

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Φαρμακογνωστική μελέτη φυτών της οικογένειας Fabaceae

(*Vicia faba, Lotus edulis, Lotus longisiliquosus, Tetragonolobus purpureus, Lathyrus laxiflorus subsp laxiflorus*)

και του είδους *Oryza sativa* (Gramineae)

Αγγελής Αποστόλης

Αθήνα 2011

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

- Α. Λ. Σκαλτσούνης, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ (μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής)

- Β. Ρούσσης, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

- Ε. Μικρός, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

- Δ. Κουρέτας, Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- Σ. Μητάκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ (μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, επιβλέπουσα καθηγήτρια)

- Ν. Αληγιάννης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ (μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής)

- Δ. Σταγκος, Λέκτορας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω:

- Την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Μητάκου Σοφία και επιβλέπουσα της παρούσας διατριβής και τον καθηγητή κ. Σκαλτσούνη Αλέξιο-Λέανδρο, για την επιλογή του θέματος, την εμπιστοσύνη και την καθοδήγησή τους καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.
- Τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής της διδακτορικής διατριβής, τον καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Σοφία Μητάκου, και τον επίκουρο καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη για την διαρκή παρακολούθηση της ερευνητικής μου προσπάθειας.
- Τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής της διδακτορικής διατριβής, τον καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, τον καθηγητή κ. Βασίλειο Ρούσση, τον καθηγητή κ. Εμμανουήλ Μικρό, τον καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα, την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Μητάκου Σοφία, τον επίκουρο καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη και τον λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο, οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διδακτορική διατριβή.
- Όλους τους καθηγητές του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων και ιδιαίτερα τον καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη ο οποίος με έκανε δεκτό στο εργαστήριο και στήριξε την προσπάθεια μου.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ:

- Τον επίκουρο καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη για την συνεργασία και τις εποικοδομητικές συζητήσεις που είχαμε.
- Τον διδάκτορα κ. Καλπουτζάκη Ελευθέριο, για το φωτογραφικό υλικό, τη συλλογή και ταυτοποίηση του φυτικού υλικού, καθώς επίσης και για τις πολύτιμες συμβουλές του σε βοτανικά θέματα. Επίσης, τον επίκουρο καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου κ. Κωνσταντινίδη Θεοφάνη, για την ταυτοποίηση των φυτών που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.
- Την διδάκτορα κ. Χαλαμπαλάκη Μαρία για την σημαντική βοήθειά στις αναλυτικές μεθόδους και στην λήψη και ερμηνεία των φασμάτων μάζας.
- Τον διδάκτορα κ. Κωστίδη Σαράντο για την σημαντική βοήθειά στην λήψη φασμάτων NMR.
- Την διδάκτορα του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου της Θεσσαλίας κ. Σπανού Χρυσούλα για την πραγματοποίηση των βιολογικών μελετών.
- Τον καθηγητή Μικροβιολογίας Τροφίμων στο Τ.Ε.Ι Αθηνών κ. Σπηλιώτη Βασίλη για την πραγματοποίηση των αντιμικροβιακών μελετών.
- Όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του Τομέα Φαρμακογνωσίας, για τη συνεργασία τους.
- Την οικογένεια μου για τη συνεχή συμπαράστασή της.

Πρόλογος

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής είχε ως σκοπό:

- Μελέτη φυτικών ειδών με καλές αντιοξειδωτικές δράσεις, που συμμετέχουν στην Μεσογειακή διατροφή.
- Μελέτη φυτικών ειδών που δεν έχουν διερευνηθεί φυτοχημικά, και εντοπίζονται στον Ελλαδικό χώρο.
- Ενσωμάτωση διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών στη διαδικασία απομόνωσης, με σκοπό τη απόκτηση *αξιόπιστων*, *επαναλήψιμων* και *συγκρίσιμων* αποτελεσμάτων.
- Εφαρμογή νέων μεθόδων στη χρωματογραφία CCC με σκοπό την *γρήγορη* και *αποδοτική* απομόνωση φυσικών προϊόντων.
- Ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών με τη χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών, με έμφαση στις φασματοσκοπίες NMR και HRMS και εξαγωγή ενδεικτικών δεδομένων.

Κατά την παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν φυτοχημικά τα παρακάτω φυτικά είδη:

- *Vicia faba* Fabaceae
- *Lotus edulis* Fabaceae
- *Lotus longisiliquosus* Fabaceae
- *Tetragonolobus purpureus* Fabaceae
- *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* Fabaceae
- *Oryza sativa* Gramineae

Συνολικά ταυτοποιήθηκαν πάνω από 100 δευτερογενείς μεταβολίτες, εκ των οποίων 12 αποδείχθηκαν νέα φυσικά προϊόντα. Επίσης, διερευνήθηκε η δυνατότητα της Χρωματογραφίας Κατ' Αντιροή (CCC) στην απομόνωση φυσικών προϊόντων. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην κατανόηση και ερμηνεία των φασματοσκοπικών τεχνικών NMR και HRMS οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την απόδοση της δομής των απομονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών. Παράλληλα μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των ολικών εκχυλισμάτων και των απομονωμένων ουσιών.

Περιεχόμενα

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή		*i*
Ευχαριστίες		*ii*
Πρόλογος		*iii*
Περιεχόμενα		*iv*
Δευτερογενείς Μεταβολίτες		*vii*
Σχήματα και Εικόνες		*xi*
Πίνακες		*xiv*
Συντομογραφίες		*xx*
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή		*1*
Κεφάλαιο 2: Οικογένεια Fabaceae		*5*
2.1	*Ταξινομική κατάταξη-Βοτανίκα χαρακτηριστικά*	*5*
2.2	*Σημαντικότητα φυτών της οικογένειας Fabaceae*	*8*
Κεφάλαιο 3: Κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών στα εδώδιμα φυτά		*11*
3.1	*Τριτερπένια και Στερόλες*	*11*
3.2	*Φαινολικά οξέα*	*18*
3.3	*Φλαβονοειδή*	*20*
Κεφάλαιο 4: Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CounterCurrent Chromatography CCC)		*26*
4.1	*Γενικά*	*26*
4.2	*Συντελεστής κατανομής K (partition coefficient)*	*27*
4.3	*Βασικοί τύποι Χρωματογραφίας Κατ' Αντιροή*	*28*
4.4	*Οργανολογία*	*30*
4.5	*Βασικές μέθοδοι της Χρωματογραφίας Κατ' Αντιροή*	*32*

4.6 Πλεονεκτήματα Χρωματογραφίας Κατ' Αντιροή 34

4.7 Επιλογή και Έλεγχος Διφασικών Συστημάτων 35

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 5: Αρχική Αξιολόγηση Φυτών της Οικογένειας Fabaceae 39

5.1 Εισαγωγή 39

5.2 Συλλογή-Διαλογή-Εκχύλιση 40

5.3 Χρωματογραφικός έλεγχος εκχυλισμάτων 42

5.3.1 Έλεγχος με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC) 42

5.3.1 Έλεγχος με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) 43

5.4 Βιολογικοί έλεγχοι εκχυλισμάτων 44

5.4.1 Μέτρηση ολικών φαινολικών 44

5.4.2 In vitro έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης-Δοκιμασία DPPH 46

5.4.3 In vitro έλεγχος αντιμεταλαξιογόνου δράσης 48

5.4.4 Έλεγχος ανασταλτικής δράσης επί του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης 54

5.4.5 In vitro έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης 56

5.5 Συμπεράσματα - Επιλογή φυτικού υλικού 62

Κεφάλαιο 6: Φαρμακογνωστική Μελέτη Φυτών της Οικογένειας Fabaceae 64

6.1 Εισαγωγή 64

6.2 Γενικά στοιχεία 66

6.2.1 Γένος Vicia-Είδος V. faba 66

6.2.2 Γένος Lotus-Είδος L. edulis και L. longisiliquosus 73

6.2.3 Γένος Tetragonolobus-Είδος T. purpureus 79

6.2.4 Γένος Lathyrus-Είδος L. laxiflorus subsp laxiflorus 82

6.3 Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών 87

6.3.1 Vicia faba 87

6.3.2 Lotus edulis 102

6.3.3 Lotus longisiliquosus 121

	6.3.4	Tetragonolobus purpureus	137
	6.3.5	Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus	147
6.4	Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών		172
	6.4.1	Vicia faba	172
	6.4.2	Lotus edulis	208
	6.4.3	Lotus longisiliquosus	229
	6.4.4	Tetragonolobus purpureus	267
	6.4.5	Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus	284
6.5	Βιολογικοί έλεγχοι απομονωμένων ουσιών		304
	6.5.1	Γενικά	304
	6.5.2	Vicia faba	305
	6.5.3	Lotus edulis	309
6.6	Συμπεράσματα		313
Κεφάλαιο 7: Φαρμακογνωστική μελέτη του φυτού Oryza sativa			316
7.1	Εισαγωγή		316
7.2	Γενικά στοιχεία		317
	7.2.1	Γένος Oryza-O.sativa	317
	7.2.2	Σταδία επεξεργασίας ρυζιού	322
	7.2.3	Φυτοχημικός χαρακτήρας του O.sativa	324
7.3	Απομόνωση-Ταυτοποίηση-Ελεγχος καθαρότητας γ-ορυζανόλης		326
	7.3.1	Απομόνωση γ-ορυζανόλης	327
	7.3.2	Ταυτοποίηση γ-ορυζανόλης	335
	7.3.3	Έλεγχος καθαρότητας γ-ορυζανόλης	342
7.4	Συμπεράσματα		344
Κεφάλαιο 8: Γενικό Συμπέρασμα - Προοπτικές			345
Βιβλιογραφία			348
Παράρτημα	Φάσματα Φυσικών Προϊόντων		382

ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ

Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 106 μεταβολίτες εκ των οποίων 12 είναι νέα προϊόντα

Vicia faba (24 μεταβολίτες N= νέο φυσικό προϊόν)

MeOH εκχύλισμα

- 3,7-δι- α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**Vfa 1**)
- 3,7-δι- α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (**Vfa 2**)
- 3-O- a-L -αραβυνοπυρανοσυλ-7-O-α-L- ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**Vfa 3**)
- 3-O-a-L -αραβυνοπυρανοσυλ-7-O-α-L- ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (**Vfa 4**)
- 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-a-L -αραβυνοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**Vfa 5**)
- 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ- a-L -αραβυνοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (**Vfa 6**)
- 3-O -β-D-γλυκοπυρανοσυλ-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**Vfa 7**)
- 3-O -β-D-γλυκοπυρανοσυλ-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (**Vfa 8**)
- 3-O-(6''-ακετυλ-β-D-γλυκοπυρανοσυλ)-7-O-α-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**Vfa 9**)
- 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γλυκοπυρανοσυλ)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**Vfa 10**)
- 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γλυκοπυρανοσυλ)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (**Vfa 11**)
- 3-O -β-D-γαλακτοπυρανοσυλ-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**Vfa 12**)
- 3-O -β-D-γαλακτοπυρανοσυλ-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (**Vfa 13**)
- 3-O-(6''-ακετυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**Vfa 14**)
- 3-O-(6''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**Vfa 15**)
- 3-O-(6''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (**Vfa 16**)
- 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**Vfa 17**)
- 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (**Vfa 18**)
- 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-6''-ακετυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**Vfa 19**)
- (6*S*, 9*R*)-Ροσεοσίδης (**Vfa 20**)
- Βυζαντιοσίδης Β (**Vfa 21**)
- μεντικαρπίνη (**Vfa 22**)
- 4-μεθόξυ-2',4'-διυδρόξυ χαλκόνη (**Vfa 23**)
- 7,4'-διϋδρόξυ φλαβώνη (**Vfa 24**)

Lotus edulis (17 μεταβολίτες N= νέο φυσικό προϊόν)

DCM εκχύλισμα

- n-οκταδεκανάλη (**L.ed 1**)
- εικοσανοϊκός εστέρας φυτόλης (**L.ed 2**)
- *α*-αμυρινη, (**L.ed 3**)
- λουπεόλη (**L.ed 4**)
- *β*-σιτοστερόλη (**L.ed 5**)
- βανιλλίνη(**L.ed 6**)
- ολεανολικό οξύ (**L.ed 7**)

MeOH εκχύλισμα

N 3-*O*-(5-*O*-ακετυλ)απιοφουρανοσυλο-7-*O*-*α*-L- ραμνοσυλοκαιμπφερόλη (L.ed 8)

- 3-*O*-(2-*O*-ακετυλ)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**L.ed 9**)
- 3-*O*-(3-*O*-ακετυλ)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**L.ed 10**)
- 3,7-δι-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**Led 11**)

N 3-*O*-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (Led 12)

- 3-*O*-νεοεσπεριδοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**L.ed 13**)
- 3-*O*-γλυκοπυρανοσυλο-7-*O*- ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**L.ed 14**)
- Ατρακτυλιγενίνη (**Led 15**)
- 2-O-β-D-γλυκοπυρανόσυλο ατρακτυλιγενίνη (**Led 16**)
- 2-O-(2'-O-ισοβαλερυλ)-β-D-γλυκοπυρανόσυλ ατρακτυλιγενίνη (**Led-17**)

Lotus longisiliquosus (28 μεταβολίτες N= νέο φυσικό προϊόν)

MeOH εκχύλισμα

- Σαλικυλικό οξύ (**Llo 1**)
- π-υδροξυβενζοϊκο οξύ (**Llo 2**)
- πάρα-υδροξυκιναμικό οξύ (**Llo 3**)
- π-O- *β*-D -γλικοπυρανόσυλο βενζοϊκό οξύ(**Llo 4**)
- 5-O -*β*-D -ξυλοπυρονόσυλο γεντισικό οξύ(**Llo 5**)
- Βενζυλ-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης (**Llo 6**)
- O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο φαινυλαιθανόλη (**Llo 7**)
- (2S, 3S)-1-φαίνυλ-2-υδρόξυ-3-O- *β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-βουτανεδιόλη (**Llo 8**)
- 1-O-μεθυλγλυκοπυρανοσίδης(**Llo 9**)
- O-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης της 3(*Z*)-εξενόλης (**Llo 10**)

***N* 3-O-*β*-D - γλυκοπυρανόσυλο οκτανοϊκό οξύ (Llo 11)**

***N* 2-μέθυλ-2- O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο προπιονικό οξύ (Llo 12)**

- Επιλοταουστραλίνη (**Llo 13**)
- Λιναμαρίνη (**Llo 14**)
- Φουλγιδικό οξύ (**Llo 15**)
- Πινελικό οξυ (**Llo16**)
- Αδενοσίνη(Llo 17)
- Ουριδίνη (Llo 18)
- Προλίνη(Llo 19)

- Λουπιναλμπίνη Α (**Llo 20**)
- ***N*** **5,7,4΄-τριυδρόξυ-8-μεθόξυ-κουμαρονοχρωμόνη (Llo 21)**
- 3- Ο-*β*-D -γαλακτοπυρανόσυλο κερκετίνη (**Llo 22**)
- 3- Ο-*β*-D -γαλακτοπυρανόσυλο ισοραμνετίνη(**Llo 23**)
- ***N*** **3-Ο-(2΄΄- *E* -κουμαρόϋλ)-γαλακτοπυρανόσυλο καιμπφερόλη (Llo 24)**
- ***N*** **3-Ο-(2΄΄-Ο-ξυλοπυρανοσυλο) γαλακτοπυρανοσυλο κερκετίνη (Llo 25)**
- ***N*** **3-(2΄΄-*E*- κουμαρόϋλ)-γαλακτοπυρανόσυλο-7-γλυκοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Llo 26)**
- ***N*** **3-(2΄΄- *E* - κουμαρόϋλ)-γαλακτοπυρανόσυλο-7-γλυκοπυρανοσυλο κερκετίνη (Llo 27)**
- Αζουκισαπονίνη V (**Llo 28**)

Tetragonolobus purpureus (12 μεταβολίτες Ν= νέο φυσικό προϊόν)

H_2O εκχύλισμα

- Γενιστίνη (**T.p 1**)
- Ονονίνη (**T.p 2**)
- Κυναροσίδης (**T.p 3**)
- 7- Ο-*β*-D -γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη (**T.p 4**)
- **N 7-Ο-(2΄΄-*β*-D-απιοφουρανοσυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη (T.p 5)**
- **N 7-Ο-[2΄΄-(5΄΄΄ακετυλ)-*β*-D-απιοφουρανοσυλ]-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη (T.p 6)**
- **N 7-Ο-[2΄΄-(5΄΄΄ακετυλ)-*β*-D-απιοφουρανοσυλ]-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-3΄-Ο- *β*-D-γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη (T.p 7)**
- 2΄- Ο- *β*-D-γλυκοπυρανόσυλο ισοετίνη (**T.p 8**)
- Ουριδίνη (**T.p 9**)
- 5-Ο -*β*-D -ξυλοπυρονόσυλο γεντισικό οξύ (**T.p 10**)
- Πινιτόλης (**T.p 11**)
- Προλίνη (**T.p 12**)

Lathyrus laxiflorus subsp laxiflorus (18 μεταβολίτες Ν= νέο φυσικό προϊόν)

H_2O εκχύλισμα

- π-υδροξυβενζοϊκό οξύ(**Lla 1**)
- Αφζελίνη (**Lla2**)
- Βανιλλικό οξύ (**Lla 3**)
- Σαλικυλικό οξύ (**Lla 4**)
- Κερκετρίνη (**Lla5**)
- Πρωτοκατεχικό οξύ (**Lla 6**)
- Ισοκερκετρίνη (**Lla7**)
- Νικοτιφλορινη (**Lla8**)
- Ρουτίνη (**Lla9**)
- 3-Ο-*β*-D-[6-Ο-*α*-L-(3-Ο-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο) ραμνοπυρανοσυλο] γαλακτοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**Lla 10**)

- 4-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης του βενζοϊκου οξέος (**Lla 11**)
- Σχαφτοσίδης (**Lla 12**)
- Ισοσχαφτοσίδης (**Lla 13**)
- Ουριδίνη (**Lla 14**)
- 3-O (2′′-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλ-6′′-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο κερκετίνης (**Lla 15**)
- Καρλινοσίδης(**Lla 16**)
- Ισοκαρλινοσίδης (**Lla 17**)
- Χλωρογενικό οξύ (**Lla 18**)

MeOH εκχύλισμα

- Αφζελίνη (**Lla2**)
- Κερκετρίνη (**Lla5**)
- Ισοκερκετρίνη (**Lla7**)
- Νικοτιφλορινη (**Lla8**)
- Ρουτίνη (**Lla9**)
- 3-O-*β*-D-[6-O-*α*-L-(3-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο) ραμνοπυρανοσυλο] γαλακτοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (**Lla 10**)
- Σχαφτοσίδης (**Lla 12**)
- Ισοσχαφτοσίδης (**Lla 13**)
- Χλωρογενικό οξύ (**Lla 18**)

Oriza sativa
EtOAc εκχύλισμα

- *trans*- φαιρουλικός εστέρας της κυκλοαρτενόλης
- *trans*- φαιρουλικός εστέρας εστέρας της 24-μεθυλενο-κυκλοαρτενόλης
- *trans*- φαιρουλικός εστέρας εστέρας της καμπεστερόλης
- *trans*- φαιρουλικός εστέρας εστέρας της β-σιτοστερόλης
- *trans*-φαιρουλικός εστέρας της (24S)-κυκλοαρτ-25-εν-3β,24-διόλη
- *trans*-φαιρουλικός εστέρας της (24S)-κυκλοαρτ-25-εν-3β,24-διόλη
- *trans*-φαιρουλικός εστέρας της κυκλοαρτ-23Z-εν-3β,25-διόλη

ΣΧΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΕΣ

Σχήμα 3.1.1: Βιοσυνθετική πορεία σχηματισμού Σκουαλενίου

Σχήμα 3.1.2: **Βασικοί σκελετοί Τετρακυκλικών Τριτερπενίων**

Σχήμα 3.1.3: Βασικοί σκελετοί Πεντακυκλικών Τριτερπενίων

Σχήμα 3.1.4: Βιοσύνθεση Στερολών

Σχήμα 3.2.1: Βιοσυνθετική οδός του σικιμικού οξέος

Σχήμα 3.2.2: Πορεία σχηματισμού φαινυλοπροπανίων

Σχήμα 3.3.1: Βιογενετική συγγένεια των Φλαβονοειδών

Σχήμα 3.3.2: Βιοσύνθεση Φλαβονοειδών

Σχήμα 4.7.1: Σχηματική παράσταση προετοιμασίας δείγματος

Σχήμα 6.2.1: Συστηματική κατάταξη του φυτού *Vicia faba*

Σχήμα 6.2.2: Συστηματική κατάταξη του φυτού *Lotus edulis* L.

Σχήμα 6.2.3: Συστηματική κατάταξη του φυτού *Lotus longisiliquosus* R. de Roemer

Σχήμα 6.2.4: Συστηματική κατάταξη του φυτού *Tetragonolobus purpureus* Moench

Σχήμα 6.2.5: Συστηματική κατάταξη του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp.*laxiflorus* (Desf.) O. Kuntze

Σχήμα 6.3.1: Αρχική επεξεργασία του φυτού *Vicia faba*

Σχήμα 6.3.2: Συνοπτική πορεία απομόνωσης των ουσιών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Vicia faba*

Σχήμα 6.3.3: Αρχική επεξεργασία του φυτού *Lotus edulis*

Σχήμα 6.3.4: Συνοπτική πορεία απομόνωσης των ουσιών του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lotus edulis*

Σχήμα 6.3.5: Συνοπτική πορεία απομόνωσης των ουσιών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lotus edulis*

Σχήμα 6.3.6: Αρχική επεξεργασία του φυτού *Lotus longisiliquosus*

Σχήμα 6.3.7: Συνοπτική πορεία απομόνωσης των ουσιών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lotus longisiliquosus*

Σχήμα 6.3.8: Αρχική επεξεργασία του φυτού *Tetragonolobus purpureus*

Σχήμα 6.3.9: Συνοπτική πορεία απομόνωσης των ουσιών του υδατικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Tetragonolobus purpureus*

Σχήμα 6.3.10: Αρχική επεξεργασία του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*.

Σχήμα 6.3.11: Κλασμάτωση και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το υδατικό εκχυλίσματα του *Lathyrus laxiflorus* subsp. *Laxiflorus.*

Σχήμα 6.3.12: Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το μεθανολικό εκχυλίσματα του *Lathyrus laxiflorus* subsp. *Laxiflorus.*

Σχήμα 6.4.1: Στερεοχημικές διαμορφώσεις των (6*S*, 9*R*)- και (6*R*, 9*R*)-Ροσεοσιση

Σχήμα 6.4.2: Τα τέσσερα πιθανά στερεοϊσομερή της ουσίας 1-φαίνυλ-2-υδρόξυ-3-O- *β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-βουτανεδιόλη

Σχήμα 7.5.1: Συστηματική κατάταξη του φυτού *Oriza sativa*

Σχήμα 7.5.2: Στάδια βιομηχανικής επεξεργασίας ρυζιού

Εικόνα 2.1.1 : Μερικοί εκπρόσωποι της οικογένειας *Fabaceae*

Εικόνα 4.1.1: **Σχηματική παράσταση διαχωρισμού με την Χρωματογραφία Αντιστρόφου Ροής**

Εικόνα 4.4.1: Τα κύρια μέρη ενός οργάνου Χρωματογραφίας Αντιστρόφου Ροής (CCC)

Εικόνα 5.4.1: Μετατροπή DPPH˙ σε DPPH-H

Εικόνα 5.4.2: Σχηματική αναπαράσταση της μετάβασης του πλασμιδιακού DNA από την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην ανοιχτή κυκλική (open circular) και στην γραμμική (linear) διαμόρφωση από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks)

Εικόνα 5.4.3: Σχηματική παράσταση της καταλυτικής δράσης του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης.

Εικόνα 6.2.1: Μερικοί εκπρόσωποι του γένους *Vicia*.

Εικόνα 6.2.2 : Μερικοί εκπρόσωποι του γένους *Lotus.*

Εικόνα 6.2.3 : Μερικοί εκπρόσωποι του γένους *Lathyrus.*

Εικόνα 6.3.1: Χρωματογράφημα του ολικού μεθανολικού εκχυλίσματος του *L. edulis* σε μήκος κύματος 280 nm.

Εικόνα 6.3.2: Χρωματογραφική απεικόνιση της μεταβολής στην κατανομή των ουσιών κατά την επεξεργασία με CCC του μεθανολικού εκχυλίσματος του *L. longisiliquosus* με τη μέθοδο των συνεχόμενων συστημάτων.

Εικόνα 6.3.3: Χρωματογραφική απεικόνιση της μεταβολής στην κατανομή των ουσιών κατά την επεξεργασία με CCC του υδατικού εκχυλίσματος του *T. purpureus* με τη μέθοδο των συνεχόμενων συστημάτων.

Εικόνα 6.3.4: Χρωματογραφήματα μεθανολικού και υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *Laxiflorus* σε μήκη κύματος 280 nm (πάνω) και 365 nm (κάτω).

Εικόνα 6.3.5: Τα χρωματογραφήματα των δύο φάσεων και οι συντελεστές κατανομής για το σύστημα *n-Hept-EtOAc-BuOH-EtOH-H_2O 1-9-5-5-15*

Εικόνα 6.3.6: Χρωματογράφημα HPLC του υδατικού εκχυλίσματος του L. laxiflorus με τις ουσίες που αντιστοιχούν στην κάθε κορυφή

Εικόνα 6.3.7: Χρωματογραφική απεικόνιση της μεταβολής στην κατανομή των ουσιών κατά την επεξεργασία με CCC του μεθανολικού εκχυλίσματος του *L. laxiflorus* με τη μέθοδο των συνεχόμενων συστημάτων

Εικόνα 6.3.8: Χρωματογραφική απεικόνιση των κλασμάτων που λάβαμε κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus* subsp. *Laxiflorus* με CCC χρησιμοποιώντας την μέθοδο των συνεχόμενων συστημάτων (gradient mode).

Εικόνα 6.5.1: Ικανότητα αναστολής ριζών των φαινολικών κλασμάτων του *V. faba*

Εικόνα 6.5.2: Ικανότητα αναστολής ριζών των φαινολικών κλασμάτων του *L. edulis*

Εικόνα 6.5.3: Προστατευτική δράση των κλασμάτων 2 και 3 έναντι των μονόκλωνων σπασιμάτων του DNA που προκαλούνται από τις ρίζες **ROO$^{\bullet}$** και **OH$^{\bullet}$**

Εικόνα 7.5.1: Χρωματογραφήματα CCC σε μήκος κύματος 325 nm. Α) Αναλυτικός διαχωρισμός με το διφασικό σύστημα 3 (c-Hex/AcN/EtOAc 5/4/1) και Β) Αναλυτικός διαχωρισμός με το διφασικό σύστημα 17 (Hept/AcN/BuOH 1.8/1.4/0.7).

Εικόνα 7.5.2: Χρωματογραφήματα CCC σε μήκος κύματος 325 nm. Παρασκευαστικός διαχωρισμός με το διφασικό σύστημα 17 (Hept/AcN/BuOH 1.8/1.4/0.7).

Εικόνα 7.5.3: UPLC-UV χρωματογράφημα (325 nm) του RBO και των κλασμάτων 3 και 5 του παρασκευαστικού CCC.

Εικόνα 7.5.4: Χρωματογραφήματα μάζας των συστατικών της γ-ορυζανόλης στο κλάσμα 5 του RBO.

Εικόνα 7.5.5: Χρωματογραφήματα μάζας των συστατικών της πολικής γ-ορυζανόλης στο κλάσμα 3 του RBO.

Εικόνα 7.5.6: Χρωματογράφημα TIC χρησιμοποιώντας την τεχνική HPLC-APCI-HRMS του Α) RBO σε αρνητικό ιονισμό, Β) RBO σε θετικό ιονισμό και Γ) κλάσματος της γ-ορυζανόλης (κλ. 5) σε θετικό ιονισμό. Εμφανής είναι η απουσία εστέρων γλυκερόλης από το κλ. 5.

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 2.2.1: Καλλιεργούμενες εκτάσεις και παραγωγή κυριοτέρων ψυχανθών σε παγκόσμια κλίμακα

Πίνακας 5.2.1: Ονομασία, τόπος συλλογής τους χρήση των υπό μελέτη φυτών της οικ. Fabaceae.

Πίνακας 5.2.2: Τα βάρη των εκχυλισμάτων των φυτών της οικ. Fabaceae.

Πίνακας 5.3.1: Μέθοδος HPLC για την ανάλυση των ολικών εκχυλισμάτων

Πίνακας 5.4.1: Συνολικό πολυφαινολικό φορτίο των μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας Fabaceae.

Πίνακας 5.4.2: Αποτελέσματα της δοκιμής DPPH των μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας Fabaceae.

Πίνακας 5.4.3: Προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων έναντι των βλαβών του DNA που προκαλούνται από τις Υδρόξυ ελεύθερες ρίζες.

Πίνακας 5.4.4: Προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων έναντι των βλαβών του DNA που προκαλούνται από τις Περόξυ ελεύθερες ρίζες.

Πίνακας 5.4.5: Επίδραση των μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων φυτών της οικ. Fabaceae στη δράση του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης.

Πίνακας 5.4.6: Προσδιορισμός μέγιστης αραίωσης των εκχυλισμάτων με την οποία επιτυγχάνεται η αναστολή των μικροοργανισμών *E. coli, Ps. Aeruginosa, Can. Albicans και St. aureus*

Πίνακας 5.4.7: % ανάπτυξη του μύκητα Asp. niger σε σχέση με το τυφλό την $4^{η}$ μέρα καλλιέργειας για καθορισμένες αραιώσεις των εκχυλισμάτων.

Πίνακας 5.5.1: Ολικά εκχυλίσματα φυτών της οικ. Fabaceae με τις καλύτερες αντιοξειδωτικές και αντιμεταλαξιογόνες ιδιότητες.

Πίνακας 6.2.1: Κατανομή ειδών του γένους γένος *Vicia* στην Ελλάδα

Πίνακας 6.2.2: Κατανομή ειδών του γένους *Lotus* στην Ελλάδα

Πίνακας 6.2.3: Κατανομή ειδών του γένους *Tetragonolobus* στην Ευρώπη

Πίνακας 6.2.4: Κατανομή ειδών του γένους *Lathyrus* στην Ευρώπη

Πίνακας 6.3.1 : Προτεινόμενα προς έλεγχο συστήματα για το διαχωρισμο με CCC του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Vicia faba*.

Πίνακας 6.3.2: Διαχωρισμός του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Vicia faba* με το σύστημα EtOAc: n-BuOH: H_2O 2:1:3.

Πίνακας 6.3.3: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *V. faba* με CCC χρησιμοποιώντας για το διαχωρισμό το σύστημα EtOAc: n-BuOH: H_2O 2:1:3.

Πίνακας 6.3.4: Ουσίες που απομονώθηκαν κατά τη επεξεργασία του φυτού *V. faba.*

Πίνακας 6.3.5 : Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των κλασμάτων του CCC με παρασκευαστική HPLC.

Πίνακας 6.3.6: Συστήματα διαλυτών, τα κλάσματα και τα βάρη τους κατά την αρχική επεξεργασία (Στήλη 1) του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος του *L. edulis* με VLC.

Πίνακας 6.3.7: Προτεινόμενα προς έλεγχο συστήματα για το διαχωρισμό με CCC του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lotus edulis.*

Πίνακας 6.3.8 : Η μέθοδος HPLC που χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των συντελεστών κατανομής στα διφασικά συστήματα του *Lotus edulis*

Πίνακας 6.3.9: Υπολογιζόμενοι συντελεστές κατανομής για τις ουσίες του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lotus edulis.*

Πίνακας 6.3.10: Διαχωρισμός του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lotus edulis* με το σύστημα *Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O 1:4:1:4.*

Πίνακας 6.3.11: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lotus edulis* με CCC χρησιμοποιώντας για το διαχωρισμό το σύστημα *Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O 1:4:1:4.*

Πίνακας 6.3.12: Διαχωρισμός του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lotus edulis* με το σύστημα *EtOAc: n-BuOH: H_2O 2:1:3*

Πίνακας 6.3.13: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lotus edulis* με CCC χρησιμοποιώντας για το διαχωρισμό το σύστημα *EtOAc: n-BuOH: H_2O 2:1:3*

Πίνακας 6.3.14:Σειρά διφασικών συστημάτων για την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του L. longisiliquosus με gradient mode CCC.

Πίνακας 6.3.15: Πορεία διαχωρισμού του μεθανολικού εκχυλίσματος του *L. longisiliquosus* με τη χρήση της τεχνικής (CCC) και τη μέθοδο των συνεχόμενων συστημάτων.

Πίνακας 6.3.16: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *L. longisiliquosus* με gradient mode CCC

Πίνακας 6.3.17: Ουσίες που απομονώθηκαν κατά τη επεξεργασία του φυτού *L. longisiliquosus.*

Πίνακας 6.3.18: Σειρά διφασικών συστημάτων για την επεξεργασία του υδατικού εκχυλίσματος του *T. purpureus* με gradient mode CCC.

Πίνακας 6.3.19: Πορεία διαχωρισμού του υδατικού εκχυλίσματος του *T. purpureus* με τη χρήση της τεχνικής CCC και τη μέθοδο των συνεχόμενων συστημάτων.

Πίνακας 6.3.20: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την του υδατικού εκχυλίσματος του *T. purpureus* με gradient mode CCC.

Πίνακας 6.3.21: Ουσίες που απομονώθηκαν κατά τη επεξεργασία του υδατικού εκχυλίσματος του *T. Purpureus.*

Πίνακας 6.3.22: Προτεινόμενα προς έλεγχο συστήματα για το διαχωρισμό με CCC του υδατικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus*.

Πίνακας 6.3.23: Η μέθοδος HPLC που χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των συντελεστών κατανομής στα διφασικά συστήματα *Lathyrus laxiflorus.*

Πίνακας 6.3.24: Διαχωρισμός του υδατικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus* με το σύστημα *n-Hept-EtOAc-BuOH-EtOH-H_2O 1-9-5-5-15*

Πίνακας 6.3.25: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την επεξεργασία του υδατικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus* με CCC χρησιμοποιώντας για το διαχωρισμό το σύστημα *n-Hept-EtOAc-BuOH-EtOH-H_2O 1-9-5-5-15*

Πίνακας 6.3.26: Ουσίες που απομονώθηκαν κατά τη επεξεργασία του υδατικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus*

Πίνακας 6.3.27: Σειρά διφασικών συστημάτων για την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus* με gradient mode CCC.

Πίνακας 6.3.28: Αποτελέσματα δοκιμής για τη σειρά διφασικών συστημάτων του *Lathyrus laxiflorus*

Πίνακας 6.3.29: Συντελεστές κατανομής για τις ουσίες του μεθανολικού εκχυλίσματος *Lathyrus laxiflorus*

Πίνακας 6.3.30: Πορεία διαχωρισμού του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus* με τη χρήση της τεχνικής CCC και τη μέθοδο των συνεχόμενων συστημάτων.

Πίνακας 6.3.31: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus* με CCC χρησιμοποιώντας για το διαχωρισμό η μέθοδο των συνεχόμενων συστημάτων.

Πίνακας 6.3.32: Ουσίες που απομονώθηκαν κατά τη επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus*

Πίνακας 6.4.1: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3,7-δι- α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 1) και της 3,7-δι- α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 2).

Πίνακας 6.4.2: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O- a-L -αραβυνοπυρανοσυλ-7-O-α-L- ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 3) και της 3-O-a-L -αραβυνοπυρανοσυλ-7-O-α-L- ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 4).

Πίνακας 6.4.3: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-a-L -αραβυνοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 5) και της 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ- a-L -αραβυνοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 6).

Πίνακας 6.4.4: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O -β-D-γλυκοπυρανοσυλ-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 7) και της 3-O -β-D-γλυκοπυρανοσυλ-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 8).

Πίνακας 6.4.5: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γλυκοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 10) και της 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γλυκοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 11).

Πίνακας 6.4.6: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O -β-D-γαλακτοπυρανοσυλ-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 12) και της 3-O -β-D-γαλακτοπυρανοσυλ-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 13).

Πίνακας 6.4.7: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O-(6''-ακετυλ-β-D-γλυκοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 9) και της 3-O-(6''-ακετυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 14).

Πίνακας 6.4.8: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O-(6''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Ρομπινίνη) (Vfa 15) και της 3-O-(6''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 16).

Πίνακας 6.4.9: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλης (Vfa 17) και της 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 18).

Πίνακας 6.4.10: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-6''-ακετυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 19).

Πίνακας 6.4.11: Χαρακτηριστικές τιμές ^{1}H- και ^{13}C- των στερεοϊσομερών του Ροσεοσίδη σε CD_3OD

Πίνακας 6.4.12: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της (6S,9R)-Ροσεοσίδης (Vfa 20) και του Βυζαντιονοσίδης Β (Vfa 21).

Πίνακας 6.4.13: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της μεντικαρπίνης (Vfa 23), της 4-μεθόξυ-2',4'-διυδρόξυ χαλκόνης (Vfa 24) και της 7,4'-διϋδρόξυ φλαβώνης (Vfa 25).

Πίνακας 6.4.14: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της α-αμυρίνης (L.ed-3)και της λουπεόλης (L.ed-4).

Πίνακας 6.4.15: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της *β*-σιτοστερόλης (L.ed-5)και (L.ed-7).

Πίνακας 6.4.16 : Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C της 3-*O*-(2-*O*-ακετυλ)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (L.ed-9) και της 3-*O*-(3-*O*-ακετυλ)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (L.ed-10)

Πίνακας 6.4.17: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-*O*-(5-*O*- ακετυλοαπιοσυλο)-7-*O*- ραμνοσυλοκαιμπφερόλη (L.ed-8)και της 3-*O*-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλης (L.ed-12).

Πίνακας 6.4.18: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C NMR της Ατρακτυλιγενίνη (Led 15), 2-O-β-D-γλυκοπυρανόσυλο ατρακτυλιγενίνη (Led 16) και 2-O-(2'-O-ισοβαλερυλ)-β-D-γλυκοπυρανόσυλ ατρακτυλιγενίνη (Led-17)

Πίνακας 6.4.19: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) του όρθο-υδροξυβενζοϊκό οξύ (L.lo 1), πάρα-υδροξυβενζοϊκο οξύ (L.lo 2), και πάρα-υδροξυσιναμικό οξύ (L.lo 3).

Πίνακας 6.4.20: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) του π-O- *β*-D -γλικοπυρανόσυλο βενζοϊκό οξύ (L.lo 4), και 5-O -*β*-D -ξυλοπυρονόσυλο γεντισικό οξύ (L.lo 5),

Πίνακας 6.4.21: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) του Βενζυλ-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης (L.lo 6), O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο φαινυλαιθανόλη (L.lo 7), και (2S, 3S)-1-φαίνυλ-2-υδρόξυ-3-O- *β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-βουτανεδιόλη (L.lo 8).

Πίνακας 6.4.22: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) του 1-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-εξεν-3(*Z*)- όλη (L.lo 10), 3-O-*β*-D - γλυκοπυρανόσυλο οκτανοϊκό οξύ (L.lo 11),

Πίνακας 6.4.23: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) των 2-μεθυλ-2-O-*β*-D – γλυκοπυρανοσυλο προπιονικό οξύ (L.lo 12), Λιναμαρίνη (L.lo 13) και Επιλοταουστραλίνη (L.lo 14),.

Πίνακας 6.4.24: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) των φουλγιδικό οξύ (L.lo 15), και 9(S),12(S),13(S)- πινελλικό οξύ (L.lo 16).

Πίνακας 6.4.25: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 5,7,4΄-τριυδρόξυ-κουμαρονοχρωμόνης (Λουπιναλμπίνης Α) (L.lo 20), και 5,7,4΄-τριυδρόξυ-8-μεθόξυ-κουμαρονοχρωμόνη (L.lo 21).

Πίνακας 6.4.26: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3- O-*β*-D -γαλακτοπυρανόσυλο κερκετίνη (L.lo 22), και 3- O-*β*-D -γαλακτοπυρανόσυλο ισοραμνετίνη (L.lo 23).

Πίνακας 6.4.27: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O-(2''- κουμαρόϋλ)-γαλακτοπυρανόσυλο καιμπφερόλη (L.lo 24), και 3-O-(2''-O-ξυλοπυρανοσυλο) γαλακτοπυρανοσυλο κερκετίνη (L.lo 25).

Πίνακας 6.4.28: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-(2''-καφεόϋλ)-γαλακτοπυρανόσυλο-7-γλυκοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (L.lo 26), και 3-(2''-καφεόϋλ)-γαλακτοπυρανόσυλο-7-γλυκοπυρανοσυλο κερκετίνη (L.lo 27).

Πίνακας 6.4.29: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της Αζουκισαπονίνης V (L.lo 28).

Πίνακας 6.4.30: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 7- O-*β*-D -γλυκοπυρανόσυλο γεντισεϊνη (T.p 1), και 7- O-*β*-D -γλυκοπυρανόσυλο φορμονονετίνη (T.p 2)

Πίνακας 6.4.31: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 7- O-*β*-D -γλυκοπυρανόσυλο λουτεολίνη (T.p 3), και 7- O-*β*-D -γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη (T.p 4)

Πίνακας 6.4.32: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 7-O-(2′′-*β*-D-απιοφουρανοσυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη (T.p 5), και 7-O-[2′′-(5′′′ακετυλ)-*β*-D-απιοφουρανοσυλ]-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη (T.p 6)

Πίνακας 6.4.33: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 7-O-[2′′-(5′′′ακετυλ)-*β*-D-απιοφουρανοσυλ]-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-3′-O- *β*-D-γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη (T.p 7), και 2′- O- *β*-D-γλυκοπυρανόσυλο ισοετίνη (T.p 8)

Πίνακας 6.4.34: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της (+)-πινιτόλης (T.p 11).

Πίνακας 6.4.35: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR των ουσιών αφζελίνη (Lla 2) και κερκετρίνη (Lla5) σε διαλύτη CD_3OD

Πίνακας 6.4.36: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) του Βανιλλικού οξέως (Lla 3), και Προτοκατεχικού οξέως (Lla 6).

Πίνακας 6.4.37: Φασματοσκοπικά δεδομενα NMR του μεταβολίτη ισοκερκετρινη (Lla5) σε διαλύτη CD_3OD

Πίνακας 6.4.38: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR των ουσιών νικοτιφλορίνη (Lla 8) και ρουτίνη (Lla 9) σε διαλύτη CD_3OD

Πίνακας 6.4.39: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 3-O-*β*-D-[6-O-*α*-L-(3-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο) ραμνοπυρανοσυλο] γαλακτοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Lla 10) σε διαλύτη CD_3OD.

Πίνακας 6.4.40: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR των ουσιών σχαφτοσίδης (Lla 12) και ισοσχαφτοσίδης (Lla 13) σε διαλύτη CD_3OD

Πίνακας 6.4.41: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 3-O-(2′′-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλ-6′′-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο κερκετίνης (Lla 15) σε διαλύτη CD_3OD.

Πίνακας 6.4.42: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR των ουσιών καρλινοσίδης (Lla 16) και ισοκαρλινοσίδης (Lla 17) σε διαλύτη CD_3OD

Πίνακας 6.4.43: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) του Χλωρογενικού οξέως (Lla 18).

Πίνακας 6.5.1: Σύσταση των φαινολικών κλασμάτων του *V. faba* που μελετήθηκαν με την τεχνική DPPH.

Πίνακας 6.5.2: Προστατευτική δράση των φαινολικών κλασμάτων του *V. faba* έναντι βλαβών του DNA που προκαλούνται από τις Περόξυ και Υδρόξυ Ελεύθερες Ρίζες.

Πίνακας 6.5.3: Δραστικότητα των φαινολικών κλασμάτων του *V. faba* ως αναστολεις του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης.

Πίνακας 6.5.4: Σύσταση των φαινολικών κλασμάτων του *L. edulis* που μελετήθηκαν με την τεχνική DPPH.

Πίνακας 6.5.5: Προστατευτική δράση των φαινολικών κλασμάτων του *L. edulis* έναντι βλαβών του DNA που προκαλούνται από τις Περόξυ και Υδρόξυ Ελεύθερες Ρίζες.

Πίνακας 6.5.6: Δραστικότητα των φαινολικών κλασμάτων του *L. edulis* ως αναστολείς του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης.

Πίνακας 7.2.1: Μερικά από τα γνωστότερα είδη και ποικιλίες ρυζιών.

Πίνακας 7.2.2 : Προτεινόμενα προς έλεγχο συστήματα για την ανάλυση του RBO με CCC.

Πίνακας 7.2.3: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την επεξεργασία του RBO με CCC με το σύστημα Hept/AcN/BuOH 1.8/1.4/0.7.

Συντομογραφίες

1-D	μίας διάστασης
2-D	δύο διαστάσεων
A	Απορρόφηση
α	Παράγοντας Διαχωρισμού
[⍰]	ειδική στροφική ικανότητα
Ac	ακετυλ ομάδα
ACN	Ακετονιτρίλιο
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
ax	αξονικός (axial)
br	ευρεία
C	άθρακας
c	συγκέντρωση
c-	κυκλο (cyclo)
CA	Χλωρογενικό οξύ (Chlorogenic acid)
CAS	Chemical Abstracts Service
$CHCl_3$	Χλωροφόρμιο
$CDCl_3$	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
CD_3OD	Δευτεριωμένη μεθανόλη
CoA	Συνένζυμο Α
COSY	COrrelation SpectrometrY
COSY-LR	Long Range COrrelation SpectrometrY
CPC	Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρηση (Centrifugal Partition Chromatography)
°C	βαθμοί Κελσίου
d	διπλή
dd	διπλή διπλή
ddd	διπλή διπλή διπλή
δ	χημική μετατόπιση
DCM	Διχλωρομεθάνιο
DMAPP	Πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
$DPPH^{\bullet}$	2,2-Διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλική ρίζα
E	*Entgegen*, αντίθετα ή *trans*
EI	Βομβαρδισμός με ηλεκτρόνια (Electron Ionisation)
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
ESI	Ηλεκτρονιοψεκασμός
eq	ισημερινός (equatorial)
FAB	Fast Atom Bombardment
FPP	Πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο
Fr	κλάσμα
g	γραμμάρια (grams)
gal	*β*-D-γαλακτοπυρανόση
GCMS	Αέρια Χρωματογταφία – Φασματομετρία Μαζας
glc	*β*-D-γλυκοπυρανόση
GPP	Πυροφωσφορικό γερανύλιο
H	Υδρογόνο
H_3BO_3	Βορικό οξύ
HCl	Υδροχλωρικό οξύ
Hex	Εξάνιο
HIV	Human Immunodeficiency Virus
H_2O	Νερό
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
Hz	Hertz
I	Αναστολή (Inhibition)
IC_{50}	Inhibition concentration
IPP	Πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	σταθερά σύζευξης
K	Σταθερά Κατανομής
λ	μήκος κύματος
kg	χιλιόγραμμα (kilograms)
m	μέτρα (meters)
m-	*meta*
m/e	αναλογία μάζας προς φορτίο ηλεκτρονίου
MeOH	Μεθανόλη
MT	μοριακός τύπος
*μ*g	μικραγραμμάρια (micrograms)
MHz	Megahertz
min	λεπτά (minutes)
ml	χιλιοστόλιτρα (millileters)
mol	mole
σ.τ.	σημείο τήξης
MPa	Megapascal
MS	Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry)
MB	Μοριακό Βάρος
MM	Μοριακός Μοδελισμός
MVA	(+)-Μεβαλονικό οξύ
m/z	αναλογία μάζας προς φορτίο
N	Άζωτο
n-	κανονικό (normal)
N_2	αέριο άζωτο
aOAc	Οξικό νάτριο
nm	νανόμετρα (nanometers)
nOe	nuclear Overhauser effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance)
O	Οξυγόνο
o-	*ortho*
p-	*para*
ppm	parts per million

Pyridine-d_6	Δευτεριωμένη πυριδίνη
q	τετραπλή (quartet)
R	*rectus* / δεξιόστροφος
R_f	Retention factor
R_t	Χρόνος κατακράτησης ή ανάσχεσης (Retention time)
RA	Ροσμαρινικό οξύ (Rosmarinic acid)
rel. int.	σχετική ένταση (relative intensity)
rha	*α*-L-ραμνοπυρανόση
RP	Αντίστροφη φάση (Reverse Phase)
rpm	περιστροφές ανά λεπτό
RSC	Ικανότητα Δέσμευσης Ελευθέρων Ριζών (Radical Scavenging Capacity)
s	απλή (singlet)
S	*sinister* / αριστερόστροφος
sec	δευτερόλεπτα (seconds)
sh	ώμος (shoulder)
t	τριπλή (triplet)
t	χρόνος (time)
T	Θερμοκρασία (Temperature)
TLC	Χρωματογραφία Λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography)
TMS	Τετραμεθυλοσιλάνιο $(CH_3)_4Si$
TOCSY	TOtal Correlated SpectroscopY
UV	Υπεριώδες
V	όγκος (volume)
Vis	ορατό (visible)
VLC	Χρωματογραφία στήλης υπό κενό (Vacuum Liquid Chromatography)
xyl	*β*-D-ξυλοπυρανόση
Z	*Zusammen*, στην ίδια πλευρά ή *cis*
(+)	δεξιόστροφος
(-)	αριστερόστροφο

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στα μέσα του εικοστού αιώνα παρατηρείται μία αλλαγή στις διατροφικές συνήθειες των κατοίκων του δυτικού κόσμου, με τα ζωικά προϊόντα να υποσκελίζουν τα φυτικά στο διαιτολόγιο. Αυτό οφείλεται στη Βιομηχανική Επανάσταση που οδήγησε σε αφθονία προϊόντων διατροφής, με αποτέλεσμα τα φυτικά προϊόντα να περάσουν σε δεύτερη μοίρα. Η δραματική αυτή αλλαγή είχε σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αυξημένη συχνότητα νοσημάτων όπως διάφορα είδη καρκίνου και παθήσεις του καρδιαγγειακού στον δυτικό κόσμο όπου η διατροφή είναι πλούσια σε ζωικά λιπαρά, σε αντίθεση με τους μεσογειακούς λαούς , για τους οποίους τα όσπρια και τα δημητριακά αποτελούν το καθημερινό διαιτολόγιο. Από πολυάριθμες μελέτες προκύπτει ότι το 70% των θανάτων σε χώρες του δυτικού κόσμου οφείλεται στον καρκίνο και στα καρδιαγγειακά νοσήματα. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το 33% των περιπτώσεων καρκίνου και το 50% των καρδιαγγειακών ασθενειών αποδίδεται σε κακή διατροφή[1].

Μία από τις γεωγραφικές περιοχές, της οποίας οι διατροφικές συνήθειες έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων, αποτελεί η Μεσόγειος. Μεγάλος αριθμός στοιχείων συνηγορούν στο γεγονός ότι η Μεσογειακή διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο έναντι μεγάλου αριθμού ασθενειών όπως η στεφανιαία νόσος. Χαρακτηριστικό της είναι η αφθονία των φυτικών προϊόντων όπως φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, όσπρια και ελαιόλαδο. Ιδιαίτερα ωφέλιμη για την υγεία έχει αποδειχθεί η Κρητική διατροφή. Αξίζει να αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια μίας τριαντάχρονης μελέτης της θνησιμότητας των Κρητικών λόγω καρδιαγγειακών νοσημάτων, στην οποία συμμετείχαν 950 άτομα ηλικίας 40-59 ετών, παρατηρήθηκαν μόνον δύο περιστατικά στη διάρκεια των πέντε πρώτων χρόνων[2,3,4].

Τα φρούτα και τα λαχανικά είναι τρόφιμα με χαμηλό ενεργειακό περιεχόμενο. Περιέχουν μεγάλη ποσότητα υγρασίας, ενώ όσον αφορά τα θρεπτικά συστατικά τους αποτελούνται κυρίως από υδατάνθρακες και δεν περιέχουν καθόλου λίπη. Είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τη διατροφή, καθώς πρόκειται για αξιόλογες πηγές μεγάλης ποικιλίας βιταμινών, μεταλλικών στοιχείων και διαιτητικών ινών. Επιπλέον τα φρούτα και τα λαχανικά περιέχουν σε μικρότερη ποσότητα αρκετές βιοδραστικές

ουσίες με πλήθος ευεργετικών ιδιοτήτων για την υγεία, όπως τα φλαβονοειδή (π.χ. κερκετίνη, καιμπφερόλη, ισοραμνετίνη, λουτεολίνη) και άλλες φαινολικές ενώσεις (π.χ. καφεϊκό οξύ). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι Έλληνες θεωρούνται ως ο λαός με την μεγαλύτερη κατανάλωση λαχανικών στο δυτικό κόσμο[2,5].

Τα δημητριακά χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και χαμηλή σε λιπαρά, ενώ είναι αξιόλογες πηγές πρωτεϊνών. Υπάρχουν διαφορές μεταξύ των επεξεργασμένων και ολικής αλέσεως δημητριακών, όσον αφορά την περιεκτικότητά τους σε θρεπτικά συστατικά και διαιτητικές ίνες. Έτσι τα επεξεργασμένα δημητριακά, στα οποία έχει αφαιρεθεί ο φλοιός με διάφορες τεχνικές, αποτελούνται κυρίως από άμυλο και πρωτεΐνες και περιέχουν μικρές ποσότητες βιταμινών και διαιτητικών ινών. Αντιθέτως, τα δημητριακά ολικής αλέσεως είναι πλούσια σε βιταμίνες του συμπλέγματος Β, σε μεταλλικά στοιχεία και διαιτητικές ίνες και επομένως η θρεπτική αξία των προϊόντων ολικής αλέσεως είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή των επεξεργασμένων προϊόντων[6].

Τα εδώδιμα φυτά της οικογένειας Fabaceae (όσπρια) θεωρούνται προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας καθώς περιέχουν μεγάλες ποσότητες υδατανθράκων (55-60%) και πρωτεϊνών (20-25%) και χαμηλά ποσοστά λιπαρών ουσιών (<5%). Επίσης είναι πλούσια σε διαιτητικές ίνες, βιταμίνες του συμπλέγματος Β και μεταλλικά στοιχεία (K, Mg, Ca, Fe). Πέραν όμως της διατροφικής τους αξίας τα λεγουμινώδη περιέχουν και σημαντικές ποσότητες φαινολικών παραγώγων όπως είναι τα φλαβονοειδή (φλαβόνες , φλαβονόλες, ισοφλαβόνες), τα φαινολικά οξέα (παράγωγα του βενζοϊκού και του σιναμικού οξέος και τα λιγνάνια)[7,8,9,10,11,12].

Εκτός από τα παραπάνω πολύ σημαντικά φυτικά προϊόντα, στη Μεσογειακή Διατροφή συμμετέχουν σε μικρότερες ποσότητες και άλλα προϊόντα φυτικής προέλευσης, όπως οι ξηροί καρποί, οι ελιές, το σκόρδο και διάφορα χορταρικά ως σαλάτες. Οι ξηροί καρποί περιέχουν μεγάλες ποσότητες λιπών, κυρίως μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, παρέχοντας έτσι στον οργανισμό τα απαραίτητα λιπαρά οξέα. Επίσης, περιέχουν μεταλλικά στοιχεία και βιταμίνες (βιταμίνη Β και βιταμίνη Ε). Από την άλλη πλευρά οι ελιές, το σκόρδο και τα διάφορα χόρτα είναι ωφέλιμα για την υγεία, λόγω της περιεκτικότητάς τους σε πολυφαινολικά συστατικά που απαντώνται σε μικρότερα ποσά συγκριτικά με τα

μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και αξίζει να διερευνηθούν περαιτέρω.

Σημαντικό στοιχείο της Μεσογειακής διατροφής είναι η μεγάλη περιεκτικότητά σε διαιτητικές ίνες , βιταμίνες και μέταλλα. Οι διαιτητικές ίνες βρίσκονται μόνον σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης, στα οποία αποτελούν τα δομικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη διατροφή ως παράγοντες που βοηθούν την πέψη και γενικότερα την φυσιολογική λειτουργία του εντέρου, ενώ παράλληλα συντελούν στην πρόληψη ασθενειών του γαστρεντερικού συστήματος. Τρόφιμα πλούσια σε διαιτητικές ίνες είναι τα δημητριακά ολικής αλέσεως, τα όσπρια, τα λαχανικά και τα φρούτα[2,6]

Αρκετέ μελέτες των τελευταίων ετών αποδίδουν τις ευεργετικές ιδιότητες της Μεσογειακής διατροφής στην αντιοξειδωτική δράση των συστατικών που λαμβάνονται μέσω αυτής Οι ουσίες αυτές εμφανίζονται σε μικρές ποσότητες στα τρόφιμα φυτικής προέλευσης και σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες δρουν προστατευτικά έναντι χρόνιων ασθενειών. Στην κατηγορία των αντιοξειδωτικών περιλαμβάνονται ουσίες που ποικίλουν στην χημική δομή και λειτουργία. Σημαντικές ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση είναι τα φαινολικά παράγωγα όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή τα λιγνάνια, οι τανίνες κ.α. Απαντούν σε σημαντικές ποσότητες στα φρούτα και τα λαχανικά καθώς και σε πολλά φυτά της οικογένειας Fabaceae. Επίσης πολλές βιταμίνες όπως η βιταμίνη Ε (τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες) και η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) διαθέτουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και απαντούν κυρίως στους ξηρούς καρπούς και τα φρούτα Μια ακόμη κατηγορία ενώσεων με πολύ καλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες είναι οι γ-οριζανόλες οι οποίες απαντούν σε μεγάλες ποσότητες στον φλοιό των καρπών των δημητριακών και κυρίως στο ρύζι.[2,13,14,15,16,17].

Πολλά φυτά που συμμετέχουν στην Μεσογειακή διατροφή περιέχουν κάποιες κατηγορίες βιοδραστικών ουσιών που εμφανίζουν δομικές και κυρίως λειτουργικές ομοιότητες με τα οιστρογόνα και είναι γνωστές ως φυτοοιστρογόνα. Τα φυτοοιστρογόνα εμφανίζονται δραστικά σε ασθένειες όπως οι ορμονοεξαρτόμενες μορφές καρκίνου, το κλιμακτιριακό σύνδρομο, στην οστεοπόρωση και σε διάφορες καρδιαγγειακές παθήσεις. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ενώσεις όπως τερπένια, παράγωγα φαινολικού οξέος, φλαβονοειδή, λιγνάνια κ.α. Πηγές πλούσιες σε

φυτοοιστρογόνα αποτελούν τα δημητριακά, τα όσπρια, τα λαχανικά, τα φρούτα και τα χορταρικά. Απαντούν σε ιδιαίτερα μεγάλες συγκεντρώσεις σε αρκετά εδώδιμα φυτά της οικογένειας Fabaceae όπως φασόλια, φακές, σόγια, αρακάς, μπιζέλια κ.α. Σύμφωνα με επιδημιολογικές και άλλες μελέτες τα μικρά ποσοστά εκδήλωσης διαφορών ορμονοεξαρτόμενων ασθενειών που παρατηρείται στους λαούς της Ασίας σε σχέση με αυτούς του δυτικού κόσμου συνδέονται άμεσα με την μεγάλη κατανάλωση τροφών πλούσιων σε φυτοοιστρογόνα όπως είναι η σόγια και το ρύζι[18,19,20,21,22,23].

Τέλος, θα πρέπει να καταστεί σαφές ότι δεν υπάρχει ένα συγκεκριμένο συστατικό της Μεσογειακής διατροφής που να ενέχει από μόνο του τις ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες. Αυτό που καθιστά το Μεσογειακό διαιτολόγιο τόσο θετικό για τον οργανισμό είναι ο συνδυασμός των τροφών και πιθανότατα οι χημικές αλληλεπιδράσεις από την κατανάλωσή τους.

Κεφάλαιο 2

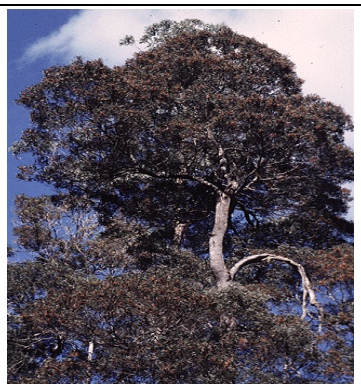
Οικογένεια Fabaceae

2.1 Ταξινομική κατάταξη-Βοτανικά χαρακτηριστικά της οικογένειας Fabaceae

Η οικογένεια *Fabaceae* ή *Leguminoseae* περιλαμβάνει 730 γένη και περισσότερα από 19.200 είδη, γεγονός που την καθιστά την τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια φυτών, μετά από τις Compositae και Orchidaceae. Η ονομασία '*Fabaceae*' προέρχεται από το παλαιότερο γένος *Faba* (το οποίο έχει ενσωματωθεί πια στο γένος *Vicia*) ενώ το '*Leguminoseae*' είναι παλαιότερη ονομασία (η οποία είναι ακόμα σε ισχύ σύμφωνα με το ICBN Art. 18.5 Κώδικας της Βιέννης) και αναφέρεται στον χαρακτηριστικό καρπό τύπου χέδροπα (Legume) των φυτών της οικογένειας.[24,25] Η οικογένεια *Fabaceae* περιλαμβάνει τρις υποοικογένειες: την Mimosoideae με 80 γένη και περίπου 3.200 είδη, την Caesalpinioideae με 170 γένη και 2.000 είδη και την Papilionoideae (πρώην Faboideae) που είναι και η μεγαλύτερη με 470 γένη και 14.000 είδη[26]. Ωστόσο στα ταξινομικά συστήματα φυτών των Arthur Cronguist[27] και Rolf Dahlgren[28] οι παραπάνω υποοικογένειες βρίσκονται στο επίπεδο της οικογένειας αν και η ταξινόμηση αυτή δεν τυγχάνει ευρείας αποδοχής από την επιστημονική κοινότητα. Έτσι, σύμφωνα με το APG III ταξινομικό σύστημα, η ταξινομική κατάταξη των φυτών της οικογένειας *Fabaceae* ή *Leguminoseae* έχει ως εξής:

Βασίλειο: Plantae
Υποβασίλειο: Tracheobionta
Άθροισμα: Spermatophyta
Υποάθροισμα: Angiospermae
Κλάση: Dicotyledones
Υποκλάση: Rosidae
Τάξη: Fabales
Οικογένεια: Fabaceae **Lindl. (1836)** (Leguminosae)
Οιποοικογένεια: Mimosoideae / Caesalpinioideae / Papilionoideae

Η οικογένεια *Fabaceae* περιλαμβάνει φυτά δικοτυλήδονα ετήσια, διετή ή πολυετή, τα οποία ποικίλουν από μικρές πόες έως τεράστια δέντρα. Αντιπρόσωποι της οικογένειας απαντούν σε όλα σχεδόν τα οικοσυστήματα με εξαίρεση τα θαλάσσια και την Ανταρκτική. Η μεγαλύτερη όμως παρουσία των φυτών αυτών παρατηρείται στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές.



Acacia melanoxylon



Hymenaea courbaril



Cassia acutifolia



Trifolium sp.



Lens culinaris



Phaseolus vulgaris

Εικόνα 2.1.1 : Μερικοί εκπρόσωποι της οικογένειας *Fabaceae*

Χαρακτηριστικό γνώρισμα των φυτών της οικογένειας *Fabaceae* αποτελούν τα ψυχόμορφα **άνθη**, οι **καρποί** τύπου **λοβού** καθώς επίσης και η συμβιωτική σχέση που αναπτύσσουν με τα **αζωτοβακτήρια**.



Τα άνθη είναι ισχυρά ζυγόμορφα και αποτελούνται από ένα σωληνοειδή κάλυκα που καταλήγει σε πέντε ανισομήκη ή σχεδόν ισομήκη δόντια και στεφάνη που αποτελείται από πέντε πέταλα τριών διαφορετικών ειδών. Το μεγαλύτερο είναι ο πέτασος, δύο όμοια μεταξύ τους, ελεύθερα το ένα από το άλλο που ονομάζονται πτέρυγες και δύο ενωμένα μεταξύ τους πέταλα που αποτελούν την τρόπιδα. Στο εσωτερικό της τρόπιδας βρίσκονται δέκα στήμονες των οποίων τα

νήματα μπορεί να είναι ενωμένα μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα σωλήνα που περιβάλλει τον ύπερο ή ο ένας να είναι ελεύθερος και οι εννέα ενωμένοι. Στο σύνολο τους μοιάζουν με **πεταλούδα (ψυχή)** και είναι δύσκολο να γίνει σύγχυση με τα άνθη άλλων οικογενειών. Λόγο του χαρακτηριστικού αυτού σχήματος των ανθέων τα φυτά της οικογένειας είναι γνωστά και με τις ονομασίες Ψυχανθή ή Παπιλιονίδες.



Ο καρπός των ψυχανθών, ο οποίος ονομάζεται και **χέδροπας** ή **λοβός** (**legume**), είναι συνήθως επιμήκης, κυλινδρικός ή πεπλατυσμένος και συνήθως περιέχει αρκετούς σπόρους. Ο χέδροπας προέρχεται από επιφυή μονόχωρη ωοθήκη σχηματισμένη από ένα μόνο καρπόφυλλο. Τα δυο τοιχώματα κάθε λοβού συνδέονται με δυο ραφές την κοιλιακή και την νότια, όπου σε μερικά είδη κατά την ωρίμανση ανοίγει είτε η μια είτε και οι δυο ραφές και εκχύνονται οι σπόροι από το εσωτερικό του λοβού. Λόγω της μορφολογίας του καρπού τα φυτά αυτά είναι γνωστά και με τις ονομασίες Χεδροπά και Λεγκουμινώδη.

Τα φύλλα είναι συνήθως σύνθετα, αποτελούμενα από τρία ή περισσότερα φυλλάρια. Στη βάση κάθε φύλου συνήθως απαντάται ένα ζεύγος παράφυλλων το μέγεθος και το σχήμα των οποίων ποικίλει στα διάφορα φυτά. Σε μερικά είδη το ακραίο φυλλάριο μπορεί να αντικαθίσταται από μια απλή η διακλαδιζόμενη έλικα. Το σχήμα των φύλλων ποικίλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των διαφόρων γενών όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα όπου δίνεται η ταξινόμηση των γενών μερικών από τα πιο σπουδαία ψυχανθή των εύκρατων περιοχών.



Τα περισσότερα ψυχανθή διαθέτουν ισχυρό πασσαλώδες ριζικό σύστημα το οποίο έχει την ικανότητα να διεισδύει βαθιά μέσα στο έδαφος. Στις ρίζες των φυτών αυτών παρατηρούνται χαρακτηριστικές εξογκώσεις, τα λεγόμενα φυμάτια. Μέσα σε κάθε φυμάτιο απαντώνται πολυάριθμα βακτήρια του γένους Rhizobium, τα λεγόμενα και αζωτοβακτήρια τα οποία αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με τα φυτά. Τα βακτήρια αυτά είναι

αερόβια και έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο και να το μετατρέπουν σε νιτρικά άλατα, μια μορφή την οποία τα φυτά μπορούν εύκολα να μεταβολίσουν. Η ωφέλεια που προκύπτει για την παγκόσμια γεωργία από την αζωτοδεσμευτική δράση των αζωτοβακτηρίων είναι τεράστια και δεδομένου ότι, λίγα μόνο φυτά άλλων οικογενειών έχουν αυτήν τη δυνατότητα, αντιλαμβανόμαστε πόσο μεγάλη είναι η συμβολή των ψυχανθών σε αυτή τη διαδικασία της βιολογικής ανακύκλωσης.

2.2 Σπουδαιότητα φυτών της οικογένειας Fabaceae

Από οικονομικής απόψεως η οικογένεια *Fabaceae* περιλαμβάνει σημαντικά φυτά και κατατάσσεται στη δεύτερη θέση μετά την οικογένεια *Graminae*. Η σπουδαιότητα των ψυχανθών είναι πολύ μεγάλη, τόσο σαν τροφές για τον άνθρωπο, όσο και σαν ζωοτροφές. Το εδώδιμο τμήμα αποτελεί ο καρπός και τα σπέρματα ενώ τα είδη που καλλιεργούνται για το σκοπό αυτό ανήκουν κυρίως στα γένη *Apios, Arachis, Cicer, Glycine, Glycyrrhiza, Lens, Phaseolus, Pisum, Vicia* και *Vigna*. Οι πόες των παραπάνω φυτών καθώς και είδη που ανήκουν στα γένη *Anthylis, Ceratonia, Coronilla, Galega, Lathyrus, Lotus, Lupinus, Medicago, Melilotus, Trifolium* και *Trigonella* καλλιεργούνται σε μεγάλες ποσότητες για την παραγωγή ζωοτροφών.

Τα φασόλια, τα μπιζέλια, τα κουκιά και τα ρεβίθια είναι τα σπουδαιότερα όσπρια και αντιπροσωπεύουν το 80% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής οσπρίων, ενώ η μηδική και η σόγια αποτελούν δύο από τα πιο σπουδαία κτηνοτροφικά φυτά παγκοσμίως. Επιπλέον, η σόγια μαζί με την αραχίδα αποτελούν δυο από τα κυριότερα ελαιοπαραγωγικά φυτά του κόσμου. Η μεγάλη οικονομική σπουδαιότητα των ψυχανθών καταδεικνύεται στον παρακάτω πίνακα, όπου φαίνονται οι καλλιεργούμενες εκτάσεις και η ετήσια παραγωγή παγκοσμίως των κυριοτέρων φυτών της οικογένειας που χρησιμοποιούνται είτε ως τρόφιμα είτε ως ζωοτροφές.

Πίνακας 2.2.1: Καλλιεργούμενες εκτάσεις και παραγωγή κυριοτέρων ψυχανθών σε παγκόσμια κλίμακα*

	Έκταση (στρέμματα)	Παραγωγή (τόνοι)
Μηδική (σανός)	330.000.000	_
Σόγια	310.000.000	36.000.000
Ξερά φασόλια	230.000.000	12.000.000
Αραχίδα	188.000.000	18.500.000
Ρεβίθια	110.000.000	7.000.000
Ξερά μπιζέλια	90.000.000	11.000.000
Κουκιά	47.000.000	6.000.000
Καγιάνος	29.000.000	2.000.000
Βίγνα	26.000.000	1.000.000
Φακή	20.000.000	1.270.000
Βίκος	20.000.000	2.000.000
Λοιπά όσπρια	11.000.000	900.000
Λούπινα	9.500.000	800.000

* Στοιχεία FAO, Production Yearbooks

Τα όσπρια είναι τροφές πλούσιες σε υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Οι υδατάνθρακες, κυρίως άμυλο, αποτελούν το 60% περίπου, ενώ οι πρωτεΐνες το 17-30% και σε αυτές οφείλεται η μεγάλη θρεπτική άξια των οσπρίων. Επίσης, είναι σχετικά πλούσια σε σίδηρο και ασβέστιο, περιέχουν ικανοποιητικές ποσότητες νιασίνης και θειαμίνης και μικρές ποσότητες καροτένιων, ριβοφλαβίνης και ασκορβικού οξέος. Αποτελούν σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής διατροφής, μειώνουν τα επίπεδα χοληστερίνης και βοηθούν στη σωστή λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος[29]. Σύμφωνα δε με τελευταίες μελέτες, τα όσπρια ασκούν μια προστατευτική δράση έναντι διάφορων τύπων καρκίνου και συμβάλουν στην αντιμετώπιση του εμμηνοπαυσιακού συνδρόμου[30].

Εκτός από τις δύο προαναφερθείσες χρήσεις στην οικογένεια *Fabaceae* ανήκουν φυτά τα οποία χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς, για ξυλεία, μερικά καλλωπιστικά φυτά, καθώς και φυτά με διάφορες άλλες χρήσεις.

Η οικογένεια *Fabaceae* παρουσιάζει τεράστιο επιστημονικό ενδιαφέρον. Αυτό καταδεικνύεται σαφέστατα από το μεγάλο πλήθος εργασιών που έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό την απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών από φυτά της οικογένειας, καθώς επίσης και τον βιολογικό έλεγχο

εκχυλισμάτων και καθαρών ουσιών. Από μέλη της οικογένειας αυτής έχει απομονωθεί μεγάλος αριθμός φυσικών προϊόντων, που ανήκουν σε πλήθος χημικών ομάδων και εμφανίζουν αξιοσημείωτη πολυπλοκότητα χημικών δομών. Οι κύριες χημικές ομάδες φυσικών προϊόντων, οι οποίες συνήθως απαντούν σε φυτά της οικογένειας *Fabaceae* είναι τα τερπένια, τα απλά φαινολικά παράγωγα, τα φλαβονοειδή και γλυκοσίδες τους, τα αλκαλοειδή και τα σάκχαρα[31]. Από τις παραπάνω ομάδες, αυτή με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι η χημική κατηγορία των φλαβονοειδών. Απαντώνται σε όλα τα είδη των ψυχανθών, συνήθως ενωμένα με ένα ή περισσότερα σάκχαρα. Παρουσιάζουν πλήθος βιολογικών δράσεων, γεγονός που τα κατατάσσει στις σημαντικότερες κατηγορίες φυσικών προϊόντων[32].

Κεφάλαιο 3

Κύριες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών στα εδώδιμα φυτά

3.1 ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΑ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΛΕΣ

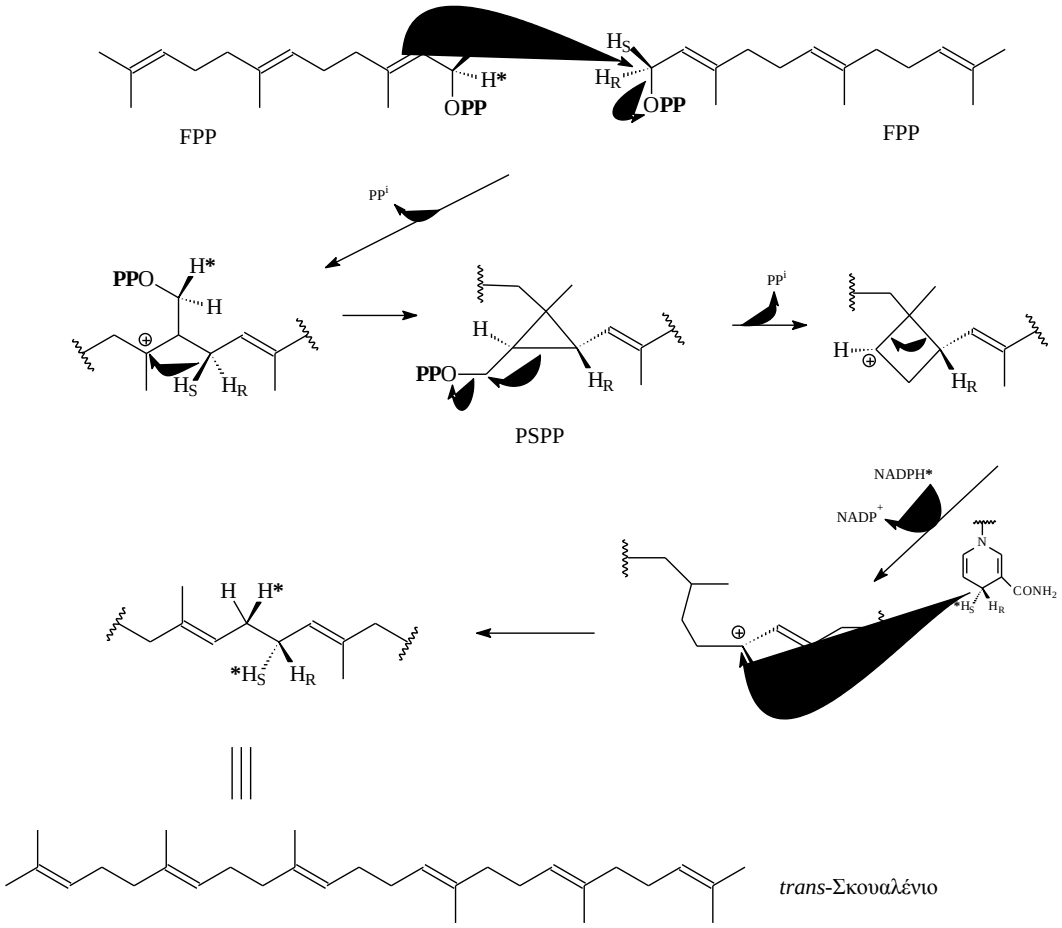
ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΙΑ

Τα τριτερπένια αποτελούν μία από τις πολυπληθέστερες κατηγορίες φυσικών προϊόντων. Ο αριθμός τους φτάνει τις αρκετές χιλιάδες, ενώ περιλαμβάνουν ογδόντα ή και περισσότερους βασικούς σκελετούς.[33] Το σκουαλένιο (C_{30}) είναι το μητρικό μόριο όλων των τριτερπενίων.[34] Αποτελείται από δύο μεγάλες αλυσίδες αποτελούμενες από συνδεόμενες (head to tail) επαναλαμβανόμενες ισοπρενικές ομάδες, οι οποίες ενώνονται, (tail to tail), στο κέντρο του μορίου.

Για το σχηματισμό του σκουαλενίου, δύο μόρια *trans* πυροφωσφορικού φαρνεσυλίου (FPP) συνδέονται tail to tail. Το πυροφοσφωρικό πρεσκουαλένιο (presqualene pyrophosphate, PSPP) αποτελεί βασικό ενδιάμεσο μόριο και σχηματίζεται από τη σύνδεση δύο μορίων FPP, μέσω αντίδρασης αλκυλίωσης στον 2,3-διπλό δεσμό. Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα απόσπαση του 1-*pro*-*S*-υδρογονοατόμου και αποφωσφορυλίωση προς το σχηματισμό κυκλοπροπανικού δακτυλίου, ο οποίος με διεύρυνση και μέσω διαμορφωτικών αλλαγών στον C-4, μετατρέπεται σε δακτύλιο κυκλοβουτανίου. Ο δακτύλιος του κυκλοβουτανίου διαρρηγνύεται παρουσία της συνθετάσης του σκουαλενίου και ενός μορίου NADPH, όποτε και προκύπτει το ευθύγραμμο μόριο του *trans* σκουαλενίου(Σχήμα 3.1.1).[35,36,37]

Κυκλοποίηση του μορίου του σκουαλενίου θα οδηγήσει στα διάφορα τριτερπενικά παράγωγα. Τρία βασικά στάδια διακρίνονται στην κυκλοποίηση του σκουαλενίου:

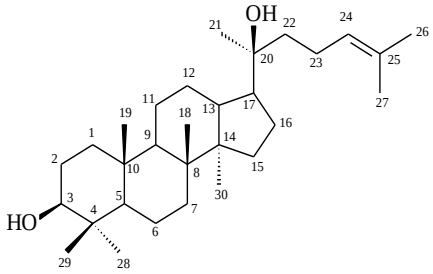
- Για κάθε αντίδραση κυκλοποίησης το μόριο του σκουαλενίου αλληλεπιδρά με την επιφάνεια του ενζύμου και υιοθετεί γραμμικά διαμορφώσεις ανακλίντρου ή/και λουτήρα, προσομοιάζοντας σε εξακυκλικό σύστημα.
- Η κυκλοποίηση πραγματοποιείται μέσω αντιδράσεων *trans*-προσθήκης στους ολεφινικούς διπλούς δεσμούς.
- Στον σχηματισμό των ενδιάμεσων δραστικών καρβοκατιόντων, μια σειρά μετατροπές Wagner-Meerwein και μεταθέσεις λαμβάνουν χώρα σύμφωνα κάθε φορά με τις στερεοχημικές συνθήκες.



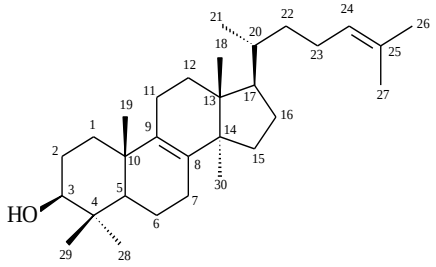
Σχήμα 3.1.1: Βιοσυνθετική πορεία σχηματισμού Σκουαλενίου

Τα τριτερπένια έχουν σχετικά μικρή ποικιλία βασικών σκελετών αν ληφθεί υπ' όψιν ο μεγάλος αριθμός των πιθανών διαμορφώσεων των μορίων του σκουαλενίου. Αυτό οφείλεται κατά ένα μέρος στο γεγονός ότι το σκουαλένιο σε αντίθεση με άλλα πρόδρομα μόρια τερπενίων, δε φέρει φωσφορικές ομάδες, πράγμα που ελαχιστοποιεί τους διαφορετικούς τρόπους κυκλοποίησης εξαιτίας της έλλειψης καλής αποχωρούσας ομάδας.[38] Γενικά, οι δακτύλιοι είναι εξαμελείς και αν υπάρχει υδροξυλομάδα στον C-3 βρίσκεται σχεδόν πάντα σε ισημερινή διευθέτηση. Οι έξι άνθρακα-άνθρακα διπλοί δεσμοί επιτρέπουν με τη διαδικασία της κυκλοποίησης δύο κύριες κατηγορίες τριτερπενίων, τα τετρακυκλικά τριτερπένια (συμπεριλαμβανομένων των στερολών) και τα πεντακυκλικά τα οποία είναι και τα πιο διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο. Μόνο- ή δικυκλικά τριτερπένια δεν έχουν εντοπιστεί ενώ κάποια τρικυκλικά έχουν απομονωθεί. Τα τελευταία προκύπτουν μέσω μερικής κυκλοποίησης.

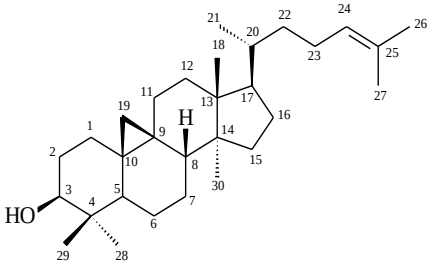
Οι τέσσερις βασικοί σκελετοί των τετρακυκλικών τριτερπενίων περιλαμβάνουν τις ομάδες του Δαμμαρενίου (Dammarene), της Ευφανίου (Euphane), του Λανοστανίου (Lanostane) και του Κυκλοαρτενίου (Cycloartene) (Σχήμα:3.1.2). Αυτά τα τριτερπένια αποτελούνται από τέσσερις συμπυκνωμένους δακτυλίους, από τους οποίους οι A, B και C είναι εξαμελείς και ο D πενταμελής. Ο πενταμελής δακτύλιος D σχηματίζεται μέσω προσθήκης στον διπλό δεσμό του C-13 σύμφωνα με τον κανόνα Markovnikov, η οποία ευνοείται θερμοδυναμικά και πραγματοποιείται απουσία ενζύμου, ενώ αντίθετα ο δακτύλιος C σχηματίζεται μέσω προσθήκης *αντι*-Markovnikov.



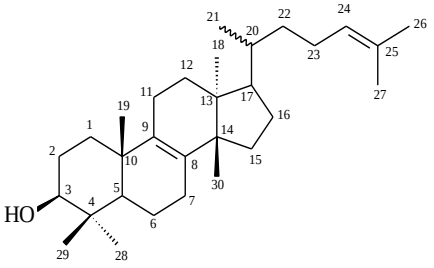
Ομάδα Δαμμαρενίου (π.χ. Δαμμαρενεδιόλη 20 *R*)



Ομάδα Λανοστανίου (π.χ. Λανοστερόλη)



Ομάδα Κυκλοαρτενίου (π.χ. Κυκλοαρτενόλη)

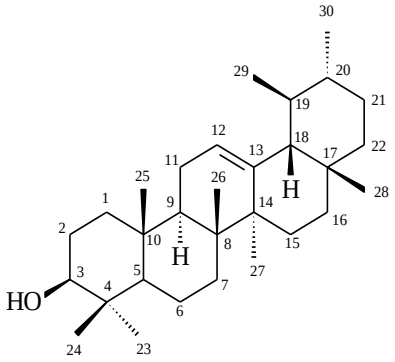


Ομάδα Ευφανίου (π.χ. Ευφόλη 20 *R*, Τιρουκαλλόλη 20 *S*)

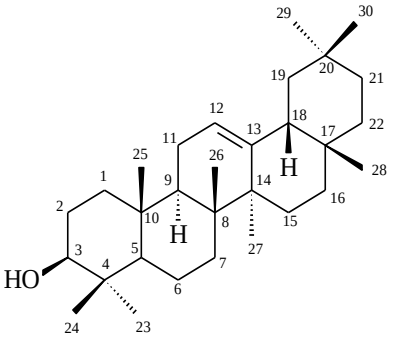
Σχήμα 3.1.2: **Βασικοί σκελετοί Τετρακυκλικών Τριτερπενίων**

Αρκετά σημαντική κατηγορία τριτερπενίων στα ανώτερα φυτά αποτελούν και τα πεντακυκλικά τριτερπένια, που όπως τα τετρακυκλικά πρόδρομα τους προέρχονται από το *trans*-σκουαλένιο. Το εποξυ-σκουαλένιο με διαμόρφωση ανάκλιντρο-ανάκλιντρο-ανάκλιντρο-λουτήρα αποτελεί και σε αυτή την περίπτωση το βασικότερο ενδιάμεσο. Τα τετρακυκλικά τριτερπένια, μπορούν να διακριθούν σε

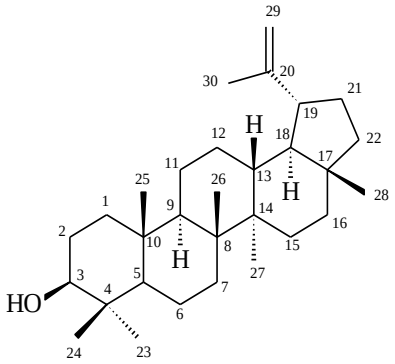
τέσσερις κύριες ομάδες: τύπου ουρσανίου (ursane, π.χ.α-αμυρίνη), ολεανίου (oleane, π.χ. β-αμυρίνη),[39] λουπανίου (lupane) και χοπανίου (hopane) (Σχήμα:3.1.3).



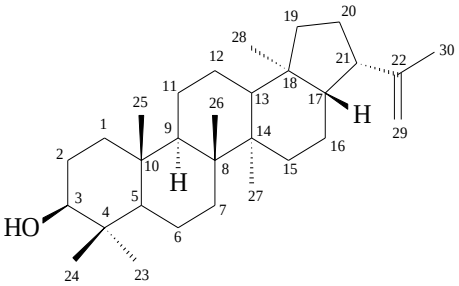
Ομάδα Ουρσανίου (π.χ. α-Αμυρίνη)



Ομάδα Ολεανίου (π.χ. β-Αμυρίνη)



Ομάδα Λουπανίου (π.χ. Λουπεόλη)



Ομάδα Χοπανίου (π.χ. Διπλοτένιο)

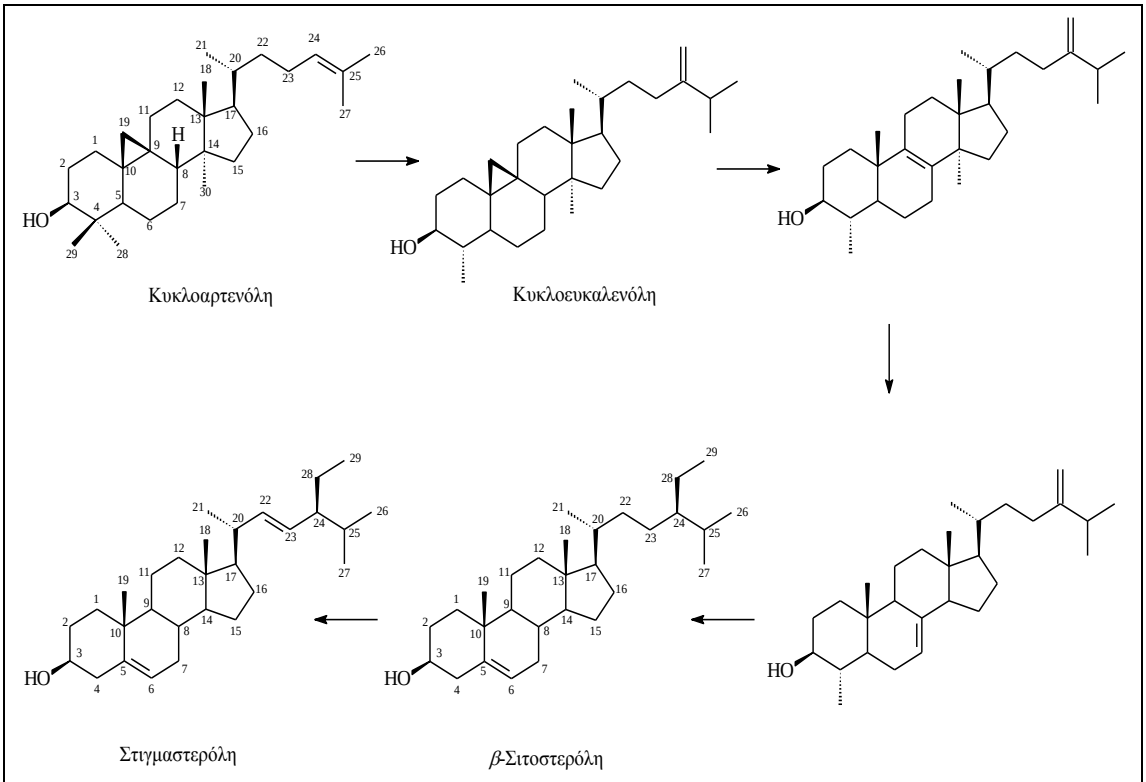
Σχήμα 3.1.3: Βασικοί σκελετοί Πεντακυκλικών Τριτερπενίων

Ο τρόπος αρίθμησης των τριτερπενίων βασίζεται στην βιοσύνθεση και έχει αποδειχθεί με πειράματα ισοτοπικής επισήμανσης. Η ποίο συνηθισμένη διαμόρφωση των μορίων είναι εκείνη που απαντάται σε κατώτερα και ανώτερα φυτά.[40] Υπάρχουν όμως περιπτώσεις όπου απαντούν με διαφορετική διαμόρφωση, όπως για παράδειγμα τα τριτερπένια που προκύπτουν από το σκουαλένιο, διαμόρφωσης ανάκλιντρο-ανάκλιντρο-ανάκλιντρο-ανάκλιντρο χωρίς περαιτέρω μετατροπές. Στα περισσότερα πεντακυκλικά τριτερπένια η υδροξυλομάδα του C-3 διαθέτει *β*-προσανατολισμό και αξονική διευθέτηση. Ελάχιστες είναι οι περιπτώσεις που η υδροξυλομάδα αυτή προτιμά *α*-προσανατολισμό, (π.χ. *epi*-*α*-αμυρίνη) ή απουσιάζει εντελώς (τετραχυμανόλη).[28]

Τα τριτερπένια διαθέτουν πλήθος βιολογικών ιδιοτήτων όπως αντιβακτηριακή, αντιμυκητιασική, αντιιική,[41] κυτταροτοξική,[42] αναλγητική, αντικαρκινική, προστατευτική στο καρδιαγγειακό,[43,44] ανοσοκατασταλτική[45] και αντιαλλεργική.[46] Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη διερεύνηση των βιολογικών ιδιοτήτων των πεντακυκλικών τριτερπενίων, όπως το ολεανολικό και το ουρσουλικό οξύ και των παραγώγων τους,[47] τα οποία απαντούν σε πολλά φαρμακευτικά φυτά. Έχει αναφερθεί ότι διαθέτουν αντιφλεγμονώδη,[48] ηπατοπροστατευτική, αντιογκογόνο, αντιιδιαβητική, αντιοξειδωτική, αντιυπερλιπιδαιμική, αντιελκωτική, αντιαλλεργική,[49] καρδιοτονωτική και διουρητική[50] δράση. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι το μπετουλικό (betulinic), το πομολικό (pomolic) και το ολεανολικό οξύ προάγουν την απόπτωση των κυττάρων K562 (λευχαιμική κυτταρική σειρά)[51] ενώ τα παράγωγα της φριεντελίνης (friedelin) εμφανίζουν αντιογκογόνο δράση.[52] Εντομοκτόνο και αντιτροφική δράση έχουν επίσης επιδείξει κάποια τριτερπένια.[53]

ΣΤΕΡΟΛΕΣ

Η βιοσύνθεση των στερολών περιλαμβάνει μία πολύπλοκη αλληλουχία βιοχημικών αντιδράσεων στις οποίες λαμβάνουν μέρος πάνω από τριάντα διαφορετικά ένζυμα.[54] Η κυκλοποίηση του 2,3-εποξυσκουαλενίου σε κυκλοαρτενόλη είναι η βάση για το σχηματισμό όλων των στερολών στα φυτά. Οι στερόλες διαθέτουν το βασικό τριτερπενικό σκελετό με τη διαφορά ότι απουσιάζουν οι μεθυλομάδες στους άνθρακες C-4 και C-14.[55,56] Μετά το σχηματισμό της κυκλοαρτενόλης σχηματίζονται τα ενδιάμεσα μόρια, 24-μεθυλενοκυκλοαρτενόλη και κυκλοευκαλενόλη. Ακολουθεί διάνοιξη του 9,19-κυκλοπροπανικού δακτυλίου της κυκλοευκαλενόλης και αλκυλίωση στον άνθρακα C-24 της πλάγιας αλυσίδας (Σχήμα 3.4.1).[57] Τέλος, λαμβάνει χώρα απομάκρυνση των μεθυλομάδων από τους άνθρακες C-4, C-13 και C-4 (με αυτή τη σειρά), αντίδραση ιδιαίτερα σημαντική για το σχηματισμό και τη βιολογική λειτουργία τον στερολών. Κάποιες στερόλες υφίστανται *cis*-αναγωγή στον Δ^{22} (π.χ. στιγμαστερόλη). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι στερόλες δεν μπορούν να ανταποκριθούν στο ρόλο τους ως βασικά δομικά στοιχεία αν δεν απομακρυνθούν οι προαναφερόμενες μεθυλομάδες.[58]



Σχήμα 3.1.4: Βιοσύνθεση Στερολών

Η κυκλοαρτενόλη στα ανώτερα φυτά χρησιμοποιείται επίσης για το σχηματισμό της χοληστερόλης και της εργοστερόλης, σε αντίθεση με τα θηλαστικά, όπου η βιοσύνθεσή τους επιτελείται μέσω λανοστερόλης. Από τις στερόλες αυτές προκύπτουν τα C_{21} στεροειδή (μέσω απομάκρυνσης της πλάγιας αλυσίδας) και οι C_{27} σαπωγενίνες (σπειροκεταλικού τύπου).[58] Από τα C_{21} στεροειδή, μέσω οξείδωσης, προκύπτουν τα C_{18} και C_{19} στεροειδή,[59] τα C_{24} μπουφαδιενολίδια και τα C_{23} καρδενολίδια, τα οποία αμφότερα οδηγούν στη βιοσύνθεση των καρδιοτονωτικών γλυκοσιδών.[58]

Οι φυτοστερόλες απαντούν σε όλα τα φυτά και είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και τη συντήρησή τους. Σε αντίθεση με τα ζωικά κύτταρα και τους μύκητες στα οποία απαντά μόνο μία στερόλη, τα φυτικά κύτταρα συνθέτουν ένα πολύπλοκο μίγμα στερολών, με κυριότερες τη στιγμαστερόλη, τη *β*-σιτοστερόλη και την 24-μεθυλοχοληστερόλη. Αποτελούν συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση της διαπερατότητάς τους.

Οι στερόλες αποτελούν κύρια δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών των φυτών. Η υδροξυλομάδα στον άνθρακα 3 του μορίου αποτελεί το υδρόφιλο μέρος του μορίου ενώ η πλάγια αλυσίδα το λιπόφιλο μέρος, το οποίο και αλληλεπιδρά με τα φωσφολιπίδια και τις πρωτεΐνες. Τρία είναι τα απαραίτητα δομικά χαρακτηριστικά, τα οποία εξασφαλίζουν τη λειτουργικότητα των στερολών στις κυτταρικές μεμβράνες:

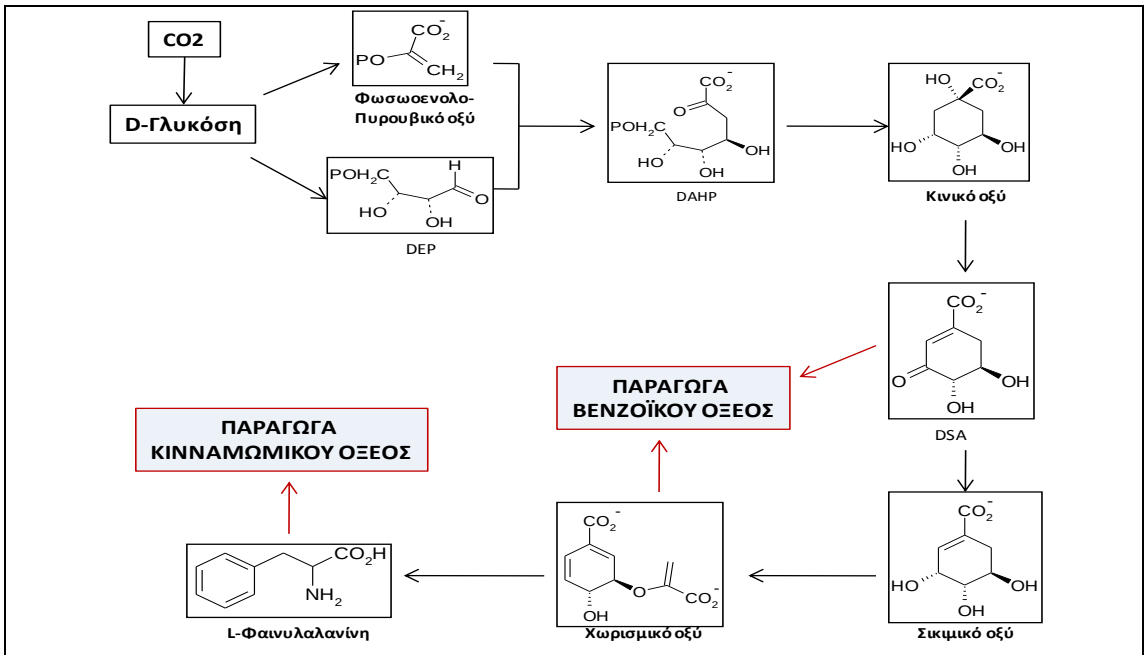
- ελεύθερη 3-υδροξυλομάδα,
- επίπεδος πεντακυκλικός σκελετός,
- αλειφατική πλάγια αλυσίδα με 8-10 ανθρακοάτομα.

Η σιτοστερόλη και η 24-μεθυλοχοληστερόλη αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα και είναι οι πιο αποτελεσματικές στερόλες, εξασφαλίζοντας τη διακίνηση των φωσφολιπιδίων. Αυτή η δράση αυξάνεται από την εισαγωγή ενός *trans*-Δ^{22} διπλού δεσμού (π.χ. στιγμαστερόλη). Επίσης, υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι οι στερόλες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του κυττάρου κατά τη διαφοροποίησή του, πέραν της ικανότητάς τους να ρυθμίζουν τη μεμβρανική κατάσταση και λειτουργικότητα.

3.2 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ

Ο όρος φαινολοξέα χρησιμοποιείται κυρίως για τα παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος . Στα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος ο καρβονυλικός άνθρακας ενώνεται απευθείας πάνω στον αρωματικό πυρήνα ενώ σε αυτά του κυνναμωμικού συνδέεται μέσο γέφυρας ακετυλενίου. Είναι ουσίες πολύ διαδεδομένες στα φυτά και απαντούν είτε ελεύθερα, είτε ως εστέρες και γλυκοσίδες . Βιοσυνθετικά προέρχονται μέσο της οδού του σικιμικού οξέος.

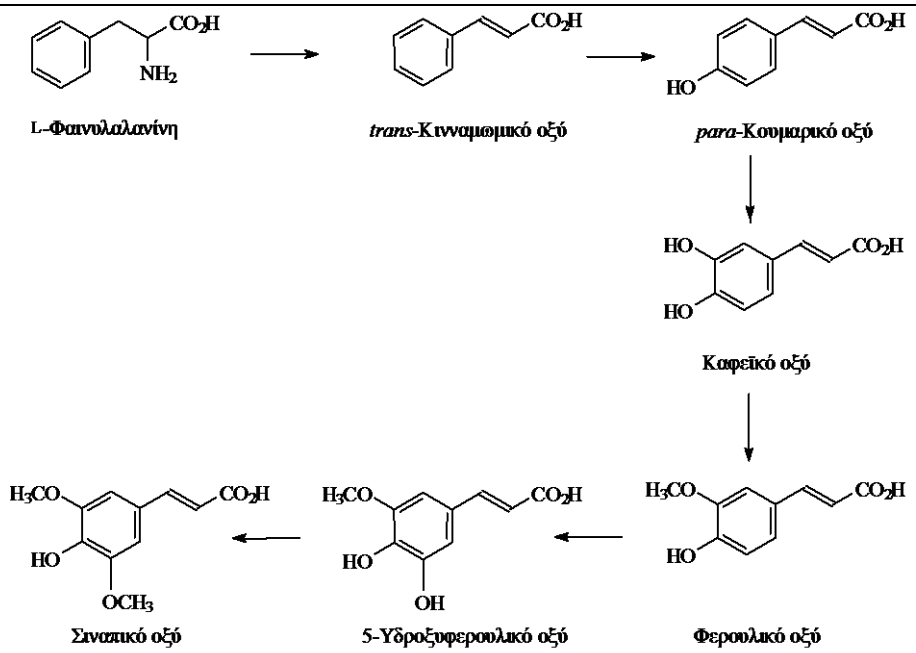
Το βιοσυνθετικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος ευθύνεται τόσο για τη παραγωγή των ζωτικών πρωτογενών μεταβολιτών, όσο και για το σχηματισμό ενός μεγάλου αριθμού δευτερογενών μεταβολιτών, όπως οι φαινόλες, οι κουμαρίνες, τα φλαβονοειδή, τα αλκαλοειδή, οι κινόνες, τα λιγνάνια και οι χρωστικές. Εκτιμάται ότι περίπου το ένα πέμπτο των ατόμων άνθρακα, σε έναν φυτικό οργανισμό, που χρησιμοποιούνται με σκοπό το σχηματισμό μεταβολιτών, διακινούνται μέσω αυτής της οδού.[60] Οι βιοσυνθετικές αυτές αντιδράσεις ελέγχονται από ένζυμα και πραγματοποιούνται παρουσία συγκεκριμένων παραγόντων ανά στάδιο (π.χ. NADPH, NADH). Στο Σχήμα 3.2.1 που ακολουθεί απεικονίζεται συνοπτικά η βιοσυνθετική οδός του σικιμικού οξέος (με **P** συμβολίζεται η φωσφορική ρίζα - PO_3^{2}).



Σχήμα 3.2.1: Βιοσυνθετική οδός του σικιμικού οξέος

Πολύ σημαντικό βήμα της οδού του σικιμικού οξέος αποτελεί η βιοσύνθεση φαινυλοπροπανίων από τα παραγόμενα αρωματικά αμινοξέα. Η φαινυλαλανίνη

παρουσία μιας λυάσης (L-phenylalanine ammonia-lyase - PAL), μετατρέπεται με απαμίνωση στο *trans*-κινναμωμικό οξύ ακολουθώντας E_2 μηχανισμό[61] . Το κινναμωμικό οξύ αποτελεί πρόδρομη ένωση για ένα μεγάλο αριθμό φαινυλοπροπανίων, που είναι μεταβολίτες ιδιαίτερα σημαντικοί στα ανώτερα φυτά (Σχήμα 3.2.2). Οι οξυγενάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση των μορίων αυτών, αφού κινητοποιούν το μοριακό οξυγόνο και καταλύουν τις αντιδράσεις υδροξυλίωσης, τόσο του κινναμωμικού οξέος όσο και των παραγώγων του. Από τα μόρια αυτά τελικά θα προκύψουν και άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως βενζοϊκά οξέα, κουμαρίνες, ταννίνες, κινόνες και φλαβονοειδή.



Σχήμα 3.2.2: Πορεία σχηματισμού φαινυλοπροπανίων

Τα φαινολικά οξέα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του πλήθους των σημαντικών βιολογικών ιδιοτήτων που διαθέτουν. Τα περισσότερα είναι χολαγωγά, ενώ επίσης εμφανίζουν αντιβακτηριακή, αντιμυκητιασική και αντιιική δράση[62,63,64]. Επιπλέον, πολλά διαθέτουν αντιφλεγμονώδη, ανοσοδιεγερτική και κυτταροστατική δράση[65]. Σε πολλές μελέτες αναφέρεται ότι τα φαινολοξέα προκαλούν μείωση των επιπέδων χοληστερόλης[66], ενώ πολλά από αυτά έχουν καλή αντιοξειδωτική δράση[67].

3.3 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ

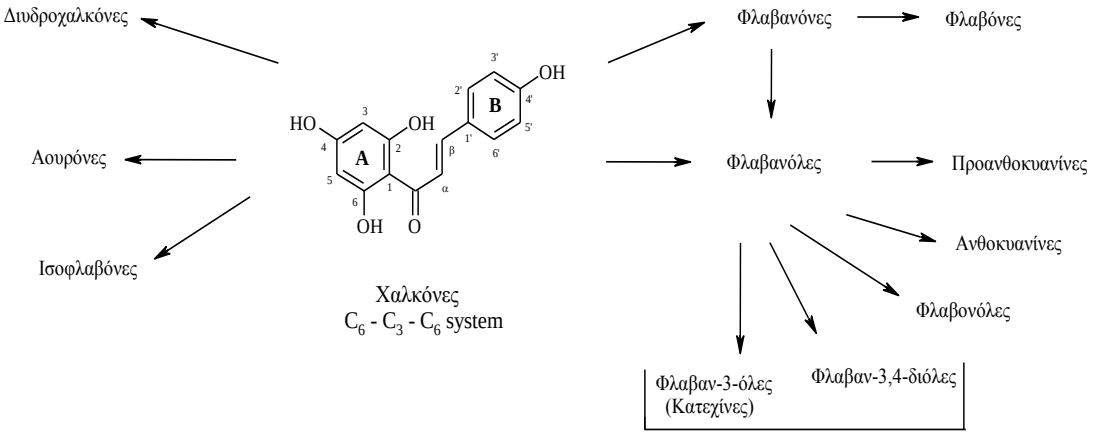
Τα φλαβονοειδή, αυτή η πολυπληθής κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών, διακρίνονται σε υποομάδες με κριτήριο το είδος του βασικού τους σκελετού. Πρόκειται για τις χαλκόνες, τις αουρόνες, τις φλαβανόνες, τις φλαβόνες, τις φλαβονόλες, τις προανθοκυανιδίνες και τα ισοφλαβονοειδή. Αξίζει να σημειωθεί ότι πάνω από 4000 διαφορετικά φλαβονοειδή προερχόμενα από φυτά έχουν καταγραφεί. Πρόκειται για μικρού μοριακού βάρους φαινυλοβενζοπυρόνες ή φαινυλοβενζοχρωμόνες με εξαιρετική δομική ποικιλία.[68] Ο όρος φλαβονοειδή προέρχεται από τους πιο κοινούς αντιπροσώπους της κατηγορίας, τις φλαβόνες. Συνήθως απαντούν με τη μορφή γλυκοσιδών γεγονός που αυξάνει τη διαλυτότητά τους στο νερό.[72]

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις με 15 άτομα άνθρακα. Ο βασικός τους σκελετός αποτελείται από δύο αρωματικούς πυρήνες, οι οποίοι συνδέονται μέσω μίας αλυσίδας τριών ατόμων άνθρακα (C_3), σχηματίζοντας ένα 1,3-διαρυλοπροπανικό σύστημα ή σύστημα C_6 - C_3 - C_6. Από το 1,3-διαρυλοπροπανικό αυτό σύστημα (χαλκόνες), έπειτα από ενδομοριακή κυκλοποίηση προκύπτει ένας δακτύλιος 4-πυρόνης. Ο δακτύλιος της πυρόνης σχηματίζεται μέσω μιας γέφυρας οξυγόνου μεταξύ του άνθρακα του δακτυλίου Α που βρίσκεται σε *ortho*-θέση και του γειτονικού στον δακτύλιο Β ανθρακοατόμου. Αυτός ο βασικός σκελετός της φλαβάνης αποτελεί το μητρικό μόριο για τα ανώτερα φλαβονοειδή.

Στα πρώιμα βιογενετικά στάδια, τα φλαβονοειδή συντίθενται μέσω ενός γενικού μονοπατιού, που σχηματικά περιγράφεται ως εξής: C_6 - C_3 + 3(C_2) $\rightarrow$ C_6 - C_3 - C_6. Πρόκειται για προϊόντα με μικτή βιοσυνθετική προέλευση, όπου ο δακτύλιος Α (φλωρογλουκινόλη, C_6) προέρχεται από τη συμπύκνωση τριών ακετυλομάδων, με σύνδεση του τύπου head to tail, ενώ ο δακτύλιος Β και τα τρία ανθρακοάτομα της αλυσίδας που ενώνει τους δύο δακτυλίους (κατεχόλη ή φαινόλη, C_9) προέρχονται από το κινναμωμικό οξύ, μέσω φαινυλαλανίνης και όχι μέσω τυροσίνης. Έτσι, για τη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών, ενεργοποιούνται τόσο η οδός του οξικού-μαλονικού οξέος (acetate-malonate pathway) όσο και του σικιμικού οξέος (shikimate pathway). Η οξυγόνωση των C_9 και C_6 συστημάτων ακολουθεί άλλο μοτίβο εξαιτίας της διαφορετικής βιογενετικής τους προέλευσης.[69] Τα δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών είναι:

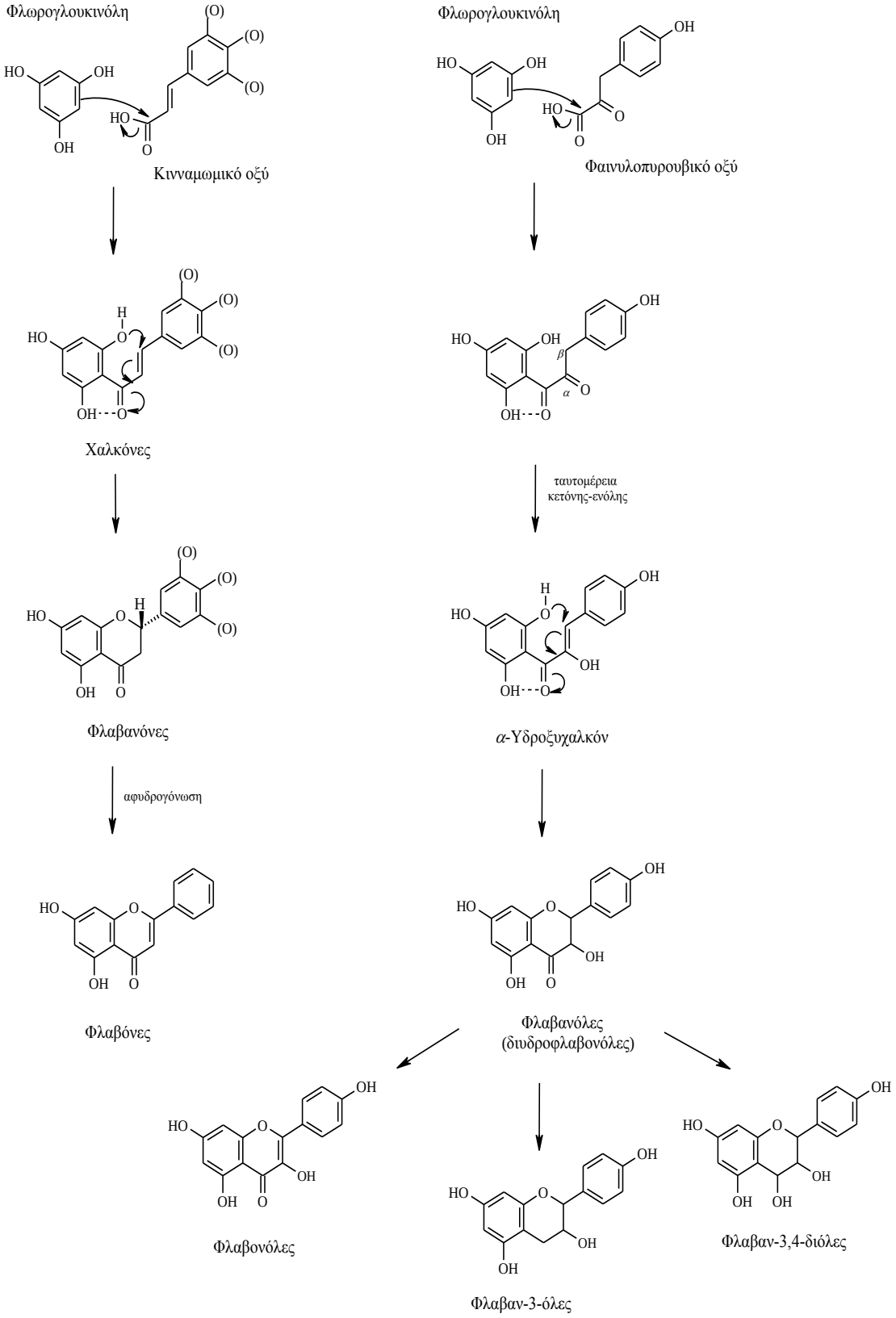
- Οι οξυγονωμένοι άνθρακες στον δακτύλιο Α, βρίσκονται σχεδόν πάντα σε *meta*-θέση και πρόκειται συνήθως για τους άνθρακες C-5, C-7 και C-9 (C-8a). Αυτό εξηγείται βιοσυνθετικά εξαιτίας της προέλευσής τους από την οδό του οξικού-μαλονικού οξέος ή μέσω πολυκετιδίων. Σπάνια περιγράφονται φλαβονοειδή με περισσότερους ή λιγότερους οξυγονωμένους άνθρακες στον δακτύλιο Α. Τα *C*- ή *O*-αλκυλιωμένα φλαβονοειδή με πρενυλομάδες, μεθυλομάδες ή σάκχαρα είναι πολύ συχνά και ιδιαίτερα οι γλυκοσίδες των φλαβονοειδών.
- Οι οξυγονωμένοι άνθρακες στον δακτύλιο Β, βρίσκονται σχεδόν πάντα σε *ortho*-θέση και σε *para*- και/ή *meta*-θέση με τον άνθρακα C-1′ εξαιτίας της προέλευσής του μέσω της οδού του σικιμικού οξέος. Φλαβονοειδή με μη οξυγονωμένο Β δακτύλιο είναι αρκετά σπάνια.

Οι χαλκόνες είναι τα πρώτα προϊόντα που προκύπτουν έπειτα από αντίδραση προσθήκης μεταξύ των μονάδων του μαλόνυλ-CoA και του κινναμωμικού οξέος, αντίδραση που καταλύεται από τη συνθάση των φλαβανών (flavanone synthase).[70] Θεωρούνται τα μητρικά μόρια όλων των υπολοίπων φλαβονοειδών (Σχήμα 3.3.1) και δίνουν το έντονο κίτρινο χρώμα στα άνθη των φυτών. Οι χαλκόνες οι οποίες φέρουν τουλάχιστον δύο ελεύθερες υδροξυλομάδες στους άνθρακες C-2, C-4 και / ή C-6, μπορούν να ισομεριστούν σε φλαβανόνες.[70,71] Αυτή η αντίδραση καταλύεται από την ισομεράση χαλκόνης-φλαβανόνης, είναι στερεοεκλεκτική και στο τελικό προϊόν, στη φλαβόνη, ο άνθρακας C-2 διαθέτει (*S*)-διαμόρφωση. Όλες οι φλαβανόνες που απαντούν στη φύση έχουν 2-*S*-διαμόρφωση και είναι αριστερόστροφες.[71] Η ισομεράση που καταλύει την αντίδραση είναι εντελώς ειδική και αντιλαμβάνεται μόνο τις ελεύθερες χαλκόνες ως υπόστρωμα, ενώ δεν έχει καμία επίδραση σε άλλα μόρια και ούτε στις γλυκοσυλιωμένες τους μορφές.[70] Γενικά, οι χαλκόνες είναι αρκετά σπάνιες εξαιτίας της γρήγορης ισομερίωσής τους σε φλαβανόνες. Αντίθετα οι φλαβανόνες είναι αρκετά διαδεδομένες, απαντούν κυρίως ως *O*-γλυκοσίδες και συσσωρεύονται στον κορμό, στα φύλλα, στα άνθη και στον καρπό. Γλυκοσίδες φλαβονολών είναι τα μόρια εκείνα τα οποία δίνουν την πικρή γεύση σε είδη *Citrus* όπως για παράδειγμα το grapefruit (*C. Paradisi*).



Σχήμα 3.3.1: **Βιογενετική συγγένεια των Φλαβονοειδών**[72,73]

Οι φλαβόνες αποτελούν την πιο πολυπληθή υποομάδα των φλαβονοειδών και στερούνται υδροξυλομάδας στον άνθρακα C-3. Οι φλαβονόλες κατηγοριοποιούνται βάσει της ύπαρξης της ομάδας υδροξυλίου στον άνθρακα αυτόν, ενώ δεν προέρχονται βιοσυνθετικά από τις φλαβόνες. Αντίθετα, σχηματίζονται είτε μέσω των αντίστοιχων διυδροφλαβονών είτε μέσω του φαινυλοπυρουβικού οξέος και των α-υδροξυχαλκονών. Ο τρόπος οξυγόνωσης των φλαβονολών είναι σχεδόν πάντα ίδιος για τους δακτυλίους A και C, δηλαδή 3,5,7-*O*-υποκατάσταση, ενώ ο δακτύλιος B εμφανίζεται μονο-, δι- και τρις-υποκατεστημένος σε *meta* και *para*-θέση, συνήθως, ως προς τον C-1'. Απαντούν συχνά με τη μορφή 3-*O*-γλυκοσιδών και βρίσκονται στα λευκά άνθη. Οι φλαβονόλες με επιπλέον υδροξυλομάδες στους άνθρακες C-6 ή C-8 έχουν κίτρινο χρώμα και συνεισφέρουν στον χρωματισμό των ανθέων[70]. Συνοπτικά, η βιοσύνθεση όλων των παραπάνω υποομάδων των φλαβονοειδών παρατίθεται στο Σχήμα 3.3.2.



Σχήμα 3.3.2: Βιοσύνθεση Φλαβονοειδών

Τα φλαβανοειδή καταλαμβάνουν κεντρικό βιοχημικό και φυσιολογικό ρόλο στα φυτά, ενώ εμφανίζουν αρκετά ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις. Λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά, αναστολείς ενζύμων, ως χρωστικές, ενώ ασκούν προστατευτική δράση κατά της υπεριώδους ακτινοβολίας. Εμπλέκονται στις διαδικασίες της φωτοσύνθεσης, της μεταφοράς ενέργειας, της μορφοποίησης των ιστών και της αναπαραγωγής. Επεμβαίνουν στην ανάπτυξη του φυτικού οργανισμού μέσω ενεργοποίησης ή αναστολής των αυξητικών ορμονών, ενώ μερικά φλαβονοειδή παίζουν ως ένα βαθμό το ρόλο αυξητικού παράγοντα. Η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες καθιστά τα φλαβονοειδή πολύ γνωστούς αναστολείς ενζύμων. Η δραστικότητα των γλυκοσιδών είναι πολύ περιορισμένη σε σχέση με τα αντίστοιχα άγλυκα.[74] Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μελέτες των σχέσεων δομής-δράσης των φλαβονοειδών αναφορικά με τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες.[75,76,77]

Το χρώμα των ανθοκυανών είναι πολύ σημαντικό για την προσέλκυση παραγόντων απαραίτητων για τη μεταφορά της γύρης και των σπόρων. Τα περισσότερα είδη *Gramineae* δεν παράγουν ανθοκυανες αφού στηρίζονται για την μεταφορά των σπόρων στον αέρα. Γενικά τα φλαβονοειδή και τα ισοφλαβονοειδή (π.χ. πτεροκαρπάνες, ροτενοειδή) δρουν ως φυτοαλεξίνες και συνιστούν την χημική άμυνα του φυτού έναντι στην επίθεση εξωγενών παραγόντων, όπως είναι για παράδειγμα οι μύκητες. Επίσης ισοφλαβονοειδή (π.χ. κουμεστρόλη) εμφανίζουν οιστρογονική δράση. Η οιστρογονική δράση των φλαβονοειδών και των ισοφλαβονοειδών είναι αρκετά σημαντική και από οικονομικής άποψης, αφού απαντούν σε μεγάλη αναλογία σε καλλιεργούμενα ή άγρια είδη που χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφές (τριφύλλι). Έχει αποδειχθεί ότι ζώα τα οποία εκτρέφονταν με τέτοια φυτά πάνω από έξι μήνες παρουσίασαν προβλήματα γονιμότητας και παροδικής στειρότητας.

Τα περισσότερα φλαβονοειδή δεν παρουσιάζουν τοξικότητα στα θηλαστικά και διακρίνονται για τις ενδιαφέρουσες και σημαντικές βιολογικές τους ιδιότητες. Εμφανίζουν αντιαλλεργική, αντιφλεγμονώδη, αντιιική και αντικαρκινική δράση, ενώ παράλληλα έχουν την ικανότητα να επεμβαίνουν με ποικίλους τρόπους στο μεταβολισμό των θηλαστικών. Το μίγμα δύο φλαβονοειδών, της εριοδικτιόλης και της εσπεριδίνης, που συχνά αναφέρεται ως "Βιταμίνη P", παρουσιάζει ευεργετική

επίδραση στο αγγειακό σύστημα, ενισχύοντας την ανθεκτικότητα φλεβών και αρτηριών, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την διαπερατότητά τους. Συγκεκριμένα, οι *C*-γλυκοσίδες των φλαβονών εμφανίζουν πολύ σημαντική προστατευτική δράση έναντι της τοξικότητας που προκαλείται από CCl_4 και γαλακτοσαμίνη, σε κυτταρικές σείρες ήπατος αρουραίων.[78] Τα φλαβονοειδή των ειδών *Citrus* εμφανίζονται ως τα πλέον δραστικά.[79]

Κεφάλαιο 4:

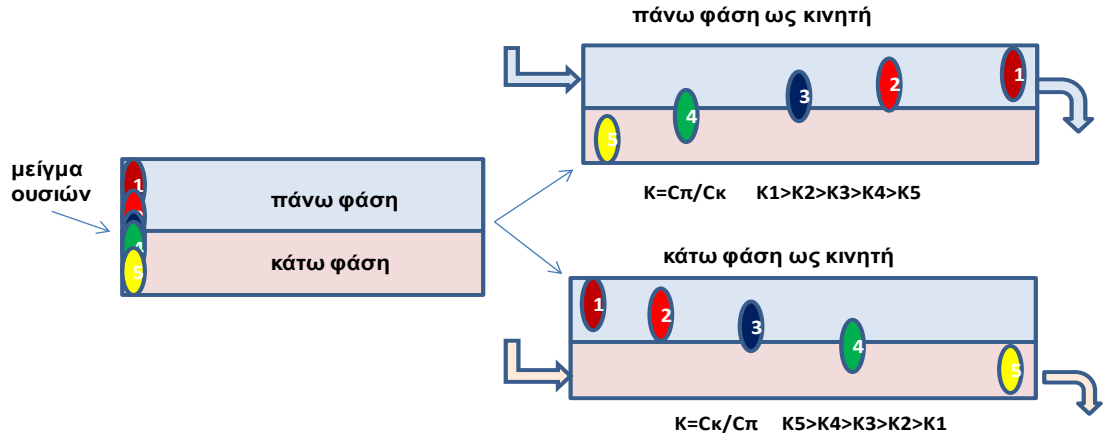
Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή

(CounterCurrent Chromatography CCC)

4.1 Γενικά

Η Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CounterCurrent Chromatography, CCC) είναι μια υγρή-υγρή τεχνική διαχωρισμού η οποία βασίζεται στην ύπαρξη δύο μη μιγνυόμενων υγρών φάσεων, εκ των οποίων η μια παραμένει στατική, ενώ η άλλη αποτελεί την κινητή φάση. Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ουσιών από μίγματα ή εκχυλίσματα και βασίζεται στην διαφορετική κατανομή των ουσιών στις δύο μη μιγνυόμενες φάσεις. Η όλη διαδικασία επιτελείται μέσα σε περιστρεφόμενη στήλη η οποία είναι πληρωμένη με την στατική φάση (όπου είναι διαλυμένο το προς ανάλυση μίγμα), ενώ η κινητή φάση διέρχεται μέσω της στατικής με τη βοήθεια αντλίας. Αν και η τεχνική ανακαλύφθηκε από τον Ito το 1964 η χρήση της ήταν περιορισμένη μέχρι τις αρχές την δεκαετίας του 90 όπου η δημιουργία των σύγχρονων μηχανημάτων έκανε τη χρήση της εύκολη και γρήγορη καθιστώντας την μια από τις κύριες τεχνικές στην απομόνωση ουσιών[80,81,82,83].

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου περιλαμβάνει τον διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος με βάση τους συντελεστές κατανομής (Κ) των συστατικών αυτών στις δυο υγρές φάσεις. Καθώς η κινητή φάση διέρχεται διαμέσου της στατικής, παρασύρει τα συστατικά του μίγματος με διαφορετική ταχύτητα το καθένα και ανάλογα με τον συντελεστή κατανομής του, κάνοντας έτσι δυνατό τον διαχωρισμό και την απομόνωση τους.



Εικόνα 4.1.1: **Σχηματική παράσταση διαχωρισμού με την Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή**

4.2 Συντελεστής Κατανομής K (partition coefficient)

Σημαντικό μέγεθος στην Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή αποτελεί ο Συντελεστής Κατανομής K (partition coefficient). Ο συντελεστής αυτός εκφράζει την κατανομή μιας ουσίας στις δυο φάσεις ενός διφασικού συστήματος και ισούται με τον λόγο των συγκεντρώσεων της ουσία στις δυο αυτές φάσεις.

$$K_x = \frac{C_x\ \alpha\ \text{phase}}{C_x\ \beta\ \text{phase}}$$

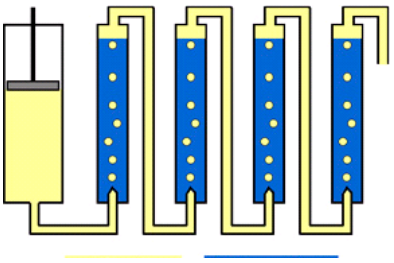
Εισήχθη ως όρος στο τέλος του 19^{του} αιώνα από τους Berthelot και Jugfleish με σκοπό να εκφράσει την υδροφοβικότητα των ουσιών. Η φυσικοχημική αυτή ιδιότητα εκφράζεται με τον συντελεστή $K_{o/w}$ ο οποίος ισούται με το λόγο των συγκεντρώσεων της ουσία στις δύο φάσεις του διφασικού συστήματος οκτανόλη/νερό. Όσο μεγαλύτερος είναι ο $K_{o/w}$ τόσο περισσότερο υδρόφοβη είναι μια ουσία και το αντίστροφο[84,85]. Η υδροφοβικότητα αποτελεί σημαντική φυσικοχημική ιδιότητα των ουσιών και ο υπολογισμός της θεωρείται απαραίτητος για τον χαρακτηρισμό των ουσιών που χρησιμοποιούνται στην φαρμακευτική βιομηχανία. Επίσης βρίσκει εφαρμογή στην κλασική χημεία για την μελέτη ανόργανων ή οργανικών πολύπλοκων ισορροπιών, στην βιομηχανική χημεία για την βελτιστοποίηση της παραγωγής και την διαχείριση αποβλήτων καθώς και στην βιομηχανία τροφίμων για την εκχύλιση και καθαρισμό της ζάχαρης, των λιπαρών ενώσεων ή της καφεΐνης[86].

Στην Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή ο συντελεστής κατανομής χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της καταλληλότητας ενός διφασικού συστήματος να διαχωρίσει τις ουσίες ενός μίγματος. Επιπλέον με βάση τις τιμές K των διαφόρων ουσιών μπορούμε να προβλέψουμε τόσο τη σειρά έκλουσης όσο και τον όγκο της κινητής φάσης που απαιτείται για την παραλαβή της κάθε ουσίας. Μπορεί να εκφραστεί είτε ως συγκέντρωση της ουσίας στην πάνω φάση προς την αντίστοιχη συγκέντρωση στην κάτω ($K_{\pi/\kappa}$) είτε το αντίστροφο ($K_{\kappa/\pi}$). Περισσότερα για τον συντελεστή κατανομής αναφέρονται παρακάτω όπου αναλύεται η διαδικασία επιλογής συστήματος.

4.3 Βασικοί τύποι Χρωματογραφίας Κατ' Αντιροή

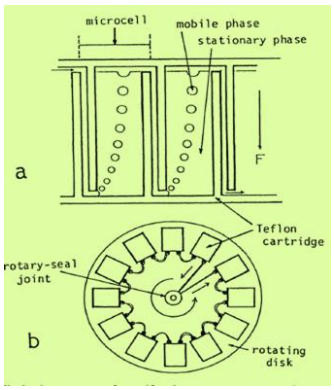
Η τεχνική περιλαμβάνει τρις βασικούς τύπους ανάλογα με τον τρόπο που επιτυγχάνεται η ισορροπία στο σύστημα:

Droplet Counter Current Chromatography (DCCC)



Ο τύπος αυτός χρησιμοποιεί την βαρύτητα προκειμένου να επιτευχθεί η ισορροπία (Υδροστατική ισορροπία). Η κινητή φάση διέρχεται διαμέσου της στατικής με πολύ μικρή ροή (στάγδην). Αυτό έχει ως συνέπεια να απαιτείται μεγάλος χρόνος για τον διαχωρισμό και να καταναλώνονται μεγάλες ποσότητες διαλύτη. Αποτελεί την πρώτη μορφή της χρωματογραφίας αντιστρόφου ροής και σήμερα χρησιμοποιείται μόνο για διδακτικούς σκοπούς[87,88].

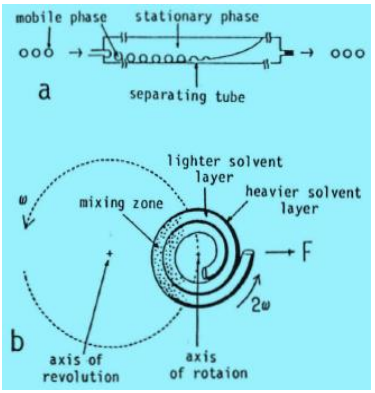
Centrifugal Partition Chromatography (CPC)



ΥΔΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΣΤΗΛΗ (Murayama et al. 1982)

Στην περίπτωση αυτή στη στήλη εφαρμόζεται κεντρομόλος δύναμη. Ως συνέπεια αυτού είναι η γρήγορη ανάμιξη και διαχωρισμός των δύο φάσεων με αποτέλεσμα γρηγορότερο και καλύτερο διαχωρισμό των ουσιών. Η στήλη του CPC είναι κυλινδρικού σχήματος με έναν κεντρικό άξονα όπου και εφαρμόζεται η περιστροφική κίνηση. Το εσωτερικό της στήλης απαρτίζεται από πολλές κυψελίδες οβάλ σχήματος τοποθετημένες στη σειρά και ενωμένες μεταξύ τους με σωληνάκια σε διάταξη κεφαλή προς ουρά. Η τεχνική αυτή αποτελεί εξέλιξη της DCCC τεχνικής, η ισορροπία εξακολουθεί να είναι υδροστατικού τύπου, εφόσον η κεντρομόλος κίνηση αυτό που προσφέρει είναι να συγκρατεί πιο σταθερά τη στατική φάση μέσα στην στήλη ώστε να μην παρασύρεται από την γρήγορη μετακίνηση της κινητής φάσης διαμέσου της στατικής[89,90].

High – Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

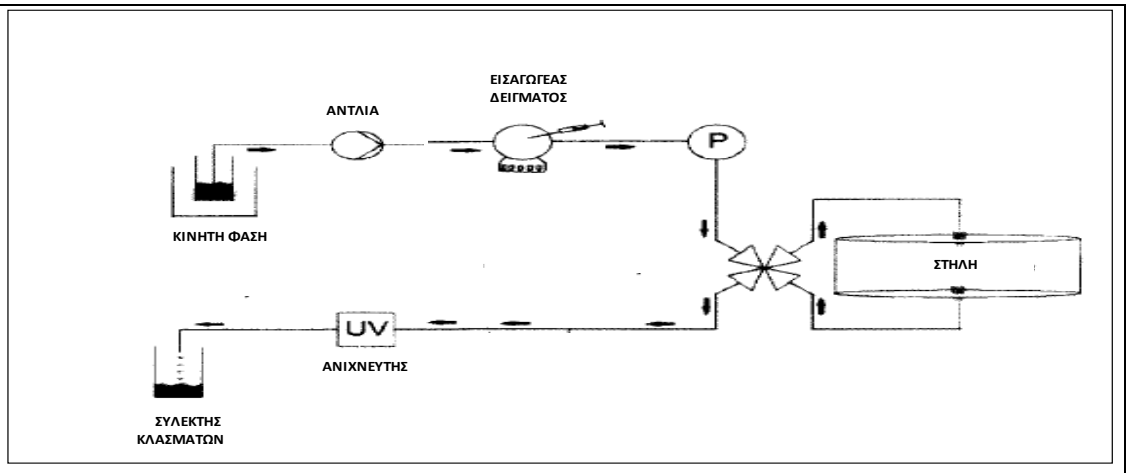


ΥΔΡΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΤΗΛΗ
(Ito 1981)

Όπως και στο CPC έτσι και εδώ στη στήλη εφαρμόζεται κεντρομόλος δύναμη. Η διαφορά μεταξύ των δύο τεχνικών έγκειται στη διαφορετική κατασκευή της στήλης καθώς και στις διαφορετικές κινήσεις που αυτή πραγματοποιεί. Έτσι η στήλη του HSCCC αποτελείται από έναν ελικοειδή σωλήνα, ο οποίος είναι τοποθετημένος κυλινδρικά γύρω από ένα κεντρικό άξονα, σχηματίζοντας πολλαπλές στοιβάδες από σπείρες. Ο σωλήνας περιστρέφεται τόσο γύρω από τον κεντρικό άξονα όσο και γύρω από τον δικό του άξονα (πλανητική κίνηση). Η κίνηση αυτή προκαλεί έντονη ανάδευση και μία επαναλαμβανόμενη διαδικασία διαδοχικής ανάμειξης και εξισορρόπησης δημιουργώντας ζώνες ανάμιξης και διαχωρισμού των δυο φάσεων μέσα στη στήλη. Για το λόγο αυτό η ισορροπία που επιτυγχάνεται ονομάζεται υδροδυναμική[91,92,93].

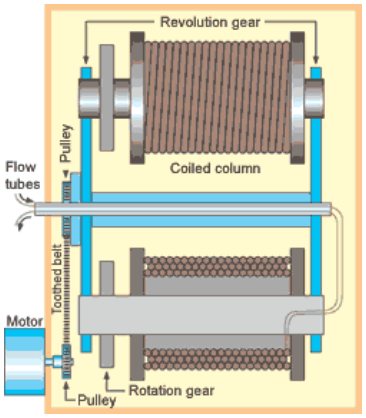
4.4 Οργανολογία

Αν και υπάρχουν διάφοροι τύποι συσκευών για την εκτέλεση διαχωρισμών τα βασικά μέρη τα οποία απαιτούνται στις περισσότερες από αυτές είναι: αντλία για τη διοχέτευση του διαλύτη, ένα απλό σύστημα εισαγωγής, ένας ανιχνευτής, ένας καταγραφέας και μία **περιστρεφόμενη στήλη** (Εικόνα 4.4.1).



Εικόνα 4.4.1: Τα κύρια μέρη ενός οργάνου Χρωματογραφίας Κατ' Αντιροή (CCC)

Η στήλη αποτελεί το κύριο μέρος της συσκευής και μπορεί να είναι υδροδυναμική ή υδροστατική.



Η **υδροδυναμική στήλη** συνήθως είναι φτιαγμένη από έναν ελικοειδή σωλήνα τοποθετημένο σπειροειδώς γύρο από έναν κεντρικό κύλινδρο σε σχήμα ''πηνίου''. Ανάλογα τον τρόπο διευθέτησης των ''πηνίων'' στο χορό διακρίνουμε κυρίως δύο ειδών υδροδυναμικές στήλες: την στήλη τύπου "J" όπου ο άξονας περιστροφής της στήλης είναι παράλληλα διευθετημένος προς τον κεντρικό άξονα περιστροφής και την στήλη τύπου "X" όπου ο προσανατολισμός της στήλης αποκλίνει απ' αυτόν του κεντρικού άξονα. Και για τους δύο τύπους υδροδυναμικών στηλών έχουν αναπτυχθεί διάφορες παραλλαγές που σκοπό έχουν να βελτιώσουν την ανάμιξη και διαχωρισμό των δύο φάσεων και κατ' επέκταση την ικανότητα διαχωρισμού των ουσιών[94,95].



Η **υδροστατική στήλη** συνήθως κατασκευάζεται από μεταλλικούς δίσκους τοποθετημένους ο ένας πάνω στον άλλο με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν στο εσωτερικό τους κενά διαστήματα (τις κυψελίδες και τους σωλήνες σύνδεσης). Οι διαφορετικοί τύποι υδροστατικών στηλών κυρίως έχουν να κάνουν με την διαφορετική διευθέτηση των κυψελίδων μέσα στη στήλη με σκοπό την καλύτερη ανάμιξη των φάσεων και αύξηση με αυτόν τον τρόπο των θεωρητικών πλακών και κατ' επέκταση της ποιότητας του διαχωρισμού[96].

Και στις δύο περιπτώσεις το μέγεθος των στηλών ποικίλει. Έτσι συναντάμε αναλυτικές στήλες (χωρητικότητας 10 έως 100 ml), ημιπαρασκευαστικές στήλες (χωρητικότητας 200 έως 500 ml) και παρασκευαστικές στήλες (χωρητικότητας 1 έως 5 λίτρων). Για τα μηχανήματα CPC δε έχουν φτιαχτεί τελευταία και στήλες μεγαλύτερες των 5 λίτρων οι οποίες προορίζονται για βιομηχανική χρήση[97,98].

Όσον αφορά τους ανιχνευτές αυτοί που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι οι ανιχνευτές UV. Λόγο όμως του περιορισμένου αριθμού μορίων που μπορούμε να παρατηρήσουμε με τους ανιχνευτές αυτούς (μόνο τα μόρια που απορροφούν στο υπεριώδες) τελευταία γίνεται προσπάθεια σύνδεσης της χρωματογραφικής στήλης και με άλλου είδους ανιχνευτές όπως σκέδασης φωτός (ELSD) και φασματογράφος μάζας (MS)[99,100].

4.5 Βασικές μέθοδοι της Χρωματογραφίας Αντιστρόφου Ροής

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση με Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή είναι κυρίως πέντε. Τρις εξ αυτόν αναφέρονται στον τρόπο έκλουσης των διαλυτών ενώ οι άλλες δυο στη χρήση περισσότερων του ενός διφασικών συστημάτων.

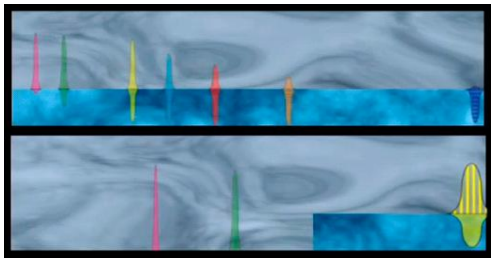
Normal-Mode

Αναφέρεται στην κλασική χρήση της τεχνική δηλαδή την χρησιμοποίηση της μιας φάσης ως κινητής και της άλλης ως στατική. Για την τεχνική CPC η χρήση της πάνω φάσης ως κινητή γίνεται από κάτω προς πάνω (ascending mode) ενώ όταν χρησιμοποιείται η κάτω φάση ως κινητή η είσοδος στη στήλη είναι από πάνω προς κάτω (descending mode). Στην τεχνική HSCCC οι αντίστοιχες κινήσεις ονομάζονται ουρά προ κεφαλή (tail to head) για κινητή την πάνω φάση και κεφαλή προς ουρά (haid to tail) όταν ως κινητή χρησιμοποιείται η κάτω φάση του διφασικού συστήματος.

Dual-Mode

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια παραλλαγή της παραπάνω μεθόδου και αναφέρεται στην δυνατότητα χρήσης τόσο της μιας όσο και της άλλης φάσης ως κινητής στην ίδια ανάλυση. Ουσιαστικά πρόκειται για τη δυνατότητα που προσφέρουν τα μηχανήματα να αλλάζουμε την κινητή φάση σε στατική και το αντίστροφο χωρίς να χρειάζεται να αδειάζει η στήλη. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται αισθητά ο χρόνος ανάλυσης ενός δείγματός και αποφεύγεται ο μεγάλος όγκος κινητής φάσης που απαιτείται για να εξέλθουν από τη στήλη οι ουσίες που κυρίως κατανέμονται στην στατική φάση.

Elution Extraction



Η τεχνική αυτή αποτελεί διαφορετική εφαρμογή των παραπάνω δύο τεχνικών και στόχος της είναι η μείωση του χρόνου ανάλυσης. Στην περίπτωση αυτή διοχετεύεται ένας συγκεκριμένος όγκος κινητής φάσης (περίπου διπλάσιος από τον όγκο της στατικής) και κατόπιν εξωθείται όλο το περιεχόμενο της στήλης και συλλέγονται τα κλάσματα. Το σκεπτικό της τεχνικής αυτής είναι ότι με την είσοδο της κινητής φάσης οι ουσίες του μίγματος διαχωρίζονται και απομακρύνονται μεταξύ τους (με βάση τον συντελεστή

κατανομής) και έτσι με την εξώθηση του περιεχομένου της στήλης εξέρχονται με τη σειρά που είναι ΄΄τοποθετημένες΄΄ μέσα σ'αυτήν. Το πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ο μικρός χρόνος διαχωρισμού και η μικρή κατανάλωση διαλυτών. Η ποιότητα όμως του διαχωρισμού πολλές φόρες είναι κακή[101,102].

Gradient Mode

Η μέθοδος αυτή άρχισε πρόσφατα να εφαρμόζεται για την ανάλυση φυσικών εκχυλισμάτων και οι βιβλιογραφικές αναφορές είναι περιορισμένες. Γίνεται χρήση πολλών συστημάτων στη σειρά προκειμένου να γίνει καλλίτερος διαχωρισμός ενός μίγματος και παραλαβή μεγαλύτερου αριθμού ουσιών σε καθαρή μορφή. Η χρήση της μεθόδου συνίσταται για την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων τα οποία περιέχουν ουσίες που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα πολικοτήτων και δομών. Η επιλογή των διφασικών συστημάτων που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να είναι κατάλληλα τόσο να διαχωρίσουν μεγάλο αριθμό ουσιών όσο και να διατηρήσουν την διφασικότητα τους μέσα στη στήλη. Η τελευταία δε προϋπόθεση αποτελεί και τον σημαντικότερο περιοριστικό παράγοντα στη χρήση της μεθόδου διότι είναι γνωστό ότι αλλαγές στο διφασικό σύστημα μπορεί να καταστρέψουν την ισορροπία των φάσεων και ως εκ τούτου να οδηγήσουν σε αποτυχημένη ανάλυση. Αυτό πού συνήθως γίνεται είναι η εφαρμογή κατάλληλης σειράς συστημάτων ώστε όλα να περιέχουν τους ίδιους διαλύτες και ίδια την φάση που θα χρησιμοποιηθεί ως στατική, ενώ αλλάζει ή αναλογία των διαλυτών που αποτελούν την κινητή φάση.

Ph Zone Refining

Στη μέθοδο αυτή αλλάζει βαθμιδωτά το Ph κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ουσιών με όξινες ή βασικές ιδιότητες όπως είναι τα οξέα, τα αλκαλοειδή κ.α. Σημαντικοί παράγοντες στην μέθοδο αυτή είναι τόσο ο συντελεστής κατανομής όσο και το pKa των ουσιών. Συνήθως το διφασικό σύστημα αποτελείται από μια οργανική και μια υδατική φάση στις οποίες προστίθενται οι παράγοντες που ρυθμίζουν το Ph.

4.5 Πλεονεκτήματα Χρωματογραφίας Αντιστρόφου Ροής

Η Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC) προσφέρει διακριτά πλεονεκτήματα για το διαχωρισμό, απομόνωση και καθαρισμό των ουσιών ενός μίγματος, συγκρινόμενο με παραδοσιακές υγρές – στερεές μεθόδους διαχωρισμού, όπως είναι η υγρή χρωματογραφία ανοικτής στήλης και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πιέσεως, διότι:

- Δεν απαιτεί τη χρήση στερεής στατικής φάσης και επομένως η πιθανότητα αμετάκλητης κατακράτησης ουσιών αποκλείεται. Έτσι, χρωματογραφούνται και ανακτώνται σχεδόν το 100% των ουσιών του μίγματος.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε διφασικό σύστημα. Επομένως η επιλογή του κατάλληλου συστήματος μπορεί να γίνει μέσα από ένα μεγάλο αριθμό συστημάτων, τα οποία μπορούν να δημιουργηθούν με τη χρήση πληθώρας διαλυτών.
- Το CCC μπορεί να προσαρμοστεί σε μεγάλης κλίμακας, συνεχείς διαχωρισμούς.
- Η διάσπαση που συχνά συμβαίνει σε πολύτιμες ουσίες όταν χρησιμοποιούνται οι συνηθισμένες χρωματογραφικές στήλες, είναι ουσιαστικά ανύπαρκτη στις ήπιες συνθήκες λειτουργίας της μεθόδου CCC.
- Έχει μικρή κατανάλωση διαλυτών. Σ'αυτό βοηθά και το γεγονός ότι το ίδιο ζεύγος διαλυτών μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για αντίστροφης φάσης έκλουση.
- Όλη η διαδικασία εκτελείται σε υγρές φάσεις και σε κλειστό σύστημα. Οι περιβαλλοντικές επιδράσεις είναι ελάχιστες και οι διαλύτες μπορούν να ανακτηθούν εξολοκλήρου και να ανακυκλωθούν.

4.7 Επιλογή και Έλεγχος Διφασικών Συστημάτων

Η επιλογή συστήματος διαλυτών αποτελεί το πιο σημαντικό στάδιο στη διαδικασία διαχωρισμού. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν η πολικότητα των συστατικών του μίγματος και η διαλυτότητά τους. Οι διαλύτες που θα συνδυασθούν θα πρέπει να έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- να σχηματίζουν διφασικό σύστημα
- να διαθέτουν μικρό χρόνο εξισορρόπησης (μικρότερο των 30 sec)
- οι όγκοι των δύο φάσεων να είναι περίπου ίσοι
- να διαλύουν πλήρως το δείγμα (το CCC είναι παρασκευαστική τεχνική και γι'αυτό το επιλεγόμενο σύστημα θα πρέπει να διαλύει μεγάλες ποσότητες δείγματος)
- οι τιμές των συντελεστών κατανομής των ουσιών του μίγματος στις δύο φάσεις να κυμαίνονται μεταξύ 0.2 και 5.0 (ιδανική περίπτωση να πλησιάζουν την τιμή 1.0)

Πρώτο και βασικό στάδιο της διαδικασίας επιλογής συστήματος αποτελεί ο βιβλιογραφικός έλεγχος και συγκεκριμένα η αναζήτηση συστημάτων που έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την απομόνωση ουσιών που ανήκουν στις ίδιες κατηγορίες με αυτές που περιέχονται στο προς ανάλυση δείγμα. Εναλλακτικά, μπορεί να επιλεγούν ως σημείο έναρξης της διαδικασίας τα κλασικά συστήματα $CHCl_3$/MeOH/H_2O (πολικό) και *n*-Hexane/EtOAc/MeOH/H_2O (λιγότερο πολικό) και οι αναλογίες των διαλυτών να αλλάζουν μέχρι να επιτευχθεί μια ικανοποιητική κατανομή του δείγματος ανάμεσα στις δυο φάσεις.

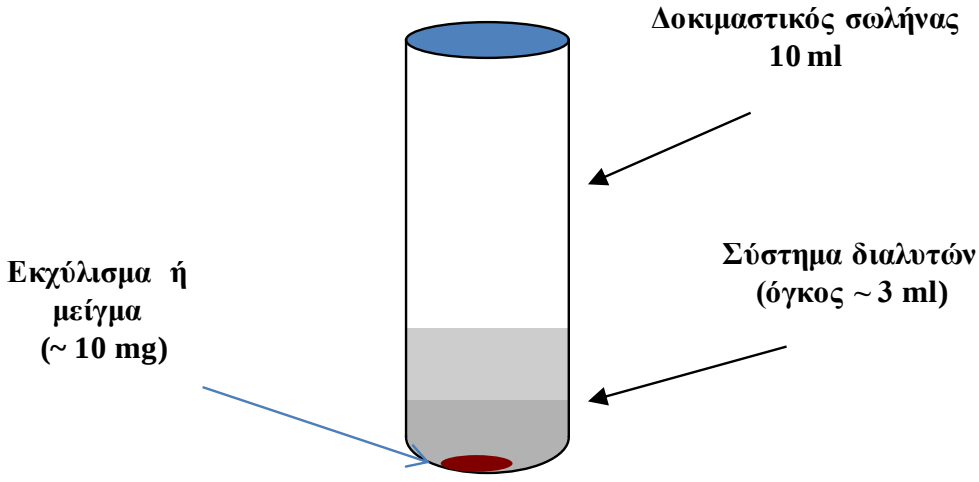
Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές, οι οποίες σχετίζονται με την επιλογή διφασικών συστημάτων. Σε μια μελέτη των Abott TP. και Kleiman R. περιγράφονται 13 διφασικά συστήματα, τα οποία είναι μίγματα $CHCl_3$: MeOH : H_2O ή n-Hexane : EtOAc : MeOH : H_2O σε διάφορες αναλογίες και αποτελούν τα αρχικά συστήματα αναζήτησης του κατάλληλου συστήματος[103]. Σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Oka F και τους συνεργάτες περιγράφεται η συστηματική αναζήτηση του κατάλληλου συστήματος από συνδυασμούς $CHCl_3$: MeOH : H_2O και n-Hexane : EtOAc : n-BuOH : MeOH : H_2O[104] ενώ ο Conway WD σε μια δημοσίευση του παρουσιάζει τριγωνικά διαγράμματα για τους διαλύτες $CHCl_3$,

MeOH και H_2O με βάση τα οποία υπολογίζονται οι αναλογίες των διαλυτών ώστε να προκύψουν διφασικά συστήματα και η σύσταση κάθε φάσης για καθορισμένο μίγμα διαλυτών[105].

Στο δεύτερο στάδιο, τα συστήματα που επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία, τα τριγωνικά διαγράμματα ή δημιουργήθηκαν από τον ερευνητή υπόκεινται σε δύο κύριους ελέγχους με στόχο να διαπιστωθεί η καταλληλότητα τους στο διαχωρισμό του προς μελέτη εκχυλίσματος ή μείγματος ουσιών. Ο πρώτος έλεγχος έχει ως στόχο την αξιολόγηση των συστημάτων ως προς την ικανότητα διάλυσης του μείγματος, την ταχύτητα διαχωρισμού και την αναλογία των δυο φάσεων. Με τον δεύτερο έλεγχο γίνεται η αξιολόγηση ως προς την κατανομή των συστατικών του δείγματος στις δύο φάσεις των διφασικών συστημάτων.

<u>Αξιολόγηση ως προς την ικανότητα διάλυσης, την ταχύτητα διαχωρισμού και την αναλογία των δυο φάσεων</u>.

Η προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες (συνήθως των 10 ml) όπου τοποθετούνται 10 mg περίπου εκχυλίσματος ή μείγματος και προστίθενται οι διαλύτες του κάθε συστήματος, στις κατάλληλες αναλογίες έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι περίπου 3 ml. Το κάθε δείγμα ανακινείται έντονα και αφήνεται να ηρεμήσει.



Σχήμα 4.7.1: Σχηματική παράσταση προετοιμασίας δείγματος

Οι βασικές προϋποθέσεις για να θεωρηθεί ένα σύστημα αποδεκτό είναι η πλήρης διάλυση του δείγματος, ο σχηματισμός και διαχωρισμός των δύο φάσεων σε χρόνο μικρότερο του ενός λεπτού και η λήψη περίπου ίσων όγκων για τις δύο φάσεις.

Αξιολόγηση ως προς την κατανομή των συστατικών του δείγματος στις δύο φάσεις

Για να θεωρηθεί ένα σύστημα ικανό να διαχωρίσει τα συστατικά ενός εκχυλίσματος θα πρέπει οι περισσότερες ουσίες του εκχυλίσματος να είναι κατάλληλα κατανεμημένες στις δυο φάσεις του διφασικού συστήματος. Μέτρο της κατανομή των ουσιών σε ένα διφασικό σύστημα διαλυτών αποτελεί ο συντελεστής κατανομής ο οποίος ισούται με το λόγο των συγκεντρώσεων της ουσίας στις δύο φάσεις του συστήματος. Με βάση τους συντελεστές κατανομής μπορούμε να προβλέψουμε εάν κάποιο διφασικό σύστημα είναι ικανό να διαχωρίσει τις ουσίες ενός μίγματος ή μέρος αυτών. Επίσης μπορούμε να προβλέψουμε τόσο την σειρά έκλουσης των ουσιών όσο και τον όγκο της κινητής φάσης που απαιτείται για να εκλουστεί κάποια ουσία.

Η εύρεση των συντελεστών κατανομής αποτελεί σημαντικό στάδιο στην διαδικασία επιλογής συστήματος. Συνήθως το στάδιο αυτό της μελέτης απαιτεί χρόνο καθώς και τη χρήση σύγχρονων τεχνικών. Έτσι είναι απαραίτητος ένας αρχικός έλεγχος ρουτίνας με σκοπό να μειωθεί ο αριθμός των συστημάτων για τα οποία θα προχωρήσουμε σε εύρεση των συντελεστών κατανομής. Την δυνατότητα αυτή μας την παρέχει η Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) η οποία είναι μια εύκολη, γρήγορη και φτηνή τεχνική με την οποία μπορούμε να απορρίψουμε τα συστήματα εκείνα στα οποία οι περισσότερες ουσίες είναι κατανεμημένες εξ ολοκλήρου στη μία από τις δύο φάσεις.

Η πλέον χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον υπολογισμό των συντελεστών κατανομής είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης ενωμένη με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού. Γνωρίζοντας ότι η επιφάνεια της κορυφής μιας ουσίας είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ουσίας αυτής υπολογίζουμε τον συντελεστή κατανομής από το λόγο των επιφανειών της κορυφής στα χρωματογραφήματα των δύο φάσεων του διφασικού συστήματος. Έτσι ίδια ποσότητα από την κάθε φάση χρωματογραφείται και υπολογίζεται η επιφάνεια των κορυφών των διαφόρων

ουσιών του υπό μελέτη εκχυλίσματος. Οι συντελεστές κατανομής υπολογίζονται με βάση τον τύπο:

$$K_x = \frac{C_x\ \alpha}{C_x\ \beta} = \frac{E_x\ \alpha}{E_x\ \beta}$$

K_x = Συντελεστής Κατανομής της ουσίας X
C_x = Συγκέντρωση της ουσίας X
E_x = Επιφάνεια Κορυφής της ουσίας X
α , β = Οι δύο φάσεις του διφασικού συστήματος

Η χρησιμοποίηση της παραπάνω τεχνικής προϋποθέτει ότι οι ουσίες απορροφούν στο υπεριώδες. Για την εύρεση των συντελεστών κατανομής ουσιών οι οποίες δεν απορροφούν στο υπεριώδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά άλλες τεχνικές όπως Υγρή Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματογράφο Μάζας (LC-MS), Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης συνδεδεμένη με Ανιχνευτή Σκέδασης Φωτός κ.α.

Τέλος στην περίπτωση μειγμάτων άπολων ή πτητικών συστατικών μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε και την Αέριο Χρωματογραφία συνδεδεμένη με Φασματογράφο Μάζας (GC-MS) προκειμένου να υπολογίσουμε τους συντελεστές κατανομής. Και στην περίπτωση αυτή η επιφάνεια κορυφής μιας ουσίας είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της .

Κεφάλαιο 5

Αρχική Αξιολόγηση Φυτών της Οικογένειας Fabacea

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα εδώδιμα φυτά της οικογένειας Fabaceae (όσπρια) θεωρούνται προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας και κατέχουν σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής Διατροφής. Τα φυτά αυτά περιέχουν σημαντικές ποσότητες δευτερογενών μεταβολιτών με αντιοξειδωτική δράση όπως είναι τα φλαβονοειδή (φλαβόνες, φλαβονόλες, ισοφλαβόνες), τα φαινολικά οξέα (παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος) και τα λιγνάνια. Αρκετές μελέτες των τελευταίων ετών αποδίδουν τις ευεργετικές ιδιότητες της Μεσογειακής διατροφής στην αντιοξειδωτική δράση των συστατικών που λαμβάνονται μέσω αυτής[106,107,108,109,110,111].

Αντικείμενο του παρόντος τμήματος της διδακτορικής εργασίας αποτελεί ο εντοπισμός φυτών της οικογένειας Fabaceae με καλές αντιοξειδωτικές και άλλες ιδιότητες. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν 11 είδη της Ελληνικής χλωρίδας από τα οποία, μετά από επεξεργασία, προέκυψαν 63 αρχικά εκχυλίσματα. Τα εκχυλίσματα αυτά υποβλήθηκαν σε μια σειρά χρωματογραφικών και βιολογικών μελετών προκειμένου να εντοπιστούν αυτά με τις καλύτερες ιδιότητες (κυρίως ως προς το φαινολικό φορτίο και τις αντιοξειδωτικές-αντιμεταλαξιογόνες δράσεις).

Η συλλογή των φυτών έγινε σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας από τον διδάκτορα κ Ε. Καλπουτζάκη ενώ μερικά είναι καλλιεργούμενα.

Για τον έλεγχο με TLC χρησιμοποιήθηκαν απλές πλάκες αλουμινίου με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F_{254}-Merck), ενώ για τον έλεγχο HPLC το όργανο Thermo Finnigan HPLC (αντλία: SpectraSystem P4000, απαεροτή: SpectraSystem 1000, ανιχνευτή UV: SpectraSystem AS3000).

Η μέτρηση των ολικών φαινολικών, οι έλεγχοι αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιογόνου δράσης καθώς και η μελέτη επίδρασης στη δράση του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου της Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Δ. Κουρέτα.

Ο έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης πραγματοποιήθηκε στο Τ.Ε.Ι Αθηνών υπό την επίβλεψη του καθηγητή Μικροβιολογίας Τροφίμων, κ. Β. Σπηλιώτη.

5.2 ΣΥΛΛΟΓΗ – ΔΙΑΛΟΓΗ – ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Για το σκοπό αυτό συλλέχτηκαν 11 ενδημικά είδη ψυχανθών και αφού διαχωρίστηκαν οι καρποί από το υπόλοιπο φυτό, εκχυλίστηκαν για να προκύψουν συνολικά 63 εκχυλίσματα. Μερικά από τα φυτά αυτά κατέχουν κυρίαρχη θέση στην διατροφή του ανθρώπου όπως τα φασόλια, τα κουκιά και η φακή ενώ άλλα παρουσιάζουν επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω των περιορισμένων αναφορών σχετικά με το φυτοχημικό τους περιεχόμενο. Τα είδη που μελετήθηκαν, ο χρόνος και ο τόπος συλλογής τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.2.1: Ονομασία, τόπος συλλογής τους χρήση των υπό μελέτη φυτών της οικ. Fabaceae.

Είδος	**Κοινή Ονομασία**	**Περίοδος και Τόπος συλλογής**	**Χρήση**
Vicia faba	Κουκιά, Κύαμοι	Μέσα Μαΐου / Χωριό Ζαρός Κεντρική Κρήτη (υψ. 350-450 μ)	Εδώδιμο
Vicia tenouifolia subsp. stenophylla	-	Τέλος Ιουνίου / Όρος Κυλλήνη (υψ. 1500 μ)	-
Lathyrus sativus	Λαθούρι	Μέσα Μαΐου/ Καισαριανή Υμηττός	Ζωοτροφή
Lathyrus laxiflorus subsp.laxiflorus	-	Τέλος Μαΐου / Χωρίο Κουνουπία, Όρος Πάρνωνας (υψ. 780 μ)	-
Lathyrus clymenus	Φάβα Σαντορίνης		Εδώδιμο
Phaseolus vulgaris	Φασόλια		Εδώδιμο
Lens culinaris	Φακές	Μέσα Μαΐου/ Καισαριανή Υμηττός	Εδώδιμο
Lupinus albus	Λούπινο το λευκό	Μέσα Μαΐου/ Καισαριανή Υμηττός	Εδώδιμο
Lotus longisiliquosus	-	Τέλος Μαΐου/ Όρος Χιονοβούνι, Επίδαυρος (υψ. 800-900 μ)	-
Lotus edulis	Περαντζούνι	Τέλος Απριλίου / Χωριό Ζαρός Κεντρική Κρήτη (υψ. 350-450 μ)	Εδώδιμο
Tetragonolobus purpureus	Άσπαγος	Τέλος Απριλίου / Χωριό Ζαρός Κεντρική Κρήτη (υψ. 350-450 μ)	Εδώδιμο

Μετά την συλλογή και διαλογή του φυτικού υλικού ακολούθησε ξήρανση και κονιοποίηση των δρογών. Οι κονιοποιημένες δρόγες στη συνέχεια εκχυλίστηκαν διαδοχικά με DCM, MeOH και H_2O. Κάθε εκχύλιση επαναλήφθηκε τρεις φορές και η διάρκεια της κάθε φοράς ήταν 48 ώρες. Από την παραπάνω διαδικασία προέκυψαν 63 εκχυλίσματα τα βάρη των οποίων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.2.2: Τα βάρη των εκχυλισμάτων των φυτών της οικ. Fabaceae.

Είδος	Τμήμα φυτού	Βάρος (g)			
		κόνεως	DCM εκχ.	MeOH εκχ.	H2O εκχ.
Vicia faba	Σπερμ.	451	6.1	8.7	12.8
	Πόα	890	13.5	78.1	68.9
Vicia tenuifolia subsp. stenophylla	Καρποί	46	0.5	3.6	5.0
	Πόα	960	13.4	52.2	54.3
Lathyrus sativus	Σπερμ.	484	3.7	5.7	14.9
	Πόα	150	6.3	14.6	17.1
Lathyrus laxiflorus subsp.laxiflorus	Πόα	172	2.8	11.9	22.4
Lathyrus clymenus	Πόα	224	4.1	15.6	24.6
Phaseolus vulgaris	Σπερμ.	751	10.2	14.5	21.3
	Πόα	250	6.7	21.7	34.4
Lens culinaris	Σπερμ.	751	8.1	13.7	38.8
	Πόα	830	24.4	51.6	72.6
Lupinus albus	Σπερμ.	102	4.3	5.4	7.5
	Περικ.	296	6.6	19.3	4.5
	Πόα	770	22.3	88.4	90.9
Lotus longisiliquosus	Καρποί	17.9	0.2	2.2	2.5
	Πόα	103	1.8	6.6	14.5
Lotus edulis	Καρποί	30	0.3	6.9	4.0
	Πόα	490	11.4	59.2	22.5
Tetragonolobus purpureus	Καρποί	174	2.2	17.2	8.0
	Πόα	815	22.0	84.7	70.6

5.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

5.3.1 Έλεγχος με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC).

Για τον έλεγχο των διχλωρομεθανικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως συστήματα ανάπτυξης μίγματα c-Hexane/CH_2Cl_2 σε διάφορες αναλογίες καθώς και μίγματα CH_2Cl_2/MeOH σε αναλογίες 100/0 ως 70/30. Για τον έλεγχο των μεθανολικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε μίγμα CH_2Cl_2 /MeOH σε αναλογίες 100/0 ως 20/80. Επίσης έγινε έλεγχος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αντιστρόφου φάσης (RP-18) στην οποία χρησιμοποιήθηκαν συστήματα διαλυτών H_2O/MeOH σε αναλογίες 100/0 ως 50/50. Τέλος τα υδατικά εκχυλίσματα ελέχθησαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αντιστρόφου φάσης (RP-18) με συστήματα διαλυτών H_2O/MeOH σε αναλογίες 100/0 ως 40/60. Ακολούθησε παρατήρηση των χρωματογραφημάτων στο υπεριώδες (σε μήκη κύματος 254 και 366 nm) και ψεκασμός με διάλυμα θειικής βανιλλίνης. Στη συνέχεια τα χρωματογραφήματα μελετήθηκαν προσεκτικά και εξήχθησαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Τα **διχλωρομεθανικα εκχυλίσματα,** τόσο των καρπών όσο και των υπέργειων τμημάτων περιέχουν κυρίως λιπαρά συστατικά και τερπενοειδή. Επίσης στην περίπτωση των υπέργειων τμημάτων περιέχονται σημαντικές ποσότητες χλωροφυλλών.
- Οι μεταβολίτες που περιέχονται στα **μεθανολικά εκχυλίσματα** ανήκουν στις γενικές κατηγορίες των τερπενοειδών, των φαινολικών παραγώγων και των σακχάρων.
- Τα **υδατικά εκχυλίσματα** περιέχουν μια πληθώρα πολικών συστατικών τα οποία κυρίως είναι φλαβονοειδή, φαινολικοί γλυκοσίδες και σάκχαρα.

5.3.2 Έλεγχος με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

Το περιεχόμενο των μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων μελετήθηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το όργανο Thermo Finnigan HPLC (αντλία: SpectraSystem P4000, απαερωτή: SpectraSystem 1000, ανιχνευτή UV-DAD: SpectraSystem AS3000) και η στήλη Lichrosorb, RP-18, 250 x 4.6 mm, 5μm (Supelco). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε

φαίνεται στον Πίνακα 5.3.1. Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων έγινε σε μήκη κύματος 260, 280 και 365 nm.

Πίνακας 5.3.1: Μέθοδος HPLC για την ανάλυση των ολικών εκχυλισμάτων

ΧΡΟΝΟΣ (min)	ΔΙΑΛΥΤΗΣ Α (%) H_2O + 2% AA	ΔΙΑΛΥΤΗΣ Β (%) AcN + 2% AA +2% MeOH	ΡΟΗ (ml/min)
0	96	4	1
30	88	12	1
45	80	20	1
75	50	50	1
80	30	70	1
85	96	4	1
95	96	4	1

Από τη μελέτη των χρωματογραφημάτων (χρόνος ανάσχεσης (Rt) και φάσμα UV των κορυφών) εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Το μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα του ίδιου τμήματος του κάθε φυτού διαθέτει παρόμοιο φαινολικό φορτίο και παρουσιάζουν κυρίως ποσοτικές διαφορές.
- Τα εκχυλίσματα του ίδιου διαλύτη, από διαφορετικά τμήματα των φυτών, περιέχουν μεγάλο αριθμό κοινών ουσιών.
- Τα σπέρματα είναι πιο φτωχά σε δευτερογενείς μεταβολίτες σε σύγκριση με τα άλλα τμήματα των φυτών.

Από τις προαναφερόμενες κατηγορίες φυσικών προϊόντων το μεγαλύτερο ενδιαφέρον από φυτοχημικής απόψεως παρουσιάζουν τα τερπενοειδή και τα φαινολικά παράγωγα. Σημαντικό ποσοστό των φαινολικών παραγώγων αποτελούν τα φλαβονοειδή, τα οποία όπως προαναφέραμε είναι ενώσεις ή ουσίες μεγάλου φαρμακολογικού ενδιαφέροντος. Έτσι αρχικά μελετήθηκαν οι αντιοξειδωτικές και φυτοοιστρογονικές ιδιότητες των μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων. Στη συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμασιών, ακολούθησε η φυτοχημική ανάλυση των πιο αξιόλογων εκχυλισμάτων.

5.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

5.4.1 *Μέτρηση Ολικών Φαινολικών.*

Ο προσδιορισμός του ολικού φαινολικού φορτίου αποτελεί μια αρχική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης ενός δείγματος, λόγω της παρατηρούμενης ανάλογης σχέσης μεταξύ των ολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ενεργότητας του δείγματος. Η μέτρηση των ολικών φαινολικών γίνεται συνήθως φωτομετρικά με τη χρήση αντιδραστηρίων όπως το Folin-Ciocalteu και το Prussian Blue. Η μέθοδος μέτρησης με τη χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu είναι η συνήθως χρησιμοποιούμενη λόγω της απλότητας και της επαναληψιμότητας της.

Η μέθοδος βασίζεται στην οξείδωση των φαινολών με ταυτόχρονη αναγωγή διαλύματος φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος με αποτέλεσμα το σχηματισμό φωσφορομολυβδενικού/φωσφοροβολφραμικού-φαινολικού συμπλόκου. Το τελευταίο χρωματίζεται μπλε σε αλκαλικό περιβάλλον και παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 765 nm. Τα φαινολικά συστατικά αντιδρούν με το αντιδραστήριο μόνο σε αλκαλικές συνθήκες και για το λόγο αυτό πραγματοποιείται ρύθμιση σε pH 10 με διάλυμα ανθρακικού νατρίου[112,113,114].

Το φαινολικό φορτίο των εκχυλισμάτων καθορίστηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu[115]. Σε κάθε διάλυμα εκχυλίσματος (0,1 ml) προστέθηκε το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (0,5 ml) και απιονισμένο νερό (5 ml) και τα δείγματα αφέθηκαν για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αναμίχθηκαν με 25% w/v διάλυμα ανθρακικού νατρίου (1,4 ml) και απιονισμένο νερό (3 ml) και μετά από επώαση μιας ώρας σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι, μετρήθηκε η απορρόφηση τους σε μήκος κύματος 765 nm. Το κάθε δείγμα ελέγθηκε εις τριπλούν. Τα λευκά δείγματα περιείχαν το αντιδραστήριο και απιονισμένο νερό χωρίς το εκχύλισμα. Επίσης μετρήθηκε και η οπτική πυκνότητα του εκχυλίσματος (0,1 ml) σε 25% w/v διάλυμα ανθρακικού νατρίου (1,4 ml) και απιονισμένο νερό (8 ml) στα 765 nm.

Η συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινολες (TPC) εκφράστηκε ως mg γαλλικού οξέος (GA) ανά g εκχυλίσματος(mg GA/g εκχυλίσματος) και μετρήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς των τιμών απορρόφησης σε συγκεντρώσεις 0, 50, 150, 250 και

500μg/ml γαλλικού οξέος (GA). Τα αποτελέσματα του ελέγχου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5.4.1)[116].

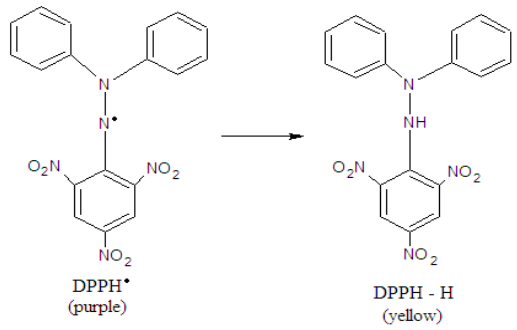
Πίνακας 5.4.1: Συνολικό πολυφαινολικό φορτίο των μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας Fabaceae.

Είδος	Τμήμα φυτού	Μεθανολικό εκχύλισμα	Υδατικό εκχύλισμα
		TPC (mgGA/g extract)	TPC (mgGA/g extract)
Phaseolus vulgaris	σπερμ.	3	2
Phaseolus vulgaris	πόα	18	28
Vicia faba	πόα	30	32
Vicia tenouifolia	καρποί	7	12
Vicia tenouifolia	πόα	9	15
Lens culinaris	πόα	16	50
Lens culinaris	σπερμ.	7	7
Lupinus albus	σπερμ.	41	22
Lupinus albus	πόα	60	39
Lupinus albus	περικ.	66	28
Lotus edulis	πόα	33	22
Lotus edulis	καρποί	8	14
Lotus longisiliquosus	πόα	11	27
Tetragonolobus purpureus	καρποί	13	21
Tetragonolobus purpureus	πόα	5	13
Lathyrus sativus	πόα	32	-
Lathyrus clymenus	πόα	-	3
Lathyrus laxiflorus	πόα	89	100

Τα αποτελέσματα της δοκιμής έδειξαν ότι τόσο τα μεθανολικά όσο και τα υδατικά εκχυλίσματα των εξεταζόμενων φυτών είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις. Στα μεθανολικά εκχυλίσματα το συνολικό πολυφαινολικό φορτίο κυμαίνεται μεταξύ 3 και 89 *mg* GA*/g εκχυλίσματος, ενώ στα υδατικά μεταξύ 2 και 100 mg* GA*/g εκχυλίσματος. Επίσης, τα αποτελέσματα της δοκιμής δείχνουν ότι το υδατικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του Lathyrus laxiflorus* διαθέτει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες ακολουθούμενο από το μεθανολικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του ίδιου φυτού.

5.4.2 In vitro Έλεγχος Ικανότητας Εξουδετέρωσης Ελευθέρων Ριζών – Δοκιμασία DPPH

Ο έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης (antioxidative activity, AOA) χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της ικανότητας των εκχυλισμάτων να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες.[117] Έχουν αναφερθεί αρκετές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της ιδιότητας αυτής, ωστόσο η δοκιμή DPPH είναι μία από τις πιο δημοφιλείς. Η μέθοδος DPPH συνίσταται στη χρήση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλικής ρίζας ($DPPH^{\bullet}$) ως πρότυπη ουσία για τον υπολογισμό της αποτελεσματικότητας μιας αντιοξειδωτικής ουσίας.[118] Η ένωση αυτή, θεωρείται ως μία σχετικά σταθερή ελεύθερη ρίζα η οποία ανάγεται από ουσίες που μπορούν να προσφέρουν ένα άτομο υδρογόνου, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο την εξουδετέρωση της. Κατά συνέπεια, όσο πιο αποτελεσματική είναι μία ουσία στην καταστροφή της ρίζας $DPPH^{\bullet}$, τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική της δραστικότητα.



Εικόνα 5.4.1: Μετατροπή $DPPH^{\bullet}$ σε DPPH-H

Η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών (Radical Scavenging Capacity, RSC)[119] προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά λόγω της χρωματικής αλλαγής, από βαθύ πορφυρό ($DPPH^{\bullet}$) σε κίτρινο (DPPH-H) [Εικόνα 5.4.1]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της απορρόφησης του διαλύματος στα 517 nm, κάνοντας δυνατή την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Σημαντικός είναι ο προσδιορισμός της τιμής IC_{50}, δηλαδή της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος που προκαλεί κατά 50% μείωση της απορρόφησης στα 517nm. Μάλιστα, όσο μικρότερη είναι η τιμή αυτή τόσο πιο ισχυρή είναι η δράση του φυτικού εκχυλίσματος/ουσίας που ελέγχεται για την αντιοξειδωτική της δράση.

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων υπολογίστηκε με βάση την ικανότητα τους να εξουδετερώνουν την ελεύθερη ρίζα 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλικής ρίζας ($DPPH^{\bullet}$) μετρώντας την μείωση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 517 nm[120]. Πιο συγκεκριμένα σε κυψελίδα που περιείχε 1 ml μεθανόλης και 100 μM πρόσφατα παρασκευασμένου $DPPH^{\bullet}$ σε μεθανόλη προστέθηκαν τα υπό μελέτη εκχυλίσματα σε συγκεντρώσεις 0.1, 0.5, 1.5 και 10 mg/ml. Τα μείγματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min και κατόπιν μετρήθηκε η απορρόφηση τους στα 517 nm ($A_{δείγμα}$). Σε κάθε πείραμα η απορρόφηση του εκχυλίσματος μόνο του σε μεθανόλη χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό ($A_{τυφλό}$) ενώ η απορρόφηση του διαλύματος $DPPH^{\bullet}$ μόνο του σε μεθανόλη ως απορρόφηση αναφοράς ($A_{αναφοράς}$). Το κάθε πείραμα διεξήχθη εις τριπλούν και επαναλήφτηκε δυο φορές. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του κάθε εκχυλίσματος (radical scavenging capacity RSC) εκφράστηκε ως η επί τις εκατό εξουδετέρωση της ρίζας $DPPH^{\bullet}$ και υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

$$\% \text{ RSC} = \frac{A_{αναφοράς} - A_{δείγματος}}{A_{αναφοράς}} \times 100$$

Στη συνέχεια, από τη γραμμική παράσταση της %RSC με τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος προσδιορίστηκε η IC_{50} δηλαδή η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που οδηγεί σε 50% της μείωσης της απορρόφησης. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5.4.2) παρουσιάζονται οι τιμές IC_{50} των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων[121].

Τα αποτελέσματα της δοκιμής καταδεικνύουν σαφέστατα ότι όλα τα υπό μελέτη εκχυλίσματα διαθέτουν καλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και εξουδετερώνουν σε σημαντικό βαθμό την ρίζα DPPH. Από τα εκχυλίσματα αυτά την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση επέδειξαν τα υπέργεια τμήματα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (τόσο το μεθανολικό όσο και το υδατικό εκχύλισμα). Επίσης πολύ καλή δράση έδειξαν: η πόα του φυτού *Phaseolus vulgaris* (μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα), η πόα του φυτού *Lens culinaris* (κυρίως το υδατικό εκχύλισμα), η πόα και το περικάρπιο του φυτού *Lupinus albus* (μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα), η πόα του φυτού *Lotus longisiliquosus* (υδατικό εκχύλισμα), η πόα και οι καρποί του φυτού *Tetragonolobus purpureus* (υδατικό εκχύλισμα) και η πόα του φυτού *Lathyrus sativus* (μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι

πόες των φυτών αυτών διαθέτουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από ότι οι καρποί και τα σπέρματα.

Πίνακας 5.4.2: Αποτελέσματα της δοκιμής DPPH των μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας Fabaceae.

Είδος	Τμήμα φυτού	Μεθανολικό	Υδατικό εκχύλισμα
		IC50 (mg/ml)	IC50 (mg/ml)
Phaseolus vulgaris	σπερμ.	4,7 ± 0,3	7,6 ± 0,3
Phaseolus vulgaris	πόα	0,7 ± 0,2	0,25 ± 0
Vicia faba	πόα	0,25 ± 0,05	0,17 ± 0
Vicia tenouifolia	καρποί	2,7 ± 0	1,9 ± 0,2
Vicia tenouifolia	πόα	3,1 ± 0	1 ± 0
Lens culinaris	πόα	1,25 ± 0	0,4 ± 0
Lens culinaris	σπερμ.	6,8 ± 0,3	2,3 ± 0
Lupinus albus	σπερμ.	3,7 ± 0,1	4,4 ± 0,2
Lupinus albus	πόα	0,7 ± 0,1	0,4 ±0
Lupinus albus	περικ.	1,6 ± 0,1	0,6 ± 0
Lotus edulis	πόα	2,4 ± 0	2,1 ± 0,3
Lotus edulis	καρποί	2,7 ± 0	1,5 ± 0
Lotus longisiliquosus	πόα	2,1 ± 0,1	0,4 ± 0
Tetragonolobus purpureus	καρποί	5,5 ± 0,2	0,8 ± 0
Tetragonolobus purpureus	πόα	1,7 ± 0	0,6 ± 0
Lathyrus sativus	πόα	0,6 ± 0,1	0,27 ± 0
Lathyrus clymenus	πόα	-	6,5 ± 0,2
Lathyrus laxiflorus	πόα	0,056 ± 0	0,08 ± 0

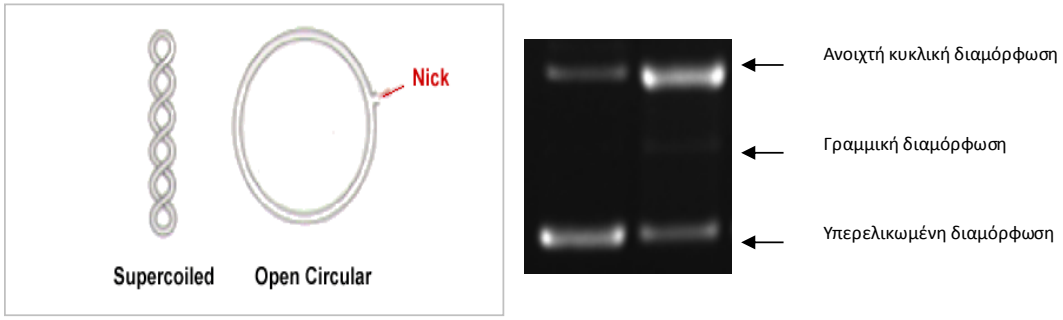
5.4.3 In vitro Έλεγχος Αντιοξειδωτικής-Αντιμεταλαξιογόνου Δράσης

Μια συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον έλεγχο αντιμεταλλαξιογόνου δράσης, είναι η μέτρηση της αναστολής της βλαβερής επίδρασης οξειδωτικών παραγόντων και υπεριώδους ακτινοβολίας στο DNA (Plasmid relaxation assay). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ικανότητας, των ουσιών/εκχυλισμάτων να παρεμποδίζουν την τοξική δράση ελευθέρων ριζών πάνω στο DNA. Ως μοντέλο για παρατήρηση της τοξικής δράσης των ελευθέρων ριζών καθώς και της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων ουσιών ή εκχυλισμάτων πάνω στο DNA, χρησιμοποιείται το πλασμιδιακό DNA. Το πλασμιδιακό DNA έχει το

πλεονέκτημα ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα. Ωστόσο από τις σημαντικότερες ιδιότητές του είναι ότι όταν τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις [Εικόνα 5.4.2].

1. Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) η οποία αποτελεί την πιο συμπυκνωμένη του μορφή χωρίς σπασίματα (άθικτη).
2. Την ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλωνα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις ελευθερώνονται και υπεύθυνοι για το φαινόμενο αυτό είναι είτε ενζυμικοί είτε άλλοι παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες, οξειδωτικοί παράγοντες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA.
3. Την γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν συμβένουν δίκλωνα σπασίματα.

Οι διαμορφώσεις αυτές τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης με την πιο μικρή σε μέγεθος διαμόρφωση να διαπερνά πιο γρήγορα τους πόρους της αγαρόζης.



Εικόνα 5.4.2: Σχηματική αναπαράσταση της μετάβασης του πλασμιδιακού DNA από την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην ανοιχτή κυκλική (open circular) και στην γραμμική (linear) διαμόρφωση από την πρόκληση θραυσμάτων (Nicks)

Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων απέναντι στην δράση ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Με βάση την αρχή της μεθόδου, έχει μελετηθεί

η προστατευτική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων απέναντι στην ικανότητα των ριζών $OH^{\bullet}$ και $ROO^{\bullet}$ να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA και να αλλάζουν την διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

- *Αναστολή βλαβών που προκαλούνται από τις Υδρόξυ ελεύθερες Ρίζες ($OH^{\bullet}$)*

Η δοκιμή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του Keum και των συνεργατών του[106]. Το μείγμα της αντίδρασης (10 μl) αποτελείται από 3 μg Bluescript-SK+ πλασμιδικό DNA (απομονώθηκε από μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες βακτηρίων), 10 mM Tris-HCl – 1mM EDTA, το εξεταζόμενο εκχύλισμα σε διάφορες συγκεντρώσεις (100, 200, 400, 800 και 1600 μg/ml) και 40 mM H_2O_2. Οι ρίζες υδροξυλίου προέρχονται από την φωτόλυση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) μετά την ακτινοβόληση του μείγματος της αντίδρασης από λάμπα υπεριώδους 300 W για 3 λεπτά και σε απόσταση 50 cm. Η αντίδραση περατώθηκε με την προσθήκη 3μl ρυθμιστικού διαλύματος (0.25% μπλε βρωμοθειόλης και 30 % γλυκερόλης) και αναλύθηκε σε γέλη ηλεκτροφόρησης 0.8% αγαρόζης στα 70 V για μία ώρα. Στη συνέχεια η γέλη επεξεργάστηκε καταλλήλως και αφού φωτογραφήθηκε με φωτοκαταγραφέα UV τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με Αναλυτή Gel-Pro. Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές.

Τα αποτελέσματα της μελέτης εκφράστηκαν ως η επί της εκατό αναστολή της βλάβης του DNA από την δράση του εκχυλίσματος και υπολογίστηκαν με βάση τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{S_0 - S}{S_{control} - S_0} \text{ x} 100$$

Όπου $S_{control}$ είναι το ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης DNA στο δείγμα αρνητικού ελέγχου (χωρίς το υπό μελέτη εκχύλισμα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και την υπεριώδη ακτινοβολία), S_0 είναι το ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης DNA στο δείγμα θετικού ελέγχου (χωρίς το εκχύλισμα αλλά με την παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της υπεριώδους ακτινοβολία), S είναι το ποσοστό της υπερελικωμένης διαμόρφωσης DNA στο δείγμα ελέγχου.

Τα αποτελέσματα της δοκιμής παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πινακας 5.4.3: Προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων έναντι των βλαβών του DNA που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου.

		Μεθανολικό εκχύλισμα						Υδατικό εκχύλισμα					
Δόση (μg/ml)		100	200	400	800	1600		100	200	400	800	1600	
	Τμήμα φυτού	% Αναστολή					r	% Αναστολή					r
Phaseolus vulgaris	σπερμ.	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	18±1	19±1	23±1	0,681
Phaseolus vulgaris	πόα	10±3	10±3	31±4	37±4	38±2	0,881	NI	11±2	27±1	29±3	34±2	0,934
Vicia faba	πόα	NI	NI	27±2	29±3	32±3	0,774	NI	NI	28±3	31±2	37±3	0,960
Vicia tenouifolia	καρπός	NI	NI	NI	NI	NI	-	NI	NI	NI	NI	NI	-
Vicia tenouifolia	πόα	NI	NI	19±2	19±1	23±1	0,776	NI	NI	NI	NI	16±3	-
Lens culinaris	πόα	NT	NI	31±3	32±2	33±3	0,848	NI	NI	19±1	18±1	27±3	0,758
Lens culinaris	σπερμ.	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	11±3	13±2	16±3	0,734
Lupinus albus	σπερμ.	NI	NI	NI	NI	NI	-	NI	NI	NI	NI	NI	-
Lupinus albus	πόα	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	17±2	16±1	20±1	0,859
Lupinus albus	περικ.	NI	NI	NI	NI	NI	-	NI	NI	NI	NI	NI	-
Lotus edulis	πόα	NI	8±2	28±2	35±1	42±2	0,974	NI	NI	21±2	22±2	30±3	0,931
Lotus edulis	καρπός	NI	NI	32±1	34±2	37±3	0,840	NI	NI	NI	NI	NI	-
Lotus longisiliquosus	πόα	NI	NI	30±2	33±1	33±1	0,905	NI	NI	13±5	14±4	20±3	0,805
Tetragonolobus purpureus	καρπός	NI	NI	18±4	21±2	23±3	0,729	NI	12±3	15±2	21±5	26±3	0,927
Tetragonolobus purpureus	πόα	NI	NI	26±2	27±2	32±2	0,768	9±4	18±1	29±1	38±3	47±3	0,975
Lathyrus sativus	πόα	NI	NI	28±3	24±2	31±2	0,851	NI	NI	NI	NI	13±2	-
Lathyrus clymenus	πόα	-	-	-	-	-	-	NI	NI	NI	NI	NI	-
Lathyrus laxiflorus	πόα	14±0	21±4	52±5	62±4	69±3	0,966	11±1	23±1	36±3	44±3	55±2	0,981

Τα αποτελέσματα της δοκιμής εμφανίζουν και πάλλη τα εκχυλίσματα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* (τόσο το μεθανολικό όσο και το υδατικό εκχύλισμα) να προστατεύουν σε μεγαλύτερο βαθμό το DNA από βλάβες που προκαλούν σε αυτό οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου. Το μεθανολικό εκχύλισμα του συγκεκριμένου φυτού εμφάνισε την ισχυρότερη δράση αναστέλλοντας τις βλάβες του DNA σε ποσοστό 52%, 62% και 69% σε συγκεντρώσεις 400, 800 και 1600 μg/ml, αντίστοιχα. Ακολουθεί το υδατικό εκχύλισμα του ίδιου φυτού με 36%, 44% και 55%

αναστολή στις ίδιες συγκεντρώσεις. Σημαντική δράση επέδειξαν επίσης: το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Tetragonolobus purpureus* (29%, 38% και 47% αναστολή για τις συγκεντρώσεις 400, 800 και 1600 μg/ml αντίστοιχα) το μεθανολικό εκχύλισμα τόσο της πόας όσο και του καρπού του φυτού *Lotus edulis* (42% και 37% αναστολή αντίστοιχα στη συγκέντρωση 1600 μg/ml) *,* το μεθανολικό εκχύλισμα της πόας του φυτού *Phaseolus vulgaris* (38% αναστολή στη συγκέντρωση 1600 μg/ml) και το υδατικό εκχύλισμα της πόας του φυτού *Vicia faba* (37% αναστολή στη συγκέντρωση 1600 μg/ml). Όπως και στην προηγούμενη δοκιμή έτσι και εδώ οι πόες των φυτών διαθέτουν ισχυρότερη δράση από ότι οι καρποί και τα σπέρματα.

- *Αναστολή βλαβών που προκαλούνται από τις υπεροξειδικες ελεύθερες ρίζες*

Η δοκιμή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του Shang-Tzen Chang και των συνεργατών του[123]. Οι ρίζες περοξειδίου ($ROO^{\bullet}$) προέρχονται από την θερμική διάσπαση του AAPH (2,2'-azobis-2-amidinopropane hydrochloride) η οποία πραγματοποιείται σε δύο στάδια: αρχικά διασπάται με θέρμανση (37^0C) δίνοντας την ρίζα αλκυλίου ($R^{\bullet}$) η οποία στη συνέχεια αντιδρά με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας σχηματίζοντας την αλκυλοϋπερόξυ-ρίζα ($ROO^{\bullet}$).

Το μείγμα της αντίδρασης (10 μl) αποτελείται από 3.2 μg Bluescript-SK+ πλασμιδικό DNA, 2.5 mM AAPH σε PBS (phosphate buffer saline) και το εξεταζόμενο εκχύλισμα σε διάφορες συγκεντρώσεις (5, 10, 20, 50, 100 και 200 μg/ml). Το μείγμα παρέμεινε στο σκοτάδι για 45 λεπτά σε θερμοκρασία 37^0C και κατόπιν αναλύθηκε σε γέλη ηλεκτροφόρησης ακλουθώντας την ίδια διαδικασία όπως και στην προηγούμενη δοκιμή.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα εμφανίζουν τα περισσότερα εκχυλίσματα (τόσο τα μεθανολικά όσο και το υδατικά) να παρουσιάζουν σημαντική αναστολή στις βλάβες που προκαλούν στο DNA οι υπεροξειδικές ελεύθερες ρίζες.

Πίνακας 5.4.4: Προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων έναντι των βλαβών του DNA που προκαλούνται από τις Περόξυ ελεύθερες ρίζες.

		Μεθανολικό εκχύλισμα							Υδατικό εκχύλισμα						
Δόση (μg/ml)		5	10	20	50	100	200		5	10	20	50	100	200	
	Τμήμα φυτού	% Αναστολή						r	% Αναστολή						r
Phaseolus vulgaris	σπερμ.	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	NI	NI	10±2	18±4	0,904
Phaseolus vulgaris	πόα	NI	14±4	24±1	56±2	81±6	93±4	0,968	16±5	26±4	57±4	84±1	87±1	91±1	0,987
Vicia faba	πόα	NI	13±2	39±4	69±3	78±4	84±5	0,979	10±1	26±1	58±1	87±1	93±1	96±1	0,991
Vicia tenouifolia	καρπός	NI	NI	NI	19±1	37±4	65±2	0,985	NI	NI	14±3	38±3	63±3	80±3	0,958
Vicia tenouifolia	πόα	NI	NI	NI	17±5	36±5	67±6	0,972	NI	NI	15±4	43±3	67±5	84±6	0,950
Lens culinaris	πόα	NI	NI	20±2	44±4	61±3	78±1	0,971	NI	14±2	32±2	67±3	73±1	84±3	0,984
Lens culinaris	σπερμ.	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	NI	31±4	49±2	73±1	0,897
Lupinus albus	σπερμ.	NI	NI	NI	10±3	13±2	16±1	0,968	NI	NI	NI	NI	NI	9±3	-
Lupinus albus	πόα	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	NI	NI	NI	14±6	17±4	26±4	0,757
Lupinus albus	περικ.	NI	NI	28±3	49±4	64±2	67±3	0,976	NI	NI	NI	14±4	17±2	20±3	0,732
Lotus edulis	πόα	NI	NI	24±3	50±3	79±1	90±4	0,983	NI	NI	15±5	41±3	67±4	76±3	0,919
Lotus edulis	καρπός	NI	NI	NI	21±2	40±3	74±4	0,947	NI	NI	10±3	45±8	70±3	80±2	0,977
Lotus longisiliquosus	πόα	NI	NI	12±2	34±3	72±2	92±2	0,943	NI	12±1	33±2	74±2	84±3	84±3	0,976
Tetragonolobus purpureus	καρπός	NI	NI	NI	8±2	24±2	48±4	0,841	NI	NI	NI	16±2	39±3	67±3	0,976
Tetragonolobus purpureus	πόα	NI	NI	9±1	30±2	58±5	88±2	0,953	NI	11±4	34±2	73±3	94±3	99±1	0,976
Lathyrus sativus	πόα	NI	20±1	38±3	87±4	96±2	93±2	0,985	NI	12±2	45±3	73±4	75±4	78±3	0,920
Lathyrus clymenus	πόα	-	-	-	-	-	-	-	NI	NI	NI	NI	NI	NI	-
Lathyrus laxiflorus	πόα	40 ±2	73±5	89±6	98±6	93±7	98±3	0,851	51±6	83±4	84±2	97±2	99±1	99±1	0,852

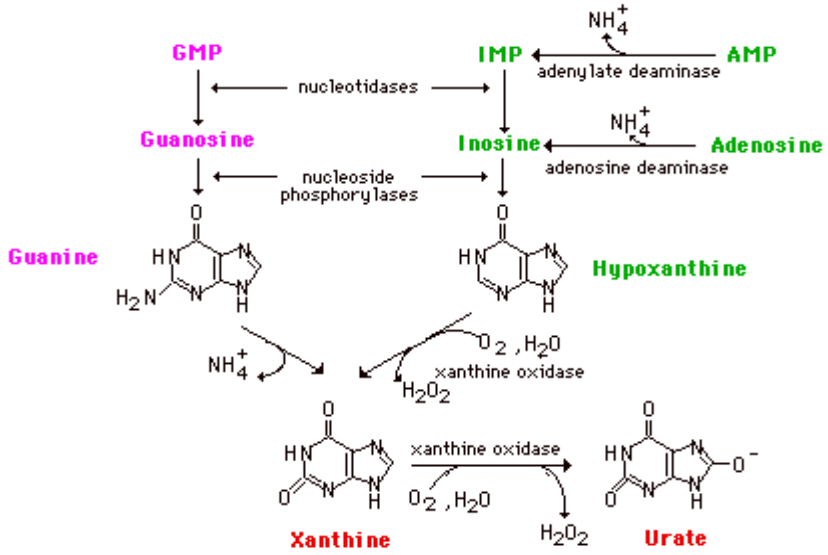
Και στην δοκιμή αυτή την υψηλότερη ανασταλτική δράση παρουσίασαν το μεθανολικό και το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* τα ποία έδειξαν 40% και 51% αναστολή αντίστοιχα σε συγκέντρωση 5 μg/ml ενώ τα ποσοστά αυτά ανήλθαν στο 100% για συγκέντρωση 200 μg/ml. 100% αναστολή των βλαβών εμφάνισε και το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Tetragonolobus purpureus.* Πολύ καλή δράση επέδειξαν επίσης: το μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα της

πόας του φυτού *Phaseolus vulgaris* (93% και 91% αναστολή στη συγκέντρωση 200 μg/ml), το υδατικό εκχύλισμα της πόας του φυτού *Vicia faba* (96% αναστολή στη συγκέντρωση 200 μg/ml), το μεθανολικό εκχύλισμα της πόας του φυτού *Lotus longisiliquosus* (92% αναστολή στη συγκέντρωση 200 μg/ml), το μεθανολικό εκχύλισμα της πόας του φυτού *Lotus edulis* (90% αναστολή στη συγκέντρωση 200 μg/ml) και το μεθανολικό εκχύλισμα της πόας του φυτού *Lathyrus sativus* (93% αναστολή στη συγκέντρωση 200 μg/ml). Και στην δοκιμή αυτή, οι καρποί και τα σπέρματα εμφάνισαν μικρότερη αναστολή σε σύγκριση με τις πόες των αντίστοιχων φυτών.

5.4.4 Έλεγχος Ανασταλτικής Δράσης επί του Ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης

Το ένζυμο Οξειδάση της Ξανθίνης (ΧΟ) καταλύει την μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη καθώς επίσης και την αντίδραση μετατροπής της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Επίσης η Οξειδάση της Ξανθίνης παίζει σημαντικό ρόλο και στον καταβολισμό των πουρινών σε μερικά είδη όπως ο Άνθρωπος. Κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων αυτών καταναλώνεται μοριακό οξυγόνο και παράγεται ρίζα υπεροξειδίου και υπεροξείδιο του υδρογόνου τα οποία είναι ισχυρά οξειδωτικά μέσα. Επίσης η δράση του ενζύμου οδηγεί και στην παραγωγή ουρικού οξέος το οποίο αποτελεί την πιο σημαντική αντιοξειδωτική ουσία στο πλάσμα του αίματος[124].

Η Οξειδάση της Ξανθίνης θεωρείται η κύρια πηγή ελευθέρων ριζών σε πολλές ασθένειες. Ειδικότερα η ΧΟ έχει ενοχοποιηθεί σε παθολογικές καταστάσεις όπως τα ισχαιμικά επεισόδια, η υποξία, τα εμφράγματα, η υπέρταση, η αθηροσκλήρωση, ο διαβήτης και ο καρκίνος[125]. Επίσης, όπως αναφέρεται και παραπάνω το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του ουρικού οξέως και έτσι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε ασθένειες όπως η αρθρίτιδα στις οποίες οι κρύσταλλοι ουρικού οξέος εναποτίθενται στις αρθρώσεις, στο συνδετικό ιστό και τα νεφρά. Έτσι οι αναστολείς της δράσης του ενζύμου πιθανόν να έχουν ταυτόχρονα αντιοξειδωτικές και ανασταλτικές ιδιότητες με θεραπευτικό ενδιαφέρον. Η πιο γνωστή ουσία για την ανασταλτική της δράση έναντι του ενζύμου ΧΟ είναι η αλοπουρινόλη.



Εικόνα 5.4.3: Σχηματική παράσταση της καταλυτικής δράσης του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης.

Προηγούμενες μελέτες φανέρωσαν ότι οι φαινολικές ενώσεις είναι σημαντικοί αναστολείς της ΧΟ[125,126]. Με σκοπό τον εντοπισμό φυσικών μεταβολιτών με τέτοια δράση προχωρήσαμε στον έλεγχο των μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων των εξεταζομένων φυτών ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την δράση του ενζύμου. Η παραγωγή ουρικού οξέος χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης για τον καθορισμό της δράσης της ΧΟ και τον υπολογισμό του δυναμικού των αναστολέων ή ενεργοποιητών. Το μείγμα της αντίδρασης (500 μl) περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (33 mM, pH 7.5), EDTA (0.1 mM), ξανθίνη (4.8 μM) και το εκχύλισμα σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η αντίδραση έλαβε χώρα με την προσθήκη του ενζύμου ΧΟ (43 mU) διαλυμένο σε απιονισμένο νερό και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα στα 295 nm για 4 nim σε θερμοκρασία δωματίου. Οι τιμές IC50 εκφράστηκαν ως η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που οδηγεί στην αναστολή της δράσης της ΧΟ κατά 50%. Ως θετικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η Αλοπουρινόλη η οποία είναι γνωστός αναστολέας της ΧΟ.

Τα αποτελέσματα της δοκιμής παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.4.5: Επίδραση των μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων φυτών της οικ. Fabaceae στη δράση του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης.

Είδος	Τμήμα φυτού	Μεθανολικό εκχύλισμα	Υδατικό εκχύλισμα
		IC50 (μg/ml)	IC50 (μg/ml)
Phaseolus vulgaris	σπερμ.	790 ± 5	NA
Phaseolus vulgaris	πόα	500 ± 2	350 ± 6
Vicia faba	πόα	540 ± 6	280 ± 3
Vicia tenouifolia	καρποί	NA	850 ± 3
Vicia tenouifolia	πόα	900 ± 2	460 ± 20
Lens culinaris	πόα	430 ± 31	585 ± 7
Lens culinaris	σπερμ.	440 ± 23	NA
Lupinus albus	σπερμ.	560 ± 9	NA
Lupinus albus	πόα	210 ± 27	375 ± 2
Lupinus albus	περικ.	200 ± 27	790 ± 18
Lotus edulis	πόα	410 ± 32	550 ± 9
Lotus edulis	καρποί	NA	670 ± 10
Lotus longisiliquosus	πόα	1000 ± 9	425 ± 3
Tetragonolobus purpureus	καρποί	1100 ± 14	620 ± 6
Tetragonolobus purpureus	πόα	910 ± 9	685 ± 6
Lathyrus sativus	πόα	600 ± 3	-
Lathyrus clymenus	πόα	-	NA
Lathyrus laxiflorus	πόα	380 ± 6	350 ± 9

Η παραπάνω δοκιμή έδειξε ότι η πλειονότητα των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων αναστέλλουν την δράση της ΧΟ. Οι τιμές IC50 δείχνουν σημαντική ανασταλτική δράση η οποία κυμαίνεται από 280 σε 850 μg/ml για τα υδατικά εκχυλίσματα και 200 έως 1100 μg/ml για τα μεθανολικά. Μόνο δύο μεθανολικά και τέσσερα υδατικά εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν δράση στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις[116].

5.4.5 Έλεγχος Αντιμικροβιακής Δράσης

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα για την μέτρηση της αντιμικροβιακής δράσης προτείνονται από το FDA και είναι οι παρακάτω:

- *Escherichia coli* {ATCC 10536}. Πρόκειται για ένα αερόβιο, αρνητικό κατά Gram βακτήριο και είναι αποκλειστικά αερόβιο ή προαιρετικά αναερόβιο. Το χρώμα των αποικιών της είναι λευκό.

- *Pseudomonas aeruginosa* {ATCC 9027}. Ανήκει στην κατηγορία ασπορογόνων μικρών βάκιλλων, αρνητικών κατά Gram και είναι ένα αποκλειστικά αερόβιο μικρόβιο. Αναπτύσσεται ταχύτατα στις επιφάνειες των τροφίμων προκαλώντας την οξείδωση τους ενώ οι αποικίες της έχουν χρώμα λευκό.

- *Staphylococcus aureus* {ATCC 6538}. Ο *St.aureus* είναι ένα παθογόνο μικρόβιο το οποίο προξενεί τροφοδηλητηριάσεις. Ο σταφυλόκοκκος είναι αερόβιος μέχρι προαιρετικά αναερόβιος, ιδιαίτερα αλατοανθεκτικός, μεσόφιλος και χρειάζεται μια οργανική ουσία στο υπόστρωμα ώστε να αντλεί το άζωτο που απαιτείται για την σύνθεση των πρωτεϊνών του. Το χρώμα των αποικιών του είναι ροδαλό έως κιτρινοπορτοκαλί ενώ κάποιες φορές είναι και λευκό.

- *Candida albicans* {ATCC 10231}. Η *C.albicans* ανήκει στις ζύμες επιφανείας οι οποίες αναπτύσσονται δευτερευόντως και παρασιτικά ως επί το πλείστον στην επιφάνεια όξινων ζυμωτικών υγρών σχηματίζοντας λευκό υμένιο. Είναι οσμόφιλη, οξεάντοχη και προκαλεί αλλοιώσεις σε διάφορα προϊόντα ζυμώσεως. Ενώ είναι ανίκανη να παράγει αλκοόλη από σάκχαρα είναι ανθεκτική σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτής. Οι αποικίες της έχουν χρώμα λευκό.

- *Aspergillus niger* {ATCC 6275*}.* Ο *Asp.niger* είναι ιδιαιτέρως γνωστός για τις ευρωτιάσεις που προκαλεί στα τρόφιμα, ενώ στελέχη του χρησιμοποιοούνται για βιομηχανική παραγωγή κιτρικού και γλυκονικού οξέος. Το χρώμα των αποικιών τους είναι μαύρο.

Στόχος των δοκιμών είναι η εύρεση της μέγιστης αρνητικής αραίωσης για κάθε εκχύλισμα, δηλαδή της ελάχιστης ποσότητας που απαιτείται για την αναστολή της δράσης του καθενός από τους πέντε παραπάνω μικροοργανισμούς. Για το λόγο αυτό έχει υπολογιστεί μια σειρά πιθανών δραστικών συγκεντρώσεων ελέγχοντας σε όλα τα πειράματα μια σειρά αραιώσεων από 1/400 έως 1/6000 για το κάθε εκχύλισμα.

Εφαρμόστηκε η μέθοδος ενσωμάτωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα για την εύρεση αντιμικροβιακής ή μη δράσης των μικροοργανισμών: *E. coli, P. aeruginosa, C. albicans, S. aureus*. Αρχικά διαλύουμε μια συγκεκριμένη ποσότητα ουσίας σε 1 ml

DMSO (dimethyl sulfoxide). Έχοντας υπολογίσει τις αραιώσεις που θα εφαρμοστούν, τοποθετούνται αυτές σε ξεχωριστά τρυβλία. Εν συνεχεία προστίθενται 10 ml TSA ή PDA ανάλογα με το μικροοργανισμό και ακολουθεί ισχυρή ανάμιξη με σκοπό την ομοιογενή κατανομή της ουσίας στο τρυβλίο. Όταν το άγαρ στερεοποιηθεί, μετά από δέκα λεπτά σε κλίβανο στους 60^{o}C, γίνεται επίστρωση των μικροοργανισμών με τη χρήση κρίκου. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετούνται για επώαση επί 24 ώρες, στους 37˚C, για τα *E. coli, P. aeruginosa, C. albicans, S. aureus*. Για την ευκολότερη ανάγνωση και κατανόηση των αποτελεσμάτων, κάθε ένα από τα τρυβλία έχει χωρισθεί σε τέσσερα τμήματα και σε κάθε τμήμα έχει επιστρωθεί και από ένας μικροοργανισμός. Μετά το πέρας του απαραίτητου για την επώαση χρόνου καταγράφηκε η αραίωση εκείνη με την οποία επετεύχθητε η αναστολή του κάθε μικροοργανισμού ξεχωριστά (Πίνακας 5.4.6).

Πίνακας 5.4.6: Προσδιορισμός μέγιστης αραίωσης των εκχυλισμάτων με την οποία επιτυγχάνεται η αναστολή των μικροοργανισμών *E. coli, Ps. Aeruginosa, Can. Albicans και St. aureus*

Είδος	**Τμήμα φυτού**	**Μέσο εκχύλισης**	**Μικροοργανισμός**			
			E. coli	***Ps. Aeruginosa***	***Can. albicans***	***St. aureus***
Vicia faba	Πόα	DCM	*<1/700*	*<1/700*	***1/1100***	*<1/700*
		MeOH	*<1/500*	*1/500*	*<1/500*	*<1/500*
		H_2O	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*
Vicia tenouifolia subsp. *stenophylla*	Καρποί	DCM	*<1/800*	*<1/800*	*1/800*	*<1/800*
		MeOH	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*
		H_2O	*<1/800*	*<1/800*	*<1/800*	*<1/800*
	Πόα	DCM	*<1/650*	*<1/650*	***1/1100***	***>1/3200***
		MeOH	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*
		H_2O	*<1/600*	*<1/600*	*<1/600*	*<1/600*
Lathyrus sativus	Σπερμ.	DCM	*<1/600*	*<1/600*	*1/600*	*<1/600*
		MeOH	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*
		H_2O	*<1/700*	*1/700*	*<1/700*	*<1/700*
	Πόα	DCM	*<1/800*	*<1/800*	*<1/800*	*<1/800*
		MeOH	*<1/600*	*<1/600*	*<1/600*	*<1/600*
		H_2O	*<1/600*	*<1/600*	*<1/600*	*<1/600*
Lathyrus laxiflorus subsp.*Laxiflorus*	Πόα	DCM	*1/700*	*1/700*	***>1/3500***	***>1/3500***
		MeOH	***<1/1200***	***<1/1200***	***<1/1200***	***<1/1200***
		H_2O	*<1/600*	*1/600*	*<1/600*	*<1/600*
Phaseolus vulgaris	Σπερμ.	DCM	*<1/600*	*<1/600*	***1/1000***	*1/600*
		MeOH	*<1/600*	*<1/600*	*<1/600*	*<1/600*
		H_2O	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*
	Πόα	DCM	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*
		MeOH	*<1/500*	*<1/500*	*1/500*	*<1/500*
		H_2O	*<1/600*	*<1/600*	*<1/600*	*<1/600*
Lens culinaris	Σπερμ.	DCM	*<1/400*	*< 1/400*	*<1/400*	*<1/400*
		MeOH	*<1/700*	*<1/700*	*1/700*	*<1/700*
		H_2O	*>1/500*	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*

	Πόα	DCM	*<1/600*	*1/600*	*<1/600*	*<1/600*
		MeOH	*<1/600*	*1/600*	*<1/600*	*<1/600*
		H_2O	*<1/600*	*<1/600*	*<1/600*	*<1/600*
Lupinus albus	Σπερμ.	DCM	*<1/600*	*1/600*	*1/900*	*<1/600*
		MeOH	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*
		H_2O	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*
	Περικ.	DCM	*<1/700*	*<1/700*	*1/700*	*<1/700*
		MeOH	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*
		H_2O	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*
	Πόα	DCM	*<1/700*	*1/700*	*<1/700*	*<1/700*
		MeOH	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*
		H_2O	*<1/600*	*<1/600*	*<1/600*	*<1/600*
Lotus longisiliquosus	Καρποί	DCM	***<1/1000***	***<1/1000***	***1/1000***	***<1/1000***
		MeOH	*<1/500*	*<1/500*	*1/500*	*<1/500*
		H_2O	***<1/1000***	***<1/1000***	***<1/1000***	***<1/1000***
	Πόα	DCM	*<1/700*	*<1/700*	***>1/3500***	***1/1200***
		MeOH	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*
		H_2O	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*
Lotus edulis	Καρποί	DCM	*<1/700*	*<1/700*	*1/700*	*<1/700*
		MeOH	*<1/400*	*<1/400*	*1/400*	*<1/400*
		H_2O	*<1/700*	*1/700*	***>1/3300***	***>1/3300***
	Πόα	DCM	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*
		MeOH	*<1/600*	*1/600*	*1/600*	*<1/600*
		H_2O	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*
Tetragonolobus purpureus	Καρποί	DCM	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*
		MeOH	*<1/500*	*1/500*	*1/500*	*<1/500*
		H_2O	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*
	Πόα	DCM	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*	*<1/700*
		MeOH	*<1/500*	*<1/500*	*1/500*	*<1/500*
		H_2O	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*	*<1/500*

Όσον αφορά στον *A. niger*, αφού έγινε η ενσωμάτωση της ουσίας στο υπόστρωμα και η ομογενοποίηση του μείγματος με ισχυρή ανακίνηση, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον κλίβανο για 10 λεπτά έως ότου στερεοποιηθούν. Ακολούθως, τοποθετήθηκε στη μέση του τρυβλίου ένα κομμάτι χαρτί στρογγυλού σχήματος το οποίο στη συνέχεια εμποτίσθηκε από μια σταγόνα του μικροοργανισμού ο οποίος είχε αραιωθεί σε 1 ml νερού (H_2O). Μετά το πέρας του απαραίτητου για την επώαση χρόνου υπολογίστηκε η % ανάπτυξη του μύκητα σε σχέση με το τυφλό κατά την $4^{η}$ μέρα καλλιέργειας (Πίνακας 5.4.7).

Πίνακας 5.4.7: % ανάπτυξη του μύκητα *A. niger* σε σχέση με το τυφλό την 4η μέρα καλλιέργειας για καθορισμένες αραιώσεις των εκχυλισμάτων.

Είδος	**Τμήμα φυτού**	**Μέσο εκχύλισης**	***A. niger***	
			Αραίωση	**% Ανάπτυξη**
Vicia faba	Πόα	DCM	*1/1600*	*18.2*
		MeOH	*1/2000*	*100.0*
		H_2O	*1/2000*	***N.D.***
Vicia tenouifolia subsp*. stenophylla*	Καρποί	DCM	*1/2500*	*38.2*
		MeOH	*1/1600*	*43.6*
		H_2O	*1/2300*	*10.9*
	Πόα	DCM	*1/1900*	*40.0*
		MeOH	*1/1400*	*29.0*
		H_2O	*1/1800*	*20.0*
Lathyrus sativus	Σπερμ.	DCM	*1/1700*	*23.6*
		MeOH	*1/1500*	*45.5*
		H_2O	*1/2200*	*27.3*
	Πόα	DCM	*1/2200*	*47.3*
		MeOH	*1/1700*	*58.2*
		H_2O	*1/1700*	*18.2*
Lathyrus laxiflorus subsp.*Laxiflorus*	Πόα	DCM	*1/2100*	*14.5*
		MeOH	*1/3600*	*31.0*
		H_2O	*1/1900*	*20.0*
Phaseolus vulgaris	Σπερμ.	DCM	*1/1700*	*32.7*
		MeOH	*1/1700*	*45.5*
		H_2O	*1/2000*	***N.D.***
	Πόα	DCM	*1/1700*	*21.8*
		MeOH	*1/1600*	*60.0*
		H_2O	*1/1700*	*27.3*
Lens culinaris	Σπερμ.	DCM	*1/2100*	*34.5*
		MeOH	*1/1200*	*43.6*
		H_2O	*1/1700*	*10.9*
	Πόα	DCM	*1/1600*	*18.2*
		MeOH	*1/1800*	*10.9*
		H_2O	*1/1800*	*29.0*
Lupinus albus	Σπερμ.	DCM	*1/1700*	*43.6*
		MeOH	*1/1500*	*58.2*
		H_2O	*1/2000*	*43.6*
	Περικ.	DCM	*1/2200*	*43.6*
		MeOH	*1/1500*	*47.3*
		H_2O	*1/2000*	***N.D.***
	Πόα	DCM	*1/2000*	*70.9*
		MeOH	*1/2200*	*49.0*
		H_2O	*1/1700*	*27.3*
Lotus longisiliquosus	Καρποί	DCM	*1/3100*	*63.6*
		MeOH	*1/1600*	*47.3*
		H_2O	*1/3000*	*20.0*
	Πόα	DCM	*1/2100*	*31.0*
		MeOH	*1/1400*	*36.4*
		H_2O	*1/1700*	***N.D.***
Lotus edulis	Καρποί	DCM	*1/2000*	*47.3*
		MeOH	*1/1300*	*49.0*
		H_2O	*1/2000*	***N.D.***
	Πόα	DCM	*1/1700*	*83.6*
		MeOH	*1/2000*	*38.2*

		H_2O	*1/1600*	*20.0*
Tetragonolobus purpureus	Καρποί	DCM	*1/2100*	*23.6*
		MeOH	*1/1500*	*60.0*
		H_2O	*1/1600*	*21.8*
	Πόα	DCM	*1/1700*	*23.6*
		MeOH	*1/2000*	*52.7*
		H_2O	*1/1600*	*43.6*

Τα συνήθως χρησιμοποιούμενα στη βιομηχανία τροφίμων συντηρητικά, σύμφωνα με τον κώδικα τροφίμων και ποτών (Κ.Τ.Π.) είναι δραστικά σε αραιώσεις 1-2/1000. Λαμβάνοντας υπ'όψην τα αποτελέσματα των αντιμικροβιακών δοκιμών για το σύνολο των πέντε μικροοργανισμών (πινάκας 5.4.6 και 5.4.7) τα φυτικά εκχυλίσματα κατατάχθηκαν ως εξής:

- Ιδιαίτερα υψηλή δράση έδειξαν: το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα της πόας του *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus*, το μεθανολικό εκχύλισμα της πόας του *Vicia faba*, το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα των καρπών του *Lotus edulis*, το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα της πόας του *Lotus longisiliquosus*, το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα της πόας του *Vicia tenuifolia subsp. stenophylla*, το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα της πόας του *Lotus edulis* , το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα των σπερμάτων του *Phaseolus vulgaris*, το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα των καρπών του *Lotus longisiliquosus* και το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα της πόας του *Vicia faba*.
- Δράση σε μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών έδειξαν: το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα της πόας του *Lathyrus laxiflorus subsp. Laxiflorus,* το υδατικό εκχύλισμα των καρπών του *Lotus edulis,* το μεθανολικό εκχύλισμα των καρπών του *Tetragonolobus purpureus*, το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα της πόας του *Lotus longisiliquosus,* το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα της πόας του *Vicia tenuifolia subsp. stenophylla,* το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα των καρπών του *Lotus longisiliquosus* και το μεθανολικό εκχύλισμα της πόας του *Lotus edulis.*

5.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Τα εκχυλίσματα 11 ενδημικών ειδών της οικογένειας *Fabaceae (Leguminosae)* μελετήθηκαν τόσο χρωματογραφικά όσο και για πιθανή αντιοξειδωτική, αντιμεταλαξιογόνο και αντιμικροβιακή δράση. Στις δοκιμές αντιοξειδωτικής / αντιμεταλαξιογόνου δράσης την μεγαλύτερη δραστικότητα επέδειξαν τα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων των φυτών, ενώ στις δοκιμές αντιμικροβιακής δράσης τα καλύτερα αποτελέσματα εμφάνισαν κυρίως τα δυχλωρομεθανικά εκχυλίσματα.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών/αντιμεταλαξιογόνων δοκιμών δημιουργήσαμε έναν πίνακα με τα 10 δραστικότερα εκχυλίσματα για την κάθε δοκιμή και τα κατατάξαμε με βάση τη δράση τους από υψηλότερη προς ασθενέστερη δράση (Πίνακας 5.5.1).

Πίνακας 5.5.1: Ολικά εκχυλίσματα φυτών της οικ. Fabaceae με τις καλύτερες αντιοξειδωτικές και αντιμεταλαξιογόνες ιδιότητες.

	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΟΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ		**ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΑΞΙΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ**	
	Ολικά Φαινολικά	**Δοκιμασία DPPH**	**Αναστολή Βλαβών DNA Προκαλούμενες από:**	
			Υδρόξυ-ρίζες	**Περόξυ-ρίζες**
1ο	*Υδ .εκχ .πόας Lathyrus laxiflorus*	*Μεθ.εκχ. πόας Lathyrus laxiflorus*	*Μεθ.εκχ. πόας Lathyrus laxiflorus*	*Υδ .εκχ .πόας Lathyrus laxiflorus*
2ο	*Μεθ.εκχ. πόας Lathyrus laxiflorus*	*Υδ .εκχ .πόας Lathyrus laxiflorus*	*Υδ .εκχ .πόας Lathyrus laxiflorus*	*Μεθ.εκχ. πόας Lathyrus laxiflorus*
3ο	*Μεθ.εκχ. περικ. Lupinus albus*	*Υδ .εκχ .πόας Vicia faba*	*Υδ .εκχ .πόας T. purpureus*	*Υδ .εκχ .πόας T. purpureus*
4ο	*Μεθ.εκχ. πόας Lupinus albus*	*Μεθ.εκχ. πόας Vicia faba*	*Μεθ.εκχ. πόας Lotus edulis*	*Υδ .εκχ .πόας Vicia faba*
5ο	*Υδ .εκχ .πόας Lens culinaris*	*Υδ .εκχ .πόας P. vulgaris*	*Μεθ.εκχ. πόας P. vulgaris*	*Μεθ.εκχ. πόας Lathyrus sativus*
6ο	*Μεθ.εκχ. σπερμ. Lupinus albus*	*Υδ .εκχ .πόας Lathyrus sativus*	*Υδ .εκχ .πόας Vicia faba*	*Μεθ.εκχ. πόας P. vulgaris*
7ο	*Υδ .εκχ .πόας Lupinus albus*	*Υδ .εκχ .πόας Lens culinaris*	*Μεθ.εκχ.καρπών Lotus edulis*	*Μεθ.εκχ. πόας L. longisiliquosus*
8ο	*Μεθ.εκχ. πόας Lotus edulis*	*Υδ .εκχ .πόας Lupinus albus*	*Υδ .εκχ .πόας P. vulgaris*	*Μεθ.εκχ. πόας Lotus edulis*
9ο	*Υδ .εκχ .πόας Vicia faba*	*Υδ .εκχ .πόας Lot. longisiliquosus*	*Μεθ.εκχ. πόας Lens culinaris*	*Μεθ.εκχ. πόας Lathyrus sativus*
10ο	*Μεθ.εκχ. πόας Vicia faba*	*Υδ .εκχ .πόας Lupinus albus*	*Μεθ.εκχ. πόας L. longisiliquosus*	*Υδ .εκχ .πόας Lotus edulis*

Αξίζει εδώ να τονιστεί ότι σε όλες τις δοκιμές αντιοξειδωτικής και αντιμεταλαξιογόνου δράσης την πρώτη θέση κατέχουν τα εκχυλίσματα της πόας του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp *laxiflorus*.

Η παρούσα ερευνητική προσπάθεια εστιάζεται κυρίως στην μελέτη φυτών με καλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Έτσι τα εκχυλίσματα που έτυχαν περαιτέρω μελέτης επιλέχτηκαν με βάση την δραστικότητά τους έναντι ελευθέρων ριζών όπως αυτή προκύπτει από τα αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών και αντιμεταλαξιογόνων δοκιμών. Επιπλέον λάβαμε υπόψη και τον βιβλιογραφικό έλεγχο για προηγούμενες φυτοχημικές αναφορές όπως και τη χρήση τους ως εδώδιμα ή μη. Έτσι αποφασίσαμε να μελετήσουμε φυτοχημικά τα εξής εκχυλίσματα:

- *Μεθανολικό εκχύλισμα της πόας του φυτού Lathyrus laxiflorus*
- *Υδατικό εκχύλισμα της πόας του φυτού Lathyrus laxiflorus*
- *Μεθανολικό εκχύλισμα της πόας του φυτού Vicia faba*
- *Μεθανολικό εκχύλισμα της πόας του φυτού Lotus longisiliquosus*
- *Μεθανολικό εκχύλισμα της πόας του φυτού Lotus edulis*
- *Διχλωρομεθανικό εκχύλισμα της πόας του φυτού Lotus edulis*
- *Υδατικό εκχύλισμα της πόας του φυτού Tetragonolobus purpureus*

Από τα παραπάνω φυτά μόνο το *Vicia faba* έχει τύχει φυτοχημικής ανάλυσης ενώ για τα υπόλοιπα δεν υπάρχουν καθόλου αναφορές. Επιπλέον τα φυτά *Vicia faba, Lotus edulis και Tetragonolobus purpureus* παρουσιάζουν επιπρόσθετο φυτοχημικό ενδιαφέρον διότι ανήκουν στα εδώδιμα φυτά της οικογένειας των ψυχανθών.

Κεφάλαιο 6
Φαρμακογνωστική Μελέτη Φυτών της Οικογένειας Fabaceae

6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πραγματοποιήθηκε η φυτοχημική ανάλυση των επιλεγομένων εκχυλισμάτων με στόχο την απομόνωση και ταυτοποίηση των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών καθώς επίσης και τη μελέτη βιολογικής δράσης των απομονωμένων ουσιών.

Για την απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών από τα επιλεγόμενα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής τεχνικές:

- Χρωματογραφία στήλης υπό κενό και υπό χαμηλή πίεση χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου (Merck, 0.04-0.06 mm (flash) και 0.015-0.04 mm) και σύστημα έκλουσης οργανικούς διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας.
- Χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση χρησιμοποιώντας ως πληρωτικό υλικό ρητήνες προσρόφησης (XAD4 και XAD7) και διαλύτες έκλουσης την μεθανόλη και το νερό.
- Χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση χρησιμοποιώντας ως πληρωτικό υλικό ρητίνες μοριακού αποκλεισμού (Sephadex LH-20) και διαλύτη έκλουσης την μεθανόλη.
- Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Prep-TLC) χρησιμοποιώντας υάλινες πλάκες με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F_{254}-Merck). Για την ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων αυτών επιλέχθηκαν μίγματα οργανικών διαλυτών σε συγκεκριμένες αναλογίες μετά από έλεγχο σε απλές πλάκες αλουμινίου.
- Παρασκευαστική χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Prep-HPLC) χρησιμοποιώντας το όργανο Thermo Finnigan HPLC (αντλία: SpectraSystem P4000, απαεροτή: SpectraSystem 1000, ανιχνευτή UV: SpectraSystem AS3000).
- Χρωματογραφία Αντιστρόφου Ροής (FCPC – Fast Centrifugal Partition Chromatography), χρησιμοποιώντας το όργανο CPC KROMATON με στήλες 200 ml και 1l, σύστημα περιστροφής 200-2000 rpm, και αντλία Lab Alliance με όριο ασφαλείας για την πίεση: 50 bars.

Η ταυτοποίηση των απομονωμένων ουσιών έγινε με τη χρήση των τεχνικών GCMS, Φασματοσκοπίας Υπεριώδους-Ορατού (UV / Vis), Υψηλής Ακρίβειας

Φασματοφωτομετρια Μάζας (HRMS) και Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού (NMR).

Οι αναλύσεις GCMS πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο Hewlett-Packard 6890-5973.

Τα φάσματα Υπεριώδους-Ορατού (UV / Vis) ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu-160A, με τη χρήση MeOH (τροποποιημένος διαλύτης υψηλής καθαρότητας).

Τα φάσματα μάζας APCI και ESI ελήφθησαν σε ένα υβριδικό φασματογράφο μάζας LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific, Brehmen, Germany).

Τα φάσματα NMR ελήφθησαν σε φασματόμετρα Bruker AC200 και Bruker DRX 400 και Bruker DRX 600. Οι χημικές μετατοπίσεις (*δ*) είναι εκφρασμένες σε ppm. Τα πειράματα 2-D (COSY, COSY LR, HMQC, HMBC, TOCSY και NOESY) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση προγραμμάτων της Bruker. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν (Aldrich) περιλαμβάνουν $CDCl_3$, CD_3OD, DMSO-d_6 και Pyridine-d_4.

Οι βιολογικές δοκιμές των απομονωμένων ουσιών πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου της Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Δ. Κουρέτα.

6.2 Γενικά Στοιχεία

6.2.1 Γενος Vicia – Ειδος V. faba

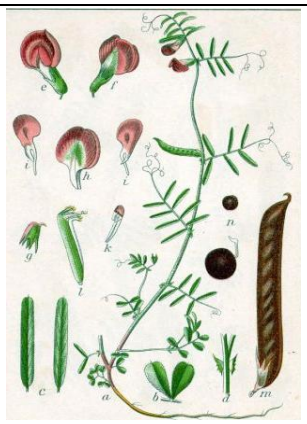
Το γένος *Vicia* ανήκει στην οικογένεια *Fabaceae* και περιλαμβάνει 250 περίπου είδη. Τα φυτά του γένους είναι μονοετή ή πολυετή, ποώδη η θαμνώδη και τα περισσότερα απαντώνται αυτοφυή σε διάφορες περιοχές των εύκρατων ζωνών και στα δύο ημισφαίρια. Από αυτά ένας μικρός αριθμός καλλιεργείται σε διάφορες χώρες και χρησιμεύει ως τροφή τόσο του ανθρώπου όσο και για τα ζώα. Τα είδη που καλιεργούνται πιο πολύ σε παγκόσμια κλίμακα είναι τα κουκιά (*V. faba*), ο κυνός βίκος (*V. sativa*), ο τριχωτός βίκος (*V. villosa*), ο πορφυρός βίκος (*V. atropurpurea*), ο στενόφυλλος βίκος (*V. angustifolia*), ο δασίκαρπος βίκος (*V. dasycarpa*), ο ουγγρικός βίκος (*V. panonica*) και ο μόνανθος βίκος (*V. monantha*). Στην Ελλάδα αναφέρονται 34 αυτοφυή είδη[127].



Vicia sativa



Vicia villosa



Vicia villosa

Εικόνα 6.2.1: Μερικοί εκπρόσωποι του γένους *Vicia.*

Οι βλαστοί των διαφόρων ειδών *Vicia* είναι μαλακοί, έρποντες ή αναρριχώμενοι και μπορούν να φτάσουν σε ύψος τα 150 εκατοστά ή και περισσότερο. Από τη βάση του κεντρικού στελέχους εκφύονται αρκετά δευτερεύοντα στελέχη. Τα φυλά είναι σύνθετα αποτελούμενα από 5-8 ζεύγη αντίθετων φυλλαρίων που καταλήγουν σχεδόν πάντοτε σε μια απλή ή διακλαδισμένη έλικα. Τα φυλλάρια έχουν σχήμα κυρίως ωοειδές, ακέραια και κατά το πλείστον είναι χνουδωτά. Τα παράφυλλα είναι μικρά, ακέραια και ενίοτε είναι δυσδιάκριτα. Τα άνθη των βίκων εκφύονται από τις

μασχάλες των φύλων και είτε αποτελούν βοτρυώδη ταξιανθία που περιλαμβάνει 2-6 ή και περισσότερα άνθη ή εκφύετε ένα μονάχα άνθος από κάθε μασχάλη. Τα άνθη αποτελούνται από 5 σέπαλα, 5 πέταλα, 10 στήμονες και τον ύπερο. Ο κάλυκας είναι σωληνοειδής με 5 ίσα ή άνισα δόντια. Το χρώμα των πετάλων ποικίλει ανάλογα με το είδος. Οι λοβοί είναι επιμήκεις, κυλινδρικοί, πεπιεσμένοι, λείοι ή χνουδωτοί και περιλαμβάνουν 4-10 σπέρματα.

Πίνακας 6.2.1: Το γένος *Vicia* στην Ελλάδα

ΕΙΔΟΣ / ΣΥΝΟΝΙΜΑ	ΥΠΟΕΙΔΗ	ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ/ΚΑΤΑΝΟΜΗ
V. pinetorum Boiss. & Spruner in Boiss.		**Ελλάδα**
V. ochroleuca Ten.	V.o.subsp. ochroleuca V.o.subsp. dinara	Βαλκάνια, Ιταλία, **Ελλάδα**
V. cracca L. **V. oreophila** Zertova		Σε όλη σχεδόν την Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. incana Gouan V. cracca subsp . gerardii Gaudin, V. gerardii All.		Κεντρική και νότια Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. tenuifolia Roth [incl. V. boissieri Freyn, V. elegans Guss.]		Κεντρική, νότια και ανατολική Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. dalmatica A. Kerner V. tenuifolia subsp. stenophylla Velen.		Νοτιανατολική Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. sibthorpii Boiss.		**Ελλάδα**
V. cassubica L.		Κεντρική, νότια και ανατολική Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. onobrychioides L.		Νότια Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. dumetorum L.		**Ελλάδα**, Ιταλία,
V. villosa Roth	V.v. subsp. villosa V.v.subsp. varia V.v subsp. eriocarpa V.v. subsp. microphylla V.v subsp. pseudocracca	Ευρώπη, **Ελλάδα**
V.benghalensis L. V. atropurpurea Desf.		Μεσόγειος, Πορτογαλία, **Ελλάδα**
V. cretica Boiss. & Heldr. In Boiss.	V.c. subsp. cretica V.c.subsp. aegaea	**Ελλάδα**
V. monantha Retz. V. calcarata Desf.	V.m. subsp. monantha V.m. subsp. triflora	Περιοχή Μεσογείου, **Ελλάδα**
V. articulate Hornem, V. monanthos (L.) Desf. non Retz.;		Νότια Ευρώπη, **Ελλάδα**

[incl. V. smyrnaea Boiss.]		
V. ervilia (L.) Willd.		Νότια Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. leucantha Biv.		Περιοχή Μεσογείου, **Ελλάδα**
V. hirsuta (L.) S.F. Gray		Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. disperma DC.		Νοτιοδυτική Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. tenuissima (Bieb.) Schinz & Thell. V. gracilis Loisel., Banks & non Solander		Νοτιοδυτική Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. tetrasperma (L.) Schreber		Νότια Ευρώπη, **Κρήτη**
V. pubescens (DC.) Link		Νότια Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. sepium L.		Σε όλη σχεδόν την Ευρώπη
V. grandiflora Scop.		Κεντρική και νοτιανατολική Ευρώπη, Ελλάδα
V. barbazitae Ten. & Guss.		Βαλκάνια και κεντρική Μεσόγειος, Ελλάδα
V. pannonica Crantz	V.p. subsp. pannonica V.p.subsp. striata (Bieb.)	Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. sativa L.	V.p.subsp. nigra V.p.subsp. amphicarpa V.p.subsp. cordata V.p.subsp. incisa V.p.subsp. sativa V.p.subsp. macrocarpa	Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. lathyroides L. [incl. V. olbiensis Reuter]		Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. cuspidata Boiss.		**Ελλάδα,** Τουρκία
V. peregrinα L. [incl. V. megalosperma Bieb.]		Νότια Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. melanops Sibth. & Sm. V. pichleri Huter		Βαλκάνια, **Ελλάδα**
V. lutea L.	V.l. subsp. lutea V.l. subsp. vestita	Νοτιοδυτική Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. hybrida L.		Νότια Ευρώπη, Ελλάδα
V. bithynica (L.) L.		Νοτιοδυτική Ευρώπη, Ελλάδα
V. narbonensis L. [incl. V. serratifolia Jacq.]		Νότια Ευρώπη, **Ελλάδα**
V. faba L. Faba vulgalis MOENCH		Ευρώπη, **Ελλάδα**



Το είδος ***Vicia faba*** είναι ένα μονοετές, εδώδιμο φυτό το οποίο είναι γνωστό στην Ελλάδα με τις ονομασίες Κουκιά ή Κύαμοι. Τα κουκιά παρουσιάζουν μεγάλη μορφολογική ποικιλομορφία ως προς το ύψος των φυτών, το μέγεθος και το σχήμα των λοβών και των σπερμάτων, το χρώμα των σπερμάτων και διάφορα άλλα χαρακτηριστικά. Είναι φυτό όρθιας αναπτύξεως, ύψους 30 έως 150 εκατοστών. Κάθε φυτό μπορεί να αποτελείται από 1 έως 5 ή και περισσότερους βλαστούς. Τα φύλλα είναι σύνθετα αποτελούμενα από 1-3 ζεύγη φυλλαρίων και είναι τοποθετημένα εναλλάξ πάνω στο στέλεχος. Τα φυλλάρια είναι ευρέα, σχήματος ωοειδούς, λεία ακέραια και φέρονται πάνω σε ένα αυλακωτό μίσχο στην άκρη του οποίου υπάρχει ένα στενό φυλλάριο μικρής αναπτύξεως. Στη βάση κάθε φύλλου υπάρχουν δυο μικρά οδοντωτά παράφυλλα των οποίων το σχήμα και το μέγεθος ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία. Τα άνθη εκφύονται από τις μασχάλες των φύλλων και φέρονται ανά 2-9 σε ένα βραχύ ποδίσκο. Τα πέταλα έχουν χρώμα λευκό και μόνο οι πτέρυγες φέρουν ανά μια κηλίδα σκοτεινού χρώματος, συνήθως μαύρου. Οι στήμονες είναι διάδελφοι, δηλαδή οι 9 συνάπτονται κατά το κατώτερο μέρος των νημάτων τους, ενώ ο δέκατος παραμένει ασύναπτος. Ο καρπός είναι λοβός και περιέχει 3 έως 8 σπέρματα. Το μήκος, το εύρος και το βάρος τω λοβών ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία και με τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Η ρίζα είναι πασσαλώδης και φέρει πλευρικές διακλαδώσεις. Τα φυμάτια είναι μεγάλα, σφαιρικά και βρίσκονται τόσο στην κυρίως ρίζα όσο και στις διακλαδώσεις της.

Με βάση το μέγεθος των σπερμάτων το είδος αυτό διακρίνεται σε τρία υποείδη, το *Vicia faba major*, το *Vicia faba minor* και το *Vicia faba equine*. Στο *V.f. major* ανήκουν οι μεγαλόσπερμες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται κυρίως για διατροφή του ανθρώπου. Οι ποικιλίες του υποείδους αυτού έχουν λοβούς μεγάλων διαστάσεων και σπέρματα πλατυσμένα, μεγάλου μεγέθους. Στα άλλα δυο υποείδη ανήκουν οι μικρόσπερμες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται κυρίως ως ζωοτροφή. Ειδικότερα στο υποείδος *V.f. minor* ανήκουν οι πολύ μικρόσπερμες ποικιλίες και στο

υποείδος *V.f. equine* οι μικρόσπερμες ποικιλίες που έχουν μεγαλύτερους σπόρους. Οι μικρόσπερμες ποικιλίες είναι γνωστές με το όνομα φούλια. Τα φούλια έχουν βλαστό υψηλότερο και πυκνότερα διακλαδιζόμενο σε σύγκριση με τις μεγαλόσπερμες ποικιλίες. Τα φύλλα είναι περισσότερο πράσινα και λιγότερα γλαυκά. Τέλος, οι λοβοί είναι μικρότερου μεγέθους και έχουν σχήμα κυλινδρικό.

Βασίλειο: Plantae
Υποβασίλειο: Tracheobionta
Άθροισμα: Spermatophyta
Υποάθροισμα: Angiospermae
Κλάση: Dicotyledones
Υποκλάση: Rosidae
Τάξη: Fabales
Οικογένεια: Fabaceae (Leguminosae)
Υποοικογένεια: Papilionoideae
Γένος: Vicia
Είδος: **Vicia faba**
Ποικιλία **V.f. major**

Σχήμα 6.2.1: Συστηματική κατάταξη του φυτού *Vicia faba*

Τα κουκιά είναι μια παλιά καλλιέργεια όπου σύμφωνα με αρχαιολογικές ενδείξεις άρχισε κατά το τέλος της Νεολιθικής εποχής. Τα πρώτα ευρήματα κουκιών προέρχονται από την περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου και ανάγονται στην αρχή της Ορειχάλκινης Εποχής γύρω στο 3000 π.Χ. Δεν υπάρχουν όμως προϊστορικά ευρήματα κουκιών ανατολικά της γραμμής που εκτείνονται από την Παλαιστίνη μέχρι την Τουρκία. Σύμφωνα με όλες τις ενδείξεις το κέντρο καταγωγής των κουκιών είναι η Εγγύς Ανατολή από όπου διαδόθηκαν προς την Ευρώπη, κατά μήκος της Βόρειας Αφρικής μέχρι την Ισπανία, κατά μήκος του Νείλου μέχρι την Αιθιοπία και από την Μεσοποταμία στην Ινδία.

Ο Όμηρος αναφέρει τα κουκιά με το όνομα κύαμοι, ονομασία η οποία χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα. Τα κουκιά κατά την αρχαιότητα χρησιμοποιούνταν για διατροφή του ανθρώπου, όπως ακριβώς και σήμερα, δηλαδή ξερά και χλωρά, ωμά και μαγειρευτά. Ο Θεόκριτος αναφέρει ότι τα κουκιά τα έτρωγαν καβουρδιστά, "κύαμον δε τις εν πύρι φρυξεί", όπως γίνεται και σήμερα σε μερικές περιοχές της Ελλάδας (Κέρκυρα) και σε άλλες χώρες (Γαλλία). Στην αρχαία

Ελλάδα τα κουκιά χρησιμοποιούνταν και ως ψηφοδέλτια κατά τις εκλογές όπως μας πληροφορεί ο Θουκυδίδης “Βουλή και από κυάμου συνελέγετο”.

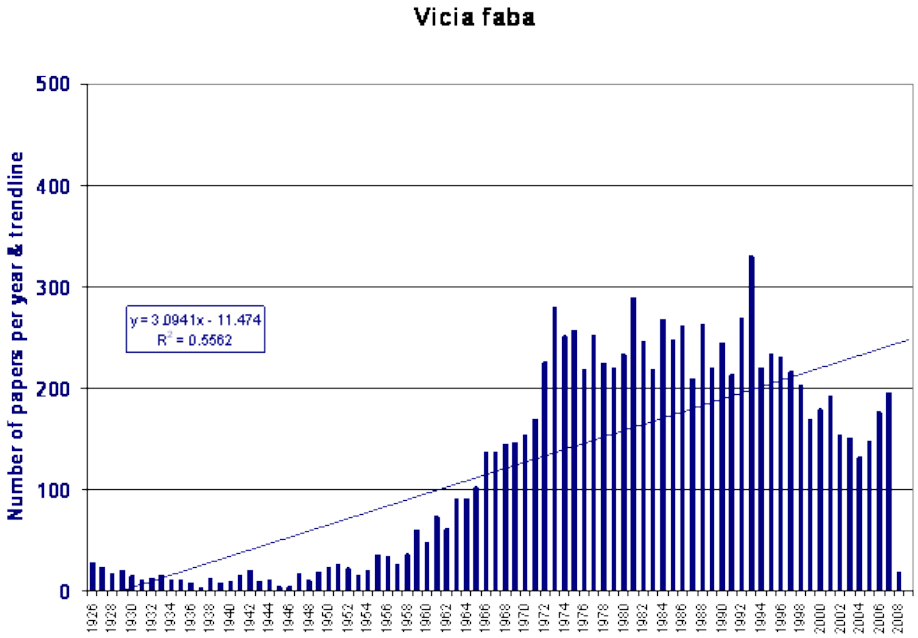
Σπέρματα κουκιών βρέθηκαν στους τάφους των Φαραώ. Ωστόσο υπάρχουν αρκέτες ενδείξεις ότι οι Αιγύπτιοι ούτε καλλιεργούσαν αλλά ούτε έτρωγαν τα κουκιά. Ο Ηρόδοτος αναφέρει ότι “κυαμοί δε, ούτε τι μάλα σπείρουσι οι Αιγύπτιοι εν τη χώρα, τους δε γινόμενους ούτε τρώγουσι ούτε οψέοντες πατέονται”. Σύμφωνα επίσης με τον Ηρόδοτο οι ιερείς απέστρεφαν ακόμη και το βλέμμα τους από τα κουκιά “οι δε δη ιερέες ουδέ ορέοντες ανέχονται, νομίζοντες ου καθαρόν μεν είναι όσπριον”. Όλες αυτές οι μαρτυρίες υποστηρίζουν την εκδοχή ότι τα κουκιά είναι ιθαγενή της Αιγύπτου. Εκτός όμως από την Αίγυπτο τα κουκιά απαντώνται αυτοφυή και σε άλλες χώρες της Βόρειας Αφρικής και της κεντρικής και νοτιοδυτικής Ασίας.

Τα κουκιά κατέχουν την τέταρτη θέση μεταξύ των οσπρίων σε παγκόσμια κλίμακα, μετά τα ξερά φασόλια, τα ξερά μπιζέλια και τα ρεβίθια. Η καλλιέργεια των κουκιών σε όλο τον κόσμο καταλαμβάνει κάθε χρόνο έκταση 47 περίπου εκατομμυρίων στρεμμάτων. Η ετήσια παραγωγή ξερών κουκιών ανέρχεται σε 6 περίπου εκατομμύρια τόνους. Το 72% της παραγωγής αυτής προέρχεται από την Κίνα. Άλλες σπουδαίες κυαμαπαραγωγικες χώρες είναι η Ιταλία, η Αίγυπτος, η Αγγλία, το Μαρόκο, η Αιθιοπία, η Ισπανία και η Βραζιλία (15). Στην Ελλάδα η καλλιέργεια των κουκιών καταλαμβάνει κάθε χρόνο 110.000 στρέμματα. Η ετήσια παραγωγή ξερών σπερμάτων από τις μεγαλόσπερμες ποικιλίες ανέρχεται σε 10.000 τόνους. Το 65% της παραγωγής αυτής προέρχεται από την Κρήτη, την Αρκαδία, την Εύβοια και τα νησιά του Αιγαίου. Η ετήσια παραγωγή κτηνοτροφικών κουκιών ανέρχεται γύρω στους 3.000 τόνους.

Η κατανάλωση κουκιών προκαλεί σε μερικά άτομα μια ασθένεια που είναι γνωστή με το όνομα **κυάμωση ή κυαμισμός**. Η κυάμωση είναι μια αιμολυτική αναιμία που προσβάλει κυρίως τα παιδιά και ιδίως τα αγόρια και σχετίζεται με την γενετική ανεπάρκεια της 6-φωσφορογλυκόζης των ερυθροκυττάρων (6GPD)[128]. Το ένζυμο αυτό ελέγχεται από ένα γονίδιο το οποίο βρίσκεται στο Χ χρωμόσωμα κάτι που εξηγεί και την εκδήλωση της ασθένειας κυρίως στα άρρενα άτομα. Οι τοξικοί παράγοντες που θεωρούνται υπεύθυνοι για την κυάμωση είναι οι ουσίες βασίνη,

κονβισίνη καθώς και ένα Dopa-γλυκοζίδιο[129]. Μεγάλες ποσότητες από τους παράγοντες αυτούς απαντώνται στα χλωρά και τα μόλις συγκομισθέντα ξερά κουκιά, ενώ με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης μειώνονται. Εμφανίζεται συνήθως στους πληθυσμούς των χωρών της Μεσογείου και πιο σπάνια σε χώρες όπως η Κίνα, το Ιράκ, το Ιράν. Πιστεύεται πως η ασθένεια ήταν γνωστή και στους Αρχαίους Έλληνες όπως συμπεραίνεται από τη ρήση του Πυθαγόρα <<*Κυάμων απέχεσθε*>>.

Το φυτό *V. faba* παρουσιάζει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον όπως καταδεικνύει ο τεράστιος αριθμός ερευνητικών μελετών που έχουν διενεργηθεί (Γράφημα 1)[130]. Οι φυτοχημικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αφορούν τόσο την απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών όσο και τον έλεγχο βιολογικής δράσης των εκχυλισμάτων, κλασμάτων ή καθαρών ουσιών του φυτού. Έχει αναφερθεί η απομόνωση ενός μεγάλου αριθμού ουσιών οι οποίες εντάσσονται στις κύριες κατηγορίες φυσικών προϊόντων όπως απλές αλειφατικές ενώσεις, απλές αρωματικές ενώσεις, φλαβονοειδή, τριτερπένια, στεροειδή, αμινοξέα και αλκαλοειδή[131].



Γράφημα 1: Επιστημονικές μελέτες για το φυτό Vicia faba στην πάροδο των χρόνων.

6.2.2. Γένος Lotus – Είδος L. edulis και L. longisiliquosus

Το γένος *Lotus* ή Λότος ή Λωτός ανήκει στην οικογένεια Fabaceae και περιλαμβάνει 100 περίπου είδη. Τα φυτά του γένους *Lotus* είναι ετήσια ή πολυετή, ποώδη ή θαμνώδη και είναι ιθαγενή των Μεσογειακών χωρών και των χωρών της Βόρειας Αμερικής. Από αυτά 16 τουλάχιστον είδη είναι αυτοφυή της Ελληνικής χλωρίδας και απαντώνται σε βοσκοτόπια και καλλιεργούμενες εκτάσεις.



Lotus uliginosus



Lotus tenuis



Lotus corniculatus

Εικόνα 6.2.2 : Μερικοί εκπρόσωποι του γένους *Lotus.*

Το γένος *Lotus* δεν περιλαμβάνει σημαντικά, από οικονομικής απόψεως, φυτά. Λίγα είναι αυτά που χρησιμοποιούνται για σανό ή βοσκή και ακόμα λιγότερα αυτά που καλλιεργούνται για το σκοπό αυτό. Ανάμεσα στα καλλιεργούμενα είδη είναι ο πλατύφυλλος λωτός (*Lotus corniculatus*), ο στενόφυλλος λωτός (*Lotus tenuis*) και ο μεγάλος λωτός (*Lotus uliginosus*). Ο πλατύφυλλος και ο στενόφυλλος λωτός αποτελούν πολύτιμα κτηνοτροφικά φυτά γνωστά με το όνομα αγριοτριφύλλι. Ο λωτός του Ομήρου και ο ήμερος λωτός του Διοσκουρίδη πιθανότατα αντιστοιχούν στα είδη αυτά.



Τα φυτά του γένους *Lotus,* των οποίων η ανάπτυξη ποικίλει από όρθια μέχρι και έρπουσα, ανάλογα με το είδος και την ποικιλία, έχουν στελέχη λεπτά, μήκους από 15 εκατοστά μέχρι και ένα μέτρο (ανάλογα με το είδος και τις συνθήκες ανάπτυξής τους). Τα φύλλα των λωτών εκφύονται κατά εναλλαγή κατά μήκος του στελέχους. Κάθε φύλλο αποτελείται από 5 φυλλάρια. Το ένα από αυτά είναι ακραίο,

δυο βρίσκονται στην άκρη του μίσχου σε αντίθετη διάταξη και τα αλλά δυο στη βάση του μίσχου. Το σχήμα και το μέγεθός τους ποικίλει ανάλογα με το είδος. Τα άνθη των λωτών φέρονται σε ομάδες πάνω σε μακρούς ανθικούς άξονες. Ο αριθμός των ανθέων σε κάθε ομάδα, καθώς και το χρώμα τους ποικίλει ανάλογα με το είδος. Οι λοβοί είναι επιμήκεις, κυλινδρικοί και σε μερικά συμπιεσμένοι. Το μέγεθός τους ποικίλει ανάλογα το είδος και φέρουν ένα πυκνό δίκτυο νεύρων που απολήγουν σε μια μικρή προεξοχή. Ο κάθε λοβός φέρει μέσα του πολλούς σπόρους. Πολλές φορές οι λοβοί των λωτών μόλις ωριμάσουν ανοίγουν, τα δυο τμήματα που προκύπτουν συστρέφονται σπειροειδώς και οι σπόροι σκορπίζονται στο έδαφος.

Οι λωτοί αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε γόνιμα εδάφη βοσκοτόπων και αυτοσπείρονται εύκολα. Εκτός όμως των εδαφών αυτών μπορούν να αναπτυχθούν και σε λιγότερο γόνιμα εδάφη, καθώς επίσης και σε κακοστραγγισμένα ή με υψηλή περιεκτικότητα αλκαλίων ή αλάτων εδάφη. Από τα καλλιεργούμενα είδη ο πλατύφυλλος λωτός αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε όξινα και σχετικά άγονα εδάφη και θεωρείται φυτό ανθεκτικό στην ξηρασία. Ο στενόφυλλος λωτός προσαρμόζεται σε βαριά, κακοστραγγισμένα αργιλώδη εδάφη, καθώς επίσης και σε εδάφη με αρκετές ποσότητες αλάτων. Ο μεγάλος λωτός αναπτύσσεται και σε όξινα εδάφη και σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από ήπιους χειμώνες. Ο σανός και των τριών καλλιεργούμενων ειδών είναι εύγευστος για τα ζώα και μεγάλης θρεπτικής αξίας. Συνήθως οι λωτοί καλλιεργούνται σε εδάφη στα οποία τα άλλα κτηνοτροφικά φυτά δεν ευδοκιμούν[127]

Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται τα είδη του γένους *Lotus* που ευδοκιμούν στην Ελλάδα, τα συνώνυμα τους, ποικιλίες και υποείδη. Επίσης, δίνονται στοιχεία για την γεωγραφική εξάπλωση των αναφερομένων ειδών.

Πίνακας 6.2.2: Κατανομή ειδών του γένους *Lotus* στην Ελλάδα (Tutin T.G., 1972)

ΕΙΔΟΣ / ΣΥΝΟΝΙΜΑ	ΥΠΟΕΙΔΗ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ
L. tenuis Waldst.& Kit. Ex Willd *L. tenuifolius* (L) Reichemb		Ευρώπη (εκτός από τις πολύ Β. περιοχές) Ελλάδα
L. stenodon (Boiss.&Heldr.) Heldr. *L. orphanidis* Ujhelyi [Incl. *L.preslii var. rostellatus* (Heldr.) Hayek.]		Αλβανία, Ελλάδα, Γιουγκοσλαβία
L. corniculatus L. [incl. *L.ambiguus* Besser ex Sprengel, *L.caucasicus* Kuprian.]		Σε όλη την Ευρώπη
L. uliginosus Schkuhr *L.pedunculatus* auct. non Cav. *L.corniculatus* subsp.*major*		Κ. Δ. & Ν. Ευρώπη Ελλάδα
L. preslii Ten.		Μεσόγειος
L. palustris Willd.		Ν. Αλβανία Ελλάδα
L. aegaeus (Grised.) Boiss.		Βουλγαρία Γιουγκοσλαβία Ελλάδα
L. parviflorus Desf.		Ν. Ευρώπη Ελλάδα
L. angustissimus (L.) [incl.*L.praetermissus* Kupr., *L. thessalus* Hayek]	Sect.KROKERIA (Moench) Willk.	Ν. Ευρώπη Ελλάδα
L. edulis L.	Sect.ERYTHROLOTUS Brand.	Μεσόγειος Ελλάδα
L. conimbricensis Brot. *L. coimbrensis* Brot. ex Willd		Μεσόγειος Ελλάδα
L. aduncus (Griseb.) Nyman	Sect. LOTEA (Medicus) Willk	Ελλάδα (Θάσος)
L. cytisoides L. *L.creticus* auct.,non L.		Μεσόγειος Ελλάδα
L. creticus L. *L. commutatus* Guss.		Μεσόγειος Ελλάδα
L. collinus (Boiss.) Heldr. *L.creticus subsp. collinus* (Boiss.) Briq. L.longisiliquosus R. de Roemer		Ελλάδα Ν. Ισπανία
L. strictus Fischer & C.A.Meyer		Β.Α. Ελλάδα Α. Βουλγαρία
L. halophilus Boiss. & Spruner in Boiss. *L.villosus* Forskal, non Burm. *L.pusillus* Viv., non Medicus		Α. Μεσόγειος Ελλάδα
L. ornithopodioides L.		Ν. Ευρώπη Ελλάδα
L. peregrinus L.	Sect. PEDROSIA Brand.	Ελλάδα Σικελία



Το είδος ***Lotus edulis*** L. είναι ένα μονοετές, εδώδιμο φυτό το οποίο είναι γνωστό στην Ελλάδα με το όνομα περανζούνι. Το ύψος του κυμαίνεται από 10 έως 50 εκατοστά και φέρει λίγο τρίχωμα. Ξεχωρίζει εύκολα από τα άλλα φυτά του γένους λόγω του χαρακτηριστικού λοβού, ο οποίος είναι επιμήκης, μήκους 20-40 mm, λίγο κυρτός και πολύ διογκωμένος, ενώ φέρει αύλακα στο πίσω μέρος. Ο κάθε λοβός περιέχει πολλά, σχεδόν σφαιρικά, σπόρια. Τα φυλλάρια του είναι επιμήκη, ωοειδή, συνήθως πιο πλατιά πάνω από τη μέση, μήκους 5-16mm. Τα άνθη είναι κίτρινα, μασχαλιαία, με πέταλα καμπυλωτά μήκους 10-16mm και φέρονται μόνα τους ή σε ζεύγη πάνω σε μίσχους μακρύτερους από τα φύλλα. Ο κάλυκας έχει μορφή καμπάνας. Το είδος αυτό απαντάται αυτοφυές σε αγρούς, πετρώδεις και αμμώδεις περιοχές και στα πλαϊνά των δρόμων, σε όλα σχεδόν τα μέρη της Ελλάδος. Επίσης απαντάται στις χώρες της Μεσογείου και τη νότια Πορτογαλία[132].

Η συστηματική κατάταξη του φυτού *Lotus edulis* έχει ως εξής : φυτό δικοτυλήδονο ανήκει στην υπερτάξη Rosidae, στην τάξη Fabales, στην οικογένεια Leguminosae, στο γένος *Lotus* και στο είδος *edulis* (Σχήμα 6.2.2).

Βασίλειο: Plantae
Υποβασίλειο: Tracheobionta
Άθροισμα: Spermatophyta
Υποάθροισμα: Angiospermae
Κλάση: Dicotyledones
Υποκλάση: Rosidae
Τάξη: Fabales
Οικογένεια: Fabaceae (Leguminosae)
Υποοικογένεια: Faboideae (Papilionoideae)
Γένος: Lotus
Είδος: **Lotus edulis L.** (1753)

Σχήμα 6.2.2: Συστηματική κατάταξη του φυτού *Lotus edulis* L.



Το είδος ***Lotus longisiliquosus*** είναι μη εδώδιμο πολυετές φυτό με ύψος μεγαλύτερο από 50 εκατοστά και φέρει λίγο τρίχωμα. Κάθε φύλλο αποτελείται από 5 φυλλάρια διαστάσεων 7-18 x 4-9 mm. Ο κάλυκας έχει μήκος 7,5-9 mm και αποτελείται από 5 οδόντες εκ των οποίων οι δύο ανώτεροι είναι ελαφρός κυρτοί, οι δύο πλάγιοι έχουν οξύ σχήμα και είναι σχεδόν ισομήκη με τους πάνω και ένα κατώτερο μεγαλύτερο. Οι ταξιανθίες φέρουν 2 με 6 άνθη κίτρινου προς καφέ-κιτρινου χρώματος. Η στεφάνη έχει μήκος 12-18 mm ενώ πτέρυγες είναι αρκετά μακρύτερες από την τρόπιδα. Η τρόπιδα έχει μακρύ, ευθύ ράμφος κίτρινου προς καφέ-κίτρινου χρώματος. Οι λοβοί είναι επιμήκεις ή ελαφρά κυρτοί , 20-50 mm μήκους . Φύεται σε ξέρα βραχώδη εδάφη και η ανθοφορία τους γίνεται τον Φεβρουάριο – Μάρτιο. Απαντάτε σε όλη την Ελλάδα, στη Νότια Ισπανία στην Β. Αφρική και στη Ν.Δ. Ασία.

Η συστηματική κατάταξη του φυτού *Lotus longisiliquosus* έχει ως εξής : φυτό δικοτυλήδονο ανήκει στην υπερτάξη *Rosidae,* στην τάξη *Fabales*, στην οικογένεια *Fabaceae* (*Leguminosae*), την υποοικογένεια Faboideae (*Papilionoideae)*, στο γένος *Lotus* και στο είδος *longisiliquosus* (Σχήμα 6.2.3).

Βασίλειο: Plantae
Υποβασίλειο: Tracheobionta
Άθροισμα: Spermatophyta
Υποάθροισμα: Angiospermae
Κλάση: Dicotyledones
Υποκλάση: Rosidae
Τάξη: Fabales
Οικογένεια: Fabaceae (Leguminosae)
Υποοικογένεια: Faboideae (Papilionoideae)
Γένος: Lotus
Είδος: **Lotus longisiliquosus** R. de Roemer (1852)
(**Lotus collinus** Heldr**.** 1897)

Σχήμα 6.2.3: Συστηματική κατάταξη του φυτού *Lotus longisiliquosus* R. de Roemer

Οι φυτοχημικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε φυτά του γένους *Lotus* αφορούν κυρίως τον εντοπισμό φυτοαλεξινών και κυανιδρυνικών γλυκοσιδών. Οι φυτοαλεξίνες που έχουν απομονωθεί από τα φυτά αυτά είναι η βεστιτόλη, η ισοβεστιτόλη, η διμεθυλβεστιτόλη και η λοτισοφλαβάνη[133]. Οι κυανιδρινικοι γλυκοσίδες Λιναμαρίνη και Λοταουστραλίνη αποτελούν χαρακτηριστικές ουσίες με αναφορές σε πολλά είδη του γένους Lotus[134,135].

Από τα φυτά του γένους μόνο το *L. corniculatus* έχει τύχει εκτενής φυτοχημικής μελέτης. Από το φυτό αυτό έχει απομονωθεί ένας μεγάλος αριθμός φαινολικών οξέων (καφεϊκό, φαιρουλικό, συρινγικό, βανιλικό οξύ κ.α.)[136], φλαβονοειδών (γλυκοσίδες κερκετίνης, κεμπφερόλης, αστραγαλίνης, κορνικουλατοσίνης, ποπουλνίνης, γκοσιπετίνης κ.α.)[137,138,139], τερπενίων (ολεανολικό οξύ)[140] και αμινοξέων (μπεταϊνη, καναβανίνη)[141,142].

Για τα φυτά *L. edulis και L. longisiliquosus* δεν υπάρχουν προηγούμενων φυτοχημικών μελετών.

6.2.3 Γένος Tetragonolobus – Είδος T. purpureus

Το γένος *Tetragonolobus* Scop. ανήκει στην οικογένεια Fabaceae και αριθμεί μόνο 18 είδη. Τα φυτά του γένους είναι ετήσια ή πολυετή, ποώδη ή θαμνώδη και μοιάζουν πολύ με τα φυτά του γένους *Lotus* όπου και ανήκαν αρχικά. Οι διαφορές με τα φυτά του γένους *Lotus* είναι οι εξής: τα φύλα αποτελούνται από τρία φυλλάρια , τα άνθη φέρονται μόνα οι σε ζεύγη, οι οδόντες του κάλυκα είναι ισομεγέθης και οι καρποί έχουν φτερωτές ή πριονωτές γωνίες και σε εγκάρσια τομή σχηματίζουν σχήμα τετράγωνο. Στην Ευρώπη απαντούν μόνο πέντε είδη κυρίως στις παραμεσόγειες περιοχές (Πίνακας 6.2.3).

Πίνακας 6.2.3: Κατανομή ειδών του γένους *Tetragonolobus* στην Ευρώπη (Flora Europea)

ΕΙΔΟΣ / ΣΥΝΟΝΙΜΑ	**ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ**
T. maritimus (L.) Roth. L. siliquosus L.	Ευρώπη (εκτός από τις πολύ Β. περιοχές) Ελλάδα
T. biflorus (Desr.) Ser. in DC. L. biflorus Desr.	Ν. Ιταλία Β.Δ. Ελλάδα
T. purpureus Moench L. tetragonolobus L. **T. wiedemannii** Boiss L. wiedemannii (Boiss) Nyman	Ν. Ευρώπη
T.requienii (Mauri ex Sang.) Sang.	Μεσόγειος ,Ελλάδα Ν. Πορτογαλια



Το είδος ***Tetragnolobus purpureus*** **Moench** είναι ένα μονοετές, εδώδιμο φυτό, μήκους 10-40 εκατοστά με οριζόντια ανάπτυξη και φέρει τρίχωμα. Χαρακτηριστικό γνώρισμά του αποτελούν τα πορφυροκόκκινα άνθη τα οποία φέρει είτε μόνα είτε σε ζεύγη. Τα φύλα είναι ωοειδή προς ρομβικά και φέρονται σε μίσχους μικρότερους ή ισομεγέθης με τα φύλα. Ο καρπός δεν φέρει τρίχωμα, έχει διαστάσεις 30-90 x 6-8 mm και φέρει πλατιά πτερύγια στις

γωνίες. Απαντάται αυτοφυές στην Ν Ευρώπη σε υγρά εδάφη , ημιορεινά λιβάδια και επίπεδες πληγές. Επίσης καλλιεργείτε για τους εδώδιμους καρπούς του.

Η συστηματική κατάταξη του φυτού *Tetragonolobus purpureus* Moench έχει ως εξής : φυτό δικοτυλήδονο ανήκει στην υπερτάξη *Rosidae,* στην τάξη *Fabales*, στην οικογένεια *Fabaceae* (*Leguminosae*), την υποοικογένεια Faboideae (*Papilionoideae)*, στο γένος *Tetragonolobus* και στο είδος *purpureus* (Σχημα 6.2.4).

Βασίλεια Plantae
Υποβασίλειο Tracheobionta
Άθροισμα Spermatophyta
Υποάθροισμα Angiospermae
Κλάση: Dicotyledones
Υποκλάση: Rosidae
Τάξη: Fabales
Οικογένεια Fabaceae(Leguminosae)
Υποοικογένεια Faboideae(Papilionoideae)
Γένος: Tetragonolobus
Είδος: ***Tetragonolobus purpureus*** Moench

Σχήμα 6.2.4: Συστηματική κατάταξη του φυτού *Tetragonolobus purpureus* Moench

Στην Κρήτη το φυτό φέρεται με τις ονομασίες ¨σανταλίδα¨ ή ¨σαντραλίδα¨ ή ¨ωραία κόρη¨ ενώ στην υπόλοιπη Ελλάδα συναντάται και με τα ονόματα ¨Ασπρόχειλας¨ και ¨Λουί¨. Το εδώδιμο τμήμα του φυτού είναι ο καρπός ο οποίος καταναλώνεται τόσο ωμός όσο και σε διάφορα φαγητά. Οι καρποί είναι ιδιαιτέρα αρεστοί στα παιδιά που τους καταναλώνουν και με την παρότρυνση των μεγαλυτέρων διότι πιστεύεται ότι διαθέτουν εξαιρετικές θρεπτικές ιδιότητες. Επίσης ολόκληρο το φυτό αποτελεί πολύ καλή τροφή για τα ζώα.

Όσον αφορά το φυτοχημικό χαρακτήρα των φυτών του γένους, οι ελάχιστες αναφορές που υπάρχουν στην βιβλιογραφία αφορούν κυρίως τον εντοπισμό των κυανιδρινικών γλυκοσιδών λιναμαρίνη και λοταουστραλίνη καθώς και την ύπαρξη φυτοαλεξινών ισοφλαβάνης. Πράγματι όπως και στα φυτά του γένους *Lotus* έτσι και στο γένος Tetragonolobus εντοπίστηκαν τόσο οι δυο αυτοί κυανυδρινικοί

γλυκοσίδες[133], όσο και οι φυτοαλεξινές βεστιτόλη, ισοβεστιτόλη και διμεθυλβεστιτόλη[132], γεγονός που δηλώνει και μέσω του φυτοχημικού χαρακτήρα, την συγγένεια των δύο αυτών γενών. Πέραν όμως αυτών δεν υπάρχουν αναφορές οι οποίες να περιγράφουν εκτενώς τον φυτοχημικό χαρακτήρα των φυτών του γένους Tetragonolobus.

6.2.3 Γενος Lathyrus – Ειδος L. laxiflorus subsp laxiflorus

Το γένος *Lathyrus* (λάθυρος ή λαθούρι) ανήκει στην οικογένεια *Leguminosae* και αριθμεί περίπου 200 είδη. Από αυτά πολύ λίγα καλλιεργούνται ,κυρίως της Ινδία, στη νότια Ρωσία, στις περιοχές της Μεσογείου και στις Ηνωμένες Πολιτείες. Τα είδη πού κυρίως καλλιεργούνται είναι το βρώσιμο λαθούρι (*L. sativus*), το κλυμένο λαθούρι (*L. clymenus*), το αδρότριχο λαθούρι *(L. hirsutus*), το ερέβινθος λαθούρι (*L. cicera*) και το ώχρος λαθούρι (*L. ochrous*) ενώ τα περισσότερα από τα υπόλοιπα είδη του γένους είναι τοξικά (ειδίκα τα σπέρματα) τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα. Επίσης μερικά είδη χρησιμοποιούνται σαν καλλωπιστικά φυτά, όπως το *L. odoratus* το οποίο είναι γνωστό ως μοσχομπίζελο λόγο της ευχάριστης οσμής του.



Lathyrus hirsutus *Lathyrus sativus* *Lathyrus cicera*

Εικόνα 6.2.3 : Μερικοί εκπρόσωποι του γένους *Lathyrus.*



Τα φυτά που ανήκουν στο γένος *Lathyrus* είναι μονοετείς ή πολυετείς πόες που μπορεί να είναι όρθιες, φρυγανώδεις ή αναρριχόμενες με βλαστούς πτερυγιοφόρους. Τα φύλλα είναι πτερωτά, αρτιόληκτα με 1-6 ζεύγη φυλλαρίων που καταλήγουν συνήθως σε έλικα απλή ή διακλαδισμένη. Σπανίως αντικαθίστανται από έλικα και φυλλόμορφα παράφυλλα. Τα άνθη είναι είτε μονήρη είτε φέρονται σε ταξιαρχία βότρυ επί μακρού και συνήθως αρθρωτού, μασχαλιαίου ποδίσκου. Ο κάλυκας είναι λοξός κωδωνοειδής με πέντε οδόντες, σχεδόν ισομήκεις. Η στεφάνη φέρει στρογγυλό ή πλατύ ωοειδές πέτασο και οι πτέρυγες είναι αντωοειδείς ή προμήκεις. Οι στήμονες είναι δέκα

διάδελφοι (εννιά ενωμένοι και ένας ελεύθερος) ή στη βάση μονάδελφος με σωλήνα λοξό ακρότομο κατά γωνία ορθή. Η ωοθήκη είναι μονόχωρη με στύλο ευθύ ή όρθιο, συνήθως περιστρεφόμενο γύρο από τον άξονα του, πεπλατυσμένο και πεπιεσμένο στη βάση, ενώ είναι αυλακωτός και τριχωτός κάτω. Ο καρπός είναι χέδρωπας προμήκης ή γραμμοειδής, πεπιεσμένος που στενεύει σε σχήμα ράμφους και μπορεί να είναι έμμισχος ή επιφυής. Περιέχει δύο ή περισσότερα σπέρματα που ανοίγουν σε δύο βαλβίδες, συνήθως συνεστραμμένες κατά μήκος.

Τα λαθούρια είναι φυτά ιθαγενή των παραμεσογείων χωρών της Ευρώπης και χωρών της νοτιοδυτικής Ασίας . Το βρώσιμο λαθούρι προέρχεται από την Κεντρική Ασία και την Αβησσυνία, το ερέβινθος λαθούρι από την Εγγύς Ανατολή και την Αβησσυνία ενώ το ώχρος λαθούρι από τις παραμεσόγειες χώρες. Μερικά δε από τα είδη αυτά ήταν γνωστά και στους Αρχαίους Έλληνες. Ο λάθυρος του Θεόφραστου αναφέρεται στο βρώσιμο λαθούρι, ο ώχρος στο ώχρος λαθούρι ενώ ο οροβιαίος ερέβινθος στο ερέβινθος λαθούρι.

Πίνακας 6.2.4: Κατανομή ειδών του γένους *Lathyrus* στην Ευρώπη

ΕΙΔΟΣ / ΣΥΝΟΝΙΜΑ	**ΥΠΟΕΙΔΗ/ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ**	**ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ/ΚΑΤΑΝΟΜΗ**
L. vernus (L.) Bernh.	L. v. subsp. gracilis L. v. subsp. vernus	Σε όλη την Ευρώπη εκτός από τα νησιά, **Ελλάδα**
L. venetus (Mill.) Wohlf. (L. variegates (Ten.) Gren.& Gordon)		Νοτιοανατολική και Κεντροανατολική Ευρώπη, **Ελλάδα**
L. niger (L.) Bernh.	L. n. subsp. Niger L. n. subsp. jordanii	Σε όλη την Ευρώπη εκτός από τια βορειοανατολικές περιοχές και πολλά νησιά, **Ελλάδα**
L. digitatus (Bieb.) Fiori in Fiori & Paol. [incl. L. sessilifolius (Sibth & Sm.) Ten. incl. L. tempskyanus (Freyn & Sint.) K. Maly]		Νοτιανατολική Ευρώπη, **Ελλάδα**
L. pallescens (Bieb.) C.Koch		Νοτιανατολική Ευρώπη
L. alpestris (Waldst. & Kit.) Kit. ex Celak. [incl. L. friedrichsthalii (Griseb.) K. Maly]		Βαλκάνια, **Ελλάδα**

L. pratensis L.		Σε όλη σχεδόν την Ευρώπη
L. hallersteinii Baumg.		**Ελλάδα**, Ρουμανία
L. laxiflorus (Desf.) O. Kuntze L. inermis Rochel ex Friv.	L.l. subsp. laxiflorus	Νοτιανατολική Ευρώπη, **Ελλάδα**,
	L.l. subsp. angustifolius	Τουρκία
L. neurolobus Boiss. & Heldr. in Boiss.		Κρήτη
L. tuberosus L.		Σε όλη σχεδόν την Ευρώπη
L. sylvestris L.		Σε όλη σχεδόν την Ευρώπη
L. latifolius L. L. megalanthus Steudel [incl. L. membranaceus C. Presl]		Κεντρική και Νότια Ευρώπη, **Ελλάδα**,
L. saxatilis (Vent.) Vis. L. ciliates Guss. Vicia saxatilis (Vent.) Tropea		Περιοχή της Μεσογείου, **Ελλάδα**
L. sphaericus Retz.		Νότια Ευρώπη, **Ελλάδα**
L. angulatus L.		Περιοχή της Μεσογείου, **Ελλάδα**
L. inconspicuus L.		Περιοχή της Μεσογείου, **Ελλάδα**
L. setifolius L.		Νότια Ευρώπη, Ελλάδα
L. cicera L. [incl. L. aegaues Davidov] L. stenophyllus Boiss & Heldr. in Boiss.		Νότια Ευρώπη, **Ελλάδα**
L. sativus L.		Κεντρική, νότια και ανατολική Ευρώπη, **Ελλάδα**
L. amphicarpos L. L. quadrimarginatus Bory & Chaub.		Νότια Ελλάδα, Σικελία
L. annuus L.		Περιοχή της Μεσογείου, Πορτογαλία, **Ελλάδα**
L. hierosolymitanus Boiss.		Κρήτη, Κυκλάδες
L. hirsutus L.		Κεντρική και Νότια Ευρώπη, **Ελλάδα**
L. clymenum L. [incl. L. tuntasii Heldr. Ex Halacsy]		Περιοχή της Μεσογείου, **Ελλάδα**
L. articulatus L.		Περιοχή της Μεσογείου, Πορτογαλία, **Ελλάδα**
L. ochrus (L.) DC. In Lam. & DC.		Νότια Ευρώπη, **Ελλάδα**
L. nissolia L.		Δυτική, κεντρική και νότια Ευρώπη, **Ελλάδα**
L. aphaca L.		Δυτική, κεντρική και νότια Ευρώπη, **Ελλάδα**

Τα λαθούρια είναι φυτά ανθεκτικά στην ξηρασία και τη ζέστη. Σε χρονιές με μεγάλη ξηρασία υπερτερούν πολλών άλλων ψυχανθών όπως του μπιζελιού, του βίκου και της φακής. Τα νεαρά φυτά αντέχουν θερμοκρασίες έως 10 βαθμούς Κελσίου υπό του μηδενός. Όσον αφορά τη σύσταση του εδάφους έχει πολύ μικρές απαιτήσεις. Μπορούν να αναπτυχθούν σε κάθε είδους εδάφους αρκεί να μην είναι πολύ βαρύ και συγκρατεί πολύ υγρασία. Στην Ελλάδα σήμερα καλλιεργούνται 68.000 στρέμματα με λαθούρια και η ετήσια παραγωγή βρώσιμου λαθουριού (φάβας) ανέρχεται στους 1.550 τόνους, ενώ η ετήσια παραγωγή ζωοτροφής υπολογίζεται στους 4.800 τόνους.

Τα σπέρματα μερικών ειδών του γένους *Lathyrus* είναι τοξικά και όταν καταναλωθούν σε μεγάλες ποσότητες προκαλούν, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα, την ασθένεια που είναι γνωστή ως λαθυρισμός. Η ασθένεια αυτή γενικώς χαρακτηρίζεται από δυσκινησία και τρόμο των άκρων. Υπεύθυνη για την εκδήλωση του λαθυρισμού θεωρείται το αλκαλοειδές λαθυρίνη το οποίο περιέχεται σε μεγάλη ποσότητα στα ξηρά σπέρματα. Με το βράσιμο η ουσία αυτή απομακρύνεται. Η ασθένεια ήταν γνωστή και στην αρχαιότητα, ενώ σήμερα περιορίζεται στην Ινδία, το Μπαγκλαντές και την Αιθιοπία. Εμφανίζεται σε περιόδους ξηρασίας, κατά τις οποίες τα σπέρματα του λαθουριού καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες αφού είναι από τα ελάχιστα φυτά που καταφέρνει να επιβιώσει λόγω της ανθεκτικότητας του.



Τα είδος ***Lathyrus laxiflorus*** **subsp.*laxiflorus* (Desf.) O. Kuntze** είναι μη αναρριχώμενη πολυετής πόα, ύψους 20 έως 50 εκατοστών και φέρει λίγο τρίχωμα. Ο βλαστός είναι μη πτερυγιοφόρος. Τα φύλλα είναι λεία με ένα ζεύγος φυλλαρίων, λογχοειδή προς ωοειδή, διαστάσεων 20-40 x 10-20 mm. Τα παράφυλλα είναι λογχοειδή προς ωοειδή-σφαιρικά, τοξοειδή ή μερικός τοξοειδή διαστάσεων 10-30 x 8-15 mm. Τα άνθη φέρονται ανά 2 έως 6 σε ταξιανθία βότρυ. Ο κάλυκας είναι τριχωτός, κωδωνοειδής με πέντε σχεδόν ισομήκεις οδόντες το μήκος των οποίων είναι 2 με 3 φορές μεγαλύτερο από το μήκος του σωλήνα. Η στεφάνη διαστάσεως 15-20 mm φέρει χρώμα μπλε-βιολετί. Ο καρπός είναι τριχωτός, διαστάσεων 30-40 x 3-5 mm και φέρει 6 σπέρματα. Το φυτό αυτό απαντάται αυτοφυές σε υψόμετρο

900 με 1500 μέτρα σε όλα σχεδόν τα μέρη της Ελλάδος στην Νοτιοανατολική Ευρώπη (Ιταλία, Βαλκάνια, Ελλάδα) και στην Νοτιοδυτική Ασία.

Η συστηματική κατάταξη του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp.*laxiflorus* (Desf.) O. Kuntze (Σχήμα 6.2.5) έχει ως εξής : φυτό δικοτυλήδονο ανήκει στην υπερτάξη *Rosidae*, στην τάξη *Fabales*, στην οικογένεια *Fabaceae* , στο γένος *Lathyrus* στο είδος *laxiflorus* και υποείδος *laxiflorus*.

Βασίλειο: Plantae
Υποβασίλειο: Tracheobionta
Άθροισμα: Spermatophyta
Υποάθροισμα: Angiospermae
Κλάση: Dicotyledones
Υποκλάση: Rosidae
Τάξη: Fabales
Οικογένεια: Fabaceae (Leguminosae)
Υποοικογένεια: Faboideae (Papilionoideae)
Γένος: Lathyrus
Είδος: **L. laxiflorus**
Υποείδος **L.l. subsp. laxiflorus**

Σχήμα 6.2.5: Συστηματική κατάταξη του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp.*laxiflorus* (Desf.) O. Kuntze

Πολλά φυτά του γένους *Lathyrus* έχουν μελετηθεί φυτοχημικά. Οι κύριες κατηγορίες φυσικών προϊόντων που απαντώνται σε αυτά είναι τα τερπένια, τα φλαβονοειδή, τα αλκαλοειδή και διάφορα αμινοξέα. Τα φλαβονοειδή κεμπφερόλης, κερκετίνης, μαλβιδινης, πετουλιδίνης και οι γλυκοσίδες τους έχουν αναφερθεί σε πολλά είδη του γένους όπως επίσης και τα αμινοξέα ομοαργινίνη και λαθυρίνη[143,144].

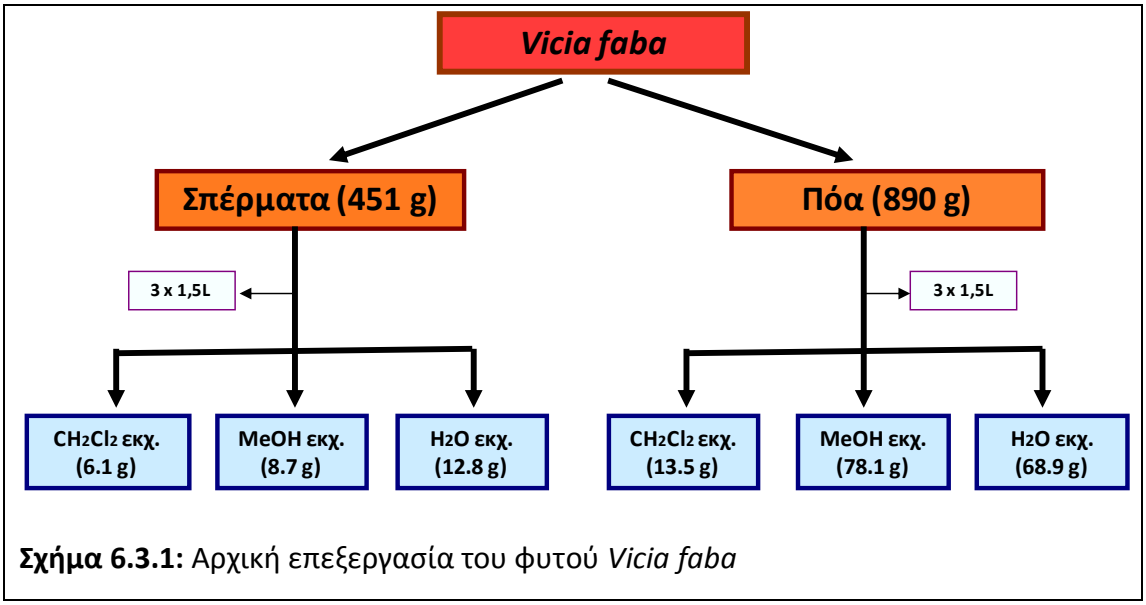
Την πιο εκτενή φυτοχημική μελέτη έχει τύχει το είδος *L. odoratus*. Από το φυτό αυτό έχει απομονωθεί ένας μεγάλος αριθμός φλαβονοειδών τα οποία είναι κυρίως γλυκοσίδες κεμπφερόλης, κερκετίνης, μαλβιδινης, κυανιδίνης, πετουλιδίνης, πελαργονίνης και πεονιδίνης. Επίσης από το φυτό έχουν απομονωθεί πολλά αμινοξέα και αρκετά αλκαλοειδή[131].

Τα είδος *Lathyrus laxiflorus* subsp.*laxiflorus* (Desf.) O. Kuntze δεν έχει τύχει προηγουμενης φυτοχημικής μελέτης.

6.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

6.3.1 *Vicia faba*

Η συλλογή του εδώδιμου φυτού *Vicia faba* πραγματοποιήθηκε στα μέσα Μαΐου από την περιοχή του χωριού Ζαρός της Κεντρικής Κρήτης (υψ. 350-450 μ). Μετά την συλλογή, διαλογή και ξήρανση του φυτικού οργανισμού, διαχωρίστηκαν τα σπέρματα από τα υπέργεια τμήματα του. Ακολούθησε η κονιοποίηση των φυτικών υλικών και προέκυψαν σκόνες βάρους 451 και 890 g, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, ακολούθησε διαδοχική εκχύλιση με CH_2Cl_2, MeOH και H_2O, ενώ τα βάρη των εκχυλισμάτων φαίνονται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα (Σχήμα 6.3.1). Η διαδικασία εκχύλισής περιγράφεται στο Κεφάλαιο 5.

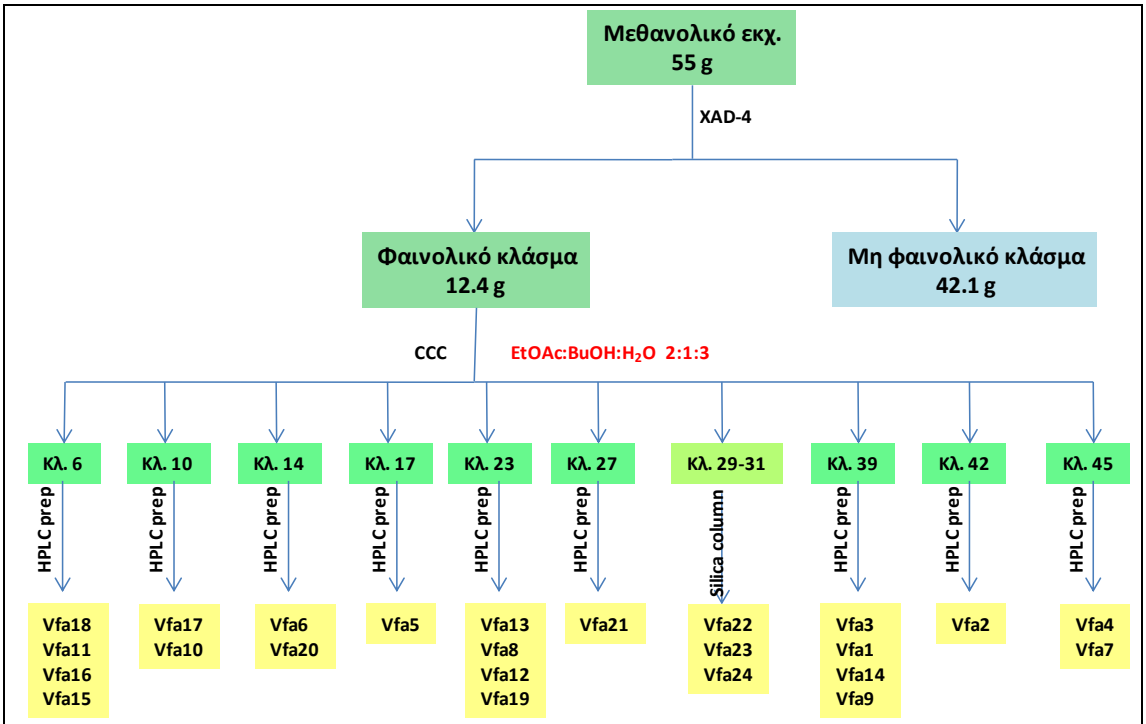


Σχήμα 6.3.1: Αρχική επεξεργασία του φυτού *Vicia faba*

Τα παραπάνω εκχυλίσματα ελέχθησαν τόσο ποιοτικά με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), όσο και ως προς την αντιοξειδωτική, αντιμεταλαξιογόνο και αντιμικροβιακή δράση τους. Όλα τα αποτελέσματα των ποιοτικών και βιολογικών μελετών παρουσιάζονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 5. Με βάση τις μελέτες αυτές αποφασίστηκε η περεταίρω μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού.

Μεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων

Η απομόνωση των κυριοτέρων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Vicia faba* πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια: α) διαχωρισμός του φαινολικού από το μη φαινολικό φορτίο με τη χρήση ρητινών προσρόφησης, β) κλασμάτωση του φαινολικού φορτίου με Υγρή Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC) και γ) απομόνωση των ουσιών από τα κλάσματα του CCC με Παρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC prep.) και Υγρή Χρωματογραφία Στήλης (LC) (Σχήμα 6.3.2).



Σχήμα 6.3.2: Διάγραμμα απεικόνισης της πορεία απομόνωσης των ουσιών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Vicia faba*

α) Διαχωρισμός του Φαινολικού από το Μη Φαινολικό Φορτίο

Ο χρωματογραφικός έλεγχος του μεθανολικού εκχυλίσματος έδειξε ότι αυτό περιέχει κυρίως σάκχαρα και ένα μεγάλο αριθμό φαινολικών παραγώγων μεταξύ των οποίων ξεχωρίζουν τα φλαβονοειδή. Προκειμένου να απομονώσουμε όσο το δυνατόν περισσότερες ουσίες σε ποσότητες που θα μας επιτρέψουν την περεταίρω ανάλυση τους, κρίναμε αναγκαίο να απομακρύνουμε αρχικά τα σάκχαρα από το υπό μελέτη εκχύλισμα.

Ένας γρήγορος και εύκολος τρόπος να διαχωρίσουμε τις φαινολικές ουσίες από τα σάκχαρα είναι η χρήση των Ρητινών Προσρόφησης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη XAD-4 και ως διαλύτες η μεθανόλη και το νερό. Αρχικά 55 γραμμάρια μεθανολικού εκχυλίσματος διαλύθηκαν σε 1 λίτρο νερό και αφέθηκαν να περάσουν με μικρή ροή από στήλη πληρωμένη με ενεργοποιημένη ρητίνη XAD-4. Στη ρητίνη προσροφήθηκαν οι φαινολικές ουσίες ενώ το υπόλοιπο (μη φαινολικό) φορτίο παρασύρεται με το νερό και συλλέγεται στην έξοδο της στήλης. Στη συνέχεια με την προσθήκη μεθανόλης παραλάβαμε το φαινολικό κλάσμα. Από τη διαδικασία αυτή προέκυψαν 12.4 g φαινολικού κλάσματος και 42.1 g μη φαινολικού κλάσματος. Ακολούθησε έλεγχος με TLC όπου διαπιστώθηκε ότι ο διαχωρισμός ήταν επιτυχής αφού το φαινολικό κλάσμα ήταν απαλλαγμένο από τα σάκχαρα που αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του μεθανολικού εκχυλίσματος.

β) Κλασμάτωση του Φαινολικού Φορτίου με CCC

Το φαινολικό κλάσμα που προήλθε από την παραπάνω διαδικασία κλασματώθηκε στη συνέχεια με Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC). Όπως προαναφέρθηκε (σελ. 35) το κρίσιμο στάδιο της τεχνικής αυτής αποτελεί η επιλογή του κατάλληλου διφασικού συστήματος. Η πληθώρα των συστατικών του υπό ανάλυση φαινολικού κλάσματος μας οδήγησε στην επιλογή του διφασικού συστήματος με κριτήριο κυρίως την καλή κλασμάτωση του μείγματος καθώς η απομόνωση των συστατικών του με μία χρωματογραφική διαδικασία κρίθηκε αδύνατη.

Επειδή ο χρωματογραφικός έλεγχος του φαινολικού κλάσματος έδειξε ότι η βασική κατηγορία φυσικών προϊόντων που περιέχονται σ' αυτό είναι τα φλαβονοειδή, αναζητήθηκαν βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την απομόνωση φλαβονοειδών από φυτικά εκχυλίσματα και έτσι επιλέχτηκαν εννέα προς έλεγχο διφασικά συστήματα που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.3.1).

Πίνακας 6.3.1 : Προτεινόμενα προς έλεγχο διφασικά συστήματα διαλυτών για το διαχωρισμό με CCC του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Vicia faba*.

ΣΥΣΤΗΜΑ	**ΔΙΑΛΥΤΕΣ**	**ΑΝΑΛΟΓΙΑ**
1	**EtOAc: n-BuOH: H_2O**	**2:1:3**
2	**n-BuOH: MeOH: H_2O**	**4:1:4**
3	**n-BuOH: H_2O**	**1:1**
4	**EtOAc: n-BuOH: H_2O**	**3:2:5**
5	**EtOAc: n-PrOH: H_2O**	**17.5:1:10**
6	**EtOAc: n-BuOH: EtOH: H_2O**	**10:1:2:10**
7	**n-BuOH: EtOH: H_2O**	**4:1:5**
8	**Aceton: n-BuOH: H_2O**	**3:8:12**
9	**CH_3COOH: n-BuOH: H_2O**	**1:4:5**

Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 ml, (σελ. 35) ακολούθησε ο έλεγχος σε τρία επίπεδα, από τα αποτελέσματα του οποίου επιλέχτηκε το κατάλληλο διφασικό συστήματα.

Στο πρώτο επίπεδο τα διφασικά συστήματα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να διαλύουν πλήρως το μείγμα και να διαχωρίζονται δύο φάσεις του σε μικρό χρονικό διάστημα (μικρότερο από 1 λεπτό). Από τον έλεγχο αυτό απορρίφτηκαν τα συστήματα: **2** (n-BuOH: MeOH: H_2O 4:1:4), **4** (EtOAc: n-BuOH: H_2O 3:2:5) και **7** (n-BuOH: EtOH: H_2O 4:1:5) λόγω δημιουργίας γαλακτώματος.

Τα υπόλοιπα έξι συστήματα εξετάστηκαν ως προς την κατανομή των ουσιών στις δυο φάσεις **με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)** (2^o επίπεδο) και **υγρή χρωματογραφία υψηλής πιέσεως (HPLC)** (3^o επίπεδο). Στην περίπτωση του πολύπλοκου μίγματος που μελετάμε η εύρεση των συντελεστών κατανομής είναι δύσκολη διότι κάθε κορυφή του χρωματογραφήματος αποτελείται από περισσότερες από μία ουσίες. Έτσι η επιλογή του διφασικού συστήματος βασίστηκε στην λεπτομερή εξέταση των χρωματογραφημάτων TLC και HPLC και όχι στον υπολογισμό των συντελεστών κατανομής. Με βάση τα αποτελέσματα του ελέγχου αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό το σύστημα **1**: (**EtOAc: n-BuOH: H_2O 2:1:3).**

Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υδροστατικού τύπου (CPC KROMATON) χρησιμοποιώντας παρασκευαστική στήλη των 1000 ml, αντλία LabAlliance, και αυτόματο συλλέκτη Buchi B-684. Αναλύθηκε δείγμα βάρους 12 g και προέκυψαν συνολικά 178 κλάσματα εκ των οποίων τα 111 πρώτα συλέχτηκαν με κινητή την οργανική φάση του διφασικού συστήματος, ενώ μετά την αναστροφή των φάσεων (κινητή η υδατική φάση) συλλέχτηκαν επιπλέον 67 κλάσματα. Η ροή των διαλυτών και η περιστροφή της στήλης διατηρήθηκαν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας στα 15 ml/min και 800 rpm αντίστοιχα (Πίνακας 6.3.2).

Η όλη διαδικασία διήρκεσε περίπου 6 ώρες και καταναλώθηκαν περίπου 5 Lt διαλυτών εκ των οποίων το 50% ήταν το νερό.

Πίνακας 6.3.2: Διαχωρισμός του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Vicia faba* με το σύστημα **EtOAc: n-BuOH: H_2O 2:1:3.**

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ	ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ	ΡΥΘΜΙΣΗ ΣΥΣΚΕΥΗΣ			ΟΓΚΟΣ κλάσματος(ml)
1-111	Κάτω φάση	Άνω φάση	Ascending	800 rpm	15ml/min	20 ml
112-178	Άνω φάση	Κάτω φάση	Descending	800 rpm	15ml/min	20 ml

Μετά τον έλεγχο των κλασμάτων με TLC πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις. Τα τελικά κλάσματα, καθώς επίσης και τα βάρη τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6.3.3: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *V. faba* με CCC με το σύστημα EtOAc: n-BuOH: H_2O 2:1:3.

ΚΛ.	ΒΑΡΟΣ (mg)	ΚΛ.	ΒΑΡΟΣ (mg)	ΚΛ.	ΒΑΡΟΣ (mg)	ΚΛ.	ΒΑΡΟΣ (mg)
1	10,9	13	123,0	25	80,1	37	290,6
2	104,7	14	73,8	26	72,0	38	393,0
3	2382,5	15	128,5	27	93,1	39	862,7
4	4330,4	16	86,8	28	41,0	40	362,4
5	385,5	17	81,0	29	116,8	41	274,6
6	201,4	18	85,6	30	242,4	42	358,2
7	118,6	19	122,3	31	379,5	43	124,6
8	106,2	20	131,1	32	181,5	44	317,3
9	133,1	21	88,1	33	162,3	45	241,9
10	234,8	22	65,5	34	126,1	46	518,1
11	110,0	23	88,3	35	219,0	47	80,7
12	130,6	24	63,3	36	319,7	48	

γ) Απομόνωση ουσιών από τα κλάσματα του CCC

Μετά τον χρωματογραφικό έλεγχο με TLC και HPLC των κλασμάτων που λάβαμε με την παραπάνω διαδικασία αποφασίστηκε η ανάλυση εννέα κλασμάτων με παρασκευαστική HPLC. Επίσης τρία κλάσματα εμφάνισαν την ίδια περίπου εικόνα στους χρωματογραφικούς ελέγχους οπότε αφού συνενώθηκαν αναλύθηκαν με χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης. Συνολικά από την ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Vicia faba* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 24 δευτερογενείς μεταβολίτες. Αναλυτικότερα οι ουσίες που απομονώθηκαν από το κάθε κλάσμα του CCC και η χρωματογραφική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.3.4).

Πίνακας 6.3.4: Ουσίες που απομονώθηκαν κατά τη επεξεργασία του φυτού *V. faba.*

Κλάσμα		Απομονωμένες ουσίες
Κλ. 6	**Prep. HPLC**	**3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη** (Vfa 18) **3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-β-D-γλυκοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη** (Vfa 11) **3-O-(6''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη** (Vfa 16) **3-O-(6''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 15)
Κλ. 10	**Prep. HPLC**	**3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-β-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 17) **3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-β-D-γλυκοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 10)
Κλ. 14	**Prep. HPLC**	**(6*S*, 9*R*)-Ροσεοσίδης** (Vfa 20) **3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο- *α*-L -αραβινοπυρανοσυλο)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη** (Vfa 6)
Κλ. 17	**Prep. HPLC**	**3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλο)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 5)
Κλ. 23	**Prep. HPLC**	**3-O -*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη** (Vfa 13) **3-O -*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη** (Vfa 8) **3-O -*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 12) **3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-6''-*O*-ακετυλ-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 19)
Κλ. 27	**Prep. HPLC**	**Βυζαντιοσίδης Β** (Vfa 21)
Κλ. 29-31	**LC**	**μεντικαρπίνη** (Vfa 22) **4-μεθοξυ-2',4'-διυδροξυχαλκόνη** (Vfa 23) **7,4'-διϋδροξυ φλαβόνη** (Vfa 24)

Κλ. 39	**Prep. HPLC**	**3-O- *α*-L -αραβινοπυρανοσυλο-7-O-α-L- ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 3) **3,7-δι- α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 1) **3-O-(6''-O-ακετυλ-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 14) **3-O-(6''-O-ακετυλ-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλ)-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 9)
Κλ. 42	**Prep. HPLC**	3**,7-δι-O- *α*-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη** (Vfa 2)
Κλ. 45	**Prep. HPLC**	**3-O-*α*-L -αραβινοπυρανοσυλ-7-O-*α*-L- ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη** (Vfa 4) **3-O -*β*-D-γλυκοπυρανοσυλ-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 7)

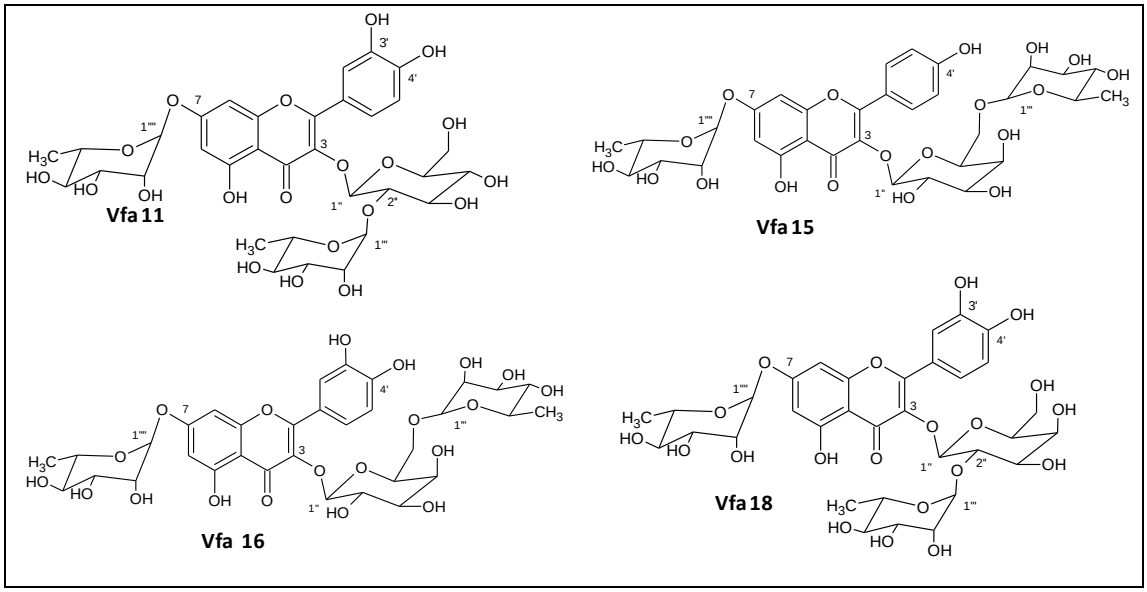
Για την πραγματοποίηση των διαχωρισμών με παρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Thermo Finnigan HPLC (αντλία: SpectraSystem P4000, απαεροτή: SpectraSystem 1000, ανιχνευτή UV-DAD: SpectraSystem AS3000) και η ημιπαρασκευαστική στήλη αντιστρόφου φάσεως τύπου Lichrosorb, RP 18. Το σύστημα έκλουσης, το οποίο επιλέχθηκε μετά από διάφορες δοκιμές, φαίνεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα. Η συλλογή των κλασμάτων έγινε με παρακολούθηση των χρωματογραφημάτων σε μήκη κύματος 240, 280 και 365 nm.

Πίνακας 6.3.5: Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των κλασμάτων του CCC με παρασκευαστική HPLC.

ΧΡΟΝΟΣ (min)	ΔΙΑΛΥΤΕΣ H_2O (%)	AcN (%)
0	96	4
30	88	12
45	80	20
75	50	50
Ροή: 3 ml/min		

Από την ανάλυση των κλασμάτων, που προέκυψαν από την χρωματογραφία CCC, με παρασκευαστική HPLC απομονώθηκαν συνολικά 22 δευτερογενείς μεταβολίτες εκ των οποίων 19 γλυκοσίδες φλαβονολών (παράγωγα κερκετινης και καιμπφερόλης) και δύο γλυκοσίδες ιονονών. Η απόδοση της δομής έγινε με τη βοήθεια φασμάτων UV, NMR και HRMS, ενώ όπου κρίθηκε αναγκαίο προχωρήσαμε και σε ακετυλίωση των μορίων.

Αναλυτικότερα το κλάσμα 6 στο χρωματογράφημα HPLC εμφάνισε 4 κορυφές, ενώ οι αντίστοιχες ουσίες διαχωρίστηκαν με τη χρήση παρασκευαστικής HPLC. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε (UV, NMR και MS) έδειξε ότι πρόκειται για τέσσερεις τριγλυκοσίδες φλαβονολών και συγκεκριμένα για τις ουσίες: **3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη** (Vfa 11), **3-O-(6''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη** (Ρομπινίνη) (Vfa 15), **3-O-(6''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη** (Vfa 16) και **3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη** (Vfa 18).



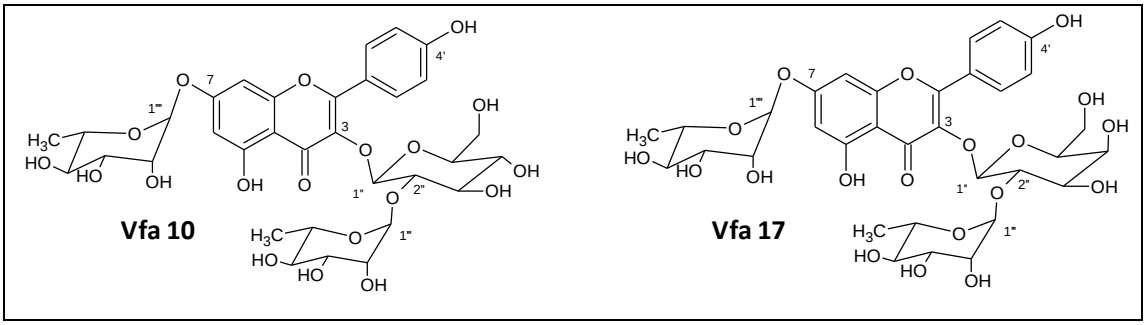
Ο μεταβολίτης **Vfa 11** έχει απομονωθεί στο παρελθόν από τα νωπά φύλλα του φυτού *Sedum telephium ssp. maximum* (Crassulaceae)[145] καθώς και από τους βλαστούς και τα φύλλα του *Delphinium hydridum* cv. (Ranunculaceae)[146], ενώ **συναντάται πρώτη φορά σε φυτά της οικογένειας Fabaceae**. Δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις της ουσίας.

Η Ρομπινίνη (**Vfa 15**) απομονώθηκε αρχικά από τους Zwenger και Dronke το 1861 ως ο κύριος μεταβολίτης των φύλων του φυτού *Robinia pseudoacacia*[147] ενώ η δομή της αποδόθηκε πολύ αργότερα από τους Zemplen και Bognar (1941)[148] και επιβεβαιώθηκε από τον Simokoriama M (1949)[149]. Στη συνέχεια απομονώθηκε και από άλλα φυτά ενώ η σύνθεση της πραγματοποιήθηκε από τον Farkas L. και τους

συνεργάτες του το 1975[150]. Τόσο ο μεταβολίτης αυτός όσο και ο **Vfa 16** έχουν αναφερθεί ξανά στο υπό μελέτη φυτό. Η Ρομπινίνη (**Vfa 15**) είναι το κύριο ενεργό συστατικό του σκευάσματος 'Flaronin' το οποίο διαθέτει υποτασική, αντιφλεγμονώδη και διουρητική δράση καθώς επίσης μειώνει τα επίπεδα αζώτου και κρεατινίνης στο αίμα. Χρησιμοποιείται στη Ρωσία και τη Γεωργία στη θεραπεία νεφρικών παθήσεων που συνοδεύονται από αζωταιμία[151,152,153]. Ο μεταβολίτης **Vfa 16,** σε πειράματα αντιοξειδωτική δράση, εμφάνισε σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών[154,155,156].

Ο μεταβολίτης **Vfa 18** έχει απομονωθεί πρόσφατα (2007) από τα φύλλα του φυτού *Litchi chinensis* Sonn. (Sapindaceae)[157] ενώ **απαντάται πρώτη φορά σε φυτά της οικογένειας Fabaceae.** Δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις της ουσίας.

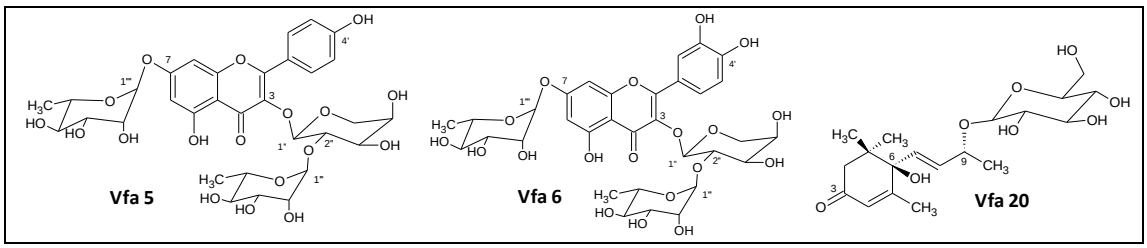
Το κλάσμα 10 περιείχε κυρίως δύο ουσίες οι οποίες και απομονώθηκαν με Παρασκευαστική HPLC . Η μελέτη των φασμάτων NMR και MS των ουσιών αυτών απεκάλυψε πως πρόκειται για δύο τριγλυκοσίδες καιμπφερόλης και συγκεκριμένα για τις ουσίες: **3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 10) και **3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 17).



Ο μεταβολίτης **Vfa 10** έχει απομονωθεί τόσο από τα νωπά φύλλα του φυτού *Sedum telephium ssp. Maximum* (Crassulaceae)[145], όσο και από τους βλαστούς και τα φύλλα του *Delphinium hydridum* cv. (Ranunculaceae)[146]. Η παρουσία του **σε φυτά της οικογένειας Fabaceae αναφέρεται πρώτη φορά**. Όσον αφορά τη βιολογική δράση, πειράματα που έγιναν σε ποντίκια, έδειξαν ότι η ουσία αυτή διαθέτει αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση[158,159]. Ο δε μεταβολίτης **Vfa 17** έχει

απομονωθεί ξανά σε προηγούμενη φυτοχημική μελέτη των φύλων του φυτού *Vicia faba*[160], ενώ δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις της ουσίας.

Από την επεξεργασία του κλάσματος 14 με παρασκευαστική HPLC παραλάβαμε σε καθαρή μορφή ένα γλυκοσίδη ιονόνης καθώς και έναν τριγλυκοσιδή της κερκετίνης. Πρόκειται για τις ουσίες: **3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη** (Vfa 6) και **(6*S*,9*R*)-Ροσεοσίδη** (Vfa 20). Επίσης από το κλάσμα 17 καταφέραμε να απομονώσουμε σε καθαρή μορφή ακόμη έναν τριγλυκοσίδη της καιμπφερόλης που, μετά από ανάλυση με φασματοσκοπία NMR και MS ταυτοποιήθηκε ως ο μεταβολίτης **3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 5).

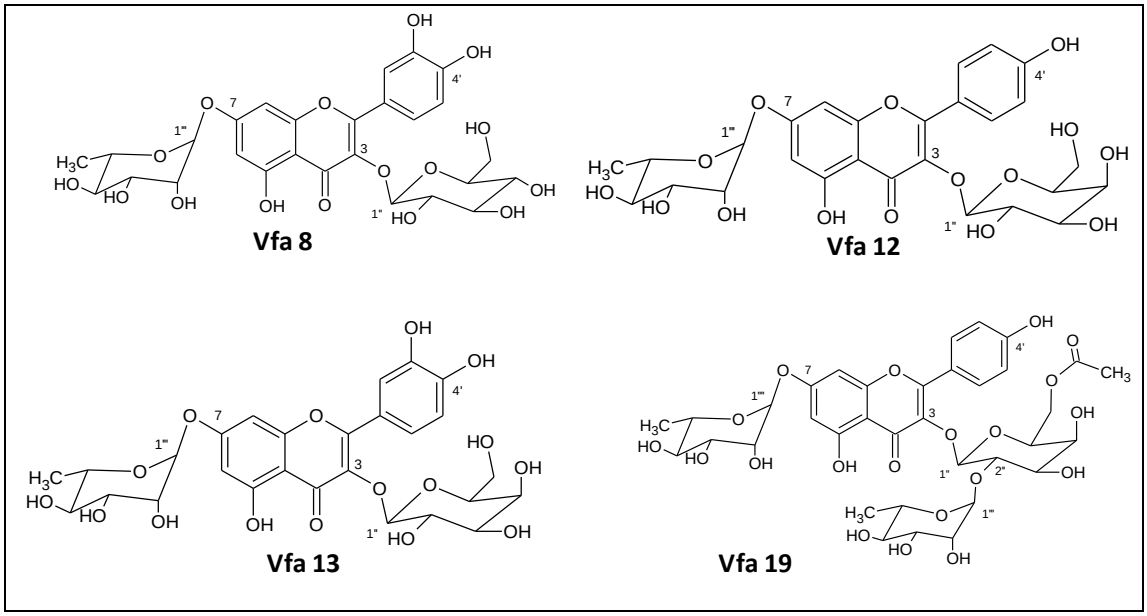


Οι μεταβολίτες **Vfa 5** και **Vfa 6** απομονώνονται δεύτερη φορά από φυτικούς οργανισμούς. Η πρώτη τους αναφορά έγινε πρόσφατα κατά την φυτοχημική μελέτη του *Anthyllis hermanniae* L. (Fabaceae) που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μας[161], ενώ δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις των ουσιών αυτών.

Ο Ροσεοσίδης απομονώθηκε αρχικά από τα υπέργεια τμήματα του *Vinca rosea* (Apocynaceae)[162], ενώ έχει βρεθεί και στους καρπούς του *Astragulus complanatus* (Fabaceae)[163], στα φύλα του *Alangiurn premnifolium* (Alangiaceae)[164] καθώς και στο *Derris trifoliata* Lour. (Fabaceae)[165]. Σε δοκιμές που έγιναν σε ποντίκια ο μεταβολίτης βρέθηκε να αναστέλλει την παραγωγή ισταμίνης κατά τη διάρκεια αλλεργικών αντιδράσεων[166,167].

Το κλάσμα 23 στο χρωματογράφημα HPLC εμφάνισε 5 κορυφές οι οποίες και απομονώθηκαν με παρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης. Η φασματοσκοπική μελέτη των φασμάτων NMR και MS που ακολούθησε έδειξε ότι πρόκειται για τις ουσίες: **3-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο**

κερκετίνη (Ισοκερκιτρίνη) (Vfa 8), **3-O-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη** (Vfa 12), **3-O -β-D-γαλακτοπυρανοσυλ-7-O-α-L-ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη** (Vfa 13) και **3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-6''-O-ακετυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη** (Vfa 19).

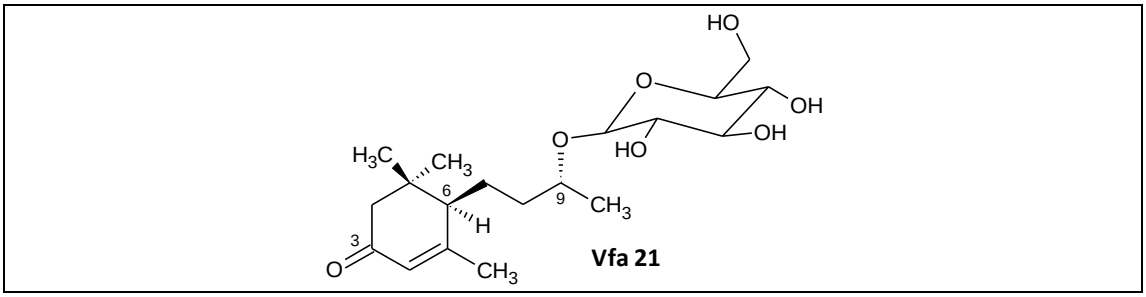


Οι μεταβολίτες **Vfa 8**, **Vfa 12** και **Vfa 13** απαντώνται συχνά στους φυτικούς οργανισμούς τόσο της οικ. Fabaceae όσο και άλλων οικογενειών. Σε μια μελέτη των Stanislaw Burda και Wieslaw Oleszek ο μεταβολίτης **Vfa 8** εμφάνισε ασθενή αντιοξειδωτική και αντιβακτηριδιακή δράση[168], ενώ σε άλλη μελέτη, η ουσία βρέθηκε να είναι νευροδραστική μειώνοντας την κινητική δραστηριότητα στα ποντίκια[169]. Όσον αφορά τον μεταβολίτη **Vfa 12** υπάρχει μία μόνο αναφορά βιολογικής δράσης, στην οποία εμφανίζεται να διαθέτει αντιφλεγμονώδη δράση[170]. Για τον δε μεταβολίτη **Vfa 13** δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις.

Τέλος ο μεταβολίτης **Vfa 19** είναι αρκετά σπάνιος με μόλις μια αναφορά η οποία αναφέρεται σε προηγούμενη απομόνωση του από το υπό μελέτη φυτό *Vicia faba*[160], ενώ δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις της ουσίας.

Το χρωματογράφημα HPLC του κλάσματος 27 φανέρωσε την ύπαρξη μιας κύριας ουσίας η οποία παραλήφθηκε σε καθαρή μορφή με τη χρήση παρασκευαστικής

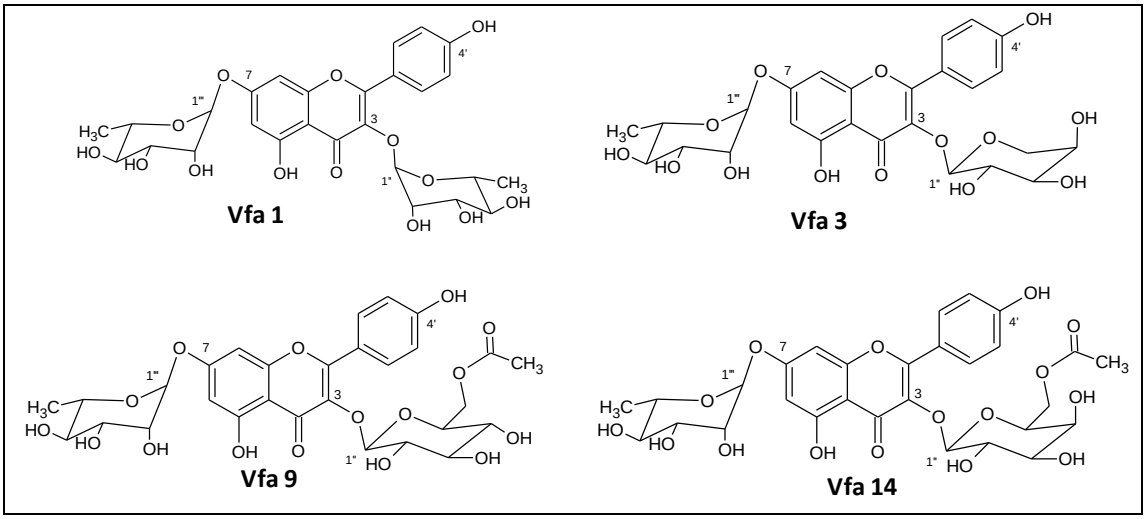
HPLC. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε έδειξε ότι πρόκειται για ένα γλυκοσίδη ιονόνης και συγκεκριμένα για την ουσία: **Βυζαντιονοσίδης Β** (Vfa 21).



Vfa 21

Η ουσία αυτή απομονώθηκε άλλη μία φορά από την πόα του φυτού *Stachys byzantina* της οικογένειας Lamiaceae[171] ενώ **αναφέρεται πρώτη φορά στη οικογένεια Fabaceae.**

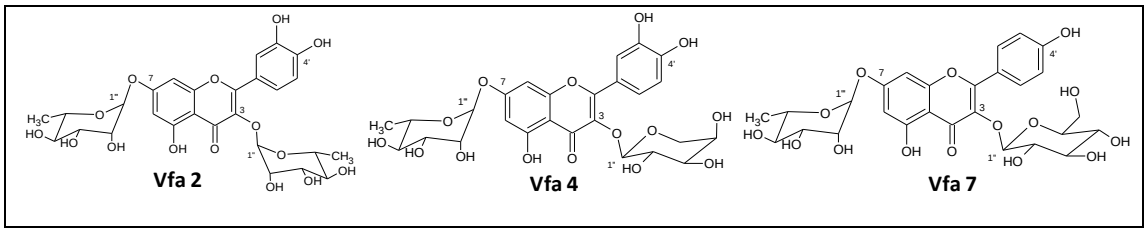
Το κλάσμα 39 εμφάνισε 4 κορυφές στο χρωματογράφημα HPLC, ενώ οι αντίστοιχες ουσίες διαχωρίστηκαν με τη χρήση παρασκευαστικής HPLC. Η φασματοσκοπική ανάλυση που ακολούθησε αποκάλυψε πως πρόκειται για τέσσερις διγλυκοσίδες της καιμπφερόλης και συγκεκριμένα για τις ουσίες: **3,7-δι-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Κεμφεριτρίνη) (Vfa 1), **3-O-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλο-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη** (Vfa 3), **3-O-(6''-O-ακετυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 9) και **3-O-(6''-O-ακετυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη** (Vfa 14).



Οι μεταβολίτες **Vfa1**, **Vfa9** και **Vfa14** έχουν αναφερθεί ξανά στο υπό μελέτη φυτό[160]. Το προϊόν **Vfa3** απομονώθηκε αρχικά από τα φύλα του *Cinnamomum*

sieboldii (Lauraceae)[172] ενώ έχει βρεθεί και στα φύλα του *Indigofera hebepetala* της οικογένειας Fabaceae[173]. Η ουσία **Vfa1** διαθέτει καλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες[174] ενώ εμφάνισε και αντιμικροβιακή-αντιμυκητιασική δράση[175]. Σε πειράματα που έγιναν σε ποντίκια η ουσία αυτή εμφάνισε αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση[158,159]. Καλή αντιοξειδωτική δράση διαθέτει και ο μεταβολίτης **Vfa3** όπως έδειξαν οι δοκιμές DPPH και Λιποξυγενάσης που πραγματοποιήθηκαν από τον *Pisteli L.* και συνεργάτες[174]. Όσον αφορά τις ουσίες **Vfa9** και **Vfa14,** δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις.

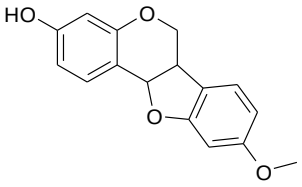
Από την επεξεργασία του κλάσματος 42 παραλάβαμε σε καθαρή μορφή έναν διγλυκοσίδη της κερκετίνης τον **3,7-δι-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη** (Vfa 2) ενώ από το κλάσμα 45 δύο ακόμη μεταβολίτες οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν ως: **3-O-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλο-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη** (Vfa 4) και **3-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 7).



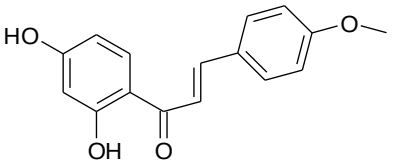
Το προϊόν Vfa4 αναφέρεται πρώτη φορά σε φυτά της οικογένειας Fabaceae ενώ έχει απομονωθεί πρόσφατα από το φυτό *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae)[176]. Οι δε μεταβολίτες **Vfa2** και **Vfa7** απαντώνται συχνά τόσο σε φυτά της οικ. Fabaceae όσο και άλλων οικογενειών. Η ουσία **Vfa2** διαθέτει καλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες[174], ενώ εμφάνισε και αντιμικροβιακή-αντιμυκητιασική δράση[175]. Επίσης σε πειράματα που έγιναν σε ποντίκια η ουσία αυτή εμφάνισε αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση[158,159]. Όσον αφορά την ουσία **Vfa7,** βιολογικά πειράματα που έγιναν σε ποντίκια, έδειξαν ότι διαθέτει αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση[158,159]. Επιπλέον, σε άλλα πειράματα, εμφανίστηκε νευροδραστική, μειώνοντας την κινητική δραστηριότητα των ποντικών[169]. Για τον δε μεταβολίτη **Vfa4** δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις.

Τέλος η ανάλυση των κλασμάτων 29, 30 και 31 έγινε με χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση. Ως πληρωτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε η γέλη πυριτίου (Silica gel

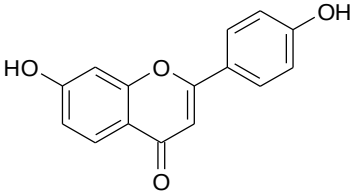
τύπου Flash) ενώ την κινητή φάση αποτελούσαν μίγματα διχλωρομεθανίου και μεθανόλης αυξανόμενης πολικότητας. Από την διαδικασία αυτή παραλάβαμε σε καθαρή μορφή τρία άγλυκα φλαβονοειδών. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε έδειξε ότι πρόκειται για τις ουσίες: **μεντικαρπίνη** (Vfa 22), **2,4-διυδρόξυ-4'-μεθοξυχαλκόνη (4΄μεθυλαιθέρας της Ισολικουιριτιγενίνης)** (Vfa 23) και **7,4'-διϋδροξυφλαβόνη** (Vfa 24).



Vfa 23



Vfa 24



Vfa 25

Η **Μεντικαρπίνη** ανήκει στην κατηγορία των πτεροκαρπανών και απομονώθηκε αρχικά από το φυτό *Medicaco truncatula* (Fabaceae). Βιοσυνθετικά προέρχεται από την βεστιτόνη με μια βιοσυνθετική πορεία δύο σταδίων η οποία καταλύεται από ένα απλό ένζυμο την συνθετάση των πτεροκαρπανών. Η Μεντικαρπίνη είναι φυτοαλεξίνη την οποία παράγει το φυτό ως απάντηση στην προσβολή του από παθογόνους μικροοργανισμούς[177]. Σε βιολογικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε HL-60 λευχαιμικά κύτταρα ανθρώπου η ουσία αυτή εμφανίστηκε να επάγει την απόπτωση των κυττάρων, εκδηλώνοντας έτσι σημαντική κυτταροτοξική δράση[178,179]. Επίσης παρουσίασε και αντιμιτοτική δράση σε πειράματα που έγιναν σε αυγά αχινού[180]. Σε μία μελέτη του Fujiwara Y. και συνεργατών, η μεντικαρπίνη εμφάνισε σημαντική ανασταλτική δράση έναντι του M2 φαινοτύπου των μακροφάγων τα οποία ενοχοποιούνται για την προώθηση του πολλαπλασιασμού μερικών τύπων καρκινικών κυττάρων[181]. Επίσης αναστέλλει την γένεση των οστεοκλαστών και επιφέρει στα οστά τα ίδια αποτελέσματα με αυτά που προκαλούνται από την έλλειψη ορμονών[182].

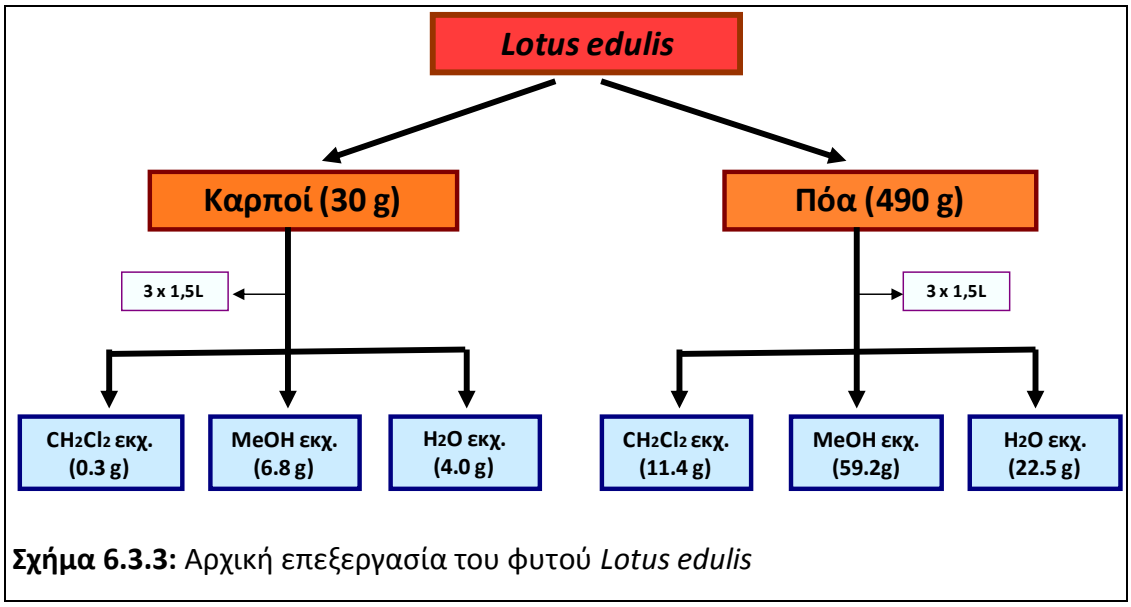
Η **4΄-μεθόξυ-Ισολικουιριτιγενίνη** ανήκει επίσης στην κατηγορία των φυτοαλεξινών και έχει βρεθεί σε πολλά φυτά κυρίως μετά την προσβολή τους από παθογόνους μικροοργανισμούς. Διαθέτει αντιφλεγμονώδη δράση αναστέλλοντας την παραγωγή προ-φλεγμονωδών παραγόντων όπως PGE2, NO και TNF-α[183,184]. Σε πειράματα

κυταροτοξικότητας, εμφάνισε δράση έναντι διαφόρων καρκινικών σειρών όπως του καρκινώματος Hep2 του λάρυγγα, του καρκινώματος H292 του πνεύμονα[185] και σε ηπατικά καρκινικά κύτταρα[186]. Επίσης είναι δραστική σε ιογενείς παθήσεις[187] καθώς και έναντι παρασίτων *Leishmania*[188].

Η **7,4'-διϋδρόξυ φλαβόνη** απομονώθηκε ως φυσικό προϊόν το 1964 από τα φυτά *Medicaco sativa* (Fabaceae) και *Trifolium repens* (Fabaceae) και έκτοτε έχει αναφερθεί σε πολλούς φυτικούς οργανισμούς[189]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ουσία αυτή είναι γνωστή από το 1899 ως προϊόν σύνθεσης[190]. Πειράματα βιολογικών μελετών έδειξαν ότι η ουσία αυτή αναστέλλει τη δράση του ενζύμου 17β-HSD τύπου Ι το οποίο μετατρέπει την ιστρόνη σε ιστραδιόλη και αποτελεί σημαντικό ένζυμο-στόχο για την καταπολέμηση οιστρογονοεξαρτόμενων ασθενειών όπως μερικοί τύποι καρκίνου του μαστού[191]. Επίσης αποτελεί σημαντικό αναστολέα της αρωματάσης, ενός ενζύμου το οποίο συμμετέχει στην βιοσύνθεση των οιστρογόνων και το οποίο επίσης αποτελεί ένζυμο-στόχο στη θεραπεία ορμονοεξαρτόμενων ασθενειών[192]. Η **7,4'-διϋδρόξυ φλαβόνη** αναστέλλει επίσης την έκκριση της ηωταξίνης-1 από τους ινοβλάστες του πνεύμονα. Η ουσία αυτή προκαλεί συσσώρευση ιοσινόφιλων στους αεραγωγούς προκαλώντας φλεγμονές οι οποίες αποτελούν σημαντικό χαρακτηριστικό του αλλεργικού άσθματος[193].

6.3.2 Lotus edulis

Η συλλογή του εδώδιμου φυτού ***Lotus edulis*** πραγματοποιήθηκε στο τέλος Απριλίου από την περιοχή του χωριού Ζαρός της Κεντρική Κρήτης (υψ. 350-450 μ). Μετά την διαλογή και ξήρανση του φυτικού οργανισμού, διαχωρίστηκαν οι καρποί από τα υπέργεια τμήματά του. Ακολούθησε η κονιοποίηση χωριστά των σπερμάτων και των υπέργειων τμημάτων του φυτού και προέκυψαν σκόνες βάρους 30 και 490 g, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, ακολούθησε εκχύλιση του φυτικού υλικού με CH_2Cl_2, MeOH και H_2O. Η διαδικασία εκχύλισής και τα βάρη των αντίστοιχων εκχυλισμάτων παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 5.

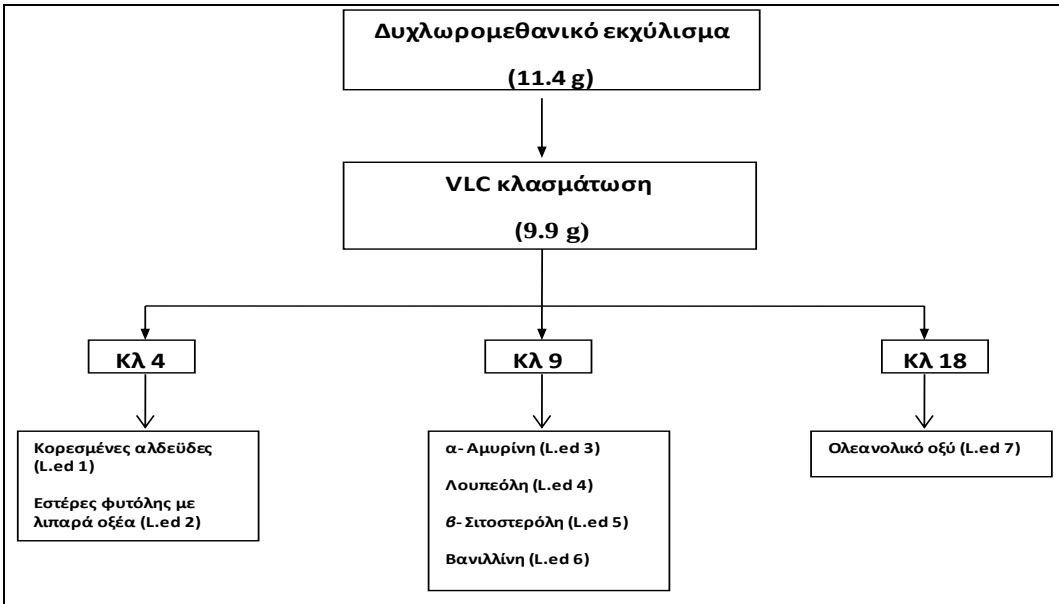


Σχήμα 6.3.3: Αρχική επεξεργασία του φυτού *Lotus edulis*

Τα παραπάνω εκχυλίσματα ελέχθησαν τόσο ποιοτικά με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), όσο και για πιθανή βιολογική δράση. Οι βιολογικές δοκιμές αφορούσαν αντιοξειδωτική, αντιμεταλαξιογόνο και αντιμικροβιακή δράση. Όλα τα αποτελέσματα των ποιοτικών και βιολογικών μελετών παρουσιάζονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 5. Με βάση τις μελέτες αυτές και λαμβάνοντας υπόψη και την απουσία σχετικών φυτοχημικών μελετών, αποφασίσαμε να αναλύσουμε περαιτέρω το **διχλωρομεθανικό** και το **μεθανολικό** εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων.

Διχλωρομεθανικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων

Συνοπτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης του διχλωρομεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού ***Lotus edulis*** παρουσιάζονται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα (Σχήμα 6.3.4).



Σχήμα 6.3.4: Συνοπτική πορεία απομόνωσης των ουσιών του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lotus edulis*

Αρχικά το διχλωμεθανικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων υποβλήθηκε σε κλασμάτωση με χρωματογραφία ανοικτής στήλης υπό κενό (Στήλη 1). Ως πληρωτικό υλικό της στήλης χρησιμοποιήθηκε η γέλη πυριτίου (Silica gel 60H) ενώ ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν μίγματα κυκλοεξανίου, διχλωρομεθανίου και μεθανόλης σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας. Αναλύθηκε δείγμα βάρους 9,9 g και συλλέξαμε αρχικά 316 κλάσματα των 100 ml τα οποία συνενώθηκαν και προέκυψαν 28 κλάσματα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.3.6.

Στη συνέχεια τα κλάσματα αυτά ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (πλάκες αλουμινίου κανονικής φάσεως). Για την ανάπτυξη των χρωματογραφικών πλακών χρησιμοποιήθηκαν μίγματα διαλυτών c-Hexane και CH_2Cl_2 σε διάφορες αναλογίες . Από την εικόνα των χρωματογραφημάτων αποφασίσθηκε η περαιτέρω ενασχόληση με τα κλάσματα **4, 9** και **18.**

Πίνακας 6.3.6 : Συστήματα διαλυτών, τα κλάσματα και τα βάρη τους κατά την αρχική επεξεργασία (Στήλη 1) του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος του L. edulis με VLC.

ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ	ΚΛΑΣΜΑ	ΒΑΡΟΣ (mg)
c-Hexane	1	87.7
c-Hexane	2	49.9
c-Hexane	3	212.5
c-Hexane/CH_2Cl_2 : 90/10	4	571.1
c-Hexane/CH_2Cl_2 : 90/10	5	137.4
c-Hexane/CH_2Cl_2 : 90/10	6	1055.4
c-Hexane/CH_2Cl_2 : 90/10	7	57.1
c-Hexane/CH_2Cl_2 : 80/20	8	259.1
c-Hexane/CH_2Cl_2 : 80/20	9	389.9
c-Hexane/CH_2Cl_2 : 70/30	10	336.5
c-Hexane/CH_2Cl_2 : 60/40	11	425.0
c-Hexane/CH_2Cl_2 : 50/50	12	365.8
c-Hexane/CH_2Cl_2 : 30/70	13	422.3
CH_2Cl_2	14	45,2
CH_2Cl_2/MeOH: 99.5/0.5	15	40.4
CH_2Cl_2/MeOH: 99.5/0.5	16	126.6
CH_2Cl_2/MeOH: 99.5/0.5	17	1230.7
CH_2Cl_2/MeOH: 99/1	18	256.0
CH_2Cl_2/MeOH: 99/1	19	263.8
CH_2Cl_2/MeOH: 99/1	20	144.4
CH_2Cl_2/MeOH: 98/2	21	68.1
CH_2Cl_2/MeOH: 98/2	22	287.6
CH_2Cl_2/MeOH: 98/2	23	155.2
CH_2Cl_2/MeOH: 97/3	24	198.4
CH_2Cl_2/MeOH: 95/5	25	717.5
CH_2Cl_2/MeOH: 90/10	26	670.8
CH_2Cl_2/MeOH: 80/20	27	74.1
CH_2Cl_2/MeOH: 50/50	28	94.2

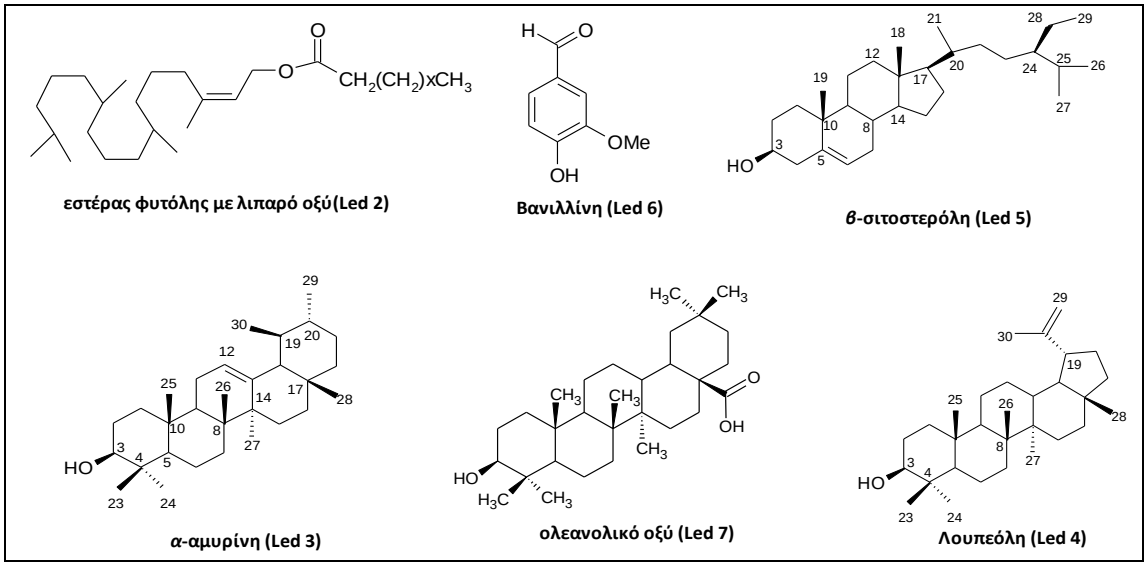
Αναλυτικότερα, κατά τον χρωματογραφικό έλεγχο με TLC φάνηκε ότι το κλάσμα 4 περιείχε συστατικά τα οποία δεν παρουσίαζαν απορρόφηση στο UV (254 και 366 nm), ενώ χρωματίζονταν έντονα (μωβ) μετά από την εμφάνιση με το μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλλίνης. Στο κλάσμα αυτό πραγματοποιήθηκε

χρωματογραφικός διαχωρισμός με υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση. Ως πληρωτικό υλικό της στήλης χρησιμοποιήθηκε η γέλη πυριτίου (Silica gel τύπου flash) ενώ τους διαλύτες έκλουσης αποτελούσαν μίγματα κυκλοεξανίου, διχλωρομεθανίου και μεθανόλης σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας. Το αποτέλεσμα της παραπάνω χρωματογραφικής διεργασίας ήταν η παραλαβή δύο αξιόλογων κλασμάτων. Μετά από μελέτη με φασματοσκοπία NMR και MS συμπεράναμε ότι πρόκειται για ένα μίγμα **κορεσμένων αλδεϋδών** (L.ed 1) με κύριο συστατικό την **n-οκταδεκανάλη** καθώς και ένα μίγμα **εστέρων της φυτόλης με λιπαρά οξέα** (L.ed 2) με κύριο συστατικό τον **εικοσανοϊκό εστέρα της**.

Στη συνέχεια μελετήθηκε το κλάσμα 9 στο οποίο συμπεράναμε με τη βοήθεια του ποιοτικού ελέγχου με TLC ότι περιέχονται κυρίως τερπενικά παράγωγα. Και εδώ πραγματοποιήθηκε χρωματογραφικός διαχωρισμός με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας στήλης υπό χαμηλή πίεση. Ως πληρωτικό υλικό της στήλης χρησιμοποιήθηκε η γέλη πυριτίου (Silica gel τύπου flash) ενώ ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν μίγματα κυκλοεξανίου, διχλωρομεθανίου και μεθανόλης σε αναλογίες αυξανόμενης πολικότητας. Από την παραπάνω ανάλυση του κλάσματος 9 παραλάβαμε σε καθαρή μορφή τέσσερεις ουσίες οι οποίες μετά από μελέτη με φασματοσκοπία NMR και MS και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα συμπεράναμε ότι πρόκειται για τα τριτερπένια ***α*-αμυρινη,** (L.ed 3) και **λουπεόλη** (L.ed 4), ενώ επίσης εντοπίστηκαν η ***β*-σιτοστερόλη** (L.ed 5) και η **βανιλλίνη**(L.ed 6).

Η εξέταση του κλάσματος 18 με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) έδειξε ότι σε αυτό υπάρχει κυρίως ένα συστατικό μαζί με χλωροφύλλες. Στη συνέχεια αποφασίστηκε η επεξεργασία του κλάσματος με ζωικό άνθρακα με σκοπό την κατακράτηση των χλωροφυλλών και την παραλαβή του φυσικού συστατικού σε καθαρή μορφή. Έτσι το κλάσμα 18 με τη μορφή διαλύματος σε διχλωρομεθάνιο διαβιβάστηκε από στήλη πληρωμένη με ζωικό άνθρακα. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες CH_2Cl_2 και MeOH σε αναλογία 50/50. Στο κλάσμα που συλλέχτηκε, μετά από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC, διαπιστώθηκε ότι περιείχε κυρίως μια ουσία. Η ουσία αυτή μελετήθηκε φασματοσκοπικά (NMR και

MS) και μετά από σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα διαπιστώσαμε ότι πρόκειται για ένα τριτερπένιο, το **<u>ολεανολικό οξύ</u>** (L.ed 7).



Ο **εικοσανοϊκός εστέρας της φυτόλης** (L.ed 2) εντοπίστηκε αρχικά στο λιπαρό κλάσμα των ανθέων του φυτού *Vicia faba* (Fabaceae)[194], ενώ στη συνέχεια βρέθηκε και σε δύο φυτά του Αμαζονίου, το *Simaruba amara* (Simarubaceae) και το *Bertholettia excelsa* (Lecythidaceae)[195]. Δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις της ουσίας.

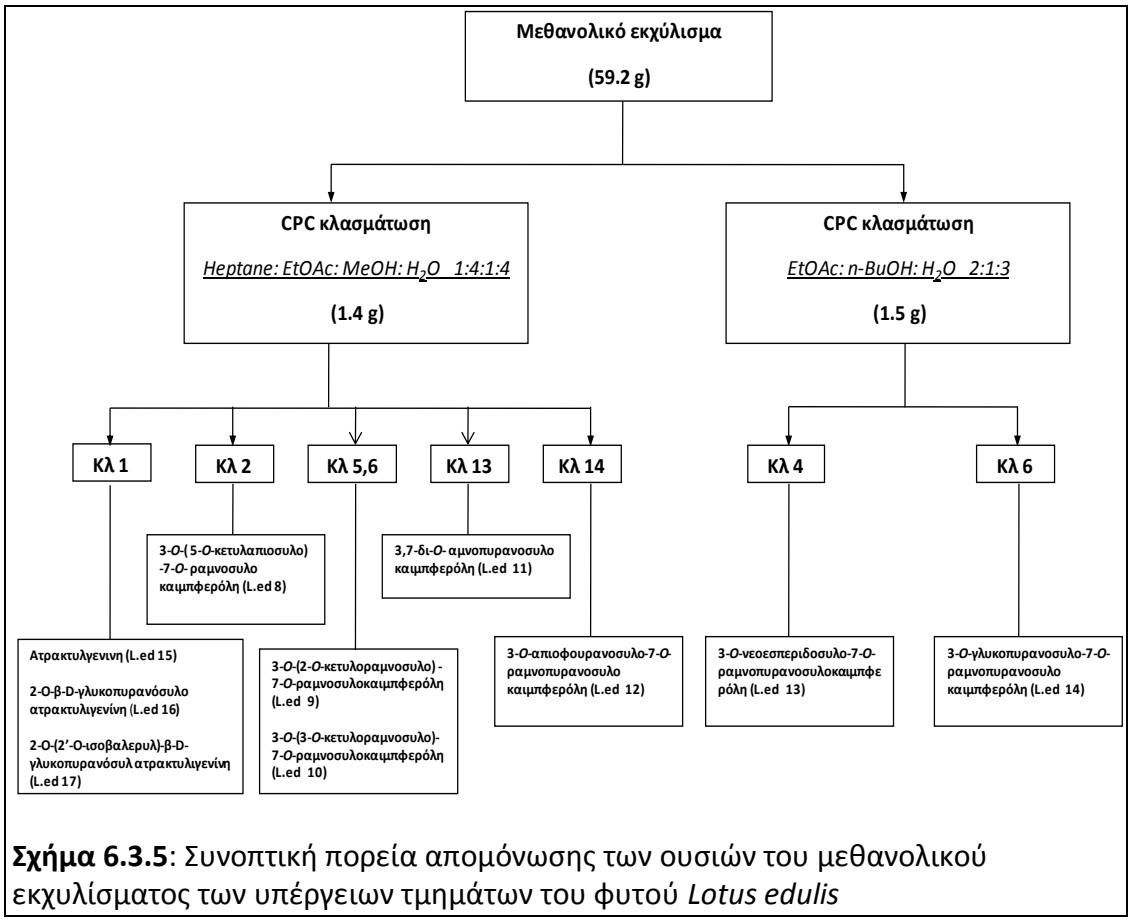
Τα τριτερπένια ***α*-αμυρίνη, λουπεόλη**, **ολεανολικό οξύ** είναι μεταβολίτες οι οποίοι απαντώνται πολύ συχνά στους φυτικούς οργανισμούς. Όσον αφορά τις βιολογικές δράσεις η ***α*-αμυρίνη** διαθέτει αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη, υποτασική δράση, αναστέλλει τη δράση διάφορων ένζυμων όπως της λιποξυγενάση Ι και της HIV-1 πρωτεάση, ενώ επάγει και τη βιοσύνθεση μελανίνης[196,197,198,199,200,201]. Η **λουπεόλη** έχει αντιβακτηριακή, ανιμυκητιασική, αντιική και αντιφλεγμονώδη δράση καθώς επίσης αντιοξειδωτική και υπατοπροστατευτική δράση.[202,203,204,205,206,207]. Τέλος το **ολεανολικό οξύ**, διαθέτει αντιβακτηρική, αντιφλεγμονώδη και αντιπαρασιτική δράση.[208,209,210]

Η ***β*-σιτοστερόλη** είναι βασικό συστατικό των μεμβρανών των φυτικών κυττάρων. Έχει αντιυπερλιποπρωτεϊνική δράση, ενώ διαθέτει επίσης αντιμυκιτιασική, αντιπηκτική, αντιοξειδωτική, ηπατοπροστατευτική και κυτταροτοξική δράση[211]. Τέλος η **βανιλλίνη** διαθέτει αντιμυκητιασική δράση, ενώ χρησιμοποιείται ως

αρωματικός παράγοντας στην ζαχαροπλαστική, σε ποτά, σε τρόφιμα και στην αρωματοποιία[212].

Μεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων

Ο διαχωρισμός και απομόνωση των ουσιών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lotus edulis* πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια: α) κλασμάτωση και απομόνωση ουσιών με Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή(CCC) και β) απομόνωση ουσιών από τα κλάσματα του CCC με Υγρή Χρωματογραφία Στήλης (LC) (Σχήμα 6.3.5).



Σχήμα 6.3.5: Συνοπτική πορεία απομόνωσης των ουσιών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lotus edulis*

α) Κλασμάτωση και απομόνωση ουσιών του μεθανολικού εκχυλίσματος με Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή(CCC)

Ο χρωματογραφικός έλεγχος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας στο μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis* έδειξε ότι η βασική κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχονται σ' αυτό είναι τα φαινολικά παράγωγα. Μεγάλο μέρος των φαινολικών αυτών παραγώγων αποτελούν τα φλαβονοειδή, τα οποία

συνιστούν μια κατηγορία φυσικών προϊόντων μεγάλου φαρμακολογικού ενδιαφέροντος. Για το λόγο αυτό αποφασίσθηκε η επιλογή κατάλληλου συστήματος για την απομόνωση των περιεχόμενων φλαβονοειδών στο υπό ανάλυση εκχύλισμα.

Πρώτο και βασικό στάδιο της διαδικασίας επιλογής συστήματος αποτέλεσε ο έλεγχος της βιβλιογραφίας που σχετίζεται με την απομόνωση φλαβονοειδών με την τεχνική CCC. Ο έλεγχος αυτός είναι πολύ χρήσιμος όσον αφορά στην επιλογή του πιο κατάλληλου μεταξύ συστημάτων που ήδη έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση φλαβονοειδών από εκχυλίσματα παρόμοιας σύστασης. Έτσι, με βάση τη βιβλιογραφία επιλέξαμε να αξιολογήσουμε 21 συστήματα διαλυτών, τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.3.7).

Πίνακας 6.3.7: Προτεινόμενα προς έλεγχο συστήματα για το διαχωρισμό με CCC του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lotus edulis.*

ΣΥΣΤΗΜΑ	**ΔΙΑΛΥΤΕΣ**	ΑΝΑΛΟΓΙΑ
1	**Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O**	**1:19:1:19**
2	**Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O**	**1:4:1:4**
3	**Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O**	**1:2:1:2**
4	**Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O**	**1:1:1:1**
5	**Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O**	**5:2:5:2**
6	**Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O**	**5:1:5:1**
7	**Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O**	**19:1:19:1**
8	**$CHCl_3$: MeOH: H_2O**	**8:10:5**
9	**$CHCl_3$: MeOH: H_2O**	**8:7:2**
10	**c-Hexane: EtOAc: MeOH: H_2O**	**2:12:3:14**
11	**EtOAc: EtOH: H_2O**	**10:1:10**
12	**EtOAc: n-BuOH: H_2O**	**2:1:3**
13	**n-BuOH: MeOH: H_2O**	**4:1:4**
14	**n-BuOH: H_2O**	**1:1**
15	**EtOAc: n-BuOH: H_2O**	**3:2:5**
16	**EtOAc: n-PrOH: H_2O**	**17.5:1:10**
17	**EtOAc: n-BuOH: EtOH: H_2O**	**10:1:2:10**
18	**n-BuOH: EtOH: H_2O**	**4:1:5**
19	**Aceton: n-BuOH: H_2O**	**3:8:12**
20	**CH_3COOH: n-BuOH: H_2O**	**1:4:5**
21	**EtOAc: n-BuOH: H_2O**	**2:3:5**

Τα παραπάνω διφασικά συστήματα υποβλήθηκαν σε τρεις διαδοχικούς ελέγχους προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν κάποιο ή κάποια από αυτά είναι κατάλληλα να διαχωρίσουν τα συστατικά του υπό μελέτη εκχυλίσματος. Οι έλεγχοι που απαιτούνται και η προετοιμασία των δειγμάτων περιγράφεται αναλυτικότερα στη σελ. 35.

Ο πρώτος έλεγχος είχε ως στόχο την αξιολόγηση των συστημάτων ως προς την ταχύτητα διαχωρισμού και την αναλογία των δυο φάσεων. Από τον έλεγχο αυτό **απορρίφθηκαν τα συστήματα 1, 4, 10, 11 και 14** είτε γιατί δημιουργούσαν γαλάκτωμα (μη σχηματισμός δύο φάσεων) είτε διότι ο χρόνος διαχωρισμού των δυο φάσεων ήταν μεγαλύτερος από τον χρόνο που απαιτείται για μία αποτελεσματική ανάλυση (μικρότερος από 1 λεπτό).

Ο δεύτερος έλεγχος που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Χρωματογραφίας TLC είχε ως στόχο την αξιολόγηση των συστημάτων ως προς την **κατανομή των συστατικών του δείγματος στις δύο φάσεις των διφασικών συστημάτων.** Ο έλεγχος αυτός είναι ένας απλός και γρήγορος τρόπος για την απόρριψη κάποιων συστημάτων στα οποία οι προς απομόνωση ουσίες κατανέμονται εξολοκλήρου στη μια από τις δύο φάσεις. Έτσι συμπεράναμε ότι τα συστήματα **3** (Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O 1:2:1:2), **5** (Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O 5:2:5:2), **6** (Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O 5:1:5:1) και **7** (Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O 19:1:19:1) είναι ακατάλληλα για την απομόνωση των φλαβονοειδών – στόχων, διότι τα περισσότερα από αυτά κατανέμονται στη μία από τις δύο φάσεις. Επίσης φάνηκε ότι τα συστήματα **15** (EtOAc: n-BuOH: H_2O 3:2:5) και **21** (EtOAc: n-BuOH: H_2O 2:3:5) δεν παρουσίασαν ικανοποιητική εικόνα διότι στην κάτω φάση (την υδατική) περιείχαν σχεδόν αποκλειστικά τα σάκχαρα. Ωστόσο, επειδή ο συγκεκριμένος έλεγχος βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε υποκειμενικούς παράγοντες (κρίση του ερευνητή), τα δυο αυτά συστήματα αποφασίσθηκε να μελετηθούν και με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).

Ο τρίτος έλεγχος είχε ως στόχο την αξιολόγηση των συστημάτων ως προς την **κατανομή των συστατικών του δείγματος στις δύο φάσεις με την βοήθεια των συντελεστών κατανομής των ουσών στα διάφορα διφασικά συστήματα.**

Ένας εύκολος τρόπος εύρεσης των συντελεστών κατανομής είναι με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Γνωρίζουμε ότι η επιφάνεια που περικλείει μια κορυφή στο χρωματογράφημα HPLC είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ουσίας στην οποία αντιστοιχεί η κορυφή αυτή. Έτσι, όταν οι όγκοι των φάσεων που αναλύονται είναι ίσοι, η επιφάνεια της κορυφής μιας ουσίας στο χρωματογραφημα της μιας φάσης προς την επιφάνεια της κορυφής της ίδιας ουσίας στο χρωματογραφημα της άλλης φάσης μας δίνει το συντελεστή κατανομής της ουσίας αυτής σε ένα διφασικό σύστημα διαλυτών.

$$K_x = \frac{C_x \text{ α φάση}}{C_x \text{ β φάση}} = \frac{E_x \text{ χρωματογραφημα α φάσης}}{E_x \text{ χρωματογραφημα β φάσης}}$$

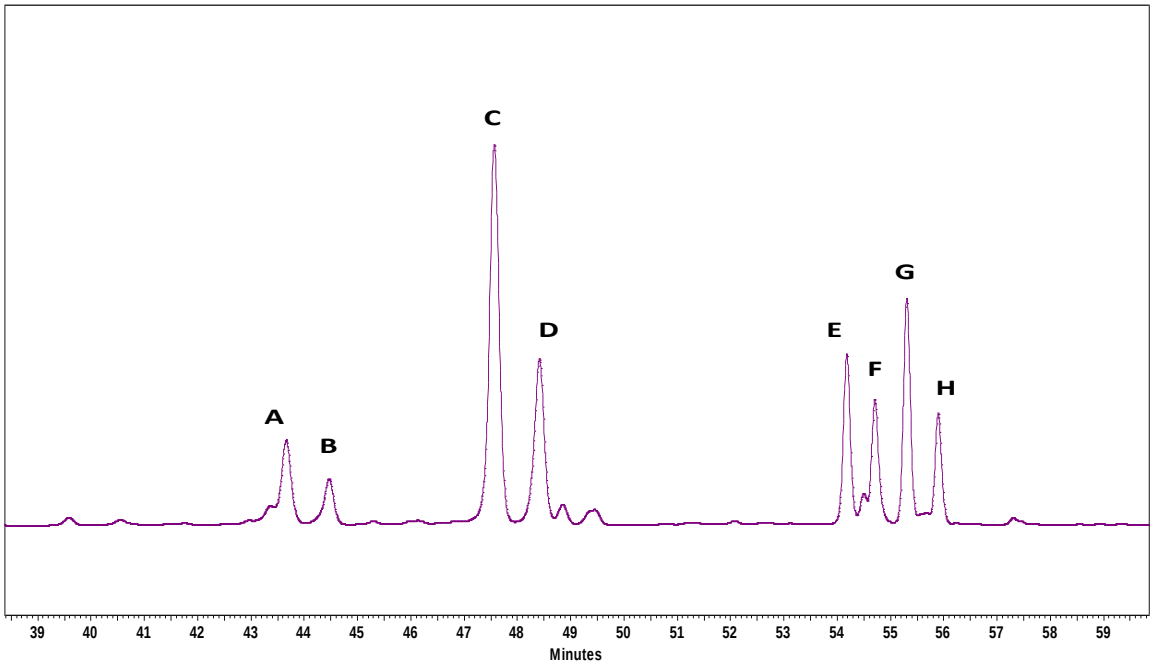
όπου: K_x= συντελεστής κατανομής της ουσίας X
C_x= συγκέντρωση της ουσίας X
E_x= επιφάνεια της κορυφής της ουσίας X στο χρωματογράφημα HPLC
α, β= οι δυο φάσεις του διφασικού συστήματος διαλυτών

Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε στήλη αντιστρόφου φάσεως τύπου Lichrosorb, RP 18, 250x4,6 mm, 5 μm, (Supelco) και προστήλη τύπου Lichrosorb, RP 18, 1cm x 4,6mm, 5μm (Supelco). Επίσης χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής UV (σε μήκη κύματος 260, 280 και 365 nm) αφού τα συστατικά που παρουσιάζουν ενδιαφέρον είναι τα φλαβονοειδή. Το σύστημα έκλουσης, το οποίο επιλέχθηκε με βάση τη βιβλιογραφία και διάφορες δοκιμές, φαίνεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6.3.8: Η μέθοδος HPLC που χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των συντελεστών κατανομής στα διφασικά συστήματα του *Lotus edulis*

ΧΡΟΝΟΣ (min)	ΔΙΑΛΥΤΕΣ H_2O (%)	AcN (%)
0	96	4
30	88	12
45	80	20
75	50	50
Ροή: 1 ml/min		

Στο χρωματογράφημα του ολικού μεθανολικού εκχυλίσματος, για τη λήψη του οποίου στον ανιχνευτή επιλέχθηκε το μήκος κύματος 280 nm, παρατηρούμε ότι τα κύρια φαινολικά συστατικά έχουν χρόνους ανάσχεσης μεταξύ 40 και 60 min. Χαρακτηριστικά επισημαίνονται εννέα κορυφές (A, B, C, D, E, F, G, H και I) για τις οποίες έγινε μέτρηση του συντελεστή κατανομής στα διάφορα συστήματα. Το χρωματογράφημα του ολικού μεθανολικού εκχυλίσματος σε μήκος κύματος 280 nm φαίνεται στην εικόνα 6.3.1.



Εικόνα 6.3.1: Χρωματογράφημα του ολικού μεθανολικού εκχυλίσματος του *L. edulis* σε μήκος κύματος 280 nm.

Στη συνέχεια για καθένα από τα συστήματα του πίνακα 6.3.7 τα οποία δεν έχουν απορριφθεί από τους προηγούμενους ελέγχους, υπολογίσθηκαν οι συντελεστές κατανομής των ουσιών A-H (ως ο λόγος της συγκέντρωσης της ουσίας στην κάτω φάση προς την αντίστοιχη συγκέντρωση στην πάνω φάση) και τα αποτελέσματα αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα 6.3.9.

Πίνακας 6.3.9: Υπολογιζόμενοι συντελεστές κατανομής για τις ουσίες του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lotus edulis.*

	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΕΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ K=Cκ.φ/Cπ.φ							
ΟΥΣΙΕΣ	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Σύστημα 2 (Hept:EtOAc:MeOH:H_2O 1:4:1:4)	-	-	19,3	14,3	4,0	2,5	1,6	1,9
Σύστημα 8 ($CHCl_3$: MeOH: H_2O 8:10:5)	7,6	7,5	6,0	5,8	3,4	2,2	1,7	2,8
Σύστημα 9 ($CHCl_3$: MeOH: H_2O 8:7:4)	35,9	25,5	15,2	16,1	7,8	3,8	2,9	4,7
Σύστημα 12 (EtOAc: n-BuOH: H_2O 2:1:3)	3.0	1.2	7.4	11.6	14.5	35.1	24.2	16.5
Σύστημα 13 (n-BuOH:MeOH: H_2O 4:1:4)	3.4	1.8	4.9	5.9	6.6	36.5	10.2	8.6
Σύστημα 15 (n-BuOH: EtOAc: H_2O 2:3:5)	4.5	2.1	11.8	20.6	22.5	49.4	62.4	63.1
Σύστημα 16 (EtOAc: n-PrOH: H_2O 140: 8: 80)	5,8	13,4	1,1	0,6	0,2	0,2	0,1	0,2
Σύστημα 17 (EtOAc:n-BuOH:EtOH:H_2O 10:1:2:10)	0.8	0.4	2.6	3.8	8.0	8.2	25.3	39.3
Σύστημα 18 (n-BuOH: EtOH: H_2O 4:1:5)	4.3	3.1	6.6	8.6	9.9	11.4	18.8	17.8
Σύστημα 19 (n-BuOH: Aceton: H_2O 8:3:12)	2.2	1.8	3.1	3.4	2.9	4.4	6.2	5.5
Σύστημα 20 (n-BuOH: CH_3COOH: H_2O 4:1:5)	2.9	2.0	4.9	5.8	6.0	6.1	12.9	19.0
Σύστημα 21 (EtOAc: n-BuOH: H_2O 2:3:5)	7.9	4.9	20.2	38.1	41.0	56.4	161.4	-

Όπως αναφέρθηκε στο γενικό μέρος, ένα διφασικό σύστημα διαλυτών είναι ικανό να διαχωρίσει τα συστατικά ενός εκχυλίσματος με Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή(CCC) όταν οι συντελεστές κατανομής των συστατικών αυτών δεν απέχουν πολύ από τη μονάδα και οι λόγοι των συντελεστών κατανομής είναι μεγαλύτεροι από 1.5. Η μελέτη των παραπάνω συντελεστών κατανομής έδειξε ότι κανένα από τα

εξεταζόμενα διφασικά συστήματα δεν είναι ικανό να διαχωρίσει όλα τα συστατικά του εκχυλίσματος. Οστόσο διαπιστώνουμε ότι το κάθε σύστημα θα μπορούσε μόνο του να διαχωρίσει μερικά από τα συστατικά αυτά. Έτσι αποφασίσαμε να επεξεργαστούμε το εκχύλισμα με δύο διαφορετικά συστήματα προκείμενου να απομονώσουμε όλες τις κορυφές για τις οποίες έγινε η μελέτη. Τα συστήματα που επιλέχτηκαν για τον διαχωρισμό είναι το σύστημα 2 (Hept:EtOAc:MeOH:H_2O 1:4:1:4) και το σύστημα 12 (EtOAc: n-BuOH: H_2O 2:1:3).

Από την μελέτη των συντελεστών κατανομής των ουσιών στο σύστημα **2** συμπεραίνουμε ότι με κινητή φάση την οργανική (πάνω) και στατική φάση την υδατική (κάτω) θα εκλουσθούν οι ουσίες G, H, F, E, C, και D, ενώ οι ουσίες A και B θα παραμείνουν στην υδατική φάση. Αντίθετα με στατική φάση την οργανική (πάνω) και κινητή την υδατική (κάτω), η σειρά έκλουσης των ουσιών θα είναι : A,B (μαζί)- C- D- E-F-H και G. Όσον αφορά την ικανότητα διαχωρισμού των ουσιών συμπεραίνουμε, με βάση τους λόγους των συντελεστών κατανομής ($\alpha_{\chi\psi}=K_\chi/K_\psi$ όπου $K_\chi>K_\psi$), ότι ο διαχωρισμός των ουσιών F, H, G δεν είναι ικανοποιητικός διότι $\alpha_{H,G}=\underline{1.15}<1.5$ και $\alpha_{F,H}=\underline{1.29}<1.5$. Επίσης, οι ουσίες C και D φαίνετε ότι δεν θα διαχωριστούν διότι $\alpha_{C,D}=\underline{1.35}<1.5$. Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι χρησιμοποιώντας για το διαχωρισμό το σύστημα **2** θα προκύψουν τρεις ομάδες ουσιών: μια ομάδα με τις ουσίες H,F,G, η ουσία E και μια ομάδα με τις ουσίες C,D. Τέλος, οι ουσίες A,B κατανέμονται σχεδόν πλήρως στην υδατική φάση και δεν είναι δυνατό να διαχωριστούν.

Για το σύστημα 12 συμπεραίνουμε ότι με στατική φάση την οργανική (πάνω) και κινητή φάση την υδατική (κάτω) η σειρά έκλουσης των ουσιών θα είναι η εξής: B,A,C,D,E,H ενώ οι ουσίες F και G θα μείνουν στην οργανική φάση. Επιπλέον οι ουσίες A,C,B θα διαχωριστούν καλά μεταξύ τους διότι $\alpha_{A,B}=\underline{2.48}>1.5$, και $\alpha_{C,A}=\underline{2.45}>1.5$. Αντίθετα, για τις υπόλοιπες ουσίες ο διαχωρισμός δεν είναι ικανοποιητικός διότι οι συντελεστές κατανομής απέχουν πολύ από τη μονάδα. Επομένως, το σύστημα 12 θα μπορούσε να θεωρηθεί πολύ καλό σύστημα για την απομόνωση των ουσιών A,B και C

Εκτέλεση διαχωρισμού

Με βάση τα όσα αναφέρονται παραπάνω, για τον διαχωρισμό των κυριότερων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *L. edulis*, επιλέχθηκαν δυο διφασικά συστήματα διαλυτών. Το σύστημα **2** (*Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O 1:4:1:4*) χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των ουσιών C, D, E, F, G και H ενώ το σύστημα 12 (*EtOAc: n-BuOH: H_2O 2:1:3*) για την απομόνωση των ουσιών A και B.

Σύστημα 2 (*Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O 1:4:1:4*)

Ο διαχωρισμός έγινε σε συσκευή υδροστατικού τύπου CPC KROMATON, χρησιμοποιώντας στήλη των 200 ml, αντλία LabAlliance με όριο πίεσης τα 50 bar και αυτόματο συλλέκτη Buchi B-684. Αναλύθηκε δείγμα βάρους 1,4 g και συλλέχτηκαν συνολικά 121 κλάσματα εκ των οποίων τα 90 πρώτα με κινητή φάση την οργανική, ενώ μετά την αναστροφή των φάσεων (κινητή η υδατική φάση) συλλέχτηκαν επιπλέον 30 κλάσματα. Η ροή των διαλυτών και η περιστροφή της στήλης διατηρήθηκαν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας στα 7.5 ml/min και 1300 rpm, αντίστοιχα (Πίνακας 6.3.10).

Η όλη διαδικασία διήρκησε περίπου 4 ώρες και καταναλώθηκαν συνολικά 1,5 Lt διαλυτών (εκ των οποίων το 40% αποτελούσε το νερό).

Πινακας 6.3.10: Διαχωρισμός του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lotus edulis* με το σύστημα *Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O 1:4:1:4.*

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ	ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ	ΡΥΘΜΙΣΗ ΣΥΣΚΕΥΗΣ			ΟΓΚΟΣ κλάσματος(ml)
1-7	Κάτω φάση	Άνω φάση	Ascending	1300 rpm	7.5ml/min	15 ml
8-90	Κάτω φάση	Άνω φάση	Ascending	1300 rpm	7.5ml/min	10 ml
91-121	Άνω φάση	Κάτω φάση	Descending	1300 rpm	7.5ml/min	10 ml

Μετά τον έλεγχο των κλασμάτων με TLC πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις. Τα τελικά κλάσματα, καθώς επίσης και τα βάρη τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.3.11).

Πίνακας 6.3.11: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lotus edulis* με CCC χρησιμοποιώντας για το διαχωρισμό το σύστημα *Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O 1:4:1:4.*

ΚΛ.	ΒΑΡΟΣ (mg)	ΚΛ.	ΒΑΡΟΣ (mg)
1	150.1	9	5.4
2	30.7	10	143.0
3	30.0	11	845.9
4	17.3	12	60.2
5	14.0	13	31.3
6	20.0	14	14.9
7	20.0	15	5.0
8	8.6		

Το κλάσμα **2** στον ποιοτικό έλεγχο που έγινε με TLC, φάνηκε να περιέχει κυρίως ένα προϊόν. Η βασική ουσία στα χρωματογραφήματα αυτά χαρακτηριζόταν από έντονη απορρόφηση στο U.V. στα 254 nm, ενώ μετά τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης εμφάνισε έντονο κίτρινο χρώμα. Ο έλεγχος με HPLC έδειξε ότι στο κλάσμα αυτό περιέχεται μία ουσία που έχει τον ίδιο χρόνο ανάσχεσης με την ουσία **G** (σύγκριση με το χρωματογράφημα HPLC του ολικού εκχυλίσματος). Από τη μελέτη των φασμάτων MS, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, COSY, HMQC και HMBC της ουσίας αλλά και τη μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, DEPT, HMQC και HMBC του ακετυλιωμένου παραγώγου της καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα δισακχαρίτη της καιμπφερόλης, την **3-*O*-(5-*O*-ακετυλο)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοσυλοκαιμπφερόλη (L.ed 8)**.

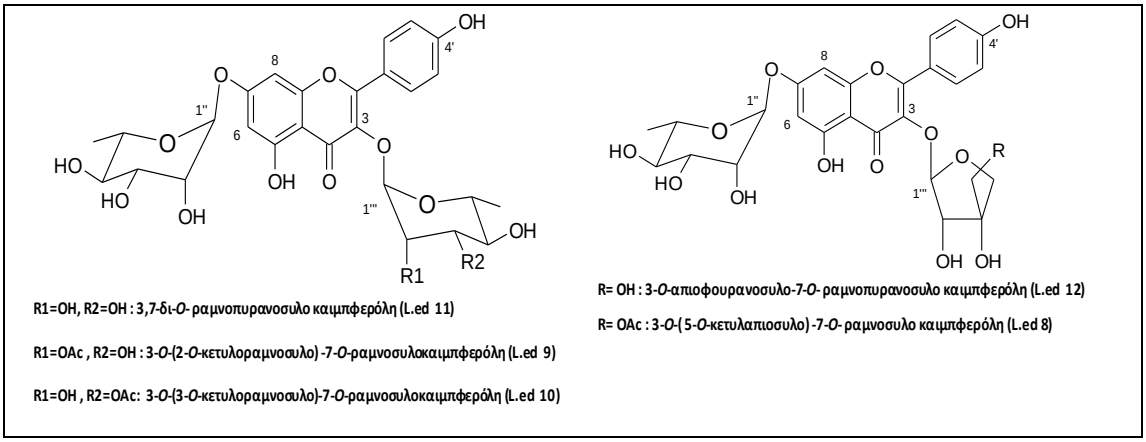
Το φλαβονοειδές αυτό αποτελεί νέο φυσικό προϊον.

Τα κλάσματα 5 και 6 στην TLC, έδειξαν να περιέχουν κυρίως μια ουσία με έντονη απορρόφηση στο U.V. (στα 254 nm), η οποία μετά τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης, έδωσε έντονα κίτρινη κηλίδα. Ωστόσο στον έλεγχο με HPLC διαπιστώθηκε η ύπαρξη δύο ουσιών με ίδιους χρόνους ανάσχεσης με τις ουσίες **E** και **F**.Πιο συγκεκριμένα στο κλάσμα 5 η κυρίαρχη κορυφή αντιστοιχούσε στην ουσία E ενώ στο κλάσμα 6 κυρίαρχη ήταν η κορυφή που αντιστοιχούσε στην ουσία F. Ακολούθησε μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων για την ταυτοποίηση των δυο προϊόντων. Από την μελέτη των φασμάτων NMR, και MS

καθώς και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα[213] συμπεράναμε ότι πρόκειται για τις ουσίες: **3-*O*-(2-*O*-ακετυλο)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (L.ed 9)** και **3-*O*-(3-*O*-ακετυλο)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (L.ed 10).** Οι παραπάνω ουσίες έχουν βρεθεί στο παρελθόν στα φύλα του *Weigela subsesillis* (Caprifoliaceae)[214], στην πόα του *Tarenna madagaskcariensis* (Rubiaceae)[215] καθώς και στο φυτό *Psacalium megaphyllum* της οικογένειας Compositae[216], ενώ **αναφέρονται πρώτη φορά σε φυτά της οικογένειας Fabaceae**. Δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις.

Το κλάσμα 13, όπως φάνηκε στον ποιοτικό έλεγχο που έγινε με TLC, περιέχει κυρίως ένα προϊόν, το οποίο χαρακτηρίζεται από έντονη απορρόφηση στο U.V. (στα 254 nm), ενώ μετά τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης, δίνει έντονο κίτρινο χρώμα. Ο έλεγχος με HPLC επιβεβαίωσε την ύπαρξη κυρίως ενός προϊόντος, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών και αντιστοιχεί στην ουσία **C** (σύγκριση με το χρωματογράφημα HPLC του ολικού εκχυλίσματος). Ο φασματοσκοπικός έλεγχος που ακολούθησε (NMR, MS) έδειξε ότι πρόκειται για την ουσία **3,7-δι-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (Led 11)**. Η ίδια ουσία απομονώθηκε και από το φυτό *Vicia faba* στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και αποτελεί έναν συχνά απαντώμενο μεταβολίτη σε εδώδιμα φυτά της οικογένειας Fabaceae.

Το κλάσμα 14 στον έλεγχο με TLC, έδειξε να περιέχει κυρίως ένα προϊόν. Η βασική κηλίδα στα χρωματογραφήματα αυτά χαρακτηριζόταν από έντονη απορρόφηση στο U.V. (254 nm) και έντονο κίτρινο χρώμα μετά από ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης και θέρμανση. Επίσης στο χρωματογράφημα HPLC διαπιστώθηκε η ύπαρξη κυρίως ενός προϊόντος, το οποίο αντιστοιχούσε στην ουσία **D** (σύγκριση με το χρωματογράφημα HPLC του ολικού εκχυλίσματος). Ακολούθησε φασματοσκοπικός έλεγχος για την ταυτοποίηση του προϊόντος. Από τη μελέτη των φασμάτων NMR και MS της ουσίας, αλλά και τη μελέτη του φάσματος ^{1}H-NMR του ακετυλιωμένου προϊόντος συμπεράναμε ότι πρόκειται για την ουσία **3-*O*-*β*-D-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (Led 12)**. **Το φλαβονοειδές αυτό αποτελεί νέο φυσικό προϊόν.**



Σύστημα 12 (*EtOAc: n-BuOH: H_2O 2:1:3*)

Ο διαχωρισμός έγινε στην ίδια συσκευή όπως και προηγουμένος. Αναλύθηκε δείγμα βάρους 1,5 g και συλλέξαμε συνολικά 102 κλάσματα εκ των οποίων τα 60 πρώτα με κινητή την κάτω φάση του διφασικού συστήματος ενώ μετά την αναστροφή των φάσεων (κινητή η άνω φάση) συλλέχτηκαν επιπλέον 41 κλάσματα. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 6.3.12) φαίνονται τα κλάσματα που συλλέχθηκαν και οι αντίστοιχες ρυθμίσεις.

Η όλη διαδικασία διήρκησε περίπου 5 ώρες και καταναλώθηκαν συνολικά 1,5 Lt διαλυτών εκ των οποίων το 50% αποτελούσε το νερό.

Πίνακας 6.3.12: Διαχωρισμός του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lotus edulis* με το σύστημα *EtOAc: n-BuOH: H_2O 2:1:3*

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ	ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ	ΡΥΘΜΙΣΗ ΣΥΣΚΕΥΗΣ			ΟΓΚΟΣ Κλάσματος (ml)
1-9	Άνω φάση	Κάτω φάση	Descending	1000 rpm	10ml/min	15 ml
10-60	Άνω φάση	Κάτω φάση	Descending	1400 rpm	5ml/min	10 ml
61-102	Κάτω φάση	Άνω φάση	Ascending	1100 rpm	5ml/min	10 ml

Μετά τον έλεγχο των κλασμάτων με TLC πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις. Τα τελικά κλάσματα, καθώς επίσης και τα βάρη τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.3.13).

Πίνακας 6.3.13: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *L. edulis* με CCC με το σύστημα *EtOAc: n-BuOH: H_2O 2:1:3*

.

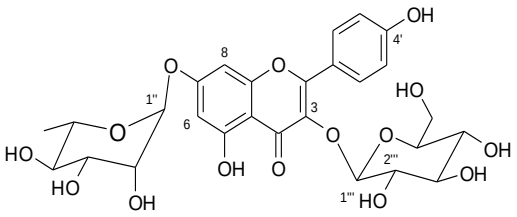
ΚΛ.	ΒΑΡΟΣ (mg)	ΚΛ.	ΒΑΡΟΣ (mg)
1	347.8	**6**	28.7
2	516.3	**7**	71.6
3	89.1	**8**	26.2
4	75.6	**9**	141.9
5			153.8

Τα αποτελέσματα του ελέγχου των χρωματογραφημάτων TLC και HPLC συμφωνούν πλήρως με τα θεωρητικά αποτελέσματα που προέκυψαν για το σύστημα **12** κατά τη διαδικασία επιλογής συστημάτων.

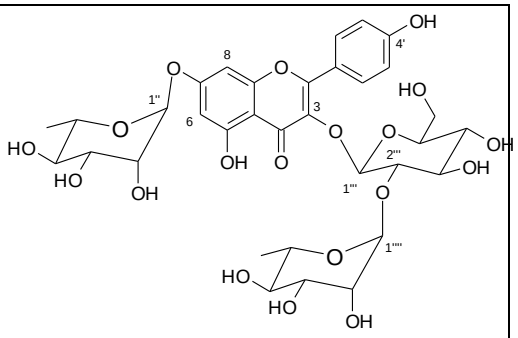
Το κλάσμα 4 στον έλεγχο που έγινε με TLC, φάνηκε να περιέχει κυρίως ένα προϊόν, το οποίο απορροφούσε στο U.V. (254 nm) και χρωματιζόταν έντονα κίτρινο μετά τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης και θέρμανση. Επίσης, στον έλεγχο με HPLC διαπιστώθηκε η ύπαρξη κυρίως ενός προϊόντος, το οποίο αντιστοιχεί στην ουσία **Β** (σύγκριση με το χροματογράφημα HPLC του ολικού εκχυλίσματος). Ο φασματοσκοπικός έλεγχος τόσο της ουσίας όσο και του ακετυλιωμένου παραγώγου που ακολούθησε, καθώς επίσης και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα[217] οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για την **3-*O*-νεοεσπεριδοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (L.ed 13)**. Το φλαβονοειδές αυτό απομονώθηκε ξανά, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Vicia faba*.

Το κλάσμα 6 στον έλεγχο που έγινε με TLC, φάνηκε να περιέχει κυρίως ένα προϊόν το οποίο χαρακτηριζόταν από απορροφούσε έντονα στο U.V. (254 nm) και χρωματιζόταν κίτρινο μετά τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης και θέρμανση. Στον έλεγχο του κλάσματος με HPLC διαπιστώθηκε η ύπαρξη κυρίως ενός προϊόντος το οποίο αντιστοιχεί στην ουσία **Α** (σύγκριση με το χρωματογράφημα HPLC του ολικού εκχυλίσματος). Στη συνέχεια

πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός έλεγχος για την ταυτοποίησή του. Από τη μελέτη των φασμάτων NMR και MS διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για γλυκοσιδικό παράγωγο της καιμπφερόλης, και πιο συγκεκριμένα για την **3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (L.ed 14).** Το φλαβονοειδές αυτό απαντάται συχνά σε φυτικούς οργανισμούς και κυρίως σε εδώδιμα φυτά της οικογένειας Fabaceae, ενώ απομονώθηκε και από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Vicia faba* στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.



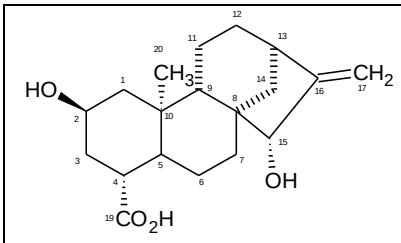
3-*O*-γλυκοπυρανοσυλο-7-*O*- ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (L.ed 14)



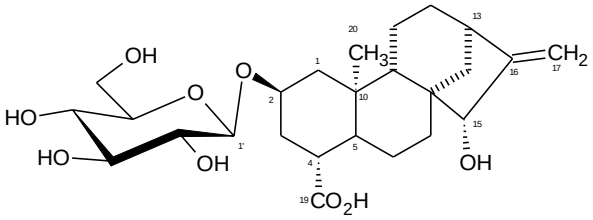
3-*O*-νεοεσπεριδοσυλο-7-*O*- ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (L.ed 13)

β) Απομόνωση ουσιών από τα κλάσματα του CCC με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Στήλης (LC).

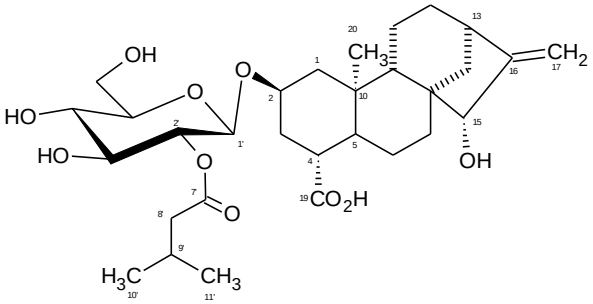
Το κλάσμα 1 που λάβαμε από την ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος με CCC χρησιμοποιώντας για το διαχωρισμό το σύστημα 2 επεξεργάστηκε με χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης. Ως πληρωτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε η γέλη πυριτίου (Silica gel Flash), ενώ ως κινητή φάση μίγματα διχλωρομεθανίου και μεθανόλης αυξανόμενης πολικότητας. Με την ανάλυση αυτή καταφέραμε και απομονώσαμε σε καθαρή μορφή τρεις δευτερογενείς μεταβολίτες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός έλεγχος για την ταυτοποίησή τους. Έτσι διαπιστώθηκε πως πρόκειται για τρία παράγωγα του καουρονικού οξέως και συγκεκριμένα για τις ουσίες: **Ατρακτυλιγενίνη** (Led 15), **2-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο ατρακτυλιγενίνη** (Led 16) και **2-O-(2'-O-ισοβαλερυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλ ατρακτυλιγενίνη** (Led-17)



Ατρακτυλγενινη (Led 15)



2-O-β-D-γλυκοπυρανοσυλ-ατρακτυλγενινη (Led 16)



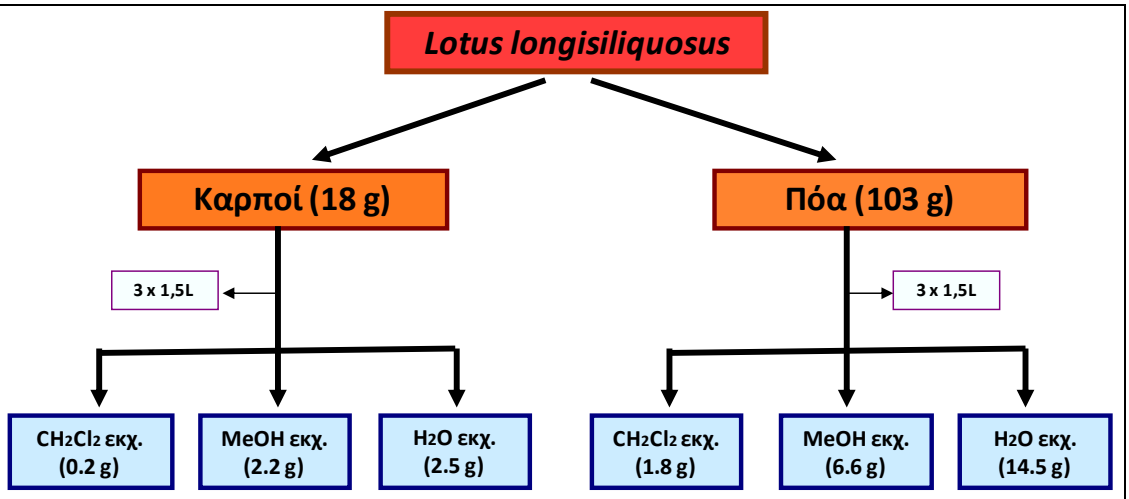
2-O-(2΄-ισοβαλερυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλ-ατρακτυλγενινη (Led 17)

Η **Ατρακτυλιγενίνη** (Led 15) απομονώθηκε πρώτη φορά από τις ρίζες του φυτού *Atractylis gummifera* (Asteraceae) ενώ βρέθηκε επίσης στους πράσινους καρπούς του καφέ (*Coffe Arabica*), στο φυτό *Coffe robusta,* στο φυτό *Inula britannica* (Compositae), καθώς και στο *Drymaria arenarioides* (Cariophylaceae). Οι μεταβολίτες **Led 16** και **Led 17** αποτελούν γλυκοσιλιομένα παράγωγα της ατρακτυλιγενίνης και απαντώνται συνήθως μαζί με αυτήν[218,219,220,221]. **Οι παραπάνω μεταβολίτες συναντώνται πρώτη φορά σε φυτά της οικογένειας Fabaceae**.

Όσον αφορά τις βιολογικές δράσεις η **Ατρακτιλγενινη** διαθέτει αντιμικροβιακή και σημαντική κυτταροτοξική δράση (έναντι αρκετών καρκινικών σειρών)[222,223,224] Ο δε μεταβολίτης **Led 17** είναι ισχυρός ανταγωνιστικός αναστολέας της μεταφοράς ADP. Έτσι προκαλεί αλλαγές στον μεταβολισμό υδρογονανθράκων με συνέπεια την εμφάνιση αναστρέψιμης υπογλυκαιμίας η οποία προέρχεται από εξάντληση του γλυκογόνου του ήπατος[225,226,]

6.3.3 Lotus longisiliquosus

Η συλλογή του φυτού *Lotus longisiliquosus* πραγματοποιήθηκε στο τέλος Μαΐου στο όρος Χιονοβούνι της επαρχίας Επίδαυρος (υψ. 800-900 μ). Μετά την διαλογή και ξήρανση του φυτικού οργανισμού, διαχωρίστηκαν τα σπέρματα από τα υπέργεια τμήματα του. Ακολούθησε η κονιοποίηση χωριστά των καρπών και των υπέργειων τμημάτων του φυτού και προέκυψαν σκόνες βάρους 18 και 103 g, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, ακολούθησε εκχύλιση του φυτικού υλικού με CH_2Cl_2, MeOH και H_2O. Τα βάρη των εκχυλισμάτων φαίνονται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα (Σχήμα 6.3.6) ενώ η διαδικασία εκχύλισης περιγράφεται στο Κεφάλαιο 5.



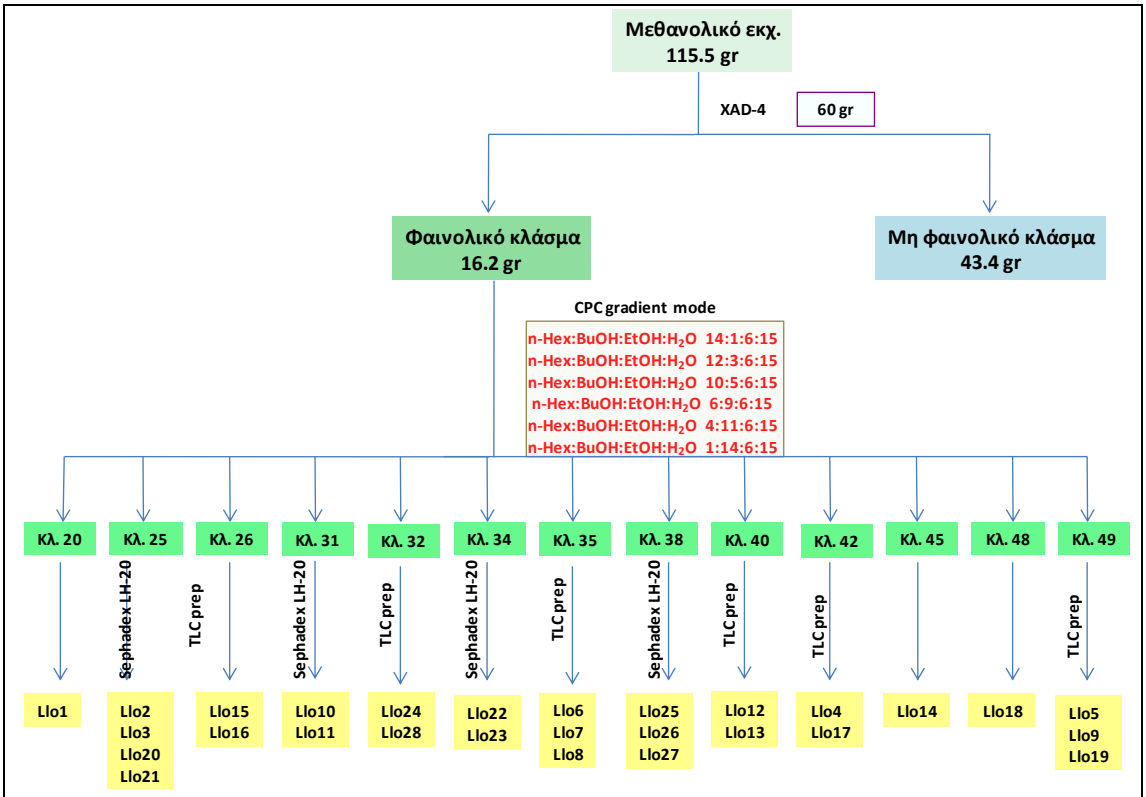
Σχήμα 6.3.6: Αρχική επεξεργασία του φυτού *Lotus longisiliquosus*

Τα παραπάνω εκχυλίσματα ελέχθησαν τόσο ως προς το χημικό τους περιεχόμενο, με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), όσο και ως προς τη βιολογική τους δραστικότητα. Οι βιολογικές δοκιμές, στις οποίες υποβλήθηκαν, αφορούσαν την αντιοξειδωτική, την αντιμεταλαξιογόνο και την αντιμικροβιακή δράση. Με βάση τα αποτελέσματα των ελέγχων, τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 5, αποφασίστηκε η περεταίρω μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού. Λόγω της περιορισμένης ποσότητας των εκχυλισμάτων, έγινε επανασυλλογή του φυτικού υλικού και ακολούθησε ξανά η παραπάνω διαδικασία οπότε

προέκυψαν για τα υπέργεια τμήματα: 29.6 g διχλωρομεθανικού, 115.5 g μεθανολικού και 242.3 g υδατικού εκχυλίσματος.

Μεθανολικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων

Ο διαχωρισμός και απομόνωση των ουσιών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lotus longisiliquosus* πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια: α) διαχωρισμός του φαινολικού από το μη φαινολικό φορτίο με Χρωματογραφία Προσρόφησης, β) κλασμάτωση του φαινολικού φορτίου με Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC) και γ) απομόνωση των ουσιών από τα κλάσματα του CCC με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού και παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας(Σχήμα 6.3.7).



Σχήμα 6.3.7: Συνοπτική πορεία απομόνωσης των ουσιών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lotus longisiliquosus*

α) Διαχωρισμός του Φαινολικού από το Μη Φαινολικό Φορτίο

Ο χρωματογραφικός έλεγχος του μεθανολικού εκχυλίσματος έδειξε ότι αυτό περιέχει κυρίως φαινολικά παράγωγα και σάκχαρα. Επίσης απεκάλυψε ότι το

φαινολικό κλάσμα περιέχει μια πληθώρα ουσιών σε μικρές ποσότητες. Προκειμένου να απομονώσουμε όσο το δυνατόν περισσότερες ουσίες σε ποσότητες που θα μας επιτρέψουν την περαιτέρω ανάλυση τους, κρίναμε αναγκαίο να απομακρύνουμε αρχικά τα σάκχαρα από το υπό μελέτη εκχύλισμα.

Ένας γρήγορος και εύκολος τρόπος να διαχωρίσουμε τις φαινολικές ουσίες από τα σάκχαρα είναι η χρήση των Ρητινών Προσρόφησης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη XAD-4 και ως διαλύτες μεθανόλη και νερό. Αρχικά 60 g μεθανολικού εκχυλίσματος διαλύθηκαν σε 1 Lt H_2O και αφέθηκαν να περάσουν με μικρή ροή από στήλη πληρωμένη με ενεργοποιημένη ρητίνη XAD-4. Η ρητίνη προσροφά τις φαινολικές ουσίες ενώ το υπόλοιπο (μη φαινολικό) φορτίο παρασύρεται με το νερό και συλλέγεται στην έξοδο της στήλης. Στη συνέχεια, με την προσθήκη μεθανόλης αποδεσμεύονται οι προσροφημένες στη ρητίνη ουσίες και παραλαμβάνεται το φαινολικό κλάσμα. Μετά την συμπύκνωση των δύο κλασμάτων προέκυψαν 16.2 g φαινολικού και 43.4 g μη φαινολικού κλάσματος. Τα δύο αυτά κλάσματα ελέχθησαν στη συνέχεια με TLC όπου διαπιστώθηκε ότι ο διαχωρισμός ήταν επιτυχής.

β) Κλασμάτωση του Φαινολικού Φορτίου με Χρωματογραφία CCC

Το φαινολικό κλάσμα που προήλθε από την παραπάνω διαδικασία κλασματώθηκε στη συνέχεια με Χρωματογραφία CCC. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το βασικό στάδιο της τεχνικής αυτής αποτελεί η επιλογή του κατάλληλου διφασικού συστήματος και της μεθόδου διαχωρισμού. Η πληθώρα των ουσιών που υπάρχουν στο υπό ανάλυση κλάσμα συνετέλεσε στο να επιλέξουμε το διφασικό σύστημα και μέθοδο με κριτήριο κυρίως την καλή κλασμάτωση του μείγματος και όχι τόσο την απομόνωση τους σε καθαρή μορφή.

- *Επιλογή του κατάλληλου διφασικού συστήματος ή μεθόδου διαχωρισμού*

Αρχικά η αναζήτηση διφασικού συστήματος έγινε σε ένα σύνολο 17 συστημάτων τα οποία προήλθαν από βιβλιογραφική μελέτη και πειραματισμό. Τα συστήματα αυτά υποβλήθηκαν στους προβλεπόμενους ελέγχους από τους οποίους συμπεράναμε ότι το καλύτερο για το διαχωρισμό ήταν το σύστημα: n-Hex-n-BuOH: EtOH: H_2O 2:3:2:5. Η ανάλυση, όμως του φαινολικού τμήματος με το παραπάνω διφασικό

σύστημα έδωσε πολύπλοκα κλάσματα όπως έδειξε ο χρωματογραφικός έλεγχος που ακολούθησε. Προκειμένου να κλασματώσουμε καλύτερα το φαινολικό τμήμα και να διευκολύνουμε έτσι την περεταίρω ανάλυση, εφαρμόσαμε τη μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient mode).

Για την δημιουργία της σειράς των διφασικών συστημάτων βασιστήκαμε στο σύστημα που χρησιμοποιήσαμε για τον προηγούμενο διαχωρισμό (n-Hex:n-BuOH:EtOH:H_2O 2:3:2:5). Στόχος μας ήταν η δημιουργία συστημάτων τέτοιων ώστε να καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα πολικοτήτων. Έτσι διατηρήσαμε σταθερή την αναλογία των διαλυτών της κάτω φάσης και μεταβάλαμε την αναλογία των διαλυτών της άνω φάσης η οποία χρησιμοποιήθηκε ως κινητή. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήσαμε μια σειρά 8 διφασικών συστημάτων αυξανόμενης πολικότητας της κινητής φάσης (Πίνακας 6.3.14).

Πίνακας 6.3.14: Σειρά διφασικών συστημάτων για την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *L. longisiliquosus* με gradient mode CCC.

ΚΩΔ.	ΔΙΑΛΥΤΕΣ	ΑΝΑΛΟΓΙΑ
Σ1	n-Hex-n-BuOH: EtOH: H_2O	14 / 1 / 6 / 15
Σ2	n-Hex-n-BuOH: EtOH: H_2O	12 / 3 / 6 / 15
Σ3	n-Hex-n-BuOH: EtOH: H_2O	10 / 5 / 6 / 15
Σ4	n-Hex-n-BuOH: EtOH: H_2O	8 / 7 / 6 / 15
Σ5	n-Hex-n-BuOH: EtOH: H_2O	6 / 9 / 6 / 15
Σ6	n-Hex-n-BuOH: EtOH: H_2O	4 / 11 / 6 / 15
Σ7	n-Hex-n-BuOH: EtOH: H_2O	2 / 13 / 6 / 15
Σ8	n-Hex-n-BuOH: EtOH: H_2O	1 / 14 / 6 / 15

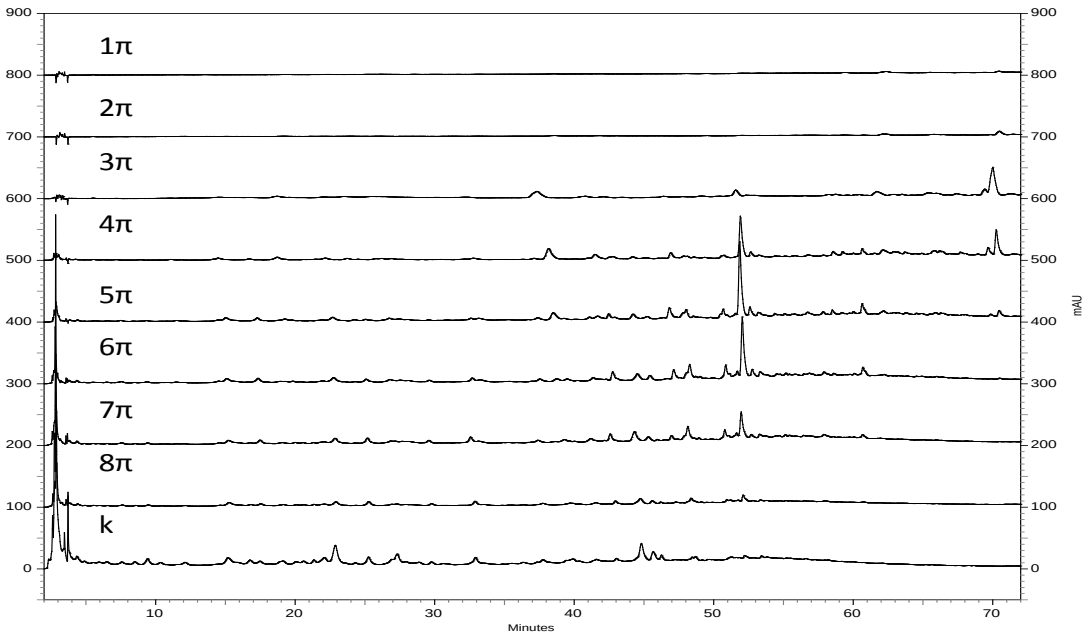
Στα παραπάνω συστήματα έγινε αρχικά έλεγχος διαλυτότητας του εκχυλίσματος και διαχωρισμού των φάσεων. Από τον πρώτο αυτό έλεγχο συμπεραίνουμε ότι και τα 8 συστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση του συγκεκριμένου εκχυλίσματος. Τα συστήματα αυτά ελέχθησαν τόσο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας όσο και με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης προκειμένου να μελετηθεί η μεταβολή στην κατανομή των ουσιών κατά την μετάβαση από το ένα σύστημα στο επόμενο. Ο έλεγχος αυτός έδειξε μια βαθμιδωτή μεταβολή στην κατανομή των ουσιών στις φάσεις του κάθε συστήματος. Τα πιο άπολα συστήματα έδειξαν καλή διαχωριστική ικανότητα σε ουσίες της άπολης περιοχής του

χρωματογραφήματος ενώ όσο προχωρούσαμε σε πιο πολικά συστήματα κατανέμονταν καλύτερα και οι πιο πολικές ουσίες.

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις κρίναμε ότι η σειρά διφασικών συστημάτων (Σ1 έως Σ8) θα μπορούσε να κλασματώσει σε ικανοποιητικό βαθμό το προς ανάλυση φαινολικό τμήμα. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να τονιστεί ότι πιο αντικειμενική κρίση για την καταλληλότητα των συστημάτων μας δίνει η μελέτη των συντελεστών κατανομής των ουσιών. Στο υπό μελέτη εκχύλισμα όμως η εύρεση των συντελεστών κατανομής είναι πάρα πολύ δύσκολη λόγω του πλήθους των ουσιών και της μικρής ποσότητάς τους μέσα στο εκχύλισμα.

Από τις παραπάνω δοκιμές συμπεράναμε ότι τα συστήματα Σ1 έως και Σ8 θα μπορούσαν, το κάθε ένα μόνο του, να διαχωρίσουν μερικές από τις ουσίες του εκχυλίσματος. Εντούτοις ήταν αναγκαίο να ελεγχτεί η ικανότητα των συστημάτων να διατηρήσουν την διφασικότητα τους κατά την μετάβαση από το ένα στο άλλο, όταν εφαρμόζονται στη σειρά μέσα στη στήλη. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε στην προσομοίωση διαχωρισμού, με την οποία ελέγχεται το κατά πόσον μια σειρά συστημάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς να υπάρχει ο κίνδυνος δημιουργίας γαλακτώματος.

Η παραπάνω δοκιμή έδειξε ότι κατά την μετάβαση από το σύστημα Σ1 με διαδοχικές προσθαφαιρέσεις της πάνω φάσης, έως και το σύστημα Σ8 ο διαχωρισμός των φάσεων ήταν ικανοποιητικός. Επιπλέον μελετήθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης οι μεταβολές στην ένταση των κορυφών κατά την μετάβαση από το ένα διφασικό σύστημα στο επόμενο όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 6.3.2).



Εικόνα 6.3.2: Χρωματογραφική απεικόνιση της μεταβολής στην κατανομή των ουσιών κατά την επεξεργασία με CCC του μεθανολικου εκχυλίσματος του *L. longisiliquosus* με τη μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης.

- *Εκτέλεση διαχωρισμού*

Για τον διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε το όργανο υδροστατικού τύπου CPC KROMATON με παρασκευαστική στήλη των 1000 ml, αντλία LabAlliance με όριο πίεσης τα 50 bar και αυτόματο συλλέκτη Buchi B-684.. Αρχικά πληρώθηκε η στήλη με την κάτω φάση του συστήματος Σ1. Στη συνέχεια τέθηκε η στήλη σε περιστροφή (650 rpm) και διοχετεύθηκε η πάνω φάση του ίδιου συστήματος. Μετά την εξισορρόπηση του διφασικού συστήματος έγινε η εισαγωγή του εκχυλίσματος βάρους 5.6 g. Αφού συλλέχθηκαν 50 κλάσματα των 10 ml μεταβλήθηκε η κινητή φάση από Σ1π σε Σ2π. Μετά από 44 κλάσματα (των 10 ml) διοχετεύθηκε η πάνω φάση του συστήματος Σ3 (Σ3π) και συλλέχτηκαν ακόμη 39 κλάσματα. Κατόπιν αλλάξαμε την κινητή φάση από Σ3π σε Σ5π. Μετά την συλλογή 35 κλασμάτων διοχετεύθηκε η πάνω φάση του συστήματος Σ6 για τα επόμενα 45 κλάσματα. Στη συνέχεια αλλάξαμε την κινητή φάση από Σ6π σε Σ8π και συλλέχτηκαν 75 κλάσματα. Στο σημείο αυτό έγινε αναστροφή των φάσεων χρησιμοποιώντας πια ως κινητή την κάτω φάση του συστήματος Σ8 όποτε συλλέχτηκαν ακόμη 61 κλάσματα. Όλη η πορεία του διαχωρισμού περιγράφεται εν συντομία στον πίνακα 6.3.15.

Πίνακας 6.3.15: Πορεία διαχωρισμού του μεθανολικού εκχυλίσματος του *L. longisiliquosus* με τη χρήση της τεχνικής CCC και τη μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης.

Στατική Φάση	Κινητή Φάση	Κλάσματα (των 10ml)
Σ1κ	Σ1π	50
Σ*	Σ2π	44
Σ*	Σ3π	39
Σ*	Σ5π	35
Σ*	Σ6π	45
Σ*	Σ8π	75
Αναστροφή Φάσεων		
Σ8π	Σ8κ	61
Ροή: 10ml/min		
Περιστροφή 650 rpm		

Συνολικά συλλέχτηκαν 351 κλάσματα των 10 ml τα οποία, μετά από έλεγχο με TLC, συνενώθηκαν για να προκύψουν τελικά 62 κλάσματα τα βάρη των οποίων παρουσιάζονται στον πίνακα 6.3.16. Η ροή των διαλυτών και η περιστροφή της στήλης διατηρήθηκαν σταθερά, καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, στα 10 ml/min και 650 rpm αντίστοιχα.

Ο διαχωρισμός διήρκησε περίπου 8 ώρες και καταναλώθηκαν περίπου 5 Lt διαλυτών εκ των οποίων το 40% αποτέλεσε το νερό.

Πίνακας 6.3.16: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *L. longisiliquosus* με gradient mode CCC

Κλ.	Βάρος (mg)	Κλ.	Βάρος (mg)	Κλ.	Βάρος (mg)	Κλ.	Βάρος (mg)
Κλ.1	38,2	Κλ.17	8	Κλ.33	246,2	Κλ.49	137,5
Κλ.2	21,1	Κλ.18	11,1	Κλ.34	255,4	Κλ.50	170,3
Κλ.3	15,9	Κλ.19	4	Κλ.35	71,5	Κλ.51	85,5
Κλ.4	7	Κλ.20	5,5	Κλ.36	47,1	Κλ.52	132,3
Κλ.5	3,8	Κλ.21	8,9	Κλ.37	34,5	Κλ.53	82
Κλ.6	4,4	Κλ.22	4	Κλ.38	95,5	Κλ.54	130,2
Κλ.7	1,9	Κλ.23	4,8	Κλ.39	68,3	Κλ.55	25,3
Κλ.8	1,9	Κλ.24	10	Κλ.40	80	Κλ.56	24,7
Κλ.9	1,6	Κλ.25	72,3	Κλ.41	102,9	Κλ.57	192
Κλ.10	2,1	Κλ.26	22,8	Κλ.42	65,1	Κλ.58	148,9
Κλ.11	2,1	Κλ.27	16,3	Κλ.43	178,9	Κλ.59	50,8
Κλ.12	2,1	Κλ.28	17,9	Κλ.44	221,4	Κλ.60	3,2
Κλ.13	1,9	Κλ.29	16,9	Κλ.45	980,3	Κλ.61	3
Κλ.14	3,9	Κλ.30	14	Κλ.46	721,2	Κλ.62	445,2
Κλ.15	3,5	Κλ.31	20,6	Κλ.47	115,8		
Κλ.16	3,6	Κλ.32	107,6	Κλ.48	117,4		

Ο χρωματογραφικός έλεγχος στα κλάσματα του παραπάνω διαχωρισμού έδειξε ότι αυτά αποτελούταν από μικρό αριθμό ουσιών ενώ κάποια από αυτά περιείχαν μόνο μια ουσία. Η σύγκριση μεταξύ της ανάλυσης με τη χρήση ενός διφασικού συστήματος και της ανάλυσης με τη χρήση πολλών συστημάτων στη σειρά, έδειξε ότι η δεύτερη μέθοδος σαφώς υπερτερεί της πρώτης τόσο στην επιτυχία της κλασμάτωσης όσο και στην δυνατότητα απομόνωσης καθαρών ουσιών. Η διαφορά αυτή γίνεται εμφανέστερη όταν πρόκειται για ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων όπου ένας καλός αρχικός διαχωρισμός είναι πολύ σημαντικός για την περαιτέρω επεξεργασία.

γ) Απομόνωση των ουσιών από τα κλάσματα του CCC με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Προκειμένου να διαχωρίσουμε τις ουσίες και να τις παραλάβουμε σε καθαρή μορφή ακολούθησε επεξεργασία επιλεγμένων κλασμάτων με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Ως πληρωτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη Sephadex LH-20 ενώ ως διαλύτης έκλουσης η μεθανόλη. Επίσης, για την ανάλυση μερικών κλασμάτων, χρησιμοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε υάλινες πλάκες επιστρωμένες με γέλη πυριτίου ενώ το σύστημα ανάπτυξης αποτέλεσαν μίγματα των διαλυτών διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη σε διαφορετικές αναλογίες.

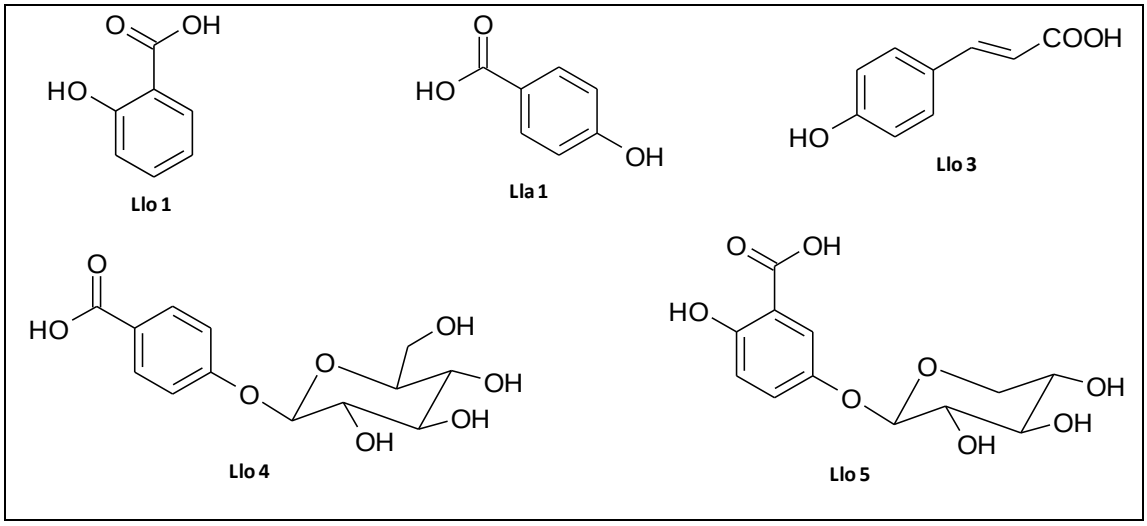
Από τα 10 κλάσματα που μελετήθηκαν περαιτέρω, 4 επεξεργάστικαν με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και 6 με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Επιπλέον τρία από τα κλάσματα του CCC περιείχαν μόνο μία ουσία απομονομένη. Συνολικά από την ανάλυση του φαινολικού κλάσματος του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Lotus longisiliquosus* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 28 δευτερογενείς μεταβολίτες εκ των οποίων οι 7 αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα. Αναλυτικότερα οι ουσίες που απομονώθηκαν από το κάθε κλάσμα του CCC και η χρωματογραφική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.3.17).

Πίνακας 6.3.17: Ουσίες που απομονώθηκαν κατά τη επεξεργασία του φυτού *L. longisiliquosus.*

Κλάσμα		Απομονωμένες ουσίες
Κλ. 20	**-**	ο-υδροξυβενζοϊκό οξύ(Llo 1)
Κλ. 25	**Sephadex LH-20**	π-υδροξυβενζοϊκο οξύ (Llo 2) π-κουμαρικό οξύ (Llo 3) 5,7,4΄-τριυδροξυκουμαρονοχρωμόνη (Llo 20) 8-μεθόξυ -5,7,4΄-τριυδρόξυκουμαρονοχρωμόνη (Llo 21) **(*N*)**
Κλ. 26	**Prep TLC**	9,12,13-τριυδροξυ-10,15-οκταδεκαδιενικό οξύ(Llo 15) 9,12,13-τριυδροξυ-10-οκταδεκαενικό οξύ(Llo16)
Κλ. 31	**Sephadex LH-20**	*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης της 3(*Z*)-εξενόλης (Llo 10) 3-*O*-*β*-D - γλυκοπυρανόσυλοκτανοϊκό οξύ (Llo 11) **(*N*)**
Κλ. 32	**Prep TLC**	3-O-(2΄΄- *E* -κουμαροϋλο)-γαλακτοπυρανόσυλοκαιμπφερόλη (Llo 24) **(*N*)** Αζουκισαπωνίνη V (Llo 28)
Κλ. 34	**Sephadex LH-20**	3- O-*β*-D -γαλακτοπυρανοσυλοκερκετίνη (Llo 22) 3- O-*β*-D -γαλακτοπυρανοσυλοϊσοραμνετίνη(Llo 23)
Κλ. 35	**Prep TLC**	Βενζυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης (Llo 6) *β*-D-γλυκοπυρανοσυλοφαινυλαιθανόλη (Llo 7) (2S, 3S)- 3-O- *β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-1-φαίνυλο-2,3-βουτανδιόλη (Llo 8)
Κλ. 38	**Sephadex LH-20**	3-O-(2΄΄-O-ξυλοπυρανοσυλο)-γαλακτοπυρανοσυλοκερκετίνη (Llo 25) **(*N*)** 3-O-(2΄΄O-*E*- κουμαροϋλο)-γαλακτοπυρανοσυλο-7-O-γλυκοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (Llo 26) **(*N*)** 3-O-(2΄΄-O-*E*-κουμαροϋλο)-γαλακτοπυρανόσυλο-7-O-γλυκοπυρανοσυλοκερκετίνη (Llo 27) **(*N*)**
Κλ. 38	**Prep TLC**	2-μέθυλο-2-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοπροπιονικό οξύ (Llo 12) **(*N*)** Λοταουστραλίνη (Llo 13)
Κλ. 42	**Prep TLC**	π-*β*-D -γλικοπυρανόσυλοβενζοϊκό οξύ(Llo 4) Αδενοσίνη(Llo 17)
Κλ. 45	**-**	Λιναμαρίνη (Llo 14)
Κλ. 48	**-**	Ουριδίνη (Llo 18)
Κλ. 49	**Prep TLC**	5-*O* -*β*-D-ξυλοπυρονόσυλογεντισικό οξύ(Llo 5) 1-O-μεθυλογλυκοπυρανοσίδης (Llo 9) Προλίνη (Llo 19)

Από τους παραπάνω μεταβολίτες 5 ανήκουν στην κατηγορία των φαινολοξέων, 3 στην κατηγορία των φαινυλαλκοολών, 4 στην κατηγορία των λιπαρών οξέων και 8 παράγωγα φλαβονοειδών. Επίσης απομονώθηκαν 2 κυανυδρινικοί γλυκοσίδες , 2 απλά γλυκοσιδικά παράγωγα, 2 νουκλεοσίδες, μία τριτερπενική σαπωνίνη και το αμινοξύ προλίνη.

Τα φαινολοξέα είναι μια κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών ευρέος διαδεδομένη στο φυτικό βασίλειο. Από τα απομονωθέντα φυσικά προϊόντα του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lotus lingisiliquosus* στην κατηγορία αυτή ανήκουν 4 παράγωγα του βενζοϊκού και ένα του σικυμικού οξέως. Αναλυτικότερα πρόκειται για τις ουσίες: **ο-υδροξυβενζοϊκό οξύ (Σαλικυλικό οξύ)** (Llo 1), **π-υδροξυβενζοϊκο οξύ** (Llo 2), **π-κουμαρικό οξύ** (Llo 3), **4-*O*-*β*-D -γλυκοπυρανοσυλοβενζοϊκό οξύ** (Llo 4) και **5-*O*-*β*-D -ξυλοπυρονοσυλογεντισικό οξύ** (Llo 5).



Το **Σαλικυλικό οξύ** (Llo 1) απομονώθηκε αρχικά από τον φλοιό της Ιτιάς (*Salix alba*, Salicaceae) ενώ στη συνέχεια βρέθηκε σε πολλά φυτά. Αποτελεί την πρόδρομη ένωση στην παρασκευή του ακετυλοσαλικυλικού οξέος (Ασπιρίνη) το οποίο είναι η βασική ουσία σε πολλά σκευάσματα με αναλγητική, αντιφλεγμονώδη και αντιπυρετική δράση. Η δράση αυτή της Ιτιάς, ήταν γνωστή από την αρχαιότητα όπου τον $5^{ο}$ αιώνα Π.Χ ο Ιπποκράτης έκανε λόγο για μία πικρή σκόνη η οποία παράγεται από τον φλοιό της και θεραπεύει τον πόνο και τον πυρετό. Το σαλικυλικό οξύ πέραν των παραπάνω δράσεων διαθέτει πλήθος άλλων φαρμακευτικών

ιδιοτήτων και χρησιμοποιείται στη θεραπεία πολλών παθήσεων όπως δερματικών (εκζέματα, σκληροδερμία, ψωρίαση κ.α) σε αρθρίτιδες (οστεοαρθρίτιδα, ρευματοειδής αρθρίτιδα) σε χρόνιες καταστάσεις που συνοδεύονται από πόνο κ.α. [227,228,229,230,231,232].

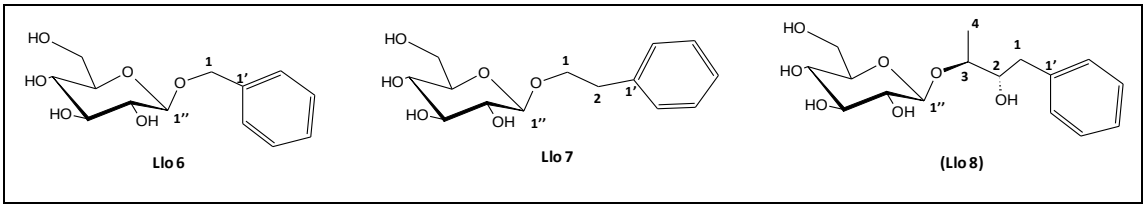
Το **π-υδροξυβενζοϊκο οξύ** (Llo 2) απαντάτε σε πολλά φυτά και διαθέτει πλήθος βιολογικών δράσεων. Χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό, αντιβακτηριδιακό, αντιμυκιτιασικό, συντηρητικό, αντιδιαβητικό, σε καρδιαγγειακά προβλήματα, σε οδοντικά σκευάσματα, σε δερματικά σκευάσματα, κ.α.[233,234,235,236,237].

Το **π-κουμαρικό οξύ** αποτελεί έναν συχνά υπαντώμενο μεταβολίτη στο φυτικό βασίλειο. Διαθέτει αρκετές βιολογικές δράσεις και χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό, αντιμικροβιακό, συντηρητικό, σε δερματικές παθήσεις κ.α. [238,239,240,241,242].

Το **4-O-*β*-D -γλυκοπυρανοσυλοβενζοϊκό οξύ** (Llo 4) έχει απομονωθεί από πολλά φυτά. Σε πειράματα βιολογικής δράσης έδειξε καλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς επίσης ανασταλτική δράση επί του ενζύμου τυροσινάση.[243,244].

Τέλος το προϊόν **5-O-*β*-D -ξυλοπυρονοσυλογεντισικό οξύ** (Llo 5) είναι αρκετά σπάνιο καθώς έχει απομονωθεί μόνο τρις φορές από φυτικούς οργανισμούς ενώ στην οικογένεια Fabaceae έχει βρεθεί πρόσφατα στις ρίζες του *Medicago truncatula*[245,246,247] .Δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις της ουσίας αυτής.

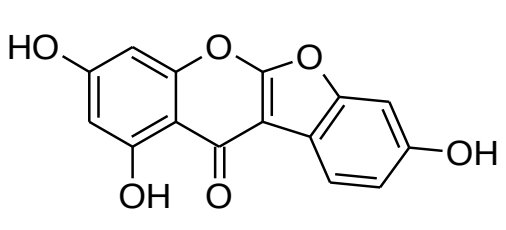
Από το υπό μελέτη εκχύλισμα απομονώθηκαν επίσης τρεις μεταβολίτες οι οποίοι ανήκουν στα παράγωγα των φαινυλαλκοολών. Πρόκειται για τις ουσίες: ***β*-D-γλυκοπυρανοσυλοβενζυλική αλκοόλη** (Llo 6), **O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-φαινυλαιθανόλη** (Llo 7) και **(*2S,3S*)-3-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-1-φαίνυλο-2,3-βουτανεδιόλη** (Llo 8).



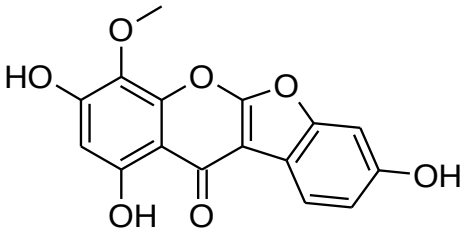
Οι μεταβολίτες **Llo 6** και **Llo 7** συναντώνται συχνά σε φυτικούς οργανισμούς. Σε πειράματα που έγιναν σε νευρωνικά κύτταρα εγκεφάλου σε ποντίκια η ουσία **Llo 6** έδειξε νευροπροστατευτική δράση[248] ενώ σε άλλα πειράματα η ίδια ουσία εμφάνισε αντινεοπλασματική δράση[249]. Όσον αφορά την ουσία **Llo 7** βιολογικές μελέτες έδειξαν ότι διαθέτει νευροπροστατευτική δράση[249], ηπατοπροστατευτική δράση[250] καθώς και ανασταλτική δράση επί των ενζύμων κυκλοοξυγενάση I και II[251]. Τέλος ο μεταβολίτης **Llo 8** έχει αναφερθεί μόνο στο φυτό *Chrysanthemum indicum* L. (Compositae)[252], ενώ **απομονώνεται για πρώτη φορά από φυτά της οικογένειας Fabaceae**.

Τα φλαβονοειδή συνιστούν μια μεγάλη κατηγορία φυσικών προϊόντων ευρέως διαδεδομένη στα φυτά και κυρίως σε αυτά της οικογένειας Fabaceae. Η παρούσα φυτοχημική μελέτη αποκάλυψε την ύπαρξη 8 τέτοιων προϊόντων στο φυτό *Lotus lingisiliquosus* εκ των οποίων τα δύο είναι παράγωγα κουμαρονοχρωμόνης ενώ τα υπόλοιπα 6 είναι γλυκοσίδες φλαβονολών.

Οι κουμαρονοχρωμόνες αποτελούν μια μικρή ομάδα φυσικών προϊόντων (περίπου 20) με κύρια παρουσία στην οικογένεια Fabaceae, ενώ έχουν αναφερθεί και στις οικογένειες Chemopodiaceae και Iridaceae[253]. Τα δύο παράγωγα κουμαρονοχρωμόνης που απομονώθηκαν είναι η **5,7,4΄-τριυδρόξυ-κουμαρονοχρωμόνη** ή **Λουπιναλμπίνη Α** (Llo 20) και η **8-μεθόξυ-5,7,4΄-τριυδρόξυ-κουμαρονοχρωμόνη** (Llo 21).



5,7,4΄-τριυδρόξυ -κουμαρονοχρωμόνη (Llo 20)

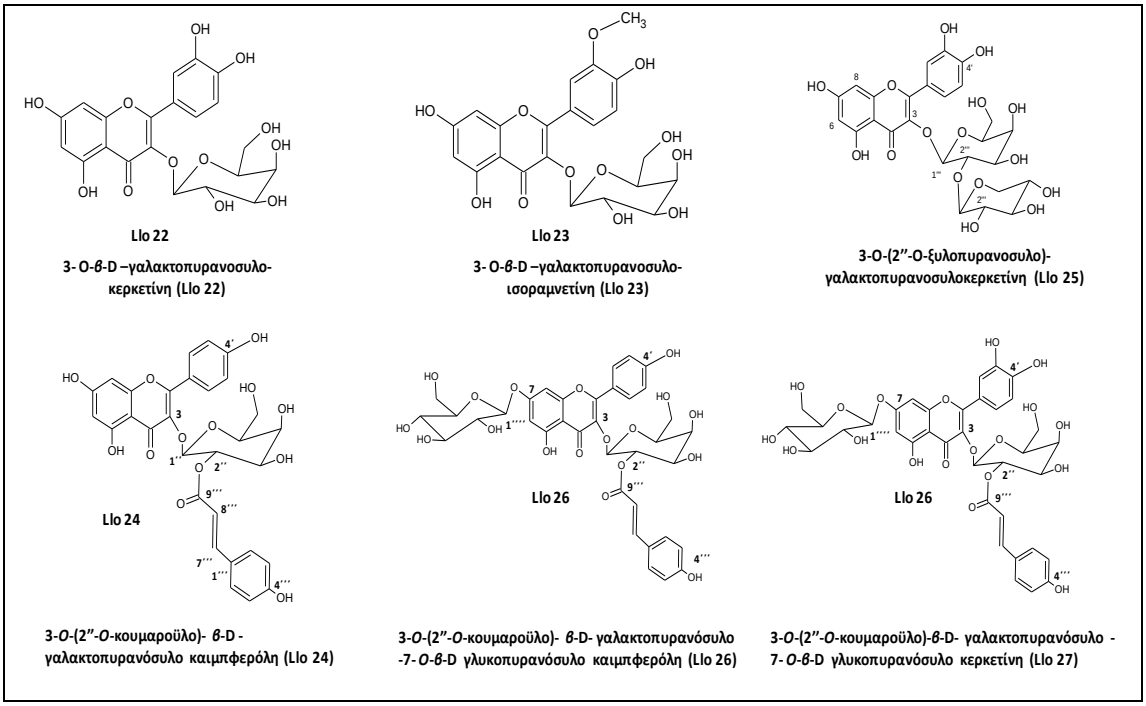


5,7,4΄-τριυδρόξυ-8-μεθόξυκουμαρονοχρωμόνη (Llo 21)

Η **Λουπιναλμπίνη Α** απομονώθηκε πρώτη φορά από τις ρίζες του φυτού *Lupinus albus* (Fabaceae) ενώ έχει αναφερθεί και στο *Iris pseudocorus* (Iridaceae)[254]. Σε βιολογικές μελέτες η ουσία αυτή εμφάνισε οιστρογονική δράση[255,256]. **Ο**

μεταβολίτης Llo 21 απομονώνεται για πρώτη φορά και αποτελεί νέο φυσικό προϊόν.

Στους γλυκοσίδες φλαβονολών ανήκουν οι ουσίες: **3-*O*-*β*-D -γαλακτοπυρανόσυλο κερκετίνη** (Υπερίνη ή Υπεροσίδης) (Llo 22), **3-*O*-*β*-D-γαλακτοπυρανόσυλο ισοραμνετίνη** (Llo 23), **3-*O*-(2''-*O*-κουμαρόϋλ)-*β*-D-γαλακτοπυρανόσυλο καιμπφερόλη** (Llo 24), **3-O-(2''-O-ξυλοπυρανοσυλο)-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο κερκετίνη** (Llo 25), **3-(2''-*O*-κουμαρόϋλ)-*β*-D-γαλακτοπυρανόσυλο-7-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη** (Llo 26) και **3-(2''-*O*-κουμαρόϋλο)-*β*-D-γαλακτοπυρανόσυλο-7-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκερκετίνη** (Llo 27)



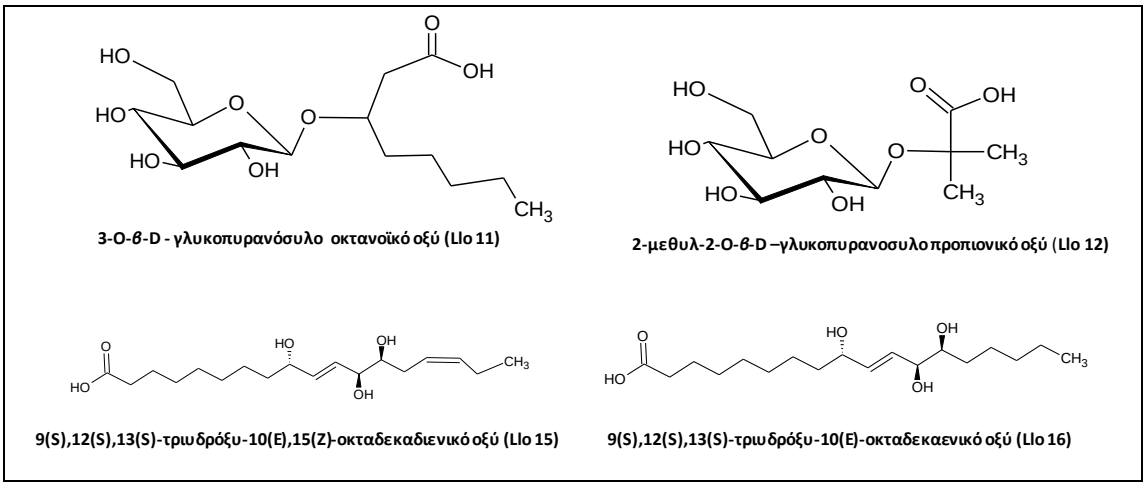
Ο **Υπεροσίδης** απαντάται σε πολλά φυτά τόσο της οικογένειας Fabaceae όσο και άλλων οικογενειών. Πρόκειται για έναν μεταβολίτη με πλήθος βιολογικώς δράσεων γεγονός που συμπεραίνεται και από τον μεγάλο αριθμό βιβλιογραφικών αναφορών. Πιο συγκεκριμένα βρίσκει εφαρμογή έναντι διαφόρων αλλεργιών, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, σε καρδιαγγειακές ασθένειες, στην οστεοπόρωση, σε διάφορες ασθένειες νευρολογικής φύσεως κ.α.[257,258,259,260].

Ο μεταβολίτης **Llo 23** απομονώθηκε αρχικά από το φυτό *Sempervivum marmoreum* (Crassulaceae) ενώ έχει αναφερθεί και σε πολλά άλλα είδη. Στην οικογένεια

Fabaceae βρέθηκε σε είδη του γένους *Anthillis* και Astragalus[261,262,263,264]. Δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις.

Οι μεταβολίτες Llo 24, Llo 25, Llo 26 και Llo 27 αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα.

Τα υδροξυλιπαρά οξέα απαντώνται πολύ συχνά στους φυτικούς οργανισμούς. Από το υπό μελέτη εκχύλισμα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τέσσερα τέτοια παράγωγα τα δύο εκ των οποίων είναι γλυκοσιδικά παράγωγα οξέων. Πρόκειται για τους μεταβολίτες: **3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοξυοκτανοϊκό οξύ** (Llo 11), **2-μέθυλο-2-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοξυπροπιονικό οξύ** (Llo 12), **9(S),12(S),13(S)-τριυδροξυ-10(E),15(Z)-οκταδεκαδιενικό οξύ (φουλγιδικό οξύ)** (Llo 15) και **9(S),12(S),13(S)-τριυδρόξυ-10(E)-οκταδεκαενικό οξύ (πινελικό οξυ)** (Llo 16).

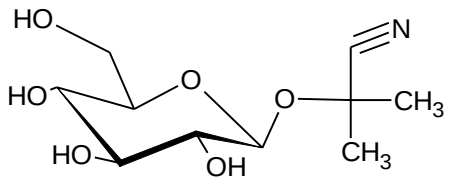


Οι μεταβολίτες Llo 11 και Llo 12 απομονώνονται πρώτη φορά από φυτικούς οργανισμούς.

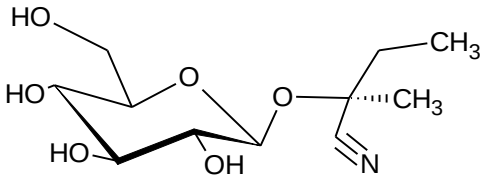
Τόσο το **φουλγιδικό οξύ** όσο και το **πινελικό οξυ** (Llo 16) απομονώθηκαν αρχικά από το φυτό του ρυζιού το οποίο είχε προσβληθεί από το μύκητα *Pyricularia oryzae* και αποτελούσαν (μαζί με άλλα C-18 ακόρεστα λιπαρά οξέα) την απάντηση του φυτού στην προσβολή αυτή[265]. Το **φουλγιδικό οξύ** απομονώθηκε επίσης από το φυτό *Rudbeckia fulgida* (Asteraceae)[266] και *Corchorus olitorius* (Tiliaceae)[267], ενώ το **πινελικό οξυ** βρέθηκε στις ρίζες του *Bupleurum falcatum* (Apiaceae)[268], στους βλαστούς του *Rourea minor* (Connaraceae)[269] καθώς και στο φυτό *Pinellia ternate* (Araceae)[270]**. Η παρουσία των δύο αυτών μεταβολιτών αναφέρεται για πρώτη φορά σε φυτά της οικογένειας Fabaceae.**

Όσον αφορά τις βιολογικές δράσεις το **φουλγιδικό οξύ** βρέθηκε να αναστέλλει την παραγωγή λιποπολυσακχαριτών σε καλλιέργειες μικροφάγων ποντικιού[268]. Το δε **πινελικό οξυ** διαθέτει επικουρική δράση (ενισχύει τη δράση) του ρινικά χορηγούμενο εμβολίου της γρίπης HV. Η στερεοχημεία στον C-9 είναι πολύ σημαντική για την εκδήλωση της δράσης αυτής. Τα 9(*S*)-στερεοεισομερή παρουσιάζουν πολύ ισχυρότερη δράση από τα 9(*R*)-ανάλογα. Από τα 9(*S*) πιο δραστικά είναι αυτά τα οποία έχουν (*S*) διαμόρφωση στον C-13 ενώ η στερεοχημεία του C-12 δεν φαίνεται να επηρεάζει την δραστικότητα του μορίου[271,272].

Επιπλέον, από το μεθανολικό εκχύλισμα απομονώθηκαν και δύο κυανυδρινικοί γλυκοσίδες, η **λιναμαρίνη** (Llo 13) και η **επιλοταουστραλίνη** (Llo 14). Οι μεταβολίτες αυτοί αποτελούν χαρακτηριστικές ουσίες με αναφορές σε πολλά είδη του γένους Lotus[273,274], ενώ **η Λιναμαρίνη αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη του εκχυλίσματος**.

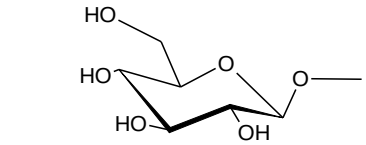


Λιναμαρίνη (Llo 13)

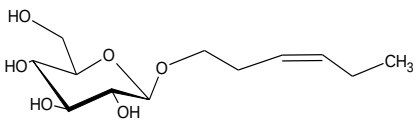


Επιλοταουστραλίνη (Llo 14)

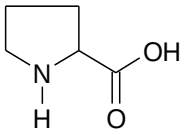
Τέλος από το υπό μελέτη εκχύλισμα απομονώθηκαν επίσης 2 απλά γλυκοσιδικά παράγωγα, 2 νουκλεοσίδες, ένα αμινοξύ και μία τριτερπενική σαπωνίνη. Πρόκειται για τις ουσίες: **1-*O*-μεθυλο-*β*-D-γλυκοπυρανόση** (Llo 9), ***β*-D-γλυκοπυρανοσίδης της 3(*Z*)-εξενόλης** (Llo 10), **Αδενοσίνη** (Llo 17), **Ουριδίνη** (Llo 18), **Προλίνη** (Llo 19), και **Αζουκισαπωνίνη V** (Llo 28).



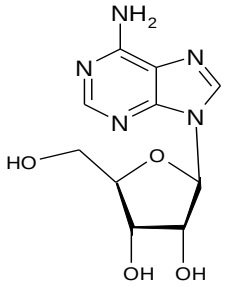
1-O-μεθυλο-*β*-D-γλυκοπυρανόση (Llo 9)



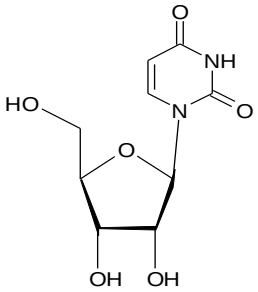
O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-3(*Z*)-εξενόλη (Llo 10)



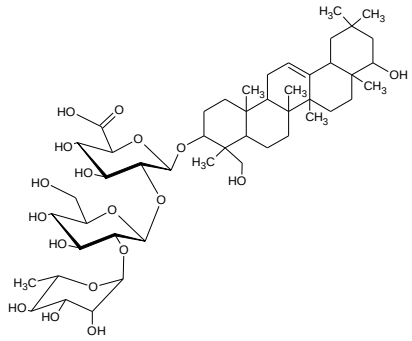
Προλίνη (Llo 19)



Αδενοσίνη (Llo 17)



Ουριδίνη (Llo 18)



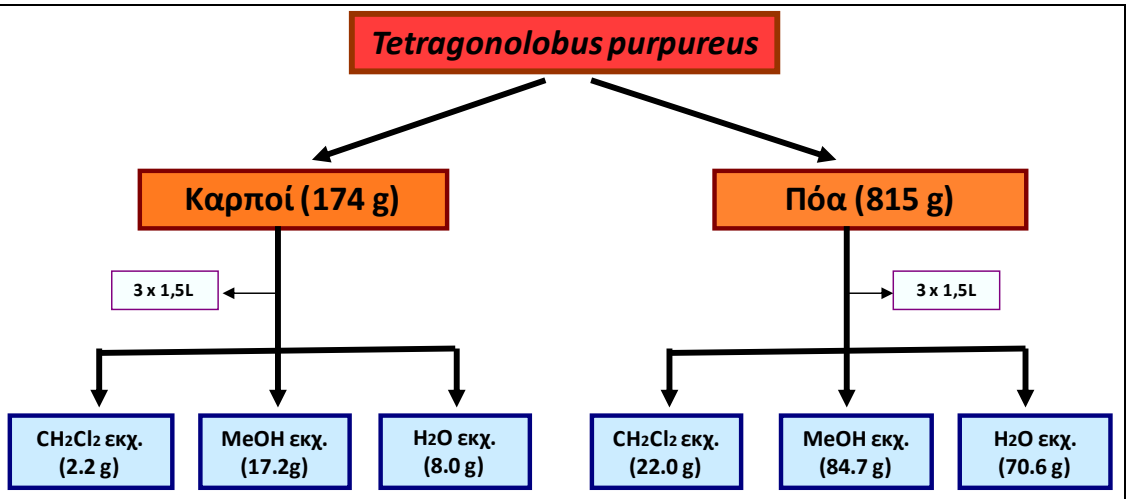
Αζουκισαπωνίνη (Llo 28)

Ο μεταβολίτης **Llo10** απομονώθηκε πρώτη φορά από το φυτό *Epimedium grandiflorum var. Thunbergianum* (Berberidaceae)[275] ενώ στη συνέχεια βρέθηκε και σε πολλά άλλα είδη. Παρόλα αυτά η **παρουσία του σε φυτά της οικογένειας Fabaceae αναφέρεται για πρώτη φορά** ενώ δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις τις ουσίας.

Η σαπωνίνη **Αζουκισαπωνίνη V** έχει απομονωθεί από τα φυτά *Phaseolus vulgaris*[276] και *Melilotus officinalis*[277] της οικογένειας Fabaceae. Σε πειράματα βιολογικής δράσης παρουσίασε αντιφλεγμονώδη δράση με σημαντική αναστολή της μετακίνησης των λευκοκυττάρων σε δόση 6 mg/rat. (Μεγαλύτερη από την Ασπιρίνη)[278]. Επίσης έδειξε σημαντική ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό των HeptG2 κυττάρων και των Caco-2 κυττάρων. Η ίδια έρευνα δείχνει πως η αντικατάσταση της ραμνόζης από τη γλυκόζη μειώνει τη δράση της σαπωνίνης και στις δύο κατηγορίες κυττάρων ενώ η μεθυλίωση του καρβοξυλίου του γλυκουρονικού οξέως μειώνει την δράση έναντι των Caco-2 κυττάρων[279].

6.3.4 Tetragonolobus purpureus

Η συλλογή του **εδώδιμου φυτού *Tetragonolobus purpureus*** πραγματοποιήθηκε στο τέλος Απριλίου στο χωριό Ζαρός της Κεντρικής Κρήτης (υψ. 350-450 μ). Μετά την διαλογή και ξήρανση του φυτικού οργανισμού, διαχωρίστηκαν οι καρποί από τα υπέργεια τμήματα του. Ακολούθησε η κονιοποίηση χωριστά των καρπών και των υπέργειων τμημάτων του φυτού και προέκυψαν σκόνες βάρους 174 και 815 g, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, ακολούθησε εκχύλιση του φυτικού υλικού με CH_2Cl_2, MeOH και H_2O. Τα βάρη των εκχυλισμάτων φαίνονται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα (Σχήμα 6.3.8) ενώ η διαδικασία εκχύλισης περιγράφεται στο Κεφάλαιο 5.

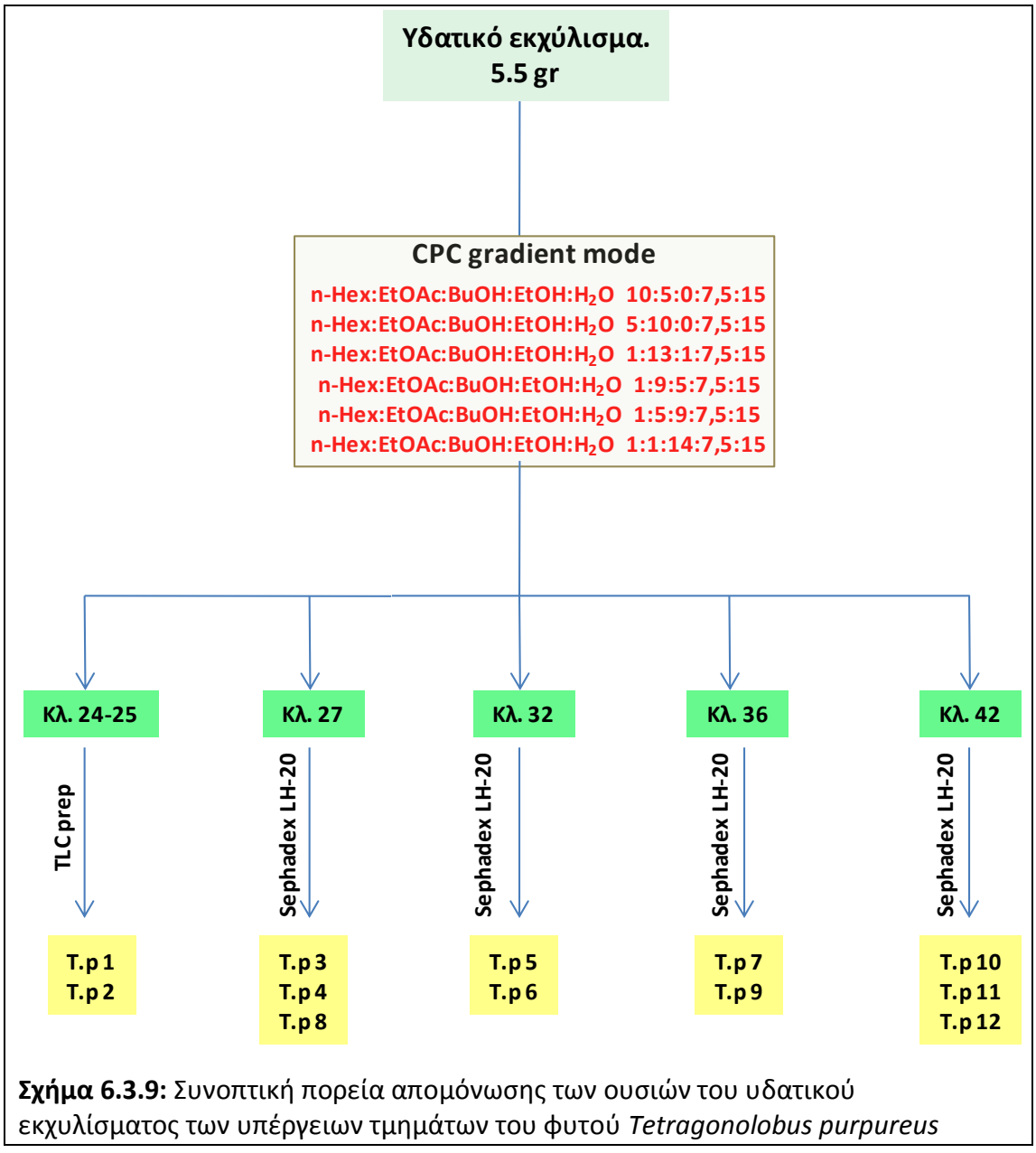


Σχήμα 6.3.8: Αρχική επεξεργασία του φυτού *Tetragonolobus purpureus*

Τα παραπάνω εκχυλίσματα ελέχθησαν τόσο ως προς το χημικό τους περιεχόμενο, με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), όσο και ως προς την πιθανή βιολογική δράση. Όλα τα αποτελέσματα των ελέγχων αναφέρονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 5 . Με βάση τις μελέτες αυτές αποφασίστικε η περαιτέρω ανάλυση του υδατικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού το οποίο έδειξε αξιόλογες αντιοξειδωτικές και αντιμεταλλαξιογόνες ιδιότητες.

Υδατικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων

Ο διαχωρισμός και απομόνωση των ουσιών του υδατικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Tetragonolobus purpureus* πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια: α) κλασμάτωση του εκχυλίσματος με Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή(CCC) και β) απομόνωση των ουσιών από τα κλάσματα του CCC με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Σχήμα 6.3.9).



Σχήμα 6.3.9: Συνοπτική πορεία απομόνωσης των ουσιών του υδατικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Tetragonolobus purpureus*

α) Κλασμάτωση του Υδατικού Εκχυλίσματος με Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή(CCC)

Η παρουσία πολλών μεταβολιτών σε παρόμοιες ποσότητες μας οδήγησε στην επιλογή διφασικού συστήματος και μεθόδου με κριτήριο κυρίως την καλή κλασμάτωση του μείγματος και όχι τόσο την απομόνωση τους σε καθαρή μορφή. Προκειμένου να κλασματώσουμε καλύτερα το εκχύλισμα και να διευκολύνουμε έτσι την περεταίρω ανάλυση, εφαρμόσαμε τη μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient mode).

- *Επιλογή της κατάλληλης σειράς διφασικών συστημάτων*

Για την δημιουργία της σειράς των διφασικών συστημάτων λάβαμε υπόψη τόσο την φύση του εκχυλίσματος όσο και τις ουσίες που αυτό εμπεριέχει. Ένας πρώτος έλεγχος του εκχυλίσματος με TLC και με HPLC-UV-DAD έδειξε ότι η βασική κατηγορία ουσιών που εμπεριέχονται σε αυτό είναι τα φλαβονοειδή. Με βάση το γεγονός αυτό αναζητήσαμε διφασικά συστήματα που χρησιμοποιούνται σε διαχωρισμούς φλαβονοειδών. Λαμβάνοντας υπόψη τις προηγούμενες μελέτες αναζήτησης συστημάτων για τα φυτά *Vicia faba, Lotus edulis* και *Lotus longisiliquosus* (εκχυλίσματα πλούσια σε φλαβονοειδή) συμπεράναμε ότι τα καλύτερα αποτελέσματα προέρχονταν από διφασικά συστήματα που βασίζονται στους διαλύτες EtOAc, BuOH και H_2O. Έτσι έχοντας ως βασικά συστατικά των διφασικών συστημάτων τους διαλύτες αυτούς, δημιουργήσαμε και ελέγξαμε τρις σειρές διφασικών συστημάτων:

- n-Hex/EtOAc/n-BuOH/ EtOH/ H_2O x/y/z/7,5/15
- n-Hex/EtOAc/n-BuOH/ MeOH/ H_2O x/y/z/7,5/15
- n-Hex/EtOAc/n-BuOH/ AcN/ H_2O x/y/z/7,5/15

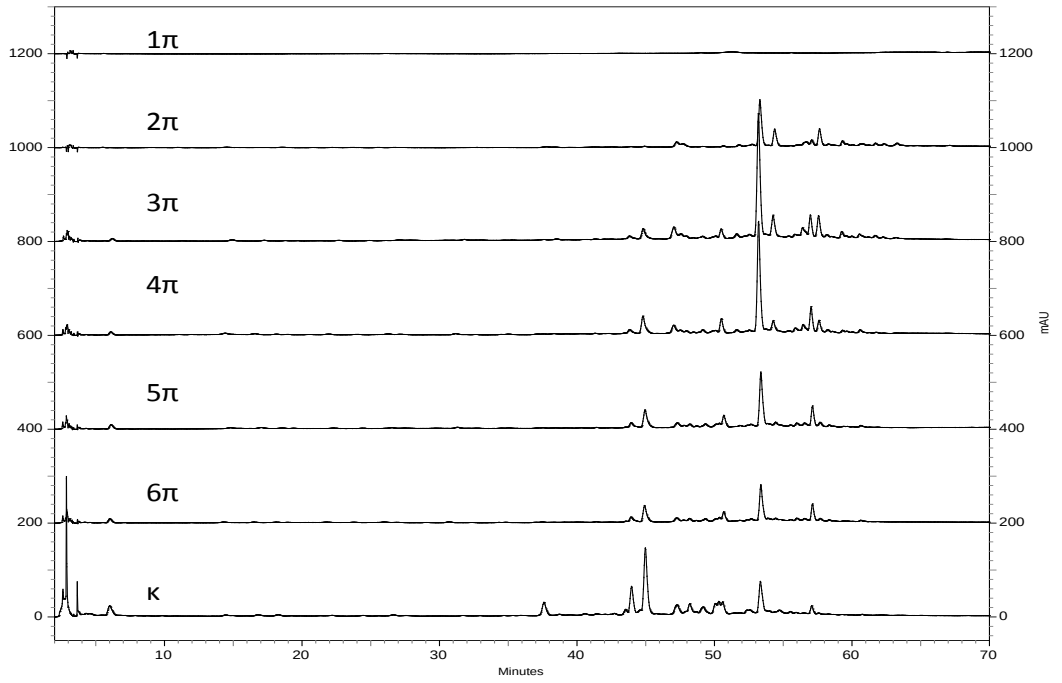
Στις παραπάνω σειρές διφασικών συστημάτων πραγματοποιήθηκαν οι απαιτούμενοι έλεγχοι, δηλαδή αρχικά έλεγχος διαλυτότητας του εκχυλίσματος και διαχωρισμού των φάσεων και στη συνέχεια μελέτη της κατανομής των ουσιών στις φάσεις του κάθε συστήματος, τόσο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας όσο και με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Με βάση τους παραπάνω ελέγχους αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε για το διαχωρισμό την 1^{η}κατηγορία διφασικών

συστημάτων, ενώ τα διφασικά συστήματα που την αποτελούν αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.3.18).

Πίνακας 6.3.18: Σειρά διφασικών συστημάτων για την επεξεργασία του υδατικού εκχυλίσματος του *T. purpureus* με gradient mode CCC.

ΚΩΔ.	ΔΙΑΛΥΤΕΣ	ΑΝΑΛΟΓΙΑ
Σ1	n-Hex-EtOAc-n-BuOH: EtOH: H_2O	10 / 5 /0/ 7,5 / 15
Σ2	n-Hex-EtOAc-n-BuOH: EtOH: H_2O	5 / 10 /0/ 7,5 / 15
Σ3	n-Hex-EtOAc-n-BuOH: EtOH: H_2O	1 / 13 /1/ 7,5 / 15
Σ4	n-Hex-EtOAc-n-BuOH: EtOH: H_2O	1 / 9 /5/ 7,5 / 15
Σ5	n-Hex-EtOAc-n-BuOH: EtOH: H_2O	1 / 5 /9/ 7,5 / 15
Σ6	n-Hex-EtOAc-n-BuOH: EtOH: H_2O	1 / 1 /14/ 7,5 / 15

Ο έλεγχος των παραπάνω συστημάτων έδειξε μια βαθμιδωτή μεταβολή στην κατανομή των ουσιών στις φάσεις του κάθε συστήματος. Τα πιο άπολα συστήματα έδειξαν καλή διαχωριστική ικανότητα σε ουσίες της άπολης περιοχής του χρωματογραφήματος ενώ όσο προχωρούσαμε σε πιο πολικά συστήματα κατανέμονταν καλύτερα και οι πιο πολικές ουσίες (Εικόνα 6.3.3).



Εικόνα 6.3.3: Χρωματογραφική απεικόνιση της μεταβολής στην κατανομή των ουσιών κατά την επεξεργασία με CCC του υδατικού εκχυλίσματος του *T. purpureus* με τη μέθοδο των συνεχόμενων συστημάτων.

Προκειμένου να ελέγξουμε την ικανότητα των συστημάτων να διατηρήσουν την διφασικότητα τους μέσα στη στήλη, κατά την μετάβαση από το ένα στο άλλο όταν εφαρμόζονται στη σειρά, προχωρήσαμε στην προσομοίωση διαχωρισμού (πιο αναλυτικά η δοκιμή αυτή περιγράφεται στη σελίδα ?). Η παραπάνω δοκιμή για την υπό μελέτη σειρά διφασικών συστημάτων (Σ1 έως Σ6) έδειξε ότι κατά την μετάβαση από το σύστημα Σ1 (με διαδοχικές προσθαφαιρέσεις της πάνω φάσης) στο σύστημα Σ6 ο διαχωρισμός των φάσεων ήταν ικανοποιητικός. Επιπλέον, μελετήσαμε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης τις μεταβολές στην ένταση των κορυφών κατά την μετάβαση από το ένα διφασικό σύστημα στο επόμενο και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 6.3.3.

- *Εκτέλεση διαχωρισμού*

Για τον διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε το όργανο υδροστατικού τύπου CPC KROMATON χρησιμοποιώντας παρασκευαστική στήλη των 1000 ml, αντλία LabAlliance με όριο πίεσης τα 50 bar και αυτόματος συλλέκτης Buchi B-684.. Αρχικά πληρώθηκε η στήλη με την κάτω φάση του συστήματος Σ1. Στη συνέχεια τέθηκε η στήλη σε περιστροφή (650 rpm) και διοχετεύθηκε η πάνω φάση του ίδιου συστήματος. Μέτα την εξισορρόπηση του διφασικού συστήματος έγινε η εισαγωγή του εκχυλίσματος βάρους 5.5 gr. Αφού συλλέχτηκαν 35 κλάσματα των 10 ml αλλάξαμε την κινητή φάση από Σ1π σε Σ2π. Μετά από 59 κλάσματα (των 10 ml) διοχετεύθηκε η πάνω φάση του συστήματος Σ3 (Σ3π) και συλλέχτηκαν ακόμη 41 κλάσματα. Κατόπιν αλλάξαμε την κινητή φάση από Σ3π σε Σ4π. Μετά την συλλογή 50 κλασμάτων διοχετεύθηκε η πάνω φάση του συστήματος Σ5 για τα επόμενα 50 κλάσματα. Στη συνέχεια άλλαξε η κινητή φάση από Σ5π σε Σ6π και συλλέχτηκαν 25 κλάσματα. Στο σημείο αυτό έγινε αναστροφή των φάσεων χρησιμοποιώντας πια ως κινητή την κάτω φάση του συστήματος Σ6 όποτε συλλέχτηκαν ακόμη 29 κλάσματα. Όλη η πορεία του διαχωρισμού περιγράφεται εν συντομία στον πίνακα 6.3.19.

Πίνακας 6.3.19: Πορεία διαχωρισμού του υδατικού εκχυλίσματος του *T. purpureus* με τη χρήση της τεχνικής CCC και τη μέθοδο των συνεχόμενων συστημάτων.

Στατική Φάση	Κινητή Φάση	Κλάσματα (των 10ml)
Σ2κ	Σ1π	35
Σ*	Σ2π	59
Σ*	Σ3π	41
Σ*	Σ4π	50
Σ*	Σ5π	50
Σ*	Σ6π	25
Αναστροφή Φάσεων		
Σ6π	Σ6κ	29
Ροή: 10ml/min		
Περιστροφή 650 rpm		

Συνολικά συλλέχτηκαν 289 κλάσματα των 10 ml τα οποία, μετά από έλεγχο με TLC, συνενώθηκαν για να προκύψουν τελικά 61 κλάσματα τα βάρη των οποίων παρουσιάζονται στον πίνακα 6.3.20. Η ροή των διαλυτών και η περιστροφή της στήλης διατηρήθηκαν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας στα 10 ml/min και 650 rpm αντίστοιχα.

Ο διαχωρισμός διήρκησε περίπου 7.5 ώρες και καταναλώθηκαν περίπου 4.5 Lt διαλυτών εκ των οποίων το 40% αποτελούσε το νερό.

Πίνακας 6.3.20: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την του υδατικού εκχυλίσματος του *T. purpureus* με gradient mode CCC.

Κλ.	Βάρος (mg)	Κλ.	Βάρος (mg)	Κλ.	Βάρος (mg)	Κλ.	Βάρος (mg)
Κλ.1	2,7	Κλ.17	14,1	Κλ.33	47,8	Κλ.49	188,9
Κλ.2	16,2	Κλ.18	13,2	Κλ.34	106,7	Κλ.50	190,1
Κλ.3	6,8	Κλ.19	10,1	Κλ.35	90,6	Κλ.51	272,9
Κλ.4	7,5	Κλ.20	9,6	Κλ.36	56,8	Κλ.52	31,5
Κλ.5	4,7	Κλ.21	7,2	Κλ.37	35,9	Κλ.53	8,7
Κλ.6	4,9	Κλ.22	6,7	Κλ.38	35,1	Κλ.54	39,5
Κλ.7	4	Κλ.23	9	Κλ.39	42,7	Κλ.55	34
Κλ.8	3	Κλ.24	12,3	Κλ.40	492,6	Κλ.56	274,2
Κλ.9	2,1	Κλ.25	14,5	Κλ.41	541,8	Κλ.57	326,4
Κλ.10	3	Κλ.26	32,8	Κλ.42	96,4	Κλ.58	285,5
Κλ.11	3,8	Κλ.27	23	Κλ.43	32,5	Κλ.59	272,6
Κλ.12	6,3	Κλ.28	20,3	Κλ.44	80,3	Κλ.60	21
Κλ.13	3,8	Κλ.29	34,8	Κλ.45	287,9	Κλ.61	27,6
Κλ.14	4,1	Κλ.30	50,6	Κλ.46	249,4		
Κλ.15	1,6	Κλ.31	202	Κλ.47	252,5		
Κλ.16	3,2	Κλ.32	39,3	Κλ.48	218,5		

Ο χρωματογραφικός έλεγχος TLC στα κλάσματα του παραπάνω διαχωρισμού έδειξε ότι αυτά αποτελούταν από μικρό αριθμό ουσιών γεγονός που δηλώνει επιτυχημένη αρχική κλασμάτωση του εκχυλίσματος.

γ) Απομόνωση των ουσιών από τα κλάσματα του CCC με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού και παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας

Προκειμένου να διαχωρίσουμε τις ουσίες και να τις παραλάβουμε σε καθαρή μορφή ακολούθησε επεξεργασία των επιλεγόμενων κλασμάτων κυρίως με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Ως πληρωτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη Sephadex LH-20 ενώ ως διαλύτης έκλουσης η μεθανόλη. Επίσης, για την ανάλυση μερικών κλασμάτων χρησιμοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε υάλινες πλάκες επιστρωμένες με γέλη πυριτίου ενώ το σύστημα ανάπτυξης αποτελούσαν κυρίως οι διαλύτες διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη σε διάφορες αναλογίες.

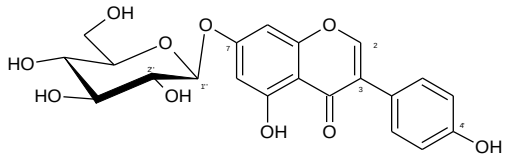
Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 6 κλάσματα εκ των οποίων 4 με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και 2 με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Συνολικά από την ανάλυση του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Tetragonolobus purpureus* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 12 δευτερογενείς μεταβολίτες εκ των οποίων 8 φλαβονοειδή, ένα φαινολοξύ, ένα αμινοξύ, μία κυκλιτόλη και ένας νουκλεοσίδης. Αναλυτικότερα οι ουσίες που απομονώθηκαν από το κάθε κλάσμα του CCC και η χρωματογραφκή μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.3.21).

Πίνακας 6.3.21: Ουσίες που απομονώθηκαν κατά τη επεξεργασία του του υδατικού εκχυλίσματος του *T. Purpureus.*

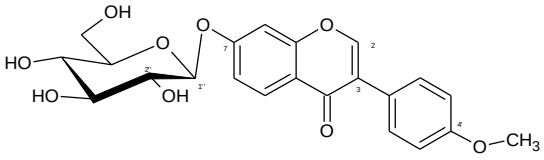
Κλάσμα		**Απομονωμένες ουσίες**
Κλ. 24-25	**Prep TLC**	**7-*O*-*β*-D -γλυκοπυρανοσυλογεντισεϊνη** (T.p 1)
		7-*O*-*β*-D -γλυκοπυρανοσυλοφορμονετίνη (T.p 2)
Κλ. 27	**Sephadex LH-20**	**7-*O*-*β*-D -γλυκοπυρανοσυλολουτεολίνη** (T.p 3)
		7-*O*-*β*-D -γλυκοπυρανοσυλοδιοσμετίνη (T.p 4)
		2′-*O*- *β*-D-γλυκοπυρανοσυλοισοετίνη (T.p 8)
Κλ. 32	**Sephadex LH-20**	**7-*O*-(2′′-*β*-D-απιοφουρανοσυλο)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη** (T.p 5)

		7-*O*-[2′′-(5′′′-*O*-ακετυλο)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο]-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοδιοσμετίνη (T.p 6)
Κλ. 36	**Sephadex LH-20**	**7-O-[2′′-(5′′′-*O*-ακετυλο)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο]-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-3′-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη** (T.p 7)
		Ουριδίνη (T.p 9)
Κλ. 42	**Sephadex LH-20**	**5-O -*β*-D -ξυλοπυρονόσυλο γεντισικό οξύ (T.p 10)**
		Πινιτόλη (T.p 11)
		Προλίνη (T.p 12)

Από τα οκτώ φλαβονοειδή που απομονώθηκαν από το φυτό δύο είναι γλυκοσίδες ισοφλαβονών. Πρόκειται για τους μεταβολίτες: **7-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο γεντισεϊνη (Γενιστίνη)** (T.p 1) και **7-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοφορμονετίνη (Ονονίνη)** (T.p 2).



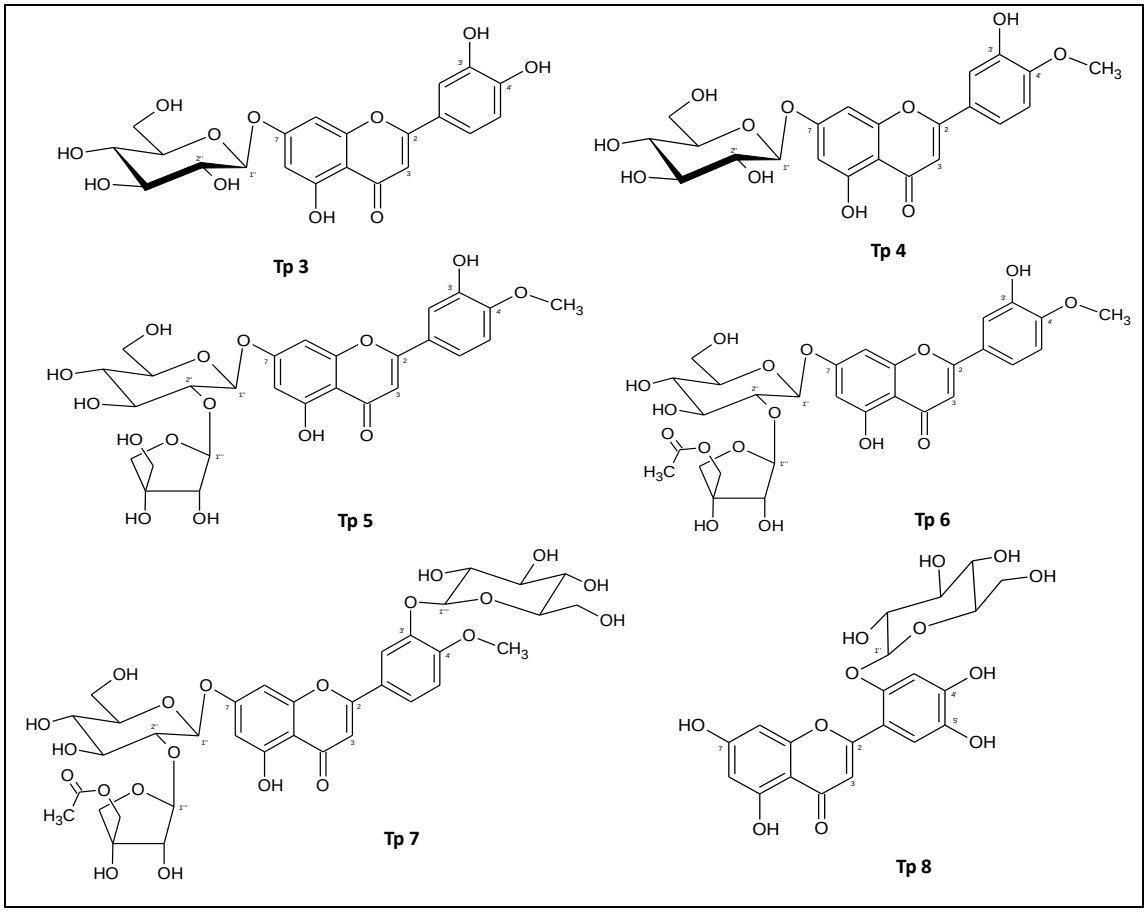
Tp 1



Tp 2

Και οι δύο αυτοί μεταβολίτες απαντώνται συχνά στα εδώδιμα φυτά της οικογένειας Fabaceae. Η **Γενιστίνη** ανήκει στην κατηγορία των φυτοοιστρογόνων, ενώ διαθέτει επιπλέον, καλή αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση[280,281,282,283]. Η **Ονονίνη** εμφάνισε, επίσης, οιστρογονική και αντιοξειδωτική δράση[284,285].

Από το υπό μελέτη εκχύλισμα απομονώθηκαν επίσης, έξι γλυκοσίδες φλαβονών εκ των οποίων πέντε έχουν ως άγλυκο την διοσμετίνη ενώ ένας την ισοετίνη. Πρόκειται για τις ουσίες: **7-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλολουτεολίνη** (T.p 3) (Κυναροσίδης), **7-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοδιοσμετίνη** (T.p 4), **7-*O*-(2′′-*β*-D-απιοφουρανοσυλο)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοδιοσμετίνη** (T.p 5), **7-*O*-[2′′-(5′′′-*O*-ακετυλο)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο]-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοδιοσμετίνη** (T.p 6), **7-O-[2′′-(5′′′-*O*-ακετυλο)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο]-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-3′-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοδιοσμετίνη** (T.p 7) και **2′-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοισοετίνη** (T.p 8).



Ο **Κυναροσίδης** (**Τ.p 3**) αποτελεί συχνά υπαντώμενο μεταβολίτη και έχει απομονωθεί από διάφορα φυτά όπως *Ferula varia, F. Foetida*[286]*, Campanula persicifolia, C. rotuntifolia*[287]*, Phyllostachys nigra*[288]*, Cynara scolimus*[289] κ.α. Η ουσία αυτή έδειξε σημαντική ανασταλτική δράση (IC50 = 0,45 και 0,99 μM αντίστοιχα) έναντι της ρεδουκτάσης της αλδόζης, ενός ένζυμου το οποίο καταλύει την μετατροπή της γλυκόζης σε σορβιτόλη. Η σορβιτόλη δεν διέρχεται εύκολα την κυτταρική μεμβράνη και η συσσώρευση της στον ενδοκυττάριο χώρο ενοχοποιείται για την εκδήλωση χρόνιων παθήσεων που συνοδεύουν τον διαβήτη, όπως είναι ο καταρράκτης[290]. Επίσης μειώνει τα επίπεδα χολυστερόλης στο αίμα και λόγο της δράσεως αυτής χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της υπερλιπιδεμίας, της αθηροσκλήρωσης και διαφόρων καρδιαγγειακών νόσων[291].

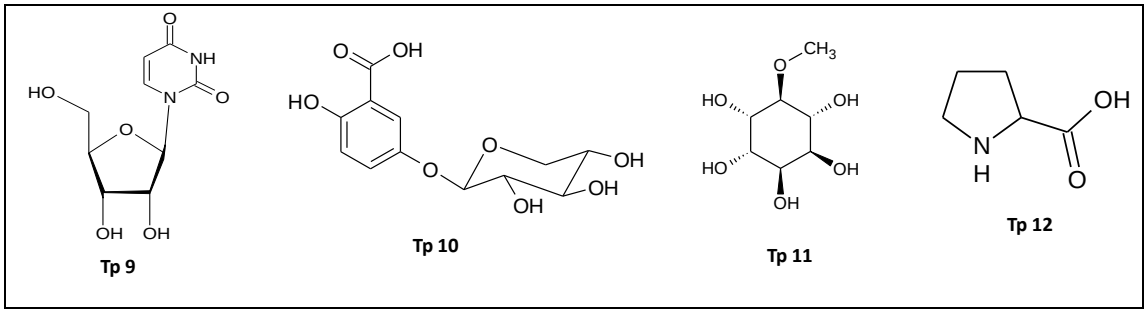
Ο μεταβολίτης **Τ.p 4** έχει επίσης απομονωθεί από αρκετά φυτά[292,293] ενώ στην οικογένεια Fabaceae βρέθηκε στα σπέρματα των *Ammopiptanthus mongolicus* και *Ammopiptanthus nanus*[294]. Επίσης έχει αναφερθεί και στο βρυόφυτο *Bryum*

cupillare[295]. Διαθέτει οιστρογονική δράση[296], αναστέλλει την ρεδουκτάση της αλδόζης καθώς και την παραγωγή ΝΟ από τα περιτοναϊκά κύτταρα ποντικιού[297].

Οι μεταβολίτες Τ.p 5, Τ.p 6 και Τ.p 7 απομονώνονται πρώτη φορά από φυτικούς οργανισμούς και αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα.

Τέλος ο μεταβολίτης **Τ.p 8** έχει βρεθεί ακόμα μία φορά από το φυτό *Heywoodiella oligocephala* (Asteraceae)[145] ενώ **απομονώνεται πρώτη φορά από φυτά της οικογένειας Fabaceae**. Δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις.

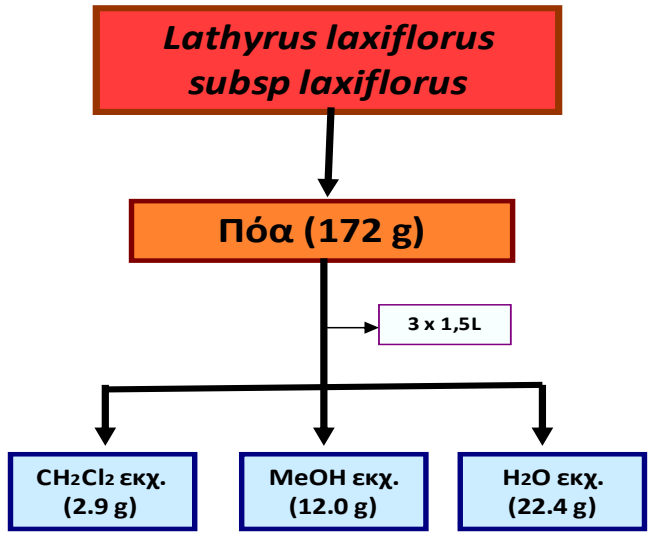
Από το υπό μελέτη εκχύλισμα απομονώθηκαν επίσης ένας νουκλεοσίδης, ένα γλυκοσιδικό παράγωγο φαινολικού οξέως, μία κυκλιτόλη και ένα αμινοξύ. Πρόκειται για τις ουσίες: **Ουριδίνη** (Τ.p 9), **5-O-*β*-D -ξυλοπυρονόσυλο γεντισικό οξύ** (Τ.p 10), **Πινιτόλη** (Τ.p 11) και **Προλίνη** (Τ.p 12).



Από τους παραπάνω μεταβολίτες οι **Τ.p 9**, **Τ.p 10** και **Τ.p 12** έχουν απομονωθεί ξανά, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, από το φυτό *Lotus longisiliquosus*. Η ουσία **Τ.p 11** απαντάτε συχνά σε φυτικούς οργανισμούς.

6.3.5 Lathyrus laxiflorus subsp laxiflorus

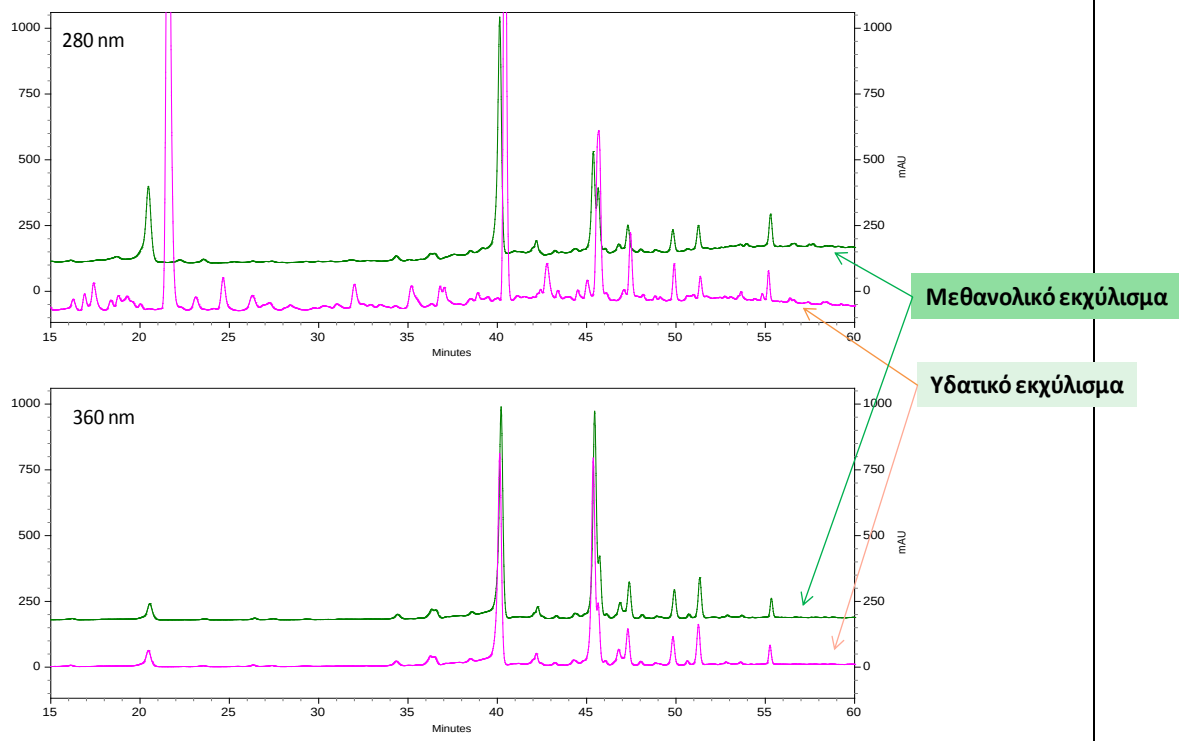
Μετά την ξήρανση και κονιοποίηση τα υπέργεια τμήματα του *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* εκχυλίστηκαν διαδοχικά με DCM, MeOH και H_2O. Κάθε εκχύλιση επαναλήφθηκε τρεις φορές και διήρκησε 48 ώρες, κάθε φορά (Σχήμα 6.3.10). Ακολούθησε ποιοτικός έλεγχος των εκχυλισμάτων με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών καθώς επίσης και μελέτη βιολογικής δράσης.



Σχήμα 6.3.10: Αρχική επεξεργασία του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*.

Αρχικά τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Για την ανάπτυξη του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία κανονικής φάσεως και μίγματα διαλυτών c-Hex/DCM και DCM /MeOH ενώ για το μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία κανονικής και αντιστρόφου φάσεως και μίγματα διαλυτών DCM /MeOH και H_2O/MeOH αντίστοιχα. Ο έλεγχος αυτός φανέρωσε την παρουσία μιας πληθώρας ουσιών οι οποίες εντάσσονται σε διάφορες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών. Πιο συγκεκριμένα το **διχλωρομεθανικό εκχύλισμα** περιέχει κυρίως λιπαρά συστατικά και τερπενοειδή καθώς επίσης και σημαντικές ποσότητες χλωροφυλλών ενώ το **μεθανολικό** και το **υδατικό εκχύλισμα** περιέχουν κυρίως φαινολικά παράγωγα και σάκχαρα.

Στη συνέχεια, το μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα μελετήθηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) συνδεδεμένη με ανιχνευτή UV. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε και τα χαρακτηριστικά του μηχανήματος αναφέρονται στο Κεφάλαιο 5. Ο έλεγχος αυτός είχε ως σκοπό την αρχική εκτίμηση του φαινολικού φορτίου των εκχυλισμάτων καθώς και την σύγκριση τους ως προς τις ουσίες που περιέχουν. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τόσο το μεθανολικό όσο και το υδατικό εκχύλισμα περιέχουν κυρίως παράγωγα φλαβονοειδών και φαινολοξέα. Επιπλέον η μελέτη των χρόνων ανάσχεσης και των φασμάτων UV των περιεχόμενων ουσιών φανέρωσε ότι τα δύο εκχυλίσματα διαθέτουν παρόμοιας σύστασης φαινολικό φορτίο. Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα HPLC των υπό μελέτη εκχυλισμάτων σε μήκη κύματος 280 και 365 nm.



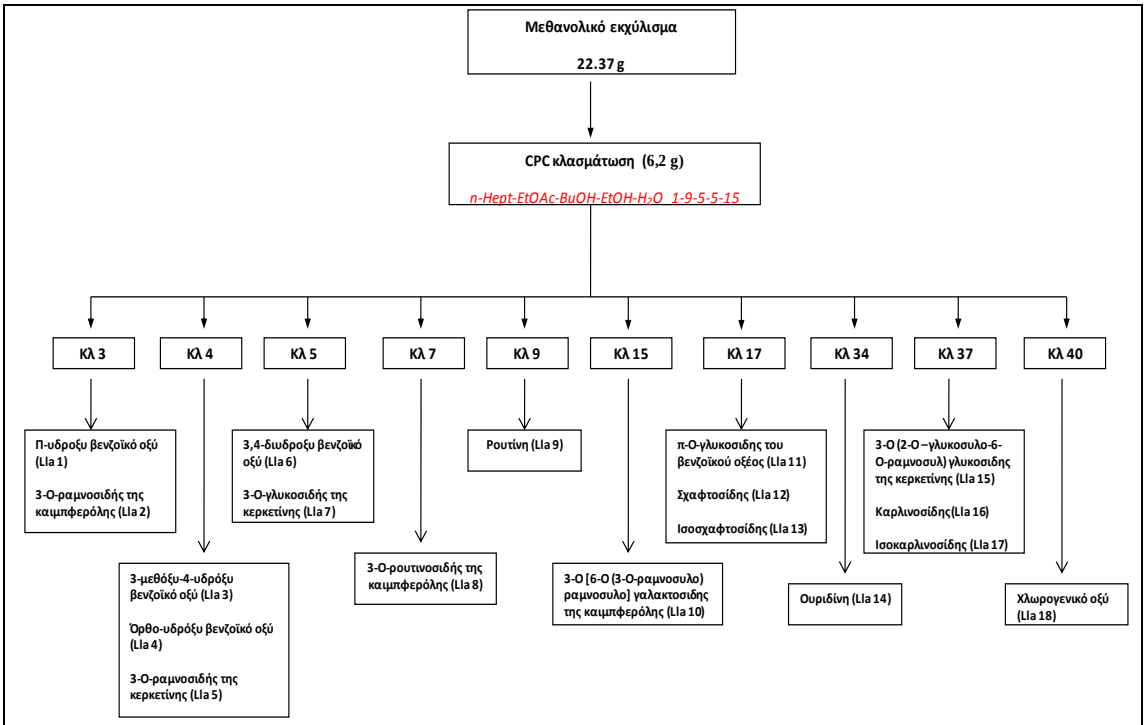
Εικόνα 6.3.4: Χρωματογραφήματα μεθανολικού και υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *Laxiflorus* σε μήκη κύματος 280 nm (πάνω) και 365 nm (κάτω).

Τα πειράματα βιολογικής δράσεως που έγιναν στο μεθανολικό και υδατικό εκχύλισμα των υπέργειων τμημάτων του φυτού (Κεφάλαιο 5) έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα αυτά διαθέτουν πολύ καλές αντιοξειδωτικές και χημειοπροστατευτικές

ιδιότητες. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις παραπάνω δοκιμασίες τόσο το μεθανολικό όσο και το υδατικό εκχύλισμα του *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* εμφάνισαν τις καλύτερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες σε ένα σύνολο 38 εκχυλισμάτων που προήλθε από φυτα της οικογένειας Fabaceae. Επίσης η παραπλήσια αντιοξειδωτική δράση των δύο εκχυλισμάτων σε συνδυασμό με την παρόμοια σύσταση του φαινολικού τους φορτίου (Εικόνα 6.3.4) μας οδήγησε στην υπόθεση ότι η δράση αυτή πιθανόν να οφείλεται στα φαινολικά παράγωγα πού εμπεριέχονται στα δύο αυτά εκχυλίσματα. Για το λόγο αυτό κρίθηκε αναγκαία η φυτοχημική ανάλυση των παραπάνω εκχυλισμάτων καθώς επίσης και η βιολογική μελέτη των απομονωμένων ουσιών.

Υδατικο Εκχυλισμα

Ο διαχωρισμός και απομόνωση των ουσιών του υδατικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια: α) κλασμάτωση του εκχυλίσματος με Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC) και β) απομόνωση των ουσιών από τα κλάσματα του CCC με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (Σχήμα 6.3.11).



Σχημα 6.3.11 Κλασμάτωση και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το υδατικό εκχυλίσματα του *Lathyrus laxiflorus* subsp. *Laxiflorus.*

α) Κλασμάτωση του εκχυλίσματος με CCC

- *Επιλογή διφασικού συστήματος.*

Το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* επεξεργάστηκε αρχικά με την τεχνική της Χρωματογραφίας Κατ' Αντιροή (CPC). Για το σκοπό αυτό επιλέχτηκαν προς έλεγχο 14 διφασικά συστήματα διαλυτών τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.3.22).

Πίνακας 6.3.22: Προτεινόμενα προς έλεγχο συστήματα για το διαχωρισμό με CCC του υδατικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus*.

ΣΥΣΤΗΜΑ	**ΔΙΑΛΥΤΕΣ**	ΑΝΑΛΟΓΙΑ
1	**n-BuOH: H_2O**	1:1
2	**Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O**	1:4:1:4
3	**Heptane: EtOAc: EtOH: H_2O**	1:2:1:2
4	**c-Hexane: EtOAc: MeOH: H_2O**	2:12:3:14
5	**Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O**	5:2:5:2
6	**$CHCl_3$: MeOH: H_2O**	8:7:2
7	**Heptane: EtOAc: MeOH: H_2O**	19:1:19:1
8	**$CHCl_3$: MeOH: H_2O**	8:10:5
9	**c-Hexane -n-BuOH: MeOH: H_2O**	1:4:1:4
10	**n-Hept-EtOAc-BuOH-EtOH-H_2O**	**1-9-5-5-15**
11	**EtOAc: EtOH: H_2O**	10:1:10
12	**EtOAc: n-BuOH: H_2O**	2:1:3
13	**n-BuOH: MeOH: H_2O**	4:1:4
14	**n-Hept-EtOAc-BuOH-AcN-H_2O**	**1-9-5-5-15**

Τα παραπάνω διφασικά συστήματα υποβλήθηκαν στους απαιτούμενους ελέγχους προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν κάποιο ή κάποια από αυτά είναι κατάλληλα να διαχωρίσουν τα συστατικά του υπό μελέτη εκχυλίσματος.

Από τον πρώτο έλεγχο, που είχε ως στόχο την αξιολόγηση των συστημάτων ως προς την ταχύτητα διαχωρισμού και την αναλογία των δυο φάσεων απορρίφθηκαν τα συστήματα **1, 5, 7, 9** και **13** λόγω δημιουργίας γαλακτώματος.

Ο δεύτερος έλεγχος με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC) είχε ως στόχο την αξιολόγηση των συστημάτων ως προς την κατανομή των συστατικών του δείγματος στις δύο φάσεις των διφασικών συστημάτων. Από τον παραπάνω έλεγχο συμπεράναμε ότι τα συστήματα: **3**, **6**, **8** και **11** είναι ακατάλληλα για την απομόνωση των φαινολικών ουσιών του υπό μελέτη εκχυλίσματος, διότι οι περισσότερες από αυτές κατανέμονται στη μία από τις δύο φάσεις.

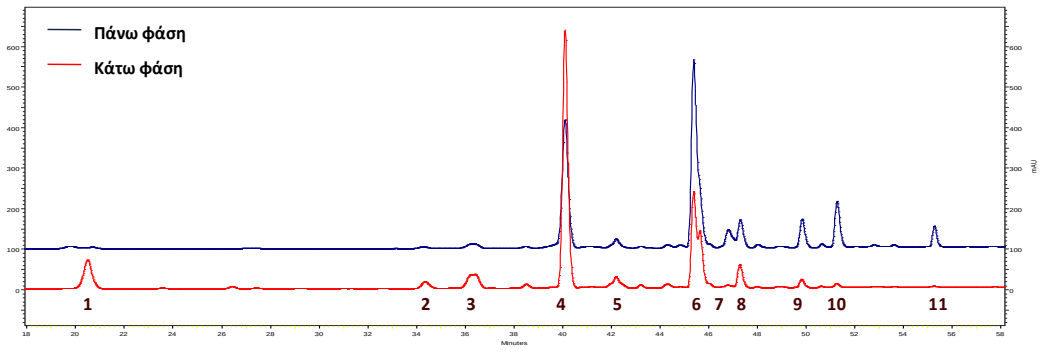
Ο τρίτος έλεγχος είχε ως στόχο την αξιολόγηση των συστημάτων ως προς την κατανομή των συστατικών του δείγματος στις δύο φάσεις με την βοήθεια των συντελεστών κατανομής των ουσιών στα διάφορα διφασικά συστήματα. Ο πιο συνήθης τρόπος εύρεσης των συντελεστών κατανομής είναι με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Οι συντελεστές κατανομής υπολογίζονται από το λόγο των επιφανειών των αντίστοιχων κορυφών στα χρωματογραφήματα των δύο φάσεων. Έτσι για τα διφασικά συστήματα 2, 4, 10, 12 και 14 μελετήθηκαν με HPLC και υπολογίστηκαν οι συντελεστές κατανομής των ουσιών. Για το σκοπό αυτό, αφού διαχωρίστηκαν οι δύο φάσεις χρωματογραφήθηκαν ίδιες ποσότητες από την κάθε φάση και υπολογίστηκαν οι επιφάνειες των κορυφών των αντίστοιχων ουσιών.

Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε το όργανο Thermo Finnigan HPLC (αντλία: SpectraSystem P4000, απαερωτή: SpectraSystem 1000, ανιχνευτή UV-DAD: SpectraSystem AS3000), η αναλυτική στήλη Lichrosorb, RP 18, 250x4,6 mm, 5 μm, (Supelco) και η προστήλη Lichrosorb, RP 18, 1cm x 4,6mm, 5μm (Supelco). Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν με ανιχνευτής UV σε μήκη κύματος 260, 280 και 365 nm. Το σύστημα έκλουσης, το οποίο επιλέχθηκε φαίνεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6.3.23 : Η μέθοδος HPLC που χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των συντελεστών κατανομής στα διφασικά συστήματα *Lathyrus laxiflorus.*

ΧΡΟΝΟΣ (min)	ΔΙΑΛΥΤΕΣ H_2O (%)	AcN (%)
0	96	4
30	88	12
45	80	20
75	50	50
Ροή: 1 ml/min		

Από τον παραπάνω έλεγχο συμπεράναμε ότι το καταλληλότερο διφασικό σύστημα για το διαχωρισμό του υδατικού εκχυλίσματος είναι το σύστημα 10: *n-Hept-EtOAc-BuOH-EtOH-H_2O 1-9-5-5-15*. Τα χρωματογραφήματα των δύο φάσεων και οι συντελεστές κατανομής για το σύστημα αυτό δίνονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 6.3.5).



Συντ. Κατανομής	ΚΟΡΥΦΕΣ 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Κκ/π	100	4.35	2.44	1.85	1.39	0.58	0.15	0.89	0.28	0.08	0.03
Κπ/κ	0.01	0.23	0.41	0.54	0.72	1.71	6.68	1.12	3.59	12.45	35.8

Εικόνα 6.3.5: Τα χρωματογραφήματα των δύο φάσεων και οι συντελεστές κατανομής για το σύστημα *n-Hept-EtOAc-BuOH-EtOH-H_2O 1-9-5-5-15*

- *Εκτέλεση διαχωρισμού*

Για τον διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε το όργανο υδροστατικού τύπου CPC KROMATON χρησιμοποιώντας παρασκευαστική στήλη των 1000 ml, αντλία LabAlliance με όριο πίεσης τα 50 bar και αυτόματος συλλέκτης Buchi B-684. Αναλύθηκε εκχύλισμα βάρους 6,2 gr και συνολικά συλλέχτηκαν 182 κλάσματα των

10 ml. Από αυτά τα 103 πρώτα συλλέχτηκαν με κινητή φάση την άνω φάση του διφασικού συστήματος ενώ μετά την αναστροφή των φάσεων (κινητή η κάτω φάση) συλλέχτηκαν επιπλέον 79 κλάσματα. Η ροή των διαλυτών και η περιστροφή της στήλης διατηρήθηκαν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας στα 10 ml/min και 750 rpm αντίστοιχα (Πίνακας 6.3.24). Η όλη διαδικασία διήρκησε περίπου 6 ώρες και καταναλώθηκαν συνολικά 3.5 lt διαλυτών εκ των οποίων το 40% περίπου αποτελούσε το νερό.

Πίνακας 6.3.24: Διαχωρισμός του υδατικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus* με το σύστημα *n-Hept-EtOAc-BuOH-EtOH-H_2O 1-9-5-5-15*

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ	ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ	ΡΥΘΜΙΣΗ ΣΥΣΚΕΥΗΣ			ΟΓΚΟΣ κλάσματος
1-103	Κάτω φάση	Άνω φάση	Ascending	750 rpm	10 ml/min	10 ml
104-182	Άνω φάση	Κάτω φάση	Descending	750 rpm	10 ml/min	10 ml

Μετά από έλεγχο με TLC στα αρχικά κλάσματα πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις για να προκύψουν τελικά 40 κλάσματα, τα βάρη των οποίων δίνονται στον πίνακα 6.3.25.

Πίνακας 6.3.25: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την επεξεργασία του υδατικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus* με CCC χρησιμοποιώντας για το διαχωρισμό το σύστημα *n-Hept-EtOAc-BuOH-EtOH-H_2O 1-9-5-5-15*

Κλ.	Βάρος (mg)	Κλ.	Βάρος (mg)	Κλ.	Βάρος (mg)	Κλ.	Βάρος (mg)
Κλ 1	5,9	**Κλ 11**	32,4	**Κλ 21**	21,8	**Κλ 31**	66,3
Κλ 2	22,2	**Κλ 12**	33,6	**Κλ 22**	130,9	**Κλ 32**	57,5
Κλ 3	30,2	**Κλ 13**	55,4	**Κλ 23**	346,2	**Κλ 33**	73,9
Κλ 4	62,5	**Κλ 14**	28,7	**Κλ 24**	984,3	**Κλ 34**	68,7
Κλ 5	36,9	**Κλ 15**	52,9	**Κλ 25**	1058,2	**Κλ 35**	23,7
Κλ 6	15,9	**Κλ 16**	47,7	**Κλ 26**	993,7	**Κλ 36**	24,2
Κλ 7	38,9	**Κλ 17**	64,2	**Κλ 27**	472,7	**Κλ 37**	31,7
Κλ 8	29,9	**Κλ 18**	93,3	**Κλ 28**	483,9	**Κλ 38**	19,1
Κλ 9	23,5	**Κλ 19**	28,3	**Κλ 29**	194,6	**Κλ 39**	9,7
Κλ 10	66,7	**Κλ 20**	24,1	**Κλ 30**	72,9	**Κλ 40**	13,3

Τα τελικά αυτά κλάσματα ελέχθησαν τόσο με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC) όσο και με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Από τον έλεγχο αυτό αποφασίστηκε η περαιτέρω μελέτη 11 κλασμάτων τα οποία περιείχαν είτε μίγματα δύο ή τριών ουσιών είτε μία ουσία σε μη καθαρή μορφή.

β) Απομόνωση των ουσιών από τα κλάσματα του CCC με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού

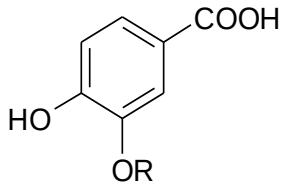
Προκειμένου να διαχωρίσουμε τις ουσίες και να τις παραλάβουμε σε καθαρή μορφή ακολούθησε επεξεργασία των επιλεγόμενων κλασμάτων με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Ως πληρωτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη Sephadex LH-20 ενώ ως διαλύτης έκλουσης η μεθανόλη.

Συνολικά επεξεργάστηκαν 10 κλάσματα από τα οποία απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 18 δευτερογενείς μεταβολίτες. Αναλυτικότερα οι ουσίες που απομονώθηκαν από το κάθε κλάσμα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα

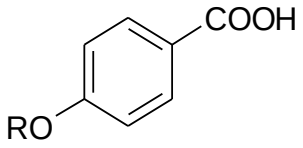
Πίνακας 6.3.26: Ουσίες που απομονώθηκαν κατά τη επεξεργασία του υδατικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus.*

Κλάσμα	Απομονωμένες ουσίες
Κλ. 3	• π-υδροξυβενζοϊκό οξύ(Lla 1) • 3-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (Αφζελίνη) (Lla2)
Κλ. 4	• 3-μεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκο οξύ (Lla 3) • ο-υδροξυβενζοϊκό οξύ (Lla 4) • 3-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη (Κερκετρίνη) (Lla5)
Κλ. 5	• 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (Lla 6) • 3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκερκετίνη (Lla7)
Κλ. 7	• 3-*O*-*β*-D-(6-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο)-γλυκοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (Lla8)
Κλ. 9	• 3-*O*-*β*-D-(6-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο) γλυκοπυρανοσυλο κερκετίνη (ρουτίνη) (Lla9)
Κλ. 15	• 3-*O*-*β*-D-[6-*O*-*α*-L-(3-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο) ραμνοπυρανοσυλο]-γαλακτοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (Lla 10)
Κλ. 17	• 4-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης του βενζοϊκου οξέος (Lla 11) • Σχαφτοσίδης (Lla 12) • Ισοσχαφτοσίδης (Lla 13)
Κλ. 34	• Ουριδίνη (Lla 14)
Κλ. 37	• 3-*O*-(2′′-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-6′′-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο)-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκερκετίνης (Lla 15) • Καρλινοσίδης(Lla 16) • Ισοκαρλινοσίδης (Lla 17)
Κλ. 40	• Χλωρογενικό οξύ (Lla 18)

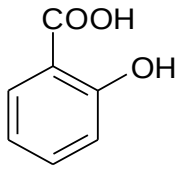
➢ Τα φαινολικά οξέα είναι ενώσεις ευρέως διαδεδομένες στη φύση και περιλαμβάνει κυρίως τα παράγωγα του βενζοϊκού και του σινναμικού οξέος. Από το υπό μελέτη εκχύλισμα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 5 παράγωγα του βενζοϊκού οξέος καθώς και ένα παράγωγο του σινναμικού. Στα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος είναι: το **π-υδροξυβενζοϊκό οξύ**(Lla 1) το οποίο απομονώθηκε από το κλάσμα 3, το **3-μεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκο οξύ** (Βανιλικό οξύ) (Lla 3) και το **ο-υδρόξυβενζοϊκό οξύ** (Σαλικυλικό οξύ) (Lla 4) από το κλάσμα 4, το **3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ** (Πρωτοκατεχικό οξύ) (Lla 6) από το κλάσμα 5 και ο **4-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης του βενζοϊκου οξέος** (Lla 11) ο οποίος απομονώθηκε από το κλάσμα 17. Τέλος από το κλάσμα 40 απομονώθηκε το **χλωρογενικό οξύ** (Lla 18) το οποίο αποτελεί κύριο μεταβολίτη του υδατικού εκχυλίσματος.



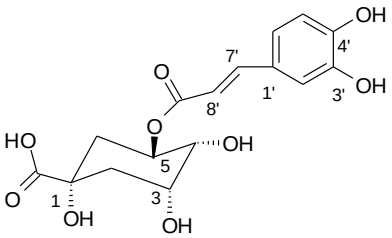
R = H: πρωτοκατεχικό οξύ (Lla6)
R= Me: βανιλλικό οξύ (Lla3)



R = H: π-υδροξυβενζοϊκό οξύ (Lla1)
R= γλυκ.: 4-O-β-D-γλυκοπυρανόσυλο βενζοϊκό οξύ (Lla11)



Σαλικυλικό οξύ (Lla4)

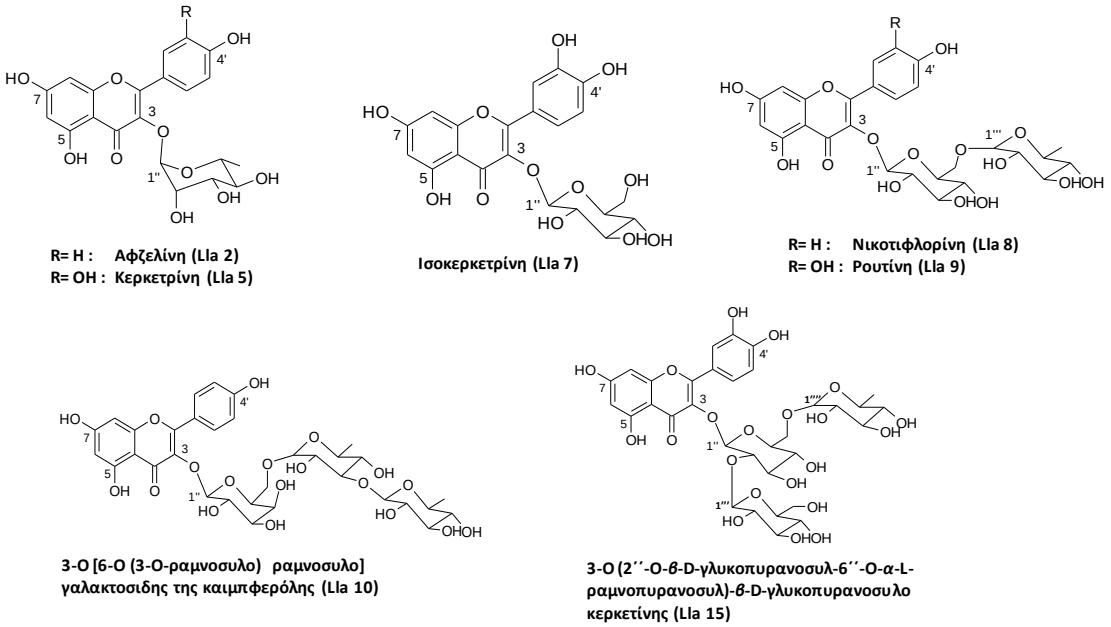


Χλωρογενικό οξύ (Lla18)

Από τους παραπάνω μεταβολίτες ο **π-υδροξυβενζοϊκό οξύ**(Lla 1), το Σαλικυλικό οξύ (Lla 4) και ο **4-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης του βενζοϊκου οξέος** (Lla 11) έχουν απομονωθεί ξανά, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Lotus longisiliquosus*. Το **Πρωτοκατεχικό** (Lla 6) και το παραγωγό του το **Βανιλικό οξύ** (Lla 3) είναι μόρια με συχνή παρουσία στους φυτικούς οργανισμούς. Διαθέτουν πλήθος βιολογικών δράσεων και το μεν Πρωτοκατεχικό οξύ χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση ηπατικών ασθενειών, το δε Βανιλλικό

οξύ σε δερματικά σκευάσματα[299,300]. Τέλος το **Χλωρογενικό οξύ** απομονώθηκε από μεγάλο αριθμό φυτικών εκχυλισμάτων και διαθέτει πολύ καλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Λόγο της δράσης αυτής χρησιμοποιείται σε διάφορα αντιοξειδωτικά καθώς και δερματικά σκευάσματα[301,302].

- Από το υδατικό εκχύλισμα απομονώθηκαν επίσης 11 γλυκοσίδες φλαβονοειδών. Από αυτούς 7 μόρια αποτελούν παράγωγα καιμπφερόλης και κερκετίνης με τα σάκχαρα να ενώνονται στη θέση 3 της γενίνης. Πιο συγκεκριμένα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι ουσίες: **3-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Αφζελίνη) (Lla2), **3-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη** (Κερκετρίνη) (Lla5), **3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκερκετίνη** (Ισοκερκετρίνη) (Lla7), **3-*O*-*β*-D-(6-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο) γλυκοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη** (Νικοτιφλορίνη) (Lla8), **3-*O*-*β*-D-(6-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο) γλυκοπυρανοσυλοκερκετίνη** (Ρουτίνη) (Lla9), **3-*O*-*β*-D-[6-*O*-*α*-L-(3-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο) ραμνοπυρανοσυλο] γαλακτοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Lla 10) και **3-*O*-(2΄΄-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλ-6΄΄-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκερκετίνης** (Lla 15). Οι γλυκοσίδες της καιμπφερόλης και της κερκετίνης είναι μόρια ευρέος διαδεδομένα στη φύση με πολλές αναφορές τόσο σε φυτά της οικογένειας Fabaceae[303] όσο και σε φυτά άλλων οικογενειών. Επίσης έχουν απομονωθεί στο παρελθόν και από φυτά του γένους *Lathyrus*[304,305,306]. Αξίζει να σημειωθεί ότι στα φυτά του γένους *Lathyrus* οι φλαβονόλες απαντώνται κυρίως με τη μορφή των 3-O-γλυκοσιδών τους όπως παρατηρούμε και στο υπό μελέτη εκχύλισμα.



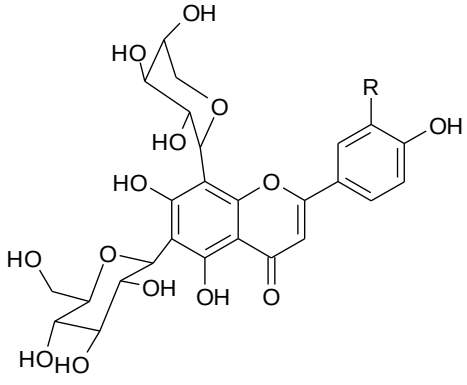
Σύμφωνα με βιολογικές μελέτες η **Αφζελίνη** (Lla2) διαθέτει αντιβακτηριδιακή, αντιοξειδωτική και ανασταλτική δράση έναντι διαφόρων ενζύμων[307,308,309,310]. Η **Κερκετρίνη** (Lla5) διαθέτει αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, υποχολιστεριμική δράση και χρησιμοποιείται σε αντιφλεγμονώδη και αναλγητικά σκευάσματα, στην αντιμετώπιση καρδιαγκειακών προβλημάτων κ.α. [311,312,313]. Η **Ισοκερκετρίνη** (Lla7) εμφάνισε μια πληθώρα βιολογικών δράσεων και χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό, διουρητικό, αντιφλεγμονώδες, σε οστεοπόρωση, σε καρδιαγκειακές ασθένειες και διάφορες νευρωνικές παθήσεις[314,315,316,317].

Η **Νικοτιφλορίνη** (Lla8) και η **Ρουτίνη** (Lla9) είναι επίσης μόρια με πλήθος βιολογικών δράσεων. Η Νικοτιφλορίνη χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό καθώς και σε διάφορες εγκεφαλικές βλάβες[318,319], ενώ η Ρουτίνη ως αντιοξειδωτικό, αντιφλεγμονώδες, αναλγητικό για χρόνιες καταστάσεις πόνου, σε καρδιαγγειακές ασθένειες κ.α.[320,321,322,323]

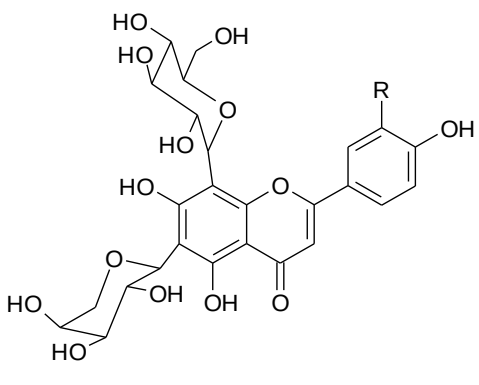
Ο μεταβολίτης **3-O-*β*-D-[6-O-*α*-L-(3-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο) ραμνοπυρανοσυλο] γαλακτοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Lla 10) **απομονώνεται πρώτη φόρα από φυτά της οικογένειας Fabaceae** ενώ έχει βρεθεί στα φύλα του φυτού *Actinidia polygala (Actinidaceae)*[324], σε φυτά του γένους *Rhamnus (Rhamnacea)*[325,326] και σε φυτά του γένους *Camelia (Theaceae)*[327]. Δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις.

Ο μεταβολίτης **3-O-(2΄΄-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλ-6΄΄-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο κερκετίνης** (Lla 15) βρέθηκε πρόσφατα σε δύο φυτά της οικογένειας Fabaceae, αρχικά από τους καρπούς του *Styphnolobium japonicum*[328] και στη συνέχεια στα άνθη του *Caragana sinica*[329]. Δεν υπάρχουν αναφορές για βιολογικές δράσεις.

➢ Από το υπό μελέτη εκχύλισμα απομονώθηκαν τέσσερις δι-C-γλυκοσίδες φλαβονοειδών. Πρόκειται για τις ουσίες: **6-*C*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-8-*C*-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλοαπιγενίνη (Σχαφτοσίδης)** (Lla 12), **6-*C*-*α*-L-αραβινοπυρανοσιλο-8-*C*-β-D-γλυκοπυρανόσυλοαπιγενίνη (Ισοσχαφτοσίδης)** (Lla 13), **6-*C*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-8-*C*-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλολουτεολίνη (Καρλινοσίδης)** (Lla 16) **και 6-*C*-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλο-8-*C*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλολουτεολίνη (Ισοκαρλινοσίδης)** (Lla 17)**.** Ο σχαφτοσίδης και ισοσχαφτοσίδης παραλήφθηκαν μαζί κατά την επεξεργασία του κλάσματος 17 ενώ ο καρλινοσίδης και ο ισοκαρλινοσίδης παραλήφτηκαν επίσης σε μίγμα από το κλάσμα 37. Ο διαχωρισμός των ισομερών αυτών και η παραλαβή τους σε καθαρή μορφή αποδείχτηκε δύσκολη εξαιτίας των παρόμοιων χημικών ιδιοτήτων που διαθέτουν. Αυτό φαίνεται και σε προηγούμενες φυτοχημικές μελέτες όπου τόσο τα ισομερή Σχαφτοσίδης και Ισοσχαφτοσίδης όσο και τα ισομερή Καρλινοσίδης και Ισοκαρλινοσίδης απαντώνται συνήθως μαζί.



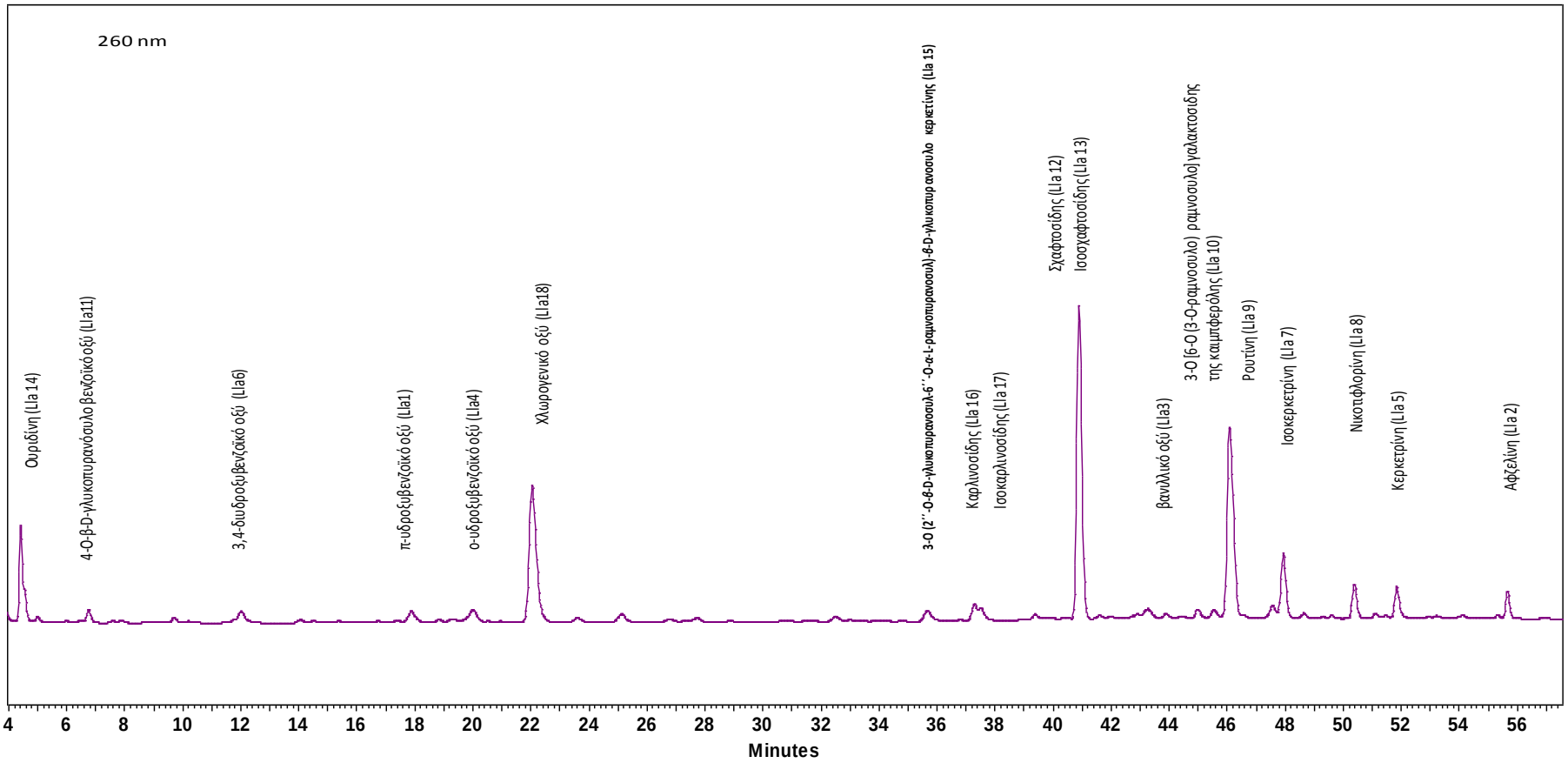
R= H : Σχαφτοσίδης (Lla 12)
R= OH : Καρλινοσίδης (Lla 16)



R= H : Ισοσχαφτοσίδης (Lla 13)
R= OH : Ισοκαρλινοσίδης (Lla 17)

Τα παραπάνω μόρια έχουν απομονωθεί και από άλλα φυτά τόσο της οικογένειας Fabaceae[330,331] όσο και άλλων οικογενειών ενώ δεν υπάρχουν προηγούμενες φυτοχημικές αναφορές για την ύπαρξη τους σε φυτά του γένους Lathyrus. Όσον αφορά τις βιολογικές δράσεις μόνο για τον Σχαφτοσίδη υπάρχουν αναφορές στις οποίες εμφανίζεται να διαθέτει αντιφλεγμονώδη[332] και κυταροτοξική δράση[333].

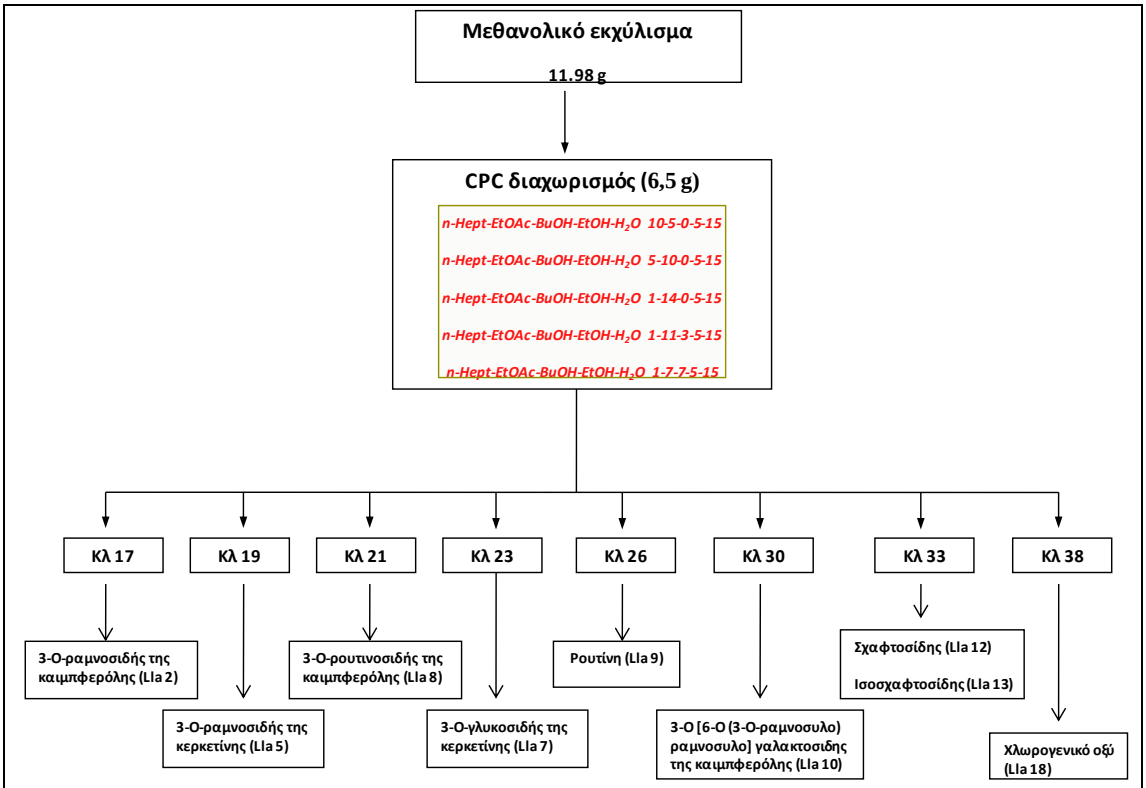
Η κάθε ουσία πού απομονώθηκε από το υδατικό εκχύλισμα χρωματογραφήθηκε με HPLC χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο και στήλη όπως και στην περίπτωση του υδατικού εκχυλίσματος. Η μελέτη των χρόνων ανάσχεσης καθώς και των φασμάτων UV των ουσιών και η σύγκριση τους με το χρωματογράφημα του υδατικού εκχυλίσματος μας κατεύθυνε στην ταύτιση της κάθε κορυφής με την αντίστοιχη ουσία (Εικόνα 6.3.6)



Εικόνα 6.3.6: Χρωματογράφημα HPLC του υδατικού εκχυλίσματος του L. laxiflorus με τις ουσίες που αντιστοιχούν στην κάθε κορυφή

Μεθανολικό εκχύλισμα

Ο διαχωρισμός και απομόνωση των ουσιών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* πραγματοποιήθηκε σε ένα στάδιο με Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC) χρησιμοποιώντας την μέθοδο των συνεχόμενων συστημάτων (Σχήμα 6.3.12).



Σχήμα 6.3.12 Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το μεθανολικό εκχυλίσματα του *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus.*

Από την σύγκριση των χρωματογραφημάτων TLC και HPLC του μεθανολικού και υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Lathyrus laxiflorus subsp. laxiflorus* συμπεραίνουμε ότι οι κύριοι δευτερογενείς μεταβολίτες στα δυο αυτά εκχυλίσματα είναι ίδιοι. Στο συμπέρασμα αυτό καταλήξαμε όχι μόνο από τα τους χρόνους ανάσχεσης των ουσιών στα παραπάνω χρωματογραφήματα αλλά και από την μελέτη των φασμάτων UV των αντίστοιχων ουσιών. Έτσι στόχος της συγκεκριμένης ανάλυσης δεν ήταν τόσο η απομόνωση και ταυτοποίηση των ουσιών του μεθανολικού εκχυλίσματος αλλά η εφαρμογή μιας μεθόδου απομόνωσης με την

οποία θα μπορούμε να παραλαμβάνουμε τις ουσίες εύκολα, γρήγορα και σε όσο το δυνατόν καθαρότερη μορφή. Για τον λόγο αυτό αναλύσαμε το συγκεκριμένο εκχύλισμα με CCC χρησιμοποιώντας την μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης. Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια νέα προσέγγιση της τεχνικής CCC με λίγες, μέχρι τώρα, εφαρμογές. Έγκειται στη χρήση πολλών διφασικών συστημάτων στη σειρά προκειμένου να απομονώσουμε τις ουσίες με μόνο μία εφαρμογή του εκχυλίσματος στο μηχάνημα.

- *Επιλογή συστημάτων*

Ο διαχωρισμός των ουσιών ενός εκχυλίσματος με την τεχνική CCC βασίζεται στην διαφορετική κατανομή των ουσιών στις δυο φάσεις ενός διφασικού συστήματος διαλυτών. Ως εκ τούτου η επιλογή του σωστού διφασικού συστήματος αποτελεί το πιο σημαντικό στάδιο στη διαδικασία διαχωρισμού ουσιών με την συγκεκριμένη τεχνική. Για να επιτύχουμε διαχωρισμό δυο ουσιών με την τεχνική CCC θα πρέπει ο λόγος των συντελεστών κατανομής των ουσιών αυτών να είναι μεγαλύτερος από 1,5. Στην πράξη όμως είναι αδύνατη η εύρεση διφασικού συστήματος ικανού να διαχωρίσει όλες τις ουσίες ενός πολύπλοκου φυτικού εκχυλίσματος. Αυτό που συνήθως γίνεται είναι είτε μια καλή αρχική κλασμάτωση του εκχυλίσματος και στη συνέχεια ανάλυση του κάθε κλάσματος ξεχωριστά με κάποιο άλλο διφασικό σύστημα ή με άλλες χρωματογραφικές μεθόδους, είτε ο στοχευμένος διαχωρισμός μικρού αριθμού ουσιών του εκχυλίσματος επιλέγοντας το κατάλληλο διφασικό σύστημα για το σκοπό αυτό.

Στόχος της μεθόδου των συνεχόμενων συστημάτων είναι η χρήση πολλών συστημάτων στη σειρά προκειμένου να απομονώσουμε οσο γίνεται περισσότερες ουσίες. Για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου θα πρέπει να επιλυθούν δύο βασικά προβλήματα. Πρώτον η επιλογή της κατάλληλης σειράς διφασικών συστημάτων ικανών να διαχωρίσουν όσο το δυνατών περισσότερες ουσίες και δεύτερον, η διατήρηση της διφασικότητας μέσα στο μηχάνημα κατά την μετάβαση από το ένα σύστημα στο επόμενο. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειώσουμε ότι οποιαδήποτε μεταβολή στο διφασικό σύστημα είναι πιθανό να επιφέρει αλλαγές στο διαχωρισμό των δύο φάσεων με αποτέλεσμα το νέο διφασικό σύστημα να είναι

μη λειτουργικό. Ένας τρόπος για την αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος είναι η δημιουργία συστημάτων διατηρώντας την μία φάση σταθερή (αυτήν που θα χρησιμοποιήσουμε ως στατική) και αλλάζοντας την αναλογία των διαλυτών στην άλλη φάση (την κινητή). Με τον τρόπο αυτό αυξάνουμε τις πιθανότητες εύρεσης σειράς συστημάτων με την οποία θα επιτευχθεί διατήρηση της διφασικότητας κατά την εκτέλεση του διαχωρισμού.

Προκειμένου να δημιουργήσουμε μια σειρά συστημάτων για την ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος με Χρωματογραφίας Κατ' Αντιροή χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης, βασιστήκαμε στο διφασικό σύστημα n-Hept-EtOAc-BuOH-EtOH-H_2O 1-9-5-5-15, το οποίο χρησιμοποιήσαμε για την ανάλυση του υδατικού εκχυλίσματος, και δημιουργήσαμε 10 διφασικά συστήματα τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6.3.27: Σειρά διφασικών συστημάτων για την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus* με gradient mode CCC.

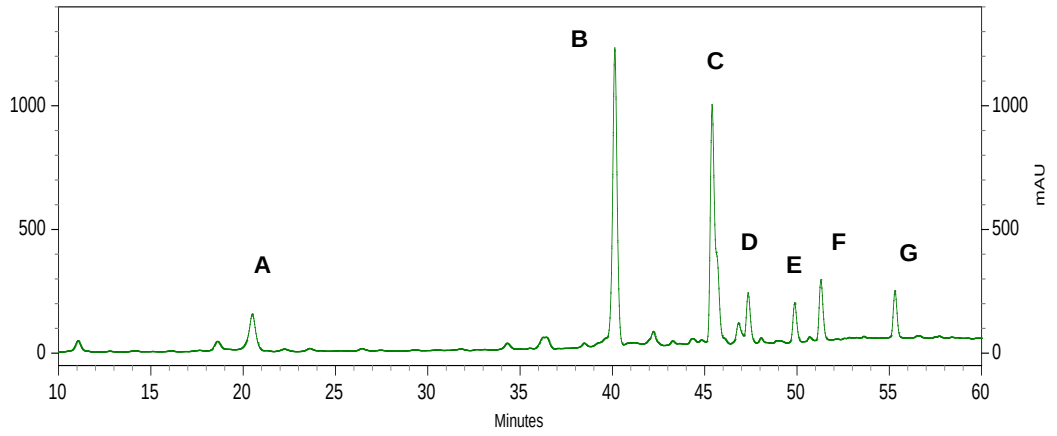
ΚΩΔ.	ΔΙΑΛΥΤΕΣ	ΑΝΑΛΟΓΙΑ
E1	n-Hept. / EtOAc / EtOH / H_2O	14 / 1 / 5 / 10
E2	n-Hept. / EtOAc / EtOH / H_2O	10 / 5 / 5 / 10
E3	n-Hept. / EtOAc / EtOH / H_2O	5 / 10 / 5 / 10
E4	n-Hept. / EtOAc / EtOH / H_2O	1 / 14 / 5 / 10
E5	n-Hept. / EtOAc / BuOH / EtOH / H_2O	1 / 13 / 1 / 5 / 10
E6	n-Hept. / EtOAc / BuOH / EtOH / H_2O	1 / 11 / 3 / 5 / 10
E7	n-Hept. / EtOAc / BuOH / EtOH / H_2O	1 / 9 / 5 / 5 / 10
E8	n-Hept. / EtOAc / BuOH / EtOH / H_2O	1 / 7 / 7 / 5 / 10
E9	n-Hept. / EtOAc / BuOH / EtOH / H_2O	1 / 5 / 9 / 5 / 10
E10	n-Hept. / EtOAc / BuOH / EtOH / H_2O	1 / 3 / 11 / 5 / 10

Στα παραπάνω συστήματα έγινε αρχικά έλεγχος διαλυτότητας του εκχυλίσματος και διαχωρισμού των φάσεων. Έτσι σε 10 δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέσαμε στο κάθε ένα 10 mg του εκχυλίσματος και τους διαλύτες στις αναλογίες του κάθε συστήματος μέχρι τελικού όγκου 3 ml. Στη συνέχεια αφού ανακινήσαμε τους δοκιμαστικούς σωλήνες, αφήσαμε το μίγμα σε ηρεμία και καταγράψαμε την διαλυτική ικανότητα του κάθε συστήματος, το χρόνο διαχωρισμού των φάσεων και την αναλογία των δυο φάσεων. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πρώτης δοκιμής.

Πίνακας 6.3.28: Αποτελέσματα δοκιμής για τη σειρά διφασικών συστημάτων του *Lathyrus laxiflorus*

ΚΩΔ.	Διάλυση	Χρόνος διαχ. Φάσεων	Αναλογία φάσεων
E1	κακή	γαλάκτωμα	-
E2	καλή	Πολύ γρήγορος	50/50
E3	καλή	Πολύ γρήγορος	50/50
E4	καλή	Πολύ γρήγορος	50/50
E5	Καλή	Πολύ γρήγορος	50/50
E6	Καλή	γρήγορος	60/40
E7	Καλή	γρήγορος	65/25
E8	Καλή	γρήγορος	70/30
E9	Καλή	Αργός	80/20
E10	καλή	γαλάκτωμα	-

Από τον πρώτο αυτό έλεγχο συμπεραίνουμε ότι τα συστήματα E1, E9 και E10 δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση του συγκεκριμένου εκχυλίσματος. Τα υπόλοιπα συστήματα, αφού διαχωρίσαμε τις δύο φάσεις, ελέχθησαν τόσο με υγρή χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας όσο και με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης προκειμένου να μελετήσουμε την μεταβολή στους συντελεστές κατανομής κατά την μετάβαση από το ένα σύστημα στο επόμενο. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται το χρωματογράφημα HPLC του μεθανολικού εκχυλίσματος με επισημασμένες τις κορυφές για τις οποίες υπολογίστηκε ο συντελεστής κατανομής.



Οι συντελεστές κατανομής υπολογίστηκαν με βάση των τύπο:

$$K_x = \frac{C_x\ \alpha\ \text{phase}}{C_x\ \beta\ \text{phase}} = \frac{E_x\ \text{chrom.}\ \alpha\ \text{phase}}{E_x\ \text{chrom.}\ \beta\ \text{phase}}$$

Όπου Cx είναι η συγκέντρωση της ουσίας ενώ Ex η επιφάνεια της κορυφής στο χρωματογράφημα HPLC. Από τη μελέτη των χρωματογραφήματων των δύο φάσεων των διφασικών συστημάτων υπολογίστηκαν οι συντελεστές κατανομής (επιφάνεια κορυφής στο χρωματογράφημα της πάνω φάσης προς την επιφάνεια της κορυφής στο χρωματογράφημα της κάτω φάσης), οι οποίοι φαίνονται στον παρακάτω πινάκα.

Πίνακας 6.3.29: Συντελεστές κατανομής για τις ουσίες του μεθανολικού εκχυλίσματος *Lathyrus laxiflorus*

ΚΟΡΥΦΕΣ	A	B	C	D	E	F	G
E2	-	-	-	-	-	-	-
E3	-	-	**0.01**	**0.06**	-	**0.40**	**0.62**
E4	**0.03**	**0.03**	**0.17**	**0.09**	**0.39**	**4.07**	**3.26**
E5	**0.07**	**0.10**	**0.36**	**0.23**	**0.79**	**5.43**	**3.98**
E6	**0.10**	**0.25**	**0.87**	**0.56**	**1.84**	**9.85**	**6.82**
E7	**0.11**	**0.58**	**1.66**	**1.22**	**3.47**	**11.91**	**9.20**
E8	**0.12**	**0.74**	**1.87**	**1.72**	**3.67**	**11.87**	**8.45**

Από την μελέτη των τιμών των συντελεστών κατανομής διαπιστώθηκε μια βαθμιδωτή αύξηση κατά την μετάβαση από το ένα σύστημα στο επόμενο. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι αυξάνοντας την πολικότητα της κινητής φάσης μεταβάλλονται αντίστοιχα και οι συντελεστές κατανομής των ουσιών. Έτσι, με βάση τους συντελεστές κατανομής συμπεραίνουμε ότι:

- Με τη χρήση του διφασικού συστήματος E3 είναι εφικτός ο διαχωρισμός μόνο των ουσών G και F, ενώ οι υπόλοιπες ουσίες θα εξέρχονταν από τη στήλη μαζί.
- Με τη χρήση του διφασικού συστήματος E5 για την ανάλυση του εκχυλίσματος θα διαχωρίζαμε μόνο την ουσία E ενώ οι ουσίες G και F, C και D, A και B θα εξέρχονταν από τη στήλη μαζί.

— Με τη χρήση του διφασικού συστήματος Ε7 για την ανάλυση του εκχυλίσματος θα διαχωρίζαμε τις ουσίες Ε, Β και Α ενώ μαζί θα εξέρχονταν οι ουσίες G και F καθώς και C και D.

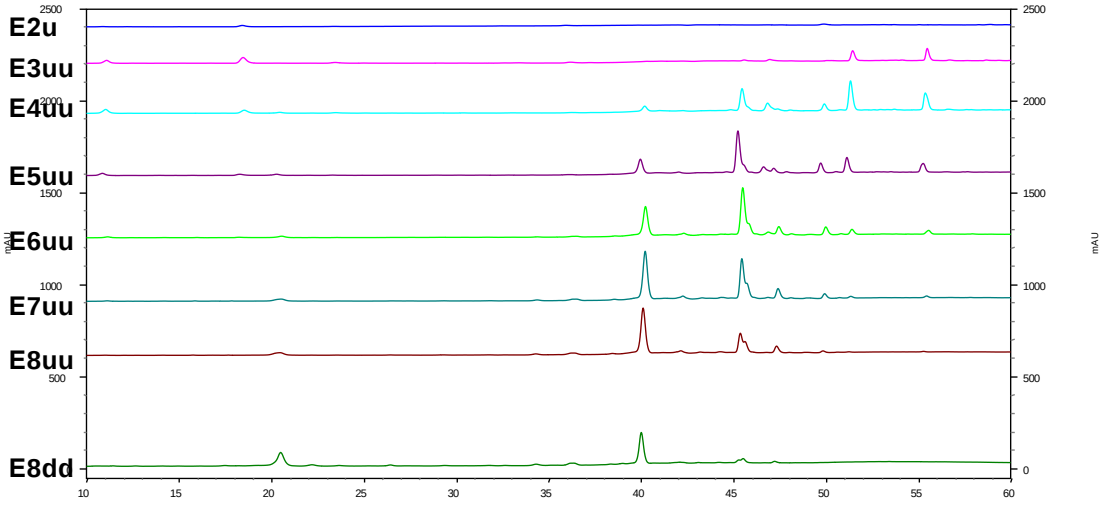
Από τις παραπάνω δοκιμές συμπεραίνουμε ότι τα συστήματα Ε2 έως και Ε8 θα μπορούσαν, το κάθε ένα μόνο του, να διαχωρίσουν μερικές από τις ουσίες του ολικού (μεθανολικού) εκχυλίσματος για τις οποίες έγινε η μελέτη . Αυτό όμως που δεν γνωρίζαμε είναι αν ήταν δυνατό να τα εισάγουμε στη σειρά προκειμένου να διαχωριστούν όλες οι προς μελέτη ουσίες με μία μόνο εφαρμογή του εκχυλίσματος στο μηχάνημα. Αυτό συμβαίνει διότι κατά την μετάβαση από το ένα σύστημα στο επόμενο εξέρχονται από το μηχάνημα κάποιες ουσίες και έτσι μεταβάλλεται η σύσταση του αρχικού εκχυλίσματος για το οποίο έγιναν οι δοκιμές με πιθανή συνέπεια τη διαφορετική συμπεριφορά μέσα στη στήλη και την δημιουργία γαλακτώματος. Για να επιλύσουμε το προαναφερόμενο πρόβλημα πραγματοποιήσαμε μια νέα δοκιμή, την προσημείωση διαχωρισμού, με την οποία θα ελέγξουμε κατά πόσον μια σειρά συστημάτων μπορεί να εφαρμοστεί στο μηχάνημα χωρίς να υπάρχει ο κίνδυνος δημιουργίας γαλακτώματος.

- *Προσομοίωση διαχωρισμού*

Η δοκιμή της προσομοίωσης διαχωρισμού έχει ως εξής: Σε δοκιμαστικό σωλήνα προσθέτουμε 10 mg αρχικού εκχυλίσματος και τους διαλύτες του πρώτου διφασικού συστήματος μέχρι όγκου 3 ml και ανακινούμε προκειμένου να διαλυθεί το εκχύλισμα και να κατανεμηθούν οι ουσίες στις δύο φάσεις. Επίσης σε άλλους δοκιμαστικούς σωλήνες σχηματίζουμε τα υπόλοιπα διφασικά συστήματα μέχρι όγκου 3 ml χωρίς την προσθήκη του ολικού εκχυλίσματος. Αφού διαχωριστούν οι δύο φάσεις στο πρώτο σύστημα απομακρύνουμε την κινητή φάση και προσθέτουμε την αντίστοιχη φάση του επόμενου διφασικού συστήματος και ανακινούμε τον δοκιμαστικό σωλήνα. Το ίδιο κάνουμε και για τα άλλα διφασικά συστήματα και παρατηρούμε αν διαχωρίζονται οι δυο φάσεις των νέων πια συστημάτων (μια φάση από το προηγούμενο και μια από το επόμενο διφασικό σύστημα) στον προβλεπόμενο χρόνο. Με τον τρόπο αυτό προσομοιάζουμε την μεταβολή των διφασικών συστημάτων μέσα στη στήλη και έτσι μπορούμε να προβλέψουμε κατά

πόσον η εφαρμογή των παραπάνω διφασικών συστημάτων στη σειρά δεν θα αντιμετωπίσει το πρόβλημα της δημιουργίας γαλακτώματος.

Η δοκιμή αυτή έδειξε ότι κατά την μετάβαση από το σύστημα Ε2 έως και το σύστημα Ε8 ο διαχωρισμός των φάσεων ήταν ικανοποιητικός. Επιπλέον μελετήσαμε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης τις μεταβολές στην ένταση των κορυφών κατά την μετάβαση από το ένα διφασικό σύστημα στο επόμενο όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 6.3.7: Χρωματογραφική απεικόνιση της μεταβολής στην κατανομή των ουσιών κατά την επεξεργασία με CCC του μεθανολικού εκχυλίσματος του *L. laxiflorus* με τη μέθοδο των συνεχόμενων συστημάτων. Με Ε3uu συμβολίζουμε την άνω φάση του συστήματος που προήρθε από την ανάμιξη της κάτω φάσης του Ε2 και της άνω φάσης του Ε3. Το ίδιο ισχύει και για τα Ε4uu, Ε5uu, Ε6uu, Ε7uu και Ε8uu. Με Ε8dd συμβολίζουμε την κάτω φάση του τελικού διφασικού συστήματος που προήλθε από την ανάμιξη της κάτω φάσης του προηγούμενου συστήματος της δοκιμής με την άνω φάση του συστήματος Ε8.

- *Εκτέλεση διαχωρισμού*

Για τον διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε το όργανο υδροστατικού τύπου CPC KROMATON χρησιμοποιώντας παρασκευαστική στήλη των 1000 ml, αντλία LabAlliance με όριο πίεσης τα 50 bar και αυτόματος συλλέκτης Buchi B-684. . Αρχικά πληρώσαμε τη στήλη με την κάτω φάση του συστήματος Ε2. Στη συνέχεια θέσαμε την στήλη σε περιστροφή (800 rpm) και διοχετεύσαμε την πάνω φάση του ίδιου συστήματος. Μέτα την εξισορρόπηση του διφασικού συστήματος έγινε η εισαγωγή του εκχυλίσματος βάρους 6,5 g. Αφού συλλέξαμε 30 κλάσματα των 10 ml αλλάξαμε την κινητή φάση από 100% Ε2u σε 50/50 Ε2u/Ε3u προκειμένου να επιτύχουμε πιο ομαλή μετάβαση από το ένα σύστημα στο επόμενο. Μετά από 10

κλάσματα (των 10 ml) διοχετεύσαμε την πάνω φάση του συστήματος Ε3 (Ε3u) και συλλέξαμε ακόμη 10 κλάσματα. Κατόπιν αλλάξαμε την κινητή φάση από 100% Ε3u σε 50/50 Ε3u/Ε4u. Μετά την συλλογή 20 κλασμάτων διοχετεύσαμε την πάνω φάση του συστήματος Ε4 για τα επόμενα 30 κλάσματα. Στη συνέχεια συλλέξαμε 34 κλάσματα χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση την άνω φάση του συστήματος Ε6 και 49 κλάσματα με κινητή φάση την άνω φάση του συστήματος Ε8. Στο σημείο αυτό έγινε αναστροφή των φάσεων χρησιμοποιώντας πια ως κινητή την κάτω φάση του συστήματος Ε8 όποτε συλλέξαμε ακόμη 27 κλάσματα. Όλη η πορεία του διαχωρισμού περιγράφεται εν συντομία στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6.3.30: Πορεία διαχωρισμού του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus* με τη χρήση της τεχνικής CCC και τη μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης.

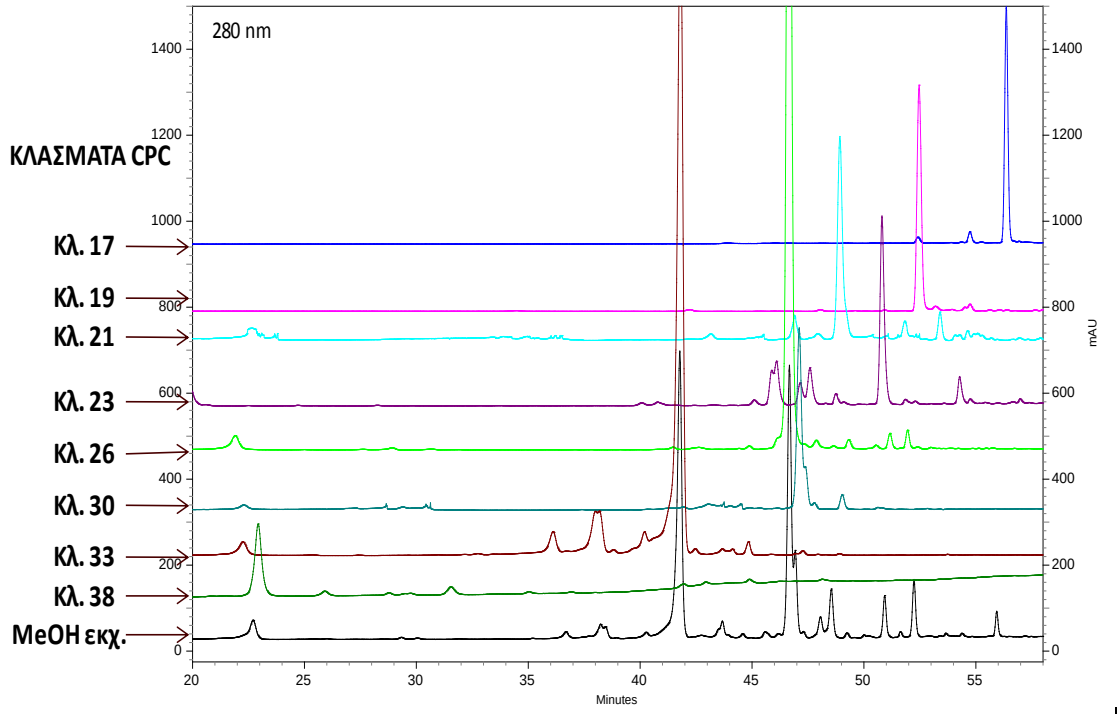
Στατική φάση	Κινητή φάση	Αναλογία	Κλάσματα
E2d	E2u	100%	30
E*	E2u + E3u	50/50	10
E*	E3u	100%	10
E*	E3u + E4u	50/50	20
E*	E4u	100%	30
E*	E6u	100%	34
E*	E8u	100%	49
	Αναστροφή		
E8u	E8d	100%	27

Συνολικά συλλέχτηκαν 210 κλάσματα των 10 ml τα οποία, μετά από έλεγχο με TLC, συνενώθηκαν για να προκύψουν τελικά 46 κλάσματα τα βάρη των οποίων παρουσιάζονται στον πίνακα 6.3.31. Η ροή των διαλυτών και η περιστροφή της στήλης διατηρήθηκαν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας στα 10 ml/min και 800 rpm, αντίστοιχα. Ο διαχωρισμός διήρκησε 7 ώρες και καταναλώθηκαν περίπου 5 lt διαλυτών εκ των οποίων το 1/3 αποτελούσε το νερό.

Πίνακας 6.3.31: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus* με CCC χρησιμοποιώντας για το διαχωρισμό η μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης.

Κλ.	Βάρος (mg)	Κλ.	Βάρος (mg)	Κλ.	Βάρος (mg)	Κλ.	Βάρος (mg)
Κλ.1	100,9	Κλ.13	23,5	Κλ.25	72,3	Κλ.37	70,7
Κλ.2	11,7	Κλ.14	18,5	Κλ.26	49,8	Κλ.38	34,8
Κλ.3	12,7	Κλ.15	21,3	Κλ.27	35,6	Κλ.39	355,1
Κλ.4	14,4	Κλ.16	15,4	Κλ.28	37,6	Κλ.40	283,1
Κλ.5	11,1	Κλ.17	34,6	Κλ.29	22,9	Κλ.41	2,2
Κλ.6	17,3	Κλ.18	21,6	Κλ.30	118,4	Κλ.42	5,2
Κλ.7	14,1	Κλ.19	39	Κλ.31	145,5	Κλ.43	16,5
Κλ.8	17	Κλ.20	20,4	Κλ.32	227,6	Κλ.44	858,7
Κλ.9	8,2	Κλ.21	67,3	Κλ.33	47,9	Κλ.45	1221,8
Κλ.10	12,4	Κλ.22	60,1	Κλ.34	63,9	Κλ.46	1718,5
Κλ.11	14,4	Κλ.23	78,4	Κλ.35	81		
Κλ.12	8,2	Κλ.24	58,1	Κλ.36	52,3		

Στη συνέχεια τα παραπάνω κλάσματα ελέγθησαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) προκειμένου να μελετήσουμε την σύσταση τους και να αντιστοιχίσουμε τις περιεχόμενες ουσίες στις βασικές κορυφές του χρωματογραφήματος. Έτσι παρατηρήσαμε ότι τα κλάσματα 17, 19, 21, 23, 26, 30, 33 και 38 περιέχουν σχεδόν απομονωμένες τις ουσίες που αντιστοιχούν στις βασικές κορυφές του χρωματογραφήματος (Εικόνα 6.3.8).



Εικόνα 6.3.8: Χρωματογραφική απεικόνιση των κλασμάτων που λάβαμε κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* με CCC χρησιμοποιώντας την μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient mode).

Συμπερασματικά αναφέρουμε ότι με τη χρήση της μεθόδου βαθμιδωτής έκλουσης καταφέραμε να απομονώσουμε σε ένα στάδιο τις 8 κύριες ουσίες του μεθανολικού εκχυλίσματος όπως αυτές φαίνονται στο χρωματογράφημα HPLC. Το αποτέλεσμα αυτό είναι πραχτικά αδύνατο με την χρήση ενός μόνο διφασικού συστήματος για τον διαχωρισμό με την τεχνική CCC. Επιπλέον αν συνυπολογιστεί ο μικρός χρόνος ανάλυσης, η μικρή ποσότητα διαλυτών που καταναλώθηκε και η ποσότητα του αρχικού δείγματος που επεξεργάστηκε, γίνεται εύκολα αντιληπτό πόσο σημαντική είναι τόσο η τεχνική όσο και η εφαρμοζόμενη μέθοδος στην απομόνωση φυσικών προϊόντων.

Από την μελέτη των φασμάτων NMR και MS των παραπάνω κλασμάτων συμπεράναμε ότι οι ουσίες που εμπεριέχονται σε αυτά είναι οι ίδιες με αυτές που απομονώθηκαν από το υδατικό εκχύλισμα (Πίνακας 6.3.32).

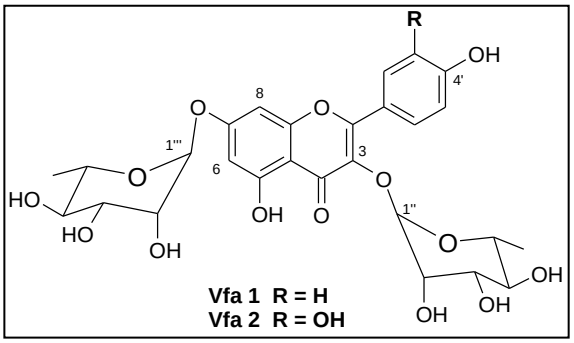
Πίνακας 6.3.32: Ουσίες που απομονώθηκαν κατά τη επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lathyrus laxiflorus*

Κλάσμα	Ουσίες
Κλ. 17	• 3-O-α-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Αφζελίνη) (Lla2)
Κλ. 19	• 3-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Κερκετρίνη) (Lla5)
Κλ. 21	• 3-O*β*-D-(6-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο) γλυκοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Lla8)
Κλ. 23	• 3-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο κερκετίνη (Lla7)
Κλ. 26	• 3-O-*β*-D-(6-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο) γλυκοπυρανοσυλο κερκετίνη (ρουτίνη) (Lla9)
Κλ. 30	• 3-O-*β*-D-[6-O-*α*-L-(3-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο) ραμνοπυρανοσυλο] γαλακτοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Lla 10)
Κλ. 33	• 6-C-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-8-C-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλο απιγενίνη (Σχαφτοσίδης) (Lla 12) • 6-C-*α*-L-αραβινοπυρανοσιλο-8-C-β-D-γλυκοπυρανόσυλο απιγενίνη (Ισοσχαφτοσίδης) (Lla 13)
Κλ. 38	• Χλωρογενικό οξύ (Lla 18)

,

6.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

6.4.1 Vicia faba



Τα προϊόντα **Vfa 1** και **Vfa 2** ήταν τα πρώτα από μια σειρά γλυκοσυδών φλαβονοειδών που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός δύο χρωματογραφικών τεχνικών: αρχικά της Χρωματογραφίας Αντιστρόφου Ροής (CCC) και στη συνέχεια τα αντίστοιχα κλάσματα επεξεργάστηκαν με Παρασκευαστική Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (prep. HPLC). Από τη μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, και DEPT των ουσιών αυτών αλλά και τη μελέτη του φάσματος ^{1}H-NMR του ακετυλιωμένου προϊόντος της ουσίας Vfa 1, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για δύο διγλυκοσίδες φλαβονολών και συγκεκριμένα για **την 3,7-δι-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη και την 3,7-δι-*O*- ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη**.

Στο φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας Vfa 1 παρατηρήσαμε τις χαρακτηριστικές κορυφές της καιμπφερόλης, δηλαδή δύο διπλές κορυφές σε *δ* 6.68 και 6.43 (*J* = 2.0 Hz) που αντιστοιχούν στα υδρογόνα 8 και 6 καθώς και δύο επίσης διπλές κορυφές σε *δ* 7.76 και 6.93 (*J* = 8.2 Hz) που αντιστοιχούν σε ένα παρα-υποκατεστημένο αρωματικό σύστημα. Στην οξυγονωμένη περιοχή του ίδιου φάσματος εμφανίζονται τα σήματα των ανωμερικών πρωτονίων δύο σακχάρων, τα οποία συντονίζονται σε *δ* 5.58 και 5.40 με τη μορφή brs, ενώ τα υπόλοιπα πρωτόνια των σακχάρων εμφανίζονται στην περιοχή 4.50 ως 3.20 ppm. Επίσης σε *δ* 1.27 και 0.93 εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές (*J* = 5.4 Hz) οι οποίες ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν σε μεθυλικά πρωτόνια.

Από τα παραπάνω συμπεράναμε ότι στο μόριο υπάρχουν δύο ραμνόσες, οι οποίες είναι συνδεδεμένες με τον αρωματικό πυρήνα της καιμπφερόλης (με βάση τις χημικές μετατοπίσεις των αρωματικών πρωτονίων). Επίσης, συμπεράναμε ότι η μια ραμνόση είναι συνδεδεμένη στην θέση 3 (κορυφή μεθυλικών πρωτονίων στα 0.93

ppm), ενώ η άλλη στην θέση 7 της καιμπφερόλης (λόγω της αποθωράκισης των πρωτονίων 6 και 8).

Με σκοπό την επιβεβαίωση των όσων προαναφέρθηκαν πραγματοποιήθηκε ακετυλίωση του προϊόντος, με προσθήκη πυριδίνης και οξικού ανυδρίτη σε αναλογία 1/1. Το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 48 ώρες. Το ακετυλιωμένο προϊόν απομονώθηκε με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, στην οποία ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε το CH_2Cl_2/MeOH 99/1, και μελετήθηκε φασματοσκοπικά.

Στο φάσμα ^{1}H-NMR του ακετυλιωμένου προϊόντος και στην περιοχή 8 – 6 ppm εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές της καιμπφερόλης [δύο διπλές κορυφές (*J* = 8.2 Hz) σε *δ* 7.88 και 7.26 καθώς επίσης και δύο διπλές κορυφές *(J* = 2.0 Hz) σε *δ* 7.07 και 6.76]. Όσον αφορά την οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρατηρήσαμε:

- Τις κορυφές των ανωμερικών πρωτονίων (ευρείες απλές) σε *δ* 5.54 και 5.51.
- Το σήμα των πρωτονίων H-2 των δύο ραμνοσών (διπλές διπλών κορυφές με *J* 3.5 , 1.8 Hz) σε *δ* 5.62 και 5,42.
- Δύο διπλές διπλών κορυφές (*J* = 9.5 3.5 Hz) στα 5.43 και 5.23 ppm οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-3 των δύο ραμνοσών.
- Στα 5.15 και 4.90 ppm δύο τριπλές κορυφές (*J* = 9.5 Hz) που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-4 των ραμνοσών.
- Δύο πολλαπλές κορυφές σε *δ* 3,90 και 3.29 που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-5 των δύο ραμνοσών.

Επιπλέον παρατηρήσαμε οκτώ απλές κορυφές στην περιοχή 2.45 ως 1.90 ppm, από τις οποίες η καθεμία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούν σε δύο ακετύλια που βρίσκονται σε φαινολικά υδροξύλια (*δ* 2.41 και 2.31) και έξι που αντιστοιχούν σε ακετύλια συνδεδεμένα σε σάκχαρα (*δ* 2.18, 2.10, 2.05, 2.02, 1.96 και 1.95).

Από τα προαναφερθέντα καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το προϊόν Vfa 1 είναι η **3,7-δι-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη ή καμπφεριτρίνη**. Η δομή αυτή επιβεβαιώνεται τόσο από τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα[334] όσο και από

το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία όπου παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 577,1525 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{27}H_{29}O_{14}$ και βαθμό ακορεστότητας 13.

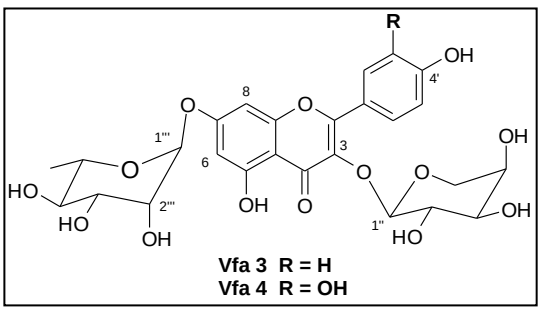
Πίνακας 6.4.1: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^1H και ^{13}C) της 3,7-δι- α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 1) και της 3,7-δι- α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 2).

	Vfa 1		Vfa 2	
C/H	^1H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
2	-	160.1	-	158.2
3	-	136.9	-	134.9
4	-	180.1	-	179.9
5	-	163.4	-	162.2
6	6.43 d (*J*= 2.0)	100.3	6.48 d (*J*= 2.0)	100.1
7	-	163.9	-	165.4
8	6.68 d (*J*= 2.0)	96.1	6.73 d (*J*= 2.0)	95.4
9	-	158.4	-	159.5
10	-	107.9	-	105.8
1′	-	122.8	-	123.1
2′	7.76 d (*J*= 8.2)	132.5	7.37 d (*J*= 2.2)	116.8
3′	6.93 d (*J*= 8.2)	117.0	-	145.1
4′	-	162.2	-	150.6
5′	6.93 d (*J*= 8.2)	117.0	6.90 d (*J*= 8.4)	117.1
6′	7.76 d (*J*= 8.2)	132.5	7.35 dd (*J*= 8.4/2.2)	123.1
1′′	5.40 brs	103.9	5.37 brs	103.4
2′′	4.25 brs	72.3	4.22 brs	71.9
3′′	3.74 dd (*J*= 9.3/3.3)	72.5	3.78 dd (*J*= 9.3/3.3)	72.3
4′′	3.52 t (*J*= 9.3)	73.7	3.54 t (*J*= 9.3)	73.5
5′′	3.36 m	72.5	3.47 m	71.7
6′′	0.93 d (*J*= 5.4)	18.1	0.96 d (*J*= 5.4)	17.5
1′′′	5.58 brs	100.3	5.56 brs	99.7
2′′′	4.05 brs	72.0	4.02 brs	71.7
3′′′	3.86 dd (*J*= 9.3/3.3)	72.5	3.84 dd (*J*= 9.3/3.3)	72.2
4′′′	3.50 t (*J*= 9.3)	73.7	3.48 t (*J*= 9.3)	73.6
5′′′	3.63 m	71.3	3.60 m	71.2
6′′′	1.27 d (*J*= 5.4)	18.5	1.27 d (*J*= 5.4)	17.8

Το φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας Vfa 2 έχει πολύ μεγάλη ομοιότητα με το αντίστοιχο φάσμα του προϊόντος Vfa 1. Η μόνες διαφορές μεταξύ των δύο αυτών φασμάτων εντοπίζονται στην αρωματική περιοχή όπου στο φάσμα της ουσίας Vfa 2 εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές της κερκετίνης αντί για αυτές της καιμπφερόλη. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε τις χαρακτηριστικές κορυφές ενός ABX υποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα, δηλαδή μία διπλή κορυφή σε *δ* 7.37 (*J* = 2.2 Hz), μια διπλά διπλή κορυφή σε *δ* 7.35 (*J* = 8.4/2.2 Hz) και μια επίσης διπλή κορυφή σε *δ* 6.90 (*J* = 8.4 Hz), οι οποίες χαρακτηρίζουν τα πρωτόνια 2′, 6′ και 5′ αντίστοιχα του δακτυλίου Β της κερκετίνης. Τα πρωτόνια 6 και 8 του δακτυλίου Α εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές σε *δ* 6.48 και 6.73 (*J* = 2.0 Hz) αντίστοιχα όπως και στην περίπτωση της καιμπφερόλης στο φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας Vfa 1. Όσον αφορά την οξυγονωμένη και την αλιφατική περιοχή παρατηρείται απόλυτη ταύτιση των σημάτων τόσο στα φάσματα ^{1}H-NMR των ουσιών Vfa 1 και Vfa 2 όσο και στα ομοπυρηνικά φάσματα δύο διαστάσεων COSY των ουσιών αυτών.

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις και την σύγκριση των αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η ουσία Vfa 2 είναι η 3,7-δι-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη[335]. Το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή καθώς παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 593,1471 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{27}H_{29}O_{15}$ και βαθμό ακορεστότητας 13. Επίσης στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται και η κορυφή m/z 301,0312 $[M-292,12]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{15}H_9O_7$ και βαθμό ακορεστότητας 11 η οποία παραπέμπει στο ιόν της κερκετίνης. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR) των ουσιών Vfa 1 και Vfa 2 δίδονται στον πίνακα (Πίνακας 6.4.1).

Τα προϊόντα **Vfa 3** και **Vfa 4** απομονώθηκαν με τον ίδιο τρόπο όπως και τα παραπάνω φυσικά προϊόντα από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού. Η εξέταση των φασμάτων NMR και MS



Vfa 3 R = H
Vfa 4 R = OH

που ακολούθησε αποκάλυψε ότι πρόκειται για δύο ακόμη διγλυκοσίδες φλαβονοείδων και συγκεκριμένα για τις ουσίες **3-*O*-*α*-L-αραβυνοπυρανοσυλ-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη** και **3-*O*-*α*-L-αραβυνοπυρανοσυλ-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη**.

Η παρουσία του άγλυκου της καιμπφερόλης γίνεται εύκολα αντιληπτή στο φάσμα ^{1}H-NMR της ουσία Vfa 3 λόγω των χαρακτηριστικών κορυφών που εμφανίζονται στην αρωματική περιοχή του φάσματος (δύο διπλές κορυφές με *J* = 9.2 Hz που ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία σε *δ* 8.10 και 6.90 καθώς επίσης και δύο διπλές κορυφές με *J* = 2.0 Hz που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία σε *δ* 6.77 και 6.48). Στην οξυγονωμένη περιοχή του ίδιου φάσματος εμφανίζονται τα σήματα των ανωμερικών πρωτονίων δύο σακχάρων, τα οποία συντονίζονται σε *δ* 5.57 και 5.21 ενώ τα υπόλοιπα πρωτόνια των σακχάρων εμφανίζονται στην περιοχή 4.50 ως 3.20 ppm. Επίσης σε *δ* 1.26 εμφανίζεται μια διπλή κορυφή (*J* = 6.1 Hz) η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε μεθυλικά πρωτόνια.

Από τα παραπάνω συμπεράναμε ότι στο μόριο υπάρχουν δύο σάκχαρα, το ένα εκ των οποίων είναι η ραμνόση (ευρεία απλή κορυφή ανωμερικού πρωτονίου σε *δ* 5.57 και κορυφή μεθυλικών πρωτονίων στα 1.27 ppm). Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων δύο διαστάσεων (COSY και HMQC-Dept) αποκάλυψε ότι το δεύτερο σάκχαρο είναι a-L–αραβινοπυρανόση. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν τα εξής χαρακτηριστικά σήματα:

- Μια διπλή κορυφή (*J* = 6.5 Hz) σε *δ* 5.21 που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 104.1 ppm (HMQC).
- Μια διπλά διπλή κορυφή (*J* = 8.2 / 6.5 Hz) σε *δ* 3.91 που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-2 του σακχάρου με τον αντίστοιχο άνθρακα να συντονίζεται στα 72.6 ppm
- Μια διπλά διπλή κορυφή (*J* = 8.2 / 3.1 Hz) σε *δ* 3.65 που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-3 του σακχάρου, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 73.9 ppm.

- Μια ευρεία απλή κορυφή σε *δ* 3.80 που αντιστοιχεί στο H-4 του σακχάρου με τον αντίστοιχο άνθρακα να συντονίζεται στα 68.8 ppm.
- Δύο ευρείες διπλές κορυφές (*J* = 10.5 Hz) σε *δ* 3.79 και 3.41 οι οποίες αντιστοιχούν στα H-5 της αραβινόζης ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 66.5 ppm (HMQC-Dept).

Για την καθορισμό της θέσης σύνδεσης των δύο σακχάρων πάνω στο άγλυκο της καιμπφερόλης καθοριστικό ρόλο έπαιξε το ετεροπυρηνικό φάσμα δύο διαστάσεων HMBC. Το σήμα σύζευξης (J^3) μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου στα 5.57 ppm και του άνθρακα στα 163.1 ppm ο οποίος με τη σειρά του συζευγνύεται (J^2) με τα πρωτόνια H-6 (*δ* 6.48) και H-8 (*δ* 6.77), δείχνει ότι η ραμνοπυρανόση είναι συνδεδεμένη στη θέση 7 της καιμπφερολης. Από το ίδιο φάσμα αποκαλύφτηκε και η σύνδεση της αραβινοπυρανόσης στη θέση 3 της καιμπφερολης λόγω του σήματος σύζευξης (J^3) μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου στα 5.21 ppm και του άνθρακα στα 135.5 ppm.

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η ουσία Vfa 3 είναι η **3-*O*-*α*-L -αραβινοπυρανοσυλ-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη**. Το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή καθώς παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 563,1369 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{26}H_{27}O_{14}$ και βαθμό ακορεστότητας 13. Επίσης στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται η κορυφή m/z 431.0956 $[M-132,04]^-$ η οποία παραπέμπει στο ιόν που προκύπτει από την απομάκρυνση μιας πεντόζης από το μόριο καθώς και η κορυφή m/z 285.2049 $[M-277,93]^-$ η οποία παραπέμπει στο ιόν της καιμπφερόλης. Η παραπάνω δομή επιβεβαιώνεται και από την σύγκριση των πειραματικών τιμών με βιβλιογραφικά δεδομένα[336,337].

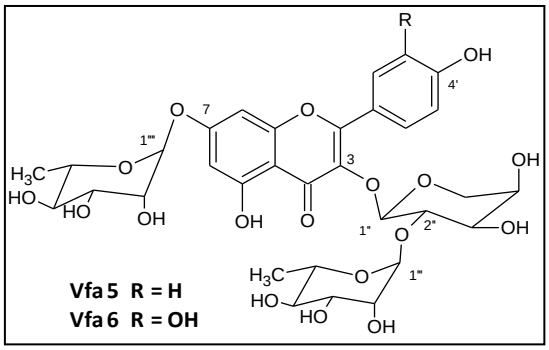
Το φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας **Vfa 4** έχει πολύ μεγάλη ομοιότητα με το αντίστοιχο φάσμα του προϊόντος Vfa 3. Οι μόνες διαφορές μεταξύ των δύο αυτών φασμάτων εντοπίζονται στην αρωματική περιοχή όπου είναι εμφανής η παρουσία ενός ABX υποκατεστιμένου αρωματικού πυρήνα (μία διπλή κορυφή με *J* = 2.2 Hz σε *δ* 7.76, μια διπλά διπλή κορυφή με *J* = 8.4 / 2.2 Hz σε *δ* 7.62 και μια επίσης διπλή

Πίνακας 6.4.2: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O- a-L -αραβυνοπυρανοσυλ-7-O-α-L- ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 3) και της 3-O-a-L -αραβυνοπυρανοσυλ-7-O-α-L- ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 4).

	Vfa 3 (MeOD)		Vfa 4 (MeOD)	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
2	-	159.4	-	159.7
3	-	135.5	-	135.9
4	-	179.8	-	180.1
5	-	163.0	-	164.4
6	6.48 d (*J*=2.0)	100.5	6.48 d (*J*=2.0)	100.9
7	-	163.1	-	163.9
8	6.77 d (*J*=2.0)	95.5	6.77 d (*J*=2.0)	95.9
9	-	156.3	-	158.4
10	-	107.3	-	107.9
1′	-	122.1	-	123.4
2′	8.10 d (*J*=9.2)	132.4	7.76 d (*J*=2.2)	117.7
3′	6.90 d (*J*=9.2)	116.5	-	146.6
4′	-	162.4	-	150.5
5′	6.90 d (*J*=9.2)	116.5	6.88 d (*J*=8.4)	116.8
6′	8.10 d (*J*=9.2)	132.4	7.62 dd (*J*=8.5/2.2)	123.8
1′′	5.21 d (*J*=6.5)	104.1	5.23 d (*J*=6.5)	104.5
2′′	3.91 dd (*J*=8.2/6.5)	72.6	3.91 dd (*J*=8.2/6.5)	72.9
3′′	3.65 dd (*J*=8.2/3.1)	73.9	3.65 dd (*J*=8.2/3.1)	74.0
4′′	3.80 brs	68.8	3.82 m	69.0
5′′α	3.79 d (*J*=10.5)	66.5	3.83 d (*J*=10.5)	66.0
5′′β	3.41 d (*J*=10.5)		3.45 d (*J*=10.5)	
1′′′	5.57 d (*J*=1.7)	100.0	5.57 d (*J*=1.7)	100.4
2′′′	4.01 dd (*J*=3.7/1.7)	71.5	4.01 dd (*J*=3.7/1.7)	73.0
3′′′	3.84 dd (*J*=9.6/3.7)	72.0	3.83 dd (*J*=9.6/3.7)	71.9
4′′′	3.48 t (*J*=9.6)	73.7	3.48 t (*J*=9.6)	74.5
5′′′	3.59 m	71.2	3.59 m	71.7
6′′′	1.26 d (*J*=6.1)	18.0	1.26 d (*J*=6.1)	18.5

κορυφή με *J* = 8.4 Hz σε *δ* 6.88) αντί του π-υποκατεστημενού αρωματικού πυρήνα που παρατηρήσαμε στο φάσμα της ουσίας Vfa 3. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος εμφανίζονται τα ίδια σήματα (σε παραπλήσιες τιμές *δ*) με αυτά στο φάσμα πρωτονίου της ουσίας Vfa 3. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε και εδώ την ύπαρξη δύο ανωμερικών πρωτονίων, τα οποία συντονίζονται σε *δ* 5.57 και 5.23 ενώ τα υπόλοιπα πρωτόνια των σακχάρων εμφανίζονται στην περιοχή 4.50 ως 3.20 ppm. Επίσης σε *δ* 1.26 εμφανίζεται η διπλή κορυφή (*J* = 6.1 Hz) των μεθυλενικών πρωτονίων της ραμνόσης.

Η πλήρη ταύτιση όλων των υπολοίπων σημάτων πλην της αρωματικής περιοχής, τόσο στα φάσματα ^{1}H-NMR όσο και στα φάσματα δύο διαστάσεων COSY και HMQC-Dept μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το προϊόν Vfa 4 είναι ο διγλυκοσίδης της κερκετίνης **3-O-*α*-L-αραβυνοπυρανοσυλ-7-O-α-L-ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη.** Η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 579,1317 $[M-H]^-$ (προτεινόμενος μοριακός τύπος $C_{26}H_{27}O_{15}$ και βαθμός ακορεστότητας 13) στο φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία Vfa 4 έρχεται να επιβεβαιώσει την παραπάνω δομή. Επίσης στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται η κορυφή m/z 446.9028 $[M-132,23]^-$ η οποία παραπέμπει στο ιόν που προκύπτει από την απομάκρυνση μιας πεντόζης από το μόριο καθώς και η κορυφή m/z 301,0315 $[M-278,10]^-$ η οποία παραπέμπει στο ιόν της κερκετίνης. Τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα βρισκονται σε απόλυτη ταύτιση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που υπαρχουν για το μόριο[338].



Τα προϊόντα **Vfa 5** και **Vfa 6** ανήκουν επίσης στην κατηγορία των γλυκοσιδών των φλαβονοειδών και παραλήφτηκαν με τη μορφή κίτρινης άμορφης σκόνης κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού αρχικά με CCC και στη συνέχεια με παρασκευαστική HPLC Η φασματοσκοπική εξέταση (NMR και MS) των ουσιών αυτών αποκάλυψε ότι πρόκειται για δύο τριγλυκοσίδες φλαβονολών και συγκεκριμένα για τις ουσίες **3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ-*α*-L-**

αραβινοπυρανοσυλ)-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (Vfa 5) και **3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ-*α*-L--αραβινοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη** (Vfa 6).

Η παρουσία του άγλυκου της καιμπφερόλης γίνεται εύκολα αντιληπτή στο φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας Vfa 5. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρατηρούμε μια σειρά κορυφών οι οποίες υποδηλώνουν την ύπαρξη τριών σακχάρων στο μόριο. Η παρουσία δύο διπλών κορυφών (*J* = 6.1 Hz) στην αλειφατική περιοχή του φάσματος (δ 1.26 και 1.08) σε συνδυασμό με τις δύο διπλές κορυφές (J = 1.4 Hz) στην περιοχή των ανωμερικών πρωτονίων (*δ* 5.57 και 5.10) υποδεικνύουν την παρουσία δύο ραμνοσών στο μόριο. Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων δύο διαστάσεων COSY και HMQC-Dept επιβεβαίωσε την παραπάνω υπόθεση. Επίσης διαπιστώθηκε και η ύπαρξη της αραβινοπυρανόσης ως το τρίτο σάκχαρο του μορίου.

Η σύνδεση της ραμνόσης στη θέση 7 και της αραβινόσης στη θέση 3 της καιμπφερόλης διαπιστώθηκε από τη μελέτη του φάσματος HMBC όπου παρατηρήσαμε τόσο το σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου στα 5.57 ppm και του άνθρακα 7 (163.6 ppm) όσο και το αντίστοιχο σήμα μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου στα 5.56 ppm και του άνθρακα 3 της καιμπφερόλης (135.9). Η αποθωράκιση τόσο του πρωτονίου της θέσης 2 της αραβινοπυρανόσης (4.11 ppm) όσο και του αντίστοιχου άνθρακα (77.1 ppm) αποτελούν ισχυρή ένδειξη ότι το δεύτερο μόριο της ραμνόσης είναι ενωμένο στη θέση αυτή. Πράγματι το σήμα σύζευξης στο φάσμα HMBC μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου της ραμνόσης (5.10 ppm) και του άνθρακα C-2 της αραβινόσης (77.1 ppm) αποδεικνύει την παραπάνω υπόθεση.

Το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία Vfa 5 έρχεται να επιβεβαιώσει την παραπάνω δομή καθώς παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 709,1939 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{32}H_{37}O_{18}$ και βαθμό ακορεστότητας 14. Επίσης στο ίδιο φάσμα εμφανίζονται και οι κορυφές:

- m/z 563.1369 $[M-146.06]^-$ η οποία παραπέμπει στο ιόν που προκύπτει από την απομάκρυνση μιας ραμνόσης από το μόριο

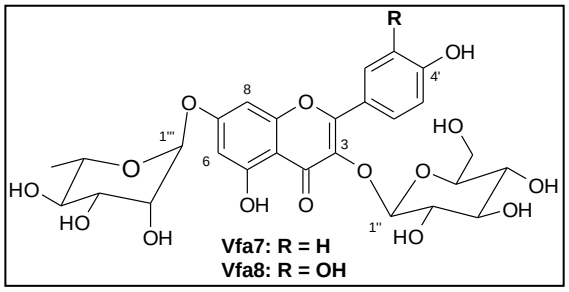
Πίνακας 6.4.3: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ- a-L -αραβυνοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 5) και της 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-a-L -αραβυνοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 6).

	Vfa 5 (MeOD)		Vfa 6 (MeOD)	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	13 C(ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	13 C (ppm)
2	-	159.7	-	159.7
3	-	135.9	-	135.9
4	-	180.1	-	180.1
5	-	163.4	-	164.4
6	6.47 d (2.2)	100.6	6.46 d (2.2)	100.9
7	-	163.6	-	163.9
8	6.76 d (2.2)	95.6	6.75 d (2.2)	95.9
9	-	158.0	-	158.4
10	-	107.9	-	107.9
1′	-	123.1	-	123.4
2′	8.09 d (8.9)	132.1	7.65 d (2.0)	117.7
3′	6.92 d (8.9)	116.5	-	146.6
4′	-	150.1	-	150.5
5′	6.92 d (8.9)	116.5	6.90 d (8.5)	116.8
6′	8.09 d (8.9)	132.1	7.61 dd (8.5/2.0)	123.8
1′′	5.56 d (5.1)	100.8	5.57 d (5.1)	101.6
2′′	4.11 dd (6.8/5.1)	77.1	4.11 dd (6.8/5.1)	77.7
3′′	3.83 m	70.2	3.84 m	72.9
4′′	3.78 m	68.8	3.78 m	69.0
5′′a	3.79 m	65.4	3.82 m	66.0
5′′b	3.36 dd (11.2/2.6)		3.40 m	
1′′′	5.10 d (1.4)	102.1	5.10 d (1.4)	102.7
2′′′	3.91 dd (3.4/1.4)	72.1	3.92 dd (3.4/1.4)	73.4.
3′′′	3.71 dd (9.5/3.4)	72.3	3.69 dd (9.5/3.4)	72.7
4′′′	3.36 t (9.5)	73.9	3.34 t (9.5)	74.1
5′′′	3.89 m	69.2	3.88 m	70.6
6′′′	1.08 d (6.1)	17.7	1.06 d (6.1)	18.0
1′′′′	5.57 d (1.4)	99.6	5.56 d (1.4)	100.4
2′′′′	4.02 dd (3.4/1.4)	71.7	4.02 dd (3.4/1.4)	73.0
3′′′′	3.83 dd (9.5/3.4)	71.4	3.82 dd (9.5/3.4)	71.9
4′′′′	3.48 t (9.5)	73.6	3.48 t (9.5)	74.5
5′′′′	3.59 m	71.3	3.59 m	71.7
6′′′′	1.26 d (6.1)	17.9	1.26 d (6.1)	18.5

- m/z 430.9254 $[M-278.27]^-$ η οποία παραπέμπει στο ιόν που προκύπτει από την απομάκρυνση μιας ραμνόσης και μιας αραβινόσης από το μόριο
- m/z 285.2049 $[M-423.99]^-$ η οποία παραπέμπει στο ιόν της καιμπφερόλης

Αντίστοιχα σήματα με τα παραπάνω παρατηρήσαμε και κατά την μελέτη των φασμάτων του μεταβολίτη **Vfa 6** με τις διαφορές να εντοπίζονται στην αρωματική περιοχή λόγω της παρουσίας της γενίνης κερκετίνης αντί της καιμπφερόλης. Η μελέτη αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο μεταβολίτης Vfa 6 είναι η **3-*O*-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*α*-L-αραβυνοπυρανοσυλο)-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη** γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 725,1889 $[M-H]^-$ η οποία εμφανίζεται στο φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία. Οι δύο παραπάνω μεταβολίτες απομονώνονται δεύτερη φορά από φυτικούς οργανισμούς. Έχουν βρεθεί πρόσφατα στο φυτό *Anthyllis hermanniae* L. (Fabaceae) σε φυτοχημική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μας. Η σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων επιβεβαίωσε την δομή των δύο αυτών ουσιών[339].

Οι μεταβολίτες **Vfa 7** και **Vfa 8** απομονώθηκαν ως κύρια συστατικά του μεθανολικού εκχυλίσματος. Από το φάσμα ^{1}H-NMR των δύο προϊόντων ήταν εμφανές ότι πρόκειται για δύο διγλυκοσίδες φλαβονοειδών. Η περαιτέρω φασματοσκοπική μελέτη έδειξε ότι πρόκειται για τις ουσίες: **3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλ-7-*O*-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Vfa 7) και **3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλ-7-*O*-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη** (Vfa 8).



Από τη μελέτη του φάσματος ^{1}H-NMR του προϊόντος Vfa 7 διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για γλυκοσιδικό παράγωγο της καιμπφερόλης, αφού στην αρωματική περιοχή παρατηρήσαμε τις τέσσερεις κορυφές πού τη χαρακτηρίζουν την γενίνη αυτή (δύο διπλές κορυφές (J = 9.0 Hz) σε δ 8.09 και δ 6.91 που ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια ή καθεμιά και δύο διπλές κορυφές (J = 2.0 Hz) σε δ 6.77 και δ 6.48 που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο). Αντίστοιχα στην αρωματική περιοχή του

φάσματος ^{1}H-NMR του προϊόντος Vfa 8 εμφανίζονται οι κορυφές ενός ABX υποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα (μια διπλή κορυφή με *J*= 2.0 Hz σε δ 7.74, μια διπλά διπλή κορυφή με *J*= 8.9 / 2.0 Hz σε δ 7.65 και μια διπλή κορυφή με *J*= 8.9 Hz σε δ 6.90) που σε συνδυασμό με τις δύο διπλές κορυφές (*J* = 2.0 Hz) σε *δ* 6.78 και *δ* 6.49 υποδεικνύουν την ύπαρξη της γενίνης κερκετίνης στο μόριο.

Πέραν των διαφορών στην αρωματική περιοχή παρατηρήθηκε απόλυτη ταύτιση των υπολοίπων σημάτων στα φάσματα ^{1}H-NMR και COSY των δύο αυτών προϊόντων. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για δύο γλυκοσίδες φλαβονοειδών που διαφέρουν μόνο στο είδος της γενίνης.

Για τον καθορισμό του τύπου των σακχάρων πραγματοποιήσαμε ακετυλίωση του προϊόντος Vfa 7, με προσθήκη πυριδίνης και οξικού ανυδρίτη σε αναλογία 1/1 και το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 48 ώρες. Το ακετυλιωμένο προϊόν απομονώθηκε με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, στην οποία ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε CH_2Cl_2 / MeOH 98.5 / 1.5. Στη συνέχεια μελετήθηκαν τα φάσματα ^{1}H-NMR, HMQC, HMBC και NOESY του προϊόντος Στο φάσμα ^{1}H-NMR του ακετυλιωμένου προϊόντος παρατηρήσαμε τις χαρακτηριστικές κορυφές της καιμπφερόλης καθώς επίσης και εννέα απλές κορυφές στην περιοχή 2.45 ως 1.90 ppm, η καθεμία από τις οποίες ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια και αντιστοιχούν σε δύο ακετύλια που βρίσκονται σε φαινολικά υδροξύλια (*δ* 2.43 και 2.31) και επτά που αντιστοιχούν σε ακετύλια πάνω σε σάκχαρα (*δ* 2.18, 2.08, 2.04, 2.02, 1.99, 1.97 και 1.91). Τα επτά ακετύλια επιβεβαιώνουν την παρουσία δύο σακχάρων στο μόριο. Από τη μορφή των κορυφών στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος συμπεράναμε ότι τα δύο σάκχαρα είναι η ραμνόση και η γλυκόση.

Στο φάσμα NOESY του ακετυλιωμένου προϊόντος παρατηρήσαμε μια σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου της ραμνόσης με τα πρωτόνια 6 και 8 της γενίνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ραμνόση βρίσκεται ενωμένη στο υδροξύλιο της θέσης 7 της καιμπφερόλης. Επομένως η γλυκόση βρίσκεται είτε στη θέση 3 είτε στη θέση 4΄ της γενίνης. Συγκρίνοντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα του υπό μελέτη μορίου με φασματοσκοπικά δεδομένα που λάβαμε από τη βιβλιογραφία για τις δύο

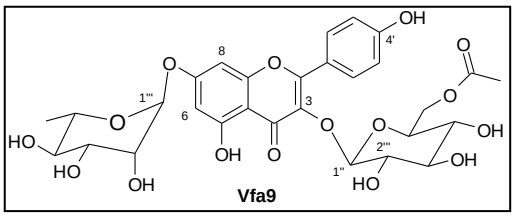
παραπάνω περιπτώσεις[340,341] καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η γλυκόση βρίσκεται συσδεδεμένη στη θέση 3 της γενίνης.

Πίνακας 6.4.4: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O -β-D-γλυκοπυρανοσυλ-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 7) και της 3-O -β-D-γλυκοπυρανοσυλ-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 8).

	Vfa 7		Vfa 8	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C*(ppm)
2	-	156.0	-	156.0
3	-	133.8	-	133.7
4	-	177.6	-	177.0
5	-	160.9	-	161.0
6	6.48 d (*J*= 2.0)	99.4	6.49 d (*J*= 2.0)	98.5
7	-	161.8	-	162.0
8	6.77 d (*J*= 2.0)	94.5	6.78 d (*J*= 2.0)	94.4
9	-	156.8	-	155.0
10	-	105.8	-	105.7
1′	-	120.9	-	121.1
2′	8.09 d (*J*= 9.0)	130.7	7.74 d (*J*= 2.0)	115.3
3′	6.91 d (*J*= 9.0)	115.0	-	145.0
4′	-	160.0	-	149.8
5′	6.91 d (*J*= 9.0)	115.0	6.90 d (*J*= 8.9)	116.4
6′	8.09 d (*J*= 9.0)	130.7	7.65 dd (*J*= 8.9/2.0)	121.1
1′′	5.34 d (*J*= 7.5)	101.3	5.35 d (*J*= 7.5)	100.8
2′′	3.51 dd (*J*= 9.2/7.5)	74.3	3.51 dd (*J*= 9.2/7.5)	74.7
3′′	3.42 t (*J*= 9.2)	76.5	3.45 t (*J*= 9.2)	77.7
4′′	3.37 t (*J*= 9.2)	70.0	3.37 t (*J*= 9.2)	71.7
5′′	3.21 ddd (*J*= 9.2/5.5/2.4)	77.1	3.24 ddd (*J*= 9.2/5.5/2.4)	79.0
6′′α	3.71 dd (*J*= 11.9/2.4)	61.1	3.74 dd (*J*= 11.9/2.4)	62.4
6′′β	3.52 dd (*J*= 11.9/5.5)		3.59 dd (*J*= 11.9/5.5)	
1′′′	5.57 brs	98.9	5.59 d (*J*= 1.7)	99.5
2′′′	4.02 dd (*J*= 3.4/1.7)	70.3	4.05 dd (*J*= 3.4/1.7)	70.2
3′′′	3.83 dd (*J*= 9.6/3.4)	70.6	3.86 dd (*J*= 9.6/3.4)	70.6
4′′′	3.50 t (*J*= 9.6)	71.8	3.50 t (*J*= 9.6)	72.0
5′′′	3.59 m	70.0	3.61 m	70.2
6′′′	1.25 d (*J*= 6.5)	17.5	1.27 d (*J*= 6.5)	18.0

Από τα παραπάνω συμπεράναμε ότι το προϊόν Vfa 7 είναι η **3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη** ενώ το προϊόν Vfa 8 η **3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη**. Τα φάσματα μάζας υψηλής ακρίβειας επιβεβαιώνουν τις παραπάνω δομές καθώς παρατηρούμε στο μεν φάσμα της ουσίας Vfa 7 την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 593,1470 $[M-H]^-$ ($C_{27}H_{29}O_{15}$) και στο δε φάσμα της ουσίας Vfa 8 την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 609.1420 $[M-H]^-$ ($C_{27}H_{29}O_{16}$). Τα πειραματικά αποτελέσματα συμφωνούν με τα βιβλιογραφικα δεδομένα που υπάρχουν για τις ουσιές Vfa 7 και Vfa 8 [342,343].

Το προϊόν **Vfa 9** αποτελεί έναν από τους πιο άπολους γλυκοσίδες φλαβονοειδών που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού. Η φασματοσκοπική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στον μεταβολίτη αυτό αποκάλυψε πως πρόκειται για την ουσία **3-O-(6''-*O*-ακετυλ-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο)-7-*O*-*α*-L ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη**.



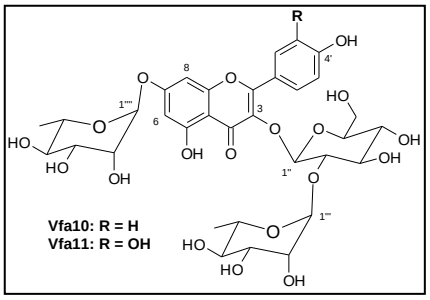
Vfa9

Στο φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας γίνεται εύκολα αντιληπτή η γενίνη καιμπφερόλη καθώς και η ύπαρξη δύο σακχάρων τα οποία είναι ενωμένα πάνω στην γενίνη (λόγω της αποθωράκισης των ανωμερικών πρωτονίων). Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων δύο διαστάσεων COSY και HMQC-Dept μας βοήθησε ώστε να ταυτοποιήσουμε τα δύο αυτά σάκχαρα ως *α*-L-ραμνοπυρανοση και *β*-D-γλυκοπυρανόση. Το ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC μας βοήθησε ώστε να καθορίσουμε την θέση σύνδεσης των σακχάρων πάνω στο άγλυκο. Στο φάσμα αυτό παρατηρήσαμε το σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου της ραμνόσης (5.56 ppm) και του C-7 (161.6 ppm) καθώς και το σήμα μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης (5.37 ppm) και του C-3 (133.3 ppm) της καιμπφερόλης.

Τα πρωτόνια της ακετυλομάδας εμφανίζονται ως απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια σε *δ* 1.73. Η σύνδεση της ακετυλομάδας στη θέση C-6 της γλυκόζης αποδεικνύεται τόσο από την αποθωράκιση των πρωτονίων (4.11 και 4.00 ppm) και του άνθρακα (62.7 ppm) της θέσης αυτής όσο και από τα σήματα σύζευξης στο φάσμα HMBC μεταξύ των H-6 της γλυκόζης και του ακετυλενικού άνθρακα στα

169.8 ppm. Τα παραπάνω αποτελέσματα οδήγησαν στην ταυτοποιηση του μορίου, γεγονός που επιβεβεώνεται και από την σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα.[344,345]

Το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία **Vfa 9** επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή καθώς παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 635,1574 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{29}H_{31}O_{16}$ και βαθμός ακορεστότητας 14.



Οι μεταβολίτες **Vfa 10** και **Vfa 11** αποτελούν δύο ακόμη τριγλυκοσίδες φλαβονοειδών οι οποίοι απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα χρησιμοποιώντας αρχικά την Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC) και στη συνέχεια τα αντίστοιχα κλάσματα επεξεργάστηκαν με παρασκευαστική Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (prep. HPLC). Οι μεταβολίτες αυτοί μελετήθηκαν φασματοσκοπικά και διαπιστώθηκε πως πρόκειται για τις ουσίες **3-*O*-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο)-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (Vfa 10)** και **3-*O*-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο)-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη (Vfa 11)**.

Η γενίνη καιμπφερόλη γίνεται αμέσως αντιληπτή στο φάσμα ^{1}H-NMR του προϊόντος **Vfa 10** λόγω των χαρακτηριστικών κορυφών που συναντάμε στην αρωματική περιοχή. Στην οξυγονωμένη περιοχή παρατηρούμε μια σειρά σημάτων, τα οποία δηλώνουν την ύπαρξη σακχάρων στο μόριο. Χαρακτηριστικές κορυφές στην περιοχή αυτή είναι: μια διπλή κορυφή (J = 7.3 Hz) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο σε δ 5.77 (ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 98.4 ppm – HMQC), μια ευρεία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο σε δ 5.58 (ο αντίστοιχος

Πίνακας 6.4.5: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γλυκοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 10) και της 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γλυκοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 11).

	Vfa 10		Vfa 11	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C*(ppm)
2	-	155.9		156.9
3	-	133.0		133.7
4	-	177.5		177.6
5	-	160.8		160.6
6	6.45 d (2.0)	99.4	6.45 d (2.0)	99.5
7	-	161.6	-	161.6
8	6.75 d (2.0)	94.5	6.74 d (2.0)	94.6
9	-	156.7		155.9
10	-	105.6		105.5
1′	-	120.7		120.9
2′	8.08 d (8.8)	130.9	7.66 d (2.3)	115.8
3′	6.90 d (8.8)	115.1		144.9
4′	-	160.1		148.7
5′	6.90 d (8.8)	115.1	6.88 d (9.2)	115.3
6′	8.08 d (8.8)	130.9	7.65 dd (9.2/2.3)	122.6
1′′	5.77 d (7.5)	98.4	5.78 d (7.8)	98.4
2′′	3.63 dd (9.2/7.5)	77.6	3.68 dd (9.2/7.8)	77.6
3′′	3.50 t (9.2)	77.5	3.56 t (9.2)	77.5
4′′	3.29 t (9.2)	70.1	3.34 t (9.2)	70.1
5′′	3.24 m	72.2	3.23 m	72.2
6′′α	3.74 dd (12.1/2.0)	60.8	3.74 dd (11.6/1.7)	61.3
6′′β	3.51 dd (12.1/2.0)		3.53 dd (11.6/5.8)	
1′′′	5.23 d (1.4)	100.6	5.23 d (1.4)	100.6
2′′′	4.00 dd (3.4/1.4)	70.2	4.03 dd (3.4/1.4)	70.1
3′′′	3.78 dd (9.5/3.4)	70.5	3.77 dd (9.5/3.4)	70.5
4′′′	3.34 t (9.5)	71.6	3.34 t (9.5)	71.6
5′′′	4.03 m	68.3	4.04 m	68.3
6′′′	0.95 d (6.1)	17.1	0.96 d (6.1)	17.1
1′′′′	5.57 d (1.4)	98.3	5.56 d (1.4)	98.3
2′′′′	4.02 dd (3.4/1.4)	70.2	4.02 dd (3.4/1.4)	70.2
3′′′′	3.83 dd (9.5/3.4)	70.6	3.83 dd (9.5/3.4)	70.6
4′′′′	3.48 t (9.5)	71.8	3.48 t (9.5)	71.8
5′′′′	3.58 m	69.8	3.58 m	69.8
6′′′′	1.25 d (6.1)	17.5	1.25 d (6.1)	17.5

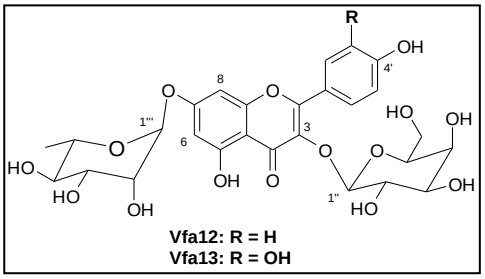
άνθρακας συντονίζεται στα 98.3 ppm – HMQC), και μια επίσης ευρεία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο σε *δ* 5.23 (ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 100.6 ppm – HMQC). Λαμβάνοντας υπόψη την μορφή των κορυφών αυτών, οι οποίες αντιστοιχούν σε ανωμερικά πρωτόνια, αλλά και τη χημική μετατόπιση των αντίστοιχων ανθράκων συμπεράναμε ότι έχουμε τρία σάκχαρα εκ των οποίων τα δύο είναι ραμνόσες (ευρείες απλές κορυφές ανωμερικών πρωτονίων και οι άνθρακες συντονίζονται στα 100 ppm περίπου).

Προκειμένου να εξακριβώσουμε τον τύπο των σακχάρων πραγματοποιήσαμε ακετυλίωση του προϊόντος. Στο φάσμα ^{1}H-NMR του ακετυλιωμένου προϊόντος εμφανίζονται έντεκα απλές κορυφές στην περιοχή 2.50 ως 1.85 ppm, από τις οποίες η καθεμία ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια και αντιστοιχούν σε δύο ακετύλια που βρίσκονται σε φαινολικά υδροξύλια (*δ* 2.47 και 2.32) και εννέα που αντιστοιχούν σε ακετύλια πάνω σε σάκχαρα (*δ* 2.18, 2.15, 2.11, 2.09, 2.05, 2.03, 1.98, 1.97 και 1.86). Από τη μορφή των κορυφών στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος συμπεράναμε ότι τα τρία σάκχαρα είναι δύο ραμνόσες και μία γλυκόζη. Από τη χημική μετατόπιση του πρωτονίου H-2΄΄ της γλυκόζης στο φάσμα ^{1}H-NMR του ακετυλιωμένου προϊόντος συμπεράναμε ότι η ραμνόση είναι ενωμένη με το υδροξύλιο της θέσης 2 της γλυκόσης (νεοεσπεριδοσίδης).

Με τη βοήθεια του φάσματος HMBC καθορίσαμε τη θέση σύνδεσης των σακχάρων με το άγλυκο της καιμπφερόλης. Έτσι συμπεράναμε ότι η ουσία **Vfa 10** είναι η **3-*O*-νεοεσπεριδόσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη.** Η κορυφή του ψευδομοριακού ιόντος m/z 739.2039 $[M-H]^-$ (με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{33}H_{39}O_{19}$ και βαθμός ακορεστότητας 14) που παρατηρήσαμε στο φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας του ουσίας έρχεται να επιβεβαιώσει την παραπάνω δομή. Τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που υπάρχουν για το φυσικό αυτό προϊόν.[346]

Στο φάσμα ^{1}H-NMR του προϊόντος **Vfa 11** γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι πρόκειται για ένα γλυκοσιδικό παράγωγο της κερκετίνης. Η απόλυτη ταύτιση των σημάτων που αντιστοιχούν στα σάκχαρα στα φάσματα ^{1}H-NMR, COSY και HMQC-Dept των προϊόντων **Vfa 10** και **Vfa 11** μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το προϊόν **Vfa 11** είναι

η **3-*O*-νεοεσπεριδόσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη.** Η σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα[346] καθώς και το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας επιβεβαιώνει την δομή αυτή καθώς παρατηρούμε την κορυφή m/z 755.1989 $[M-H]^-$ (με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{33}H_{39}O_{20}$ και βαθμός ακορεστότητας 14) η οποία αντιστοιχεί στην κορυφή του ψευδομοριακού ιόντος του μορίου.



Τα προϊόντα **Vfa 12** και **Vfa 13** απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα ακλουθώντας την ίδια διαδικασία που χρησιμοποιήσαμε για την απομόνωση των παραπάνω γλυκοσιδών των φλαβονοειδών. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε έδειξε πως πρόκειται για τις ουσίες **3-*O*-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (Vfa 12)** και **3-*O*-β-D-γαλακτοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη (Vfa 13)**.

Στο φάσμα ^{1}H-NMR του προϊόντος **Vfa 12** τα χαρακτηριστικά σήματα της καιμπφερόλης εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές (*J* = 8.9 Hz) που ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία σε *δ* 8.12 και 6.90 (H-2′,6′και H-3′,5′) καθώς και δύο επίσης διπλές κορυφές (*J* = 2.0 Hz) που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία σε *δ* 6.77 και 6.47 (H-8 και H-6). Στο αντίστοιχο φάσμα του προϊόντος **Vfa 13** τα πρωτόνια του ABX υποκατεστημένου δακτυλίου Β της κερκετίνης εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή (*J* = 2.2 Hz) σε *δ* 7.85 (H-2′) , μια διπλά διπλή κορυφή (*J* = 8.5/2.2 Hz) σε *δ* 7.63 (H-6′) και μια επίσης διπλή κορυφή (*J* = 8.5 Hz) σε *δ* 6.88 (H-5′). Τα δε πρωτόνια του δακτυλίου Α εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές με *meta*- σύζευξη (*J* = 2.0 Hz) σε *δ* 6.77 και 6.48 (H-6 και H-8).

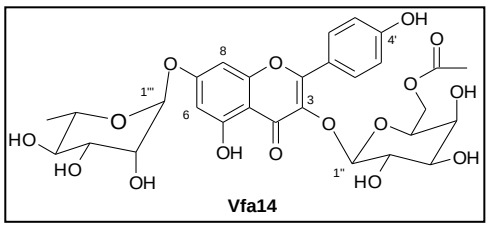
Το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόσης εμφανίζεται με τη μορφή διπλής κορυφής (*J* = 1.4 Hz) και σε *δ* 5.56 τόσο στο φάσμα πρωτονίου της ουσίας **Vfa 12** όσο και σε αυτό της ουσίας **Vfa 13.** Σε ίδιο *δ* (5.25), στα παραπάνω φάσματα, εμφανίζεται και η διπλή κορυφή (*J* = 7.8 Hz) που αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο της γαλακτόζης**.** Η μικρή απόκλιση στις τιμές *δ* των κορυφών των υπολοίπων πρωτονίων της γαλακτόζης (σε σύγκριση με την απόλυτη ταύτιση των τιμών *δ* των κορυφών των

Πίνακας 6.4.6: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O -β-D-γαλακτοπυρανοσυλ-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 12) και της 3-O -β-D-γαλακτοπυρανοσυλ-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 13).

	Vfa 12 (MeOD)		Vfa 13	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
2		159.2		156.1
3		135.7		133.4
4		180.1		177.5
5		162.7		160.9
6	6.77 d (2.0)	100.3	6.77 d (2.0)	99.4
7		163.5		161.6
8	6.47 d (2.0)	95.8	6.48 d (2.0)	94.4
9		157.8		155.9
10		107.4		105.5
1′		122.4		120.7
2′	8.12 d (8.9)	132.4	7.85 d (2.2)	115.2
3′	6.90 d (8.9)	116.1		144.9
4′		161.8		149.2
5′	6.90 d (8.9)	116.1	6.88 d (8.5)	116.4
6′	8.12 d (8.9)	132.4	7.63 dd (8.5/2.2)	121.8
1′′	5.25 d (7.8)	104.5	5.25 d (7.8)	102.3
2′′	3.80 dd (9.5/7.8)	72.7	3.82 dd (9.5/7.8)	71.3
3′′	3.54 dd (9.5/3.4)	74.8	3.55 dd (9.5/3.4)	73.4
4′′	3.82 m	69.8	3.84 m	68.0
5′′	3.45 m	77.1	3.45 m	75.8
6′′α	3.62 dd (11.3/6.1)	61.9	3.65 dd (11.3/6.1)	60.8
6′′β	3.54 br d (11.3)		3.50 br d (11.3)	
1′′′	5.56 d (1.4)	99.7	5.56 d (1.4)	98.9
2′′′	4.02 dd (3.4/1.4)	71.6	4.02 dd (3.4/1.4)	70.3
3′′′	3.83 dd (9.5/3.4)	71.9	3.83 dd (9.5/3.4)	70.6
4′′′	3.48 t (9.5)	73.6	3.48 t (9.5)	71.8
5′′′	3.58 m	71.1	3.58 m	70.0
6′′′	1.25 d (6.1)	18.0	1.25 d (6.1)	17.5

πρωτονίων τις ραμνόσης) στα φάσματα των δύο προϊόντων δικαιολογείται από το διαφορετικό ηλεκτροχημικό περιβάλλον που δημιουργείται λόγω του επιπρόσθετου υδροξυλίου στο δακτύλιο Β της κερκετίνης με τον οποίο γειτνιάζει η γαλακτόζη.

Τα φάσματα μάζας υψηλής ακρίβειας επιβεβαιώνουν τις παραπάνω δομές καθώς παρατηρούμε στο μεν φάσμα της ουσίας Vfa 12 την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 593,1472 $[M-H]^-$ ($C_{27}H_{29}O_{15}$) και στο δε φάσμα της ουσίας Vfa 13 την κορυφή του ψευδομοριακού ιόντος m/z 609.1419 $[M-H]^-$ ($C_{27}H_{29}O_{16}$). Επιπλέον τα πειραματικά αποτελέσματα των ουσιών αυτών βρισκονται σε συμφονία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.[343,347]



Vfa14

Το προϊόν **Vfa 14** εμφανίστηκε να είναι πιο άπολο από τους υπόλοιπους γλυκοσίδες φλαβονοειδών που απομονώθηκαν από το φυτό. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε έδειξε πως πρόκειται για την ουσία **3-O-(6''-*O*-ακετυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη**.

Στο φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας γίνεται εύκολα αντιληπτό πως πρόκειται για έναν διγλυκοσίδη της καιμπφερόλης. Η αποθωράκιση των πρωτονίων Η-6 και Η-8 του δακτυλίου Α της καιμπφερόλης υποδεικνύει την Ο-γλυκοζυλίωση στην θέση 7. Η μελέτη των φασμάτων COSY και HMQC-Dept βοήθησε ώστε να ταυτοποιήσουμε τα δύο αυτά σάκχαρα ως *α*-L-ραμνοπυρανόση και *β*-D-γαλακτοπυρανόση ενώ το φάσμα HMBC καθόρισε την θέση σύνδεσης των σακχάρων πάνω στο άγλυκο. Στο φάσμα αυτό παρατηρήσαμε το σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου της ραμνόσης (5.57 ppm) και του C-7 (163.5 ppm) καθώς και το σήμα μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου της γαλακτόζης (5.11 ppm) και του C-3 (135.7 ppm) της καιμπφερόλης.

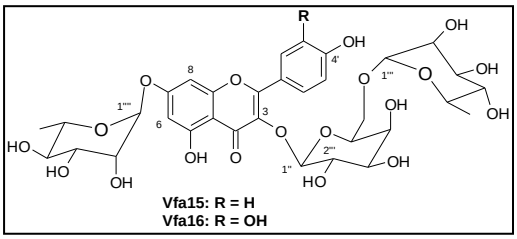
Τα πρωτόνια της ακετυλομάδας εμφανίζονται με τη μορφή απλής κορυφής που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια σε *δ* 1.80. Η σύνδεση της ακετυλομάδας στη θέση C-6 της γαλακτόζης υποδεικνύεται από την αποθωράκιση τόσο των πρωτονίων (4.16 και 4.03 ppm) όσο και του άνθρακα (64.4 ppm) της θέσης αυτής. Τα σήματα

Πίνακας 6.4.7: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O-(6''-ακετυλ-β-D-γλυκοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 9) και της 3-O-(6''-ακετυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 14).

	Vfa 9 (DMSO)		Vfa 14 (MeOD)	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
2	-	157.5	-	159.2
3	-	133.3	-	135.7
4	-	177.5	-	180.1
5	-	160.8	-	162.7
6	6.46 d (*J*= 2.0)	99.4	6.46 d (*J*= 2.0)	100.3
7	-	161.6	-	163.5
8	6.85 d (*J*= 2.0)	94.6	6.74 d (*J*= 2.0)	95.8
9	-	156.0	-	157.8
10	-	105.5	-	107.4
1′	-	120.6	-	122.4
2′	8.09 d (*J*= 8.9)	130.9	8.11 d (*J*= 8.2)	132.4
3′	6.90 d (*J*= 8.9)	115.1	6.88 d (*J*= 8.2)	116.1
4′	-	160.8	-	161.8
5′	6.90 d (*J*= 8.9)	115.1	6.88 d (*J*= 8.2)	116.1
6′	8.09 d (*J*= 8.9)	130.9	8.11 d (*J*= 8.2)	132.4
1′′	5.37 d (7.8)	101.0	5.11 d (7.8)	105.0
2′′	3.23 dd (*J*= 8.9/7.8)	74.1	3.81 dd (9.5/7.8)	72.7
3′′	3.35 m	76.1	3.54 dd (9.5/3.4)	74.8
4′′	3.13 t (*J*= 8.9)	69.8	3.76 m	70.0
5′′	3.30 m	73.9	3.67m	74.5
6′′α	4.11 dd (11.9/2.1)	62.7	4.16 dd (11.4/7.9)	64.4
6′′β	4.00 dd (11.9/5.5)		4.03 dd (11.4/4.6)	
1′′′	5.56 brs	98.3	5.57 brs	99.7
2′′′	3.85 brs	72.2	4.02 brs	71.6
3′′′	3.64 dd (*J*= 9.5/3.1)	70.1	3.83 dd (*J*= 9.3/3.3)	71.9
4′′′	3.35 t (*J*= 9.5)	71.6	3.48 t (*J*= 9.3)	73.6
5′′′	3.42 m	69.8	3.60 m	71.1
6′′′	1.12 d (*J*= 6.1)	17.9	1.27 d (*J*= 5.4)	18.0
CH_3-CO	1.73 s	20.2	1.80 s	20.2
CH_3-**CO**	-	169.8	-	172.4

σύζευξης στο φάσμα HMBC μεταξύ των H-6 και του καρβονυλικού άνθρακα στα 172.4 ppm επιβεβαίωσε την παραπάνω υπόθεση.

Σο φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία **Vfa 14** παρατηρήσαμε την ίδια κορυφή του ψευδομοριακού ιόντος (m/z 635,1574 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{29}H_{31}O_{16}$ και βαθμός ακορεστότητας 14) με αυτήν στο αντίστοιχο φάσμα του προϊόντος **Vfa 9** γεγονός που επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή. Επιπλέον τα πειραματικά δεδομένα συμφωνούν με αυτά που υπαρχουν στην βιβλιογραφία για την ουσια **3-O-(6''-*O*-ακετυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη.**[344]



Τα προϊόντα **Vfa 15** και **Vfa 16** αποτελούν δύο ακόμη τριγλυκοσίδες φλαβονοειδών οι οποίοι απομονώθηκαν από το φυτό *Vicia faba*. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε έδειξε ότι πρόκειται για τις ουσίες: **3-*O*-(6''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (Vfa 15)** και **3-*O*-(6''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη (Vfa 16).**

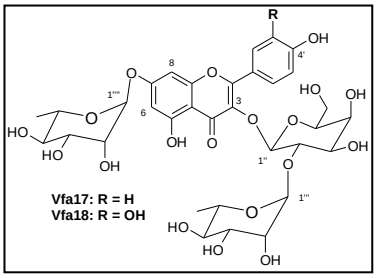
Η μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, COSY και HMQC-Dept της ουσίας **Vfa 15** οδήγησε στο συμπέρασμα πως πρόκειται για έναν τριγλυκοσίδη της καιμπφερόλης που φέρει δύο *α*-L ραμνοπυρανόσες και μία *β*-D-γαλακτοπυρανόση. Η εμφάνιση της κορυφής του ανωμερικού πρωτονίου της ραμνοσης σε δ 4.40 σε συνδυασμό με την αποθωράκιση του άνθρακα (65.5 ppm) της θέσης 6 της γαλακτόζης δηλώνουν ότι η μία ραμνόση είναι συνδεδεμένη στη θέση αυτή της γαλακτόζης. Η μελέτη του φάσματος HMBC έδειξε ότι η δεύτερη ραμνόση είναι ενωμένη στη θέση 7 ενώ ο δισακχαρίτης στη θέση 3 της καιμπφερόλης.

Πίνακας 6.4.8: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O-(6''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Ρομπινίνη) (Vfa 15) και της 3-O-(6''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 16).

	Vfa 15 (d_6-DMSO)		Vfa 16 (d_6-DMSO)	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
2	-	156.2	-	156.9
3	-	133.7	-	133.7
4	-	177.8	-	177.6
5	-	161.5	-	160.6
6	6.43 d (*J*=2.1 Hz)	99.5	6.43 (*J*=2.1 Hz)	99.5
7	-	160.8	-	161.6
8	6.79 d (*J*=2.1 Hz)	94.7	6.77 d (*J*=2.1 Hz)	94.6
9	-	157.1	-	155.9
10	-	105.7	-	105.5
1′	-	120.9	-	120.9
2′	8.08 d (*J*=8.8)	131.1	7.56 d (*J*= 2.2)	115.8
3′	6.80 d (*J*=8.8)	115.7	-	144.9
4′		160.3	-	148.7
5′	6.80 d (*J*=8.8)	115.7	6.78 d (*J*=8.5)	115.3
6′	8.08 d (*J*=8.8)	131.1	7.69 dd (*J*=8.5/2.2)	122.6
1′′	5.28 d (*J*=8.8)	102.4	5.32	102.3
2′′	3.56	71.0	3.59	71.2
3′′	3.34	73.1	3.40	73.4
4′′	3.61	68.1	3.61	68.1
5′′	3.56	73.8	3.55	73.8
6′′α	3.59	65.5	3.61	65.4
6′′β	3.25		3.25	
1′′′	4.40 brs	100.2	4.41	100.2
2′′′	3.39 brs	70.4	3.39	70.5
3′′′	3.63	70.4	3.63	70.4
4′′′	3.08	72.0	3.08	72.2
5′′′	3.35	68.3	3.35	68.4
6′′′	1.07 d (*J*=6.1)	18.0	1.06 d (*J*=6.1)	18.0
1′′′′	5.54 brs	98.4	5.55 brs	98.7
2′′′′	3.85	70.0	3.84	70.1
3′′′′	3.63	70.4	3.63	70.5
4′′′′	3.27	71.7	3.30	71.8
5′′′′	3.43	70.0	3.43	70.2
6′′′′	1.13 d (*J*=6.1)	17.9	1.12 d (*J*=6.1)	18.0

Την παραπάνω δομή επιβεβαιώνουν τόσο η σύγκριση των φασματοσκοπικών αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα[343] όσο και το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας του προϊόντος όπου παρατηρούμε την κορυφή του ψευδομοριακού ιόντος m/z 739.2039 $[M-H]^-$ ($C_{33}H_{39}O_{19}$).

Τα φάσματα ^{1}H-NMR, COSY και HMQC-Dept της ουσίας **Vfa 16** διέφεραν από τα αντίστοιχα της ουσίας **Vfa 15** μόνο στην αρωματική περιοχή όπου φαίνεται να πρόκειται για παράγωγο κερκετίνης και όχι καιμπφερόλης. Η σύγκριση των φασματοσκοπικών αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα καθώς και το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας του προϊόντος (κορυφή μοριακού ιόντος m/z 755.1989 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{33}H_{39}O_{20}$) επιβεβαίωσαν την δομή της ουσίας **Vfa 16** ως **3-*O*-(6''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη.**



Οι μεταβολίτες **Vfa 17** και **Vfa 18** παραλήφτηκαν με τη μορφή κίτρινης άμορφης σκόνης κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού, αρχικά με CCC και στη συνέχεια με παρασκευαστική HPLC. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε αποκάλυψε πως πρόκειται για τις ουσίες: **3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλης (Vfa 17)** και **3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη (Vfa 18)**.

Στο φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας **Vfa 17** γίνεται εύκολα αντιληπτό πως πρόκειται για έναν τριγλυκοσίδη της καιμπφερόλης. Η μελέτη των φασμάτων COSY και HMQC-Dept αποκάλυψε ότι τα τρία σάκχαρα του μορίου είναι δύο α-L ραμνοπυρανόσες και μία β-D-γαλακτοπυρανόση. Η σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων της ουσίας **Vfa 17** με αυτά της ουσίας **Vfa 15 (**η οποία διαθέτει τη ίδια γενίνη και τα ίδια σακχαρα) έδειξε ότι η διαφορά μεταξύ των δύο αυτών μορίων έγκειται στην σύνδεση των σακχάρων που είναι συνδεδεμένα στη θέση 3 της γενίνης. Πράγματι η

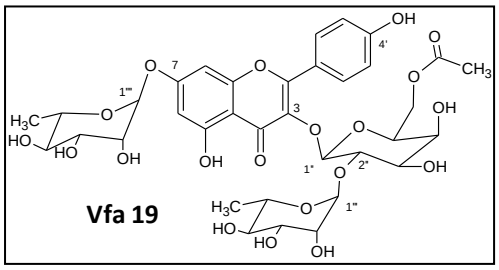
Πίνακας 6.4.9: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλης (Vfa 17) και της 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη (Vfa 18).

	Vfa 17 (DMSO-d_6)		Vfa 18 (DMSO-d_6)	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
2	-	156.0	-	156.8
3	-	133.8	-	133.4
4	-	177.8	-	177.8
5	-	160.8	-	161.0
6	6.42 d (2.0)	99.5	4.41 d (J = 2.0 Hz)	99.5
7	-	161.8	-	161.7
8	6.81 d (2.0)	94.5	6.77 d (J = 2.0 Hz)	94.5
9	-	156.8		156.1
10	-	105.8		105.9
1′	-	121.0	-	
2′	8.10 d (8.5)	131.2	7.54 d (J = 2.2 Hz)	115.1
3′	6.82 d (8.5)	115.4	-	
4′	-	160.1	-	
5′	6.82 d (8.5)	115.4	6.77 d (J = 8.6 Hz)	115.6
6′	8.10 d (8.5)	131.2	7.71 dd (J = 8.6/2.2 Hz)	123.0
1′′	5.65 d (7.8)	98.8	5.62 d (J = 7.7 Hz)	98.8
2′′	3.79 dd (9.5/7.8)	75.5	3.78 dd (9.5/7.8)	75.3
3′′	3.58 dd (9.5/3.4)	74.3	3.57 dd (9.5/3.4)	74.3
4′′	3.64 m	68.5	3.63 t (9.5)	68.7
5′′	3.29 m	75.6	3.29 m	75.7
6′′α	3.42 dd (11.4/6.5)	60.3	3.42 dd (11.4/6.5))	60.3
6′′β	3.29 dd (11.4/4.6)		3.29 dd (11.4/4.6)	
1′′′	5.05 d (1.4)	100.6	5.02 brs	100.6
2′′′	3.73 dd (3.4/1.4)	70.3	3.75 dd (3.4/1.4)	70.3
3′′′	3.46 dd (9.5/3.4)	70.6	3.49 dd (9.5/3.4)	70.6
4′′′	3.10 t (9.5)	72.1	3.12 t (9.5)	71.9
5′′′	3.73 m	68.4	3.76 m	68.2
6′′′	0.72 d (6.1)	17.3	0.80 d (J= 6.3 Hz)	17.3
1′′′′	5.54 d (1.4)	98.5	5.54 brs	98.5
2′′′′	3.84 dd (3.4/1.4)	70.0	3.84 dd (3.4/1.4)	70.0
3′′′′	3.63 dd (9.5/3.4)	70.3	3.63 dd (9.5/3.4)	70.3
4′′′′	3.27 t (9.5)	71.8	3.29 t (9.5)	71.8
5′′′′	3.42 m	70.3	3.42 m	70.3
6′′′′	1.10 d (6.1)	17.9	1.10 d (6.1)	17.9

αποθωράκιση του H-2 (3.79 ppm) και C-2 (75.5 ppm) της γαλακτόζης και η ταυτόχρονη θωράκιση του C-6 (60.3 ppm) σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές στα φάσματα του προϊόντος **Vfa 15** δηλώνουν την σύνδεση 2-1 των δύο αυτών σακχάρων αντί για 6-1 που παρατηρείται στην ουσία **Vfa 15**. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από την αποθωράκιση των ανωμερικών πρωτονίων των δύο αυτών σακχάρων (5.65 ppm από 5.28 ppm για το H-1 της γαλακτόσης και 5.05 ppm από 4.40 ppm για το H-1 της ραμνόσης) ένα φαινόμενο το οποίο παρατηρείται γενικότερα όταν ο δισακχαρίτης στη θέση 3 έχει σύνδεση 2-1.

Με βάση την παραπάνω φασματοσκοπικής ανάλυσης καθώς και σύγκριση των πειραματικών τιμών με βιβλιογραφικά δεδομένα[344] συμπεράναμε ότι η ουσία **Vfa 17** είναι η **3-*O*-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-*O*-*α*-L ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλης**. Την δομή αυτή επιβεβαιώνει και το φάσμα HRMS στο οποίο εμφανίζεται η κορυφή του ψευδομοριακού ιόντος m/z 739.2040 $[M-H]^-$ ($C_{33}H_{39}O_{19}$).

Στο φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας **Vfa 18** η παρουσία των χαρακτηριστικών κορυφών ενός ABX υποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα αντί των κορυφών του π-υποκατεσιμένου αρωματικού πυρήνα στο αντίστοιχο φάσμα της ουσίας **Vfa 17** δηλώνει την η ουσία αυτή είναι παράγωγο κερκετίνης. Επίσης η παρόμοια εικόνα για τα υπόλοιπα σήματα των δύο αυτών φασμάτων των δύο ουσιών μας οδηγεί στην υπόθεση ότι πρόκειται για τον αντίστοιχο τριγλυκοσίδη της κερκετίνης. Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων COSY και HMQC-Dept και η σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα επιβεβαίωσε την παραπάνω υπόθεση και καθόρισε την δομή της ουσίας **Vfa 18** ως **3-*O*-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ0-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη**. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 755.1988 $[M-H]^-$ που εμφανίζεται στο φάσμα HRMS της ουσίας **Vfa 18** ήταν ίδια με αυτήν στο αντίστοιχο φάσμα της ουσίας **Vfa 16** κάτι που αναμενόταν με βάση τους μοριακούς τύπους των δύο αυτών προϊόντων.



Vfa 19

Το προϊόν **Vfa 19** αποτελεί τον τελευταίο γλυκοσίδη φλαβονολών που απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού. Από την φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε συμπεράναμε πως πρόκειται για την ουσία **3-*O*-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-6''-*O*-ακετυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη.**

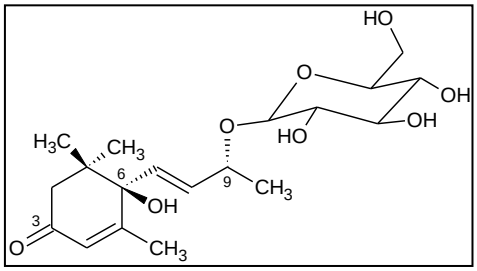
Η μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, COSY και HMQC-Dept της ουσίας **Vfa 19** έδειξε ότι πρόκειται για έναν τριγλυκοσίδη της καιμπφερόλης ο οποίος έχει τα ίδια σάκχαρα και την ίδια συνδεσμολογία με την ουσία **Vfa 17**. Η σημαντική διαφορά στα φάσματα των δύο αυτών μεταβολιτών εντοπίζεται στη θέση 6 της γαλακτόζης όπου παρατηρούμε αποθωράκιση τόσο των πρωτονίων (*δ* 4.05 και 3.87) όσο και του αντίστοιχου άνθρακα (*δ* 62.9). Επίσης στο φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας **Vfa 19** παρατηρούμε μια απλή κορυφή σε *δ* 1.66 η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και παραπέμπει σε ακετύλιο. Τα παραπάνω στοιχεία μας οδηγούν στην υπόθεση ότι στη θέση 6 της γαλακτόζης βρίσκεται συνδεδεμένη μία ομάδα ακετυλίου. Τα σήματα σύζευξης ενός ακετυλενικού άνθρακα (*δ* 170.4) τόσο με τα πρωτόνια H-6 της γαλακτόζης όσο και με την απλή κορυφή σε δ 1.66 που παρατηρούνται στο φάσμα HMBC επιβεβαίωσε την παραπάνω υπόθεση.

Με βάση τα παραπάνω και συγκρίνοντας τα πειραματικά αποτελέσματα με αυτά της βιβλιογραφίας[344] καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η ουσία **Vfa 19** είναι η **3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-6''-ακετυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη.** Την δομή αυτή επιβεβαιώνει και η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 781.2144 $[M-H]^-$ (προτεινόμενος μοριακός τύπος $C_{35}H_{41}O_{20}$ και βαθμός ακορεστότητας 15) που εμφανίζεται στο φάσμα HRMS της ουσίας.

Πίνακας 6.4.10: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-O-(2''-a-L-ραμνοπυρανοσυλ-6''-ακετυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Vfa 19).

	Vfa 19 (DMSO-d_6)	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)
2	-	156.0
3	-	133.8
4	-	177.8
5	-	160.8
6	6.43 d (2.0)	99.7
7	-	161.8
8	6.82 d (2.0)	94.7
9	-	156.8
10	-	105.8
1′	-	121.0
2′	8.07 d (8.5)	131.2
3′	6.84 d (8.5)	115.4
4′	-	160.1
5′	6.84 d (8.5)	115.4
6′	8.07 d (8.5)	131.2
1′′	5.57 d (7.8)	98.7
2′′	3.78 dd (9.5/7.8)	75.2
3′′	3.58 dd (9.5/3.4)	74.0
4′′	3.64	68.9
5′′	3.62 m	72.9
6′′α	4.05 dd (11.4/7.8)	62.9
6′′β	3.87 dd (11.4/4.6)	
1′′′	5.05 d (1.4)	100.8
2′′′	3.73 dd (3.4/1.4)	70.3
3′′′	3.46 dd (9.5/3.4)	70.6
4′′′	3.13 t (9.5)	72.1
5′′′	3.73 m	68.4
6′′′	0.78 d (6.1)	17.3
1′′′′	5.54 d (1.4)	98.5
2′′′′	3.84 dd (3.4/1.4)	70.0
3′′′′	3.63 dd (9.5/3.4)	70.3
4′′′′	3.27 t (9.5)	71.8
5′′′′	3.42 m	70.3
6′′′′	1.10 d (6.1)	17.9
$\underline{CH_3}$-CO	1.66 s	20.1
CH_3-$\underline{CO}$	-	170.4

Ο μεταβολίτες **Vfa 20 και Vfa 21** απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Vicia faba*. χρησιμοποιόντας για το σκοπό αυτό αρχικά την Χρωματογραφία CCC και στη συνέχεια τα αντίστοιχα κλάσματα επεξεργάστηκαν με παρασκευαστική. HPLC. Από τη μελέτη των φασμάτων NMR και MS των ουσιών αυτών καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για τις ουσίες **(6*S*,9*R*)-Ροσεοσίδη (Vfa 20) και Βυζαντιοσίδης Β (Vfa 21)**.



Στο φάσμα ^{1}H NMR του μεταβολίτη **Vfa 20** εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά σήματα μιας 3-οξο-*α*-ιονόλης και ενός σακχάρου. Η παρουσία μίας απλής κορυφής που αντιστοιχεί σε ένα βινυλικό πρωτόνιο στα 5.85 ppm και μίας πολυπλοκης κορυφής, στα 5.86 ppm, που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί σε δύο ολεφινικά πρωτόνια, υποδεικνύουν την παρουσία τουλάχιστον δύο διπλών δεσμών. Στο φάσμα COSY ορατή είναι η σύζευξη, ενός εκ των δύο αυτών ολεφινικών πρωτονίων με ένα οξυμεθινικό πρωτόνιο στα 4.42 ppm (quin, *J* = 5.8 Hz), το οποίο επίσης συζευγνύεται με τα πρωτόνια ενός δευτεροταγούς, τελικού μεθυλίου που συντονίζονται στα 1.29 ppm (d, *J* = 6.5 Hz). Οι τιμές των χημικών αυτών μετατοπίσεων είναι χαρακτηριστικές της πλάγιας αλυσίδας (στον C-6) μεταβολιτών με βασικό σκελετό μεγαστιγμανίου (megastigmane) και πρόκειται για τα πρωτόνια H-7, H-8, H-9 και H-10, αντίστοιχα.

Οι δύο διπλές κορυφές στα 2.53 (d, *J* = 17.0 Hz) και 2.15 ppm (d, *J* = 17.0 Hz) που αντιστοιχούν στα αποθωρακισμένα δίδυμα πρωτόνια του C-2, είναι χαρακτηριστικά σήματα μεταβολιτών με βασικό σκελετό ιονόνης και συγκεκριμένα τύπου ροσεοσίδη (roseoside). Η προτεινόμενη δομή επιβεβαιώθηκε από το φάσμα HMBC, στο οποίο είναι ορατές οι συζεύξεις των προαναφερόμενων πρωτονίων με έναν αποθωρακισμένο καρβονυλικό άνθρακα ο οποίος συντονίζεται στα 201.2 ppm (C-3) και με έναν τεταρτοταγή άνθρακα, ο οποίος συντονίζεται στα 42.5 ppm και πρόκειται για τον C-1. Τέλος, τα πρωτόνια του βινιλικού μεθυλίου (CH_3-5) τα οποία

συντονίζονται στα 1.92 ppm εμφανίζουν σύζευξη με τον C-4 στα 126.9 ppm, με τον τεταρτοταγή C-5 (*δ* 167.2) και με τον οξυγονωμένο C-6 (*δ* 80.0).

Τα φάσματα COSY και HMQC επέτρεψαν την αναγνώριση του σακχάρου ως *β*-γλυκοπυρανοσίδη. Επιπρόσθετα, στο φάσμα HMBC ορατή είναι η σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου H-1′ (*δ* 4.34) με τον C-9 (*δ* 77.3) ο οποίος συζευγνύεται επίσης με τα H-10 (*δ* 1.29) και τα δύο βινυλικά πρωτόνια H-7, H-8 (δ 5.86). Με βάση τα παραπάνω, είναι εμφανές ότι η γλυκοσυλίωση λαμβάνει χώρα στον C-9. Πρόκειται λοιπόν για την **9-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο–6-υδροξυ-3-οξο-*α*-ιονόλη**. Η δομή αυτή επιβεβαιώνεται και από το φάσμα HRMS της ουσίας στο οποίο παρατηρούμε την κορυφή του ψευδομοριακού ιόντος m/z 385.1838 $[M-H]^-$ ($C_{19}H_{29}O_8$ και βαθμός ακορεστότητας 5).

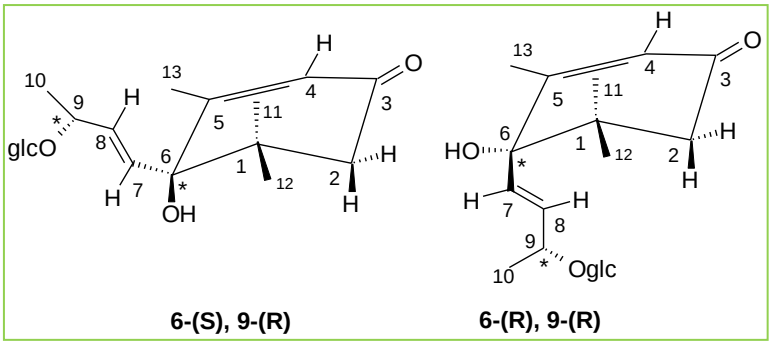
Στη γενίνη υπάρχουν δύο ασύμμετροι άνθρακες και συγκεκριμένα οι C-6 και C-9. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.4.11) δίδονται οι χημικές μετατοπίσεις των χαρακτηριστικών πρωτονίων και ανθράκων των τεσσάρων διαφορετικών στερεοϊσομερών του ροσεοσίδη[348].

Πίνακας 6.4.11: Χαρακτηριστικές τιμές ^{1}H- και ^{13}C- των στερεοϊσομερών του Ροσεοσίδη σε CD_3OD

	(6*S*,9*R*)-	**(6*R*,9*R*)-**	**(6*S*,9*S*)-**	**(6*R*,9*S*)-**
H-7	5.86 (m)	5.85 (m)	5.97 (dd 15.5, 1)	5.97 (d 15.5)
H-8			5.73 (dd 15.5, 7.5)	5.70 (dd 15.5, 8)
H-9	4.42 (m)	4.44 (qdd 6.5, 3.5, 1,5)	4.53 (quint.-like 6.5)	4.53 (quint.-like 7)
H-10	1.29 (d, 6.5)	1.30 (d, 6.5)	1.29 (d, 6.5)	1.28 (d, 6.5)
H-1’	4.34 (d 8)	4.33 (d 8)	4.27 (d 8)	4.31 (d 8)
C-6	80.04	79.97	80.05	79.98
C-7	131.58	131.67	133.74	134.12
C-8	135.33	135.11	133.81	133.80
C-9	77.32	76.90	74.67	74.70
C-10	21.22	21.16	22.29	22.22
C-1’	102.79	102.59	100.29	100.91

Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό, οι στερεοχημικές μεταβολές στον C-9 οδηγούν σε σημαντική αλλαγή στην τιμή χημικής μετατόπισης τόσο του αντίστοιχου άνθρακα όσο και του ανωμερικού άνθρακα. Σε σύγκριση με τις τιμές αυτές, το πρωτόνιο H-9 υιοθετεί *β*-προσανατολισμό οπότε ο C-9 είναι *R*.

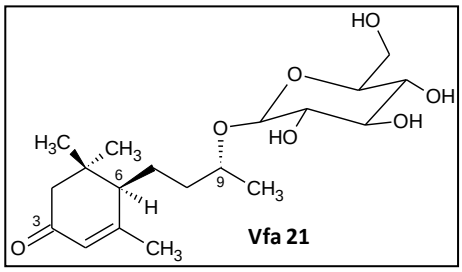
Η διάκριση όμως μεταξύ του (6*S*,9*R*) και (6*R*,9*R*) ροσεοσίδη είναι πιο δύσκολη και δεν καθίσταται δυνατή μόνο με τη σύγκριση των τιμών των χημικών μετατοπίσεων. Το φάσμα NOESY αποδείχθηκε πολύτιμο για τον προσδιορισμό της στερεοχημείας του C-6. Οι συζεύξεις του ολεφινικού H-8 πρωτονίου με τα H-9, H-10 και H-13 δηλώνει την υιοθέτηση ισημερινού ή *α*-προσανατολισμού της πλάγιας αλυσίδας στον C-6 (σε αντίθετη περίπτωση το ολεφινικό H-8 πρωτόνιο θα είχε σύζευξη με τα H-12 και H-2*β* πρωτόνια). (σχήμα 6.4.2)



Σχήμα 6.4.1: Στερεοχημικές διαμορφωσεις των (6*S*, 9*R*)- και (6*R*, 9*R*)-Ροσεοσιδη

Βάσει των παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι ο μεταβολίτης **Vfa 20** είναι ο **(6*S*, 9*R*)-9-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-3-οξο-6-υδροξυ-*α*-ιονόλη** ή **(6*S*, 9*R*)-Ροσεοσίδης**[349,350,351]**.**

Στο φάσμα ^{1}H NMR του μεταβολίτη **Vfa 21** εμφανίζονται ξανά τα χαρακτηριστικά σήματα μιας 3-οξο-*α*-ιονόλης και ενός σακχάρου. Στο φάσμα αυτό όμως παρατηρούμε μόνο μία απλή κορυφή που αντιστοιχεί σε βινυλικό πρωτόνιο (*δ* 5.80) ενώ απουσιάζουν οι κορυφές των ολεφινικών πρωτονίων H-7 και H-8. Αντί αυτών εμφανίζονται στην περιοχή 1.9 με 1.6 ppm τέσσερεις πολλαπλές κορυφές οι οποίες δηλώνουν την απουσία διπλού δεσμού στη θέση 7-8 που παρατηρήσαμε στο προϊόν **Vfa 20**. Επίσης σε *δ* 1.99 εμφανίζεται το σήμα ενός πρωτονίου το οποίο, όπως προέκυψε από τη μελέτη των φασμάτων HMQC και HMBC, είναι ενωμένο με τον άνθρακα C-6 (*δ* 52.4) του μορίου.



Στο φάσμα COSY είναι ορατή η σύζευξη των πρωτονίων H-8 (δ 1.66 και 1.60) με ένα οξυμεθινικό πρωτόνιο στα 3.88 ppm, το οποίο με τη σειρά του συζεύγνυται με τα πρωτόνια ενός μεθυλίου που συντονίζονται στα 1.18 ppm (d, *J* = 6.2 Hz). Οι τιμές των χημικών αυτών μετατοπίσεων είναι χαρακτηριστικές των πρωτονίων H-9 και H-10 της πλάγιας αλυσίδας (στον C-6) μεταβολιτών με βασικό σκελετό μεγαστιγμανίου (megastigmane) και πιο συγκεκριμένα του τύπου μπλουμενόλης C (blumenol C).

Πίνακας 6.4.12: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της (6S,9R)-Ροσεοσίδης (Vfa 20) και του Βυζαντιονοσίδης Β (Vfa 21).

	Vfa 21		Vfa 20	
	^{1}H	**^{13}C**	**^{1}H**	**^{13}C**
1	-	37.3	-	42.5
2a	2.46 d(*J*=17.0 Hz)	48.0	2.53 d (*J*=17.0 Hz)	50.7
2b	1.97 d(*J*=17.0 Hz)		2.15 d (*J*=17.0 Hz)	
3	-	202.3		201.2
4	5.80 s	125.4	5.85 s	126.9
5	-	170.0	-	167.2
6	1.99 s	52.4	-	80.0
7a	1.97 m	26.8	5.86 m	131.5
7b	1.51 m			
8a	1.66 m	37.9	5.86 m	135.2
8b	1.60 m			
9	3.88 m	75.6	4.42 m	77.3
10	1.18 d d (*J*=6.2 Hz)	19.8	1.29 d (*J*=6.5 Hz)	21.2
11	1.10 s	27.4	1.04 s	23.4
12	1.02 s	29.0	1.03 s	24.2
13	2.05 s	25.0	1.92 s	19.5
1’	4.33 d(*J*=8.0 Hz)	102.0	4.34 d (*J*=8.0 Hz)	102.7
2’	3.14 dd(*J*= 8.9/8.0Hz)	75.1	3.17 dd (*J*= 8.9/8.0Hz)	75.2
3’	3.34 t(*J*=8.9 Hz)	78.2	3.34 t (*J*=8.9 Hz)	78.0
4’	3.26 t(*J*=8.9 Hz)	71.9	3.25 t (*J*=8.9 Hz)	71.6
5’	3.25 m	78.0	3.24 m	77.9
6’a	3.86 dd(*J*=11.6/2.0 Hz)	62.9	3.85 dd (*J*=11.6/2.0 Hz)	62.8
6’b	3.65 dd(*J*=11.6/5.5 Hz)		3.62 dd (*J*=11.6/5.1 Hz)	

Τα αποθωρακισμένα δίδυμα πρωτόνια του C-2 εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές στα 2.46 (d, *J* = 17.0 Hz) και 1.97 ppm (d, *J* = 17.0 Hz). Στο φάσμα HMBC, είναι ορατές οι συζεύξεις των πρωτονίων αυτών με έναν αποθωρακισμένο καρβονυλικό άνθρακα ο οποίος συντονίζεται στα 202.3 ppm (C-3) και με έναν τεταρτοταγή άνθρακα, ο οποίος συντονίζεται στα 37.3 ppm και πρόκειται για τον C-1. Τέλος, τα πρωτόνια του βινιλικού μεθυλίου (CH_3-5) τα οποία συντονίζονται στα 2.05 ppm εμφανίζουν σύζευξη με τον C-4 στα 125.4 ppm, με τον τεταρτοταγή C-5 (*δ* 170.0) και με τον μεθινικό C-6 (*δ* 52.4).

Τα φάσματα COSY και HMQC συνέβαλαν στην αναγνώριση του σακχάρου ως *β*-γλυκοπυρανοση. Η χημική μετατόπιση του ανωμερικού άνθρακα (*δ* 102.0) δηλώνει O-γλυκοζυλίωση η οποία έχει λάβει χώρα στον C-9 ως το μόνο διαθέσιμο υδροξύλιο του μορίου. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από το φάσμα HMBC όπου είναι ορατή η σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου H-1′ (*δ* 4.33) με τον C-9 (*δ* 75.6) ο οποίος συζεύγνυται επίσης με τα H-10 (*δ* 1.18) και τα πρωτόνια H-7 και H-8. Με βάση τα παραπάνω συμπεράναμε ότι πρόκειται για την ουσία **9-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλομεγαστιγμαν-4-εν-3-ονη**. Η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 371.2056 $[M-H]^-$ ($C_{19}H_{31}O_7$ και βαθμό ακορεστότητας 4) που παρατηρούμε στο φάσμα HRMS της ουσίας επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή.

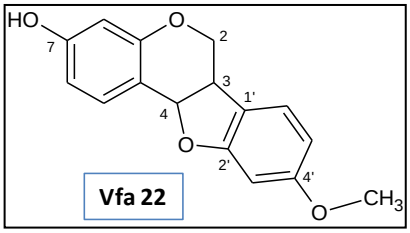
(Methanol-d_4)	C-9	C-10	Glc-1
9*R*: 	75.7~76.8	19.7~20.4	102.0~102.9
9*S*: 	77.7~78.1	21.8~22.0	103.7~103.9

Από τους δύο ασύμμετρους άνθρακες του μορίου (C-6 και C-9) η στερεοχημεία στη θέση 9 προσδιορίζεται εύκολα από τις τιμές των χημικών μετατοπίσεων των ανθράκων C-9, C-10 και C-1’ . Έτσι συγκρίνοντας τις τιμές των πειραματικών δεδομένων με αυτές της βιβλιογραφίας συμπεραίνουμε ότι το πρωτόνιο H-9 υιοθετεί *β*-προσανατολισμό οπότε ο C-9 είναι *R*[352].

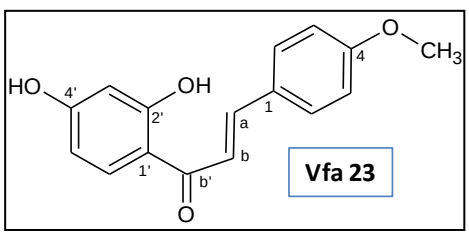
Προκειμένου να προσδιορίσουμε την στερεοχημεία στον C-6 προχωρήσαμε στη λήψη του φάσματος NOESY. Οι συζεύξεις του H-8 πρωτονίου με τα H-9, H-10 και κυρίως τα H-13 δηλώνουν την υιοθέτηση ισημερινού ή *α*-προσανατολισμού της πλάγιας αλυσίδας στον C-6 και κατ’ επέκταση τον προσδιορισμό του ως 6*R*.

Με βάση τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι ο μεταβολίτης **Vfa 21** είναι ο **(6*R*, 9*R*)-9-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλομεγαστιγμαν-4-εν-3-όνη** ή **Βυζαντιοσίδης Β.**

Τα προϊόντα **Vfa 22** , **Vfa 23** και **Vfa 24** αποτελούν τους πιο άπολους μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού. Παραλήφθηκαν ως μίγμα κατά την επεξεργασία του εκχυλίσματος με Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC) και διαχωρίστηκαν με τη βοήθεια Χρωματογραφίας Στήλης Χαμηλής Πιέσεως (VLC). Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε αποκάλυψε πως πρόκειται για τις ουσίες: **μεντικαρπίνη (Vfa 22)**, **2,4-διυδρόξυ-4'-μεθόξυ-χαλκόνη (Vfa 23)** και **7,4'-διϋδροξυφλαβόνη (Vfa 24)**.

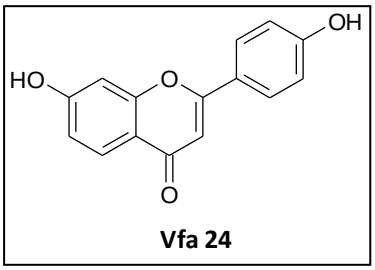


Στο φάσμα ^{1}H NMR του μεταβολίτη **Vfa 22** εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά σήματα του σκελετού μιας πτεροκαρπάνης. Πιο συγκεκριμένα σε δ 5.47 (d 6.4), 4.21 (br d 8.8), 3.54 (br d 8.8) και 3.53 (br d 6.4) παρατηρούμε τις κορυφές των H-4, H-2ax , H-2eq και H-3 αντίστοιχα. Στα φάσματα ^{1}H NMR, COSY και HMQC γίνεται εμφανής η παρουσία δύο 1,3,4-τριςυποκατεστημένων αρωματικών πυρήνων καθώς και μιας μεθοξυλομάδας. Το σήμα συζευξής (J^{3}), στο φάσμα HMBC, μεταξύ της κορυφής της μεθοξυλομάδας (απλή κορυφή σε *δ* 3.74) και του C-4΄ (*δ* 162.7) υποδεικνύει την θέση πρόσδεσης της ομάδας αυτής πάνω στο μόριο. Από την παραπάνω μελέτη συμπεράναμε ότι πρόκειται για το φυσικό προϊόν **μεντικαρπίνη**. Τη δομή αυτή επιβεβαιώνει τόσο η συγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα[343,353] όσο και η κορυφή του ψευδομοριακού ιόντος m/z 369.0739 $[M-H]^{-}$ ($C_{16}H_{13}O_4$ και βαθμό ακορεστότητας 10) που παρατηρούμε στο φάσμα HRMS της ουσίας.



Τα χαρακτηριστικά σήματα του σκελετού της χαλκόνης γίνονται αμέσως αντιληπτά στο φάσμα ^{1}H NMR του μεταβολίτη **Vfa 23**. Οι δύο διπλές κορυφές σε *δ* 7.63 και 7.79 (*J* = 15.5 Hz) είναι χαρακτηριστικές των πρωτονίων ενός *trans* διπλού δεσμού και πιο

συγκεκριμένα των πρωτονίων α και β αντίστοιχα της χαλκόνης. Επιπλέον στα φάσματα ^{1}H NMR, COSY και HMQC γίνεται εμφανής η παρουσία ενός 1,2,4-τρεισυποκατεστιμένου αρωματικού πυρήνα, ενός 1,4-δισυποκατεστιμένου αρωματικού πυρήνα καθώς και μιας μεθοξυλομάδας. Η μελέτη του φάσματος HMBC μας βοήθησε να καθορίσουμε την δομή του μορίου ως **4-μεθόξυ-2',4'-διυδροξυχαλκόνη.** Η σύγκριση των αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα[343,354] καθώς και η κορυφή του ψευδομοριακού ιόντος m/z 369.0739 $[M-H]^-$ ($C_{16}H_{13}O_4$ και βαθμός ακορεστότητας 10) που παρατηρούμε στο φάσμα HRMS της ουσίας επιβεβαιώνουν την παραπάνω δομή.



Vfa 24

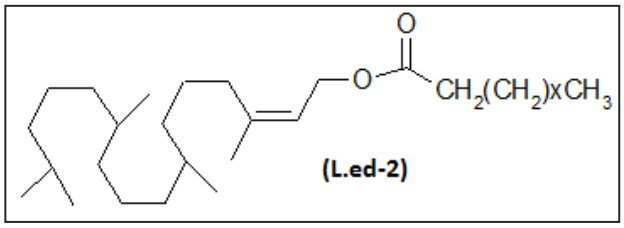
Στο φάσμα ^{1}H NMR του μεταβολίτη **Vfa 24** εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά σήματα ενός φλαβονοειδούς. Η απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο Η-3 στα 6.68 ppm με τον αντίστοιχο άνθρακα να συντονίζεται στα 105.2 ppm (HMQC) δηλώνει την ύπαρξη σκελετού φλαβόνης στο μόριο. Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων COSY, HMQC, HMBC καθώς και το φάσμα HRMS (m/z 253.0489 $[M-H]^-$) συνέβαλαν στην ταυτοποίηση του προϊόντος ως **7,4'-διϋδρόξυ φλαβόνηΣφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.**.

Πίνακας 6.4.13: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της μεντικαρπίνης (Vfa 22), της 4-μεθόξυ-2',4'-διυδρόξυ χαλκόνης (Vfa 23) και της 7,4'-διϋδρόξυ φλαβώνης (Vfa 24).

Vfa 22			Vfa 23			Vfa 24		
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)	C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
2ax	4.21 br d (8.8)	67.5	1	-	128.0	1	-	-
2eq	3.54 br d (8.8)		2	7.63 d (8.8)	131.9	2		165.8
3	3.53 br d (6.4)	39.3	3	6.85 d (8.8)	116.9	3	6.68 s	105.2
4	5.47 d (6.4)	80.0	4	-	161.5	4	-	180.1
5	7.29 d (8.4)	133.1	5	6.85 d (8.8)	116.9	5	7.97 d (8.8)	127.7
6	6.49 dd 8.4/2.4)	110.7	6	7.63 d (8.8)	131.9	6	6.94 dd (8.8/2.2)	116.3
7	-	158.3	α	7.63 d (15.5)	118.5	7	-	164.5
8	6.31 d (2.4)	104.1	β	7.79 d (15.5)	145.9	8	6.97 d (2.2)	103.4
9	-	157.8	β′	-	193.2	9	-	159.8
10	-	113.3	1′	-	114.6	10	-	117.0
1’	-	119.4	2′	-	166.8	1′	-	123.6
2’	-	162.5	3′	6.28 d (2.2)	103.8	2′	7.88 d (8.8)	129.3
3’	6.31 d (2.4)	97.4	4′	-	166.4	3′	6.94 d (8.8)	116.9
4’	-	162.7	5′	6.43 dd (8.8/2.2)	109.1	4′	-	162.5
5’	6.44 dd 8.1/2.4)	107.3	6′	7.97 d (8.8)	133.5	5′	6.94 d (8.8)	116.9
6’	7.17 d (8.1)	126.0	$\underline{CH_3}O$	3.73 s	55.6	6′	7.88 d (8.8)	129.3
$\underline{CH_3}O$	3.74 s	55.9						

6.4.2 Lotus edulis

Το προϊόν **L.ed-1** απομονώθηκε από το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα του φυτού και κατά τον χρωματογραφικό έλεγχο με TLC δεν παρουσίαζε απορρόφηση στο UV (254 και 366 nm) ενώ χρωματίσθηκε έντονα (μωβ) μετά την εμφάνιση με το μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλλίνης. Από το φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας διαπιστώσαμε ότι πρόκειται για μίγμα κορεσμένων αλδεϋδών. Χαρακτηριστικές είναι οι δύο ευρείες απλές κορυφές σε *δ* 9.79 και 9.38 οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια αλδεϋδομάδων. Επίσης παρατηρήσαμε δύο διπλές τριπλών κορυφές (*J* = 7.0 / 1.6 Hz) σε *δ* 2.44 και 2.37 που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των μεθυλενίων που γειτνιάζουν με την αλδεϋδομάδα, μία τριπλή κορυφή (*J* = 7.0 Hz) που αντιστοιχεί στο ακραίο μεθύλιο και μία ευρεία απλή κορυφή στην περιοχή 1.35-1.25 ppm που αντιστοιχεί στα μεθυλενικά πρωτόνια της αλειφατικής αλυσίδας. Το ίδιο δείγμα μελετήθηκε και με την τεχνική GC-MS, όπου διαπιστώθηκε ότι το κύριο συστατικό του μίγματος είναι η n-οκταδεκανάλη.

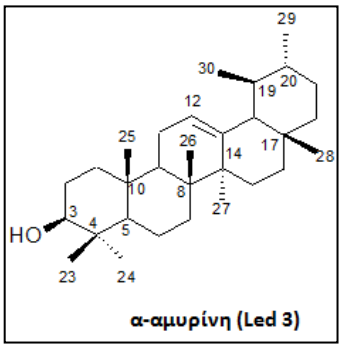


(L.ed-2)

Το προϊόν **L.ed-2** απομονώθηκε επίσης από το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα. Στον έλεγχο με TLC δεν παρουσίασε απορρόφηση στο UV (254 και 366 nm) ενώ χρωματίσθηκε έντονα μετά τον ψεκασμό με το μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλλίνης και θέρμανση. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος που ακολούθησε αποκάλυψε ότι πρόκειται για παράγωγο της *cis*-φυτόλης. Συγκεκριμένα στο φάσμα ^{1}H-NMR παρατηρήσαμε μία ευρεία τριπλή κορυφή (*J* = 7.0 Hz) σε *δ* 5.31 που αντιστοιχεί σε ολεφινικό μεθίνιο, του οποίου ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 117.5 ppm (HMQC). Τα πρωτόνια του οξυγονωμένου μεθυλενίου εμφανίζονται ως διπλή κορυφή (*J* = 7.0 Hz) σε *δ* 4.56 του οποίου ο άνθρακας συντονίζεται στα 61.0 ppm (HMQC). Επίσης παρατηρήσαμε μία τριπλή κορυφή (*J* = 7.2 Hz) σε *δ* 1.98 που αντιστοιχεί σε μεθυλενικά πρωτόνια που γειτνιάζουν με το διπλό δεσμό, μία απλή κορυφή σε *δ* 1.67 που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε μεθυλομάδα που βρίσκεται πάνω στο διπλό δεσμό, μία μεγάλη ευρεία απλή κορυφή στην περιοχή 1.40-1.20 ppm που

αντιστοιχεί σε μεθυλενικά πρωτόνια αλυσίδας καθώς και τις διπλές κορυφές (*J* = 6.5 Hz) που αντιστοιχούν σε μεθύλια που συνδέονται με μεθίνια.

Στο φάσμα HMBC παρατηρήσαμε τις συζεύξεις των ανθράκων του διπλού δεσμού με τα οξυγονωμένα μεθυλενικά πρωτόνια. Ωστόσο, παρατηρήσαμε και μία σύζευξη των τελευταίων με άνθρακα καρβονυλίου (*δ* 174.0), γεγονός το οποίο φανερώνει ότι η υδροξυλομάδα στη συγκεκριμένη θέση είναι εστεροποιημένη. Πράγματι στο φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές των κορεσμένων λιπαρών οξέων, όπως είναι η τριπλή κορυφή (*J* = 7.2 Hz) σε *δ* 2.25 και η πολλαπλή κορυφή σε *δ* 1.58, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια των μεθυλενίων που γειτνιάζουν με την καρβοξυλομάδα. Από τα προαναφερόμενα και μετά από σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα[355] συμπεράναμε ότι η ουσία **L.ed-2** ανήκει στην κατηγορία των εστέρων της φυτόλης. Το ίδιο δείγμα μελετήθηκε και με την τεχνική GC-MS, όπου διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για μείγμα εστέρων της φυτόλης με λιπαρά οξέα με κύριο συστατικό τον εστέρα της φυτόλης με το εικοσανοϊκό οξύ.

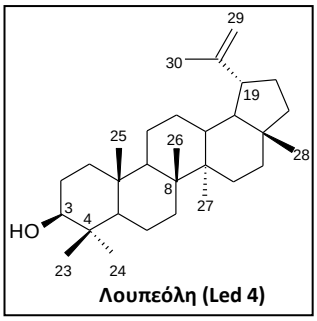


α-αμυρίνη (Led 3)

Το προϊόν **L.ed-3** αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος Κατά την εξέταση του χρωματογραφήματος TLC, παρατηρήθηκε η ύπαρξη μίας κηλίδας η οποία δεν απορροφούσε στο UV ενώ χρωματίστικε μπλε μετά από ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης. Ακολούθησε λήψη φασμάτων MS, ^{1}H NMR, ^{13}C-NMR και DEPT. Μετά από τη μελέτη των φασμάτων αυτών και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα[356] διαπιστώθηκε ότι η ουσία που απομονώθηκε είναι η ***α-αμυρινη***.

Αναλυτικότερα, στο φάσμα ^{1}H-NMR το ολεφινικό μεθίνιο εμφανίζεται ως διπλή διπλής κορυφή στα 5.10 ppm (*J* = 4.2 / 3.2 Hz) ενώ το οξυγονωμένο μεθινικο πρωτόνιοεμφανίζεται με τη μορφή διπλή διπλής κορυφή στα 3.19 ppm (*J* = 10.7 / 5.2 Hz). Επίσης σε *δ* 1.01, 0.99, 0.97, 0.87, 0.80 και 0.78 παρατηρούμε έξι απλές κορυφές που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμιά και αντιστοιχούν σε πρωτόνια μεθυλίων που βρίσκονται πάνω σε τεταρτοταγείς άνθρακες. Σε *δ* 0.92 και

0.91 εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές (*J* = 6.2 Hz) που ολοκληρώνουν επίσης, για τρία πρωτόνια η καθεμιά και αντιστοιχούν σε πρωτόνια μεθυλίων που βρίσκονται πάνω σε τριτοταγείς άνθρακες. Στο φάσμα ^{13}C της ουσίας συμπεράναμε ότι υπάρχουν 30 άνθρακες από τους οποίους δύο ανήκουν σε διπλό δεσμό (*δ* 139.6 και 124.4), ένας σε οξυγονωμένο άνθρακα (*δ* 78.9) ενώ οι υπόλοιποι σε αλειφατικούς άνθρακες. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H-NMR και ^{13}C) της *α*-αμυρίνης δίδοντα στον πίνακα 6.4.14.



Λουπεόλη (Led 4)

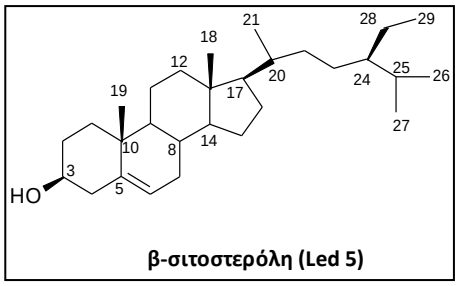
Κατά την εξέταση με TLC το προϊόν **L.ed-4** δεν παρουσίασε απορρόφηση στο UV ενώ χρωματίσθηκε μώβ μετά από ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης. Από τη μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR και DEPT της ουσίας και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα[357,358] διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το φυσικό προϊόν **λουπεόλη**.

Στο φάσμα ^{1}H-NMR χαρακτηριστικές είναι οι δύο ευρείες απλές κορυφές στα 4.69 και 4.56 ppm, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμιά και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-29. Το πρωτόνιο του οξυγονωμένου μεθινίου εμφανίζεται στα 3.18 ppm ως διπλή διπλής κορυφή (*J* = 11.4 και 5.2 Hz) ενώ στα 1.68 ppm παρατηρούμε μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθύλιο που βρίσκεται πάνω σε διπλό δεσμό. Στο ίδιο φάσμα εμφανίζονταν επίσης οι έξι απλές κορυφές, σε *δ* 1.03, 0.98, 0.97, 0.83, 0.79 και 0.76, που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμιά και αντιστοιχούν στα μεθύλια που είναι συνδεδεμένα σε τεταρτοταγείς άνθρακες. Στο φάσμα ^{13}C της ουσίας συμπεράναμε ότι υπάρχουν 30 άνθρακες εκ των οποίων οι δύο ανήκουν σε διπλό δεσμό (*δ* 150.9 και 109.3), ενώ υπάρχει και ένας οξυγονωμένος άνθρακας (*δ* 79.0). Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της λουπεόλης (L.ed-4) παρατίθενται στον πίνακα 6.4.14.

Πίνακας 6.4.14: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της **α-αμυρίνης** (L.ed-3)και της **λουπεόλης** (L.ed-4).

	L.ed-3		L.ed-4	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
1	2.05-0.65 (m)	38.8	1.68/0.91 (m/m)	38,7
2	2.05-0.65 (m)	27.3	1.61/1.54 (m/m)	27,4
3	3.19 (dd, 10.7 / 5.2)	78.9	3.18 (dd, 11.4 / 5.2)	79,0
4	-	40.0	-	38,8
5	2.05-0.65 (m)	55.2	0.69 (m)	55,3
6	2.05-0.65 (m)	18.4	1.39/1.54 (m/m)	18,3
7	2.05-0.65 (m)	33.0	1.41 (m)	34,2
8	-	40.0	-	40,8
9	2.05-0.65 (m)	47.7	1.28 (m)	50,4
10	-	36.9	-	37,1
11	2.05-0.65 (m)	23.4	1.25/1.42 (m/m)	20,9
12	5.10 (dd, 4.2 / 3.2)	124.4	1.07/1.68 (m/m)	25,1
13	-	139.6	1.67 (m)	38,0
14	-	42.1	-	42,8
15	2.05-0.65 (m)	29.7	1.71/1.01 (m/m)	27,4
16	2.05-0.65 (m)	26.6	1.38/1.49 (m/m)	35,5
17	-	33.8	-	43,0
18	2.05-0.65 (m)	59.1	1.37 (m)	48,2
19	2.05-0.65 (m)	39.6	2.38 (m)	47,9
20	2.05-0.65 (m)	39.7	-	150,9
21	2.05-0.65 (m)	31.3	1.33/1.93 (m/m)	29,8
22	2.05-0.65 (m)	41.5	1.42/1.20 (m/m)	40,0
23	0,78 (s)	28.1	0.98 (s)	28,0
24	0.80 (s)	15.6	0.76 (s)	15,4
25	0.87 (s)	15.7	0.83 (s)	16,1
26	0,97 (s)	16.9	1.03 (s)	15,9
27	0,99 (s)	23.3	0.97 (s)	14,5
28	1.01 (s)	28.8	0.79 (s)	18,0
29	0.91 (d, 6.2)	17.5	4.69/4.56 (brs/brs)	109,3
30	0.92 (d, 6.2)	21.4	1.68 (s)	19,3

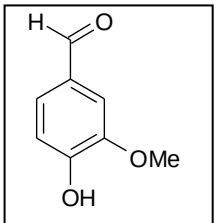
Το προϊόν **L.ed-5** αποτελεί κύριο μεταβολίτη του διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος. Από τη μελέτη των φασμάτων MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, COSY και HMQC και με τη βοήθεια βιβλιογραφικών δεδομένων[359,360,361,362] αποδείχθηκε ότι πρόκειται για τη ***β*-σιτοστερόλη**.



β-σιτοστερόλη (Led 5)

Στο φάσμα ^{1}H-NMR παρατηρήσαμε την παρουσία έξι μόνο κορυφών που αντιστοιχούν σε μεθύλια γεγονός που αποτελεί σημαντική ένδειξη σκελετού φυτοστερόλης. Ο Δ^5 διπλός δεσμός υποδεικνύεται με την παρουσία της κορυφής στα 5.35 ppm η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6, ενώ η παρουσία του *β*-υδροξυλίου στην θέση 3 διαπιστώνεται από την κορυφή στα 3.53 ppm που αντιστοιχεί στο αξονικό H-3. Τα πρωτόνια H-4 εμφανίζονται αποθωρακισμένα στα 2,28 ppm λόγω της παρουσίας τόσο του διπλού δεσμού στη θέση 5 όσο και της υδροξυλομάδας στη θέση 3. Στο φάσμα ^{13}C-NMR παρατηρήσαμε την ύπαρξη 29 ανθράκων εκ των οποίων δύο βρίσκονταν στην ωλεφινική περιοχή (*δ* 140.7 και 121.7 ppm) και αντιστοιχούν στους άνθρακες του διπλού δεσμού, ενώ ένας στην οξυγονωμένη περιοχή (δ 71.8 ppm) και αντιστοιχεί στον οξυγονωμένο άνθρακα της θέσης 3. Αναλυτικότερα τα φασματοσκοπικά δεδομένα της *β*-σιτοστερόλης αναφέρονται στον πίνακα 6.4.15.

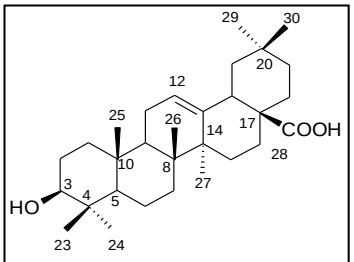
Το προϊόν **L.ed-6** διέφερε σημαντικά από τα υπόλοιπα συστατικά που απομονώθηκαν από το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα διότι παρουσίασε έντονη απορρόφηση στο υπεριώδες (256 nm) κατά τον χρωματογραφικό έλεγχο με TLC. Η μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR και COSY-LR μας βοήθησαν να συμπεράνουμε ότι η υπό μελέτη ουσία είναι η **βανιλλίνη**. Πιο συγκεκριμένα στο φάσμα ^{1}H-NMR παρατηρήσαμε τις τρεις χαρακτηριστικές κορυφές στα 7.41 ppm (dd, *J* = 8.5 / 2.1 Hz), 7.40 ppm (d, *J* = 2.1 Hz) και 7.03 ppm (d, *J* = 8.5 Hz) οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτονίων του ABX υποκατεστιμένου αρωματικού πυρήνα. Το πρωτόνιο της αλδεϋδομάδας εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 9.81 ppm. Τέλος στο ίδιο φάσμα



Βανιλλίνη (Led 6)

εμφανίζεται και μια απλή κορυφή σε *δ* 3.91 που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια της μεθοξυλομάδας. Επίσης η σύγκριση του **L.ed-6** με πρότυπη ουσία (Aldrich V 110-4), με χρωματογραφία TLC επιβεβαίωσε την θεωρία μας.

Το προϊόν **L.ed-7** αποτελεί τον τελευταίο μεταβολίτη που απομονώθηκε από το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα του φυτού. Για την ταυτοποίηση της δομής του προϊόντος προχωρήσαμε στη λήψη φασμάτων ^{1}H-NMR, ^{13}C, DEPT καθώς και φασμάτων μάζας. Η μελέτη των φασμάτων αυτών και η σύγκριση των αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα[363] οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα ακόμη τριτερπένιο και συγκεκριμένα για το **ολεανολικό οξύ**.



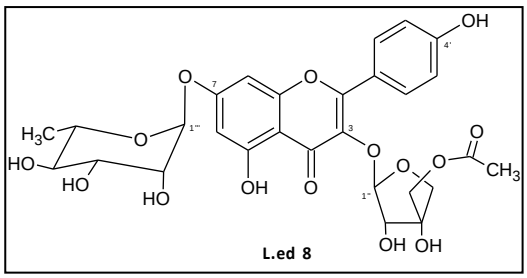
ολεανολικό οξύ (Led 7)

Στο φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας η ύπαρξη του Δ^{12} διπλού δεσμού υποδεικνύεται από την παρουσία της τριπλής κορυφής στα 5.28 ppm (*J* = 3.6Hz), ενώ η διπλή διπλής κορυφή που εμφανίζεται στα 3,2 ppm (J=9,6Hz, 4,8Hz) αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3. Επίσης στο ίδιο φάσμα παρατηρούμε και επτά απλές κορυφές σε δ 1,11 , 0,96 , 0,90 , 0,89 ,0.88, 0.75 και 0.72 ppm που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμιά και αντιστοιχούν σε επτά μεθύλια. Στο φάσμα ^{13}C της ουσίας συμπεράναμε ότι υπάρχουν 30 άνθρακες εκ των οποίων δύο ανήκουν σε διπλό δεσμό (δύο κορυφές σε δ 143.6 και 122.6 ppm), ένας είναι άνθρακας καρβοξυλύου (μια κορυφή στα 183.5 ppm) και ένας οξυγονωμένος άνθρακας (μια κορυφή στα 79.0 ppm). Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του ολεανολικού οξέως αναφέρονται στον Πίνακα 6.4.15.

Πίνακας 6.4.15: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της ***β*-σιτοστερόλης** (L.ed-5)και του ολεανολικού οξέος(L.ed-7).

	L.ed-5		L.ed-7	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
1	1.15 1.89 (m,m)	37.2	0,82/1.37 (m)	38.4
2	1.85 1.56 (m,m)	31.6	1,62 (m)	27.1
3	3.53 (m)	71.8	3.24 (dd, 9.6, 4.8)	79.0
4	2.28 (m)	42.3	-	38.7
5	-	140.7	0,78 (m)	55.2
6	5.35 (m)	121.7	1,38/1.19 (m/m)	18.3
7	1.53	31.9	1.33/1.16 (m/m)	32.6
8	1.93	31.9	-	39.2
9	0.98	50.1	1.51 (m)	47.6
10	-	36.5	-	37.0
11	1.51	21.1	1.76	22.9
12	1.19 2.03	39.7	5.28 (t, 3.6)	122.6
13	-	42.3	-	143.6
14	1.00	56.7	-	41.6
15	1.13 1.61	24.3	1.02/1.99 (m/m)	27.6
16	1.35 1.86	28.2	1.92/1.76 (m/m)	23.4
17	1.10	56.0	-	46.5
18	0.68 (s)	11.8	2.83 (dd, 13.6, 4.2)	41.0
19	1.00 (s)	19.4	1.63/1.12 (m/m)	45.8
20	1.37	36.1	-	30.6
21	0.92 (d, 6.5)	18.8	1.26/1.03 (m/m)	33.8
22	1.04 1.35	33.9	1.62/1.84 (m/m)	32.4
23	1.20	26.0	0.96 (s)	28.1
24	1.97	45.8	0.88 (s)	15.5
25	1.70	29.1	0.72 (s)	15.3
26	0.84 (d, 6.5)	19.8	0.90 (s)	17.1
27	0.81 (d, 6.5)	19.0	1.11 (s)	25.9
28	1.27	23.0	-	183.4
29	0.85 (t, 7.5)	12.0	0.75 (s)	33.1
30			0.89 (s)	23.6

Το προϊόν **L.ed-8** αποτελεί κύριο προϊόν του μεθανολικού εκχυλίσματος και απομονώθηκε κατά την επεξεργασία του με Χρωματογραφίας Κατ' Αντιροή. Στον ποιοτικό έλεγχο με TLC η ουσία αυτή χαρακτηριζόταν από έντονη απορρόφηση στο U.V. (στα 254 και 365 nm), ενώ μετά τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης παρουσίασε έντονο κίτρινο χρώμα. Η μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, COSY, HMQC και HMBC της ουσίας αλλά και των φασμάτων ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, DEPT, HMQC και HMBC του ακετυλιωμένου παραγώγου έδειξε ότι πρόκειται για ένα δισακχαρίτη της καιμπφερόλης, την **3-*O*-(5-*O*-ακετυλο-απιοφουρανόσυλο)-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη. Το φλαβονοειδές αυτό αποτελεί νέο φυσικό προϊόν.**



L.ed 8

Πιο συγκεκριμένα στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR παρατηρήσαμε τις χαρακτηριστικές κορυφές της καιμπφερόλης, δηλαδή δύο ευρείες απλές κορυφές στα 6.74 και 6.45 ppm οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-8 και H-6, καθώς επίσης και δύο διπλές κορυφές σε *δ* 7.87 και 6.94, που η καθεμία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχούν σε ένα π-υποκατεστημένο αρωματικό σύστημα.

Στην οξυγονωμένη περιοχή του ίδιου φάσματος εμφανίζονται μια σειρά κορυφών που δηλώνουν την παρουσία σακχάρων στο μόριο. Χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές στα 5.72 και 5.58 ppm, οι οποίες είναι ευρείες απλές και αντιστοιχούν σε ανωμερικά μεθινικά πρωτόνια (οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται στα 111.2 και 100.3 ppm – HMQC). Από τη μορφή των ανωμερικών πρωτονίων, την χημική μετατόπιση τους και τη χημική μετατόπιση των αντίστοιχων ανθράκων συμπεράναμε ότι στο μόριο υπάρχουν δύο τουλάχιστον σάκχαρα, από τα οποία το ένα είναι ραμνόση (ευρεία απλή κορυφή ανωμερικού πρωτονίου και ανωμερικός άνθρακας στα 100.3 ppm περίπου και διπλή κορυφή με *J* = 6.5 Hz που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια σε *δ* 1,26) ενώ το άλλο είναι απιόση (ευρεία απλή κορυφή ανωμερικού πρωτονίου και ανωμερικός άνθρακας στα 110 ppm περίπου). Η παρουσία οκτώ σημάτων στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος ^{13}C-NMR (80.0-67.0 ppm) επιβεβαιώνει την παρουσία δύο σακχάρων στο μόριο. Επιπλέον οι

χημικές μετατοπίσεις των ανωμερικών πρωτονίων δηλώνουν ότι και τα δύο σάκχαρα βρίσκονται συνδεδεμένα σε αρωματικό πυρήνα.

Η αποθωράκιση των πρωτονίων 6 και 8 της καιμπφερόλης αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι το ένα από τα δύο σάκχαρα είναι συνδεδεμένο στη θέση 7 της γενίνης. Αντίθετα οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων 2΄,6΄και 3΄,5΄ είναι παρόμοιες με τις αντίστοιχες της καιμπφερόλης γεγονός που δηλώνει ότι στη θέση 4΄ δεν υπάρχει σάκχαρο. Το φάσμα HMBC αποδείχτηκε καθοριστικό στην αποσαφήνιση της θέσης σύνδεσης των σακχάρων με την γενίνη. Το σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου της απιόσης και του άνθρακα στα 135,4 ppm (C-3) δηλώνει ότι το σάκχαρο αυτό βρίσκεται συνδεδεμένο στη θέση 3 της καιμπφερόλης. Αντίστοιχα το σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου της ραμνόσης και του άνθρακα στα 163.6 ppm (C-7) δείχνει ότι η ραμνόση ενώνεται με το υδροξύλιο της θέσης 7 της γενίνης.

Τέλος, στο φάσμα πρωτονίου εμφανίζεται μια απλή κορυφή σε *δ* 2,10 ppm η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε μεθύλιο ακετυλίου που βρίσκεται σε σάκχαρο. Στο φάσμα HMBC φαίνεται ότι ο καρβονυλικός άνθρακας του ακετυλίου (170,9 ppm) παρουσιάζει σύζευξη με δύο πρωτόνια σε *δ* 4.18 και 4.05 γεγονός που φανερώνει ότι το ακετύλιο βρίσκεται στο μεθυλένιο της απιόσης. Με τη βοήθεια των προαναφερόμενων φασμάτων αποδόθηκαν όλα τα σήματα στα φάσματα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR και οι χημικές μετατοπίσεις φαίνονται στον πίνακα 6.4.17 (σελ. 222).

Με σκοπό την επιβεβαίωση όσων αναφέρθηκαν για τον τύπο των σακχάρων που υπάρχουν στο μόριο πραγματοποιήθηκε ακετυλίωση. Έτσι, μέρος της ουσίας ακετυλιώθηκε με προσθήκη πυριδίνης και οξικού ανυδριτη σε αναλογία 1/1 και το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 48 ώρες. Το ακετυλιωμένο προϊόν απομονώθηκε με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, στην οποία ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε CH_2Cl_2 και MeOH σε αναλογία 99 / 1.

Στο φάσμα ^{1}H-NMR του ακετυλιωμένου προϊόντος παρατηρήσαμε τις χαρακτηριστικές κορυφές της καιμπφερόλης και συγκεκριμένα τις δύο διπλές κορυφές (*J* = 8.2 Hz) σε *δ* 7.75 και 7.24 καθεμία απ’ τις οποίες ολοκληρώνει για δύο

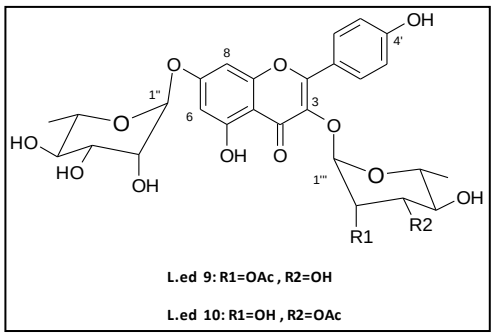
πρωτόνια και αντιστοιχούν στα πρωτόνια 2΄,6΄ και 3΄,5΄. Επίσης, εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές (*J* = 2.0 Hz) σε *δ* 7.06 και 6.76 που αντιστοιχούν στα πρωτόνια Η-8 και Η-6 του φλαβονοειδούς. Όσον αφορά την οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρατηρήσαμε:

- Τις κορυφές των ανωμερικών πρωτονίων (ευρείες απλές) σε *δ* 5.60 και 5.53
- Το σήμα του πρωτονίου 2 της απιόσης (ευρεία απλή κορυφή) σε *δ* 5.61.
- Στα 5.14 ppm μια τριπλή κορυφή (*J* = 9.5 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο Η-4 της ραμνόσης.
- Μια πολλαπλή κορυφή στα 5.42 ppm η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια Η-2 και Η-3 της ραμνόσης.
- Τα πρωτόνια των δύο μεθυλενίων της απιόσης ως τέσσερις διπλές κορυφές σε *δ* 4,67 (*J* = 12.2 Hz), 4.42 (*J* = 12.2 Hz), 4.00 (*J* = 10.9 Hz), 3.74 (*J* = 10.9 Hz).
- Μια πολλαπλή κορυφή σε *δ* 3.88 που αντιστοιχεί στο Η-5 της ραμνόσης.

Επιπλέον παρατηρήσαμε οκτώ απλές κορυφές στην περιοχή 2.45-1.90 ppm, από τις οποίες καθεμία ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια και αντιστοιχούν σε δύο ακετύλια που βρίσκονται σε φαινολικά υδροξύλια (*δ* 2.42 και 2.31) και έξι που αντιστοιχούν σε ακετύλια πάνω σε σάκχαρα (*δ* 2.18, 2.07, 2.05, 2.04, 2.01 και 1.95).

Από τη μορφή των πρωτονίων των δύο σακχάρων συμπεράναμε ότι πρόκειται για α-ραμνοπυρανόση και β-απιοφουρανόση.

Οι μεταβολίτες **L.ed-9** και **L.ed-10** παρελήφθησαν ως μείγμα κατά την επεξεργασία του μεθανόλικού εκχυλίσματος του φυτού. Αν και στον έλεγχο του κλάσματος με TLC εμφανίστηκε κυρίως μια ουσία, η οποία απορροφούσε έντονα στο U.V. (στα 254 και 365 nm) και χρωματιζόταν έντονα κίτρινη μετά τον ψεκασμό με το



L.ed 9: R1=OAc , R2=OH

L.ed 10: R1=OH , R2=OAc

αντιδραστήριο εμφάνισης, εντούτοις στον έλεγχο με HPLC διαπιστώθηκε η ύπαρξη δύο ουσιών με παραπλήσιους χρόνους ανάσχεσης. Ακολούθησε μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων για την ταυτοποίηση των δύο προϊόντων. Από την μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, DEPT, COSY, COSY-LR, HMQC και HMBC καθώς και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα[364,365] συμπεράναμε ότι πρόκειται για τις ουσίες **3-*O*-(2-*O*-ακετυλο)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** και **3-*O*-(3-*O*-ακετυλ)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR παρατηρήσαμε τα εξής:

- Μια διπλή κορυφή (*J* = 8.8 Hz) σε *δ* 7.80.
- Μια διπλή κορυφή (*J* = 8.8 Hz) σε *δ* 7.77.
- Μια διπλή κορυφή (*J* = 8.8 Hz) σε *δ* 6.94.
- Μια διπλή κορυφή (*J* = 2.0 Hz) σε *δ* 6.70.
- Μια διπλή κορυφή (*J* = 2.0 Hz) σε *δ* 6.44.

Η απουσία άλλων σημάτων στην περιοχή αυτή, μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για μείγμα δύο παραγώγων καιμπφερόλης (δύο διαφορετικές κορυφές για τα πρωτόνια Η-2΄, Η-6΄).

Στην οξυγονωμένη περιοχή του ίδιου φάσματος εμφανίζεται μια σειρά κορυφών, που δηλώνουν την παρουσία σακχάρων στο μόριο. Χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές στα 5.54, 5.44 και 5.38 ppm, οι οποίες είναι ευρείες απλές και αντιστοιχούν σε ανωμερικά μεθινικά πρωτόνια ραμνόσης (οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται στα 99.8, 102.9 και 100.4 ppm–HMQC).

Στην ίδια περιοχή του φάσματος παρατηρούμε μια διπλή διπλής κορυφή (*J* = 3.3, 1,8 Hz) σε *δ* 5.43 καθώς και μια επίσης διπλή διπλής κορυφή (*J* = 9.3, 3.3 Hz) σε δ 4.98. Η μορφή των κορυφών αυτών και η χημική τους μετατόπιση δηλώνουν την ύπαρξη ακετυλίου πάνω σε ραμνόση στις θέσεις 2 και 3, αντίστοιχα. Από την ολοκλήρωση των παραπάνω κορυφών καθώς επίσης και την ολοκλήρωση των

κορυφών των ακετυλίων (απλές κορυφές σε *δ* 2.13 και 2.06) συμπεράναμε ότι τα δύο αυτά ακετύλια βρίσκονται πάνω σε διαφορετικά μόρια ραμνόσης.

Από τη μορφή των ανωμερικών πρωτονίων, την χημική μετατόπιση, την ολοκλήρωση των κορυφών τους, καθώς επίσης και τη χημική μετατόπιση των αντίστοιχων ανθράκων συμπεράναμε ότι υπάρχουν τέσσερα τουλάχιστον σάκχαρα: δύο ραμνόσες, μια 2-*O*-ακετυλοραμνόση και μια 3-*O*-ακετυλοραμνόση τα οποία βρίσκονται συνδεδεμένα σε αρωματικό πυρήνα (βλέπε τις χημικές μετατοπίσεις των ανωμερικών πρωτονίων).

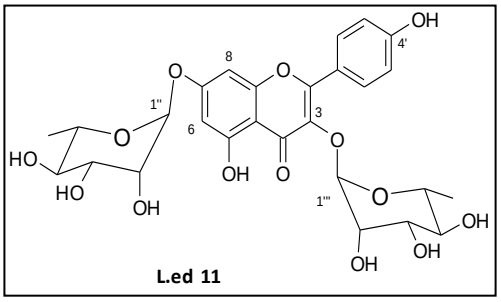
Έχοντας υπόψη το γεγονός ότι οι δύο ουσίες του μίγματος έχουν παρόμοια πολικότητα (στην TLC δίνουν μια κηλίδα ενώ στην HPLC οι κορυφές στο χρωματογράφημα επικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό) συμπεράναμε ότι πρόκειται για δύο δισακχαρίτες της καιμπφερόλης, όπου ο καθένας περιέχει μια ραμνόση και μια 2-*O*- ή 3-*O*- ακετυλοραμνόση. Από τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων 6 και 8 συμπεραίνουμε ότι στη θέση 7 της γενίνης υπάρχει σάκχαρο. Στο φάσμα HMBC παρατηρήσαμε σύζευξη ^{3}J του ανωμερικού πρωτονίου της ραμνόσης, που συντονίζεται στα 5.54 ppm (H-1′′), με τον άνθρακα στα 163.5 ppm (άνθρακας 7 της καιμπφερόλης), καθώς επίσης και τις συζεύξεις των ανωμερικών πρωτονίων στα 5.44 και 5.38 ppm με τον άνθρακα που συντονίζεται στα 136.2 ppm (άνθρακας 3 της καιμπφερόλης). Έτσι συμπεράναμε πως πρόκειται για δύο διραμνοσιδες της καιμπφερόλης με τα σάκχαρα να ενώνονται στις θέσεις 3 και 7 της γενίνης.

Τα ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόσης που βρίσκεται στη θέση 7 της γενίνης (*δ* 5.54) παρουσιάζει σύζευξη ^{3}J στο φάσμα COSY με το πρωτόνιο H-2′′′ (*δ* 4.02), το οποίο με τη σειρά του συζευγνύεται με το πρωτόνιο H-3′′′ (*δ* 3.83). Από τη χημική μετατόπιση των πρωτονίων αυτών συμπεραίνουμε ότι τα υδροξύλια των αντίστοιχων θέσεων δεν είναι ακετυλιωμένα. Επομένως, και στα δύο φλαβονοειδή οι ακετυλομάδες βρίσκονται στις ραμνόσες που συνδέονται στη θέση 3 της γενίνης.

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR των δύο αυτών ουσιών δίδονται στον Πίνακας 6.4.16 .

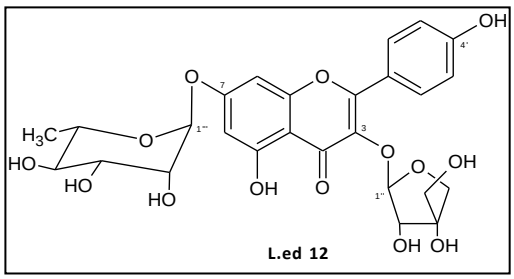
Πίνακας 6.4.16: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C της 3-*O*-(2-*O*-ακετυλο)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (L.ed-9) και της 3-*O*-(3-*O*-ακετυλο)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (L.ed-10)

	L.ed-9		L.ed-10	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
1	-	-	-	-
2	-	159.7	-	159.7
3	-	136.2	-	136.2
4	-	179.7	-	179.7
5	-	162.9	-	162.9
6	6.44 (d 2.0)	100.6	6.44 (d 2.0)	100.6
7	-	163.5	-	163.5
8	6.70 (d 2.0)	95.6	6.70 (d 2.0)	95.6
9	-	158.1	-	158.1
10	-	107.5	-	107.5
1′	-	122.3	-	122.3
2′6′	7.77 (d, 8.2)	131.9	7.80 (d, 8.2)	131.9
3′5′	6.94 (d, 8.2)	116.7	6.94 (d, 8.2)	116.7
4′	-	161.8	-	161.8
1′′	5.38 (brs)	100.4	5.44 (brs)	102.9
2′′	5.42 (dd 3.3/1.8)	73.3	4.36 (dd 3.3/1.8)	69.7
3′′	3.88 (dd 9.3/3.3)	71.2	4.98 (dd 9.3/3.3)	75.3
4′′	3.55 (t 9.3)	74.0	3.55 (t 9.3)	70.3
5′′	3.46 (m)	72.2	3.46 (m)	72.2
6′′	0.95 (d 6.1)	17.7	0.95 (d 6.1)	17.7
1′′′	5.54 (brs)	99.8	5.54 (brs)	99.8
2′′′	4.02 (dd 3.3/1.8)	71.7	4.02 (dd 3.3/1.8)	71.7
3′′′	3.83 (dd 9.3/3.3)	72.1	3.83 (dd 9.3/3.3)	72.1
4′′′	3.48 (t 9.3)	73.6	3.48 (t 9.3)	73.6
5′′′	3.62 (m)	71.3	3.62 (m)	71.3
6′′′	1.24 (d 5.4)	18.1	1.24 (d 5.4)	18.1
CH$_3$CO-	2.06 (m)	20.8	2.13 (m)	21.1
CH$_3$**C**O-	-	172.8	-	172.8



L.ed 11

Το προϊόν **L.ed-11** απομονώθηκε επίσης σε ένα στάδιο με επεξεργασία του μεθανόλικού εκχυλίσματος του φυτού με χρωματογραφία Κατ' Αντιροή. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος που ακολούθησε και η σύγκριση των αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η υπό μελέτη ουσία είναι η **3,7-δι-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη**. Η ίδια ουσία απομονώθηκε και κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Vicia faba* (Vfa 1) η οποία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η φασματοσκοπική μελέτη της ουσίας παρουσιάζεται στη σελίδα 172 ενώ τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα δίνονται στον πίνακα 6.4.1 (σελ. 174).



L.ed 12

Ο μεταβολίτης **L.ed-12** αποτελεί κύριο προϊόν του μεθανολικού εκχυλίσματος και απομονώθηκε με απευθείας επεξεργασία του ολικού εκχυλίσματος με CCC. Από τη μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, και DEPT της ουσίας, αλλά και τη μελέτη του φάσματος ^{1}H-NMR του ακετυλιωμένου προϊόντος καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το **νέο φυσικό προϊόν 3-*O*-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη**.

Τα φάσματα του προϊόντος παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τα φάσματα της ουσίας 3-*O*-(5-*O*-ακετυλαπιοφουρανοσυλο)-7-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη. Στο φάσμα ^{1}H-NMR οι χαρακτηριστικές κορυφές της καιμπφερολης εμφανίζονται ως δύο ζεύγη διπλών κορυφών σε 7.90 και 6.94 ppm για τα πρωτόνια του πάρα-υποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα και σε *δ* 6.73 και 6.46 για τα πρωτόνια H-8 και H-6, αντίστοιχα. Επίσης, παρατηρήσαμε τα σήματα των ανωμερικών πρωτονίων δύο σακχάρων (μιας ραμνόσης και μιας απιόσης), τα οποία συντονίζονται στα 5.73 και 5.57 ppm, αντίστοιχα. Στην περιοχή 4.50 ως 3.20 ppm συντονίζονται τα υπόλοιπα πρωτόνια των δύο σακχάρων, εκτός από τα πρωτόνια του μεθυλίου της

Πίνακας 6.4.17: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της 3-*O*-(5-*O*- ακετυλοαπιοσυλο)-7-*O*- ραμνοσυλοκαιμπφερόλη (L.ed-8)και της 3-*O*-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλης (L.ed-12).

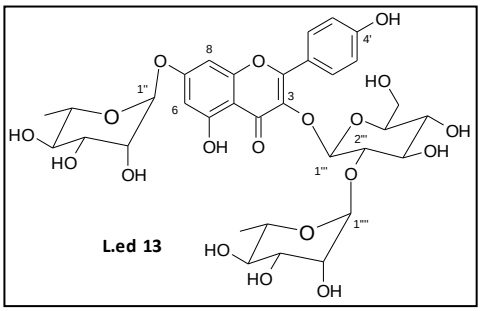
	L.ed-8		L.ed-12	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
1	-	-	-	-
2	-	160.2	-	159.6
3	-	135.4	-	135.2
4	-	179.7	-	179.5
5	-	163.0	-	162.6
6	6.45 (d, 2.1)	99.9	6.46 (d, 2.1)	99.6
7	-	163.6	-	163.2
8	6.74 (d, 2.1)	95.7	6.73 (d, 2.1)	95.3
9	-	158.1	-	157.7
10	-	107.8	-	107.1
1′	-	122.6	-	122.3
2′	7.87 (d, 8.2)	132.1	7.90 (d, 8.2)	131.6
3′	6.94 (d, 8.2)	116.5	6.94 (d, 8.2)	116.1
4′	-	161.7	-	161.3
5′	6.94 (d, 8.2)	116.5	6.94 (d, 8.2)	116.1
6′	7.87 (d, 8.2)	132.1	7.90 (d, 8.2)	131.6
1′′	5.72 (brs)	111.2	5.73 (brs)	110.9
2′′	4.23 (brs)	79.5	4.31 (brs)	
3′′	-	76.6	-	79.2
4′′α	3.53 (d, 12.5)	79.2	3.54 (d, 12.5)	75.2
4′′β	3.64 (d, 12.5)		3.64 (d, 12.5)	
5′′α	4.18 (d, 11.0)	67.8	4.27 (d, 11.0)	63.7
5′′β	4.06 (d, 11.0)		4.16 (d, 11.0)	
1′′′	5.58 (brs)	100.3	5.57 (brs)	100.3
2′′′	4.04 (brs)	71.2	4.06 (brs)	72.0
3′′′	3.85 (dd, 9.5/1.7)	71.7	3.86 (dd, 9.5/1.7)	72.5
4′′′	3.50 (t, 9.5)	73.6	3.52 (t, 9.5)	73.7
5′′′	3.64 (m)	71.7	3.64 (m)	71.7
6′′′	1.26 (d, 6.5)	18.2	1.29 (d, 6.5)	17.8
$\underline{CH_3}$CO-	2.10 (s)	20.7		
CH_3**$\underline{C}$**O-	-	172.6		

ραμνόσης, τα οποία εμφανίζονται ως διπλή κορυφή (J = 6.5 Hz) στα 1.29 ppm. Η διαφορά με το φάσμα ^{1}H-NMR του προϊόντος L.ed-8 έγκειται στην απουσία του σήματος που αντιστοιχεί σε ακετύλιο.

Στο φάσμα ^{13}C-NMR της ουσίας παρατηρήσαμε τα σήματα των ανωμερικών ανθράκων σε δ 110.9 για την απιόση και 100.3 για την ραμνόση. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος επίσης παρατηρήσαμε οκτώ σήματα από τα οποία τα δύο (δ 75.2 και 63.7) αντιστοιχούν σε μεθυλενικούς άνθρακες (από το φάσμα DEPT) της απιόσης.

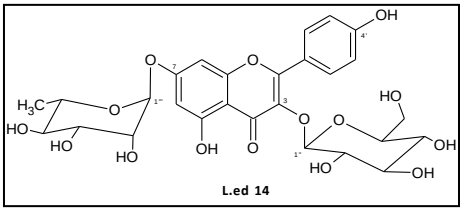
Από τα προαναφερθέντα καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το προϊόν είναι το μη ακετυλιωμένο παράγωγο της ουσίας L.ed-8. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μορίου δίδονται στον πίνακα 6.4.17.

Με σκοπό την επιβεβαίωση των όσων προαναφέρθηκαν πραγματοποιήθηκε ακετυλίωση του προϊόντος. Το ακετυλιωμένο προϊόν απομονώθηκε με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, (σύστημα ανάπτυξης CH_2Cl_2 / MeOH 99 / 1) και ήταν ίδιο με το πλήρως ακετυλιωμένο παράγωγο της ουσίας L.ed-8 (σύγκριση χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών δεδομένων). **Το φλαβονοειδές αυτό αποτελεί νέο φυσικό προϊόν.**



Το προϊόν **L.ed-13** απομονώθηκε ως κύριος μεταβολίτης κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός έλεγχος για την ταυτοποίησή του. Από τη μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HMQC, HMBC και NOESY της ουσίας, του φάσματος ^{1}H-NMR του ακετυλιωμένου παραγώγου, καθώς επίσης και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για την **3-*O*-νεοεσπεριδοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη**. Η ίδια ουσία απομονώθηκε και κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού

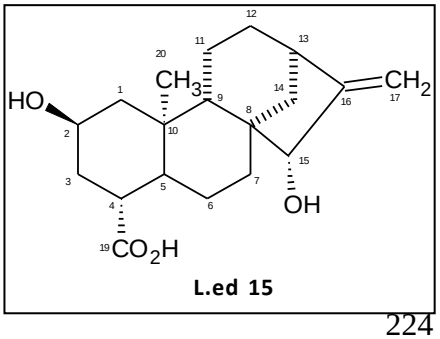
Vicia faba η οποία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η φασματοσκοπική μελέτη της ουσίας παρουσιάζεται στη σελίδα 186 ενώ τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα δίνονται στον πίνακα 6.4.5 (σελ. 187).



L.ed 14

Το προϊόν **L.ed-14** αποτελεί τον τελευταίο γλυκοσίδη φλαβονολης που απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Lotus edulis*. Η διαδικασία της απομόνωσης περιλαμβάνει ένα στάδιο και επιτεύχθηκε με την χρήση της Χρωματογραφίας Αντιστρόφου Ροής. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος που ακολούθησε έδειξε ότι πρόκειται για την ουσία **3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη**. Το ίδιο φυσικό προϊόν απομονώθηκε και κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Vicia faba* η οποία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η φασματοσκοπική μελέτη του προϊόντος παρουσιάζεται στη σελιδά 182 ενώ τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα δίνονται στον πίνακα6.4.4 (σελ. 184).

Οι μεταβολίτες **Led-15, Led-16 και Led-17** παραλήφθηκαν σε μίγμα κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με CCC. Ακολούθησε επεξεργασία του μίγματος με Υγρή Χρωματογραφία Στήλης Χαμηλής Πιέσεως με σκοπό την απομόνωση και την παραλαβή τους σε καθαρή μορφή. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος που ακολούθησε έδειξε πως πρόκειται για τρία παράγωγα καουρενικού οξέος και συγκεκριμένα για τα προϊόντα: **Ατρακτυλιγενίνη** (Led-15**)**, **2-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοατρακτυλιγενίνη** (Led-16) και **2-*O*-(2'-*O*-ισοβαλερυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλατρακτυλιγενίνη** (Led-17).



L.ed 15

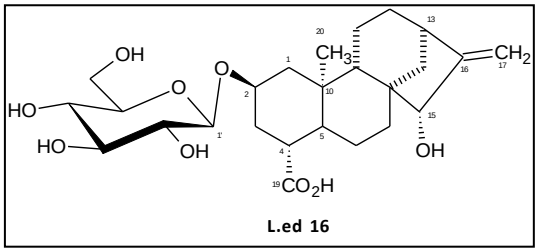
Κατά την εξέταση του χρωματογραφήματος TLC του προϊόντος **Led-15**, παρατηρήθηκε η ύπαρξη μίας κηλίδας η οποία δεν απορροφούσε στο UV ενώ χρωματίστηκε μπλε-μωβ μετά από ψεκασμό

με το αντιδραστήριο εμφάνισης. Από τη μελέτη των φασμάτων HRMS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, COSY HSQC-DEPT και HMBC καθώς και τη βοήθεια βιβλιογραφικών δεδομένων[366,367] αποδείχθηκε ότι πρόκειται για το μεταβολίτη **Ατρακτυλιγενίνη**.

Στο φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσίας παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 319,1891 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{19}H_{27}O_4$ και βαθμό ακορεστότητας 6. Στο φάσμα ^{13}C NMR συμπεράναμε ότι πράγματι υπάρχουν 19 άνθρακες εκ των οποίων ένας είναι καρβονιλικός άνθρακας (*δ* 182.8), δύο ανήκουν σε εξωμεθυλενικό διπλό δεσμό (*δ* 160.9 και 108.4), δύο σε οξυγονωμένους άνθρακες (*δ* 83.8 και 65.5), ενώ οι υπόλοιποι σε αλειφατικούς άνθρακες.

Στο φάσμα ^{1}H-NMR χαρακτηριστικές είναι οι δύο ευρείες απλές κορυφές στα 5.17 και 5.06 ppm οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμιά και αντιστοιχούν στα πρωτόνια του εξωμεθυλενικού διπλού δεσμού H-17. Τα δύο οξυμεθινικά πρωτόνια εμφανίζονται στα 4.33 ppm (πολλαπλή κορυφή) για το H-2 και στα 3.75 ppm (ευρεία απλή κορυφή) για το H-15 και επιβεβαιώνουν την ύπαρξη δύο υδροξυλίων στο μόριο. Χαρακτηριστικές είναι επίσης οι κορυφές που αντιστοιχούν στα μεθινικά πρωτόνια H-4 (td *J* = 5.7/2.2 Hz σε *δ* 2.46), H-13 (br s σε *δ* 2.69) καθώς και αυτά του μεθυλίου στη θέση 20 τα οποία εμφανίζονται με τη μορφή απλής κορυφή που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια σε *δ* 1.09. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μορίου δίδονται στον πίνακα V.

Το προϊόν **Led-16** εμφάνισε τα ίδια χαρακτηριστικά στον χρωματογραφικό έλεγχο με TLC με αυτά του προϊόντος **Led-15** δηλαδή δεν απορροφούσε στο UV ενώ χρωματίστηκε μπλε-μωβ μετά από ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης. Οι δύο αυτές κηλίδες όμως εμφανίστηκαν σε διαφορετικά Rf στην χρωματογραφική πλάκα δηλώνοντας ότι η ουσία **Led-16** είναι αρκετά πιο πολική από την **Led-15** .



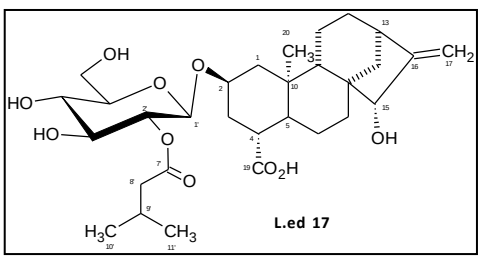
L.ed 16

Στο φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας Led-16 παρατηρούμε και πάλι τα χαρακτηριστικά σήματα της ατρακτυλιγενίνης. Η κύρια διαφορά στα φάσματα των δύο αυτών ουσιών εντοπίζεται στην οξυγονωμένη περιοχή όπου εμφανίζονται επιπλέον οι κορυφές ενός σακχάρου. Η παρουσία του σακχαριδικού τμήματος γίνεται αντιληπτή και στο φάσμα ^{13}C NMR όπου παρατηρούμε, πέραν των κορυφών που αντιστοιχούν στους άνθρακες της ατρακτυλγενινης, έξι επιπλέον σήματα στην οξυγονωμένη περιοχή (στα 102.9, 77.8, 77.3, 75.2, 71.2 και 62.4) τα οποία δηλώνουν την ύπαρξη μιας εξόζης στο μόριο.

Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων COSY και HSQC-DEPT βοήθησε στην ταυτοποίηση του σακχάρου ως *β*-γλυκοπυρανόση. Η αποθωράκιση τόσο του πρωτονίου H-2 (4.46 ppm) όσο και του αντίστοιχου άνθρακα C-2 (74.4 ppm) της ατρακτυλγενίνης μας οδήγησε στην υπόθεση ότι το σάκχαρο ενώνεται στο υδροξύλιο της θεσης 2 της γενίνης. Πράγματι το σήμα σύζευξης στο φάσμα HMBC μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης (4.53 ppm) και του άνθρακα C-2 της γενίνης (74.4 ppm) επιβεβαιώνει την παραπάνω υπόθεση.

Με βάση τα παραπάνω συμπεράναμε ότι η υπό ανάλυση ουσία είναι η **2-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοατρακτυλιγενίνη.** Στο φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 481,2410 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{25}H_{37}O_9$ γεγονός που συμφωνεί με την παραπάνω δομή. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H NMR και ^{13}C NMR του μορίου δίδονται στον πίνακα V και βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά της βιβλιογραφίας[366,367].

Το προϊόν **Led-17** εμφάνισε παρόμοια εικόνα με τις ουσίες Led-15 και Led-16 στο χρωματογράφημα TLC γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση πως πιθανόν να πρόκειται για κάποιο παρεμφερές παράγωγο καουρονικού οξέος. Πράγματι το άγλυκο ατρακτυλγενίνη γίνεται εύκολα αντιληπτό τόσο στο φάσμα πρωτονίου όσο και στο φάσμα άνθρακα του προϊόντος **Led-17.** Στα φάσματα



αυτά ορατά είναι και τα σήματα ενός σακχάρου, όπου μετά από μελέτη και των φασμάτων δύο διαστάσεων COSY και HSQC-DEPT αποκαλύφθηκε πως πρόκειται για την β-γλυκοπυρανόση.

Το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου εμφανίζεται με τη μορφή διπλής κορυφής (J=7,9 Hz) στα 4,62 ppm ενώ το H-2΄ ως διπλά διπλή κορυφή (J=9,4/7,9 Hz) στα 4,68 ppm (COSY). Η αποθωράκιση αυτή του πρωτονίου H-2΄σε συνδυασμό με την μικρή θωράκιση του αντίστοιχου άνθρακα (δ 74,4-HSQC-DEPT) αποτελούν ισχυρή ένδειξη εστεροποίησης του υδροξυλίου της θέσεως αυτής.

Επιπλέον στο φάσμα πρωτονίου παρατηρούμε μια διπλή κορυφή στα 2,25 ppm (J=6,2 Hz) η οποία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και εμφανίζει σήμα σύζευξης ^{3}J στο φάσμα COSY με μία πολλαπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο στα 2,10 ppm και η οποία με τη σειρά της συζευγνύεται (^{3}J) με μια διπλή κορυφή που ολοκληρώνει για έξι πρωτόνια σε δ 1,00 (J = 6.2 Hz) και αντιστοιχεί σε δύο τελικά μεθύλια. Τα σήματα αυτά είναι χαρακτηριστικά της παρουσίας μιας ισοβαλερυλομάδας [-$COCH_2CH(CH_3)_2$], κάτι που επιβεβαιώνεται από το σήμα σύζευξης (^{3}J) στο φάσμα HMBC μεταξύ του μεθινικού πρωτονίου στα 2,10 ppm και ενός καρβονυλικού άνθρακα στα 173,4 ppm.

Στο φάσμα HMBC παρατηρούμε το σήμα σύζευξης ^{3}J μεταξύ του πρωτονίου H-2΄του σακχάρου και του καρβονυλικού άνθρακα στα 173,4 ppm γεγονός που επιβεβαιώνει την παρουσία της ισοβαλερυλ ομάδας στη θέση 2 της γλυκόζης. Το 2’-O-ισοβαλερυλ-*β*-D-γλυκοπυρανοσιδικό τμήμα ενώνεται στη θέση 2 της ατρακτυλγενίνης όπως αποδεικνύεται τόσο από την αποθωράκιση του C-2 της γενίνης (από 65,5 στα 74,4 ppm), όσο και από το σήμα σύζευξης στο φάσμα HMBC μεταξύ του H-2 (4,26 ppm) της γενίνης και του ανωμερικού άνθρακα της γλυκόζης (100,7 ppm).

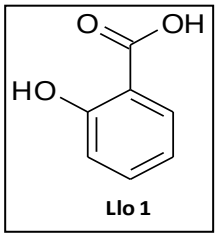
Με βάση τα παραπάνω συμπεράναμε πως πρόκειται για την ουσία **2-O-(2’-*O*-ισοβαλερυλο)-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλατρακτυλιγενίνη.** Στο φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 565,2978 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{30}H_{45}O_{10}$. Στο φάσμα MS/MS της κορυφής του μοριακού ιόντος εμφανίζονται τρεις κορυφές σε m/z 481,23 [M^--

ισοβαλερικό οξύ], m/z 463,22 [M$^-$-ατρακτυλγενίνη] και m/z 301,17 [M$^-$-ισοβαλερυλγλυκόζη] γεγονός που συμφωνεί με την παραπάνω δομή. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H NMR και ^{13}C NMR του μορίου δίδονται στον πίνακα V και βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά της βιβλιογραφίας[366,367,368,369].

Πίνακας 6.4.18: Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C NMR της **Ατρακτυλιγενίνη** (Led 15), **2-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοατρακτυλιγενίνη** (Led 16) και **2-*O*-(2'-*O*-ισοβαλερυλο)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλατρακτυλιγενίνη** (Led-17)

	L.ed15		**L.ed16**		**L.ed17**	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)
1	2.16 m 0.64 t (11,7)	51.1	2.28 m 0.77 t (11,7)	48.7	2.31 m 0.74 t (11,7)	48.3
2	4.33 m	65.5	4.46 m	74.4	4.26 m	74.4
3	2.35 dt (11,8/2,2) 1.16 dt (11,8/5,7)	39.9	2.50 dt (11,8/2,2) 1.22 dt (11,8/5,7)	37.4	2.39 dt (11,8/2,2) 1.16 dt (11,8/5,7)	36.3
4	2.46 td (5,7/2,2)	47.4	2.47 m	44.5	2.63 td (5,7/2,2)	44.5
5	1.33 m	50.9	1.38 m	50.8	1.42 m	50.9
6	1.60 m	28.6	1.60 m	28.6	1.67 m	28.6
7	2.14 m	38.9	2.14 m	38.9	2.14 m	38.9
8	-	48.7	-	48.7	-	48.7
9	1.02 dd (8,4/1,3)	54.5	1.02 dd (8,4/1,3)	54.5	1.02 dd (8,4/1,3)	54.5
10	-	41.4	-	41.8	-	41.8
11	1.46 m	19.0	1.47 m	19.2	1.46 m	18.9
12	1,64 m	33.5	1,64 m	33.9	1,65 m	32.7
13	2.69 m	43.8	2.70 m	43.7	2.70 m	43.6
14	1.93 dd (11,9/1,3) 1.37 dd (11,9/5,1)	36.9	1.94 dd (11,9/1,3) 1.37 dd (11,9/5,1)	36.9	1.88 dd (11,9/1,3) 1.38 dd (11,9/5,1)	36.9
15	3.75 brs	83.8	3.76 brs	83.5	3.76 brs	83.8
16	-	160.9	-	160.0	-	159.3
17	5.17 brs 5.06 brs	108.4	5.17 brs 5.06 brs	108.9	5.18 brs 5.07 brs	108.9
19	-	182.8	-	182.8	-	182.8
20	1.09 s	17.6	1.03 s	17.4	1.01 s	16.8
1'			4.53 d (7,9)	102.9	4.62 d (7,9)	100.7
2'			3.11 dd (9,4/7,9)	75.2	4.68 dd (9,4/7,9)	74.4
3'			3.38 m	77.8	3.50 t (9.4)	76.3
4'			3.36 m	71.2	3.38 t (9.4)	70.7
5'			3.32 m	77.3	3.34 m	77.3
6'			3.83 dd (11,6/2.2)	62.4	3.86 dd (11,6/2.2)	62.4
			3.70 dd (11,6/5,6)		3.70 dd (11,6/5,6)	
7'						173.4
8'					2.25 d (6.2)	44.6
9'					2.10 m	26.8
10'					1.00 d (6.2)	22.7
11'					1.00 d (6.2)	22.7

6.4.3 Lotus longisiliquosus

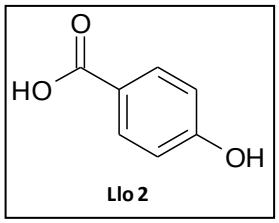


Llo 1

Ο μεταβολίτης **L.lo 1** παραλήφθηκε σε καθαρή μορφή κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC). Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων NMR και HRMS αποκάλυψε πως πρόκειται για το φυσικό προϊόν **ο-υδρόξυ βενζοϊκό οξύ** ή **Σαλικυλικό οξύ**.

Στο φάσμα ^{1}H-NMR του προϊόντος παρατηρήσαμε μόνο 4 κορυφές στην αρωματική περιοχή εκ των οποίων δύο ευρείες διπλές (*J*=8,1 Hz) σε δ 7.86 και 6,95 καθώς και δύο ευρείες τριπλές (*J*=8,1 Hz) σε δ 7,64 και 6,87. Η απουσία άλλων σημάτων από το φάσμα μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως πρόκειται για απλό φαινολικό παράγωγο με όρθο υποκατάσταση. Στο φάσμα HMBC είναι εμφανής η σύζευξης μεταξύ της διπλής κορυφής στα 7,86 ppm και ενός καρβονιλικού άνθρακα στα 173,5 ppm.

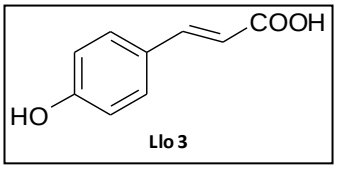
Το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας συνετέλεσε στην αποσαφήνιση της δομής του προϊόντος. Η παρουσία της κορυφής του μοριακού ιόντος σε m/z 137,0253 $[M-H]^-$ (με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_7H_5O_3$ και βαθμό ακορεστότητας 5) οδήγησε στο συμπέρασμα πως πρόκειται για το φυσικό προϊόν **σαλικυλικό οξύ.**



Llo 2

Ο μεταβολίτης **L.lo 2** παραλήφτηκε ως λευκή άμορφη σκόνη κατά την επεξεργασία του κλάσματος του CCC με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού. Η παρουσία, στο φάσμα ^{1}H-NMR του προϊόντος, μόνο των σημάτων ενός π-υποκατεστιμένου αρωματικού πυρήνα (δύο διπλές κορυφές με *J*= 8.7 Hz σε *δ* 7.73 και 6.71) σε συνδυασμό με την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 137.0253 $[M-H]^-$ (με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_7H_5O_3$ και βαθμό ακορεστότητας 5) στο φάσμα HRMS, οδήγησε στο συμπέρασμα πως πρόκειται για το φυσικό προϊόν **π-υδροξυβενζοϊκό οξύ**.

Το προϊόν **L.lo 3** απομονώθηκε από το ίδιο κλάσμα του CCC όπως και το **L.lo 2** χρησιμοποιώντας την ίδια χρωματογραφική τεχνική. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε αποκάλυψε πως πρόκειται για το **π-κουμαρικό οξύ**.



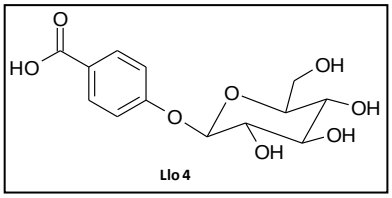
Llo 3

Η παρουσία του π-υποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα γίνεται αμέσως αντιληπτή στο φάσμα ^{1}H-NMR του προϊόντος καθώς παρατηρούμε τις δύο διπλές κορυφές (*J*= 8,6 Hz) σε *δ* 7,39 και 6,76. Επιπλέον παρατηρούμε και δύο διπλές κορυφές (*J*= 16,2 Hz) σε *δ* 7,25 και 6,22 που αντιστοιχούν σε δύο *trans*-ολεφινικά πρωτόνια. Τα σήματα σύζευξης των πρωτονίων αυτών, (φάσμα HMBC) τόσο με έναν καρβονυλικό άνθρακα (169,9 ppm), όσο και με τους άνθρακες 1 (126,8ppm) και 2,6 (129,8ppm) του αρωματικού πυρήνα βοήθησαν στην απόδοση της δομής ως **π-υδροξυ κιναμμωμικό οξύ**. Η κορυφής του μοριακού ιόντος m/z 163,0409 $[M-H]^-$ (με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_9H_7O_3$ και βαθμό ακορεστότητας 6) στο φάσμα HRMS, επιβεβαίωσε την παραπάνω δομή.

Πίνακας 6.4.19: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) του **ο-υδροξυβενζοϊκό οξύ** (L.lo 1), **π-υδροξυβενζοϊκο οξύ** (L.lo 2), και **π-κουμαρικό οξύ** (L.lo 3).

	L.lo 1		**L.lo 2**		**L.lo 3**	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
1	-	111,9	-	127,0	-	126,8
2	-	161,9	7,73 d (8.7)	131.7	7,39 d (8.5)	129.8
3	6,95 br d (8.1)	117,9	6,71 d (8.7)	114,6	6,76 d (8.5)	116,1
4	7,64 br t (8.1)	136,5	-	160,1	-	159,2
5	6,87 br t (8.1)	119,4	6,71 d (8.7)	114,6	6,76 d (8.5)	116,1
6	7,86 br d (8.1)	130,9	7,73 d (8.7)	131.7	7,39 d (8.5)	129.8
7					7,25 d (16,2)	140,7
8					6,22 d (16,2)	
COOH	-	173,5	-	169,0	-	169.9

Το προϊόν **Llo 4** απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού χρησιμοποιώντας αρχικά την Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή και στη συνέχεια το αντίστοιχο κλάσμα επεξεργάστηκε με Παρασκευαστική TLC. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος που ακολούθησε, έδειξε πως πρόκειται για την ουσία **4-O-*β*-D–γλυκοπυρανόσυλοξυ βενζοϊκό οξύ**.

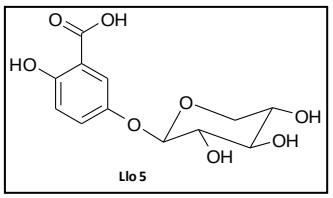


Llo 4

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR εμφανίζονται οι δύο διπλές κορυφές (7,92 και 7,07 ppm) του παρα-υποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα ενώ στην οξυγονωμένη περιοχή τα σήματα ενός σακχάρου. Η μελέτη των φασμάτων δύο διαστάσεων COSY και HSQC-Dept, βοήθησε στην ταυτοποίηση του σακχάρου ως *β*-D –γλυκοπυρανόση. Το σήμα σύζευξης που εμφανίζεται στο φάσμα HMBC μεταξύ της διπλής κορυφής (*J*= 7,5 Hz) στα 4,99 ppm (κορυφή ανωμερικού πρωτονίου) και του άνθρακα στα 160,7 ppm (άνθρακας 4 του αρωματικού πυρήνα) αποσαφήνισε τη θέση σύνδεσης του σακχάρου με το άγλυκο. Στο ίδιο φάσμα παρατηρούμε και το σήμα σύζευξης μεταξύ της διπλής κορυφής (*J*= 8,7 Hz) στα 7,92 ppm (H-2/H-6) με έναν άνθρακα στα 175,1 ppm (καρβονυλικός άνθρακας).

Από την παραπάνω μελέτη συμπεράναμε πως πρόκειται για τον μεταβολίτη **4-O-*β*-D -γλυκοπυρανόσυλο βενζοϊκό οξύ.** Η δομή αυτή επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα HRMS όπου παρατηρήσαμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 137,0253 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_7H_5O_3$ και βαθμό ακορεστότητας 5. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι στις περιπτώσεις που το σάκχαρο ενώνεται με το υδροξύλιο του οξέος (εστερικός δεσμός) το ανωμερικό του πρωτόνιο αποθωρακίζεται αρκετά και συντονίζεται περίπου στα 5,70 ppm[370]. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίδοντα στον πίνακα II

Το προϊόν **Llo 5** παραλήφτηκε με τη μορφή λευκής άμορφης σκόνης κατά την επεξεργασία με παρασκευαστική TLC του κλάσματος του CCC. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος που ακολούθησε, έδειξε πως πρόκειται για το φυσικό προϊόν **5-O-*β*-D-ξυλοπυρονοσυλογεντισικό οξύ**.



Llo 5

Στο φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας εμφανίζονται οι κορυφές ενός ABX υποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα καθώς και τα σήματα ενός σακχάρου. Πιο συγκεκριμένα στην αρωματική περιοχή του φάσματος εμφανίζεται μια διπλή κορυφή με μέτα-σύζευξη (*J*=3,0 Hz) σε δ 7,58, μια διπλά διπλή κορυφή (*J*=8,8/3,0 Hz) σε δ 7,03 και μια διπλή κορυφή με όρθο-σύζευξη (*J*=8,8 Hz) σε δ 6,71. Η περαιτέρω μελέτη των ετεροπυρηνικών φασμάτων δύο διαστάσεων HSQC-Dept και HMBC βοήθησε στο να καθορήσουμε την δομή του άγλυκου τμήματος του μορίου ως 2,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ ή Γεντισικό οξύ.

Στο φάσμα HMBC παρατηρούμε τα σήματα σύζευξης (J^3) μεταξύ της κορυφής του H-6 με τον καρβονυλικό άνθρακα (175,5 ppm), τον C-2 (οξυγονωμένος αρωματικός άνθρακας στα 157,9 ppm) και τον C-4 (στα 123,7 ppm, HSQC-Dept). Στο ίδιο φάσμα εμφανίζονται τα σήματα σύζευξης (J^3) μεταξύ της κορυφής του H-3 με τους C-1 (120,1 ppm) και C-5 (οξυγονωμένος αρωματικός άνθρακας στα 150,4 ppm) καθώς και τα αντίστοιχα σήματα μεταξύ της κορυφής του H-4 με τους C-2 (στα 157,9 ppm) και C-6 (στα 119,3 ppm, HSQC-Dept).

Η μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, COSY και HSQC-Dept βοήθησε στην ταυτοποίηση του σακχάρου ως *β*-D –ξυλοπυρονόση. Το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται με τη μορφή ευρείας διπλής κορυφής (*J*=7,5 Hz) σε δ 4,72 ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 104,2 ppm. Τα χαρακτηριστικά δίδυμα πρωτόνια της θέσης 5 εμφανίζονται ως δύο διπλά διπλές κορυφές σε δ 3,90 (*J*=11,6/5,4 Hz) και 3,33 (*J*=11,6/9,5 Hz) ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 66,8 ppm. Το σήμα σύζευξης (J^3) στο φάσμα HMBC μεταξύ της κορυφής του ανωμερικού πρωτονίου και του άνθρακα που συντονίζεται στα 150,4 ppm δειλώνει ότι το σάκχαρο είναι ενωμένο στη θέση 5 του γεντισικού οξέος.

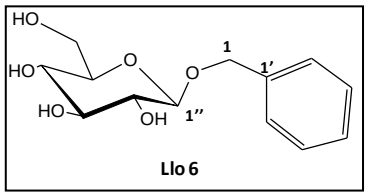
Από την παραπάνω μελέτη καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως πρόκειται για τον μεταβολίτη **5-O-*β*-D -ξυλοπυροοσυλογεντισικό οξύ**. Την δομή αυτή επιβεβαιώνει τόσο η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 285,0622 $[M-H]^-$ (προτεινόμενος μοριακός τύπος $C_{12}H_{13}O_8$ και βαθμός ακορεστότητας 6) στο φάσμα HRMS του προϊόντος όσο και η σύγκριση των φασματοσκοπικών αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά

δεδομένα[371]. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας διδονται στον πίνακα 6.4.20.

Πίνακας 6.4.20: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) του **π-Ο-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοξυ βενζοϊκό οξύ** (L.lo 4), και **5-Ο-*β*-D-ξυλοπυρονοσυλογεντισικό οξύ** (L.lo 5),

	L.lo 4		**L.lo 5**	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
1	-	132.7	-	120,1
2	7,92 d (8.7)	131.8		157,9
3	7,07 d (8.7)	116.3	6,71 d (8,8)	117,4
4	-	160,7	7,03 dd (8,8/3,0)	123,7
5	7,07 d (8.7)	116.3	-	150,4
6	7,92 d (8.7)	131.8	7,58 d (3,0)	119,3
COOH	-	175,1	-	175,5
CH_3-O				
	Ο- *β*-D -γλικοπυρανόση		Ο -*β*-D -ξυλοπυρονόση	
1	4,99 d (7,5)	102,0	4,72 brd (7,5)	104,2
2	3,47 (m)	74,8	3,39 m	74,8
3	3,48 (m)	77,9	3,39 m	77,8
4	3,42 (m)	71,3	3,54 m	71,0
5	3,47 (m)	78,0	3,90 dd (11,6/5,4)	66,8
			3,33 dd (11,6/5,4)	
6	3,88 dd (12,0/2,1)	62,3		
	3,71 dd (12,0/5,5)			

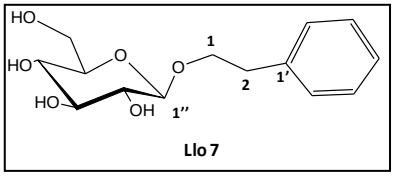
Οι μεταβολίτες **L.lo 6**, **L.lo 7** και **L.lo 8** παραλήφθηκαν μαζί κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με CCC και διαχωρίστηκαν μετά από επεξεργασία του μείγματος με Παρασκευαστική TLC. Στη συνέχεια ακολούθησε φασματοσκοπικός έλεγχός όπου και διαπιστώθηκε πως πρόκειται για τις ουσίες: **Βενζυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδη** (Llo 6), ***β*-D-γλυκοπυρανοσυλοφαινυλαιθανόλη** (Llo 7) και **3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-1-φαινυλο-2,3-βουτανοδιόλη** (Llo 8).



Llo 6

Στο φάσμα ^{1}H-NMR του προϊόντος **L.lo 6** παρατηρούμε τα χαρακτηριστικά σήματα μιας βενζυλικής αλκοόλης και ενός σακχάρου. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος εμφανίζονται τρεις κορυφές: μια διπλά διπλή κορυφή (*J*=8,1/1,5 Hz)σε *δ* 7,42 που αντιστοιχεί στα πρωτόνια Η-2΄ και Η-6΄, μια διπλά τριπλή κορυφή (*J*=8,1/1,5 Hz) σε *δ* 7,33 που αντιστοιχεί στα πρωτόνια Η-3΄ και Η-5΄ καθώς και μια τριπλά τριπλή κορυφή (*J*=8,1/1,5 Hz) σε *δ* 7,27 που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο Η-4΄. Σε δ 4,93 και δ 4,69 εμφανίζονται τα μεθυλενικά πρωτόνια Η-1 με τη μορφή δύο διπλών κορυφών (*J*=11,8 Hz) ενώ στην περιοχή 4,40-3,20 συντονίζονται τα πρωτόνια του σακχάρου.

Η μελέτη των φασμάτων COSY και HSQC-Dept βοήθησε στην ταυτοποίηση του σακχάρου ως *β*-D-γλυκοπυρανόση ενώ η θέση σύνδεσης της υποδεικνύεται από το μόνο διαθέσιμο υδροξύλιο στο μόριο της βενζυλαλκόλης. Τέλος η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 269,1037 M-H]$^{-}$ (προτεινόμενος μοριακός τύπος $C_{13}H_{17}O_6$ και βαθμός ακορεστότητας 5) στο φάσμα HRMS της ουσίας επιβεβαιώνει την δομή της ουσίας **L.lo 6** ως **Βενζυλ-Ο-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδη.** Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.21

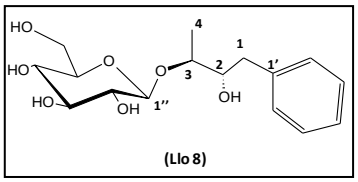


Llo 7

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR του προϊόντος **L.lo 7** εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά σήματα ενός μονουποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα ενώ στην οξυγονωμένη περιοχή παρατηρούμε μια σειρά σημάτων που δηλώνουν την ύπαρξή ενός τουλάχιστον σακχάρου. Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων δύο διαστάσεων COSY, HSQC-Dept και HMBC συνέβαλαν στην απόδοση της δομής του προϊόντος **L.lo 7** ως ***β*-D-γλυκοπυρανοσυλοφαινυλαιθανόλη.**

Στο φάσμα HRMS της ουσίας παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 283,1179 [M-H]$^{-}$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{14}H_{19}O_6$ και βαθμό ακορεστότητας 5.

Τα μεθυλενικά πρωτόνια Η-2 εμφανίζονται με τη μορφή πολλαπλής κορυφής σε *δ* 2,94 ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 37,0 ppm. Σε *δ* 4,09 και 3,76 εμφανίζονται δύο κορυφές (ddd) (*J*=9,5/8,0/7,0 Hz) οι οποίες αντιστοιχούν στα μεθυλενικά πρωτόνια Η-1, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 71,5 ppm. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.21.



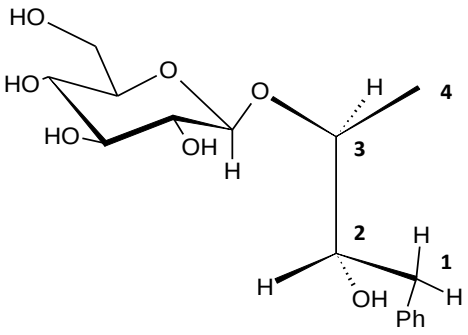
(Llo 8)

Στο φάσμα ^{1}H-NMR του προϊόντος **L.lo 8** γίνεται αμέσως αντιληπτή η ύπαρξη ενός μονουποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα καθώς και ενός σακχάρου. Πέραν όμως των σημάτων του σακχάρου στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος εμφανίζονται δύο επιπλέον κορυφές που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν σε δύο οξυγονωμένα μεθινικά πρωτόνια ενώ στην αλειφατική περιοχή παρατηρούμε μια διπλή κορυφή (*J*=6,4 Hz) σε δ 1,29 που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε ένα μεθύλιο.

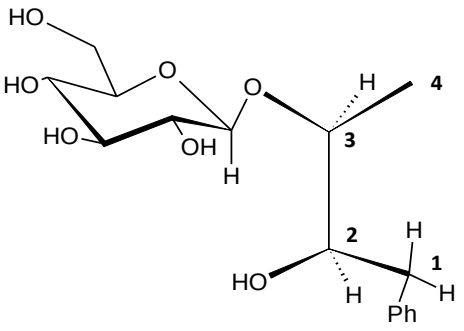
Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων δύο διαστάσεων COSY, HSQC-Dept και HMBC αποκάλυψε πως πρόκειται για ένα παράγωγο της 2,3-διυδρόξυ-βουτανεδίολης. Οι δύο υποκαταστάτες του μορίου είναι το φαινύλιο και η *β*-D-γλυκοπυρανόση οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι στις θέσεις 1 και 3 της βουτανεδιόλης όπως αποκάλυψε το φάσμα HMBC. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήσαμε το σήμα σύζευξης (J^3) μεταξύ της κορυφής του ανωμερικού πρωτονίου (d, *J*=7,8 Hz) σε *δ* 4,35 και του άνθρακα που συντονίζεται στα 79,9 ppm (C-3 της βουτανεδιόλης).Επίσης χαρακτηρηστικά ήταν τα σήματα σύζευξης (J^3) μεταξύ των κορυφών που αντιστοιχούν στα πρωτόνια Η-1 (δ 2,85 και 2,68) με τον αρωματικό άνθρακα στα 130,2 ppm (C-2΄,6΄).

Με βάση την παραπάνω μελέτη καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως το προϊόν **L.lo 8** είναι η **1-φαινυλ-2-υδροξυ-3-Ο-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-βουτανεδιόλη**. Τη δομή αυτή επιβεβαιώνει και η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 327,1456 $[M-H]^-$ (προτεινόμενος μοριακός τύπος $C_{16}H_{33}O_7$ και βαθμός ακορεστότητας 5) στο φάσμα HRMS της ουσίας.

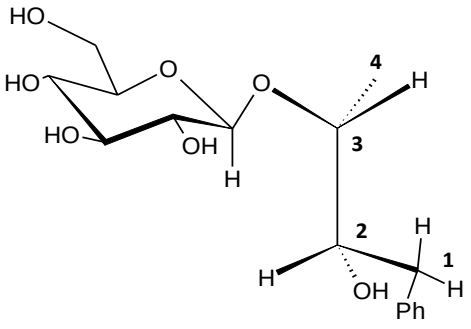
Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό στην ένωση υπάρχουν δύο ασύμμετρα κέντρα και συγκεκριμένα πρόκειται για τους άνθρακες C-2 και C-3. Έτσι οι πιθανοί στερεοχημικοί τύποι για το προϊόν αυτό είναι τέσσερεις όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα.



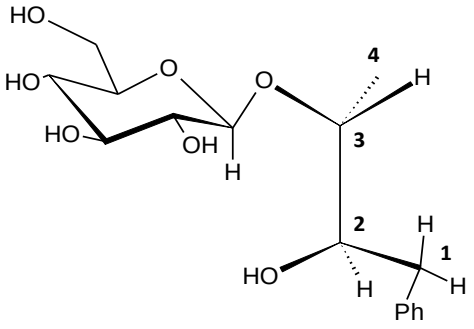
[2(S), 3(S)]



[2(R), 3(S)]



[2(S), 3(R)]



[2(R), 3(R)]

Σχήμα 6.4.2: Τα τέσσερα πιθανά στερεοϊσομερή της ουσίας **1-φαίνυλ-2-υδρόξυ-3-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-βουτανεδιόλη**

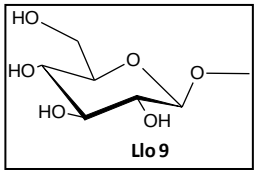
Το φάσμα NOESY έπαιξε σημαντικό ρόλο στην αποσαφήνιση τηςσχετικής στερεοχημείας του μορίου. Τα σήματα σύζευξης που παρατηρούνται στο φάσμα αυτό, μεταξύ των πρωτονίων που συντονίζονται σε *δ* 2,85 και *δ* 2,68 (H-1), με τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσεως 4 (*δ* 1,29) και η απουσία σήματος των πρωτονίων H-1 με το πρωτόνιο H-3, **υποδεικνύουν (S) διευθέτηση του άνθρακα της θέσης 3**. Στο ίδιο φάσμα παρατηρούμε σύζευξη στο χώρο και μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου του σακχάρου (δ 4,35) με το πρωτόνιο της θέσεως 2 γεγονός που υποδεικνύει **(S) διευθέτηση του συγκεκριμένου άνθρακα**. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι πρόκειται για το στερεοεισομερές **(2S, 3S)- 3-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-1-φαίνυλ-2,3-βουτανεδιόλη.** Η παραπάνω δομή επιβεβαιώνεται και από την σύγκριση των πειραματικών αποτελεσμάτων με

βιβλιογραφικά δεδομένα[372]. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.21.

Πίνακας 6.4.21: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) του **Βενζυλ-Ο-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης** (L.lo 6), **Ο-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο φαινυλαιθανόλη** (L.lo 7), και **(2S, 3S)- 3-Ο-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-1-φαίνυλο-2,3-βουτανεδιόλη** (L.lo 8).

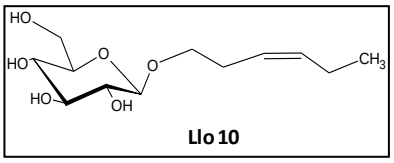
	L.lo 6		**L.lo 7**		**L.lo 8**	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
1	4,93 d (11,8) 4,69 d (11,8)	71,6	2,94 m	37,0	2,85 dd (13,9/4,5) 2,68 dd (13,9/9,2)	39,5
2			4,09 ddd (9,5/8/7) 3,76 ddd (9,5/8/7)	71,5	3,91 ddd(9,2/4,5/3,4)	75,5
3					3,80 qd (6,4/3,4)	79,9
4					1,29 d (6,4)	16,0
	1-φαινύλιο		1-φαινύλιο		1-φαινύλιο	
1’		138,7		140,1		140,1
2’	7,42 dd (8,1/1,5)	129,1	7,26 m	129,8	7,26 m	130,2
3’	7,33 td (8,1/1,5)	129,1	7,26 m	129,1	7,26 m	128,9
4’	7,27 td (8,1/1,5)	126,8	7,17 m	127,0	7,17 m	126,8
5’	7,33 td (8,1/1,5)	129,1	7,26 m	129,1	7,26 m	128,9
6’	7,42 dd (8,1/1,5)	129,1	7,26 m	129,8	7,26 m	130,2
	Ο- *β*-D -γλικοπυρανόση		Ο- *β*-D -γλικοπυρανόση		Ο- *β*-D -γλικοπυρανόση	
1’’	4,35 d (7,8)	103,7	4,30 d (7,9)	104,2	4,35 d (7,8)	103,8
2’’	3,19 dd (9,0/7,8)	75,1	3,18 dd (9,0/7,9)	75,1	3,18 dd (9,0/7,8)	75,2
3’’	3,35 t (9,0)	78,0	3,35 t (9,0)	78,0	3,33 t (9,0)	78,0
4’’	3,27 t (9,0)	71,5	3,28 t (9,0)	71,5	3,28 m	71,5
5’’	3,21 m	77,8	3,27 m	78,0	3,22 m	77,8
6’’	3,85 dd (12,1/2,4) 3,65 dd (12,1/5,5)	62,6	3,85 dd (12,1/2,4) 3,65 dd (12,1/5,5)	62,6	3,82 dd (11,8/2,1) 3,65 dd (11,8/5,8)	62,6

Το προϊόν **Llo 9** παραλήφτηκε με τη μορφή λευκής άμορφης σκόνης κατά την επεξεργασία με Παρασκευαστική TLC του κλάσματος 49 του CCC. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος που ακολούθησε, έδειξε πως πρόκειται για ένα απλό γλυκοζιδικό παράγωγο το **1-Ο-μεθυλ-*β*-D -γλυκοπυρανοσίδη**.



Llo 9

Οι μεταβολίτες **Llo 10** και **Llo 11** παρελήφθησαν σε μείγμα (κλάσμα 31) κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με CCC. Ο διαχωρισμός και η απομόνωση τους πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της Χρωματογραφίας Μοριακού Αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό την ρητίνη Sephadex-LH20. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε αποκάλυψε πως πρόκειται τα φυσικά προϊόντα: **1-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-εξεν-3(*Z*)-όλη** (Llo 10) και **3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο οκτανοϊκό οξύ** (Llo 11).



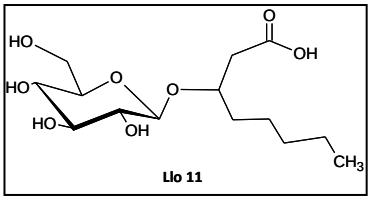
Llo 10

Στο φάσμα ^{1}H-NMR του προϊόντος **L.lo 10** παρατηρούμε δύο κορυφές στην περιοχή 5,5-5,3 ppm οι οποίες παραπέμπουν σε πρωτόνια διπλού δεσμού, μια σειρά κορυφών στην περιοχή 4,5-3,0 ppm που δηλώνουν την ύπαρξη σακχάρου στο μόριο καθώς και τρεις κορυφές στην αλειφατική περιοχή του φάσματος. Ο μικρός αριθμός των κορυφών σε συνδυασμό με τις περιοχές του φάσματος στις οποίες συντονίζονται οδηγούν στην υπόθεση ότι πιθανόν να πρόκειται για κάποιο απλό γλυκοσιδικό παράγωγο μικρού μοριακού βάρους.

Το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας επιβεβαιώνει την παραπάνω υπόθεση καθώς παρατηρούμαι την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 261,1348 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή $C_{12}H_{21}O_6$ και βαθμός ακορεστότητας 2. Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων COSY, HSQC-Dept, και HMBC αποκάλυψε ότι πρόκειται για την ουσία **1-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-εξεν-3(*Z*)- όλη**.

Τα φάσματα δύο διαστάσεων COSY και HMBC συνέβαλαν σημαντικά στον καθορισμό της δομής του άγλυκου τμήματος του μορίου. Η θέση του διπλού δεσμού καθορίστηκε με την βοήθεια του φάσματος HMBC και πιο συγκεκριμένα από τα σήματα σύζευξης (J^3) που εμφανίζονται στο φάσμα αυτό τόσο μεταξύ των πρωτονίων H-1 (δ 3,84 και 3,54) με τον άνθρακα C-3 (δ 125,7) όσο και μεταξύ των τελικών μεθυλικών πρωτονίων H-6 (δ 0,97) και του άνθρακα C-4 που συντονίζεται στα 134,3 ppm. Η σταθερά σύζευξης 11,0 Hz μεταξύ των πρωτονίων H-3 και H-4 υποδεικνύει *Z* διευθέτηση του διπλού δεσμού.

Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με αυτά της βιβλιογραφίας για την ουσία **1-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-εξεν-3(*Z*)-όλη**[373]**.** Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.22.



Llo 11

Στο φάσμα ^{1}H-NMR του προϊόντος **L.lo 11** όλες οι κορυφές συντονίζονται στην περιοχή 4,5-0,8 ppm γεγονός που δηλώνει την απουσία αρωματικών ή ολεφινικών πρωτονίων. Η ύπαρξη ενός σακχάρου στην ένωση γίνεται εύκολα αντιληπτή λόγω των χαρακτηριστικών κορυφών που εμφανίζονται στην περιοχή 4,5-3,0 ppm. Με την βοήθεια των φασμάτων COSY και HSQC-Dept διαπιστώθηκε πως το σάκχαρο είναι η ***β*-D-γλυκοπυρανόση**.

Η αποσαφήνιση της δομής του άγλυκου τμήματος του μορίου έγινε μετά από μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, COSY, HSQC-Dept, HMBC και HRMS. Το μοναδικό μεθυνικό πρωτόνιο του άγλυκου τμήματος (HSQC-Dept) εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος (δ 4,11) ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 79,2 ppm (HSQC-Dept). Στο φάσμα COSY παρατηρούμε την σύζευξη του πρωτονίου αυτού με τέσσερα πρωτόνια σε *δ* 2,53, 2,31, 1,60 και 1,55 τα οποία αποτελούν δύο ζεύγη μεθυλενικών πρωτονίων με τους αντίστοιχους άνθρακες να συντονίζονται στα 46,4 ppm (για τις κορυφές σε δ 2,53 και 2,31) και 36,2 ppm (για τις κορυφές σε δ 1,60 και 1,55) (HSQC-Dept). Στο φάσμα HMBC το μεθυνικό πρωτόνιο συζεύγνυται (J^3) με τρεις άνθρακες: έναν καρβονυλικό στα 180,4 ppm, έναν αλειφατικό στα 25,9 ppm καθώς και τον ανωμερικό άνθρακα του σακχάρου στα 104,2 ppm. Επιπλέον, στο φάσμα ^{1}H-NMR παρατηρούμε, στα 0,91 ppm, μια τριπλή κορυφή (*J* = 7,0 Hz) η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια ενός τελικού μεθυλίου (ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 14,3 ppm – HSQC-Dept).

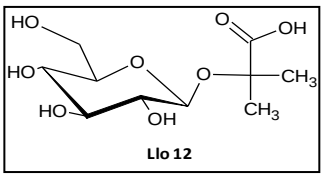
Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε πως το άγλυκο τμήμα του μορίου είναι παράγωγο 3-υδρόξυ-λιπαρού οξέος, ενώ το σάκχαρο βρίσκεται ενωμένο στη θέση 3 του άγλυκου. Το φάσμα HRMS συνέβαλε καθοριστικά στην αποσαφήνιση της

δομής. Η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 321,1556 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{14}H_{25}O_8$ και ο βαθμός ακορεστότητας 2 οδήγησαν στο συμπέρασμα πως ο μεταβολίτης **L.lo 11** είναι το φυσικό προϊόν **3-O-*β*-D –γλυκοπυρανοσυλοξυοκτανοϊκό οξύ**. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.22.

Πίνακας 6.4.22: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) του **1-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-εξεν-3(*Z*)- όλη** (L.lo 10), **3-O-*β*-D - γλυκοπυρανόσυλο οκτανοϊκό οξύ** (L.lo 11),

	L.lo 10		**L.lo 11**	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
1	3,87 m 3,54 m	70,4		180,4
2	2,38 m	28,6	2,53 dd (14,1/7,3) 2,31 dd (14,1/7,3)	46,4
3	5,39 dtt (11,0/7,0/1,5)	125,7	4,11 m	79,2
4	5,45 dtt (11,o/7,0/1,5)	134,3	1,60/1,55 m	36,2
5	2,08 m	21,3	1,52/1,40 m	25,9
6	0,97 t (7,5)	14,4	1,31 m	33,3
			1,33 m	23,7
			0,91 t (7,0)	14,3
	O- *β*-D -γλυκοπυρανόση		O- *β*-D -γλυκοπυρανόση	
1′	4,26 d (7,8)	104,2	4,30 d (7,9)	104,2
2′	3,17 dd (9,0/7,8)	75,1	3,18 dd (9,0/7,9)	75,1
3′	3,47 t (9,0)	77,9	3,35 t (9,0)	78,0
4′	3,28 t (9,0)	71,5	3,28 t (9,0)	71,5
5′	3,26 m	77,8	3,27 m	78,0
6′	3,85 dd (12,1/2,4) 3,66 dd (12,1/5,5)	62,6	3,85 dd (12,1/2,4) 3,65 dd (12,1/5,5)	62,6

Το προϊόν **Llo 12** παραλήφθηκε σε καθαρή μορφή κατά την επεξεργασία με παρασκευαστική TLC του κλάσματος 40 του CCC. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος που ακολούθησε, έδειξε πως πρόκειται για το μεταβολίτη **2-**



Llo 12

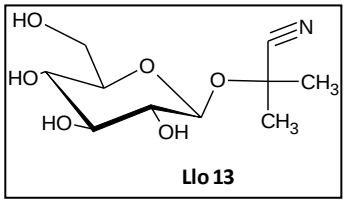
μεθυλο-2-*O*-*β*-D–γλυκοπυρανοσυλοξυπροπιονικό οξύ.

Στο φάσμα ^{1}H-NMR του προϊόντος παρατηρούμε τα χαρακτηριστικά σήματα ενός σακχάρου στην περιοχή 4,50-3,2 ppm καθώς και δύο απλές κορυφές που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία σε δ 1,52 και 1,45 και αντιστοιχουν σε δύο μεθύλια. Τα φάσματα δύο διαστάσεων COSY και HSQC-Dept βοήθησαν στην ταυτοποίηση του σακχάρου ως ***β*-D–γλυκοπυρανόση.**

Στο φάσμα HMBC παρατηρούμε σήματα σύζευξης (J^3) μεταξύ των μεθυλικών πρωτονίων και ενός καρβονυλικού άνθρακα στα 177,1 ppm καθώς επίσης και το σήμα σύζευξης (J^3) μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης με έναν οξυγονωμένο τεταρτοταγή άνθρακα στα 79,5 ppm. Στο ίδιο φάσμα ορατά είναι και τα σήματα σύζευξης (J^2) μεταξύ του οξυγονωμένου τεταρτοταγούς άνθρακα και των μεθυλικών πρωτονίων.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι το προϊόν **Llo 12** είναι το **2-μεθυλο-2-*O*-*β*-D –γλυκοπυρανοσυλοξυπροπιονικό οξύ**. Τη δομή αυτή επιβεβαιώνει και η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 265,0909 $[M-H]^-$ (με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή $C_{10}H_{17}O_8$ και βαθμό ακορεστότητας 2) που παρατηρούμε στο φάσμα μάζας (HRMS). Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.23.

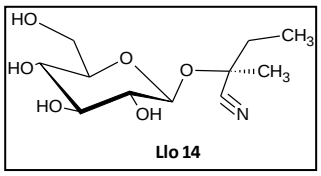
Ο μεταβολίτης **Llo 13** αποτελεί κύριο προϊόν του μεθανολικού εκχυλίσματος και απομονώθηκε από αυτό σε ένα στάδιο κατά την επεξεργασία με Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC). Στο φάσμα HRMS του προϊόντος εμφανίζεται η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 248,1127 $[M+H]^+$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{10}H_{18}O_6N$. Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων NMR καθώς και η σύγκριση των πειραματικών αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα έδειξε πως πρόκειται για τον κυανυδρικό γλυκοσίδη **Λιναμαρίνη**[374,375,376]**.**



Llo 13

Τα πρωτόνια των δύο μεθυλίων εμφανίζονται με τη μορφή απλών κορυφών σε δ 1,67 και 1,66 ενώ οι άνθρακες τους συντονίζονται στα 28,4 και 27,7 ppm αντίστοιχα (HSQC-Dept). Τα πρωτόνια αυτά συζευγνύονται στο φάσμα HMBC με έναν άνθρακα στα 122,2 ppm ο οποίος αντιστοιχεί στον άνθρακα C-1 της ένωσης. Στο ίδιο φάσμα παρατηρούμε και το σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης (δ 4,62) με τον οξυγονωμένο τεταρτοταγή άνθρακα (C-2) ο οποίος συντονίζεται στα 72,9 ppm. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.23.

Ο μεταβολίτης **Llo 14** παραλήφθηκε σε καθαρή μορφή κατά την επεξεργασία με παρασκευαστική TLC του κλάσματος 40 του CCC. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος που ακολούθησε, έδειξε πως πρόκειται για τον κυανυδρικό γλυκοσίδη **επίλοταουστραλίνη**.



Llo 14

Η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 262,1293 $[M+H]^+$ (με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{11}H_{20}O_6N$) στο φάσμα HRMS της ουσίας δείχνει την παρουσία μιας επιπλέον μεθυλενικής ομάδας συγκρινόμενο με το αντίστοιχο φάσμα του μεταβολίτη **Llo 13**. Η διαφορά αυτή γίνεται ορατή και στο φάσμα ^{1}H-NMR του προϊόντος **Llo 14** όπου εμφανίζονται 4 κορυφές στην αλειφατική περιοχή αντί για δύο που παρατηρήσαμε στην αντίστοιχη περιοχή του φάσματος της Λιναμαρίνης. Η παρουσία του επιπλέον μεθυλενίου φαίνεται τόσο από τις δύο πολλαπλές κορυφές σε *δ* 1,97 και 1,88 που αντιστοιχούν σε μεθυλενικά πρωτόνια (COSY, HSQC-Dept) όσο και από την παρουσία μιας τριπλής κορυφής (J = 7,8 Hz) σε *δ* 1,09 που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε ένα τελικό μεθύλιο.

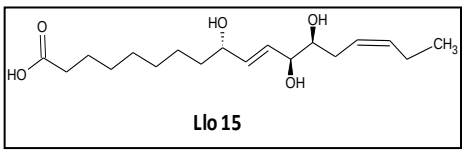
Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων COSY, HSQC-Dept και HMBC οδήγησε στο συμπέρασμα πώς πρόκειται για τον μεταβολίτη **2-O-*β*-D–γλυκοπυρανοσυλο-2-μέθυλβουτυρονιτρίλιο**. Το μόριο αυτό απαντάται με τη μορφή δύο επιμερών: του (R)-2-O-*β*-D–γλυκοπυρανοσυλο-2-μεθυλοβουτυρονιτρίλιο (Λοταουστραλίνη) και του (S)-2-O-*β*-D–γλυκοπυρανοσυλο-2-μεθυλοβουτυρονιτρίλιο (Επιλοταουστραλίνη). Η σύγκριση των πειραματικών αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα για τα

δύο επιμερή οδήγησε στο συμπέρασμα πως η υπό μελέτη ουσία είναι η **Επιλοταουστραλίνη**[377,378,379]. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.23.

Πίνακας 6.4.23: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) των **2-μεθυλ-2-Ο-*β*-D–γλυκοπυρανοσυλοξυπροπιονικό οξύ** (L.lo 12), **Λιναμαρίνη** (L.lo 13) και **Επιλοταουστραλίνη** (L.lo 14),.

	L.lo 12		**L.lo 14**		**L.lo 13**	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
1		177,1	-	122,2	-	122,1
2		79,5	-	72,9	-	76,7
3	1,45 s	27,2	1,67 s	28,4	1,97/1,88 m	35,2
4					1,09 t (7,8)	9,2
-CH_3	1,52 s	24,1	1,66 s	27,7	1,62 s	25,0
	O- *β*-D -γλυκοπυρανόση		O- *β*-D -γλυκοπυρανόση		O- *β*-D -γλυκοπυρανόση	
1′	4,48 d (7,9)	99,5	4,62 d (7,9)	101,2	4,63 d (7,9)	101,2
2′	3,27 dd (9,0/7,9)	75,1	3,19 dd (9,0/7,9)	74,6	3,19 dd (9,0/7,9)	75,2
3′	3,39 t (9,0)	78,2	3,41 t (9,0)	77,9	3,40 t (9,0)	78,4
4′	3,36 t (9,0)	71,4	3,32 t (9,0)	71,2	3,34 t (9,0)	71,7
5′	3,25 m	77,8	3,32 m	77,9	3,32 m	78,4
6′	3,83 dd (12,1/2,2)	62,5	3,85 dd (12,1/2,4)	62,5	3,85 dd (12,1/2,4)	63,0
	3,66 dd (12,1/5,7)		3,68 dd (12,1/5,5)		3,69 dd (12,1/5,5)	

Οι μεταβολίτες **Llo 15** και **Llo 16** παρελήφθησαν σε μείγμα (κλάσμα 26) κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με CCC ενώ ο διαχωρισμός και η απομόνωση τους πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της παρασκευαστικής TLC. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε αποκάλυψε πως πρόκειται για δύο τριυδρόξυ ακόρεστα λιπαρά οξέα, τα: **9(S),12(S),13(S)-τριυδρόξυ-10(E),15(Z)-οκταδεκαδιενικό οξύ (φουλγιδικό οξύ)** (Llo 15), **9(S),12(S),13(S)-τριυδρόξυ-10(E)-οκταδεκαενικό οξύ** (**πινελλικό οξύ)** (Llo 16).



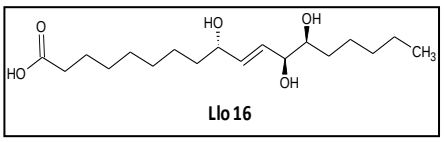
Llo 15

Στο φάσμα HRMS της ουσίας **Llo 15** παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 327,2178[M-H]$^{-}$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{18}H_{31}O_5$ και βαθμό ακορεστότητας 3. Το φάσμα ^{13}C-NMR της ουσίας είναι χαρακτηριστικό ενός ακόρεστου λιπαρού οξέος μακράς

αλυσίδας. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήσαμε ένα μεθυλικό άνθρακα σε *δ* 14,4, πολλούς μεθυλενικούς άνθρακες σε *δ* 21,5 εως 39,2, τέσσερεις άνθρακες διπλού δεσμού σε *δ* 126.3, 131.1, 134.2 και 136.6 καθώς και έναν καρβονυλικό άνθρακα στα 182.8 ppm. Επιπλέον εμφανίζονται και τρεις οξυγονωμένοι άνθρακες σε *δ* 73.0, 75.7 και 75.9 με τα αντίστοιχα μεθινικά πρωτόνια να συντονίζονται σε *δ* 4.04, 3.94 και 3.45 αντίστοιχα (HMQC-Dept) δηλώνοντας την παρουσία τριών υδροξυλικών ομάδων στο μόριο.

Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης των φασμάτων COSY, HSQC-Dept, HMBC και λαμβάνοντας υπόψη και το Μοριακό Βάρος της ουσίας (φάσμα μάζας) καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι ο μεταβολίτης **Llo 15** είναι το **9,12,13-τριυδρόξυ-10(E),15(Z)-οκταδεκαδιενικό οξύ.** Η Ε διαμόρφωση του διπλού δεσμού C-10 – C-11 καθορίστηκε από την σταθερά σύζευξης των H-10 , H-11 η οποία μετρήθηκε 16,1 Hz. Αντίστοιχα, η σταθερά σύζευξης 11.2 Hz μεταξύ των H-15 και H-16 δηλώνει Z διαμόρφωση του διπλού δεσμού στη θέση αυτή.

Στο μόριο υπάρχουν τρία ασύμμετρα κέντρα άνθρακα δίνοντας έτσι 8 πιθανά στερεοϊσομερή. Η σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα των διαφορετικών στερεοϊσομερών μορφών μας οδήγησε στο συμπέρασμα πως η ένωση μας είναι το **9(S),12(S),13(S)-τριυδρόξυ-10(E),15(Z)-οκταδεκαδιενικό οξύ (φουλγιδικό οξύ)**[380,381,382]. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.24.



Llo 16

Η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 329,2334[M-H]$^{-}$ που παρατηρούμε στο φάσμα HRMS του μεταβολίτη **Llo 16** αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{18}H_{34}O_5$. Τα φάσματα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας είναι χαρακτηριστικά ενός μονοϋποκατεστιμένου λιπαρού οξέος με 18 άτομα άνθρακα παρόμοιας δομής με τον μεταβολίτη **Llo 15**. Πράγματι η βασική διαφορά στα φάσματα ^{1}H-NMR των ουσιών αυτών είναι η απουσία των κορυφών που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του διπλού δεσμού της θέσεως 15-16 καθώς και η θωράκιση των πρωτονίων H-17 και ο συντονισμός τους σε *δ* 1.34 (COSY), στο μεταβολίτη **Llo 16.**

Πίνακας 6.4.24: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) των **φουλγιδικό οξύ** (L.lo 15), και **9(S),12(S),13(S)- πινελλικό οξύ** (L.lo 16).

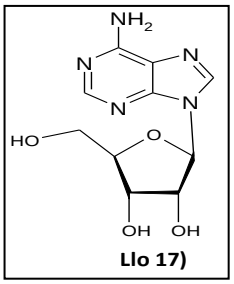
	L.lo 15		**L.lo 16**	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
1	-	182,8	-	182,8
2	2,14 m	39,2	2,14 m	39,2
3	1,60 m	27,7	1,60 m	27,7
4	1,34 m	30,7	1,34 m	30,7
5	1,34 m	30,5	1,34 m	30,5
6	1,34 m	30,5	1,34 m	30,5
7	1,34 m	26,4	1,34 m	26,4
8	1,52 m	38,4	1,52 m	38,4
9	4,04 td (6,6/5,1)	73,0	4,04 td (6,6/5,1)	73,0
10	5,72 dd (16,1/4,7)	136,6	5,72 br t (4,7)	136,6
11	5,72 dd (16,1/4,7)	131,1	5,72 br t (4,7)	131,1
12	3,94 br t (5,0)	75,7	3,90 br t (5,0)	76,4
13	3,45 ddd (8,1/4,8/4,4)	75,9	3,40 m	75,6
14	2,35 m	31,4	1,34 m	33,9
	2,13 m			
15	5,45 ddd (11,2/5,7/1,5)	126,3	1,34 m	30,7
16	5,45 ddd (11,2/5,7/1,5)	134,2	1,34 m	33,0
17	2,07 m	21,5	1,34 m	23,6
18	0,96 t (7,5)	14,4	0,91 t (7,2)	14,3

Το φάσμα HMBC επιβεβαιώνει την παραπάνω παρατήρηση καθώς δεν εμφανίζεται το σήμα σύζευξης μεταξύ του τελικού μεθυλίου και ενός ολεφινικού άνθρακα όπως παρατηρούμε στο αντίστοιχο φάσμα του προϊόντος **Llo 15**. Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, COSY, HSQC-Dept και HMBC οδήγησε στην ταυτοποίηση του προϊόντος **Llo 16** ως **9,12,13-τριυδρόξυ-10 -οκταδεκαενικό οξύ**.

Η Ε διαμόρφωση του $\Delta_{10,11}$ καθορίστηκε και πάλι από την σταθερά σύζευξης των Η-10 , Η-11 (16,1 Hz), ενώ η σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα των διαφορετικών στερεοϊσομερών μορφών μας οδήγησε στο συμπέρασμα πως η υπό έλεγχο ουσία είναι το **9(S),12(S),13(S)- πινελλικό οξύ** ή

9(S),12(S),13(S)-τριυδρόξυ-10(E)-οκταδεκαενικό οξύ[383,384,385]. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.24.

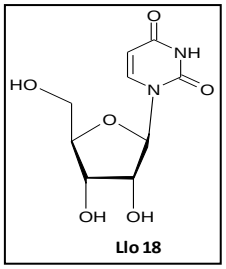
Ο μεταβολίτης **Llo 17** παραλήφθηκε σε καθαρή μορφή κατά την επεξεργασία με Παρασκευαστική TLC του κλάσματος 42 του CCC. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος που ακολούθησε, έδειξε πως πρόκειται για τον νουκλεοσίδη **Αδενοσίνη** .



Llo 17)

Το φάσμα πρωτονίου του **Llo 17** είναι χαρακτηριστικό ενός αζωτούχου παραγώγου λόγω των αποθωρακισμένων απλών κορυφών στα 8.31 ppm (s, H-8) και 8.18 ppm (s, H-2). Επιπλέον, η παρουσία του σακχάρου πιστοποιείται τόσο από τη διπλή κορυφή στα 5.97 ppm (*J* = 6.2 Hz) στο φάσμα ^{1}H NMR, που αποδίδεται στο ανωμερικό πρωτόνιο, όσο και από την χαρακτηριστική τιμή χημικής μετατόπισης του ανωμερικού άνθρακα (91,0 ppm), στο φάσμα HSQC-Dept. Η αποθωράκιση του ανωμερικού πρωτονίου και η θωράκιση του αντίστοιχου άνθρακα, είναι ενδεικτικό της *N*-γλυκοσυλίωσης. Η σύγκριση των πειραματικών δεδομένων του **Llo 17** με τα βιβλιογραφίκα δεδομένα, πιστοποίησε την παρουσία της **Αδενοσίνης**.[386,387] Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

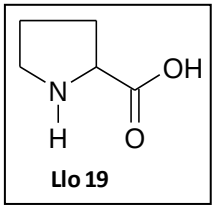
Ο μεταβολίτης **Llo 18** απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα σε ένα στάδιο κατά την επεξεργασία με Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC). Από την μελέτη των φασμάτων NMR, HRMS καθώς και τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα διαπιστώθηκε πως πρόκειται για τον νουκλεοσίδη **Ουριδίνη**[388]**.** Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον παρακάτω πίνακα.



Llo 18

Πίνακας 6.4.24α: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) των **Αδενοσίνη** (L.lo 17), **ουριδίνη** (L.lo 18) και **Προλίνη** (L.lo 19).

	L.lo 17		**L.lo 18**		**L.lo 19**	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
2	8,18 s	153,3	-	153,4	3,84 dd (8,6/6,4)	62,8
3	-	-	-	-	2,24 m 2,04 m	30,8
4	-	149,9		166,2	1,90 m	25,5
5	-	120,9	5,70 d (8,0)	102,5	3,30 m 3,10 m	47,0
6	-	157,4	8,01 d (8,0)	142,8	-	175,7
7	-	-				
8	8,31 s	141,7				
9	-	-				
1′	5,97 d (6,2)	91,0	5,90 d (4,7)	90,7		
2′	4,74 dd (6,2/5,0)	75,4	4,18 t (4,8)	75,5		
3′	4,32 dd (5,0/2,5)	72,4	4,15 t (4,8)	71,1		
4′	4,17 d (2,5)	88,0	4,00 m	86,3		
5′α	3,88 dd (12,9/2,5)	63,4	3,84 dd (12,0/2,5)	62,2		
5′β	3,75 dd (12,9/2,9)		3,73 dd (12,0/2,5)			

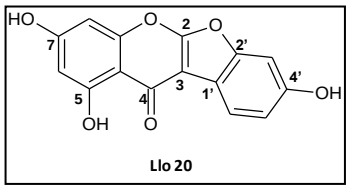


Llo 19

Ο μεταβολίτης **Llo 19** παραλήφθηκε σε καθαρή μορφή μετά την επεξεργασία του κλάσματος 49 του CCC με παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος που ακολούθησε, έδειξε πως πρόκειται για το αμινοξύ **Προλίνη** γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη σύγκριση των πειραματικών αποτελεσμάτων με βιβλιογραφικά δεδομένα[389,390]. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.24α.

Οι μεταβολίτες **Llo 20** και **Llo 21** παραλήφτηκαν σε μίγμα (κλάσμα 25) κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με CCC ενώ ο διαχωρισμός και η απομόνωση τους πραγματοποιήθηκε με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό τη ρητίνη Sephadex-LH20. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε αποκάλυψε πως πρόκειται για δύο κουμαρονοχρωμόνες και

συκγεκριμένα τις: **5,7,4΄-τριυδρόξυ-κουμαρονοχρωμόνη (Λουπιναλμπίνης Α)** (L.lo 20) και **8-μεθόξυ-5,7,4΄-τριυδρόξυ-κουμαρονοχρωμόνη** (L.lo 21).



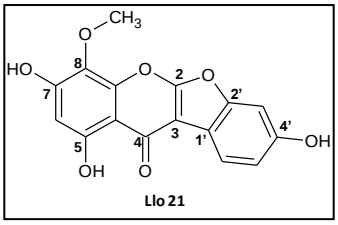
Llo 20

Το φάσμα UV (MeOH) του **Llo 20** δίνει μέγιστο απορρόφησης στα 256 nm καθώς και τρεις κορυφές μικρότερης έντασης στα 283, 301 και 335 nm. Οι κορυφές αυτές είναι χαρακτηριστικές για μόρια τύπου ισοφλαβόνης και κουμαρονοχρωμόνης[391]. Στο φάσμα πρωτονίου της ουσίας εμφανίζονται μόνο πέντε κορυφές στην αρωματική περιοχή δηλώνοντας την παρουσία μόνο αρωματικών πρωτονίων στο μόριο. Πιο συγκεκριμένα σε *δ* 6,46 και 6,26 εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές με *meta*- σύζευξη (*J* = 2,0 Hz) οι οποίες παραπέμπουν στα πρωτόνια Η-6 και Η-8 ενός 5,7-διοξυγονωμένου Α-δακτυλίου καθώς επίσης και τρεις κορυφές σε δ 7,77 (d, *J*=8,5 Hz), 7,00 (d, *J*=2,2 Hz) και 6,90 (dd, *J*=8,5/2,2 Hz) χαρακτηριστικές ενός ABX υποκατεστημένου Β-δακτυλίου. Η απουσία από το φάσμα πρωτονίου της χαρακτηριστικής απλής κορυφής του πρωτονίου Η-2 που απαντάται στις ισοφλαβόνες μας οδηγεί στην υπόθεση πως πρόκειται για μόριο με σκελετό κουμαρονοχρωμόνης.

Στο φάσμα μάζας (HRMS) εμφανίζεται η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 283,0256[M-H]$^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{15}H_7O_6$. Οι 12 βαθμοί ακορεστότητας που δίνει ο μοριακός τύπος $C_{15}H_8O_6$ συναινούν στην άποψη πως πρόκειται για μόριο με δομή κουμαρονοχρωμόνης. Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων ^{13}C-NMR, COSY, HSQC-Dept και HMBC καθώς και η σύγκριση των πειραματικών τιμών με βιβλιογραφικά δεδομένα οδήγησαν στο συμπέρασμα πως πρόκειται για την ουσία **5,7,4΄-τριυδρόξυ-κουμαρονοχρωμόνη** ή **Λουπιναλμπίνη Α**[392,393].

Στο φάσμα HMBC παρατηρούμε τα σήματα σύζευξης (J^3) μεταξύ του πρωτονίου Η-6’ και τριών ανθράκων: δύο οξυγονωμένων αρωματικών σε *δ* 151,8 (C-2’) και 157,7 (C-3’) καθώς και ενός άνθρακα στα 98,6 ppm ο οποίος αντιστοιχεί στον C-3. Η θωράκιση του άνθρακα της θέσεως 3 είναι χαρακτηριστική για μόρια με δομή

κουμαρονοχρωμόνης[394,395]. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα VII.



Llo 21

Στο φάσμα ^{1}H-NMR του μεταβολίτη **Llo 21** εμφανίζονται μόνο πέντε κορυφές εκ των οποίων τέσσερεις στην αρωματική περιοχή και μία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος. Στην αρωματική περιοχή παρατηρούμε το ίδιο ABX σύστημα όπως και στην περίπτωση της Λουπιναλμπίνης Α δηλαδή μία διπλή κορυφή (*J*=8,5 Hz) στα 7,78 ppm, μια διπλή κορυφή (*J*=2,2 Hz) σε δ 7,02 και μια διπλά διπλή κορυφή (*J*=8,5/2,2 Hz) σε δ 6,91 ενώ οι άνθρακες τους συντονίζονται στα 122,3 ppm, 99,4 ppm και 114,4 ppm αντίστοιχα (HSQC-Dep). Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στην υπόθεση ότι πιθανόν να πρόκειται για κάποιο μόριο με παραπλήσια δομή με αυτή της Λουπιναλμπίνης Α.

Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται από το σήμα σύζευξης (J^3)που παρατηρούμε στο φάσμα HMBC του **Llo 21** μεταξύ του πρωτονίου Η-6΄ με έναν άνθρακα στα 98,6 ppm ο οποίος αντιστοιχεί στον χαρακτηριστικό, για το σκελετό κουμαροχρωμόνης, άνθρακα C-3.

Η κύρια διαφορά στα φάσματα ^{1}H-NMR των δύο ουσιών εντοπίζεται στον Α δακτύλιο όπου εμφανίζεται μόνο μια απλή κορυφή σε *δ* 6.31 με τον αντίστοιχο άνθρακα να συντονίζεται στα 101,5 ppm (HSQC-Dep). Στο ίδιο φάσμα παρατηρούμε μια απλή κορυφή σε *δ* 3,91 η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε μια μεθοξυλομάδα. Στο φάσμα HMBC παρατηρούμε σήμα σύζευξης μεταξύ των πρωτονίων της μεθοξυλομάδας και ενός άνθρακα στα 130,3 ppm, ο οποίος με τη σειρά του συζεύγνυται με το πρωτόνιο (στα 6,31 ppm) του δακτυλίου Α της κουμαρονοχρωμόνης. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η υπό μελέτη ουσία έχει αντίστοιχη δομή με την Λουπιναλμπίνης Α, με τη διαφορά να εντοπίζεται στον δακτύλιο Α και συγκεκριμένα υπάρχει μια μεθοξυλομάδα στη θέση 6 ή 8.

Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται από το φάσμα HRMS της ουσίας όπου παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 313,0362[M-H]$^{-}$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{16}H_9O_7$ και βαθμό

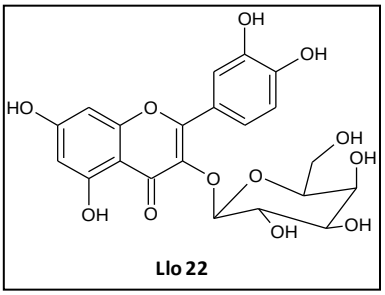
ακορεστότητας 12. Στο ίδιο φάσμα παρατηρούμαι και την κορυφή m/z 298,02[M-H-15,02]$^-$ η οποία αντιστοιχεί στο τμήμα του μορίου που παραμένει όταν απομακρύνεται από αυτό ένα μεθύλιο.

Η χημική μετατόπιση τόσο του μοναδικού αρωματικού πρωτονίου του δακτυλίου Α (δ 6,31) όσο και του αντίστοιχου άνθρακα (*δ* 101,5) είναι ενδεικτική του 5,7,8-τριυδροξυ-υποκατεστημένου δακτυλίου Α των φλαβονοειδών[396]. Προκειμένου όμως να επιβεβαιώσουμε την θέση της μεθοξυλομάδα (6 ή 8) συγκρίναμε τα πειραματικά δεδομένα με τα φασματοσκοπικά δεδομένα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για την ουσία 6-μεθόξυ-5,7,4΄-τριυδρόξυ-κουμαρονοχρωμόνη[397]. Από την σύγκριση αυτή συμπεράναμε ότι ο μεταβολίτης **Llo 21** είναι η **8-μεθόξυ-5,7,4΄-τριυδρόξυ-κουμαρονοχρωμόνη.** Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.25.

Πίνακας 6.4.25: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της **5,7,4΄-τριυδρόξυ-κουμαρονοχρωμόνης (Λουπιναλμπίνης Α)** (L.lo 20), και **8-μεθόξυ-5,7,4΄-τριυδρόξυ-κουμαρονοχρωμόνη** (L.lo 21).

	L.lo 20		**L.lo 21**		
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
2		163,1	2		163,1
3		98,6	3		98,6
4		179,7	4		179,8
5		163,8	5		159,9
6	6,26 d (2,0)	100,1	6	6,31 s	101,5
7		165,9	7		158,7
8	6,46 d (2,0)	95,9	8		130,3
9		156,7	9		148,6
10		104,3	10		104,0
1΄		115,7	1΄		115,7
2΄		151,8	2΄		151,8
3΄	7,00 d (2,2)	99,4	3΄	7,02 d (2,2)	99,4
4΄		157,7	4΄		157,7
5΄	6,90 dd (8,5/2,2)	114,4	5΄	6,91 dd (8,5/2,2)	114,4
6΄	7,77 d (8,5)	122,3	6΄	7,78 d (8,5)	122,3
			-CH_3	3,91 s	61,7

Τα προϊόντα **Llo 22** και **Llo 23** απομονώθηκαν κατά την επεξεργασία του κλάσματος 34 του CCC με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού χρησιμοποιώντας ως πληρωτικό υλικό τη ρητίνη Sephadex-LH20. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε αποκάλυψε πως πρόκειται για δύο μονογλυκοσίδες φλαβονολών, τις ουσίες: **3-O-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλοκερκετίνη** (L.lo 22), και **3-O-*β*-D-γαλακτοπυρανόσυλοισοραμνετίνη** (L.lo 23).



Llo 22

Ο σκελετός της κερκετίνης καθώς και η ύπαρξη ενός σακχαριδικού τμήματος είναι εμφανή στο φάσμα ^{1}H NMR του μεταβολίτη **Llo 22**. Ορατές είναι τρεις κορυφές στα 7.84 (d, *J* = 2.2 Hz), 7.59 (dd, *J* = 8.5/2.2 Hz) και 6.86 ppm (d, *J* = 8.5 Hz) που αντιστοιχούν στα H-2′, H-6′ και H-5′ και υποδηλώνουν την ύπαρξη δύο υδροξυλίων στον δακτυλίου Β. Επίσης σε *δ* 6,38 και 6,18 συντονίζονται οι δύο διπλές κορυφές (*J* = 2.2 Hz), των πρωτονίων H-8 και H-6, του δακτυλίου Α, αντίστοιχα. Επιπλέον το φάσμα HMBC υποδεικνύει την 3-*O*-γλυκοσυλίωση, από το σήμα που αντιστοιχεί στη σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου με τον άνθρακα C-3 στα 135,6 ppm.

Η ταυτοποίηση του σακχάρου, ως *β*-γαλακτοπυρανόση επιτεύχθηκε με τη βοήθεια φασμάτων COSY και HSQC-Dept. Το ανωμερικό πρωτόνιο (H-1′′) συντονίζεται στα 5.15 ppm ως διπλή κορυφή (*J* = 7.8 Hz) με τον αντίστοιχο άνθρακα να συντονίζεται στα 104,5 ppm. Οι χαρακτηρηστικές κορυφές στο φάσμα ^{1}H-NMR οι οποίες επιβεβαιώνουν την ύπαρξη γαλακτόσης, αφορούν στα H-3′′ και H-4′′. Το H-3′′ συντονίζεται στα 3.55 ppm (dd, *J* = 9.5, 3.4 Hz) και παρουσιάζει σύζευξη και με τα δύο γειτονικά πρωτόνια (αξονικό και ισημερινό), ενώ το H-4′′ συντονίζεται στα 3.84 ppm, ως ευρεία διπλή κορυφή με μικρή σταθερά σύζευξης (*J* = 3,3 Hz) οφειλόμενη στον ισημερινό προσανατολισμό του. Επιπλέον, το H-5′′ συντονίζεται στα 3.45 ppm (t, *J* = 6.0 Hz), επιβεβαιώνοντας τον ισημερινό προσανατολισμό του γειτονικού H-4′′. Όλα τα παραπάνω αποδεικνύουν την παρουσία της *β*-γαλακτοπυρανόσης.

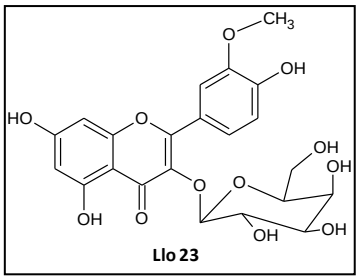
Τελικά, το προϊόν **Llo 22** ταυτοποιήθηκε ως **3-*O*-*β*-D-γαλακτοπυρανοσίδης της κερκετίνης**. Η δομή αυτή επιβεβαιώθηκε τόσο από την κορυφή του μοριακού ιόντος

m/z 463,0893[M-H]$^-$ (προτεινόμενος μοριακός τύπος για την κορυφή αυτή $C_{21}H_{19}O_{12}$) όσο και από τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα[398,399]. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.26.

Πίνακας 6.4.26: Φασματοσκοπικά δεδομένα της **3-O-*β*-D-γαλακτοπυρανόσυλοκερκετίνη** (L.lo 22), και **3-O-*β*-D-γαλακτοπυρανόσυλοισοραμνετίνη** (L.lo 23).

	L.lo 22		**L.lo 23**		
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
2		158,2	2		158,1
3		135,6	3		135,1
4		179,5	4		178,9
5		162,9	5		162,9
6	6,18 d (2,0)	100,1	6	6,18 d (2,0)	100,0
7		166,0	7		167,2
8	6,38 d (2,0)	94,7	8	6,37 d (2,0)	94,8
9		159,0	9		158,3
10		105,7	10		105,2
1′		123,2	1′		122,7
2′	7.84 d (2.2)	116,0	2′	8,03 d (2,2)	114,3
3′		145,9	3′		148,2
4′		149.8	4′		150,3
5′	6.86 d (8.5)	117,5	5′	6,90 d (8,5)	115,6
6′	7.59 dd (8.5/2.2)	123,1	6′	7,57 dd (8,5/2,2)	123,2
			-CH_3	3,95 s	56,8
1′′	5.15 d (7.8)	104.5	1′′	5,32 d (7,8)	104,1
2′′	3.82 dd (9.5/7.8)	72.7	2′′	3,82 dd (9,6/7,8)	72,9
3′′	3.55 dd (9.5/3.4)	74.8	3′′	3,56 dd (9,6/3,3)	75,1
4′′	3.84 brd (3,3)	69.8	4′′	3,84 brd (3,3)	69,6
5′′	3.45 brt (6,0)	77.1	5′′	3,47 brt (6,0)	77,0
6′′	3.65 dd (11.3/6.1) 3,57 dd (11,3/6,3)	61.9	6′′	3,65 dd (11,3/5,8) 3,57 dd (11,3/6,3)	62,0

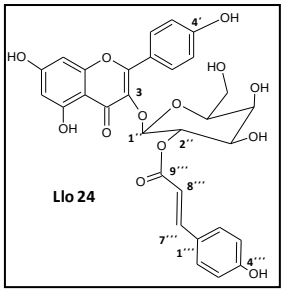
Στο φάσμα ^{1}H NMR του μεταβολίτη **Llo 23** γίνεται εμφανής η παρουσία ενός φλαβονοειδούς με βασικό σκελετό κερκετίνης καθώς και ενός σακχαριδικού τμήματος. Επιπλέον εμφανίζεται και μια απλή κορυφή στα 3,95 ppm που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και δηλώνει την ύπαρξη μιας μεθοξυλομάδας στο μόριο. Οι κορυφές στα 8,03 (d, *J* = 2.2 Hz), 7.57 (dd, *J* = 8.5/2.2 Hz) και 6.90 ppm (d, *J* = 8.5 Hz) δηλώνουν την παρουσία ενός ABX συστήματος στον δακτύλιο Β και αντιστοιχούν στα πρωτόνια Η-2′, Η-6′ και Η-5′, ενώ οι κορυφές στα 6,37 (d, *J* = 2.2 Hz) και 6,18 ppm (d, *J* = 2.2 Hz) αντιστοιχούν στα πρωτονία Η-8 και Η-6 του δακτυλίου Α.



Llo 23

Στο φάσμα HMBC παρατηρούμε σήμα σύζευξης μεταξύ των πρωτονίων της μεθοξυλομάδας και ενός άνθρακα στα 148,2 ppm ο οποίος με τη σειρά του συζευγνύεται με το πρωτόνιο Η-5΄ και όχι με τα πρωτόνια Η2΄και Η-6΄. Το γεγονός αυτό δηλώνει την παρουσία της μεθόξυ ομάδας στην θέση 3΄ του δακτυλίου Β γεγονός που δικαιολογεί και την αποθωράκιση του Η-2΄. Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων ^{1}H NMR, COSY και HSQC-Dept συνέβαλε στον προσδιορισμό του σακχάρου ως *β*-γαλακτοπυρανόσης ενώ το φάσμα HMBC υποδεικνύει την 3-*O*-γλυκοσυλίωση καθώς παρατηρούμε το σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου (δ 5,32) με τον άνθρακα C-3 στα 135,1 ppm.

Με βάση την παραπάνω μελέτη καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως ο μεταβολίτης **Llo 23** είναι η **3-O-*β*-D-γαλακτοπυρανόσυλοισοραμνετίνη.** Η δομή αυτή επιβεβαιώθηκε τόσο από την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 477,1051[M-H]$^{-}$ (προτεινόμενος μοριακός τύπος για την κορυφή αυτή $C_{22}H_{21}O_{12}$) όσο και από τη σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα[400,401]. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.26.



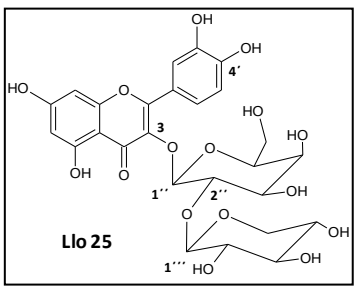
Ο μεταβολίτης **Llo 24** απομονώθηκε σε καθαρή μορφή κατά την επεξεργασία του κλάσματος 32 του CCC με παρασκευαστική TLC. Η μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, COSY, HSQC-Dept, HMBC και HRMS που ακολούθησε αποκάλυψε πως πρόκειται για το νέο φυσικό προϊόν **3-O-(2''-κουμαρόϋλ)-*β*-D-γαλακτοπυρανόσυλοκαιμπφερόλη.**

Στο φάσμα ^{1}H NMR του **Llo 24** είναι εμφανής η παρουσία ενός πυρήνα *O*-γλυκοσυλιωμένης φλαβονόλης, συνδεδεμένου με ένα μόριο κουμαρικού οξέος. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος εμφανίζεται ο σκελετός της καιμπφερόλης τα πρωτόνια της οποίας συντονίζονται στα 8.02 και 6.86 ppm ως διπλές κορυφές (*J* = 8.8 Hz) που αντιστοιχούν στα H-2′ / H-6′ και H-3′ / H-5′ του *para*-συστήματος του δακτυλίου Β καθώς και δύο διπλές κορυφές (*J* = 2,0 Hz) στα 6.15 και 6.38 ppm που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 και H-8 του δακτυλίου Α. Στην ίδια περιοχή του φάσματος εμφανίζονται και τα σήματα του κουμαρικού οξέος ως δύο διπλές κορυφές (*J* = 8,4 Hz) που ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμιά (7.50 και 6.78 ppm, για τα πρωτόνια H-2′′′ / H-6′′′ και H-3′′′ / H-5′′′) καθώς και δύο διπλές κορυφές (*J* = 16,1 Hz) στα 7,55 και 6,35 pmm οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-7′′′ και H-8′′′ αντίστοιχα. Η σταθερά σύζευξης 16,1 Hz των πρωτονίων H-7′′′ και H-8′′′ επιβεβαιώνει τον *trans*-προσανατολισμό του διπλού δεσμού του κουμαροϋλο-ομάδας.

Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος ^{1}H NMR παρατηρούμε τα χαρακτηριστικά σήματα ενός σακχάρου. Η μελέτη των φασμάτων COSY και HSQC-Dept βοήθησε στην ταυτοποίηση του ως *β*-γαλακτοπυρανόση. Το ανωμερικό πρωτόνιο (H-1′′) συντονίζεται στα 5.66 ppm ως διπλή κορυφή (*J* = 7.8 Hz) με τον αντίστοιχο άνθρακα να συντονίζεται στα 99,2 ppm. Το H-3′′ συντονίζεται στα 3.67 ppm (dd, *J* = 9.5, 3.4 Hz) και παρουσιάζει σύζευξη στο φάσμα COSY και με τα δύο γειτονικά πρωτόνια (αξονικό και ισημερινό), ενώ το H-4′′ συντονίζεται στα 3.73 ppm, ως ευρεία διπλή κορυφή με μικρή σταθερά σύζευξης (*J* = 3,3 Hz) οφειλόμενη στον ισημερινό προσανατολισμό του. Οι παραπάνω κορυφές είναι χαρακτηριστικές για την *β*-γαλακτοπυρανόση.

Στο φάσμα COSY παρατηρούμε την σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου του σακχάρου με το πρωτόνιο H-2΄΄ το οποίο συντονίζεται στα 5.18 ppm ως διπλά διπλή κορυφή (*J* = 9,6/7.8 Hz) με τον αντίστοιχο άνθρακα να συντονίζεται στα 72,8 ppm (HSQC-Dept). Η αποθωράκιση αυτή του πρωτονίου H-2΄΄ σε συνδυασμό με την μη αποθοράκιση του αντίστοιχου άνθρακα είναι ισχυρή ένδειξη της ακυλίωσης στη θέση αυτή. Πράγματι στο φάσμα HMBC παρατηρούμε το σήμα σύζευξης μεταξύ του πρωτονίου H-2΄΄ και ενός καρβονυλικού άνθρακα στα 168,4 ppm (C-9΄΄΄) ο οποίος με τη σειρά του δίνει σήμα σύζευξης με το H-7΄΄΄ του κουμαρικού οξέος. Στο ίδιο φάσμα παρατηρούμε επίσης και το σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου του σακχάρου και του C-3 της καιμπφερόλης στα 133,8 ppm γεγονός που αποδεικνύει την 3-O-γλυκοζυλίωση.

Από τα παραπάνω συμπεράναμε ότι ο μεταβολίτης **Llo 24** είναι το φυσικό προϊόν **3-O-(2΄΄-O-κουμαρόϋλ0)-*β*-D-γαλακτοπυρανόσυλοκαιμπφερόλη.** Το φάσμα HRMS της ουσίας επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή καθώς παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 593,1312 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή είναι $C_{30}H_{25}O_{13}$ και βαθμό ακορεστότητας 18. Στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται και η κορυφή που αντιστοιχεί στο ιόν της καιμπφερόλης m/z 285,0410 $[M^-\text{-}308.09]^-$. Επίσης εμφανής είναι και η κορυφή m/z 447.0944 $[M^-\text{-}146.04]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{21}H_{19}O_{11}$ και βαθμό ακορεστότητας 12 η οποία αντιστοιχεί στο ιόν του 3-O-γαλακτοπυρανοσίδη της καιμπφερόλης. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.27.



Llo 25

Ο μεταβολίτης **Llo 25** απομονώθηκε σε καθαρή μορφή κατά την επεξεργασία του κλάσματος 38 του CCC με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού χρησιμοποιώντας ως πληρωτικό υλικό τη ρητίνη Sephadex-LH20. Η μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, COSY, HSQC-Dept, HMBC και HRMS που ακολούθησε αποκάλυψε πως πρόκειται για το νέο φυσικό προϊόν **3-O-(2΄΄-O-*β*-D-ξυλοπυρανοσυλο)-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο κερκετίνη.**

Η παρουσία κερκετίνης διακρίνεται εύκολα στο φάσμα ^{1}H-NMR λόγω των χαρακτηριστικών κορυφών που εμφανίζονται στην αρωματική περιοχή. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε τις χαρακτηριστικές κορυφές του ABX υποκατεστημένου δακτυλίου Β στα 7,71 (d, *J*=2,0 Hz), 7,64 (dd *J*=8,7/2,0 Hz) και 6,86 ppm (d, *J*=8,7 Hz) ενώ τα πρωτόνια Η-6 και Η-8 του δακτυλίου Α συντονίζονται στα 6,18 (d, *J*=2,0 Hz) και 6,38 ppm (d, *J*=2,0 Hz) αντίστοιχα. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρατηρούμε μια σειρά σημάτων που δηλώνουν την παρουσία δύο τουλάχιστον σακχάρων στο μόριο.

Τα φάσματα ^{1}H NMR, COSY και HSQC-Dept χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση της δομής του πρώτου σακχάρου ως *β*-γαλακτοπυρανόση. Το ανωμερικό πρωτόνιο (Η-1΄΄) συντονίζεται στα 5.40 ppm (d, *J* = 7.8 Hz) ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας στα 101,2 ppm. Τα Η-3΄΄ και Η-4΄΄ συντονίζονται στα 3.72 ppm (dd, *J* = 9.5/3.3 Hz) και 3.84 ppm (brd, *J* = 3.3 Hz) αντίστοιχα και η μορφή τους συνετέλεσε στον καθορισμό της δομής του σακχάρου ως *β*-γαλακτοπυρανόση. Η τυπική αποθωράκιση τόσο του πρωτονίου Η-2΄΄, το οποίο συντονίζονται στα 4,00 ppm (dd, *J* = 9,6/7,8 Hz), όσο και του αντίστοιχου άνθρακα στα 79,9 ppm αποτελεί ισχυρή ένδιξη ότι σε αυτή τη θέση βρίσκεται συνδεδεμένο το δεύτερο σάκχαρο. Το σήμα σύζευξης (J^3) στο φάσμα HMBC μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου της γαλακτόσης και του άνθρακα στα 134,8 ppm καθόρισε την σύνδεση της γαλακτόζης στη θέση 3 της κερκετίνης.

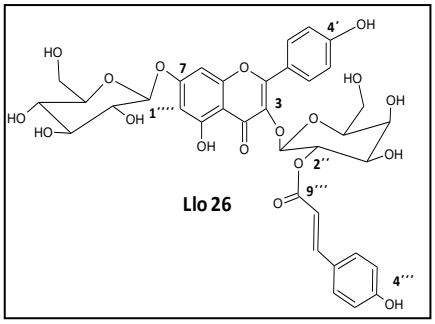
Η μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, COSY και HSQC-Dept βοήθησε επίσης στην ταυτοποίηση του δεύτερου σακχάρου ως *β*-D–ξυλοπυρανόση. Το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται με τη μορφή διπλής κορυφής (*J*=6,6 Hz) σε *δ* 4,76 ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 105,2 ppm. Τα χαρακτηριστικά δίδυμα πρωτόνια της θέσης 5 εμφανίζονται ως δύο διπλά διπλές κορυφές σε *δ* 3,95 (*J*=11,8/4,9 Hz) και 3,24 (*J*=11,8/9,4 Hz) ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 66,4 ppm. Το σήμα σύζευξης (J^3) στο φάσμα HMBC μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου και του άνθρακα C-2΄΄ στα 79,9 ppm επιβεβαιώνει την σύνδεση της ξυλόζης στη θέση 2 της γαλακτόζης.

Πίνακας 6.4.27: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της **3-O-(2''-O-κουμαρόϋλο)-γαλακτοπυρανόσυλοκαιμπφερόλη** (L.lo 24), και **3-O-(2''-O-ξυλοπυρανοσυλο) γαλακτοπυρανοσυλοκερκετίνη** (L.lo 25).

	L.lo 24 (DMSO-d_6)			**L.lo 25 (MeOD)**	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
2		159,4	2		157,8
3		133,8	3		134,8
4		177,5	4		178,9
5		160,9	5		162,7
6	6,15 d (2,0)	99,4	6	6,18 d (2,0)	99,7
7		162,1	7		165,6
8	6,38 d (2,0)	94,4	8	6,38 d (2,0)	94,4
9		156,4	9		158,2
10		105,4	10		105,3
1′		120,8	1′		121,8
2′	8,02 d (8,8)	131,5	2′	7,71 d (2,0)	117,2
3′	6,86 d (8,8)	115,7	3′		145,8
4′		160,6	4′		149,5
5′	6,86 d (8,8)	115,7	5′	6,86 d (8,7)	116,2
6′	8,02 d (8,8)	131,5	6′	7,64 dd (8,7/2,0)	123,3
O-*β*-D-γαλακτοπυρανόση				**O-*β*-D-γαλακτοπυρανόση**	
1′′	5,66 d (7,8)	99,2	1′′	5,40 d (7,8)	101,2
2′′	5,18 dd (9,6/7,8)	72,8	2′′	4,00 dd (9,6/7,8)	79,9
3′′	3,67 dd (9,6/3,3)	71,3	3′′	3,72 dd (9,6/3,3)	75,1
4′′	3,73 d (3,3)	68,4	4′′	3,84 brd (3,3)	70,1
5′′	3,45 m	76,3	5′′	3,45 brt (6,0)	77,1
6′′	3,45 dd (11,8/5,8)	60,5	6′′	3,62 dd (11,3/5,8)	61,9
	3,32 dd (11,8/6,3)			3,56 dd (11,3/6,3)	
***E*- κουμαρόϋλ**				**O-*β*-D-ξυλοπυρανόση**	
1′′′	-	125,7	1′′′	4,76 d (6,6)	105,2
2′′′/6′′′	7,50 d (8,4)	130,8	2′′′	3,39 m	74,6
3′′′/5′′′	6,78 d (8,4)	116,3	3′′′	3,39 m	76,8
4′′′	-	159,9	4′′′	3,50 m	70,8
7′′′	7,55 d (16,1)	145,5	5′′′	3,95 dd (11,8/4,9)	66,4
8′′′	6,35 d (16,1)	114,8		3,24 dd (11,8/9,4)	
9′′′	-	168,4			

Από την παραπάνω μελέτη συμπεράναμε ότι ο μεταβολίτης **Llo 25** είναι το φυσικό προϊόν **3-O-(2''-O-*β*-D-ξυλοπυρανοσυλο)-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλοκερκετίνη.** Η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 593,1510 $[M-H]^-$ στο φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή. Ο προτεινόμενος μοριακός τύπος για την κορυφή αυτή είναι $C_{27}H_{29}O_{15}$ και ο βαθμός ακορεστότητας 13. Στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται και η κορυφή που αντιστοιχεί στο ιόν της καιμπφερόλης m/z 301,0367 $[M^{-}292,09]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{15}H_9O_7$ και βαθμό ακορεστότητας 11. Επίσης εμφανής είναι και η κορυφή m/z 447.0944 $[M^{-}-146.05]^-$ η οποία αντιστοιχεί στο ιόν που προκύπτει όταν από το μόριο απομακρύνεται μια ξυλόση. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.27.

Τα προϊόντα **Llo 26** και **Llo 27** απομονώθηκαν κατά την επεξεργασία του κλάσματος 38 του CCC με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού χρησιμοποιώντας ως πληρωτικό υλικό τη ρητίνη Sephadex-LH20. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε αποκάλυψε πως πρόκειται για τα φυσικά προϊόντα **3-O-(2''-O-κουμαροϋλο)-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο-7-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη** (L.lo 26), και **3-O-(2''-O-κουμαροϋλο)-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο-7-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκερκετίνη** (L.lo 27).



Llo 26

Στο φάσμα ^{1}H-NMR του **Llo 26** διακρίνονται εύκολα ένας πυρήνας καιμπφερόλης, μία κουμαροϋλο-ομάδα καθώς και τα σήματα δύο σακχάρων στην οξυγονωμένη περιοχή. Τα πρωτόνια της καιμπφερόλης συντονίζονται στα 8.04 και 6.88 ppm ως διπλές κορυφές (J = 8.7 Hz) που αντιστοιχούν στα H-2′ / H-6′ και H-3′ / H-5′ του *πάρα*-συστήματος του δακτυλίου Β καθώς και δύο διπλές κορυφές (J = 2,0 Hz) στα 6.45 και 6.70 ppm που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 και H-8 του δακτυλίου Α. Στην ίδια περιοχή του φάσματος εμφανίζονται και τα σήματα της κουμαροϋλο-ομάδας ως δύο διπλές

κορυφές (*J* = 8,6 Hz) που ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμιά (7.43 και 6.81 ppm, για τα πρωτόνια H-2′′′ / H-6′′′ και H-3′′′ / H-5′′′) καθώς και δύο διπλές κορυφές (*J* = 16,1 Hz) στα 7,64 και 6,34 pmm οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-7′′′ και H-8′′′ αντίστοιχα. Η σταθερά σύζευξης 16,1 Hz των πρωτονίων H-7′′′ και H-8′′′ επιβεβαιώνει τον *trans*-προσανατολισμό του διπλού δεσμού της κουμαροϋλο-ομάδας.

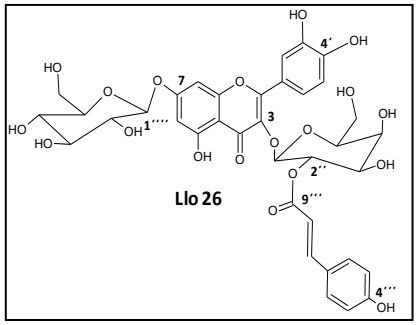
Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος ^{1}H NMR παρατηρούμε τα χαρακτηριστικά σήματα δύο σακχάρων. Η επιπλέον μελέτη των φασμάτων COSY και HSQC-Dept βοήθησε στην ταυτοποίηση τους ως β-γλυκοπυρανόση και *β*-γαλακτοπυρανόση. Το ανωμερικό πρωτόνιο της β-γλυκοπυρανόσης συντονίζεται στα 5.01 ppm ως διπλή κορυφή (*J* = 7.5 Hz) με τον αντίστοιχο άνθρακα να συντονίζεται στα 101,5 ppm. Στο φάσμα HMBC παρατηρούμε σήμα σύζευξης (J^3) μεταξύ του πρωτονίου αυτού και του οξυγονωμένου άνθρακα C-7 (164,5 ppm), ο οποίος με τη σειρά του συζευγνύεται (J^2) με τα πρωτόνια H-6 και H-8. Το γεγονός αυτό πιστοποιεί τη σύνδεση της β-γλυκοπυρανόσης στη θέση 7 της καιμπφερόλης και δικαιολογεί την παρατηρούμενη αποθωράκιση των πρωτονίων H-6 και H-8 του Α δακτυλίου.

Το ανωμερικό πρωτόνιο της *β*-γαλακτοπυρανόσης συντονίζεται στα 5.61 ppm ως διπλή κορυφή (*J* = 7.8 Hz) και εμφανίζει σήμα σύζευξης, στο φάσμα HMBC, με έναν άνθρακα στα 135,0 ppm (C-3) γεγονός που αποδεικνύει την σύνδεση του σακχάρου στην θέση 3 της καιμπφερόλης. Από τη μελέτη του φάσματος COSY διαπιστώνουμε ότι το πρωτόνιο H-2′′ της *β*-γαλακτοπυρανόσης συντονίζεται στα 5.35 ppm (dd, *J* = 9,6/7.8 Hz). Η αποθωράκιση αυτή είναι ισχυρή ένδειξη της ακυλίωσης στη θέση αυτή, με το κουμαρικό οξύ. Πράγματι στο φάσμα HMBC παρατηρούμε το σήμα σύζευξης μεταξύ του παραπάνω πρωτονίου και ενός καρβονιλικού άνθρακα στα 168,6 ppm ο οποίος με τη σειρά του δίνει σήμα σύζευξης με το H-7 του κουμαρικού οξέος. Έτσι διαπιστώσαμε ότι το κουμαρικό οξύ βρίσκεται ενωμένο στη θέση 2 της γαλακτόζης.

Από τα παραπάνω συμπεράναμε ότι ο μεταβολίτης **Llo 26** είναι το νέο φυσικό προϊόν **3-O-(2′′-O-κουμαρόϋλο)-*β*-D-γαλακτοπυρανόσυλο-7-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη.** Το φάσμα HRMS της ουσίας επιβεβαιώνει την

παραπάνω δομή καθώς παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 755,1836 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή είναι $C_{36}H_{35}O_{18}$ και βαθμό ακορεστότητας 19. Στο ίδιο φάσμα εμφανίζονται και οι κορυφές: m/z 593,1314 $[M^{-}162,05]^-$ $[C_{30}H_{25}O_{13}$, (M- εξόζη)], m/z 447.0943 $[M^{-}308,09]^-$ $[C_{21}H_{19}O_{11}$ (M-εξόζη-κουμαρικό οξύ)] καθώς και m/z 285,0411 $[M^{-}470,14]^-$ (καιμπφερόλη).

Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.28.



Στο φάσμα ^{1}H-NMR του **Llo 27** γίνεται εύκολα αντιληπτό πως πρόκειται για παρόμοια δομή με αυτήν του μεταβολίτη **Llo 26.** Η βασική διαφορά στα δύο φάσματα εντοπίζεται στην αρωματική περιοχή όπου παρατηρούμε την αντικατάσταση του *πάρα*-συστήματος του δακτυλίου Β της καιμπφερόλης με ένα ABX υποκατεστημένο αρωματικό σύστημα δηλώνοντας την παρουσία του σκελετού της κερκετίνης στο μόριο. Οι κορυφές του ABX συστήματος συντονίζονται στα 7,71 (d *J*=2,2 Hz), 7,58 (dd *J*=8,7/2,2 Hz) και 6,88 (d *J*=8,7Hz) ppm και αντιστοιχούν στα πρωτόνια Η-2΄, Η-6΄ και Η-5΄αντίστοιχα. Τα πρωτόνια του Α δακτυλίου εμφανίζονται αποθωρακισμένα στα 6,45 και 6,73 ppm, δηλώνοντας την σύνδεση σακχάρου στο υδροξύλιο της θέσης 7.

Εκτός της κερκετίνης, τα υπόλοιπα τμήματα της ένωσης εμφανίζονται ίδια με αυτά του μεταβολίτη **Llo 26.** Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων COSY, HSQC-Dept και HMBC επιβεβαίωσε την παρουσία τόσο της κουμαροϋλο-ομάδας όσο και των σακχάρων β-γλυκοπυρανόση και *β*-γαλακτοπυρανόση. Στο φάσμα HMBC παρατηρούμε τις ίδιες συζεύξεις για τα ανωμερικά πρωτόνια των σακχάρων όπως και στο αντίστοιχο φάσμα του **Llo 26** δηλώνοντας έτσι ότι η β-γλυκοπυρανόση βρίσκεται συνδεδεμένη με το υδροξύλιο της θέσης 7 ενώ η *β*-γαλακτοπυρανόση ενώνεται με το υδροξύλιο της θέσης 3 της κερκετίνης. Η αποθωράκιση του Η-2 της *β*-γαλακτοπυρανόσης είναι επίσης ορατή (5,36 ppm) δηλώνοντας την ακυλίωση στη

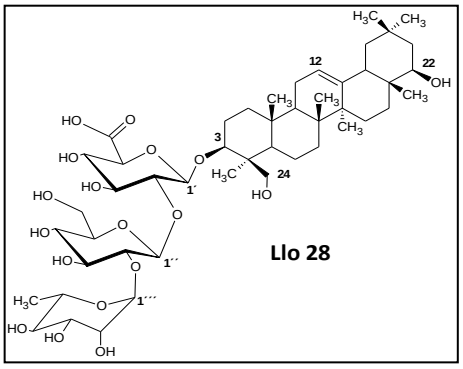
θέσης αυτή. Πράγματι στο φάσμα HMBC παρατηρούμε το σήμα σύζευξης μεταξύ του πρωτονίου H-2΄΄ και του καρβονυλικού άνθρακα της κουμαροϋλο-ομάδα στα 168,6 ppm.

Από τα παραπάνω συμπεράναμε ότι ο μεταβολίτης **Llo 27** είναι το νέο φυσικό προϊόν **3-O-(2΄΄-O-κουμαρόϋλο)-*β*-D-γαλακτοπυρανόσυλο-7-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο κερκετίνη.** Το φάσμα HRMS της ουσίας επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή καθώς παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 771,1790 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή είναι $C_{36}H_{35}O_{19}$ και βαθμό ακορεστότητας 19. Στο ίδιο φάσμα εμφανίζονται και οι κορυφές: m/z 609,1268 $[M^{-}162,05]^-$ $[C_{30}H_{25}O_{14}$ (M- εξόζη)], m/z 463.0893 $[M^{-}308,09]^-$ $[C_{21}H_{19}O_{12}$ (M-εξόζη-κουμαρικό οξύ)] και m/z 301,0365 $[M^{-}470,14]^-$ που αντιστοιχεί στο ιόν της κερκετίνης. Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό τα φάσματα μάζας των δύο παραπάνω ουσιών παρουσιάζουν παρόμοια θραυματοποίηση με την διαφορά να εντοπίζεται στο επιπλέον άτομο οξυγόνου που χαρακτηρίζει τις βασικές κορυφές του φάσματος του **Llo 27** σε σχέση με αυτό του **Llo 26.**

Πίνακας 6.4.28: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της **3-O-(2''-O-καφεόϋλο)-γαλακτοπυρανόσυλο-7-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη** (L.lo 26), και **3-(2''-καφεόϋλ)-γαλακτοπυρανόσυλο-7-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκερκετίνη** (L.lo 27).

	L.lo 26		**L.lo 27**	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)
2		158,6		158,8
3		135,0		135,0
4		179,0		178,9
5		162,3		162,3
6	6,45 d (2,0)	100,5	6,45 d (2,0)	100,5
7		164,5		164,5
8	6,70 d (2,0)	95,5	6,73 d (2,0)	95,5
9		157,5		157,3
10		107,4		107,4
1′		122,0		121,7
2′	8,04 d (8,7)	132,2	7,71 d (2,2)	117,2
3′	6,88 d (8,7)	116,0		145,4
4′		161,4		150,2
5′	6,88 d (8,7)	116,0	6,88 d (8,7)	116,0
6′	8,04 d (8,7)	132,2	7,58 dd (8,7/2,2)	123,5
3-O-*β*-D-γαλακτοπυρανόση			**3-O-*β*-D-γαλακτοπυρανόση**	
1′′	5,61 d (7,8)	100,8	5,60 d (7,8)	100,8
2′′	5,35 dd (9,8/7,8)	74,1	5,36 dd (9,8/7,8)	74,1
3′′	3,78 dd (9,8/3,3)	73,2	3,78 dd (9,8/3,3)	73,2
4′′	3,89 d (3,3)	70,2	3,89 d (3,3)	70,2
5′′	3,45 m	77,0	3,45 m	77,0
6′′	3,61 dd (11,8/5,8)	61,8	3,67 dd (11,8/5,8)	61,8
	3,56 dd (11,8/6,3)		3,59 dd (11,8/6,3)	
***E*-κουμαροϋλο-ομάδα**			***E*-κουμαροϋλο-ομάδα**	
1′′′	-	127,0	-	127,0
2′′′/6′′′	7,43 d (8,6)	131,1	7,43 d (8,6)	131,1
3′′′/5′′′	6,81 d (8,6)	116,7	6,80 d (8,6)	116,7
4′′′	-	161,8	-	161,8
7′′′	7,64 d (16,1)	146,7	7,64 d (16,1)	146,7
8′′′	6,34 d (16,1)	115,1	6,35 d (16,1)	115,1
9′′′	-	168,6	-	168,6
7-O-*β*-D-γλυκοπυρανόση			**7-O-*β*-D-γλυκοπυρανόση**	
1′′′′	5.01 d (*J*= 7.5)	101.5	5.01 d (*J*= 7.5)	101.5
2′′′′	3.48 dd (*J*= 9.2/7.5)	74.6	3.48 dd (*J*= 9.2/7.5)	74.6
3′′′′	3.56 t (*J*= 9.2)	77,4	3.56 t (*J*= 9.2)	77,4
4′′′′	3.38 t (*J*= 9.2)	71,1	3.38 t (*J*= 9.2)	71,1
5′′′′	3.50 m	78,0	3.50 m	78,0
6′′′′	3.91 dd (*J*= 11.9/2.4)	62,2	3.91 dd (*J*= 11.9/2.4)	62,2
	3.68 dd (*J*= 11.9/5.5)		3.68 dd (*J*= 11.9/5.5)	

Το προϊόν **Llo 28** αποτελεί τον πιο πολικό μεταβολίτη που απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού και παραλήφθηκε σε καθαρή μορφή κατά την επεξεργασία του κλάσματος 32 του CCC με παρασκευαστική TLC. Η μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, COSY, HSQC-Dept, HMBC και HRMS που ακολούθησε αποκάλυψε πως πρόκειται για την τριτερπενική σαπωνίνη **Αζουκισαπωνίνη V**.



Το φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη **Llo 28** εμφανίζει την χαρακτηριστική εικόνα μιας σαπωνίνης με τα σήματα στην οξυγονωμένη περιοχή να υποδεικνύουν την παρουσία τουλάχιστον τριών σακχάρων ενώ αυτά στην αλειφατική περιοχή δηλώνουν την παρουσία ενός τριτερπενικού άγλυκου. Ο αριθμός των κορυφών που αντιστοιχούν σε μεθύλια στο φάσμα ^{1}H NMR και το γεγονός ότι δεν εμφανίζονται διπλές κορυφές που αντιστοιχούν σε πρωτόνια μεθυλίων αποτελεί ένδειξη της ύπαρξης ενός πεντακυκλικού τριτερπενίου με σκελετό ολεανίου. Η μελέτη των φασμάτων ^{13}C-NMR, COSY, HSQC-Dept και HMBC αποκάλυψε ότι στον ολεανικό σκελετό υπάρχουν δύο οξυγονωμένοι άνθρακες (C-3 και C-22), ένας διπλός δεσμός (Δ^{12}) καθώς και μία υδροξυμεθυλενομάδα στη θέση C-24.

Πιο συγκεκριμένα η παρουσία του διπλού δεσμού Δ^{12} υποδεικνύεται από την κορυφή στο φάσμα ^{1}H NMR στα 5.26 ppm (t, *J* = 3.5 Hz) που αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης C-12. Επιπλέον, ο τεταρτοταγής C-13 συντονίζεται στα 145,0 ppm στο φάσμα ^{13}C NMR, ενώ ο C-12 εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία (*δ* 124,2). Η παρουσία του *β*-υδροξυλίου στη θέση 3 υποδεικνύεται από την διπλά διπλή κορυφή στα 3.42 ppm (dd, *J* = 10.6, 3.9 Hz) που αντιστοιχεί στο H-3, ενώ οι μεγάλες σταθερές σύζευξης υποδηλώνουν την αξονική διευθέτησή του. Ο C-3 εμφανίζεται αρκετά αποθωρακισμένος και συντονίζεται στα 92,4 ppm (HSQC-Dept) γεγονός που υποδεικνύει την παρουσία σακχάρου στο υδροξύλιο αυτής της θέσης. Το πρωτόνιο H-22 συντονίζεται σε *δ* 3,40 και ο αντίστοιχος άνθρακας στα 77,2 ppm φανερώνοντας την παρουσία μιας υδρόξυ ομάδας στη θέση αυτή. Τα πρωτόνια της

υδροξυμεθυλ ομάδας στη θέση C-24 συντονίζονται σε *δ* 4,15 και 3,21 ως δύο διπλές κορυφές (*J* = 11,4 Hz) ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας σε *δ* 64,2.

Η παρουσία τριών σακχάρων στο μόριο αποδεικνύεται από την εμφάνιση στο φάσμα πρωτονίου τριών κορυφών ανωμερικών πρωτονίων σε *δ* 5,16 (brs), 4,90 (d, J=7,7 Hz) και 4,46 (d, J=7,7 Hz) των οποίων οι αντίστοιχοι (ανωμερικοί) άνθρακες συντονίζονται στα 102,4, 102,2 και 105,6 ppm. Με τη βοήθεια των φασμάτων COSY, HSQC-Dept και HMBC τα σάκχαρα αυτά ταυτοποιήθηκαν ως *α*-ραμνοπυρανόση, *β*-γλυκοπυρανόση και *β*-γλυκουρονικό οξύ αντίστοιχα, ενώ τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4.29. Σημαντικά στοιχεία για την ταυτοποίηση του γλυκουρονικού οξέος ήταν τόσο η απουσία των πρωτονίων H-6 της εξόζης όσο και η ύπαρξη συζευξεων στο φάσμα HMBC, μεταξύ των πρωτονίων H-4′ (J^3) και H-5′ (J^2) και του καρβονυλικό άνθρακα C-6′ (176,7 ppm).

Το φάσμα HMBC αποδείχτηκε πολύτιμο εργαλείο στον καθορισμό της συνδεσης των σακχάρων. Το σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου H-1′ του *β*-γλυκουρονικού οξέος (*δ* 4,46) με τον άνθρακα C-3 στα 92,4 ppm υποδεικνύει την σύνδεση αυτού του σακχάρου στο υδροξύλιο της θέσης 3 της γενίνης. Τόσο το πρωτόνιο H-2′ (δ 3,76) όσο και ο αντίστοιχος άνθρακας (δ 77,6) του γλυκουρονικού οξέος εμφανίζονται αποθωρακισμένα υποδεικνύοντας την O-γλυκοσυλίωση της θέσης αυτής. Πράγματι το σήμα σύζευξης στο φάσμα HMBC μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου H-1′′ της *β*-γλυκοπυρανόσης (*δ* 4,90) και του άνθρακα C-2 του γλυκουρονικού οξέος υποδεικνύει 1→2 σύνδεση των δύο αυτών σακχάρων. Τέλος, στο ίδιο φάσμα, παρατηρούμε και το σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου H-1′′′ της α-ραμνοπυρανόσης (*δ* 5,16) με τον άνθρακα C-2′′ της *β*-γλυκοπυρανόσης (*δ* 78,3).

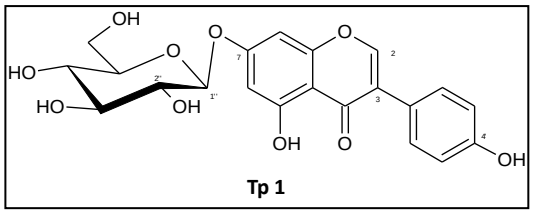
Στο φάσμα HRMS παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 941,5121 $[M-H]^-$ (με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{48}H_{77}O_{18}$ και βαθμό ακορεστότητας 10). Στο φάσμα MS-MS της κορυφής του μοριακού ιόντος εμφανίζονται και οι κορυφές: m/z 795,45 $[M-146,06]^-$ (M- πεντόζη), m/z 633,29 $[M-308,03]^-$ (M-πεντόζη-εξόζη) και m/z 457,57 $[M-483,75]^-$ (M-πεντόση-εξόση-εξουρονικό οξυ) που αντιστοιχεί στο ιόν του αγλύκου.

Από τα παραπάνω συμπεράναμε ότι ο μεταβολίτης **Llo 28** είναι η τριτερπενική σαπωνίνη **3-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-(1→2)-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-(1→2)-*β*-D-γλυκουρονοπυρανοσυλο-σοϋαπογενόλη Β ή Αζουκισαπωνίνη V**. Η σύγκριση των πειραματικών τιμών με βιβλιογραφικά δεδομένα που υπάρχουν για την προαναφερόμενη ουσία επιβεβαιώνει τη δομή της **Αζουκισαπωνίνης V**[402,403,404]**.** Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.29.

Πίνακας 6.4.29: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της Αζουκισαπονίνης V (L.lo 28).

	L.lo 28 (MeOD)				
Τριτερπένιο			Σάκχαρα		
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
1	1,66/1,04	39,9		*β*-D-Γλυκουρονικό οξύ	
2	2,14/1,85	27,5	1′	4,46 d (7,7)	105,6
3	3,42 dd (10,6/3,9)	92,4	2′	3,76 dd (9,5/7,7)	77,6
4	-	44,7	3′	3,63 t (9,5)	78,8
5	0,96 m	57,6	4′	3,42 t (9,5)	74,3
6	1,64/1,37	19,6	5′	3,56 d (9,5)	76,8
7	1,56/1,40 m	34,3	6′	-	176,7
8	-	40,8		*β*-D-Γλυκοπυρανόση	
9	1,60 m	49,2	1′′	4,90 d (7,7)	102,2
10	-	37,6	2′′	3,66 dd (9,5/7,7)	78,3
11	1,89 m	25,1	3′′	3,66 t (9,5)	76,8
12	5,26 t (3,5)	124,2	4′′	3,74 t (9,5)	71,8
13	-	145,0	5′′	3,51 m	76,5
14	-	43,7	6′′	3,77 m	62,2
15	1,78/1,05	27,3		3,73 m	
16	1,74/1,33	30,2		*α*-L-Ραμνοπυρανόση	
17	-	38,9	1′′′	5,16 brs	102,4
18	2,06	47,2	2′′′	3,92 brs	72,4
19	1,75/0,97	47,6	3′′′	3,74 dd (9,6/3,3)	72,0
20	-	31,6	4′′′	3,42 t (9,6)	74,4
21	1,46/1,23	42,5	5′′′	4,13 m	69,8
22	3,40 m	77,2	6′′′	1,30 d (6,4)	18,4
23	1,28 s	23,7			
24	4,15 d (11,4)	64,2			
	3,21 d (11,4)				
25	0,91 s	16,5			
26	0,99 s	17,8			
27	1,13 s	23,8			
28	0,85 s	20,6			
29	1,02 s	29,5			
30	0,93 s	32,9			

6.4.4 Tetragonolobus purpureus



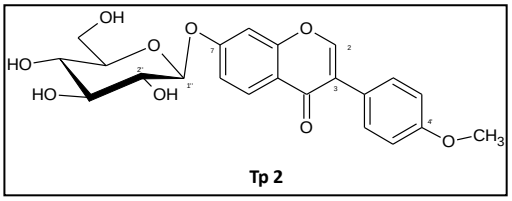
Το προϊόν **T.p 1** παραλήφθηκε με τη μορφή άμορφης κίτρινης σκόνης κατά την επεξεργασία του υδατικού εκχυλίσματος αρχικά με CCC και στη συνέχεια με επεξεργασία του κλάσματος 24-25 με παρασκευαστική TLC. Στον ποιοτικό έλεγχο με TLC η ουσία αυτή χαρακτηριζόταν από έντονη απορρόφηση στο U.V. (στα 254 και 365 nm), ενώ μετά τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης εμφάνισε έντονο κίτρινο χρώμα. Η μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, COSY, HMQC και HMBC της ουσίας έδειξε ότι πρόκειται για ένα γλυκοσίδη ισοφλαβόνης, και συγκεκριμένα την **7-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο γεντιστεϊνη ή Γενιστίνη.**

Πιο συγκεκριμένα στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR παρατηρήσαμε τις χαρακτηριστικές κορυφές της γεντισεϊνης δηλαδή μία απλή κορυφή στα 8.10 ppm η οποία αντιστοιχεί στο χαρακτηριστικό πρωτόνιο H-3 των ισοφλαβονών, δύο διπλές κορυφές (*J*= 2.0 Hz) στα 6.68 και 6.48 ppm οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-8 και H-6 καθώς επίσης και δύο διπλές κορυφές (*J*= 8.5 Hz) σε *δ* 7.32 και 6.78, που η καθεμία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχούν σε ένα πάρα υποκατεστημένο αρωματικό σύστημα. Στην οξυγονωμένη περιοχή του ίδιου φάσματος εμφανίζονται επτά κορυφές οι οποίες δηλώνουν την παρουσία σακχάρου στο μόριο. Από την περαιτέρω μελέτη των φασμάτων δύο διαστάσεων COSY και HSQC-DEPT διαπιστώθηκε η παρουσία της *β*-γλυκοπυρανόσης.

Η αποθωράκιση των πρωτονίων 6 και 8 της καιμπφερόλης αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι το ένα από τα δύο σάκχαρα είναι συνδεδεμένο στη θέση 7 της γενίνης. Αντίθετα οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων 2΄,6΄και 3΄,5΄ειναι παρόμοιες με τις αντίστοιχες της γενιστεϊνης γεγονός που δηλώνει ότι στη θέση 4΄ δεν υπάρχει σάκχαρο. Το σήμα σύζευξης, στο φάσμα HMBC, μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου H-1΄΄ της γλυκόζης (*δ* 5.05) και του άνθρακα στα 164.6 ppm (C-7) αποδεικνύει ότι πράγματι το σάκχαρο αυτό βρίσκεται συνδεδεμένο στη θέση 7 της γενίνης.

Η παραπάνω δομή για το προϊόν T.p 1 επιβεβαιώνεται τόσο από το φάσμα μάζας HRMS όπου παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 431,0953 [M-H] (προτεινόμενος μοριακός τύπος $C_{21}H_{19}O_{10}$) όσο και από την σύγκριση των πειραματικών δεδομένων με αυτά που υπάρχουν στην βιβλιογραφία[405,406,407]. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.30.

Το προϊόν **T.p 2** απομονώθηκε από το ίδιο κλάσμα και ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με το προϊόν **T.p 1** .Στον έλεγχο με TLC εμφανίστηκε λιγότερο πολικό από το **T.p 1** διαθέτοντας όμως τα ίδια χαρακτηριστικά με αυτό δηλαδή απορροφούσε έντονα στο U.V. (στα 254 και 365 nm), ενώ μετά τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης έδωσε κίτρινο χρώμα. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε αποκάλυψε πως πρόκειται για την ουσία **7-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο φορμονονετίνη (ονονίνη).**



Tp 2

Στο φάσμα πρωτονίου εμφανίζονται τα σήματα μιας ισοφλαβόνης στην αρωματική περιοχή και ενός σακχάρου στην οξυγονωμένη. Επιπλέον παρατηρούμε και μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια σε *δ* 3.83 η οποία παραπέμπει σε μια μεθόξυ ομάδα. Η συνδυασμένη μελέτη των φασμάτων ^{1}H NMR, COSY, HSQC-DEPT και HMBC έδειξε ότι η ισοφλαβόνης διαθέτει ένα ABX υποκατεστημένο δακτύλιο A [*δ* 8.16 d (J=8.7 Hz), *δ* 7,27 d (J=2,5 Hz) και *δ* 7,23 dd (J=8,7/2,5 Hz)] καθώς και ένα πάρα υποκατεστημένο δακτύλιο B [*δ* 7,49 d (J=8.9 Hz), *δ* 7,00 d (J=8,9 Hz)].

Στο φάσμα HMBC παρατηρούμε μια σύζευξη μεταξύ της κορυφής της μεθοξυ-ομάδας και του οξυγονωμένου αρωματικού άνθρακα στα 161.1 ppm ο οποίος με τη σειρά του συνδέεται με τα πρωτόνια H-2΄/H-6΄. Το γεγονός αυτό τοποθετεί την μεθόξυ ομάδα στη θέση 4΄του μορίου οδηγώντας στο συμπέρασμα πως η γενίνη της ένωσης είναι η Φορμονονετίνη.

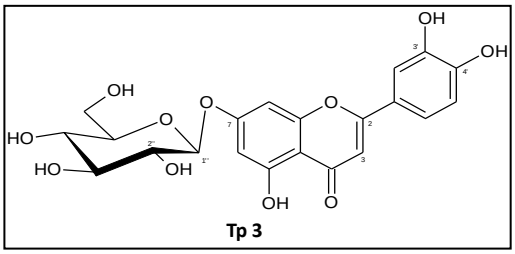
Πίνακας 6.4.30: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της **7- O-*β*-D -γλυκοπυρανόσυλο γεντισεϊνη** (T.p 1), και **7- O-*β*-D -γλυκοπυρανόσυλο φορμονονετίνη** (T.p 2)

	T.p 1		**T.p 2**		
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
2	8.10 s	154.8	2	8.24 s	155.2
3		125.2	3		125.3
4		182.6	4		177.8
5		163.6	5	8.16 d (8.7)	128.3
6	6,48 d (2,0)	100,9	6	7.23 dd (8.7/2,5)	117.0
7		164.6	7		163.7
8	6,68 d (2,0)	95.5	8	7.27 d (2,5)	104.9
9		159,2	9		159.2
10		107.4	10		120.4
1′		121.0	1′		125.7
2′	7.32 d (8.5)	131.4	2′	7.49 d (8.9)	131.3
3′	6.78 d (8.5)	117.5	3′	7.00 d (8.9)	114.9
4′		162.2	4′		161.1
5′	6.78 d (8.5)	117,5	5′	7.00 d (8.9)	114.9
6′	7.32 d (8.5)	131.4	6′	7.49 d (8.9)	131.3
			-CH_3	3,83 s	55.7
1′′	5.05 d (7.8)	101.4	1′′	5.12 d (7.8)	101.8
2′′	3.49 dd (9.5/7.8)	74.7	2′′	3.52 dd (9.5/7.8)	74.6
3′′	3.52 t (9.5)	77.8	3′′	3.53 t (9.5)	78.0
4′′	3.42 t (9.5)	71.6	4′′	3.42 t (9.5)	71.2
5′′	3.53 m	78.2	5′′	3.56 m	78.5
6′′	3.92 dd (11.3/2.0) 3,72 dd (11,3/5.8)	62.3	6′′	3.92 dd (11.3/2.0) 3,72 dd (11,3/5.8)	62.3

Όσον αφορά το σακχαριδικό τμήμα του μορίου η παραπάνω μελέτη έδειξε πως πρόκειται για την *β*-γλυκοπυρανόση. Το σήμα σύζευξης στο φάσμα HMBC μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου του σακχάρου (*δ* 5,12) και του άνθρακα 7 της φορμονετίνης επιβεβαιώνει την θέση σύνδεσης της γλυκόζης στο μόνο διαθέσιμο

ελεύθερο υδροξύλιο του άγλυκου. Έτσι συμπεράναμε ότι το προϊόν **T.p 2** είναι η ουσία **7- O-*β*-D -γλυκοπυρανόσυλο φορμονονετίνη (Ονονίνη).**

Στο φάσμα μάζας HRMS παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 429,1229 [M-H] με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{22}H_{22}O_9$ ο οποίος συμφωνεί με την παραπάνω δομή. Επίσης τα πειραματικά φασματοσκοπικά δεδομένα βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με αυτά που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για τον παραπάνω μεταβολίτη[407,408]. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.30.



Tp 3

Ο μεταβολίτης **T.p 3** παραλήφθηκε σε καθαρή μορφή μετά την ανάλυση του κλάσματος 27 του CCC με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού. Στον έλεγχο με TLC εμφάνισε τα χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών δηλαδή απορρόφηση στο UV στα 254 και 365 nm και εμφάνιση κίτρινου χρώματος κηλίδας μετά τον ψεκασμό της χρωματογραφικής πλάκας με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση. Ο φασματοσκοπικός έλεγχος που ακολούθησε έδειξε ότι πρόκειται για γλυκοσιδικό παράγωγο φλαβόνης και συγκεκριμένα για την **7- O-*β*-D -γλυκοπυρανοσυλο λουτεολίνη.**

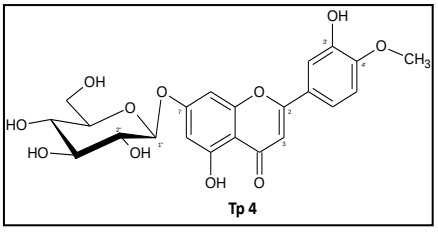
Η παρουσία της λουτεολίνης γίνεται εύκολα αντιληπτή στο φάσμα ^{1}H-NMR της ουσία T.p 3 λόγω των χαρακτηριστικών κορυφών που εμφανίζονται στην αρωματική περιοχή του φάσματος. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε τις κορυφές του ABX υποκατεστημένου δακτυλίου Β σε *δ* 7.41 (dd, *J*=8.5/2.2 Hz), 7.39 (d, *J*=2.2 Hz) και 6.88 (d, *J*=8.5 Hz), μία απλή κορυφή στα 6.65 ppm που αντιστοιχεί στο H-3 (χαρακτηριστική κορυφή φλαβονών) καθώς επίσης και δύο διπλές κορυφές με *J*=2.2 Hz σε *δ* 6.80 και 6.49 και οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-8 και H-6 του δακτυλίου Α.

Στην οξυγονωμένη περιοχή του ίδιου φάσματος εμφανίζονται τα σήματα ενός σακχάρου, το ανωμερικό πρωτόνιο του οποίου εμφανίζεται με τη μορφή διπλής

κορυφής σε *δ* 5.07 με *J*=7,8 Hz ενώ τα υπόλοιπα πρωτόνια εμφανίζονται στην περιοχή 4.00 ως 3.40 ppm. Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων COSY και HSQC-DEPT βοήθησε στην ταυτοποίηση του σακχάρου ως *β*-γλυκοπυρανόση. Το σήμα σύζευξης (J^3) μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου H-1΄΄ και του άνθρακα C-7 στα 164,6 ppm δείχνει ότι η γλυκόζη είναι συνδεδεμένη στη θέση 7 της γενίνης, γεγονός που δικαιολογεί και την αποθωράκιση των πρωτονίων του δακτυλίου Α.

Με βάση τα παραπάνω καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η ουσία **T.p 3** είναι η **7-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλολουτεολίνη**. Το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή καθώς παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 447,0902 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{21}H_{19}O_{11}$. Επίσης στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται η κορυφή m/z 285.04 $[M-162,05]^-$ η οποία παραπέμπει στο ιόν της λουτεολίνης. Η παραπάνω δομή επιβεβαιώνεται και από την σύγκριση των πειραματικών τιμών με βιβλιογραφικά δεδομένα[409,410,411]. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.31.

Το προϊόν **T.p 4** απομονώθηκε από το υδατικό εκχύλισμα ακολουθώντας την ίδια διαδικασία που χρησιμοποιήσαμε για την απομόνωση του προηγούμενου μεταβολίτη. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε έδειξε πως πρόκειται για την ουσία **7-O-*β*-D -γλυκοπυρανοσυλοδιοσμετίνη.**



Το φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας **T.p 4** έχει μεγάλη ομοιότητα με το αντίστοιχο φάσμα του προϊόντος **T.p 3**. Η μόνες διαφορές μεταξύ των δύο αυτών φασμάτων εντοπίζονται α) στην αρωματική περιοχή όπου είναι εμφανής η αποθωράκιση των πρωτονίων του ABX υποκατεστιμένου αρωματικού πυρήνα Β (δ 7.54 από 7.41 για το Η-6’, 7.44 από 7.39 για το Η-2΄και 7.08 από 6.88 για το Η-5΄) και β) η εμφάνιση μιας απλής κορυφής που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια σε δ 3.95 και παραπέμπει στην ύπαρξη μιας μεθόξυ ομάδας στο μόριο. Η πλήρης ταύτιση όλων των υπολοίπων σημάτων τα οποία αντιστοιχούν στους δακτυλίους Α και C της γενίνης καθώς και

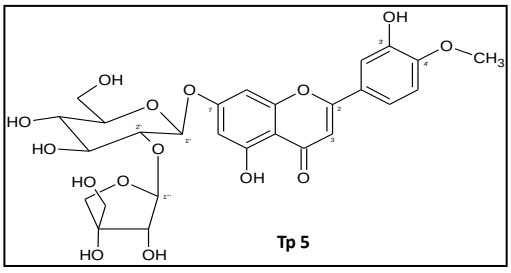
Πίνακας 6.4.31: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της **7-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο λουτεολίνη** (T.p 3), και **7-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη** (T.p 4)

	T.p 3		**T.p 4**		
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
2		166,3	2		166,4
3	6,65 s	104,5	3	6,65 s	104,5
4		183,5	4		183,5
5		162,6	5		162,6
6	6,49 d (2,2)	100,8	6	6,51 d (2,2)	100,8
7		164,6	7		164,6
8	6,80 d (2,2)	95,6	8	6,82 d (2,2)	95,6
9		158,5	9		158,5
10		106,3	10		106,3
1′		124,6	1′		122.5
2′	7,39 d (2,2)	113,7	2′	7,44 d (2,2)	113,7
3′		147,2	3′		147,8
4′		150.8	4′		152,3
5′	6.88 d (8.5)	116.8	5′	7,08 d (8.5)	112,5
6′	7,41 d (8.5/2.2)	120.5	6′	7,54 d (8.5/2.2)	119,9
			$-CH_3$	3,95 s	56,2
1′′	5.07 d (7.8)	101.4	1′′	5.08 d (7.8)	101.3
2′′	3.51 dd (9.5/7.8)	74.7	2′′	3.51 dd (9.5/7.8)	74.4
3′′	3.52 t (9.5)	77.8	3′′	3.52 t (9.5)	77.6
4′′	3.41 t (9.5)	71.6	4′′	3.41 t (9.5)	71.0
5′′	3.54 m	78.2	5′′	3.54 m	78.0
6′′	3.92 dd (11.3/2.0)	62.3	6′′	3.92 dd (11.3/2.0)	62.3
	3,72 dd (11,3/5.8)			3,72 dd (11,3/5.8)	

στα πρωτόνια του σακχάρου (τόσο στα φάσματα ^{1}H-NMR όσο και στα φάσματα δύο διαστάσεων COSY και HMQC-Dept), μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το προϊόν **T.p 4** διαθέτει παρόμοια δομή με αυτήν του **T.p 3** με μία επιπλέον μεθοξυλομάδα συνδεδεμένη σε ένα από τα δύο υδροξύλια του δακτυλίου Β.

Σημαντικό εργαλείο για την αποσαφήνιση της δομής του μορίου αποτέλεσε το φάσμα HMBC. Το σήμα σύζευξης (^{3}J) μεταξύ των πρωτονίων της μεθόξυ ομάδας (3.95 ppm) και του άνθρακα C-4′ στα 152.3 ppm, ο οποίος με τη σειρά του συνδέεται (^{3}J) τόσο με το πρωτόνιο H-2′ (7.44 ppm) όσο και με το H-6′ (7.54 ppm) του δακτυλίου Β τοποθετεί τη μεθοξυλομάδα στη θέση C-4′ της γενίνης υποδεικνύοντας την παρουσία διοσμετίνης. Στο ίδιο φάσμα παρατηρούμε και το σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης με τον άνθρακα C-7 της γενίνης γεγονός που επιβεβαιώνει τη σύνδεση του σακχάρου στη θέση αυτή. Έτσι συμπεράναμε ότι το προϊόν **T.p 4** είναι η ουσία **7-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο διοσμετίνη.**

Η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 461,1058 $[M-H]^-$ (προτεινόμενος μοριακός τύπος $C_{22}H_{21}O_{11}$) στο φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία **T.p 4** έρχεται να επιβεβαιώσει την παραπάνω δομή. Επίσης στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται η κορυφή m/z 299,05 $[M-162,05]^-$ η οποία παραπέμπει στο ιόν της διοσμετίνης. Τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που υπάρχουν για το μόριο[412,413,414]. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.31.



Tp 5

Ο μεταβολίτης **T.p 5** αποτελεί κύριο προϊόν του υδατικού εκχυλίσματος και απομονώθηκε από αυτό κατά την υποβολή του κλάσματος 32 του CCC σε Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού. Στον έλεγχο με TLC εμφάνισε τα χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών δηλαδή απορρόφηση στο UV στα 254 και 365 nm και εμφάνισε κηλίδα κίτρινου χρώματος μετά τον ψεκασμό της χρωματογραφικής πλάκας με μεθανολικό διάλυμα θειικής

βανιλίνης και θέρμανση. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε έδειξε πως πρόκειται για την ουσία **7-O-(2΄΄-*β*-D-απιοφουρανοσυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη.**

Η απόλυτη ταύτιση των σημάτων της αρωματικής περιοχής των φασμάτων ^{1}H-NMR, COSY και HSQC-DEPT των ουσιών **T.p 5** και **T.p 4** δηλώνει ξεκάθαρα ότι τα δύο αυτά μόρια διαθέτουν το ίδιο άγλυκο τμήμα. Η διαφορά μεταξύ των δύο αυτών προϊόντων συνίσταται στην ύπαρξη ενός επιπλέον σακχάρου στο προϊόν **T.p 5** όπως φαίνεται τόσο από τα σήματα στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος ^{1}H-NMR όσο και την ύπαρξη έντεκα οξυγονωμένων ανθράκων στο φάσμα ^{13}C-NMR.

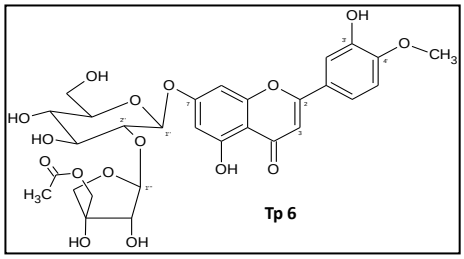
Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος πρωτονίου εμφανίζονται τα ανωμερικά πρωτόνια των δύο σακχάρων σε δ 5,45 (H-1΄΄΄, διπλή κορυφή με *J* = 1.5 Hz) και 5,16 (H-1΄΄ διπλή κορυφή με *J*=7,7 Hz) με τους αντίστοιχους άνθρακες να συντονίζονται στα 110,7 και 100,0 ppm (HSQC-DEPT). Από τη μορφή των ανωμερικών πρωτονίων, την χημική μετατόπιση τους και τη χημική μετατόπιση των αντίστοιχων ανθράκων συμπεράναμε ότι τα δύο σάκχαρα του μορίου είναι μία απιόση και μία εξόση. Η παρουσία εννέα σημάτων στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος ^{13}C-NMR (81.0-60.0 ppm) επιβεβαιώνει την παρουσία μιας πεντόζης και μιας εξόζης στο μόριο. Η περαιτέρο μελέτη των φασμάτων COSY και HSQC-DEPT επιβεβαίωσε την παρουσία της β-απιοφουρανόσης στο μόριο καθώς επίσης συνέβαλε στην ταυτοποίηση της εξόσης ως β-γλυκοπυρανόσης.

Η αποθωράκιση τόσο του πρωτονίου H-2΄΄ (3,69 ppm) αλλά κυρίως του αντίστοιχου άνθρακα (78,3 ppm) της γλυκόζης αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι η απιόση είναι συνδεδεμένη στη θέση αυτή του σακχάρου. Πράγματι το σήμα σύζευξης στο φάσμα HMBC μεταξύ του H-2΄΄ της γλυκόζης (3,69 ppm) και του ανωμερικού άνθρακα C-1΄΄΄ της απιόζης στα 110,7 ppm επιβεβαιώνει την παραπάνω υπόθεση. Στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται και το σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου H-1΄΄ της γλυκόζης (5,16 ppm) και του άνθρακα στα 164,6 ppm (C-7) γεγονός που δηλώνει ότι ο δισακχαρίτης βρίσκεται ενωμένος στο υδροξύλιο της θέσεως 7 της γενίνης.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η υπό μελέτη ουσία είναι το νέο φυσικό προϊόν **7-O-(2΄΄-*β*-D-απιοφουρανοσυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοδιοσμετίνη.** Το

φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή καθώς παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 593,1469 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{27}H_{29}O_{15}$. Επίσης στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται και η κορυφή m/z 461,11 $[M-132,05]^-$ η οποία αντιστοιχεί στο ιόν που προκύπτει από την απομάκρυνση μιας πεντόσης από το μόριο καθώς και η κορυφή m/z 299,05 $[M-294,09]^-$ η οποία παραπέμπει στο ιόν της διοσμετίνης. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.32.

Το προϊόν **T.p 6** απομονώθηκε από το ίδιο κλάσμα και ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με το προϊόν **T.p 5**. Στον έλεγχο με TLC εμφανίστηκε λιγότερο πολικό από το **T.p 5** ενώ η κηλίδα του απορροφούσε έντονα στο U.V. (στα 254 και 365 nm) και εμφάνιζε κίτρινο χρώμα μετά τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο της θειϊκής βανιλλίνης και θέρμανση. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε αποκάλυψε πως πρόκειται για το νέο φυσικό προϊόν **7-*O*-[2΄΄-(5΄΄΄-*O*-ακετυλο)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο]-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοδιοσμετίνη.**



Tp 6

Η μελέτη των φασμάτων ^{1}H-NMR, COSY και HMQC-Dept της ουσίας **T.p 6** έδειξε ότι πρόκειται για έναν διγλυκοσίδη της διοσμετίνης ο οποίος είναι παρόμοιος με το μεταβολίτη **T.p 5**. Η παρουσία του αγλυκού της διοσμετίνης γίνεται εύκολα αντιληπτή τόσο από τις χαρακτηριστικές κορυφές στην αρωματική περιοχή όσο και από την απλή κορυφή της μεθόξυ ομάδας που συντονίζεται σε *δ* 3,95. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλες οι παραπάνω κορυφές συντονίζονται σε ίδια δ με τις αντίστοιχες του φάσματος της ουσίας **T.p 5**. Σε ίδια *δ* συντονίζονται τόσο τα πρωτόνια της γλυκόζης όσο και το ανωμερικό πρωτόνιο της απιοσης γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα δύο σάκχαρα συνδέονται με τον ίδιο τρόπο όπως και στην περίπτωση της ουσίας **T.p 5**.

Πίνακας 6.4.32: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της **7-O-(2′′-*β*-D-απιοφουρανοσυλο)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοδιοσμετίνη** (T.p 5), και **7-O-[2′′-(5′′′-O-ακετυλο)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο]-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοδιοσμετίνη** (T.p 6)

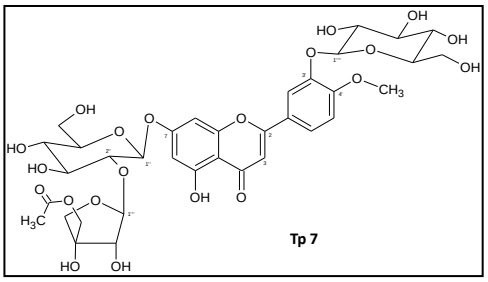
	T.p 5		**T.p 6**	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
2		166,3		166,4
3	6,65 s	104,5	6,65 s	104,5
4		183,5		183,5
5		162,6		162,6
6	6,48 d (2,2)	100,8	6,48 d (2,2)	100,8
7		164,6		164,6
8	6,79 d (2,2)	95,8	6,79 d (2,2)	95,8
9		158,5		158,5
10		106,3		106,3
1′		124,6		124,6
2′	7,44 d (2,2)	113,7	7,44 d (2,2)	113,7
3′		147,8		147,8
4′		152,3		152,3
5′	7,09 d (8.5)	112.5	7,09 d (8.5)	112.5
6′	7,54 d (8.5/2.2)	119,9	7,54 d (8.5/2.2)	119,9
-CH_3	3,95 s	56,2	3,95 s	56,2
1′′	5.16 d (7.7)	100.0	5.16 d (7.7)	100.0
2′′	3.69 dd (9.0/7.7)	78.3	3.69 dd (9.0/7.7)	78.3
3′′	3.63 t (9.0)	78.2	3.63 t (9.0)	78.2
4′′	3.41 t (9.0)	71.0	3.41 t (9.0)	71.0
5′′	3.54 m	78.0	3.54 m	78.0
6′′	3.92 dd (12.3/2.2)	62.3	3.92 dd (12.3/2.2)	62.3
	3,72 dd (12,3/5.9)		3,72 dd (12,3/5.9)	
1′′′	5,45 d (1,5)	110,7	5,45 d (1,5)	110,7
2′′′	3,95 m	77,8	3,95 m	77,8
3′′′	-	80,3	-	80,3
4′′′	4,04 d (9,9)	75,1	4,15 d (9,9)	75,4
	3,82 d (9,9)		3,86 d (9,9)	
5′′′	3,54 s	65,7	4,11 d (11,3)	68,5
			4,06 d (11,3)	
OCO**<u>CH₃</u>**			1,93 s	20,4
O**<u>C</u>**OCH$_3$				171,1

Η σημαντική διαφορά στα φάσματα των δύο αυτών μεταβολιτών εντοπίζεται στη θέση 5 της απιοφουρανόσης όπου παρατηρούμε αποθωράκιση τόσο των H-5′′′ πρωτονίων (*δ* 4.11 και 4.06 αντί 3.54) όσο και του αντίστοιχου άνθρακα (*δ* 68.5 από 65.7). Επίσης στο φάσμα ^{1}H-NMR της ουσίας **T.p 6** παρατηρούμε μια απλή κορυφή σε *δ* 1.93 η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και παραπέμπει σε ακετυλομάδα.

Τα παραπάνω στοιχεία μας οδηγούν στην υπόθεση ότι στη θέση 5 της απιόσης βρίσκεται συνδεδεμένη μία ακετυλομάδα. Τα σήματα σύζευξης του καρβονυλικού άνθρακα σε *δ* 171.1, τόσο με τα πρωτόνια Η-5 της απιοσης όσο και με την απλή κορυφή σε *δ* 1.93 τα οποία παρατηρούνται στο φάσμα HMBC επιβεβαίωσε την παραπάνω υπόθεση.

Ετσι συμπεράναμε ότι η υπό μελέτη ουσία είναι η **7-O-[2΄΄-(5΄΄΄ακετυλ)-*β*-D-απιοφουρανοσυλ]-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη.** Το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσίας επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή καθώς παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 635,1570 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{29}H_{31}O_{16}$. Επίσης στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται και η κορυφή m/z 461,11 $[M-174.05]^-$ καθώς και η κορυφή m/z 299,05 $[M-336.10]^-$ η οποία παραπέμπει στο ιόν της διοσμετίνης. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας δίνονται στον πίνακα 32.

Ο μεταβολίτης **T.p 7** απομονώθηκε από το υδατικό εκχύλισμα κατά την μελέτη του κλάσματος 36 του CCC με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού. Στον έλεγχο που έγινε με TLC το προϊόν αυτό απορροφούσε έντονα στο UV (254 και 365 nm) και εμφάνισε κηλίδα κίτρινου χρώματος κατά τον ψεκασμό της χρωματογραφικής πλάκας με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε έδειξε πως πρόκειται για το νέο φυσικό προϊόν **7-*O*-[2΄΄-(5΄΄΄-*O*-ακετυλο)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο]-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-3΄-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοδιοσμετίνη.**



Στην αρωματική περιοχή του φάσματος πρωτονίου της ουσίας εμφανίζεται μια σειρά σημάτων που παραπέμπουν σε φλαβόνη τύπου λουτεολίνης. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε τις κορυφές του ABX υποκατεστημένου δακτύλιου Β σε *δ* 7.87 (d, *J*=2.2 Hz), 7.73 (dd, *J*=8.5/2.2 Hz), και 7.17 (d, *J*=8.5 Hz), μία απλή κορυφή στα 6.74 ppm που αντιστοιχεί στο Η-3 (χαρακτηριστική κορυφή φλαβονών) καθώς επίσης και δύο διπλές κορυφές με *J*=2.2 Hz σε *δ* 6.89 και 6.41 και οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια Η-8 και Η-6 του δακτυλίου Α. Από της τιμές δ των

πρωτονίων τόσο του δακτυλίου Α όσο και αυτών του δακτυλίου Β (συγκρινόμενες με αυτές της λουτεολίνης[415]) συμπεραίνουμε ότι τα υδροξύλια των δύο αυτών δακτυλίων είναι υποκατεστημένα.

Στην οξυγονωμένη περιοχή του ίδιου φάσματος εμφανίζονται τα σήματα τριών τουλάχιστον σακχάρων (τρεις κορυφές ανωμερικών πρωτονίων σε δ 5.50, 5.18 και 5.00 ενώ τα υπόλοιπα πρωτόνια συντονίζονται στην περιοχή 4.15 με 3.40 ppm) καθώς και μία απλή κορυφή σε δ 3.97 που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και παραπέμπει σε μία μεθόξυ ομάδα. Τέλος σε δ 1.92 εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει επίσης για τρία πρωτόνια και παραπέμπει σε ακετύλιο.

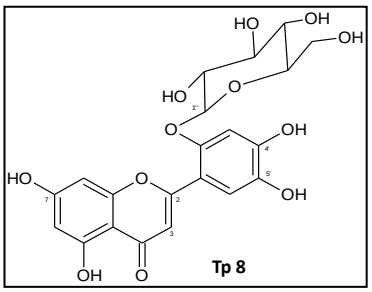
Η μελέτη των φασμάτων COSY και HSQC-DEPT βοήθησε στην ταυτοποίηση των τριών σακχάρων του μορίου ως μία β-απιοφουρανόση και δύο β-γλυκοπυρανόσες. Η αποθωράκιση τόσο του πρωτονίου Η-2 της μίας γλυκόσης όσο και του αντίστοιχου άνθρακα δηλώνει ότι στη θέση αυτή βρίσκεται συνδεδεμένο ένα άλλο σάκχαρο και πιθανότατα η απιόση λόγω των παρόμοιων τιμών *δ* των πρωτονίων των δύο αυτών σακχάρων με τα αντίστοιχα του προϊόντος **T.p 6.** Επίσης η χαρακτηριστική αποθωράκιση τόσο των πρωτονίων Η-5 της απιοφουρανόσης όσο και του αντίστοιχου άνθρακα (παρόμοια με αυτήν του προϊόντος **T.p 6**) αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι στη θέση αυτή του σακχάρου υπάρχει μία ακετυλ-ομάδα.

Σημαντικό εργαλείο για την αποσαφήνιση της δομής του μορίου αποτέλεσε το φάσμα HMBC. Στο φάσμα αυτό παρατηρήσαμε:

- Το σήμα σύζευξης (^3J) μεταξύ των πρωτονίων της μεθόξυ ομάδας (3.97 ppm) και του άνθρακα C-4’ στα 154.2 ppm ο οποίος με τη σειρά του συζευγνύεται (^3J) τόσο με το πρωτόνιο Η-2’ (7.87 ppm) όσο και με το Η-6’ (7.73 ppm) του δακτυλίου Β. Το σήμα αυτό τοποθετεί τη μεθόξυλομάδα στη θέση C-4’ της γενίνης φανερώνοντας την παρουσία αγλύκου τύπου διοσμετίνης.
- Τα σήματα σύζευξης (^3J) ενός καρβονυλικού άνθρακα (*δ* 172.5) τόσο με τα πρωτόνια Η-5’’’ της απιοσης (4,13 και 4,08 ppm) όσο και με την απλή κορυφή στα 1.92 ppm τα οποία επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ακετυλ-ομάδας στη θέση 5’’’ της απιόσης.

- Το σήμα σύζευξης μεταξύ του πρωτονίου H-2΄΄ (3,72 ppm) της γλυκόζης (με ανωμερικό στα 5.18 ppm - COSY) και του ανωμερικού άνθρακα C-1΄΄ της απιόζης στα 110,0 ppm γεγονός που αποδεικνύει ότι η απιόση βρίσκεται συνδεδεμένη στη θέση 2 της γλυκόζης.
- Το σήμα σύζευξης (^3J) μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου H-1΄΄ (δ 5.18) (που ανήκει στη γλυκόζη του δισακχαρίτη) με τον άνθρακα C-7 (δ 164.5) της γενίνης.
- Το σήμα σύζευξης (^3J) μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου H-1΄΄΄΄ (δ 5.00) της δεύτερης γλυκόζης με έναν οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα στα 148.1 ppm, ο οποίος με τη σειρά του συζευγνύεται (^3J) με το H-3' του δακτυλίου B της γενίνης.

Από όλα τα παραπάνω συμπεράναμε ότι η υπό μελέτη ουσία είναι η **7-O-[2΄΄-(5΄΄΄-O-ακετυλο)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο]-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-3΄-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοδιοσμετίνη.** Η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 797.2097 $[M-H]^-$ (προτεινόμενος μοριακός τύπος $C_{35}H_{41}O_{21}$) στο φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία έρχεται να επιβεβαιώσει την παραπάνω δομή. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.33.



Το προϊόν **T.p 8** απομονώθηκε από το κλάσμα 27 του CCC ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με το προϊόντα **T.p 3** και **T.p 4**. Στον έλεγχο με TLC εμφάνισε τα χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών δηλαδή απορρόφηση στο U.V. (στα 254 και 365 nm) και κηλίδα κίτρινου χρώματος μετά τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης και θέρμανση. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε αποκάλυψε πως πρόκειται για την ουσία **2΄-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοϊσοετίνη.**

Στο φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη **T.p 8** γίνεται εμφανές ότι πρόκειται για γλυκοσιδικό παράγωγο φλαβονοειδούς. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος εμφανίζονται πέντε κορυφές εκ των οποίων τρεις απλές και δύο διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 2.2 Hz ενώ στην οξυγονωμένη περιοχή εμφανίζεται μια σειρά σημάτων τα οποία φανερώνουν την παρουσία ενός σακχάρου στο μόριο.

Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων δύο διαστάσεων HSQC-DEPT και HMBC αποκάλυψε πως το άγλυκο τμήμα του μορίου είναι η ισοετίνη. Τα πρωτόνια Η-6 και Η-8 του δακτυλίου Α εμφανίζονται ως διπλές κορυφές με μέτα σύζευξη σε δ 6.13 και 6.34 με τους άνθρακες τους να συντονίζονται στα 100.7 και 95.6 ppm αντίστοιχα. Τα πρωτόνια Η-3’ και Η-6’ του δακτυλίου Β συντονίζονται σε δ 6.82 και 7.35 ως απλές κορυφές με τους αντίστοιχους άνθρακες να συντονίζονται σε δ 105.2 (C-3’) και 114.7 (C-6’) . Τέλος το πρωτόνιο Η-3 εμφανίζεται με τη μορφή απλής κορυφής σε δ 7.15 ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 108.7 ppm. Η αποθωράκιση τόσο του πρωτονίου Η-3 όσο και του αντίστοιχου άνθρακα είναι χαρακτηριστική για φλαβόνες με υδροξύλιο στη θέση 2’ του δακτυλίου Β [416].

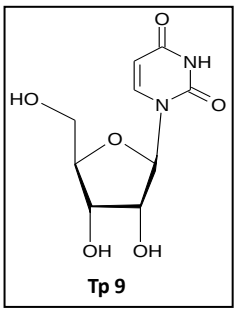
Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρατηρούμε τα σήματα ενός σακχάρου με το ανωμερικό πρωτόνιο να εμφανίζεται με τη μορφή διπλής κορυφής (J = 7.7 Hz) σε δ 4.95 ενώ τα υπόλοιπα πρωτόνια συντονίζονται στην περιοχή 3.92 με 3.40 ppm. Μετά από μελέτη των φασμάτων δύο διαστάσεων COSY και HSQC-DEPT συμπεράναμε ότι το σάκχαρο είναι η β-γλυκοπυρανόση. Το σήμα σύζευξης (^3J) μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου (δ 4.95) με τον οξυγονωμένο αρωματικό άνθρακα C-2΄ στα 152.3 ppm ο οποίος με τη σειρά του συζευγνύεται (^3J) με το Η-6’ του δακτυλίου Β της γενίνης δηλώνει ότι το σάκχαρο βρίσκεται συνδεδεμένο στον δακτύλιο Β με ένα από τα υδροξύλια των θέσεων 2’ ή 4΄.

Προκειμένου να διαπιστώσουμε την ακριβή θέση σύνδεσης του σακχάρου με το άγλυκο συγκρίναμε τα πειραματικά φασματοσκοπικά δεδομένα με αυτά που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για την περίπτωση όπου το σάκχαρο συνδέεται στη θέση 2΄ της ισοετίνης[417,418] και την περίπτωση όπου συνδέεται στη θέση 4΄[419]. Από την σύγκριση αυτή διαπιστώσαμε ότι η υπό μελέτη ουσία είναι η **2΄-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοισοετίνη[420].** Το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή καθώς παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 463.1059 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{21}H_{19}O_{12}$.

Πίνακας 6.4.33: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της **7-O-[2′′-(5′′′-O-ακετυλο)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο]-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-3′-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοδιοσμετίνη** (T.p 7), και **2′-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοισοετίνη** (T.p 8)

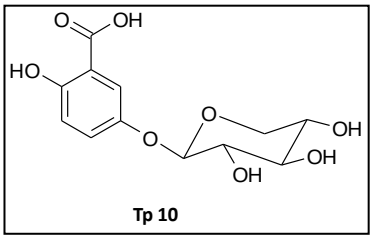
	T.p 7		**T.p 8**	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
2		165,7		162.8
3	6,74 s	104,8	7.15 s	108.7
4		183,7		183.3
5		162,6		162.5
6	6,41 d (2,2)	100,9	6,13 d (2,2)	100.7
7		164,5		165.1
8	6,89 d (2,2)	95,7	6,34 d (2,2)	95.6
9		158,9		158.8
10		105,5		105.1
1′		124,4		111.6
2′	7,87 d (2,2)	115,9		152.3
3′		148,1	6.82 s	105.2
4′		154,2		152.3
5′	7,17 d (8.5)	113,4		142.0
6′	7,73 d (8.5/2.2)	123,1	7.35 s	114.7
-OCH_3	3,97 s	56,6		
1′′	5.18 d (7.7)	99,6	4.95 d (7.7)	102.6
2′′	3.72 dd (9.0/7.7)	77,9	3.57 dd (9.0/7.7)	74.3
3′′	3.65 t (9.0)	78.4	3.46 t (9.0)	78.2
4′′	3.41 t (9.0)	71.1	3.42 t (9.0)	71.2
5′′	3.56 m	78.2	3.48 m	77.8
6′′	3.93 dd (12.3/2.2)	62.4	3.92 dd (12.3/2.2)	62.3
	3,72 dd (12,3/5.9)		3,72 dd (12,3/5.9)	
1′′′	5,50 d (1,5)	110,0		
2′′′	3,85 m	78,5		
3′′′		78,5		
4′′′	4,14 d (9,9)	75,1		
	3,87 d (9,9)			
5′′′	4,13 d (11,3)	68,2		
	4,08 d (11,3)			
OCO**<u>CH$_3$</u>**	1,92 s	20,3		
O**<u>C</u>**OCH_3		172,5		
1′′′′	5.00 d (7.7)	102,8		
2′′′′	3.55 dd (9.0/7.7)	74,7		
3′′′′	3.63 t (9.0)	78,2		
4′′′′	3.41 t (9.0)	71,0		
5′′′′	3.54 m	78,0		
6′′′′	3.86 dd (12.3/2.2)	62,3		
	3,68 dd (12,3/5.9)			

Το προϊόν **T.p 9** παραλήφθηκε κατά την φυτοχημική ανάλυση του υδατικού εκχυλίσματος αρχικά με CCC και στη συνέχεια, με επεξεργασία του κλάσματος 36 με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε έδειξε πως πρόκειται για το νουκλεοζίτη **Ουριδίνη.** Η ουσία αυτή απομονώθηκε και από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Lotus longisiliquosus* καθώς και από το υδατικό εκχύλισμα του *Lathyrus laxiflorus* στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της περιγράφονται στη σελίδα 247.



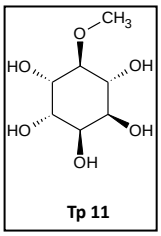
Tp 9

Ο μεταβολίτης **T.p 10** παραλήφθηκε κατά την φυτοχημική ανάλυση του κλάσματος 42 του CCC με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε έδειξε πως πρόκειται για την ουσία **5-O-*β*-D-ξυλοπυρονόσυλο γεντισικό οξύ.** Η ουσία αυτή απομονώθηκε και από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Lotus longisiliquosus* στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της περιγράφονται στη σελίδα 231.



Tp 10

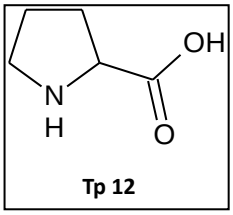
Το προϊόν **T.p 11** απομονώθηκε από το κλάσμα 42 του CCC με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού. Στον έλεγχο με TLC δεν εμφάνισε απορρόφηση στο U.V. (στα 254 και 365 nm) ενώ η κηλίδα του έλαβε μπλε-μαύρο χρώμα μετά τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης και θέρμανση. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε έδειξε πως πρόκειται για την κυκλιτόλη **Πινιτόλη.** Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης δίνονται στον παρακάτω πίνακα.



Tp 11

Πίνακας 6.4.34: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) της (+)-πινιτόλης (T.p 11).

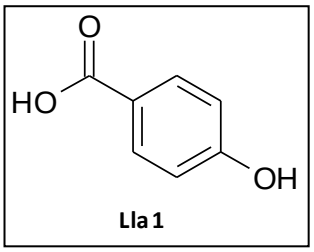
1	3.25	t (9.5 Hz)	85.2
2	3.59	t (9.5 Hz)	74.5
3	3.69	dd (9.5/2.2 Hz)	72.9
4	3.89	d (2.2 Hz)	73.9
5	3.89	d (2.2 Hz)	73.9
6	3.74	dd (9.5/2.2 Hz)	72.2
OCH3	3.61	s	61.1



Tp 12

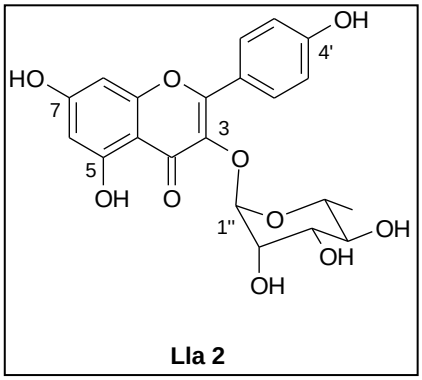
Ο μεταβολίτης **T.p 12** παραλήφθηκε κατά την φυτοχημική ανάλυση του κλάσματος 42 του CCC με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε έδειξε πως πρόκειται για το αμινοξύ **Προλίνη.** Η ουσία αυτή απομονώθηκε και από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Lotus longisiliquosus* στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της περιγράφονται στη σελίδα 248.

6.4.5 Lathyrus laxiflorus supsp laxiflorus



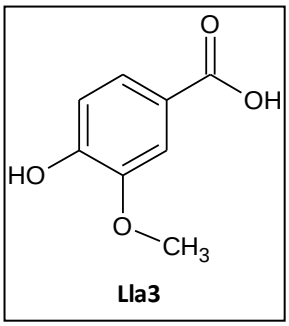
Lla 1

Το **π-υδρόξυβενζοϊκό οξύ** (**Lla 1)** παραλήφθηκε ως λευκή άμορφη σκόνη κατά την φυτοχημική μελέτη του υδατικού εκχυλίσματος αρχικά με CCC και στη συνέχεια με επεξεργασία του κλάσματος 3 με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού. Η ουσία αυτή απομονώθηκε και από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Lotus longisiliquosus* στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της περιγράφονται στη σελίδα 229.



Lla 2

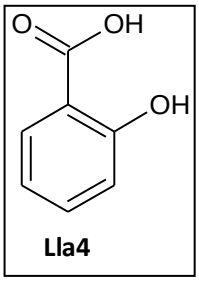
Η αφζελίνη (Lla 2) απομονώθηκε ως κίτρινο, άμορφο στερεό τόσο από το κλάσμα 3 της επεξεργασίας του υδατικού εκχυλίσματος με CPC όσο και από το κλάσμα 17 της επεξεργασίας του μεθανολικού εκχυλίσματος με την ίδια τεχνική. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^{1}H NMR παρατηρούμε τα χαρακτηριστικά σήματα της καιμπφερόλης ενώ στην οξυγονωμένη περιοχή εμφανίζονται τα σήματα ενός σακχάρου. Το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχαρου, το οποίο εύκολα ταυτοποιήθηκε ως *α*-ραμνόση, εμφανίζεται στα 5.38 ppm, ως ευρεία απλή κορυφή. Επιπλέον, τα χαρακτηριστικά πρωτόνια του μεθυλίου της θέσεως 5 συντονίζονται στα 0.92 ppm (d, *J* = 6.0 Hz). Τα υπόλοιπα πρωτόνια του σακχάρου ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια των φασμάτων ^{1}H NMR, COSY και HMQC. Κατόπιν σύγκρισης με τα βιβλιογραφικά δεδομένα διαπιστώθηκε ότι το προϊόν Lla 2 είναι ο 3-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσίδης της καιμπφερόλης.[421,422]. Το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσίας επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή καθώς παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 431,0957 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{21}H_{19}O_{10}$ και βαθμό ακορεστότητας 12. Επίσης στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται και η κορυφή m/z 285,0388 $[M-146,06]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{15}H_9O_6$ και βαθμό ακορεστότητας 11 η οποία παραπέμπει στο ιόν της καιμπφερόλης. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας Lla 2 δίνονται στον πίνακα 6.4.35.



Lla3

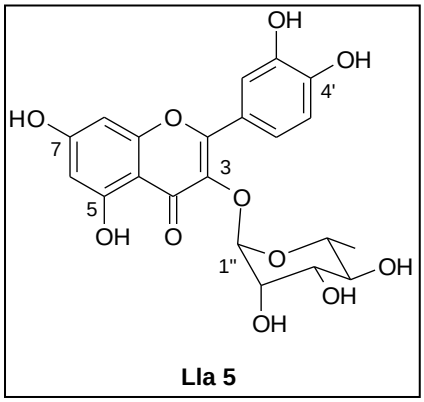
Το **βανιλλικό οξύ** (Lla 3) παραλήφθηκε σε καθαρή μορφή κατά την επεξεργασία του υδατικού εκχυλίσματος αρχικά με CCC και στη συνέχεια ανάλυση του κλάσματος 4 με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού. Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρήσαμε τις χαρακτηριστικές κορυφές ενός ABX υποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα σε δ 7,56 (d *J*=2.0 Hz), 7,86 (dd *J*=8.8, 2.0 Hz) και 6,87 (d *J*=8.8 Hz) καθώς και μια απλή κορυφή σε δ 3,88 που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε μια μεθοξυλομάδα. Ο μοριακός τυπος της ουσίας βρέθηκε να είναι $C_8H_8O_4$ από το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας (κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 167,0341 $[M-H]^-$. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως πρόκειται για κάποιο παράγωγο του βενζοϊκού οξέος. Πράγματι στο φάσμα HMBC παρατηρούμε τα σήματα σύζευξης (J^3) μεταξύ των πρωτονίων H-2 και H-6 με έναν καρβονυλικό άνθρακα στα 171,0 ppm. Στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται και το σήμα σύζευξης (J^3) μεταξύ των πρωτονίων της μεθοξυλομάδας και ενός οξυγονωμένου αρωματικού άνθρακα στα 148,1 ppm (C-3) ο οποίος με τη σειρά του συνδέεται (J^3) με το πρωτόνιο H-5 του αρωματικού πυρήνα.

Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι πρόκειται για την ουσία 3-μεθόξυ-4-υδρόξυ βενζοϊκό οξύ ή βανιλλικό οξύ. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μορίου παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4.36 και συμφωνούν πλήρως με αυτά που υπάρχουν στην βιβλιογραφία[423].



Lla4

Το **Σαλικυλικό οξύ** (**Lla 4)** παραλήφθηκε ως λευκή άμορφη σκόνη κατά την φυτοχημική μελέτη του υδατικού εκχυλίσματος αρχικά με CCC και στη συνέχεια, επεξεργασία του κλάσματος 4 με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού. Η ουσία αυτή απομονώθηκε και από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Lotus longisiliquosus* στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της περιγράφονται στη σελίδα 229.

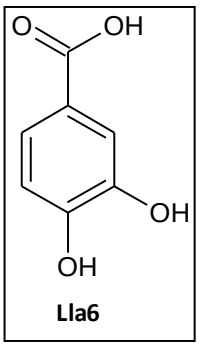


Lla 5

Ο μεταβολίτης **κερκετρίνη** (Lla 5) απομονώθηκε από το κλάσμα 4 του CPC με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως πληρωτικό υλικό την ρητήνη Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης την μεθανόλη. Επίσης υπάρχει σε καθαρή μορφή και στο κλάσμα 19 της επεξεργασίας του μεθανολικού εκχυλίσματος με την τεχνική CPC. Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρούμε τα χαρακτηριστικά σήματα της κερκετίνης δηλαδή ένα ABX σύστημα στην περιοχή 7.40 – 6.90 ppm και δύο διπλές κορυφές με μέτα- σύζευξη (*J*= 2.0 Hz) στην περιοχή 6.40 με 6.20 ppm. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος εμφανίζονται τα ίδια σήματα με αυτά του μεταβολίτη Lla 2 τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια μιας *α*-L-ραμνοπυρανοσης. Επιπλέον στο φάσμα HMBC παρατηρούμε το χαρακτηριστικό σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου της ραμνόσης (5.34 ppm) και του άνθρακα 3 της κερκετίνης (135.3 ppm). Το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή καθώς παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 447,0902 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{21}H_{19}O_{11}$ και βαθμό ακορεστότητας 12. Επίσης στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται και η κορυφή m/z 301,0334 $[M-146,06]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{15}H_9O_7$ και βαθμό ακορεστότητας 11 η οποία παραπέμπει στο ιόν της κερκετίνης. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας Lla 5 παρατίθενται στον πίνακα 6.4.35 και έρχονται σε συμφωνία με αυτά της βιβλιογραφίας[424,425].

Πινακας 6.4.35: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR των ουσιών **αφζελίνη** (Lla 2) και **κερκετρίνη** (Lla5) σε διαλύτη CD_3OD

	αφζελίνη		**κερκετρινη**	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1				
2		159.3		158.5
3		136.2		135.3
4		179.7		179.5
5		163.3		163.0
6	6.19 (d, *J*=1.9Hz)	99.8	6.20 (d, *J=2.2* Hz)	100.5
7		165.9		166.1
8	6.36 (d, *J=1.9*Hz)	94.7	6.37 (d, *J=2.2* Hz)	95.5
9		158.6		159.2
10		105.8		105.7
1’		122.5		123.2
2’	7.77 (d, *J*=8.6Hz)	131.9	7.34 (d, *J*=2.2 Hz)	116.2
3’	6.94 (d, *J*=8.6Hz)	116.4		145.9
4’		161.5		149.8
5’	6.94 (d, *J*=8.6Hz)	116.4	6.91 (d, *J*=8.2 Hz)	116.5
6’	7.77 (d, *J*=8.6Hz)	131.9	7.31 (dd, *J=8.2/*2.2 Hz)	123.0
1’’	5.38 (d, *J*=1.9Hz)	103.5	5.34 (d, *J*=1.5 Hz)	103.3
2’’	4.22 (dd, *J*=3.3,1.6Hz)	71.8	4.22 (dd, *J*=3.3,1.5 Hz)	71.8
3’’	3.71 (dd, *J*=9.0,3.3Hz)	72.0	3.74 (dd, *J*=9.5,3.3 Hz)	72.0
4’’	3.33 (t, *J*=9.0Hz)	73.1	3.33 (t, *J*=9.5 Hz)	73.2
5’’	3.31 (m)	72.0	3.42 (m)	
6’’	0.92 (d, *J*=6.0Hz)	17.8	0.94 (d, *J*=6.0Hz)	17.9



Lla6

Το **Προτοκατεχικό οξύ** (Lla 6) παραλήφθηκε σε καθαρή μορφή κατά την επεξεργασία του υδατικού εκχυλίσματος αρχικά με CCC και στη συνέχεια με ανάλυση του κλάσματος 5 με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού. Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρήσαμε μόνο τρεις κορυφές στην αρωματική περιοχή σε δ 7,44 (d *J*=2,0 Hz), 7,42 (dd *J*=8,8/2,0 Hz) και 6,80 (d *J*=8,8 Hz) οι οποίες είναι χαρακτηριστικές ενός ABX υποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα. Το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας δίνει μοριακό τύπο $C_7H_6O_4$ για την ουσία αυτή (κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 153,0186 $[M-H]^-$) γεγονός που σε συνδυασμό με

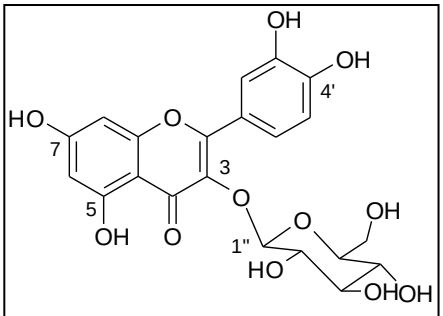
το φάσμα πρωτονίου υποδεικνύει πως πρόκειται για ένα διυδρόξυ παράγωγο του βενζοϊκού οξέος. Η τοποθέτηση των υδροξυλίων στις θέσεις 3 και 4 καθορίστηκε από το φάσμα HMBC όπου παρατηρούμε τα σήματα σύζευξης (J^3) μεταξύ των πρωτονίων H-2 και H-6 με τον καρβονυλικό άνθρακα στα 170,8 ppm.

Από τα παραπάνω διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για την ουσία 3,4-διυδρόξυ βενζοϊκό οξύ ή προτοκατεχικό οξύ. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μορίου παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4.36 και συμφωνούν πλήρως με αυτά που υπάρχουν στην βιβλιογραφία[426].

Πίνακας 6.4.36: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) του **Βανιλλικού οξέος** (Lla 3), και **Προτοκατεχικού οξέος** (Lla 6).

	Lla3		**Lla6**	
C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
1	-	123,6	-	123,6
2	7,56 d (2,0)	113,8	7,56 d (2,0)	117,7
3	-	148,1	-	145,8
4	-	151,9	-	151,1
5	6,87 d (8.8)	115,6	6,87 d (8.8)	115,8
6	7,86 dd (8.8/2,0)	125,0	7,86 dd (8.8/2,0)	123,7
COOH	-	171,0	-	170,8
OCH_3	3,88 s	56,4		

Η **ισοκερκετρίνη** (Lla 7) απομονώθηκε με τη μορφή άμορφου κίτρινου στερεού τόσο από το υδατικό εκχυλίσμα (κλάσμα 5) όσο και από το μεθανολικό (κλάσμα 23). Ο σκελετός της κερκετίνης είναι εμφανής στο φάσμα ^{1}H NMR καθώς και η ύπαρξη ενός σακχαριδικού τμήματος. Ορατές είναι τρεις κορυφές στα 7.71 (d, *J* = 1.9 Hz), 7.59 (dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz) και 6.87 ppm (d, *J* = 8.4 Hz) που αντιστοιχούν στα H-2′, H-6′ και H-5′ του δακτυλίου Β καθώς και δύο κορυφές στα 6.40 (d, *J=1.9*Hz) και 6.21 ppm (d, *J*=1.9Hz) που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-8 και H-6 αντίστοιχα



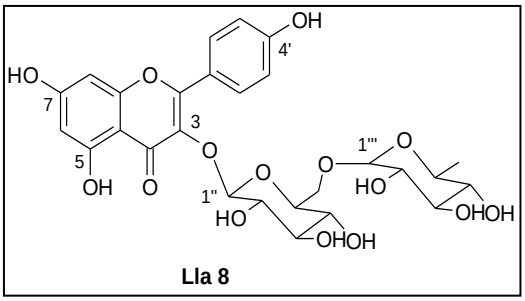
Lla 7

του δακτυλίου Α. Επιπλέον το φάσμα HMBC υποδυκνύει την 3-*O*-γλυκοσυλίωση, από το σήμα που αντιστοιχεί στη σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου H-1'' με τον άνθρακα C-3 της κερκετίνης στα 135.6 ppm. Ο προσδιορισμός του σακχάρου, ως β-γλυκοπυρανόση επιτεύχθηκε με τη βοήθεια φασμάτων COSY και HMQC. Το ανωμερικό πρωτόνιο (H-1'') συντονίζεται στα 5.27 ppm ως διπλή κορυφή (J = 7.5 Hz) ενώ το H-4'' αντιστοιχεί σε μια τριπλή (J = 9.0 Hz) στα 3.35 ppm. Κατόπιν και σύγκρισης με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, διαπιστώθηκε ότι το προϊόν Lla 7 συμπίπτει δομικά με τον 3-*O*-β-D-γλυκοπυρανοσίδη της κερκετίνης.[427,428,429] . Το φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή καθώς παρατηρούμε την κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 463,0850 $[M-H]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο για την κορυφή αυτή $C_{21}H_{19}O_{12}$ και βαθμό ακορεστότητας 12. Επίσης στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται και η κορυφή m/z 301,0340 $[M-162,05]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{15}H_9O_7$ και βαθμό ακορεστότητας 11 η οποία παραπέμπει στο ιόν της κερκετίνης.

Πινακας 6.4.37: Φασματοσκοπικά δεδομενα NMR του μεταβολίτη ισοκερκετρινη (Lla7) σε διαλύτη CD_3OD

	ισοκερκετρινη				
	^1H	^{13}C		^1H	^{13}C
1			1''	5.27 (d, *J*=7.5 Hz)	104.3
2		158.5	2''	3.48 (dd, *J*=9.0, 7,5 Hz)	75.7
3		135.6	3''	3,43 (t, *J*=9.0 Hz)	78.1
4		179.5	4''	3,35 (t, *J*=9.0 Hz)	71.2
5		163.1	5''	3.22 (m)	78.4
6	6.21 (d, *J*=1.9Hz)	99.9	6''a	3.72 (dd, *J*=12.0, 2,1 Hz)	62.6
7		166.0	6''b	3.58 (dd, *J*=12.0, 5.5 Hz)	
8	6.40 (d, *J=1.9*Hz)	94.8			
9		159.0			
10		105.7			
1'		123.2			
2'	7.71 (d, *J*=1.9Hz)	116.0			
3'		149.8			
4'		145.9			
5'	6.87 (d, *J*=8.4Hz)	117.5			
6'	7.59 (dd, *J*=8.4, 1.9Hz)	123.1			

Ο μεταβολίτης **νικοτιφλορίνη** (Lla 8) απομονώθηκε σε καθαρή μορφή τόσο από το μεθανολικό (κλάσμα 21) όσο και από το υδατικό (κλάσμα 7) εκχύλισμα. Η παρουσία της γενίνης καιμπφερόλη διακρίνεται εύκολα στο φάσμα ^{1}H NMR λόγω των χαρακτηριστικών κορυφών της στην αρωματική περιοχή. Η εμφάνισης των H-6 και H-8 στα 6.22 και 6.42 ppm, αντίστοιχα σε συνδυασμό με την εμφάνιση του αποθωρακισμένου C-2 στα 161.6 ppm καταδεικνύει ότι η *O*-γλυκοσυλίωση έχει λάβει χώρα στη θέση C-3. Τα δύο ανωμερικά πρωτόνια συντονίζονται στα 5.14 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1′′) και 4.52 ppm (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-1′′′), όπου το πιο αποθωρακισμένο πρωτόνιο αποδίδεται στο σάκχαρο που συνδέεται απευθείας με τη γενίνη, ενώ το άλλο, στο σάκαρο που συνδέεται με την εξόση. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα COSY LR, όπως και από το HMQC. Στο τελευταίο φάσμα χαρακτηριστική ήταν η αναστροφή της αποθωράκισης στους ανωμερικούς άνθρακες, όπου οι C-1′′ και C-1′′′ συντονίζονται στα 102.5 και 104.7 ppm, αντίστοιχα.



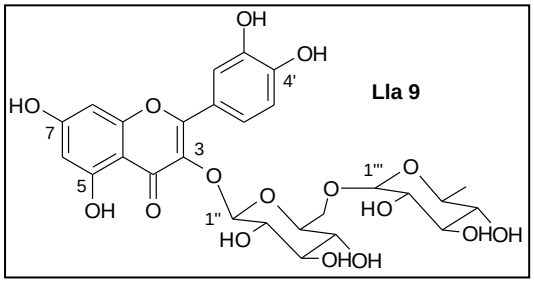
Lla 8

Τα φάσματα ^{1}H NMR, COSY και HMQC ήταν καθοριστικά για την ταυτοποίηση του πρώτου σακχάρου ως *β*-γλυκοπυρανόση. Το δεύτερο σάκχαρο συνδέεται στη θέση C-6′′, γεγονός που διαπιστώνεται από την τυπική αποθωράκιση τόσο των πρωτονίων αυτής της θέσης, τα οποία συντονίζονται στα 3.81 (1H, dd, *J* = 11.3, 1.4 Hz, H-6a′′) και 3.38 ppm (1H, dd, *J* = 11.3, 6.1 Hz, H-6b′′), όσο και του αντίστοιχου άνθρακα C-6′′ στα 68.8 ppm. Το δεύτερο σάκχαρο προσδιορίστηκε ως *α*-L-ραμνοπυρανόση, όχι μόνο λόγω της μικρής σταθεράς σύζευξης του ισημερινού ανωμερικού πρωτονίου (*J* = 1.5 Hz), αλλά και από την παρουσία της μεθυλομάδας στη θέση C-5′′′, τα πρωτόνια της οποίας συντονίζονται στα 1.12 ppm (d, *J* = 6.4 Hz). Τελικά, το προϊόν Lla 8 ταυτοποιήθηκε ως 3-*O*-ρουτινοσίδης της καιμπφερόλης[429]. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας Lla 2 δίνονται στον πίνακα 6.4.38.

Η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 593,1506 $[M-H]^-$ στο φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή. Ο προτεινόμενος μοριακός

τύπος για την κορυφή αυτή είναι $C_{27}H_{29}O_{15}$ και ο βαθμός ακορεστότητας 13. Στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται και η κορυφή που αντιστοιχεί στο ιόν της καιμπφερόλης m/z 285,0413 $[M^{-}\text{-}308.11]^{-}$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{15}H_9O_6$ και βαθμό ακορεστότητας 11. Επίσης εμφανής είναι και η κορυφή m/z 447.0946 $[M^{-}\text{-}146.06]^{-}$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{21}H_{19}O_{11}$ και βαθμό ακορεστότητας 12 όπου αντιστοιχεί στο ιόν που προκύπτει όταν από το μόριο απομακρύνεται μια ραμνόση. Το φάσμα MS/MS του μοριακού ιόντος m/z 593 $[M\text{-}H]^{-}$ δίνει τις κορυφές m/z 285 και m/z 284 σε αναλογία 9 προς 1. Η αναλογία αυτή είναι χαρακτηριστική του 3-O-ρουτινοσίδη της καιμπφερόλης και το διαφοροποιεί τόσο από τον 3-O-ρομπινομπιοσίδη της καιμπφερόλης (αναλογία 5 προς 3) όσο και από τον 3-O-νεοεσπεροσίδη της καιμπφερόλης (αναλογία 1 προς 3)[430].

Η **ρουτίνη** (Lla 9) αποτελεί κύριο μεταβολίτη τόσο του μεθανολικού όσο και του υδατικού εκχυλίσματος. Το φάσμα ^{1}H NMR είναι παρόμοιο με αυτό του Lla 8, με μόνη διαφορά την υποκατάσταση του δακτυλίου Β του φλαβονοειδούς. Σε αυτή την περίπτωση η γενίνη είναι η κερκετίνη, η οποία στη θέση C-3 είναι *O*-γλυκοσυλιωμένη. Ο διγλυκοσίδης όπως και στο μεταβολίτη Lla 8 είναι ο ρουτινοσίδης. Το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου που συνδέεται απευθείας με τη γενίνη συντονίζεται στα 5.11 (d, *J* = 7.5 Hz, H-1′′), ενώ του άλλου σακχάρου στα 4.52 ppm (d, *J* = 1.5 Hz, H-1′′′). Επιπλέον, η αποθωράκιση των H-6′′ (*δ* 3.80 και *δ* 3.38) και του C-6′′ (*δ* 68.6) της β-γλυκοπυρανόσης επιβεβαιώνει την σύνδεση της *α*-ραμνοπυρανόσης στη θέση αυτή, οπότε προκύπτει ένας 1′′′→ 6′′ γλυκοσιδικός δεσμός. Έτσι ο μεταβολίτης Lla 9 ταυτοποιήθηκε ως ο 3-*O*-ρουτινοσίδης της κερκετίνης[429].

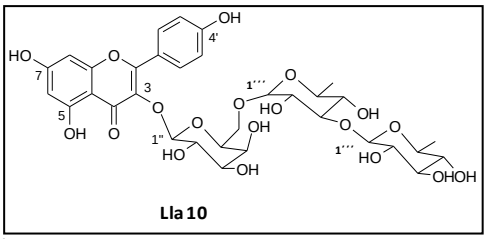


Η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 609.1491 $[M\text{-}H]^{-}$ ($C_{27}H_{29}O_{16}$) καθώς και οι κορυφές m/z 301.0365 $[M^{-}\text{-}308.11]^{-}$ ($C_{15}H_9O_7$) και m/z 463.0890 $[M^{-}\text{-}146.06]^{-}$ ($C_{21}H_{19}O_{12}$) στο φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή.

Πινακας 6.4.38: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR των ουσιών νικοτιφλορίνη (Lla 8) και ρουτίνη (Lla 9) σε διαλύτη CD_3OD

	νικοτιφλορίνη		**ρουτίνη**	
	^{1}H (ppm)	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm)	^{13}C (ppm)
1				
2		161.6		158.5
3		135.5		135.6
4		179.5		179.4
5		163.1		163.0
6	6.22 (d, *J*=1.9Hz)	100.2	6.21 (d, *J*=1.9Hz)	99.9
7		166.1		166.0
8	6.42 (d, *J=1.9*Hz)	95.0	6.41 (d, *J=1.9*Hz)	94.9
9		158.7		159.4
10		105.8		105.7
1’		122.9		123.2
2’	8.07 (d, *J*=9.0 Hz)	132.5	7.67 (d, *J*=2.1 Hz)	117.7
3’	6.90 (d, *J*=9.0 Hz)	116.2		145.8
4’		159.5		149.8
5’	6.90 (d, *J*=9.0 Hz)	116.2	6.88 (d, *J*=8.6 Hz)	116.1
6’	8.07 (d, *J*=9.0 Hz)	132.5	7.63 (dd, *J*=8.6, 2.1 Hz)	123.6
1’’	5.14 (d, *J*=7.5 Hz)	104.7	5.11 (d, *J*=7.5 Hz)	104.7
2’’	3.43 (dd, *J*=8.8, 7.5 Hz)	75.9	3.47 (dd *J*=8.9, 7.5 Hz)	75.7
3’’	3.41 (t, *J*=8.8 Hz)	78.3	3.41 (t, *J*=8.9 Hz)	78.2
4’’	3.25 (t, *J*=8.8 Hz)	71.7	3.27 (t, *J*=8.9 Hz)	71.4
5’’	3.32 (m)	77.3	3.33 (m)	77.3
6’’a	3.81 (dd, *J*=11.3, 1.4 Hz)	68.8	3.81 (dd, *J*=11.3, 1.2 Hz)	68.6
6’’b	3.38 (dd, *J*=11.3, 6.1 Hz)		3.39 (dd, *J*=11.3, 6.1 Hz)	
1’’’	4.52 (d, *J*=1.5Hz)	102.5	4.52 (d, *J*=1.6Hz)	102.4
2’’’	3.63 (dd, *J*=3.3,1.5Hz)	72.4	3.63 (dd, *J*=3.3,1.6Hz)	72.1
3’’’	3.52 (dd, *J*=9.5,3.3Hz)	72.5	3.53 (dd, *J*=9.5,3.3Hz)	72.3
4’’’	3.28 (t, *J*=9.5Hz)	74.1	3.27 (t, *J*=9.5Hz)	73.4
5’’’	3.45 (m)	69.9	3.45 (m)	69.7
6’’’	1.12 (d, *J*=6.4Hz)	18.1	1.12 (d, *J*=6.4Hz)	17.9

Ο μεταβολίτης **3-*O*-*β*-D-[6-*O*-*α*-L-(3-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο)-ραμνοπυρανοσυλο] γαλακτοπυρανοσυλο καιμπφερόλη** (Lla 10) απομονώθηκε σε καθαρή μορφή τόσο από το μεθανολικό εκχύλισμα (κλάσμα 30) όσο και από το υδατικό (κλάσμα 11). Η γενίνη καιμπφερόλη διακρίνεται εύκολα στο φάσμα ^{1}H NMR λόγω των χαρακτηριστικών κορυφών της στην αρωματική περιοχή. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος εμφανίζονται τα σήματα των τριών ανωμερικών πρωτονίων των σακχάρων. Από αυτά οι δύο κορυφές έχουν σταθερές σύζευξης 1.5 Hz και σε συνδυασμό με την παρουσία δύο διπλών κορυφών που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία στα 1,14 και 1,18 ppm (*J* = 6.4 Hz) υποθέσαμε ότι πρόκειται για δύο α-L-ραμνοπυρανοσιδες. Η μελέτη των φασμάτων ^{1}H NMR, COSY και HMQC επιβεβαίωσε την παραπάνω υπόθεση καθώς επίσης μας κατεύθυνε να ταυτοποιήσουμε το τρίτο σάκχαρο ως β-D-γαλακτοπυρανόση. Στο τελευταίο συμπέρασμα καταλήξαμε τόσο από την διπλή κορυφή του ανωμερικού πρωτονίου στα 5.04 (*J*=7.9 Hz) ppm όσο και από την διπλή διπλής κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 3΄΄ στα 3.55 ppm (*J*=9.7, 3.3 Hz).



Lla 10

Η τυπική αποθωράκιση τόσο των πρωτονίων της θέσης 6 της γαλακτόζης , τα οποία συντονίζονται στα 3.74 (1H, dd, *J* = 11.0, 5.5 Hz, H-6a΄΄) και 3.39 ppm (1H, dd, *J* = 11.0, 6.1 Hz, H-6b΄΄), όσο και του αντίστοιχου άνθρακα στα 67.7 ppm υποδηλώνει ότι στο υδροξύλιο της θέσης αυτής συνδέεται ένα άλλο σάκχαρο. Επιπλέον η αποθωράκιση του άνθρακα 3΄΄΄ της ραμνόσης στα 79.6 ppm μας οδηγεί στην υπόθεση ότι το τρίτο σάκχαρο είναι ενωμένο πάνω σε αυτή τη θέση μέσω γέφυρας οξυγόνου. Η μελέτη του φάσματος HMBC ήταν αποκαλυπτική στο να επιβεβαιώσουμε τις παραπάνω υποθέσεις. Έτσι παρατηρούμε ένα χαρακτηριστικό σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου H-1΄΄΄ στα 4.51 ppm και του άνθρακα C-6΄΄ της γαλακτόζης στα 67.4 ppm καθώς επίσης και το σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου H-1΄΄΄΄ στα 4.93 ppm και του άνθρακα C-3΄΄΄ της ραμνόσης. Έτσι συμπεράναμε ότι πρόκειται για τον τρειςακχαρίτη β-D-γαλακτοπυρανόση-(6-1)-α-L-ραμνοπυρανοση-(3-1)-α-L-ραμνοπυρανοση. Επιπλέον το σήμα σύζευξης μεταξύ της κορυφής του ανωμερικού πρωτονίου H-1΄΄ της

γαλακτόσης στα 5.04 ppm και του άνθρακα C-3 στα 136.7 ppm καταδεικνύει ότι η *O*-γλυκοσυλίωση έχει λάβει χώρα στη θέση C-3 της γενίνης.

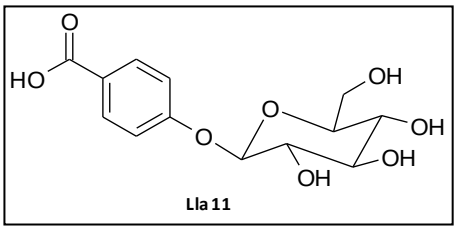
Τελικά, το προϊόν Lla10 ταυτοποιήθηκε ως 3-*O*-*β*-D-[6-*O*-*α*-L-(3-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο)-ραμνοπυρανοσυλο]-γαλακτοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.39 και βρίσκονται σε πλήρη ταύτιση με αυτά της βιβλιογραφίας[425,426,427,428].

Η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 739.2099 $[M-H]^-$ στο φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή. Ο προτεινόμενος μοριακός τύπος για την κορυφή αυτή είναι $C_{33}H_{39}O_{19}$ και ο βαθμός ακορεστότητας 14. Στο ίδιο φάσμα εμφανίζεται και η κορυφή που αντιστοιχεί στο ιόν της καιμπφερόλης m/z 285,0411 $[M^{-}454.17]^-$ με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{15}H_9O_6$ και βαθμό ακορεστότητας 11. Το φάσμα MS/MS του μοριακού ιόντος m/z 739 $[M-H]^-$ δίνει κυρίως την κορυφή m/z 285 $[M^{-}454]^-$ ενώ είναι ορατές και οι κορυφές m/z 593 $[M^{-}146]^-$ (M - ραμνόση) και m/z 593 $[M^{-}292]^-$ (M- ραμνόση-ραμνόση).

Πινακας 6.4.39: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 3-*O*-*β*-D-[6-*O*-*α*-L-(3-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο)-ραμνοπυρανοσυλο]-γαλακτοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (Lla 10) σε διαλύτη CD_3OD.

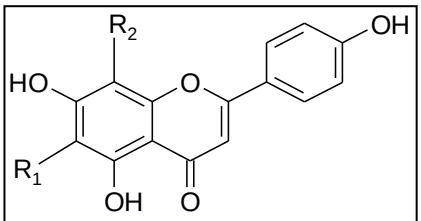
	3-O-*β*-D-[6-O-*α*-L-(3-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο) ραμνοπυρανοσυλο] γαλακτοπυρανοσυλο καιμπφερόλη				
	^{1}H	^{13}C			
1			1''	5.04 (d, *J*=7.9 Hz)	105.5
2		161.5	2''	3.80 (dd, *J*=9.7, 7.5 Hz)	72.9
3		136.7	3''	3.55 (dd, *J*=9.7, 3.3 Hz)	74.8
4		179.5	4''	3.78 (br d, *J*=4.1 Hz)	70.1
5		163.3	5''	3.66 (br t, *J*=6.4 Hz)	75.3
6	6.23 (d, *J*=2.2 Hz)	99.9	6''a	3.74 (dd, *J*=11.0, 5.5 Hz)	67.4
7		166.3	6''b	3.39 (dd, *J*=11.0, 6.1 Hz)	
8	6.42 (d, *J=2.2* Hz)	94.9	1'''	4.51 (d, *J*=1.5Hz)	101.8
9		158.5	2'''	3.69 (dd, *J*=3.3,1.5Hz)	71.7
10		105.6	3'''	3.60 (dd, *J*=9.5,3.3Hz)	79.6
1'		122.5	4'''	3.40 (t, *J*=9.5Hz)	73.1
2'	8.11 (d, *J*=8.8 Hz)	132.2	5'''	3.56 (m)	69.8
3'	6.89 (d, *J*=8.8 Hz)	115.9	6'''	1.18 (d, *J*=6.2Hz)	17.9
4'		159.8	1''''	4.93 (d, *J*=1.5Hz)	103.8
5'	6.89 (d, *J*=8.8 Hz)	115.9	2''''	3.93 (dd, *J*=3.3,1.5Hz)	72.1
6'	8.11 (d, *J*=8.8 Hz)	132.2	3''''	3.72 (dd, *J*=9.5,3.3Hz)	72.1
			4''''	3.35 (t, *J*=9.5Hz)	74.0
			5''''	3.67 (m)	70.0
			6''''	1.14 (d, *J*=6.2Hz)	17.9

Το προϊόν **Lla 11** παραλήφθηκε ως λευκή άμορφη σκόνη κατά την φυτοχημική μελέτη του υδατικού εκχυλίσματος αρχικά με CCC και στη συνέχεια, επεξεργασία του κλάσματος 4 με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε έδειξε πως πρόκειται για το φυσικό προϊόν **4-O-β-D-γλυκοπυρανόσυλο βενζοϊκό οξύ.** Ο μεταβολίτης αυτός απομονώθηκε και από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Lotus longisiliquosus* στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της περιγράφονται στη σελίδα 230.



Lla 11

Οι ουσίες **σχαφτοσίδης** (Lla 12) και **ισοσχαφτοσίδης** (Lla 13) αποτελούν τους κύριους μεταβολίτες τόσο του μεθανολικού όσο και του υδατικού εκχυλίσματος. Πρόκειται για δύο ισομερείς δι-C-γλυκοσίδες της απιγενίνης, που απαντώνται συνήθως μαζί ενώ ο διαχωρισμός τους καθίσταται αρκετά δύσκολος εξαιτίας των παρόμοιων φυσικοχημικών ιδιοτήτων των δύο αυτών μορίων. Αν και στο χρωματογράφημα HPLC-UV φαίνεται να υπάρχει μια μόνο ουσία, στην ανάλυση με UPLC-UV-MS που ακολούθησε παρατηρήσαμε την ύπαρξη δύο ουσιών, οι οποίες εμφανίστηκαν ως δύο μερικώς επικαλυπτόμενες κορυφές στο αντίστοιχο χρωματογράφημα. Τόσο το φάσμα UV όσο και το φάσμα MS υψηλής ακρίβειας αποκάλυψαν ότι πρόκειται για ισομερείς ενώσεις με παρόμοια δομή. Πιο συγκεκριμένα στο φάσμα UV παρατηρούμε δύο μέγιστα απορρόφησης σε μήκη κύματος 271 και 338 nm χαρακτηριστικά των C-γλυκοσιδών της απιγενίνης[431]. Στο φάσμα μάζας εμφανίζεται και για τις δύο ουσίες το ίδιο μοριακό ιόν m/z 563.1423 $[M-H]^-$. Ο προτεινόμενος μοριακός τύπος για την κορυφή αυτή είναι $C_{26}H_{27}O_{14}$ και ο βαθμός ακορεστότητας 13.



Lla12: R_1=glc, R_2=ara
Lla13: R_1=ara, R_2=glc

Στο φάσμα ^{1}H NMR παρατηρούμε τα σήματα των δύο 6,8-δι-C-γλυκοσιδών σε αναλογία 1 προς 2 περίπου. Συγκεκριμένα παρατηρούμε για κάθε ουσία δύο διπλές

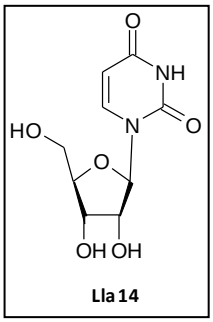
κορυφές (*J* = 8.8 Hz) που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2',6' και H-3',5' του δακτυλίου Β, μία απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-3, δύο διπλές κορυφές στην περιοχή 4.5 με 5.1 ppm που αντιστοιχούν στα ανωμερικά πρωτόνια των δύο σακχάρων και τα σήματα των υπολοίπων πρωτονίων των σακχάρων στην περιοχή 3.2 – 4.2 ppm. Η μελέτη του ετεροπυρηνικού φάσματος HSQC-DEPT αποκάλυψε ότι οι ανωμερικοί άνθρακες συντονίζονται στην περιοχή 72 με 77 ppm κάτι που δηλώνει C-γλυκοσυλίωση των μορίων[432].

Τα δύο σάκχαρα ταυτοποιήθηκαν ως β-D-γλυκοπυρανόση και α-L-αραβινοπυρανόση με την βοήθεια των φασμάτων ^{1}H NMR, COSY και HSQC-DEPT και βρέθηκε πως ήταν τα ίδια και για τα δύο μόρια. Η θέση τους πάνω στο άγλυκο τις γενίνης καθορίστηκε από το φάσμα HMBC. Έτσι για τον μεταβολίτη σχαφτοσίδη (6-C-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-8-C-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλο απιγενίνη) παρατηρούμε τα σήματα σύζευξης (J^3) του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης στα 4.91 ppm με τους άνθρακες C-7 (162.9 ppm) και C-5 (161.0 ppm) καθώς επίσης και τα σήματα σύζευξης (J^3) του ανωμερικού πρωτονίου της αραβινόσης στα 4.94 ppm με τους άνθρακες C-7 (162.9 ppm) και C-9 (156.9 ppm) της απιγενίνης. Σε αντιδιαστολή με τα παραπάνω στο άλλο ισομερές το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης εμφάνισε σήματα σύζευξης με τους άνθρακες C-7 (162.8 ppm) και C-9 (157.4 ppm), ενώ αυτό της αραβινόσης με τους άνθρακες C-7 (162.8 ppm) και C-5 (160.2 ppm) της γενίνης. Από αυτά συμπεράναμε ότι πρόκειται για τον μεταβολίτη ισοσχαφτοσίδη (6-C-*α*-L-αραβινοπυρανοσιλο-8-C-β-D-γλυκοπυρανόσυλο απιγενίνη). Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα των δύο μορίων βρίσκονται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία[433,434,435,436] και δίνονται στον πίνακα 6.4.40.

Πινακας 6.4.40: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR των ουσιών **σχαφτοσίδης** (Lla 12) και **ισοσχαφτοσίδης** (Lla 13) σε διαλύτη CD_3OD

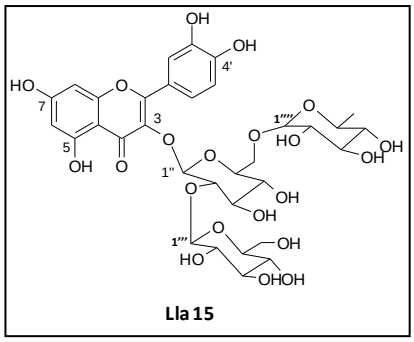
	Σχαφτοσίδης		**Ισοσχαφτοσίδης**	
	^{1}H	^{13}C	^{1}H	^{13}C
1				
2		166.7		166.7
3	6.59 s	103.7	6.60 s	103.7
4		184.3		184.3
5		161.0		160.2
6		109.4		108.3
7		162.9		162.8
8		105.1		105.5
9		156.9		157.4
10		105.3		105.3
1’		123.3		123.3
2’	8.00 d (*J* = 8.8 Hz)	130.1	7.98 d (*J* = 8.8 Hz)	130.1
3’	6.93 d (*J* = 8.8 Hz)	116.8	6.92 d (*J* = 8.8 Hz)	116.8
4’		162.8		162.8
5’	6.93 d (*J* = 8.8 Hz)	116.8	6.92 d (*J* = 8.8 Hz)	116.8
6’	8.00 d (*J* = 8.8 Hz)	130.1	7.98 d (*J* = 8.8 Hz)	130.1
	8-C-ara		*6-C-ara*	
1	**4.94** d (*J* = 10.0 Hz)	76.8	**4.88** d (*J* = 10.0 Hz)	76.4
2	3.99 m	70.4	4.03 m	70.7
3	3.65 m	75.1	3.65 m	75.1
4	4.01 m	71.5	4.02 m	70.7
5a	4.09 dd (*J* = 12.3/3.3 Hz)	72.2	4.05 dd (*J* = 12.3/3.3 Hz)	71.9
5b	3.79 dd (*J* = 12.3/1.0 Hz)		3.75 dd (*J* = 12.3/1.0 Hz)	
	6-C-gluc		*8-C-gluc*	
1	**4.91** d (*J* = 9.9 Hz)	75.4	**5.03** d (*J* = 9.9 Hz)	74.9
2	4.12 m	72.6	4.09 m	73.0
3	3.48 m	79.7	3.54 m	80.1
4	3.55 t (*J* = 8.4 Hz)	71.2	3.63 t (*J* = 8.4 Hz)	71.9
5	3.42 m	82.2	3.47 m	82.7
6a	3.88 dd (*J* = 12.3/2.0 Hz)	62.8	3.95 dd (*J* = 12.3/2.0 Hz)	62.9
6b	3.75 dd (*J* = 12.3/5.4 Hz)		3.78 dd (*J* = 12.3/5.4 Hz)	

Το προϊόν **Lla 14** παραλήφθηκε κατά την φυτοχημική ανάλυση του υδατικού εκχυλίσματος αρχικά με CCC και στη συνέχεια, επεξεργασία του κλάσματος 4 με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού. Η φασματοσκοπική μελέτη που ακολούθησε έδειξε πως πρόκειται για το νουκλεοζίτη **Ουριδίνη.** Η ουσία αυτή απομονώθηκε και από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Lotus longisiliquosus* στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της περιγράφονται στη σελίδα 246.



Lla 14

Ο μεταβολίτης **3-O (2΄΄-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλ-6΄΄-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο κερκετίνης** (Lla 15) απομονώθηκε από το κλάσμα 37 της επεξεργασίας με CCC του υδατικού εκχυλίσματος με τη χρήση της Χρωματογραφίας Μοριακού Αποκλεισμού. Η γενίνη κερκετίνη γίνεται εύκολα αντιληπτή στο φάσμα πρωτονίου της ουσίας λόγω των χαρακτηριστικών κορυφών της στην αρωματική περιοχή. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος εμφανίζονται τα σήματα τριών ανωμερικών πρωτονίων σε *δ* 5,28 (d J=7,5 Hz), 4,76 (d J=7,5 Hz) και 4,49 (d J=1,5 Hz) που παραπέμπουν στην ύπαρξη τριών σακχάρων στο μόριο. Η ύπαρξη της κορυφής με σταθερά σύζευξης 1.5 Hz σε συνδυασμό με την παρουσία μίας διπλής κορυφής που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια στα 1.10 ppm (*J* = 6.4 Hz) υποδεικνύει την παρουσίας μιας α-L-ραμνοπυρανόσης στο μόριο. Η μελέτη των φασμάτων ^{1}H NMR, COSY και HSQC-Dept επιβεβαίωσε την παραπάνω υπόθεση και βοήθησε στην ταυτοποίηση των αλλων δύο σακχάρων ως β-D-γλυκοπυρανόσες.



Lla 15

Από την ανάλυση όλων των κορυφών των σακχάρων συμπεράναμε πως τόσο τα πρωτόνια όσο και οι αντιστοιχοι ανθρακες των θέσεων 2 και 6 της μίας γλυκόζης εμφανίζονται αρκετά αποθωρακισμενα. Πιο συγκεκριμένα το πρωτόνιο H-2 συντονίζεται στα 3,78 ppm με τον αντιστοιχο άνθρακα στα 82,5 ppm, ενώ τα

πρωτόνια Η-6 εμφανίζονται στα 3,78 και 3,33 ppm με τον άνθρακα τους να συντονίζεται στα 67,9 ppm. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι τα άλλα δύο σάκχαρα βρίσκονται ενωμένα σε αυτές τις θέσεις της γλυκοπυρανόσης.

Η μελέτη του φάσματος HMBC ήταν αποκαλυπτική στο να επιβεβαιώσουμε τις παραπάνω υποθέσεις. Έτσι παρατηρούμε ένα χαρακτηριστικό σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου της ραμνοπυρανόσης στα 4.49 ppm και του άνθρακα 6 στα 67.9 ppm καθώς επίσης και το σήμα σύζευξης μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου της δεύτερης γλυκοπυρανόσης στα 4.76 ppm και του άνθρακα 2 της πρώτης γλυκοπυρανόσης στα 82,5 ppm. Επιπλέον το σήμα σύζευξης μεταξύ της κορυφής του ανωμερικού πρωτονίου της πρώτης γλυκοπυρανόσης στα 5.28 ppm και του άνθρακα στα 135,4 ppm καταδεικνύει ότι η *O*-γλυκοσυλίωση έχει λάβει χώρα στη θέση C-3 της γενίνης.

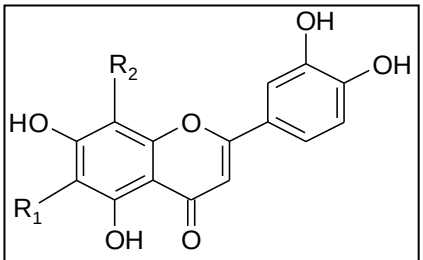
Τελικά, το προϊόν Lla15 ταυτοποιήθηκε ως 3-*O* (2′′-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλ-6′′-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκερκετίνης. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H-NMR και C-13) της ουσίας δίνονται στον πίνακα 6.4.41 και συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας[429].

Η κορυφή του μοριακού ιόντος m/z 771.2003 $[M-H]^-$ στο φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας της ουσία επιβεβαιώνει την παραπάνω δομή. Ο προτεινόμενος μοριακός τύπος για την κορυφή αυτή είναι $C_{33}H_{39}O_{21}$ και ο βαθμός ακορεστότητας 14. Στο φάσμα MS/MS του μοριακού ιόντος εμφανίζεται κυρίως την κορυφή m/z 609,29 $[M-162,05]^-$ (M - γλυκόζη) ενώ είναι ορατές και οι κορυφές m/z 463,27 $[M-307,93]^-$ (M-γλυκόζη-ραμνόση) και m/z 301,13 $[M-470,07]^-$ (κερκετίνη). Η βασική κορυφή m/z 609, 29 που εμφανίζεται στο παραπάνω φάσμα δηλώνει την απομάκρυνση μιας εξώζης από το μόριο επιβεβαιώνοντας έτσι την σύνδεση της ραμνοπυρανόσης στη θέση 6 της πρώτης γλυκόζης και όχι στην αντίστοιχη θέση της δεύτερης.

Πινακας 6.4.41: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 3-O-(2′′-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλ-6′′-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο κερκετίνης (Lla 15) σε διαλύτη CD_3OD.

	3-O-(2′′-O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλ-6′′-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο κερκετίνης				
	^{1}H	^{13}C			
			1′′	5.28 (d, *J*=7.5 Hz)	101.1
1			2′′	3.78 (dd, *J*=9.7, 7.5 Hz)	82.5
2		158,7	3′′	3.57 (t, *J*=9.7 Hz)	77.7
3		135,4	4′′	3.40 (t, *J*=9.7 Hz)	71.0
4		179.5	5′′	3.31 (m)	76.8
5		163,1	6′′a	3.78 (dd, *J*=11.0, 2.0 Hz)	67.9
6	6.21 (d, *J*=1.8 Hz)	99.8	6′′b	3.33 (dd, *J*=11.0, 6.1 Hz)	
7		166.3	1′′′	4.76 (d, *J*=7.5 Hz)	104.7
8	6.39 (d, *J*=1.8 Hz)	94.6	2′′′	3.41 (dd, *J*=9.7, 7.5 Hz)	75.4
9		158.5	3′′′	3.40 (t, *J*=9.7 Hz)	77.8
10		105.7	4′′′	3.31 (t, *J*=9.7 Hz)	71.2
1′		122.8	5′′′	3.33 (m)	78.0
2′	7.66 (d, *J*=2,1 Hz)	117,8	6′′′a	3.78 (dd, *J*=11.0, 2.0 Hz)	62.3
3′		145.8	6′′′b	3.70 (dd, *J*=11.0, 6.1 Hz)	
4′		149.6	1′′′′	4.49 (d, *J*=1.5Hz)	102.1
5′	6.89 (d, *J*=8.5 Hz)	116,2	2′′′′	3.58 (dd, *J*=3.3,1.5Hz)	72.0
6′	7.54 (dd, *J*=8.5/2.1 Hz)	132.2	3′′′′	3.48 (dd, *J*=9.5,3.3Hz)	72.2
			4′′′′	3.27 (t, *J*=9.5Hz)	73.8
			5′′′′	3.42 (m)	69.6
			6′′′′	1.10 (d, *J*=6.4Hz)	17.8

Οι μεταβολίτες **καρλινοσίδης (Lla 16)** και **ισοκαρλινοσίδης (Lla 17)** απομονώθηκαν ως μείγμα κατά την επεξεργασία με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού του κλάσματος 37 το οποίο πρόεκυψε από την κλασμάτωση του υδατικού εκχυλίσματος με την τεχνική CPC. Για την ταυτοποίηση των μορίων ακουλουθηθηκε η ίδια διαδικασία με αυτήν των ουσιών σχαφτοσίδης (Lla 12) και ισοσχαφτοσίδης (Lla 13). Έτσι στο φάσμα UV των ουσιών παρατηρούμε δύο μέγιστα απορρόφησης σε μήκη κύματος 271 και 348 nm χαρακτηριστικά των C-γλυκοσιδών της λουτεολίνης.



Lla16: R_1=glc, R_2=ara
Lla17: R_1=ara, R_2=glc

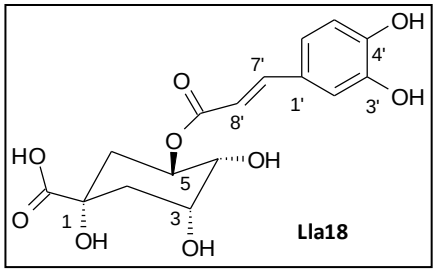
Πινακας 6.4.42: Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR των ουσιών καρλινοσίδης (Lla 16) και ισοκαρλινοσίδης (Lla 17) σε διαλύτη CD_3OD

	Καρλινοσίδης		**Ισοσκαρλινοσίδης**	
	^{1}H	^{13}C	^{1}H	^{13}C
1				
2		166.7		166.7
3	6.58 s	103.7	6.57 s	103.7
4		184.3		184.3
5		161.0		160.2
6		109.4		108.3
7		162.9		162.8
8		105.1		105.5
9		156.9		157.4
10		105.0		105.0
1’		123.7		123.7
2’	7.56 d (*J* = 1.8 Hz)	114.8	7.56 d (*J* = 1.8 Hz)	114.8
3’		146.9		146.9
4’		151.2		151.2
5’	6.92 d (*J* = 8.2 Hz)	116.9	6.92 d (*J* = 8.2 Hz)	116.9
6’	7.53 dd (*J* = 8.2/1.8 Hz)	120.9	7.53 dd (*J* = 8.2/1.8 Hz)	120.9
	8-C-ara		*6-C-ara*	
1	**4.87** d (*J* = 10.0 Hz)	76.4	**4.87** d (*J* = 10.0 Hz)	76.3
2	4.03 m	70.4	4.03 m	70.8
3	3.62 dd (*J* = 9.3/2.6 Hz)	75.5	3.65 dd (*J* = 9.3/2.6 Hz)	75.1
4	4.01 m	71.5	4.01 m	70.4
5a	4.09 dd (*J* = 12.3/3.3 Hz)	72.1	4.05 dd (*J* = 12.3/3.3 Hz)	72.0
5b	3.81 dd (*J* = 12.3/1.0 Hz)		3.76 dd (*J* = 12.3/1.0 Hz)	
	6-C-gluc		*8-C-gluc*	
1	**4.95** d (*J* = 9.9 Hz)	75.3	**5.03** d (*J* = 9.9 Hz)	74.9
2	4.11 m	72.6	4.09 m	72.9
3	3.50 t (*J* = 8.4 Hz)	79.7	3.54 t (*J* = 8.4 Hz)	80.2
4	3.64 t (*J* = 8.4 Hz)	72.4	3.68 t (*J* = 8.4 Hz)	72.2
5	3.43 m	82.5	3.49 m	82.8
6a	3.86 dd (*J* = 12.3/2.0 Hz)	62.8	3.98 dd (*J* = 12.3/2.0 Hz)	62.9
6b	3.77 dd (*J* = 12.3/5.4 Hz)		3.84 dd (*J* = 12.3/5.4 Hz)	

Στο φάσμα μάζας εμφανίζεται και για τις δύο ουσίες το ίδιο μοριακό ιόν m/z 579.1314 $[M-H]^-$. Ο προτεινόμενος μοριακός τύπος για την κορυφή αυτή είναι $C_{26}H_{27}O_{15}$ και ο βαθμός ακορεστότητας 13.

Στο φάσμα ^{1}H NMR παρατηρούμε παρόμοια σήματα με αυτά των δι-C-γλυκοσιδών της απιγενίνης με τη μόνη διαφορά να βρίσκεται στις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του Β δακτυλίου του φλαβονοειδούς. Αναλυτικότερα αντί του πάρα υποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα Β συναντάμε ένα ABX σύστημα

υποκατάστασης πού αποτελείται από μία διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 1.8 Hz, μια διπλή διπλής κορυφή με σταθερές σύζευξης 1.8 και 8.2 Hz και μία ακόμη διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 8.2 Hz. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την πλήρη αντιστοιχία των άλλων σημάτων του φάσματος μας οδήγησε στην υπόθεση ότι πρόκειται για τους αντίστοιχους 6,8-δι-C-γλυκοσίδες τις λουτεολίνης. Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων ^{1}H NMR, COSY, HSQC-DEPT και HMBC επιβεβαίωσε την παραπάνω υπόθεση οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για τις ουσίες καρλινοσίδης (6-C-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο-8-C-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλο λουτεολίνη) και ισοκαρλινοσίδης (6-C-*α*-L-αραβινοπυρανοσιλο-8-C-β-D-γλυκοπυρανόσυλο λουτεολίνη). Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα των δύο μορίων βρίσκονται σε συμφωνία με την βιβλιογραφία[437] και δίνονται στον πίνακα 6.4.42.



Το προϊόν **Lla 18** αποτελεί ένα από τα κύρια και πιο πολικά συστατικά του υδατικού εκχυλίσματος. Από το φάσμα ^{1}H NMR, και συγκεκριμένα από τα δύο *trans*-βινυλικά πρωτόνια που αντιστοιχούν στις δύο διπλές κορυφές στα 7.59 και 6.32 ppm με χαρακτηριστικές σταθερές σύζευξης 15.8 Hz, συμπεραίνεται η ύπαρξη ενός βασικού σκελετού καφεϊκού οξέος. Οι προαναφερθείσες κορυφές αντιστοιχούν στα H-7′ και H-8′ του καφεϊκού οξέος, αντίστοιχα. Επιπλέον, τα πρωτόνια H-2′, H-6′και H-5′ του ABX συστήματος συντονίζονται στα 7.07 (d), 6.96 (dd) και 6.79 (d) ppm, αντίστοιχα. Στο φάσμα HMBC διακρίνεται η σύζευξη του H-8′ με τον C-1′ (*δ* 127.9) του αρωματικού πυρήνα και τον καρβονυλικό C-9′ στα 169.2 ppm. Η τελευταία χημική μετατόπιση φανερώνει την εστεροποίηση του καφεϊκού οξέος.

Οι κορυφές που εμφανίζονται στην αλειφατική περιοχή, ειδικότερα εκείνες στα 5.40, 4.13 και 3.69 ppm, υποδεικνύουν μία ομάδα κινικού οξέος. Η απόδοση των τελευταίων κορυφών στα H-5, H-3 και H-4 αντίστοιχα, βασίστηκε στις σταθερές σύζευξης, καθώς η $J_{4,5}$ μεταξύ των δύο αξονικών πρωτονίων H-4 και H-5 ήταν μεγάλη (10.1 Hz), ενώ η $J_{3,4}$ ήταν αρκετά μικρότερη (3.1 Hz) λόγω της ισημερινής

διευθέτησης του H-3.[438,439] Οι κορυφές μεταξύ 1.9 – 2.2 ppm αντιστοιχούν στα δίδυμα ζεύγη πρωτονίων H-2 και H-6. Η μεταξύ τους διάκριση έγινε με τη βοήθεια των φασμάτων COSY και HSQC-Dept. Τα πρωτόνια που συντονίζονται στα 2.17 (dd, *J* = 15.0, 3.1 Hz) και 1.96 ppm (d, *J* = 15.0 Hz) συνδέονται με τον άνθρακα στα 40.6 ppm (C-2) και είναι τα H-2_{ax} και H-$2_{eq,}$ ενώ αυτά που συντονίζονται στα 2.10 (m) και 2.06 ppm (d, *J* = 12.0 Hz) συνδέονται με τον C-6 στα 39.1 ppm και είναι τα H-6_{eq} και H-6_{ax}. Στο φάσμα COSY διακρίνονται επίσης, οι συζεύξεις μεταξύ του H-2 και του H-3, και του H-6 με το H-5. Τέλος, το φάσμα HMBC υποδεικνύει τη σύζευξη των παραπάνω πρωτονίων με τον καρβονυλικό άνθρακα στα 180.9 ppm που αποδίδεται στον C-7 του κινικού οξέος.

Το τμήμα του καφεϊκού οξέος συνδέεται με τον C-5 (*δ* 72.7) του κινικού οξέος, το πρωτόνιο του οποίου βρέθηκε να είναι το πιο αποθωρακισμένο. Τέλος, στο φάσμα μάζας υψηλής ακρίβειας φαίνεται τόσο το μοριακό ιόν στα *m/z* 353,0853 $[M-H]^-$ όσο και το θραύσμα του κινικού οξέος στα *m/z* 191.06 Τελικά, το προϊόν **Lla 18** ταυτοποιήθηκε ως το **5-καφεϋλοκινικό οξύ** ή **χλωρογενικό οξύ**, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη βιβλιογραφία[440,441].

Πίνακας 6.4.43: Φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C) του **Χλωρογενικού οξέος** (Lla 18).

C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C (ppm)	C/H	^{1}H (ppm, m, Hz)	^{13}C(ppm)
1		77,7	1′		127,9
2	2,17 dd (15,0/3,1)	40,6	2′	7,07 d (2,0)	115,1
	1,96 brd (15,0)		3′		144,5
3	4,13 br d (3,1)	73,2	4′		146,8
4	3,69 dd (10,1/3,1)	75,2	5′	6,79 d (8,0)	116,5
5	5,40 ddd (11,0/10,1/4,8)	72,7	6′	6,96 dd (8,0/2,0)	122,9
6	2,10 m	39,1	7′	7,59 d (15,8)	146,8
	2,06 br d (12,0)		8′	6,32 d (15,8)	115,6
7		180,9	9′		169,2

6.5 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

6.5.1 Γενικά

Η μελέτη βιολογικής δράσης των ολικών εκχυλισμάτων (Κεφάλαιο 5) εμφανίζει τα φυτά *Vicia faba*, *Lotus edulis*, *Lotus longisiliquosus*, *Tetragonolobus purpureus* και *Lathyrus laxiflorus* subsp *laxiflorus* να διαθέτουν σημαντική αντιοξειδωτική και αντιμεταλλαξιογόνο δράση. Για το λόγο αυτό κρίνεται σημαντικό να εξεταστούν τα κλάσματα και οι καθαρές ουσίες, που προέκυψαν από τα παραπάνω εκχυλίσματα, ως προς τις δράσεις αυτές. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ελέγξαμε έναν αριθμό κλασμάτων τα οποία προέκυψαν κατά την επεξεργασία των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis.* Για τη μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης εφαρμόστηκε η δοκιμασία DPPH ενώ η αντιμεταλλαξιογόνος δράση ελέγθηκε με βάση την αναστολή των βλαβών του DNA που προκαλούνται από τις Υδρόξυ και Περόξυ ελεύθερες ρίζες. Η αρχή μεθόδου και η εφαρμοζόμενη μέθοδος για τις δοκιμασίες αυτές περιγράφονται στο Κεφάλαιο 5.

Η μελέτη επίδρασης των ολικών εκχυλισμάτων επί της δράσης του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης (ΧΟ) έδειξε ότι τόσο τα μεθανολικά όσο και τα υδατικά εκχυλίσματα των επιλεγομένων φυτών αναστέλλουν την δράση του ενζύμου σε σημαντικό βαθμό (Κεφάλαιο 5). Προκειμένου να εξετάσουμε σε πιο βαθμό οι περιεχόμενες, στα εκχυλίσματα αυτά, ουσίες είναι υπεύθυνες για την παραπάνω δράση ελέγξαμε έναν αριθμό κλασμάτων και καθαρών ουσιών που προέκυψαν από την επεξεργασία των φυτών *Vicia faba* και *Lotus edulis.* Η αρχή μεθόδου καθώς και η εφαρμοζόμενη διαδικασία για την δοκιμασία αυτή περιγράφονται στο Κεφάλαιο 5.

6.5.2 Vicia faba

- *In vitro* έλεγχος αντιοξειδωτικής δράση- δοκιμασία DPPH

Η τεχνική DPPH χρησιμοποιήθηκε για τον *in vitro* υπολογισμό της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών των κλασμάτων που προέκυψαν κατά την επεξεργασία με CCC του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Vicia faba*. Μελετήθηκαν 10 φαινολικά κλάσματα η σύσταση των οποίων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

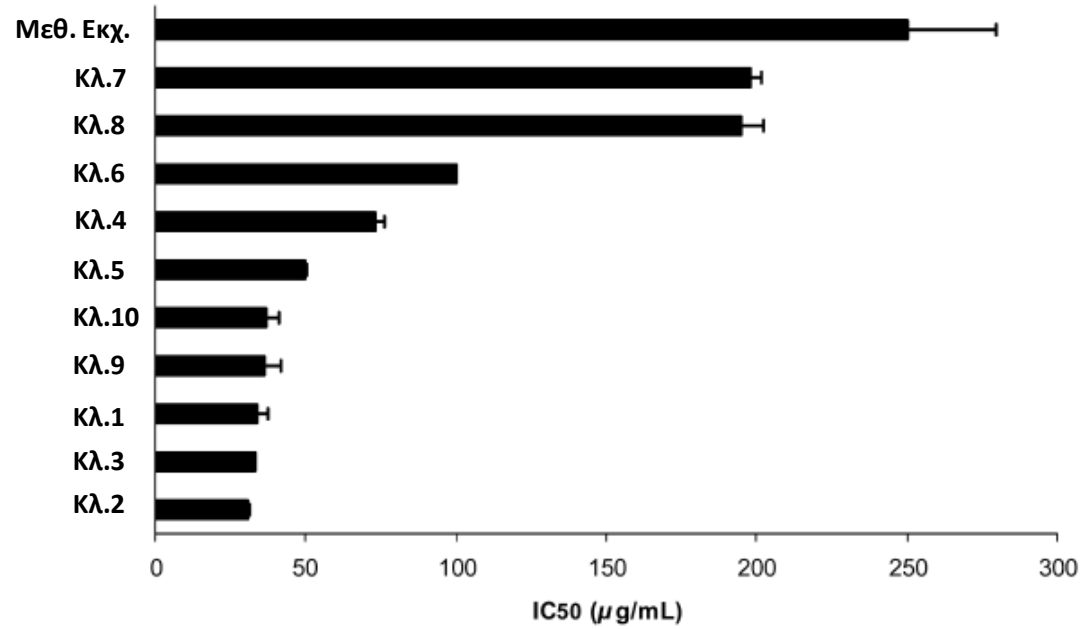
Πίνακας 6.5.1: Σύσταση των φαινολικών κλασμάτων του *V. faba* που μελετήθηκαν με την τεχνική DPPH.

Φαινολικά Κλάσματα	Σύσταση Κλάσματος	Αναλογία Ουσιών
Κλ.1	**Vfa11/Vfa18/Vfa20**	**1/3/3**
Κλ.2	**Vfa11/Vfa18**	**1/2**
Κλ.3	**Vfa10/Vfa17/Vfa20**	**1/1/6**
Κλ.4	**Vfa10/Vfa17/Vfa20**	**1/1/4**
Κλ.5	**Vfa12/Vfa19**	**1/4**
Κλ.6	**Vfa7/Vfa12/Vfa19**	**1/4/2**
Κλ.7	**Μίγμα άπολων συστατικών**	
Κλ.8	**Vfa1/Vfa9**	**2/1**
Κλ.9	**Vfa3/Vfa7**	**1/1**
Κλ.10	**Vfa7/Vfa12**	**3/2**

Vfa1: 3,7-δι-α-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη, **Vfa3**: 3-O-α-L-αραβυνοπυρανοσυλ-7-O-α-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη, **Vfa7**: 3-O-β-D-γλυκοπυρανοσυλ-7-O-α-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη, **Vfa9**: 3-O-(6''-ακετυλ-β-D-γλυκοπυρανοσυλ)-7-O-α-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη, **Vfa10**: 3-O-(2''-α-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γλυκοπυρανοσυλ)-7-O-α-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη, **Vfa11**: 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλ-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλ)-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη , **Vfa12**: 3-O-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ-7-O-α-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη, **Vfa17**: 3-O-(2''-α-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη, **Vfa18**: 3-O-(2''-α-L-ραμνοπυρανοσυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L-ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη, **Vfa19**: 3-O-(2''-α-L-ραμνοπυρανοσυλ-6''-ακετυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ)-7-O-α-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη, Vfa20: (6*S*, 9*R*)-Ροσεοσίδης.

Η εφαρμοζόμενη μέθοδος είναι η ίδια με αυτήν που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής δράσης των ολικών εκχυλισμάτων και περιγράφεται στο Κεφάλαιο 5 (σελ. 46) της παρούσας εργασίας. Τα αποτελέσματα της δοκιμής εκφράστηκαν ως η συγκέντρωση του κλάσματος (*μ*g/ml) που απαιτείται για την εξουδετέρωση του 50% της ελεύθερης ρίζας $DPPH^{\bullet}$ (IC50). Με βάση τις τιμές IC50, όλα τα φαινολικά κλάσματα που εξετάστηκαν εμφάνισαν σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της ρίζας $DPPH^{\bullet}$ όπως άλλωστε και το αρχικό εκχύλισμα του φυτού. Οι

τιμές IC50 κυμαίνονται μεταξύ 30 και 198 *μ*g/ml με τα κλάσματα 1, 2, 3, 9 και 10 να εμφανίζουν την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση εξουδετερώνοντας το 50% της ρίζας DPPH$^{\bullet}$ σε συγκεντρώσεις 30-37 *μ*g/ml, ενώ τα κλάσματα 6, 7 και 8 εμφάνισαν την πιο ασθενή δράση. Εντούτοις, όλα τα φαινολικά κλάσματα, έδειξαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση συγκρινόμενα με το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού (Εικόνα 6.5.1)[442].



Εικόνα 6.5.1: Ικανότητα αναστολής ριζών των φαινολικών κλασμάτων του *V. faba*

- *In vitro* έλεγχος αντιοξειδωτικής-αντιμεταλλαξιογόνου δράσης

Στη μελέτη βιολογικής δράσης των ολικών εκχυλισμάτων εμφανίζεται το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού να διαθέτει σημαντική προστατευτική δράση έναντι των βλαβών που προκαλούνται στο DNA από τις Υδρόξυ και Περόξυ ελεύθερες ρίζες. Έτσι κρίθηκε σκόπιμο τα παραπάνω κλάσματα να ελεγχτούν ως προς τη δράση αυτή. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε περιγράφεται στο Κεφάλαιο 5 (σελ. 48) της παρούσας εργασίας. Τα αποτελέσματα της δοκιμής εκφράστηκαν ως η συγκέντρωση του κλάσματος (*μ*g/ml) που απαιτείται για την εξουδετέρωση του 50% της δράσης των ελεύθερων ριζών ROO$^{\bullet}$ και OH$^{\bullet}$ επί της διαμόρφωσης του πλασμιδικού DNA (IC50) και παρουσιάζονται στον Πίνακας 6.5.2.

Πίνακας 6.5.2: Προστατευτική δράση των φαινολικών κλασμάτων του *V. faba* έναντι βλαβών του DNA που προκαλούνται από τις Περόξυ και Υδρόξυ Ελεύθερες Ρίζες.

Φαινολικά Κλάσματα	**Σύσταση**		**IC_{50} (μg/ml)**	
	Ουσίες	**Αναλ.**	**$ROO^{\bullet}$**	**$OH^{\bullet}$**
Κλ.9	**Vfa3/Vfa7**	**1/1**	**1,9 ± 0,1**	**653 ± 55,1**
Κλ.2	**Vfa11/Vfa18**	**1/2**	**2,1 ± 0,1**	**>1600**
Κλ.5	**Vfa12/Vfa19**	**1/4**	**2,7 ± 0,3**	**420 ± 72,1**
Κλ.3	**Vfa10/Vfa17/Vfa20**	**1/1/6**	**2,8 ± 0,3**	**1157 ± 140,1**
Κλ.10	**Vfa7/Vfa12**	**3/2**	**3,0 ± 0,1**	**560 ± 40,0**
Κλ.1	**Vfa11/Vfa18/Vfa20**	**1/3/3**	**3,8 ± 0,2**	**>1600**
Κλ.4	**Vfa10/Vfa17/Vfa20**	**1/1/4**	**5,5 ± 0,9**	**1010 ± 165,2**
Κλ.6	**Vfa7/Vfa12/Vfa19**	**1/4/2**	**6,2 ± 0,4**	**450 ± 50,0**
Κλ.8	**Vfa1/Vfa9**	**2/1**	**6,9 ± 0,4**	**293 ± 49,3**
Κλ.7	**Μίγμα άπολων συστατικών**		**9,4 ± 1,2**	**NT**
Μεθ.εκχ.			**28,3 ± 2,7**	**>1600**

Τα αποτελέσματα της δοκιμής δείχνουν ότι όλα τα εξεταζόμενα κλάσματα αναστέλλουν σε σημαντικό βαθμό τις βλάβες του DNA που προκαλούνται από τη δράση των Υδρόξυ και Περόξυ ριζών. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στην υπόθεση ότι οι φαινολικές ενώσεις που εμπεριέχονται στα κλάσματα αυτά είναι υπεύθυνες για την προστατευτική και αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

Με βάση τις τιμές IC50 τα κλάσματα αυτά εμφάνισαν πολύ καλύτερες δράσεις έναντι των βλαβών που προκαλούνται από τις Περόξυ ρίζες (IC50 μεταξύ 1,9 και 9,4 μg/ml) σε σχέση με τις βλάβες που προκαλούν οι Υδρόξυ ελεύθερες ρίζες (IC50 μεταξύ 293 και > 1600 μg/ml) (Πίνακας?). Ωστόσο τα κλάσματα εμφανίζουν διαφορετική ικανότητα αναστολής για τις δύο ρίζες. Για παράδειγμα το κλάσμα 9 το οποίο είναι το πιο δραστικό έναντι των βλαβών που προκαλούνται από τις Περόξυ ρίζες, δεν είναι τόσο δραστικό έναντι αυτών που προκαλούνται από τις Υδρόξυ ρίζες. Το κλάσμα 1 διαθέτει παρόμοια ικανότητα έναντι της δράσης των $ROO^{\bullet}$ ριζών, ενώ εμφάνισε μόνο 25% αναστολή σε συγκέντρωση 1600 μg/ml έναντι της δράσης των $HO^{\bullet}$ ριζών. Αντίθετα με τα δύο αυτά κλάσματα, το κλάσμα 8 διαθέτει μέτρια δράση έναντι των $ROO^{\bullet}$ ριζών ενώ εμφανίστηκε ως το πιο δραστικό κλάσμα έναντι της δράσης των $HO^{\bullet}$ ριζών[442].

- Αναστολή Οξειδάσης της Ξανθίνης

Τα κλάσματα που εξετάστηκαν ως προς τις αντιοξειδωτικές-αντιμεταλαξιογόνες ιδιότητες στις παραπάνω δοκιμές ελέγχτηκαν και ως προς την ικανότητά τους να επιδρούν στη δράση του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης. Η αρχή μεθόδου της δοκιμής καθώς και η μέθοδος που εφαρμόστηκε περιγράφονται στο Κεφάλαιο 5 (σελ. 54) της παρούσας εργασίας. Τα αποτελέσματα της δοκιμής εκφράστηκαν ως η συγκέντρωση του κλάσματος (μg/ml) που απαιτείται για την αναστολή κατά 50% της δράσης του ενζύμου. Τα αποτελέσματα της δοκιμής παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.5.3).

Πινακας 6.5.3: Δραστικότητα των φαινολικών κλασμάτων του *V. faba* ως αναστολεις του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης.

Φαινολικά Κλάσματα	**Σύσταση**		**IC_{50} (μg/ml)**
	Ουσίες	**Αναλ.**	
Κλ.8	**Vfa1/Vfa9**	**2/1**	**40**
Κλ.9	**Vfa3/Vfa7**	**1/1**	**55**
Κλ.3	**Vfa10/Vfa17/Vfa20**	**1/1/6**	**66**
Κλ.5	**Vfa12/Vfa19**	**1/4**	**72**
Κλ.6	**Vfa7/Vfa12/Vfa19**	**1/4/2**	**72**
Κλ.2	**Vfa11/Vfa18**	**1/2**	**85**
Κλ.7	**Μίγμα άπολων συστατικών**		**94**
Κλ.10	**Vfa7/Vfa12**	**3/2**	**95**
Κλ.4	**Vfa10/Vfa17/Vfa20**	**1/1/4**	**115**
Κλ.1	**Vfa11/Vfa18/Vfa20**	**1/3/3**	**135**
Μεθ.εκχ.			**540**

Τα αποτελέσματα της δοκιμής δείχνουν ότι όλα τα εξεταζόμενα κλάσματα διαθέτουν σημαντική ανασταλτική δράση επί του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης. Οι τιμές IC50 κυμαίνονται μεταξύ 40 και 135 μg/ml με το κλάσμα 8 να εμφανίζει την ισχυρότερη δράση και το κλάσμα 1 την ασθενέστερη[443].

6.5.2 Lotus edulis

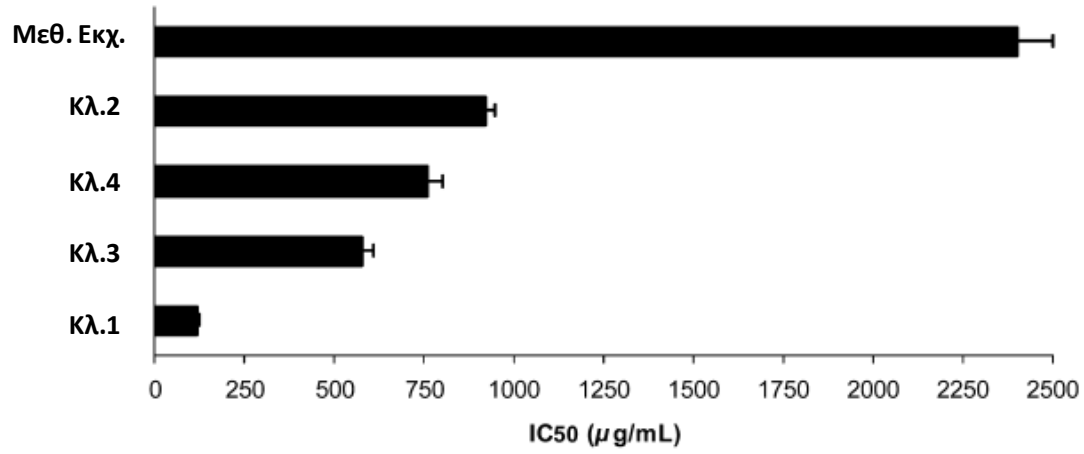
- *In vitro* έλεγχος αντιοξειδωτικής δράση- δοκιμασία DPPH

Τέσσερα κλάσματα που προέκυψαν κατά την επεξεργασία με CCC του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Lotus edulis*, μελετήθηκαν *in vitro* ως προς τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες με τη χρήση της τεχνικής DPPH. Τρία από τα κλάσματα αυτά περιέχουν από μία ουσία ενώ το ένα αποτελεί μίγμα δύο φλαβονοειδών σε αναλογία 1:1. Η σύσταση των κλασμάτων που μελετήθηκαν φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6.5.4: Σύσταση των φαινολικών κλασμάτων του *L. edulis* που μελετήθηκαν με την τεχνική DPPH.

Φαινολικά Κλάσματα	**Σύσταση Κλάσματος**
Κλ.1	3-*O*-(5-*O*-ακετυλ)-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (L.ed 8)
Κλ.2	3-*O*-(2-*O*-ακετυλ)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (L.ed 9) 3-*O*-(3-*O*-ακετυλ)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (L.ed 10)
Κλ.3	3,7-δι-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Led 11)
Κλ.4	3-*O*-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Led 12)

Τα αποτελέσματα της δοκιμής εκφράστηκαν ως η συγκέντρωση του κλάσματος (*μ*g/ml) που απαιτείται για την εξουδετέρωση του 50% της ελεύθερης ρίζας $DPPH^{\bullet}$ (IC50). Με βάση τις τιμές αυτές, τα παραπάνω φαινολικά κλάσματα εμφάνισαν σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της ρίζας $DPPH^{\bullet}$ όπως άλλωστε και το αρχικό εκχύλισμα του φυτού. Οι τιμές IC50 κυμαίνονται μεταξύ 120 και 580 *μ*g/ml με το κλάσματα 1 (ουσία L.ed 8) να εμφανίζει την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και το κλάσμα 2 (ουσίες L.ed 9 και L.ed 10 σε αναλογία 1:1) την πιο ασθενή. Εντούτοις, όλα τα φαινολικά κλάσματα, έδειξαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση συγκρινόμενα με το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού (Εικόνα 6.5.2)[442].



Εικόνα 6.5.2: Ικανότητα αναστολής ριζών των φαινολικών κλασμάτων του *L. edulis*

- *In vitro* έλεγχος αντιοξειδωτικής-αντιμεταλαξιογόνου δράση

Τα παραπάνω κλάσματα ελέγθηκαν ως προς την ικανότητα τους να προστατεύουν το DNA από βλάβες που προκαλούνται από τη χρήση Υδρόξυ και Περόξυ ελεύθερων ριζών. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε περιγράφεται στο Κεφάλαιο 5 (σελ. 48) της παρούσας εργασίας. Τα αποτελέσματα της δοκιμής εκφράστηκαν ως η συγκέντρωση του κλάσματος (μg/ml) που απαιτείται για την εξουδετέρωση του 50% της δράσης των ελεύθερων ριζών $ROO^{\bullet}$ και $OH^{\bullet}$ επί της διαμόρφωσης του πλασμιδικού DNA (IC50) και παρουσιάζονται στον πίνακας 6.5.5.

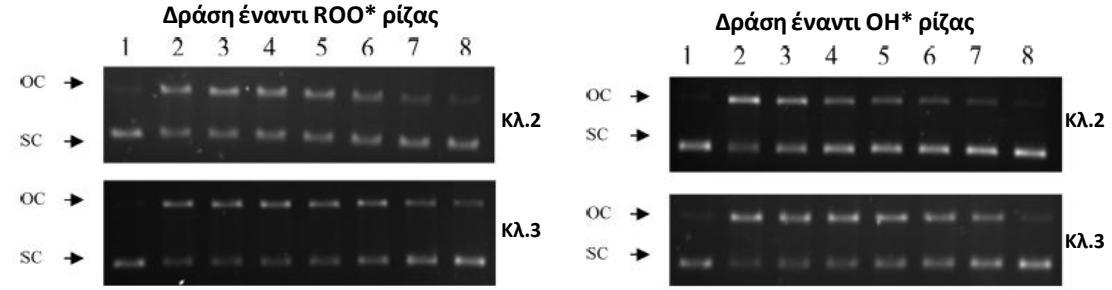
Πίνακας 6.5.5: Προστατευτική δράση των φαινολικών κλασμάτων του *L. edulis* έναντι βλαβών του DNA που προκαλούνται από τις Περόξυ και Υδρόξυ Ελεύθερες Ρίζες.

Φαινολικά Κλάσματα	**Σύσταση**	**IC_{50} (μg/ml)**	
		$ROO^{\bullet}$	**$OH^{\bullet}$**
Κλ.1	Led 8	**9,8 ± 0,4**	**NT**
Κλ.2	Led 9/ Led 10 (1/1)	**13,3 ± 0,3**	**220 ± 34,6**
Κλ.4	Led 12	**30,2 ± 5,3**	**249 ± 34,6**
Κλ.3	Led 11	**34,2 ± 3,0**	**1337 ± 32,1**
Μεθ.εκχ.		**48,7 ± 6,5**	**>1600**

Τα αποτελέσματα της δοκιμής δείχνουν ότι όλα τα εξεταζόμενα κλάσματα αναστέλλουν σε σημαντικό βαθμό τις βλάβες του DNA που προκαλούνται από τη δράση των Υδρόξυ και Περόξυ ριζών. Οι τιμές IC50 κυμαίνονται μεταξύ 9,8 και 34,2 μg/ml για τις βλάβες που προκαλούνται από τις Περόξυ ρίζες και μεταξύ 220 και

1337 μg/ml για τις βλάβες που προκαλούνται από τις Υδρόξυ ελεύθερες ρίζες. ((Πίνακας 6.5.5). Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα εξεταζόμενα κλάσματα, έδειξαν ισχυρότερη δράση συγκρινόμενα με το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού.

Το κλάσμα 2 (ουσίες L.ed 9 και L.ed 10 σε αναλογία 1:1) εμφανίστηκε να διαθέτει ισχυρή ανασταλτική δράση τόσο έναντι των $ROO^{\bullet}$-εξαρτώμενων βλαβών του DNA όσο και αυτών που προκαλούνται από τις ρίζες $OH^{\bullet}$. Το κλάσμα 3 (ουσία L.ed 11) διαθέτει επίσης καλές ανασταλτικές δράσεις, ασθενέστερες όμως από αυτές του κλάσματος 2. Σημειώνεται δε ότι η ουσία L.ed 11 (κλάσμα 3) διαφέρει από τις L.ed 9 και L.ed 10 (κλάσμα 2) μόνο σε μία ακετυλομάδα. Η ανασταλτική δράση που εμφανίζουν τα παραπάνω κλάσματα είναι συναρτήσει της συγκέντρωσης όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 6.5.3)[442].



Εικόνα 6.5.3: Προστατευτική δράση των κλασμάτων 2 και 3 έναντι των μονόκλωνων σπασιμάτων του DNA που προκαλούνται από τις ρίζες **$ROO^{\bullet}$** και **$OH^{\bullet}$** : OC, ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, SC, υπερελικωμένη διαμόρφωση: Στήλες: 1-δείγμα χωρίς το κλάσμα και χωρίς τις ελεύθερες ρίζες, 2-δείγμα χωρίς το κλάσμα, 3 έως 8 – δείγμα με το κλάσμα σε διάφορες συγκεντρώσεις.

- <u>Αναστολή Οξειδάσης της Ξανθίνης</u>

Τα τέσσερα παραπάνω κλάσματα ελέγχτηκαν και ως προς την ικανότητά τους να επιδρούν στη δράση του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης. Η αρχή μεθόδου της δοκιμής καθώς και η μέθοδος που εφαρμόστηκε περιγράφονται στο Κεφάλαιο 5 (σελ. 54) της παρούσας εργασίας. Τα αποτελέσματα της δοκιμής εκφράστηκαν ως η συγκέντρωση του κλάσματος (μg/ml) που απαιτείται για την αναστολή κατά 50% της δράσης του ενζύμου. Τα αποτελέσματα της δοκιμής παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.5.6).

Πίνακας 6.5.6: Δραστικότητα των φαινολικών κλασμάτων του *L. edulis* ως αναστολείς του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης.

Φαινολικά Κλάσματα	**Σύσταση**	**IC_{50} (μg/ml)**
Κλ.2	Led 9/ Led 10 (1/1)	**55**
Κλ.4	Led 12	**90**
Κλ.3	Led 11	**97**
Κλ.1	Led 8	**260**
Μεθ.εκχ.		**410**

Τα αποτελέσματα της δοκιμής δείχνουν ότι όλα τα εξεταζόμενα κλάσματα διαθέτουν σημαντική ανασταλτική δράση επί του ενζύμου Οξειδάση της Ξανθίνης. Οι τιμές IC50 κυμαίνονται μεταξύ 55 και 260 μg/ml με το κλάσμα 2 να εμφανίζει την ισχυρότερη δράση και το κλάσμα 1 την ασθενέστερη[443].

6.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής εργασίας, συλλέχθηκαν 11 είδη της Ελληνικής χλωρίδας τα οποία ανήκουν στην οικογένειας Fabaceae. Τα φυτά αυτά, μετά τη συλλογή, διαλογή και ξήρανση, εκχυλίστηκαν διαδοχικά με διχλωρομεθάνιο, μεθανόλη και νερό. Τα αρχικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε μια σειρά ελέγχων (χρωματογραφικοί και βιολογικοί έλεγχοι) προκειμένου να επιλεγούν για περαιτέρω ανάλυση, αυτά με τις καλύτερες ιδιότητες. Από την αρχική αυτή αξιολόγηση αποφασίστηκε η φυτοχημική μελέτη των εξής επτά αρχικών εκχυλισμάτων:(Κεφάλαιο 5)

- *Μεθανολικό εκχύλισμα της πόας του φυτού Lathyrus laxiflorus* subsp*. laxiflorus*
- *Υδατικό εκχύλισμα της πόας του φυτού Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*
- *Μεθανολικό εκχύλισμα της πόας του φυτού Vicia faba*
- *Μεθανολικό εκχύλισμα της πόας του φυτού Lotus longisiliquosus*
- *Μεθανολικό εκχύλισμα της πόας του φυτού Lotus edulis*
- *Διχλωρομεθανικό εκχύλισμα της πόας του φυτού Lotus edulis*
- *Υδατικό εκχύλισμα της πόας του φυτού Tetragonolobus purpureus*

Από την επεξεργασία των παραπάνω εκχυλισμάτων απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν **99 φυσικά προϊόντα**. Οι κύριες κατηγορίες στις οποίες ανήκουν οι μεταβολίτες αυτοί είναι τα φλαβονοειδή και γλυκοσίδες φλαβονοειδών, τα φαινολικά και καρβοξυλικά οξέα καθώς και οι γλυκοσίδες τους, τα τερπένια και οι απλοί φαινολικοί γλυκοσίδες.

Από τα 99 προϊόντα που απομονώθηκαν, τα **12 είναι νέα προϊόντα**, ενώ ακόμη 12 εντοπίζονται πρώτη φορά σε φυτά της οικογένειας Fabaceae.Τα νέα φυσικά προϊόντα είναι τα έξης:

- **3-*O*-(5-*O*-ακετυλο)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (L.ed 8)**.
- **3-*O*-*β*-D-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη (Led 12)**.
- **3-O-*β*-D -γλυκοπυρανόσυλοξυοκτανοϊκό οξύ (Llo 11)**
- **2-μέθυλ-2-O-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο προπιονικό οξύ (Llo 12)**
- **8-μεθόξυ-5,7,4΄-τριυδρόξυ-κουμαρονοχρωμόνη (Llo 21)**
- **3-*O*-(2''-*O*-κουμαρόϋλ)-*β*-D-γαλακτοπυρανόσυλο καιμπφερόλη (Llo 24)**,
- **3-O-(2''-O-ξυλοπυρανοσυλο)-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο κερκετίνη (Llo 25)**,
- **3-(2''-*O*-κουμαρόϋλ)-*β*-D-γαλακτοπυρανόσυλο-7-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο καιμπφερόλη (Llo 26)**
- **3-(2''-*O*-κουμαρόϋλο)-*β*-D-γαλακτοπυρανόσυλο-7-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο κερκετίνη (Llo 27)**
- **7-O-(2΄΄-*β*-D-απιοφουρανοσυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλοδιοσμετίνη (T.p 5)**
- **7-O-[2΄΄-(5΄΄΄-O-ακετυλ0)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο]-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη (T.p 6)**
- **7-O-[2΄΄-(5΄΄΄-O-ακετυλο)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο]-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο-3΄-O- *β*-D-γλυκοπυρανόσυλοδιοσμετίνη (T.p 7)**

Κεντρικό ρόλο στην απομόνωση των ουσιών έπαιξε η Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC). Η τεχνική χρησιμοποιήθηκε τόσο για αρχική κλασμάτωση των εκχυλισμάτων (*Vicia faba, Lotus longisiliquosus, Tetragonolobus purpureus*), όσο και για απευθείας απομόνωση ουσιών (*Lotus edulis* και *Lathyrus laxiflorus subsp laxiflorus*). Ακολουθήθηκαν δύο μέθοδοι της τεχνικής. Η μέθοδος με τη χρήση ενός διφασικού συστήματος, (*Vicia faba, Lotus edulis, Lathyrus laxiflorus subsp laxiflorus*) και η μέθοδος της βαθμιδωτής έκλουσης (*Lotus longisiliquosus, Tetragonolobus purpureus Lathyrus laxiflorus subsp laxiflorus)*.

Η απόδοση της δομής των απομονωθέντων μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους και κυρίως με φασματοσκοπία NMR. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ανάλυση και κατανόηση των φασμάτων NMR, στην εξαγωγή συμπερασμάτων και συγκεκριμένων χαρακτηριστικών σταθερών, με σκοπό την ευκολότερη και γρηγορότερη ταυτοποίηση μορίων που ανήκουν στις χημικές κατηγορίες που πραγματεύεται η παρούσα ερευνητική προσπάθεια

Τα κλάσματα που προέκυψαν κατά τη διαδικασία απομόνωσης του *Vicia faba* καθώς και καθαρές ουσίες που προήλθαν από το *Lotus edulis* μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική και αντιμεταλαξιογόνο δράση. Τα αποτελέσματα των δοκιμών αυτών κρίθηκαν πολύ ενθαρρυντικά για περαιτέρω μελέτες.

Κεφάλαιο 7
Φαρμακογνωστική μελέτη του φυτού Oryza sativa

7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η εύρεση γρήγορης και αποδοτικής μεθόδου για την παραλαβή, σε καθαρή μορφή, της γ-οριζανόλης από το RBO.

Οι ευεργετικές ιδιότητες του ρυζιού στην υγεία του ανθρώπου, οπως διαπιστώθηκε από πολυάριθμες έρευνες, οφείλονται κυρίως στις ουσίες που απαντώνται στο πίτουρο που αποτελεί παραπροϊόν της επεξεργασίας του. Πιο συγκεκριμένα στο πίτουρο περιέχεται μεγάλος αριθμός αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως για παράδειγμα η βιταμίνη Ε (τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες) και η γ-ορυζανόλη[444,445].
Η γ-οριζανόλη αποτελεί πολύπλοκο μίγμα εστέρων του φερουλικού οξέος με διάφορες φυτοστερόλες και τριτερπενικές αλκοόλες. Οι ουσίες αυτές, αν και βρίσκονται σε μικρό ποσοστό στο πίτουρο, φαίνεται να είναι υπεύθυνες σε μεγάλο βαθμό για τις αξιοσημείωτες βιολογικές του δράσεις. Το γεγονός αυτό έχει αυξήσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων για αυτήν την κατηγορία φυσικών προϊόντων.[446,447,448].
Κατά τη διάρκεια των περασμένων ετών, έχουν αναφερθεί πολλές προσπάθειες απομόνωσης καθαρής γ-ορυζανόλης από το έλαιο πίτουρου ρυζιού (Rice Bran Oil-RBO) χρησιμοποιώντας ένα μεγάλο αριθμό μεθόδων. Για παράδειγμα η χρήση πολυμερικών μεμβρανών[449] καθώς και η εκχύλιση με υπερκρίσιμο CO_2 οδήγησε σε κλάσμα πλούσιο στις ουσίες αυτές αλά όχι σε καθαρή γ-ορυζανόλη[450,451]. Ο Zullaikah και οι συνεργάτες του κατάφεραν να απομονώσουν καθαρή γ-οριζανόλη μετά από κρυστάλλωση δύο βημάτων αλλά με απόδοση μόνο 59% [452]. Οι Xu και Godber απομόνωσαν επίσης καθαρή γ-ορυζανόλη με τη χρήση παρασκευαστικής HPLC αφού όμως πρώτα εμπλούτισαν το κλάσμα με χρωματογραφία στήλης υπό κενό[453]. Υπάρχει μόνο μία εργασία, στη διεθνή βιβλιογραφία, που περιγράφει την ανάκτηση γ-ορυζανόλης υψηλής καθαρότητας, από το RBO, σε ένα στάδιο χρησιμοποιώντας όμως χρωματογραφία στήλης. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή δεν επέτρεπε τη χρησιμοποίηση αυξημένης αρχικής ποσότητας RBO με αποτέλεσμα τη μικρή απόδοση σε γ-ορυζανόλη, λιγότερα από 10 mg σε κάθε εφαρμογή[454].

7.2 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

7.2.1 Γένος Oryza – Είδος O. sativa

Το γένος ***Oryza*** ανήκει στην οικογένεια Gramineae (Poaceae) η οποία αποτελεί την σημαντικότερη από οικονομικής άποψης οικογένεια φυτών καθώς περιλαμβάνει βασικά είδη στην διατροφή του ανθρώπου όπως είναι το στάρι (*Triticum vulgare*), το Καλαμπόκι (*Zea mays*), το ρύζι (*Oryza sativa*), το κριθάρι (*Hordeum vulgare*) κ.α. Το γένος αυτό περιλαμβάνει περίπου 19 μονοετή ή πολυετή είδη αγρωστωδών φυτών, αυτοφυή των τροπικών και υποτροπικών περιοχών της Αφρικής , Ασίας και Β. Αυστραλίας. Καλλιεργούμενα είναι κυρίως τα είδη *Oryza sativa* και *Oryza glaberrima* τα οποία προέρχονται από την τροπική και υποτροπική Ν. Ασία και τη Δ. Αφρική, αντίστοιχα. Πιο διαδεδομένο είναι το είδος *O. sativa*, το οποίο αποτελεί το 20% της παγκόσμιας καλλιέργειας[455,456].

Πίνακας 7.2.1: Μερικά από τα γνωστότερα είδη και ποικιλίες ρυζιών.

ΕΙΔΟΣ	**Ποικιλία**	**Κοινό όνομα**	**Ομάδα κατάταξης**
O. glaberrima		Αφρικάνικο Ρύζι	
O. glutinosa		"Κολλώδες λευκό"	
O. nivara		Άγριο ρύζι**	(Ζιζάνιο)
O. punctata		Κόκκινο ρύζι	(Ζιζάνιο)
O. sativa*	Basmati	Μπασμάτι	Indica Αρωματικό
O. sativa*	Chinoor		Indica Αρωματικό
O.* sativa	Jasmine Thai	Γιασμίν Ταϊλάνδης	Indica Αρωματικό
O. sativa*	Patna	Μακρόσπερμο Πάτνα	Indica
O. sativa*	Arborio	Μικρόσπερμο Ιταλικό	Japonica
O.* sativa	Huesca	Μικρόσπερμο Ισπανίας	Japonica
O. sativa*	Masoori	Μικρόσπερμο Ινδίας	Japonica
O. sativa*	Jaladhi	Δυτ. Βεγγάλης	Floating'Πλωτό' Ρύζι

** Πολλές από τις ποικιλίες του O. sativa, παλαιότερα κατατάσσονταν σαν διαφορετικό είδος*
*** Σαν άγριο ρύζι είναι γνωστός και ο καρπός μερικών ειδών του γένους Zizania sp.*

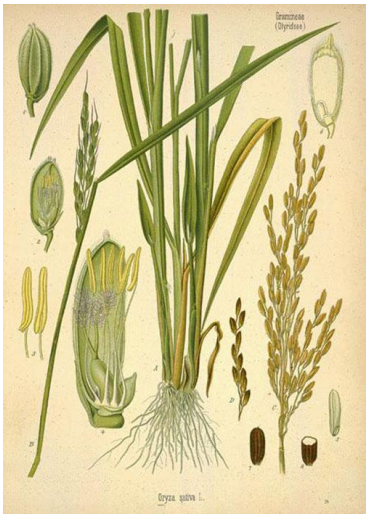
Το ρύζι αποτελεί το τρίτο πιο καλλιεργούμενο φυτό παγκοσμίως μετά το στάρι και το καλαμπόκι. Σε πολλές χώρες της Ασίας είναι η κύρια καλλιέργεια, ενώ μερικές, όπως η Καμπότζη, καταλαμβάνει το 90% των καλλιεργούμενων εκτάσεων. Η

παραγωγή του ρυζιού έχει αυξηθεί από 200 εκατομμύρια τόνους το 1960 σε 600 εκατομμύρια τόνους το 2004. Οι τρεις κύριες παραγωγικές χώρες παγκοσμίως είναι η Κίνα (31% της παγκόσμιας παραγωγής) η Ινδία (20%) και η Ινδονησία (9%)[457].

Τα είδη του γένους *Oriza* είναι ετήσια ή πολυετή φυτά υγροτόπων, τα οποία φτάνουν σε ύψος τα 1-2 μέτρα. Χαρακτηριστικό γνώρισμα τους είναι οι απλές ταξιανθίες τύπου σταχιδίων στα οποία τα λέπυρα είναι σχεδόν ανύπαρκτα ενώ δύο άγονα λήμμα προσομοιάζουν τα λέπυρα. Επίσης φέρουν ινώδες ριζικό σύστημα, κυλινδρικούς στήμονες και επικαλυπτόμενα φύλλα με παράλληλα φλεβώδη ελάσματα.

Βασίλειο: Plantae
Υποβασίλειο: Tracheobionta
Άθροισμα: Spermatophyta
Υποάθροισμα: Angiospermae
Κλάση: Monocotilidons
Τάξη: Poales
Οικογένεια: Poaceae (Graminea)
Υποοικογένεια: Ehrhartoideae
Γένος: **Oriza**
Είδος: **Oriza sativa (L)**

Σχήμα 7.5.1: Συστηματική κατάταξη του φυτού *Oriza sativa*



Το *O. sativa* είναι ένα μονοετές φυτό το οποίο φτάνει σε ύψος τα 1 έως 1.8 μέτρα ή και περισσότερο μερικές φορές, ανάλογα με την ποικιλία και τη γονιμότητα του εδάφους. Διαθέτει μακριά και λεπτά φύλλα (50-100 εκατ. μήκος και 2 - 2,5 εκατ. πλάτος), ενώ η ταξιανθία (σταχύδιο) έχει μήκος 30-50 εκατοστά. Ο καρπός είναι τύπου καρύοψη με το περικάρπιο να είναι στενά συνδεδεμένο με το σπέρμα. Το μήκος του καρπού είναι 5 έως 12 mm, ενώ

το πλάτος 2-3 mm. Με βάση τον λόγο μήκους προς πλάτος των κόκκων, οι ποικιλίες του είδους *O. sativa* διακρίνονται κυρίως σε τρεις τύπους: στις ποικιλίες τύπου *indica* ή μακρόσπερμες, σε ποικιλίες τύπου *japonica* ή κοντόσπερμες και στις ποικιλίες τύπου *javonica* ή πλατύσπερμες. Στις ποικιλίες τύπου *indica* το μήκος του κόκκου είναι τέσσερις μέχρι πέντε φορές μεγαλύτερο από το πλάτος ενώ αυτές του τύπου *japonica* έχουν μήκος σπόρου δύο μέχρι τρεις φορές μεγαλύτερο από το πλάτος του.

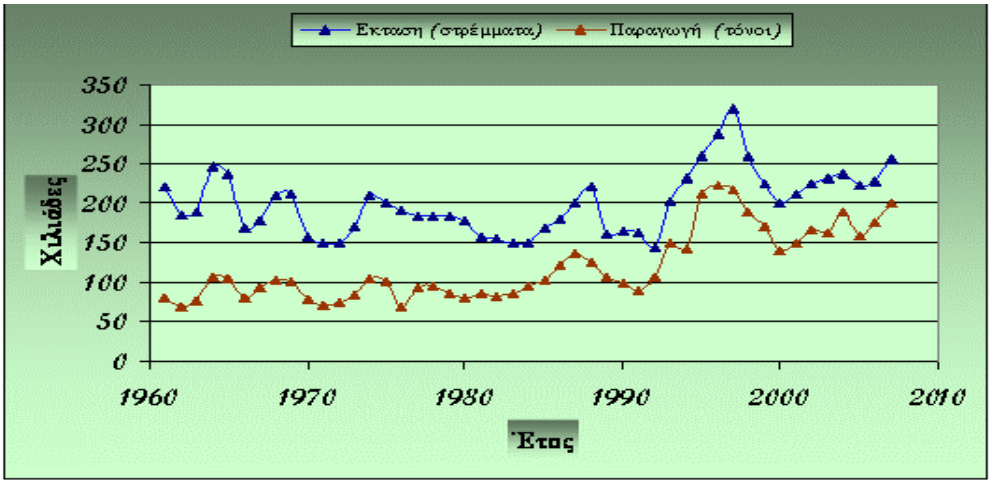
Οι πιο γνωστές ποικιλίες τύπου *indica* είναι οι Basmati και Jasmine και είναι προσαρμοσμένες περισσότερο σε τροπικά και υποτροπικά περιβάλλοντα ενώ γνωστές ποικιλίες τύπου *japonica* είναι η Arborio και Masoori οι οποίες ευδοκιμούν καλύτερα σε εύκρατες και ορεινές περιοχές. Στην Ελλάδα από το 1958 έως σήμερα δημιουργήθηκαν 21 ποικιλίες ρυζιού, 17 *japonica* και 4 *indica*. Από αυτές οι ποικιλίες που είναι εγγεγραμμένες στον Κοινοτικό Κατάλογο Ποικιλιών και συνεχίζουν να εμπορεύονται είναι: Αξιός, Δίον, Μακεδονία, Ολυμπιάδα, Στρυμόνας, Αλέξανδρος, Δήμητρα, Ευρώπη, Ρωξάνη, Ισπανική Α΄και Ρέα.

Η καλλιέργεια του ρυζιού πιστεύεται ότι άρχισε ταυτόχρονα σε πολλές χώρες, πριν από περίπου 6500 χρόνια. Τα πρώτα είδη που εξημερώθηκαν ήταν το *O. sativa* στην Ασία και το *O. glaberrima* στην Αφρική. Μια μελέτη γενετικής δείχνει ότι το κοινό άγριο ρύζι, (*O. rufipogon*), ήταν ο πρόγονος του ασιατικού ρυζιού. Οι Zohary και Hopf (2000) θεωρούν ότι η καλλιέργειας του ρυζιού άρχισε σε τρεις διαφορετικές περιοχές και ως αποτέλεσμα αυτού είναι οι τρεις διαφορετικοί τύποι ρυζιού που υπάρχουν. Σύμφωνα με τους Londo και Chiang το είδος *O. Sativa* φαίνεται να έχει δημιουργηθεί γύρω από τους πρόποδες των Ιμαλαΐων, με το *O. Sativa* var *indica* στην ινδική πλευρά και το *O.sativa* var.*japonica* την κινεζική και την ιαπωνική πλευρά. Στην Ευρώπη καλλιεργήθηκε αρχικά από τους Μουσουλμάνους στην Ιβηρική χερσόνησο κατά το δέκατο αιώνα. Οι πρώτες περιοχές όπου φαίνεται να έχει αρχίσει η καλλιέργεια, στην Ευρώπη, είναι η Βαλένθια και η Μαγιόρκα. Αργότερα καλλιεργήθηκε και στη Σικελία, και πάλι από τους Μουσουλμάνους, όπου το ρύζι έγινε μια σημαντική καλλιέργεια για το νησί. Κατά τον 15ο αιώνα η

καλλιέργεια του ρυζιού εξαπλώθηκε στην Γαλλία και Ιταλία από όπου με τις εξερευνήσεις διαδόθηκε σε όλες τις ηπείρους[458,459,460,461,462].

Ο Θεόφραστος (370-285 π.Χ.), στο έργο του ¨Φυτών Ιστορία¨ (4, 4, 10) περιγράφει το 'όρυζον', όπως το ονομάζει, ως είδος της Ασίας όπου το καλλιεργούν και από το οποίο γίνεται το 'έψημα'. Αναφέρει ότι μοιάζει με το φυτό ζήα (σόργο;) και καλλιεργείται στις πλαγιές, τον περισσότερο χρόνο μέσα στο νερό. Αλλά και ο Στράβωνας (65 π.Χ-25 μ.Χ) που το αναφέρει σαν 'όρυζα', λέει ότι φύεται στη Βακτριανή, στη Βαβυλώνα, στη Σούσα αλλά και στην κάτω Συρία. Ο Διοσκουρίδης (1ος αιώνας μ.Χ.) και ο γιατρός Γαληνός (130-200 μ.Χ.) είχαν μελετήσει αρκετά το ρύζι ως προϊόν διατροφής και μέσο θεραπείας ασθενειών του πεπτικού συστήματος, ενώ ο Αιλιανός (2οςαιώνας μ.Χ.) στο έργο του ¨Περί Ζώων Ιδιότητος¨ αναφέρει ότι οι Ινδοί έδιναν στους ελέφαντες πολεμιστές κρασί από ρύζι. Γενικά φαίνεται ότι οι πρόγονοί μας γνώριζαν τις χρήσεις του ρυζιού αλλά είχαν δείξει λίγο ενδιαφέρον για την καλλιέργειά του, ίσως επειδή η διατροφή τους στηριζόταν σε προϊόντα παραγόμενα από άλλα σιτηρά.

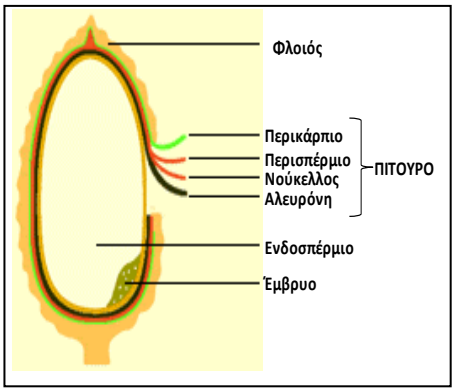
Στην Ελλάδα καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά το έτος 1929 κυρίως στο νομό Πρεβέζης. Κατά την περίοδο 1931-1948 η έκταση των ορυζώνων κυμαινόταν μεταξύ 10.000 και 40.000 στρεμμάτων, ενώ μετά το 1935 άρχισε να δοκιμάζεται η καλλιέργειά του και σε άλλες περιοχές (Αιτωλοακαρνανία, Θεσσαλία, Μακεδονία, Θράκη). Το 1950 η καλλιεργούμενη έκταση αυξήθηκε σε 100.000 στρέμματα. Η παραγωγή κατά το έτος 1959, σύμφωνα με επίσημα δεδομένα ήταν 67.300 τόνοι αναποφλοίωτου (41.000 τόνοι αποφλοιωμένου) ρυζιού, έναντι 3.000 τόνων προπολεμικά. Η εξέλιξη αυτή οδήγησε στην αυτάρκεια της χώρας σε ρύζι. Κατά το διάστημα από το 1961 μέχρι σήμερα, η καλλιεργούμενη έκταση κυμάνθηκε μεταξύ 149.000 έως και 320.000 στρέμματα ετησίως και η παραγωγή ξεπέρασε τους 200.000 τόνους. Σήμερα, η καλλιέργεια του ρυζιού απαντάται στους Νομούς Θεσσαλονίκης (51%), Σερρών (16%), Ημαθίας (7%), Καβάλας (8%), Φθιώτιδας (5%), Αιτωλοακαρνανίας (6%), Πιερίας (6%) και σε έξι άλλους Νομούς (1%)[463].



Το ρύζι ανήκει στη ομάδα των δημητριακών τα οποία αποτελούν τη βάση της διατροφής του ανθρώπου. Είναι τροφή εύπεπτη και μπορεί να καταναλωθεί από όλους. Δεν περιέχει χοληστερόλη, αλάτι και λίπη και είναι ιδανικό για μια υγιεινή διατροφή και για τη διατήρηση του κανονικού βάρους του σώματος. Είναι χαρακτηριστικό ότι στις χώρες της Ασίας, όπου το ρύζι είναι η βασική τροφή, ο αριθμός των ατόμων που είναι υπέρβαροι ή παχύσαρκοι είναι σημαντικά χαμηλότερος από τις χώρες του Δυτικού ημισφαιρίου. Πρέπει πάντως να τονιστεί ότι το αναποφλοίωτο ρύζι (καφέ) είναι αυτό που περιέχει τις ευεργετικές για την υγεία ουσίες, όπως οι βιταμίνες του συμπλέγματος Β, φυτικές ίνες και μέταλλα, καθώς και σημαντικό ποσοστό αντιοξειδωτικών παραγόντων (βιταμίνη Ε και γ-ορυζανόλη). Η επεξεργασία για την παραγωγή του αποφλοιωμένου ρυζιού συντελεί στην απομάκρυνση του μεγαλύτερου μέρους των βιταμινών και των μετάλλων καθώς και όλης της ποσότητα των φυτικών ινών.

7.2.2 Στάδια επεξεργασίας ρυζιού

Από τον αγρό έως την κατανάλωση του ρυζιού μεσολαβούν διάφορα στάδια επεξεργασίας κατά τα οποία απομακρύνονται κυρίως οι εξωτερικές στρώσεις του κόκκου. Η επεξεργασία αυτή, η οποία πραγματοποιείται σε μεγάλες βιομηχανικές μονάδες, περιλαμβάνει κυρίως την αποφλοίωση και την λείανση ή λεύκανση του κόκκου.



Το αναποφλοίωτο ρύζι αποτελεί την πρώτη ύλη στη γραμμή παραγωγής και μετά από διάφορα στάδια επεξεργασίας λαμβάνεται στο τελικό προϊόν το οποίο αποτελεί το 60% περίπου του αρχικού βάρους του κόκκου. Τα υπόλοιπα είναι φλοιός, ξένες ύλες, σπασμένο ρύζι και πίτουρα. Στο πίτουρο ρυζιού περιέχεται μεγάλος αριθμός ισχυρής δράσης αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως είναι η βιταμίνη Ε (τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες) και η γ-ορυζανόλη.

Ανάλογα με την επεξεργασία που υφίσταται το ρύζι διαχωρίζεται σε 3 βασικούς τύπους:

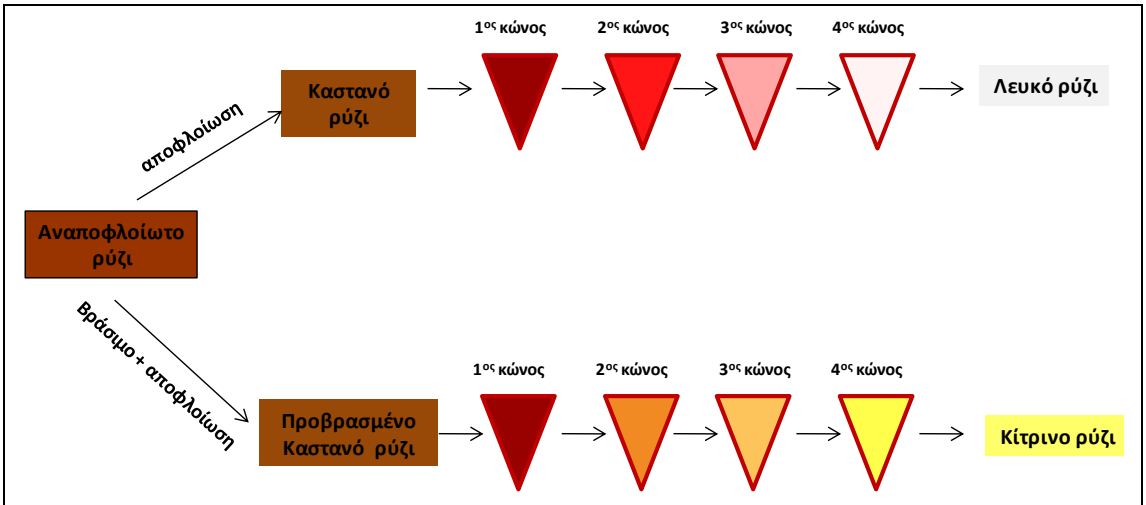
a. <u>Το καστανό ή ακατέργαστο ρύζι</u>. Προέρχεται από την πρώτη αποφλοίωση. Είναι το ρύζι το οποίο κατανάλωνε ο άνθρωπος μέχρι και τις αρχές του 20 αιώνα. Τα «αρνητικά» του καστανού ρυζιού, είναι ότι χρειάζεται τριπλάσιο χρόνο βρασίματος, λασπώνει και είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στις αλλαγές θερμοκρασίας με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μικροοργανισμών που εσωκλείονται στο κόκκο και την αλλοίωση με ταχείς ρυθμούς. Είναι πάντως η μορφή με την μεγαλύτερη διατροφική αξία διότι διαθέτει μεγάλο ποσοστό βιταμινών και άλλων βιοδραστικών ουσιών.

b. <u>Το λευκό ρύζι</u>. Προέρχεται από την λείανση ή λεύκανση του καστανού ρυζιού. Αν και στο λευκό ρύζι απουσιάζει το μεγαλύτερο μέρος των φυτικών ινών και των βιταμινών, ο μικρός χρόνος βρασίματος (εντός 10 λεπτών) και η

σπυρωτή του υφή κατέστησαν την μορφή αυτή την πλέον χρησιμοποιούμενη στις χώρες του δυτικού, κυρίως, κόσμου.

c. Το κίτρινο ρύζι ή ρύζι υγροθερμικής επεξεργασίας, το οποίο συνδυάζει την ευκολία στο βράσιμο με την διατροφική αξία. Με το «βράσιμο» του αναποφλοίωτου ρυζιού, επιτυγχάνουμε την «αποτύπωση» μέρους των θρεπτικών συστατικών του φλοιού στον εσωτερικό κόκκο. Γι αυτό και έχει αυτό το κίτρινο χρώμα. Στη συνέχεια ο αναποφλοίωτος βρασμένος κόκκος επεξεργάζεται όπως και το λευκό. Αν και έχει λιγότερες βιταμίνες από το καστανό, χαρακτηρίζεται από την ευκολία του γρήγορου βρασίματος και της σπυρωτής υφής.

Η βιομηχανική επεξεργασία ρυζιού περιλαμβάνει κυρίως δύο ‘’γραμμές’’ παραγωγής: την λευκή και την κίτρινη γραμμή. Και οι δύο γραμμές παραγωγής περιλαμβάνουν τέσσερα διαδοχικά στάδια επεξεργασίας (κώνους) προκειμένου να καταλήξουμε από το καστανό, ακατέργαστο ρύζι στο λευκό ή το κίτρινο ρύζι. Για την παρασκευή του κίτρινου ρυζιού μεσολαβεί ένα επιπλέον στάδιο, ο βρασμός του αναποφλοίωτου κόκκου. Όλη η βιομηχανική πορεία παρασκευής των τριών τύπων ρυζιού παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 7.5.2: Στάδια βιομηχανικής επεξεργασίας ρυζιού

7.2.3 Φυτοχημικός Χαρακτήρας του O.sativa

Πολλές φυτοχημικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα χημικά συστατικά του φυτού *O. sativa*. Οι μελέτες αυτές αφορούσαν τόσο την πόα του φυτού όσο και τον καρπό ο οποίος αποτελεί το εδώδιμο τμήμα του. Το αποτέλεσμα αυτών των μελετών είναι η απομόνωση ενός μεγάλου αριθμού δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες φυσικών προϊόντων. Οι κύριες κατηγορίες ουσιών οι οποίες έχουν απομονωθεί από το ρύζι είναι τα τριτερπένια και οι στερόλες, τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα λιπαρά οξέα, διάφορες βιταμίνες κ.α.

Από την **πόα του φυτού** έχει απομονωθεί ένας μεγάλος αριθμός φαινολικών οξέων (βενζοϊκό, σαλικυλικό, φερουλικό, συριγκικό, π-κουμαρικό οξύ κ.α)[464,465], φαινολικές ενώσεις (κατεχόλη, βανιλλίνη κ.α.)[465], φλαβονοειδή (ναριγκενίνη, σακουρανετίνη κ.α)[466], C-γλυκοσίφλαβόνες (σχαφτοσίδης, νεοσχαφτοσίδης, καρλινοσιδης, νεοκαρλινοσίδης κ.α.)[467], διάφορα αμινοξικά παράγωγα γασμινοξικού οξέος[466] καθώς και άλλες ουσίες όπως η κορονατίνη και η 12-οχο-PDA[468].

Σημαντική ομάδα ουσιών οι οποίες απομονώθηκαν από την πόα του φυτού αποτελούν οι στερόλες με αλλοπαθητική δράση. Σύμφωνα με την μελέτη του *Francisco A. Macıas* και συνεργατών[469] το κλάσμα με την ισχυρότερη αλλοπαθητική δράση περιείχε τις ουσίες σιτοστερόλη, 7-οξοσιτοστερόλη, στιγμαστερόλη, 7-οξοστιγμαστερόλη, (6,22E)-υδρόξυ-στιγματα-4,22-διεν-3-ονη, υπεροξειδική εργοστερόλη και 5,8-επιδιοξυ-24(R)-μεθυλχολεστα-6-εν-3-ολη.

Όπως προαναφέρθηκε, οι ευεργετικές ιδιότητες του ρυζιού οφείλονται κυρίως στις ουσίες που περιλαμβάνονται στο πίτουρο. Μια ημερήσια πρόσληψη μερικών μόνο γραμμαρίων πίτουρου ρυζιού, είναι ικανή να μειώσει τα επίπεδα της χοληστερόλης του αίματος και του ήπατος. Στο παραπροϊόν αυτό περιέχεται μεγάλος αριθμός ισχυρών αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως για παράδειγμα η βιταμίνη Ε (τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες) και η γ-ορυζανόλη. Η πολύ υψηλή περιεκτικότητα του σε φυτικές ίνες επιδρά θετικά και στο πεπτικό σύστημα. Το πίτουρο του ρυζιού περιέχει

τουλάχιστον το 78% της θειαμίνης (βιταμίνη Β1) και το 67% της νιασίνης ολόκληρου του κόκκου του ρυζιού, όπως επίσης περίπου το 80% του σιδήρου του.

Σύσταση Λιπαρών Οξέων στο RBO	
Λιπαρό Οξύ	%
Παλμιτικό (16:0)	15.0%
Στεαρικό (18:0)	1.9%
Ολεϊκό (18:1)	42.5%
Λινολεϊκό (18:2)	39.1%
Λινολενικό (18:3)	1.1%
Αραχιδονικό (20:0)	0.5%
Βεχενικό (22:0)	0.2%

Το **Έλαιο Πίτουρου Ρυζιού (RBO)** παραλαμβάνεται από την εκχύλιση του πίτουρου και αποτελεί πολύ καλό συμπλήρωμα διατροφής καθώς περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό των βιοδραστικών ουσιών που υπάρχουν στο ρύζι. Αποτελεί το 15-20 % περίπου του βάρους του πίτουρου και περιέχει κυρίως λιπαρά συστατικά (όπως λιπαρές αλκοόλες, λιπαρά οξέα και κορεσμένους υδρογονάνθρακες), γ-οριζανόλη, τακοφερόλες, φυτοστερόλες κ.α. Η γ-οριζανόλη υπάρχει σε ποσοστό 1-2% και μαζί με τις τοκοφερόλες αποτελούν ισχυρούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες με προστατευτική δράση στο καρδιαγγειακό σύστημα, ενώ οι φυτοστερόλες πιστεύεται ότι μειώνουν την απορρόφηση της χοληστερόλης από τον οργανισμό[470,471].

Η γ-οριζανόλη αποτελεί πολύπλοκο μίγμα εστέρων του φερουλικού οξέως με διάφορες φυτοστερόλες και τριτερπενικές αλκοόλες. Από αυτές σε μεγαλύτερο ποσοστό βρίσκονται οι εστέρες του φερουλικού οξέος με την κυκλοαρτενόλη, την 24-μεθυλενοκυκλοαρτενόλη, την καμπεστερόλη και την *β*-συτοστερόλη ενώ σε μικρότερο ποσοστό απαντώνται άλλα εστερικά παράγωγα του φερουλικού οξέος με παραπλήσιας δομής στερόλες η τριτερπενικές αλκοόλες.

Οι ουσίες αυτές αν και αποτελούν μικρό ποσοστό του RBO (1-3%) φαίνεται να είναι υπεύθυνες σε μεγάλο βαθμό για την αντιοξειδωτική και υποχολιστεριμική του δράση[472,473,474]. Επιπλέον η γ-ορυζανόλη μειώνει τις αλλεργικές φλεγμονές[475] και αποτρέπει τις προκαλούμενες από την αιθανόλη ηπατικές βλάβες[476]. Επίσης χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής κυρίως σε αθλητές οι οποίοι την χρησιμοποιούν ως φυσικό στεροειδές προκειμένου να αυξήσουν την μυϊκή μάζα[477]. Η γ-ορυζανόλη έχει επίσης εγκριθεί στην Ιαπωνία για την αντιμετώπιση μεταεμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων. Τέλος έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την απώλεια οστικής μάζας και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα διατροφής στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης[478].

7.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ γ-ΟΡΙΖΑΝΟΛΗΣ

- Το πίτουρο το οποίο αποτελεί παραπροϊόν της επεξεργασίας του ρυζιού, προήρθε από την βιομηχανική μονάδα επεξεργασίας ρυζιού ΕΒ.ΓΕ.ΠΙΣΤΙΟΛΑΣ Α.Ε (ΑΓΡΙΝΙΟ, ΕΛΛΑΔΑ).
- Το έλαιο πίτουρου ρυζιού (RBO) παραλήφτηκε με κλασική εκχύλιση του πίτουρου με οξικό αιθυλεστέρα. Εκχυλίστηκαν 1.7 kg πίτουρο και προέκυψαν 379 gr RBO (22,3%).
- Για την απομόνωση της γ-ορυζανόλης χρησιμοποιήθηκε η Χρωματογραφία CCC. Οι διαχωρισμοί έγιναν στο όργανο υδροστατικού τύπου Kromaton (Angers, France) FCPC® χρησιμοποιώντας αναλυτική στήλη των 50 ml και παρασκευαστική των 1000 ml και αντλία LabAlliance, ενώ για την καταγραφή του χρωματογραφήματος ο ανιχνευτής UV Sycam S3200 και το πρόγραμμα ανάλυσης Clarity®.
- Η ταυτοποίηση και ο έλεγχο καθαρότητας της γ-ορυζανόλης πραγματοποιήθηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης UPLC (Accela Thermo Finnigan) συνδεδεμένη με ανιχνευτή DAD και υβριδικό Φασματογράφο Μάζας γραμμικής παγίδας ιόντων (Ion trap – IT) σε σειρά με υψηλής διακριτικής ικανότητας τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitral trap – OT) (LTQ-Orbitrap, Discovery Thermo Finnigan). Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε στήλη Ascentis Express Fused-Core™ C-18 (100 x 2.1 mm id, 2.7 μm, Supelco, PA, USA).

7.3.1 Απομόνωση γ-ορυζανόλης

- Εύρεση κατάλληλου διφασικού συστήματος

Πρώτο στάδιο της διαδικασίας απομόνωσης αποτέλεσε η αναζήτηση διφασικού συστήματος ικανού να διαχωρίσει την γ-οριζανόλη από τα υπόλοιπα συστατικά του RBO (κυρίως λιπαρές ουσίες). Λαμβάνοντας υπόψη την λιπαρή φύση του ελαίου και συμβουλευόμενοι την βιβλιογραφία δημιουργήσαμε 17 μη υδατικά διφασικά συστήματα τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.2.2). Τα συστήματα αυτά υποβλήθηκαν στους προβλεπόμενους ελέγχους (βλέπε σελ. 35) προκειμένου να επιλεγεί το καταλληλότερο για την παραλαβή της γ-οριζανόλης σε καθαρή μορφή.

Πίνακας 7.2.2: Προτεινόμενα προς έλεγχο συστήματα για την ανάλυση του RBO με CCC.

ΣΥΣΤΗΜΑ	**ΔΙΑΛΥΤΕΣ**	**ΑΝΑΛΟΓΙΑ**
1	c-Hex/EtOAc/MeOH	**14/1/15**
2	c-Hex/EtOH/MeOH	**15/5/10**
3	c-Hex/AcN/ EtOAc	**5/4/1**
4	c-Hex/AcN/EtOH/MeOH	**10/5/5/10**
5	C-Hex/Tol/AcN/MeOH	**15/2/13/4**
6	C-Hex/Tol/AcN/MeOH	**15/2/10/2**
7	c-Hex/EtOAc/AcN/MeOH	**14/1/1/16**
8	c-Hex/EtOAc/EtOH/H_2O	**10/5/13/2**
9	C-Hex/THF/AcN/MeOH	**15/2/10/2**
10	THF/c-Hex/AcN/MeOH	**7/8/3/15**
11	Tol/c-Hex/MeOH	**8/8/15**
12	c-Hex/BuOH/AcN	**14/3/14**
13	Hept/MeOH	**2.5/1.5**
14	Hept/AcN	**1/1**
15	Hept/AcN/BuOH	**1.5/1.5/0.3**
16	Hept/AcN/BuOH	**1.5/1.5/0.5**
17	Hept/AcN/BuOH	1.8/1.4/0.7

Συγκεκριμένα τα παραπάνω διφασικά συστήματα υποβλήθηκαν σε δύο ελέγχους (σελ 35) προκειμένου να διαπιστωθεί εάν κάποιο ή κάποια από αυτά είναι κατάλληλα να διαχωρίσουν τα συστατικά του υπό μελέτη εκχυλίσματος.

Ο πρώτος έλεγχος είχε ως στόχο την αξιολόγηση των συστημάτων ως προς την ταχύτητα διαχωρισμού και την αναλογία των δυο φάσεων. Από τον έλεγχο αυτό **απορρίφθηκαν τα συστήματα 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11 και 12** είτε γιατί δημιουργούσαν γαλάκτωμα είτε διότι ο χρόνος διαχωρισμού των δυο φάσεων ήταν μεγαλύτερος από τον χρόνο που απαιτείται για μία αποτελεσματική ανάλυση (μικρότερος από 1 λεπτό).

Ο δεύτερος έλεγχος πραγματοποιήθηκε με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC) και είχε ως στόχο την αξιολόγηση των συστημάτων ως προς την **κατανομή των συστατικών του δείγματος στις δύο φάσεις των διφασικών συστημάτων.** Αν και ο έλεγχος αυτός πραγματοποιείται κυρίως για την απόρριψη των συστημάτων στα οποία οι προς απομόνωση ουσίες βρίσκονται εξολοκλήρου στη μια από τις δύο φάσεις στην περίπτωση μας χρησιμοποιήθηκε και για την επιλογή του κατάλληλου διφασικού συστήματος. Αυτό γίνεται διότι στο υπό μελέτη εκχύλισμα (RBO) μόνο η γ-ορυζανόλη παρουσιάζει απορρόφηση στην περιοχή UV-Vis. Έτσι, η τεχνική HPLC-UV δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να υπολογιστούν οι συντελεστές κατανομής των αναλυόμενων ουσιών και κατ' επέκταση να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα (υπολογίζοντας τον συντελεστή διαχωριστικότητας *α*) για το εάν το σύστημα είναι κατάλληλο ή όχι για τον διαχωρισμό.

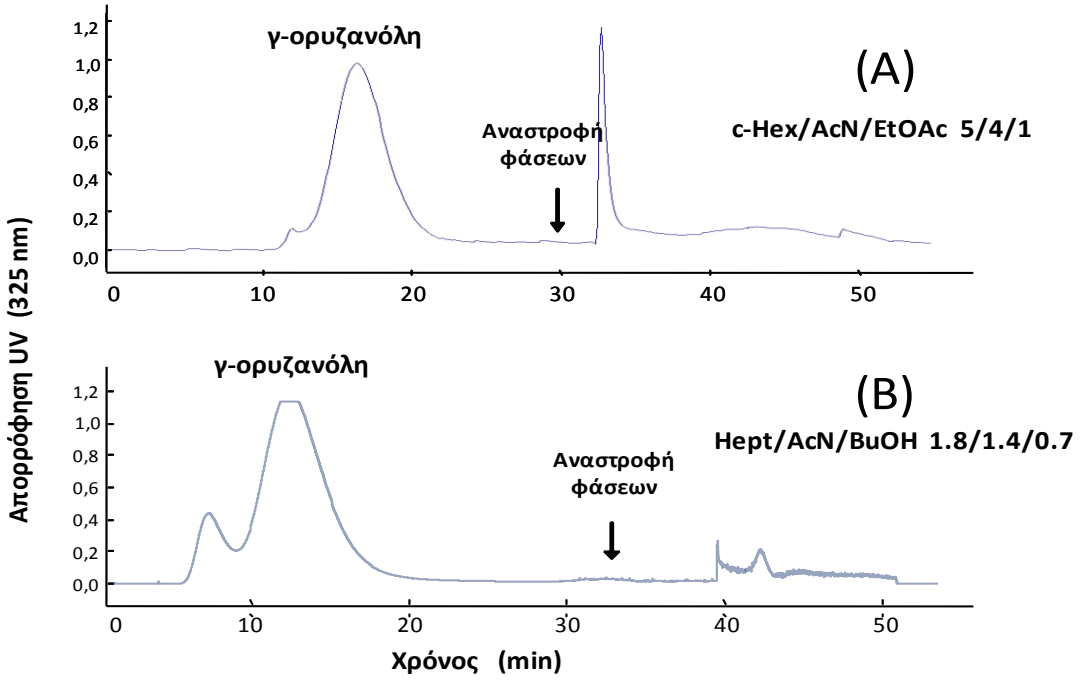
Έτσι, βάση του ελέγχου TLC, τα διφασικά συστήματα **3 (c-Hex/ACN/EtOAc 5/4/1)** και **17 (Hept/ACN/BuOH 1.8/1.4/0.7)** κρίθηκαν ικανά για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό της γ-ορυζανόλης από τα υπόλοιπα συστατικά του RBO.

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα του παραπάνω ελέγχου και να ελεγχθεί ποιο από τα δύο αυτά συστήματα είναι πιο αποτελεσματικό, έλαβε χώρα επεξεργασία του RBO με αναλυτικού τύπου CCC και με τα δύο διφασικά συστήματα.

Επιπρόσθετα, ο έλεγχος με TLC των δύο αυτών συστημάτων έδειξε ότι η γ-ορυζανόλη κατανέμεται περισσότερο στην πάνω φάση (λιγότερο πολική φάση) του διφασικού συστήματος 3 ενώ για το σύστημα 17 η μεγαλύτερη ποσότητά της βρίσκεται κατανεμημένη στην κάτω φάση (περισσότερο πολική φάση). Οι υπόλοιπες λιπαρές ουσίες του RBO κατανέμονται καλύτερα στην πάνω φάση (την άπολη φάση) και στα δύο διφασικά συστήματα. Προκειμένου να παραληφθεί η γ-

ορυζανόλη σε σύντομο χρονικό διάστημα θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί ως κινητή η φάση στην οποία κατανέμεται καλύτερα. Έτσι στην περίπτωση του συστήματος 3 ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε η πάνω φάση του συστήματος ενώ για το σύστημα 17 η κάτω φάση.

Οι διαχωρισμοί έγιναν σε αναλυτική στήλη των 50 ml, χρησιμοποιώντας δείγμα βάρους 170 mg. Η ροή των διαλυτών και η περιστροφή της στήλης διατηρήθηκαν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας στα 2 ml/min και 750 rpm αντίστοιχα. Η συλλογή των κλασμάτων έγινε με βάση το χρωματογράφημα UV-Vis και σε μήκος κύματος 325 nm (μήκος κύματος στο οποίο η γ-ορυζανόλη παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης) (Εικόνα 7.5.1).

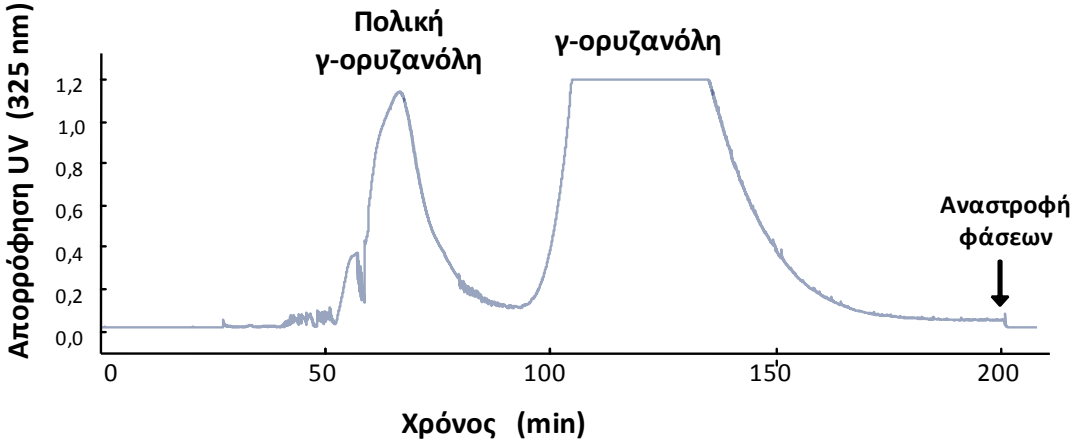


Εικόνα 7.5.1: Χρωματογραφήματα CCC σε μήκος κύματος 325 nm. Α) Αναλυτικός διαχωρισμός με το διφασικό σύστημα 3 (c-Hex/ACN/EtOAc 5/4/1) και Β) Αναλυτικός διαχωρισμός με το διφασικό σύστημα 17 (Hept/ACN/BuOH 1.8/1.4/0.7).

Τα κλάσματα των δύο παραπάνω διαχωρισμών ελέχθησαν με TLC. Ο έλεγχος αυτός έδειξε ότι στην περίπτωση του συστήματος 3 η γ-οριζανόλη συνεκλούεται με ποσότητα λιπαρών ουσιών, ενώ ο διαχωρισμός με το σύστημα 17 προσφέρει μεγάλου βαθμού καθαρότητας γ-ορυζανόλη. Έτσι αποφασίστηκε να χρησιμοποιθεί το σύστημα 17 για την πραγματοποίηση παρασκευαστικής κλίμακας διαχωρισμού με CCC.

- Εκτέλεση διαχωρισμού

Με βάση τα όσα αναφέρονται παραπάνω, για τον διαχωρισμό του RBO με CCC, επιλέχθηκε το διφασικό σύστημα διαλυτών: **Hept/ACN/BuOH 1.8/1.4/0.7.** Ο διαχωρισμός έγινε σε παρασκευαστική στήλη των 1000 ml, ενώ για την καταγραφή του χρωματογραφήματος χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής UV-Vis σε μήκος κύματος 325 nm. Αναλύθηκε δείγμα βάρους 8,0 g ενώ η ροή των διαλυτών και η περιστροφή της στήλης διατηρήθηκαν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας στα 10 ml/min και 850 rpm, αντίστοιχα. Η συλλογή των κλασμάτων έγινε με βάση το χρωματογράφημα UV (Εικόνα 7.5.2).



Εικόνα 7.5.2: Χρωματογραφήματα CCC σε μήκος κύματος 325 nm. Παρασκευαστικός διαχωρισμός με το διφασικό σύστημα 17 (Hept/ACN/BuOH 1.8/1.4/0.7).

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση η κάτω φάση του συστήματος (πιο πολική φάση) ενώ ως στατική φάση η πάνω (άπολη φάση). Με βάση το χρωματογράφημα συλλέξαμε συνολικά 10 κλάσματα από τα οποία τα 6 με κινητή την κάτω φάση, ενώ τα υπόλοιπα 4 μετά την αναστροφή των φάσεων.

Ο συνολικός χρόνος διαχωρισμού κυμάνθηκε στις 4 ώρες περίπου, ενώ καταναλώθηκαν συνολικά 3,6 Lt διαλυτών.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.2.3) φαίνονται τα κλάσματα του διαχωρισμού, τα βάρη τους καθώς και τα ποσοστό του κάθε κλάσματος στο RBO.

Η σύγκριση των χρωματογραφημάτων CCC που λάβαμε κατά το διαχωρισμό του RBO με αναλυτική (Εικόνα 7.5.1Β) και παρασκευαστική στήλη (Εικόνα7.5.2) δείχνει ξεκάθαρα μια βελτίωση της ποιότητας του διαχωρισμού κατά τη μετάβαση από μικρότερη σε μεγαλύτερης κλίμακας διαχωρισμούς. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένα σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου CCC.

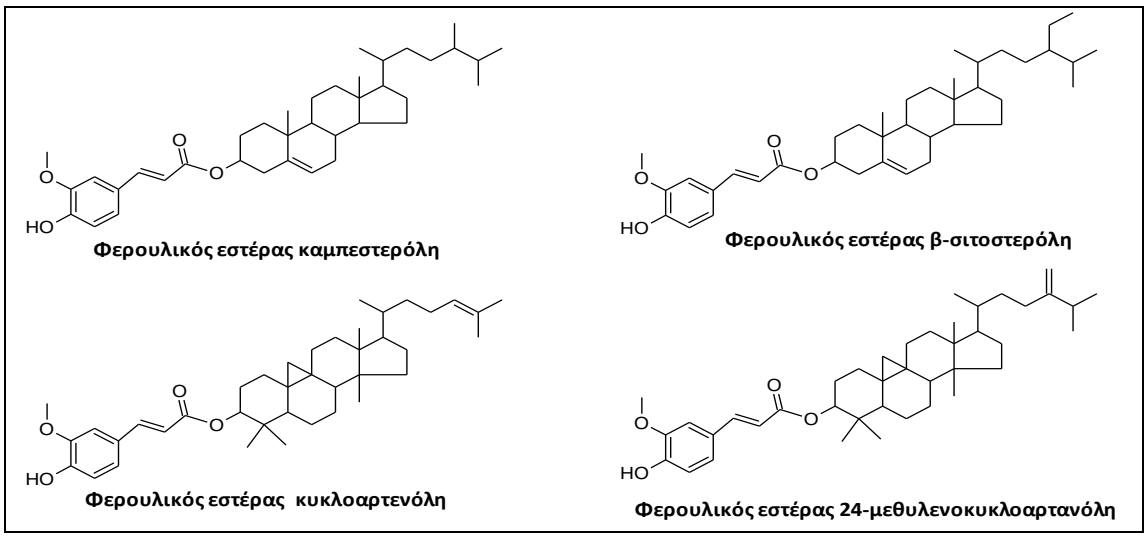
Πίνακας 7.2.3: Τα κλάσματα και τα βάρη που προέκυψαν κατά την επεξεργασία του RBO με CCC με το σύστημα **Hept/AcN/BuOH 1.8/1.4/0.7**.

ΚΛ.	ΒΑΡΟΣ (mg)	% στο RBO
1	7,71	0.10
2	11,62	0.15
3	68,20	0.85
4	66,59	0.83
5	193,20	2.42
6	604,67	7.57
7	65,44	0.82
8	4063,64	50.80
9	2727,80	34.10
10	135,36	1.69

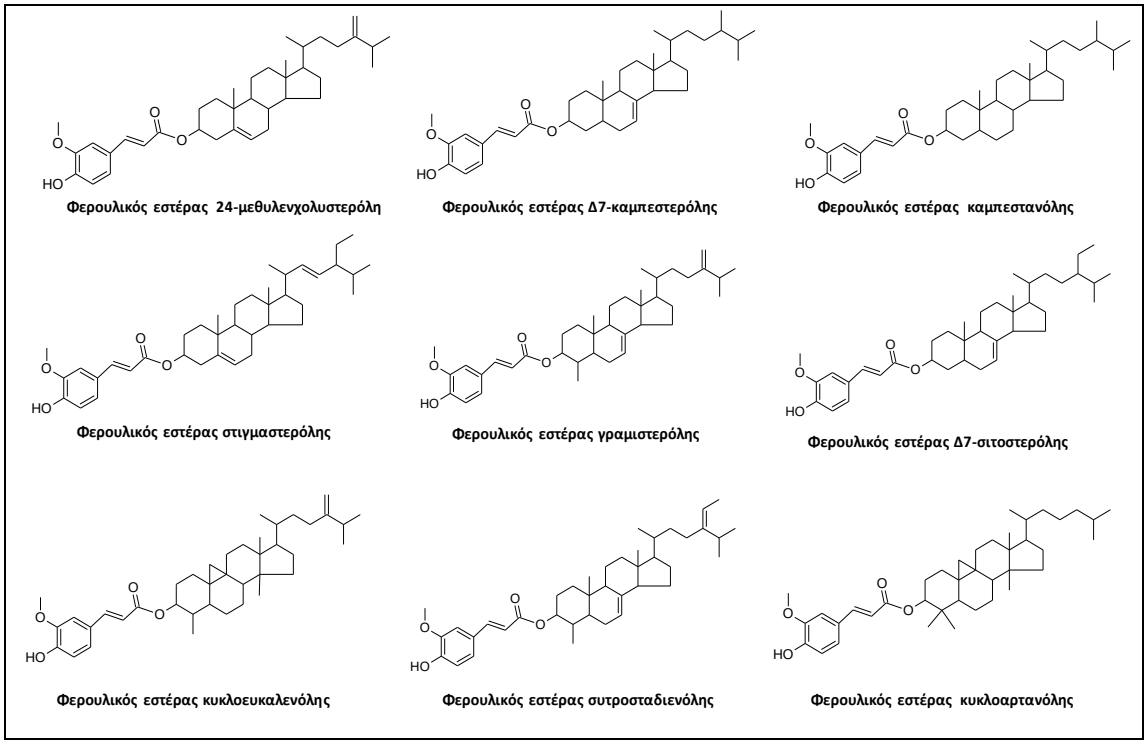
Όπως παρουσιάζεται και στο χρωματογράφημα CCC (Εικόνα 7.5.2) η κορυφή της γ-ορυζανόλη εμφανίζεται σε Rt **95-150 min** και συλλέχτηκε στο **κλάσμα 5**. Αν και στο χρωματογράφημα αυτό φαίνεται ότι η γ-οριζανόλη απομονώθηκε σε καθαρή μορφή εντούτοις η ύπαρξη στο έλαιο πολλών ουσιών οι οποίες δεν παρουσιάζουν απορρόφηση στο UV δεν αποκλείει την πιθανή συνέκλουση τους γεγονός που οδήγησε σε περεταίρω ελέγχους προκειμένου να διαπιστωθεί ο βαθμός καθαρότητας της. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε έλεγχος με TLC στα κλάσματα του διαχωρισμού χρησιμοποιώντας για το σκοπό αυτό πλάκες αλουμινίου (Silica gel 60 F_{254}, Merck) και σύστημα ανάπτυξης: τολουένιο / οξίκος αιθυλεστέρας / μεθανόλη σε αναλογίες 90:6:4 (v/v/v). Επίσης χρησιμοποιήθηκε και

πρότυπη γ-ορυζανόλη. Τα αποτελέσματα του ελέγχου έδειξαν ότι στο κλάσμα 5 υπάρχει σχεδόν αποκλειστικά γ-ορυζανόλη.

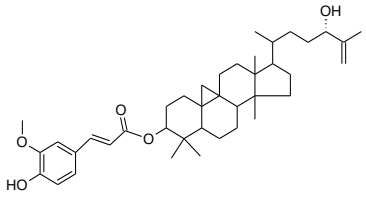
Όπως αναφέρεται και παραπάνω η γ-ορυζανόλη αποτελεί πολύπλοκο μίγμα εστέρων του φερουλικού οξέος με διάφορες φυτοστερόλες και τριτερπενικές αλκοόλες. Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρο η σύσταση της γ-οριζανόλης που προέκυψε από την προαναφερόμενη διαδικασία προχωρήσαμε σε φασματοσκοπική μελέτη του κλάσματος 5 του CCC με τη χρήση φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS). Από την μελέτη αυτή συμπεράναμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του μίγματος (γ-ορυζανόλη) αποτελείται από τέσσερεις ουσίες. Πρόκειται για τους εστέρες του φερουλικού οξέος με την κυκλοαρτενόλη, την 24-μεθυλενοκυκλοαρτενόλη, την καμπεστερόλη και την *β*-συτοστερόλη.



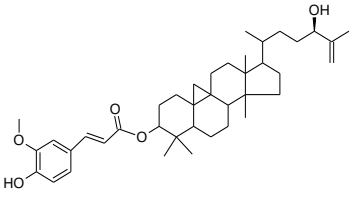
Επίσης, εντοπίστηκαν σε μικρό ποσοστό εστέρες του φερουλικού οξέος με την 24-μεθυλενεχολυστερόλη, την Δ7-καμπεστερόλη, την καμπεστανόλη, την στιγμαστερόλη, την γραμμιστερόλη, την Δ7-σιτοστερόλη, την κυκλοευκαλενόλη την συτροσταδιενόλη και την κυκλοαρτανόλη.



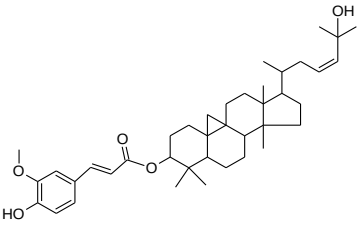
Από τα υπόλοιπα κλάσματα του διαχωρισμού μεγάλο ενδιαφέρον παρουσίασε το **κλάσμα 3,** με Rt **60-80 min** στο ίδιο χρωματογράφημα CCC (Εικόνα 7.5.2). Στον έλεγχο με TLC βρέθηκε ότι το κλάσμα αυτό περιέχει ουσίες πιο πολικές από την γ-ορυζανόλη παρουσιάζοντας όμως παρόμοια χαρακτηριστικά [απορρόφηση στο UV (325 nm) και βαθύ μπλε χρωματισμό μετά τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο εμφάνισης και θέρμανση]. Ο έλεγχος που ακολούθησε αποκάλυψε ότι πράγματι πρόκειται για εστέρες φερουλικού οξέος με τριτερπενικές αλκοόλες με μόνη δομική διαφορά την ύπαρξη ενός επιπλέον υδροξυλιού στο τριτερπενικό τμήμα. Το μίγμα αυτό που ονομάστηκε πολική γ-ορυζανόλη, περιέχει τρεις κύριες ουσίες: τον εστέρα του φερουλικού οξέος με την (24S)-κυκλοαρτ-25-ενο-3*β*,24-διόλη, την (24S)-κυκλοαρτ-25-ενο-3β,24-διόλη και την κυκλοαρτ-23Z-ενο-3β,25-διόλη. Οι παραπάνω μεταβολίτες έχουν αναφερθεί μόνο μία φορά σε πρόσφατη φυτοχημική μελέτη του RBO[479].



Φερουλικός εστέρας(24S)-κυκλοαρτ-25-εν-3β,24-διολη



Φερουλικός εστέρας(24R)-κυκλοαρτ-25-εν-3β,24-διολη



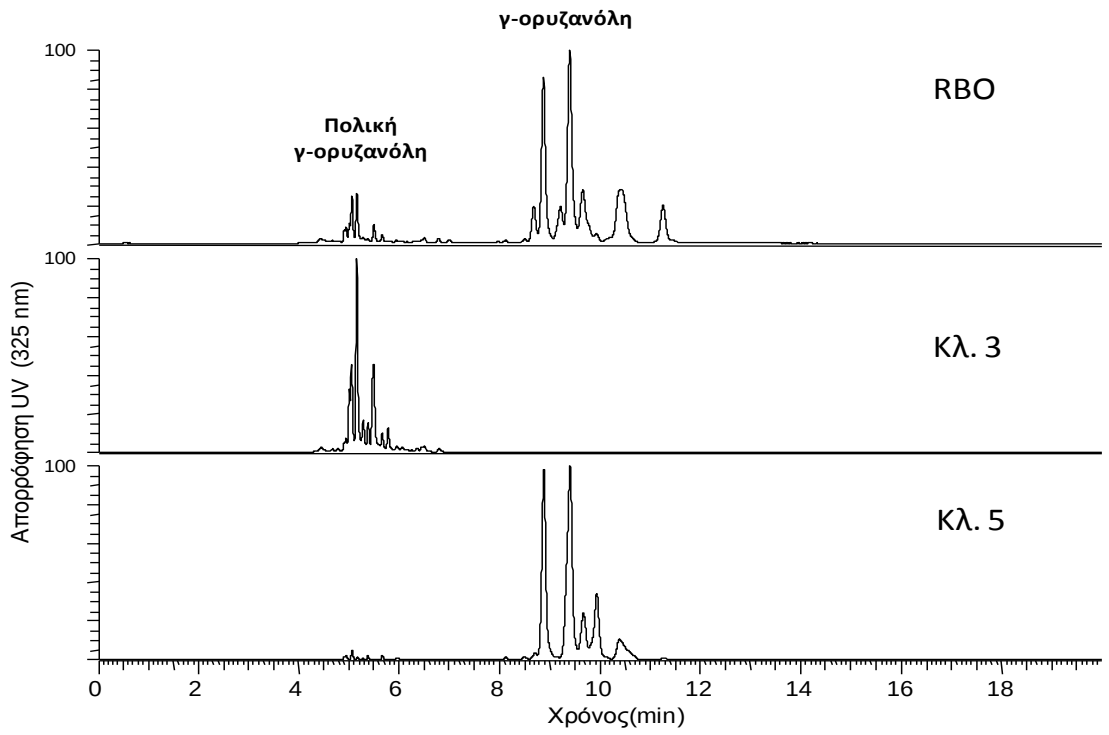
Φερουλικός εστέρας κυκλοαρτ-23Z-εν-3β,25-διολη

7.3.2 Ταυτοποίηση γ-ορυζανόλης

Για την ανάλυση των κλασμάτων 3 και 5 του CCC (κλάσματα που περιέχουν γ-ορυζανόλη) και την ταυτοποίηση των περιεχόμενων μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υπερυψηλής Απόδοσης συνδεδεμένη με υβριδικό Φασματογράφο Μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (UHPLC- HRMS) ενώ ως μέθοδος ιονισμού χρησιμοποιήθηκε η τεχνική Χημικού Ιονισμού υπό Ατμοσφαιρική Πίεση (APCI).

Ο όγκος έγχυσης ήταν 10 μL ενώ η έκλουση έγινε σε αυξημένη θερμοκρασία 50^{0}C και ροή 400 μL/min. Ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν (A) νερό και (B) ακετονιτριλιο:μεθανόλη (1:1 v/v) ενώ η μέθοδος έκλουσης καταστρώθηκε ως εξής: 50% B για 1 min, μετά 100% B σε 2 min και διατήρηση του έως τα 12 min (συνολικός χρόνος ανάλυσης 20 min). Τα δεδομένα MS αποκτήθηκαν με πλήρη σάρωση (full scan), σε εύρος μαζών *m/z* 100 έως 1000 mmu και διακριτική ικανότητα (resolution) 30000. Για τον ιονισμό (APCI) οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: θερμοκρασία εξάτμισης (vaporizer temperature) 350 ^{0}C, θερμοκρασία τριχοειδούς 250 ^{0}C και τάση τριχοειδούς 30V. Άζωτο χρησιμοποιήθηκε ως βοηθητικό αέριο εξάτμισης (sheath gas) 40 μονάδες (arbitrary units) και ως βοηθητικό αέριο (auxiliary gas) 20 μονάδες (arbitrary units).

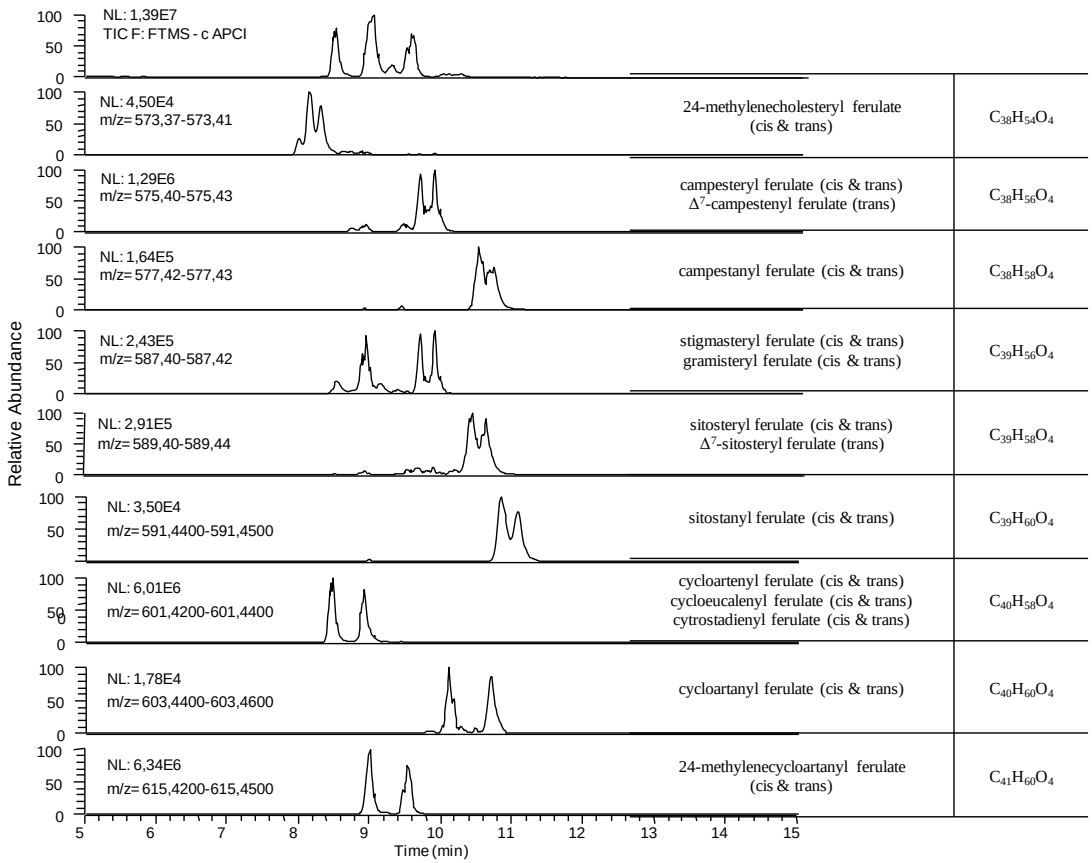
Αναλύοντας τόσο το RBO όσο και τα κλάσματα 3 και 5 του CCC διαπιστώθηκε ότι η πρώτη ομάδα κορυφών αντιστοιχεί στην πολική γ-ορυζανόλη και εκλούεται μεταξύ 4.5 και 5.5 min (κλάσμα 3), ενώ η γ-ορυζανόλη μεταξύ 8.5 και 11.5 min (κλάσμα 5) (Εικόνα 7.5.3). Μελέτη τόσο των χρωματογραφημάτων συνολικού ιοντικού ρεύματος (Total Ion Current Chromatogram - TIC) όσο και των χρωματογραφημάτων εξαγόμενων ιόντων (Extraction Ion Chromatograms – XIC) οδήγησε στην ταυτοποίηση τους. Εμφανή ήταν τα χαρακτηριστικά ψευδομοριακά ιόντα των εστέρων του φερουλικού οξέος με τριτερπενικές αλκοόλες και στερόλες τόσο για τους μεταβολίτες της γ-ορυζανόλης όσο και της πολικής γ-ορυζανόλης.



Εικόνα 7.5.3: UPLC-UV χρωματογράφημα (325 nm) του RBO και των κλασμάτων 3 και 5 του παρασκευαστικού CCC.

Το κλάσμα της γ-ορυζανόλης (κλάσμα 5 του παρασκευαστικού CCC) μελετήθηκε λεπτομερώς, με τη μέθοδο των εξαγόμενων ιόντων μέσω των χρωματογραφημάτων XIC. Στο μίγμα αυτό ανιχνεύτηκαν τόσο τα 10 συστατικά που περιγράφονται στην εργασία των Xu και Godber, όσο και μερικοί επιπλέον εστέρες φερουλικού οξέος με τριτερπενικές αλκοόλες οι οποίοι έχουν περιγραφεί σε προηγούμενη εργασία του Stoggl και συνεργατών του[453,480] (Εικόνα 7.5.4).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί για την ανάλυση LC-HRMS του δείγματος χρησιμοποιήθηκε η τεχνική APCI τόσο σε αρνητικό όσο και σε θετικό ιονισμό. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η βασική κορυφή στα φάσματα αρνητικού ιονισμού (APCI-) των συστατικών της γ-ορυζανόλης αντιστοιχούν στο ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ σε αντίθεση με τα φάσματα θετικού ιονισμού (APCI+) στα οποία η βασική κορυφή αποτελεί θραύσμα του μορίου $[M+H-194]^+$ αντιστοιχεί στο ιόν που προκύπτει από την απομάκρυνση μίας ομάδας φερουλικού οξέος από το μόριο.

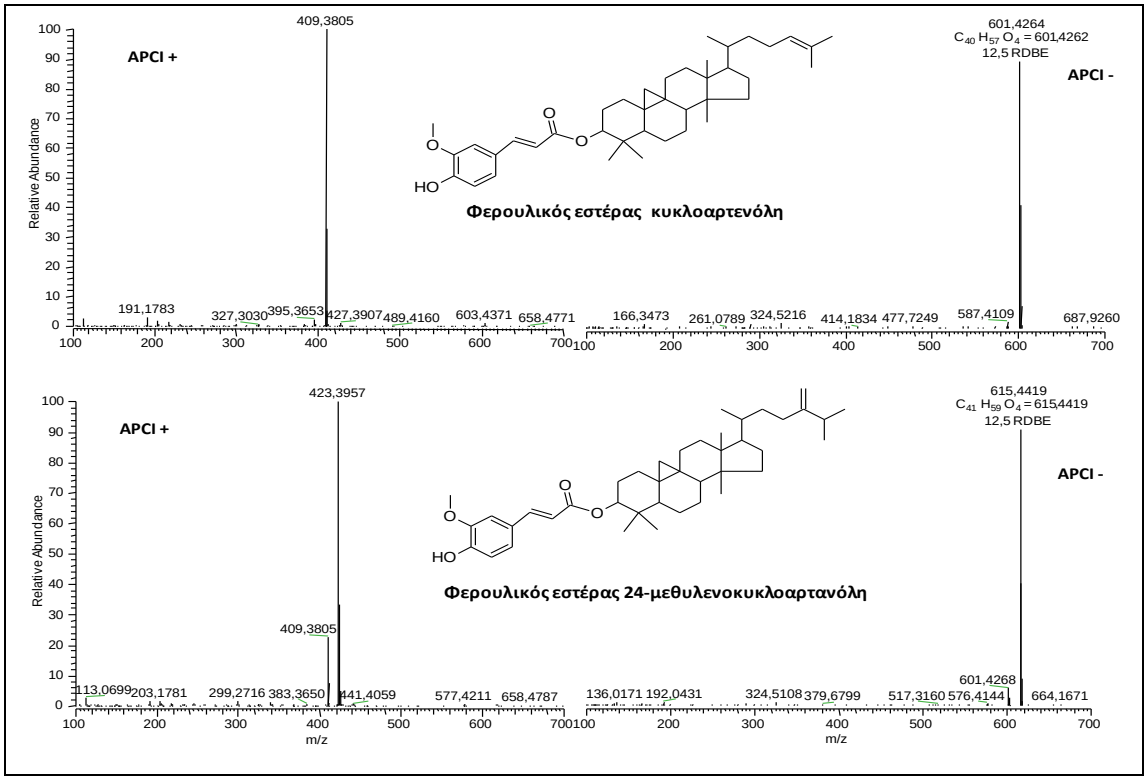


Εικόνα 7.5.4: Χρωματογραφήματα μάζας των συστατικών της γ-ορυζανόλης στο κλάσμα 5 του RBO.

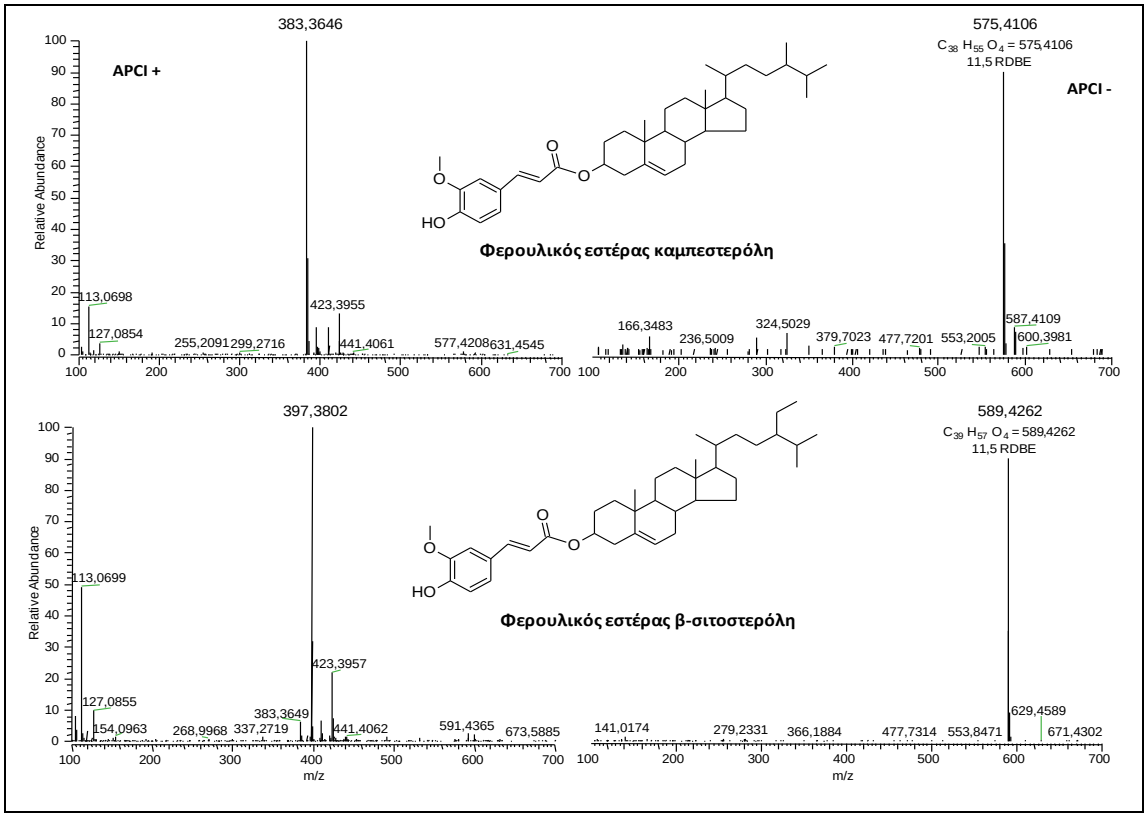
Στο χρωματογράφημα TIC (+ και -) του κλάσματος 5 του RBO εμφανίζονται τέσσερεις κύριες κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στα τέσσερα βασικά συστατικά του μίγματος της γ-ορυζανόλης δηλαδή τους φερουλικούς εστέρες της κυκλοαρτενόλης, της 24-μεθυλενο-κυκλοαρτενόλης, της καμπεστερόλης και της β-συτοστερόλης.

Ο **φερουλικός εστέρας της κυκλοαρτενόλης** εμφάνισε, στο φάσμα αρνητικού ιονισμού, βασική κορυφή σε *m/z* 601,4264 με προτεινόμενο μοριακό τύπο $C_{40}H_{57}O_4$ και βαθμό ακορεστότητας 12,5 και η οποία αντιστοιχεί στο ψευδομοριακό ιόν της ουσίας. Στο αντίστοιχο φάσμα θετικού ιονισμού παρατηρήθηκε επίσης η κορυφή του ψευδομοριακού ιόντος σε *m/z* 603,4391, η βασική όμως κορυφή του φάσματος εμφανίστηκε σε m/z 409,3805 και αντιστοιχεί στο θραύσμα που προκύπτει μετά την απομάκρυνση της φερουλικής ομάδας από το μόριο. Αντίστοιχα ο **φερουλικός εστέρας της 24-μεθυλενο-κυκλοαρτενόλης** εμφάνισε, στο φάσμα αρνητικού ιονισμού, βασική κορυφή την κορυφή του ψευδομοριακού ιόντος σε *m/z* 615,4419

(μοριακός τύπος $C_{41}H_{59}O_4$ και βαθμό ακορεστότητας 12,5) ενώ στο φάσμα θετικού ιονισμού η βασική κορυφή *m/z* 423,3957 αντιστοιχεί επίσης στο θραύσμα που προέκυψε μετά την απομάκρυνση της φερουλικής ομάδας από το μόριο $[M+H-194]^+$.



Οι κύριοι εστέρες στερολών του φερουλικού οξέος στο μίγμα της γ-ορυζανόλης είναι ο **φερουλικός εστέρας της καμπεστερόλης** και ο **φερουλικός εστέρας της *β*-σιτοστερόλης**. Στο φάσμα αρνητικού ιονισμού οι ουσίες αυτές εμφάνισαν την κορυφή του ψευδομοριακού ιόντος (βασική κορυφή) σε *m/z* 575,4106 (μοριακός τύπος $C_{38}H_{55}O_4$ και βαθμό ακορεστότητας 11,5) και *m/z* 589,4262 (μοριακός τύπος $C_{39}H_{57}O_4$ και βαθμό ακορεστότητας 11,5) αντίστοιχα. Στο φάσμα θετικού ιονισμού η βασική κορυφή αντιστοιχεί στο ιόν που προκύπτει μετά την απομάκρυνση της ομάδας του φερουλικού οξέος $[M+H-194]^+$ με *m/z* 383,3646 και *m/z* 397,3802 αντίστοιχα.



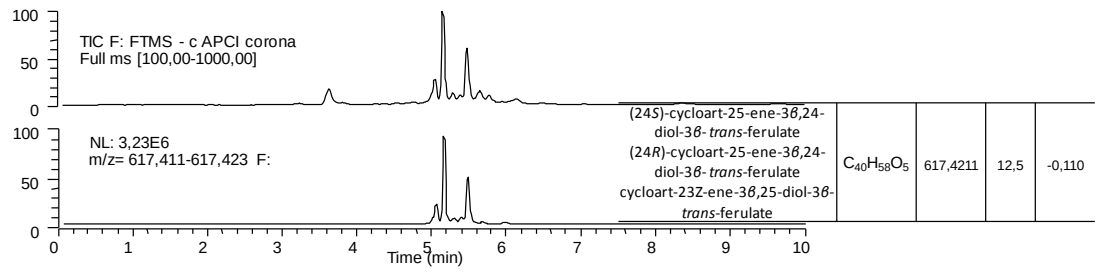
Πέραν των τεσσάρων αυτών κύριων συστατικών του μίγματος της γ-ορυζανόλης η ανάλυση του κλάσματος 5 του RBO αποκάλυψε και την ύπαρξη μιας πλειάδας εστέρων του φερουλικού οξέος τόσο με στερόλες όσο και με τριτερπενικές αλκοόλες (Εικόνα 7.5.4). Οι ουσίες αυτές αποτελούν μικρό ποσοστό του μίγματος και παρουσιάζουν το ίδιο μοντέλο θραυσματοποίησης με τις παραπάνω ουσίες τόσο στα φάσματα αρνητικού ιονισμού όσο και σε εκείνα θετικού ιονισμού.

Χρησιμοποιώντας την ίδια μεθοδολογία αναλύθηκε και το κλάσμα 3 του RBO. Το κλάσμα αυτό αποτελείται από μια ομάδα ουσιών οι οποίες διαθέτουν παρόμοια δομή με αυτήν των συστατικών της γ-ορυζανόλης. Το συμπέρασμα αυτό εξήχθη μετά τη σύγκριση των φασμάτων UV όσο και των φασμάτων HRMS και ^{1}H-NMR. Στα φάσματα UV των ουσιών αυτών παρατηρούνται τέσσερα μέγιστα απορρόφησης (μήκη κύματος 217, 234, 295 και 324 nm) τα οποία παρατηρούνται και στα φάσματα των ουσιών της γ-ορυζανόλης. Στο φάσμα HRMS (αρνητικού ιονισμού) οι ουσίες αυτές εμφάνισαν παρόμοια φασματομετρικά χαρακτηριστικά με τις ορυζανόλες όπως ίδιου εύρους βαθμό ακορεστότητας (11,5-13,5), όσο και παρόμοια στοιχειακή αναλογία στους προτεινόμενους μοριακούς τύπους. Επίσης

στα φάσματα θετικού ιονισμού η βασική κορυφή αντιστοιχεί όχι στο ψευδομοριακό ιόν αλλά στο ιόν $[M+H-194]^+$ όπως παρατηρήθηκε και στα συστατικά του κλάσματος 5 του RBO. Επιπροσθέτως το φάσμα ^{1}H-NMR είναι χαρακτηριστικό εστέρων φερουλικού οξέος με τριτερπένικες αλκοόλες καθώς στην αρωματική περιοχή εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά σήματα της φερουλικής ομάδας ενώ στην αλειφατική έναν αριθμό σημάτων που παραπέμπουν στην παρουσία τριτερπενίου.

Σημαντικό στοιχείο στην ταυτοποίηση των συστατικών του κλάσματος 3 του RBO αποτέλεσε η παρουσία τουλάχιστον ενός επιπλέον ατόμου οξυγόνου στους M.T των περισσότερων συστατικών του μίγματος. Όπως αποκάλυψε το φάσμα HRMS θετικού ιονισμού, όπου παρατηρείται κυρίως το ιοντικό θραύσμα $[M+H-194]^+$, το επιπλέον υδροξύλιο βρίσκεται στο τερπενικό τμήμα του μορίου. Η παρουσία αυτού του τύπου γ-ορυζανόλης (πολική γ-ορυζανόλη) έχει αναφερθεί σε δύο προηγούμενες μελέτες του RBO[479,481] επιβεβαιώνοντας τις παραπάνω διαπιστώσεις.

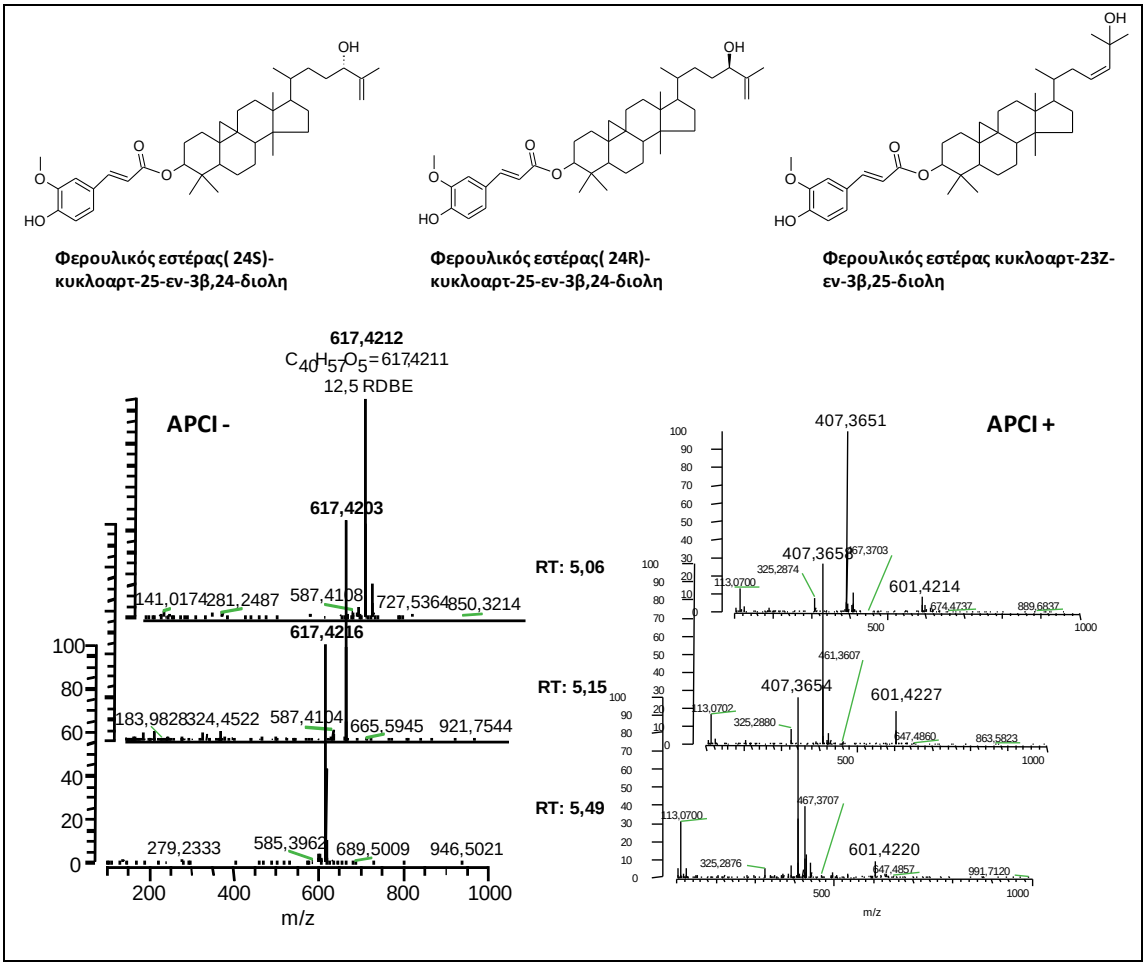
Στο χρωματογράφημα TIC (+ και -) του κλάσματος 3 εμφανίζονται τρεις κύριες κορυφές οι οποίες εκλούονται μεταξύ 4,5 και 5,5 min και αντιστοιχούν στα τρία κύρια συστατικά του μίγματος της πολικής γ-ορυζανόλης. Οι ουσίες αυτές ταυτοποιήθηκαν ως ο ***trans*-φερουλικός εστέρας της (24*S*)-κυκλοαρτ-25-ενο-3*β*,24-διόλη**, ο ***trans*-φερουλικός εστέρας της (24*S*)-κυκλοαρτ-25-ενο-3*β*,24-διόλη** και ο ***trans*-φερουλικός εστέρας της κυκλοαρτ-23*Z*-ενο-3*β*,25-διόλη** (Εικόνα 7.5.5).



Εικόνα 7.5.5: TIC κλάσματος 3 του RBO και XIC των τριών κύριων πολικών γ-ορυζανολών

Αξίζει να σημειωθεί ότι και οι τρεις ουσίες που ανιχνεύθηκαν σε αρνητικό ιονισμό εμφανίζουν το ίδιο ψευδομοριακό ιόν (m/z 617,4212) ίδιο προτεινόμενο μοριακό τύπο ($C_{40}H_{57}O_5$) και ίδιο βαθμό ακορεστότητας (12,5) δηλώνοντας ότι πρόκειται για ισομερείς ενώσεις. Επίσης στα φάσματα θετικού ιονισμού η βασική κορυφή

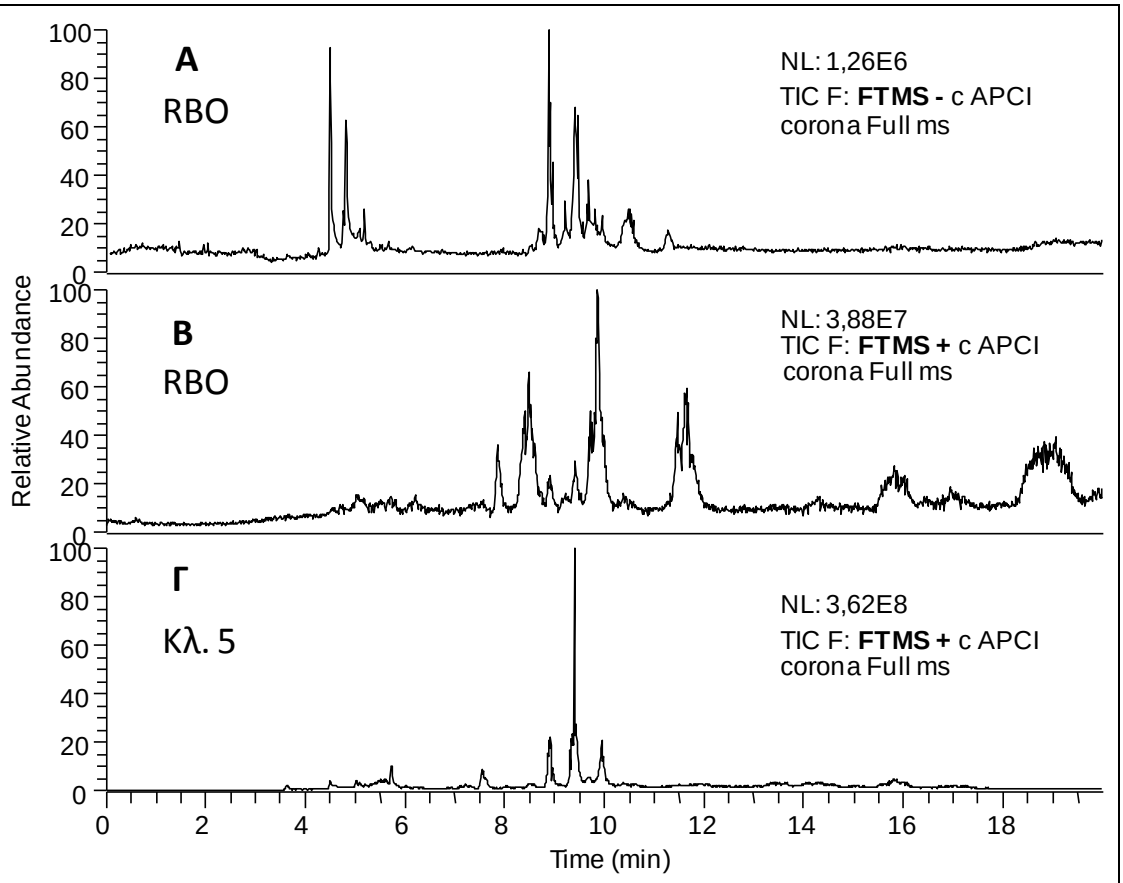
αντιστοιχεί στο ιόν που προκύπτει μετά την απομάκρυνση μιας φερουλικής ομάδας, ακλουθώντας το πρότυπο θραυσματοποίησης της γ-ορυζανόλης. Επιπρόσθετα, στα φάσματα θετικού ιονισμού εμφανίζεται ένα επιπλέον ιόν το οποίο μετά την απομάκρυνση ενός μορίου νερού από το μόριο $[M+H-H_2O]^+$. Το ιόν αυτό είναι χαρακτηριστικό των πολικών γ-ορυζανολών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστική κορυφή στην διάκριση μεταξύ των δύο τύπων ορυζανόλης.



7.3.3 Έλεγχος καθαρότητας γ-ορυζανόλης

Οι περισσότερες μέθοδοι ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης κλασμάτων πλούσιων σε γ-ορυζανόλη βασίζονται στην Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης συνδεδεμένη με ανιχνευτή UV σε μήκος κύματος 325 nm (HPLC-UV). Το RBO, ωστόσο, είναι πλούσιο σε λιπόφιλες ενώσεις οι οποίες είτε δεν απορροφούν στο UV είτε απορροφούν σε διαφορετικό μήκος κύματος και στις περισσότερες περιπτώσεις, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται κλασικές τεχνικές διαχωρισμού, συνεκλούονται με την γ-ορυζανόλη δίνοντας λανθασμένα αποτελέσματα πιστοποίησης και καθαρότητας. Για τους παραπάνω λόγους κρίθηκε απαραίτητο να λάβει χώρα μελέτη καθαρότητας της γ-ορυζανόλης με τη μέθοδο UHPLC-APCI-HRMS όπως και στην περίπτωση της ταυτοποίησης των συστατικών.

Η σύγκριση των χρωματογραφημάτων TIC του RBO σε θετικό και αρνητικό ιονισμό έδειξε ότι οι ουσίες που συνεκλούονται με την γ-ορυζανόλη (7,5 με 12,0 min) ιονίζονται ικανοποιητικά με την τεχνική APCI+ σε αντίθεση με την τεχνική APCI- στην οποία δεν ιονίζονται και κατά συνέπεια δεν παρατηρούνται. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το χρωματογράφημα TIC+ προκειμένου να μελετηθεί η καθαρότητα του κλάσματος της γ-ορυζανόλης (Εικόνα 7.5.6). Επιπλέον σε θετικό ιονισμό εμφανίζονται αρκετές κορυφές στο TIC οι οποίες αντιστοιχούν σε εστέρες γλυκερόλης και διαθέτουν παρόμοιες τιμές μοριακών βαρών με τα συστατικά της γ-ορυζανόλη, γεγονός που μπορεί εύκολα να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα. Για παράδειγμα κορυφή σε *m/z* 603,5338 (μοριακός τύπος $C_{39}H_{71}O_4$ και βαθμό ακορεστότητας 4) μπορεί εύκολα να θεωρηθεί ως το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ του φερουλικού εστέρα της κυκλοαρτενόλης το οποίο εμφανίζεται σε *m/z* 603,4398 (μοριακός τύπος $C_{40}H_{59}O_4$ και βαθμό ακορεστότητας 11). Η παραπάνω διαπίστωση είναι εφικτή μόνο σε περιπτώσεις όπου η ανάλυση και γενικότερα ο έλεγχος καθαρότητας πραγματοποιηθεί σε φασματόμετρα μεγάλης διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας μάζας (HRMS) και εφόσον έχει αναπτυχθεί η κατάλληλη μέθοδος διαχωρισμού και ιονισμού του δείγματος. Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτή η μεγάλη δυσκολία στον έλεγχο καθαρότητας της γ-ορυζανόλης καθώς επίσης και τη μεγάλη σημασία της ανάλυσης τέτοιων δειγμάτων με φασματόμετρα υψηλής διακριτικότητας.



Εικόνα 7.5.6: TIC χρησιμοποιώντας την τεχνική HPLC-APCI-HRMS του Α) RBO σε αρνητικό ιονισμό, Β) RBO σε θετικό ιονισμό και Γ) κλάσματος της γ-ορυζανόλης (κλ. 5) σε θετικό ιονισμό. Εμφανής είναι η απουσία εστέρων γλυκερόλης από το κλ. 5.

Όπως παρατηρούμε στην παραπάνω εικόνα το κλάσμα 5 που προέκυψε από την επεξεργασία του RBO με την τεχνική CCC είναι απαλλαγμένο από εστέρες γλυκερόλης και άλλα συστατικά που υπάρχουν στο έλαιο.

7.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Ο μεγάλος αριθμός ωφέλιμων ιδιοτήτων των φερουλικών εστέρων φυτοστερολών έχουν καταστήσει τα φυσικά αυτά συστατικά, προϊόντα αυξανόμενου ενδιαφέροντος με πολλαπλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων.

Η Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC) προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων χρωματογραφικών μεθόδων στην απομόνωση σε καθαρή μορφή μεγάλων ποσοτήτων γ-ορυζανόλης. Ένα από τα κύρια πλεονέκτημα του CCC είναι η αποτελεσματική ανάλυση μεγάλων ποσοτήτων δείγματος, αντίθετα με ότι συμβαίνει στην στερεά – υγρή χρωματογραφία όπου απαιτείται μικρός όγκος ένεσης για να εξασφαλιστεί καλή ποιότητα ανάλυσης. Επιπλέον, η απουσία στερεής φάσης παρακάμπτει προβλήματα μη αναστρέψιμης προσρόφησης ουσιών, εξασφαλίζοντας έτσι την ανάκτηση ολόκληρης της ποσότητας του προς ανάλυση δείγματος. Έτσι η Χρωματογραφία CCC μπορεί να αποτελέσει τεχνική επιλογής για την αύξηση της απόδοσης στην παραγωγή γ-ορυζανόλης.

Στην παρούσα εργασία αναπτύχτηκε μια μέθοδος απομόνωσης με την χρήση CCC, ειδική στην ανάλυση άπολων δειγμάτων (όπως τα έλαια), η οποία επέτρεψε την παραλαβή από το RBO υψηλής καθαρότητας γ-ορυζανόλης σε ένα μόνο βήμα. Επίσης, απομονώθηκε και παραλήφθηκε άλλη μία ομάδα ενώσεων, η πολική γ-ορυζανόλη, δίνοντας έτσι νέες δυνατότητες στη αξιοποίηση του RBO. Επιπλέον, αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε νέα μέθοδος ταυτοποίησης και ελέγχου καθαρότητας των απομονωμένων κλασμάτων γ-ορυζανόλης με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υπερυψηλής Απόδωσης συνδεδεμένη σε σειρά με Ανιχνευτή Φωτοδιόδων και Φασματογράφο Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (UHPLC-DAD-APCI (±)-HRMS). Η μέθοδος αυτή οδήγησε τόσο στην ταυτοποίηση της γ-ορυζανόλης και της πολικής γ-ουζανόλης όσο και στη επιβεβαίωση της υψηλής καθαρότητας της.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η μετάβαση από την αναλυτική στην παρασκευαστική εφαρμογή (scale-up) συνοδεύεται με σαφή βελτίωση στην ποιότητα του διαχωρισμού γεγονός πολύ ενθαρρυντικό για πιθανή χρήση της τεχνικής σε βιομηχανική κλίμακα.

Κεφάλαιο 8
Γενικό Συμπέρασμα - Προοπτικές

8.1 ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής εργασίας αποτελεί ο εντοπισμός και η φαρμακογνωστική μελέτη φυτών της Ελληνικής χλωρίδας με καλές αντιοξειδωτικές και άλλες ιδιότητες, καθώς και η γρήγορη και αποδοτική παραλαβή των εμπεριεχόμενων ουσιών.

Μελετήθηκαν φυτοχημικά πέντε είδη της οικογενείας Fabaceae (*Vicia faba, Lotus edulis, Lotus longisiliquosus, Tetragonolobus purpureus, Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus*) καθώς και το φυτό *Oryza sativa*. Από τα φυτά αυτά απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν περισσότερα από **100 φυσικά προϊόντα** εκ των οποίων τα **12 είναι νέα προϊόντα.** Οι κύριες κατηγορίες στις οποίες ανήκουν οι μεταβολίτες αυτοί είναι τα φλαβονοειδή και γλυκοσίδες φλαβονοειδών, τα φαινολικά και καρβοξυλικά οξέα καθώς και οι γλυκοσίδες τους, οι απλοί φαινολικοί γλυκοσίδες καθώς και τα τριτερπένια και οι φαιρουλικοί τους εστέρες.

Κεντρικό ρόλο στην απομόνωση των ουσιών έπαιξε η Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC). Η τεχνική χρησιμοποιήθηκε τόσο για αρχική κλασμάτωση των εκχυλισμάτων (*Vicia faba, Lotus longisiliquosus, Tetragonolobus purpureus*), όσο και για απευθείας απομόνωση ουσιών από τα αρχικά εκχυλίσματα (*Lotus edulis* και *Lathyrus laxiflorus* subsp *laxiflorus*). Επίσης ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ανάλυση άπολων μιγμάτων και στην γρήγορη και αποδοτική παραλαβή ουσιών αυξημένου φαρμακολογικού ενδιαφέροντος (απομόνωση γ-ορυζανόλης από το RBO)

Η απόδοση της δομής των απομονωθέντων μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους και κυρίως με φασματοσκοπία NMR και φασματομετρία HRMS. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ανάλυση και κατανόηση των φασμάτων NMR και MS, στην εξαγωγή συμπερασμάτων και συγκεκριμένων χαρακτηριστικών σταθερών, με σκοπό την ευκολότερη και γρηγορότερη ταυτοποίηση μορίων που ανήκουν στις χημικές κατηγορίες που πραγματεύεται η παρούσα ερευνητική προσπάθεια.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής εργασίας καταδεικνύουν σαφέστατα ότι τα φυτά της οικογένειας Fabaceae, πέραν της διατροφικής τους αξίας, διαθέτουν και ένα φορτίο δευτερογενών μεταβολιτών με σημαντικές βιολογικές δράσεις και θα μπορούσαν να αποτελέσουν καλές πηγές αντιοξειδωτικών παραγόντων.

Επίσης γίνονται εμφανή τα πλεονεκτήματα της χρωματογραφίας Κατ' Αντιροή στην επεξεργασία πολύπλοκων εκχυλισμάτων και την γρήγορη και αποδοτική παραλαβή τόσο των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών όσο και αυτών που βρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι η μετάβαση από την αναλυτική στην παρασκευαστική εφαρμογή (scale-up) συνοδεύεται με σαφή βελτίωση στην ποιότητα του διαχωρισμού γεγονός πολύ ενθαρρυντικό για πιθανή χρήση της τεχνικής σε βιομηχανική κλίμακα.

Τέλος συμπεραίνουμε ότι η Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης συνδεδεμένη σε σειρά με Ανιχνευτή Φωτοδιόδων και Φασματογράφο Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (UHPLC-DAD-APCI (±)-HRMS), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος επιλογής για την ανάλυση και τον έλεγχο καθαρότητας πολύπλοκων μιγμάτων ουσιών, παρέχοντας ταυτόχρονα πολύτιμες πληροφορίες ως προς τα δομικά τους χαρακτηριστικά.

Ως συνέχεια της εργασίας αυτής είναι:

- Η βιολογική μελέτη των εκχυλισμάτων, κλασμάτων και καθαρών προϊόντων, από όλα τα φυτικά είδη που διερευνήθηκαν, ως προς την:
  - αντιοξειδωτική/ αντιμεταλαξιογόνο δράση
  - δραστικότητα έναντι του ενζύμου τυροσινάση
  - εκτίμηση της οιστρογονικής/αντιοιστρογονικής δράσης.
- Η μελέτη των διχλωρομεθανικών εκχυλισμάτων των φυτών της οικογένειας Fabaceae με καλές αντιμικροβιακές ιδιότητες

- Η περαιτέρω μελέτη του RBO με έμφαση στην πολική γ-ορυζανόλη η οποία αποτελεί ένα μίγμα ουσιών με περιορισμένες αναφορές τόσο ως προς τις εμπεριεχόμενες ουσίες όσο και την βιολογική τους δραστικότητα.

- Η ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων που στις περιπτώσεις της βαθμιδωτής έκλουσης θα βοηθήσουν τόσο στην ευκολότερη επιλογή διφασικών συστημάτων όσο και στην πρόβλεψη των παραμέτρων έκλουσης (χρόνος και όγκος έκλουσης)

Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

1. Goldberg I., 1994, Functional Foods – Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals, Chapman & Hall, New York

2. Wahrburg U., Kratz M., Cullen P., European Journal of Lipid Science Technology, 104, 698-705, 2002

3. Buzina R., Suboticanec K., Saric M., Annual Nutrition Metabolites, 35, 32-40, 1991

4. Kromhout D., The Seven Countries Study, Acta Cardiol. 54, 155-158, 1999

5. Trichopoulou A, Vasilopoulou E, **Mediterranean diet and longevity**., *Br J Nutr*.; 84 (2), 205-9. 2000

6. Willett WC; Sacks, F; Trichopoulou, A; Drescher, G; Ferro-Luzzi, A; Helsing, E; Trichopoulos, D. **Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating**. *American Journal of Clinical Nutrition* 61 (6): 1402S–6S. 1995)

7. Mark J. Messina., **Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects**, *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, (3), 439S-450S, 1999

8. Anderson, R.N. **Method for constructing complete annual U.S. life tables. National Center for Health Statistics.** *Vital Health Statistics Series*, 2 (129), 1–36. 1999

9. Nestlé M. **Mediterranean diets: historical and research overview**. *American Journal of Clinical Nutrition*; 61:1313S-1320S 1995

10. Vasilopoulou, E., Georga, K., Joergensen, M. B., Naska, A., & Trichopoulou, A.. **The antioxidant properties of Greek foods and the flavonoid content of the Mediterranean menu. Current Medicinal Chemistry—Immunology**, *Endocrine and Metabolic Agents*, 5, 1–13. 2005

11. Mendel Friedman, **Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review**, *J. Agric. Food Chem*.**,** 44, 6-29, **1996**

12. Linda K. Massey, Reid G. Palmer and Harry T. Horner, **Oxalate Content of Soybean Seeds (Glycine max: Leguminosae), Soyfoods, and Other Edible Legumes**, *J. Agric. Food Chem.* **2001,** *49,* 4262−4266

13. Etherton P., Hecker K., Bonanome A., Coval S., Binkoski A., Hilpert K., Griel A., Etherton T., The American Journal of Medicine, 113, 71S-88S, 2002

14. Sang S, Cheng X, Stark RE, Rosen RT, Yang CS, Ho CT., **Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins: analysis of radical reaction**

products of catechin and epicatechin with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl., *Bioorg Med Chem.* 2002 Jul;10(7):2233-7.

15. Stagos D, Spanou C, Margariti M, Stathopoulos C, Mamuris Z, Kazantzoglou G,Magiatis P, Kouretas D. **Cytogenetic effects of grape extracts and plant polyphenols on mitomycin C-induced SCEs in human blood lymphocytes**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2007) 55(13):5246-5252.

16. Ghiselli A., D'Amacis A., Giacosa A., European Journal of Cancer Prevention, 6, S15-S19, 1997

17. Sundram K., Khor H.T., Ong A.S.H. and Pathmanathan R., Effect of Dietary Palm Oil on Mammary Carcinogenesis in Female Rats , Cancer Res., 49, 1447-1451, 1989

18. Fritsche S. and Steinhart H. European Food and Research Technology, 209, 153-179, 1999

19. Adlercreutz H., Markkanen H., Watanabe S., Lancet, 342, 1209-1210, 1993

20. Knight D. and Eden J., Maturitas, 22, 167-175, 1995

21. Kurzer M. and Xu X., Annual Review of Nutrition, 17, 155-158. 1997

22. Goodman M. T., Wilkens L.R., Lyu L.C., Wu A.H., Kolonel L.N., American Journal of Epidemiology, 146, 294-306, 1997

23. Murkies A., Wilcox G., Davis S., Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 83, 297-303, 1998

24. Angiosperm Phylogeny Group (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436.

25. Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M. and Webb, D. A., Flora Europaea, Vol. 2, *Cambridge University Press*, Cambridge, 1968, 126-157

26. International Code of Botanical Nomenclature (VIENNA CODE). Seventeenth International Botanical Congress Vienna, Austria, July 2005

27. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants* (1981) and *The Evolution and Classification of Flowering Plants* (1968; 2nd edition, 1988).

28. PBIO 250 Lecture Notes, James L. Reveal, Dahlgren System of Angiosperm Classification Norton-Brown Herbarium, University of Maryland

29. Δαλιάνη Κ., **Ψυχανθή για Καρπό και Σανό**, 1993

30. Audrey H. Ensminger, Marion Eugene Ensminger James E. Konlande, John R.K. RobsonThe **Concise Encyclopedia of Foods & Nutrition**, April 21, 1995

31. Chapman & Hall, **Phytochemical dictionary of the Leguminosae**, Volume 1, 1994

32. J.B. Harborne , **Distribution of flavonoids in the Leguminosae.** In: J.B. Harborne, D. Boulter and B.L. Turner, Editors, *Chemotaxonomy of the Leguminosae*, Academic Press, London (1971), pp. 257–282.

33. Volkman, J. K., *Organic Geochemistry*, 2005, *36*, 139-159

34. Robinson, T., **The Organic Constituents of Higher Plants - Their Chemistry and Interrelationships**, *Burgess Publishing Company*, U.S.A., 1963, *Chapter 8*, 117-172

35. Torssell, K. B. G., **Natural Product Chemistry-A Mechanistic and Biosynthetic Approach to Secondary Metabolism**, *John Wiley and Sons Limited*, Chichester, 1983, *Chapter 5*, 167-225

36. Banthorpe, D. V. and Charlwood, B. V., **The Isoprenoids, Secondary Plant Products,** Editors: Bell, E. A. and Charlwood, B. V., *Springer-Verlag Berlin-Heidelberg,* Germany, 1980, 185-220

37. Nicholas, H. J., **Terpenes: Phytochemistry - Organic Metabolites**, Editor: Miller, L. P., *Litton Education Publishing Company Inc.*, 1973, 254-309

38. Haslam, E., **Metabolites and Metabolism - A Commentary on Secondary Metabolism**, *Oxford University Press Limited*, England, 1985, *Chapter 5*, 86-116

39. Barton, D. H. R., Lier, E. F. and McGhie, J. F., *J. Chem. Soc.(C) Organic*, 1968, 1031-1040

40. Seo, S., Tomita, Y. and Tori, K. *J. C. S. Chemical Communications.*, 1975, 954-955

41. Lin, J-H., Ku, Y-R., Teng S-F., Wen, K-C. and Liao C-H., *Journal of Food and Drug Analysis*, 2000, *8*, 4, 278-282

42. Chiang, Y-M., Chang, J-Y., Kuo, C-C., Chang, C-Y. and Kuo, Y-H., *Phytochemistry*, 2005, *66*, 495-501

43. Somova, L. I., Shode, F. O. and Mipando, M., *Phytomedicine*, 2004, *11*, 121-129

44. Pawar, R. S. and Bhutani, K. K., *Phytomedicine*, 2005, *12*, 391-393

45. Duan, H., Takaishi, Y., Momota, H., Ohmoto, Y., Taki, T., Tori, M., Takaoka, S., Jia, Y. and Li, D., *Tetrahedron*, 2001, *57*, 8413-8424

46. Patočka, J., *Journal of Applied Biomedicine*, 2003, *1*, 7-12

47. Liu, J., *Journal of Ethnopharmacology*, 1995, *49*, 57-68

48. Máñez, S., Recio, M. C., Giner, R. M. and Ríos, J-L., *European Journal of Pharmacology*, 1997, *334*, 103-105

49. Oliveira, F. A., Lima-Junior, R. C. P., Cordeiro, W. M., Vieira-Júnior, G. M., Chaves, M. H., Almeida, F. R. C., Silva, R. M., Santos, F. A. and Rao, V. S. N., *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 2004, *78*, 719-725

50. Somova, L. O., Nadar, A., Rammanan, P. and Shode, F. O., *Phytomedicine*, 2003, *10*, 115-121

51. Fernandes, J., Castilho, R. O., da Costa, M. R., Wagner-Souza, K., Kaplan, M. A. C. and Gattass, C. R., *Cancer Letters*, 2003, *190*, 165-169

52. Kundu, J. K., Rouf, A. S. S., Hossain, N., Hasan, C. M. and Rashid, M. A., *Fitoterapia*, 2000, *71*, 577-579

53. Pungitore, C. R., García, M., Gianello, J. C., Sosa, M. E. and Tonn, C. E., *Journal of Stored Products Research*, 2005, *41*, 433-443

54. Pascal, S., Taton, M. and Rahier, A., *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, *268*, 16, 11639-11654

55. Vickery, M. L. and Vickery, B., **Secondary Plant Metabolism**, *The MacMillan Press Limited*, London, 1981, *Chapter 5*, 112-156

56. Mann, J., **Secondary Metabolism**, *Oxford Science Publications*, Oxford, UK, 1987, *Chapter 3*, 95-172

57. Hartmann, M-A., *Trends in Plant Science*, 1998, *3*, 5, 170-175

58. Darnet, S., and Rahier, A., *Biochemical Journal*, 2004, *378*, 889-898

59. Kitajima, J., Kimizuka, K. and Tanaka, Y., *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1999, *47*, 8, 1138-1140

60. Haslam, E., **Aspects of Enzymology of the Shikimate Pathway**, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 1996, *69*, 158-240

61. Manitto, P., **Biosynthesis of Natural Products**, *Ellis Horwood Limited (Publishers)*, Chichester, 1981, *Chapter 2*, 51-124

62. Corthout J., Pieters L., Claeys M., Geerts S., Varden Berghe D., Vlitinck A., *Planta Med.,* 60 (5), 460-463, 1994

63. Panizzi L., Caponi C., Catalano S., Cioni P.L., Morelli I., **In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of Rubus ulmifolius**, *Journal of Ethnofarmacology*, 79, 165-168, 2002.

64. Wen A., Delaquis P., Stanich K., Toivonen P., **Antilisterian activity of selected phenolic acids,** *Food Microbiology*, 20, 305-311, 2003

65. Fernandez M.A., Saenz M.T., Garcia M.D., *J. Pharm. Pharmacol*., 542, 49-58, 2003

66. Nakajima H., Wada M., Ota T., *Igaku to Seibutsugaku*, 125(60), 211-214, 1992

67. Carton E., Carbonneau M.A., Fouret G., Descomps B., Leger C.L., *J. Nat. Prod*., 64(4), 480-486, 2001

68. Harborne, J. B. (Ed), The Flavonoids - **Advances in Research since** 1986, *Chapman and Hall*, London, 1993, *Chapter 15*, 619-652

69. Ryles, A. P., Smith, K. and Ward, R. S., Essential Organic **Chemistry for Students of the Life Sciences**, *John Wiley and Sons Limited*, Chichester, 1980, *Chapter 15*, 264-283

70. Vickery, M. L. and Vickery, B., **Secondary Plant Metabolism**, *The MacMillan Press Limited*, London, 1981, *Chapter 7*, 183-219

71. Manitto, P., **Biosynthesis of Natural Products**, *Ellis Horwood Limited (Publishers)*, Chichester, 1981, *Chapter 2*, 364-429

72. Harborne, J. B. (Ed), **The Flavonoids - Advances in Research since** 1986, *Chapman and Hall*, London, 1993, *Chapter 11*, 499-536

73. Mann, J., **Secondary Metabolism**, *Oxford Science Publications*, Oxford, UK, 1987, *Chapter 6*, 261-301

74. Mishra, B., Priyadarsini, K. I., Kumar, M. S., Unnikrishnan, M. K. and Mohan, H., *Biological & Medicinal Chemistry*, 2003, *11*, 2677-2685

75. Pietta, P-G., *Journal of Natural Products*, 2000, *63*, 1035-1042

76. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G., *Free Radical Biology & Medicine*, 1996, *20*, 7, 933-956; .

77. Aruoma, O. I., *Mutation Research*, 2003, *9-20*, 523-524; Burda, S. and Oleszek, W., *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2001, *49*, 2774-2779

78. Hoffmann-Bohm, K., Lotter, H., Seligmann, O. and Wagner, H., *Planta Medica*, 1992, *58*, 544-548

79. Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R. and Del Rio, J. A., *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1997, *45*, 12, 4505-451

80. Y. Ito, R.L. Bowman, **Coundercurrent Chromatography: Liquid-Liquid Partition Chromatography without Solid Support**, *Science* 167 (1970) 281.

81. Y. Ito, R.L. Bowman, *J. Chromatogr. Sci*. 8 (1970) 315.

82. T. Tanimura, J.J. Pisano, Y. Ito, R.L. Bowman, Science 169 (1970) 54.

83. Y. Ito, in: N.B. Mandava, Y. Ito (Eds.), Countercurrent Chromatography:Theory and Practice, Marcel Dekker, New York, 1988, pp.79–442.

84. M. Berthelot, E. Jungfleish, Ann. Chim. Phys. 26 (1872) 396

85. J. Sangster, Octanol–Water Partition Coefficients, Fundamentals and Physical Chemistry, Wiley, Chichester, 1997.

86. J. Rydberg, C. Musikas, G.R. Choppin, **Principle and Practices of Solvent Extraction**, *Marcel Dekker, New York*, 1992.

87. Naman Doshi, Avani Sheth, Dhrubo Sen and J.B. Dave, **Counter Curent Chromatography: A Superior and An Advanced Analytical Technique**, *Pharma Times*, 42, 11-15, 2010.

88. Sanchez F G, Lopez M.H. and Gomez J.C.M., *Talanda*, 34, 610, 1987

89. Murayama, W. et al*., J. Chromatogr*., 239, 643-649 (1982)

90. Motomizu S, Oshima M and Ikegami T **Sensitivity enhancement in the spectrophotometric determination of silicate by a flotation-exchange extraction method using an ion associate**. *Analyst* 115: 1627. (1990)

91. Motomizu S, Hagiwara T, Yokoyama A and Oshima M **Color development based on the ion association of molybdophosphate with cationic dye chloro-malachite green.** *Analytical Sciences* 9(6): 817. (1993)

92. Torres F M and Cerdà V **Simultaneous determination of phosphate and silicate in waste water by sequential injection analysis**. *Analyst* 122: 1033. (1997).

93. Ohashi A, Ogiwara M, Ikeda R, Okasa H and Ohashi K Cloud **point extraction and preconcentration for gas chromatography of phenothiazine tranquilizers in spiked human serum.** *Analytical Science,* 20:1353. (2004)

94. Yoichiro Ito, **Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography**, *Journal of Chromatography A*, 1065 (2005) 145–168

95. Sutherland, I.A. **Recent progress on the industrial scale-up of counter-current chromatography**, *J. Chromatog. A*., 1151, 6-13 (2007)

96. Ito, Y., **Toroidal Coil Planet Centrifuge**, *US Patent No*. 4228009 (1977)

97. Margraff, R., Intes, O., Renault, J.-H. and Garret, P. **Partitron 25, a multi-purpose industrial centrifugal chromatograph: Rotor design and preliminary results on efficiency and stationary phase retention**, *J. Liquid Chromatog. & Rel. Technol*., 28 (12-13), 1893-1902 (2005)

98. Sutherland, I.A., Bourton, E., Fisher, D., Intes, O., Audo, G. and Couillard, F. **Rapid Optimisation and Scale-up to Pilot Scale: linear protein purification scale up from a 0.5 litre to a 6.25 litre CPC rotor using myoglobin and lysozyme as a model test system**, *J. Chromatog. A.,* (2007)

99. Philippe Duret, Mohamed Akram Fakhfakh, Christine Herrenknecht, **Preparetive separation of quinolines by centrifugal partition chromatography with gradient elution**, *Journal of Chromatography A*, 1011, 55-65, 2003

100. Young Wan Ha and Yeong Shik Kim, **Preparative Isolation of Six Major Saponins from Platycodi Radix by High-speed Counter-current Chromatography,** *Phytochem. Anal.* 2009; 20: 207–213

101. Giddings JC. ***Unified Separation Science****. John Wiley & sons; New York*: 1991. pp. 97–101.

102. Berthod A, Ruiz-Angel MJ, Carda-Broch S. *Anal. Chem.* 2003;75:5886–5894

103. Abott TP, Kleiman R *J. Chromatogr*. 538:109 (1991)

104. Oka F, Oka H, Ito Y *J. Chromatogr*. 538:99 (1991)

105. Conway WD **Countercurrent chromatography; apparatus theory and applications. VCH, Weinheim / Foucault AP (ed) Centrifugal partition chromatography**. Marcel Dekker, New York, NY (1990)

106. Mark J. Messina., **Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects**, *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, (3), 439S-450S, 1999

107. Anderson, R.N. **Method for constructing complete annual U.S. life tables. National Center for Health Statistics.** *Vital Health Statistics Series*, 2 (129), 1–36. 1999

108. Nestlé M. **Mediterranean diets: historical and research overview**. *American Journal of Clinical Nutrition*; 61:1313S-1320S 1995

109. Vasilopoulou, E., Georga, K., Joergensen, M. B., Naska, A., & Trichopoulou, A.. **The antioxidant properties of Greek foods and the flavonoid content of the Mediterranean menu. Current Medicinal Chemistry—Immunology**, *Endocrine and Metabolic Agents*, 5, 1–13. 2005

110. Mendel Friedman, **Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review**, *J. Agric. Food Chem*.**,** 44, 6-29, **1996**

111. Linda K. Massey, Reid G. Palmer and Harry T. Horner, **Oxalate Content of Soybean Seeds (Glycine max: Leguminosae), Soyfoods, and Other Edible Legumes**, *J. Agric. Food Chem.* **2001,** *49,* 4262−4266

112. Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LCM, **The chemistry of tea flavonoids.** *Crit Rev Food Sci Nutr* 37, 693-704, 1997

113. Hagerman, A. E. and Butler, L. G. 1989. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. J. Chem. Ecol. 15: 1795-1810.

114. VERNON L. SINGLETON, RUDOLF ORTHOFER, and ROSAM. LAMUELA-RAVENTAS, **Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent**, *METHODS IN ENZYMOLOGY*. VOL. 299

115. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Meth Enzymol 299:152-178

116. Chrysoula I. Spanou, Aristidis S. Veskoukis, Dimitrios Stagos, Kalliopi Liadaki, Nectarios Aligiannis, Apostolos Angelis, Alexios-Leandros Skaltsounis, Maria Anastasiadi, Serkos A. Haroutounian, Dimitrios Kouretas, **Effects of greek legume plant extracts on xanthine oxidase, catalase and superoxide dismutase activities**, *J Physiol Biochem*, in press

117. Buijnsters, M., Bicanic, D., Chirtoc, M., Nicoli, M. C. and Min-Kuo, Y., *Analytical Sciences*, 2001, *17*, s544-s546

118. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C., *Lebensm. Wiss. Technol.*, 1995, *28*, 25-30

119. Argolo, A. C. C., Sant'Ana, A. E. G., Pletsch, M. and Coelho, L. C. B. B., *Bioresource Technology*, 2004, *95*, 229-233

120. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1995, *28*, 25–30.

121. Spanou C, Stagos D, Tousias L, Angelis A, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Kouretas D, **Assessment of antioxidant activity of extracts from unique Greek varieties of Leguminosae plants using in vitro assays** *Anticancer Res*. 2007, 27(5A), 3403-10

122. Keum Y.S., Park K.K., Lee J.M., Chum K.S., Park J.H., Lee S.K., Kwon H., Surch Y., **Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of the heat-processed ginseng.**, *Cancer Lett*., 2000, 150, 41-48

123. Shang-Tzen Chang, Jyh-Horng Wu, Sheng-Yang Wang, Pei-Ling Kang, Nin-Sum Yang and Lie-Fen Shyur, **Antioxidant activity of extract from Acacia confuse Bark and heartwood,** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49, 3420-3424.

124. McCord JM, Fridovich I **The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase.** *J Biol Chem* 243:5753-5760, (1968)

125. Borges F, Fernandes E, Roleira, F, **Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors**. *Curr Med Chem* 9:195-217, (2002)

126. Cotelle N **Role of flavonoids in oxidative stress**. Cur Top Med Chem 1:569-590, (2001)

127. Δαλιάνη Κ., **Ψυχανθή για Καρπό και Σανό**, 1993

128. Basler M.A., **The Epidemiology of favism,** *World Health Organization Bull*, 48, 1-13, 1973

129. Kirman H.N., *Ann. New York Acad. Sci*., 151, 753-764, 1968

130. Australian New Crops Web Site, **Listing of Interesting Plants of the World**, *http://www.newcrops.uq.edu.au/listing/species_pages_V/Vicia_faba_2007.htm*

131. Chapman and Hall, **Phytochemical Dictionary of the Leguminosae**, Volume 1, 1994

132. Blamey M. & Crey-Wilson C., 1993

133. Ingham J.L*., Phytochemistry*, 16, 1279-1282, 1977

134. Van Valen F., *Planta Med*., 35, 141-149, 1979

135. G. W. BUTLHR, **THE DISTRIBUTION OF THE CYANOGLUCOSIDES LINAMARIN AND LOTAUSTRALIN IN HIGHER PLANTS**, *Phytochemisty,* 4, 127-131.

136. Cherney J.H. et al., *J. Agric. Food. Chem*., 37, 345-350, 1989

137. Reynaud J., et al., *Phytochemistry*, 21, 2604-2605, 1982

138. Jay M., et al., *Phytochemistry,* 17, 827-829, 1978

139. Harborne J.B., *Phytochemistry*, 8, 177-183, 1969

140. Walter E.D., *J. Pharm. Sci*., 50, 173, 1961.

141. Wood K.V., et al., Plant Physiol., 96, 892-897, 1991

142. Przybylska J. and Rymowicz-Dabrowska T., *Rocz. Nauk. Roln. Ser.A,* 96, 25-33, 1970

143. Bell E.A., *Biochem J.,* 83, 225-229, 1962

144. Pecket R.C., *New Phytol*., 59, 138-144, 1960

145. N. MULINACCI, F. F. VINCIERI, A. BALDI, M. BAMBAGIOTTI-ALBERTI, A. SENDLT and H. WAGNER, **FLAVONOL GLYCOSIDES FROM *SEDUM TELEPHIUM* SUBSPECIES *MAXIMUM* LEAVES**, *Phytochemistry,* Vol. 38, No. 2, pp. 531-533, 1995

146. Hitoshi Yoshimitsu , Makiko Nishida, Fumio Hashimoto, Mika Tanaka, Yusuke Sakata, Masafumi Okawa, Toshihiro Nohara, **Chromone and flavonol glycosides from Delphinium hybridum cv.''Belladonna Casablanca''**, *J Nat Med* (2007) 61:334–338

147. Zwanger, C. and Dronke, F. (1861) *Ann. Suppl.* 1, 263.

148. Zemplbn, G. and Bog&r, R. (1941) *Ber. Deut. Chem. Ges*. 74. i483.

149. Shimokoriyama, M. (1949) *Bot. Mug*. (Tokyo) 62, 737.

150. L. FARKAS, B. VERMES, M. Nogradi, **THE FINAL STRUCTURE OF ROBININ AND BIOROBIN AND THEIR TOTAL SYNTHESIS,** *Phymchemistry*. 1976. 15. pp. 215-218.

151. M.D. Alaniya, E.P. Kemertelidze, N.F. Komissarenko, **Flavonoids from Some Species of Astragalus L of Georgian Flora, Metsniereba**, Tbilisi, 2002 (Russian).

152. M.D. Alaniya, T.I. Gigoshvili, **Flavonoids and cycloartans in the manufacturing remains of preparation Flaronin,** Proc. Georgian Acad. Sci. Chem. Ser. 22 (1996) 176–178 (Georgian).

153. Tsiklauri L, An G, Ruszaj DM, Alaniya M, Kemertelidze E, Morris ME, **Simultaneous determination of the flavonoids robinin and kaempferol in human breast cancer cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry**., *J Pharm Biomed Anal*. 2011 Apr 28;55(1):109-13

154. Hori, Yumiko; Murakoso, Tomomi; Fukumura, Motonori; Toriizuka, Kazuo, **Constituents and antioxidative Activity of a hot-water extract of adzuki (Vigna angularis) beans** *Shokuryo Gakkaishi* (2009), 62(1), 3-11

155. Mariani, Cristina; Braca, Alessandra; Vitalini, Sara; De Tommasi, Nunziatina; Visioli, Francesco; Fico, Gelsomina **Flavonoid characterization and in vitro antioxidant activity of Aconitum anthora L. (Ranunculaceae)** *Phytochemistry* (2008), 69(5), 1220-1226.

156. Yoshida, Kumi; Kondo, Tadaomi; Ito, Mie; Kondo, Tadao , **Analysis of polyphenols in water extract of red adzuki bean, Vigna angularis** *New Technologies & Medicine* (2005), 6(3), 226-231.

157. Huang, Shaojun; Huang, Qiuling; Yi, Xianghui; Huang, Lulu; Yu, Jing, **Chemical constituents in leaves of Litchi chinensis** Sonn., Zhongcaoyao (2007), 38(9), 1313-1315.

158. De Melo, Giany O.; Malvar, David do C.; Vanderlinde, Frederico A.; Rocha, Fabio F.; Pires, Priscila Andrade; Costa, Elson A.; de Matos, Lecia G.; Kaiser, Carlos R.; Costa, Sonia S. **Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from Sedum dendroideum** *Journal of Ethnopharmacology* (2009), 124(2), 228-232.

159. De Melo, Giany O.; Malvar, David do C.; Vanderlinde, Frederico A.; Pires, Priscilla A.; Cortes, Wellington S.; Germano Filho, Pedro; Muzitano, Michelle F.; Kaiser, Carlos R.; Costa, Sonia S. **Phytochemical and pharmacological study of Sedum dendroideum leaf juice** *Journal of Ethnopharmacology* (2005), 102(2), 217-220

160. FRANCISCO TOM&-LORENTE, MANUELA M. GARCIA-GRAU, FANCISCO A. TOM&-BARBERAN and Jo& L. NIETot, **ACETYLATED FLAVONOL GLYCOSIDES FROM VICIA FABA LEAVES**, Phytochemistry, Vol. 28, No. 7, pp. 1993-1995, 1989

161. Maria Halabalaki,[†] Aurélie Urbain,[†,‡] Aristea Paschali,[†] Sofia Mitakou,[†] François Tillequin,[§] and Alexios-Leandros Skaltsounis, **Quercetin and Kaempferol 3-*O*-[*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-*α*-L-arabinopyranoside]-7-*O*-*α*-L-rhamnopyranosides from *Anthyllis hermanniae* L.: Structure Determination and Conformational Studies**, *J Nat Prod*. (In press)

162. Bhakuni DS. Joshi PP, Uprety H, Kapil RS, **Roseoside -A C13 glycoside from Vinca rosea.** *Phytohemistry* 13, 2541-2543, (1974)

163. Cui BL. Nakamura M. Kinjo J. Nohara T, **Chemical constituents of Astragati Semen.** *Chem Pharm Bull*, 41, 78- 182, (1993)

164. Otsuka H., Yao M., Kamada K., Takeda N., Agangliosides G-M: **glycosides of megastigmane derivatives from the leaves of Alanglium premniblium.** *Chem Pharm Bull* , 43, 754-759, (1995)

165. Yoshio Takeda Kaori Yano Hisako Ayabe Toshiya Masuda Hideaki Otsuka Etsuko Sueyoshi Takakazu Shinzato Mitsunori Aramoto, **Glycosidic constituents of the leaves of an Okinawan Leguminosae plant, Derris trifoliata Lour**., *J Nat Med* (2008) 62:476–478

166. Yoshikawa M, Shimada H, Saka M, Yoshizumi S, Yamahara J, Matsuda H, Medicinal foodstuffs. V. Moroheiya. (1): **Absolute stereostructures of**

corchoionosides A, B, and C, histamine release inhibitors from the leaves of Vietnamese Corchorus olitorius L. (Tiliaceae), Chem Pharm Bull (Tokyo). 1997 Mar;45(3):464-9

167. Neil Frankish[1], Fábio de Sousa Menezes[1], Clive Mills[1],Helen Sheridan[1], **Enhancement of Insulin Release from the *β*-Cell Line INS-1 by an Ethanolic Extract of *Bauhinia variegata* and Its Major Constituent Roseoside**, Planta Med 2010; 76(10): 995-997.

168. Stanislaw Burda* and Wieslaw Oleszek, **Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids,** J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 2774−2779

169. Loscalzo, Leonardo M.; Wasowski, Cristina; Marder, Mariel **Neuroactive Flavonoid Glycosides from Tilia petiolaris DC. Extracts** *Phytotherapy Research* (2009), 23(10), 1453-1457

170. Asres, Kaleab; Eder, Urlike; Bucar, Franz **Studies on the antiinflammatory activity of extracts and compounds from the leaves of Melilotus elegans** *Ethiopian Pharmaceutical Journal* (2000), 18, 15-24.

171. Takeda Y., Zhang H., Masuda T., Honda G., Otsuka H., Sezik E., Yesilada E., Sun H., *Phytochemistry*, 44, 1335—1337 (1997)

172. KIMIKO NAKANO, MIKIKO TAKATANI, TOSHIAKI TOMIMATSU and TOSHIHIRO NOHARA, **FOUR KAEMPFEROL GLYCOSIDES FROM LEAVES OF *CINNAMOMUM SIEBOLDII***, *Phytochemistry*, Vol. 22, No. 12, pp. 2831-2833, 1983

173. AURANGZEB HASAN, IFFIKHAR AHMAD, MIR AJAB KHANt and MUHAMMAD IQBAL CHUDHARY, **TWO FLAVONOL TRIGLYCOSIDES FROM FLOWERS OF *INDIGOFERA HEBEPETALA,*** *Phytochemistry,* Vol. 43, No. 5, pp. 1115-I 118, 1996

174. Pistelli, L.; Noccioli, C.; Martera, M.; Giamperi, L.; Bucchini, A.; Fraternale, D.; Ricci, D. **Antioxidant flavonol glycosides from Dorycnium hirsutum** *Chemistry of Natural Compounds* (2006), 42(3), 281-284

175. Ozcelik, Berrin; Orhan, Ilkay; Toker, Gulnur **Antiviral and antimicrobial assessment of some selected flavonoids** *Journal of Biosciences* (2006), 61(9/10), 632-638

176. Keiko Yonekura-Sakakida, Takayuki Tohge, Fumio Matsuda, Ryo Nakabayashi, Hiromitsu Takayama, Rie Niida, Akiko Watanabe-Takahashi, Eri Inoue and Kazuki Saito, **Comprehensive Flavonol Profiling and Transcriptome Coexpression Analysis Leading to Decoding Gene-Metabolite Corretation in Arabidopsis,** *The Plant Cell*, 20, 2160-2176, 2008

177. L Guo, R A Dixon, N L Paiva, **Conversion of vestitone to medicarpin in alfalfa (Medicago sativa L.) is catalyzed by two independent enzymes.**

Identification, purification, and characterization of vestitone reductase and 7,2'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanol dehydratase., *The Journal of Biological Chemistry* (1994) , 269, (35), 22372-22378

178. Militao, Gardenia C. G.; Dantas, Ivana N. F.; Pessoa, Claudia; Falcao, Maria Jose C.; Silveira, Edilberto R.; Lima, Mary Anne S.; Curi, Rui; Lima, Thais; Moraes, Manoel O.; Costa-Lotufo, Leticia V. **Induction of apoptosis by pterocarpans from Platymiscium floribundum in HL-60 human leukemia cells** *Life Sciences* (2006), 78(20), 2409-2417.

179. Lu, Kuan-Hung; Chang, Yuh-Fang; Yin, Pen-Hui; Chen, Ting-Ting; Ho, Yu-Ling; Chang, Yuan-Shiun; Chi, Chin-Wen **In vitro and in vivo apoptosis-inducing antileukemic effects of Mucuna macrocarpa stem extract on HL-60 human leukemia cells** *Integrative Cancer Therapies* (2010), 9(3), 298-308

180. Militao, Gardenia Carmen Gadelha; Jimenez, Paula Christine; Wilke, Diego Veras; Pessoa, Claudia; Falcao, Maria Jose Cajazeiras; Lima, Mary Anne Sousa; Silveira, Edilberto Rocha; Odorico de Moraes, Manoel; Costa-Lotufo, Leticia Veras **Antimitotic properties of pterocarpans isolated from Platymiscium floribundum on sea urchin eggs** *Planta Medica* (2005), 71(7), 683-685.

181. Fujiwara, Yukio; Komohara, Yoshihiro; Tsurushima, Keiichiro; Ikeda, Tsuyoshi; Takeya, Motohiro **Effect of natural compounds on human macrophage activation** *Inflammation and Regeneration* (2010), 30(6), 520-523.

182. Tyagi, Abdul M.; Gautam, Abnish K.; Kumar, Amit; Srivastava, Kamini; Bhargavan, Biju; Trivedi, Ritu; Saravanan, S.; Yadav, Dinesk K.; Singh, Nidhi; Pollet, Caroline **Medicarpin inhibits osteoclastogenesis and has nonestrogenic bone conserving effect in ovariectomized mice** *Molecular and Cellular Endocrinology* (2010), 325(1-2), 101-109

183. Katsuya Suzuki, Ban Hyun Seung, Lim Soon Sung, Lee Sanghyun, Jung Sang Hoon, Lee Yeon Sil, Shin Kuk Hyun and Kazuo Ohuchi: **The mechanism of anti-inflammatory activity of 2'-hydroxychalcone derivatives** . *Ensho Saisei*, 25: 130-136, 2005 .

184. Kim YP, Ban HS, Lim SS, Kimura N, Jung SH, Ji J, Lee S, Ryu N, Keum SR, Shin KH, Ohuchi K., **Inhibition of prostalglandin E2 production by 2'-hydoxychalcone derivatives and the mechanism of action.,** J Pharm Pharmacol. 2001 Sep;53(9):1295-302.

185. Garcez, Fernanda R.; Garcez, Walmir S.; Santana, Andrea L. B. D.; Alves, Milene M.; de Fatima, Maria; Matos, C.; **Scaliante, Anne de M. Bioactive flavonoids and triterpenes from Terminalia fagifolia (combretaceae)** *Journal of the Brazilian Chemical Society* (2006) , 17, 1223-1228.

186. Loa, Jacky; Chow, Pierce; Zhang, Kai **Studies of structure-activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells** *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (2009), 63(6), 1007-1016.

187. Boddupalli, Sekhar; Mahmood, Khalid; Saliou, Claude **Use of chalcones for the treatment of viral disorders** *PCT Int. Appl.* (2006), WO 2006127539 A1 20061130.

188. Oliver Kayser1* and Albrecht F. Kiderlen2, ***In vitro* Leishmanicidal Activity of Naturally Occurring Chalcones,** *Phytother. Res.* 15, 148–152 (2001)

189. E. M. BICKOFF, A. L. LIVINGSTON and S. C. WITT, **IDENTIFICATION OF 7,4'-DIHYDROXYFLAVONE IN FORAGES**, *Phytochemistry*, 1965. vol. 4. pp. 523-524

190. ST. V. KOSTANBCKI and F. W. OSIUS, Ber. 32,321(1899).

191. Brozic, Petra; Kocbek, Petra; Sova, Matej; Kristl, Julijana; Martens, Stefan; Adamski, Jerzy; Gobec, Stanislav; Lanisnik Rizner, **Tea Flavonoids and cinnamic acid derivatives as inhibitors of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1** *Molecular and Cellular Endocrinology* (2009), 301(1-2), 229-234.

192. Ta, Nga; Walle, Thomas **Aromatase inhibition by bioavailable methylated flavones** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (2007), 107(1-2), 127-129.

193. Jayaprakasam, Bolleddula; Doddaga, Srinivasulu; Wang, Rong; Holmes, Daniel; Goldfarb, Joseph; Li, Xiu-Min **Licorice Flavonoids Inhibit Eotaxin-1 Secretion by Human Fetal Lung Fibroblasts in Vitro** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2009), 57(3), 820-825

194. Griffiths, D. Wynne; Robertson, Graeme W.; Shepherd, Tom; Ramsay, Gavin Phytochemistry (Elsevier), 1999 , vol. 52, # 4 p. 607 - 612

195. Pereira, Alberto S.; Siqueira, Denilson S.; Elias, Vladimir O.; Simoneit, Bernd R. T.; Cabral, Jose A.; Aquino Neto, Francisco R. *Phytochemistry*, 2002 , vol. 61, 6 p. 711 - 720

196. Kolak, Ufuk (Soenmez); Ari, Sule; Birman, Huesniye; Hasancebi, Semra; Ulubelen, Ayhan *Planta Medica*, 2001 , vol. 67, # 8 p. 761 - 763

197. Saeed, M. Asif; Sabir, A. W. Fitoterapia, 2001 , vol. 72, # 7 p. 807 - 809

198. Otuki, Michel F.; Vieira-Lima, Fabiana; Malheiros, Angela; Yunes, Rosendo A.; Calixto, Joao B. *European Journal of Pharmacology*, 2005 , vol. 507, # 1-3 p. 253 - 260

199. Akihisa, Toshihiro; Franzblau, Scott G.; Ukiya, Motohiko; Okuda, Hiroki; Zhang, Fangqiu; Yasukawa, Ken; Suzuki, Takashi; Kimura, Yumiko, *Biological & Pharmaceutical Bulletin,* 2005 , vol. 28, # 1 p. 158 - 160

200. Hata, Keishi; Hori, Kazuyuki; Takahashi, Saori *Journal of Natural Products*, 2002 , vol. 65, # 5 p. 645 - 648

201. Gutierrez-Lugo, Maria-Teresa; Deschamps, Joshua D.; Holman, Theodore R.; Suarez, Enrique; Timmermann, Barbara N. *Planta Medica*, 2004 , vol. 70, # 3 p. 263 - 265

202. Tanaka, Reiko; Kinouchi, Yoshitaka; Wada, Shun-ichi; Tokuda, Harukuni *Planta Medica*, 2004 , vol. 70, # 12 p. 1234 - 1236

203. Suksamrarn, Sunit; Panseeta, Panomwan; Kunchanawatta, Soykam; Distaporn, Thanomsin; Ruktasing, Saovaluk; Suksamrarn, Apichart *Chemical & Pharmaceutical Bulletin,* 2006 , vol. 54, # 4 p. 535 - 537

204. LABORATOIRES EXPANSCIENCE Patent: US2006/216249 A1, 2006 ;

205. WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION Patent: US2005/201956 A1, 2005;

206. Msika, Philippe; Piccardi, Nathalie; Piccirilli, Antoine Patent: US2005/75380 A1, 2005 ;

207. Gauthier, Charles; Legault, Jean; Lebrun, Maxime; Dufour, Philippe; Pichette, Andre *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006 , vol. 14, # 19 p. 6713 - 6725

208. Zhou, Zhengming Patent: US2008/166383 A1, 2008 ;

209. Aoki, Yoshinori; Yoshimura, Hiroyuki Patent: US2007/9620 A1, 2007 ;

210. Peixoto, Juliana A.; Silva, Marcio Luis Andrade E; Crotti, Antonio E. M.; Veneziani, Rodrigo Cassio Sola; Januario, Ana H.; Magalhaes, Lizandra G.; Dos Santos, Fransergio F.; Cunha, Wilson R.; Gimenez, Valeria M. M.; Groppo, Milton; Albuquerque, Sergio; Da Silva Filho, Ademar A. *Molecules*, 2011 , vol. 16, # 2 p. 1825 - 1833

211. *Harborne JB*, *Baxter H*. **Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants**. London; Washington, DC: Taylor & Francis, *1993*

212. Tsuchida, Yuuzou Patent: EP1994928 A1, 2008

213. (Ana-L. and Perez-Castorena 1997)

214. Won, Hee Mok; Kwon, Yong Soo; Lee, Jin Hoon; Kim, Chang Min **Chemical constituents of the leaves of Weigela subsesillis** *Saengyak Hakhoechi* (2004), 35(1), 1-5.

215. Djoudi, Roukia; Bertrand, Cedric; Fiasson, Katia; Fiasson, Jean-Louis; Comte, Gilles; Fenet, Bernard; Rabesa, Zafera Antoine **Polyphenolics and iridoid glycosides from Tarenna madagascariensis** *Biochemical Systematics and Ecology* (2007), 35(5), 314-316.

216. Perez-Castorena, Ana-L.; Castro, Agustin; Roma de Vivar, Alfonso **A dirhamnopyranoside from Psacalium megaphyllum,** *Phytochemistry* (1997), 46(7), 1297-1299

217. (Mulinacci N 1994)

218. Bradbury, A. G. W.; Balzer, H. H. **Carboxyatractyligenin and atractyligenin glycosides in coffee** *Colloque Scientifique International sur le Cafe* (1999), 18th, 71-77

219. Cascio, G.; Mantia, G.; Fontana, G.; Vetri, P. **Glycosides of Coffea robusta L. Linden and carbohydrate metabolism** *Pharmacological Research* (1993), 27(Suppl. 1), 35-6

220. Vargas, David; Dominguez, Xorge A.; Acuna-Askar, Karim; Gutierrez, Marcos; Hostettmann, Kurt **Norditerpenes and norditerpene glycosides from Drymaria arenarioides** *Phytochemistry* (1988), 27(5), 1532-4.

221. Shao, Yu; Bai, Nai-Shen; Zhou, Bing-Nan **Kaurane glycosides from Inula britannica** *Phytochemistry* (1996), 42(3), 783-786.

222. Rosselli, Sergio; Bruno, Maurizio; Maggio, Antonella; Bellone, Gabriella; Chen, Tzu-Hsuan; Bastow, Kenneth F.; Lee, Kuo-Hsiung *Journal of Natural Products*, 2007 , vol. 70, # 3 p. 347 - 352

223. Sergio; Bruno, Maurizio; Maggio, Antonella; Bellone, Gabriella; Chen, Tzu-Hsuan; Bastow, Kenneth F.; Lee, Kuo-Hsiung, **Cytotoxic activity of some natural and synthetic ent-kauranes** *Journal of Natural Products* (2007), 70(3), 347-352

224. Camarda, L.; Di Stefano, V.; Schillaci, D. **Atractyligenine chemistry, part VI: Synthesis and biological activities of atractyligenine derivatives** *Pharmazie* (2002), 57(6), 374-376.

225. Fontana, G.; Mantia, G.; Vetri, P.; Venturella, F.; Hopps, V.; Cascio, G**. Effects on the carbohydrate metabolism of "coffee atractylosides"** *Fitoterapia* (1994), 65(1), 29-33.

226. Cascio, G.; Mantia, G.; Fontana, G.; Vetri, P. **Effects on the carbohydrate metabolism of Coffea robusta unroasted coffee-beans extract** *Fitoterapia* (1994), 65(1), 24-8.

227. DYNAMIS THERAPEUTICS, INC. Patent: WO2006/47409 A2, 2006 ;

228. ADITECH PHARMA AB Patent: WO2007/42035 A2, 2007 ;

229. Stookey, Evangeline L.; Sandroni, Paola; Pittelkow, Mark R. *Patent*: US2007/82070 A1, 2007 ;

230. CALGENEX CORPORATION Patent: US2008/38219 A1, 2008 ;

231. Skolnick, Phil; Stern, Warren Patent: US2008/14272 A1, 2008 ;

232. Beyreuther, Bettina; Stohr, Thomas Patent: US2007/43120 A1, 2007 ;

233. Hemosol LP Patent: US6974794 B1, 2005 ;

234. Chang, Chao-Lin; Wu, Yang-Chang; Wang, Guei-Jane; Zhang, Li-Jie; Tsai, Wen-Jen; Kuo, Yao-Haur; Chen, Ru-Yin *Phytochemistry,* 2010 , vol. 71, # 2-3 p. 271 - 279

235. CYCLACEL LIMITED; CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED Patent: WO2008/122767 A2, 2008

236. Pullen, Erroll Patent: US2008/214400 A1, 2008 ;

237. Fabricant, Jill D. Patent: US2007/99966 A1, 2007 ;

238. Tsuchida, Yuuzou Patent: EP1994928 A1, 2008 ;

239. SUNTORY LIMITED Patent: WO2007/4689 A1, 2007 ;

240. Gadow, Astrid von; Joubert, Elizabeth; Hansmann, Chris F. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997 , vol. 45, # 3 p. 632 - 638

241. L'OREAL Patent: US2008/233076 A1, 2008 ;

242. LIPO CHEMICALS INC. Patent: WO2008/73684 A1, 2008 ;

243. Fiorentino, Antonio; D'Abrosca, Brigida; Pacifico, Severina; Mastellone, Claudio; Piscopo, Vincenzo; Monaco, Pietro; Caputo, Romualdo *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008 , vol. 56, # 8 p. 2660 - 2667

244. Masuda, Toshiya; Fujita, Nao; Odaka, Yuka; Takeda, Yoshio; Yonemori, Shigetomo; Nakamoto, Katsuo; Kuninaga, Hideki *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,* 2007 , vol. 71, # 9 p. 2316 - 2320

245. Nassar M.I., Gaara A.H., Marzouk M.S., El-Din E., El-Khrisy A.M., ***A new gentisic acid glycoside and C-glycosylflavones from Erythrina indica with the antioxidant activity evaluation***, *Bulletin of the Faculty of Pharmacy*, 41, 207-209, 2003.

246. Fayos J., Belles J.M., Lopez-Gresa M.P., Primo J., Conejero V.*,* ***Induction of gentisic acid 5-O-β-xylopyranoside in tomato and cucumber plants infected by different pathogens*****.** *Phytochemistry*, 67, 142-148, 2006.

247. Stochmal A., Kowalska I., Janda B., Perrone A., Piacente S., Oleszek W., ***Gentistic acid conlugates of Medicago truncatula roots****. Phytochemistry*, 70, 1272-1276.

248. Mook-Jung, Inhee; Kim, Hee; Fan, Wenzhe; Tezuka, Yasuhiro; Kadota, Shigetoshi; Nishijo, Hisao; Jung, Min Whan *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2002 , vol. 25, # 8 p. 1101 - 1104

249. Fukuda, Toshiyuki; Ito, Hideyuki; Mukainaka, Teruo; Tokuda, Harukuni; Nishino, Hoyoku; Yoshida, Takashi *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2003 , vol. 26, # 2 p. 271 - 273

250. Zhang, Yi; Morikawa, Toshio; Nakamura, Seikou; Ninomiya, Kiyofumi; Matsuda, Hisashi; Muraoka, Osamu; Yoshikawa, Masayuki *Heterocycles*, 2007 , vol. 71, # 7 p. 1565 - 1576

251. Cichewicz, Robert H.; Nair, Muraleedharan G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002 , vol. 50, # 1 p. 87 - 91

252. Matsuda H, Morikawa T., et al, Medicinal Flowers, VI. **Absolute Stereostructures of Two New Flavonol Glycosides and a Phenylbutanoid Clycoside from the Flowers of *Chrysanthemum indicum* L. : Their Inhibitory Activities for Rat Lens Aldose Reductase**, *Chem. Pharm. Bull*., 50(7) 972-975 (2002)

253. FUJINORI NANAWA, SATOSHI TAHARA and JUNYA MIZUTANI, **ISOFLAVONOIDS PRODUCED BY IRIS PSEUDACORUS LEAVES TREATED WITH CUPRIC CHLORIDE**, *Phytochemistry*, Vol. 30, No. 1, pp. 157 163, 1991

254. Satoshi Tahara, John L. Ingham and Junya Mizutani, **New Coumaronochromones from White Lupin, Lupinus albus L. (Leguminosae),** *Agric. Biol. Chem*., 49 (6), 1775-1783, 1985

255. Ahn, Eun-Mi; Nakamura, Norio; Akao, Teruaki; Nishihara, Tsutomu; Hattori, Masao *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2004 , vol. 27, # 4 p. 548 - 553

256. Miller, Chris P.; Collini, Michael D.; Harris, Heather A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,* 2003 , vol. 13, # 14 p. 2399 - 2404

257. LOZOYA LEGORRETA, Xavier Patent: WO2006/90206 A1, 2006 ;

258. Gupta, Shyam K Patent: US2006/269494 A1, 2006 ;

259. Merck Patent GmbH Patent: EP1124548 B1, 2005 ;

260. Coleman, Henry D.; Sudol, R. Neil; Sapone, William J. Patent: US2005/271600 A1, 2005 ;

261. Gumenyuk et al. Chemistry of Natural Compounds, 1972 , vol. 8, p. 385 Khimiya Prirodnykh Soedinenii, 1972 , vol. 8, p. 391

262. Marco, J. Alberto; Barbera, Oscar; Sanz, Juan F.; Sanchez-Parareda, Juan *Phytochemistry*, 1985 , vol. 24, # 10 p. 2471 - 2472

263. Adell, Joaquin; Barbera, Oscar; Marco, J. Alberto *Phytochemistry* , 1988 , vol. 27, # 9 p. 2967 - 2970

264. Yasinov, R. K.; Khaitov, I. Kh. *Chemistry of Natural Compounds*, 1988 , vol. 24, # 3 p. 386

265. Kato, Tadahiro; Yamaguchi, Yoshihiro; Abe, Nobunori; Uyehara, Tadao; Namai, Tsuneo; et al. *Tetrahedron Letters*, 1985 , vol. 26, # 19 p. 2357 - 2360

266. WERNER HERZ and PALANIAPPAN KULANTHAIVEL, **TRIHYDROXY-C_{18}-ACIDS AND A LABDANE FROM *RUDBECKIA FULGIDA***, *Phytochemistry*, Vol. 24, pp. 89-91, 1985

267. Yoshikawa, Masayuki; Murakami, Toshiyuki; Shimada, Hiromi; Yoshizumi, Satoshi; Saka, Masami; et al. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1998 , vol. 46, # 6 p. 1008 - 1014

268. Kobayashi, Masaru; Tawara, Tomoka; Tsuchida, Takashi; Mitsuhashi, Hiroshi *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1990 , vol. 38, # 11 p. 3169 - 3171

269. He, Zhen-Dan; Ma, Cui-Ying; Tan, Ghee Teng; Sydara, Kongmany; Tamez, Pamela; Southavong, Bounhoong; Bouamanivong, Somsanith; Soejarto, D. Doel; Pezzuto, John M.; Fong, Harry H. S.; Zhang, Hong-Jie *Phytochemistry*, 2006 , vol. 67, # 13 p. 1378 - 1384

270. Takayuki Nagai, Hiroaki Kiyohara, Kaori Munakata, Tatsuya Shirahata, Toshiaki Sunazuka, Yoshihiro Harigaya, Haruki Yamada**, Pinellic acid from the tuber of Pinellia ternata Breitenbach as an effective oral adjuvant for nasal influenza vaccine**, *International Immunopharmacology* 2 (2002) 1183–1193

271. Gowravaram Sabitha, E. Venkata Reddy, M. Bhikshapathi and J. S. Yadav, **Total synthesis of (9S,12R,13S)-pinellic acid**, *Tetrahedron Letters* 48 (2007) 313–315

272. Takayuki Nagai, Hiroaki Kiyohara, Kaori Munakata, Tatsuya Shirahata, Toshiaki Sunazuka, Yoshihiro Harigaya, Haruki Yamada, **Pinellic acid from the tuber of Pinellia ternata Breitenbach as an effective oral adjuvant for nasal influenza vaccine**, *International Immunopharmacology* 2 (2002) 1183–1193

273. Van Valen F., *Planta Med*., 35, 141-149, 1979

274. G. W. BUTLHR, THE DISTRIBUTION OF TI-IE CYANOGLUCOSIDES LINAMARIN AND LOTAUSTRALIN IN HIGHER PLANTS, Phytochemisty, 4, 127-131.

275. [1] Miyase, Toshio; Ueno, Akira; Takizawa, Nobuo; Kobayashi, Hiromi; Oguchi, Hiroko, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1988 , vol. 36, # 7 p. 2475 - 2484

276. Mei Dong, Xiangjiu He and Rui Hai Liu, **Phytochemical of Black Been Seed coats: Isolation Structure Elucidation, and Their Antiproliferative and Antioxidative Activities**, *J. Agric. Food Chem*., 2007, 55, 6044-60511.

277. Sam Sic Kang, Young Soon Lee and Eun Bang Lee, **Isolation of Azukisaponin V Possessing Leucocyte Migration Inhibitory Activity from Melilotus officinalis, *Kor****. J. Pharmacogn*., 18(2), 89-93, 1987.

278. Sam Sic Kang, Young Soon Lee and Eun Bang Lee, **Isolation of Azukisaponin V Possessing Leucocyte Migration Inhibitory Activity from Melilotus officinalis, Kor.** J. Pharmacogn., 18(2), 89-93, 1987.

279. Mei Dong, Xiangjiu He and Rui Hai Liu, **Phytochemical of Black Been Seed coats: Isolation Structure Elucidation, and Their Antiproliferative and Antioxidative Activities**, *J. Agric. Food Chem*., 2007, 55, 6044-60511.

280. Cheng, Wei-Yi; Kuo, Yueh-Hsiung; Huang, Ching-Jang *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 2007 , vol. 55, # 18 p. 7350 - 7358

281. Kei Shimoda, Naoji Kubota, Hatsuyuki Hamada and Hiroki Hamada, **Synthesis of Gentiooligosaccharides of Genistein and Glycitein and Their Radical Scavenging and Anti-Allergic Activity**, *Molecules* 2011, 16, 4740-4747

282. Alvesalo, J.; Vuorela, H.; Tammela, P.; Leinonen, M.; Saikku, P.; Vuorela, P. *Biochemical Pharmacology*, 2006 , vol. 71, # 6 p. 735 - 741

283. Matsuda, Hisashi; Wang, Tao; Managi, Hiromi; Yoshikawa, Masayuki *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003 , vol. 11, # 24 p. 5317 - 5324

284. Zhu, Judy T. T.; Choi, Roy C. Y.; Chu, Glanice K. Y.; Cheung, Anna W. H.; Gao, Qiu T.; Li, Jun; Jiang, Zhi Y.; Dong, Tina T. X.; Tsim, Karl W. K. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 2007 , vol. 55, # 6 p. 2438 - 2445

285. Wang, Fu-Rong; Yang, Xiu-Wei; Zhang, Ying; Liu, Jian-Xun; Yang, Xin-Bao; Liu, Yang; Shi, Ren-Bing *Journal of Asian Natural Products Research*, 2011 , vol. 13, # 4 p. 319 - 329

286. M. P. Yuldashev, **Cynaroside content of the plants*Ferula varia* and *F. Foetida****, CHEMISTRY OF NATURAL COMPOUNDS*, 33,(5), 597-598, 1972

287. L. S. Teslov and S. V. Teslov, **Cynaroside and luteolin from Campanula persicifolia and C. rotundifolia,** *CHEMISTRY OF NATURAL COMPOUNDS*, 1), 117, 1997

288. Hu C, Zhang Y, Kitts DD, **Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo Phyllostachys nigra var. Henonis leaf extract in vitro.,** *J Agric Food Chem*. 48(8), 3170-6, 2000

289. B. Nüβlein, W. Kreis**, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A CYNAROSIDE 7-*O*-β-D-GLUCOSIDASE FROM *CYNARAE SCOLYMI* FOLIUM,** ***ISHS*** *Acta Horticulturae 681: IV International Congress on Artichoke*, 2005

290. Yoshikawa M., Marikawa T., Murakami T., et al, *Chem. Pharm. Bull*., 47, 340-345, 1999

291. VANADIS BIOSCIENCE LTD Patent: WO2006/116815 A1, 2006 ;

292. D. Gantimur, A. I. Syrchina, and A. A. Semenov, **NEW GLYCOSIDES FROM PLANTS OF THE GENUS Phlojodicarpus**, *UDC* 547.814+547.972

293. Masayuki YOSHIKAWA, Toshiaki UEMURA, Hiroshi SHIMODA, Akinobu KISHI, Yuzo KAWAHARA, and Hisashi MATSUDA, Medicinal Foodstuffs. XVIII. **Phytoestrogens from the Aerial Part of Petroselinum crispum MILL. (PARSLEY) and Structures of 60-Acetylapiin and a New Monoterpene Glycoside, Petroside**, *Chem. Pharm. Bull.*, 48(7), 1039—1044, 2000

294. Huanhuan Wei, Ping Wu, Xuejun Ge, Meifang Liu, Xiaoyi Wei, **Chemical constituents of the seeds of Ammopiptanthus (Leguminosae) and their systematic and ecological significance**, *Biochemical Systematics and Ecology* 35 274-280, 2007

295. Stein, S. Anhut, H.D. Zinsmeister, R. Mues, W. Barz and J. Koster, *Z. Naturforsch.* **40c** (1985), p. 469.

296. Yoshikawa, Masayuki; Uemura, Toshiaki; Shimoda, Hiroshi; Kishi, Akinobu; Kawahara, Yuzo; Matsuda, Hisashi *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2000 , vol. 48, # 7 p. 1039 - 1044

297. matsuda, Hisashi; Morikawa, Toshio; Toguchida, Iwao; Harima, Shoichi; Yoshikawa, Masayuki *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2002 , vol. 50, # 7 p. 972 - 975

298. JEFFREY B. HARBORNE, **THE RARE FLAVONE ISOETIN AS A YELLOW FLOWER PIGMENT IN HEYWOODIELLA *OLIGOCEPHALA* AND IN OTHER CICHORIEAE**, *Phytochemistry*., Vol. 17. pp 915-917, 1978

299. National Defense Medical Center; National Defense University Patent: US2006/40875 A1, 2006 ;

300. Unilever Home and Personal Care USA, Division Of Conopco, Inc. Patent: US2006/210497 A1, 2006 ;

301. Ichim, Thomas E. Patent: US2008/50347 A1, 2008 ;

302. Azuma, Keiko; Nakayama, Masayoshi; Koshioka, Masaji; Ippoushi, Katsunari; Yamaguchi, Yuichi; Kohata, Katsunari; Yamauchi, Yuji; Ito, Hidekazu; Higashio, Hisao *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999 , vol. 47, # 10 p. 3963 - 3966

303. Chapman & Hall, *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae,* ILDIS and CHCD

304. Priyanganie Ranabahu **and** Jeffrey B. Harborne **The flavonoids of the genus *Lathyrus* and a comparison of flavonoid patterns within the tribe vicieae** *Biochemical Systematics and Ecology* Volume 21, Issues 6-7, September-October 1993, Pages 715-722

305. Joël Reynauld**,** Ali Ismaili **and** Maurice Jay **Flavonoid glycosides of *Lathyrus pratensis (Leguminosae)*** *Phytochemistry* Volume 20, Issue 8, 1981, Pages 2052-2053

306. Μουγούλια Ελευθερία, **Φυτοχημική Ανάλυση του Lathyrus ochrus**, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Φαρμακευτικής Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2004

307. Riviere, Celine; Quetin-Leclercq, Joelle; Hong, Van Nguyen Thi; Van, Minh Chau; Dejaegher, Bieke; Heyden, Yvan Vander; Pieters, Luc *Phytochemistry* (Elsevier), 2009 , vol. 70, # 1 p. 91 - 99

308. Yang, Jian-Hong; Liu, Ying; Wang, Li-Qin; Chen, Ye-Gao; Kondratyuk, Tamara P.; Marler, Laura E.; Pezzuto, John M.; Qiu, Xi; Choi, Yongsoo; Cao, Hongmei; Yu, Rui; Breemen, Richard B. Van; Fong, Harry H. S.; Zhang, Hong-Jie; Sturdy, Megan; Pegan, Scott; Mesecar, Andrew D. *Phytochemistry*, 2010 , vol. 71, # 5-6 p. 641 - 647

309. Rho, Ho Sik; Ghimeray, Amal Kumar; Yoo, Dae Sung; Cho, Dong Ha; Ahn, Soo Mi; Kwon, Sun Sang; Lee, Keun Ha; Cho, Jae Youl *Molecules*, 2011 , vol. 16, # 4 p. 3338 - 3344

310. Chou, Shu-Chen; Su, Chung-Ren; Wu, Tian-Shung; Ku, Yuh-Chi *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2009 , vol. 57, # 11 p. 1227 - 1230

311. Merck Patent GmbH Patent: EP1124548 B1, 2005 ;

312. BMB Patent Holding Corporation Patent: US2008/171708 A1, 2008 ;

313. Hsieh, Ching-Y. U.; Chang, Shang-Tzen Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010 , vol. 58, # 3 p. 1578 - 1583

314. LOZOYA LEGORRETA, Xavier Patent: WO2006/90206 A1, 2006 ;

315. SAN-EI GEN F.F.I., INC. Patent: EP1752498 A1, 2007 ;

316. Robbins, Wendye Patent: US2006/111307 A1, 2006 ;

317. ONO, Mitsunori Patent: WO2006/74278 A2, 2006 ;

318. SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION Patent: WO2006/1665 A1, 2006 ;

319. Sang, Shengmin; Cheng, Xiaofang; Zhu, Nanqun; Stark, Ruth E.; Badmaev, Vladimir; Ghai, Geetha; Rosen, Robert T.; Ho, Chi-Tang *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001 , vol. 49, # 9 p. 4478 - 4481

320. BARRON, Jon Patent: WO2008/21987 A2, 2008 ;

321. Fontaine, Juliette S. Patent: US2008/31869 A1, 2008 ;

322. Chomczynski, Piotr Patent: US2006/121133 A1, 2006 ;

323. AlphaRx Inc. Patent: US2006/135822 A1, 2006 ;

324. Lu Juan et al., **Study on chemical constituents of leaves of Actinidia polygama**, *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, 44(5), 328-330, (2009)

325. **Rebai Ben Ammar, Wissem Bhouri, Mohamed Ben Sghaier, Jihed Boubaker, Ines Skandrani, Aicha Neffati, Ines Bouhlel, Soumaya Kilani, Anne-Marie Mariotte, Leila Chekir-Ghedira′ Marie-Geneviève Dijoux-Franca and Kamel Ghedira, Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of Rhamnus alaternus L. (Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study,** *Food Chemistry,* Volume 116, Issue 1, 1 September 2009, Pages 258-264

326. D. Prasad, G. Pant, M.S.M. Rawat, A. Nagatsu. "**Constituents of Rhamnus virgatus (Rhamnaceae)**" *Biochemical Systematics and Ecology* 28(10) pp. 1027-1030.

327. Christiane Lakenbrinka; T. My Loc Lama; Ulrich H. Engelhardta; Victor Wray **New Flavonol Triglycosides from Tea (Camellia sinensis),** *Natural Product Research,* Volume 14, Issue 4 July 2000 , pages 233 - 238

328. Kite, Geoffrey C.; Veitch, Nigel C.; Boalch, Martha E.; Lewis, Gwilym P.; Leon, Christine J.; Simmonds, Monique S. J. *Phytochemistry* (Elsevier), 2009 , vol. 70, # 6 p. 785 - 794

329. Tai, Zhi-Gang; Cai, Le; Sun, Wei-Jun; Yang, Ya-Bin; Cao, Qiu-E; Ding, Zhong-Tao; Dai, Lin; Zhe, Wei Molecules, 2010 , vol. 15, # 10 p. 6722 - 6732

330. A. LINARD, P. DELAVEAU, R. R. PARIS, G. DELLAMONICA* and J. CHOPIN* **ISOCARLINOSIDE, A DI-C-GLYCOSYLFLAVONE FROM LESPEDEZA CAPITATA** *Phytochemistry,* Vo l. 21, No. 3, pp. 191-199, 1982

331. Rayyan S, Fossen T, Andersen M, **Flavone C-glycosides from seeds of fenugreek, Trigonella foenum-graecum** *L. J Agric Food Chem.* 2010 Jun 23;58(12):7211-7

332. Melo, Giany O. De; Muzitano, Michelle F.; Legora-Machado, Alexandre; Almeida, Thais A.; Oliveira, Daniela B. De; Kaiser, Carlos R.; Koatz, Vera Lucia G.; Costa, Sonia S. *Planta Medica*, 2005 , vol. 71, # 4 p. 362 - 363

333. Tian, Li-Wen; Zhang, Ying-Jun; Yang, Chong-Ren; Pei, Ying; Wang, Yi-Fei *Journal of Natural Products*, 2009 , vol. 72, # 6 p. 1057 - 1060

334. YOSHIAKI TAKAYA, YOSHIHITO KONDO, TADASHI FURUKAWA, AND MASATAKE NIWA, Antioxidant **Constituents of Radish Sprout (Kaiware-daikon), *Raphanus sativus* L**., *J. Agric. Food Chem.* 2003, *51,* 8061-8066

335. G. Ficoa, A. Bracab, I. Morellib, F. Tome`, **Flavonol glycosides from *Aconitum vulparia*,** *Fitoterapia* 74, 420–422,(2003)

336. KIMIKO NAKANO, MIKIKO TAKATANI, TOSHIAKI TOMIMATSU and TOSHIHIRO NOHARA, **FOUR KAEMPFEROL GLYCOSIDES FROM LEAVES OF *CINNAMOMUM SIEBOLDII*,** *Phytochemistry*, 22, pp. 2831-2833, 1983

337. AURANGZEB HASAN, IFFIKHAR AHMAD, MIR AJAB KHANT and MUHAMMAD IQBAL CHUDHARY, **TWO FLAVONOL TRIGLYCOSIDES FROM FLOWERS OF *INDIGOFERA HEBEPETALA*,** *Phytochemistry,* Vol. 43, No. 5, pp. 1115-1118, 1996

338. Keiko Yonekura-Sakakida, Takayuki Tohge, Fumio Matsuda, Ryo Nakabayashi, Hiromitsu Takayama, Rie Niida, Akiko Watanabe-Takahashi, Eri Inoue and Kazuki Saito, **Comprehensive Flavonol Profiling and Transcriptome Coexpression Analysis Leading to Decoding Gene-Metabolite Corretation in Arabidopsis**, *The Plant Cell*, 20, 2160-2176, 2008

339. Maria Halabalaki, Aurélie Urbain, Aristea Paschali, Sofia Mitakou, François Tillequin and Alexios-Leandros Skaltsounis, **Quercetin and Kaempferol 3-*O*-[*α*-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-*α*-L-arabinopyranoside]-7-*O*-*α*-L-rhamnopyranosides from *Anthyllis hermanniae* L.: Structure Determination and Conformational Studies**, *J Nat Prod*. (In press)

340. Mulinacci N 1994

341. Strack D. 1989

342. Markham.K.A. R. 1977, Strack D. 1989

343. Agrawal P. K., ***Carbon-13 NMR of Flavonoids,*** Elsevier Science Publishing Co.: Amsterdam, 1989.

344. FRANCISCO TOM-LORENTE, MANUELA M. GARCIA-GRAU, FANCISCO A. TOM-BARBERAN and Jo& L. NIETot, **ACETYLATED FLAVONOL GLYCOSIDES FROM VICIA FABA LEAVES,** *Phytochemistry*, Vol. 28, No. 7, pp. 1993-1995, 1989

345. Seckin Ozden, Nedime Burust, Kenjiro Toki, Norio Saito, Toshio Honda, Acetylate Kaempferol glycosides from the Flowers of Delfinium formosusm, *Phytochemistry,* Vol. 49, No. 1, pp. 241-245, 1989

346. MULINACCI, F.F. VINCIERI, A. BALDI, M. BAMBAGIOTTI-ALBERTI, A. SENDLT and H. WAGNERT, **FLAVONOL GLYCOSIDES FROM *SEDUM TELEPHIUM* SUBSPECIES *MAXIMUM* LEAVES**, *Phytochemistry,* Vol. 38, No. 2, pp. 531-533, 1995

347. QIN Lru, MING Lru, TOM J. MABRY and RICHARD A. DIXON, **FLAVONOL GLYCOSIDES FROM *CEPHALOCEREUS SENZLIS,*** Phymchmiswy, Vol. 36. No. 1, pp. 229-231. 1994

348. Yamano Yumiko, Ito Masayoshi , **Synthesis of optically active vomifoliol and roseoside stereoisomers.** *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 53 (5), p.541-546, May 2005

349. **Yoshio Takeda, Hongjie Zhang, Toshiya Masuda, Gisho Honda, Hideaki Otsuka, Ekrem Sezik, Erdem Yesilada and Handong Sun. Megastigmane glucosides from *Stachys byzantina.*** *Phytochemistry,* 44(7),pp 1335-1337, 1997

350. Wang W, Li XC, Ali Z, Khan IA. **Two new C(13) nor-isoprenoids from the leaves of Casearia sylvestris.** *Chem Pharm Bull*. 2009, 57(6), 636-638.

351. YanBo Shen, Minoru Terazawa, **Dihydroroseoside, a new cyclohexanone glucoside, from the leaves of shirakamba (Betula platyphylla Sukatchev var. japonica Hara),** *J Wood Sci* (2001) 47:145-148.

352. Katsuyoshi MATSUNAMI, Hideaki OTSUKA and Yoshio TAKEDA, **Structural Revisions of Blumenol C Glucoside and Byzantionoside B,** *Chem. Pharm. Bull*. 58(3) 438-441 (2010)

353. Jeong Seon Yoon, Sang Hyun Sung , Jong Hee Park 2, and Young Choong Kim, **Flavonoids from Spatholobus suberectus**, *Arch Pharm Res* Vol 27, No 6, 589-592, 2004.

354. Lu F, Xu XJ, **Studies on flavonoids of Oxytropis falcata**., *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2007 Feb;32(4):318-20

355. Sims and Pettus, 1976

356. Ying Wang, Min Yang 2003

357. Reynolds W., Enriquez R. , 1985

358. Mahato S. & Kundu A. 1994.

359. Chien-Ya Hung and Gow-Chin Yen, 1999

360. Nes. N. W. et al., 1991

361. [1] Rubinstein. I. et al., 1975

362. Thompson J.M. & Butky R.S., 1972

363. Chien-Ya Hung and Gow-Chin Yen, 1999

364. Ana-L. and Perez-Castorena 1997

365. Masuda T. 1990

366. Hartmut Richter and Gerhard Spiteller, A New **Atractiligenine Glycoside from Green Coffee-beans,** *Chem. Ber*., 111, 3506-3509, 1978.

367. Lewis I.A.S. and MacLeod J.K., **13C NMR Spectra of Wedeloside and Related Kaurenoid Derivatives**, *Org. Magn. Res*., 18, 138-142, 1982.

368. Roeder E., Bourauel T., Meier U. and Wiedenfeld H., **Diterpene Glycoside from Iphiona aucheri,** *Phytochemistry*, 37, 353-355, 1994

369. MacLeod K.J., Moeller D.R.P., Two Toxic Kaurene **Glycoside from the Burrs of Xanthium pungens,** *J. Nat. Prod*., 53, 451-455, 1990.

370. Silke Klick and Karl Herrmann, **Glucosides and glucose esters of hydroxybenzoic acids in *plants***, *Phytochemistry*, 27 (7), 2177-2188, 1988

371. Joaquin Fayos et.al, **Induction of gentisic acid 5-O-β-D-xylopyranoside in tomato and cucumber plants infected by different pathogens**, *Phytochemistry*, 67, 142-148, 2006.

372. Matsuda H, Morikawa T., et al, **Medicinal Flowers, VI. Absolute Stereostructures of Two New Flavonol Glycosides and a Phenylbutanoid Clycoside from the Flowers of *Chrysanthemum indicum* L. : Their Inhibitory Activities for Rat Lens Aldose Reductase,** *Chem. Pharm. Bull*., 50(7) 972-975 (2002)

373. Satoshi Yamamura, Koichiro Ozawa, Koichiro Ohtani, et.al., **Antihistaminic flavones and Aliphatic Glycosides from Mentha Spicata,** *Phytochcmistry* 1997, Vol. 48, pp. 131-136

374. Somphit Sornyotha, Khin Lay Kyu, Khanok Ratanakhanokchai, **Purification and detection of linamarin from cassava root cortex by high performance liquid chromatography,** *Food Chemistry* 104 (2007) 1750–1754

375. Neville L R King and J Howard Bradbury, Bitterness of Cassava: **Identification of a New Apiosyl Glucoside and other Compounds that Affect its Bitter Taste**, *J Sci Food Agric* 1995,68,223-230

376. Sunny E. Iyuke and Christopher A. Idibie, **Recovery of Linamarin by Adsorption of Cassava Extract onto Activated Carbon**, *Ind. Eng. Chem. Res.* 2007, *46,* 4974-4981

377. Yurdanur Akgula,b, Daneel Ferreirab,c, Ehab A. Abourashedb, Ikhlas A. Khanb,c, **Lotaustralin from Rhodiola rosea roots**, *Fitoterapia* 75 (2004) 612–614

378. F. H. BISSETT, R. C. CLAPP, R. A. COBURN, M. G. ETTLINGERT and L. LONG, JR., **CYANOGENESIS IN MANIOC: CONCERNING LOTAUSTRALIN**, *Phytochcmistry* 1969, Vol. 8, pp. 2235- 2247

379. R. H. DAvis and A. NAHRSTEDT, **LINAMARIN AND LOTAUSTRALIN AS THE SOURCE OF CYANIDE IN *ZYGAENA FILIPENDULAE* L. (LEPIDOPTERA),** *Comp. Biochern. Phisiol.,* Vol. 64B, pp. 395- 397

380. JOHNH . C and RICHARED.MOOR, **MALYNGIC ACID, A NEW FATTY ACID FROM *LYNGBYA MAJUSCULA,*** *Tetrahedron 36, 993-996*

381. M. Habib Oueslati,† Hichem Ben Jannet,† Zine Mighri,† J. Chriaa,§ and Pedro M. Abreu*,‡, **Phytochemical Constituents from *Salsola tetrandra****, J. Nat. Prod., 2006, 69, 1366-1369*

382. Yusuke Kurashina, Ayako Miura, Masaru Enomoto, Shigefumi Kuwahara, **Stereoselective synthesis of malyngic acid and fulgidic acid**, *Tetrahedron* 67 (2011) 1649e1653

383. Gowravaram Sabitha, E. Venkata Reddy, M. Bhikshapathi and J. S. Yadav, **Total synthesis of (9S,12R,13S)-pinellic acid**, *Tetrahedron Letters* 48 (2007) 313–315

384. Takayuki Nagai, Hiroaki Kiyohara, Kaori Munakata, Tatsuya Shirahata, Toshiaki Sunazuka, Yoshihiro Harigaya, Haruki Yamada, **Pinellic acid from the tuber of Pinellia ternata Breitenbach as an effective oral adjuvant for nasal influenza vaccine,** *International Immunopharmacology* 2 (2002) 1183–1193

385. Tatsuya Shirahata, Toshiaki Sunazuka, Kiminari Yoshida, Daisuke Yamamoto, Yoshihiko Harigaya, Takayuki Nagai, Hiroaki Kiyohara, Haruki Yamada, Isao Kuwajima and Satoshi O -mura, **Total Synthesis and Adjuvant Activity of All Stereoisomers of Pinellic Acid**, *Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters* 13 (2003) 937–941

386. Lin, Y-L., Wang, W-Y., Kuo, Y-H. and Chen, C-F., *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2000, *47*, 1, 247-251

387. Sang, S., Kikuzaki, H., Lapsley, K., Rosen, R. T., Nakatani, N. and Ho, C-T., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, *50*, 16, 4709-4712

388. Anita Dunger, Hans-Heinrich Limbach, and Klaus Weisz, **NMR Studies on the Self-Association of Uridine and Uridine Analogues**, *Chem. Eur. J*. 1998, 4, 621 – 628

389. L. Pogliani and M. Ellenberger, **A NMR Investigation of Proline and its Derivatives. 11-Conformational Implications of the 'H NMR Spectrum of L-Proline at Different pH**, *Organic Magnetic Resonance*, 1975, Vol. 7 , pp. 61 to 7 1 .

390. Mark T. Hamann and Paul J. Scheuer, Kahalalide F, **A Bioactive Depsipeptide from the Sacoglossaa Mollusk Elysia rufiscens and the Green Alga Bryopsis sp.,** *J . Am . Chem. SOC*. 1993,115, 5825-5826

391. Satoshi Tahara, John L. Ingham and Junya Mizutani, **New Coumaronochromones from White Lupin, Lupinus albus L. (Leguminosae),** *Agric. Biol. Chem*., 49 (6), 1775-1783, 1985

392. Satoshi Tahara, John L. Ingham* and Junya Mizutani, **New Coumaronochromones from White Lupin, Lupinus albus L. (Leguminosae),** *Agric. Biol. Chem*., 49 (6), 1775-1783, 1985

393. FUJINORI NANAWA, SATOSHI TAHARA and JUNYA MIZUTANI, **ISOFLAVONOIDS PRODUCED BY IRIS PSEUDACORUS LEAVES TREATED WITH CUPRIC CHLORIDE**, *Phytochemistry*, Vol. 30, No. 1, pp. 157 163, 1991

394. Pan Shu, Min Jian Qin, Wen Juan Shen, Gang Wu, **A new coumaronochromone and phenolic constituents from the leaves of Iris bungei Maxim.,** *Biochemical Systematics and Ecology* 37 (2009) 20–23

395. Wen-Li Lo, Fang-Rong Chang, Tian-Jye Hsieh, Yang-Chang Wu, **Coumaronochromones and flavanones from *Euchresta formosana* roots**, *Phytochemistry*, Vol. 60, pp. 839-845, 2002.

396. Agrawal P.K., **Carbon-13 NMR of Flavonoids**, *Elsevier Science Publishers B.V*., 1989.

397. MIZUO MIZUNO. TOSHIYUKI TANAKA, KOH-ICHI TAMURA and MUNEKAZU IINUMA, **COUMARONOCHROMONES FROM THE STEMS OF EUSCHRESTA FORMOSANA,** *Phytochemistry*, Vol. 28, No. 9, pp. 2518-2519, 1989.

398. Braca, A., De Tommasi, N., Mendez, J., Morelli, I. and Pizza, C., *Phytochemistry*, 1999, *51*, 1121-1124

399. Scharbert, S., Holzmann, N. and Hofmann, T., *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2004, *52*, 3498-3508

400. Andreas Schieber, Petra Keller, Petra Streker, Iris Klaiber,Reinhold Carle, **Detection of isorhamnetin glycosides in extracts of apples (Malus domestica cv. "Brettacher") by HPLC-PDA and HPLC-APCI-MS/MS,** *Phytochemical Analysis* 13 (2) p. 87–94, 2002

401. Noelia Castillo-Mu ñoz[†], Sergio G ómez-Alonso[‡], Esteban Garc ía-Romero[‡], M. Victoria G ómez[§], Aldrik H. Velders[§] and Isidro Hermos ín-Guti érrez, **Flavonol 3-*O*-Glycosides Series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot Red Wine Grapes,** *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, *57* (1), pp 209–219

402. Sam Sic Kang, Young Soon Lee and Eun Bang Lee, **Isolation of Azukisaponin V Possessing Leucocyte Migration Inhibitory Activity from Melilotus officinalis**, *Kor. J. Pharmacogn.*, 18(2), 89-93, 1987.

403. Mei Dong, Xiangjiu He and Rui Hai Liu, **Phytochemical of Black Been Seed coats: Isolation Structure Elucidation, and Their Antiproliferative and Antioxidative Activities**, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 6044-60511.

404. Caralyn L. Curl, Keith R. Price and G. Roger Fenwick, *J* **Isolation and Structural Elucidation of a New Saponin (Soyasaponin V) from Haricot Bean (*Phaseolus vulgaris* L.),**. *Sci. Food Agric.*, 43, 101-107, 1988

405. Kei Shimoda, Naoji Kubota, Hatsuyuki Hamada and Hiroki Hamada, **Synthesis of Gentiooligosaccharides of Genistein and Glycitein and Their Radical Scavenging and Anti-Allergic Activity**, *Molecules* 2011, 16, 4740-4747

406. Augusta Caligiani, Gerardo Palla, Annalisa Maietti, Martina Cirlini and Vincenzo Brandolini, **1H NMR Fingerprinting of Soybean Extracts, with Emphasis on Identification and Quantification of Isoflavones,** *Nutrients* 2010, 2, 280-289

407. S. F. WANG, T. J. RIDSDILL-SMITH and E. L. GHISALBERTI, **ROLE OF ISOFLAVONOIDS IN RESISTANCE OF SUBTERRANEAN CLOVER TRIFOLIATES TO THE REDLEGGED EARTH MITE Halotydeus destructor**, *Journal of Chemical Ecology,* Vol. 24, No. 12, 1998

408. Eva de Rijke, Frans de Kanter, Freek Ariese, Udo A. Th. Brinkman, Cees Gooijer, **Liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy for the identification of isoflavone glucoside malonates in T. pratense L. leaves.** *Journal of Separation Science,*Volume 27, Issue 13, 1061-1070, 2004

409. Ueli A. Hartwig, Carl A. Maxwell, Cecillia M. Joseph, and Donald A. Phillips, **Chrysoeriol and Luteolin Released from Alfalfa Seeds Induce nod Genes in Rhizobium meliloti,** *Plant Physiol.* (1990) 92, 116-122

410. Marelle G. Boersma, Hester van der Woude, Jan Bogaards, Sjef Boeren, Jacques Vervoort, Nicole H. P. Cnubben, Marlou L. P. S. van Iersel, Peter J. van Bladeren, and Ivonne M. C. M. Rietjens, **Regioselectivity of Phase II**

Metabolism of Luteolin and Quercetin by UDP-Glucuronosyl Transferases, *Chem. Res. Toxicol*. 2002, 15, 662-670

411. Kishore K.Chiruvella, Arifullah Mohammed, Gayathri Dampuri, Rama Gopal Ghanta, Sathees C. Raghavan, **Phytochemical and Antimicrobial Studies of Methyl Angolensate and Luteolin-7-O-glucoside Isolated from Callus Cultures of *Soymida febrifuga,*** *International Journal of Biomedical Science* 3(4), 269-278, Dec 15, 2007

412. D. Gantimur, A. I. Syrchina, and A. A. Semenov, **NEW GLYCOSIDES FROM PLANTS OF THE GENUS Phlojodicarpus,** *UDC* 547.814+547.972

413. Matsuzaki K., Wang Y. Q., Takahashi K., Okuyama T., *Shoyakugaku Zashi*, 44, 251—253 (1990).

414. Huanhuan Wei, Ping Wu, Xuejun Ge, Meifang Liu, Xiaoyi Wei, **Chemical constituents of the seeds of Ammopiptanthus (Leguminosae) and their systematic and ecological significance,** *Biochemical Systematics and Ecology* 35 274-280, 2007

415. Human Metabolome Database Version 2.5, Showing metabocard for Luteolin (HMDB05800), http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB05800

416. CHUN-NAN LIN,*~" CHAI-MING LU* and PAo - LIN HUANG, **FLAVONOIDS FROM ARTOCARPUS HETEROPHYLLUS**, *Phytochemistry*, Vol. 39, No. 6, pp. 1447 1451, 1995.

417. K. GLUCHOFF-FIASSON, J. FAVRE-BONVIN' and J. L. FIASSON, **GLYCOSIDES AND ACYLATED GLYCOSIDES OF ISOETIN FROM EUROPEAN SPECIES OF HYPOCHOERIS**, *Phyrochemisrry,* Vol. 30. No. 5, pp. 1673.1675. 1991

418. JEFFREY B. HARBORNE, **REVISED STRUCTURES FOR THREE ISOETIN GLYCOSIDES, YELLOW FLOWER PIGMENTS IN HEYWOODZELLA OLIGOCEPHALA,** *Phyrochemistry*, Vol. 30, No. 5, pp. 1677-1678, 1991

419. GUIDO F. PAULI and PETER JUNIOR, PHENOLIC GLYCOSIDES FROM ADONIS ALEPPICA , *Phytochemistry,* VoL 38, No. 5, pp. 1245 1250, 1995.

420. JEFFREY B. HARBORNE, **THE RARE FLAVONE ISOETIN AS A YELLOW FLOWER PIGMENT IN HEYWOODIELLA *OLIGOCEPHALA* AND IN OTHER CICHORIEAE**", *Phytochemistry*. 1978, Vol. 17. pp 915 917

421. Masaoud, M., Ripperger, H., Porzel, A. and Adam, G., *Journal für praktische Chemie*, 1994, *336*, 43-45

422. Fossen, T., Larsen, A., Kiremire, B. T. and Andersen, Ø. M., *Phytochemistry*, 1999, *51*, 1133-1137

423. Human Metabolome Database Version 2.5, http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00484

424. Markham J., Ternai B., Stanley R., Geiger H. and Mabry T., *Tetrahedron*, 34, 1389 (1978)

425. Asen A. and Horowitz R.M., *Phytochemistry*, 16, 147, 1977

426. Human Metabolome Database Version 2.5, http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00484

427. Slimestad, R., Andersen, M., Francis, G. W., Marston, A. and Hostettmann, K., *Phytochemistry*, 1995, *40*, 5, 1537-1542

428. Kazuma, K., Noda, N. and Suzuki, M., *Phytochemistry*, 2003, *62*, 229-237

429. Sang, S., Cheng, X., Zhu, N., Stark, R. E., Badmaev, V., Ghai, G., Rosen, R. T. and Ho, C-T., *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2001, *49*, 4478-4481

430. Geoffrey C. Kite and Nigel C. Veitch, *Rapid Commun. Mass Spectrom., 23, 3125-3132, 2009.*

431. Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M.B., *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer- Verlag, Berlin, 1970.

432. Markham K. R., Chari V.M., The Flavonoids: Advances in Reasearch since 1986, ed. by Harborne J.B., Chapman and Hall, London, 1994, pp. 441-497.

433. Xie C., Veitch N., Houghton P. and Simmonds M., Flavone C-Glycosides from Viola yedoensis Makino, Chem. Pharm. Bull., 51, 1204-1207, 2003

434. SALEH RAYYAN, TORGILS FOSSEN, AND ØYVIND M. ANDERSEN, *Flavone C-Glycosides from Seeds of Fenugreek, Trigonella foenum-graecum L*. J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 7211–7217

435. Hiller K., Rahn I., Leska M., *Structure of the flavonoid C-glycosides from Astrantia major L*., Scientia Pharmaceutica, 1988, 56, 169-170

436. Jay M., Lameta-D'Arcy A., Viricel M., *C-Glycosiflavones from roots of Glycine max*, Phytochemistry, 1984, 23, 1153-1155.

437. Linard A., Delaveau P., Paris R.R., Dellamonica G., Chopin J., Isocarlinoside, a di-C-glycosilflavone from Lespedeza capitata, Phytochemistry, 1982, 21, 797-799

438. Corse, J., Lundin, R. E., Sondheimer, E. and Waiss, A. C. Jr., *Phytochemistry*, 1966, *5*, 767-776

439. Haribal, M., Feeny, P. and Lester, C. C., *Phytochemistry*, 1998, *49*, 1, 103-108

440. Nishizawa, M., Izuhara, R., Kaneko, K., Koshihara, Y. and Fujimoto, Y., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1988, *36*, 1, 87-95

441. Ohmoto, T. and Yamaguchi, K., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1988, *36*, 2, 807-809

442. CHRYSOULA SPANOU, GEORGIA BOUROU, ALBIONA DERVISHI, NEKTARIOS ALIGIANNIS, APOSTOLOS ANGELIS, DIMITRI KOMIOTIS, ALEXIOS-LEANDROS SKALTSOUNIS, AND DEMETRIOS KOURETAS, **Antioxidant and Chemopreventive Properties of Polyphenolic Compounds Derived from Greek Legume Plant Extracts,** *J. Agric. Food Chem.* 2008, *56,* 6967–6976

443. CHRYSOULA SPANOU, ARISTIDIS S. VESKOYKIS, THALIA KERASIOTI, MARIA KONTOU, NEKTARIOS ALIGIANNIS, APOSTOLIS ANGELIS, ALEXIOS-LEANDROS SKALTSOUNIS and DEMETRIOS KOURETAS, **FLAVONOID GLYCOSIDES ISOLATED FROM UNIQUE LEGUME PLANT EXTRACTS AS NOVEL INHIBITORS OF XANTHINE OXIDASE,** J. Nat. Prod., in press.

444. Kahlon, T. S., Saunders, R. M., Sayre, R. N., Chow, F. I., Chiu, M. M., Betschart, A. A., *Cereal Chem.* 1992, *69*, 485-489.

445. Revilla, E., Maria, C. S., Miramontes, E., Bautista, J., Martinez, A, G., Cremades, O., Certand, R., Parrad, J., *Food Res. Int.* 2009, *42*, 387-393.

446. Scavariello, E. M. S., Arellano, D. B., *Archivos Latinoamericanos De Nutricion* 1998, *48*, 7-12.

447. Xu, Z. M., Hua, N., Godber, J. S., *J. Agric. Food Chem.* 2001, *49*, 2077-2081.

448. Islam, M. S., Yoshida, H., Matsuki, N., Ono, K., Nagasaka, R., Ushio, H., *J. Pharmacol. Sci*. 2009, *111*, 328-337.

449. Manjula, S., Subramanian, R., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2008, *151*, 629-637.

450. Xu, Z. M., Godber, J. S., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2000, *77*, 547-551.

451. Imsanguan, P., Roaysubtawee, A., Borirak, R., Pongamphai, S., Douglas, S., Douglas, P. L., *LWT - Food Science and Technology* 2008, *41*, 1417-1424.

452. Zullaikah, S., Melwita, E., Ju, Y. H., *Bioresour. Technol.* 2009, *100*, 299-302.

453. Xu, Z. M., Godber, J. S., *J. Agric. Food Chem.* 1999, *47*, 2724-2728.

454. Lai, S. M., Hsieh, H. L., Chang, C. W., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2005, *28*, 145-160.

455. Species Plantarum 1:333. 1753

456. Smith, Bruce D. The Emergence of Agriculture. Scientific American Library, A Division of HPHLP, New York, 1998.

457. International Rice Research Institute statistics (accessed September 2005)

458. J.P. Londo, Y. Chiang et al, "Phylogeography of Asian wild rice, Oryza rufipogon, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, Oryza sativa", PNAS 103(25):9578-83, 2006

459. Diamond, Jared (1999). Guns, Germs, and Steel: The Fates of Human Societies. New York: W.W. Norton & Company. ISBN 0-393-31755-2

460. Sorghum: Origin, History, Technology, and Production By C. Wayne Smith.Published 2000. John Wiley and Sons. ISBN 0471242373

461. http://www.carolinagoldricefoundation.org/ Carolina Gold Rice Foundation

462. Rice Research in South Asia through Ages by Y L Nene, Asian Agri-History Vol. 9, No. 2, 2005 (85–106).

463. Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Ινστιτούτο Σιτηρών, www.serealinsitute.gr

464. I. M. Chung1, J. K. Ahn1,3, and S. J.Yun2, **Identification of allelopathic compounds from rice (Oryza sativa L.) straw and their biological activity, Can**. J. Plant Sci., 81: 815–819

465. I.M. Chung, K.H. Kim, J.K. Ahn*, S.C. Chun, C.S. Kim, J.T. Kim, S.H. Kim, **Screening of allelochemicals on barnyardgrass (Echinochloa crus-galli) and identification of potentially allelopathic compounds from rice (Oryza sativa)** variety hull extracts, Crop Protection 21 (2002) 913–920

466. Shigeru Tamogami, Randeep Rakwal, Osamu Kodama, **Phytoalexin production by amino acid conjugates of jasmonic acid through induction of naringenin-7-O-methyltransferase, a key enzyme on phytoalexin biosynthesis in rice (Oryza sativa L.)**, FEBS Letters 401 (1997) 239-242

467. EIJSABETH BESSON,G EORGETTE DELLAMONICAJ, EAN CHOPIN, KENNETH R MARKHAM,M UJO KIMt, HEN&K KOHt and HIROSHI FUKAMIt, **C-GLYCOSYLFLAVONES FROM ORYZA SATIVA***, Phytochemistry***.** Vol 24, No 5, pp 1061-1OM 1985

468. Shigeru Tamogami*, Osamu Kodama1, **Coronatine elicits phytoalexin production in rice leaves (Oryza sativa L.) in the same manner as jasmonic acid,** *Phytochemistry* 54 (2000) 689-694.

469. *Francisco A. Mac´ıas∗, Nuria Chinchilla, Rosa M. Varela, Jos´e M.G. Molinillo,* **Bioactive steroids from *Oryza sativa* L.,** *steroids* 7 1 (2 0 0 6) 603–608

470. A.F. Cicero, A. Gaddi (2001). **Rice bran oil and gamma-oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinaemias and other conditions"**. *Phytother Res* 15 (4): 277–286

471. University of Rochester Medical Center "Can Rice Bran Oil Melt Away Cholesterol?". Science Daily, May 12, 2005

472. Scavariello, E. M. S., Arellano, D. B., *Archivos Latinoamericanos De Nutricion* 1998, *48*, 7-12.

473. Xu, Z. M., Hua, N., Godber, J. S., *J. Agric. Food Chem.* 2001, *49*, 2077-2081.

474. Islam, M. S., Yoshida, H., Matsuki, N., Ono, K., Nagasaka, R., Ushio, H., *J. Pharmacol. Sci*. 2009, *111*, 328-337.

475. Oka, T., Fujimoto, M., Nagasaka, R., Ushio, H., Hori, M., Ozaki, H., *Phytomedicine* 2010, *17*, 152-156.

476. Chotimarkorn, C., Ushio, H., *Phytomedicine* 2008, 15, 951-958.

477. Fry, A. C., Bonner, E., Lewis, D. L., Johnson R. L., Stone, M. H., Kraemer, W. J., *Int. J. Sport Nutr.* 1997, *7*, 318-329.

478. Wang, J.F., *Zhongguo zhen jiu* 2009, *29*, 623-625.

479. Luo, H-F., Li, Q., Yu, S., Badger, M. T., Fang, N., J. Nat. Prod. 2005, *68*, 94-97.

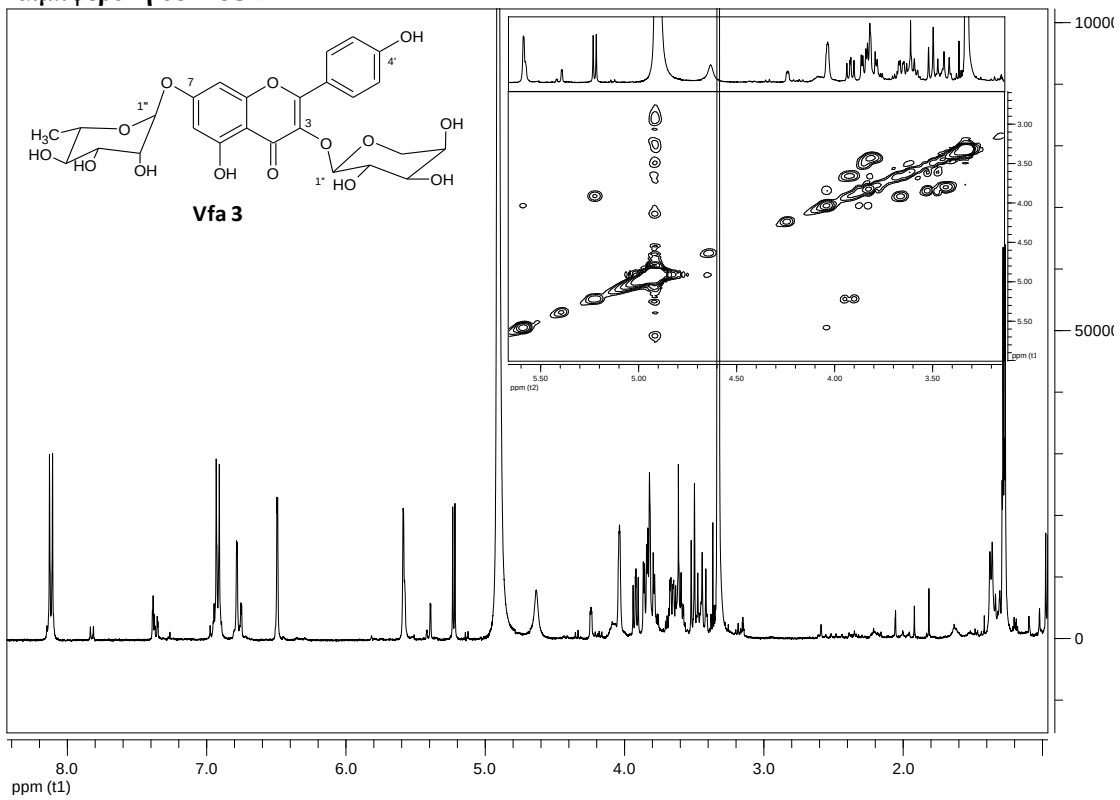
480. Stöggl, W., Huck, C., Wongyai, S., Scherz, H., Bonn, G., *J. Sep. Sci.* 2005, *28*, 1712-1718.

481. Fang, N., Yu, S., Badger, M. T., *J. Agric. Food Chem.* 2003, *51*, 3260-3267.

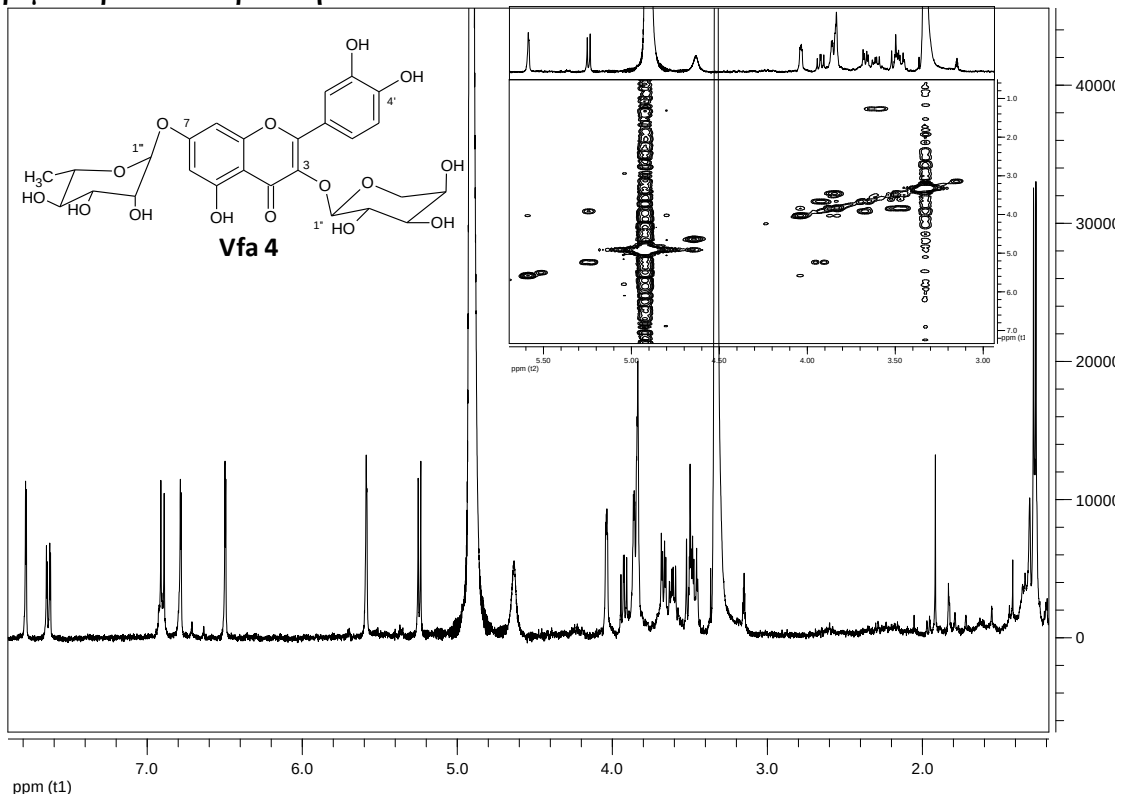
482. Apostolis Angelis, Aurélie Urbain, Maria Halabalaki, Nektarios Aligiannis, Alexios-Leandros Skaltsounis **One-step isolation of γ-oryzanol from rice bran oil by non-aqueous hydrostatic countercurrent chromatography,** *Journal of Separation Science*, 34 (18), 2528–2537, 2011

Παράρτημα
Φάσματα Φυσικών Προϊόντων

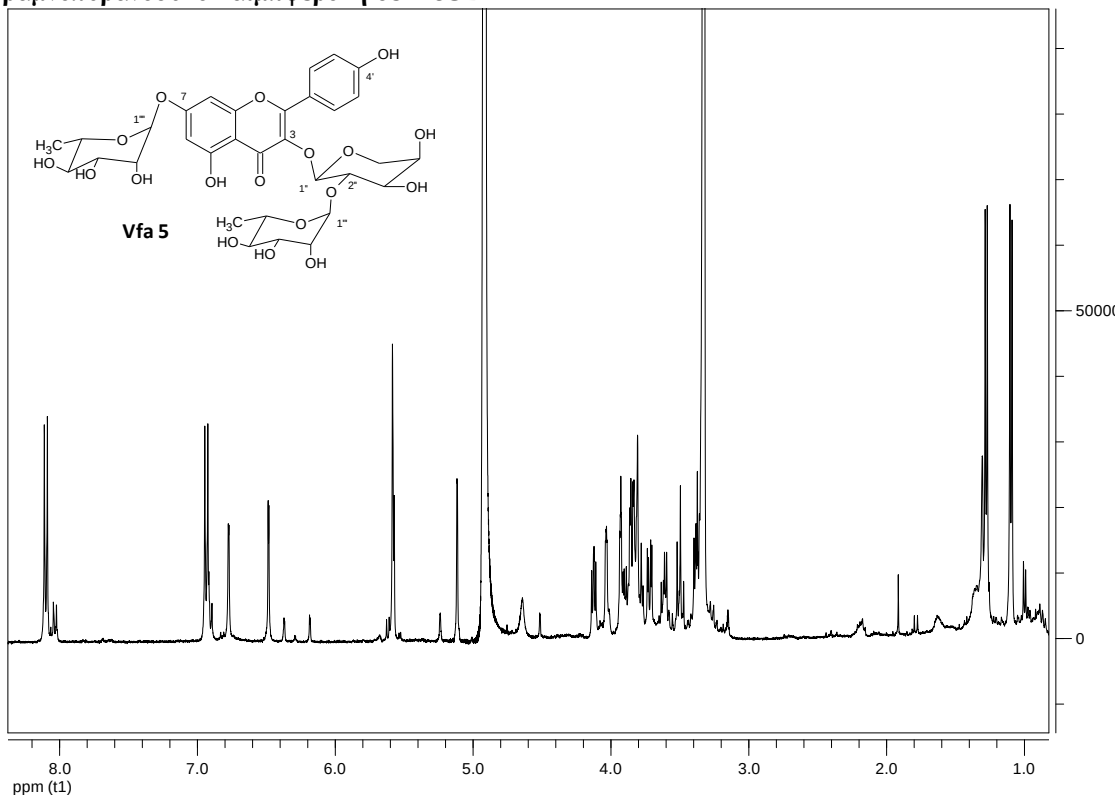
Φάσμα ^{1}H NMR και COSY του 3-O-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλο-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-καιμπφερόλη σε MeOD



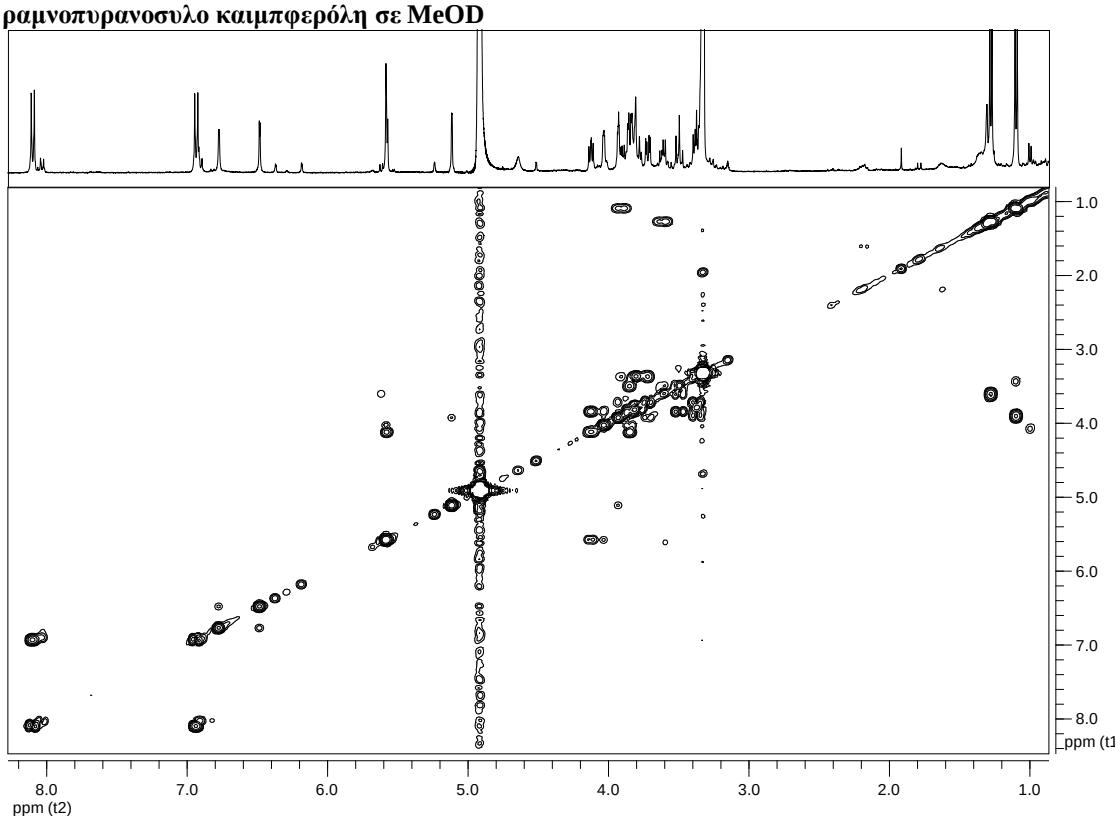
Φάσμα ^{1}H NMR και COSY του 3-O-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλο-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη σε MeOD



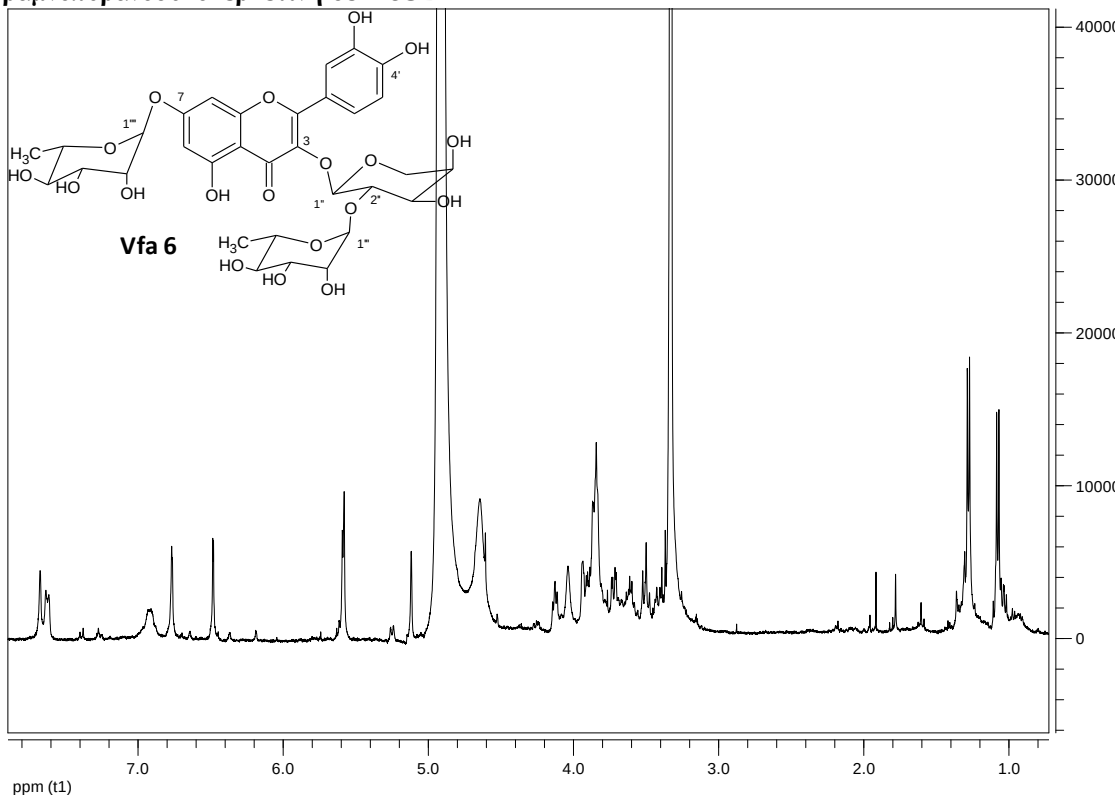
Φάσμα ^{1}H NMR του 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη σε MeOD



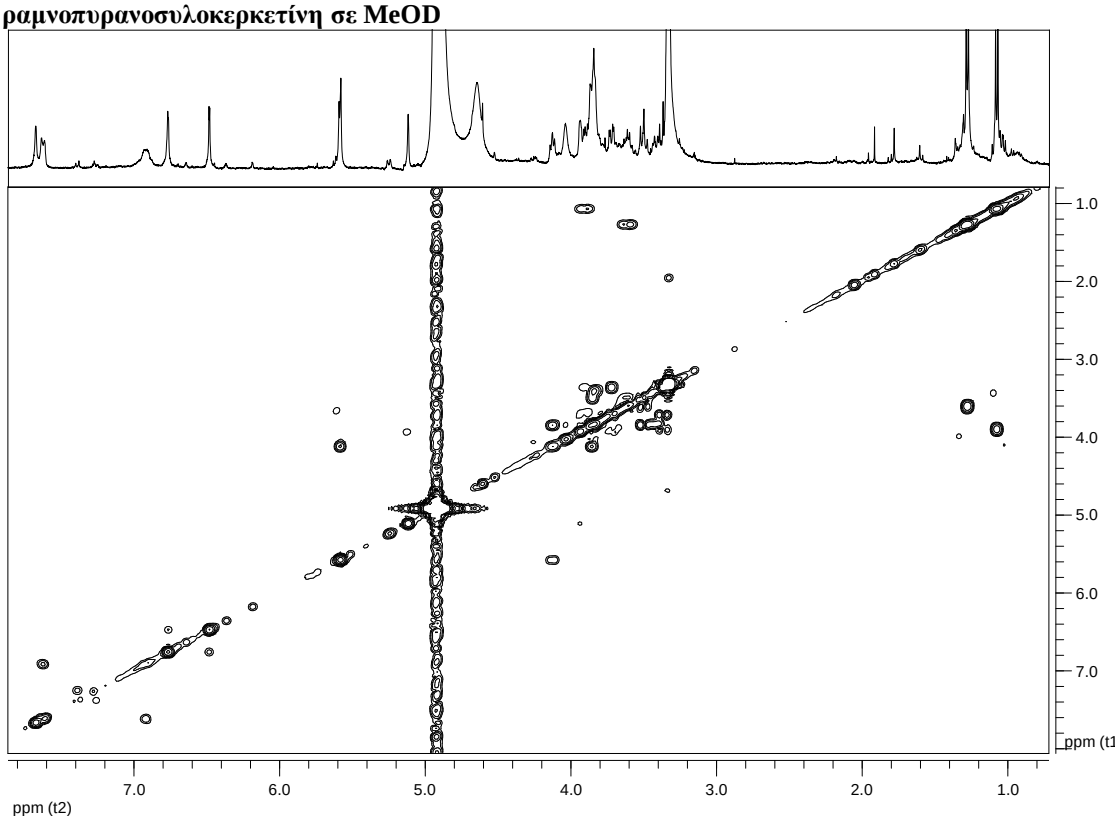
Φάσμα COSY του 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη σε MeOD



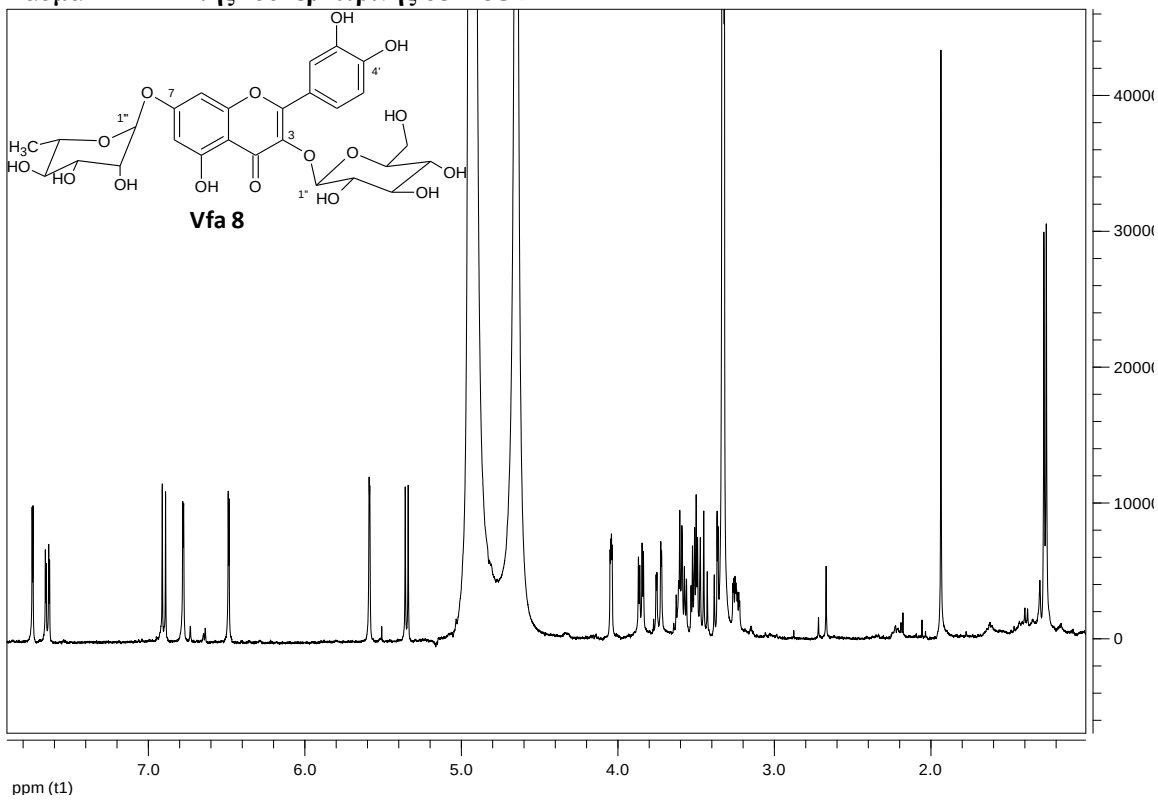
Φάσμα ^{1}H NMR του 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη σε MeOD



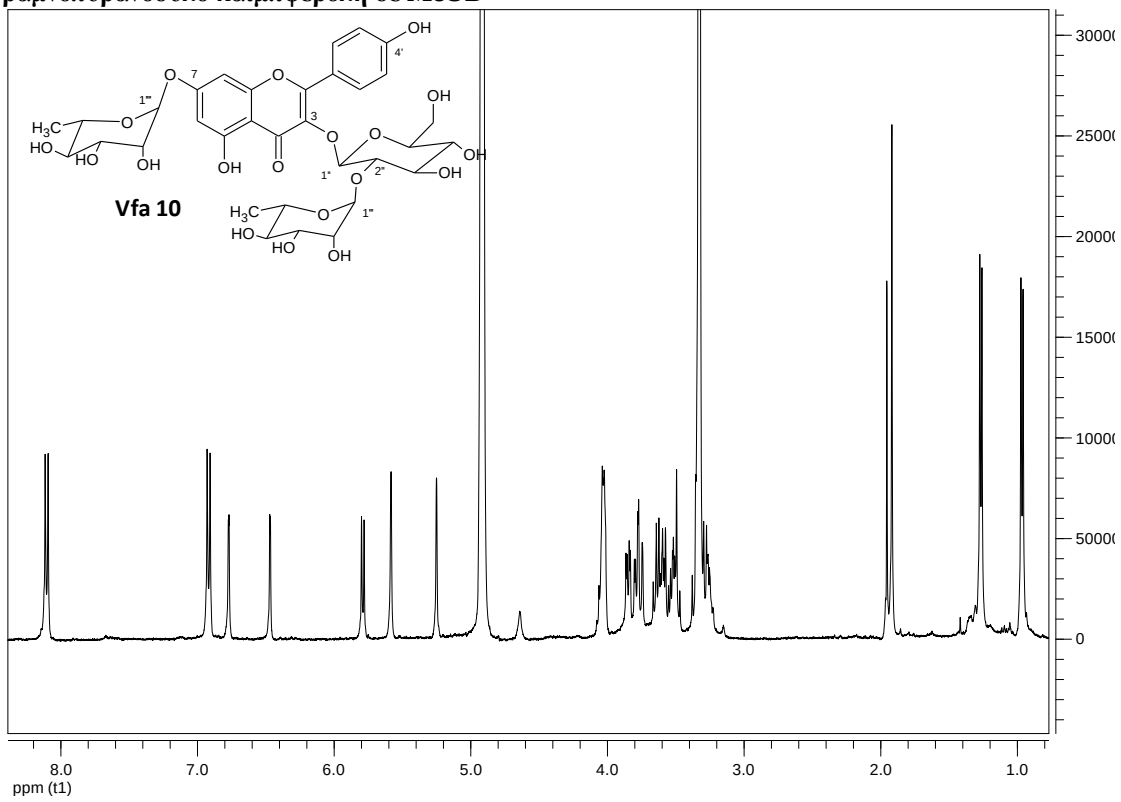
Φάσμα COSY του 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*α*-L-αραβινοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη σε MeOD



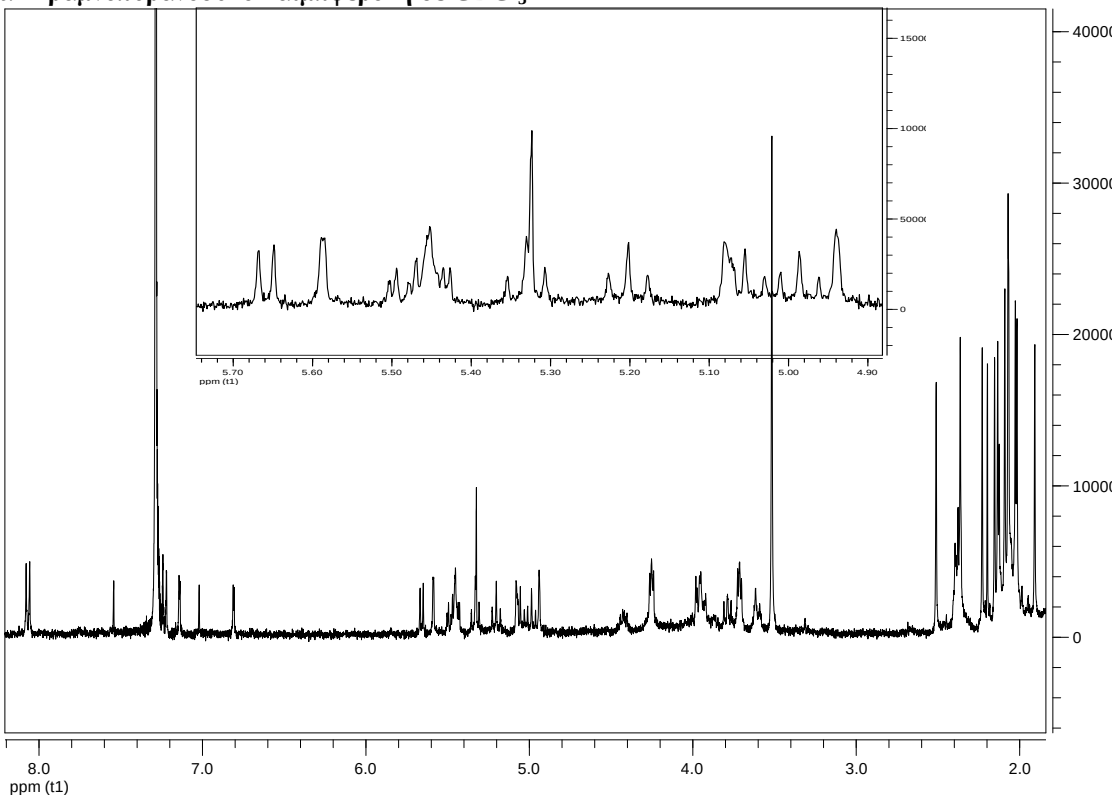
Φάσμα ^{1}H NMR της Ισοκερκιτρίνης σε MeOD



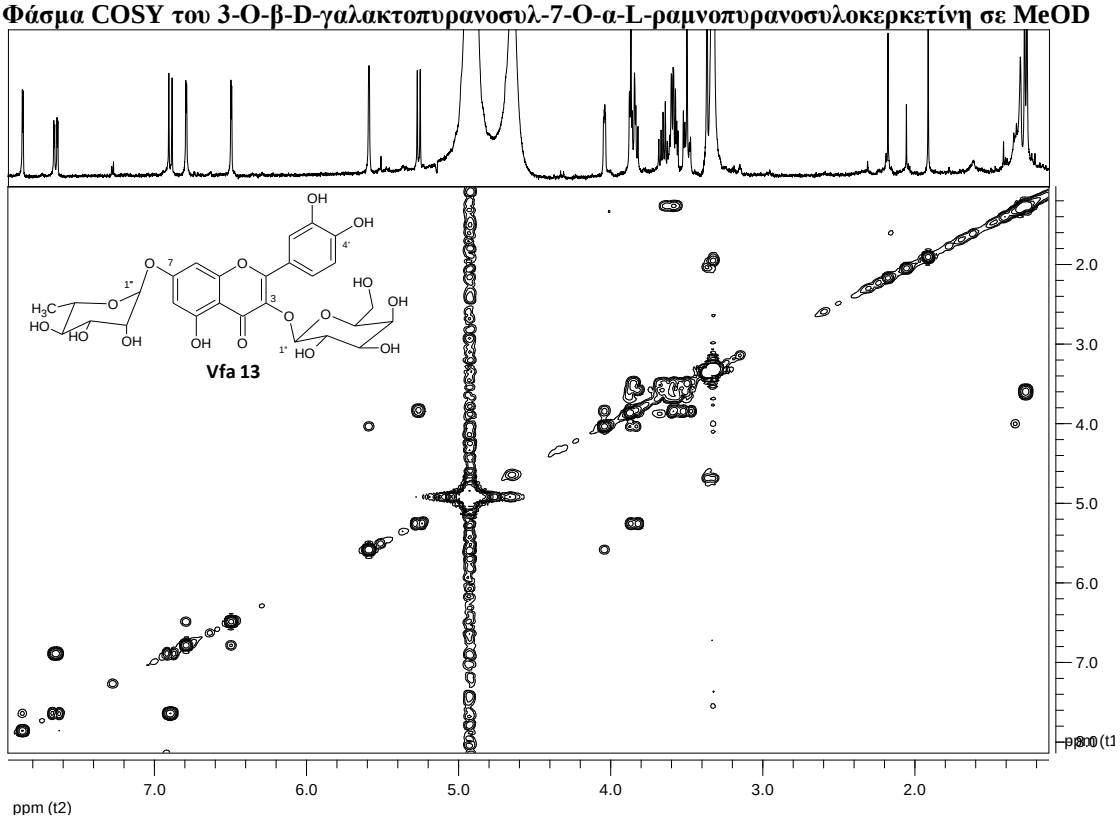
Φάσμα ^{1}H NMR της 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη σε MeOD



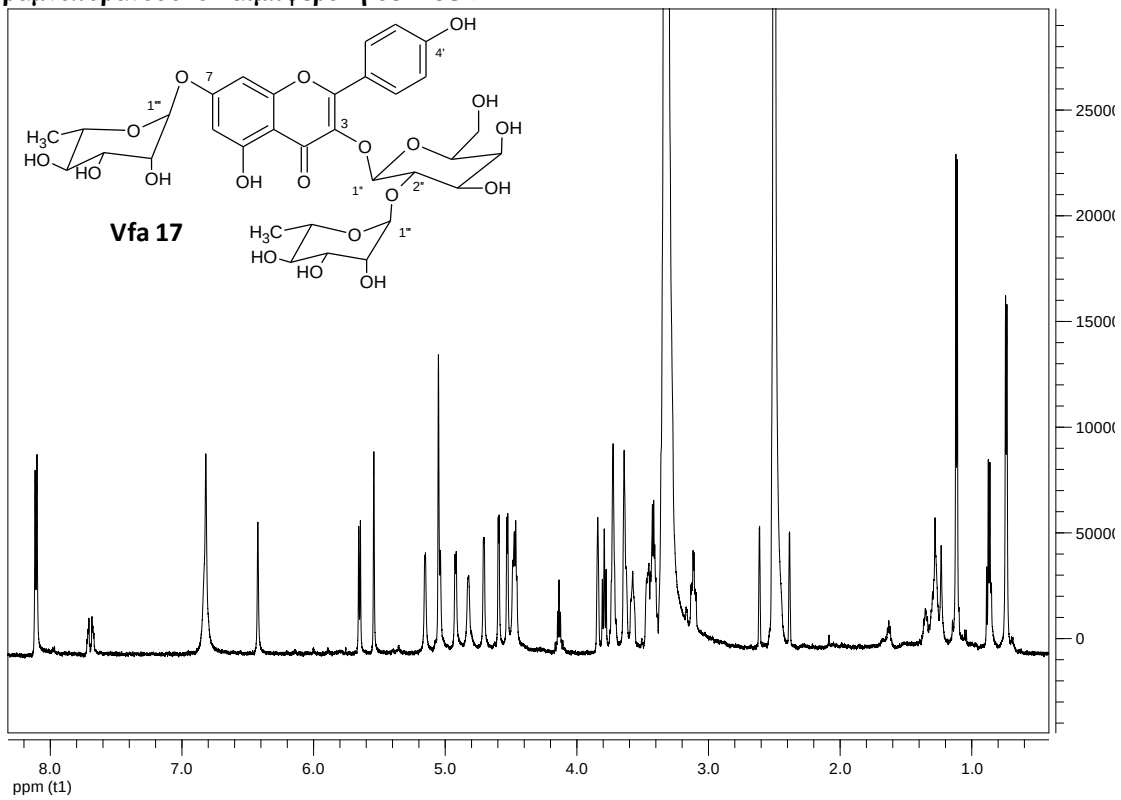
Φάσμα ^{1}H NMR του ακετυλιομένου 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη σε $CDCl_3$



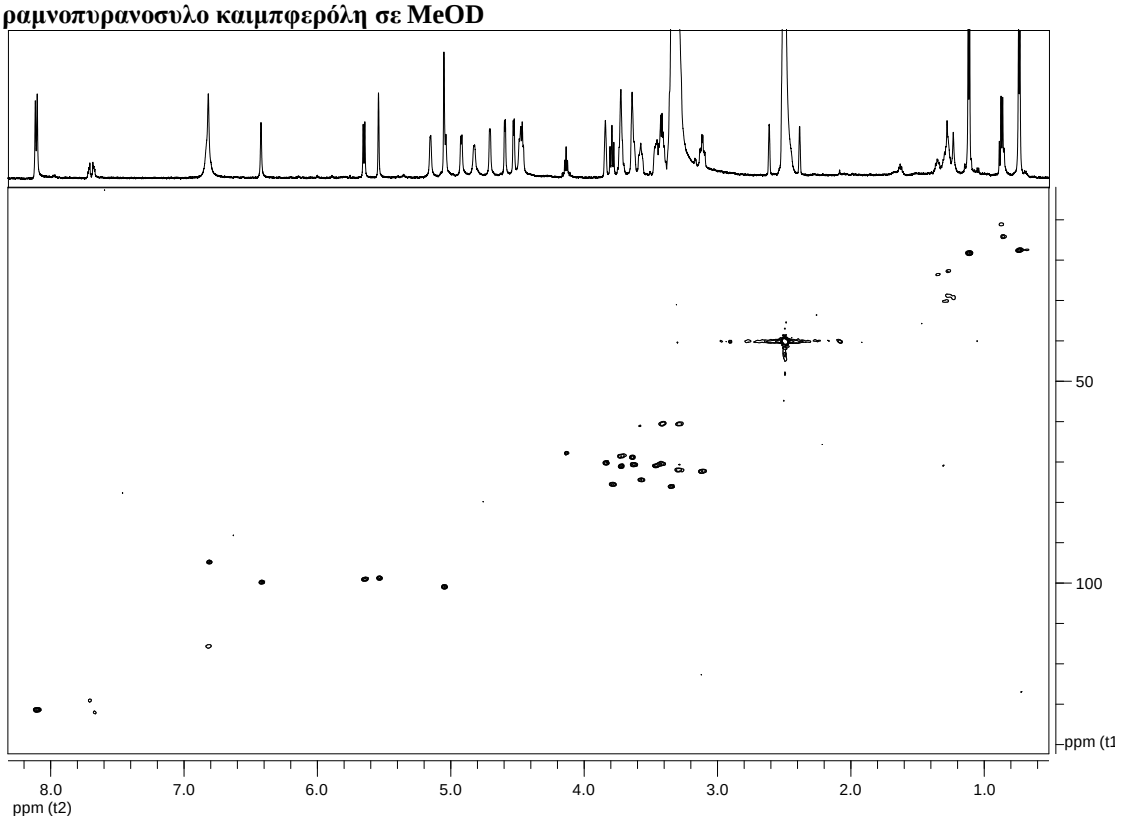
Φάσμα COSY του 3-O-β-D-γαλακτοπυρανοσυλ-7-O-α-L-ραμνοπυρανοσυλοκερκετίνη σε MeOD



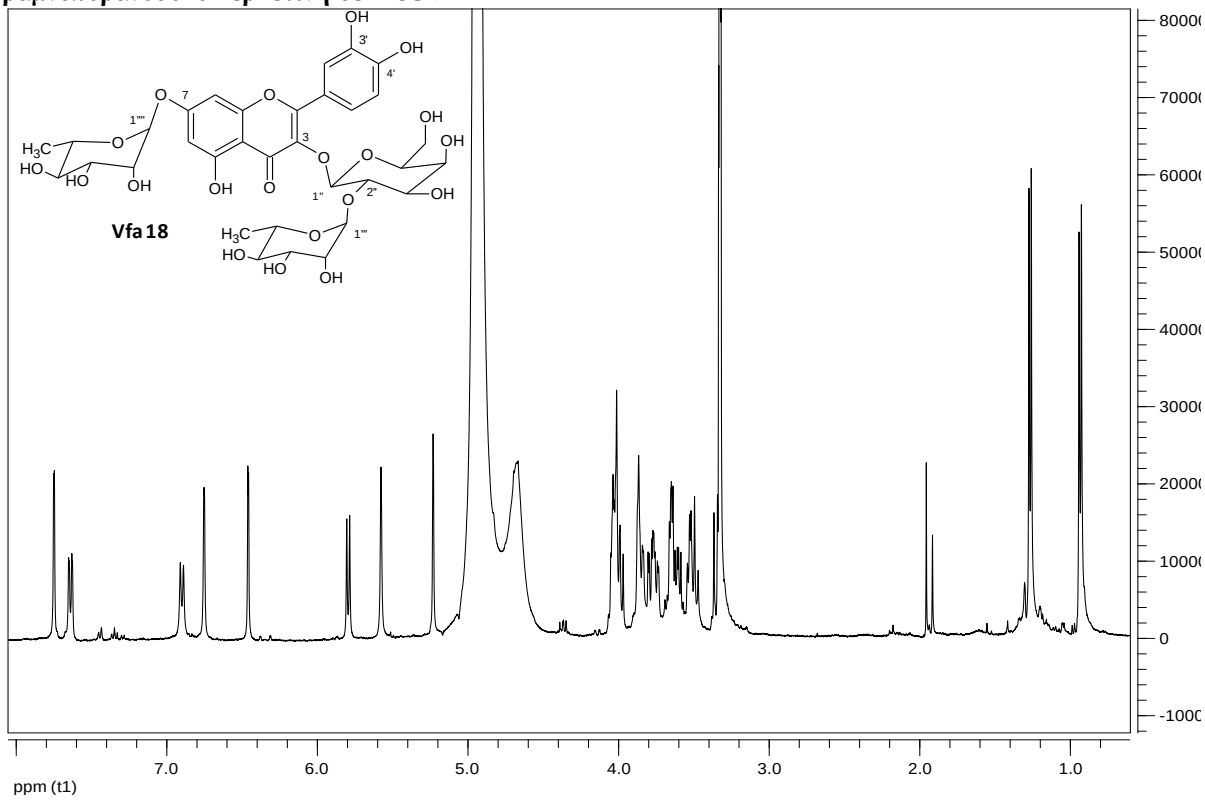
Φάσμα ^{1}H NMR της 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη σε MeOD



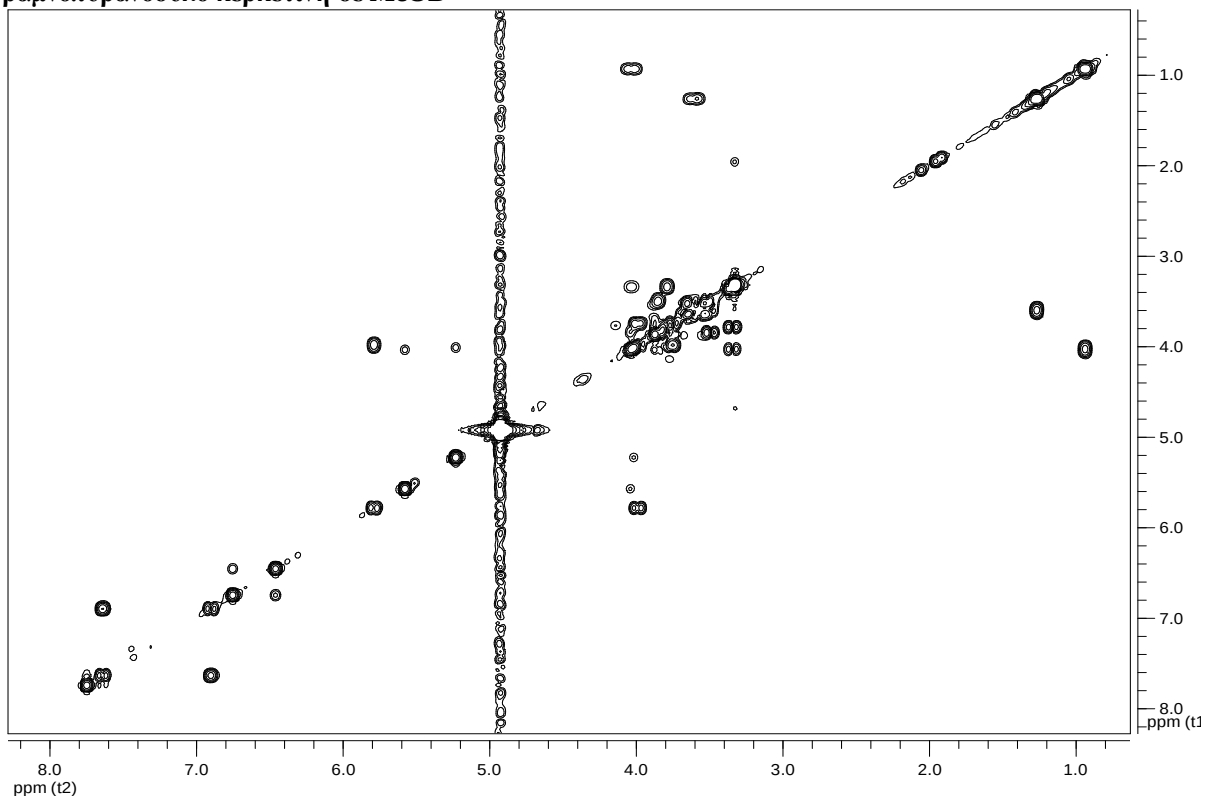
Φάσμα HSQC-DEPT της 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη σε MeOD



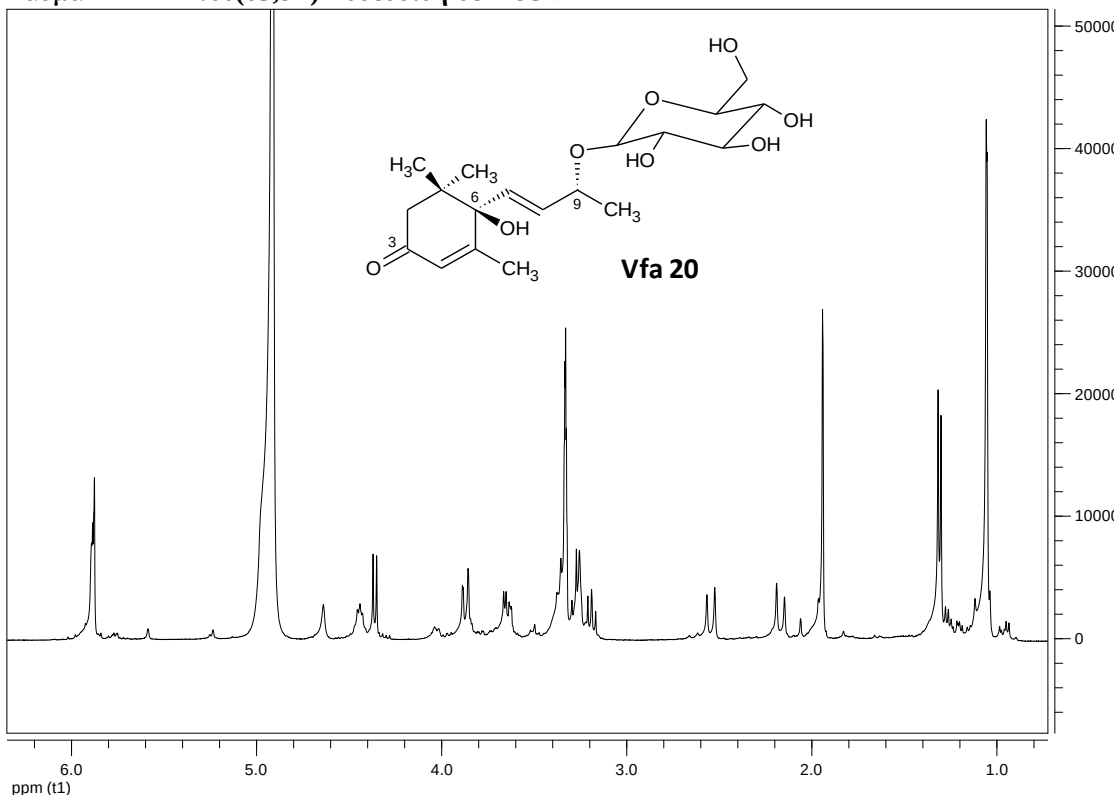
Φάσμα ^{1}H NMR της 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη σε MeOD



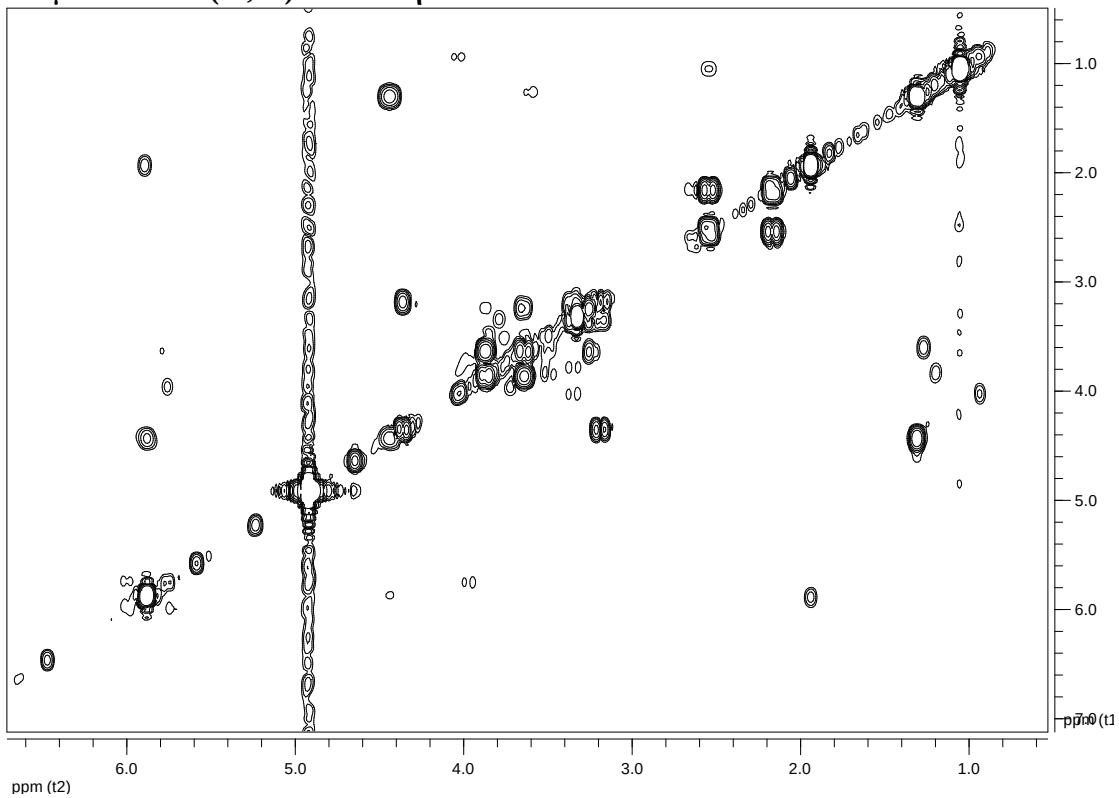
Φάσμα COSY της 3-O-(2''-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλο)-7-O-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο κερκετίνη σε MeOD



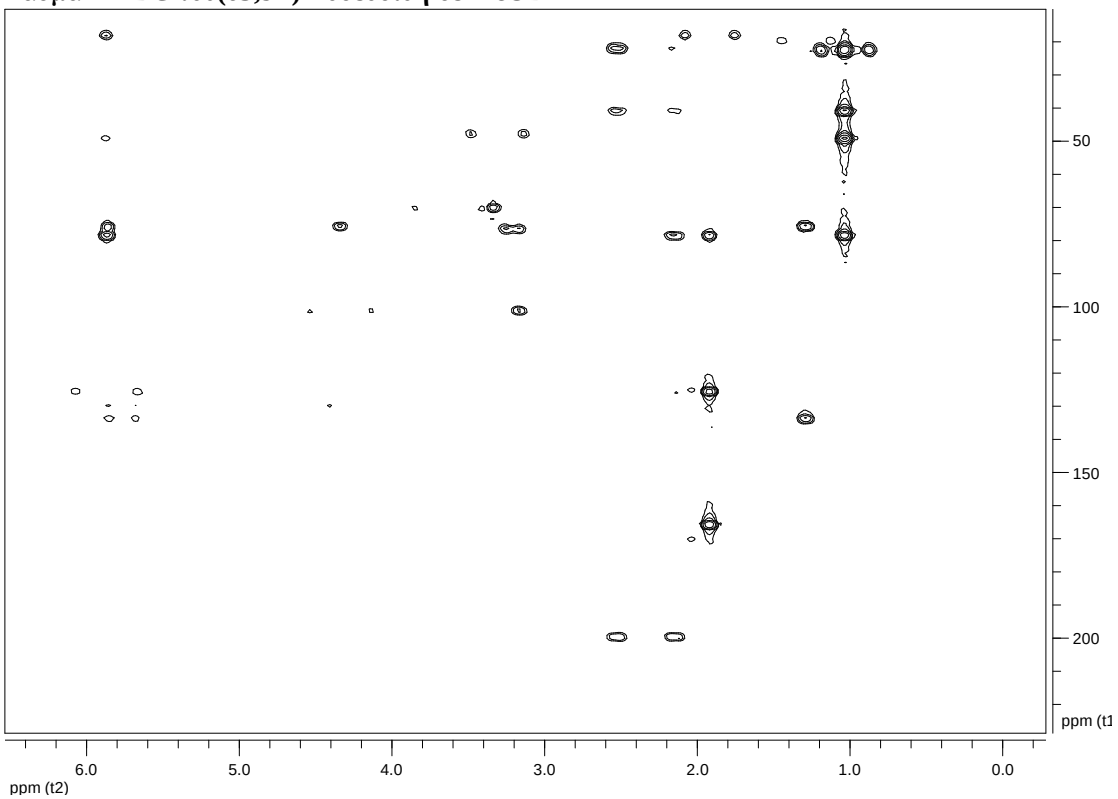
Φάσμα ^{1}H NMR του(6*S*,9*R*)-Ροσεοσίδη σε MeOD



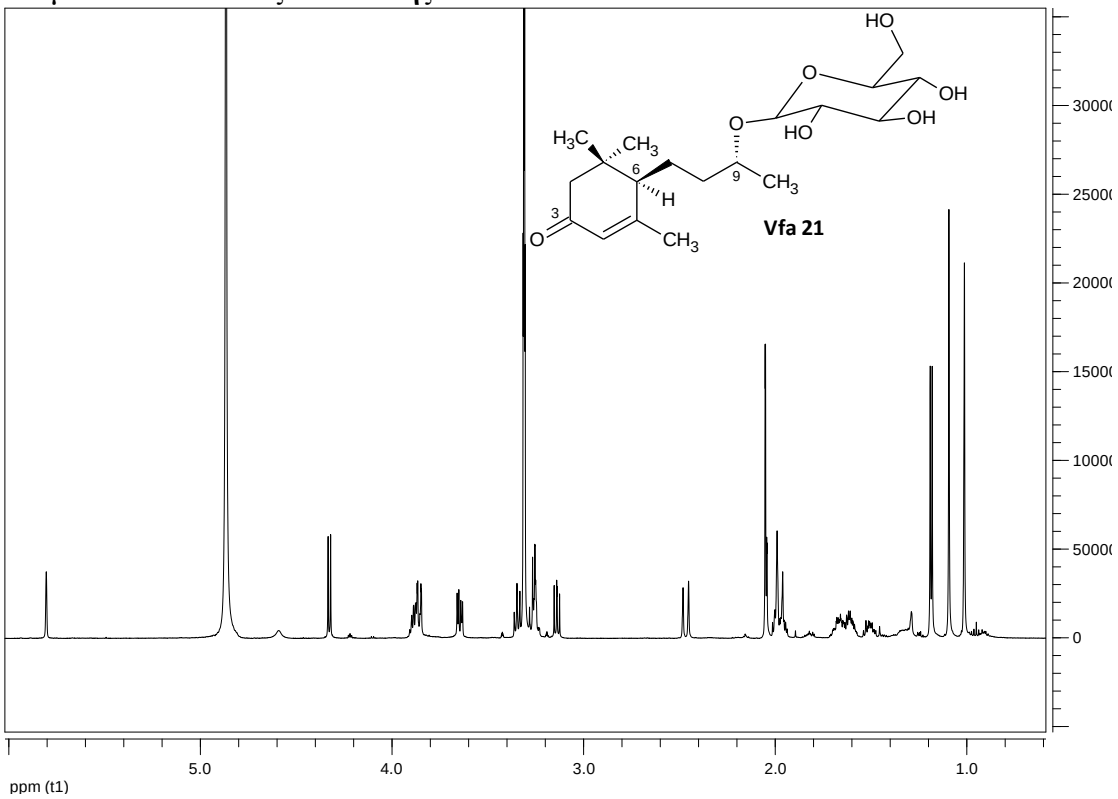
Φάσμα COSY του(6*S*,9*R*)-Ροσεοσίδη σε MeOD



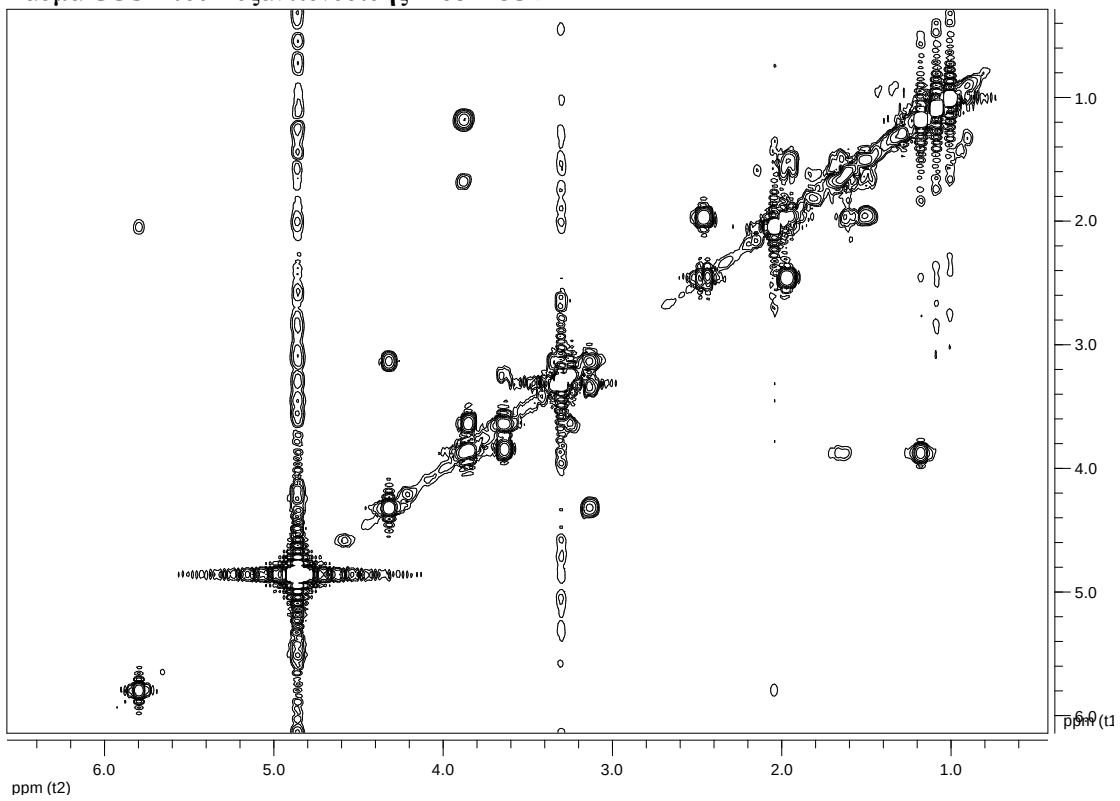
Φάσμα HMBC του(6*S*,9*R*)-Ροσεοσίδη σε MeOD



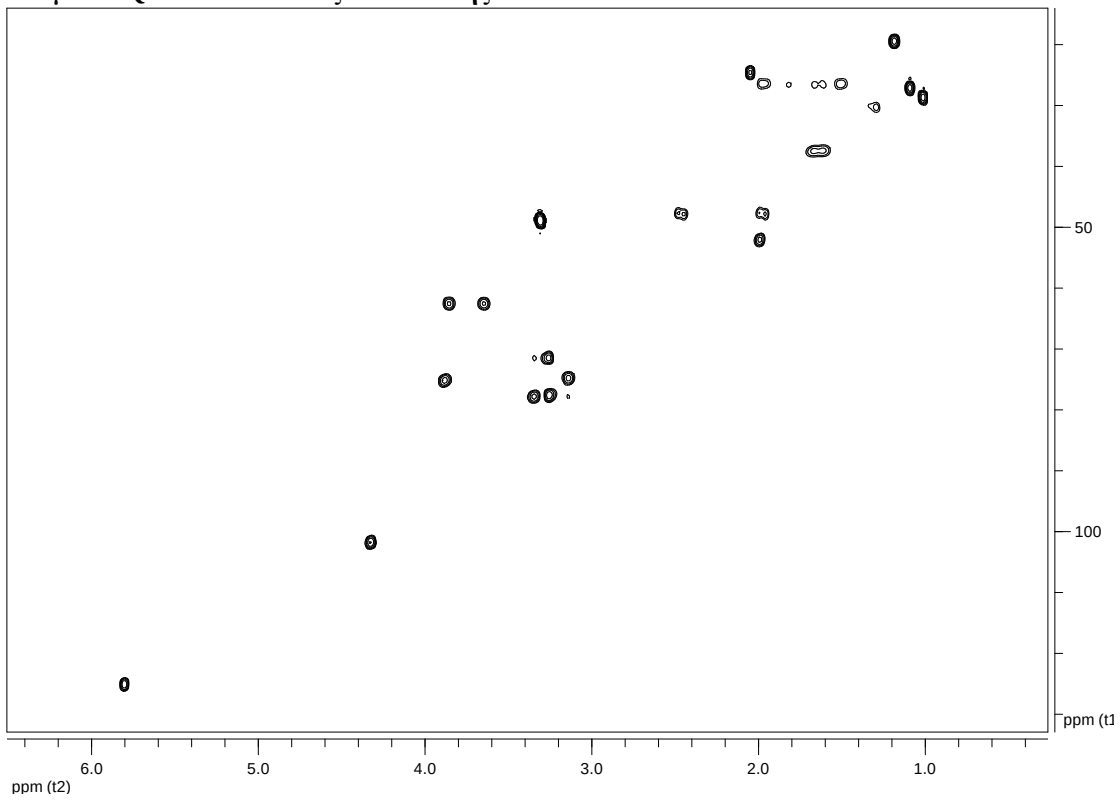
Φάσμα ^{1}H NMR του Βυζαντιονοσίδης Β σε MeOD



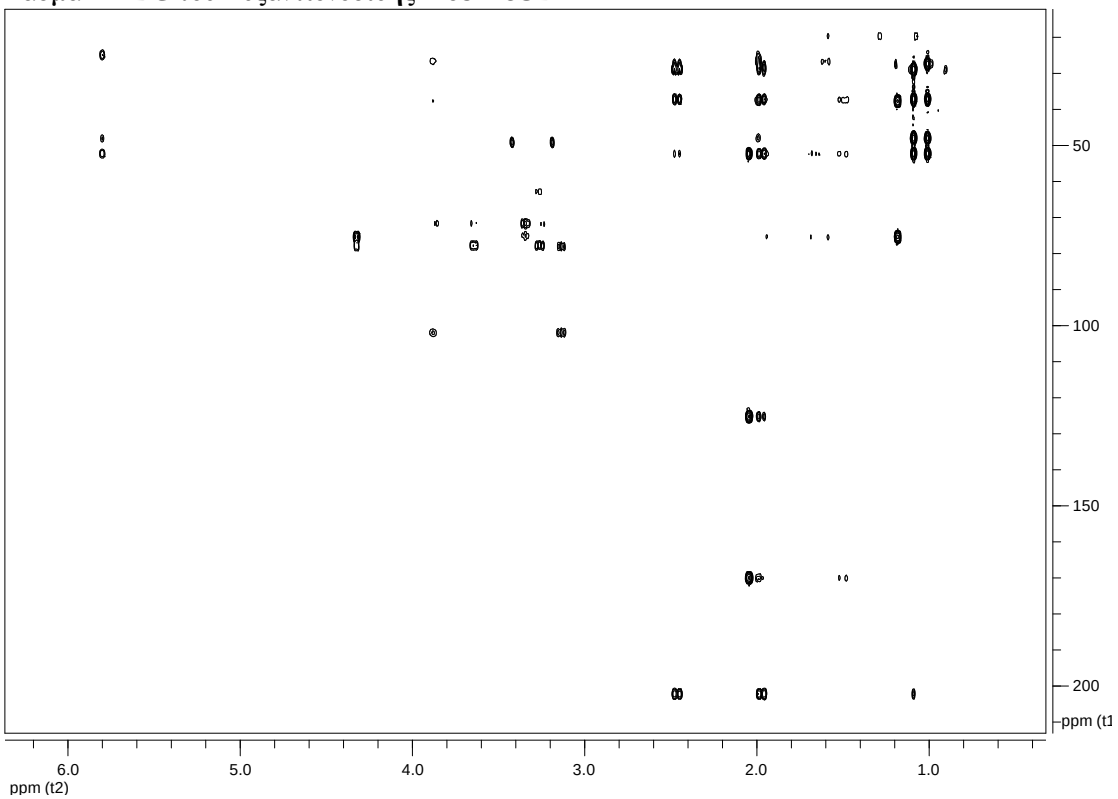
Φάσμα COSY του Βυζαντιονοσίδης Β σε MeOD



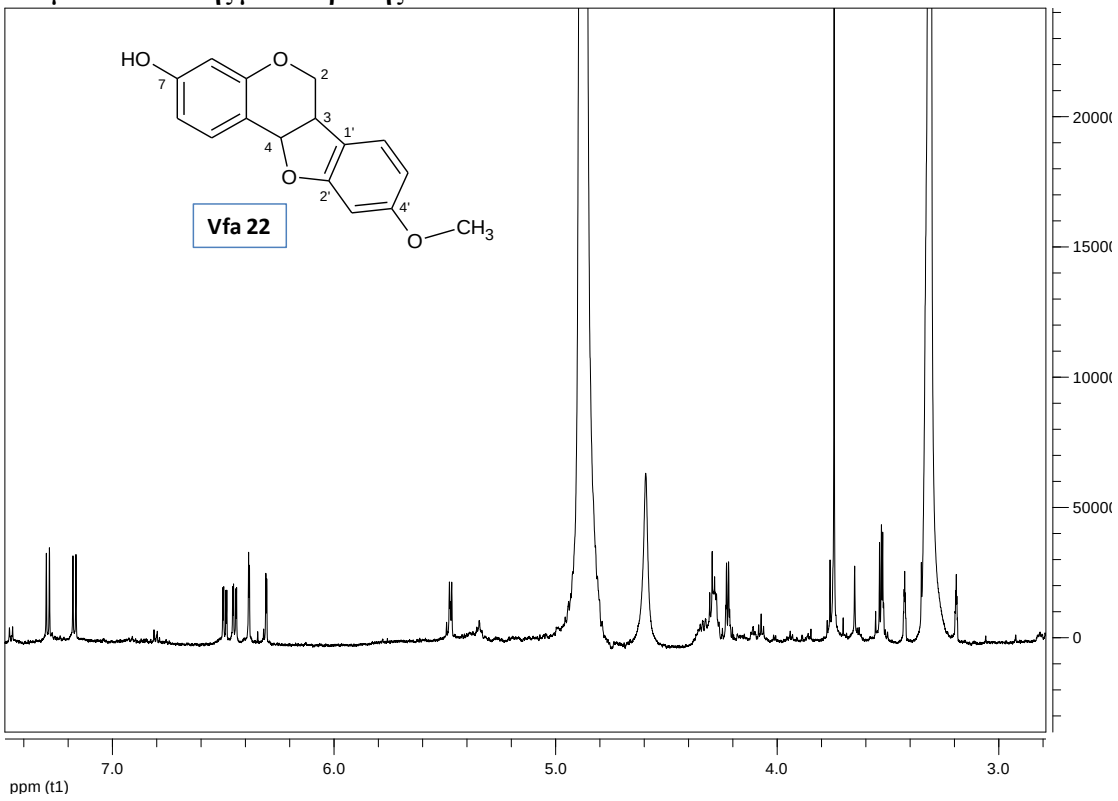
Φάσμα HSQC-DEPT του Βυζαντιονοσίδης Β σε MeOD



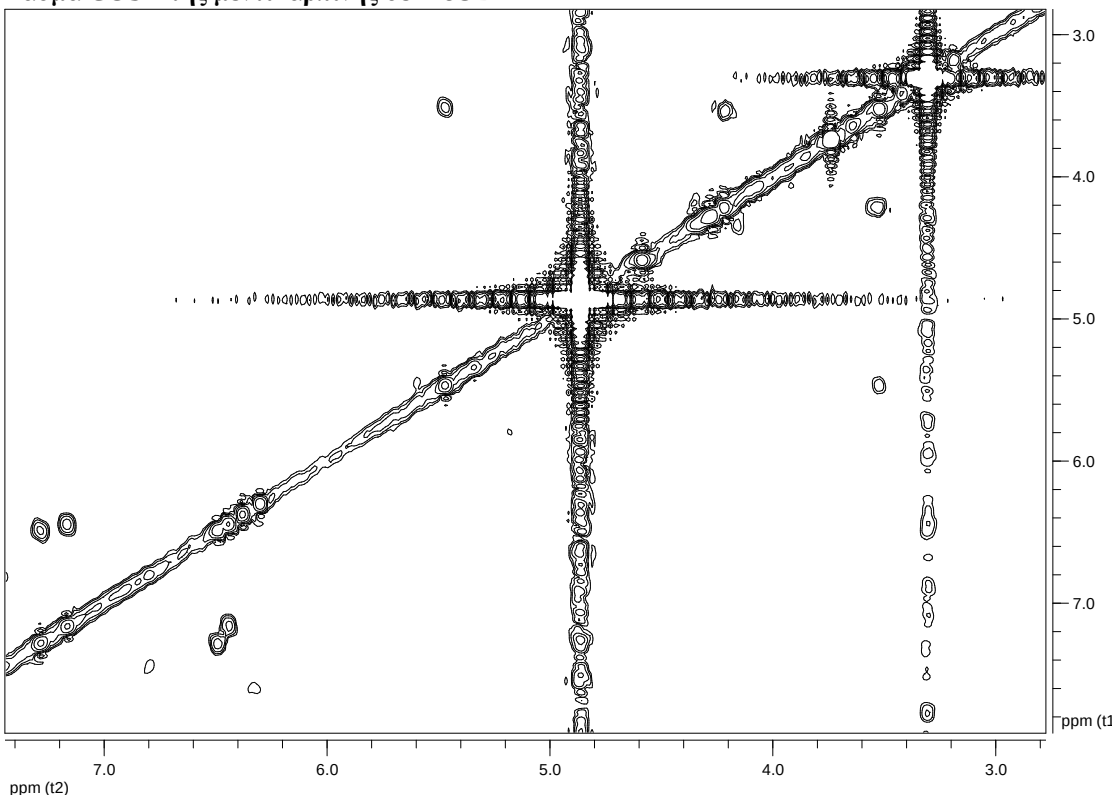
Φάσμα HMBC του Βυζαντιονοσίδης Β σε MeOD



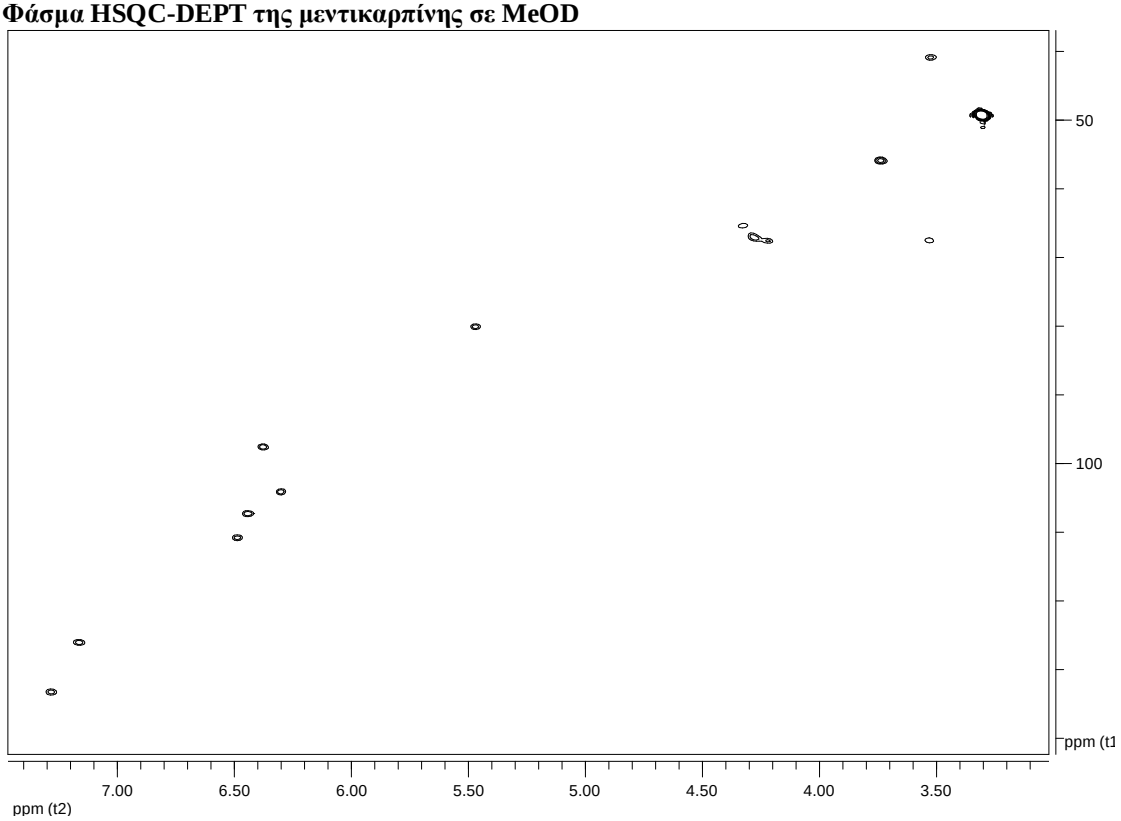
Φάσμα ^{1}H NMR της μεντικαρπίνης σε MeOD



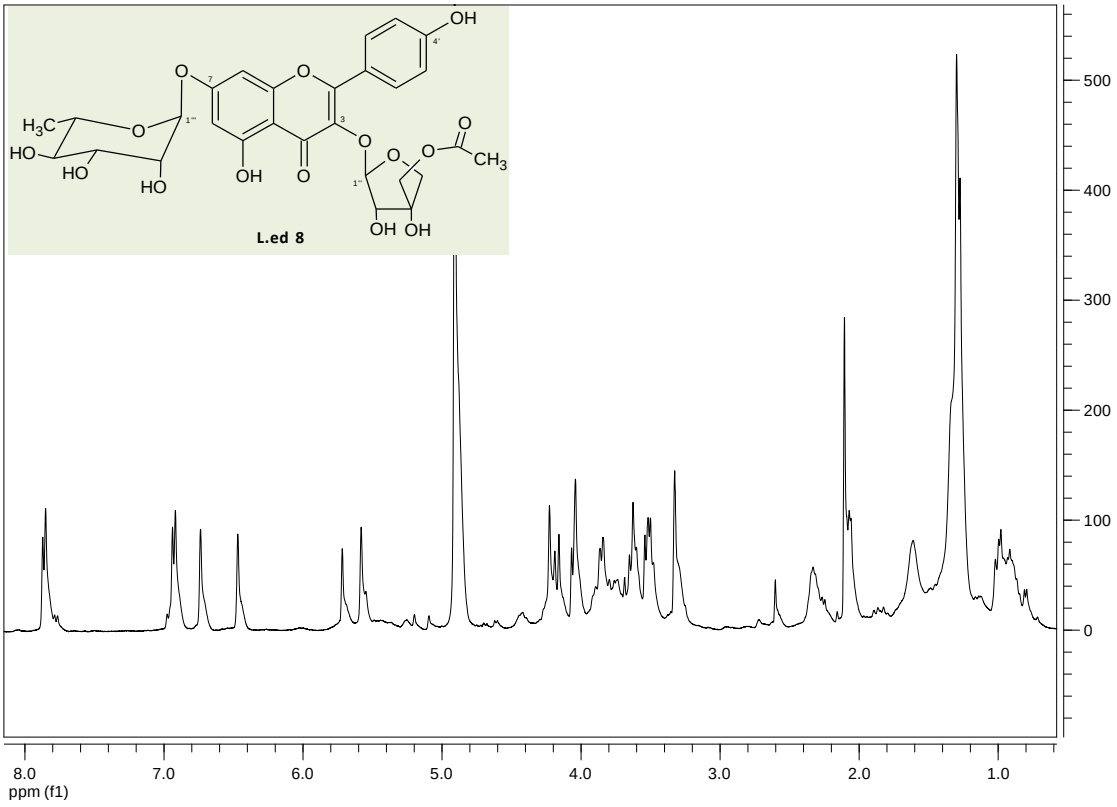
Φάσμα COSY της μεντικαρπίνης σε MeOD



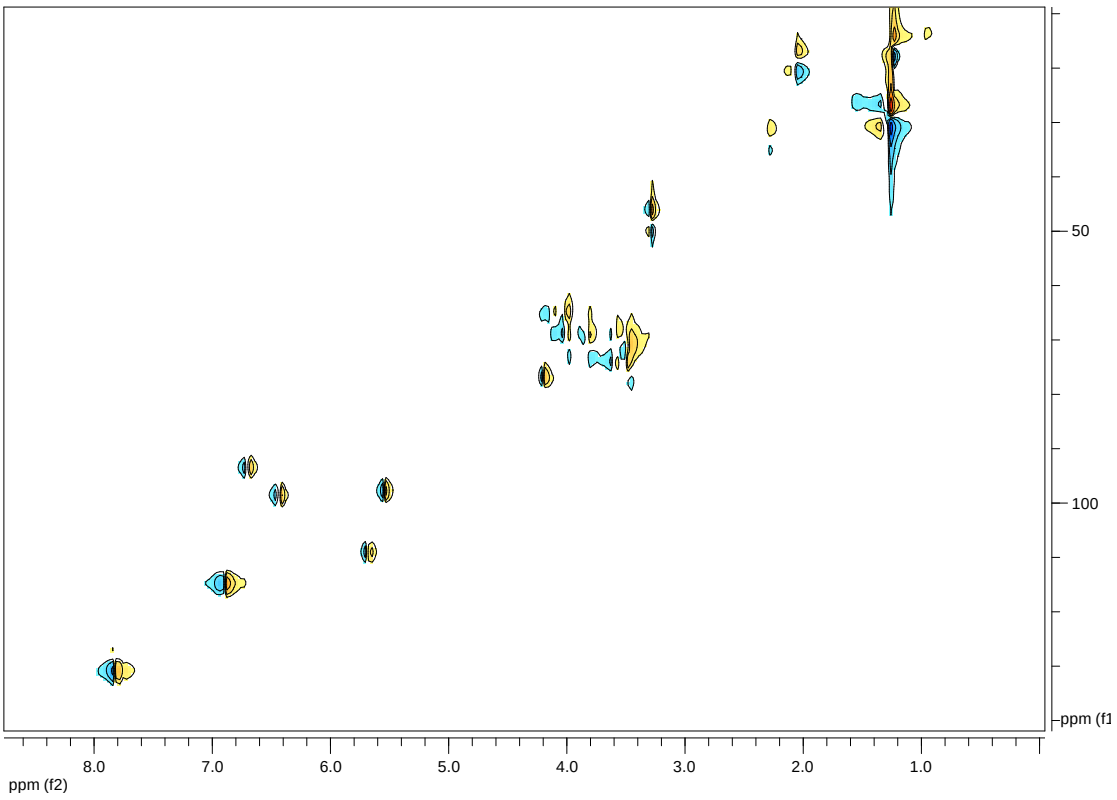
Φάσμα HSQC-DEPT της μεντικαρπίνης σε MeOD



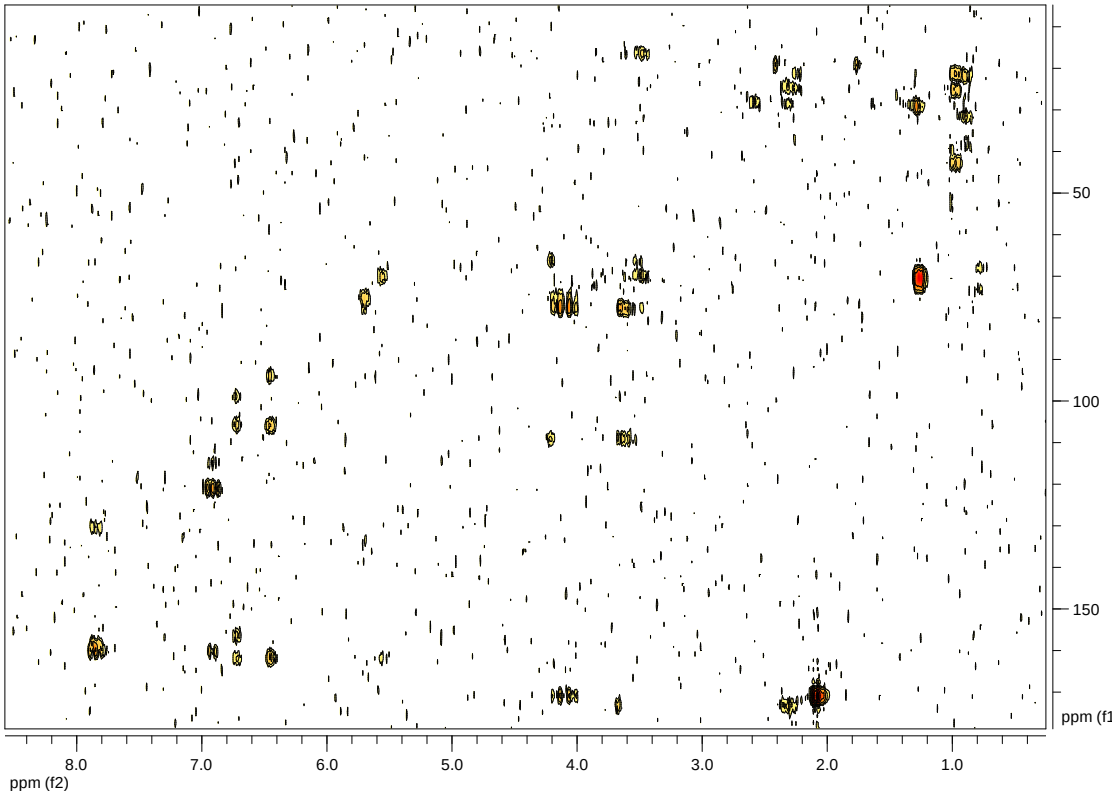
Φάσμα ^{1}H NMR του 3-*O*-(5-*O*-ακετυλο)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοσυλοκαιμπφερόλη σε MeOD



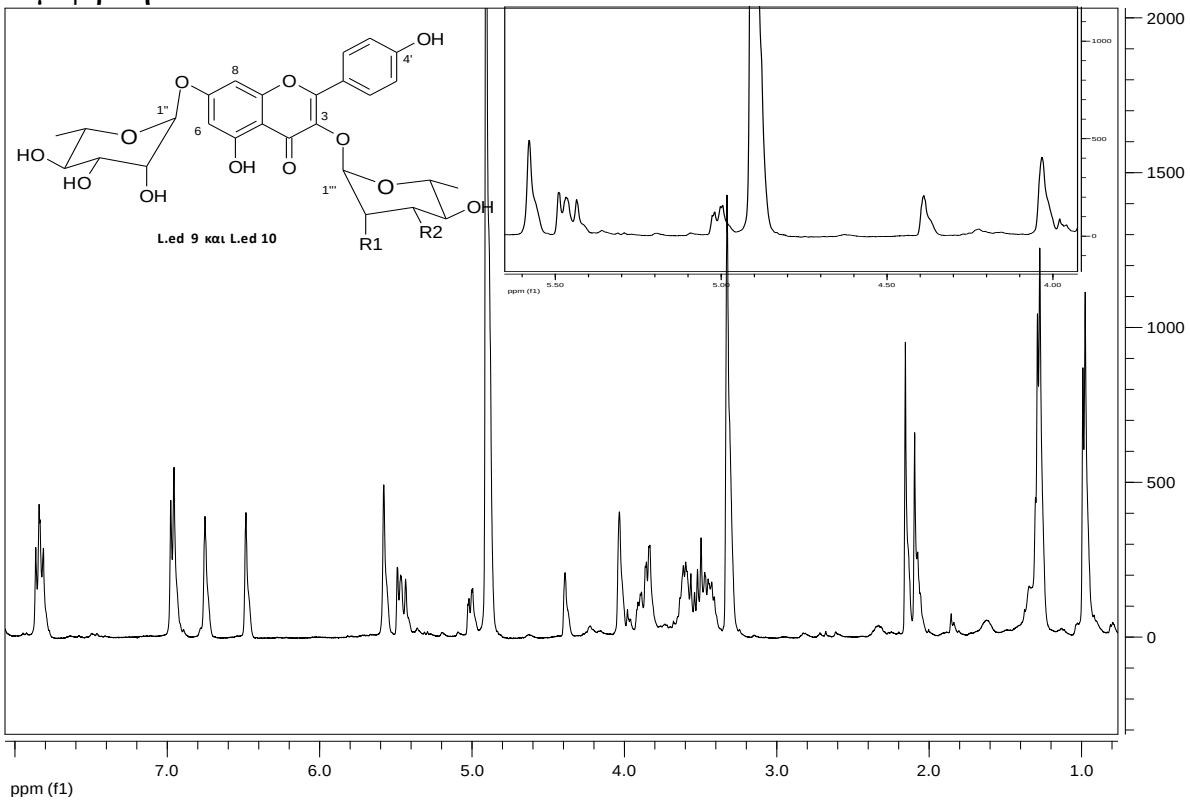
Φάσμα HMQC του 3-*O*-(5-*O*-ακετυλο)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοσυλοκαιμπφερόλη σε MeOD



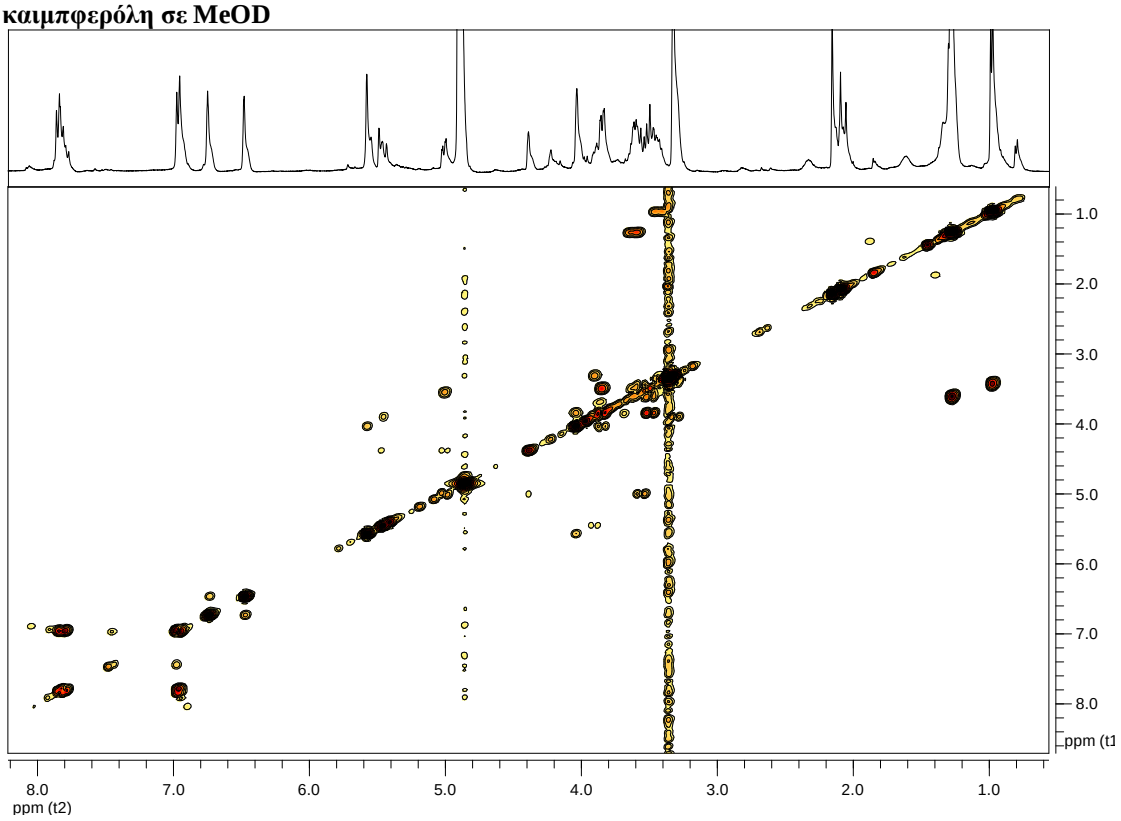
Φάσμα HMBC του 3-*O*-(5-*O*-ακετυλο)-*β*-D-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοσυλοκαιμπφερόλη σε MeOD



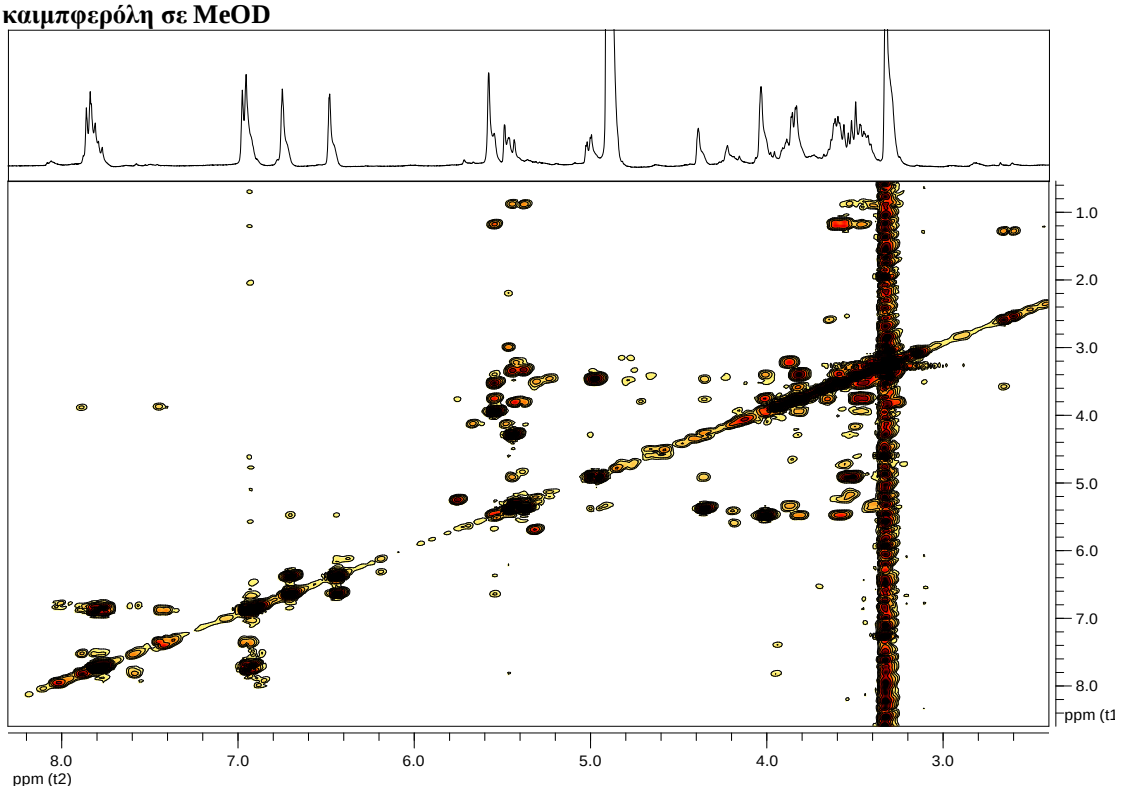
Φάσμα ^{1}H NMR των 3-*O*-(2-*O*-ακετυλο)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη και 3-*O*-(3-*O*-ακετυλο)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη σε MeOD



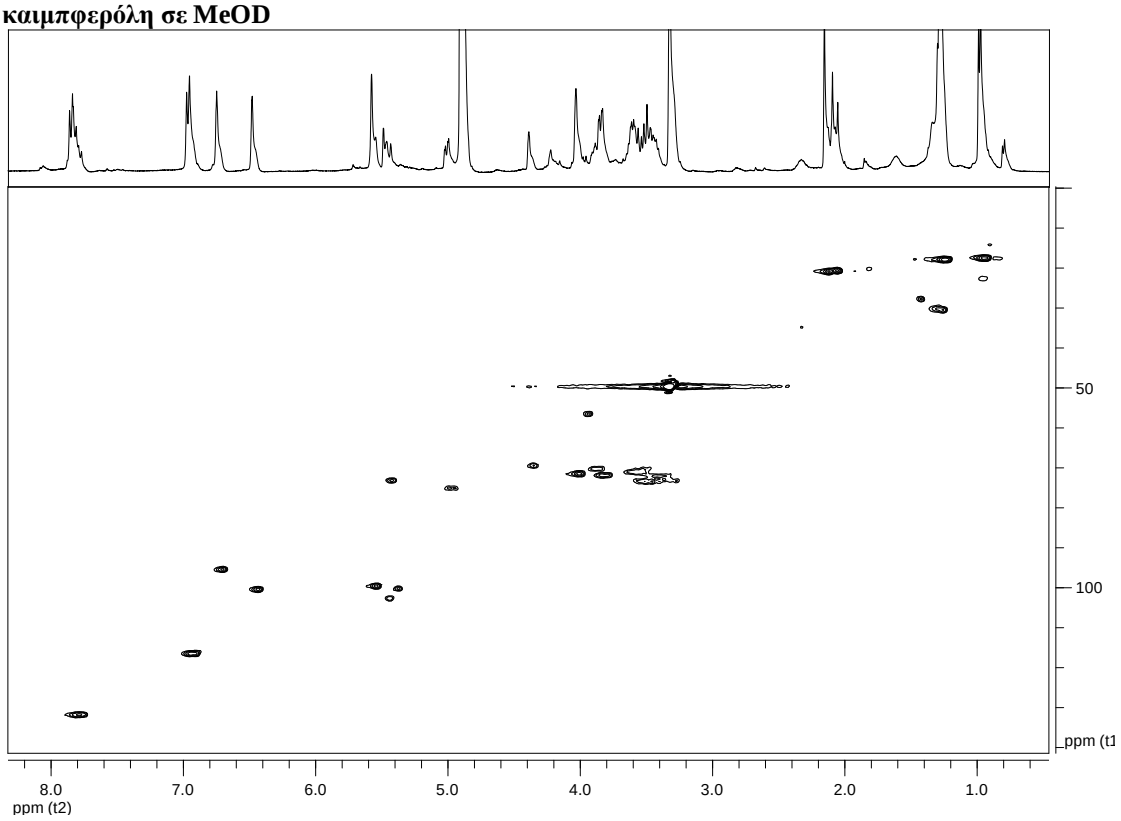
Φάσμα COSY των 3-*O*-(2-*O*-ακετυλο)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη και 3-*O*-(3-*O*-ακετυλο)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη σε MeOD



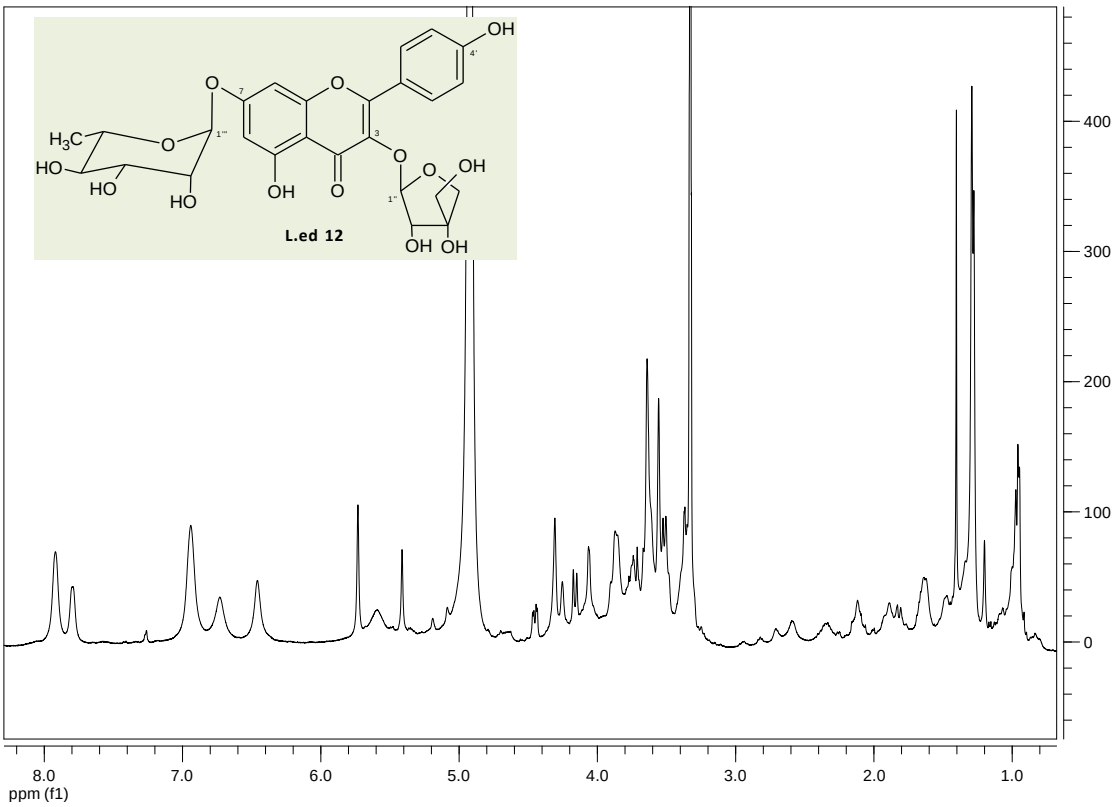
Φάσμα COSY-LR των 3-*O*-(2-*O*-ακετυλο)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη και 3-*O*-(3-*O*-ακετυλο)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη σε MeOD



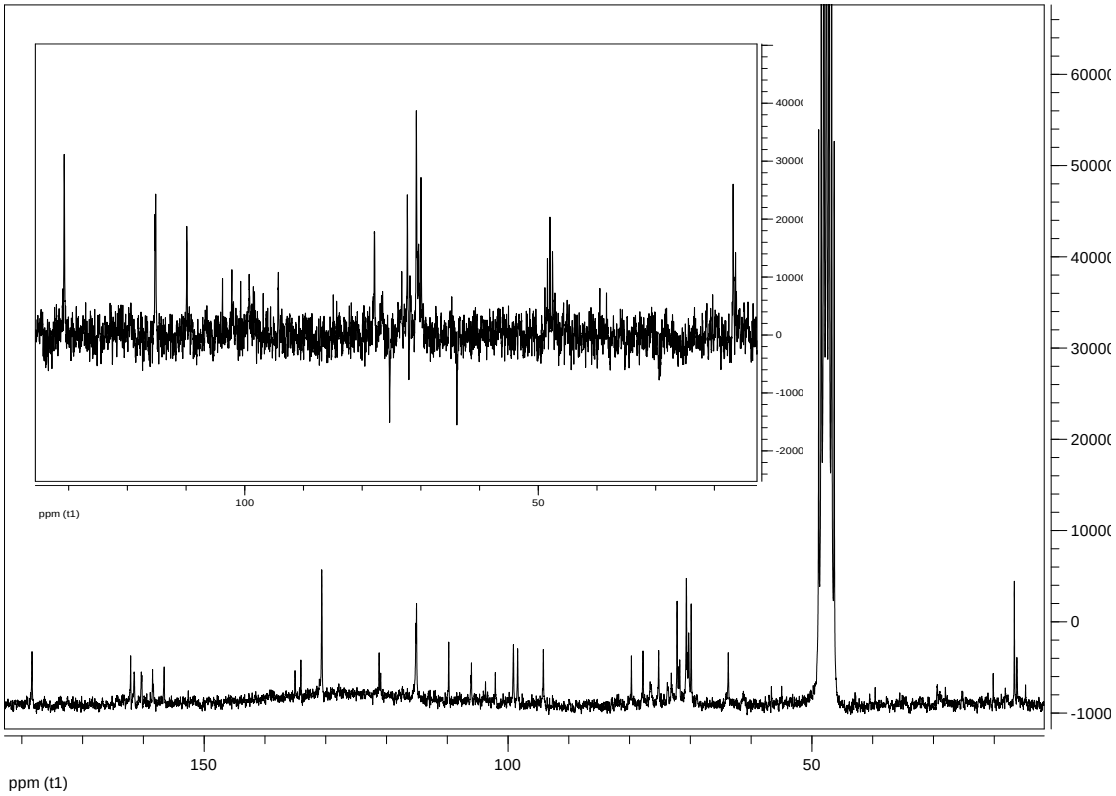
Φάσμα HSQC των 3-*O*-(2-*O*-ακετυλο)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη και 3-*O*-(3-*O*-ακετυλο)-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλο καιμπφερόλη σε MeOD



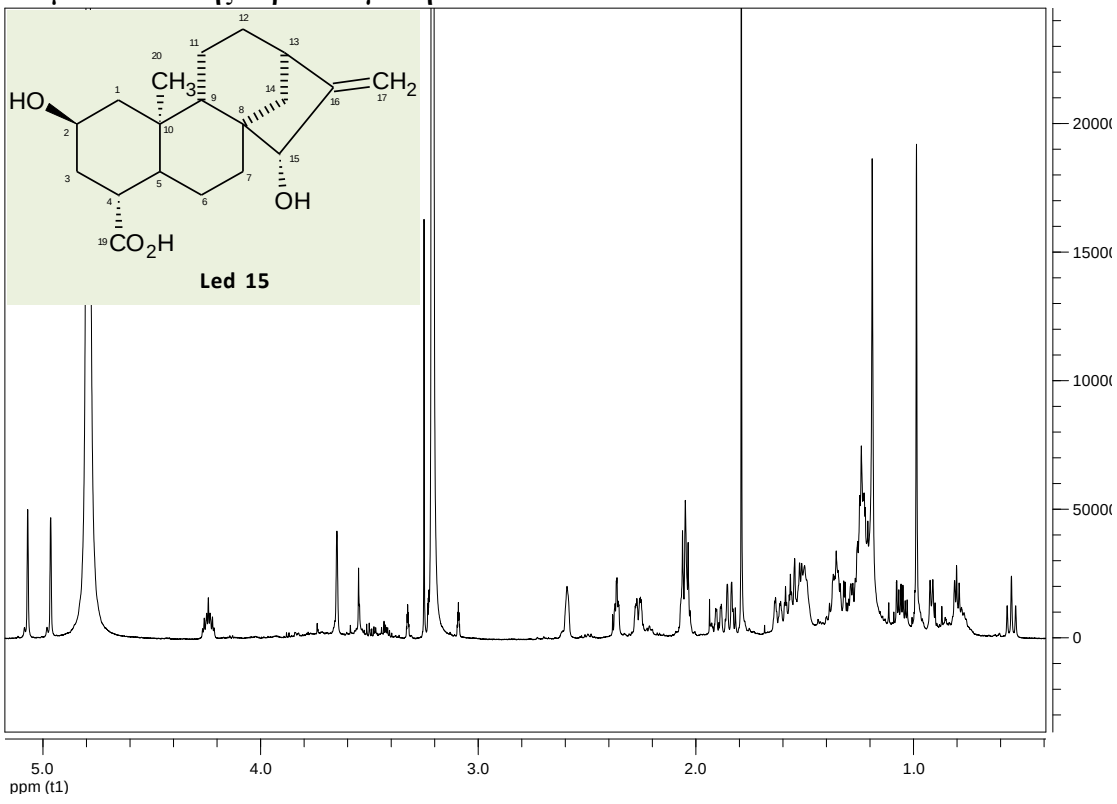
Φάσμα ^{1}H NMR του3-*O*-*β*-D-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη σε MeOD



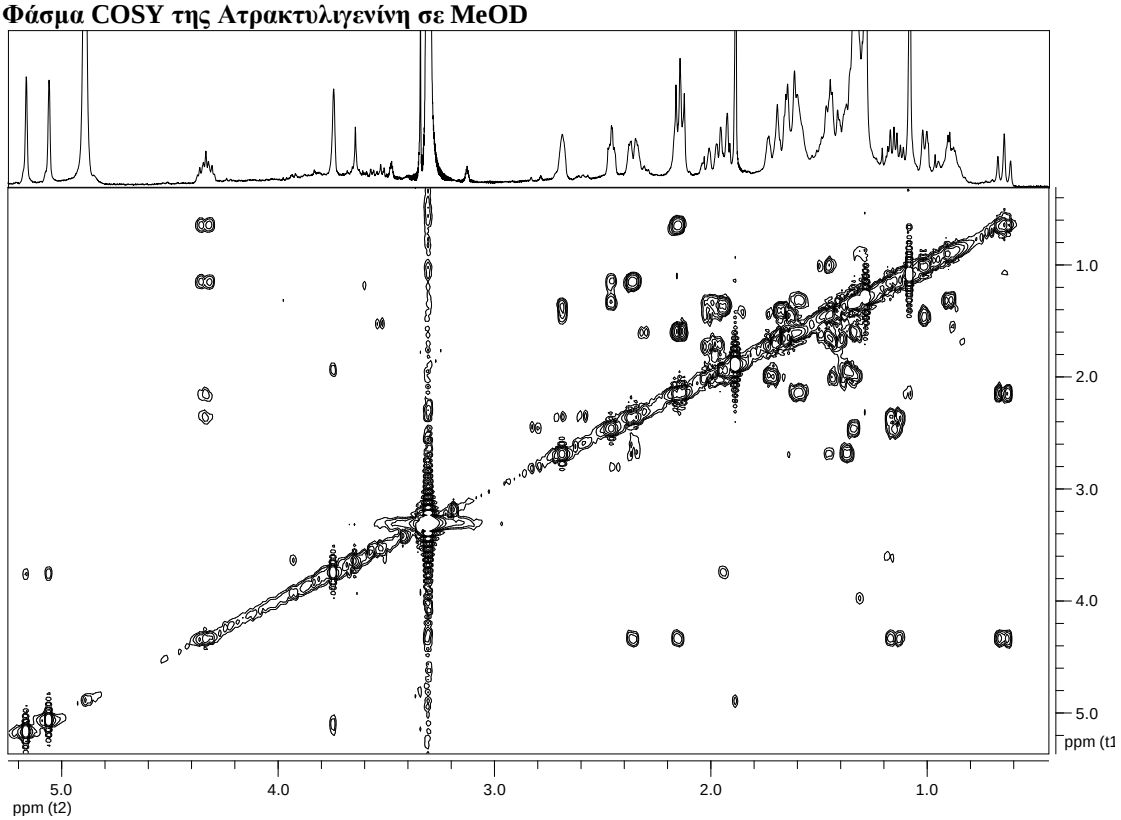
Φάσμα ^{13}C και DEPT του3-*O*-*β*-D-απιοφουρανοσυλο-7-*O*-*α*-L-ραμνοπυρανοσυλοκαιμπφερόλη σε MeOD



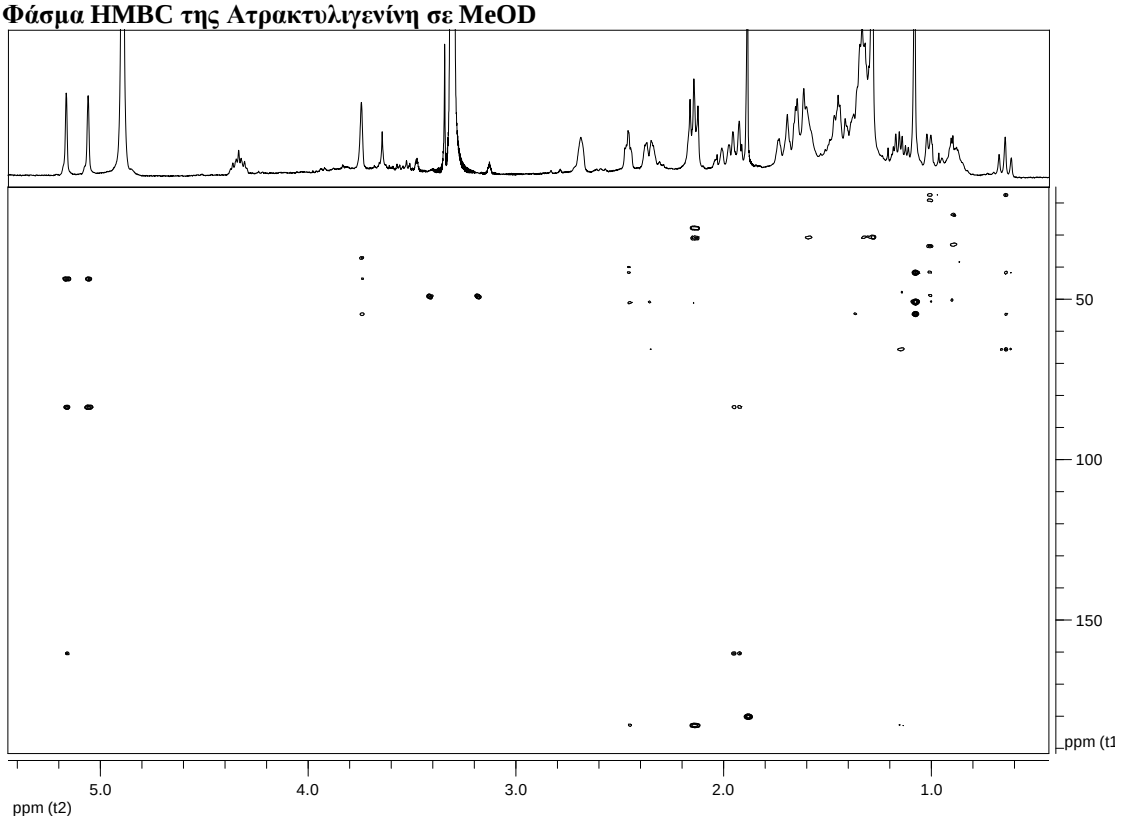
Φάσμα ^{1}H NMR της Ατρακτυλιγενίνη σε MeOD



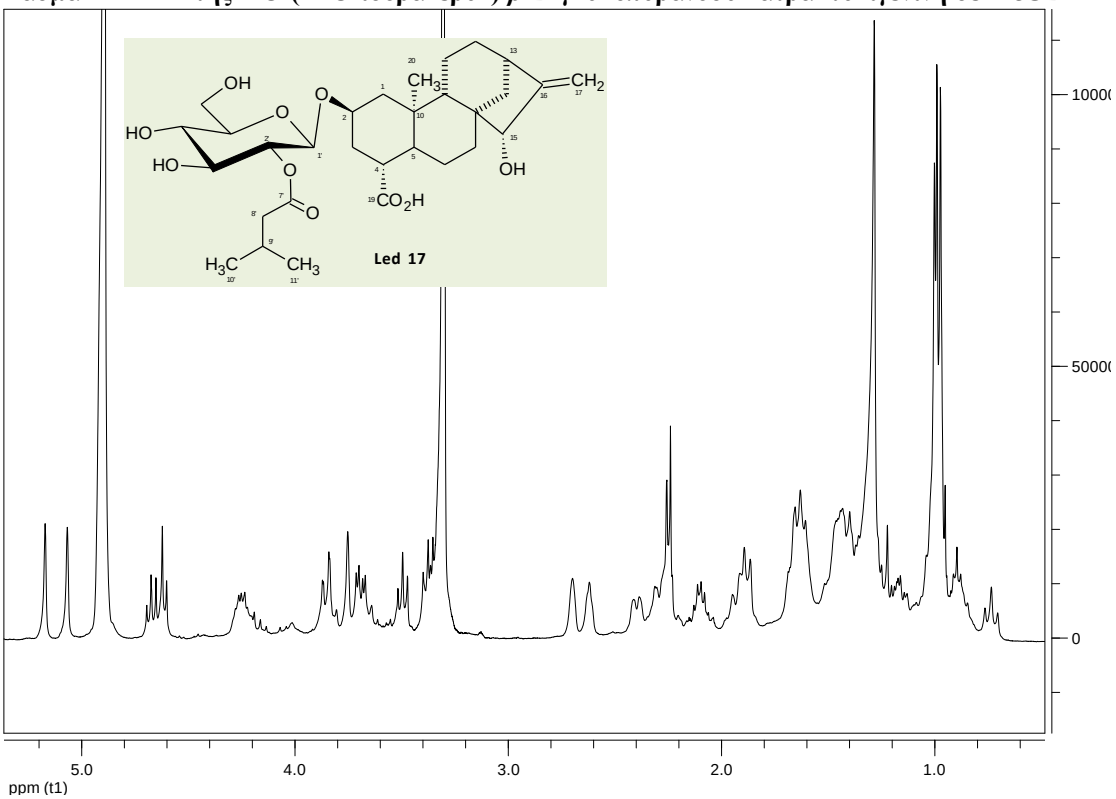
Φάσμα COSY της Ατρακτυλιγενίνη σε MeOD



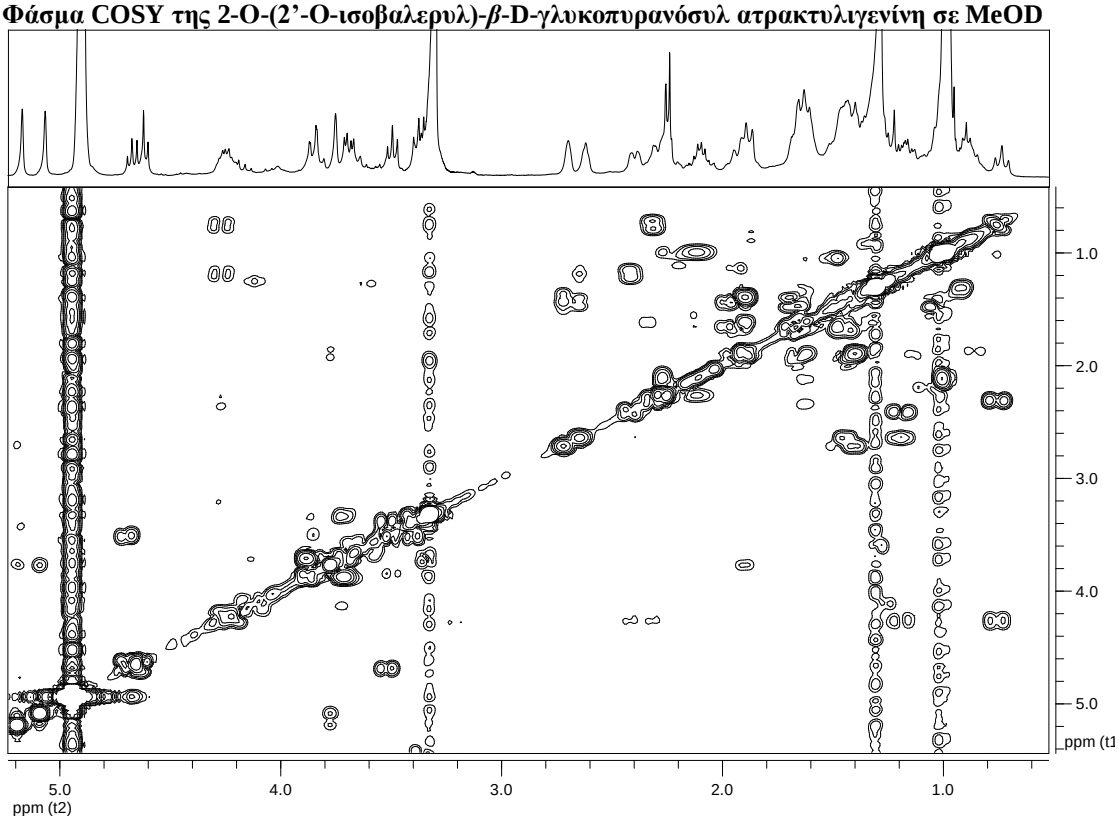
Φάσμα HMBC της Ατρακτυλιγενίνη σε MeOD



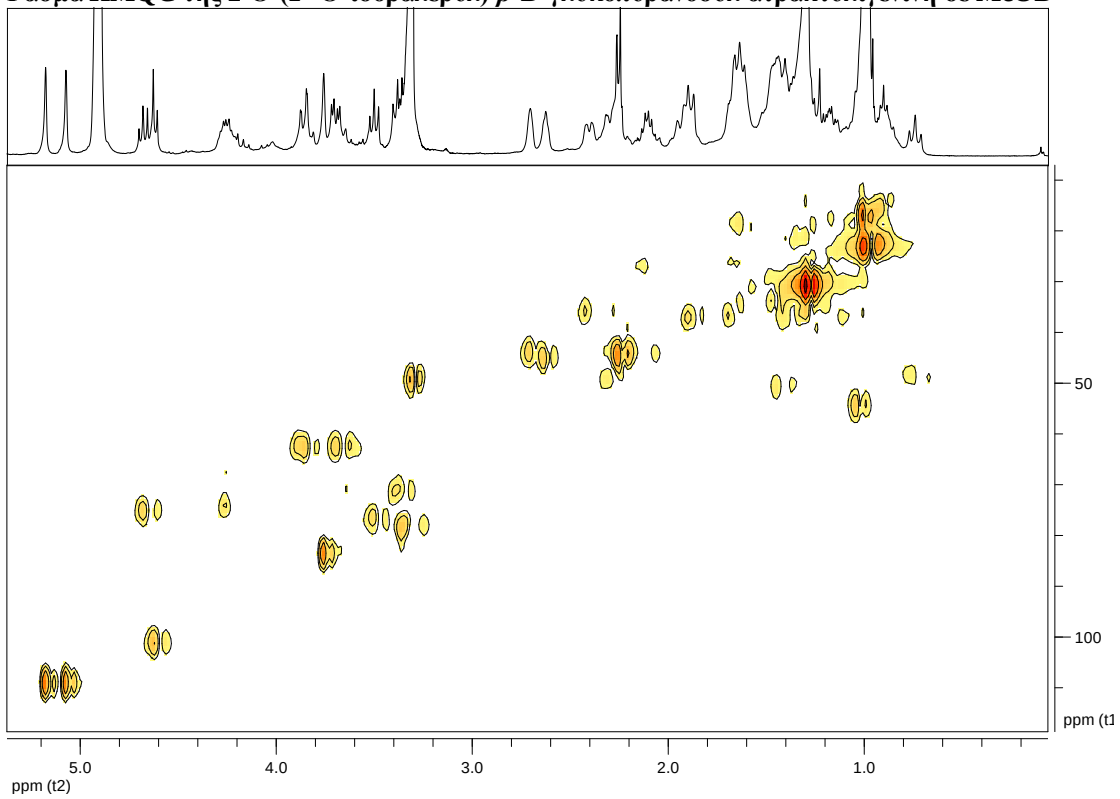
Φάσμα ^{1}H NMR της 2-O-(2'-O-ισοβαλερυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλ ατρακτυλιγενίνη σε MeOD



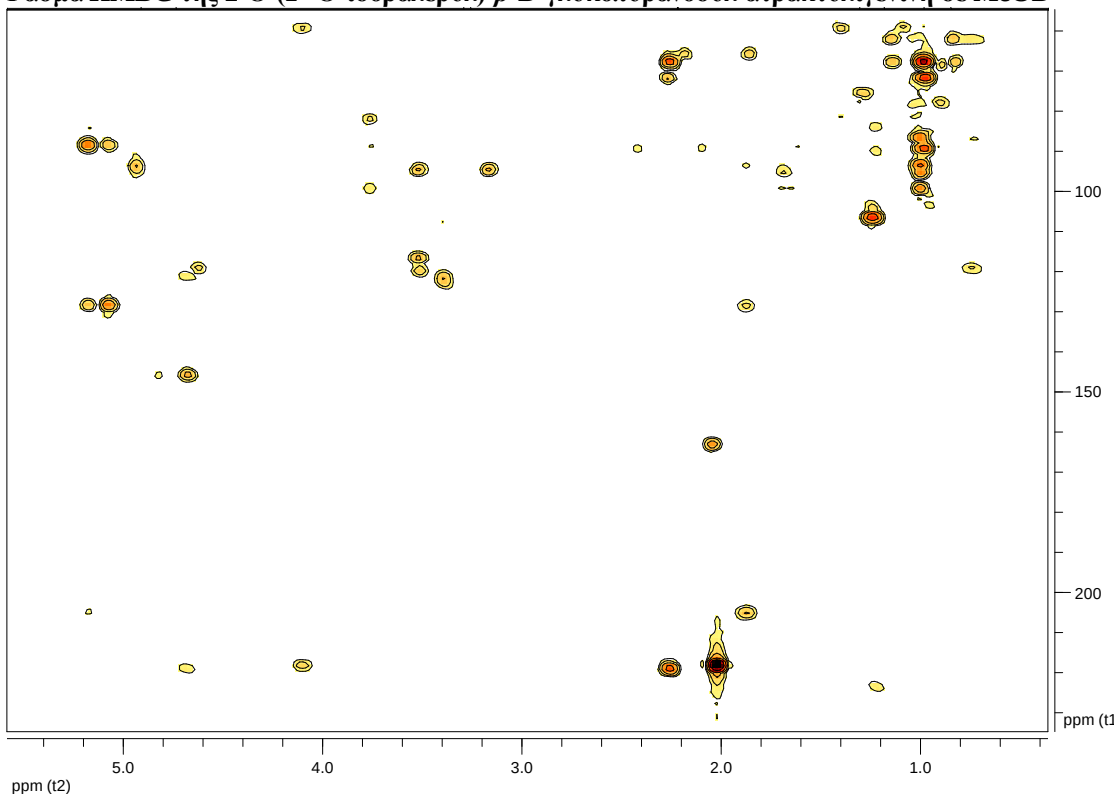
Φάσμα COSY της 2-O-(2'-O-ισοβαλερυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλ ατρακτυλιγενίνη σε MeOD



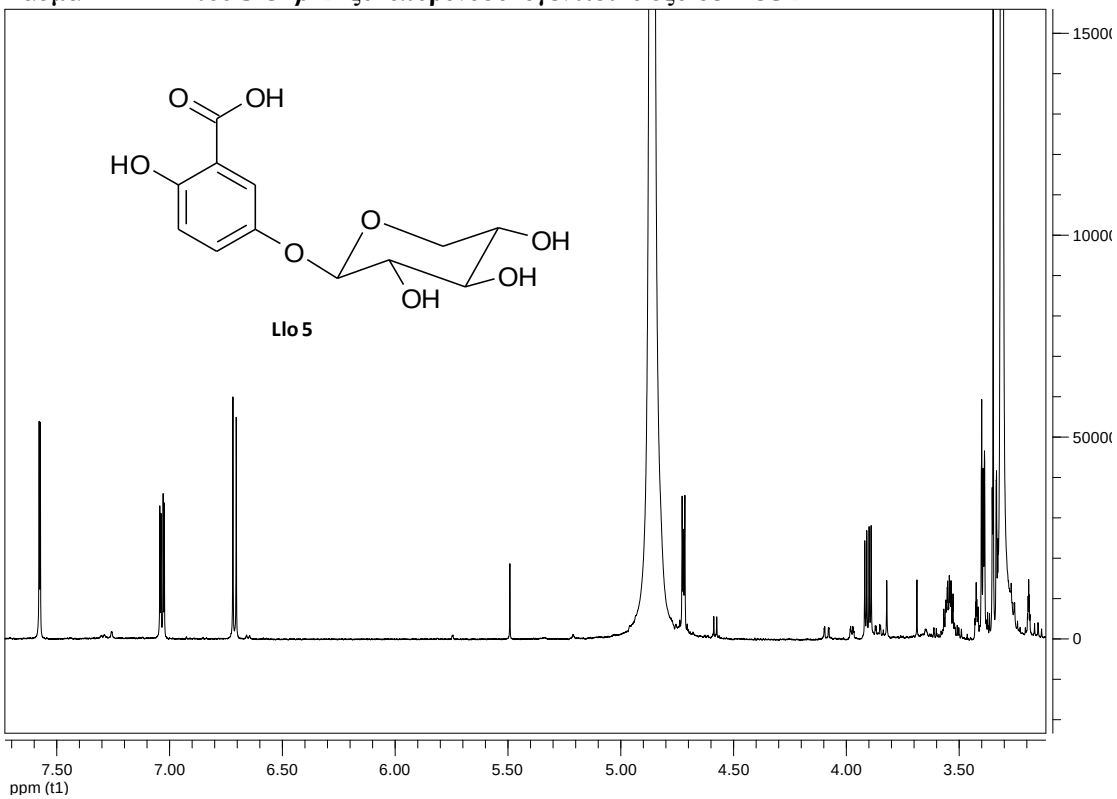
Φάσμα HMQC της 2-O-(2'-O-ισοβαλερυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλ ατρακτυλιγενίνη σε MeOD



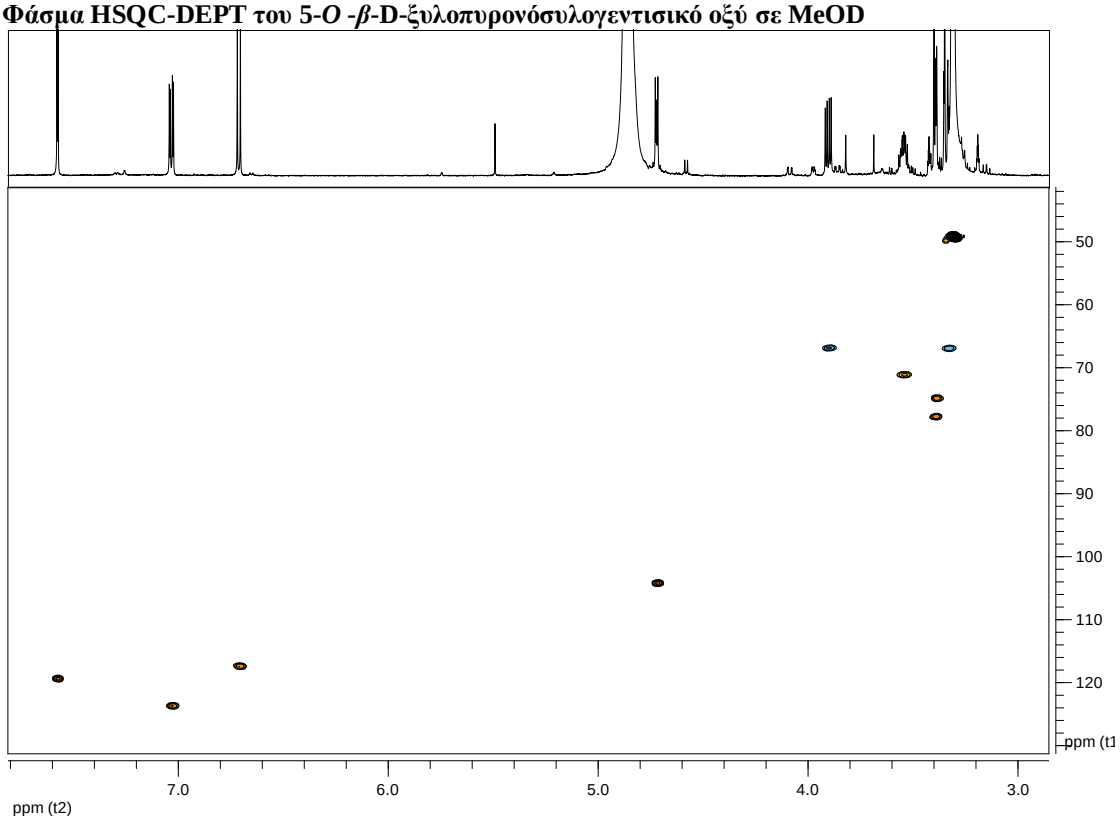
Φάσμα HMBC της 2-O-(2'-O-ισοβαλερυλ)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλ ατρακτυλιγενίνη σε MeOD



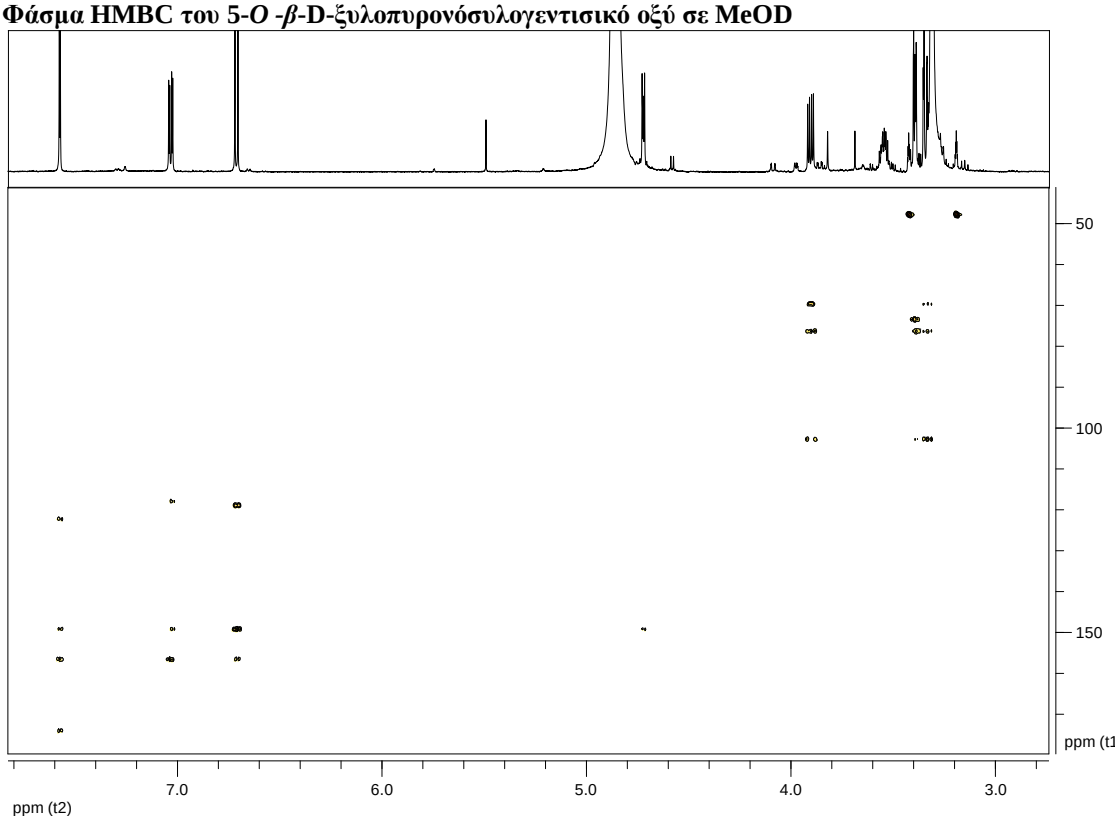
Φάσμα ^{1}H NMR του 5-*O* -*β*-D-ξυλοπυρονόσυλογεντισικό οξύ σε MeOD



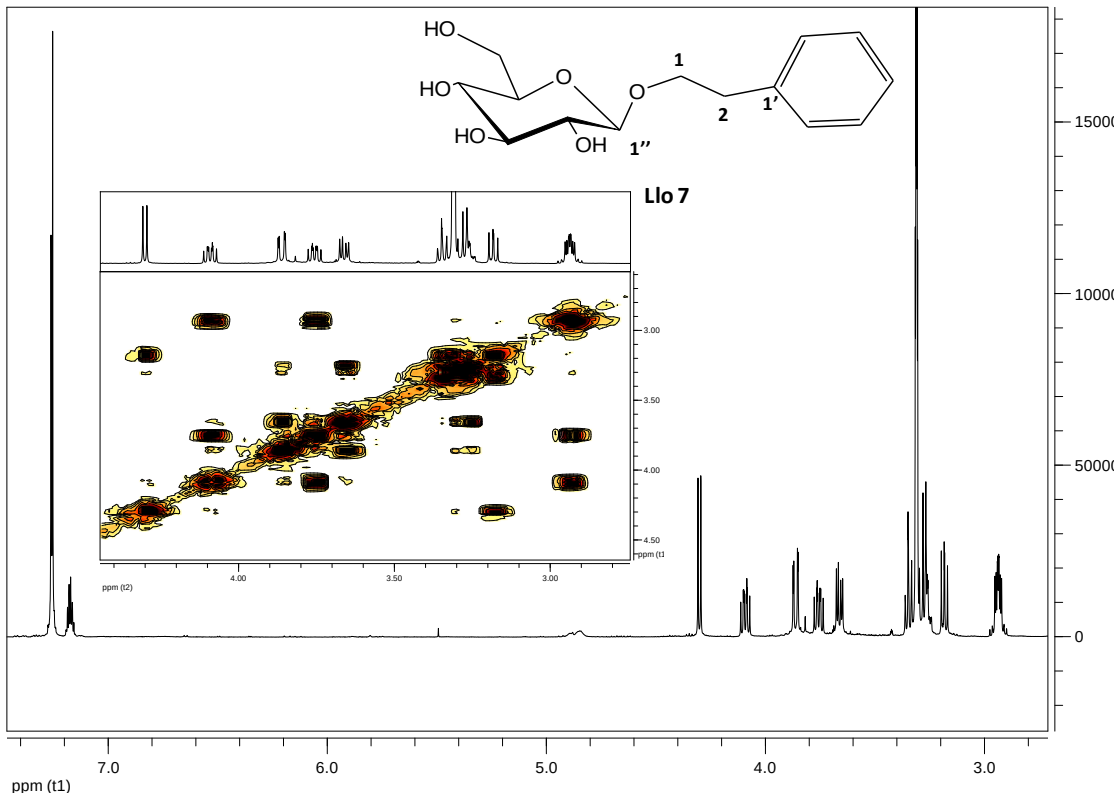
Φάσμα HSQC-DEPT του 5-*O* -*β*-D-ξυλοπυρονόσυλογεντισικό οξύ σε MeOD



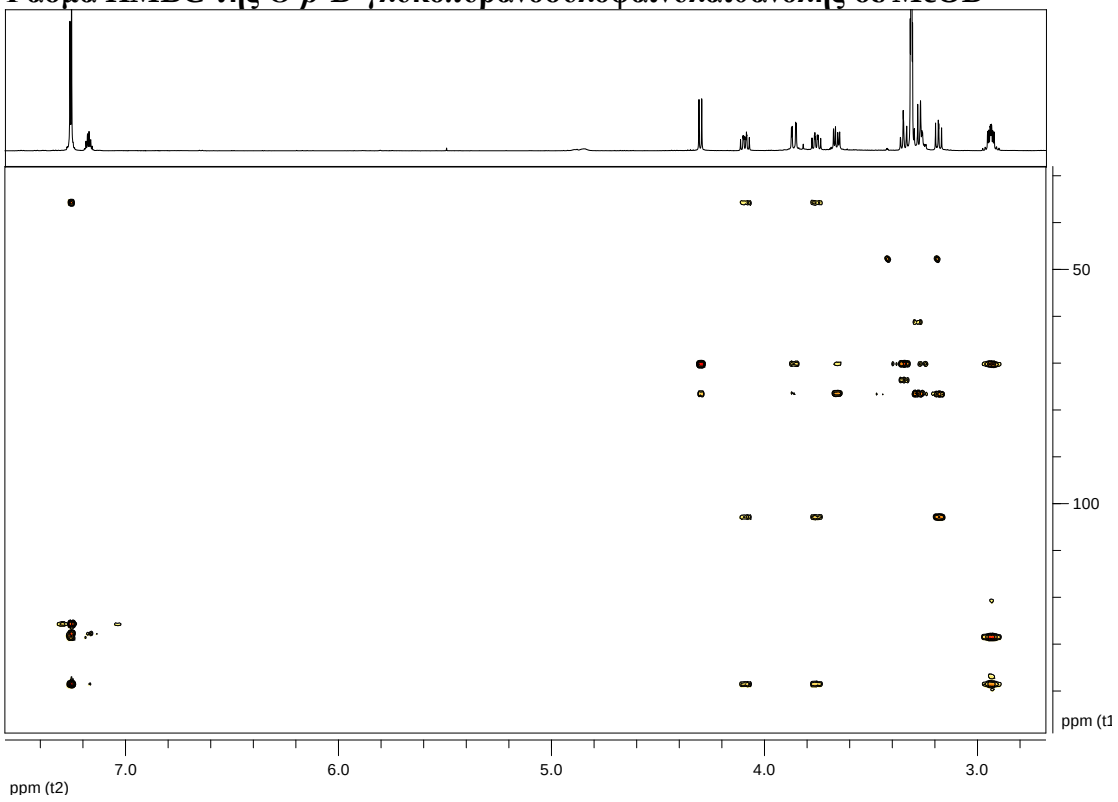
Φάσμα HMBC του 5-*O* -*β*-D-ξυλοπυρονόσυλογεντισικό οξύ σε MeOD



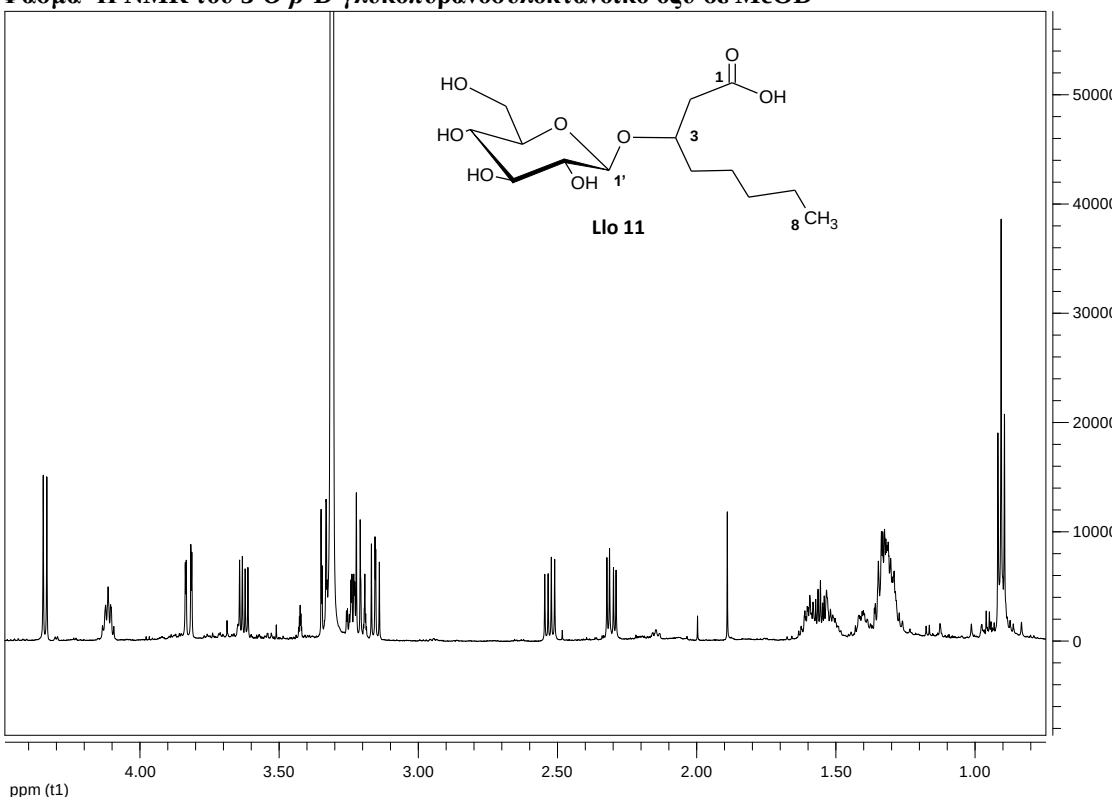
Φάσμα ^{1}H NMR και COSY της O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοφαινυλαιθανόλης σε MeOD



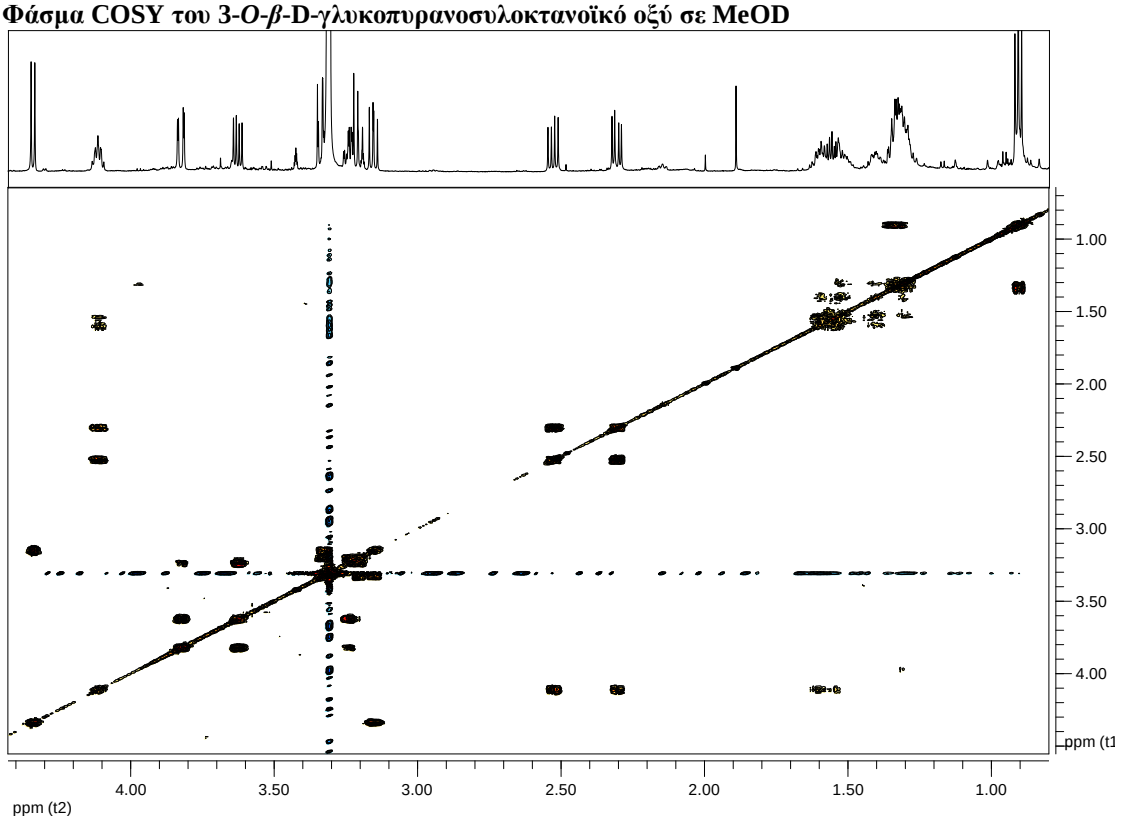
Φάσμα HMBC της O-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοφαινυλαιθανόλης σε MeOD



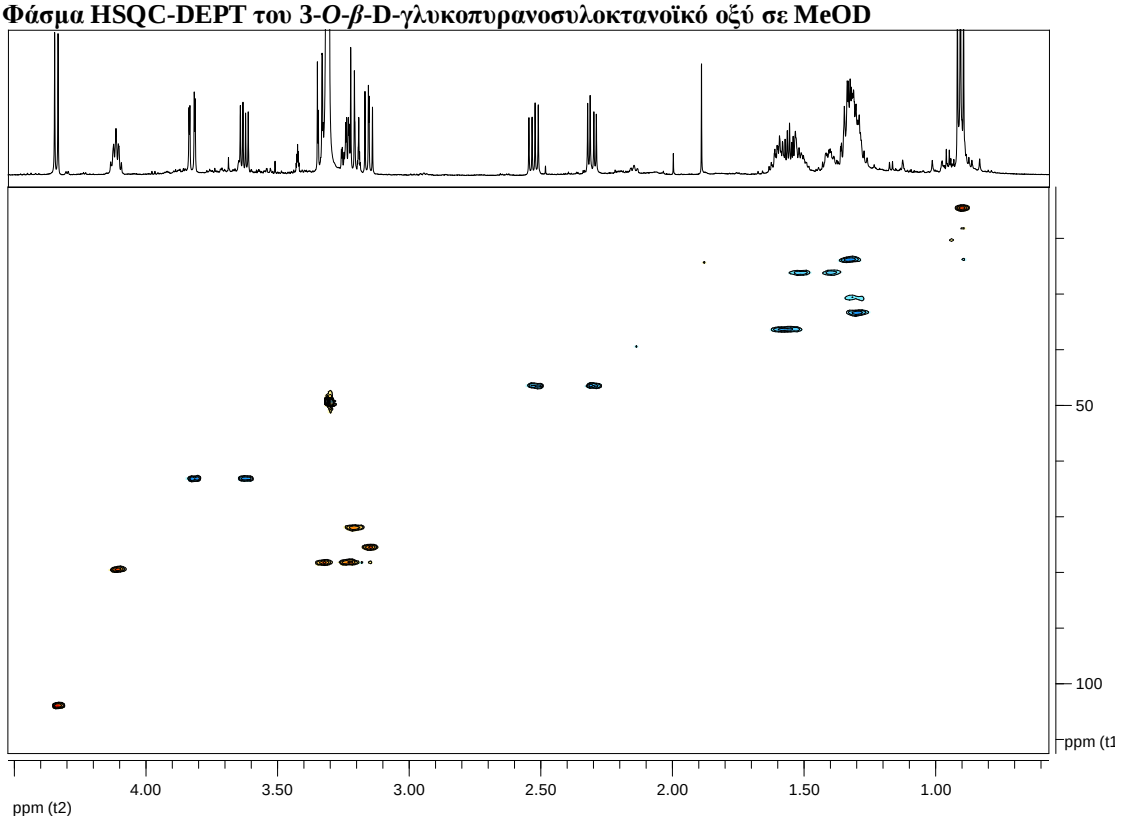
Φάσμα ^{1}H NMR του 3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκτανοϊκό οξύ σε MeOD



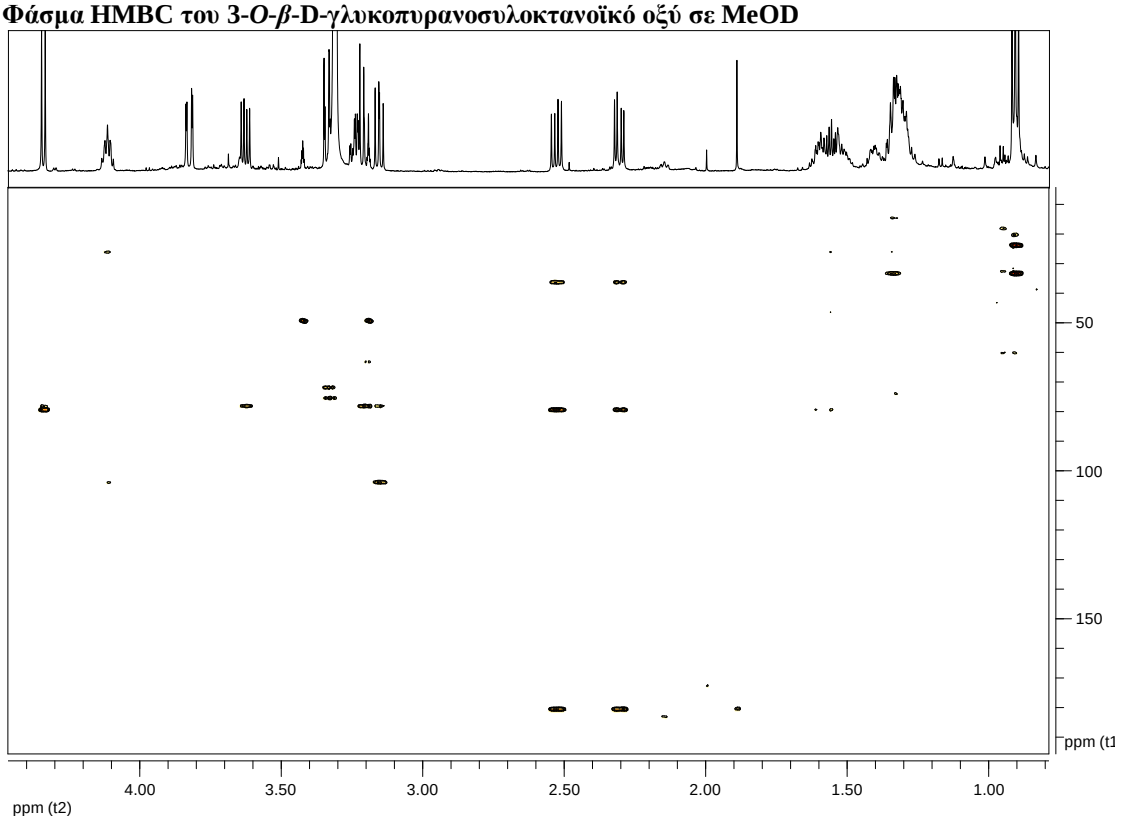
Φάσμα COSY του 3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκτανοϊκό οξύ σε MeOD



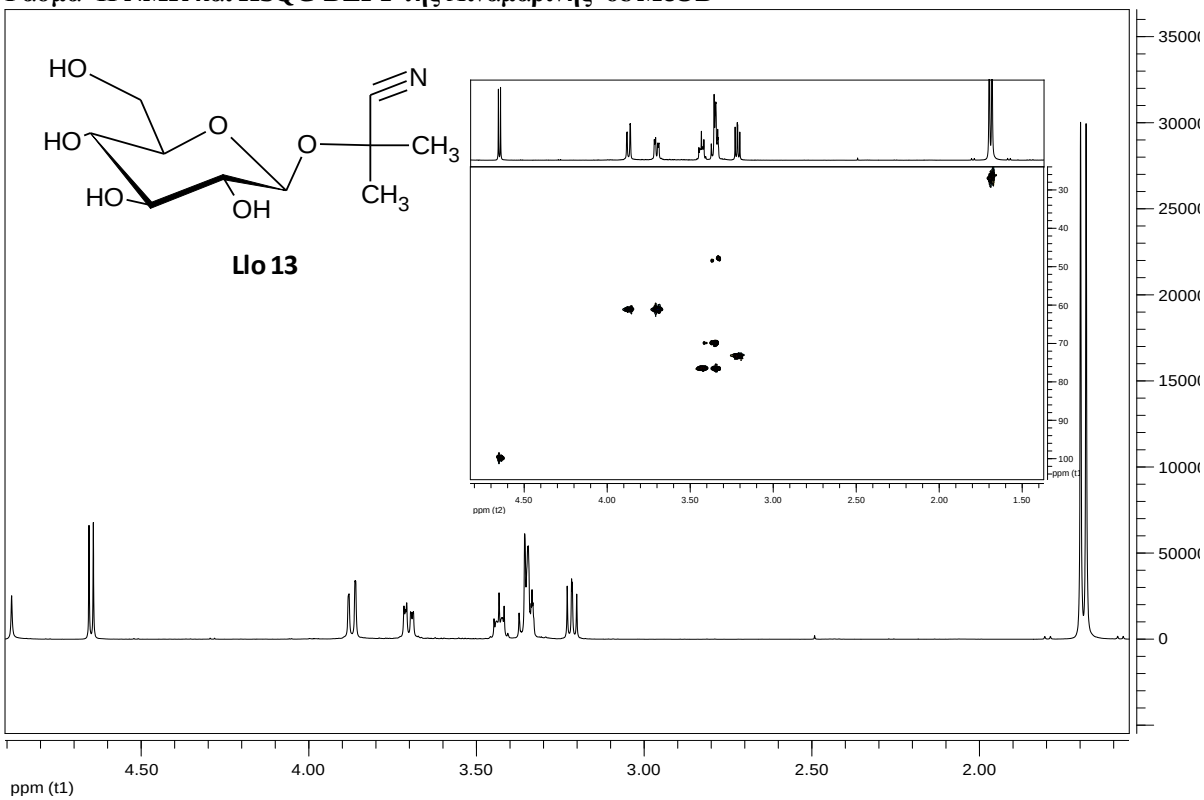
Φάσμα HSQC-DEPT του 3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκτανοϊκό οξύ σε MeOD



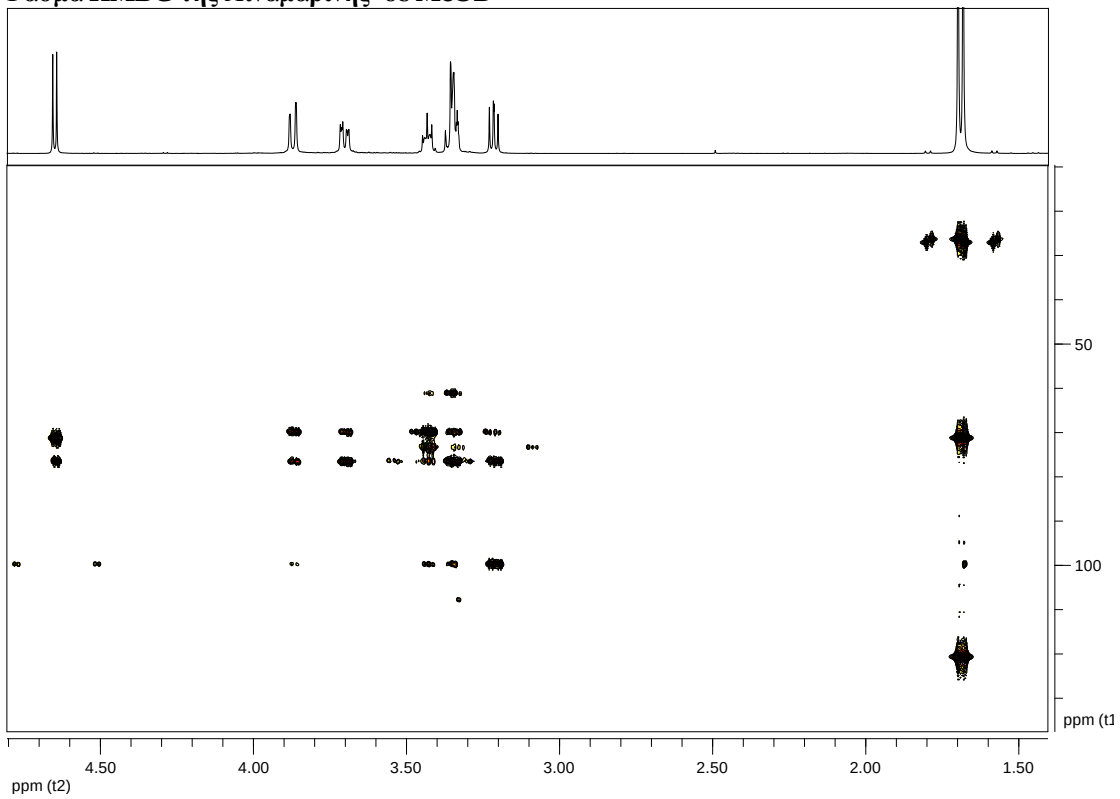
Φάσμα HMBC του 3-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοκτανοϊκό οξύ σε MeOD



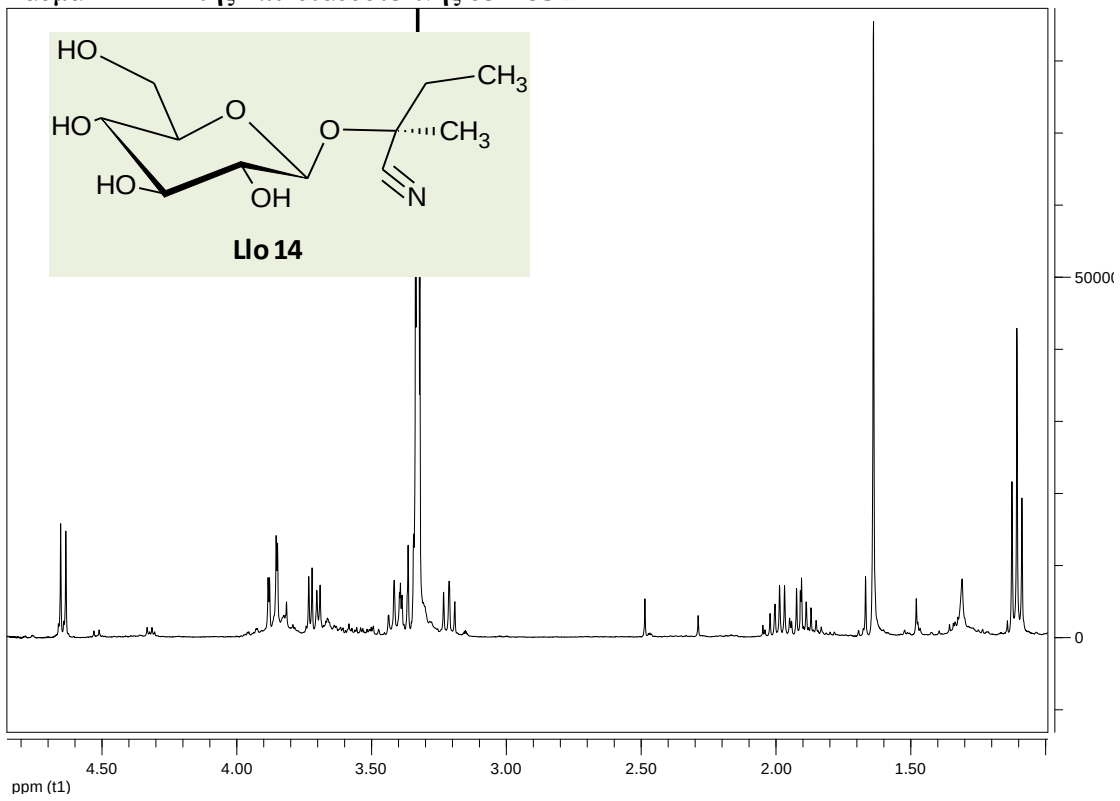
Φάσμα ^{1}H NMR και HSQC-DEPT της Λιναμαρίνης σε MeOD



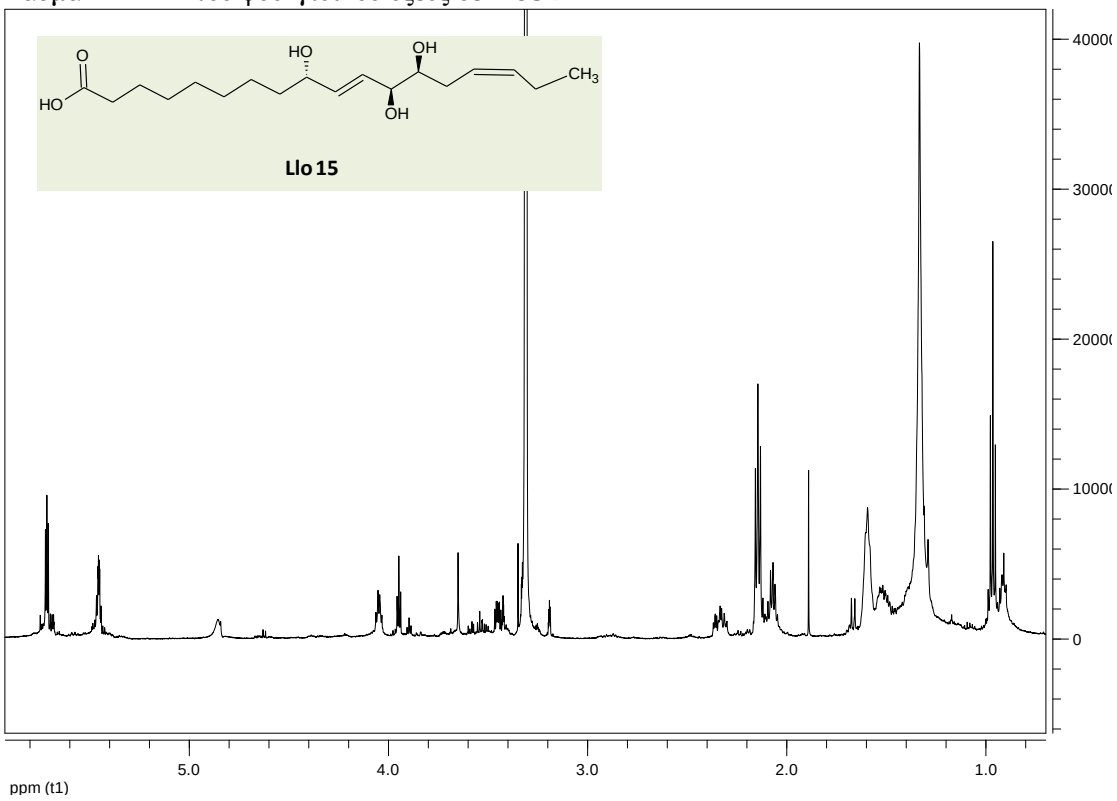
Φάσμα HMBC της Λιναμαρίνης σε MeOD



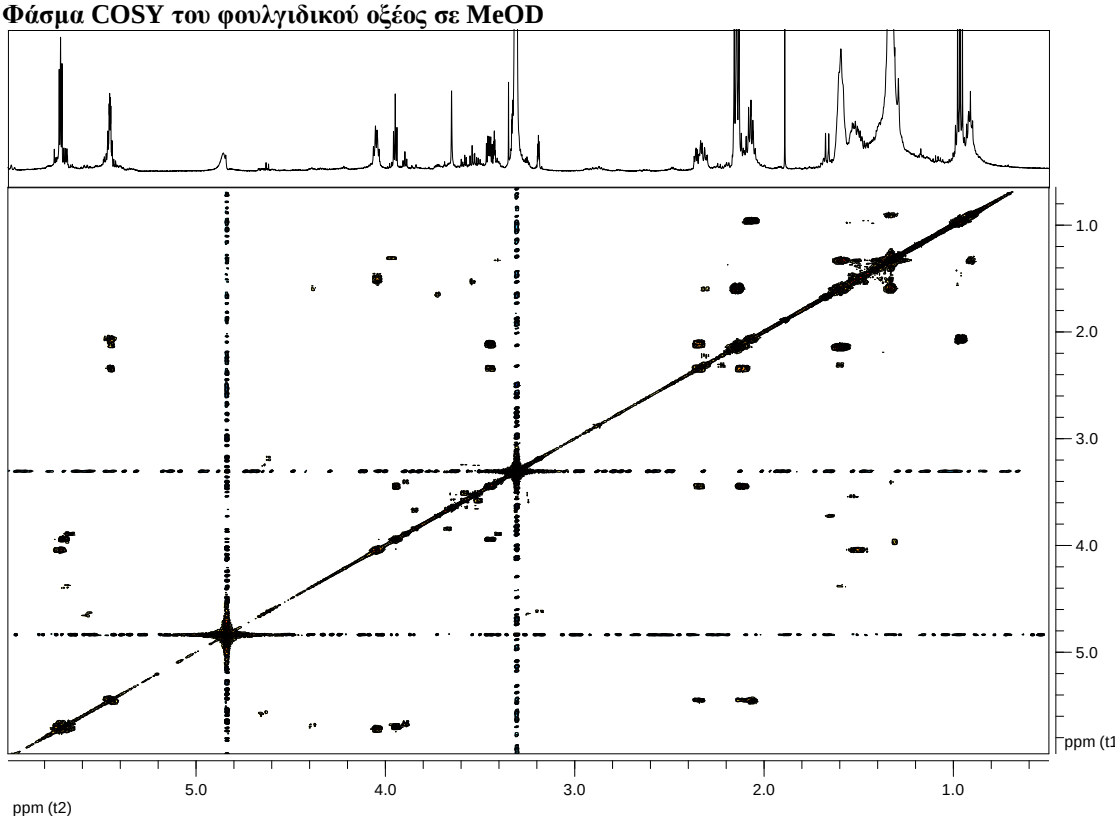
Φάσμα ^{1}H NMR της Επιλοταουστελίνης σε MeOD



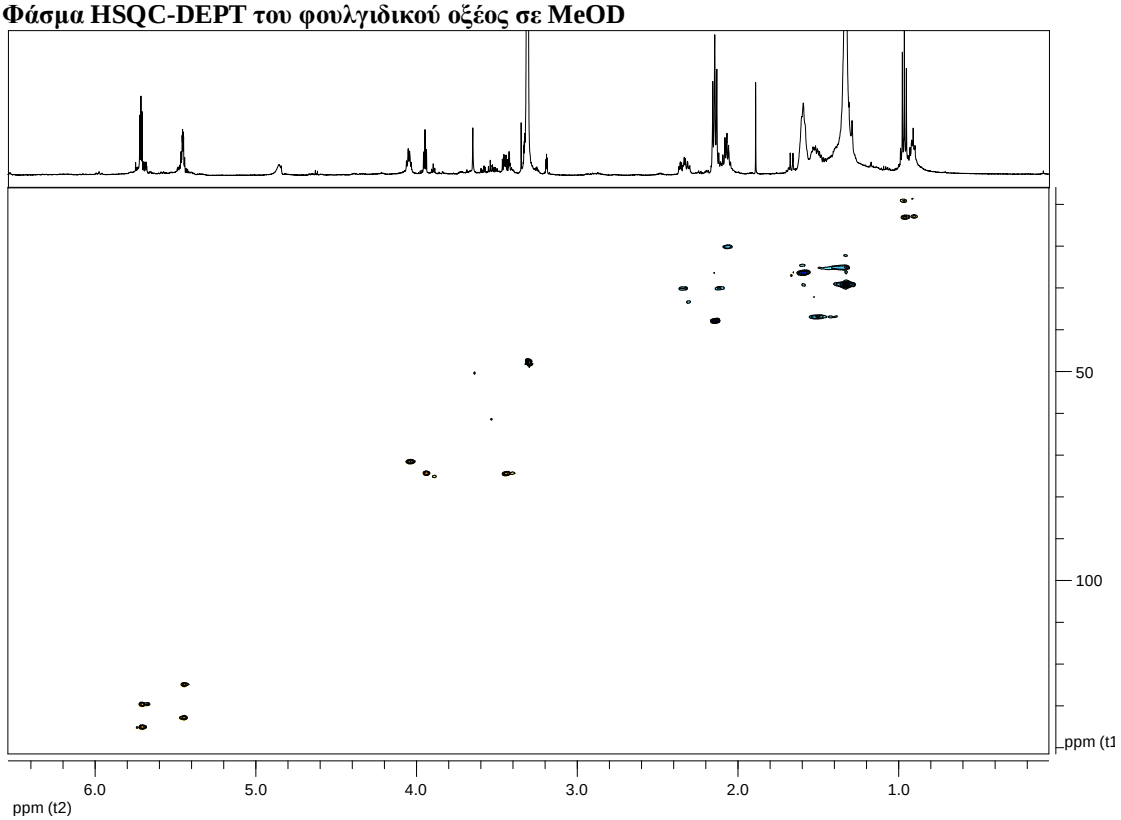
Φάσμα ^{1}H NMR του φουλγιδικού οξέος σε MeOD



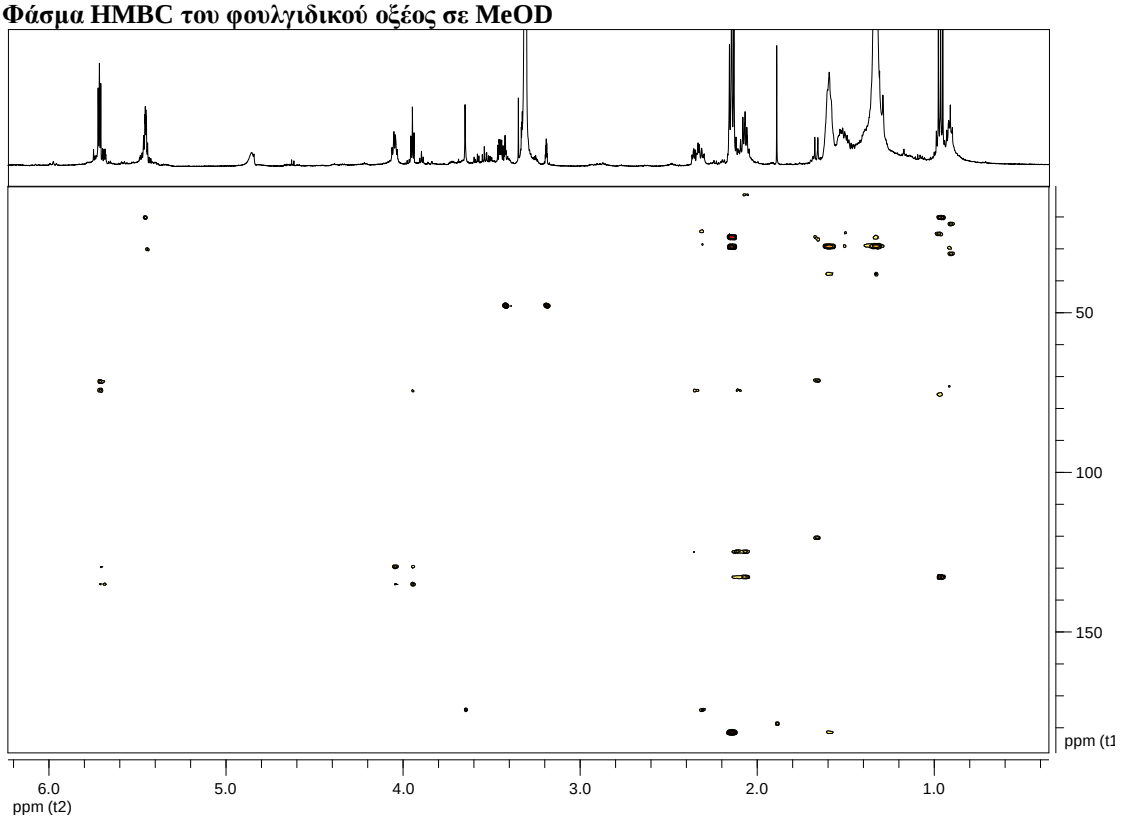
Φάσμα COSY του φουλγιδικού οξέος σε MeOD



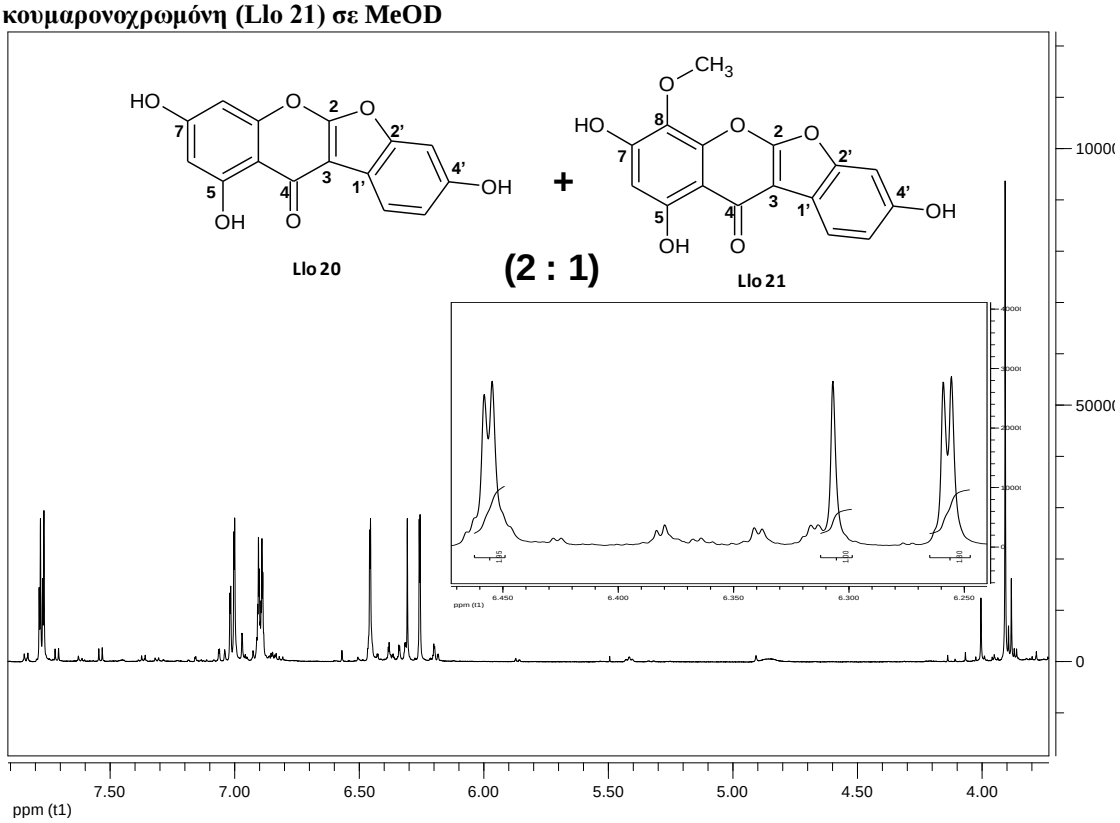
Φάσμα HSQC-DEPT του φουλγιδικού οξέος σε MeOD



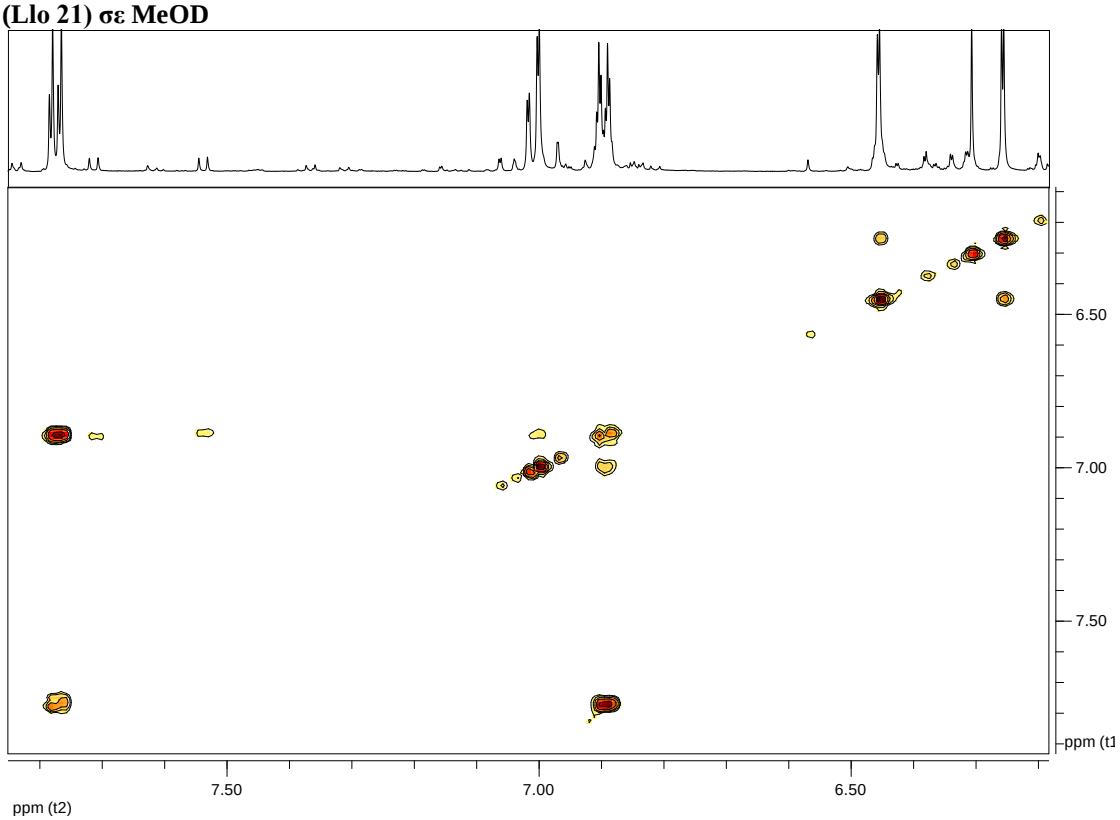
Φάσμα HMBC του φουλγιδικού οξέος σε MeOD



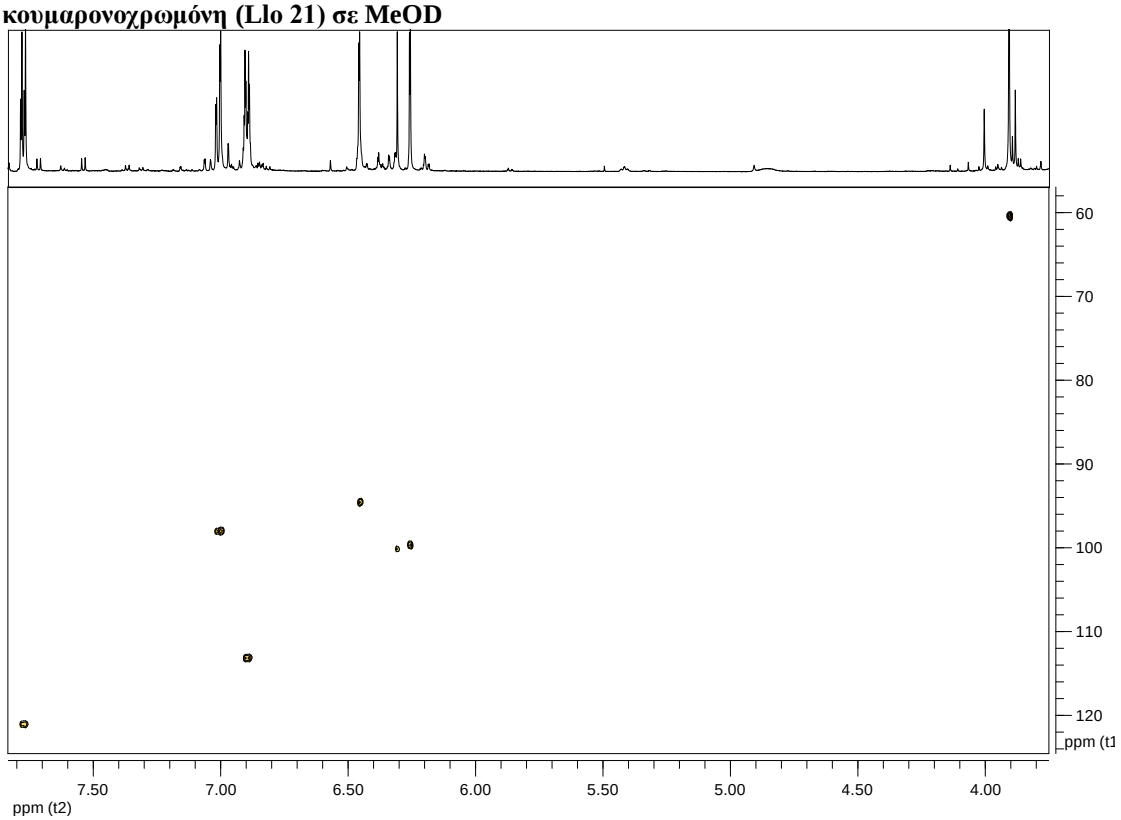
Φάσμα ^{1}H NMR των Λουπιναλμπίνη Α (Llo 20) και 8-μεθόξυ-5,7,4΄-τριυδρόξυ-κουμαρονοχρωμόνη (Llo 21) σε MeOD



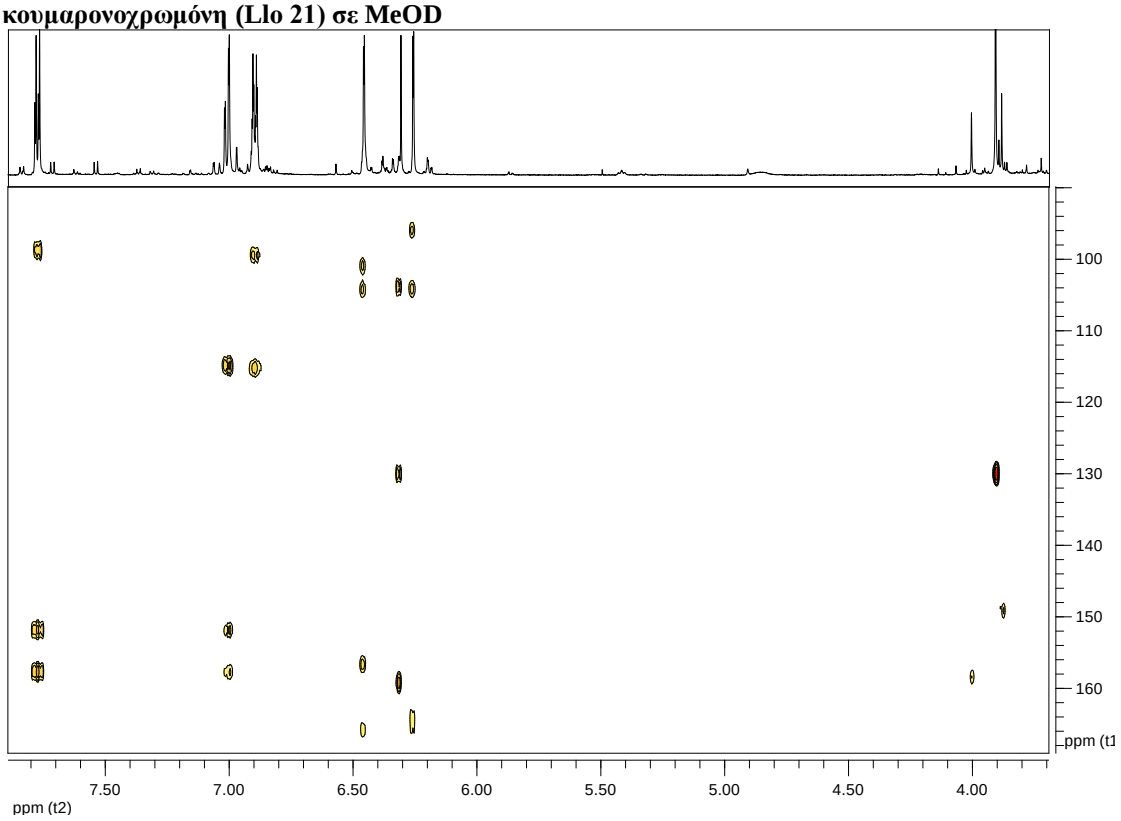
Φάσμα COSY των Λουπιναλμπίνη Α (Llo 20) και 8-μεθόξυ-5,7,4΄-τριυδρόξυ-κουμαρονοχρωμόνη (Llo 21) σε MeOD



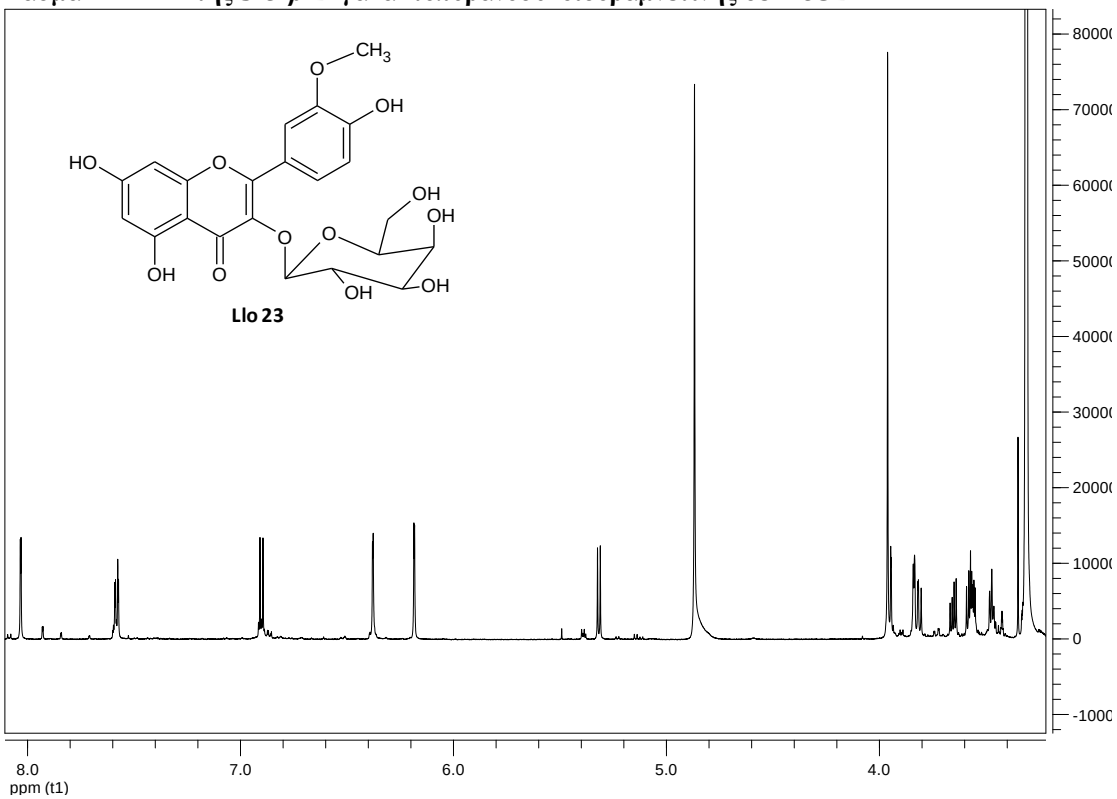
Φάσμα HSQC-DEPT των Λουπιναλμπίνη Α (Llo 20) και 8-μεθόξυ-5,7,4΄-τριυδρόξυ-κουμαρονοχρωμόνη (Llo 21) σε MeOD



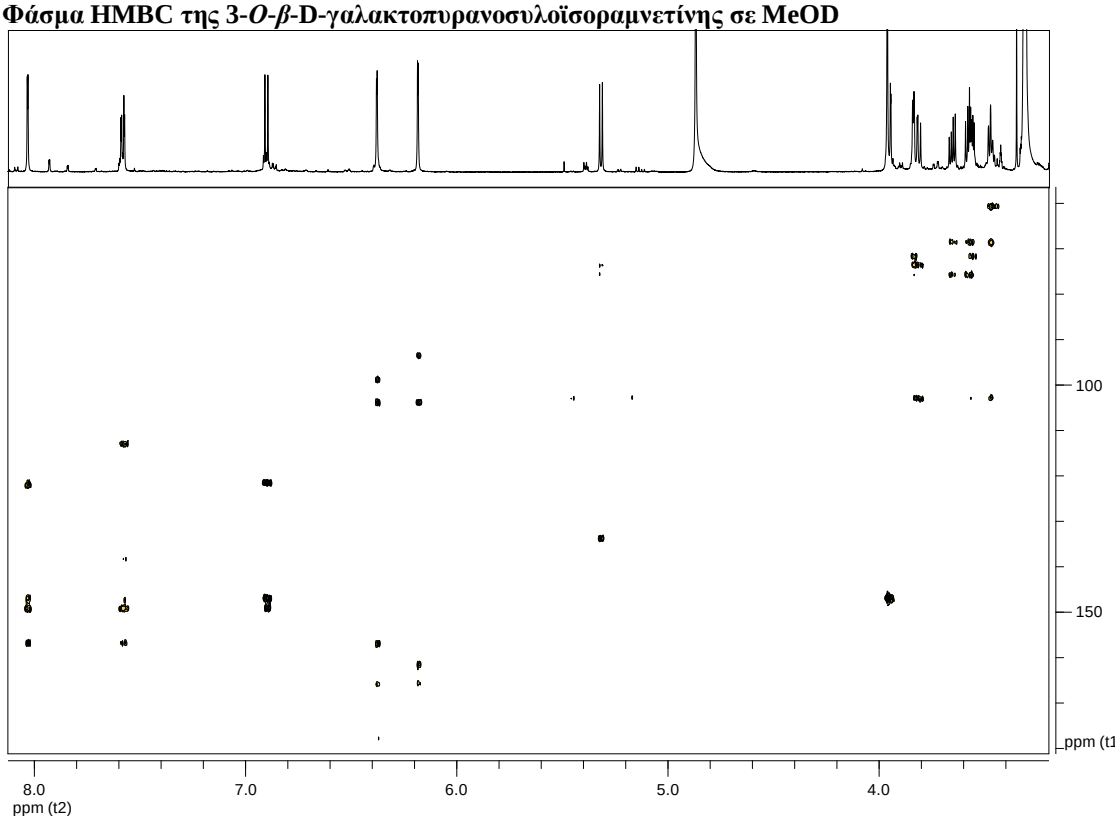
Φάσμα HMBC των Λουπιναλμπίνη Α (Llo 20) και 8-μεθόξυ-5,7,4΄-τριυδρόξυ-κουμαρονοχρωμόνη (Llo 21) σε MeOD



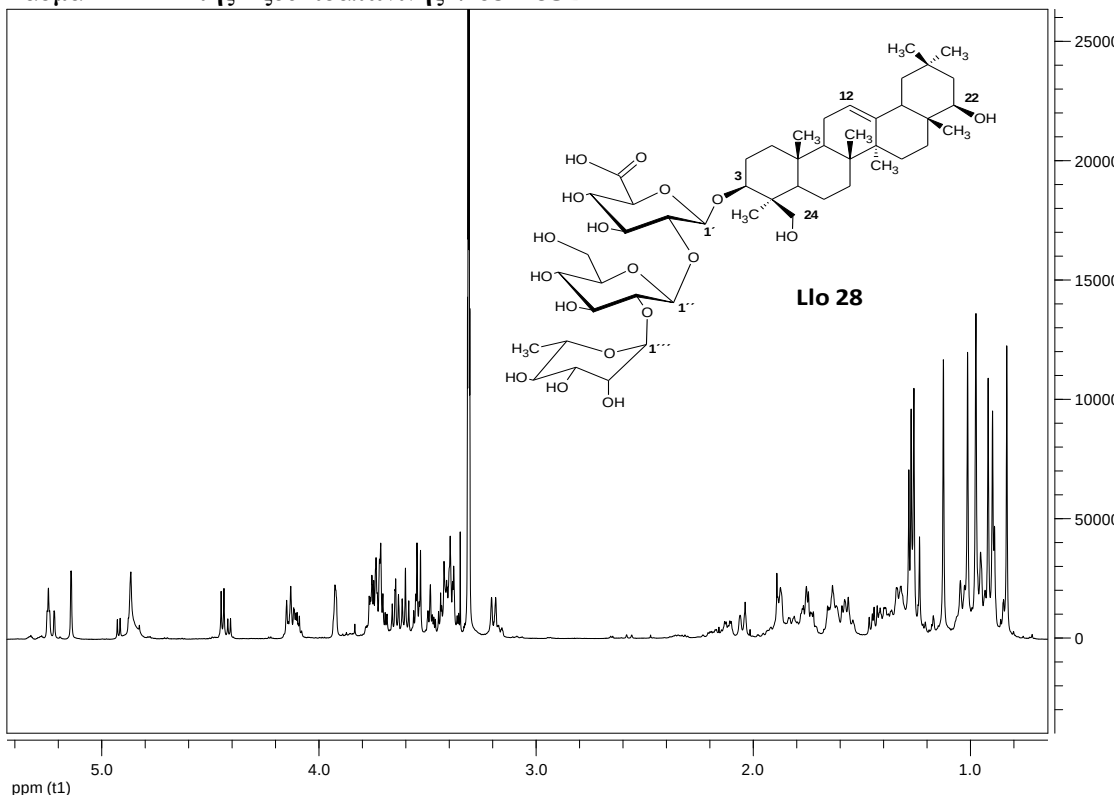
Φάσμα ^{1}H NMR της 3-*O*-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλοϊσοραμνετίνης σε MeOD



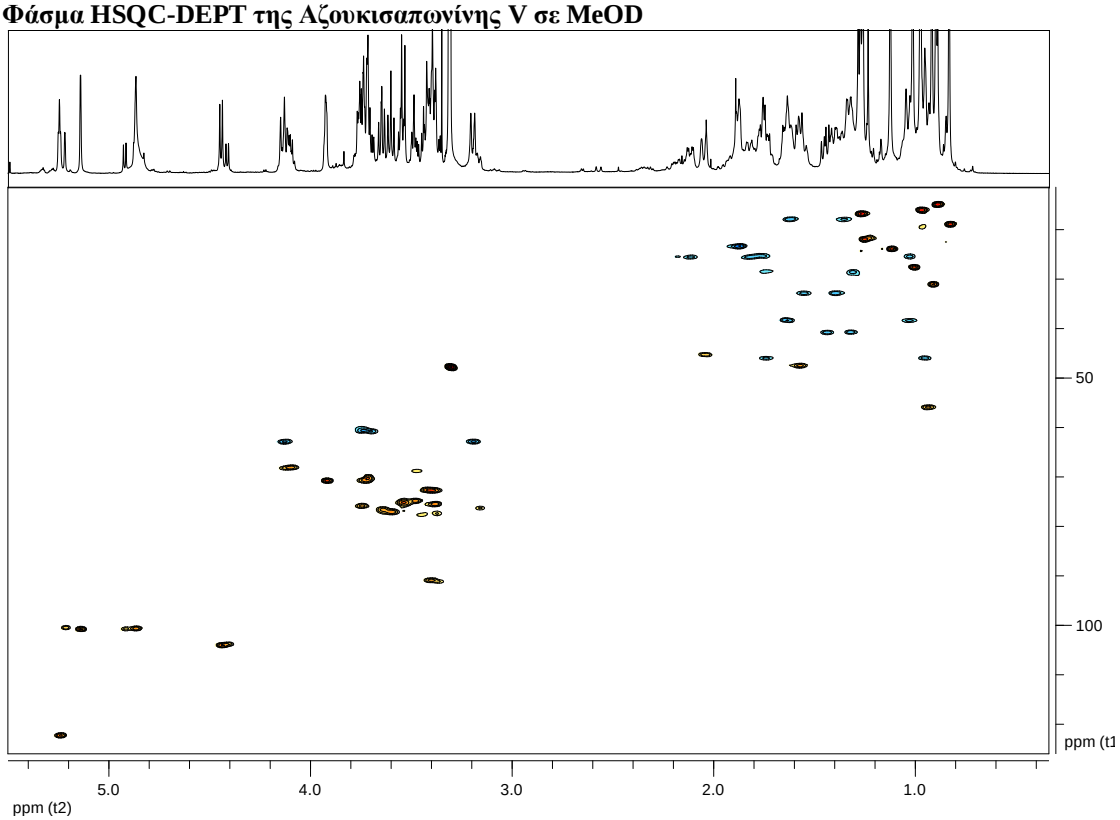
Φάσμα HMBC της 3-*O*-*β*-D-γαλακτοπυρανοσυλοϊσοραμνετίνης σε MeOD



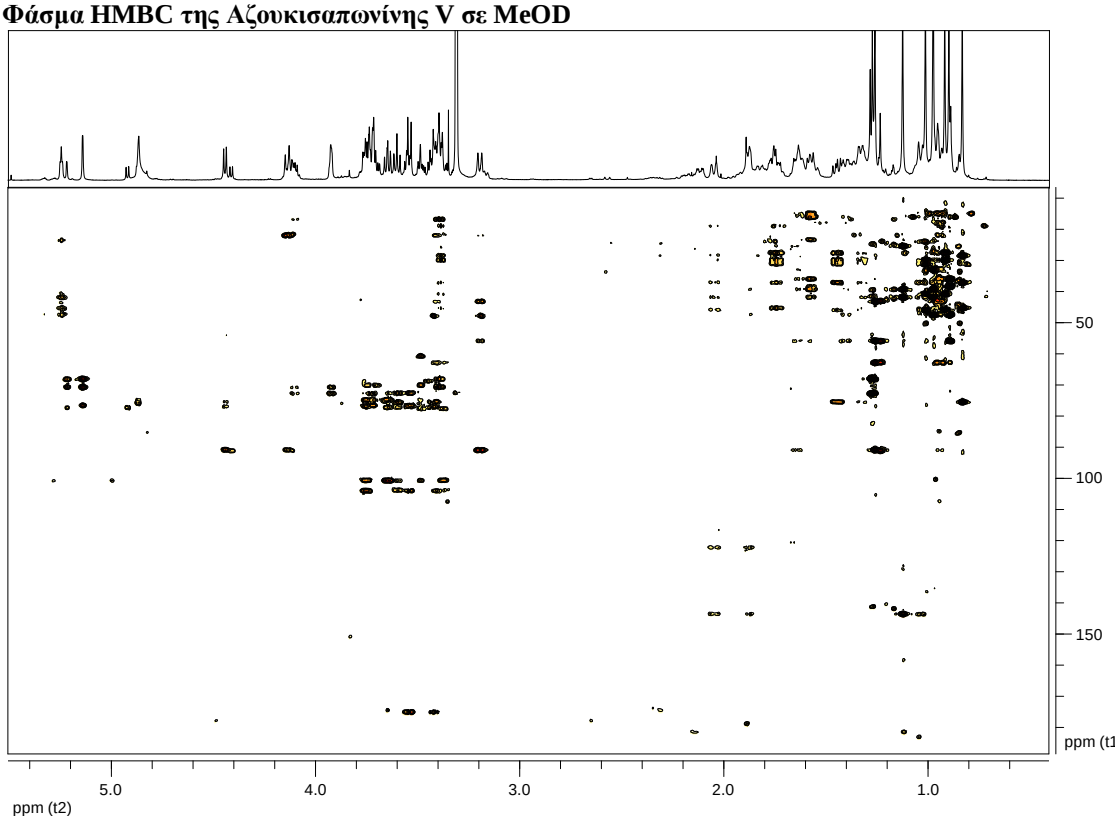
Φάσμα ^{1}H NMR της Αζουκισαπωνίνης V σε MeOD



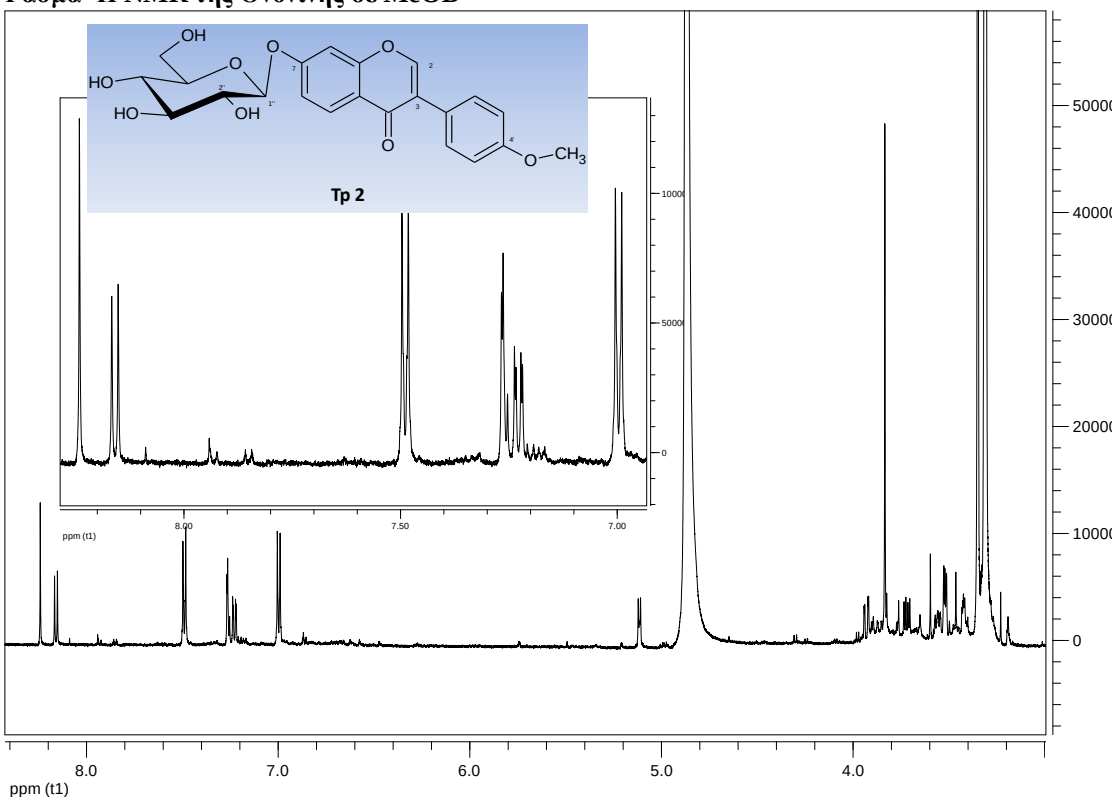
Φάσμα HSQC-DEPT της Αζουκισαπωνίνης V σε MeOD



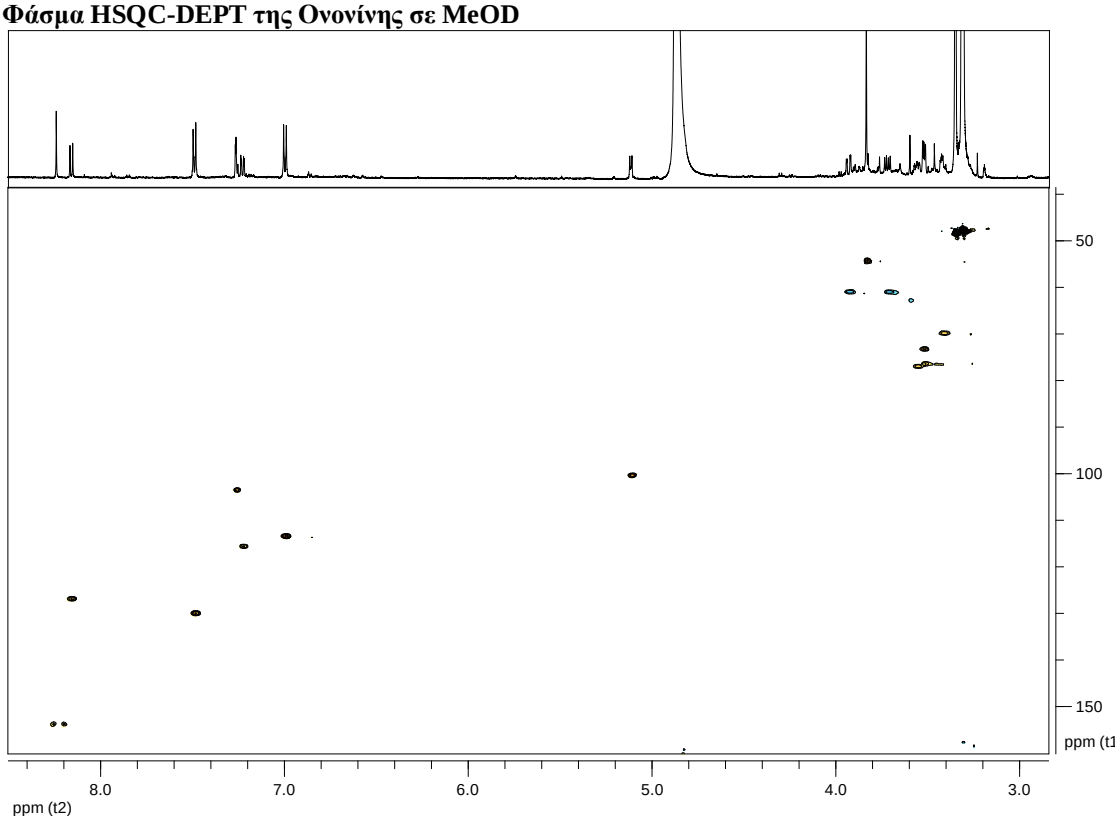
Φάσμα HMBC της Αζουκισαπωνίνης V σε MeOD



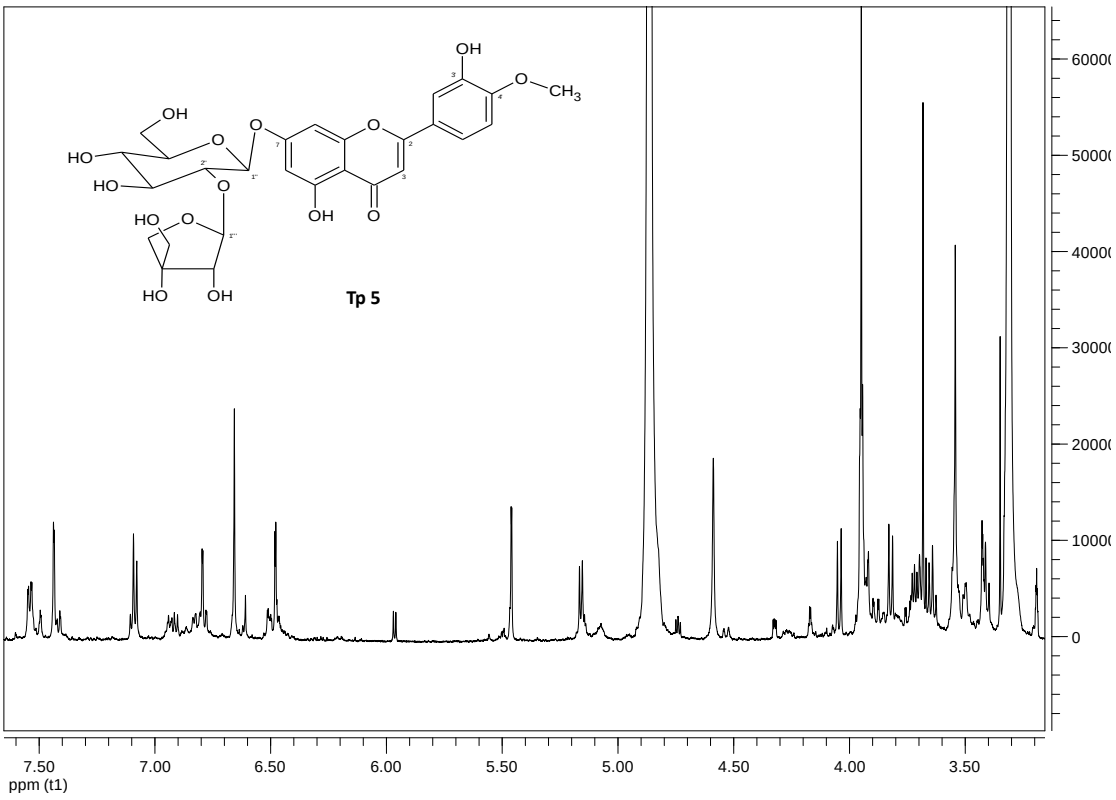
Φάσμα ^{1}H NMR της Ονονίνης σε MeOD



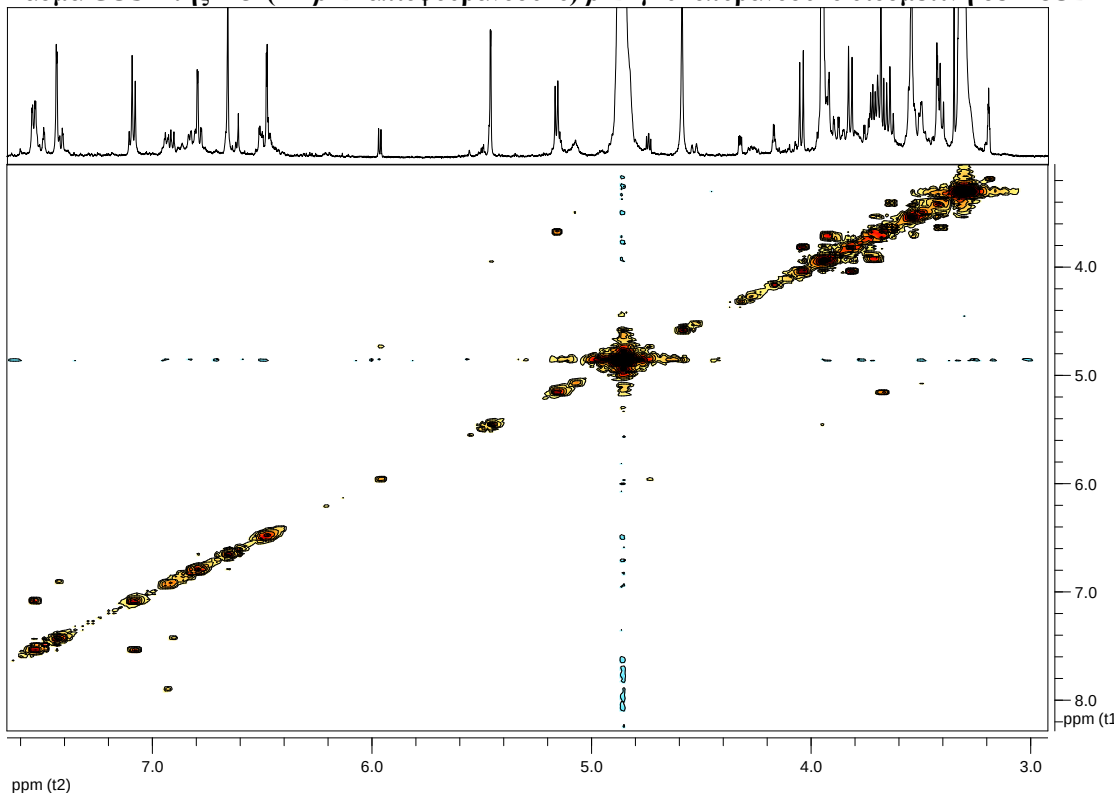
Φάσμα HSQC-DEPT της Ονονίνης σε MeOD



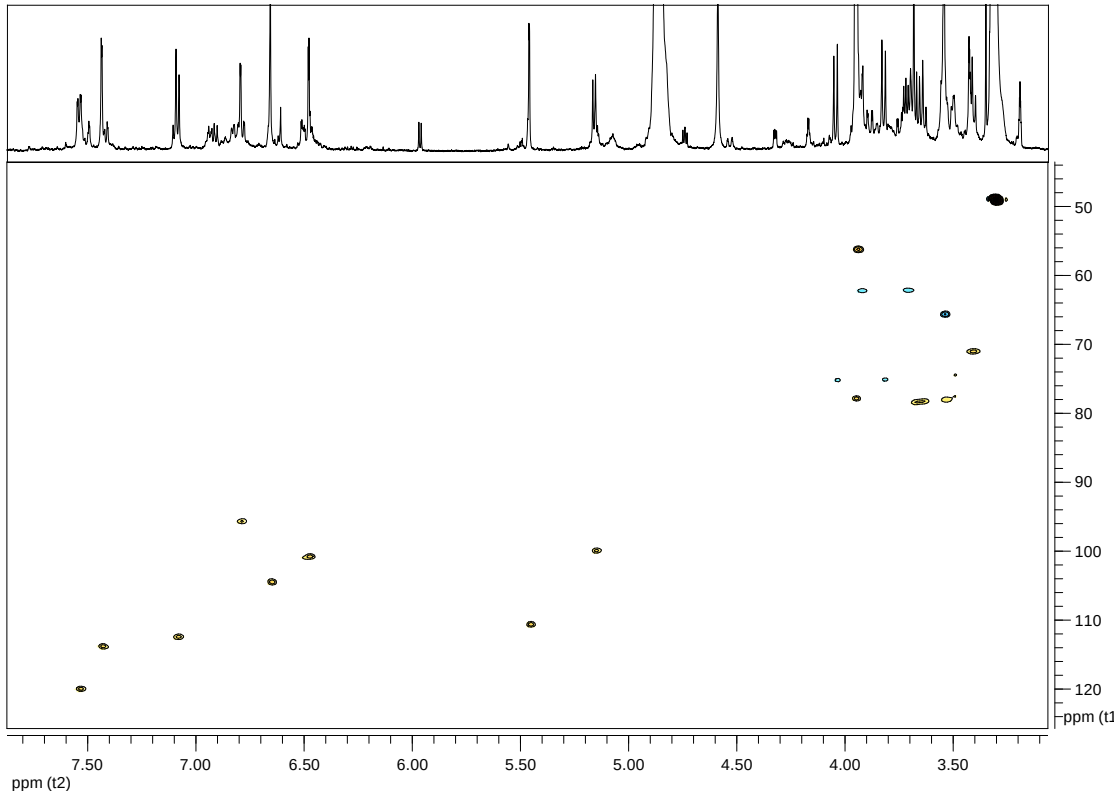
Φάσμα ^{1}H NMR της 7-*O*-(2΄΄-*β*-D-απιοφουρανοσυλο)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη σε MeOD



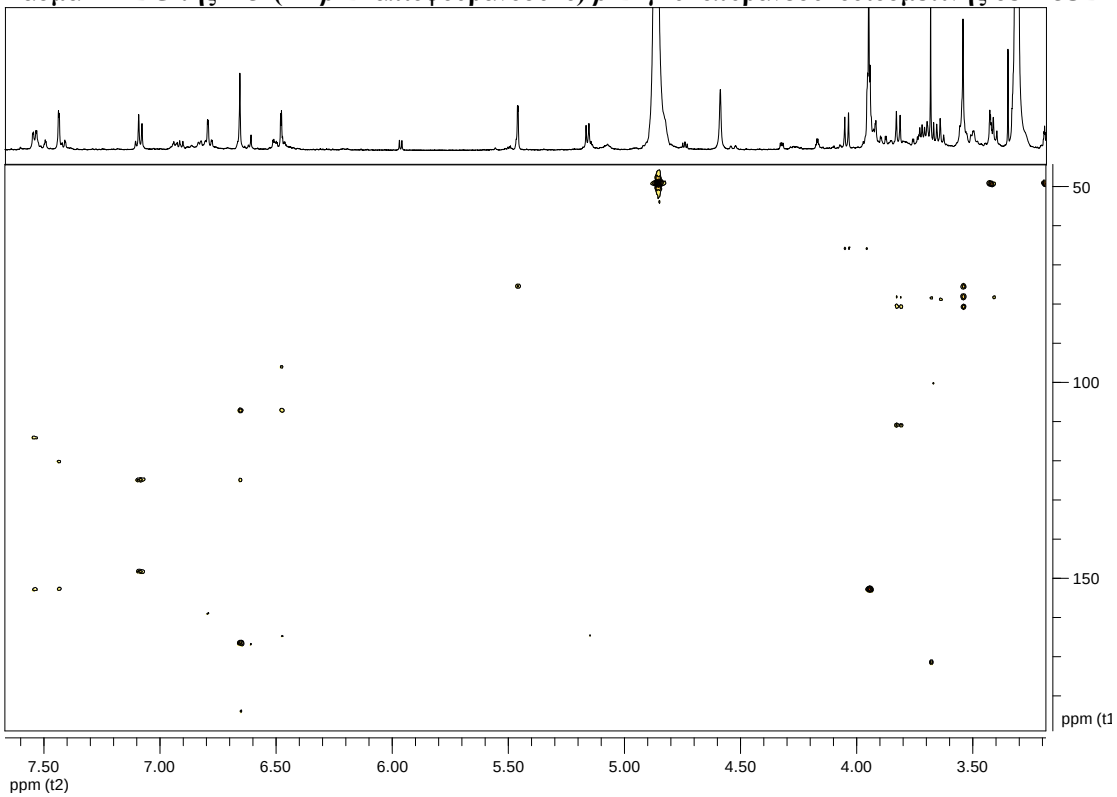
Φάσμα COSY της 7-*O*-(2΄΄-*β*-D-απιοφουρανοσυλο)-*β*-D-γλυκοπυρανόσυλο διοσμετίνη σε MeOD



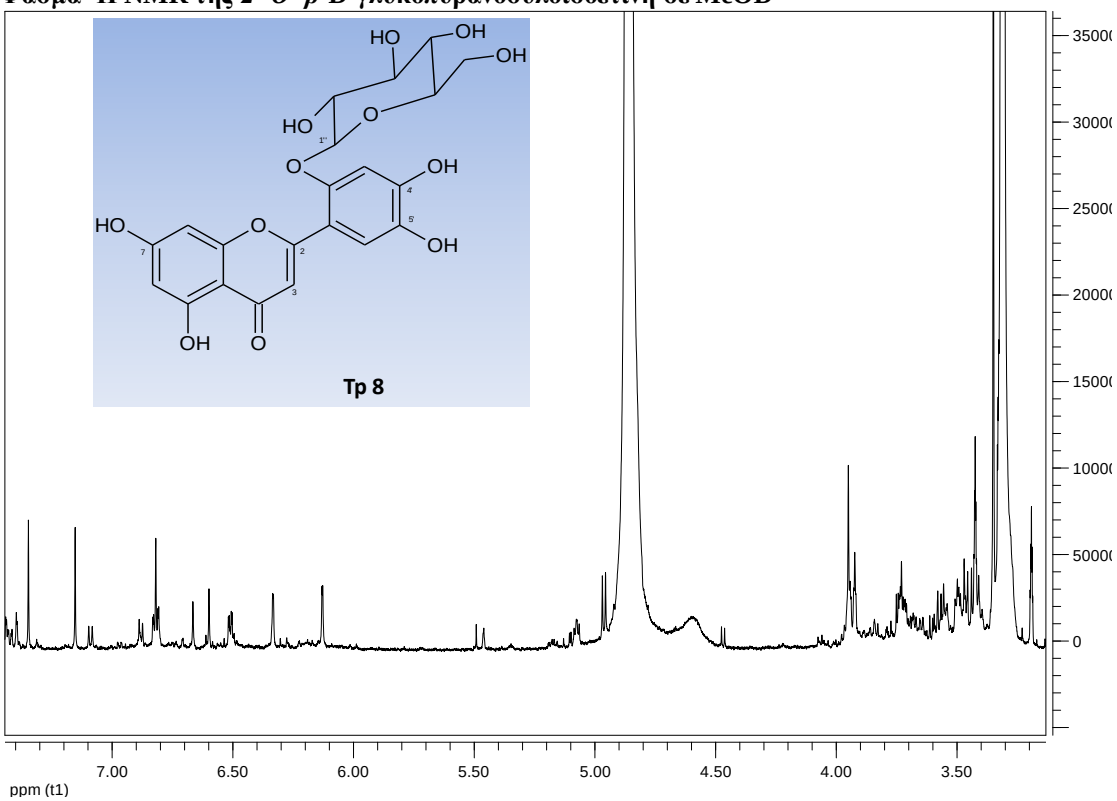
Φάσμα HSQC-DEPT της 7-*O*-(2΄΄-*β*-D-απιοφουρανοσυλο)-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοδιοσμετίνης σε MeOD



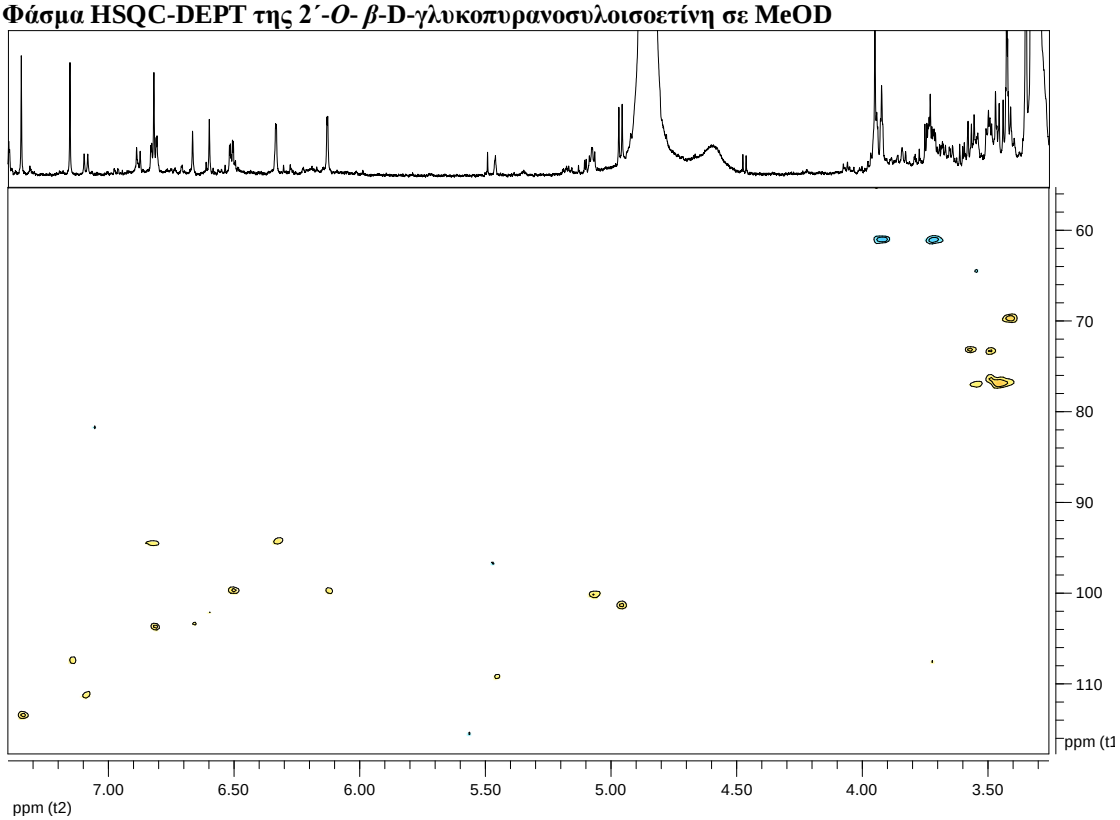
Φάσμα HMBC της 7-*O*-(2΄΄-*β*-D-απιοφουρανοσυλο)-*β*-D-γλυκοπυρανοσυλοδιοσμετίνης σε MeOD



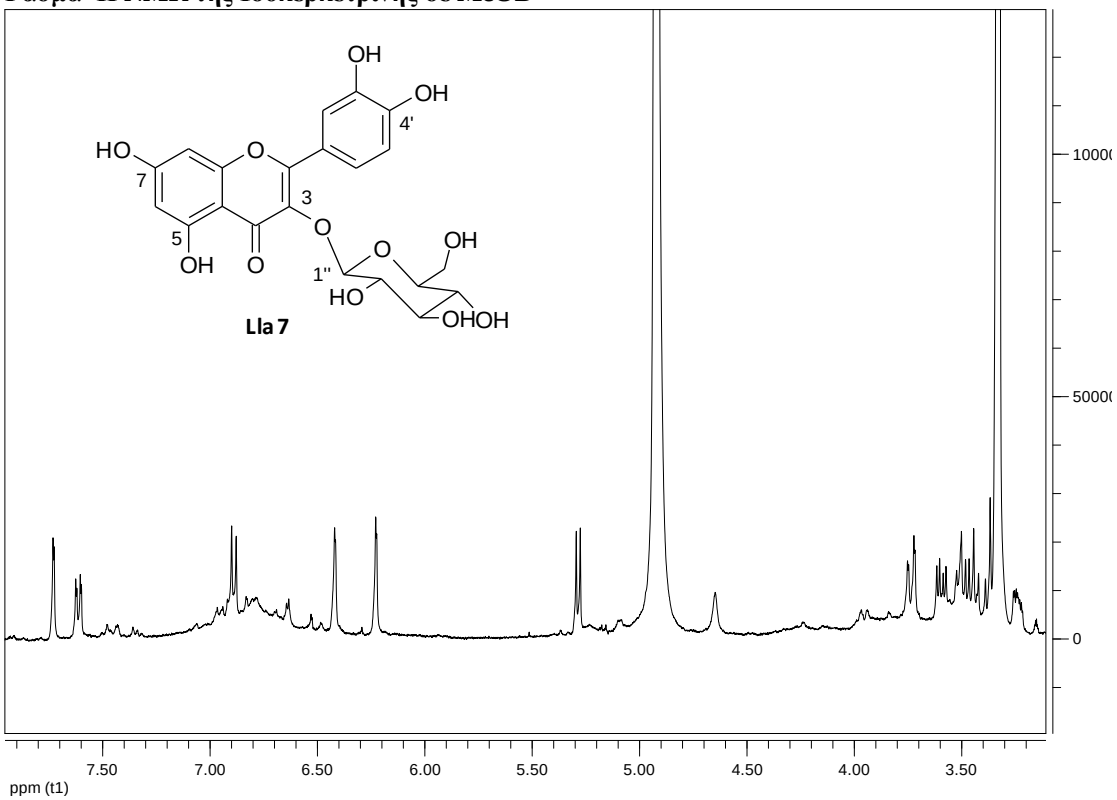
Φάσμα ^{1}H NMR της 2΄-*O*- *β*-D-γλυκοπυρανοσυλοισοετίνη σε MeOD



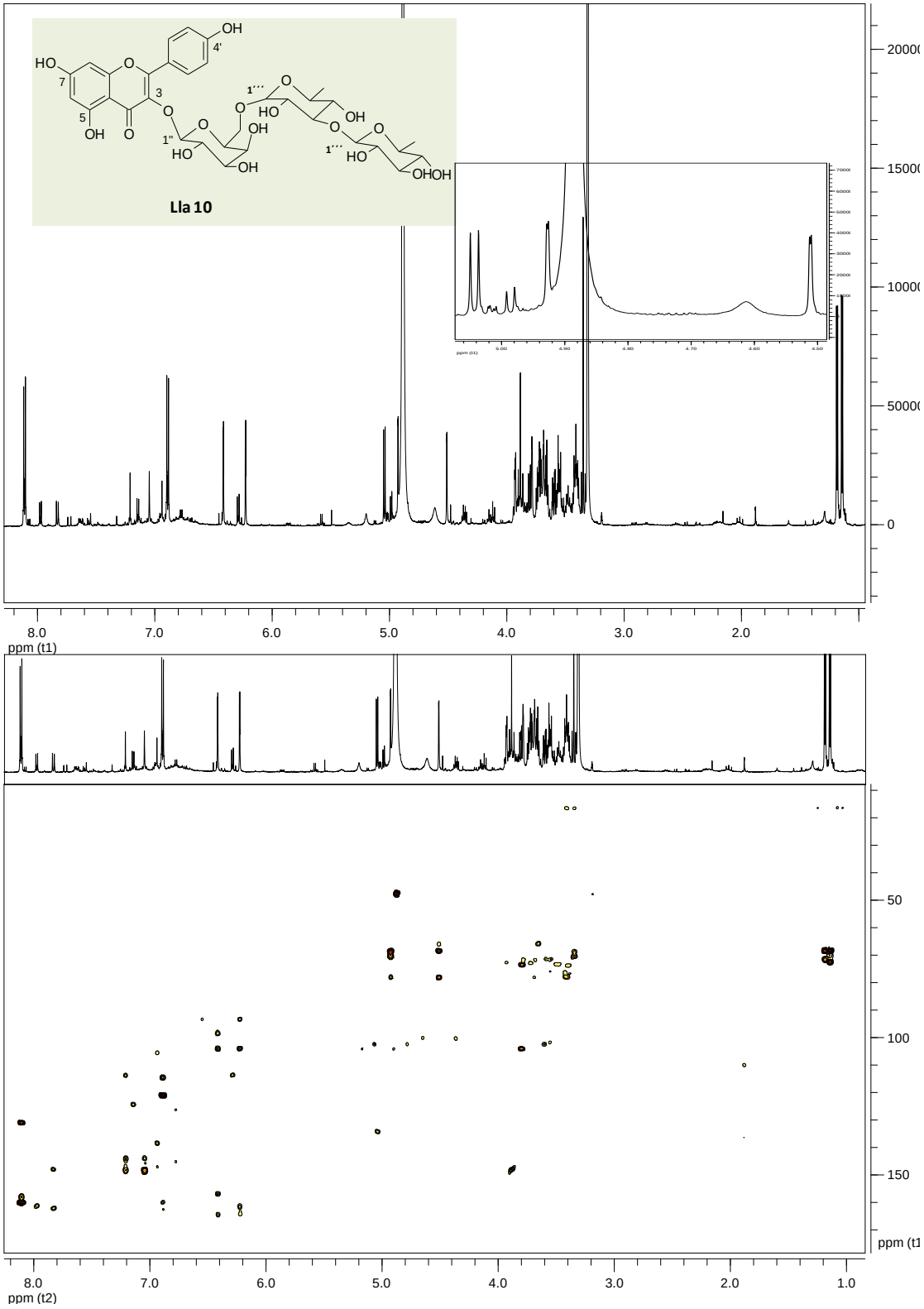
Φάσμα HSQC-DEPT της 2΄-*O*- *β*-D-γλυκοπυρανοσυλοισοετίνη σε MeOD



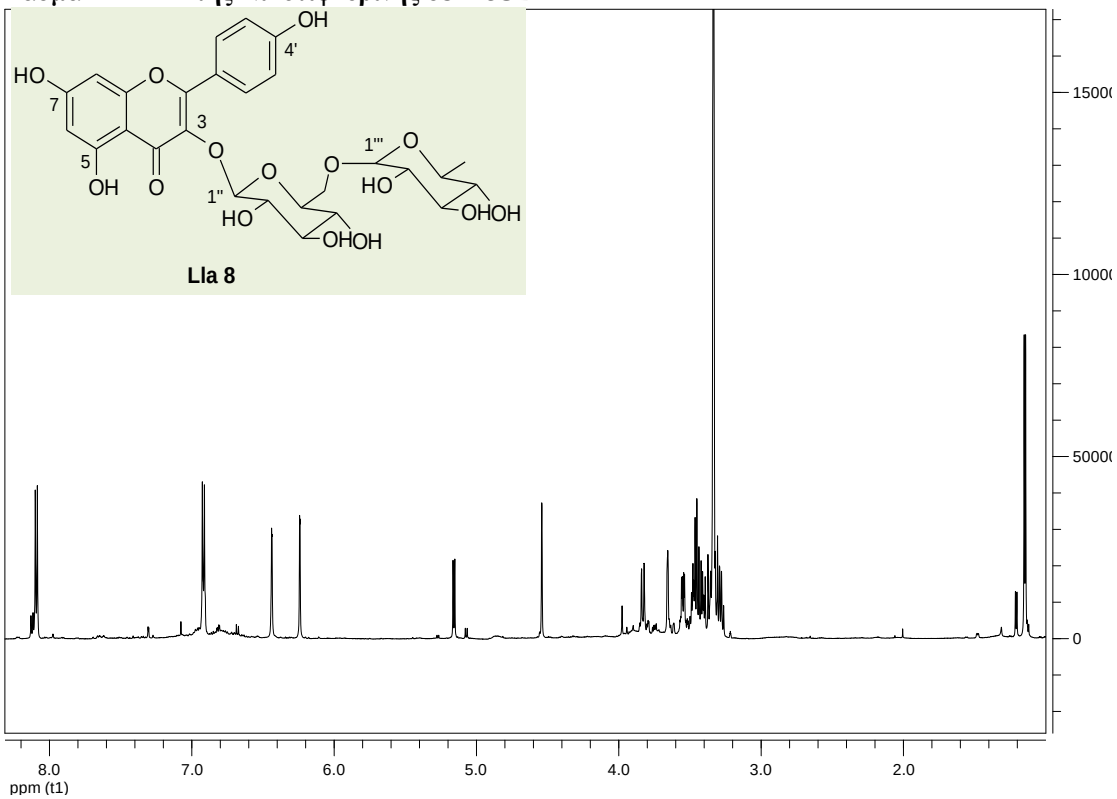
Φάσμα ^{1}H NMR της Ισοκερκετρίνης σε MeOD



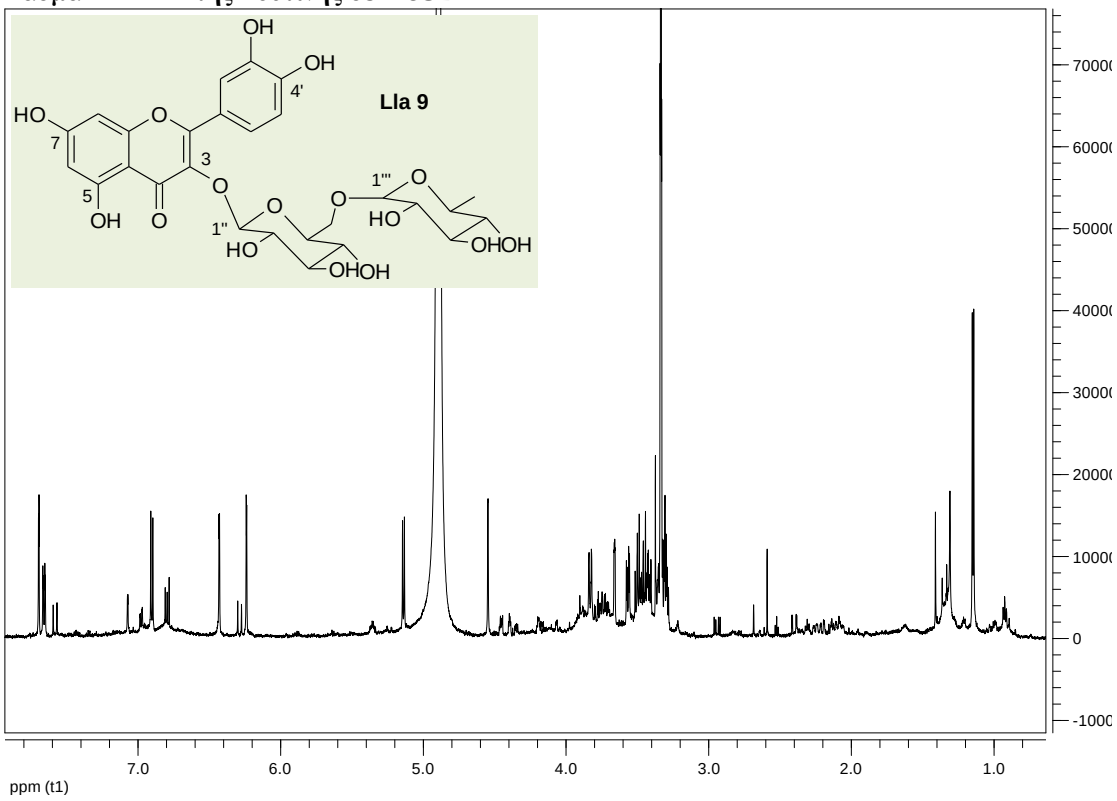
Φάσμα ^{1}H NMR της σε MeOD



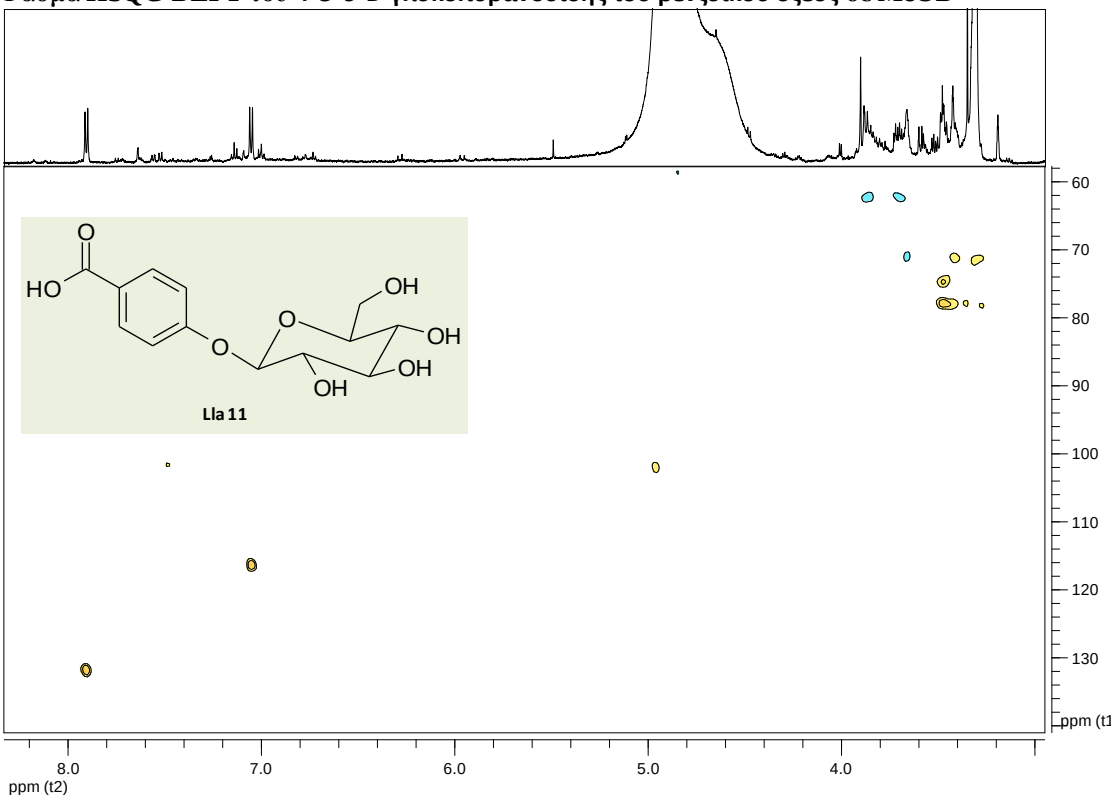
Φάσμα ^{1}H NMR της Νικοτιφλορίνης σε MeOD



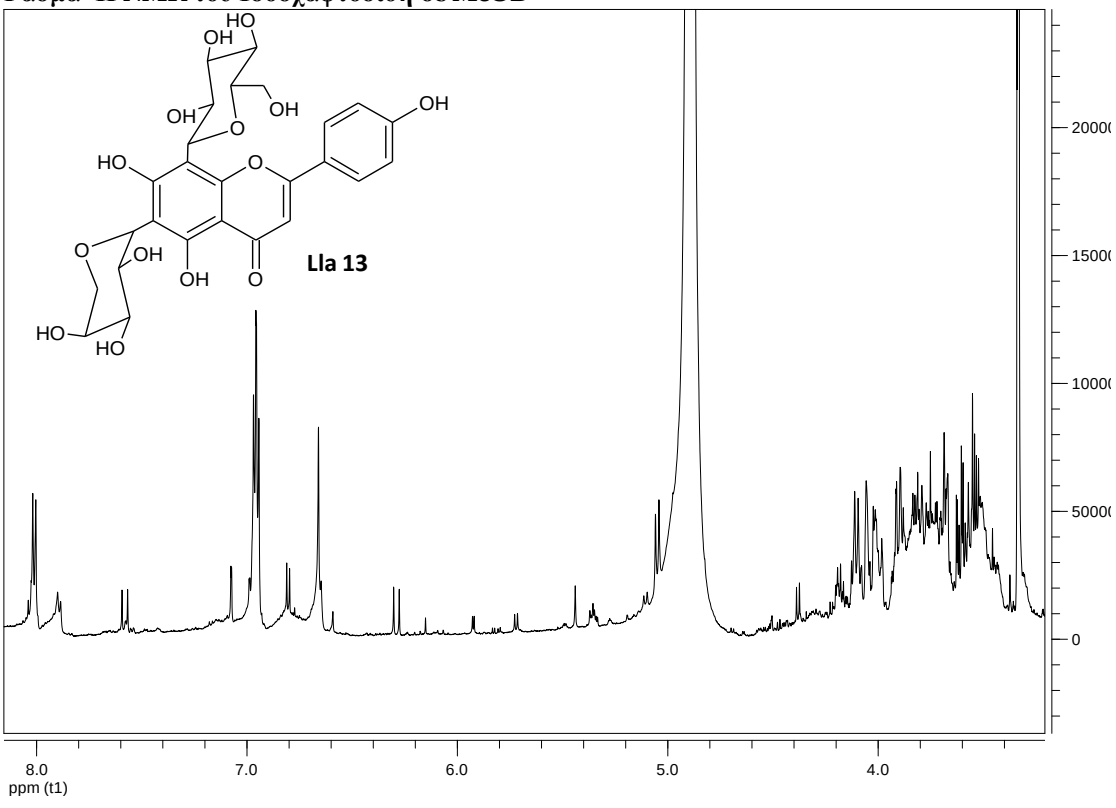
Φάσμα ^{1}H NMR της Ρουτίνης σε MeOD



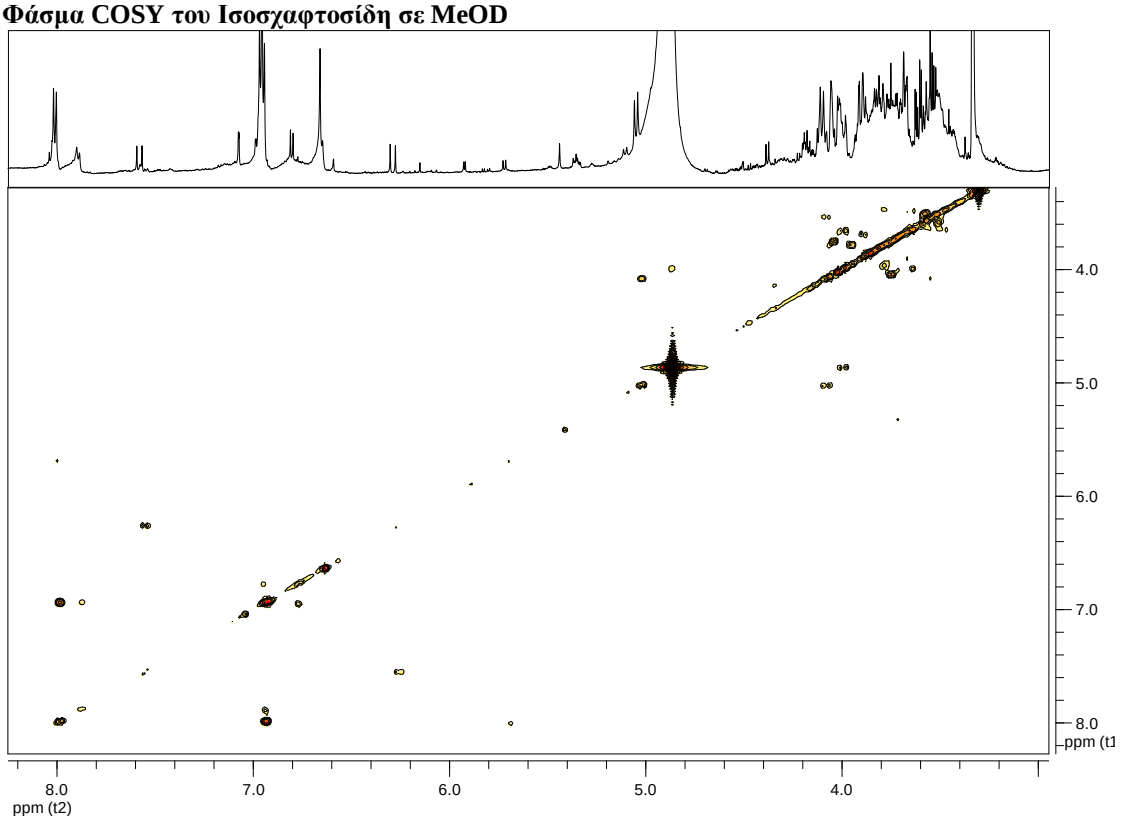
Φάσμα HSQC-DEPT του 4-*O*-*β*-D-γλυκοπυρανοσίδης του βενζοϊκου οξέος σε MeOD



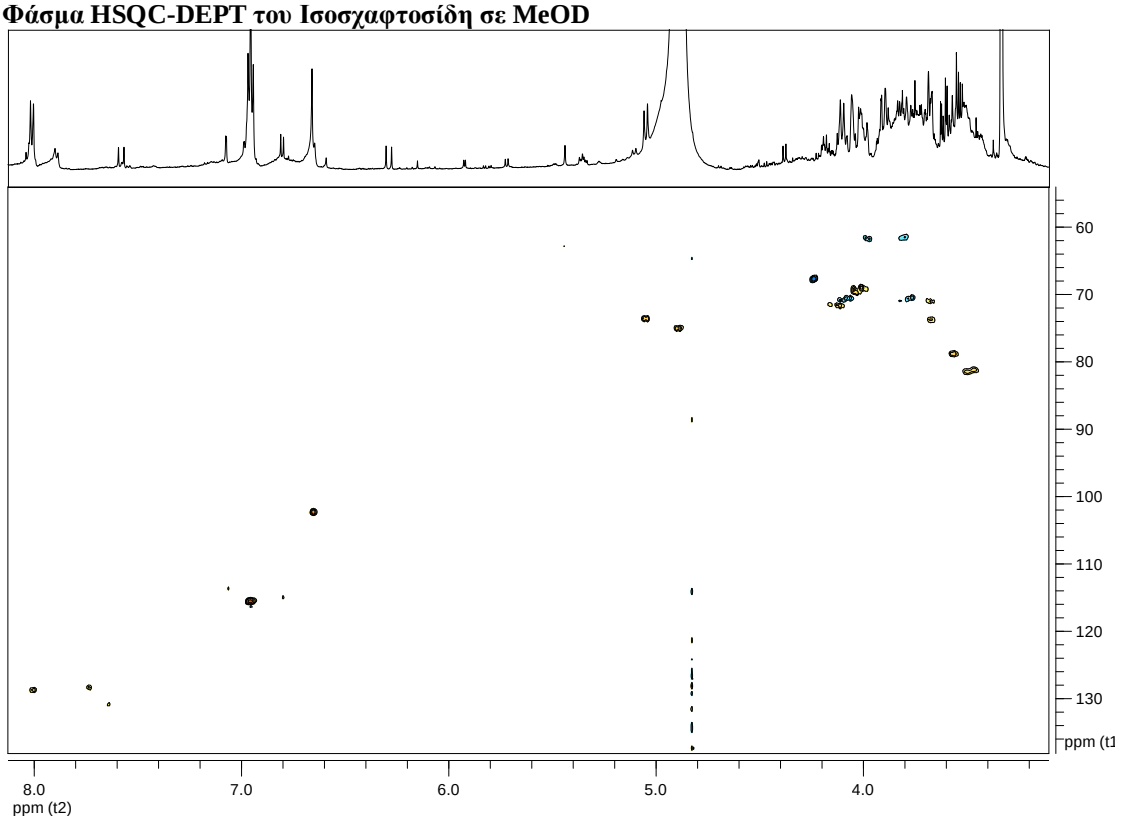
Φάσμα ^{1}H NMR του Ισοσχαφτοσίδη σε MeOD



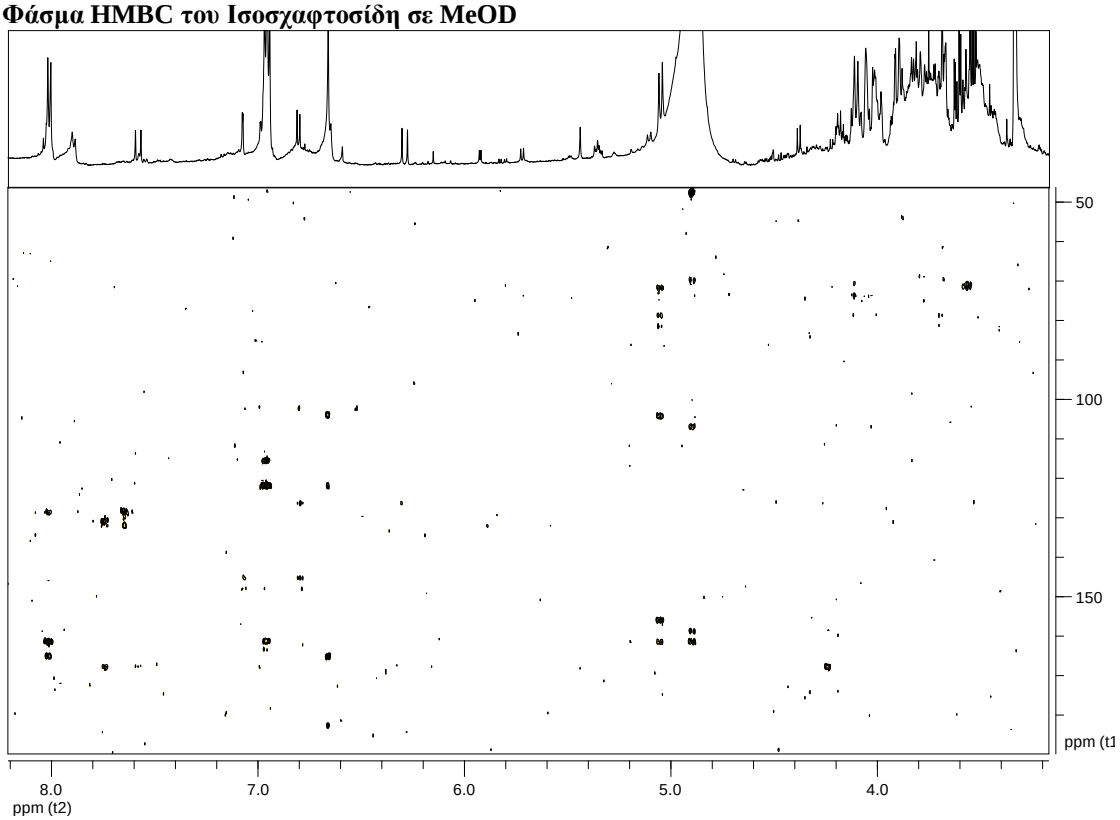
Φάσμα COSY του Ισοσχαφτοσίδη σε MeOD



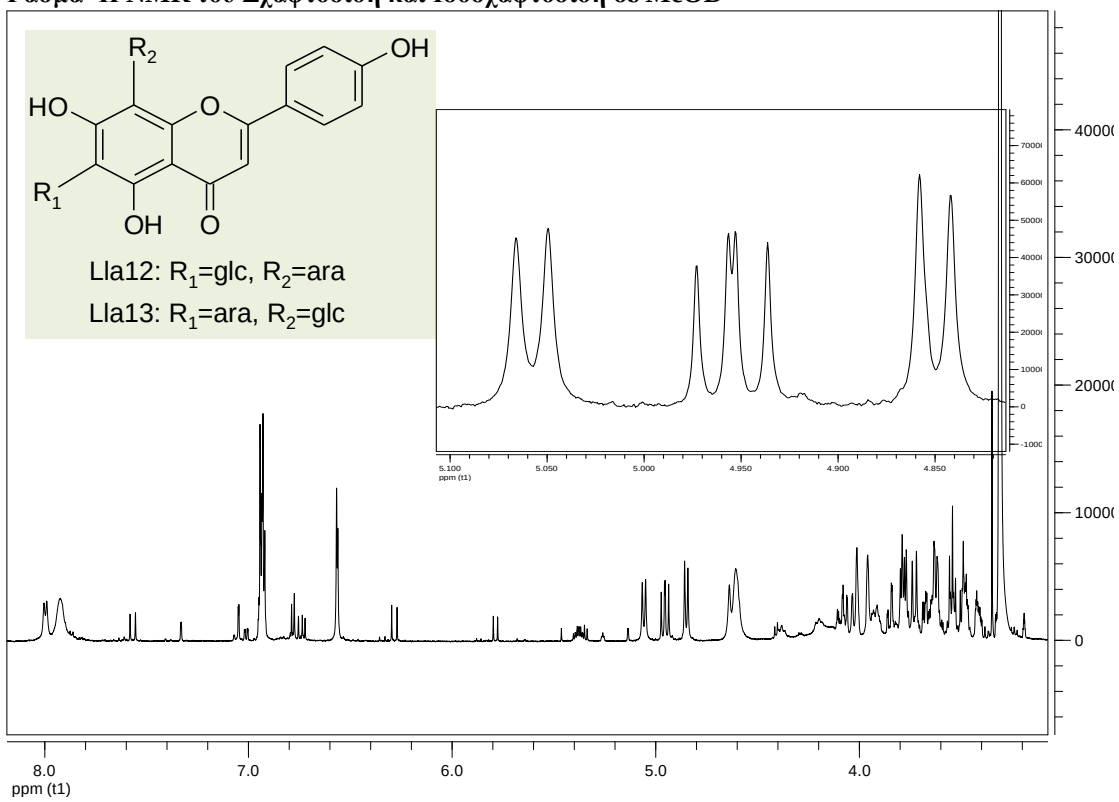
Φάσμα HSQC-DEPT του Ισοσχαφτοσίδη σε MeOD



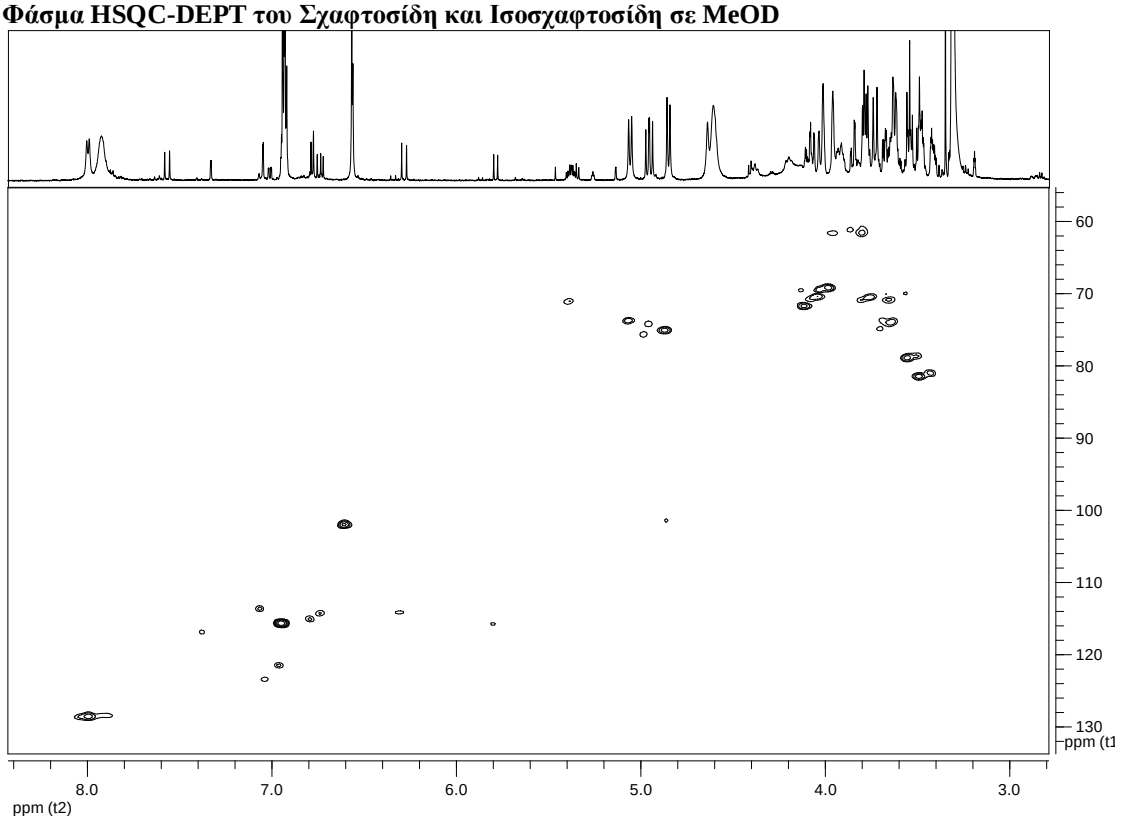
Φάσμα HMBC του Ισοσχαφτοσίδη σε MeOD



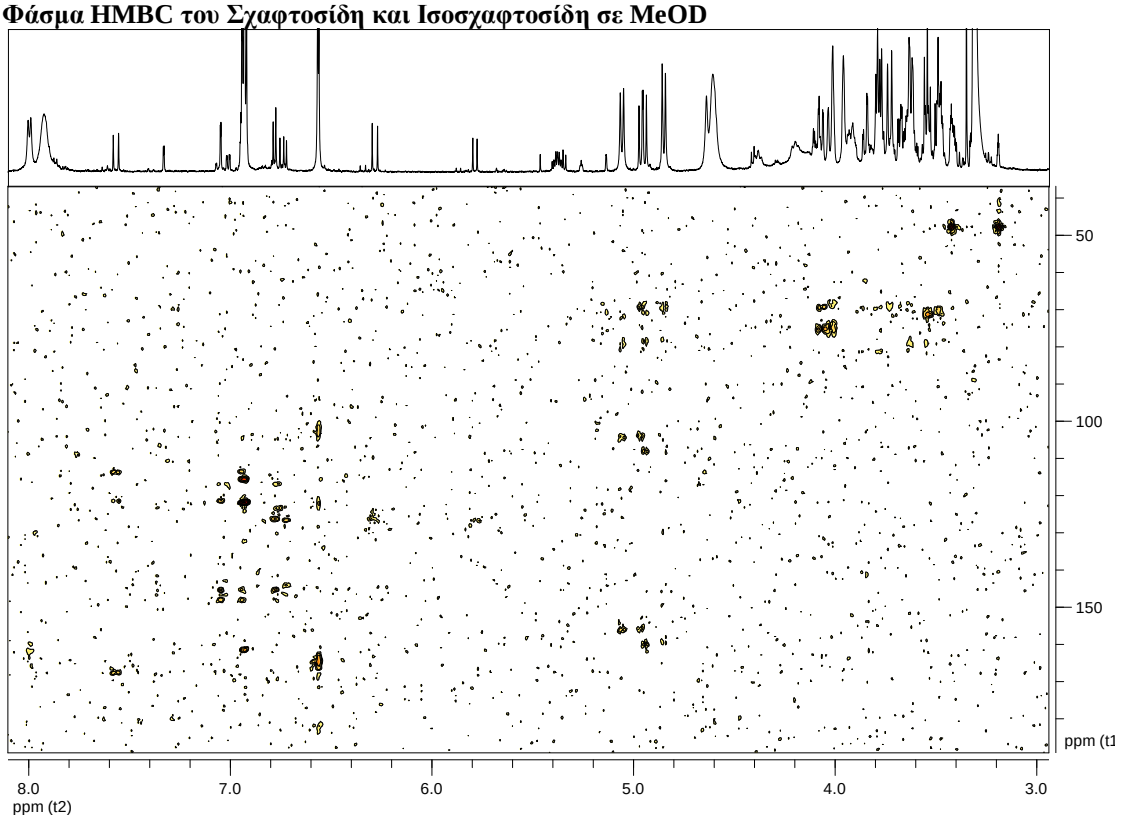
Φάσμα ^{1}H NMR του Σχαφτοσίδη και Ισοσχαφτοσίδη σε MeOD



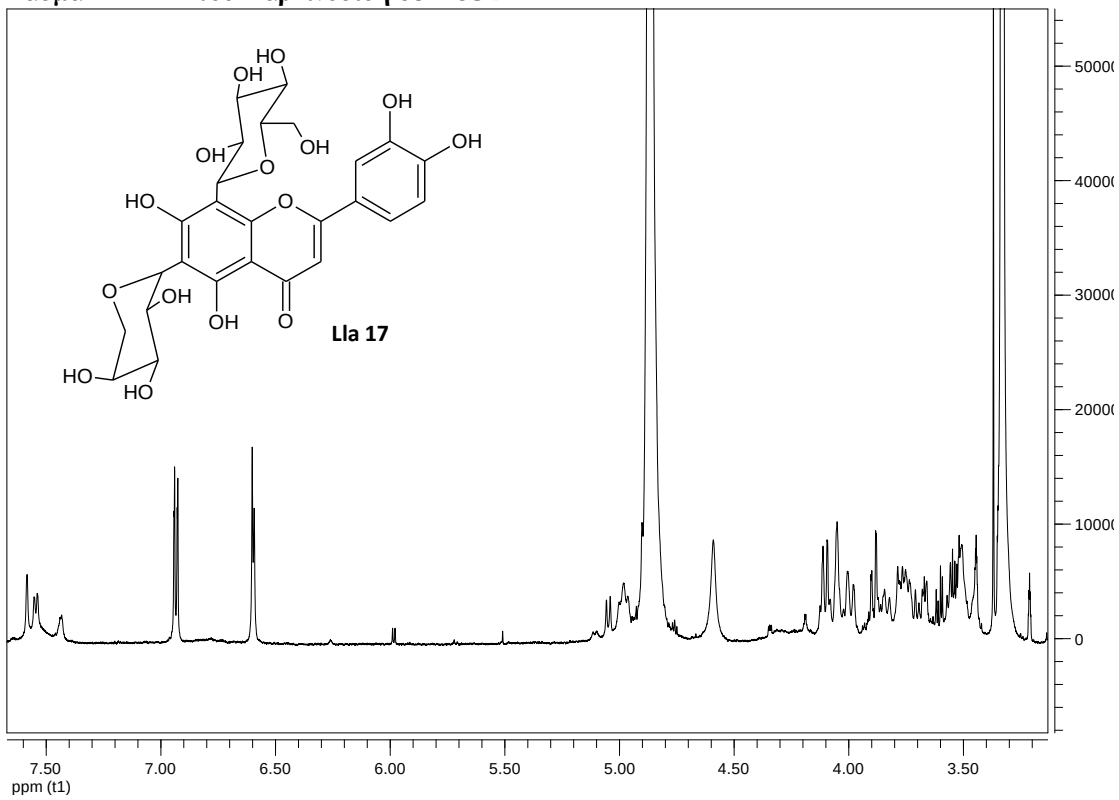
Φάσμα HSQC-DEPT του Σχαφτοσίδη και Ισοσχαφτοσίδη σε MeOD



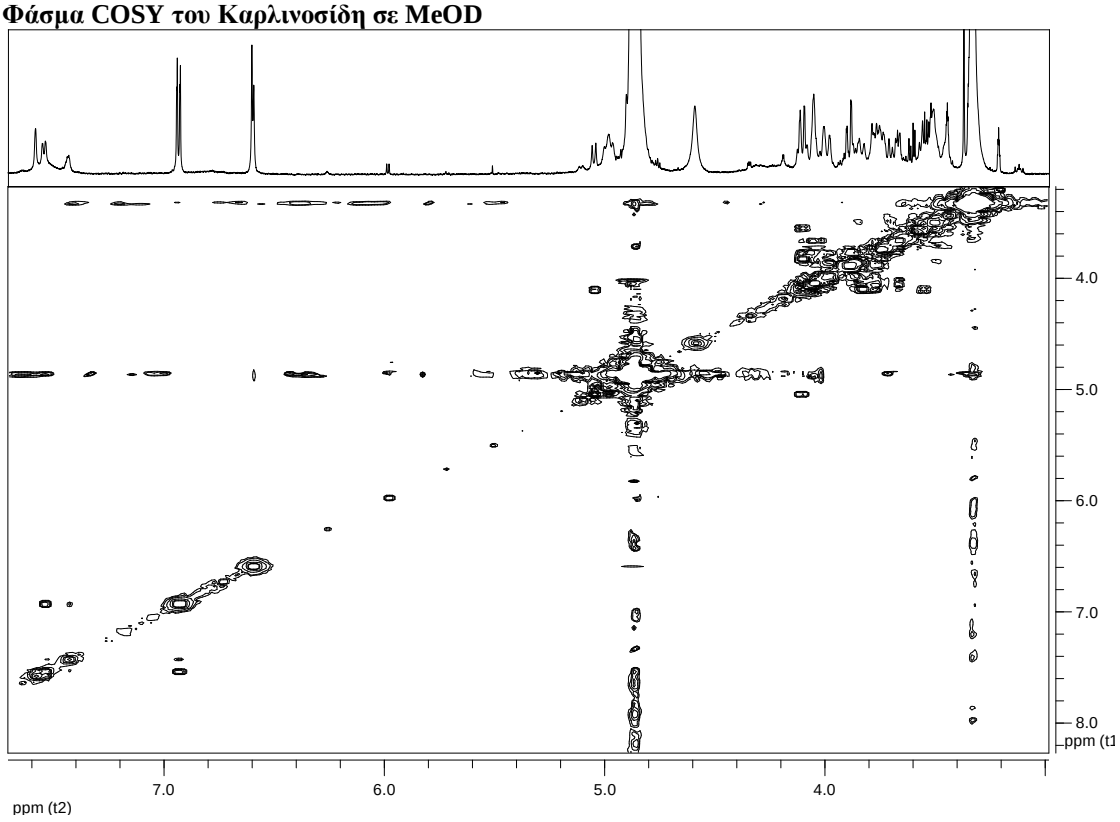
Φάσμα HMBC του Σχαφτοσίδη και Ισοσχαφτοσίδη σε MeOD



Φάσμα ^{1}H NMR του Καρλινοσίδη σε MeOD



Φάσμα COSY του Καρλινοσίδη σε MeOD



Φάσμα HSQC-DEPT του Καρλινοσίδη σε MeOD

