

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**Απομόνωση και ταυτοποίηση βιοδραστικών
μεταβολιτών από το μαλακό κοράλλι
*Pseudopterogorgia rigida***

Παναγιώτα Γεωργαντέα

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2011

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**Βασίλειος Ρούσσης**

Καθηγητής Φαρμακευτικού Τμήματος Πανεπιστημίου Αθηνών - Επιβλέπων

Όλγα Τζάκου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακευτικού Τμήματος Πανεπιστημίου Αθηνών

Μαρία Ζερβού

Ερευνήτρια Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**Γεώργιος Βερροιόπουλος**

Καθηγητής Βιολογικού Τμήματος Πανεπιστημίου Αθηνών

Ευγένιος Κοκκάλου

Καθηγητής Φαρμακευτικού Τμήματος Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Βασίλειος Ρούσσης

Καθηγητής Φαρμακευτικού Τμήματος Πανεπιστημίου Αθηνών

Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης

Καθηγητής Φαρμακευτικού Τμήματος Πανεπιστημίου Αθηνών

Μαρία Κουλάδη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακευτικού Τμήματος Πανεπιστημίου Αθηνών

Όλγα Τζάκου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακευτικού Τμήματος Πανεπιστημίου Αθηνών

Μαρία Ζερβού

Ερευνήτρια Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να απευθύνω ένα θερμό ευχαριστώ σε όσους βοήθησαν, με κάθε τρόπο, να ολοκληρωθεί η διδακτορική μου διατριβή.

Με τεράστια συγκίνηση για έναν κύκλο που έκλεισε, ευχαριστώ τους Καθηγητές μου Βασίλειο Ρούσση και Κωνσταντίνο Βάγια για την άμεση επίβλεψη, τη μετάδοση των γνώσεών τους και την καθοδήγηση τους, καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου και κυρίως για την ακριβή συμπαράστασή τους και την αξέχαστη φιλία τους.

Ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τζάκου Όλγα, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαρία Κουλάδη και την ερευνήτρια Δρ. Μαρία Ζερβού για την προθυμία τους, τη διάθεσή τους να με βοηθήσουν οποιαδήποτε στιγμή και τη θερμή τους παρουσία.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, για τον πολύτιμο τους χρόνο που αφιέρωσαν στην αξιολόγηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Μέσα από την καρδιά μου, ευχαριστώ τη φίλη μου Λέκτορα Ευσταθία Ιωάννου για όλα τα χρόνια ενηλικίωσης, που πέρασαν από πάνω μας, και τη βοήθειά της σε επιστημονικό επίπεδο.

Επίσης, ευχαριστώ τους φίλους στο Εργαστήριο Δρ. Βαγγέλη Σμυρνωτόπουλο, Δρ. Διονύσιο Αμπάτη, Δρ. Ιωάννα Κοντιζά, Δρ. Μαρία Κλάδη και Δημήτριο Ντουντανιώτη, για τη βοήθεια που μου προσέφεραν και τις όμορφες μέρες που περάσαμε μαζί.

Ευχαριστώ,

τον Καθηγητή του Βιολογικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Αθηνών Βερροϊόπουλο Γεώργιο και την Καθηγήτρια Claire Hellio (University of Portsmouth, UK), για την αξιολόγηση της αντιβιοεπιστρωτικής δράσης ορισμένου αριθμού μεταβολιτών,

τον Καθηγητή Χρήστο Ρουσάκη (ISOMer, Laboratoire de Pharmacogénomique Marine, Nantes, France) και τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Dimitri Moreau, για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης αριθμού μεταβολιτών,

τον Dr. Antonio Quesada (University of Jaén, Spain), για την κρυσταλλογραφική ανάλυση με ακτίνες X σε έναν μεταβολίτη,

τον Καθηγητή Dale Nagle (University of Mississippi, USA), για την αξιολόγηση της επίδρασης ορισμένου αριθμού μεταβολιτών στην ενεργοποίηση του παράγοντα HIF-1 σε καρκινικά κύτταρα,

τον Dr. Ελευθέριο Μυλωνάκη και τον Dr. Γεώργιο Τέγο (Massachusetts General Hospital, Harvard University, USA), για την αξιολόγηση της αντιμηκυτιασικής δράσης αριθμού μεταβολιτών,

την ερευνήτρια Ελένη Σιάπη του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, για τη λήψη

φασμάτων μάζας υψηλής ευκρίνειας και την ερευνήτρια Δρ. Μαρία Ζερβού για την λήψη ορισμένων φασμάτων NMR.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη Δ.Ε.Π. και τους φίλους-συναδέλφους μεταπτυχιακούς φοιτητές του Τομέα Φαρμακογνωσίας για τη συνεργασία και τη χαρά πάνω στα πρόσωπά τους.

Τέλος, πέρα και πάνω από όλους, ευχαριστώ τους φίλους και την οικογένεια μου, που ορίζουν αυτό που είμαι και αυτά που αγαπώ.

Γιώτα Γεωργαντέα

Αθήνα, 2011

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη των θαλάσσιων οργανισμών ως πηγή βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί μία σύγχρονη προέκταση της χημείας φυσικών προϊόντων. Οι κύριοι στόχοι του ερευνητικού αυτού κλάδου είναι η ανακάλυψη (απομόνωση και δομικός χαρακτηρισμός) νέων χημικών ενώσεων που προέρχονται από θαλάσσιους οργανισμούς, η αξιολόγηση των πιθανών βιολογικών ιδιοτήτων τους και η αξιοποίηση τους σε σύγχρονους χώρους εφαρμογής. Η πραγματοποίηση των παραπάνω, συνήθως υποβοηθείται και συνοδεύεται από τη μελέτη και αποσαφήνιση του οικολογικού ρόλου των μεταβολιτών.

Το αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής εντάσσεται στην επιστημονική περιοχή των θαλάσσιων φυσικών προϊόντων με στόχο την απομόνωση και την αξιολόγηση της φαρμακολογικής τους δράσης.

Τα οργανικά εκχυλίσματα από το κοράλλι *Pseudopterogorgia rigida*, που συλλέχθηκε στη Θάλασσα της Καραϊβικής, επεξεργάστηκαν με τεχνικές υγρής χρωματογραφίας, κυρίως υψηλής πίεσης, και απέδωσαν συνολικά πενήντα έξι (**1-56**) δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν δομικά μετά από φασματοσκοπική ανάλυση.

Από τους πενήντα έξι μεταβολίτες, οι σαράντα επτά ανήκουν στην κατηγορία των σεσκιτερπενίων, οι τρεις στην κατηγορία των διμερών σεσκιτερπενίων, δύο ανήκουν στην κατηγορία των μονοτερπενίων, ένας είναι στεροειδικής δομής, δύο ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεοζιτών και ένας στην κατηγορία των σεσκιτερπενικών γλυκοζιτών. Τα είκοσι πέντε από τα σαράντα επτά σεσκιτερπένια αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα, εκ των οποίων τα δέκα οκτώ ανήκουν στην κατηγορία των μπισαμπολανίων (**9, 10, 12, 17-22, 28, 31-36** και **49**), επτά ανήκουν στην κατηγορία των καδινανίων (**37-43**) και ένα έχει σκελετό τσαμιγκρανίου (**18**). Νέα φυσικά προϊόντα αποτελούν, επίσης, τα τρία σεσκιτερπενικά διμερή (**50-52**) και ο σεσκιτερπενικός γλυκοζίτης (**56**).

Για μία ουσία επιβεβαιώθηκε η προτεινόμενη χημική δομή με κρυσταλλογραφική ανάλυση με ακτίνες Χ (**26**), ενώ αποδόθηκαν πλήρως τα φασματοσκοπικά δεδομένα για τέσσερις ουσίες που στο παρελθόν είχαν αναφερθεί ως ημισυνθετικές (**4, 6, 7** και **11**).

Μέχρι στιγμής έχει διενεργηθεί έλεγχος σε 8 μεταβολίτες ως προς την κυτταροτοξική τους δράση σε καρκινικά κύτταρα των σειρών NSCLC-N6-L16, NCTC-2544 και A549, τα αποτελέσματα των οποίων έδειξαν ότι 4 από αυτούς παρουσίασαν ιδιαίτερα επίπεδα δραστηριότητας (μεταβολίτες **16, 18, 26** και **34**).

Παράλληλα, έχει ολοκληρωθεί ο έλεγχος ως προς την παρεμπόδιση της βιοεπίστρωσης υποθαλάσσιων επιφανειών (antifouling), για 4 μεταβολίτες, επί μικροοργανισμών και μακροοργανισμών που εμπλέκονται στη βιοεπίστρωση, εκ των

οποίων οι 3 (μεταβολίτες **8**, **16** και **26**) έδειξαν σημαντικά αποτελέσματα.

Οι μεταβολίτες **8**, **16**, **24** και **26** ελέγχθηκαν, επίσης, για την πιθανή αντιμυκητιασική τους δράση έναντι του παθογόνου μύκητα *Candida albicans*, με δραστικότερο όλων τον μεταβολίτη **8**.

Διενεργήθηκε έλεγχος της επίδρασης ορισμένων δευτερογενών μεταβολιτών (**8**, **13**, **26** και **47**) στην ενεργοποίηση του παράγοντα HIF-1, με τον μεταβολίτη **26** να υποδεικνύει σημαντικά ποσοστά αναστολής.

ABSTRACT

The study of marine organisms as a source of bioactive secondary metabolites is a modern extension of natural products chemistry. The main target of this field is the discovery (isolation and structure elucidation) of new compounds that are biosynthesized by marine organisms, the evaluation of their potential biological properties and their exploitation in scientific and industrial applications. The realization of the above is usually assisted by the study and elucidation of the ecological roles of the secondary metabolites in the natural ecosystem of the organisms.

The subject of the present PhD thesis is within the framework of marine natural products field, aiming at the isolation of new bioactive metabolites and the evaluation of their pharmacological activities.

Knowing the impressive number and the structural variety of the secondary metabolites produced by soft corals of the genus *Pseudopterogorgia*, a thorough investigation of the organic extracts of *P. rigida* was undertaken.

The extracts of the tropical coral *P. rigida*, collected in Caribbean Sea, were subjected to a series of chromatographic separations, mainly High Pressure Liquid Chromatography, to afford 56 secondary metabolites that were characterized on the basis of their spectral data.

Among these metabolites, 47 are sesquiterpenes, 3 are sesquiterpenoid dimers, 2 are monoterpenes, 1 is a steroid, 2 are nucleosides and 1 is sesquiterpenoid glycoside. 25 out of 47 sesquiterpenes are new natural products: 18 feature the bisabolane skeleton (**9**, **10**, **12**, **17–22**, **28**, **31–36** και **49**), 7 belong in the class of cadinanes (**37–43**) and 1 has a chamigrane skeleton (**18**). Furthermore, the 3 sesquiterpenoid dimers (**50–52**) and the sesquiterpenoid glycoside (**56**) are new natural products.

The X-ray crystallographic analysis of metabolite **26** was undertaken in order to decipher the disputed nature of the quinone ring of this molecule, whereas the spectroscopic data of metabolites **4**, **6**, **7** and **11**, previously reported as semisynthetic products, were fully assigned.

Currently, the cytotoxic activity of 8 metabolites against the A-549, NCTC-2544 and NSCLC-N6-L16 cancer cell lines has been evaluated. The results showed that metabolites **16**, **18**, **26** and **34** exhibited considerable cytotoxic activity.

Furthermore, the antifouling activity of 4 isolated metabolites against microorganisms and macroorganisms has been tested and 1 of them (**8**) has shown noteworthy preliminary results.

Metabolites **8**, **16**, **24** and **26** were tested for their potential activity against *Candida albicans*. Metabolite **8** showed the highest activity.

Compound **26** inhibited hypoxia-induced HIF-1 activation and viability of the human breast tumor T47D cells at concentration of 10.0 μ M.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	v
ABSTRACT	vii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ix
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	xiii

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
---	----------

1.1 Από πού προήλθε η γνώση των ανθρώπων για τις φαρμακευτικές ιδιότητες χημικών ενώσεων φυτών και ζώων	3
1.2 Θάλασσα. Η σημαντική πηγή βιολογικά δραστικών συστατικών	7
1.3 Παραδείγματα βιολογικά δραστικών συστατικών που απομονώθηκαν από κοράλλια	10
1.4 Χημική Οικολογία	12
1.5 Χημική Προστασία. Τρία παραδείγματα στην περίπτωση των κοραλλιών	13
1.6 Τι είναι τα Κοράλλια	14
1.7 Κοραλλιογενείς ύφαλοι (Coral Reefs)	14
1.8 Οι κοραλλιογενείς ύφαλοι υποφέρουν από την αύξηση της θερμοκρασίας του πλανήτη	15
1.9 Κοράλλια στις Ελληνικές θάλασσες	16

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
--	-----------

2.1 Φυλογένεση Κνιδοζώων	21
2.2 Διαγνωστικά και ειδικά χαρακτηριστικά των Κνιδοζώων	24
2.3 Κυτταρική συγκρότηση των Κνιδοζώων	26
2.3.1 Κύτταρα επιδερμίδας	26
2.3.2 Κύτταρα γαστροδερμίδας	28
2.4 Ανοσολογία των Κνιδοζώων	29
2.5 Ταξινόμηση των Κνιδοζώων	30
2.5.1 Ομοταξία Υδρόζωα	31
2.5.2 Ομοταξία Σκυφόζωα	32
2.5.3 Ομοταξία Ανθόζωα	33
2.5.3.1 Υφομοταξία Οκτωκοράλλια (Soft Corals)	33
2.5.3.2 Υφομοταξία Εξακοράλλια (Zoantharia)	36
2.6 Ερευνητικός προσανατολισμός	39
2.7 Χημικά συστατικά Οκτωκοραλλίων των τάξεων <i>Alcyonacea</i> και	40

<i>Gorgonacea</i>	
2.8 Ταξινομικά στοιχεία του υπό μελέτη είδους	46
2.9 Χημικά συστατικά συγγενικών ειδών της <i>Pseudopterogorgia rigida</i>	46
2.9.1 <i>Pseudopterogorgia acerosa</i>	46
2.9.2 <i>Pseudopterogorgia americana</i>	48
2.9.3 <i>Pseudopterogorgia bipinnata</i>	50
2.9.4 <i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>	54
2.9.5 <i>Pseudopterogorgia kallos</i>	60
2.10 Χημικά συστατικά του είδους <i>Pseudopterogorgia rigida</i>	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	65
3.1 Οργανολογία	67
3.2 Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια	69
3.3 Συλλογή του οργανισμού και αρχική επεξεργασία	70
3.4 Διαχωρισμοί και Απομονώσεις Μεταβολιτών	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	101
4.1 Ανάλυση της χημικής σύστασης του κλάσματος A ₁ του κοραλλιού με αέριο χρωματογραφία-φασματομετρία	103
4.2 Απόδοση της δομής των μεταβολιτών από το κοράλλι <i>Pseudopterogorgia rigida</i>	105
4.2.1 Μεταβολίτης 1 (-)-σ-κουρκουμένιο	105
4.2.2 Μεταβολίτης 2 (7R,9S)-(-)-μπισακουμόλη	108
4.2.3 Μεταβολίτης 3 (7R,9R)-(-)-μπισακουμόλη	112
4.2.4 Μεταβολίτης 4 Νέο Φυσικό Προϊόν	115
4.2.5 Μεταβολίτης 5	119
4.2.6 Μεταβολίτης 6	123
4.2.7 Μεταβολίτης 7	127
4.2.8 Μεταβολίτης 8 (-)-κουρκουφαινόλη	131
4.2.9 Μεταβολίτης 9 Νέο Φυσικό Προϊόν	134
4.2.10 Μεταβολίτης 10 Νέο Φυσικό Προϊόν	138
4.2.11 Μεταβολίτης 11	142
4.2.12 Μεταβολίτης 12 Νέο Φυσικό Προϊόν	146
4.2.13 Μεταβολίτες 13 και 14 αμπολένιο	150
4.2.14 Μεταβολίτης 15	156
4.2.15 Μεταβολίτης 16 (-)-κουρκουϋδροκινόνη	160
4.2.16 Μεταβολίτης 17 Νέο Φυσικό Προϊόν	163

4.2.17 Μεταβολίτες 18 και 19 <i>Νέα Φυσικά Προϊόντα</i>	168
4.2.18 Μεταβολίτης 20 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	175
4.2.19 Μεταβολίτης 21 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	180
4.2.20 Μεταβολίτης 22 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	185
4.2.21 Μεταβολίτης 23 ηλιαννουόλη Η	190
4.2.22 Μεταβολίτης 24 (-)-κουρκουκινόνη	196
4.2.23 Μεταβολίτης 25	199
4.2.24 Μεταβολίτης 26 περεζόνη	203
4.2.25 Μεταβολίτης 27 άλας της περεζόνης	211
4.2.26 Μεταβολίτης 28 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	215
4.2.27 Μεταβολίτης 29 υδροξυπερεζόνη	220
4.2.28 Μεταβολίτης 30 μεθοξυπερεζόνη	223
4.2.29 Μεταβολίτης 31 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	228
4.2.30 Μεταβολίτης 32 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	234
4.2.31 Μεταβολίτης 33 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	236
4.2.32 Μεταβολίτης 34 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	240
4.2.33 Μεταβολίτης 35 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	245
4.2.34 Μεταβολίτης 36 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	251
4.2.35 Μεταβολίτης 37 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	255
4.2.36 Μεταβολίτης 38 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	260
4.2.37 Μεταβολίτης 39 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	266
4.2.38 Μεταβολίτης 40 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	271
4.2.39 Μεταβολίτης 41 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	277
4.2.40 Μεταβολίτης 42 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	282
4.2.41 Μεταβολίτης 43 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	289
4.2.42 Μεταβολίτης 44 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	294
4.2.43 Μεταβολίτες 45 και 46 λολιολίδιο	299
4.2.44 Μεταβολίτης 47 α-πιπιτζόλη	305
4.2.45 Μεταβολίτης 48 β-πιπιτζόλη	310
4.2.46 Μεταβολίτης 49 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	314
4.2.47 Μεταβολίτες 50 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	320
4.2.48 Μεταβολίτης 51 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	327
4.2.49 Μεταβολίτης 52 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	336
4.2.50 Μεταβολίτης 53 χοληστερόλη	340
4.2.51 Μεταβολίτης 54 θυμιδίνη	342
4.2.52 Μεταβολίτης 55 2'-δεοξυ-ουριδίνη	346
4.2.53 Μεταβολίτης 56 <i>Νέο Φυσικό Προϊόν</i>	350
4.3 Αξιολόγηση βιολογικής δράσης απομονωθέντων προϊόντων	355
4.3.1 Έλεγχος κυτταροτοξικής δράσης	355

4.3.2 Έλεγχος δράσης κατά της βιοεπίστρωσης (biofouling)	357
4.3.2.1 Αναστολή ανάπτυξης μικροοργανισμών που εμπλέκονται στη βιοεπίστρωση	359
4.3.2.2 Αναστολή ανάπτυξης μακροοργανισμών που εμπλέκονται στη βιοεπίστρωση	360
4.3.3 Έλεγχος αντιμυκητιασικής δράσης	362
4.3.4 Έλεγχος επίδρασης στην ενεργοποίηση του παράγοντα HIF-1 (Hypoxia Inducing Factor-1) σε καρκινικά κύτταρα	364
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	367
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	377

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

1D-NMR	πείραμα NMR μίας διάστασης
2D-NMR	πείραμα NMR δύο διαστάσεων
¹H NMR	1D-NMR πείραμα πυρήνων υδρογόνου (πρωτονίου)
¹³C NMR	1D-NMR πείραμα πυρήνων άνθρακα, με ευρεία ετεροπυρηνική αποσύζευξη (proton-noise decoupled)
[α]_D	ειδική στροφική ικανότητα
Ac	ακετύλιο
br	broad, ευρεία (NMR)
C₆D₆	δευτεριωμένο βενζόλιο
CDCl₃	δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
CH₂Cl₂	διχλωρομεθάνιο
CHCl₃	χλωροφόρμιο
COSY	2D-NMR πείραμα ομοπυρηνικού συσχετισμού ¹ H- ¹ H για ² J και ³ J (Correlated Spectroscopy)
δ	χημική μετατόπιση της απορρόφησης ενός πυρήνα σε σχέση με το τετραμεθυλοσιλάνιο (σε ppm) (NMR)
d	doublet, διπλή (NMR)
DEPT-135	1D-NMR πείραμα πυρήνων άνθρακα, κατά το οποίο οι κορυφές των πρωτοταγών και τριτοταγών ανθράκων δίνουν θετικό σήμα, οι κορυφές των δευτεροταγών δίνουν αρνητικό σήμα, ενώ οι τεταρτοταγείς δεν δίνουν καθόλου σήμα (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
EIMS	φασματομετρία μάζας με μέθοδο ιονισμού τον βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (Electron Impact Mass Spectrometry)
EtOAc	οξικός αιθυλεστέρας
FABMS	φασματομετρία μάζας με μέθοδο ιονισμού τον βομβαρδισμό με ταχέως κινούμενα άτομα (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry)
cHex	κυκλοεξάνιο
n-Hex	κανονικό εξάνιο
HMBC	2D-NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού ¹ H- ¹³ C για ² J και ³ J (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation)
HMQC	2D-NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού ¹ H- ¹³ C για ¹ J (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)
HPLC	υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography)
HRMS	φασματομετρία μάζας υψηλής ευκρίνειας (High Resolution Mass Spectrometry)
HSQC	2D-NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού ¹ H- ¹³ C για ¹ J (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
GC	αέριος χρωματογραφία (Gas Chromatography)
GC-MS	αέριος χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

IC₅₀	η συγκέντρωση του μεταβολίτη που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής αύξησης κατά 50%
IR	φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας (I nfrared R adiation)
J	σταθερά σύζευξης (σε Hz) (NMR)
m	multiplet, πολλαπλή (NMR)
Me	μεθύλιο
MeOH	μεθανόλη
MeOH-d₄	δευτεριωμένη μεθανόλη
MIC	ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής της βακτηριακής ανάπτυξης (M inimum I nhibitory C oncentration)
MS	φασματομετρία μάζας (M ass S pectrometry)
m/z	λόγος μάζας προς φορτίο
NMR	φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (N uclear M agnetic R esonance)
NOE, nOe	N uclear O verhauser E ffect
NOESY	2D-NMR πείραμα ομοπυρηνικού συσχετισμού ¹ H- ¹ H στο χώρο (N uclear O verhauser E ffect S pectroscopy)
PCIMS	φασματομετρία μάζας με μέθοδο ιονισμού τον θετικό χημικό ιονισμό (C hemical I onization M ass S pectrometry in positive mode)
i-Prop	ισοπροπανόλη (2-προπανόλη)
RI	δείκτης διάθλασης (R efractive I ndex)
q	quaternary, τετραπλή (NMR)
s	singlet, απλή (NMR)
t	triplet, τριπλή (NMR)
TLC	χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (T hin L ayer C hromatography)
t_R	χρόνος ανάσχεσης (retention time)
UV	φασματοσκοπία υπεριώδους ακτινοβολίας (U ltra V iolet)
VCC	V acuum L iquid C hromatography

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Από πού προήλθε η γνώση των ανθρώπων για τις φαρμακευτικές ιδιότητες των χημικών ενώσεων φυτών και ζώων;



«Δεν υπάρχει καμιά ασθένεια, όσο φοβερή και να είναι, για την οποία να μην έχει προβλέψει ο Δημιουργός την αντίστοιχη θεραπεία στο φυτικό κόσμο.»

Παράκελσος

Μία μέρα εντοπίστηκε μία επιστολή που είχε αποσταλεί το 1538 από το δόκτορα Ortiz, αξιωματούχο και αρχίατρο του Οίκου και της Αυλής του αυτοκράτορα Κάρολου του 5^{ου}, στον δόκτορα Avila de Lobera. Ρωτούσε τον δόκτορα Ortiz από πού προήλθε η γνώση των ανθρώπων ότι ορισμένες ασθένειες θεραπεύονταν με συγκεκριμένα γιατρικά και πώς ανακάλυψαν τις ιδιότητες των βοτάνων.

«Αυτή είναι η απάντησή μου για την παρέμβαση των φαρμάκων και για άλλα ζητήματα. Σ' ένα βαθμό οφείλεται στους ανθρώπους, σ' ένα βαθμό στα ζώα, σ' ένα βαθμό στα πτηνά και σε ένα βαθμό στους δαίμονες, οι οποίοι για να ξεγελάσουν τους ευγενείς ανακάλυψαν, μέσα από μεγάλα όνειρα, σημαντικά φάρμακα: όπως το φάρμακο του Άραβα ιατρού Avenzoar, το ροδόνερο για τα μάτια, στο κεφάλαιο 4 του έργου του Τειΐζιρ ή Θεϊζιρ και το γαληνικό σκεύασμα του Έλληνα ιατρού Γαληνού, στην ιεραποστολή Saguinis, για την αιμορραγία της αρτηρίας του χεριού.

Με τέσσερις τρόπους αποκτώνται γνώσεις: Ο πρώτος είναι αυτός που αποκαλείται «τυχαίο συμβάν», όπως στην περίπτωση που πονάει το πίσω μέρος του κεφαλιού (πιθανόν λόγω κάποιας πτώσης), σπάει η φλέβα του μετώπου και ο πόνος περνάει καθώς το αίμα βγαίνει από την πληγή. Ο δεύτερος είναι το «φυσικό συμβάν», όπως στην περίπτωση που λόγω ενός μεγάλου πυρετού ανοίγει η μύτη και με το αίμα που τρέχει πέφτει ο πυρετός. Ο τρίτος είναι η περίπτωση που κάποιος πληγωμένος, ψάχνοντας κάτι για να γιατρευτεί, σκεπάζει την πληγή με κάποιο βότανο και θεραπεύεται. Ο τέταρτος είναι γνώση μιμήσεως. Γενικά, όλα οφείλονται στους ανθρώπους, γιατί με τη σωφροσύνη που τους διακρίνει παρατηρούσαν όσα συνέβαιναν στους άλλους ανθρώπους και μέσα από διάφορα γεγονότα κατάφεραν να αποκτήσουν γνώση της πολλαπλότητάς τους. Αυτά τα γεγονότα ή εμπειρίες ήταν πολλά και τα βίωναν οι άνθρωποι σε όλα τα μέρη. Καθώς ήταν σημαντικά και γοήτευαν τις καρδιές των ανθρώπων, τα διηγούνταν οι μεν στους δε. Οφείλουμε πολλά σε όλους τους δημιουργούς της ιατρικής, γιατί μας έχουν διασαφηνίσει τις γνώσεις που υπάρχουν γύρω από αυτά και άλλα πολλά ζητήματα, η γνώση των

οποίων δε θα είχε γίνει δυνατή αν δεν υπήρχε η πείρα πολλών αιώνων. Επίσης, δεν θα ξέραμε ότι τα δηλητήρια σκοτώνουν αν δεν είχαμε την εμπειρία να δούμε άλλους να πεθαίνουν. Γενικά, στους ανθρώπους οφείλονται όλα όσα έχουν επιτευχθεί είτε με την εμπειρία είτε με τη λογική.

Στα ζώα οφείλεται μεγάλο μέρος των γνώσεων όπως αυτή της δίαιτας. Βλέπουμε ότι κανένα ζώο, όταν πάσχει από κάποια σοβαρή αρρώστια, δεν τρώει μέχρι να καλυτερέψει. Βλέπουμε ότι αν ένας σκύλος είναι σοβαρά πληγωμένος, κλείνεται στον εαυτό του και για τρεις μέρες δεν τρώει ακόμα και αν υπάρχει φαγητό κοντά του. Τα σχετικά με την αιμορραγία τα «ανακάλυψε» ο ιπποπόταμος ο οποίος ζώντας κοντά στο Νείλο, όταν έπασχε από κάποια αρρώστια, πήγαινε σε καλαμιές που τις είχαν κόψει πρόσφατα και τρυπούσε κάποια φλέβα του με αυτή που του φαινόταν πιο κατάλληλη. Κατ' αυτόν τον τρόπο αιμορραγούσε και έδωσε παράδειγμα στους ανθρώπους να μειώνουν το αίμα. Έτσι, απ' ότι φαίνεται, αυτή η τέχνη ήρθε από την Αίγυπτο. Ό,τι αφορά στους εμετούς, μας το έδειξαν οι σκύλοι που τρώνε σταφύλια και χόρτα, για να τους προκαλέσουν. Οι κόμπρες μας έδειξαν ότι το μάραθο είναι καλό για τα μάτια γιατί όταν αλλάζει το δέρμα τους, δημιουργείται πρόβλημα στα μάτια τους οπότε τα καθαρίζουν τρίβοντάς τα πάνω σε μάραθο.

Επίσης, πολλά οφείλονται στα πτηνά. Το πτηνό Ίβις που μοιάζει με πελαργό μάς έδειξε το κλύσμα γιατί, όταν νιώθει δυσκοιλιότητα, παίρνει νερό από την θάλασσα και με το ράμφος του το τοποθετεί στον πρωκτό του και έτσι ανακουφίζεται. Τα χελιδόνια μας έμαθαν ότι το χελιδονόχορτο είναι καλό για τα μάτια θεραπεύοντας μ' αυτό τα παιδιά τους. Τις ιδιότητες της ρίγανης μας τις έδειξαν οι πελαργοί, οι οποίοι όταν είναι πληγωμένοι την βάζουν πάνω στην πληγή. Επίσης, έχει γραφτεί και λέγεται ότι ένας δράκος έδωσε στο νεκρό παιδί του ένα βότανο και αναστήθηκε. Σύμφωνα με τα όσα λέει ο Αρϋλεγο στην «Ιστορία των βοτάνων», στο κεφάλαιο 114, αυτό το βότανο είναι πικρό, με καρπό ράγα (αγγουράκι) και φύεται στα βουνά. Το βότανο που το ονόμασαν δίκταμο το έδειξαν στους ανθρώπους οι χοίροι, αν και ο Τυλίο λέει ότι τις ιδιότητές του τις έδειξαν πρώτα τα θηρία και τα κατσίκια.

Πολλές ακόμα ιδιότητες διαφόρων πραγμάτων μας δίδαξαν τα ζώα και τα πτηνά και θα μας δείξουν και στο μέλλον αν έχουμε την προνοητικότητα να εφαρμόσουμε αυτά που βλέπουμε να κάνουν εκείνα. Έτσι λοιπόν κύριε, πολλά οφείλουμε στους ανθρώπους, τα ζώα και τα πτηνά και πολύ περισσότερο στο Θεό που μας φανέρωσε τόσες ιδιότητες και μυστικά των πραγμάτων τα οποία καθημερινά μας αποκαλύπτουν καινούργιες, θαυμαστές ιδιότητές τους.»

Η παρατήρηση, λοιπόν, της φύσης υποδεικνύει τους οργανισμούς-παραγωγούς οργανικών ενώσεων, που λειτουργούν ευεργετικά για την αποκατάσταση της ομοιόστασης στο σώμα των οργανισμών-καταναλωτών.

Χιμπατζήδες – Γιατροί

Με στόχο την ανακάλυψη καινούργιων πεδίων στην ιατρική, επιστήμονες καταγράφουν και κατηγοριοποιούν τα φυτά που επιλέγουν να τραφούν οι χιμπατζήδες για να γιαιτρευτούν, όταν αρρωσταίνουν.

Είχαμε την περίπτωση μιας ανορεξικής θηλυκής, εντελώς εξαντλημένης, η οποία άρχισε να τρώει τον πικρό μίσχο *Vernonia amygdalina*. Έπειτα από δύο μέρες, η κατάστασή της άρχισε να βελτιώνεται θεαματικά. Ανακαλύφθηκαν λοιπόν, στο συγκεκριμένο φυτό δραστικές ουσίες με αντιπαρασιτική, αντϊοιδηματική δράση, ενισχυτικές του ανοσοποιητικού συστήματος. Προφανώς, οι πίθηκοι μπορούν να ξεχωρίσουν τα φυτά με θεραπευτικές ιδιότητες από άλλα, τοξικά φυτά.

Κατά την διάρκεια μίας αποστολής στο Κονγκό, επιστήμονες είχαν την ευκαιρία να δουν τους χιμπατζήδες να τρώνε τα άνθη του *Symphonia globulifera*, ενός δέντρου της οικογένειας *Clusiaceae*. Δείγμα από το συγκεκριμένο φυτό περιλαμβάνει γκουτιφερόνες, ουσίες που ανασχέουν την ανάπτυξη του ιού του AIDS. Σήμερα διεξάγονται έρευνες για τον εντοπισμό ασθενειών που προσπαθούν να θεραπεύσουν οι πίθηκοι τρώγοντας αυτό το φυτό. (Gilles Mermet – Γεωτρόπιο)

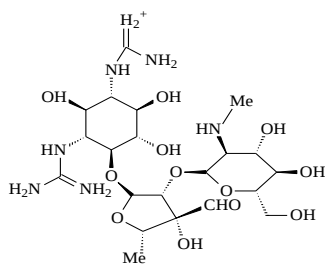
παυσίπονα με κατανάλωση περίπου 25 εκατομμύρια κιλά το χρόνο, προήλθε από μικρή συνθετική τροποποίηση φυσικού προϊόντος που βρίσκεται στο φλοιό της Ιτιάς).

Από τα 520 νέα φάρμακα, τα οποία εγκρίθηκαν μεταξύ 1983 και 1994 (Cragg, 1997), το 40% ήταν φυσικά προϊόντα ή προήλθαν από αυτά, ενώ το 60-80% των αντιβακτηριακών και αντικαρκινικών φαρμάκων προήλθαν από φυσικά προϊόντα (Εικόνα 1.1).

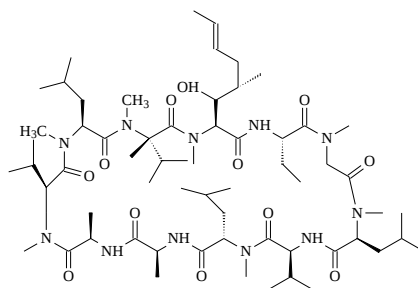
Η Ιατρική μέχρι τη δεκαετία του '50 ήταν συνυφασμένη με τα φυσικά προϊόντα. Από τότε και μέχρι τη δεκαετία του '70 επικράτησε στην παρασκευή των φαρμάκων η συνθετική χημεία. Ωστόσο σήμερα τα φυσικά προϊόντα έχουν αναγνωριστεί ως μια σημαντική πηγή αποτελεσματικών φαρμάκων.



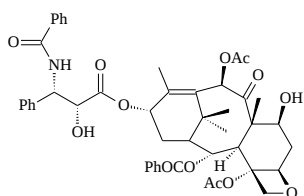
Τα φυτά έχουν προσφέρει τα περισσότερα από τα δραστικά συστατικά φαρμακευτικών προϊόντων, ενώ περίπου το 60% του παγκόσμιου πληθυσμού στηρίζεται σχεδόν εξ ολοκλήρου στα φυτά για τη φαρμακευτική του περίθαλψη (η ασπιρίνη, από τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα



Στρεπτομυκίνη
(αντιβιοτικό)



Κυκλοσπορίνη Α
(αντιβιοτικό)



Ταξόλη (αντικαρκινικός παράγοντας)



Taxus brevifolia

Εικ. 1.1 Παραδείγματα φυσικών προϊόντων-φαρμάκων. Χαρακτηριστική η ποικιλία στη δομή και τη δράση τους

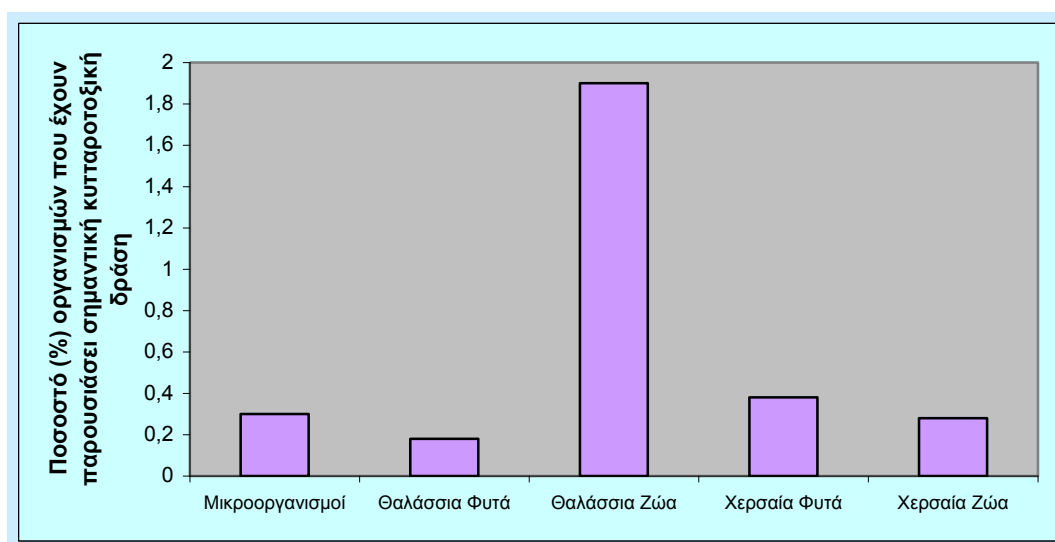
1.2 Θάλασσα. Η σημαντική πηγή βιολογικά δραστηκών συστατικών

Το υδάτινο περιβάλλον καλύπτει περισσότερο από το 70% της συνολικής επιφάνειας του πλανήτη γη. Αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 95% της βιόσφαιρας και συντηρεί, σύμφωνα με τις πιο συντηρητικές εκτιμήσεις, τουλάχιστον 200.000 μορφές ζωής.

Από τα 28 κύρια Φύλα του ζωικού βασιλείου, τα 26 απαντώνται και στον υδάτινο χώρο, ενώ τα 8 από αυτά είναι αποκλειστικά υδρόβια, γεγονός αναμενόμενο καθώς η ζωή πρωτοεμφανίστηκε στους προϊστορικούς ωκεανούς πριν από 3 δισεκατομμύρια χρόνια.

Συνεπώς, οι θαλάσσιοι οργανισμοί, που δεν εγκατέλειψαν ποτέ τον αρχικό τους βίοτοπο, είχαν στη διάθεσή τους περισσότερο χρόνο προσαρμογής και εξέλιξης και μάλιστα σε ένα πολύ πιο ομοιογενές και σταθερό περιβάλλον από αυτό της χέρσου.

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, 23 χιλιάδες συστατικά έχουν απομονωθεί από θαλάσσιους οργανισμούς. Εκατοντάδες από αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί σαν μόρια - οδηγοί για τη σύνθεση χημικών ενώσεων με θεραπευτικές ιδιότητες, ενώ άλλα αποτελούν αυτούσια συστατικά φαρμακευτικών σκευασμάτων ή είναι υποψήφια φάρμακα (Διάγραμμα 1.1) για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, καθώς βρίσκονται σε στάδια κλινικών μελετών (Πίνακες 1.1, 1.2).



Διάγραμμα 1.1 Ποσοστό (%) συμμετοχής οργανισμών στην απομόνωση κυτταροτοξικών ενώσεων, σύμφωνα με προκλινικές μελέτες του National Cancer Institute, USA (Munro, 1999)

Πίνακας 1.1 Στάδιο κλινικών ερευνών φυσικών προϊόντων που απομονώθηκαν από θαλάσσιους οργανισμούς (Fortman *et al*, 2005)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΦΥΣΙΚΗ ΠΗΓΗ	ΣΤΑΔΙΟ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ
EA-941	καρχαρίας	Φάση III
Βρυοστατίνη-1	Βακτήριο-συμβιώτης (<i>Endobugula setula</i>) της <i>Bugula neritina</i> (βρυόζωο)	Φάση II
Απλιδίνη	<i>Aplidium albicans</i> (ασκίδιο)	Φάση II
Καχαλαλίδιο F	<i>Elysia rufescens</i> (μαλάκιο)	Φάση II
Σκουαλαμίνη	<i>Squalus acanthias</i> (καρχαρίας)	Φάση II
Σαλινοσποραμίδιο	<i>Salinospora</i> CNB-392 (βακτήριο)	Φάση II
E7389	<i>Halichondria okadai</i> (σπόγγος)	Φάση I
Δισκοδερμαλίδιο	<i>Discodermia dissoluta</i> (σπόγγος)	Φάση I
ES-285	<i>Spisula polynyma</i> (δίθυρο)	Φάση I
KRN-7000	<i>Agelas mauritanus</i> (σπόγγος)	Φάση I
Λαυλιμαλίδιο	<i>Cacospongia mycofijiensis</i> (σπόγγος)	Προκλινικό
Κουρασίνη A	<i>Lyngbya majuscula</i> (κυανοβακτήριο)	Προκλινικό
Βιτιλεβουαμίδιο	<i>Didemnun cuculiferum</i> (ασκίδιο)	Προκλινικό
Διαζοναμίδιο A	<i>Diazona angulata</i> (ασκίδιο)	Προκλινικό
Ελευθεροβίνη	<i>Eleutherobia</i> sp. (μαλακό κοράλλι)	Προκλινικό
Σαρκοδικτυΐνη	<i>Sarcodictyon roseum</i> (μαλακό κοράλλι)	Προκλινικό
Πελορουσίδιο A	<i>Mycale</i> sp. (σπόγγος)	Προκλινικό
Σαλικυλιχαλιμίδιο A	<i>Haliclona</i> sp. (σπόγγος)	Προκλινικό
Θειοκοραλίνιο	<i>Micromonospora marina</i> (βακτήριο)	Προκλινικό
Ασκιδιδεμνίνη	<i>Didemnun</i> sp. (ασκίδιο)	Προκλινικό
Βαριολίνες	<i>Kirkpatrickia varialosa</i> (σπόγγος)	Προκλινικό
Δικτυοδενδρίνες	<i>Dictyodendrilla verongiformis</i> (σπόγγος)	Προκλινικό

Πίνακας 1.2 Φαρμακευτική δράση φυσικών προϊόντων θαλάσσιας προέλευσης

ΣΤΟΧΟΣ	ΧΗΜΙΚΗ ΕΝΩΣΗ	ΕΙΔΟΣ	ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ
Ακτίνη	Γιασπλακινολίδιο	<i>Jaspis</i> sp. (σπόγγος)	Αντικαρκινικό
	Λατρουνκουλίνη Α	<i>Latrunculia</i> sp. (σπόγγος)	Αντικαρκινικό
Τουμπουλίνη	Δισκοδερμαλίδιο	<i>Discoderma</i> sp. (σπόγγος)	Αντικαρκινικό
	Κουρασίνη	<i>Lyngbya majuscula</i> (κυανοβακτήριο)	Αντικαρκινικό
Φωσφολιπάση Α	Μανναλίδιο	<i>Luffariella variabilis</i> (σπόγγος)	Αντιφλεγμονώδες
Φωσφατάσες	Οκαδαϊκό οξύ	<i>Prorocentrum lima</i> (δινομαστιγωτό)	Αντικαρκινικό
	Δυσοδιολίδιο	<i>Dysidea etheria</i> (σπόγγος)	Αντικαρκινικό
Πρωτεϊνική κινάση C	Βρυοστατίνη-1	<i>Bugula neritina</i> (βρυόζωο)	Αντικαρκινικό (μελάνωμα)
Δίαυλοι ιόντων	Σαξιτοξίνη	<i>Alexandrium</i> sp. (δινομαστιγωτό)	Αναλγητικό
Νικοτινο-ακετυλο- χολινικοί υποδοχείς	ω-Κωνοτοξίνη	<i>Conus</i> sp. (γαστερόποδο)	Αναλγητικό
Τοποισομεράση II	Μακουλαβαμίνη	<i>Zyzzya</i> sp. (σπόγγος)	Αντικαρκινικό

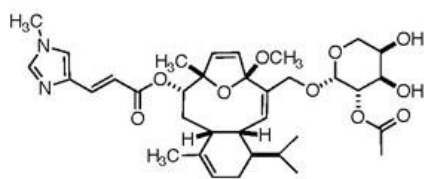
Όπως οι Σπόγγοι, τα Γαστερόποδα, τα Κυανοβακτήρια, τα Δινομαστιγωτά, έτσι και τα κοράλλια είναι μία εξαιρετική πηγή βιολογικά δραστικών συστατικών.

1.3 Παραδείγματα βιολογικά δραστικών συστατικών που απομονώθηκαν από κοράλλια (Πίνακας 1.3)

Πίνακας 1.3 Εν δυνάμει χρήσεις συστατικών από κοράλλια, όπως καταγράφησαν τα έτη 2000-2001

ΟΝΟΜΑ	ΕΦΑΡΜΟΓΗ	ΕΙΔΟΣ	ΑΝΑΦΟΡΑ
Διακετυλένια	Κυτταροτοξικά έναντι κάποιων καρκινικών σειρών	<i>Montipora</i> sp.	<i>J. Nat. Prod.</i> , 2001 , 64, 1059-63.
Μοντιπορίνη Α	Δραστικό έναντι του καρκίνου του παχέως εντέρου	<i>Montipora</i> sp.	<i>J. Nat. Prod.</i> , 2001 , 64, 1059-63.
Πολυ-υδροξυ-στερόλες	Κυτταροτοξικές	<i>Sarcophyton trocheliophorum</i>	<i>Chem. Pharm. Bull.</i> , 2000 , 48, 1087-9.
Σεσκιτερπένια ιλλουδαλενίου (νιτρικοί εστέρες και κάποια χλωριωμένα παράγωγα)	Ήπια κυτταροτοξικότητα έναντι καρκινικών σειρών ανθρώπινων κυττάρων	<i>Alcyonium paessleri</i>	<i>J. Org. Chem.</i> , 2000 , 65, 4482-6.

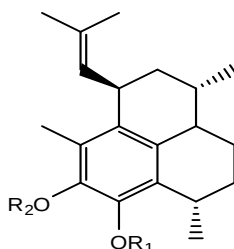
Η **ελευθεροβίνη** είναι από τους πρόσφατους βιοδραστικούς μεταβολίτες θαλάσσιας προέλευσης, που απομονώθηκε από τα σπάνια μαλακά κοράλλια του γένους *Eleutherobia*. Η εντυπωσιακή αντικαρκινική δραστηριότητα, ο σπάνιος μηχανισμός δράσης που είναι όμοιος με αυτόν της ταξόλης (διακόπτει την αποδιοργάνωση των κυτταρικών μικροσωληνίσκων καθιστώντας αδύνατη την κυτταρική διαίρεση), αλλά και η ευκολία παρασκευής της ελευθεροβίνης την ανέδειξαν σαν το πλέον ενδιαφέρον μόριο των τελευταίων δεκαετιών και το πιο ελπιδοφόρο στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, των ωοθηκών, των νεφρών και του λάρυγγα (Lindel *et al*, 1997; Long *et al*, 1998).



Ελευθεροβίνη

*Erythropodium caribaeorum*

Ένας θαλάσσιος οργανισμός που παρουσιάζει επίσης ιδιαίτερο φαρμακολογικό ενδιαφέρον, είναι το μαλακό κοράλλι της Καραϊβικής *Pseudopterogorgia elizabethae*. Από τον οργανισμό αυτό, που ανήκει στην Υφομοταξία των Οκτωκοραλλίων, έχουν μέχρι σήμερα απομονωθεί είκοσι νέοι διτερπενικοί γλυκοζίτες, **ψευδοπτεροσίνες A-Z** (Look *et al*, 1986; Roussis *et al*, 1990; Ata Athar *et al*, 2003; Duque *et al*, 2004; Rodriguez I. *et al*, 2004). Αυτοί, όπως έχει αποδειχθεί, βιοσυντίθενται από συμβιωτικά Δινομαστιγώτα του γένους *Symbiodinium*. Η φαρμακολογική τους αξιολόγηση έδειξε ότι έχουν πολύ σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση (Fenical, 1987; Mayer *et al*, 1998; Ata *et al*, 2003) συνδυαζόμενη με μηδενική σχεδόν τοξικότητα (Pseudopterosin E, LD₅₀ >300mg/Kg). Οι μεταβολίτες αυτοί (Εικόνα 1.2) σταματούν τη σύνθεση των λευκοτριενίων επιδρώντας ανταγωνιστικά στις λιποξυγενάσες ή άλλα ένζυμα πολύ νωρίς στην πορεία της βιοσύνθεσης του αραχιδονικού οξέος (Roussis *et al*, 1990). Ο μηχανισμός με τον οποίο οι μεταβολίτες αυτοί σταματούν τη σύνθεση των λευκοτριενίων παρατηρείται για πρώτη φορά. Ένα ημισυνθετικό παράγωγο βρίσκεται στην φάση Ι των κλινικών δοκιμών ως αντιφλεγμονώδες και επουλωτικό πληγών. Επίσης, το εκχύλισμα του οργανισμού που περιλαμβάνει τις ψευδοπτεροσίνες αποτελεί ήδη προϊόν εμπορικής εκμετάλλευσης ως δραστικός παράγοντας στην καλλυντική κρέμα Résilience της εταιρίας Estée Lauder, για την πρόληψη της γήρανσης και του ερεθισμού από την έκθεση στον ήλιο ή σε χημικά.



A-D :	R ₁ =D-Ξυλόζη,	R ₂ =H
E :	R ₁ =H,	R ₂ =Φουκόζη
F :	R ₁ =H,	R ₂ =Αραβινόζη
G-J :	R ₁ = Φουκόζη,	R ₂ =H

Εικ. 1.2 Ψευδοπτεροσίνες του είδους *Pseudopterogorgia elizabethae*

Εκτός από το πλήθος των βιοδραστικών μεταβολιτών που βιοσυνθέτουν τα κοράλλια, ακόμη και ο σκληρός σκελετός τους έχει ιδιαίτερη αξία για την ανθρώπινη υγεία. **Ο σκελετός των κοραλλιών** αποτελείται, κατά κύριο λόγο, από υδροξυαπατίτη -άλας του ασβεστίου- και η πορώδης δομή του μοιάζει πολύ με τη δομή των ανθρώπινων οστών. Έτσι, τα αιμοφόρα αγγεία και οι μυϊκές ίνες αναπτύσσονται ανεμπόδια. Αποτέλεσμα, ο υδροξυαπατίτης των κοραλλιών να αποτελεί ιδανικό υλικό σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης οστών. Υπάρχουν αρκετά παρασκευάσματα εγκεκριμένα από το FDA γι' αυτόν το λόγο, αλλά και για μοσχεύματα στην οδοντιατρική (Henkel, 1998).

1.4 Χημική Οικολογία

Η επιστήμη, που διερευνά τη σημασία των δευτερογενών προϊόντων του μεταβολισμού των οργανισμών στη συμπεριφορά και στις σχέσεις μεταξύ τους, είναι η Χημική Οικολογία ή Οικολογική Βιοχημεία, η οποία κινείται στα όρια Χημείας-Βιολογίας. Εξ' ορισμού ο νέος αυτός διεπιστημονικός τομέας τροφοδοτείται, αλλά και τροφοδοτεί με δεδομένα έναν αριθμό επιστημονικών κατευθύνσεων.

Αυτές περιλαμβάνουν:

- τη χημεία φυσικών προϊόντων,
- τη βιοχημεία,
- τις μελέτες μηχανισμού δράσης των δευτερογενών μεταβολιτών,
- τη συνθετική οργανική χημεία και
- τους κλάδους της βιολογίας που ασχολούνται με μελέτες συμπεριφοράς, εξελικτικές αντιδράσεις στα χημικά σήματα και οικολογικές συνέπειες.

Είναι, γενικά, αποδεκτό ότι η συντριπτική πλειοψηφία των μορίων, που προέρχονται από φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, δεν είναι προϊόντα ατυχούς διαδικασίας ή τελικής απόρριψης, αλλά συντέθηκαν από τους οργανισμούς με σοβαρό ενεργειακό κόστος, για να ικανοποιήσουν εξειδικευμένες ανάγκες (Ρούσσης, 1997).

Οι σοβαρότεροι οικολογικοί ρόλοι που διαδραματίζουν τα φυσικά προϊόντα για τους οργανισμούς που τα συνθέτουν είναι (Paul, 1992):

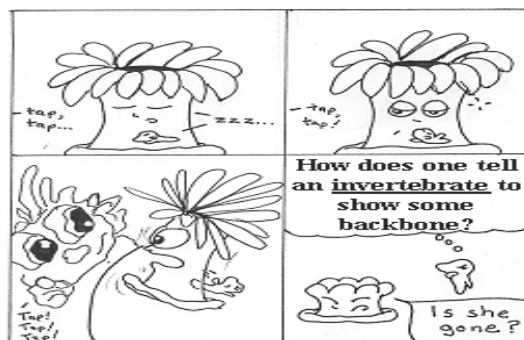
- ✚ χημική επικοινωνία
- ✚ προσανατολισμός της νυμφικής εγκατάστασης
- ✚ ορμονικές ρυθμίσεις
- ✚ εδαφικός ανταγωνισμός
- ✚ χημική προστασία από τα φυτοφάγα, παθογόνους μικροοργανισμούς και αρπακτικά

1.5 Χημική Προστασία. Τρία παραδείγματα στην περίπτωση των κοραλλιών

Οι περισσότεροι οργανισμοί, χερσαίοι ή θαλάσσιοι, που δεν έχουν τη δυνατότητα κίνησης για να αποφύγουν τους διώκτες τους ή δε διαθέτουν επαρκή μηχανική προστασία, αναγκάζονται να επενδύσουν σημαντικά ποσά ενέργειας στη σύνθεση χημικών ουσιών για την απώθηση των εχθρών τους.

Ο βαθμός στον οποίο οι οργανισμοί είναι εξοπλισμένοι με μέσα χημικής προστασίας είναι άμεσα εξαρτημένος από:

- ✓ τα επίπεδα κινδύνου που αντιμετωπίζουν οι οργανισμοί,
- ✓ το κόστος σύνθεσης της χημικής άμυνας και
- ✓ τη σχετική αξία των διαφόρων μελών του οργανισμού που είναι περισσότερο εκτεθειμένα (Ρούσσης & Βάγιας, 1997)



Στους χημικούς μηχανισμούς αποθάρρυνσης των θηρευτών περιλαμβάνονται μία σειρά από τοξίνες π.χ. τοξικές ουσίες περιέχονται στα κνιδοκύτταρα των Κνιδοζώων. Έχει παρατηρηθεί ότι τα κνιδοκύτταρα δεν χρησιμοποιούνται μόνο για την επίθεση στη λεία, αλλά και για την άμυνά τους.



Εικ. 1.3 Κοραλλιογενής ύφαλος. «Η συνύπαρξη γεννά την ανάγκη ανάπτυξης μηχανισμών επιβίωσης»

Μερικές φορές είναι πολύ καθοριστική για τα εδραία υδρόβια ζώα, η εξασφάλιση της μη προσκόλλησης άλλων οργανισμών στην επιφάνειά τους ή στην περιοχή γύρω τους. Αρκετά Ασκίδια, Βρυόζωα και Ανθόζωα παράγουν για τον σκοπό αυτό ουσίες αντιβιοτικές ή ανασταλτικές της ανάπτυξης ή της προσκόλλησης προνυμφών ανταγωνιστικών ειδών (Αποστολοπούλου, 1996).

Σε κάποιες περιπτώσεις, η μεγάλη περιεκτικότητα σε ανόργανα συστατικά μειώνει την τροφική ποιότητα του θύματος με αποτέλεσμα να μην προτιμάται από τους θηρευτές του. Οι Σπόγγοι περιέχουν παρά πολλές βελόνες, πολλοί Πολύχαιτοι καλύπτονται εξωτερικά από κόκκους άμμου, ενώ τα Κοράλλια επενδύουν σε ασβεστολιθικές κατασκευές (Harper, 2001).

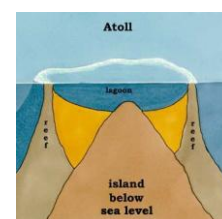
1.6 Τι είναι τα Κοράλλια

Πρόκειται για ζώα. Αν και δεν είναι σπάνια τα μονήρη είδη, τα κοράλλια ζουν κυρίως σε αποικίες. Η βάση αυτών των αποικιών είναι ο *πολύποδας*, μία μικροσκοπική ανεμώνη είτε εξακτινωτής (Εξακοράλλια), είτε οκτακτινωτής (Οκτωκοράλλια) συμμετρίας. Ο κάθε πολύποδας καταλαμβάνει έναν από τους δεκάδες ή εκατοντάδες πόρους (οπές) του σκελετού της αποικίας από τον οποίο αναδύεται όταν επιζητά να τραφεί και στον οποίο καταφεύγει όταν αναζητά προστασία. Η γέννηση ενός νέου πολύποδα συνεπάγεται την ανάπτυξη του σκελετού, και ως εκ τούτου την επέκταση της αποικίας.

Συνήθως, η λέξη κοράλλι παραπέμπει αυτόματα στους κοραλλιογενείς υφάλους. Όχι άδικα, αφού οι υφαλοι αυτοί είναι πράγματι βιογενείς σχηματισμοί που δημιουργήθηκαν στη διάρκεια χιλιετιών από τις αλληπάλληλες αποθέσεις των ασβεστολιθικών σκελετών των κοραλλιών.

1.7 Κοραλλιογενείς υφαλοι (Coral Reefs)

Μάζες βιογενούς ασβεστόλιθου που σχηματίζονται από αποικίες κοραλλιών μαζί με άλλους οργανισμούς π.χ. ασβεστοφύκη. Σχηματίζονται όπου υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης των κοραλλιών, κοντά σε ακτές ή σε ρηχούς πυθμένες και δημιουργούνται διαχρονικά (οι νεώτερες γενιές αναπτύσσονται επάνω στα σκελετικά στοιχεία των παλαιότερων). Εάν υπάρξει αργή βύθιση του πυθμένα ή βαθμιαία ανύψωση της στάθμης της θάλασσας, τότε ο ύφαλος σταδιακά αποκτά μεγάλο πάχος. Τυπικές μορφές κοραλλιογενών υφάλων παρατηρούνται στα ηφαιστειακά νησιά του Ειρηνικού. Αυτά περιβάλλονται αρχικά από έναν κροσσωτό ύφαλο (fringe reef). Ενώ βυθίζονται σιγά σιγά, ο ύφαλος αναπτύσσεται προς τα έξω, οπότε δημιουργείται ένα κοραλλιογενές φράγμα (barrier reef). Όταν το νησί βυθιστεί τελείως παραμένει η απόλλη (atoll).



Ο πρώτος που μελέτησε τους υφάλους και διατύπωσε αυτή τη θεωρία για τη δημιουργία των ατολλών ήταν ο Δαρβίνος. Γεωτρήσεις και σεισμικές έρευνες που έγιναν σε απόλλες επιβεβαίωσαν τη θεωρία του. Σε γεώτρηση, που έγινε το 1951 στην απόλλη Eniwetok στα 1.250 m, συναντήθηκε βασάλτης και επάνω του υφαλώδης ασβεστόλιθος του Ηωκαίνου, οπότε υπολογίστηκαν μέσοι ρυθμοί βύθισης πυθμένα και αύξησης κοραλλιών. Βέβαια, αν λάβουμε υπόψη μας τις διακυμάνσεις της στάθμης της

θάλασσας κατά τις παγετώδεις και μεσοπαγετώδεις περιόδους του Πλειστοκαίνου, δεν μπορούμε να μιλάμε για ένα απλό, αλλά για ένα πολύπλοκο φαινόμενο.

1.8 Οι κοραλλιογενείς ύφαλοι υποφέρουν από την αύξηση της θερμοκρασίας του πλανήτη

Η υπερθέρμανση του πλανήτη σκοτώνει τους κοραλλιογενείς υφάλους. Η Αμερικανική Εθνική Υπηρεσία Θαλάσσιων Αλιευμάτων (NMFS) έχει επισημάνει, ήδη, ότι δύο είδη κοραλλιών πρέπει να περιληφθούν επισήμως στα απειλούμενα είδη, βάσει του σχετικού αμερικανικού νόμου, επειδή κινδυνεύουν να εξαφανιστούν εξαιτίας της ανόδου της θερμοκρασίας της θάλασσας.

Τα δύο είδη κοραλλιών είναι αυτά από τα οποία αποτελούνται κυρίως κοραλλιογενείς ύφαλοι στην Καραϊβική και τον Κόλπο της Φλόριντα. Οι πληθυσμοί τους έχουν μειωθεί κατά 80% έως 98% σε όλη την περιοχή. Το NMFS κατέληξε στο συμπέρασμα πως για το γεγονός αυτό ευθύνεται εν μέρει «η άνοδος της θερμοκρασίας της επιφάνειας της θάλασσας».

Διευκρινίζει ότι τα κοράλλια πεθαίνουν όταν η θερμοκρασία της θάλασσας ξεπεράσει τους 29 βαθμούς Κελσίου, επειδή διαταράσσεται η συμβιωτική σχέση, που υπάρχει ανάμεσα σε ένα είδος μικροσκοπικών φυκών και το κοράλλι.

Τα κοράλλια είναι στην πραγματικότητα αποικίες δισεκατομμυρίων μικροσκοπικών ζώων, που αποκαλούνται πολύποδες. Ο ύφαλος δημιουργείται από τους ασβεστολιθικούς σκελετούς τους. Οι πολύποδες εξαρτώνται με τη σειρά τους από συμβιωτικά φύκη, που φέρουν την επιστημονική ονομασία ζωοξανθέλλες. Τα φύκη αυτά, όχι μόνο δίνουν στο κοράλλι το χρώμα του, αλλά και, μέσω φωτοσύνθεσης, προσφέρουν τροφή στους πολύποδες. Περισσότερα από ένα εκατομμύριο από τα φύκη αυτά συνωστίζονται σε κάθε τετραγωνικό εκατοστό κοραλλιών. Αλλά όταν η θερμοκρασία της θάλασσας αυξάνεται, οι πολύποδες τα απωθούν στο στομάχι τους. Το κοράλλι γίνεται διαφανές και τελικά πεθαίνει.

Δεν είναι, όμως, μόνο η θάλασσα της Καραϊβικής και ο Κόλπος της Φλόριντα. «Σήμερα, ύφαλοι του Ινδικού Ωκεανού, έχουν μετατραπεί σε υφάλους από χαλάσματα και χλωροφύκη, με πολύ λίγα ψάρια», λέει ο Nikolas Graham, καθηγητής στο Πανεπιστήμιο του Newcastle. Ο Μεγάλος Κοραλλιογενής Ύφαλος, ανοιχτά της Αυστραλίας, υπέστη και αυτός το 1998 τη μεγαλύτερη λεύκανση μέσα σε 700 χρόνια, έως τότε τουλάχιστον, αφού αυτή που υπέστη το 2002 ήταν ακόμα μεγαλύτερη. Επιστήμονες από τη Βρετανία, τις Σεϋχέλλες και την Αυστραλία πραγματοποίησαν το 1994 εκτεταμένες έρευνες σε 21 περιοχές κοραλλιών. Έκαναν παρόμοιες έρευνες και το 2005 για να υπολογίσουν την έκταση της ζημιάς, που είχε προκληθεί από τη

«λεύκανση» του 1998. «Πριν από το 1998, περίπου 50% της περιοχής, στην οποία διεξήχθη η έρευνα ήταν καλυμμένη με αναπτυσσόμενα κοράλλια. Σήμερα μόλις 7,5% της ίδιας περιοχής έχει ζωντανά κοράλλια και λιγότερο από 1% καλύπτεται από αναπτυσσόμενα είδη», υπογραμμίζει ο Nikolas Graham. Η ποικιλία και ο αριθμός των ψαριών που ζουν στην περιοχή επλήγησαν επίσης. Από τα 134 είδη ψαριών, που ήταν γνωστό πως ζούσαν εκεί, περίπου τα μισά εξαφανίσθηκαν από τις περιοχές που επλήγησαν περισσότερο. Τέσσερα είδη ψαριών, πιθανόν, εξαλείφθηκαν πλήρως από την περιοχή και οι πληθυσμοί άλλων έξι ειδών έχουν φτάσει σε κρίσιμα χαμηλό σημείο.

1.9 Κοράλλια στις Ελληνικές θάλασσες

Κοράλλια υπάρχουν και στα ελληνικά νερά. Ο σχηματισμός των υφάλων ωστόσο είναι μια συνάρτηση πολλών παραγόντων (θερμοκρασία, αλατότητα, τροφικό καθεστώς κ.α.), που δεν ευνοείται ιδιαίτερα στη Μεσόγειο. Οι περιορισμοί αυτοί, όμως, δεν ισχύουν και για τα μη ερματυπικά κοράλλια (κοράλλια που δεν σχηματίζουν υφάλους).

Από τους ομορφότερους αντιπροσώπους των κοραλλιών αυτών είναι αναμφισβήτητα οι γοργόνιες. Πρόκειται για αποικιακό κοράλλι με κεράτινο σκελετό, οι πολύπλοκες διακλαδώσεις του οποίου σχηματίζουν μεγάλες βεντάλιες εντυπωσιακών χρωμάτων. Η περίπλοκη και συνεχώς εξελισσόμενη δομή της κάθε αποικίας ξεδιπλώνεται σε ένα μοναδικό επίπεδο, κάθετο πάντα στο επικρατές ρεύμα, με τρόπο ώστε ο κάθε ένας από τους μικρούς αποίκους να έχει ισότιμη πρόσβαση στο ρεύμα. Αυτός άλλωστε, αποτελεί τη μοναδική πηγή τροφής των αποικιών, εφόσον δεν διαθέτουν συμβιωτικές ζωοξανθέλλες.

Περίπου 20 είδη γοργονιών απαντούν στα μεσογειακά νερά. Στις Ελληνικές θάλασσες ωστόσο, δεν έχουν αναφερθεί περισσότερα από 10 είδη (σε αυτά περιλαμβάνεται και το πολύτιμο κόκκινο κοράλλι ***Corallium rubrum***).



Παλιότερα, οι επιστήμονες έτειναν να θεωρούν τα υπόλοιπα είδη απόντα από την ανατολική λεκάνη της Μεσογείου. Νεότερες όμως έρευνες, φαίνεται να ανατρέπουν την υπόθεση αυτή: η δυνατότητά μας, πλέον, να προσεγγίσουμε βαθύτερους βιότοπους, προσθέτει ολοένα περισσότερες αναφορές για την ύπαρξη των έως πρόσφατα άγνωστων ειδών στα ελληνικά νερά. Τι είναι όμως αυτό που καθορίζει την παρουσία και την βαθυμετρική τους εξάπλωση; Τι διαφοροποιεί την ανατολική από τη δυτική λεκάνη; Πού μπορούμε να δούμε τα απίστευτα τοπία των κρεμαστών

κοραλλιών, που ο κάθε υποβρύχιος επισκέπτης θαυμάζει στα καταδυτικά πάρκα των ακτών της Γαλλίας, της Ισπανίας και της Ιταλίας;

Όπως προαναφέρθηκε, η παρουσία των γοργονιών εξαρτάται από τον επιτυχή συνδυασμό μίας ποικιλίας περιβαλλοντικών παραμέτρων. Αρχικά, απαραίτητη είναι η ύπαρξη πηγής τροφής. Τέτοια μπορεί να είναι η εκβολή ενός ποταμού ή και η ανάδυση ψυχρών νερών πλούσιων σε θρεπτικά συστατικά (φαινόμενο γνωστό ως *upwelling*). Επίσης, μόνιμα ρεύματα μικρότερης ή μεγαλύτερης έντασης είναι σημαντικότερος παράγοντας ανάπτυξής τους. Η απουσία έντονου ηλιακού φωτός, άλλοτε σε μεγαλύτερο και άλλοτε σε μικρότερο βαθμό, είναι χαρακτηριστική των προτιμήσεών τους. Το γεγονός αυτό οφείλεται, πιθανά, στην προσπάθεια αποφυγής των ανταγωνιστικών φυκών παρά στην καθ' αυτή αποστροφή τους για το φως. Τέλος, είναι οργανισμοί *ψυχρόφιλοι* (αγαπούν τα κρύα νερά) και ευάλωτοι στις κλιματικές αλλαγές. Οι ασυνήθιστα υψηλές θερμοκρασίες, που παρατηρήθηκαν στη δυτική Μεσόγειο τα καλοκαίρια μεταξύ 1999-2002, προκάλεσαν μαζικές θανατώσεις στους αυτόχθονες πληθυσμούς γοργονιών.

Σε σύγκριση με τις δυτικές Μεσογειακές χώρες, τα oligοτροφικά νερά των θαλασσών μας επιτρέπουν τη διείσδυση του φωτός πολύ βαθύτερα. Αυτό που θα δούμε στη Γαλλία σε βάθος μόλις 15 μέτρων, ίσως στο Ν. Αιγαίο αναγκαστούμε να το αναζητήσουμε στα 90 μέτρα.

Σχετικά λίγα είναι τα είδη γοργονιών, που μπορεί να συναντήσει κανείς στη διάρκεια μίας κατάδυσης στα ελληνικά ύδατα. Η κίτρινη και η λευκή γοργόνια (*Eunicella cavolinii* και *E. singularis*, αντίστοιχα) είναι τα είδη που απαντούν στα μικρότερα σχετικά βάθη. Σε περιοχές με μικρή διαύγεια, όπως το Β. Αιγαίο (π.χ. Φιδονήσι) ή οι εκβολές ποταμοχειμάρρων (π.χ. Λαμπίρι), μπορούμε να τις δούμε ρηχότερα από τα 10 μέτρα.



Η -έως τώρα- ρηχότερη επίσημη αναφορά της κόκκινης γοργόνια (*Paramuricea clavata*) στο Αιγαίο είναι τα 45 μέτρα. Συχνότερα, πάντως, εντοπίζονται βαθύτερα των 80 μέτρων.

Η ροζ γοργόνια (*Leptogorgia sarmentosa*) είναι σχετικά σπάνια και, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες, δεν σχηματίζει πυκνές συνευρέσεις, αλλά απαντάται αποκλειστικά σε μεμονωμένες αποικίες.



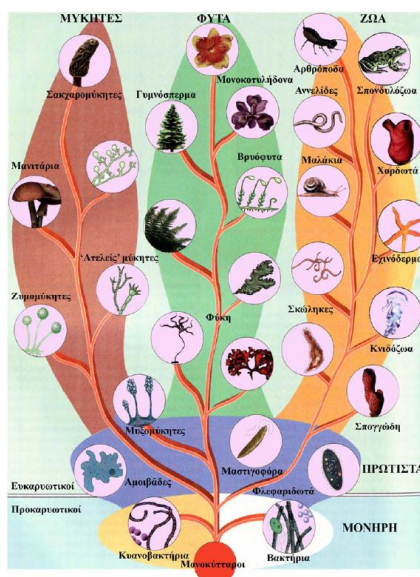
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Φυλογένεση Κνιδοζών

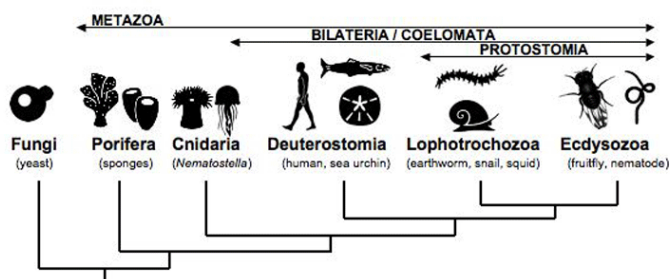
Φύλο Κνιδόζωα: περίπου 10.000 είδη, 700 εκατομμύρια χρόνια εξέλιξης (Holstein, 2003)

Το όνομα του Φύλου προκύπτει από την ελληνική λέξη "κνίδω", που σημαίνει κεντρίζω.

Τα Κνιδόζωα θεωρούνται τα πρώτα πραγματικά *μετάζωα*. Σε αυτό το Φύλο παρατηρείται, για πρώτη φορά, η σαφής διαφοροποίηση των κυττάρων σε ιστούς. Επειδή φυλογενετικά τα Κνιδόζωα (*Κοιλεντερωτά*) θεωρούνται πρόγονοι πολλών άλλων ζωικών ομάδων (μορφών) κατέχουν σημαντική θέση στο ζωικό βασίλειο (Εικόνες 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6).



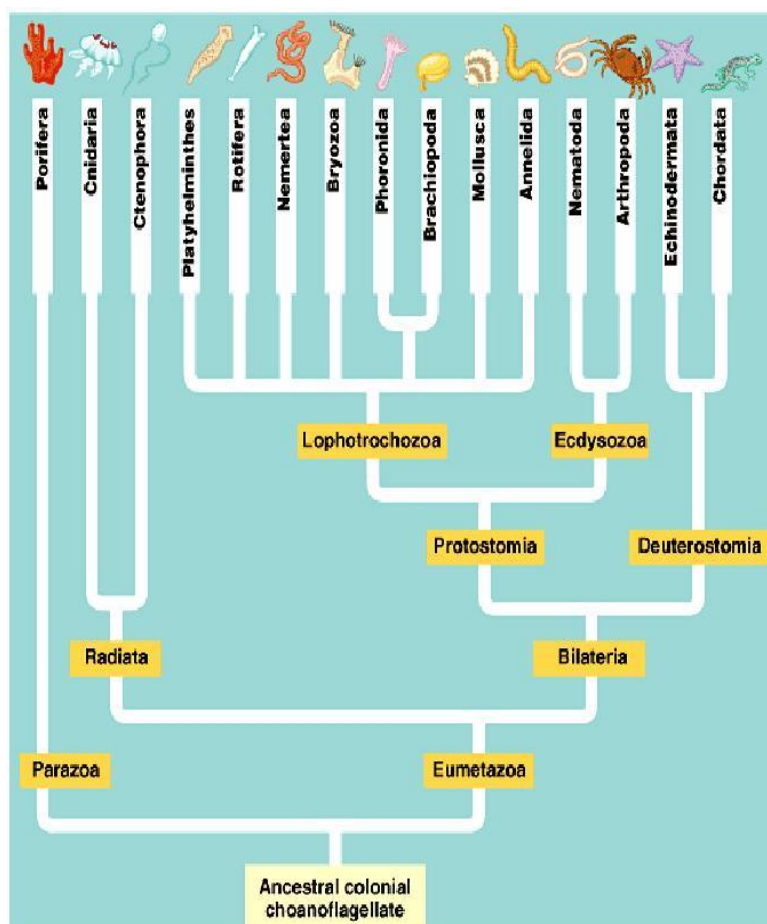
Εικ. 2.1 Απεικόνιση της σημαντική θέσης που κατέχουν τα Κνιδόζωα στο ζωικό βασίλειο



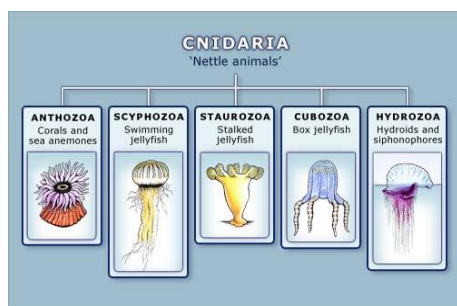
Εικ. 2.2 Φυλογενετικές σχέσεις Μεταζών

Κοινός πρόγονος όλων των θαλάσσιων ζώων είναι, όπως φαίνεται και στην

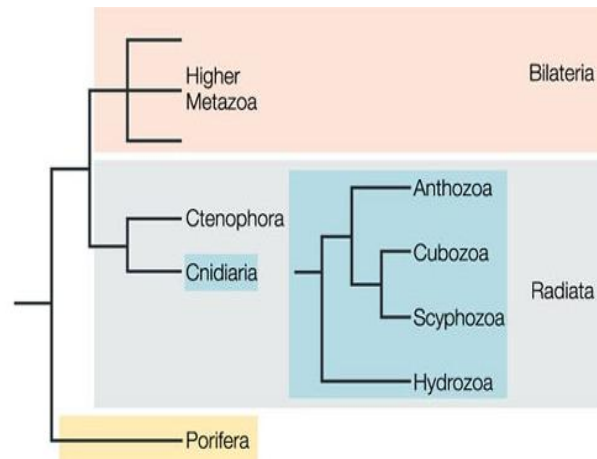
Εικόνα 2.3, ένα αποικιακό χανομαστιγτώ. Από αυτή την προγονική μορφή προέκυψαν τα Παράζωα (π.χ. σπόγγοι) και τα Ευμετάζωα, που εξελίχθηκαν και έδωσαν ανώτερες μορφές ζωής, όπως το Φύλο των Χορδωτών. Τα Κνιδάρια έκαναν νωρίς την εμφάνιση τους στο υγρό στοιχείο, γεγονός που υποδεικνύει ότι, αν και κατώτερες μορφές ζωής, ανέπτυξαν τέτοια χημεία, η οποία τους επέτρεψε να επιβιώσουν στο πέρασμα των αιώνων αντιμετωπίζοντας επιτυχώς τους θηρευτές τους, αλλά και όποιες άλλες αντίξοες συνθήκες.



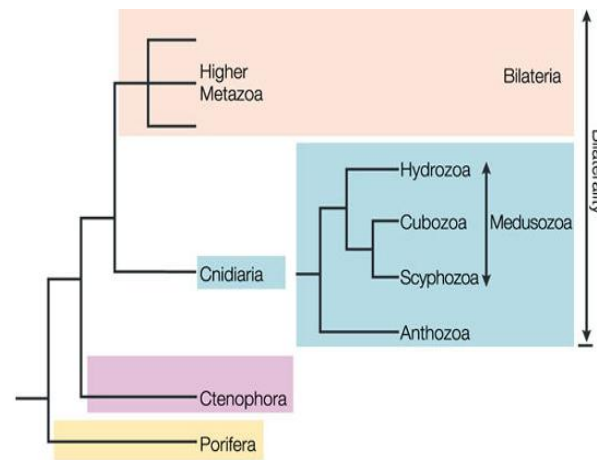
Εικ. 2.3 Εξελικτικές πορείες μέσω των οποίων προέκυψαν τα διαφορετικά Φύλα



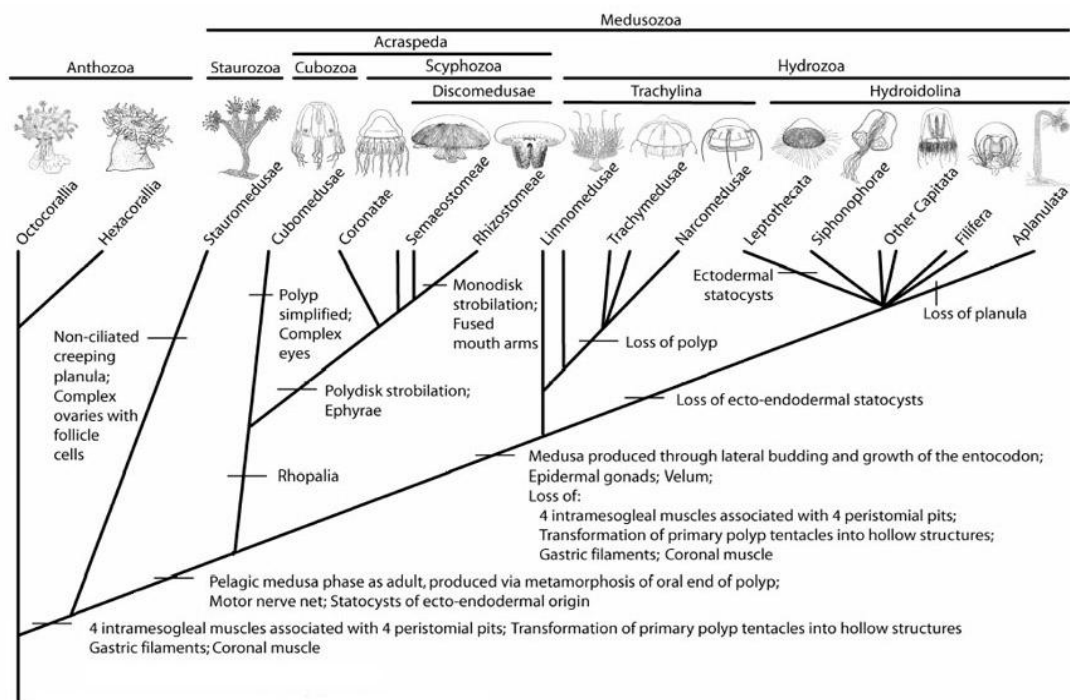
Τα Κνιδόζωα εμφανίστηκαν στο Προκάμβριο και ζουν έως σήμερα. Είναι πολυμορφικά ζώα και πολλά έχουν ασβεστολιθικό ή οργανικό σκελετό. Υποδιαιρούνται σε πέντε Ομοταξίες\Κλάσεις (Ανθόζωα, Σκυφόζωα, Σταυρόζωα, Κυβόζωα, Υδρόζωα).



Εικ. 2.4 Κλασική (μη μοριακή) φυλογένεση Κνιδοζώων



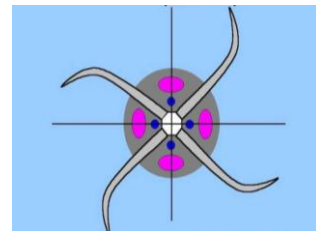
Εικ. 2.5 Φυλογένεση Κνιδοζώων βασισμένη σε μοριακά δεδομένα



Εικ. 2.6 Φυλογενετικές σχέσεις Κνιδοζώων

2.2 Διαγνωστικά και ειδικά χαρακτηριστικά των Κνιδοζών

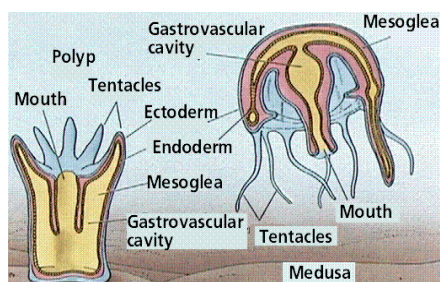
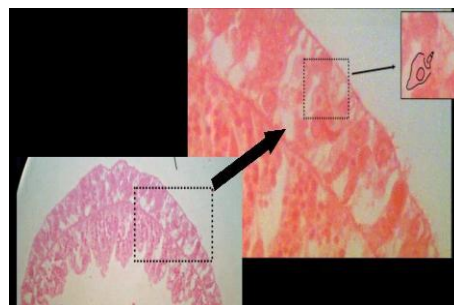
- Τα Κνιδόζωα είναι απλοί, πολυκύτταροι, θαλάσσιοι οργανισμοί. Θεωρούνται πιο εξελιγμένοι οργανισμοί από τους Σπόγγους, επειδή τα κύτταρά τους είναι οργανωμένα σε ιστούς, οι οποίοι διευθετούνται ακτινωτά (Εικόνα 2.7).



Εικ. 2.7 Απεικόνιση των πολλαπλών επιπέδων συμμετρίας της μέδουσας

- Το σώμα τους είναι σακοειδές και αποτελείται από δύο στοιβάδες κυττάρων. Την εξωτερική στοιβάδα ή εξώδερμα (ectoderm) και την εσωτερική στοιβάδα ή ενδόδερμα (endoderm). Μεταξύ τους παρεμβάλλεται ένα άμορφο ζελατινώδες στρώμα, η μεσογλοία (mesogloea), με ένα υποτυπώδες νευρικό δίκτυο (Εικόνα 2.8). Στο εσωτερικό σχηματίζεται μία κοιλότητα, η γαστρική κοιλότητα (enteron), με πτυχωμένο εσωτερικό τοίχωμα, έτσι ώστε να σχηματίζονται κατακόρυφες μεσεντέριες πτυχές. Η γαστρική κοιλότητα έχει μόνο ένα άνοιγμα, το στόμα, το οποίο χρησιμεύει και σαν έδρα. Το στόμα περιβάλλεται από ακτινωτά διαταγμένες κεραίες για τη σύλληψη της τροφής (Εικόνα 2.9).

Εικ. 2.8 Δύο κυτταρικά στρώματα. Τα Κνιδόζωα είναι Διπλοβλαστικοί οργανισμοί



Εικ. 2.9 Σώμα Κνιδοζών

- Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των Κνιδόζων από το οποίο πήραν το όνομά τους είναι, ότι στο εξώδερμά τους και ιδίως στις κεραίες, φέρουν ειδικά κύτταρα τα κνιδοκύτταρα (30 διαφορετικοί τύποι κνιδοκυττάρων έχουν περιγραφεί σύμφωνα με τον Tardent, 1995). Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν, μέσα σε ειδικές κύστες τις νηματοκύστες, ένα τοξικό υγρό που σκοτώνει μικρούς οργανισμούς π.χ. μικρά ψάρια και προκαλεί κνησμό σε μεγαλύτερους.

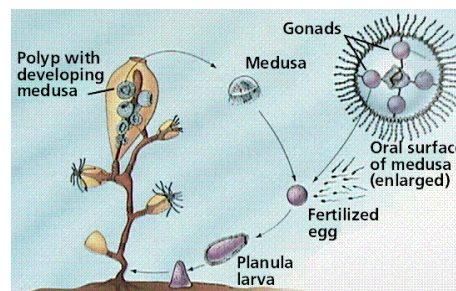
- Ο κύκλος ζωής στα Κνιδόζωα παρουσιάζει ένα παροδικό πολυμορφισμό

και οι οργανισμοί εμφανίζονται με δύο μορφές: τη μορφή του εδραίου πολύποδα (Polyp) και τη μορφή της ελεύθερης μέδουσας (medusa).

Πολύποδας: μικροσκοπικό μέγεθος, κυλινδρική ή ασκοειδής μορφή προσκολλημένη στο βυθό. Με διαδοχικές εκβλαστήσεις, σχηματίζεται αποικία μορφής αλυσίδας με μήκος έως 2 m. Οι πολύποδες μπορούν να είναι αποικιακοί, με πολυμορφισμό μέσα στις αποικίες (Peckenik, 1996).

Μέδουσα: κυλινδρικό ή ασκοειδές πεπλατυσμένο σώμα με μορφή ομπρέλας, διαμέτρου από 12 mm έως 2 m. Είναι ελεύθερες κολυμβητικές μορφές. Οι μέδουσες φέρουν μακριές λεπτές συλληπτήριες κεραιές, που το μήκος τους μπορεί να φθάσει τα 10 m.

Οι μορφές αυτές εναλλάσσονται περιοδικά, έτσι οι πολύποδες δίνουν γένεση, με εκβλάστηση (αφυλετικά-asexual), σε μέδουσες οι οποίες πολλαπλασιάζονται φυλετικά (sexual) για να προκύψουν πολύποδες και ούτω καθεξής. Σχηματικά, τα στάδια που διέρχονται αυτές οι μορφές είναι: πολύποδας → εκβλάστηση → νέοι πολύποδες- αποικία → απόσπασση → μέδουσα → άρρενα και θήλεα γεννητικά κύτταρα → πλάνουλα → προσκόλληση → πολύποδας (Εικόνα 2.10).



Εικ. 2.10 Κύκλος ζωής Κνιδοζώου

Ο πολυμορφισμός αυτός δεν παρατηρείται σε όλα τα Κνιδόζωα, αλλά στα πιο απλά. Στα εξελιγμένα (π.χ. στα Ανθόζωα) δεν παρατηρείται το στάδιο της μέδουσας.

- Τα περισσότερα είναι σαρκοφάγα, επιτελούν ανταλλαγή αερίων και όλα είναι υδρόβια με την πλειοψηφία τους θαλάσσια.

2.3 Κυτταρική συγκρότηση των Κνιδοζώων

2.3.1 Κύτταρα επιδερμίδας

1. Μυοεπιθηλιακά κύτταρα

Κυλινδρικά, καλυπτήρια κύτταρα με αποφυάδες στη βάση τους, που σχηματίζουν συσταλτά μυονημάτια (δηλαδή επιμήκεις μύες).

2. Ενδιάμεσα κύτταρα

Κύτταρα με εμφανείς πυρήνες και μικρό κυτταρόπλασμα, ικανά να μετατρέπονται σε άλλα κύτταρα.

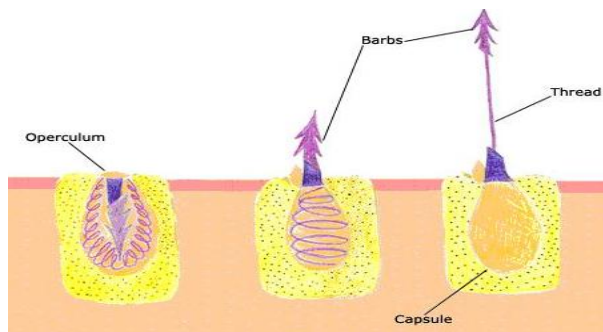
3. Κνιδοκύτταρα

Περιλαμβάνουν κάψα, τη νηματοκύστη (Εικόνα 2.11). Στο ένα άκρο φέρουν κνιδοβλέφαρο, με δομή μαστίγιου, στα Υδρόζωα και Σκυφόζωα.



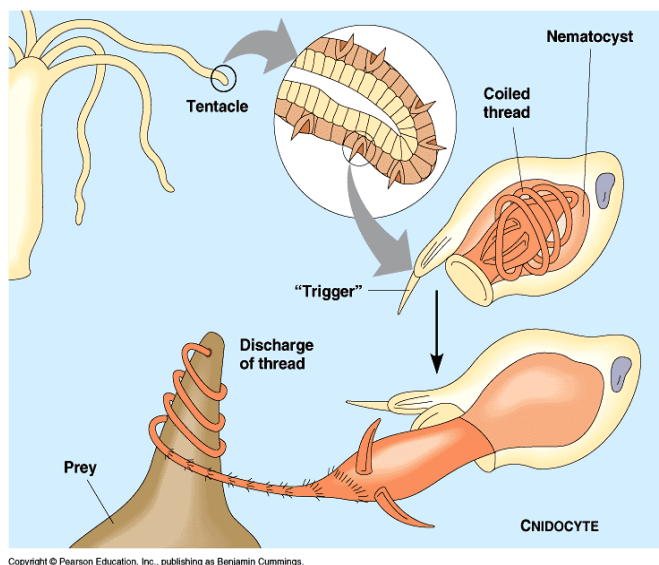
Εικ. 2.11 Νηματοκύστες κάτω από το μικροσκόπιο

Τα Ανθόζωα φέρουν σύνολο βλεφαρίδων, που σχηματίζουν κώνο. Η νηματοκύστη περιέχει εσπειραμένο ή πτυχωμένο νημάτιο, που συχνά φέρει άκανθες (Εικόνα 2.12).



Εικ. 2.12 Το εσπειραμένο νημάτιο της νηματοκύστης συχνά φέρει άκανθες

Η αποβολή των νηματοκύστεων επιτυγχάνεται με γρήγορη πρόσληψη νερού στο κνιδοκύτταρο (Sponaugle, 1991). Αυτή προκαλείται από αλλαγή στη διαπερατότητα των μεμβρανών, που πιθανώς επιτυγχάνεται με ηλεκτρικό μήνυμα από τα κνιδοβλέφαρα (Εικόνα 2.13). Οι νηματοκύστες χρησιμοποιούνται μία μόνο φορά (Εικόνες 2.14 και 2.15), ενώ τα κνιδοκύτταρα αναγεννώνται από ενδιάμεσα κύτταρα.



Εικ. 2.13 Κνιδοκύτταρα στην επιδερμίδα των κεραίων. Διακρίνεται το κνιδοβλέφαρο (trigger). Με ηλεκτρικό μήνυμα από το κνιδοβλέφαρο προκαλείται η αλλαγή στη διαπερατότητα των μεμβρανών. Συνέπεια, η γρήγορη πρόσληψη νερού στο κνιδοκύτταρο και η αιφνίδια αποβολή των νηματοκύστεων. Οι άκανθες του νηματίου (thread) ακινητοποιούν τη λεία.



Εικ. 2.14 και **2.15** Νηματοκύστη που αποβάλλεται από τις κεραίες του Κνιδοζώου *Physalia physalis*

Υπάρχουν πολλών ειδών νηματοκύστες, οι πιο μελετημένες, δομικά, εκ των οποίων είναι:

α) Κυρίως νηματοκύστες

Φέρουν αγκάθια και μπορούν να εκτοξεύσουν τοξίνη. Χρησιμεύουν στην άμυνα και στη σύλληψη της τροφής.

β) Σπειροκύστες

Κολλώδεις σχηματισμοί, που απαντούν σε ορισμένα Ανθόζωα. Δημιουργούν πυκνό δίκτυο για προσκόλληση και σύλληψη της λείας.

γ) Πτυχοκύστες

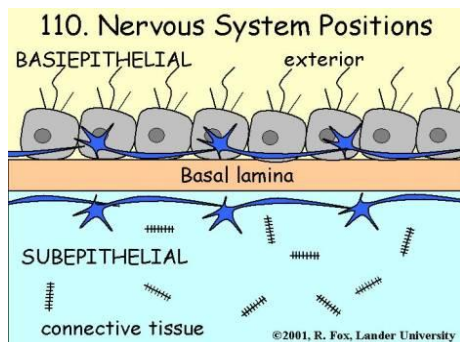
Απαντούν στα Κηριανθάρια. Δεν φέρουν αγκάθια, είναι κολλώδεις και βοηθούν στο σχηματισμό ενός σωλήνα μέσα στον οποίο ζει το ζώο.

4. Αδενικά κύτταρα

Εκκρίνουν βλέννα συμβάλλοντας, με αυτόν τον τρόπο, στην προστασία, στη σύλληψη της λείας και στην προσκόλληση του οργανισμού.

5. Νευρικά κύτταρα

Επιμήκη κύτταρα (Εικόνα 2.16), κάθετα προς την επιφάνεια της επιδερμίδας. Συνδέονται μεταξύ τους με συνάψεις και σχηματίζουν νευρικό πλέγμα.



Εικ. 2.16 Τα δύο νευρικά συστήματα των Κνιδοζώων (επιθηλιακό και υποεπιθηλιακό)

2.3.2 Κύτταρα γαστροδερμίδας

1. Μυοτροφικά κύτταρα

Ομοιάζουν στα μυοεπιθηλιακά κύτταρα της επιδερμίδας, με αποφυάδες κάθετες στον κύριο άξονα. Φέρουν μαστίγια για την κίνηση της τροφής μέσα στη γαστροαγγειακή κοιλότητα. Ασκούν κυτταροφαγία.

2. Αδενικά κύτταρα

Αυτά που εντοπίζονται στο στόμα, εκκρίνουν βλέννα. Αυτά που εδρεύουν στη γαστροαγγειακή κοιλότητα, εκκρίνουν ένζυμα για μερική πέψη.

3. Κνιδοκύτταρα

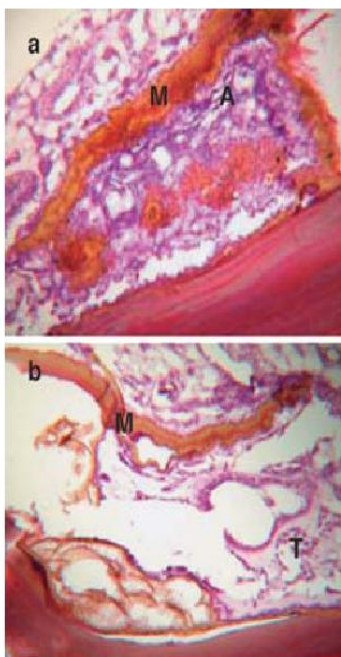
Κνιδοκύτταρα στη γαστροδερμίδα υπάρχουν μόνο στα Ανθρώζωα.

2.4 Ανοσολογία των Κνιδοζώων

Αν και οι νηματοκύστες είναι σημαντικές για την εξασφάλιση της λείας των κοραλλιών και την προστασία τους έναντι των θηρευτών τους, δεν παρέχουν προστασία εναντίον των παθογόνων μικροοργανισμών (ιοί, βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα).

Βασικές γραμμές άμυνας των κοραλλιών περιλαμβάνουν:

- την ύπαρξη μηχανικών ή φυσικών εμποδίων (π.χ. ύπαρξη επιδερμίδας),
- την έκκριση χημικών ουσιών (π.χ. οξέων),
- την παραγωγή βιοδραστικών συστατικών (π.χ. αντιμικροβιακών πεπτιδίων),
- την ύπαρξη φαγοκυττάρων, που εγκολπώνουν (Εικόνα 2.17) και καταστρέφουν μικροοργανισμούς εξ επαφής (Mullen, 2004).

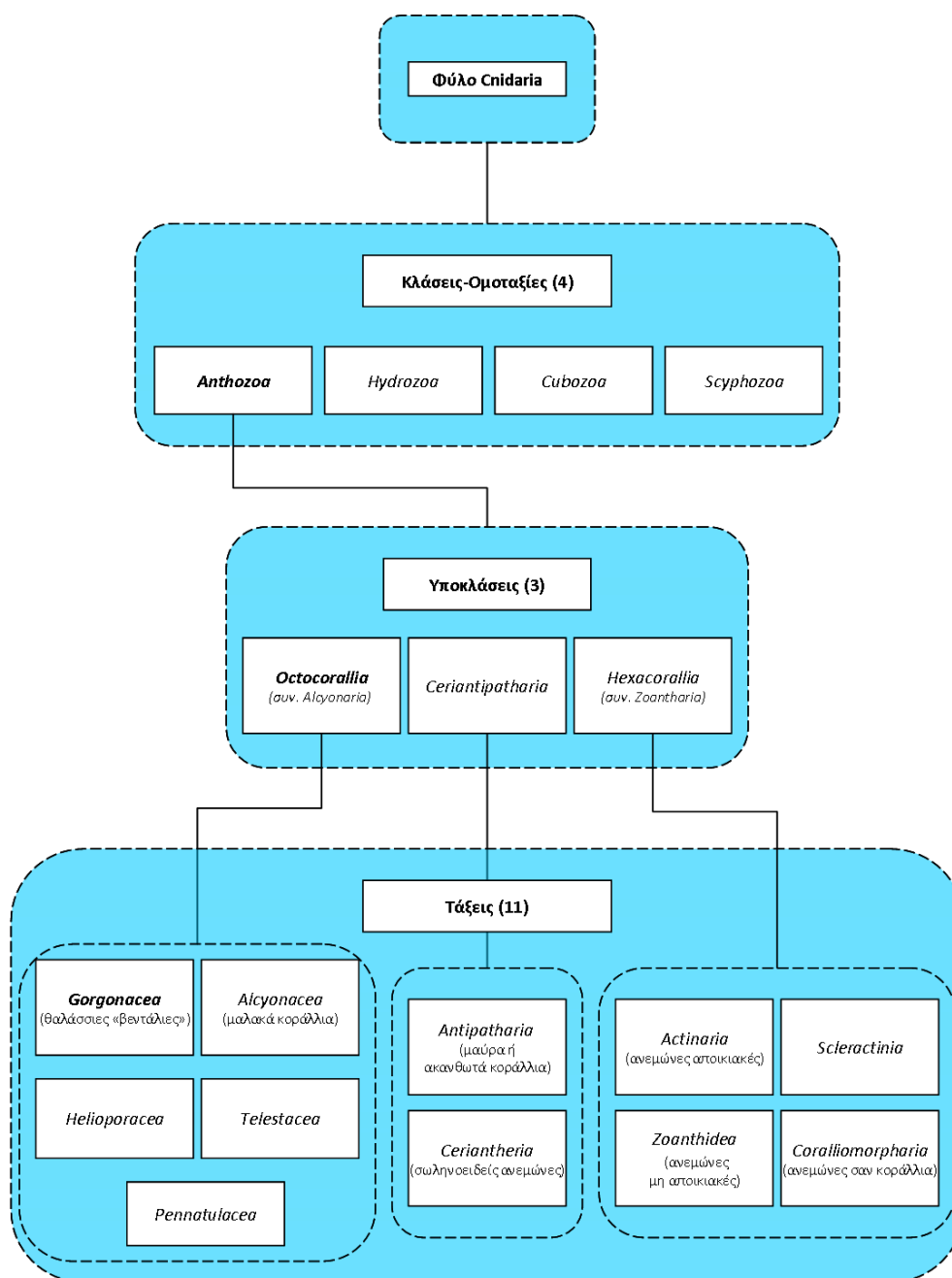


Εικ. 2.17 Φωτογραφία από μικροσκόπιο, που αποδεικνύει ότι τα είδη του γένους *Pseudopterogorgia* μπορούν να αμυνθούν στην παρασιτική εισβολή και να αναγεννήσουν τους κατεστραμμένους ιστούς τους.

Μία στιβάδα γοργονίνης (M) εκτείνεται από τον εξωσκελετό μέχρι τη μεσογλοία, υποδεικνύοντας ότι ένα παράσιτο ήταν παρόν (α, b). Φαίνεται ότι η εγκόλπωση και η φαγοκυττάρωση απέτρεψαν, όχι μόνο την περαιτέρω μόλυνση, αλλά και εκτόπισαν το παράσιτο από το σώμα του κοραλλιού. Οξεόφιλα κύτταρα παρατηρούνται σε υψηλή συγκέντρωση στα σημεία που ήταν το παράσιτο. Το κοράλλι αναγεννά τους “πληγέντες” ιστούς του (7) {b: κοινένχυμα, καθώς κινείται μέσα στην περιοχή της εγκόλπωσης που προηγήθηκε}.

2.5 Ταξινόμηση των Κνιδοζώων

Στη συνομοταξία των Κνιδοζώων (Phylum: *CNIDARIA*, Εικ. 2.18) του ζωικού βασιλείου (Kingdom: *ANIMALIA*) περιλαμβάνονται οι ομοταξίες των Ανθοζώων (Class: *ANTHOZOA*) και των Υδροζώων (Class: *HYDROZOA*). Η ομοταξία των Ανθοζώων περιλαμβάνει 9 τάξεις και 63 οικογένειες, που περιλαμβάνουν πληθώρα ειδών και υποειδών (taxa), τα οποία κατανέμονται σε 561 γένη, ενώ η ομοταξία των Υδροζώων περιλαμβάνει 3 τάξεις και 4 οικογένειες, που περιλαμβάνουν, επίσης, σημαντικό αριθμό ειδών και υποειδών (taxa), τα οποία κατανέμονται σε 32 γένη.



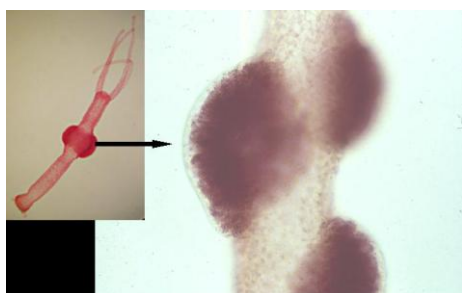
Εικ. 2.18 Μερική ταξινομική κατάταξη των Κνιδοζώων

2.5.1 Ομοταξία Υδροζωα

Πολυμορφικοί οργανισμοί, με οργανικό (χιτινώδες) κέλυφος (ελάχιστα έχουν ασβεστολιθικό σκελετό, όπως η *Millipora*). Εμφανίζονται είτε με τη μορφή του πολύποδα είτε με τη μορφή της μέδουσας ή περνούν και από τις δύο μορφές κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους.

Τρία κύρια χαρακτηριστικά συνδέουν τα μέλη αυτής της Ομοταξίας:

- η μεσογλοία είναι πάντα ακυτταρική,
- η γαστροδερμίδα δεν έχει κνιδοκύτταρα,
- οι γονάδες βρίσκονται στην επιδερμίδα (ή, αν οι γονάδες βρίσκονται στη γαστροδερμίδα, τα ωάρια και τα σπερματοζωάρια ελευθερώνονται κατευθείαν στο εξωτερικό περιβάλλον και όχι στη γαστροαγγειακή κοιλότητα) (Εικόνα 2.19).



Εικ. 2.19 Πολύποδας με γονάδες για σεξουαλική αναπαραγωγή

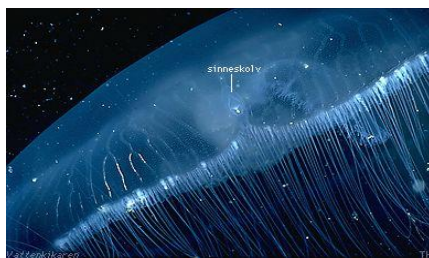
Μερικές μορφές, όπως η Ύδρα, εμφανίζονται μόνο ως μονήρεις πολύποδες, όμως η πλειονότητα των υδροζώνων είναι αποικιακά. Στην Ύδρα εμφανίζονται εκβλαστήσεις, απλές εγκολπώσεις του τοιχώματος του σώματος. Στο άκρο του εκβλαστήματος σχηματίζεται στόμα και κεραίες και όλο το εκβλάστημα αποκόπτεται για να δώσει ένα νέο άτομο. Κατά την ανάπτυξη των αποικιακών μορφών, τα εκβλαστήματα παραμένουν προσκολλημένα στο αρχικό σώμα και με τη σειρά τους δημιουργούν νέα εκβλαστήματα. Έτσι, οι πολύποδες παραμένουν συνδεδεμένοι μεταξύ τους και τα τρία στρώματα του σώματος (επιδερμίδα, ενδοδερμίδα, μεσογλοία) καθώς και η γαστροαγγειακή κοιλότητα είναι συνεχή.

2.5.2 Ομοταξία Σκυφόζωα

Στα Σκυφόζωα η κύρια μορφή είναι η μέδουσα, ενώ ο πολύποδας περιορίζεται στην προνυμφική φάση. Το όνομά τους προέρχεται από τον Σκύφο (Αρχαίο Ελληνικό αγγείο μορφής «μπολ»). Είναι ζώα που κολυμπούν ελεύθερα και έχουν ακτινωτή τετραμερή συμμετρία. Επειδή το σώμα τους αποτελείται μόνο από μαλακούς ιστούς, τα απολιθώματά τους είναι ελάχιστα και βρίσκονται υπό μορφή αποτυπωμάτων σε λεπτόκοκκα ιζήματα. Αναφέρονται μέδουσες που διατηρήθηκαν σαν αποτυπώματα-εσωτερικά εκμαγεία, επειδή όλες οι κοιλότητές τους γέμισαν από λεπτόκοκκο ίζημα πριν την αποσύνθεση του σώματός τους.

Οι μέδουσες των Σκυφοζώων είναι γενικά μεγαλύτερες από τις υδρομέδουσες (Εικόνα 2.20), με διάμετρο που συνήθως κυμαίνεται από 2 έως 40 cm. Μπορεί, όμως, να φτάσει και τα 2 m.

Εκτός από ορισμένες εξαιρέσεις τα Σκυφόζωα είναι γονοχωριστικά. Οι γονάδες βρίσκονται στη γαστροδερμίδα, σε αντίθεση με τις υδρομέδουσες.



Εικ. 2.20 Τα κνιδοκύτταρα στην επιδερμίδα των κεραιών των Σκυφοζώων μπορούν να σκοτώσουν τη λεία τους. Στο μέσο της φωτογραφίας διακρίνεται περιοχή συσσώρευσης αισθητηρίων κυττάρων για την αντίληψη της λείας

2.5.3 Ομοταξία Ανθόζωα

Γενικά χαρακτηριστικά:

- Ζώα που ζουν αποκλειστικά στη θάλασσα.
- Χωρίς τη μορφή μέδουσας.
- Το στοματικό άκρο εκτείνεται σε στοματικό δίσκο, που περιβάλλεται από κεραίες.
- Η γαστραγγειακή κοιλότητα χωρίζεται σε τμήματα από επιμήκη διαφράγματα (τα μεσεντέρια) (Εικόνα 2.21). Τα μεσεντέρια φέρουν νηματοκύστες στο περιθώριο τους.
- Οι γονάδες αναπτύσσονται στη γαστροδερμίδα.
- Μονήρη ή αποικιακά.
- Όταν υπάρχει σκελετός μπορεί όπως στα Σκληρακτίνια, να είναι ασβεστολιθικός εξωσκελετός και να εκκρίνεται από την επιδερμίδα ή, όπως στα Οκτωκοράλλια, να είναι εσωτερικός και να εκκρίνεται από τα κύτταρα της μεσογλοίας. Στα Οκτωκοράλλια, ο σκελετός είναι ασβεστολιθικός ή από κερατίνη. Όπου ο σκελετός λείπει, η γαστροαγγειακή κοιλότητα λειτουργεί σαν υδροστατικός σκελετός.



Εικ. 2.21 Περιοχή του φάρυγγα. Διακρίνονται τα μεσεντέρια διαφράγματα και η σιφονογλυφή

2.5.3.1 Υφομοταξία Οκτωκοράλλια

Ανθόζωα με 8 κοίλες και πτεροειδείς κεραίες και 8 πλήρη διαφράγματα. Συνήθως έχουν μία σιφονογλυφή στην κοιλιακή πλευρά. Είναι όλα αποικιακά, “βυθισμένα” σε ένα κοινέγχυμα από μεσογλοία. Οι πολύποδες είναι συνδεδεμένοι μεταξύ τους με μία μάζα ιστού, το κοινέγχυμα (Coll, 1992). Αυτό αποτελείται από παχιά μάζα μεσογλοίας, που διαπερνάται από γαστροδερμικούς σωλήνες, οι οποίοι επικοινωνούν με τη γαστροαγγειακή κοιλότητα των πολυπόδων. Η επιφάνεια όλης της μάζας καλύπτεται από επιδερμίδα. Αυτή συνδέεται με την επιδερμίδα του μίσχου των πολυπόδων. Μόνο το ανώτερο τμήμα κάθε πολύποδα προεξέχει από το κοινέγχυμα.

Τα αμοιβαδοκύτταρα της μεσογλοίας εκκρίνουν σκελετικό υλικό. Ο σκελετός, δηλαδή είναι εσωτερικός, σε αντίθεση με τα Σκληρακτίνια που έχουν εξωτερικό σκελετό. Αποτελείται από ή ασβεστολιθικές βελόνες ή από κερατίνη.

Τάξη Αλκυονειδή (Alcyonacea)

Οι πολύποδες είναι "βυθισμένοι" σε σαρκώδες κοινέγχυμα, εκτός από το ακραίο τμήμα τους. Ο σκελετός αποτελείται από μεμονωμένες ασβεστολιθικές βελόνες, σκόρπιες μέσα στο κοινέγχυμα. Στο σχήμα μοιάζουν με μανιτάρια ή με φυτά.

Αντιπρόσωπος: ***Alcyonium palmatum***. Στη Μεσόγειο απαντά το *A. palmatum*. Ζει στερεωμένο σε πέτρες ή όστρακα σε λασπώδη βυθό και σε βάθη κάτω από 10 μέτρα.



Τάξη Γοργονοειδή (Gorgonacea)

Έχουν σκελετικό άξονα, διακλαδισμένο συχνά σε σχήμα βεντάλιας. Ο σκελετός αποτελείται στο κέντρο του από κερατίνη και περιβάλλεται εξωτερικά από γοργονίνη. Σε μερικά γοργονοειδή, όπως το *Corallium*, ο σκελετός έχει και ασβεστολιθικές βελόνες.

Αντιπρόσωποι: ***Corallium rubrum*** (κόκκινο κοράλλι). Ζει στη Μεσόγειο, σε σκληρό υπόστρωμα, σε περιοχές με λίγο φως, δηλαδή σε σπήλαια της περιαιγιαλίτιδας ζώνης και στη βαθιά ζώνη.

Eunicella cavolini Ζει στη Μεσόγειο, σε σκιερές περιοχές, με σκληρό υπόστρωμα, συνήθως σε βάθη μεγαλύτερα από 10 μέτρα.



Τάξη Πτεροειδή (Pennatulacea)

Το σώμα τους αποτελείται από τη ράχη, που διακλαδίζεται και φέρει, στις διακλαδώσεις, τους πολύποδες και από ένα γυμνό στέλεχος «βυθισμένο» στο μαλακό υπόβαθρο. Ο σκελετός είναι κεράτινος ή ασβεστολιθικός.

Αντιπρόσωπος: ***Pennatula phosphorea***. Ζει, και στη Μεσόγειο, σε αμμώδεις και λασπώδεις βυθούς σε αρκετά μεγάλα βάθη (30-40 μέτρα).



Τάξη Στελεχοφόρα (Stolonifera)

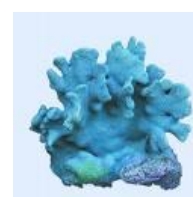
Οι πολύποδες βγαίνουν μεμονωμένα από μία έρπουσα βάση. Ο σκελετός, όταν υπάρχει, αποτελείται από ασβεστολιθικές βελόνες, που σε μερικά είδη ενώνονται και σχηματίζουν σωλήνες.

Αντιπρόσωπος: ***Tubipora musica***. Ζει σε κοραλλιογενείς υφάλους.



Τάξη Κοινοθηκωτά (Coenothecalia)

Γνωστά σαν μπλε κοράλλια. Ζουν σε κοραλλιογενείς υφάλους.
Αντιπρόσωπος: ***Helipora*** sp. του Ινδο-Ειρηνικού Ωκεανού.





Τάξη Τηλεστοειδή (Telestacea)

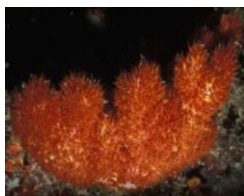
Υπάρχει βάση που έρπει. Από αυτή βγαίνουν επιμηκυσμένοι πολύποδες και από αυτούς άλλοι πολύποδες πλευρικοί.

Αντιπρόσωπος: ***Telesto*** sp.

Τα χρώματα των οκτωκοραλλίων προέρχονται από μία ή συνδυασμό των εξής τριών πηγών:

- Χρωστικές, που βρίσκονται στους ιστούς των πολυπόδων.
- Ενδοκυτταρικά συμβιωτικά φύκη στο σώμα των πολυπόδων, που ονομάζονται ζωοξανθέλλες.
- Μέταλλα, που προσδίδουν χρώμα στα ασβεστούχα αγκάθια της αποικιακής οργάνωσης.

Τα χρώματα μεταξύ διαφορετικών αποικιών του ίδιου είδους, συχνά διαφέρουν μεταξύ τους. Για το λόγο αυτό, τα χρώματα είναι σπάνια χρήσιμα στις διαδικασίες προσδιορισμού και ταυτοποίησης των ειδών (Humann, 1993).



Εικ. 2.22 *Dendronephthya* sp. Το λαμπρό κόκκινο χρώμα της είναι μία ξεκάθαρη προειδοποίηση, για ζώα που μπορεί να επιχειρήσουν να την καταβροχθήσουν ότι μπορεί να περιέχει τοξίνες

2.5.3.2 Υφομοταξία Εξακοράλλια (Zoantharia ή Hexacorallia)

Τα Ζωανθάρια (ζώα μορφής άνθους) είναι ζώα μορφής πολύποδα, που σχηματίζουν ασβεστολιθικό σκελετό. Ζουν μεμονωμένα (μονήρη) ή σε αποικίες.

Ο κάθε πολύποδας αρχίζει να δημιουργεί στη βάση του σώματός του (βασική πλάκα) σκελετό από CaCO_3 . Ο σκελετός αυτός έχει μορφή σωληνοειδή-κωνική, φέρει κατακόρυφα διαφράγματα (septa) και περιβάλλεται από εξωτερικό τοίχωμα, την επιθήκη. Στην άνω επιφάνειά του σχηματίζεται κοιλότητα, ο κάλυκας (calice), την οποία καταλαμβάνει ο ζωντανός πολύποδας. Η αύξηση του σκελετού γίνεται με διαδοχική απόθεση CaCO_3 στη βάση του πολύποδα, οπότε ο σκελετός αυξάνει κατά μήκος και πλάτος.

Τα κατακόρυφα διαφράγματα (septa) είναι ακτινωτά διαταγμένα και, πολλές φορές, ενώνονται στο κέντρο του κάλυκα, σχηματίζοντας μία μικρή προεξοχή, το στυλίδιο. Ο αριθμός και ο τρόπος διάταξης των septa αποτελεί ταξινομικό χαρακτηριστικό στις διάφορες ομάδες των κοραλλιών.

Ο μεμονωμένος πολύποδας, με τον αντίστοιχο σκελετό του, ονομάζεται κοραλλίτης. Όταν, όμως, πολλοί κοραλλίτες συνενώνονται σχηματίζουν αποικία και, μαζί με το σύνολο του σκελετού, ονομάζονται κοράλλιο. Η συνένωση των κοραλλιτών, μερικές φορές, γίνεται με μία ασβεστολιθική μάζα, το κοινέγχυμα. Στο κέντρο των κατακόρυφων διαφραγμάτων σχηματίζεται συνήθως, το στυλίδιο (collumela), ενώ σε μερικές ομάδες κοραλλιών παρατηρούνται και οριζόντια διαφράγματα (tabulae) υπό μορφή πατωμάτων.

Τάξη Ακτινάρια (Actinaria, θαλάσσιες ανεμώνες)

Ζώα συνήθως μονήρη, με πολλά πλήρη μεσεντέρια, χωρίς σκελετό. Η βάση του σώματος είναι προσαρμοσμένη ή για να προσκολλάται στο σκληρό υπόστρωμα ή για να σκάβει στο μαλακό. Συνήθως με δύο σιφωνογλυφές.

Αντιπρόσωποι στη Μεσόγειο: ***Actinia equina***. Ζει στη μεσοπαλιρροιακή ζώνη, συνήθως σε σχισμές βράχων. Οι κεραίες μπορούν να συστέλλονται και να μη φαίνονται. Αντέχει πολλές ώρες έξω από το νερό.



Anemonia sulcata. Βρίσκεται σε σκληρό υπόστρωμα, κοντά στις ακτές κάτω από την επιφάνεια του νερού έως μέτρια βάθη. Οι κεραίες δεν συστέλλονται. Δεν αντέχει πολύ έξω από το νερό.

Οι θαλάσσιες ανεμώνες βρίσκονται σε όλα τα βάθη και όλα τα γεωγραφικά πλάτη. Παρουσιάζουν όμως, τη μεγαλύτερη ποικιλία στις τροπικές περιοχές. Συνήθως, βρίσκονται προσκολλημένες σε στερεά υποστρώματα, αλλά υπάρχουν και είδη που βρίσκονται βυθισμένα στην άμμο ή στη λάσπη. Το μεγαλύτερο μέρος του σώματος

αποτελεί ο μίσχος, που στηρίζεται στο υπόστρωμα με τον ποδικό δίσκο. Στο αντίθετο άκρο βρίσκεται ο στοματικός δίσκος. Στο κέντρο του στοματικού δίσκου βρίσκεται το στόμα σαν μία σχισμή. Από το ένα ή και από τα δύο άκρα του στόματος ξεκινά μία βλεφαριδοφόρος αύλακα, η σιφωνογλυφή, που χρησιμεύει για την κυκλοφορία του νερού στη γαστραγγειακή κοιλότητα.

Η αναπαραγωγή μπορεί να είναι εγγενής ή αγενής. Στην αγενή αναπαραγωγή αποκόπτονται τμήματα του σώματος, τα οποία δίνουν νέες ανεμώνες με αναγέννηση. Η εγγενής αναπαραγωγή γίνεται με γονάδες, που σχηματίζονται στη γαστροδερμίδα, πάνω στα μεσεντέρια. Οι περισσότερες ανεμώνες είναι ερμαφρόδιτες, αλλά μόνο το ένα φύλο ωριμάζει κάθε περίοδο αναπαραγωγής.

Τάξη Ζωνανθίδια (Zoanthidae)

Μικρά ανθόζωα σαν τα ακτινάρια, αλλά με μία σιφωνογλυφή. Μερικές φορές είναι αποικιακά. Συχνά καλύπτουν επιφάνειες βράχων ή οστράκων.

Αντιπρόσωποι στη Μεσόγειο: ***Parazoanthus axinellae***.

Βρίσκεται σε μικρές ή μεγάλες ομάδες στα τοιχώματα των σπηλαίων και σε σκιερούς βράχους, μαζί με ερυθροφύκη, σπόγγους, βρυόζωα και σπόγγους.



Τάξη Κοραλλιόμορφα (Corallinomorpha)

Μορφολογικά μοιάζουν με τα σκληρακτίνια, αλλά δεν έχουν σκελετό.

Αντιπρόσωπος: ***Corynactis* sp.**



Τάξη Κυριανθή (Ceriantharia)

Μεγάλα μονήρη ανθόζωα. Ζουν στην άμμο και στη λάσπη.

Πιο γνωστοί αντιπρόσωποι είναι είδη του γένους ***Cerianthus***. Οι αντιπρόσωποι του γένους έχουν πολλές κεραιές διαταγμένες σε δύο σειρές και μία σιφωνογλυφή. Ζουν σε μακρύ βλεννώδη σωλήνα, που εκκρίνουν από την επιδερμίδα. Συχνά έχουν ξένα σωματίδια, όπως άμμο και σπασμένα όστρακα, ενσωματωμένα στο σωλήνα.



Τάξη Αντιπαθή (Antipatharia)

Αποικιακά ανθόζωα με κεράτινο αξονικό σκελετό, που άλλοτε διακλαδίζεται και άλλοτε όχι. Ζουν σε μεγάλα βάθη από 100 έως 1000 μέτρα. Είναι γνωστά σαν μαύρα κοράλλια.

Αντιπρόσωπος: *Antipathes*. Στη Μεσόγειο ζει το ***Antipathes fragilis***.



Τάξη Σκληρακτίνια ή Μαδρεποράρια (*Scleractinia* ή *Madreporaria*)

Ζώα συνήθως αποικιακά, υπάρχουν όμως και μονήρη. Πολλά πλήρη μεσεντέρια διαφράγματα. Ασβεστολιθικός σκελετός, ο κοραλλίτης, που εκκρίνεται από κύτταρα του εξωδέρματος. Ο κοραλλίτης χωρίζεται σε διαμερίσματα από ασβεστολιθικά διαφράγματα και, στο κέντρο του, έχει την κολωνοειδή στήλη (*columella*), που σχηματίζεται από τη σύντηξη των διαφραγμάτων με προεξοχές της βάσης. Σε τροπικές περιοχές σχηματίζουν κοραλλιογενείς υφάλους (π.χ τα είδη ***Acropora*** και ***Meandrina***).



Αντιπρόσωποι της Μεσογείου: ***Caryophyllia clavus***. Ζώα μονήρη. Βρίσκονται σε σκληρό υπόστρωμα, πάνω σε βράχους, πέτρες ή όστρακα. Χαρακτηριστικό είδος της "Κοραλλιογενούς Βιοκοινωνίας".

Cladocora caespitosa. Ζώα αποικιακά. Ζουν σε σκληρό υπόστρωμα και προτιμούν οριζόντιους βράχους. Βρίσκονται, συνήθως, σε βάθη από 15 ως 600 μέτρα, αλλά μπορεί να βρεθούν και σε 2-3 μέτρα βάθος.



2.6 Ερευνητικός προσανατολισμός

Μελέτες των θαλάσσιων οικοσυστημάτων έχουν αποκαλύψει ότι οι αντιπρόσωποι της υποκλάσης των Οκτωκοραλλίων (*Alcyonaria*) αποτελούν ένα σημαντικό ποσοστό της θαλάσσιας βιομάζας, ειδικά στους κοραλλιογενείς υφάλους.

Σε πολλά σημεία του Ινδο-Ειρηνικού Ωκεανού και της Ερυθράς Θάλασσας, η ποικιλία και η πυκνότητα των Οκτωκοραλλίων της τάξης *Alcyonacea* κυριαρχεί στις βενθικές κοινωνίες, ξεπερνώντας πολλές φορές σε ποσοστιαία κάλυψη του βυθού ακόμα και τα σκληρά κοράλλια.

Στην τάξη *Gorgonacea* περιλαμβάνονται πολυάριθμα είδη, τα οποία εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα και προφάνεια (Fenical, 1987). Παρά τη διατροφική αξία τους ως εν δυνάμει βορά των θηρευτών και την έλλειψη δομικών μηχανισμών άμυνας (εξωσκελετός), έρευνες πεδίου έχουν δείξει ότι η συχνότητα με την οποία ενοχλούνται από θηρευτές είναι πρακτικά αμελητέα (Pawlik *et al*, 1987).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις, σε συνδυασμό με την εμπειρία που είχε αποκτηθεί στον τομέα της Χημικής Οικολογίας στο χερσαίο περιβάλλον, οδήγησαν στην υπόθεση ότι οι οργανισμοί αυτοί θα πρέπει να προστατεύονται βασισμένοι στο χημικό τους περιεχόμενο, που πιθανότατα να περιλαμβάνει και ουσίες με αντιτροφική δράση (Rodriguez *et al*, 1998).

Οι κυριότερες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίες έχουν απομονωθεί από μέλη της υποκλάσης των Οκτωκοραλλίων περιλαμβάνουν στεροειδή, μερικά από τα οποία έχουν εμφανίσει αξιόλογη φαρμακολογική δράση (Schmitz *et al*, 1976; He *et al*, 1995; Kerr *et al*, 1996; Rodríguez *et al*, 1998; El Sayed *et al*, 1999; Naz *et al*, 2000), ακετογενίνες και λιπίδια (Carballeira, 1996). Η κύρια κατηγορία συστατικών, όμως, στην οποία ανήκουν τα περισσότερα από τα φυσικά προϊόντα που έχουν απομονωθεί, είναι η τάξη των τερπενίων. Πολύ συχνά είναι σεσκι- ή διτερπένια, τα οποία εμφανίζουν ποικίλη βιοδραστικότητα.

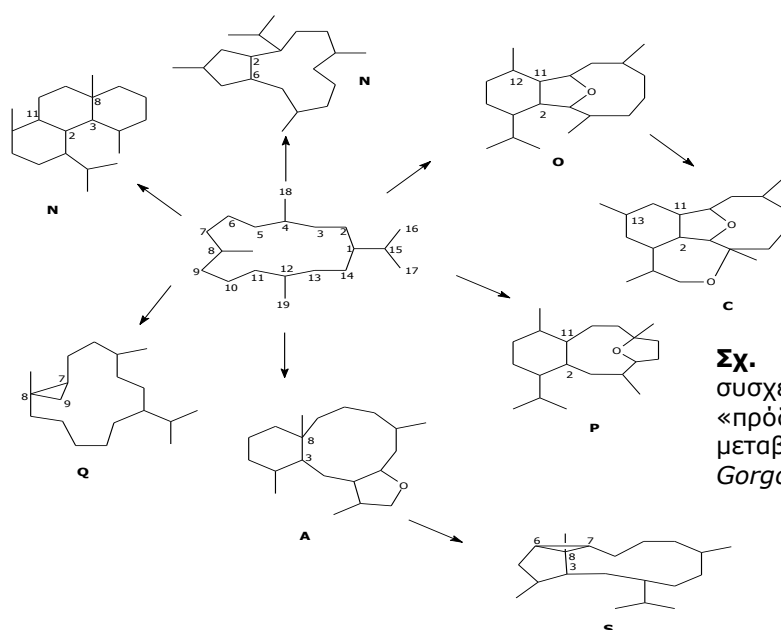
Στόχος της παρούσας μελέτης υπήρξε, η διερεύνηση της χημικής σύστασης ενός Οκτωκοραλλίου της τάξης *Gorgonacea*, του οργανισμού *Pseudopterogorgia rigida*. Η επιλογή του τροπικού αυτού οργανισμού έγινε με βάση τις παρατηρήσεις πεδίου, αλλά και το φαρμακολογικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν τα προγενέστερα ευρήματα από ταξινομικά συγγενικά του είδη, καθώς και από τη δυνατότητα συλλογής του σε ικανές ποσότητες. Οι τελευταίες θα ήταν πιθανό να απαιτηθούν σε περίπτωση ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων.

2.7 Χημικά συστατικά Οκτώκοραλλίων των τάξεων *Alcyonacea* και *Gorgonacea*

Το κοράλλι *Pseudopterogorgia rigida* είναι μέλος της τάξης *Gorgonacea*, η οποία μαζί με την τάξη *Alcyonacea*, περιλαμβάνουν σημαντικό αριθμό ειδών, που έχουν μελετηθεί εντατικά τις δύο τελευταίες δεκαετίες. Οι οργανισμοί αυτοί απαντώνται σε μεγάλη πληθυσμιακή πυκνότητα στους τροπικούς κοραλλιογενείς υφάλους. Οι «γοργόνιες» βρίσκονται κυρίως, στην θάλασσα της Καραϊβικής, ενώ τα είδη της τάξης *Alcyonacea*, κυρίως στην περιοχή του Ινδο-Ειρηνικού ωκεανού.

Από προγενέστερες μελέτες είναι γνωστό ότι τα είδη των δύο τάξεων διαθέτουν χημική προστασία, η οποία τους επιτρέπει να είναι σχετικά απαλλαγμένα από επιβιωτικούς μικροοργανισμούς και τους βοηθάει να μη γίνονται βορά των θηρευτικών οργανισμών. Αυτές οι παρατηρήσεις έδωσαν την ώθηση, για να διερευνηθεί η χημική σύσταση μελών των δύο τάξεων.

Σημαντικό, για τη μεγάλη έκταση που πήρε η διερεύνηση του χημικού τους φορτίου, είναι το γεγονός ότι αποδίδουν αξιόλογο βάρος οργανικού εκχυλίσματος, καθώς και το ότι απαντούν σε σχετικά προσβάσιμα βάθη.



Σχ. 2.1 Προτεινόμενη βιογενετική συσχέτιση μεταξύ του σεμβρανοειδούς «πρόδρομου» και των διτερπενικών μεταβολιτών των τάξεων *Alcyonacea*, *Gorgonacea*

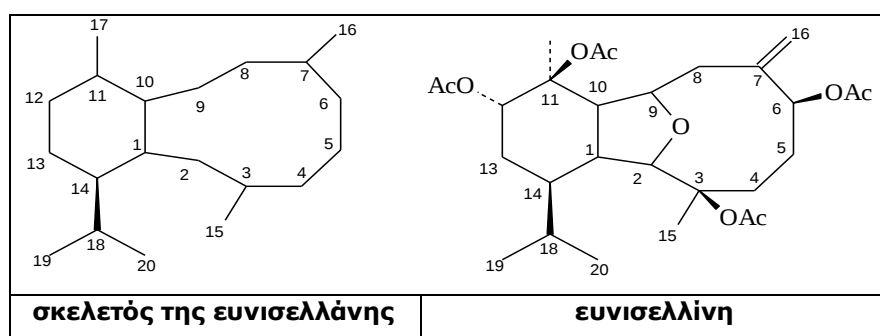
Οι έρευνες αυτές που ξεκίνησαν τη δεκαετία του '60, έχουν αποδειχτεί αρκετά επιτυχείς. Αποκάλυψαν ότι στα μαλακά κοράλλια, τα διτερπένια είναι οι πιο συχνά ευρισκόμενοι δευτερογενείς μεταβολίτες. Η κυρίαρχη τάξη διτερπενίων που συναντάται είναι τα σεμβράνια (cembrane), με S προσανατολισμό στην τάξη *Alcyonacea* και R στην τάξη *Gorgonacea* (Harper, 2001). Από το σύνολο των σεμβρανίων, που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα, τα 200 έχουν απομονωθεί από θαλάσσια ασπόνδυλα (Wright *et al*, 1989; Wahlberg *et al*, 1994). Μάλιστα έχει

προταθεί ότι, οι άλλες τάξεις διτερπενικών δευτερογενών μεταβολιτών, που έχουν απομονωθεί από τα διάφορα είδη των τάξεων *Alcyonacea* και *Gorgonacea*, στην πραγματικότητα βιοσυντίθενται στους οργανισμούς αυτούς με ενδιάμεσο πρόδρομο ένα σεμβρανοειδές μόριο.

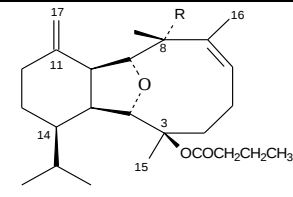
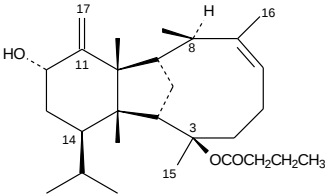
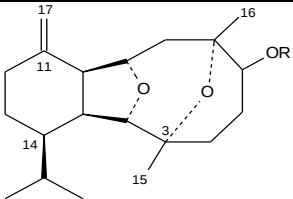
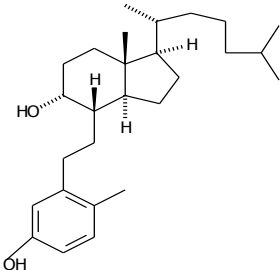
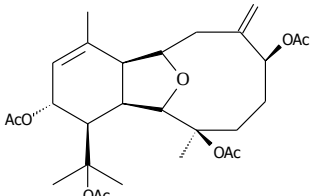
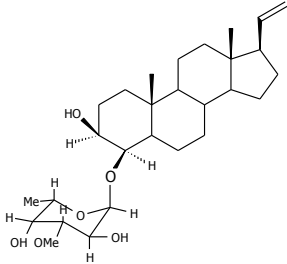
Ο κύριος παραγωγός σεμβρανοειδών διτερπενίων του γένους *Pseudopterogorgia* είναι η *Pseudopterogorgia bipinnata* (Wahlberg et al, 1994). Στο Σχήμα 2.1 φαίνονται οι κυριότερες τάξεις (χημικές ομάδες) διτερπενίων που έχουν απομονωθεί από τις δύο τάξεις.

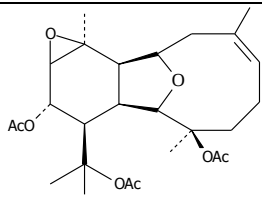
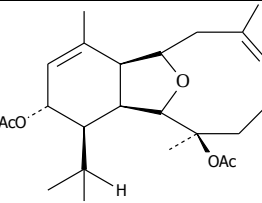
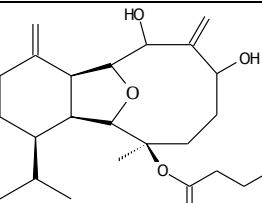
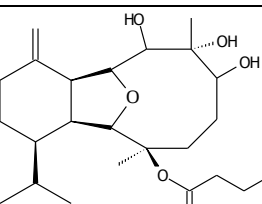
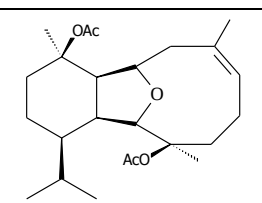
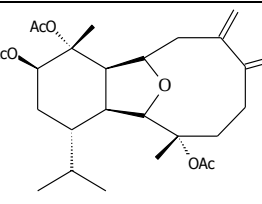
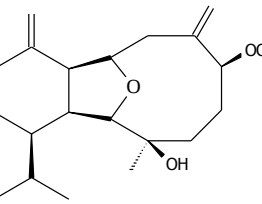
- A** Βασικός σκελετός της τάξης των μπριαρανίων (briarins)
- C** Βασικός σκελετός της τάξης των ασβεστινινών (asbistinins)
- N** Βασικός σκελετός της τάξης των καπνοσανοειδών (carposanoids)
- O** Βασικός σκελετός της τάξης των κλαδιελλινών (cladiellins)
- P** Βασικός σκελετός της τάξης των σαρκοδικτυϊνών (sarcodictyins)
- Q** Βασικός σκελετός της τάξης των γκερσολανοειδών (gersolanoids)
- S** Βασικός σκελετός της τάξης των ερυθρανοειδών (erythranoids)

Οι Tursch και Djerassi (1968) ήταν οι πρώτοι που απομόνωσαν και χαρακτήρισαν δομικά τη ευνισελλίνη, ένα [8.4.0] δίκυκλο τετραδεκάνιο, που ανήκει στην τάξη των διτερπενίων. Η ευνισελλίνη απομονώθηκε από μία «γοργόνια» που βρίσκεται στη Μεσόγειο, την *Eunicella stricta* (ή *E. sinularis*). Από τότε, από άλλα είδη *Eunicella*, όσο και από άλλα μέλη των τάξεων *Alcyonacea* και *Gorgonacea*, έχει απομονωθεί ένας σημαντικός αριθμός διτερπενίων, που ανήκουν στην τάξη της ευνισελλάνης (γνωστά και σαν κλαδιελλίνες). Είναι σημαντικό ότι αρκετοί από τους δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν εμφανίζουν και αξιόλογες φαρμακολογικές δράσεις (Πιν. 2.1).

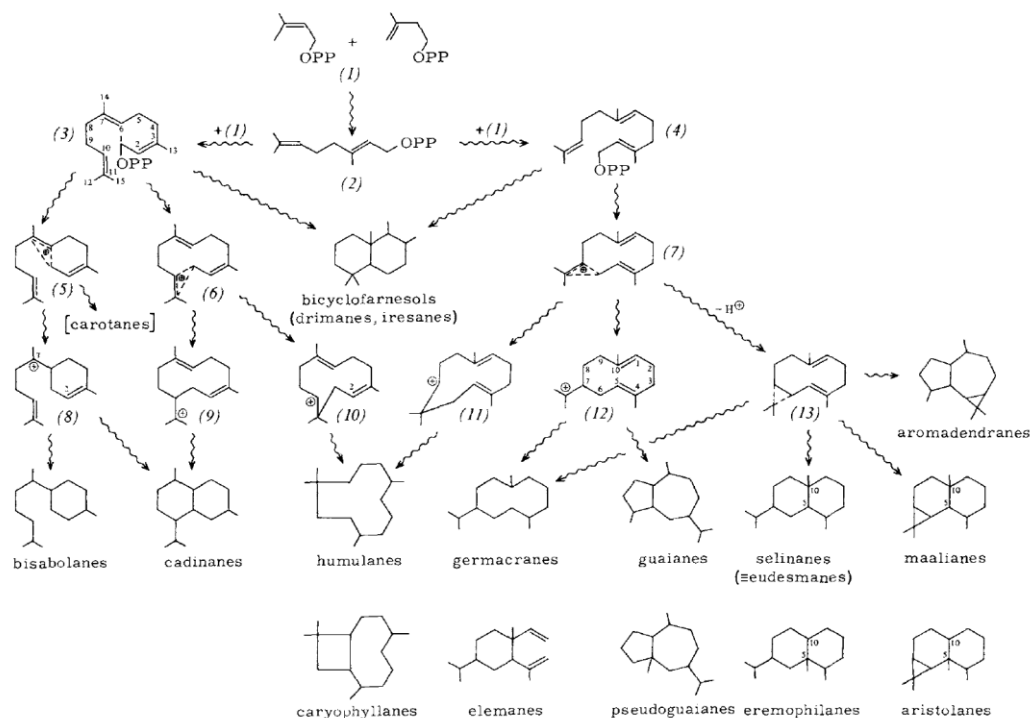


Πίνακας 2.1 Βιοδραστικά συστατικά από μέλη των τάξεων *Alcyonacea* και *Gorgonacea*

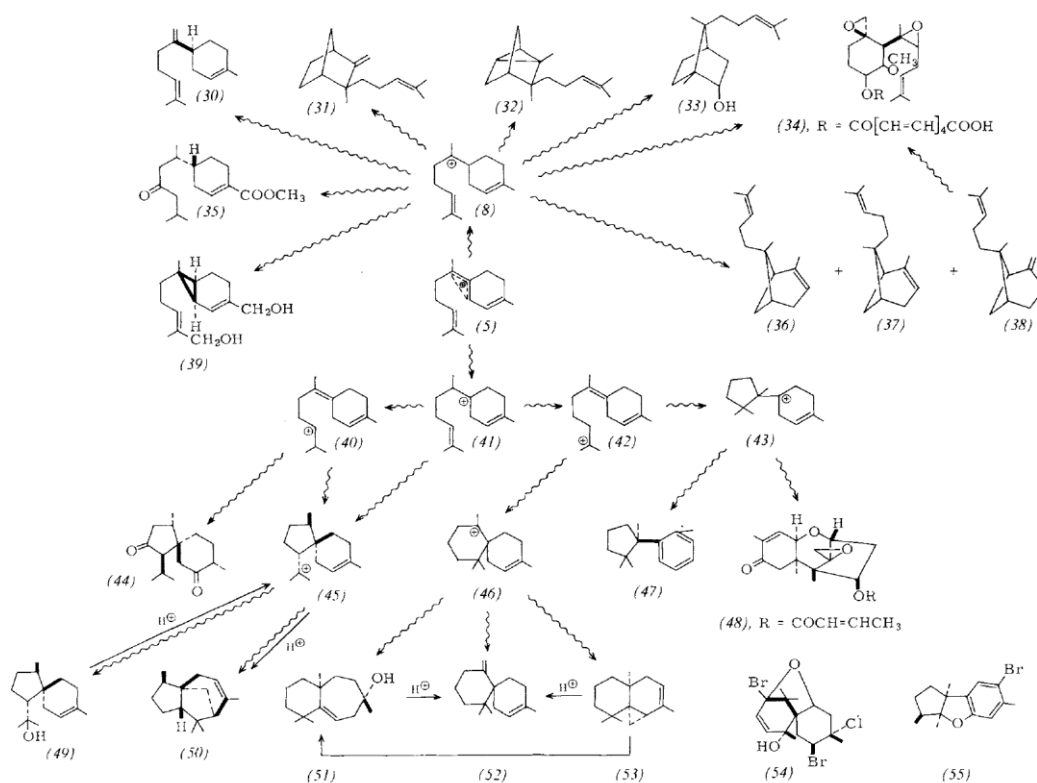
Ουσία	Παραγωγός οργανισμός	Βιολογική Δράση
 R=H Litophylin A, R=OCOCH₂CH₂CH₃ Litophylin B	<i>Litophyton</i> sp. <i>Nephtheidae</i> <i>Alcyonacea</i>	Ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη εντόμων
 Litophylin C	<i>Litophyton</i> sp. <i>Nephtheidae</i> <i>Alcyonacea</i>	Ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη εντόμων
 R=H Sclerophytin A R=Ac Sclerophytin B	<i>Sclerophytum capitalis</i> <i>Alcyonacea</i>	Δραστικές κατά της καρκινικής κυτταρικής σειράς L ₁₂₁₀
 Astrogorgadiol	<i>Astrogorgia</i> sp. <i>Gorgonacea</i>	Αναστολέας της κυτταρικής διαίρεσης σε γονιμοποιημένα αυγά αστερία
 Astrogorgin	<i>Astrogorgia</i> sp. <i>Gorgonacea</i>	Αναστολέας της κυτταρικής διαίρεσης σε γονιμοποιημένα αυγά αστερία
 Verrucoside	<i>Eunicella verrucosa</i> <i>Gorgonacea</i>	Κυτταροτοξικό κατά των κυτταρικών σειρών P ₃₈₈ , A-549, HT-29

 Calicophorin A	<i>Calicogorgia</i> sp. Gorgonacea	Ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των εντόμων
 Calicophirin B	<i>Calicogorgia</i> sp. Gorgonacea	Ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των εντόμων
 Litophynol A	<i>Litophyton</i> sp. Alcyonacea	Αιμολυτική δράση
 Litophynol B	<i>Litophyton</i> sp. Alcyonacea	Αιμολυτική δράση
	<i>Eunicella cavolini</i> Gorgonacea	Κυτταροτοξική και ιχθυοτοξική δράση
 Labiatin B	<i>Eunicella labiata</i> Gorgonacea	Κυτταροτοξική δράση κατα της σειράς HCT- 116
 Cladiellaperoxide	<i>Cladiella sphaeroides</i> Alcyonacea	Κυτταροτοξική δράση

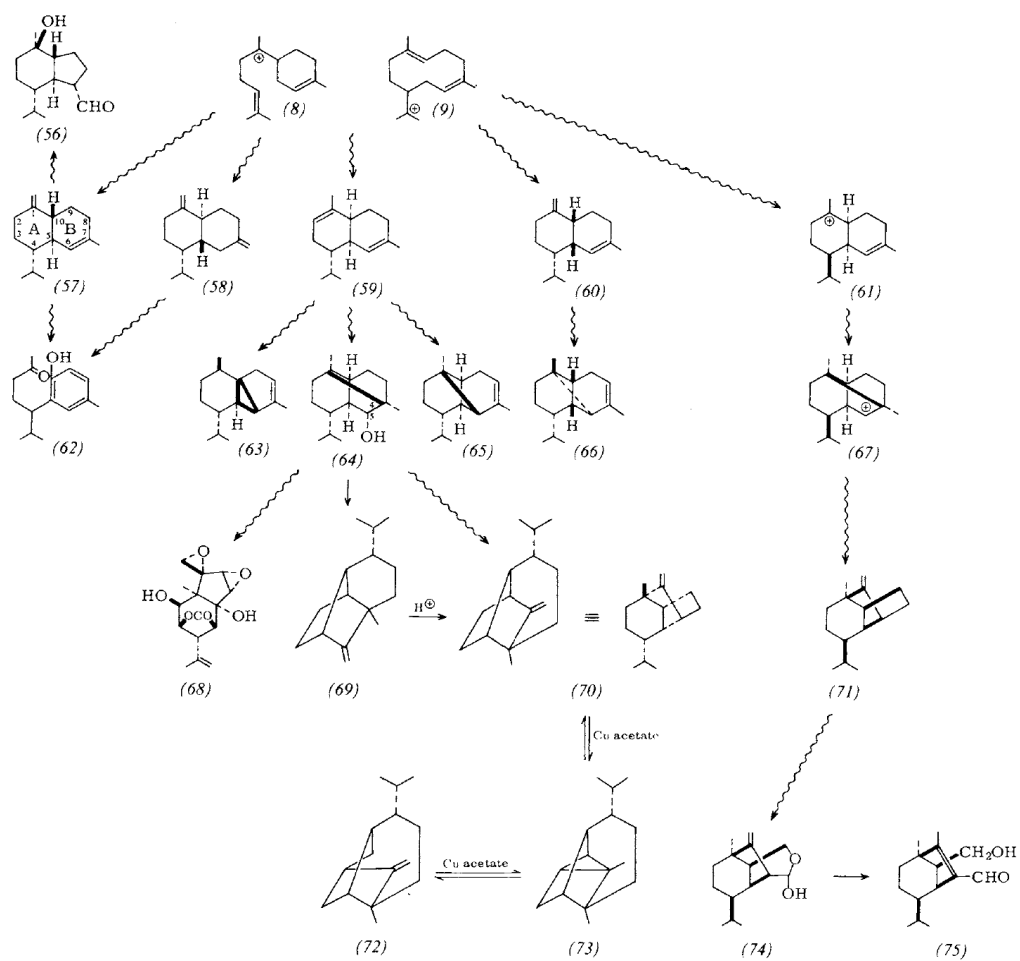
Στα μαλακά κοράλλια ισχυρή κάνουν την παρουσία τους και τα σεσκιτερπένια (Σχήμα 2.2), ως συχνά ευρισκόμενοι δευτερογενείς μεταβολίτες. Η κυρίαρχη τάξη σεσκιτερπενίων που συναντάται είναι τα μπισαμπολάνια (Σχήμα 2.3) και τα καδινάνια (Σχήμα 2.4).



Σχήμα 2.2 Βιογένεση βασικών σκελετών σεσκιτερπενίων (Rucker, 1973)



Σχήμα 2.3 Μπισαμπολάνια και συγγενικά σεσκιτερπένια (Rucker, 1973)



Σχήμα 2.4 Καδινάνια και συγγενικά σεσκιτερπένια (Rucker, 1973)

2.8 Ταξινόμικά στοιχεία του υπό μελέτη είδους

ΒΑΣΙΛΕΙΟ/KINGDOM:	ΖΩΑ/ANIMALIA
ΥΠΟΒΑΣΙΛΕΙΟ:	ΑΣΠΟΝΔΥΛΑ/INVERTEBRATES
ΣΥΝΟΜΟΤΑΞΙΑ/PHYLUM:	ΚΝΙΔΟΖΩΑ/CNIDARIA
ΟΜΟΤΑΞΙΑ:	ANTHOZOA (EHRENBERG, 1834)
ΥΦΟΜΟΤΑΞΙΑ:	ALCYONARIA/OCTOCORALLIA
ΤΑΞΗ:	GORGONACEA
ΥΠΟΤΑΞΗ:	HOLAXONIA (STUDER, 1887)
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ:	GORGONIIDAE (LAMOUROUX, 1812)
ΓΕΝΟΣ:	PSEUDOPTEROGORGIA (KUE, 1919)
ΕΙΔΟΣ:	<i>P. rigida</i> (BIELCHOWSKY, 1929)

2.9 Χημικά συστατικά συγγενικών ειδών της *Pseudopterogorgia rigida*

Οι γοργόνιες του γένους *Pseudopterogorgia* δημιουργούν αποικίες, που παρουσιάζουν τη μορφή δεσμίδων μακρών και εξαιρετικά λεπτών «φτερών». Τα παρακλάδια διακλαδίζονται πτεροειδώς. Οι κύριοι κλάδοι έχουν συχνότερα μωβ χρώμα ή βιολετί και περιστασιακά ένα ωχρό κίτρινο χρώμα. Οι ζωντανές αποικίες παράγουν μεγάλες ποσότητες βλέννας.

Ύψος αποικίας: 0,3 μ – 2 μ

Βάθος: 0,9 μ – 55 μ

2.9.1 *Pseudopterogorgia acerosa* (Pallas, 1766)

Είναι μία γοργόνια με μακριά, εύκαμπτα κλαδιά και παρακλάδια. Σχηματίζει εντυπωσιακά γιγαντιαία «φτερά», που μπορεί να φτάσουν τα 2 μέτρα στο ύψος. Τα παρακλάδια της αναδύονται, ανά ζεύγη, από αντίθετες πλευρές του κυρίως κλάδου (συνήθως όχι από το ίδιο ύψος).



Εικ. 2.23 *Pseudopterogorgia acerosa*

Το ψευδοπετερολίδιο που έχει απομονωθεί από εκπροσώπους του είδους, παρεμποδίζει την κυτταρική διαίρεση, χωρίς να παρεμποδίζει την πυρηνική διαίρεση γονιμοποιημένων αυγών αχινού. Παράλληλα, παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση (Fenical, 1987).

Πίνακας 2.2 Χημικό περιεχόμενο του είδους *Pseudopterogorgia acerosa*

ψευδοπετερολίδιο (Bandurraga et al, 1982)	12-υδροξυ-Ε-γ-μπισαμπολένιο	τομπαγκολίδιο (Tinto et al, 1990)
δεσοξυψευδοπετερολίδιο (Chan et al, 1991)	ασεροσολίδιο (Chan et al, 1991)	διεποξυγοργιασερόνη (Tinto et al, 1991)
γοργιασερόνη (Tinto et al, 1991)	γοργιασεροδιόλη, R=H μεθοξυγοργιασερόλη, R=CH ₃ (Tinto et al, 1991)	ισογοργιασεροδιόλη (Tinto et al, 1991)

ασεροστερόλη (John <i>et al</i> , 1993)		11-γοργιασερόλη (Tinto <i>et al</i> , 1995)
αλανολίδιο (Rodriguez <i>et al</i> , 1996)	ασεροπερίνη (Rodriguez <i>et al</i> , 1996)	
β,β-διεποξυψευδοπερολίδιο (Rodriguez <i>et al</i> , 1998)	ασερολίδιο (Montalvo <i>et al</i> , 2006) Κυτταροτοξικό	

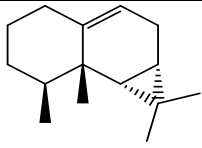
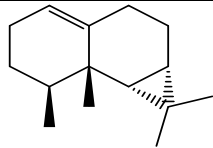
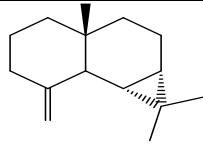
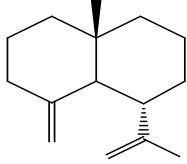
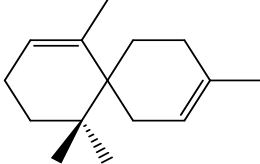
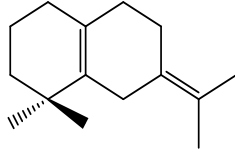
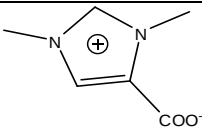
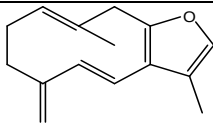
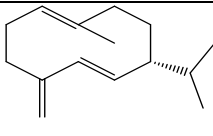
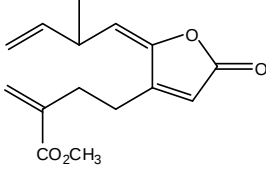
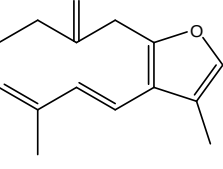
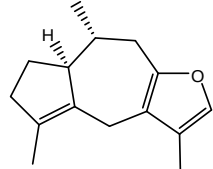
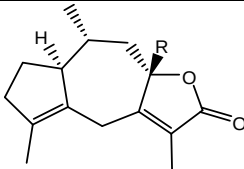
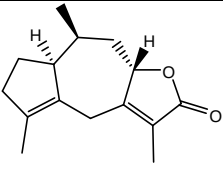
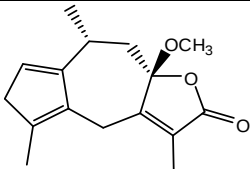
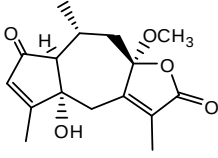
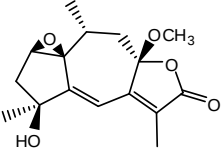
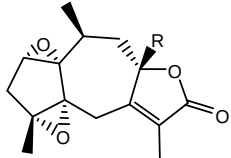
2.9.2 *Pseudopterogorgia americana* (Gmelin, 1791)

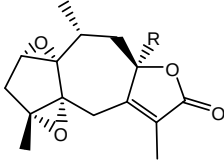
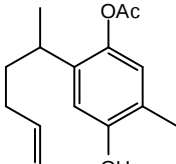
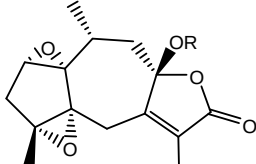
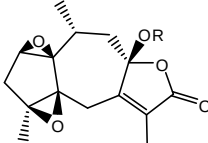
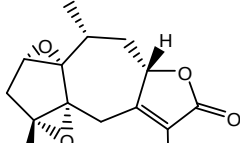
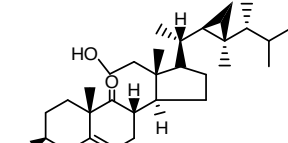
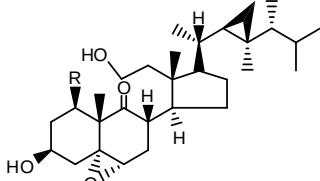
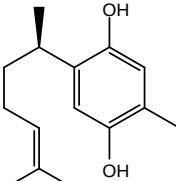
Τα παρακλάδια των αντιπροσώπων αυτού του είδους αναδύονται από αντίθετες πλευρές του κυρίως κλάδου και συνήθως ανά ζεύγη. Οι αποικίες φτάνουν το ένα μέτρο ύψος. Χαρακτηριστικό του είδους είναι ότι παράγει σημαντικές ποσότητες βλέννας.



Εικ. 2.24 *Pseudopterogorgia americana*

Πίνακας 2.3 Χημικό περιεχόμενο του είδους *Pseudopterogorgia americana*

		
(+)-9-αριστολένιο	(-)-(10)-αριστολένιο	(+)-γ-μασαλιένιο
		
(+)-β-γοργονένιο	α-τσαμιγκρένιο	καριδιένιο
		
νορζωοανεμώνινη (Weinheimer <i>et al</i> , 1973)	φουρανοτριένιο (Chan <i>et al</i> , 1990)	γερμακρένιο-D (Chan <i>et al</i> , 1990)
		
ελεμανολίδιο (Chan <i>et al</i> , 1990)	ισοφουρανοτριένιο (Chan <i>et al</i> , 1990)	φουρανογουαιαν-4-ένιο (Rodriguez <i>et al</i> , 1997)
		
αμερικανολίδιο D, R=H αμερικανολίδιο E, R=OH μεθοξυ-αμερικανολίδιο E, R=OCH ₃ (Rodriguez <i>et al</i> , 1997)	αμερικανολίδιο F (Rodriguez <i>et al</i> , 1997)	μεθοξυ-αμερικανολίδιο G (Rodriguez <i>et al</i> , 1997)
		
μεθοξυ-αμερικανολίδιο I (Rodriguez <i>et al</i> , 1998)	μεθοξυ-αμερικανολίδιο H (Rodriguez <i>et al</i> , 1998)	10-επιμεθοξυαμερικανολίδιο A R=OCH ₃ 10-επιαμερικανολίδιο C, R=H (Rodriguez <i>et al</i> , 1998)

		
8-επιμεθοξυαμερικανολίδιο A R=OCH ₃ 8-επιαμερικανολίδιο C, R=H (Rodriguez <i>et al</i> , 1998)	1-ακετοξυ- κουρκουδροκινόνη (Miller <i>et al</i> , 1995)	αμερικανολίδιο A, R=H 8-μεθοξυ-αμερικανολίδιο A, R=CH ₃ (Rodriguez <i>et al</i> , 1996)
		
αμερικανολίδιο B, R=H 8-μεθοξυ-αμερικανολίδιο B, R=CH ₃ (Rodriguez <i>et al</i> , 1996)	αμερικανολίδιο C (Rodriguez <i>et al</i> , 1996)	σεκογοργοστερόλη
		
9(11)-σεκογοργοστερόλες, R=H, R=OH Naz <i>et al</i> , 2000) Κυτταροτοξικές	κουρκουδροκινόνη (Miller <i>et al</i> , 1995)	

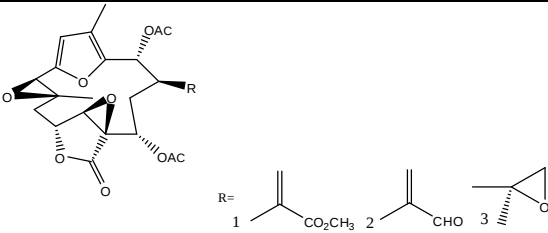
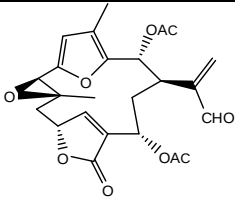
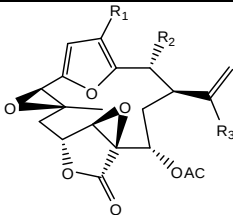
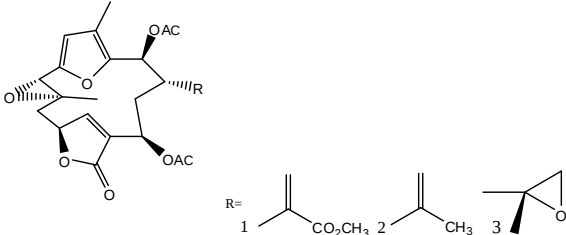
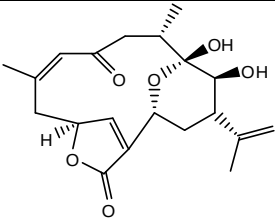
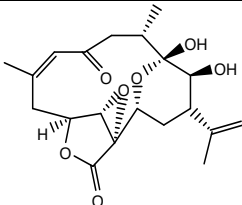
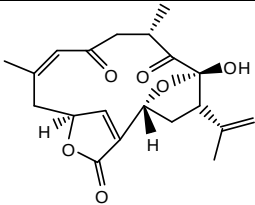
2.9.3 *Pseudopterogorgia bipinnata* (Verrill, 1864)

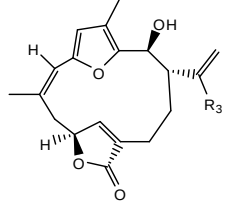
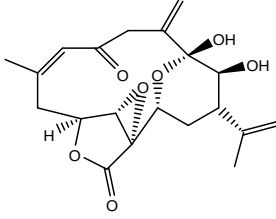
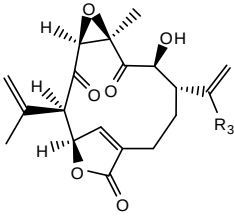
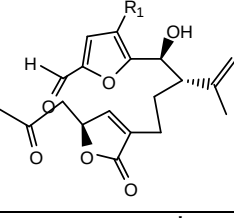
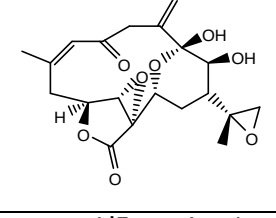
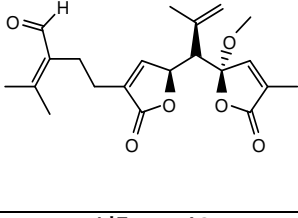
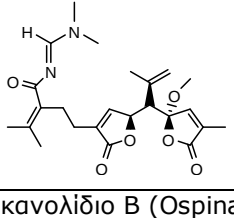
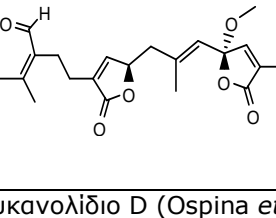
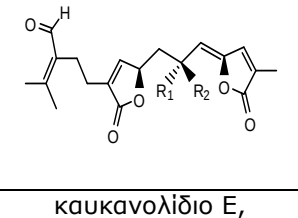
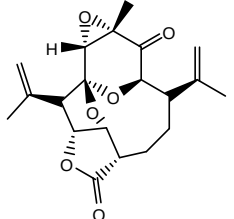
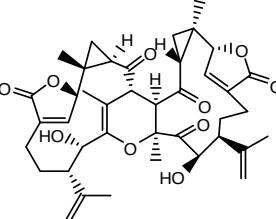
Είδος με αραιές διακλαδώσεις επί του πρωτογενούς κορμού του (ομοιάζει πολύ με τη φτέρη της ξηράς). Οι κλάδοι του είναι σκληροί και όχι εύκαμπτοι, σε αντίθεση με αυτούς των προαναφερθέντων ειδών. Τα παρακλάδια εκφύονται από αντίθετες πλευρές του κυρίως κλάδου ανά ζεύγη.



Εικ. 2.25 *Pseudopterogorgia bipinnata*

Πίνακας 2.4 Χημικό περιεχόμενο του είδους *Pseudopterogorgia bipinnata*

		
μπιπιννατίνες A-C (Wright <i>et al</i> , 1989)		
		
μπιπιννατίνη D (Wright <i>et al</i> , 1989)	R ₁ =CO ₂ CH ₃ , R ₂ = H, R ₃ = CHO, μπιπιννατίνη E R ₁ =R ₃ =CH ₃ , R ₂ =OAc, μπιπιννατίνη F R ₁ =CHO, R ₂ = H, R ₃ = CH ₃ , λοφοτοξίνη	
		
μπιπιννατίνες I, G, H (Rodriguez <i>et al</i> , 1999)		
		
μπιπιννατολίδιο I (Rodriguez <i>et al</i> , 1999)	μπιπιννατολίδιο H (Rodriguez <i>et al</i> , 1999)	μπιπιννατολίδιο J (Rodriguez <i>et al</i> , 1999)

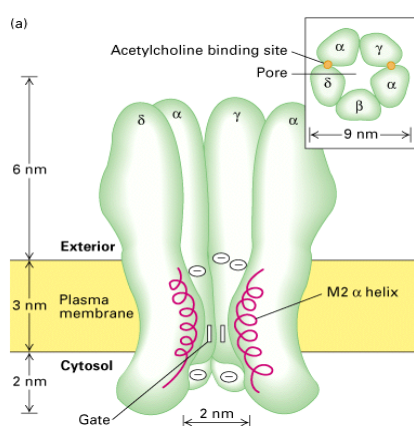
		
μπιπιννατίνη J (Rodriguez <i>et al</i> , 1999)	μπιπιννατολίδιο G (Rodriguez <i>et al</i> , 1999)	μπιπινναπερολίδιο A (Rodriguez <i>et al</i> , 1999)
		
seco-μπιπιννατίνη J (Rodriguez <i>et al</i> , 2000)	μπιπιννατολίδιο K (Rodriguez <i>et al</i> , 2000)	καυκανολίδιο A (Ospina <i>et al</i> , 2005) Αντιπλασμωδικό
		
καυκανολίδιο B (Ospina <i>et al</i> , 2005) Αντιπλασμωδικό	καυκανολίδιο D (Ospina <i>et al</i> , 2005) Αντιπλασμωδικό	καυκανολίδιο E, R ₁ =CH ₃ , R ₂ =OCH ₃ καυκανολίδιο F, R ₂ =CH ₃ , R ₁ =OCH ₃ (Ospina <i>et al</i> , 2005) Αντιπλασμωδικό
		
μπιπινναπερολίδιο B (Ospina <i>et al</i> , 2007) Κατά της φυματίωσης	μπισγερσολανολίδιο (Rodriguez <i>et al</i> , 1999)	

Τα χαρακτηριστικά σεμβρανοειδή αυτού του είδους παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα οξειδωσης.

Οι μπιπιννατίνες A, B, D είναι δραστικές έναντι της P₃₈₈ κυτταρικής καρκινικής σειράς με ID₅₀ 0.9, 3.2 και 1.5 μg/ml, αντιστοίχως. Η μπιπιννατίνη C, που στερείται το α, β ακόρεστο καρβονύλιο, είναι πολύ λιγότερο δραστική με ID₅₀ 46.6 μg/ml.

Οι Sine και Taylor σε πειράματα τους το 1981, διαπίστωσαν ότι απαιτούνται δύο μόρια ακετυλοχολίνης για το άνοιγμα διαύλων ιόντων (Na, K, Ca), διαδικασία απαραίτητη για τη μετάδοση του ερεθίσματος μέσω των νευρομυϊκών συνάψεων και την εκδήλωση κινήσεων στους ανώτερους οργανισμούς. Αντίθετα, η παρεμπόδιση της λειτουργίας του υποδοχέα ακετυλοχολίνης (αναστολή ανοίγματος διαύλων) μπορεί να επιτευχθεί μετά από ανταγωνιστική δέσμευση μίας και μόνο εκ των δύο θέσεων πρόσδεσης (υποδοχής) της ακετυλοχολίνης από άλλο δομικά παρεμφερές μόριο.

Οι **λοφοτοξίνες** (φουρανολακτονικά σεμβρενολίδια) **μπλοκάρουν τους νικοτινο-ακετυλοχολινικούς υποδοχείς**, προκαλώντας νευρομυϊκή παράλυση. Αντιδρούν με το αμινοξύ Tyr 190, που εδρεύει στην α-υπομονάδα του υποδοχέα.



Εικ. 2.26 Νικοτινο-ακετυλοχολινικός υποδοχέας

Μία ποικιλία οργανισμών όπως φύκη, φυτά, κοράλλια, Γαστερόποδα, Αμφίβια και Ερπετά βιοσυνθέτουν μόρια ανταγωνιστές της ακετυλοχολίνης στην πρόσδεση της στους νικοτινο-ακετυλοχολινικούς υποδοχείς, προφανώς για να εκμεταλλευτούν τα παραλυτικά αποτελέσματα που προκαλούν στους θηρευτές τους.

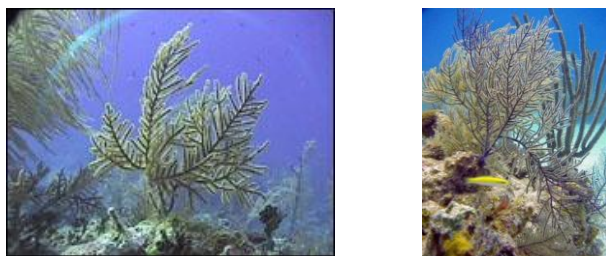
Η δομή της λοφοτοξίνης είναι αξιοπρόσεκτη για δύο λόγους. Πρώτος είναι το γεγονός ότι οι λοφοτοξίνες **δεν έχουν άτομο αζώτου** και για αυτόν το λόγο στερούνται θετικού φορτίου. Το άτομο αζώτου είναι κοινό χαρακτηριστικών όλων των άλλων φυσικών ή συνθετικών ανταγωνιστών της ακετυλοχολίνης.

Ο δεύτερος αφορά στη διαλυτότητα της ένωσης. Αν και οι λοφοτοξίνες είναι πολικά συστατικά, η διτερπενική φύση τους προσδίδει ένα **σημαντικό βαθμό υδροφοβικότητας**. Είναι διαλυτές σε πολικούς οργανικούς διαλύτες, αλλά παρουσιάζουν περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό. Η υδροφοβική τους φύση αποτρέπει τη διάλυσή τους στο θαλάσσιο νερό, ελαχιστοποιώντας τη διάχυσή τους έξω από το σώμα του κοραλλιού. Ακόμα, επιτρέπει στις λοφοτοξίνες να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες και να παρεμβάλλονται στα ενεργά κέντρα ενδοκυτταρικών υποδοχέων. Τέλος, πιθανότατα να έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να απορροφώνται από λιπώδεις ιστούς.

Τα παραπάνω εγκαθιστούν τις λοφοτοξίνες μόρια-οδηγούς στην κατανόηση της δομής και της λειτουργίας των νευρομυϊκών νικοτινο-ακετυλοχολινικών υποδοχέων. Η μη αναστρέψιμη παρεμπόδιση της λειτουργίας των υποδοχέων, που προκαλούν οι λοφοτοξίνες, τις καθιστά ενδεχόμενη θεραπευτική λύση σε ασθένειες όπως ο στραβισμός, ο βλεφαροσπασμός και ο ημιπροσωπικός σπασμός (Abramson *et al*, 1991).

2.9.4 *Pseudopterogorgia elisabethae* (Bayer, 1961)

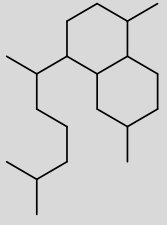
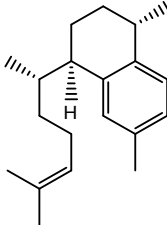
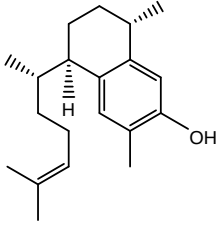
Σχηματίζουν αποικίες, το ύψος των οποίων δεν ξεπερνά το ένα μέτρο. Τα παρακλάδια εκφύονται από αντίθετες πλευρές του κυρίως κλάδου ανά ζεύγη. Η επιφάνεια τους εμφανίζεται αρκετά βλεννώδης, όχι όμως τόσο όσο στην περίπτωση της *P. americana*.

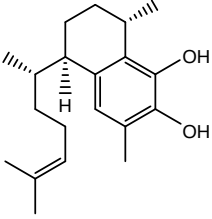
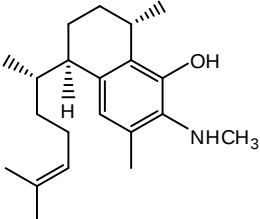
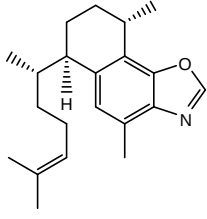
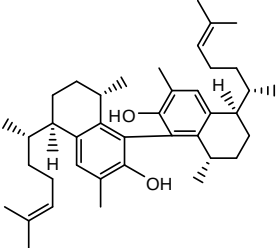
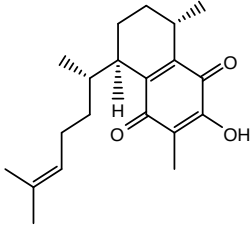
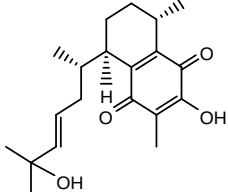
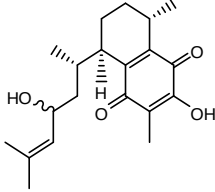
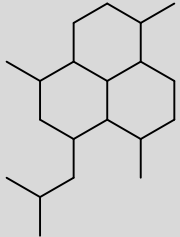
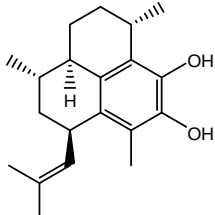
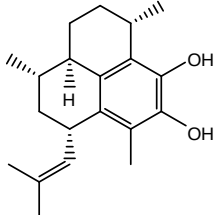


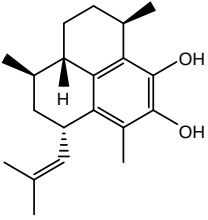
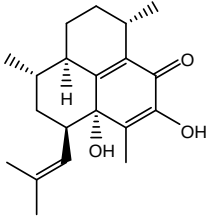
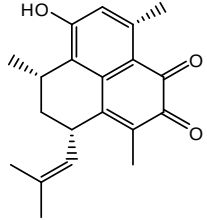
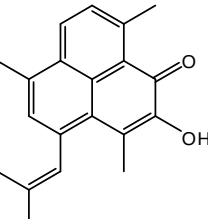
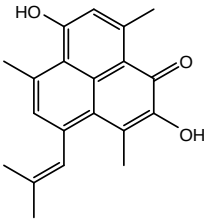
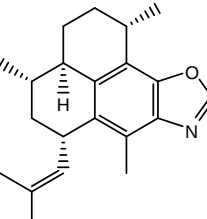
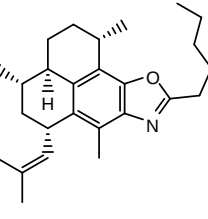
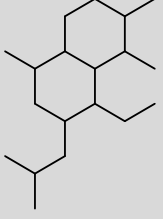
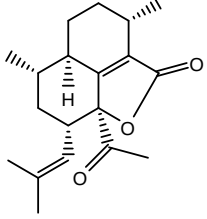
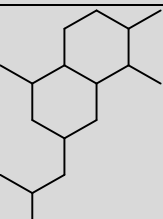
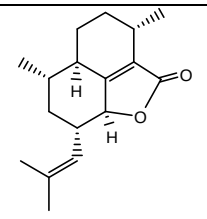
Εικ. 2.27 *Pseudopterogorgia elisabethae*

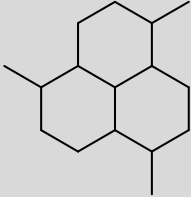
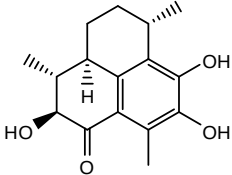
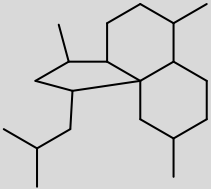
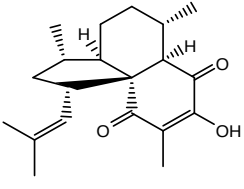
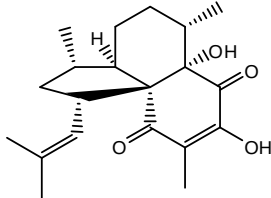
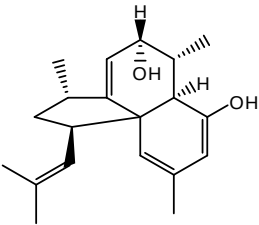
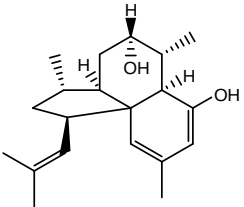
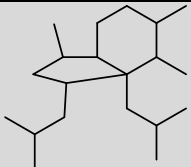
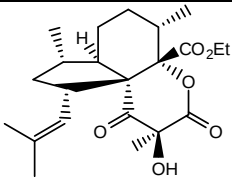
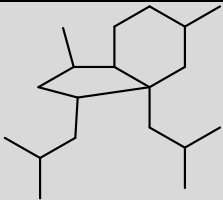
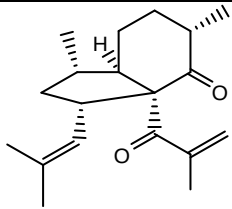
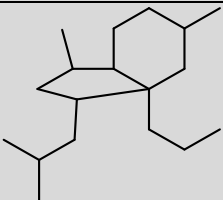
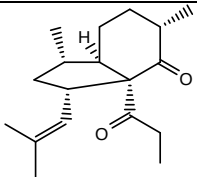
Το ψευδοπερολίδιο έδειξε ότι περιορίζει κατά 83% τη φλεγμονή σε περιπτώσεις οιδήματος. Οι ψευδοπεροσίνες (βλέπε σε προηγούμενο κεφάλαιο) και οι σεκο-ψευδοπεροσίνες προκαλούν μείωση από 75%-95%, χορηγούμενες στα πειραματόζωα σε δόσεις της ίδιας συγκέντρωσης (Fenical, 1987).

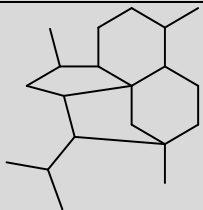
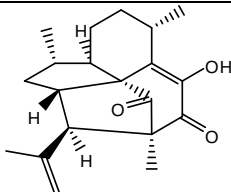
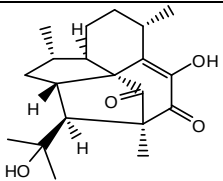
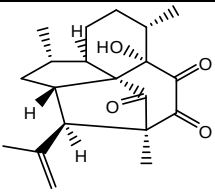
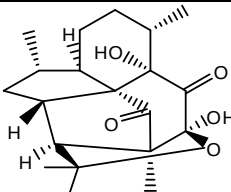
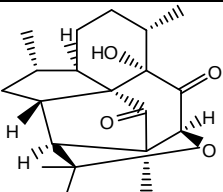
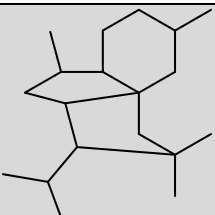
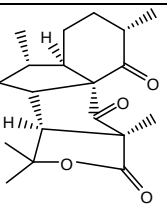
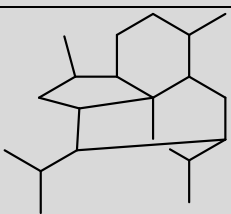
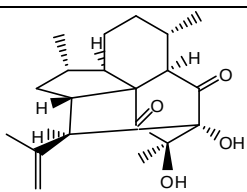
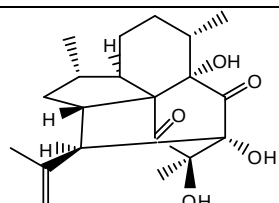
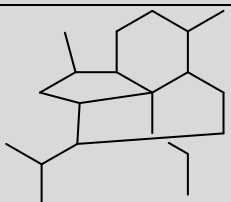
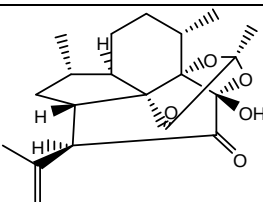
Πίνακας 2.5 Χημικό περιεχόμενο του είδους *Pseudopterogorgia elisabethae*

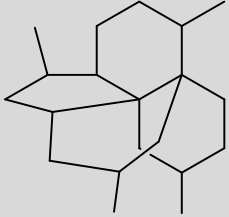
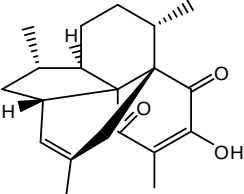
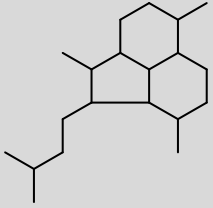
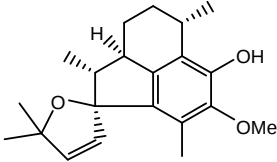
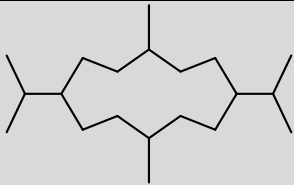
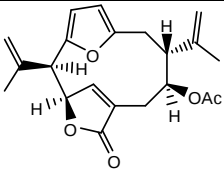
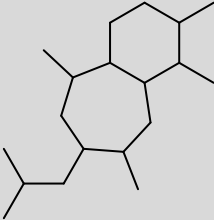
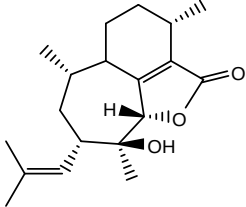
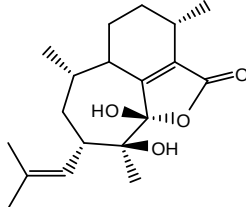
		
Σκελετός σερρουλατανίου	ερογοργιαένιο (Rodriguez <i>et al</i> , 2001) Κατά της φυματίωσης	7-υδροξερογοργιαένιο (Rodriguez <i>et al</i> , 2001) Κατά της φυματίωσης

		
άγλυκο seco- ψευδοπεροσίνης A-D (Look <i>et al</i> , 1987), E—G, 2003, H-I (Rodriguez <i>et al</i> , 2004)	ελιζαμπεθαμίνη (Ata <i>et al</i> , 2000) Κυτταροτοξικό	seco-ψευδοπεροξαζόλη (Rodriguez <i>et al</i> , 1999)
		
bis-7-υδροξερογοργιάνιο (Rodriguez <i>et al</i> , 2001)	ελιζαμπεθαδιόνη (Ata <i>et al</i> , 2003) Αντιφλεγμονώδες	
		
tert-υδροξεελιζαμπεθαδιόνη (Rodriguez <i>et al</i> , 2000)	seco- υδροξεελιζαμπεθαδιόνη, 1988	
		
Σκελετός αμφιλεκτανίου	άγλυκα ψευδοπεροσίνης A- D (Look <i>et al</i> , 1986), E-F (Roussis <i>et al</i> , 1990)	άγλυκα ψευδοπεροσίνης G- J (Roussis <i>et al</i> , 1990), M-O (2003), P-V (Duque <i>et al</i> , 2004),), P-Z (Rodriguez <i>et al</i> , 2004) P, U, V, W Κυτταροτοξικές P Αντιϊκή P Κατά της φυματίωσης P, Q, U, V

		Αντιπλασμωδικές
		
άγλυκα ψευδοπεροσίνης K-L (Roussis <i>et al</i> , 1990), Z (2004)	ελιζαμπεθόλη, 2003	ελιζαμπατίνη A (Rodriguez <i>et al</i> , 1999)
		
ελιζαμπατίνη B (Rodriguez <i>et al</i> , 1999)	ελιζαμπατίνη C (Rodriguez <i>et al</i> , 2000)	ψευδοπεροξαζόλη (Rodriguez <i>et al</i> , 1999) Κατά της φυματίωσης
		
ομοψευδοπεροξαζόλη (Rodriguez <i>et al</i> , 2003) Κατά της φυματίωσης		
		
Σκελετός νορ-αμφιλεκτανίου	4-ακετυλοαμφιλεκτολίδιο (Rodriguez <i>et al</i> , 2000)	
		
Σκελετός τρις-νορ-αμφιλεκτανίου	αμφιλεκτολίδιο (Rodriguez <i>et al</i> , 2000)	

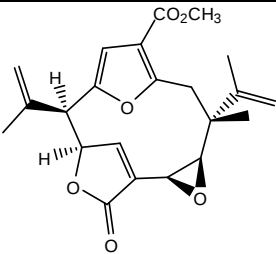
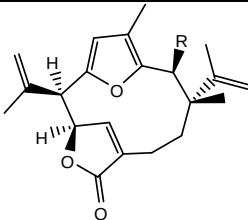
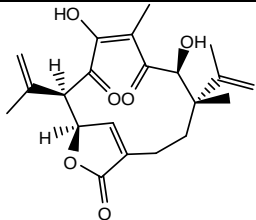
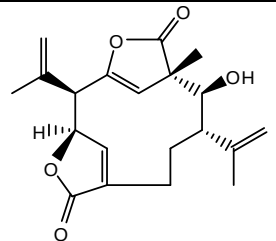
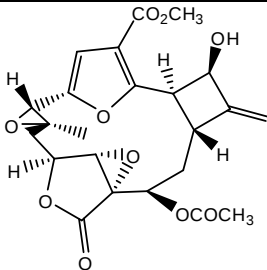
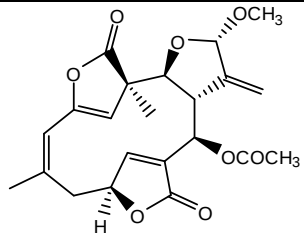
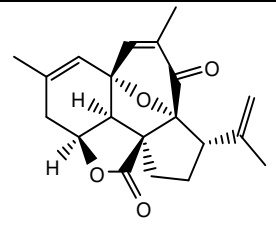
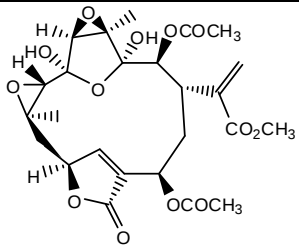
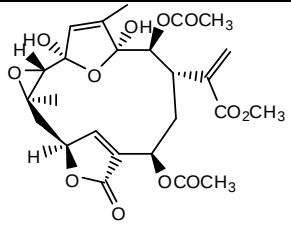
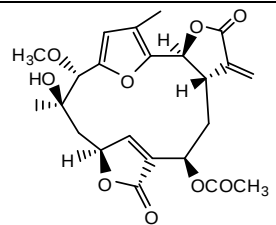
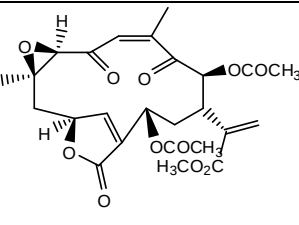
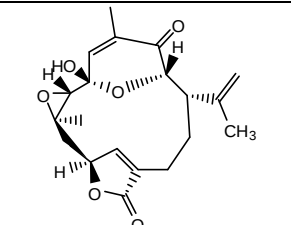
		
Σκελετός τετρικς-νορ-αμφιλεκτανίου	αμφιφεναλόνη (Rodriguez <i>et al</i> , 2000)	
		
Σκελετός ελιζαμπεθανίου	ελιζαμπεθίνη Α (Rodriguez <i>et al</i> , 1998)	ελιζαμπεθίνη D (Rodriguez <i>et al</i> , 2000)
		
ελιζαμπεθίνη Ε (Ata <i>et al</i> , 2004)	ελιζαμπεθίνη F (Ata <i>et al</i> , 2004)	
		
Σκελετός σεκο-ελιζαμπεθανίου	ελιζαμπεθολίδιο (Rodriguez <i>et al</i> , 2000)	
		
Σκελετός νορ-ελιζαμπεθανίου	ελιζαμπεθίνη Β (Rodriguez <i>et al</i> , 1998)	
		
	Κυτταροτοξικό	

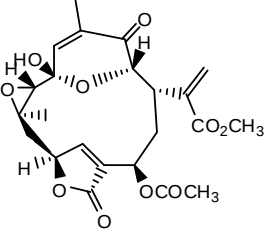
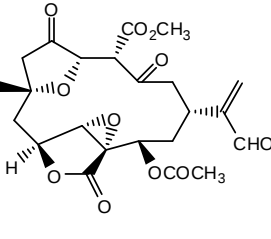
Σκελετός μπις-νορ-ελιζαμπεθανίου	ελιζαμπεθίνη C (Rodriguez <i>et al</i> , 1998)	
		
Σκελετός ελιζαπερανίου	ελιζαπεροσίνη B (Rodriguez <i>et al</i> , 2000) Κατά της φυματίωσης	ελιζαπεροσίνη C, 2000
		
ελιζαπεροσίνη D, 2003	ελιζαπεροσίνη A (Rodriguez <i>et al</i> , 2000)	ελιζαπεροσίνη E, 2003
		
Σκελετός νορ-ελιζαπερανίου	ελιζαμπανολίδιο (Rodriguez <i>et al</i> , 1998)	
		
Σκελετός κουμπιανίου	κουμπιασίνη A (Rodriguez <i>et al</i> , 2000)	κουμπιασίνη B (Rodriguez <i>et al</i> , 2000)
		
Σκελετός σεκο-κουμπιανίου	κουμπιασίνη C (Rodriguez <i>et al</i> , 2000)	

		
Σκελετός κολομπιανίου	κολομπιασίνη A (Rodriguez <i>et al</i>, 1999) Κατά της φυματίωσης	
		
Σκελετός ιλεαμπεθανίου	ιλεαμπεθίνη, 2002	
		
Σκελετός ψευδοπετρανίου	ακετοξυ-ψευδοπετρολίδιο, 1999	
		
Σκελετός νορ-σανδρεσανίου	σανδρεσολίδιο A (Rodriguez <i>et al</i>, 1999)	σανδρεσολίδιο B (Rodriguez <i>et al</i>, 1999)

2.9.5 *Pseudopterogorgia kallos* (Bielschowsky, 1918)

Πίνακας 2.6 Χημικό περιεχόμενο του είδους *Pseudopterogorgia kallos*

		
4-καρβονυλκαλλολίδιο A (Look et al, 1985)	καλλολίδιο A, R=OH Αντιφλεγμονώδες καλλολίδιο B, R=H (Look et al, 1985)	καλλολίδιο C (Look et al, 1985)
		
καλλοσίνη A (Marrero et al, 2003)	προβριντενσίνη (Marrero et al, 2003) Κυτταροτοξικό	σιερεσκολίδιο (Marrero et al, 2004)
		
ιντρίκαρένιο (Marrero et al, 2005)	μπιπιννατίνη L (Marrero et al, 2008)	μπιπιννατίνη M (Marrero et al, 2008)
		
μπιπιννατίνη K (Marrero et al, 2008)	μπιπιννατίνη P (Marrero et al, 2008)	μπιπιννατίνη N (Marrero et al, 2008)

	
μπιπιννατίνη O (Marrero <i>et al</i>, 2008)	μπιπιννατίνη Q (Marrero <i>et al</i>, 2008) Κυτταροτοξικό

Τα παρακάτω είδη του γένους *Pseudopterogorgia* έχουν μελετηθεί πολύ λιγότερο ως προς το χημικό τους περιεχόμενο.

- ***Pseudopterogorgia anceps***
- ***Pseudopterogorgia blanquillensis*** (Stiasny, 1941)
- ***Pseudopterogorgia hummelincki*** (Bayer, 1961)
- ***Pseudopterogorgia navia***

2.10 Χημικά συστατικά του είδους *Pseudopterogorgia rigida* (Bielchowsky, 1929)

Οι αποικίες του είδους μεγαλώνουν σε ένα επίπεδο (Εικόνες 2.28, 2.29). Οι κυρίως κλάδοι είναι πιο σκληροί και λιγότερο ελαστικοί από των υπολοίπων αντιπροσώπων του γένους. Παρουσιάζουν συνήθως μωβ αποχρώσεις, ενώ σπάνια εμφανίζονται λαμπερά κίτρινοι ή λευκοί (Humann, 1993). Τα ζεύγη παρακλαδιών εκτείνονται από τα κυρίως κλαδιά, αφήνοντας μεταξύ τους αυστηρά επαναλαμβανόμενα σε μήκος, διαστήματα. Αυτά τα παρακλάδια είναι κοντά, σκληρά και τοποθετημένα έτσι, ώστε να σχηματίζουν μεταξύ τους γωνία σχεδόν 180° .

Ύψος αποικίας: 0,7 μ – 1 μ

Βάθος: 1,5 μ – 46 μ



Εικ. 2.28 *Pseudopterogorgia rigida*



Εικ. 2.29 Πτεροειδής διακλάδωση

Τα χαρακτηριστικά σεσκιτερπενικά συστατικά του είδους είναι το α , β και γ -μπισαμπολένιο (Miller *et al*, 1995) και το α -κουρκουμένιο. Τρία παράγωγα του α -κουρκουμενίου, η κουρκουφαινόλη, η κουρκουκινόνη και η κουρκουϊδροκινόνη (Πίνακας 2.8) είναι υπεύθυνες για τις αντιβιοτικές ιδιότητες της *Pseudopterogorgia rigida*.

Τα σεσκιτερπένια, κουρκουϊδροκινόνη και κουρκουκινόνη αποτελούν τους κυριότερους δευτερογενείς μεταβολίτες του είδους (Πίνακας 2.7). Η κουρκουϊδροκινόνη απαντάται σε υψηλή συγκέντρωση κυρίως στις «άκρες» της αποικίας. Η κουρκουκινόνη, που προέρχεται από την οξείδωση της κουρκουϊδροκινόνης, απαντάται σε όλο το μήκος και πλάτος της αποικίας. Οι υψηλές συγκεντρώσεις τους λειτουργούν απωθητικά για οργανισμούς, κυρίως μικρά ψάρια, που απειλούν την ύπαρξη του είδους τρεφόμενοι από τους πολύποδες του (Harvell *et al*, 1988). Άλλωστε, οι κινόνες και οι υδροκινόνες είναι γνωστές και στην περίπτωση

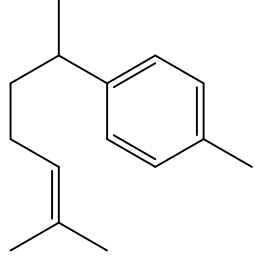
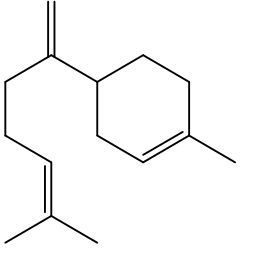
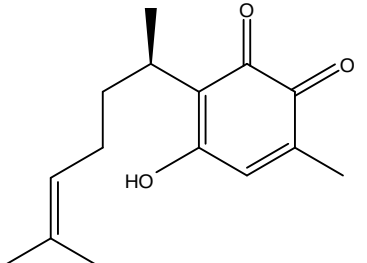
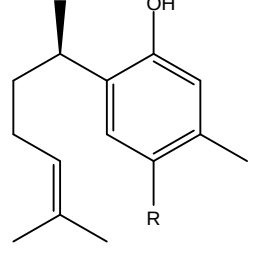
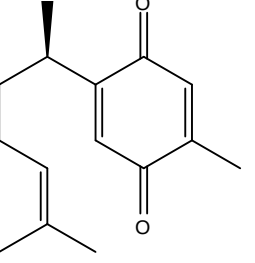
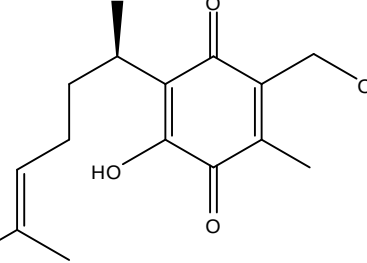
των φυτών ως δευτερογενείς μεταβολίτες, που λειτουργούν αποτρεπτικά στην προσβολή των τελευταίων από έντομα (είναι μόρια που δεσμεύουν πρωτεΐνες, όπως ένζυμα κύριων μεταβολικών μονοπατιών).

Πίνακας 2.7 Η ποσοστιαία αναλογία των κύριων μεταβολιτών στο σώμα της *Pseudopterogorgia rigida*

Κύριοι μεταβολίτες του είδους	Ποσοστιαία αναλογία
(-)-κουρκουϋδροκινόνη	18%
(-)-κουρκουκινόνη	6-8%
(-)-κουρκουφαινόλη	4-6%
(-)-α- κουρκουμένιο	4%

Λεπτομερέστερη μελέτη του είδους από την Harvell το 1989, έδειξε ότι η κουρκουϋδροκινόνη απαντάται σχεδόν αποκλειστικά στους πολύποδες, οι οποίοι εντοπίζονται μόνο στα παρακλάδια και στην κορυφή του κυρίως σώματος της αποικίας, ενώ σκληρίτες κάνουν την εμφάνισή τους μόνο στους κυρίως κλάδους. Οι τελευταίοι είναι μία ακόμα γραμμή άμυνας που διαθέτει η *Pseudopterogorgia rigida* για την αντιμετώπιση, σε αυτή την περίπτωση, των οργανισμών που δείχνουν τη διατροφική προτίμησή τους για το αξονικό κοινέγχυμα της αποικίας.

Πίνακας 2.8 Χημικό περιεχόμενο του είδους *Pseudopterogorgia rigida*

		
(-)-α-κουρκουμένιο	(+)-β-μπισαμπολένιο	ριτζιδόνη (Freyer <i>et al</i> , 1997)
		
R=H (-)- κουρκουφαινόλη, R=OH (-)- κουρκουϋδροκινόνη (McEnroe <i>et al</i> , 1978)	(-)-κουρκουκινόνη (McEnroe <i>et al</i> , 1978)	μοχικινόνη (D'Armas <i>et al</i> , 2000)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Οργανολογία

Φασματογράφος Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Τα πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μίας διάστασης (1D NMR), όπως και τα δισδιάστατα πειράματα (2D NMR) ομοπυρηνικού και ετεροπυρηνικού συσχετισμού, πραγματοποιήθηκαν σε φασματογράφους BRUKER AC 200 MHz, BRUKER DRX 400 MHz.

Συσκευές Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης

- i) χρωματογράφος CECIL 1100 Series, Liquid Chromatography Pump, με μονή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και με ανιχνευτή RI GBC LC 1240, συνδεδεμένος με καταγραφέα Pharmacia LKB-REC1.
- ii) χρωματογράφος AGILENT, 1100 Series, με τετραπλή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και ανιχνευτή RI AGILENT, 1100 Series.

Στήλες Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης

- i) στήλη κανονικής φάσης (normal phase) Spherisorb HPLC column 25cm×10mm, S₁₀W, 64340 plates/meter.
- ii) στήλη αντίστροφης φάσης Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm.
- iii) στήλη κανονικής φάσης (normal phase) Chiralcel OD, 10μm, 25cm×10mm.
- iv) αναλυτική στήλη κανονικής φάσης (normal phase) Chiralcel OD, 10μm, 25cm×0.46cm.
- v) στήλη αντίστροφης φάσης Nucleosil 250x10 mm, 100 C₁₈/7μm.

Αέριος Χρωματογράφος-Φασματογράφος Μάζας (GC-MS)

Τα φάσματα μάζας ιονισμού ηλεκτρονίων (EIMS) καταγράφηκαν σε φασματόμετρο μάζας Hewlett Packard model 5973, το οποίο αποτελούσε ανιχνευτή σε συσκευή αέριας χρωματογραφίας Hewlett Packard model 6890, με τριχοειδή στήλη διαστάσεων 30m×0.25mm, τύπου HP-5.

Τα φάσματα μάζας που ελήφθησαν με απευθείας εισαγωγή δείγματος (Direct Probe Controller) καταγράφηκαν σε φασματόμετρο μάζας Thermo DSQ με ιονισμό ηλεκτρονίων EI (70eV) ή χημικό ιονισμό CI (CH₄).

Για τις αναλύσεις GC-MS χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος Hewlett-Packard 6890, εξοπλισμένος με τριχοειδή στήλη HP-5 MS (30 m x 0,25 mm, film thickness 0,25 μm), συνδεδεμένος σε σειρά με φασματογράφο μάζας Hewlett-Packard 5973. Η

μέθοδος ιονισμού ήταν ο βομβαρδισμός με δέσμη ηλεκτρονίων στα 70 eV (EIMS). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε το αδρανές αέριο He (2 mL/min). Η ταυτοποίηση των χημικών συστατικών έγινε με σύγκριση του χρόνου ανάσχεσης κάθε συστατικού σε σχέση με τους χρόνους ανάσχεσης πρότυπων ενώσεων και τη μελέτη των φασμάτων μάζας με τη βοήθεια βιβλιοθηκών (Wiley library spectra, NIST/NBS) και δεδομένων της βιβλιογραφίας (Adams, 2001). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών βασίστηκε στον ολικό αριθμό των θραυσμάτων των συστατικών, όπως αυτά ανιχνεύτηκαν από τον φασματογράφο μάζας.

Φάσματα Μάζας Υψηλής Ευκρίνειας

Τα δεδομένα των φασμάτων μάζας υψηλής ευκρίνειας (HRFABMS) μετρήθηκαν από το Πανεπιστήμιο του Notre Dame, Τμήμα Χημείας και Βιοχημείας (Ινδιάνα – Η.Π.Α.).

Τα δεδομένα των φασμάτων μάζας υψηλής ευκρίνειας (HRESIMS) μετρήθηκαν από το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (ΕΙΕ).

Κρυσταλλογραφία Ακτινών Χ

Τα δεδομένα των κρυσταλλογραφιών με ακτίνες-Χ, οι αναλύσεις τους και οι απεικονίσεις των χημικών δομών πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Διδακτικής των Επιστημών του Πανεπιστημίου της Jaén (Ισπανία).

Στερεοχημικές διαμορφώσεις δομής ελάχιστης ενέργειας

Σχεδιάστηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα μοριακής μοντελλοποίησης HyperChem 7.0 (Hypercube, Inc.).

Πολωσίμετρο

Για τη μέτρηση της ειδικής στροφικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε πολωσίμετρο τύπου Polarimeter 341 της PERKIN ELMER, με κυψελίδας μήκους $\lambda = 10$ cm και όγκου $V = 1$ ml. Η θερμοκρασία του οργάνου κατά τη λήψη της γωνίας στροφής ήταν 20°C.

Φασματογράφος Υπερύθρου (IR)

Τα φάσματα IR καταγράφηκαν σε φασματογράφο Perkin-Elmer Paragon 500 σε παράθυρα KBr ή σε φασματογράφο Bruker Tensor 27 με την τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR).

Φασματογράφος Υπεριώδους ακτινοβολίας (UV)

Τα φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας UV καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους SHIMADZU UV model 160A, με κυψελίδα πάχους 1 cm.

3.2 Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί υγρής χρωματογραφίας με υποβοήθηση κενού πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης της στήλης γέλη πυριτίου κανονικής φάσης Kieselgel 60H της εταιρείας Merck ή αντίστροφης (C_{18}) φάσης.

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί υγρής χρωματογραφίας βαρύτητας πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης της στήλης γέλη πυριτίου κανονικής φάσης Kieselgel 60A flash (35-70 μ M) της εταιρείας Merck.

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί εκχύλισης στερεής φάσης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας προκατασκευασμένες στήλες γέλης πυριτίου κανονικής (SiOH) ή αντίστροφης (C_{18}) φάσης τύπου SEP-PAK silica cartridge for rapid sample preparation της εταιρείας Waters Associates ή Chromafix της εταιρείας Macherey-Nagel.

Οι χρωματογραφικοί προσδιορισμοί TLC πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πλάκες αλουμινίου με επίστρωση Kieselgel 60 G/UV254 (20 x 20 cm, πάχους 0,2 mm) της εταιρείας Macherey-Nagel. Μετά την ανάπτυξη τους σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών, οι πλάκες ελέγχονταν σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV) στα 254 nm και 365 nm και οι κηλίδες ανιχνεύονταν ύστερα από ψεκασμό με διάλυμα 5% H_2SO_4 σε MeOH και θέρμανση της πλάκας στους 100°C για περίπου 2 min.

Οι διαλύτες cHex, EtOAc και CH_2Cl_2 ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences, οι οποίοι πριν από τη χρήση τους αποστάχθηκαν. Οι διαλύτες MeOH, Me_2CO και EtOH ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Οι διαλύτες n-Hex, i-Prop, CH_3CN και $CHCl_3$ ήταν καθαρότητας HPLC της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Όλοι οι διαλύτες πριν από τη χρήση τους σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς HPLC διηθήθηκαν υπό κενό και απαερώθηκαν.

Το H_2O που χρησιμοποιήθηκε ήταν απεσταγμένο, που στη συνέχεια διηθήθηκε μέσω συστήματος ρητινών.

Για τη λήψη των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ($CDCl_3$), δευτεριωμένο βενζόλιο (C_6D_6)

και δευτεριωμένη μεθανόλη ($\text{MeOH-}d_4$) από τις εταιρίες SDS Company 13124 Peypin France και Aldrich-Sigma Chemical Company.

3.3 Συλλογή του οργανισμού και αρχική επεξεργασία

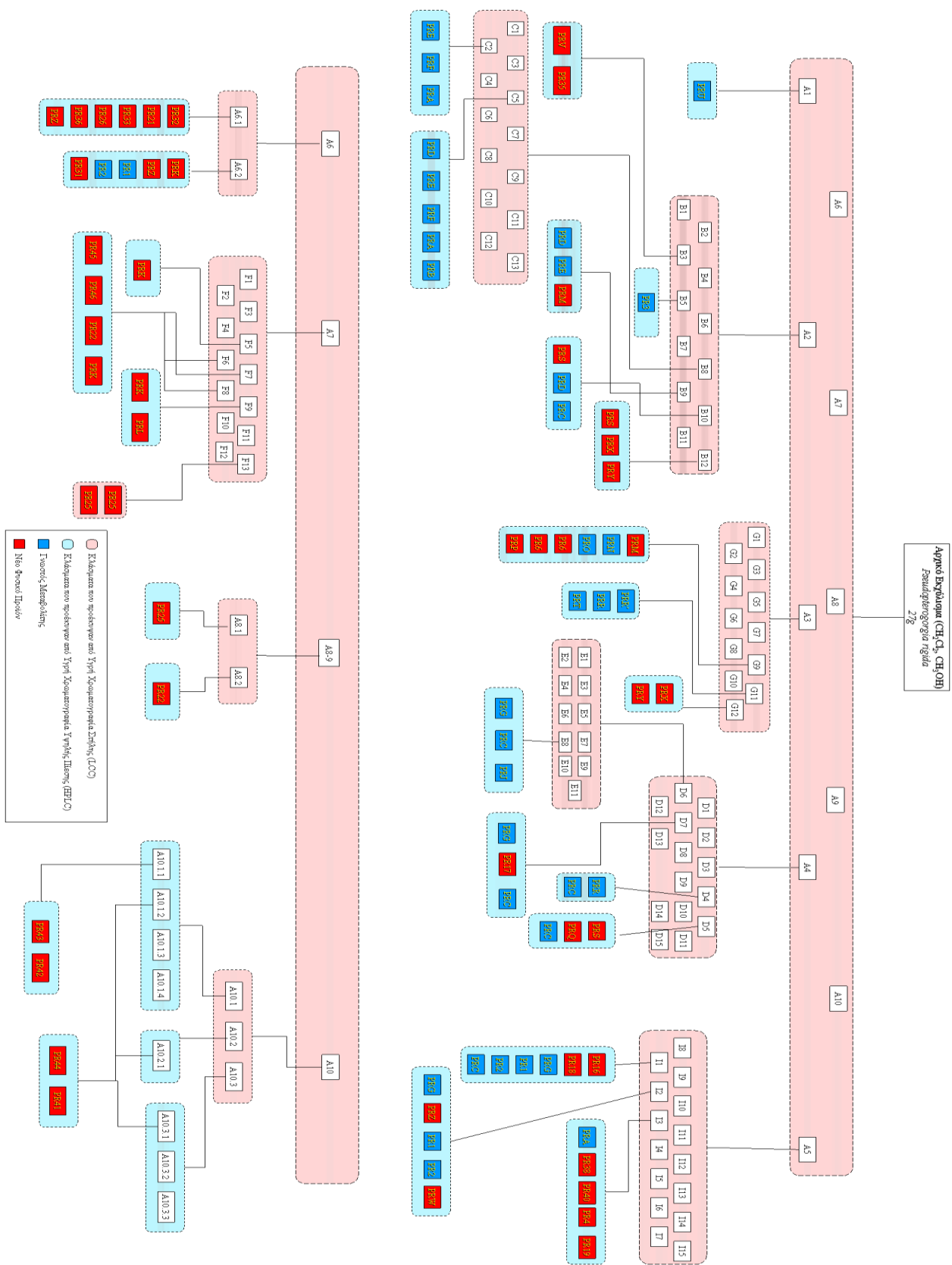
Ο οργανισμός *Pseudopterogorgia rigida*, της οικογένειας Gorgoniidae, συλλέχθηκε το 1997 στη θάλασσα της Καραϊβικής (Εικ. 3.1), σε βάθος 20-30m, με αυτόνομη κατάδυση. Κατόπιν, μεταφέρθηκε κατεψυγμένος στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του Πανεπιστημίου Αθηνών.

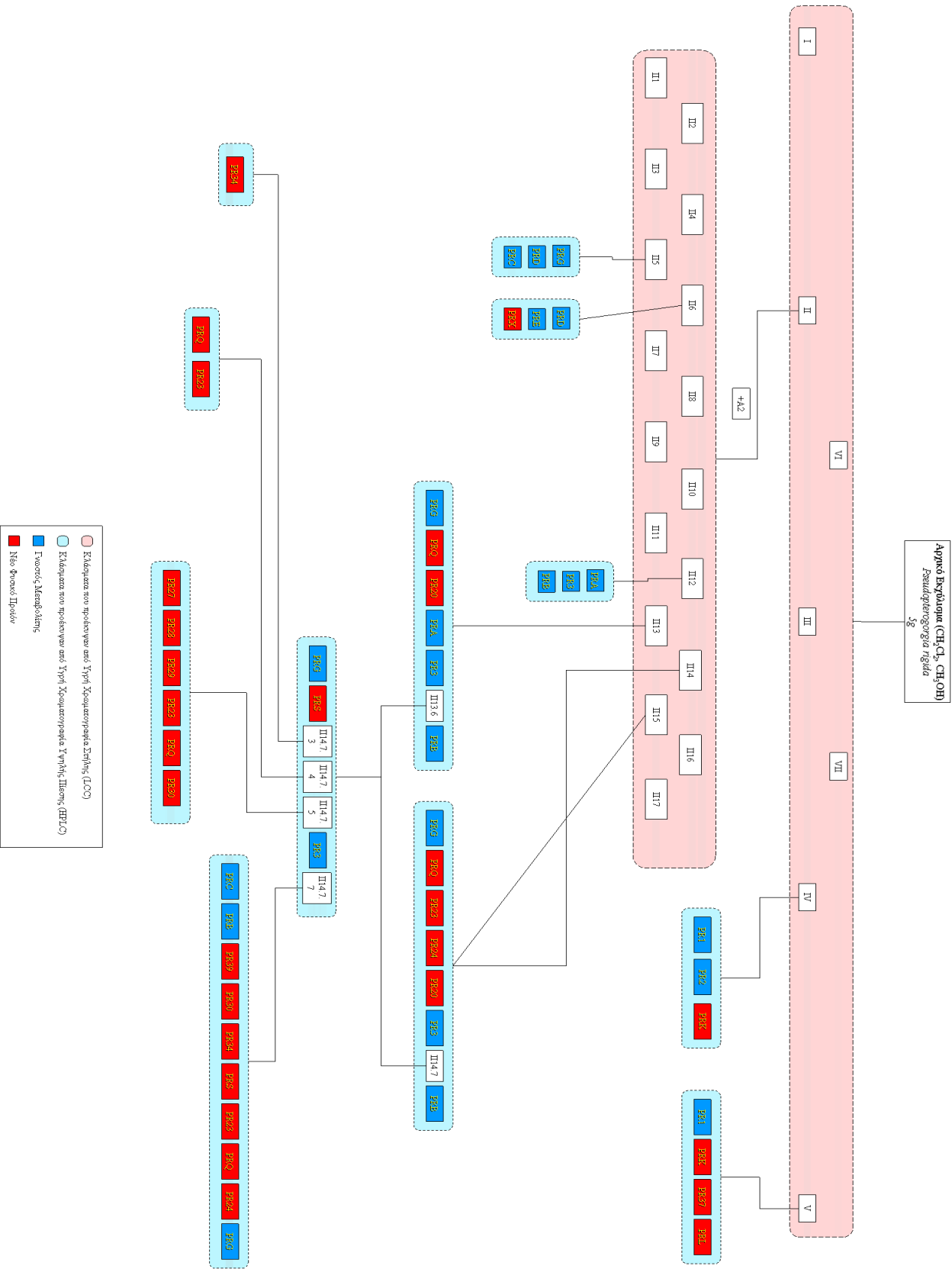


Εικ. 3.1 Ευρύτερη περιοχή συλλογής του οργανισμού

3.4 Διαχωρισμοί και Απομονώσεις Μεταβολιτών

Στα σχήματα που ακολουθούν φαίνεται συνοπτικά η πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από τον υπό μελέτη οργανισμό.





Νο Μεταβολίτη	Κωδικός	Νο Μεταβολίτη	Κωδικός
Μεταβολίτης 1	PRU	Μεταβολίτης 29	PR44
Μεταβολίτης 2	PRR1	Μεταβολίτης 30	PR3
Μεταβολίτης 3	PRR2	Μεταβολίτης 31	PRX
Μεταβολίτης 4	PR40	Μεταβολίτης 32	PRY
Μεταβολίτης 5	PRT	Μεταβολίτης 33	PR17
Μεταβολίτης 6	PRO	Μεταβολίτης 34	PRK
Μεταβολίτης 7	PRN	Μεταβολίτης 35	PR30
Μεταβολίτης 8	PRB	Μεταβολίτης 36	PR39
Μεταβολίτης 9	PRZ	Μεταβολίτης 37	PR24
Μεταβολίτης 10	PR4	Μεταβολίτης 38	PR34
Μεταβολίτης 11	PR19	Μεταβολίτης 39	PRS
Μεταβολίτης 12	PRW	Μεταβολίτης 40	PR27
Μεταβολίτης 13	PR1	Μεταβολίτης 41	PR28
Μεταβολίτης 14	PR2	Μεταβολίτης 42	PRQ
Μεταβολίτης 15	PR31	Μεταβολίτης 43	PR23
Μεταβολίτης 16	PRG	Μεταβολίτης 44	PR18
Μεταβολίτης 17	PR33	Μεταβολίτης 45	PR25a
Μεταβολίτης 18	PRL	Μεταβολίτης 46	PR25b
Μεταβολίτης 19	PR37	Μεταβολίτης 47	PRE
Μεταβολίτης 20	PR45	Μεταβολίτης 48	PRD
Μεταβολίτης 21	PR46	Μεταβολίτης 49	PRV
Μεταβολίτης 22	PR20	Μεταβολίτης 50	PR35
Μεταβολίτης 23	PR21	Μεταβολίτης 51	PR6
Μεταβολίτης 24	PRC	Μεταβολίτης 52	PRP
Μεταβολίτης 25	PR22	Μεταβολίτης 53	PRJ
Μεταβολίτης 26	PRA	Μεταβολίτης 54	PR42
Μεταβολίτης 27	PRF	Μεταβολίτης 55	PR43
Μεταβολίτης 28	PRM	Μεταβολίτης 56	PR41

1^ο Στάδιο Διαχωρισμού (Στήλη-A)

Ο ξηρός οργανισμός εκχυλίστηκε εξαντλητικά με μίγμα διαλυτών $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ σε αναλογία 3:1. Το οργανικό εκχύλισμα συμπυκνώθηκε υπό κενό και παρελήφθησαν 32,0 g. στερεού υπολείμματος. 27,0 g. της ποσότητας αυτής χρωματογραφήθηκαν σε στήλη με υποβοήθηση κενού (Vacuum Column Chromatography). Το πληρωτικό υλικό της στήλης ήταν γέλη πυριτίου (silica gel), ενώ ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε σύστημα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας. Χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες αναλογίες μίγματα cHex, EtOAc και MeOH.

Συνολικά, παρελήφθησαν 35 κλάσματα όγκου 200 ml το καθένα, τα οποία, αφού εξετάστηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (TLC), συνενώθηκαν σε 10. Στον Πιν. 3.1 καταγράφονται οι τελικές συνενώσεις και τα βάρη των υπολειμμάτων. Τα 10 αυτά κλάσματα εξατμίστηκαν υπό κενό σε θερμοκρασίες που δεν ξεπερνούσαν τους 40° C και για το καθένα πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός έλεγχος ^1H NMR.

Πιν. 3.1 Οι μάζες των κλασμάτων της στήλης-A

Αριθμός κλάσματος	Μάζα Κλάσματος
A ₁	224,0 mg
A ₂	11,64 g
A ₃	1,0 g
A ₄	3,11 g
A ₅	1,24 g
A ₆	407,7 mg
A ₇	487,0 mg
A ₈	228,0 mg
A ₉	45,0 mg
A ₁₀	50,0 mg

2^ο Στάδιο Διαχωρισμού (Στήλη-B)

8,6 g από τα 11,64 g του κλάσματος A₂, της αρχικής στήλης, χρωματογραφήθηκαν σε στήλη βαρύτητας. Το πληρωτικό υλικό της στήλης ήταν γέλη πυριτίου (silica gel), ενώ χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών cHex/EtOAc σε αναλογία 95:5. Συνολικά, συλλέχθηκαν 42 κλάσματα. Τα κλάσματα αυτά υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικό έλεγχο λεπτής στοιβάδος (TLC) και αποφασίστηκε η συνένωσή τους σε 12. Στον Πίνακα 3.2 φαίνονται οι ποσότητες των συνενωμένων κλασμάτων.

Με φασματοσκοπικό έλεγχο ^1H NMR επιλέχθηκαν τα κλάσματα που παρουσίαζαν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για περαιτέρω διαχωρισμό.

Αριθμός κλάσματος	Μάζα Κλάσματος (mg)
B ₁	17,0
B ₂	20,0
B ₃	350,0
B ₄	2,31 g
B ₅	81,0
B ₆	143,0
B ₇	2,16 g
B ₈	499,0
B ₉	68,0
B ₁₀	53,0
B ₁₁	103,0
B ₁₂	90,0

Πιν. 3.2 Οι ποσότητες των συνενωμένων κλασμάτων της στήλης-B

3^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-1)

Μετά την παραλαβή μέρους του κλάσματος A₁ που διαλύεται σε MeOH/H₂O 95:5 (100 mg), αυτό υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Kromasil C₁₈) με μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 95:5 και απέδωσε τον μεταβολίτη **1** (PRU, 22mg) στα 15,8 min της ένεσης.

4^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-2)

Μετά την παραλαβή μέρους του κλάσματος B₃ που διαλύεται σε MeOH/H₂O 90:10 (10 mg), προέκυψαν δύο νέοι μεταβολίτες, οι οποίοι περαιτέρω διαχωρίστηκαν σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης, με αναλυτική στήλη (Στήλη Econosphere 250x4.6 mm, C₁₈/5μm), ροή 1ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 80:20. Οι μάζες των μεταβολιτών από τη διαδικασία αυτή και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.3.

Πιν. 3.3 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-2 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	1,5	9,5	49 (PRV)
2	1,5	13,6	50 (PR35)

5^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-3)

Μετά την παραλαβή μέρους του κλάσματος B₅ που διαλύεται σε MeOH/H₂O 65:35 (66 mg), προέκυψε ο μεταβολίτης **30** (PR3). Για περαιτέρω καθαρισμό

διαβιβάστηκε από μικρή στήλη γέλης πυριτίου με διαλύτες έκλουσης μίγματα cHex/EtOAc, προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Στο κλάσμα που παραλήφθηκε με 95% cHex, εντοπίστηκε ο μεταβολίτης **30** σε καθαρή μορφή (15,5 mg).

6^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-4)

Μέρος του κλάσματος B₈ υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 75:25. Συνολικά, παρελήφθησαν 5 κορυφές. Οι μάζες των κλασμάτων και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.4.

Πιν. 3.4 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-4 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	1,2	12	48 (PRD)
2	3,2	13	47 (PRE)
3	2,6	20	27 (PRF)
4	11,5	26	26 (PRA)
5	17,8	55	8 (PRB)

7^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-5)

Το B₁₀ (53 mg), υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 75:25. Συνολικά, παρελήφθησαν 3 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.5.

Πιν. 3.5 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-5 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	1,0	9,3	39 (PRS)
2	1,0	11,6	48 (PRD)
3	25,0	41,5	24 (PRC)

8^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-6)

Μετά την παραλαβή μέρους του κλάσματος B₁₂ που διαλύεται σε MeOH/H₂O 80:20 (36 mg), το δείγμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography) αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 80:20. Παρελήφθησαν 2 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.6.

Πιν. 3.6 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-6 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	1,5	8,5	32 (PRY)
2	6,5	9,5	31 (PRX)

Οι ίδιοι μεταβολίτες παρελήφθησαν, υπό την ίδια διαδικασία, και από το κλάσμα G₁₂.

9^ο Στάδιο Διαχωρισμού (Στήλη-C)

Μέρος του κλάσματος B₈ (284 mg) υποβλήθηκε σε στήλη βαρύτητας. Η στατική φάση ήταν γέλη πυριτίου (silica gel), ενώ την κινητή αποτέλεσαν μίγματα cHex/EtOAc προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας (αναλογία 80/20 για την παραλαβή των 22 πρώτων κλασμάτων, 50/50 για την παραλαβή των επόμενων 11 κλασμάτων και μίγμα διαλυτών EtOAc/MeOH 50/50 για την παραλαβή των τελευταίων 7 κλασμάτων). Τα κλάσματα αυτά υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικό έλεγχο λεπτής στοιβάδος (TLC) και αποφασίστηκε η συνένωσή τους σε 13. Στον Πίνακα 3.7 φαίνονται οι μάζες των συνενωμένων κλασμάτων.

Αριθμός κλάσματος	Μάζα Κλάσματος (mg)
C ₁	0,3
C ₂	12,4
C ₃	61,0
C ₄	89,0
C ₅	39,0
C ₆	8,5
C ₇	6,2
C ₈	1,1
C ₉	4,4
C ₁₀	2,5
C ₁₁	2,4
C ₁₂	2,5

της στήλης-C

Πιν. 3.7 Οι μάζες των συνενωμένων κλασμάτων

10^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-7)

Το κλάσμα C₂ (12,4 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης υπό τις ίδιες συνθήκες με αυτές του κλάσματος B₇. Συνολικά, εμφανίστηκαν 3 κορυφές. Από τον φασματοσκοπικό έλεγχο ¹H NMR διαπιστώθηκε πως η κορυφή-1 αντιστοιχούσε στον μεταβολίτη **47**, η κορυφή-2 αντιστοιχούσε στον μεταβολίτη **27** και η κορυφή-3 στον μεταβολίτη **26**, οπότε οι ποσότητες αυτές προστέθηκαν στις ήδη υπάρχουσες. Οι μάζες των κλασμάτων και ο χρόνος έκλουσης της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.8.

Πιν. 3.8 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-7 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	1,8	12,8	47 (PRE)
2	3,3	17	27 (PRF)
3	6,8	24	26 (PRA)

11^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-8)

Το κλάσμα C₅ (39 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης. Διαλύτης έκλουσης το μίγμα MeOH/H₂O σε αναλογία 75:25 (οι πειραματικές συνθήκες πανομοιότυπες με αυτές του 6ου σταδίου). Συνολικά καταγράφησαν 5 κορυφές. Παρελήφθησαν καθαροί οι μεταβολίτες **8**, **26**, **27**, **47** και **48**, οπότε οι ποσότητες αυτές προστέθηκαν στις ήδη υπάρχουσες.

12^ο Στάδιο Διαχωρισμού (Στήλη-D)

Το κλάσμα A₄ (3,11 g) υποβλήθηκε σε στήλη βαρύτητας. Το πληρωτικό υλικό της στήλης ήταν γέλη πυριτίου (silica gel).

Αριθμός κλάσματος	Μάζα Κλάσματος (mg)
D ₁	23,6
D ₂	32,5
D ₃	666,0
D ₄	219,0
D ₅	322,0
D ₆	371,0
D ₇	835,0
D ₈	123,0
D ₉	54,0
D ₁₀	125,0
D ₁₁	73,0
D ₁₂	7,0
D ₁₃	42,0
D ₁₄	14,0
D ₁₅	72,0

Πιν. 3.9 Οι ποσότητες των συνενωμένων κλασμάτων της στήλης-D

Χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών cHex/EtOAc σε σταθερή αναλογία 90:10, για την παραλαβή 52 κλασμάτων. Τα κλάσματα αυτά υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικό έλεγχο λεπτής στοιβάδος (TLC) και αποφασίστηκε η συνένωση τους σε 15. Στον Πίνακα 3.9 φαίνονται οι ποσότητες των συνενωμένων κλασμάτων.

13^ο Στάδιο Διαχωρισμού

222 mg από το κλάσμα D₅ διαβιβάστηκαν από μικρή στήλη γέλης πυριτίου τύπου SEP-PAK με διαλύτες έκλουσης μίγματα MeOH/H₂O, προοδευτικά μειούμενης πολικότητας. Παραλήφθηκαν 3 κλάσματα.

Αριθμός κλάσματος	Μάζα κλάσματος (mg)	Αναλογία Διαλυτών
1	52,6	MeOH/H ₂ O 80:20
2	77,0	MeOH/H ₂ O 90:10
3	30,0	MeOH

14^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-9)

Μετά την παραλαβή μέρους του κλάσματος D₄ που διαλύεται σε MeOH/H₂O 80:20, αυτό υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Kromasil C₁₈) με μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 80:20. Παρελήφθησε ο μεταβολίτης **2** (PRR1, 1,4 mg) στα 14,5 min.

15^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-10)

Το μέρος του κλάσματος D₅ που παραλήφθηκε με MeOH/H₂O 80:20, υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Nucleosil 250x10 mm, 100 C₁₈/7μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 90:10. Συνολικά, παρελήφθησαν 5 κορυφές. Η μία από αυτές, που εκλούστηκε στα 16 min, υποβλήθηκε σε επιπλέον υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης με μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 70:30 που απέδωσε δύο ακόμα μεταβολίτες. Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.10.

Πιν. 3.10 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-10 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	1,0	18,0	39 (PRS)
2	1,0	25,0	42 (PRQ)

16^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-11)

Μετά την παραλαβή του μέρους του κλάσματος D₇ που διαλύεται σε MeOH/H₂O 80:20, αυτό υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Kromasil C₁₈) με μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 80:20. Παρελήφθησε (παράλληλα με τους μεταβολίτες **16** και **24**) ο μεταβολίτης **33** (1,8 mg) στα 13,3 min.

17^ο Στάδιο Διαχωρισμού (Στήλη-E)

Αριθμός κλάσματος	Μάζα Κλάσματος (mg)
E ₁	2,4
E ₂	4,0
E ₃	16,5
E ₄	19,5
E ₅	12,0
E ₆	17,6
E ₇	11,5
E ₈	228,0
E ₉	15,7
E ₁₀	11,5
E ₁₁	11,2

Το κλάσμα D₆ (371 mg) υποβλήθηκε σε στήλη βαρύτητας. Το πληρωτικό υλικό της στήλης ήταν γέλη πυριτίου. Χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών cHex/EtOAc σε σταθερή αναλογία 90:10, για την παραλαβή 11 κλασμάτων (Πιν. 3.11). Από τον φασματοσκοπικό έλεγχο ¹H NMR διαπιστώθηκε πως τα κλάσματα E₃, E₄, E₅ αντιστοιχούσαν στον καθαρό μεταβολίτη **16**, ο οποίος κυριαρχούσε σε αρκετά ακόμα κλάσματα της στήλης.

Πιν. 3.11 Οι ποσότητες των συνενωμένων κλασμάτων της στήλης-E

18^ο Στάδιο Διαχωρισμού (Διήθηση, Στήλες Βαρύτητας)

Το κλάσμα E₈ έδειξε, φασματοσκοπικά, την ύπαρξη επιπλέον μεταβολιτών με διαφορετική συμπεριφορά ως προς τη διαλυτότητά τους. Για το λόγο αυτό

παραλήφθηκε με μίγμα MeOH/H₂O σε αναλογία 1:1 και ακολούθησε διήθηση μέσω ηθμού Millipore TTP 2,0 μm.

Το διήθημα, μετά την εξάτμιση του διαλύτη, έδωσε υπόλειμμα βάρους 92,3 mg, το οποίο για περαιτέρω καθαρισμό διαβιβάστηκε από μικρή στήλη γέλης πυριτίου τύπου SEP-PAK με διαλύτες έκλουσης μίγματα cHex/EtOAc, προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Παραλήφθηκαν 4 κλάσματα από τα οποία τα No2 και 3 περιείχαν καθαρό τον μεταβολίτη **24**.

Από το ίζημα, που παρέμεινε στον ηθμό, διαβιβάστηκε πρώτα MeOH και στη συνέχεια CH₂Cl₂ μέχρι την πλήρη παραλαβή του σε μορφή διαλύματος. Χρωματογραφικός και φασματοσκοπικός έλεγχος ¹H NMR, των δύο υπολειμμάτων, έδειξε ότι το διαλυτό υπόλειμμα στη MeOH (112 mg) περιείχε σε καθαρή μορφή τον μεταβολίτη **16**, ενώ το διαλυτό στο CH₂Cl₂ (7,6 mg), περιείχε κυρίως έναν επιπλέον μεταβολίτη, τον **53**. Το υπόλειμμα αυτό διαβιβάστηκε μέσω μικρής στήλης γέλης πυριτίου τύπου SEP-PAK με την βοήθεια μιγμάτων cHex/EtOAc, αυξανόμενης πολικότητας απ' όπου και παραλήφθηκε ο μεταβολίτης **53** σε καθαρή μορφή.

Αριθμός κλάσματος	Μάζα Κλάσματος (mg)
F ₁	0,5
F ₂	1,4
F ₃	26,0
F ₄	30,0
F ₅	20,0
F ₆	18,0
F ₇	4,6
F ₈	25,0
F ₉	69,0
F ₁₀	191,0
F ₁₁	35,0
F ₁₂	9,7
F ₁₃	29,0

19^ο Στάδιο Διαχωρισμού (Στήλη-F)

Το κλάσμα A₇ (487 mg) υποβλήθηκε σε στήλη βαρύτητας. Η στήλη πληρώθηκε με γέλη πυριτίου και χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών cHex/EtOAc σε σταθερή αναλογία 70:30, για την παραλαβή 61 κλασμάτων. Τα κλάσματα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικό έλεγχο λεπτής στοιβάδος (TLC) και αποφασίστηκε η συνένωση τους σε 13. Στον Πίνακα 3.12 φαίνονται οι ποσότητες των συνενωμένων κλασμάτων.

Πιν. 3.12 Οι ποσότητες των συνενωμένων κλασμάτων της στήλης-F

20^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-12)

Το κλάσμα F₅ (20 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης κανονικής φάσης (Στήλη SpherisOrb 25 cm x 10 mm, S10W) με ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης cHex/EtOAc σε αναλογία 85:15. Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής δείκτη διάθλασης και εμφανίσθηκε μία κορυφή 6 mg (μεταβολίτης **34**, PRK).

21^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-13)

Τα συνενωμένα κλάσματα F₆, F₇, F₈ (50 mg) υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (Στήλη Chiral 250x10 mm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 1,5 ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης *n*-Hex/*i*-Prop σε αναλογία 85:15. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.13.

Πιν. 3.13 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-13 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	1,0	15,2	20 (PR45)
2	1,5	16,8	21 (PR46)
3	1,2	18,0	25 (PR22)
4	4,6	19,3	34 (PRK)

22^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-14)

23 mg από το κλάσμα F₉ χρωματογραφήθηκαν με τις ίδιες σχεδόν συνθήκες όπως και το κλάσμα F₅. Διέφερε μόνο η αναλογία cHex/EtOAc (70:30 σε αυτή την περίπτωση). Το χρωματογράφημα εμφάνισε δύο κορυφές, που αντιστοιχούσαν σε καθαρούς μεταβολίτες. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος ¹H NMR έδειξε ότι επρόκειτο για τον μεταβολίτη **34** (PRK) της προηγούμενης διαδικασίας, ενώ προέκυψε και ένας ακόμα, ο μεταβολίτης **18** (PRL).

Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-14 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.14.

Πιν. 3.14 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-14 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	3	10	34 (PRK)
2	9	14	18 (PRL)

23^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-15)

Για τον καθαρισμό του, το κλάσμα F₁₃, διαβιβάστηκε από μικρή στήλη γέλης πυριτίου με διαλύτες έκλουσης μίγματα MeOH/H₂O, προοδευτικά μειούμενης πολικότητας. Παραλήφθηκαν 5 κλάσματα από τα οποία το No1 (50% MeOH) περιείχε τους μεταβολίτες **45-46** (PR25, 2mg), που περαιτέρω διαχωρίστηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης, με αναλυτική στήλη (Στήλη Econosphere 250x4.6mm, 100 C₁₈/7μm), ροή 1,0 ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 55:45 (χρόνος καταγραφής κορυφής που αντιστοιχούσε στον μεταβολίτη **45** στα 3,8 min; χρόνος καταγραφής κορυφής που αντιστοιχούσε στον μεταβολίτη **46** στα 4,2 min).

24^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-16)

Ο καθαρισμός των μεταβολιτών **45-46** έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (Στήλη Chiral 250x4.6 mm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 1,2 ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης *n*-Hex/*i*-Prop σε αναλογία 85:15 (χρόνος καταγραφής κορυφής στα 18,9 min).

25^ο Στάδιο Διαχωρισμού (Στήλη-G)

Σε στήλη βαρύτητας υποβλήθηκε το κλάσμα A₃ (1000 mg). Η στήλη πληρώθηκε με γέλη πυριτίου και χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών cHex/EtOAc σε σταθερή αναλογία 95:5, για την παραλαβή 12 κλασμάτων. Στον Πίνακα 3.15 φαίνονται οι ποσότητες των συνενωμένων κλασμάτων.

Αριθμός κλάσματος	Μάζα Κλάσματος (mg)
G ₁	25,5
G ₂	88,4
G ₃	14,0
G ₄	29,0
G ₅	21,0
G ₆	19,0
G ₇	14,6
G ₈	29,0
G ₉	173,0
G ₁₀	386,0
G ₁₁	215,0
G ₁₂	42,7

Πιν. 3.15 Οι ποσότητες των συνενωμένων κλασμάτων της στήλης-G

26^ο Στάδιο Διαχωρισμού

Το κλάσμα G₉ (173 mg) διαβιβάστηκε από μικρή στήλη γέλης πυριτίου τύπου SEP-PAK με διαλύτες έκλουσης μίγματα MeOH/H₂O, προοδευτικά μειούμενης πολικότητας. Παραλήφθηκαν 3 κλάσματα.

Αριθμός κλάσματος	Μάζα κλάσματος (mg)	Αναλογία Διαλυτών
1	23,5	MeOH/H ₂ O 80:20
2	103,4	MeOH/H ₂ O 90:10
3	14,0	MeOH

27^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-17)

Το μέρος του κλάσματος G₉ που παραλήφθηκε με MeOH/H₂O 80:20, υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Nucleosil 250x10 mm, 100 C₁₈/7μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 90:10. Συνολικά

παρελήφθησαν 5 κορυφές. Οι μάζες των κλασμάτων και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.16.

Πιν. 3.16 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-17 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	2,2	11,3	28 (PRM)
2	1,5	12,8	7 (PRN)
3	2,8	13,5	6 (PRO)
4	1,6	15,5	51 (PR6)
5	2,2	17	51 (PR6)

28^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-18)

Το μέρος του κλάσματος G₉ που παραλήφθηκε με MeOH/H₂O 90:10, υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Nucleosil 250x10 mm, 100 C₁₈/7μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 90:10. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κορυφές. Οι μάζες των κλασμάτων και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.17.

Πιν. 3.17 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-18 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	12,2	15,5	51 (PR6)
2	22,5	17	51 (PR6)
3	1,3	21	52 (PRP)

29^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-19)

Μετά την παραλαβή του μέρους του κλάσματος G₁₁ που διαλύεται σε MeOH/H₂O 80:20 (50 mg), αυτό υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Kromasil C₁₈) με μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 80:20. Οι μάζες των κλασμάτων και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.18.

Πιν. 3.18 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-19 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	1,8	8,1	
2	5,3	16,0	2 (PRR1), 3 (PRR2)
3	6,0	17,8	5 (PRT)

30^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-20)

Το μίγμα μεταβολιτών **2-3** διαχωρίστηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (Στήλη Chiral 250x4.6 mm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 0.75ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης *n*-Hex/*i*-Prop σε αναλογία 95:5. Οι μάζες των κλασμάτων και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.19.

Πιν. 3.19 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-20 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	1,0	8,4	3 (PRR2)
2	2,5	9,8	2 (PRR1)

31^ο Στάδιο Διαχωρισμού (Στήλη-I)

Το κλάσμα A₅ (1240 mg) υποβλήθηκε σε στήλη με υποβοήθηση κενού. Η στατική φάση ήταν γέλη πυριτίου αντίστροφης (C₁₈) φάσης, ενώ την κινητή αποτέλεσαν μίγματα MeOH/H₂O προοδευτικά μειούμενης πολικότητας και CH₂Cl₂ για την παραλαβή του τελευταίου κλάσματος. Τα κλάσματα που παραλήφθηκαν υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικό έλεγχο λεπτής στοιβάδος (TLC) και αποφασίστηκε η συνένωση τους σε 15. Στον Πίνακα 3.20 φαίνονται οι μάζες των συνενωμένων κλασμάτων.

Πιν. 3.20 Οι μάζες των συνενωμένων κλασμάτων της στήλης-I

Αριθμός κλάσματος	Μάζα Κλάσματος (mg)	Αναλογία Διαλυτών
I ₁	63,3	MeOH/H ₂ O 70:30
I ₂	90,4	MeOH/H ₂ O 70:30
I ₃	46,0	MeOH/H ₂ O 75:25
I ₄	35,0	MeOH/H ₂ O 75:25
I ₅	35,0	MeOH/H ₂ O 80:20
I ₆	58,5	MeOH/H ₂ O 80:20
I ₇	46,2	MeOH/H ₂ O 80:20
I ₈	59,1	MeOH/H ₂ O 85:15
I ₉	72,4	MeOH/H ₂ O 85:15
I ₁₀	416,5	MeOH/H ₂ O 90:10
I ₁₁	73,0	MeOH/H ₂ O 95:5
I ₁₂	124,4	MeOH/H ₂ O 95:5
I ₁₃	29,5	MeOH
I ₁₄	35,7	MeOH
I ₁₅	107,5	CH ₂ Cl ₂

32^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-21)

Το I₁ (61 mg), υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 80:20. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.21.

Πιν. 3.21 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-21 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	3,4	5,4	44 (PR18)
3	3,4	7,5	16 (PRG)
4	3,1	8,5	13 (PR1), 14 (PR2)
5	2,5	23,8	24 (PRC)

33^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-22)

Ο καθαρισμός του μεταβολίτη **44** έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης, με αναλυτική στήλη (Στήλη Econosphere 250x4.6mm, 100 C₁₈/7μm), ροή 0,75 ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 70:30 (χρόνος καταγραφής κορυφής στα 5,2 min).

34^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-23)

Το I₂ (90 mg), υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 75:25. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.22.

Πιν. 3.22 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-23 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	8,4	11,0	16 (PRG)
2	1,3	12,5	9 (PRZ)
3	21,6	13;5	13 (PR1), 14 (PR2)
4	3,8	15,8	12 (PRW)

35^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-24)

Το μίγμα μεταβολιτών **13-14** διαχωρίστηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (Στήλη Chiral 250x4.6 mm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 1,0 ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης *n*-Hex/*i*-Prop σε αναλογία 90:10. Οι μάζες των κλασμάτων από τη διαδικασία αυτή και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.23.

Πιν. 3.23 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-24 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	15,0	10,0	14 (PR2)
2	5,5	11,5	13 (PR1)

36^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-25)

Το I₃ (46 mg), υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 80:20. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.24.

Πιν. 3.24 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-25 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	1,5	6,8	26 (PRA)
2	2,1	11,5	
3	2,2	12,0	10 (PR4)
4	1,5	12,8	11 (PR19)

37^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-26)

Ο καθαρισμός του μεταβολίτη **11** έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης, με αναλυτική στήλη (Econosphere C₁₈ 250x4.6 mm, C₁₈/5μm), ροή 1ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 60:40 (Χρόνος καταγραφής κορυφής στα 12,2 min).

38^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-27)

Μετά την παραλαβή μέρους του κλάσματος A₆ που διαλύεται σε MeOH/H₂O 50:50 (22,0 mg), αυτό υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε

αναλογία 70:30. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.25.

Πιν. 3.25 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-27 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	2,5	4,6	23 (PR21)
2	2,1	5,3	17 (PR33)
3	1,0	5,7	
4	1,2	8,0	
5	1,1	12,1	9 (PRZ)

39^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-28)

Μετά την παραλαβή του μέρους του κλάσματος A₆ που διαλύεται σε MeOH/H₂O 60:40 (34,0 mg), αυτό υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 70:30. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.26.

Πιν. 3.26 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-28 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	2,2	10,2	34 (PRK)
2	2,5	11,8	9 (PRZ)
3	4,4	13,6	13 (PR1), 14 (PR2)
4	0,8	14,5	15 (PR31)

40^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-29)

Μετά την παραλαβή του μέρους του κλάσματος A₈₋₉ που διαλύεται σε MeOH / H₂O 60:40 (9,7 mg), αυτό υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης, με αναλυτική στήλη (Econosphere 250x4.6 mm, C₁₈/5μm), ροή

0,75 ml/min και με μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 60:40. Παρελήφθησε, (παράλληλα με τον μεταβολίτη **24**), ο μεταβολίτης **25** (1,8 mg) στα 9,3 min.

41^ο Στάδιο Διαχωρισμού (Στήλη-A –Επανάληψη-)

Τα υπολειπόμενα 5 g του αρχικού δείγματος, χρωματογραφήθηκαν σε στήλη με υποβοήθηση κενού (Vacuum Column Chromatography). Το πληρωτικό υλικό της στήλης ήταν γέλη πυριτίου (silica gel), ενώ ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε σύστημα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας. Χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες αναλογίες μίγματα cHex, EtOAc και MeOH.

Αριθμός κλάσματος	Μάζα Κλάσματος
I	22,0 mg
II	1,6 g
III	0,8 g
IV	100,0 mg
V	160,0 mg
VI	137,7 mg
VII	837,0 mg

Συνολικά, παρελήφθησαν 13 κλάσματα, το καθένα τα οποία, αφού εξετάστηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (TLC), συνενώθηκαν σε 7. Στον Πιν. 3.27 καταγράφονται οι τελικές συνενώσεις και τα βάρη των υπολειμμάτων. Τα VII κλάσματα εξατμίστηκαν υπό κενό σε θερμοκρασίες που δεν ξεπερνούσαν τους 40°C και για το καθένα πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός έλεγχος ¹H NMR.

42^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-30)

Μετά την παραλαβή του μέρους του κλάσματος V που διαλύεται σε MeOH/H₂O 60:40 (14,0 mg), αυτό υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (Στήλη Chiral 250x10 mm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 1,5 ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης *n*-Hex/*i*-Prop σε αναλογία 85:15. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.28.

Πιν. 3.28 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-30 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	5,0	15,0	13 (PR1)
2	2,1	18,0	34 (PRK)
3	0,8	21,0	19 (PR37)
4	4,0	22,1	18 (PRL)

43^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-31)

Μετά την παραλαβή του μέρους του κλάσματος A₁₀ που διαλύεται σε MeOH/H₂O 30:70 (500,0 mg), αυτό υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 55:45. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.29.

Πιν. 3.29 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-31 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)
A _{10.1.1}	370,0	3,0
A _{10.1.2}	40,0	7,0
A _{10.1.3}	28,0	9,6
A _{10.1.4}	30,0	16,6

44^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-32)

Μετά την παραλαβή του μέρους του κλάσματος A₁₀ που διαλύεται σε MeOH/H₂O 40:60 (140,0 mg), αυτό υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 55:45. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κορυφή (16,0 mg- χρόνος καταγραφής κορυφής 6.0 min).

45^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-33)

Μετά την παραλαβή του μέρους του κλάσματος A₁₀ που διαλύεται σε MeOH/H₂O 50:50 (180,0 mg), αυτό υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 55:45. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κορυφές. Οι μάζες των

μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.30.

Πιν. 3.30 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-33 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)
A _{10.3.1}	17,0	5,6
A _{10.3.2}	12,0	9,2
A _{10.3.3}	10,0	16,6

46^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-34)

Το κλάσμα A_{10.1.1} (370,0 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 1ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης CH₃CN/H₂O σε αναλογία 10:90. Παρελήφθησαν πολλές κορυφές, δύο εκ των οποίων παρουσίασαν φασματοσκοπικό ενδιαφέρον. Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής των δύο κορυφών φαίνονται στον Πίνακα 3.31.

Πιν. 3.31 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-34 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	3,0	8,0	55 (PR43)
2	13,0	9,2	54 (PR42)

47^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-35)

Τα κλάσματα A_{10.1.2}, A_{10.2.1}, A_{10.3.1} (70,0mg συνολικά) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 0.75ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης CH₃CN/H₂O σε αναλογία 20:80. Παρελήφθησαν πολλές κορυφές, τρεις εκ των οποίων παρουσίασαν φασματοσκοπικό ενδιαφέρον. Οι μάζες των μεταβολιτών από τη διαδικασία αυτή και ο χρόνος καταγραφής των τριών κορυφών φαίνονται στον Πίνακα 3.32.

Πιν. 3.32 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-35 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	3,0	17,0	
2	2,5	19,6	29 (PR44)
3	6,6	28,0	56 (PR41)

48^ο Στάδιο Διαχωρισμού (Στήλη-II)

Τα υπολειπόμενα 3 g του δείγματος A₂ και το 1,6 g του κλάσματος II υποβλήθηκαν σε στήλη με υποβοήθηση κενού. Η στατική φάση ήταν γέλη πυριτίου αντίστροφης (C₁₈) φάσης, ενώ την κινητή αποτέλεσαν μίγματα MeOH/H₂O προοδευτικά μειούμενης πολικότητας. 17 κλάσματα παραλήφθησαν. Στον Πίνακα 3.33 φαίνονται οι μάζες των σημαντικότερων κλασμάτων.

Πιν. 3.33 Οι μάζες των συνενωμένων κλασμάτων της στήλης-II

Αριθμός κλάσματος	Μάζα Κλάσματος (mg)	Αναλογία Διαλυτών
II ₅	20,3	MeOH/H ₂ O 75:25
II ₆	47,4	MeOH/H ₂ O 75:25
II ₇	29,0	MeOH/H ₂ O 75:25
II ₈	580,0	MeOH/H ₂ O 75:25
II ₉	374,0	MeOH/H ₂ O 75:25
II ₁₀	196,5	MeOH/H ₂ O 75:25
II ₁₁	173,2	MeOH/H ₂ O 75:25
II ₁₂	104,0	MeOH/H ₂ O 75:25
II ₁₃	133,0	MeOH/H ₂ O 80:20
II ₁₄	197,0	MeOH/H ₂ O 85:15
II ₁₅	57,0	MeOH/H ₂ O 90:10
II ₁₆		MeOH
II ₁₇		CH ₂ Cl ₂

49^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-36)

Το II₁₃ (133 mg), υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 80:20. Συνολικά παρελήφθησαν 7 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών από τη διαδικασία αυτή και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.34.

Πιν. 3.34 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-36 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	3,0	6,8	16 (PRG)
2	0,6	9,3	42 (PRQ)
3	1,6	11,5	22 (PR20)
4	3,6	12,6	26 (PRA)
5	4,4	19,8	30 (PR3)
6	77,0	21,0	-
7	15,0	22,8	8 (PRB)

50^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-37)

Ο απόλυτος καθαρισμός του μεταβολίτη **22** (PR20) έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης, με αναλυτική στήλη (Econosphere C-18 250x4.6 mm, C₁₈/5μm), ροή 0,75 ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 70:30 (χρόνος καταγραφής κορυφής στα 9,0 min).

51^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-38)

Το II₁₄ (200 mg), υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography) αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 80:20. Συνολικά παρελήφθησαν 8 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.35.

Πιν. 3.35 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-38 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	9,4	7,0	16 (PRG)
2	1,4	8,5	42 (PRQ)
3	2,6	11,0	43 (PR23)
4	2,4	11,7	37 (PR24)
5	1,8	12,2	22 (PR20)
6	1,7	17,8	30 (PR3)
7	120,0	22,7	-
8	10,4	26,8	8 (PRB)

52^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-39)

Ο καθαρισμός του μεταβολίτη **43** (PR23) έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης, με αναλυτική στήλη (Econosphere 250x4.6 mm, C₁₈/5μm), ροή 0,75 ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 60:40 (χρόνος καταγραφής κορυφής στα 13,6 min).

53^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-40)

Ο καθαρισμός του μεταβολίτη **37** (PR24) έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης, με αναλυτική στήλη (Econosphere 250x4.6 mm, C₁₈/5μm), ροή 0,75 ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 60:40 (χρόνος καταγραφής κορυφής στα 14,5 min).

54^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-41)

Η κορυφή 6 από την HPLC του II₁₃ (77 mg) και η κορυφή 7 από την HPLC του II₁₄ (120 mg), υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 90:10. Συνολικά παρελήφθησαν 7 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.36.

Πιν. 3.36 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-41 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	13,0	5,0	16 (PRG)
2	3,4	5,5	39 (PRS)
3	1,6	6,2	38 (PR34)
4	3,6	6,5	42 (PRQ) 43 (PR23)
5	8,2	7,0	-
6	3,5	9,2	30 (PR3)
7	140,8	10,6	-

55^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-42)

Το κλάσμα 5 (8,2 mg) του 54^{ου} σταδίου διαχωρισμού υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (Στήλη Kromasil 250x8 mm, 100 C₁₈/5μm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 70:30. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών από τη διαδικασία αυτή και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.37.

Πιν. 3.37 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-42 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	0,8	6,5	-
2	1,0	7,3	40 (PR27)
3	1,0	9,2	41 (PR28)
4	3,8	17,0	35 (PR30), 43 (PR23)

56^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-43)

Οι μεταβολίτες **35**, **43** περαιτέρω διαχωρίστηκαν σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης, με αναλυτική στήλη (Econosphere 250x4.6 mm, C₁₈/5μm), ροή 1ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης MeOH/H₂O σε αναλογία 60:40.

Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.38.

Πιν. 3.38 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-43 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	2,0	10,2	43 (PR23)
2	1,5	13,5	35 (PR30)

57^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-44)

Το κλάσμα 7 (140,8 mg) του 54^{ου} σταδίου διαχωρισμού υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (Στήλη Chiral 250x10 mm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 2,0 ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης *n*-Hex/*i*-Prop σε αναλογία 95:5. Συνολικά παρελήφθησαν 8 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.39.

Πιν. 3.39 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-44 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	75,0	10,0	24 (PRC)
2	8,0	11,5	8 (PRB), 36 (PR39)
3	2,0	12,5	35 (PR30))
4	1,0	14,8	38 (PR34)
5	2,3	15,6	39 (PRS), 43 (PR23)
6	2,2	21,0	42 (PRQ)
7	1,5	24,0	37 (PR24)
8	5,1	38,0	16 (PRG)

Ο καθαρισμός του μεταβολίτη **36** έγινε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (Στήλη Chiral 250x10 mm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 1,5 ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης *n*-Hex/*i*-Prop σε αναλογία 97:3 (χρόνος καταγραφής κορυφής στα 17,3 min).

58^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-45)

Μετά την παραλαβή του μέρους κλάσματος V που διαλύεται σε MeOH/H₂O 50:50 (6,7 mg), το δείγμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (Στήλη Chiral 250x10 mm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 1.5ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης *n*-Hex/*i*-Prop σε αναλογία 85:15. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών από τη διαδικασία αυτή και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.40.

Πιν. 3.40 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-45 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	1,0	21,0	19 (PR37)
2	3,0	22,0	18 (PRL)

59^ο Στάδιο Διαχωρισμού (HPLC-46)

Μετά την παραλαβή του μέρους του κλάσματος V που διαλύεται σε MeOH/H₂O 60:40 (6,4 mg), το δείγμα υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (Στήλη Chiral 250x10 mm) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI detector), ροή 1.5ml/min και μίγμα διαλυτών έκλουσης *n*-Hex/*i*-Prop σε αναλογία 85:15. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κορυφές. Οι μάζες των μεταβολιτών και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής φαίνονται στον Πίνακα 3.41.

Πιν. 3.41 Οι μάζες των κλασμάτων από την HPLC-46 και ο χρόνος καταγραφής της κάθε κορυφής

Αριθμός κορυφής	Μάζα Κλάσματος (mg)	Χρόνος καταγραφής κορυφής (min)	Μεταβολίτης
1	4,5	15,0	13 (PR1)
2	1,5	18,0	34 (PRK)

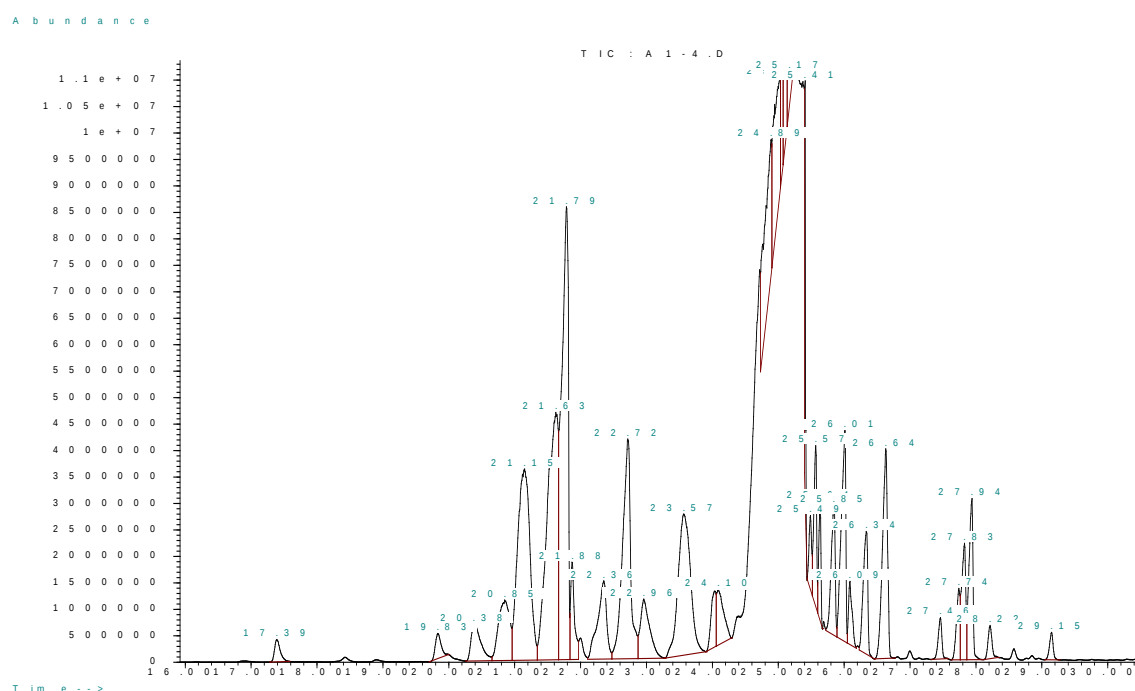
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ανάλυση της χημικής σύστασης του κλάσματος A₁ με Αέριο Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας.

Η πρώτη κλασμάτωση (χρωματογραφία σε στήλη με υποβοήθηση κενού) του αρχικού εκχυλίσματος του οργανισμού *P.rigida* απέδωσε ένα άχρωμο κλάσμα (A₁, 224.0 mg, 0.8%), το οποίο, μετά από ανάλυση με GC-MS, έδειξε ότι αποτελείται από πολλούς ισομερείς C₁₅H₂₄ (M⁺ *m/z* 204) υδρογονάνθρακες σε μικρές αναλογίες και έναν κύριο C₁₅H₂₂ (M⁺ *m/z* 202), ο οποίος απομονώθηκε σε καθαρή μορφή και προσδιορίστηκε ως το α -κουρκουμένιο (22.0 mg).

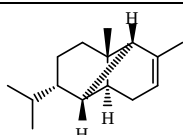
Χωρίς περαιτέρω διαχωρισμό, τα υπόλοιπα σесκιτερπένια προσδιορίστηκαν με τη σύγκριση των φασματοσκοπικών τους δεδομένων (MS) και του χρόνου ανάσχεσής τους με αυτά πρότυπων δειγμάτων (Givaudan Corp.).

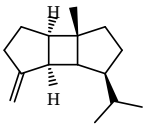
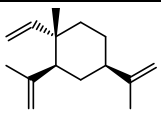
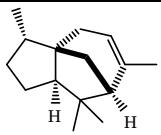
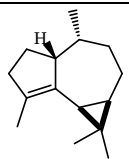
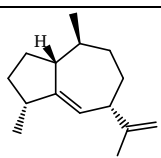
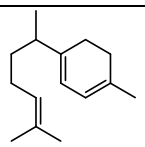
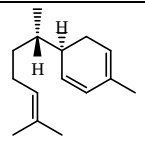
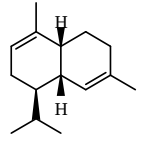
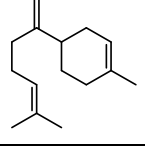
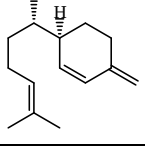
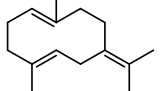
Ταυτοποιήθηκαν συνολικά 13 συστατικά, που συνιστούν το 29.6% του κλάσματος A₁. Κύριους μεταβολίτες αποτελούν το α -κουρκουμένιο (9.8%), το α -κεδράνιο (4.5%), το α -γκουργκουνένιο (3.4%) και το γ -κουρκουμένιο (4.0%).



Εικ. 4.1 Χρωματογράφημα του κλάσματος A₁

Πίνακας 4.1 Συστατικά του κλάσματος A₁ που ταυτοποιήθηκαν με GC-MS

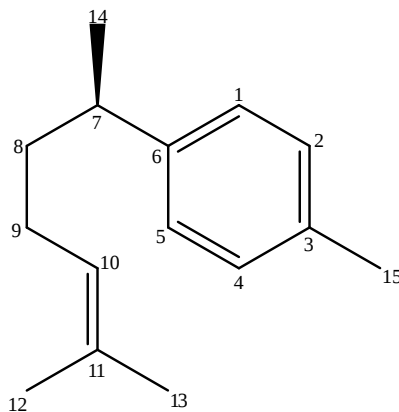
	Μεταβολίτες	Δομή	Χρόνος ανάσχεσης (<i>t_R</i>)	Περιεκτικότητα %
1	α -κοπαένιο (α -copaene)		20.02	0.32

2	β -μπουρμπονένιο (β -bourbonene)		20.38	0.71
3	β -ελεμένιο (β -elemene)		20.85	1.30
4	α -κεδράνιο (α -cedrane)		21.15	4.54
5	α -γκουργκουνένιο (α -gurjunene)		21.59	3.44
6	γ -γκουργκουνένιο (γ -gurjunene)		24.04	0.70
7	γ -κουρκουμένιο (γ -curcumene)		24.32	4.03
8	α -ζινγκιμπερένιο (α -zingiberene)		25.49	0.98
9	α -μουρολένιο (α -muurolene)		25.64	0.81
10	β -μπισαμπολένιο (β -bisabolene)		25.85	1.47
11	β -σεσκιφελλανδρένιο (β -sequiphellandrene)		29.7	1.18
12	β -γερμακρένιο (β -germacrene)		31.2	0.31

4.2 Απόδοση δομής των μεταβολιτών

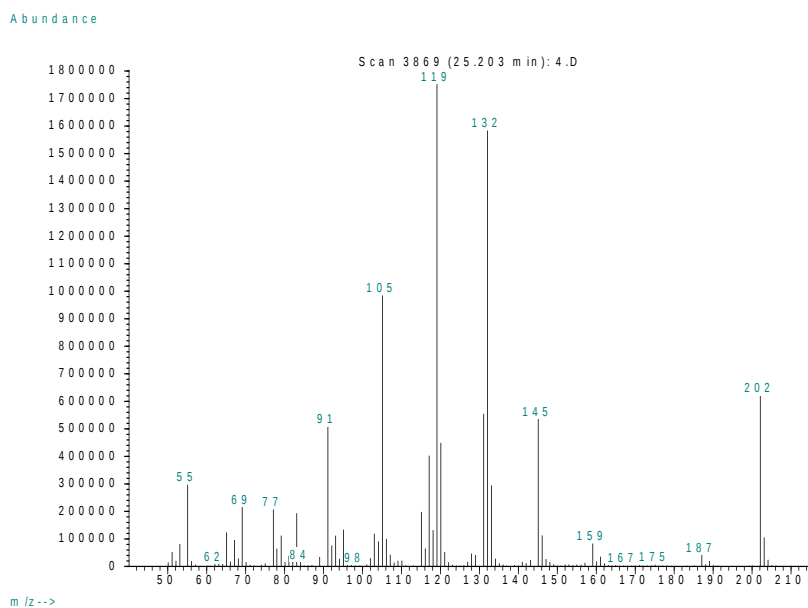
4.2.1 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 1

Ο μεταβολίτης **1** (22.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



$[\alpha]_D = -28.0$ (c 0.1, CHCl_3)

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.2), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 202 $[\text{M}]^+$, που υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}$.

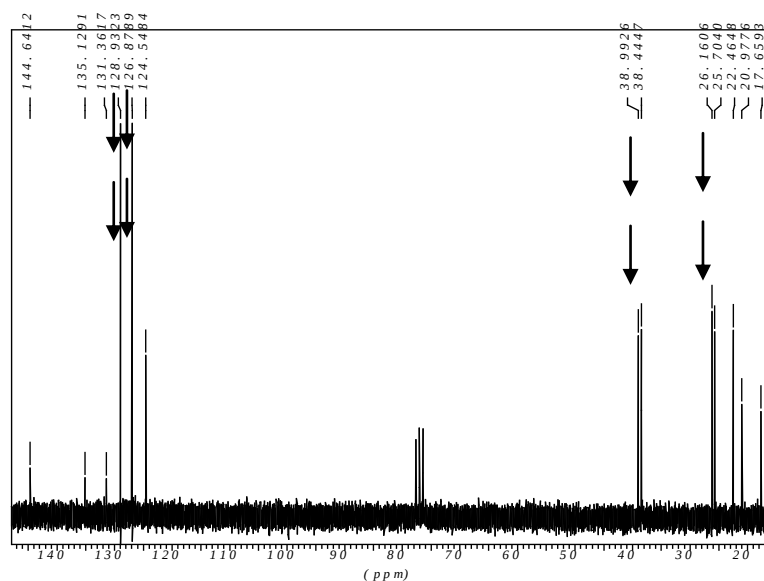


Εικ. 4.2 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **1**

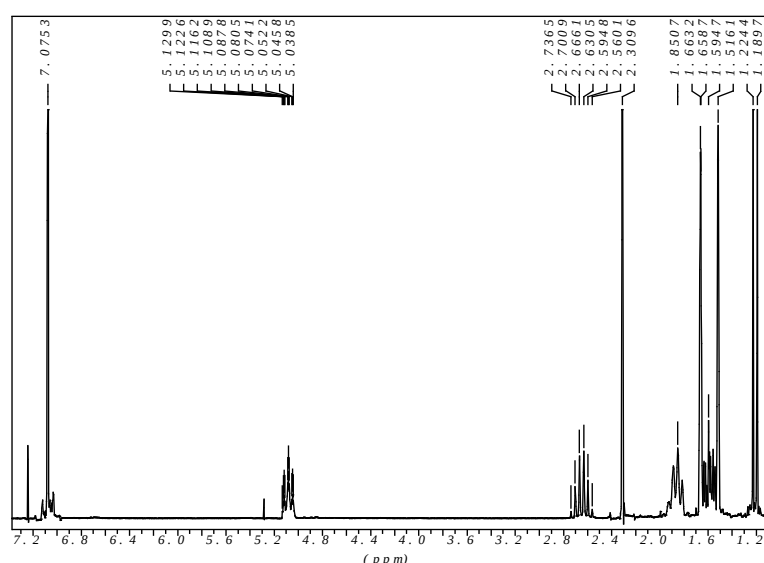
Στο φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.3) του μεταβολίτη **1** εμφανίζονται 7 άτομα ανθράκων στην αλειφατική περιοχή και 8 ολεφινικοί/αρωματικοί άνθρακες (τρεις εκ των οποίων είναι τεταρτοταγείς).

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.4) υποδεικνύει την ύπαρξη ισοπροπυλιδενικής ομάδας (ολεφινικό πρωτόνιο σε δ 5.09 και δύο απλές κορυφές βινυλικών μεθυλίων σε δ 1.67 και 1.53), ενός μεθυλίου (δ 1.22, d) σε βενζυλικό μεθίνιο (δ 2.66, sextet) και

ενός αρωματικού μεθυλίου (δ 2.32, s). Ο αρωματικός δακτύλιος είναι δισυποκατεστημένος και παρουσιάζει 4 αρωματικά πρωτόνια (δ 7.09, brs).



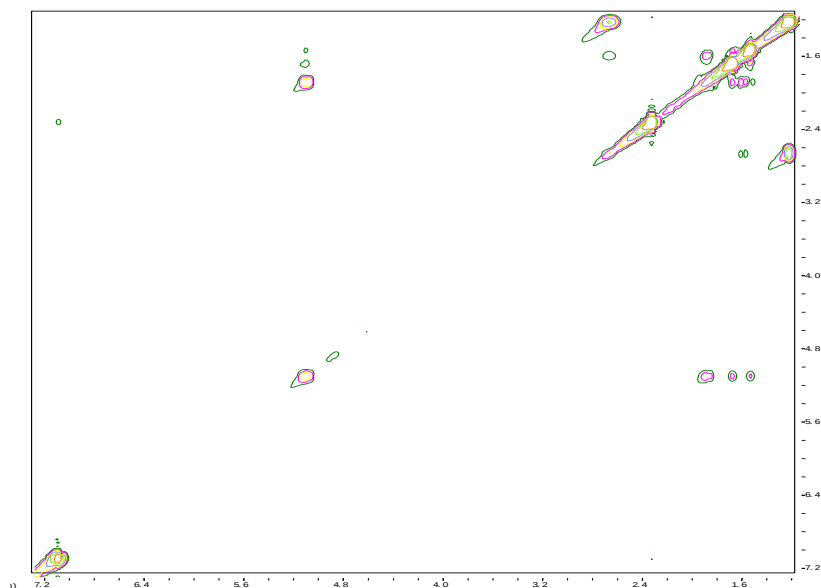
Εικ. 4.3 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **1**



Εικ. 4.4 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **1**

Με βάση τα παραπάνω, ο μεταβολίτης **1** θεωρήθηκε σεσκιτερπένιο του οποίου ο βαθμός ακορεστότητας υπολογίστηκε ως $\Omega=5$. Λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία τεσσάρων διπλών δεσμών, το μόριο θα πρέπει να έχει έναν δακτύλιο.

Στο φάσμα COSY (Εικ. 4.5) φαίνονται η σύζευξη των πρωτονίων του αρωματικού μεθυλίου με τα γειτονικά αρωματικά πρωτόνια, η γειτνίαση του ολεφινικού πρωτονίου με τα δύο μεθύλια της ισοπροπυλιδενικής ομάδας και η σύζευξη του βενζυλικού μεθινίου με το μεθύλιο με το οποίο βρίσκονται πάνω στον ίδιο άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας του μορίου.



Εικ. 4.5 Φάσμα COSY (CDCl₃) του μεταβολίτη **1**

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταβολίτης **1** ταυτίζεται με τον γνωστό (Simonsen, 1952), μονοκυκλικό σεσκιτερπενικό υδρογονάνθρακα **(-)-α-κουρκουμένιο** (Maurer *et al*, 1977; Van Beek *et al*, 1991). Στο μόριο έχουν αποδοθεί κυτταροτοξικές (Kim *et al*, 2003) και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Sartoratto *et al*, 2004), ενώ έχει βρεθεί ότι αποτελεί συστατικό της φερομόνης των αρσενικών εντόμων του είδους *Thyanta pallidovirens* (McBrien *et al*, 2002).

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη παρατίθενται στον Πίνακα 4.2.

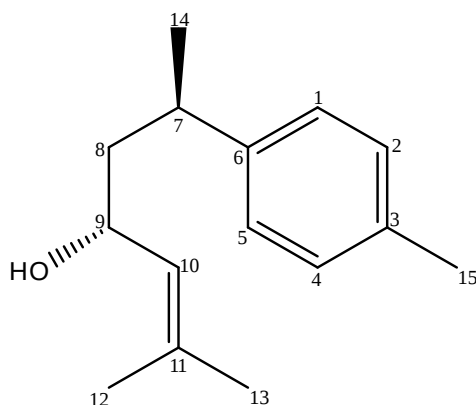
Πίνακας 4.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **1** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY
1	7.09 (1H, brs)	126.9	H-2
2	7.09 (1H, brs)	128.9	H-1, H-15
3	-	135.1	-
4	7.09 (1H, brs)	128.9	H-5, H-15
5	7.09 (1H, brs)	126.9	H-4
6	-	144.6	-
7	2.66 (1H, sextet, J=7.0)	38.9	H-8, H-14
8	1.60 (2H, m)	38.4	H-7, H-9
9	1.89 (2H, m)	26.2	H-8, H-10
10	5.09 (1H, brt, J=7.1)	124.5	H-9, H-12, H-13
11	-	131.4	-
12	1.53 (3H, brs)	17.7	H-10
13	1.67 (3H, brs)	25.7	H-10
14	1.22 (3H, d, J=7.0)	22.5	H-7
15	2.32 (3H, s)	21.0	H-2, H-4

4.2.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 2

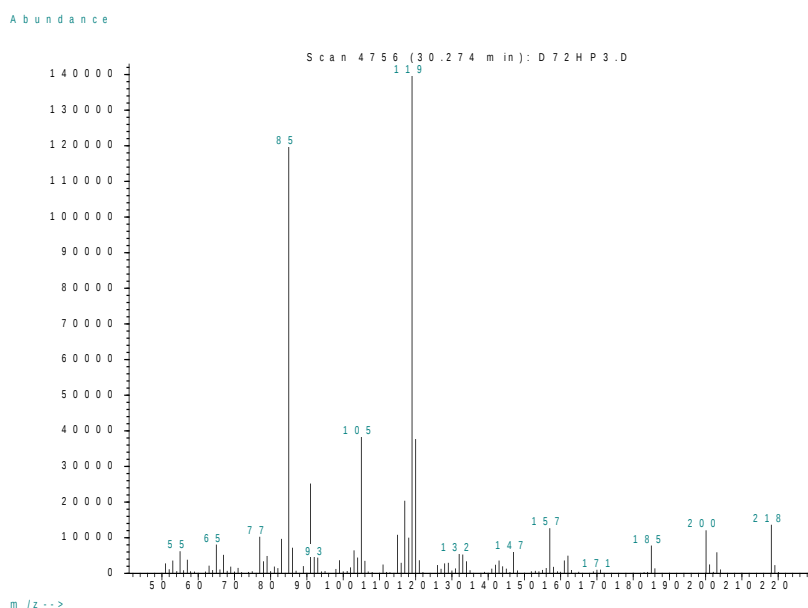
Πρώτη αναφορά σε θαλάσσιο είδος

Ο μεταβολίτης **2** (2.5 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



$[\alpha]_D = -27.0$ (c 0.1, CHCl_3)

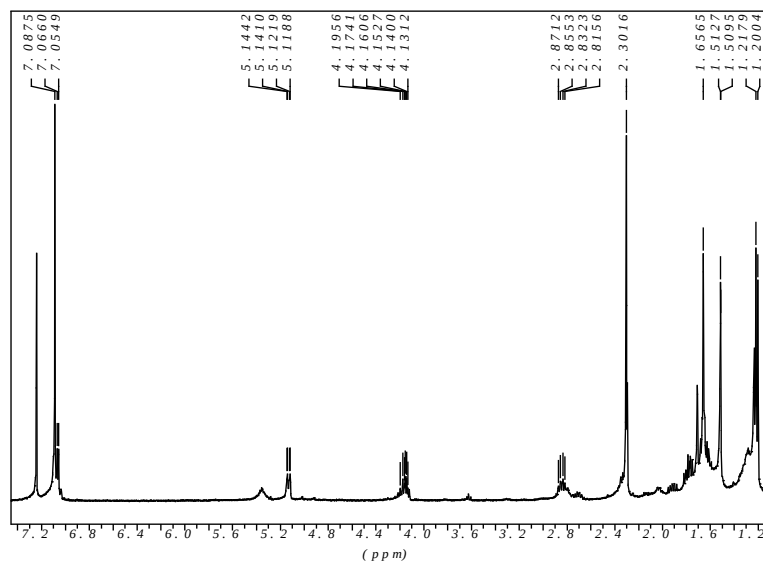
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.6), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 218 $[\text{M}]^+$, που υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.



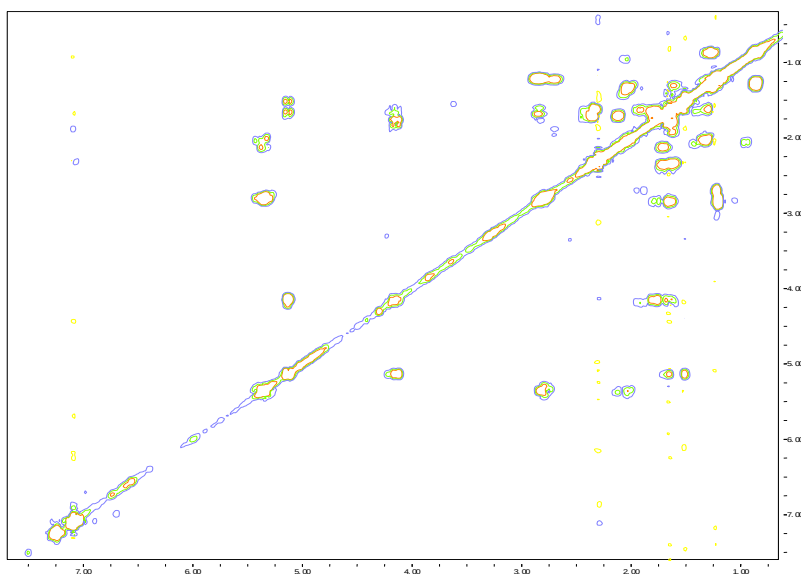
Εικ. 4.6 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **2**

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 4.7) υποδεικνύει την ύπαρξη ισοπροπυλιδενικής ομάδας (ολεφινικό πρωτόνιο δ 5.14 και δύο απλές κορυφές βινυλικών μεθυλίων στα 1.65 ppm και 1.51 ppm), αρωματικού μεθυλίου (δ 2.30, s) και μεθυλίου σε βενζυλικό μεθίνιο (διπλή κορυφή που αντιστοιχεί σε τρία πρωτόνια στα 1.20 ppm, η οποία εμφανίζει σύζευξη με το μεθίνιο στα 2.85 ppm). Ο αρωματικός δακτύλιος εμφανίζει 4 αρωματικά πρωτόνια (δ 7.09, s). Επίσης, χαρακτηριστική είναι και η παρουσία οξυγονωμένου μεθινίου στα 4.15 ppm, το οποίο εμφανίζει σύζευξη με το ολεφινικό

πρωτόνιο του μορίου, όπως προκύπτει από τη μελέτη του φάσματος COSY (Εικ. 4.8) και υποδεικνύει την παρουσία ενός υδροξυλίου στον C-9.



Εικ. 4.7 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **2**

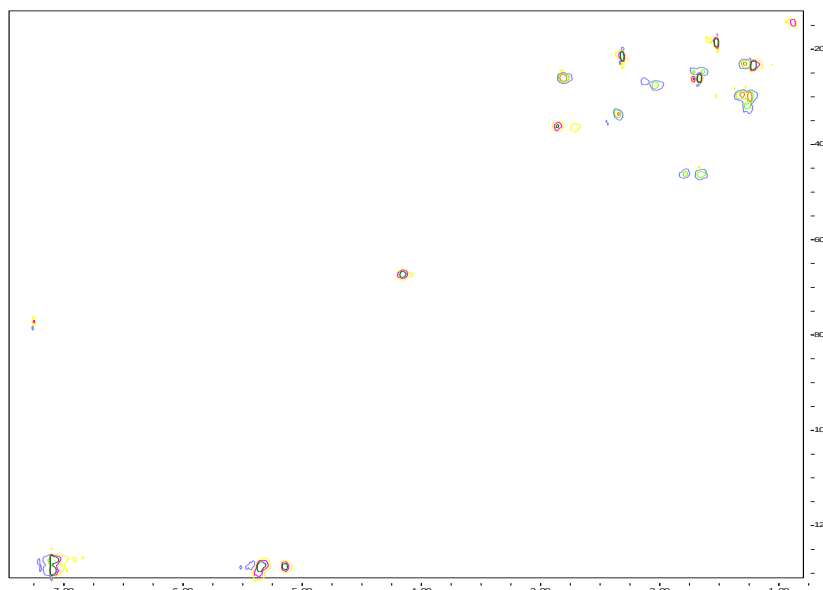


Εικ. 4.8 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **2**

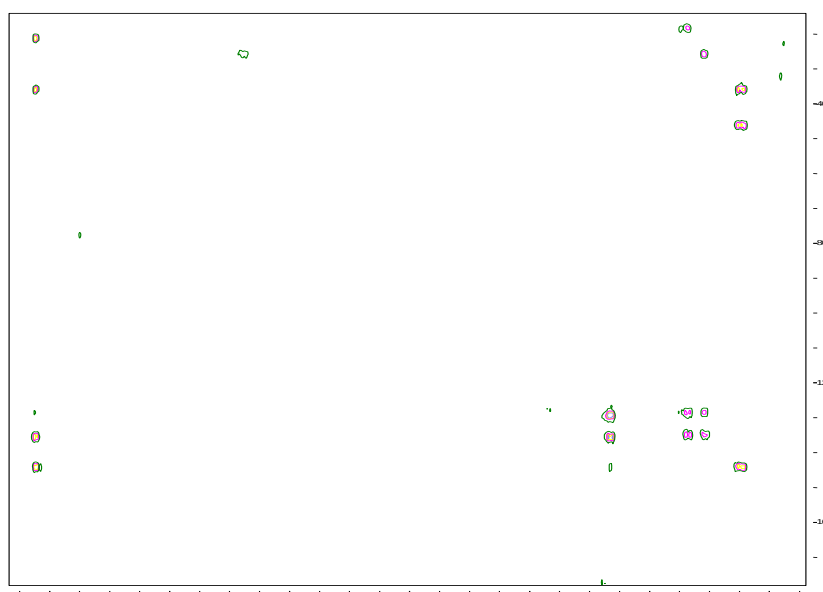
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και λαμβάνοντας υπ' όψιν τα πειράματα HMBC (Εικ. 4.10) και HSQC-DEPT (Εικ. 4.9) που βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και στον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο, ο μεταβολίτης **2** ταυτίστηκε με το σεσκιτερπένιο **(7R,9S)-(-)-μπισακουμόλη** (σκελετός μπισαμπολενίου).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο οπτικός αντίποδας του μεταβολίτη **2** έχει απομονωθεί στο παρελθόν από τις ρίζες του φυτού *Curcuma xanthorrhiza*, ενώ η

απόλυτη στεreoχημεία του προσδιορίστηκε ως 7*S*,9*R* (Uehara *et al*, 1989). Παρουσιάζει ισχυρή κυτταροτοξικότητα ($IC_{50}=22.9 \mu M$) κατά λευχαιμικών κυττάρων της σειράς L₁₂₁₀ (Fukuda *et al*, 2006).



Εικ. 4.9 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl₃) του μεταβολίτη **2**



Εικ. 4.10 Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **2**

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **2** παρατίθενται στον Πίνακα 4.3.

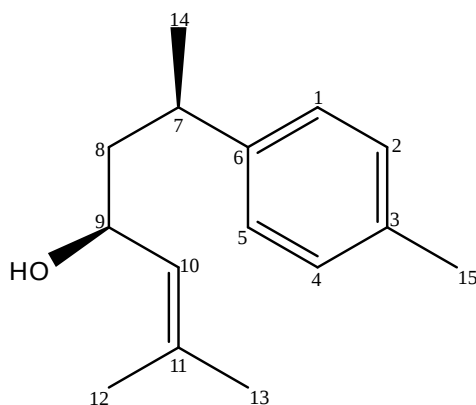
Πίνακας 4.3 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **(7*R*,9*S*)-(-)-μπισακουμόλη** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	7.09 (1H, s)	127.1	H-2	C-3, C-5
2	7.09 (1H, s)	129.3	H-1, H-15	C-4, C-6, C-15
3	-	135.6	-	-
4	7.09 (1H, s)	129.3	H-5, H-15	C-2, C-6, C-15
5	7.09 (1H, s)	127.1	H-4	C-3, C-7
6	-	144.1	-	-
7	2.85 (1H, m)	36.1	H-14, H-8a, H-8b	-
8	a 1.78 (1H, m) b 1.65 (1H, m)	46.1	H-7, H-8b, H-9 H-7, H-8a, H-9	- -
9	4.14 (1H, m)	67.3	H-8a, H-8b, H-10	-
10	5.14 (1H, brdd, <i>J</i> =8.5, 1.3)	128.4	H-9, H-12, H-13	-
11	-	135.0	-	-
12	1.51 (3H, s)	18.6	H-10	C-10, C-11, C-13
13	1.65 (3H, s)	26.1	H-10	C-10, C-11, C-12
14	1.20 (3H, d, <i>J</i> =6.8)	23.3	H-7	C-6, C-7, C-8
15	2.30 (3H, s)	21.4	H-2, H-4	C-2, C-3, C-4

4.2.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 3

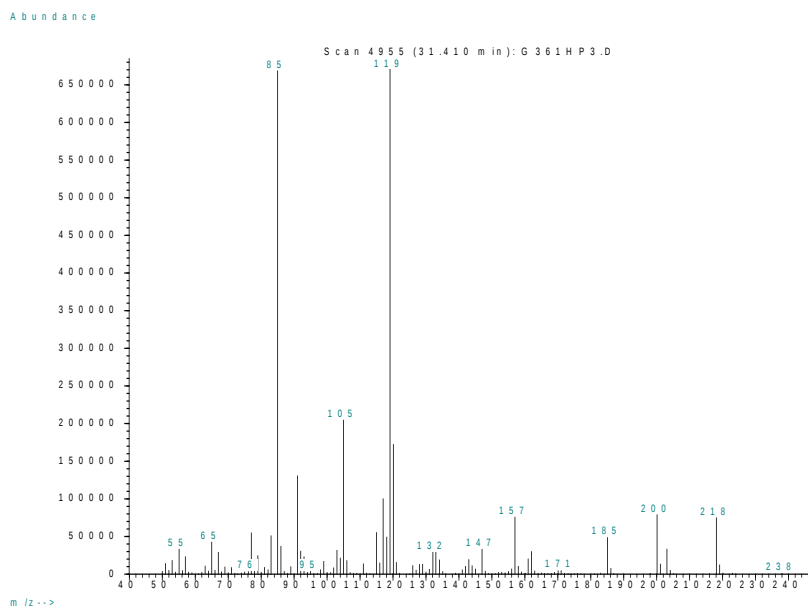
Πρώτη αναφορά σε θαλάσσιο είδος

Ο μεταβολίτης **3** (0.5 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.

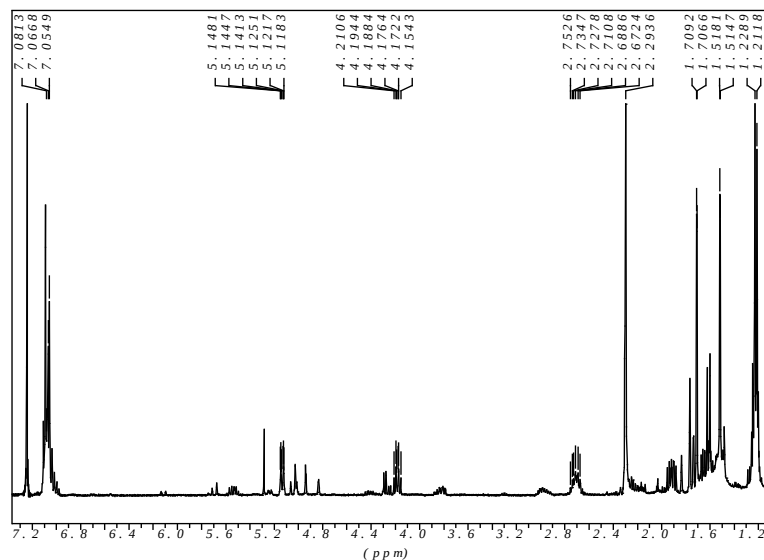


$[\alpha]_D = -19.0$ (c 0.1, CHCl_3)

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.11), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 218 $[\text{M}]^+$, που υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.

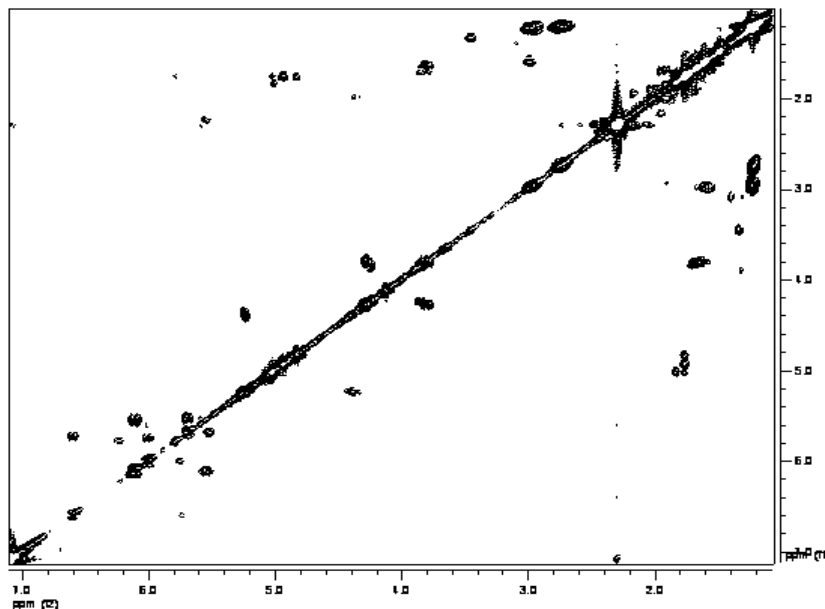


Εικ. 4.11 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **3**



Εικ. 4.12 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του μεταβολίτη **3**

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 4.12) εμφανίζεται παρόμοιο με αυτό του μεταβολίτη **2**, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για δύο ισομερείς ενώσεις. Από τη μελέτη της βιβλιογραφίας (Li *et al*, 2003) προκύπτει ότι ο μεταβολίτης **3** ταυτίζεται με την **(7R,9R)-(-)-μπισακουμόλη**, που αποτελεί το επιμερές του μεταβολίτη **2** στον C-9 του μορίου.



Εικ. 4.13 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **3**

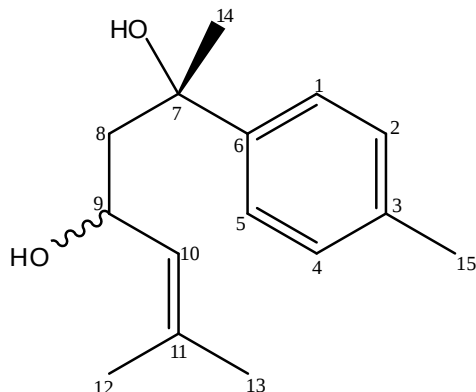
Πίνακας 4.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **(7*R*,9*R*)-(-)-μπισακουμόλη** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)
1	7.07 (1H, m)
2	7.07 (1H, m)
3	-
4	7.07 (1H, m)
5	7.07 (1H, m)
6	-
7	2.70 (1H, m)
8	1.70 (2H, m)
9	4.18 (1H, m)
10	5.13 (1H, m)
11	-
12	1.52 (3H, d, <i>J</i> =1.1)
13	1.71 (3H, d, <i>J</i> =1.1)
14	1.22 (3H, d, <i>J</i> =6.8)
15	2.29 (3H, s)

4.2.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 4

Ημισυνθετικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **4** (0.6 mg) απομονώθηκε με τη μορφή άχρωμου ελαιώδους υπολείμματος.



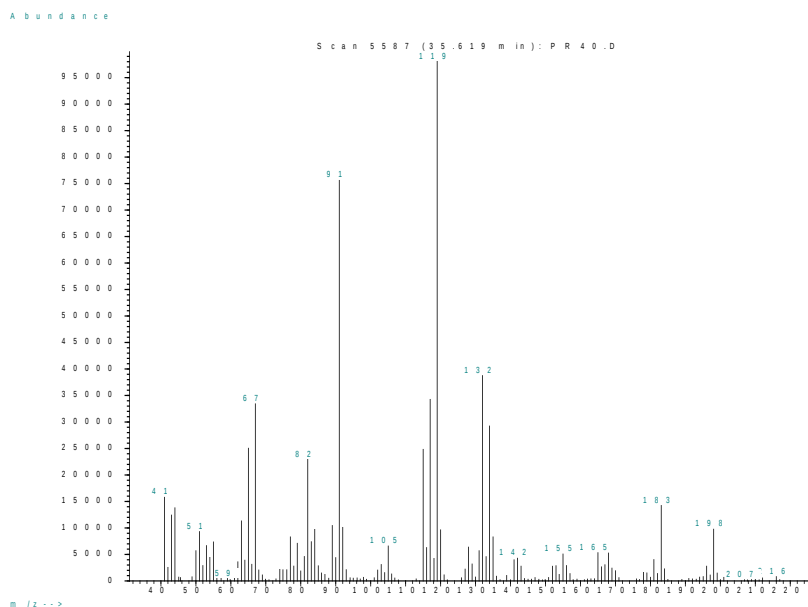
$[\alpha]_D = -5.2$ (c 0.058, CHCl_3)

UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 246 (2.3) (nm)

IR (film) ν_{max} 3450, 2932, 2331, 1653, 1266, 738 cm^{-1}

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **4** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.

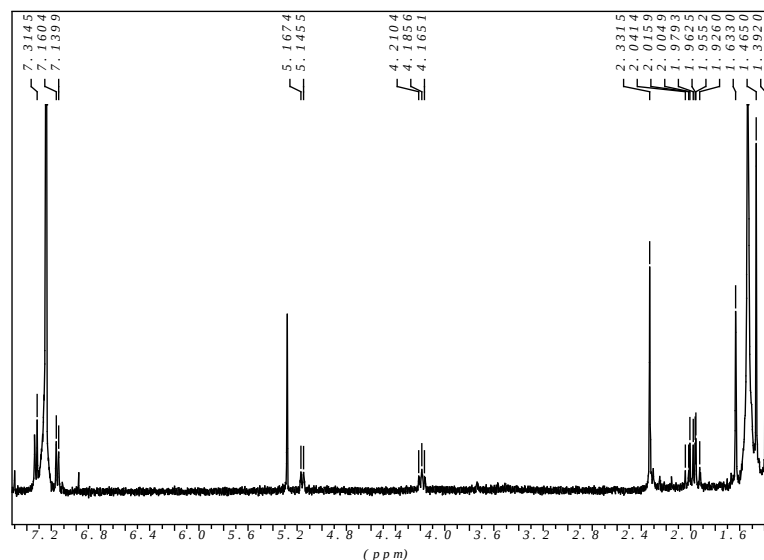
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.14), το θραύσμα $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ εμφανίζεται σε m/z 216.



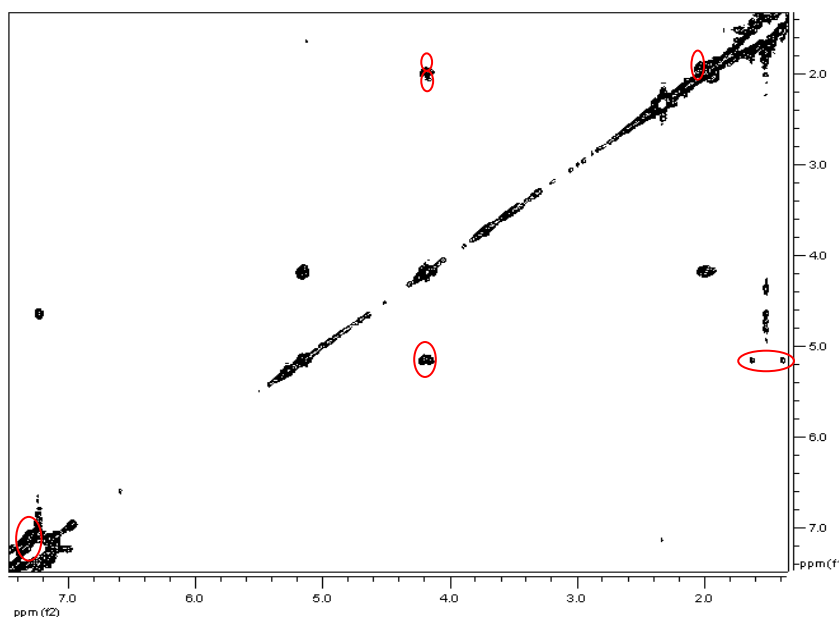
Εικ. 4.14 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **4**

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.15) εμφάνισε σημαντικές ομοιότητες με αυτά των μεταβολιτών **2** & **3**: τα σήματα των τεσσάρων αρωματικών πρωτονίων σε δ 7.33 και 7.15, του ολεφινικού πρωτονίου σε δ 5.17, του οξυγονωμένου πρωτονίου σε δ 4.19, του αρωματικού μεθυλίου σε δ 2.33, των δύο βινυλικών μεθυλίων σε δ 1.63 και δ

1.39. Αισθητή η απουσία του βενζυλικού μεθινίου στον C-7 από το παρόν σεσκιτερπένιο, που συνδυάζεται με την παρουσία του Me-14 ως απλής κορυφής, σε δ 1.47. Αυτή η παρατήρηση σε συνδυασμό με το μοριακό ιόν παραπέμπουν στην ύπαρξη και δεύτερου υδροξυλίου στον C-7 της πλευρικής αλυσίδας.



Εικ. 4.15 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του μεταβολίτη **4**



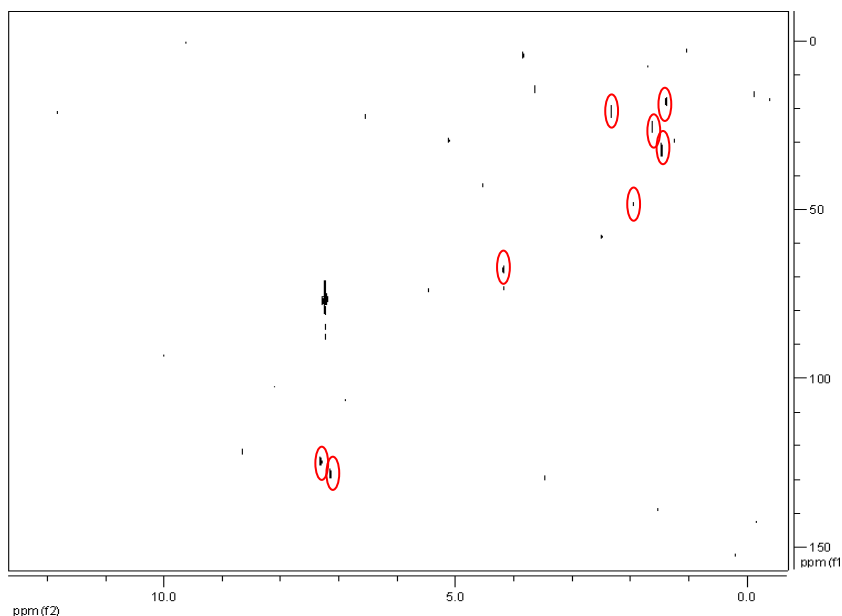
Εικ. 4.16 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **4**

Τα πειράματα COSY (Εικ. 4.16), HSQC-DEPT (Εικ. 4.17) και HMBC (Εικ. 4.18) βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και στον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο.

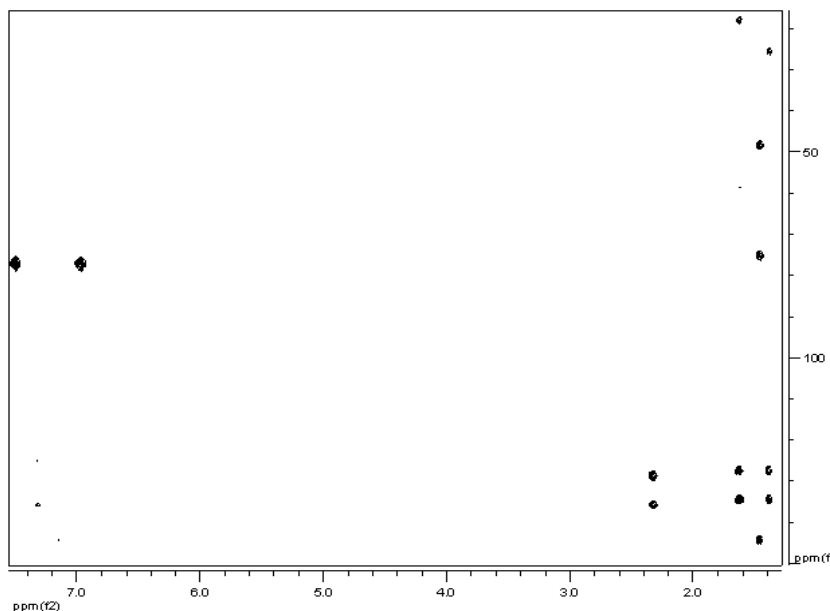
Συγκεκριμένα, στο φάσμα HMBC, το αρωματικό μεθύλιο παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-2 (128.3 ppm), τον τεταρτοταγή C-3 (135.4 ppm), όπως και με τον C-4

(128.3 ppm). Το αρωματικό πρωτόνιο H-1 συσχετίζεται με τους C-3 και C-5 (124.3 ppm), το αρωματικό πρωτόνιο H-5 συσχετίζεται με τους C-1 (124.3 ppm) και C-3, ενώ τα αρωματικά πρωτόνια H-2 και H-4 συσχετίζονται με τον C-6 (144.2 ppm).

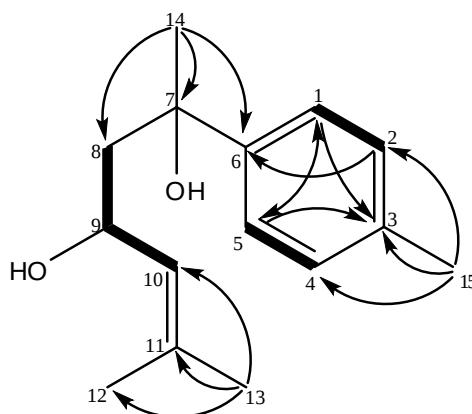
Στην πλευρική αλυσίδα του σεσκιτερπενίου, τα πρωτόνια του Me-14 συσχετίζονται με τους C-6, C-7 (75.0 ppm) και C-8 (48.3 ppm), ενώ τα πρωτόνια των βινυλικών μεθυλίων συσχετίζονται με τους C-10 (127.3 ppm) και C-11 (134.3 ppm).



Εικ. 4.17 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **4**



Εικ. 4.18 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **4**



Σχήμα 4.1 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **4**

Η σχετική στερεοχημεία στον C-9 δεν ήταν εφικτό να καθοριστεί με φασματοσκοπικά δεδομένα.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω δεδομένα και αυτά της βιβλιογραφικής αναζήτησης, ο μεταβολίτης **4** ταυτίζεται με γνωστό σεσκιτερπένιο, το οποίο δεν έχει απομονωθεί στο παρελθόν σαν φυσικό προϊόν, αλλά έχει παραχθεί ημισυνθετικά (Vig *et al*, 1980). Τα πλήρη φασματοσκοπικά του δεδομένα αποδίδονται για πρώτη φορά και παρατίθενται στον Πίνακα 4.5.

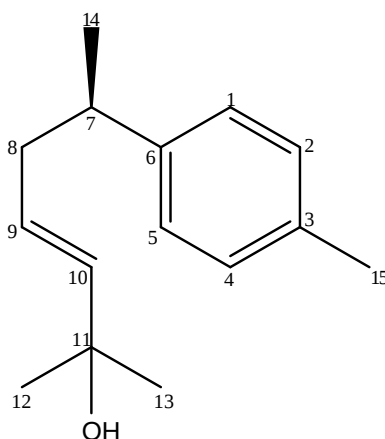
Πίνακας 4.5 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **4** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	7.33 (1H, d, J=7.8)	124.3	H-2	C-3, C-5
2	7.15 (1H, d, J=7.8)	128.3	H-1	C-6
3	-	135.4	-	-
4	7.15 (1H, d, J=7.8)	128.3	H-5	C-6
5	7.33 (1H, d, J=7.8)	124.3	H-4	C-1, C-3
6	-	144.2	-	-
7	-	75.0	-	-
8	a 2.05 (1H, m) b 1.94 (1H, m)	48.3	H-8b, H-9 H-8a, H-9	- -
9	4.19 (1H, m)	67.7	H-8b, H-8a, H-10	-
10	5.17 (1H, brd, J=8.8)	127.3	H-9, H-12, H-13	-
11	-	134.3	-	-
12	1.63 (3H, d, J=1.1)	25.5	H-10	C-10, C-11, C-13
13	1.39 (3H, d, J=1.1)	18.0	H-10	C-10, C-11, C-12
14	1.47 (3H, s)	32.2	-	C-6, C-7, C-8
15	2.33 (3H, s)	21.1	-	C-2, C-3, C-4

4.2.5 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 5

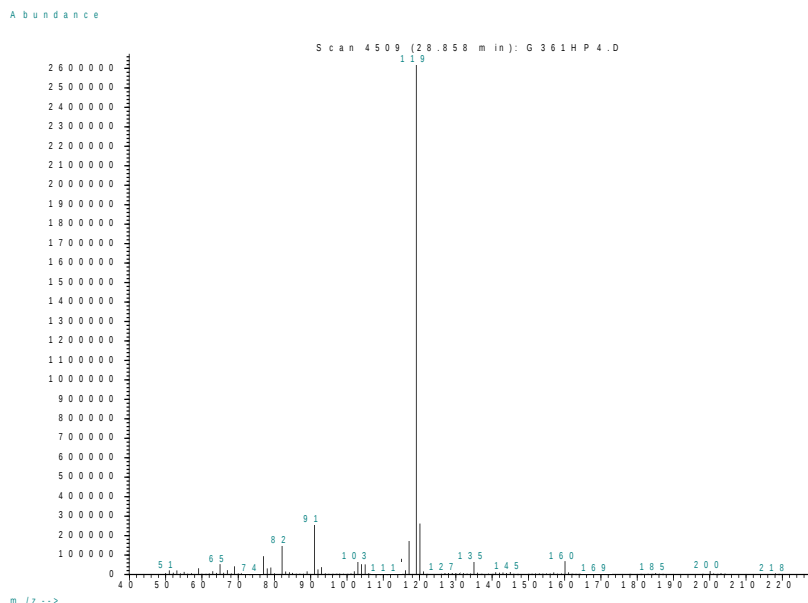
Πρώτη αναφορά σε θαλάσσιο είδος

Ο μεταβολίτης **5** (1.2 mg) απομονώθηκε με τη μορφή άχρωμου ελαιώδους υπολείμματος.



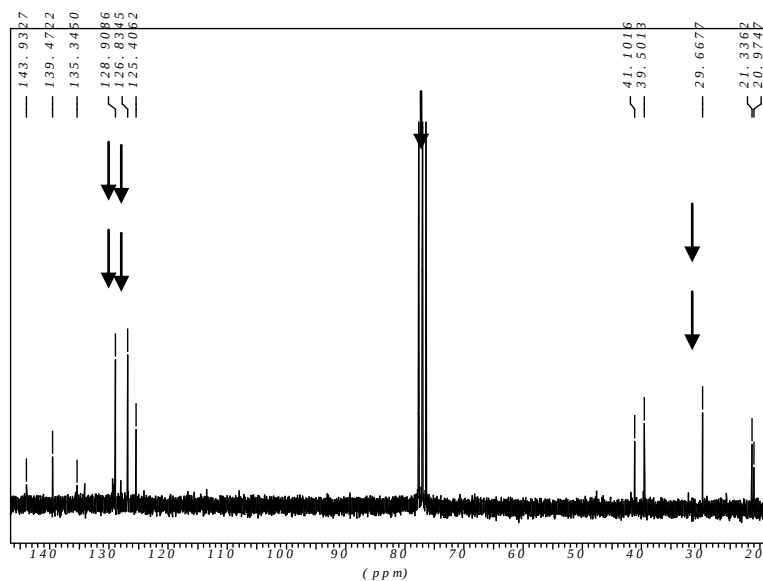
$[\alpha]_D = -28.0$ (c 0.1, CHCl_3)

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.19), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 218 $[\text{M}]^+$, που υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.



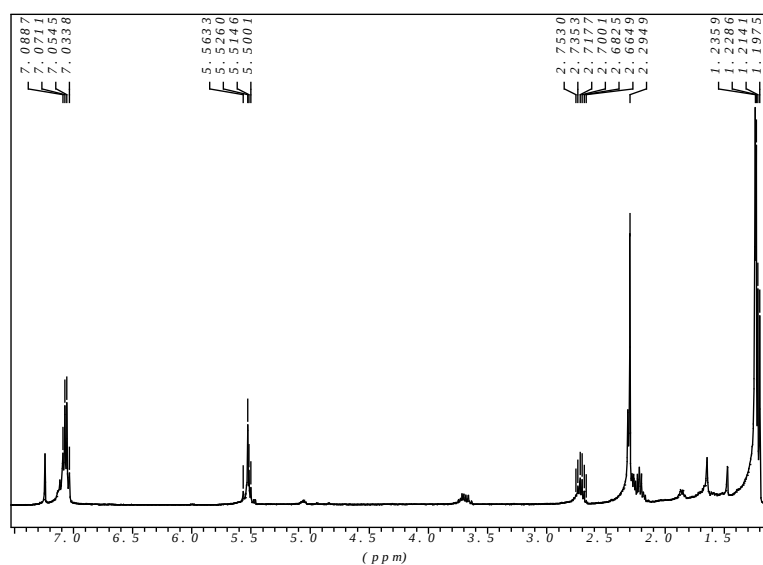
Εικ. 4.19 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **5**

Το φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.20) του μεταβολίτη **5** εμφανίζονται 6 άτομα ανθράκων στην αλειφατική περιοχή, 8 ολεφινικούς/αρωματικούς άνθρακες (δύο εκ των οποίων είναι τεταρτοταγείς) και την ύπαρξη ενός οξυγονωμένου άνθρακα στα 70.4 ppm. Συμφωνεί, δηλαδή, με την ύπαρξη 15 ατόμων άνθρακα στο μόριο.

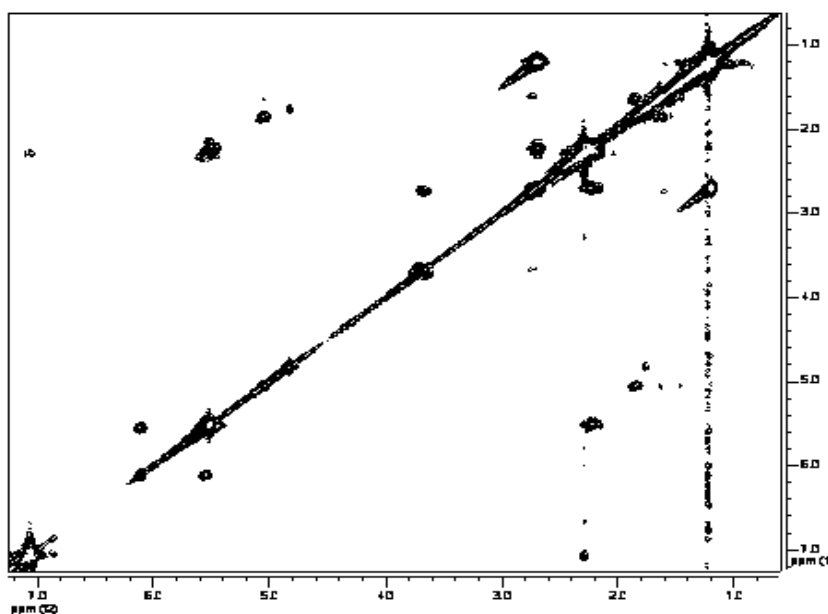


Εικ. 4.20 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **5**

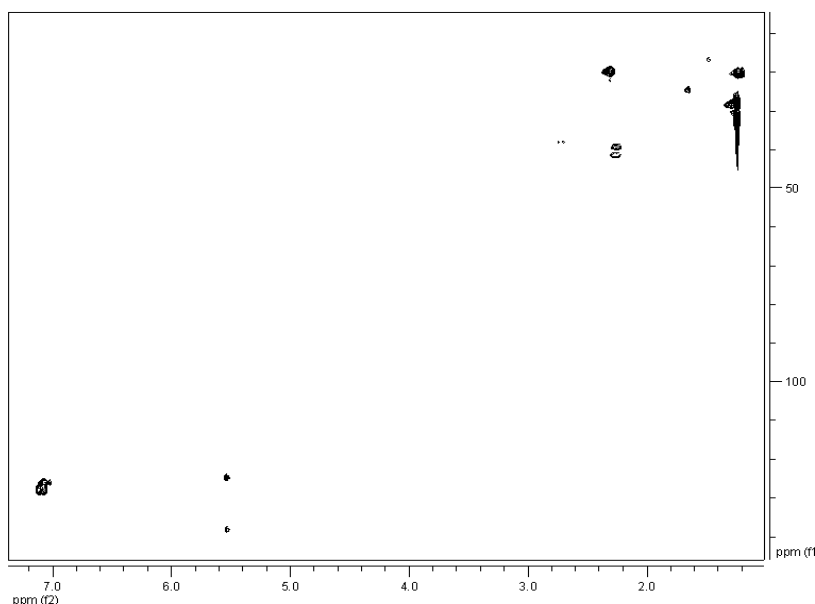
Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.21) παρουσιάζει δύο απλές κορυφές οξυγονωμένων μεθυλίων που σχεδόν συμπίπτουν στα 1.24 ppm, αρωματικό μεθύλιο (δ 2.29, s), μεθύλιο (δ 1.21, d) σε βενζυλικό μεθίνιο (δ 2.70, sextet) και δύο ολεφινικά πρωτόνια (δ 5.53, m). Ο αρωματικός δακτύλιος εμφανίζει 4 αρωματικά πρωτόνια (δ 7.07, m). Τα δύο ολεφινικά πρωτόνια συζεύγνυνται μεταξύ τους, όπως προκύπτει από τη μελέτη του φάσματος COSY (Εικ. 4.23), ενώ το ένα εκ των δύο εμφανίζει σύζευξη και με τα πρωτόνια του H_2 -8. Η σύζευξη αυτή ορίζει τη θέση του διπλού δεσμού ανάμεσα σε C-9 και C-10 της πλευρικής αλυσίδας του μορίου.



Εικ. 4.21 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **5**



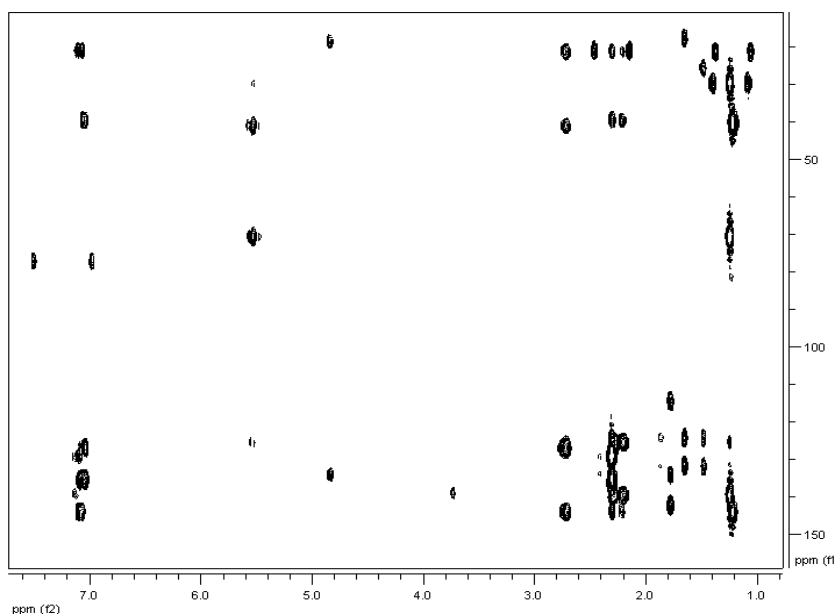
Εικ. 4.22 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **5**



Εικ. 4.23 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **5**

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και τα πειράματα HMBC (Εικ. 4.24) και HSQC-DEPT (Εικ. 4.23), που βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και στον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο, ο μεταβολίτης **5** ταυτίστηκε με γνωστό σесκιτερπένιο που έχει απομονωθεί στο παρελθόν από τα φύλλα του φυτού *Baccharis dracunculifolia* (Fukuda *et al*, 2006) και παρουσιάζει ισχυρή κυτταροτοξικότητα κατά λευχαιμικών κυττάρων της σειράς L₁₂₁₀ (IC_{50} =34.4 μM).

Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.6.



Εικ. 4.24 Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **5**

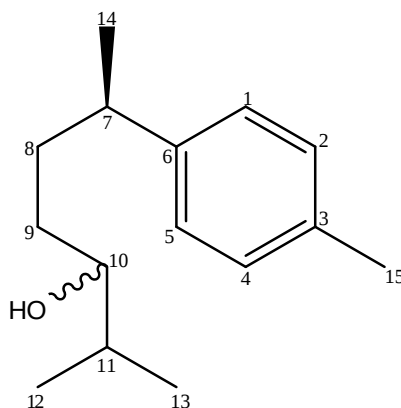
Πίνακας 4.6 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **5** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	7.05 (1H, m)	126.6	H-2	C-3, C-5, C-7
2	7.08 (1H, m)	128.6	H-1, H-15	C-4, C-6, C-15
3	-	135.1	-	-
4	7.08 (1H, m)	128.6	H-5, H-15	C-2, C-6, C-15
5	7.05 (1H, m)	126.6	H-4	C-1, C-3, C-7
6	-	143.6	-	-
7	2.70 (1H, sextet, J=6.9)	39.3	H-8, H-14	C-1, C-5, C-6, C-8, C-14
8	2.23 (2H, m)	40.9	H-7, H-9	-
9	5.53 (1H, m)	125.0	H-8, H-10	-
10	5.53 (1H, m)	139.2	H-9	C-8, C-9, C-11, C-12, C-13
11	-	70.4	-	-
12	1.23 (3H, s)	29.4	-	C-10, C-11, C-13
13	1.24 (3H, s)	29.4	-	C-10, C-11, C-12
14	1.21 (3H, d, J=6.9)	21.0	H-7	C-6, C-7, C-8
15	2.30 (3H, s)	20.7	H-2, H-4	C-2, C-3, C-4

4.2.6 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 6

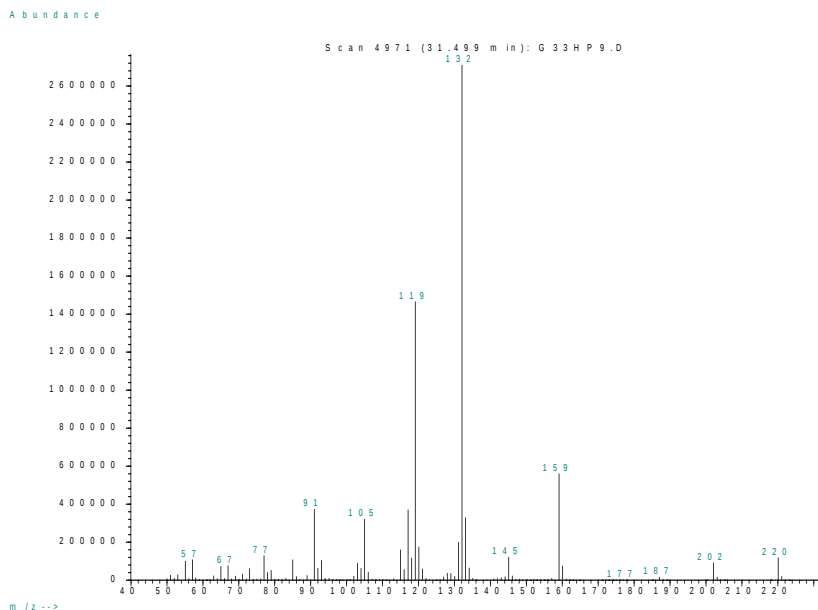
Ημισυνθετικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **6** (2.5 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



$[\alpha]_D = -17.0$ (c 0.1, CHCl_3)

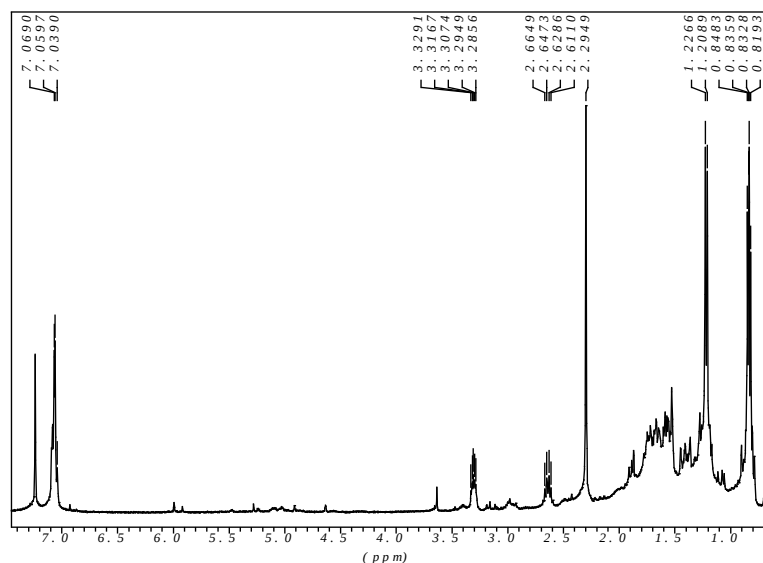
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.25), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 220 $[\text{M}]^+$, που υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 4 βαθμούς ακορεστότητας.



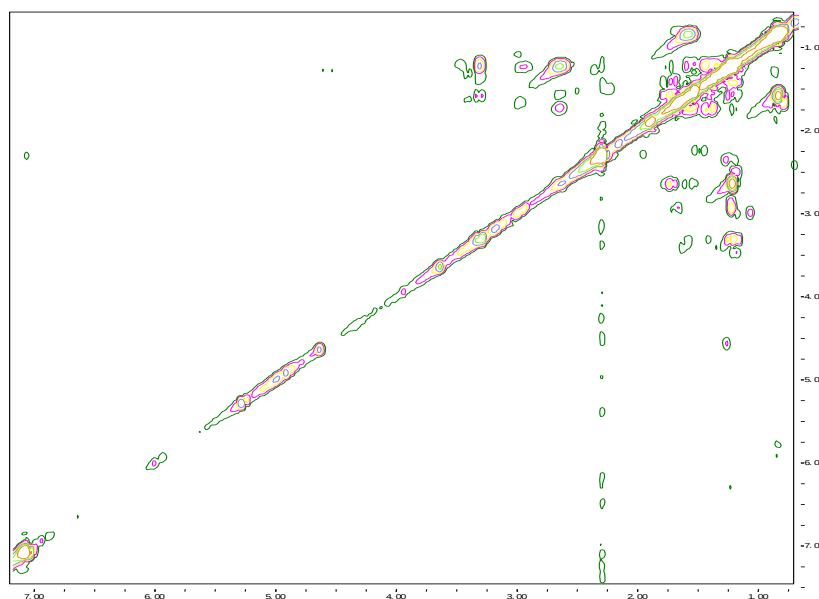
Εικ. 4.25 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **6**

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 4.26) του μεταβολίτη **6** παρατηρούνται μία πολλαπλή κορυφή οξυγονωμένου μεθινίου (δ 3.31), μία απλή αρωματικού μεθυλίου (δ 2.29) και μία διπλή ενός μεθυλίου (δ 1.22) σε βενζυλικό μεθίνιο (δ 2.64, sextet). Ο αρωματικός δακτύλιος, σύμφωνα με την ολοκλήρωση, εμφανίζει τέσσερα αρωματικά πρωτόνια (δ

7.06, m). Επίσης, εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές μεθυλίων της πλευρικής αλυσίδας (οι μετατοπίσεις τους συμπίπτουν στα 0.83 ppm).

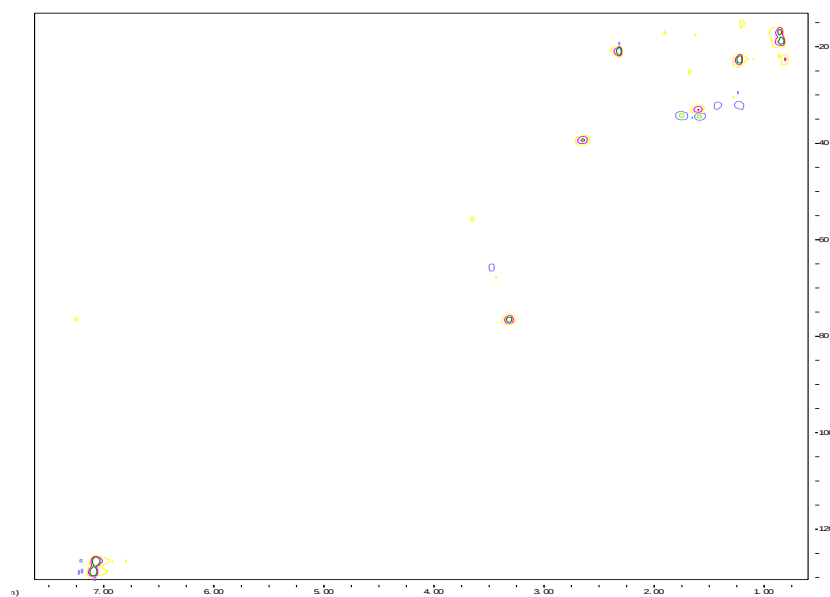


Εικ. 4.26 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **6**

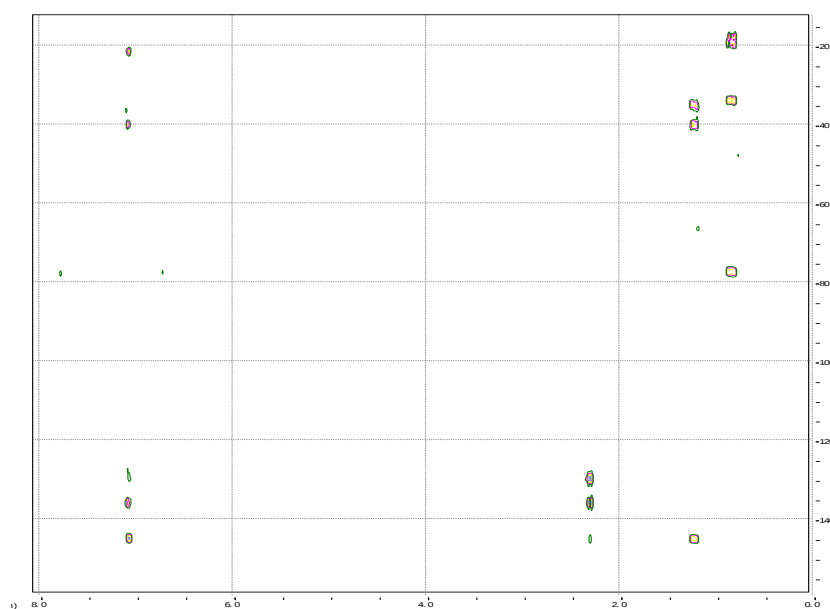


Εικ. 4.27 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **6**

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και λαμβάνοντας υπ' όψιν τα πειράματα HMBC (Εικ. 4.29), HSQC-DEPT (Εικ. 4.28) και COSY (Εικ. 4.27) που βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και στον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο, ο μεταβολίτης **6** ταυτίστηκε με γνωστή χημική δομή. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο μεταβολίτης αυτός πρώτη φορά αναφέρεται ως φυσικό προϊόν, αλλά έχει παραχθεί ημισυνθετικά στο παρελθόν (Vig *et al*, 1983).



Εικ. 4.28 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **6**



Εικ. 4.29 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **6**

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **6** παρατίθενται, για πρώτη φορά, στον Πίνακα 4.7.

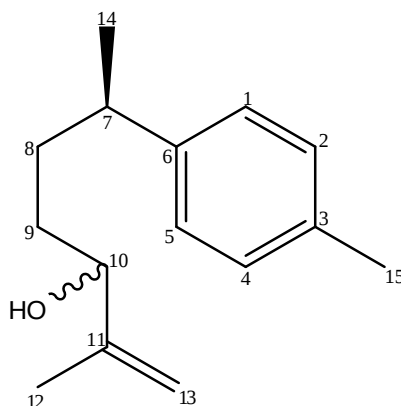
Πίνακας 4.7 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **6** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	7.08 (1H, m)	126.8	H-2	C-3, C-7
2	7.06 (1H, m)	129.0	H-1, H-15	C-4, C-6, C-15
3	-	134.9	-	-
4	7.06 (1H, m)	129.0	H-5, H-15	C-2, C-6, C-15
5	7.08 (1H, m)	126.8	H-4	C-3, C-7
6	-	143.9		-
7	2.64 (1H, sextet, J=7.0)	39.3	H-14, H-8b, H-8a	-
8	a 1.75 (1H, m)	34.2	H-7, H-8b, H-9a	-
	b 1.58 (1H, m)		H-7, H-8a, H-9b	-
9	a 1.41 (1H, m)	32.0	H-8a, H-9b, H-10	-
	b 1.22 (1H, m)		H-8b, H-9a, H-10	-
10	3.31 (1H, m)	76.5	H-9a, H-9b, H-11	-
11	1.58 (1H, m)	33.1	H-10, H-12, H-13	-
12	0.84 (3H, d, J=7.2)	18.8	H-11	C-10, C-11, C-13
13	0.83 (3H, d, J=6.7)	16.9	H-11	C-10, C-11, C-12
14	1.22 (3H, d, J=7.0)	22.6	H-7	C-6, C-7, C-8
15	2.30 (3H, s)	20.9	H-2, H-4	C-2, C-3, C-4

4.2.7 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 7

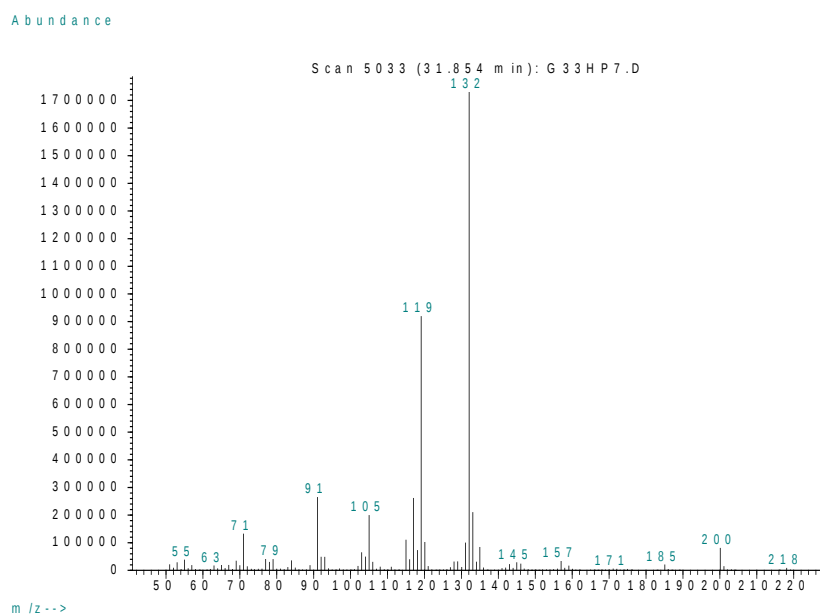
Ημισυνθετικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **7** (2.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



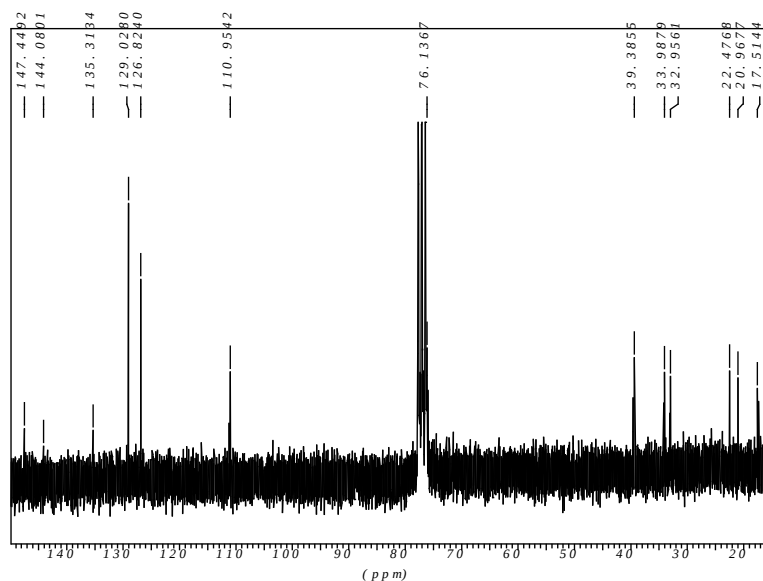
$[\alpha]_D = -6.0$ (c 0.1, CHCl_3)

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.30), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 218 $[\text{M}]^+$, που υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.



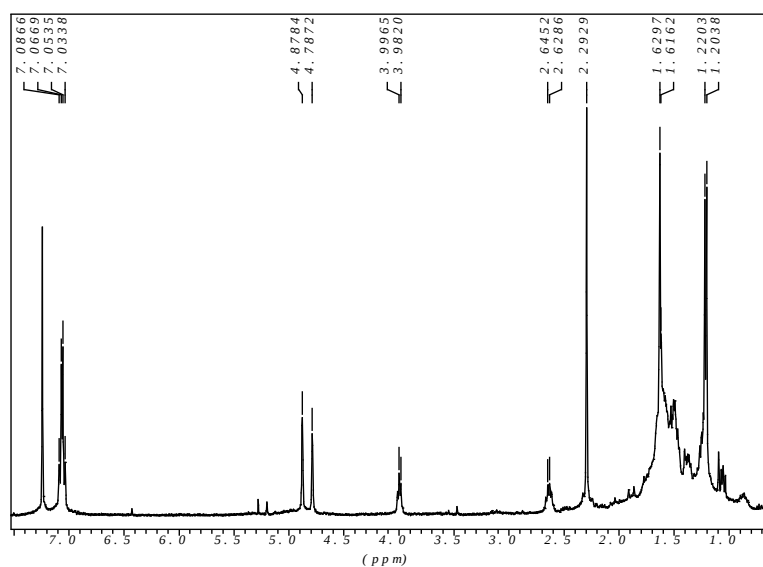
Εικ. 4.30 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **7**

Στο φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.31) του μεταβολίτη **7** εμφανίζονται 6 άτομα ανθράκων στην αλειφατική περιοχή, 8 ολεφινικοί/αρωματικοί άνθρακες (τρεις εκ των οποίων είναι τεταρτοταγείς) και ένας οξυγονωμένος άνθρακας στα 76.1 ppm.

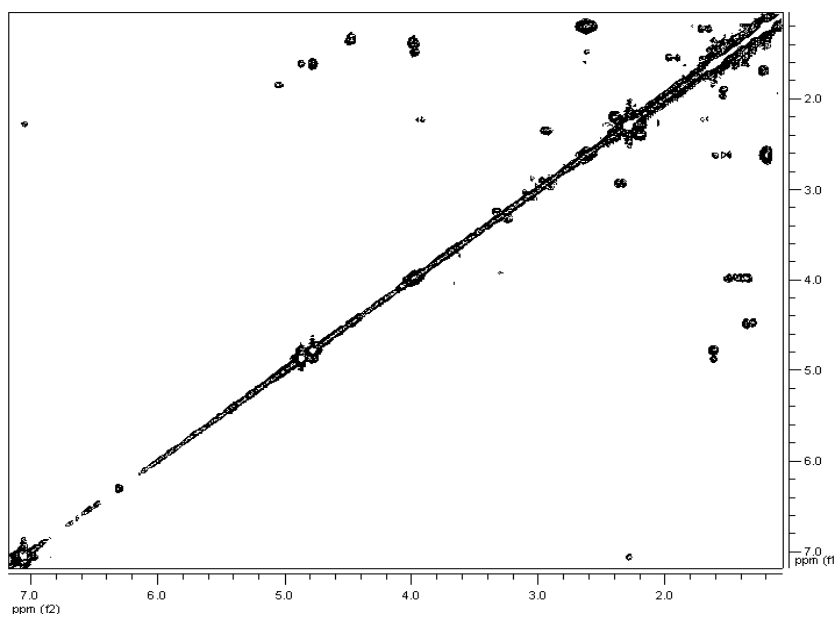


Εικ. 4.31 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **7**

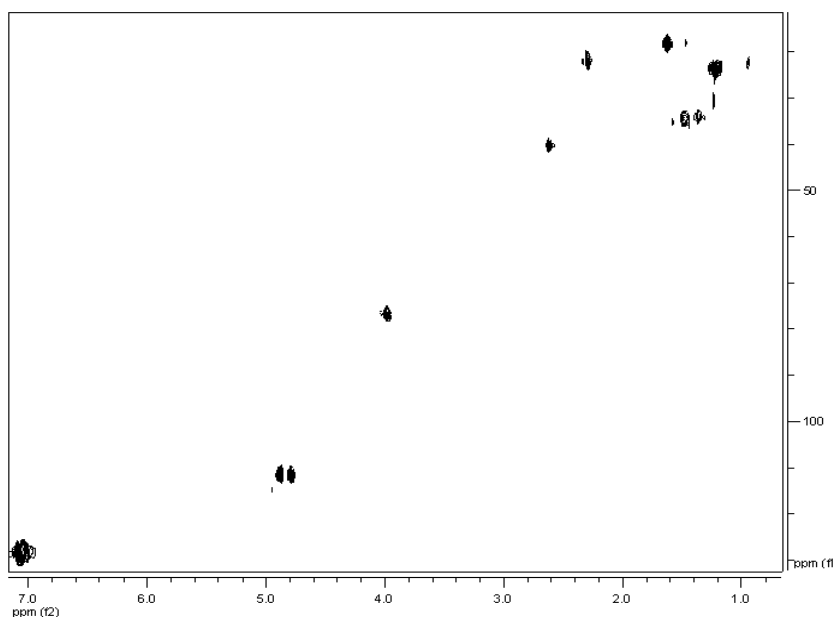
Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.32) υποδεικνύει την ύπαρξη εξωμεθυλενίου (δύο απλές κορυφές στα 4.88 και 4.79 ppm, αντίστοιχα), μία πολλαπλή κορυφή οξυγονωμένου μεθινίου στα 4.00 ppm, μία απλή κορυφή βινυλικού μεθυλίου στα 1.63 ppm, μία απλή κορυφή αρωματικού μεθυλίου στα 2.29 ppm και μία διπλή κορυφή ενός μεθυλίου σε βενζυλικό μεθίνιο. Με βάση την ολοκλήρωση και το φάσμα HSQC-DEPT (Εικ. 4.34), ο αρωματικός δακτύλιος του σεσκιτερπενίου είναι δισυποκατεστημένος και παρουσιάζει 4 αρωματικά πρωτόνια (δ 7.05, m).



Εικ. 4.32 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **7**



Εικ. 4.33 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **7**



Εικ. 4.34 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **7**

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταβολίτης **7** ταυτίζεται με γνωστό σесκίτερπένιο, το οποίο δεν έχει απομονωθεί στο παρελθόν σαν φυσικό προϊόν, αλλά έχει παραχθεί ημισυνθετικά (Thomas, 1980; Vig *et al*, 1983).

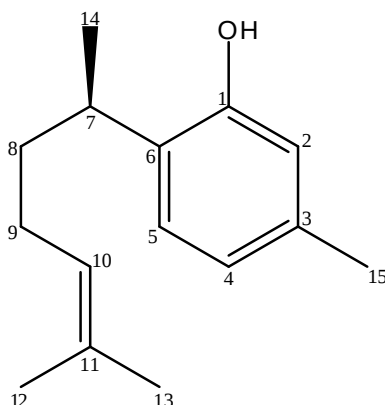
Τα πλήρη φασματοσκοπικά του δεδομένα αποδίδονται για πρώτη φορά και παρατίθενται στον Πίνακα 4.8.

Πίνακας 4.8 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **7** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY
1	7.06 (1H, m)	128.1	H-2
2	7.06 (1H, m)	128.1	H-1, H-15
3	-	135.8	-
4	7.06 (1H, m)	128.1	H-5, H-15
5	7.06 (1H, m)	128.1	H-4
6	-	144.5	-
7	2.63 (1H, m)	39.8	H-14, H-8a, H-8b
8	a 1.61 (1H, m) b 1.53 (1H, m)	34.4	H-7, H-9b H-7
9	a 1.51 (1H, m) b 1.38 (1H, m)	33.6	H-9b, H-10 H-8a, H-9a, H-10
10	3.99 (1H, t, J=5.8)	76.1	H-9a, H-9b
11	-	147.9	-
12	1.63 (3H, s)	17.9	H-13a, H-13b
13	a 4.88 (1H, brs) b 4.79 (1H, brs)	111.4	H-12, H-13b H-12, H-13a
14	1.21 (3H, d, J=7.0)	23.1	H-7
15	2.29 (3H, s)	21.7	H-2, H-4

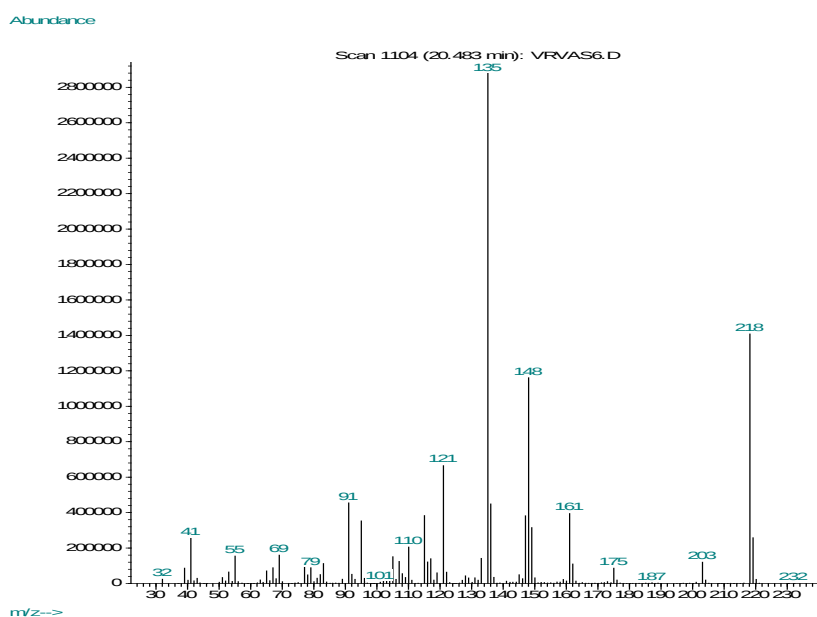
4.2.8 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 8

Ο μεταβολίτης **8** (17.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινης σκόνης.



$[\alpha]_D = -20.8$ (c 0.086, CHCl_3)

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.35), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 218 $[\text{M}]^+$, που υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$.

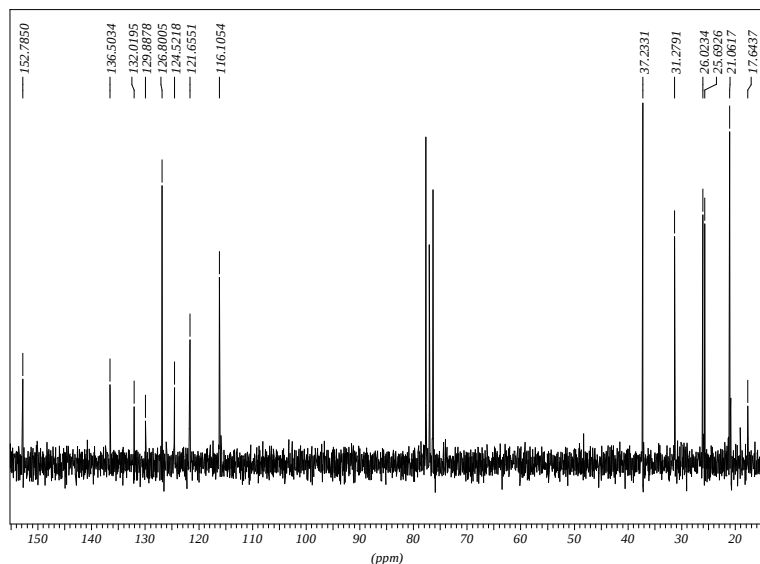


Εικ. 4.35 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **8**

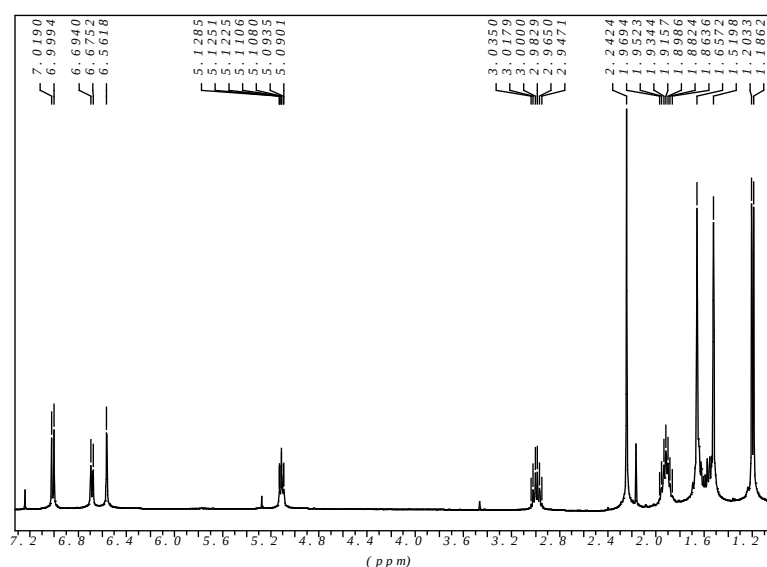
Το φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.36) του μεταβολίτη **8** επιβεβαίωσε την παρουσία των 15 ανθράκων. Τα 8 άτομα στην περιοχή των ολεφινικών/αρωματικών υποδεικνύουν την παρουσία τεσσάρων διπλών δεσμών. Ο βαθμός ακορεστότητας υπολογίστηκε ως $\Omega=5$, υποδηλώνοντας ότι το μόριο είναι μονοκυκλικό.

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.37) υποδεικνύει την ύπαρξη ισοπροπυλιδενικής ομάδας (ολεφινικό πρωτόνιο σε δ 5.11 και δύο απλές κορυφές βινυλικών μεθυλίων σε δ 1.66 και 1.52), ενός αρωματικού μεθυλίου (δ 2.24, s) και ενός μεθυλίου (δ 1.20, d) σε βενζυλικό μεθίνιο (δ 3.00, sextet). Ο αρωματικός δακτύλιος, σύμφωνα με την

ολοκλήρωση, είναι τρεις υποκατεστημένοι (δ 6.56, s; δ 6.70, d; δ 7.02, d). Το πρωτόνιο που εμφανίζεται σαν απλή κορυφή στα 6.56 ppm παρουσιάζει μακρά σύζευξη με το αρωματικό μεθύλιο (φάσμα COSY, Εικ. 4.38), υποδεικνύοντας έτσι την ortho θέση του πρωτονίου ως προς το αρωματικό μεθύλιο.



Εικ. 4.36 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **8**

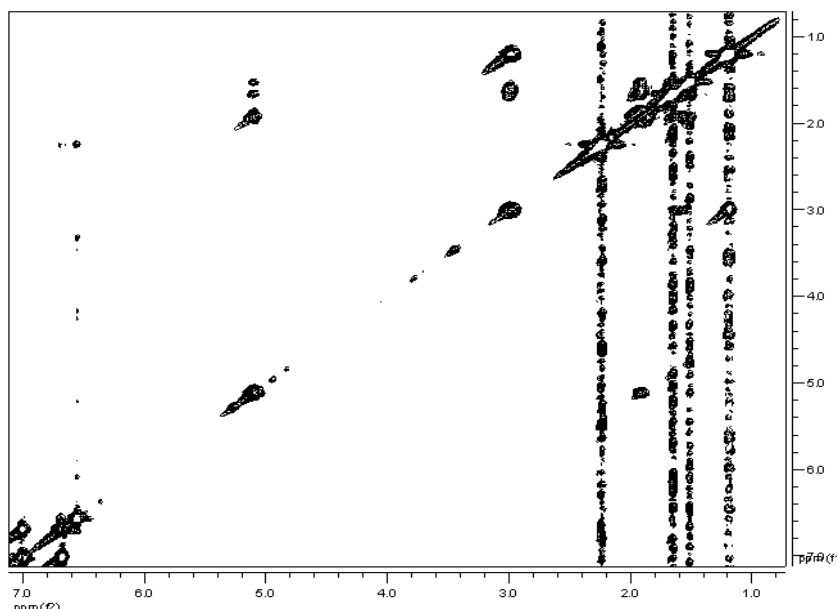


Εικ. 4.37 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **8**

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταβολίτης **8** ταυτίζεται με το γνωστό σεσκιτερπένιο (-)-κουρκουφαινόλη. Η (-)-κουρκουφαινόλη απομονώθηκε για πρώτη φορά από το μαλακό κοράλλι *Pseudopterogorgia rigida* (McEnroe *et al*, 1978) και παρουσίασε σημαντική δραστικότητα κατά του *Staphylococcus aureus* και του θαλάσσιου παθογόνου βακτηρίου *Vibrio anguillarum*. Η (+)-κουρκουφαινόλη, που έχει απομονωθεί από σπόγγους του γένους *Didiscus*, έχει επιδείξει εξαιρετική

δραστικότητα έναντι του ανθεκτικού μύκητα *Candida albicans*, του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*, του πρωτοζώου *Plasmodium falciparum*, που είναι υπεύθυνο για την ασθένεια της ελονοσίας (El Sayed *et al*, 2002), καλή ιχθυοτοξική και κυτταροτοξική δράση (Wright *et al*, 1987).

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της **(-)-κουρκουφαινόλης** παρατίθενται στον Πίνακα 4.9.



Εικ. 4.38 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **8**

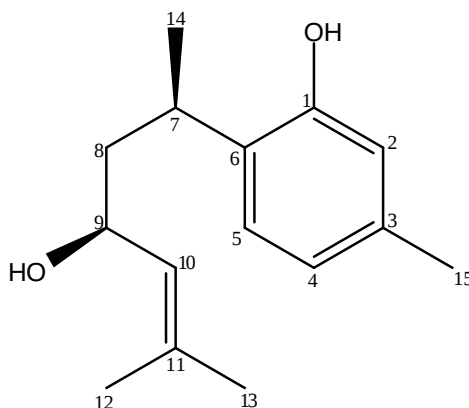
Πίνακας 4.9 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **8** (CDCl_3 , δ_{H} 7.24 ppm, δ_{C} 77.00 ppm)

Θέση	^1H NMR (ppm)	^{13}C NMR (ppm)	COSY
1	-	152.8	-
2	6.56 (1H, s)	116.1	H-15
3	-	132.0	-
4	6.70 (1H, brd, $J=7.9$)	121.7	H-5, H-15
5	7.02 (1H, d, $J=7.9$)	126.8	H-4
6	-	136.5	-
7	3.00 (1H, sextet, $J=6.8$)	31.3	H-14
8	1.62 (2H, m)	26.1	H-7
9	a1.96 (1H, m) b1.88 (1H, m)	37.3	H-8, H-9b, H-10 H-8, H-9a, H-10
10	5.11 (1H, dddd, $J=7.1, 7.1, 1.3, 1.3$)	124.6	H-9, H-12, H-13
11	-	129.9	-
12	1.66 (3H, brs)	25.7	H-10
13	1.52 (3H, brs)	17.7	H-10
14	1.20 (3H, d, $J=6.8$)	21.1	H-7
15	2.24 (3H, s)	21.1	H-2, H-7
OH	4.71 (1H, brs)	-	-

4.2.9 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 9

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **9** (3.9 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



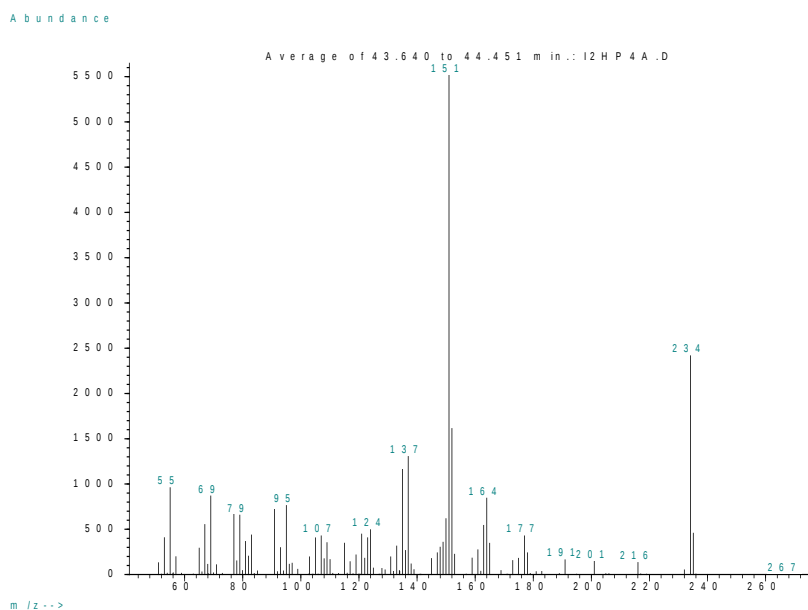
$[\alpha]_D = +31.2$ (c 0.25, CHCl_3)

IR (film) ν_{max} 3300, 2928, 1140, 955, 808 cm^{-1}

UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 246 (2.99), 274 (3.15) (nm)

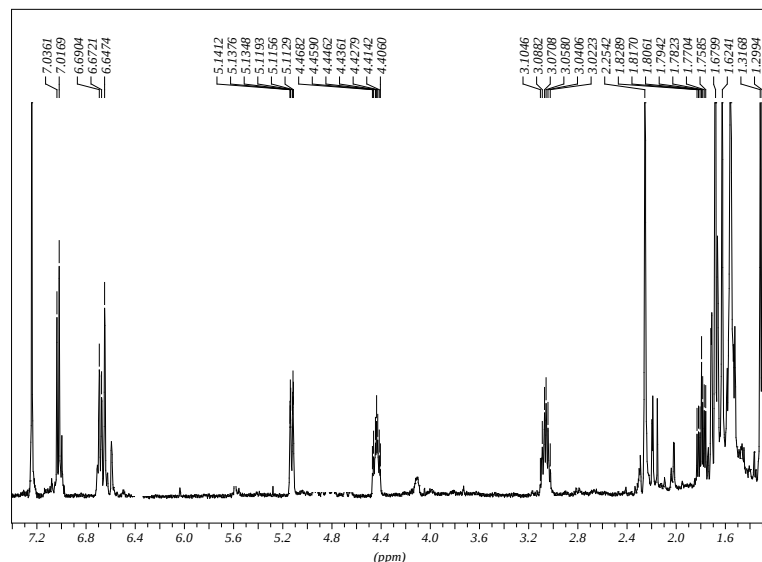
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **9** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRFABMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ σε m/z 216.1520 (θεωρητικό MB: 216.1514), ενώ στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.39), το μοριακό ιόν $[\text{M}]^+$ εμφανίζεται σε m/z 234.



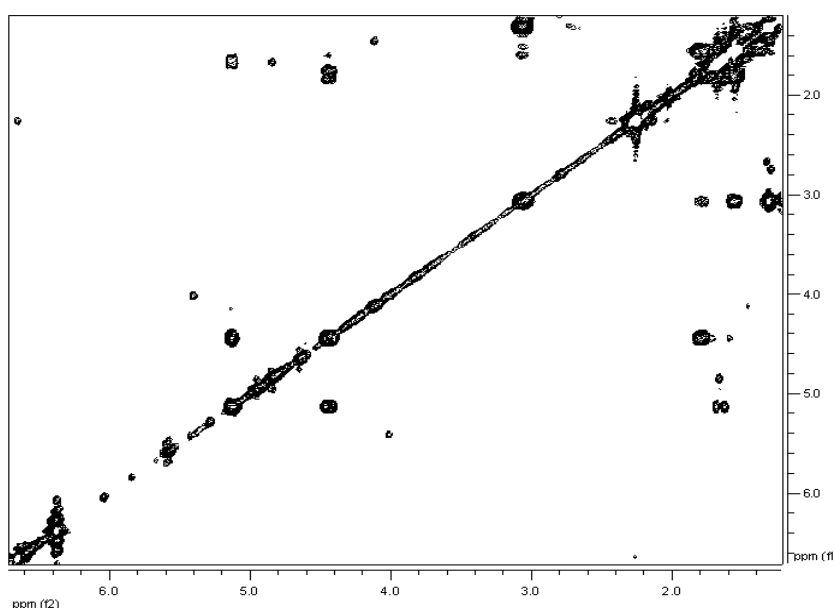
Εικ. 4.39 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **9**

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.40) ομοιάζει με αυτά των μεταβολιτών **2** & **3**. Η διαφορά εντοπίζεται στην αρωματική περιοχή όπου, όσον αφορά στον παρόντα μεταβολίτη, ο αρωματικός δακτύλιος έχει τρία πρωτόνια, τα δύο εκ των οποίων εμφανίζουν σύζευξη μεταξύ τους, ενώ το τρίτο συζεύγνεται με τα πρωτόνια του αρωματικού μεθυλίου (Εικ. 4.41). Αυτή η παρατήρηση, το μοριακό ιόν του μεταβολίτη και οι χημικές μετατοπίσεις των C-9 και C-1 (68.2 και 153.0) υποδεικνύουν την παρουσία ενός υδροξυλίου στον C-9 και ενός στον C-1 του δακτυλίου.

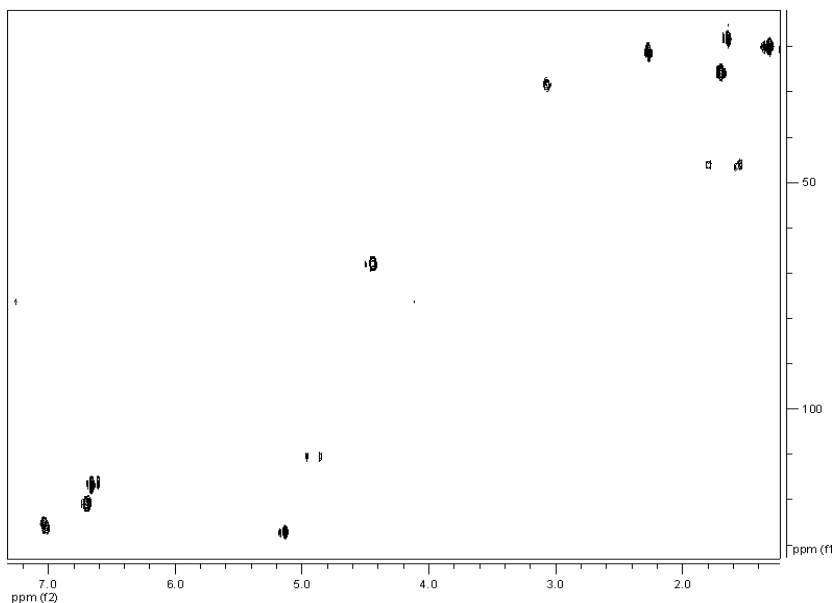


Εικ. 4.40 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **9**

Στο φάσμα COSY παρατηρείται η σύζευξη του ολεφινικού H-10 με το οξυγονωμένο μεθίνιο H-9, το οποίο συζεύγνεται με το μεθυλένιο H_2 -8, που εν συνεχεία παρουσιάζει σύζευξη με το μεθίνιο H-7, που τελικά συζεύγνεται με το μεθύλιο Me-14.

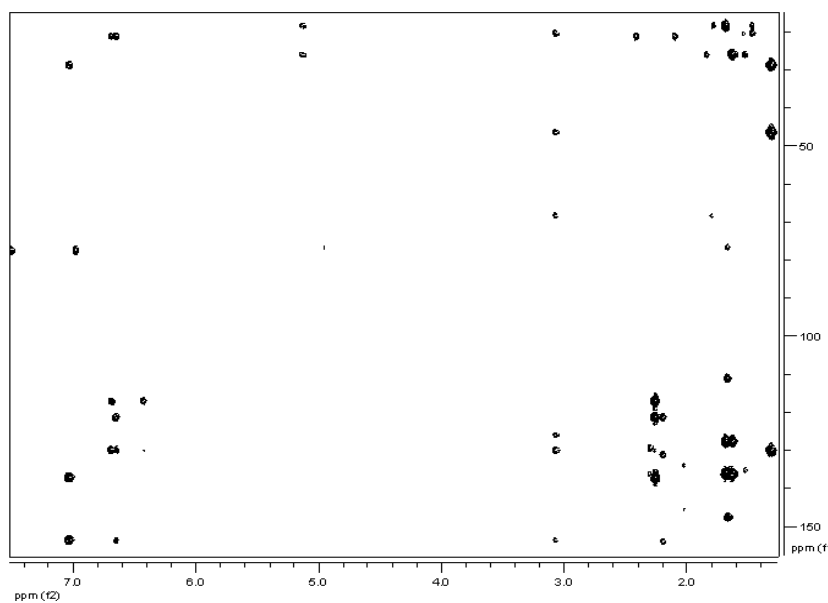


Εικ. 4.41 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **9**



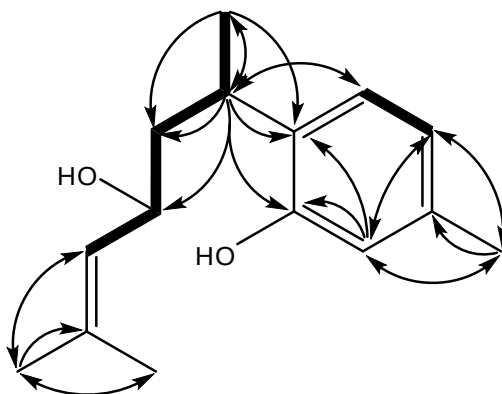
Εικ. 4.42 Φάσμα ΗΜQС (CDCl₃) του μεταβολίτη **9**

Επιπλέον, η συσχέτιση ΗΜΒС (Εικ. 4.43) του H-7 με τους C-1, C-5 και C-6 καθόρισε τη θέση του υδροξυλίου στον αρωματικό δακτύλιο.



Εικ. 4.43 Φάσμα ΗΜВС (CDCl₃) του μεταβολίτη **9**

Συγκρίνοντας τις χημικές μετατοπίσεις των μεταβολιτών **2** και **3** προκύπτει το συμπέρασμα ότι όταν το υδροξύλιο του C-9 βρίσκεται πάνω από το επίπεδο που ορίζει το μόριο, τότε το H-7 θωρακίζεται, ενώ το H-9 αποθωρακίζεται. Αυτή η παρατήρηση συντείνει στη διαπίστωση ότι ο μεταβολίτης **9** είναι το 9(*R**) ισομερές, ενώ ο μεταβολίτης **10**, που ακολουθεί, είναι το 9(*S**) ισομερές.



Σχήμα 4.2 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **9**

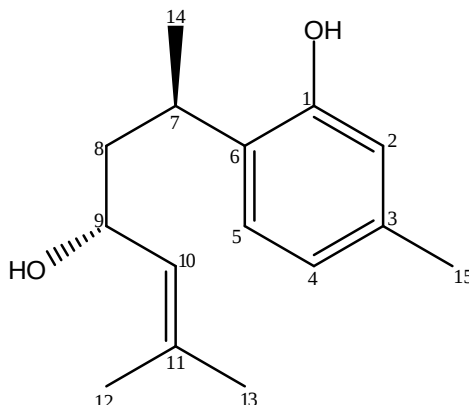
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, το μόριο ταυτοποιήθηκε ως **1,9(R*)-διϋδροξυ-α-κουρκουμένιο** και με βάση τη βιβλιογραφική αναζήτηση είναι νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.10.

Πίνακας 4.10 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **9** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	153.0	-	-
2	6.65 (1H, brs)	116.9	H-15	C-4, C-6, C-15
3	-	136.7	-	-
4	6.69 (1H, brd, J=7.5)	121.2	H-5	C-2, C-6, C-15
5	7.03 (1H, d, J=7.5)	125.8	H-4	C-1, C-3, C-7
6	-	129.3	-	-
7	3.06 (1H, m)	28.7	H-14, H-8a, H-8b	C-1, C-5, C-6, C-8, C-9, C-14
8	a 1.80 (1H, ddd, J=13.8, 8.8, 4.8) b 1.60 (1H, m)	46.4	H-7, H-8b, H-9 H-7, H-8a, H-9	- -
9	4.44 (1H, td, J=8.8, 3.3)	68.2	H-8a, H-8b, H-10	-
10	5.13 (1H, dt, J=8.8, 1.3)	127.5	H-9, H-12, H-13	C-12, C-13
11	-	135.6	-	-
12	1.68 (3H, brs)	25.9	H-10	C-10, C-11, C-13
13	1.63 (3H, brs)	18.4	H-10	C-10, C-11, C-12
14	1.31 (3H, d, J=7.0)	20.3	H-7	C-6, C-7, C-8
15	2.25 (3H, s)	21.3	H-4	C-2, C-3, C-4

4.2.10 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 10*Νέο φυσικό προϊόν*

Ο μεταβολίτης **10** (1.2 mg) απομονώθηκε με τη μορφή άχρωμου ελαιώδους υπολείμματος.



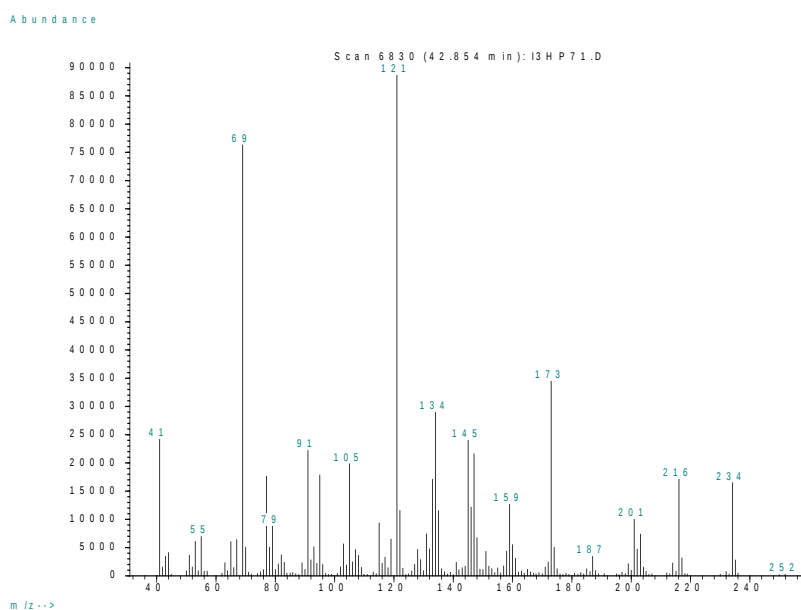
$[\alpha]_D = -7.2$ (c 0.083, CHCl_3)

IR (film) ν_{max} 3300, 2928, 1140, 955, 808 cm^{-1}

UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 245 (2.49), 276 (2.74) (nm)

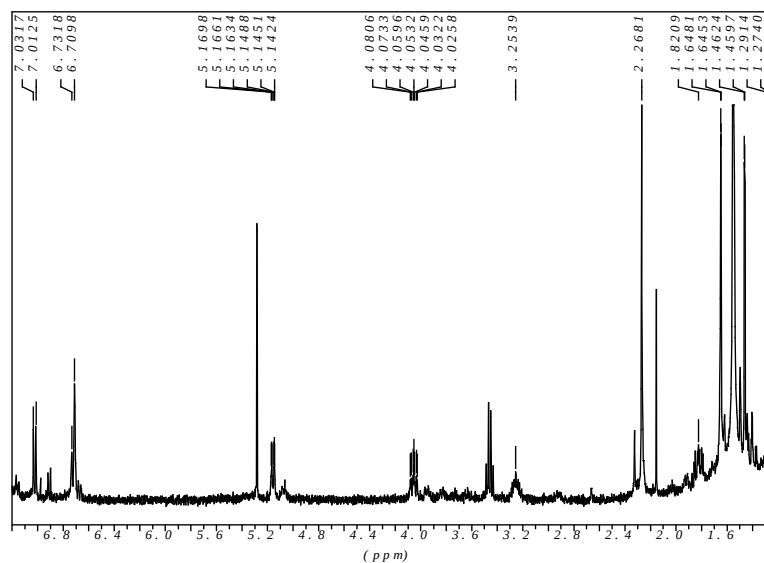
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **10** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRFABMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ σε m/z 216.1522 (θεωρητικό MB: 216.1514), ενώ στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.44), το μοριακό ιόν $[\text{M}]^+$ εμφανίζεται σε m/z 234.

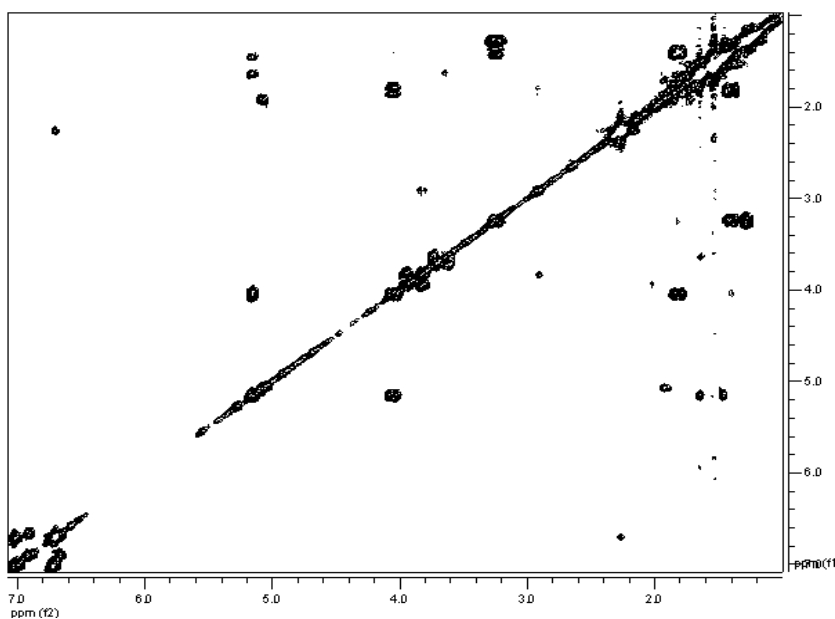


Εικ. 4.44 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **10**

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.45) εμφανίζεται παρόμοιο με αυτό του μεταβολίτη **9**, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για δύο ισομερείς ενώσεις.

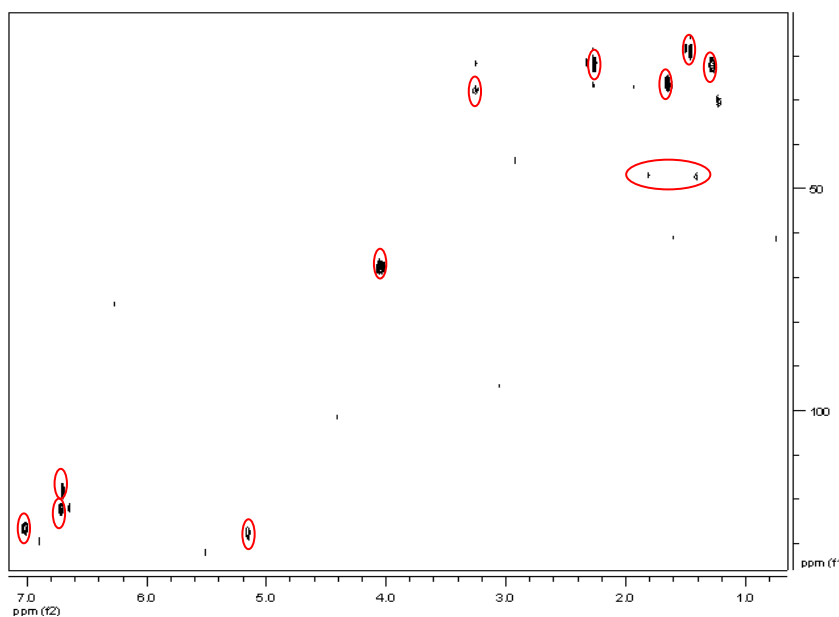


Εικ. 4.45 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **10**

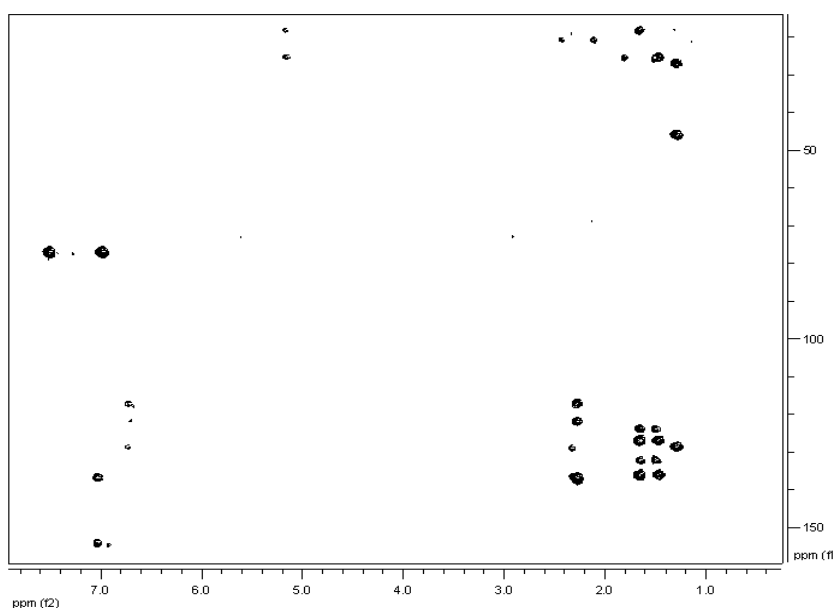


Εικ. 4.46 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **10**

Τα πειράματα COSY (Εικ. 4.46), HSQC-DEPT (Εικ. 4.47) και HMBC (Εικ. 4.48) επιβεβαίωσαν την αλληλουχία των ανθράκων και τις σχετικές θέσεις ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο.



Εικ. 4.47 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **10**



Εικ. 4.48 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **10**

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, το μόριο ταυτοποιήθηκε ως **1,9(*S**)-διϋδροξυ- α -κουρκουμένιο** και με βάση τη βιβλιογραφική αναζήτηση είναι νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.11.

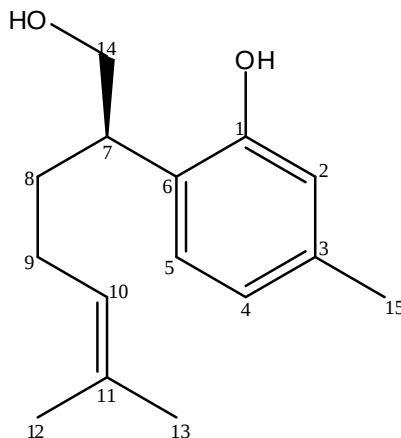
Πίνακας 4.11 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **10** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	153.9	-	-
2	6.71 (1H, brs)	117.0	H-15	C-4, C-6, C-15
3	-	136.7	-	-
4	6.73 (1H, d, J=7.5)	121.6	H-5	C-2, C-6, C-15
5	7.02 (1H, d, J=7.5)	126.5	H-4	C-1, C-3, C-7
6	-	128.3	-	-
7	3.26 (1H, m)	26.9	H-14, H-8a, H-8b	-
8	a 1.82 (1H, m) b 1.42 (1H, m)	46.0	H-9, H-8b, H-7 H-8a, H-7	- -
9	4.06 (1H, ddd, J=11.0, 8.4, 2.6)	67.8	H-10, H-8a, H-8b	-
10	5.16 (1H, dt, J=8.4, 1.2)	126.8	H-9, H-12, H-13	C-12, C-13
11	-	135.8	-	-
12	1.46 (3H, d, J=1.2)	18.3	H-10, H-13	C-10, C-11, C-13
13	1.65 (3H, d, J=1.2)	25.4	H-10, H-12	C-10, C-11, C-12
14	1.29 (3H, d, J=7.0)	21.9	H-7	C-6, C-7, C-8
15	2.27 (3H, s)	21.7	H-4	C-2, C-3, C-4

4.2.11 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 11

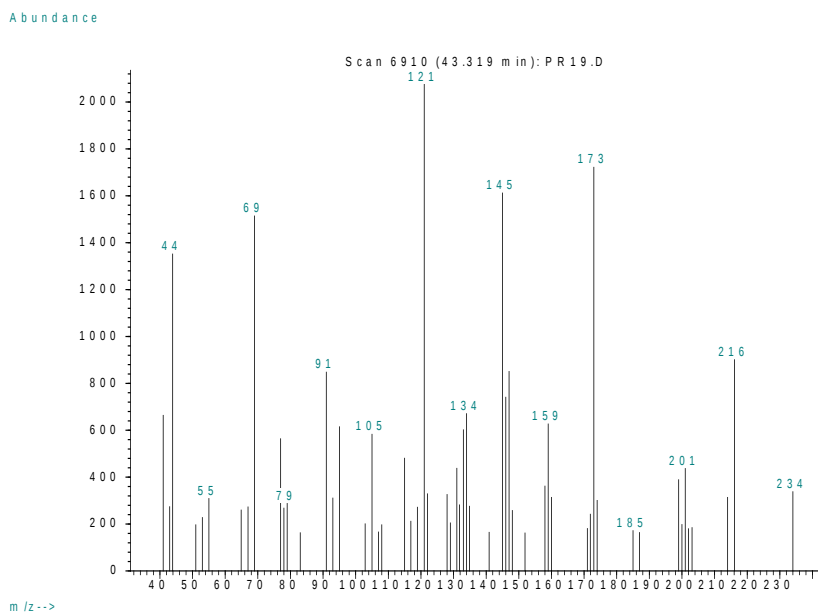
Ημισυνθετικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **11** (1.2 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



$[\alpha]_D = -15.0$ (c 0.066, CHCl_3)

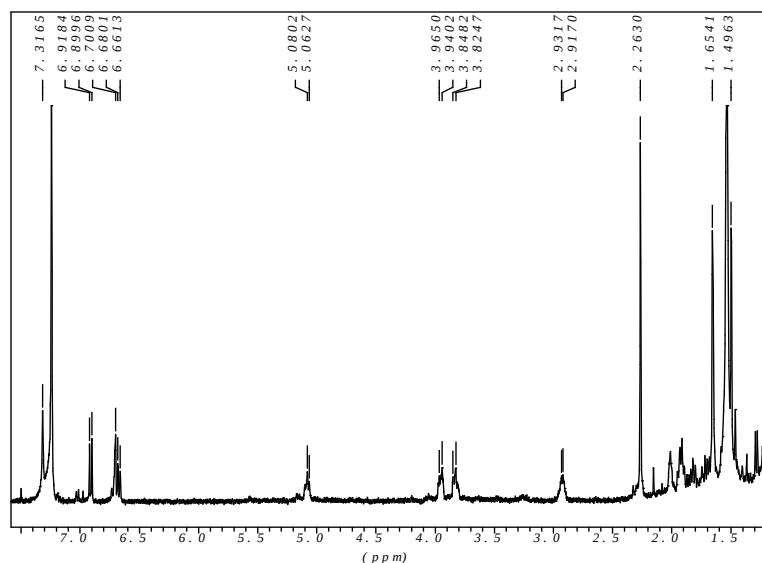
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.49), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 234 $[\text{M}]^+$, που υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.



Εικ. 4.49 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **11**

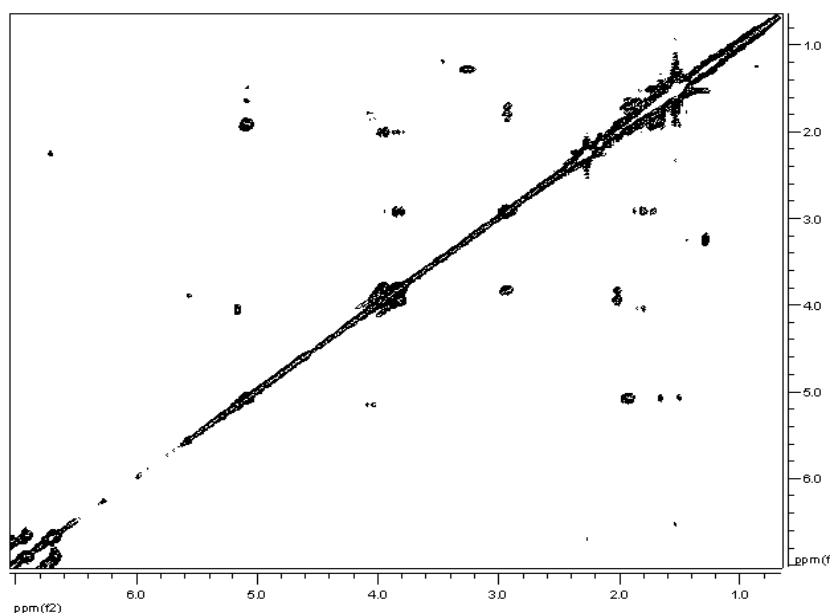
Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 4.50) ομοιάζει με αυτό του μεταβολίτη **8**. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει ισοπροπυλιδενική ομάδα (ολεφινικό πρωτόνιο σε δ 5.08 και δύο απλές κορυφές βινυλικών μεθυλίων σε δ 1.65 και 1.50), ένα αρωματικό μεθύλιο (δ 2.26) και τριςυποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο (δ 6.70, s; δ 6.67, d; δ 6.91, d). Δεν παρατηρείται σήμα μεθυλίου στο βενζυλικό μεθίλιο (δ 2.93), ενώ αντ'

αυτού παρουσιάζονται δύο πολλαπλές κορυφές που αντιστοιχούν σε ένα πρωτόνιο η κάθε μία σε δ 3.94 και 3.85, οι οποίες συζεύγνυνται με το βενζυλικό μεθίλιο.

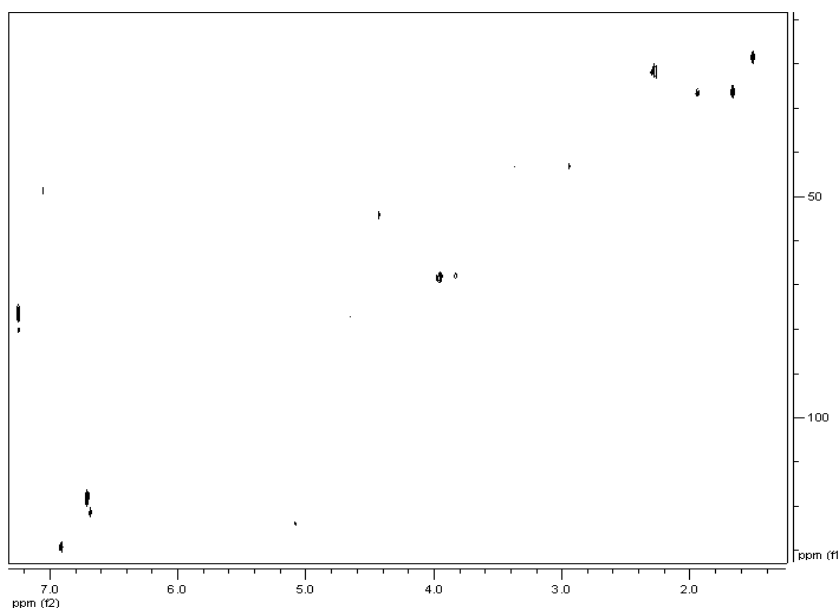


Εικ. 4.50 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **11**

Συμπληρωματικά, στο φάσμα COSY (Εικ. 4.51) εμφανής είναι η σύζευξη των πρωτονίων του C-14 και με ένα πρωτόνιο σε δ 2.02, το οποίο στο φάσμα HSQC-DEPT δεν εμφανίζει συσχέτιση. Αυτό το στοιχείο σε συνδυασμό με την περαιτέρω μελέτη του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 4.52), που δείχνει ότι το μεθυλένιο H_2 -14 βρίσκεται πάνω σε άνθρακα με μετατόπιση στα 68.1 ppm, υποδεικνύει την ύπαρξη υδροξυλίου στον C-14.

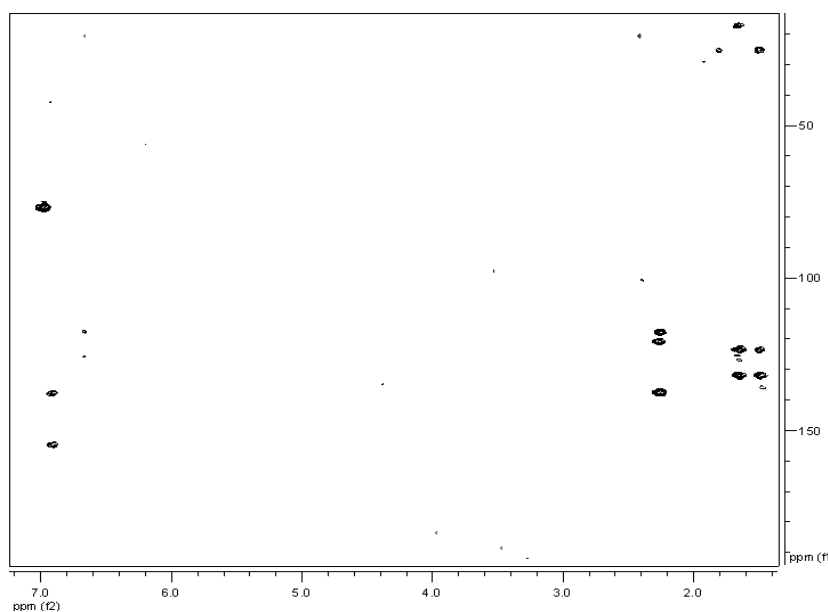


Εικ. 4.51 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **11**



Εικ. 4.52 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **11**

Τα πειράματα HMBC (Εικ. 4.53) και HSQC-DEPT βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και στον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο.



Εικ. 4.53 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **11**

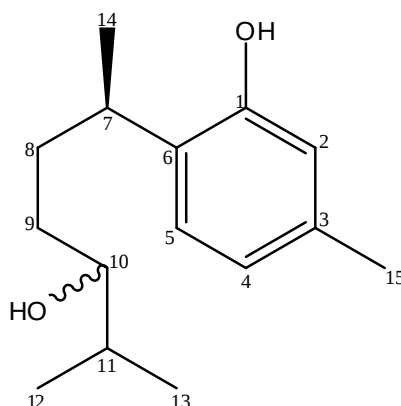
Με βάση τα παραπάνω, ο μεταβολίτης **11** ταυτοποιήθηκε ως **14-υδροξυ-(-)-κουρκουφαινόλη**, η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναζήτηση είναι γνωστή χημική δομή (Sugahara *et al*, 1998), που πρώτη φορά αναφέρεται ως φυσικό προϊόν. Τα πλήρη φασματοσκοπικά του δεδομένα αποδίδονται για πρώτη φορά και παρατίθενται στον Πίνακα 4.12.

Πίνακας 4.12 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **11** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	154.4	-	-
2	6.70 (1H, s)	118.1	H-15	-
3	-	137.6	-	-
4	6.67 (1H, d, J=7.7 Hz)	121.6	H-5	C-2, C-6, C-15
5	6.91 (1H, d, J=7.7 Hz)	129.1	H-4	C-1, C-3, C-7
6	-	125.7	-	-
7	2.93 (1H, m)	43.1	H-8b, H-8a, H-14a, H-14b	-
8	a 1.81 (1H, m) b 1.71 (1H, m)	29.7	H-8b, H-9, H-7 H-8a, H-9, H-7	- -
9	1.94 (2H, m)	26.5	H-8a, H-8b, H-10	-
10	5.08 (1H, dddd, 7.3, 7.3, 1.5, 1.5)	124.1	H-12, H-13, H-9a	-
11	-	131.9	-	-
12	1.65 (3H, brs)	25.8	H-10	C-10, C-11, C-13
13	1.50 (3H, brs)	18.2	H-10	C-10, C-11, C-12
14	a 3.94 (1H, m) b 3.85 (1H, m)	68.1	OH-14, H-7, H-14b OH-14, H-7, H-14a	- -
15	2.26 (3H, s)	21.2	H-2	C-2, C-3, C-4
OH-1	7.32 (1H, brs)	-	-	-
OH-14	2.02 (1H, brs)	-	H-14a, H-14b	-

4.2.12 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 12*Νέο φυσικό προϊόν*

Ο μεταβολίτης **12** (4.6 mg) απομονώθηκε με τη μορφή καστανού ελαιώδους υπολείμματος.



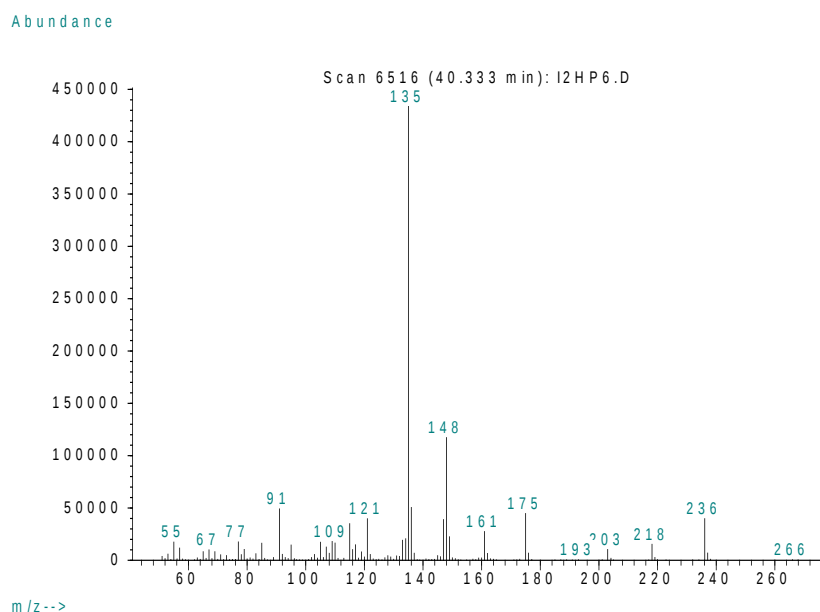
$[\alpha]_D = -23.0$ (c 0.1, CHCl_3)

IR (film) ν_{max} 3302 (broad), 2948, 2225, 1164 cm^{-1}

UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 246 (2.82), 276 (2.81) (nm)

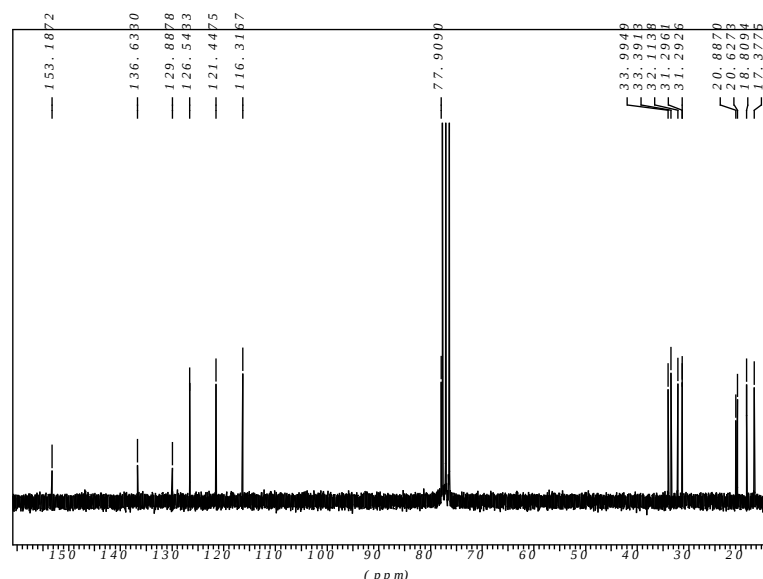
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **12** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 4 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRFABMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}-\text{H}]^+$ σε m/z 235.1681 (θεωρητικό MB: 235.1698). Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.53), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 236 $[\text{M}]^+$.



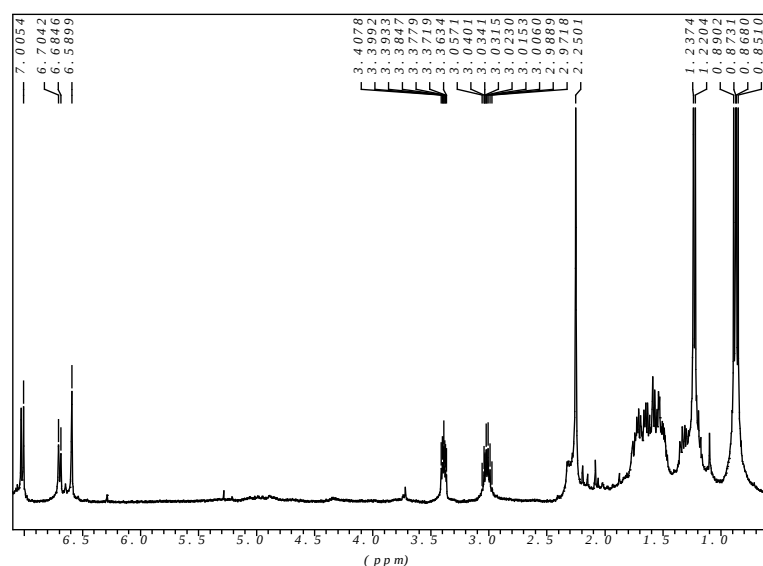
Εικ. 4.54 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **12**

Στο φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.55) εμφανίζονται 8 άτομα ανθράκων στην αλειφατική περιοχή, 6 ολεφινικοί/αρωματικοί άνθρακες (τρεις εκ των οποίων είναι τεταρτοταγείς) και ένας οξυγονωμένος άνθρακας στα 77.9 ppm.



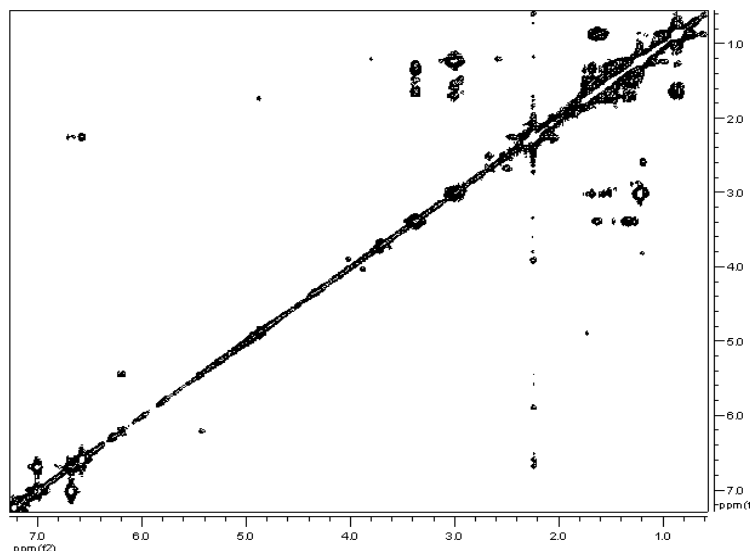
Εικ. 4.55 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **12**

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.56) ομοιάζει με αυτό του μεταβολίτη **6**. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει πρωτόνιο σε οξυγονωμένο άνθρακα σε δ 3.38, δύο διπλές κορυφές μεθυλίων σε δ 0.88 και 0.86, ένα αρωματικό μεθύλιο σε δ 2.25 και μεθύλιο (δ 1.22) σε βενζυλικό μεθίλιο (δ 3.01). Όμως, ο αρωματικός δακτύλιος, σύμφωνα με την ολοκλήρωση, εμφανίζει τρία αρωματικά πρωτόνια (δ 6.59, s; δ 6.70, d; δ 7.01, d). Το μοριακό ιόν του μεταβολίτη **12** είναι κατά 16 μονάδες μεγαλύτερο από το αντίστοιχο του μεταβολίτη **6**, γεγονός που παραπέμπει στην ύπαρξη υδροξυλίου στον αρωματικό δακτύλιο.



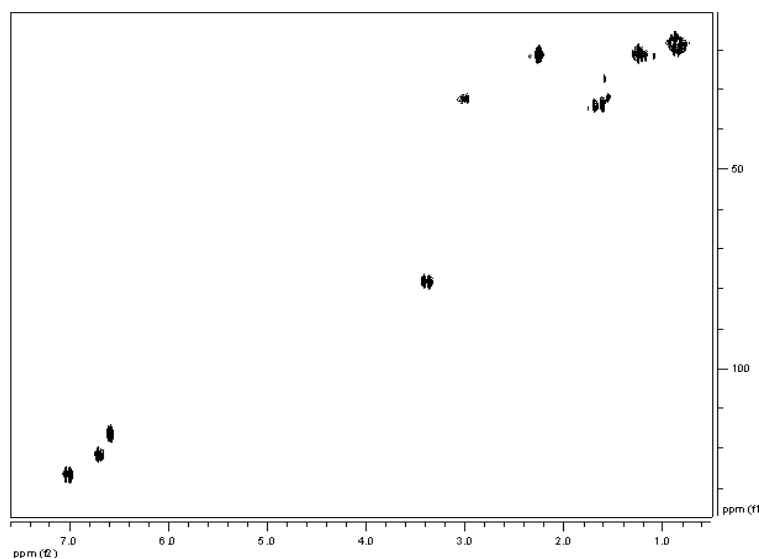
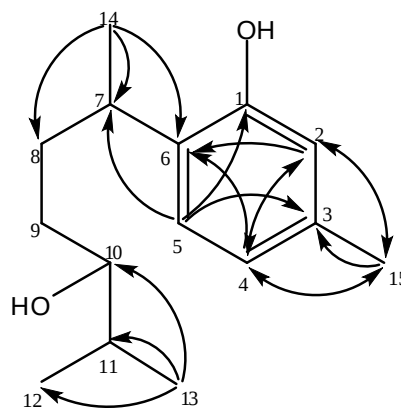
Εικ. 4.56 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **12**

Στο φάσμα COSY (Εικ. 4.57) φαίνονται η σύζευξη των πρωτονίων του αρωματικού μεθυλίου με το αρωματικό πρωτόνιο H-2, η σύζευξη του βενζυλικού μεθινίου με το Me-14 και οι συζεύξεις του H-11, τόσο με τα H-12 και H-13, όσο και με το H-10 (3.38 ppm) που βρίσκεται, προφανώς, στον οξυγονωμένο C-10.

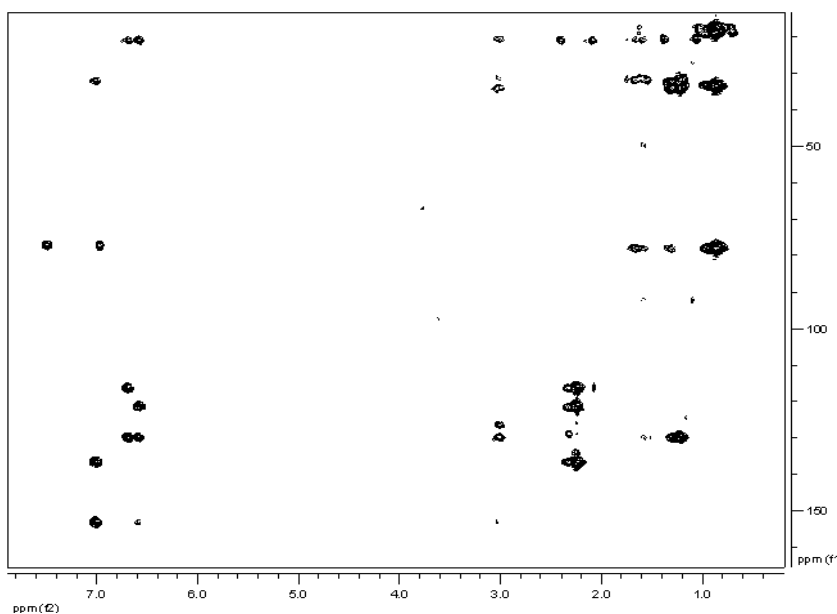


Εικ. 4.57 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **12**

Τα πειράματα HMBC (Εικ. 4.59) και HMQC (Εικ. 4.58) επιβεβαίωσαν τις αρχικές υποθέσεις για το μόριο.



Εικ. 4.58 Φάσμα HMQC (CDCl_3) του μεταβολίτη **12**



Εικ. 4.59 Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **12**

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και τη βιβλιογραφική αναζήτηση, ο μεταβολίτης **12** ταυτοποιήθηκε ως **10-υδροξυ-διϋδροκουρκουφαινόλη** και πρόκειται για νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.13.

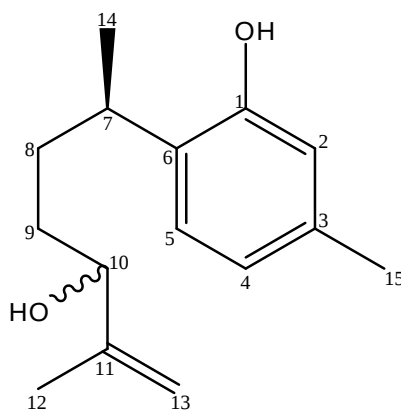
Πίνακας 4.13 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **12** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	153.2	-	-
2	6.59 (1H, s)	116.5	H-15	C-6, C-4
3	-	136.6	-	-
4	6.70 (1H, d, J=7.8)	121.5	H-5	C-2, C-6
5	7.01 (1H, d, J=7.8)	126.6	H-4	C-1, C-3, C-7
6	-	129.9	-	-
7	3.01 (1H, sextet, J=6.8)	32.3	H-14, H-8a	-
8	a 1.70 (1H, m) b 1.56 (1H, m)	33.8	H-7, H-8b, H-9b H-8a	- -
9	a 1.52 (1H, m) b 1.33 (1H, m)	31.4	H-9b H-8a, H-9a, H-10	- -
10	3.38 (1H, ddd, J=8.9, 5.8, 3.4)	78.0	H-9a, H-9b, H-11	-
11	1.65 (1H, m)	27.5	H-10, H-12, H-13	-
12	0.88 (3H, d, J=6.9)	18.3	H-11	C-10, C-11, C-13
13	0.86 (3H, d, J=6.9)	18.3	H-11	C-10, C-11, C-12
14	1.22 (3H, d, J=6.8)	20.8	H-7	C-6, C-7, C-8
15	2.25 (3H, s)	21.1	H-2	C-2, C-3, C-4

4.2.13 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ 13 και 14

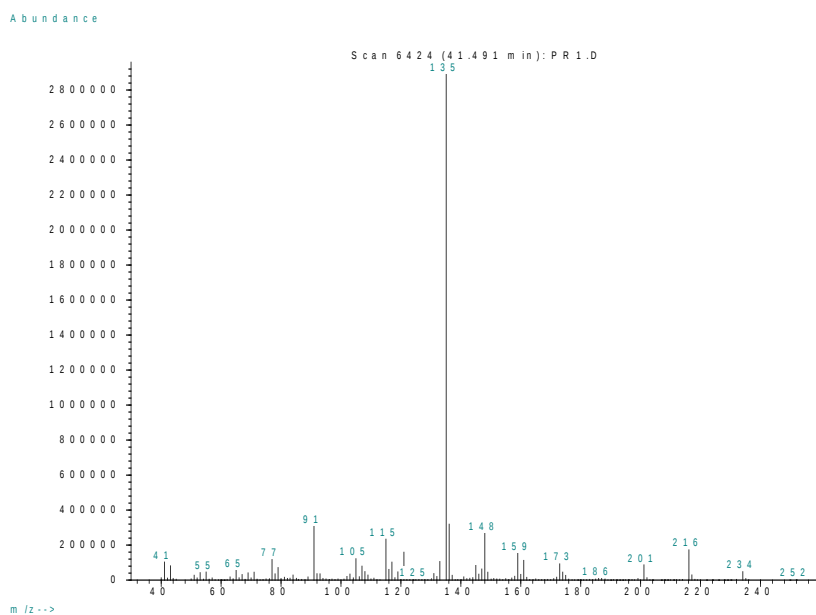
Πρώτη αναφορά στο γένος

Ο μεταβολίτης **13** (15.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



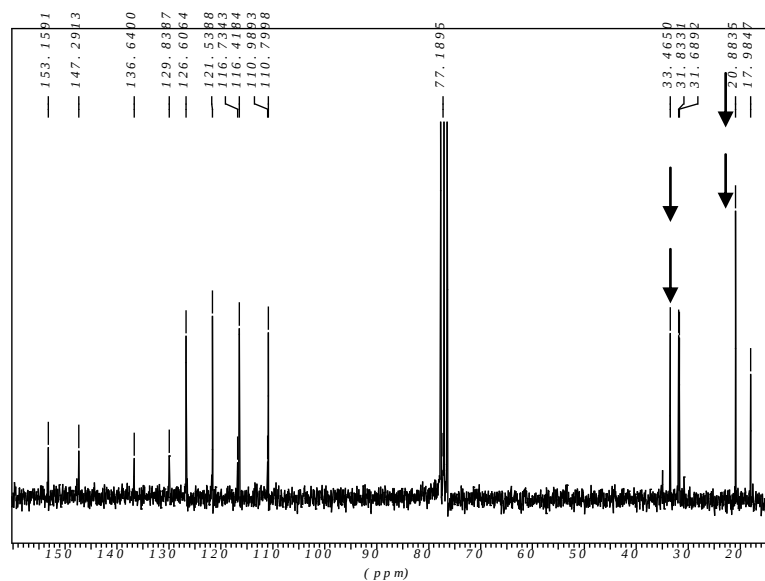
$[\alpha]_D = -13.0$ (c 0.1, CHCl_3)

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.60), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 234 $[\text{M}]^+$ και υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.



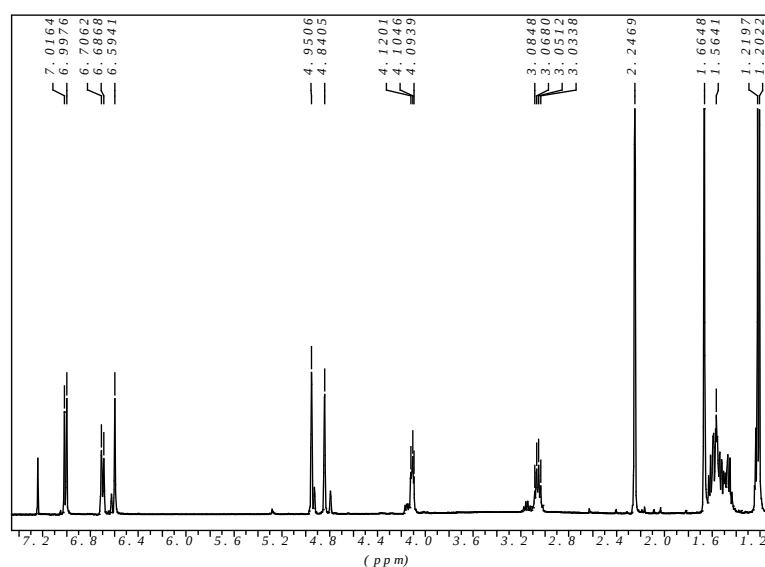
Εικ. 4.60 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **13**

Στο φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.61) εμφανίζονται 6 άτομα ανθράκων στην αλειφατική περιοχή, 8 ολεφινικοί/αρωματικοί άνθρακες (τέσσερεις εκ των οποίων είναι τεταρτοταγείς) και ένας οξυγονωμένος στα 77.2 ppm.

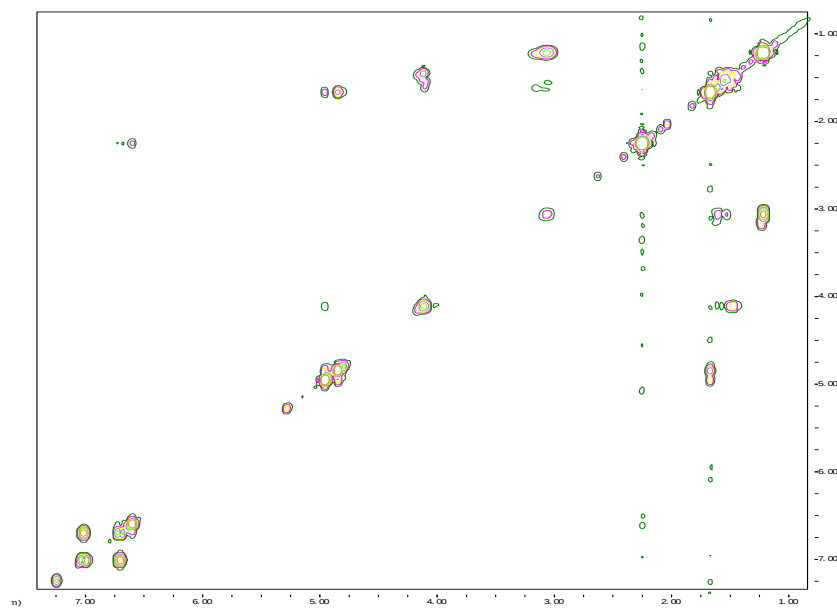


Εικ. 4.61 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **13**

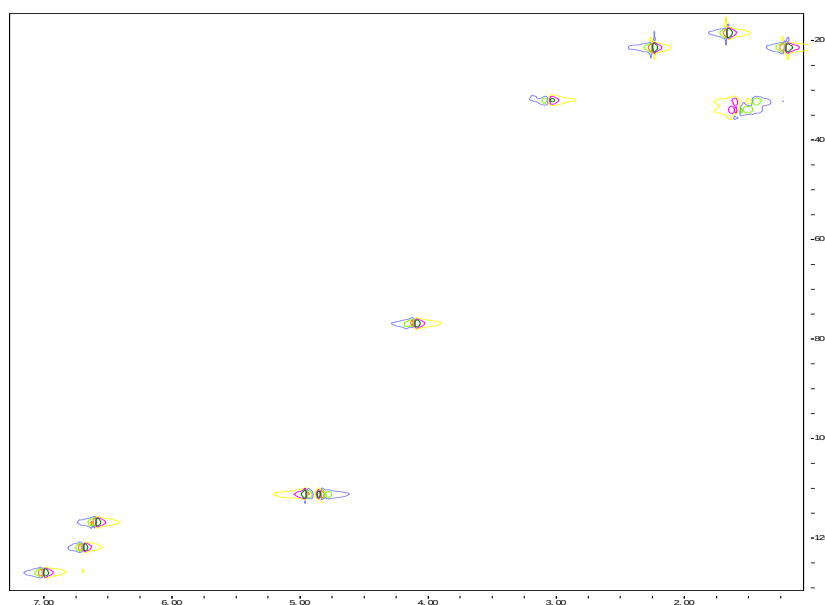
Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.62) υποδεικνύει την ύπαρξη εξωμεθυλενίου (δ 4.95, s; δ 4.84, s), οξυγονωμένου μεθινίου (δ 4.10, m), βινυλικού μεθυλίου (δ 1.66, s), αρωματικού μεθυλίου (δ 2.25, s) και ενός μεθυλίου (δ 1.21, d) σε βενζυλικό μεθίνιο (δ 3.05, m). Ο αρωματικός δακτύλιος παρουσιάζει τρία αρωματικά πρωτόνια (δ 6.59, s; δ 6.70, d; δ 7.01, d).



Εικ. 4.62 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **13**



Εικ. 4.63 Φάσμα COSY (CDCl₃) του μεταβολίτη **13**



Εικ. 4.64 Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **13**

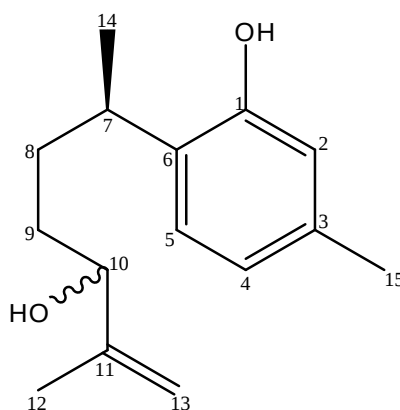
Η σχετική στεreoχημεία στον C-10 δεν ήταν εφικτό να καθοριστεί με φασματοσκοπικά δεδομένα.

Η μελέτη των φασμάτων του μεταβολίτη **13** οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το αρωματικό μπισαμπολένιο **αμπολένιο**, που απομονώθηκε για πρώτη φορά από σπόγγο του γένους *Arenochalina* (Butler *et al*, 1991) και παρουσίασε σημαντική δραστικότητα κατά του μύκητα *Candida albicans* και κάποιων κυτταρικών καρκινικών σειρών. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.14.

Πίνακας 4.14 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **13** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY
1	-	153.2	-
2	6.59 (1H, s)	116.4	H-15
3	-	136.6	-
4	6.69 (1H, d, J=7.6)	121.5	H-5
5	7.00 (1H, d, J=7.6)	126.6	H-4
6	-	129.8	-
7	3.05 (1H, sextet, J=7.0)	31.7	H-14, H-8b, H-8a
8	a 1.64 (1H, m) b 1.51 (1H, m)	33.5	H-7 H-7
9	a 1.61 (1H, m) b 1.44 (1H, m)	31.8	H-9b, H-10 H-9a, H-10
10	4.10 (1H, dd, J=4.3, 4.3)	77.2	H-9a, H-9b
11	-	147.3	-
12	1.66 (3H, s)	18.0	H-13b, H-13a
13	a 4.95 (1H, brs) b 4.84 (1H, brs)	110.8	H-13b, H-12 H-13a, H-12
14	1.21 (3H, d, J=7.0)	20.9	H-7
15	2.25 (3H, s)	20.9	H-2

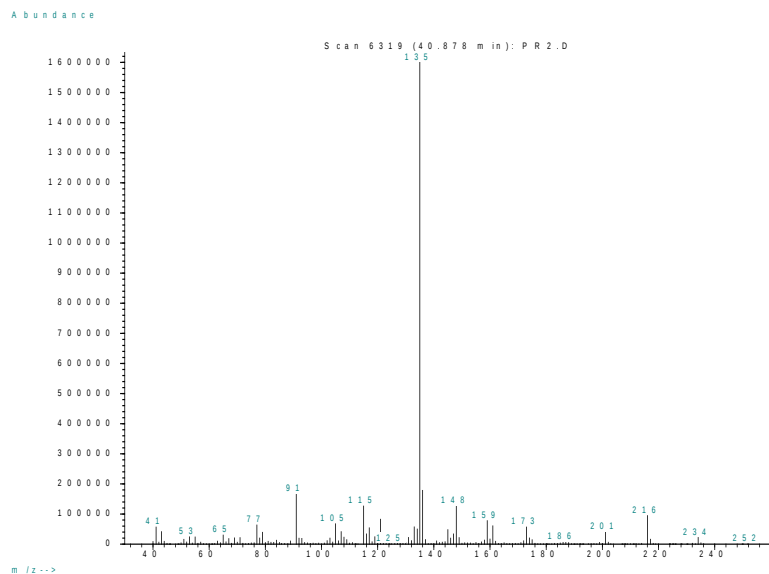
Ο μεταβολίτης **14** (βάρους 5.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



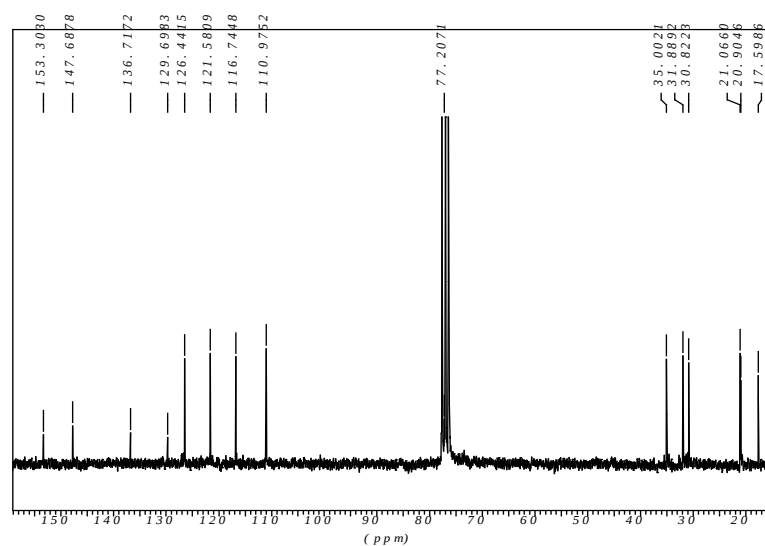
[α]_D = +7.5 (c 0.26, CHCl₃)

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.65), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε *m/z* 234 [M]⁺, που υποδεικνύει τον μοριακό τύπο C₁₅H₂₂O₂.

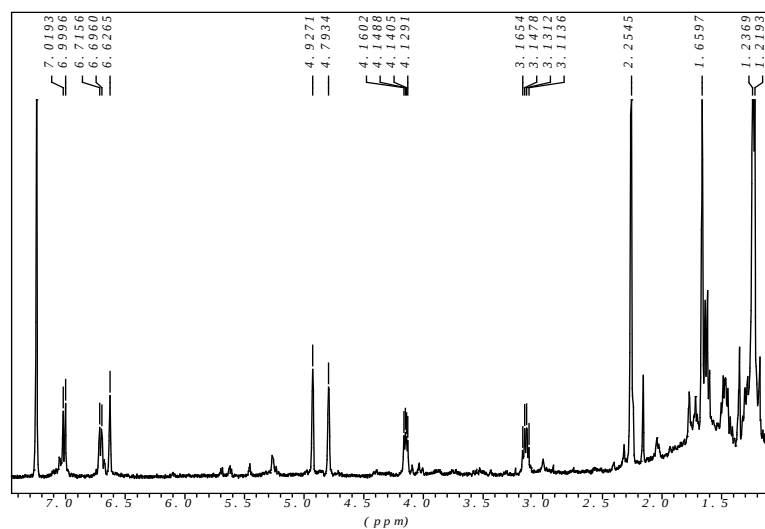
Το φάσμα ¹H-NMR (Εικ. 4.66), όπως και το φάσμα ¹³C-NMR (Εικ. 4.66), είναι παρόμοια με αυτά του μεταβολίτη **13**, υποδεικνύοντας ότι οι παρόντες μεταβολίτες αποτελούν ισομερή και συγκεκριμένα επιμερή στον C-10, στον οποίον εδρεύει το υδροξύλιο.



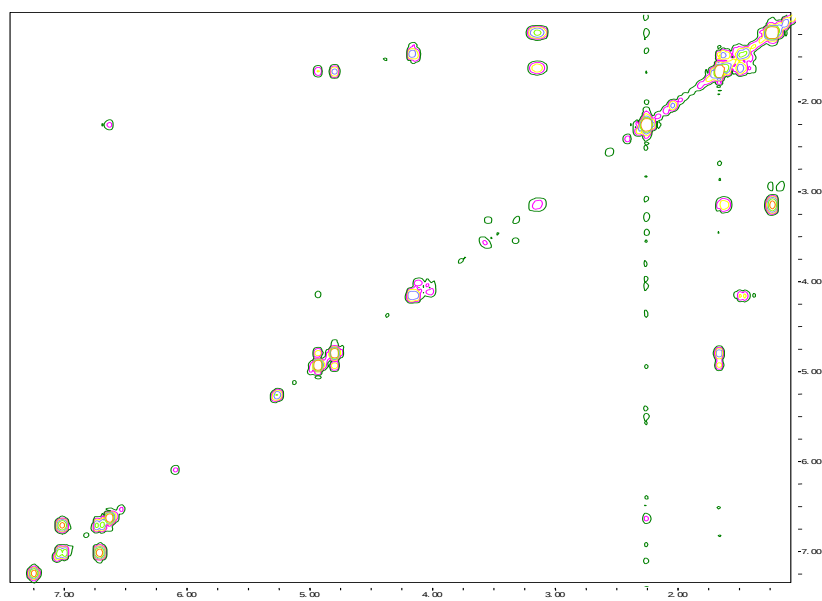
Εικ. 4.65 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **14**



Εικ. 4.66 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **14**



Εικ. 4.67 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **14**



Εικ. 4.68 Φάσμα COSY (CDCl₃) του μεταβολίτη **14**

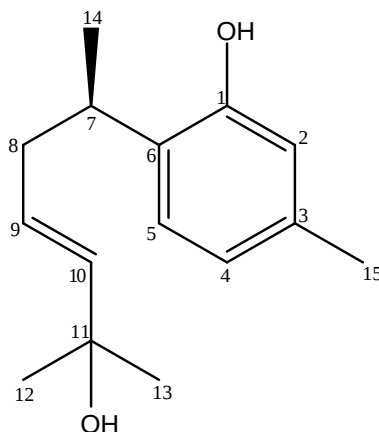
Ο μεταβολίτης **14** βρέθηκε και αυτός στον σπόγγο *Arenochalina* το 1991. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του επιμερούς παρατίθενται στον Πίνακα 4.15.

Πίνακας 4.15 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **14** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY
1	-	153.3	-
2	6.63 (1H, s)	116.7	H-15
3	-	136.7	-
4	6.71 (1H, d, J=7.9)	121.6	H-5
5	7.01 (1H, d, J=7.9)	126.4	H-4
6	-	129.7	-
7	3.14 (1H, sextet, J=7.0)	30.8	H-8, H-14
8	1.62 (2H, m)	35.0	H-7, H-9a, H-9b
9	a 1.48 (1H, m) b 1.38 (1H, m)	31.9	H-8, H-10, H-9b H-8, H-10, H-9a
10	4.15 (1H, dd, J=7.7, 4.4)	77.2	H-9a, H-9b, H-13a
11	-	147.7	-
12	1.66 (3H, s)	17.6	H-13a, H-13b
13	a 4.93 (1H, brs) b 4.79 (1H, brs)	111.0	H-10, H-12, H-13b H-12, H-13a
14	1.23 (3H, d, J=7.0)	20.9	H-7
15	2.26 (3H, s)	21.1	H-2

4.2.14 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 15

Ο μεταβολίτης **15** (1.5 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



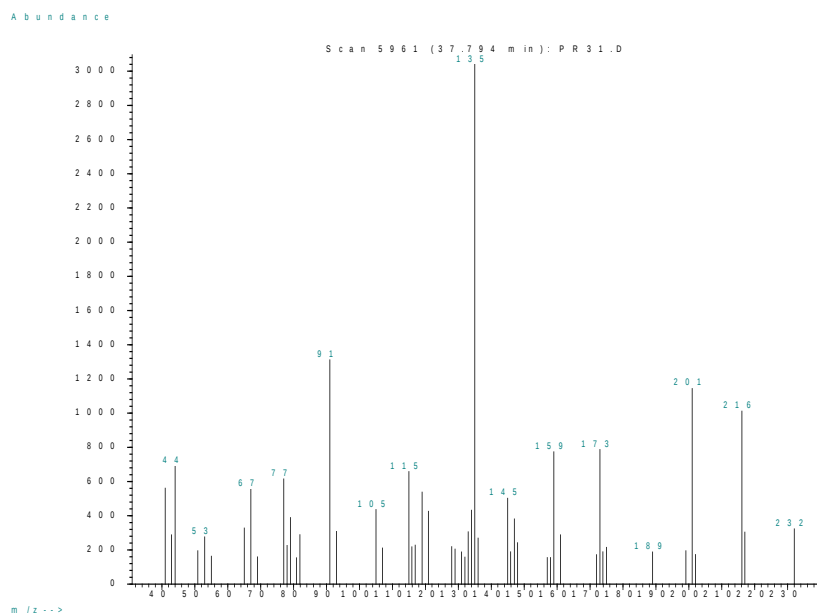
$[\alpha]_D = -5.6$ (c 0.125, CHCl_3)

UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 211 (3.25) (nm)

IR (film) ν_{max} 3334 (broad), 2925, 1655, 1420, 1150, 1117, 807 cm^{-1}

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **15** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.

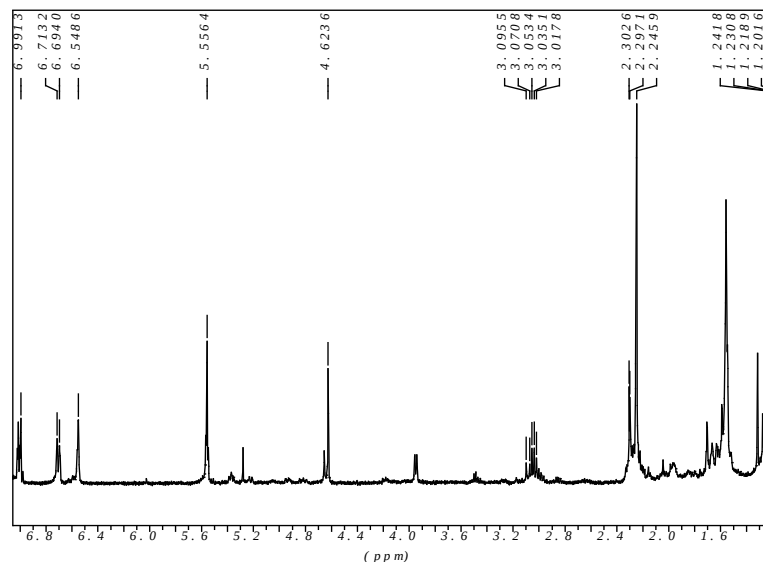
Το φάσμα μάζας (Εικ. 4.69) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν σε m/z 216 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$.



Εικ. 4.69 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **15**

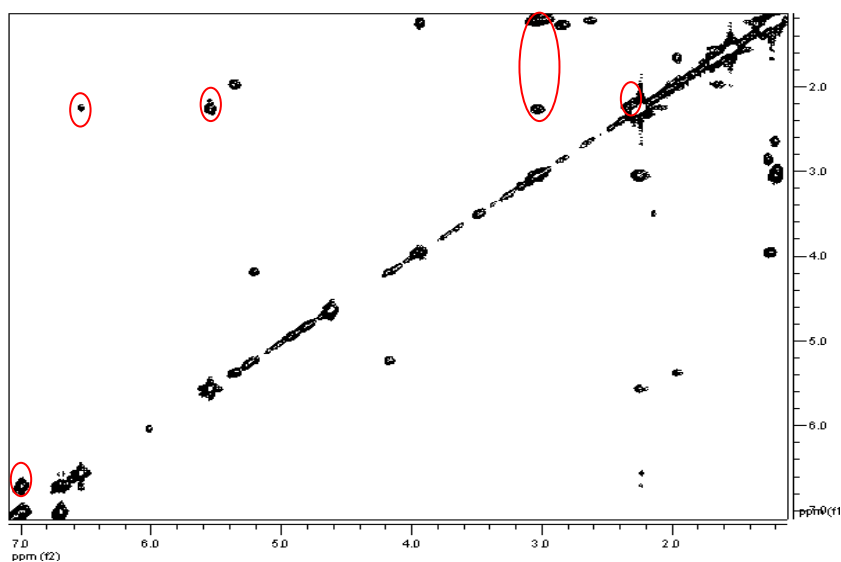
Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.70) εμφάνισε χαρακτηριστικά σήματα, τα οποία αντιστοιχούν σε σεσκιτερπένιο με σκελετό μπισαμπολανίου. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται τρία αρωματικά πρωτόνια σε δ 7.00, 6.70 και 6.55, δύο ολεφινικά

πρωτόνια σε δ 5.55, ένα μεθίνιο σε δ 3.05, ένα μεθύλιο σε αρωματικό δακτύλιο σε δ 2.25, δύο μεθύλια σε υψηλά πεδία σε δ 1.24 και 1.23, ένα μεθύλιο σε τριτοταγή άνθρακα σε δ 1.22 και το πρωτόνιο ενός υδροξυλίου σε δ 4.63 (δεν παρουσιάζει σύζευξη με άνθρακα στο φάσμα HSQC-DEPT, Εικ. 4.72).

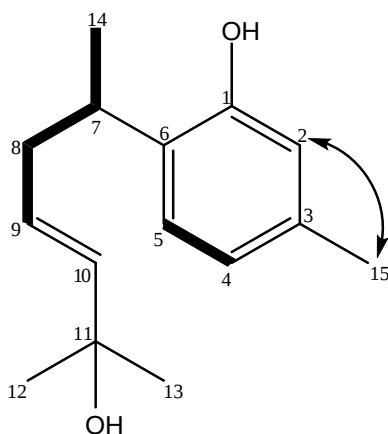


Εικ. 4.70 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **15**

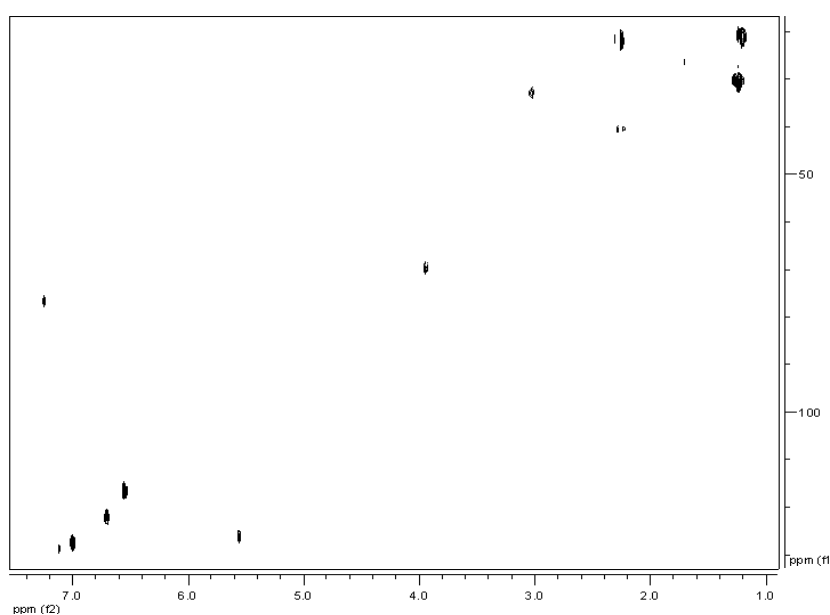
Στο φάσμα COSY (Εικ. 4.71) φαίνονται η σύζευξη των πρωτονίων του αρωματικού μεθυλίου με το αρωματικό πρωτόνιο H-2 σε δ 6.55, των αρωματικών πρωτονίων σε δ 7.00 και δ 6.70 μεταξύ τους, η σύζευξη του βενζυλικού μεθινίου H-7 με το Me-14 και το H₂-8 και, επίσης, η σύζευξη του ολεφινικού H-9 με το H₂-8.



Εικ. 4.71 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **15**

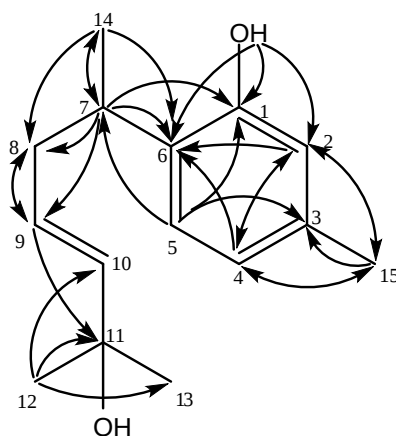


Σχήμα 4.3 Συζεύξεις COSY του μεταβολίτη **15**

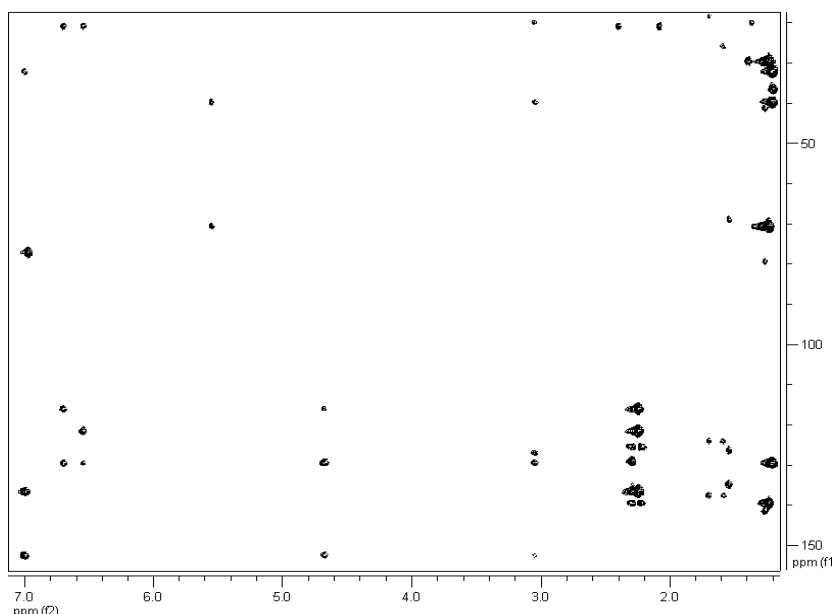


Εικ.4.72 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl₃) του μεταβολίτη **15**

Στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.73), τα μεθύλια σε δ 1.23 και 1.24 παρουσιάζουν συσχέτιση με τον C-10 (139.9 ppm) του διπλού δεσμού της πλευρικής αλυσίδας όπως και με τον C-11 (70.8 ppm).



Σχήμα 4.4 Χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **15**



Εικ. 4.73 Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **15**

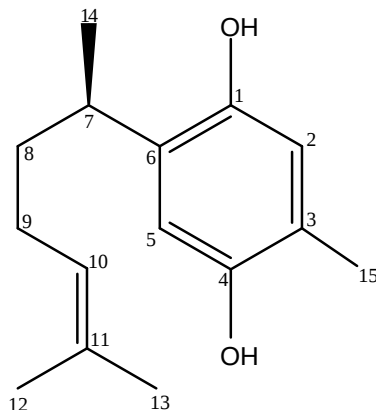
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και τη βιβλιογραφική αναζήτηση, προέκυψε ότι ο μεταβολίτης **15** έχει απομονωθεί στο παρελθόν από σπόγγο του γένους *Arenochalina* (Butler *et al*, 1991). Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.16.

Πίνακας 4.16 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **15** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	152.9	-	-
2	6.55 (1H, s)	116.4	H-15	C-4, C-6, C-15
3	-	136.8	-	-
4	6.70 (1H, d, J=7.8)	122.1	H-5	C-2, C-6, C-15
5	7.00 (1H, d, J=7.8)	127.4	H-4	C-1, C-3, C-7
6	-	129.8	-	-
7	3.05 (1H, m)	32.9	H-14, H-8a, H-8b	C-1, C-6, C-8, C-9, C-14
8	a 2.27 (1H, m) b 2.17 (1H, m)	40.4	H-7, H-8b, H-9 H-8a, H-9	C-9, C-10 C-9, C-10
9	5.55 (1H, m)	125.9	H-8a, H-8b	C-8, C-11
10	5.55 (1H, m)	139.9	-	-
11	-	70.8	-	-
12	1.24 (3H, s)	30.3	-	C-13, C-10, C-11
13	1.23 (3H, s)	30.3	-	C-12, C-10, C-11
14	1.22 (3H, d, J=6.9)	20.5	H-7	C-6, C-7, C-8
15	2.25 (3H, s)	21.5	H-2	C-2, C-3, C-4
OH	4.63 (1H, brs)	-	-	C-1, C-2, C-6

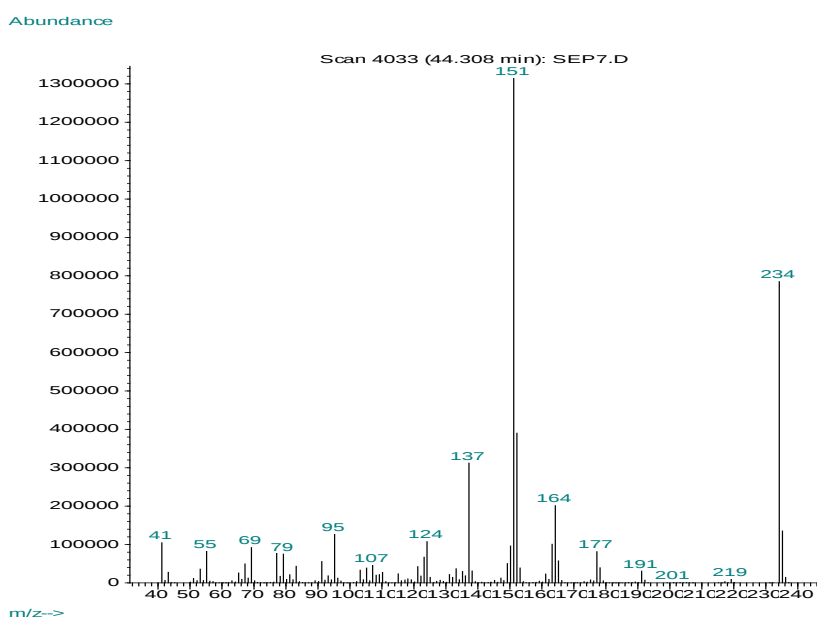
4.2.15 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 16

Ο μεταβολίτης **16** (80.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



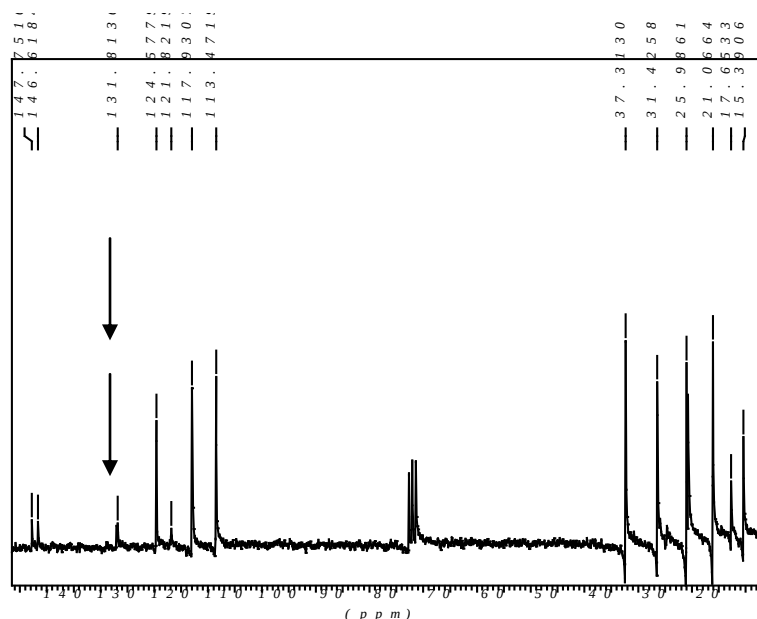
$[\alpha]_D = -25.38$ (c 0.086, CHCl_3)

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.74), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 234 $[\text{M}]^+$, που υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$.



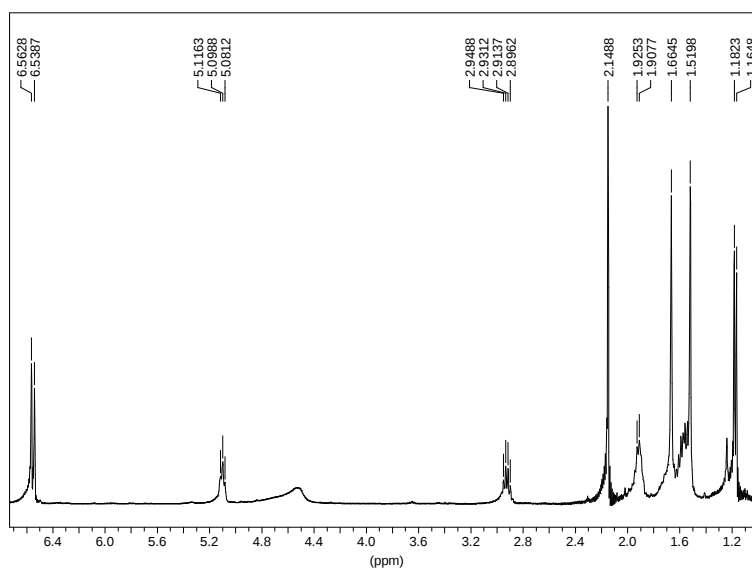
Εικ. 4.74 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **16**

Το φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.75) παρουσιάζει τα 15 άτομα των ανθράκων του μορίου. Τα 8 άτομα στην περιοχή των ολεφινικών/αρωματικών επιβεβαιώνουν την παρουσία τεσσάρων διπλών δεσμών. Ο βαθμός ακορεστότητας υπολογίστηκε ως $\Omega=5$. Δηλαδή, το μόριο διαθέτει έναν δακτύλιο.



Εικ. 4.75 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **16**

Τα χαρακτηριστικά του φάσματος ^1H -NMR (Εικ. 4.76) της κουρκουϋδροκινόνης ομοιάζουν με αυτά της κουρκουφαινόλης (μεταβολίτης **8**). Αξιοσημείωτη, η παρουσία των σημάτων δύο αρωματικών πρωτονίων, που δεν παρουσιάζουν σύζευξη μεταξύ τους. Στο παρόν μόριο, το αρωματικό H-4, έχει αντικατασταθεί από ένα υδροξύλιο.



Εικ. 4.76 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **16**

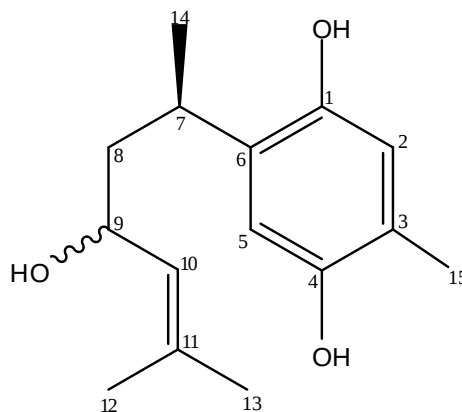
Ο μεταβολίτης **16** ελέγχθηκε φασματοσκοπικά και η μελέτη των φασμάτων του οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το σεσκιτερπένιο **(-)-κουρκουϋδροκινόνη** (McEnroe *et al*, 1978).

Πίνακας 4.17 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **16** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY
1	-	146.6	-
2	6.54 (1H, s)	117.9	H-15
3	-	121.8	-
4	-	147.8	-
5	6.55 (1H, s)	113.5	-
6	-	131.6	-
7	2.93 (1H, sextet, J=7.1)	31.4	H-8, H-14
8	1.59 (2H, m)	37.3	H-7, H-9
9	1.93 (2H, m)	26.0	H-8, H-10
10	5.10 (1H, tm, J=7.0)	124.6	H-9, H-12, H-13
11	-	132.1	-
12	1.66 (3H, s)	17.7	H-10
13	1.52 (3H, s)	25.7	H-10
14	1.17 (3H, d, J=7.1)	21.1	H-7
15	2.15 (3H, s)	15.4	H-2
OH	4.34 (2H, brs)	-	-

4.2.16 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 17*Νέο φυσικό προϊόν*

Ο μεταβολίτης **17** (1.5 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.

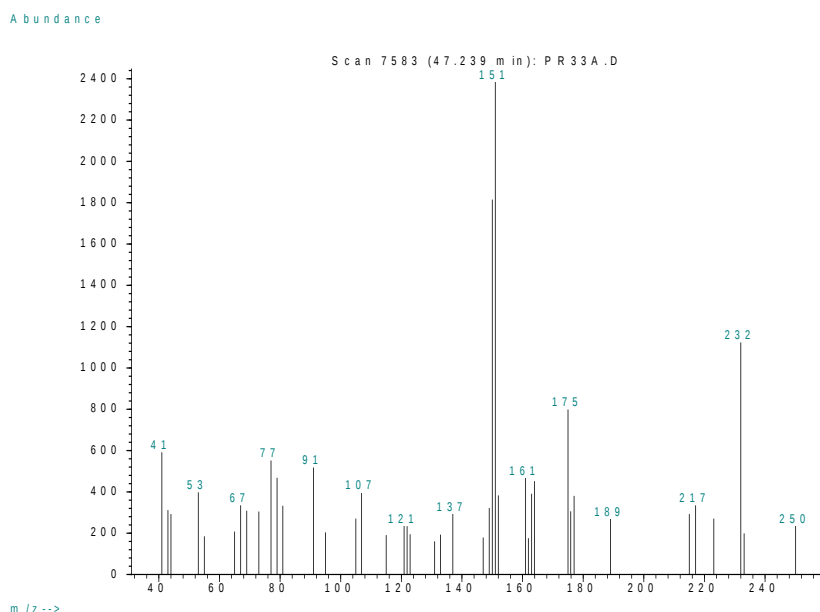

 $[\alpha]_D = -18.0$ (c 0.083, CHCl_3)

 UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 246 (3.18), 292 (3.13) (nm)

 IR (film) ν_{max} 3370 (broad), 2929, 2338, 2253, 1682, 1173 cm^{-1}

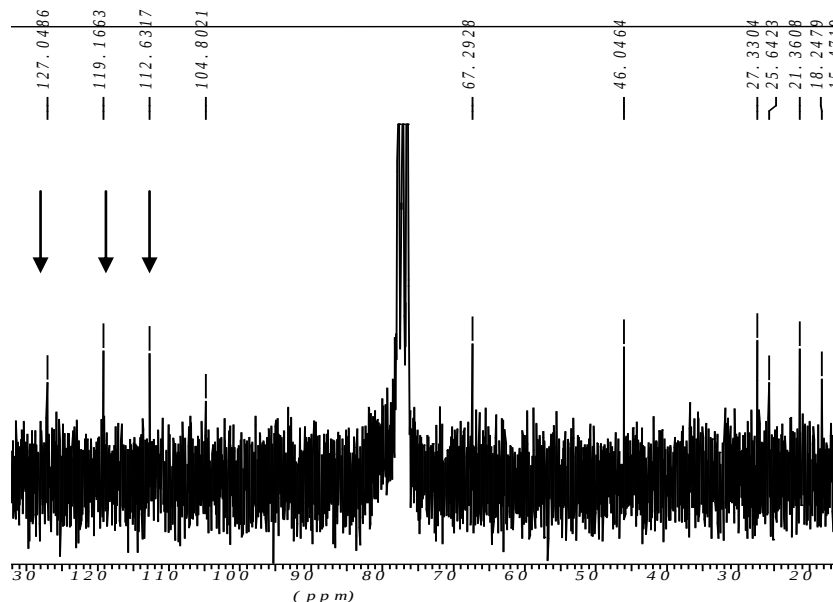
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **17** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRESIMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}-\text{H}]^+$ σε m/z 249.1498 (θεωρητικό MB: 249.1496). Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.77), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 250 $[\text{M}]^+$.



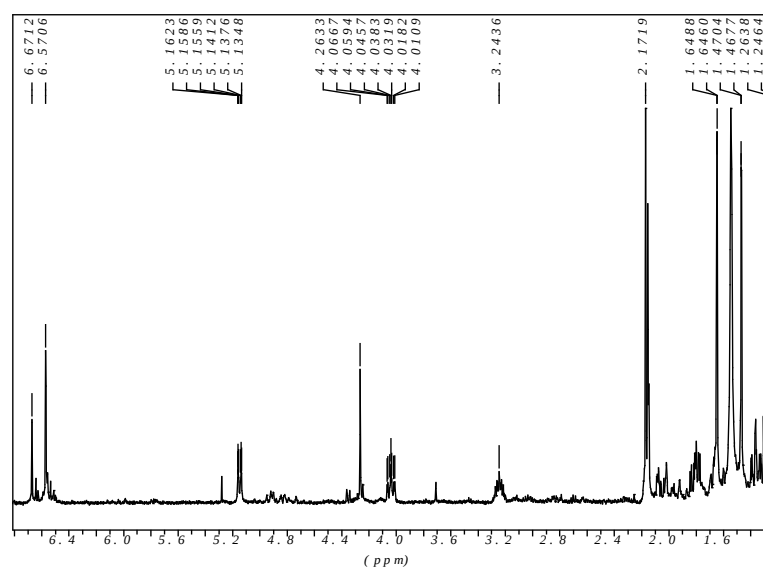
Εικ. 4.77 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **17**

Στο φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.78) του μεταβολίτη **17** εμφανίζονται 7 άτομα ανθράκων στην αλειφατική περιοχή, 3 ολεφινικοί/αρωματικοί άνθρακες πρωτονιωμένοι (127.0, 119.2, 112.6 ppm) και ένας οξυγονωμένος άνθρακας (67.3 ppm).



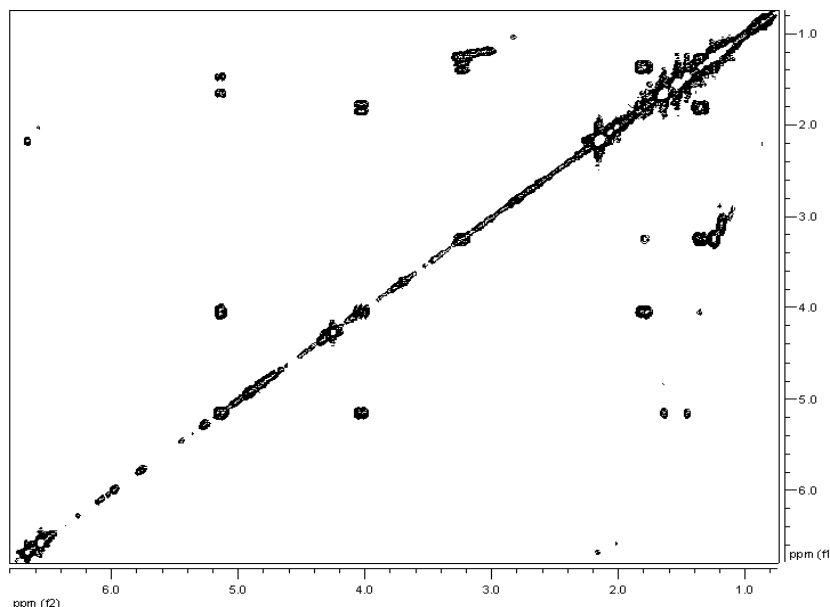
Εικ. 4.78 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **17**

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.79) παρουσιάζει το ισοπροπυλιδένιο (δ 5.15, 1H, ddd; δ 1.65, 3H, s; δ 1.47, 3H, s), το μεθύλιο στο βενζυλικό μεθίλιο (δ 1.25, 3H, d; δ 3.24, 1H, m), τα δύο αρωματικά πρωτόνια (δ 6.67, s; δ 6.57, s) και το αρωματικό μεθύλιο (δ 2.17, s), που εμφανίζει σύζευξη με το γειτονικό αρωματικό πρωτόνιο στα 6.67 ppm.

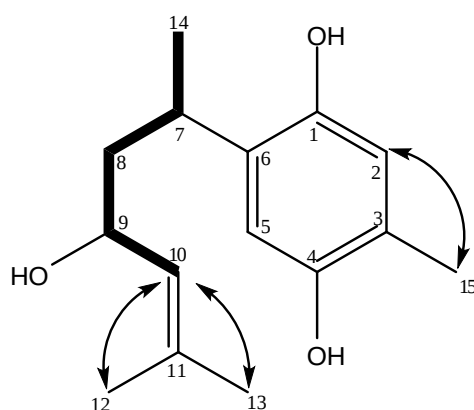


Εικ. 4.79 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **17**

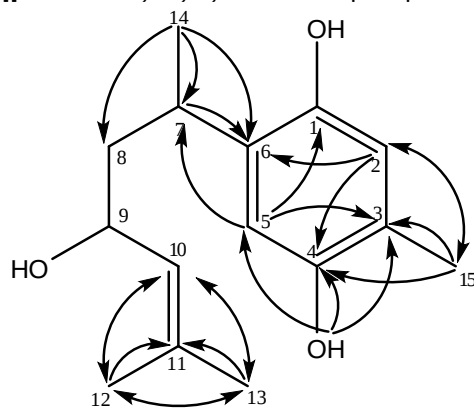
Στο φάσμα COSY (Εικ. 4.80) φαίνονται η σύζευξη του Me-15 με το H-2, η γειτνίαση του ολεφινικού H-10 με τα δύο μεθύλια της ισοπροπυλιδενικής ομάδας, η σύζευξη του H-7 με το Me-14 και η σύζευξη του H-10 με το H-9 (δ 4.03, ddd) που βρίσκεται στον οξυγονωμένο άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας.



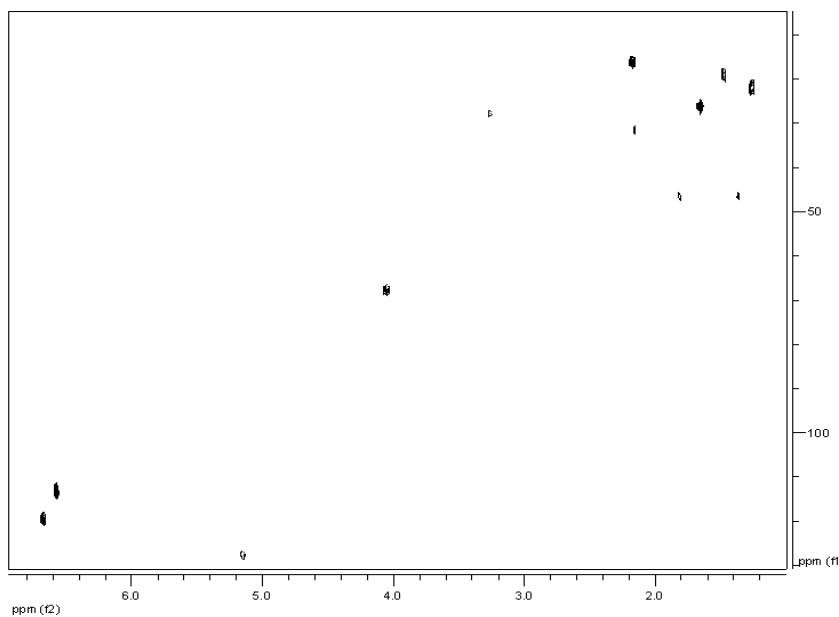
Εικ. 4.80 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **17**



Σχήμα 4.5 Συζεύξεις COSY του μεταβολίτη **17**

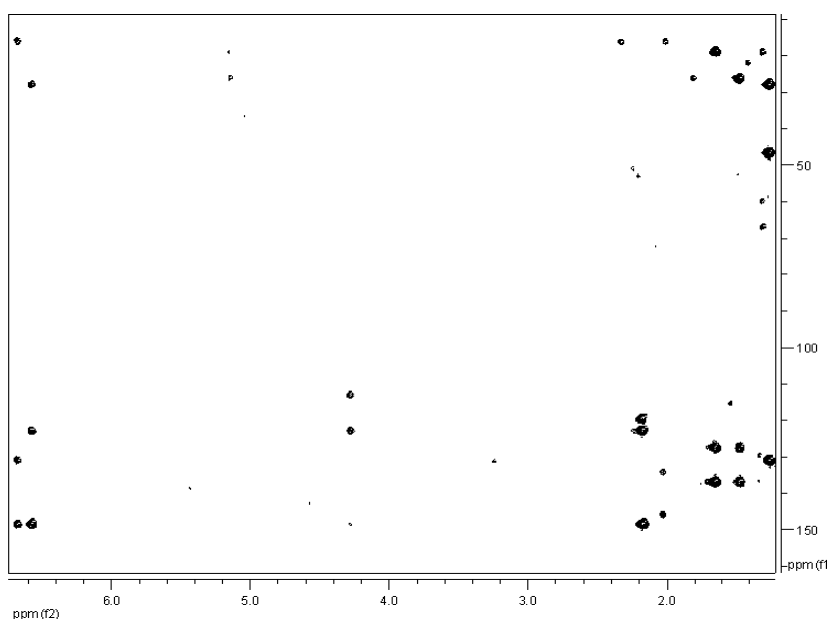


Σχήμα 4.6 Χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **17**



Εικ. 4.81 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **17**

Τα πειράματα HMBC (Εικ. 4.82) και HSQC-DEPT (Εικ. 4.81) βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και στον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο.



Εικ. 4.82 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **17**

Ο μεταβολίτης **17** ταυτοποιήθηκε ως **9-υδροξυ-κουρκουϋδροκινόνη** και με βάση τη βιβλιογραφική αναζήτηση είναι νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **17** παρατίθενται στον Πίνακα 4.18.

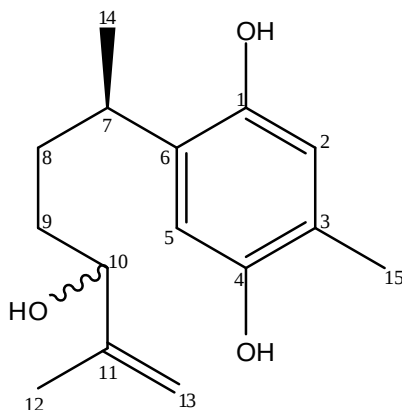
Πίνακας 4.18 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **17** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	148.5	-	-
2	6.67 (1H, s)	119.1	H-15	C-4, C-6, C-15
3	-	122.7	-	-
4	-	148.5	-	-
5	6.57 (1H, s)	112.9	-	C-1, C-3, C-7
6	-	130.8	-	-
7	3.24 (1H, m)	27.8	H-14, H-8a, H-8b	C-6
8	a 1.82 (1H, m) b 1.35 (1H, m)	46.5	H-9, H-7, H-8b H-9, H-7, H-8a	- -
9	4.02 (1H, ddd, J=13.9, 8.4, 2.9)	67.5	H-8a, H-8b, H-10	-
10	5.15 (1H, dt, J=8.4, 1.2)	127.3	H-10, H-12, H-13	C-12, C-13
11	-	136.8	-	-
12	1.65 (3H, d, J=1.2)	26.1	-	C-13, C-10, C-11
13	1.47 (3H, d, J=1.2)	18.7	-	C-12, C-10, C-11
14	1.26 (3H, d, J=7.0)	21.9	H-7	C-6, C-7, C-8
15	2.17 (3H, s)	15.9	H-2	C-2, C-3, C-4
OH	4.26 (H, brs)	-	-	C-3, C-4, C-5

4.2.17 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ 18 και 19

Νέα φυσικά προϊόντα

Ο μεταβολίτης **18** (2.8 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



$[\alpha]_D = -7.5$ (c 0.04, CHCl_3)

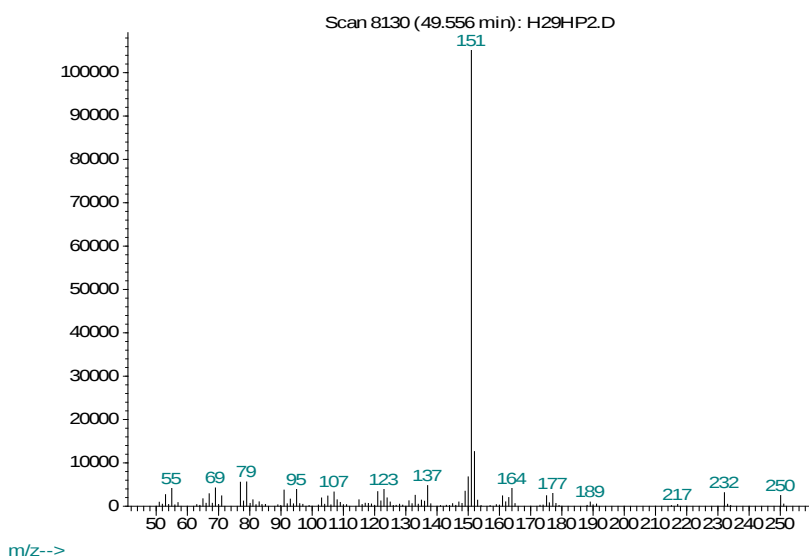
UV λ_{max} (CHCl_3) (log ϵ) 240 (2.79), 250 (2.85), 260 (2.78) (nm)

IR (film) ν_{max} 3406 (broad), 2965, 1652, 1446, 1259, 1089, 1021, 797 cm^{-1}

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **18** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.

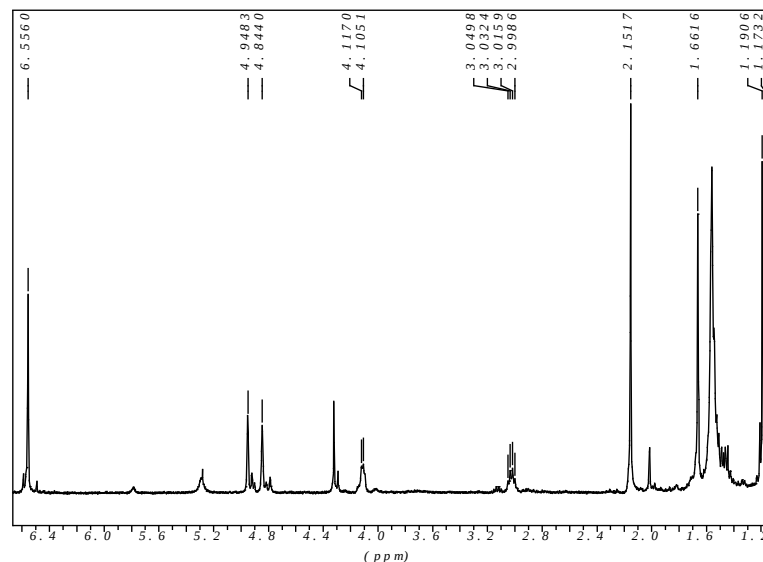
Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRFABMS) παρουσίασε μοριακό ιόν $[\text{M}]^+$ σε m/z 250.1581 (θεωρητικό MB: 250.1569). Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.83), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 250 $[\text{M}]^+$.

Abundance

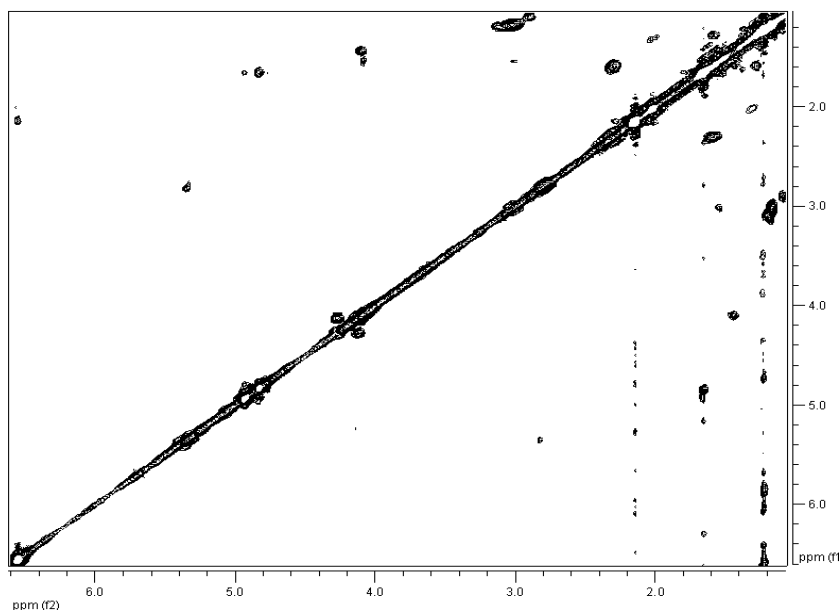


Εικ. 4.83 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **18**

Το φάσμα ^1H -NMR του μεταβολίτη **18** (Εικ. 4.84) ομοιάζει με τα φάσματα των μεταβολιτών **13** και **14**. Η διαφορά έγκειται στην αρωματική περιοχή, όπου στον μεταβολίτη **18**, εμφανίζονται τα σήματα δύο αρωματικών πρωτονίων, χωρίς σύζευξη μεταξύ τους, και όχι τριών πρωτονίων, όπως στην περίπτωση του μεταβολίτη **13**.



Εικ. 4.84 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **18**



Εικ. 4.85 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **18**

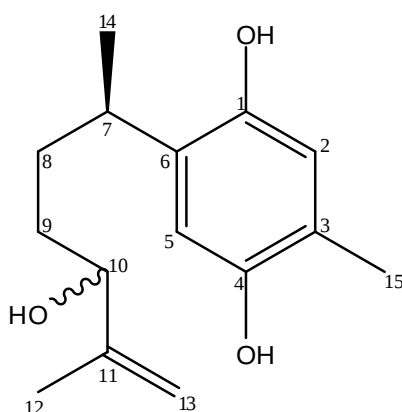
Τα πειράματα COSY (Εικ. 4.85), HMBC (Εικ. 4.87) και HMQC (Εικ. 4.86) βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και στον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο. Οι συζεύξεις του αρωματικού πρωτονίου H-2 (δ 6.55) με τον C-4 (δ 147.2) και του αρωματικού πρωτονίου H-5 (δ 6.5) με τον C-1 (δ 146.8), στο φάσμα HMBC, υπέδειξε ότι ο αρωματικός δακτύλιος φέρει δύο υδροξύλια.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και τη βιβλιογραφική αναζήτηση, ο μεταβολίτης **18** ταυτοποιήθηκε ως **4-υδροξυ-αμπολένιο** και πρόκειται για νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.19.

Πίνακας 4.19 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **18** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	146.8	-	-
2	6.55 (1H, s)	118.1	H-15	C-4, C-6, C-15
3	-	121.9	-	-
4	-	147.2	-	-
5	6.55 (1H, s)	113.2	-	C-1, C-3, C-7
6	-	131.5	-	-
7	3.02 (1H, m)	32.6	H-14, H-8	-
8	1.56 (1H, m)	34.0	H-9b	-
9	a 1.56 (1H, m) b 1.48 (1H, m)	34.0	H-10, H-9b H-10, H-9a, H-8	C-7 C-7
10	4.09 (1H, m)	76.0	H-9a, H-8b	-
11	-	147.7	-	-
12	1.66 (3H, s)	18.0	H-13a, H-13b	C-10, C-11, C-13
13	a 4.94 (1H, d, J=0.7) b 4.83 (1H, s)	110.8	H-12, H-13a H-12, H-13b	C-10, C-12 C-10, C-12
14	1.18 (3H, d, J=7.0)	21.8	H-7	C-6, C-7
15	2.15 (3H, s)	15.4	H-2	C-2, C-3, C-4

Ο μεταβολίτης **19** (0.6 mg) απομονώθηκε με τη μορφή άχρωμου ελαιώδους υπολείμματος.

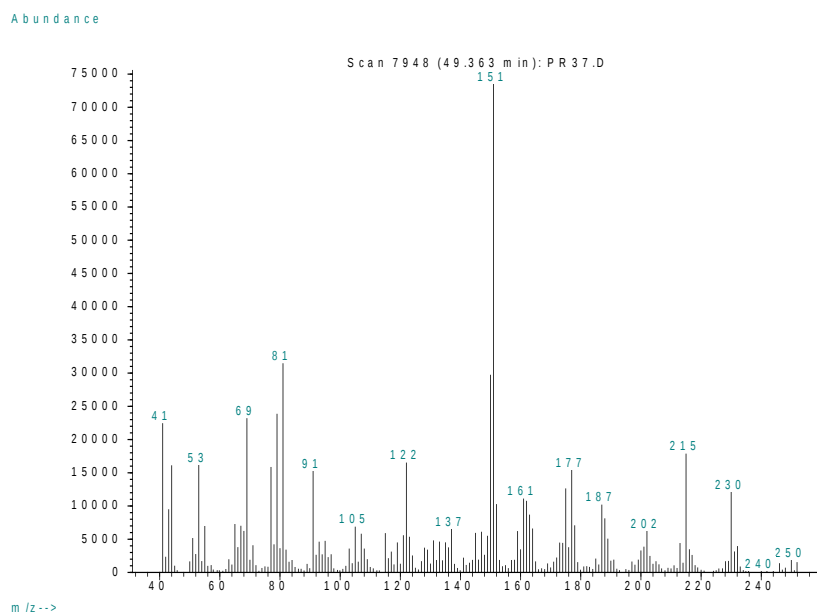


[α]_D = +12.0 (c 0.025, CHCl₃)

UV λ_{max} (CHCl₃) (log ε) 256 (3.26), 295 (3.02) (nm)

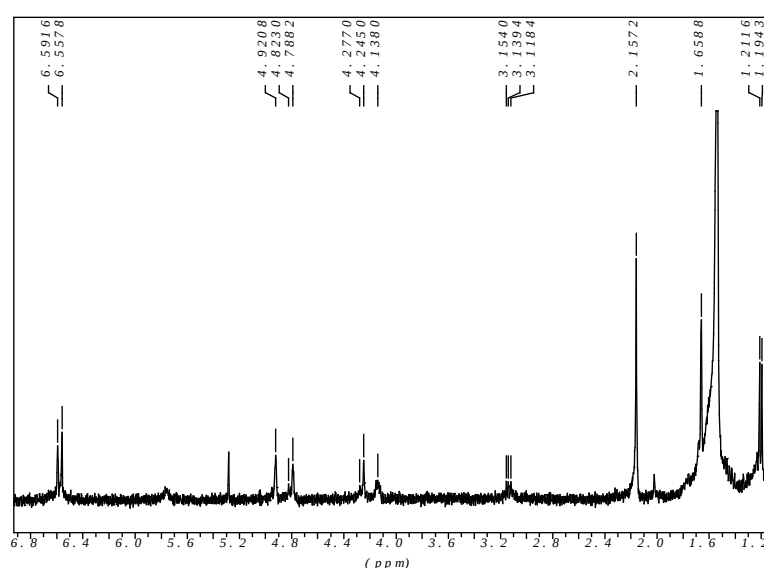
IR (film) ν_{max} 3406 (broad), 2965, 1652, 1446, 1259, 1089, 1021, 797 cm⁻¹

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRFABMS) παρουσίασε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 250.1578 (θεωρητικό MB: 250.1569). Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.88), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 250 $[M]^+$.

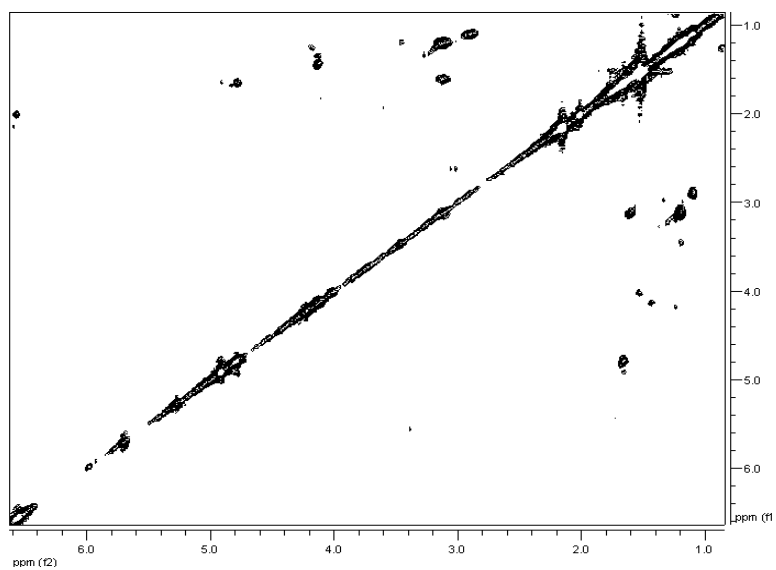


Εικ. 4.88 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **19**

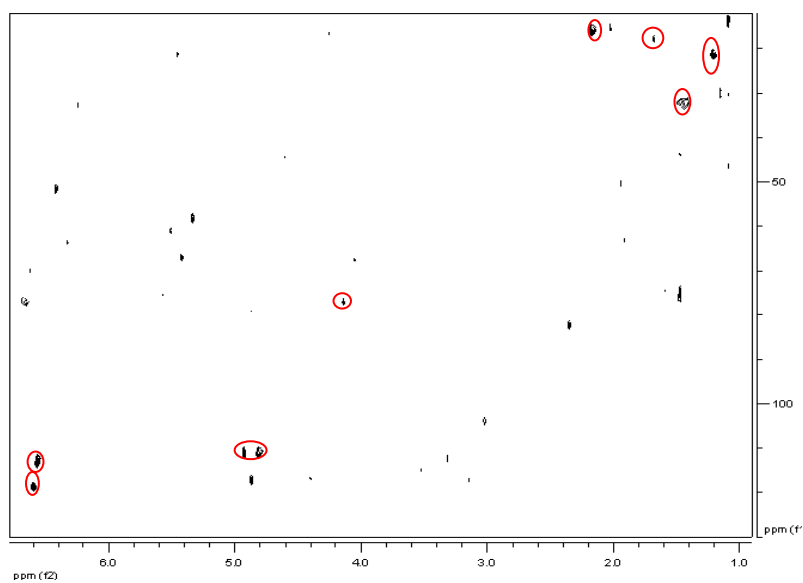
Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 4.89) είναι παρόμοιο με αυτό του μεταβολίτη **18**, καθώς και οι συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στα πειράματα COSY (Εικ. 4.90), HMQC (Εικ. 4.91) και HMBC (Εικ. 4.92). Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι οι μεταβολίτες **18** και **19** αποτελούν ισομερή και συγκεκριμένα επιμερή στον C-10. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταβολίτης **19** ταυτοποιήθηκε, επίσης, ως νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.20.



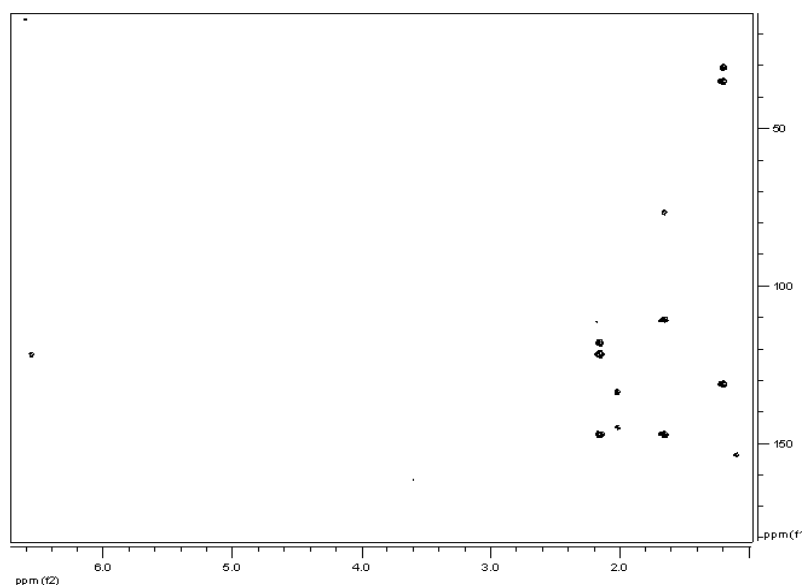
Εικ. 4.89 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του μεταβολίτη **19**



Εικ. 4.90 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **19**



Εικ. 4.91 Φάσμα HSQC (CDCl_3) του μεταβολίτη **19**



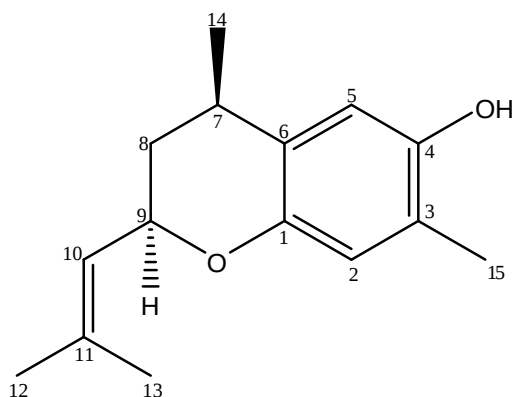
Εικ. 4.92 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **19**

Πίνακας 4.20 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **19** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	148.4	-	-
2	6.59 (1H, s)	118.3	H-15	C-6
3	-	121.6	-	-
4	-	147.3	-	-
5	6.56 (1H, s)	112.8	-	C-1
6	-	131.2	-	-
7	3.14 (1H, m)	30.7	H-14, H-8	-
8	1.63 (2H, m)	34.9	H-9b, H-7	-
9	a 1.78 (1H, m) b 1.45 (1H, m)	31.8	H-10 H-10, H-8	- -
10	4.14 (1H, m)	77.3	H-9a, H-9b	-
11	-	147.6	-	-
12	1.66 (3H, s)	18.0	H-13a, H-13b	C-10, C-11, C-13
13	a 4.92 (1H, s) b 4.79 (1H, s)	110.6	H-12, H-13a H-12, H-13b	C-10 -
14	1.20 (3H, d, J=7.0)	20.8	H-7	C-6, C-7, C-8
15	2.16 (3H, s)	15.8	H-2	C-2, C-3, C-4

4.2.18 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 20*Νέο φυσικό προϊόν*

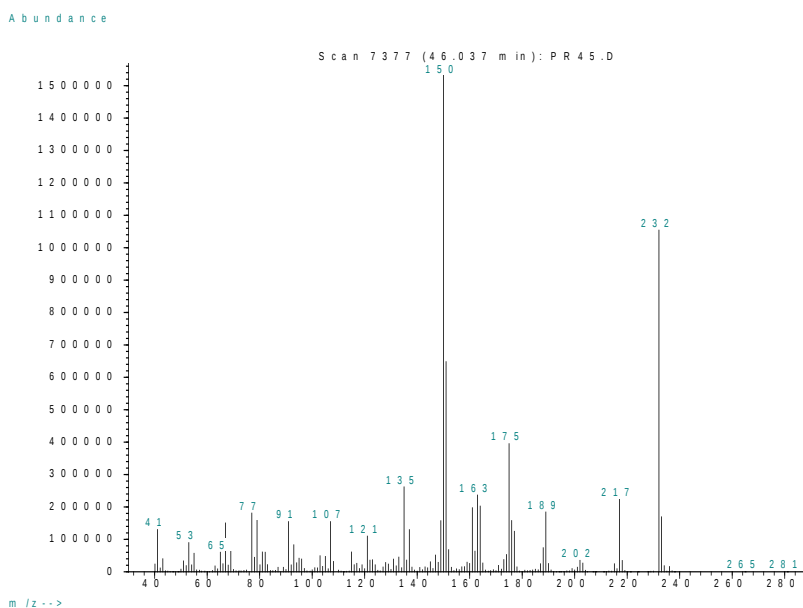
Ο μεταβολίτης **20** (1.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.


 $[\alpha]_D = -30.4$ (c 0.125, CHCl_3)

 $\text{UV } \lambda_{\text{max}} (\text{CHCl}_3) (\log \epsilon) 246 (3.20), 296 (3.20) (\text{nm})$
 $\text{IR (film)} \nu_{\text{max}} 3400 (\text{broad}), 2926, 1654, 1495, 1419, 1376, 1192, 1017, 872 \text{ cm}^{-1}$

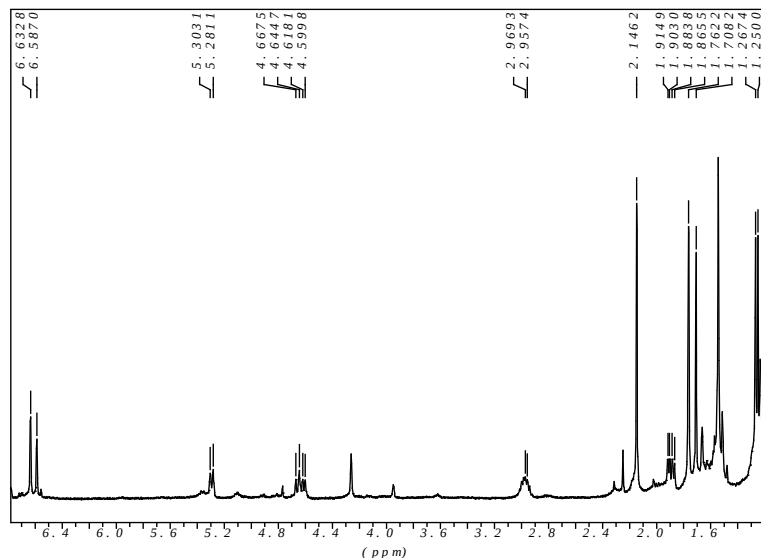
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **20** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRESIMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ σε m/z 233.1538 (θεωρητικό MB: 233.1547), ενώ στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.93) το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 232 $[\text{M}]^+$.

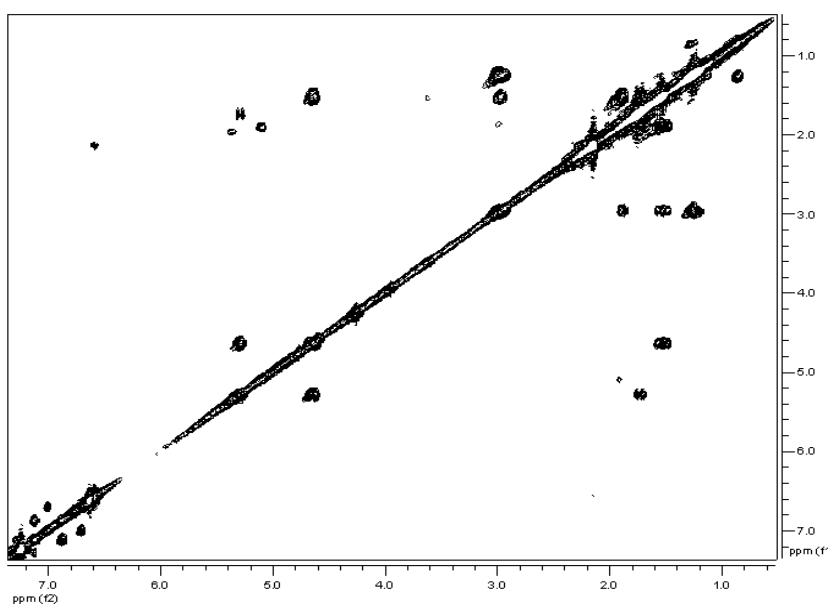


Εικ. 4.93 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **20**

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.94) είναι παρόμοιο με αυτό του μεταβολίτη **9**. Η βασική διαφορά παρατηρείται στον αρωματικό δακτύλιο των δύο μορίων. Το παρόν μόριο στερείται ενός αρωματικού πρωτονίου (έχει δύο αρωματικά πρωτόνια που δεν παρουσιάζουν σύζευξη μεταξύ τους).

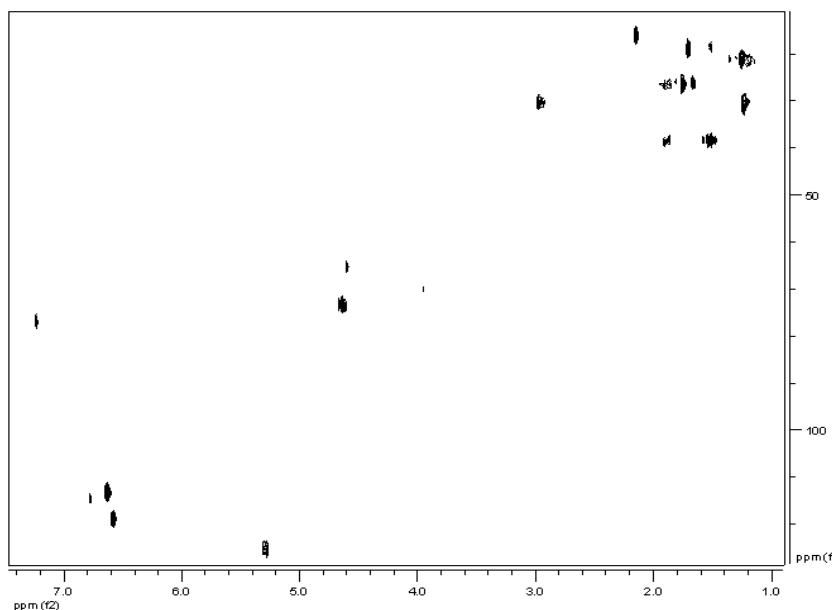


Εικ. 4.94 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **20**



Εικ. 4.95 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **20**

Η γέφυρα οξυγόνου δεν θα μπορούσε να υπάρχει μεταξύ των C-9 και C-4, όπως αποδεικνύουν χαρακτηριστικές συζεύξεις στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.97). Επιπρόσθετα, με βάση πειράματα μοριακής προσομοίωσης, στην τελευταία περίπτωση, η δομή δεν ευνοείται ενεργειακά.

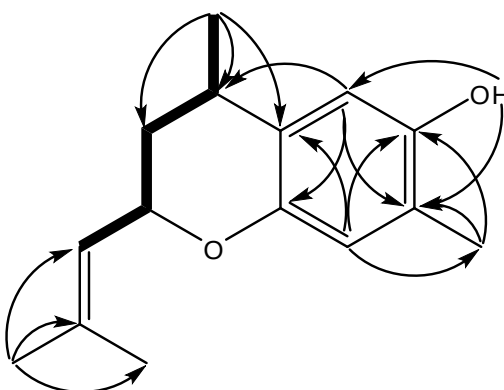


Εικ. 4.96 Φάσμα ΗΜQC (CDCl₃) του μεταβολίτη **20**

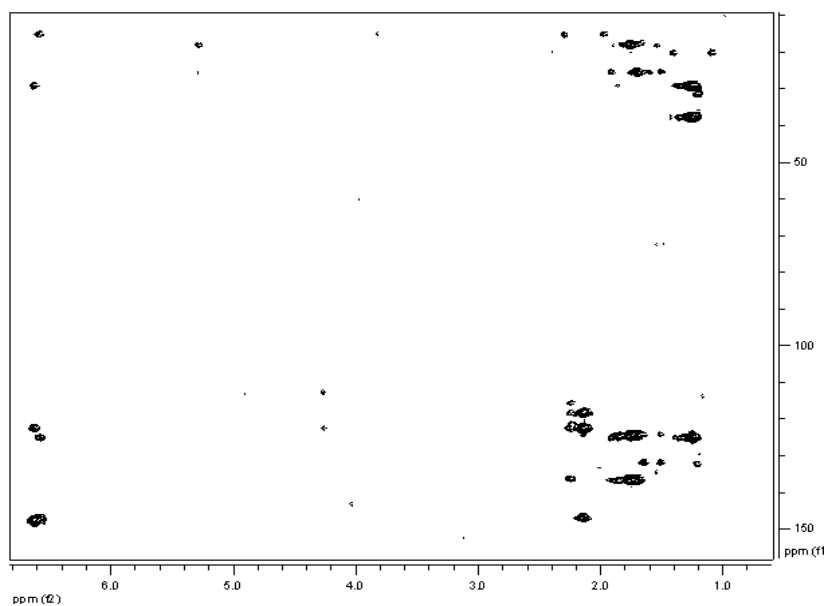
Στο φάσμα ΗΜΒC, το αρωματικό μεθύλιο παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-2 (118.9 ppm), τον τεταρτοταγή C-3 (123.2 ppm), όπως και με τον C-4 (147.6 ppm). Το αρωματικό πρωτόνιο H-2 συσχετίζεται με τους C-4, C-6 (125.6 ppm) και C-15 (16.1 ppm), ενώ το αρωματικό πρωτόνιο H-5 συσχετίζεται με τους C-1 (148.5 ppm), C-3 και C-7 (30.1 ppm). Το πρωτόνιο του OH-4 συσχετίζεται με τους C-3 και C-5.

Στην πλευρική αλυσίδα του σεσκιτερπενίου, τα πρωτόνια του Me-14 συσχετίζονται με τους C-6, C-7 και C-8 (38.3 ppm), ενώ τα πρωτόνια των βινυλικών μεθυλίων συσχετίζονται με τους C-10 (125.4 ppm) και C-11 (137.5 ppm).

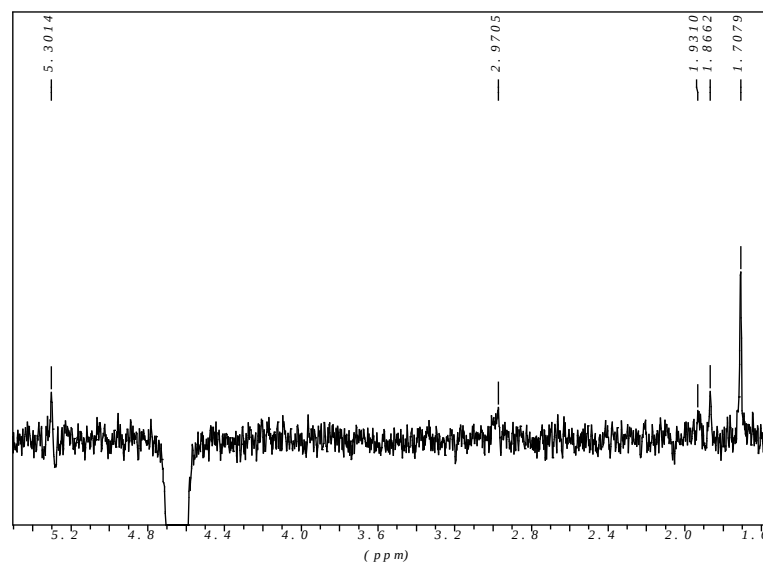
Λαμβάνοντας υπ' όψιν το βαθμό ακορεστότητας της ένωσης, δηλαδή την αναγκαιότητα ύπαρξης ενός επιπλέον δακτυλίου στο μόριο, προκύπτει η παρουσία γέφυρας οξυγόνου μεταξύ των C-1 και C-9.



Σχήμα 4.8 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις ΗΜΒC του μεταβολίτη **20**



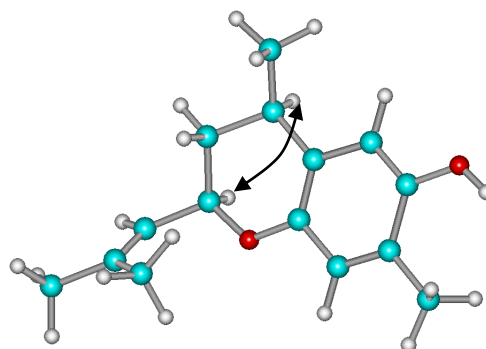
Εικ. 4.97 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **20**



Εικ. 4.98 Φάσμα 1D NOE (CDCl_3) του μεταβολίτη **20**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H-9

Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των δύο ασύμμετρων κέντρων βασίστηκε σε πειράματα 1D NOE (Εικ. 4.98). Η συσχέτιση των πρωτονίων H-7/H-9 καθόρισε τη σχετική στεreoχημεία στους άνθρακες C-7 και C-9.

Με βάση τα παραπάνω φασματοσκοπικά δεδομένα, ο μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως **1,9(*R**)-εποξυ-4-υδροξυ- α -κουρκουμένιο** και με βάση τη βιβλιογραφική αναζήτηση είναι νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.21.



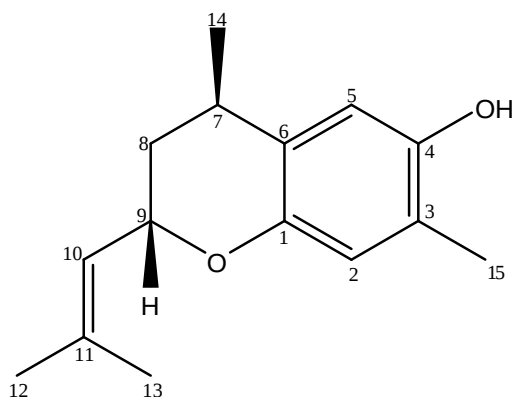
Πίνακας 4.21 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **20** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC	1D NOE
1	-	148.5	-	-	-
2	6.59 (1H, s)	118.9	H-15	C-4, C-6, C-15	-
3	-	123.2	-	-	-
4	-	147.6	-	-	-
5	6.63 (1H, s)	113.5	-	C-1, C-3, C-7	-
6	-	125.6	-	-	-
7	2.97 (1H, m)	30.1	H-8a, H-8b, H-14	-	H-9
8	a 1.89 (1H, ddd, J=13.9, 6.2, 1.5) b 1.54 (1H, m)	38.3	H-7, H-8b H-7, H-8a, H-9	- -	H-9 -
9	4.64 (1H, m)	73.3	H-8b, H-10	-	H-7, H-8a, H-10, H-13
10	5.29 (1H, d, J=8.8)	125.4	H-10, H-12, H-13	C-13	H-9
11	-	137.5	-	-	-
12	1.76 (3H, s)	26.4	-	C-10, C-11, C-13	-
13	1.71 (3H, s)	19.0	-	C-10, C-11, C-12	H-9
14	1.26 (3H, d, J=7.0)	21.1	H-7	C-6, C-7, C-8	-
15	2.15 (3H, s)	16.1	H-2	C-2, C-3, C-4	-
OH	4.26 (H, brs)	-	-	C-3, C-5	-

4.2.19 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 21

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **21** (1.5 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



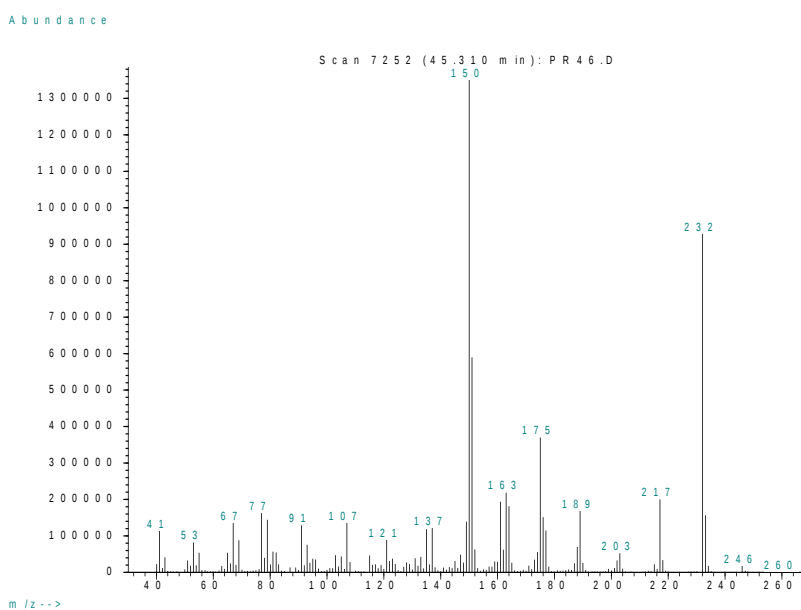
$[\alpha]_D = +12.8$ (c 0.125, CHCl_3)

UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 254 (3.22), 297 (3.15) (nm)

IR (film) ν_{max} 3400 (broad), 2926, 1654, 1495, 1419, 1376, 1192, 1017, 872 cm^{-1}

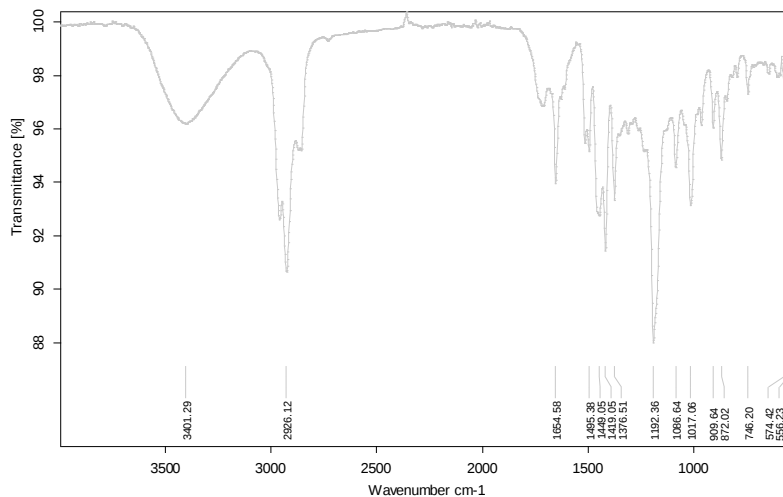
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **21** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRESIMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ σε m/z 233.1542 (θεωρητικό MB: 233.1547), ενώ στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.99) το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 232 $[\text{M}]^+$.



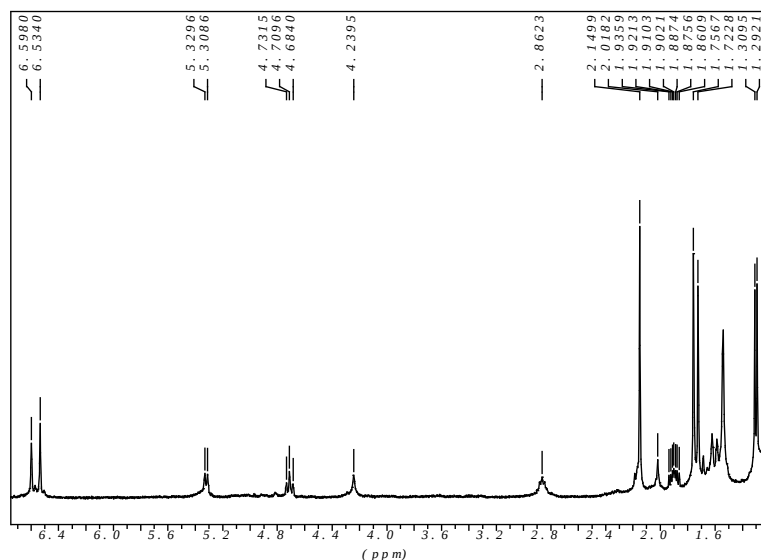
Εικ. 4.99 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **21**

Η ταινία απορρόφησης στα 1017 cm^{-1} στο φάσμα IR (Εικ. 4.100) υπέδειξε την παρουσία αιθερικού δεσμού, ενώ οι απορροφήσεις σε $\nu_{\max}$ 3400 cm^{-1} υποδηλώνουν την παρουσία υδροξυλικής ομάδας στο μόριο.

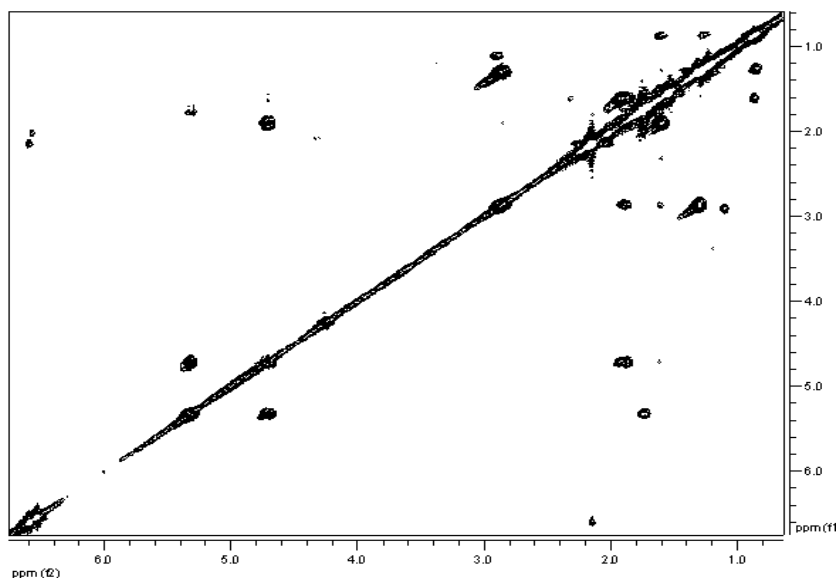


Εικ. 4.100 Φάσμα IR του μεταβολίτη **21**

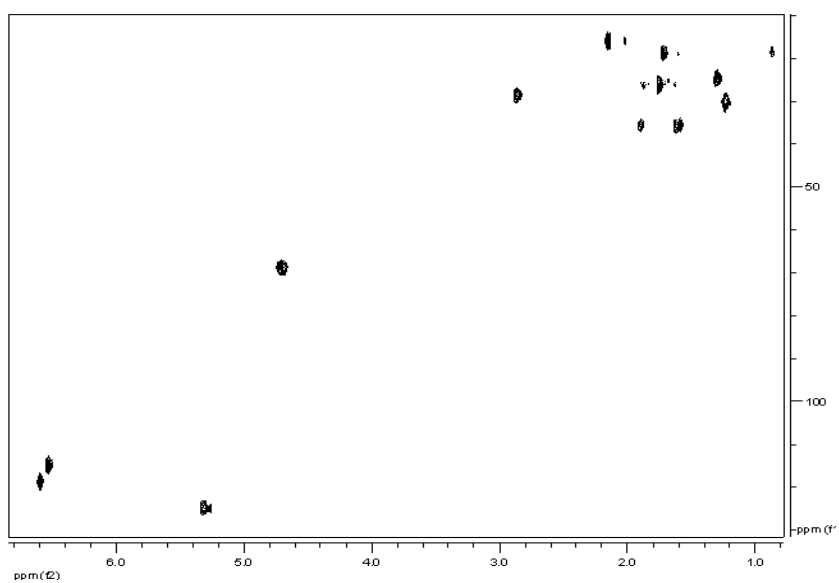
Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 4.101) είναι παρόμοιο με αυτό του μεταβολίτη **20**, όπως και οι συσχετίσεις που παρατηρούνται στα δισδιάστατα πειράματα COSY (Εικ. 4.102), HMQC (Εικ. 4.103) και HMBC (Εικ. 4.104). Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι οι μεταβολίτες **20** και **21** είναι ισομερή και συγκεκριμένα επιμερή στον C-9.



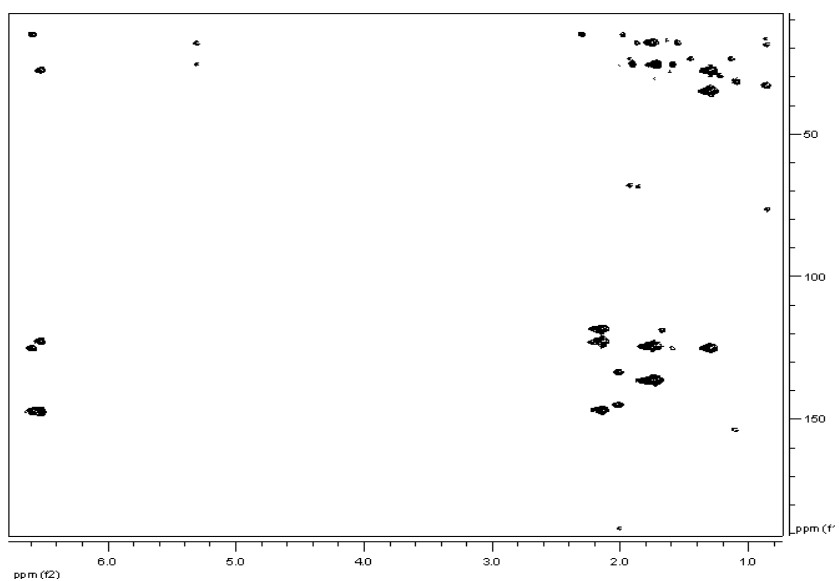
Εικ. 4.101 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του μεταβολίτη **21**



Εικ. 4.102 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **21**

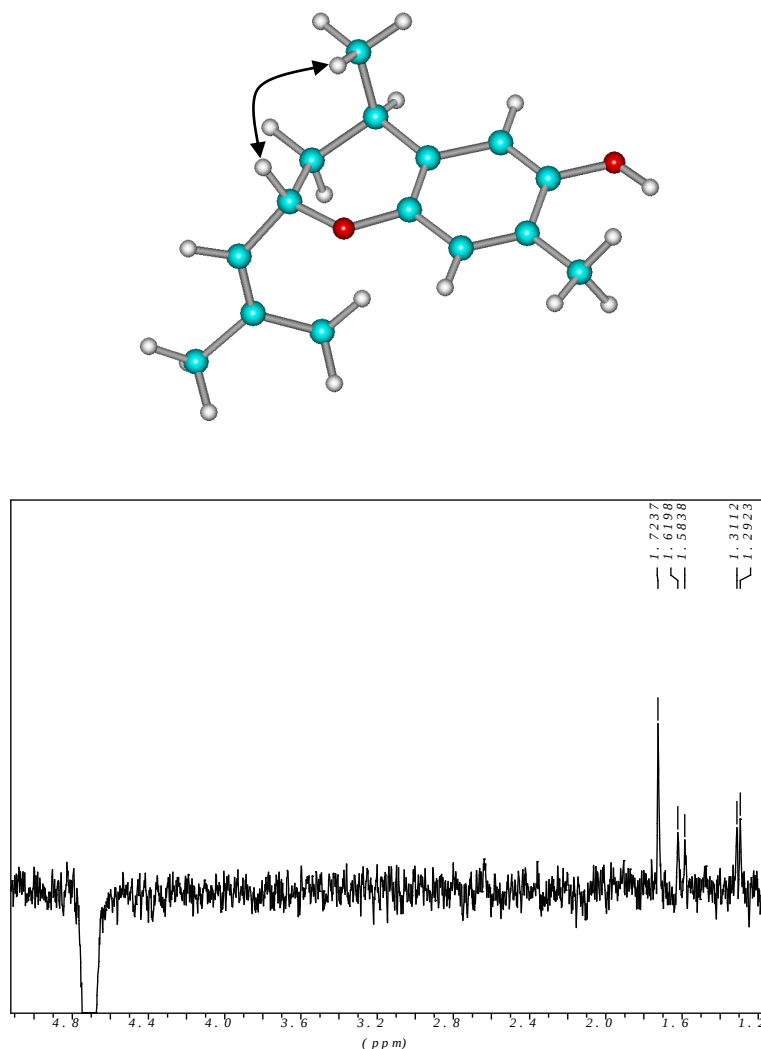


Εικ. 4.103 Φάσμα ΗΜQC (CDCl_3) του μεταβολίτη **21**



Εικ. 4.104 Φάσμα ΗΜΒC (CDCl_3) του μεταβολίτη **21**

Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των δύο ασύμμετρων κέντρων βασίστηκε σε πειράματα 1D NOE (Εικ. 4.105). Η συσχέτιση των πρωτονίων H-14/H-9 καθόρισε τη σχετική στεreoχημεία στους άνθρακες C-7 και C-9.



Εικ. 4.105 Φάσμα 1D NOE (CDCl_3) του μεταβολίτη **21**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H-9

Με βάση τα παραπάνω φασματοσκοπικά δεδομένα, ο μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως **1,9(*S**)-εποξυ-4-υδροξυ-α-κουρκουμένιο** και με βάση τη βιβλιογραφική αναζήτηση είναι νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.22.

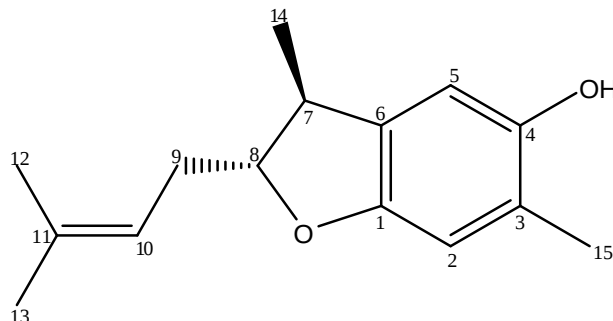
Πίνακας 4.22 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **21** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC	1D NOE
1	-	148.4	-	-	-
2	6.60 (1H, s)	119.2	H-15	C-4, C-6, C-15	-
3	-	123.4	-	-	-
4	-	147.3	-	-	-
5	6.53 (1H, s)	115.1	-	C-1, C-3, C-7	-
6	-	125.5	-	-	-
7	2.86 (1H, m)	28.7	H-14, H-8a, H-8b	-	-
8	a 1.90 (1H, ddd, J=16.2, 10.2, 5.9) b 1.62 (1H, ddd, J=13.7, 2.2, 2.2)	36.0	H-9, H-7, H-8b H-9, H-7, H-8a	- C-6	- H-9
9	4.71 (1H, brt, J=8.3)	69.2	H-8a, H-8b, H-10	-	H-13, H-8b, H-14
10	5.32 (1H, brd, J=8.3)	124.9	H-10, H-12, H-13	C-12, C-13	-
11	-	137.0	-	-	-
12	1.76 (3H, s)	26.3	-	C-13, C-10, C-11	-
13	1.72 (3H, s)	18.9	-	C-12, C-10, C-11	H-9
14	1.31 (3H, d, J=7.0)	24.7	H-7	C-6, C-7, C-8	H-9
15	2.15 (3H, s)	16.0	H-2	C-2, C-3, C-4	-
OH	4.24 (H, brs)	-	-	-	-

4.2.20 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 22

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **22** (2.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



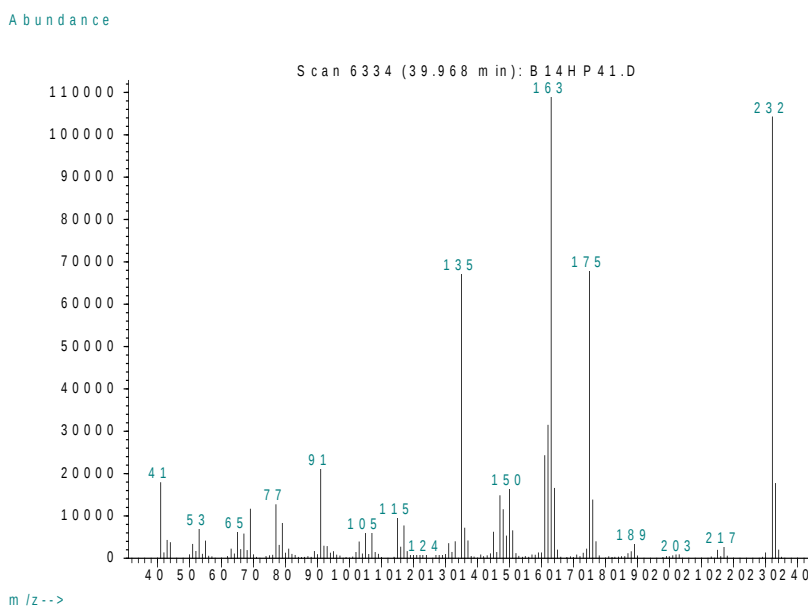
$[\alpha]_D = -21.4$ (c 0.019, CHCl_3)

UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 265 (3.29), 301 (3.43) (nm)

IR (film) ν_{max} 3418, 2911, 2357, 2225, 1650, 1169, 861 cm^{-1}

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **22** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

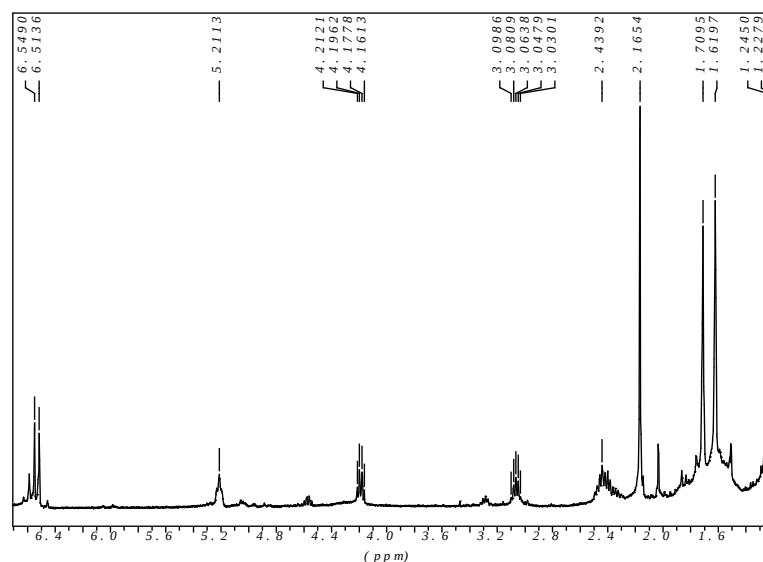
Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRFABMS) παρουσίασε μοριακό ιόν $[\text{M}]^+$ σε m/z 232.1453 (θεωρητικό MB: 232.1463).



Εικ. 4.106 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **22**

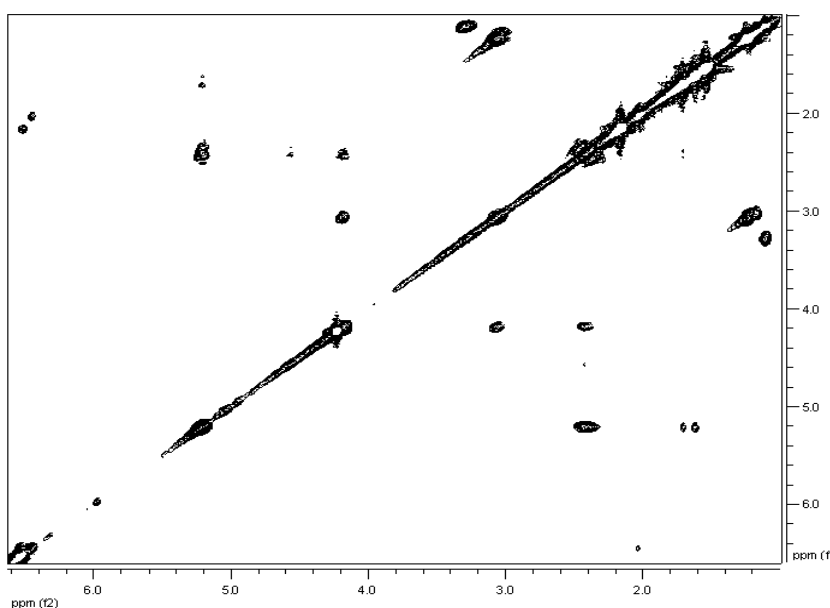
Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.107) εμφάνισε χαρακτηριστικά σήματα, τα οποία αντιστοιχούν σε δύο αρωματικά πρωτόνια σε δ 6.55 (1H, s) και δ 6.52 (1H, s), ένα ολεφινικό πρωτόνιο σε δ 5.21, πρωτόνιο σε οξυγονωμένο άνθρακα σε δ 4.19, ένα

μεθίνιο σε δ 3.06, ένα μεθυλένιο σε χαμηλά πεδία σε δ 2.44, ένα μεθύλιο σε αρωματικό δακτύλιο σε δ 2.17, δύο βινυλικά μεθύλια σε δ 1.62 (3H, s) και δ 1.71 (3H, s), ένα μεθύλιο σε τριτοταγή άνθρακα σε δ 1.24 (3H, d) και στο πρωτόνιο ενός υδροξυλίου σε δ 4.22 (το πρωτόνιο του δεν παρουσιάζει σύζευξη με άνθρακα στο φάσμα HSQC-DEPT, Εικ. 4.109).



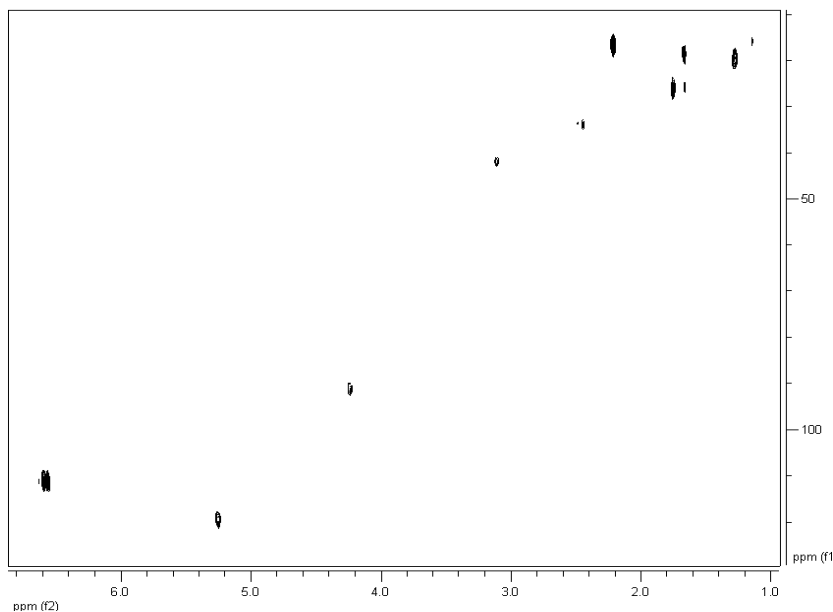
Εικ. 4.107 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **22**

Στο φάσμα COSY (Εικ. 4.108) φαίνονται οι συζεύξεις των πρωτονίων του αρωματικού μεθυλίου με το αρωματικό πρωτόνιο σε δ 6.52, του βενζυλικού H-7 με το μεθύλιο που εδρεύει στον ίδιο άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας του μορίου και με το μεθίνιο του οξυγονωμένου C-8, του H-8 με το H₂-9 και η σύζευξη του τελευταίου με το ολεφινικό πρωτόνιο της ισοπροπυλιδενικής ομάδας του μορίου.



Εικ. 4.108 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **22**

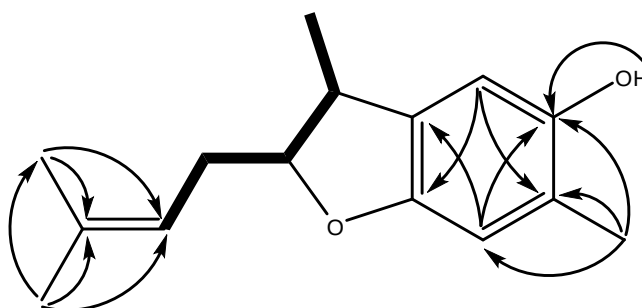
Η ύπαρξη άνθρακα στα 90.6 ppm σε συνδυασμό με την πολλαπλή κορυφή στο φάσμα ^1H -NMR στα 4.19 ppm επιβεβαιώνει την παρουσία οξυγονωμένου μεθινίου.



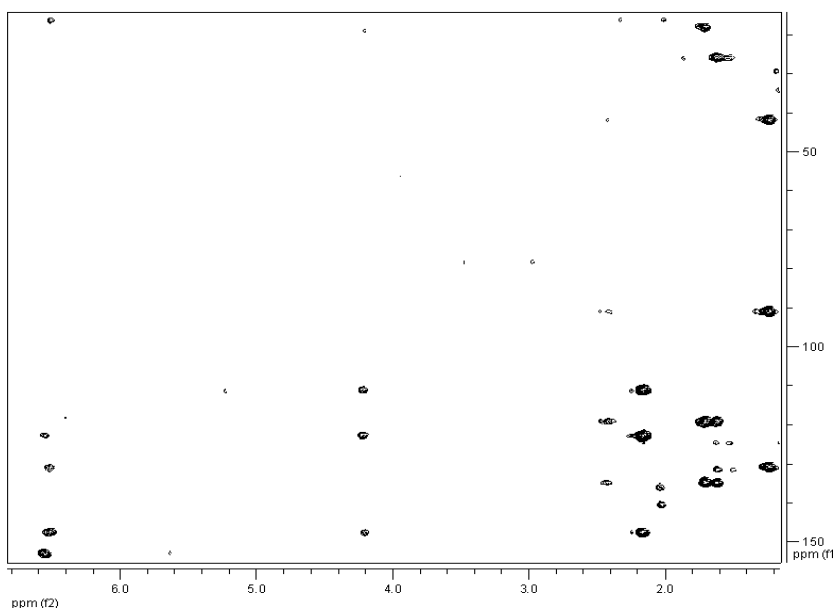
Εικ. 4.109 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **22**

Στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.110), το αρωματικό μεθύλιο παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-4 στα 147.6 ppm, τον τεταρτοταγή C-3 στα 122.6 ppm, όπως και με τον C-2 στα 111.4 ppm. Το πρωτόνιο H-2 συσχετίζεται με τον τεταρτοταγή C-6 του δακτυλίου, τον C-4 και τον C-15 στα 16.8 ppm. Το άλλο αρωματικό πρωτόνιο στα 6.55 ppm (H-5) παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-1 (τον δεύτερο οξυγονωμένο άνθρακα του δακτυλίου στα 153.1 ppm) και τον C-3. Επίσης, το πρωτόνιο του υδροξυλίου του αρωματικού δακτυλίου συσχετίζεται με τον C-3, τον C-4 και τον C-5.

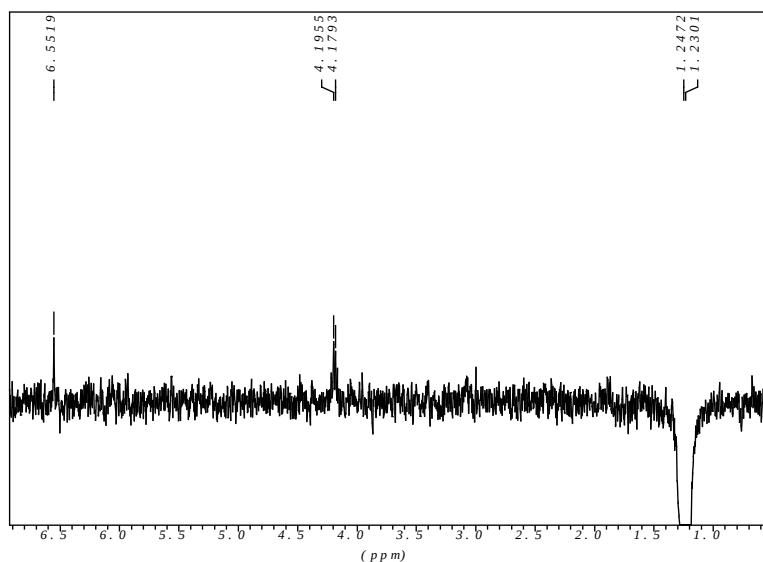
Λαμβάνοντας υπ' όψιν το βαθμό ακορεστότητας της ένωσης, δηλαδή την αναγκαιότητα ύπαρξης ενός επιπλέον δακτυλίου στο μόριο, προκύπτει η παρουσία γέφυρας οξυγόνου μεταξύ των C-1 και C-8.



Σχήμα 4.9 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **22**



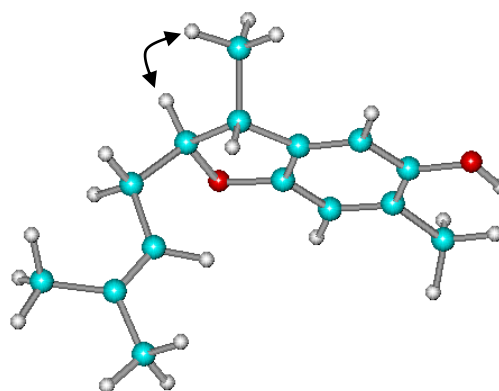
Εικ. 4.110 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **22**



Εικ. 4.111 Φάσμα 1D NOE (CDCl_3) του μεταβολίτη **22**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο $\text{H}_3\text{-14}$

Η απόδοση της σχετικής στερεοχημείας των δύο ασύμμετρων κέντρων βασίστηκε σε πειράματα 1D NOE (Εικ. 4.111). Η συσχέτιση των πρωτονίων H-14/H-8 καθόρισε τη σχετική στερεοχημεία στους άνθρακες C-7 και C-8 ως $7R^*, 9S^*$.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και τη βιβλιογραφική αναζήτηση, ο μεταβολίτης **22** ταυτοποιήθηκε ως νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.23.

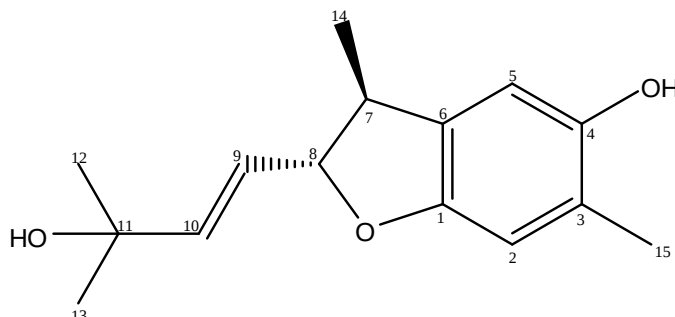


Πίνακας 4.23 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **22** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC	1D NOE
1	-	153.1	-	-	-
2	6.52 (1H, s)	111.4	H-15	C-4, C-6, C-15	-
3	-	122.6	-	-	-
4	-	147.6	-	-	-
5	6.55 (1H, s)	111.4	-	C-1, C-3	H-14
6	-	130.9	-	-	-
7	3.06 (1H, qd, J=6.9, 6.9)	42.0	H-8, H-14	-	-
8	4.19 (1H, ddd, J=6.9, 6.9, 6.9)	91.4	H-7, H-9	-	H-14
9	2.44 (2H, m)	33.9	H-8, H-10	C-8, C-10, C-11	-
10	5.22 (1H, m)	119.7	H-9, H-12, H-13	-	-
11	-	134.6	-	-	-
12	1.62 (3H, brs)	18.8	H-10	C-13, C-10, C-11	-
13	1.71 (3H, brs)	26.3	H-10	C-12, C-10, C-11	-
14	1.24 (3H, d, J=6.9)	19.9	H-7	C-6, C-7, C-8	H-5, H-8
15	2.17 (3H, s)	16.8	H-2	C-2, C-3, C-4	-
OH	4.22 (1H, brs)	-	-	C-3, C-4, C-5	-

4.2.21 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 23

Ο μεταβολίτης **23** (1.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



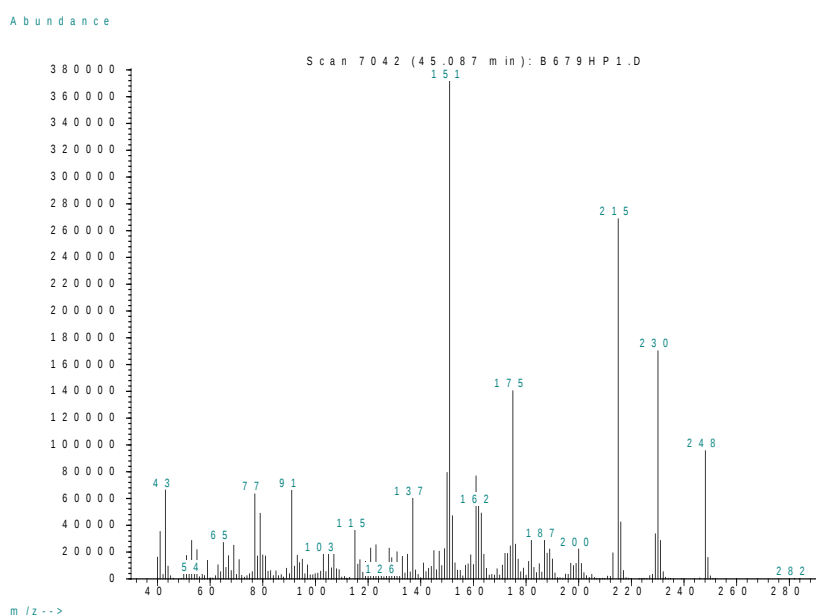
$[\alpha]_D = -3.6^\circ$ (c 0.083, CHCl_3)

UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 252 (3.27), 296 (3.27) (nm)

IR (film) ν_{max} 3221 (broad), 2967, 2357, 2207, 1689, 1183 cm^{-1}

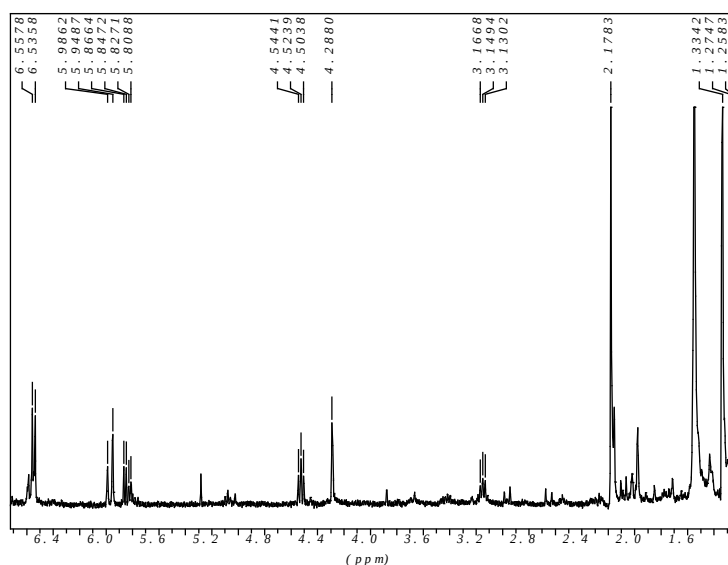
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **23** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.112), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 248 $[\text{M}]^+$.



Εικ. 4.112 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **23**

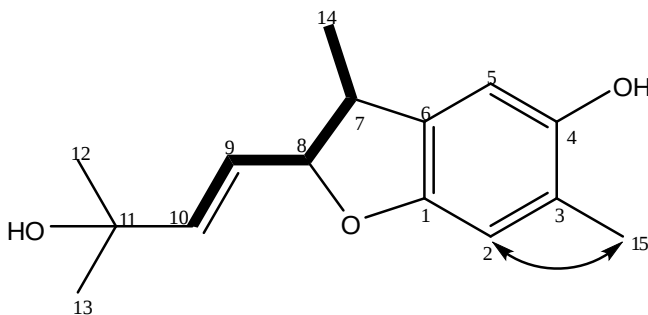
Στο φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.113) εμφανίζεται το μεθύλιο στο βενζυλικό μεθίνιο (δ 1.27, 3H, d; δ 3.15, 1H, m), δύο αρωματικά πρωτόνια (δ 6.56, s; δ 6.54, s) και ένα αρωματικό μεθύλιο (δ 2.18, s), που εμφανίζει σύζευξη με το γειτονικό αρωματικό πρωτόνιο στα 6.54 ppm. Επίσης, παρατηρούνται κορυφές για δύο μεθύλια σε οξυγονωμένο άνθρακα (δ 1.34, s), ένα πρωτόνιο σε οξυγονωμένο άνθρακα (δ 4.53, t) και δύο ολεφινικά πρωτόνια (δ 5.99, d; δ 5.86, dd).



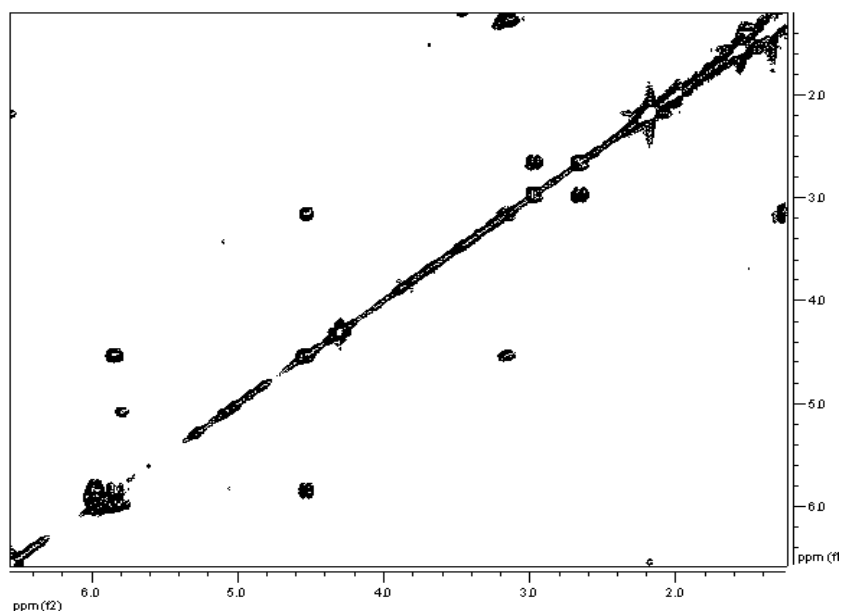
Εικ. 4.113 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του μεταβολίτη **23**

Λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία τεσσάρων διπλών δεσμών, το μόριο θα πρέπει να έχει τον αρωματικό και άλλον ένα δακτύλιο.

Στο φάσμα COSY (Εικ. 4.114) φαίνεται η σύζευξη του βενζυλικού H-7 με τα πρωτόνια H₃-14, αυτή του H-7 με το H-8 (δ 4.53) που βρίσκεται στον οξυγονωμένο άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας του μορίου, η σύζευξη του H-8 με το H-9 (δ 5.86) και αυτή του H-9 με το H-10 (δ 5.99).



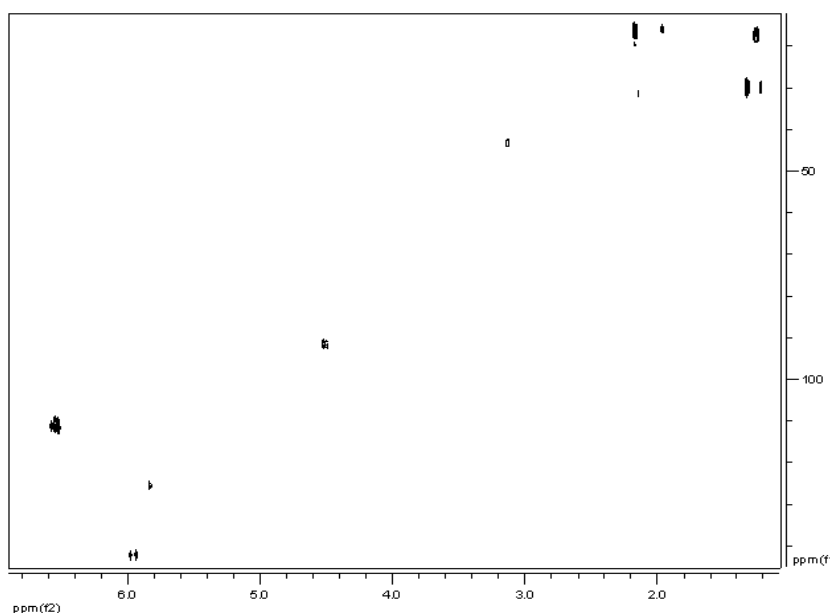
Σχήμα 4.10 Συζεύξεις COSY του μεταβολίτη **23**



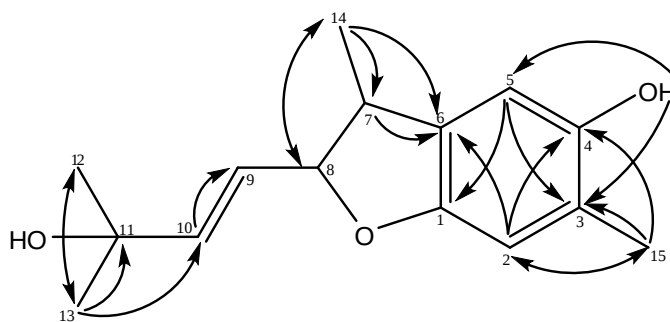
Εικ. 4.114 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **23**

Στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.116), τα πρωτόνια των αλειφατικών μεθυλίων παρουσιάζουν ισχυρές ετεροπυρηνικές συζεύξεις με τον C-11 στα 70.3 ppm και τον ολεφινικό C-10 στα 141.7 ppm. Το αρωματικό μεθύλιο παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-2 στα 111.0 ppm, τον C-3 στα 122.6 ppm και τον C-4 στα 147.5 ppm.

Η χαρακτηριστική μετατόπιση του C-8 στα 91.5 ppm, υποδεικνύει σύνδεση του οξυγόνου με αρωματικό πυρήνα, όπως και στην περίπτωση του μεταβολίτη **22**.

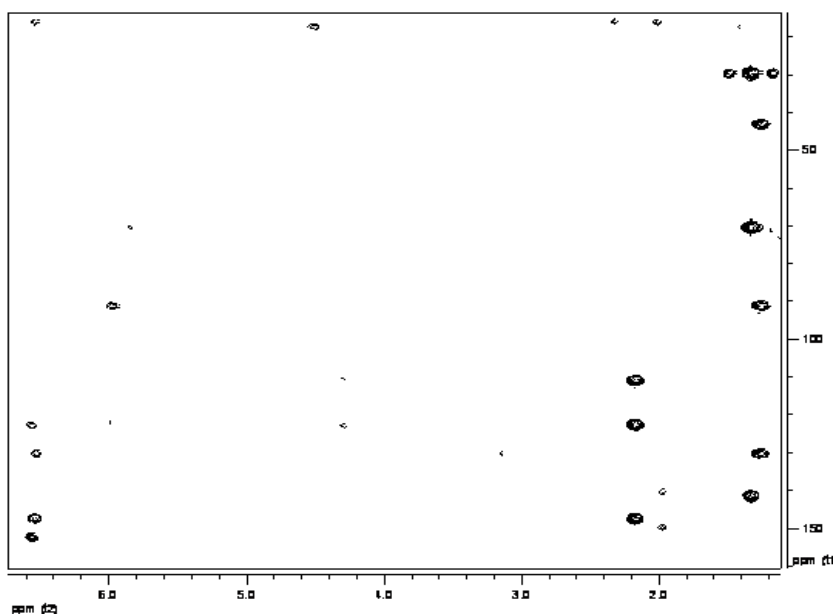


Εικ. 4.115 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **23**



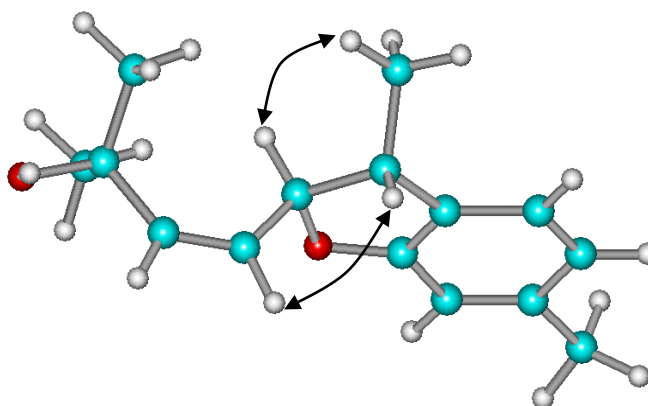
Σχήμα 4.11 Χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **23**

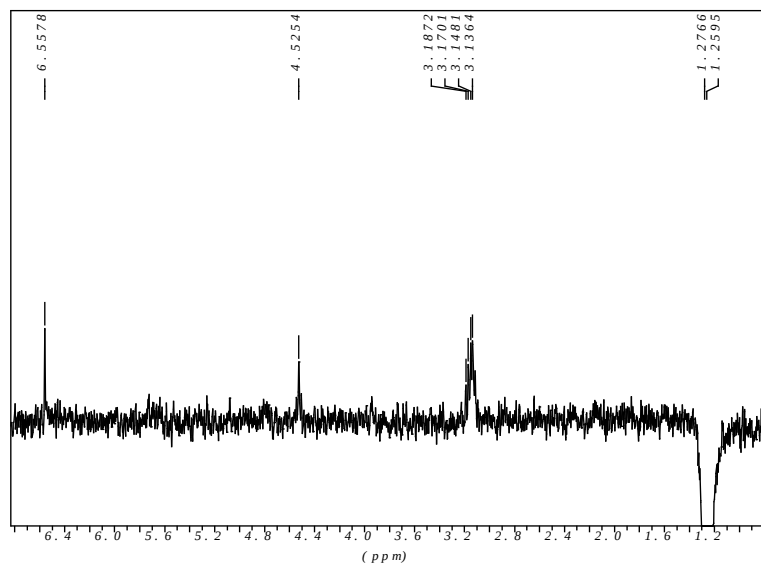
Οι συσχετίσεις του ευκίνητου πρωτονίου (-OH-4) με τους άνθρακες C-3 και C-5, επιβεβαιώνουν την παρουσία ελεύθερου υδροξυλίου στον C-4 και υποδεικνύουν το σχηματισμό δεύτερου δακτυλίου μέσω οξυγόνου μεταξύ των C-8 και C-1.



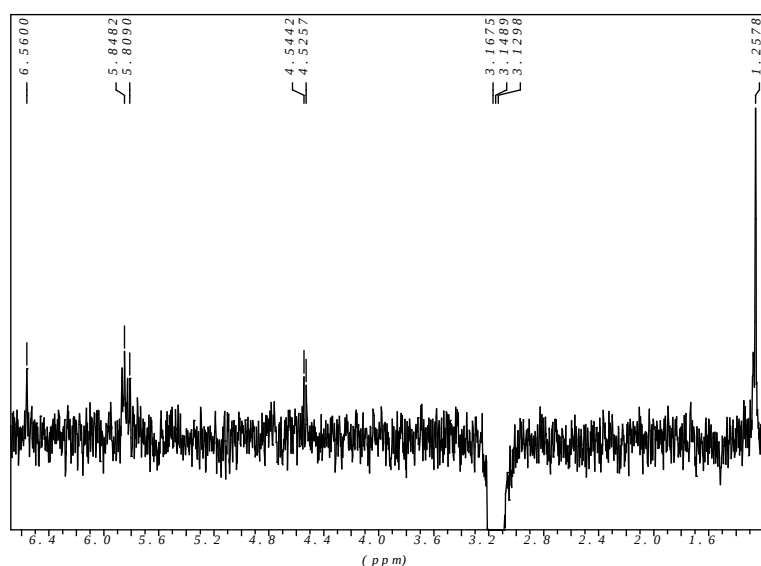
Εικ. 4.116 Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **23**

Η απόδοση της σχετικής στερεοχημείας των δύο ασύμμετρων κέντρων βασίστηκε σε πειράματα 1D NOE (Εικ. 4.117, 4.118). Οι συσχετίσεις των πρωτονίων H-14/H-8 και H-7/H-9 καθόρισαν τη σχετική στερεοχημεία στους άνθρακες C-7 και C-8 ως 7*R**,9*S**.





Εικ. 4.117 Φάσμα 1D NOE (CDCl₃) του μεταβολίτη **23**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H₃-14



Εικ. 4.118 Φάσμα 1D NOE (CDCl₃) του μεταβολίτη **23**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H-7

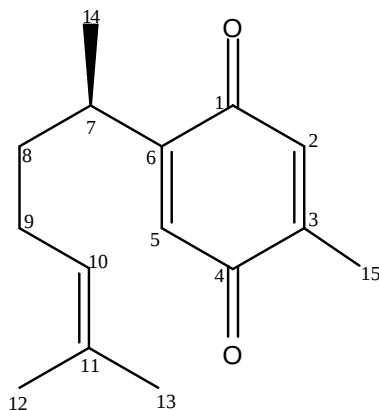
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταβολίτης **23** ταυτίστηκε με το γνωστό διϋδροβενζοφουράνιο **ηλιαννουόλη Η**, που έχει απομονωθεί στο παρελθόν από τα φύλλα του φυτού *Helianthus annuus* (Macias *et al*, 1999) και παρουσιάζει ισχυρή αλληλοχημική φυτοτοξικότητα. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **23** παρατίθενται στον Πίνακα 4.24.

Πίνακας 4.24 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **23** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC	1D NOE
1	-	152.4	-	-	-
2	6.54 (1H, s)	111.0	H-15	C-4, C-6, C-15	-
3	-	122.6	-	-	-
4	-	147.5	-	-	-
5	6.56 (1H, s)	111.0	-	C-1, C-3	H-7, H-14
6	-	130.1	-	-	-
7	3.15 (1H, m)	43.4	H-8, H-14	C-6	H-5, H-8, H-9
8	4.53 (1H, t, J=8.0)	91.5	H-7, H-9	C-14	H-7, H-14
9	5.86 (1H, dd, J=15.3, 8.0)	124.9	H-8, H-10	-	H-7
10	5.99 (1H, d, J=15.3)	141.7	H-9	C-8	-
11	-	70.3	-	-	-
12	1.34 (3H, s)	30.0	-	C-13, C-10, C-11	-
13	1.34 (3H, s)	30.0	-	C-12, C-10, C-11	-
14	1.27 (3H, d, J=6.9)	17.8	H-7	C-6, C-7, C-8	H-5, H-8
15	2.18 (3H, s)	16.5	H-2	C-2, C-3, C-4	-
OH	4.29 (1H, brs)	-	-	C-3, C-5	-

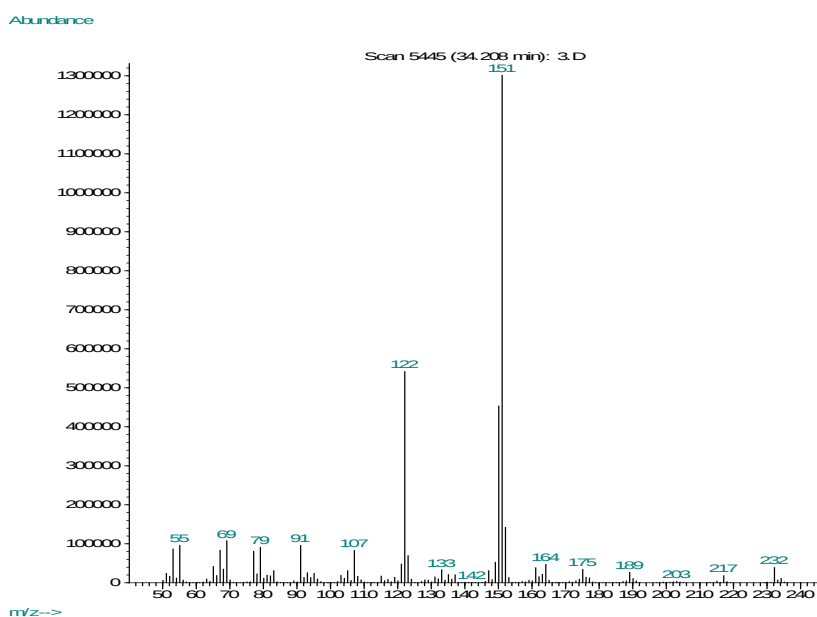
4.2.22 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 24

Ο μεταβολίτης **24** (60.0 mg), που απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος, ελέγχθηκε φασματοσκοπικά και η μελέτη των φασμάτων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το σεσκιτερπένιο (-)-κουρκουκινόνη.



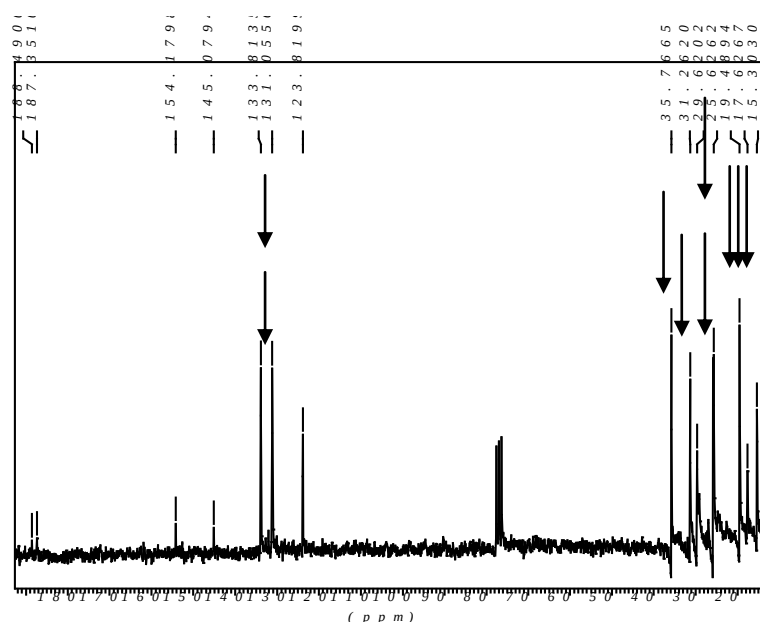
$[\alpha]_D = -5.45$ (c 0.073, CHCl_3)

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.119), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 232 $[\text{M}]^+$, που υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.



Εικ. 4.119 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **24**

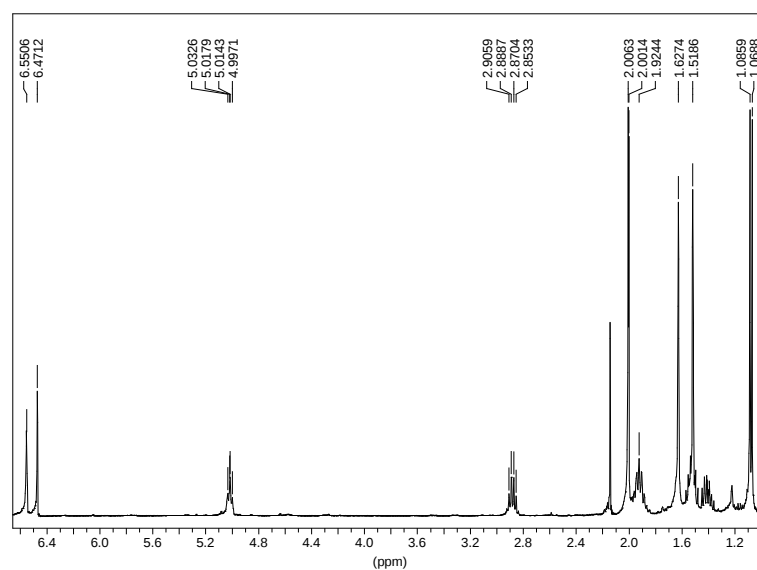
Από το φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.120), εμφανής είναι η ύπαρξη δύο καρβονυλίων στο μόριο. Τα 6 άτομα στην περιοχή των ολεφινικών/αρωματικών ανθράκων υποστηρίζουν την παρουσία τριών διπλών δεσμών. Εφόσον ο βαθμός ακορεστότητας είναι 6, το μόριο πρέπει να έχει έναν δακτύλιο.



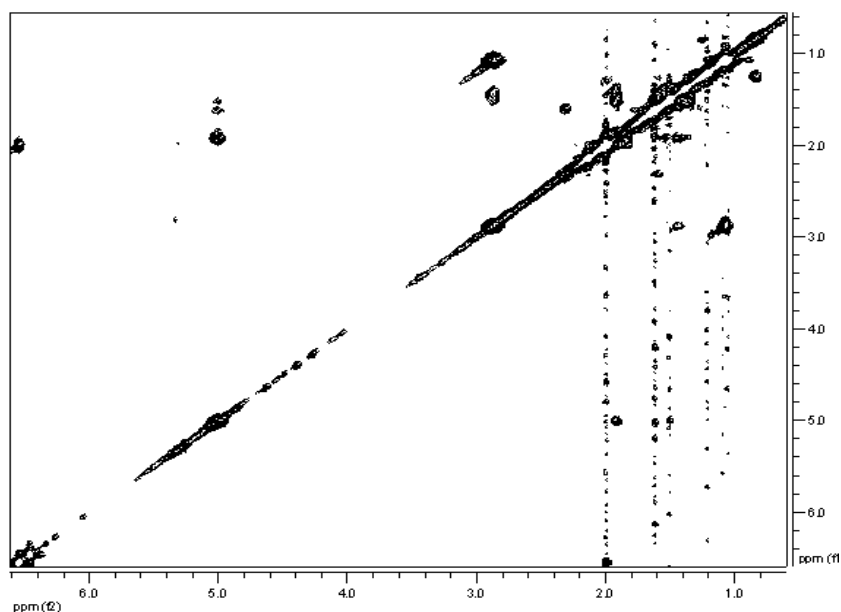
Εικ. 4.120 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **24**

Στο φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.121) της κουρκουκινόνης εμφανίζονται κορυφές χαρακτηριστικές για ισοπροπυλιδένιο (δ 5.01, 1H, dd; δ 1.62, 3H, s; δ 1.51, 3H, s), μεθύλιο στο βενζυλικό μεθίνο (δ 1.10, 3H, d; δ 2.9, 1H, m) και για δύο αρωματικά πρωτόνια (δ 6.47, s; δ 6.55, s). Παρατηρείται, επίσης, ένα αρωματικό μεθύλιο στα 2.00 ppm, που εμφανίζει σύζευξη με το γειτονικό αρωματικό πρωτόνιο στα 6.55 ppm (Εικ. 4.122).

Τα χαρακτηριστικά του φάσματος ^1H -NMR της κουρκουκινόνης είναι σε πλήρη αναλογία με αυτά της κουρκουϋδροκινόνης (μεταβολίτης **16**). Αξιοσημείωτη, η μετατόπιση των πρωτονίων του αρωματικού μεθυλίου σε υψηλότερα πεδία (δ 2.00), σε σχέση με αυτή του αρωματικού μεθυλίου της κουρκουϋδροκινόνης (δ 2.15).



Εικ. 4.121 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **24**



Εικ. 4.122 Φάσμα COSY (CDCl₃) του μεταβολίτη **24**

Η **(-)-κουρκουκινόνη** απομονώθηκε από το μαλακό κοράλλι *Pseudopterogorgia rigida* το 1978 (McEnroe *et al*). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **24** παρατίθενται στον Πίνακα 4.25.

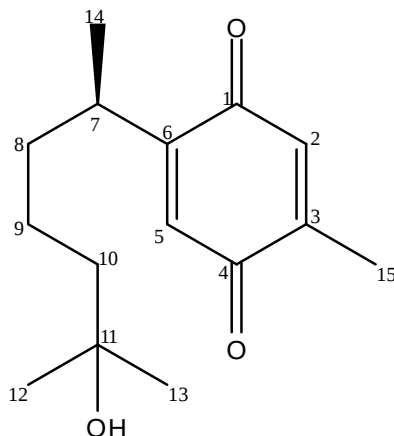
Πίνακας 4.25 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **24** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY
1	-	187.4	-
2	6.55 (1H, d, J=1.5)	133.8	H-15
3	-	145.1	-
4	-	188.5	-
5	6.47 (1H, s)	131.1	-
6	-	154.2	-
7	2.88 (1H, sextet, J=7.0)	31.3	H-8b, H-14
8	a 1.52 (1H, m) b 1.45 (1H, m)	35.8	H-7, H-9 H-10
9	1.92 (2H, m)	25.7	H-8b, H-10
10	5.01 (1H, tm, J=7.0)	123.8	H-8b, H-9, H-12, H-13
11	-	131.9	-
12	1.62 (3H, s)	17.6	H-10
13	1.51 (3H, s)	25.5	H-10
14	1.07 (3H, d, J=7.0)	19.5	H-7
15	2.00 (3H, d, J=1.5)	15.4	H-2

4.2.23 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 25

Ημισυνθετικό προϊόν

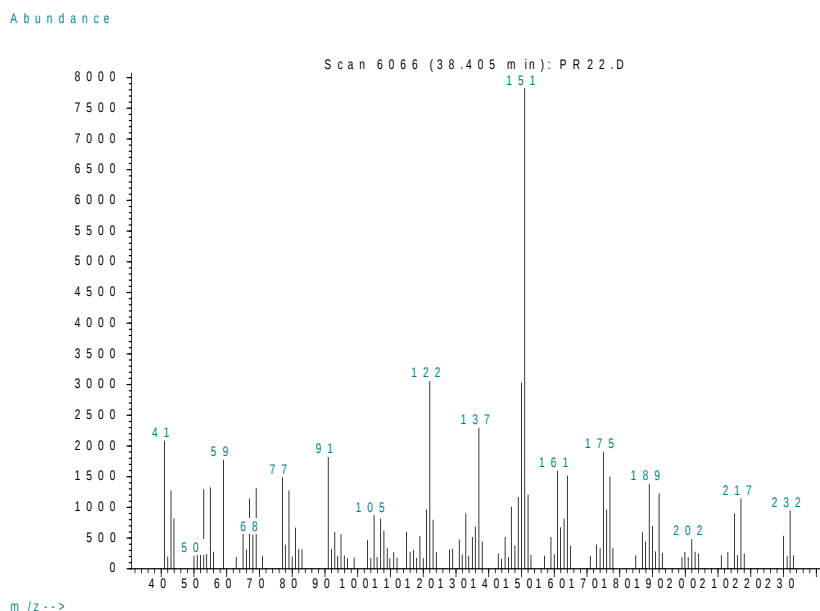
Ο μεταβολίτης **25** (1.5 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



$[\alpha]_D = -4.0$ (c 0.1, CHCl_3)

IR (film) ν_{max} 3429 (broad), 2966, 1654, 1266, 737 cm^{-1}

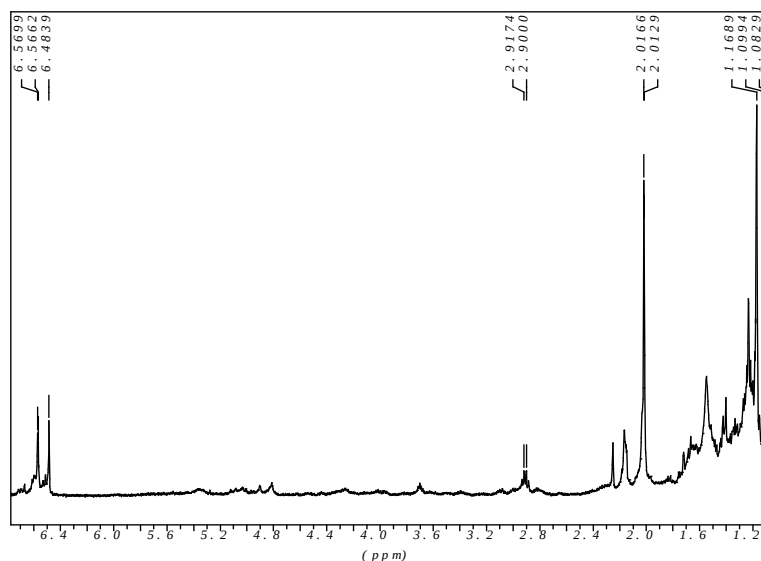
Το φάσμα μάζας (Εικ. 4.123) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ σε m/z 232 το οποίο αντιστοιχεί στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.



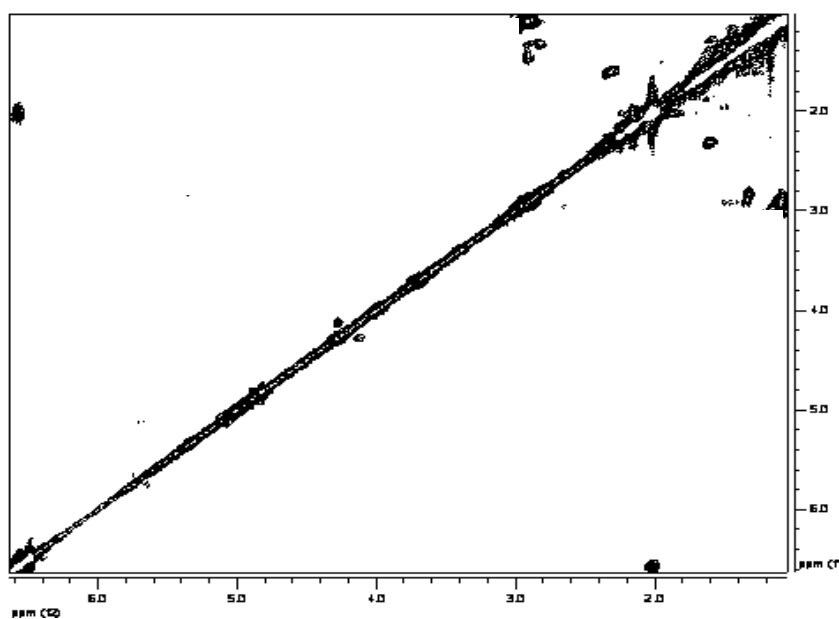
Εικ. 4.123 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **25**

Στο φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.124) του μεταβολίτη **25** εμφανίζονται κορυφές χαρακτηριστικές για ένα μεθύλιο σε βενζυλικό μεθίλιο (δ 1.09, 3H, d; δ 2.91, 1H, q), δύο μεθύλια σε οξυγονωμένο άνθρακα (δ 1.17, s) και για δύο αρωματικά πρωτόνια (δ

6.49, s; δ 6.57, s). Παρατηρείται, επίσης, ένα αρωματικό μεθύλιο στα 2.02 ppm, που εμφανίζει σύζευξη με το γειτονικό αρωματικό πρωτόνιο στα 6.57 ppm (Εικ. 4.125).

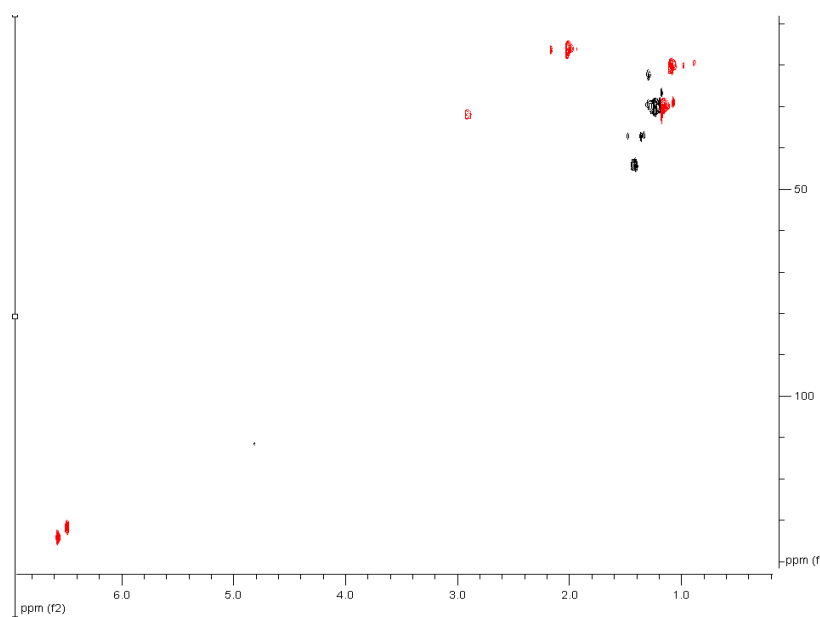


Εικ. 4.124 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του μεταβολίτη **25**

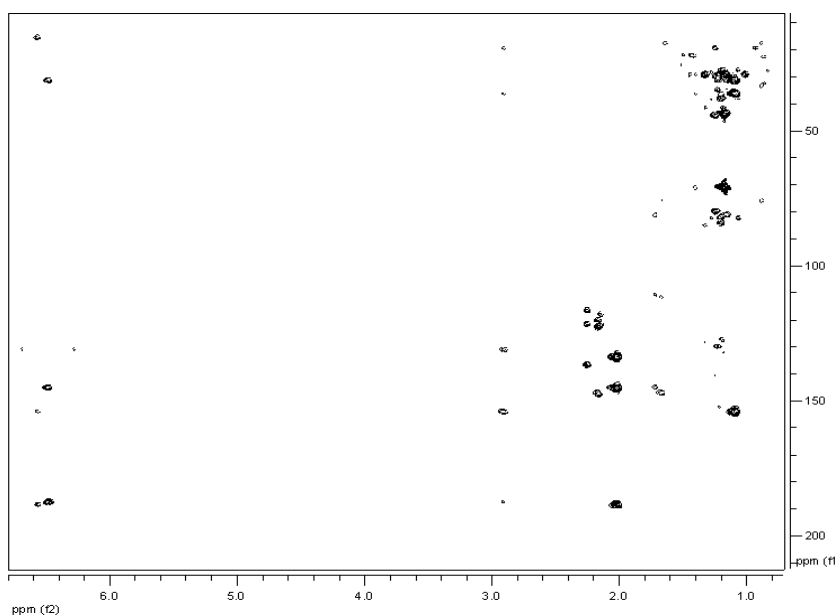


Εικ. 4.125 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **25**

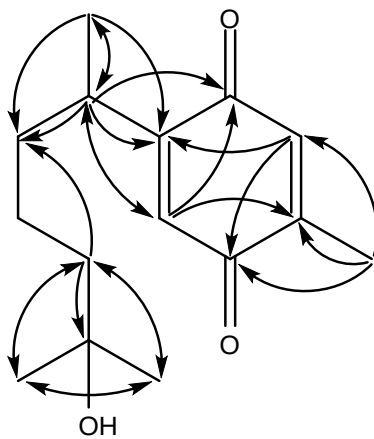
Τα πειράματα COSY, HMBC (Εικ. 4.127) και HMQC (Εικ. 4.126) βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και στον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταβολίτης **25** ταυτίστηκε με γνωστό ημισυνθετικό προϊόν (Joseph-Nathan *et al*, 1988). Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.26.



Εικ. 4.126 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **25**



Εικ. 4.127 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **25**



Σχήμα 4.12 Χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **25**

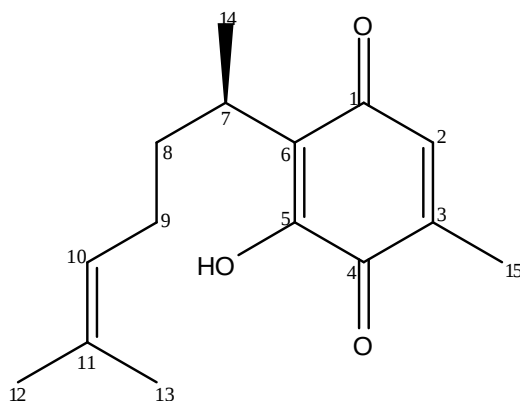
Πίνακας 4.26 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **25** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	187.1	-	-
2	6.57 (1H, d, J=1.5)	133.5	H-14	C-4, C-6, C-14
3	-	145.1	-	-
4	-	188.3	-	-
5	6.49 (1H, s)	130.6	-	C-1, C-3, C-7
6	-	153.8	-	-
7	2.91 (1H, q, J=6.6)	31.5	H-8a, H-8b, H-14	C-1, C-5, C-6, C-8, C-14
8	a 1.47 (1H, m)	36.1	H-7, H-8b	-
	b 1.35 (1H, m)		H-7, H-8a	-
9	1.30 (1H, m)	22.4	H-10	-
10	1.42 (2H, m)	44.2	H-9, H-12, H-13	C-8, C-11, C-12, C-13
11	-	70.8	-	-
12	1.17 (3H, s)	29.3	H-10	C-10, C-11, C-13
13	1.17 (3H, s)	29.3	H-10	C-10, C-11, C-12
14	1.09 (3H, d, J=6.6)	19.6	H-7	C-6, C-7, C-8
15	2.02 (3H, d, J=1.5)	15.8	H-2	C-2, C-3, C-4

4.2.24 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 26

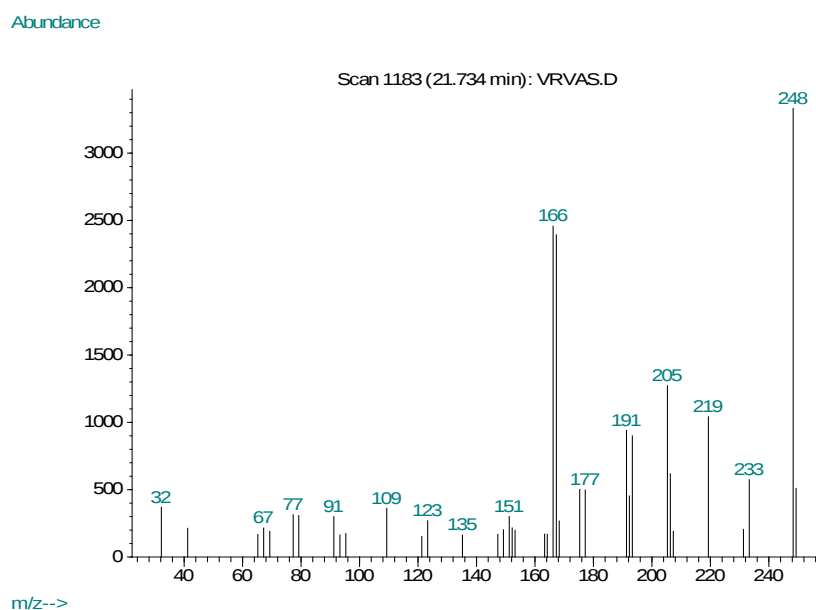
Πρώτη αναφορά σε θαλάσσιο είδος

Ο μεταβολίτης **26** (70.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή χρυσοκίτρινης σκόνης.



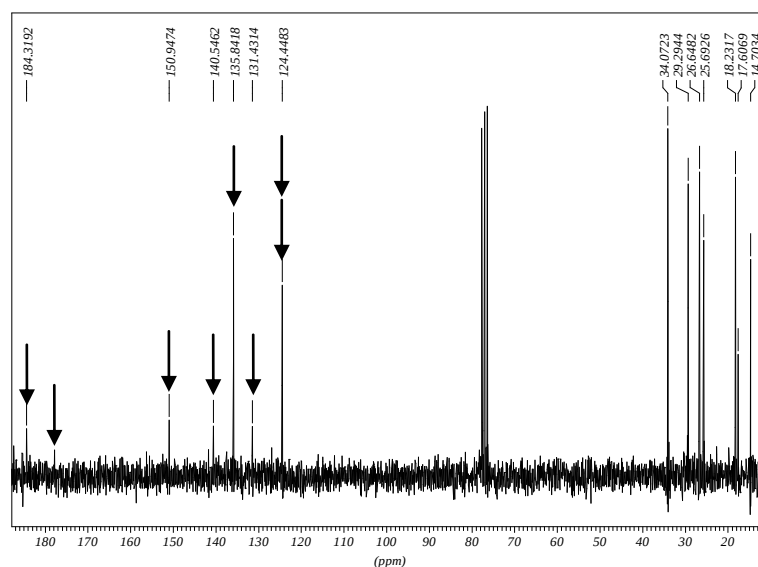
$[\alpha]_D = +7.5$ (c 0.053, CHCl_3)

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.128) του, το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 248 $[\text{M}]^+$, που υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$.



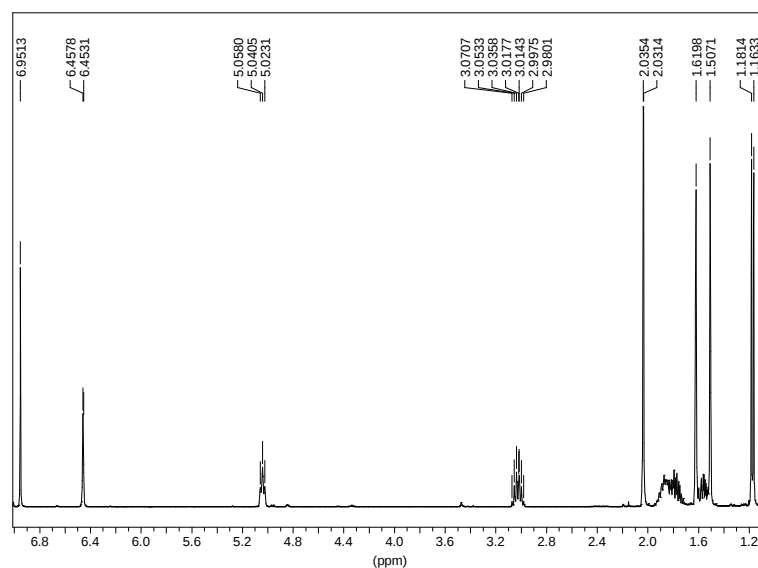
Εικ. 4.128 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **26**

Στο φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.129) του μεταβολίτη **26** εμφανίζονται 7 άτομα ανθράκων στην αλειφατική περιοχή, 6 ολεφινικοί/αρωματικοί άνθρακες (τέσσερις εκ των οποίων είναι τεταρτοταγείς) και δύο καρβονύλια στα 184.3 και 187.4 ppm.

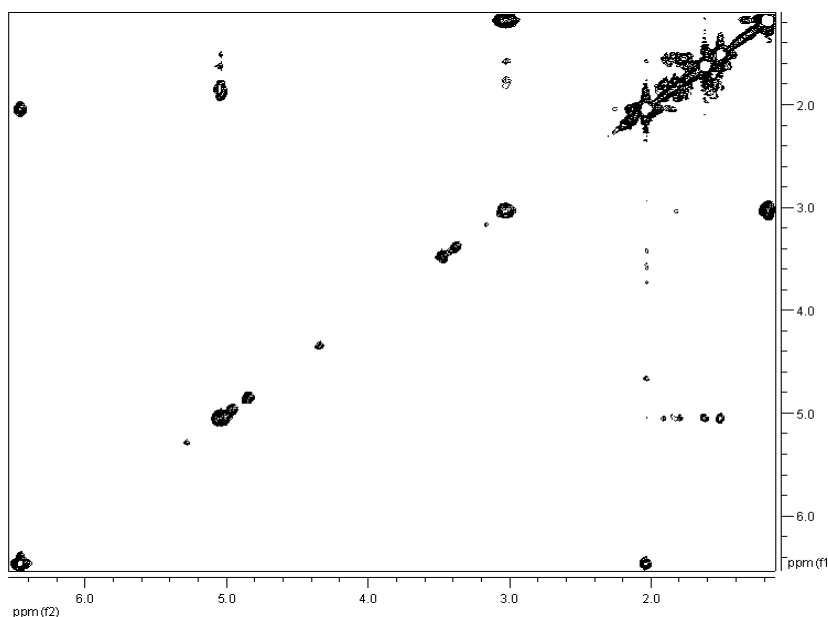


Εικ. 4.129 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **26**

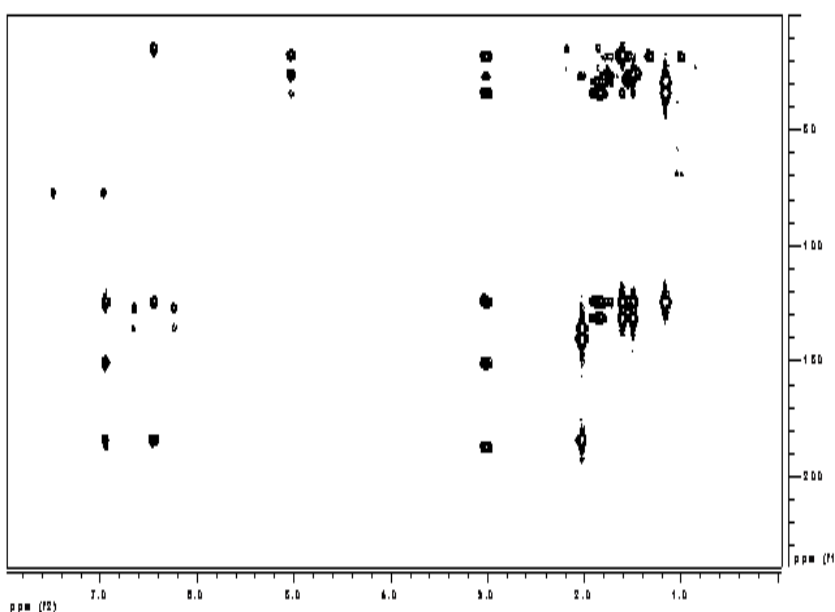
Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.130) εμφάνισε τα χαρακτηριστικά σήματα ενός αρωματικού σεσκιτερπενίου. Συγκρίνοντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα με αυτά του μεταβολίτη **24**, προκύπτει ότι το παρόν μόριο έχει μόνο ένα αρωματικό πρωτόνιο σε δ 6.46, ενώ το σήμα σε δ 6.95 αντιστοιχεί σε πρωτόνιο υδροξυλίου.



Εικ. 4.130 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **26**



Εικ. 4.131 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **26**



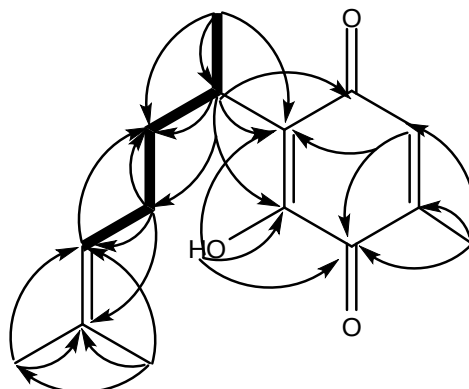
Εικ. 4.132 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **26**

Στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.132), τα πρωτόνια των μεθυλίων ($\text{H}_3\text{-12}$, $\text{H}_3\text{-13}$) της ισοπροπυλιδενικής ομάδας παρουσιάζουν ισχυρές ετεροπυρηνικές συζεύξεις με τον C-10 στα 124.5 ppm και τον τεταρτοταγή C-11 στα 131.4 ppm.

Το αρωματικό H-2 (6.46 ppm) παρουσιάζει συσχέτιση με ένα από τα δύο καρβονύλια στα 184.3 ppm (C-4), με τον C-6 στα 124.5 ppm (συσχέτιση με αυτόν παρουσιάζουν και τα πρωτόνια $\text{H}_3\text{-14}$), όπως και με τον C-15 στα 14.7 ppm.

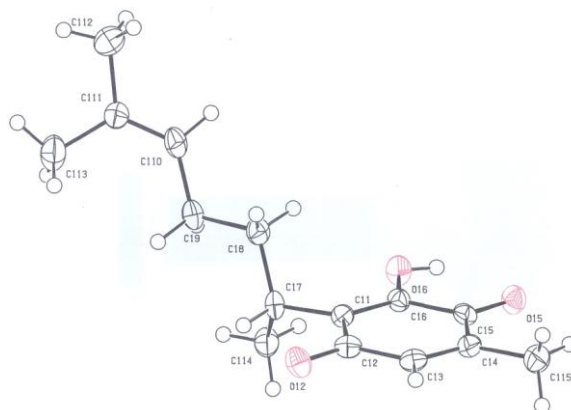
Τα $\text{H}_3\text{-15}$ παρουσιάζουν συσχέτιση με το ίδιο καρβονύλιο (C-4), τον τεταρτοταγή C-3 και με τον C-2 στα 135.8 ppm.

Το πρωτόνιο του υδροξυλίου παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-5 στα 151.0 ppm στον οποίον βρίσκεται, με τον C-6 και τον C-4 στα 184.3 ppm.



Σχήμα 4.13 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **26**

Όλες οι παραπάνω συσχετίσεις και, κυριότερα, αυτές του αρωματικού υδροξυλίου, υποδεικνύουν την παρουσία μίας παρα-κινόνης. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε με κρυσταλλογραφική ανάλυση με ακτίνες Χ.



Εικ. 4.133 Δομή περεζόνης (Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ)

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταβολίτης **26** ταυτίζεται με το γνωστό σεσκιτερπένιο **περεζόνη**. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το μόριο αυτό δεν έχει απομονωθεί στο παρελθόν από θαλάσσιο οργανισμό. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.27.

Πίνακας 4.27 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **26** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
C-1	-	187.4	-	-
C-2	6.46 (1H, d, J=1.5)	135.8	H-15	C-4, C-6, C-15
C-3	-	140.6	-	-
C-4	-	184.3	-	-
C-5	-	151.0	-	-
C-6	-	124.5	-	-
C-7	3.02 (1H, sextet, J=7.0)	29.3	H-8a, H-8b H-14	C-1, C-5, C-6, C-8, C-9, C-14
C-8	a 1.79 (1H, m) b 1.58 (1H, m)	34.1	H-7, H-8b H-7, H-8a, H-9a	C-9, C-10, C-14 -
C-9	a 1.92 (1H, m) b 1.80 (1H, m)	26.6	H-8b, H-9b, H-10 H-9a, H-10	C-7, C-8, C-10, C-11
C-10	5.04 (1H, tm, J=7.0)	124.5	H-9a, H-9b, H-12, H-13	C-8, C-12, C-13
C-11	-	131.4	-	-
C-12	1.62 (3H, s)	25.7	H-10	C-13, C-10, C-11
C-13	1.51 (3H, s)	17.6	H-10	C-12, C-10, C-11
C-14	1.17 (3H, d, J=7.0)	18.2	H-7	C-6, C-7, C-8
C-15	2.03 (3H, d, J=1.5)	14.7	H-2	C-2, C-3, C-4
OH-5	6.95 (1H, brs)	-	-	C-4, C-5, C-6

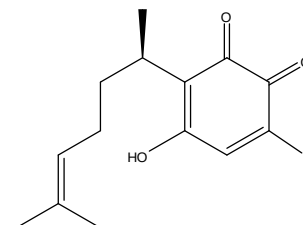
Η σεσκιτερπενική κινόνη περεζόνη, που έχει βρεθεί στο γένος *Perezia* (μετονομάστηκε ως *Acourtia*, Compositae), έχει υπάρξει το κέντρο έντονης επιστημονικής προσοχής εδώ και ενάμισι αιώνα, εξαιτίας των εντυπωσιακών χημικών μετασχηματισμών που υφίσταται μέσω πολλών και διαφορετικών μηχανισμών (Enriquez *et al*, 1998). Γνωστή από το 1852, αλλά μόλις το 1965 διευκρινίστηκε η δομή της και επιβεβαιώθηκε με τη βοήθεια κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ (Soriano Garcia *et al*, 1986) και σύνθεσης του μορίου (Rodriguez-Hernandez *et al*, 1994).

Σε *in vivo* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια, η περεζόνη – χορηγούμενη 5 λεπτά πριν την εκδήλωση επαγόμενου εμφράγματος σε δόση 3.1 mg/kg- προστατεύει από την εκδήλωση συμπτωμάτων αρρυθμίας και πτώσης της πίεσης του αίματος. Η προστατευτική δράση της, πιθανότατα, συνδέεται με την επαγωγή παραγωγής ATP και την απελευθέρωση ιόντων Ca⁺² από το εσωτερικό των μιτοχονδρίων, που αυτή προκαλεί. Έτσι, κατά την επαναφορά της παροχής του αίματος στους ιστούς μετά την περίοδο ισχαιμίας, η πρόκληση βλαβών στους ιστούς, λόγω οξειδωτικού stress, είναι πολύ περιορισμένη (Tellez *et al*, 1999).

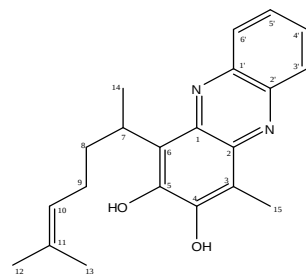
Άλλες φαρμακολογικές δράσεις του μορίου είναι η υπογλυκαιμική (Alarcón-Aguilar *et al*, 1997), η φυτοτοξική, η αντιτροφική δράση του έναντι φυτοφάγων εντόμων (Burgueño-Tapia *et al*, 2008), η αύξηση της εντερικής κινητικότητας

(Enríquez *et al*, 1980) και η παρεμπόδιση της επαγόμενης από το κολλαγόνο συσσώρευσης αιμοπεταλίων (de la Peña *et al*, 2001).

Το 1997, μία επιστημονική ομάδα από Αμερική με επικεφαλής τον Alan Freyer, μελέτησε τη χημική σύσταση του είδους *P.rigida*, μετά από συλλογή του από τις Μπαχάμες σε βάθος 18 m. Αποτέλεσμα της μελέτης ήταν η απομόνωση και ο προσδιορισμός ενός νέου μορίου, που φέρει το όνομα ριτζιδόνη. Η ριτζιδόνη έχει το ίδιο μοριακό βάρος, καθώς και τα ίδια φασματοσκοπικά δεδομένα πρωτονίου και άνθρακα με την περεζόνη. Διαφέρει από την τελευταία, μόνο στο ότι πρόκειται για μία ορθο-κινόνη.



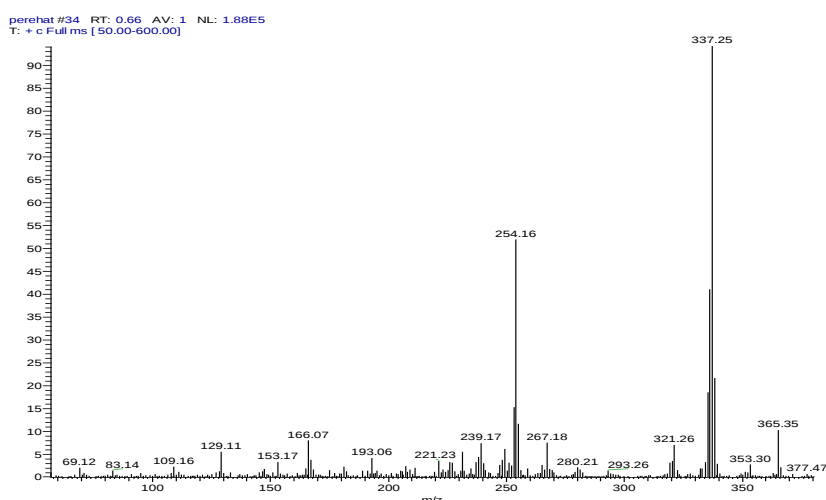
Η επιβεβαίωση ότι η ριτζιδόνη αποτελεί ορθο-κινόνη ήρθε, για την επιστημονική ομάδα, μετά τη συμπύκνωση



αυτής με *o*-φαινυλενοδιαμίνη, η οποία απέδωσε ένα κύριο προϊόν φαιναζίνης. Το προϊόν είχε μοριακό βάρος 336 ($C_{21}H_{24}N_2O_2$), γεγονός που υποδεικνύει ότι κατά τη διάρκεια της αντίδρασης συνέβη μία μη αναμενόμενη οξείδωση του φαινυλικού δακτυλίου στον C-4. Το φάσμα 1H -NMR του προϊόντος είχε τέσσερις καινούργιες πολλαπλές κορυφές μεταξύ 8.01 και 7.49 ppm, ενώ η αλειφατική περιοχή έμεινε σχεδόν ανεπηρέαστη.

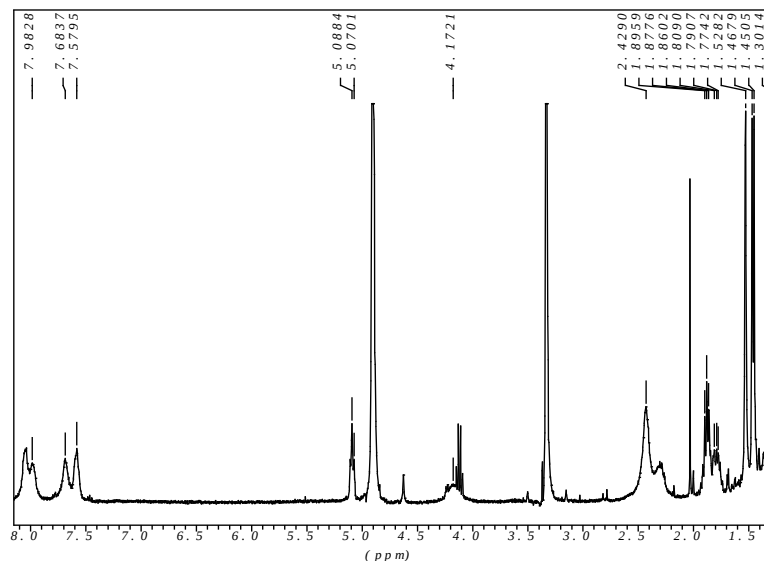
Σε μία δική μας προσπάθεια, πλέον, να κατανοήσουμε τι συμβαίνει με τα μόρια της περεζόνης και της ριτζιδόνης (οι ελάχιστες ενέργειες των δύο μορίων σε πειράματα μοριακής προσομοίωσης είναι σχεδόν ταυτόσημες), επιχειρήσαμε να επαναλάβουμε την αντίδραση συμπύκνωσης με τον μεταβολίτη **26**.

Σε διάλυμα περεζόνης (24 mg) σε μεθανόλη (5ml), προστέθηκαν 10 mg του αντιδραστήριου *o*-φαινυλενοδιαμίνης. Το μίγμα αναδεύτηκε για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και το επικρατές προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με παρασκευαστική TLC, για να δώσει 13 mg παραγώγου φαιναζίνης (ρουμπινί σκόνη, M.B. 336).



Εικ. 4.134 Φάσμα μάζας του φαιναζινικού αναλόγου της περεζόνης

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.135) του παραγώγου ταυτίζεται, σχεδόν, με αυτό της δημοσιευμένης εργασίας του 1997.

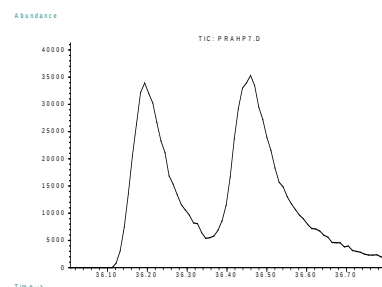


Εικ. 4.135 Φάσμα ^1H -NMR ($\text{MeOH}-d_4$) του φαιναζινικού αναλόγου της περεζόνης

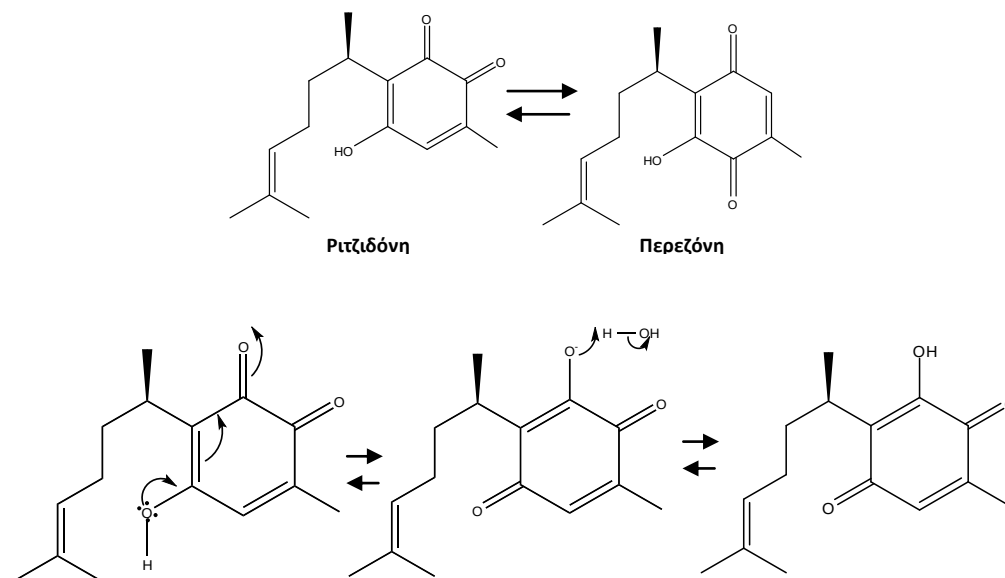
Πίνακας 4.28 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του φαιναζινικού αναλόγου της περεζόνης ($\text{MeOH}-d_4$)

Θέση	^1H NMR (ppm)
7	4.19 (1H, m)
8	a 2.31 (1H, m) b 1.80 (1H, m)
9	1.88 (1H, m)
10	5.09 (1H, tm, $J=7.3$)
12	1.53 (3H, s)
13	1.30 (3H, s)
14	1.46 (1H, d, $J=7.0$)
15	2.43 (3H, brs)
3'	8.04 (1H, m)
4'	7.68 (1H, m)
5'	7.58 (1H, m)
6'	7.98 (1H, m)

Οι παραπάνω παρατηρήσεις, σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι στο χρωματογράφημα GC-MS του μεταβολίτη **26** εμφανίζονται δύο κορυφές ίδιου μοριακού βάρους στα 36.2 και 36.5 min, μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι σε στερεή κατάσταση και σε χαμηλές θερμοκρασίες λήψης των πειραμάτων NMR, ο μεταβολίτης είναι αποκλειστικά στη μορφή της παρα-κινόνης. Όταν το μόριο είναι διαλυμένο σε κάποιον διαλύτη σε θερμοκρασία δωματίου ή όταν παραμένει υπό τις υψηλές θερμοκρασίες κατά την αέριο χρωματογραφία, τότε ορθο- και παρα- κινόνη



μπορούν να αλληλομετατρέπονται, σύμφωνα με τον παρακάτω μηχανισμό (Σχήμα 4.14).



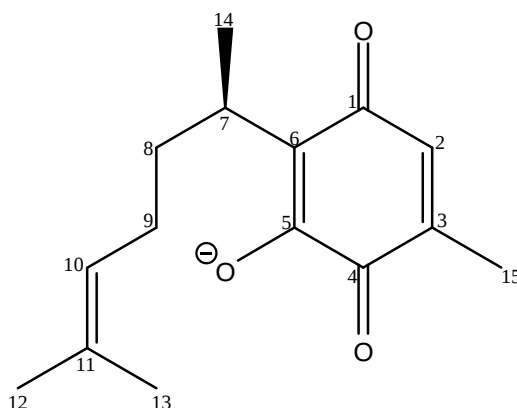
Σχήμα 4.14 Μηχανισμός αλληλομετατροπής μεταξύ των μορφών της ορθο- και παρα- κινόνης

Πίνακας 4.29 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR της περεζόνης, που απομονώθηκε από δύο διαφορετικά εργαστήρια, και της ριτζιδόνης (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

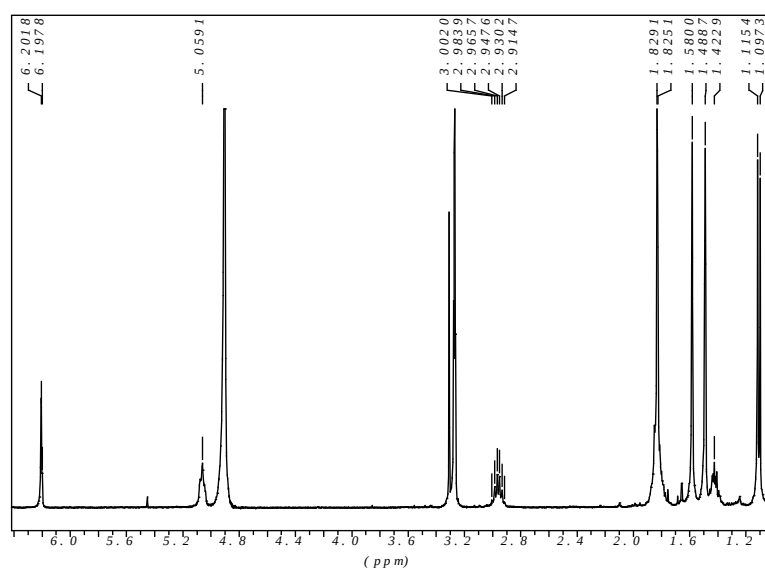
	Περεζόνη (2011)		Ριτζιδόνη (Freyer, 1997)		Περεζόνη (Sanchez, 1985)	
Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)
1	-	187.4	-	187.4	-	187.1
2	6.46 (d, 1.5)	135.8	6.46 (q, 1.5)	135.8	6.46 (q, 1.8)	135.6
3	-	140.6	-	140.5	-	140.3
4	-	184.3	-	184.3	-	184.0
5	-	151.0	-	151.0	-	150.9
6	-	124.5	-	124.6	-	124.3
7	3.02 (sextet, 7.0)	29.3	3.05	29.3	3.10 (sextet, 7.0)	29.3
8	a 1.79 b 1.58	34.1	a 1.80 b 1.57	34.1	1.85	34.1
9	a 1.92 (1H, m) b 1.80 (1H, m)	26.6	1.87	26.7	1.85	26.6
10	5.04 (m)	124.5	5.04 (m)	124.5	5.05 (m)	124.3
11	-	131.4	-	131.3	-	131.1
12	1.62	25.7	1.62	25.7	1.66	25.6
13	1.51	17.6	1.51	17.6	1.55	17.5
14	1.17 (d, 7.0)	18.2	1.18 (d, 7.0)	18.2	1.21 (d, 7.0)	18.2
15	2.03 (d, 1.5)	14.7	2.04 (d, 1.5)	14.7	2.06 (d, 1.8)	14.6
OH	6.95	-	7.10	-	6.95	-

4.2.25 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 27

Το άλας της περεζόνης (8.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή μωβ σκόνης.



Το φάσμα ¹H-NMR (Εικ. 4.136) παρουσιάζει πολύ σημαντικές ομοιότητες με αυτό του μεταβολίτη **26**. Άξια αναφοράς είναι η μετατόπιση των πρωτονίων του αρωματικού μεθυλίου, του μεθυλίου στον τριτοταγή άνθρακα και του αρωματικού πρωτονίου σε υψηλότερα πεδία. Επίσης, στο φάσμα λείπει το σήμα του υδροξυλίου της περεζόνης.

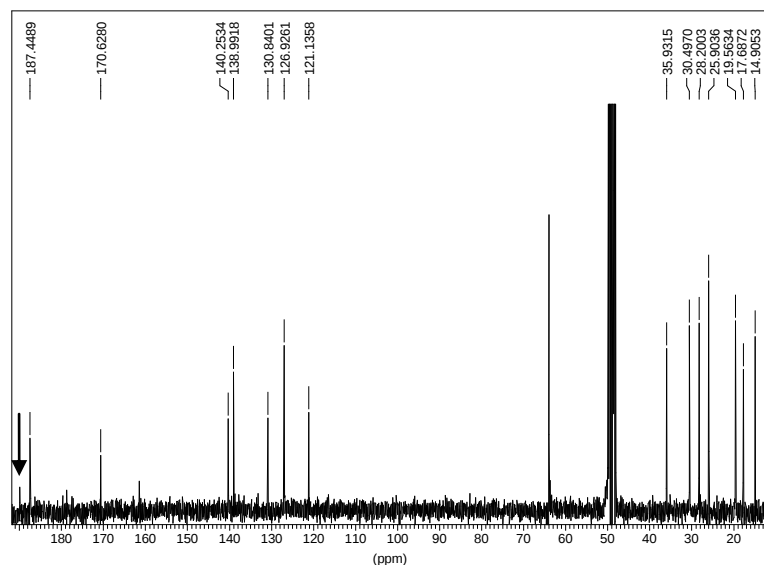


Εικ. 4.136 Φάσμα ¹H-NMR (MeOD) του μεταβολίτη **27**

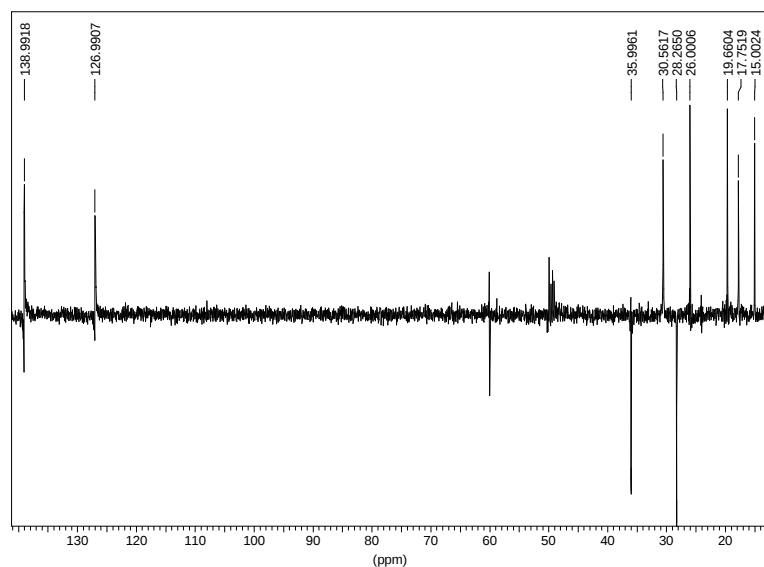
Αξίζει να σημειωθεί πως το άλας εκλουόταν, στην αντίστροφης φάσης HPLC, λίγα λεπτά πριν την περεζόνη. Είχε χαρακτηριστικό μωβ χρώμα και ήταν αδιάλυτο στο διχλωρομεθάνιο.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις είναι αυτές που συνηγόρησαν στην υπόθεση ότι πρόκειται για άλας της περεζόνης. Για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης, σε μικρή ποσότητα περεζόνης διαλυμένης σε μεθανόλη προστέθηκε στο διάλυμα **μ**α σταγόνα,

NaOH 1N. Το διάλυμα απέκτησε ακαριαία ένα εντυπωσιακό μωβ χρώμα. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του άλατος, που προέκυψε από την περεζόνη, ταυτίζονταν πλήρως με αυτά του παρόντος μορίου.

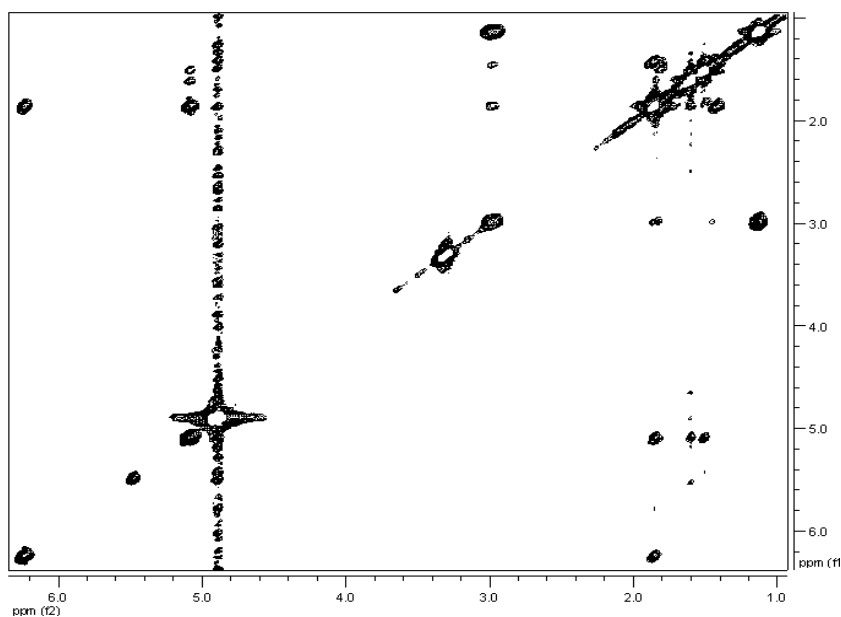


Εικ. 4.137 Φάσμα ^{13}C -NMR ($\text{MeOH}-d_4$) του μεταβολίτη **27**

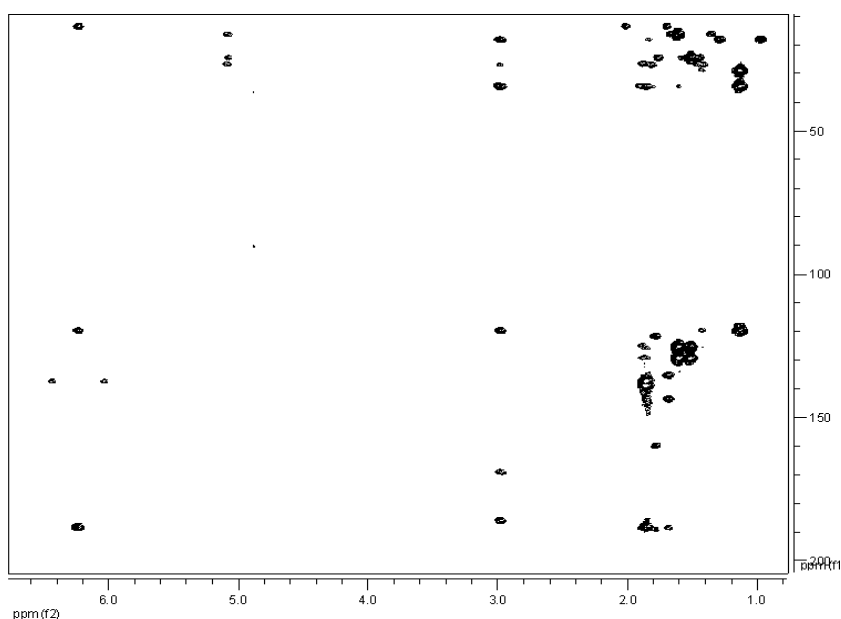


Εικ. 4.138 Φάσμα DEPT-135 ($\text{MeOH}-d_4$) του μεταβολίτη **27**

Στη φύση, το κοράλλι έχει το ίδιο μωβ χρώμα, που παρατηρήθηκε για το άλας της περεζόνης.



Εικ. 4.139 Φάσμα COSY (MeOH- d_4) του μεταβολίτη **27**



Εικ. 4.140 Φάσμα HMBC (MeOH- d_4) του μεταβολίτη **27**

Τα πειράματα HMBC (Εικ. 4.140) και COSY (Εικ. 4.139) βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και προσδιόρισαν τις σχετικές θέσεις ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο.

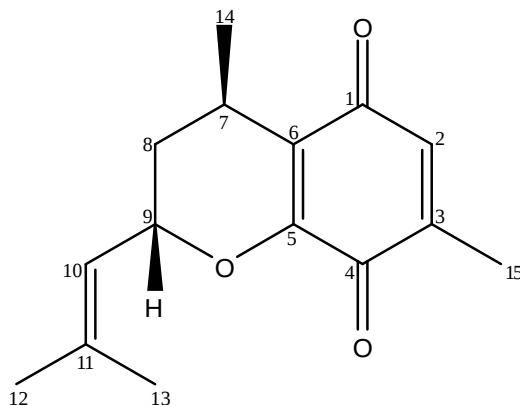
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **27**, παρατίθενται στον Πίνακα 4.30.

Πίνακας 4.30 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μετά νατρίου άλατος της περεζόνης (MeOH- d_4 , δ_H 3.31 ppm, δ_C 49.00 ppm)

Θέση	1H NMR (ppm)	^{13}C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	187.4	-	-
2	6.20 (1H, q, $J=1.6$)	139.0	H-15	C-4, C-6, C-15
3	-	140.3	-	-
4	-	189.4	-	-
5	-	170.6	-	-
6	-	121.1	-	-
7	2.96 (1H, sextet, $J=7.0$)	30.5	H-8b, H-14	C-1, C-5, C-6, C-8, C-9, C-14
8	a 1.45 (1H, m)	35.9	H-9	-
	b 1.49 (1H, m)		H-7	-
9	1.84 (1H, m)	28.2	H-8a, H-10	-
10	5.06 (1H, m)	126.9	H-9, H-12, H-13	C-9, C-12, C-13
11	-	130.8	-	-
12	1.58 (3H, s)	25.9	H-10	C-10, C-11, C-13
13	1.49 (3H, s)	17.7	H-10	C-10, C-11, C-12
14	1.10 (3H, d, $J=7.3$)	19.6	H-7	C-6, C-7, C-8
15	1.83 (3H, d, $J=1.6$)	14.9	H-2	C-2, C-3, C-4

4.2.26 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 28*Νέο φυσικό προϊόν*

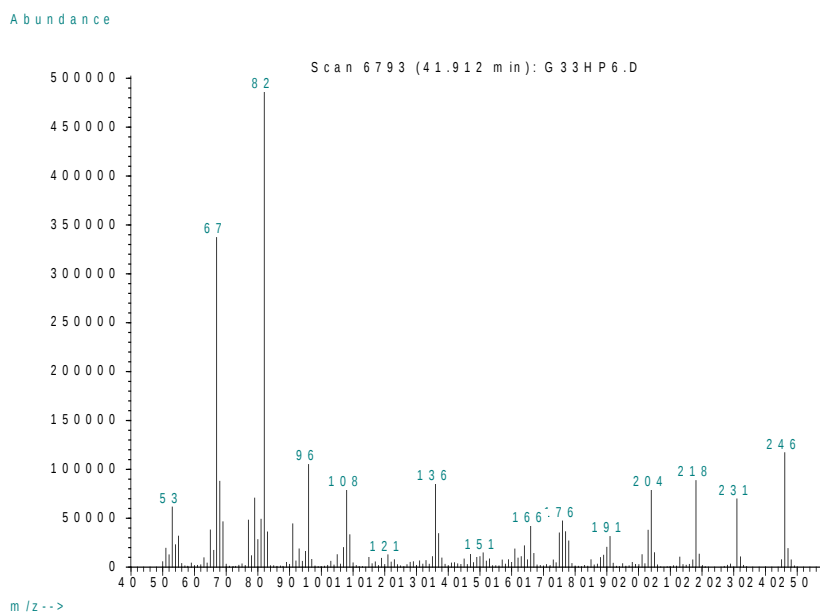
Ο μεταβολίτης **28** (2.2 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.


 $[\alpha]_D = -11.0$ (c 0.1, CHCl_3)

 $\text{UV } \lambda_{\text{max}} (\text{CHCl}_3) (\log \epsilon) 269 (3.59) (\text{nm})$
 $\text{IR (film)} \nu_{\text{max}} 1718, 1652, 1095, 736 \text{ cm}^{-1}$

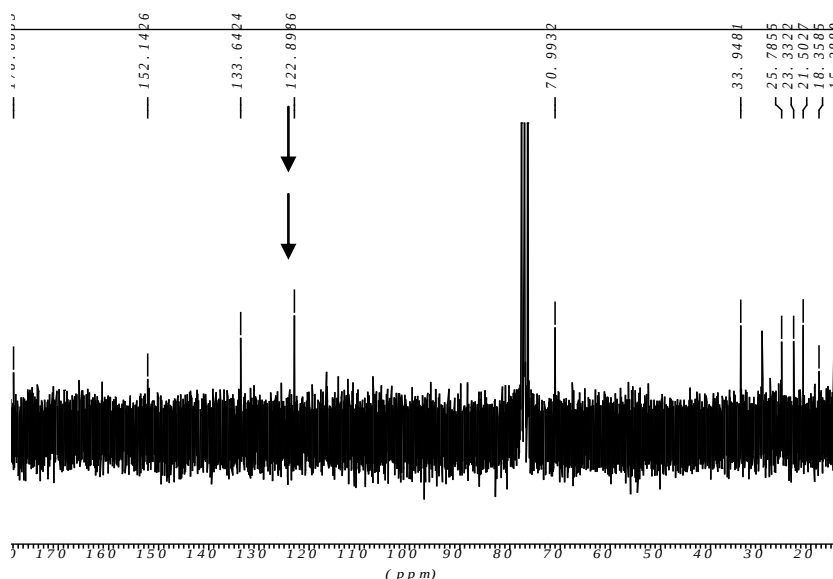
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **28** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 7 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRFABMS) παρουσίασε μοριακό ιόν $[\text{M}]^+$ σε m/z 246.1259 (θεωρητικό MB: 246.1256). Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.141), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 246 $[\text{M}]^+$, κατά 2 ατομικές μονάδες μικρότερο από αυτό της περεζόνης.



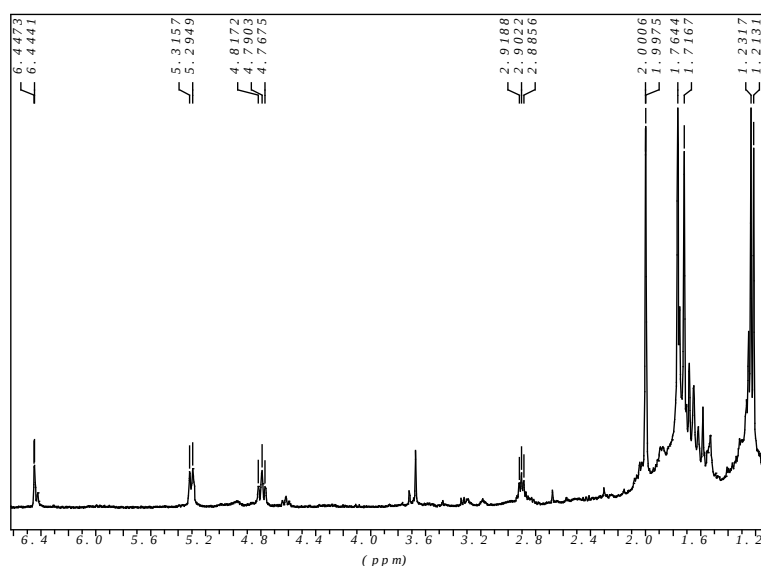
Εικ. 4.141 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **28**

Στο φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.142) παρατηρήθηκαν 6 άτομα ανθράκων στην αλειφατική περιοχή, 1 οξυγονωμένο άτομο άνθρακα και 4 ολεφινικοί/αρωματικοί άνθρακες (δύο εκ των οποίων είναι τεταρτοταγείς).



Εικ. 4.142 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **28**

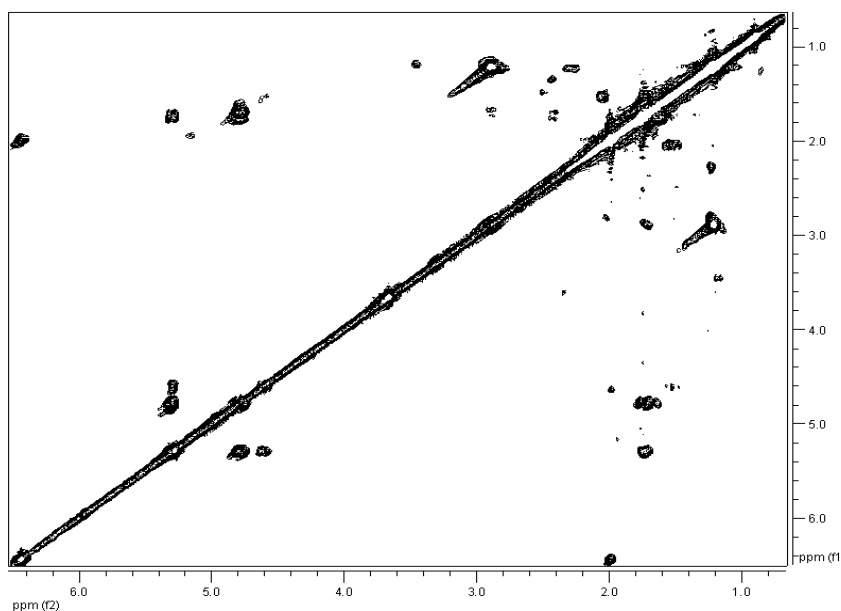
Στο φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.143) παρατηρήθηκαν ένα αρωματικό πρωτόνιο (δ 6.44), ένα ολεφινικό πρωτόνιο (δ 5.30), δύο μεθίνια (δ 2.90, δ 4.79), ένα μεθύλιο σε αρωματικό δακτύλιο (δ 1.99), δύο βινυλικά μεθύλια (δ 1.72 και δ 1.76) και ένα μεθύλιο σε τριτοταγή άνθρακα (δ 1.22). Οι δύο διαφορές με το φάσμα ^1H -NMR της περεζόνης (μεταβολίτης **26**) είναι: α) η παρουσία οξυγονωμένου μεθινίου στα 4.79 ppm, β) η απουσία σήματος στα 6.95 ppm, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του υδροξυλίου του αρωματικού δακτυλίου της περεζόνης.



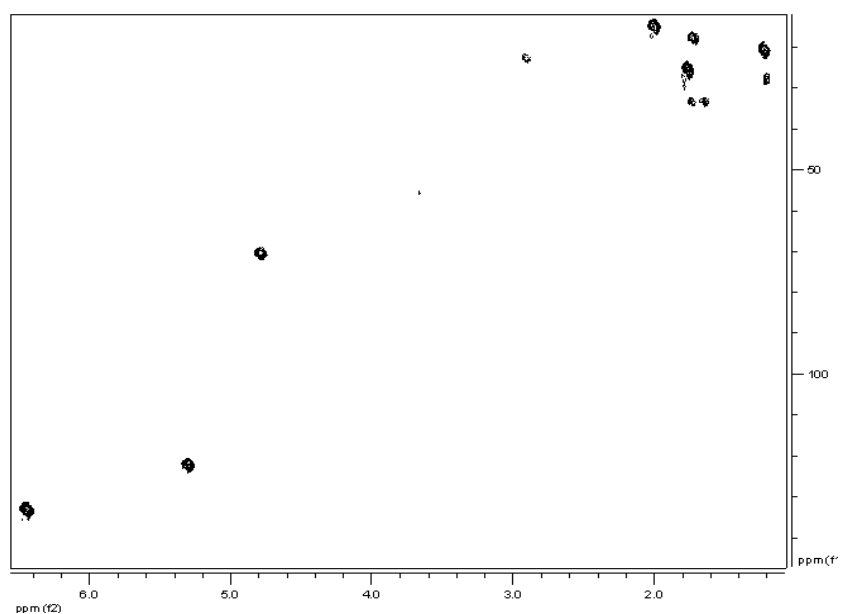
Εικ. 4.143 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **28**

Τα παραπάνω δύο στοιχεία σε συνδυασμό με το μοριακό βάρος του μεταβολίτη **28**, παραπέμπουν στην ύπαρξη γέφυρας οξυγόνου μεταξύ του C-5 και C-9.

Στο φάσμα COSY (Εικ. 4.144) εμφανής είναι η σύζευξη του ολεφινικού μεθινίου στα 5.30 ppm με το οξυγονωμένο μεθίνιο στα 4.79 ppm.



Εικ. 4.144 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **28**



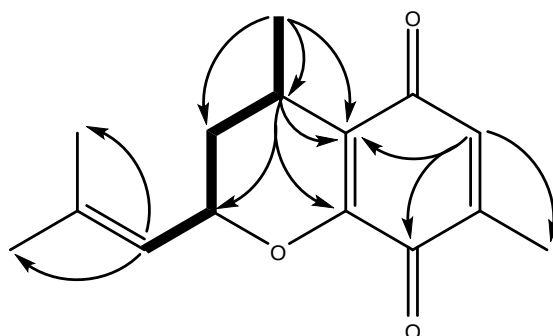
Εικ. 4.145 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **28**

Στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.146), το $\text{H}_3\text{-15}$ παρουσιάζει συσχέτιση με ένα καρβονύλιο στα 182.2 ppm (C-4), με τον τεταρτοταγή C-3 στα 142.7 ppm, όπως και με τον C-2 στα 133.4 ppm.

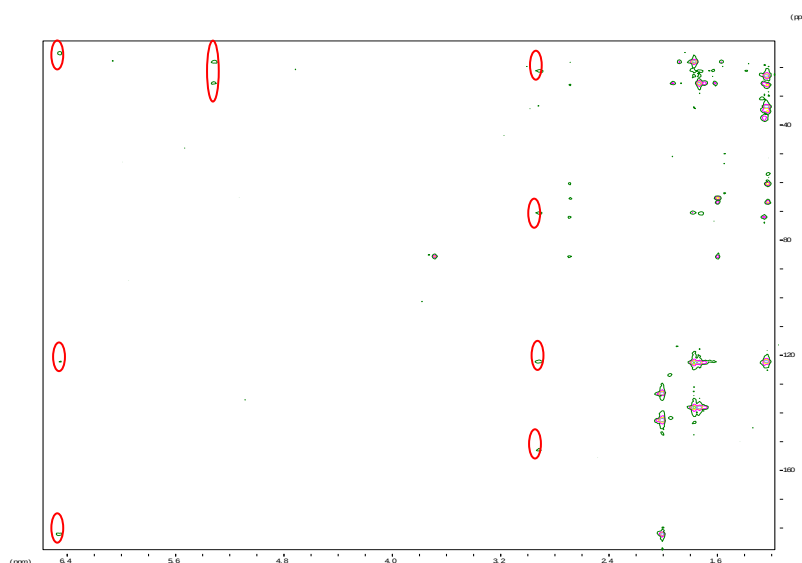
Το αρωματικό πρωτόνιο παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-4, C-15 και τον C-6 στα 122.2 ppm. Με τον C-6 συσχετίζεται και το αλειφατικό μεθύλιο $\text{H}_3\text{-14}$.

Το H-7 παρουσιάζει συσχέτιση με τους C-6, C-9, C-14 και τον C-5 (153.1 ppm). Ο αρωματικός C-5 παρουσιάζεται σε χαμηλότερα πεδία (συγκριτικά με του μεταβολίτη **26**), γεγονός που παραπέμπει, σε συνδυασμό με το μοριακό βάρος της ένωσης, στην ύπαρξη γέφυρας οξυγόνου μεταξύ των C-5 και C-9.

Προσπάθεια συμπύκνωσης του μεταβολίτη **28** με φαινυλενοδιαμίνη δεν οδήγησε στο φαιναλινικό ανάλογο, που θα ήταν αναμενόμενο στην περίπτωση της ορθο-κινόνης, υποστηρίζοντας την προτεινόμενη δομή της παρα-κινόνης για τον μεταβολίτη **28**.

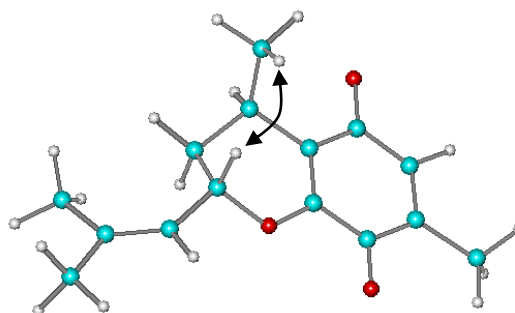


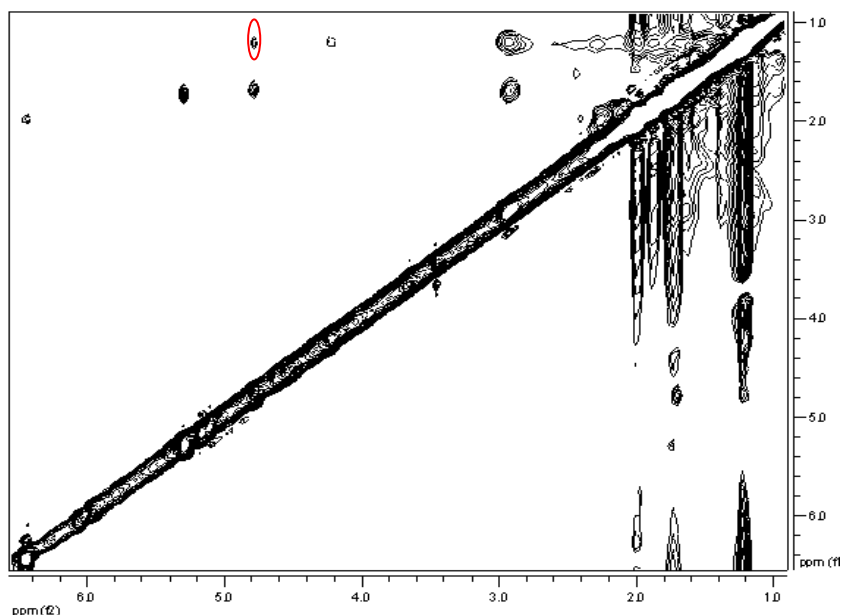
Σχήμα 4.15 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **28**



Εικ. 4.146 Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **28**

Η απόδοση της σχετικής στερεοχημείας των δύο ασύμμετρων κέντρων βασίστηκε σε πειράματα NOESY (Εικ. 4.147). Η συσχέτιση των πρωτονίων H-14/H-9 καθόρισε τη σχετική στερεοχημεία στους άνθρακες C-7 και C-9 ως 7*R**,9*S**.





Εικ. 4.147 Φάσμα NOESY (CDCl_3) του μεταβολίτη **28**

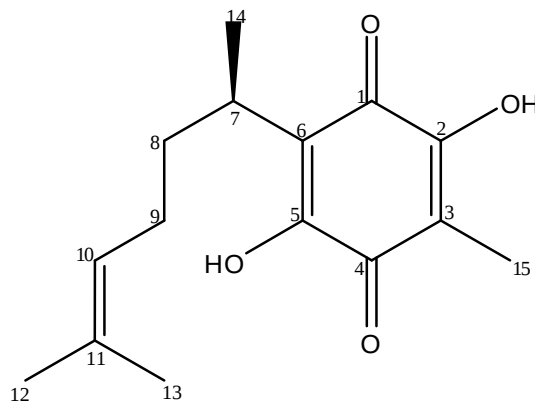
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταβολίτης **28** ταυτοποιήθηκε ως **5,9-εποξυ-περεζόνη** και σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναζήτηση είναι νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.31.

Πίνακας 4.31 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **28** (CDCl_3 , δ_{H} 7.24 ppm, δ_{C} 77.00 ppm)

Θέση	^1H NMR (ppm)	^{13}C NMR (ppm)	COSY	HMBC	NOESY
1	-	n.d.	-	-	-
2	6.44 (1H, d, $J=1.7$)	133.4	H-15	C-4, C-6, C-15	H-15
3	-	142.7	-	-	-
4	-	182.2	-	-	-
5	-	153.1	-	-	-
6	-	122.9	-	-	-
7	2.90 (1H, ddd, $J=7.0, 5.2, 1.3$)	23.3	H-8a, H-8b, H-14	C-5, C-6, C-9, C-14	H-8a, H-14
8	a 1.72 (1H, m) b 1.63 (1H, m)	33.9	H-7, H-8b, H-9 H-7, H-8a, H-9	- -	H-7, H-9 -
9	4.79 (2H, ddd, $J=11.2, 8.7, 2.5$)	71.0	H-8a, H-8b, H-10	-	H-8a, H-14
10	5.30 (1H, dt, $J=8.7, 1.3$)	122.9	H-9, H-12, H-13	C-12, C-13	H-13
11	-	138.3	-	-	-
12	1.71 (3H, d, $J=0.9$)	18.4	H-10, H-13	C-13, C-10, C-11	-
13	1.76 (3H, brs)	25.8	H-10, H-12	C-12, C-10, C-11	H-10
14	1.22 (3H, d, $J=7.0$)	21.5	H-7	C-6, C-7, C-8	H-7, H-9
15	1.99 (3H, d, $J=1.7$)	15.3	H-2	C-2, C-3, C-4	H-2

4.2.27 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 29

Ο μεταβολίτης **29** (2.5 mg) απομονώθηκε με τη μορφή μωβ ελαιώδους υπολείμματος.

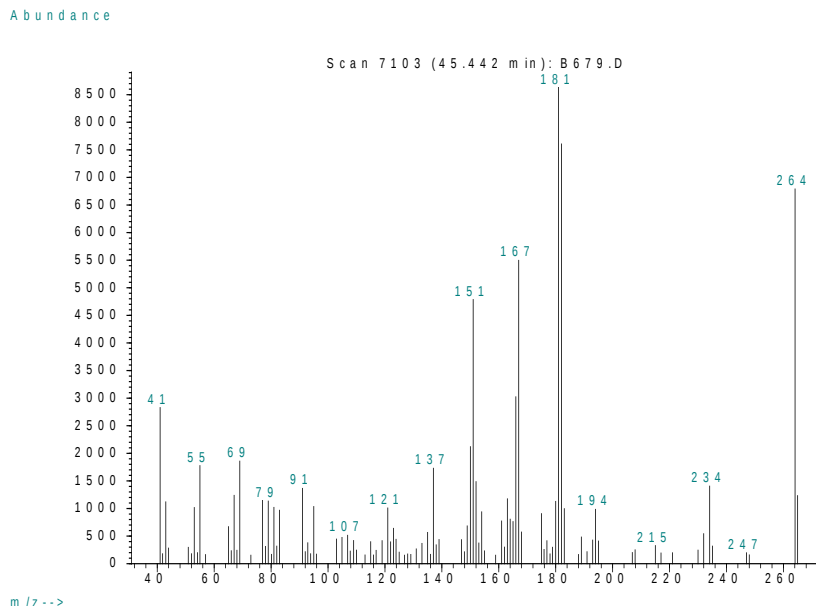


$[\alpha]_D = +25.0$ (c 0.02, MeOH)

IR (film) $\nu_{\max}$ 3321 (broad), 2943, 2832, 1449, 1114, 1022 cm^{-1}

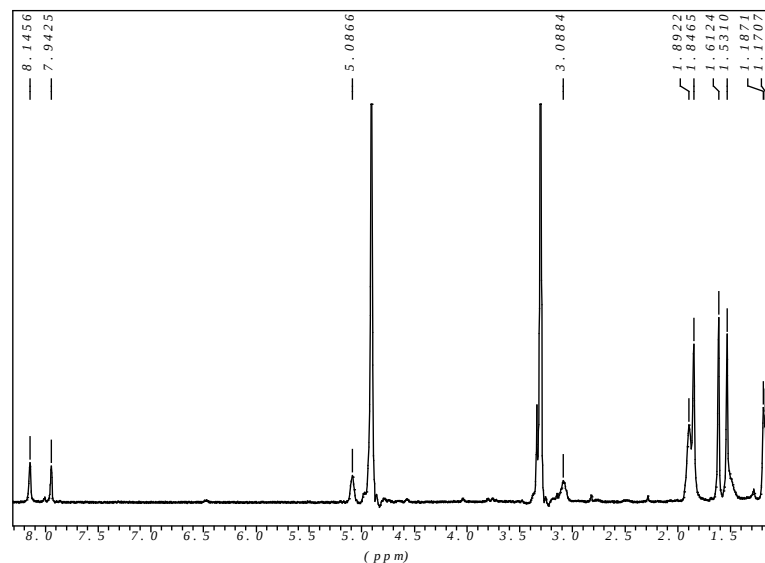
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **29** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.148), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 264 $[\text{M}]^+$.

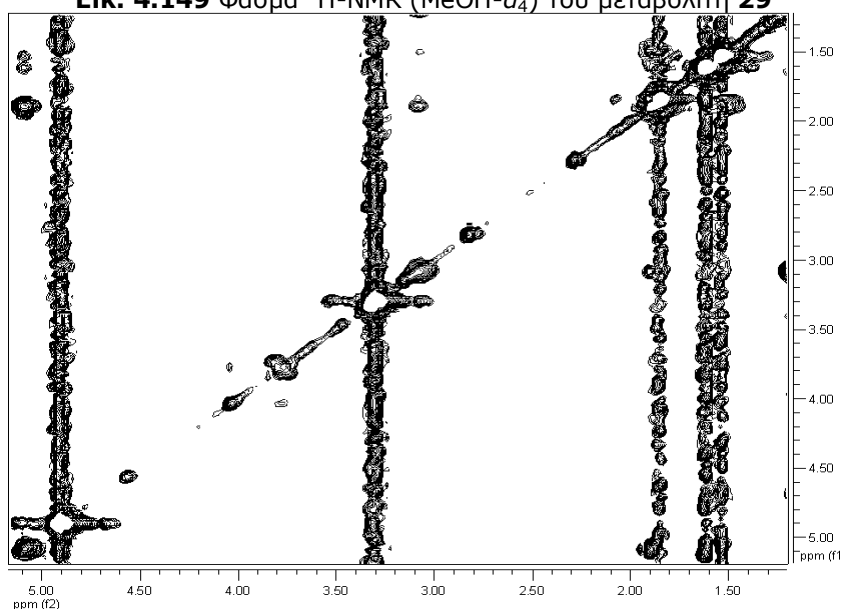


Εικ. 4.148 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **29**

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.149) παρουσιάζει πολύ σημαντικές ομοιότητες με αυτό της περεζόνης. Άξια αναφοράς είναι η παρουσία μίας απλής κορυφής στα 7.94 ppm και μίας απλής στα 8.15 ppm, που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία.



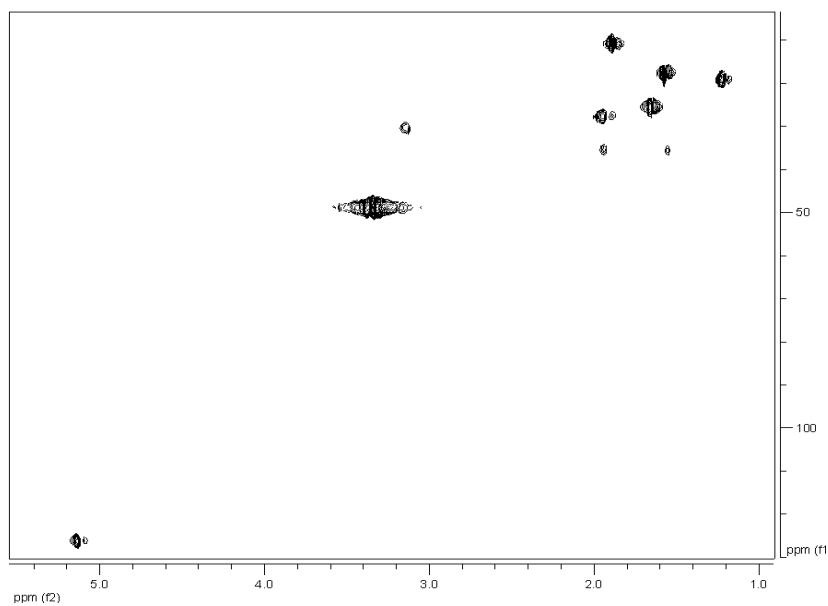
Εικ. 4.149 Φάσμα ^1H -NMR ($\text{MeOH-}d_4$) του μεταβολίτη **29**



Εικ. 4.150 Φάσμα COSY ($\text{MeOH-}d_4$) του μεταβολίτη **29**

Το φάσμα HSQC-DEPT (Εικ. 4.151) δεν παρουσίασε σήματα στα 7.94 ppm και 8.15 ppm, γεγονός που υποδεικνύει ότι πρόκειται για πρωτόνια υδροξυλίων.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταβολίτης **29** ταυτοποιήθηκε ως το γνωστό σεσκιτερπένιο **υδροξυπερεζόνη**, που έχει απομονωθεί στο παρελθόν από τις ρίζες του φυτού *Perezia hebeclada* (Joseph-Nathan *et al*, 1972). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **29** παρατίθενται στον Πίνακα 4.32.



Εικ. 4.151 Φάσμα HSQC-DEPT (MeOH- d_4) του μεταβολίτη **29**

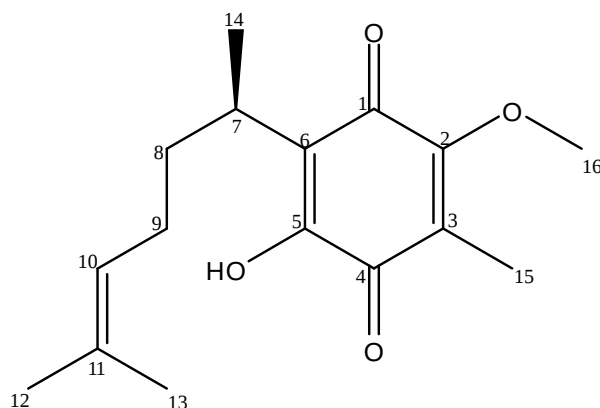
Πίνακας 4.32 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **29** (MeOH- d_4 , δ_H 3.31 ppm)

Θέση	^1H NMR (ppm)	COSY
7	3.09 (1H, m)	H-8a, H-8b, H-14
8	a 1.88 (1H, m)	H-14
	b 1.52 (1H, m)	H-14
9	1.88 (2H, m)	H-10
10	5.09 (1H, m)	H-9, H-12, H-13
12	1.53 (3H, s)	H-10
13	1.61 (3H, s)	H-10
14	1.18 (3H, d, $J=6.6$)	H-7
15	1.85 (3H, s)	-
OH	7.94 (1H, brs)	-
OH	8.15 (1H, brs)	-

4.2.28 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 30

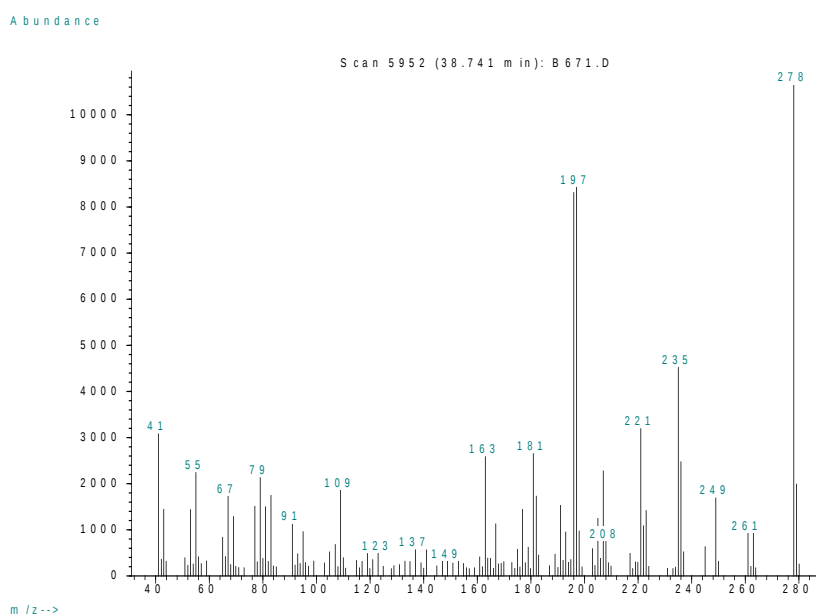
Πρώτη αναφορά ως φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **30** (16.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή καστανού ελαιώδους υπολείμματος.



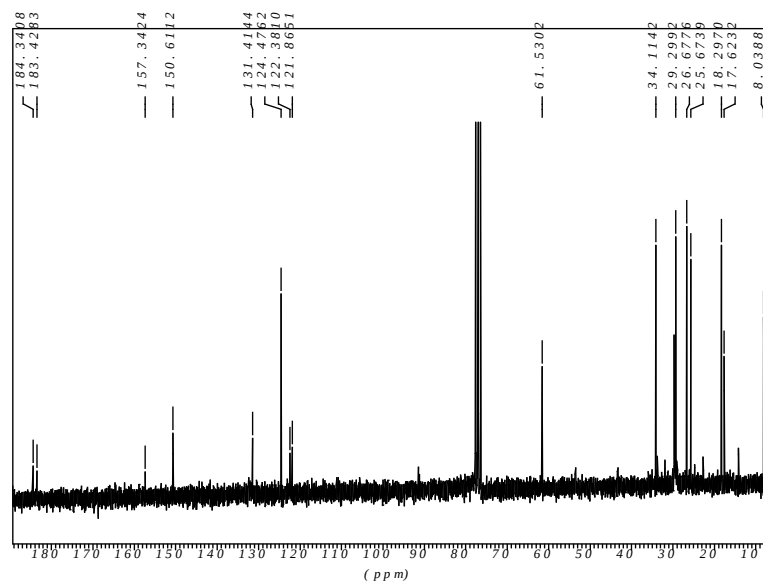
$[\alpha]_D = +8.57$ (c 0.046, CHCl_3)

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.152), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 278 $[\text{M}]^+$, που υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.



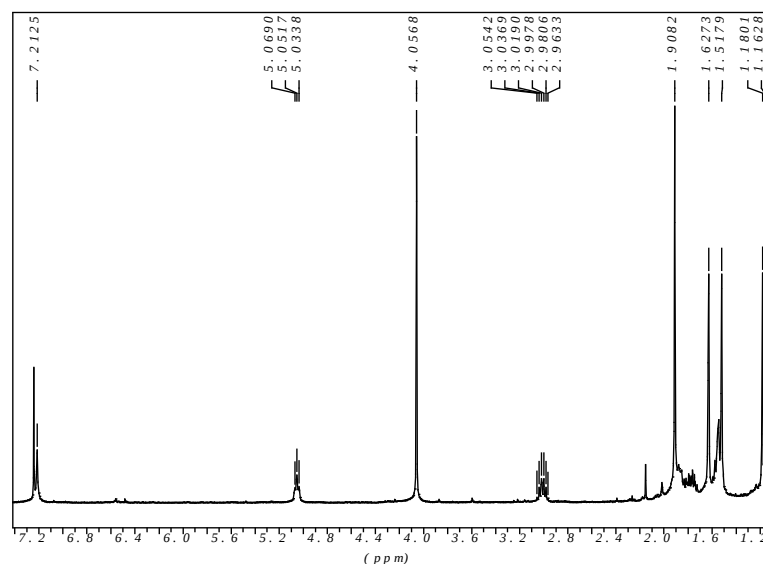
Εικ. 4.152 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **30**

Στο φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.153) εμφανίζονται 7 άτομα ανθράκων στην αλειφατική περιοχή, ένα άτομο στην περιοχή των οξυγονομένων ανθράκων στα 61.5 ppm, 6 ολεφινικοί/αρωματικοί άνθρακες (πέντε εκ των οποίων είναι τεταρτοταγείς) και δύο καρβονύλια στα 183.4 και 184.3 ppm.

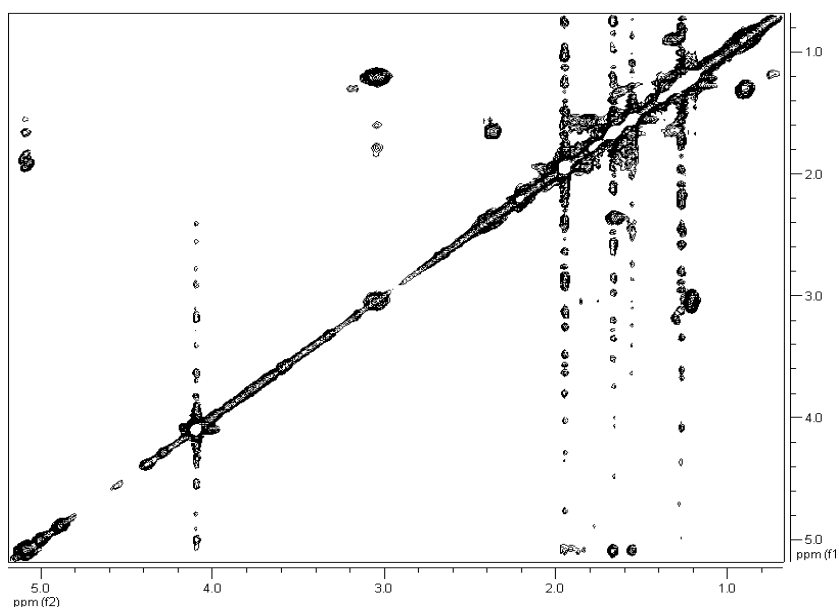


Εικ. 4.153 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **30**

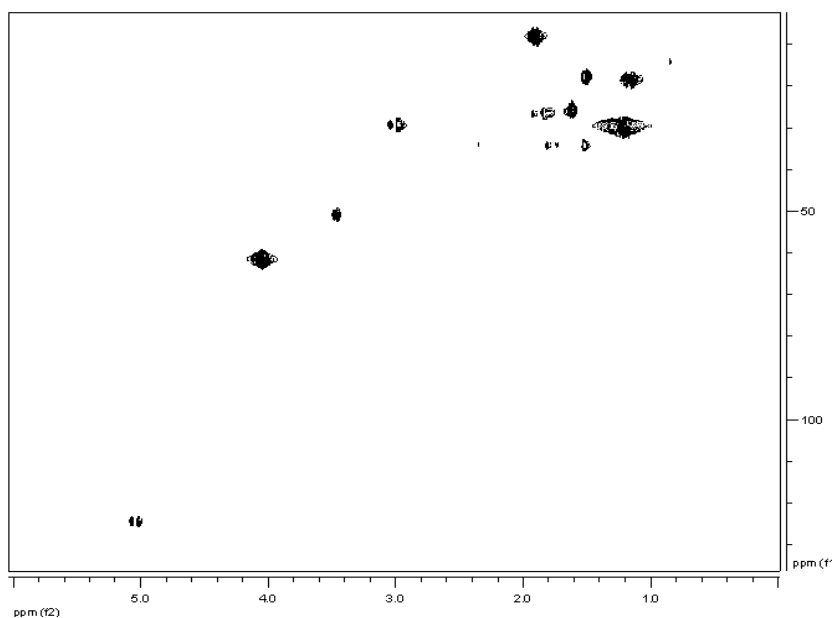
Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.154) παρουσιάζει πολύ σημαντικές ομοιότητες με αυτό του μεταβολίτη **29**. Άξια αναφοράς είναι η απουσία του σήματος του ενός αρωματικού υδροξυλίου και η παρουσία μίας απλής κορυφής στα 4.05 ppm, που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια. Η ύπαρξη άνθρακα στα 61.5 ppm σε συνδυασμό με την απλή κορυφή στο φάσμα ^1H -NMR στα 4.05 ppm παραπέμπει στην παρουσία οξυγονωμένου μεθυλίου.



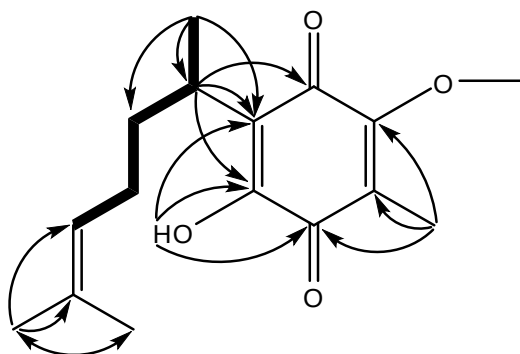
Εικ. 4.154 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **30**



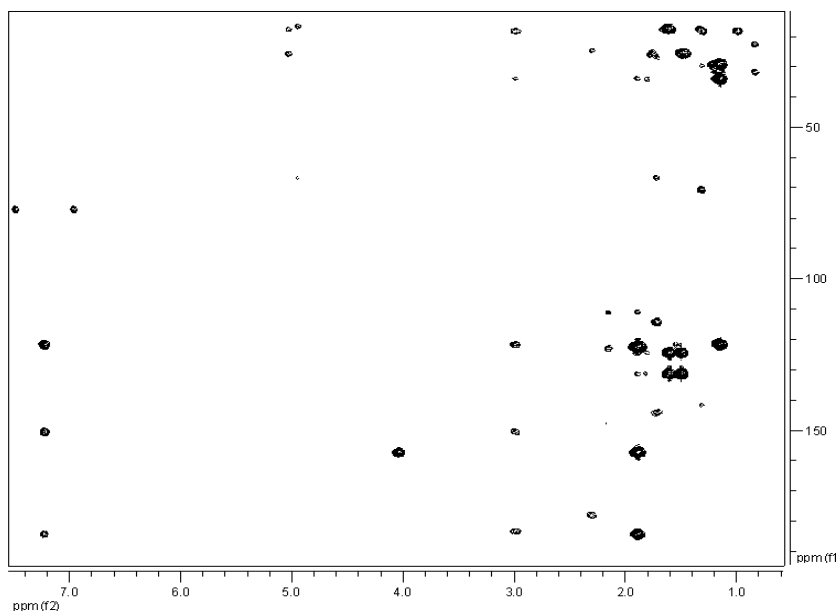
Εικ. 4.155 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **30**



Εικ. 4.156 Φάσμα ΗΜQC (CDCl_3) του μεταβολίτη **30**



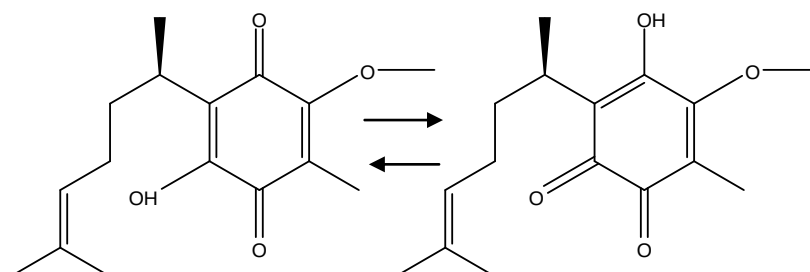
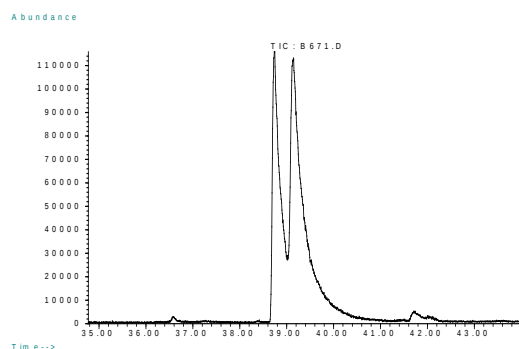
Σχήμα 4.16 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **30**



Εικ. 4.157 Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **30**

Με την περαιτέρω βοήθεια των πειραμάτων ΗΜQC (Εικ. 4.156) και ΗΜBC (Εικ. 4.157), ο μεταβολίτης **30** ταυτίστηκε με τη γνωστή παρα-κινόνη **μεθοξυπερεζόνη**. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το μόριο δεν έχει απομονωθεί στο παρελθόν από φυτικές πηγές, αλλά έχει παραχθεί ημισυνθετικά (Joseph-Nathan *et al*, 1993). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **30** παρατίθενται στον Πίνακα 4.33.

Στο χρωματογράφημα (GC-MS) της μεθοξυπερεζόνης εμφανίζονται δύο ισοϋψείς κορυφές ίδιου μοριακού βάρους στα 38.7 και 39.1 min, όπως συνέβη και με την περίπτωση της περεζόνης, που οδήγησαν στην υπόθεση ότι, και σε αυτή την περίπτωση, η ορθο- και η παρα- μορφή είναι σε συνεχή αλληλομετατροπή.



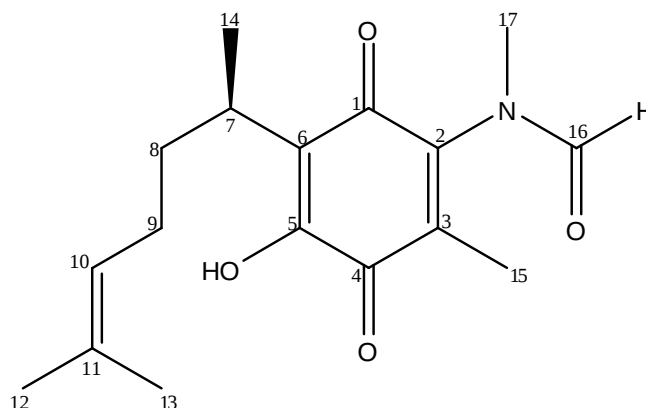
Πίνακας 4.33 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **30** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	183.4	-	-
2	-	157.3	-	-
3	-	122.3	-	-
4	-	184.3	-	-
5	-	150.6	-	-
6	-	121.9	-	-
7	3.00 (1H, sextet, J=6.9)	29.3	H-14, H-8a, H-8b	C-6, C-5, C-1, C-8, C-14
8	a 1.76 (1H, m) b 1.56 (1H, m)	34.1	H-7, H-8b, H-9 H-7, H-8a	- -
9	1.87 (1H, m)	26.7	H-8a, H-10	-
10	5.05 (1H, tm, J=7.0)	124.3	H-9, H-12, H-13	-
11	-	131.4	-	-
12	1.51 (3H, s)	17.6	H-10	C-10, C-11, C-13
13	1.62 (3H, s)	25.7	H-10	C-10, C-11, C-12
14	1.17 (3H, d, J=6.9)	18.3	H-7	C-6, C-7, C-8
15	1.90 (3H, s)	8.0	-	C-2, C-3, C-4
16	4.05 (3H, s)	61.5	-	C-2
OH	7.21 (1H, brs)	-	-	C-4, C-5, C-6

4.2.29 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 31

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **31** (7.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



$[\alpha]_D = +5.4$ (c 0.092, CHCl_3)

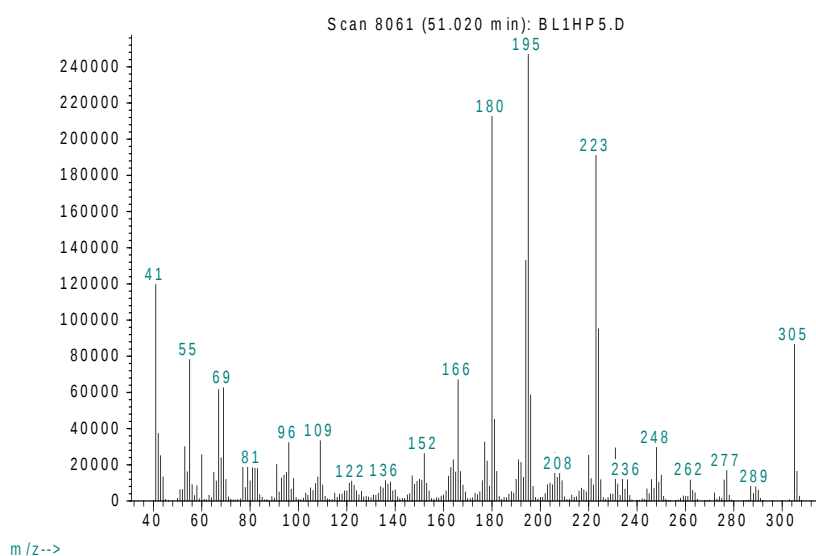
UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 262 (3.70), 306 (3.47) (nm)

IR (film) ν_{max} 3400, 2926, 1680, 1655, 1373, 1267, 1082, 975, 755 cm^{-1}

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **31** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_4$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 7 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRESIMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}-\text{H}]^+$ σε m/z 304.1551 (θεωρητικό MB: 304.1554). Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.158), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 305 $[\text{M}]^+$.

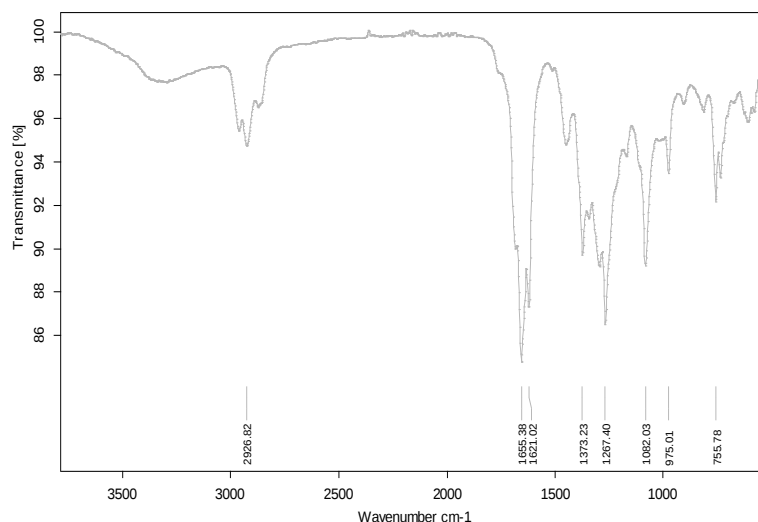
Abundance



$m/z \rightarrow$

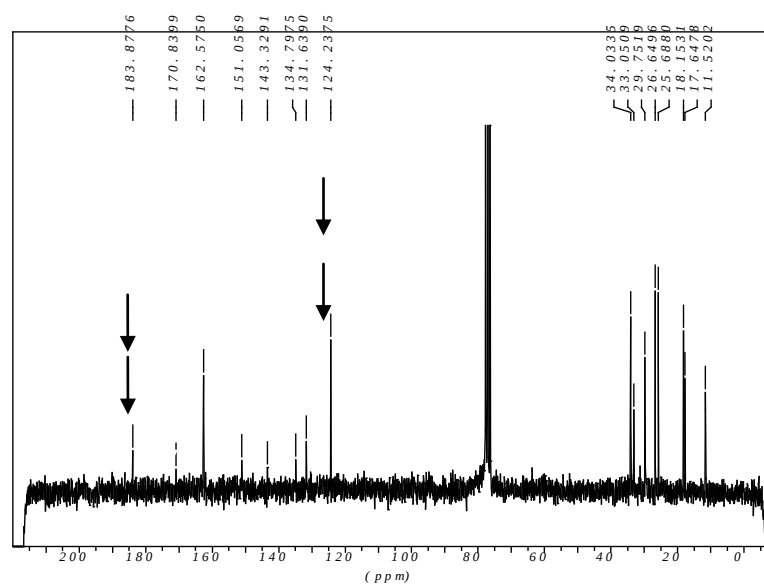
Εικ. 4.158 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **31**

Η ευρεία ταινία απορρόφησης στα 3200-3400 cm^{-1} στο φάσμα IR (Εικ. 4.159) υπέδειξε την παρουσία υδροξυλικών ομάδων στο μόριο. Εμφανείς είναι ακόμα οι χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης της C=C έκτασης ολεφινικού δεσμού σε ν_{max} 1655 cm^{-1} , μίας αλδεϋδομάδας σε ν_{max} 1680 cm^{-1} και ενός *trans*-διπλού δεσμού στα 975 cm^{-1} .

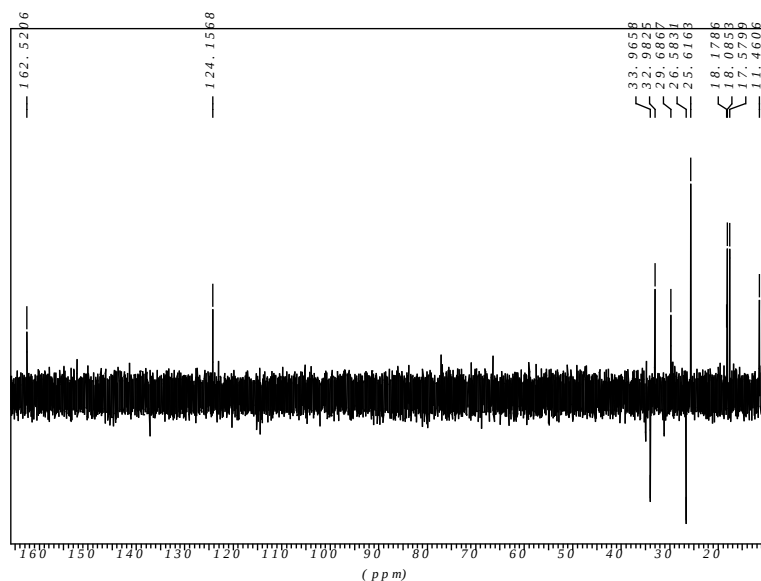


Εικ. 4.159 Φάσμα IR του μεταβολίτη **31**

Στα φάσματα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.160) και DEPT-135 (Εικ. 4.161) του μεταβολίτη **31** εμφανίζονται 8 άτομα ανθράκων στην αλειφατική περιοχή (5 μεθύλια, 2 μεθυλένια, 1 μεθίνιο), 6 ολεφινικοί/αρωματικοί άνθρακες (πέντε εκ των οποίων είναι τεταρτοταγείς) και τρία καρβονύλια στα 183.2, 182.1 και 162.3 ppm.



Εικ. 4.160 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **31**

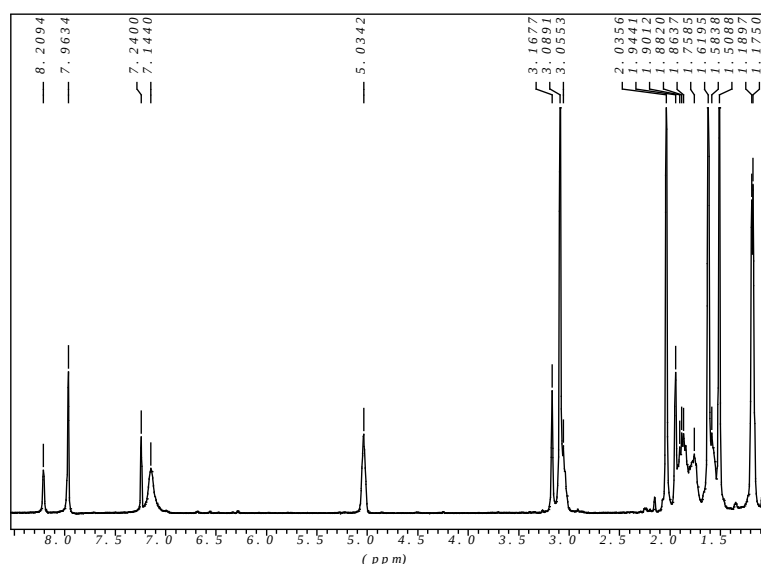


Εικ. 4.161 Φάσμα DEPT-135 (CDCl_3) του μεταβολίτη **31**

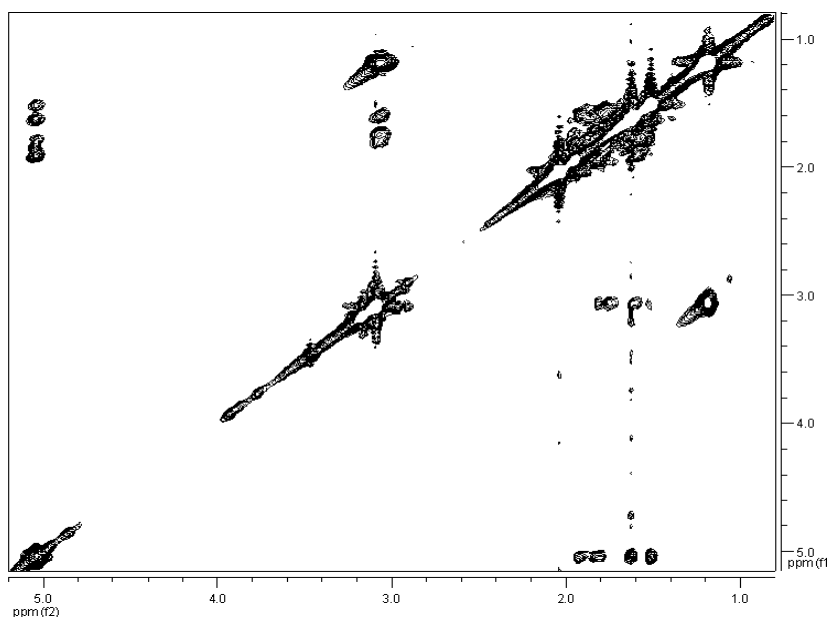
Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.162) παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με αυτό του μεταβολίτη **26** (περεζόνη). Άξια αναφοράς είναι η διαφοροποίηση σε δύο σημεία:

α) στην παρουσία μίας απλής κορυφής στα 3.09 ppm, που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια. Η ύπαρξη άνθρακα στα 33.4 ppm σε συνδυασμό με αυτή την απλή κορυφή στο φάσμα ^1H -NMR υποδεικνύει την παρουσία μεθυλίου σε άζωτο.

β) στην παρουσία μίας απλής κορυφής στα 7.97 ppm, που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και παραπέμπει στην ύπαρξη αλδεϋδης στο μόριο.

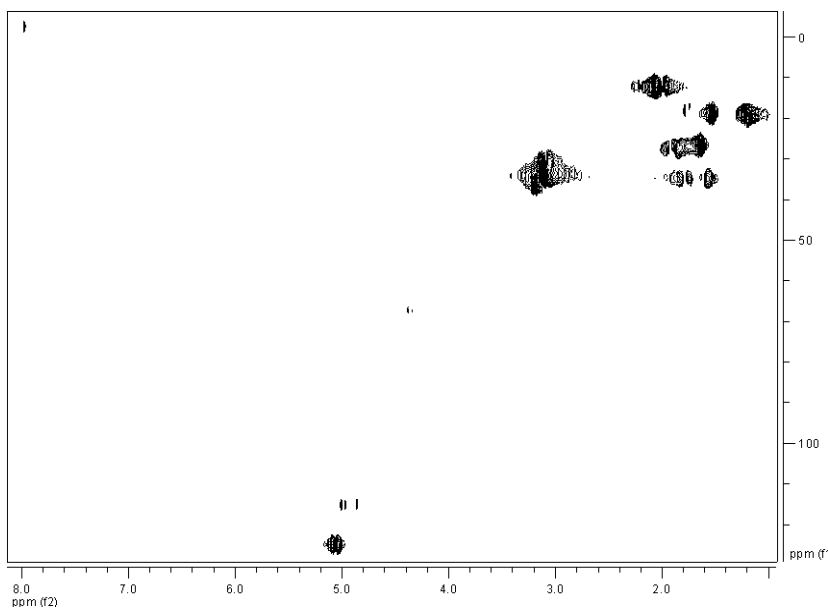


Εικ. 4.162 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **31**



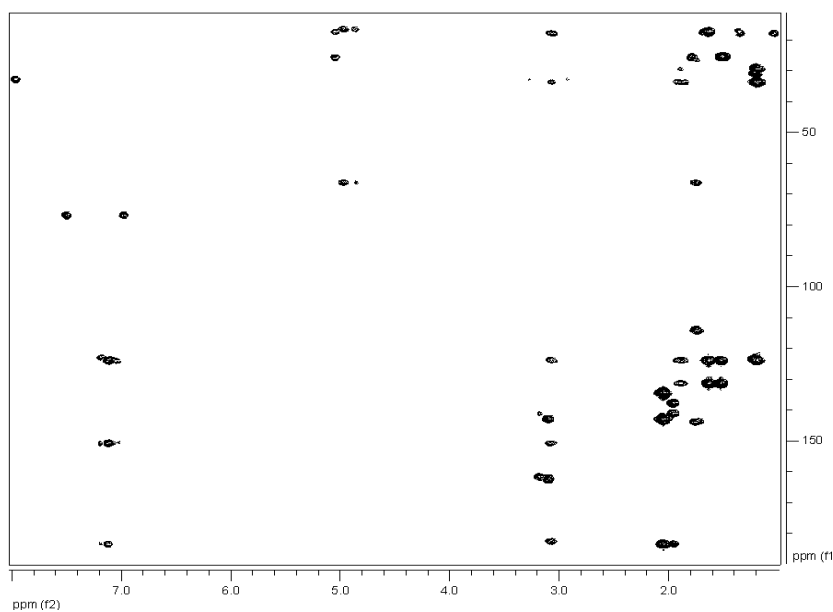
Εικ. 4.163 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **31**

Στο φάσμα HMQC (Εικ. 4.164) παρουσιάζεται τη σύζευξη άνθρακα και υδρογόνου της αλδεΐδης στα 162.3 ppm. Ταυτόχρονα, η απουσία συσχέτισης στα 7.09 ppm παραπέμπει στο ότι πρόκειται για πρωτόνιο υδροξυλίου.

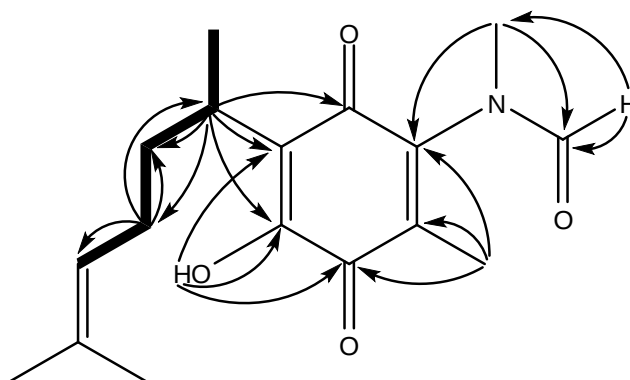


Εικ. 4.164 Φάσμα HMQC (CDCl_3) του μεταβολίτη **31**

Το φάσμα HMBC (Εικ. 4.165) βοήθησε στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και τον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο. Το αμίδιο τοποθετήθηκε στον C-2 του αρωματικού δακτυλίου και το υδροξύλιο στον C-5.



Εικ. 4.165 Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **31**



Σχήμα 4.17 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **31**

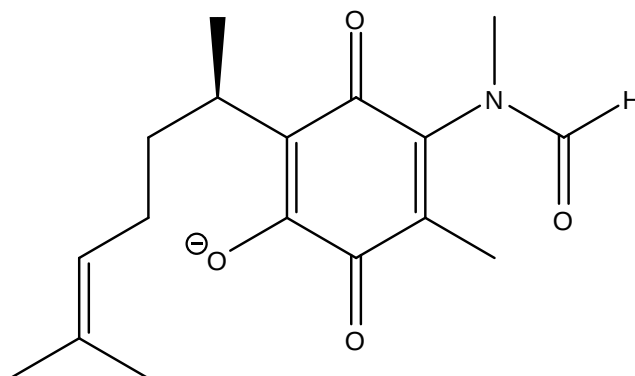
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και τη βιβλιογραφική αναζήτηση, ο μεταβολίτης **31** ταυτοποιήθηκε ως **ριτζιδαμίδιο** και είναι νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.34.

Πίνακας 4.34 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **31** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

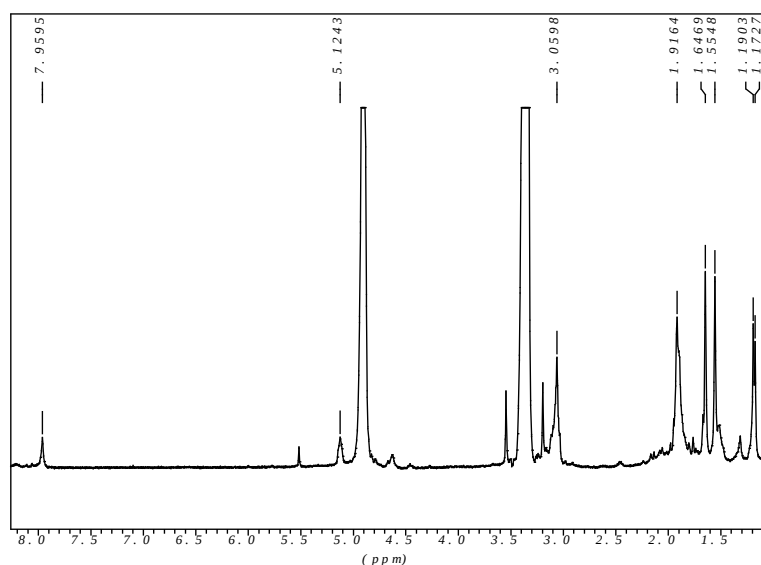
Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	182.1	-	-
2	-	142.9	-	-
3	-	134.6	-	-
4	-	183.2	-	-
5	-	150.7	-	-
6	-	124.2	-	-
7	3.06 (1H, m)	30.0	H-8a, H-8b, H-14	C-14, C-1, C-5, C-6, C-9
8	a 1.76 (1H, m)	33.4	H-7, H-8b	-
	b 1.60 (1H, m)		H-7, H-8a, H-9a	-
9	a 1.92 (1H, m)	26.9	H-8b, H-9b, H-10	C-7, C-8, C-10, C-11
	b 1.83 (1H, m)		H-9a, H-10	C-8, C-10, C-11
10	5.03 (1H, brs)	124.5	H-9a, H-9b, H-12, H-13	C-12, C-13
11	-	131.3	-	-
12	1.62 (3H, s)	26.0	H-10	C-13, C-10, C-11
13	1.51 (3H, s)	18.3	H-10	C-12, C-10, C-11
14	1.19 (3H, d, J=5.9)	18.5	H-7	C-6, C-7, C-8
15	2.04 (3H, s)	11.9	-	C-2, C-3, C-4
16	7.96 (1H, s)	162.3	-	C-17
17	3.09 (3H, s)	33.4	-	C-16, C-17
OH	7.14 (1H, brs)	-	-	C-4, C-5, C-6

4.2.30 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 32

Το άλας του ριτζαμιδίου (1.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή μωβ σκόνης.



Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 4.166) παρουσιάζει πολύ σημαντικές ομοιότητες με αυτό του μεταβολίτη **31**. Άξια αναφοράς είναι η μετατόπιση των πρωτονίων του Me-15 και του Me-17 σε υψηλότερα πεδία. Επίσης, στο φάσμα λείπει το σήμα του υδροξυλίου του ριτζαμιδίου.



Εικ. 4.166 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ ($\text{MeOH-}d_4$) του μεταβολίτη **32**

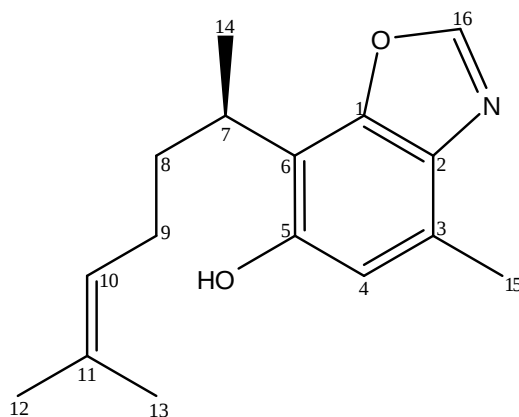
Αξίζει να σημειωθεί πως το άλας εκλουόταν, στην αντίστροφης φάσης HPLC, λίγα λεπτά πριν το ριτζαμίδιο. Είχε χαρακτηριστικό μωβ χρώμα και ήταν αδιάλυτο στο διχλωρομεθάνιο.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις είναι αυτές που συνηγόρησαν στην υπόθεση ότι το παρόν μόριο μπορεί να είναι άλας του ριτζαμιδίου. Για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης, σε μικρή ποσότητα του μεταβολίτη **31** διαλυμένης σε μεθανόλη, προστέθηκε μία σταγόνα NaOH 1N. Το διάλυμα απέκτησε ακαριαία ένα μωβ χρώμα.

Το φάσμα ^1H -NMR του άλατος που προέκυψε ταυτιζόταν πλήρως με αυτό του μεταβολίτη **32**.

4.2.31 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 33*Νέο φυσικό προϊόν*

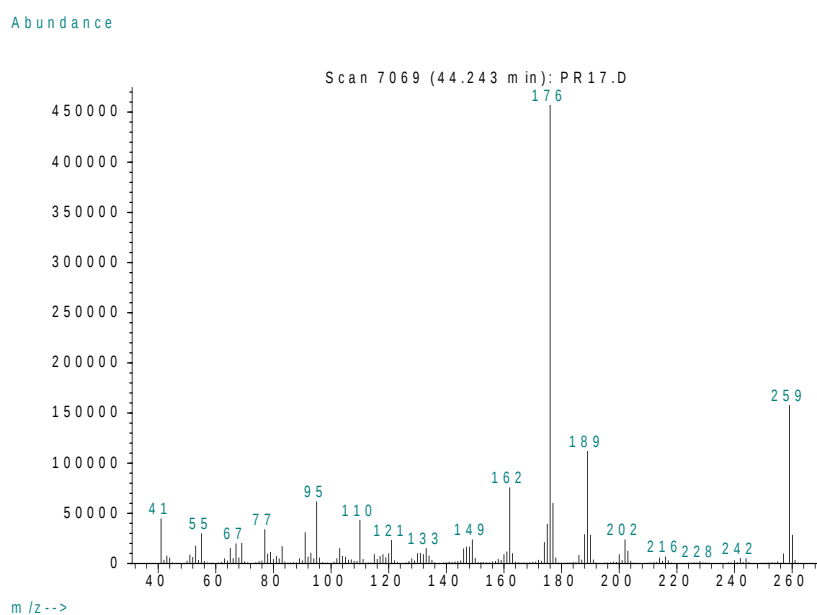
Ο μεταβολίτης **33** (1.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.


 $[\alpha]_D = -4.0$ (c 0.1, CHCl_3)

 $\text{UV } \lambda_{\text{max}} (\text{CHCl}_3) (\log \epsilon) 250 (3.23), 278 (3.00) (\text{nm})$
 $\text{IR (film)} \nu_{\text{max}} 3263, 2963, 1732, 1520, 1392, 1266, 1098, 1040 \text{ cm}^{-1}$

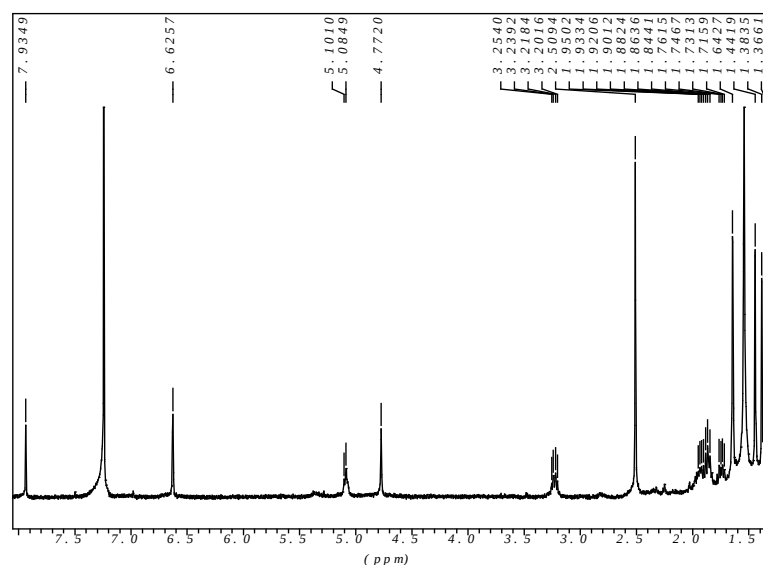
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **33** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 7 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRESIMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ σε m/z 260.1652 (θεωρητικό MB: 260.1645). Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.167), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 259 $[\text{M}]^+$.

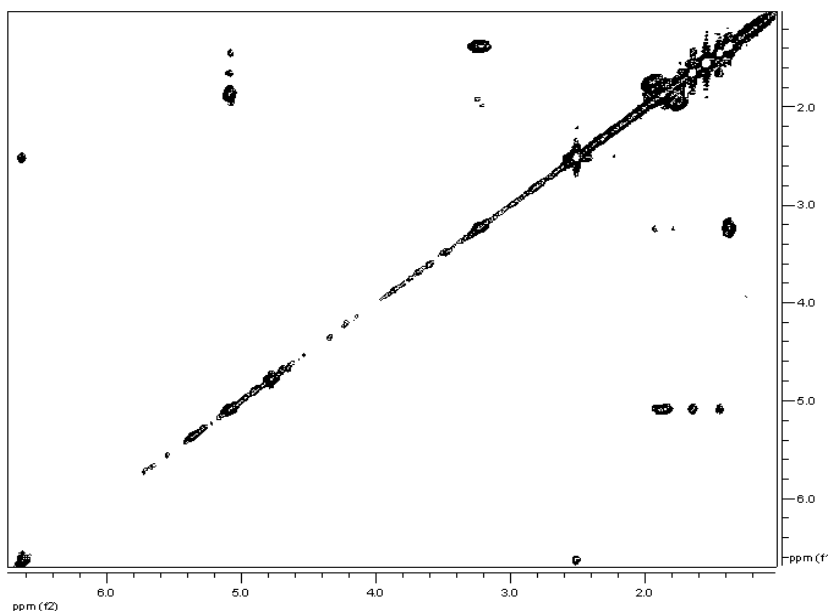


Εικ. 4.167 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **33**

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 4.168) παρουσιάζει ισοπροπυλιδένιο (δ 5.08, 1H; δ 1.64, 3H; δ 1.44, 3H), ένα μεθύλιο στο βενζυλικό μεθίνιο (δ 1.37, 3H; δ 3.23, 1H), ένα αρωματικό πρωτόνιο (δ 6.63) και ένα αρωματικό μεθύλιο (δ 2.52), που εμφανίζει σύζευξη με το αρωματικό πρωτόνιο. Το σήμα σε δ 4.77 αντιστοιχεί σε πρωτόνιο υδροξυλίου, ενώ αυτό σε δ 7.93 αντιστοιχεί σε πρωτόνιο μεθινίου, σε εξαιρετικά χαμηλά πεδία.



Εικ. 4.168 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του μεταβολίτη **33**



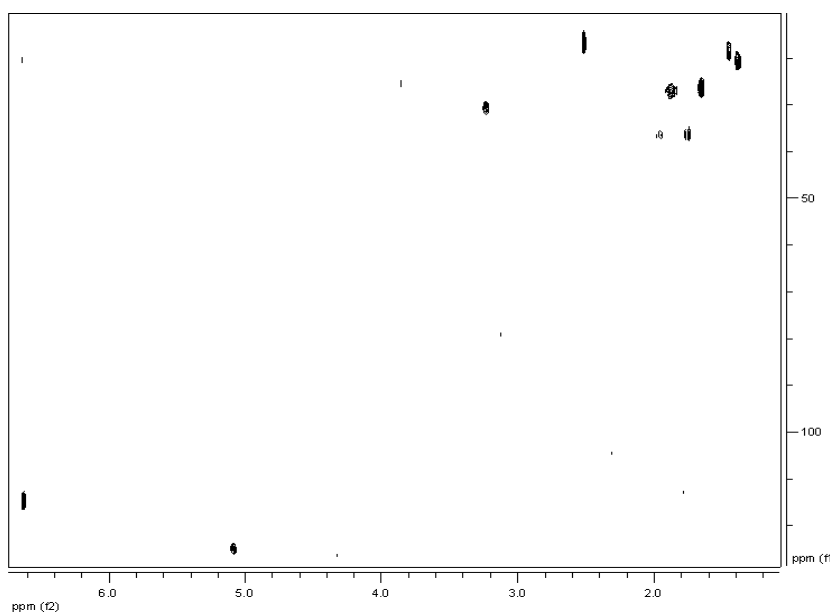
Εικ. 4.169 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **33**

Στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.171), τα πρωτόνια των μεθυλίων (H_3 -12, H_3 -13) της ισοπροπυλικής ομάδας παρουσιάζουν ισχυρές ετεροπυρηνικές συζεύξεις με τον C-10 (124.5 ppm) και τον τεταρτοταγή C-11 (131.9 ppm).

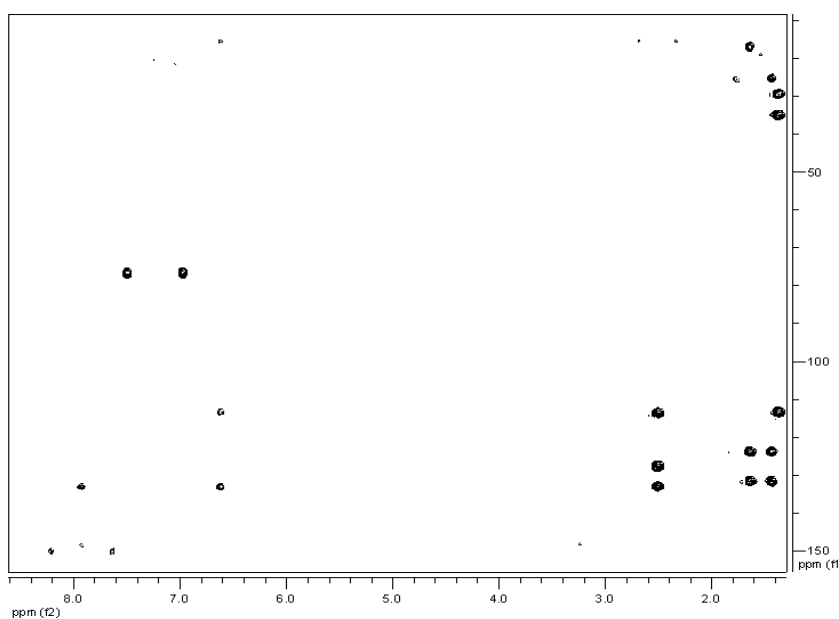
Τα πρωτόνια του H₃-14 συσχετίζονται με τον τεταρτοταγή C-6 (113.9 ppm), τον C-7 (30.4 ppm) και τον C-8 (35.8 ppm). Τα H₃-15 παρουσιάζουν συσχέτιση με τον τεταρτοταγή C-2 (133.2 ppm), τον τεταρτοταγή C-3 (127.9 ppm) και με τον C-4 (114.3 ppm).

Το βενζυλικό μεθίνιο H-7 συσχετίζεται με τον οξυγονωμένο C-5 (148.7 ppm) του αρωματικού δακτυλίου, ενώ το αρωματικό H-4 παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-2, με τον C-6, όπως και με τον C-15 (16.4 ppm).

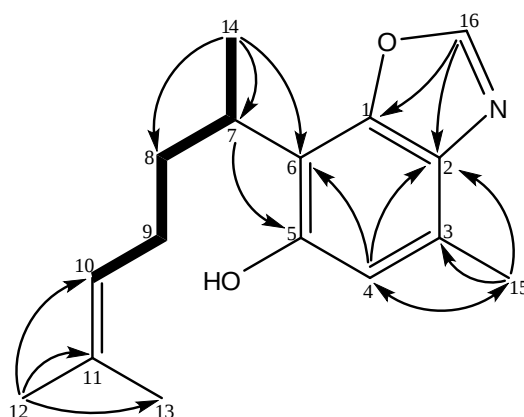
Το ολεφινικό μεθίνιο σε δ 7.93 συσχετίζεται με τον δεύτερο οξυγονωμένο άνθρακα C-1 (149.0 ppm) του αρωματικού δακτυλίου και με τον C-2. Αυτή η παρατήρηση σε συνδυασμό με την αναγκαιότητα ύπαρξης ενός επιπλέον δακτυλίου στο μόριο, παραπέμπουν σε δακτύλιο οξαζολίνης συνδεδεμένο στους άνθρακες C-1 και C-2 του αρωματικού σεσκιτερπενίου.



Εικ. 4.170 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl₃) του μεταβολίτη **33**



Εικ. 4.171 Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **33**



Σχήμα 4.18 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **33**

Ο μεταβολίτης **33** ταυτοποιήθηκε, με βάση τη βιβλιογραφική αναζήτηση, ως νέα χημική ένωση. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.35.

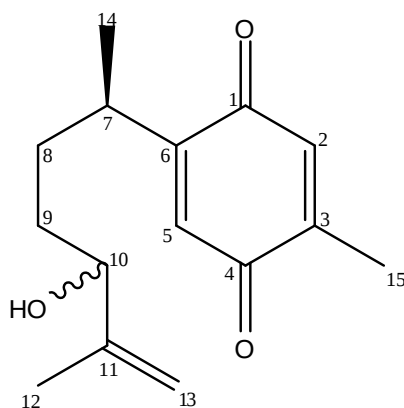
Πίνακας 4.35 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **33** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	149.0	-	-
2	-	133.2	-	-
3	-	127.9	-	-
4	6.63 (1H, s)	114.3	H-15	C-2, C-6, C-15
5	-	148.7	-	-
6	-	113.9	-	-
7	3.23 (1H, m)	30.4	H-8a, H-8b, H-14	-
8	a 1.94 (1H, m) b 1.74 (1H, m)	35.8	H-7, H-8b, H-9 H-7, H-8a	- -
9	1.84 (1H, m)	26.5	H-8a, H-10	-
10	5.08 (1H, m)	124.5	H-9, H-12, H-13	-
11	-	131.9	-	-
12	1.64 (3H, brs)	25.9	H-13, H-10	C-10, C-11, C-13
13	1.44 (3H, brs)	18.0	H-12, H-10	C-10, C-11, C-12
14	1.37 (3H, d, J=7.0 Hz)	20.3	H-7	C-6, C-7, C-8
15	2.52 (3H, s)	16.4	H-4	C-2, C-3, C-4
16	7.93 (1H, s)	150.1	-	C-1, C-2
OH	4.77 (1H, brs)	-	-	-

4.2.32 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 34

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **34** (12.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος. Η μελέτη των φασμάτων μάζας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για σεσκιτερπένιο.



$[\alpha]_D = -12.5$ (c 0.04, CHCl_3)

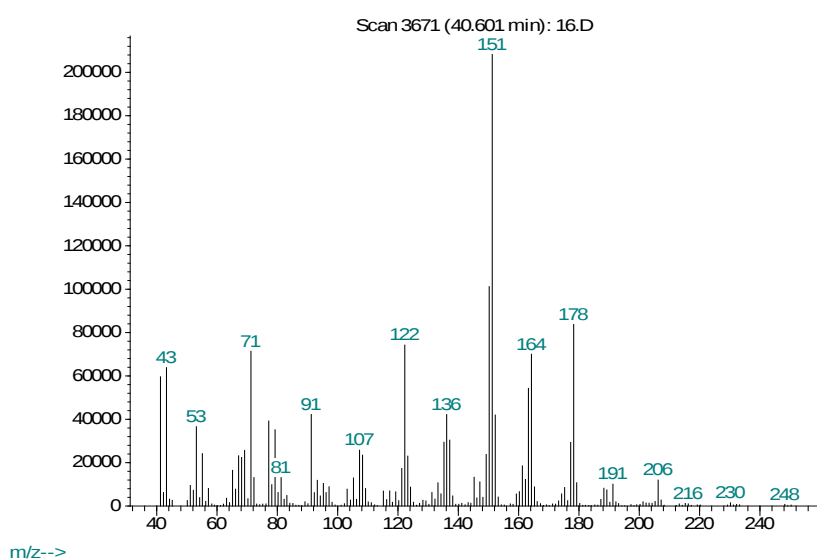
UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 264 (3.3) (nm)

IR (film) ν_{max} 3431 (broad), 2917, 1647, 1445, 1252, 910 cm^{-1}

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **34** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRFABMS) παρουσίασε μοριακό ιόν $[\text{M}]^+$ σε m/z 248.1417 (θεωρητικό MB: 248.1412).

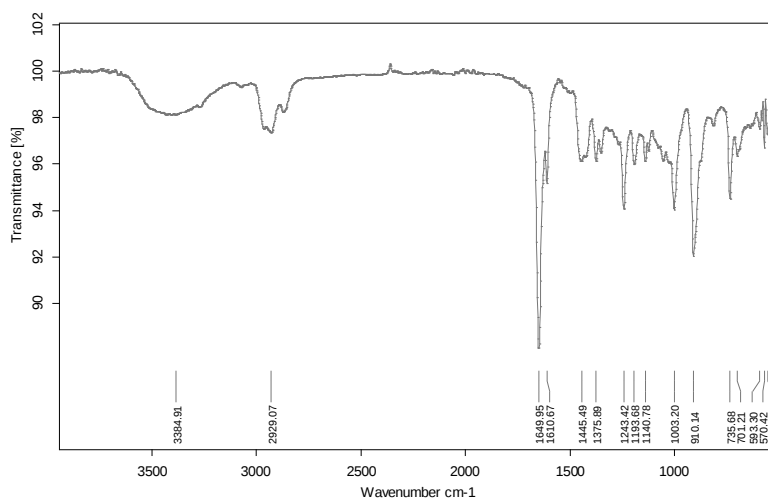
Abundance



$m/z \rightarrow$

Εικ. 4.172 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **34**

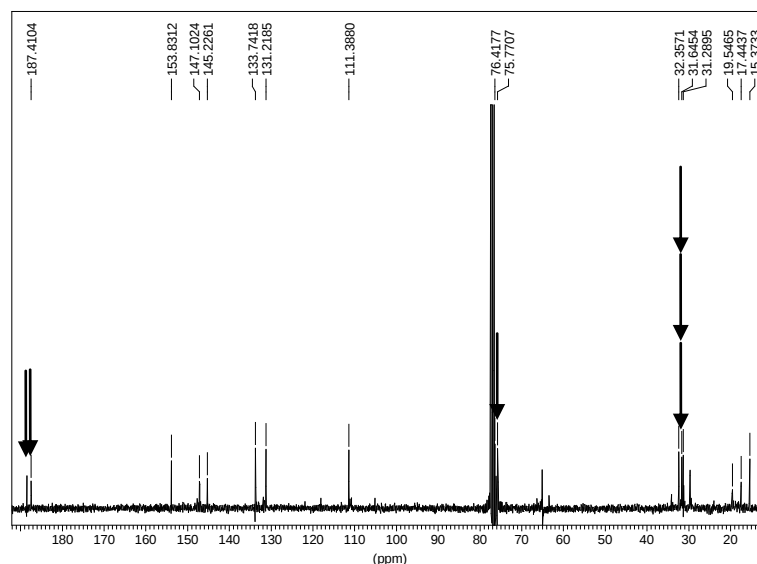
Στο φάσμα IR (Εικ. 4.173) είναι εμφανής η παρουσία υδροξυλομάδας και καρβονυλομάδας.



Εικ. 4.173 Φάσμα IR του μεταβολίτη **34**

Στο φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.174) του μεταβολίτη **34** παρουσιάζονται 15 άτομα ανθράκων. Εμφανής είναι η ύπαρξη δύο καρβονυλίων, ενώ τα 6 άτομα ανθράκων στην περιοχή των ολεφινικών/αρωματικών επιβεβαιώνουν την παρουσία τριών διπλών δεσμών.

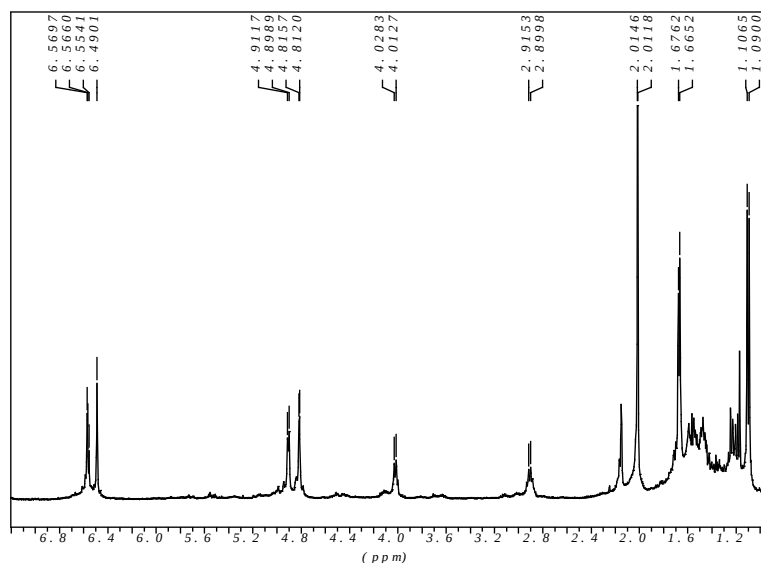
Η ύπαρξη άνθρακα στα 75.8 ppm σε συνδυασμό με την πολλαπλή κορυφή στο φάσμα ^1H -NMR στα 4.02 ppm υποδεικνύει την παρουσία οξυγονωμένου μεθινίου.



Εικ. 4.174 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **34**

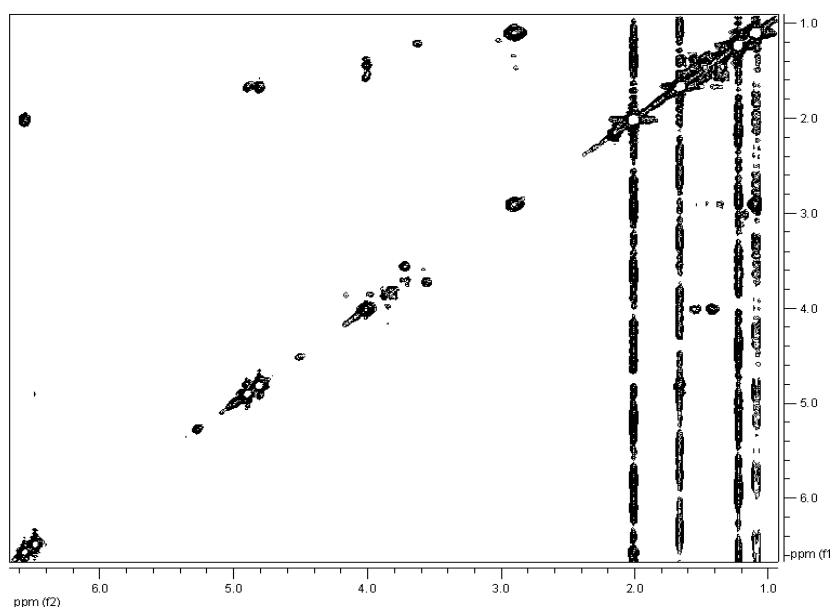
Όσον αφορά στο φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.175), αυτό διαφέρει μόνο στην αρωματική περιοχή από τα φάσματα των μεταβολιτών **13** και **14**. Επίσης, το αρωματικό μεθύλιο συντονίζεται στα 2.01 ppm (2.15 ppm για τον μεταβολίτη **18** και

2.16 ppm για τον μεταβολίτη **19**), γεγονός που μπορεί να δικαιολογηθεί από την αντικατάσταση του 1,4 διϋδροφαινολικού δακτυλίου με παρα-κινονικό δακτύλιο.



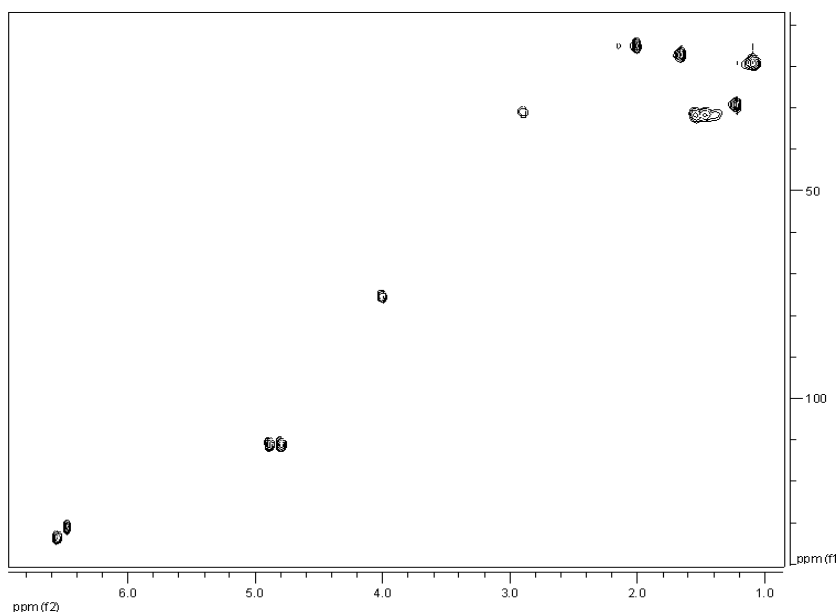
Εικ. 4.175 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του μεταβολίτη **34**

Η μελέτη του φάσματος COSY (Εικ. 4.176) επιβεβαιώνει ότι τα καρβονύλια στον αρωματικό δακτύλιο του μορίου είναι σε para θέση.

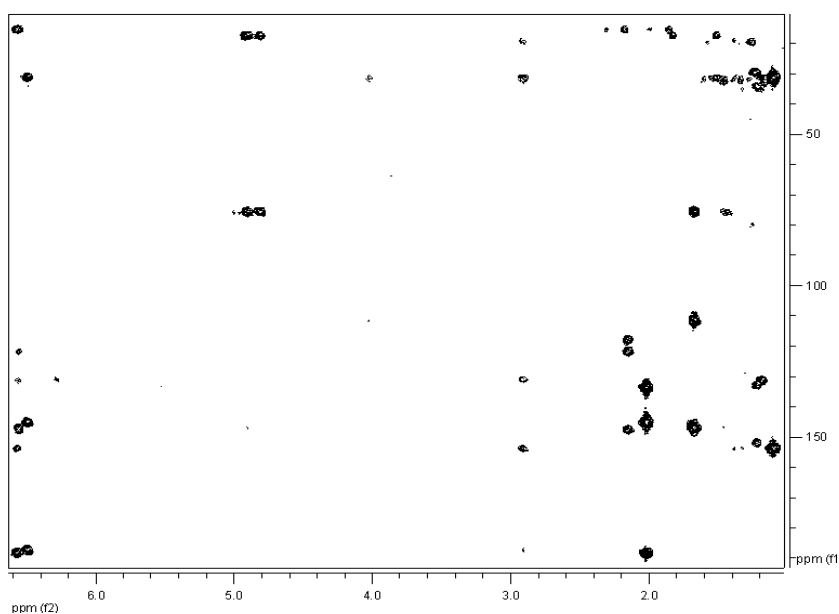


Εικ. 4.176 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **34**

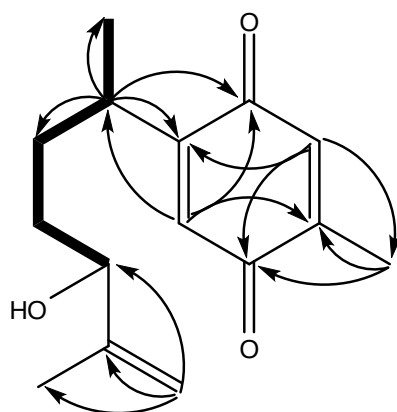
Στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.178), το αρωματικό μεθύλιο παρουσιάζει συσχέτιση με ένα από τα δύο καρβονύλια (188.4 ppm), όπως και με έναν άνθρακα στα 133.0 ppm. Σε αυτόν τον άνθρακα (με βάση και το φάσμα COSY και το φάσμα HMQC) πρέπει να βρίσκεται το αρωματικό πρωτόνιο που συντονίζεται στα 6.57 ppm.



Εικ. 4.177 Φάσμα ΗΜQС (CDCl₃) του μεταβολίτη **34**



Εικ. 4.178 Φάσμα ΗΜBС (CDCl₃) του μεταβολίτη **34**



Σχήμα 4.19 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις ΗΜBС του μεταβολίτη **34**

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναζήτηση, ο μεταβολίτης **34** είναι νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.36.

Καθώς δεν απομονώθηκε το επιμερές του μεταβολίτη **34** στον C-10, σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων για την απόδοση της σχετικής στερεοχημείας δεν ήταν εφικτή.

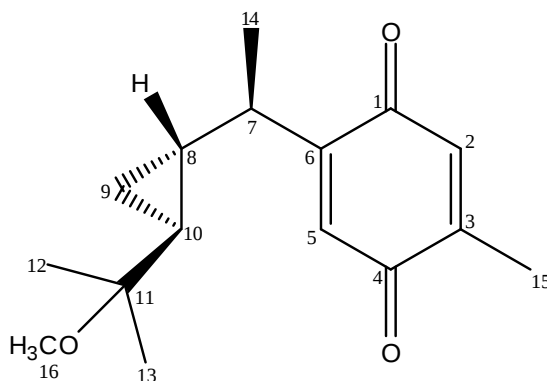
Πίνακας 4.36 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **34** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	187.4	-	-
2	6.57 (1H, d, J=1.1)	133.0	H-15	C-4, C-6, C-15
3	-	145.2	-	-
4	-	188.4	-	-
5	6.49 (1H, s)	131.0		C-1, C-3, C-7
6	-	153.8	-	-
7	2.90 (1H, m)	31.3	H-14, H-8a, H-8b	C-1, C-5, C-6, C-8, C-14
8	a 1.36 (1H, m) b 1.50 (1H, m)	32.5	H-7, H-8b, H-9b H-7, H-8a, H-9b, H-9a	- -
9	a 1.43 (1H, m) b 1.56 (1H, m)	32.5	H-8b, H-9b, H-10 H-8b, H-8a, H-9a, H-10	C-7 -
10	4.02 (1H, m)	75.8	H-9a, H-9b	-
11	-	147.1	-	-
12	1.67 (3H, brd, J=4.4)	17.4	H-13a, H-13b	C-10, C-11, C-13
13	a 4.90 (1H, brd, J=5.1) b 4.81 (1H, brd, J=1.6)	111.4	H-12, H-13b H-12, H-13a	C-10, C-12 C-10, C-11, C-12
14	1.10 (3H, d, J=6.6)	19.5	H-7	C-6, C-7, C-8
15	2.01 (3H, d, J=1.1)	15.4	H-2	C-2, C-3, C-4

4.2.33 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 35

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **35** (1.8 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



$[\alpha]_D = -12.0$ (c 0.125, CHCl_3)

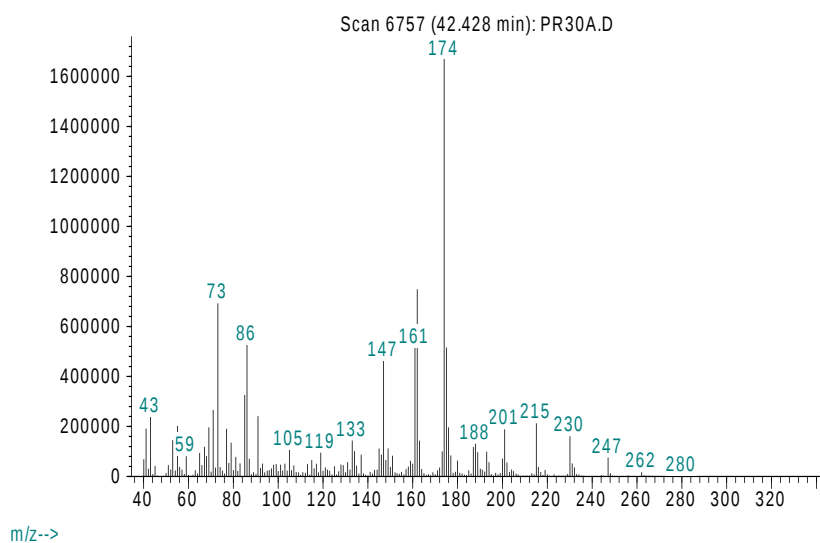
UV λ_{max} (CHCl_3) (log ϵ) 254 (3.78) (nm)

IR (film) ν_{max} 2971, 1655, 1460, 1376, 1240, 1177, 1071, 912 cm^{-1}

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **35** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_3$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRESIMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ σε m/z 263.1647 (θεωρητικό MB: 263.1642). Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.179), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 262 $[\text{M}]^+$.

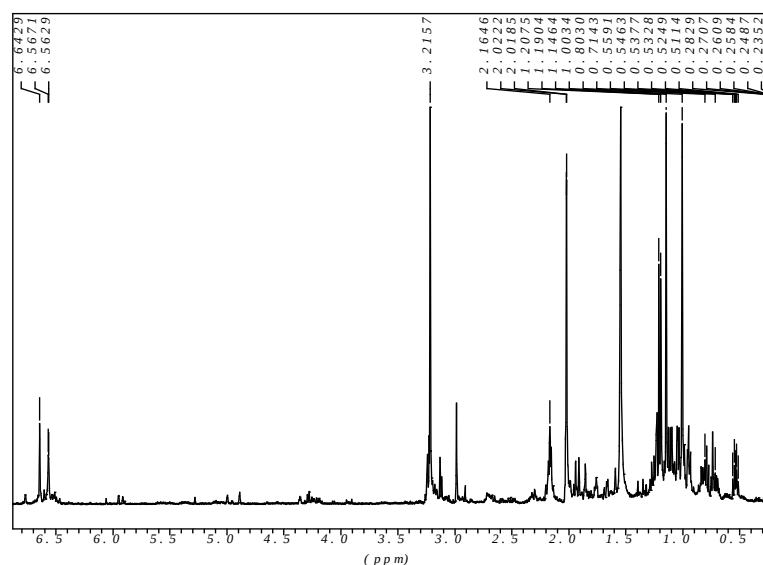
Abundance



$m/z \rightarrow$

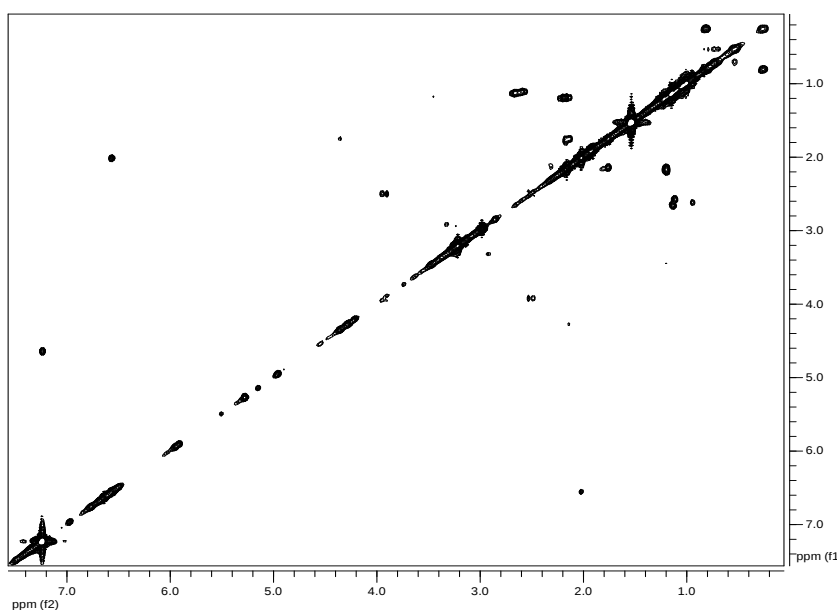
Εικ. 4.179 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **35**

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.180) εμφάνισε χαρακτηριστικά σήματα για δύο αρωματικά πρωτόνια σε δ 6.64 και 6.57, το δεύτερο εκ των οποίων συζεύγνεται με το γειτονικό αρωματικό μεθύλιο σε δ 2.02, ένα μεθύλιο σε βενζυλικό μεθίνιο (δ 1.20, 3H, d; δ 2.17, 1H, m), δύο μεθίνια σε δ 0.74 και 0.82, σε ένα μεθυλένιο σε δ 0.54 και 0.27 (με βάση και τα φάσματα COSY, Εικ. 4.181 και HSQC-DEPT, Εικ. 4.182), δύο αλειφατικά μεθύλια σε δ 1.15 και 1.00 και μία μεθοξυομάδα σε δ 3.22.



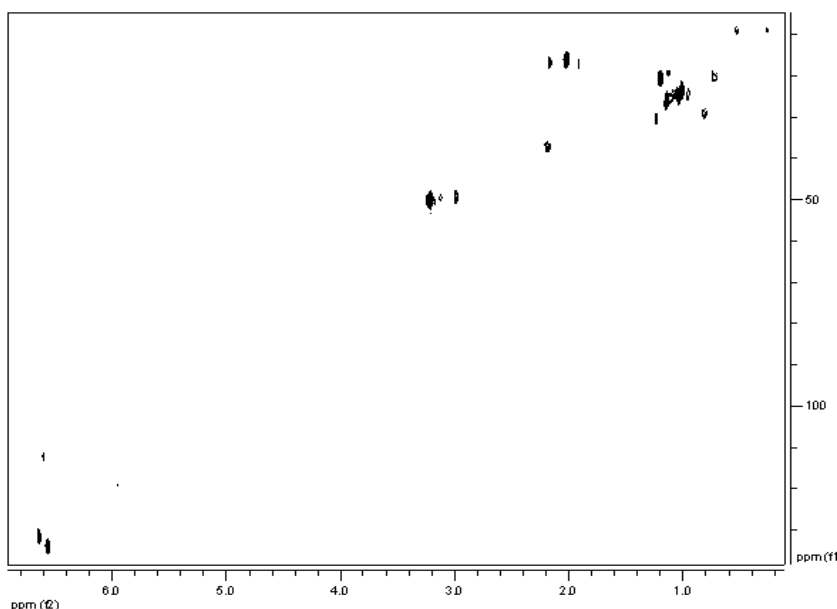
Εικ. 4.180 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **35**

Στο φάσμα COSY φαίνονται η σύζευξη του βενζυλικού μεθινίου με το μεθύλιο Me-14 της πλευρικής αλυσίδας του μορίου και με το H-8 στα 0.74 ppm. Το H-8 εμφανίζει σύζευξη με το H-9a, ενώ το H-10 εμφανίζει σύζευξη με τα H-9a και H-9b.



Εικ. 4.181 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **35**

Αφού το σήμα του αρωματικού πρωτονίου σε δ 6.57 είναι διπλή κορυφή λόγω της μακράς σύζευξης του με το αρωματικό μεθύλιο, συνεπάγεται ότι τα καρβονύλια του μορίου (η παρουσία των οποίων αποδεικνύεται από τη μελέτη του φάσματος HMBC) είναι σε para θέση.

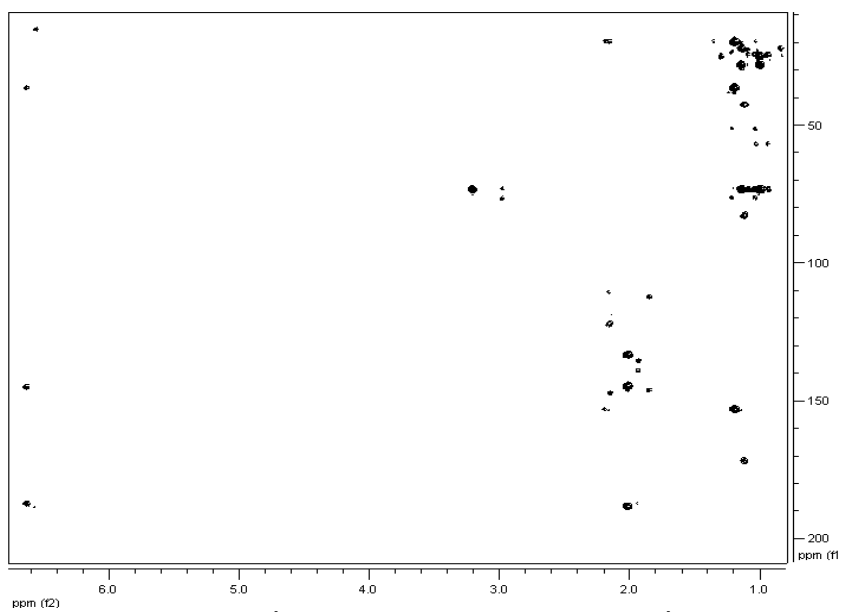


Εικ. 4.182 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **35**

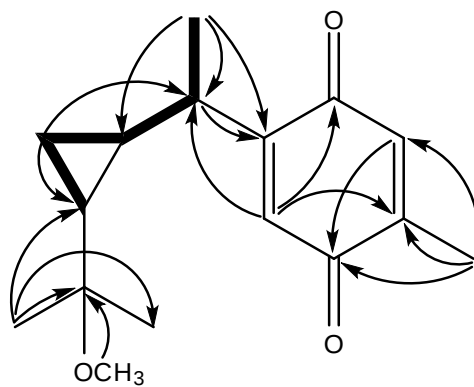
Στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.183), τα πρωτόνια των αλειφατικών μεθυλίων παρουσιάζουν ισχυρές ετεροπυρηνικές συζεύξεις με τον C-11 στα 73.2 ppm (με τον οποίον συσχετίζονται και τα πρωτόνια της μεθοξυομάδας) και τον τριτοταγή C-10 στα 28.8 ppm. Ισχυρές ετεροπυρηνικές συζεύξεις παρουσιάζουν, επίσης, τα πρωτόνια του μεθυλίου στο βενζυλικό μεθίνιο με τον C-6 του αρωματικού δακτυλίου στα 152.9 ppm, με τον C-7 στα 37.3 ppm και με τον C-8 στα 20.5 ppm.

Το αρωματικό μεθύλιο παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-4 (188.2 ppm), τον C-3 (144.8 ppm) και τον C-2 (133.9 ppm). Σε αυτόν τον άνθρακα (με βάση και τα φάσματα COSY και HSQC-DEPT) βρίσκεται το αρωματικό πρωτόνιο, που εμφανίζεται στα 6.57 ppm.

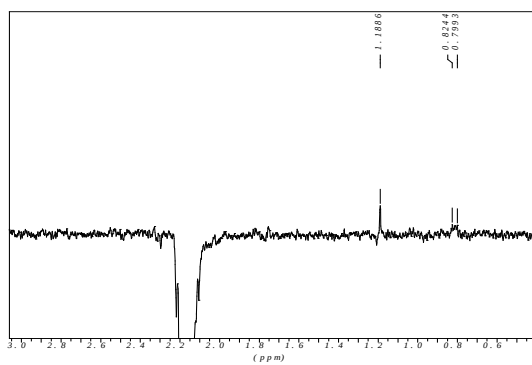
Επίσης, το αρωματικό πρωτόνιο στα 6.64 ppm παρουσιάζει συσχέτιση με τους C-1 (187.3 ppm), C-3 και C-7 (36.3 ppm).



Εικ. 4.183 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **35**



Σχήμα 4.20 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **35**



Εικ. 4.184 Φάσμα 1D NOE (CDCl_3) του μεταβολίτη **35**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H-7

ήταν αναμενόμενη μόνο σε δύο πιθανές στερεοδιαμορφώσεις του μορίου, στην 7*R**,8*R**,10*S** και στην 7*R**,8*S**,10*R**. Η απουσία συσχέτισης των πρωτονίων H-7/H-9 (συσχέτιση, η οποία είναι παρούσα στον μεταβολίτη **36**) καθόρισαν τη σχετική στερεοχημεία στους άνθρακες C-7, C-8 και C-10 ως 7*R**,8*R**,10*S**.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταβολίτης **35** ταυτοποιήθηκε ως **κυκλο-κουρκουκινόνη Α** και σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναζήτηση είναι νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **35** παρατίθενται στον Πίνακα 4.37.

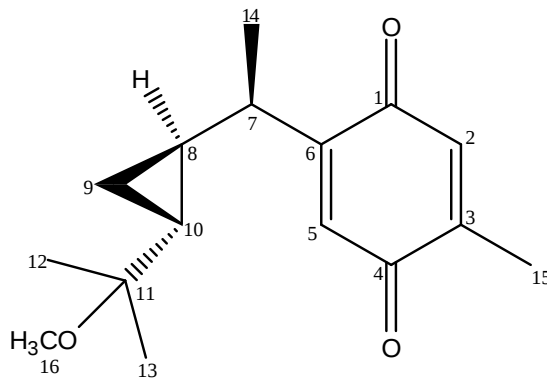
Πίνακας 4.37 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **35** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC	1D NOE
1	-	187.3	-	-	-
2	6.57 (1H, d, J=1.5)	133.9	H-15	C-4, C-15	-
3	-	144.8	-	-	-
4	-	188.2	-	-	-
5	6.64 (1H, s)	131.5	-	C-1, C-3, C-7	-
6	-	152.9	-	-	-
7	2.17 (1H, m)	36.3	H-8, H-14	C-14, C-6	H-10
8	0.74 (1H, m)	19.7	H-7, H-9a	-	H-12
9	a 0.54 (1H, m) b 0.27 (1H, m)	8.8	H-8, H-9b, H-10 H-9a, H-10	- -	- -
10	0.82 (1H, m)	28.4	H-9a, H-9b	C-13	H-7, H-13
11	-	73.2	-	-	-
12	1.00 (3H, s)	22.3	-	C-10, C-11, C-13	H-8
13	1.15 (3H, s)	24.9	-	C-10, C-11, C-12	H-10
14	1.20 (3H, d, J=7.0)	20.5	H-7	C-6, C-7, C-8	-
15	2.02 (3H, d, J=1.5)	16.0	H-2	C-2, C-3, C-4	-
16	3.22 (3H, s)	49.9	-	C-11	-

4.2.34 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 36

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **36** (1.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



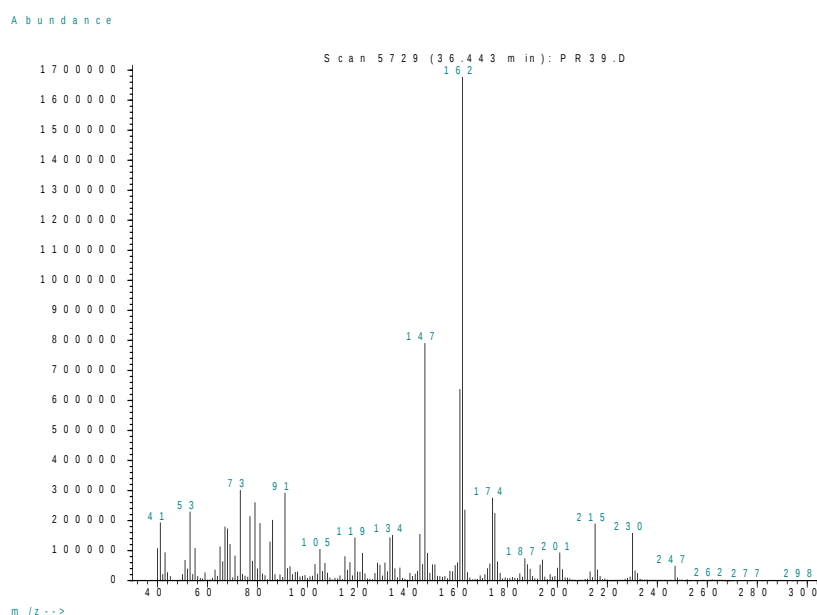
$[\alpha]_D = -22.3$ (c 0.058, CHCl_3)

UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 254 (4.11) (nm)

IR (film) ν_{max} 2971, 1655, 1460, 1376, 1240, 1177, 1071, 912 cm^{-1}

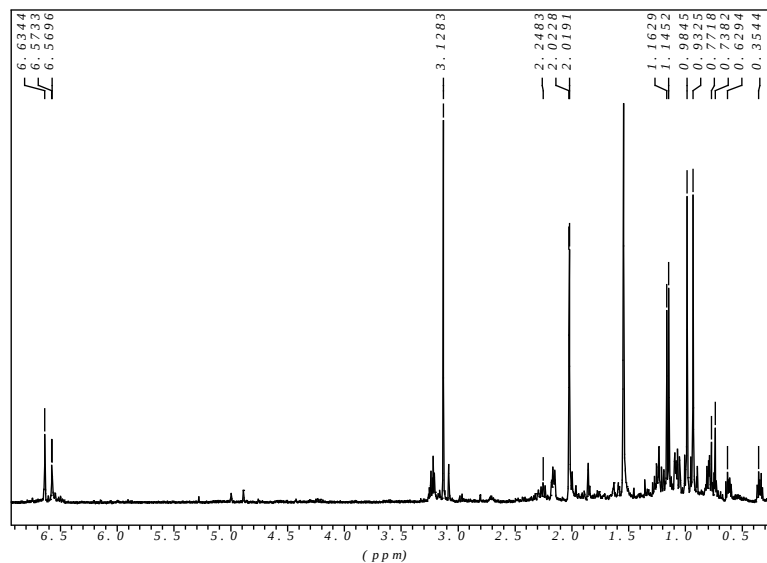
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **37** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_3$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRESIMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{Na}]^+$ σε m/z 285.1465 (θεωρητικό MB: 285.1461). Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.188), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 262 $[\text{M}]^+$.

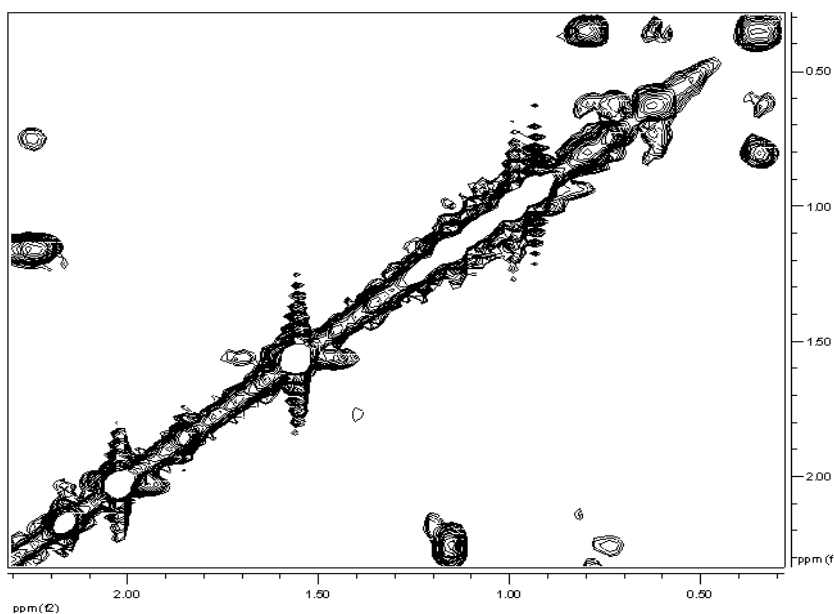


Εικ. 4.188 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **36**

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.189) είναι παρόμοιο με αυτό του μεταβολίτη **37**, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για δύο ισομερείς ενώσεις.

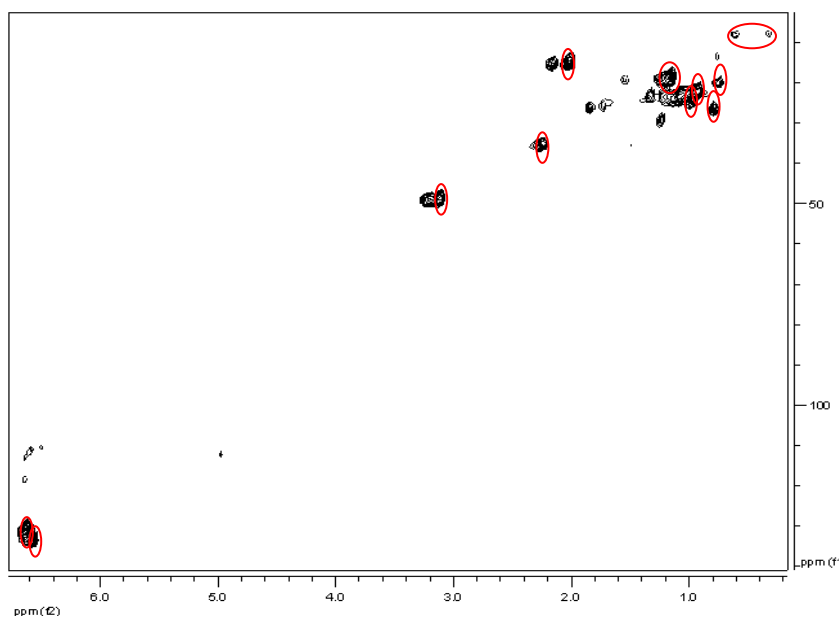


Εικ. 4.189 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **36**

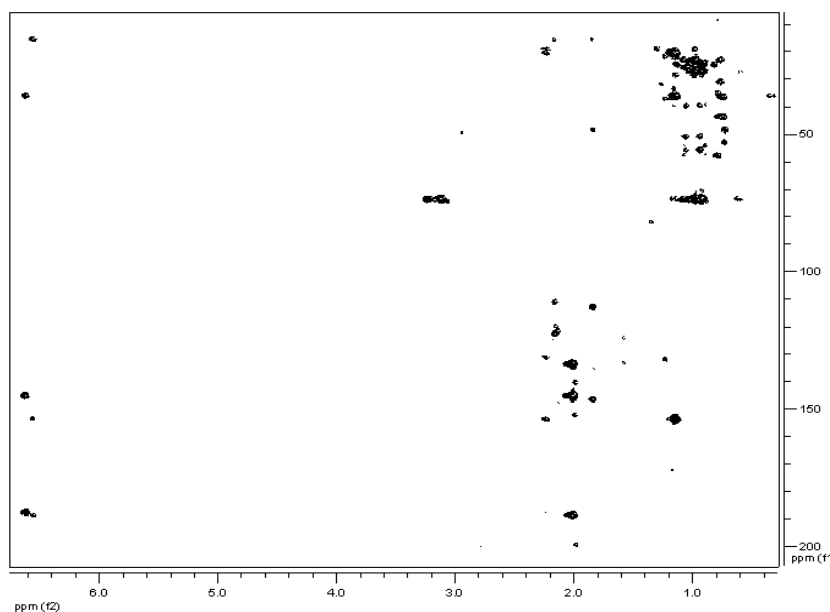


Εικ. 4.190 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **36**

Τα πειράματα COSY (Εικ. 4.190), HSQC-DEPT (Εικ. 4.191) και HMBC (Εικ. 4.192) επιβεβαίωσαν την αλληλουχία των ανθράκων και τις σχετικές θέσεις ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο.

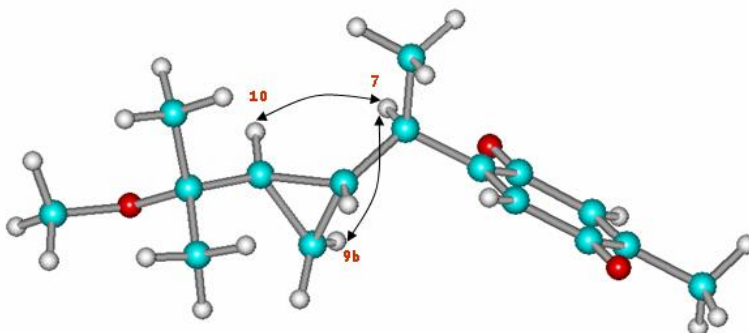


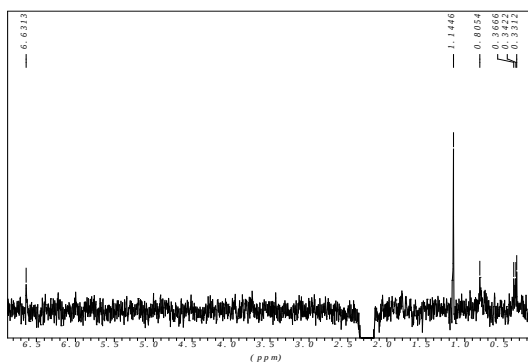
Εικ. 4.191 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **36**



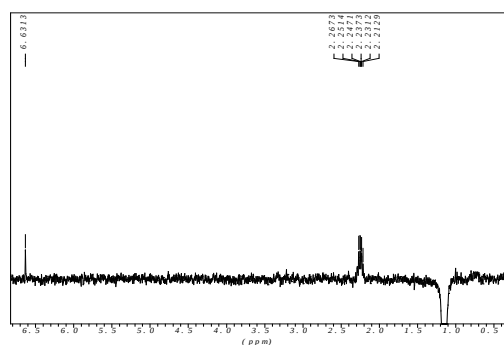
Εικ. 4.192 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **36**

Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των τριών ασύμμετρων κέντρων βασίστηκε σε πειράματα 1D NOE (Εικ. 4.193, 4.194). Οι συσχετίσεις των πρωτονίων H-7/H-10 και H-7/H-9b καθόρισαν τη σχετική στεreoχημεία στους άνθρακες C-7, C-8 και C-10 ως 7*R**, 8*S**, 10*R**.





Εικ. 4.193 Φάσμα 1D NOE (CDCl₃) του μεταβολίτη **36**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H-7



Εικ. 4.194 Φάσμα 1D NOE (CDCl₃) του μεταβολίτη **36**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H₃-14

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταβολίτης **36** αποτελεί το επιμερές του μεταβολίτη **37** στον C-7 του μορίου. Ταυτοποιήθηκε ως **κυκλο-κουρκουκινόνη Β** και είναι νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.38.

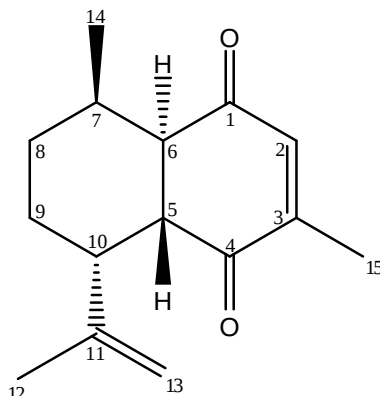
Πίνακας 4.38 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **36** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC	1D NOE
1	-	187.1	-	-	-
2	6.57 (1H, d, J=1.5)	133.1	H-15	C-4, C-6, C-15	-
3	-	144.8	-	-	-
4	-	188.2	-	-	-
5	6.63 (1H, s)	130.7	-	C-1, C-3, C-7	-
6	-	153.2	-	-	-
7	2.25 (1H, m)	35.7	H-8, H-14	C-5, C-6, C-8	H-9b, H-10
8	0.75 (1H, m)	20.3	H-7, H-9a	C-13	-
9	a 0.62 (1H, m) b 0.36 (1H, m)	8.5	H-8, H-9b, H-10 H-9a, H-10	C-10, C-11 C-7	- H-7
10	0.80 (1H, m)	27.0	H-9b, H-9a	C-12	H-7
11	-	73.3	-	-	-
12	0.98 (3H, s)	24.4	-	C-10, C-11, C-13	-
13	0.93 (3H, s)	22.8	-	C-10, C-11, C-12	-
14	1.16 (3H, d, J=7.0)	18.8	H-7	C-6, C-7, C-8	-
15	2.02 (3H, d, J=1.5)	15.3	H-2	C-2, C-3, C-4	-
16	3.13 (3H, s)	49.3	-	C-11	-

4.2.35 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 37

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **37** (1.3 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου κρυσταλλικού υπολείμματος.



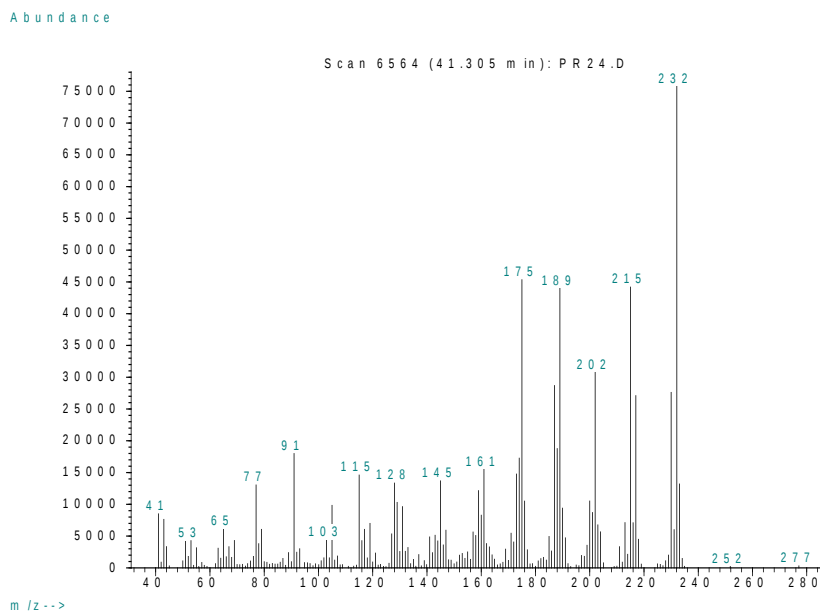
$[\alpha]_D = -9.6$ (c 0.083, CHCl_3)

UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 246 (3.56) (nm)

IR (film) ν_{max} 2338, 2235, 1678, 1164 cm^{-1}

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **37** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

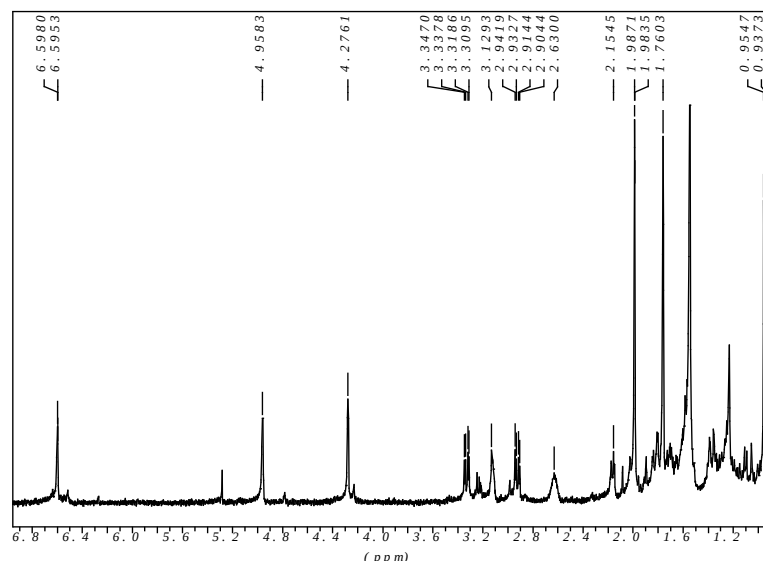
Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRFABMS) παρουσίασε μοριακό ιόν $[\text{M}]^+$ σε m/z 232.1473 (θεωρητικό MB: 232.1463).



Εικ. 4.195 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **37**

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.196) εμφάνισε χαρακτηριστικά σήματα, τα οποία αντιστοιχούν σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο (δ 6.59), σε ένα μεθύλιο σε τριτοταγή

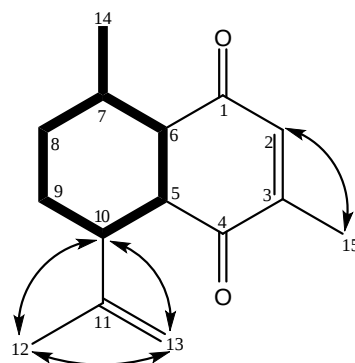
άνθρακα (δ 0.95), σε τέσσερα μεθίνια (δ 3.33, 3.13, 2.92 και 2.63), σε δύο βινυλικά μεθύλια (δ 1.76 και 1.98) και σε δύο απλές κορυφές (δ 4.96 και 4.27), που παραπέμπουν στην ύπαρξη εξωμεθυλενίου στο μόριο.



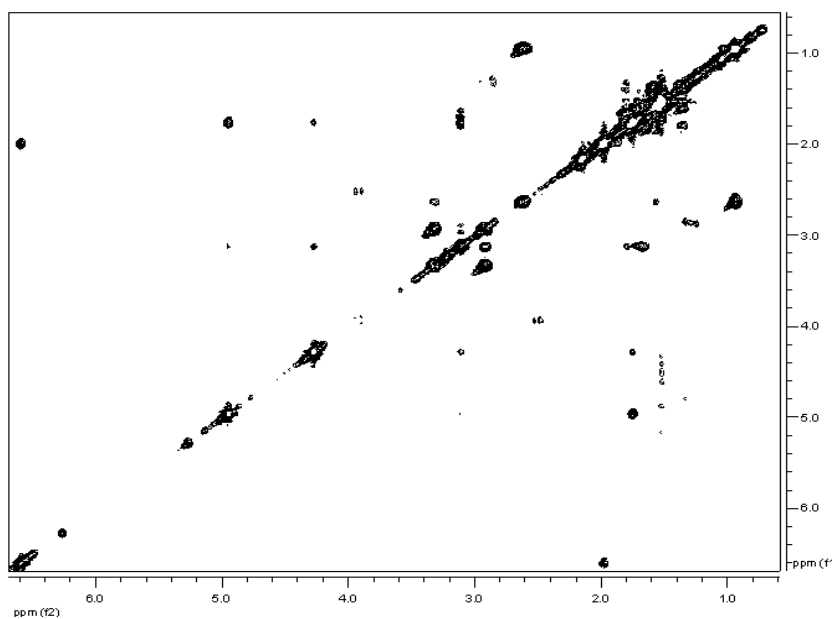
Εικ. 4.196 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του μεταβολίτη **37**

Στο φάσμα COSY (Εικ. 197) φαίνονται η σύζευξη των πρωτονίων του μεθυλίου H_3 -15 στον κινονικό δακτύλιο με το ολεφινικό πρωτόνιο και η σύζευξη του μεθινίου H -7 (δ 2.63) με το H_3 -14. Αφού το σήμα του ολεφινικού πρωτονίου είναι διπλή κορυφή λόγω της σύζευξης του και με το H_3 -15, προκύπτει η ισχυρή ένδειξη ότι τα καρβονύλια του μορίου (η παρουσία των οποίων αποδεικνύεται από τη μελέτη του φάσματος HMBC) είναι τοποθετημένα σε para θέση.

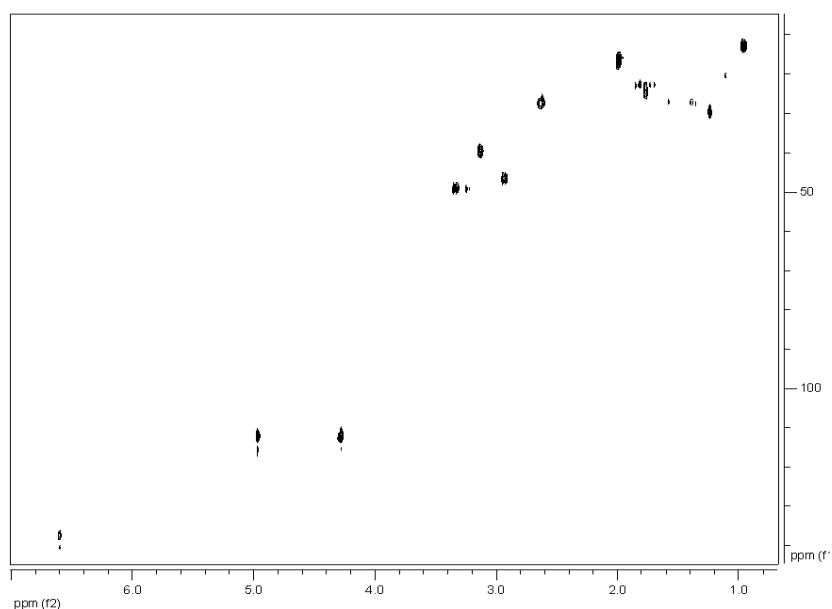
Στο φάσμα COSY, επίσης, φαίνονται η σύζευξη του H -7 με το H_2 -8 και το H -6 (δ 3.33), η σύζευξη του H -6 με το H -5 (δ 2.92), αυτή του H -5 με το H -10 (δ 3.13) – απόδειξη για την ύπαρξη ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ των C -5 και C -10- και αυτή του H -10 με το H_2 -9, το βινυλικό μεθύλιο H_3 -12 και τα εξωμεθυλενικά πρωτόνια. Η τελευταία παρατήρηση, υποστηρίζει τη θέση του εξωμεθυλενίου στην ισοπροπυλική ομάδα.



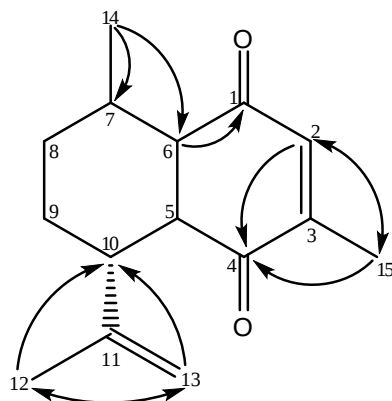
Σχήμα 4.21 Συζεύξεις COSY του μεταβολίτη **37**



Εικ. 4.197 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **37**

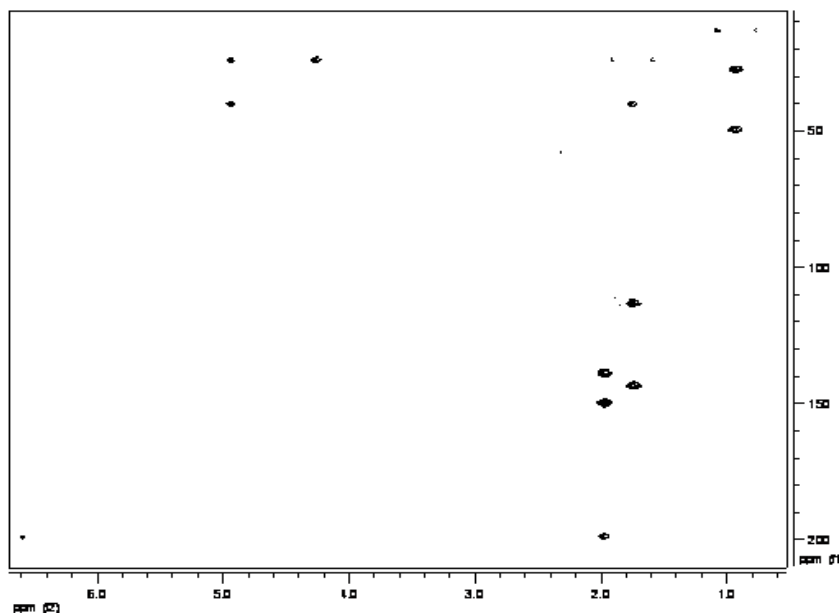


Εικ. 4.198 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **37**

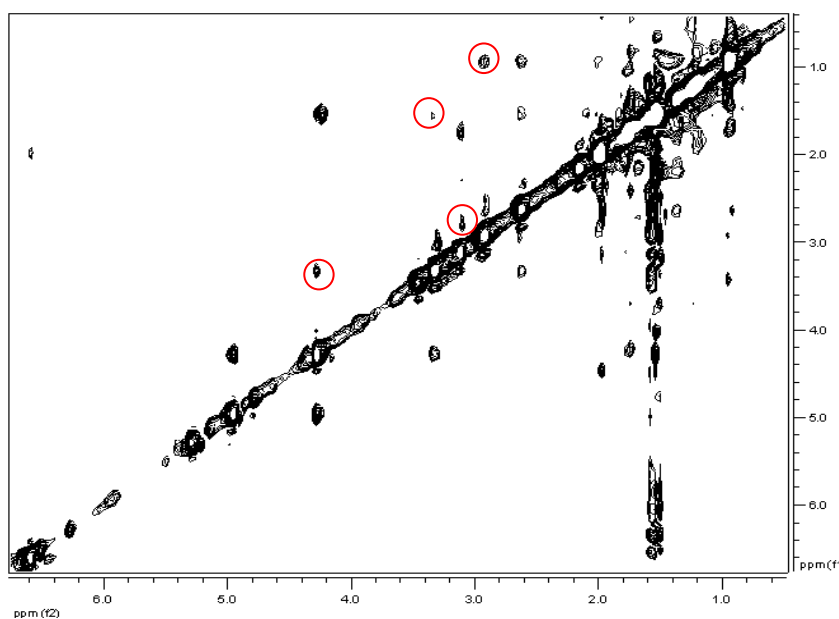


Σχήμα 4.22 Χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **37**

Στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.199), το μεθύλιο του διϋδροκινονικού δακτυλίου παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-4 (198.8 ppm), τον C-3 (149.6 ppm) και τον C-2 (138.5 ppm). Σε αυτόν τον άνθρακα (με βάση και το φάσμα COSY και το φάσμα HSQC-DEPT) είναι το ολεφινικό πρωτόνιο (6.59 ppm). Το H-6 σε δ 3.33 παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-1 (199.2 ppm).



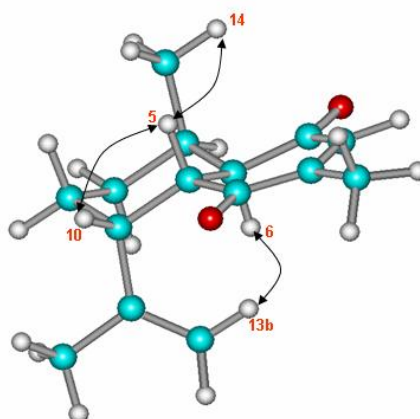
Εικ. 4.199 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **37**



Εικ. 4.200 Φάσμα NOESY (CDCl_3) του μεταβολίτη **37**

Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των τεσσάρων ασύμμετρων κέντρων βασίστηκε σε πειράματα NOESY (Εικ. 4.200). Οι συσχετίσεις των πρωτονίων $\text{H}_3\text{-14/H-5}$, H-5/H-10 , H-6/H-13b καθόρισαν τη σχετική στεreoχημεία στους άνθρακες C-5, C-6, C-7 και C-10 ως $5R^*$, $6R^*$, $7R^*$, $10R^*$.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναζήτηση, ο μεταβολίτης **37** είναι νέα χημική δομή καδινανικού σκελετού. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.39.



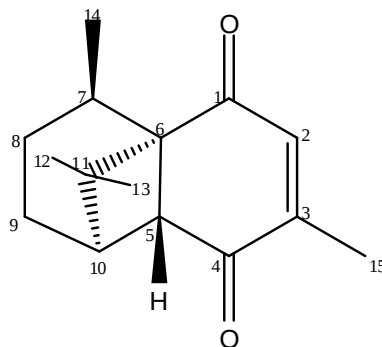
Πίνακας 4.39 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **37** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC	NOESY
1	-	199.2	-	-	-
2	6.59 (1H, d, J=1.1)	138.5	H-15	C-4	-
3	-	149.6	-	-	-
4	-	198.8	-	-	-
5	2.92 (1H, dd, J=11.3, 3.7)	46.9	H-6, H-10	-	H-14, H-10
6	3.33 (1H, dd, J=11.3, 3.7)	49.2	H-5, H-7	C-1	H-13b, H-8a
7	2.63 (1H, m)	27.6	H-6, H-8a, H-14	-	-
8	a 1.56 (1H, m) b 1.38 (1H, m)	27.1	H-7, H-8b, H-8a, H-9a, H-9b	- -	H-6 -
9	a 1.80 (1H, m) b 1.63 (1H, m)	22.9	H-8b, H-9b H-8b, H-9a, H-10	- -	- -
10	3.13 (1H, m)	40.0	H-5, H-9b, H-12, H-13a, H-13b	-	H-5
11	-	143.1	-	-	-
12	1.76 (3H, brs)	24.0	H-10, H-13b, H-13a	C-10, C-11, C-13	-
13	a 4.96 (1H, brs) b 4.27 (1H, brs)	113.1	H-10, H-12 H-10, H-12	C-10, C-13 C-10, C-13	- H-6
14	0.95 (3H, d, J=7.0)	13.1	H-7	C-6, C-7	H-5
15	1.98 (3H, d, J=1.1)	16.6	H-2	C-2, C-3, C-4	-

4.2.36 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 38

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **38** (1.7 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



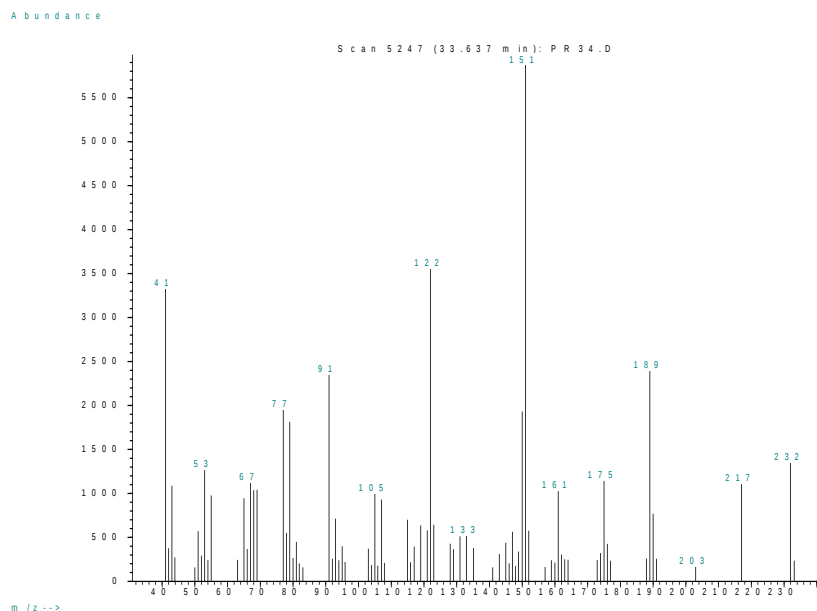
$[\alpha]_D = -51.6$ (c 0.083, CHCl_3)

UV λ_{max} (CHCl_3) (log ϵ) 248 (3.84) (nm)

IR (film) ν_{max} 2939, 2347, 2235, 1664, 1183 cm^{-1}

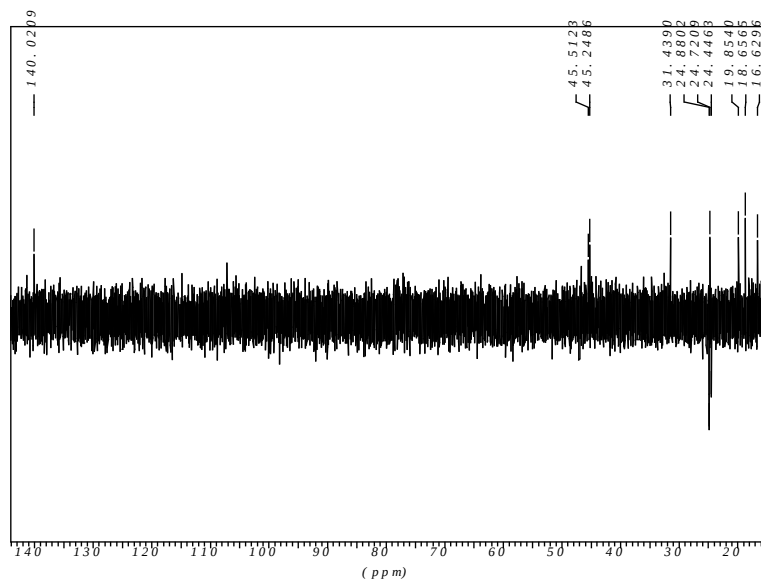
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **38** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.201), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 232 $[\text{M}]^+$.



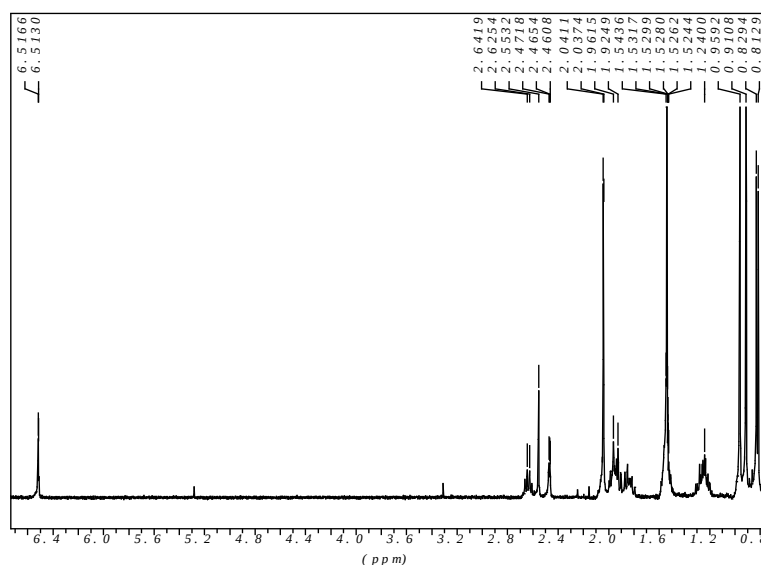
Εικ. 4.201 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **38**

Στο φάσμα DEPT-135 (Εικ. 4.202) του μεταβολίτη εμφανίζονται 4 μεθύλια, 2 μεθυλένια και 3 μεθίνια στην αλειφατική περιοχή και 1 ολεφινικό/αρωματικό μεθίνιο στα 140.2 ppm.



Εικ. 4.202 Φάσμα DEPT-135 (CDCl_3) του μεταβολίτη **38**

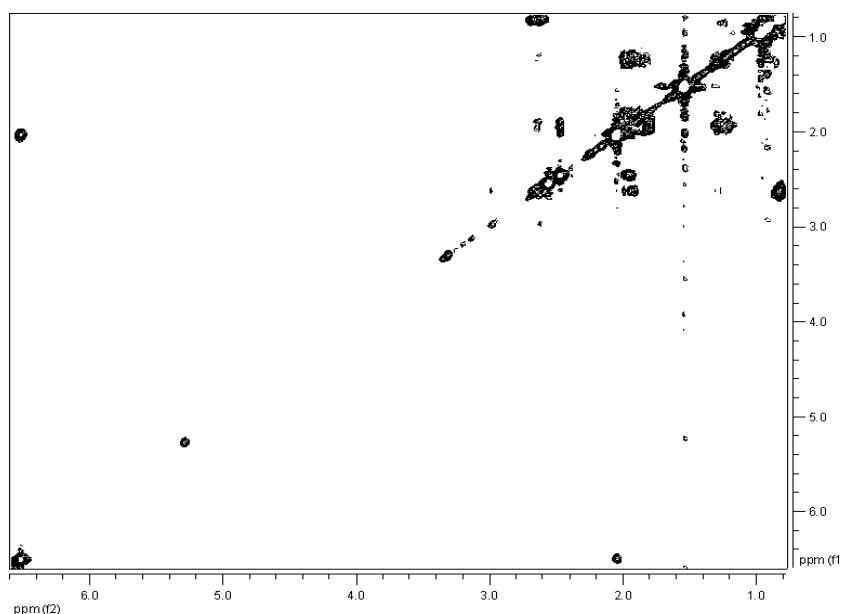
Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.203) εμφάνισε χαρακτηριστικά σήματα, τα οποία αντιστοιχούν σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο (δ 6.51), σε μεθύλιο σε τριτοταγή άνθρακα (δ 0.82), σε τρία μεθίλια (δ 2.63, 2.55 και 2.46) και σε δύο αλειφατικά μεθύλια σε δ 0.96 και 0.91 (δύο απλές κορυφές).



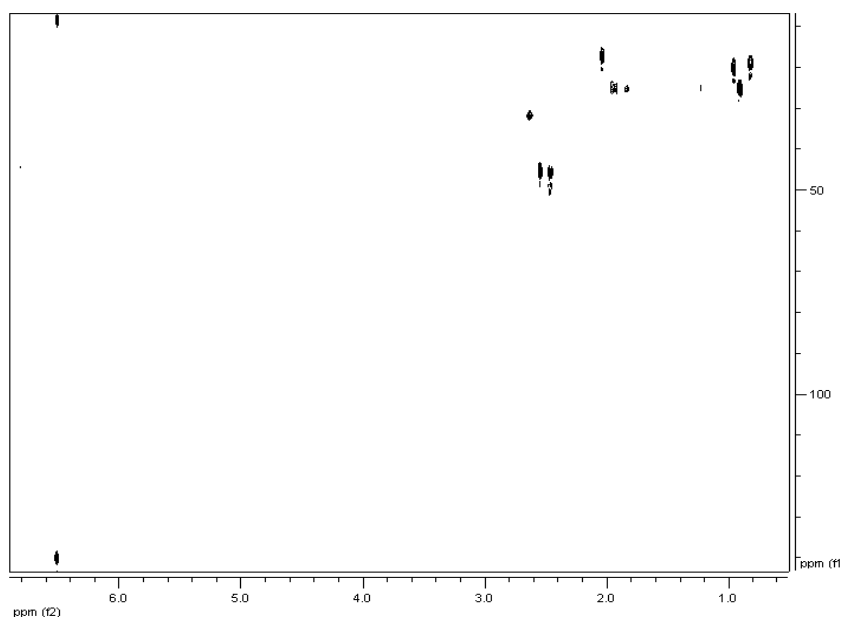
Εικ. 4.203 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **38**

Στο φάσμα COSY (Εικ. 4.204) φαίνονται η σύζευξη του H_3 -15 με το H -2 και η σύζευξη του H -7 (δ 2.63) με το H_3 -14.

Αφού το σήμα του ολεφινικού πρωτονίου είναι διπλή κορυφή λόγω της σύζευξης του με το μεθύλιο του διϋδροκινονικού δακτυλίου, συνεπάγεται ότι τα καρβονύλια του μορίου (η παρουσία των οποίων αποδεικνύεται από τη μελέτη του φάσματος HMBC, Εικ. 4.207) είναι τοποθετημένα, πιθανότατα, σε para θέση.



Εικ. 4.204 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **38**

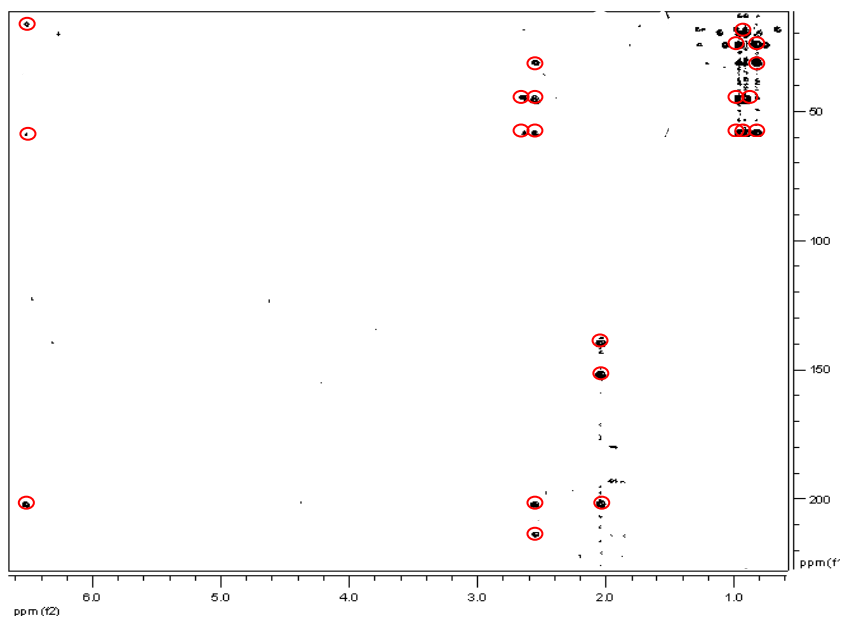


Εικ. 4.205 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **38**

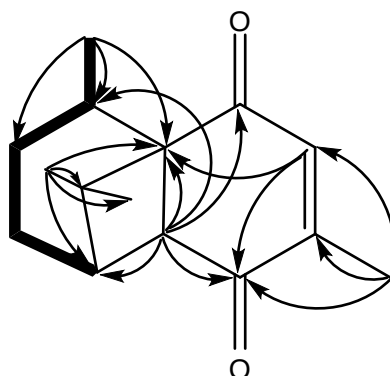
Στο φάσμα HMBC, το H_3 -15 παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-4 (202.1 ppm), με τον C-3 (152.4 ppm) και τον C-2 (140.2 ppm). Σε αυτόν τον άνθρακα (με βάση και το φάσμα COSY και το φάσμα HSQC-DEPT) βρίσκεται το ολεφινικό πρωτόνιο (H -2).

Το H -2 παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-4, τον C-15 και με τον C-6 (58.9 ppm), ενώ ταυτόχρονα με τον C-6 συσχετίζονται τα πρωτόνια του Me -14 και τα αλειφατικά Me -12 και Me -13. Η τελευταία παρατήρηση υποδεικνύει το δεσμό άνθρακα-άνθρακα μεταξύ των C-6 και C-11.

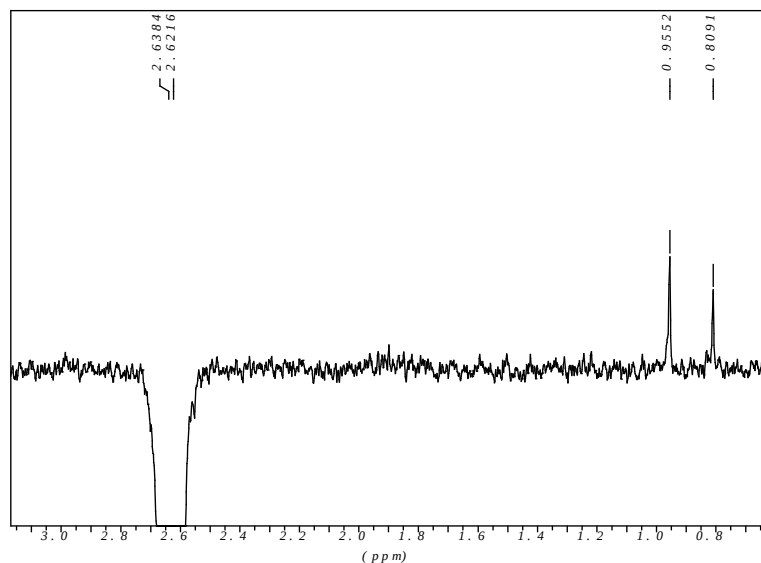
Το μεθίνιο σε δ 2.55 ppm παρουσιάζει συσχέτιση με τους C-1 (213.8 ppm), με C-4, C-6, C-7, αλλά και C-10, γεγονός που το τοποθετεί στη θέση 5 του μορίου και παραπέμπει στην ύπαρξη ενός επιπλέον ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ των C-5 και C-10.



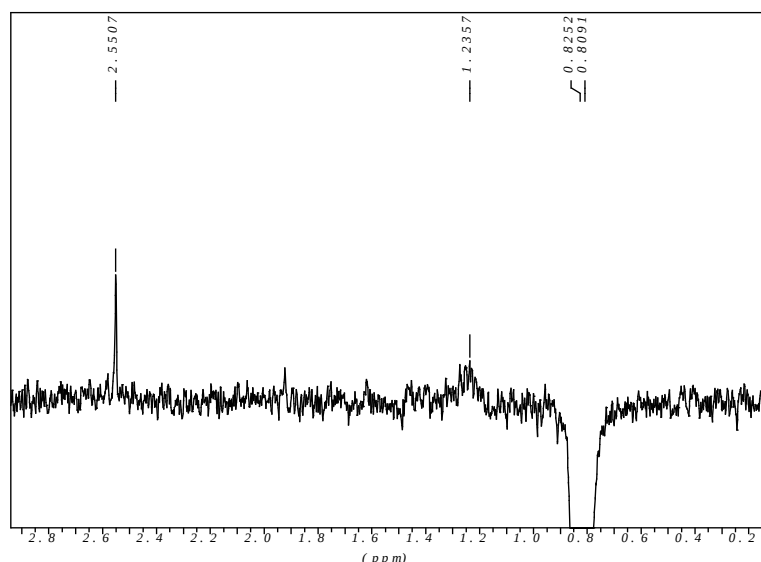
Εικ. 4.206 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **38**



Σχήμα 4.23 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **38**

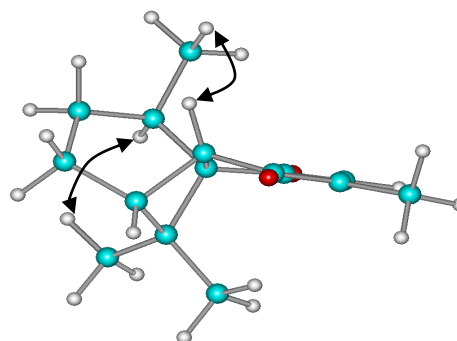


Εικ. 4.207 Φάσμα 1D NOE (CDCl_3) του μεταβολίτη **38**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H-7



Εικ. 4.208 Φάσμα 1D NOE (CDCl_3) του μεταβολίτη **38**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H₃-14

Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των τεσσάρων ασύμμετρων κέντρων βασίστηκε σε πειράματα 1D NOE (Εικ. 4.207, 4.208). Οι συσχετίσεις των πρωτονίων H-14/H-5, H-7/H-12 και η απουσία σύζευξης του H-5 με το H-10 στο φάσμα COSY (σχηματίζουν μεταξύ τους γωνία 90°), καθόρισαν τη σχετική στεreoχημεία στους άνθρακες C-5, C-6, C-7 και C-10 ως $5R^*$, $6R^*$, $7R^*$, $10R^*$.



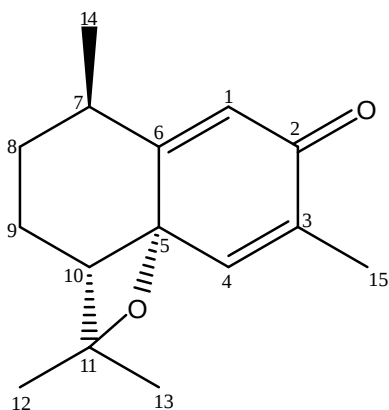
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναζήτηση, ο τρικυκλικός μεταβολίτης **38** είναι νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.40.

Πίνακας 4.40 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **38** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC	1D NOE
1	-	213.9	-	-	-
2	6.51 (1H, d, J=1.5)	140.2	H-15	C-4, C-6, C-15	-
3	-	152.4	-	-	-
4	-	202.1	-	-	-
5	2.55 (1H, s)	45.4	-	C-1, C-4, C-6, C-7, C-10	H-14
6	-	58.9	-	-	-
7	2.63 (1H, m)	31.6	H-14, H-8a, H-8b	C-6	H-12
8	a 1.94 (1H, m) b 1.21 (1H, m)	24.6	H-7, H-8b, H-9b H-7, H-8a	- -	- H-14
9	a 1.98 (1H, m) b 1.85 (1H, m)	25.1	H-9b, H-10 H-8a, H-9a	- -	- -
10	2.46 (1H, dd, J=4.1, 1.4)	45.7	H-9a	-	-
11	-	45.4	-	-	-
12	0.96 (3H, s)	19.9	-	C-6, C-10, C-11, C-13	H-7
13	0.91 (3H, s)	25.0	-	C-6, C-10, C-11, C-12	-
14	0.82 (3H, d, J=6.6)	18.8	H-7	C-6, C-7, C-8	H-5, H-8b
15	2.04 (3H, d, J=1.5)	16.6	H-2	C-2, C-3, C-4	-

4.2.37 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 39*Νέο φυσικό προϊόν*

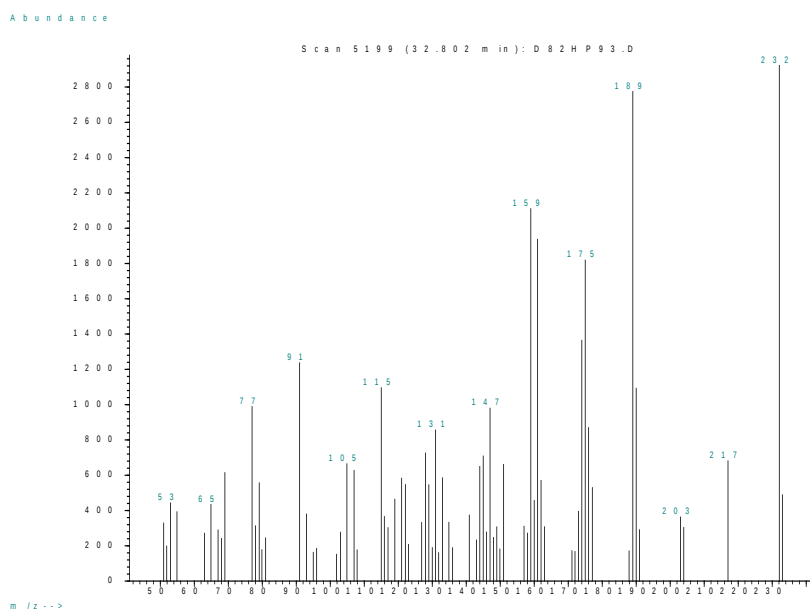
Ο μεταβολίτης **39** (9.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή καστανού ελαιώδους υπολείμματος.


 $[\alpha]_D = -19.3$ (c 0.05, CHCl_3)

 $\text{UV } \lambda_{\text{max}} (\text{CHCl}_3) (\log \epsilon) 251 (3.95) (\text{nm})$
 $\text{IR (film)} \nu_{\text{max}} 1712, 1650, 1125, 746 \text{ cm}^{-1}$

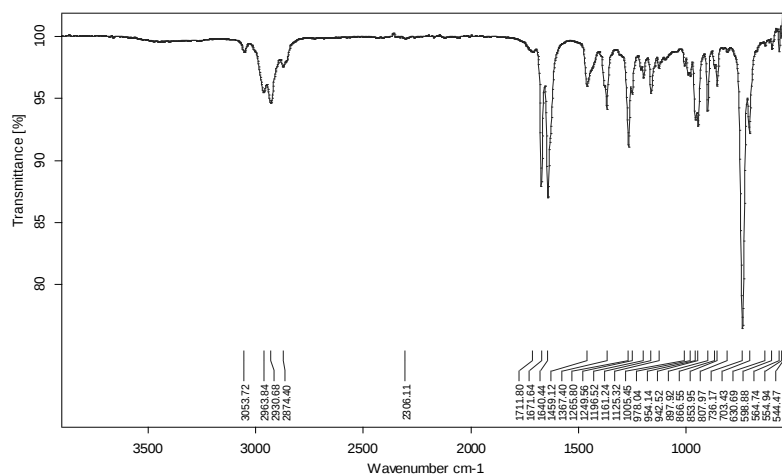
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **39** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRFABMS) παρουσίασε μοριακό ιόν $[\text{M}]^+$ σε m/z 232.1444 (θεωρητικό MB: 232.1463).



Εικ. 4.209 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **39**

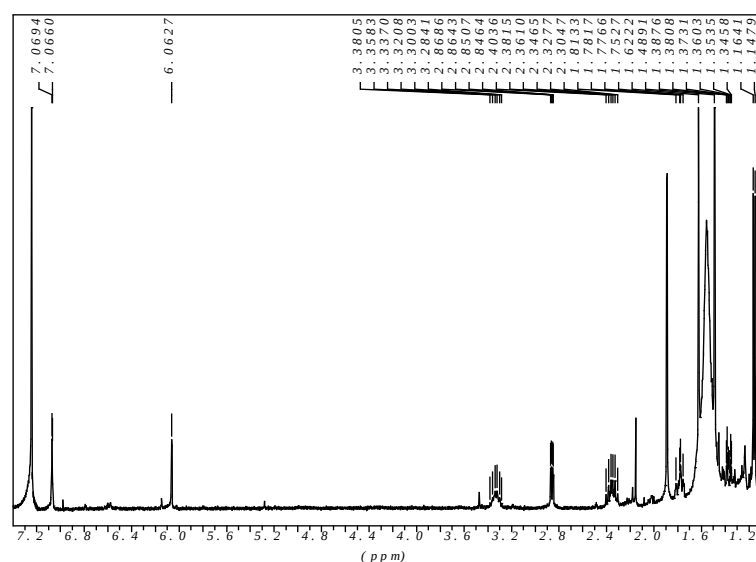
Η απορρόφηση στα 1125 cm^{-1} στο φάσμα IR (Εικ. 4.210) υπέδειξε την παρουσία αιθερικού δεσμού, ενώ αυτή στα 1712 cm^{-1} την παρουσία μίας καρβονυλομάδας.



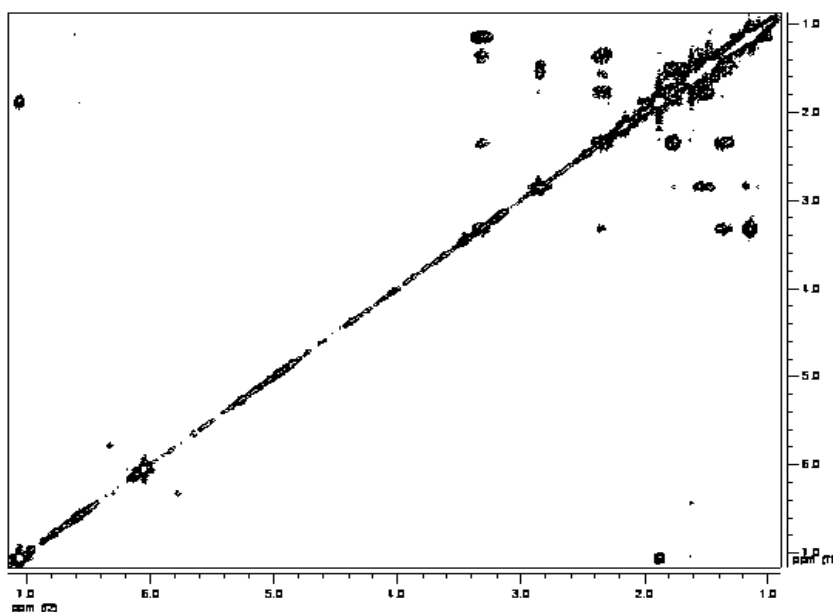
Εικ. 4.210 Φάσμα IR του μεταβολίτη **39**

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.211) έδειξε την ύπαρξη δύο απλών κορυφών μεθυλίων σε δ 1.62 και 1.49, ενός βινυλικού μεθυλίου (δ 1.89, d) και ενός μεθυλίου σε βινυλικό μεθίνο (δ 1.15, d; δ 3.32, m). Ο αρωματικός δακτύλιος είναι τετραϋποκατεστημένος και έχει 2 ολεφινικά πρωτόνια σε δ 6.06 (s) και δ 7.07 (d), το τελευταίο από τα οποία παρουσιάζει μακρά σύζευξη με το βινυλικό μεθύλιο (φάσμα COSY).

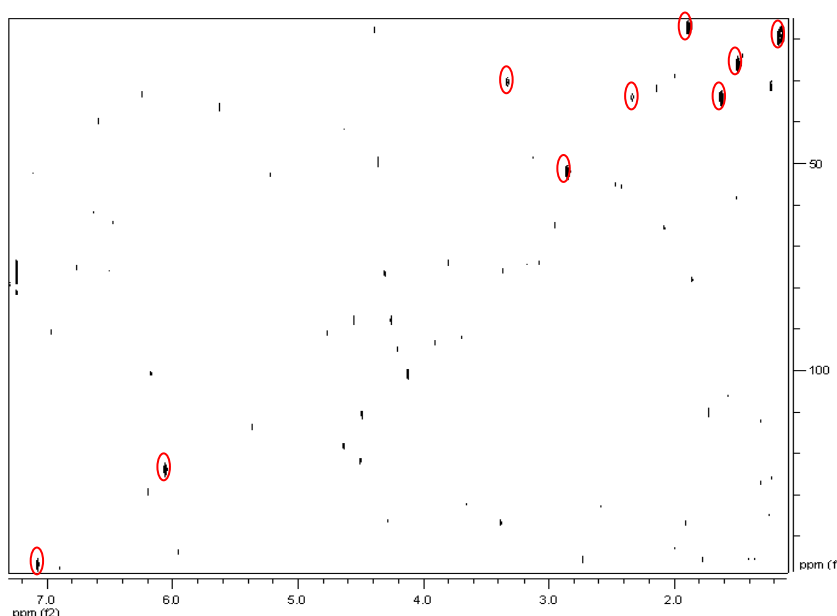
Επίσης, στο φάσμα COSY (Εικ. 4.212) εμφανίζονται οι συζεύξεις του H-10 με το H₂-9 και του H₂-8 με το H-7.



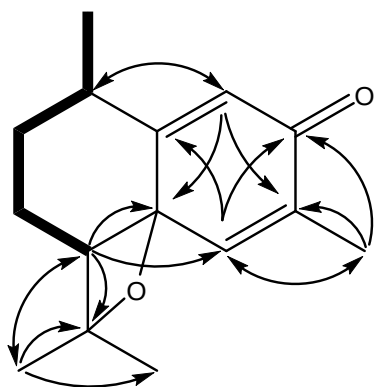
Εικ. 4.211 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **39**



Εικ. 4.212 Φάσμα COSY (CDCl₃) του μεταβολίτη **39**



Εικ. 4.213 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl₃) του μεταβολίτη **39**

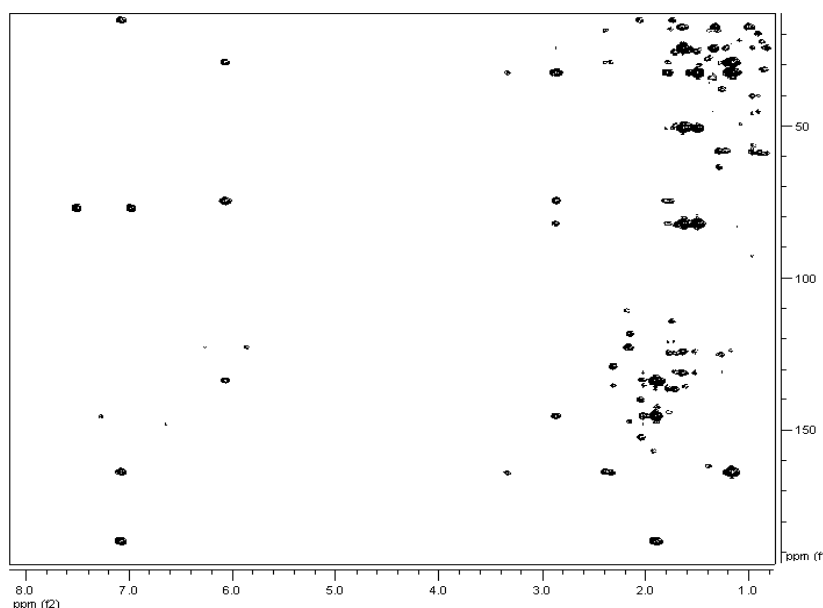


Στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.214), το βινυλικό μεθύλιο Me-15 παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-4 (145.4 ppm), στον οποίο εδρεύει το ένα ολεφινικό πρωτόνιο (δ 7.07), με τον τεταρτοταγή C-3, όπως και με τον C-2 (186.5 ppm). Το H-4 συσχετίζεται με τον τεταρτοταγή C-6 του δακτυλίου και τον C-2.

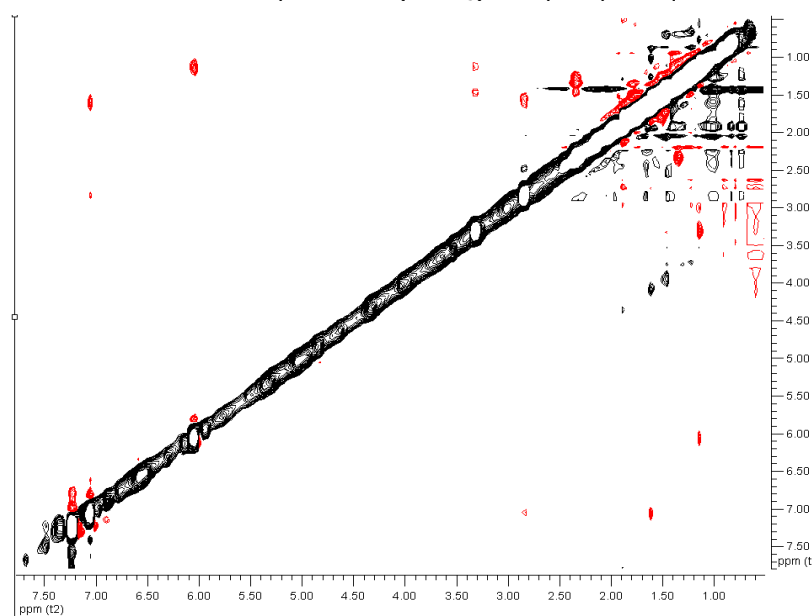
Το δεύτερο ολεφινικό πρωτόνιο (H-1) στα 6.06 ppm παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-7 του βινυλικού μεθινίου και τον C-5 του δακτυλίου (74.7 ppm).

Τα Me-12 και Me-13 συσχετίζονται με τον C-11 (82.1 ppm) και τον C-10 (51.0 ppm), ενώ αντίστοιχα το H-10 συσχετίζεται με τους C-12 και C-13, τον C-11, τον C-4 και τον C-5. Η τελευταία παρατήρηση αποτελεί απόδειξη της ύπαρξης δεσμού μεταξύ των C-5 και C-10.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, το μοριακό βάρος και το βαθμό ακορεστότητας της ένωσης, δηλαδή την αναγκαιότητα ύπαρξης ενός επιπλέον δακτυλίου στο μόριο, επαληθεύεται η παρουσία γέφυρας οξυγόνου μεταξύ των C-5 και C-11.



Εικ. 4.214 Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **39**

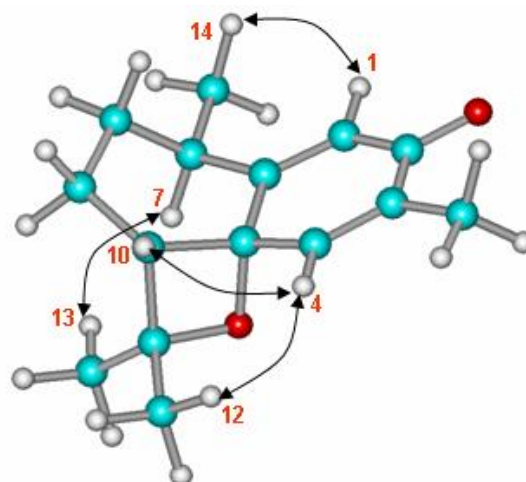


Εικ. 4.215 Φάσμα NOESY (CDCl₃) του μεταβολίτη **39**

Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των τριών ασύμμετρων κέντρων βασίστηκε σε πειράματα NOESY (Εικ. 4.215). Η συσχέτιση των πρωτονίων H-7/H-13,

H-10/H-4 και H-4/H-12 καθόρισαν τη σχετική στεreoχημεία στους άνθρακες C-5, C-7 και C-10 ως 5*R**,7*R**,10*S**.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναζήτηση, ο μεταβολίτης **39** είναι νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **39** παρατίθενται στον Πίνακα 4.41.



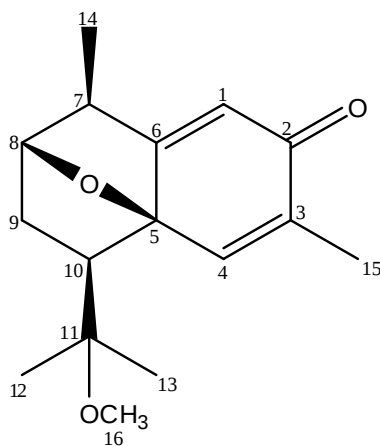
Πίνακας 4.41 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **39** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	HMBC	COSY	NOESY
1	6.06 (1H, s)	122.6	C-3, C-5, C-7		H-14
2	-	186.5	-	-	-
3	-	133.8	-	-	-
4	7.07 (1H, d, <i>J</i> =1.4)	145.4	C-2, C-6, C-15	H-15	H-10, H-12
5	-	74.7	-	-	-
6	-	163.7	-	-	-
7	3.32 (1H, m)	29.1	C-6, C-8	H-8a, H-8b, H-14	H-13
8	a 2.34 (1H, m) b 1.36 (1H, dt, <i>J</i> =10.8, 2.7)	32.4	C-6, C-7, C-9 C-14	H-7, H-8b, H-9a, H-9b H-7, H-8a	- -
9	a 1.76 (1H, m) b 1.55 (1H, m)	18.7	C-5, C-7, C-8, C-11 -	H-8a, H-9b, H-10 H-8a, H-9a, H-10	- -
10	2.85 (1H, dd, <i>J</i> =7.2, 1.7)	51.0	C-4, C-5, C-11, C-12, C-13	H-9a, H-9b, H-13	H-4
11	-	82.1	-	-	-
12	1.62 (3H, s)	32.4	C-10, C-11, C-12	-	H-4
13	1.49 (3H, s)	24.6	C-10, C-11, C-13	H-10	H-7
14	1.15 (3H, d, <i>J</i> =6.5)	17.2	C-6, C-7, C-8	H-7	H-1
15	1.89 (3H, d, <i>J</i> =1.4)	15.2	C-2, C-3, C-4	H-4	-

4.2.38 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 40

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **40** (1.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή πράσινου ελαιώδους υπολείμματος.



$[\alpha]_D = +7.2$ (c 0.042, CHCl_3)

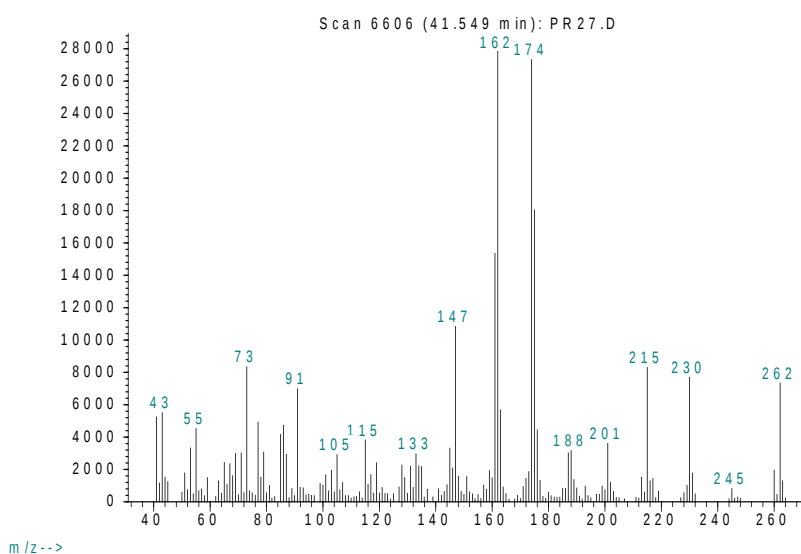
UV λ_{max} (CHCl_3) (log ϵ) 253 (3.59) (nm)

IR (film) ν_{max} 2347, 2235, 1645, 1173 cm^{-1}

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **40** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_3$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRESIMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ σε m/z 263.1639 (θεωρητικό MB: 263.1647). Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.216), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 262 $[\text{M}]^+$.

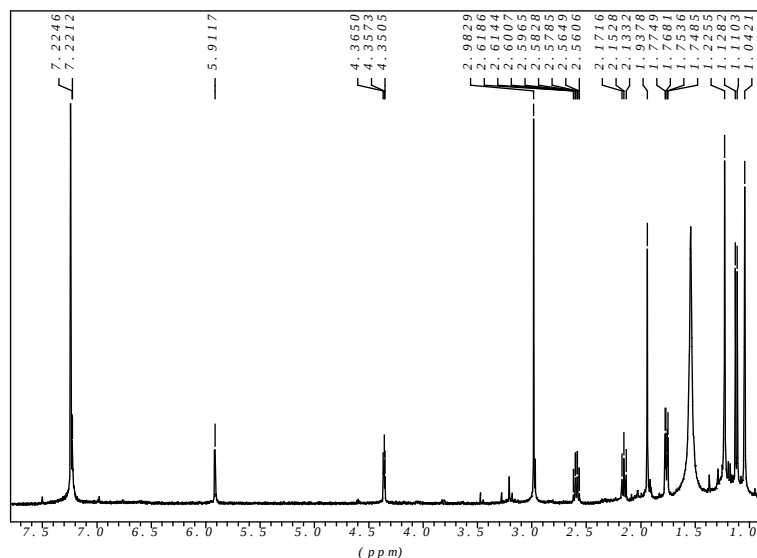
Abundance



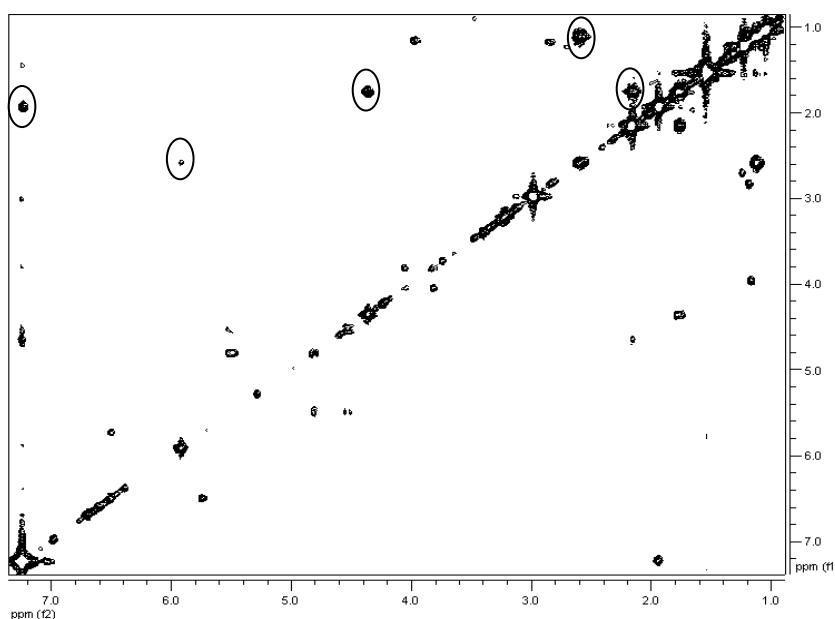
$m/z \rightarrow$

Εικ. 4.216 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **40**

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.217) ομοιάζει με αυτό του μεταβολίτη **39**. Χαρακτηριστικές διαφορές, σε αυτή την περίπτωση, είναι η εμφάνιση ενός μεθυλίου σαν απλή κορυφή στα 2.98 ppm και ενός μεθινίου στα 4.36 ppm. Διαφορά εντοπίζεται, επίσης, στις μετατοπίσεις των H_3 -12 και H_3 -13, που εμφανίζονται σε υψηλότερα πεδία.



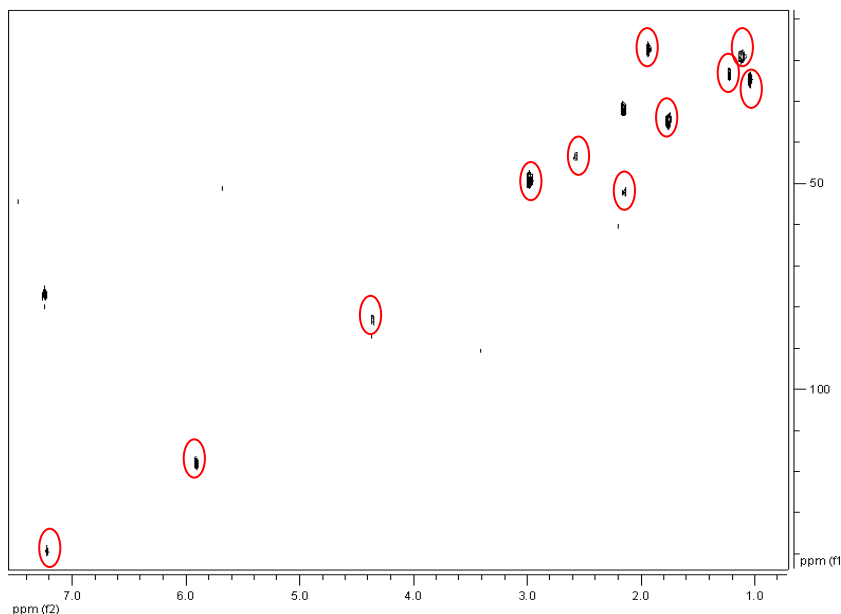
Εικ. 4.217 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **40**



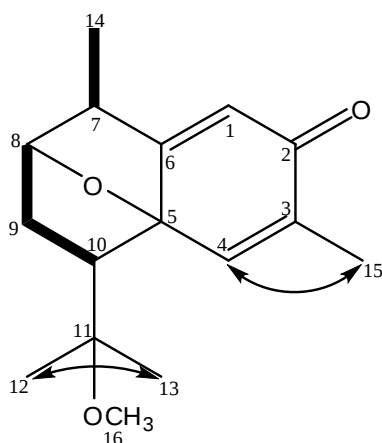
Εικ. 4.218 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **40**

Οι ετεροπυρηνικές συσχετίσεις HSQC-DEPT (Εικ. 4.219) προσδιόρισαν την αντιστοιχία ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο και οι συσχετίσεις COSY (Εικ. 4.218) βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των πρωτονίων, με εξαίρεση την απουσία συσχέτισης μεταξύ των H -7 (2.59 ppm) και H -8 (4.36 ppm).

Η ύπαρξη άνθρακα στα 82.4 ppm σε συνδυασμό με την πολλαπλή κορυφή στο φάσμα ^1H -NMR στα 4.36 ppm υποδεικνύει την παρουσία οξυγονωμένου μεθινίου.



Εικ. 4.219 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **40**



Σχήμα 4.24 Συζεύξεις COSY του μεταβολίτη **40**

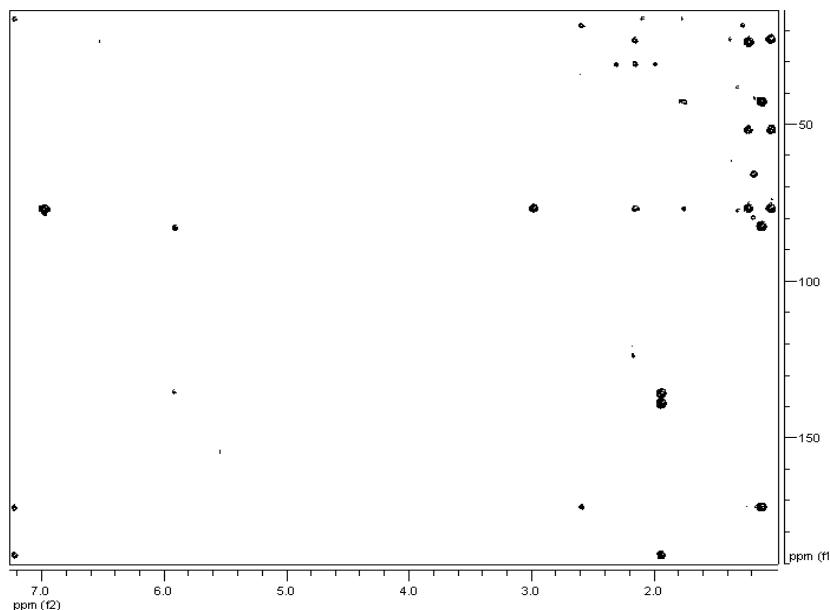
Στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.220), το βινυλικό μεθύλιο παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-4 (138.6 ppm) στον οποίον υπάρχει το ένα ολεφινικό πρωτόνιο (δ 7.22), τον τεταρτοταγή C-3 (135.4 ppm) και τον C-2 (187.1 ppm). Το H-4 συσχετίζεται με τον τεταρτοταγή C-6 του δακτυλίου, τον C-2 και τον C-15.

Το δεύτερο ολεφινικό πρωτόνιο (δ 5.92) παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-7 του βινυλικού μεθινίου, τον τεταρτοταγή C-3 και τον τεταρτοταγή C-5 του δακτυλίου (82.9 ppm).

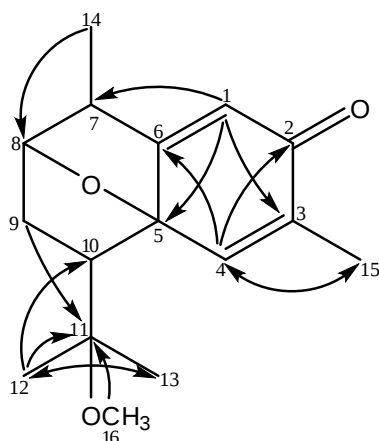
Τα Me-12 και Me-13 συσχετίζονται με τον C-11 (76.7 ppm) και τον C-10 (51.6 ppm). Επιπρόσθετα, το μεθύλιο στα 2.98 ppm συσχετίζεται με τον C-11, συσχέτιση που υποδεικνύει τη θέση της μεθοξομάδας στο μόριο.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω και το βαθμό ακορεστότητας της ένωσης, δηλαδή την αναγκαιότητα ύπαρξης δύο επιπλέον δακτυλίων στο μόριο, προκύπτει η

παρουσία γέφυρας οξυγόνου μεταξύ των C-5 και C-8, αλλά και ο δεσμός μεταξύ των C-5 και C-10.

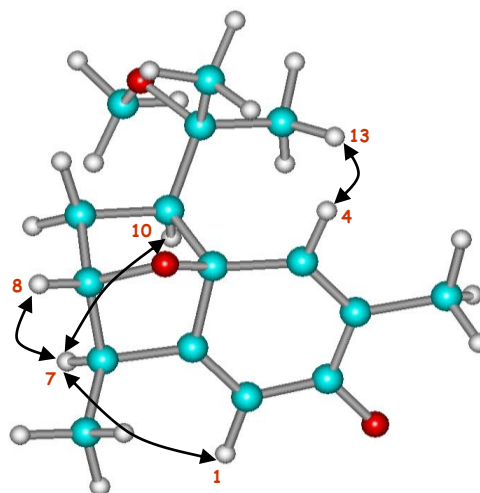


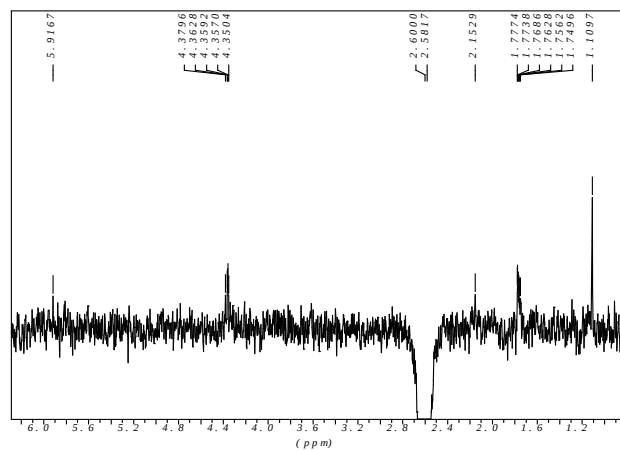
Εικ. 4.220 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **40**



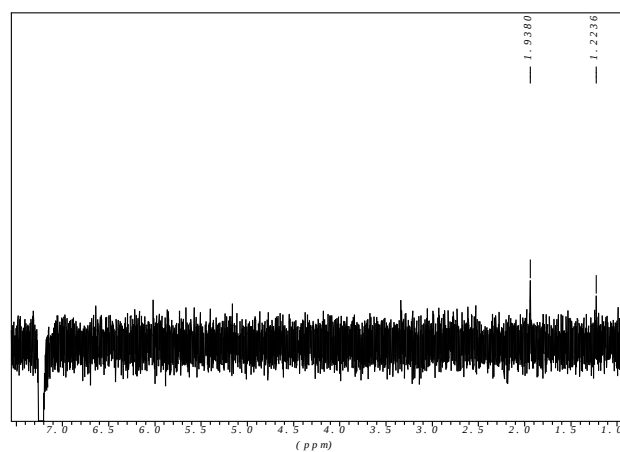
Σχήμα 4.25 Χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **40**

Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των τεσσάρων ασύμμετρων κέντρων βασίστηκε σε πειράματα 1D NOE (Εικ. 4.221, 4.222) και στο γεγονός ότι το H-7 δεν παρουσίασε συσχέτιση με το H-8 στο φάσμα COSY. Οι συσχετίσεις NOE των πρωτονίων H-7/H-1, H-7/H-8, H-7/H-10 και H-4/H-13 καθόρισαν τη σχετική στεreoχημεία στους C-5, C-7, C-8 και C-10 ως 5*R**, 7*R**, 8*S**, 10*S**.





Εικ. 4.221 Φάσμα 1D NOE (CDCl₃) του μεταβολίτη **40**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H-7



Εικ. 4.222 Φάσμα 1D NOE (CDCl₃) του μεταβολίτη **40** Ακτινοβολήση (irradiation) στο H-4

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταβολίτης **40** ταυτοποιήθηκε ως νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.42.

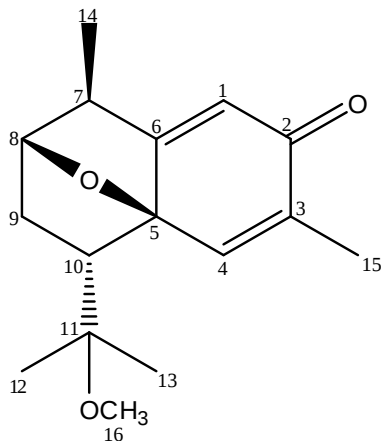
Πίνακας 4.42 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **40** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC	1D NOE
1	5.92 (1H, s)	117.2	H-7	C-3, C-5, C-7	H-7
2	-	187.1	-	-	-
3	-	135.4	-	-	-
4	7.22 (1H, d, J=1.4)	138.6	H-15	C-2, C-6, C-15	H-13, H-15
5	-	82.9	-	-	-
6	-	171.9	-	-	-
7	2.59 (1H, q, J=7.1)	42.8	H-1, H-14	C-6, C-14	H-1, H-8, H-9, H-10
8	4.36 (1H, t, J=2.9)	82.4	H-9	-	H-7, H-14
9	1.77 (2H, dd, J=7.7, 2.9)	34.0	H-8, H-10	C-7, C-11	H-7
10	2.15 (1H, t, J=7.7)	51.6	H-9	-	H-7
11	-	76.7	-	-	-
12	1.04 (3H, s)	23.9	H-13	C-10, C-11, C-13	-
13	1.23 (3H, s)	22.8	H-12	C-10, C-11, C-12	H-4
14	1.12 (3H, d, J=7.1)	18.6	H-7	C-6, C-7, C-8	H-8
15	1.94 (3H, d, J=1.4)	16.5	H-4	C-2, C-3, C-4	H-4
16	2.98 (3H, s)	48.4	-	C-11	-

4.2.39 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 41

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **41** (1.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



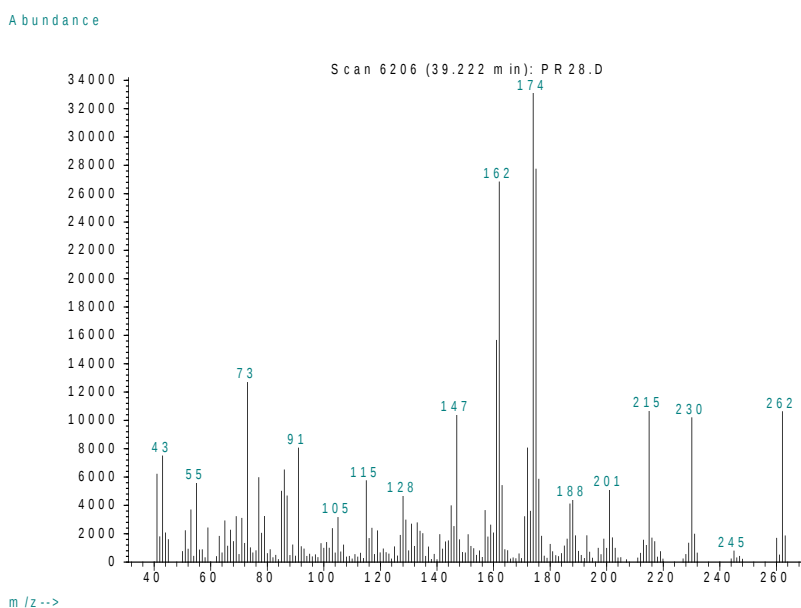
$[\alpha]_D = -24.0$ (c 0.042, CHCl_3)

UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 252 (3.58) (nm)

IR (film) ν_{max} 2347, 2235, 1645, 1173 cm^{-1}

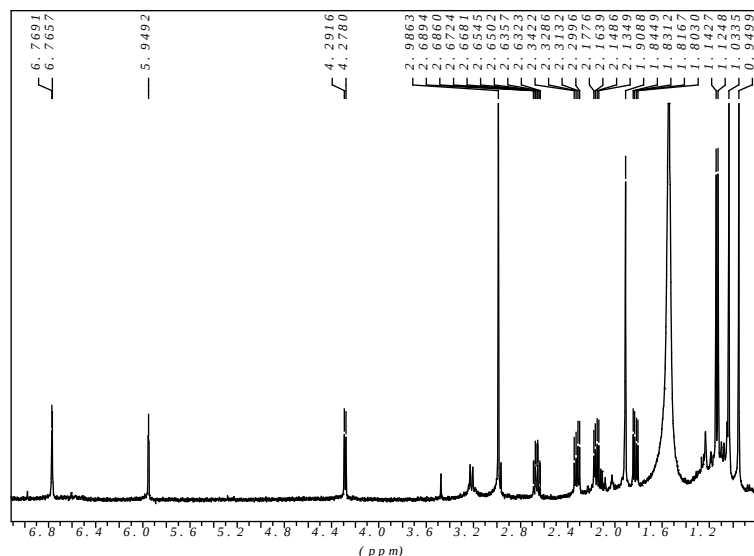
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **41** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_3$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRESIMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{Na}]^+$ σε m/z 285.1458 (υπολογιζόμενο MB: 285.1467). Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.223), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 262 $[\text{M}]^+$.



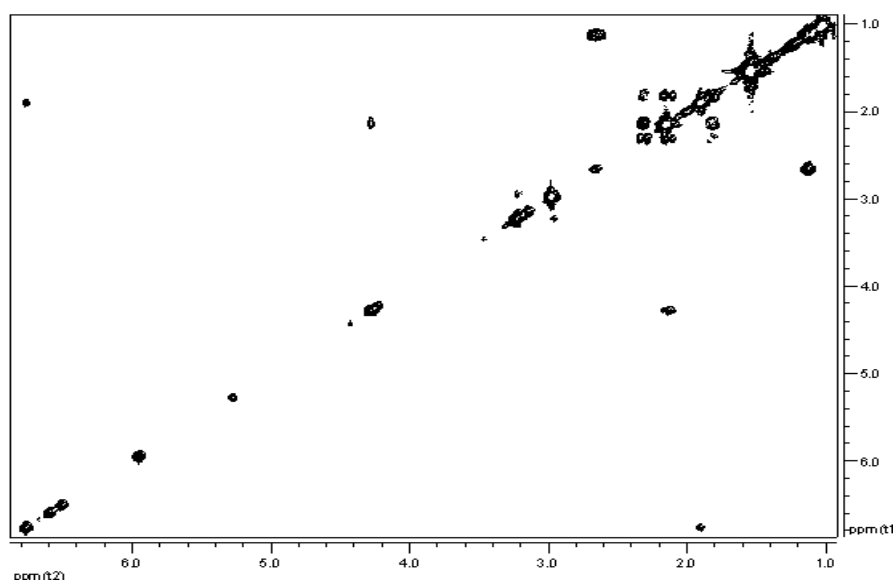
Εικ. 4.223 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **41**

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 4.224) είναι παρόμοιο με αυτό του μεταβολίτη **40**. Χαρακτηριστική η μετατόπιση σε υψηλότερα πεδία του H-4 και των H₃-12 και H₃-13, υποδεικνύοντας πιθανή αλλαγή στερεοχημείας στον C-10.

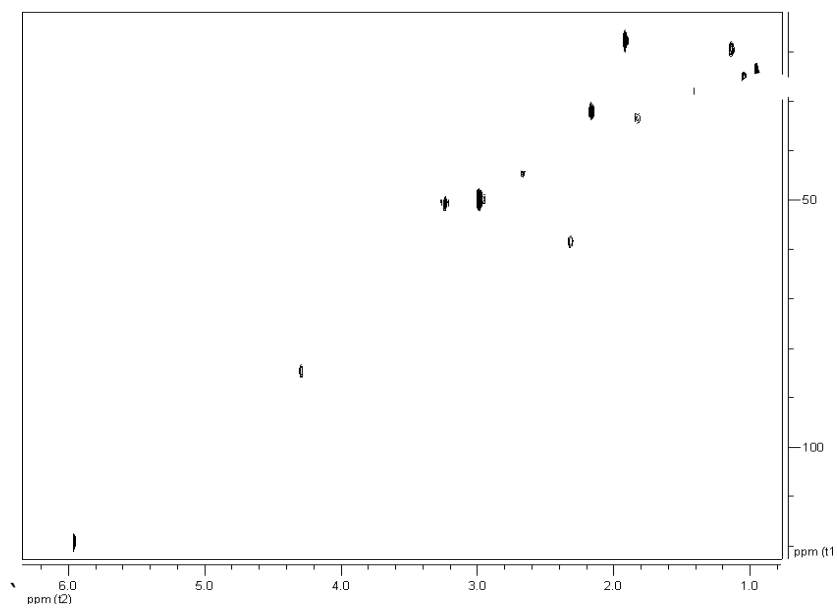


Εικ. 4.224 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του μεταβολίτη **41**

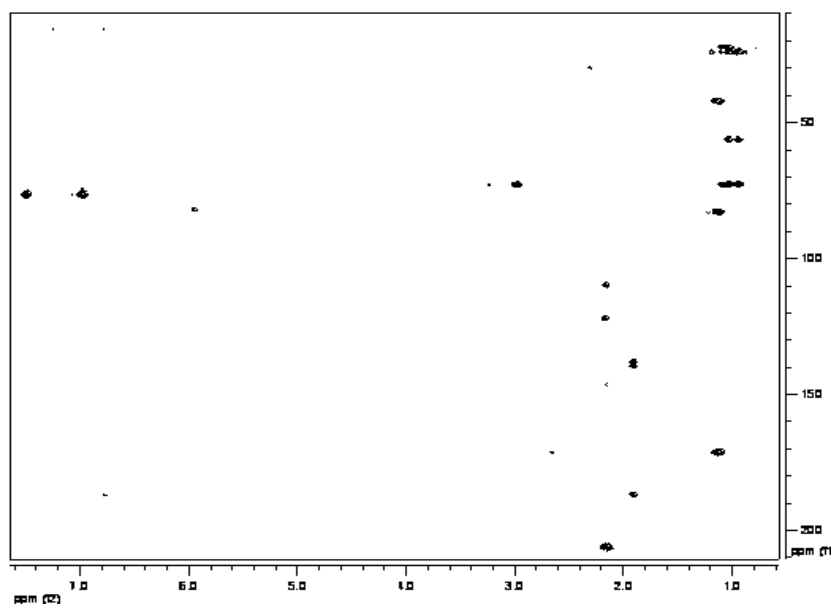
Τα πειράματα COSY (Εικ. 4.225), HSQC-DEPT (Εικ. 4.226) και HMBC (Εικ. 4.227) βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και στον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο. Και σε αυτή την περίπτωση, δεν παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ των H-7 (2.67 ppm) και H-8 (4.29 ppm).



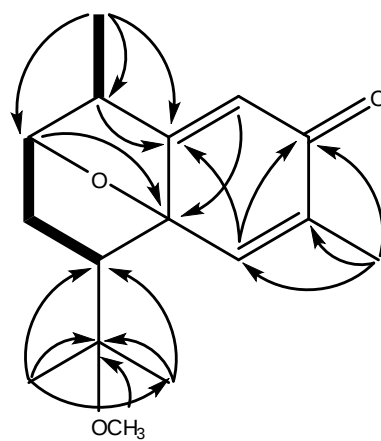
Εικ. 4.225 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **41**



Εικ. 4.226 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **41**

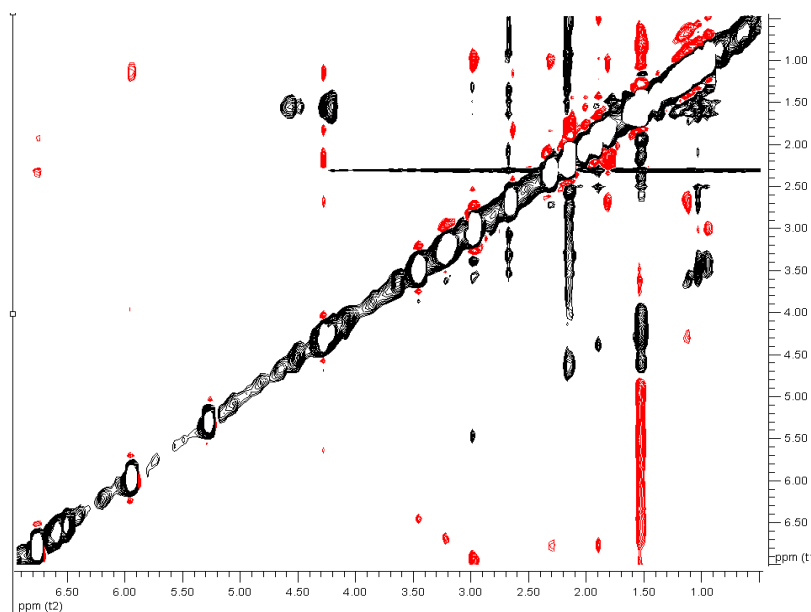
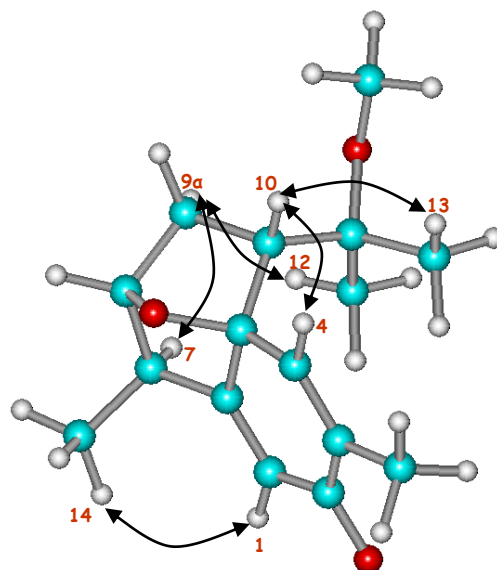


Εικ. 4.227 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **41**



Σχήμα 4.26 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **41**

Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των τεσσάρων ασύμμετρων κέντρων βασίστηκε σε πειράματα NOESY (Εικ. 4.228) και στο στοιχείο που προέκυψε από τη μελέτη του COSY, ότι δηλαδή το H-7 δεν παρουσίασε συσχέτιση με το H-8. Οι συσχετίσεις των πρωτονίων H-14/H-1, H-7/H-9α, H-9α/H-12, H-10/H-4, H-10/H-13 καθόρισαν τη σχετική στεreoχημεία στους άνθρακες C-5, C-7, C-8, και C-10 ως 5*R**, 7*R**, 8*S**, 10*R**.



Εικ. 4.228 Φάσμα NOESY (CDCl₃) του μεταβολίτη **41**

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταβολίτης **41** ταυτοποιήθηκε ως το επιμερές του μεταβολίτη **42** στον C-10 και σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναζήτηση είναι νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.43.

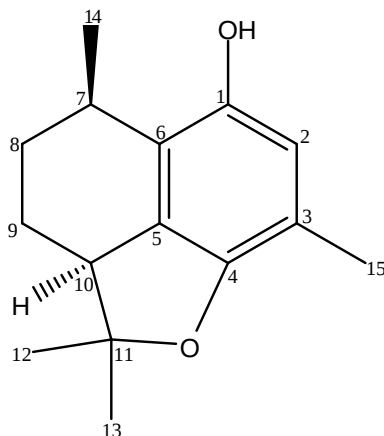
Πίνακας 4.43 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **41** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC	NOESY
1	5.95 (1H, s)	118.9	H-7	C-5	H-14
2	-	187.1	-	-	-
3	-	138.8	-	-	-
4	6.77 (1H, d, J=1.5)	140.1	H-15	C-2, C-6, C-15	H-10, H-15
5	-	82.7	-	-	-
6	-	171.7	-	-	-
7	2.67 (1H, q, J=7.1)	42.9	H-1, H-14	C-6, C-14	H-9α, H-14
8	4.29 (1H, d, J=5.5)	83.3	H-9β	C-5	H-7, H-9β, H-9α, H-14
9	α 1.83 (1H, dd, J=11.6, 5.5) β 2.14 (1H, ddd, J=11.6, 11.6, 5.5)	33.0	H-9β, H-10 H-8, H-9α, H-10	- -	H-7, H-8, H-12 H-8
10	2.32 (1H, dd, J=11.6, 5.5)	57.1	H-9α, H-9β	-	H-4, H-13
11	-	73.4	-	-	-
12	0.95 (3H, s)	23.8	-	C-10, C-11, C-13	H-9α
13	1.03 (3H, s)	25.7	-	C-10, C-11, C-12	H-10, H-16
14	1.13 (3H, d, J=7.1)	19.0	H-7	C-6, C-7, C-8	H-1, H-7, H-8
15	1.91 (3H, d, J=1.5)	17.3	H-4	C-2, C-3, C-4	H-4
16	2.98 (3H, s)	49.4	-	C-11	H-13

4.2.40 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 42

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **42** (7.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή καστανού ελαιώδους υπολείμματος.



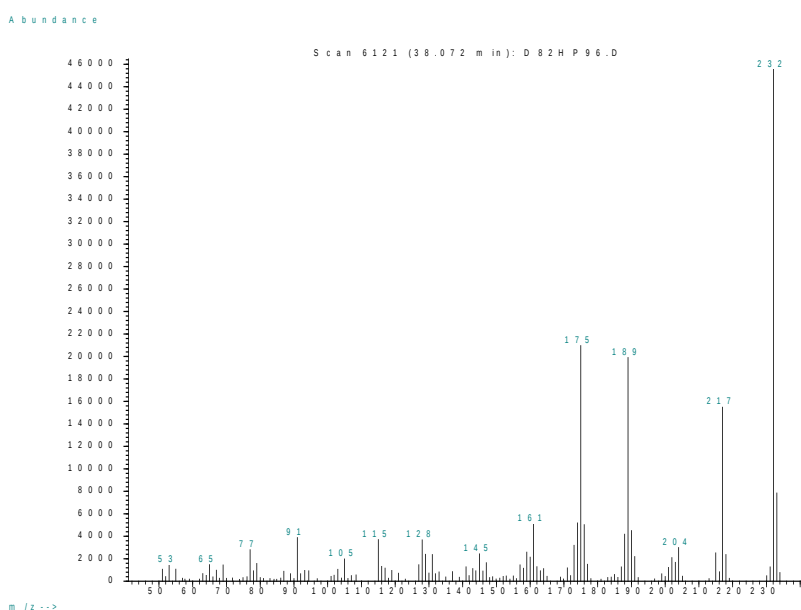
$[\alpha]_D = -30.0$ (c 0.053, CHCl_3)

IR (film) ν_{max} 3390 (broad), 2860, 1652, 1086 cm^{-1}

UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 247 (3.17), 300 (3.33) (nm)

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **42** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

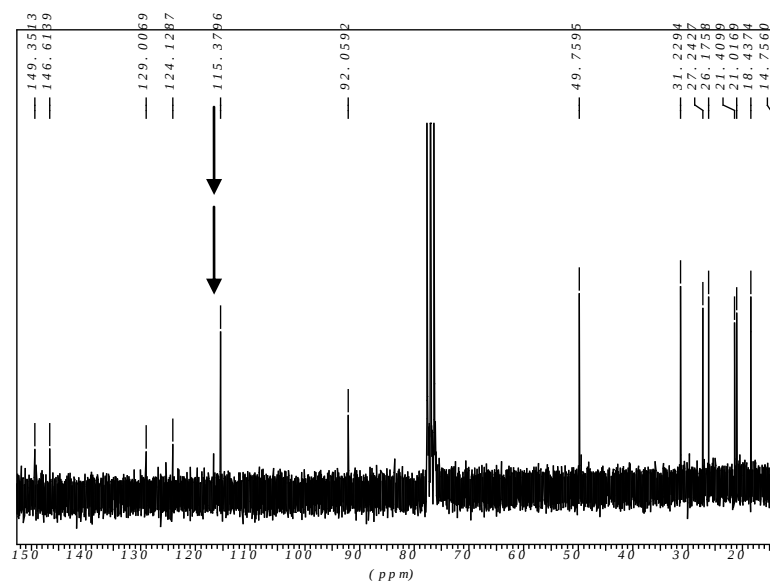
Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRFABMS) παρουσίασε μοριακό ιόν $[\text{M}]^+$ σε m/z 232.1468 (θεωρητικό MB: 232.1463).



Εικ. 4.229 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **42**

Στο φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.230) εμφανίζονται 15 άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών, ένας άνθρακας είναι οξυγονωμένος και συντονίζεται σε δ 92.1, ενώ έχει

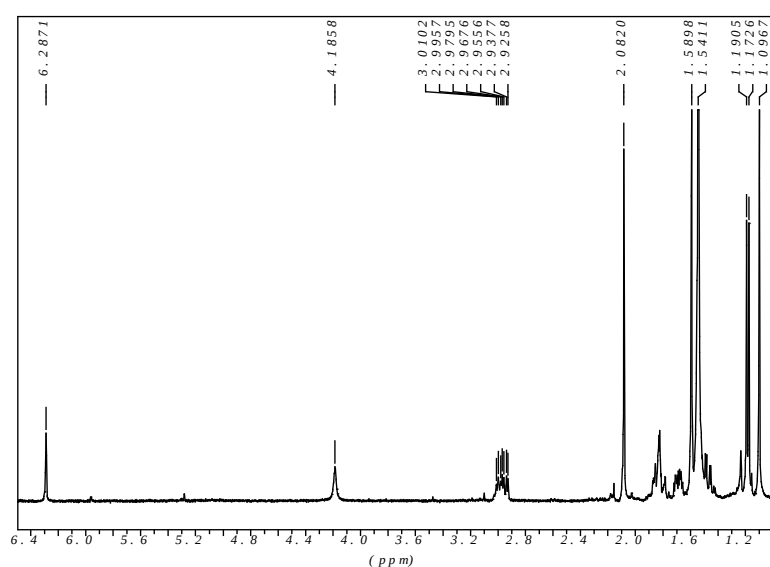
άνθρακες είναι ολεφινικοί και συντονίζονται σε δ 115.4, 115.4, 124.1, 129.0, 146.6 και 149.4.



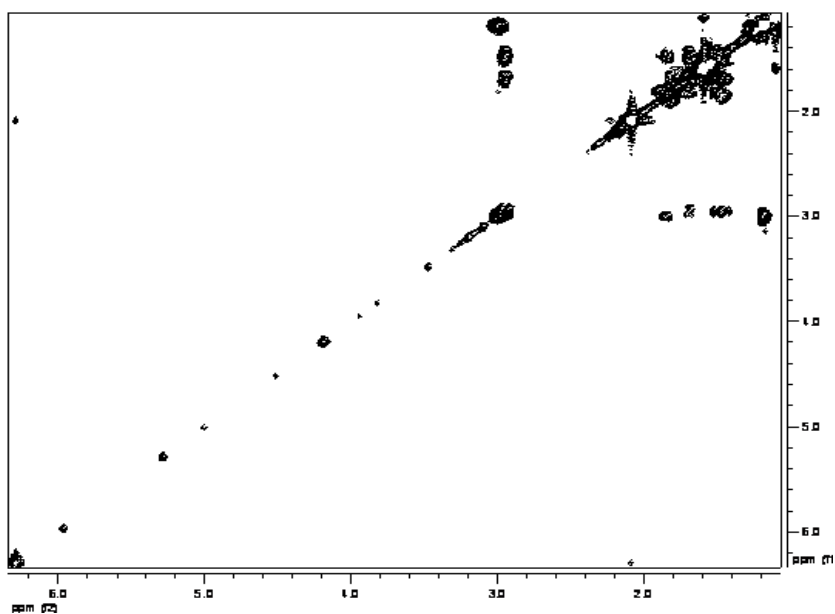
Εικ. 4.230 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **42**

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.231) υποδεικνύει την ύπαρξη δύο απλών κορυφών μεθυλίων σε δ 1.59 και 1.10, ενός αρωματικού μεθυλίου (δ 2.08, s) και μεθυλίου σε βενζυλικό μεθίνιο (δ 1.18, d; δ 2.99, m). Ο αρωματικός δακτύλιος εμφανίζει ένα αρωματικό πρωτόνιο (δ 6.29, s) που παρουσιάζει μακρά σύζευξη με το αρωματικό μεθύλιο (φάσμα COSY).

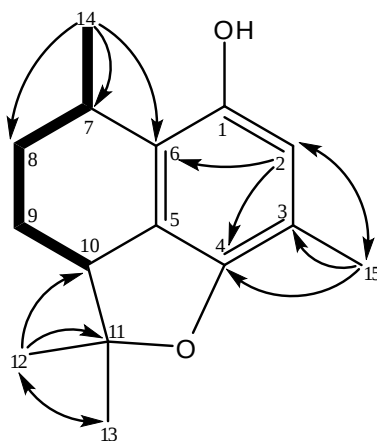
Στο φάσμα COSY (Εικ. 4.232) εμφανίζεται το H-10 (δ 2.94) να συζεύγνεται με το H₂-9, το H₂-9 με το H₂-8 και το H₂-8 με το H-7.



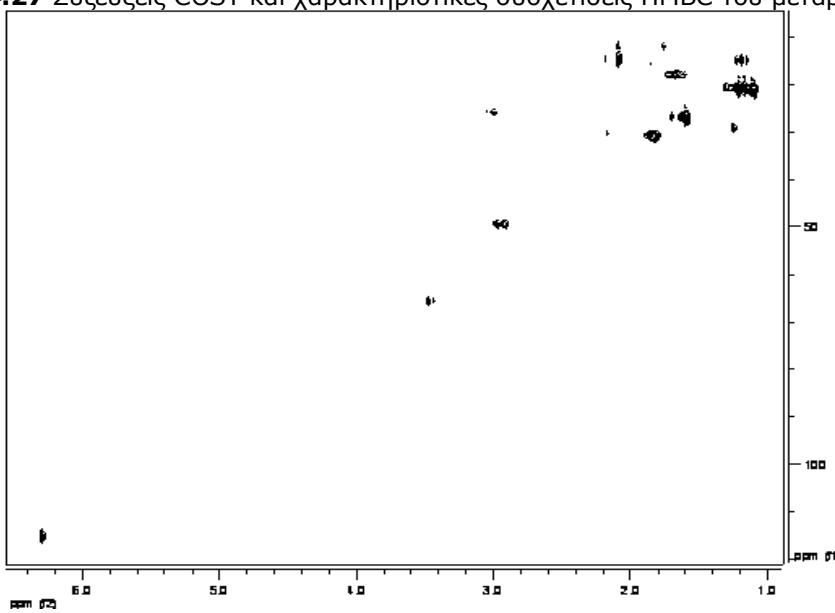
Εικ. 4.231 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **42**



Εικ. 4.232 Φάσμα COSY (CDCl₃) του μεταβολίτη **42**

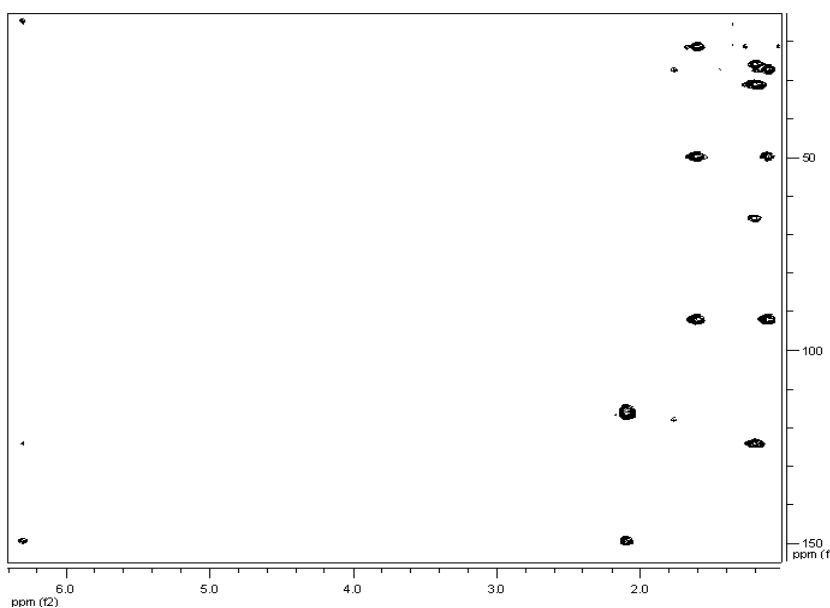


Σχήμα 4.27 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **42**



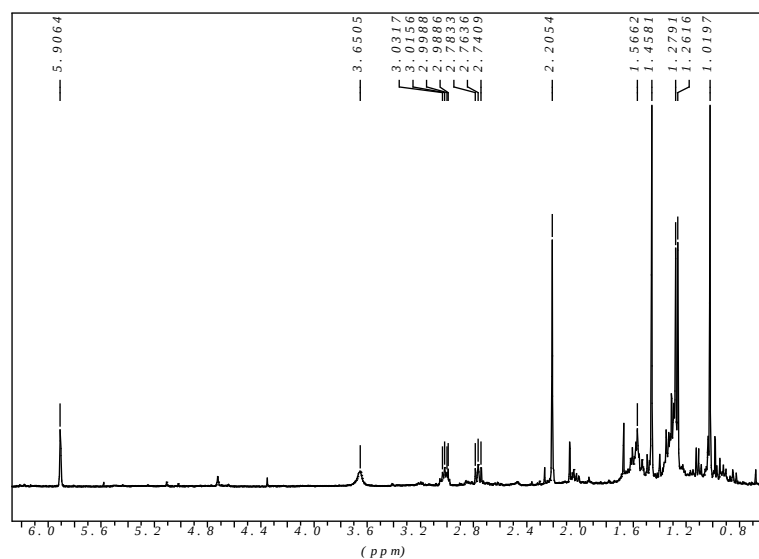
Εικ. 4.233 Φάσμα HMQC (CDCl₃) του μεταβολίτη **42**

Στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.234), τα πρωτόνια των αλειφατικών μεθυλίων στα 1.10 ppm και στα 1.59 ppm παρουσιάζουν ισχυρές ετεροπυρηνικές συζεύξεις με τον C-10 (49.5 ppm) και με τον C-11 (91.6 ppm). Με βάση το βαθμό ακορεστότητας, το μόριο θα πρέπει να είναι τρικυκλικό. Η παρουσία 2 οξυγονωμένων αρωματικών ανθράκων και ενός αλειφατικού οξυγονωμένου άνθρακα, σε συνδυασμό με τα δύο οξυγόνα του μορίου, συνηγορούν στην παρουσία γέφυρας οξυγόνου, που ενώνει τον C-11 με τον C-4.

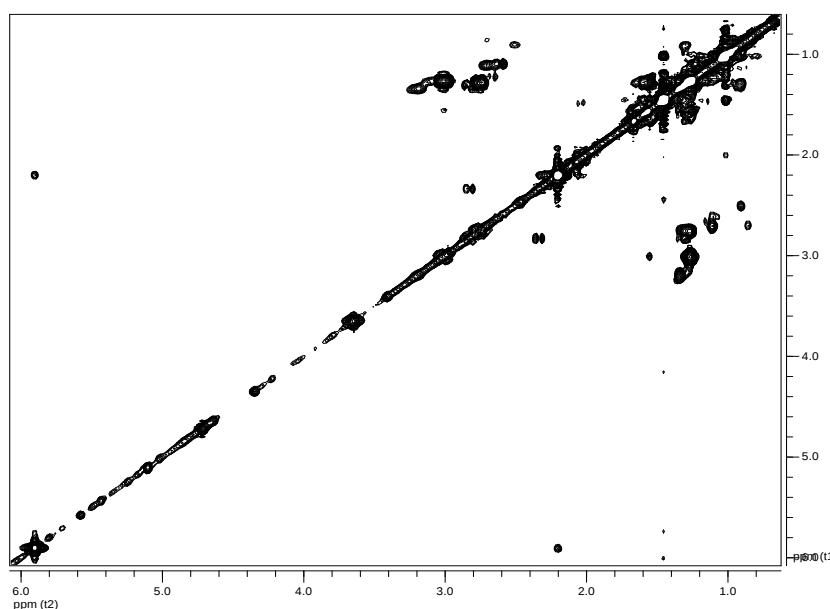


Εικ. 4.234 Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **42**

Περαιτέρω, η χρήση βενζολίου ως διαλύτη, κρίθηκε απαραίτητη προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τη σχετική στερεοχημία του μορίου εφόσον επιτεύχθηκε καλύτερος διαχωρισμός των σημάτων των πρωτονίων (φάσμα ¹H-NMR Εικ. 4.236). Στο φάσμα COSY (Εικ. 4.233) εμφανίζεται το H-7 (δ 3.02) να συζεύγνεται με το H-8α (δ 1.56), το H-8α με το H₂-9 (δ 1.29) και το H₂-9 με το H-10 (δ 2.76).

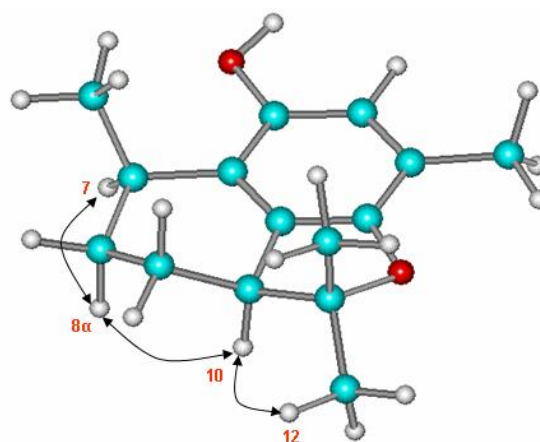


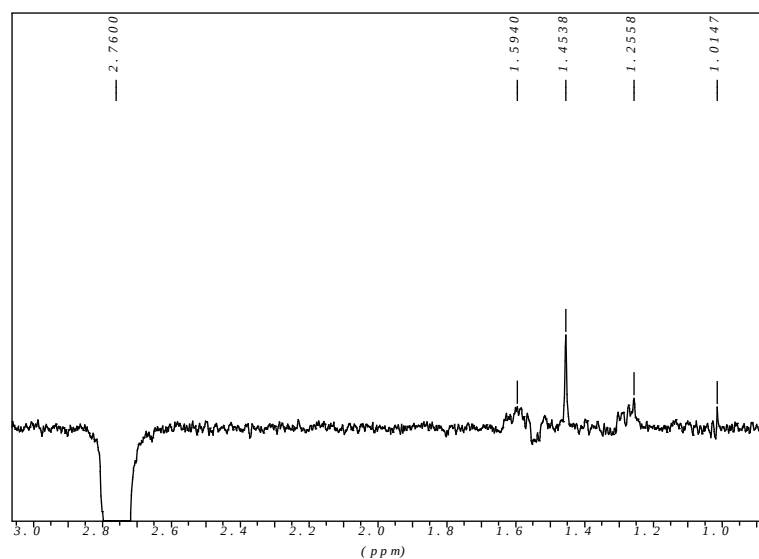
Εικ. 4.235 Φάσμα ^1H -NMR (C_6D_6) του μεταβολίτη **42**



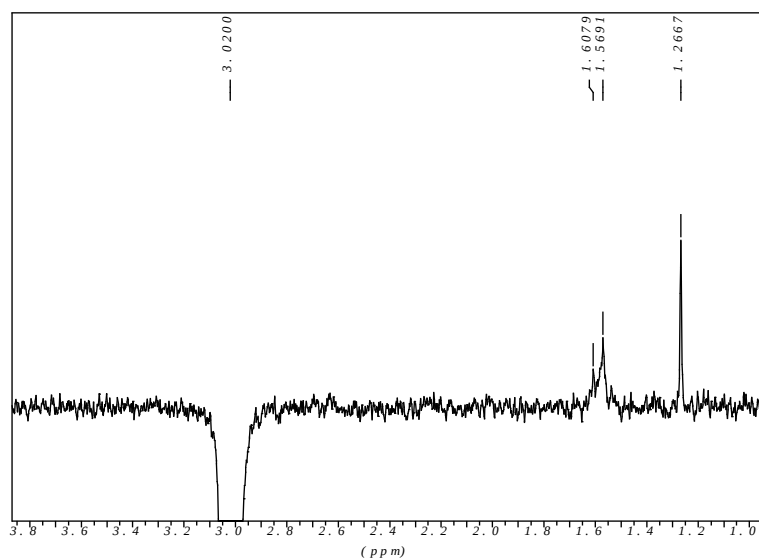
Εικ. 4.236 Φάσμα COSY (C_6D_6) του μεταβολίτη **42**

Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των δύο ασύμμετρων κέντρων βασίστηκε σε πειράματα 1D NOE (Εικ. 4.237, 4.238). Η συσχέτιση των πρωτονίων H-7/H-8α και H-8α/H-10 καθόρισε τη σχετική στεreoχημεία στους C-7 και C-10 ως 7*R**,10*S**.





Εικ. 4.237 Φάσμα 1D NOE (C₆D₆) του μεταβολίτη **42**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H-10



Εικ. 4.238 Φάσμα 1D NOE (C₆D₆) του μεταβολίτη **42**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H-7

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και τη βιβλιογραφική αναζήτηση, ο μεταβολίτης **42** αποτελεί τη νέα χημική δομή **ψευδοριτζιδόλη Α**. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.44.

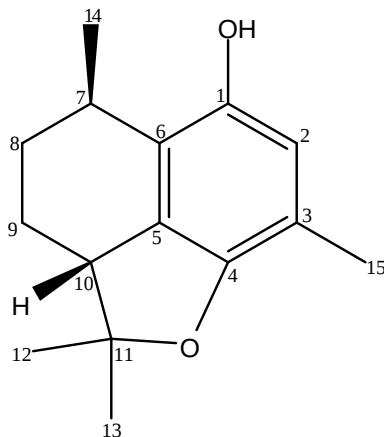
Πίνακας 4.44 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **42** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	HMBC	COSY
1	-	146.6	-	-
2	6.29 (1H, s)	115.4	C-4, C-6, C-15	H-15
3	-	115.4	-	-
4	-	149.4	-	-
5	-	129.0	-	-
6	-	124.1	-	-
7	2.99 (1H, m)	26.2	-	H-8, H-14
8	1.85 (2H, m)	31.2	-	H-7, H-9α, H-9β
9	α 1.68 (1H, m) β 1.47 (1H, m)	18.4	-	H-8, H-9β, H-10 H-8, H-9α, H-10
10	2.94 (1H, dd, J=12.0, 5.7)	49.8	-	H-9α, H-9β
11	-	92.1	-	-
12	1.59 (3H, s)	27.2	C-10, C-11, C-13	H-13
13	1.10 (3H, s)	21.4	C-10, C-11, C-12	H-12
14	1.18 (3H, d, J=7.2)	21.0	C-6, C-7, C-8	H-7
15	2.08 (3H, s)	14.8	C-2, C-3, C-4	H-2
OH	4.19 (1H, brs)	-	-	-

4.2.41 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 43

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **43** (1.3 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



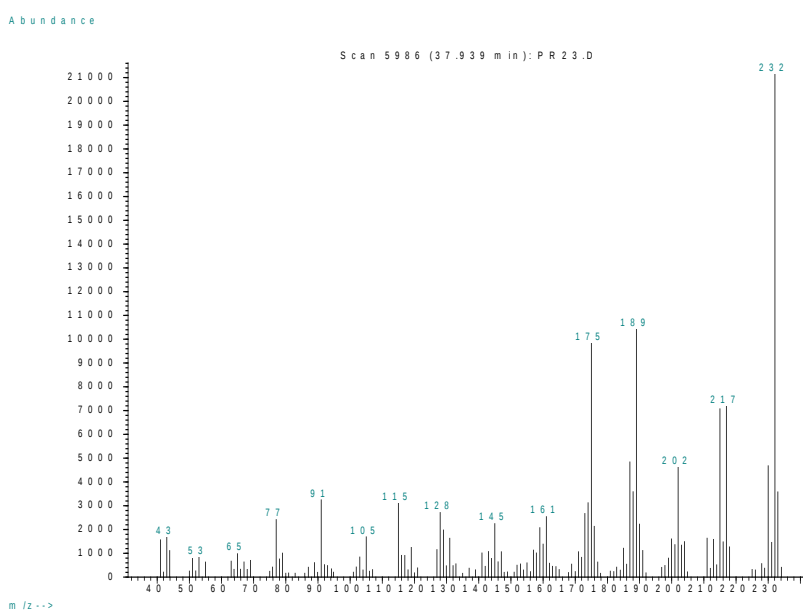
$[\alpha]_D = -16.9$ (c 0.083, CHCl_3)

IR (film) ν_{max} 3390 (broad), 2860, 1652, 1086 cm^{-1}

UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 246 (3.39), 302 (3.41) (nm)

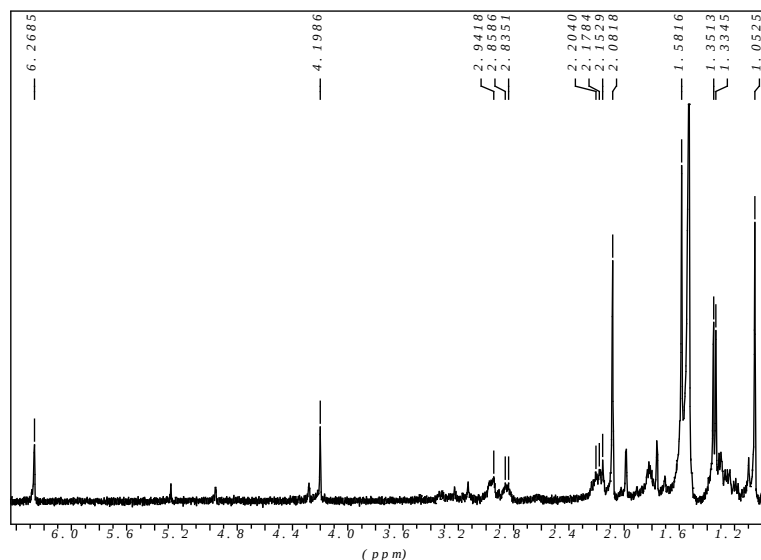
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **43** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRFABMS) παρουσίασε μοριακό ιόν $[\text{M}]^+$ σε m/z 232.1480 (θεωρητικό MB: 232.1463).



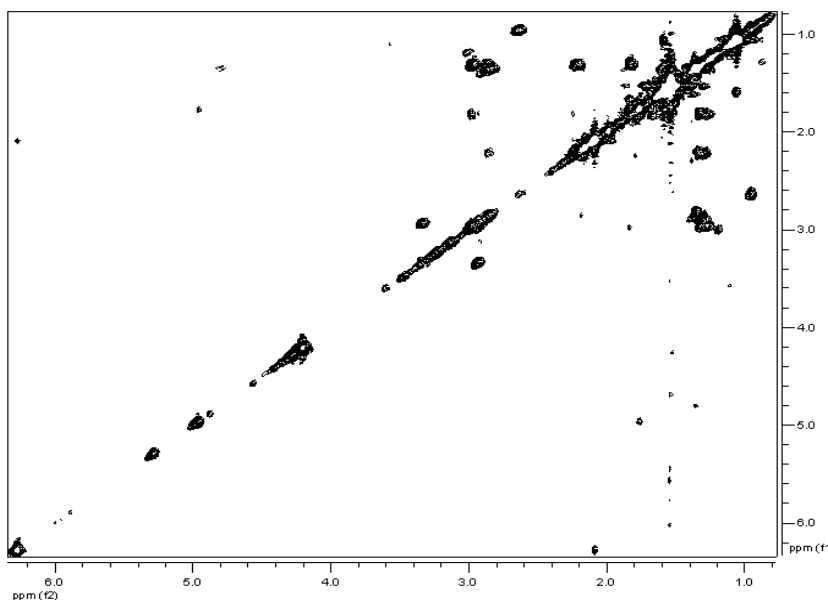
Εικ. 4.239 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **43**

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.240) είναι παρόμοιο με αυτό του μεταβολίτη **42**. Χαρακτηριστική είναι η μετατόπιση του H-7 σε υψηλότερα πεδία με ταυτόχρονη μετατόπιση των H₂-8. Αυτή η παρατήρηση παραπέμπει στην εξαγωγή του συμπεράσματος ότι ο παρόν μεταβολίτης πρέπει να είναι διαστερομερές του μεταβολίτη **42**.

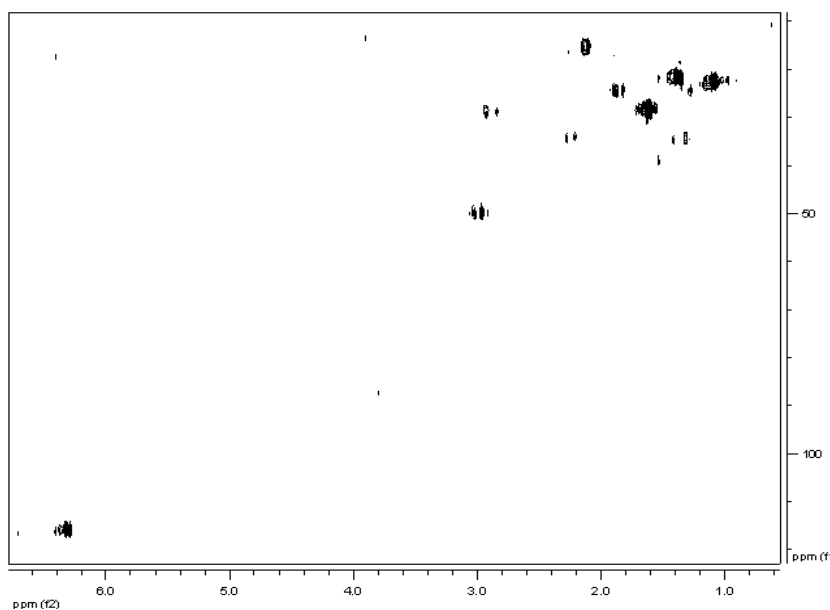


Εικ. 4.240 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **43**

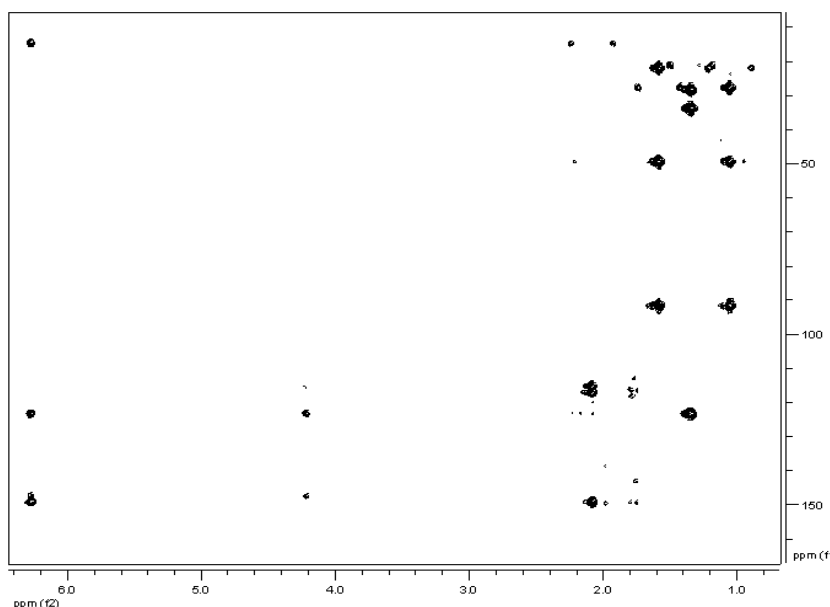
Τα πειράματα COSY (Εικ. 4.241), HSQC-DEPT (Εικ. 4.242) και HMBC (Εικ. 4.243) βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και στον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο.



Εικ. 4.241 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **43**

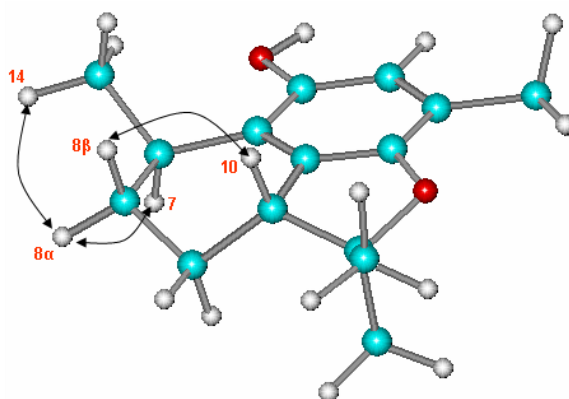


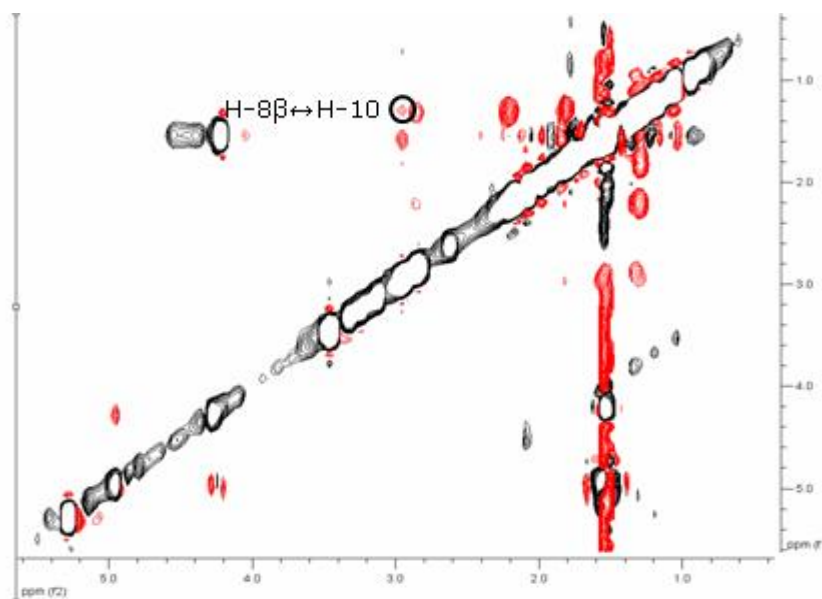
Εικ. 4.242 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl₃) του μεταβολίτη **43**



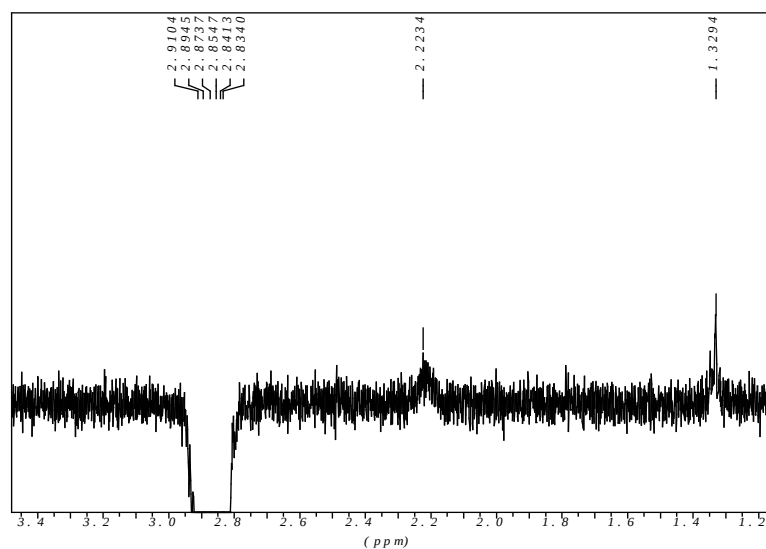
Εικ. 4.243 Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **43**

Η απόδοση της σχετικής στερεοχημείας των δύο ασύμμετρων κέντρων βασίστηκε σε πειράματα NOESY (Εικ. 4.244) και 1D NOE (Εικ. 4.245, 4.246). Η συσχέτιση των πρωτονίων H-8α/H-7, H-8α/Me-14 και H-8β/ H-10 καθόρισε τη σχετική στερεοχημεία στους C-7 και C-10 ως 7*R**,10*R**.

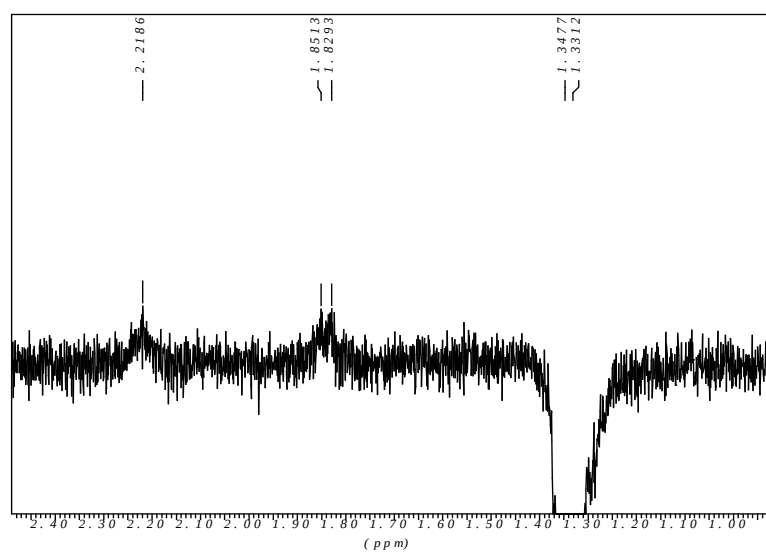




Εικ. 4.244 Φάσμα NOESY (CDCl_3) του μεταβολίτη **43**



Εικ. 4.245 Φάσμα 1D NOE (CDCl_3) του μεταβολίτη **43**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H-7



Εικ. 4.246 Φάσμα 1D NOE (CDCl_3) του μεταβολίτη **43**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H₃-14

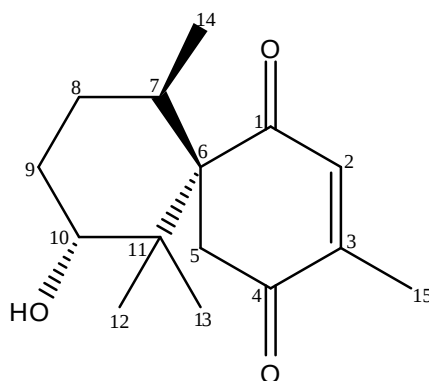
Με βάση τα παραπάνω, ο μεταβολίτης **43** ταυτοποιήθηκε ως το επιμερές του μεταβολίτη **42** στον C-10 και αποτελεί τη νέα χημική δομή **ψευδοριτζιδόλη Β**. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.45.

Πίνακας 4.45 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **43** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC	NOESY
1	-	147.2	-	-	-
2	6.27 (1H, s)	115.8	H-15	C-1, C-4, C-6, C-15	-
3	-	116.8	-	-	-
4	-	149.1	-	-	-
5	-	n.d.	-	-	-
6	-	122.9	-	-	-
7	2.85 (1H, m)	28.8	H-8α, H-8β, H-14	-	H-8α
8	α 2.19 (1H, m) β 1.32 (1H, m)	34.2	H-7, H-8β H-7, H-8α, H-9β	C-6, C-10 -	H-7, H-14 H-10
9	α 1.29 (1H, m) β 1.82 (1H, m)	24.4	H-8β, H-9α, H-10 H-9β, H-10	- -	- H-14
10	2.94 (1H, m)	49.9	H-9α, H-9β	-	H-8β
11	-	91.8	-	-	-
12	1.58 (3H, s)	28.1	H-13	C-10, C-11, C-13	-
13	1.05 (3H, s)	22.5	H-12	C-10, C-11, C-12	-
14	1.34 (3H, d, J=7.2)	20.8	H-7	C-6, C-7, C-8	H-8α, H-9β
15	2.08 (3H, s)	15.3	H-2	C-2, C-3, C-4	-
OH	4.20 (1H, s)	-	-	C-1, C-2, C-6	-

4.2.42 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 44*Νέο φυσικό προϊόν*

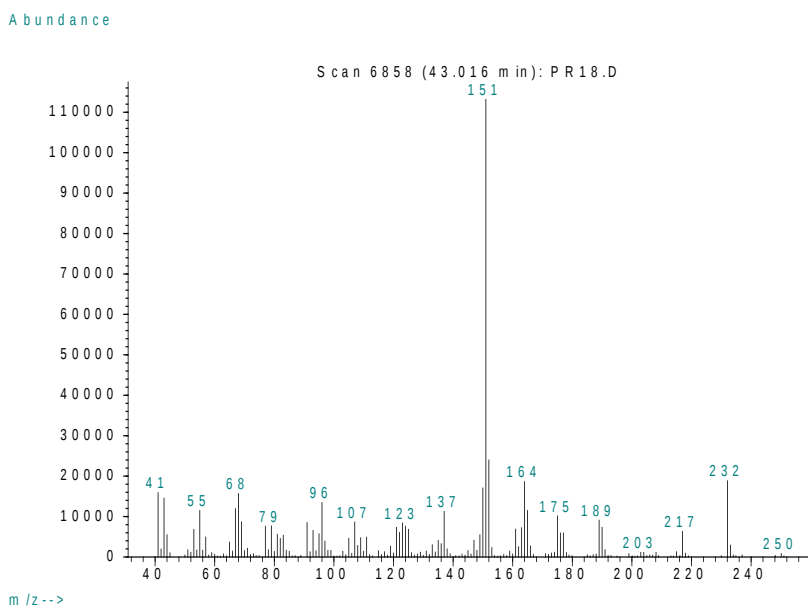
Ο μεταβολίτης **44** (1.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.


 $[\alpha]_D = -12.0$ (c 0.108, CHCl_3)

 $\text{UV } \lambda_{\text{max}} (\text{CHCl}_3) (\log \epsilon) 211 (3.25) (\text{nm})$
 $\text{IR (film)} \nu_{\text{max}} 3300 (\text{broad}), 2939, 2216, 1650 \text{ cm}^{-1}$

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **44** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.

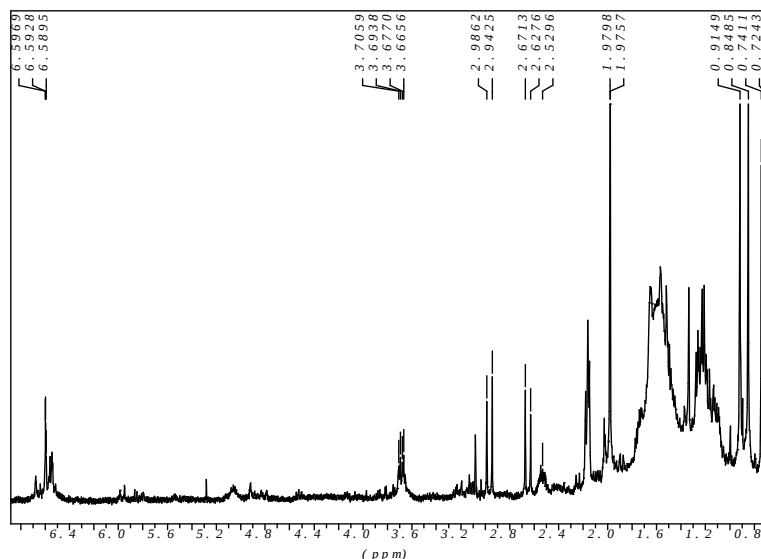
Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRESIMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ σε m/z 251.1649 (θεωρητικό MB: 251.1647).



Εικ. 4.247 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **44**

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 4.248) εμφανίζονται χαρακτηριστικά σήματα, τα οποία αντιστοιχούν σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο σε δ 6.59, ένα οξυγονωμένο πρωτόνιο σε δ 3.68, ένα μεθίνιο σε δ 2.53, ένα μεθυλένιο σε χαμηλά πεδία σε δ 2.96 (1H , d,

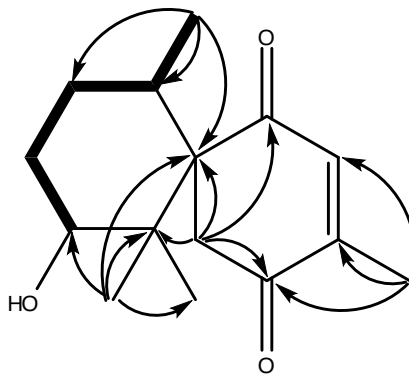
$J=17.6$) και δ 2.65 (1H, d, $J=17.6$), ένα βινυλικό μεθύλιο σε δ 1.98, δύο αλειφατικά μεθύλια σε δ 0.91 και δ 0.85 και, επίσης, ένα μεθύλιο σε τριτοταγή άνθρακα σε δ 0.74.



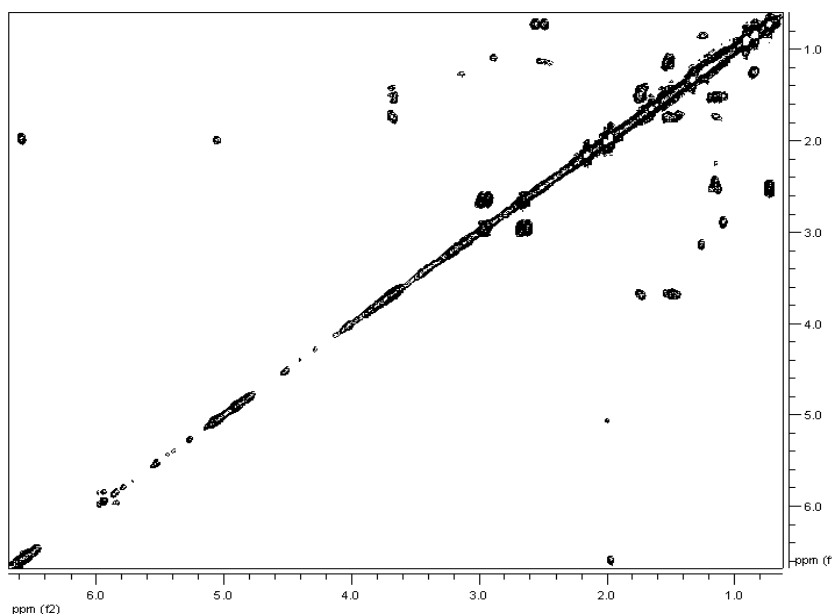
Εικ. 4.248 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του μεταβολίτη **44**

Στο φάσμα COSY (Εικ. 4.249), φαίνονται η σύζευξη των πρωτονίων του μεθυλίου Me-15 με το ολεφινικό πρωτόνιο H-2 και η σύζευξη του H-7 με τα πρωτόνια του Me-14 και με τα H₂-8, η σύζευξη των H₂-8 με τα H₂-9 και η σύζευξη των τελευταίων με το H-10 (3.68 ppm).

Το μεθυλένιο H₂-5 σε δ 2.96 και δ 2.65, δεν παρουσιάζει καμία σύζευξη με γειτονικά πρωτόνια. Η παραπάνω επισήμανση σε συνδυασμό με το σήμα του ολεφινικού πρωτονίου, που αποτελεί διπλή κορυφή λόγω της μακράς σύζευξής του με το βινυλικό μεθύλιο, υποδεικνύει ότι τα καρβονύλια του μορίου (η παρουσία των οποίων αποδεικνύεται από τη μελέτη του φάσματος HMBC) είναι τοποθετημένα σε para θέση.

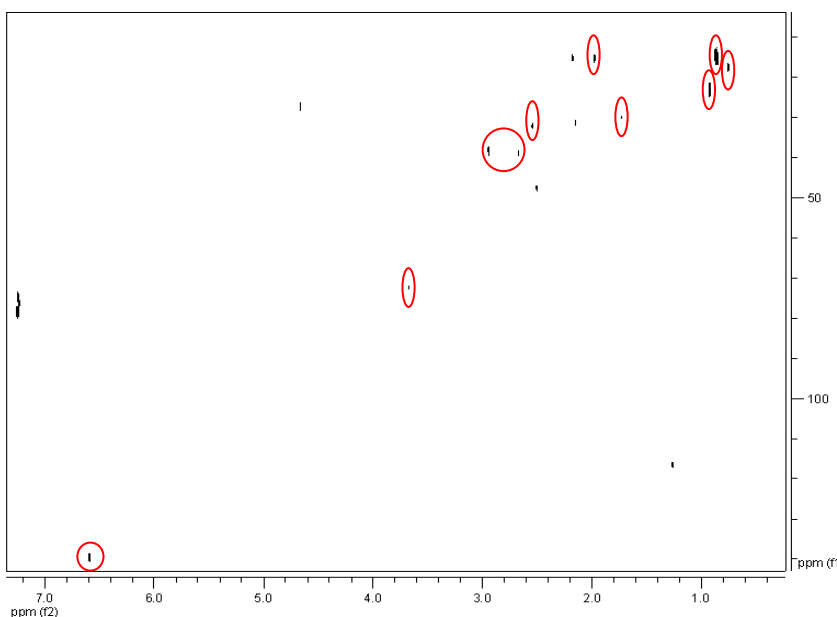


Σχήμα 4.28 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **44**



Εικ. 4.249 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **44**

Η ύπαρξη άνθρακα στα 72.3 ppm και η πολλαπλή κορυφή στο φάσμα ^1H -NMR στα 3.68 ppm, υποδεικνύει την παρουσία οξυγονωμένου μεθινίου.



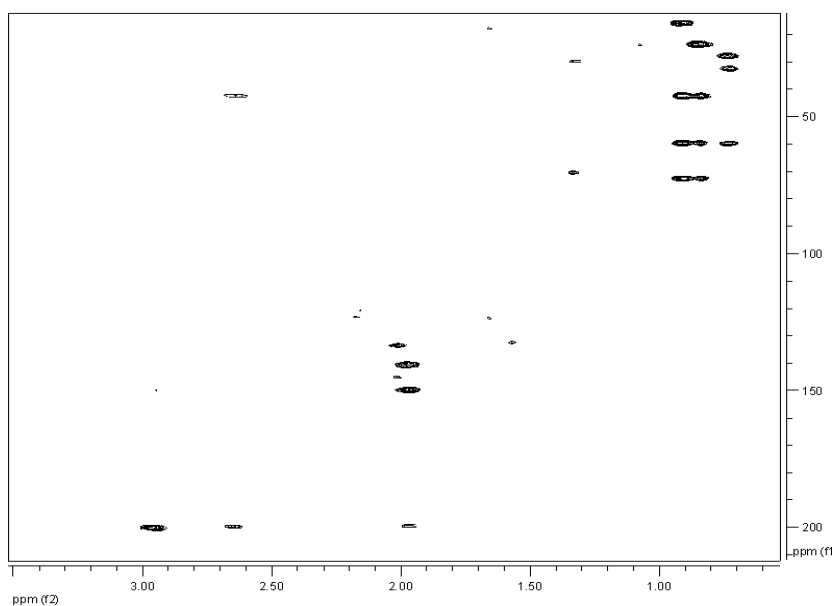
Εικ. 4.250 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **44**

Στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.251), τα πρωτόνια των αλειφατικών Me-12 και Me-13 παρουσιάζουν ισχυρές ετεροπυρηνικές συζεύξεις με τον C-10 στα 72.3 ppm, τον τεταρτοταγή C-11 (42.2 ppm) και άλλον έναν τεταρτοταγή στα 59.6 ppm (C-6). Με τον τελευταίο παρουσιάζουν ισχυρές ετεροπυρηνικές συζεύξεις και τα πρωτόνια του Me-14. Το τελευταίο στοιχείο συνηγορεί στην παρουσία ενός δεσμού που ενώνει τον C-6 με τον C-11.

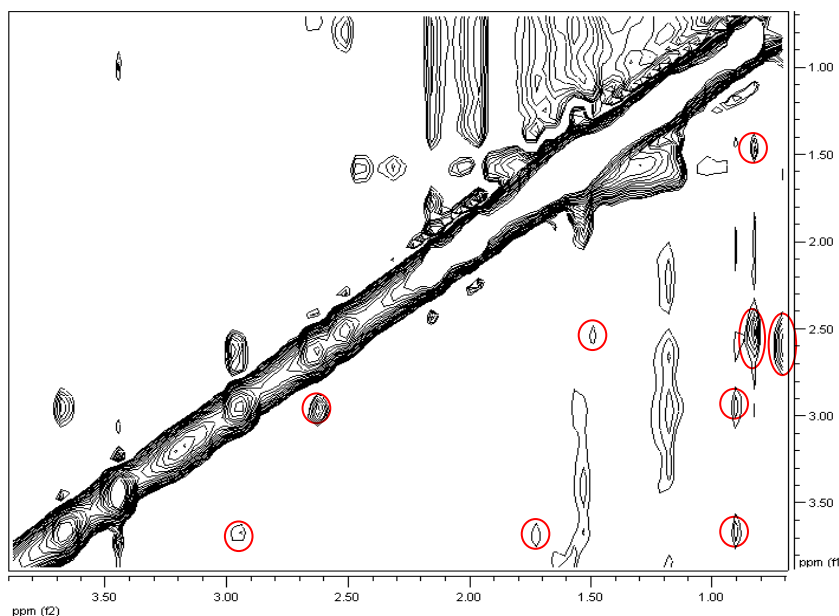
Το βινυλικό μεθύλιο Me-15 παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-4 (199.2 ppm), τον C-3 (149.8 ppm) και με τον C-2 (140.2 ppm). Σε αυτόν τον άνθρακα (με βάση τα

φάσματα COSY και HSQC-DEPT) είναι συνδεδεμένο το ολεφινικό πρωτόνιο που εμφανίζεται στα 6.59 ppm.

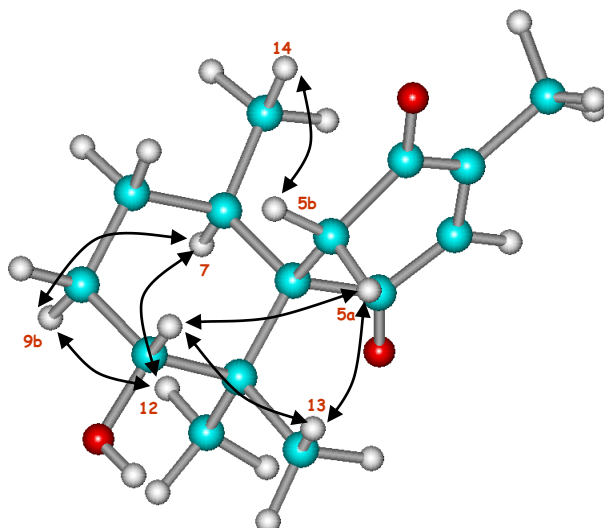
Το πρωτόνιο του αποθωρακισμένου μεθυλενίου που εμφανίζεται σε δ 2.96 παρουσιάζει συσχέτιση με τον C-1 (199.9 ppm), καθώς και με τον C-6 (59.6 ppm), ενώ το πρωτόνιο του αποθωρακισμένου μεθυλενίου σε δ 2.65 με τον C-4 (199.2 ppm) και με τον C-11 (42.2 ppm), σήμα που επιβεβαιώνει την υπόθεση ύπαρξης δεσμού άνθρακα-άνθρακα μεταξύ των C-6 και C-11 του μορίου.



Εικ. 4.251 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **44**



Εικ. 4.252 Φάσμα NOESY (CDCl_3) του μεταβολίτη **44**



Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των ασύμμετρων κέντρων βασίστηκε σε πειράματα NOESY (Εικ. 4.252). Οι συσχετίσεις των πρωτονίων H₃-14/H-5b, H-7/H₃-12, H₃-13/H-10, H₃-13/H-5a, H-10/H-5a καθόρισαν τη σχετική στεreoχημεία στους άνθρακες C-6, C-7 και C-10 ως 6*S**,7*R**,10*R**.

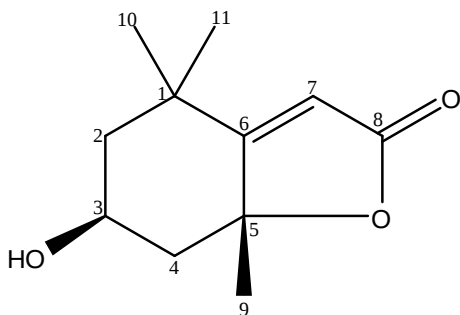
Με βάση τα παραπάνω φασματοσκοπικά δεδομένα και σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναζήτηση, ο μεταβολίτης **44** είναι νέα χημική δομή τσαμικρανικού σκελετού. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.46.

Πίνακας 4.46 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **44** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

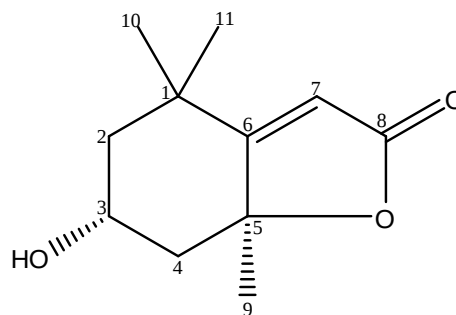
Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC	NOESY
1	-	199.9	-	-	-
2	6.59 (1H, d, J=1.6)	140.2	H-15	-	-
3	-	149.8	-	-	-
4	-	199.7	-	-	-
5	a 2.96 (1H, d, J=17.6) b 2.65 (1H, d, J=17.6)	39.0	H-5b H-5a	C-1, C-6 C-4, C-11	H-10, H-13 H-8b, H-14
6	-	59.6	-	-	-
7	2.53 (1H, m)	32.1	H-8b, H-14	-	H-9b, H-12
8	a 1.52 (1H, m) b 1.15 (1H, m)	27.6	H-7, H-8b, H-9a H-8a	- -	- H-5b
9	a 1.74 (1H, m) b 1.49 (1H, m)	30.2	H-8b, H-9b, H-10 H-9a, H-10	-	- H-7, H-12
10	3.68 (1H, dd, J=11.2, 4.2)	72.3	H-9a, H-9b	-	H-5a, H-13
11	-	42.2	-	-	-
12	0.85 (3H, s)	15.5	-	C-6, C-10, C-11, C-13	H-7, H-9b
13	0.91 (3H, s)	23.6	-	C-6, C-10, C-11, C-12	H-5a, H-10
14	0.74 (3H, d, J=6.5)	17.9	H-7	C-6, C-7, C-8	H-5b
15	1.98 (3H, d, J=1.6)	15.5	H-2	C-2, C-3, C-4	-

4.2.43 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ 45 και 46

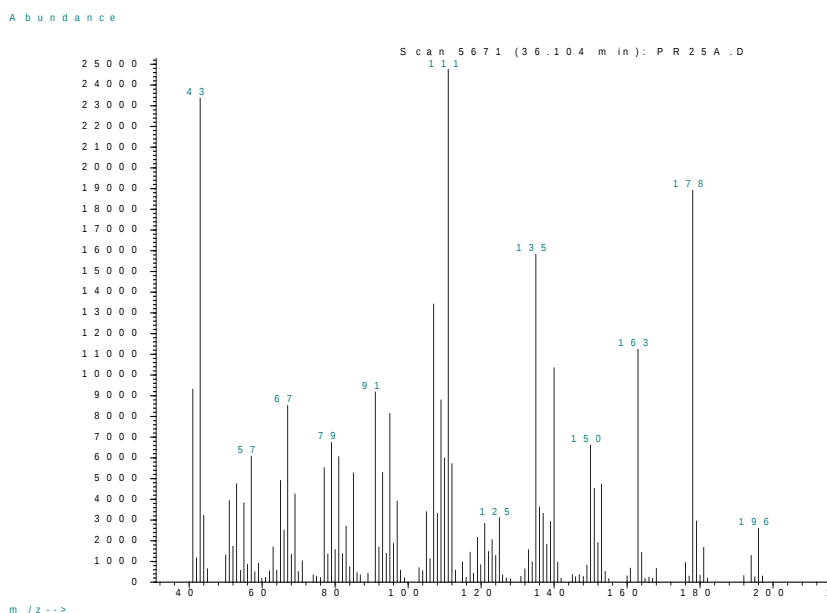
Ο μεταβολίτης **45** (1.8 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



$[\alpha]_D = -99.0$ (c 0.108, CHCl_3)



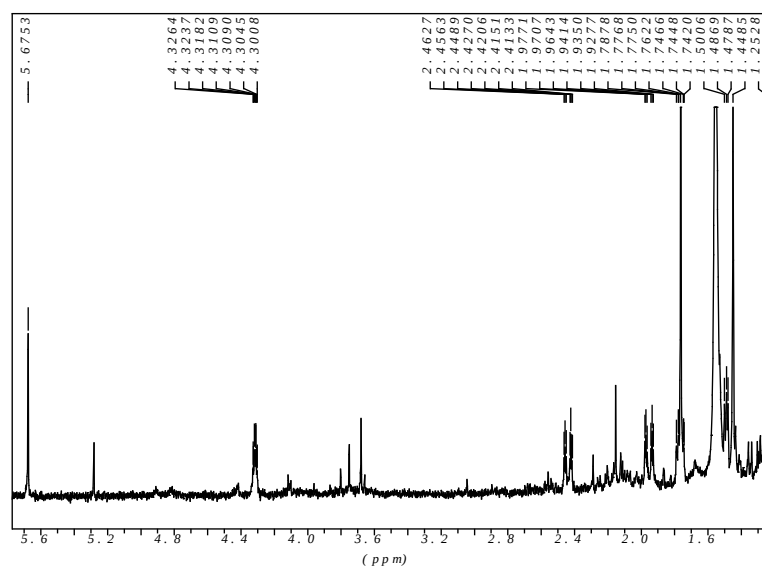
$[\alpha]_D = +101.0$ (c 0.108, CHCl_3)



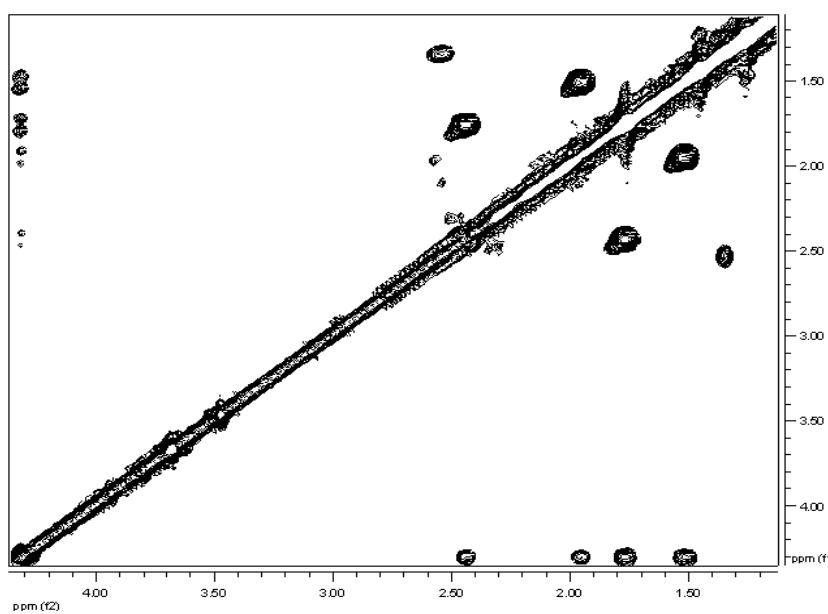
Εικ. 4.253 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **45**

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **45** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_3$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 4 βαθμούς ακορεστότητας.

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.253), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 196 $[\text{M}]^+$.

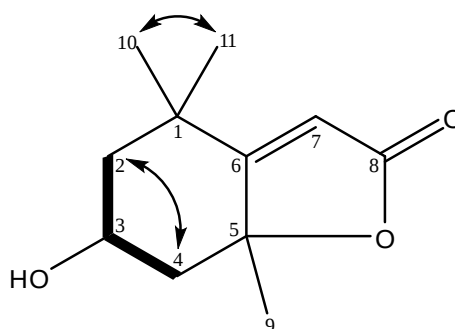


Εικ. 4.254 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **45**

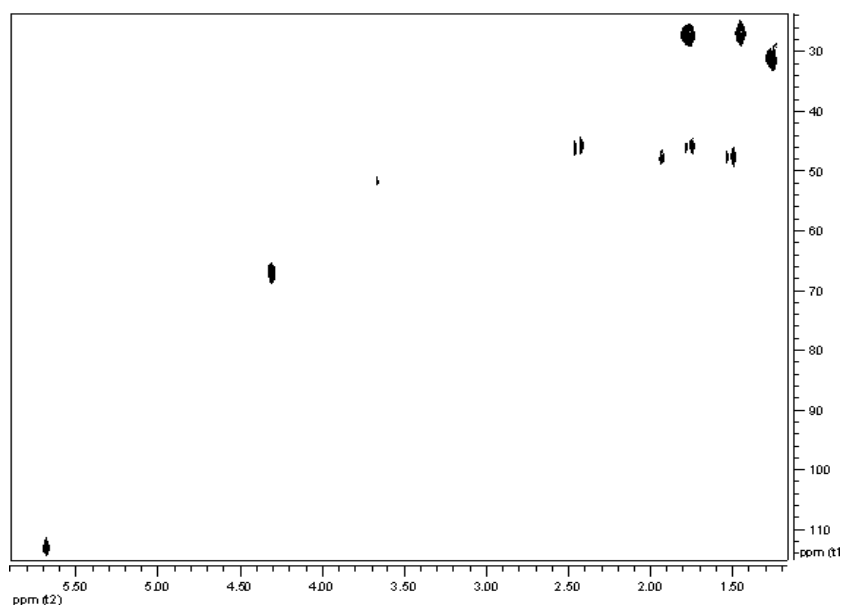


Εικ. 4.255 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **45**

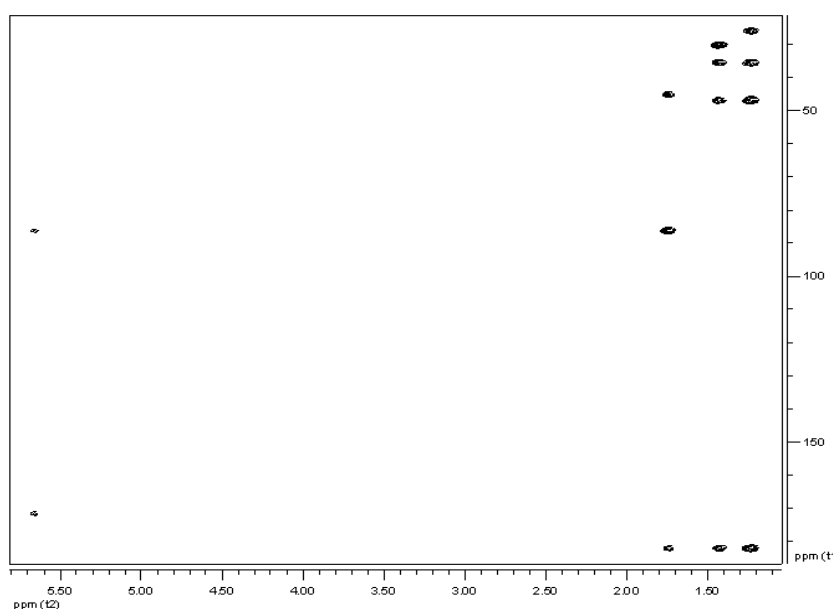
Τα πειράματα COSY (Εικ. 4.255), HSQC-DEPT (Εικ. 4.256) και HMBC (Εικ. 4.257) βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και στον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο.



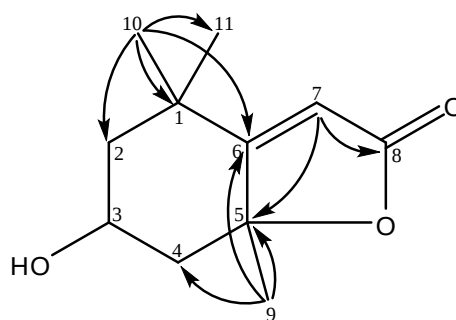
Σχήμα 4.29 Συζεύξεις COSY του μεταβολίτη **45**



Εικ. 4.256 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **45**



Εικ. 4.257 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **45**



Σχήμα 4.30 Χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **45**

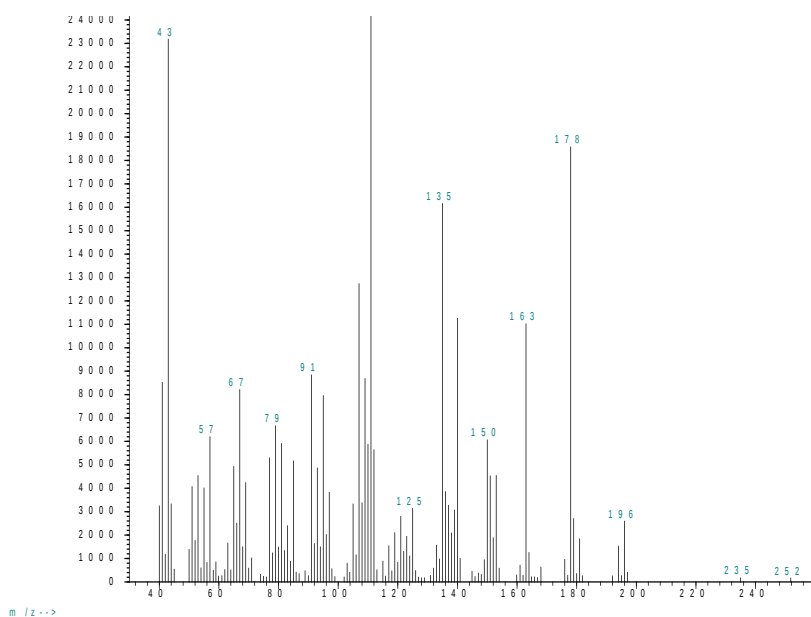
Με βάση τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων, ο μεταβολίτης **45** ταυτίστηκε με το γνωστό φυτικό προϊόν **(-)-λολιολίδιο** (Hodges *et al*, 1964). Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.47. Μελέτες καταδεικνύουν ότι πρόκειται για παράγωγο οξείδωσης συγκεκριμένων καροτενοειδών (Pettit *et al*, 1980). Στο μαλακό κοράλλι *P. rigida*, πιθανόν να εντοπίζονται στο εκχύλισμα προερχόμενα από τις συμβιωτικές ζωοξανθέλλες του οργανισμού που βιοσυνθέτουν τα πρόδρομα καροτενοειδή.

Πίνακας 4.47 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **45** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	35.9	-	-
2	a 1.95 (1H, ddd, J=14.4, 2.7, 2.7) b 1.52 (1H, m)	47.2	H-2b, H-3, H-4a H-2a, H-3	- -
3	4.32 (1H, m)	67.2	H-2a, H-2b, H-4a, H-4b	-
4	a 2.44 (1H, ddd, J=14.4, 2.7, 2.7) b 1.76 (1H, m)	45.9	H-2a, H-3, H-4b H-3, H-4a	C-2 -
5	-	86.5	-	-
6	-	182.0	-	-
7	5.68 (1H, s)	113.0	-	C-5, C-8
8	-	171.4	-	-
9	1.76 (3H, s)	27.4	-	C-4, C-5, C-6
10	1.45 (3H, s)	27.1	-	C-1, C-2, C-6, C-11
11	1.25 (3H, s)	31.1	-	C-1, C-2, C-6, C-10

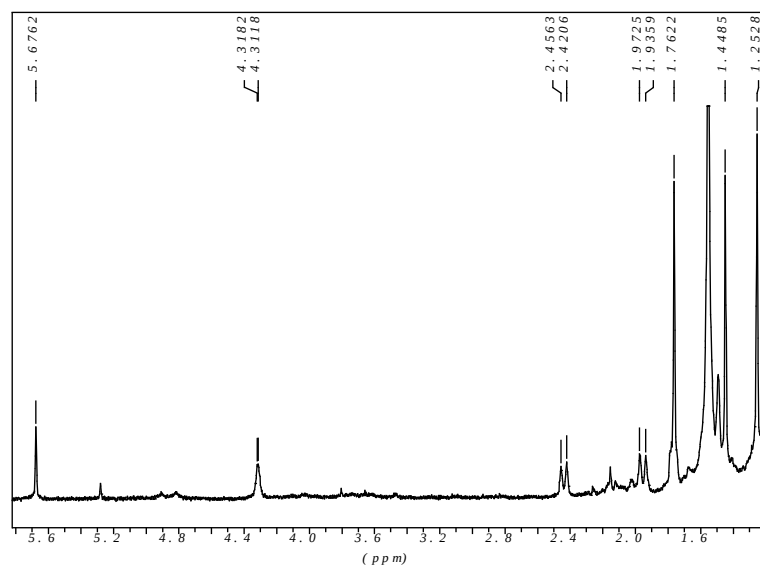
Ο μεταβολίτης **46** (1.7 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.258), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε *m/z* 196 [M]⁺.



Εικ. 4.258 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **46**

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 4.259) ταυτίζεται με αυτό του μεταβολίτη **45**, μία παρατήρηση που παραπέμπει στο συμπέρασμα ότι ο παρόν μεταβολίτης **(+)-λολιολίδιο** είναι οπτικός αντίποδας του μεταβολίτη **45**, που έχει απομονωθεί στο παρελθόν από αρκετά φυτά όπως το *Lolium perenne* (Hodges *et al*, 1964) και *Salvia divinorum* (Valdes *et al*, 1986), αλλά και από το μαλάκιο *Dolabella ecaudata* (Pettit *et al*, 1980).



Εικ. 4.259 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του μεταβολίτη **45**

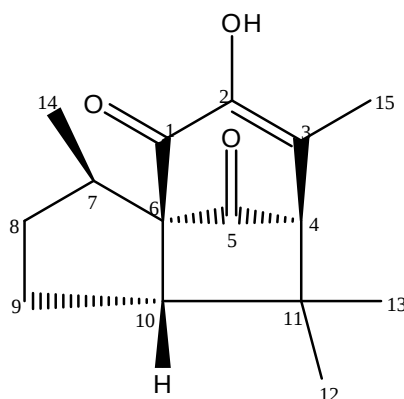
Πίνακας 4.48 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **46** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)
2	a 1.95 (1H, m) b 1.52 (1H, m)
3	4.31 (1H, m)
4	a 2.44 (1H, m) b 1.76 (1H, m)
7	5.68 (1H, s)
8	-
9	1.76 (3H, s)
10	1.45 (3H, s)
11	1.25 (3H, s)

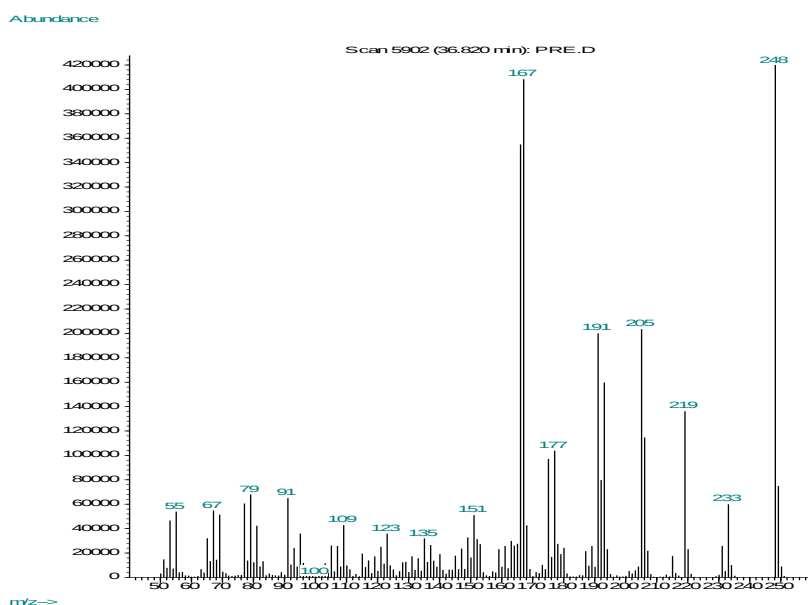
4.2.44 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 47

Πρώτη αναφορά σε θαλάσσιο είδος

Ο μεταβολίτης **47** (23.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή υποκίτρινης σκόνης. Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.260) του, το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 248 $[M]^+$ και υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $C_{15}H_{20}O_3$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.

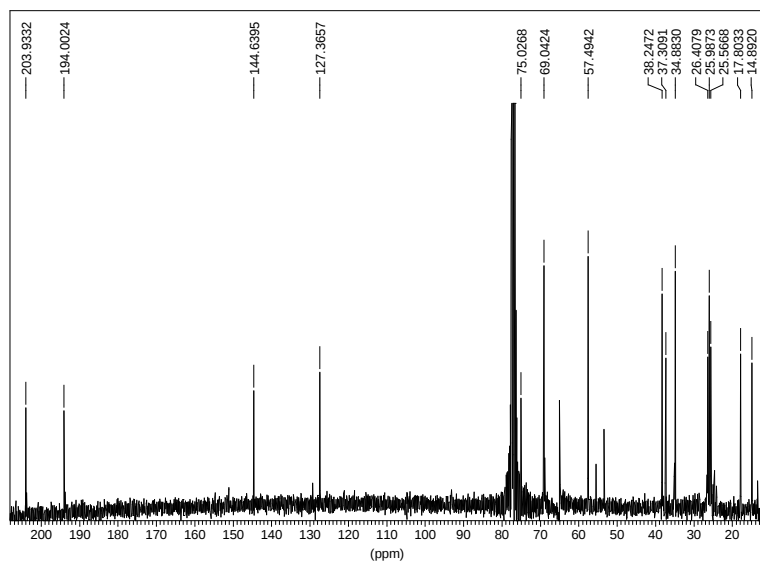


$[\alpha]_D = +72.5$ (c 0.04, $CHCl_3$)

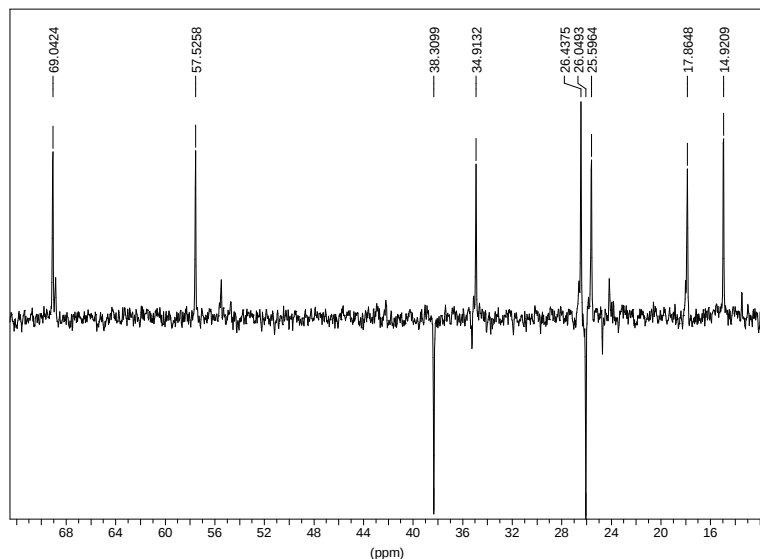


Εικ. 4.260 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **47**

Στο φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.261), εμφανίζονται δεκαπέντε άτομα ανθράκων. Αξίζει να σημειωθεί η εμφάνιση δύο καρβονυλίων και δύο ανθράκων στην ολεφινική/αρωματική περιοχή. Με βάση αυτό το δεδομένο και γνωρίζοντας το βαθμό ακορεστότητας συμπεραίνουμε ότι ο μεταβολίτης **47** διαθέτει ένα διπλό δεσμό και είναι τρικυκλικό μόριο.

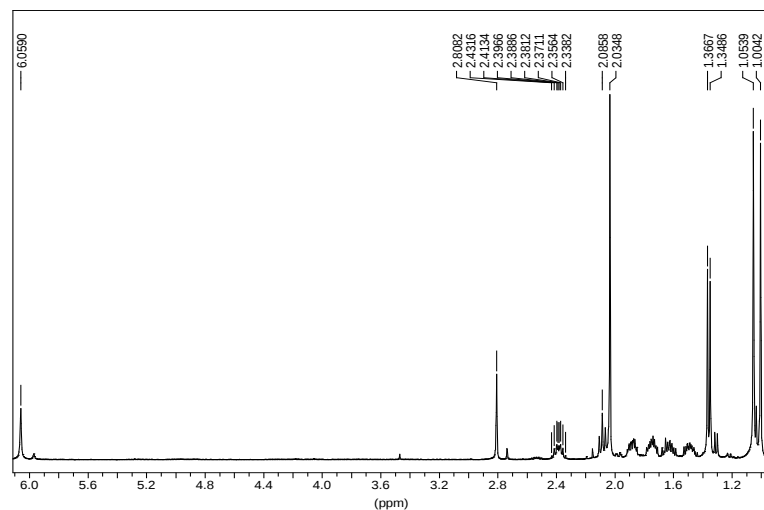


Εικ. 4.261 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **47**

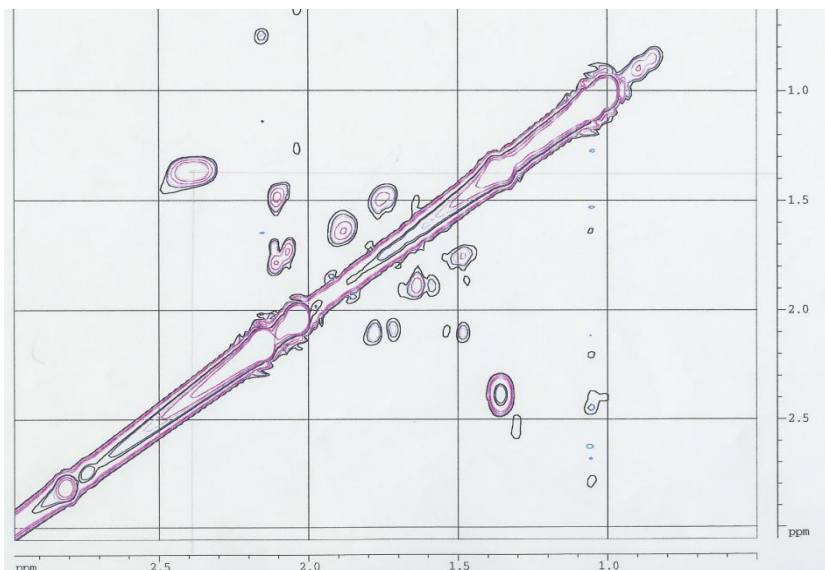


Εικ. 4.262 Φάσμα DEPT-135 (CDCl_3) του μεταβολίτη **47**

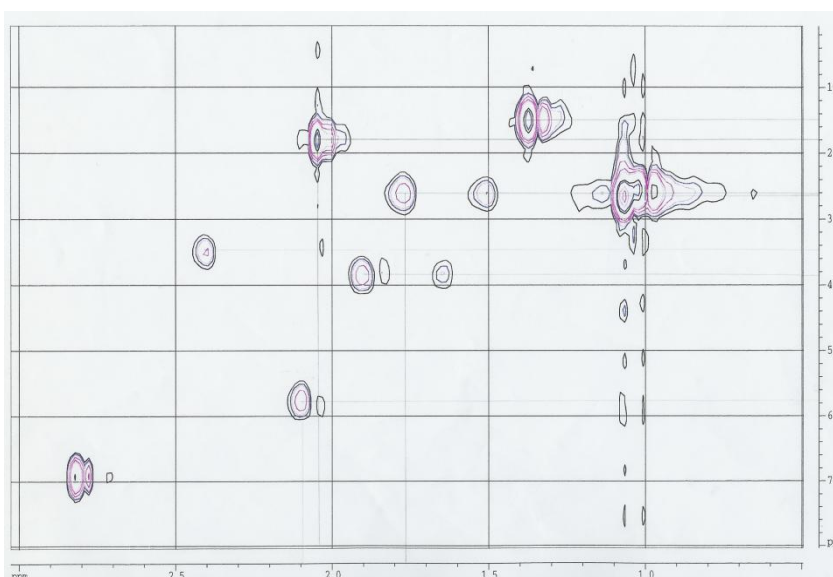
Στο φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.263) εμφανίζονται χαρακτηριστικά σήματα, τα οποία αντιστοιχούν σε ένα αλλυλικό πρωτόνιο σε δ 2.81 (1H, s), δύο μεθίνια σε δ 2.40 (1H, m) και 2.09 (1H, t) αντίστοιχα, ένα βινυλικό μεθύλιο σε δ 2.03 (3H, s), δύο αλειφατικά μεθύλια σε δ 1.05 (3H, s) και δ 1.00 (3H, s), ένα μεθύλιο σε τριτοταγή άνθρακα σε δ 1.36 (3H, d) και, επίσης, σε ενολικό πρωτόνιο υδροξυλίου σε δ 6.06.



Εικ. 4.263 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **47**

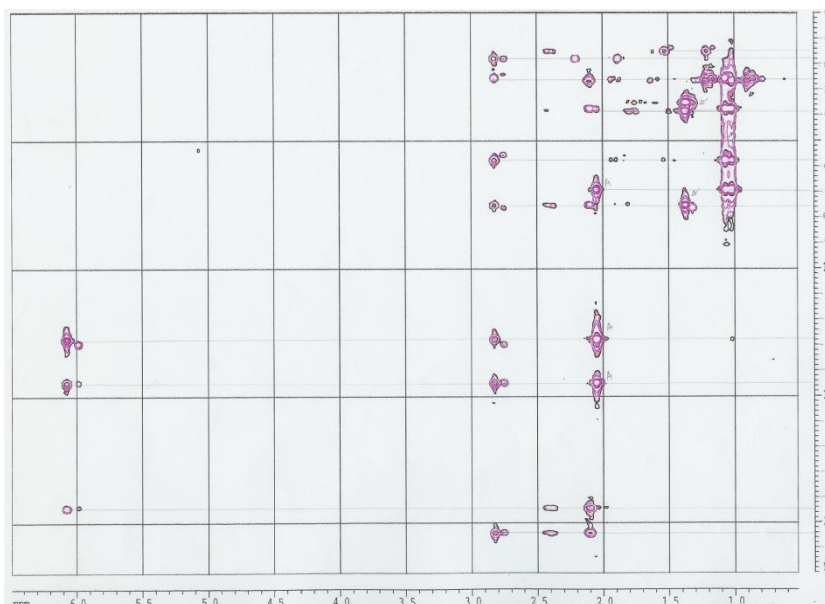


Εικ. 4.264 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **47**

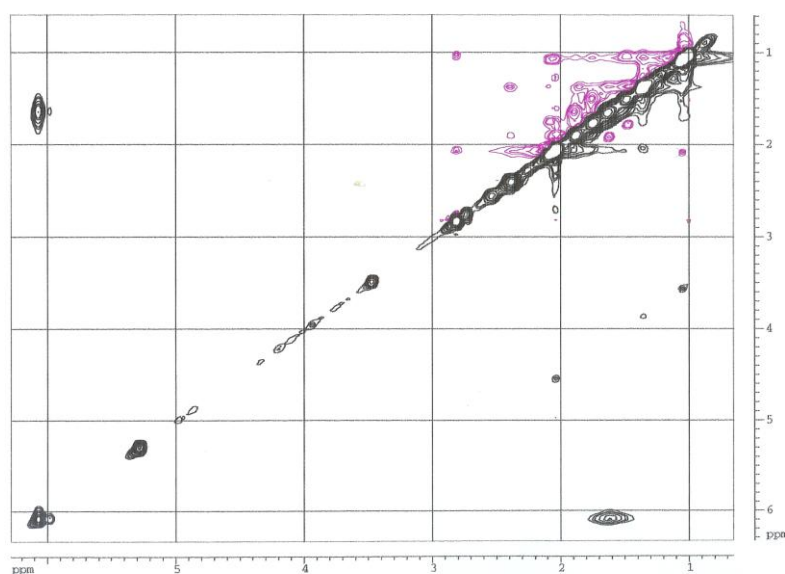


Εικ. 4.265 Φάσμα HMQC (CDCl_3) του μεταβολίτη **47**

Τα πειράματα COSY (Εικ. 4.264), HMQC (Εικ. 4.265) και HMBC (Εικ. 4.266) βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και στον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο.

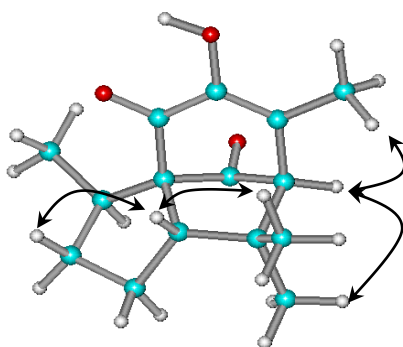


Εικ. 4.266 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **47**



Εικ. 4.267 Φάσμα NOESY (CDCl_3) του μεταβολίτη **47**

Χαρακτηριστικές συσχετίσεις στο φάσμα NOESY του μεταβολίτη **47**



Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και τη βιβλιογραφική αναζήτηση, ο μεταβολίτης **47** ταυτίζεται με την **α -πιπιτζόλη**, που απομονώθηκε πρώτη φορά το 1965 από φυτό του γένους *Perezia* (Walls *et al*, 1965). Από θαλάσσιο οργανισμό απομονώνεται πρώτη φορά. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα, παρατίθενται στον Πίνακα 4.49.

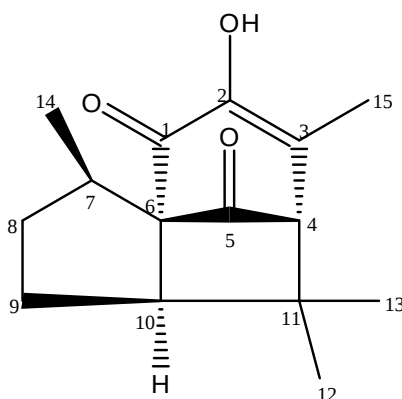
Πίνακας 4.49 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **47** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	194.0	-	-
2	-	144.6	-	-
3	-	127.4	-	-
4	2.81 (1H, s)	69.0	-	C-2, C-3, C-5, C-6, C-10, C-12, C-13, C-15
5	-	203.9	-	-
6	-	75.0	-	-
7	2.40 (1H, m)	34.9	H-14, H-8a, H-8b	C-14, C-1, C-5, C-6
8	a 1.88 (1H, m) b 1.64 (1H, m)	38.2	H-7, H-8b, H-9b H-7, H-8a	C-9 C-9, C-10, C-14
9	a 1.73 (1H, m) b 1.49 (1H, m)	26.0	H-9b, H-10 H-10, H-9a, H-8a	- C-8
10	2.09 (1H, t, J=8.3)	57.5	H-9a, H-9b	C-1, C-5, C-6, C-8, C-9
11	-	37.3	-	-
12	1.05 (3H, s)	26.4	-	C-4, C-10, C-11, C-13
13	1.00 (3H, s)	25.6	-	C-4, C-10, C-11, C-12
14	1.36 (3H, d, J=7.3)	14.9	H-7	C-6, C-7, C-8
15	2.03 (3H, s)	17.8	-	C-2, C-3, C-4
OH	6.06 (1H, s)	-	-	C-1, C-2, C-3

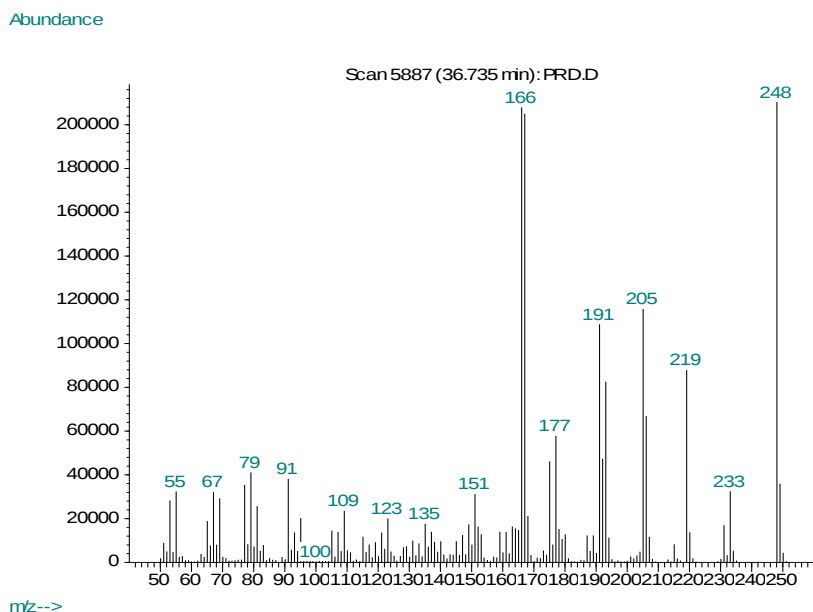
4.2.45 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 48

Πρώτη αναφορά σε θαλάσσιο είδος

Ο μεταβολίτης **48** (12.7 mg) απομονώθηκε με τη μορφή υποκίτρινης σκόνης. Στο φάσμα μάζας του (Εικ. 4.268), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 248 $[M]^+$ και υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $C_{15}H_{20}O_3$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 6 βαθμούς ακορεστότητας.



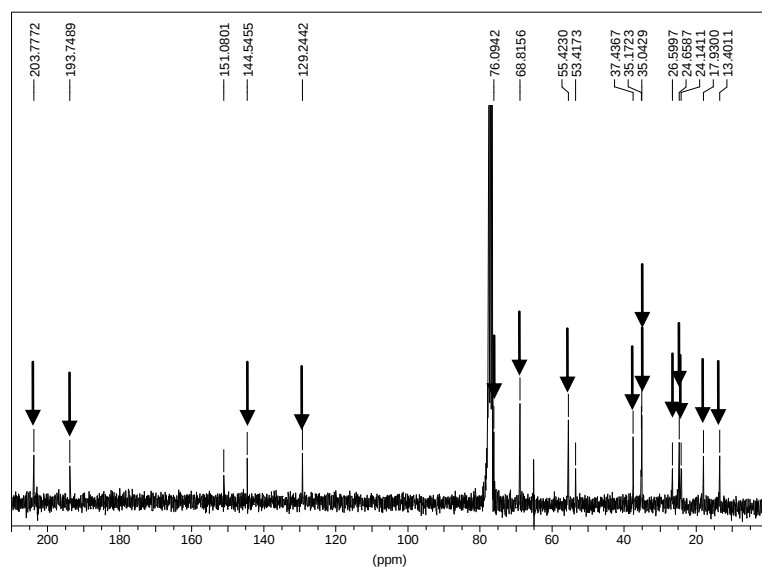
$[\alpha]_D = -87.0$ (c 0.066, $CHCl_3$)



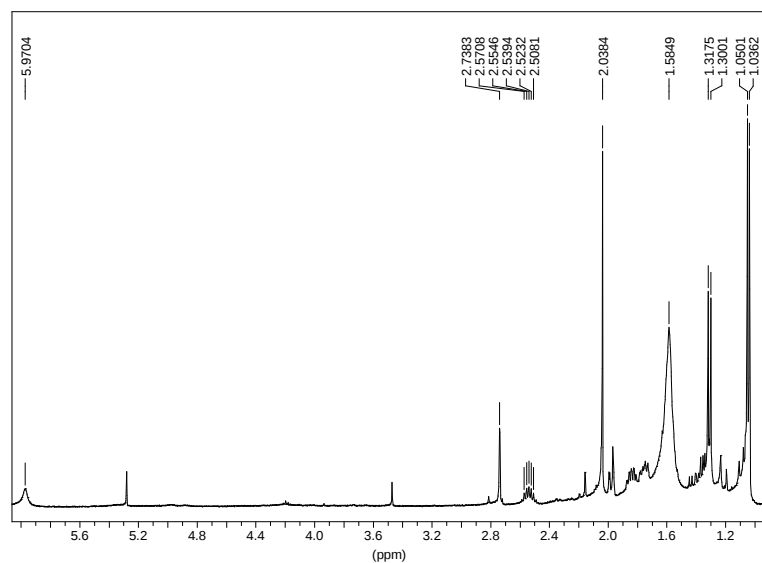
Εικ. 4.268 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **48**

Τα φάσματα 1H -NMR (Εικ. 4.269) και ^{13}C -NMR (Εικ. 4.269) εμφανίζονται παρόμοια με αυτά του μεταβολίτη **47**, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για δύο ισομερείς ενώσεις. Από τη μελέτη της βιβλιογραφίας (Walls *et al*, 1965) προκύπτει ότι ο μεταβολίτης **48** ταυτίζεται με τη **β-πιπιτζόλη**, που απομονώθηκε πρώτη φορά το 1965 από φυτό του γένους *Perezia* (Walls *et al*, 1965). Από θαλάσσιο οργανισμό απομονώνεται πρώτη φορά.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **48**, παρατίθενται στον Πίνακα 4.50.

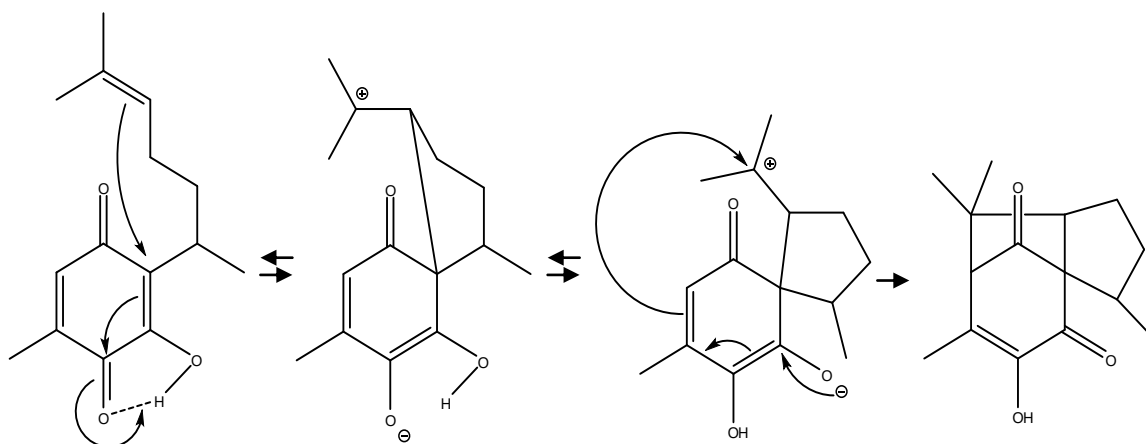


Εικ. 4.269 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **48**

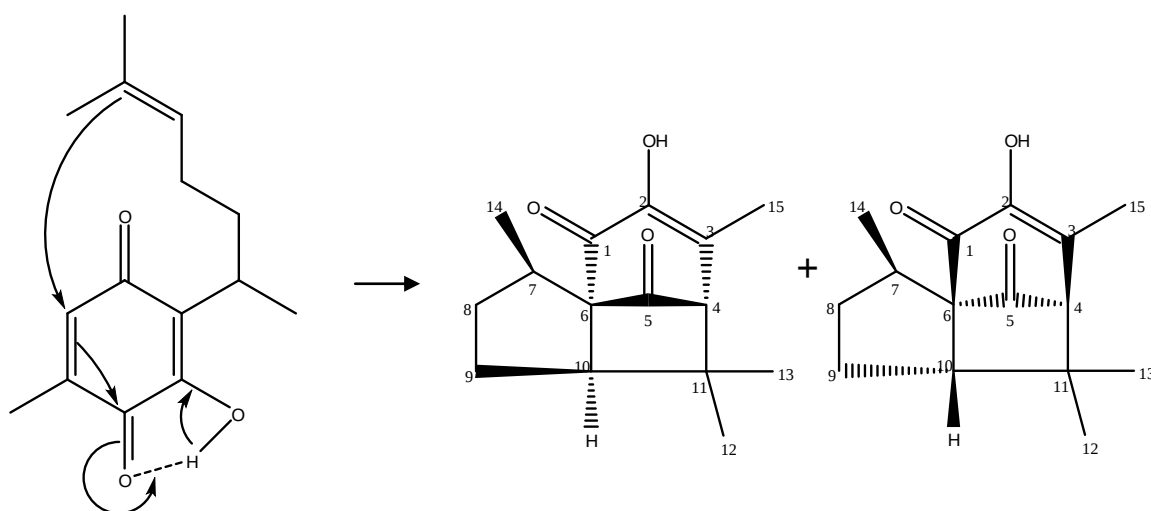


Εικ. 4.270 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **48**

Προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού της πιπιτζόλης από περεζόνη (θερμικός μετασχηματισμός-αναδιάταξη). Ο σκελετός κεδρενίου είναι ένα παράγωγο της κυκλοποίησης του β-κουρκουμενίου (Wagner *et al*, 1965).



STEPWISE MECHANISM



CONCERTED PATH (Joseph-Nathan *et al*, 1977)

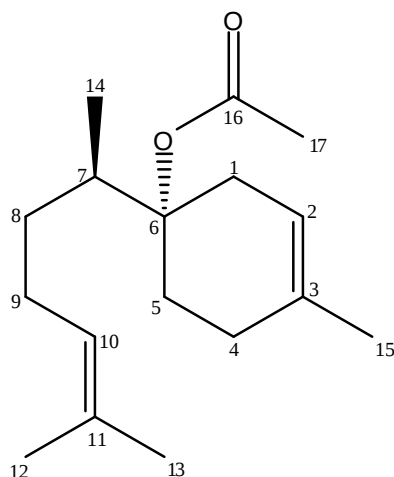
Πίνακας 4.50 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **48** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY
1	-	193.7	-
2	-	144.5	-
3	-	129.2	-
4	2.74 (1H, s)	68.8	-
5	-	203.8	-
6	-	76.1	-
7	2.55 (1H, m)	35.0	H-14, H-8a, H-8b
8	a 1.84 (1H, m) b 1.34 (1H, m)	35.2	H-7, H-8b H-7, H-8a, H-9a
9	a 1.76 (1H, dddd, J=13.5, 7.0, 2.3, 2.3) b 1.57 (1H, m)	24.7	H-8b, H-9b, H-10 H-9a, H-10
10	1.95 (1H, dd, J=10.2, 2.3)	55.4	H-9a, H-9b
11	-	37.4	-
12	1.05 (3H, s)	26.6	-
13	1.04 (3H, s)	24.1	-
14	1.31 (3H, d, J=7.0)	13.4	H-7
15	2.04 (3H, s)	17.9	-
OH	5.97 (1H, s)	-	-

4.2.46 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 49

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **49** (1.4 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



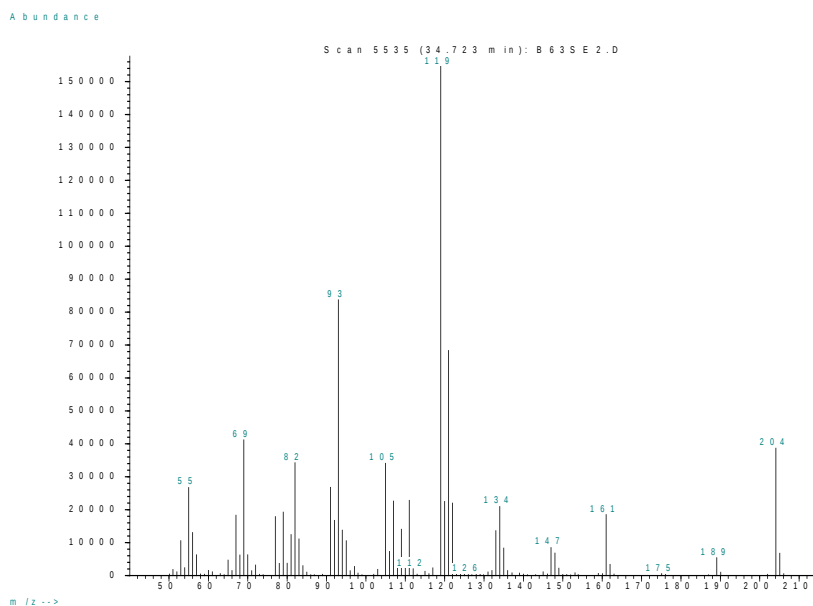
$[\alpha]_D = +26.7$ (c 0.075, CHCl_3)

UV λ_{max} (CHCl_3) (log ϵ) 275 (2.63), 246 (2.59) (nm)

IR (film) ν_{max} 2930, 1723, 1447, 1368, 1266, 1021, 738 cm^{-1}

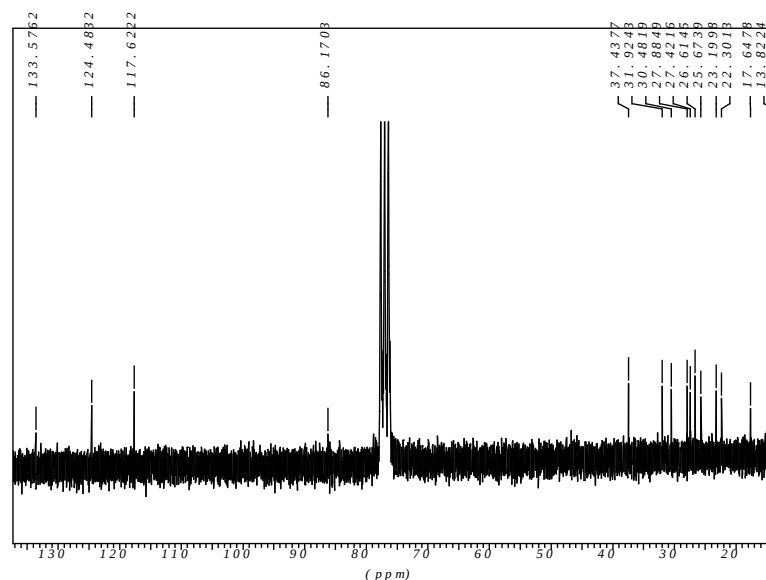
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **49** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_2$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 4 βαθμούς ακορεστότητας.

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.271), εμφανίζεται ψευδομοριακό ιόν σε m/z 204 $[\text{M}-\text{AcOH}]^+$.

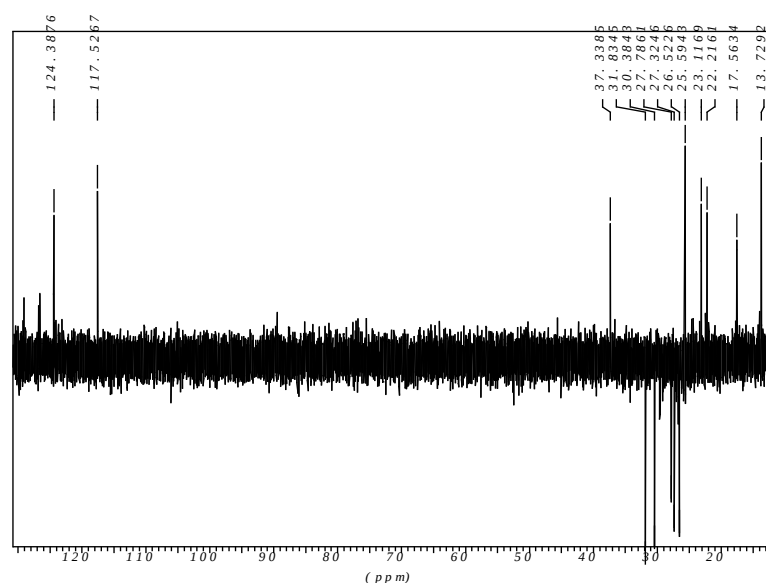


Εικ. 4.271 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **49**

Στα φάσματα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.272) και DEPT-135 (Εικ. 4.273) του μεταβολίτη **49** εμφανίζονται 11 άτομα ανθράκων στην αλειφατική περιοχή (5 μεθύλια, 5 μεθυλένια, 1 μεθίνιο), 2 πρωτονιωμένοι ολεφινικοί άνθρακες και ένας τεταρτοταγής οξυγονωμένος άνθρακας σε χαμηλά πεδία (86.2 ppm).

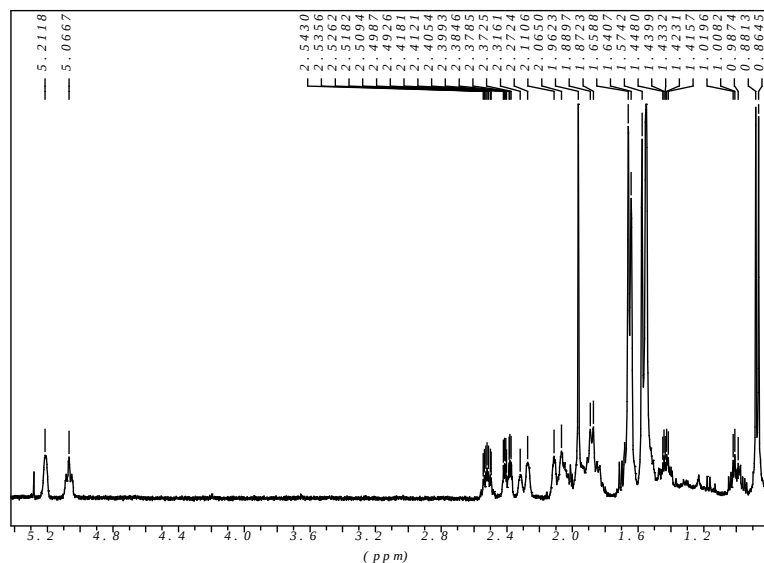


Εικ. 4.272 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **49**



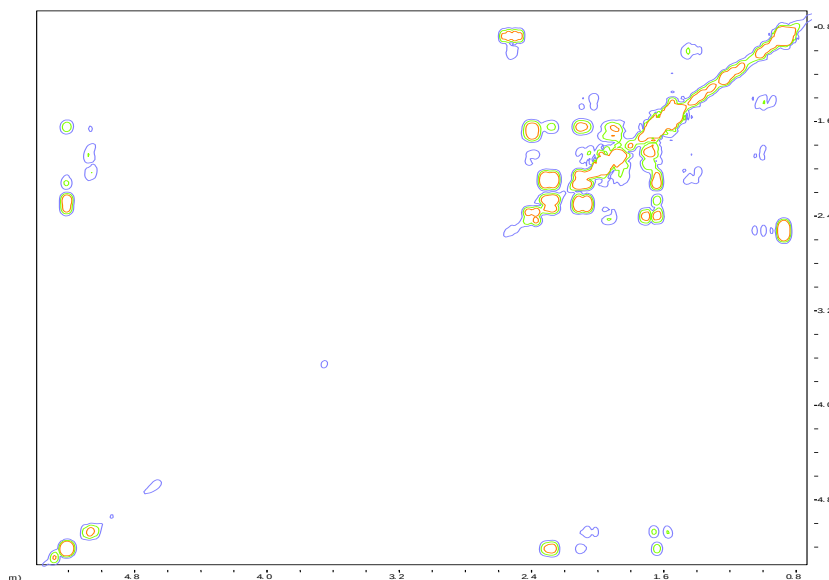
Εικ. 4.273 Φάσμα DEPT-135 (CDCl_3) του μεταβολίτη **49**

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.274) παρουσιάζει κορυφές που αντιστοιχούν σε ισοπροπυλιδένιο (δ 5.07, 1H; δ 1.66, 3H; δ 1.57, 3H), ένα αποθωρακισμένο μεθύλιο (δ 1.96, s), ένα βινυλικό μεθύλιο (δ 1.64, s), ένα μεθύλιο σε αποθωρακισμένο μεθίνιο (δ 0.88, 3H; δ 2.52, 1H) και δύο ολεφινικά πρωτόνια (δ 5.21 και 5.07).



Εικ. 4.274 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του μεταβολίτη **49**

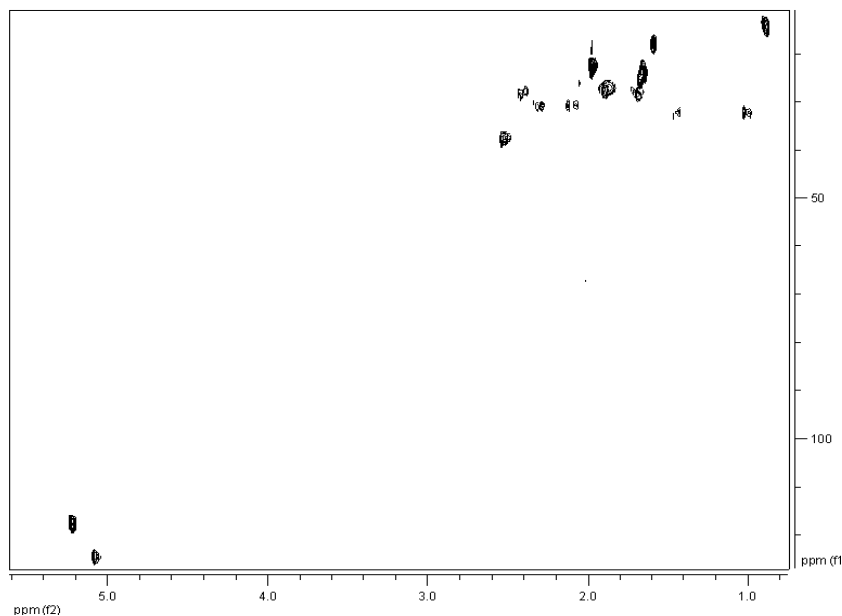
Στο φάσμα COSY (Εικ. 4.275) φαίνονται η μακρά σύζευξη των πρωτονίων του Me-15, τόσο με το ολεφινικό H-2, όσο και με το H₂-4, η σύζευξη του H-2 με το H₂-1, του H₂-4 με το H₂-5, η σύζευξη του H-7 με το Me-14, του H-7 με το H₂-8, του H₂-8 με το H₂-9, του H₂-9 με το H-10 και η γειτνίαση του ολεφινικού H-10 με τα Me-12 και Me-13 της ισοπροπυλιδενικής ομάδας.



Εικ. 4.275 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **49**

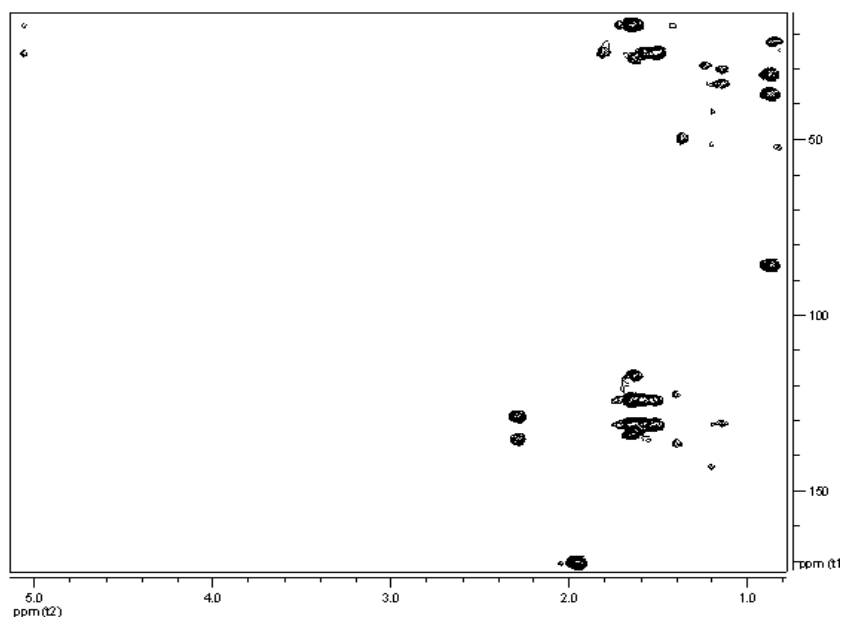
Ισχυρές συσχετίσεις, στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.277), μεταξύ του Me-14 (δ 0.88) και των ανθράκων C-6 (86.2 ppm), C-7 (37.4 ppm) και C-8 (31.8 ppm), του Me-15 (δ 1.64) και των ανθράκων C-2 (117.6 ppm), C-3 (135.7 ppm) και C-4 (27.9 ppm), των Me-12 (δ 1.57) και Me-13 (δ 1.66) με τους άνθρακες C-10 (124.5 ppm)

και C-11 (131.6 ppm) και, τέλος, του Me-17 με καρβονύλιο (C-16, 170.5 ppm) καθόρισαν τις θέσεις των μεθυλίων στο μόριο.

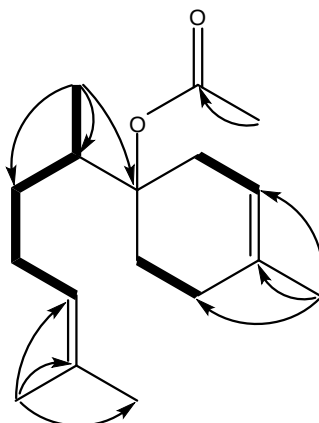


Εικ. 4.276 Φάσμα ΗΜQC (CDCl_3) του μεταβολίτη **49**

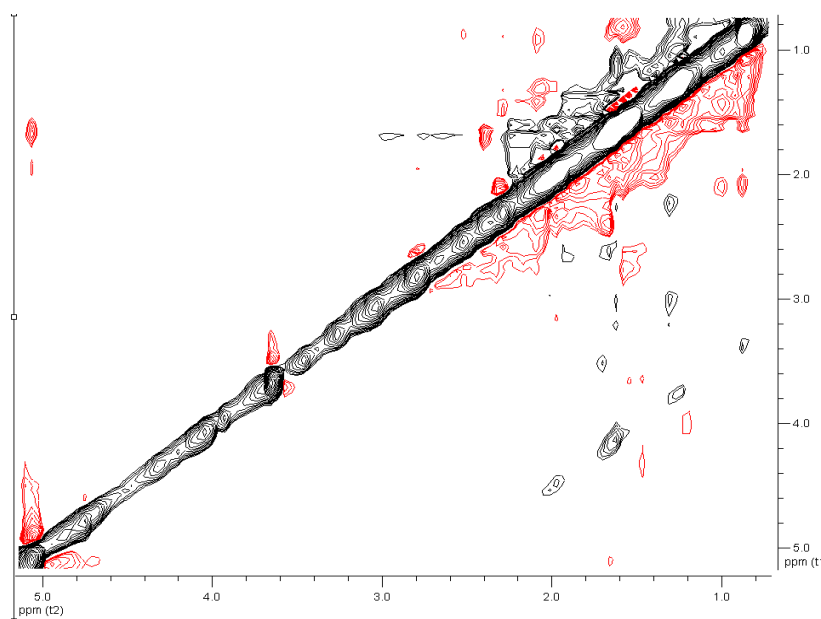
Η συσχέτιση του Me-17 με τον C-16, σε συνδυασμό με τη γνώση του μοριακού βάρους του μορίου και την παρουσία του τεταρτοταγούς οξυγονωμένου C-6, υποδεικνύουν τη σύνδεση ακετυλομάδας στον C-6 του μορίου.



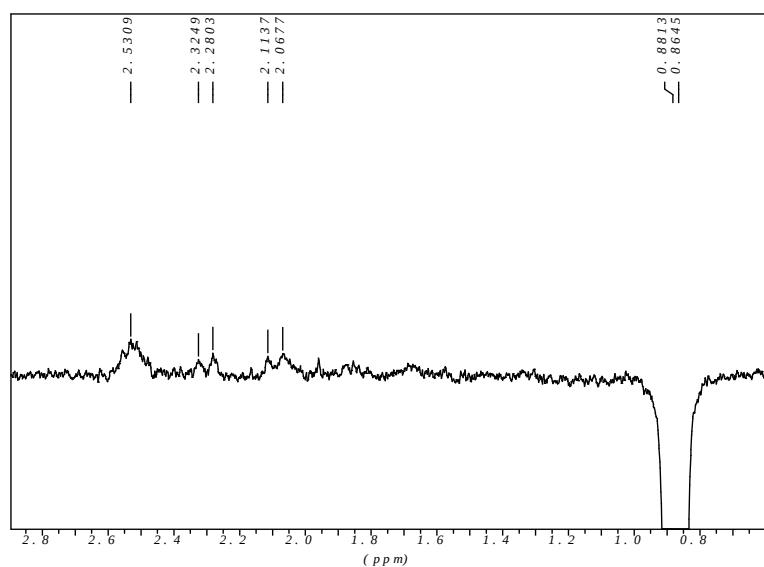
Εικ. 4.277 Φάσμα ΗΜBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **49**



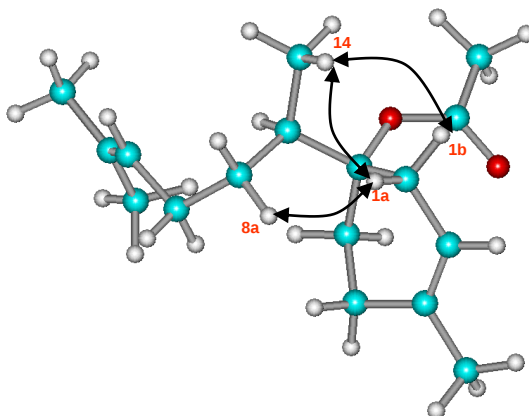
Σχήμα 4.31 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **49**



Εικ. 4.278 Φάσμα NOESY (CDCl₃) του μεταβολίτη **49**



Εικ. 4.279 Φάσμα 1D NOE (CDCl₃) του μεταβολίτη **49**. Ακτινοβόληση (irradiation) στο H₃-14



Σχήμα 4.32 Χαρακτηριστικές NOE συσχετίσεις του μεταβολίτη **49**

Οι συσχετίσεις των πρωτονίων H-1a/H-8a, H-1a/H-14 και H-1b/H-14 καθόρισαν τη σχετική στερεοχημεία στους άνθρακες C-6 και C-7 ως *6S**,*7R**. Άλλωστε, στην περίπτωση της στερεοχημείας *6R**,*7R**, θα αναμενόταν να παρατηρηθεί η συσχέτιση H-7/H-1.

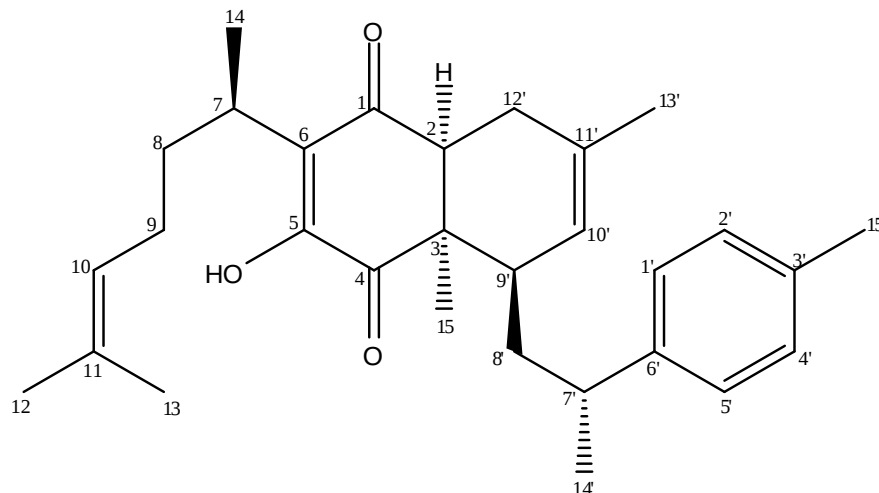
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναζήτηση, ο μεταβολίτης **49** είναι νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.51.

Πίνακας 4.51 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **49** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC	NOESY
1	a 2.28 (1H, brd, J=17.9) b 2.10 (1H, brd, J=17.9)	30.5	H-1b, H-2 H-1a, H-2	- -	H-8a, H-14 H-14
2	5.21 (1H, m)	117.6	H-1a, H-1b, H-15	-	-
3	-	135.7	-	-	-
4	a 2.40 (1H, dddd, J=13.3, 2.4, 2.4, 2.4, 2.4) b 1.70 (1H, m)	27.9	H-4b, H-5, H-15 H-4a, H-5	- -	- -
5	1.86 (2H, m)	27.4	H-4a, H-4b	-	-
6	-	86.2	-	-	-
7	2.52 (1H, ddd, J=9.6, 7.0, 2.3)	37.4	H-8b, H-15	-	-
8	a 1.44 (1H, m) b 1.02 (1H, m)	31.8	H-8b, H-9a H-7, H-8a	- -	H-1a -
9	a 2.04 (1H, m) b 1.86 (1H, m)	26.6	H-8a, H-9b, H-10 H-9a, H-10	- -	- -
10	5.07 (1H, m)	124.5	H-9a, H-9b, H-12, H-13	C-12, C-13	-
11	-	131.6	-	-	-
12	1.57 (3H, s)	17.6	H-10	C-10, C-11, C-13	-
13	1.66 (3H, s)	25.7	H-10	C-10, C-11, C-12	-
14	0.88 (1H, d, J=7.0)	13.8	H-7	C-6, C-7, C-8	H-1a, H-1b
15	1.64 (3H, s)	23.2	H-2, H-4a	C-2, C-3, C-4	-
16	-	170.5	-	-	-
17	1.96 (3H, s)	22.3	-	C-16	-

4.2.47 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 50*Νέο φυσικό προϊόν*

Ο μεταβολίτης **50** (1.2 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



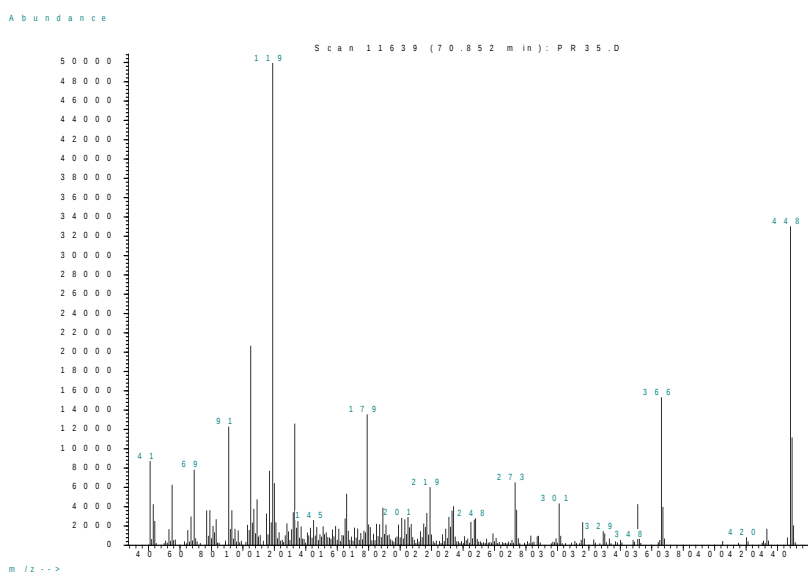
$[\alpha]_D = -111.0$ (c 0.1, CHCl_3)

UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 287 (3.78) (nm)

IR (film) ν_{max} 3343 (broad), 2920, 2357, 2234, 1664, 1454, 1379, 1178 cm^{-1}

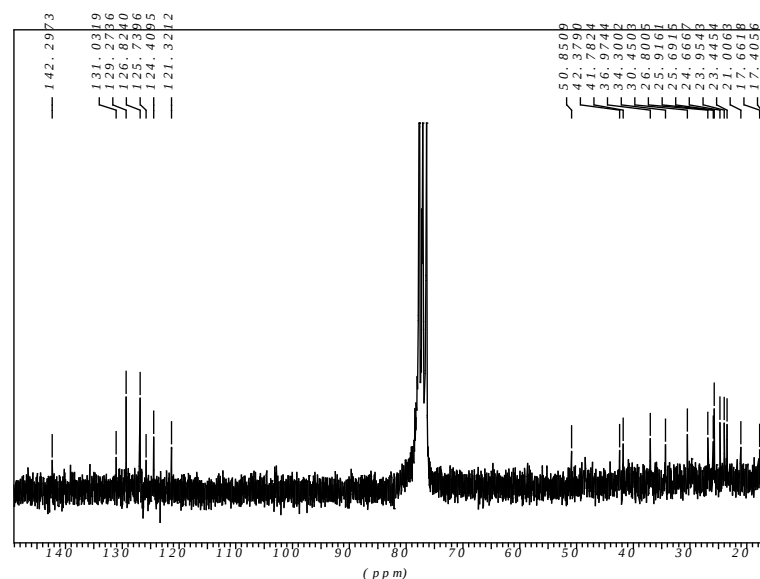
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **35** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_3$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 11 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRESIMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}-\text{H}]^+$ σε m/z 447.2947 (θεωρητικό MB: 447.2894). Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.280), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 448 $[\text{M}]^+$. Το μοριακό βάρος του μορίου και το φάσμα ^1H -NMR παραπέμπουν σε διμερές σесκιτερπενίων.



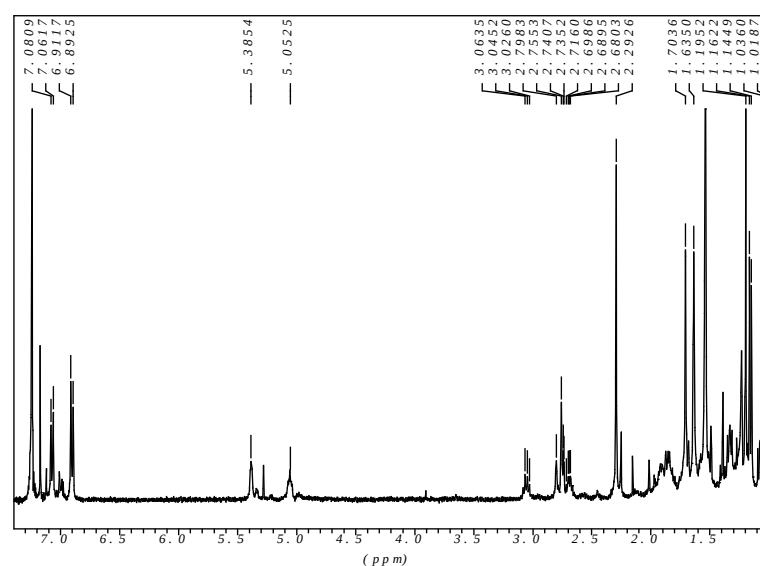
Εικ. 4.280 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **50**

Το φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.281), λόγω της μικρής ποσότητας του μεταβολίτη, δεν ήταν καθοριστικό για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

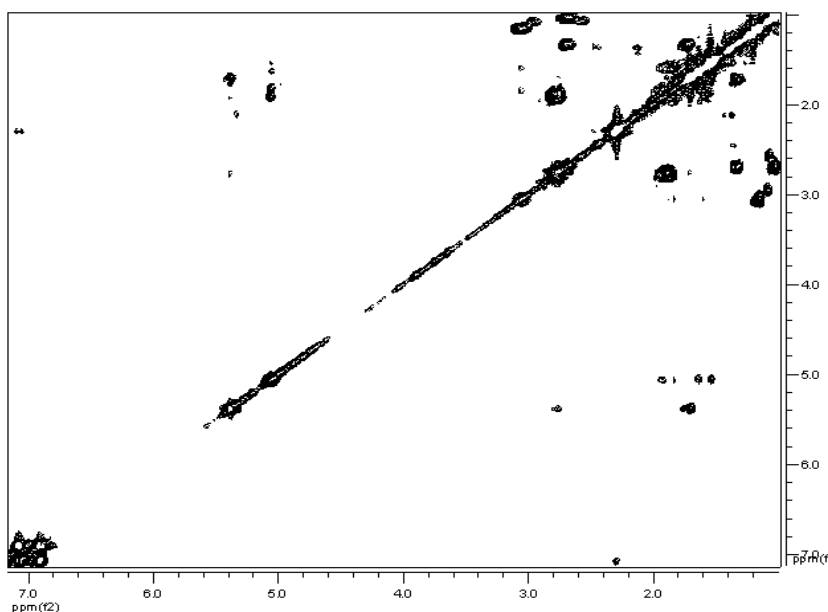


Εικ. 4.281 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **50** (ελλίπες)

Το φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.282) εμφάνισε σήματα, που αντιστοιχούν σε ένα υδροξύλιο σε δ 7.17 (το πρωτόνιο δεν παρουσιάζει σύζευξη με άνθρακα στο φάσμα HSQC-DEPT), τέσσερα αρωματικά πρωτόνια, δύο ολεφινικά, δύο πρωτόνια σε τριτοταγείς άνθρακες σε δ 2.76 και 1.73, δύο βενζυλικά μεθίλια, ένα μεθύλιο σε αρωματικό δακτύλιο, ένα μεθύλιο σε τεταρτοταγή άνθρακα σε δ 1.19, τέσσερα μεθυλένια-ένα από τα οποία εμφανίζεται σε χαμηλά πεδία σε δ 2.78 και 1.88 (εμφανίζουν σύζευξη τόσο μεταξύ τους στο φάσμα COSY, όσο και με το πρωτόνιο σε δ 2.76)-, τρία βινυλικά μεθύλια και, επίσης, δύο μεθύλια σε τριτοταγείς άνθρακες.

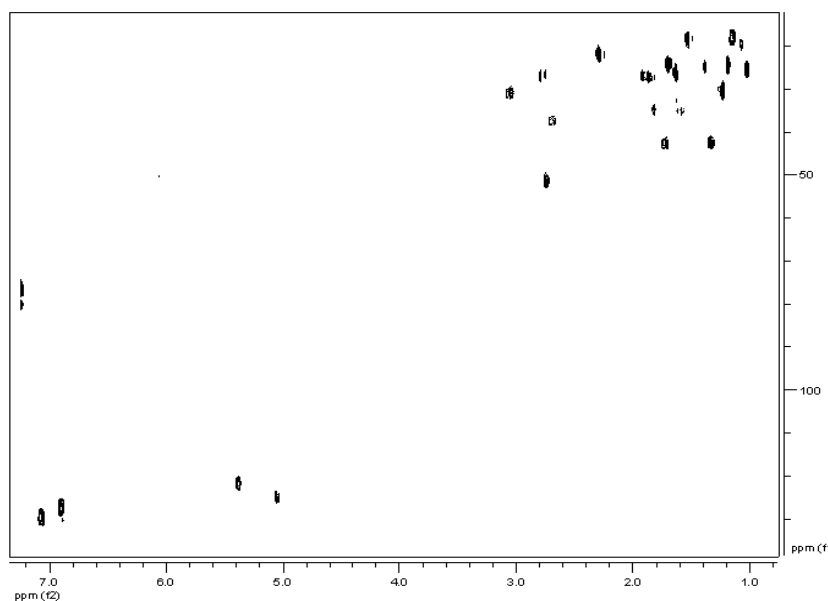


Εικ. 4.282 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **50**



Εικ. 4.283 Φάσμα COSY (CDCl₃) του μεταβολίτη **50**

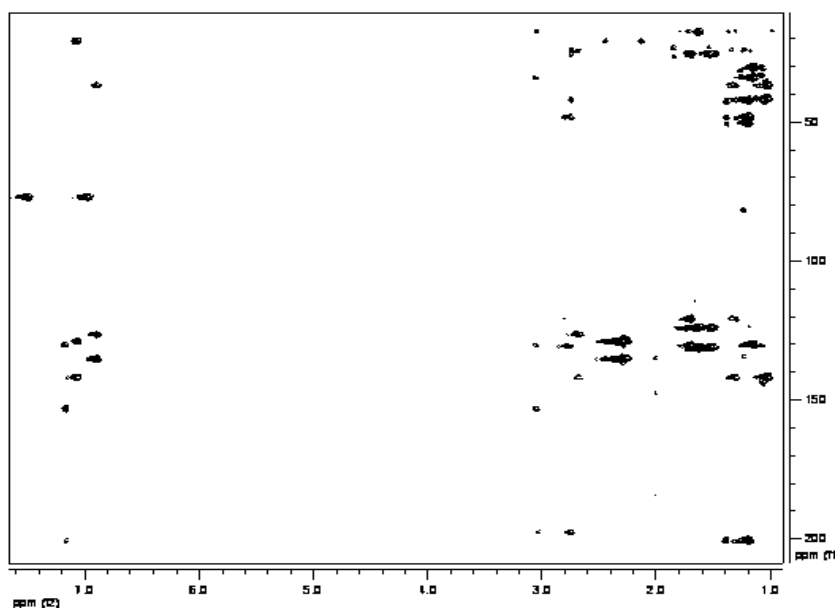
Τα πειράματα COSY (Εικ. 4.283), HSQC-DEPT (Εικ. 4.284) και HMBC (Εικ. 4.285) βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και στον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο.



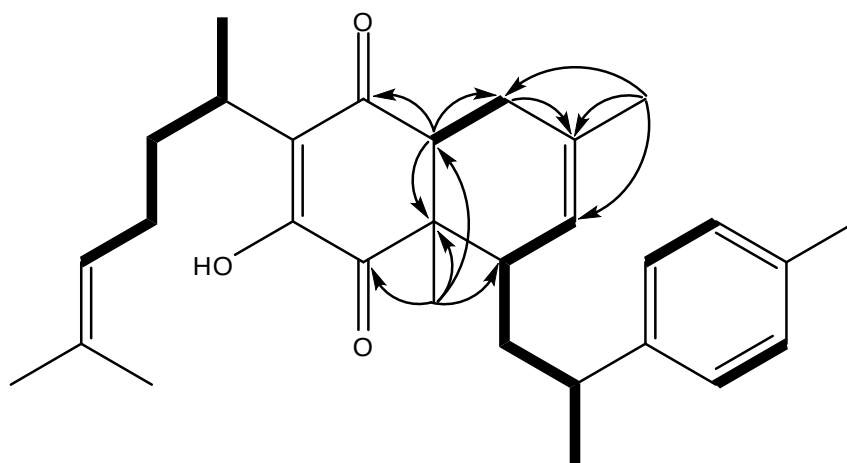
Εικ. 4.284 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl₃) του μεταβολίτη **50**

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα ομοιάζουν με αυτά των μεταβολιτών **26** (περεζόνη) και **1** (κουρκουμένιο).

Ο διπλός δεσμός μεταξύ των θέσεων 2 και 3 της περεζόνης έχει αντικατασταθεί από απλό και δύο νέοι δεσμοί έχουν δημιουργηθεί μεταξύ των C-2 και C-12', αλλά και C-3 και C-9'. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από την συσχέτιση του H₂-12' με τον C-2 και του H₃-15 με τον C-9'.

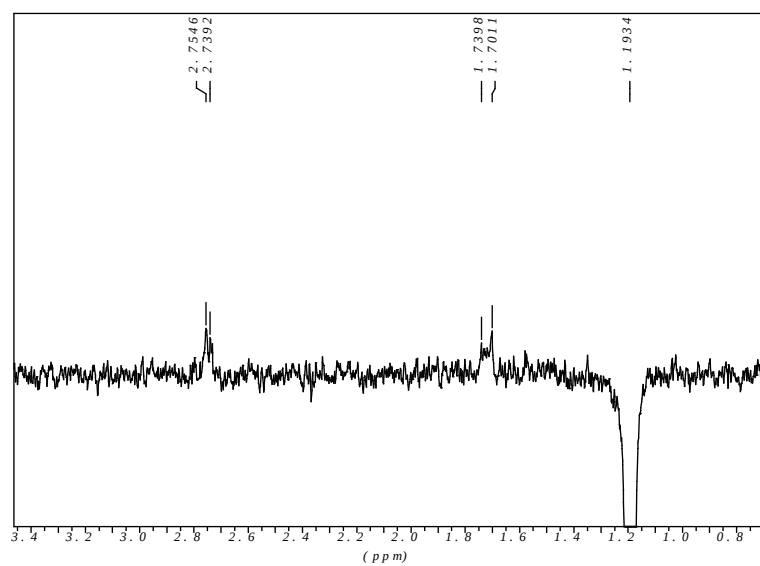


Εικ. 4.285 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **50**

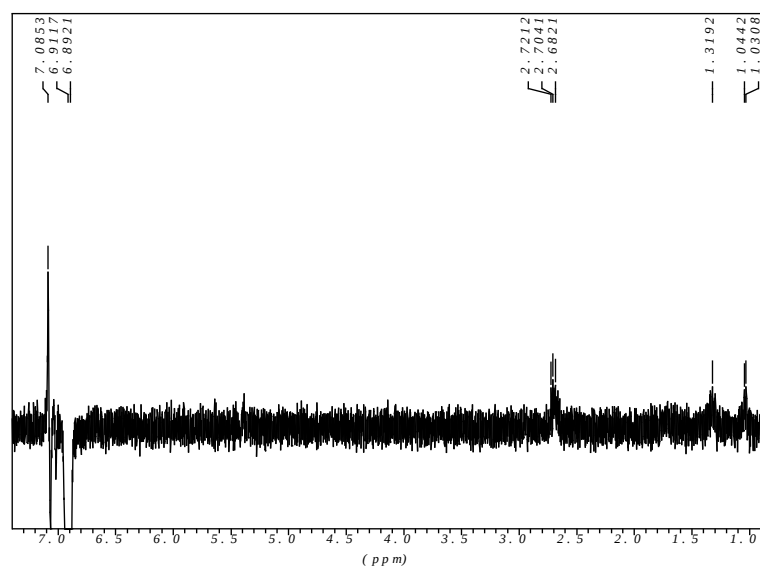


Σχήμα 4.33 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **50**

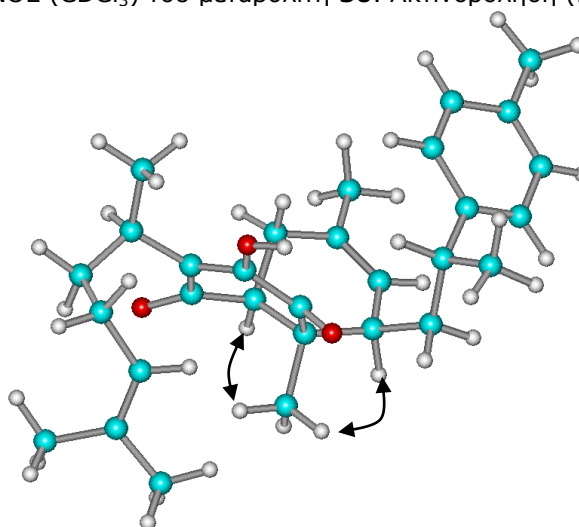
Η στεreoχημεία του μεταβολίτη στις θέσεις 7 και 7' αναμένεται να είναι *R* ίδια με αυτή του κουρκουμενίου και της περεζόνης, τα οποία είναι τα πρόδρομα μόρια του μεταβολίτη **50**. Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των υπολοίπων τριών ασύμμετρων κέντρων βασίστηκε σε πειράματα 1D NOE (Εικ. 4.286, 4.287). Οι συσχετίσεις των πρωτονίων H-15/H-2 και H-15/H-9' καθόρισαν τη σχετική στεreoχημεία στους άνθρακες C-2, C-3 και C-9'. Ταυτόχρονα, η συσχέτιση noe των H-1'/H-9', που θα αναμενόταν στην περίπτωση του 7*R**,2*R**,3*S**,7'*R**, 9'*S** ισομερούς, δεν παρατηρείται.



Εικ. 4.286 Φάσμα 1D NOE (CDCl₃) του μεταβολίτη **50**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H₃-15

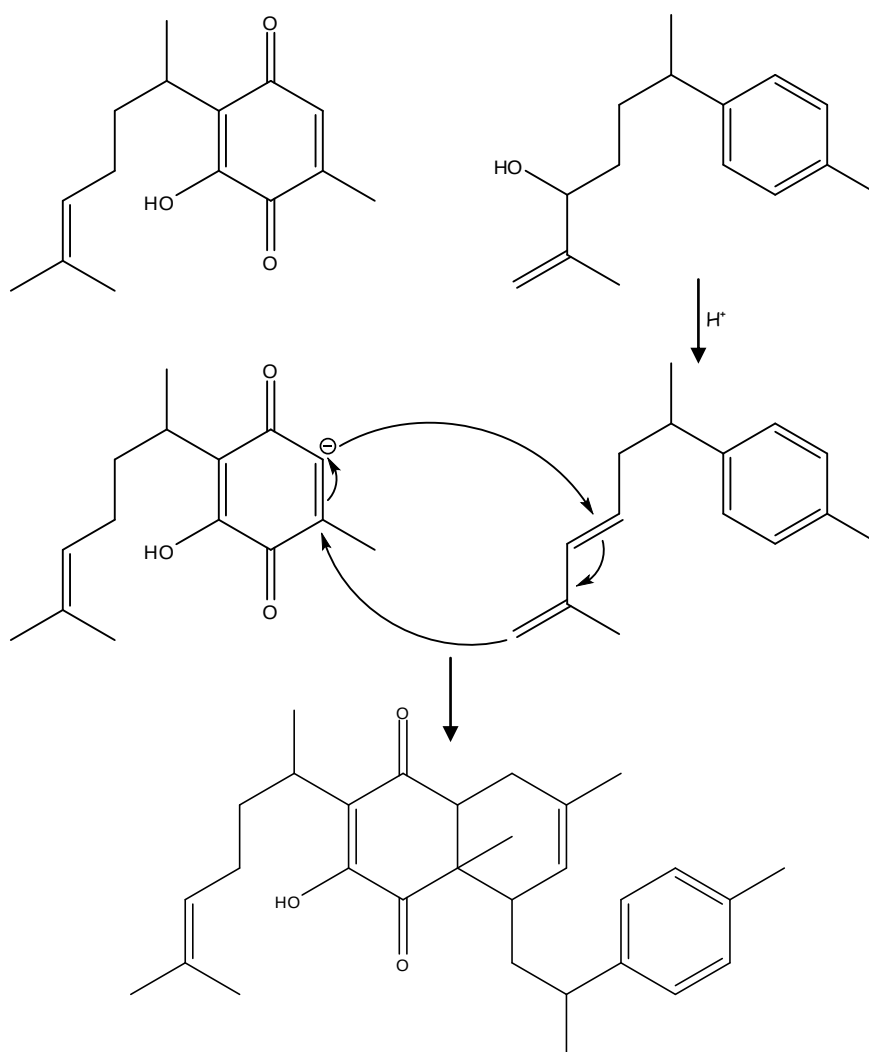


Εικ. 4.287 Φάσμα 1D NOE (CDCl₃) του μεταβολίτη **50**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H-1'



Σχήμα 4.34 Χαρακτηριστικές NOE συσχετίσεις του μεταβολίτη **50**

Προτεινόμενη βιοσυνθετική πορεία του μεταβολίτη **50**



Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, η σχετική στεreoχημεία του μεταβολίτη **50** προτείνεται ως $7R^*, 2S^*, 3R^*, 7'R^*, 9'R^*$. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναζήτηση είναι νέα χημική δομή και ονομάστηκε **κουρκουπερεζόνη**. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.52.

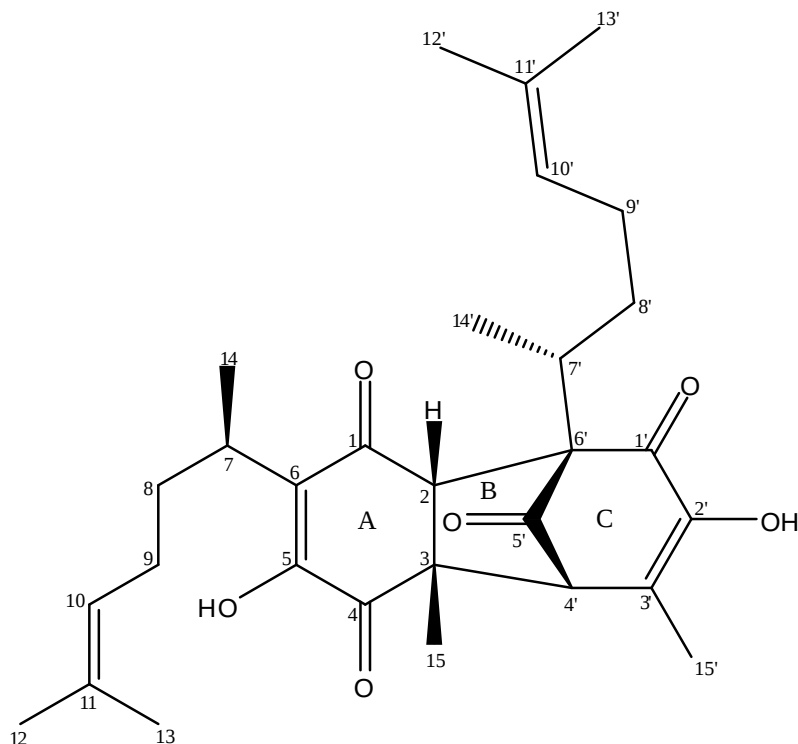
Πίνακας 4.52 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **50** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC	1D NOE
1	-	197.7	-	-	-
2	2.76 (1H, m)	50.3	H-12'a, H-12'b	C-1, C-3, C-15, C-12'	H-15
3	-	47.9	-	-	-
4	-	200.9	-	-	-
5	-	153.1	-	-	-
6	-	130.3	-	-	-
7	3.06 (1H, m)	30.0	H-8a, H-8b, H-14	C-1, C-5, C-6, C-8, C-14	-
8	a 1.85 (1H, m) b 1.59 (1H, m)	34.0	H-7, H-8b H-7, H-8a, H-9a	- -	- -
9	a 1.93 (1H, m) b 1.83 (1H, m)	26.8	H-8b, H-9b, H-10 H-9a, H-10	- -	- -
10	5.06 (1H, m)	124.0	H-9a, H-9b, H-12, H-13	-	-
11	-	131.2	-	-	-
12	1.64 (3H, s)	25.3	H-10	C-10, C-11, C-13	-
13	1.54 (3H, s)	17.3	H-10	C-10, C-11, C-12	-
14	1.15 (3H, d, J=7.0)	17.0	H-7	C-6, C-7, C-8	-
15	1.19 (3H, s)	23.7	-	C-2, C-3, C-4, C-9'	H-2, H-9'
1'	6.90 (1H, d, J=7.9)	126.7	H-2'	C-3', C-5', C-7'	H-7'
2'	7.07 (1H, d, J=7.9)	128.9	H-1', H-15'	C-4', C-6', C-15'	-
3'	-	135.6	-	-	-
4'	7.07 (1H, d, J=7.9)	128.9	H-5', H-15'	C-2', C-6', C-15'	-
5'	6.90 (1H, d, J=7.9)	126.7	H-4'	C-1', C-3', C-7'	H-8', H-14'
6'	-	141.7	-	-	-
7'	2.69 (1H, m)	36.7	H-8b', H-14'	C-1', C-5', C-6', C-14'	H-1'
8'	1.34 (1H, t, J=2.5)	41.2	H-7', H-9'	C-6', C-7', C-10'	H-5'
9'	1.73 (1H, m)	41.8	H-8', H-10'	-	H-15
10'	5.39 (1H, m)	120.9	H-9', H-12'a, H-12'b, H-13'	-	-
11'	-	130.8	-	-	-
12'	a 2.78 (1H, m) b 1.88 (1H, m)	25.6	H-2, H-10', H-12'b, H-13' H-2, H-10', H-12'a	C-2, C-11' C-11'	- -
13'	1.70 (3H, s)	23.1	H-10', H-12'a	C-10', C-11', C-12'	-
14'	1.03 (3H, d, J=7.0)	24.3	H-7'	C-6', C-7', C-8'	H-5'
15'	2.29 (3H, s)	20.7	H-2', H-4'	C-2', C-3', C-4'	-
OH	7.17 (1H, brs)	-	-	C-4, C-5, C-6	-

4.2.48 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 51

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **51** (14.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



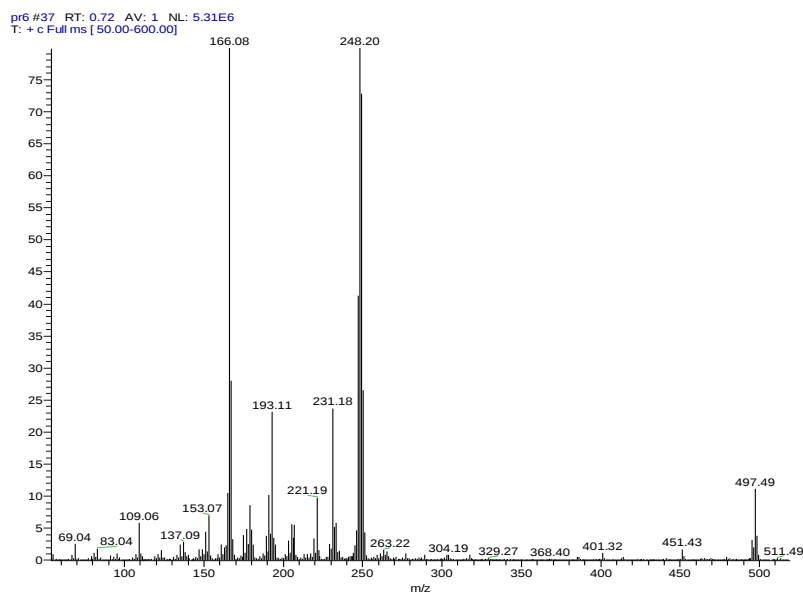
$[\alpha]_D = -6.17$ (c 0.583, CHCl_3)

UV λ_{max} (CHCl_3) (log ϵ) 273 (6.61) (nm)

IR (film) ν_{max} 3300 (broad), 2857, 2315, 1763, 1655, 1395, 1110 cm^{-1}

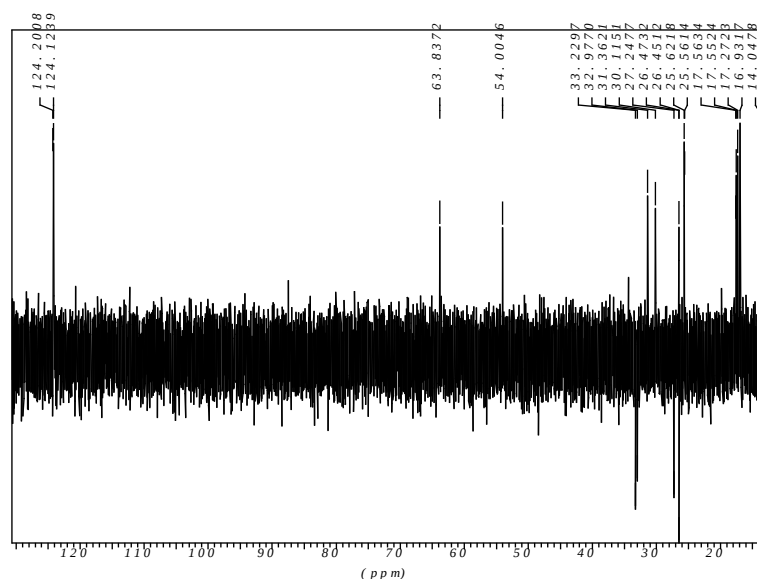
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **51** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_6$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 11 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRESIMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}-\text{H}]^+$ σε m/z 495.2761 (θεωρητικό MB: 495.2752). Στο φάσμα μάζας (EIMS, Εικ. 4.288), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 497 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Το μοριακό βάρος και το φάσμα ^1H -NMR του μορίου παραπέμπει σε διμερές της περεζόνης.

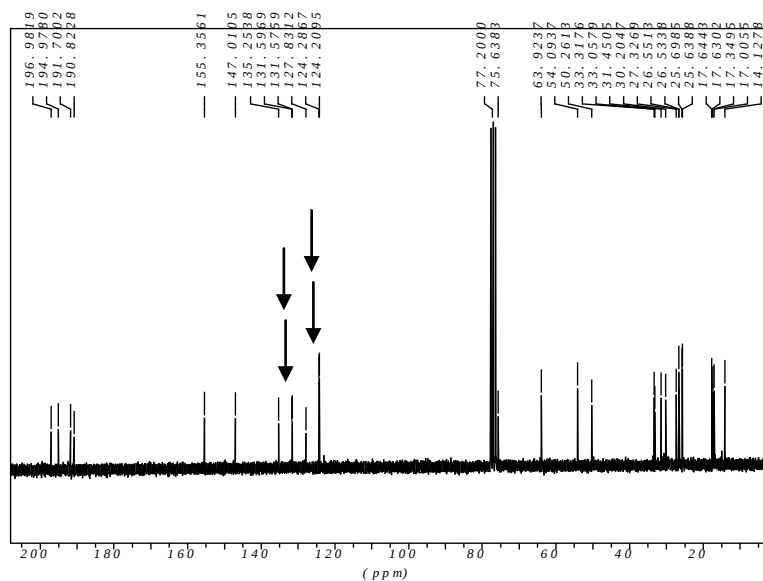


Εικ. 4.288 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **52**

Το φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.290) εμφανίζει 30 άτομα άνθρακα που αντιστοιχούν σε 14 άτομα ανθράκων στην αλειφατική περιοχή (4 εκ των οποίων αντιστοιχούν σε μεθυλένια, σύμφωνα με το φάσμα DEPT, Εικ. 4.289), 2 τριτοταγείς άνθρακες σε δ 54.0 και 63.9 ppm, 2 τεταρτοταγείς άνθρακες στα 50.1 και 75.4 ppm, 8 ολεφινικοί/αρωματικοί άνθρακες (έξι εκ των οποίων είναι τεταρτοταγείς) και τέσσερα καρβονύλια στα 190.0, 191.6, 194.5 και 196.9 ppm.

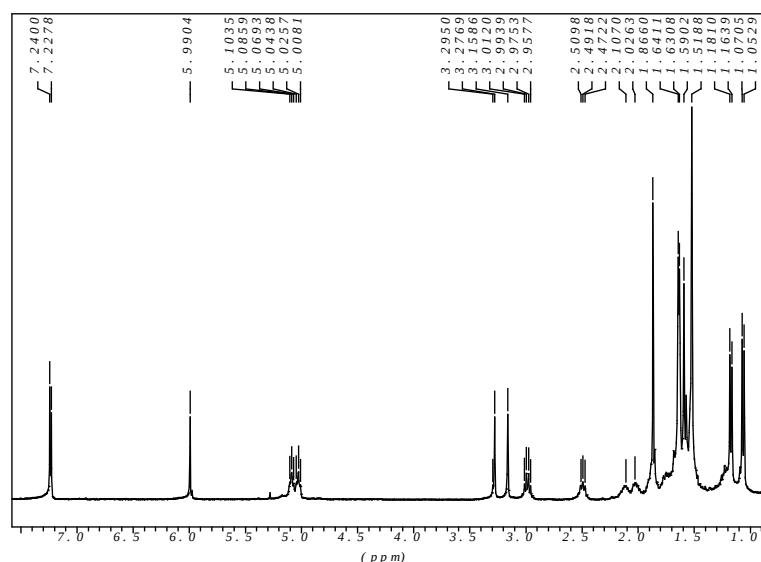


Εικ. 4.289 Φάσμα DEPT-135 (CDCl_3) του μεταβολίτη **51**



Εικ. 4.290 Φάσμα ^{13}C -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **51**

Κατά αναλογία με το φάσμα ^1H -NMR της περεζόνης (μεταβολίτης **26**), ο μεταβολίτης **51** εμφάνισε χαρακτηριστικά σήματα, που αντιστοιχούν σε δύο υδροξύλια σε αρωματικό δακτύλιο σε δ 7.24 και 6.00 (τα πρωτόνια τους δεν παρουσιάζουν σύζευξη με άνθρακα στο φάσμα HSQC-DEPT, Εικ. 4.293), δύο ολεφινικά πρωτόνια, δύο πρωτόνια σε τριτοταγείς άνθρακες που δεν εμφανίζουν σύζευξη με γειτονικά πρωτόνια, δύο μεθίνια που εμφανίζουν σύζευξη με μεθύλια, δύο μεθύλια σε τεταρτοταγείς άνθρακες σε δ 1.51 και 1.86, τέσσερα μεθυλένια και τέσσερα βινυλικά μεθύλια.

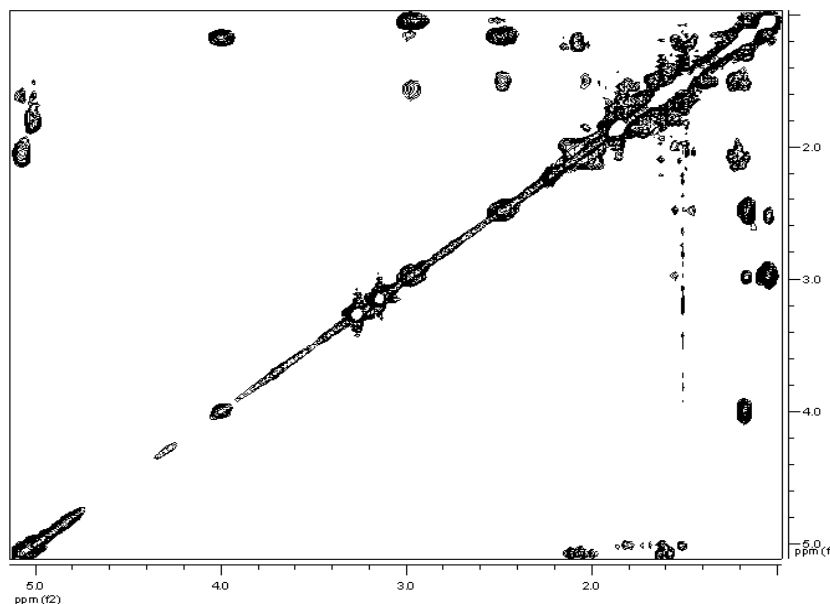


Εικ. 4.291 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **51**

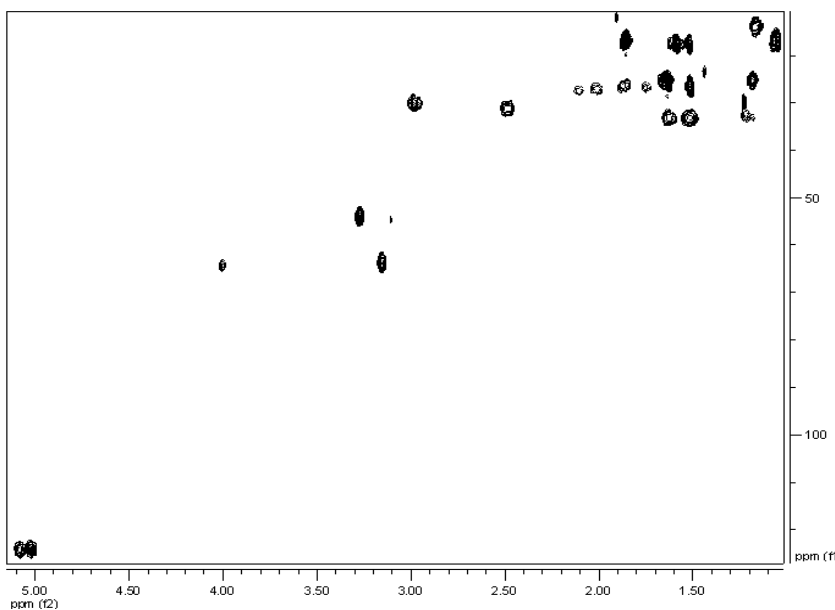
Με βάση τα παραπάνω, ο μεταβολίτης **51** θεωρήθηκε διμερές σεσκιτερπενίων με βαθμό ακορεστότητας $\Omega=11$. Λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία τεσσάρων διπλών

δεσμών (από το φάσμα άνθρακα) και τεσσάρων καρβονυλίων, το μόριο θα πρέπει να έχει τρεις δακτυλίους.

Στο φάσμα COSY (Εικ. 4.292) φαίνονται οι τυπικές συζεύξεις των πρωτονίων της πλευρικής αλυσίδας των δύο μονομερών περεζόνης.



Εικ. 4.292 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **51**



Εικ. 4.293 Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **51**

Στο φάσμα HMBC (Εικ. 4.294), ισχυρή ετεροπυρηνική συζεύξη παρουσιάζουν τα πρωτόνια του C-14 με τον C-6 (135.2 ppm), ενώ το H-7 συσχετίζεται με καρβονύλιο του δακτυλίου A στα 191.6 ppm (C-1), με τον άνθρακα που φέρει το υδροξύλιο στα 155.0 ppm (C-5) και τον C-6.

Το μεθύλιο του δακτυλίου A (Me-15) παρουσιάζει συσχέτιση με το άλλο καρβονύλιο στα 194.5 ppm (C-4), με τον τεταρτοταγή C-3 (50.1 ppm), με τον

τριτοταγή C-4' στα 63.9 ppm του άλλου μονομερούς (που ταυτίζεται με το μεθίνιο στα 3.15 ppm) και με τον τριτοταγή C-2 στα 54.0 ppm (που αντιστοιχεί στο μεθίνιο στα 3.26 ppm). Το H-2 συσχετίζεται με τα 2 καρβονύλια του δακτυλίου A, με τον C-3, τον C-15 και με τους C-6', C-7' του άλλου μονομερούς.

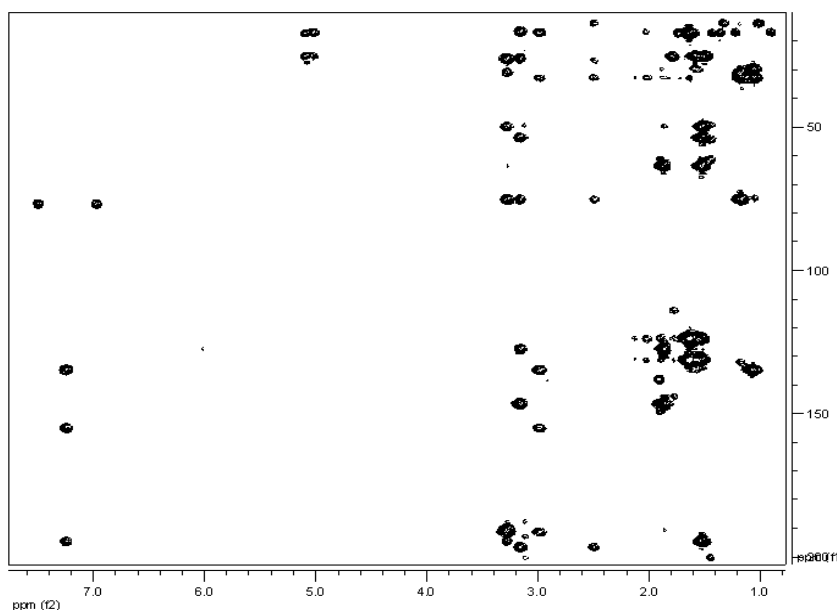
Το υδροξύλιο του δακτυλίου A παρουσιάζει συσχέτιση με τον άνθρακα στον οποίον βρίσκεται (155.0 ppm), με τον C-4 και τον C-6.

Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω πληροφοριών από το φάσμα HMBC, παραπέμπει σε μία δομή που έχει στοιχεία της περεζόνης. Μόνο που στην περίπτωση του μεταβολίτη **51**, ο διπλός δεσμός μεταξύ των θέσεων 2 και 3 έχει αναχθεί σε απλό. Παράλληλα, έχουν δημιουργηθεί δύο νέοι δεσμοί C-C μεταξύ των C-2 και C-6' και των C-3 και C-4'.

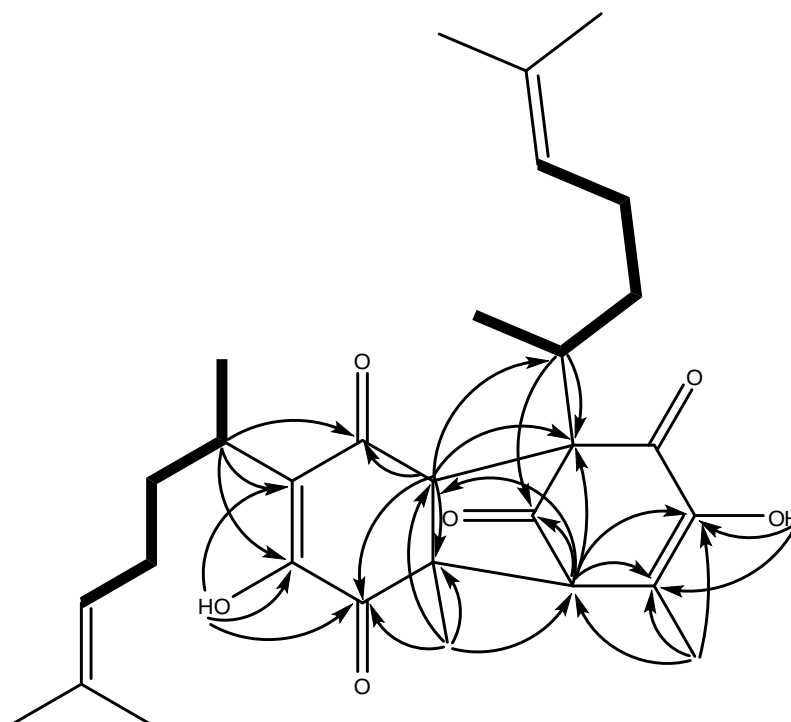
Αξιοσημείωτες συσχετίσεις στο δεύτερο μονομερές είναι αυτές των πρωτονίων του C-14' με τον C-6' (75.4 ppm), του H-7' με καρβονύλιο του δακτυλίου C στα 196.9 ppm (C-5'), του H-4' με τον C-2 και C-15 του δακτυλίου A.

Το μεθύλιο του δακτυλίου C (Me-15') παρουσιάζει συσχέτιση με τον τεταρτοταγή C-2' (146.6 ppm), με τον τεταρτοταγή C-3' (127.8 ppm) και με τον τριτοταγή C-4' στα 63.9 ppm.

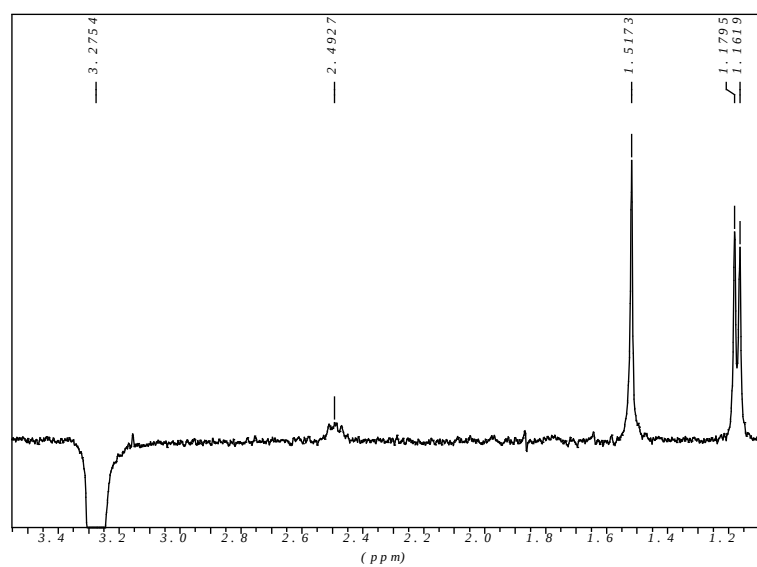
Το υδροξύλιο του δακτυλίου C παρουσιάζει συσχέτιση με τον άνθρακα στον οποίον βρίσκεται (146.6 ppm) και με τον C-3'.



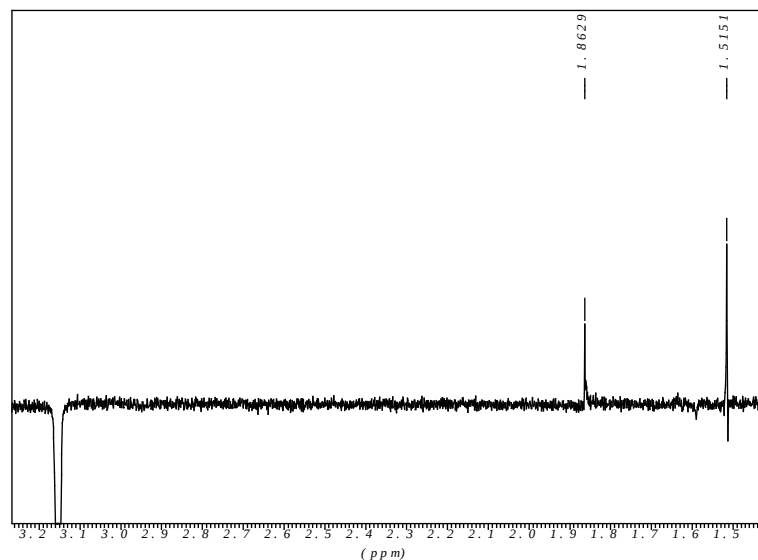
Εικ. 4.294 Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **51**



Σχήμα 4.35 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **51**

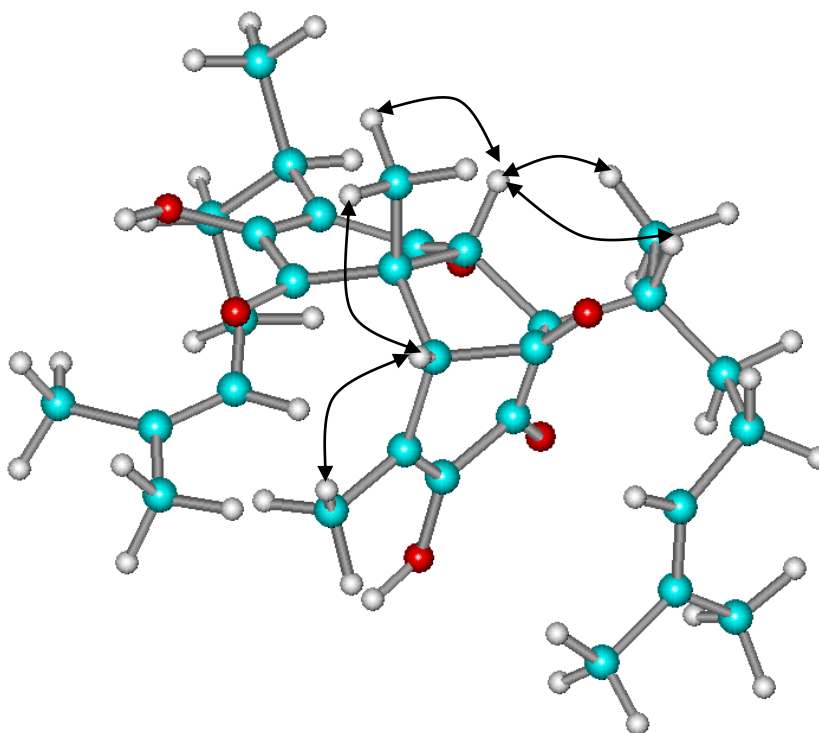


Εικ. 4.295 Φάσμα 1D NOE (CDCl₃) του μεταβολίτη **51**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H-2



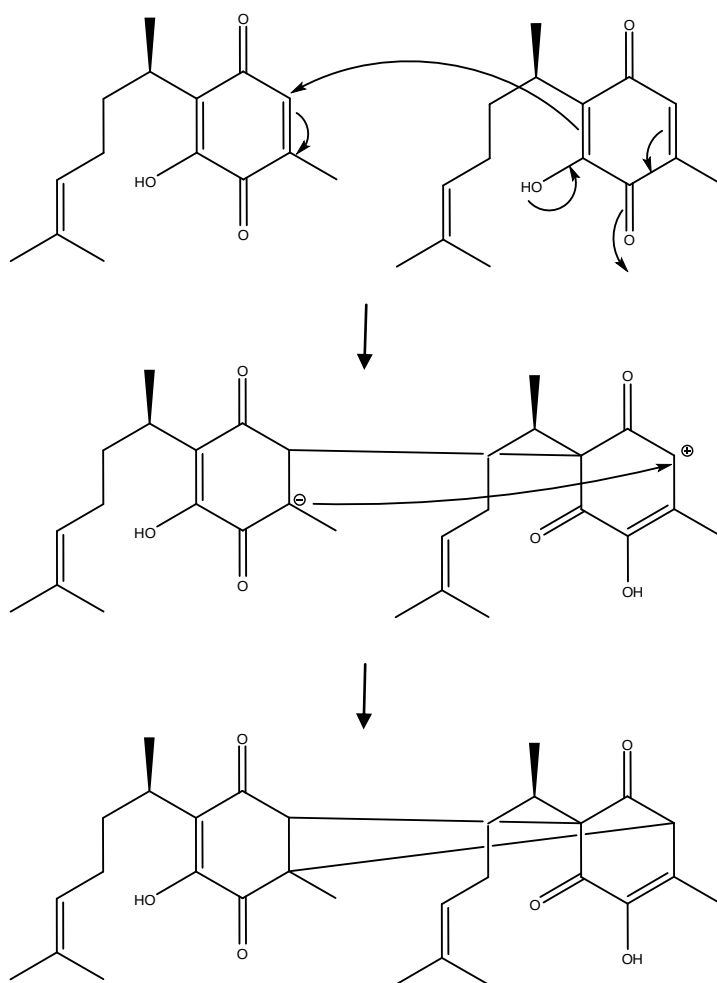
Εικ. 4.296 Φάσμα 1D NOE (CDCl_3) του μεταβολίτη **51**. Ακτινοβολήση (irradiation) στο H-4'

Η στεreoχημεία του μεταβολίτη στις θέσεις 7 και 7' αναμένεται να είναι *R* σε αναλογία με αυτή της περεζόνης, βάσει της βιοσύνθεσης. Οι συσχετίσεις NOE (Εικ. 4.295, 4.296) των πρωτονίων H-2/H-15, H-2/H-7', H-2/H-14', H-4'/H-15' και H-4'/H-15 καθόρισαν τη σχετική στεreoχημεία στους άνθρακες C-2, C-3, C-4' και C-6'.



Σχήμα 4.36 Χαρακτηριστικές NOE συσχετίσεις του μεταβολίτη **51**

Προτεινόμενη βιοσυνθετική πορεία του μεταβολίτη **51**



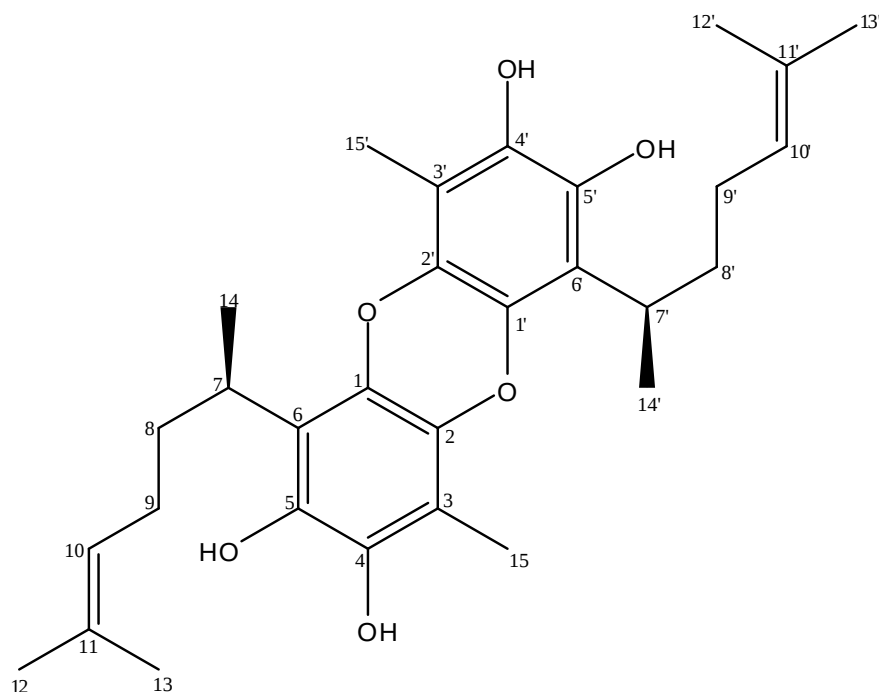
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, η σχετική στεreoχημεία αποδόθηκε ως $7R^*, 2S^*, 3S^*, 4'R^*, 6'S^*, 7'R^*$ και, μετά από βιβλιογραφική αναζήτηση, ο μεταβολίτης **51** ταυτοποιήθηκε ως νέα χημική δομή και ονομάστηκε **περεζοπερεζόνη**. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.53.

Πίνακας 4.53 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **51** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC	1D NOE
1	-	191.6	-	-	-
2	3.26 (1H, s)	54.0	-	C-1, C-3, C-4, C-15, C-6', C-7'	H-15, H-7', H-14'
3	-	50.1	-	-	-
4	-	194.5	-	-	-
5	-	155.0	-	-	-
6	-	135.2	-	-	-
7	2.99 (1H, sextet, J=7.0)	30.4	H-8a, H-8b, H-14	C-1, C-5, C-6, C-8, C-14	-
8	a 1.62 (1H, m) b 1.52 (1H, m)	33.4	H-7, H-9a H-7, H-9b	- -	- -
9	a 1.86 (1H, m) b 1.75 (1H, m)	26.3	H-8a, H-9b, H-10 H-8b, H-9a, H-10	C-7 -	- -
10	5.02 (1H, t, J=7.0)	124.2	H-9b, H-9a, H-12, H-13	C-12, C-13	-
11	-	131.0	-	-	-
12	1.63 (3H, brs)	25.9	H-10	C-10, C-11, C-13	-
13	1.52 (3H, brs)	17.8	H-10	C-10, C-11, C-12	-
14	1.06 (3H, d, J=7.0)	17.4	H-7	C-6, C-7, C-8	-
15	1.51 (3H, s)	26.7	-	C-2, C-3, C-4, C-4'	H-2, H-4'
1'	-	190.0	-	-	-
2'	-	146.6	-	-	-
3'	-	127.8	-	-	-
4'	3.15 (1H, s)	63.9	-	C-2', C-3', C-5', C-6', C-15', C-2, C-15	H-15', H-15
5'	-	196.9	-	-	-
6'	-	75.4	-	-	-
7'	2.49 (1H, m)	31.6	H-8a', H-14'	C-5', C-6', C-8', C-9', C-14'	H-2
8'	a 1.53 (1H, m) b 1.22 (1H, m)	32.8	H-7', H-8b', H-9'b H-7', H-8a', H-9'a	- -	- -
9'	a 2.10 (1H, m) b 2.00 (1H, m)	27.5	H-8'b, H-9b', H-10' H-8'a, H-9a', H-10'	- -	- -
10'	5.08 (1H, t, J=7.0)	124.2	H-9'a, H-9'b, H-12', H-13'	-	-
11'	-	131.0	-	-	-
12'	1.64 (3H, brs)	25.9	H-10'	C-10', C-11', C-13'	-
13'	1.59 (3H, brs)	17.8	H-10'	C-10', C-11', C-12'	-
14'	1.16 (3H, d, J=7.0)	14.2	H-7'	C-6', C-7', C-8'	H-2
15'	1.86 (3H, s)	17.0	-	C-2', C-3', C-4'	H-4'
OH-5	7.25 (1H, brs)	-	-	C-4, C-5, C-6	-
OH-2'	6.00 (1H, brs)	-	-	C-2', C-3'	-

4.2.49 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 52*Νέο φυσικό προϊόν*

Ο μεταβολίτης **52** (1.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή κίτρινου ελαιώδους υπολείμματος.



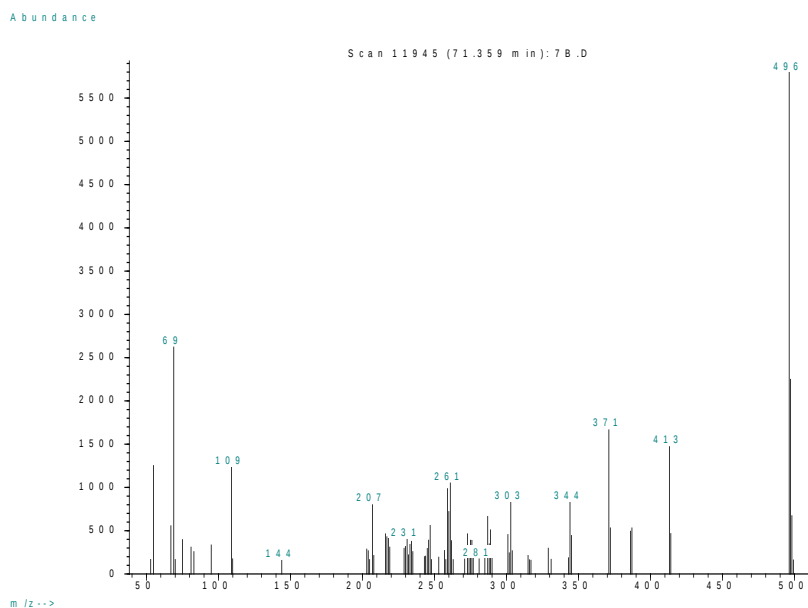
$[\alpha]_D = -9.0$ (c 0.1, CHCl_3)

UV λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) 273 (4.22) (nm)

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **52** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_6$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 11 βαθμούς ακορεστότητας.

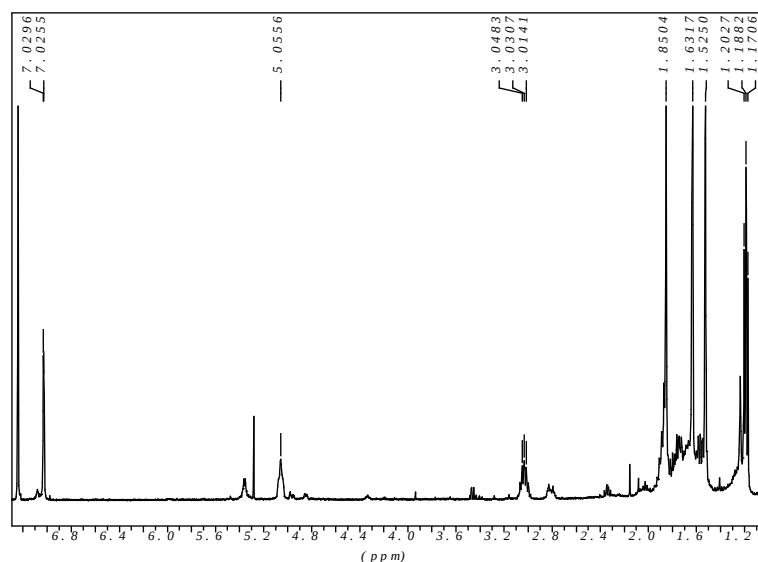
Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRFABMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ σε m/z 497.2907 (θεωρητικό MB: 497.2903).

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 4.297), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 496 $[\text{M}]^+$. Το μοριακό βάρος του μορίου και το φάσμα ^1H -NMR παραπέμπουν στο συμμετρικό διμερές ενός σεσκιτερπενίου.



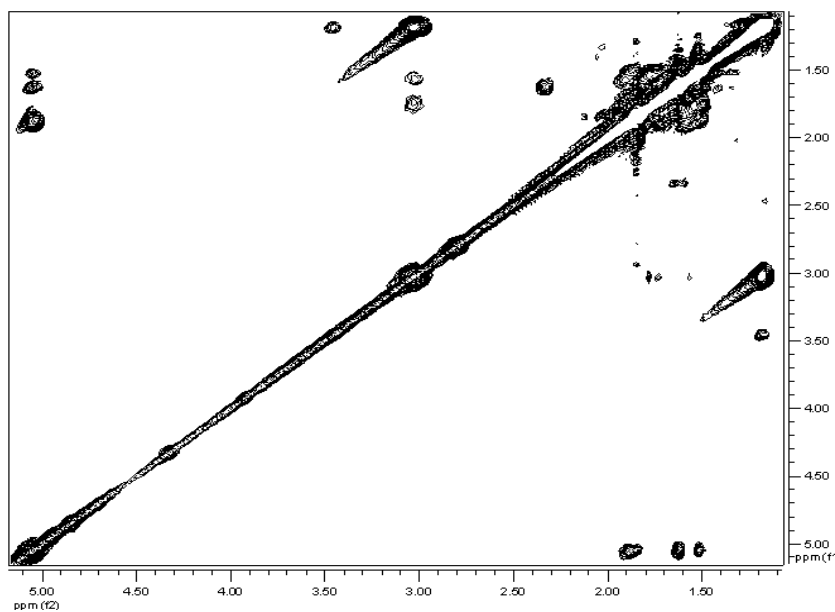
Εικ. 4.297 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **52**

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 4.298) υποδεικνύει την ύπαρξη δύο απλών κορυφών μεθυλίων της ισοπροπυλιδενικής ομάδας στα 1.63 ppm και 1.53 ppm, αρωματικού μεθυλίου (δ 1.85, s) και μεθυλίου (δ 1.19, m) σε βενζυλικό μεθίνιο (δ 3.04, m). Ο αρωματικός δακτύλιος είναι πλήρως υποκατεστημένος. Τα φαινολικά υδροξύλια εμφανίζονται στα 7.03 ppm.

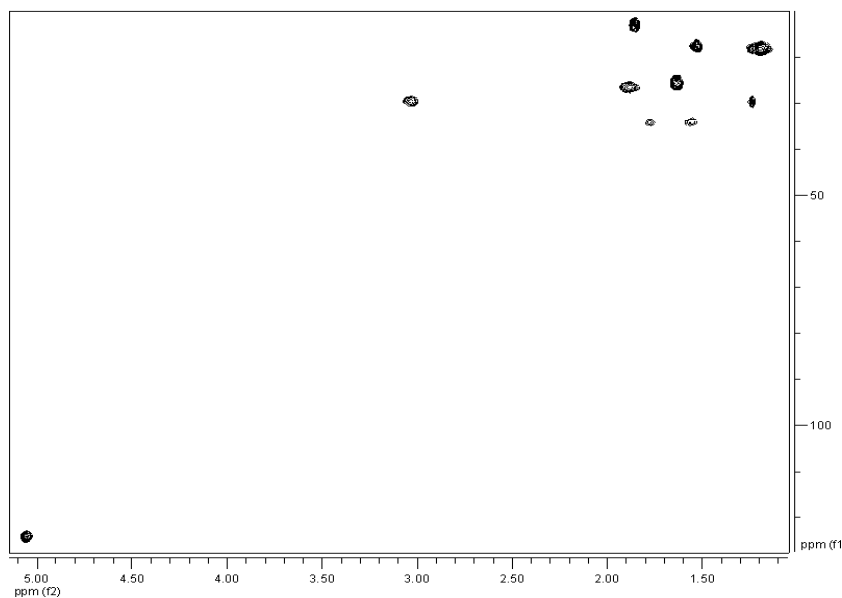


Εικ. 4.298 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του μεταβολίτη **52**

Οι συσχετίσεις HMQC (Εικ. 4.300) προσδιόρισαν τις αντιστοιχίες ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο και οι συσχετίσεις COSY (Εικ. 4.299) βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των πρωτονίων.



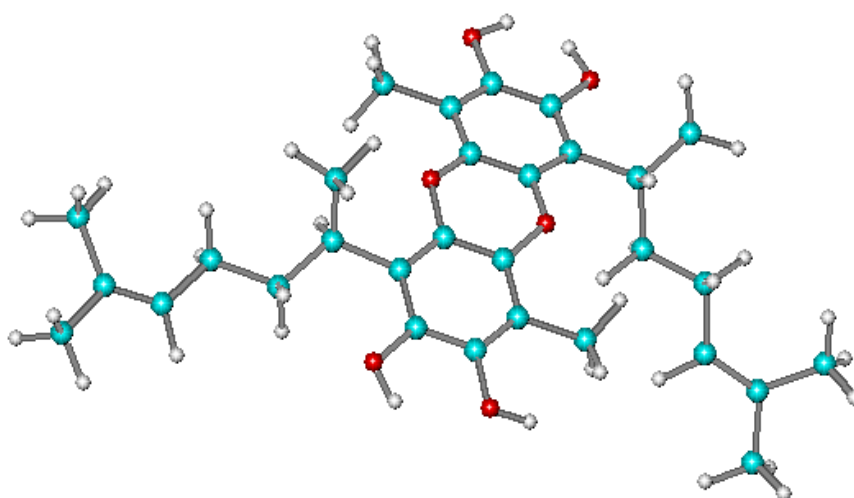
Εικ. 4.299 Φάσμα COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **52**



Εικ. 4.300 Φάσμα HMQC (CDCl_3) του μεταβολίτη **52**

Ο μεταβολίτης ήταν ασταθής και αποικοδομήθηκε πριν τη λήψη φάσματος HMBC, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η απόδοση των πλήρων φασματοσκοπικών του δεδομένων.

Ο μόνος τρόπος σύνδεσης των δύο μονομερών, ώστε να προκύπτει συμμετρικό διμερές, είναι αυτός που απεικονίζεται στο Σχήμα 4.37.



Σχήμα 4.37 Τρισδιάστατη δομή iso-περεζοπερεζόνης

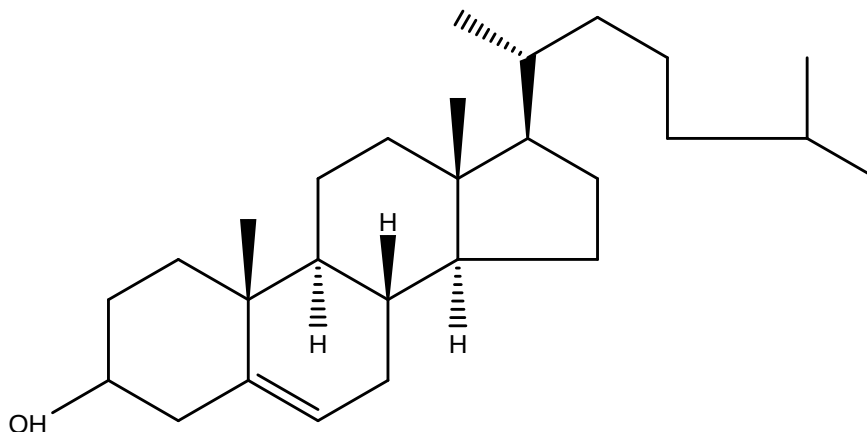
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταβολίτης **52** ταυτοποιήθηκε ως **iso-περεζοπερεζόνη** και σύμφωνα με τη βιβλιογραφική αναζήτηση είναι νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.54.

Πίνακας 4.54 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **52** (CDCl₃, δ_H 7.24 ppm, δ_C 77.00 ppm, n.d.: not detected)

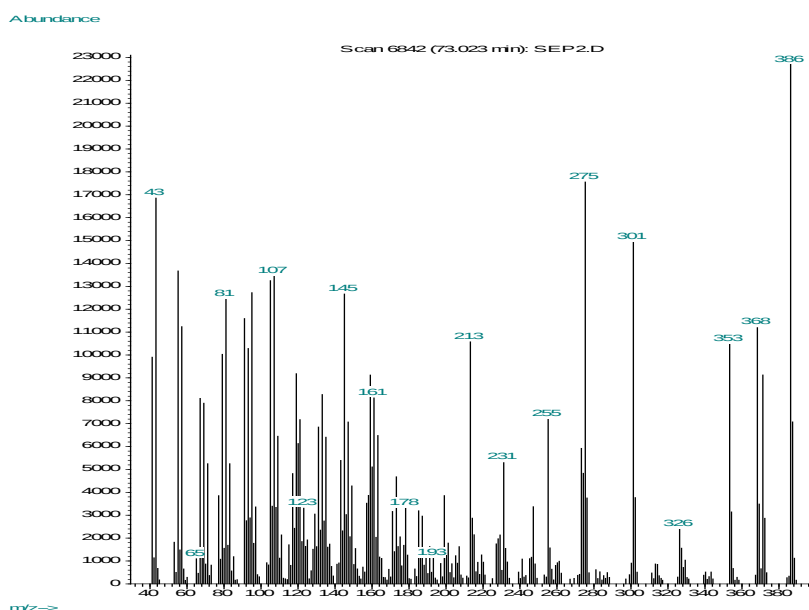
Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY
1, 1'	-	n.d.	-
2, 2'	-	n.d.	-
3, 3'	-	n.d.	-
4, 4'	-	n.d.	-
5, 5'	-	n.d.	-
6, 6'	-	n.d.	-
7, 7'	3.04 (1H, m)	29.4	H-14, H-8a, H-8b
8, 8'	a 1.75 (1H, m) b 1.57 (1H, m)	34.0	H-7, H-8b H-7, H-8a, H-9
9, 9'	1.88 (1H, m)	26.5	H-8b, H-10
10, 10'	5.06 (1H, m)	123.9	H-9, H-12, H-13
11, 11'	-	n.d.	-
12, 12'	1.53 (3H, s)	17.5	H-10
13, 13'	1.63 (3H, s)	25.4	H-10
14, 14'	1.19 (3H, m)	17.9	H-7
15, 15'	1.85 (3H, s)	12.8	-
OH	7.03 (4H, brs)	-	-

4.2.50 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 53

Ο μεταβολίτης **53** απομονώθηκε με τη μορφή υπόλευκου ελαιώδους υπολείμματος. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων $^1\text{H-NMR}$ (Εικ. 4.301) και του φάσματος μάζας (Εικ. 4.300), οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ουσία στεροειδικής δομής.

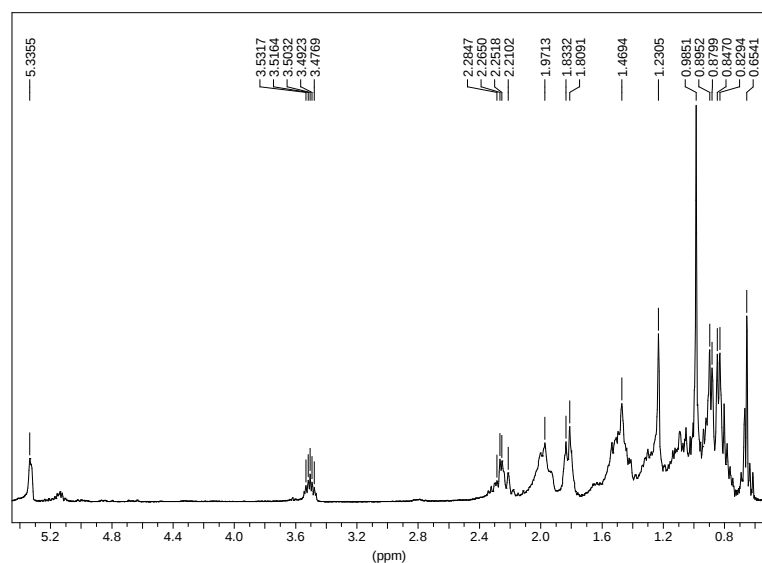


Στο φάσμα μάζας του μεταβολίτη (Εικ. 4.301), το μοριακό ιόν εμφανίζεται σε m/z 386 $[\text{M}]^+$, που υποδεικνύει τον μοριακό τύπο $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$.



Εικ. 4.301 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **53**

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας (Εικ. 4.302) υπήρχαν σήματα τα οποία έδειχναν την ύπαρξη ενός οξυγονωμένου μεθινίου σε δ 3.50 (1H, m), ενός ολεφινικού μεθινίου σε δ 5.32 (1H, m), δύο τεταρτοταγών μεθυλίων σε δ 0.98 (3H, s), 0.65 (3H, s), καθώς και δύο τριτοταγών μεθυλίων σε δ 0.89 (3H, d, 6.5 Hz) και 0.84 (6H, d, 6.8 Hz).

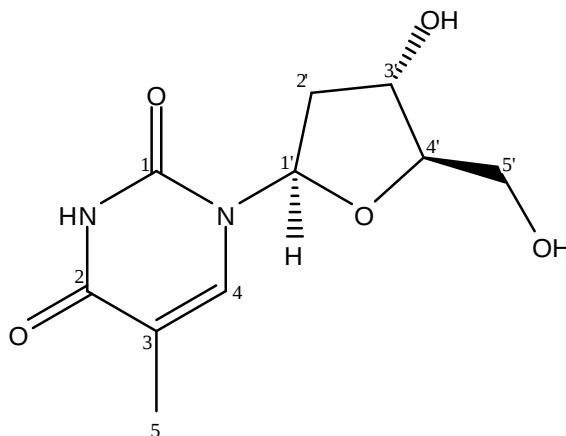


Εικ. 4.302 Φάσμα ^1H -NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **53**

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων με αυτών της βιβλιογραφίας (Silverstein & Webster, 1998b; Itoh *et al.* 1983) οδήγησε στη διαπίστωση ότι επρόκειτο για το γνωστό στεροειδές **χοληστερόλη**.

4.2.51 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 54

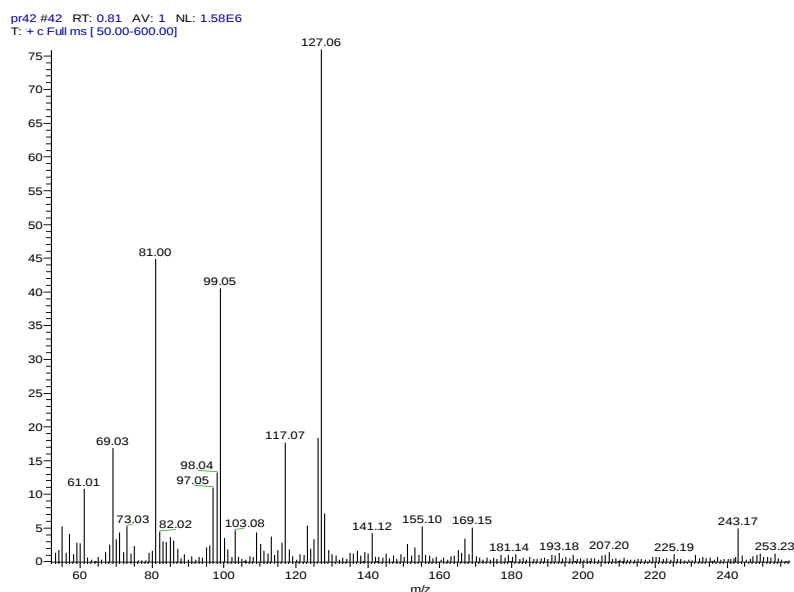
Ο μεταβολίτης **54** (13.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή μωβ ελαιώδους υπολείμματος.



IR (film) $\nu_{\max}$ 3368 (broad), 1664, 1473, 1273, 1093, 1021 cm^{-1}

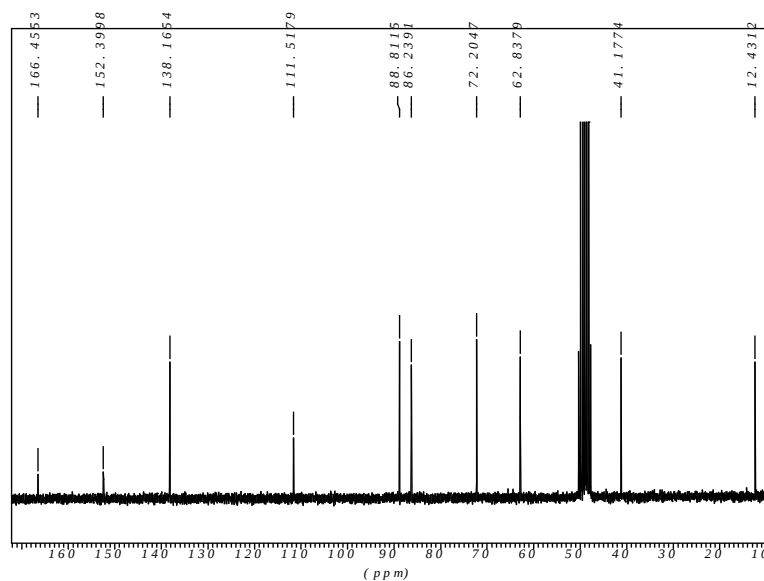
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **54** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας (CIMS, Εικ. 4.303) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ σε m/z 243.



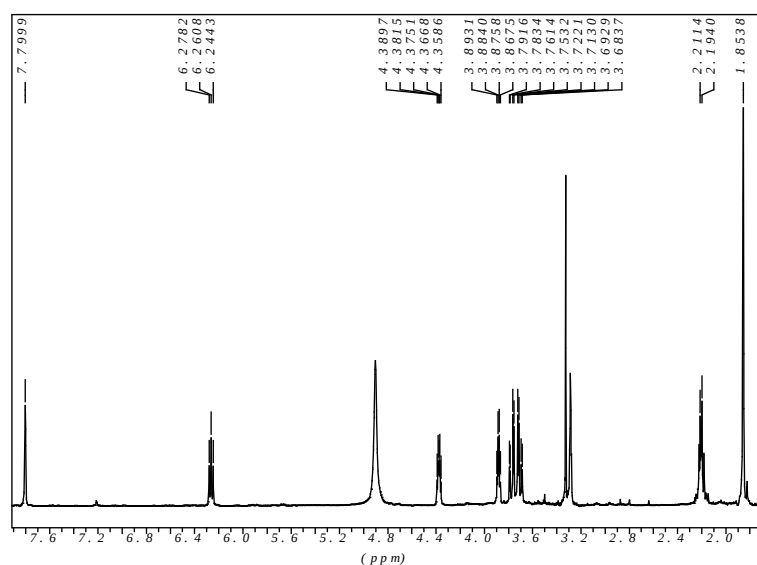
Εικ. 4.303 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **54**

Στο φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.304) του μεταβολίτη **54** εμφανίζονται 2 άτομα ανθράκων στην αλειφατική περιοχή, 4 οξυγονωμένοι άνθρακες, 2 ολεφινικοί άνθρακες (ένας εκ των οποίων είναι τεταρτοταγής) και 2 καρβονύλια σε υψηλά πεδία.



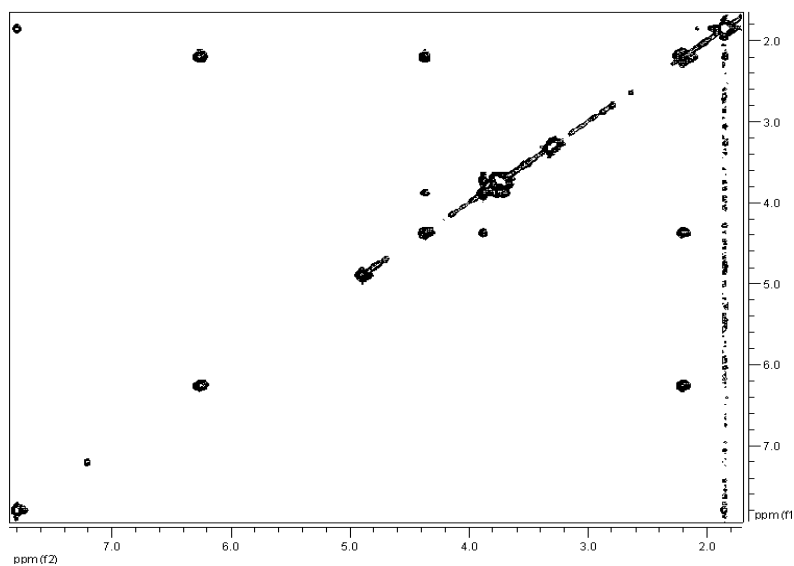
Εικ. 4.304 Φάσμα ^{13}C -NMR ($\text{MeOH-}d_4$) του μεταβολίτη **54**

Παράλληλα, στο φάσμα ^1H -NMR (Εικ. 4.305) εμφανίζονται χαρακτηριστικά σήματα τα οποία αντιστοιχούν σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο σε δ 7.81, σε τρία οξυγονωμένα μεθίνια σε δ 6.27, 4.39 και 3.89, σε ένα οξυγονωμένο μεθυλένιο σε δ 3.80 και 3.71, σε ένα μεθυλένιο σε δ 2.21 και σε ένα βινυλικό μεθύλιο σε δ 1.87.

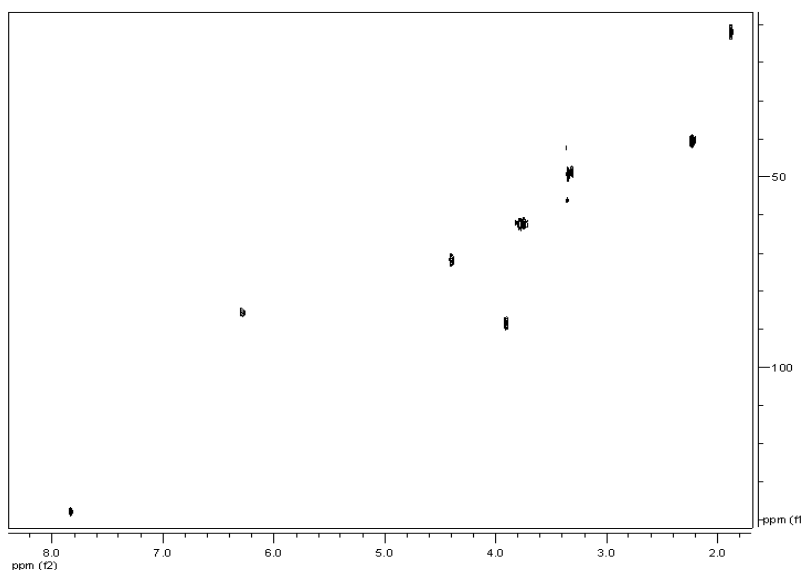


Εικ. 4.305 Φάσμα ^1H -NMR ($\text{MeOH-}d_4$) του μεταβολίτη **54**

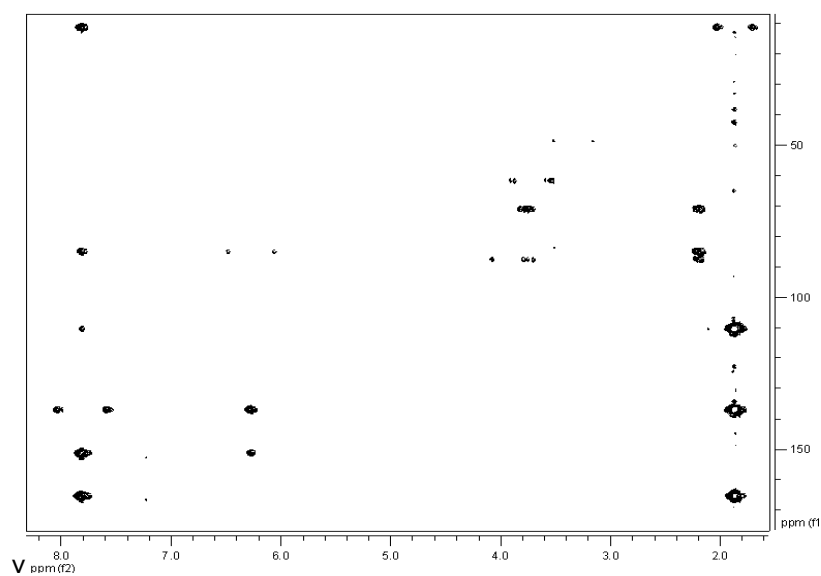
Τα πειράματα COSY (Εικ. 4.306), HSQC-DEPT (Εικ. 4.307) και HMBC (Εικ. 4.308) βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και στον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων-πρωτονίων στο μόριο. Με βάση αυτά, ο μεταβολίτης **54** ταυτίζεται με τον γνωστό νουκλεοζίτη **θυμιδίνη** (Τσουκάτου, 2003). Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.55.



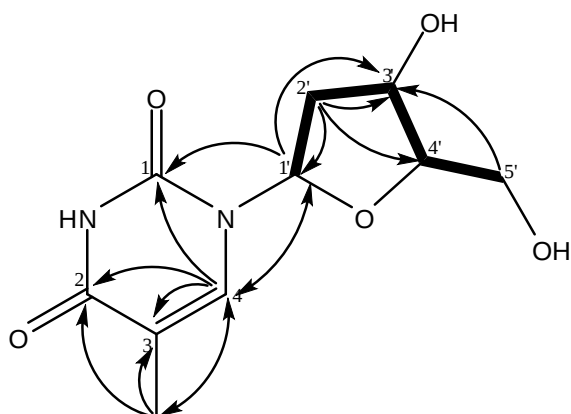
Εικ. 4.306 Φάσμα COSY (MeOH- d_4) του μεταβολίτη **54**



Εικ. 4.307 Φάσμα HSQC-DEPT (MeOH- d_4) του μεταβολίτη **54**



Εικ. 4.308 Φάσμα HMBC (MeOH- d_4) του μεταβολίτη **54**



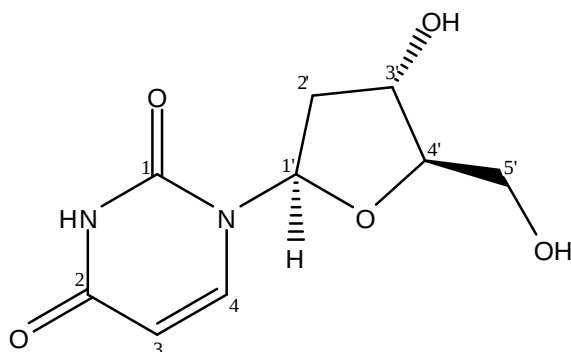
Σχήμα 4.38 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **54**

Πίνακας 4.55 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **54** (MeOH-*d*₄, δ_H 3.31 ppm, δ_C 49.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	152.4	-	-
2	-	166.5	-	-
3	-	111.5	-	-
4	7.81 (1H, s)	138.2	H-5	C-1, C-2, C-3, C-5, C-1'
5	1.87 (3H, s)	12.4	H-4	C-2, C-3, C-4
1'	6.27 (1H, t, <i>J</i> =6.9)	86.2	H-2'	C-1, C-4, C-3'
2'	2.21 (2H, m)	41.2	H-1', H-3'	C-1', C-3', C-4'
3'	4.39 (1H, ddd, <i>J</i> =5.9, 3.3, 3.3)	72.2	H-2', H-4'	-
4'	3.89 (1H, ddd, <i>J</i> =3.3, 3.3, 3.3)	88.8	H-3', H-5'a, H-5'b	-
5'	a 3.80 (1H, dd, <i>J</i> =12.0, 3.3) b 3.71 (1H, dd, <i>J</i> =12.0, 3.3)	62.8	H-4', H-5'b H-4', H-5'a	C-3' C-3'

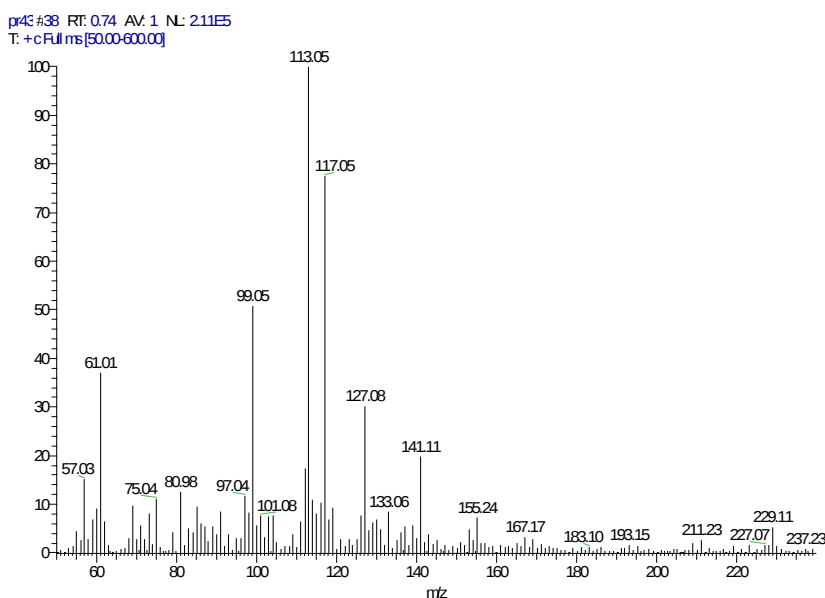
4.2.52 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 55

Ο μεταβολίτης **55** (2.0 mg) απομονώθηκε με τη μορφή μωβ ελαιώδους υπολείμματος.



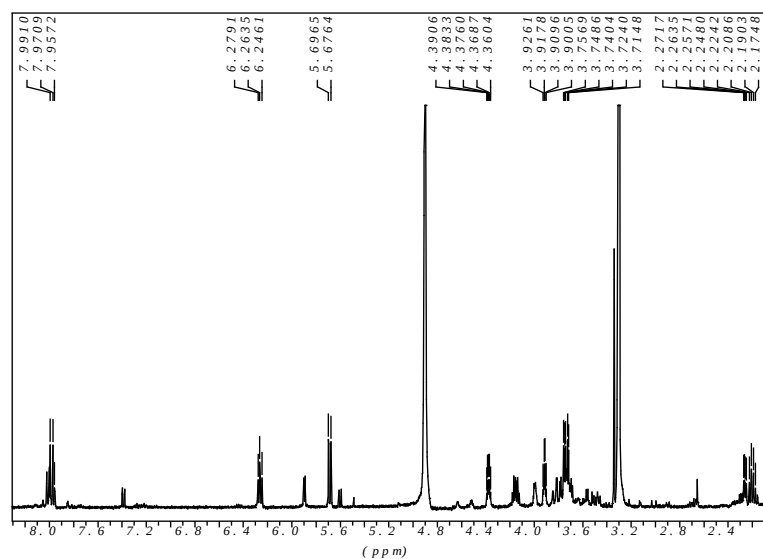
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **55** οδήγησαν στον μοριακό τύπο $C_9H_{12}N_2O_5$. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 5 βαθμούς ακορεστότητας.

Το φάσμα μάζας (CIMS, Εικ. 4.309) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ σε m/z 229.



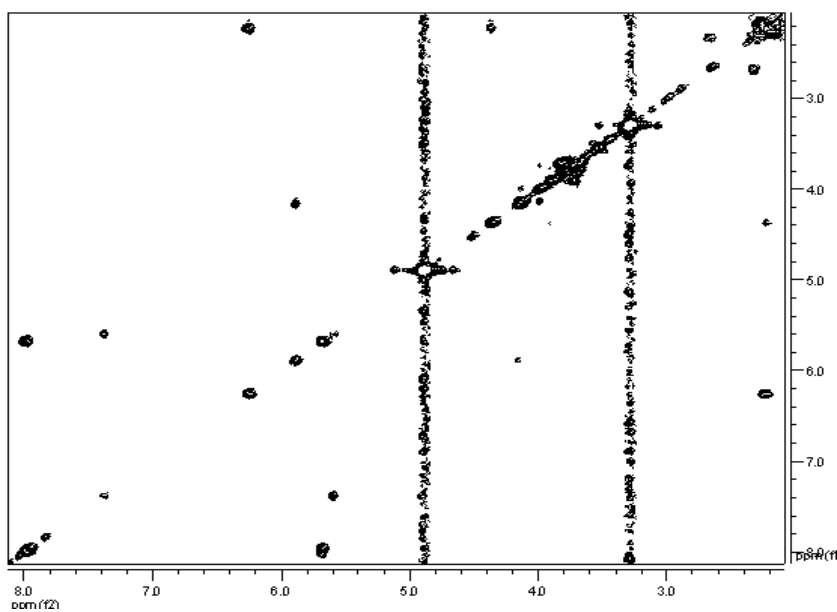
Εικ. 4.309 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **55**

Στο φάσμα 1H -NMR (Εικ. 4.310) εμφανίζονται χαρακτηριστικά σήματα τα οποία αντιστοιχούν σε δύο ολεφινικά πρωτόνια σε δ 8.00 και 5.68, σε τρία οξυγονωμένα μεθίνια σε δ 6.27, 4.37 και 3.91, σε ένα οξυγονωμένο μεθυλένιο σε δ 3.75 και σε ένα μεθυλένιο σε δ 2.26 και 2.19.

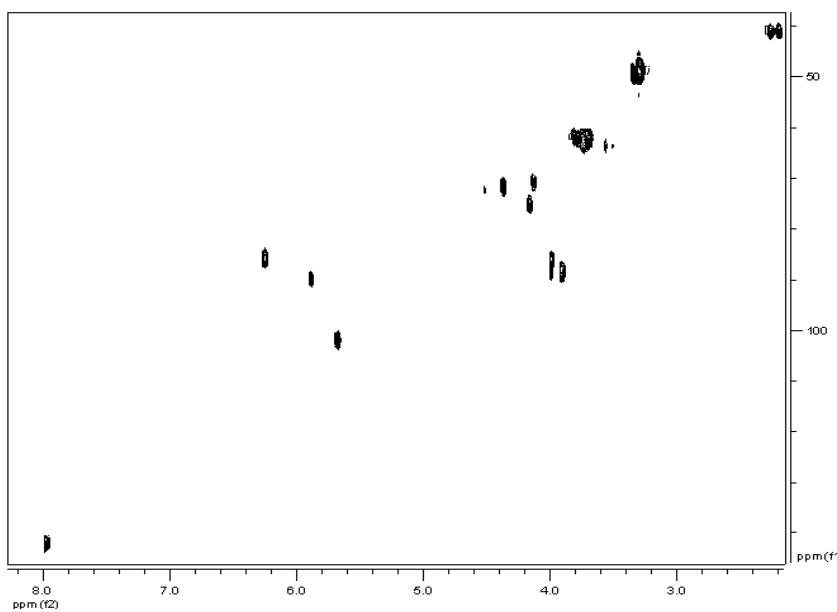


Εικ. 4.310 Φάσμα ^1H -NMR ($\text{MeOH-}d_4$) του μεταβολίτη **55**

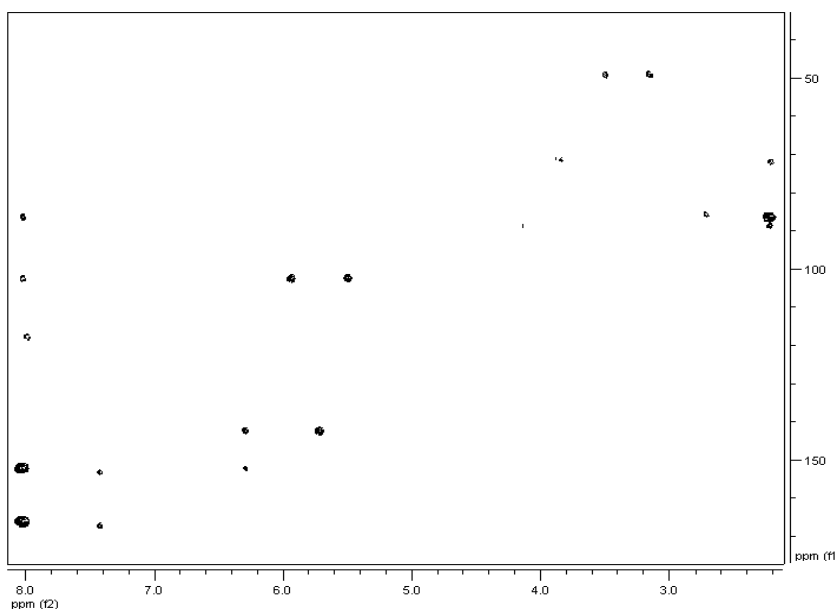
Στο φάσμα COSY (Εικ. 4.311) φαίνονται η σύζευξη των ολεφινικών πρωτονίων, η σύζευξη του H-1' με το H₂-2', του H₂-2' με το H-3', του H-3' με το H-4' και του H-4' με το H₂-5'.



Εικ. 4.311 Φάσμα COSY ($\text{MeOH-}d_4$) του μεταβολίτη **55**



Εικ. 4.312 Φάσμα HSQC-DEPT (MeOH- d_4) του μεταβολίτη **55**



Εικ. 4.313 Φάσμα HMBC (MeOH- d_4) του μεταβολίτη **55**

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, ο μεταβολίτης **55** ταυτίζεται με τον γνωστό νουκλεοζίτη **2'-δεοξυ-ουριδίνη** (Πέγκας, 2005). Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.56.

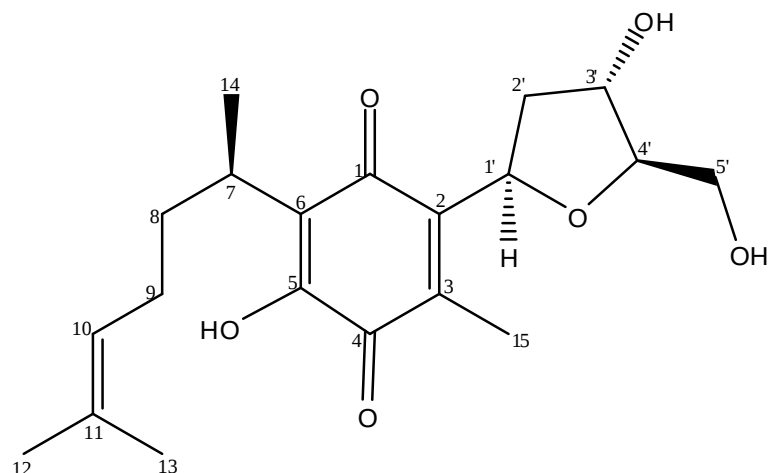
Πίνακας 4.56 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **55** (MeOH-*d*₄, δ_H 3.31 ppm, δ_C 49.00 ppm)

Θέση	¹ H NMR (ppm)	¹³ C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	152.3	-	-
2	-	166.2	-	-
3	5.68 (1H, d, <i>J</i> =8.0 Hz)	102.6	H-4	C-4
4	8.00 (1H, d, <i>J</i> =8.0 Hz)	142.5	H-3	C-1, C-2, C-3, C-1'
1'	6.27 (1H, t, <i>J</i> =7.0 Hz)	86.6	H-2'a, H-2'b	C-1, C-4
2'	a 2.26 (1H, m) b 2.19 (1H, m)	41.4	H-1', H-2'b, H-3' H-1', H-2'a, H-3'	C-1', C-3', C-4' C-1', C-3', C-4'
3'	4.37 (1H, ddd, <i>J</i> =6.0, 3.2, 3.2)	72.3	H-2'a, H-2'b, H-4'	-
4'	3.91 (1H, ddd, <i>J</i> =3.2, 3.2, 3.2)	89.0	H-3', H-5'	C-3'
5'	3.75 (2H, m)	62.9	H-4'	-

4.2.53 ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 56

Νέο φυσικό προϊόν

Ο μεταβολίτης **56** (6.6 mg) απομονώθηκε με τη μορφή μωβ ελαιώδους υπολείμματος.



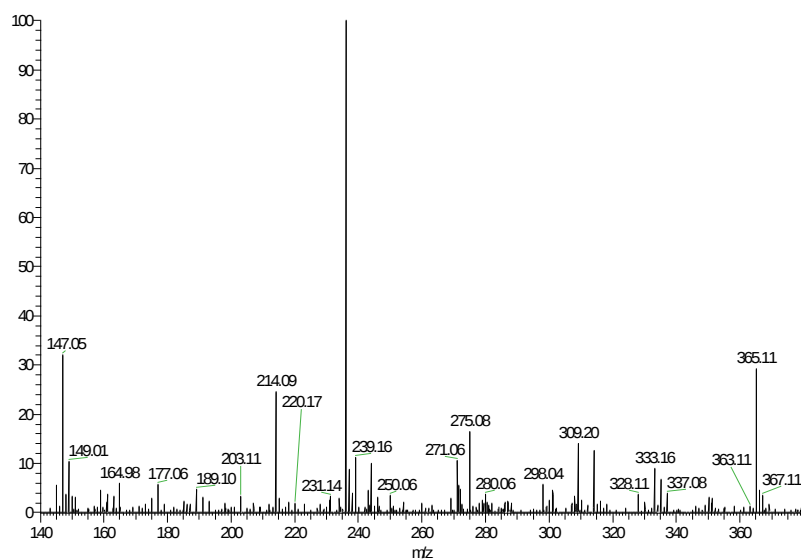
$[\alpha]_D = +12.0$ (c 0.033, MeOH)

UV λ_{max} (CHCl₃) (log ϵ) 212 (3.6) (nm)

IR (film) ν_{max} 3338 (broad), 2942, 2833, 1698, 1546, 1377, 1102, 1026 cm⁻¹

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS του μεταβολίτη **56** οδήγησαν στον μοριακό τύπο C₂₀H₂₈O₆. Με βάση τον μοριακό τύπο, ο μεταβολίτης πρέπει να έχει 7 βαθμούς ακορεστότητας.

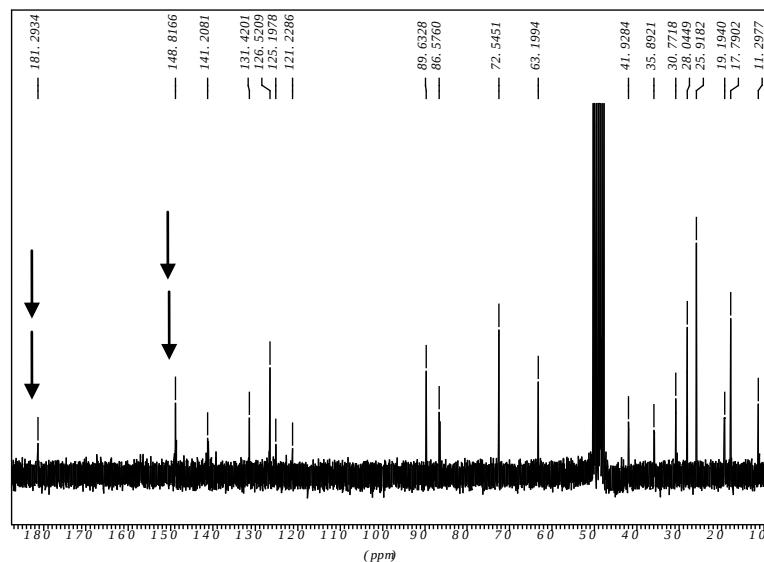
Το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRESIMS) παρουσίασε ψευδομοριακό ιόν [M+H]⁺ σε m/z 365.1875 (θεωρητικό MB: 365.1959). Το ψευδομοριακό ιόν [M+H]⁺ παρατηρήθηκε και στο φάσμα μάζας (CIMS, Εικ. 4.314).



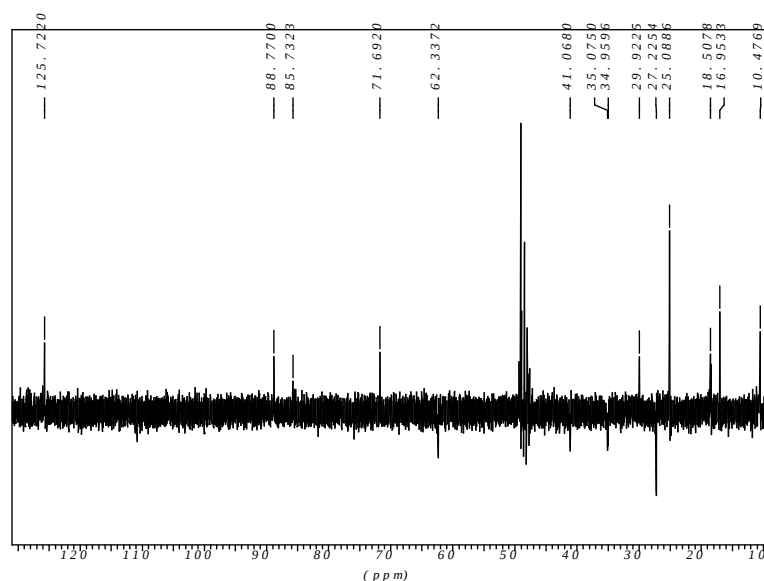
Εικ. 4.314 Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **56**

Στο φάσμα ^{13}C -NMR (Εικ. 4.315) του μεταβολίτη **56** εμφανίζονται 8 άτομα ανθράκων στην αλειφατική περιοχή και 4 οξυγονωμένοι άνθρακες.

Το φάσμα DEPT-135 (Εικ. 4.316) εμφάνισε 13 άνθρακες, οι οποίοι αντιστοιχούν σε πέντε τριτοταγείς, τέσσερις δευτεροταγείς και τέσσερις πρωτοταγείς.



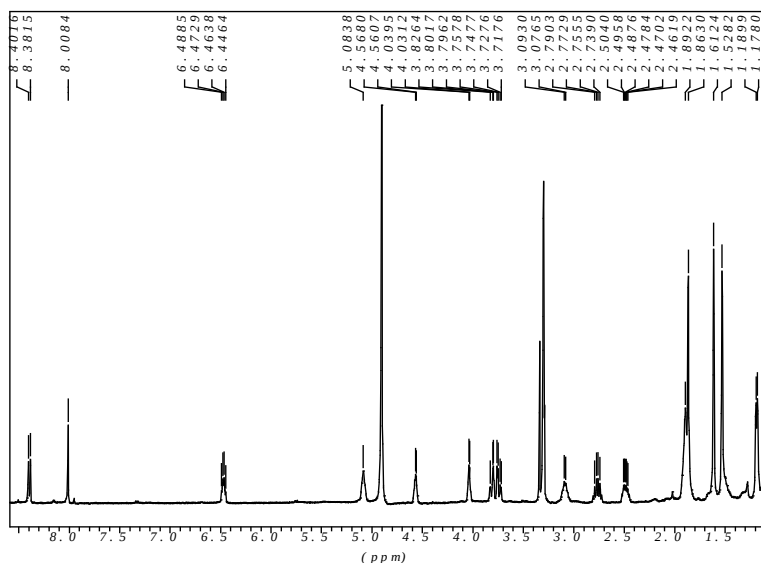
Εικ. 4.315 Φάσμα ^{13}C -NMR ($\text{MeOH}-d_4$) του μεταβολίτη **56**



Εικ. 4.316 Φάσμα DEPT-135 ($\text{MeOH}-d_4$) του μεταβολίτη **56**

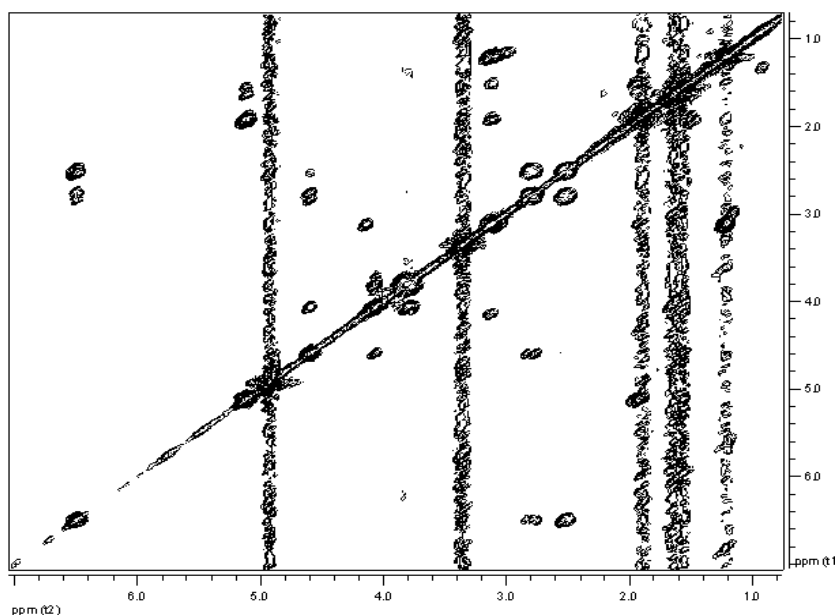
Κατά αναλογία με το φάσμα ^1H -NMR της περεζόνης (μεταβολίτης **26**) και του υδατάνθρακα των μεταβολιτών **54** και **55**, ο μεταβολίτης **56** εμφάνισε χαρακτηριστικά σήματα, που αντιστοιχούν σε ισοπροπυλιδενική ομάδα (ολεφινικό πρωτόνιο σε δ 5.08 και δύο απλές κορυφές βινυλικών μεθυλίων σε δ 1.61 και 1.53), αρωματικού μεθυλίου (δ 1.85, s) και ενός μεθυλίου σε βενζυλικό μεθίνιο (δ 1.18, d; δ 3.08, m). Επίσης, παρατηρήθηκαν τρία οξυγονωμένα μεθίνια σε δ 6.47 (ddd, 6.6, 6.6,

3.7), 4.56 (ddd, 6.0, 6.0, 2.9) και 4.02 (ddd, 3.3, 3.3, 3.3), ένα οξυγονωμένο μεθυλένιο σε δ 3.74 και 3.82 (m) και ένα μεθυλένιο σε δ 2.76 (ddd, 13.4, 13.4, 6.6) και 2.49 (m).

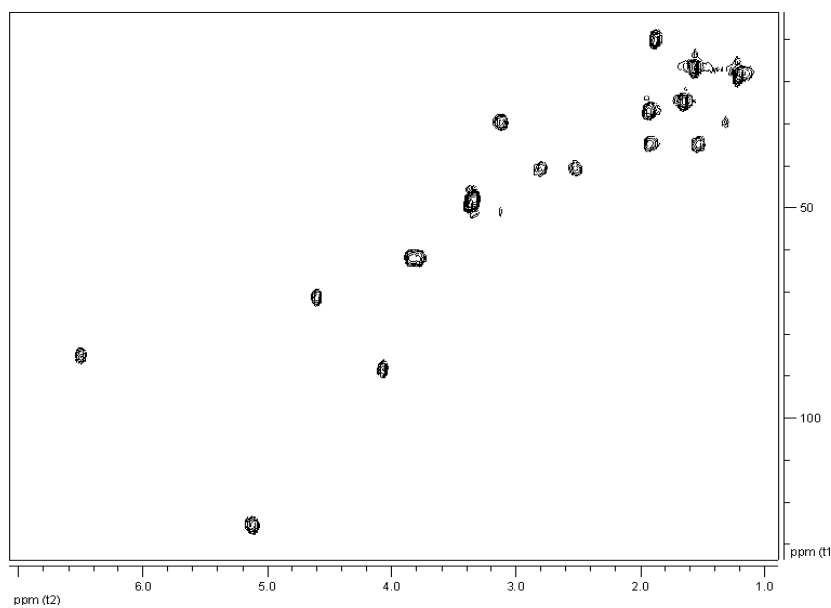


Εικ. 4.317 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ ($\text{MeOH-}d_4$) του μεταβολίτη **56**

Τα πειράματα COSY (Εικ. 4.318) και HSQC-DEPT (Εικ. 4.319) και HMBC (Εικ. 4.320) βοήθησαν στον καθορισμό της αλληλουχίας των ανθράκων και στον προσδιορισμό των σχετικών θέσεων ανθράκων πρωτονίων στο μόριο.

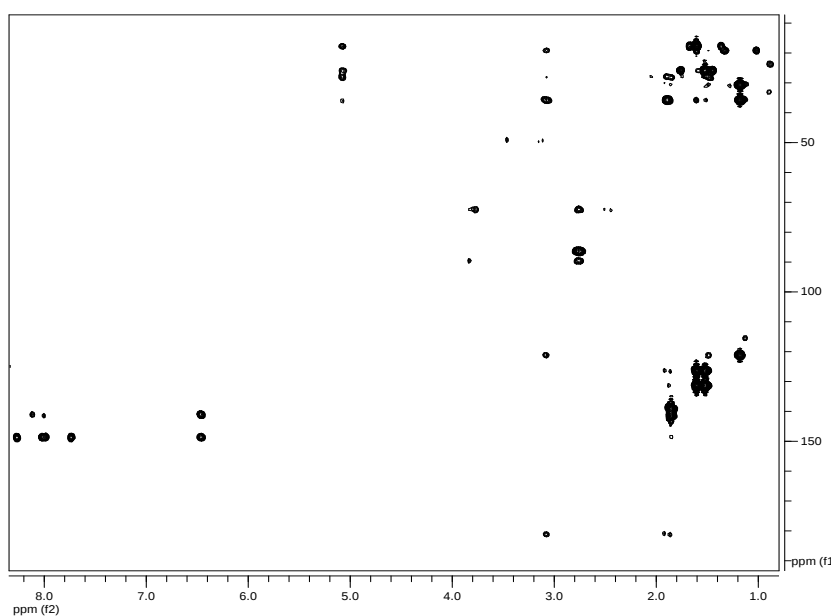


Εικ. 4.318 Φάσμα COSY ($\text{MeOH-}d_4$) του μεταβολίτη **56**

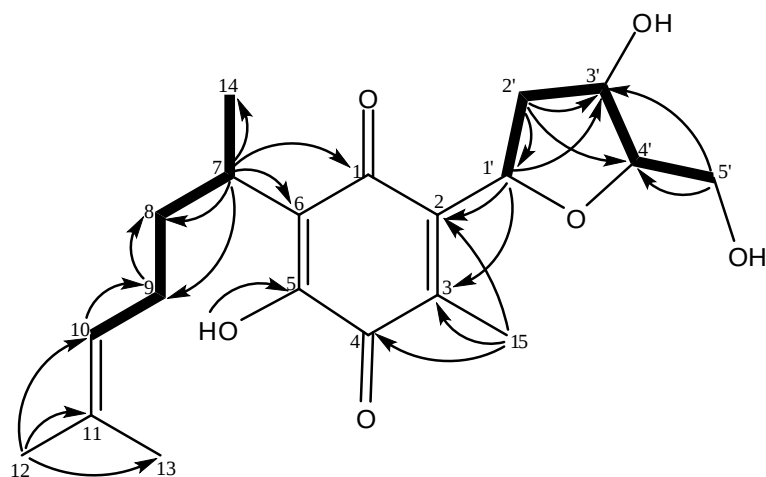


Εικ. 4.319 Φάσμα HSQC-DEPT (MeOH- d_4) του μεταβολίτη **56**

Το φάσμα HSQC-DEPT δεν παρουσίασε σήματα στα 8.00 ppm και 8.40 ppm, γεγονός που υποδεικνύει ότι πρόκειται για πρωτόνια υδροξυλίων.



Εικ. 4.320 Φάσμα HMBC (MeOH- d_4) του μεταβολίτη **56**



Σχήμα 4.39 Συζεύξεις COSY και χαρακτηριστικές συσχετίσεις HMBC του μεταβολίτη **56**

Ο μεταβολίτης **56** ταυτοποιήθηκε, με βάση τη βιβλιογραφική αναζήτηση, ως νέα χημική δομή. Τα φασματοσκοπικά του δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 4.57.

Πίνακας 4.57 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **56** (MeOH- d_4 , δ_H 3.31 ppm, δ_C 49.00 ppm)

Θέση	1H NMR (ppm)	^{13}C NMR (ppm)	COSY	HMBC
1	-	181.3	-	-
2	-	148.8	-	-
3	-	141.2	-	-
4	-	181.3	-	-
5	-	148.8	-	-
6	-	121.2	-	-
7	3.08 (1H, m)	30.8	H-8a, H-8b, H-14	C-1, C-6, C-8, C-9, C-14
8	a 1.90 (1H, m) b 1.51 (1H, m)	35.9	H-7, H-8b H-7, H-8a, H-9	C-9, C-10 C-6
9	1.90 (2H, m)	28.0	H-8b, H-10	C-8
10	5.08 (1H, m)	126.5	H-9, H-12, H-13	C-8, C-9, C-12, C-13
11	-	131.4	-	-
12	1.53 (3H, s)	17.8	H-10	C-10, C-11, C-13
13	1.61 (3H, s)	25.9	H-10	C-10, C-11, C-12
14	1.18 (3H, brd, $J=6.5$)	19.2	H-7	C-6, C-7, C-8
15	1.85 (3H, s)	11.3	-	C-2, C-3, C-4
1'	6.47 (1H, ddd, $J=6.6, 6.6, 3.7$)	86.6	H-2'a, H-2'b	C-2, C-3, C-3'
2'	a 2.76 (1H, ddd, $J=13.4, 13.4, 6.6$) b 2.49 (1H, m)	41.9	H-1', H-2'b, H-3' H-1', H-2'a, H-3'	C-1', C-3', C-4' C-3'
3'	4.56 (1H, ddd, $J=6.0, 6.0, 3.3$)	72.5	H-2'a, H-2'b, H-4'	-
4'	4.02 (1H, ddd, $J=3.3, 3.3, 3.3$)	89.6	H-3', H-5'a, H-5'b	-
5'	a 3.82 (1H, m) b 3.74 (1H, m)	63.2	H-4', H-5'b H-4', H-5'a	C-3', C-4' C-3'
OH	8.00 (1H, brs)	-	-	C-5
OH	8.39 (1H, brs)	-	-	-

4.3 Αξιολόγηση βιολογικής δράσης απομονωθέντων προϊόντων

Με βάση τις διαθέσιμες ποσότητες, διενεργήθηκαν βιολογικοί έλεγχοι σε ορισμένους από τους απομονωμένους μεταβολίτες.

4.3.1 Έλεγχος κυτταροτοξικής δράσης

Η αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας των μεταβολιτών **8, 16, 18, 24, 26, 27, 34** και **47** πραγματοποιήθηκε σε καρκινικά κύτταρα της σειράς NSCLC-N6-L16 (κύτταρα από ανθρώπινο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα μέτριας διαφοροποίησης με σπάνια κερατινοποίηση), NCTC-2544 (ανθρώπινα κερατινοποιημένα κύτταρα), καθώς και της σειράς A549 (κυτταρική καρκινική σειρά επιθηλιακών κυττάρων πνευμονικού ιστού ανθρώπου τύπου II).

Συνθήκες καλλιέργειας για τις καρκινικές σειρές NSCLC-N6-L16, A549 και NCTC

Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε RPMI 1640 μέσο, συμπληρούμενο με 5% βοδινό εμβρυϊκό ορό, στον οποίο προστέθηκαν 100 IU πενικιλίνης/ml, 100 μg στρεπτομυκίνης/ml και 2 mM γλουταμίνης στους 37°C σε ατμόσφαιρα αέρα/διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 95:5 (v/v). Υπό τις συνθήκες αυτές ο χρόνος ολοκλήρωσης ενός κυτταρικού κύκλου είναι 32 ώρες (Roussakis *et al.*, 1991).

Αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας

Τα πειράματα εκτελέστηκαν σε 96τρυπες πλάκες (2×10^5 κύτταρα/ml). Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις των μεταβολιτών για 72 ώρες. Η κυτταρική ανάπτυξη υπολογίστηκε με βάση χρωματομετρική μέθοδο που στηρίζεται στην μετατροπή του χρωματισμού του MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) σε κυανό παράγωγο φορμαζανίου από τα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων. Η οπτική πυκνότητα του κάθε διαλύματος που ήταν ανάλογη της ποσότητας του διαλυμένου φορμαζανίου, μετρήθηκε στα 570 nm σε κάθε κυψελίδα σε φωτόμετρο τύπου Titertek Multiskan MKII. Πραγματοποιήθηκαν οκτώ επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση. Το πρότυπο αναφοράς ανάπτυξης προσδιορίστηκε από 16 επαναλήψεις. Η κυτταροτοξική δράση εκφράζεται σε IC₅₀ (μg/ml). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 4.58.

Από τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών γίνεται φανερό ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες **16** (κουρκουϋδροκινόνη), **18** (4-υδροξυ-αμπολένιο), **34** και **26** (περεζόνη) παρουσίασαν ιδιαίτερα επίπεδα δραστηριότητας στις κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκαν.

Πίνακας 4.58 *In vitro* Κυτταροτοξικότητα Μεταβολιτών

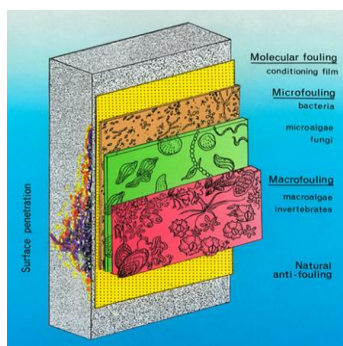
Μεταβολίτης	Χημική δομή	IC ₅₀ (μg/ml)		
		Καρκινική Σειρά		
		A549	NSCLC-N6-L16	NCTC-2544
8		αδρανής	αδρανής	-
16		10,7	8,7	-
18		18,5	23,8	9,6
24		>30	>30	-
26		14,8	11,7	-
27		αδρανής	>30	-
34		8,1	8,4	5,3
47		αδρανής	αδρανής	-

4.3.2 Έλεγχος δράσης κατά της βιοεπίστρωσης (biofouling)

Με τον όρο βιοεπίστρωση (fouling) εννοείται η διαδοχική ανάπτυξη μίας κοινωνίας από βακτήρια, πρωτόζωα, μακροφύκη και ασπόνδυλα σε επιφάνειες εκτεθειμένες στο νερό.

Η εποίκιση νέων επιφανειών πραγματοποιείται σε τέσσερις φάσεις (Εικ. 4.321) οι οποίες επικαλύπτουν χρονικά η μία την άλλη και είναι οι εξής:

- Βιοχημικές συνθήκες
- Βακτηριακός εποικισμός
- Εποικισμός μονοκύτταρων ευκαρυωτικών οργανισμών
- Εποικισμός πολυκύτταρων ευκαρυωτικών οργανισμών



Εικ. 4.321 Στάδια βιοεπίστρωσης

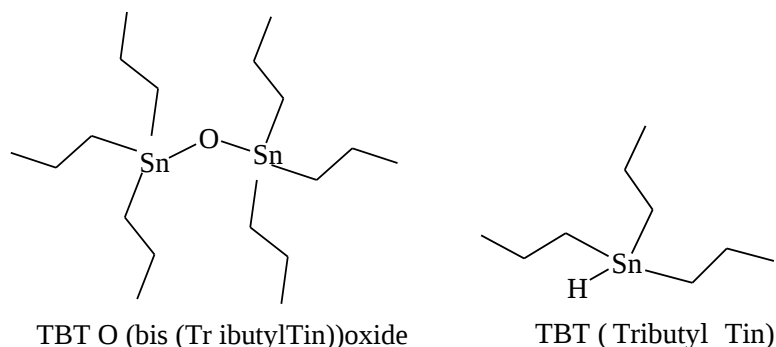
Ο έλεγχος της βιοεπίστρωσης είναι από τα σοβαρότερα προβλήματα που αντιμετωπίζει η μοντέρνα ναυπηγική και από τους μεγαλύτερους ερευνητικούς στόχους της θαλάσσιας τεχνολογίας. Η ανεξέλεγκτη εγκατάσταση των θαλάσσιων ασπόνδυλων και μικροφυκών στα ύφαλα των πλοίων έχει σαν αποτελέσματα:

- μείωση ταχύτητας των πλοίων
- μείωση της απόδοσης των καυσίμων
- αύξηση μόλυνσης της ατμόσφαιρας
- επιφανειακή διάβρωση

Κοστίζει στις θαλάσσιες βιομηχανίες πάνω από \$6.5 δις το χρόνο. Στο αμερικανικό ναυτικό κοστίζει \$1 δις το χρόνο.

Για να αποφευχθεί ο εποικισμός των θαλάσσιων οργανισμών σε υποθαλάσσιες κατασκευές έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς ποικίλες ουσίες με βιοκτόνο δράση, όπως μόλυβδος, πίσσα, αρσενικό, υδράργυρος και DDT, οι οποίες όμως αποσύρθηκαν λόγω της αποδεδειγμένης τοξικότητάς τους, όχι μόνο στους οργανισμούς στόχους, αλλά και στα ωφέλιμα για τον άνθρωπο θαλάσσια είδη.

Το 1960 άρχισε η χρήση των οργανοκασσιτερικών ενώσεων σαν βιοκτόνα συστατικά των υφαλοχρωμάτων με τη μορφή τριοργανοκασσιτερικών ενώσεων, κύρια τριβουτυλικού (TBT) και τριφαινυλικού (TPT) κασσίτερου με πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα (Εικ. 4.322). Τα συμπολυμερή αυτοσπιννούμενα (SPC) TBT υφαλοχρώματα, παρέχουν αντιρρυπαντική προστασία στα ύφαλα των πλοίων από τις επικαθίσεις για περίοδο μέχρι και πέντε χρόνια.



Εικ. 4.322 Οι δομές των TBT και TBT O

Σε μετρήσεις που έγιναν σε πυρήνες ιζημάτων φάνηκε πως το TBT, καθώς και τα προϊόντα αποικοδόμησής του, διβουτυλικός (DBT) και μονοβουτυλικός κασσίτερος (MBT), παρουσιάζουν πολύ χαμηλό ρυθμό αποικοδόμησης, με αποτέλεσμα οι συσσωρευμένες χημικές μορφές του κασσίτερου να μπορούν να απελευθερωθούν κάτω από ορισμένες συνθήκες στο θαλασσινό νερό με συνέπεια τη δημιουργία ενός μεγάλου οικοτοξικού προβλήματος (Τσουκάτου, 2003). Η τοξικότητα των οργανοκασσιτερικών ενώσεων έγκειται στην υψηλή λιποδιαλυτότητα με αποτέλεσμα την αυξημένη ικανότητα διείσδυσης στις βιολογικές μεμβράνες. Από το 1990 έχει περιοριστεί αισθητά η χρήση τους παγκοσμίως.

Μία από τις πιο υποσχόμενες εναλλακτικές λύσεις στην αντικατάσταση των υφαλοχρωμάτων, που περιέχουν τοξικές ουσίες, είναι ο εντοπισμός φυσικών προϊόντων με δράση κατά του εποικισμού τα οποία θα προέρχονται από τους ίδιους τους θαλάσσιους οργανισμούς και θα λειτουργούν σαν φυσικοί αναστολείς. Πολλά θαλάσσια φύκη, σπόγγοι, ασκίδια, κοράλλια έχουν βρεθεί σε περιοχές ενεργές σε βιοεπίστρωση να είναι εντελώς ελεύθερα βιοεπίστρωσης τα ίδια. Αυτό το γεγονός σημαίνει ότι έχουν αναπτύξει, στα πλαίσια του μεταβολισμού τους, μηχανισμούς antifouling και έχει προσανατολίσει την έρευνα για φυσικά antifouling στα εκχυλίσματα αυτών των οργανισμών.

4.3.2.1 Αναστολή ανάπτυξης μικροοργανισμών που εμπλέκονται στη βιοεπίστρωση

Οι μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν ήταν 3 σειρές θαλάσσιων βακτηρίων, τα *Halomonas marina*, *Pseudoalteromonas elyakovii* και *Vibrio aestuarianus*, 3 σειρές χερσαίων βακτηρίων τα *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* και *Bacillus subtilis*, και 3 μικροφύκη τα *Pleurochrysis roscoffensis*, *Exanthemachrysis gayraliae* και *Cylindrotheca cloisterium*.

Οι ουσίες, που δοκιμάστηκαν, αραιώθηκαν στις κατάλληλες συγκεντρώσεις με απόλυτη αιθανόλη. Οι διάφορες συγκεντρώσεις τοποθετήθηκαν σε 96τρυπες πλάκες. Κάθε μία συγκέντρωση δοκιμάστηκε 6 φορές. Οι συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν ήταν 50μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml και 0.1μg/ml (Hellio *et al*, 2002).

Όταν τοποθετήθηκαν τα διαλύματα στις 96τρυπες πλάκες αφέθηκαν να εξατμιστούν, για να μην έχουμε θετικά σφάλματα εξαιτίας της παρουσίας αιθανόλης στα διαλύματα. Στη συνέχεια οι πλάκες αποστειρώθηκαν με UV ακτινοβολία. Όλες οι υπόλοιπες διεργασίες έλαβαν χώρα σε ασηπτικές συνθήκες. Ο εμβολιασμός των μικροοργανισμών έγινε στη συνέχεια.

Οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε ειδικό καλλιεργητικό υλικό difco και επωάστηκαν στις πλάκες για 48h στους 30°C. Τα χερσαία βακτήρια καλλιεργήθηκαν σε ειδικό καλλιεργητικό υλικό Nutrient Broth No2 και επωάστηκαν και αυτά στις πλάκες για 48h στους 30°C. Οι σειρές των μικροφυκών καλλιεργήθηκαν σε ειδικό καλλιεργητικό υλικό f/2 Guillard & Ryther και επωάστηκαν για 5 μέρες (απαραίτητο το ηλιακό φως).

Τα αποτελέσματα δόθηκαν σαν ελάχιστες συγκεντρώσεις παρεμπόδισης (MIC). Τα πιο σημαντικά αποτελέσματα τα έδωσαν η περεζόνη (**26**) έναντι του θαλασσίου βακτηρίου *Vibrio aestuarianus* και η κουρκουϋδροκινόνη (**16**) έναντι του μικροφύκου *Cylindrotheca cloisterium*. Οι ενώσεις κουρκουφαινόλη (**8**) και κουρκουκινόνη (**24**) δεν κατέδειξαν καμία δραστικότητα.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 4.59.

Πίνακας 4.59 *In vitro* αναστολή ανάπτυξης μικροοργανισμών

Μεταβολίτης	Χημική δομή	MIC (μg/ml)	
		Είδος μικροοργανισμού	
		<i>Vibrio aestuarianus</i>	<i>Cylindrotheca cloisterium</i>
8		αδρανής	αδρανής
16		αδρανής	>50
24		αδρανής	αδρανής
26		>50	αδρανής

4.3.2.2 Αναστολή ανάπτυξης μακροοργανισμών που εμπλέκονται στη βιοεπίστρωση

Η προκαταρκτική αξιολόγηση της δράσης των μεταβολιτών στην αναστολή εγκατάστασης μακροοργανισμών, που εμπλέκονται στη βιοεπίστρωση, έγινε με τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Qian και συνεργάτες (Harder *et al*, 2004).

Συγκεκριμένα παρασκευάστηκε γέλη με προσθήκη Phytigel (Sigma Chemical) 4% (w/v) σε αποσταγμένο νερό, με ανάδευση και θέρμανση (100°C) σε ποτήρι ζέσης. Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχθηκε έως τους 70°C και προστέθηκε, υπό ανάδευση, το διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης του εκάστοτε μεταβολίτη (σε DMSO). Το διάλυμα μεταφέρθηκε γρήγορα σε αποστειρωμένους σωλήνες Corning των 25 ml, οι οποίοι πωματίστηκαν και αφέθηκαν να ψυχθούν αναποδογυρισμένοι για να φύγουν οι φυσαλίδες. Η γέλη, αφού αφαιρέθηκε από το σωλήνα, κόπηκε με αποστειρωμένη λεπίδα σε δίσκους πάχους 3 mm.

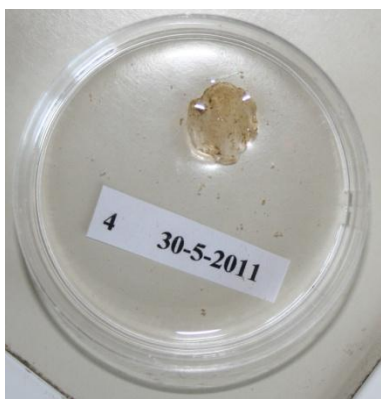
Οι δίσκοι τρυπήθηκαν με πετονιά και τοποθετήθηκαν σε ενυδρεία 100 lt, που είχαν δημιουργηθεί μεσόκοσμοι με τους συνήθεις θαλάσσιους οργανισμούς του Μεσογειακού οικοσυστήματος που εμπλέκονται στη βιοεπίστρωση (φύκη, Ασκίδια, Πολύχαιτοι, Θυσσανόποδα, Βρυόζωα). Οι δίσκοι αφαιρέθηκαν μετά από 15 ημέρες και εκτιμήθηκε με μικροσκοπική εξέταση η βιοεπίστρωση που είχε συντελεστεί, όπως και οι οργανισμοί που είχαν εγκατασταθεί. Η αποτελεσματικότητα εκτιμήθηκε με βάση τη βιοεπίστρωση που είχε συντελεστεί στα δισκία του μάρτυρα. Οι μετρήσεις έγιναν σε τριπλά δείγματα.



Μάρτυρας



Μεταβολίτης **8**



Μεταβολίτης **16**



Μεταβολίτης **24**



Μεταβολίτης **26**

Η αρχική αξιολόγηση, των τεσσάρων φυσικών προϊόντων που ελέγχθηκαν, έδειξε ότι ο μεταβολίτης **8** παρουσίασε σημαντική αναστολή της βιοεπίστρωσης έναντι όλων των μακροοργανισμών του μεσόκοσμου. Η περαιτέρω αξιολόγηση του μεταβολίτη, σε μεγαλύτερη χρονική διάρκεια και εύρος συγκεντρώσεων τόσο στο εργαστήριο όσο και στο πεδίο, έχει ήδη προγραμματιστεί.

4.3.3 Έλεγχος αντιμυκητιασικής δράσης

Λόγω της εμφάνισης ανθεκτικότητας πολλών παθογόνων βακτηρίων σε γνωστά αντιβιοτικά, της εμφάνισης νέων παθογόνων ειδών, αλλά και της ταχείας εξέλιξης που παρουσιάζουν νέες λοιμώξεις, υπάρχει αναμφίβολα άμεση και μεγάλη ανάγκη χρήσης νέων αντιμικροβιακών παραγόντων.

Η άποψη που επικρατούσε στην δεκαετία του '70 ότι η μάχη κατά των μολυσματικών ασθενειών έχει κερδηθεί αποδείχθηκε ανεδαφική μιας και άρχισε βαθμιαία να παρουσιάζεται όλο και πιο συχνό το φαινόμενο της εμφάνισης ανθεκτικότητας σε παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως στους *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* και *Enterococcus faecalis*.

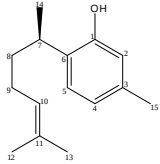
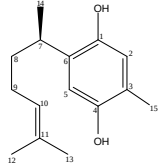
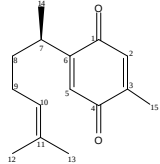
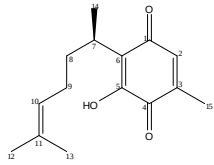
Συνθετικά ανάλογα γνωστών αντιβιοτικών μόνο προσωρινές λύσεις μπορούν να δώσουν, αφού οι υπάρχοντες μηχανισμοί ανάπτυξης αντίστασης γρήγορα και εύκολα προσαρμόζονται για να αντιμετωπίσουν και το νέο παράγωγο. Έτσι, οι στρατηγικές που εφαρμόζονται σήμερα για την ανεύρεση νέων αντιβιοτικών φαρμάκων έχουν σαν κύριο στόχο την ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων χημικών σκελετών, που θα μπορούσαν να αποτελέσουν τα νέας γενιάς αντιβιοτικά. Μία από τις στρατηγικές αυτές είναι και η έρευνα στα φυσικά προϊόντα.

Στα πλαίσια αυτά, ελέγχθηκαν οι μεταβολίτες **8**, **16**, **24** και **26** για την πιθανή αντιμικροβιακή τους δράση. Ο παθογόνος μικροοργανισμός, έναντι του οποίου ελέγχθηκε η δράση τους, ήταν ο μύκητας *Candida albicans*. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 4.60.

Εκτίμηση της ελάχιστης συγκέντρωσης αναστολής (MIC) της ανάπτυξης του παθογόνου μύκητα C. albicans (MLR62)

Οι ελάχιστες συγκεντρώσεις αναστολής (MICs) της ανάπτυξης του παθογόνου μύκητα *Candida albicans* προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο μικροδιάλυσης (NCCLS, 2002). Το στέλεχος *C. albicans* MLR62 καλλιεργήθηκε στους 35°C για 24 h σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα YPD. Υγρό θρεπτικό μέσο YPD εμβολιάστηκε με πέντε αποικίες διαμέτρου 1 mm και επωάστηκε για 4 έως 6 h ώστε το εναιώρημα να αποκτήσει πυκνότητα 10^7 κύτταρα/ml. Εναιώρημα κυττάρων τελικής πυκνότητας $1-5 \times 10^3$ κύτταρα/mL παρασκευάστηκε σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 ρυθμισμένο σε pH 7 στους 25°C. Εναιώρημα της κυτταρικής καλλιέργειας τοποθετήθηκε σε 96τρυπες πλάκες (100 μ L/τρύπα με πυκνότητα $1-5 \times 10^3$ κύτταρα/mL) και σε αυτό προστέθηκαν 100 μ L διαλύματος του υπό έλεγχο μεταβολίτη γνωστής συγκέντρωσης (1-500 μ g/ml σε DMSO). Οι πλάκες επωάστηκαν στους 35°C για 48 h. Ως MIC προσδιορίστηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση του μεταβολίτη που προκάλεσε μείωση 50% της θολερότητας.

Πίνακας 4.60 *In vitro* αναστολή ανάπτυξης του παθογόνου μύκητα *Candida albicans*

Μεταβολίτης	Χημική δομή	MIC (μg/ml)
8		31,25
16		250
24		αδρανής
26		62,5

4.3.4 Έλεγχος επίδρασης στην ενεργοποίηση του παράγοντα HIF-1 (Hypoxia Inducing Factor-1) σε καρκινικά κύτταρα

Υποξία, δηλαδή η κατάσταση μειωμένης παροχής οξυγόνου, προκαλείται όταν τα υπάρχοντα αγγεία στην περιοχή ενός όγκου αποτυγχάνουν να καλύψουν τις αυξημένες απαιτήσεις σε οξυγόνο των γρήγορα πολλαπλασιαζόμενων καρκινικών κυττάρων. Η υποξία είναι κοινό χαρακτηριστικό των συμπαγών όγκων και η έκτασή της συσχετίζεται με προχωρημένα στάδια καρκίνου και αντίσταση στη φαρμακευτική αγωγή.

Σε μία προσπάθεια να επιβιώσουν, τα υποξικά κύτταρα ενεργοποιούν την έκφραση γονιδίων, που προάγουν αγγειογένεση και την περαιτέρω μετάσταση των ίδιων (ένα τέτοιο γονίδιο κωδικοποιεί την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1). Τα νεοσχηματισθέντα αγγεία, συνήθως, αποτυγχάνουν να ωριμάσουν με αποτέλεσμα κάποιες περιοχές του όγκου να παραδίδονται στο υποξικό στρες. Τα υποξικά κύτταρα, έχει αποδειχθεί, ότι είναι πιο επιθετικά και ανθεκτικά σε θεραπεία. Μέχρι σήμερα, κανένα φάρμακο δεν έχει βρεθεί, που να μπορεί να «στοχεύσει» υποξικά καρκινικά κύτταρα.

Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 αποτελεί ένα σημαντικό μοριακό στόχο, για την ανακάλυψη αντικαρκινικών φαρμάκων. Φάρμακα δραστικά κατά της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1, παρεμποδίζουν την αγγειογένεση στα σημεία του όγκου και, κατ'επέκταση, τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Liu *et al*, 2009).

Ο έλεγχος της αναστολής ή της επαγωγής που προκαλούν οι δευτερογενείς μεταβολίτες στην ενεργοποίηση του παράγοντα HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) διενεργήθηκε στην καρκινική σειρά T47D, προερχόμενη από ανθρώπινο καρκίνωμα μαστού.

Κύτταρα της καρκινικής σειράς T47D διατηρούνταν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα (5% CO₂ / 95% αέρας) σε θρεπτικό μέσο DMEM/F12 με γλουταμίνη, το οποίο συμπληρωνόταν με 10% βοδινό εμβρυϊκό ορό, 50 U/mL πενικιλλίνη και 50 μg/mL στρεπτομυκίνη.

Εναιώρημα της κυτταρικής καλλιέργειας τοποθετήθηκε σε 96τρυπες πλάκες (100 μL/τρύπα με πυκνότητα 3×10⁵ κύτταρα/mL) και ακολούθησε επώαση των κυττάρων στους 37°C για 12 h. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα του υπό έλεγχο μεταβολίτη γνωστής συγκέντρωσης (σε DMEM/F12) (100 μL/τρύπα). Μετά από 30 min επώασης, η έκθεση των κυττάρων συνεχίστηκε για 16 h επιπλέον στους 37°C σε υποξικές (5% CO₂ / 1% O₂ / 94% N₂) ή κανονικές (5% CO₂ / 95% αέρας) συνθήκες. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε συσκευή BioTek Synergy HT στα 515 nm με φίλτρο αναφοράς στα 690 nm. Η % αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της

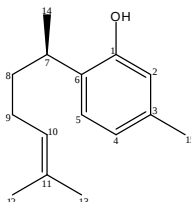
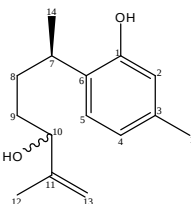
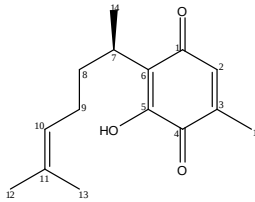
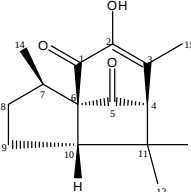
βιωσιμότητάς τους υπολογίσθηκε με βάση τον τύπο: % αναστολή = $1 - \text{OD}_{\text{μεταβολίτη}} / \text{OD}_{\text{μάρτυρα}}$. Ο προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων προσδιορίσθηκε με τη μέθοδο Neutral Red (Borenfreund and Puerner, 1985; Hodges *et al*, 2004).

Για τη λειτουργική δοκιμασία της HIF-1 δράσης κύτταρα T47D μετασχηματίσθηκαν με δείκτη αναφοράς pTK-HRE3-luc ή με το μάρτυρα pGL3-Control με ηλεκτροπόρωση χρησιμοποιώντας το σύστημα ECM830 στα 140 V για 70 ms. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε 96τρυπες πλάκες (πυκνότητα 4.5×10^4 κύτταρα/τρύπα) σε DMEM/F12 με 10% βοδινό εμβρυϊκό ορό και αντιβιοτικά (100 μL /τρύπα). Μετά από 24 h επώασης, προστέθηκε διάλυμα του υπό έλεγχο μεταβολίτη γνωστής συγκέντρωσης (σε DMEM/F12) (100 μL /τρύπα). Μετά από 30 min επώασης, η έκθεση των κυττάρων συνεχίστηκε για 16 h επιπλέον στους 37°C σε υποξικές (5% CO_2 / 1% O_2 / 94% N_2), κανονικές (5% CO_2 / 95% αέρας) ή μιμητικές της υποξίας (10 μM 1,10-φαινανθρολίνη) συνθήκες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα λύθηκαν και προσδιορίστηκε η δράση της λουσιφεράσης, χρησιμοποιώντας απεριθμιτή σπινθηρισμών TopCount, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Διενεργήθηκε έλεγχος της επίδρασης ορισμένων δευτερογενών μεταβολιτών στην ενεργοποίηση του παράγοντα HIF-1.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου επίδρασης των μεταβολιτών στην ενεργοποίηση του παράγοντα HIF-1 και στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων T47D παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.61.

Πίνακας 4.61 Ποσοστά της επίδρασης των μεταβολιτών στην ενεργοποίηση του παράγοντα HIF-1 και στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων T47D.

Μεταβολίτης	HIF-1 (1 μ M)	T47D (1 μ M)	HIF-1 (10 μ M)	T47D (10 μ M)
8				
	-21%	-4%	-6%	0%
13				
	-8%	-1%	-14%	0%
26				
	-24%	-3%	69%	76%
47				
	-5%	-3%	-5%	0%

Με (+) υποδηλώνεται η αναστολή και με (-) η επαγωγή της ενεργοποίησης του παράγοντα HIF-1 και της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων.

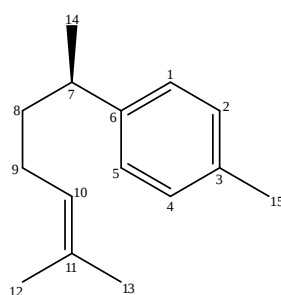
Σε συγκέντρωση 10 μ M, ο μεταβολίτης **26** (περεζόνη) έδειξε σημαντική αναστολή (69%) της ενεργοποίησης του παράγοντα HIF-1 και της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων T47D (76%).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο:
ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Από το οργανικό εκχύλισμα του οργανισμού *Pseudopterogorgia rigida* απομονώθηκαν, με χρωματογραφικούς διαχωρισμούς (VCC, GCC, HPLC), πενήντα έξι δευτερογενείς μεταβολίτες (**1-56**).

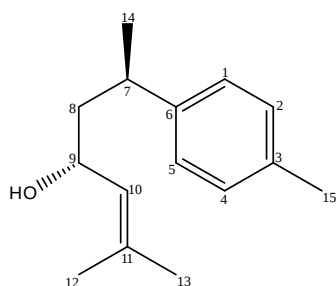
Η απόδοση της δομής των μεταβολιτών, καθώς και η εύρεση της σχετικής στερεοχημείας, επιτεύχθηκαν με χρήση φασματοσκοπίας NMR μίας και δύο διαστάσεων (1D ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, NOE, 2D COSY, NOESY, HMQC, HSQC-DEPT, HMBC), με χρήση φασματομετρίας μάζας (MS, HRMS) και φασματοσκοπιών υπεριώδους (IR) και υπεριώδους (UV).

Ο μεταβολίτης **1** είναι το γνωστό φυσικό προϊόν (-)- α -κουρκουμένιο, από το οποίο πιστεύεται ότι μπορεί να προκύψουν βιοσυνθετικά οι περισσότεροι σεσκιτερπενικοί μεταβολίτες του οργανισμού.

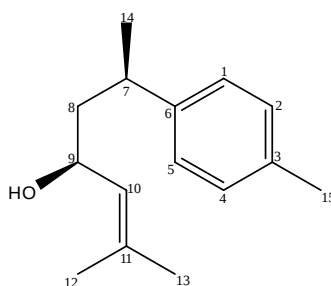


1

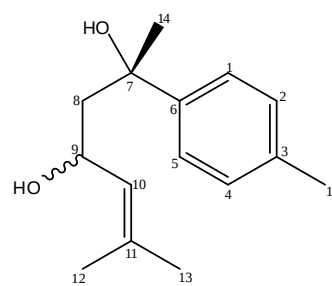
Τα αρωματικά σεσκιτερπένια **2-19** είναι φυσικά προϊόντα με σκελετό μπισαμπολανίου. Για τους μεταβολίτες **4**, **6**, **7** και **11** που έχουν αναφερθεί ως ημισυνθετικά προϊόντα αποδόθηκαν πλήρως τα φασματοσκοπικά τους δεδομένα. Οι μεταβολίτες **9**, **10**, **12**, **17-19** είναι νέα φυσικά προϊόντα.



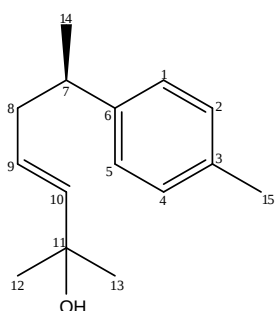
2



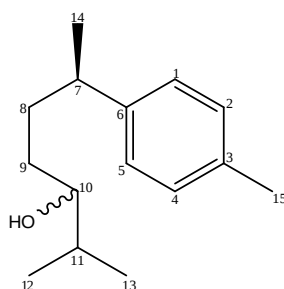
3



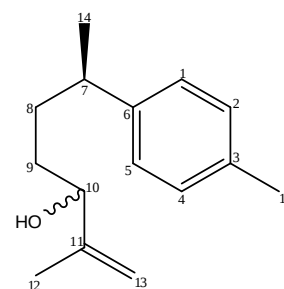
4



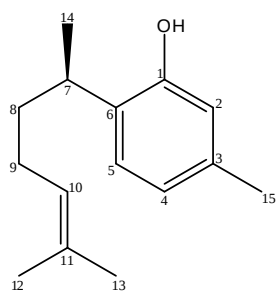
5



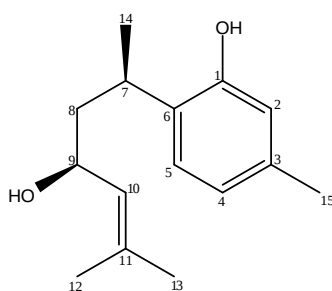
6



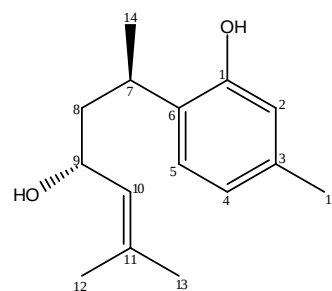
7



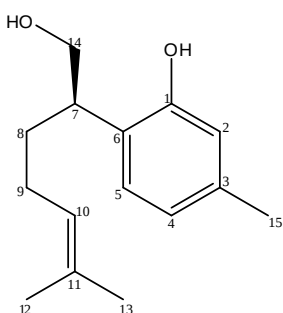
8



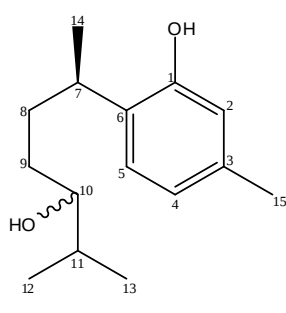
9



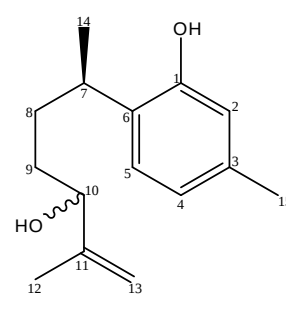
10



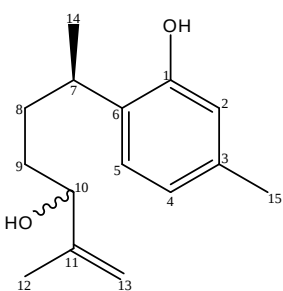
11



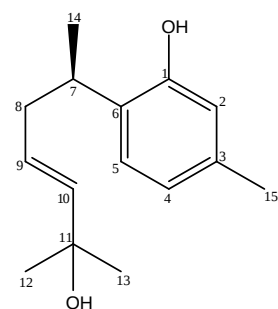
12



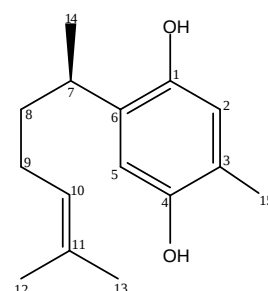
13



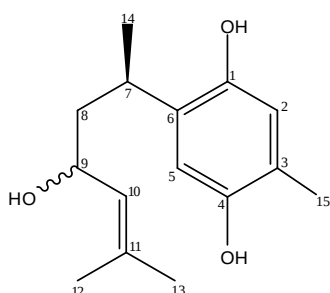
14



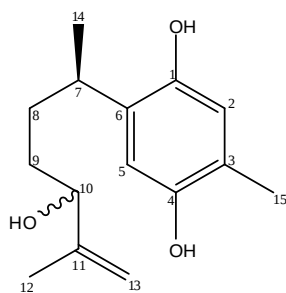
15



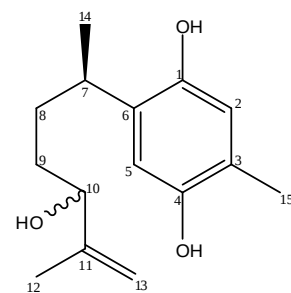
16



17

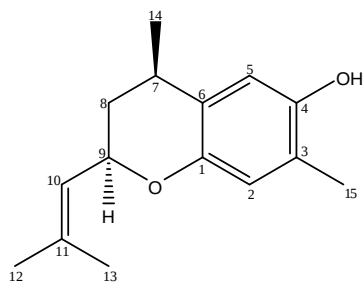


18

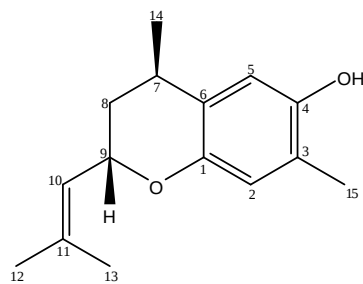


19

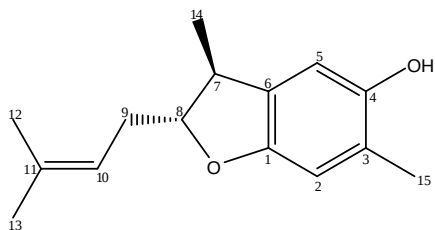
Οι μεταβολίτες **20-23** και **33** είναι ετεροκυκλικά σесκιτερπένια μπισαμπολανίου. Τα **20-22** και **33** είναι νέα φυσικά προϊόντα, ενώ ο μεταβολίτης **23** έχει απομονωθεί στο παρελθόν από τα φύλλα του φυτού *Helianthus annuus*. Οι μεταβολίτες **20-21** παρουσιάζουν γέφυρα οξυγόνου μεταξύ των C-1 και C-9, ενώ οι μεταβολίτες **22-23** μεταξύ των C-1 και C-8. Ο μεταβολίτης **33** φέρει δακτύλιο οξαζολίνης.



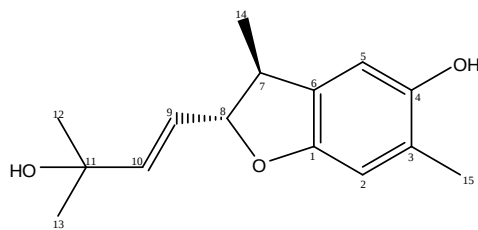
20



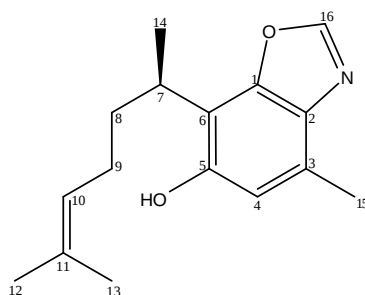
21



22

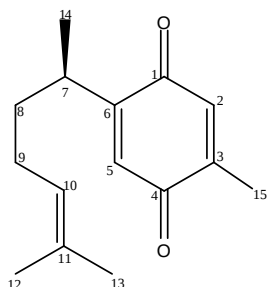


23

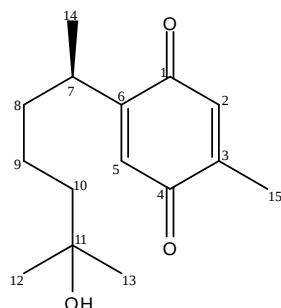


33

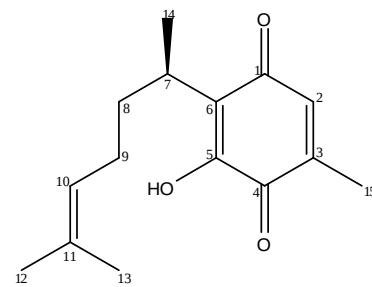
Οι μεταβολίτες **24-32**, **34-36** και **56** είναι σесκιτερπένια μπισαμπολανίου με κινονικό δακτύλιο, εκ των οποίων οι μεταβολίτες **28**, **31**, **32**, **34-36** και **56** αποτελούν νέες δομές. Οι μεταβολίτες **35-36** φέρουν κυκλοπροπανικό δακτύλιο, ενώ ο μεταβολίτης **56** φέρει δεσοξυριβόζη στη θέση 2 του κινονικού δακτυλίου. Για τον μεταβολίτη **26** (περεζόνη) επιβεβαιώθηκε η προτεινόμενη χημική δομή με κρυσταλλογραφική ανάλυση με ακτίνες Χ.



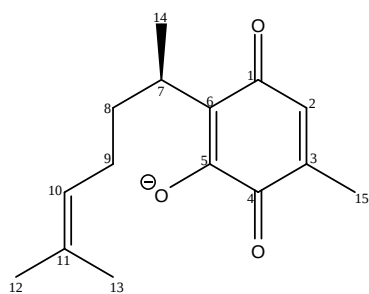
24



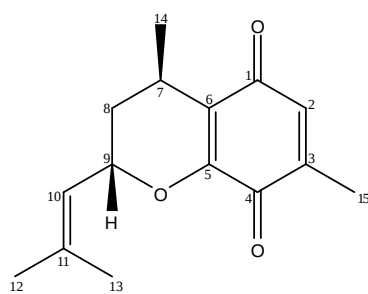
25



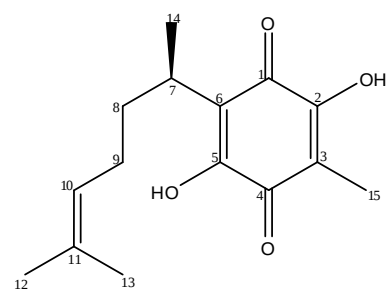
26



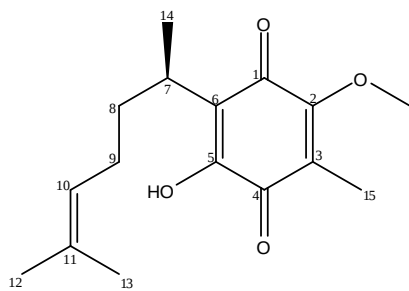
27



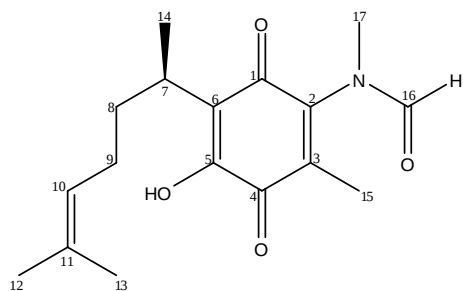
28



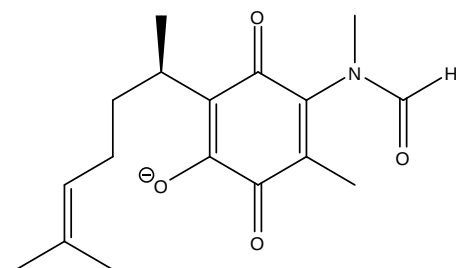
29



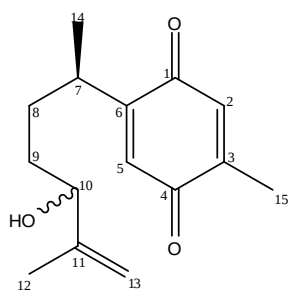
30



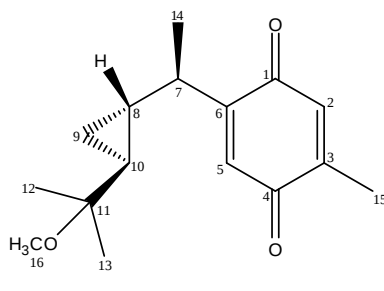
31



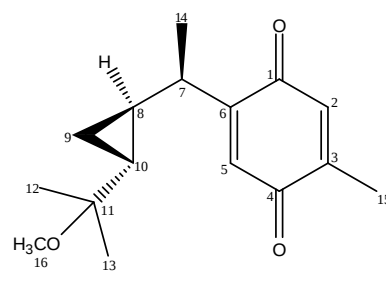
32



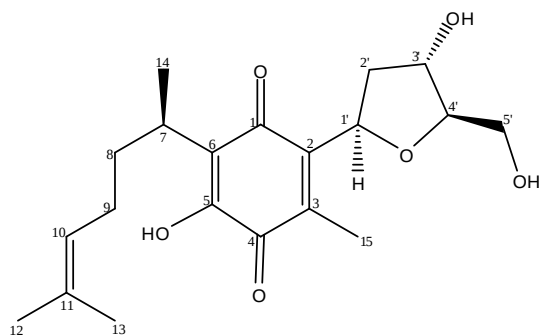
34



35

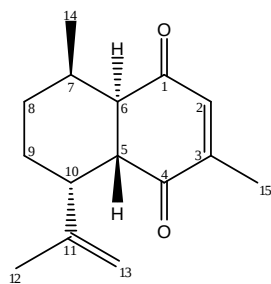


36

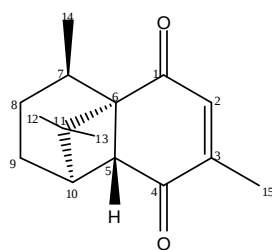


56

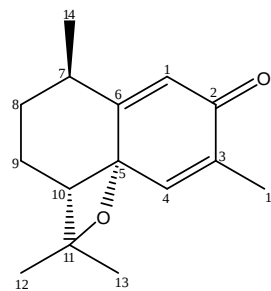
Οι μεταβολίτες **37-43** είναι νέα φυσικά προϊόντα, και συγκεκριμένα σεσκιτερπένια, με σκελετό καδινανίου.



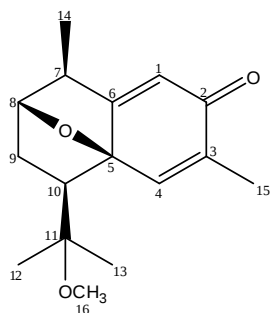
37



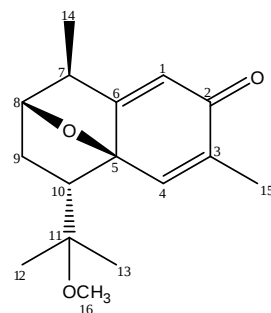
38



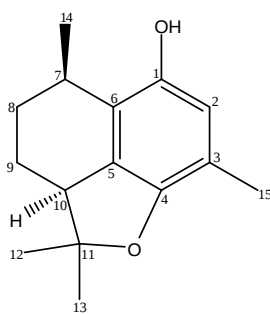
39



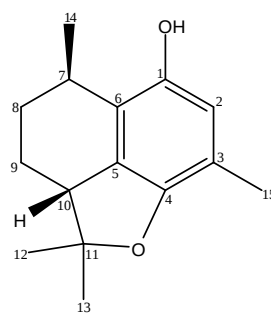
40



41

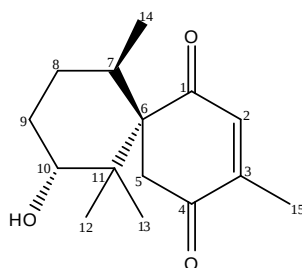


42



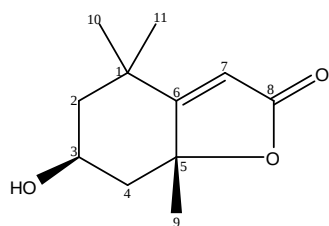
43

Ο μεταβολίτης **44** αποτελεί νέο φυσικό προϊόν με ανθρακικό σκελετό τσαμικρανίου.

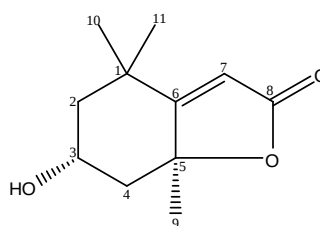


44

Οι μεταβολίτες **45-46** είναι γνωστά παράγωγα οξείδωσης καροτενοειδών. Στο μαλακό κοράλλι *P. rigida*, πιθανόν να εντοπίζονται στο εκχύλισμα προερχόμενα από τις συμβιωτικές ζωοξανθέλλες του οργανισμού που βιοσυνθέτουν τα πρόδρομα καροτενοειδή.

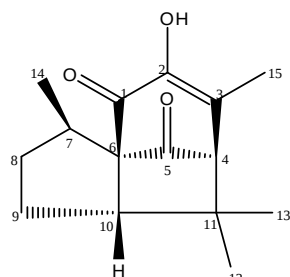


45

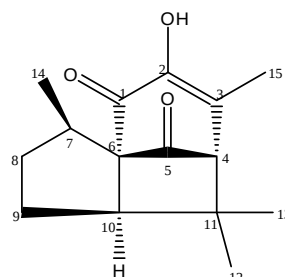


46

Οι μεταβολίτες **47-48** είναι γνωστά φυσικά προϊόντα, με ανθρακικό σκελετό κεδρανίου που έχουν απομονωθεί στο παρελθόν από χερσαίους φυτικούς οργανισμούς και απομονώνονται για πρώτη φορά από θαλάσσιο οργανισμό.

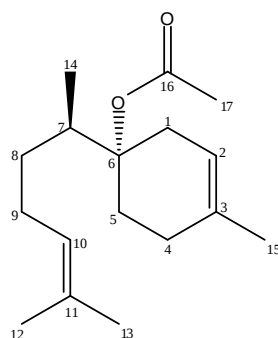


47



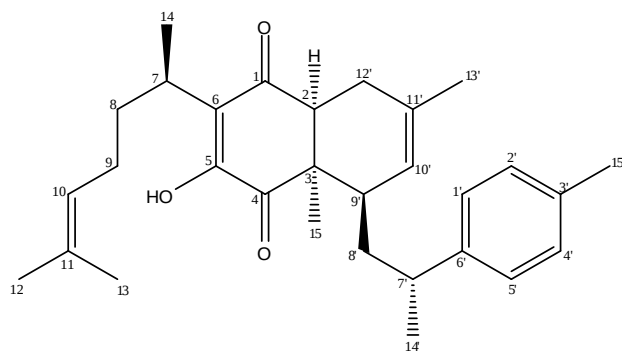
48

Ο μεταβολίτης **49** αποτελεί νέο φυσικό προϊόν με σκελετό μπισαμπολανίου, ο οποίος σε αντίθεση με τη πλειονότητα των απομονωμένων μορίων του κοραλλιού *P. rigida* δεν έχει αρωματικό ή κινονικό δακτύλιο.

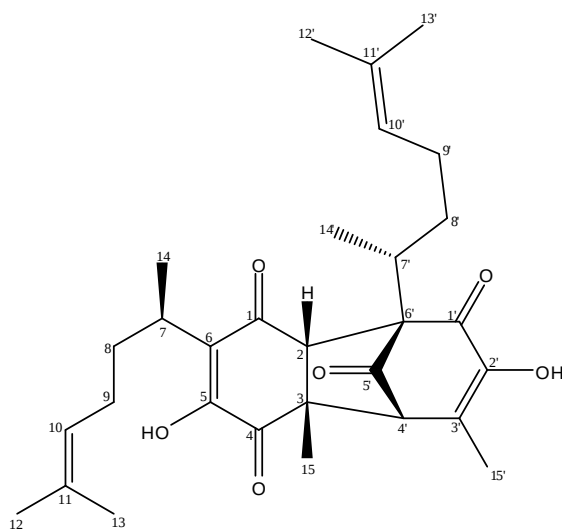


49

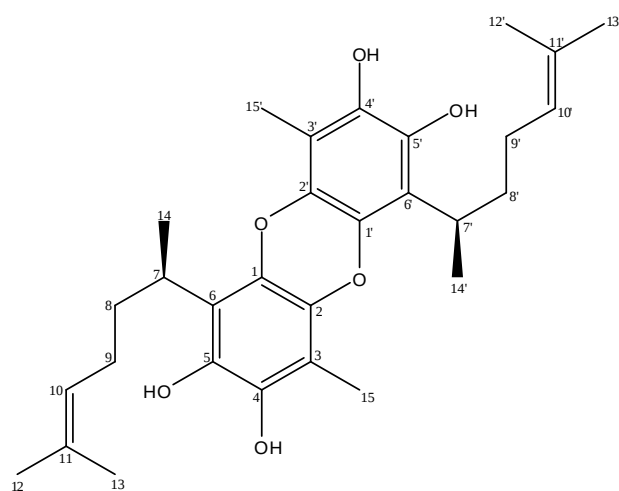
Οι μεταβολίτες **50**, **51** και **52** είναι νέα φυσικά προϊόντα, και συγκεκριμένα διμερή σεσκιτερπένιων.



50

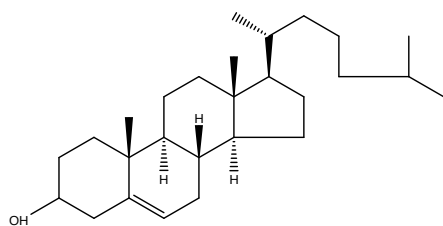


51

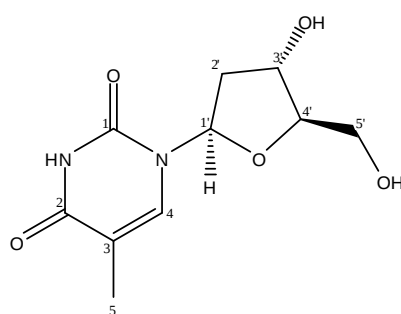


52

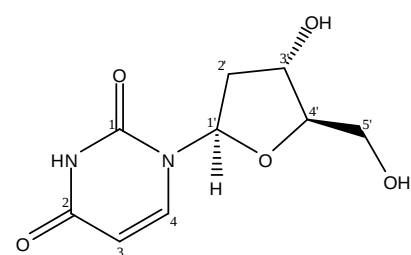
Οι μεταβολίτες **53** (χοληστερόλη) και **54-55** (νουκλεοσιδικά παράγωγα) είναι γνωστά φυσικά προϊόντα, που έχουν απομονωθεί στο παρελθόν και από θαλάσσιους οργανισμούς.



53



54



55

Από τους απομονωθέντες μεταβολίτες, οι **8**, **16**, **18**, **24**, **26**, **27**, **34**, **47** υποβλήθηκαν σε αξιολόγηση της κυτταροτοξικής τους δράσης σε συγκεκριμένες καρκινικές σειρές (NSCLC-N6-L16, A549, NCTC-2544). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες **16** (κουρκουϋδροκινόνη), **18** (4-υδροξυ-αμπολένιο), **26** (περεζόνη) και **34** παρουσίασαν ιδιαίτερα επίπεδα δραστηριότητας στις κυτταρικές σειρές που ελέγχθησαν.

Η αρχική αξιολόγηση, των τεσσάρων φυσικών προϊόντων (**8**, **16**, **24**, **26**) που ελέγχθηκαν για αναστολή της βιοεπίστρωσης έναντι εννέα μικροοργανισμών και των πλέον κοινών μακροοργανισμών, έδειξε ότι ο μεταβολίτης **8** παρουσίασε σημαντική αναστολή της βιοεπίστρωσης έναντι όλων των μακροοργανισμών.

Οι μεταβολίτες **8**, **16**, **24** και **26** ελέγχθηκαν, επίσης, για την πιθανή αντιμυκητιασική τους δράση έναντι του είδους *Candida albicans*, με δραστικότερο όλων τον μεταβολίτη **8**.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου επίδρασης των μεταβολιτών **8**, **13**, **26** και **47** στην ενεργοποίηση του παράγοντα HIF-1 και στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων T47D έδειξαν ότι ο μεταβολίτης **26** (περεζόνη) σε συγκέντρωση 10 μ M, αναστέλλει την ενεργοποίηση του παράγοντα HIF-1 (69%) και τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων T47D (76%).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Abramson S. N., Fenical W., Taylor P. Lophotoxins: Irreversible active-site-directed inhibitors of nicotinic acetylcholine receptors. *Drug Development Res.*, **1991**, 24, 297–312.
- 2) Αποστολοπούλου Μ., Θεσσαλού Μ., Κουσουλάκος Α., Λεγάκις Α., Νικολαΐδου Α. Γενικές Έννοιες Ζωολογίας-Ζωολογία Ασπονδύλων. Πανεπιστήμιο Αθηνών, **1996**.
- 3) Alarcon-Aguilar F. J., Roman-Ramos R., Jimenez-Estrada M., Reyes-Chilpa R., Gonzalez-Paredes B., Flores-Saenz J. L. Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *J. Ethnopharmacol.*, **1997**, 5, 171–177.
- 4) Archer, D. A., Thomson, R. H. Naturally occurring quinones. Part IX. The chemistry of hydroxyperezone and perezinone. *J. Chem. Soc. C: Org. Chem.*, **1967**, 1710-1716.
- 5) Archer D. A., Thomson R. H. The structure of perezone *Chem. Commun.*, **1965**, 15, 354–355.
- 6) Arif J. M., Al-Hazzani A. A., Kunhi M., Al-Khodairy F. Novel Marine Compounds: Anticancer or Genotoxic? *J. Biomed. Biotechnol.*, **2004**, 2, 93–98.
- 7) Ata A., Win H. Y., Holt D., Holloway P., Segstro E. P., Jayatilake G. S. New antibacterial diterpenes from *Pseudopterogorgia elisabethae* *Helv. Chim. Acta*, **2004**, 87, 1090–1098.
- 8) Ata A., Kerr R. G., Moya C. E., Jacobs R. Identification of anti-inflammatory diterpenes from the marine gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Tetrahedron*, **2003**, 59, 4215-4222.
- 9) Ata A. Kerr R. G. Elisabethamine: a new diterpene alkaloid from *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 5821-5825.
- 10) Bai D., Abramson S. N., Sattelle D. B. Actions of a Coral Toxin Analogue (Bipinnatin-B) on an Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Arch. Ins. Biochem. Physiol.*, **1993**, 23, 155-159.
- 11) Baker D. D., Alvi K. A. Small-molecule natural products: new structures, new activities. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2004**, 15, 576-583.
- 12) Bandurraga M. M., Fenical W., Donovan S. F., Clardy J. Pseudopterolide, an irregular diterpenoid with unusual cytotoxic properties from the Caribbean sea whip *Pseudopterogorgia acerosa* (Pallas) (Gorgonacea). *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 6463-6465.
- 13) Belofsky G., Carreno R., Lewis K., Ball A., Casadei G., Tegos G. P. Metabolites of the "Smoke Tree", *Dalea spinosa*, Potentiate Antibiotic Activity against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Nat. Prod.*, **2006**, 69, 261-264.
- 14) Blunt J. W., Copp B. R., Hu W., Munro M. H. G., Northcote P. T., Prinsep M. R. Marine natural products (review). *Nat. Prod. Rep.*, **2009**, 26, 170–244.
- 15) Bohlman, F., Banerjee, S., Jakupovic, J., King, R. M., Robinson, H. Bisabolene derivatives and acetylenic compounds from peruvian *Coreopsis* species. *Phytochemistry*, **1985**, 24, 1295-1297.

- 16) Bordoloi M., Shukla V. S., Nath S. C., Sharma R. P. Naturally occurring cadinenes *Phytochemistry*, **1989**, 28, 2007-2037.
- 17) Borenfreund E., Puerner J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.*, **1985**, 24, 119-124.
- 18) Bosch T. C. G. Control of asymmetric cell divisions: Will cnidarians provide an answer? *BioEssays*, **2004**, 26, 929-931.
- 19) Burgueño-Tapia E., Castillo L., González-Coloma A., Joseph-Nathan P. Antifeedant and Phytotoxic Activity of the Sesquiterpene *p*-Benzoquinone Perezone and Some of its Derivatives *J. Chem. Ecol.*, **2008**, 34, 766-771.
- 20) Burgueño-Tapia E., Joseph-Nathan P. Detailed Studies of Perezone Rearrangements *Monatshefte fur Chemie*, **1997**, 128, 651-658.
- 21) Butler M.S., Capon R.J, Nadeson R., Beveridge A. A. Aromatic bisabolenes from an Australian marine sponge, *Arenochalina sp.* *J. Nat. Prod.*, **1991**, 54, 619-623.
- 22) Carabez, A., Sandoval, F. The action of the sesquiterpenic benzoquinone perezone on electron-transport in biological membranes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1988**, 260, 293-300.
- 23) Carballeira N. M., Sostre A., Rodríguez A. Phospholipid fatty acid composition of gorgonians of the genus *Pseudopterogorgia*: Identification of tetracosapolyenoic acids. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, **1996**, 113, 781-783.
- 24) Chan W. R., Tinto W. F., Laydoo R. S., Manchand P. S., Reynolds W. F., McLean S. Cembrane and pseudopterane diterpenoids of the octocoral *Pseudopterogorgia acerosa*. *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 1773-1776.
- 25) Chan W. R., Tinto W. F., Moore R. New germacrane derivatives from gorgonian octocorals of the genus *Pseudopterogorgia*. *Tetrahedron*, **1990**, 46, 1499-1502.
- 26) Chuzel O., Piva O. Tandem Michael-Wittig-Horner reaction: Application to the synthesis of bisabolanes. *Synthetic Commun.*, **2003**, 33, 393-402.
- 27) Coll J. C. The chemistry and chemical ecology of Octocorals, *Chem. Rev.*, **1992**, 92, 623.
- 28) Coll J. C., Bowden B. F., Tapiolas D. M., Willis R. H., Djura P., Streamer M., Trott L. Studies of Australian soft corals-XXXV. The terpenoid chemistry of soft corals and its implications. *Tetrahedron*, **1985**, 41, 6, 1085-1092.
- 29) Cortes E., Ortiz B., Sanchez-Obregon R., Walls F., Yuste F. The Mass Spectral Fragmentation of Perezone and Related Compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrosc.*, **1997**, 11, 904-906.
- 30) Covell D. G., Huang R., Wallqvist A. Anticancer medicines in development: assessment of bioactivity profiles within the National Cancer Institute anticancer screening data. *Mol. Cancer Ther.*, **2007**, 6, 2261-2270.
- 31) Cragg G., Newman D., Snader K. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, **1997**, 60, 52-60.
- 32) D'Armas H. T., Mootoo B. S., Reynolds W. F. An unusual sesquiterpene derivative from the Caribbean gorgonian *Pseudopterogorgia rigida*. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, 1593-1595.

- 33) De La Pena A., Izaguirre R., Banos G., Viveros M., Enriquez R. G., Fernandez J. M. Effect of perezzone, aminoperezzone and their corresponding isomers isoperezzone and isoaminoperezzone upon in vitro platelet aggregation. *Phytomedicine*, **2001**, 8, 465-468.
- 34) Duque C., Puyana M., Narváez G., Osorno O., Hara N., Fujimoto Y. Pseudopterოსins P-V, new compounds from the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* from Providencia island, Colombian Caribbean. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 10627-10635.
- 35) El Sayed K.A., Yousaf M., Hamann M.T., Avery M.A., Kelly M., Wipf P. Microbial and chemical transformation studies of the bioactive marine sesquiterpenes (S)-(+)-curcuphenol and -curcudiol isolated from a deep reef collection of the Jamaican sponge *Didiscus oxeata*. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 1547-53.
- 36) El Sayed K.A., Bartyzel P., Shen X., Perry T.L., Zjawiony J.K., Hamann M.T. Marine natural products as antituberculosis agents. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 949-953.
- 37) Enhsen A., Karabelas K., Heerding J. M., Moore H. W. Synthesis of hydroxyquinones and related compounds: semisquaric acids, (+-)-terreic acid, (+-)-perezzone and (+-)-isoperezzone. *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 1177-1185.
- 38) Enriquez R. G., Fernandez-G. J. M., Gnecco D., Penicaud A., Reynolds W. F. The crystal and molecular structures of isoperezzone, aminoperezzone, and isoaminoperezzone: a comparative study of their crystal packing. *J. Chem. Crystallogr.*, **1998**, 28, 529-537.
- 39) Enriquez R., Ortega J., Lozoya X. Active components in *Perezia* roots. *J. Ethnopharmacol.* **1980**, 2, 389-393.
- 40) Fenical W. Marine soft corals of the genus *Pseudopterogorgia*: a resource for novel anti-inflammatory diterpenoids. *J. Nat. Prod.* **1987**, 50, 1001-1008.
- 41) Fortman J. L., Sherman D. H. Utilizing the power of microbial genetics to bridge the gap between the promise and the application of marine natural products. *ChemBioChem*, **2005**, 6, 960-978.
- 42) Freyer A. J., Patil A. D., Killmer L., Zuber G., Myers C., Johnson R. K. Rigidone, a sesquiterpene o-quinone from the gorgonian *Pseudopterogorgia rigida*. *J. Nat. Prod.*, **1997**, 60, 309-311.
- 43) Frontana C., Gonzalez I. Effects of the molecular structure on the electrochemical properties of naturally occurring a-hydroxyquinones. An electrochemical and ESR study *J. Electroanal. Chem.*, **2007**, 603, 155-165.
- 44) Fukuda M., Ohkoshi E., Makino M., Fujimoto Y. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. *Chem. Pharm. Bull.*, **2006**, 54, 1465-1468.
- 45) Fusetani N., Sugano M., Matsunaga S., Hashimoto K. (+)-Curcuphenol and dehydrocurcuphenol, novel sesquiterpenes which inhibit H, K-ATPase, from a marine sponge *Epipolapsis* sp. *Experientia*, **1987**, 43, 1234-1235.
- 46) Garcia E., Mendoza V., Guzman A. J. Formation of mansonones from naturally occurring para-benzoquinones. *Nat. Prod. Lett.*, **1997**, 11, 67-72.
- 47) Graf F. Dynamics of proton tautomerism in 2,5-dihydroxy-*p*-benzoquinone: A ¹³C NMR and CNDO study. *Chem. Phys. Lett.*, **1979**, 62, 291-294.

- 48) Harder T., Chun Kwan Lau S., Tam W., Qian P. A bacterial culture-independent method to investigate chemically mediated control of bacterial epibiosis in marine invertebrates by using TRFLP analysis and natural bacterial populations *FEMS Microbiol. Ecol.*, **2004**, 47, 93-99.
- 49) Harper M. Introduction to the chemical ecology of marine natural products. *Edit. McClintock J., Baker B.* Marine Chemical Ecology, CRC Press, New York, **2001**.
- 50) Harvell C. D., Fenical W. Chemical and structural defenses of Caribbean gorgonians (*Pseudopterogorgia* spp.): Intracolony localization of defense. *Limnol. Oceanogr.*, **1989**, 34, 382-389.
- 51) Harvell C. D., Fenical W., Greene C. H. Chemical and structural defenses of Caribbean gorgonians (*Pseudopterogorgia* spp.): Development of an in situ feeding assay *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **1988**, 49, 287-294.
- 52) Harvis C. A., Burch M. T., Fenical W. New marine diterpenoids, including a unique hydroperoxide, from a caribbean gorgonian coral of the genus *Pseudopterogorgia*. *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 4361-4364.
- 53) He H., Kulanthaivel P., Baker B. J., Kalter K., Darges J., Cofield D., Wolff L., Adams L. New antiproliferative and antiinflammatory 9, 11-secoosterols from the gorgonian *Pseudopterogorgia* sp. *Tetrahedron*, **1995**, 51, 51-58.
- 54) Heckrodt T. J., Mulzer J. Marine natural products from *Pseudopterogorgia elisabethae*: Structures, biosynthesis, pharmacology, and total synthesis. *Top. Curr. Chem.*, **2005**, 244, 1-41.
- 55) Hellio C., Berge J. P., Beaupoil C., Le Gal Y., Bourgougnon N. Screening of Marine Algal Extracts for Anti-settlement Activities against Microalgae and Macroalgae. *Biofouling*, **2002**, 18, 205-215.
- 56) Henkel J. Drugs of the Deep. *FDA Consumer*, **1998**, 32, 30-33.
- 57) Hodges T.W., Hossain C.F., Kim Y.-P., Zhou Y.-D., Nagle D.G. Molecular-targeted antitumor agents: the *Saururus cernuus* dineolignans manassantin B and 4-O-demethylmanassantin B are potent inhibitors of hypoxia-activated HIF-1. *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67, 767-771.
- 58) Hodges R., Porte A. L. The structure of loliolide. A terpene from *Lolium perenne*. *Tetrahedron*, **1964**, 20, 1463-1467.
- 59) Holstein T.W., Hobmayer E., Technau U. Cnidarians: An Evolutionarily Conserved Model System for Regeneration? *Developmental Dynamics*, **2003**, 226, 257-267.
- 60) Honwad V. K., Rao A. S. Terpenoids. LXIX. Absolute configuration of (-)- α -curcumene. *Tetrahedron*, **1965**, 21, 2593-604.
- 61) Humann P. Reef Coral Identification. Florida-Bahamas-Caribbean, *Edit. DeLoach Ned, New World Publications, INC, Florida*, **1993**.
- 62) Ioannou E., Abdel-Razik A. F., Alexi X., Vagias C., Alexis M. N., Roussis V. Pregnanes with antiproliferative activity from the gorgonian *Eunicella cavolini*. *Tetrahedron*, **2008**, 64, 11797-11801.

- 63) Izac R. R., Bandurraga M. M., Wasylyk J. M., Dunn F. W., Fenical W. Germacrene derivatives from diverse marine soft-corals (octocorallia). *Tetrahedron*, **1982**, 38, 301-304.
- 64) John L. M. D., Tinto W. F., McLean S., Reynolds W. F. Acerosterol, a novel polyhydroxylated sterol from the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia acerosa*. *J. Nat. Prod.*, **1993**, 56, 144-146.
- 65) Joseph-Nathan P., Burgueno-Tapia E., Santillan R. L. Further $\text{BF}_3 \cdot \text{ET}_2\text{O}$ -catalyzed cycloadditions of sesquiterpenic p-benzoquinones. *J. Nat. Prod.*, **1993**, 56, 1758-1765.
- 66) Joseph-Nathan P., Hernandez-Medel M. D. R., Martinez E., Rojas M., Cerda C. M. Conformation and absolute configuration of naturally occurring parvifoline and several synthetic derivatives. *J. Nat. Prod.*, **1988**, 51, 675-689.
- 67) Joseph-Nathan P., Martinez E., Rojas M., Santillan R. L. The solid-state versus the solution structure of 6-hydroxyperezinone. *J. Nat. Prod.*, **1987**, 50, 860-865.
- 68) Joseph-Nathan P., Gutierrez A., Hernandez J., Roman L., Santillan R. ^{13}C -NMR studies of cendranolides. *J. Nat. Prod.*, **1986**, 49, 79-89.
- 69) Joseph-Nathan P., Hernandez J. D., Roman L. U., Garcia G., Mendoza V., Mendoza S. Coumarin and terpenoids from *Perezia alamani* var. *oolepis*. *Phytochemistry*, **1982**, 21, 1129-1132.
- 70) Joseph-Nathan P., Abramo-Bruno D., Ortega D. A. Carbon- ^{13}C NMR Studies of Benzoquinones. *Org. Magn. Res.*, **1981**, 15, 311-316.
- 71) Joseph-Nathan P., Roman L., Hernandez J., Taira Z., Watson W. H. The stereochemistry of pipitzols and perezols. *Tetrahedron*, **1980**, 36, 731-734.
- 72) Joseph-Nathan P., Mendoza V., Garcia E. The reaction mechanism of the perezone-pipitzol transformation. *Tetrahedron*, **1977**, 33, 1573-1576.
- 73) Joseph-Nathan P., Gonzalez P., Garcia E., Barrios H., Walls F. Further studies on hydroxyperezone derivatives. *Tetrahedron*, **1974**, 30, 3461-3464.
- 74) Joseph-Nathan P., Gonzalez P., Rodriguez V. Terpenoids of *Perezia hebeclada*. *Phytochemistry*, **1972**, 11, 1803-1808.
- 75) Joseph-Nathan P., Gonzalez P. Natural abundance ^{13}C NMR Studies of perezone and derivatives. *Org. Magn. Res.*, **1971**, 3, 23-29.
- 76) Joseph-Nathan P., Reyes J., Gonzalez P. Contribution to the chemistry of perezone. *Tetrahedron*, **1968**, 24, 4007-4013.
- 77) Kashman Y., Rudi A., Gutman-Naveh N. 7-hydroxy (and acetoxo)- α -muurolene from the soft-coral *Heteroxenia fuscescens* *Tetrahedron*, **1978**, 34, 1227-1229.
- 78) Kerr R. G., Rodriguez L. C., Keliman J. A chemoenzymatic synthesis of 9(11)-secosteroids using an enzyme extract of the marine gorgonian *Pseudopterogorgia americana*. *Tetrahedron Lett.*, 1996, 37, 8301-8304.
- 79) Kim M., Kim J. S., Hon, J., Ji M.-J., Lee Y. Cytotoxic activity of the extracts from *Curcuma zedoaria*. *J. Toxicol. Public Health*, **2003**, 19, 293-296.
- 80) Kobayashi M., Kondo K., Osabe K., Mitsuhashi H. Marine terpenes and terpenoids. V. Oxidation of sarcophytol A, a potent anti-tumor-promoter from the soft coral *Sarcophyton*. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, **1988**.

- 81) Kohl A. C., Kerr R. G. Identification and characterization of the pseudopterodin diterpene cyclase, elisabethatriene synthase, from the marine gorgonian, *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2004**, 424, 97-104.
- 82) König G. M., Wright A. D. New and Unusual Sesquiterpenes: Kelsoene, Prespatane, Epi-γ-gurjunene, and T-Cadinthiol, from the Tropical Marine Sponge *Cymbastela hooperi* *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 3837-3840.
- 83) Krol W., Czuba Z., Scheler S., Gabrys J., Grabiec S., Shani J. Antioxidant property of ethanolic extract of propolis as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. *Biochem. Int.*, **1990**, 21, 593-597.
- 84) Li A., Yue G., Li Y., Pana X., Yang T.-K. Total asymmetric synthesis of (7*S*,9*R*)-(+)-bisacumol. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 75-78.
- 85) Lindel T., Jensen P. R., Fenical W., Long B. H., Casazza A. M., Carboni J., Fairchild C. R. Eleutherobin, a new cytotoxin that mimics paclitaxel (taxol) by stabilizing microtubules. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 8744-8745.
- 86) Lissi E., Salim-Hanna M., Pascual C., Del Castillo M. D. Evaluation of total antioxidant potential and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Rad. Biol. Med.*, **1995**, 18, 153-158.
- 87) Liu Y., Veena C. K., Morgan J. B., Mohammed K. A., Jekabsons M. B., Nagle D. G., Zhou Y.
- 88) Methylalpinumisoflavone Inhibits Hypoxia-inducible Factor-1 (HIF-1) Activation by Simultaneously Targeting Multiple Pathways. *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284, 5859-5868.
- 89) Long B. H., Carboni J. M., Wasserman A. J., Cornell L. A., Casazza A. M., Jensen P. R., Lindel T., Fenical W., Fairchild C. R. Eleutherobin, a novel cytotoxic agent that induces tubulin polymerization, is similar to paclitaxel (Taxol). *Cancer Res.*, **1998**, 58, 1111-1115.
- 90) Look S. A., Fenical W. The seco-pseudopterodins, new anti-inflammatory diterpene-glycosides from a Caribbean gorgonian octocoral of the genus *Pseudopterogorgia*. *Tetrahedron*, **1987**, 43, 3363-3370.
- 91) Look S. A., Fenical W., Jacobs R. S., Clardy J. The pseudopterodins: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1986**, 83, 6238-6240.
- 92) Look S. A., Fenical W., Matsumoto G. K., Clardy J. The Pseudopterodins: a new class of antiinflammatory and analgesic diterpene pentosides from the marine sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* (Octocorallia). *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 5140-5145.
- 93) Look S. A., Fenical W., Jacobs R., Clardy J. The pseudopterodins: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1986**, 83, 6238-6240.
- 94) Look S. A., Burch M. T., Fenical W., Qi-tai Z., Clardy J. Kallolide A; antiinflammatory diterpenoid and related lactones from Caribbean octocoral *Pseudopterogorgia kallos* (Bielschowsky). *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 5741-5746.

- 95) Look S. A., Buchholz K., Fenical W. 12-hydroxy-E-γ-bisabolene, a new sesquiterpene alcohol from a Caribbean sea whip of the genus *Pseudopterogorgia* (Gorgonacea, Cnidaria). *Experientia*, **1984**, 40, 931-933.
- 96) Lu J., Xie X., Chen B., She X., Pan X. An enantioselective synthesis of (S)- and (R)-curcuphenol. *Tetrahedron*, **2005**, 16, 1435-1438.
- 97) Macias F. A., Varela R. M., Torres A., Molinillo J. M. G. New Bioactive Plant Heliannuols from Cultivar Sunflower Leaves. *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62, 1636-1639.
- 98) Marrero J., Rodriguez A.D., Barnes C.L. Intricarene, an unprecedented trispiropentacyclic diterpene from the Caribbean sea plume *Pseudopterogorgia kallos*. *Org. Lett.*, **2005**, 7, 1877-1880.
- 99) Marrero J., Rodriguez A.D., Baran P., Raptis R.G. Ciereszkolide: Isolation and structure characterization of a novel rearranged cembrane from the Caribbean Sea plume *Pseudopterogorgia kallos*. *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 0, 3909-3912.
- 100) Marrero J., Rodriguez A.D., Baran P., Raptis R.G. Isolation and characterization of kallosin A, a novel rearranged pseudopterane diterpenoid from the Caribbean sea plume *Pseudopterogorgia kallos* (Bielschowsky). *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 4977-4979.
- 101) Marrero J., Benitez J., Rodriguez A. D., Zhao H., Raptis R. G. Bipinnatins K-Q, minor cembrane-type diterpenes from the West Indian gorgonian *Pseudopterogorgia kallos*: Isolation, structure assignment, and evaluation of biological activities. *J. Nat. Prod.*, **2008**, 71, 381-389.
- 102) Marrero J., Rodriguez A.D., Baran P., Raptis R.G. Isolation and structure of providencin: A highly oxygenated diterpene possessing a unique bicyclo[12.2.0]hexadecane ring system from the sea plume *Pseudopterogorgia kallos*. *Org. Lett.*, **2003**, 5, 2551-2554.
- 103) Maurer B., Grieder A. Sesquiterpenoids from costus root oil (*Saussurea lappa* Clarke). *Helv. Chim. Acta*, **1977**, 60, 2177-9.
- 104) Mayer A. M. S., Glaser K. B., Cuevas C., Jacobs R. S., Kem W., Little R. D., McIntosh J. M., Newman D. J., Potts B. C., Shuster D. E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2010**, 31, 255-265.
- 105) Mayer A. M. S., Jacobson P. B., Fenical W., Jacobs R. S., Glaser K. B. Pharmacological characterization of the pseudopterogens: Novel anti-inflammatory natural products isolated from the Caribbean soft coral, *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Life Sci.*, **1998**, 62, 401-407.
- 106) McBrien H. L., Millar J. G., Rice R. E., McElfresh J. S., Cullen E., Zalom F. G. Sex attractant pheromone of the red-shouldered stink bug *Thyanta pallidovirens*: A pheromone blend with multiple redundant components. *J. Chem. Ecol.*, **2002**, 28, 1797-1818.
- 107) McEnroe F. J., Fenical W. Structures and synthesis of some new antibacterial sesquiterpenoids from the gorgonian coral *Pseudopterogorgia rigida*. *Tetrahedron*, **1978**, 34, 1661-1664.
- 108) Mermet G. Το φαρμακείο της φύσης. *Γεωτρόπιο-Ελευθεροτυπία*, **2002**, 130, 52-65.

- 109) Miller S. L., Tinto W. F., McLean S., Reynolds W. F., Yu M. Bisabolane sesquiterpenes from barbadian *Pseudopterogorgia* spp. *J. Nat. Prod.*, **1995**, 58, 1116-1119.
- 110) Miller S. L., Tinto W. F., Yang J., McLean S., Reynolds W. F. 9,11-Seco-24-hydroxydinosterol from *Pseudopterogorgia americana*. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 1227-1228.
- 111) Minatti A., Dotz K. Enantioselective total synthesis of (-)-Curcuquinone via regioselective chromium-mediated benzannulation. *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 3745-3748.
- 112) Miyazawa T., Fujimoto K., Suzuki T., Yasuda K. Determination of phospholipid hydroperoxides using luminol chemiluminescence –HPLC. *Meth. Enzymol.*, **1994**, 34, 324-332.
- 113) Montalvo D., Amade P., Funel-Le Bon C., Fernandez R., Reyes F. Acerolide, a new cytotoxic cembranolide from the soft coral *Pseudopterogorgia acerosa*. *Nat. Prod. Res.*, **2006**, 20, 548-552.
- 114) Morimoto S., Shindo M., Yoshida M., Shishido K. Syntheses of heliannuols G and H; structure revision of the natural products. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 7353-7356.
- 115) Mullen K., Harvell C. D., Peters E. Coral resistance to disease. *Edit. Rosenberg E.*, **2004**, 378-399.
- 116) Munro M.H.G., Blunt J.W., Dumdei E.J., Hickford S.J.H., Lill R.E., Li S., Battershill C.N., Duckworth A.R. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotechnol.*, **1999**, 70, 15-25.
- 117) Navas M. J., Jimenez A. M. Chemiluminescent methods in alcoholic beverage analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 183-189.
- 118) Naz S., Kerr R. G., Narayanan R. New antiproliferative epoxysecosterols from *Pseudopterogorgia americana*. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 6035-6040.
- 119) NCCLS, **2002**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 2nd ed. NCCLS document M27-A2. NCCLS, Wayne, PA
- 120) Olivera B. M. Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol. Biol. Cell*, **1997**, 8, 2101-2109.
- 121) Ospina C.A., Rodriguez A.D., Zhao H., Raptis R.G. Bipinnapterolide B, a bioactive oxapolycyclic diterpene from the Colombian gorgonian coral *Pseudopterogorgia bipinnata* *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 7520-7523.
- 122) Ospina C. A., Rodriguez A. D., Sanchez J. A., Ortega-Barria E., Capson T. L., Mayer A. M. S. Caucanolides A-F, unusual antiplasmodial constituents from a Colombian collection of the gorgonian coral *Pseudopterogorgia bipinnata*. *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68, 1519-1526.
- 123) Paula V. F., Rocha M. E., de A. Barbosa L. C., Howarth O. W. Aquatidial, a New bis-Norsesquiterpenoid from *Pachira aquatica* Aubl. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2006**, 17, 1443-1446.
- 124) Pawlik J. R., Fenical W. Chemical defence of *Pterogorgia anceps*, a Caribbean gorgonian coral. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **1992**, 87, 183-188.

- 125) Pawlik J. R., Burch M. T., Fenical W. Patterns of chemical defense among Caribbean gorgonian corals: a preliminary survey. *J. Exper. Mar. Biol. Ecol.*, **1987**, 108, 55-66.
- 126) Peckenik J. A. Biology of the invertebrates, *Ed. Kemp M. J.*, WCB, USA, **1996**.
- 127) Πέγκας Γ. Διπλωματική Εργασία. Τμήμα Φαρμακευτικής. ΕΚΠΑ, **2005**.
- 128) Peng J., Franzblau S. G., Zhang F., Hamann M. T. Novel sesquiterpenes and a lactone from the Jamaican sponge *Myrmekioderma styx*. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 9699-9702.
- 129) Pettit G. R., Herald C. L., Ode R. H., Brown P., Gust D. J., Michel C. The isolation of loliolide from an Indian ocean Opisthobranch Mollusc. *J. Nat. Prod.*, **1980**, 43, 752-755.
- 130) Pouchert C., Behnke J. The Aldrich Library of ¹³C and ¹H NMR spectra, *Edition I, vol I*, USA **1993a**.
- 131) Pouchert C., Behnke J. The Aldrich Library of ¹³C and ¹H NMR spectra, *Edition I, vol II*, USA **1993b**.
- 132) Pouchert C., Behnke J. The Aldrich Library of ¹³C and ¹H NMR spectra, *Edition I, vol III*, USA **1993c**.
- 133) Proksch P., Edrada-Ebel R., Ebel R. Drugs from the sea- Opportunites and Obstacles. *Mar. Drugs*, **2003**, 1, 5-17.
- 134) Rodriguez-Hernandez A., Barrios H., Collera O., Enriquez R. G., Ortiz B., Sanchez-Obregon R., Walls F., Yuste F. Isomerization of perezzone into isoperezzone and preparation of dihydroisoperezzone. *Nat. Prod. Lett.*, **1994**, 4, 133-139.
- 135) Rodriguez I. I., Shi Y., Garcia O. J., Rodriguez A. D., Mayer A. M. S., Sanchez J. A., Ortega-Barria E., Gonzalez J. New pseudopterogorgia and seco-pseudopterogorgia diterpene glycosides from two Colombian isolates of *Pseudopterogorgia elisabethae* and their diverse biological activities *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67, 1672-1680.
- 136) Rodriguez I. I., Rodriguez A. D. Homopseudopterogorgia, a new antimycobacterial diterpene alkaloid from *Pseudopterogorgia elisabethae* *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66, 855-857.
- 137) Rodríguez A. D., Rodríguez I. I. Ileabethin: isolation and structure of a new class of perhydroacenaphthene diterpene from the caribbean sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* (Bayer). *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 5601-5604.
- 138) Rodriguez A. D., Ramirez C. Serrulatane diterpenes with antimycobacterial activity isolated from the West Indian sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, 100-102.
- 139) Rodríguez A. D., Shi Y. Structurally diverse terpenoids from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* (Bayer). *Tetrahedron*, **2000**, 56, 9015-9023.
- 140) Rodriguez A. D., Shi Y. New metabolites from the West Indian sea feather *Pseudopterogorgia bipinnata*. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, 1548-1550.
- 141) Rodriguez A. D., Ramirez C., Shi Y. P. The cumbiasins, structurally novel diterpenes possessing intricate carbocyclic skeletons from the West Indian sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* (Bayer) *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 6682-6687.

- 142) Rodríguez A. D., Ramírez C. A marine diterpene with a novel tetracyclic framework from the West Indian gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Org. Lett.*, **2000**, 2, 507-510.
- 143) Rodríguez A. D., Ramírez C., Rodríguez I., Barnes C. L. Novel terpenoids from the West Indian sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* (Bayer). Elisapterosins A and B: rearranged diterpenes possessing an unprecedented. *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 1390-1398.
- 144) Rodríguez A. D., Ramírez C., Medina V., Shi Y. Novel lactones from *Pseudopterogorgia elisabethae* (Bayer). *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 5177-5180.
- 145) Rodríguez A. D., Ramírez C., Rodríguez I. I. Sandresolides A and B: novel nor-diterpenes from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* (Bayer). *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 7627-7631.
- 146) Rodríguez A. D., Shi J. G., Huang S. D. Highly oxygenated pseudopterane and cembranolide diterpenes from the Caribbean Sea feather *Pseudopterogorgia bipinnata*. *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62, 1228-1237.
- 147) Rodríguez A. D., Ramírez C., Rodríguez I. I. Elisabatins A and B: New amphilectane-type diterpenes from the West Indian sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62, 997-999.
- 148) Rodríguez A. D., Shi J. Isolation, structure elucidation & synthesis of bisgersolanolide, a novel heptacyclic bis-diterpenoid from the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia bipinnata*. *Org. Lett.*, **1999**, 1, 337-340.
- 149) Rodríguez A. D., Ramírez C., Rodríguez I. I., Gonzalez E. Novel antimycobacterial benzoxazole alkaloids, from the West Indian sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Org. Lett.*, **1999**, 1, 527-530.
- 150) Rodríguez A. D., Rivera J., Boulanger A. New polyhydroxydinostane sterols from the Caribbean gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia americana*. *Tetrahedron Letters*, **1998**, 39, 7645-7648.
- 151) Rodríguez A. D., Gonzalez E., Huang S. D. Unusual terpenes with novel carbon skeletons from the West Indian sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* (Octocorallia). *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 7083-7091.
- 152) Rodríguez A. D., Soto J. J. Pseudopterane and norcembrane diterpenoids from the Caribbean sea plume *Pseudopterogorgia acerosa*. *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 401-404.
- 153) Rodríguez A. D., Boulanger A., Martinez J. R., Huang S. D. Sesquiterpene lactones from the Caribbean sea plume *Pseudopterogorgia americana*. *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 451-455.
- 154) Rodríguez A.D., Boulanger A. New guaiane metabolites from the Caribbean gorgonian coral, *Pseudopterogorgia americana*. *J. Nat. Prod.*, **1997**, 60, 207-211.
- 155) Rodríguez A. D., Soto J. J. A novel norditerpene from the Caribbean sea plume *Pseudopterogorgia acerosa* (Pallas) *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 4487-4490.
- 156) Rodríguez A. D., Soto J. J. Isolation and structure of aceropterine, a rare pseudopterane alkaloid from the Caribbean sea plume *Pseudopterogorgia acerosa* (Pallas) *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 2687-2690.

- 157) Rodríguez A. D., Boulanger A. Americanolides A - C, new guaianolide sesquiterpenes from the Caribbean sea plume *Pseudopterogorgia americana*. *J. Nat. Prod.*, **1996**, 59, 653-657.
- 158) Rodríguez A. D. The natural products chemistry of West Indian gorgonian octocorals. *Tetrahedron*, **1995**, 51, 4571-4618.
- 159) Rubio M., Ramirez G. G., Jimenez F., Salcedo R., Belmont M. A. About perezone derivatives, a theoretical approach. *J. Mol. Struct.*, **1997**, 397, 239-248.
- 160) Roura-Pérez G., Quiróz B., Aguilar-Martínez M., Frontana C., Solano A., González I., Bautista-Martínez J. A., Jiménez-Barbero J., Cuevas G. Remote Position Substituents as Modulators of Conformational and Reactive Properties of Quinones. Relevance of the π/π Intramolecular Interaction *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 1883-1894.
- 161) Roussakis C., Robillard N., Riou D., Biard J. F., Pradal G., Piloquet P., Debitus C., Verbist J. F. Effects of bistramide A on a non-small-cell bronchial carcinoma line. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1991**, 28, 283-292.
- 162) Ρούσσης Β., Βάγιας Κ. Χημική Οικολογία- Θαλάσσια Φαρμακογνωσία, Αθήνα, **1997**.
- 163) Roussis V., Zhongde W., Fenical W. New antiinflammatory pseudopterogens from the marine octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*. *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 4916-4922.
- 164) Rucker G. Sesquiterpenes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 12, 793-806.
- 165) Sanchez I. H., Mendoza S., Calderon M., Larraza, M. I., Flores H. J. Total Synthesis of (+)-Perezone *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 5077-5079.
- 166) Sanchez I. H., Yanez R., Enriquez R. A Reaction Mechanism Change in the Lewis Acid Catalyzed Perezone-Pipitzol Transformation. *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 2818-2819.
- 167) Sartoratto A., Machado A. L. M., Delarmelina C., Figueira G. M., Duarte M. C. T., Rehder V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, **2004**, 35, 275-280.
- 168) Schmitz F. J., Campbell D. C., Kubo I. Marine natural products: 5 α -cholestane-3 β , 5, 6 β -tetrol: a polyhydroxylated steroid from the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Steroids*, **1976**, 28, 211-221.
- 169) Shi Y., Rodríguez I. I., Rodríguez A. D. Elisapterosins D and E: complex polycyclic diterpenes of the rare elisapterane class of natural products from the Caribbean sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* (Bayer). *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 3249-3253.
- 170) Schmid V., Ono S., Reber-Muller S. Cell-Substrate Interactions in Cnidaria. *Microsc. Res. Techn.*, **1999**, 44, 254-268.
- 171) Sir Simonsen John. The Terpenes. *Cambridge Univ. Press*, **1952**, III, 18.
- 172) Soriano-Garcia M., Toscano R. A., Flores-Valverde E., Montoya Vega F., Lopez-Celis I. Structure of 2-(1,5-Dimethyl-4-hexenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-benzoquinone (Perezone), a Sesquiterpene. *Acta Cryst. Section C*, **1986**, 42, 327-329.
- 173) Sponaugle S. Flow patterns and velocities around a suspension-feeding gorgonian polyp: evidence from physical models. *J. Exper. Mar. Biol. Ecol.*, **1991**, 148, 135-145.
- 174) Sugahara T., Ogasawara K. A new stereocontrolled route to (+)-curcuphenol, a phenolic sesquiterpene from the marine sponge *Didiscus flavus* *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 2215-2217.

- 175) Tardent P. The Cnidarian cnidocyte, a high-tech cellular weaponry *BioEssays*, **1995**, 17, 351-362.
- 176) Tellez J. F., Carvajal K., Cruzz D., Carabez A., Chavez E. Effect of perezone on arrhythmias and markers of cell injury during reperfusion in the anesthetized rat. *Life Sci.*, **1999**, 65, 1615-1623.
- 177) Thomas A. F. Two new sesquiterpenoid ketones from cassia oil. *Helv. Chim. Acta*, **1980**, 63, 1615-18.
- 178) Tinto W. F., Laydoo R. S., Miller S. L., Reynolds W. F., McLean S. 11-Gorgiacerol, a new pseudopteranol from *Pseudopterogorgia acerosa* *J. Nat. Prod.*, **1995**, 58, 1975-1977.
- 179) Tinto W.F., John L., Lough A.J., Reynolds W.F., McLean S. A pseudopterane metabolite of *Pseudopterogorgia acerosa* containing an unusually stable diepoxifuran. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 4661-4664.
- 180) Tinto W. F., John L., Reynolds W. F., McLean S. Novel pseudopteranoloids of *Pseudopterogorgia acerosa*. *Tetrahedron*, **1991**, 47, 8679-8686.
- 181) Tinto W. F., Chan W. R., Reynolds W. F., McLean S. Tobagolide, a new pseudopterane diterpenoid of the octocoral *Pseudopterogorgia acerosa*. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 465-468.
- 182) Τσουκάτου Μ. Μελέτη Βιοδραστικών Μεταβολιτών από Θαλάσσιους Οργανισμούς. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α., **2003**.
- 183) Uehara S., Yasuda I., Takeya K., Itokawa H. New bisabolane sesquiterpenes from the rhizomes of *Curcuma xanthorrhiza* (Zingiberaceae). *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, 37, 237-240.
- 184) Valdés L. J. Lolilide from *Salvia divinorum*. *J. Nat. Prod.*, **1986**, 49, 171.
- 185) Van Beek T. A., Lelyveld G. P. Isolation and identification of the five major sesquiterpene hydrocarbons of Ginger. *Phytochem. Anal.*, **1991**, 2, 26-34.
- 186) Vig O. P., Dua D. M., Gauba R., Puri S. K. Synthesis of (+,-)-2-methyl-6-(4-methylphenyl)-1-hepten-3-one and (+,-)-2-methyl-6-(4-methylphenyl)-3-heptanone. *Indian J. Chem., Section B: Org. Chem.*, **1983**, 22B, 406-7.
- 187) Vig O. P., Sharma S.D., Soni B.R., Sharma M.L. Synthesis of ar-pseudotsugonoxide. *Indian J. Chem., Section B: Org. Chem.*, **1980**, 19B, 353-5.
- 188) Wagner E. R., Moss R. D., Broker R. M., Heeschen J. P., Potts W. J., Dilling M. L. A correction of the structure of perezone. *Tetrahedron Lett.*, **1965**, 47, 4233-4239.
- 189) Wahlberg I., Eklund A. M. Cembranoloids pseudopteranoloids and cubitanoids. *Nat. Prod. Rep.*, **1994**, 2762.
- 190) Wang G., Tang W., Bidigare R. R. Terpenoids As Therapeutic Drugs and Pharmaceutical Agents, Humana Press, **2005**.
- 191) Walls F., Padilla J., Joseph-Nathan P., Giral F., Escobar M., Romo J. Studies in perezone derivatives. Structures of the pipitzols and perezinone. *Tetrahedron*, **1966**, 22, 2387-2399.
- 192) Walls F., Padilla J., Joseph-Nathan P., Giral F., Romo J. The structures of α - and β - pipitzols. *Tetraedron Lett.*, **1965**, 21, 1577-1582.

- 193) Weinheimer A. J. Metzner E. K, Mole M. L. A new marine betaine, norzooanemonin, in the gorgonian *Pseudopterogorgia americana*. *Tetrahedron*, **1973**, 29, 3135-3136.
- 194) Wright A. E., Burres N. S., Schulte G. K. Cytotoxic cembranoids from the gorgonian *Pseudopterogorgia bipinnata*. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 3491-3494.
- 195) Wright A. E., Pomponi S. A., McConnell O. J., Kohmoto S., McCarthy P. J. (+)-Curcuphenol and (+)-Curcudiol, Sesquiterpene Phenols from Shallow and Deep Water Collections of the Marine Sponge *Didiscus flavus*. *J. Nat. Prod.*, **1987**, 50, 976-978.
- 196) Yildiz G., Demiryurek A. T. Ferrous iron-induced luminol chemiluminescence: a method for hydroxyl radical study. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, **1998**, 39, 179-184.