 5 fraksjoner, 5A-5E. Fraksjon 5B ble kromatografert på silika gel kolonne og eluert med CHCl₃-MeOH og hver hovedfraksjon ble så renset på en C-18 omvendt fase kolonne av silika gel som gav komponent 1, 2, 4, og 10. Fraksjon 5C ble kromatografert på silika gel og eluert med CHCl₃-MeOH, og videre separert på en omvendt fase C-18 kolonne av silika gel som gav komponent 3, 5, 6, 11, 12, og 13. Fraksjon 5D ble kromatografert på MCl og eluert med 60 % MeOH i vann og hovedkomponentene ble så renset på silika gel og eluert med CHCl₃-MeOH som gav komponent 14 og 15.

Den n-BuOH løselige delen ble kromatografert på MCl gel for å fjerne pigmenter og deretter separert på silika gel og eluert med CHCl₃-MeOH som gav 5 fraksjoner. (Bu 1-5). Bu2 ble kromatografert på en C-18 omvendt fase kolonne og eluert med 60 % CH₃OH i vann som gav en fraksjon som igjen ble renset videre på Sephadex LH-20 som gav komponent 7. Bu5 ble kromatografert på omvendt fase C-18 kolonne og eluert med 60% CH₃OH i vann som gav 2 fraksjoner. Disse ble renset på silika gel og eluert med CHCl₃-MeOH-H₂O som gav komponent 8 og 9. Den kjemiske strukturen til stoffene ble klarlagt ved hjelp av spektrale metoder, spesielt 1D og 2D NMR (Xiang, et al., 2004).

Baruah et al. isolerte komponentene darutigenol og darutosid fra den polare fraksjonen av ekstraktet fra *Siegesbeckia orientalis* (Barua et al., 1980).

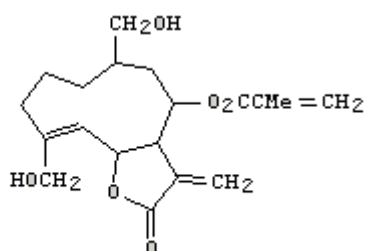


Figur 71: Kjemisk struktur til ent-12 α ,16-epoksy-2 β ,15 α ,19-trihydroksypimar-8-en (1), ent-12 α ,16-epoksy-2 β ,15 α ,19-trihydroksypimar-8(14)-en (2), ent-2 α ,15,16,19-tetrahydroksypimar-8(14)-en (3), ent-15-oxo-2 β ,16,19-trihydroksypimar-8(14)-en (4), ent-2-oxo-15,16-dihydroksypimar-8(14)-en-16-O- β -glucopyranosid (5), ent-2-oxo-15,16,19-trihydroksypimar-8(14)-en (6), ent-2-oxo-3 β ,15,16-trihydroksypimar-8(14)-en-3-O- β -glucopyranosid (7), pubesid D (8), ent-2 β ,15,16,19-tetrahydroksypimar-8(14)-en-19-O- β -

glucopyranosid (9), kirenol (10), pubesid B (11), pubesid A (12), pubesid C (13), 16-acetylkirenol (14) og isopropylidenkirenol (15). Hentet fra Xiang et al. 2004.

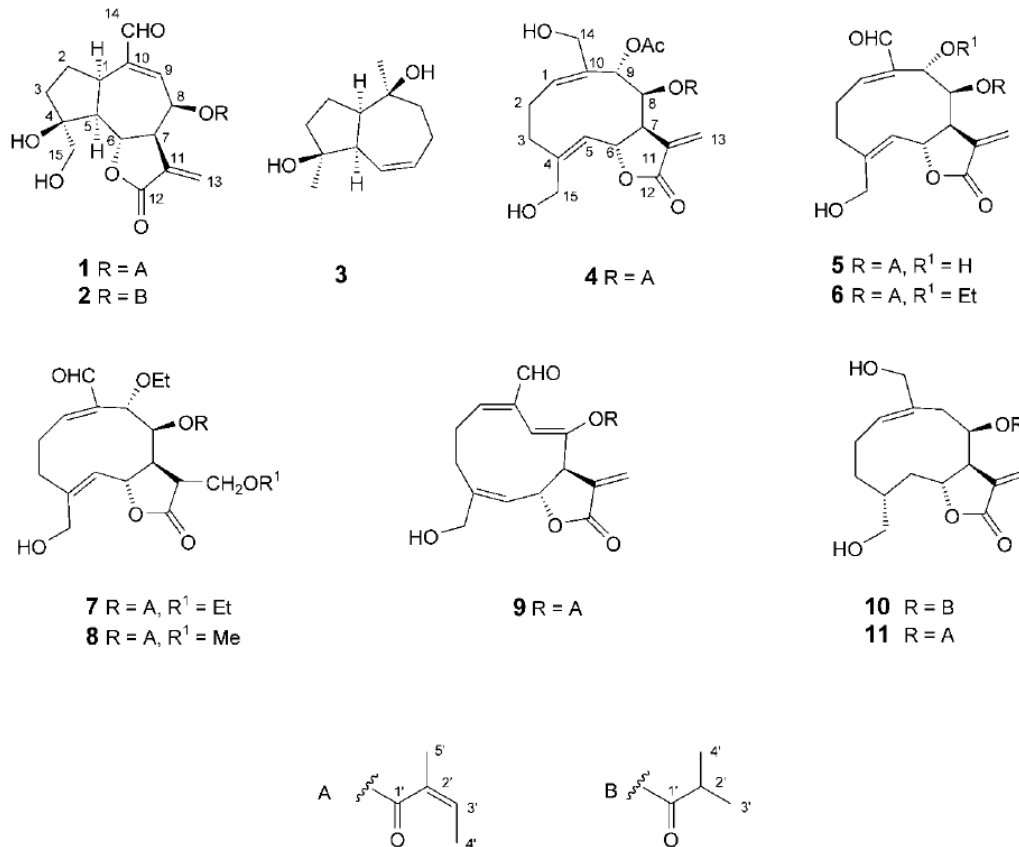
12.5.2 Sesquiterpenlaktoner

Rybalko et al. rapporterer om et sesquiterpenlakton ved navn orientin funnet i *Siegesbeckia orientalis* og identifisert ved hjelp av IR, UV spektral analyse og NMR. Kun abstraktet er tilgjengelig (Rybalko et al., 1976).



Figur 72: kjemisk struktur av orientin hentet fra Rybalko et al. 1976 og kopiert fra SciFinder.

Xiang et al. isolerte 8 sesquiterpenlaktoner fra de overjordiske delene *Siegesbeckia orientalis*. Deres kjemiske struktur ble identifisert ved hjelp av spektralanalyser, spesielt 1D og 2D NMR. Det luft tørkede pulveret ble ekstrahert med 95% EtOH og kokt i vann for deretter å ekstraheres suksessivt med petroleum eter, AcOEt og BuOH. Den AcOEt løselige delen ble kromatografert på silika gel og eluert med petroleum eter/ AcOEt, AcOEt og MeOH som gav fraksjon 1-5- Fraksjon 4 ble kromatografert på MCl gel kolonne og eluert med MeOH/H₂O som gav fraksjon 4.1-4.3. Fraksjon 4.2 ble kromatografert på silika gel og eluert med CHCl₃/Me₂CO og Me₂CO som gav fraksjon 4.2.1-4.2.8. Disse ble renses på C18 kolonne og eluert med MeOH/Me₂CO, Sephadex LH-20 og EtOH som gav komponent 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 og 11. Fraksjon 4.3 ble kromatografert på silika gel kolonne og eluert med CHCl₃/MeOH og MeOH for så å renses på silika gel og elueres med Sephadex LH-20, EtOH, MeOH/H₂O som gav komponent 6 og 9. Fraksjon 3 ble kjørt på silika gel og eluert med CHCl₃/MeOH som gav en fraksjon. Denne ble videre renses på C18 kolonne og eluert med MeOH/H₂O som gav komponent 3. Komponentene 6, 7 og 8 var artefakter (Xiang et al., 2005).

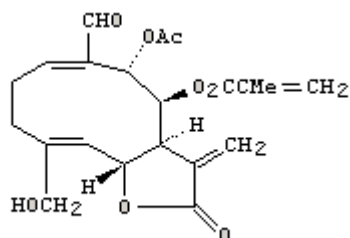


Figur 73: kjemisk struktur av 8 β -(angeloyloksy)-4 β ,6 α ,15-trihydroksy-14-oxoguaia-9,11(13)-dien-12-oic syre 12,6-lakton (1), 4 β ,6 α ,15-trihydroksy-8 β -(isobutyryloksy)-14-oxoguaia-9,11(13)-dien-12-oic syre 12,6-lakton (2), 11,12,13-trinorguai-6-ene-4 β ,10 β -diol (3), 2-metylbut-2-enoic syre (3aS,4S,5S,6Z,10Z,11aR)-5-(acetyloksy)-2,3,3a,4,5,8,9,11a-octahydro-6,10-bis(hydroksymetyl)-3-metylen-2-oxo-cyclodeca[b]furan-4-yl ester (4), lecocarpinolid (5), (1(10)E,4Z)-8 β -(angeloyloksy)-9 α -etoksy-6 α ,15-dihydroksy-14-oxogermacra-1(10),4,11(13)-trien-12-oic syre 12,6-lakton (artefakt 6), (1(10)E,4Z)-8 β -(angeloyloksy)-9 α ,13-dietoksy-6 α ,15-dihydroksy-14-oxogermacra-1(10),4-dien-12-oic syre 12,6-lakton (artefakt 7), (1(10)E,4Z)-8 β -(angeloyloksy)-9 α -etoksy-6 α ,15-dihydroksy-13-metoksy-14-oxogermacra-1(10),4-dien-12-oic syre 12,6-lakton (artefakt 8), (1(10)E,4E,8Z)-8-(angeloyloksy)-6 α ,15-dihydroksy-14-oxogermacra-(1(10),4,8,11(13)-tetraen-12-oic syre 12,6-lakton (9), (4 β ,10E)-6 α ,14,15-trihydroksy-8 β -(isobutyryloksy)germacra-10,11(13)-dien-12-oic syre 12,6-lakton (10) og (1(10)E,4 β)-8 β -(angeloyloksy)-6 α ,14,15-trihydroksygermacra-1(10),11(13)-dien-12-oic syre 12,6-lakton (11), hentet fra Xiang et al. 2005.

12.5.3 Melampolider

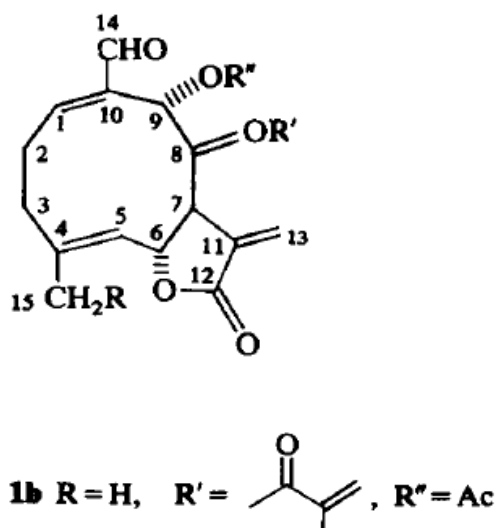
Baruah et al. isolerte en kjemisk komponent ved navn orientolid fra den overjordiske delen av planten *Siegesbeckia orientalis*. Planten ble først ekstrahert med CH₂Cl₂ og deretter med MeOH. Løsningen ble vasket med petrol, konsentrert og ekstrahert med CHCl₃, avdampert

og kromatografert over en silika gel kolonne og eluert med C_6H_6 -EtOAc i ulike forhold og EtOAc-MeOH i ulike forhold på TLC og videre rensset ved PLC (C_6H_6 -EtOAc som gav orientalid. Den kjemiske strukturen ble klarlagt ved hjelp av IR, 1H -NMR og ^{13}C -NMR (R. N. Baruah et al., 1979).

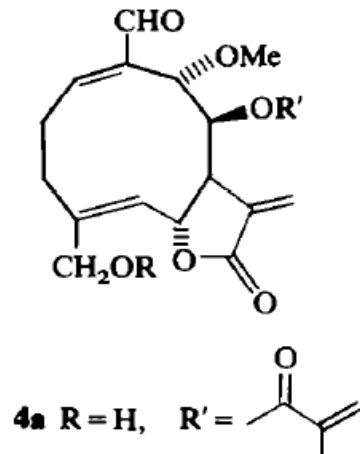


Figur 74: kjemisk struktur av orientalid hentet fra Baruah et al. 1979 og kopiert fra SciFinder.

Barua et al. isolerte og identifiserte også to melampolider (1b og 4a) fra *Siegesbeckia orientalis*. De to melampolidene ble isolert fra den polare fraksjonen av ekstraktene. Komponentene ble kromatografert ved hjelp av TLC på silika gel kolonne og eluert med C_6H_6 -EtOAc i ulike forhold og EtOAc-MeOH i ulike forhold, for deretter å separeres ved PLC (uvisst om dette er en forkortelse for partition liquid chromatography). Komponentene ble identifisert ved bruk av spektroskopiske metoder (IR, 1H -NMR, ^{13}C -NMR) (Barua, et al., 1980).



Figur 75: kjemisk struktur av et melampolid (1b), hentet fra Baruah et al. 1980.



Figur 76: kjemisk struktur av et melampolid (4a), hentet fra Baruah et al. 1980.

12.6 Biologiske studier

Sun et al. studerte den immunosuppressive effekten til etanolekstraktet av *Siegesbeckia orientalis* (EESO) *in vitro* og *in vivo* i mus. I denne studien ble kirenol brukt for å identifisere og kvantifisere EESO. Effekten av dette ekstraktet ble studert på splenocyttdifferensiering og proliferasjon *in vitro* og humoral og cellulær immunrespons på ovalbumin (OVA) i ICR mus. EESO gav en signifikant ($p < 0,05$) konsentrasjonsavhengig minkning av concanavalin A (Con A) – og lipopolysakkarid (LPS)- stimulert splenocyttdifferensiering *in vitro*. ICR mus ble immunisert subkutant med OVA dag 0 og 14. Musene fikk administrert intraperitonealt EESO fra første immuniserings dag i en dose på 0,25, 0,5 og 1,0 mg med intervaller på 7 dager. OVA spesifikt antistoff i serum, mitogen- og OVA-indusert splenocyttdifferensiering ble målt dag 28 med ELISA. EESO gav en signifikant doseavhengig senkning av Con A-, LPS- og OVA indusert splenocyttdifferensiering i de OVA-immuniserte musene. Nivåene av OVA spesifikt IgG, IgG1 og IgG2b i serum ble signifikant redusert ved EESO. Denne effekten på IgG1 antistoff av EESO i en dose på 1,0 mg var mer signifikant enn effekten til cyclosporin A som ble brukt som positiv kontroll. Resultatene tyder på at EESO kan undertrykke den cellulære og humorale responsen på ovalbumin i mus (Sun & Wang, 2006).

Hwang et al. undersøkte effekten av vannekstraktet av *Siegesbeckia orientalis* på IgE produksjon i miltceller fra mus. Ekstraktet ble administrert daglig intraperitonealt. Effekten ble studert på interleukin (IL)-4-avhengig IgE respons. IL-4 avhengig IgE produksjon av

lipopolysakkarid-stimulerte milt celler ble hemmet av ekstraktet. Det ble også brukt humane IgE-produserende B celler (U266B1) hvor det ble oppdaget en hemming av LPS og IL-4 aktivert IgE produksjon ved tilsetning av vannekstrakt fra *Siegesbeckia orientalis*. Disse resultatene tyder på at vannekstraktet av *S. orientalis* kan ha en antiallergen aktivitet ved å hemme produksjonen av IgE fra B celler (Hwang, et al., 2001).

Nguyen Hai Nam gjorde en bioassay guidet fraksjonering og isolering av en cytotoxisk komponent, pubetalin, fra metanolekstraktet av *Siegesbeckia orientalis*. Pubetalin viste en sterk cytotoxisk aktivitet mot både tumor melanom celle linjer fra mus (B16 melanoanoma) og humane lunge tumor celler (A549) med ED₅₀ på respektive 0,45 og 0,79 µg/ml, og mot leukemi celle linjer (L1210), med ED₅₀ verdier på 0,37 µg/ml. Kirenol viste ingen signifikant cytotoxisk aktivitet med ED₅₀ på mer enn 30 µ/ml. En konsentrasjon på ≤ 4 µg/ml ble ansett for å være signifikant (Nam, 2000).

12.7 Diskusjon

Det er gjort flere kjemiske studier av *Siegesbeckia orientalis* som viser at planten inneholder en rekke kjemiske komponenter så som diterpenoider, sesquiterpenlaktoner, melampolider og et flavonoid. Det er gjort få biologiske studier med *Siegesbeckia orientalis*. Resultatene fra Hwang et al. kan tyde på at vannekstraktet av *S.orientalis* kan ha en potensiell antiallergen aktivitet. En studie av Sun et al. viste at etanolekstraktet fra *S.orientalis* kan undertrykke den cellulære og humorale responsen på ovalbumin i mus. Det er ikke funnet noen studier som har undersøkt om det er noen sammenheng mellom en eventuell effekt på IgE produksjon og IgG produksjon på cellulært nivå eller om det kan dreie seg om flere potensielle virkningsmekanismer. Det er heller ikke identifisert noe virkestoff i forhold til antiallergen aktivitet. Nam fant en cytotoxisk aktivitet av pubetalin. Det er uvisst om pubetalin også kan virke cytotoxisk i forhold til B celler og eventuelt andre humorale celler.

Det er ikke funnet noen biologiske studier som støtter den tradisjonelle bruken av planten med hensyn til hudsykdommer eller som stimulantia. Det er ikke oppgitt i professor Nordals Burma herbarium hvilke typer av hudsykdommer. Hudsykdommer kan i enkelte sammenhenger involvere immunforsvaret. *Siegesbeckia orientalis* oppgis å ha vært brukt ved en rekke plager i tradisjonell medisin. Zhong Yao Cai analyserte den antitrombotiske

fraksjonen av flere arter av *Siegesbeckia* ved LC/MS og HPLC. I denne fraksjonen ble det funnet flere diterpenoider hvorav kirenol utgjorde mer enn 10 % (artikkel på kinesisk)(Chou et al., 2006). Dong et al. gjorde en studie av *Siegesbeckia glabrescens* hvor komponenten darutosid viste en svangerskapsavsluttende aktivitet i tidlig stadie hos rotter i en dose på 20-40 mg/kg (artikkel på kinesisk) (Dong et al., 1989). Det kan ikke utelukkes at darutosid kan være fosterskadelig. *Siegesbeckia orientalis* har et høyt potensiale som medisinsplante på grunn av sine mange innholdsstoffer. Det gjenstår å klarlegge om noen av disse kan ha biologisk aktivitet hos mennesker og dyr.

12.8 Konklusjon

Det er gjort få biologiske studier av planten *Siegesbeckia orientalis*. Et par studier kan tyde på at planten kan hemme produksjonen av IgE og IgG på cellulært nivå, men det er ikke identifisert noe virkningsmekanisme eller virkestoff. Det er usikkert hvorvidt en eventuell cytotoxisk aktivitet av pubetalin kan innvirke på den humorale cellulære responsen. *Siegesbeckia orientalis* inneholder også darutosid, en komponent som muligens kan være fosterskadelig.

13. *Tagetes erecta* L.



Bilde av *Tagetes erecta* hentet fra (Zelenhoz, 2002).

13.1 Sammendrag

Tagetes erecta er en vanlig hageplante her i Norge og er utbredt over store deler av verden. Den store oransje blomsten er mest kjent for sitt innhold av lutein, et fargestoff som brukes mye som tilsetning i hønsefôr. Tradisjonelt har planten vært brukt mot insekter. Oljen er vist å ha antibakteriell effekt. *Tagetes* planter er dokumenterte produsenter av tiofen komponenter (bi- og tertienyler), som kan utgjøre nesten 1% av rotens vekt. Disse komponentene kan i varierende grad produseres av plantecellen som respons på miljøforandringer som UV-bestråling og infeksjon, samt er vist å ha fungicid, insekticid og allergene aktiviteter.

13.2 Taksonomiske betegnelser

Botanisk navn: *Tagetes erecta* L.

Klasse: Equisetopsida C. Agardh

Underklasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Overorden: Asteranae Takht.

Orden: Asterales Lindl.

Familie: Asteraceae Bercht. & J. Presl.

Genus: *Tagetes* L.

Synonym: *Tagetes elongata* Willd., *Tagetes ernstii* H. Rob. & Nicolson, *Tagetes excelsa* Soule, *Tagetes heterocarpha* Rydb., *Tagetes major* Gaertn., *Tagetes patula* L. med flere (Tropicos. org., 2010c).

Vanlig navn: Marigold, Stor fløyelsblomst

13.3 Botanikk og flora

Tagetes erecta, også kalt stor fløyelsblomst er en vanlig hageplante her i Norge med sine store gule blomster. Det er en oppreist ettårig plante som kan bli 0,5 meter høy. Som prydblante finnes det mange sorter og hybrider av fløyelsblomst. Felles for alle er at de har rørblomster i kurven og tungeblomster langs randen. Fargen på blomsten kan variere fra lys gul til mørk oransje.

13.4 Tradisjonell bruk

Professor Nordals Burma herbarium opplyser at bladene og blomstene har vært brukt på grunn av sin analgesiske og antiseptiske effekt.

Ekstrakt av *Tagetes erecta* blomsten brukes som tilsetningsstoff i hønsefor for å bedre fargen på eggeplommen og kyllingen. Dette på grunn av dens høye innhold av karotenoider, spesielt dihydroksykarotenoider (Navarrete-Bolaños et al., 2004).

Oljen er vist å ha en antibakteriell effekt og fra India og Pakistan er det rapport om at råekstrakt av planten, samt infusjon av planten er brukt mot reumatisme, forkjølelse og bronkitt. Bladene brukes ved nyrebesvær og muskelsmerter og appliseres lokalt på byller,

karbunkler, sår og blødende hemoroider. Juicen fra bladene brukes mot øreverk (Garg & Dengre, 1986). Preparasjoner av planten brukes også mot hodepine, myalgia og magesmerter (Baquar, 1989; Duke et al., 2002).

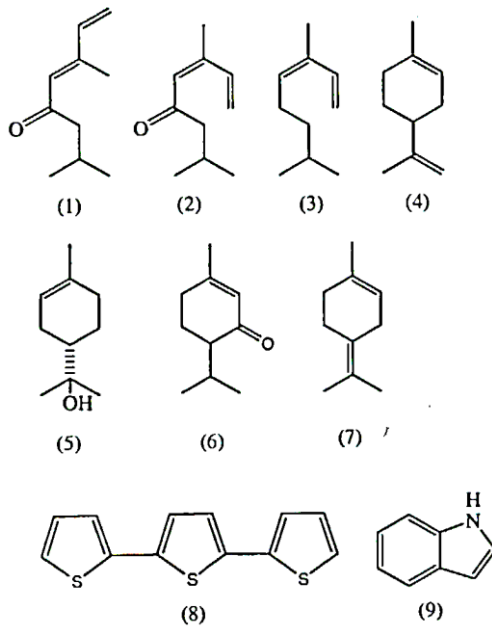
Tagetes erecta har tradisjonelt vært brukt for å kontrollere tilstedeværelsen av insekter. *Tagetes erecta* er et yndet sted for enkelte insekter å legge egg og har derfor vært brukt som lokkemiddel for å fange insekter (Bruce & Cork, 2001). Olje ekstrahert fra ulike deler av *Tagetes erecta* brukes i tropene for å smøre husdyr som beskyttelse mot spyfluer og komponenten tertienyl (2,2':5', 2'' -tertiofen) som finnes i oljen har blitt identifisert som en fototoksisk komponent mot mygg (Broussalis et al., 1999).

13.5 Ekstraksjon av *Tagetes erecta*

Den tradisjonelle metoden å ekstrahere karotenoider fra *Tagetes erecta* på dateres tilbake flere tiår. Blomsten presses, tørkes og males til pulver som så pelletiseres og ekstraheres med heksan. Ved alle trinn i prosessen tapes karotenoider. Ensilasjen er gjenstand for en ukontrollert fermentering under lagring i 3-4 uker på åpne plasser og med lite beskyttelse. Denne prosessen resulterer i delvis degradering av celleveggen i plantevevet som gjør det lettere å ekstrahere innholdet i de indre lipidvesiklene. En betydelig andel av karotenoidene tapes ved oksidasjon på grunn av ukontrollerbare forhold. Derfor beholder de tørkede blomstene bare ca 50 % av karotenoidene som er til stede i den friske blomsten. Enzymmediert ekstraksjon av karotenoider kan øke utbyttet til over 85 % ved å unngå tørke og ensilasje operasjonene som normalt anvendes (Barzana et al., 2002).

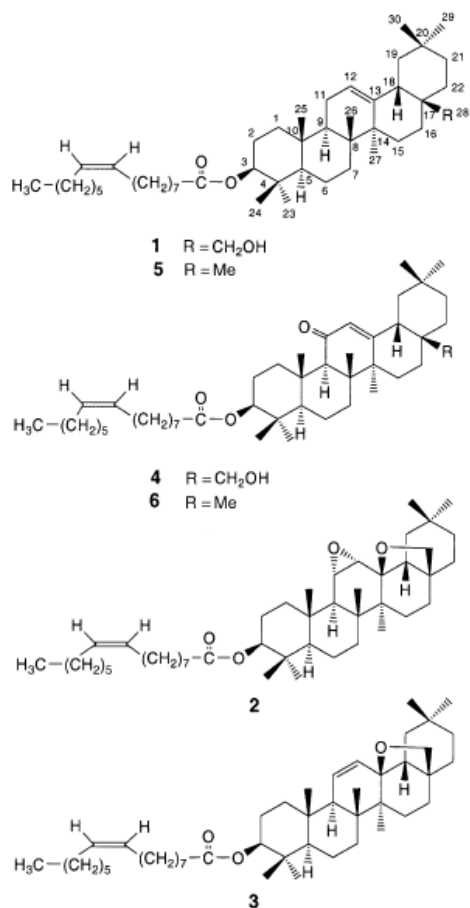
13.6 Fytokjemisk profil

Tagetes erecta inneholder forskjellige fytokjemiske komponenter så som terpenoider, karotenoider, flavanoider og fettsyrer. Hoved terpenoidene er isolert og identifisert som tageton, linalool, ocimen, limonen, eudesmol, aromadendren og α -tertienyl. Tertienyl fra *T. erecta* er funnet i konsentrasjoer på 15-21 mg/kg ferske kronblad (Zechmeister & Sease, 1974; Rodriguez & Mabry, 1975). Det er funnet flere bitienyler i etyl eter ekstraktet fra ferske malte røtter av *T. erecta* (Tsao et al., 2007).



Figur 77: Kjemisk struktur av trans-tageton (1), cis-tageton (2), ocimen (3), Limonen (4), α -terpineol (5), piperiton (6), terpinolen (7), α -tertienyl (8) og indol (9), hentet fra Tsao et al. 2007.

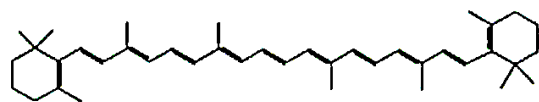
Faizi et al. isolerte seks olean type triterpenoider fra petroleum eter ekstraktet og CHCl_3 ekstraktet av blomstene til *T. erecta*. Spektralanalyser, TLC og VLC (vacuum liquid chromatography) etterfulgt av TLC katakteriserte disse komponentene som 3-O-[(9Z)-hexadec-9-enoyl] erythrodiol (1), 11 α ,12 α :13 β ,28-diepoksy-yoleanan-3 β -yl (9Z)-hexadec-9-enoat (2), 13 β ,28-epoksyolean-11-en-3 β -yl (9Z)-hexadec-9-enoat (3), 28-hydroksy-11-oxoolean-12-en-3 β -yl (9Z)-hexadec-9-enoat (4), 3-O-[(9Z)-hexadec-9-enoyl]- β -amyirin (5) og 11-oxoolean-12-en-3 β -yl(9Z)-hexadec-9-enoat (6). Artikkelen påpeker at komponentene 2-4 og 6 kan anses for å være artefakter og autooksidasjonsprodukter av komponentene 1 og 5. Videre konkluderer studien med at triterpenoider med en α,β -umettet keton del i ring C har viktige biologiske aktiviteter samt at estere som 1-6 også er rapportert å inneha signifikante farmakologiske egenskaper (Faizi & Naz, 2004)



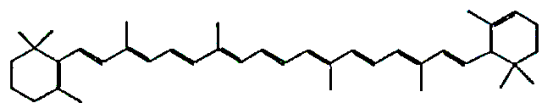
Figur 78: Kjemisk struktur av oleanan type triterpenoider isolert fra *Tagetes erecta*: 3-O-[(9Z)-hexadec-9-enoyl] erythrodiol (1), 11 α ,12 α :13 β ,28-diepoksy-yoleanan-3 β -yl (9Z)-hexadec-9-enoat (2), 13 β ,28-epoksyolean-11-en-3 β -yl (9Z)-hexadec-9-enoat (3), 28-hydroksey-11-oxoolean-12-en-3 β -yl (9Z)-hexadec-9-enoat (4), 3-O-[(9Z)-hexadec-9-enoyl]- β -amyryn (5) og 11-oxoolean-12-en-3 β -yl(9Z)-hexadec-9-enoat (6), hentet fra Faizi et al. 2004.

En rekke karotenoider og oksygenerte karotenoider er isolert fra blomstene av *T. erecta* inkludert fytoen, fytofluen, α -karoten, β -karoten, β -zeakaroten, δ -karoten, δ -kryptoxantin, β -kryptoxantin, lutein, anteraxantin, zeaxantin, neoxantin, krysantemaxantin og auroxantin (Rodriguez & Mabry, 1975).

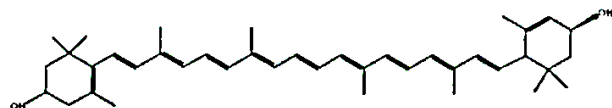
Figur 79 (neste side): Skjematiske oversikt over karotenoider isolert fra *Tagetes erecta*: β -karoten (1), α -karoten (2), lutein (3), zeaxantin (4), kryptoxantin (5), anteraxantin (6), neoxantin (7), δ -karoten (8), fytoen (9) og fytofluen (10), hentet fra Tsao et al. 2007. Dessverre kommer ikke dobbeltbindingene tydelig fram.



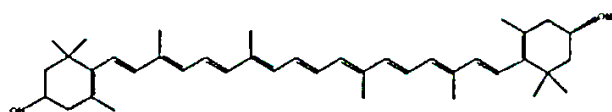
(1)



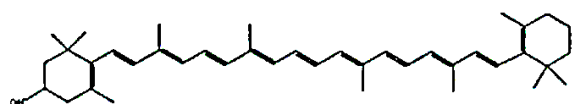
(2)



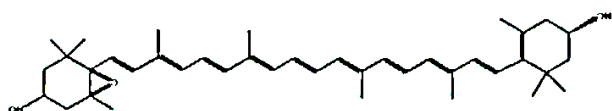
(3)



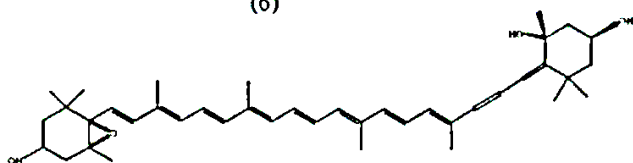
(4)



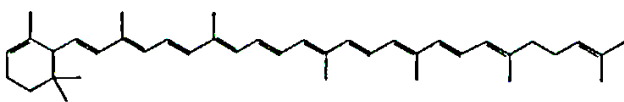
(5)



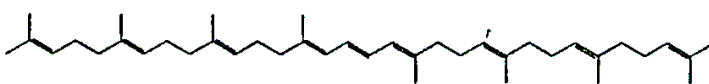
(6)



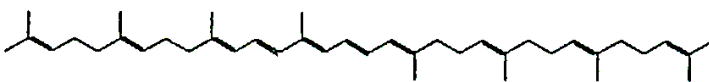
(7)



(8)

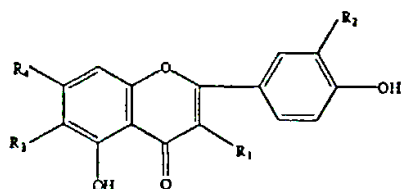


(9)



(10)

Flere flavonoider, i størst grad quercetagenin, quercetagenin-7-O-glukosid (quercetagitrin), quercetagenin-3-O-glukosid (tagetiin) og quercetagenin-7-O-dirhamnosid er også isolert fra blad og blomst av *T. erecta* (Rodriguez & Mabry, 1975). To flavonoider, quercetagenin og quercetagetrin er også isolert fra frø av *T. erecta* i den perioden planten bærer frukt (Kaloshina & Mazulin, 1983).



	R1	R2	R3	R4
Quercetagenin	OH	OH	OH	OH
Tagetiin	OGlc ORha ORha	OH OH	OH OH	OH OH
Patuletin	OH	OH	OMe	OH
Patuletrin	OH	OH	OMe	OGlc
Quercetagitrin	OH	OH	OH	OGlc

Figur 80: Kjemisk struktur av flavonoider isolert fra *Tagetes erecta*, hentet fra Tsao et al. 2007.

Fettsyrer som er isolert fra *Tagetes erecta* blomst er hovedsakelig mettede fettsyrer inkludert laurin syre (lauric acid), myristin syre (myristic acid), palmitin syre (palmitic acid) og olje syre (oleic acid) (Alam et al., 1968).

13.7 Eterisk olje

Ved hjelp av GC-MS ble det isolert 27 komponenter fra olje av *T. erecta* blad. Av disse var hovedkomponentene terpinolen (12,4 %), E- β -ocimen (13,1 %), piperiton (20 %) og limonen (11 %). I denne studien fant man også indol i små mengder fra blad (Machado et al., 1994). Singh et al. analyserte den kjemiske sammensetningen av den eteriske oljen fra blad av *T. erecta* ved hjelp av HPLC, GC og GC-MS. Det ble isolert 26 komponenter som utgjorde 89 % av den totale oljen. Hovedkomponentene var (Z)- β -ocimen (42,2 %), dihydrotageton (14,3%), (Z)-tageton (8,3), limonen (7,3%), E-ocimen (6,1%) og (Z)-ocimenon (5,3%) (Singh et al., 2003).

Tabell 7 (neste side): Kjemiske innholdsstoffer i den eteriske oljen fra *Tagetes erecta*, hentet fra Singh et al. 2003 og Sefidkon et al. 2004.

Komponent	Blad og stilk (%) (Sefidkon et al.)	Blomst (%) (Sefidkon et al.)	Blad (%) Singh et al.
α -thujen	-	t	
α -pinen	0,3	t	t
camfen	t	t	t
sabinen	0,5	0,3	0,3
β -pinen	t	t	0,1
myrcen	0,1	0,2	0,1
α -felandren	0,3	t	0,3
α -terpinen	t	t	t
p-cymen	t	t	0,1
limonen	6,2	2,5	7,3
(Z)- β -ocimen	10,4	13,7	42,2
(E)- β -ocimen	0,9	1,7	0,4
γ -terpinen	t	t	t
terpinolen	18,4	6,3	t
linalool	0,3	1,2	0,2
fenol	2,6	1,9	-
t-ment-2-en-1-ol	0,4	0,4	-
Terpinen-1-ol	1,7	2,4	-
(E)-tageton	2,2	1,3	0,4
(Z)-tageton	3,7	1,5	8,3
p-cymen-8-ol	0,6	-	-
terpinen-4-ol	0,2	-	-
α -terpineol	0,3	-	-
verbenon	0,2	-	-
(Z)-ocimenon	5,5	7,7	5,3
(E)-ocimenon	12,6	9,8	6,1
piperiton	4,2	0,6	-
Lavandulyl acetat	0,2	-	-
piperitenon	10,4	2,6	-
β -bournonen	-	0,2	-
β -karyofyllen	8,5	35,2	-
(Z)- β -farnesen	1,2	0,4	-
α -humulen	-	0,7	-
germakren D	3,0	4,1	-
bisyklogermakren	1,6	2,1	-
δ -cadinen	-	0,2	-
sfatulenol	-	0,3	-
karyofyllen oksid	0,2	1,2	-
t-muurolol	-	0,3	-
etyl-2-metyl butanoat	-	-	0,8
2-metyl-1butyl acetat	-	-	0,2
oktanal	-	-	0,1
dihydrotageton	-	-	14,3
Allo-ocimen	-	-	0,6
(Z)- β -ocimen-oksidi	-	-	0,5
trans-karyofyllen	-	-	0,7
bisyklogermakren	-	-	1,0

Sefidkon et al. analyserte den hydro destillerte oljen fra blad, stilk og blomst av *T. erecta* ved hjelp av GC og GC-MS. Resultatene er gjengitt i tabell 7. Tabellen viser at blad, stilk og blomst har litt forskjellig sammensetning. Hovedkomponentene i blomsteroljen var β -karyofyllen, men hovedkomponenten i stilk og blad var terpinolen. Prosentvis andel av hovedkomponentene var også ulik i begge oljer. Noen komponenter så som p-cymen-8-ol, terpinen-4-ol, α -terpineol og verbenon ble kun funnet i oljen fra blad og stilk. Andre komponenter så som β -bourbonen, α -humulen, δ -cadinen, spatulenol og t-muurolol ble kun funnet i blomsteroljen (Sefidkon et al., 2004). Når vi sammenligner resultatene fra Singh et al. som analyserte *T. erecta* planter fra India og Sefidkon et al. som analyserte planter fra Iran ser vi at andel av ulike innholdsstoffene også kan variere mellom ulike land.

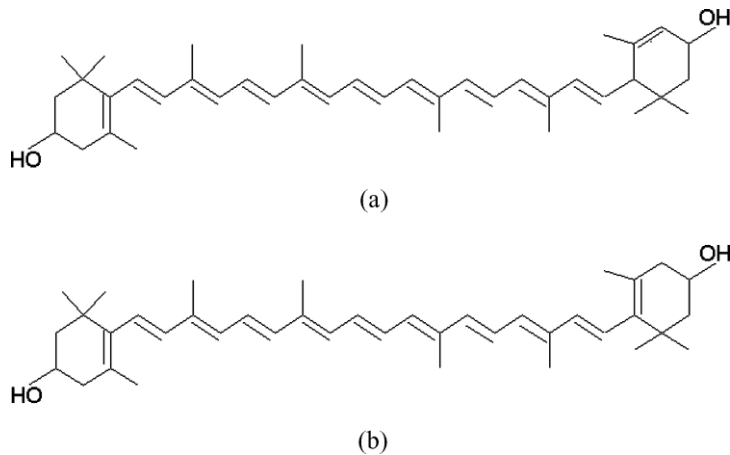
13.8 Karotenoider

Xantofyll, de oksygenrike karotenoidene regnes for å være de viktigste bioaktive fytokjemiske stoffene i *T. erecta*. Det totale xantofyllinnholdet i blomsten kan bli opp til 2,5 % på basis av tørr vekt, av hvilke 88-92% er fra lutein og zeaxantin (Quackenbush & Miller, 1972; Hadden et al., 1999). Lutein og zeaxantin er årsaken til den gule fargen til blomsten. Lutein finnes hovedsakelig i xantofyll (72,3-87,3%), mens zeaxantin representerer rundt 4,0-16,4% av det totale karotenoid innholdet (Rodriguez & Mabry, 1975). Det meste av lutein og zeaxantin består av esterifiserte mettede fettsyrer. Ca. 95% av luteinet foreligger i form av estere med ulik lengde på de mettede fettsyrene. Mesteparten av lutein estrene i *Tagetes erecta* er diestere. Dimyristat og dipalmitat er rapportert som hoved diestere av lutein (Philip & Berry, 1976; Tsao, et al., 2007).

13.8.1 Lutein

Lutein er hoved karotenoidet i *Tagetes erecta* kronblad, og finnes enten i fri form eller esterifisert med en eller to fettsyrer. Lutein ((all-E,3R,3'R,6'R)- β -carotene-3,3'diol) er et naturlig forekommende xantofyll pigment og et oksygenert karotenoid uten vitamin-A aktivitet. Lutein finnes sammen med xantofyll isomeren zeaxantin i blant annet grønnsaker

og frukt. Det brukes som et fargestoff i mat og som næringstilskudd i mange typer matvarer i konsentrasjoner fra 2 til 330 mg/kg. Lutein og zeaxantin forekommer som naturlig form i all-trans konfigurasjon (Archer et al., 2006).



Figur 81: a) Kjemisk struktur av lutein og b) kjemisk struktur av zeaxantin, hentet fra Archer et al. 2006.

Minst 17 ulike karotenoider har vært isolert fra stor fløyelsblomst kronblad. Av disse utgjør lutein 90 % av vekten. Gomez et al. har identifisert og beskrevet fettsyre fordelingen til flere fettløselige preparasjoner av *Tagetes erecta*. Palmitinsyre er den mest forekommende fettsyren når man analyserer det totale lipidekstraktet fra planten, men det finnes også betydelige mengder med umettede, oljesyre og linolsyre. Graden av umettedhet er mye lavere i det totale karotenoidekstraktet enn i det totale lipidekstraktet. Dette gjelder spesielt rensket lutein. De mono- og di-esterifiserte luteinene skiller seg ikke fra hverandre i så stor grad med hensyn til innhold av fettsyrer, bortsett fra små mengder av pentadekansyre og linolsyre i diesterifisert form, som ikke finnes i monoesterifisert lutein. I begge tilfeller er palmitinsyre og stearinsyre til stede i omtrent like deler. Det totale karotenoid ekstraktet skiller seg fra rensket lutein hovedsakelig på grunn av det lavere relative innholdet av laurin og stearinsyre og det høyere innholdet av palmitin og linolsyre. Disse forskjellene kan komme av at fettsyrer esterifiseres til andre karotenoider enn lutein, eller også av mengden triglyserider i karotenoid ekstraktet. Det kommersielle pulveret prepareres fra *Tagetes erecta* blomster som tørkes i solen for så å pulveriseres. I denne prosessen øker det relative forholdet av mettede over umettede fettsyrer på grunn av autooksidasjon (Gómez et al., 1978).

Lutein har en hydroksylgruppe på hver sin ionone ring og kan esterifiseres med fettsyrer i plantecellen og danne mono- og diacetylerede derivater. Ofte gjør man en alkalisk forsåpning før man analyserer karotenoid ekstraktet i HPLC apparatet for å fjerne triacylglyserider og annet støy, noe som gjør at man mister informasjon om karotenoide estere i naturlige eksemplarer. Derfor kan resultatene til forskjellige studier virke forvirrende og motsigende. Gregory et al. og Rivas viste at friske preparerte blomster fra *Tagetes erecta* ikke inneholder lutein i fri form, men er rik på flere lutein diestere med lutein dipalmitat og myristat palmitat som hoved estere i de mørk oransje blomstene. Breithaupt et al. spaltet lutein diestere fra *Tagetes erecta* ved hjelp av enzymer og identifiserte 8 lutein monoestere ved LC-MS. Disse var 3'-O-lauroyl-lutein, 3-O-lauroyl lutein, 3'-O-myristoyl-lutein, 3-O-myristoyl-lutein, 3'-O-palmitoyl-lutein, 3-O-palmitoyl-lutein, 3'-O-stearoyl-lutein og 3-O-stearoyl-lutein (Gregory et al., 1986; Rivas, 1989; Breithaupt, Bamedi et al., 2002).

I *Tagetes erecta* finnes lutein i form av mettede fettsyrediester. Majoriteten av lutein esterene i stor fløyelsblomst er funnet å være diestere på grunn av to hydroksy grupper, en på hver sin ionon ring. Fettsyrene til diestrene er mettede med en karbonkjede lengde på mellom C₁₂-C₁₈. Dimyristat og dipalmitat er rapportert å være hoved diestrene i lutein (83-92% av totale estere). Tsao et al. separerte og identifiserte opptil fem diestere fra ekstrakt av *Tagetes erecta* (oleoresin) ved hjelp av LC-UV og LC-MS. Disse ble eluert på en omvendt fase LC (C₁₈) kolonne i følgende rekkefølge: dimyristat (C₁₄/C₁₄), myristat-palmitat (C₁₄/C₁₆), dipalmitat (C₁₆/C₁₆), palmitat-stearat (C₁₆/C₁₈) og distearat (C₁₈/C₁₈) (Tsao et al., 2004).

Den predominerende geometriske isomeren av lutein anses for å være all-trans fordi den er kjemisk mest stabil og det vanligste hydrolyseproduktet av lutein estere. Ved å bruke en mobilfase bestående av både etyl acetat og acetonitril-metanol (9:1) fikk man en bedre separasjon på en C₁₈ kolonne, og ved å bruke absorpsjonen av lutein cis isomere ved 330 nm i kombinasjon med MS kunne man identifisere cis-lutein isomerene dimyristat, myristat-palmitat, dipalmitat og palmitat-stearat diestere, så vel som både trans- og cis-lutein laurat-palmitat og trans- og cis lutein myristat-stearat. Tilstedeværelse av all-trans-lutein laurat-myristat, dimyristat, myristat-palmitat, palmitat-stearat og distearat diestere, som også har vært rapportert av andre, kunne også bekreftes (Tsao, et al., 2004).

Hadden et al. analyserte ekstrakt av *Tagetes erecta* blomster med HPLC og fant trans-lutein som hovedkomponenten av karotenoider med flere cis-lutein isomere som mindre komponenter. Cis-komponentene antas å dannes i den innhøstede blomsten under påvirkning

av varme som brukes under kommersiell dehydrasjon i forkant av industriell ekstraksjon. Denne trans-til-cis isomeriseringen reverseres ved lyspåvirkning av ekstraktet i fortynnet heksan løsning (Hadden, et al., 1999).

13.8.2 Fremstilling av lutein

Den stereoselektive totale syntesen av (3R, 3'R, 6'R)-lutein har mange trinn og gir lite utbytte. Derfor isoleres dette karotenoidet fra saponifiserte ekstrakter av *Tagetes erecta* og er kommersielt tilgjengelig som et kosttilskudd. Selv om (3R, 3'R)-zeaxantin er vanlig forekommende i naturen, så er konsentrasjonen i de fleste lett tilgjengelige naturlige produkter ikke tilstrekkelig stor for kommersiell produksjon ved ekstraksjon og isolering. I motsetning til situasjonen for (3R, 3'R,6'R)-lutein, så blir den stereoselektive totale syntesen av (3R,3'R)-zeaxantin utført ved hjelp av flere lange og kostbare metoder. På grunn av at disse prosedyrene benytter toksiske reagenser så må man forsikre seg om at det ikke er noen rester av forurensning i produktet for at dette karotenoidet trygt kan benyttes som kosttilskudd og tilsetningsstoff/fargestoff i matvarer.

Det fines også flere prosesser som omdanner den kommersielt tilgjengelige (3R, 3'R, 6'R)-lutein eller råekstraktet av *Tagetes erecta* blomster ved hjelp av base-katalysert isomerisering til optisk inaktive (3R, 3'R meso)-zeaxantin. Selv om mesoformen av zeaxantin ikke finnes i matvarer eller serum så er den identifisert som et metabolsk produkt av (3R, 3'R, 6'R)-lutein fra matvarer i okulært vev hos mennesker. Både (3R, 3'S, 6'R)-lutein, (3R, 6'R)-3-hydrokxy- β , karoten-3'on og (3R, 3'S meso)-zeaxantin er identifisert som hovedmetabolitter til (3R, 3'R, 6'R)-lutein og (3R, 3'R)-zeaxantin. I en annen prosess omdannes (3R, 3'R, 6'R)-lutein til (3R, 3'S meso) zeaxantin som oksideres videre til β , β -karoten-3,3'-dion etterfulgt av redusering med natrium eller kalium borhydrid til en rasemisk blanding av (3R, 3'R)-zeaxantin, (3R, 3'S meso)-zeaxantin og (3S, 3'S)-zeaxantin. På grunn av det lave utbyttet samt det faktum at produktet med den racemiske blandingen av (3RS, 3'RS)-zeaxantin ikke kunne løses, så er denne tilnærmingen ikke å foretrekke.(3R,3'S, 6'R)-lutein har vært fremstilt ved delvis syntese fra reduksjon av (3R,6'R)-3-hydrokxy- β ,karoten-3'-on med diisobutyl-aluminiumhydrid (DIBAL-H). Denne reduksjonen er ikke stereoselektiv og gir en blanding av (3R, 3'R, 6'R)-lutein og (3R, 3'S, 6'R)-lutein (Khachik, 2003).

Enzymatisk hydrolyse av en blanding med lutein diestre fra *Tagetes erecta* ble gjort både i organiske løsemidler og CO₂ i superkritisk tilstand (SC-CO₂) ved bruk av to ulike kommersielle lipaser. Begge lipaser viste en avhengighet mellom initial reaksjonshastighet og initial vann aktivitet (a_{wi}) i heksan, hvor den høyeste hydrolysehastigheten fant sted ved laveste a_{wi} til de biokatalytiske partiklene. Det samme resultatet ble observert ved bruk av isooktan, toluen eller SC-CO₂. En hypotese er at en økning i a_{wi} genererer et hydrofilt mikromiljø som forhindrer forflytning av lutein diestere i retning enzymet. Beregninger fra isoterme analyser av tilgjengelig vann for hydrolyse, Karl-Fischer titrering og omdanning av substrat ved $a_{wi}=0,13$ indikerer at reaksjonsgraden ikke er begrenset av hvor mye vann som er tilgjengelig. Enzymet som holder den største mengden vann etter prehydrering og ved samme a_{wi} (0,13) vil gi størst omdanning av substrat og konsentrasjon av fritt lutein produkt. Kapasiteten til å lagre vann, ikke a_{wi} er avgjørende for hydrolysehastigheten til diestrene. Dette fenomenet kan kanskje forklares ved en konkurranse mellom vann og luteindiesterne om å nå fram til enzymet, en hypotese som enda ikke er bekreftet (Mora-Pale et al., 2007).

Behandling av *Tagetes erecta* blomst med cellulolytiske enzymer kan bedre utbyttet av xantofyll ekstraksjonen (Navarrete-Bolaños, et al., 2004).

13.8.3 Absorpsjon av lutein

Lutein kan inntas i fri eller esterifisert form. Estrene hydrolyseres av pankreas lipase slik at kun fri form sirkulerer i blodbanen. Transport av karotenoider fra fettemulsjon dråper til blandede miceller avhenger av deres hydrofobisitet, pH og konsentrasjon av gallesyrer. Andre karotenoider, slik som lykopen og xantofyll kan minke transporten av β -karoten, men hverken β -karoten eller andre typer xantofyll påvirker transporten av lutein. De mer polare karotenoidene slik som xantofyll solubiliseres fortrinnsvis på overflaten av fettemulsjon dråpene og micellene, mens de mindre polare karotenoidene inkorporeres i kjerneområdet. Dette underletter transporten av lutein og zeaxantin fra fettdråpene til vannfasen. Xantofyll inkorporeres lettere i miceller enn andre karotenoider. I motsetning til de mindre polare karotenoidene som fraktes med miceller til leveren, så fraktes en stor andel av xantofyll med HDL i blodbanen (Romanchik et al., 1995; Garrett et al., 2000; Tyssandier et al., 2001; Archer, et al., 2006).

Biotilgjengeligheten av lutein fra grønnsaker er vist å være 67% i forhold til kosttilskudd med krystallinks lutein. Mekanisk bearbeiding og varme øker biotilgjengeligheten mens fiber nedsetter opptaket. Inntak sammen med fett øker opptaket av esterifisert lutein.

Absorpsjonen av lutein var 30-40 % basert på data fra forsøk med rotter.

Toppkonsentrasjonen av lutein i mennesker kommer 11-16 timer etter inntak av en enkelt dose. Ved daglig tilskudd med 20 mg lutein daglig ble en vedlikeholds konsentrasjon nådd innen 30 dager, noe som stemmer med en halveringstid på 5-7 dager (Archer, et al., 2006).

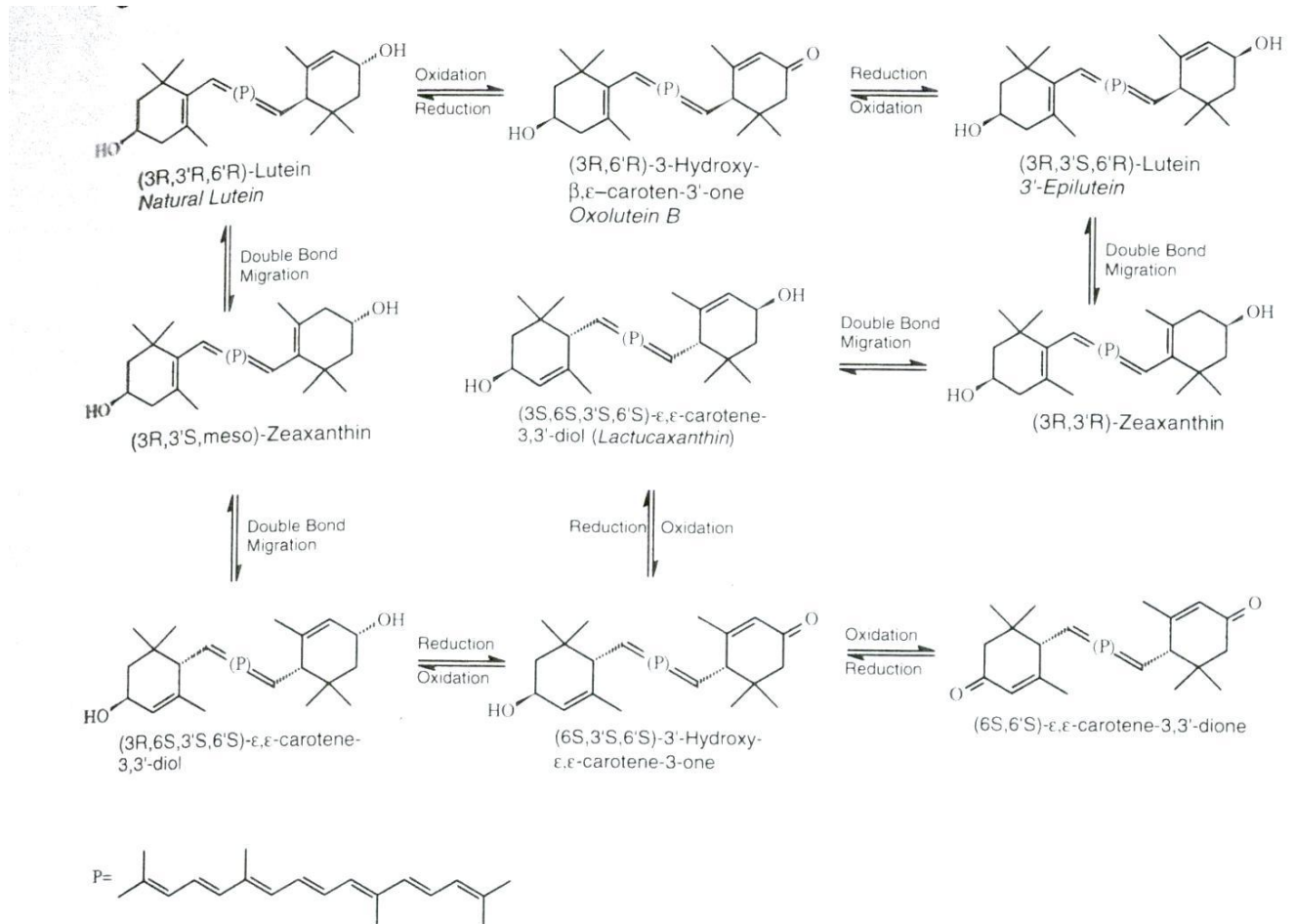
For å bedre løseligheten og biotilgjengeligheten ble lutein solubilisert i mikroemulsjon basert på etoksyliert sorbitan fettsyrestre, glycerol, limonene og etanol. Miceller med den hydrofile delen ut mot vannfasen og en vann i olje emulsjon solubiliserer begge lutein bedre enn en olje i vann emulsjon og maksimal solubilisering oppnås innenfor den bikontinuerlige fasen. Lutein i fri form solubiliseres bedre enn esterifisert lutein, i en vann i olje mikroemulsjon, mens esterifisert lutein løses bedre i en olje i vann mikroemulsjon. Vegetabilsk olje minker solubiliseringen av lutein i fri form. Glycerol og alkohol øker solubiliseringen av både esterifisert og fritt lutein. Solubiliseringen er avhengig av surfaktant i alle mesofase strukturer, men har sterkest effekt i den bikontinuerlige fasen (Amar et al., 2003).

13.8.4 Farmakokinetikk

β -karoten, lutein og lykopen er de karotenoidene som i hovedsak er funnet i vev hos mennesker. Retina i øyet inneholder en høy konsentrasjon av zeaxantin og lutein, som gir farge til macula lutea (den gule flekk). Lutein eller lutein estre ekstrahert fra *Tagetes erecta* kronblad og gitt til mennesker i doser på 0,2 til 0,5 mg/kg kroppsvekt er vist å resultere i akkumulering av lutein i makula ved økt makula pigment tetthet. Flere studier på mennesker har sett på sammenhengen mellom makulær degenerasjon og inntaket av lutein eller zeaxantin, inntak fra kosttilskudd, eller serumkonsentrasjon. Selv om disse studiene var designet for å se på okulære effekter, så ble også kliniske og biokjemiske parametre undersøkt i tillegg, uten at noen bivirkninger ble rapportert fra disse. Daglig inntak av lutein fra naturlige kilder er 1-2 mg/dag (tilsvarende ca 0,01-0,03 mg/kg kroppsvekt per dag). Xantofyller er forstadier til retinol. Det er vist at de har liten eller ingen aktivitet som substrater til β -karoten-15,15'-dioksygenase, selv om de er i stand til å hemme omdanning av β -karoten til retinol (Grolier et al., 1997; Duncan et al., 2002; FAO/WHO, 2005; Archer, et al., 2006).

13.8.5 Biotransformasjon

Det er identifisert et antall metabolitter fra lutein og zeaxantin som hovedsaklig er resultat av tre typer reaksjoner med de funksjonelle gruppene til disse karotenoidene – oksidasjon, reduksjon og flytting av dobbeltbinding.



Figur 82: Forslag til metabolitter fra lutein og zeaxantin, hentet fra Archer et al. 2006.

Lutein og zeaxantin kan være i likevekt med karotenoid 3'-epilutein, et mellomledd. Allylisk oksidasjon av lutein ved C₃ resulterer i dannelsen av oxolutein B som kan eksistere i likevekt med lutein og 3'-epilutein gjennom reduksjons reaksjoner. 3'-epilutein og zeaxantin kan også eksistere i likevekt gjennom reversibel flytting av dobbeltbinding. Således kan tilstedeværelse av 3'-epilutein i serum være en følge av omdanning av lutein og/eller zeaxantin. Karotenoider kan også inngå i syre katalysert hydrolyse med 3-hydroksyendegrupper. Det er mulig at lutein gjennomgår en hydrolyse i magesyren og danner 3-hydroksy-3', 4'-didehydro-β,γ-karoten og 3-hydroksy-2', 3'-didehydro-β,karoten (anhydroluteiner) som kan isoleres fra serum. Disse metabolittene er påvist i serum, bryst

melk og ekstrakt fra retina (Khachik, Bernstein et al., 1997; Khachik, Spengler et al., 1997; Khachik, Steck et al., 1997; Archer, et al., 2006). Dietmar et al. utelukker imidlertid at karotenoid estere spaltes i magesekken og henviser til List og Hörhammer som fant at karotenoid estere var stabile ved pH 1.2 ved 37° C. Breithaupt et al. fant at lutein viste en meget lav hydrolyse hastighet når det ble testet som substrat for kolesterol esterase og pankreas lipase sammenlignet med retinyl palmitat og β -kryptoxantin estere (List & Hörhammer, 1967; Breithaupt, et al., 2002; Breithaupt, Wirt et al., 2002).

13.8.6 Kliniske studier og lutein

Det er gjort et antall studier på mennesker med hensyn til effekten av lutein og zeaxantin, spesielt i forhold til sammenhengen mellom serumkonsentrasjon og insidensen av aldersrelatert makula degenerasjon. Ingen av disse studiene rapporterte om bivirkninger av lutein/zeaxantin selv om det i noen tilfeller ble konsumert høye konsentrasjoner. Lutein er en antioksidant og beskytter makulære retina og retinal pigment epitel fra lys mediert oksidativ skade. Flere studier viser at inntak av lutein er forbundet med mindre alders relatert makulær degenerasjon (AMD) (Goldberg et al., 1998; Krinsky et al., 2003).

Et fåtall andre kliniske studier har vært gjort som er relevante i forhold til evaluering av sikkerheten med lutein i mennesker.

I en multisenter 20 ukers intervensjons studie med lutein i friske frivillige fant man ingen forandring i hematologiske eller biokjemiske parametre etter kontinuerlige daglige doser på 15 mg (0,25mg/kg kroppsvekt) (Olmedilla et al., 2002; Archer, et al., 2006). I en studie på effektene av 2-ukers inntak av ulike karotenoider, inkludert lutein fra tomat juice, gulrotsaft og spinat tilsvarende 11,3 mg per dag fant man god toleranse for alle subjekter. Det ble ikke funnet noen signifikante forandringer i verdier av hemoglobin, leukocytter eller serum elektrolytter (Müller et al., 1999; Archer, et al., 2006). I en studie hvor man undersøkte effekten av konsistensen på maten (oversatt fra "food matrix") på biotilgjengeligheten av karotenoider målte man også konsentrasjonen av kolesterol og triacylglycerol i serum. Det ble ikke funnet noen signifikante endringer i serum konsentrasjonen av kolesterol eller triacylglycerol hos de som fikk krystallinsk lutein fra fløyelsblomst kronbladedekstrakt (suspensjon i vegetabilsk olje med β -karoten) tilsvarende 6,6 mg/dag i tre uker sammenlignet med kontrollene (Castenmiller et al., 1999; Archer, et al., 2006).

I en dobbelblind, parallell, placebo kontrollert intervensjons studie undersøkte man effekten av signifikant forhøyet plasma konsentrasjon av lutein på fastende fett syre profiler i plasma. Friske ikke røykere og menn fikk daglig tilskudd med lutein (fra fløyelsblomst ekstrakt i kapsler) tilsvarende 15 mg/dag (10 subjekter) eller placebo (maisolje i kapsler) (11 subjekter) i 26 dager. Blodprøver ble tatt før behandling og på dag 28 for å analysere konsentrasjonen av lang kjedete fettsyrer. Tilskudd med lutein i 4 uker hadde ingen effekt på individuelle fettsyrer (14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:3, 20:4, 20:5, 22:6), totale fettsyrer, totale umettede, totale mettede, enumettede eller flerumettede fettsyrer, eller på ration umettede: mettede, flerumettede: mettede, enumettede: mettede fettsyrer (Wright et al., 1999; Archer, et al., 2006).

13.8.7 Epidemiologiske studier av lutein

De fleste epidemiologiske studier som er gjort på xantofyll har tilnærmet seg hypotesen om at inntak av disse komponentene er omvendt relatert til utviklingen av cancer. Et antall slike studier har antydnet at xantofyll fra mat muligens kan beskytte mot utvikling av ulike typer cancer inkludert øsofagus, kolon, bryst, prostata og lunge, selv om nyere studier på brystkreft og lungekreft har indikert at disse komponentene ikke virker beskyttende (Archer, et al., 2006).

Tatt i betraktning de strukturelle likheter mellom xantofyll og β -karoten ble det vurdert to studier som viste at tilskudd med β -karoten økte risikoen for lunge kreft i stor røykere. Den ene studien administrerte β -karoten i en dose på 30 mg/dag i tillegg til 25000 IU retinyl palmitat til 18314 personer. Den andre studien administrerte β -karoten i en dose på 20 mg/dag med eller uten 50 mg α -tokoferol til 29 133 manlige røykere. I lys av de negative resultatene fra disse studiene på gentoksisitet og fravær av tumor-fremmende aktivitet til lutein, ble det vurdert slik at disse intervensjonsstudiene med β -karoten ikke var egnet for å estimere risikoen av lutein (CaPreStuGr, 1994; Omenn et al., 1996; Archer, et al., 2006).

Resultatet av et antall epidemiologiske studier, inkludert deskriptive, kohort og case-kontroll studier, foreslår at en karotenoid rik diett er sett i sammenheng med redusert risiko for hjerte kar sykdommer (IOM, 2000). Det er ikke rapportert om økt risiko for hjerteinfarkt i sammenheng mellom økt nivå av lutein og zeaxantin i serum. Epidemiologiske funn, så vel som studier *in vitro* og i muse modeller, støtter hypotesen om at økt inntak av lutein i

kostholdet beskytter mot utvikling av aterosklerose på et tidlig stadium (Street et al., 1994; Dwyer et al., 2001; Archer, et al., 2006).

13.8.8 Biologiske studier og lutein

Bashir et al evaluerte *in vitro* antioksidant aktivitet av *Tagetes erecta* ekstrakt av blomsten og *in vivo* smertestillende effekt på eddiksyre induisert abdominal vridning hos mus. Total antioksidant status ble undersøkt ved hjelp av en metode basert på ABTS[®] (2,2 azinobis 3-tybenziazolinsulfat) inkubasjon med metmyoglobin og H₂O₂, som gir en stabil blå-grønn radikal dannelse. Antioksidant aktivitet svekker fargeintensiteten i proporsjon med konsentrasjonen og reduserer derved absorbansen av blandingen ved 600nm. Verdiene ble brukt til å måle total antioksidant aktivitet av råekstraktet som Trolox (6,hydroksey-2,5,7,8) tetrametylkroman-2-karboksylysyre) antioksidant ekvivalent uttrykt som µmol av Trolox/g tørket ekstrakt. Den hemmende aktiviteten ble funnet å være ekvivalent med 0,174 µmol Trolox per mg tørket ekstrakt. Den reduserende styrken til 1 mg blomster ble funnet å være ekvivalent med 82,62 µg askorbinsyre.

Antall vridninger ble tallet i 20 minutter, 5 minutter etter intraperitoneal administrering av 0,8 % eddiksyre (10ml/kg). Diclofenac natrium (20 mg/kg) ble brukt som referanse. Den smertestillende effekten var dose-avhengig og signifikant sammenlignet med kontrollen. Forbehandling med ekstrakt av blomstene fra *Tagetes erecta* reduserte (p< 0,05) antall vridninger fra 75,8 til 51,25 (100 mg/ml) og til 22,6 (300 mg/ml). Abdominal vridning som respons på eddiksyre antas å være delvis mediert gjennom lokale peritoneale reseptorer og prostanoide relatert hvor flere studier indikerer økt nivå av lipoxygenase produkter så vel som PGE₂ og PGF_{2α}. Dette kan tyde på mulige komponenter som griper inn i lipooksygenase og/eller syklooksygenase veiene i tillegg til den observerte antioksidant effekten (Derardt et al., 1980; Bashir & Gilani, 2008).

Lutein hemmet N-nitrosourea-mediert avvikkende krypte foci, en intermediær markør for koloncancer, i kolon epitel hos rotter (Narisawa et al., 1996). Små mengder lutein fra kosten (0,002 %) minket insidensen og veksten av mamma tumor i BALB/c mus (Park et al., 1998). Lutein hemmet også veksten av rotte ascites hepatom celler i kultur (Kozuki et al., 2000).

González et al. undersøkte effekten av xantofyll ekstrahert fra *Tagetes erecta* på aflatoksin B₁ (AFB₁) mutagenitet ved bruk av en test med *Salmonella typhimurium* dyrket på plater. Effekten av lutein på DNA-reparasjonssystemet i disse bakteriene ble undersøkt ved en

preinkubasjonstest. Det mutagene potensialet var 1,031 revertanter per mol for en dose-responskurve av AFB₁. Det ble valgt å bruke en dose på 0,5 µg AFB₁ per plate. Ren lutein og xantofyll fra *Tagetes erecta* blomst hemmet den mutagene aktiviteten til AFB₁ på en dose avhengig måte. En blanding av xantofyll og lutein estere hemmet den mutagene aktiviteten mer effektivt enn ren lutein. Prosentvis hemming av AFB₁ mutagenitet var 37 % for lutein, 66 % for oleoresin og 76 % for en blanding av xantofyll og lutein estere i en dose på 2 µg per plate. Lutein hadde en moderat effekt på DNA reparasjonssystemet (González de Mejía et al., 1997).

Ved spektrofotometriske studier ble det oppdaget en ny topp med en absorpsjon på 378 nm når lutein ble inkubert sammen med AFB₁. Resultatene kan tyde på at den hemmende mekanismen til lutein mot AFB₁ mutagenitet muligvis er et resultat av en kombinasjon av flere mekanismer:

- a) Lutein kan interagere direkte og ikke-enzymatisk med det proksimate og/eller ultimate mutagenet/enene
- b) Dannelse av et kompleks mellom lutein og AFB₁, og således en redusert biotilgjengelighet av AFB₁
- c) det kan være en mulighet for at lutein har en påvirkning på den metabolske aktiveringen av AFB₁ via de metabolske enzymene og uttrykket av AFB₁-modifisert DNA i *Salmonella*.

Data fra studien peker på at hovedmekanismen bak hemmingen er dannelsen av et kompleks mellom lutein og AFB₁ metabolitter. Resultatene peker også i retning av at en blanding med xantofyll og lutein estere inneholder flere pigmenter som kan ha en synergistisk effekt (González de Mejía, et al., 1997).

13.8.9 Matinntak av lutein

Hovedkildene til lutein/zeaxantin i kostholdet er grønne bladgrønnsaker så som rå spinat (11,9 mg/100g), mais (kokt, 1,8 mg/100g), brokkoli (rå, 2,4 mg/100g), rosenkål (kokt, 1,3 mg/100g), grønne bønner (kokt, 0,7 mg/100g), og erter (hermetiske, 1,3 mg/100g).

Grønncål har det høyeste innholdet av lutein/zeaxantin av alle matvarer som er analysert (rå, 39,5 mg/100g). Plommen i egget inneholder også lutein.

Gjennomsnittlig estimert inntak av lutein/zeaxantin varierer fra studie til studie og med populasjon, sted og type lutein. Data fra et antall studier i Nord Amerika og UK indikerer at inntaket av lutein fra naturlige kilder varierer innenfor området 1-2 mg/dag (ca. 1,01-0,03 mg/kg kroppsvekt daglig). Kruger et al. estimerte det daglige 90 persentil inntaket av lutein/zeaxantin i USA ved bruk av matdagbok til å være respektive 3,83 og 7,29 mg/dag og respektive 0,91 og 1,77 mg/dag for krystallinsk lutein. Gjennomsnittlig inntak av lutein i 1543 kannadiere estimert ved 24 timers kostregistrering var 1,41 mg/dag (Kruger et al., 2002; Archer, et al., 2006).

13.8.10 Toksikologi og lutein

Det er gjort flere toksisitetstudier på dyr, inkludert studier på fosterutvikling. Ingen av disse har rapportert om bivirkninger. Tatt i betraktning data som viste at lutein ikke var genotoksisk, ikke hadde noen strukturell risiko, ikke virket vekstfremmende på tumorer, og er en naturlig komponent i kroppen (øyet), så har komiteen konkludert med at det ikke er behov for en carcinogenitetsstudie. Lutein har noen strukturelle likheter med β -karoten. β -karoten har vært rapportert å øke utvikling av lungekreft når det ble gitt som tilskudd til storrøykere. Tilgjengelig data indikerer at lutein i mat ikke forventes å ha denne effekten. Komiteen var ikke i stand til å estimere om lutein i form av tilskudd vil kunne ha den rapporterte effekten i storrøykere (CaPreStuGr, 1994; Omenn, et al., 1996; Johnson-Down et al., 2002; Archer, et al., 2006).

Lutein har en oral LD₅₀ på >2000 mg/kg kroppsvekt i rotter. I en 13-uke studie i rotter ble lutein administrert i orale doser på opp til 200 mg/kg kroppsvekt uten å vise noen behandlings effekt (Pfannkuch et al., 2000a; Kruger, et al., 2002).

En 52-ukers studie på aper var designet for å evaluere okulære effekter. Lutein ble administrert i doser på 0,2 eller 20 mg/kg kroppsvekt per dag. Selv om det ikke var noe toksikologiske effekter ved den høyeste dosen på 20 mg/kg kroppsvekt per dag som ble testet, så ble denne studien ikke ansett for å gi et tilstrekkelig grunnlag for å fastsette ADI, ettersom det har vært brukt mye høyere doser i flere andre studier som har vært uten effekt.

De tilgjengelige toksikokinetiske sammenlignbare data for mennesker og rotter indikerer at studien på toksisitet i rotter kunne brukes for å fastsette en ADI. Komitéen konkluderte med at den beste studien for denne hensikten var en 90-dagers studie på rotter (Pfannkuch et al., 2000b; Pfannkuch et al., 2000c; Pfannkuch, 2001; Pfannkuch et al., 2001).

Basert på studier av rotter er det satt en ADI på 0-2 mg/kg kroppsvekt per dag basert på en NOEL på 200 mg/kg kroppsvekt per dag (den høyeste dosen testet i denne studien) og en sikkerhetsfaktor på 100 (FAO/WHO, 2005). Selv om ADI var basert på resultatene fra en kortsiktig studie, så indikerer en mangel på effekt i mye høyere doser i noen studier at en sikkerhetsfaktor på 100 er tilstrekkelig. Harikumar et al. evaluerte den kort siktige (4 uker) og sub kroniske (13 uker) toksisitets profil av lutein og dens esterifiserte form isolert fra *Tagetes erecta* i rotter i doser på 4, 40 og 400 mg/kg kroppsvekt. Studien viste ingen mortalitet, endring i kroppsvekt, endring av matinntak, organ vekt eller andre typer bivirkninger. Administrering av lutein endret ikke leverfunksjons-, nyrefunksjons- eller hematologiske parametre eller lipid profil. Histopatologiske analyser av organene støttet tidligere rapporter om nontoksitet av lutein og dens esterform (Harikumar et al., 2008). Tatt i betraktning toksikologiske data og strukturelle og fysiologiske likheter mellom xantofyllene lutein og zeaxantin, bestemte komitéen å inkludere zeaxantin i ADI (0-2 mg/kg kroppsvekt) for lutein, som hadde en sterkere toksikologisk database, og la denne være en gruppe ADI for de to substansene. Denne gruppe ADI gjelder ikke for andre xantofyll inneholdende ekstrakter med et innhold av lutein og zeaxantin lavere enn det som er sitert i spesifikasjonene (Archer, et al., 2006).

Antioksidant aktivitet av lutein ble undersøkt ved bruk av fotokjemiluminesens (PCL) essay og β -karoten-linol syre modell system (β -CLAMS). Lutein viste større antioksidant aktivitet enn β -karoten og lykopen. Mutagene og anti-mutagene egenskaper ble undersøkt ved Ames test. Lutein viste ingen mutagenitet opp til en konsentrasjon på 1335 μ g per plate. Lutein har vanskelig for å løse seg i konsentrasjoner høyere enn dette. Lutein viser ingen mutagen evne i høye doser. Dette er i motsetning til β -karoten. β -karoten er ikke mutagen i lave doser, men blir mutagen ved høye doser, noe som har vært tilskrevet prooksidant aktivitet. Lutein har ikke vist noen prooksidant aktivitet, og forårsaker således ingen oksidativ skade. Lutein er en ikke-mutagen antioksidant og viste i tillegg en anti-mutagen aktivitet ved å beskytte celler fra skade ved kjente mutagener (Wang et al., 2006).

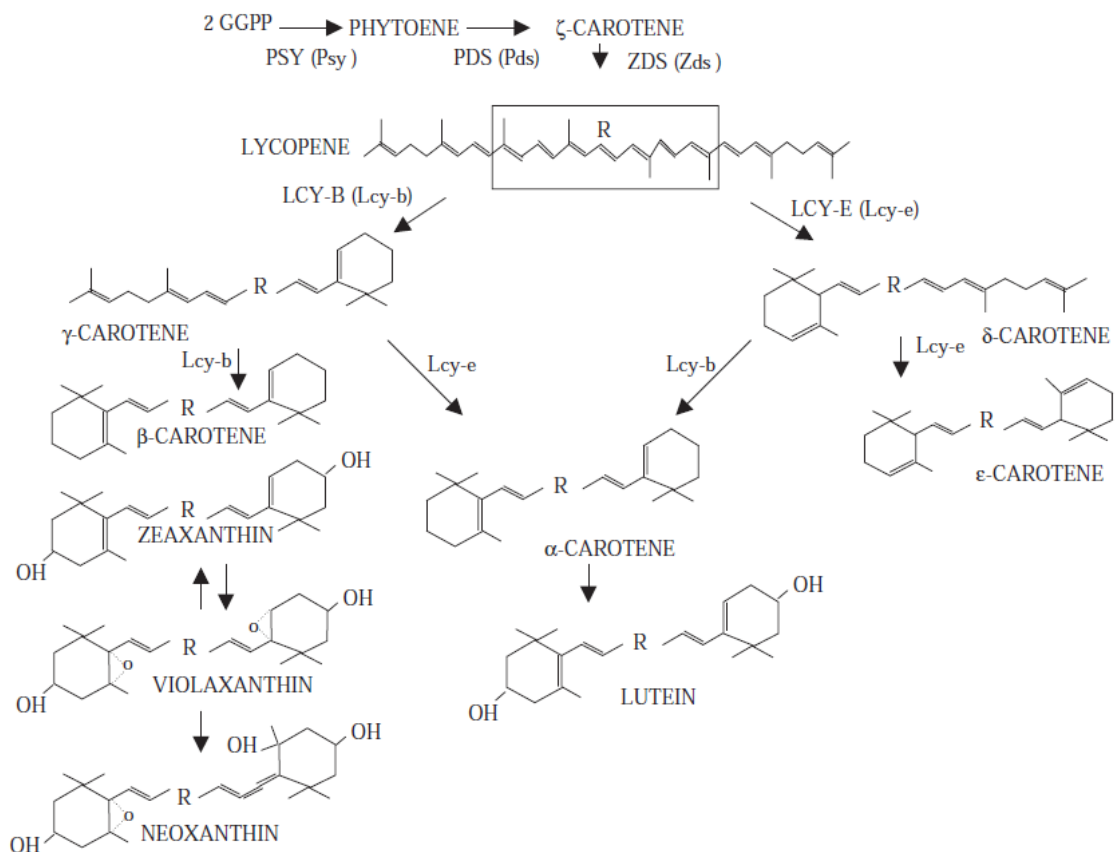
Preinkubasjon mellom lutein og mutagener antas å danne et lutein og mutagen kompleks som så reduserer biotilgjengeligheten av mutagenet. Antall muterte celler var også lavere ved lutein og mutagen preinkubering, noe som kan komme av luteins evne til å fange frie radikaler. Ames testen viste heller ingen klastogen aktivitet, men heller en anti-klastogen aktivitet på alle dose nivåer sammenlignet med positive kontroller. Den anti-klastogene aktiviteten til β -karoten har på den annen side ikke vært konkluderende på grunn av motstridende resultater fra ulike studier, noe som kan skyldes at det har vært brukt ulike konsentrasjoner av β -karoten i ulike studier (Wang, et al., 2006).

Det er gjort en evaluering av hvor trygt det er å spise et krystallinsk lutein produkt brukt som ingrediens i mat. Denne evalueringen ble gjort på bakgrunn av hvor trygt det er å innta hele produktet (FloraGLO®) så vel som å vurdere sikkerheten med å innta hovedkomponentene lutein og zeaxantin. Evalueringen baserer seg på en vurdering av den inkrementelle økningen dette inntaket vil gi av lutein og zeaxantin og i totale karotenoider, sammenlignet med bakgrunnsnivået. I tillegg bestemmes biotilgjengeligheten av lutein + zeaxantin fra krystallinsk lutein produkt ved tilsetning til mat, som brukes til å justere det daglige inntaket av lutein og zeaxantin fra denne nye kilden og standardisere den til den biotilgjengelige dosen av disse karotenoidene fra matkilder. Det antatte inntaket av lutein og zeaxantin fra det krystallinske lutein produktet ville øke inntaket i en diett fattig på grønnsaker til et middels nivå tilsvarende anbefalt inntakt av grønnsaker og anses derfor for å være trygt. Sikkerheten ved å innta produktet bestemmes ved å evaluere kilden til produktet, produksjonsprosessen, urenheter og produkt spesifikasjonene. En bekreftelse på sikkerheten gis ved toksikologi studier av det krystallinske lutein produktet på dyr, så vel som ved humane og epidemiologiske studier av lutein og zeaxantin inntak. Kruger et al. konkluderte med at krystallinsk lutein kan anses for å være en trygg (GRAS generally recognized as safe) kilde til lutein brukt etter sin hensikt i mat (Kruger, et al., 2002).

13.8.11 Biosyntese av lutein

Tagetes erecta blomster er en rik kilde til karotenoider og har derfor vært brukt som modellstudier av pigmentering ved blomsterutvikling. Disse viser ulike nivå av pigmentering forårsaket av lutein. Karotenoider har en essensiell funksjon i fotosyntesen. Karotenoider, inkludert lutein er tetraterpenoider og produseres i planten via isoprenoid eller terpenoid sporet. Alle isoprenoide komponenter biosyntetiseres fra en enkel C5-isoprenoid enhet. Biosynteseveien til karotenoider danner intermediater for biosyntesen av plante

vekstregulatoren ”abscisic syre”. Biosyntesen av karotenoider foregår i plastidene. Det første trinnet er en kondensasjonreaksjon mellom to geranylgeranyl difosfat (GGDP) molekyler som danner fytoen katalysert av fytoen syntase (Psy). GGDP er forstadiet til diterpenene. To enzymer fytoen desaturase (Pds) og karoten-desaturase (Zds) introduserer fire dobbeltbindinger som omdanner fytoen til lykopen via fytofluen, karoten og neurosporen. Deretter kan lykopen inngå i en ringdannelse ved to syklaser som gir en forgrening av reaksjonskjeden. Den ene grenen leder til dannelsen av β -karoten (β,β -karoten) og dens derivater av xantofyll zeaxantin, violaxantin og neoxantin. Den andre grenen leder til dannelsen av karotenoider med en β og en ϵ ring, så som α -karoten og lutein (Del Villar-Martinez et al., 2005).



Figur 83: Forgorening av karotenoid biosyntesen ved syklisering av lykopen som gir karotenoider. (GGPP = geranylgeranyl pyrofosfat, Psy= fytoen syntase, Pds= fytoen desaturase, Zds= ζ -karoten desaturase, Lcy-b= lykopen β -cyclase, Lcy-e= lykopen ϵ -cyclase), hentet fra Del Villar-Martinez et al. 2005.

Dannelse av karotenoider er en meget regulert prosess. Konsentrasjonen og sammensetningen av xantofyll i blad påvirkes av lysintensitet, og akkumulering av spesifikke karotenoider i kromoplastene til frukt og blomster er regulert ved utvikling. I høyere planter er karotenoidene lokalisert i plastidene. Plastidene utvikles til kromoplaster under blomsterutviklingen. I denne prosessen omorganiseres tylakoidmembranen. Klorofyll og det meste av det fotosyntetiske maskineriet forsvinner og karotenoidene akkumuleres i liposomer (Del Villar-Martinez, et al., 2005).

Sreekala et al. gjorde kryssningsforsøk med ulike hybrider av *Tagetes erecta* og fant at det totale innholdet av karotenoider og lutein synes å være bestemt ved dominans (eller ikke-additiv) genetikk, mens innholdet av xantofyll estere bestemmes ved både additiv og dominant genetikk. Esterase i frø viste høy grad av polymorfisme, mens peroxidase i små planter viste liten grad av polymorfisme (Sreekala & Raghava, 2003).

Moehs et al. studerte genuttrykket av karotenoider i *Tagetes erecta* små planter ved å kloner hovedandelen av genene i denne synteseveien og bruke disse for å estimere steady-state mRNA i fire kultivarer av *Tagetes erecta* med ekstreme forskjeller i karotenoid innhold. Moehs et al. klonet genene for følgende enzymer i karotenoid biosynteseveien: fytoene synthase, fytoene desaturase, ζ -karoten desaturase, lykopen β -syklase, lykopen ϵ -syklase og β -karoten hydroksylase. Disse er spesifikke for karotenoidveien. I tillegg ble cDNA klonet for 1-deoksy-D-xylulose syntase (DXP syntase), IPP isomerase og GGDP syntase som katalyserer trinn i den sentrale isoprenoide veien som er felles for syntesen av karotenoider og andre plastid-deriverte terpenoider så som tokoferol, plastoquinon og klorofyll. Totale karotenoider ble ekstrahert fra blad og kronblad til de ulike variantene og analysert ved HPLC. Alle variantene i studien akkumulerte primært esterifisert lutein i kronbladene, men i ulike mengder. Dette indikerer at mutasjonene ikke bare er spesifikke for kronbladene men også har en kvantitativ effekt, det vil si at de ikke blokkerer individuelle trinn i biosyntesen eller forårsaker akkumulering av biosyntetiske intermediater. Dette tyder på at forskjellene i mønstret av uttrykte gener i karotenoid biosynteseveien blant de ulike variantene primært kan relateres til regulering av flyt gjennom sporet og ikke til spesifikke typer av produsert karotenoid. Uttrykket av fytoen syntase synes å være mest relatert til nivået av karotenoider og således flyt i sporet. Konklusjonen at uttrykket og/eller stabiliteten av fytoen syntase transkripter er et essensielt krav for akkumulering av karotenoider støttes av det faktum at blek gule eller hvite blomster nesten ikke uttrykker dette enzymet (Moehs et al., 2001).

13.9 Tiofener

Tiofener tilhører en gruppe alkynderivater, polyalkyner, nærmere bestemt polyacetylen komponenter karakterisert ved en, to eller tre aromatiske fem-ringer inneholdende sulfur som er bundet sammen ved deres α -karbon (Jacobs et al., 1994). Biosyntetisk er disse komponentene beslektet med fettsyrer. De fleste av disse er dannet fra linolsyre gjennom en rekke desatureringsreaksjoner som via krepenynsyre (oversatt fra “crepenynic acid”) leder til en C_{18} triensyre. Generelt kan polyalkyner ekstraheres fra ferske planter og separeres tilfredsstillende ved hjelp av HPLC og på tynnsjiktsskolonne av silika med innhold av kaffein som interagerer med π elektronene på de umettede delene og muliggjør separering av komponenter som strukturelt er meget like. Ofte er polyalkyner og biogenetisk relaterte sulfur inneholdende derivater fototoksiske. Denne fototoksiske aktiviteten er UVA avhengig og spesielt uttalt overfor nematoder, insektslarver, spesielle typer sopp (for eksempel *Candida*), noen bakterier og noen virus. Det er verdt å legge merke til sammenhengen mellom bruken av Asteraceae i tradisjonell medisin for behandling av hudsykdommer og tilstedeværelse av flerumettede eller tiofen-type komponenter i planten. Et eksempel på det er tiofener i *Tagetes* (Bruneton, 1995).

13.9.1 Kjemiske studier av tiofener

Tiofener er en vanlig komponent i familien *Asteraceae*. Forekomsten av tiofener i blad, rot og blomster fra *Tagetes* varierer meget. Tiofener akkumulerer i rot og blad. Verma et al. gjorde en kvantitativ evaluering av tiofener i tre *Tagetes* arter, *T.minuta*, *T.patula* og *T.erecta* ved hjelp av HPLC. Resultatene viste at *T.patula* røtter inneholdt mest tiofener etterfulgt av *T.minuta* blad. Akkumulering av tiofener i blomstene var liten. Verma et al. identifiserte seks komponenter fra *Tagetes minuta* røtter. Disse var: 2,2':5'2''-terthienyl, 5-(3-buten-1-ynyl-2,2'-bithienyl) (BBT), β -sitosterol, stigmasterol, octacosanol og 3-octacosanylstigmasterol (Verma & Singh, 2002).

A-T (2,2':5', 2''-terthienyl) og BBT ble isolert fra *Tagetes erecta* allerede i 1962 og sågar fremstilt syntetisk (Bohlmann & Herbst, 1962).

Jacobs et al. undersøkte tiofen syntese og akkumulering i *Tagetes erecta* og *Tagetes patula*. Akkumulering av tiofener kom raskt i gang i spirende småplanter fra begge arter. Tiofen akkumulerte hovedsakelig i røtter og hypokotylar. BBT og 5-(4-acetoksy-1-butynyl)-2,2'-

bitienyl (BBTOAc) var hovedkomponentene av tiofener. *Tagetes patula* hadde høyere tiofenkonsentrasjoner enn *Tagetes erecta*. Akkumuleringsmønstrer for de individuelle tiofenene var forskjellig innen det enkelte organet, mellom organer og mellom begge arter. I hypokotylene til *Tagetes erecta* var tiofenkonsentrasjonen høy i epidermis og vaskulært vev og lav i parenkymalt vev til bark og marg. Syntesen av tiofener var høy i røtter og hypokotylene og meget liten i bladene. Tiofener ble transportert fra røttene til skudd, men hastigheten av denne transporten var for lav til å kunne forklare den høye konsentrasjonen i hypokotylene. Det ble da konkludert med at tiofenene i hovedsak akkumulerer der hvor de syntetiseres (Jacobs, et al., 1994).

Bruce et al. påviste syv elektrofysiologisk aktive komponenter i ferske blomster av *Tagetes erecta* analysert ved GC-MS. Disse komponentene ble identifisert som benzaldehyd, (S)-(-)-limonen, (R, S)-(\pm)-linalool, (E)-myroksid, (Z)- β -ocimen, fenylacetaldehyd og (R)-(-)-piperiton (Bruce & Cork, 2001).

Kjemiske studier av *Tagetes erecta* har også vist at blomster og blad inneholder tageton, d-limonen, ocimen, linalyl-acetat og linalool 9,8% sammen med andre terpenener i mindre mengder (Leung, 1980; Khan et al., 1996).

Eksplantasjon av blad brukes fortrinnsvis framfor eksplantasjon av røtter for å fremstille kallas kultur. Sekundær kallas (C_2) fra *T.patula* hentet fra blad til 4-7 uker gamle planter inneholdt større mengder med akkumulerte tiofener (opp til 80 % av mengden i bladene) enn original kallas (C_1) eller tertiær kallas (C_3) (subkulturert to ganger). Konsentrasjonen av tiofener i C_2 kallas fra *T.minuta* var halvparten av konsentrasjonen i C_1 kallas, mens konsentrasjonen av tiofener i C_1 kallas kom opp i 1-2 % av verdiene for bladene.

Mesteparten av C_3 kallas fra *T.minuta* inneholdt ikke noe tiofener. Selv om C_1 kallas fra *T.erecta* også inneholdt betydelige mengder med tiofener, så døde C_2 kallas, trolig på grunn av høye nivåer av akkumulerte fenoliske komponenter. Forekomsten av tiofener i blad og rot varierte meget mellom de ulike *Tagetes* artene. Noen tiofener finnes enten bare i bladene eller bare i røttene. Forskjellene og mengdene av tiofener var størst i blad fra *T.minuta* og minst i blad fra *T.erecta*. Unge planter fra *T.erecta* inneholdt tiofener i bladene hovedsakelig, mens tiofener i eldre planter hovedsakelig akkumulerte i røtter. Forskjellene og mengdene av tiofener i røttene var størst i *T.patula*, mens for bladene var dette tilfelle for *T.minuta*.

Resultatene av analysene av tiofener i de ulike kalli viser at det bare fantes to ulike tiofener i C_1 fra *T.erecta*, men likevel var dette tiofen innholdet generelt større sammenlignet med C_1

kallus fra de to andre *Tagetes* artene som ble studert. Selv om blad fra *T. erecta* ikke inneholdt tiofener etter 4 ukers kultur, så fortsatte kallus fra gamle blad å produsere tiofener. Ketel konkluderer med at det ikke er noen sammenheng mellom tiofen produksjon i kallus og produksjonen i den opprinnelige plantedelen fra hvilken man har gjort eksplantasjon (Ketel, 1987).

Uorganisert kallus fra *Tagetes erecta* dyrket *in vitro* akkumulerer tiofener i mindre mengder sammenlignet med røtter fra intakte planter hvilket indikerer at produksjonen av sekundær metabolitter er positivt korrelert med organiseringen av cellene i morfologisk differensierte organ. Mukundan undersøkte karakteristika ved tiofen produksjon i transformert rot kultur fra *Tagetes erecta* og sammenlignet denne med normal rotkultur og røtter til intakte planter. Røtter fra *Tagetes erecta* ble transformert ved å infektare sterile småplanter med en stamme av *Agrobacterium rhizogenes*. De små plantene responderte på infeksjonen ved å produsere røtter. Tiofeninnholdet i ekstraktet fra planter, normale røtter, normal rotkultur og transformert rotkultur ble analysert ved hjelp av HPLC. Transformerte røtter testet positive på opiner i motsetning til normale røtter. Alle tre typer røtter akkumulerte de samme typer tiofen, men i ulike mengder. Fire typer tiofener ble påvist i alle røttene. De viktigste tiofenene var 5-(4-acetoxy-1-butenyl)-2,2'-bithienyl (BBTOAc), etterfulgt av 5-(3-buten-1-enyl)-2,2'-bithienyl (BBT), 5-(4-hydroksey-1-butenyl)-2,2'-bithienyl (BBTOH) og 2,2':5', 2''-terthienyl (α -T). BBTOAc var det dominerende tiofenet i alle røttene etterfulgt av BBT, BBTOH og α -T. BBTOAc utgjorde 64 % av totalt tiofen innhold i røtter fra intakte planter. I normal og transformert rotkultur utgjorde BBTOAc respektive 68 % og 63 % av totale tiofener, hvilket indikerer en predominans av BBTOAc i unge røtter fra *T. erecta*. Disse resultatene peker også i retning av at syntesen av BBTOAc foregår i røttene (Mukundan & Hjortso, 1990).

Transformert rotkultur viste 3 ganger større vekt i både fersk og tørr tilstand sammenlignet med normal rotkultur og dannet flere sidegrener enn normale røtter. Transformerte røtter representerer et organisert system og tidligere studier har viste en positiv korrelasjon mellom morfologisk differensiering og tiofen produksjon. Tiofensyntese i *Tagetes erecta* er relatert til nydannelse av røtter. Det totale tiofen innholdet i rotkultur rapportert i studien til Mukundan et al. er ca. 400 ganger mengden rapportert for kalli fra *T. erecta* (Ketel, 1986; Ketel & Breteler, 1988; Lam et al., 1988; Mukundan & Hjortso, 1990).

Infeksjon med *Fusarium oxysporum* resulterte i ulike mønstre av tiofen kinetikk i det infekte vevet avhengig av om infeksjonen var av moderat virulent eller meget virulent art. De påviste tiofenene 5-(4-hydrokso-1-butenyl)-2,2'-bitienyl (BBTOH), 5-(4acetokso-1-butenyl)-2,2'-bitienyl (BBTOAc) og alfa-tertienyl (α -T) akkumulerte i rot og stamme som var delvis skadet av det moderate patogenet og nådde maksimal konsentrasjon 12 dager etter inokulasjon med opp til 12 ganger så høy konsentrasjon som i ikke-infekte planter. En alvorlig infeksjon med den meget virulente typen resulterte i en nedgang i tiofennivået i det skadede vevet. De naturlig forekommende tiofenene BBTOH, BBTOAc, α -T, 5-(3-buten-1-ynil)-2,2'-bitienyl (BBT) og 5-(3,4-diacetokso-1-butinyl)-2,2'-bitienyl (BBT-20Ac) hemmet fullstendig *in vitro* spore vekst av begge soppene i en konsentrasjon på 5 μ g/ml i nærvær av UV lys (4 W/m). α -T var sterkt fototoksisk mot mycelevekst til begge soppene i "shake" kultur med en EC_{50} på respektive 0,03 og 0,06 μ /ml for den meget virulente og moderat virulente typen av *F.oxysporum*. I mørket ble bare den moderat virulente typen hemmet ved høy konsentrasjon av α -T. α -T som var behandlet med tritium ble ikke signifikant metabolisert av *F.oxysporum* når den ble dyrket i "shake" kultur som inneholdt 0,3 μ g av $^3H_{\alpha}$ -T per milliliter. Kourany et al. henviser til tidligere studier som viste at nært UV-lys gav en sterk økning i toksisiteten eller den hemmende effekten på sporenes spiring og vekst. Resultatene fra disse studiene indikerer at effekten av tiofener på levende celler primært er assosiert med oppløsning av cellemembranen, noe som også kan være forklaringen på den fototoksiske aktiviteten observert i omtalte studie. Det faktum at α -T ikke ble metabolisert av test organismen indikerer også at den α -T komponenten man hadde i utgangspunktet var kilden til den biologiske aktiviteten. Tidligere studier har vist at beslektede polyacetylen acetater var mindre toksiske enn deres tilsvarende alkoholer. Således er det mulig at acetater representerer komponenter som planten har på lager og som blir mer biologisk aktive etter deacetylering, en prosess mediert ved esterase som er tilstede i plantevevet (Chan et al., 1975; Dicosmo et al., 1982; Downum et al., 1983; Kourany & Arnason, 1988).

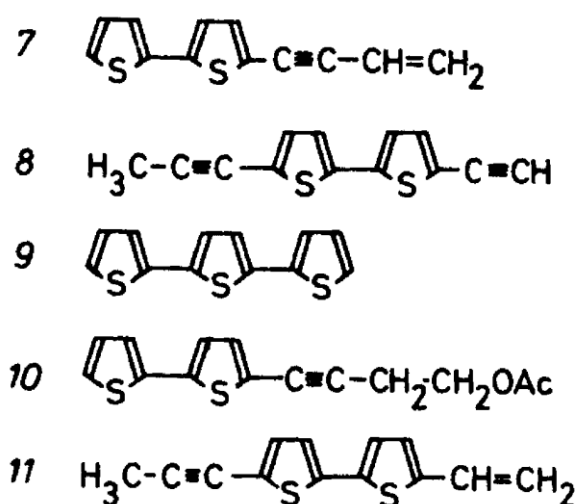
Det ugunstige kjemiske miljøet som blir dannet ved høye nivåer av BBTOH, BBTOAc og α -T i *callistephi*-infektet vev hos *T.erecta* kan forventes å spille en rolle ved hemming av det angripende patogenet, basert på data fra bioassay. Mengden av BBTOH, BBTOAc og α -T i planter, på basis av frisk vekt, 12 dager etter inokulering med f.sp. *callistephi* var respektive 7 μ g/g, 40 μ g/g og 4 μ g/g. Disse nivåene er tilstrekkelige for å hemme spiring av *callistephi* ved nært UV lys. Nivået av α -T tilsvarer 67 ganger EC_{50} for veksthemming av mycelevekst i lys, og 4 ganger EC_{50} i mørket (Kourany & Arnason, 1988).

Croes et al. studerte akkumulering av tiofen i *Tagetes erecta* og *Tagetes minuta*. Fire tiofener, BBTOH, BBTAOc, BBT og α -T ble detektert og kvantifisert ved hjelp av HPLC. Rot tuppen av *T. erecta* ble avkuttet fra småplanter og dyrket i et vekstmedium med sukkrose og agar. Konsentrasjonen av NAA (1-naftaleneddiksyre) og BA ((N6-benzyladenin) i mediet var kritisk. *T. erecta* vev ble brunt og døde når konsentrasjonen av NAA var under 1 μ M. Med en BA konsentrasjon i dette området overlevde vevet men vokste sakte. En NAA konsentrasjon på 10 μ M reduserte veksten sterkt og en slik BA konsentrasjon var supraoptimal for tiofen akkumulering. Derfor ble begge vekstregulatorer tilsatt standard medium i en konsentrasjon på 1 μ M. Analyser av kallus viste at alle de fire nevnte tiofener er til stede i både *T. erecta* og *T. minuta* men i ulike mengder. BBTOH er den dominerende formen i *T. minuta*, mens acetat esteren BBTOAc dominerer i *T. erecta* (Croes et al., 1989).

Tilsynekomsten av røtter på *T. erecta* den andre uken var ledsaget av en 4-fold økning i tiofen konsentrasjon i det samme tidsintervallet. Dette nivået holdt seg mer eller mindre konstant den tredje uken. En nedgang i veksthastigheten den tredje uken reflekterer det faktum at en økende andel av kallus massen blir engasjert i differensiering framfor celle formering. Når røttene ble eldre økte tiofenkonsentrasjonen sakte men sikkert. Tiofen sammensetningen endret seg med alderen i begge *Tagetes* arter. I unge småplanter var BBT den dominerende komponenten, mens BBTOAc ble mer forekommende ved videre vekst. Denne endringen startet tidligere og var mer tydelig i *T. erecta* enn i *T. minuta*. Nivået av rotgenererende kallus til *T. erecta* er noe mindre enn i intakte røtter. Bestråling med lys ved 12 W/ m² stimulerte tiofenproduksjonen i *T. erecta* uten å ha noen spesiell effekt på differensieringen. BA i høye konsentrasjoner reduserte tiofen nivået og undertrykte samtidig differensiering av røttene. Tiofen akkumulering i avskårne røtter skjer på samme nivå som i røtter som ikke er avskårne. Dette tyder på at biosyntesen i røttene er uavhengig av rotskyting (Croes, et al., 1989).

Sarin et al. rapporterte om pyretriner i *Tagetes erecta* basert på resultater fra TLC og GLC analyser (Sarin, 2004). Det er likevel liten sannsynlighet for at det finnes pyretriner i *Tagetes erecta*. Hogstad et al. fant ingen spor av pyretriner i *Tagetes erecta* ved å bruke TLC, GLC-MS, H-NMR og SIM (selected ion monitoring) med en følsomhet på 0,0001 %. Selv om det ut fra TLC analysen alene kunne se ut som om *Tagetes* artene inneholdt pyretriner, så gav resultatene fra GLC, H-NMR og MS den ekstra informasjonen som var nødvendig for å vise at dette ikke var tilfellet. Fra ekstrakt av røtter av *Tagetes erecta* og *T. patula* ble det isolert 3

tiofener ved hjelp av TLC. Disse ble identifisert som BBT (7), BBTOAc (10) og α -T (9) ved H-NMR og MS. I tillegg ble komponentene (8) og (11) som vist i figuren nedenfor funnet i ekstrakt fra blomstene. Komponentene (7) og (10) i figuren nedenfor ble hovedsakelig funnet i røttene, mens komponent (9) dominerte i blomstene. Komponent (8) ble ikke detektert i kallus (Hogstad et al., 1984). Komponent (8) er den samme komponenten som Bohlman et al. fant i blomstermel fra *Tagetes erecta* i 1967, bekreftet ved NMR (Bohlmann et al., 1967).

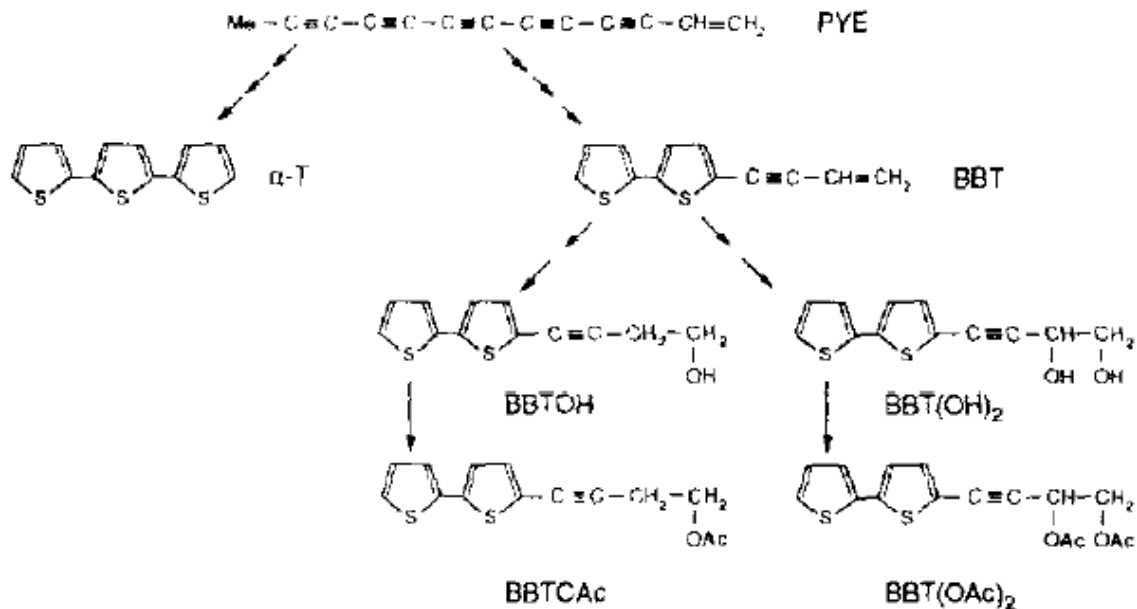


Figur 84: kjemisk struktur av 5 tiofener funnet i *Tagetes erecta*, hentet fra Hogstad et al. 1884.

Martin et al. studerte effekten av kalium på frigjørelsen av α -tertienyl (α -T), BBT og BBTOAc. HPLC analyser viste at effekten av kalium mangel på tiofenproduksjonen synes å være varierende med tid og komponent. Den største effekten av kaliummangel på tiofenproduksjonen ble sett i tidlige stadier av veksten. I uke 3 var α -T og BBT produksjonen oppe i 250 % sammenlignet med kontrollen ved laveste kaliumnivå, mens nivået av BBT var lavere. I uke 4 ble det observert maksimal produksjon av alle tre komponenter med 50 % kaliummangel. Etter uke 4 ble effekten av kaliummangel mer kompleks. Produksjonen av BBT forble større enn kontrollene ved 10 % og 25 % kaliummangel, mens α -T produksjonen forble størst ved 50 % kaliummangel i uke 8 og 10. Produksjonen av BBTOAc økte ikke og var generelt lavere enn i kontrollene (Martin & Weidenhamer, 1995).

13.9.2 Biosyntese av tiofener

Jacobs et al. undersøkte evnen til å syntetisere tiofener i protoplaster fra *Tagetes erecta* og *Tagetes patula* ved å ekstrahere radiomerkede tiofener fra dyrkede planter. De viktigste tiofenene fra *Tagetes*, BBT og BBTOAc akkumulerer hovedsakelig i røttene og hypotokylene, mens konsentrasjonen i bladene er liten. Bitiofenene (bitienylene) syntetiseres fra en syrederivert polyacetylenforløper, tridekaptentaynen (PYE). Den sekvensielle dannelsen av to sulfurinneholdende aromatiske ringer i nabostilling ved definerte posisjoner i polyacetylen substratet er den mest karakteristiske egenskapen til tiofen syntese. I tillegg kreves det at den terminale metylgruppen fjernes for å få C₁₂ tiofenener som predominerer i *Tagetes*. Modifisering av sidekjedene leder til de mer polare tiofenene (Jacobs, Stalman et al., 1995).



Figur 85: Biosyntetisk forhold mellom PYE og dets tiofenderivater i *Tagetes*, hentet fra Jacobs et al 1995.

Croes et al. studerte hvordan biosyntesen av tiofener blir regulert i småplanter og transformerte røtter av *Tagetes erecta* og *T.patula*. To sannsynlige intermediater ble isolert fra en mutant av *Tagetes erecta* med et alternerende tiofen spektrum ved hjelp av GC-MS, H-NMR og HPLC. Man tror at karbonskjelettet til tiofenene er derivert fra oljesyre.

(oversatt fra "upwind approaches") fra *Helicoverpa armigera* sammenlignet med en kontrolløsning. Dette resultatet ble bekreftet med en syntetisk blanding av de EAG aktive komponentene (Bruce & Cork, 2001).

Aguilar evaluerte den antihelmintiske aktiviteten til 14 planteekstrakter *in vitro* på det fjerde larvestadiet til *Haemonchus contortus* (en parasitt i dyr som skilles ut via avføring), deriblandt *Tagetes erecta*. En suspensjon med ca 600 larver ble tilsatt hver brønn med ekstrakt av *Tagetes erecta* tilsvarende 550 mL av 20mg/mL. Platene ble innkubert ved romtemperatur i 76 timer. Prøver ble studert under mikroskop. Resultatet ble angitt i prosentvis larvemortalitet. Et tilsvarende antall brønner med larver i en piperazin løsning ble brukt som kontroll. Heksan ekstrakt av *T. erecta* blomst viste en letal aktivitet på (99,7 %), mens metanol ekstrakt av *T. erecta* viste 58,3 % letal aktivitet (Aguilar et al., 2008).

Elango et al. Testet larvicid aktivitet av blad fra *Tagetes erecta* og fant en moderat aktivitet mot *Anopheles subpictus* (myggart som kan overføre malaria) og *Culex tritaeniorhynchus* (myggart som kan overføre japansk encefalitt). Bladene ble ekstrahert med ulike løsemidler som aceton, kloroform, etylacetat, heksan, metanol og preparert i ulike konsentrasjoner. Av alle ekstraktene fra *T. erecta* viste metanolekstraktet størst aktivitet mot *C. tritaeniorhynchus*, mens etylacetat ekstraktet viste størst aktivitet mot *A. Subpictus*. I denne studien ble det testet flere andre plantearter som hadde mye høyere aktivitet enn *T. erecta* (Elango et al., 2009).

Broussalis et al. testet toxisiteten av den overjordiske delen av *Tagetes erecta* ekstrakt på insektet *Sitophilus oryzae* L. (en art av ursnutebille) uten signifikant resultat (Broussalis, et al., 1999).

Green et al. testet damp destillert olje fra *Tagetes patula*, *T. erecta* og *T. minuta* for larvicid aktivitet mot *Aedes aegypti* (en myggart som kan overføre dengue feber). De ble da funnet en larvicid aktivitet kun for *T. minuta*. Terpenet ocimenon som er en del av oljen ble funnet å ha larvicid aktivitet kun ved høyere konsentrasjoner enn i oljen samt å miste sin aktivitet etter 24 timer i vannløsning (Green et al., 1991).

Garg et al. undersøkte den antibakterielle aktiviteten til den eteriske oljen av *Tagetes erecta* ved hjelp av agardiffusjonsmetoden. Oljen viste en utmerket aktivitet mot *Staphylococcus albus*, *Bacillus myocides*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *S. paratyphi*, *Shigella schimitzii*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella flexneri* og *Xanthomonas campestris* (Garg & Dengre, 1986).

Polytienylene α -T og 5-(3-buten-1-ynyl)-2,2'-bitienyl (5-BBT) ble identifisert som komponenter i *Tagetes erecta* ved spektroskopiske analyser. Polytienyler ble funnet å ha en soppdrepende og antibakteriell virkning mot kulturer av *Candida albicans*, *Escherichia coli* og *Sarcina lutea* (Kane et al., 2002).

13.10 Kliniske studier av *Tagetes erecta*

Khan et al. undersøkte effekten av terapi med *Tagetes erecta* for behandling av hyperkeratotiske områder under fotsålen. Det ble gjort en dobbelt blind placebo kontrollert studie som gikk over 8 uker. 30 personer ble randomisert i 3 grupper. Gruppe A ble behandlet med en preparasjon av *T. erecta* i tillegg til en liten støttdempende pute under foten. Gruppe B fikk placebo og en beskyttende liten pute. Gruppe C fikk samme preparasjon av *T. erecta* som gruppe A, men uten pute. Pasta, tinktur og olje fra *T. erecta* ble preparert fra friske blad og blomster. Hver enkelt gruppe fikk behandling på klinikken en gang i uken i 4 uker, etterfulgt av 4 ukers hjemmebehandling. Effekt på redusert liktorn og nydannelse av vev samt smertenivå ble greistrert. Resultatene viste at gruppe A hadde signifikant mindre nydannelse av vev og signifikant mindre smerte sammenlignet med kontrollen. Grupe A hadde også signifikant mindre nydannelse av vev og signifikant mindre smerte enn gruppe C. Således viste resultatene at terapi med *T. erecta* med beskyttende støtpute under foten var mer effektiv enn terapi med *T. erecta* uten beskyttende pute. Likevel var terapi med *T. erecta* uten pute bedre sammenlignet med placebo (Khan, et al., 1996).

13.11 Biologiske studier av *Tagetes erecta*

Bashir et al. evaluerte antioksidant aktivitet av etanol ekstrakt fra *Tagetes erecta* blomst *in vitro* og analgesisk aktivitet på eddiksyreindusert abdominal vridning. Ekstrakt fra ferske blomster ble preparert med 80 % vandig etanol. Den aktive ingrediensen ble rapportert å være lutein. Antioksidant aktivitet ble målt ved hjelp av ABTS (2,2-azinobis 3-tybenzthiazolinesulfat) inkubert med metmyoglobin og H₂O₂ som gir en stabil blågrønn radikaldannelse. Antioksidanter svekker fargeintensiteten og dermed absorbansen proporsjonalt med konsentrasjonen. Dyrene ble inndelt i 4 grupper á 5. Abdominal vridning ble indusert ved intraperitoneal administrering av 0,8% eddik syre (10 ml/kg) 30 minutter etter administrering av salin eller ulike doser med ekstrakt (100 og 300 mg/kg) eller referanse medikament diclofenac natrium (20 mg/kg). Antall vridninger ble tellet fra 5

minutter etter injeksjon i en periode på 20 minutter. Resultatene viste et utpreget antioksidant potensial og en dose avhengig analgesisk effekt (Bashir & Gilani, 2008).

Blad fra *T. erecta* ble kuttet opp i små biter og vasket med destillert vann. Den flyktige oljen ble utvunnet ved hydrodestillering. Oljen ble screenet for insekticid aktivitet mot hvite termitter (*Odontotermes obesus* Rhamb.) ved bruk av petriskåler forsynt med en bit filterpapir som var dynket i respektive 0,5, 2, 3 og 6 µl/skål. 10 termitter ble plassert i hver skål med 10 gram jord og en liten bit med sukkerrør. En liten glippe mellom hver petriskål sørget for at termittene fikk nok luft. En kontroll fikk tilsvarende petriskål med filterpapir uten olje. Resultatene viste 100 % mortalitet for 6 µl/petriskål etter 24 timers eksponering. Mindre doser viste lavere dødelighet. En sammenligning med syntetiske insekt midler viste at oljen hadde mindre aktivitet i forhold til disse.

Den eteriske oljen ble også testet på syv patogene sopp ved hjelp av petriskål metoden. Disse var *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum falcatum*, *trichothecium roseum*, *Curvularia palliscens*, *Aspergillus niger* og *A. terreus*. Soppkulturene ble dyrket på havre agar medium. En dose med olje tilsvarende 2, 4 og 6 µl/skål ble tilsatt et på forhånd sterilisert filterpapir. En kontroll ble på tilsvarende måte forsynt med filterpapir uten olje. Prosentvis veksthemming ble kalkulert. Oljen viste god aktivitet mot *Aspergillus terreus* og *Colletotrichum falcatum*, men var mindre effektiv mot *Trichothecium roseum*, *Fusarium moniliforme*, *Curvularia palliscens*, *Aspergillus niger* og ineffektiv mot *F. oxysporum*. Oljen viste ingen fullstendig veksthemmende effekt for noen av soppartene som ble testet. Studien konkluderer med at oljen fra *T. erecta*, som er rik på (Z)-β-ocimen, innehar en statistisk antisopp aktivitet så vel som insekticid egenskaper (Singh, et al., 2003).

13.11.1 Toxitet og *Tagetes erecta*

Tagetes ekstrakter og olje fra *Tagetes* er fototoksisk. Etersom det ikke er fastslått noen sikker grense for sikker bruk ved tilsetning i kosmetiske produkter så anbefaler Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) at olje fra *Tagetes erecta*, *Tagetes minuta* og *Tagetes patula* ikke skal være en ingrediens i kosmetiske produkter (SCCP/0869/05, 2005).

Inntak av små mengder av planten *Tagetes erecta* regnes ikke for å være farlig. Om man skulle være så uheldig å få i seg større mengder av planten så bør Giftinformasjonen kontaktes (Helsedirektoratet, 2009).

Enkelte tilfeller av kontaktdermatitis relatert til pulver fra *Tagetes erecta* er rapportert. Et tilfelle av IgE-mediert allergi er rapportert for en person som fra tidligere var allergisk for *H. annuus* (solsikke) pollen og som hadde jobbet med transport av sekker med mel av *T. erecta* i 6 år. SDS-PAGE immunblotting (en type Western blot og/eller protein immunoblot) viste et IgE bånd på 60 kDa. Kryssreaktivitet mellom *H. annuus* pollen og mel fra *Tagetes erecta* ble bekreftet ved EAST (enzym allergosorbent test) (Luch-Pérez et al., 2009).

13.12 Diskusjon

I følge professor Nordals Burma herbarium ble bladene og blomstene til *Tagetes erecta* brukt på grunn av sine smertestillende og antiseptiske egenskaper. Det foreligger en del dokumentasjon på at *T. erecta* inneholder tiofener. Forekomsten av tiofener varierer imidlertid meget. Mye tyder på at unge planter av *T. erecta* hovedsakelig akkumulerer tiofener i bladene, mens eldre planter akkumulerer tiofener i røttene. Croes et al. peker på at BBT var den dominerende komponenten i unge små planter, mens BBTOAc ble mer forekommende ved videre vekst relatert til nydannelse av røtter. Studier av rotkultur fra *T. erecta* viser på sin side at transfekterte små planter responderer ved å produsere røtter med et økt innhold av tiofener i forhold til normale røtter, samt at tiofensyntesen i *T. erecta* er relatert til nydannelsen av røtter. Det ser således ut til at *T. erecta* produserer tiofener som en form for forsvarsmekanisme.

Studier av Mukundan et al. viste at BBTOAc var det dominerende tiofenet i røttene etterfulgt av BBT, BBTOH og α -T, samt at BBTOAc syntesen hovedsakelig foregår i røttene. Studier viser også at beslektede polyacetylen acetater er mindre toksiske enn deres tilsvarende alkoholer. Det er derfor mulig at acetater representerer et lager av komponenter som planten mobiliserer ved deacetylering mediert ved esteraser som finnes i plantevevet.

Det er gjort studier med ekstrakt av *T. erecta* på mygglarver som viste larvicid aktivitet. Damp destilert olje fra *T. erecta* viste imidlertid ingen larvicid aktivitet mot *Aedes aegypti*. Oljen av *T. erecta* har vist antibakteriell effekt ved agardiffusjonsmetoden. Polytietyler fra *T.*

erecta er også vist å ha en antibakteriell aktivitet. Det er likevel uklart hvilke komponenter som er aktive, eventuelt i hvilken dose de virker og hvordan de virker. Den eteriske oljen inneholder blant annet ocimen (2,6-dimetylokta-2,5,7-trien-4-on) som er vist å ha larvicid aktivitet kun ved større konsentrasjoner enn det som er tilfellet for *T. erecta*. Tiofener er fototoksiske overfor insektlarver, enkelte typer sopp og noen typer bakterier, noen typer virus og overfor rundormer. Resultater fra studier som har vist at nært UV-lys gav sterk økning i toksisiteten indikerer at effekten på levende celler primært er assosiert med oppløsning av cellemembranen og at α -T kan være en mulig kilde til denne biologiske aktiviteten.

Det meste av litteratur som er funnet på *T. erecta* i forhold til kjemiske og biologiske studier omhandler plantens innhold av lutein og tiofener. *Tagetes erecta* er også rapportert å inneholde polyfenoler. Det er uvisst om disse har betydning for den aktivitet som er observert i ulike studier med *T. erecta*. Studier som omhandler tiofener fra *T. erecta* er små og utført under ulike betingelser. De er derfor i stor grad ikke sammenlignbare med hensyn til innholdet av tiofener i planten, hvilke typer tiofener som er til stede i hvilken del av planten og i hvilken mengde disse er til stede. Vi vet at lysforhold, næringsbetingelser og om planten er blitt utsatt for en infeksjon har stor betydning for plantens produksjon av tiofener. Disse betingelsene er ikke standardiserte fra studie til studie. Dessuten er det mye som tyder på at *Tagetes minuta* og *Tagetes patula* kan være en større kilde til tiofener med mindre planten er infisert. Man vet likevel i stor grad hvilke tiofener som er vanligst forekommende i planten og kan eventuelt teste hver enkelt komponent for seg for å kartlegge deres virkningsprofil i forhold til blant annet antibakteriell, larvicid og soppdrepende aktivitet.

Spørsmålet hvorfor bladene og blomstene oppgis å være brukt og ikke røttene er det ikke funnet noe svar på. Logisk resonnering tilsier likevel at selv om bladene inneholder mindre mengder tiofener, så er de likevel utsatt for større grad av sollys enn røttene og kan teoretisk sett tenkes å ha større toksisk effekt av den grunn. Dette er en hypotese som verken er bekreftet eller avkreftet.

Det foreligger få studier på *T. erecta* i forhold til analgesisk effekt. Bashir et al. fant en analgesisk effekt av etanolekstraktet av *Tagetes erecta* blomst, hvor den aktive ingrediensen ble rapportert å være lutein. Bruce et al. påviste syv elektrofysiologisk aktive komponenter i ferske blomster fra *T. erecta* som alle utløste EAG responser som var signifikant større enn

kontrollresponsen hos hunnmøll. Om disse komponentene har en synergistisk effekt er uvisst. En placebo kontrollert studie av Khan et al. viste at en preparasjon med *T. erecta* påført lokalt under foten reduserte smerten relatert til reduksjon i hyperkeratotiske områder. Det er uklart om denne effekten relatert til smerten var grunnet en reduksjon i nydannelse av vev og liktorn og/eller i hvor stor grad *T. erecta* hadde en analgesisk effekt uavhengig av fysisk trykkreduksjon under foten.

Det foreligger en del dokumentasjon på *T. erecta* som en rik kilde til lutein. Det er imidlertid ikke funnet noen studier som tilsier at lutein har en analgesisk eller antiseptisk effekt. Derimot er lutein en antioksidant. Det er vist stor interesse for den potensielle muligheten for at lutein og zeaxantin kan forebygge og forsinke aldersrelatert makulær degenerasjon. Det foreligger imidlertid ingen bevis for at friske personer burde ta antioksidant vitamin og mineral tilskudd for å forebygge eller forsinke utviklingen av AMD. (Evans, 2006; Evans & Henshaw, 2008)

13.13 Konklusjon

Studier viser at blomst og blad fra *T. erecta* inneholder fototoksiske tiofener og flyktige komponenter som kan ha et potensiale for å virke analgesisk og/eller antiseptisk. Disse studiene er gjort under ulike betingelser og er derfor ikke sammenlignbare med hensyn til dose og respons av de ulike komponenter, heller ikke om det foreligger en eventuell synergistisk effekt. Det gjenstår en god del samkjørte studier om dette skal kunne kartlegges.

14. *Vernonia cinerea* Less



Bilde av *Vernonia cinerea*, hentet fra (Blanco, 1883b).

14.1 Sammendrag

Vernonia cinerea er et vanlig ugress i asiatiske land og mye brukt i disse landene i tradisjonell medisin blant annet mot malaria. Det er forsket på denne planten siden 60-tallet og flere kjemiske komponenter er identifisert etter hvert. Det er gjort få biologiske studier av planten og det er så langt ikke identifisert noen virkningsmekanisme for plantens mange innholdsstoffer. Likevel tyder enkelte studier på at planten inneholder komponenter som muligens har analgetiske, antipyretisk og antiinflammatorisk aktivitet, men som ikke er identifisert.

14.2 Taksonomiske betegnelser

Botanisk navn: *Vernonia cinerea* Less

Klasse: Equisetopsida C. Agardh

Underklasse: Magnoliidae Novák ex. Takht.

Overorden: Asterales Link

Orden: Asterales Link

Familie: Asteraceae Bercht. & J. Presl.

Genus: *Vernonia* Schreb

Synonym: *Blumea esquirolii* H. Lév. & Vaniot, *Conyza chinensis* L., *Conyza chinensis* Lam., *Conyza cinerea* L., *Conyza ivifolia* Burm. F., *Cyanthillium cinereum* (L.) Kuntze, *Vernonia abbreviata* DC., *Vernonia erguta* Baker, *Vernonia benoticaefolia* Baker, *Vernonia cinerea* subsp. *vialis* (DC.) Humbert, *vernonia exilis* Miq., *Vernonia vialis* DC. med flere (Tropicos. org., 2010i).

14.3 Botanikk og flora

Urten *Vernonia cinerea* kan være ettårig eller flerårig. Den kan bli 15-150 cm høy; stammen er oppreist, enkel eller forgrenet, med furer langs stilken, dunhåret til skjellete med korte t-formede hår og lengre flagelleformede hår. Løvet er mørkt grønne, eggformete, lansettformete til spatelformete med elliptiske, omvendt eggformete eller eggformete blad som er 1-12 cm lange og 0,3-5 cm brede, med kileformet basis som blir smalere eller avrundet til en trang bladstilk. Bladkantene er sagtannete eller sjeldent forekommende hele, spissen er butt. Oversiden er spredt forsynt med dunhår eller er skjellaktig, og undersiden har

sparsomt med dunhår eller kjertelhår med nedsunkne kjertler. Blomsterhodene har tallrike løse terminale kvaster som er 2-20 cm i diameter; støttebladene er syllindriske eller eggformet syllindriske. 3-6 mm lange, 2,2-2,5 mm i diameter i blomstringstiden.

Støttebladene under blomsten sitter sammen 3-4 i grupper presset inntil blomsten, men bli mer bakoverbøyd når frukten er dannet, de er grønne, ofte purpuraktige i tuppen, lansettformede, 1,5-5- mm lange, spisse, men fine oppreiste dunhår og med noen få kjertelhår. Kronbladene er lys fiolette, purpurfargende eller lilla, 3,3-7,5 mm lange, med 1-3 mm lange fliker, med fine dunhår nedenfor spissen med spinkle oppreiste hår og med runde kjertler. Akenene (små tørre frukter) er syllindriske eller neste syllindriske eller utydelig 5-ribbede, 1-2,8 mm lange, med oppreiste dunhår; ytre pappus av smale lansettformede flak, 0,2-0,6 mm lange, indre pappus er hvit og 3,5-5 mm lang (Aluka.org., 2000).

14.4 Tradisjonell bruk

Vernonia cinerea er kjent som medisinsplante i asiatiske land. Professor Nordals Burma herbarium oppgir at hele planten har vært brukt som antiastmatikum og tonikum. Det er rapportert om mange terapeutiske bruksområder av denne planten, men spesielt i forhold til malaria feber og leversykdommer. I Kambodsja er den vidt utbredt som tradisjonell medisin for behandling av feber, malaria og kolikk (Chea et al., 2006). *Vernonia cinerea* er brukt som antiinflammatorisk middel ved behandling av sår, leversykdommer, gastrointestinale forstyrrelser, hoste astma og bronkitt (Abeysekera et al., 1999). Planten er et vanlig ugress med rosa blomster som vokser over hele India. I India gis blomstene for konjunktivitt og juice fra planten gis mot hemoroider (Gunasingh & Nagarajan, 1981). Et infus av urten gis i kombinasjon med quinin mot malaria (Tandon et al., 1998).

I India brukes den også som tonikum, magestyrkende middel, adstringerende middel, middel mot innvollsorm og i diuretisk hensikt og ved astma og bronkitt. Roten oppgis å være spesielt bitter samt å inneha diuretiske egenskaper i tillegg til å være virksom mot innvollsorm. Fersk juice av bladene gis mot dysenteri og appliseres lokalt for å trekke ut guinea orm (en type innvollsorm). Frøene brukes også som orm middel mot rundorm og trådorm, samt gis for forkjølelse, flatulens, kolikk og kroniske hudsykdommer. En pasta av frøene blandet med limejuice brukes for å fjerne hodelus. Blomstene brukes for behandling av konjunktivitt, feber og reumatisme (Misra et al., 1993). Planten med blomster brukes som dekokt eller infus for å fremme perspirasjon ved feber (Gupta, Mazumber, Manikandan,

Bhattacharya et al., 2003). Planten vokser også i sørøst Kina der den brukes til behandling av forkjølelse, sår hals, hodepine, eksem, mastitt, dysenteri, infeksjon og skader (Chen et al., 2006). I Malaysia er planten rapportert å ha sedative egenskaper. Tradisjonelle preparasjoner koker planten i vann og brukes som sådan for insomni (Muir, 1981).

14.5 Kjemiske studier

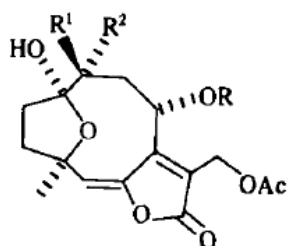
Tandon et al. isolerte fire komponenter fra etanolekstraktet av den overjordiske delen av *Vernonia cinerea*. Den pulveriserte planten ble ekstrahert med etanol, deretter konsentrert *in vacuo* og tilsatt vann, for så å fraksjoneres med n-heksan og etyl acetat. Løsningsmiddelet ble så fjernet fra heksanekstraktet og en del av resten ble kromatografert over silika gel og eluert med varierende andeler av og CHCl_3 . Fraksjonene ble monitorert ved TLC.

Stigmasterol ble isolert fra heksan- CHCl_3 (1:1) fraksjonen og dotriacontanoic syre ble isolert fra CHCl_3 fraksjonen. Etylacetat fraksjonen ble kromatografert over silika gel og gav stigmasterol- β -D-glukopyranosid (stigmasterol-3-O- β -D-glukosid) og luteolin-7-O-glukopyranosid (luteolin 7-O-glukosid) fra respektive CHCl_3 -MeOH (95:5) fraksjonen og CHCl_3 -MeOH (9:1) fraksjonen. Komponentene ble identifisert ved hjelp av smeltepunkts analyser, spektroskopiske data (MS, $^1\text{H-NMR}$, co-TLC) og ved å sammenligne med autentiske eksemplarer (Tandon, et al., 1998).

Gupta et al. identifiserte flere steroider, triterpenoider, fenyylpropanoider, flavonoider og tanniner fra metanolekstraktet av *Vernonia cinerea* ved hjelp av kvalitative analyser som ble bekreftet ved TLC. Artikkelen spesifiserer ikke nærmere hvilke de respektive komponenter var (Gupta, et al., 2003).

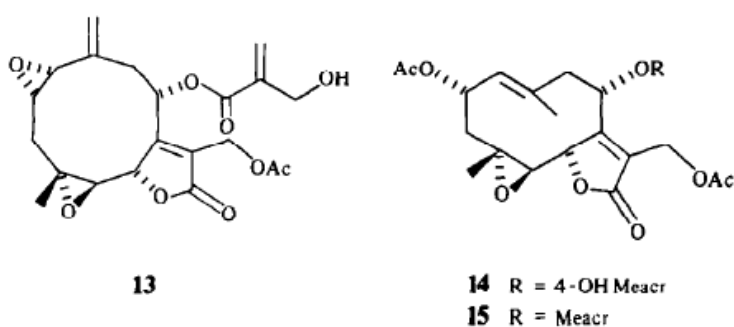
Jakupovic et al. isolerte fire hirsutinolider fra den overjordiske delen av *Vernonia cinerea* samlet inn fra *Costa Rica*. Eksemplarer av *Vernonia cinerea* innsamlet fra Malawi viste innhold av glaucolid E og to beslektede laktoner. Ekstrakt av *Costa Rica* materialet ble preparert fra to polare fraksjoner (1, Et_2O -petrol, 1:1 og 2, Et_2O). Fraksjon 1 ble kromatografert ved TLC og eluert med $\text{MeOH-H}_2\text{O}$, 3:2 som gav komponent 9. Fraksjon 2 gav 8α -[hydroksymetakryloyloksy]-hirsutinolid-13-O-acetat (8) som kun skilte seg fra komponent (9) ved $^1\text{H-NMR}$ analyse ved manglende signaler fra ester gruppen. Fraksjon 2 gav også stilpnomentolid-8-O-tiglat og en blanding som ved videre HPLC ($\text{MeOH-H}_2\text{O}$, 3:2) gav 8α -[4-hydroksytigloyloksy]-hirsutinolid-13-O-acetat (10), 8α -[4-hydroksymetakryloyloksy]-10 α -hydroksyhirsutinolid-13-O-acetat (11) og 8α -[4-

hydroksytigloyloksy]-10 α -hydroksyhirsutinolid-13-O-acetat (12). Ekstrakt av Malawi eksemplaret ble også preparert i to polare fraksjoner (1, Et₂O og 2, Et₂O-meOH, 4:1) som videre ble kromatografert ved TLC. Fraksjon 1 ble eluert med Et₂O-petrol (4:1) og gav 19-Hydroksyglaucolid E (14) og glaucolid E (15). Bearbeiding av fraksjon 2 ved TLC og eluering med C₆H₆-CH₂Cl₂-Et₂O (1:1:3) etterfulgt av HPLC (MeOH-H₂O, 3:2) gav vernocinerolid-8-O-[4-hydrokymetakrylat] (13). Komponentene ble identifisert ved hjelp av ¹H-NMR (Jakupovic et al., 1986).



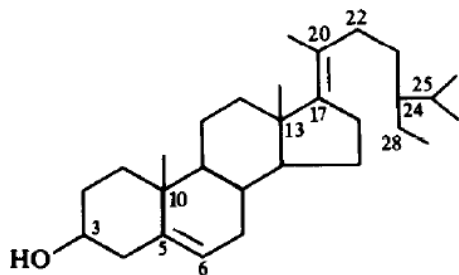
8	9	10	11	12
4-OH Meacr	Tigl	4-OH Tigl	4-OH Meacr	4-OH Tigl
H	H	H	Me	Me
Me	Me	Me	OH	OH

Figur 88: kjemisk struktur av 8 α -[hydroksymetakryloyloksy]-hirsutinolid-13-O-acetat (8), komponent (9), 8 α -[4-hydroksytigloyloksy]-hirsutinolid-13-O-acetat (10), 8 α -[4-hydroksymetakryloyloksy]-10 α -hydroksyhirsutinolid-13-O-acetat (11) og 8 α -[4-hydroksytigloyloksy]-10 α -hydroksyhirsutinolid-13-O-acetat (12), hentet fra Jakupovic et al. 1986.



Figur 89: kjemisk struktur av vernocinerolid-8-O-[4-hydrokymetakrylat] (13), 19-hydroksyglaucolid E (14) og glaucolid E (15), hentet fra Jakupovic et al. 1986.

Misra et al. isolerte komponenten stigmast-5,17(20)-dien-3 β -ol og 26-metylheptacosanoic syre fra petrolekstraktet av røttene til *Vernonia cinerea* i tillegg til stigmasterol og sitosterol (Misra et al., 1984b).



Figur 90: kjemisk struktur av stigmast-5,17(20)-dien-3 β -ol, hentet fra Misra et al. 1984.

Rao isolerte fire triterpenkomponenter β -amyrin acetat, lupeol acetat, β -amyrin, lupeol og tre steroler, β -sitosterol, α -pinasterol og kaliumklorid fra planten *Vernonia cinerea* (Rao, 1962).

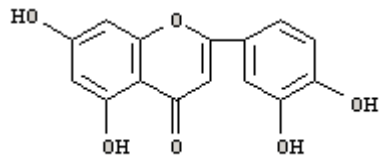
14.5.1 Eterisk olje

Rajalakshmi et al. undersøkte den kjemiske sammensetningen til blant annet den eteriske oljen fra *Vernonia cinerea* ved hjelp av GC utrustet med FID (flamme ionisasjons detektor). Den eteriske oljen ble separert fra tørket og pulverisert plante ved hydro destillering. Prosentandel av oljen ble kalkulert på tørr vekt basis. Oljen viste en blandet kjemotype hvor sesquiterpenlaktoner var dominerende. Sesquiterpenhydrokarbonene germacren- D (15,4 %), α -humulen (12,2 %), β -karyofyllen (12,1 %) og δ -cadinen (11,3 %) var hovedkomponentene som ble identifisert. Spor av terpenen-4-ol (0,2 %) og linalool (0,1%) ble også identifisert (Rajalakshmi & Jose, 2002).

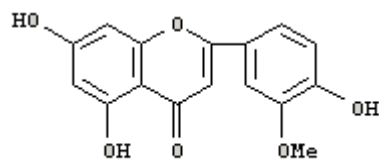
14.5.2 Flavonoider

Gunasingh et al. rapporterer om funn av luteolin, chrysoeriol, luteolin-7-O-glukosid, og isoorientin (luteolin-6-C-glukosid) isolert fra friske blomster av *Vernonia cinerea*. Blomstene ble ekstrahert med varm 80 % etanol under reflux og det vandige konsentratet ble fraksjonert i løsninger med petrol, Et₂O, EtOAc og EtCOMe. Et₂O fraksjonen gav luteolin i form av gule nåler (MeOH), C₁₅H₁₀O₆, med smeltepunkt på 328-330°C. Moderløsningen inneholdt i tillegg chrysoeriol. Resten av EtOAc fraksjonen krystalliserte som gule nåler med smeltepunkt på 251-253 °C, C₂₁H₂₀O₁₁, karakterisert som luteolin-7-O-glukosid. EtCOMe fraksjonen gav gule nåler med smeltepunkt på 240-242 °C, C₂₁H₂₀O₁₁, og $[\alpha]_D^{32} + 32^\circ$ (pyridin), karakterisert som isoorientin. Identiteten til komponentene ble

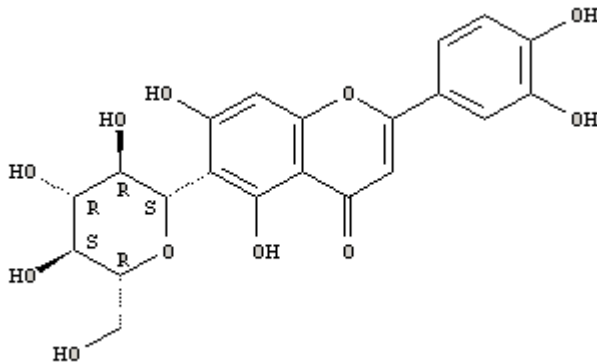
bekreftet ved co-PC og ved å sammenligne med autentiske eksemplar (Gunasingh & Nagarajan, 1981).



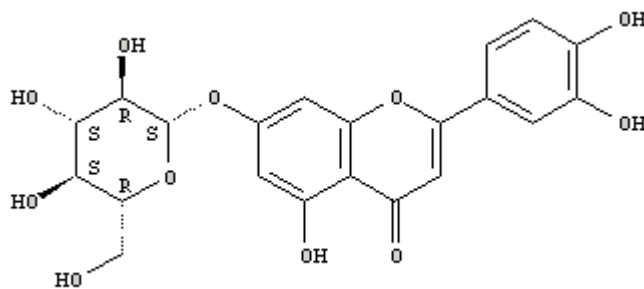
Figur 91: kjemisk struktur av luteolin hentet fra Gunasingh og Nagarajan 1981 og kopiert fra SciFinder.



Figur 92: kjemisk struktur av chrysoeriol hentet fra Gunasingh og Nagarajan 1981 og kopiert fra SciFinder.



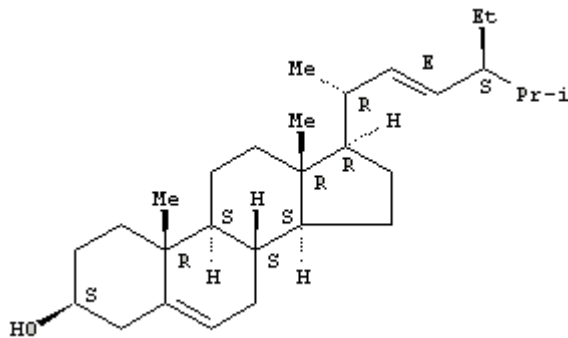
Figur 93: kjemisk struktur av isoorientin hentet fra Gunasingh og Nagarajan 1981 og kopiert fra SciFinder.



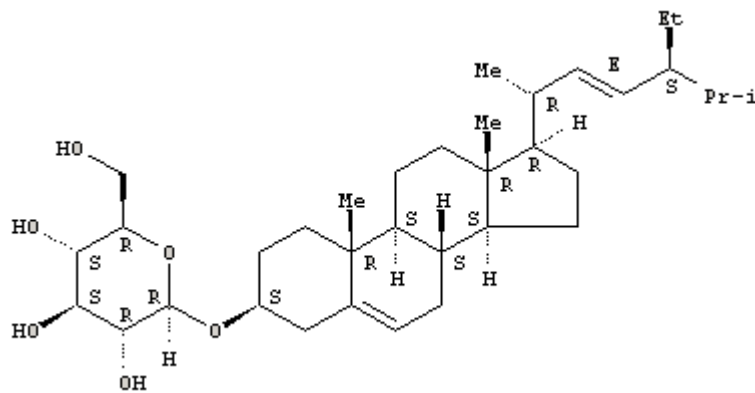
Figur 94: kjemisk struktur av luteolin 7-O-glukosid hentet fra Gunasingh og Nagarajan 1981 og kopiert fra SciFinder.

14.5.3 Triterpenoider

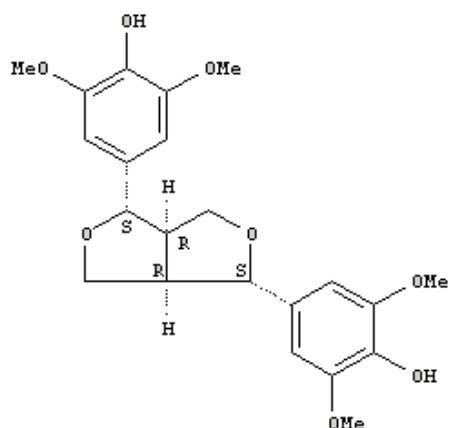
Zhu et al. isolerte og identifiserte fire innholdsstoffer i planten *Vernonia cinerea* ved hjelp av bio-aktivitet guided isolering med PC-12 modell, separering ved kolonne kromatografi og spektroskopiske metoder. Disse var (+)-lirioresinol B, stigmasterol, stigmasterol-3-O- β -glukosid og 4-sulfo-benzocyclobuten. Kun abstraktet er tilgjengelig på engelsk (Zhu et al., 2008).



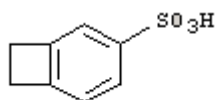
Figur 95: kjemisk struktur av stigmasterol hentet fra Zhu et al. 2008 og kopiert fra SciFinder.



Figur 96: kjemisk struktur av stigmasterol-3-O- β -D-glukosid hentet fra Zhu et al. 2008 og kopiert fra SciFinder.

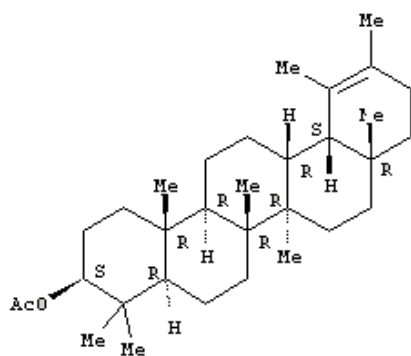


Figur 97: kjemisk struktur av liriorelinol B hentet fra Zhu et al. 2008 og kopiert fra SciFinder.



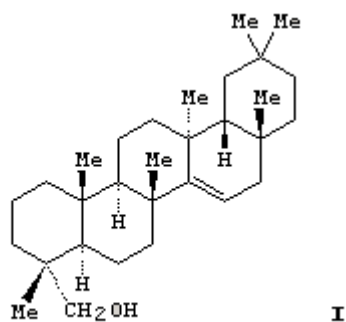
Figur 98: kjemisk struktur av 4-sulfo-benzocyclobuten hentet fra Zhu et al. 2008 og kopiert fra SciFinder.

Misra et al. isolerte et triterpenoid karakterisert som 3β -acetoksyurs-19-en fra røttene til *Vernonia cinerea*. Pulveriserte røtter ble først ekstrahert med petroleum eter og deretter med etanol. Alkohol ekstraktet ble fraksjonert i et C_6H_6 -løselig og en C_6H_6 -uløselig fraksjon. Den benzen løselige resten ble kromatografert over en silika gel kolonne og eluert med løsningsmidler av økende polaritet: heksan og heksan- C_6H_6 (9:1, 5:1 og 3:1). Komponentene 3β -Acetoksyurs-19-en og lupeol acetat, begge med molekylformel $C_{32}H_{52}O_2$ ble isolert fra heksan ekstraktet. Den kjemiske strukturen til 3β -Acetoksyurs-19-en ble klarlagt ved hjelp av spektral analyser (IR, 1H -NMR og MS) (Misra, et al., 1993).

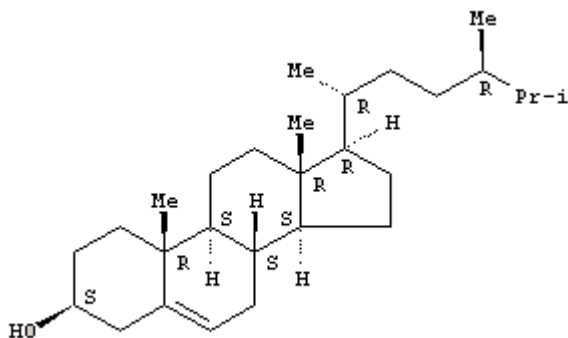


Figur 99: kjemisk struktur av 3β -acetoksyurs-19-en hentet fra Misra et al. 1993 og kopiert fra SciFinder.

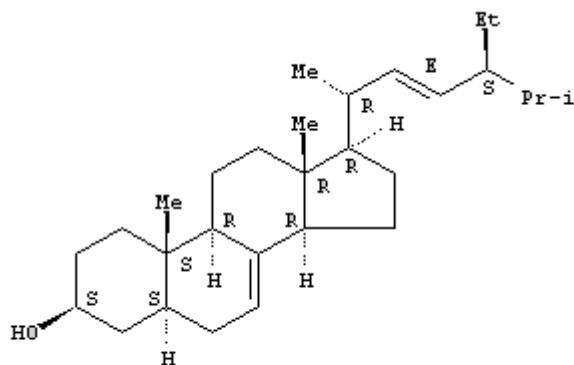
Misra et al isolerte også et triterpenoid med taraxeran skjelett ved navn 24-hydroksytaraxer-14-en i tillegg til campesterol og α -spinasterol. De lufttørkede og pulveriserte røttene fra *Vernonia cinerea* ble ekstrahert med petroleum og deretter med EtOH. Avdamping av alkoholekstraktet under vakuum gav et fast stoff som ble delt mellom EtOH og C₆H₆. Resten fra C₆H₆ løsningen ble kromatografert over en silika gel kolonne og eluert med løsningsmidler av økende polaritet (C₆H₆, C₆H₆-EtOAc). Campesterol og α -spinasterol ble isolert fra C₆H₆ ekstraktet. 24-hydroksytaraxer-14-en ble isolert fra C₆H₆-EtOAc ekstraktet. Den kjemiske strukturen til 24-hydroksytaraxer-14-en ble klarlagt ved hjelp av IR og MS (Misra, et al., 1984b).



Figur 100: kjemisk struktur av 24-hydroksytaraxer-14-en hentet fra Misra et al. 1984 og kopiert fra SciFinder.

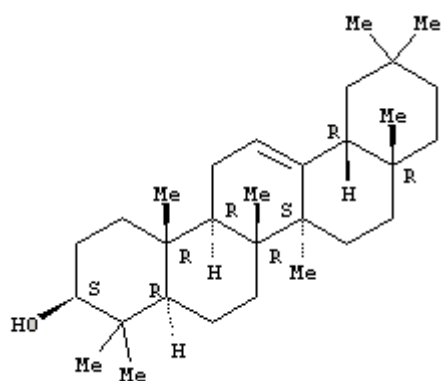


Figur 101: kjemisk struktur av campesterol hentet fra Misra et al. 1984 og kopiert fra SciFinder.

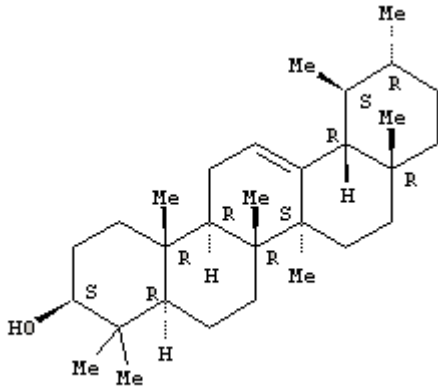


Figur 102: kjemisk struktur av α -spinasterol hentet fra Misra et al. 1984 og kopiert fra SciFinder.

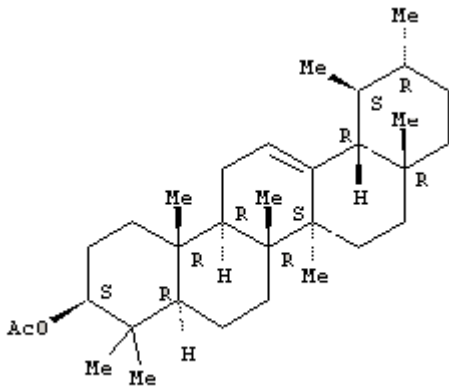
Misra et al. isolerte også seks triterpener ved navn δ -amyrin acetat, α -amyrin acetat, β -amyrin acetat, 3β -acetoksyurs-13(18)-en, β -amyrin og α -amyrin fra røttene til *Vernonia cinerea*. Pulveriserte røtter ble ekstrahert med petroleum eter. Ekstraktet ble filtrert og løsningsmiddelet ble fjernet ved destillering under redusert trykk. Dette gav en brun masse som ble kromatografert over en kolonne av silika gel, eluert med petrol og petrol- C_6H_6 . Det rene petrol eluatet gav δ -amyrin acetat. Petrol- C_6H_6 eluatet (9:1) gav α -amyrin acetat, 3β -acetoksyurs-13(18)-en og β -amyrin acetat. Petrol- C_6H_6 eluatet (1:1) gav β -amyrin og petrol- C_6H_6 eluatet (1:3) gav α -amyrin. Identiteten til komponentene ble klarlagt ved analyse av smeltepunkt, optisk rotasjon, IR, 1H -NMR, MS og kjemiske analyser (Misra et al., 1984a).



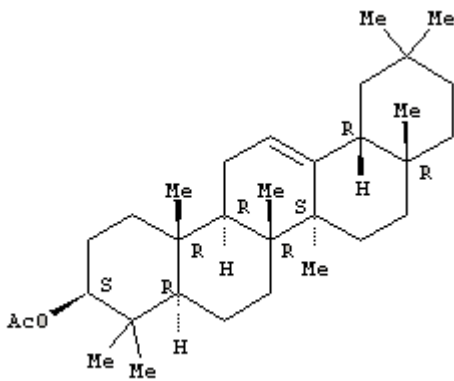
Figur 103: kjemisk struktur av β -amyrin hentet fra Misra et al. 1984 og kopiert fra SciFinder.



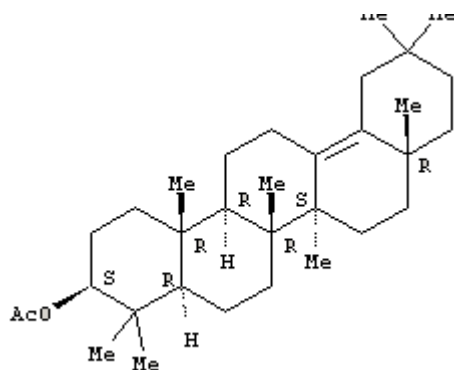
Figur 104: kjemisk struktur av α -amyrin hentet fra Misra et al. 1984 og kopiert fra SciFinder.



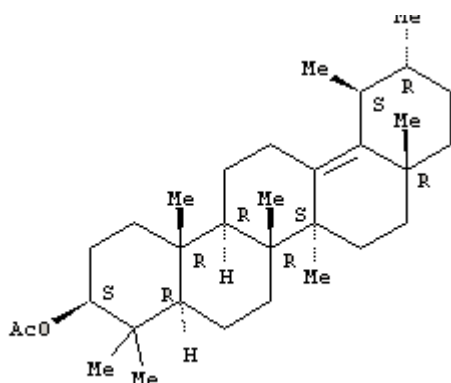
Figur 105: kjemisk struktur av α -amyrin acetat hentet fra Misra et al. 1984 og kopiert fra SciFinder.



Figur 106: kjemisk struktur av β -amyrin acetat hentet fra Misra et al. 1984 og kopiert fra SciFinder.



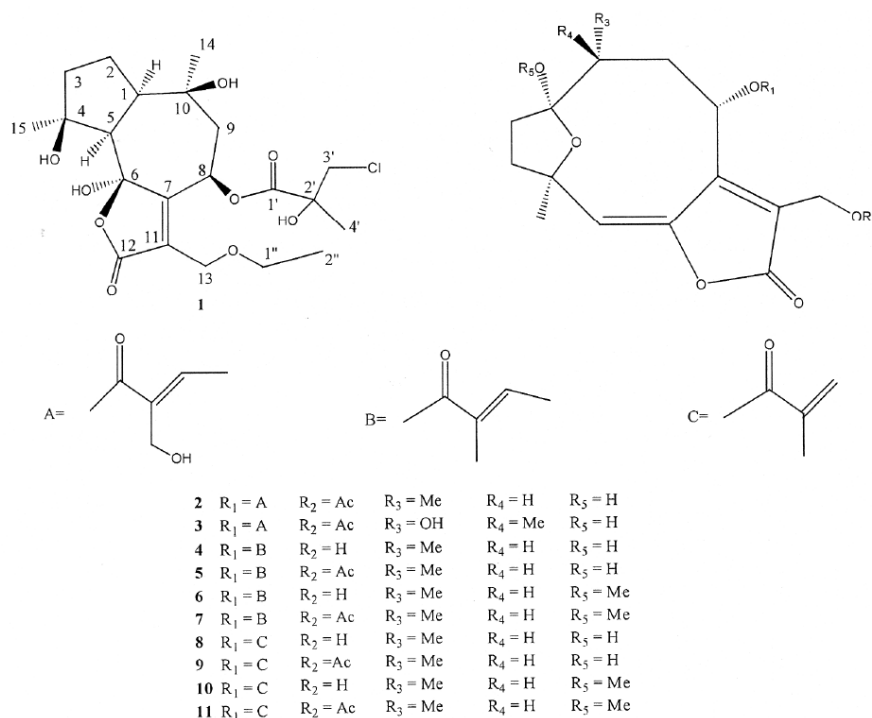
Figur 107: kjemisk struktur av δ -amyrin acetat hentet fra Misra et al. 1984 og kopiert fra SciFinder.



Figur 108: kjemisk struktur av 3 β -acetoksyurs-13(18)-en hentet fra Misra et al. 1984 og kopiert fra SciFinder.

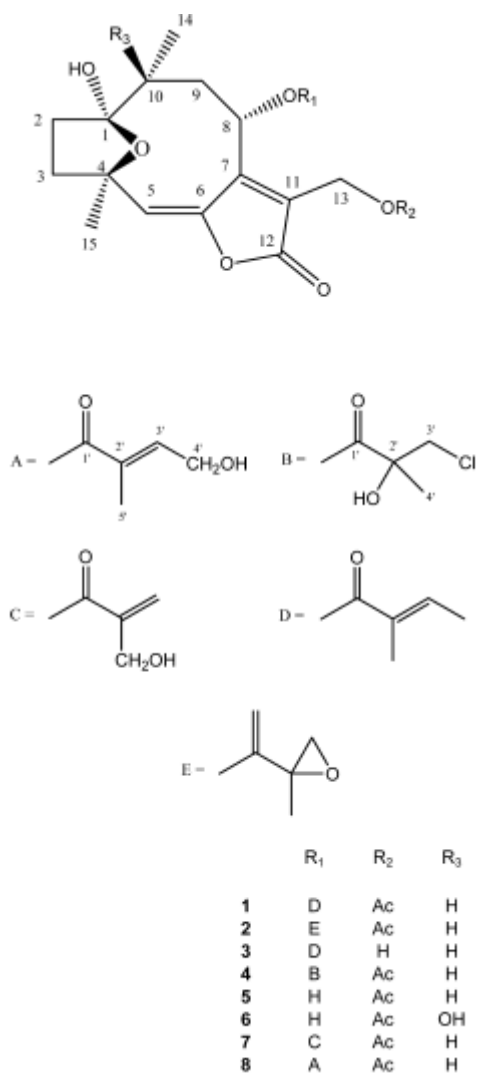
14.5.4 Sesquiterpenoider

Chen et al. isolerte og identifiserte et sesquiterpenlakton så vel som 10 fra tidligere kjente sesquiterpenlaktoner fra den etylacetatløselige fraksjonen av etanolektraktet fra planten *Vernonia cinerea*. Disse er gjengitt i figur 109. Den kjemiske strukturen til 8 β [3-kloro-2-hydroksy-2-metylpropanoyloksy]-4 β ,6 α ,10 β -trihydroksyl-13-etoksy-7(11)-guaiaen-12,6-olid ble hovedsakelig klarlagt ved hjelp av spektrale data, spesielt 2D- NMR teknikker (Chen, et al., 2006).



Figur 109: kjemisk struktur til 8β [3-kloro-2-hydroksey-2-metylpropanoyloksy]-4β,6α,10β-trihydroksyl-13-etoksy-7(11)-guaiaen-12,6-olid (vernocinolid A) (1), 8α-[4-hydroksy-tigloyloksy]-hirsutinolid-13-O-acetat (2), 8α-[4-hydroksy-tigloyloksy]-10α-hydroksy-hirsutinolid-13-O-acetat (3), 8α-tigloyloksy-hirsutinolid (4), 8α-tigloyloksy-hirsutinolid-13-O-acetat (5), vernolid-A (6), vernolid-B (7), 8α-[2-metylakryloyloksy]-hirsutinolid (8), 8α-[2-metylakryloyloksy]-hirsutinolid-13-O-acetat (9), 8α-[2-metylakryloyloksy]-1β,4β-epoksy-1α-metoksy-10βH-germakra-5E,7(11)-dien-12,6-olid (10) og 8α-[2-metylakryloyloksy]-1β,4β-epoksy-1α-metoksy-13-O-acetat-10βH-germakra-5E,7(11)-dien-12,6-olid (11) hentet fra Chen et al. 2006.

Chea et al. isolerte 8 sesquiterpen laktoner fra *Vernonia cinerea*. Den tørkede og pulveriserte planten ble ekstrahert med kokende vann, filtrert og frysetørket. Dette pulveret ble løst i destillert vann og deretter skilt med diklormetan, filtrert, avdampet og kromatografert over silika gel og gradient eluert med CH₂Cl₂-CH₃OH som gav 8α-tigloyloksy-hirsutinolid-13-O-acetat, 8α-epoksymetakryloyloksy-hirsutinolid-13-O-acetat og 8α-tigloyloksy-hirsutinolid og to fraksjoner F1 og F2. Fraksjon F1 ble kromatografert på silika gel og gav vernolid C, hirsutinolid-13-O-acetat og piptocarphin D. Fraksjon F2 ble prosessert på en Sephadex LH-20 kolonne og eluert med CH₂Cl₂-CH₃OH som gav 8α-(4-hydroksymetakryloyloksy)-hirsutinolid-13-O-acetat og vernolid D. Komponentene ble identifisert ved hjelp av ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMBC og HR-ESI-MS (high resolution electrospray ionization mass spectrum) (Chea, et al., 2006).



Figur 110: kjemisk struktur av 8 α -tigoyloxy-hirsutinolid-13-O-acetat (1), 8 α -epoksymetakryloyloxy-hirsutinolid-13-O-acetat (2), 8 α -tigloyloxy-hirsutinolid (3), vernolid C (4), hirsutinolid-13-O-acetat (5), piptocarphin D (6), 8 α -(4-hydroksymetakryloyloxy)-hirsutinolid-13-O-acetat (7) og vernolid D (8), hentet fra Chea et al. 2006.

Kuo et al. gjorde en bio-assay veiledet fraksjonering av etanolekstraktet fra stilken til *Vernonia cinerea* og isolerte vernolid-A og vernolid B. Den kjemiske strukturen ble klarlagt på bakgrunn av spektroskopiske analyser (IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ og $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$). De tørkede stilkene av *V. cinerea* ble ekstrahert med etanol, som igjen ble ekstrahert videre med n-heksan og CHCl_3 og deretter kromatografert på en silika gel kolonne og eluert med n-heksan-EtOAc og EtOAc. Den bioaktive fraksjonen (n-heksan:EtOAc, 2:1) ble separert videre ved HPLC (5C_{18}) med $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (9:1) som gav vernolid-A og vernolid-B (Kuo et al., 2003).

14.6 Biologiske studier

Iwalewa et al. testet kloroform-, metanol- og eterekstraktet av *Vernonia cinerea* blad (100, 200 og 400 mg/kg intraperitonealt) på eddiksyre induert vridning hos mus, carrageenin induert ødem og ølgjær induert pyreksi i rotter for å evaluere den respektive analgesiske, antiinflammatoriske, antipyretiske og adferdsmessige aktiviteten. Forandringene med hensyn til vridninger og adferdsmessig aktivitet i mus, samt pyreksi og potevolum i rotter ble signifikant ($p < 0,05$) redusert sammenlignet med kontrollene. Antall vridninger minket signifikant ($p < 0,005$) og var sammenlignbar med ASA, men ikke med morfin. Det ble observert en økt smerteterskel i den ødematøse høyre bakpoten til musene. Resultatene indikerer at disse ekstraktene har analgesiske, antipyretiske og antiinflammatoriske egenskaper. Iwalewa et al. foreslår at disse effektene kan bidra til at *Vernonia cinerea* eventuelt kan brukes til behandling av malaria. Studier pågår for videre å identifisere innholdsstoffene i det enkelte ekstrakt og kartlegge deres respektive virkningsmekanisme (Iwalewa et al., 2003).

14.6.1 Cytotoksisk aktivitet

(+)-lirioresinol, stigmasterol-3-O- β -glukosid og 4-sulfo-benzocyclobuten oppgis å ha vist cytotoksisk aktivitet ved PC-12. 4-sulfo-benzocyclobuten skal ha vist en spesifikk effekt i forhold til overlevelsen av en type fibroblaster og induere NGF (nerve growth factor) aktivitet. Dette er interessante resultater som dessverre ikke har vært mulig å undersøke videre. Artikkelen er skrevet på kinesisk (Zhu, et al., 2008)

Kuo et al. gjorde en biologisk evaluering av komponentene vernolid-A og – B som viste en cytotoksisk aktivitet mot humane KB (oral epidermoid carcinom), DLD-1 (colon adenocarcinom, NCI-661 (lunge stor celle carcinom) og Hela (cervix epiteloid carcinom) tumor celle linjer. Vernolid-A viste ED_{50} verdier på respektive 0,02 $\mu\text{g/ml}$, 0,05 $\mu\text{g/ml}$, 0,53 $\mu\text{g/ml}$, 0,04 $\mu\text{g/ml}$ for Kb, DLD-1, NCI-661 og Hela). Vernolid-B viste en marginal cytotoxicitet (Kuo, et al., 2003).

14.6.2 Insektmiddel

Tandon et al. undersøkte det biologiske potensialet til *Vernonia cinerea* i for å se på om planten kunne hindre blad av *Ricinus communis* i å bli spist av møll og nattsvermelarver. To typer sommerfuglinsekter *Spilosoma obliqua* og *Spodoptera litura* ble alet opp på *Ricinus communis*. Ulike grupper av larver fikk hakkede *Ricinus* dyppet i ulike planteekstrakter/plantekomponenter. Ved å telle antall avføringer til de ulike gruppene ble det registrert hvor effektivt plantematerialet var i forhold til å gi larvene mindre matlyst.

Stigmasterol, stigmasterol- β -D-glukopyranosid og luteolin-7-O-glukopyranosid og dotriacontanoic syre ble identifisert som rene aktive komponenter fra planten *Vernonia cinerea* i forhold til å minke matlysten til de testede insektlarvene.

Probit analysen viste en ED₅₀ på 557,14 ppm og 964,1 ppm for stigmasterol, 432,96 ppm og 586,95 ppm for luteolin-7-O-glukopyranosid mot respektive *S. obliqua* og *S. litura*. ED₅₀ var på 220,37 ppm for stigmasterol- β -D-glukopyranosid og 2056,57 ppm for dotriacontanoic syre mot *S. obliqua*. Resultatene indikerer at stigmasterol- β -D-glukopyranosid var den mest potente av de fire komponentene. Årsaken til dette kan muligens skyldes glukose delen som er bundet i 3 β -posisjon til stigmasterol. Det er nødvendig med flere studier for om mulig å klarlegge dette struktur –aktivitets forholdet (Tandon, et al., 1998).

14.6.3 Antibakteriell effekt

Gupta et al. testet petroleum eter ekstraktet, benzen ekstraktet, kloroform ekstraktet og metanolekstraktet av *Vernonia cinerea* for antibakteriell effekt. Benzenekstraktet av *vernonia cinerea* viste en bredspektret antibakteriell effekt (50-500 μ g/ml). De andre ekstraktene var inaktive. Den antibakterielle effekten var konsentrasjonsavhengig.

Aktiviteten ved en dose på 500 μ g/ml var sammenlignbar med aktiviteten til kloramfenikol (10 μ g/ml) mot *Bacillus subtilis* og *Pseudomonas aeruginosa*. I tillegg til disse bakteriene ble også følgende bakterier testet: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermii*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Klebsellia pneumoniae*, *Salmonella typhi* og *Shigella dysenteriae*. Alle fraksjonene viste positiv test på flavonoider og tanniner, men kun petroleum eter fraksjonen og benzen fraksjonen testet positivt på terpenoider (Gupta, Mazumber, Manikandan, Haldar et al., 2003).

14.6.4 Antiinflammatorisk aktivitet

Mazumder et al. evaluerte den anti-inflammatoriske aktiviteten til metanol ekstraktet av planten *Vernonia cinerea* Less. I en akutt modell (carraggenin, histamin og serotonin induisert ødem i poten til rotter) og en kronisk modell (bomull pellets induisert granulom). Metanolekstraktet (250 og 500 mg/kg p.o) utøvet en signifikant ($p < 0,001$) og doseavhengig aktivitet mot alle de flogistiske midlene som ble brukt. Metanolekstraktet viste en signifikant ($p < 0,01$) antiinflammatorisk aktivitet i den kroniske modellen. Alle effektene ble sammenlignet med et standard medikament fenylybyazon (100 mg/kg p.o.) (Mazumder et al., 2003).

Latha et al. testet antiinflammatorisk aktivitet til alkohol ekstraktet av blomsten *Vernonia cinerea* på adjuvans induisert artritt hos rotter. Artritt ble induisert ved intradermal injeksjon (i en pote) av 0,1 ml Freund's adjuvant som inneholdt 10 mg/ml av varmedrepte *Mycobacterium tuberculosis*. Blomsterekstraktet ble administrert per os i 5 % akasie harpiks i doser på 100 mg/kg kroppsvekt. Rottene ble inndelt i fire grupper, en kontrollgruppe, en adjuvant gruppe, en kontrollgruppe som fikk drogen i 8 dager og en gruppe med adjuvante rotter som fikk drogeekstraktet i 11-18 dager. Artritt ble estimert ved fysiske og biokjemiske målinger og histologisk eksaminering. En økning i pote volum ble assosiert med infiltrasjon av granulocytter og monocytter i det periartrittiske vevet. Miltvekten økte i de artrittiske rottene. Det var ingen signifikant økning i levervekt eller nyrevekt. Endringene i potevolum, kroppsvekt og vevsvekt, samt serumaktivitet av ALT, AST, ACP og catepsin-D i adjuvante rotter ble reversert ved oral administrering med 100 mg/kg kroppsvekt av blomsterekstraktet. Ekstraktet reverserte også de mest utpregede histopatologiske forandringene i poten til de adjuvante rottene.

Fytokjemiske studier viste innhold av alkaloider, flavonoider, saponiner, karbohydrater, proteiner, fenoler og tanniner. Aktiviteten til aminotransferaser, alkalisk fosfatase, ACP (acid phosphatase) og katepsin-D var økt i adjuvante rotter og kan trolig ha en sammenheng med lysosomal skade av cellene ved inflammasjon. Histologisk ble det observert ødem og nedbrytning av synovialt hulrom ved fibrinellulære depoter i leddene til de adjuvante rottene. Administrering av ekstrakt fra *Vernonia cinerea* bedret symptomene på artritt, hvilket kan indikere en antiinflammatorisk nytte av komponenter isolert fra etanolekstraktet. Latha et al. konkluderer med at ekstraktet inneholder antiinflammatoriske komponenter som ikke er identifisert (Latha et al., 1999).

Kumar og Kuttan evaluerte aktiviteten av planten *Vernonia cinerea* i forhold til antioksidative og antiinflammatoriske egenskaper. Metanolekstraktet av *V.cinerea* fanget hydroksylradikaler generert ved Fentom reaksjon (inhibitory concentration, IC_{50} 130 $\mu\text{g/ml}$), superoksid generert ved foto reduksjon av riboflavin (IC_{50} 190 $\mu\text{g/ml}$) og viste en signifikant hemming av lipid peroksidering (IC_{50} 130,5 $\mu\text{g/ml}$). Metanolekstraktet av *V.cinerea* fanget også nitrogen oksid (IC_{50} 210 $\mu\text{g/ml}$). Intreperitoneal administrering av *V.cinerea* til mus hemmet PMA (phorbol-12-myristat-13-acetat) induisert superoksid generering peritoneale makrofager fra mus. Administrering av *V.cinerea* til mus gav en signifikant økning i nivå av katalase, superoksid dismutase, glutation, glutation peroksidase og glutation-5-transferase i blod og lever, mens nivået av lipid peroksidering ble signifikant senket. Det ble også observert at ekstrakt av *V.cinerea* gav en signifikant hemming av carrageenan induisert inflammasjon, sammenlignet med kontroll modeller. Nedregulering av proinflammatorisk cytokin nivå og gen uttrykk gav støtte til de ovenfor nevnte resultater. Artikkelen konkluderer med at den undertrykkende effekten i forhold til inflammasjon kan forklares ved plantens antioksidative egenskaper, men at det er behov for flere studier for å klarlegge den/de eksakt/e virkningsmekanisme/r, samt hvilken nytte planten kan ha som antioksidant og antiinflammatorisk middel (Kumar & Kuttan, 2009).

Abeysekera et al. studerte effekten av en rekke komponenter isolert fra *Vernonia cinerea* i forhold til prosentvis hemming av kjemiluminescens generert av zymosan-aktiverte polymorf nukleære leukocytter. Disse komponentene var som følger: luteolin, luteolin-7-O-glukosid, luteolin 4'-O-glukosid, klorogenic syre og 3,5-dikaffeoylquinic syre. Rapporten oppgir resultatene i forhold til IC_{50} verdier, det vil si den molare konsentrasjonen som kreves for å gi en 50 % reduksjon av kjemiluminescens i forhold til en kontroll (null konsentrasjon). Rapporten konkluderer med at de studerte komponentene som alle var effektive hemmere av oksidativ lekkasje fra polymorfnukleære leukocytter kan ha en betydning for den antiinflammatoriske aktiviteten som *Vernonia cinerea* tradisjonelt har vært hevdet å inneha (Abeysekera, et al., 1999).

14.6.5 Antipyretisk aktivitet

Gupta et al. evaluerte det antipyretiske potensialet til metanolekstraktet av planten *Vernonia cinerea* (MEVC). Ekstraktet ble blandet i en 0,25 % løsning av karboksymetylcellulose og

administrert per os til rotter. Rottene ble inndelt i 5 grupper og rektal temperatur ble målt initialt og med en times intervaller i 5 timer etter administrering av enten 0,25 % karboksymetylcelluloseløsning (kontrollgruppe) eller metanolekstrakt. Feber ble induisert ved å injisere 10 ml/kg av 15 % w/v gjær suspendert i en 0,25 % w/v løsning av karboksymetylcellulose. 19 timer etter injeksjon av gjær fikk kontrollgruppen 0,25 % karboksymetylcellulose løsning tilsvarende en dose på 5 ml/kg. Den andre gruppen fikk en standard febernedsettende middel, paracetamol i en dose på 150 mg/kg (p.o.). Gruppe 3,4 og 5 fikk metanolekstrakt tilsvarende en dose på respektive 100, 250 og 500 mg/kg kroppsvekt.

Metanolekstraktet av *Vernonia cinerea* viste ingen signifikant reduksjon av normal kroppstemperatur gitt i en dose på 100 mg/kg. Derimot viste MEVC en signifikant senkning av normal kroppstemperatur i opptil 3 timer etter oral administrering av doser på 250 og 500 mg/kg. Injeksjon av gjær gav en markert økning av rektal temperatur 19 timer etter administrering. Behandling med MEVC viste en doseavhengig senkning av temperaturen. Denne effekten startet etter en time og maksimal effekt ble registret med en dose på 500 mg/kg. Paracetamol tilsvarende en dose på 150 mg/kg gav en signifikant senkning av den økte temperaturen hos rotter injisert med gjær sammenlignet med kontroll gruppen. Resultatene skal ha vist en identisk antipyretisk effekt sammenlignet med paracetamol, men videre studier er nødvendig for om mulig å undersøke CNS profilen til MEVC i forhold til den hypotermiske aktiviteten. Det spekuleres i om den hypotermiske effekten kan ha en sammenheng med nedsatt aktivitet hos hypothalamus (Gupta, et al., 2003).

14.6.6 Antiplasmodisk aktivitet

Chea et al. testet *in vitro* antiplasmodisk aktivitet av tre sesquiterpenlaktoner isolert fra diklorometan fraksjonen av et vannekstrakt av *Vernonia cinerea* på en klorokin resistent stamme av *Plasmodium falciparum*. Komponentene 8 α -tigoyloksy-hirsutinolid-13-O-acetat, 8 α -(4-hydroksymetakryloyloksy)-hirsutinolid-13-O-acetat og vernolid D utøvte en signifikant antiplasmodisk aktivitet med IC₅₀ på respektive 3,9 μ M, 3,7 μ M og 3,5 μ M. Klorokin ble brukt som positiv kontroll med en IC₅₀ på 0,52 μ M. Sesquiterpenlaktонene ble isolert fra et dekokt som brukes i tradisjonell medisin. Dette kan tyde på at planten har et potensiale for bruk i behandling mot malaria (Chea, et al., 2006).

14.6.7 Sedativ effekt

Muir et al. undersøkte om vannekstrakt av bladene fra *Vernonia cinerea* inneholdt farmakologisk aktive sedative substanser. Etter at vannuløselige rester var fjernet, ble en mettet løsning av blyacetat tilsatt for å felle ut tanniner. Deretter ble en mettet løsning av ammoniumsulfat tilsatt den klare løsningen som ble varmet opp for å koagulere proteiner og felle ut overskudd av bly som blyacetat. Filtratet ble deretter ekstrahert med metanol og filtret på nytt. Dette metanolekstraktet ble inndampet til tørrhet som gav en sirupaktig mørk brun masse. Denne ble så fortynnet med fysiologisk saltvann og administrert intraperitonealt til mus. Kontrollgruppen fikk bare fysiologisk saltvann. Musene fikk enten ekstrakt av *V. cinerea* eller fysiologisk saltvann som kontroll 10 minutter før 40 mg/kg med pentobarbiton natrium, ekstrakt av *V. cinerea* eller fysiologisk saltvann ble administrert intraperitonealt. Tiden musene sov, grovmotorisk aktivitet samt respons på smertestimuli ved varm plate metoden ble så registrert.

Doser på mer enn 2500 mg/kg var dødelig. Subletale doser (ca. 1200 mg/kg) reduserte aktiviteten til musene og forårsaket krampetrekninger. Doser på 500 mg/kg eller mindre viste ingen endring av musenes adferd. Når 1000 mg/kg med ekstrakt av *V. cinerea* ble administrert 10 minutter før injeksjon av 40 mg/kg med pentobarbiton natrium ble det ikke observert noen økning i tiden musene sov, men musene syntes å være dypere anestisert i løpet av de initiale få minuttene av bevisstløshet, sammenlignet med kontrollgruppen. Når musene fikk 500 mg/kg med ekstrakt av *V. cinerea* samtidig med 35 mg/kg pentobarbiton natrium ble det ikke observert noen signifikant effekt. Derimot viste en dose på 1000 mg/kg med ekstrakt av *V. cinerea* en signifikant ($p < 0,05$) økning i tiden musene sov sammenlignet med kontrollgruppen. En dose på 1000 mg/kg med ekstrakt av *V. cinerea* viste en signifikant reduksjon av motorisk aktivitet sammenlignet med kontrollgruppen. Denne effekten var signifikant kun i 20 minutter. Doser på 250 mg/kg viste en signifikant økning av reaksjonstid i test på varm plate. Denne effekten var signifikant 25 minutter etter administrering med ekstrakt av *V. cinerea*.

Selv om disse resultatene er av preliminær natur så kan de tyde på at bruk av vannekstrakt fra *V. cinerea* for dets sedative effekt kan medføre ukjente bivirkninger ettersom den sedative effekten hos mus synes å inntreffe kun ved relativt høye doser. Likevel er det mulig at planten inneholder en smertestillende komponent som kan brukes i relativt lave doser og derfor kan være mindre skadelig (Muir, 1981).

14.6.8 Diuretisk aktivitet

Adeboye et al. studerte den diuretiske effekten av ekstrakt fra blad av *V. cinerea* på rotter. Pulveriserte blad ble ekstrahert med respektive kloroform, metanol og vann under redusert trykk. Kloroformekstraktet og metanolekstraktet ble deretter inndampet til tørrhet ved romtemperatur. Vannekstraktet ble konsentrert ved frysetørring. Rotter ble inndelt i 6 grupper á 5. Kontrollgruppen fikk kun vann (50 ml/kg) per oralt. Den andre, tredje og fjerde gruppen fikk vann (50 ml/kg) iblandet respektive kloroformekstrakt, metanolekstrakt og vannekstrakt av *V. cinerea* tilsvarende doser på 62,5 mg/kg, 125 mg/kg, 250 mg/kg og 500 mg/kg. Den femte og sjette gruppen fikk vann iblandet respektive ”frusemide” eller ”chlorpropamide” i en dose på 10 mg/kg. Alle gruppene fikk det samme væskeinntak.

Urin ble samlet 24 timer før og 24 timer etter administrering av de forskjellige dosene, og urinen ble analysert for Na^+ og K^+ konsentrasjon ved flamme fotometri (phlame photometry) og for Cl^- ved titrering (titrimetric method). Disse målingene ble gjentatt med en ukers intervall. Kloroformekstraktet viste en signifikant økning av diuresen, mens metanol og vann ekstraktet viste en signifikant reduksjon av diuresen. Den observerte effekten på urin volum og elektrolytt utskillelse var doseavhengig. Det ble observert en trend med signifikant økning i natriuretisk og kaliuretisk aktivitet ledsagende økt diurese og en trend med signifikant reduksjon av natriurese og kaliurese ledsagende redusert diurese. I alle tilfeller var økningen eller reduksjonen av elektrolytt ekskresjonen og urin volumet mindre enn for den diuretiske standarden frusemide og den anti-diuretiske standarden chlorpropamide. Studien støtter bruken av planten mot urininkontinens (Adeboye et al., 1997).

14.6.9 Toksisitet

Latha et al. testet metanolekstraktet av *Vernonia cinerea* på mus og rotter i forhold til toksisitet. Ca. 200 g tørket plantemateriale ble kokt i et Soxhlet apparat med 200 ml metanol i 48 timer. Ekstraktet ble deretter konsentrert videre ved å inndampes til tørrhet i en rotaro evapor som gav 18 g ekstrakt. 10 mus av begge kjønn ble holdt fastende over natten før behandling, og fikk mat en time etter behandling. En enkelt dose på 2000 mg/kg, som anbefalt av OECD (Economic Co-operation and Development) retningslinjer (2000), av råekstraktet ble gitt i sonde. En kontrollgruppe bestående av 10 mus av begge kjønn fikk vann i stedet for råekstrakt. Deretter ble musene observert hver time de 6 første timene og så

daglig i 14 dager, for mulige symptomer på forgiftning. Musene ble veid daglig. Etter denne observasjonstiden på 14 dager ble 7 mus av hvert kjønn drept for å måle organ og kroppsvekt. Lever, lunge, milt og nyrer ble fjernet fra de gjenværende 3 mus av begge kjønn.

Det ble ikke observert noen symptomer på forgiftning eller død hos noen av musene, og alle overlevde de 14 observasjons dagene. Obduksjon av musene viste ingen forandringer i noe organ. Det var ingen forskjell i kroppsvekt mellom forsøksdyrene og kontrollgruppen. Det var heller ikke tegn til noen signifikant forskjell på organ/kroppsvekt. Obduksjon og histopatologisk undersøkelse av de respektive organ viste ingen signifikante forskjeller. Matinntaket til musene som fikk *V. cinerea* var likt med matinntaket til kontrollgruppen. Denne studien viste således ingen akutt toksisitet av *V. cinerea* hos mus.

Bioaktiviteten til ekstraktet ble testet på reker som ble plassert i en liten boks med en konsentrasjon fra 100 til 0,195 mg/mL men *V. cinerea* i DMSO (dimetylsulfoksid) og sjøvann. Den negative kontrollgruppen ble plassert i samme type boks med kun DMSO og sjøvann. En suspensjon på 10-15 rekelarver ble tilsatt hver boks og inkubert i 24 timer. Antall døde og overlevende reker ble tallet etter 6 og 24 timer. Ekstrakt av *V. cinerea* viste ingen signifikant toksisitet mot reker, med IC_{50} på 3,87 mg/mL (etter 6 timer) og 2,72 mg/mL (etter 24 timer). Det ble ikke observert noen endring i toksisitet ved 6 timers og 24 timers eksposisjon. Disse resultatene indikerer at ekstraktet hadde IC_{50} verdier på mer enn 1,0 mg/mL. Disse resultatene foreslår også at metanolekstraktet av *V. cinerea* ikke er cytotoxisk *in vivo* (Latha et al., 2010).

14.6.10 Alkaloid produksjon

Maheshwari et al. analyserte raskt voksende kallas, celleduspensjon og rotkultur av *Vernonia cinerea* for innholdet av alkaloider. Kallas og rotkultur ble dyrket fra unge blad "explanter" i Murashige og Skoog (MS) basal medium supplementert med kombinasjoner av auxiner og cytokininer. Celle suspensjons kultur ble dyrket fra kallas kultur. Maksimal biomasse av kallas, celle suspensjon og rotkultur ble registrert i mediet som var supplementert med respektive 1 mg/L α -naftalen eddiksyre (NAA) og 5 mg/L benzylaminopurin (BA), 1,0 mg/L NAA og 0,1 mg/L BA og 1,5 mg/L NAA. Fem uker gammel kallas kultur viste maksimal biomasse og innhold av alkaloider (750 μ g/g). Celle suspensjon vekst og alkaloid innhold var på sitt høyeste i 20-dager gamle kulturer og alkaloid innholdet var 1,15 mg/g. En prøve

på 0,2 g fra rot vev regenerert i et halvfast medium viste en 6,3 ganger økning av biomasse over en periode på 5 uker etter at det ble overført til flytende MS medium som inneholdt 1,5 mg/L NAA. Det største innholdet av alkaloider på 2 mg/g tørrvekt ble oppnådd i 5 uker gamle kulturer. Maksimum alkaloid innhold ble observert i rotkulturer *in vitro* og ikke *in vivo*.

Kallus kultur av *Vernonia cinerea* akkumulerte alkaloider i betydelige mengder. Rotvekst og innhold av alkaloider ble påvirket av sukkrose konsentrasjonen. Rot kulturer med 3 % sukkrose gav mest alkaloider (2 g/g tørrvekt) etter 5 uker. Alkaloid innholdet hos *in vitro* dyrkede røtter var 2,5 ganger høyere sammenlignet med den overjordiske delen av planten (800 µg/g tørrvekt) og 1,67 ganger større sammenlignet med røttene til drivhusdyrkede planter (1,2 mg/g tørrvekt). NAA i kulturmediet var den stimulerende faktoren for å øke biosyntesen av alkaloider (Maheshwari et al., 2007).

14.7 Diskusjon

Vernonia cinerea er en plante som er kjent i asiatiske land for sin bruk i tradisjonell medisin. Det er funnet flere kjemiske komponenter i planten siden 60-tallet, og det er gjort noen få biologiske studier av planten i rotter. Resultatene indikerer at ekstrakt fra planten har analgesiske, antipyretiske og antiinflammatoriske egenskaper, men det er ikke identifisert noe enkelt virkestoff i forhold til disse resultatene. Enkelte studier peker på at den antiinflammatoriske effekten av planten kan ha en sammenheng med dens antioksidative egenskaper.

Stigmasterol, stigmasterol- β -D-glukopyranosid og luteolin-7-O-glukopyranosid og dotriacontanoic syre ble identifisert som rene aktive komponenter fra planten i forhold til å minke matlysten til insektlarver, men virkningsmekanismen er ikke klarlagt. Resultatene indikerer at stigmasterol- β -D-glukopyranosid var den mest potente av de fire komponentene. Årsaken til dette kan muligens skyldes glukose delen som er bundet i 3 β -posisjon til stigmasterol, men det kreves flere studier for å klarlegge dette spørsmålet.

Sesquiterpenlaktone 8 α -tigoyloksy-hirsutinolid-13-O-acetat, 8 α -(4-hydroksymetakryloyloksy)-hirsutinolid-13-O-acetat og vernolid D ble funnet å utøve en signifikant antiplasmodisk aktivitet og kan muligens forklare den tradisjonelle bruken av planten ved malaria.

(+)-lirioresinol, stigmasterol-3-O- β -glukosid og 4-sulfo-benzocyclobuten oppgis å ha vist cytotoxisk aktivitet i en kinesisk studie der 4-sulfo-benzocyclobuten skal ha vist en spesifikk effekt i forhold til overlevelsen av en type fibroblaster og inducere NGF. Kuo et al. gjorde en biologisk evaluering av komponenten vernolid-A som viste en cytotoxisk aktivitet mot ulike typer cancer celle linjer. Latha et al. gjorde en toksisitetsstudie av metanolekstraktet av planten. Denne studien viste ingen toksisitet på mus og reker.

Adeboye et al, viste at kloroformekstraktet av blad fra *V. cinerea* hadde en diuretisk effekt, mens derimot metanol og vannekstraktet viste en antidiuretisk effekt. Det kan tyde på at det finnes ulike komponenter i planten som har antagonistisk aktivitet i forhold til diuretisk effekt.

Det er gjort en del studier i Kina på denne planten som ikke er oversatt til engelsk. Der er uklart om noen av de kinesiske studiene har kommet lengre i forhold til å identifisere en eventuell virkningsmekanisme for enkelte av de kjemiske komponentene i *Vernonia cinerea*. Det er derfor ikke umulig at slike resultater vil kunne publiseres i løpet av de nærmeste årene.

Det er ikke funnet noen studier av planten *Vernonia cinerea* i forhold til antiastmatisk aktivitet.

14.8 Konklusjon

Kjemiske og biologiske studier av planten *Vernonia cinerea* kan tyde på at planten inneholder komponenter med analgesiske, antipyretiske og antiinflammatoriske egenskaper som ennå ikke er identifisert. Studier fra Kina tyder også på at planten inneholder komponenter med cytotoxiske egenskaper.

15. Oppsummering

Denne oppgaven har tatt for seg vitenskapelig litteratur, kjemiske og biologiske studier som er gjort på 10 planter som tradisjonelt er brukt i sørøst asiatisk folkemedisin. Ni av disse plantene tilhører familien Asteraceae. Vi skal nå oppsummere noen fellestrekk ved disse plantene for å se om det kan være en rimelig sammenheng mellom de kjemiske stoffene som er isolert og den tradisjonelle bruken av plantene.

Familien Asteraceae er kjemisk karakterisert ved syntese og akkumulering av mange klasser naturlige komponenter. Den eteriske oljen gir en karakteristisk lukt og er årsak til at flere planter i denne familien er råvarer for parfymeindustrien og som krydder og smaksstoffer i næringsmiddelindustrien. Et vesentlig antall av ulikartede funksjoner er blitt tilskrevet plantenes terpenoider som er isolert fra den eteriske oljen i plantene. De vekstregulerende egenskapene til sesquiterpenoidene abscisiner og diterpenoid baserte gibberiliner er noe dokumentert, men man vet lite om den generelle rollen terpenoidene har i forhold til interaksjon mellom planter, dyr, insekter og bakterier med hensyn til kommunikasjonssignaler, forsvarsmekanismer, lokkemiddel etc. Dette er et område det forskes aktivt på. Noen studier har vist at terpenoider innehar et vidt spekter av farmakologiske aktiviteter. Enkelte av disse er identifisert som aktive komponenter i droger brukt i folkemedisinen. Selv om det er gjort et vesentlig arbeid på ulike planter i familien Asteraceae i forhold til kjemiske substanser i de eteriske oljene, så har denne forskningen i vesentlig grad hatt fokus på noen få kommersielt økonomisk verdifulle arter. Screening av et større antall av planter som inneholder eteriske oljer i mindre mengder og som kan være av medisinsk interesse er så langt ikke blitt gjort (Rajalakshmi & Jose, 2002).

Lukten av de eteriske oljene er knyttet til de oksygenholdige komponentene. De terpen rike oljene kan ikke karakteriseres som velluktende, men har likevel sin egen spesielle duft, spesielt når de er hydrolyserte. Teoretisk sett kan det være en mulighet for at flyktige komponenter har en viss innvirkning på insekter og predatorer og dermed har betydning for plantens evne til å overleve og formere seg. Mange av de plantene som her er nevnt er hardføre planter, enkelte vokser som ugress og er utbredt over store deler av verden. Dette kan tyde på at de har en stor evne til å tilpasse seg ulike vekstmiljøer. Det kan ikke utelukkes at terpenoidene er delaktige i den tilpasningsevnen plantene har.

Ser vi på kjemiske studier av *Artemisia glauca*, *Blumea balsamifera*, *Elephantopus scaber*, *Tagetes erecta* og *Vernonia cinerea* finner vi at alle inneholder eteriske oljer. Ser vi nærmere på innholdsstoffene i disse oljene finner vi nært beslektede stoffer og til dels de samme komponentene i ulike mengder. De eteriske oljene er blandinger av flyktige stoff som har en mer eller mindre karakteristisk lukt. De eteriske oljene er vidt utbredt i kurvplantefamilien. Den finnes i alle deler av planten, men er mest vanlig i blomsten og fruktene. Mengden av de eteriske oljene kan ofte variere mye med faktorer som klima, jordsmonn, gjødsling, modningsgrad og utvinningsmåte.

De organiske stoffene en finner i den eteriske oljen kan spores tilbake til to grunnelement, respektive terpenskjelettet og til fenypropanskjelettet. Terpenene er kondensasjonsprodukt av isopren. Kondensasjon mellom to mol isopren gir monoterpener. Monoterpenene kan være enten alifatiske eller sykliske. Kondensasjon mellom tre mol isopren gir sesquiterpener, mellom 4 mol isopren diterpener og mellom seks mol isopren triterpener. Oksygenderivater av terpenene blir også kalt kamfer arter. Karotenoidene, steroidene med flere hører til polyterpenene. I nærvær av lys og luft blir innholdsstoffene i de terpenrike oljene lett oksiderte og polymeriserte. Denne prosessen danner peroksid i oljene som da etter hvert blir mer tyktflytende og avsetter et harpikslignende stoff (Nordal, 1960b). Ser vi nærmere på de plantene som er omtalt i denne oppgaven finner vi flere som inneholder en eller flere av stoffgruppene diterpenoider, sesquiterpenoider eller sesquiterpenlaktoner. Det er ikke funnet kjemisk analytiske studier på alle plantene med hensyn til den eteriske oljen. Det kan da være en mulighet for at disse plantene inneholder eteriske oljer med kjemiske substanser som ennå ikke er identifisert.

Selv om de eteriske oljene er komplekse blandinger, har de likevel noen felles egenskaper i forhold til virkning og bruk. Eteriske oljer virker desinfiserende og antiseptisk. Flere planter fra professor Nordal databasen har vært brukt i tradisjonell medisin på grunn av sine antiseptiske egenskaper. Som eksempel kan nevnes *Artemisia glauca*, *Blumea balsamifera* og *Tagetes erecta*. Noen få kjemiske og biologiske studier peker i retning av en viss antimikrobiell aktivitet mot enkelte typer bakterier og sopp, men det er behov for flere studier på dette området. Det er isolert et terpenoid fra *Elephantopus scaber* med en mulig virkningsmekanisme i forhold til antimikrobiell aktivitet. Dette terpenoidet er karakterisert som et steroid i en annen studie av samme forfatter, hvor det viste en senkning av blodsukkeret hos diabetes induserte rotter. Det pågår videre forskning på denne

komponenten for om mulig å kartlegge eventuelle andre virkningsmekanismer. Det er også gjort studier som viser en bredspektret antibakteriell effekt for *Vernonia cinerea*, en plante som inneholder en rekke forskjellige sesquiterpenlaktoner og triterpenoider, blant annet stigmasterol. Det er likevel ikke identifisert noe virkningsmekanisme for stoffene i denne planten. Stigmasterol er en kjemisk komponent som er isolert fra både *Emilia sonchifolia* og *Elephantopus scaber*. Enkelte komponenter som for eksempel stigmasterol og sitosterol går igjen i flere planter.

De velluktende og velsmakende oljene stimulerer spytt- og mage-sekresjonen i små doser, og flere planter brukes av den grunn som krydder. Som eksempel kan nevnes estragon. *Blumea balsamifera* er et eksempel på en plante som har vært brukt som ”magestyrkende middel”. Denne planten har også vært brukt som ekspektorantia, spasmolytikum og antiseptikum. *Blumea balsamifera* inneholder blant annet kamfer og borneol. Kamfer er et eksempel på et keton. Kamfer kan i små doser virke stimulerende på hjertet og respirasjonssenteret og ble før i tiden benyttet ved febersykdommer, narkotiske forgiftninger og ved sykdommer i respirasjonsorganene, for eksempel ved bronkitt. Før i tiden ble kamfer også benyttet som desinfeksjonsmiddel i sår terapien og i liniment til omslag ved giktiske affeksjoner. Kamfer kan også virke roende på den glatte muskulaturen i tarmen og galleblæra og genitalia. Dette kan muligens forklare bruken av kamfer som karminativ, cholegogum og antiafrodisiakum (Nordal, 1960b). Kamfer er også ingrediens i enkelte nesepriper, men i følge Martindale av tvilsom effekt. Bruken av kamferliniment anbefales ikke på grunn av dens potensielle toksisitet og har blitt inndratt fra markedet i USA og UK. I USA er det ikke tillatt med mer enn 11 % kamfer i preparater for utvortes bruk. Innvortes kan kamfer virke irriterende på slimhinner i større doser (Martindale, 2010a). Borneol har vært brukt i aromatiske preparat til bruk ved hoste og andre sykdommer i luftveiene, i tillegg til bruk ved sykdommer i muskel og skjelett systemet (Martindale, 2009).

Om de eteriske oljene gis i store doser kan de hemme fordøyelsesenzymenes normale funksjon og skade slimhinnene i mage tarm kanalen, med magesmerter, oppkast og diaré som resultat. Eteriske oljer i større doser kan også forårsake uterusblødninger og abort. Store doser kan også føre til alvorlige forgiftninger. Eteriske oljer kan irritere og skade hud og slimhinner ved lokal applisering ettersom de er fettløselige og kan trenge gjennom vevet (Nordal, 1960b). Ettersom de eteriske oljene kan være skadelige i store doser bør de ikke brukes før dose, sikkerhet og effekt er avklart ved vitenskapelige studier.

Flere av de planter som er omtalt har vært brukt for ulikartede plager. Ettersom den eteriske oljen har mange virkningsområder er det mulig at det har en sammenheng med den tradisjonelle bruken, men det er ikke funnet noen studier som kan bekrefte denne hypotesen.

De eteriske oljene kan skilles ut av kroppen via huden og lungene. Slike oljer blir ofte brukt som ekspektorantia og antas å øke bronkialesekresjonen i tillegg til å virke antiseptisk.

Artemisia glauca, *Evolvulus alsinoides* og *Vernonia cinerea* har vært brukt i tradisjonell medisin som ekspektorantia og ved astma. Det er ikke funnet noen vitenskapelige studier som kan bekrefte denne virkningen. Kjemiske studier viser at den eteriske oljen til *Artemisia glauca* inneholder blant annet metyleugenol, terpinolen og capillen. Terpinolen finnes også i tetreolje, en eterisk olje som er rapportert å ha baktericide og fungicide egenskaper, og som brukes utvortes for ulike hudsykdommer (Martindale, 2010b). Eugenol er en fenol som også finnes i kryddernellik og som brukes som smak stoff, karminativ og digestive. Eugenol i midlertidige tannfyllinger kan ha en lokalbedøvende virkning. Eugenol er ingrediens i orale hygiene preparater. Eugenol er rapportert å hemme prostaglandinsyntesen (Martindale, 2005). Kjemiske studier av *Evolvulus alsinoides* viser at planten inneholder blant annet scopoletin og scopolin. Biologiske studier viser at ekstrakt av planten gav en immunmodulerende og antiinflammatorisk effekt på adjuvant artritt induserte rotter, samt at et hydroalkohol ekstrakt av planten virket hemmende på AChE. En screening av flere naturlige produkter i forhold til AChE hemmende aktivitet viser en potensiell effekt av scopoletin og scopolin. Det er ikke funnet noen studier som kan bekrefte en eventuell sammenheng mellom *Evolvulus alsinoides*, scopoletin, scopolin, AChE hemmende aktivitet og astma. Biologiske studier har vist at metanolekstraktet av *Vernonia cinerea* hadde en antiinflammatorisk aktivitet hos rotter, men det er ikke identifisert noe virkestoff for denne planten.

Mange eteriske oljer skilles ut gjennom nyrene. Slike oljer har blitt benyttet til desinfeksjon av urinveiene og som vandrivende middel i de tilfeller oljen stimulerer nyrefunksjonen. Om dosene blir for store kan derimot nyrene skades og det kan komme blod i urinen (Nordal, 1960b). *Blumea balsamifera* og *Grangea maderaspatana* oppgis i Nordals Burma herbarium å ha vært brukt blant annet som antispasmodikum, det vil si som krampestillende middel. Cryptomeridiol er isolert fra bladene til *Blumea balsamifera*. Cryptomeridiol finnes også i andre planter og er den aktive komponenten i Proximol®, et renalt spasmolytisk produkt. Det er ikke isolert noe tilsvarende virkestoff fra *Grangea maderaspatana*. Denne planten

inneholder imidlertid ulike diterpen syrer som er vannløselige. Det er derfor nærliggende å tro at disse syrene skilles ut via nyrene.

Elephantopus scaber, *Emilia sonchifolia* og *Grangea maderaspatana* oppgis å ha vært brukt som febernedsettende midler. En studie på rotter viste at oral administrering av ekstrakt fra *Elephantopus scaber* ikke hadde noen antipyretisk effekt, mens det derimot ble observert en signifikant reduksjon av hypertermi etter intraperitoneal administrering. Det er ikke funnet noen studier som er gjort på *Emilia sonchifolia* i forhold til antipyretisk aktivitet. Imidlertid har vannekstraktet av *Emilia sonchifolia* viste en relativt god antiinflammatorisk aktivitet hos mus sammenlignet med ASA. Det er heller ikke funnet noen studier som er gjort i forhold til en eventuell antipyretisk effekt av *Grangea maderaspatana*. Felles for alle disse tre plantene er at de inneholder ulike steroider. Det kunne derfor ha vært av interesse å teste de respektive steroider for eventuell antipyretisk effekt.

Tagetes erecta og *Elephantopus scaber* angis å ha vært brukt som smertestillende midler. Det er gjort en studie av *Elephantopus scaber* i forhold til analgetisk effekt. Denne studien gav et negativt resultat. En annen studie gave et positivt, men heller tvilsomt resultat på grunn av svakheter med metoden. En studie viste analgesisk effekt av etanolekstraktet fra *Tagetes erecta* blomst i forhold til eddiksyreindusert abdominal vridning. Syv komponenter fra *Tagetes erecta* blomst ble i en studie testet i forhold til elektrofysiologisk aktivitet, og som alle gav et signifikant resultat på hunnmøll. Ellers er det gjort lite studier på disse plantene i forhold til analgesisk effekt. Den eteriske oljen fra *Tagetes erecta* inneholder blant annet større mengder ocimen. Betydningen av denne komponenten er ikke kjent i forhold til analgesisk og antiseptisk aktivitet.

Evolvulus alsinoides, *Grangea maderaspatana* og *Emilia sonchifolia* skal ha vært brukt mot innvollsorm. Det er ikke registrert noen studier som har undersøkt dette. Det er gjort biologiske studier som viser at ekstrakt av *Evolvulus alsinoides* kan ha en AChE hemmende effekt relatert til scopoletin og scopolin. Tilsvarende studier er ikke gjort på innvollsorm.

Blomst fra *Chrysanthemum cinerariaefolium* er tradisjonelt brukt som insektmiddel og antiparasitikum. Det er gjort flere studier på pyretriner fra *Chrysanthemum cinerariaefolium* i forhold til insekticid og antiparasitt effekt. I en Cochrane rapport ble det konkludert med at permetrin, en syntetisk pyretrin analog, synes å være mest effektivt som lokalbehandling mot

skabb sammenlignet med andre insekt midler. Pyretriner og pyretroider finnes i små mengder i myggmidler.

Siegesbeckia orientalis skal ha vært brukt ved hudsykdommer og som stimulantia. Det er gjort studier som viser at etanolekstrakt av *Siegesbeckia orientalis* kan ha en potensiell antiallergen aktivitet og undertrykke den cellulære og humorale responsen på ovalbumin hos mus. Det er ikke identifisert noe virkestoff i forhold til denne aktiviteten. *Siegesbeckia orientalis* inneholder et cytotoxisk stoff pubetalin, men det er ikke undersøkt om pubetalin virker cytotoxisk på B-celler. Det er uklart hvilke typer hudsykdommer planten skal ha vært brukt mot. Det kan da ikke utelukkes at planten kan ha vært brukt ved allergiske sykdommer, for eksempel kontakt allergi. Hva gjelder bruken av *Siegesbeckia orientalis* som stimulantia, er det ikke funnet noen studier på det.

Emilia sonchifolia har tradisjonelt vært brukt ved øyesykdommer. Undersøkelser av flavonoidfraksjonen fra *Emilia sonchifolia* viste at denne var i stand til å modulere progresjonen av selenit induisert katarakt i rotter. Denne effekten ses i sammenheng med flavonoidenes antioksidant aktivitet.

Mange av plantene omtalt i denne oppgaven inneholder flavoner, flavonoler og/eller flavonoider som kan være bundet til deres respektive glykosider. Eksempel på flavonoider er luteolin, quercetin og derivater av disse. Dette er kjemiske stoffer det er forsket en del på i forhold til blant annet antioksidant aktivitet. Disse stoffene virker ved selv å bli oksidert, og vil, når de befinner seg i planten, kunne beskytte stoffer som for eksempel isoprenoid derivater fra å oksidere. *Blumea balsamifera* for eksempel er en plante som inneholder en rekke flavonoider. Denne planten er forsket en del på i forhold til antitumor aktivitet. BB1 er et flavonoid som er funnet å ha en synergistisk effekt med TRAIL og BME er vist å ha en antiproliferativ effekt i rotte og humane hepatocellulære carcinom celler. Det er foreslått at den/ de effektive komponenten/e i BME består av et lipofilt og fenolisk materiale, men det forskes videre for om mulig å finne en eller flere virksomme komponenter i forhold til nevnte resultater.

Flere stoffer i flavonoid gruppen antas å virke diuretisk, avførende og svettedrivende. Quercetin kan virke stimulerende på hjertet og øke blodtrykket. Rutin, isoquercetin med flere kan styrke blodkapillærene og påvirker permeabiliteten av disse (Nordal, 1960a). Disse stoffene kan således tjene til å underbygge virkningen av andre stoffer i en stoffblanding.

Flere av plantene som er omtalt i denne oppgaven er undersøkt i forhold til anticancer aktivitet. En av disse er *Elephantopus scaber*. Det er funnet en antitumor effekt av isodeoksyelefantopin *in vitro* og *in vivo*, samt en antitumor effekt av scabertopin, isoscabertopin og deoksyelefantopin *in vitro*. Dette er kjemisk beslektede komponenter med ulik stereokjemi. Det kan være av interesse for videre forskning og undersøke hvilken betydning stereokjemien har for virkningen av de komponentene som er isolert fra denne planten. Deoksyelefantopin er vist å ha en sårlegende aktivitet. Studier av andre planter med lignende sesquiterpenlakter med et alfa metylen lakton er også rapportert å ha en sårlegende aktivitet. Det er derfor mulig at også alfa metylenlaktonet har en betydning for aktiviteten til disse stoffene.

Summa summarum inneholder mange av plantene omtalt i denne oppgaven flere kjemiske komponenter som kan ha en sammenheng med den tradisjonelle bruken av planten i forhold til milde plager av mindre alvorlig art så som fordøyelsesbesvær og luftveisbesvær relatert til sine antiseptiske og appetittvekkende egenskaper. Likevel er det svært lite dokumentasjon som foreligger om disse plantene, både med hensyn til kjemiske og biologiske egenskaper. Det er på ingen måte gjort studier som gir grunnlag for bruk av disse plantene i forhold til sikkerhet og effekt, med unntak av pyretriner fra *Chrysanthemum cinerariaefolium* og lutein fra *Tagetes erecta*. Som vi har sett inneholder plantene stoffer som kan være skadelige i større mengder, men også komponenter som kan ha et potensial som virkestoffer. Det er derfor en rimelig sannsynlighet for at videre forskning på disse plantene vil kunne gi nyttige resultater med hensyn til å kartlegge eventuelle virkestoffer, sikkerhet og effekt av disse. Sikkerhet og effekt av plantene og deres respektive kjemiske komponenter er ikke avklart før klinisk randomiserte, dobbelt blindete og placebokontrollerte studier er gjennomført av tilstrekkelig omfang og varighet. I forkant av eventuelle kliniske studier er det nødvendig med flere kjemiske, biologiske og toksikologiske studier for å garantere en forsvarlig testing i henhold til internasjonale retningslinjer.

Tabellen på neste side oppsummerer noen av de kjemiske komponenter som er isolert fra de respektive plantene. Av disse er **det kun pyretriner isolert fra *Chysanthemum cinerariaefolium* som har en dokumentert effekt i forhold til den tradisjonelle bruken planten er hevdet å ha.**

Plantenavn	Kjemiske komponenter	Tradisjonell bruk
<i>Artemisia glauca</i>	aromatiske acetylen terpenoider flavonoider	tonikum antiseptikum antiastmatikum
<i>Blumea balsamifera</i>	sesquiterpenoider sesquiterpenlaktoner terpenoider flavonoider	ekspektorantia magestyrkende middel antispasmodikum antiseptikum
<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	pyretriner sesquiterpenlaktoner flavonoider karotenoider	insektmiddel antiparasitikum
<i>Elephantopus scaber</i>	aurantiamider terpenoider triterpenoider sesquiterpenlaktoner guaianolider	antipyretikum analgetikum tonikum
<i>Emilia sonchifolia</i>	terpenoider flavonoider pyrrolizidin alkaloider	antipyretikum øyesykdommer middel mot innvollsorm
<i>Evolvulus alsinoides</i>	scopoletin scopolin fenoler	styrkende middel middel mot innvollsorm antiastmatikum
<i>Grangea maderaspatana</i>	flavoner flavonoler diterpener clerodan derivater eudesmanolider steroider	middel mot innvollsorm antipyretikum antispasmodikum
<i>Siegesbeckia orientalis</i>	ent-piraman diterpener diterpenoider sesquiterpenlaktoner germacranolider flavonoider	hudsykdommer stimulantia
<i>Tagetes erecta</i>	terpenoider tiofener karotenoider flavonoider fettsyrer	analgetikum antiseptikum
<i>Vernonia cinerea</i>	triterpenoider sesquiterpenoider sesquiterpenlaktoner flavonoider	antiastmatikum tonikum

16. Ordliste

Abiotisk – av ikke levende opprinnelse

Acetylen – etyn

Adstringerende – som virker sammentrekkende på blodkar og vev

Afrodisiakum – et middel som skal øke sexlysten

Akene - en liten nøttefrukt, det vil si en liten tørr frukt som ikke åpner seg og som spres sammen med frøet

Alkaloid – et nitrogenholdig organisk molekyl med farmakologisk virkning

Analgesisk – smertestillende

Antagonistisk - motvirkende

Antipyretisk – febernedsettende

Artritt – leddbetennelse

Ataksi – sviktende evne til å samordne muskelbevegelser

Cholagogue – galledrivende

Cholecystitt - galleblærebetennelse

Cytotoksisk – celledskadelig

Dekokt – avkok, uttrekk av plantedeler fremstilt ved koking

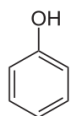
Digestive – middel som fremmer fordøyelsen

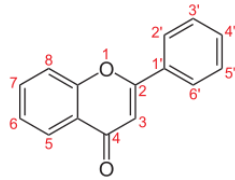
Droge – råstoff fra planter eller dyr for tilberedning av medikamenter eller fargestoff

Ekspektorantia – hosteløsende midler

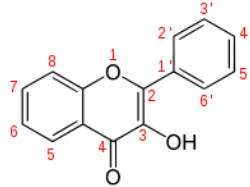
Farmakognosi – drogekunnskap

Fenol -





Flavon –



Flavonol –

Flavonoider – derivater av flavaner (2-fenylchroman)

Flogistisk – som gir betennelsesreaksjon

Fruktaner – kjeder av fruktosemolekyler med sukrose i den ene enden

Genitalia – kjønnsorganer

Glukosid – et glykosid der karbohydratdelen er glukose

Glykosid – et molekyl med en karbohydrat del bundet til en ikke-karbohydrat del

Hemikarp – en del av en frukt som spontant deler seg i to halvdeler

Humoral – som angår kroppsvæskene

Hypertermi – feber

Hypokotyl - del av stengelen som hos kimplanter befinner seg nedenfor frøbladene

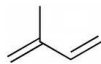
Index Kewensis – et standardreferanseverk for plantenavn

Infus – et uttrekk av plantedeler med vann

Inulin – en type fruktan med 1-2 bindinger

Intraperitoneal – som ligger innenfor bukhinnen

Isopren -

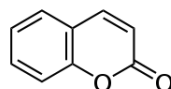


Karminativ – middel mot tarmgass og kolikk

Kallus – nydannet vev

Konjunktivitt – betennelse i øyets bindehinne

Kumarin -



Meteorisme - luftplager

Morfologi – læren om planters og dyrs former og bygning

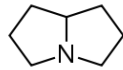
Neurastenia – nervesvekkelse

Nefritt - nyrebetennelse

Permeabilitet - gjennomtrengelighet

Proliferativ – raskt økende i antall

Pyrrolizidin -



Sinusitt - bihulebetennelse

Stimulantia - i snevrere betydning legemidler som brukes for å bedre blodomløp og åndedrett, i videre betydning også midler som øker aktiviteten i hjernebarken, delvis også om narkotiske midler.

Spasmolytikum – middel mot krampe

Surfaktant- et stoff med en polar ende og en fettløselig ende

Synergistisk – gjensidig forsterkende

Taksonomi – anvendelsen av og læren om klassifisering

Terpenoid – kondensasjonsprodukt av isoprener

Tinktur – spritholdig uttrekk av droger eller spritholdig oppløsning av ekstrakter

Uterus – livmor

Xantofyll – gult fargestoff som finnes i planter

17. Forkortelser

ADI – Acceptible daily Intake

BuOH – butanol

BME – metanolekstrakt av *Bumea balsamifera*

COSY – correlation spectroscopy

ED₅₀ – den dosen som gir en ønsket effekt hos 50% av individene

EtOAc- etylacetat

FAB – fast atom bombardment

FAO – Food and Agriculture Organization

f.sp. – forma specialis, en taksonomisk gruppering

GC – gass kromatografi

LD₅₀ – den dosen som forårsaker død hos 50% av individene

HDL – high-density lipoprotein

HETCOR – Heteronuclear Shift Correlation

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Coherence

HMQC – Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

HPLC – High performance liquid chromatography

HR-EI – High Resolution Electron Impact

HSQC – se HETCOR

IC₅₀ – mengde/dose som gir 50% hemming

i.p. - intraperitonealt

IR – infrared radiation

LC – Liquid Chromatography

MeOH - metanol

MIC – minste hemmende konsentrasjon

MS – massespektrometer

NF- κ B – nuclear factor kappaB, en transkripsjonsfaktor

NMR – Nuclear Magnetic Resonance

NOESY – nuclear Overhauser effect spectroscopy

p.o. – per os

RfD – referansedose

Pappus – en samling med akener (”fallskjerm”)

sGOT – serum glutamat oksalat transaminase

sGPT – serum glutamat pyruvat transaminase

TLC – tynnsjikt-kromatografi

TNF – tumor nekrose faktor

TRAIL – TNF relatert apoptose induserende ligand

WHO – verdens helse organisasjon

Kilder

- Abeyssekera, A. M., deSilva, K. T. D., deSilva, S. R. P., Sirimanne, V. D. P., Labadie, R. P., vandenBerg, A. J. J., & Sluis, W. V. (1999). Inhibition of chemiluminescence generated by zymosan-activated polymorphonuclear leucocytes by phenolic constituents of *Vernonia cinerea*. *Fitoterapia*, 70, 317-319.
- Adeboye, J. O., Asije, W., & Awe, S. O. (1997). Short Communication, Diuretic and Antidiuretic Activity of the Leaf Extracts of *Vernonia cinerea* (Less) (Fam. Compositae). *Phytotherapy Research*, 11, 454-456.
- Adisewojo, S. S., Tjokronegoro, S., & Tjokronegoro, R. (1984). 2. Natural biological compounds traditionally used as pesticides and medicines. *The Environmentalist*, 4(Supplement No. 7), 11-14.
- Aglarova, A. M., Zilfikarov, I. N., & Severtseva, O. V. (2008). Biological characteristics and useful properties of tarragon (*Artemisia Dracuncululus L.*) (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42(2), 81-86.
- Agro Atlas. (2010). *Siegesbeckia orientalis L. Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries* Retrieved 21.01.10, from http://www.agroatlas.ru/en/content/weeds/Siegesbeckia_orientalis/
- Aguilar, H. H., De Gives, P. M., Sánchez, O. S., López-Arellano, M. E., Hernández, E. L., Aroche, U. L., & Valladares-Cisneros, G. (2008). *In Vitro* Nematocidal Activity of Plant Extracts of mexican Flora against *Haemonchus contortus* Fourth Larval Stage. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases*, 1149, 158-160.
- Ahmad, A., Alkarkhi, A. F. M., Hena, S., & Khim, L. H. (2009). Extraction, separation and identification of chemical ingredients of *Elephantopus scaber L.* using factorial design of experiment. *International Journal of Chemistry*, 1(1), 36-49.
- Ahmed, M., Islam, M. M., Hossain, C. F., & Khan, O. F. (2001). A preliminary study on the analgesic activity of *Grangea maderaspatana*. *Fitoterapia* 72, 553-554.
- Alam, A. U., Cough, I. R., & Creger, C. R. (1968). Fatty acid composition of the xanthophyll esters of *Tagetes erecta* petals. *Lipids*, 3(2), 183.
- Ali, D. H. M., Wong, K. C., & Lim, P. K. (2005). Flavonoids from *Blumea balsamifera*. *Fitoterapia*, 76, 128-130.
- Altai Home. (2009). *Artemisia glauca*. In *robs-journeys* (Ed.), *Flower Photos One: Russian Federation Altai Autonomous region*.
- Aluka.org. (2000). Entry for *vernonia cinerea (L.) Less.* (family COMPOSITAE). Retrieved 08.02.10., from Aluka org. <http://www.aluka.org/action/showMetadata?doi=10.5555/AL.AP.FLORA.FTEA004802&pgs=>
- . (2008). Entry for *GRANGEA maderaspatana (L.) Poir.*, from Aluka org. <http://aluka.org/action/showMetadata?doi=10.5555/AL.AP.FLORA.FLOS00379&pgs>

- Amar, I., Aserin, A., & Garti, N. (2003). Solubilization patterns of lutein and lutein esters in food grade nonionic microemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4775-4781.
- Amel'chenko, V. P., Serykh, E. A., & Khanina, M. A. (1996). *Proceedings of the conf.: "theoretical and applied aspects of the study of medicinal plants,"*. Paper presented at the Theoretical and Applied Aspects of the Study of Medicinal Plants, Tomsk.
- Anadón, A., Martínez-Larranaga, M. R., Diaz, M. J., & Bringas, P. (1991). Toxicokinetics of Permethrin in the Rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 110, 1-8.
- Anadón, A., Martínez-Larranaga, M. R., & Martínez, M. A. (2009). Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal* 182, 7-20.
- Archer, M. C., Ishiwata, H., & Walker, R. (2006). Lutein from *Tagetes erecta* L (Vol. 54, pp. 49-86). Toronto: WHO.
- Arykova, T. M. (1996). *Proceedings of the conference: "Theoretical and applied aspects of the study of medicinal plants.* Paper presented at the Theoretical and Applied Aspects of the Study of Medicinal Plants, Tomsk.
- Asije, O., Adelusi, S. A., & Usifoh, C. O. (2006). Anticonvulsant activity of *Emilia sonchifolia* leaf extracts. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 49(4), 269-275.
- Atapour, M., Zahedi, M. J., Mehrabani, M., Safavi, M., Keyvanfard, V., Foroughi, A., Siavoshi, F., & Forooumadi, A. (2009). In vitro susceptibility of the gram-negative bacterium *Helicobacter pylori* to extracts of Iranian medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*, 47(1), 77-80.
- Atkinson, B. L., Blackman, A. J., & Faber, H. (2004). The degradation of the natural pyrethrins in crop storage. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 280-287.
- Auddy, B., Ferreira, M., Blasina, F., Lafon, L., Arredondo, F., Dajas, F., Tripathi, P. C., Seal, T., & Mukherjee, B. (2003). Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 84, 131-138.
- Austin, D. F. (2008). *Evolvulus alsinoides* (Convolvulaceae): An American herb in the Old World. *Journal of Ethnopharmacology*, 117, 185-198.
- AustralianFlora. (1993). Flora of Australia, *Blumea balsamifera*. 50. Retrieved from <http://www.anbg.gov.au/abrs/online-resources/flora/stddisplay.xsql?pnid=7248>
- Avani, K., & Neeta, S. (2005). A study of the antimicrobial activity of *Elephantopus scaber*. *Indian Journal of Pharmacology*, 37(2), 126-127.
- Avdeeva, E. V. (1997). *Author's abstract of master's thesis in pharmaceutical sciences*. Moscow.
- Balza, F., & Towers, G. H. N. (1984). Dihydroflavonols of *Artemisia dracunculus*. *Phytochemistry*, 23(10), 2333-2337.
- Baquar, S. R. (Ed.). (1989). *Medicinal and poisonous plants of Pakistan*. Karachi: Printas.

- Barua, R. N., Sharma, R. P., Thyagarajan, G., Herz, W., & Govindan, S. V. (1980). New melampolides and darutigenol from *Siegesbeckia orientalis*. *Phytochemistry*, *19*, 323-325.
- Baruah, N. C., Sharma, R. P., Thyagarajan, G., Herz, W., & Govindan, S. V. (1979). New flavonoids from *Inula cappa*. *Phytochemistry*, *18*, 2003-2006.
- Baruah, N. C., & Sharma, R. P. (1992). (2R,3R)-7,5'-dimethoxy-3,5,2'-trihydroxyflavanone from *Blumea balsamifera*. *Phytochemistry*, *31*(11), 4040.
- Baruah, R. N., Sharma, R. P., Madhusudanan, K. P., Thyagarajan, G., Herz, W., & Murari, R. (1979). A New Melampolide from *Siegesbeckia orientalis*. *Phytochemistry*, *18*, 991-994.
- Barzana, E., Rubio, D., Santamaria, R. I., Garcia-Correa, O., Garcia, F., Ridaura Sanz, V. E., & López-Munguia, A. (2002). Enzyme-mediated solvent extraction of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(16), 4491-4496.
- Bashir, S., & Gilani, A. H. (2008). Short communication, studies on the antioxidant and the analgesic activities of aztec marigold (*Tagetes erecta*) flowers. *Phytotherapy Research*, *22*, 1692-1694.
- Batugal, P. A., J., K., S.Y., L., & Oliver, J. T. (2004). Medicinal Plants Research in Asia: The Framework and Project Workplans (Vol. 1, pp. 1-228). Malaysia: International Plant Genetic Resources Institute.
- Beentje, H. J. (2000). Entry for *Elephantopus scaber* L. (family COMPOSITAE). Retrieved 09.03.10, from Aluka org.
<http://www.aluka.org/action/showMetadata?doi=10.5555/AL.AP.FLORA.FTE.A004951&pgs=>
- Benli, M., Kaya, I., & Yigit, N. (2007). Screening antimicrobial activity of various extracts of *Artemisia dracuncululus* L. *Cell biochemistry and function*, *25*, 681-686.
- Bhuiyan, M. N. I., Chowdhury, J. U., & Begum, J. (2009). Chemical components in volatile oil from *Blumea balsamifera* (L.) DC. *Bangladesh Journal of Botany*, *38*(1), 107-109.
- Blanco, F. M. (1883a). *Emilia sonchifolia* *Flora de Filipinas* Wikimedia Commons.
- . (1883b). *Vernonia cinerea* *Flora de Filipinas* Wikimedia Commons.
- . (1980). *Blumea balsamifera* *Flora de Filipinas* Blanco2.403.jpg: Wikispecies free species directory.
- Bohlmann, F., Grenz, M., Wotschokowsky, M., & Berger, E. (1967). Über neue thiophenacetylenverbindungen. *Chemische Berichte*, *100*, 2518-2522.
- Bohlmann, F., & Mahanta, P. K. (1979). Eine neue diterpensaure aus *Centida orbicularis*. *Phytochemistry*, *18*, 1067-1068.
- Bohlmann, F., & Herbst, P. (Eds.). (1962). *Über die Inhaltstoffe von Tagetes-arten* (Vol. 95): VCH Verlagsgesellschaft.
- Breithaupt, D. E., Bamedi, A., & Wirt, U. (2002). Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, *132*, 721-728.

- Breithaupt, D. E., Wirt, U., & Bamedi, A. (2002). Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and several fruits by liquid chromatography - mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 66-70.
- Broussalis, A. M., Ferraro, G. E., Martino, V. S., Pinzón, R., Coussio, J. D., & Alvarez, J. C. (1999). Argentine plants as potential source of insecticidal compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 67, 219-223.
- Bruce, T. J., & Cork, A. (2001). Electrophysiological and behavioral responses of female *Helicoverpa armigera* to compounds identified in flowers of African marigold, *Tagetes erecta*. *Journal of Chemical Ecology*, 27(6), 1119-1131.
- Brun, V., & Schumacher, T. (Eds.). (1987). *Traditional herbal medicine in northern Thailand*. Berkeley and Los Angeles: University of California Press.
- Bruneton, J. (Ed.). (1995). *Pharmacognosy, phytochemistry, medical plants*. Andover: Intersept Ltd.
- CaPreStuGr. (1994). The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. Beta Carotene Cancer Prevention Study Group The Alpha-Tocopherol. *The New England Journal of Medicine*, 330(15), 1029-1035.
- Castenmiller, J. J. M., West, C. E., Linszen, J. P. H., van Het Hof, K. H., & Voragen, A. G. J. (1999). The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of beta-karoten and to a lesser extent of lutein in humans. *Journal of Nutrition*, 129, 349-355.
- Cerevenka, F., Koleckar, V., Rehakova, Z., Jahodar, L., Kunes, J., Opletal, L., Hyspler, R., Jun, D., & Kuca, K. (2008). Evaluation of natural substances from *Evolvulus alsinoides* L. with the purpose of determining their antioxidant potency. *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*, 23(4), 574-578.
- Chan, G. F. Q., Towers, G. H. N., & Mitchell, J. C. (1975). Ultraviolet-mediated antibiotic activity of thiophene compounds of *Tagetes*. *Phytochemistry*, 14, 2295-2296.
- Chea, A., Hout, S., Long, C., Marcourt, L., Faure, R., Azas, N., & Elias, R. (2006). Antimalarial activity of sesquiterpene lactones from *Vernonia cinerea*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54(10), 1437-1439.
- Chen, C.-P., Lin, C.-C., & Namba, T. (1989). Screening of Taiwanese crude drugs for antibacterial activity against *Streptococcus mutans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 27, 285-295.
- Chen, M., Qin, J.-J., Fu, J.-J., Hu, X.-H., Liu, X.-H., Zhang, W.-D., & Jin, H.-Z. (2010). Blumeaenes A-J, sesquiterpenoid esters from *Blumea balsamifera* with NO inhibitory activity. *Planta Med.*, *Epub ahead of print*.
- Chen, X., Zhan, Z.-J., & Yue, J.-M. (2006). Sesquiterpenoids from *Vernonia cinerea*. *Natural Product Research*, 20(2), 125-129.
- Cheng, D., & Roder, E. (1986). Pyrrolizidin-alkaloide aus *Emilia sonchifolia* *Planta Medica*, 52(6), 484-486.
- Chou, G. X., Jin, R. M., Wang, Z. T., & Chen, C. X. (2006). Study on antithrombotic fraction of herba Siegesbeckiae. *Zhong Yao Cai*, 29(3), 235-237.

- Cibin, T. R., Srinivas, G., Gayathri Devi, D., Srinivas, P., Lija, Y., & Abraham, A. (2006). Antioxidant and antiproliferative effects of flavonoids from *Emilia sonchifolia* Linn on human cancer cells. *International Journal of Pharmacology*, 2(5), 520-524.
- Croes, A. F., Aarts, A. M., Bosveld, M., Breteler, H., & Wullems, G. J. (1989). Control of thiophene accumulation in calli of two *Tagetes* species. *Physiologia Plantarum*, 76, 205-210.
- Croes, A. F., Jacobs, J. J. M. R., Arroo, R. R. J., & Wullems, G. J. (1994). Thiophene biosynthesis in *Tagetes* roots: molecular versus metabolic regulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38, 159-165.
- Crowley, M. P., Godin, P. J., Inglis, H. S., Snarey, M., & Thain, A. M. (1962). The biosynthesis of the "pyrethrins"* I The incorporation of ¹⁴C-labelled compounds into the flowers of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and the biosynthesis of Chrysanthemum monocarboxylic acid. *Biochemica et Biophysica Acta*, 60, 312-319.
- Curini, M., Epifano, F., Genovese, S., Tammaro, F., & Menghini, L. (2006). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* "Piemontese" from Italy. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(6), 738-739.
- Daisy, P., Mathew, S., Suveena, S., & Rayan, N. A. (2008). A novel terpenoid from *Elephantopus Scaber* - antibacterial activity on *Staphylococcus aureus*: a substantiate computational approach. *International Journal of Biomedical Science*, 4(3), 196-203.
- Daisy, P., Jasmine, R., Ignacimuthu, S., & Murugan, E. (2009). A novel steroid from *Elephantopus scaber* L. an ethnomedicinal plant with antidiabetic activity. *Phytomedicine*, 16, 252-257.
- De Silva, L. B., Herath, W. H. M. W., & Jennings, R. C. (1982). A New sesquiterpenelactone from *Elephantopus scaber*. *Phytochemistry*, 21(5), 1173-1175.
- Del Villar-Martinez, A. A., Garcia-Saucedo, P. A., Carabez-Trejo, A., Cruz-Hernández, A., & Parades-López, O. (2005). Carotenogenic gene expression and ultrastructural changes during development in marigold. *Journal of Plant Physiology*, 162, 1046-1056.
- Derardt, R., Jougney, S., Delevalcee, F., & Falhout, M. (1980). Release of prostaglandins E and F in algogenic reaction and its inhibition. *European Journal Pharmacology*, 51, 17-24.
- Dicosmo, E., Towers, G. H. N., & Lam, J. (1982). Photo-induced fungicidal activity elicited by naturally occurring thiophene derivatives. *Pesticide Science*, 327, 9-11.
- Dong, X. Y., Chen, M., Jin, W., Huang, D. X., Shen, S. M., & Li, H. T. (1989). Studies on antifertility constituents of *Siegesbeckia glabrescens* Mak. *Yao Xue Xue Bao*, 24(11), 833-836.
- Downum, K. R., Hancock, R. E. W., & Towers, G. H. N. (1983). Photodynamic action on *Escherichia coli* of natural acetylenic thiophenes, particularly 5-(buten-1-ynyl)-2,2'-bitienyl. *Photobiochemistry and Photobiophysics*, 6, 145-152.

- Duke, J. A., Bogenschutz-Godwin, M. J., de Celliar, J., & Duke, P. A. K. (Eds.). (2002). *Handbook of Medicinal herbs* (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Duncan, J. L., Aleman, T. S., Gardner, L. M., de Castro, E., Marks, D. A., Emmons, J. M., Bieber, M. L., Steinberg, J. D., Bennett, J., Stone, E. M., MacDonald, I. M., Cideciyan, A. V., Maguire, M. G., & Jacobson, S. G. (2002). Macular pigment and lutein supplementation in choroideremia. *Experimental Eye Research*, *74*, 371-381.
- Dunkel, F. V., Serugendo, A. S., Breene, W. M., & Sriharan, S. (1995). Influence of insecticidal plant materials used during storage on sensory attributes and instrumental hardness of dry edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, *48*, 1-16.
- Dwyer, J. H., Navab, M., Dwyer, K. M., Hassan, K., Sun, P., Shircore, A., Hama-Levy, S., Hough, G., Wang, X., Drake, T., Merz, N. B., & Fogelman, A. M. (2001). Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis. The Los Angeles Atherosclerosis Study. *Circulation*, *103*, 2922-2927.
- Eiring, Ø. (2009, 17.10.07). Myggmidler - behandlingsanbefaling ved forgiftning Retrieved 17.08.09, 2009, from <http://www.helsebiblioteket.no/Forgiftninger/Gasser+og+kjemikalier/9151.cms>
- Elango, G., Rahuman, A., Bagavan, A., Kamaraj, C., Zahir, A. A., & Venkatesan, C. (2009). Laboratory study on larvicidal activity of indigenous plant extracts against *Anopheles subpictus* and *Culex tritaeniorhynchus*. *Parasitology Research*, *104*, 1381-1388.
- Evans, J. R. (2006). Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration. [Intervention Review]. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007(2), Art.No.:CD000254. doi: 10.1002/14651858.CD000254.pub2.
- Evans, J. R., & Henshaw, K. S. (2008). Antioxidant vitamin and mineral supplements for preventing age-related macular degeneration. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008(1), Art.No.:CD000253. doi: 10.1002/14651858
- Faizi, S., & Naz, A. (2004). Palmitoleate (=9Z)-hexadeca-9-enoate) esters of oleanane triperpenoids from the golden flowers of *Tagetes erecta*: isolation and autooxidation products. *Helvetica Chimica Acta*, *87*, 46-56.
- FAO/WHO. (2005). Evaluation of certain food additives. In J. F. W. E. Committee (Ed.), *Sixty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Geneva: WHO.
- Fazilatun, N., Nornisah, M., & Zahri, I. (2005). Superoxide radical scavenging properties of extracts and flavonoids isolated from the leaves of *Blumea balsamifera*. *Pharmaceutical Biology*, *43*(1), 15-20.
- FDA. (2009). Everything Added to Food in the United States, Doc. No 2841. EAFUS: A food Additive Database Retrieved 26.02.10, from U.S. Food and Drug Administration <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=eafusListing&id=3380>

- FNA. (2010). *Emilia sonchifolia* (L.) DC. Vol. 20. *Flora of North America*
Retrieved from
http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=200023879
- FOC. (1762). *Evolvulus alsinoides*. www.efloras.org Retrieved 10.02.10, from Flora of China@efloras.org
http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=200018836
- Franzosa, J. A., & Osimitz, T. G. (2007). Cutaneous contact urticaria to pyrethrum-real?, common?, or not documented?: an evidence-based approach. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 26, 57-72.
- Fujimoto, Y., Soemartono, A., & Sumatra, M. (1988). Sesquiterpenelactones from *Blumea balsamifera*. *Phytochemistry*, 27(4), 1109-1111.
- Ganju, L., Karan, D., Chanda, S., Srivastava, K. K., Sawhney, R. C., & Selvamurthy, W. (2003). Immunomodulatory effects of agents of plant origin. *Biomedicine and Pharmacology*, 57, 296-300.
- Gao, J., Cheng, D., & Liu, X. (1993). Chemical constituents of *Emilia sonchifolia* L. DC. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 18(2), 102-103.
- Garg, S. C., & Dengre, S. L. (1986). Antibacterial activity of essential oil of *Tagetes erecta* Linn. *Hindustan antibiotics bulletin*, 28(1-4), 27-29.
- Garrett, D. A., Faila, M. L., & Sarama, R. J. (2000). Estimation of the carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 574-580.
- Giang, P. M., Son, P. T., & Otsuka, H. (2005). Ent-piramide-type diterpenoids from *Siegesbeckia orientalis* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(2), 232-234.
- Giftinformasjonen. (2008, 27.08.08). Myggmidler med pyretriner eller pyretroider
Retrieved 17.08.09, 2009, from
<http://www.helsedirektoratet.no/vp/template/ver1-0/print.jsp?articleId=58875§ion>
- Glover, J. (1955). Chilling and flower-bud stimulation in pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). *Annals of Botany*, XIX(73), 138-148.
- Goldberg, J., Flowerdew, G., Smith, E., Brody, J. A., & Tso, O. M. (1998). Factors associated with age-related macular degeneration. An analysis of data from the first national health and nutrition examination survey. *American Journal of Epidemiology*, 128, 700-710.
- Gómez, R., Goñi, F. M., & Macarulla, M. (1978). Carotenoids from marigold (*Tagetes erecta*) petals and their esterified fatty acids. *Revista Española de Fisiología*, 34, 253-256.
- González de Mejía, E., Ramos-Gómez, M., & Loarca-Piña, G. (1997). Antimutagenic activity of natural xanthophylls against aflatoxin B1 in *Salmonella typhimurium*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30, 346-353.
- Goswami, A. C., Baruah, R. N., Sharma, R. P., Baruah, J. N., Kulanthaivel, P., & Herz, W. (1984). Germacranolides from *Inula cappa*. *Phytochemistry*, 23(2), 367-372.

- Govindachari, T. R., Sidhaye, A. R., & Viswanathan, N. (1970). Deoxyelephantopin, a new sesquiterpene from *Elephantopus scaber* Linn. *Indian Journal of Chemistry*, 8, 762.
- Govindachari, T. R., Viswanathan, N., & Fuhrer, H. (1972). Isodeoxyelephantopin, a new germacranediolide from *Elephantopus scaber* Linn. *Indian Journal of Chemistry*, 10, 272-273.
- Govorko, D., Logendra, S., Wang, Y., Esposito, D., Komarnytsky, S., Ribnicky, D., Poulev, A., Wang, Z. T., Cefalu, W. T., & Raskin, I. (2007). Polyphenolic compounds from *Artemisia dracunculus* L. inhibit PEPCK gene expression and gluconeogenesis in an H4IIE hepatoma cell line. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 293, E1503-E1510.
- Gramshaw, J. W., Cotton, C. M., & Evans, L. V. (Eds.). (1988). *Production of flavour volatiles by callus and suspension cultures of tarragon (Artemisia dracunculus)*. Berlin: Walter de Gruyter.
- Green, M. M., Singer, J. M., Sutherland, D. J., & Hibben, C. R. (1991). Larvicidal activity of *Tagetes minuta* (Marigold) toward *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7(2), 282-286.
- Greger, H. (1979). Aromatic acetylenes and dehydrofalcarnone derivatives within the *Artemisia Dracunculus* group. *Phytochemistry*, 18, 1319-1322.
- Greger, H., & Bohlmann, F. (1979). 8-hydroxycapillarin - Ein Neues Isocoumarin aus *Artemisia dracunculus*. *Phytochemistry*, 18, 1244-1245.
- Gregory, G. K., Chen, T. S., & Philip, T. (1986). Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Science*, 51, 1093-1094.
- Grolier, P., Duszka, C., Borel, P., Alexandre-Gouabau, M.-C., & Azais-Braesco, V. (1997). In vitro and in vivo inhibition of beta karoten dioxygenase activity by canthaxanthin in rat intestine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 348, 233-238.
- Grossgeim, A. A. (Ed.). (1952). *The plant riches of the Caucasus (på russisk)*. Moscow.
- Gunasingh, C. B. G., & Nagarajan, S. (1981). Flavonoids of the Flowers of *vernonia cinerea*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3, 114-114.
- Guo, D. A., Zhang, Z. G., Ye, G. Q., & Lou, Z. C. (1997). Studies on liposoluble constituents from the aerial parts of *Siegesbeckia orientalis* L. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 4, 282-285.
- Gupta, M., Mazumber, U. K., Manikandan, L., Bhattacharya, S., Haldar, P. K., & Rpy, S. (2003). Evaluation of antipyretic potential of *Vernonia cinerea* extract in rats. *Phytotherapy Research*, 17, 804-806.
- Gupta, M., Mazumber, U. K., Manikandan, L., Haldar, P. K., Bhattacharya, S., & Kandar, C. C. (2003). Antibacterial activity of *vernonia cinerea*. *Fitoterapia*, 74, 148-150.
- Gupta, P., Akanksha, Siripurapu, K. B., Ahmad, A., Palit, G., Arora, A., & Maurya, R. (2007). Anti-stress constituents of *Evolvulus alsinoides*: An Ayurvedic crude drug. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(5), 771-775.
- Hadden, W. L., Watkins, R. H., Levy, L. W., Regalado, E., Rivadeneira, D. M., van Bremen, R. B., & Schwartz, S. J. (1999). Carotenoid composition of marigold

- (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. *Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4189-4194.
- Hadis, M., Lulu, M., Mekonnen, Y., & Asfaw, T. (2003). Field trials on the repellent activity of four plant products against mainly mansonias population in western Ethiopia. *Phytotherapy research*, 17, 202-205.
- Hahne, M., Kataoka, T., Schröter, M., Hofmann, K., Irmeler, M., Bodmer, J.-L., Schneider, P., Bornand, T., Holler, N., French, L. E., Sordat, B., Rimoldi, D., & Tschopp, J. (1998). APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *Journal of Experimental Medicine*, 188, 1185-1190.
- Hammer, M. L. A., & Johns, E. A. (1993). Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará (Brazil). *Journal of Ethnopharmacology*, 40, 53-75.
- Harikumar, K. B., Nimita, C. V., Preethi, K. C., & Kuttan, R. (2008). Toxicity profile of lutein and lutein ester isolated from marigold flowers (*Tagetes erecta*). *International Journal of Toxicology*, 27, 1-9.
- Hasegawa, H., Yamada, Y., Harasawa, H., Tsuji, T., Murata, K., Sugahara, K., Tsuruda, K., Ikeda, S., Imaiizumi, Y., Tomonaga, M., Masuda, M., Takasu, N., & Kamihira, S. (2005). Sensitivity of adult T-cell leukaemia lymphoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *British Journal of Haematology*, 128, 253-265.
- Hasegawa, H., Yamada, Y., Komiyama, K., Hayashi, M., Ishibashi, M., Yoshida, T., Sakai, T., Koyano, T., Kam, T.-S., Murata, K., Sugahara, K., Tsuruda, K., Akamatsu, N., Tsukasaki, K., Masuda, M., Takasu, N., & Kamihira, S. (2006). Dihydroflavonol BB-1, an extract of natural plant *Blumea balsamifera*, abrogates TRAIL resistance in leukemia cells. *Blood*, 107, 679-688.
- Head, S. W. (1968). Fatty acid composition of extract from pyrethrum flowers (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16(5), 762-765.
- . (1973). Carotenoid constituents of pyrethrum flowers (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21(6), 999-1001.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, J., & Williamson, E. M. (Eds.). (2004). *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy*. Spain: Churchill Livingstone.
- Hellrup, J., & Backlund, A. (2006). Dragon (*Artemisia dracuncululus*) - inte bara i bérnaisen! (pp. 1-6): Avdelningen for farmakognosi, Institutionen for läkemedelskemi, Uppsala Universitet.
- Helsedirektoratet. (2009). Ufarlige planter. Retrieved from http://www.helsedirektoratet.no/giftinfo/planter/ufarlige_planter/ufarlige_planter_41863
- Hirono, I., Haga, M., Fujii, M., Matsuura, S., Matsubara, N., Nakayama, M., Furuya, T., Hikichi, M., Takanashi, H., Uchida, E., Hosaka, S., & Ueno, I. (1979). Induction of hepatic tumors in rats by senkirkine and symphytine. *Journal of the National Cancer Institute*, 63(2), 469-472.

- Hisham, A., Pieters, L. A. C., Dommissie, R., Claeys, M., van den Berghe, D., & Scharpé Vlieninck, A. J. (1990). A new cytotoxic guaianolide glucoside from *Elephantopus scaber*. *Planta Medica*, 56(6), 542.
- Hisham, A., Pieters, L. A. C., Claeys, M., Dommissie, R., Vanden Berghe, D., & Vlieninck, A. J. (1992). Guaianolide glucosides from *Elephantopus scaber*. *Planta Medica*, 58(5), 474-475.
- Hitmi, A., Coudret, A., & Barthomeuf, C. (2000). The production of pyrethrins by plant cell and tissue cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Tagetes* species. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 317-337.
- Hofer, O., Szabó, G., & Greger, H. (1986). 2-Hydroxy-4-methoxy-trans-cinnamic acid as a precursor of herniarin in *Artemisia dracunculus*. *Monatshefte für Chemie* 117, 1219-1222.
- Hogstad, S., Johansen, G. L., & Anthonsen, T. (1984). Possible confusion of pyrethrins with thiophenes in *Tagetes* species. *Acta chemica Scandinavica, Series B*, 10, 902-903.
- Huneck, S., Bohlmann, F., Banerjee, S., Hartono, L., Ang, W., & Khaidav, T. (1985). Inhaltsstoffe aus vier vertreprern der tribus Anthemideae aus der Mongolei. *Pharmazie*, 40, 365-366.
- Hurteau, M. D., & Anderson, M. K. (Producer). (2006, 16.04.2009). Plant guide: Tarragon *Artemisia dracunculus* L. Retrieved from http://plants.nrcs.usda.gov/plantguide/pdf/cs_arldr4.pdf
- Hwang, W.-J., Park, E.-J., Jang, C.-H., Han, S.-W., Oh, G.-J., Kim, N.-S., & Kim, H.-M. (2001). Inhibitory effect of immunoglobulin E production by Jin-Deuk-Chal (*Siegesbeckia orientalis*). *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 23(4), 555-563.
- Ichikawa, H., Nair, M. S., Takada, Y., Alan Sheeja, D. B., Suresh Kumar, M. A., Oommen, O. V., & Aggarwal, B. B. (2006). Isolexylephanntopin, a novel sesquiterpene lactone, potentiates apoptosis, inhibits invasion, and abolishes osteoclastogenesis through suppression of nuclear factor-kB (NF-kB) activation and NF-kB-regulated gene expression. *Clinical Cancer Research*, 12(19), 5910-5918.
- IOM. (2000). Beta-carotene and other carotenoids. In: Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and sarotenoids. (pp. 325-382). Washington, DC: Institute of Medicine (IOM)/ National Academy Press (NAP).
- Ishibashi, M., & Ohtsuki, T. (2008). Studies on search for bioactive natural products targeting TRAIL signaling leading to tumor cell apoptosis. *Medical Reserach Reviews*, 28(5), 688-714.
- Iwalewa, E. O., Iwalewa, O. J., & Adeboye, J. O. (2003). Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* Less leaf. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(2-3), 229-234.
- Iyer, C. S. R., & Iyer, P. R. (1978). Steroids from *Grangea maderaspatana*. *Phytochemistry*, 17, 2036-2037.
- . (1979). Isolation of strictic acid from *Grangea maderaspatana* Poir: Identity of methyl strictate with methyl seconidoresedate. *Indian Journal of Chemistry*, 18B, 529-531.

- Jacobs, J. J., Arroo, R. R., De Koning, E. A., Klunder, A. J., Croes, A. F., & Wullems, G. J. (1995). Isolation and characterization of mutants of thiophene synthesis in *Tagetes erecta*. *Plant Physiology*, *107*, 807-814.
- Jacobs, J. J., Stalman, M., Croes, A. F., & Wullems, G. J. (1995). Thiophene bioconversions in *Tagetes* protoplasts *Plant Science*, *104*, 139-145.
- Jacobs, J. J. M. R., Engelberts, A., Croes, A. F., & Wullems, G. J. (1994). Thiophene synthesis and distribution in young developing plants of *Tagetes patula* and *Tagetes erecta*. *Journal of Experimental Botany*, *45*(279), 1459-1466.
- Jain, S., & Sareen, V. (1993). Oestrogenic and pregnancy interceptory efficacy of a flavonoid mixture from *Grangea maderaspanana* Poir (*Artemisia maderaspatana*) in the mouse. *Phytotherapy Research*, *7*, 381-383.
- Jakupovic, J., Banerjee, S., Castro, V., Bohlmann, F., Schuster, A., Msonthi, J. D., & Keeley, S. (1986). Poskeanolide, a seco-germacranolide and other sesquiterpen lactones from *Vernonia* species. *Phytochemistry*, *25*(6), 1359-1364.
- Jasmine, R., Daisy, P., & Selvakumar, B. N. (2007). A novel terpenoid from *Elephantopus scaber* with antibacterial activity against beta-lactamase-producing clinical isolates. *Research Journal of Microbiology* *2*(10), 770-775.
- Johnson-Down, L., Saudny-Unterberger, H., & Gray-Donald, K. (2002). Food Habits of Canadians: lutein and lycopene in the Canadian population. *Journal of the American Dietetic Association*, *102*, 988-991.
- Kaloshina, N. A., & Mazulin, A. V. (1983). Flavonoids from seeds of *Tagetes erecta*. *Kihimika Prir Soedin*, *1*, 104-105.
- Kane, S., Samb, A., Mboup, S., & Kornprobst, J. M. (2002). Polythienyles de l'huile de la composee *Tagetes erecta* du senegal: structures et proprietes antifongique at antibacterienne. *Journal de la Societe Oest-Africaine de Chimie*, *7*(14), 53-66.
- Kasaj, D., Rieder, A., Krenn, L., & Kopp, B. (1999). Separation and quantitative analysis of natural pyrethrins by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, *50*(9/10), 607-610.
- Kavvadias, D., Abou-Mandour, A. A., Czygan, F.-C., Beckmann, H., Sand, P., Riederer, P., & Schreier, P. (2000). Identification of benzodiazepines in *Artemisia dracuncululus* and *Solanum tuberosum* rationalizing their endogenous formation in plant tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *269*, 290-295.
- Ketel, D. H. (1986). Morphological differentiation and occurrence of thiophenes in leaf callus cultures from *Tagetes* species: relation to growth medium of the plants. *Physiolgia plantarum*, *66*, 392-396.
- . (1987). Distribution and accumulation of thiophenes in plants and calli of different *Tagetes* species. *Journal of Experimental Botany*, *38*(187), 322-330.
- Ketel, D. H., & Breteler, H. (1988). Morphogenesis and thiophene production in cell cultures of *Tagetes* species. *Bioactive Molecules*, 267-278.
- Khachik, F., Bernstein, P. S., & Garland, D. L. (1997). Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *38*, 1802-1811.

- Khachik, F., Spengler, C. J., Smith, J. C., Canfield, L. M., Steck, A., & Pfander, H. (1997). Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Analytical Chemistry*, *69*, 1873-1881.
- Khachik, F. (2003). An efficient conversion of (3R,3'R,6'R)-lutein to (3R,3'S,6'R)-lutein (3'-Epilutein) og (3R,3'R)-zeaxanthin. *Journal of Natural Products*, *66*, 67-72.
- Khachik, F., Steck, A., Pfander, H., Ohigashi, H., Osawa, T., Terao, J., Watanabe, S., & Yoshikawa, T. (Eds.). (1997). *Bioavailability, metabolism, and possible mechanism of chemoprevention by lutein and lycopene in humans*. Tokyo: Springer-Verlag.
- Khan, M. T., Potter, M., & Birch, I. (1996). Podiatric treatment of hyperkeratotic plantar lesions with marigold *Tagetes erecta*. *Phytotherapy Research*, *10*, 211-214.
- Khanina, K. A. (1999). *Author's Abstract of Doctoral Thesis in Pharmaceutical Sciences*. Perm'.
- Kim, K.-B., Anand, S. S., Kim, H. J., White, C. A., & Bruckner, J. V. (2007). Toxicokinetics and tissue distribution of deltamethrin in adult Sprague-Dawley rats. *Toxicological sciences*, *101*(2), 197-205.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., & Yildirim, A. (2005). Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of turkish artemisia absinthium, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(24), 9452-9458.
- Kourany, E., & Arnason, T. J. (1988). Accumulation of phototoxic thiophenes in *Tagetes erecta* (Asteraceae) elicited by *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *33*, 287-297.
- Kozuki, Y., Miura, Y., & Yagasaki, K. (2000). Inhibitory effects of carotenoids on the invasion of rat ascites hepatoma cells in culture. *Cancer Letters*, *151*, 111-115.
- Krinsky, N. I., Landrum, J. T., & Bone, R. A. (2003). Biologic mechanisms of the protective role of lutein an zeaxantin in the eye. *Annual Review of Nutrition*, *23*, 171-201.
- Krishna, V., & Singh, P. (1999). A clerodane derivative from *Grangea maderaspatana*. *Phytochemistry*, *52*, 1341-1343.
- . (2001). Highly oxygenated flavonols from *Grangea maderaspatana*. *Journal of Medical and Aromatic Plant Sciences*, *23*, 609-611.
- Kruger, C. L., Murphy, M., DeFreitas, Z., Pfannkuch, F., & Heimbach, J. (2002). An innovative approach to the determination of safety for a dietary ingredient derived from a new source: Case study using a crystalline lutein product. *Food and Chemical Toxicology*, *40*, 1535-1549.
- Kubota, H., Kojima-Yuasa, A., Morii, R., Huang, X., Norikura T., Rho, S.-N., & Matsui-Yuasa, I. (2009). Anti-obesity effect of *Blumea balsamifera* extract in 3T3-L1 preadipocytes og adipocytes. *The American Journal og Chinese Medicine*, *37*(5), 843-854.

- Kucherov, E. V., Baikov, G. K., & Gufranova, I. B. (Eds.). (1976). *Useful plants of the southern Urals (på russisk)*. Moscow: Nauka.
- Kueh, J. S. H., MacKenzie, I. A., & Pattenden, G. (1985). Production of chrysanthemic acid and pyrethrins by tissue cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Plant Cell Reports*, 4, 118-119.
- Kumar, P. P., & Kuttan, G. (2009). *Vernonia cinerea* L. scavenges free radicals and regulates nitric oxide and proinflammatory cytokines profile in carrageenan induced paw edema model. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 31(1), 94-102.
- Kuo, Y.-H., Kuo, Y.-J., Yu, A.-S., Wu, M.-D., Ong, C.-W., Kuo, L.-M. Y., Huang, J.-T., Chen, C.-F., & Li, S.-Y. (2003). Two novel sesquiterpen lactones, cytotoxic vernolid-A and -B, from *Vernonia cinerea*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51(4), 425-426.
- Kupriyanov, A. N. (Ed.). (1998). *What grows in the garden (på russisk)*. Barnaul.
- Kurkin, V. A., Zapesochnaya, G. G., & Mytsyk, A. V. (1996). *Rast.Resursy*, 32(1-2), 88-92.
- Lam, J., Breteler, H., Arnason, T., & Hansen, L. (1988). Chemistry and biology of naturally - occurring acetylenes and related compounds (NOARC). *Bioactive Molecules*, 7, 255-265.
- Laranja, S. M. R., Bergamaschi, C. M., & Schor, N. (1991). Evaluation of acuta administration of natural products with potential diuretic effects, in humans. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz., Rio de Janeiro*, 86(Suppl. II), 237-240.
- Latha, R. M., Geetha, T., & Varalakshmi, P. (1999). Effect of *Vernonia cinerea* Less flower extract in adjuvant-induced arthritis. *General Pharmacology*, 31(4), 601-606.
- Latha, Y. L., Darah, I., Jain, K., & Sasidharan, S. (2010). Toxicity study of *Vernonia cinerea*. *Pharmaceutical Biology*, 48(1), 101-104.
- Leung, A. Y. (Ed.). (1980). *Encyclopedia of common natural ingredients, used in food, drugs and cosmetics* New York: Academic Press.
- Li, Y., Ooi, L. S. M., Wang, H., But, P. P. H., & Ooi, V. E. C. (2004). Antiviral activities of medicinal herbs traditionally used in southern mainland China. *Phytotherapy Research*, 18, 718-722.
- Liang, Q.-L., Min, Z.-D., & Cheng, L. (2002). Studies on the two dipeptides from *Elephantopus scaber*. *Journal of China Pharmaceutical University*, 33(3), 178-180.
- Liang, Q.-L., Min, Z.-D., & Tang, Y.-P. (2008). A new elemanolide sesquiterpene lactone from *Elephantopus scaber*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10(5), 403-407.
- Liang, Q. L., & Shi, G. X. (2003). Structure elucidation of sesquiterpenoids from *Elephantopus scaber* using NOESY technique (I). *Chinese Journal of Magnetic Resonance*, 20, 289-295.
- . (2004). Structure elucidation of sesquiterpenoides from *Elephantopus scaber* using the NOESY technique (II). *Chinese Journal of Magnetic Resonance*, 21, 311-315.

- Lienstat. (2003). *Siegesbeckia orientalis* Liste des excursions journalières et des errêtes
LIENSTAT.HTM
- Lija, Y., Biju, P. G., Reeni, A., Cibin, T. R., Sahasranamam, V., & Abraham, A. (2006). Modulation of selenite cataract by the flavonoid fraction of *Emilia sonchifolia* in experimental animal models. *Phytotherapy Research*, 20, 1091-1095.
- Lin, C.-C., Yen, M.-H., & Chiu, H.-F. (1991). The pharmacological and pathological studies on Taiwan folk medicine (VI): the effect of *Elephantopus scaber* subsp. *oblanceolata*, *E. mollis* and *Pseudoelephantopus spicatus*. *American Journal of Chinese Medicine*, XIX(1), 41-50.
- Lindeberg, I. (1982). *Örtmedicin och växtmagi*. Stockholm: Det Bästa.
- List, P. H., & Hörhammer, I. (1967). Hagers handbuch der pharmazeutischen praxis (pp. 733). Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Logendra, S., Ribnicky, D. M., Yang, H., Poulev, A., Ma, J., Kennelly, E. J., & Raskin, I. (2006). Bioassay-guided isolation of aldose reductase inhibitors from *Artemisia dracuncululus*. *Phytochemistry*, 67, 1539-1546.
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Kolodziejczyk, P. P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69, 1732-1738.
- Lopez-Lazaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(1), 31-59.
- Luch-Pérez, M., García-Rodríguez, Malet, A., Amat, P., & Bartolomé, B. (2009). Occupational allergy caused by marigold (*Tagetes erecta*) flour inhalation. *Allergy* 64, 1099-1100.
- Lucius, E. (1917). *Chrysanthemum cinerariaefolium* A manual of Organic Materia Medica and Pharmacognosy: Lessico.
- Machado, M., Silva, M. G., Matos, F. J. A., Craveriro, A. A., & Alencar, J. W. (1994). The presence of indole as a minor constituent of *Tagetes erecta* leaf oil. *Journal of Essential Oil Research*, 6, 2203-2205.
- Maheshwari, P., Songara, B., Kumar, S., Jain, P., Srivastava, K., & Kumar, A. (2007). Alkaloid production in *Vernonia cinerea*: callus, cell suspension and root cultures. *Biotechnology Journal*, 2, 1026-1032.
- Martin, J. J., & Weidenhamer, D. (1995). Potassium deficiency increases thiophene production in *Tagetes erecta* L. *Current topics in plant physiology*, 277-279.
- Martindale. (2002). Martindale - The complete drug reference S. C. Sweetman (Ed.) Retrieved from http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian/ND_T/HCS/ND_PR/Main/CS226E8A/DU
- . (2009). Borneol, Bornyl Acetate *The Complete Drug Reference* Retrieved from http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian/ND_T/HCS/ND_PR/Main/CS/EEC097/DUPLICATIONSHIELDSYNC/D41D5C/ND_PG/PRIH/ND_B/HCS/SBK/1/ND_P/Main/PFActionId/hcs.main.RepeatKeywordSearch.Search?ContentSetId=30&ResultMode=All&userSearchTerm=borneol&userSearchOption=BeginWith

- . (2010a). Camphor *The Complete Drug reference* Retrieved from http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian/ND_T/HCS/ND_PR/Main/CS/E040EA/DUPLICATIONSHIELDSYNC/4C801E/ND_PG/PRIH/ND_B/HCS/SBK/3/ND_P/Main/PFActionId/hcs.common.RetrieveDocumentCommon/DocId/263-j/ContentSetId/30/SearchTerm/CAMPHOR%20/SearchOption/BeginWith
- . (2010b). Melaleuca Oil *The Complete Drug Reference* Retrieved from http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian/ND_T/HCS/ND_PR/Main/CS/FCEF00/DUPLICATIONSHIELDSYNC/38DD5F/ND_PG/PRIH/ND_B/HCS/SBK/4/ND_P/Main/PFActionId/hcs.common.RetrieveDocumentCommon/DocId/4669-f/ContentSetId/30/SearchTerm/terpinolen/SearchOption/BeginWith
- (Ed.). (2005). *Eugenol* (34 ed.). Suffolk: Pharmaceutical Press, William Clowes.
- Mashanov, V. I., & Pokrovskii (Eds.). (1991). *Spicy-aromatic plants (på russisk)*. Moscow: Agropromizdat.
- Matsuda, K., Kikuta, Y., Haba, A., Nakayama, K., Katsuda, Y., Hatanaka, A., & Komai, K. (2005). Biosynthesis of pyrethrin I in seedlings of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Phytochemistry*, *66*, 1529-1535.
- Mazumder, U. K., Gupta, M., Manikandan, L., Bhattacharya, S., Haldar, P. K., & Ray, S. (2003). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Vernonia cinerea* Less. extract in rats. *Phytomedicine*, *10*, 185-188.
- Meepagala, K. M., Sturtz, G., & Wedge, D. E. (2002). Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus L. Var. dracunculus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 6989-6992.
- Misra, T. N., Singh, R. S., Upadhyay, J., & Srivastava, R. (1984a). Chemical constituents of *Vernonia cinerea*, part I. Isolation and spectral studies of triterpenes. *Journal of Natural Products*, *47*(2), 368-372.
- . (1984b). Isolation of a natural sterol and an aliphatic acid from *Vernonia cinerea*. *Phytochemistry*, *23*(2), 415-417.
- Misra, T. N., Singh, R. S., Srivastava, R., Pandey, H. S., Prasad, C., & Singh, S. (1993). A new triterpenoid from *Vernonia cinerea*. *Planta Medica*, *59*(5), 458-460.
- Moehs, C. P., Tian, L., Osteryoung, K. W., & DellaPenna, D. (2001). Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Molecular Biology*, *45*, 281-293.
- MOH Myanmar. (2010a). *Traditional medicine*. Ministry of Health, Myanmar Retrieved from <http://www.moh.gov.mm/file/traditional%20medicine.pdf>.
- . (2010b). *Medicinal Plants of Myanmar*. Ministry of Health, Department of Traditional Medicine Retrieved from www.moh.gov.mm/file/mpm.pdf
- Monago, C. C., & Ugbomeh, P. A. (2004). Antidiabetic effect of *Emilia sonchifolia* in dithizone diabetic rats. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, *10*(1), 183-187.
- Mora-Pale, J. M., Pérez-Munguía, S., González-Mejía, J. C., Dordick, J. S., & Bárzana, E. (2007). The lipase-catalyzed hydrolysis of lutein diesters in non-aqueous media is favored at extremely low water activities. *Biotechnology and Bioengineering*, *98*(3), 535-542.
- Muir, C. K. (1981). Depressant action of an extract of *Vernonia cinerea*. *Medical Journal of Malaysia*, *36*(2), 119-121.

- Mukherjee, P. K., Kumar, V., & Houghton, P. J. (2007). Screening of Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Phytotherapy Research*, *21*, 1142-1145.
- Muko, K. N., & Ohiriu, F. C. (2000). A preliminary study on the anti-inflammatory properties of *Emilia sonchifolia* leaf extracts. *Fitoterapia*, *71*, 65-68.
- Mukundan, U., & Hjortso, M. A. (1990). Thiophene content in normal and transformed root cultures of *Tagetes erecta*: a comparison with thiophene content in roots of intact plants. *Journal of Experimental Botany*, *41*(232), 1497-1501.
- Müller, H., Bub, A., Watzl, B., & Rechkemmer, G. (1999). Plasma concentrations of carotenoids in healthy volunteers after intervention with carotenoid-rich foods. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, *38*(35-44).
- Nahata, A., Patil, U. K., & Dixit, V. K. (2009). Anxiolytic activity of *Evolvulus alsinoides* and *Convolvulus pluricaulis* in rodents, *47*(5), 444-451.
- Nam, N. H. (2000). Cytotoxic Principle of *Siegesbeckia orientalis* growing in Vietnam. *Journal of Chemistry*, *38*(4), 84-86.
- Narisawa, T., Fukaura, Y., Hasebe, M., Ito, M., Aizawa, R., Murakoshi, M., Uemura, S., Khachik, F., & Nishinod, H. (1996). Inhibitory effects of natural carotenoids, alpha-carotene, beta-carotene, lycopene and lutein, on colonic aberrant crypt foci formation in rats. *Cancer Letters*, *107*(137-142).
- Navarrete-Bolaños, J. L., Jiménez-Islas, H., Botello-Alvarez, E., Rico-Martinez, R., & Paredes-López, O. (2004). Improving xanthophyll extraction from marigold flower using cellulolytic enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 3394-3398.
- Nessa, F., Ismail, Z., & Mohamed, N. (2004). Isolation of sterols and hydrocarbons from the leaves of *Blumea balsamifera* DC. *ACGC Chemical Research Communications*, *17*, 9-15.
- Nessa, F., Ismail, Z., Mohamed, N., & Haris, M. R. H. M. (2004). Free radical scavenging activity of organic extracts and of pure flavonoids of *Blumea balsamifera* DC leaves. *Food Chemistry*, *88*, 243-252.
- Nessa, F., Ismail, Z., Karupiah, S., & Mohamed, N. (2005). RP-HPLC method for the quantitative analysis of naturally occurring flavonoids in leaves of *Blumea balsamifera* DC. *Journal of Chromatographic Science*, *43*, 416-420.
- NFS. (1963). Meddelelser fra Norsk Farmasøytisk Selskap. *25*, 155-185.
- Nguyen, M. T. T., Awale, S., Tezuka, Y., Tran, Q. L., Watanabe, H., & Kadota, S. (2004). Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medical plants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *27*(9), 1414-1421.
- Noor Rain, A., Khozirah, S., Mohd Ridzuan, M. A. R., Ong, B. K., Rohaya, C., Rosilawati, M., Hamdino, I., Badrul, A., & Zakiah, I. (2007). Antiplasmodial properties of some Malaysian medicinal plants. *Tropical Biomedicine*, *24*(1), 29-35.
- Nordal, A. (Ed.). (1960a). *Forelesninger i farmakognosi I*. Oslo - Bergen: Universitetsforlaget.
- (Ed.). (1960b). *Forelesninger i farmakognosi II*. Oslo-Bergen: Universitetsforlaget.

- (Ed.). (1963). *The Medicinal Plants and Crude Drugs of Burma*. Oslo: Section of Pharmacognosy, Institute of Pharmacy, University of Oslo.
- Norikura, T., Kojima-Yuasa, A., Shimizu, M., Huang, X., Xu, S., Kametani, S., Rho, S.-N., Kennedy, D. O., & Matsui-Yuasa, I. (2008a). Mechanism of growth inhibitory effect of *Blumea balsamifera* extract in hepatocellular carcinoma. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(5), 1183-1189.
- . (2008b). Anticancer activities and mechanisms of *Blumea balsamifera* extract in hepatocellular carcinoma cells *The American Journal of Chinese Medicine*, 36(2), 411-424.
- Noroozi, M., Angerson, W. J., & Lean, M. E. J. (1998). Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67, 1210-1218.
- Nummeropplysningen 1881. (2010). Kart Myanmar Retrieved 30.03.10, from http://www.1881.no/Map/Page/Route.aspx/?WT.mc_id=Goo_010907_Verden_skart_land&WT.srch=1&gclid=CM2mq8KL4KACFRgsDgodQEgTIg
- Nuraliev, Y. (Ed.). (1991). *Medicinal Plants (på russisk)*. Nizhnyi Novgorod: IKPA.
- Olmedilla, B., Granado, F., Southon, S., Wright, A. J. A., Blanco, I., Gil-Martinez, E., van den Berg, H., Thurnham, D., Corridan, B., Chopra, M., & Hininger, I. (2002). A European multicentre, placebo-controlled supplementation study with alpha-tocopherol, carotene-rich palm oil, lutein or lycopene: Analysis of serum responses. *Clinical Science*, 102, 447-456.
- Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Valanis, B., Williams, J. H., Barnhart, S., & Hammar, S. (1996). Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine*, 334, 1150-1155.
- Onuchak, L. A., Kurkin, V. A., Minakhmetov, R. A., & Kurkina, A. V. (2000). *Khim.Prirod.Soedin.*, 2, 115-117.
- Oo, T. N. (2004). Status of Forest Genetic Resources Conservation and Management in Myanmar *National APFORGEN Coordinator & Range Officer Thuang Naing Oo* (pp. 1-15). Myanmar: Forest Research Institute, Forest Department, Ministry of Forestry.
- Osaki, N., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Hayashi, M., Komiyama, K., & Ishibashi, M. (2005). Sesquiterpenoids and plasmin-inhibitory flavonoids from *Blumea balsamifera*. *Journal of Natural Products*, 68, 447-449.
- Osimitz, T. G., & Franzosa, J. A. (2006). Pyrethrum allergic contact dermatitis in humans - real?, common?, or not documented?: an evidence-based approach. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 25, 287-308.
- Osimitz, T. G., Sommers, N., & Kingston, R. (2009). Human exposure to insecticide products containing pyrethrins and piperonyl butoxide (2001-2003). *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1406-1415.
- Pandey, U. C., Singhal, A. K., Barua, N. C., Sharma, R. P., Baruah, J. N., Watanabe, K., Kulanthaivel, P., & Herz, W. (1984). Stereochemistry of strictic acid and related furano-diterpenes from *Conyza japonica* and *Grangea maderaspatana*. *Phytochemistry*, 23(2), 391-397.

-
- Park, J. S., Chew, B. P., & Wong, T. S. (1998). Dietary lutein from marigold extract inhibits mammary tumor development in BALB/c mice. *The Journal of Nutrition*, 128(10), 1650-1656.
- Patel, V., Shukla, S., Patel, S., & Ipcowala, I. (2009). Free radical scavenging activity of *Grangea maderaspatana*. *Pharmacognosy Magazine*, 5(20), 381-387.
- Paulsen, B. S. (2003, 25.09.03). *Minnetale over professor Arnold Sofus Nordal, Dr. Philos.* Årbok 2003. Det Norske Videnskaps-Akademi, Oslo.
- Pazhani, G. P., Subramanian, N., Arunchalam, G., Hemalatha, S., & Ravichandran, V. (2000). Antidiarrhoeal potential of *Elephantopus scaber* Linn. leaf extract. *Indian Drugs*, 38(5), 269-271.
- Pfannkuch, F., Wolz, E., Aebischer, C. P., Schierle, J., & Green, C. (2000a). Ro 15-3971/000 (10%): 13-week oral toxicity (dietary administration) toxicity study in the rat with a 4-week treatment-free period (Roche project 952V99). *Unpublished report project No. 161/354 from Covance Laboratories Ltd., Harrogate UK.* Basle.
- Pfannkuch, F., Wolz, E., Aebischer, C. P., Schierle, J., Niggemann, B., & Zuhlke, U. (2000b). Ro 01-9509/000 (zeaxanthin 10%) and Ro 15-3971/000 (lutein 10%): combined 52-week oral (gavage) pilot toxicity study with two carotenoids in the cynomolgus monkey (Roche project No. 9004V98). (Vol. Unpublished report No. 161-298, dated May 11, from Covance Laboratories Ltd, Harrogate UK.). Basle.
- Pfannkuch, F., Wolz, E., Aebischer, C. P., Schierle, J., Niggemann, B., & Zuhlke, U. (2000c). Ro 01-9509 (zeaxanthin 10%)/Ro 15-3971 (lutein 10%): combined 52-week oral (gavage) pilot toxicity with two carotenoids in the cynomolgus monkey. (Vol. Unpublished report No. B-171 423, Amendment to Final Report No. 1, dated December 18,). Basle.
- Pfannkuch, F. (2001). Ro 01-9509/000 (zeaxanthin 10%) and Ro 1539-71 (lutein 10%): combined 52-week oral (gavage) pilot toxicity study with two carotenoids in the cynomolgus monkey. (Vol. Unpublished report No. 0161/424-D6154 from Covance Laboratories Ltd, Harrogate U.K.). Basle: (Roche Research report No.: B-171 423). Comprehensive overview on eye examinations.
- Pfannkuch, F., Wolz, E., & Green, C. (2001). Ro 15-3971 (10% lutein): Pathological evaluation of the liver and kidney following a 13-week dietary toxicity study in the rat (report No. 1005032). (Vol. Unpublished report No. 0161/424-D6154 from Covance Laboratories Ltd, harrogate U.K.). Basle.
- Pfeil, R. (2003). Pyrethrins (addendum) *Pesticide residues in food - 2003, Toxicological evaluations* (pp. 321-328). Geneva: WHO.
- Philip, T., & Berry, J. W. (1976). A process for the purification of lutein-fatty acid esters from marigold petals. *Journal of Food Science*, 41, 163-164.
- Pickering, H., & Wild, H. (1975). *Grangea maderaspatana*. In F. o. Zimbabwe (Ed.), *The Compositae of the Flora Zambesiaca area.4. Astereae. Kirkia 10(1)*.
- Poli, A., Nocolau, M., Simdes, M. O., Nicolau, R. M. R., & Zanin, M. (1992). Preliminary pharmacologic evaluation of crude whole plant extracts of *Elephantopus scaber*. part I: in vivo studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 37, 71-76.

- Polyanskaya, E. V., Korolyuk, E. A., & Tkachev, A. V. (2007). Composition of essential oil from *Artemisia glauca* from western Siberia. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(5), 544-547.
- Quackenbush, F. W., & Miller, S. L. (1972). Composition and analysis of the carotenoids in marigold petals. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 55, 617-621.
- Ragasa, C. Y., Co, A. L. K. C., & Rideout, J. A. (2005). Antifungal metabolites from *Blumea balsamifera*. *Natural Product Research*, 19(3), 231-237.
- Rajalakshmi, R., & Jose, J. (2002). Essential oil composition of four medicinal plants of Asteraceae. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 24, 990-993.
- Rajesh, M. G., & Latha, M. S. (2001). Hepatoprotection by *Elephantopus scaber* Linn. in CCL4-induced Liver Injury. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 45(4), 481-486.
- Rao, K. V. (1962). Chemical constituents of *Vernonia cinerea* Less. *Journal of the Indian Chemical Society*, 39(11), 749-752.
- Rao, P. R., Seshadri, T. R., & Sharma, P. (1973). Polyphenolic constituents of pyrethrum flowers (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). *Current Science*, 42(23), 811-812.
- Rao, V. M., Damu, G. L. V., DSudhakar, D., & Rao, V. (2009). Two new bio-active flavones from *Grangea maderaspatana*. *Asian Journal of Chemistry*, 21(2), 1552-1558.
- Ribnicky, D. M., Poulev, A., O'Neal, J., Wnorowski, G., & Malek, D. E. (2004). Toxicological evaluation of the ethanolic extract of *Artemisia dracuncululus* L. for use as a dietary supplement and in functional foods. *Food and Chemical Toxicology*(42), 585-598.
- Ribnicky, D. M., Poulev, A., Watford, M., Cefalu, W. T., & Raskin, I. (2006). Antihyperglycemic activity of TarralinTM, an ethanolic extract of *Artemisia dracuncululus* L. *Phytomedicine*, 13, 550-557.
- Ribnicky, D. M., Kuhn, P., Poulev, A., Logendra, S., Zuberi, A., Cefalu, W. T., & Raskin, I. (2009). Improved absorption and bioactivity of active compounds from an anti-diabetic extract of *Artemisia dracuncululus* L. *International Journal of Pharmaceutics*, 370(1-2), 87-92. doi: S0378-5173(08)00787-4 [pii] 10.1016/j.ijpharm.2008.11.012 [doi]
- Rivas, J. D. L. (1989). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein fatty acid esters from marigold flower petal powder. *Journal of Chromatography*, 464, 442-447.
- Rivera, S. B., Swedlund, B. D., King, G. J., Bell, R. N., Hussey, C. E., Shattuck-Eidens, D. M., Wrobel, W. M., Peiser, G. D., & Poulter, C. D. (2001). Chrysanthemyl diphosphate synthase: isolation of the gene and characterization of the recombinant non-head-to-tail monoterpene synthase from *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), 4373-4378.
- Rodriguez, E., & Mabry, T. J. (1975). *Tageteae*-chemical review. *The biology and chemistry of the Compositae*, 2, 785-797.

- Rojatkar, S. R., Chiplunkar, Y. G., & Nagasampagi, B. A. (1994). A Diterpene from *Cipadessa fruticosa* and *Grangea maderaspatana*. *Phytochemistry*, 37(4), 1213-1214.
- Rollinger, J. M., Hornick, A., Langer, T., Stuppner, H., & Prast, H. (2004). Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47, 6248-6254.
- Romanchik, J. E., Morel, D. W., & Harrison, E. H. (1995). Distributions of carotenoids and beta-tocopherol among lipoproteins do not change when human plasma is incubated in vitro. *The Journal of Nutrition*, 125, 260-2617.
- Ruangrungsi, N., Tappayuthpijarn, P., & Tantivatana, P. (1981). Traditional medicinal plants of Thailand. Isolation and structure elucidation of two new flavonoids, (2R,3R)-dihydroquercetin-4'-methyl ether and (2R,3R)-dihydroquercetin 4',7-dimethyl ether from *Blumea balsamifera*. *Journal of Natural Products*, 44(5), 541-545.
- Ruangrungsi, N., Tantivatana, P., Tappayuthpijarn, P., Borris, R. P., & Cordell, G. A. (1985). Traditional medicinal plants of Thailand VI. Isolation of cryptomeridiol from *Blumea balsamifera*. *Journal of the Science Society of Thailand*, 11, 47-50.
- Ruangrungsi, N., Tantivatana, P., Tappayuthpijarn, P., Borris, R. P., Cordell, G. A., Kasiwong, S., Likhitwitayawuid, K., Lange, G. L., & Decicco, C. P. (1989). Constituents of *Grangea maderaspatana*. A new eudesmanolide. *Journal of Natural Products*, 52(1), 130-134.
- Rugutt, J. K., Henry, C. W., Franzblau, S. G., & Warner, I. M. (1999). NMR and molecular mechanics study of pyrethrins I and II. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3402-3410.
- Ruppelt, B. M., Pereira, E. F. R., Goncalves, L. C., & Pereira, N. A. (1991). Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom - I. Analgesic and anti-inflammatory activities. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 86(Suppl.II), 203-205.
- Rybalko, K. S., Konovalova, O. A., & Petrova, E. F. (1976). Orientin, a new sesquiterpene lactone from *Siegesbeckia orientalis*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 3, 394-395.
- Saadali, B., Boriky, D., Blaghen, M., Vanhaelen, M., & Talbi, M. (2001). Alkamides from *Artemisia dracuncululus*. *Phytochemistry*, 58, 1083-1086.
- Sadvakosova, G. G. (1981). *Author's abstract of master's thesis in biological sciences*. Alma-Ata.
- Samuelsson, G. (Ed.). (2004). *Drugs of natural origin: a textbook of pharmacognosy* (5th ed.). Stockholm: Swedish Pharmaceutical Society: Swedish Pharmaceutical Press.
- Sarin, R. (2004). Insecticidal activity of callus culture of *Tagetes erecta*. *Fitoterapia*, 75, 62-64.
- Sashida, Y., Nakata, H., Shimomura, H., & Kagaya, M. (1983). Sesquiterpene lactones from pyrethrum flowers. *Phytochemistry*, 22(5), 1219-1222.
- Satchell, F. B. (2002). *Letter to Mary Ann Coral-Amasifuen, Kelatron Corporation*. College Park, MD: Food and Drug Administration, Public health Service.

- Sayyah, M., Nadjafnia, L., & Kamalinejad, M. (2004). Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculus* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, *94*, 283-287.
- SCCP/0869/05. (2005). Opinion on *Tagetes erecta*, *T. minuta* and *T. patula* extracts and oils (phototoxicity only) C7- Risk assessment (pp. 1-20): European Commission, health & Consumer Protection Directorate-General, Directorate C - Public Health and Risk Assessment.
- Sefidkon, F., Salehyar, S., Mirza, M., & Dabiri, M. (2004). The essential oil of *Tagetes erecta* L. occurring in Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, *19*, 579-581.
- Shahriyary, L., & Yazdanparast, R. (2007). Inhibition of blood platelet adhesion, aggregation and secretion by *Artemisia dracunculus* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, *114*, 194-198.
- Shatar, S., Dung, N. X., & Karashawa, D. (2003). Essential oil composition of some Mongolian *Artemisia* species. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, *6*(3), 203-206.
- Shylesh, B. S., & Padikkala, J. (2000). In vitro cytotoxic and antitumor property of *Emilia sonchifolia* (L.) DC. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *73*, 495-500.
- Shylesh, B. S., Ajikumaran, N. S., & Subramoniam, A. (2005). Induction of cell-specific apoptosis and protection from Dalton's lymphoma challenge in mice by an active fraction from *Emilia sonchifolia*. *Indian Journal of Pharmacology* *37*(4), 232-237.
- Silván, A. M., Abad, M. J., Bermejo, P., Sollhuber, M., & Villar, A. (1969). Antiinflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia*. *Journal of Natural Products*, *59*, 1183-1185.
- Sim, K. Y., & Lee, H. T. (1969). Constituents of *Elephantopus scaber* (Compositae). *Phytochemistry*, *8*, 933-934.
- Singh, G., Singh, O. P., DeLampasona, M. P., & Catalán, C. A. N. (2003). Studies on essential oils. Part 35: chemical and biocidal investigation on *Tagetes erecta* leaf volatile oil. *Flavour and Fragrance Journal*, *18*, 62-65.
- Singh, P., & Jain, S. (1990). Auranamide - a phenylalanine derivative from *Grangea maderaspatana* Poir. *Journal of the Indian Chemical Society*, *67*, 596-597.
- Singh, P., Srivastava, B., Kumar, A., & N.K., D. (2008). Fungal contamination of raw materials of some herbal drugs and recommendation of *Cinnamomum camphora* oil as herbal fungitoxicant. *Microbial Ecology*, *56*, 555-560.
- Singh, S. D. J., Krishna, V., Mankani, K. L., Manjunatha, B. K., Vidya, S. M., & Manohara, Y. N. (2005). Wound healing activity of the leaf extracts and deoxyelephantopin isolated from *Elephantopus scaber* Linn. *Indian Journal of Pharmacology*, *37*(4), 238-242.
- Siripurapu, K. B., Gupta, P., Bhatia, G., R., M., Nath, C., & Palit, G. (2005). Adaptogenic and anti-amnesic properties of *Evolvulus alsinoides* in rodents. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *81*, 424-432.
- Söderlund, D. M., & Bloomquist, J. R. (1989). Neuritoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Entomology*, *34*, 77-96.

- Solecki, R. (1999). Pyrethrum extract (pyrethrins) (addendum) *Pesticide residues in food - 1999* (pp. 1-24). Rome: WHO.
- Sørensen, H. L. (Ed.). (1969). *Norsk skole flora* (22 ed.). Oslo: Aschehoug, H. & Co. (Nygaard, W.).
- Sreekala, C., & Raghava, S. P. S. (2003). Exploitation of heterosis for carotenoid content in African marigold (*Tagetes erecta L.*) and its correlation with esterase polymorphism. *Theoretical and Applied Geneics*, 106, 771-776.
- Srinivasan, K. K., & Sankara Subramanian, S. (1980). Chemical Investigation of *Emilia sonchifolia*. *Fitoterapia*, 5, 241-243.
- Staba, E. J., Nygaard, B. G., & Zito, S. W. (1984). Light effects on pyrethrum shoot cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 3, 211-214.
- Stanberry, L. R., Bernstein, D. I., & Myers, M. G. (1986). Evaluation of the herpes simplex virus antiviral activity of pyrethrins. *Antiviral research*, 6, 95-102.
- Stankov, S. S. (Ed.). (1951). *Wild-growing useful plants of the USSR*. Moscow: Sovetskaya Nauka.
- Street, D. A., Comstock, G. W., Salkeld, R. M., Schuep, W., & Klag, M. J. (1994). Serum antioxidants and myocardial infarction. Are low levels of carotenoids and beta-tocopherol riskfactors for myocardial infarction? *Circulation*, 90, 1154-1161.
- Strong, M., & Johnstone, P. (2009). Interventions for treating scabies (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2009(1), 1-54.
- Su, M., Wu, X., Chung, H. Y., Li, Y., & Ye, W. (2009). Antiproliferative activities of five Chinese medical herbs and active compounds in *Elephantopus scaber*. *Natural Product Communications*, 4(8), 1025-1030.
- Sun, H.-X., & Wang, H. (2006). Immunosuppressive activity of the ethanol extract of *Siegesbeckia orientalis* on the immune responses to ovalbumin in mice. *Chemistry and Biodiversity*, 3, 754-761.
- Swanston-Flatt, S. K., Flatt, P. R., Day, C., & Bailey, C. J. (1991). Traditional dietary adjuncts for the treatment of diabetes mellitus. *Proceedings of the Nutrition Society*, 50, 641-651.
- Talapatra, S. K., Pal, M. K., Mallik, A. K., & Talapatra, B. (1983). Structure and synthesis of (-)-anabellamide. A new phenylalanine derived ester amide from *Anaphalis subumbellata*: occurrence of 4'-hydroksydehydrokawain. *Journal of Natural Products*, 46, 140-143.
- Tandon, M., Shukla, Y. N., Tripathi, A. K., & Singh, S. C. (1998). Insect antifeedant from *Vernonia cinerea*. *Phytotherapy Researsch*, 12, 195-199.
- Tropicos.org. (2010a). *Siegesbeckia orientalis L.* Retrieved 21.01.10, from Missouri Botanical Garden <http://www.tropicos.org/Name/2704061>
- . (2010b). *Blumea balsamifera L.* (DC). W3 TROPICOS Retrieved 19.02.10, from Missouri Botanical Garden - 4344 Shaw Boulevard - Saint Louis, Missouri 63110
<http://www.tropicos.org/Name/2701935>
- . (2010c). *Tagetes erecta L.* Retrieved 12.03.10, from Missouri Botanical Garden <http://www.tropicos.org/Name/2703314>
- . (2010d). *Grangea maderaspatana (L.) Poir.* Retrieved 27.02.10, from Missouri Botanical Garden <http://www.tropicos.org/ame/2700805>

- . (2010e). *Evolvulus alsinoides* (L.) L. Retrieved 10.02.10, from Missouri Botanical Garden <http://www.tropicos.org/Name/8500038>
- . (2010f). *Elephantopus scaber* L. Retrieved 08.01.10, from Missouri Botanical Garden <http://www.tropicos.org/Name/2700686>
- . (2010g). *Artemisia glauca* (Pall. ex Willd.). W3 TROPICOS Retrieved 26.02.10, from Missouri Botanical Garden <http://www.tropicos.org/Name/2700138>
- . (2010h). *Emilia sonchifolia* (L.) DC. Retrieved 15.01.10, from Missouri Botanical Garden <http://www.tropicos.org/Name/2702414>
- . (2010i). *Vernonia cinerea* (L.) Less. Retrieved 08.02.10, from Missouri Botanical Garden <http://www.tropicos.org/Name/2701536>
- . (2010j). *Chrysanthemum cinerariifolium* Vis. Retrieved 08.03.10, from Missouri Botanical Garden <http://www.tropicos.org/Name/2700546>
- Tsai, C.-C., & Lin, C.-C. (1999). Anti-inflammatory effects of Taiwan folk medicine "Teng-Khia-U" on carrageenan- and adjuvant-induced paw edema in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 85-89.
- Tsao, R., Yang, R., Young, J. C., Zhu, H., & Manolis, T. (2004). Separation of geometric isomers of native lutein diesters in marigold (*Tagetes erecta* L.) by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1045, 65-70.
- Tsao, R., Li, L., & Liu, C. (Eds.). (2007). *Marigold (Tagetes erecta L.) as a source of nutraceuticals, functional foods, and natural health products*. Kerala, India: Research Signpost 37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023.
- Tun, U. K., & U.P., T. (2006). Myanmar medicinal Plant Database Alphabetical Index by Scientific (Botanical) names. Retrieved 30.03.10. <http://www.tuninst.net/MyanMedPlants/TIL/gen-indx.htm#Some-Contro-Points>
- Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M., & Webb, D. A. (Eds.). (1976). *Flora Europaea, Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae)* (Vol. 4). Cambridge: Cambridge University Press.
- Tyssandier, V., Lyan, B., & Borel, P. (2001). Main factors governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1553, 185-292.
- Unesco. (1998). *Elephantopus scaber Plant Resources of South-East Asia, No 12 (2)*: Unesco
- USSR Flora (Ed.). (1961). *Flora of the USSR (på russisk)*. Moscow: Academy of Sciences of the USSR Press.
- Verma, V. H. K., & Singh, B. (2002). Isolation and quantitative analysis of thiophenes from *Tagetes* species by HPLC. *Journal of the Indian Chemical Society*, 79, 546-547.
- Vienne, M., Braemer, R., Paris, M., & Couderc, H. (1989). Chemotaxonomic study of two cultivars of *Artemisia dracuncululus* L.: ("French" and "Russian" Tarragon). *Biochemical Systematics and Ecology*, 17(5), 373-374.

- Wang, F., Cheng, X.-L., Li, Y.-J., Shi, S., & Liu, J.-K. (2009). Ent-pimarane diterpenoids from *Siegesbeckia orientalis* and structure revision of a related compound. *Journal of Natural Products*, 72, 2005-2008.
- Wang, L.-L., & Hu, L.-H. (2006). Chemical constituents of *Siegesbeckia orientalis* L. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(8), 991-995.
- Wang, L., Jian, S., Nan, P., & Zhong, Y. (2004). Chemical Composition of the Essential Oil of *Elephantopus scaber* from Southern China. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59(5-6), 327-329.
- Wang, L., Jian, S., & Nan, P. (2005). Chemotypical variability of leaf oils in *Elephantopus scaber* from 12 locations in China. *Chemistry of Natural Compounds*, 41(5), 491-493.
- Wang, M., Tsao, R., Zhang, S., Dong, Yang, R., Gong, J., & Pe, i. Y. (2006). Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1522-1529.
- Wang, Z. Q., Ribnicky, D., Zhang, X. H., Raskin, I., Yu, Y., & Cefalu, W. T. (2008). Bioactives of *Artemisia dracuncululus* L enhance cellular insulin signaling in primary human skeletal muscle culture. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 57((Suppl 1)), S58-S64.
- Ware, C. F. (2000). APRIL and BAFF connect autoimmunity and cancer. *Journal of Experimental Medicine*, 192, F35-F38.
- Watanabe, J., Shinmoto, H., & Tsushida, T. (2005). Coumarin and flavone derivatives from estragon and thyme as inhibitors of chemical mediator release from RBL-2H3 Cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(1), 1-6.
- Werker, E., Putievsky, E., Ravid, U., Dudai, N., & Katzir, I. (1994). Glandular hairs, secretory cavities, and the essential oil in leaves of tarragon (*Artemisia dracuncululus* L.). *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 2(3).
- Wright, A. J., Hughes, D. A., Bailey, A. L., & Southon, S. (1999). Beta-carotene and lycopene, but not lutein, supplementation changes the plasma fatty acid profile of healthy male non-smokers. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 134, 592-598.
- Wursten, B. (2004). *Evolvulus alsinoides*. In F. o. Zimbabwe (Ed.).
- Xiang, Y., Zhang, H., Fan, C.-Q., & Yue, J.-M. (2004). Novel diterpenoids and diterpenoid glycosides from *Siegesbeckia orientalis*. *Journal of Natural Products*, 67, 1517-1521.
- Xiang, Y., Fan, C.-Q., & Yue, J.-M. (2005). Novel sesquiterpenoids from *Siegesbeckia orientalis*. *Helvetica Chimica Acta*, 88, 160-170.
- Xiong, J., Ma, Y., & Xu, Y. (1997). The constituents of *Siegesbeckia orientalis*. *Natural Product Sciences*, 3(1), 14-18.
- Xu, G., Liang, Q., Gong, Z., Yu, W., He, S., & Xi, L. (2006). Antitumor activities of the four sesquiterpene lactones from *Elephantopus scaber*. *Experimental Oncology*, 28, 106-109.
- Yakovlev, G. P., & Blinova, K. F. (Eds.). (1999). *Encyclopedic dictionary of medicinal plants and products of animal origin (på russisk)*. St.Petersburg: SpetsLit.

- Yamamoto, M., Ogawa, K., Morita, M., Fukuda, K., & Komatsu, Y. (1996). The herbal medicine Inchin-ko-to Inhibits Liver Cell Apoptosis Induced by Transforming Growth Factor B1. *Hepatology*, 23(3), 552-559.
- Yang, T.-H., Liu, S.-C., Chang, S.-S., Hsiao, C.-F., & Ku, N. H.-M. (1976). Studies on the constituents of *Siegesbeckia orientalis* L. *Proceedings of the National Science Council*, 9(2), 149-154.
- Zdero, C., Bohlmann, F., King, R. M., & Robinson, H. (1991). Sesquiterpene lactones and other constituents from *Siegesbeckia orientalis* and *Guizotia scabra*. *Phytochemistry*, 30(5), 1579-1584.
- Zechmeister, L., & Sease, J. W. (1974). A blue fluorescing compound, terthienyl isolated from marigolds. *Journal of the American Chemical Society*, 69, 273-275.
- Zelenhoz. (2002). *Tagetes erecta* Index of /n/3: Zelenhoz.com.
- Zhu, H.-X., Tang, Y.-P., Pan, L.-M., & Min, Z.-D. (2008). Studies on bioactive constituents of whole herbs of *vernonis cinerea*. *Zhong guo zhong yao za zhi*, 16, 1986-1988.
- Zito, S. W., & Tio, C. D. (1990). Constituents of *Chrysanthemum cinerariaefolium* in leaves, regenerated plantlets and callus. *Phytochemistry*, 29(8), 2533-2534.