Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Φαρμακευτικής

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Μελέτη του είδους Allium ampeloprasum για την απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών με πιθανή δράση στην οστεοπόρωση

ΙΩΑΝΝΑ Κ. ΝΑΚΑ

Χημικός Μηχανικός

Αθήνα 2016

Στην μνήμη της πολυαγαπημένης μου μητέρας

και στην οικογένεια μου…

Ευχαριστίες

Για την παρούσα διπλωματική εργασία η οποία αποτελεί το καταστάλαγμα μιας διετούς προσπάθειας, θα ήθελα να εκφράσω από καρδιάς την ευγνωμοσύνη μου στους ανθρώπους οι οποίοι συνέβαλαν ο καθένας ξεχωριστά με τον τρόπο του στην περάτωση της.

Αρχικά ευχαριστώ θερμά τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής της διπλωματικής εργασίας για το μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης, οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την εργασία μου και συγκεκριμένα:

- Τον Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη
- Την Καθηγήτρια κα. Σοφία Μητάκου και
- Τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αληγιάννη Νεκτάριο

Ευχαριστώ ολόψυχα τον επιβλέποντα αυτής της διπλωματικής εργασίας, τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων κ. Νεκτάριο Αληγιάννη, για την επιλογή και την ανάθεση του θέματος, την υπομονή, την επιστημονική και ηθική υποστήριξη του και την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Επίσης, ευχαριστώ τον Δρ. Ελευθέριο Καλπουτζάκη για τη συλλογή και ταυτοποίηση των φυτικών δρογών της παρούσας διατριβής.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην υποψήφια διδάκτορα του ΕΚΠΑ του Τμήματος Φαρμακευτικής, Αργυρώ Βοντζαλίδου για την εποικοδομητική συνεργασία και συνύπαρξη μας στα πλαίσια του εργαστηρίου, την καθοδήγηση και την επίβλεψη της παρούσας εργασίας, την αμέριστη και ειλικρινή υποστήριξή της.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και για την μεταδιδάκτορα Μαρία Μακροπούλου για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη της, τις αμέτρητες και ουσιαστικές συμβουλές της και την θετικότητα της.

Τον μεταδιδάκτορα Vincent Brieudes για τη λήψη φασμάτων μάζας.

Ευχαριστώ πολύ τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς συμφοιτητές και συμφοιτήτριες μου για τις όμορφες στιγμές που μου χάρισαν, την βοήθεια τους και για το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στο Κοινωφελές Ίδρυμα «Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης», που με την χορήγηση υποτροφίας του αποτέλεσε θεμέλιο λίθο από υλικής και όχι μόνο άποψης, για την ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου, στους γονείς μου Ειρήνη και Κωνσταντίνο, οι οποίοι με μεγάλωσαν σε ένα ειδυλιακό περιβάλλον, χωρίς καμία στέρηση, γεμάτο από αγάπη και εμπιστοσύνη σε μένα και στις δυνατότητες μου. Ευχαριστώ πολύ τον αδερφό μου Δημήτρη ο οποίος με υποστηρίζει σε κάθε προσπάθεια και είναι δίπλα μου κάθε στιγμή. Εύχομαι με την μέχρι στιγμής πορεία μου και με το πέρας και των μεταπτυχιακών μου σπουδών να τους έκανα

λίγο ακόμα υπερήφανους. Ελπίζω η μητέρα μου η οποία εδώ και 2,5 χρόνια δεν είναι δίπλα μου να χαίρεται με την πρόοδο μου. Στην οικογένεια μου και στην μνήμη της μονάκριβης μου μητέρας αφιερώνεται αυτή η διπλωματική εργασία.

Ιωάννα Νάκα

Αθήνα, 2016

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η φυτοχημική μελέτη του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα και της μεθανόλης του φυτού *Allium ampeloprasum*, με σκοπό την απομόνωση φυσικών προϊόντων με πιθανή ευεργετική δράση στην οστεοπόρωση. Στηριζόμενοι σε αναφορές στο έργο του Διοσκουρίδη, το πλούσιο φυτοχημικό προφίλ του αλλά και αποτελέσματα βιολογικών ελέγχων αναφορικά με την οιστρογονικότητα αποφασίστηκε η ένταξη του συγκεκριμένου είδους στην γενικότερη προσπάθεια της ερευνητικής μας ομάδας για τη μελέτη δρογών της ελληνικής παραδοσιακής θεραπευτικής .

Μετά τη συλλογή και την ξήρανσή του φυτού, παρασκευάστηκαν εχυλίσματα αυξανόμενης πολικότητας και αξιολογήθηκαν ως προς το χημικό τους περιεχόμενο με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και υγρής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδος υψηλής απόδοσης (HPTLC). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής, ενώ τα κλάσματα που προέκυψαν επεξεργάστηκαν με τη χρήση διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών, όπως είναι η υγρή χρωματογραφία στήλης, η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

Οι απομονωμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών (1D και 2D NMR) και της τεχνικής GC-MS. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 23 μεταβολίτες, οι οποίοι ανήκουν στις κατηγορίες των: τερπενοειδών (AAE1, AAE2, AAE5), φαινολικών οξέων (AAM1), φλαβονοειδών (AAM3, AAM4), σαπωγενινών (AAM2, AAE3, AAE6), σαπωνινών (AAM5, AAM6, AAM7, AAM8, AAM9, AAM10), απλών αζωτούχων βάσεων (AAM11, AAM12, AAM14, AAM15), δύο *cis*/*trans* παράγωγων κινναμωμικού οξέος (AAE7, AAE8), λιγνανίων (AAE4), διυδροβενζοφουρανίων (AAM13) καθώς και λιπαρά οξέα και υδρογονάνθρακες. Η πλειοψηφία των μεταβολιτών έχει αναφερθεί στο γένος *Allium* εκτός από τους μεταβολίτες (AAM5, AAM6, AAM9) που απομονώνονται πρώτη φορά από το είδος *A. ampeloprasum* και οι μεταβολίτες (AAM10 και AAM13), οι οποίοι αποτελούν δυο νέα φυσικά προϊόντα.

Συνέχεια της εργασίας αυτής θα αποτελέσει η ολοκλήρωση της φυτοχημικής μελέτης του *Allium ampeloprasum*, αλλά κυρίως η βιολογική αξιολόγηση των απομονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών ως προς την οιστρογόνο /αντιοιστρογόνο δράση τους αλλά κυρίως την ικανότητά τους να προάγουν την οστεοβλαστογένεση.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: *Allium ampeloprasum*, οστεοπόρωση, φυτοοιστρογόνα, σαπωνίνες, λιγνάνια, φλαβονοειδή, φαινολικές ενώσεις, φυτοχημική ανάλυση.

ABSTRACT

The purpose of this thesis was the phytochemical investigation of ethyl acetate and methanolic extract of *Allium ampeloprasum* in order to discover natural products related to the prevention and treatment of osteoporosis. Taking into consideration relevant information of traditional medicine based on texts of Dioscorides, the biological activity of *Allium ampeloprasum* extracts concerning their estrogenic and osteoblastic activity, as well as their chemical profile these extracts were selected for further analysis.

After the plant collection the ethyl acetate and methanolic extracts were obtained and their chemical profile was investigated using HPLC and HPTLC techmiques. Furthermore the above mentioned extracts were fractionated by use of centrifugal partition chromatography (CPC), and the fractions were further submitted to several chromatographic techniques (such as: column chromatography with solid phase sephadex LH-20 or silica gel and preparative TLC). All the isolated compounds were identified using with the use of nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and GC-MS.

In total 23 metabolites were identified belonging to the categories of phenolic acids, flavonoids, sapogenins, saponins, lignans and dihydrobenzofurans. The majority of the isolated compounds have previously been reported in *Allium* species, whereas three metabolites (AAM5, AAM6, AAM9) are reported in *Allium ampeloprasum* for the first time and two compounds (AAM10 and AAM13) are identified for the first time as natural compounds.

To conclude, between our future goals is the completion of the phytochemical analysis of the extracts *Allium ampeloprasum* and also the biological evaluation of the isolated compounds concerning their estrogenic and osteoprotective activity.

.

KEY WORDS: *Allium ampeloprasum*, osteoporosis, phytoestrogens, saponins, lignans, flavonoids, phenolic compounds, phytochemical analysis.

ΣΚΟΠΟΣ

Ένα από τα κύρια επιστημονικά ενδιαφέροντα της ερευνητικής μας ομάδας τα τελευταία χρόνια, αποτελεί η ανεύρεση νέων φυσικών προϊόντων με οιστρογονική δράση. ΄Ενας από τους απώτερους σκοπούς της ομάδας μας είναι η κατάρτιση τόσο μιας χημειοθήκης φυσικών προϊόντων και φυτικών εκχυλισμάτων όσο και μιας βάσης δεδομένων (με φυσικοχημικά, χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά) που θα συντελέσουν στην ταχεία και αποτελεσματική αξιολόγηση πληροφοριών λαϊκής θεραπευτικής. Σε δεύτερο επίπεδο στοχεύουμε στην αξιοποίηση της βιοποικιλότητας της ελληνικής χλωρίδας και στην ανάδειξη της ως μια πλούσια πηγή βιοδραστικών προϊόντων. Στο πλαίσιο λοιπόν αυτής της ερευνητικής προσπάθειας εντάσσεται και η παρούσα διπλωματική εργασία η οποία επικεντρώνεται στη φυτοχημική μελέτη του φυτού *Allium ampeloprasum.*

Στηριζόμενοι σε σχετικές πληροφορίες λαϊκής θεραπευτικής και στα αποτελέσματα της αξιολόγησησ σημαντικού αριθμού φυτικών εκχυλισμάτων σχετικά με την οστεοβλαστική δραστηριότητα πλήθους φυτικών ειδών, καταλήξαμε στην επιλογή της φυτοχημικής μελέτης του εδώδιμου φυτού *Allium ampeloprasum.*

Το συγκεκριμένο φυτικό είδος αναφέρεται στη λαϊκή θεραπευτική ως εμμηναγωγό, ενώ σε πρωταρχικούς βιολογικούς ελέγχους το μεθανολικό εκχύλισμα όλου του φυτού σημείωσε οιστρογονική δράση στα ανθρώπινα κύτταρα ενδομητρίου (Ishikawa) και σε εκείνα του μαστού (MCF-7), καθώς επίσης ικανότητα αύξησης της διαφοροποίησης οστεοβλαστικών κυττάρων σε κυτταρική σειρά προ-οστεοβλαστικών κυτάρων (MC3T3-E1).

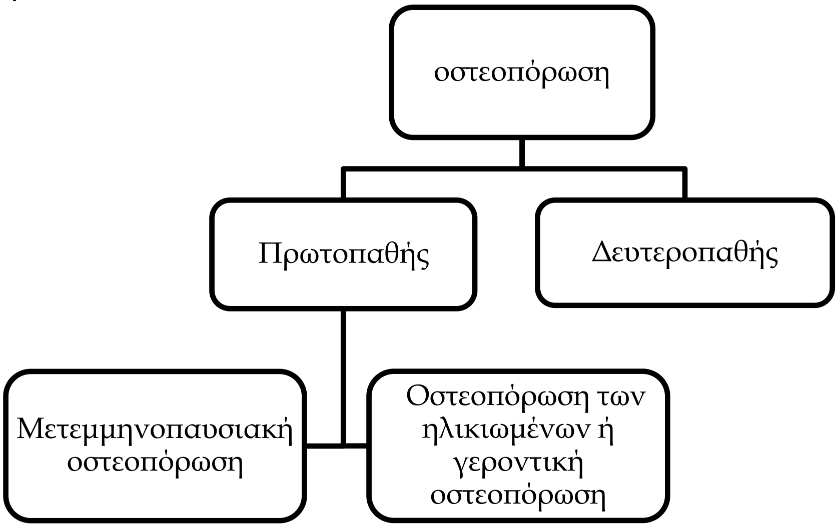
Έτσι λοιπόν, αποφασίστηκε η ενασχόληση με την απομόνωση και την ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών από το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα και της μεθανόλης όλου του φυτού *Allium ampeloprasum* με σκοπό τον φυτοχημικό χαρακτηρισμό των προαναφερόμενων παρασκευασμάτων και την αξιολόγηση της οστεοπραστατευτικής τους δράσης.

1 ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ

1.1 Οστεοπόρωση

Η οστεοπόρωση είναι η συχνότερη πάθηση των οστών και χαρακτηρίζεται, πρώτον, από χαμηλή οστική μάζα ή, πιο απλά, από λιγότερη ποσότητα οστού και δεύτερον, από διαταραχή της μικροαρχιτεκτονικής δομής των οστών με αποτέλεσμα τη μείωση της αντοχής τους και τον αυξημένο κίνδυνο κατάγματος .

Η οστεοπόρωση διακρίνεται σε:



Παρακάτω παρουσιάζεται σε ποιές περιπτώσεις ανθρώπων εμφανίζεται ο κάθε τύπος οστεοπόρωσης.

Μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση	•Η πιο συχνή μορφή οστεοπόρωσης. •Εμφανίζεται σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση και σχετίζεται με τη μειωμένη παραγωγή οιστρογόνων, που φυσιολογικά παρατηρείται σε αυτή την ηλικία των γυναικών.
Γεροντική οστεοπόρωση	•Εμφανίζεται σε γυναίκες και άνδρες ηλικίας 70 ετών και πάνω
Δευτεροπαθής	•Αναπτύσσεται σε ασθενείς με ορισμένες παθήσεις, όπως είναι π.χ. ο υπερπαραθυρεοειδισμός, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο υπογοναδισμός, ο υπερθυρεοειδισμός και το σύνδρομο δυσαπορρόφησης. •Μπορεί να εμφανιστεί σε ασθενείς που παίρνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα ορισμένα φάρμακα, όπως τα γλυκοκορτικοειδή (δηλ. η κορτιζόνη), η θυρεοειδική ορμόνη σε δόση μεγαλύτερη από ό,τι χρειάζεται για την αντιμετώπιση του υποθυρεοειδισμού, τα αντιεπιληπτικά φάρμακα ή η ηπαρίνη.

1.2 Συχνότητα εμφάνισης οστεοπόρωσης

Η οστεοπόρωση εμφανίζεται συνήθως μετά την ηλικία των 50 ετών, είναι πολύ συχνότερη στις γυναίκες απ' ότι στους άνδρες και η συχνότητά της αυξάνει με την πρόοδο της ηλικίας. Σύμφωνα με τα ευρήματα επιδημιολογικών μελετών σε διάφορες χώρες, η οστεοπόρωση προσβάλλει το 25-35% των γυναικών και το 15-20% των ανδρών ηλικίας 50 ετών και πάνω. Σε ότι αφορά τη χώρα μας, στα πλαίσια της πρόσφατης πανελλήνιας επιδημιολογικής έρευνας για τις ρευματικές παθήσεις στο γενικό πληθυσμό ενηλίκων, βρέθηκε ότι 28,4% των Ελληνίδων 50 ετών και πάνω παρουσιάζουν οστεοπόρωση.

1.3 Αιτίες και τρόποι ανάπτυξης της οστεοπόρωση

Δύο είναι οι παράγοντες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της οστεοπόρωσης:

1. Το χαμηλό επίπεδο της κορυφαίας οστικής μάζας που αποκτά ένα άτομο στην ηλικία των 25 περίπου ετών.
2. Η αυξημένη οστική απώλεια που μπορεί να συμβεί μετά την ηλικία των 45-50 ετών.

Το ποσό της οστικής μάζας, που έχει ένα άτομο σε οποιαδήποτε ηλικία, είναι αποτέλεσμα δύο βασικών και αλληλένδετων κυτταρικών λειτουργιών, που πραγματοποιούνται συνεχώς μέσα στα οστά καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής, στα πλαίσια της λεγόμενης οστικής ανακατασκευής. Οι λειτουργίες αυτές είναι, πρώτον, η οστική απορρόφηση που προηγείται και δεύτερον, η οστική παραγωγή που ακολουθεί. Η οστική απορρόφηση γίνεται από τα κύτταρα που λέγονται **οστεοκλάστες** και η οστική παραγωγή γίνεται από τα κύτταρα που λέγονται **οστεοβλάστες.** Φυσιολογικά, μέχρι την ηλικία περίπου των 25 ετών η οστική παραγωγή είναι μεγαλύτερη από την οστική απορρόφηση και έτσι η οστική μάζα αυξάνει συνεχώς, και μάλιστα πιο πολύ στους άνδρες από ότι στις γυναίκες, για να φθάσει στην ηλικία αυτή των 25 ετών στο μέγιστο επίπεδό της, που είναι γνωστό ως κορυφαία οστική μάζα. Κατά τα επόμενα 20 περίπου χρόνια η οστική απορρόφηση είναι ίση με την οστική παραγωγή τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες και επομένως η οστική μάζα παραμένει σταθερή. Μετά την ηλικία όμως των 45 ετών η εικόνα αρχίζει να αναστρέφεται. Η οστική απορρόφηση δηλ. γίνεται μεγαλύτερη από την οστική παραγωγή και μάλιστα σε μεγαλύτερο βαθμό στις γυναίκες από ότι στους άνδρες λόγω της μειωμένης παραγωγής των οιστρογόνων και τελικά της εμφάνισης της εμμηνόπαυσης περί την ηλικία περίπου των 50 ετών. Έτσι το αποτέλεσμα είναι μια "φυσιολογική" οστική απώλεια. Στους άνδρες η "φυσιολογική" οστική απώλεια είναι μικρότερου βαθμού, αλλά μετά την ηλικία των 70 ετών η "φυσιολογική" ετήσια οστική απώλεια είναι στο ίδιο επίπεδο σε άνδρες και γυναίκες. Έτσι, όταν σε ορισμένα άτομα κάτω από την επίδραση παραγόντων κινδύνου για την οστεοπόρωση δεν αποκτηθεί το μέγιστο επίπεδο της κορυφαίας οστικής μάζας μέχρι την ηλικία των 25 ετών ή ο ετήσιος ρυθμός της οστικής απώλειας μετά από την ηλικία των 45-50 ετών είναι μεγαλύτερος από τον "φυσιολογικό", τότε το αποτέλεσμα είναι η συνεχής απώλεια οστικής μάζας και τελικά η πρόκληση οστεοπόρωσης.

1.4 Παράγοντες κινδύνου που επιδρούν στην ανάπτυξη της οστεοπόρωσης

Είναι γνωστό από τα ευρήματα πολλών επιδημιολογικών και άλλων μελετών ότι για την ανάπτυξη της οστεοπόρωσης καθοριστικό ρόλο παίζουν πολλοί παράγοντες κινδύνου. Από τους παράγοντες αυτούς ορισμένοι δεν είναι δυνατόν να τροποποιηθούν ή να εξουδετερωθούν, ενώ μερικοί άλλοι μπορεί να τροποποιηθούν και να εξουδετερωθούν και το γεγονός αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία τόσο για την πρωτογενή όσο και για τη δευτερογενή πρόληψη της οστεοπόρωσης.

- Οι μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου για την οστεοπόρωση είναι:
    - Γενετικοί
    - Οικογενειακό ιστορικό οστεοπόρωσης
    - Ιστορικό κατάγματος
    - Γυναικείο φύλο
    - Ηλικία άνω των 50 ετών
    - Εμμηνόπαυση/ υστερεκτομή
    - Συνεχής λήψη γλυκοκορτικοειδών σε ημερήσια δόση ίση ή μεγαλύτερη από 7,5 mg πρεδνιζολόνης για χρονικό διάστημα > 3 μηνών
    - Παθήσεις: Υπερπαραθυρεοειδισμός, ρευματοειδής αρθρίτιδα, υπογοναδισμός, υπερθυρεοειδισμός, σύνδρομο δυσαπορρόφησης
- Οι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου για την οστεοπόρωση είναι:

    - Πρόωρη εμμηνόπαυση (πριν από την ηλικία των 45 ετών). Τα οιστρογόνα είναι ορμόνες που παράγονται κυρίως από τις ωοθήκες και λιγότερο από τα επινεφρίδια και προφυλάσσουν από την οστεοπόρωση διότι αναστέλλουν την οστική απορρόφηση από τους οστεοκλάστες και αυξάνουν την οστική παραγωγή από τις οστεοβλάστες. Όταν μια γυναίκα παρουσιάσει εμμηνόπαυση πριν από την ηλικία των 45 ετών, αυτό σημαίνει ότι έχει πρόωρα μειωμένη παραγωγή οιστρογόνων και γι΄ αυτό είναι σε κίνδυνο για ανάπτυξη οστεοπόρωσης.

    - Αμηνόρροια διάρκειας μεγαλύτερης από ένα χρόνο. Η αμηνόρροια οφείλεται σε μειωμένη παραγωγή οιστρογόνων και γι΄ αυτό αποτελεί παράγοντα κινδύνου για οστεοπόρωση, εφόσον έχει μεγάλη διάρκεια, πάνω από ένα χρόνο.

    - Διατροφή φτωχή σε ασβέστιο ή βιταμίνη D. Το ασβέστιο και η βιταμίνη D είναι ουσίες απαραίτητες τόσο για την φυσιολογική ανάπτυξη των οστών όσο και για τη διατήρηση της οστικής μάζας στα φυσιολογικά επίπεδα για την ηλικία και το φύλο κάθε ατόμου. Επομένως, η ημερήσια λήψη με την τροφή ασβεστίου και βιταμίνης D σε ποσότητα μικρότερη από την απαραίτητη ανάλογα με το φύλο και την ηλικία κάθε ατόμου αποτελεί παράγοντα κινδύνου για οστεοπόρωση.Έλλειψη σωματικής άσκησης. Η σωματική άσκηση φαίνεται ότι προσφέρει μηχανικά ερεθίσματα στις οστεοβλάστες για παραγωγή οστικής μάζας και γι΄ αυτό η μη άσκηση αποτελεί παράγοντα κινδύνου για οστεοπόρωση.

    - Χαμηλό σωματικό βάρος. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι το χαμηλό σωματικό βάρος αποτελεί παράγοντα κινδύνου για οστεοπόρωση.

- Κάπνισμα. Το κάπνισμα αποτελεί παράγοντα κινδύνου για οστεοπόρωση διότι μειώνει την παραγωγή οιστρογόνων, συμβάλλει στην πρόκληση πρώιμης εμμηνόπαυσης και δρα τοξικά στις οστεοβλάστες, μειώνοντας έτσι την οστική μάζα.

- Μεγάλη κατανάλωση οινοπνευματωδών ποτών. Αν και η μέτρια κατανάλωση οινοπνευματωδών ποτών αυξάνει την παραγωγή οστικής μάζας, ωστόσο η μεγάλη κατανάλωση δρα τοξικά στις οστεοβλάστες και μειώνει την παραγωγή οστικής μάζας.

1.5 Συμπτώματα της οστεοπόρωσης

Η οστεοπόρωση είναι μια σιωπηρή νόσος, δεν παρουσιάζει δηλαδή συμπτώματα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αυτό σημαίνει ότι περνάνε αρκετά χρόνια, κατά τη διάρκεια των οποίων η οστεοπόρωση συνεχώς χειροτερεύει από πλευράς απώλειας οστικής μάζας και διαταραχής της μικροαρχιτεκτονικής δομής των οστών, μέχρι να εμφανιστεί το πρώτο της σύμπτωμα, που είναι το κάταγμα. Η οστεοπόρωση είναι νόσος όλων των οστών και γι' αυτό κατάγματα μπορεί να συμβούν σε διάφορες θέσεις του σκελετού, αλλά συνήθως συμβαίνουν στους σπονδύλους, στον αυχένα του μηριαίου οστού και στο αντιβράχιο. Πιο συγκεκριμένα, περίπου 40% των οστεοπορωτικών καταγμάτων αφορούν τη σπονδυλική στήλη, 20% τον αυχένα του μηριαίου οστού, 20% το αντιβράχιο και 20% διάφορα άλλα οστά.

1.6 Διάγνωση της οστεοπόρωσης

Η διάγνωση της οστεοπόρωσης γίνεται βασικά με δύο τρόπους:

1. Μέτρηση της Οστικής Πυκνότητας (Οστική Πυκνομετρία)

Η μέτρηση της οστικής πυκνότητας γίνεται στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης πριν από την ηλικία των 60 ετών ή στο άνω άκρο του μηριαίου οστού στην ηλικία των 60 ετών και πάνω. Για τη μέτρηση αυτή η πιο χρήσιμη και αξιόπιστη μέθοδος είναι η μέτρηση της απορρόφησης διπλοενεργειακών φωτονίων, που είναι γνωστή ως DEXA από το Dual Energy X-ray absorptiometry.

2. Μέτρηση του Οστικού Μεταβολισμού (Απώλεια Οστικής Πυκνότητας)

Η Μέτρηση του Οστικού Μεταβολισμού (Απώλεια Οστικής Πυκνότητας) γίνεται με ειδικές εργαστηριακές εξετάσεις αίματος και ούρων (Οστικοί Δείκτες), που προσδιορίζουν προϊόντα είτε της οστικής αποδόμησης είτε του οστικού σχηματισμού. Με αυτούς εντοπίζεται και υπολογίζεται με σημαντική ακρίβεια ο ρυθμός απώλειας της οστικής πυκνότητας. Οι ειδικές αυτές εξετάσεις αίματος και ούρων είναι, οι μετρήσεις της Δεοξυπυριδινολίνης ή Dpd, του Καρβόξυ-τελοπεπτιδίου του κολλαγόνου ή β-CTX (Cross Laps), του Αμινο-τελοπεπτιδίου του κολλαγόνου ή NTX, καθώς και άλλων κατάλληλων βιοχημικών δεικτών όπως της Οστικής Αλκαλικής Φωσφατάσης, Οστεοκαλσίνης, Ασβεστίου, Φωσφόρου κλπ.
Μελετάται επίσης μία εξέταση γονιδίων για τον εντοπισμό τυχόν προδιάθεσης για την ανάπτυξη της πάθησης.

Για τις γυναίκες οι προαναφερόμενες διαγνωστικές εξετάσεις πρέπει να γίνονται απαραίτητα κατά την περίοδο της εμμηνόπαυσης. Νεότερες όμως μελέτες υποστηρίζουν ότι περίπου το 19% των γυναικών εμφανίζουν συμπτώματα οστεοπόρωσης πριν την εμμηνόπαυση, που σημαίνει ότι οι εξετάσεις αυτές είναι καλύτερα να γίνονται έγκαιρα, με τα πρώτα συμπτώματα της κλιμακτηρίου. Για τους άνδρες οι εξετάσεις αυτές πρέπει να γίνονται περίπου στην ηλικία των 65 ετών.

1.7 Πρόληψη

Όπως σε όλες σχεδόν τις παθήσεις, έτσι και στην οστεοπόρωση ισχύει το αρχαίο ρητό, «Κάλλιον του θεραπεύειν, το προλαμβάνειν». Είναι δηλαδή προτιμότερη και ευκολότερη η πρόληψη της ασθένειας παρά η θεραπεία της.
Η πρόληψη θα πρέπει να αρχίζει από την παιδική ηλικία σε μία προσπάθεια «αποθήκευσης» όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας οστικής μάζας, ούτως ώστε να θωρακίσει το σκελετό μας για όλη την υπόλοιπη μας ζωή.

Θα πρέπει δε να δίδεται ιδιαίτερη βαρύτητα σε δύο κυρίως τομείς.

1. Στη διατροφή η οποία παίζει σημαντικότατο ρόλο στην πρόληψη της οστεοπόρωσης γι’ αυτό και συνίσταται η ικανή λήψη τροφών πλούσιων σε περιεκτικότητα ασβεστίου, όπως είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά (σπανάκι, μπρόκολο), τα ψάρια (σολομός, σαρδέλες, τόνος), οι ξηροί καρποί, οι σπόροι, διάφορα όσπρια κλπ.

2. Στην άσκηση η οποία είναι επίσης ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες πρόληψης της οστεοπόρωσης και σε συνδυασμό με την κατάλληλη διατροφή αποτελούν το πιο σίγουρο μέτρο πρόληψης. Η άσκηση βοηθά όχι μόνο στην ενδυνάμωση των μυών αλλά και των οστών, ενώ βελτιώνει παράλληλα τη φυσική κατάσταση του οργανισμού και την αίσθηση της ισορροπίας, με ελαχιστοποίηση του κινδύνου των πτώσεων και συνεπώς των καταγμάτων. Θα πρέπει εδώ να τονίσουμε την ιδιαίτερη σημασία που παίζει η κατάλληλη ένταση, η συνέπεια και η συνέχεια στα προγράμματα άσκησης και κινησιοθεραπείας. Επίσης με την άσκηση εκπαιδευόμαστε στη σωστή στάση που πρέπει να έχει το σώμα μας σε όλες τις βασικές θέσεις, όρθια, καθιστή, ύπτια και πρηνή.

Άλλοι παράγοντες πρόληψης της οστεοπόρωσης είναι η κατάλληλη διαμόρφωση του χώρου εργασίας και κατοικίας μας, η αποφυγή της κατάχρησης καπνίσματος, αλκοόλ, καφεΐνης κλπ.

1.8 Θεραπεία για την οστεοπόρωση

Η θεραπεία της οστεοπόρωσης δεν μπορεί να πετύχει πλήρη αναπλήρωση της οστικής μάζας, που έχει ήδη χαθεί, ούτε αποκατάσταση της διαταραγμένης μικροαρχιτεκτονικής δομής των οστών και φυσικά δεν μπορεί να αναιρέσει τις σοβαρές συνέπειες των οστεοπορωτικών καταγμάτων, που μπορεί να έχουν ήδη συμβεί. Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι σήμερα υπάρχουν θεραπευτικές δυνατότητες για την οστεοπόρωση. Τα κυριότερα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την όσο το δυνατόν καλύτερη αντιμετώπιση αυτής της «σιωπηλής ασθένειας» είναι:

1. Τα οιστρογόνα (θεραπεία υποκατάστασης ορμονών) και αφορά τις γυναίκες που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση. Με τη χορήγηση των οιστρογόνων διατηρείται η οστική πυκνότητα και μειώνεται ο κίνδυνος καταγμάτων. Τα οιστρογόνα επίσης ανακουφίζουν από τα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης (εξάψεις, κολπική ξηρότητα κλπ.), δρουν ευεργετικά στις πάσχοντες από αρτηριοσκλήρωση και καρδιοαγγειακά προβλήματα και μειώνουν τον κίνδυνο της εμφάνισης της νόσου Αλτσχάϊμερ. Τα οιστρογόνα δεν μπορούν όμως να

χορηγηθούν σε γυναίκες που πάσχουν από καρκίνο του μαστού, με ηπατική νόσο ή είχαν πρόσφατο καρδιοαγγειακό επεισόδιο.

2. Η Καλσιτονίνη η οποία έχει αναλγητική δράση σε ασθενείς με οξύ πόνο λόγω σπονδυλικών καταγμάτων. Είναι δε κατάλληλη ως εναλλακτική θεραπεία στις γυναίκες που δεν μπορεί να τους χορηγηθούν οιστρογόνα.
3. Τα Διφωσφονικά με αποτελεσματική δράση στη μείωση των καταγμάτων.
4. Τα Φθοριούχα όπου η λήψη φθορίου βοηθά στο σχηματισμό οστού, με έντονο ωστόσο προβληματισμό όσον αφορά την ποιότητα του οστού που δημιουργείται και στις διάφορες παρενέργειες που προκαλεί (ναυτία, εμετός, διάρροια).
5. Τα Αναβολικά Στεροειδή όπου αυξάνουν την οστική πυκνότητα αλλά ταυτόχρονα και τη μυϊκή μάζα, με σημαντικά όμως μειονεκτήματα ειδικά στις γυναίκες επειδή προκαλούν αρρενοποίηση (τριχοφυΐα κλπ.).
6. Η Ραλοξιφένη ένα νέο φάρμακο υπό μελέτη, όπου «μιμείται» την ευεργετική δράση των οιστρογόνων.
7. Το Ασβέστιο και η Βιταμίνη D όπου ο συνδυασμός αυτός είναι ιδιαίτερα ευεργετικός για τα οστά και ανεξάρτητα από οποιανδήποτε άλλη θεραπευτική αγωγή, συνίσταται η χορήγηση τους σε καθημερινή βάση.

Άλλα φάρμακα βρίσκονται επίσης σε επίπεδο ερευνών για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης όπως το στρόντιο, η παραθορμόνη, η αυξητική ορμόνη, ο αυξητικός παράγων κλπ. Η επιλογή του κατάλληλου φαρμάκου εξαρτάται από το φύλο, την ηλικία και τη βαρύτητα της νόσου. Η επιλογή είναι αυστηρά έργο του ειδικού γιατρού ο οποίος πιθανόν να συστήσει συνδυασμένη θεραπεία [1]

1.9 Εναλλακτικές θεραπείες

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την ανεύρεση εναλλακτικών θεραπευτικών προσεγγίσεων και νέων προϊόντων με σκοπό την πρόληψη και θεραπεία της οστεοπόρωσης και ειδικά της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης. Το ενδιαφέρον αυτό αυξήθηκε λόγω του ότι η χρήση συμβατικής θεραπείας και συγκεκριμένα οιστρογόνων συνοδεύεται συγχρόνως από σοβαρές παρενέργειες, όπως η υπερπλασία του ενδομητρίου και η αυξανόμενη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού.

Μία σύγχρονη προσέγγιση για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης σχετίζεται με την ανακάλυψη διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων και προϊόντων φυσικής προέλευσης, τα οποία έχουν την ιδιότητα να μιμούνται το ρόλο των οιστρογόνων και είναι γνωστά ως “φυτο-οιστρογόνα”.

Ως φυτοοιστρογόνα ορίζονται οι μη στερεοειδικές ενώσεις, οι οποίες απαντώνται στα φυτά και παρουσιάζουν οιστρογόνο δράση. Στα φυτοοιστρογόνα ανήκουν πολλές κατηγορίες χημικών ενώσεων μεταξύ των οποίων, ισοφλαβόνες, λιγνάνια, στιλβενοειδή, κουμεστάνες και λακτόνες ρεσορκυλικού οξέος.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη επίδρασης των φυτοοιστρογόνων στην υγεία των οστών ενώ μελετάται η δράση τους ως εναλλακτική θεραπεία αντικατάστασης των οιστρογόνων για την καταπολέμηση της οστεοπόρωσης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Οι Κινέζοι και γενικότερα οι λαοί της Ασίας, που έχουν παράδοση χιλιάδων χρόνων στη χρήση φαρμάκων φυτικής προέλευσης, χρησιμοποιούν το ρίζωμα "Drynariae", ένα παραδοσιακό κορεάτικο φάρμακο, ως ένα από τα κύρια συστατικά σε συνταγές για την αντιμετώπιση οστικών βλαβών [2]. Σήμερα είναι γνωστό ότι το υδατικό εκχύλισμα του φυτού αυτού προωθεί την οστεοβλαστική διαφοροποίηση [3] και η φυτοχημική του ανάλυση έδειξε ότι η δρόγη αυτή είναι πλούσια σε φλαβονοειδή και φαινολικά παράγωγα, τα οποία κατέχουν σημαντική οιστρογονική δράση. Επίσης η σόγια είναι γνωστή για τις οιστρογονικές ιδιότητές της [4][5], ενώ άλλη μια γνωστή δρόγη, με οιστρογονικές ιδιότητες είναι το ρίζωμα του φυτού *Cimicifuga racemosa* (Black Cohosh) [6]. Επιπρόσθετα, υπάρχουν αναφορές για φυτά τα οποία, αν και δεν είναι γνωστά για ανάλογες δράσεις, φέρουν δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν στις κατηγορίες των κλασικών φυτοοιστρογόνων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το είδος *Astragalus membranaceus*, το οποίο περιέχει ισοφλαβονοειδή και έχει αποδειχτεί ότι εμποδίζει την ελάττωση της οστικής μάζας σε επίμυες που είχαν υποστεί ωοθηκεκτομή [7]. Αντίστοιχα δεδομένα παρουσιάστηκαν σε μια μελέτη, κατά την οποία το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Onobrychis ebenoides* (οικ. Leguminosae), το οποίο είναι πλούσιο σε βενζοφουράνια και ισοφλαβονοειδή, φάνηκε ικανό να εμποδίζει την απώλεια οστικής μάζας σε ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες [8].

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης και εκχυλίσματα θαλάσσιων οργανισμών που έχουν έντονη επίδραση στο οστό μέσω ενίσχυσης του σχηματισμού αλλά και καταστολής της απορρόφησής του. Αυτές οι οστεοπροστατευτικές επιδράσεις πραγματοποιούνται μέσω αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών μονοπατιών οδηγώντας σε ενεργοποίηση των οστεοβλαστών και αδρανοποίηση των οστεοκλαστών. Γνωστό για τη δράση του είναι το εκχύλισμα του *Padina pavonica* με κύριο συστατικό τη δικτυόλη, το οποίο περιλαμβάνεται σε συμπληρώματα διατροφής κατά της οστεοπόρωσης, τα οποία φαίνεται να αυξάνουν την πρόσληψη και τη διατήρηση του ασβεστίου. Άλλοι θαλάσσιοι οργανισμοί με παρόμοια δραστικότητα είναι οι *Sargassum horneri*, *Undaria pinnatifida, Sargassum horneri, Eiseniabicyclis, Cryptonemia scmitziana, Gelidium amansii* και *Ulva pertusa Kjellman*. Εκτός από τα θαλάσσια φύκια και σφουγγάρια, διάφορα κυανοβακτηρίδια, μικρόβια και άλλοι μικροοργανισμοί περιέχουν ουσίες που έχουν επίσης μεταβολική δράση στα οστών [9].

Πλήθος μελετών υποστηρίζουν ότι τα φυτοοιστρογόνα θα μπορούσαν να αποτελέσουν ιδανικά θεραπευτικά εργαλεία όχι μόνο για την αντιμετώπιση των ανεπιθύμητων συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης, αλλά και για τη διατήρηση της οστικής μάζας. Συγκριτικά με την κλασική θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης, θεωρείται ότι εμφανίζουν λιγότερες παρενέργειες, αλλά τόσο το γεγονός αυτό, όσο και ο μηχανισμός δράσης τους θα πρέπει να διερευνηθούν περισσότερο με τη διεξαγωγή επιπλέον μελετών, εφόσον τον τελευταίο καιρό αυξάνονται οι έρευνες που δείχνουν ότι η χορήγηση φυτοοιστρογόνων σε πειραματόζωα φαίνεται να συνοδεύεται από σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες [10].

2 ΔΡΟΓΟΒΟΤΑΝΙΚΗ

2.1 Οικογένεια Liliaceae

Η οικογένεια των Liliaceae περιλαμβάνεται στην τάξη (order) Liliales της συνομοταξίας των αγγειόσπερμων (Angiospermae) του φυτικού βασιλείου (Plantae=Flora) και απαριθμεί, σύμφωνα με τα στοιχεία του Unwpwcmc 1.438 taxa (είδη/species, υποείδη/subspecies, ποικιλίες/varieties και μορφές/forms). Σε αυτά, θα πρέπει να προστεθούν: α) 636 taxa της οικογένειας Alliaceae, β) 181 taxa της οικογένειας Colchicaceae, γ) 504 taxa της οικογένειας Hyacinthaceae, δ) 106 taxa της οικογένειας Convallariaceae, ε) 12 taxa της οικογένειας Ruscaceae, και στ) 41 taxa της οικογένειας Trilliaceae, που αν και κατ' άλλα συστήματα ταξινόμησης κατατάσσονται στα Liliaceae, κατά το WCMS, σήμερα κατατάσσονται στις ιδιαίτερες ως άνω οικογένειες. Έτσι ο συνολικός αριθμός των taxa της οικογένειας Liliaceae ανέρχεται στα 2.918, τα οποία κατανέμονται στα κάτωθι 107 γένη και έχει κοσμοπολίτικη εξάπλωση.

Στην οικογένεια αυτή ανήκουν πολλά κοινά καλλιεργούμενα φυτά, όπως η τουλίπα, το κρεμμύδι, το σκόρδο κ.ά. Είναι κυρίως πόες πολυετείς με βολβούς ή ριζώματα και σπανιότερα πολυετή αναρριχώμενα φυτά. Στις τροπικές χώρες ζουν μερικά είδη δενδρώδη, που ανήκουν στα γένη *Dracaena* και *Aloe*. Τα φύλλα τους είναι επιμήκη, παραλληλόνευρα. Τα άνθη τους είναι συνήθως μεγάλα, εντυπωσιακά, με ωραία χρώματα, όπως λευκό, ιώδες, κυανό, κίτρινο και κόκκινο. Έχουν περιγόνιο από 6 τέπαλα ελεύθερα ή συμφυή τοποθετημένα σε δύο σπονδύλους. Οι στήμονες είναι συνήθως 6, τοποθετημένοι και αυτοί σε δυο σπονδύλους, ενώ η ωοθήκη αποτελείται από 3 καρπόφυλλα και είναι επιφυής. Ο καρπός είναι κάψα τοιχορραγής ή ραξ.

Στα Liliaceae, που διαιρούνται σε 6 υποοικογένειες, ανήκουν πολλά φυτά, τα οποία καλλιεργούνται ως διακοσμητικά. Μεταξύ αυτών είναι είδη των γενών *Lilium*, όπως το *Lilium candidum* (κν. Κρίνος της Παναγίας, Tulipa, Ruscus, Convallaria (κν. Μυγκές), *Hyacinthus* (κν. ζουμπούλι) κ.ά. [11].
Παρακάτω παρουσιάζεται η γεωγραφική εξάπλωση φυτών της οικογένειας Liliaceae [12].

Σχήμα 2-1 Γεωγραφική εξάπλωση φυτών της οικοογένειας Liliaceae

2.2 Γένος *Allium*

2.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά του γένους *Allium*

Το γένος *Allium* περιλαμβάνει πολυετή γεώφυτα βολβώδη ή σπανιότερα, ριζωματώδη, ποικίλης μορφολογίας και μεγέθους [από πολύ μικρό (π.χ. *A. chamemoly*) μέχρι και περισσότερο από 1.5m]. Οι βασικές μορφολογικές δομές χρήσιμες από ταξινομική άποψη περιγράφονται στις παρακάτω ενότητες.

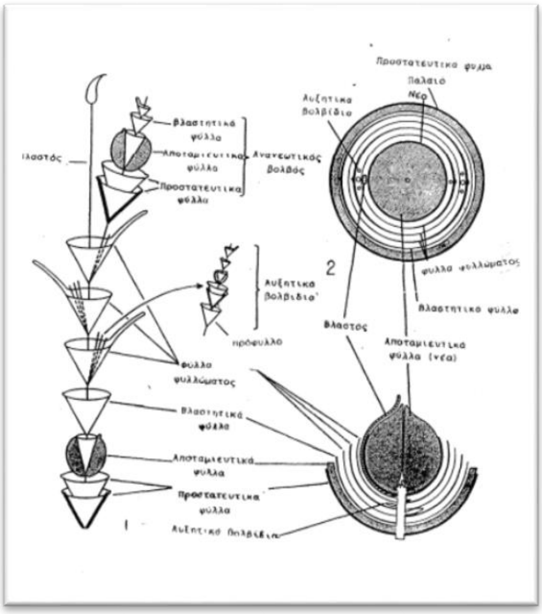
- ΒΟΛΒΟΣ

Το σχήμα, το μέγεθος των βολβών αλλά κυρίως η υφή των εξωτερικών τους χιτώνων (Σχήμα 2-2) έχουν ιδιαίτερη σημασία για τον χαρακτηρισμό και την συστηματική κατάταξη των ειδών. Χαρακτηριστικό γνώρισμα μπορεί επίσης να θεωρηθεί η ύπαρξη ή μη, αυξητικών βολβιδίων, καθώς και η μορφολογία και η θέση τους σε σχέση με τον βλαστό. Ο βολβός συγκροτείται από ένα σύνολο μεταμορφωμένων φύλλων. Σύμφωνα με τον Mann (1960) και τους Pastor & Valdes (1985) σε ένα βολβό μπορούμε να διακρίνουμε από το εξωτερικό προς το εσωτερικό τα εξής τμήματα (Σχήμα 2-2):

-Προστατευτικά φύλλα (χιτώνες) : χρώματος φαιού ή καστανού, μεμβρανώδη ή παχύτερα και σκληρά, ή ινώδη (δικτυωτά ή μη) βοθριόγλυπτα ή λεία.

-Αποταμιευτικά φύλλα [storage leaves]: παρατηρούνται μόνο στους κύριους ανανεωτικούς βολβούς και συνήθως καταναλώνονται κατά την διάρκεια της αυξητικής περιόδου.

- Φύλλα βλαστητικά : είναι τα πρώτα που εμφανίζονται όταν ο βολβός αρχίζει να βλαστάνει, δεν σχηματίζουν έλασμα και μόλις προεξέχουν από το έδαφος. Περικλείουν την βάση των κυρίως φύλλων του φυλλώματος, ή και ολόκληρα τα φύλλα στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης τους.



Σχήμα 2-2 Σχηματική αναπαράσταση της δομής του βολβού του *A.neapolitanum*

- Φύλλα φυλλώματος: είναι τα κανονικά φύλλα και έδρα της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας.

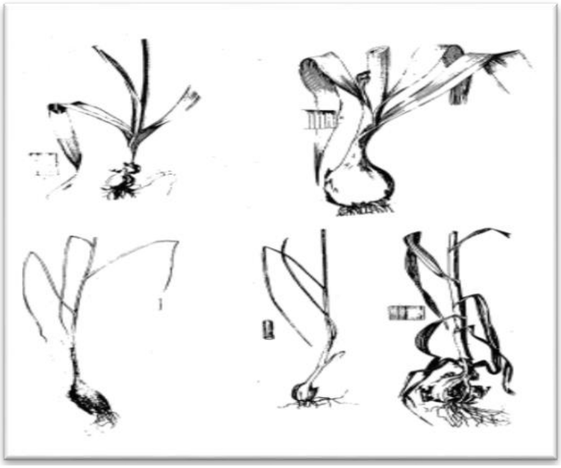
- Φύλλα φυλλώματος αποταμιευτικά: έχουν ιδιότητες φωτοσυνθετικές στο έλασμα τους και αποταμιευτικές στη βάση τους.

- Αυξητικά βολβίδια: Είναι οργανίδια μικρού μεγέθους που απαντούν και χαρακτηρίζουν πολλά είδη του γένους. Εμφανίζονται στην μασχάλη των φύλλων του φυλλώματος, ένα ή πολλά ταυτόχρονα και μπορεί να είναι έμμισχα ή άμισχα. Σε μερικά είδη τα αυξητικά βολβίδια εμφανίζονται κοντά στην βάση του υπέργειου τμήματος του βλαστού μεταξύ των κολεών των φύλλων (η.χ. *A. sphaerocephabn*). Το κάθε ένα περιβάλλεται από συνήθως ένα δερματώδες, καστανό περίβλημα).

- Ανανεωτικός βολβός: Είναι ο αρκετά ευμεγέθης νεοσχηματισμένος βολβός, από τον οποίο θα προέλθει ένα νέο φυτό την επόμενη βλαστητική περίοδο. Όλα τα προαναφερθέντα τμήματα μπορούν να παρατηρηθούν σε ημιτελή μορφή στον βολβό αυτό.

- **<u>ΒΛΑΣΤΟΣ</u>**

Προέρχεται από την δραστηριοποίηση του ανανεωτικού βολβού και καταλήγει στην ταξιανθία. Είναι ευδιάκριτος, όρδιος ή συχνά κεκαμμένος στο επάνω τμήμα του (π.χ. *A.neapolitanum, A.staticiforme, A.guttatum*), λείος ποικίλου μεγέθους (αν και σε ορισμένα είδη φαίνεται να είναι υποτυπώδης π.χ. *A.chamaemoly*). Στην πλειοψηφία των ειδών είναι κυλινδρικός και μερικές φορές διογκωμένος και κοίλος (π.χ. *A.cepa*), ή σπανιότερα γωνιώδης (σχήμα οριζόντιας τομής τριγωνικό π.χ. *A. neapolitanum*).



Σχήμα 2-3 Τύποι βολβών, βλαστών, φύλλων που απαντούν σε είδη του γένους *Allium*

- **<u>ΦΥΛΛΩΜΑ</u>**

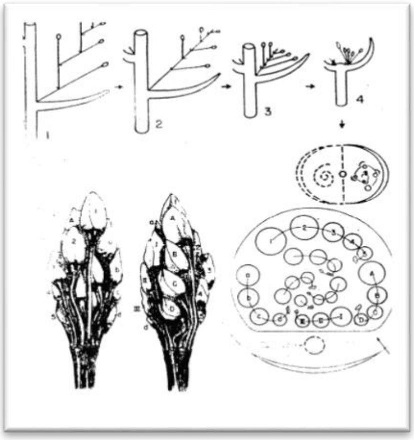
Το φύλλωμα και ιδιαίτερα το έλασμα των φύλλων εμφανίζει αξιοσημείωτη ποικιλομορφία στα είδη του γένους *Allium*. Αρκετά από τα χαρακτηριστικά του φυλλώματος θεωρούνται χρήσιμα ταξινομικά γνωρίσματα. Σαν τέτοια μπορούμε να αναφέρουμε το μέγεθος και την μορφολογία του ελάσματος των φύλλων (γραμμοειδή, πεπλατυσμένα, επίπεδα ή σχηματίζοντας τρόπιδα, κυλινδρικά, ημικυλινδρικά και αυλακοειδή, κοίλα, σωληνοειδή κλπ.) (Σχήμα 2-3) την παρουσία ή απουσία κολεών και τριχώματος.

- **<u>ΣΠΑΘΗ</u>**

Μεγάλη συστηματική αξία έχει το σχήμα και η μορφολογία των σχηματισμών εκείνων που περιβάλλουν και προστατεύουν τα άνθη της ταξιανθίας (σπάθη) στα πρώτα στάδια ανάπτυξης της. Η σπάθη μπορεί να είναι μακρύτερη ή βραχύτερη από τους ποδίσκους, ενιαία, απλή ή διαχωριζόμενη κατά ποικίλους τρόπους σε λοβούς. Σε μερικά είδη (π.χ. sect. *Codonoprasum*) η σπάθη αποτελείται από δύο ξεχωριστά τμήματα (διμερής), ίσα ή άνισα μεταξύ τους. Μπορεί να είναι επίσης εύπτωτη πριν την άνθηση ή παραμένουσα κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας.

- **<u>ΤΑΞΙΑΝΘΙΑ</u>**

Η ταξιανθία σχηματίζεται στην κορυφή του βλαστού και στα περισσότερα είδη δίνει την εντύπωση σκιαδίου. Στην ουσία όμως και σύμφωνα με λεπτομερείς παρατηρήσεις, πρόκειται για μια συνένωση αρκετών βοστρύχων (ή ελικοειδών κορύμβων με φορά δεξιόστροφη ή αριστερόστροφη). Σε κάθε βόστρυχο η άνθηση εκτυλίσσεται με αυστηρή διαδοχή από το πρωτοεμφανιζόμενο άνθος μέχρι το νεώτερο. Αν και η άνθηση αρχίζει από τους περιφερειακούς βοστρύχους, ωστόσο υπάρχει κάποια σχετική αλληλοεπικάλυψη μεταξύ τους, με αποτέλεσμα η άνθηση των κεντρικών βοστρύχων να αρχίζει πριν να ολοκληρωθεί η άνθηση των περιφερειακών. Το σχήμα της ταξιανθίας είναι συνήθως σφαιρικό, ημισφαιρικό, περισσότερο ή λιγότερο ελλειψοειδές, ή ανεστραμμένου κώνου (Εικόνα 2-4-α).

Σχήμα 2-4 α) Αναλυτική δομή ταξιανθίας (sect. Molium). β) διαδοχικά στάδια διαφοροποίησης των ανθέων κατά την άνθηση

Το μέγεθος και η μορφή της είναι συνάρτηση του αριθμού των ανθέων που περιλαμβάνει καθώς και του μήκους των ποδίσκων. Σε μερικά είδη στην ταξιανθία παρατηρείται μερική ή ολική αντικατάσταση των ανθέων από άμισχα βολβίδια. Σε ορισμένα είδη υπάρχουν στην βάση των ποδίσκων ή των βοστρύχων ένα ή περισσότερα δευτερογενή βράκτεια.

- **<u>ΑΝΘΗ</u>**

Το άνθος είναι σύνθετη δομή και έχει ιδιαίτερη ταξινομική αξία τόσο στο σύνολο του όσο και στα επιμέρους τμήματα του. Τα τμήματα του που έχουν ιδιαίτερη σημασία και θα συζητηθούν παρακάτω είναι το περιάνθιο, οι στήμονες και ο ύπερος (ωοθήκη, στύλος).

<u>Περιάνθιο</u>

Περιάνθιο εξαμερές, με τέπαλα συνήθως ομοιόμορφα ως προς το χρώμα, το σχήμα ή το μέγεθος. Το σχήμα του μπορεί να αστερόμορφο κωδωνοειδές ή κυπελλοειδές. Τα τέπαλα είναι ελεύθερα ελαφρώς αλληλοεπικαλυπτόμενα στη βάση τους και συχνά εμφανίζουν μικροσκοπική θυλώδη υφή (Σχήμα 2-5). Το χρώμα τους μπορεί να είναι λευκό, ρόδινο, ιώδες, πορφυρό ανοιχτόχρωμο ή σκούρο, κίτρινο ή κιτρινοπράσινο και συνήθως με εντονότερη χρώση στο κεντρικό νεύρο.

Σχήμα 2-5 Τύποι περιάνθιων

<u>Οι στήμονες</u>

Οι στήμονες είναι έξι και φύονται από την βάση των τεπάλων. Ταξινομική αξία έχει το μέγεθος τους συγκριτικά με αυτό των τεπάλων (βραχύτεροι ή μεγαλύτεροι). Τα νήματα τους είναι συνήθως πεπλατυσμένα στην βάση και συμφύονται σχηματίζοντας ένα δακτύλιο. Οι στήμονες μπορεί να είναι είτε όμοιοι μεταξύ τους, απλοί (σπανιότερα τρισχιδείς), είτε ανόμοιοι (π.χ. sect. *Allium*), οπότε οι τρεις εξωτερικοί είναι απλοί, ενώ οι τρείς εσωτερικοί είναι τρισχιδείς (Σχήμα 2-6).

Στην δεύτερη περίπτωση, το σχήμα και η σχέση του μεγέθους των προεξοχών αυτών των εσωτερικών στημόνων και του ελάσματος της βάσης χρησιμοποιείται επίσης σαν ταξινομικό χαρακτηριστικό.

Σχήμα 2-6 Στήμονες εσωτερικοί και εξωτερικοί, απλοί και τρισχιδεί

Ύπερος

Η ωοθήκη μπορεί να είναι σφαιρική ή ωοειδής, με ή χωρίς μίσχο, συνήθως λεία ή σπανιότερα με υφή θυλοειδή. Συνήθως είναι τρίχωρη με δύο κυρίως σπερμοβλάστες σε κάθε χώρο αν και σε ορισμένα είδη παρατηρούμε μεγαλύτερο αριθμό σπερμοβλαστών. Ο στύλος είναι νηματοειδής, βραχύς, γυνοβασικός. Το στίγμα είναι απλό (πολύ σπάνια τρίλοβο).

- **ΚΑΡΠΟΣ**

Κάψα μεμβρανώδης, τριγωνική, τρίχωρη, με 1-2 και σπανιότερα περισσότερα σπέρματα σε κάθε χώρο. Τα σπέρματα είναι μαύρα γωνιώδη (συνήθως τριγωνικά) ή σφαιρικά. [13],[14],[15]

2.2.2 Είδη φυτών που συγκαταλέγονται στο γένος *Allium*.

Παρακάτω παρουσιάζεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας με μερικά από τα είδη φυτών που συγκαταλέγονται στο γένος *Allium*.

Πίνακας 2-1 Συγκεντρωτικός πίνακας με μερικά από τα είδη και υπο- είδη φυτών που συγκαταλέγονται στο γένος *Allium*

Βασίλειο/ Kingdom: ΦΥΤΑ/ PLANTAE Συνομοταξία/Division: ANGIOSPERMAE Τάξη/Order: LILIALES Οικογένεια/ Family: LILIACEAE Γένος *Allium* (σήμερα θεωρείται ότι ανήκει στην οικογένεια ALLIACEAE)
Τάξα
A. aaseae, A. a-bolosii, A. achaicum, A. acutangulum, A. acutiflorum, A. aethusanum, A. affine, A. albanum, A. albidum, A. albiflorum, A. album, A. alpinarii, A. alpinum, A. altaicum, A. ambiguum, A. amblyanthum, A. amethystinum, A. ammophilum, A. amoenum, ***A. ampeloprasum,*** ***A. ampeloprasum ssp. ampeloprasum,*** ***A. ampeloprasum ssp.:var. ampeloprasum: ampeloprasum,*** ***A. ampeloprasum ssp.: var. ampeloprasum: babingtonii,*** ***A. ampeloprasum ssp.:var. ampeloprasum: bulbiferum,*** ***A. ampeloprasum ssp.:var. ampeloprasum: bulbilliferum,*** ***A. ampeloprasum ssp.:var. ampeloprasum: commutatum,*** ***A. ampeloprasum ssp.:var. ampeloprasum: holmense,*** ***A. ampeloprasum ssp.:var. ampeloprasum: porrum,*** ***A. ampeloprasum var. atroviolaceum,*** ***A. ampeloprasum ssp. bimetrale,***

A. ampeloprasum ssp. leucanthum,
A. ampeloprasum ssp. porrum,
A. amphipulchellum, A. amplectens, A. angulosum, A. antoni-bolosii, A. armenum, A. armerioides, A. artemisietorum, A. arvense, A. ascalonicum, A. assimile, A. atropurpureum, A. atrorubens, A. atroviolaceum, A. auctum, A. auriculatum, A. autumnale, A. azaurenum, A. babingtonii, A. balansae, A. baytopiorum, A. bellulum, A. bimetrale, A. blomfieldianum, A. bolosii, A. bornmuelleri, A. bourgeaui, A. brevicaule, A. breviradium, A. bulgaricum, A. burlewii, A. caeruleum, A. caespitosum, A. calamarophilon, A. callidictyon, A. callimischon, A. canadense , A. cappedocicum, A. carinatum, , A. carneum, A. caspium, A. cassium var. hirtellum, A. cepa, A. chamaemoly, A. chamaespathum, A. chrysonemum, A. cilicicum, A. circinnatum, A. cirrhosum, A. clusianum, A. coeruleum, A. columbianum, A. commutatum, A. compactum, A. confertum, A. confusum, A. constrictum, A. controversum, A. convallarioides, A.coppoleri, A. cornutum, A. coryi, A. crameri, A. cratericola, A. crenulatum, A. crispum, A. cristatum, A. cupani, A. cuthbertii, A. cyrilli, A. czelghauricum, A. dalmaticum, A. davisiae, A. decidum, A. decipiens, A. delicatulum, A. descendens, A. dictuon, A. dilatatum, A. dioscoridis, A. djimilense, A. drusorum, A. ebusitanum, A. eldivanense, A. elmendorfii, A. ericetorum, A. erubescens, A. erythraeum, A. euboicum, A. eugenii, A. fallax, A. favosum, A. fimbriatum, A. firmotunicatum, A. fistulosum, A. flavescens, A. flavum, A. foliosum, A. fragrans, A. frigidum, A. fuscum, A. gaditanum, A. gayi, A. geyeri, A. globosum, A. glumaceum, A. gomphrenoides, A. gooddingii, A. gorumsense, A. goulimyi, A. grande, A. gredense, A. grosii, A. guicciardii, A. gunibicum, A. guttatum, A. heldreichii, A. hickmanii, A. hierochuntinum, A. hirsutum, A. hirtovaginatum, A. hirtovaginum, A. hoffmanii, A. horvatii, A. howellii, A. huber-morthii, A. hyalinum, A. hymenorhizum, A. hymettium, A. hypsistum, A. ilgazense, A. inaequale, A. incisum, A. inderiense, A. insubricum, A. integerrimum, A. intermedium, A. isauricum, A. jajlae, A. jepsonii, A. jubatum, A. karamanglui, A. karyateini, A. kastambulense, A. kermesinum, A. kochii, A. koenigianum, A. kurtzianum, A. lacunosum, A. lacunosumvar. davisiae, A. lehmanii, A. leonidii, A. leucanthum, A. lineare,A. lojaconoi, A. longanum, A. longicuspis, A. longispathum, A. lopadosanum, A. loratum, A. loscosii, A. lusitanicum, A. luteolum, A. macedonicum, A. macrostemum, A. madidum, A. magicum, A. majus, A. mareoticum, A. margaritaceum, A. mariae, A. maritimum, A. marschallianum, A. massaessylum, A. melanantherum, A. melananthum, A. meliophilum, A. melitense, A. meteoricum, A. microbulbum, A. microspathum, A. modestum, A. moly, A. monanthum, A. montanum, A. monticola, A. moschatum, A. multibulbosum, A. multiflorum, A. munzii, A. myrianthum, A. narcissiflorum, A. neapolitanum, A. nebrodense, A. negrianum, A. nemrutaghense, A. neriniflorum, A. nevii, A. nevsehirense, A. nigrum, A. obliquum, A. obtusiflorum, A. ochroleucum, A. odorum, A. oleraceum, A. oltense, A. olympicum, A. opacum, A. ophioscorodon, A. orientale, A. oschaninii, A. oxyphilum, A. paczoskianum, A. palentinum,
A. pallens, A. paniculatum, A. paradoxum, A. parciflorum, A. pardoi, A. parishii, A. parnassicum, A. passeyi, A. paulii, A. pedemontanum, A. pendulinum, A. peninsulare, A. perdulce var. sperryi, A. permixtum, A. peroninianum, A. pervestitum, A. phalareum, A. phrygium, A. phthioticum, A. pilosum, A. pleianthum, A. podolicum, A. polyanthum, A. porrum, ***A. porrum ssp. eu-ampeloprasum****, A. praescissum, A. preslianum, A. proponticum, A. pruinatum, A. pseudoflavum, A. pseudopulchellum, A. pskemense, A. pulchellum, A. pumilum, A. punctum, A. purpurascens, A. purpureum, A. pyrenaicum, A. qasyunense, A. regelianum, A. regnieri, A. rhetoreanum, A. rhodopeum, A. rilaense, A. riparium, A. robertianum, A. robinsonii, A. rollii, A. roseum, A. rothii, A. rotundum, A. rouyi, A. roylei, A. rubellum, A. rubens, A. rubrovittatum, A. ruhmerianum, A. runyonii, A. rupestre, A. sabulosum, A. sanbornii, A. sandrasicum, A. sardoum, A. sardoum, A. sativum, A. savranicum, A. saxatile, A. scaberrimum, A. scabriflorum, A. schergianum, A. schmitzii, A. schoenoprasum, A. schugnanicum, A. scilloides, A. scopulicola, A. scorodoprasum, A. scorzonerifolium, A. scythicum, A. segetum, A. seirotrichum, A. senescens, A. sergii, A. serra, A. serratum, A. shatakiense, A. shevockii, A. sibiricum, A. sibthorpianum, A. siculum, A. sieheanum, A. sinaiticum, A. sintenisii, A. sipyleum, A. siskiyouense, A. sivasicum, A. sosnowskyanum, A. spathaceum, A. speculae, A. sphaerocephalon, A. sphaeropodum, A.*

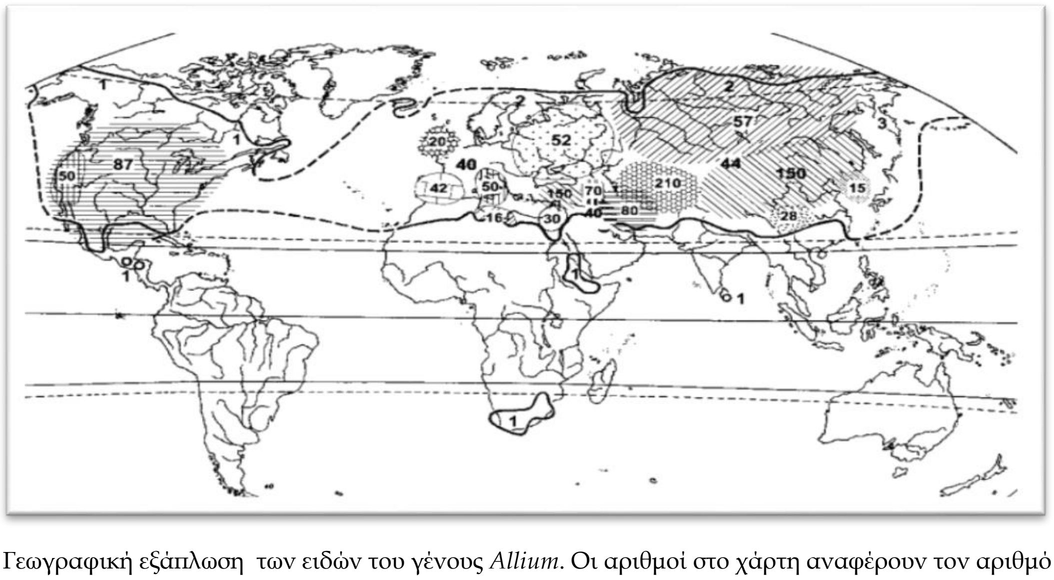
stamineum, A. staticiforme, A. stearnianum, A. stearnii, A. stelleranum, A. stenopetalum, A. stipitatum, A. stojanovii, A. stracheyi, A. stracheyo, A. stramineum, A. strictum, A. stylosum, A. suaveolens, A. subhirsutum, A. subvillosum, A. suwurowii, A. talijevii, A. tardans, A. tauricola, A. tauricum, A. tchihatschewii, A. tenuiflorum, A. thracicum, A. togashii, A. trachypus, A. transtaganum, A. transvestiens, A. trautvetteranum, A. tribracteatum, A. trichocnemis, A. trifoliatum, A. triquetrum, A. tuberosum, A. tuolumnense, A. ucrainicum, A. ursinum, A. valdecallosum, A. validum, A. variegatum, A. vavilovii, A. victorialis, A. vineale, A. virguncule var. kiiense, A. vuralii, A. waldsteinii, A. webbii, A. weissii, A. welwitschii, A. wendelboanum, , A. willdii, A. willeanum, A. xanthicum, A. yosemitense [16]

2.2.2.1 *Καλλιεργούμενα είδη*

Μερικά είδη του γένους *Allium* είναι από τα πιο γνωστά καλλιεργούμενα λαχανικά, όπως το κρεμμύδι (*Allium cepa L.*), το σκόρδο (*Allium sativum L.*) και το πράσο (*Allium porrum L.*). Τα είδη αυτά καλλιεργούνται σε όλο τον κόσμο. Άλλο καλλιεργούμενο είδος λιγότερο γνωστό στο ευρύ κοινό είναι το σχοινόπρασο (*Allium schoenoprasum L.*), γνωστό διεθνώς ως chives.[15]

2.2.3 Γεωγραφική εξάπλωση φυτών του γένους *Allium*

Το γένος *Allium* περιλαμβάνει περίπου 600-700 είδη και έχει ευρύτατη εξάπλωση, σε όλο σχεδόν το Βόρειο Ημισφαίριο (Ασία, Ευρώπη και Β. Αμερική). Αρκετοί αντιπρόσωποι του απαντούν σχεδόν συνεχόμενα από την Πορτογαλία στον Ατλαντικό ωκεανό, μέχρι την Ιαπωνία στις ακτές του Ειρηνικού ωκεανού. Το κέντρο εξέλιξης του βρίσκεται στην Ασία (Ν.Ρωσσία, Τουρκία, Ιράν, Αφγανιστάν). Στην Ευρώπη σημαντική είναι η παρουσία του στην περιοχή της Μεσογείου και ιδιαίτερα στην Βαλκανική χερσόνησο [14]. Όσον αφορά την Ελλάδα, το γένος *Allium* εμφανίζει τους περισσότερους αντιπροσώπους, περίπου 85 (σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα δεδομένα), από οποιονδήποτε άλλο ευρωπαϊκό χώρο. Αποτελεί το 50% των ειδών που είναι γνωστά σε όλη την Ευρώπη και το 85% των ειδών της Βαλκανικής χερσονήσου. Από πολλούς βοτανικούς, ο ελληνικός χώρος θεωρήθηκε ένα δευτερογενές κέντρο εξέλιξης για το γένος *Allium* εξαιτίας, κυρίως, της γεωγραφικής θέσης, της παλαιογεωγραφίας του, της γεωμορφολογίας και των κλιματολογικών ιδιαιτεροτήτων του [17].



Σχήμα 2-7 Γεωγραφική εξάπλωση των ειδών του γένους *Allium*. Οι αριθμοί στο χάρτη αναφέρουν τον αριθμό των ειδών που βρίσκονται σε κάθε περιοχή.

2.3 Είδος *Allium ampeloprasum*

2.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά του είδους *Allium ampeloprasum*

Το *Allium ampeloprasum* είναι ένα είδος άγριου πράσου και θεωρείται ο πρόγονος του ήμερου πράσου. Χαρακτηρίζεται από βολβό ευρέως ωοειδή έως σφαιρικό, διαμέτρου 1.2-5.5 cm. Εξωτερικοί χιτώνες μεμβρανώδεις, χρώματος φαιού, εύκολα διαχωριζόμενοι. Αυξητικά βολβίδια πολλά, σχήματος περίπου σφαιρικού ή περικεφαλαίας, διαστάσεων 2-3 x 2-6 mm, χρώματος κιτρινωπού, με ή χωρίς μίσχο, τα οποία παραμένουν πολύ κοντά στον πατρικό βολβό ακόμα και μετά την αποσύνδεση του χιτώνα που τα περιβάλλει. Βλαστός εύρωστος και λείος, καλυμμένος με τους κολεούς των φύλλων περίπου μέχρι το μέσον του 50-160 cm. Φύλλα 5-12, επίπεδα, πεπλατυσμένα, με τρόπιδα και οδοντωτά άκρα, πλάτους 0.5-2.5cm. Σπάδη μεμβρανώδης, απλή, εύπτωτη μήκους μέχρι 9cm. Ταξιανθία πυκνή, συνήθως σφαιρική, με πολλά άνθη διαμέτρου 3.5-8 cm. Ποδίσκοι πράσινοι ή ερυθρωποί ή καστανοί μήκους 2-4.5 cm αρκετές φορές μακρύτεροι από το περιάνθιο. Περιάνθιο κυπελλόσχημο ή ευρύ κωδωνοειδές, διαστάσεων 5 x 4.5 – 5 mm. Τέπαλα ισομήκη, μη αλληλοεπικαλυπτόμενα, ρόδινα, σκουρόχρωμα ερυθρά, ή λευκά με κεντρικό νεύρο συχνά πράσινο και με λεία ή ξυλώδη υφή (ιδιαίτερα κοντά στην περιοχή του κεντρικού νεύρου). Τα εξωτερικά κοίλα, επιμήκη και οξύληκτα, τα εσωτερικά ευρέως ωοειδή, με αμβλέα άκρα που σχηματίζουν μικρή προεξοχή στο κέντρο, διαστάσεων 5xl.5-2cm. Στήμονες εξερχόμενοι, οι τρείς εξωτερικοί με απλά οβελοειδή νήματα, πλάτους 0.5-lmm στη βάση τους, οι τρείς εσωτερικοί με νήματα τρισχιδή των οποίων το έλασμα βάσης είναι πλατύτερο (περίπου ίσο με το πλάτος των τεπάλων) και έχει μήκος σχεδόν διπλάσιο από το κεντρικό ανθηροφόρο τμήμα, τα πλευρικά τμήματα πολύ μακρύτερα του κεντρικού, λεπτότερα και συστραμμένα. Ανθήρες κίτρινοι ή πορφυρόχρωμοι. Στύλος εξερχόμενος. Κάπα διαμέτρου 4mm.

Σχήμα 2-8 Αντιπροσωπευτική εικόνα του *Allium ampeloprasoum*

Εποχή άνθησης: Απρίλιος -Μάιος

Καταναλώνεται από το Φεβρουάριο έως το Μάιο [13],[18].

Η συστηματική ταξινόμηση του είδος *Allium ampeloprasum* παραθέτεται παρακάτω [19]:

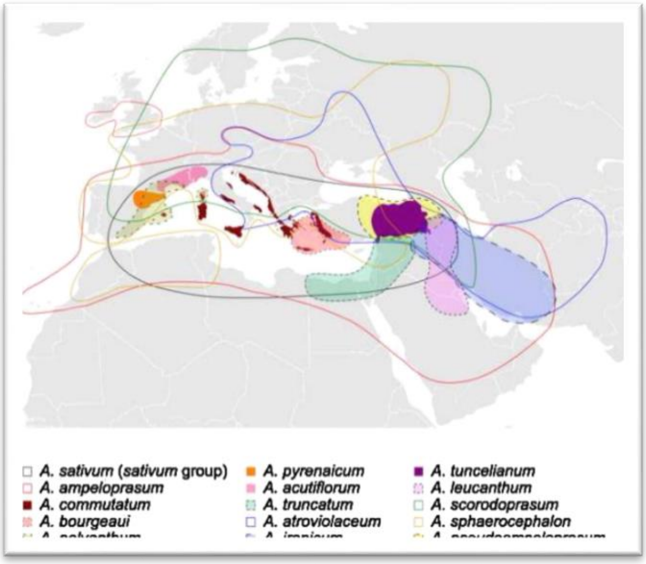
Πίνακας 2-2 Συστηματική ταξινόμηση του φυτού *Allium ampeloprasum*

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ		
	Βασίλειο:	Φυτά (Plantae)
	Συνομοταξία ή Άθροισμα:	Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)
	Ομοταξία ή Κλάση:	Μονοκοτυλήδονα (Liliopsida)
	Τάξη:	Λειριώδη (Liliales)
	Οικογένεια:	Λειριοειδή (Liliaceae)
	Γένος:	Άλλιο (*Allium*)
	Είδος:	*A. ampeloprasum*
	Κοινή ονομασία	Αγριόπρασο

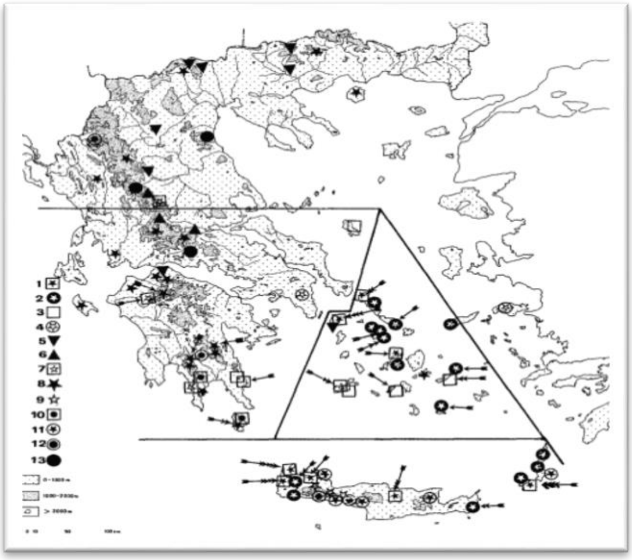
2.3.2 Γεωγραφική εξάπλωση φυτών του είδους *Allium ampeloprasum*

Το *Allium ampeloprasum* είναι ιδιαίτερα ποικιλόμορφο είδος των περιοχών της Μεσογείου και ορισμένων χωρών της Μαύρης Θάλασσας, με την εξάπλωση του να ευνοείται από τον άνθρωπο, εμφανίζεται επίσης ως επιγενές στην Βορειοανατολική Ευρώπη και το Ηνωμένο Βασίλειο, Β. Αφρική, Τουρκία, Δ. Συρία, Β. Ιράκ, Ιράν [20] [21].

Όσον αφορά την Ελλάδα το *Allium ampeloprasum* είναι το είδος εκείνο στο οποίο έχουν αναφερθεί τα υψηλότερα επίπεδα πολυπλοειδίας για το γένος *Allium* στον Ελληνικό χώρο. Είναι διεσπαρμένο σ' όλη την Ελλάδα. Το βρίσκουμε στην Αμοργό κυρίως στα Κατάπολα και την Αιγιάλη, ενώ αναφέρεται και στην χώρα. Υπάρχει και στην Ηρακλειά, και επίσης στα νησιά Κουφονήσι και Λιάδι [17]. Ενώ σχετικά με το βιότοπο, το *Allium ampeloprasum* το συναντάμε κατά κανόνα σε θέσεις που χαρακτηρίζονται από έντονη ανθρωπογενή δραστηριότητα, χέρσες ή καλλιεργούμενες εκτάσεις και πρανή δρόμων της πεδινής και ημιορεινής ζώνης, δάση Πεύκης, βραχώδεις χαράδρες, ελαιώνες, χαλάσματα, αμμώδεις παραλίες [13].



α)



β)

Σχήμα 2-9 Γεωγραφική εξάπλωση των ειδών του γένους *Allium* και ειδικά του είδους 1⊠ = *A. Ampeloprasum στον κόσμο α) και* στην Ελλάδα β)

3 ΔΡΟΓΟΧΗΜΕΙΑ

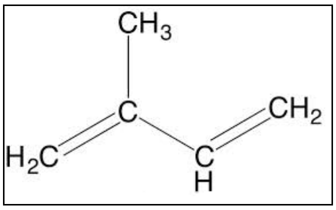
3.1 Δρογοχημεία του γένους *Allium*

3.1.1 Δευτερογενείς Μεταβολίτες

Ως δευτερογενής μεταβολισμός, ορίζεται μια μεταβολική δραστηριότητα που έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μεταβολικών προϊόντων τα οποία παράγονται μόνο σε επιμέρους ιστούς όργανα και σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης. Η δράση τους στα φυτά συνήθως σχετίζεται με την ρύθμιση του μεταβολισμού και/ή της αύξησης, την απόδοση του αρώματος και του χρωματισμού των τμημάτων του φυτού και την προστασία έναντι παθογόνων οργανισμών. Αν και ο δευτερογενής μεταβολισμός γενικά αποτελεί το 10% του συνολικού μεταβολισμού στα φυτά ωστόσο, τα προϊόντα του αποτελούν τα κύρια συστατικά με φαρμακολογική δράση. Παρακάτω παρουσιάζονται μερικές από τις κυριότερες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν απομονωθεί από φυτά του γένους *Allium.*

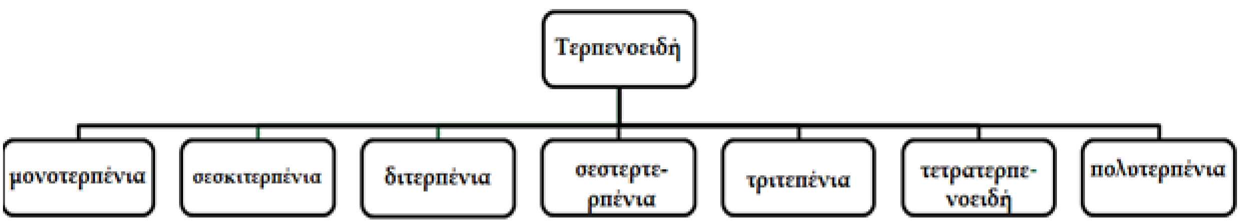
3.1.1.1 *Τερπένια*

Τα τερπενοειδή ή τερπένια αποτελούν την πιο δομικά ποικίλη κατηγορία των φυτικών φυσικών προϊόντων. Όλα τα τερπενοειδή, προέρχονται από επαναληπτική σύντηξη μονάδων με πέντε άνθρακες, που βασίζονται στον σκελετό του ισοπεντανίου. Αυτά τα μονομερή γενικά αναφέρονται ως μονάδες ισοπρενίου καθώς η θερμική αποσύνθεση πολλών τερπενοειδών αποδίδει αέριο ισοπρένιο ως προϊόν. Σε κατάλληλες χημικές συνθήκες το ισοπρένιο πολυμερίζεται σε μακρομόρια που περιέχουν αριθμό ατόμων άνθρακα πολλαπλάσιο του πέντε, δημιουργώντας έτσι πολυάριθμους σκελετούς τερπενοειδών.
Τα μικρότερα τερπενοειδή περιέχουν μια μονάδα ισοπρενίου και ονομάζονται ημιτερπενοειδή. Το πιο γνωστό είναι το ίδιο το ισοπρένιο, ένα πτητικό προϊόν που εκλύεται από φωτοσυνθετικά ενεργούς ιστούς.



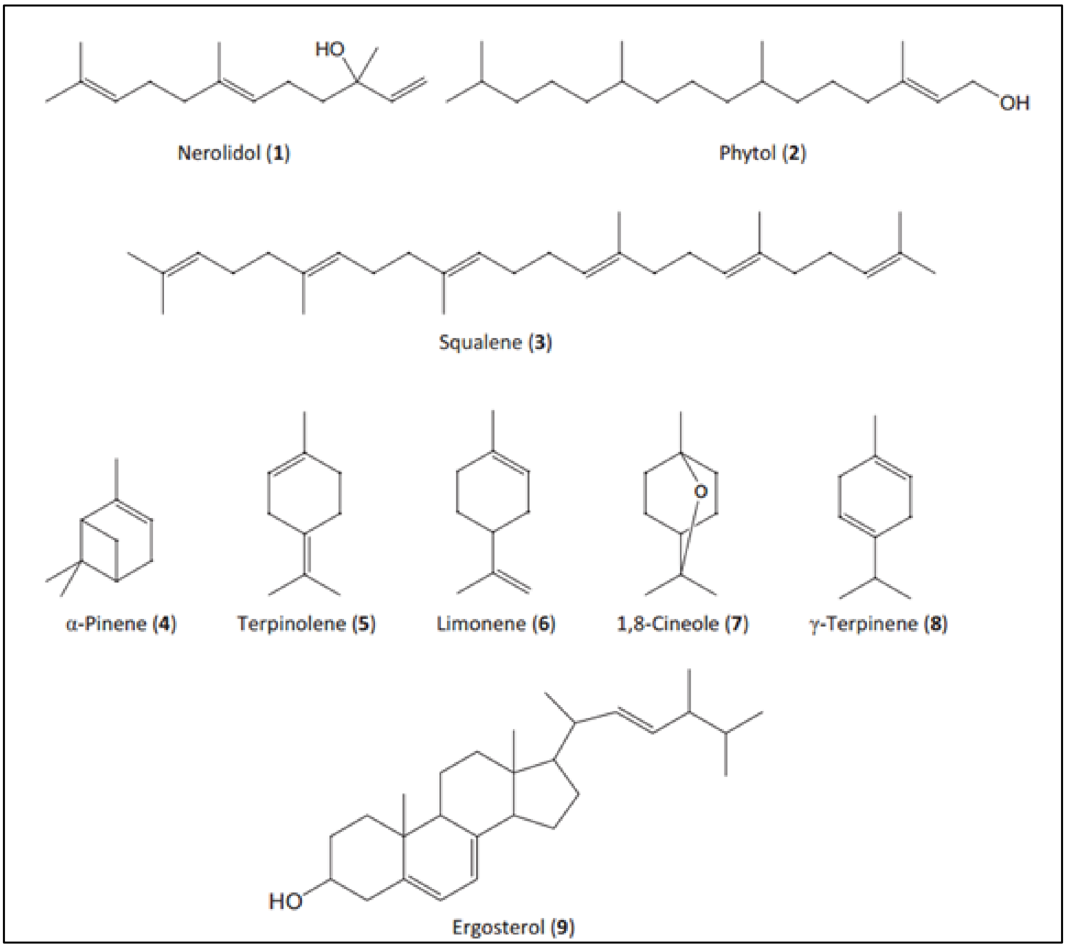
Σχήμα 3-1 Δομή ισοπρενίου

Ανάλογα με τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου διαιρούνται σε μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, διτερπένια, σεστερτερπένια, τριτερπένια και πολυτερπένια.



Σχήμα 3-2 Κατηγοριοποίηση Τερπενοειδών**[22]**

Παρακάτω παρουσιάζονται μερικά από τα πιο συνήθης τερπενοειδή που έχουν απομονωθεί από φυτά του γένους *Allium* [23].



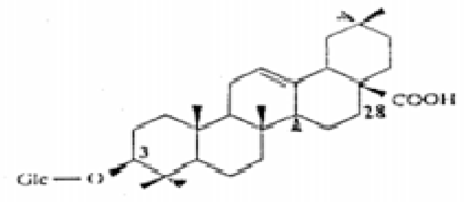
Σχήμα 3-3 Αντιπροσωπευτικές ενώσεις τερπενοειδών που έχουν απομονωθεί από φυτά του γένους *Allium*.

3.1.1.2 <u>Σαπωνίνες και Σαπωγενίνες</u>

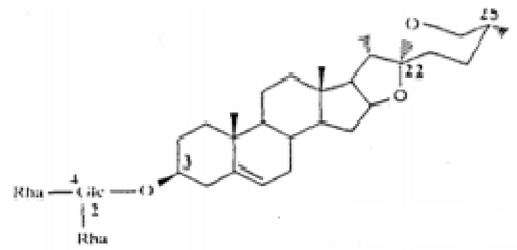
Οι σαπωνίνες είναι γλυκοσιδικά συστατικά με ευρεία κατανομή στο φυτικό βασίλειο. Χαρακτηρίζονται από την ιδιότητα τους να αφρίζουν, να αιμολύουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια και την ιχθυοκτόνο τους δράση. Το όνομα τους, το οποίο προέρχεται από τη λέξη σάπων, υποδηλώνει μια από τις πιο παλιές χρήσεις των φυτών που τις παράγουν. Τα φυτικά είδη στα οποία έχουν βρεθεί σαπωνίνες είναι πάνω από 500 και ανήκουν σε περισσότερες από 90 οικογένειες. Στο ζωικό βασίλειο έχουν εντοπιστεί σε μερικά θαλάσσια εχινόδερμα και αστερίες.

Κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες (Σχήμα 3-4), ανάλογα με το είδος του άγλυκου (σαπωγενίνη):

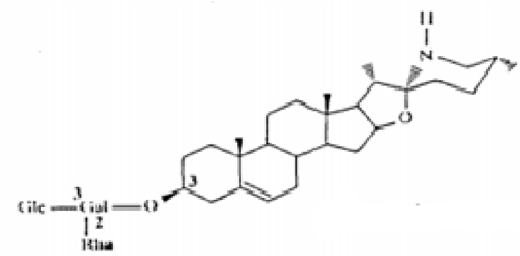
1 Τριτερπενικές σαπωνίνες, με άγλυκο ένα τριτερπένιο



2 Στεροειδικές σαπωνίνες, με άγλυκο ένα στεροειδές (C27) ,



3 Γλυκοαλκαλοειδή, με άγλυκο ένα στεροειδικό αλκαλοειδές

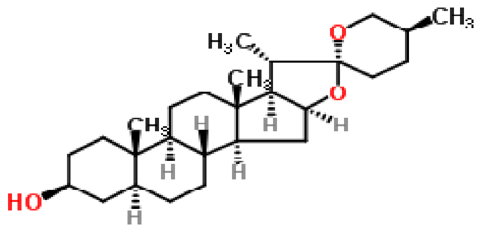
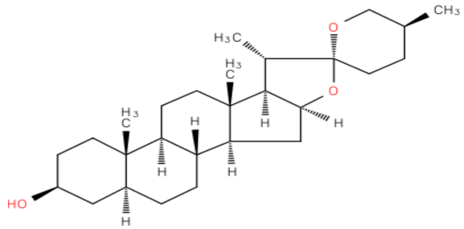
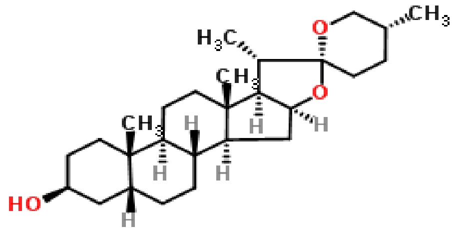
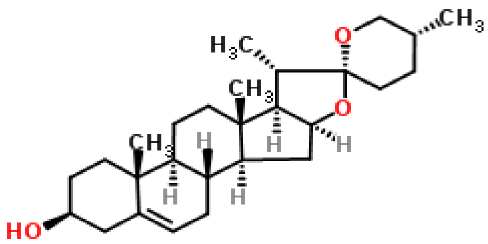


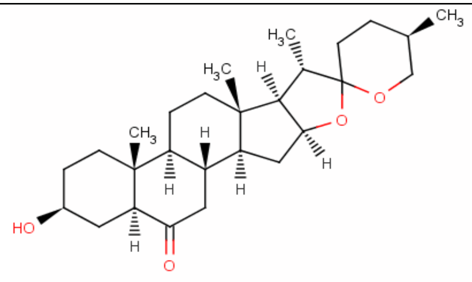
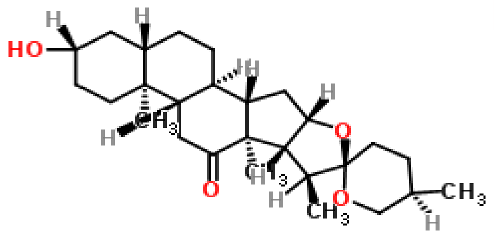
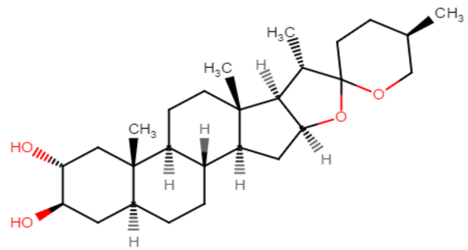
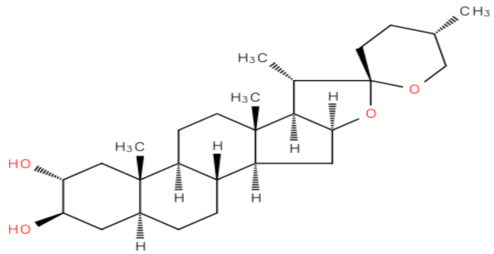
Σχήμα 3-4 Αντιπροσωπευτικές ενώσεις των τριών κλάσεων των σαπωνινών.

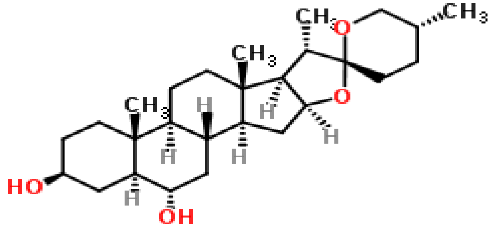
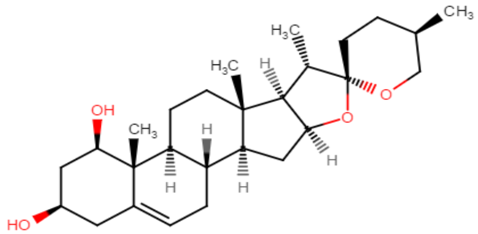
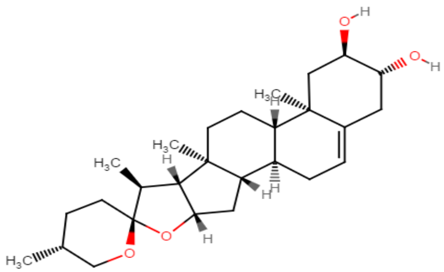
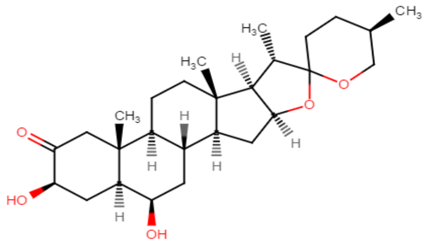
Ένας ή περισσότεροι ολιγοσακχαρίτες, απλοί ή διακλαδισμένοι, είναι προσκολλημένοι σε μία ή περισσότερες θέσεις, με εστερικό ή αιθερικό δεσμό. Ανάλογα με τον αριθμό των αλυσίδων που είναι προσκολλημένες, ονομάζονται μονοδεσμοσιδικές (μία αλυσίδα συνήθως στη θέση C3), διδεσμοσιδικές (δύο αλυσίδες, συνήθως στην C3 και την C28 στις τριτερπενικές ή στην C26 στις στεροειδικές) και τριδεσμοσιδικές. Συνήθως τα φυτά παράγουν μείγματα συγγενικών γλυκοζιτών, που βασίζονται σε μία ή περισσότερες σαπωγενίνες. [24]

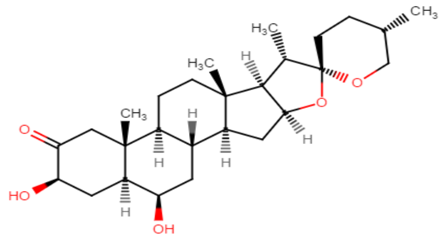
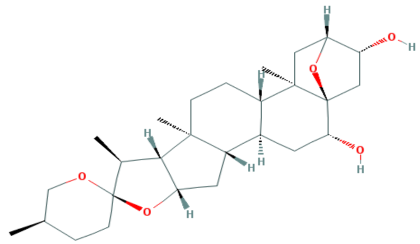
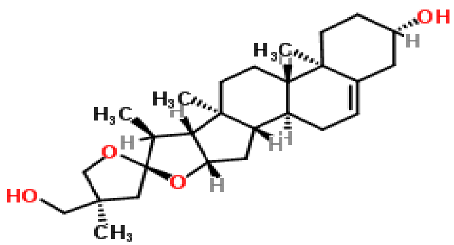
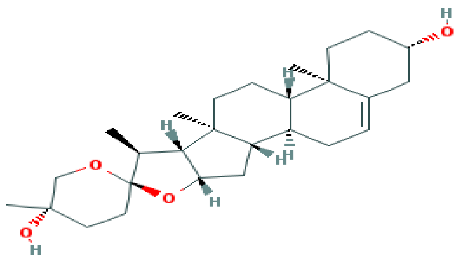
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται μερικές από τις πιο συνήθης σαπωνίνες και σαπωγενίνες που έχουν απομονωθεί από φυτά του γένους *Allium* [25],[26],[27]

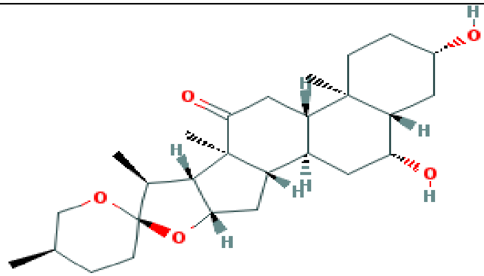
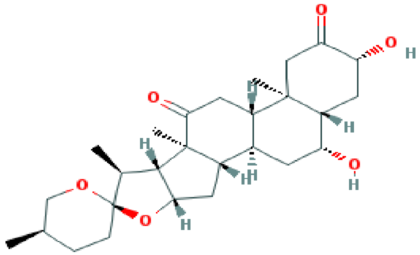
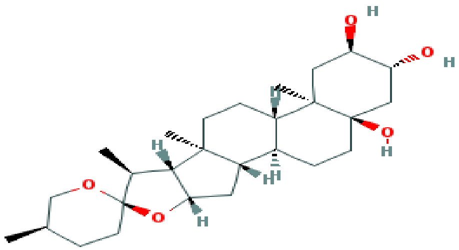
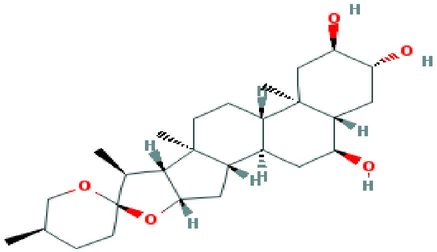
Πίνακας 3-1 Σαπωνίνες και σαπωγενίνες που έχουν απομονωθεί από φυτά του γένους *Allium*

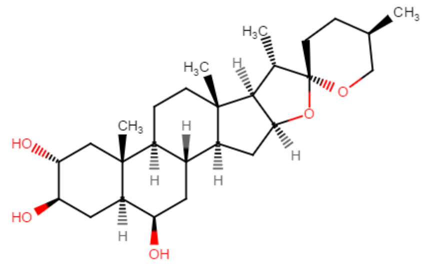
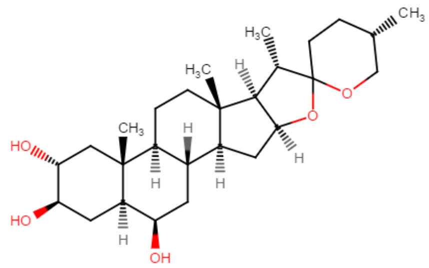
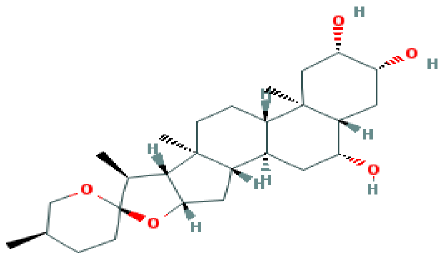
Κοινό όνομα	Επιστημονική Ονομασία	Τύπος	Είδος
Tigogenin	(25R)-5α-spirostane-3β-ol		*A. affine, A. chinense, A. fistulosum, A. macleanii, A. macrostemon, A. rotundum, A. sativum*
Neotigogenin	(25S)-5α-spirostane-3β-ol		*A. chinense, A. tuberosum*
Smilagenin	(25R)-5β-spirostane-3β-ol		*A. macrostemon*
Diosgenin	(25R)-spirost-5(6)-ene-3β-ol		*A. affine, A. albidum, A. ampeloprasum, A. angulosum, A. cepa, A. cernuum, A. fistulosum, A. flavum, A. fuscoviolaceum, A. giganteum, A. gramineum, A. karataviense, A. narcissiflorum, A. nutans, A. porrum, A. rotundum, A. schoenoprasum, A. senescens, A. ursinum, A. vineale, A. waldsteinii*

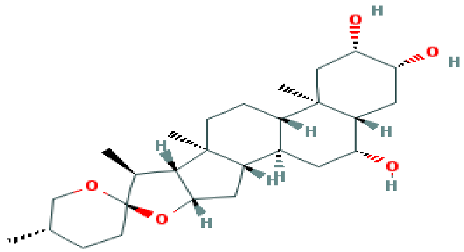
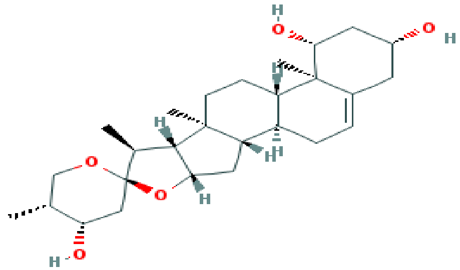
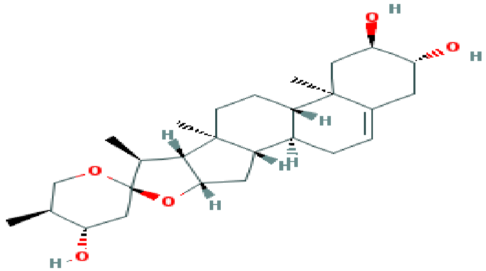
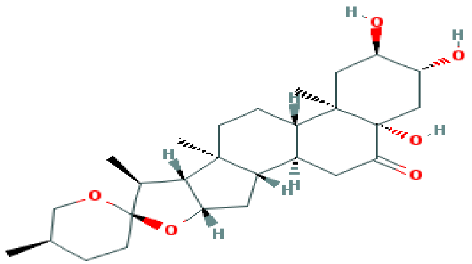
Laxogenin	(25R)-5α-spirostane-3β-ol-6-one		*A. chinense, A. tuberosum*
Hecogenin	(25R)-5α-spirostane-3β-ol-12-one		*A. albidum, A. rotundum*
Gitogenin	(25R)-5α-spirostane-2α,3β-diol		*A. aflatunense, A. chinense, A. cyrillii, A. elburzense, A. fistulosum, A. hirtifolium, A. jesdianum, A. macrostemon, A. porrum,A. rotundum, A. sativum, A. sativum L. var. Voghiera, A. victorialis var. platyphyllum*
Neogitogenin	(25S)-5α-spirostane-2α,3β-diol		*A. chinense, A. tuberosum*

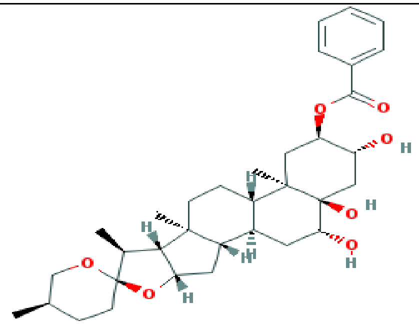
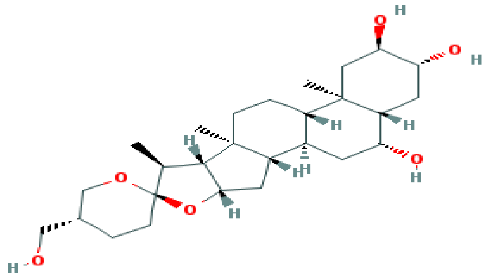
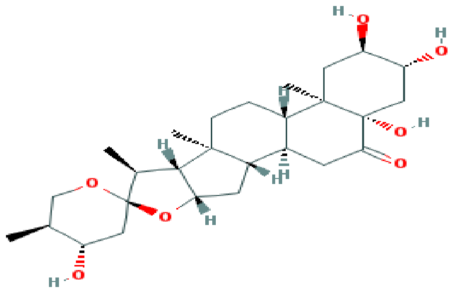
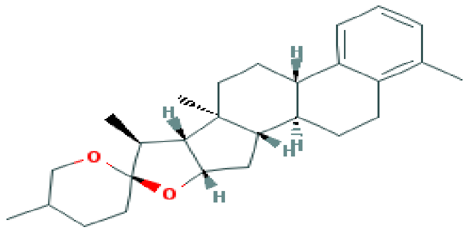
b-Chlorogenin	(25R)-5α-Spirostane-3β,6β-diol		*A. erubescens, A. giganteum, A. gramineum, A. leucanthum, A. porrum, A. rotundum, A. sativum, A. waldsteini*
Ruscogenin	(25R)-spirost-5(6)-ene-1β,3β-diol		*A. affine, A. albidum, A. nutans*
Yuccagenin	(25R)-spirost-5(6)-ene-2α,3β-diol		*A. ampeloprasum, A. fistulosum, A. flavum, A. giganteum, A. karataviense, A. rotundum, A. turcomanicum*
Porrigenin B	(25R)-5α-spirostane-3β,6β-diol-2-one		*A. ampeloprasum, A. porrum*

Neoporrigenin B	(25S)-5α-spirostane-3β,6β-diol-2-one		*A. macrostemon*
Anzurogenin B	(25R)-5α-spirostane-2α,5α-epoxy-3β,6β-diol		*A. stipitatum/A. suvorovii*
Nuatigenin	(22S,25S)-22,25-epoxy-furost-5(6)-ene-3β,26-diol		*A. vineale*
Izonuatigenin	(25R)-spirost-5(6)-ene-3β,25β-diol		*A. vineale*

12-Ketoporrigenin	(25R)-5α-spirostane-3β,6β-diol-12-one		*A. porrum*
Porrigenin C	(25R)-5α-spirostane-3β,6β-diol-2,12-dione		*A. porrum*
Agapanthagenin	(25R)-5α-spirostane-2α,3β,5α-triol		*A. aflatunense, A. elburzense, A. hirtifolium.*
Gantogenin	(25R)-5α-spirostane-2α,3β,6a-triol		*A. giganteum, A. jesdianum*

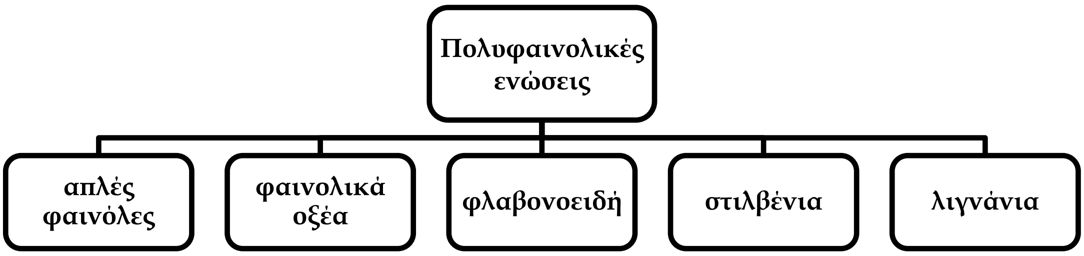
Agigenin	(25R)-5α-spirostane-2α,3β,6β-triol		*A. albopilosum, A. ampeloprasum, A atroviolaceum, A. giganteum, A. gramineum, A. hirtifolium, A. leucanthum, A. macleanii, A. ostrowskianum, A. porrum, A. rotundum, A. sativum var. Voghiera, A.schubertii*
Neoagigenin	(25S)-5α-spirostane-2α,3β,6β-triol		*A. albopilosum, A. ampeloprasumssp. persicum, A. giganteum, A. minutiflorum, A. nigrum, A. porrum, A. schubertii, A. turcomanicum*
Porrigenin A	(25R)-5α-spirostane-2β,3β,6β-triol		*A. porrum*

Neoporrigenin A	(25S)-5α-spirostane-2β,3β,6β-trio		*A. stipitatum/A. suvorovii*
Cepagenin	(24S,25R)-spirost-5(6)-ene-1β,3β,24-triol		*A. cepa*
Karatavigenin C	(24S,25S)-spirost-5(6)-ene-2α,3β,24-triol		*A. karataviense*
Anzurogenin A	(25R)-5β-spirostane-2α,3β,5β-triol-6-one		*A. stipitatum/A. suvorovii*

Karatavigenin B (2-O-benzoylalliogenin)	2-O-benzoyl-(25R)-5α-spirostane-2α,3β,5α,6β-tetrol		*A. karataviense*
Atroviolacegenin	(25R)-5α-spirostane-2α,3β,6β,27-tetrol		*A. atroviolaceum*
Anzurogenin C	(24S,25S)-5β-spirostane-2α,3β,5,24-tetrol-6-one		*A. stipitatum/A. suvorovii*
Luvigenin	(25R)-4-methyl-19-norspirosta-l,3,5(10)-triene		*A. giganteum*

3.1.1.3 <u>Φαινολικές ενώσεις</u>

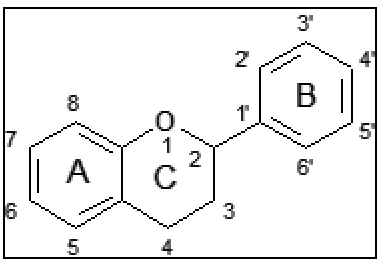
Οι φαινολικές ενώσεις ή πολυφαινόλες είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, όπου έχουν ήδη ταυτοποιηθεί περισσότερες από 8000 φαινολικές δομές. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει επικρατήσει με τον όρο «πολυφαινόλες» να νοείται μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απ' ευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Επίσης, οι πολυφαινόλες είναι είτε απλά μόρια όπως τα φαινολικά οξέα, είτε υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις όπως οι ταννίνες. Η πλειονότητα τους είναι συζευγμένες με υδατάνθρακες μέσω των υδροξυλίων τους. Τα συζευγμένα σάκχαρα μπορεί να είναι μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες ή ολιγοσακχαρίτες. Το πιο κοινό σάκχαρο που απαντάται είναι η γλυκόζη και έπονται η γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη κ.α. Επίσης, και άλλα συστατικά μπορούν να συνδεθούν με πολυφαινολικές δομές, όπως αμίνες, οργανικά οξέα, καρβοξυλικά οξέα, λιπίδια κ.α. Οι πολυφαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε δεκατέσσερις μεγάλες κατηγορίες: απλές φαινόλες, βενζοκινόνες, φαινολικά οξέα, ακετοφαινόνες, φαινυλοξικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, (υδροξυ)κιναμμωμικά οξέα, κουμαρίνες, χρωμόνες, ναφθοκινόνες, ξανθόνες, στιλβένια, ανθρακινόνες, φλαβονοειδή και λιγνάνες. Οι περισσότερο μελετημένες κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων είναι οι απλές φαινόλες, τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια και τα λιγνάνια (Σχήμα 3-5).



Σχήμα 3-5 Κατηγοριοποίηση πολυφαινολοκών ενώσεων

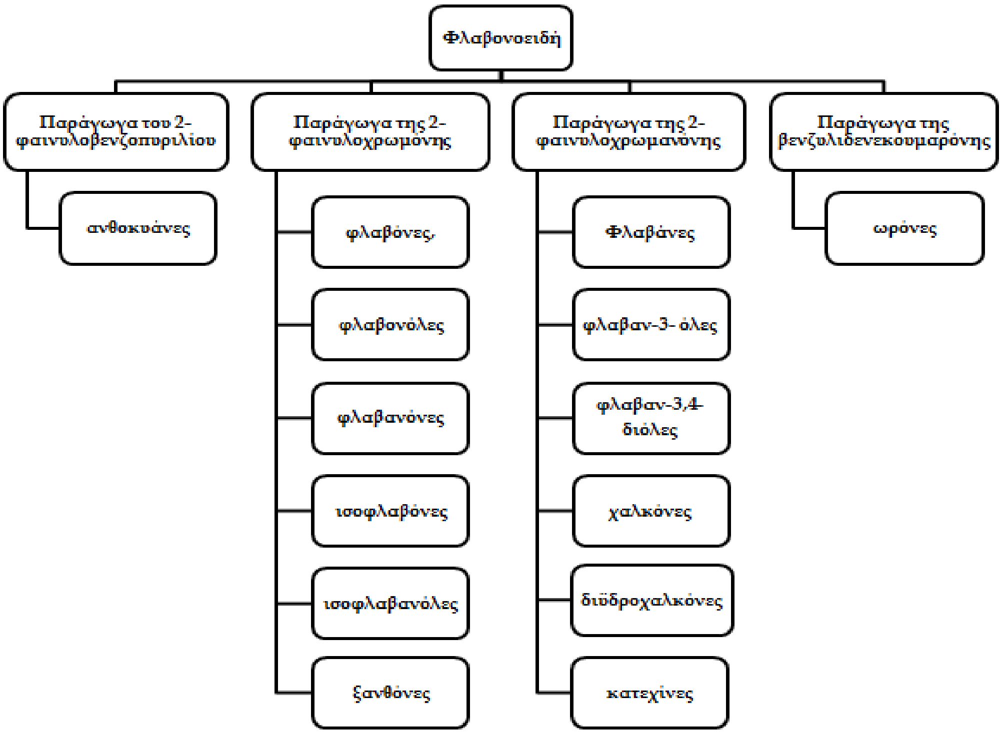
3.1.1.3.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις, πολύ διαδεδομένες στα φυτά. Πολλές από αυτές είναι υπεύθυνες για το χρώμα των καρπών και των ανθέων. Δεν είναι βιταμίνες, παρά το γεγονός ότι αρχικά οι ερευνητές που τις ανακάλυψαν θεώρησαν ότι αποτελούν σημαντικές βιταμίνες στην λειτουργία του οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται λόγος για ουσίες οι οποίες περιέχονται στα φυτά, προωθούν την δράση της βιταμίνης C και εμποδίζουν την οξείδωση της. Αρχικά, πήραν το όνομα βιταμίνη P αλλά έπειτα κατέληξαν να ονομάζονται φλαβονοειδή. Πρόκειται, λοιπόν για ουσίες που υπάρχουν μόνο στα φυτά και αποτελούν τμήμα των αμυντικών μηχανισμών τους, καθώς προσφέρουν ανοσία απέναντι σε μύκητες, έντομα και άλλους επιβλαβείς οργανισμούς. Η χημική τους δομή αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους συνδεδεμένους μέσω τριών ατόμων άνθρακα, που συνήθως σχηματίζουν ένα οξυγονούχο αρωματικό δακτύλιο. Οι διαφορές μεταξύ των τάξεων οφείλονται στον πυρανικό δακτύλιο (απουσία ή παρουσία διπλού δεσμού, παρουσία 3-υδροξυ και/ή 2- οξυ ομάδων) και στον αριθμό των υδροξυλίων στους δακτύλιους A και B [28].



Σχήμα 3-6 Βασική δομή και σύστημα αρίθμησης των φλαβονοειδών

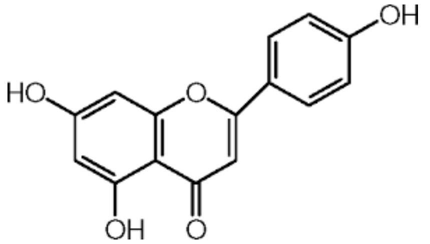
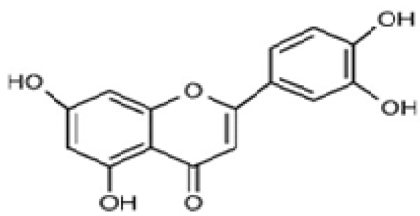
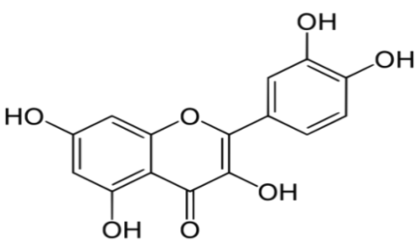
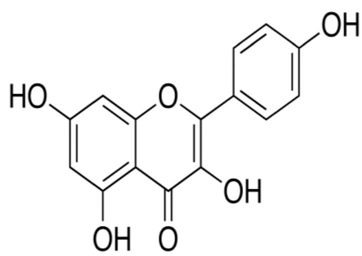
Πιο συγκεκριμένα, ανάλογα του βαθμού οξείδωσης του πυρανικού τους δακτυλίου διαιρούνται στις εξής κατηγορίες:

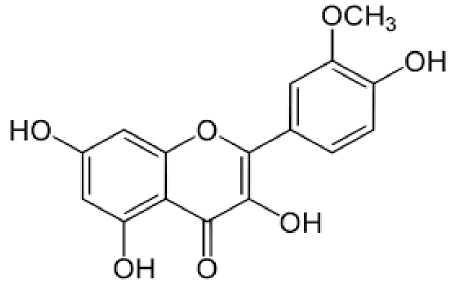
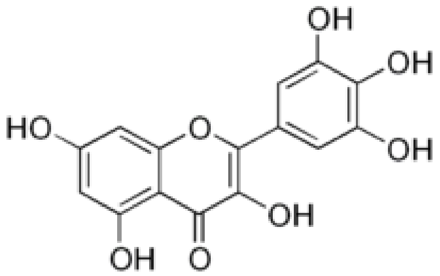
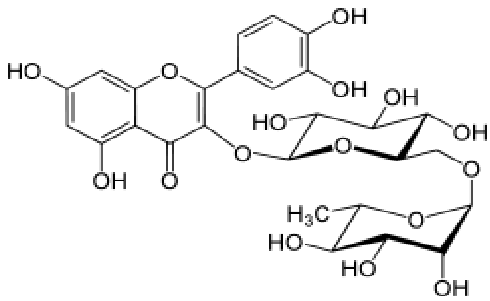
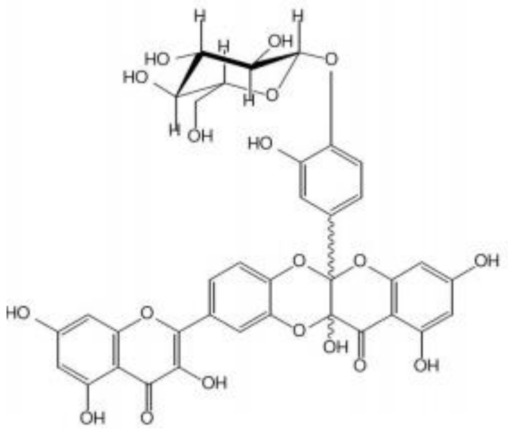
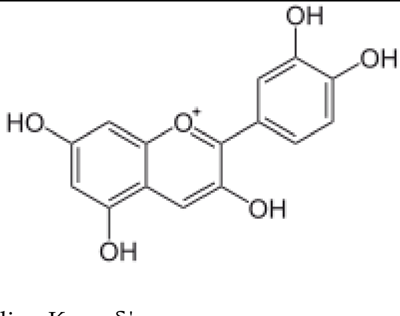
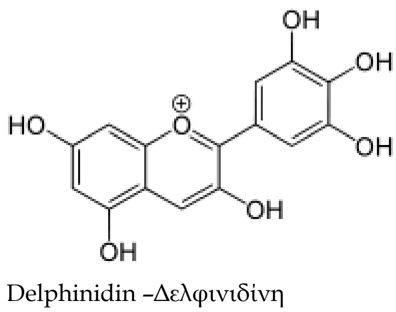


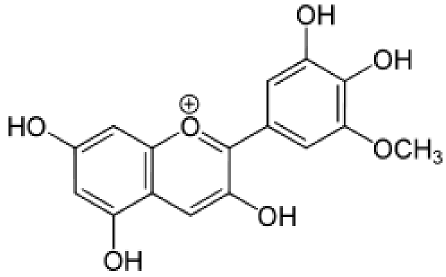
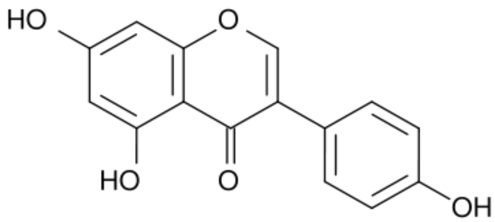
Σχήμα 3-7 Κατηγοριοποίηση φλαβονοειδών

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται μερικά από τα συνηθέστερα φλαβονοειδή και που έχουν απομονωθεί από φυτά του γένους *Allium* [25],[29],[30],[31],[32].

Πίνακας 3-2 Τα κυριότερα φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί από φυτά του γένους *Allium*

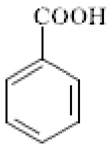
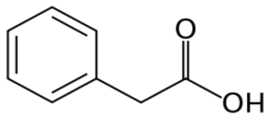
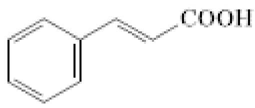
Φλαβονοειδή	
Φλαβόνες	
 Apigenin- Απιγενίνη	 Luteolin - Λουτεολίνη
Φλαβονόλες	
 Quercetin- Κερκετίνη + Παράγωγα	 Kaempferol - Καμφερόλη +Παράγωγα

 Isorhamnetin- Ισοραμνετίνη+ Παράγωγα	
 Myricetin - Μυρισετίνη	 Rutin - Ρουτίνη
 Γλυκοζίτης φλαβονόλης	
Ανθοκυανίνες	
 Cyanidin - Κυανιδίνη	 Delphinidin –Δελφινιδίνη

 Petunidin- Πετουνιδίνη	
Ισοφλαβόνες	
 genistein (4,-5,7-trihydroxyisoflavone)- Γενιστεΐνη	

3.1.1.3.2 Φαινολικά οξέα

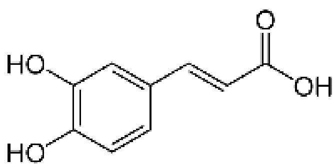
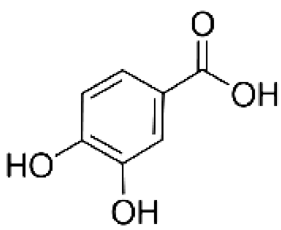
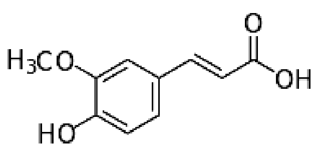
Τα φαινολοξέα αποτελούν μία ομάδα οργανικών οξέων και οι οποίες εμπεριέχουν όλες τις οργανικές ενώσεις που έχουν το λιγότερο μία καρβοξυλομάδα και ένα φαινολικό υδροξύλιο. Ο όρος όμως χρησιμοποιείται και για παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος που είναι πολύ διαδεδομένα στα φυτά, ελεύθερα σαν εστέρες ή σαν γλυκοσίδες.

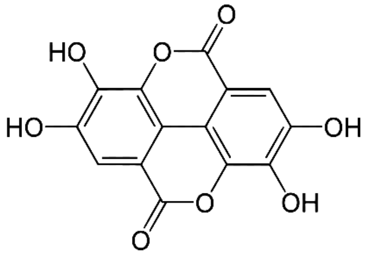
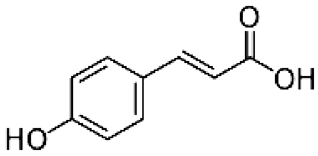
 Βενζοϊκό οξύ	 Φαινυλοξικό οξύ	 Κινναμωμικό οξύ

Σχήμα 3-8 Βασικές δομές του βενζοϊκού, φαινυλοξικού και κινναμωμικού οξέος

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται μερικά από τα κυριότερα φαινολικά οξέα που έχουν απομονωθεί από φυτά του γένους *Allium* [33].

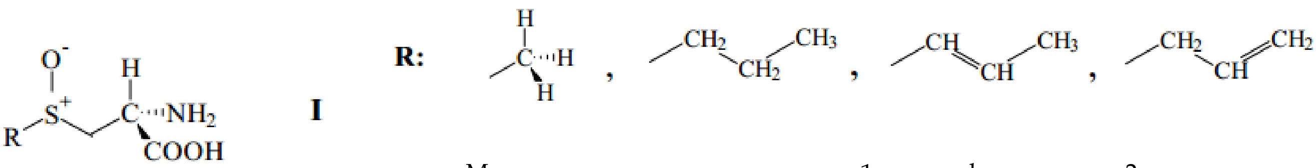
Πίνακας 3-3 Τα κυριότερα φαινολικά οξέα που έχουν απομονωθεί από φυτά του γένους *Allium*

Φαινολικά οξέα		
 Caffeic acid	 Protocatechuic acid	 Ferulic acid

 Ellagic acid	 *p*-Coumaric acid	

3.1.1.4 <u>Θειοενώσεις</u>

Και τα τρία μέλη του γένους των *Allium* οφείλουν σχεδόν το σύνολο των ιδιοτήτων τους σε μερικές δεκάδες ενώσεις που είναι δυνατόν να παραχθούν και οι οποίες έχουν χαρακτηριστικό την ύπαρξη ατόμων θείου στο μόριό τους. Αυτές οι ενώσεις προκύπτουν κυρίως από S-αλκενυλ(ή αλκυλ) σουλφοξείδια της κυστεΐνης. Τα σουλφοξείδια αυτά έχουν τη μορφή που περιγράφεται στο (Σχήμα 3-9), όπου R να αναπαριστώνται οι ομάδες μεθυλίου(Me), n-προπυλίου(n-Pr), 1-προπενυλ και 2- προπενυλ (αλλυλίου). Στα *Allium* όλοι αυτοί οι υποκαταστάτες απαντώνται προσδεδεμένοι είτε με την ένωση I (Σχήμα 3-9 α) είτε με άλλες πεπτιδικές δομές έχοντας πάντα σαν χαρακτηριστικό την ύπαρξη ατόμων θείου. Τον ποιον ακριβώς υποκαταστάτη R (Σχήμα 3-9 β) θα περιέχει μια ένωση είναι, χαρακτηριστικό του είδους του *Allium*. Έτσι, στο σκόρδο περιέχεται η ομάδα 2-προπενυλ- ή αλλυλ- οπότε προκύπτει το (+)S- αλλυλ σουλφοξείδιο της L-κυστεΐνης (Σχήμα 3-10 α) ή πιο γνωστά την αλλιίνη. Η αλλιίνη είναι η πρώτη από τις αντίστοιχες θειοενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα *Allium* από τους Stoll και Seebeck το 1948.



Me n pr 1 propenyl 2 propeny

β)

α)

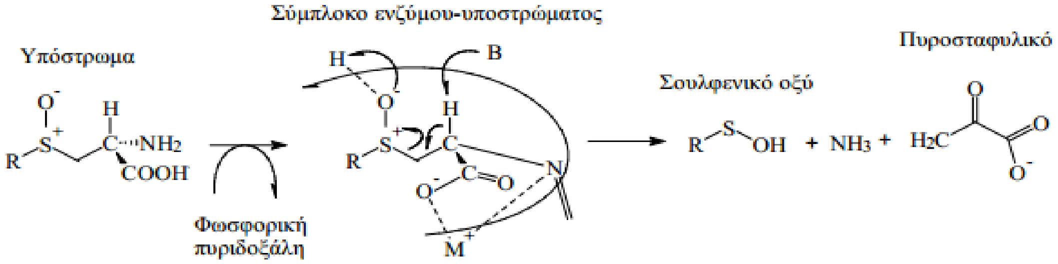
Σχήμα 3-9 Συντακτικός τύπος α) σουλφοξειδίου, β) υποκαταστατών σουλφοξειδίων

α) β)

Σχήμα 3-10 Συντακτικός τύπος α) της Αλλιίνη, β) του(+)S-(1 προπενυλ) σουλφοξειδίου της κυστεΐνης

Στο κρεμμύδι και στο πράσο έχουμε κυρίως τον υποκαταστάτη 1-προπενύλ οπότε και προκύπτει το χαρακτηριστικό(+)S-(1 προπενυλ) σουλφοξείδιο της κυστεΐνης Σχήμα 3-10 β). Η ένωση αυτή είναι ισομερές της αλλιίνης και η διαφορά τους είναι η θέση του διπλού δεσμού.

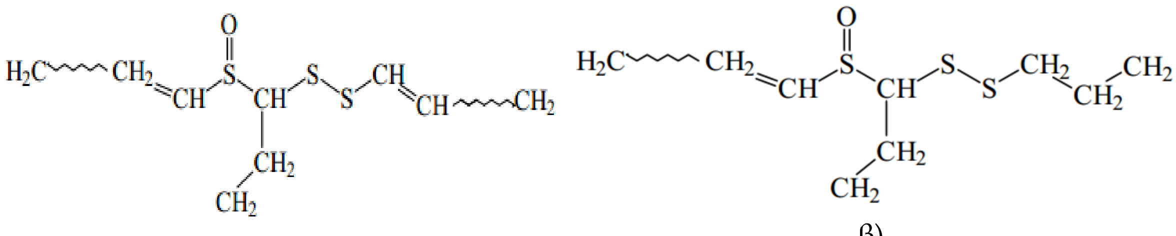
Τα πεπτιδικά αυτά σουλφοξείδια είναι κατάλληλα ενσωματωμένα μέσα στα κύτταρα των *Allium* στις διάφορες στοιβάδες. Σύνθλιψη ή τεμαχισμός των φυτών ελευθερώνει τα σουλφοξείδια και ενεργοποιεί τη δράση χαρακτηριστικών ενζύμων, των αλλινασών. Τα ένζυμα αυτά διασπούν τα σουλφοξείδια κυστεΐνης, ελευθερώνοντας πτητικά σουλφενικά οξέα της μορφής R-S-OH, σύμφωνα με τη γενική ενζυμική αντίδραση στο Σχήμα 3-11.
Τα σουλφενικά οξέα έχουν σαν χαρακτηριστικό τη μεγάλη αστάθεια και δραστικότητα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένας μεγάλος αριθμός χαρακτηριστικών ενώσεων στις οποίες οφείλονται σχεδόν όλες οι ιδιότητες των *Allium*.



Σχήμα 3-11 Γενική ενζυμική αντίδραση σχηματισμού σουλφενικών οξέων

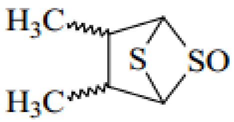
Όλες αυτές οι ενώσεις είναι χαρακτηριστικές για το κάθε είδος και βρίσκονται στη μεγαλύτερη αναλογία. Πρέπει να τονιστεί ότι το κάθε είδος παράγει ένα πολύπλοκο μίγμα μερικών δεκάδων θειοενώσεων ανάλογα με την κατεργασία και τις συνθήκες που υφίσταται. Όλες, όμως, έχουν κοινά πρόδρομα μόρια τα πεπτιδικά σουλφοξείδια και τα πολύ δραστικά σουλφενικά οξέα. Η δραστικότητα και η αστάθεια αυτών των μορίων οδηγεί, μέσα από πολύπλοκες και μερικές φορές αδιευκρίνιστες αντιδράσεις αποικοδόμησης και αναδιάταξης, στη δημιουργία ποικίλων θειοενώσεων.

Χαρακτηριστικά, επίσης, σχηματιζόμενα μόρια είναι τα θειοσουλφενικά με γενική μορφή R-SO-S-R' με R, R' τις προαναφερόμενες ρίζες του σχήματος 1, αλλά και τα δι, τρι ή και πολυσουλφίδια με μορφή αντίστοιχα R-S-S-R', R-S-S-S-R' ή R-(S)n-R'. Ακόμα έχει επιβεβαιωθεί ο σχηματισμός κεπαϊνών (Σχήμα 3-12 α) και ομολόγων κεπαϊνών (Σχήμα 3-12 β) ζιεμπελάνων, βινυλοδιθειίνων και του διμερούς LF (Σχήμα **3-13** α), β), γ)).

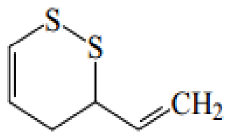


α) β)

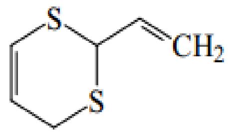
Σχήμα 3-12 α) Συντακτικός τύπος κεπαϊνων, β) συντακτικός τύπος ομόλογων κεπαϊνων



α)

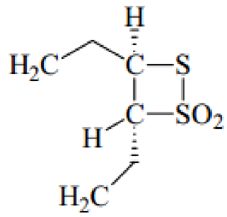


2-βινυλ-[4H]-1,3-διθειίνη



3-βινυλ-[4H]-1,2-διθειίνη

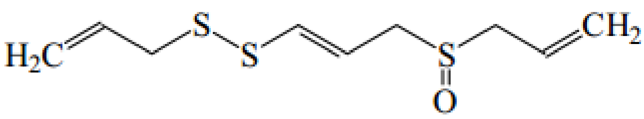
β)



γ)

Σχήμα 3-13 α) Συντακτικός τύπος ζιεμπελάνων, β) Συντακτικός τύπος διθειίνων, γ) Συντακτικός τύπος διμερούς LF

Επίσης ένωση πολύ μεγάλης σημασίας είναι η αχοέν(ajoene) [34],[35],[25].



Σχήμα 3-14 Συντακτικός τύπος του ajoene

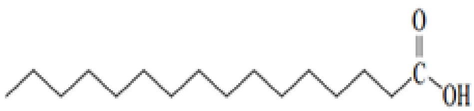
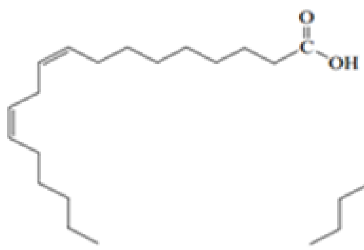
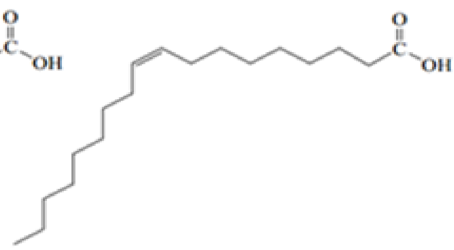
3.1.1.5 <u>Λιπίδια</u>

Σαν λιπίδια χαρακτηρίζονται οι οργανικές εκείνες ενώσεις που δεν διαλύονται στο νερό αλλά παραλαμβάνονται από οργανικούς διαλύτες. Ο πιο συνηθισμένος διαχωρισμός των λιπιδίων πραγματοποιείται με βάση την πολικότητά τους. Έτσι, έχουμε τα ουδέτερα και τα πολικά λιπίδια.

Στα ουδέτερα συναντά κανείς τους κηρούς, τις στερόλες και τους εστέρες τους, τα λιπαρά οξέα και τις λιπαρές αλκοόλες, τα γλυκερίδια είτε αυτά είναι τρι-, δι- ή μόνο υποκατεστημένα.

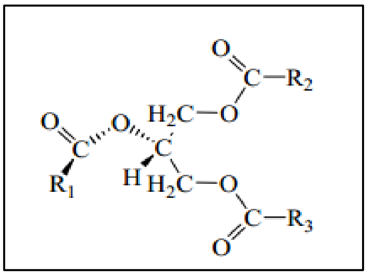
Όσον αφορά την ύπαρξη ουδέτερων λιπιδίων σε φυτά του γένους *Allium* στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι στα φυτά αυτά περιέχονται διάφορα λιπαρά οξέα (μονοκαρβοξυλικά οργανικά οξέα με ευθεία αλυσίδα 4-30 ατόμων άνθρακα με γενικό τύπο $CH_3(CH_2)_nCOOH$). Συγκεκριμένα επικρατεί το λινελαϊκό οξύ, ακολουθεί το παλμιτικό οξύ και σε λιγότερο ποσοστό εμφανίζονται το ελαϊκό και το α-λινολεϊκό.

Πίνακας 3-4 Αντιπροσωπευτικά λιπαρά οξέα των *Allium*

Λιπαρά οξέα	
 Παλμιτικού οξέος(C16:0)	  α β α) λινελαϊκού (C18:2 cis) β) ελαϊκού οξέος(C18:1 cis)

Μια άλλη σημαντική κατηγορία ενώσεων που έχουν απομονωθεί από φυτά του εν λόγω γένους είναι τα ουδέτερα γλυκερολιπίδια, τα οποία περιέχουν στο μόριό τους την βάση γλυκερόλη, τα υδροξύλια της οποίας είναι είτε μερικώς είτε εξολοκλήρου δεσμευμένα. Η δέσμευση και των τριών θέσεων με ακυλομάδες και εστερικό δεσμό θα δώσει τα πλέον χαρακτηριστικά και αναγνωρίσιμα λιπίδια, τα τριγλυκερίδια.

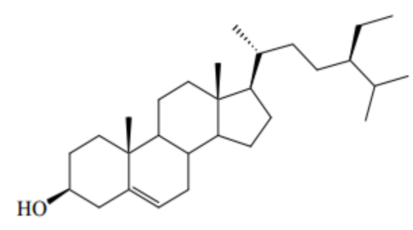
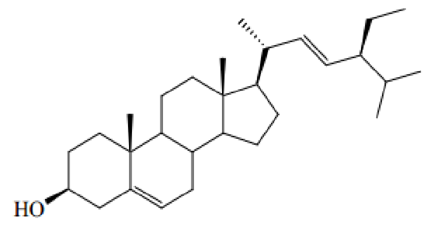
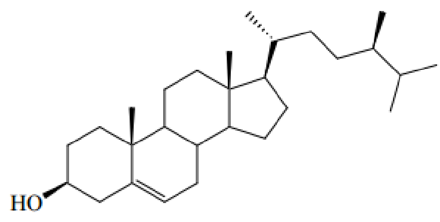
Αυτά τα τελευταία τα συναντάμε και πιο συχνά σε αυτό το γένος, και ειδικά ενώσεις όπως είναι η τριλινελαϋλογλυκερόλη (LLL), ακολουθεί η διλινελαϋλολινολενυλογλυκερόλη(LLLn), η παλμιτυλοδιλινελαϋλογλυκερόλη (PLL) και η ελαϋλοδιλινελαϋλογλυκερόλη(OLL). Δεκάδες άλλα είδη εμφανίζονται σε μικρότερα ποσοστά.



Σχήμα 3-15 Γενικός τύπος τριγλυκεριδίων R1, R2, R3 ανθρακικές αλυσίδες

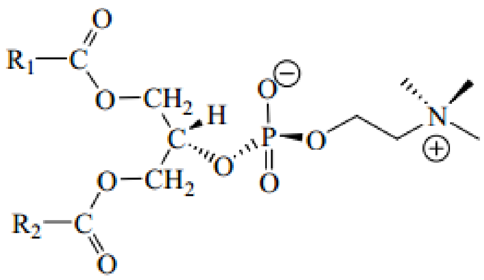
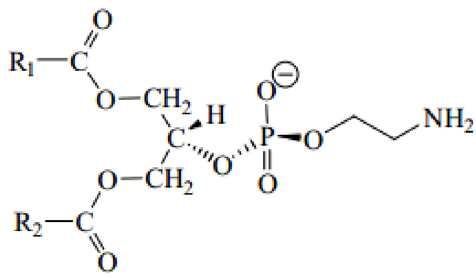
Στα ουδέτερα λιπίδια συγκαταλέγονται και τα λιπίδια στερολών δηλαδή οι ελεύθερες στερόλες (FS), οι εστέρες στερολών(SE), οι γλυκοζίτες στερολών(SG) και οι ακυλιωμένες μορφές τους (ASG). Από κάθε μία από αυτές τις υποκατηγορίες έχουν απομονωθεί διάφορες ενώσεις από τα φυτά του γένους *Allium*, αλλά οι επικρατέστερες ενώσεις κατατάσσονται στις στερόλες, οργανικές ενώσεις που ανήκουν στην πολυπληθή οικογένεια των ισοπρενοειδών. Η συνηθέστερη στερόλη που συναντάται είναι η β-σιτοστερόλη, ενώ σε αξιόλογα ποσά εμφανίζονται η στιγμαστερόλη και η καμπεστερόλη.

Πίνακας 3-5 Αντιπροσωπευτικά λιπίδια στερολών των *Allium*

Λιπίδια στερολών		
 β-σιτοστερόλη	 Στιγμαστερόλη	 Καμπαστερόλη

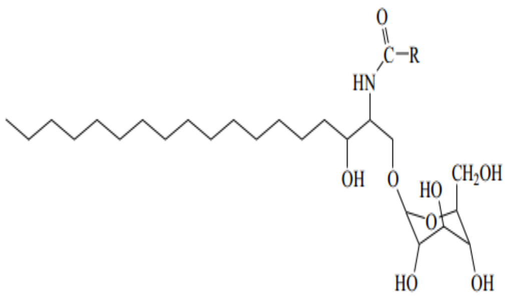
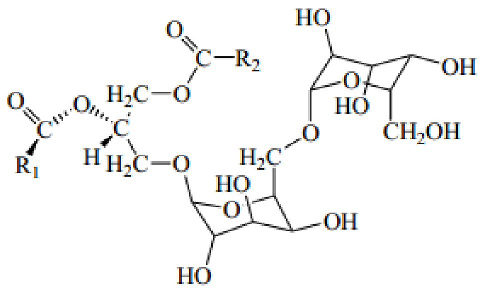
Όπως προαναφέρθηκε στην κατηγορία τον λιπιδίων ανήκουν και τα πολικά λιπίδια, τα οποία περιέχουν στο μόριό τους χαρακτηριστικές πολικές ομάδες και χαρακτηρίζονται από την σχετικά μεγαλύτερη πολικότητα που εμφανίζουν. Με βάση τις χαρακτηριστικές ομάδες που περιέχουν αυτά τα λιπίδια διακρίνονται στα φωσφολιπίδια και τα γλυκολιπίδια. Βιβλιογραφικά έχει βρεθεί ότι πολλά φωσφολιπίδια δηλαδή μόρια που φέρουν ένα ή πολλά άτομα φωσφόρου, απαντώνται στο γένος *Allium*. Πιο συγκεκριμένα οι ενώσεις αυτές συγκαταλέγονται στις κατηγορίες των φωσφατιδυλοχολινών και φωσφατιδυλοαιθα-νολαμινών.

Πίνακας 3-6 Αντιπροσωπευτικά φωσφολιπίδια των *Allium*

Φωσφολιπίδια	
 Φωσφατιδυλοχολίνες (R1, R2) ανθρακικές αλυσίδες	 Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη

Ακόμα έχουν απομονωθεί από τα *Allium* και γλυκολιπίδια, ενώσεις που περιέχουν στο μόριό τους σάκχαρα. Ειδικότερα οι ενώσεις αυτές ανήκουν στην κατηγορία των μόνο- και διγαλακτοζυλο διγλυκεριδίων, σφιγγογλυκολιπίδιων (η κερεβροζίτη), επίσης πιθανολογείται στο κρεμμύδι και στο πράσο η ύπαρξη τρι- και τετρα διγαλακτοζυλο διγλυκεριδίων [34].

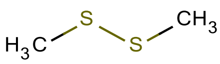
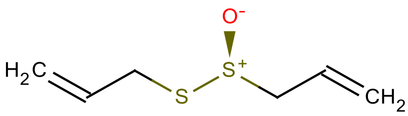
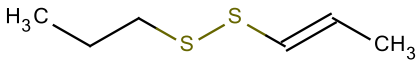
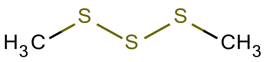
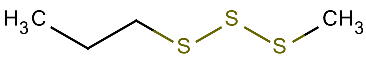
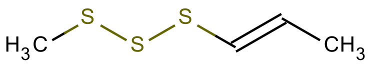
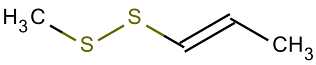
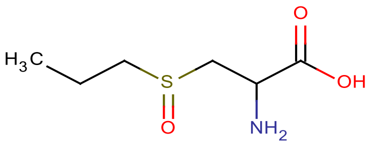
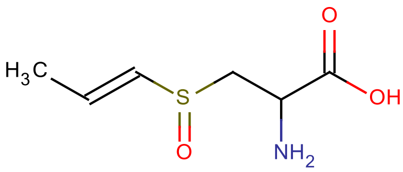
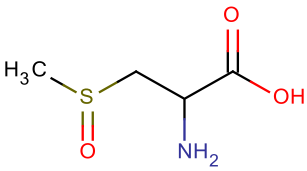
Πίνακας 3-7 Αντιπροσωπευτικά γλυκολιπίδια των *Allium*

Γλυκολιπίδια	
 Κερεβροζίτη (σφιγγογλυκολιπίδιων)	 Διγαλακτοζυλο διγλυκεριδίο ή DGDG

3.2 Δρογοχημεία του *Allium ampeloprasum*

Το *Allium ampeloprasum* είναι γευστικό λαχανικό με μεγάλη διατροφική και θεραπευτική αξία για τον ανθρώπινο οργανισμό. Οι φαρμακευτικές ιδιότητες τους οφείλονται κυρίως στην παρουσία πολλών σουλφιδικών ενώσεων. Αν και τα πράσα περιέχουν αναλογικά λιγότερες φυτικές θειούχες χημικές ουσίες από το σκόρδο, εξακολουθούν να έχουν σημαντικές ποσότητες αντιοξειδωτικών. Οι ενώσεις μετατρέπονται σε αλλισίνη με ενζυματική αντίδραση, όταν το πράσο κόβεται. Εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι η αλλισίνη μειώνει τα επίπεδα χοληστερόλης και ότι έχει αντιβακτηριακή, αντιική και αντιμυκητιακή δράση. Παρακάτω παρουσιάζονται μερικές από τις σουλφιδικές ενώσεις του *Allium ampeloprasum*.

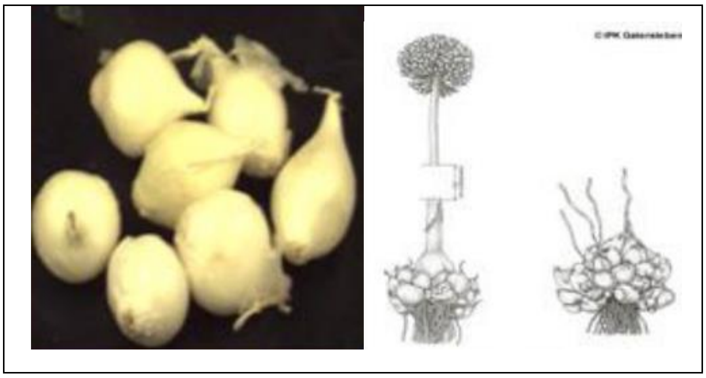
Πίνακας 3-8 Αντιπροσωπευτικές σουλφιδικές ενώσεις του *Allium ampeloprasum*

Σουλφιδικών ενώσεων		
 dimethyl disulfide	 Allicin	 propyl propenyl disulfide
 dimethyl trisulfide	 methyl propyl trisulfide	 methyl propenyl trisulfide
 methyl propenyl disulfide	 S-propyl cysteine sulfoxide	 S-propenyl cysteine sulfoxide
	 S-methyl cysteine sulfoxide	

Επιπλέον είναι ενδιαφέρον ότι αποτελείται από νερό σε ποσοστό 90% , το οποίο είναι σημαντικό στοιχείο μιας υγιούς διατροφής. Επίσης προσδίδουν πολύ λίγες θερμίδες στον οργανισμό μας. Για την ακρίβεια, έχουν μόλις 64 θερμίδες ανά 100γρ., ενώ τα κοτσάνια τους έχουν σημαντικές ποσότητες φυτικών ινών.

Πίνακας 3-9 Χημικός και διατροφικός χαρακτηρισμός του *Allium ampeloprasum L.* , βρώσιμο μέρος (ανά 100g).

Συστατικό	Μονάδες	Πράσο, βολβός, ακατέργαστο
Νερό	g	86
Ενέργεια	Kcal	35
Πρωτεΐνες	g	1. 9
Λιπίδια	g	0. 4
Υδατάνθρακες	g	5. 9
Φυτικές ϊνες	g	3. 3
Ash	g	1
ξηρή ουσία	g	14
Ολικό Άζωτο	g	0. 31
Σύνολο κορεσμένου λιπαρού οξέος	g	0. 061
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα MUFA	g	0,006
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα P FA	g	0,253
Συνολικά διαθέσιμα σάκχαρα	g	5. 9
Γλυκόζη	g	2. 4
Φρουκτόζη	g	2. 4
Σακχαρόζη	g	1. 1
διαλυτοί μη αμυλούχος πολυσακχαρίτες	g	1. 6
Αδιάλυτοι μη αμυλούχος πολυσακχαρίτες	g	1. 6



Σύσταση	Μονάδες	Τιμή/ποσότητα
Οξαλικό οξύ	(mg/100	91. 6
Γ ουταμικό οξύ	(mg/100g)	51,67
Μηλικό οξύ	(mg/100g)	132,86
Κιτρικο οξυ	(mg/100g)	38,86
Σουκινικό οξύ	(mg/100g)	2,14
pH	(mg/100g)	5,76

Αποτελεί πλούσια πηγή βιταμινών και ανόργανων συστατικών που είναι απαραίτητα για την υγεία μας. Ο φυλλώδης μίσχος τους περιέχει αρκετές ζωτικής σημασίας βιταμίνες όπως πυριδοξίνη, φολικό οξύ, νιασίνη, ριβοφλαβίνη και θειαμίνη, σε υγιείς αναλογίες. 100 gr. φρέσκα στελέχη παρέχουν 84 mg φυλλικού οξέος που είναι ουσιώδες για τη σύνθεση του DNA και την κυτταρική διαίρεση. Επιπλέον, είναι καλές πηγές βιταμίνης A και άλλων αντιοξειδωτικών όπως τα καροτενοειδή, η ξανθίνη και η λουτεΐνη. Έχουν επίσης ορισμένες άλλες βασικές βιταμίνες, όπως οι C, K και E. Οι βιταμίνες αυτές εξασφαλίζουν την υγεία και τη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ η βιταμίνη C βοηθά το ανθρώπινο σώμα να αναπτύσσει αντίσταση εναντίον μολυσματικών παραγόντων και να καταστρέφει τις επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες. Συγχρόνως περιέχει μεταλλικά στοιχεία (Κάλιο, ασβέστιο, σελήνιο, μαγνήσιο). Όλες αυτές οι ουσίες είναι απαραίτητες για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού και την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος και των οστών του σώματος. Επίσης είναι μία καλή πηγή σιδήρου (βοηθά στην καταπολέμηση της αναιμίας). Παρακάτω παρουσιάζονται σε πινακοποιημένη μορφή οι τιμές για τα συστατικά αυτά [36], [37].

Πινακας 3-10 Μακρο και μικρο θρεπτικά συστατικά του *Allium ampeloprasum* (ανά 100g).

Σύσταση	Μονάδες	Πράσο, βολβός, ακατέργαστο
Νάτριο	mg	9
Κάλιο	mg	310
Ασβέστιο	mg	63
Μαγνήσιο	mg	10
Μαγγάνιο	μg	188
Σίδερο	mg	1.1
Ψευδάργυρος	mg	0.4
Χαλκός	mg	0.1
Φώσφορος	mg	43
Ισοδύναμο βήτα-καροτένιο	μg	49
Συνολικό ισοδύναμό βιταμίνη Α	μg	8
Βιταμίνη Ε	mg	0.92
Θειαμίνη	mg	0.1
Ριβοφλαβίνη	mg	0.05
Νιασίνη	mg	0.6
Βιταμίνη Β6	mg	0.25
Συνολικό φυλλικό οξύ	μg	86
Βιταμίνη C	mg	18

3.2.1.1 *Σαπωνίνες*

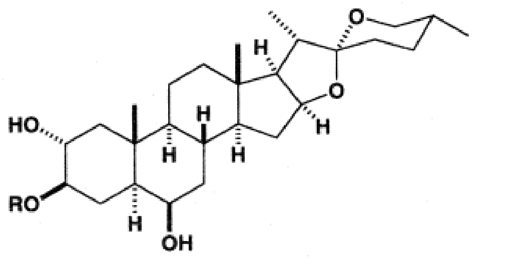
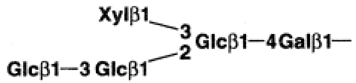
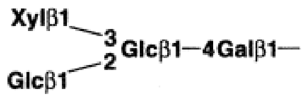
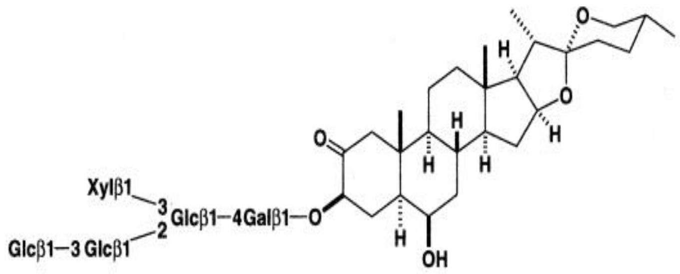
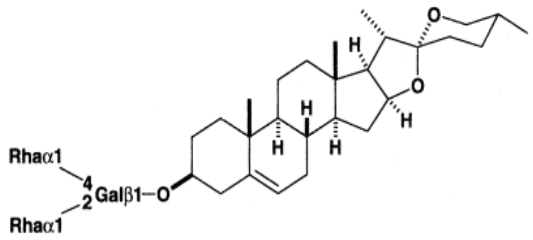
Είδος	Κοινό όνομα του γλυκοσίδη	Σαπωγενίνη	Το υπόλοιπο ζάχαρο
A. ampeloprasum L.		Agigenin	
		Agigenin	3-O-β-D-Glc-(1→4)-O-β-D-Gal
	AMPELOSIDE Bs1	Agigenin	3-O-β-D-Glc-(1→3)-O-β-D-Glc-(1→4)-O-β-D-Gal
	AGINOSIDE [93]		
	YAYOISAPONIN C	Agigenin	3-O-β-D-Glc-(1→2)-[β-D-Glc-(1→3)]-O-β-D-Glc-(1→4)-O-β-D-Gal
	YAYOISAPONIN A	Agigenin	3-O-β-D-Glc-(1→3)-O-β-D-Glc-(1→2)-[β-D-Xyl-(1→2)]-O-β-D-Glc-(1 →4)-O-β-D-Gal
	DIOSCIN	Diosgenin	3-O-α-L-Rhα-(1 →2)-[α-L-Rhα-(1→4)]-O-β-D-Glc
	KARATAVIOSIDE A	Yuccagenin	3-O-β-D-Glc-(1→2)-[β-D-Xyl-(1→3)]-O-β-D-Glc-(1→4)-O-β-D-Gal
	YAYOISAPONIN B	Porrigenin B	3-O-β-D-Glc-(1→3)-O-β-D-Glc-(1→2)-[β-D-Xyl-(1→3)]-O-β-D-Glc-(1 →4)-O-β-D-Gal
	AMPELOSIDE Bf2	(25R)-5α-furostane-2α,3β,6β,22,26-pentaol	26-O-β-D-Glc 3-O-β-D-Glc-(1→3)-O-β-D-Glc-(1→4)-O-β-D-Gal
		(25R)-5α-furostane-2α,3β,6β,22,26-pentaol	26-O-β-D-Glc 3-O-β-D-Glc-(1→4)-O-β-D-Gal
		(25R)-5α-furostane-3β,26-diol	26-O-β-D-Glc 3-O-β-D-Glc-(1→2)-O-β-D-Xyl-(1→3)-O-β-D-Glc-(1 →4)-O-β-D-Gal
A. ampeloprasumL. ssp. Persicum	PERSICOSIDE A	Neoagigenin	3-O-β-D-Glc-(1→3)-[β-D-Xyl-(1→2)]-O-β-D-Glc-(1→4)-O-β-D-Gal
	PERSICOSIDE B	Neoagigenin	3-O-β-D-Xyl-(1→3)-[α-L-Rhα-(1→2)]-O-β-D-Glc-(1→4)-O-β-D-Gal
	PERSICOSIDE C (C1/C2)	Furost-5(6)-ene-1b,3β,22ξ,26-	26-O-α-L-Rhα-(1 →2)-β-D-Gal 1-O-β-D-Glc-(1→3)-

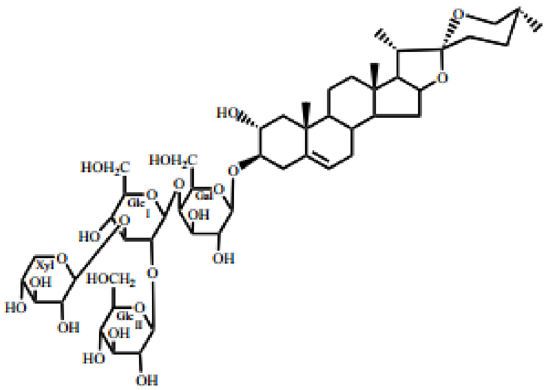
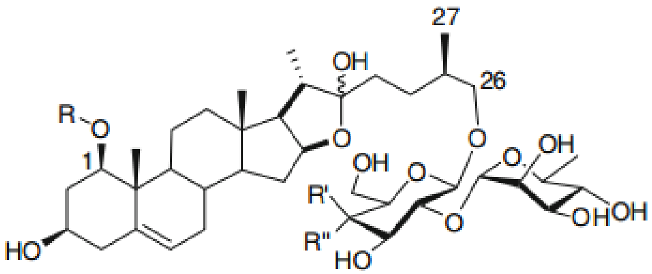
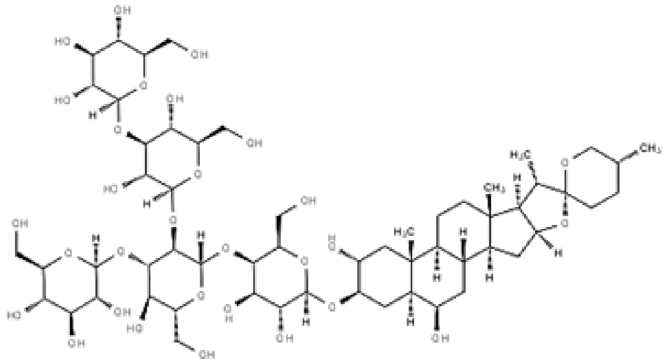
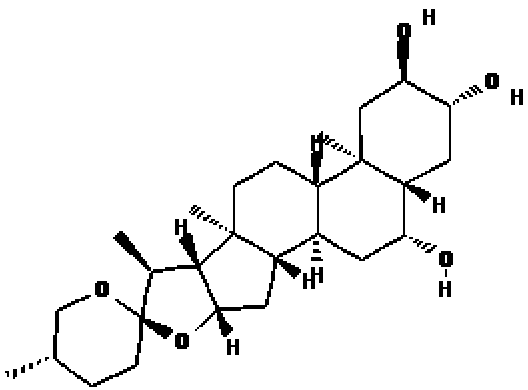
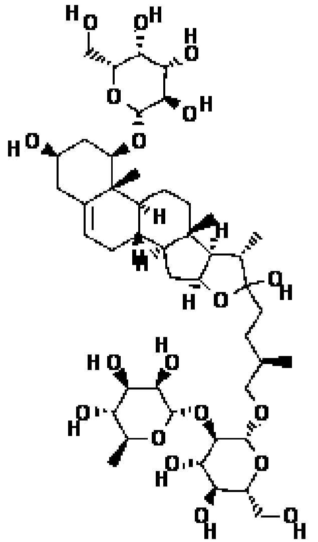
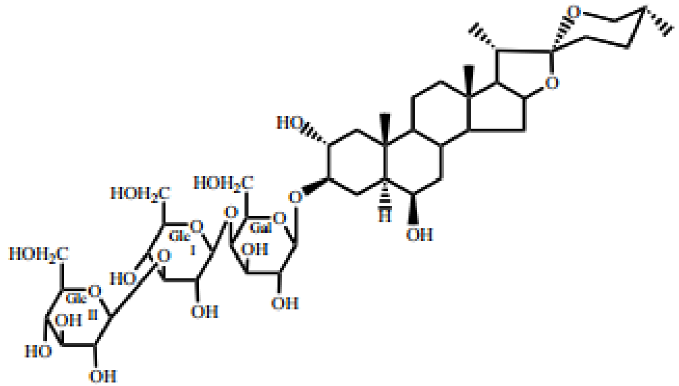
		tetrol	O-β-D-Glc-(1→2)-O-β-D-Gal
	PERSICOSIDE D (D1/D2)	Furostane-2α,3β,22ξ,26-tetrol	26-O-β-D-Glc 3-O-β-D-Glc-(1→3)-O-β-D-Glc-(1→2)-O-β-D-Gal
	CEPOSIDES A1/A2	(25R)-furost-5(6)-ene-1b,3β,22ξ,26-tetrol	26-O-α-L-Rhα-(1 →2)-O-β-D-Gal 1-O-β-D-Xyl
	CEPOSIDES C1/C2	(25R)-furost-5(6)-ene-1b,3β,22ξ,26-tetrol	26-O-α-L-Rhα-(1 →2)-O-β-D-Gal 1-O-β-D-Gal
	TROPEOSIDES A1/A2	Furost-5(6)-ene-3β,22ξ-diol	26-O-α-L-Rha 1-O-β-D-Gal
	TROPEOSIDES B1/B2	Furost-5(6)-ene-3β,22ξ-diol	26-O-α-L-Rha 1-O-β-D-Xyl
	ASCALONICOSIDES A1/A2	Furost-5(6)-ene-3β,22ξ-diol	26-O-α-L-Rhα-(1 →2)-O-β-D-Glc 1-O-β-D-Gal
	PERSICOSIDE E	Alliosterol	1-O-α-L-Rha 16-O-α-L-Rha (1 →2)-O-β-D-Gal
A. porrumL. (A. ampeloprasumL. var. porrum)		Diosgenin β-Chlorogenin Porrigenin B Neoporrigenin B 12-Ketoporrigenin Porrigenin C Agigenin Neoagigeni Porrigenin A Neoporrigenin A 2,3-Seco-porrigenin	
	F-GITONIN	Gitogenin	3-O-β-D-Glc-(1→3)-O-β-D-Glc-(1→2)-[β-D-Xyl-(1→3)]-O-β-D-Glc-(1 →4)-O-β-D-Gal
		β-Chlorogenin	3-O-β-D-Glc-(1→2)-[β-D-Glc-(1→3)]-O-β-D-Gal

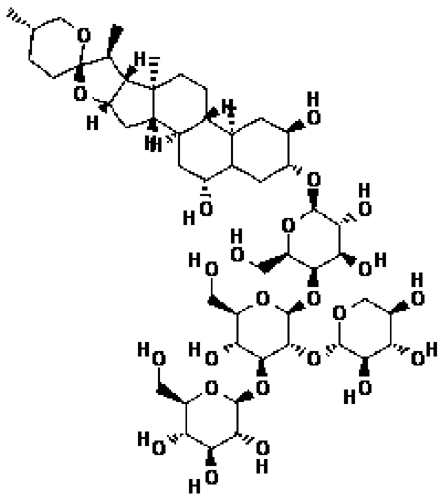
			6-O-β-D-Glc
		β-Chlorogenin	3-O-β-D-Glc-(1→2)-[β-D-Xyl-(1→3)]-O-β-D-Glc-(1→4)-O-β-D-Gal
		β-Chlorogenin	3-O-β-D-Glc-(1→3)-O-β-D-Glc-(1→2)-[β-D-Xyl-(1→3)]-O-β-D-Glc-(1 →4)-O-β-D-Gal
	AGINOSIDE LEUCOSPIROSIDE A		
		12-Ketoporrigenin	3-O-β-D-Glc-(1→2)-[β-D-Xyl-(1→3)]-O-β-D-Glc-(1→4)-O-β-D-Gal
		Porrigenin B	3-O-β-D-Glc-(1→3)-O-β-D-Glc-(1→2)-[β-D-Glc-(1→3)]-O-β-D-Glc-(1 →4)-O-β-D-Gal
		Porrigenin C	3-O-β-D-Glc-(1→2)-[β-D-Xyl-(1→3)]-O-β-D-Glc-(1→4)-O-β-D-Gal
		Alliosterol	1-O-α-L-Rha 16-O-β-D-Glc
		Alliosterol	1-O-β-D-Glc-(1→4)-O-α-L-Rha 16-O-β-D-Gal [26]

Παρακάτω παρουσιάζονται μερικές από τις δομές σαπωνινών και σαπωγενινών που έχουν απομονωθεί από το φυτό *A. ampeloprasum*

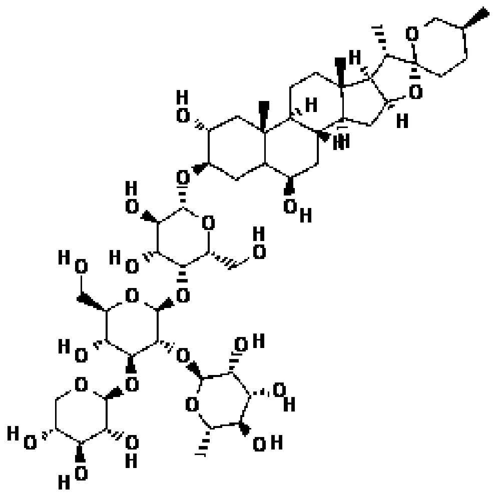
Πίνακας 3-11 Αντιπροσοπεφτικές σαπωνίες και σαπωγενίνες του *A. ampeloprasum*

<table>
<tr><th colspan="3">Σαπωνίες και σαπωγενίνες</th></tr>
<tr>
<td>
R
Yayoisaponin A 
Yayoisaponin C 
Aginoside 
Agigenin H</td>
<td>
Yayoisaponin B</td>
<td>
Dioscin [38]</td>
</tr>
</table>

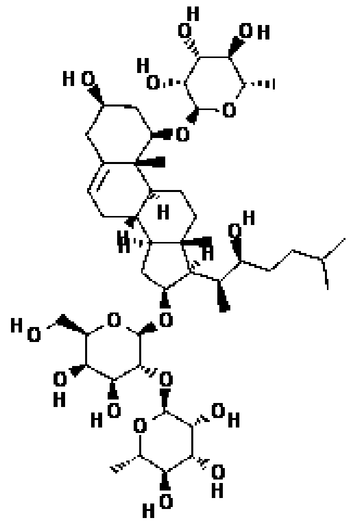
<table>
<tr>
<td>
KARATAVIOSIDE A</td>
<td>
<table>
<tr><td></td><td>R</td><td>R′</td><td>R′′</td></tr>
<tr><td>CEPOSIDES A1/A2</td><td>β-D-Xyl</td><td>OH</td><td>H</td></tr>
<tr><td>CEPOSIDES A1/A2</td><td>β-D-Gal</td><td>OH</td><td>H</td></tr>
</table></td>
<td>
leucospiroside A</td>
</tr>
<tr>
<td>
Neoagigenin</td>
<td>
ASCALONICOSIDES A1/A2</td>
<td>
AMPELOSIDE Bs1</td>
</tr>
</table>



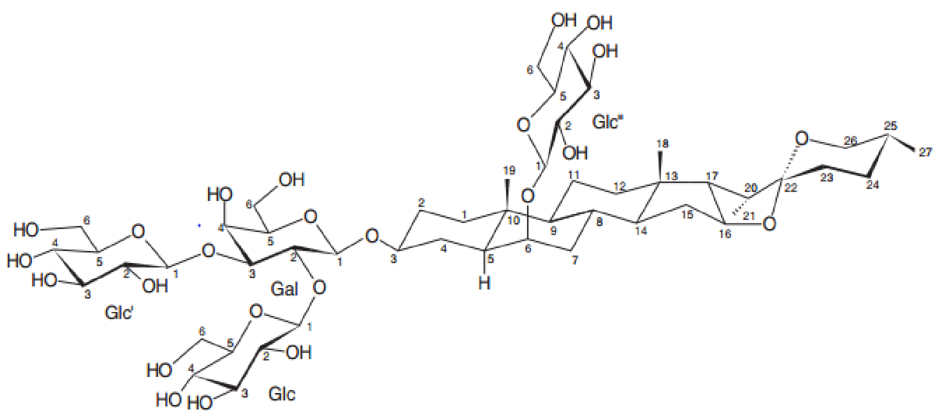
PERSICOSIDE A



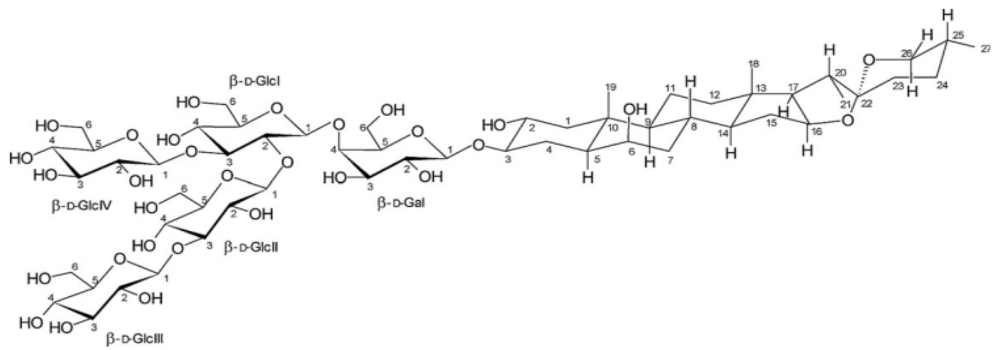
PERSICOSIDE B



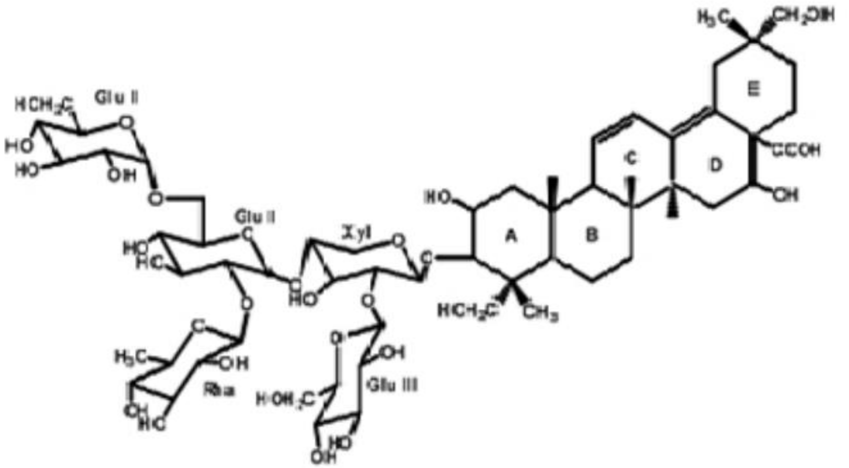
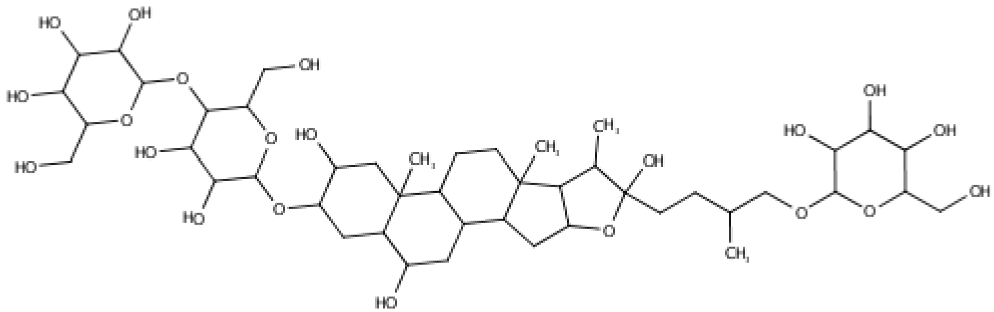
PERSICOSIDE E



(3β,5α,6β,25R)-6-[(β-D-Glucopyranosyl)oxy]-spirostan-3-yl O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-glucopyranosyl-(1→3)]-β-D-galactopyranoside [39]

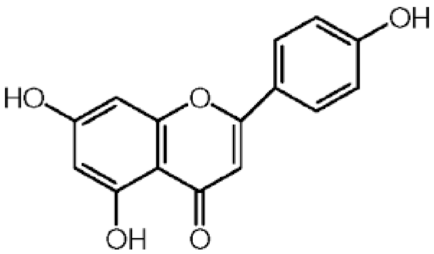
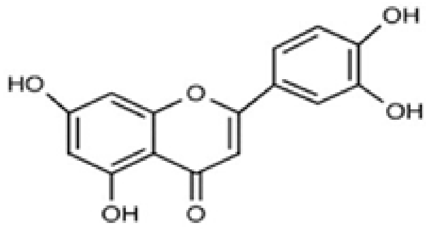
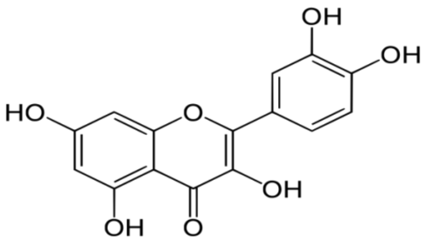
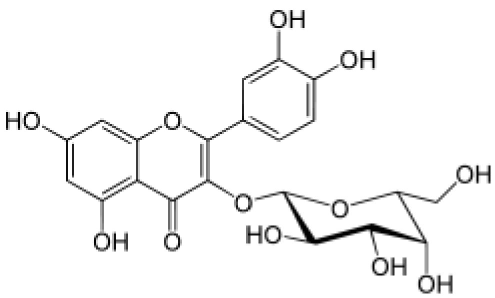
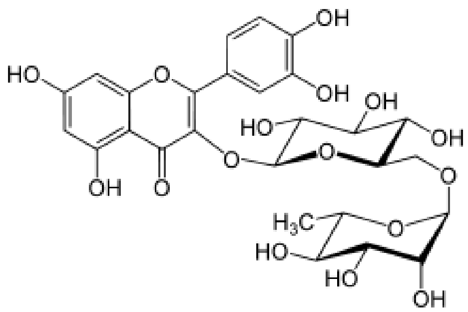
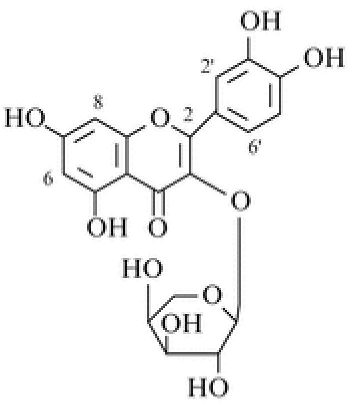
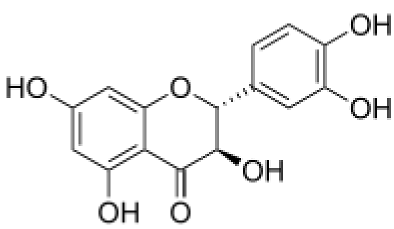


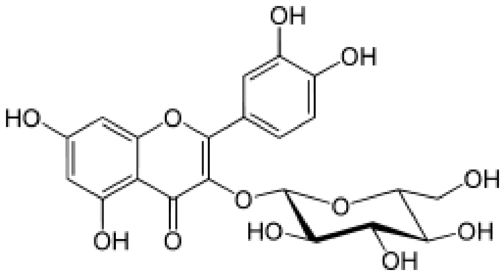
3-[(O-b-D-glucopyranosyl-(1→3)-b-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-[O-b-D-glucopyranosyl-(1→3)]-O-b-D-glucopyranosyl-(1→4)-b-D-galactopyranosyl)oxy]-2,6-dihydroxy-(2a,3b,5a,6β,25R)-spirostane [40]

 3-O-{β-D-glucopyranosyl-(1→6)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-xylopyranosyl}-2,16-dihydroxy-23,29-dihydroxymethylolean-11,13(18)-diene-28-oic acid [41]	 AMPELOSIDE Bf2

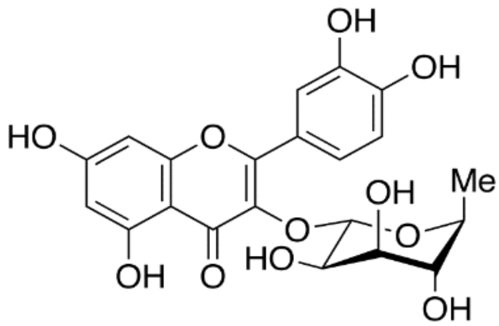
3.2.1.2 <u>*Φλαβονοειδή*</u>

Πίνακας 3-12 Τα κυριότερα φλαβονοειδή που έχουν απομονωθεί από το *Allium ampeloprasum* [42, 18, 43]

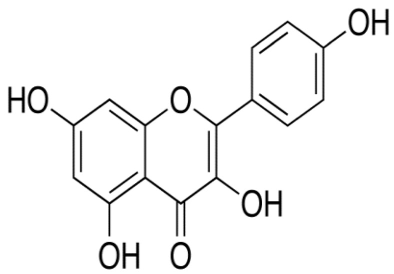
Φλαβονοειδή	
Φλαβόνες	
 Apigenin	 Luteolin
Φλαβονόλες	
 Quercetin	
Παράγωγα κερκετίνης	
 Quercetin 3-O-galactoside	 Quercetin 3-O-rutinoside
 Quercetin-3-O-arabinoside (Gvajaverin)	 Dihydroquercetin- Taxifolin



Quercetin-3-*O*-glucoside-isoquercetin

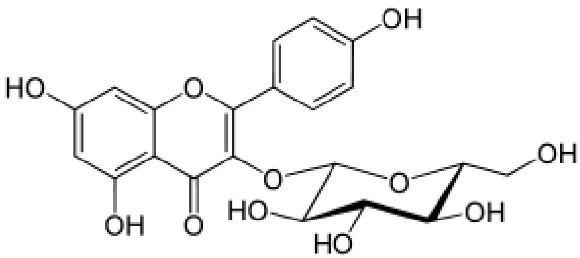


Quercetin 3-o-rhamnoside

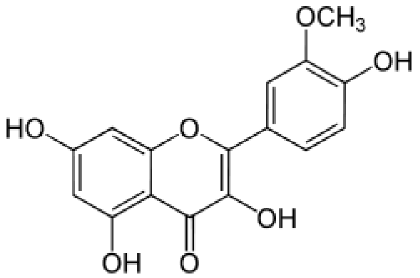


Kaempferol

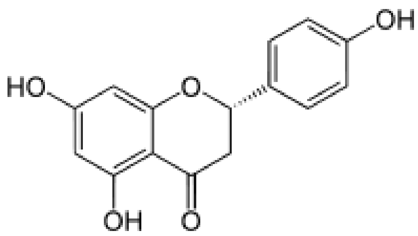
Παράγωγα κεμφερόλης – γλυκοσίδες κεμφερόλης



Kaempferol 3-O-glucoside-Astragalin



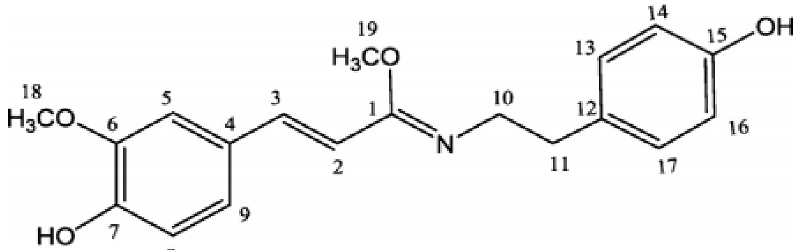
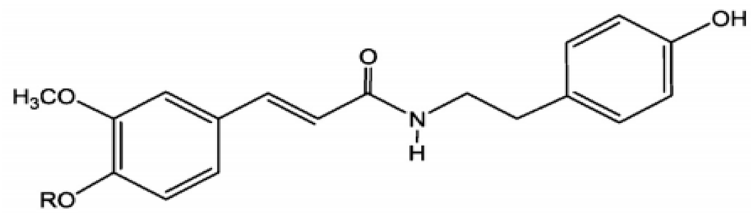
Isorhamnetin



Narinenin

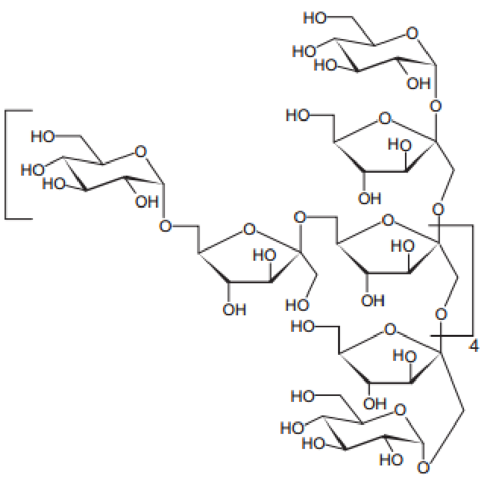
3.2.1.3 *Παράγωγα κινναμωμικού οξέος*

Πίνακας 3-13 Τα κυριότερα παράγωγα κινναμωμικού οξέος που έχουν απομονωθεί από το *Allium ampeloprasum*

Παράγωγα κινναμωμικού οξέος
 **1**   A cinnamic imidate, (1Z,2E)-methyl 3-(-p-hydroxy-m-methoxyphenyl) – N - (-p-hydroxyphenethyl) acrylimidate, named persicoimidate
 **2** R = H   **3** R = OCH_3 N-feruloyl tyramine (2) and N-caffeoyl tyramine (3)

[44]

3.2.1.4 *Πολυσακχαρίτες*



a-D-Glcp-(1→1)-b-D-Fruf-(2→1)-{[a-D-Glcp-(1→6)-bD-Fruf-(2→6)]-a-D-Fruf-(2→1)}4-a-D-Fruf-(2M1)-b-D-Glcp –(glucofructan) [45]

4 ΔΡΟΓΟΙΣΤΟΡΙΑ

4.1 Ιστορική αναδρομή σχετικά με χρήσεις και ιδιότητες φυτών των *Allium*

Η προέλευση και οι ιδιότητες των φυτών των *Allium* χάνονται στα βάθη της ιστορίας. Το σκόρδο και το κρεμμύδι είναι από τα πιο παλιά καλλιεργούμενα φυτά. Φαίνεται ότι ήταν γνωστά πολύ πριν από κάθε ιστορική μαρτυρία ενώ η καταγωγή τους χάνεται κάπου στην Κεντρική Ασία. Ανήκουν σε εκείνα τα φυτικά είδη τα οποία από πολύ παλιά είναι συνδεδεμένα με τις διατροφικές συνήθειες και τα θεραπευτικά μέσα των διαφόρων λαών.

Πολλές αναφορές σε αρχαία κείμενα επιβεβαιώνουν την πολύπλευρη χρήση τους από ένα πλήθος αρχαίων λαών (Βαβυλωνίων, Αιγυπτίων, Εβραίων, Ελλήνων, Ρωμαίων, Κινέζων, Ινδών, Ινδιάνων, Βίκινγκς και άλλων Ευρωπαϊκών φυλών από τον Μεσαίωνα και μετά). Για συγκριτικούς λόγους, αξίζει τον κόπο να παραθέσουμε, εν συντομία, ορισμένες από αυτές.

Οι Αιγύπτιοι δείχνουν να είναι από τους πρώτους που εκτίμησαν τις μοναδικές τους ιδιότητες. Ο Πλούταρχος (Περί της Ισιδος και του Οσιρι 2:253) αναφέρει ότι για τους Αρχαίους Αιγύπτιου το κρεμμύδι συμβόλιζε το σύμπαν. Σύμφωνα με την κοσμογονία τους οι διαφορετικές σφαίρες του σύμπαντος ουρανός, γή, κόλαση ήταν συγκεντρικές όπως τα φύλλα του βολβού του κρεμμυδιού. Τα σκόρδα και τα κρεμμύδια πάντα εφοδίαζαν τους τάφους των Φαραώ, ώστε σύμφωνα με τις δοξασίες τους, τα γεύματά τους στη μετέπειτα ζωή να ήταν πλούσια και πλήρη. Τεράστια χρηματικά ποσά ξοδεύονταν για να τραφούν με κρεμμύδια και σκόρδα οι δούλοι που έχτιζαν τις πυραμίδες. Χαρακτηριστικά, ο Ηρόδοτος αναφέρει ότι κατά το κτίσιμο της πυραμίδας του Χέοπα, οι δούλοι κατέβηκαν σε απεργία όταν προσπάθησαν να τους μειώσουν τα σκόρδα και τα κρεμμύδια από την τροφή τους. Ο Codex Ebers, ένας αιγυπτιακός ιατρικός πάπυρος που χρονολογείται πριν από το1500 π.Χ., από τις 800 φαρμακευτικές συνταγές αναφέρει 22 με βασικό συστατικό το σκόρδο για διάφορες ασθένειες.

Στην Αρχαία Ελλάδα ο Ιπποκράτης (Περί διαίτης ΙΙ 54 (VI 556) & Περί παθήσεων 54(VI 264)) χρησιμοποιούσε το σκόρδο για τις καθαρτικές, διουρητικές του ιδιότητες, για τα τραύματα και την πνευμονία, ενώ ο Αριστοτέλης κατά της λύσσας. Επιπλέον στο 1ο μ.Χ. αιώνα, ο Διοσκουρίδης γιατρός, φαρμακολόγος και βοτανολόγος από την Ανάζαρβο της Κιλικίας, πρότεινε το σκόρδο για τις περιπτώσεις εντερικών ταινιών ερεθισμού της σκωληκοειδίτιδας, σαν τονωτικό του κυκλοφορικού συστήματος και σαν κατάπλασμα σε περιπτώσεις δερματικών παθήσεων (εξανθημάτων, αλωπεκίας, λέπρας). Ενώ από τους Ρωμαίους ο Πλίνιος το χρησιμοποιούσε σαν φάρμακο κατά δεκαπέντε ασθενειών και επιπλέον σαν απωθητικό φιδιών, σκορπιών.

Στην Ινδία, από το σκόρδο παρασκεύαζαν μια αντισηπτική λοσιόν για το πλύσιμο πληγών και ελκών. Στην Κίνα το τσάι από κρεμμύδι για πολύ καιρό προτείνονταν για τον πυρετό, τον πονοκέφαλο, τη χολέρα και τη δυσεντερία.

Στην Ευρώπη του Μεσαίωνα κυκλοφορούσε ένα βιβλίο φαρμακευτικής και εμπειρικής ιατρικής που ανάμεσα στα άλλα θεωρούσε το χυμό κρεμμυδιού σαν κατάλληλο φάρμακο για την αντρική τριχόπτωση, τους σπασμούς και τα δαγκώματα από τα λυσσασμένα σκυλιά. Ο μεγάλος θαλασσοπόρος Τζέϊμς Κουκ στο ταξίδι του για τα νησιά Γκαλαπάγκος είχε διατάξει το πλήρωμα του να καταναλώνει μεγάλες ποσότητες κρεμμυδιών για την καταπολέμηση της αβιταμίνωσης και των πιθανών ασθενειών. Στο σκόρδο εξαιτίας των ανεξήγητων, μέχρι τότε, θαυμαστών δράσεών του είχαν αποδοθεί υπερφυσικές ικανότητες. Έτσι, είχε στρατευθεί στον αγώνα του ξορκίσματος των κακών και διαβολικών πνευμάτων, των μαγισσών και των βρικολάκων και ότι άλλο γεννούσε η φοβισμένη ανθρώπινη φαντασία. Στις μεγάλες, μάλιστα, επιδημίες του 18ου αιώνα σκορπούσαν φέτες κρεμμυδιού και κρεμούσαν παντού σκόρδα για να“παγιδεύσουν” τις αιτίες του κακού [13].

Εκτός από το σκόρδο και το κρεμμύδι υπάρχουν πολλές αναφορές σε αρχαία κείμενα για το πράσο και για το αγριόπρασο. Πιο συγκεκριμένα ο Διοσκουρίδης στο έργο του "**Περὶ ὕλης ιατρικής**" (De Materia Medica), το οποίο ήταν προϊόν προσωπικών παρατηρήσεων, απαλλαγμένο από προλήψεις και δεισιδαιμονίες, πρότεινε το πράσο γνωστό ως *Allium porrum ή Allium ameloprasum var porrum*, ως καταπραϋντικό για πόνους στομαχιού, ως καλό διουρητικό, ως εμμηναγωγό (για την αντιμετώπιση των διαταραχών της έμμηνου ρύσης). Επίσης προκαλεί νωθρότητα της όρασης και μειώνει τον πόνο από κύστες των νεφρών. Τα φύλλα του φυτού βρασμένα σε θαλασσινό νερό και ξύδι είναι ένα εξαιρετικό βάμμα (λουτρό) για ασφυξία και τη σκληρότητα της μήτρας. Σε μία άλλη φαρμακευτική συνταγή ο Διοσκουρίδης αναφέρει ότι αν αναμιχθεί ο χυμός από τους σπόρους του πράσου με ξύδι και λιβάνι, αυτό το σκεύασμα έχει αιμοστατική δράση (ειδικά στο αίμα που προέρχεται από τα ρουθούνια), αποτρέπει τα αφροδίσια νοσήματα, ενώ αν προστεθεί και μέλι μπορεί να χρησιμοποιούνται ως σιρόπι για όλες τις διαταραχές στο στήθος. Επιπλέον μπορεί να ληφθεί ως ένα ποτό με μέλι και νερό από εκείνους που έχουν δαγκωθεί από δηλητηριώδη πλάσματα, ενώ μπορεί να εφαρμοστεί το πράσο και τοπικά. Σταγόνες από χυμό του εν λόγω φυτού με ξίδι, λιβάνι και γάλα καταπραΰνουν τον πόνο και ελαττώνουν το θόρυβο στα αυτιά. Τέλος δυο κουταλάκια του γλυκού των σπόρων του φυτού που λαμβάνεται σε ένα ρόφημα με την ίδια ποσότητα μούρα μυρτιάς σταματάει την δημιουργία παλιού αίματος στην έμμηνο ρύση.

Όσον αφορά το *Allium ampeloprasum* ο Διοσκουρίδης αναφέρει ότι σε σχέση με το πράσο έχει λιγότερη δράση για πόνους του στομαχιού, ενώ είναι πιο διουρητικό και εξίσου εμμηναγωγό και καταπραϋντικό για πόνους από τσίμπημα δηλητηριώδη ζώων [46].

5 ΔΡΟΓΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ

Στην σημερινή εποχή παρά την ραγδαία εξέλιξη της Φαρμακολογικής επιστήμης και των θεραπευτικών μέσων, πολλές έρευνες συνεχίζουν να γίνονται, που ενισχύουν τις παραδοσιακές αντιλήψεις για τις ποικίλες φαρμακολογικές ιδιότητες του γένους *Allium*.

5.1 Φαρμακολογικές και βιολογικές δράσεις φυτών του γένους *Allium*

Δραστικά κατά πολλών θετικών και αρνητικών κατά Gramm μικροβίων, κόκκων, μυκοβακτηριδίων, κορυνοβακτηρηδίων, μυκήτων κ.λ.π. βρέθηκαν τα μεθανολικά κυρίως εκχυλίσματα (ιδιαίτερα του *A. sativum*) σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης. Η δραστικότητα αυτή αποδίδεται κυρίως στο S-αλλυλο κυστεϊνικό σουλφοξείδιο (αλλιίνη) το οποίο διασπάται πολύ εύκολα, ιδιαίτερα με την αύξηση της θερμοκρασίας.

- **Δράση κατά των Καρδιαγγειακών Παθήσεων**

Στην περίπτωση αυτή τα είδη του γένους *Allium* (κυρίως τα *A. cepa* και *A. sativum*) δρουν κατά πολλών διαφορετικών παραγόντων που σχετίζονται θετικά με καρδιοαγγειακές παθήσεις.
α) Υποχοληστερολαιμική δράση

Η υποχοληστερολαιμική δράση έχει διαπιστωθεί από πολλούς ερευνητές. Σύμφωνα με έρευνες, η δράση αυτή οφείλεται στα σχηματιζόμενα δισουλφίδια, τα οποία αναστέλλουν την βιογένεση της χοληστερόλης, αδρανοποιώντας μη αντιστρεπτά το υπεύθυνο ένζυμο, την 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλ- CoA αναγωγάση (HMG- CoA αναγωγάση).

β) Αντιθρομβωτική δράση

i) Παρεμπόδιση της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων

Για την δράση αυτή ευθύνονται τα παράγωγα των κυστεϊνικών σουλφοξειδίων και κυρίως εκείνα με μεγαλύτερα μοριακά βάρη. Αυτά σχηματίζονται με παρατεταμένη πυρόλυση (π.χ. μέθυλ-αλλυλ τρισουλφίδια, σεπαένια).

ii) Ινωδολυτική & Αντιυπερτασική ιδιότητα.

Η ινοδωλυτική δραστικότητα είναι άλλη μία παράμετρος που μπορεί να εμποδίσει τον σχηματισμό θρόμβων. Πολλοί ερευνητές έχουν αναφερθεί σ'αυτή ιδιότητα των ειδών του γένους *Allium*.

- **Αντιυπεργλυκαιμική Δράση**

Από το 1923 είναι γνωστή και η αντιυπεργλυκαιμική δράση. Σύμφωνα με τους Augusti & Benaim (1975) για την δράση αυτή ενοχοποιείται το αλλυλο-πρόπυλο δισουλφίδιο. Αυτό δρα μάλλον, απενεργοποιώντας τους αδρανοποιητές της ινσουλίνης σε διαβητικά άτομα. Γενικά παρατηρείται μια δράση παρόμοια με αντιδιαβητικά φάρμακα, χωρίς όμως πρόκληση υπογλυκαιμικής δράσης σε φυσιολογικά άτομα.

- **Αντιασθματική & Αντιαλεργική δράση**

Η ιδιότητα αυτή αποδίδεται στα κυστεϊνικά σουλφοξείδια συμμετρικά ή μη και ιδιαίτερα στα ακόρεστα τα οποία δρουν σαν αντιασθματικά με πολλούς τρόπους.

- **Παθήσεις του πεπτικού συστήματος**

Το πράσο εμφανίζει ήπια αποτοξινωτική και υπακτική δράση. Χρησιμοποιείται, έτσι, για παθήσεις του πεπτικού συστήματος όπως το έλκος στομάχου ή για την αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας του εντέρου. Ολιγοήμερη δίαιτα με πράσο καταπολεμά τη χρόνια διάρροια ενώ μια συστηματική δίαιτα δρα κατά οξείων και χρόνιων παθήσεων του ήπατος [13],[34].

- **Δράση στην οστεοπόρωση**

Στα είδη του γένους *Allium*, αλλά και στα περιεχόμενα φλαβονοειδή και κυρίως στην κερκετίνη, την ρουτίνη και καμφερόλη έχουν αποδοθεί οστεοπροστατευτικές ιδιότητες τόσο in vitro [47][48], όσο και σε *in vivo* μοντέλα οστεοπόρωσης [49],[50]. Οι Mukherjee et al., προσδιόρισαν τις οστεοπροστατευτικές ιδιότητες του *Allium sativum* σε επίμυες, δείχνοντας την αύξηση της οστικής πυκνότητας, κυρίως μέσω μηχανισμού μεταφοράς ασβεστίου [51][52], ενώ οι Oliveira et al.[53] και Wetli et al. [54] παρουσίασαν την ικανότητα του *Allium cepa* να καταστέλλει την διαφοροποίηση και την ενεργότητα των οστεοκλαστών.

- **Αντικαρκινική Δράση**

Οι μελέτες των τελευταίων χρόνων έχουν αρχίσει να αναδεικνύουν μια πιθανή πολύπλευρη αντικαρκινική δράση των ειδών των *Allium*. Η κατανάλωση κρεμμυδιού και σκόρδου σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες έχει συνδεθεί με την χαμηλή πιθανότητα ανάπτυξης διαφόρων μορφών καρκίνου. Χαρακτηριστικές είναι οι επιδημιολογικές μελέτες στην Κίνα στις οποίες επιβεβαιώνεται ο χαμηλός κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του εντέρου και του στομάχου από άτομα που καταναλώνουν σχετικά υψηλές ποσότητες σκόρδου. Αντίστοιχες μελέτες έχουν διεξαχθεί στην Ιταλία για τον καρκίνο του στομάχου και στους Ιάπωνες της Χαβάης και το Βέλγιο για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί πάνω στη χημειοπροστατευτική δράση των *Allium*. Σαν χημειοπροστατευτικά μέσα ορίζονται οι μη θρεπτικές ουσίες που περιέχονται στη δίαιτα του ανθρώπου και εμφανίζουν αντιμεταλλακτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Το σκόρδο και το κρεμμύδι έχουν αποδείξει με πληθώρα μελετών ότι παρουσιάζουν τέτοιες ιδιότητες. Έχει αποδειχτεί *in vivo* και *in vitro* ότι οι δραστικές ουσίες των *Allium* κυρίως αναστέλλουν την καρκινογένεση αλλά και μειώνουν τη προώθηση διαφόρων μορφών καρκίνου σε πολλά κατάλληλα μοντέλα βιοχημικών συστημάτων [13].

5.2 Φαρμακολογικές και βιολογικές δράσεις του *Allium ampeloprasum*

- **<u>Αντιμικροβιακή δράση</u>**

Το *Allium ampeloprasum* παρουσιάζει ισχυρές αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ένα σύνολο 12 *Allium*, που χρησιμοποιήθηκαν για μαγειρικούς σκοπούς, εξετάστηκαν για αντιβακτηριακή δράση κατά Escherichia coli με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων και μέσο της μεθόδου ελάχιστης θανατηφόρου συγκέντρωσης. Μαζί με τα άλλα 12 *Allium*, και το πράσο (*A. porrum*) και το αγριόπρασο (*A. ampeloprasum*) εμφάνισαν αντι-βακτηριακή δράση.
Εκτός από αυτά, τα αιθέρια έλαια από διάφορα μπαχαρικά, εξετάζονται ως φυσικοί αντιμικροβιακή παράγοντες, λόγω του πιθανού ρόλου τους στην προστασία των τροφίμων από μικροοργανισμούς, και της μη τοξικότητάς τους, σε αντίθεση με τα συνθετικά συντηρητικά.

Επίσης ανασταλτική δράση έχουν εμφανίσει τα αιθέρια έλαια, διάφορων συγκεντρώσεων (1, 4, 7 και 10%), *Allium ampeloprasum* επί τρεις ζύμες (Saccharomyces cerevisiae, Candida tropicalis και Rhodotorula sp.) και τρεις μύκητες (Aspergillus tamarii, Penicillium griseofulvum και Eurotium amstelodami) .

Επιπλέον, το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του υπο-είδος *Allium ampeloprasum* γνωστό ως *Allium ampeloprasum L. var, atroviolaceum* (ενδημικά της Kermanshah, Ιράν) έδειξε αντιμικροβιακή δραστικότητα εναντίον Klebsiella pneumonia (250 μgr / ml) και Shigella flexenry (250 μgr / ml). Η αντιμικροβιακή δράση του *Allium ampeloprasum L. var atroviolaceum* μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι περιέχει πινένιο και φαινόλες [55].

- **Υποχοληστερολαιμική επίδραση**

Το φυτό *Allium ampeloprasum var porrum L.* έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι χρήσιμο για την θεραπεία της υπερχοληστερολαιμίας. Σε μια μελέτη διάρκειας 12 εβδομάδων κουνέλια τράφηκαν με υπερχοληστεριναιμική διατροφή ώστε να αξιολογηθεί η αντιϋπερχοληστερολεμική επίδραση υδροαλκοολικού εκχυλίσματος από βολβούς του *A. ampeloprasum var porrum L.*. Τα κουνέλια χωρίστηκαν σε πέντε ομάδες – την ομάδα ελέγχου-τυφλό, την υπερχοληστερολαιμική ομάδα ελέγχου, και στις τρεις ομάδες θεραπευτικής αγωγής (υπερχοληστεριναιμική διατροφή + 250, 500, ή 1, 000mg / kg σωματικού βάρους του εκχυλίσματος, αντίστοιχα). Η συνολική χοληστερόλη του πλάσματος, LDL μειώθηκε σημαντικά σε όλες τις ομάδες που έλαβαν θεραπεία με εκχύλισμα *A. porrum* σε σχέση με την υπερχοληστερολαιμική ομάδα. Έτσι, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι αυτό το φυτό μπορεί να είναι χρήσιμο για την αντιμετώπιση της υπερχοληστερολαιμίας [36].

- **Αντιοξειδωτική Δράση**

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των (*Allium ampeloprasum var. porrum*) έχει αποδειχτεί από διαφορετικές ερευνητικές εργασίες που έχουν πραγματοποιηθεί σε όλο τον κόσμο.
Η ικανότητα αυτών των φυτών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες αποδίδεται κυρίως στους δευτερογενείς μεταβολίτες allicin και S-βενζυλο phenylmethanethiosulfinate (BPT)[56].

- **Ανδρογόνο δράση**

Έρευνες σε αυτόν τον τομέα υποδεικνύουν ότι η στοματική χορήγηση του *A. ampeloprasum* μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση της ανδρικής γονιμότητας και την έκκριση της τεστοστερόνης, γοναδοτροπίνες (LH, FSH) σε φυσιολογικούς αρουραίους. Η βελτίωση της αναπαραγωγικής λειτουργίας των αρουραίων οφείλεται στην αντιοξειδωτική και ανδρογόνο δράση του *A. ampeloprasum*. Επίσης το *A. ampeloprasum* ως τρόφιμο είναι χρήσιμο για τους ασθενείς που πάσχουν από τη σεξουαλική ανικανότητα [57].

- **Ρόλο στην εμφάνιση διαβήτη και των συναφών επιπλοκών της**

Έπειτα από χορήγηση του *A. ampeloprasum* από του στόματος για ένα μήνα σε διαβητικούς αρουραίους παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο επίπεδο της γλυκόζης, χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων (45), που αποδεικνύουν και την πιθανή αντιδιαβητική του δράση [58].

- **Αντικαρκινική δράση**

Η έρευνα αποδεικνύει επίσης την πιθανή επίδραση του *A. ampeloprasum* σε κύτταρα οστεοσαρκώματος, U2OS. Αυτό μειώνει την βιωσιμότητα των U2OS κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και επηρεάζουν την μορφολογία τους. Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι το *A. ampeloprasum* όχι μόνο αναστέλλει των πολλαπλασιασμό καρκινικών κύτταρων, αλλά επηρεάζει επίσης στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων [59].

- **<u>Δράση στην οστεοπόρωση</u>**

Μια μελέτη σε αρσενικούς αρουραίους, στους οποίους πραγματοποιήθηκε στοματική χορήγηση αλκοολικού εκχυλίσματος του είδους *Allium ampeloprasum var. porrum* απέδειξε τις οστεοπροστατευτικές ιδιότητες του φυτού αυτού. Αυτό διαπιστώθηκε λόγω της αύξηση της οστικής πυκνότητας, κυρίως μέσω μηχανισμού μεταφοράς ασβεστίου [60].

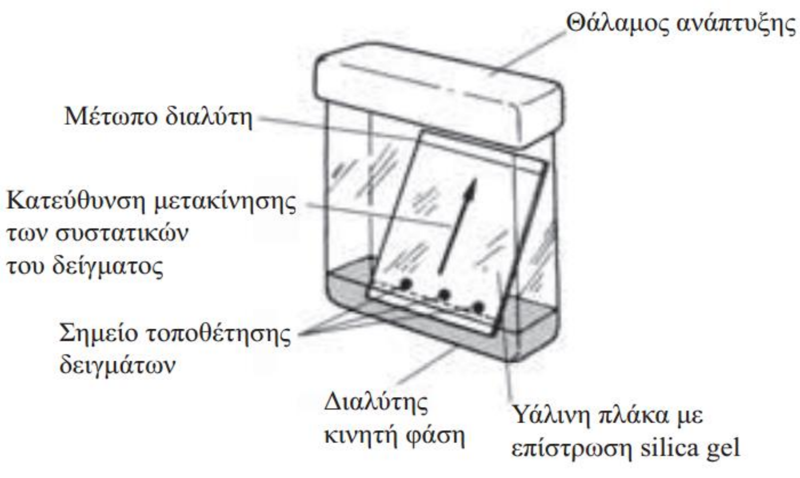
6 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Χρωματογραφικές τεχνικές

Χρωματογραφία ονομάζουμε το σύνολο των τεχνικών που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των συστατικών ενός δείγματος στις οποίες τα συστατικά κατανέμονται σε δύο μη αναμειγνυόμενες φάσεις, η μία από τις οποίες είναι στατική ενώ η άλλη κινητή (ορισμός κατά IUPAC). Οι δύο φάσεις βρίσκονται στη χρωματογραφική στήλη, και ο διαχωρισμός αυτός βασίζεται στις διαφορές, που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητες των συστατικών ενός μείγματος, όπως είναι το σημείο ζέσεως (για πτητικές ενώσεις), η πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία (για ιοντικές ενώσεις), το μέγεθος των μορίων κ.α. Οι διαφορές αυτές διαφοροποιούν τη σχετική φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού προς τις δύο φάσεις της χρωματογραφικής στήλης. Έτσι, η κινητή (ή φέρουσα φάση), διερχόμενη μέσα από τη στατική, προκαλεί διαφορετική μετατόπιση πάνω σε αυτή των συστατικών του μείγματος, τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους

6.1.1 Αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Analytical Thin Layer Chromatography – Analytical TLC)

Η χρωματογραφική αυτή τεχνική παρέχει τη δυνατότητα ποιοτικού κυρίως ελέγχου του χημικού περιεχομένου των ολικών εκχυλισμάτων και των κλασμάτων τους. Η αρχή της μεθόδου έγκειται στους δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ της στατικής φάσης και του διαλύτη ανάπτυξης, με τα μόρια του υπό εξέταση δείγματος. Ο διαχωρισμός των ενώσεων βασίζεται στον ανταγωνισμό της διαλυμένης ουσίας και της κινητής φάσης για τη δέσμευση των θέσεων στην στατική φάση



Εικόνα 6-1 Διάταξη ενός συστήματος TLC

Χρησιμοποιούνται αλουμινένιες και γυάλινες πλάκες με επίστρωση γέλης οξειδίου του πυριτίου (silica gel 60 F_{254} Merck), η οποία αποτελεί την στατική φάση και πιο συγκεκριμένα:

- Γέλης οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20/20 x 10 cm, πάχους στιβάδας 0,1 mm (TLC κανονικής φάσεως)

- Γέλης οξειδίου του πυριτίου αντιστρόφου φάσεως (RP-18 $F_{254}S$) με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20/20 x 10 cm, πάχος στιβάδας 0,25 mm (TLC αντιστρόφου φάσεως)

Οι πλάκες μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων, μεταφέρονται σε γυάλινους θαλάμους που έχουν ήδη κορεστεί με το κατάλληλο σύστημα διαλυτών (κινητή φάση) και πραγματοποιείται η ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων.

Τα συστήματα των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων ήταν:

Πίνακας 6-1 Συστήματα των διαλυτών

TLC κανονικής φάσης	TLC αντίστροφης φάσης
CH_2Cl_2/MeOH	H_2O/ACN
EtOAc/MeOH/H_2O/FA	
Tol/EtOH/ FA	

Μετά την ανάπτυξή τους τα χρωματογραφήματα παρατηρήθηκαν σε λάμπα υπεριώδους–ορατού (UV-Vis), σε μήκη κύματος 254nm και 366nm. Σε ορισμένα από αυτά πραγματοποιήθηκε λήψη φωτογραφίας, στα αντίστοιχα μήκη κύματος ή στο ορατό, με χρήση CAMAG TLC Visualizer. Ενώ τέλος ψεκάστηκαν με μεθανολικό διάλυμα θεϊκής βαννιλίνης 5%(αντιδραστήριο εμφάνισης), θερμάνθηκαν και παρατηρήθηκαν στο ορατό.

6.1.2 Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Preparative Thin Layer Chromatography – Preparative TLC)

Με την παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος είναι δυνατή η ποσοτική παραλαβή ενός ή περισσοτέρων δευτερογενών μεταβολιτών από ένα απλό μίγμα. Η αρχή της μεθόδου και η διαδικασία είναι όμοιες με την αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, με τη διαφορά ότι μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος απομακρύνεται η ζώνη που αντιστοιχεί στον μεταβολίτη που μας ενδιαφέρει, ο οποίος και εκχυλίζεται από το οξείδιο του πυριτίου με κατάλληλο διαλύτη.

Πραγματοποιήθηκε σε γυάλινες πλάκες με επίστρωση πυριτίου (Silica gel 60 F_{254}) κανονικής φάσεως και (Silica gel 60 RP-18 $F_{254}s$) αντιστρόφου φάσεως και πιο συγκεκριμένα:

- Γέλης οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε γυάλινες πλάκες 20 x 20 cm. Πάχος στιβάδας 0.25 mm (παρασκευαστική TLC).
- Γέλης οξειδίου του πυριτίου αντιστρόφου φάσεως (RP-18) με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20 cm. Πάχος στιβάδας 0.25 mm (παρασκευαστική TLC).
- Γέλης οξειδίου του πυριτίου αντιστρόφου φάσεως (RP-18) με δείκτη φθορισμού σε γυάλινες πλάκες 10 x 20 cm. Πάχος στιβάδας 0.25 mm (παρασκευαστική TLC).

Για την ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων αυτών επιλέχθηκαν μίγματα οργανικών διαλυτών σε συγκεκριμένες αναλογίες μετά από τον έλεγχο με την αναλυτική TLC. Η παρατήρηση των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε, όπως και προηγούμενα, σε λάμπα υπεριώδους–ορατού (UV-Vis), σε μήκη κύματος 254nm και 366nm.

6.1.3 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (High Performance Preparative Thin Layer Chromatography - HPTLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης είναι μια σύγχρονη αναλυτική τεχνική με παρόμοια αρχή μεθόδου με την TLC, ωστόσο πλεονεκτεί έναντι αυτής στην μελέτη της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης πολύπλοκων δειγμάτων και μειονεκτεί στο γεγονός ότι απαιτεί μεγαλύτερο και ακριβότερο εξοπλισμό και είναι και πιο χρονοβόρα τεχνική. Είναι αρκετά απλή στο χειρισμό της, επιτρέπει τη μελέτη πολλών δειγμάτων στην ίδια ανάλυση, δεν έχει μεγάλο λειτουργικό κόστος, είναι σύντομη, επαναλήψιμη ενώ είναι δυνατή και η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με τη χρήση πυκνομετρίας. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πραγματοποίηση βιολογικών ελέγχων.

Στην εν' λόγω εργασία η τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC) χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί καλύτερα το φυτοχημικό περιεχόμενο των δειγμάτων, καθώς και για την πραγματοποίηση των παρασκευαστικών TLC. Η συσκευή (CAMAG) που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει:

Σύστημα CAMAG Linomat 5 με σύριγγα για την ομοιόμορφη εφαρμογή των δειγμάτων στις πλάκες με τη μορφή ψεκασμού (παρέχει ακρίβεια και επαναληψιμότητα)

CAMAG TLC Visualizer για την αποτύπωση του χρωματογραφήματος ως έγχρωμης εικόνας στα 254 nm, 366 nm και το ορατό.

CAMAG TLC Scanner 3 για την πυκνομετρική αξιολόγηση του χρωματογραφήματος και την λήψη φασμάτων απορρόφησης

Μετά την επίστρωση των πλακών ακολούθησε η ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων σε ειδικούς θαλάμους και μετά την παρατήρησή τους στο ορατό και το υπεριώδες (στα 254 nm και 366nm) ακολούθησε εμφάνιση με το αντιδραστήριο της θειικής βαννιλίνης.

6.1.4 Υγρή χρωματογραφία στήλης υπό χαμηλή πίεση (LC)

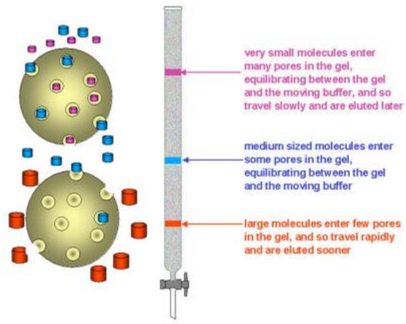
Στη μέθοδο αυτή ως ακίνητη φάση χρησιμοποιείται κατάλληλο στερεό υλικό με προσροφητικές ικανότητες, ενώ ως κινητή υγρό. Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος στηρίζεται στην εκλεκτική προσρόφηση των συστατικών του επί της ακίνητης φάσης. Μόρια τα οποία προσροφώνται ισχυρότερα μετακινούνται με μικρότερη ταχύτητα επί της ακίνητης φάσης με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους από κάποια άλλα τα οποία προσροφώνται λιγότερο ισχυρά. Τα πιο γνωστά προσροφητικά υλικά, με ισχυρή προσροφητική ικανότητα, είναι το τριοξείδιο του αργιλίου (Alumina) και το διοξείδιο του πυριτίου (Silica gel). Όσον αφορά την κινητή φάση υπάρχει δυνατότητα επιλογής μεταξύ αρκετών διαλυτών. Σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται μίγματα διαλυτών ή και σειρές από μίγματα με σειρά αυξανόμενης πολικότητας(βαθμίδωση ισχύος εκλούσεως). Στην κλασσική υγρή χρωματογραφία η χρησιμοποιούμενη στήλη είναι υάλινος σωλήνας, ο οποίος φέρει πορώδες διάφραγμα στην μια του άκρη.

Εικόνα 6-2 Προσομοίωμα μίας στήλης υγρής χρωματογραφίας

Όσον αφορά την συγκεκριμένη εργασία η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των κλασμάτων που προέκυψαν έπειτα από τον διαχωρισμό με CPC. Η στατική φάση ήταν SiO_2 (Silica gel 40-60μm/Silica flash) κανονικής φάσης, το δείγμα τοποθετήθηκε με την τεχνική της ξηρής εναπόθεσης ενώ η κινητή φάση ήταν μίγμα διαλυτών κυκλο- εξανίου και οξικού αιθυλεστέρα (C-Hex/EtOAc) διαδοχικά αυξανόμενης πολικότητας.

6.1.5 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (molecular exclusion chromatography) ή χρωματογραφία διηθήσεως πηκτής (gel filtration chromatography)

Σε αυτό το είδος της χρωματογραφίας ως ακίνητη φάση χρησιμοποιούνται πηκτές (γέλες, gels) από ορισμένα διασυνδεόμενα πολυμερή, τα οποία φέρουν διάφορες ομάδες (υδροξυλομάδες, αμιδικές ομάδες, ακετυλιωμένες υδροξυλομάδες κ.ά.). Τέτοια υλικά είναι τα πολυμερή της δεξτράνης (Sephadex G), της αγαρόζης (Sepharose B), του πολυακρυλαμιδίου (Bio-Gel P) κ.ά. Οι ομάδες αυτές έχουν τη δυνατότητα προσρόφησης διαφόρων διαλυτών. Η προσρόφηση αυτή επιφέρει διόγκωση των κόκκων του gel, μέσω διάνοιξης της δομής των διασυνδεόμενων πολυμερών αλυσίδων, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται στους κόκκους πόροι διαφόρων μεγεθών. Έτσι, αν χρησιμοποιηθεί ένα τέτοιο υλικό ως ακίνητη φάση και ως κινητή φάση κάποιος κατάλληλος διαλύτης ή μίγμα διαλυτών μπορεί να γίνει **κλασμάτωση των ουσιών ενός μίγματος με βάση το μέγεθος των μορίων του**. Τα μεγάλα μόρια που δεν χωρούν στους πόρους ελίσσονται μεταξύ των κόκκων



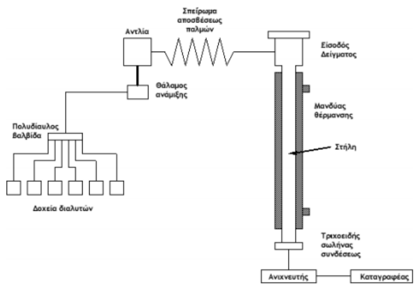
Εικόνα 6-3 Λειτουργία της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης.

και εκλούονται πρώτα, ενώ τα μικρότερα μόρια τα οποία εισχωρούν στους πόρους κινούνται με μικρότερες ταχύτητες. Η ικανότητα των πηκτών μοριακού αποκλεισμού να κατακρατούν ουσίες μικρού μοριακού βάρους αξιοποιείται για την απομάκρυνση μικρομοριακών αντιδραστηρίων και προϊόντων από μεγαλομόρια, μετά από κάποια χημική αντίδραση ή στάδιο καθαρισμού.

Στην συγκεκριμένη εργασία η στατική φάση ήταν Sephadex LH-20 (κόκκους μεγέθους: 25-100 μ), η οποία πριν την χρήση της επί τουλάχιστον 24 ώρες ενεργοποίηθηκε σε MeOH. Έπειτα, τοποθετήθηκε στη στήλη, το δείγμα διαλύθηκε στον ίδιο διαλύτη και η κινητή παρέμεινε ίδια (MeOH) μέχρι το τέλος της ανάλυσης

6.1.6 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)

Σ΄ αυτή την τεχνική υγρής χρωματογραφίας, η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης, μέσα από την στατική φάση που αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου και επομένως μεγάλης αντίστασης σωματίδια υψηλής διαχωριστικής απόδοσης, γίνεται με τη χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσης. Η HPLC είναι η περισσότερο χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική τεχνική για την ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων. Μία συσκευή HPLC αποτελείται από πέντε βασικά τμήματα: 1) το σύστημα παροχής κινητής φάσης 2) το σύστημα εισαγωγής δείγματος 3) τη στήλη 4) τον ανιχνευτή και 5) τον καταγραφέα. Μία τέτοια διάταξη απεικονίζεται στο διπλανό σχήμα. Τα περισσότερα μίγματα ουσιών μπορούν να διαχωριστούν και να αναλυθούν με την HPLC, αρκεί να επιλεγεί το κατάλληλο σύστημα στατικής και κινητής φάσης ή πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης. Η HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό και την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση μιγμάτων ουσιών ποικίλης προέλευσης. Αποτελεί σήμερα την τεχνική επιλογής σε πολλά προβλήματα φαρμακευτικής ανάλυσης και ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων, τα οποία περιέχουν τα φυσιολογικά συστατικά, τα χορηγούμενα φάρμακα και τους μεταβολίτες τους, συνήθως σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία κατά τη διάρκεια της ανάλυσης οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας HPLC και πριν τη χρησιμοποίησή τους πραγματοποιείται διήθηση σε ειδική συσκευή υπό κενό και με ηθμό 0.45 μm. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό έλεγχο των εκχυλισμάτων ήταν η Supelco RPHS C18 διαστάσεων 250 x 4.6 mm i.d., 5.0 μm (Discovery).



Εικόνα 6-4 Βασικά τμήματα από τα οποία αποτελείται μια συσκευή HPLC

6.1.7 Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρηση (Centrifugal partition chromatography, CPC)

Πρόκειται για μια τεχνική διαχωρισμού η οποία βασίζεται στην ύπαρξη δύο μη μιγνυόμενων υγρών φάσεων, τη στατική και την κινητή φάση. Η Χρωματογραφία Κατανομής με Φυγοκέντρηση (Centrifugal partition chromatography, CPC) ανακαλύφθηκε το 1964 από τον Ito. Και σ΄ αυτή την τεχνική υπάρχει η έννοια της στήλης, η οποία μάλιστα είναι σπειροειδής. Η όλη διαδικασία επιτελείται μέσα στη στήλη η οποία είναι πληρωμένη με την στατική φάση (σ′ αυτήν ευρίσκεται διαλυμένο το προς ανάλυση μίγμα). Η κινητή φάση διέρχεται μέσω της στατικής. Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος με βάση τους συντελεστές κατανομής των συστατικών αυτών στις δυο υγρές φάσεις αποτελεί την αρχή λειτουργίας της μεθόδου. Καθώς η κινητή φάση διέρχεται διαμέσου της στατικής, ανοδικά ή καθοδικά, παρασύρει τα συστατικά του μίγματος (ο διαφορετικός συντελεστής κατανομής καθενός από αυτά συνεπάγεται και διαφορετική ταχύτητα εξόδου των συστατικών) και καθιστά δυνατό τον διαχωρισμό και την απομόνωση τους. Σημαντική λεπτομέρεια είναι όμως το να αποκατασταθεί αρχικά ισορροπία μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης.

Εικόνα 6-5 Συσκεύη CPC

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Αν και υπάρχουν διάφοροι τύποι συσκευών για την εκτέλεση διαχωρισμών CPC, 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. Η τελευταία αποτελεί το κύριο μέρος της συσκευής. Η κινητή φάση αντλείται μέσα στην συμπληρωμένη στήλη ενώ αυτή περιστρέφεται με ταχύτητα πιθανό υψηλότερη από τα 300 rpm. Μετά από λίγα λεπτά η κινητή φάση εξέρχεται από τη στήλη, ενώ λόγω των φυγοκεντρικών δυνάμεων που αναπτύσσονται σ′ αυτή, όπως ήδη αναφέρθηκε, λόγω της περιστροφής, η στατική φάση παραμένει στην αρχική της θέση. Η ροή της κινητής φάσης αλλά και η ταχύτητα περιστροφής της στήλης ρυθμίζονται, ώστε να έχουμε διαχωρισμό των δύο φάσεων και εξισορρόπηση.

ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

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 στο θα πρέπει να έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

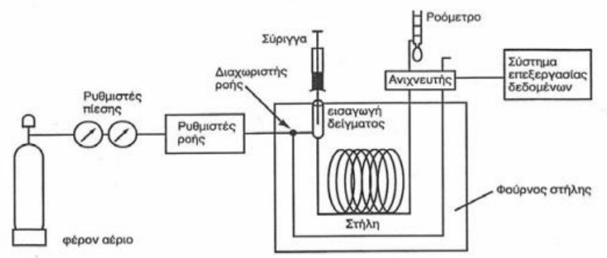
- να σχηματίζουν διφασικό σύστημα
- να διαθέτουν μικρό χρόνο εξισορρόπησης (μικρότερο των 30 sec)
- οι όγκοι των δύο φάσεων να είναι περίπου ίσοι, με σκοπό να αποφεύγεται η απώλεια του διαλύτη
- να διαλύουν πλήρως το δείγμα (το CPC είναι παρασκευαστική τεχνική και γι αυτό το επιλεγόμενο σύστημα θα πρέπει να διαλύει μεγάλες ποσότητες δείγματος)
- οι τιμές των συντελεστών κατανομής των ουσιών του μίγματος στις δύο φάσεις να κυμαίνονται μεταξύ 0.5 και 2.0 (ιδανική περίπτωση να πλησιάζουν την τιμή 0.1.

Για την επιλογή συστήματος διαλυτών απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί ο βιβλιογραφικός έλεγχος και συγκεκριμένα η αναζήτηση συστημάτων που έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς για την απομόνωση ουσιών (σημειωτέον βέβαια ότι οι ουσίες ανήκουν στις ίδιες κατηγορίες με αυτές που περιέχονται στο προς ανάλυση δείγμα). Στη συνέχεια, συστήματα που επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία μπορεί να ελεγχθούν είτε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) είτε με χρωματογραφία υψηλής πιέσεως (HPLC).

6.1.8 Αέρια χρωματογραφία σε σύζευξη με Φασματόμετρο Μάζας (GC-MS)

Αέρια χρωματογραφία / φασματομετρία μαζας (GC-MS) είναι μία σύζευξη δύο ισχυρών αναλυτικών τεχνικών. Η αέρια χρωματογραφία διαχωρίζει τα συστατικά ενός μίγματος αποτελεσματικά και το φασματόμετρο μάζας παρέχει τις πληροφορίες που βοηθούν στην αναγνώριση της δομής κάθε συστατικού.

Η αέρια χρωματογραφία αναπτύχθηκε ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία τριάντα χρόνια. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή, αν συγκριθεί με ανάλογες τεχνικές χημικής ανάλυσης και με τις μεγάλες δυνατότητες εφαρμογής που έχει. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου, βιομηχανίες αρωματοποιίας κ.τ.λ. Η βασική αρχή ενός αέριου χρωματογράφου περιλαμβάνει την πτητικότητα του δείγματος σε έναν θερμαινόμενο στόμιο εισαγωγής (injector), τον διαχωρισμό των συστατικών του μίγματος σε μια ειδική στήλη με βάση το χρόνο και την ανίχνευση κάθε συστατικού από έναν ανιχνευτή. Ένα σημαντικό τμήμα του αέριου χρωματογράφου είναι η χρήση ενός φέροντος αερίου, όπως το υδρογόνο ή το ήλιο, για να μεταφέρει το δείγμα από τον εγχυτήρα, μέσω της στήλης, και στον ανιχνευτή. Η στήλη, ή η πληρωμένη στήλη, περιέχει ένα επίστρωμα στατικής φάσης. Ο διαχωρισμός των συστατικών καθορίζεται από τη κατανομή κάθε συστατικού μεταξύ του φέροντος αερίου (κινητή φάση) και της στατικής φάσης. Ένα συστατικό που ξοδεύει λίγο χρόνο στη στατική φάση θα εκλουστεί γρήγορα. Μόνο εκείνα τα υλικά που μπορούν να ατμοποιηθούν χωρίς αποσύνθεση είναι κατάλληλα για την ανάλυση με αέρια χρωματογραφία. Η απλοποιημένη διάταξη του αέριου χρωματογράφου δίνεται στην εικόνα 6-7. Στην παρούσα εργασία η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση μειγμάτων άπολων ή πτητικών συστατικών.



Εικόνα 6-6 Απλοποιημένη διάταξη του αέριου χρωματογράφου

6.2 Φασματοσκοπικές Τεχνικές

6.2.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας κυρίως τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Πιο συγκεκριμένα τα απομονωμένα συστατικά των εκχυλισμάτων, μετά την απομάκρυνση του διαλύτη με εξάτμιση υπό κενό σε συσκευή ‘rotavapor’ και την εφαρμογή υψηλού κενού, επαναδιαλύθηκαν σε δευτεριωμένους διαλύτες ανάλογα με την πολικότητά τους. Στη συνέχεια, στα παρασκευαζόμενα διαλύματα πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων μιας (1D-NMR) και δύο διαστάσεων (2D-NMR). Η λήψη των φασμάτων μιας διαστάσεως 1H-NMR και δύο διαστάσεων COSY (Correlation Spectroscop), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) και HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), έγινε σε φασματογράφο Bruker Advance III 600 MHz, ο οποίος είναι εξοπλισμένος με ανιχνευτή 5mm broadband inverse detection probe (BBI) και ένα ρομποτικό δειγματολήπτη 60 θέσεων (B-ACS 60), ενώ το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το TopSpin™.

Εικόνα 6-8 Συσκευή πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR Bruker Avace III 600 MHz

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη των φασμάτων ήταν η δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD), το δευτεριωμένο διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO-D6) και το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl3).

Από τη μελέτη των ληφθέντων φασμάτων προέκυψαν συμπεράσματα σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά των απομονωμένων ενώσεων και καταλήξαμε στην ταυτοποίησή τους. Οι χημικές μετατοπίσεις (*δ*) εκφράζονται σε ppm, ενώ οι σταθερές σύζευξης (*J*) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως s (απλή), brs (ευρεία απλή), d (διπλή), t (τριπλή), q (τετραπλή), dd (διπλή-διπλής) και m (πολλαπλή). Ακολούθησε σύγκριση των πειραματικών τιμών με δεδομένα της βιβλιογραφίας.

7 ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του φυτοχημικού προφίλ και η απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το εστερικό και μεθανολικό εκχύλισμα ολόκληρου του φυτού *Allium ampeloprasum* που συλλέχτηκε στην περιοχή Ζαρός, Κρήτης. Το συγκεκριμένο φυτικό είδος, αφότου συλλέχτηκε, ξηράνθηκε σε σκιερό και καλά αεριζόμενο χώρο και μετέπειτα κονιοποιήθηκε.

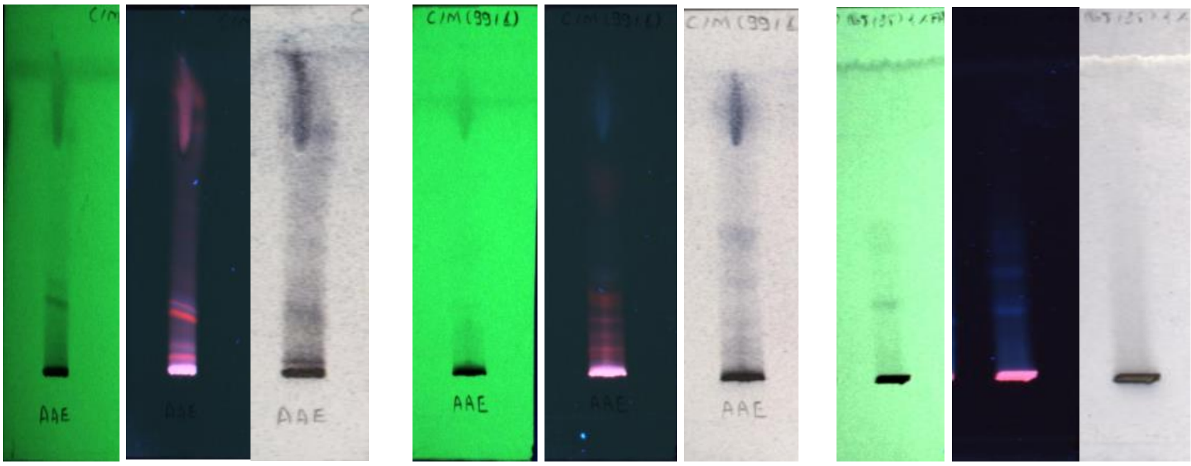
7.1 Παρασκευή Φυτικών Εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα του *A. ampeloprasum* παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της εκχύλισης με υπέρηχους. Πιο συγκεκριμένα, ζυγίστηκαν 120 g *A. ampeloprasum* και προστέθηκε στην ξηρή δρόγη διαλύτης EtOAc με την προϋπόθεση ο διαλύτης να καλύπτει την δρόγη. Στην συνέχεια εκχυλίστηκε με τη βοήθεια υπερήχων για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 30^{o}C. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε 3 φορές. Μετά την εκχύλιση ακολούθησε διήθηση και εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό με χρήση συσκευής Rotavapor (Buchi), με σκοπό να ληφθεί το ξηρό εκχύλισμα. Παραλήφθησαν 2.8 g εκχυλίσματος και η απόδοση της εκχύλισης υπολογίστηκε ίση με α=2.3%. Στην συνέχεια έγινε διαδοχική εκχύλιση της ήδη υπάρχουσας δρόγης, με έναν περισσότερο πολικό διαλύτη τη MeOH, προκειμένου να γίνει παραλαβή της πλειονότητας των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών. Στην περίπτωση αυτή παραλήφθηκαν 3.5g μεθανολικού εκχυλίσματος με απόδοση εκχύλισης α=2.9%

7.1.1 Έλεγχος χημικού φορτίου εκχυλισμάτων με την τεχνική της HPTLC και HPLC

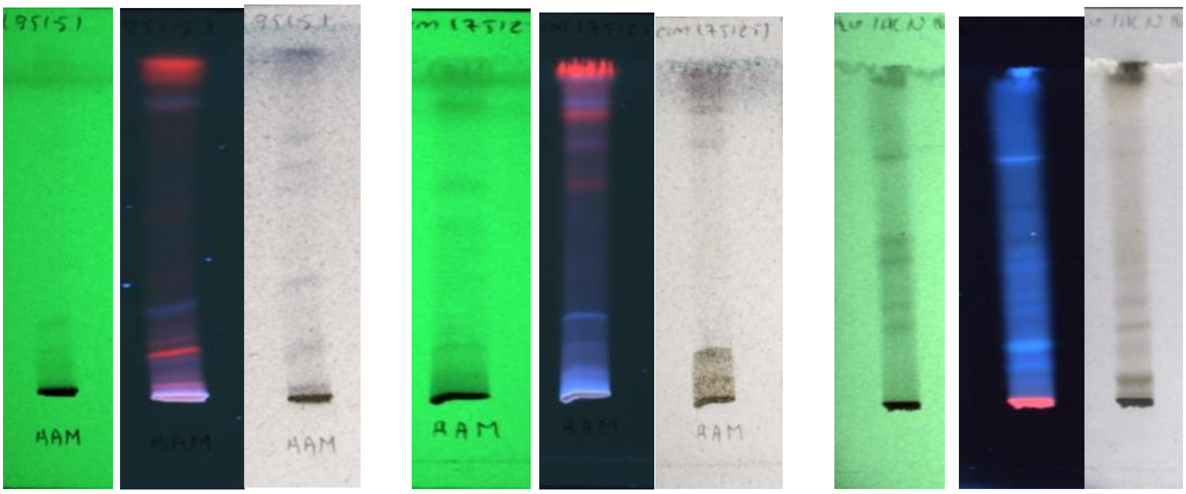
Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως προς την οστεοπροστατευτική δράση που επέδειξε το φυτό *A. Ampeloprasum* σε πρωταρχικούς βιολογικούς ελέγχους -από ένα σύνολο εκχυλισμάτων προερχόμενων από τη βιβλιοθήκη του εργαστηρίου μας- σε συνδυασμό με βιβλιογραφικές αναφορές οδηγηθήκαμε στη μελέτη των δυο εκχυλισμάτων. Για το λόγο αυτό, πριν προχωρήσουμε θεωρήθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί το φυτοχημικό τους προφίλ.

Πιο συγκεκριμένα για τη χρήση της HPTLC, 5mg από κάθε εκχύλισμα διαλύθηκε σε 1 ml αντίστοιχου διαλύτη (EtOAc, MeOH). Από τα διαλύματα που προέκυψαν τοποθετήθηκαν 4 μl σε πλάκα TLC κανονικής φάσης silica gel 60 F 254 και αντίστροφου φάσης silica gel 60 RP - 18 F 254 S διαστάσεων 10 x 20 cm με το Camag Linomat 5. Στη συνέχεια, οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης κορεσμένο από το σύστημα διαλυτών που επιλέχθηκε με βάση τις δοκιμασίες σε πλάκες TLC που πραγματοποιήθηκαν σε προηγούμενο στάδιο. Το χρωμτογράφημα του εκχυλίσματος του EtOAc αναπτύχθηκε σε μίγμα CH_2Cl_2/MeOH σε αναλογίες (99/1) και (95/5) ενώ της MeOH σε CH_2Cl_2/MeOH σε αναλογία (75/25) καθώς και σε πλάκα TLC αντιστρόφου φάσης με σύστημα ανάπτυξης διαλυτών H_2O/AcN (65/35) +1% FA.



a) b) c)

Εικόνα 7-1 Χρωμτογραφήματα του εκχυλίσματος του EtOAc σε μίγμα CH_2Cl_2/MeOH σε αναλογίες a) (99/1) και b) (95/5) και οι αντιστρόφους φάσης με σύστημα ανάπτυξης διαλυτών c) H2O/AcN (65/35) +1% FA.



a) b) c)

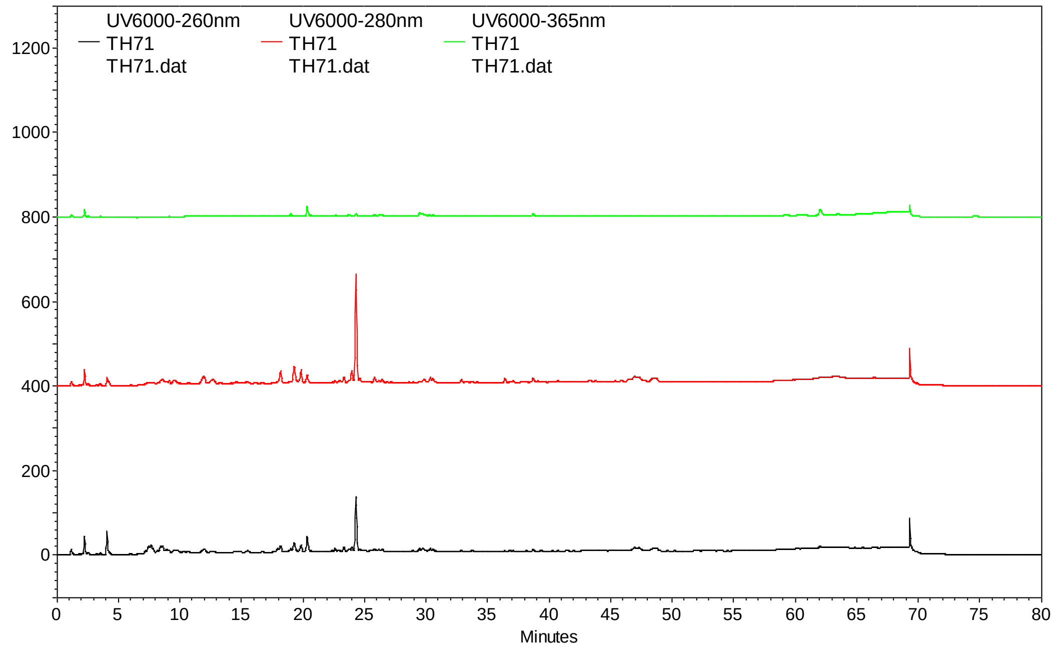
Εικόνα 7-2 Χρωμτογραφήματα του εκχυλίσματος του MeOH σε μίγμα CH_2Cl_2/MeOH σε αναλογίες α) (95/5) και β) (75/25) και οι αντιστρόφους φάσης με σύστημα ανάπτυξης διαλυτών H2O/AcN (65/35) +1% FA.

Αρχικά, από την παρατήρηση των χρωματογραφημάτων και των δυο εκχυλισμάτων όσον αφορά το χημικό τους περιεχόμενο διακρίνουμε την παρουσία χλωροφυλλών (ερυθρές κηλίδες στα 365 nm και πράσινου χρώματος στο ορατό πριν και μετά την εμφάνιση με διάλυμα θειϊκής βαννιλίνης), φαινολικών παραγώγων και φλαβονοειδών (σκούρες κηλίδες στα 254 nm και στο ορατό μετά την εμφάνιση) και πιθανώς τερπενίων (ουσίες που δεν απορροφούν στα 254 nm αλλά εμφανίζουν μπλε-μώβ χρώμα έπειτα από την εμφάνιση με το αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης). Αξίζει να σημειωθεί πως στο MeOH εκχύλισμα παρατηρούμε την ύπαρξη ουσιών που δεν απορροφούν στα 254 nm και 365 nm αλλά έπειτα από ψεκασμό και θέρμανση με το αντιδραστήριο θειϊκής βαννιλίνης εμφανίζουν έντονη καφέ χρώση γεγονός που μας παραπέμπει στην ύπαρξη σαπωνινών οι οποίες χαρακτηρίζουν το γένος.

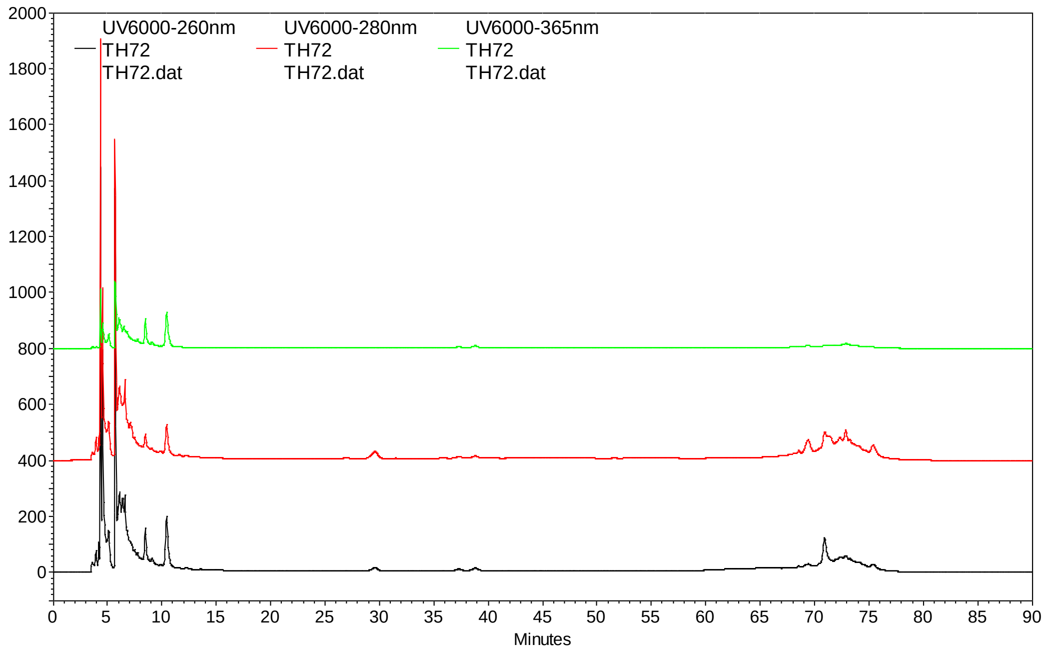
Επιπλέον τα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν και σε χρωματογραφία με την τεχνική της HPLC. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 7-1 και τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν σε μήκη κύματος 260, 280 και 365 nm. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν μίγματα ακετονιτριλίου - νερού και η ταχύτητα ροής ήταν 1.0 ml/min

Πίνακας 7-1 Αναλογίες διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε μέθοδο.

ΜΕΘΟΔΟΣ Α (MeOH) ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ			ΜΕΘΟΔΟΣ Β (EtOAc) ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ		
Χρόνος (min)	**Νερό**	**Ακετονιτρίλιο**	**Χρόνος (min)**	**Νερό**	**Ακετονιτρίλιο**
0	95	5	0	100	0
60	70	30	60	0	100
70	40	60	70	100	0
80	100	0	80	100	0
90	100	0			



Εικόνα 7-3 Χρωματογράφημα εκχυλίσματος του EtOAc με την τεχνική της HPLC σε μήκη κύματος 260, 280 και 365 nm



Εικόνα 7-4 Χρωματογράφημα εκχυλίσματος του MeOH με την τεχνική της HPLC σε μήκη κύματος 260, 280 και 365 nm

Από τη μελέτη των χρωματογραφημάτων (απορρόφηση στα διάφορα μήκη κύματος, χρόνος ανάσχεσης (Rt) και φάσμα UV των κορυφών) διαπιστώθηκε ότι:

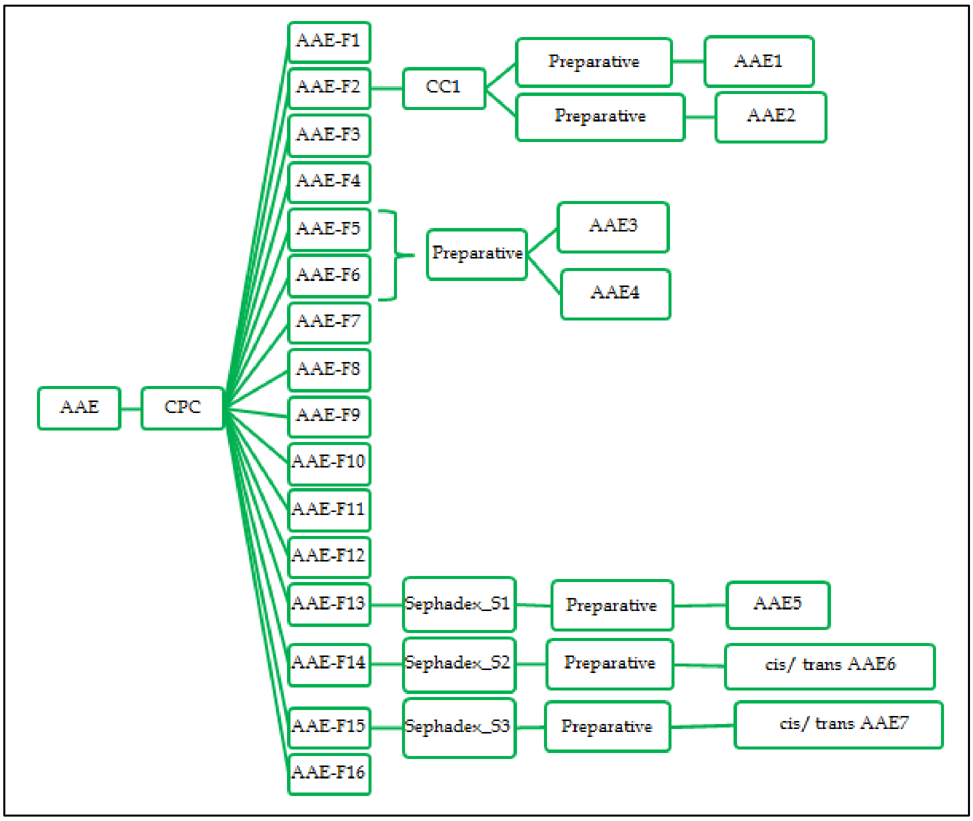
- Το μεθανολικό και το οξικό αιθυλεστερικό εκχύλισμα είναι πλούσια σε τερπένια και φαινολικά παράγωγα
- Το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού φαίνεται να έχει ένα πιο πλούσιο φυτοχημικό προφίλ σε σύγκριση με του οξικού

Από τις προαναφερόμενες κατηγορίες φυσικών προϊόντων το μεγαλύτερο ενδιαφέρον από φυτοχημικής απόψεως παρουσιάζουν τα τερπενοειδή με κύριες κατηγορίες της σαπωνίνες και τα φλαβονοειδή, τα οποία είναι ουσίες μεγάλου φαρμακολογικού ενδιαφέροντος.

7.2 Μελέτη του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα του *A. ampeloprasum*

Η απομόνωση των κυριότερων συστατικών του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα του φυτού *A. ampeloprasum*, έγινε με χρήση διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών. Έγινε μια αρχική κλασμάτωση με Υγρή Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC) και μετέπειτα στα κλάσματα του CCC με την πιο ενδιαφέρουσα εικόνα διεξήχθηκαν χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού Sephadex LH-20, χρωματογραφία στήλης silica gel και παρασκευαστικής χρωματογραφίας TLC με σκοπό την απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών.

Η συνολική πορεία για την απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών από το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστερικού φαίνεται στο διάγραμμα (Σχήμα 7.1). Στη συνέχεια θα παρατεθεί αναλυτικά η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση των μεταβολιτών.



Σχήμα 7-1 Η συνολική πορεία για την απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών από το εκχύλισμα του EtOac

7.2.1 Αρχική κλασμάτωση του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα με χρωματογραφία κατ'αντιρροή (AAE)

Για την απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών, από το εστερικό εκχύλισμα του *A. ampeloprasum*, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του CPC. Αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη για την εύρεση του κατάλληλου διφασικού συστήματος διαλυτών, που θα οδηγούσε στην καλύτερη δυνατή κλασμάτωση.

Για την κλασμάτωση του εστερικού εκχυλίσματος έγιναν δοκιμές από τα συστήματα ARIZONA

Πίνακας 7-2 Δοκιμαστικά διφασικά συστήματος διαλυτών (ARIZONA) που χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του CPC

ARIZONA	HEPTANE	ETHYL ACETATE	METHANOL	WATER
F	1	5	1	5
H	1	3	1	3
K	1	2	1	2
M	5	6	5	6
N	1	1	1	1
Q	3	2	3	2
T	3	1	3	1
W	6	1	6	1
Y	19	1	19	1

Για την επιλογή του διφασικού συστήματος, 8-10 mg του εκχυλίσματος τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, όπου προστέθηκαν 4 ml του κάθε μίγματος διαλυτών. Ακολούθησε έντονη ανακίνηση προκειμένου να διαλυθεί το εκχύλισμα και να κατανεμηθούν οι ουσίες στις δυο φάσεις. Οι φάσεις αυτές διαχωρίστηκαν μεταξύ τους και ελέχθησαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) με σκοπό να αξιολογηθεί η κατανομή των ουσιών στις δυο φάσεις. ‘Επειτα από τον συγκεκριμένο έλεγχο κατανομής καταλήξαμε στο σύστημα T ως το πιο καταλληλότερο.

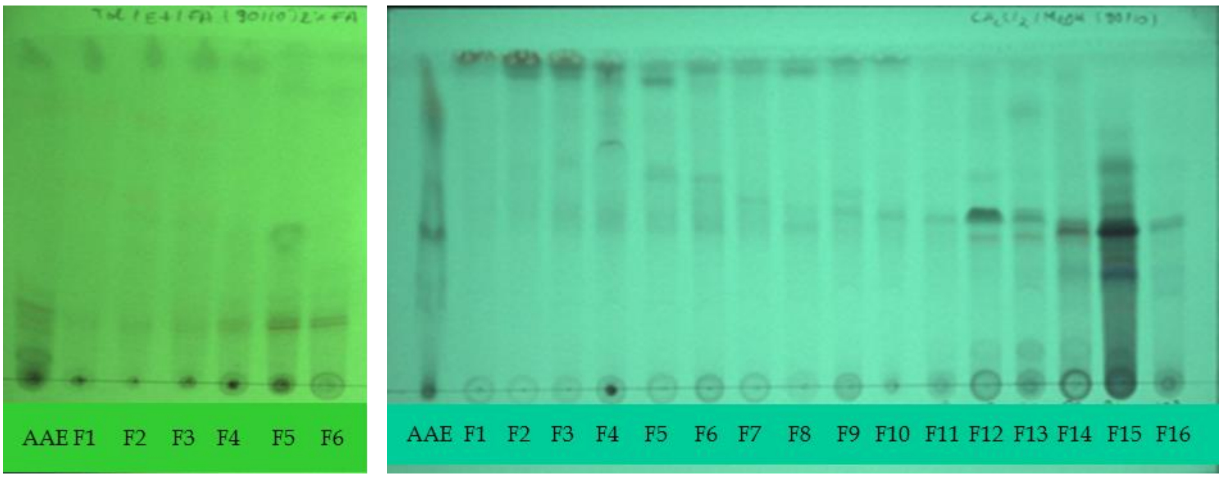
Παρακάτω παρουσιάζονται σε πίνακα όλα τα χαρακτηριστικά της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε.

Πίνακας 7-3 Χαρακτηριστικά της πειραματικής διαδικασίας του CPC

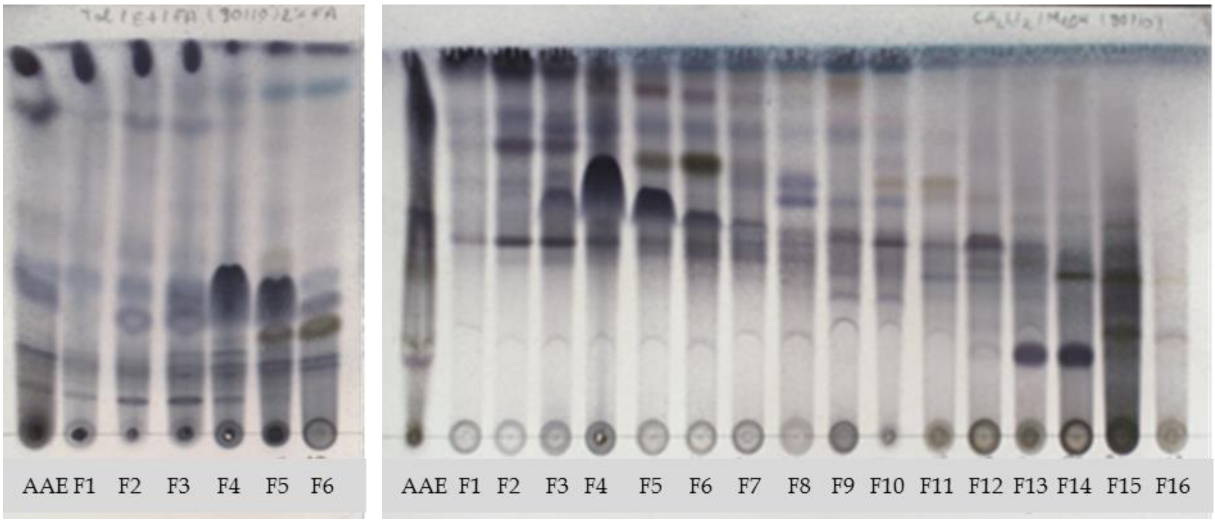
Δεδομένα CPC	
5 L διφασικό σύστημα – στα 235 mL πραγματοποιήθηκε η εξισορρόπηση	
ascending mode	
Στατική φάση η κάτω (υδατική) φάση	
Κινητή φάση η πάνω (οργανική) φάση	
Βάρος δείγματος	2.0 g
Ταχύτητα της κινητής φάσης	700 στροφές το λεπτό
Ροή των διαλυτών κατά το γέμισμα	35ml/min
Ροή συλλογής κλασμάτων	10ml/min
Όγκος κλάσματος:	20 ml

Παρελήφθησαν 59 κλάσματα (έως ότου ο έλεγχος με TLC έδειξε ότι δεν εκλούονται άλλες ουσίες), οπότε και έγινε αναστροφή των φάσεων με τη υδατική φάση να χρησιμοποιείται ως κινητή μέχρι το τέλος της ανάλυσης. Συνολικά παρελήφθησαν 114 κλάσματα όπου μετά από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις με βάση την ομοιότητα του χημικού φορτίου και καταλήξαμε σε 16 συνενωμένα κλάσματα.

Παρακάτω απεικονίζεται ο χρωματογραφικός έλεγχος των συνενωμένων κλασμάτων σε TLC κανονικής φάσης και σύστημα ανάπτυξης Tol/EtOH (90/10) 2% FA και CH_2CL_2/MeOH (90/10) ενώ ελέχθησαν και σε TLC αντίστροφης φάσης σε σύστημα ανάπτυξης H_2O/ACN (65/35) 1% FA.



a)



b)

Εικόνα 7-5 TLC χρωματογράφημα των κλασμάτων που προέκυψαν από το AAE μετά την κλάσματωση CPC – από A) παρατήρηση στα 254 nm B) εμφάνιση με διάλυμα θειϊκής βανιλλίνης

Πινακας 7-4 Τα κλάσματα του αρχικού διαχωρισμού μέσω CPC του εκχυλίσματος AAE

Κλάσματα	**Συνενώσεις**	**Βάρη [mg]**
AAE-F1	8	622.9
AAE-F2	9	420.5
AAE-F3	10	91
AAE-F4	11-14	118.4
AAE-F5	15-17	27.2
AAE-F6	18-22	23.2
AAE-F7	23-31	21.3
AAE-F8	32-40	12.1
AAE-F9	41-51	10
AAE-F10	52-61	10
AAE-F11	62-68	7.1
AAE-F12	69-77	14.4
AAE-F13	78-84	16.1
AAE-F14	85-95	66.1
AAE-F15	96-102	184.5
AAE-F16	103-114	6.5

7.2.2 Επεξεργασία κλασμάτων και απομόνωση συστατικών

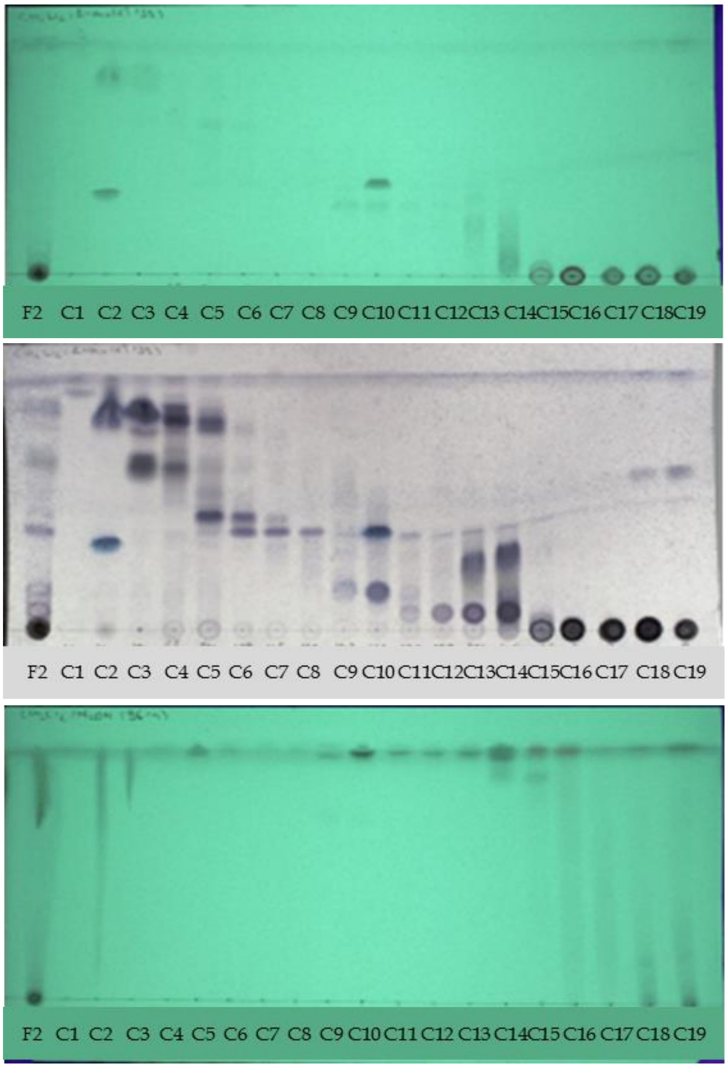
Από τα συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν έπειτα από τον χρωματογραφικό έλεγχο με TLC αποφασίστηκε η περεταίρω ανάλυση 6 κλασμάτων τα οποία επεξεργάστηκαν κυρίως με Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού - Sephadex LH-20, με Χρωματογραφία Στήλης Χαμηλής Πίεσης με πληρωτικό υλικό γέλη πυριτίου και τέλος με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC.

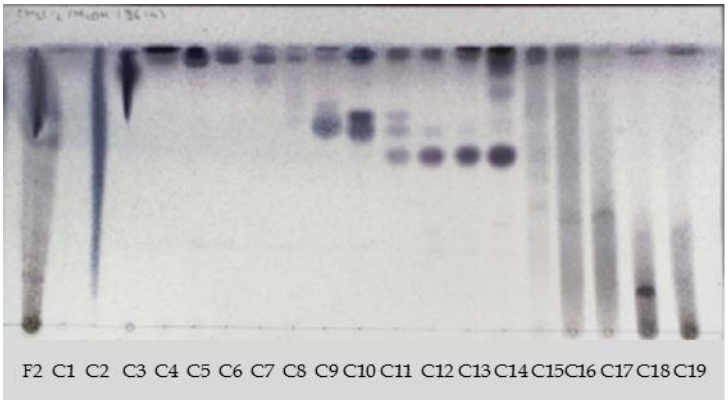
7.2.2.1 *Κλάσμα AAE_ F2 CPC*

300 mg του κλάσματος AAE_F2 επεξεργάστηκαν με Χρωματογραφία Στήλης Χαμηλής Πίεσης με πληρωτικό υλικό γέλη πυριτίου και εισήχθησαν στην στήλη με την τεχνική της ξηρής εναπόθεσης (ξηρό dépôt). Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα C-Hex και DCM αυξανόμενης πολικότητας και DCM και EtOAc αυξανόμενης πολικότητας επίσης. Συνολικά παρελήφθησαν 285 κλάσματα όπου μετά από χρωματογραφικό έλεγχο σε ένα άπολο (DCM/C-Hex 65/35) και ένα πιο πολικό σύστημα (DCM/MeOH 65/35) καταλήξαμε σε 19 συνενώσεις όπως φαίνονται στις παρακάτω TLC και πίνακα.

Πινακας 7-5 Τα κλάσματα του AAE-F2 μετά από επεξεργασίας με υγρή χρωματογραφία στήλης

Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρη [mg]
AAE-F2-C1	23-29	0.5
AAE-F2-C2	30-37	22.2
AAE-F2-C3	38-64	29.1
AAE-F2-C4	65-83	3.5
AAE-F2-C5	84-107	3.4
AAE-F2-C6	108-114	1.8
AAE-F2-C7	115-131	0.8
AAE-F2-C8	132-142	1.6
AAE-F2-C9	143-160	8.1
AAE-F2-C10	161-189	11.3
AAE-F2-C11	190-197	1.5
AAE-F2-C12	198-202	1.3
AAE-F2-C13	203-214	4.5
AAE-F2-C14	215-224	10.6
AAE-F2-C15	225-281-1K	20.6
AAE-F2-C16	2Κων.	19.5
AAE-F2-C17	3Κων.	11.5
AAE-F2-C18	4-7Κων.	15.2
AAE-F2-C19	8-13Κων.	11.2

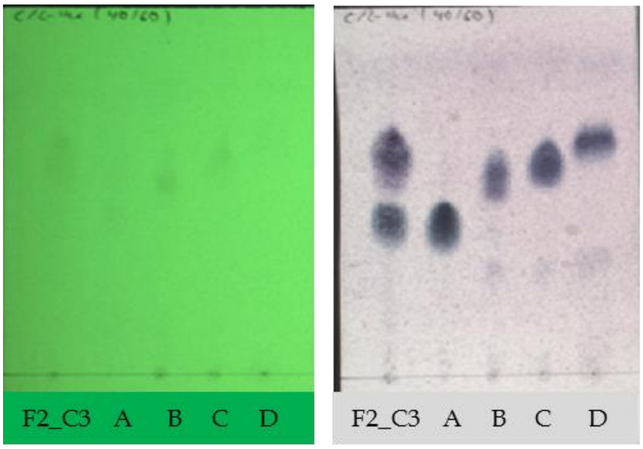




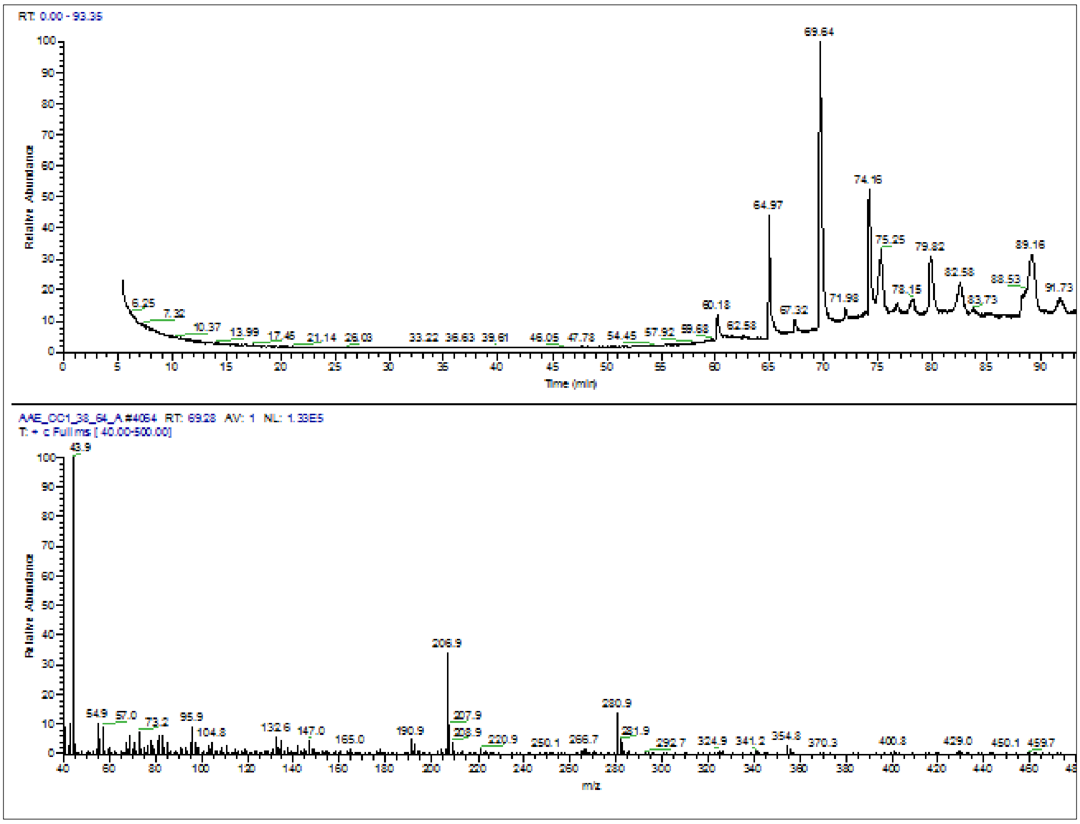
Εικόνα 7-6 Χρωματογραφικός έλεγχος συνενωμένων κλασμάτων από υγρή χρωματογραφία στήλης του AAE-F2.

➢ **<u>Κλάσμα AAE-F2-C3</u>**

Το κλάσμα AAE-F2-C3 υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος με σκοπό τον περαιτέρω καθαρισμό του. 25mg του κλάσματος διαλύθηκαν σε C-Hex και επιστρώθηκαν σε γυάλινη πλάκα silica gel με το σύστημα CAMAG Linomat 5. Το σύστημα ανάπτυξης ήταν DCM/C-Hex (40/60), παρελήφθησαν 4 ζώνες ενώ το οξείδιο του πυριτίου εκχυλίστηκε με EtOAc. Με τη χρήση της τεχνικής GC-MS ταυτοποιήθηκαν οι εξής μεταβολίτες:



Εικόνα 7-7 TLC χρωματογράφημα του κλάσματος AAE-F2-C3 μετά από preparative



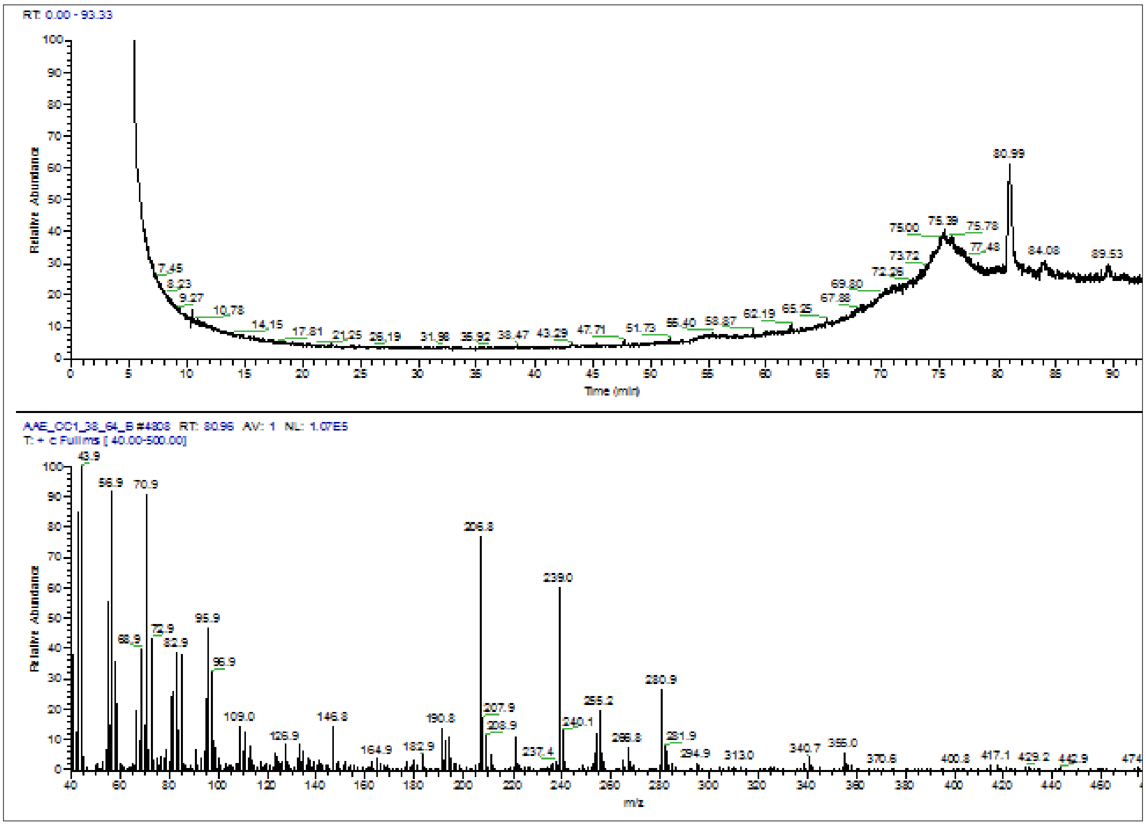
Εικόνα 7-8 Χρωματογράφημα GC-MS του AAE-F2-C3_A

Ο μεταβολίτης Α ένα μίγμα κυρίως δυο αλδεϋδών μακράς αλυσίδας όπως είναι η Octadecanal $C_{18}H_{36}O$ με ΜΒ=268.49 g/mol, και η 14- octadecenal $C_{18}H_{34}O$ με ΜΒ=266.46g/mol.

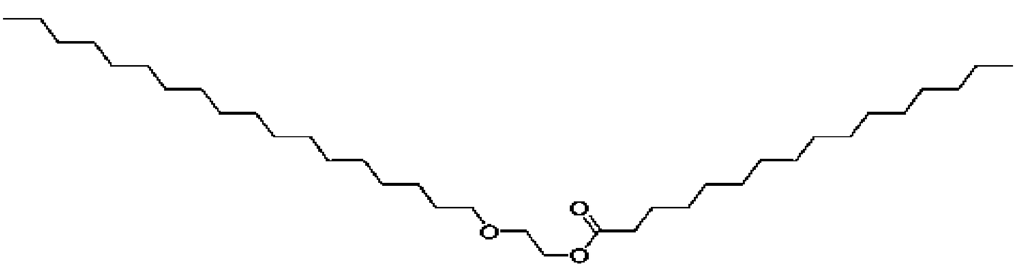
Octadecanal

14- octadecenal

Όσον αφορά τοος μεταβολίτες Β και C, αυτοί ταυτοποιήθηκαν ως Hexadecanoic acid, 2-(octadecyloxy)ethyl ester ή Palmitic acid 2-(octadecyloxy)ethyl ester, ένας εστέρας λιπαρού οξέος.



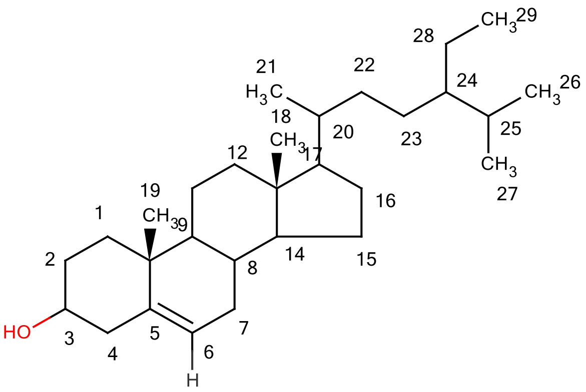
Εικόνα 7-9 Χρωματογράφημα GC-MS του AAE-F2-C3_A



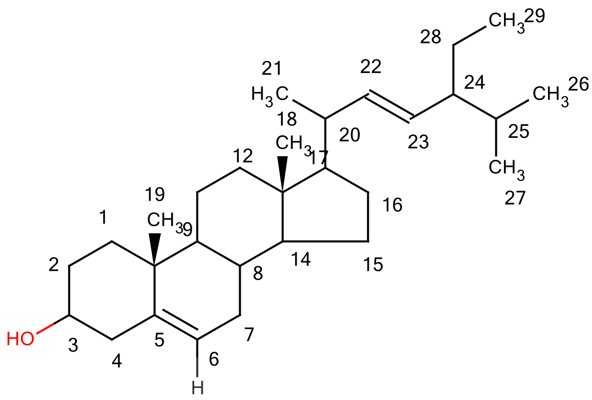
Palmitic acid 2-(octadecyloxy) ethyl ester

➢ **<u>Κλάσμα AAE-F2-C13 (AAE1)</u>**

Το κλάσμα AAE-F2-C13 φάνηκε να περιέχει σε μεγάλη περιεκτικότητα 1 μεταβολίτη και με σκοπό την παραλαβή του πραγματοποιήθηκε περεταίρω επεξεργασία του κλάματος με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως προαναφέρθηκε αυτή τη φορά το σύστημα ανάπτυξης ήταν DCM/MeOH (99/1) και ο μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως μίγμα σε μεγαλύτερο ποσοστό β-σιτιστερόλης με πολύ μικρό ποσοστό στιγμαστερόλης. Αναμενόμενο καθώς οι δυο αυτές ουσίες διαφέρουν ελάχιστα δομικά και λόγω της ίδιας πολικότητας που εμφανίζουν σχεδόν πάντα απομονώνονται ως μίγμα.

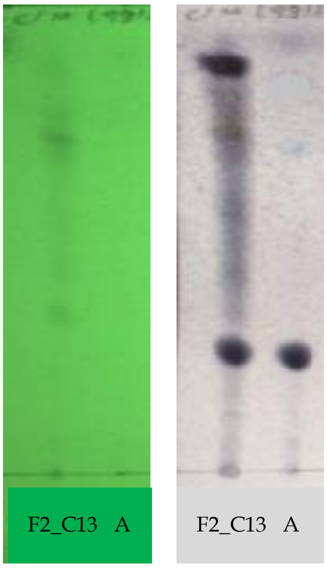


β-σιτιστερόλη - AAE1



στιγμαστερολη

Η β-σιτοστερόλη (Beta-Sitosterol) είναι μια φυτική στερόλη (φυτοστερόλη), ουσία που βρίσκεται σε όλα σχεδόν τα φυτικά τρόφιμα, όπως φρούτα, λαχανικά, ξηρούς καρπούς και σπόρους δημητριακών και έχει απομονωθεί και γενικά από φυτά του είδους *Allium* και ειδικά από το *A. ampeloprasum* και διατίθεται στο εμπόριο ως ένα ασφαλές διατροφικό συμπλήρωμα.



Εικόνα 7-10 TLC χρωματογράφημα AAE1

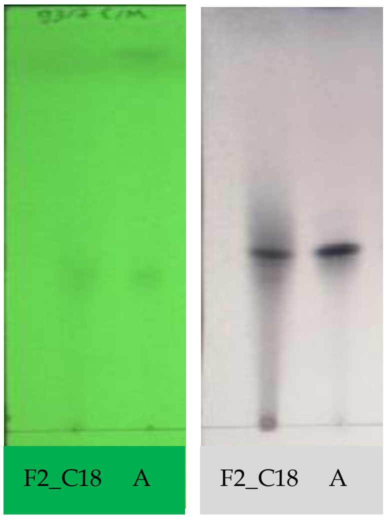
Η β-σιτοστερόλη χρησιμοποιείται κυρίως για τη μείωση της χοληστερίνης, της τριχόπτωσης και τη βελτίωση των συμπτωμάτων της ήπιας έως μέτριας καλοήθη υπερτροφία του προστάτη. Χρησιμοποιείται επίσης για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, την πρόληψη του καρκίνου του παχέος εντέρου, σε περιπτώσεις χολόλιθων, κοινό κρυολόγημα και γρίπη, HIV/AIDS, ρευματοειδή αρθρίτιδα, φυματίωση, ψωρίαση, αλλεργίες, καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, ινομυαλγία, συστημένο τρηματώδη λύκο (SLE), άσθμα, βρογχίτιδα, ημικρανία, πονοκέφαλο και στο σύνδρομο χρόνιας κόπωσης. Πιθανολογείται επίσης ο ρόλος της στον έλεγχο των χρόνιων φλεγμονωδών καταστάσεων.

Χρησιμοποιείται επιπλέον την μείωση του πόνου και του πρηξίματος μετά από τρέξιμο σε περιπτώσεις μαραθωνοδρόμων και για τη θεραπεία πληγών και εγκαυμάτων.

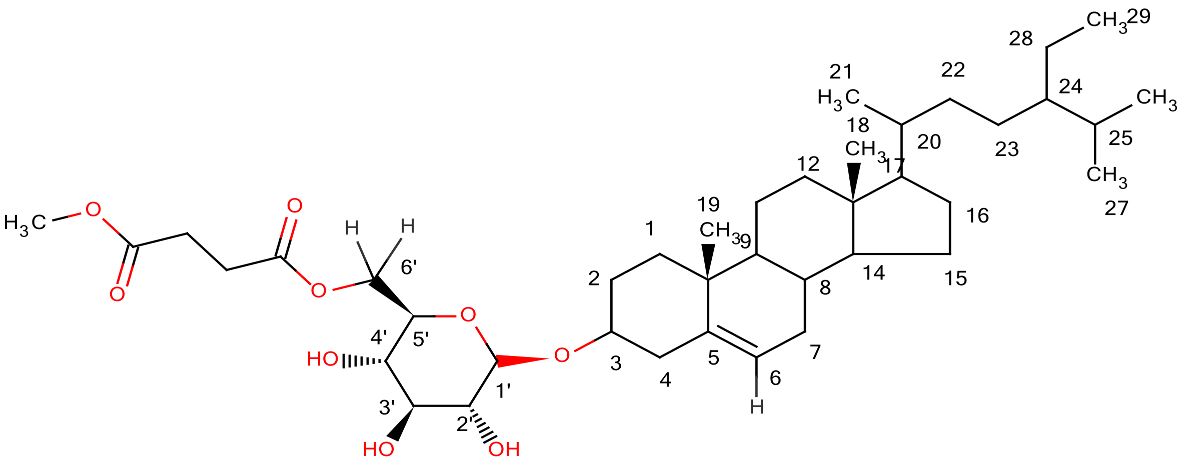
Όσον αφορά την στιγμαστερόλη είναι και αυτή μια απο τις 40 περίπου φυτοστερόλες έχουν αναγνωρισθεί μέχρι σήμερα, και υπάρχει σε αφθονία στη φύση [61], [62].

- **<u>Κλάσμα AAE-F2-C18 – (AAE2)</u>**

Το κλάσμα AAE-F2-C18 φάνηκε να περιέχει μόνον έναν δευτερογενή μεταβολίτη παρόμοιο με το κλάσμα AAE-F2-C13 αλλά εμφανώς πιο πολικό. Υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος με σκοπό τον περαιτέρω καθαρισμό του με σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH (40/60) και εκχύλιση του οξειδίου του πυριτίου με EtOAc. Ο μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως ένα εστεροποιημένο παράγωγο του 3-*O*-β-γλυκοσίδη της σιτοστερόλης (AAE2).

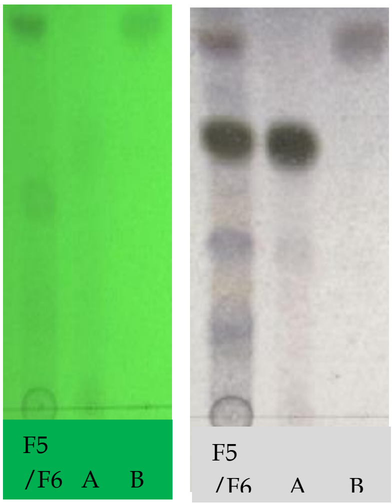


Εικόνα 7-11 TLC χρωματογράφημα του AAE2



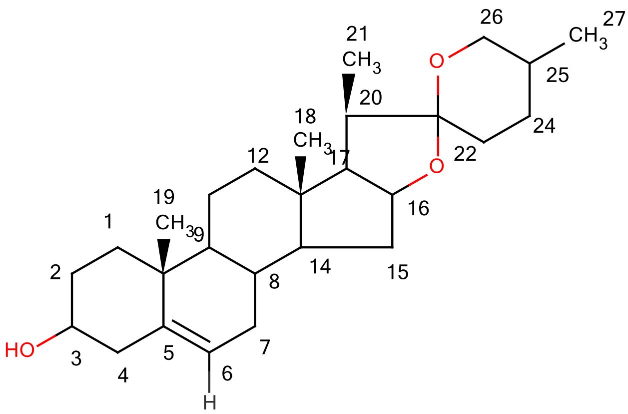
Εστεροποιημένο παράγωγο του 3-*O*-β-γλυκοσίδη της σιτοστερόλης - AAE2

7.2.2.2 <u>*Κλάσμα AAE-F5/F6*</u>



Εικόνα 7-12 TLC χρωματογράφημα a) AAE3, b) AAE4

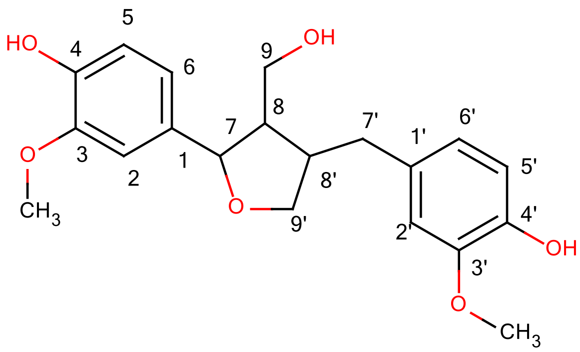
Τα κλάσματα AAE-F5 και AAE-F6 (50 mg) φάνηκε να περιέχουν παρόμοιους δευτερογενείς μεταβολίτες διαφορετικών κατηγοριών μεταξύ τους και με σκοπό την επεξεργασία μεγαλύτερης ποσότητας αρχικού κλάσματος αποφασίστηκε η συνένωσή τους και η περαιτέρω επεξεργασία τους με παρασκευαστική χρωματογραφία TLC με σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH (95/5) από όπου απομονώθηκαν δυο μεταβολίτες. Σκοπός μας ήταν η παραλαβή δυο ουσιών που πιθανώς ανήκουν στην κατηγορία των τερπενοειδών. Πιο συγκεκριμένα, η πρώτη ουσία AAE-F5/F6_A (AAE3) ταυτοποιήθηκε ως η διοσγενίνη που ανήκει στην κατηγορία των σαπωγενινών. Έχει ξαναπομονωθεί τόσο από φυτά του γένους *Allium* όσο και από το *Allium ampeloprasum*. Η διοσγενίνη (diosgenin) είναι μια φυτοορμόνη που εξισορροπεί την αναλογία οιστρογόνων και προγεστερόνης στο γυναικείο σώμα. Έτσι υποστηρίζει την ορμονική ισορροπία και συμβάλλει στην εξάλειψη των PMS και τα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης. Η διοσγενίνη αποτελεί μια ένωση που συγκαταλέγεται στις φυσικά παραγόμενες στεροειδείς ορμόνες και ονομάζεται DHEA (δεϋδροεπιανδροστερόνη, επίσης γνωστή ως η «ορμόνη της νεολαίας»), η οποία βοηθά στην καλή φυσική εμφάνιση, αποτρέπει την αύξηση του σωματικού βάρους και διατηρεί χαμηλά τα επίπεδα του στρες. Έχει ηρεμιστικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, είναι ισχυρό αντιφλεγμονώδες, παράλληλα περιορίζει την κατακράτηση υγρών και ανακουφίζει από τα συμπτώματα εφίδρωσης [63][63]–[65]. Επίσης μια σημαντική δράση της ουσίας αυτής είναι η δράση της στην οστεοπόρωση. Έρευνες επιβεβαίωσαν την οστεοπροστατευτική δράση της ουσίας αυτής, συγκεκριμένα φάνηκε να επάγει την ενεργότητα των οστεοβλαστών και να καταστέλλει την οστεοκλαστογένεση *in vitro*. Επίσης η οστεοπροστατευτική ικανότητα της διοσγενίνης επιβεβαιώθηκε και με μια πρόσφατη μελέτη σε *in vivo* μοντέλο οστεοπόρωσης, σε ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες κατά την οποία διαπιστώθηκε μείωση της οστικής απορρόφησης, αλλά και αύξηση του πάχους του φλοιώδους οστού του [66]. Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές για δράση στην οστεοαρθρίτιδα και στην Ρευματοειδή Αρθρίτιδα.



Διοσγενίνη – AAE3

Η ουσία αυτή έχει απομονωθεί κυρίως από το φυτό του είδους *Dioscorea* [65], αλλα και από φυτά του είδους *Allium*, όπως *Allium rotundum L.* [67], *A. affine, A. albidum, A. angulosum, A. cepa, A. cernuum, A. fistulosum, A. flavum, A.fuscoviolaceum, A. giganteum, A.gramineum, A. karataviense, A. narcissiflorum, A. nutans, A. porrum, A. schoenoprasum, A. senescens, A. ursinum, A. vineale, A. waldsteinii* και από το *Allium ampeloprasum* [26].

Η άλλη ουσία AAE-F5/F6 _B (AAE4) ταυτοποιήθηκε ως η λαρισιρεσινόλη (lariciresinol), η οποία ανήκει στην κατηγορία των λιγνανίων (κατηγορία των πολυφαινολών) τα οποία αποτελούν δευτερεύοντα συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων και των φυτικών ινών των σπόρων, των φρούτων και των λαχανικών. Η ουσία αυτή έχει απομονωθεί από τους τρεις κύριους εκπροσώπους του είδους *Allium*, από το σκόρδο (*Allium sativum L.*), το κρεμμύδι *(Allium cepaL. var.cepa)* και το πράσο (*Allium porrum L. var. porrum*), ενώ υπάρχει και μια αναφορά για την απομόνωση της λαρισιρεσινόλης από το *A. ampeloprasum var. porrum* [68].

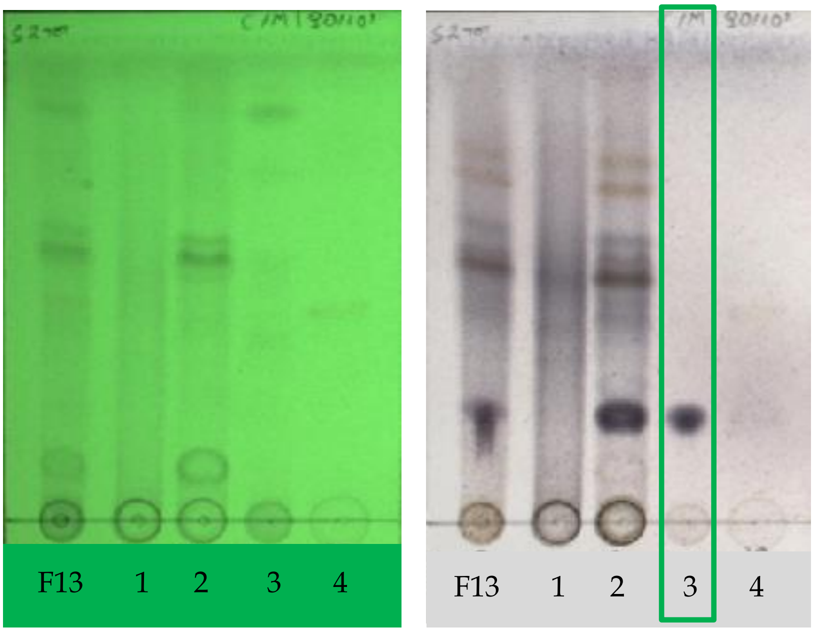


Λαρισιρεσινόλη - AAE4

Όσον αφορά τις φαρμακολογικές δράσεις της ουσίας αυτή, οι μελέτες δείχνουν ότι η λαρισιρεσινόλη έχει αντιοξειδωτική δράση [69], αντιφλεγμονώδη δράση, αντιμυκητιασική δράση [70], δράση στην πρόληψη των καρδιακών παθήσεων και συνδέεται με τη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης αρκετών τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των ωοθηκών, του μαστού, του προστάτη και του καρκίνου της μήτρας [71].

7.2.2.3 <u>Το κλάσμα AAE-F13</u>

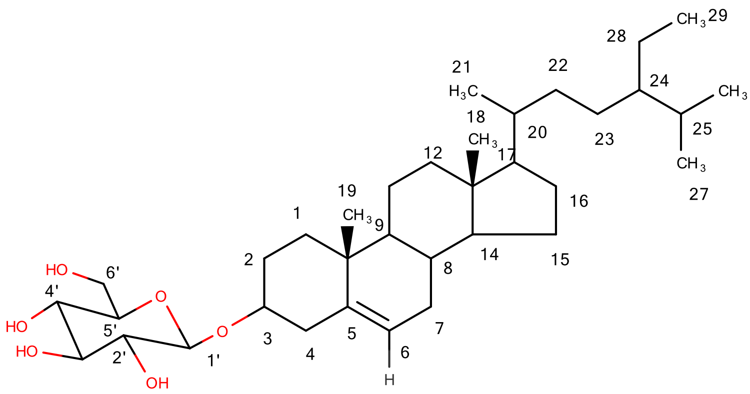
Το κλάσμα AAE-F13 (16,2 mg) φάνηκε να περιέχει σε μεγάλη περιεκτικότητα έναν μεταβολίτη διαφορετικής κατηγορίας από τους υπόλοιπους γι αυτό και επεξεργάστηκε με χρήση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη. Συλλέχθηκαν 43 κλάσματα και μετά από ποιοτικό έλεγχο με TLC προέκυψαν 4 συνενωμένα κλάσματα.



Σύστημα ανάπτυξης TLC DCM/MeOH 90/10

Εικόνα 7-13 TLC χρωματογράφημα κλασμάτων από την Sephadex S1 του AAE-F13

Ο μεταβολίτης AAE-F13_S1_3 (AAE5) με τη βοήθεια φασματοσκοπικών τεχνικών ταυτοποιήθηκε ως ο 3-*O*-β-γλυκοσίδης της σιτοστερόλης γεγονός που δικαιολογεί την αυξημένη πολικότητα της ουσίας που οφείλεται στην παρουσία του σακχάρου.



3-*O*-β-γλυκοσίδης της σιτοστερόλης – AAE5

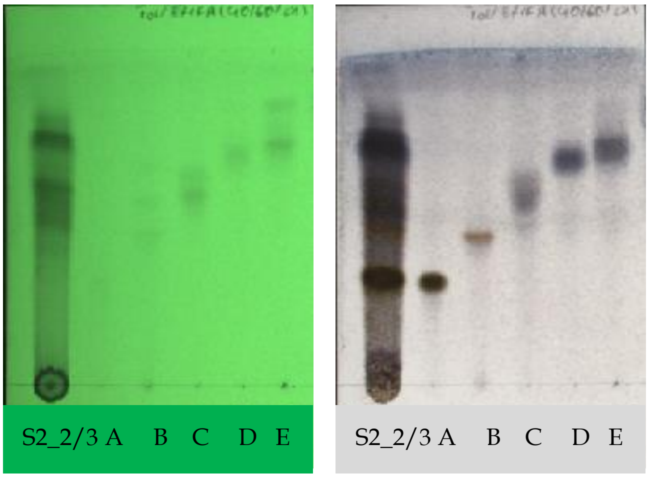
Ο 3-*O*-β-γλυκοσίδης της σιτοστερόλης, όπως και η ίδια η σιτοστερόλη είναι ευραίως διαδεδομένη στα φυτά και αντίστοιχα και στο είδος *Allium* και έχει τις αντίστοιχες φαρμακολογικές ιδιότες με τη σιτοστερόλη [72].

7.2.2.4 <u>Το κλάσμα AAE-F14</u>

Το κλάσμα AAE-F14 (66.1mg) φάνηκε να έχει παρόμοιο φυτοχημικό προφίλ με το προηγούμενο κλάσμα που μελετήθηκε με διαφορά την ύπαρξη μιας ουσίας που δεν απορροφά στα 254nm αλλά μετά από εμφάνιση με θειϊκή βανιλλίνη ψεκάζεται καφέ. Με σκοπό την παραλαβή κυρίως αυτής της ουσίας πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη και έπειτα σε παρασκευαστική TLC για την παραλαβή της σε καθαρή μορφή.

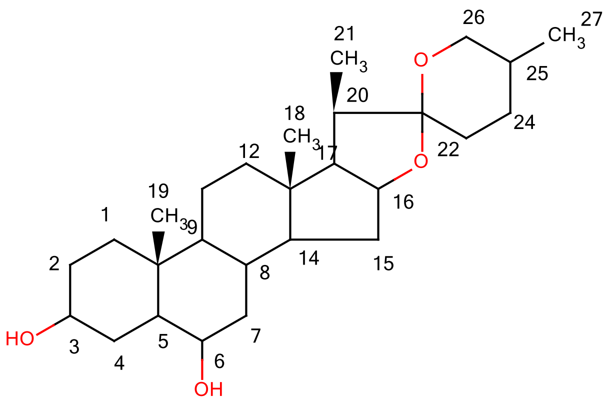
- **Κλάσμα AAE-F14 _S2_2/3**

Έτσι λοιπόν το κλάσμα που περιείχε την επιθυμητή ουσία επεξεργάστηκε με παρασκευαστική TLC σε σύστημα ανάπτυξης Tol/EtOAc (40/60).



Εικόνα 7-14 TLC χρωματογράφημα ενώσεων από Preparative του AAE-F14 _S2_2/3

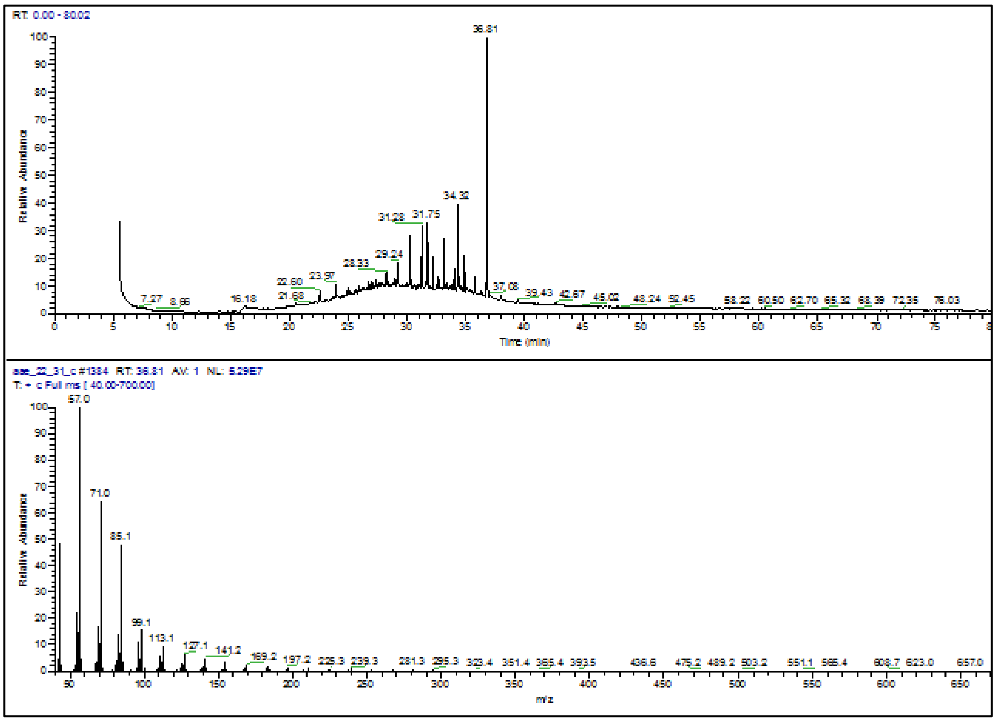
Η πιο πολική ζώνη (A) που παραλήφθηκε ταυτοποιήθηκε ως β-χλωρογενίνη (β-Chlorogenin) (AAE6), μια στεροειδής σαπωγενίνη η οποία έχει απομονωθεί από τα *A. erubescens, A. giganteum, A. gramineum, A. leucanthum, A. porrum, A. rotundum, A. sativum, A. waldsteini* , αλλά και από το *A. porrumL. (A. ampeloprasum L. var. porrum)* [26].



β-χλωρογενίνη – ΑΑΕ6

Για την ένωση αυτή έχει αναφερθεί η ιδιότητα της να αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων (αντιπηκτική δράση) [73] και της έχει αποδωθεί και αντιμυκητιασική δράση [74]. Επίσης υπάρχει μία έρευνα που αποκαλύπτει την συσχέτιση της δράσης της ουσίας αυτής με δερματολογικές διαταραχές όπως η ακμή, η πιτυρίδα, και η κακοσμία του σώματος, εξαιτίας της μείωση τη περίσσειας σμήγματος που προκαλεί [75].

Η ζώνη C με τη χρήση της τεχνικής GC-MS ταυτοποίηθηκε ως Tetratriacontane $C_{44}H_{90}$ και με MB=619.204 g/mol

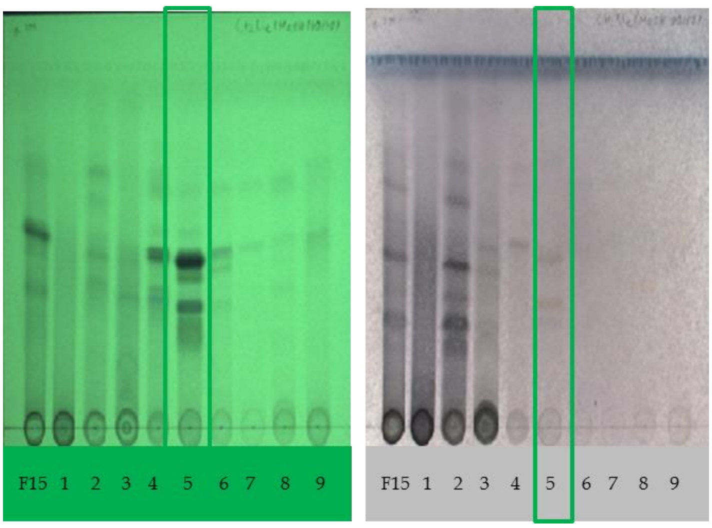


Εικόνα 7-15 Χρωματογράφημα GCMS του κλάσματος AAE-F14 _S2_2/3_C

Tetratriacontane

7.2.2.5 Το Κλάσμα AAE-F15

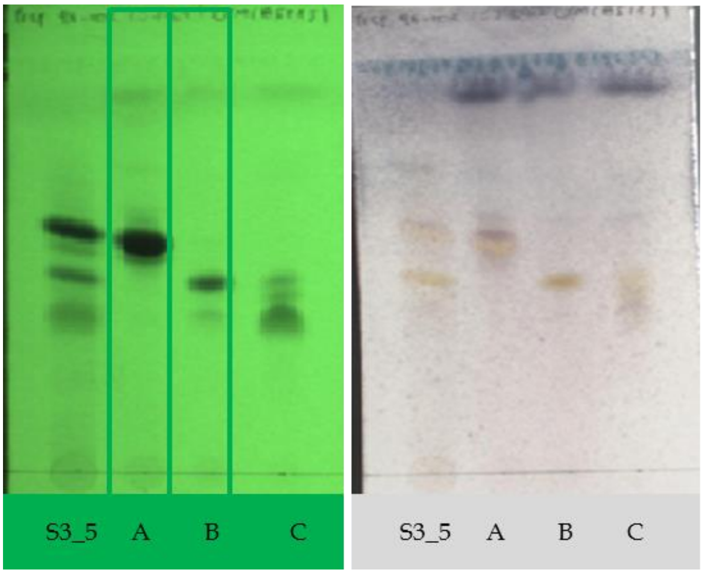
Ομοίως 100mg του κλάσματος AAE-F15 επεξεργάστηκαν με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη, με σκοπό τον καθαρισμό των κύριων φαινολικών παραγώγων που φαίνεται να περιέχει. Ύστερα από τη συλλογή 90 κλασμάτων και τον ποιοτικό έλεγχο με TLC προέκυψαν οι εξής συνενώσεις:



Σύστημα ανάπτυξης TLC DCM/MeOH 90/10
Εικόνα 7-16 TLC χρωματογράφημα κλασμάτων από Sephadex S3 του AAE-F15

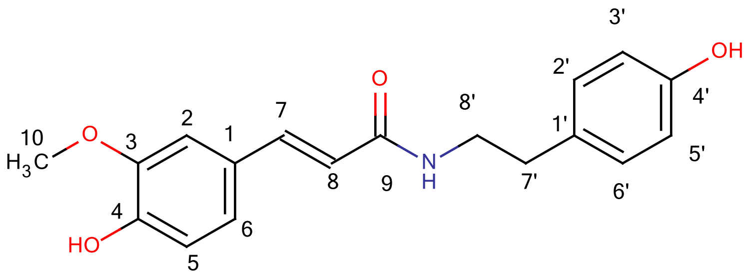
➢ <u>Κλάσμα AAE-F15_S3_5</u>

Από τα κλάσματα της παραπάνω χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού το AAE-F15_S3_5 επιλέχθηκε για περαιτέρω επεξεργασία με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος με σκοπό τον περαιτέρω διαχωρισμό των μεταβολιτών που περιείχε. Η prep_TLC αναπτύχθηκε στο Tol/EtOAc (40/60) 2%FA και παρελήφθησαν τρεις ζώνες. Ενώ εκχύλιση του οξειδίου του πυριτίου έγινε με EtOAc -dist .

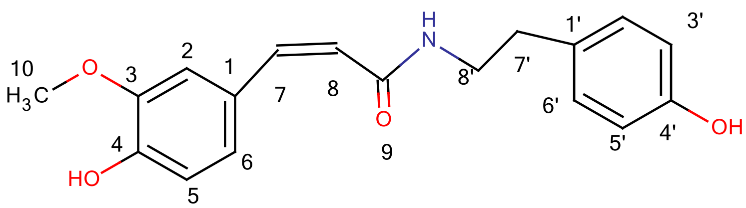


Εικόνα 7-17 TLC χρωματογράφημα ενώσεων από Preparative του AAE-F15 _S3_5

Ο μεταβολίτης Α (AAE7) ταυτοποιήθηκε ως μίγμα σε μεγαλύτερο ποσοστό N-*trans*-φερουλόυλ-τυραμίνη (N-*trans*-feruloyl tyramine) και σε μικρότερο ποσοστό N-*cis*-φερουλόυλ-τυραμίνη (N-*cis*-feruloyl tyramine).



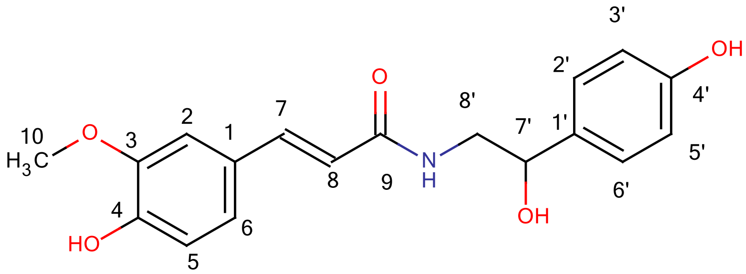
N-*trans*-φερουλόυλ-τυραμίνη - AAE7



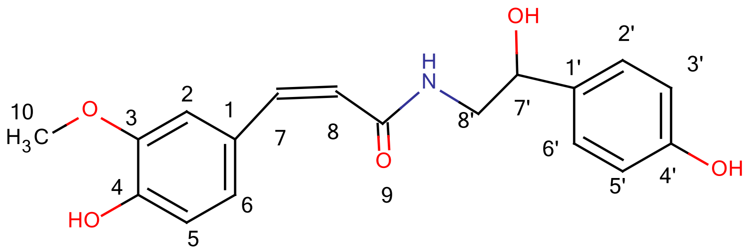
N-*cis*-φερουλόυλ-τυραμίνη - AAE7

Οι ενώσεις αυτές είναι παράγωγα κινναμωμικού οξέος, έχουν απομονωθεί από φυτά του γένους *Rheum* και *Piper,* ενώ όσον αφορά το γένος *Allium* έχουν απομονωθεί από το *Allium Sativum* [76] *και Allium ampeloprasum subsp. persicum* [77]. Τα παράγωγα αυτά έχουν συνδεθεί με δράσεις όπως αντιοξειδωτική [78], ηπατοπροστατευτική, αντικαρκινική [79], αντιμυκητιασική [77] και ανασταλτική της μελανογένεσης [80].

Ο μεταβολίτης Β (AAE8) με χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών ταυτοποιήθηκε και αυτός ως μίγμα σε μεγαλύτερο ποσοστό N-*trans*-φερουλόυλ-οκτοπαμίνη (N-*trans*-feruloyloctopamine) και σε μικρότερο ποσοστό το *cis* παράγωγο του.



N-*trans*-φερουλόυλ-οκτοπαμίνη - AAE8



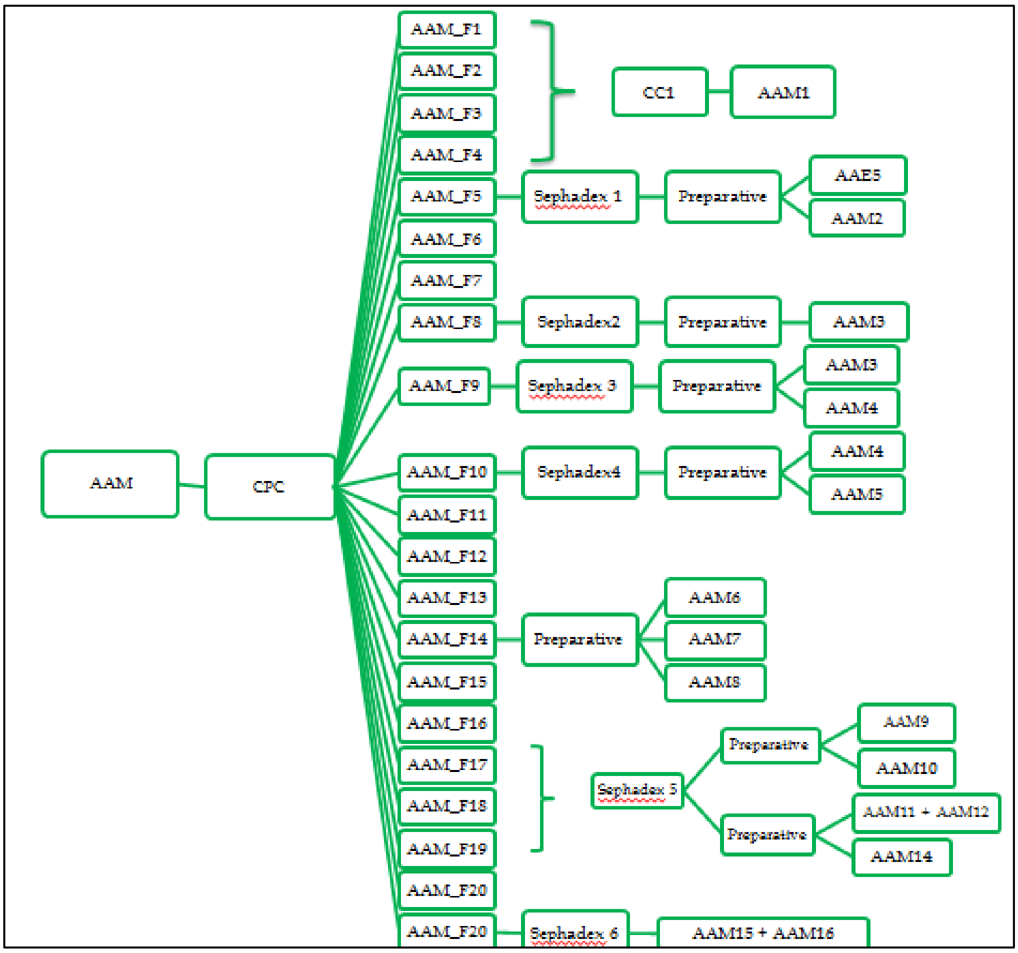
N-*cis*-φερουλόυλ-οκτοπαμίνη - AAE8

Και οι μεταβολίτες αυτοί είναι παράγωγα κινναμωμικού οξέος, έχουν απομονωθεί από διάφορα φυτά και από το *Alliium ampeloprasum* [81]. Και τα συγκεκριμένα παράγωγα χαρακτηρίζονται από αντιοξειδωτική [82], αντιδιαβητική [81] και ανασταλτική δράση της μελανογένεσης [83],

7.3 Μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος είδος *A. ampeloprasum*

Με σκοπό την παραλαβή περισσότερων μεταβολιτών διαφορετικών κατηγοριών που δεν εντοπίστηκαν στο εστερικό εκχύλισμα του *A. ampeloprasum*, προχωρήσαμε και στην κλασμάτωση του MeOH εκχυλίσματος του φυτού. Για την κλασμάτωση του και σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε επίσης η Υγρή Χρωματογραφία Κατ' Αντιροή (CCC) και τα μετέπειτα κλάσματα επεξεργάστηκαν με τις ίδιες τεχνικές (χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού Sephadex LH-20, χρωματογραφία στήλης silica gel και παρασκευαστικής χρωματογραφίας TLC) με σκοπό την απομόνωση όσο το δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών ποικίλων κατηγοριών.

Παρακάτω παρατίθεται ένα διάγραμμα ροής στο οποίο παρουσιάζονται όλα τα στάδια οι χρωματογραφικές τεχνικές που πραγματοποιήθηκαν στα κυριότερα κλάσματα του CCC και ποιες ενώσεις απομονώθηκαν.



Σχήμα 7-2 Η συνολική πορεία για την απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών από το εκχύλισμα του MeOH

7.3.1 Αρχική κλασμάτωση μεθανολικού εκχυλίσματος με χρωματογραφία κατ’αντιρροή (CCC)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε δοκιμή ενός διφασικού συστήματα με τρεις διαλύτες σε διαφορετικές αναλογίες (ισοκρατική έκλουση).

Πίνακας 7-6 Δοκιμαστικό σύστημα ισοκρατική έκλουση για το CPC

Συστήματα	**Αναλογίες**
EtOAc-EtOH-H_2O	10/1/10

Η δοκιμή έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στην § 7.2.1 αλλά ο χρωματογραφικός έλεγχος της κατανομής των ουσιών δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Λόγω λοιπόν της πληθώρας δευτερογενών μεταβολιτών που εντοπίζονται στο εκχύλισμα, (λιπαρά συστατικά, τερπένια, σαπωνίνες, φλαβονοειδή, φαινολικά παράγωγα) πιθανώς ένα μόνο σύστημα δεν μπορεί να επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα. Οπότε για καλύτερα αποτελέσματα δοκιμάστηκε η ανάλυση του συγκεκριμένου εκχύλισματος χρησιμοποιώντας την μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution). Πιο συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν σειρές διφασικών συστημάτων, ικανά να διαχωρίσουν όσο το δυνατόν περισσότερες ουσίες και να διατηρούν την διφασικότητα μέσα στο στήλη κατά την μετάβαση από το ένα σύστημα στο επόμενο.

Επαναλήφθηκε ο έλεγχος κατανομής των ουσιών στις δυο φάσεις με την εφαρμογή των ακόλουθων συστημάτων και αφού κρίθηκε ικανοποιητικός προχωρήσαμε στην εφαρμογή τους στο CPC.

Πίνακας 7-7 Δοκιμαστικά Συστήματα βαθμιδωτής έκλουσης για το CPC

Σύστημα	Hexane	EtOAc	BuOH	MeOH	H_2O
S1	2.0	4.0	0.0	1.0	5.0
S2	1.0	4.5	0.5	1.0	5.0
S3	0.5	4.0	1.5	1.0	5.0
S4	0.5	3.0	2.5	1.0	5.0
S5	0.5	1.0	4.5	1.0	5.0

Παρακάτω παρουσιάζονται σε πίνακα όλα τα χαρακτηριστικά της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε.

Πίνακας 7-8 Χαρακτηριστικά της πειραματικής διαδικασίας του CPC

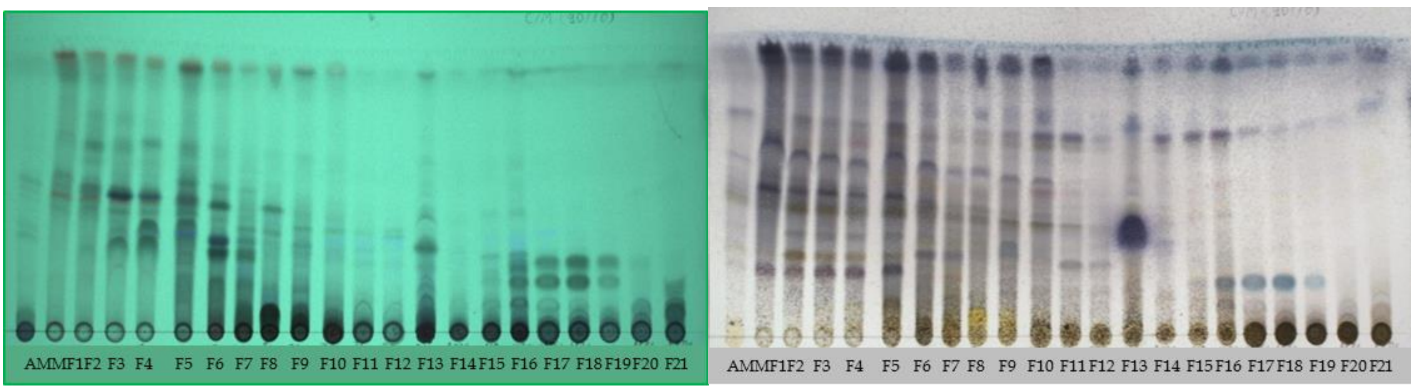
Δεδομένα CPC	
ascending mode	
Στατική φάση η κάτω (υδατική) φάση	
Κινητή φάση η πάνω (οργανική) φάση	
Συσκευή υδροστατικού τύπου	CPC KROMATON
Παρασκευαστική στήλη	1000 ml
Αντλία	LabAlliance
Αυτόματο συλλέκτη	Buchi B-684
Βάρος δείγματος	1.5 g
Ταχύτητα της κινητής φάσης	680 στροφές το λεπτό
Ροή των διαλυτών κατά το γέμισμα	35ml/min
Ροή συλλογής κλασμάτων	10ml/min
Όγκος κλάσματος:	30 ml

Παραλήφθηκαν 150 κλάσματα (στον πίνακα φαίνονται αναλυτικά πόσα κλάσματα παρελήφθησαν με κάθε σύστημα) έως ότου ο έλεγχος με TLC έδειξε ότι δεν εκλούονται άλλες ουσίες), οπότε και έγινε αναστροφή των φάσεων με τη υδατική φάση να χρησιμοποιείται ως κινητή μέχρι το τέλος της ανάλυσης. Συνολικά παραλάβαμε 136 κλάσματα όπου μετά από χρωματογραφικό έλεγχο με TLC πραγματοποιήθηκαν συνενώσεις με βάση την ομοιότητα του χημικού φορτίου και καταλήξαμε σε 21 συνενωμένα κλάσματα.

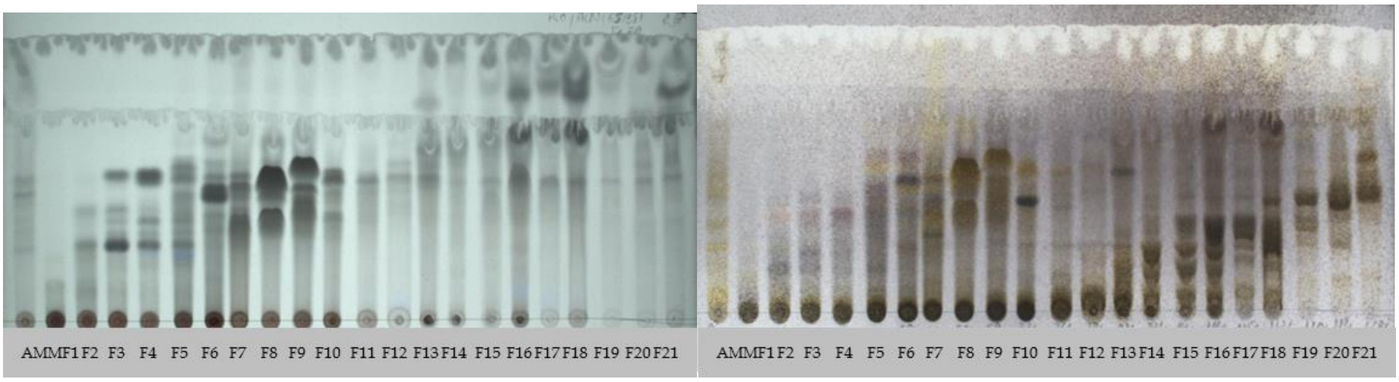
Πίνακας 7-9 Αντιστοιχία εκλύωμενων κλασμάτων με συστήματα έκλυσης CPC

Κλάσματα	Χρησιμοποιούμενα συστήματα
1-26	S1
28-55	S2
56-80	S3
81-127	S4
128-150	S5

Παρακάτω απεικονίζεται ο χρωματογραφικός έλεγχος των συνενωμένων κλασμάτων σε TLC κανονικής φάσης και σύστημα ανάπτυξης CH_2CL_2/MeOH (90/10) ενώ ελέγθησαν και σε TLC αντίστροφης φάσης σε σύστημα ανάπτυξης H_2O/ACN (65/35) 1% FA.



A) Σύστημα ανάπτυξης TLC CH_2CL_2/MeOH (90/10)



B) Σύστημα ανάπτυξης RP-TLC H_2O/ACN (65/35) 1% FA.

Εικόνα 7-18 TLC χρωματογράφημα των κλασμάτων που προέκυψαν από το AAM μετά την κλάσματωση CPC – από A) παρατήρηση στα 254 nm B) εμφάνιση με διάλυμα θεϊκής βανιλλίνης

Πίνακας 7-10 Τα κλάσματα του αρχικού διαχωρισμού μέσω CPC του εκχυλίσματος AAM

Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρη [mg]
AAM-F1	1	220.8
AAM-F2	2-6	122.7
AAM-F3	7-11	86.3
AAM-F4	12-15	27.5
AAM-F5	16-37	67.1
AAM-F6	38-45	63.4
AAM-F7	46-51	43
AAM-F8	52-58	34.3
AAM-F9	59-71	43.7
AAM-F10	72-75	64
AAM-F11	76-78	43.8
AAM-F12	79-86	104.6
AAM-F13	87-102	40.9
AAM-F14	103-109	82.5
AAM-F15	110-111	12.3
AAM-F16	112-114	16.7
AAM-F17	115-116	9.2
AAM-F18	117-119	28.5
AAM-F19	120-122	39.5
AAM-F20	123-127	52.2
AAM-F21	128-136	76.2

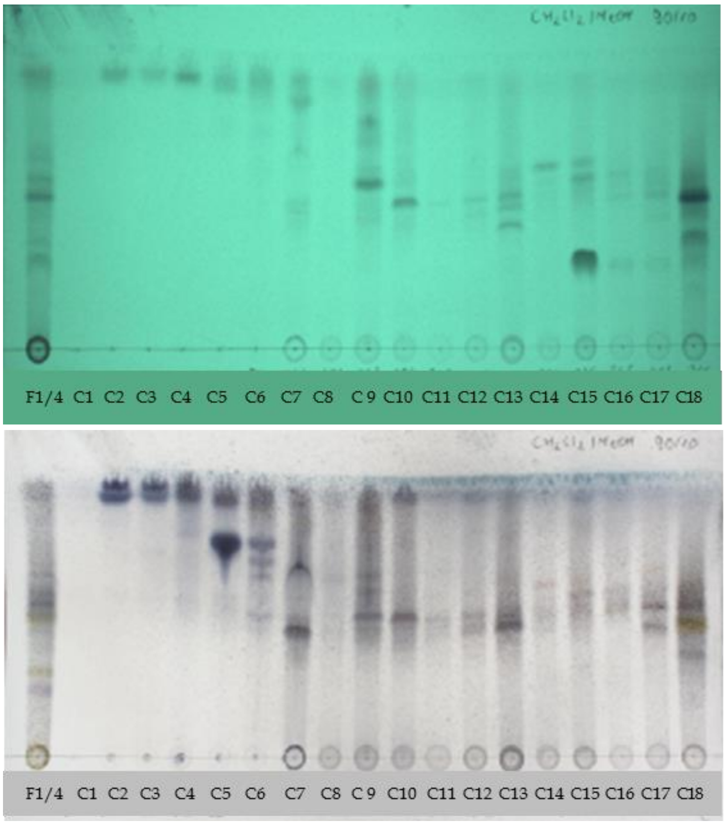
7.3.2 Επεξεργασία κλασμάτων και απομόνωση συστατικών

Από τα κλάσματα που προέκυψαν από την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος με την τεχνική του CPC, έπειτα από τον χρωματογραφικό έλεγχο με TLC αποφασίστηκε η περεταίρω ανάλυση 15 κλασμάτων. Τα κλάσματα αυτά επεξεργάστηκαν κυρίως με συνδυασμό χρωματογραφικών τεχνικών όπως Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού - Sephadex LH-

20, με Χρωματογραφία Στήλης Χαμηλής Πίεσης με πληρωτικό υλικό γέλη πυριτίου και τέλος με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC. Στον Πίνακας 7-11 επισημαίνονται με διαφορετική απόχρωση τα δεκαοχτώ υπό μελέτη κλάσματα .

7.3.2.1 ***Κλάσμα AAM_F1-F4***

Τα 4 πρώτα κλάσματα από το CPC, τα οποία παρουσίασαν παρόμοιο φυτοχημικό προφίλ, συνενώθηκαν (440 mg) και επεξεργάστηκαν με Χρωματογραφία Στήλης Χαμηλής Πίεσης με πληρωτικό υλικό γέλη πυριτίου, όπου το δείγμα εισήχθη στην στήλη με την τεχνική της ξηρής εναπόθεσης (ξηρό dépôt). Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα C-Hex και EtOAc αυξανόμενης πολικότητας ο όγκος συλλογής κλασμάτων ήταν 20ml ενώ τελικά συλλέχθησαν 267 κλάσματα και μέτα από χρωματογραφικό έλεγχο καταλήξαμε σε 18 συνενώσεις.



Οι TLC αναπτύχθηκαν στο σύστημα CDM/MeOH (90/10)

Εικόνα 7-19 Χρωματογραφικός έλεγχος συνενωμένων κλασμάτων από υγρή χρωματογραφία στήλης του AAM-F1-F4

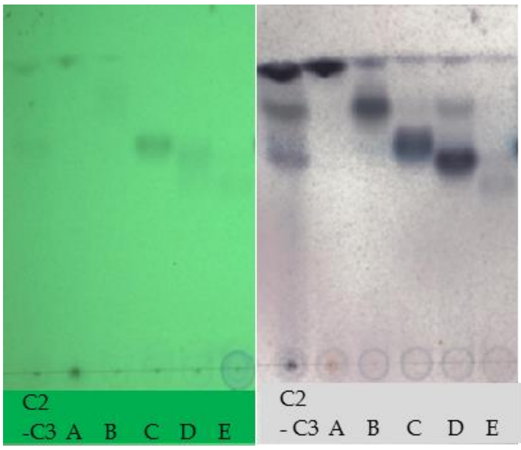
Πίνακας 7-11 Τα κλάσματα του AAM_F1-F4 μετά από επεξεργασίαςμε υγρή χρωματογραφία στήλης

Κλάσματα	Συνενώσεις	Βάρη [mg]
AAM-F1/4-C1	31-32	0.9
AAM-F1/4-C2	33-36	19,2
AAM-F1/4-C3	37-40	10,4
AAM-F1/4-C4	41-58	5
AAM-F1/4-C5	59-95	24,6
AAM-F1/4-C6	96-116	15,1
AAM-F1/4-C7	117-151	29,7
AAM-F1/4-C8	152-162	0,8
AAM-F1/4-C9	163-193	6,4
AAM-F1/4-C10	194-202	10,1
AAM-F1/4-C11	203-204	0,7
AAM-F1/4-C12	205-210	2,2
AAM-F1/4-C13	211-230	9,2
AAM-F1/4-C14	231-234	1,6
AAM-F1/4-C15	235-244	4
AAM-F1/4-C16	245-255	3,8
AAM-F1/4-C17	256-265	6,8
AAM-F1/4-C18	266-τελ	26,2

➢ Κλάσμα AAM-F1/4-C2-C3

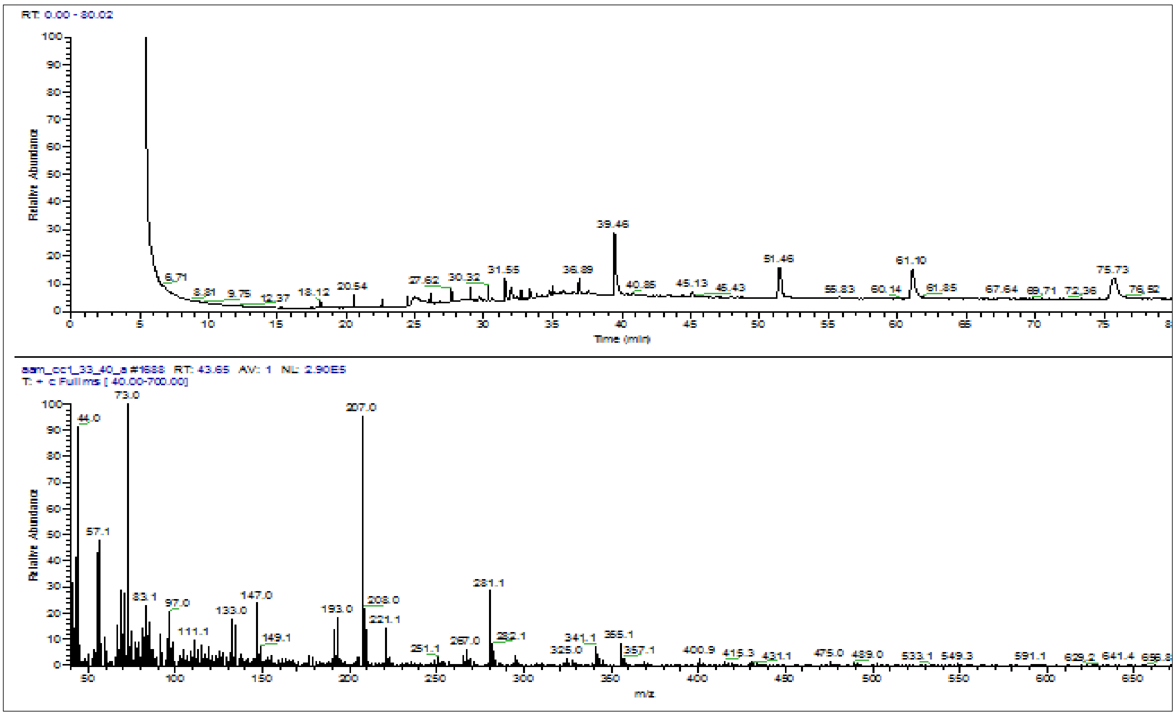
Τα κλάσματα AAM-F1/4-C2 και AAM-F1/4-C3 φάνηκε να περιέχουν λιπαρά όπου μετά από συνένωση τους υποβλήθηκαν σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος με σκοπό τον περαιτέρω καθαρισμό τους.

Πιο συγκεκριμένα, για την παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος, 25mg του κλάσματος AAM-F1/4-C2-C3 διαλύθηκαν σε MeOH και επιστρώθηκαν σε γυάλινη πλάκα silica gel με το σύστημα CAMAG Linomat 5. Στην συνέχεια έγινε ανάπτυξη του χρωματογραφήματος σε σύστημα c-Hex/EtOAc (92/8) παραλήφθησαν τέσσερις ζώνες (A, B,C,D). Έπειτα πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του οξειδίου του πυριτίου με EtOAc και με τη βοήθεια του GC-MS ταυτοποιήθηκαν οι εξής μεταβολίτες:

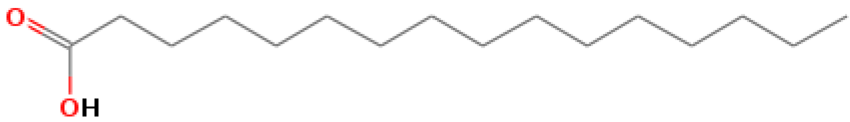


Εικόνα 7-20 TLC χρωματογράφημα ενώσεων από preparative του AAM-F1/4-C2-C3

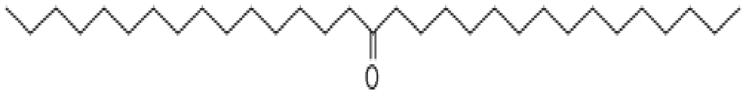
Ο μεταβολίτης A ένα μίγμα κυρίως του δεκαεξανοϊκού οξέος (hexadecanoic acid) $C_{16}H_{32}O_2$ MB=256.4241, πρόκειται για λιπαρό οξύ, αρκετά διαδεδομένο στη φύση και ενός υδρογονάνθρακα, του 16-Hentriacontanone C31H62O και MB= 450.82338 g/mol.



Εικόνα 7-21 Χρωματογράφημα GC-MS του AAM-F1/4-C2-C3_A

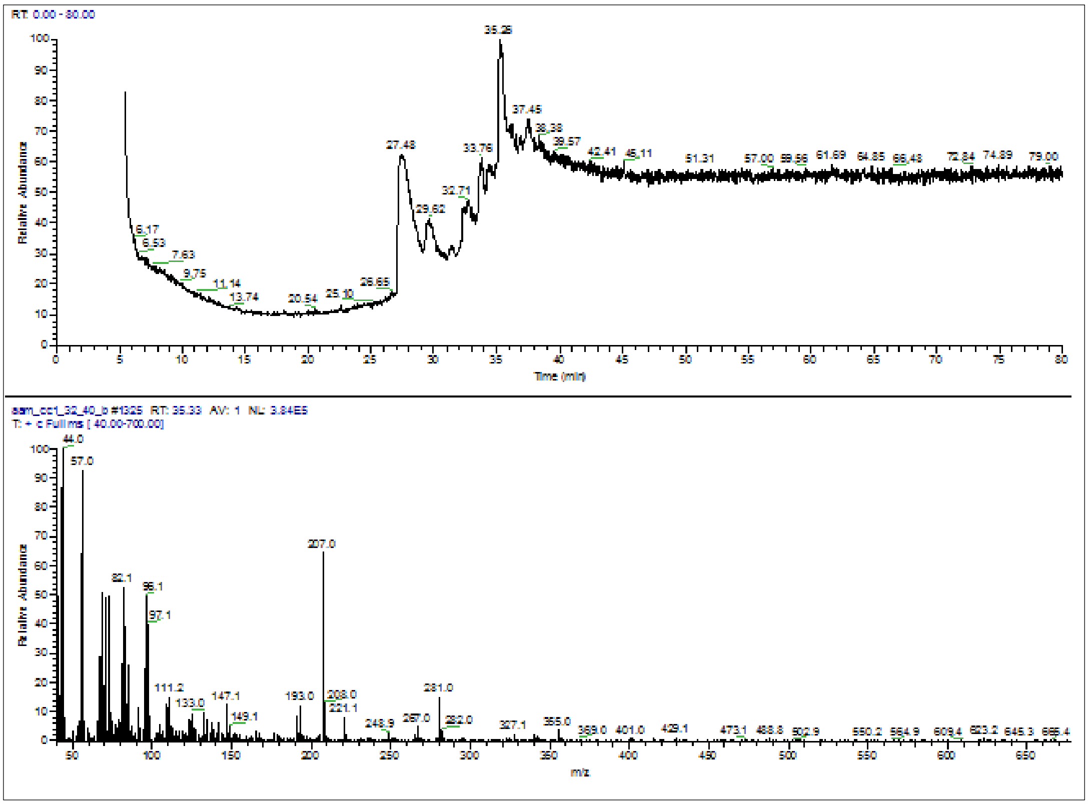


hexadecanoic acid



16-Hentriacontanone

Ο μεταβολίτης B ως ένα λιπαρό οξυ το πενταδεκανοϊκό οξύ (Pentadecanoic acid) ($C_{15}H_{30}O_2$) και 242.403 g/mol.

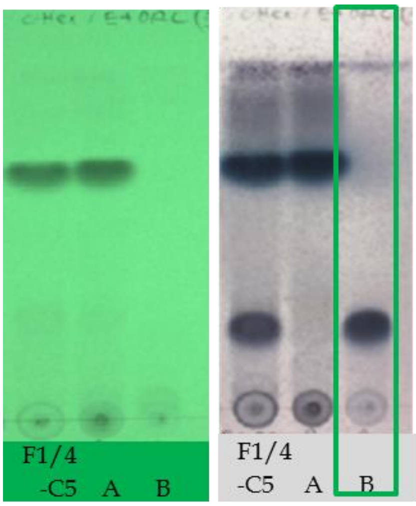


Εικόνα 7-22 Χρωματογράφημα GC-MS MS του AAM-F1/4-C2-C3_A

Pentadecanoic acid

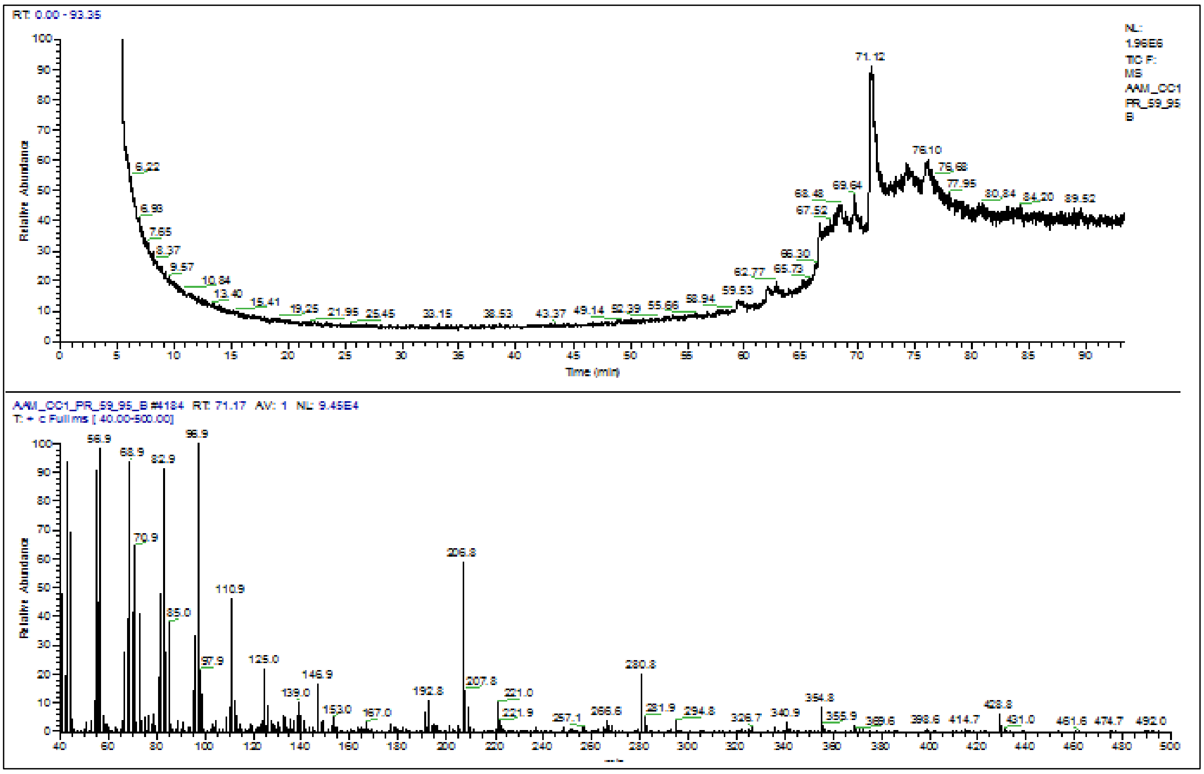
➢ <u>**Κλάσμα AAM-F1/4-C5**</u>

Ομοίως από το κλάσμα AAM-F1/4-C5 με παρασκευαστική TLC σε σύστημα c-Hex/EtOAc (92/8) παραλήφθηκε ο μεταβολίτης AAM-F1/4-C5_B

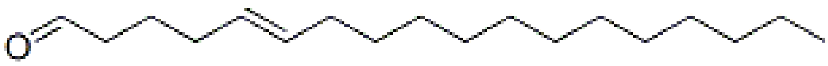


Εικόνα 7-23 TLC χρωματογράφημα ενώσεων από preparative του AAM-F1/4-C5

Με τη βοήθεια του GC-MS ταυτοποιήθηκαν ως 5-Octadecenal ($C_{18}H_{34}O$) και MB= 266.469 g/mol



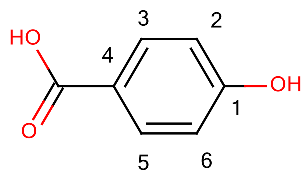
Εικόνα 7-24 Χρωματογράφημα GC-MS AAM-F1/4-C5_B



5-Octadecenal

- **<u>Κλάσμα AAM-F1/4-C15 –(AAM1)</u>**

Ομοίως το κλάσμα AAM-F1/4-C15 από τον χρωματογραφικό έλεγχο φαίνεται να περιέχει σε μεγαλύτερο ποσοστό ένα μεταβολίτη και με την χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών ταυτοποιήθηκε ως το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (AAM1) (p-OH-benzoic acid).

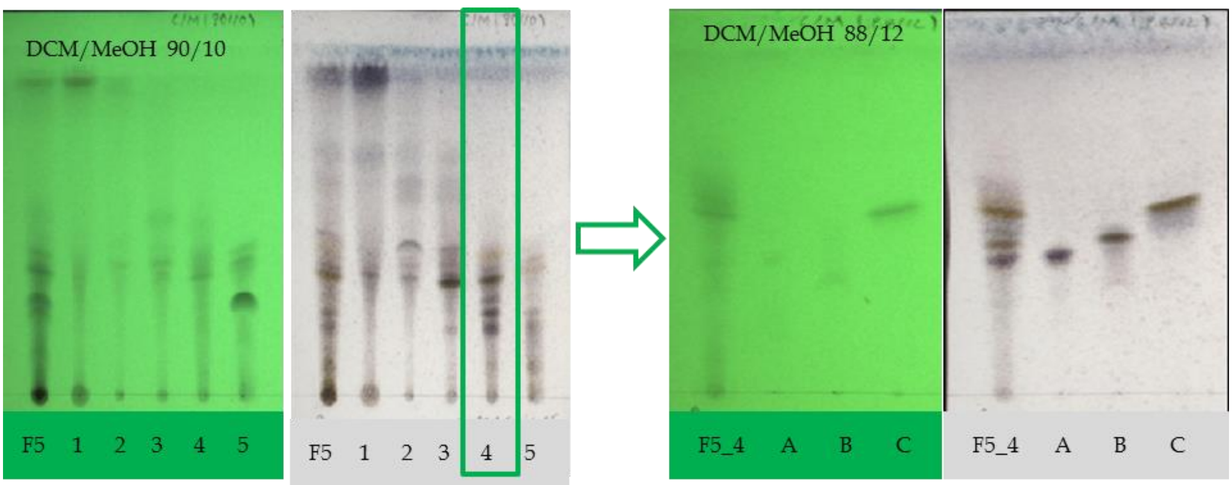


4-υδροξυβενζοϊκό οξύ - AAM1

Το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (AAM1) ένα φαινολικό παράγωγο του βενζοϊκού οξέος. Το οποίο είναι είναι ευραίως διαδεδομένη στα φυτά και αντίστοιχα και στο είδος *Allium.* Είναι κυρίως γνωστό για την αντιοξειδωτική δράση, επίσης τα άλατα και οι εστέρες του είναι γνωστά ως parabens τα οποία χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά στα καλλυντικά προϊόντα.

7.3.2.2 <u>Κλάσμα AAM-F5</u>

Το κλάσμα AAM-F5 (55 mg) από το χρωματογραφικό έλεγχο φάνηκε να περιέχει πλήθος μεταβολιτών παρόμοιας πολικότητας και με σκοπό τον διαχωρισμό τους χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τον οξικό αιθυλεστέρα. Ύστερα από τη συλλογή 65 κλασμάτων και τον ποιοτικό

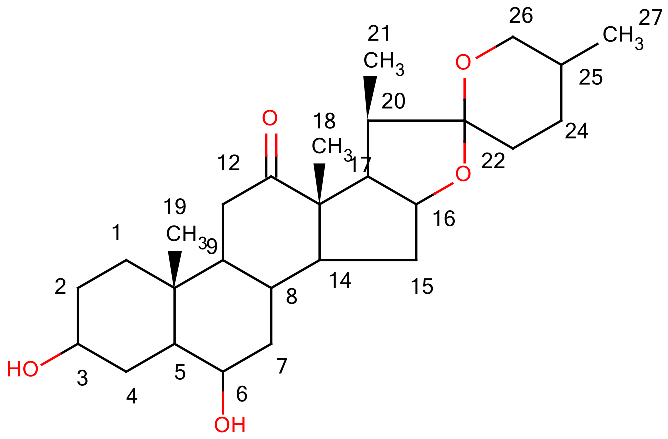


Εικόνα 7-25 TLC χρωματογράφημα κλασμάτων από την Sephadex S1 του AAM-F5 και των ενώσεων από την αντίστοιχη preparative.

έλεγχο με TLC εφόσον δεν λήφθηκαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα επιλέχθηκε να μελετηθεί περαιτέρω το κλάσμα F5_S1_4 με σκοπό την παραλαβήτων 3 κύριων μεταβολιτών του.

- **<u>Το κλάσμα AAM-F5_S1_4</u>**

Έτσι λοιπόν ακολουθήθηκε η γνωστή διαδικασία με σύστημα ανάπτυξης DCM/MeOH (88/12) και παραλήφθηκαν 3 ουσίες. Πιο συγκεκριμένα η πιο πολική ουσία Α ταυτοποιήθηκε ως 3-ο-γλυκοσίδης της β-σιτοστερόλης που έχει απομονωθεί προηγουμένως και από το κλάσμα του οξικού αιθυλεστερα. Η τρίτη ουσία που απομονώθηκε χαρακτηρίστηκε ως μίγμα δυο στεροειδών σαπωγενινών. Συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκε μια στεροειδής σαπωγενίνη, η 12-κετοποριγενίνη (12-ketoporrigenin) (AAM2) η οποία βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο μίγμα. Είναι χαρακτηριστική για το είδος *Allium porrum* [84], ενώ συγχρόνως υπάρχουν αναφορέα και στο *A. porrum L. (A. ampeloprasum L. var. porrum)*[26], όσον αφορά τις δράσεις της εμφανίζει κυτταροτοξικότητα σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές

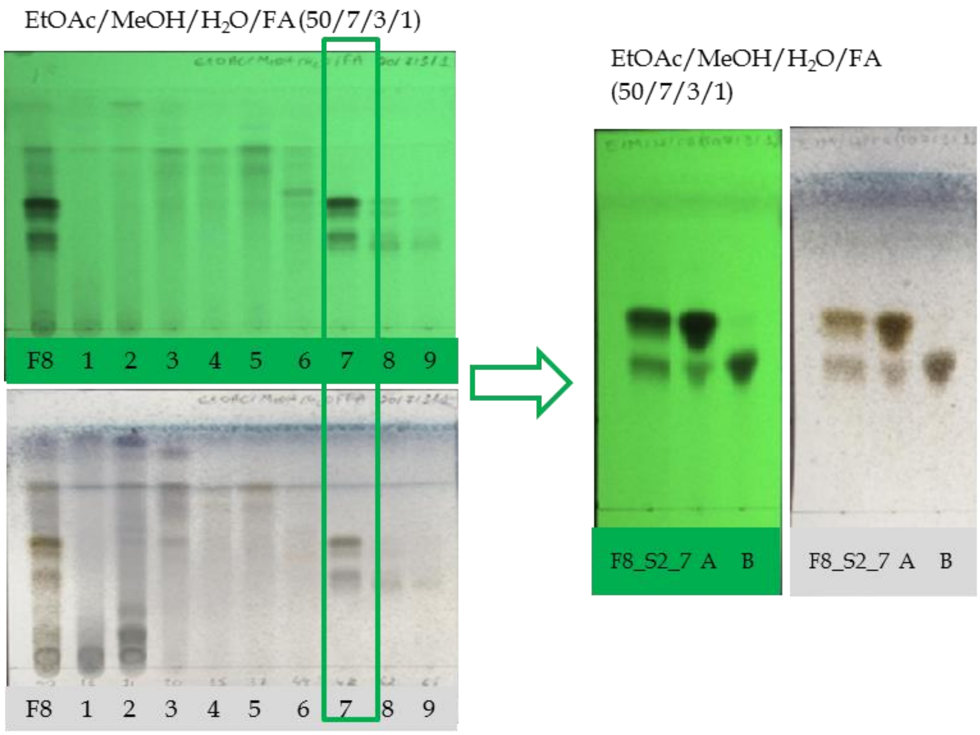


12- κετοποριγενίνη - AAM2

Τέλος ο δεύτερος μεταβολίτης διερευνάται με φασματοσκοπικές τεχνικές για την απόδοση της δομής του.

7.3.2.3 <u>Κλάσμα AAM-F8</u>

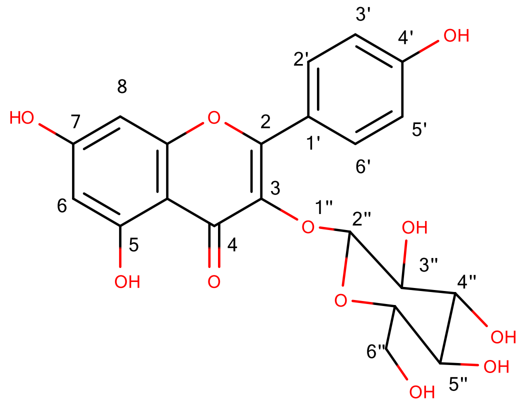
Ομοίως 30mg του κλάσματος AAM-F8 επεξεργάστηκαν με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη, με σκοπό τον καθαρισμό των κύριων φαινολικών παραγώγων που φαίνεται να περιέχει. Ύστερα από τη συλλογή 70 κλασμάτων και τον ποιοτικό έλεγχο με TLC προέκυψαν οι εξής συνενώσεις



Εικόνα 7-26 TLC χρωματογράφημα κλασμάτων από την Sephadex S2 του AAM-F8 και των ενώσεων από την αντίστοιχη preparative

- <u>Κλάσμα AAM-F8 _S2_7</u>

Παρατηρώντας τις παραπάνω TLC αποφασίστηκε να γίνει περαιτέρω επεξεργασία μόνο στο κλάσμα 7 της Sephadex, το οποίο φάνηκε να περιέχει σε μεγάλη συγκέντρωση δυο δευτερογενείς μεταβολίτες και γι' αυτό υποβλήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος με σκοπό τον περαιτέρω διαχωρισμό τους. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H_2O/FA (50/7/3/1) και παραλήφθησαν δύο ζώνες (A, B). Πιο συγκεκριμένα, απομονώθηκαν ο μεταβολίτης A ο οποίος φάνηκε να αντιστοιχεί στον 3-ο-γλυκοσίδης της καμφερόλης (AAM3)



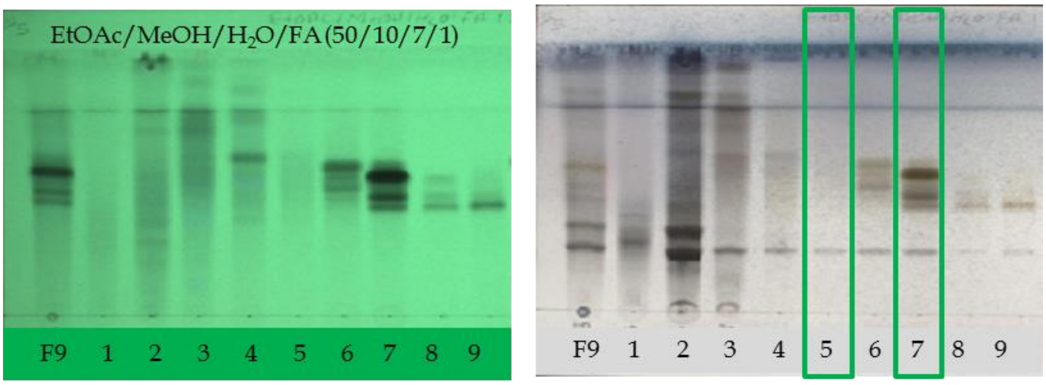
3-*O*-γλυκοσίδης της καιμφερόλης - AAM3

Πρόκειται για ένα φυσικό φλαβονοειδές που έχει απομονωθεί από πολλές φυτικές πηγές που ανήκουν στις οικογένειες Asteraceae, Paeoniaceae, Compositae κ.λ.π. Όσον αφορά το γένους *Allium* έχουν γίνει αναφορές σε διάφορα είδη όπως: *A. porrum*, *A. neapolitanum*, *A. hirtifolium*, αλλα και στο *A.ampeloprasum* [85]. Οι δράσεις με τις οποίες συνδέεται η ένωση αυτή είναι πολλές αλλα η χαρακτιριστική είναι η αντιοξειδωτική δράση, ενω υπάρχουν αναφορές και για αντιφλεγομονώδη, αντιδιαβιτική, ηπατοπροστατευτική δράση και έχει συνδεθεί με τις μειωμένες πιθανότητες καρδιοπάθειας [86],[87].

Ενώ ο B διερευνάται με φασματοσκοπικές τεχνικές για την απόδοση της δομής του.

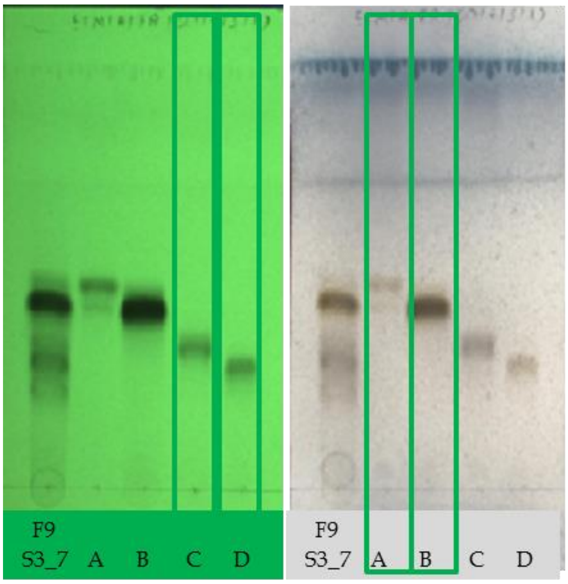
7.3.2.4 Κλάσμα AAM-F9

Το κλάσμα AAM_F9 (40mg) επίσης επεξεργάστηκε με χρήση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη καθώς φάνηκε να περιέχει μεταβολίτες διαφορετικών κατηγοριών. Συλλέχθηκαν 83 κλάσματα και μετά από ποιοτικό έλεγχο με TLC προέκυψαν 9 συνενωμένα κλάσματα, όπως φαίνεται στις παρακάτω TLC.



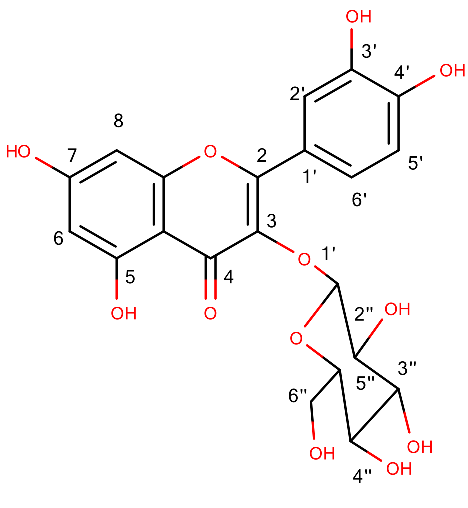
Εικόνα 7-27 TLC χρωματογράφημα κλασμάτων από την Sephadex S3 του AAM-F9

Παρατηρώντας τις παραπάνω TLC το κλάσμα F9_S3_5 φαίνεται να περιέχει ουσίες της κατηγορίας των σαπωγενινών αλλά λόγω μικρής ποσότητας δεν μπορέσαμε να οδηγηθούμε στην απομόνωση και ταυτοποίησή τους. Έτσι, αποφασίστηκε να γίνει περαιτέρω επεξεργασία στο κλάσμα AAM_F9 _S3_7 που φαίνεται να περιέχει φλαβονοειδή.



Εικόνα 7-28 TLC χρωματογράφημα ενώσεων από preparative του AAM_F9 _S3_7

Έτσι λοιπόν, με χρήση παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής το κλάσμα AAM_F9_S3_7 και σε σύστημα ανάπτυξης EtOAc/MeOH/H2O/FA(50/7/3/1) απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ο μεταβολίτης A ως 3-*O*-γλυκοσίδης της καιμφερόλης, μεταβολίτη ο οποίος έχει ξαναπομονωθεί από προηγούμενο κλάσμα, ενώ ο μεταβολίτης B φάνηκε να αντιστοιχεί στον 3-*O*-γλυκοσίδη της κερκετίνης (AAM4).

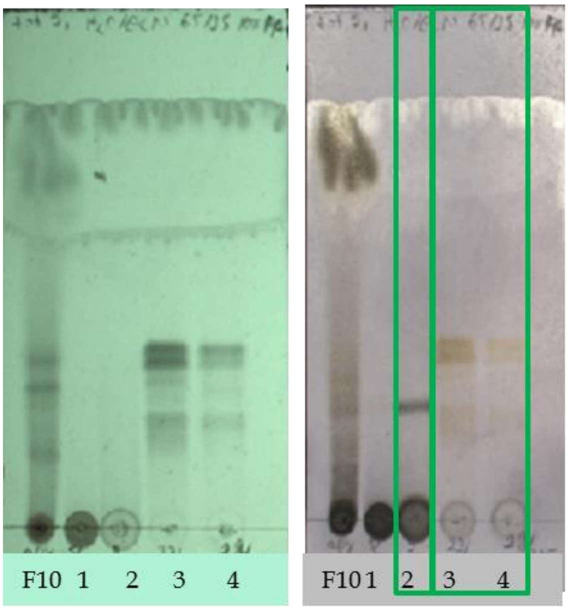


3- *O* -γλυκοσίδης της κερκετίνης –AAM4

Είναι ένας γλυκοσίδης μίας φλαβονόλης (φλαβονοειδές) που βρίσκεται σε πολλά φρούτα, λαχανικά, φύλλα και σπόρους. Έχει απομονωθεί από διάφορα είδη *Allium* (*A.neapolitanum, A.porrum*) [30],[31] αλλά και από το *A. ampeloprasum* [42]. Παρουσιάζει μεγάλο φαρμακολογικό ενδιαφέρον καθώς έχει αναφερθεί η αντιοξειδωτική [88], η αντιφλεγμονώδης [89] αντικαρκινική δράση και μπορεί να έχει θετικά αποτελέσματα στην καταπολέμηση ή στην πρόληψη καρκίνου, προστάτη, καρδιοπάθειας [90], [91].

7.3.2.5 ***Κλάσμα AAM-F10***

Το κλάσμα AAM-F10 (45mg) φάνηκε και αυτό να περιέχει επίσης μια ουσία που πιθανώς να ανήκει στην κατηγορία των σαπωνινών γι' αυτό και υποβλήθηκε σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη. Ύστερα από τη συλλογή 35 κλασμάτων και τον ποιοτικό έλεγχο με TLC προέκυψαν 4 συνενωμένα κλάσματα όπως φαίνεται παρακάτω.

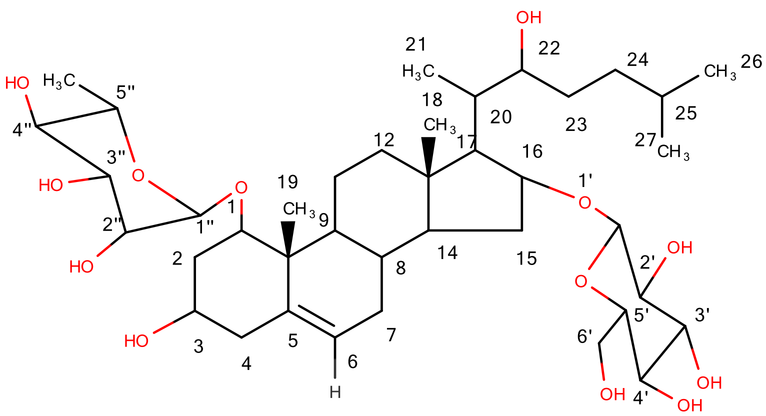


Σύστημα ανάπτυξης RP-TLC H2O/ACN (65/35) 1% FA

Εικόνα 7-29 TLC χρωματογράφημα ενώσεων από την Sephadex S4 του AAM_F10

- **Κλάσμα AAM-F10 _S4_2**

Τα 19.5 mg του κλάσματος S4_2 επεξεργάστηκαν και αυτά με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος με σκοπό την απομόνωση του κύριου μεταβολίτη. Συγκεκριμένα απομονώθηκε ο μεταβολίτης (3.2 mg), ο οποίος με χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών ταυτοποιήθηκε ως ο cholest-5-ene-1β,3β,16β,22-tetrol-1-O-α-l-rhamnopyranosyl-16-O-β-d-glucopyranoside. Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης αποτελεί σακχαριδικό παράγωγο της σαπωγενίνης αλλιοστερόλη.



AAM5

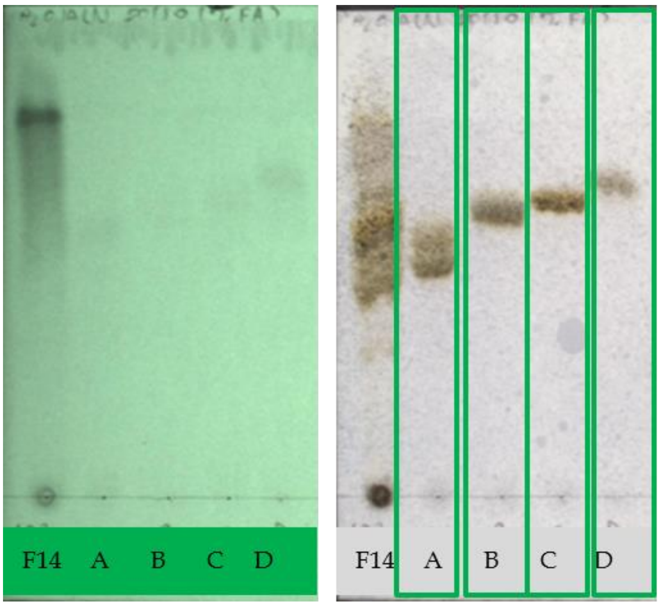
Η ένωση (AAM5) αυτή έχει απομονωθεί από το *Polygonatum odoratum* [92], *Galtonia candicans* [93] αλλά και από φυτά του γένους *Allium*, όπως το *Allium jestianum* [94], *Albopilosum and A. ostrowskianum* [95], ενώ είναι η πρώτη φορά που απομονώνεται από το είδους *A. ampeloprasum*. Χαρακτηριστικό της οποία είναι η κυτταροτοξική, αντιμυκητιασική δράση.

- **<u>Κλάσμα AAM-F10 _S4_3-4</u>**

Ομοίως τα κλάσματα AAM-F10_S4_3 και AAM-F10_S4_4 συνενώθηκαν, υποβλήθηκαν σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος και έπειτα από φασματοσκοπική μελέτη φάνηκε να περιέχουν σε μεγαλύτερο ποσοστό τον μεταβολίτη 3-*O*-γλυκοσίδης της κερκετίνης, ο οποίος έχει ξανααπομονωθεί.

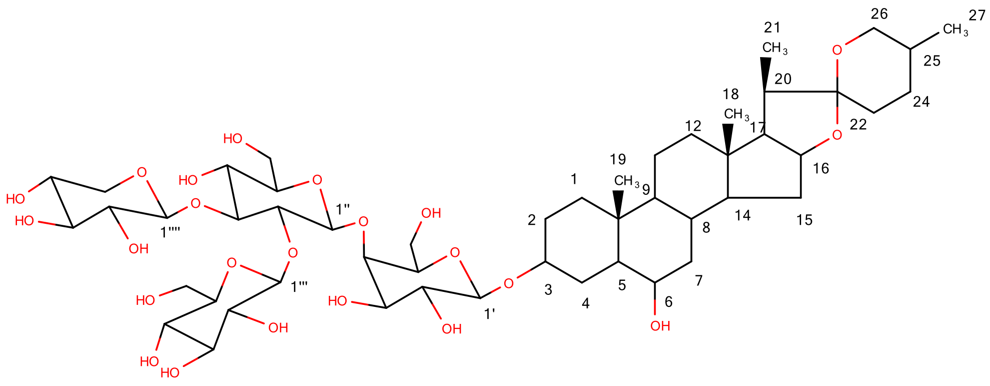
7.3.2.6 Το κλάσμα AAM-F14

Το κλάσμα AAM-F1 (25mg) ομοίως υποβλήθηκε και αυτό σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος με σκοπό την απομόνωση των τεσσάρων κύριων μεταβολιτών του που φαίνεται να ανήκουν στην κατηγορία των σαπωγενινών. Το δείγμα επιστρώθηκε σε πλάκα αντιστρόφου φάσεως και αναπτύχθηκε σε σύστημα H_2O/ACN (50/50) 1% FA.



Εικόνα 7-30 TLC χρωματογράφημα ενώσεων από preparative του AAM_F14

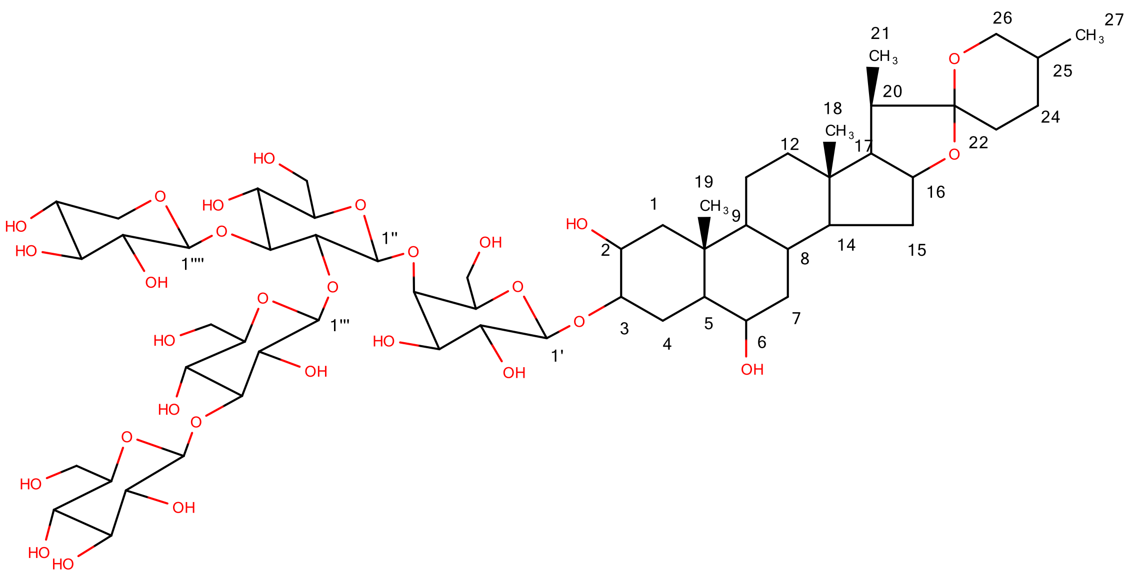
Παρελήφθησαν τέσσερις ζώνες (A,B,C,D) και με τη βοήθεια φασματοσκοπικών μελετών ο μεταβολίτης AAM-F14_A ταυτοποιήθηκε ως μια στεροειδής σαπωνίνη, συγκεκριμένα είναι ένας γλυκοσίδης της β-χλωρογενίνης γεγονός που δικαιολογεί την πολικότητα της ουσίας και το χρώμα της κηλίδας στην TLC που έχει γίνει σκούρο καφέ, καθώς η παρουσία του σακχάρου εμφανώς έχει αυξήσει την πολικότητα σε σχέση με την γενίνη της.



Αγαμενοσίδης Β –ΑΑΜ6

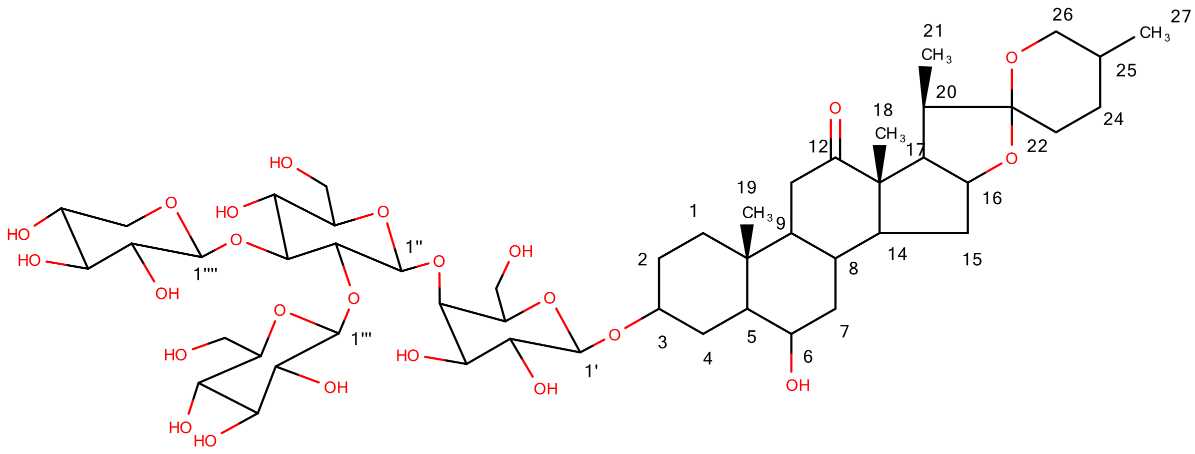
Η συγκεκριμένη σαπωνίνη ονομάζεται αγαμενοσίδης Β (Agamenoside B) (AAM 6), είναι χαρακτηριστική ένωση για το φυτό *Agave americana L* με αντιμυκητιασική δράση και ουσιαστικά αποτελεί σακχαριδικό παράγωγο της β-χλωρογενίνης. Επίσης έχει απομονωθεί από το *Allium porrum* L [74].

Ο μεταβολίτης Β ταυτοποιήθηκε ως μείγμα μιας στεροειδής σαπωνίνη γνωστή ως γιαγιοισαπωνίνη Α (yayoisaponin A) (AAM7), μια ένωση αντιπροσωπευτική για το *Allium ampeloprasum* αφού έχει απομονωθεί μόνο από αυτό και αυτή η σαπωνίνη χαρακτηρίζεται για την αντιμυκητιασική δράση της [38] και άλλης μιας παρόμοιας σαπωνίνης που διαφέρει με την γιαγιοσαπωνίνη στα σάκχαρα από τα οποία αποτελείται, αλλά η δομή της διερευνάται με φασματοσκοπικές τεχνικές



Γιαγιοισαπωνίνη Α- ΑΑΜ7

Όσον αφορά τον μεταβολίτη C, με φασματοσκοπικών τεχνικών ταυτοποιήθηκε ως ένας γλυκοσίδης της 12-κετοποριγενίνης (12-ketoporrigenin) (AAM8), η παρουσία των σακχάρων δικαιολογεί την αυξημένη πολικότητα της ουσίας οπότε και την εικόνα της TLC στην οποία το χρώμα της κηλίδας στην TLC έχει γίνει πιο σκούρο καφέ σε σχέση με την γενίνη της.



AAM8

Η ένωση αυτή είναι χαρακτηριστική για το είδος *A.porrum*, ενώ υπάρχουν αναφορές και για το *A. Porrum L. (A.ampeloprasum L. var. porrum).* Όσον αφορά την φαρμακολογική της δράση εμφανίζει κυτταροτοξικότητα σε δύο κυτταρικές σειρές (J-774(murine monocyte/macrophage) και WEHI-164 (murine fibrosarcoma))[96].

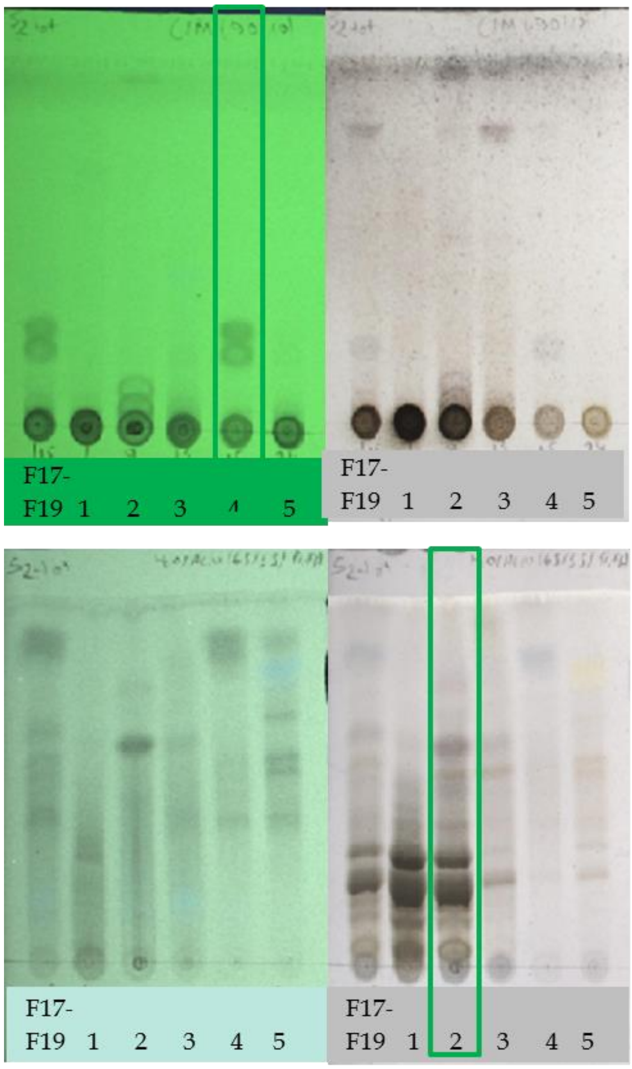
7.3.2.7 <u>Το κλάσμα AAM-F17-F19</u>

Τα κλάσματα AAM-F17-F19 (77,2mg) φάνηκαν ότι είναι πολύ πλούσιο σε μεταβολίτες και με στόχο τον καλύτερο διαχωρισμό τους και την μετέπειτα απομόνωση τους, υποβλήθηκε σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη. Συλλέχθηκαν 30 κλασμάτων και μετά από τον ποιοτικό έλεγχο με TLC προέκυψαν 5 συνενωμένα κλάσματα όπως φαίνεται παρακάτω.

Πίνακας 7-12 Κλάσματα και βάρης της Sephadex S5

Κλάσματα	**Βάρη [mg]**
S5_1	17.2
S5_2	16.1
S5_3	55.2
S5_4	13,3
S5_5	2.9

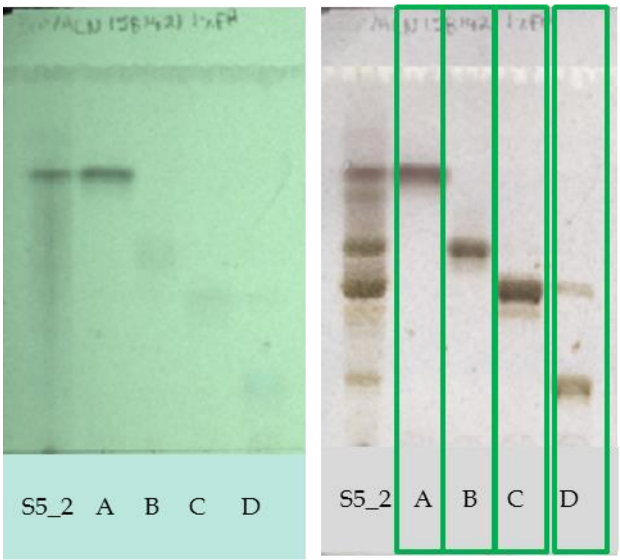
Σύστημα ανάπτυξης TLC:
a) CH2CL2/MeOH 90/10
b) H2O/ACN 65/35 1%FA



Εικόνα 7-31 TLC χρωματογράφημα από την Sephadex S5 του AAM_F17-F19

➢ <u>**Το κλάσμα AAM-F17/19_S5_ 2**</u>

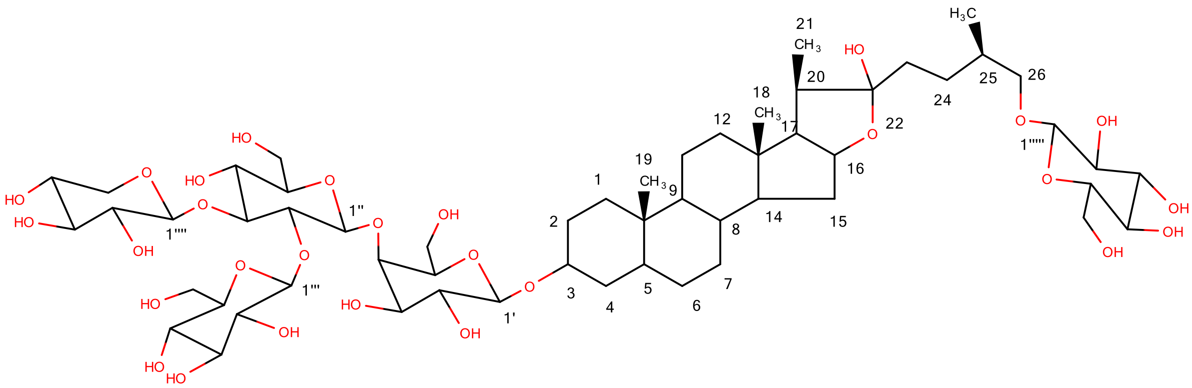
Τα 16,1 mg του κλάσματος S5_2 υποβλήθηκαν και αυτά σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, η prep_TLC αναπτύχθηκε στο TLC H2O/ACN (58/42) 1% FA, ενώ η εκχύλιση του οξειδίου του πυριτίου έγινε με MeOH- HPLC και παρελήφθησαν τέσσερεις ζώνες (A, B,C,D), όπως φαίνονται στην παρακάτω TLC .



Εικόνα 7-32 TLC χρωματογράφημα ενώσεων από preparative του AAM-F17/19_S5_ 2

Με την βοήθεια φασματοσκοπικών τεχνικών ταυτοποιήθηκαν οι εξής μεταβολίτες:

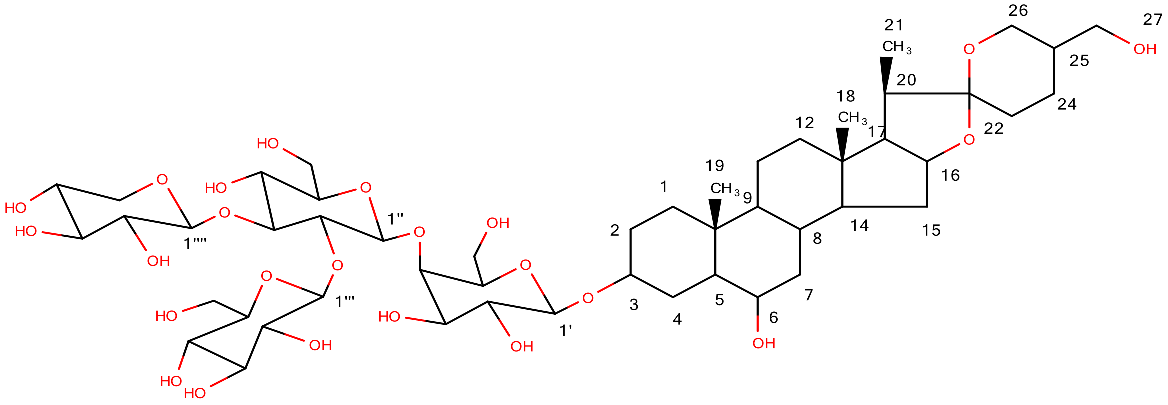
Ο μεταβολίτης Β (AAM9) είναι και αυτός μια σαπωνίνη.



AAM9

Για την οποία υπάρχουν αναφορές στο φυτό *Capsicum annuum L* και έχει το συμβατικό όνομα proto-degalactotigonin [97], επίσης έχει απομονωθεί από το *Anemarrhena asphodeloides Bge.* και ονομάζεται ως timosaponin Ii [98][99]. Όσον αφορά το γένους *Allium* έχει απομονωθεί από το *Allium sativum*, αλλά στο *A. ampeloprasum* απομονώνεται για πρώτη φορά.

Και ο μεταβολίτης C (AAM10) ταυτοποιήθηκε ως μια άλλη στεροειδής σαπωνίνη σπιροστανικού σκελετού.

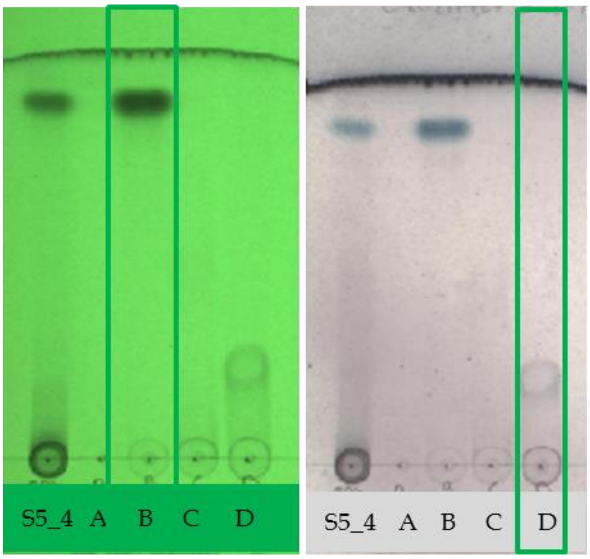


AAM10

Ενώ ο μεταβολίτης C με βάση τις βάσεις δεδομένων φυσικών προϊόντων φαίνεται να αποτελεί ένα νέο φυσικό προϊόν.

- **<u>Το κλάσμα AAM-F17/19_S5_4</u>**

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για το κλάσμα AAM-F17_S5_4 και παρελήφθησαν δύο δευτερογενείς μεταβολίτες. Συγκεκριμένα απομονώθηκαν οι μεταβολίτες A και D όπως φαίνονται στην παρακάτω TLC.

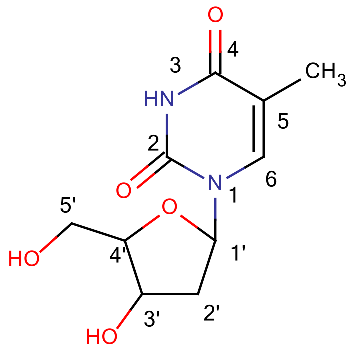


Εικόνα 7-33 TLC χρωματογράφημα ενώσεων από preparative του AAM-F17/19_S5_4

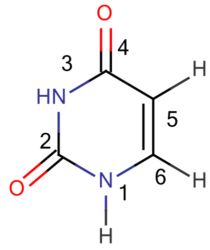
Πίνακας 7-13 Κλάσματα Sephadex S5 και τα βάρη τους.

Κλάσματα S5_4	**Βάρη [mg]**
A	0.2
B	1.5
C	2.8
D	0.2

Με την χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών ο μεταβολίτης AAM-F17/19_S5_4_B είναι ένα μίγμα δύο αζωτούχων βάσεων που ταυτοποιήθηκαν ως η θυμιδίνη και η ουρακίλη.



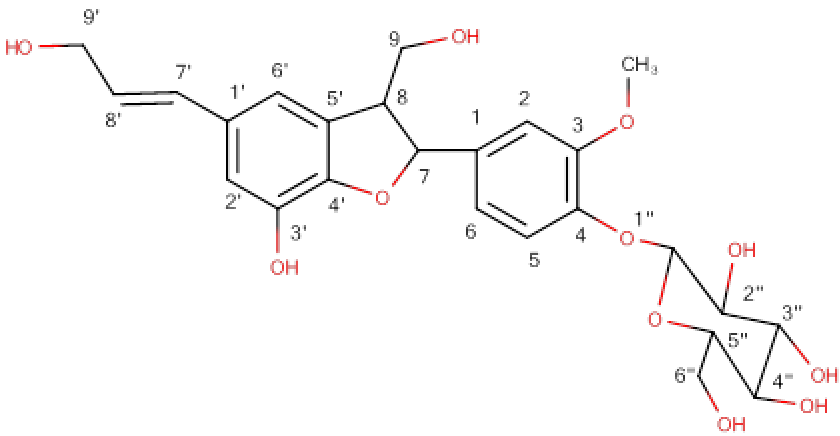
Θυμιδίνη - AAM11



Ουρακίλη - AAM12

Η Ουρακίλη (U) είναι μια αζωτούχος βάση που ανήκει στην κατηγορία των πυριμιδινών και συμμετέχει στην δημιουργία ριβονουκλεοτιδίων, ενώ η θυμιδίνη είναι ένα νουκλεοσίδιο που προέρχεται από την σύνδεση της θυμίνης με δεοξυριβόζη. Οι ουσίες αυτές είναι κοινές στο φυτικό βασίλειο.

Ο μεταβολίτης AAM-F17/19_S5_4_D (AAM13) πρόκειται για ένα γλυκοσιδικό παράγωγο διυδροβενζουφαριανίου το (3S,4R,5R,6)-2-{4-[7-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-5-[(1E)-3-hydroxyprop-1-en-1-yl]-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl]-2-methoxyphenoxy}-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol.



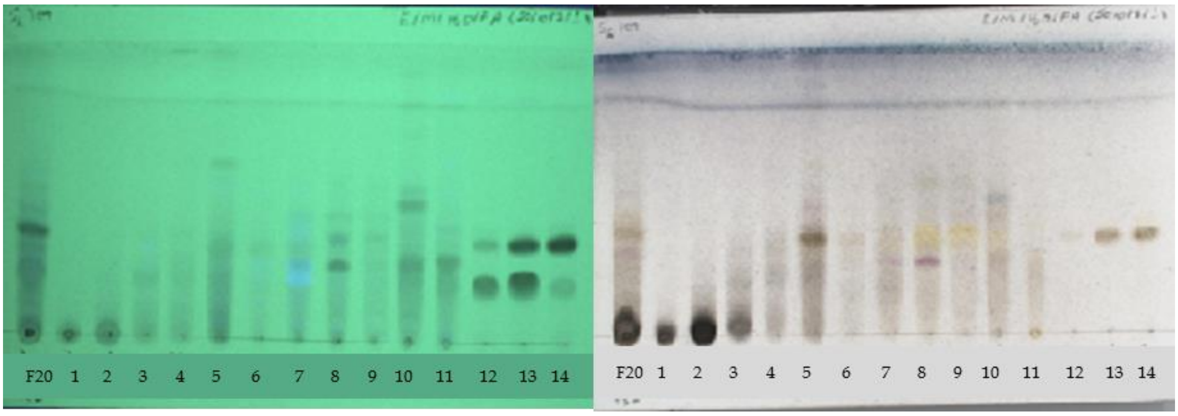
Νεολιγνάνιο –AAM13

Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας παρουσιάζουν μεγάλο φαρμακολογικό ενδιαφέρον καθώς έχει αναφερθεί η αντιοξειδωτική και η αντιφλεγμονώδης δράση τους [100]. Επίσης παρουσιάζονται ως οστεοπροστατευτικοί παράγοντες, μέσω επαγωγής της ενεργότητας των οστεοβλαστικών κυττάρων [101].

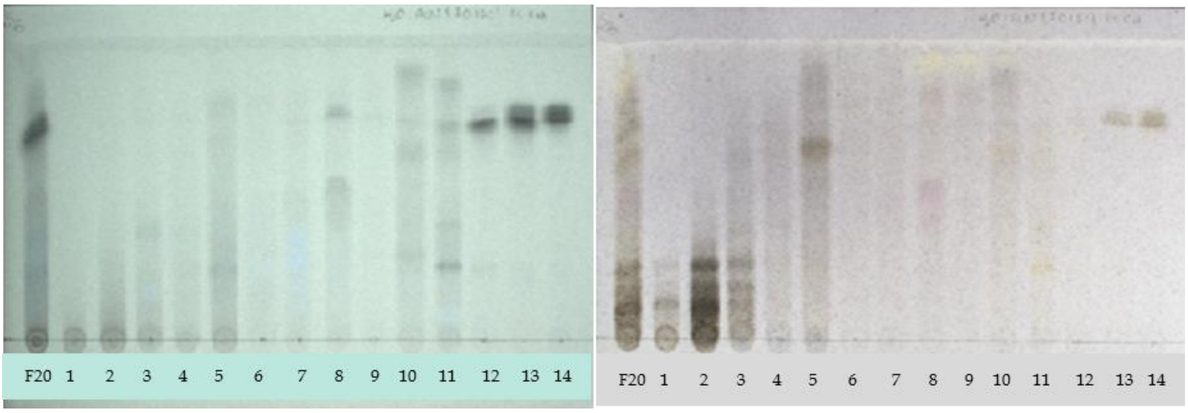
Μετά από την αναζήτησή στις βάσεις δεδομένων των φυσικών προϊόντων συμπεραίνεται ότι το AAM13 αποτελεί ένα νέο φυσικό προϊόν.

7.3.2.8 <u>Το κλάσμα AAM-F20</u>

Το τελικό κλάσμα του CPC AAM-F20 (76,2mg) φάνηκε να έχει ένα πολύ πλούσιο φυτοχημικό προφίλ και με στόχο την απομόνωση των κυριότερων μεταβολιτών του, υποβλήθηκε σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και διαλύτη έκλουσης τη μεθανόλη. Συλλέχθηκαν 74 κλασμάτων και μετά από τον ποιοτικό έλεγχο με TLC προέκυψαν 14 συνενωμένα κλάσματα όπως φαίνεται στις παρακάτω TLC και στον αντίστοιχο πίνακα.



Σύστημα ανάπτυξης των κανονικών TLC EtOAc/MeOH/H2O/FA (50/10/7/1)



Δεύτερο σύστημα ανάπτυξης των RP TLC H20/ACN (70/30) 1%F

Εικόνα 7-34 TLC χρωματογράφημα από την Sephadex S6

Πίνακας 7-14 Κλάσματα Sephadex S6 και τα βάρη τους.

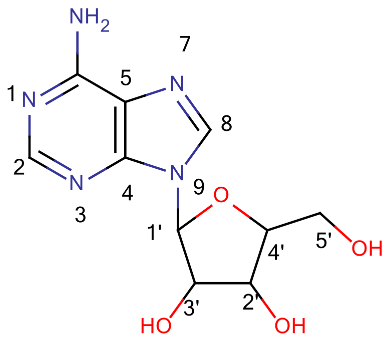
Κλάσματα	Βάρη [mg]
S6_1	3
S6_2	9.7
S6_3	4.8
S6_4	1
S6_5	5.6
S6_6	0.1
S6_7	1.6

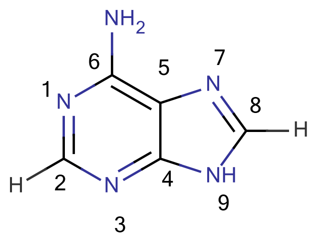
Πίνακας 7-15 Κλάσματα Sephadex S6 και τα βάρη τους.

Κλάσματα	Βάρη [mg]
S6_8	2.5
S6_9	8.4
S6_10	4
S6_11	3.5
S6_12	0.7
S6_13	0.2
S6_14	0.3

➢ **Κλάσμα AAM-F20_ S6_12**

Το κλάσμα AAM-F20_ S6_12 από τον χρωματογραφικό έλεγχο φαίνεται να είναι ένα μίγμα δύο μεταβολιτών, συγκεκριμένα σε μεγαλύτερο ποσοστό περιέχει ένα μεταβολίτη, ο οποίος και με την χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών ταυτοποιήθηκε η αδενοσίνη, ενώ σε μικρότερη αναλογία περιέχει μια άλλη αζωτούχα βάση την αδενίνη.





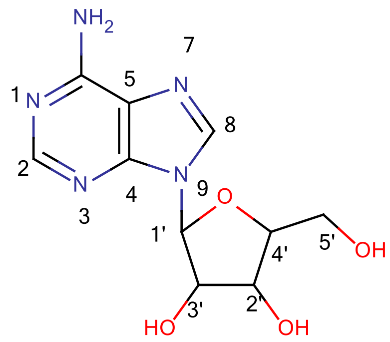
,

Αδενοσίνη - AAM14 Αδενίνη - AAM15

Η αδενοσίνη είναι ένα νουκλεοτίδιο που υπάρχει στη φύση και είναι γνωστό ως ένα αντιαρρυθμικό φάρμακο [102]. Όσον αφορά την αδενίνη είναι μια αζωτούχος βάση που ανήκει στην κατηγορία των πουρινών και συμμετέχει στην δημιουργία των νουκλεοτιδίων και άλλων σημαντικών μορίων του κυττάρου[103].

- **<u>Κλάσμα AAM-F20_ S6_14</u>**

Από το κλάσμα κλάσμα AAM-F20_S6_14 ταυτοποιήθηκε σε πιο καθαρή μορφή η αδενοσίνη (AAM 14).



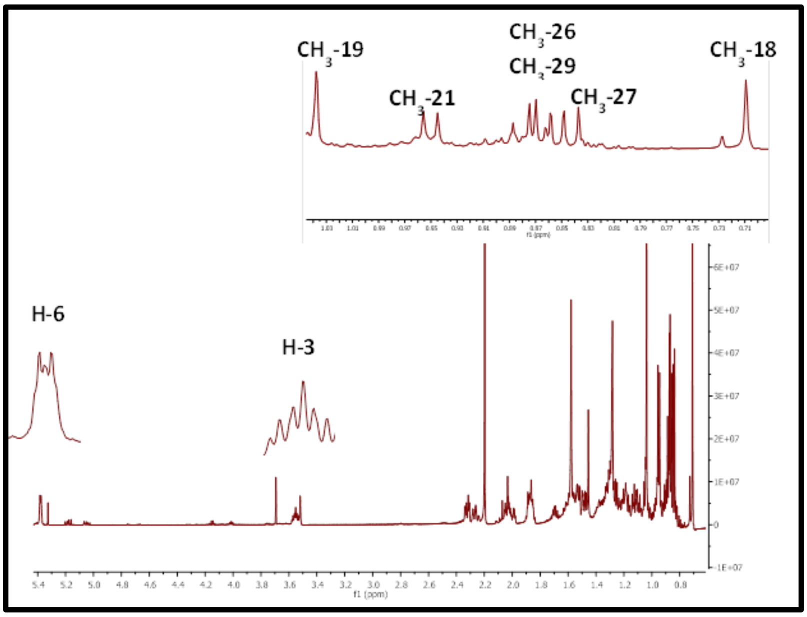
Αδενοσίνη - AAM14

8 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Στην ενότητα αυτή, η φασματοσκοπική μελέτη των μεταβολιτών δεν ακολουθεί τη σειρά με την οποία απομονώθηκαν οι μεταβολίτες αλλά είναι ομαδοποιημένοι όσο γίνεται ανά κατηγορία με σκοπό να είναι πιο κατανοητή η ανάλυση των φασματοσκοπικών τους χαρακτηριστικών

1. <u>Μεταβολίτης AAE_1</u>

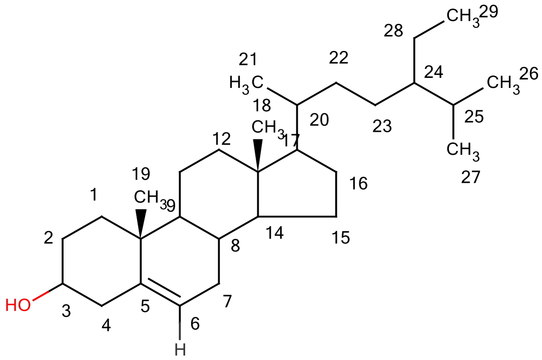
Στο χρωματογράφημα TLC ο συγκεκριμένος μεταβολίτης φαίνεται να μην απορροφά στα 254nm και 365nm και έπειτα από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλλίνης εμφανίζει μπλε χρώση. Στο φάσμα ^{1}H του κλάσματος (Εικόνα 8-1) διακρίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές οι οποίες σε πλήρη συμφωνία με τη βιβλιογραφία μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για τη β-σιτοστερόλη. Συγκεκριμένα, στα 3.52 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης H-3 που φέρει και OH ενώ η τριπλή κορυφή στα 5.35 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6 του διπλού δεσμού. Στην αλειφατική περιοχή του φάσματος εμφανίζονται οι υπόλοιπες κορυφές του μορίου, που αντιστοιχούν στις μεθυλομάδες του μορίου. Χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές των μεθυλίων της θέσης 18 και 19 που εμφανίζονται ως απλές κορυφές στα 0.68 και 1.0 ppm αντίστοιχα και ολοκληρώνουν για 3 πρωτόνια. Τα μεθύλια των θέσεων 26 και 27 εμφανίζονται ως διπλές κορυφές ενώ το μεθύλιο της θέσης 29 ως τριπλή κορυφη.



Εικόνα 8-1 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης AAE_1

Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων και ανθράκων του μορίου περιλαμβάνονται στον Πίνακας 8-1 και είναι σύμφωνες με τη βιβλιογραφία.

Πίνακας 8-1 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης (* αλληλεπικάλυψη σημάτων)

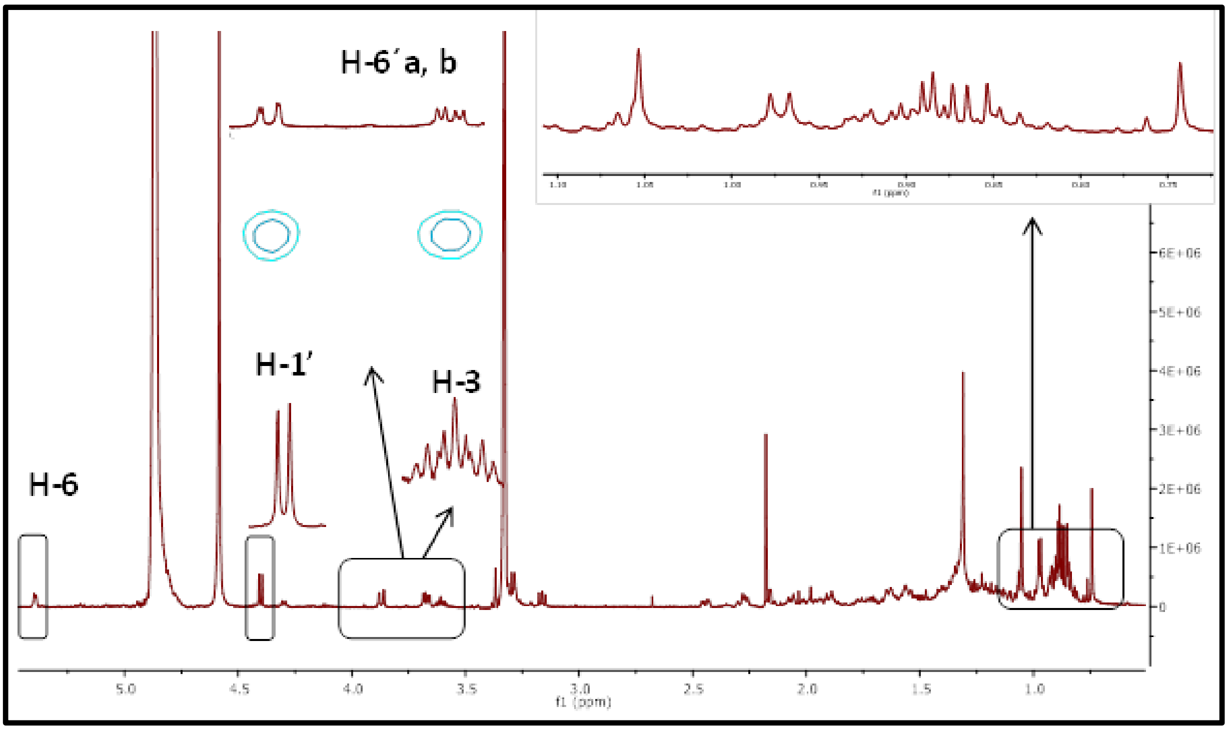


β-σιτοστερόλη

ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	1.84 (1H, *)/1.08 (1H, *)	37.4
2	1.84 (1H, *) / 1.5 (1H, *)	31.8
3	3,55 (1H, m)	72.0
4	2.34 (1H, m) / 2.31 (1H, *)	42.0
5	-	141.0
6	5,35 (1H, m)	122.7
7	1.51(1H, *) / 1.97 (1H, *)	32.0
8	1.98 (1H, m)	33.0
9	0.95 (1H, *)	51.5
10	-	37.9
11	1.49 (2H, *)	22.1
12	2.04 (1H, *) / 1.18 (1H, *)	40.9
13	-	41.9
14	1.01 (1H, *)	58.1
15	1.57 (1H, m)/ 1.07 (1H, m)	25.1
16	1.86 (1H, *m)/ 1.29 (1H, m)	29.2
17	1.14 (1H, m)	57.4
18	1.01 (3H, s)	12.2
19	0.68 (3H, s)	19.7
20	1.38 (1H, m)	37.3
21	0.92 (3H, d, 6.5)	19.2
22	1.38 (1H, *)/1.04 (1H, *)	35.0
23	1.16 (2H, m, *)	26.9
24	0.94 (1H, m)	47.2
25	1.68 (1H, m)	30.3
26	0.81(3H, d, 6.5)	19.6
27	0.84(3H, d, 6.5)	19.5
28	1.22 (3H, m)	22.5
29	0.85 (3H, t, 7.5)	12.2

2. Μεταβολίτης AAE_5

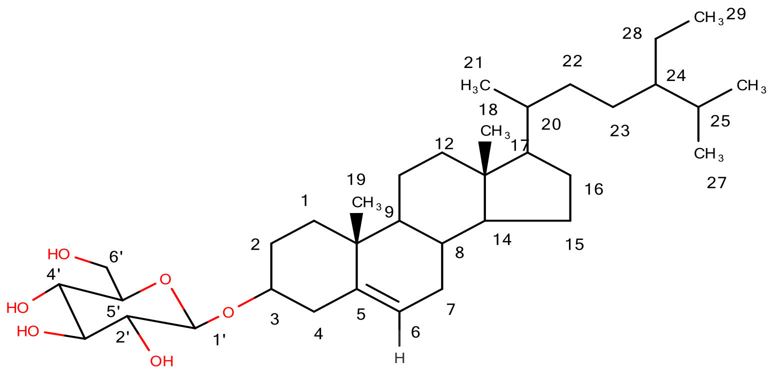
Ο εν λόγω μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως ο 3-*O*–γλυκοσίδη της σιτοστερόλης. Στο χρωματογράφημα TLC φαίνεται να έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με τον παραπάνω αλλά εμφανίζεται εμφανώς πιο πολικός. Πολλές ομοιότητες παρατηρούνται επίσης στο φάσμα ^{1}H τους κυρίως στην αλειφατική περιοχή όπου εντοπίζεται η ύπαρξη δύο απλών, τριών διπλών και μίας απλής κορυφής που αντιστοιχούν στα μεθύλια του μορίου. Αξίζει να σημειωθεί πως στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος του μεταβολίτη AAE_5 στα 4.38 ppm παρατηρήθηκε μια διπλή κορυφή που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο με J = 7.9 Hz που



Εικόνα 8-2 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης AAE_5

παραπέμπει σε ανωμερικό πρωτόνιο γλυκόζης. Λαμβάνοντας υπ′ όψιν και την ύπαρξη δυο διπλών κορυφών στα 3.85 και 3.67 ppm που αντιστοιχούν σε μεθυλένιο όπως διαπιστώθηκε από το φάσμα HSQC-DEPT (H-6′a,b γλυκόζης), καταλήξαμε πως πρόκειται για το γλυκοζυλιωμένο παράγωγο της σιτοστερόλης. Η θέση σύνδεσης του σακχάρου προσδιορίστηκε από το φάσμα HMBC και καθορίστηκε στη θέση 3 γεγονός που δικαιολογεί και τη μικρή αποθωράκιση που παρουσιάζει το πρωτόνιο της θέσης 3 στα 3.61 ppm και άνθρακα στα 79.8 ppm. Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των ανθράκων που περιλαμβάνονται στον Πίνακας 8-2 προέκυψαν έπειτα από τη μελέτη των φασμάτων HSQC και HMBC και σύγκρισή τους με αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Πίνακας 8-2 Φασματοσκοπικά δεδομένα 1H-NMR και 13C-NMR της ένωσης AAE_5 (* αλληλεπικάλυψη σημάτων)



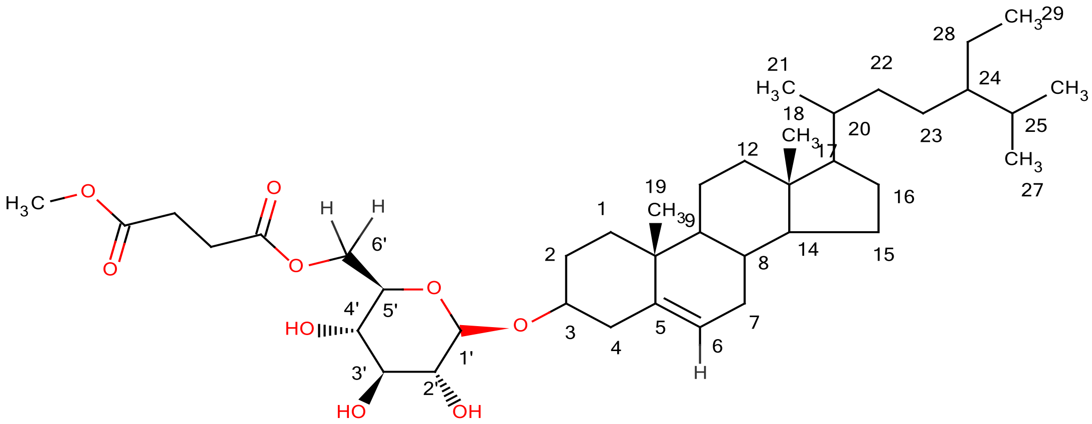
3- *O* -γλυκοσίδης της σιτοστερόλης

ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	1.99 (1H, m)/1.08 (1H, m)	38.4
2	1.92 (1H, m)/1.61 (1H, m)	30.5
3	3,61 (1H, m)	79.8
4	2.42 (1H, d, 12)/2.26 (1H, d, 12)	39.6
5	-	141.9
6	5,38 (1H, m)	122.7
7	1.51(1H, *)/ 1.97 (1H, *)	32.0
8	1.98 (1H, m)	32.9
9	0.95 (1H, m)	51.5
10	-	37.9
11	1.53 (2H, m)	22.1
12	2.04 (1H, m)/1.18 (1H, m)	40.9
13	-	41.9
14	1.01 (1H, m)	58.1
15	1.62 (1H, m) /1.10 (1H, m)	25.1
16	1.86 (1H, m)/ 1.29 (1H, m)	29.2
17	1.14 (1H, m)	57.4
18	0.72 (3H, s)	12.2
19	1.03 (3H, s)	19.7
20	1.38 (1H, m)	37.3
21	0.95 (3H, d, 6.5)	19.2
22	1.38 (1H, m)/ 1.04 (1H, m)	34.9
23	1.21 (2H, m)	26.9
24	0.94 (1H, m)	47.2
25	1.68 (1H, m)	30.3
26	0.85 (3H, d, 6.5)	19.6
27	0.85 (3H, d, 6.5)	19.5
28	1.22 (2H, m)	22.5
29	0.86 (3H, t, 7.5)	12.2
1′	4.38 (1H, d, 7.9)	102.3
2′	3.14 (1H, t, 7.9)	75.1
3′	3.35 (1H, t, 7.9)	78.0
4′	3.28 (1H, d, 7.9)	71.5
5′	3.26 (1H, m)	76.3
6′a, b	3.85 (1H, d, 12)/3.67 (1H, dd, 12/5)	62.6

3. <u>Μεταβολίτης AAE_2</u>

Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης παρουσίασε παρόμοια εικόνα στην TLC με του προαναφερόμενους μεταβολίτες αλλά εμφανίζεται πιο πολικός από τη σιτοστερόλη αλλά πιο άπολος από το γλυκοζυλιωμένο πράγωγό της. Μελετώντας όμως το φάσμα πρωτονίου διακρίνουμε βασικές ομοιότητες με αυτό του 3- *O* – γλυκοσίδη της σιτοστερόλης κυρίως στην αλειφατική περιοχή, στην ύπαρξη των πρωτονίων H-3 και H-5 αλλά και του ανωμερικού πρωτονίου, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο βασικός σκελετός του μορίου είναι ο ίδιος. Βασική διαφορά εντοπίζεται στα πρωτόνια H-6’a,b της γλυκόζης που εμφανίζονται εμφανώς αποθωρακισμένα στα 4.5 και 4.3 ppm αντίστοιχα και η ύπαρξη μιας απλής κορφής στα ppm που ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια χαρακτηριστική κορυφή μεθοξυλομάδας.

Πίνακας 8-3 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAE_2 (*:αλληλεπικάλυψη σημάτων)



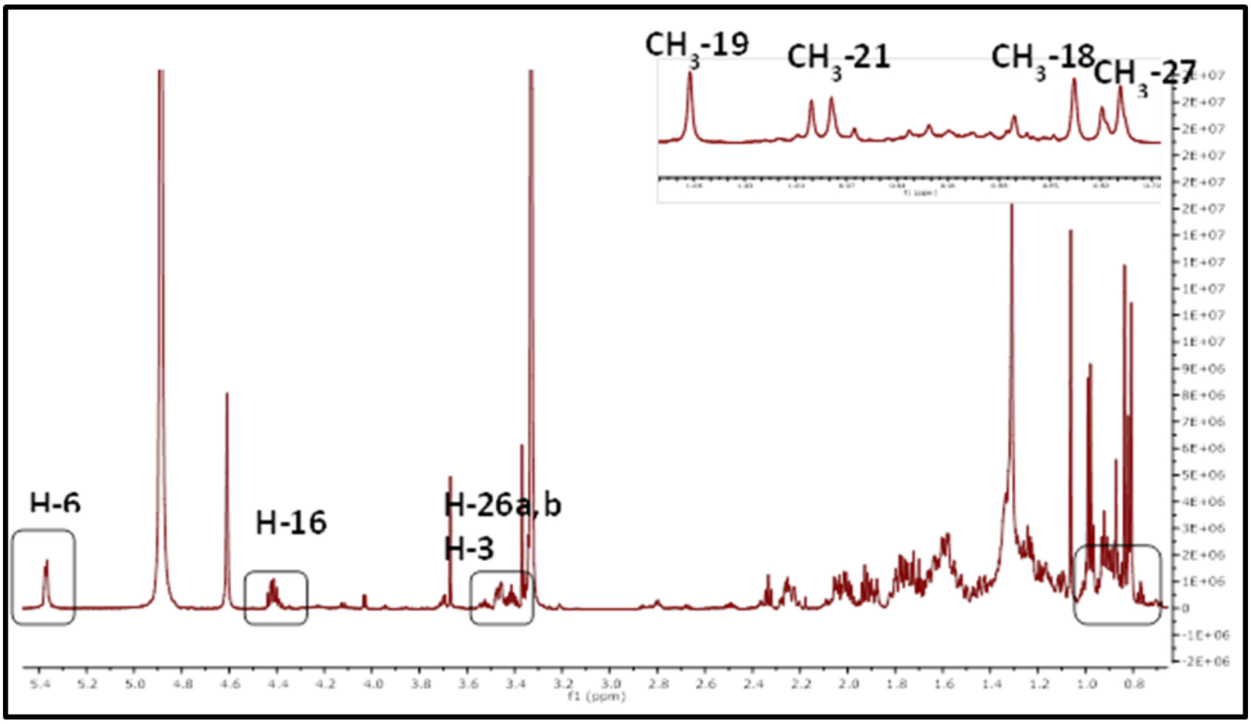
Εστεροποιημένο παράγωγο της του 3- O – γλυκοσίδη της σιτοστερόλης

ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	1.99 (1H, m) 1.08 (1H, m)	38.4
2	1.92 (1H, m) 1.61 (1H, m)	30.5
3	3.45(1H, m)	79.8
4	2.42 (1H, d,12) 2.26 (1H, d, 12)	39.6
5	-	140.5
6	5.35 (1H,m*)	122.8
7	1.55/1.9 (1H, m)	32.7
8	1.96 (1H, m)	32.8
9	0.90 (1H, m *)	50.7
10	-	37.9
11	1.53 (2H, m)	22.1
12	2.04 (1H, m) 1.18 (1H, m)	40.9
13	-	41.9
14	0.96 (1H, m)	57.2
15	1.62 (1H, m) 1.10 (1H, m)	25.1
16	1.86 (1H, m) 1.29 (1H, m)	29.2

17	1.08 (1H, m)	56.5
18	0.68 (3H, s)	12.3
19	1.01 (3H, s)	19.9
20	1.34 (1H, m)	36.6
21	0.92 (3H, d, 6)	19.0
22	1.38 (1H, m) 1.04 (1H, m)	34.9
23	1.21 (2H, m)	26.9
24	0.90 (1H, m)	46.3
25	*1.66* (1H, m)	30.1
26	0.81 (3H, d, 7)	19.9
27	0.85(3H, *)	19.5
28	1.24 (3H, *)	23.0
29	0.82 (3H, *)	12.1
1′	4.38 (1H, d, 7.9)	101.5
2′	3.34 (1H, *)	74.2
3′	3.36 (1H, *)	70.6
4′	3.56 (1H, *)	76.3
5′	3.45 (1H, m)	74.7
6′	4.5 (1H, dd, 12.2/4.8) 4.3 (1H, dd, 12.2/2)	62.6
7′	-	
8′	-	
9′	2.36 (1H, (1H, t, 7)	39.5
10′	2.30 (1H, (1H, t, 7)	39.1
11′	-	
12′	-	-
13′	3.66 (3H, s)	51.5

4. Μεταβολίτης ΑΑΕ_3

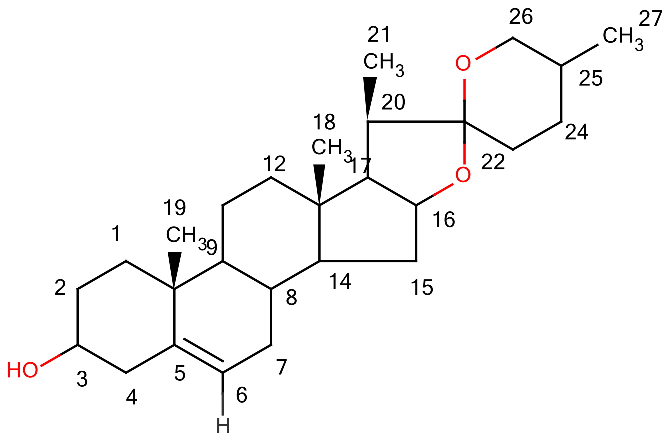
Με βάση το χρωματογράφημα TLC η συγκεκριμένη ουσία δεν απορροφά στα 254 και 365 nm αλλά έπειτα από ψεκασμό και θέρμανση με το διάλυμα θειικής βανιλλίνης εμφανίζει σκούρα γκρι χρώση. Έπειτα από μελέτη των φασμάτων δυο διαστάσεων και σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα, καταλήξαμε ότι πρόκειται για τη στεροειδική σαπωγενίνη σπιροστανικού σκελετού, διοσγενίνη. Στο φάσμα 1Η στην αλειφατική περιοχή παρατηρούμε χαρακτηριστικά, δυο διπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για τρια πρωτόνια στα 0.78 και 0.96 ppm που αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 27, 21 και δυο απλές κορυφές με την ίδια ολοκλήρωση στα 0.82 και 1.04 ppm που αντιστοιχούν στα μεθύλια 18 και 19 αντιστοίχως. Η πολλαπλή κορυφή στα 5.35 με άνθρακα στα 122.2 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο Η-6 του διπλού δεσμού ενώ η πολλαπλή κορυφή που συντονίζεται στα 3.4 ppm με οξυγονωμένο άνθρακα στα 72 ppm που ολοκληρώνει επίσης για ένα πρωτόνιο αντιστοιχεί στη θέση 3.



Εικόνα 8-3 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης ΑΑΕ_3

Χαρακτηριστική είναι η σύζευξη της μεθυλομάδας 27, που παρατηρείται στο φάσμα HMBC, με τον άνθρακα στα 67.7 ppm των μεθυλενίων της θέσης 26 που εμφανίζονται σαν δυο ξεχωριστές πολλαπλές κορυφές στα 3.47 και 3.33 ppm. Τέλος, χαρακτηριστική είναι η πολλαπλή κορυφή του πρωτονίου της θέσης 14 στα 1.15 με άνθρακα στα 57.6 ppm και η κορυφή του μεθυλενίου της θέσης 2 στα 1.6 και 1.4 ppm σαν δυο πολλαπλές κορυφές με μεθυλενικό άνθρακα στα 30 και η κορυφή του μεθινικού πρωτονίου της θέσης 16 που συντονίζεται στα 4.40 ppm με τη μορφή πολλαπλής κορυφής και άνθρακα στα 82 ppm. Οι χημικές μετατοπίσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακας 8-4 αποδώθηκαν με τη βοήθεια φασμάτων δυο διαστάσεων HMBC και HSQC και σύγκριση με τη βιβλιογραφία.

Πίνακας 8-4 Φασματοσκοπικά δεδομένα [1]H-NMR και [13]C-NMR της ένωσης AAE_3 (* αλληλεπικάλυψη των σημάτων)

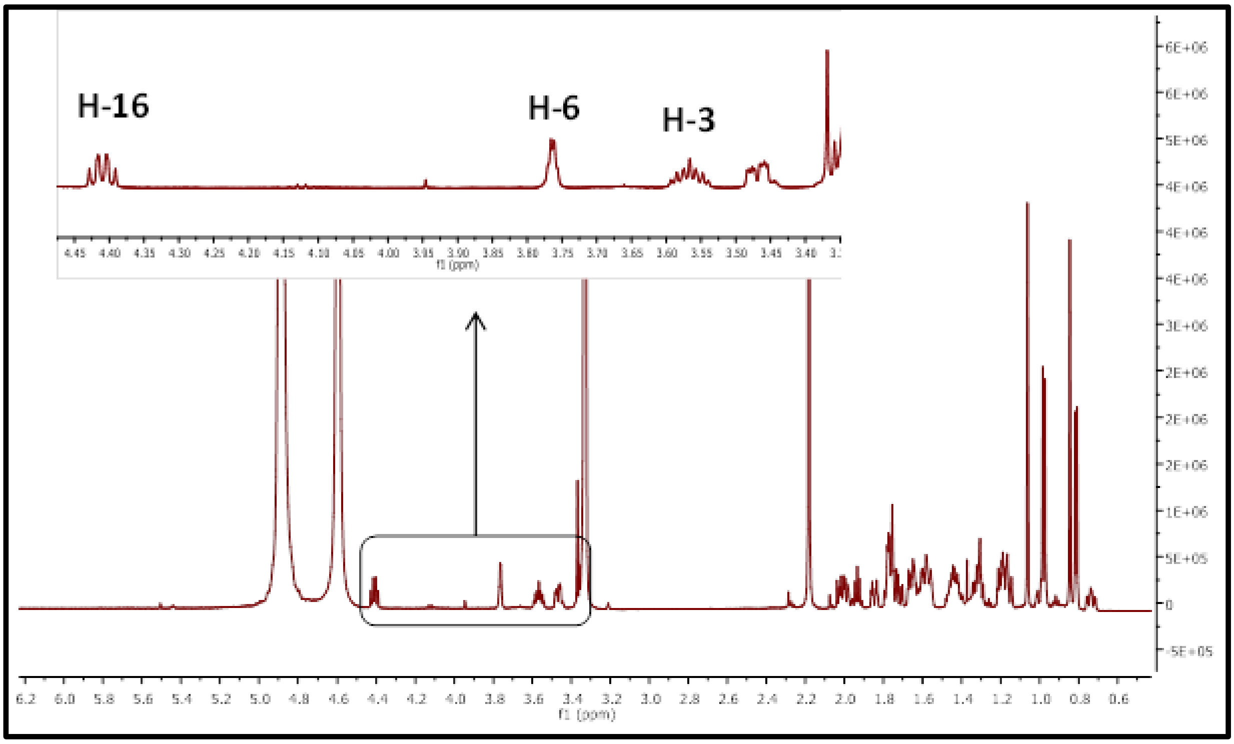


Διοσγενίνη

ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	1.86 (1H, m)/1.07 (1H,m)	38.4
2	1.62 (2H, m)	30.0
3	3.4 (1H, m)	72.0
4	2.23 (2H, m)	43.0
5	-	142.1
6	5.35 (1H, brd, 5.0)	122.2
7	1.56(1H, m)/2.0(1H,m)	32.4
8	1.66 (1H, m)	32.7
9	0.97 (1H, m)	51.5
10	-	38.0
11	1.55 (2H, m)	22.0
12	1.76 (1H, m)/1.18(1H, m)	40.8
13	-	42.0
14	1.15 (1H, m)	57.7
15	1.99 (1H, m)/1.27 (1H, m)	32.7
16	4.40 (1H, m)	82.2
17	1.74 (1H, m)	63.7
18	0.82 (3H, s)	17.0
19	1.04 (3H, s)	19.8
20	1.90 (1H, m)	42.8
21	0.96 (3H, d, 6.6)	14.8
22	-	110.8
23	1.5 (1H, m)/1.6 (1H, m)	32.2
24	1.62 (1H, m)/1.42 (1H, m)	29.8
25	1.60 (1H, m)	31.4
26	3.45 (1H, m)/3.39 (1H,m)	67.7
27	0.78 (3H, d, 6.6)	17.1

5. <u>Μεταβολίτης ΑΑΕ_6</u>

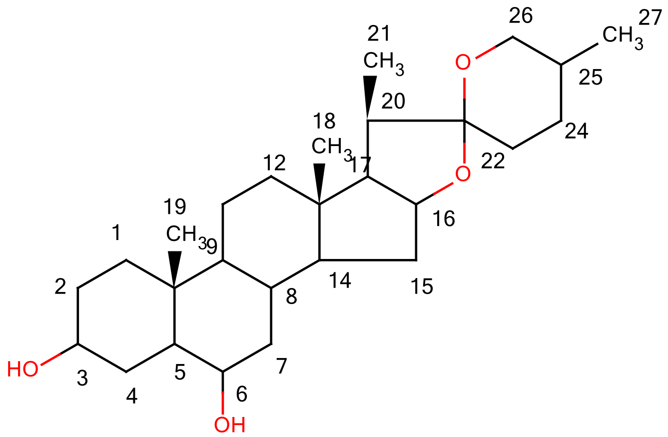
Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως β-χλωρογενίνη. Στο χρωματογράφημα TLC παρουσιάζει παρόμοια εικόνα με την διοσγενίνη αλλά είναι πιο πολική. Όπως είναι αναμενόμενο λόγω της δομικής αναλογίας που παρουσιάζουν, η εικόνα των φασμάτων είναι σχεδόν όμοια εκτός από μια βασική διαφορά την απουσία πρωτονίου στα 5.4 ppm. Αντίθετα, συναντάμε μια πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο στα 3.74 ppm με άνθρακα στα 72.3 ppm δηλαδή στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος. Το πρωτόνιο αυτό αντιστοιχεί στη θέση 6 η οποία έχει πλέον χάσει το διπλό δεσμό και έχει υποκατασταθεί με ένα υδροξύλιο.



Εικόνα 8-4 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης AAE_6

Στον Πίνακας 8-5 παρουσιάζονται τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη που προέκυψαν έπειτα από μελέτη φασμάτων δυο διαστάσεων και βιβλιογραφική σύγκριση.

Πίνακας 8-5 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAE_6

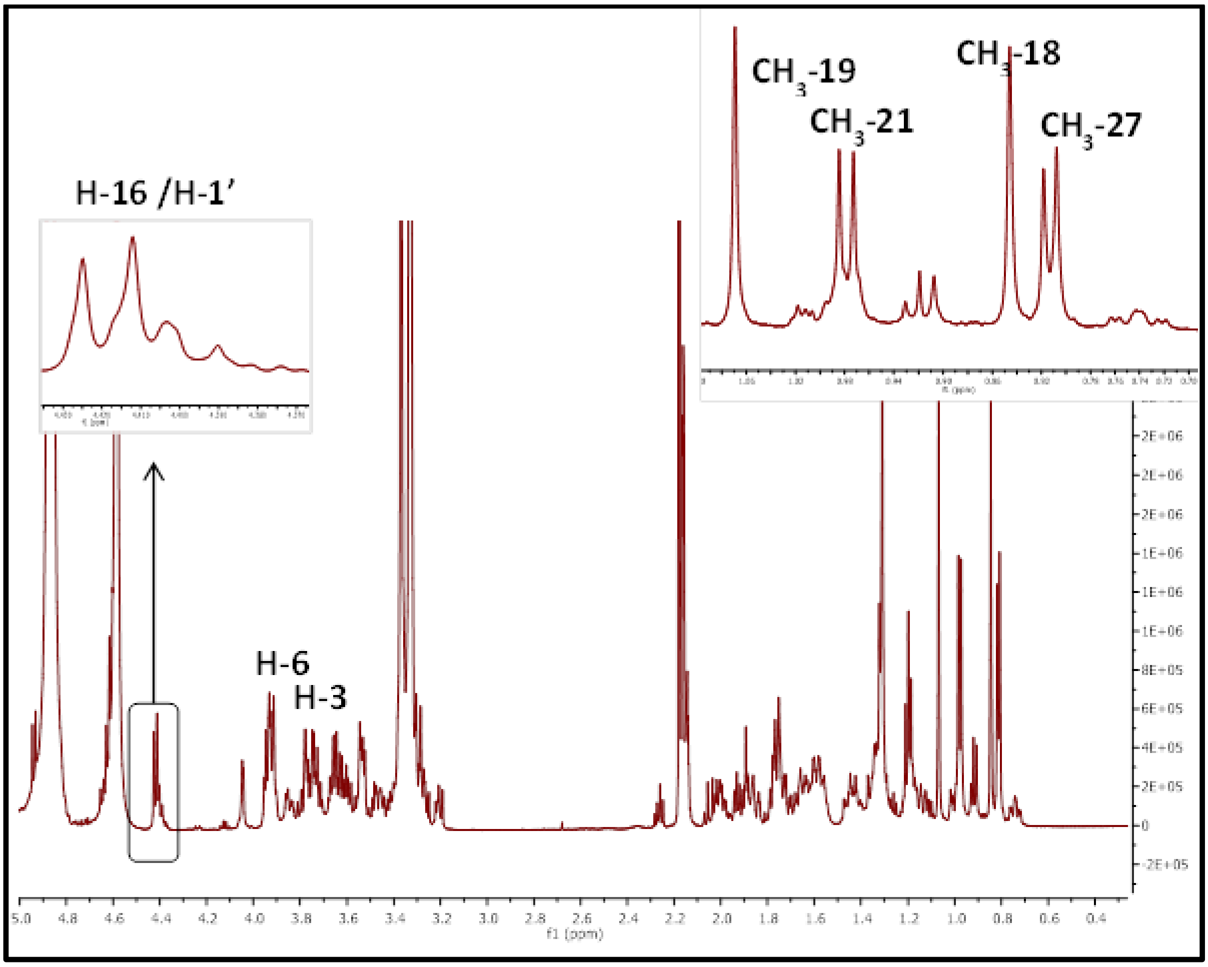


β- χλωρογενίνη

ΘΕΣΗ	**1H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)**	**13 C NMR δ σε ppm**
1	1.65 (1H, m)/0.98 (1H, m)	39.6
2	1.64 (1H, m)/1.43 (1H, m)	30.0
3	3.55 (1H, m)	72.3
4	1.75 (2H, m)	32.2
5	1.13 (1H, m)	48.9
6	3.74 (1H, brd, 2.7)	72.4
7	1.84 (1H, m)/1.2 (1H, m)	40.0
8	1.99 (1H, m)	32.7
9	0.73 (1H, m)	55.7
10	-	38.0
11	1.55 (1H, m)/1.4 (1H, m)	21.0
12	1.76 (1H, m)/1.18 (1H, m)	40.8
13	-	41.2
14	1.15 (1H, m)	57.7
15	1.99 (1H, m)/1.27 (1H, m)	32.7
16	4.4 (1H, m)	82.2
17	1.74 (1H, m)	63.7
18	0.83 (3H, s)	17.0
19	1.04 (3H, s)	16.0
20	1.93 (1H, t, 6.7)	42.8
21	0.96 (3H, d, 6.6)	14.8
22	-	110.0
23	1.7 (1H, m)/1.6 (1H, m)	32.2
24		
25	1.60 (1H, m)	31.4
26	3.46 (1H, m)/3.44 (1H, m)	67.7
27	0.81 (3H, d, 6.5)	17.1

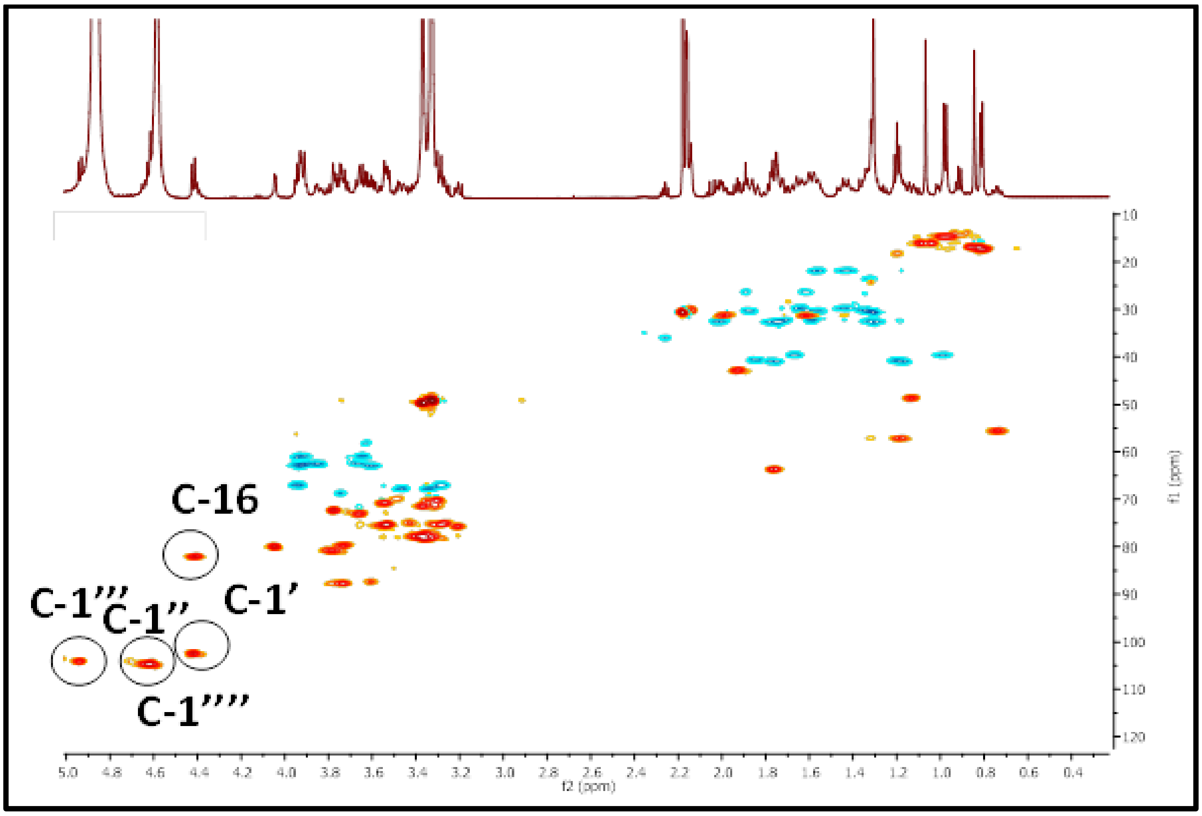
6. Μεταβολίτης AAM_6

Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως αγαμενοσίδης Β. Πρόκειται για μια σαπωνίνη σπιροστανικού σκελετού όπου η γενίνη της είναι ο προαναφερόμενος μεταβολίτης, η β-χλωρογενίνη. Ομοίως και σε αυτήν την περίπτωση, δεν σημειώθηκε καμία απορρόφηση στα 254 και 365 nm ενώ έπειτα από ψεκασμό με θεϊκή βανιλλίνη εμφάνισε σκούρα γκρι χρώση ενώ σε σχέση με την β-χλωρογενίνη εμφανίζεται σημαντικά πολικότερος, γεγονός που δικαιολογείται από την παρουσία των σακχαριδικών ομάδων.

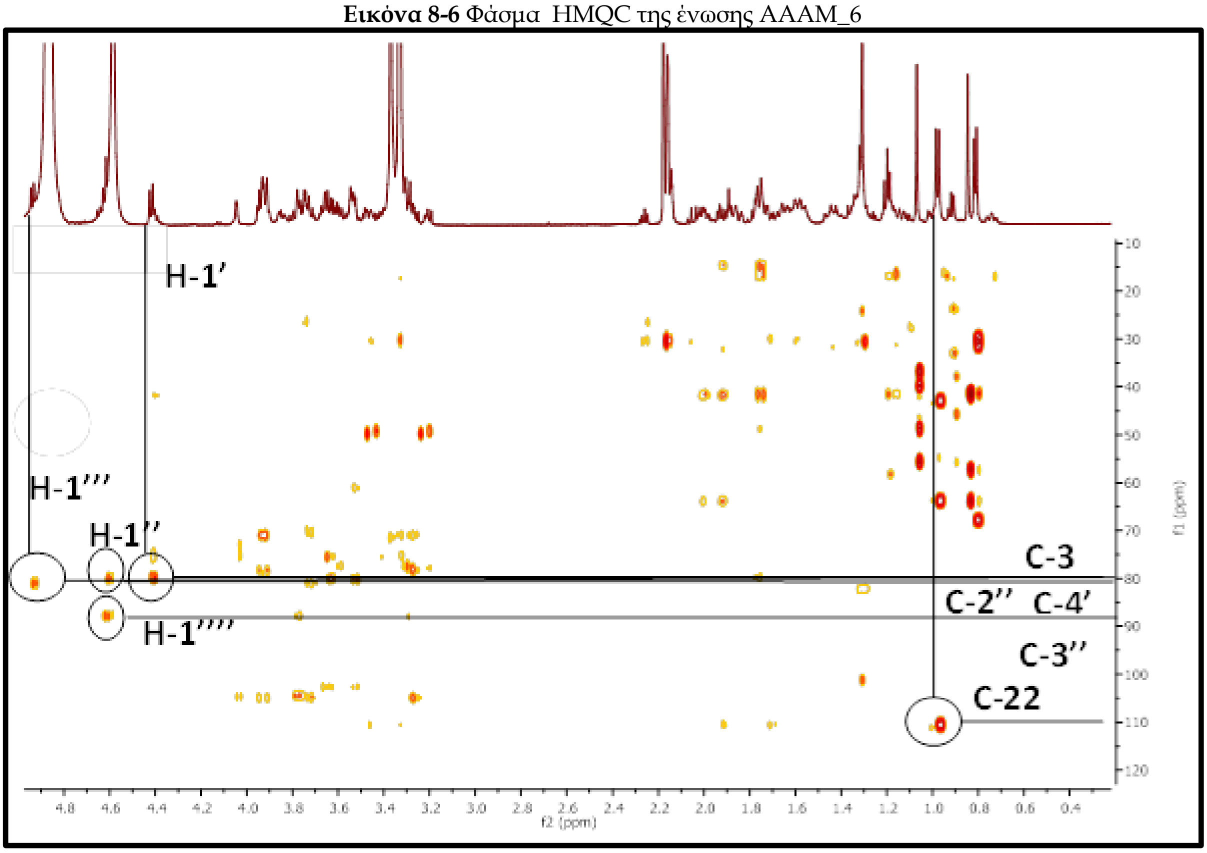


Εικόνα 8-5 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης AAM_6

Από το φάσμα πρωτονίου σε πρώτη φάση μπορούμε να διακρίνουμε ευκρινώς την ύπαρξη των μεθυλομάδων 19, 21, 18 και 27 στα 1.07, 0.98, 0.85 και 0.81 ppm αντίστοιχα. Με τη βοήθεια του φάσματος HMBC παρατηρούμε τη σύζευξη της μεθυλομάδας 21 με άνθρακα στα 110.7 ppm που αντιστοιχεί στον άνθρακα 22 και υποδηλώνει την ύπαρξη του κλειστού δακτυλίου. Λαμβάνοντας υπ’ όψιν και τη χαρακτηριστική κορυφή του H-16 στα 4.40 ppm με άνθρακα στα 82 ppm καθώς επίσης και του H-6 στα 3.78 ppm με οξυγονωμένο άνθρακα 72.5 ppm, οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα πως η γενίνη πιθανώς είναι η β-χλωρογενίνη που περιγράφεται ανωτέρω γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τις λοιπές χημικές μετατοπίσεις. Αποθωρακισμένο παρουσιάζεται το πρωτόνιο της θέσης 3 σε δ 3.76 με άνθρακα 80 ppm καθιστώντας το πιθανή θέση σύνδεσης των σακχάρων. Πράγματι στο φάσμα HMBC σημειώνεται σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου της γαλακτόζης με τον άνθρακα της θέσης 3, επιβεβαιώνοντας την *O*-γλυκοζυλίωση από την τιμή του ανωμερικού άνθρακα της γαλακτόζης στα 104.7 ppm.



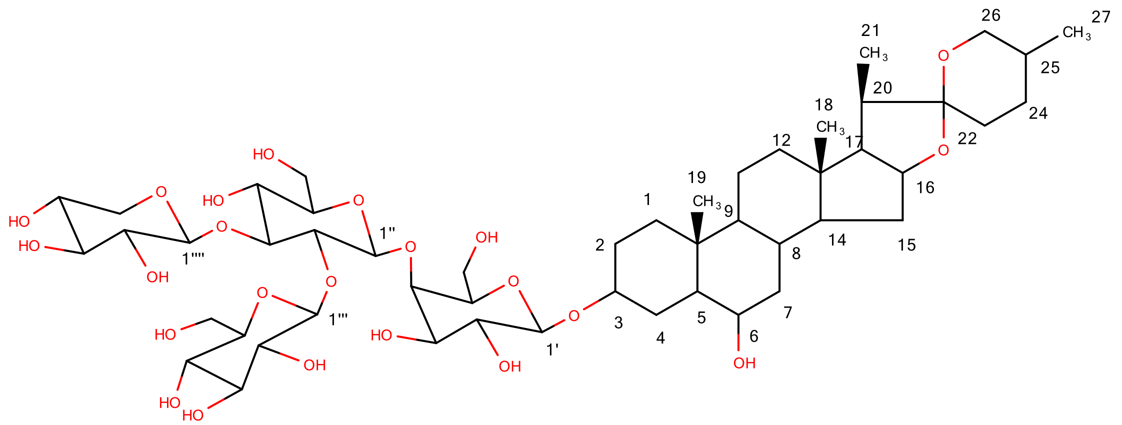
Εικόνα 8-6 Φάσμα HMQC της ένωσης AAAM_6



Εικόνα 8-7 Φάσμα HMBC της ένωσης AAM_6

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως από την παρατήρηση του φάσματος ^{1}H και HSQC-DEPT σημειώνεται η ύπαρξη τριών ανωμερικών πρωτονίων ενώ πιο προσεκτική παρατήρηση μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως στα 4.61 ppm εντοπίζονται δυο ανωμερικά πρωτόνια με κοινό άνθρακα. Στα 4.04 ppm συντονίζεται το χαρακτηριστικό πρωτόνιο Η-4 της γαλακτόσης με άνθρακα στα 80.2 εμφανώς αποθωρακισμένο καθώς αποτελεί θέση σύνδεσης του δεύτερου σακχάρου της γλυκόζης 1 στη σαπωνίνη. Στο φάσμα HMBC επιβεβαιώθηκε η σύζευξη του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης 1 με τον άνθρακα 4 της γαλακτόσης. Με όμοιο τρόπο εντοπίστηκε και η θέση σύνδεσης της γλυκόζης 2 στη θέση 2 της γλυκόζης 1, καθώς και της ξυλόζης στη θέση 3 της γλυκόζης 1 επίσης. Ο μεθυλενικός άνθρακας της ξυλόζης εμφανίζεται σε υψηλότερα ppm από τα αντίστοιχα της γλυκόζης με χαρακτηριστική μετατόπιση τα 67.4 ppm. Παρακάτω παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και ανθράκων του μεταβολίτη έπειτα από μελέτη των φασμάτων COSY, HSQC και HMBC και σύγκριση με τη βιβλιογραφία.

Πίνακας 8-6 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAM_6



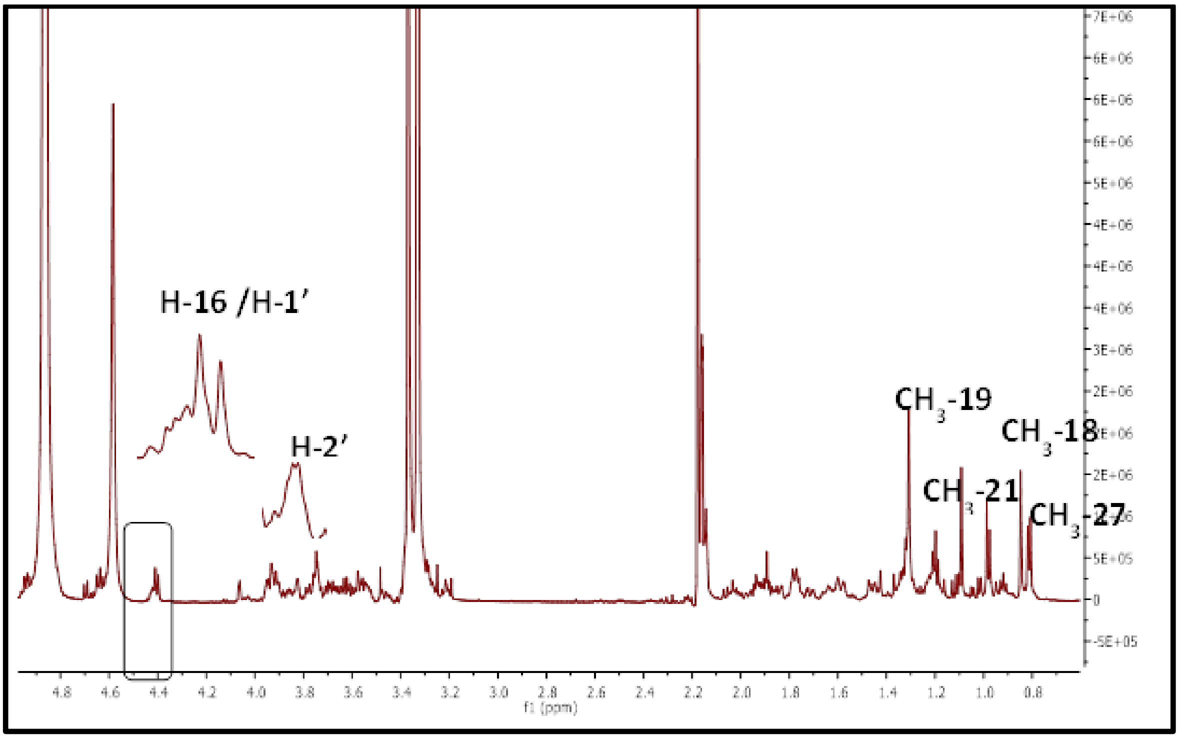
Αγαμενοσίδης Β

ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	1.67 (1H, m), 0.99 (1H,m)	39.6
2	1,64/1.43 (2H, m)	30.5
3	3.73 (1H, m)	80.0
4	1.74 (2H, m)	32.7
5	1.13 (1H ,m)	48.6
6	3.78 (1H, brd, 2.7)	72.5
7	1.84/1.2	40.0
8	1.99 (1H, m)	31.0
9	0.74 (1H, m)	55.4
10	-	36.5
11	1.55/1.4 (2H, m)	21.2
12	1.76 (1H, m) / 1.18(1H, m)	41.0
13	-	41.3
14	1.18 (1H, m)	57.1
15	2.0 (1H, m), 1.72 (1H, m)	32.3
16	4.4 (1H, m)	82.0
17	1.76 (1H, m)	63.7

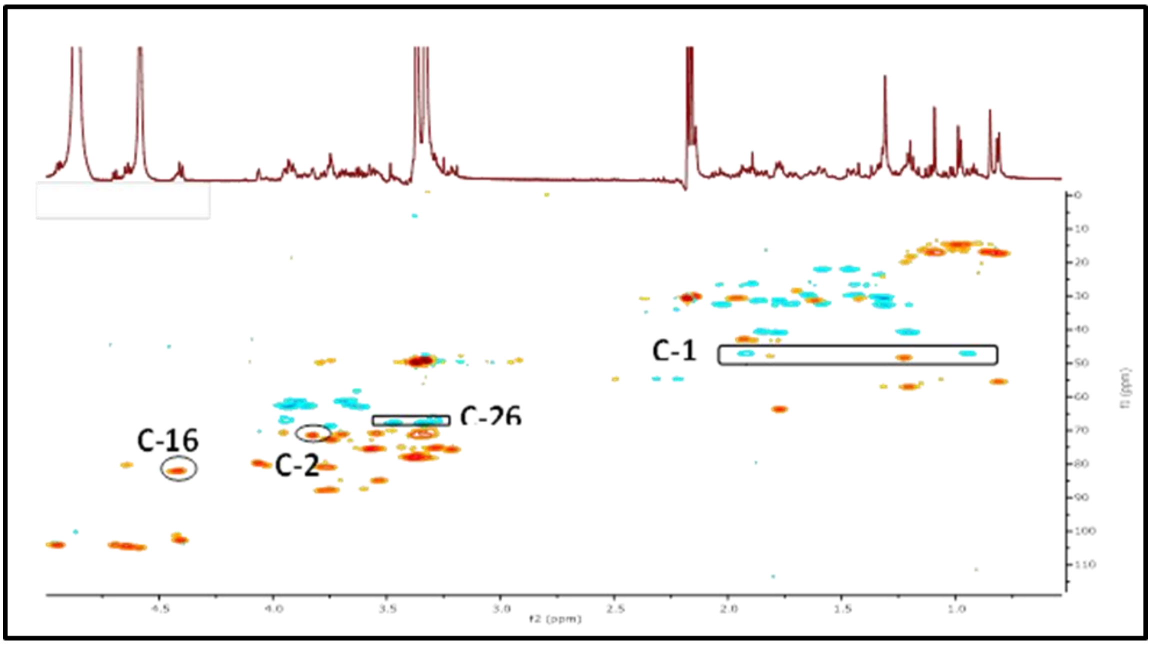
18	0.85 (3H, s)	16.8
19	1.07 (3H, s)	16.0
20	1.93 (1H, t, 6.7)	42.6
21	0.98 (3H, d, 6.6)	14.5
22	-	110.7
23	1.7/1.3 (2H, m)	32.2
24	1.64 (1H, m), 1.34 (1H, m)	30.0
25	1.61 (1H, m)	31.9
26	3.46 (1H, m), 3.34 (1H,m)	67.9
27	0.81 (3H, d, 6.5)	17.2
	3-Galactose-1	
1′	4.41 (1H, d, 7.7)	102.7
2′	3.65 (1H, *)	73.4
3′	3.53 (1H, *)	75.8
4′	4.04 (1H, *)	80.0
5′	3.53 (1H, *)	75.8
6′a, b	3.92 (1H, d, 12) 3.64 (1H, dd, 12/5)	61.4
	4′-Glucose-1	
1′′	4.61 (1H, d, 8.0)	105.1
2′′	3.77(1H, *)	81.2
3′′	3.72(1H, *)	88.4
4′′	3.30(1H, *)	70.8
5′′	3.26(1H, *)	75.6
6′′a, b	3.92(1H, d, 12 3.60(1H, dd, 12/5)	63.2
	2′′-Glucose-2	
1′′′	4.94(1H, d, 8.8)	104.6
2′′′	3.20(1H, *)	76.2
3′′′	3.36(1H, *)	78.2
4′′′′	3.36(1H, *)	71.6
5′′′	3.36(1H, *)	78.2
6′′′a, b	3.84(1H, d, 12) 3.61(1H, dd, 12/5)	63.0
	3′′-Xylose	
1′′′′	4.61 (1H, d, 8.0)	105.1
2′′′′	3.25(1H, *)	75.2
3′′′′	3.30(1H, *)	78.1
4′′′′′	3.53(1H, *)	71.4
5′′′′a, b	3.28(1H, d, 12) 3.93(1H, dd, 12/5)	67.4

7. AAM_7

Στη συγκεκριμένη περίπτωση ταυτοποιήθηκε μίγμα μεταβολιτών που παρουσιάζουν ακριβώς την ίδια πολικότητα και δεν παρουσιάζουν καμια απορρόφηση στα 254 και 365 nm. Ο πρώτος μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως ο γιαγιοσαπωνίνη Α και έχει την ίδια χρωματογραφική εικόνα με τον μεταβολίτη AAM_7. Εμφανίζεται ελαφρώς πολικότερη γεγονός που δικαιολογείται από την παρουσία μιας παραπάνω γλυκόζης και την ύπαρξη υδροξυλομάδας στη θέση 2 της γενίνης.

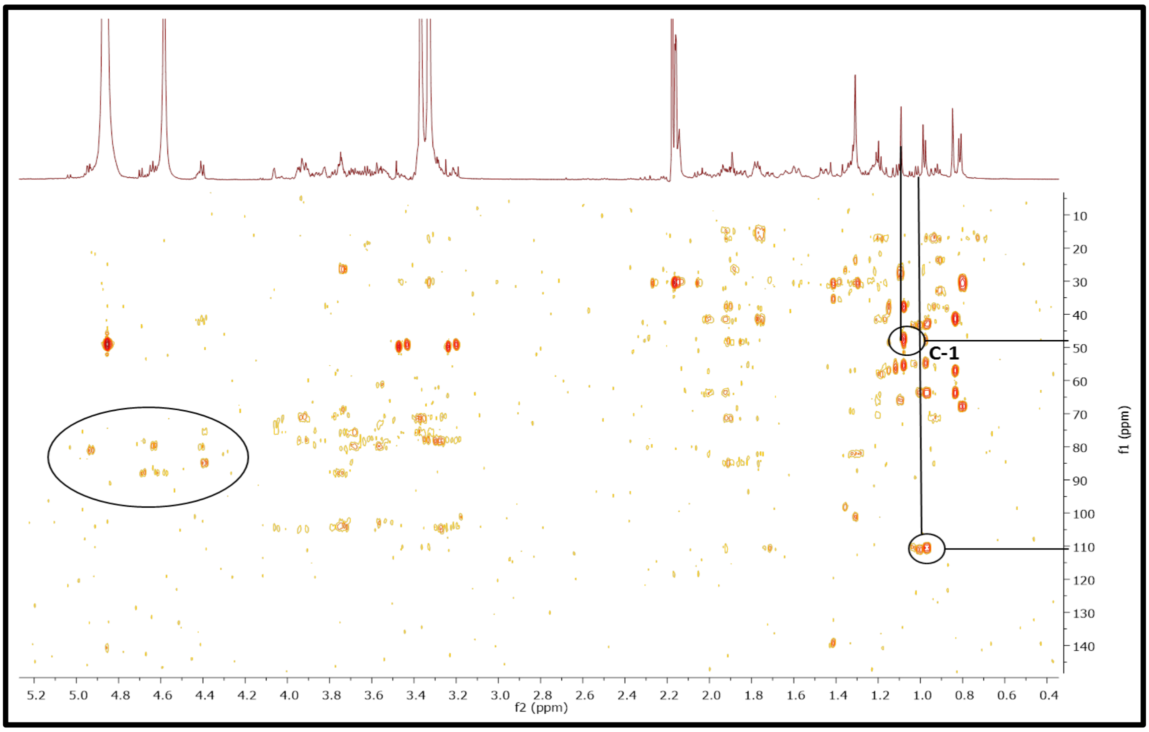


Εικόνα 8-8 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης AAM_7



Εικόνα 8-9 Φάσμα HMQC της ένωσης AAM_7

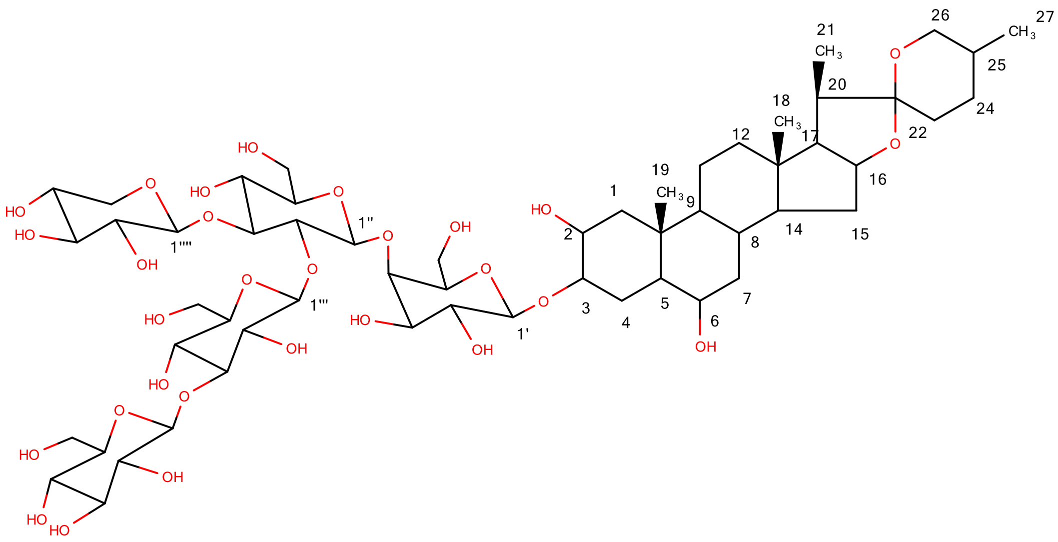
Πιο συγκεκριμένα και στην περίπτωση αυτή εντοπίστηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές των μεθυλίων 18, 19, 21 και 27, ο μεθυλενικός άνθρακας 26 με μετατόπιση στα 67.9 ppm καθώς και η σύζευξη του μεθυλίου 21 με τον άνθρακα 22 στα 110.7 ppm υποδηλώνοντας την ύπαρξη του σπιροστανικού σκελετού. Εντοπίστηκε επίσης η κορυφή του πρωτονίου 16 στα 4.40 ppm με άνθρακα 82 ppm καθώς και η κορυφή του πρωτονίου 6 στα 3.86 ppm ελαφρώς αποθωρακισμένη με οξυγονωμένο άνθρακα 71.4 ppm επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη υδροξυλομάδας στη θέση αυτή.



Εικόνα 8-10 Φάσμα HMBC της ένωσης AAM_7

Μελετώντας το φάσμα HMBC παρατηρήσαμε πως το μεθύλιο της θέσης 19 παρουσιάζει σύζευξη με έναν άνθρακα στα 37.5 που αντιστοιχεί στη θέση 10, έναν άνθρακα στα 47.8 που αντιστοιχεί στη θέση 5 και έναν μεθυλενικό άνθρακα στα 47 που αντιστοιχεί στη θέση 1. Η χαρακτηριστική αποθωράκιση του άνθρακα 1 οφείλεται στην παρουσία υδροξυλομάδας στη θέση 2. Σημειώνεται πως το πρωτόνιο της θέσης 2 συντονίζεται στα 3.82 ppm με άνθρακα 71.5 ppm. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρατηρούμε την ύπαρξη πέντε ανωμερικών πρωτονίων με ανωμερικούς άνθρακες κοντά στα 100 ppm και μια κορυφή στα 4.04 ppm χαρακτηριστική του πρωτονίου 4 γαλακτόσης. Πιο συγκεκριμένα το ανωμερικό πρωτόνιο στα 4.40 αντιστοιχεί σε γαλακτόση που συνδέεται στη θέση 3 της γενίνης καθώς παρατηρείται σύζευξη με τον άνθρακα 3. Τα μεθυλένια της θέσης 6 a,b συντονίζονται σε δ 3.9 και 3.7 ενώ το πρωτόνιο της θέσης 4 της γαλακτόσης εμφανίζει άνθρακα στα 80 ppm καθώς στη θέση αυτή φαίνεται να συνδέεται η γλυκόση 1 με ανωμερικό πρωτόνιο στα 4.64 ppm. Στα 88 εμφανίζεται ο άνθρακας 2 της γλυκόζης 1, στον οποίο συνδέεται η γλυκόζη 2 με ανωμερικό πρωτόνιο στα 4.7 ppm.

Πίνακας 8-7 Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ένωσης AAM_7



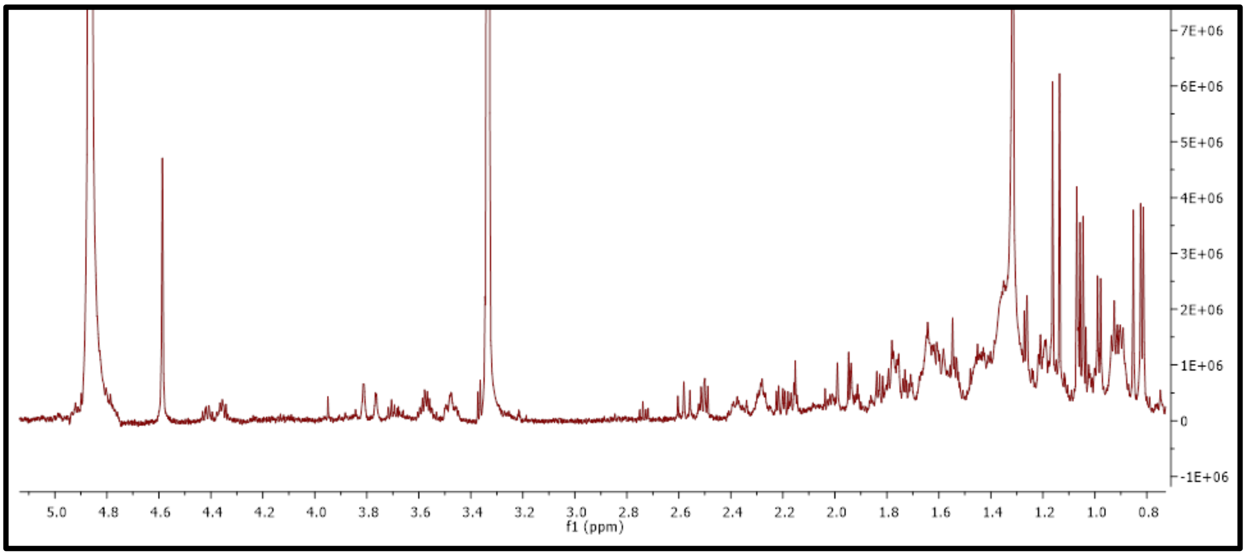
Γιαγιοσαπωνίνη A

ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	1.92 (1H, m)/0.94 (1H,m)	47.0
2	3.82 (2H, m)	71.5
3	3.53 (1H, m)	84.0
4	1.85 (1H, m)/1.77 (1H, m)	31.6
5	1.21 (1H, m)	47.8
6	3.78 (1H, brd, 2.7)	72.5
7	1.84 (1H, m)/1.2 (1H, m)	40.0
8	1.99 (1H, m)	31.0
9	0.74 (1H, m)	55.4
10	-	36.5
11	1.55 (1H, m)/1.4 (1H, m)	21.2
12	1.76 (1H, m)/ 1.18(1H, m)	41.0
13	-	41.3
14	1.18 (1H, m)	57.1
15	2.0 (1H, m)/1.3 (1H, m)	32.3
16	4.4 (1H, m)	82.0
17	1.76 (1H, m)	63.7
18	0,85 (3H, s)	16.8
19	1,07 (3H, s)	16.0
20	1.93 (1H, t, 6.7)	42.6
21	0.98 (3H, d, 6.6)	14.5
22	-	110.7
23	1.7 (1H, m)/1.3 (1H, m)	32.2
24	1.64 (1H, m)/1.44 (1H, m)	30.0
25	1.61 (1H, m)	31.9
26	3.46 (1H, m), 3.44(1H,m)	67.9
27	0.81 (3H, d, 6.5)	17.2
	3-Galactose-1	
1′	4.41 (1H, d, 7.7)	102.7
2′	3.65 (1H, *)	73.4

3′	3.53 (1H, *)	75.8
4′	4.04 (1H, *)	80.0
5′	3.53 (1H, *)	75.8
6′a, b	3.92 (1H, d, 12) 3.64 (1H, dd, 12/5)	61.4
	4′-Glucose-1	
1′′	4.64 (1H, d, 8.0)	105.1
2′′	3.77 (1H, *)	81.2
3′′	3.72 (1H, *)	88.4
4′′	3.30 (1H, *)	70.8
5′′	3.26 (1H, *)	75.6
6′′a, b	3.92 (1H, d, 12) 3.60 (1H, dd, 12/5)	63.2
	2′′-Glucose-2	
1′′′	4.94(1H, d, 8.8)	104.6
2′′′	3.41 (1H, *)	76.2
3′′′	3.56 (1H, *)	87.7
4′′′′	3.36 (1H, *)	71.6
5′′′	3.36(1H, *)	78.2
6′′′a, b	3.84 (1H, d, 12) 3.61 (1H, dd, 12/5)	63.0
	3′′-Xylose	
1′′′′	4.61 (1H, d, 8.0)	105.1
2′′′′	3.25 (1H, *)	75.2
3′′′′	3.30 (1H, *)	78.1
4′′′′′	3.53 (1H, *)	71.4
5′′′′	3.28 (1H, d, 12) 3.93(1H, dd, 12/5)	67.4
	3′′′-Glucose-3	
1′′′′	4.58(1H, d, 8.0)	104.9
2′′′′	3.26 (1H, *)	75.0
3′′′′	3.40 (1H, *)	78.0
4′′′′′	3.25 (1H, *)	71.5
5′′′′	3.40(1H, *)	78.0
6′′′′a, b	3.87 (1H, d, 12) 3.64 (1H, dd, 12/5)	63.0

8. Μεταβολίτης ΑΑΜ_2

Ο μεταβολίτης αυτός ταυτοποίηθηκε ως 12-κετοποριγενίνη και στο χρωματογράφημα TLC δεν παρουσίασε καμια απορρόφηση και έπειτα από ψεκασμό με θεϊκή βανιλλίνη έδω σε σκούρα μπλέ χρώση. Πρόκειται για μια γενίνη σπιροστανικού σκελετού με τη διαφορά ότι στη θέση 12 υπάρχει καρβονύλιο.

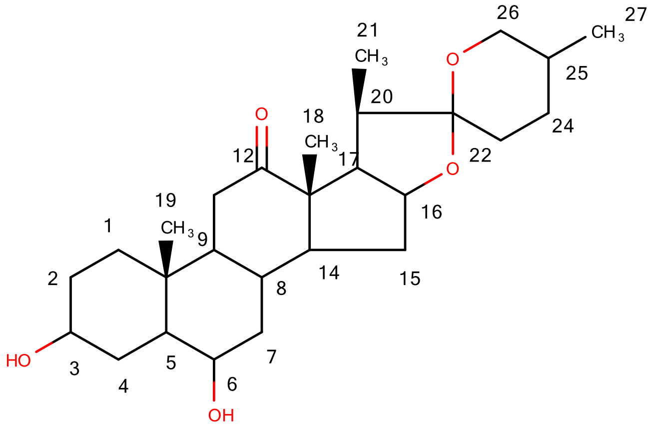


Εικόνα 8-11 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης ΑΑΜ_2

Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρούμε την ύπαρξη δυο απλών κορυφών που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια στα 1.13, 1.16 ppm και αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 18 και 19. Οι κορυφές αυτές εμφανίζονται αποθωρακισμένες λόγω ύπαρξης καρβονυλομάδας στη θέση 12. Στα 1.04 0.81 ppm παρατηρούμε δυο διπλές κορυφές με *J*=7.8Hz που ολοκληρώνουν επίσης για τρια πρωτόνια και αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 21 και 27 αντιστοίχως. Το πρωτόνιο της θέσης 3 συντονίζεται στα 3.5 ppm ενώ το H-6 στα 3.82 ppm με οξυγονωμένο άνθρακα στα 71.5 ppm. Το μεθύλιο της θέσης 18 παρουσιάζει σύζευξη με καρβονυλικό άνθρακα στα 216 ppm ο οποίος παρουσιάζει επίσης σύζευξη με τον μεθυλενικό άνθρακα 11 στα 38.5 ppm και όπως είναι αναμενόμενο εμφανίζεται εμφανώς αποθωρακισμένος.

Τέλος, η σύζευξη του μεθυλίου 21 με τον τεταρτοταγή άνθρακα 22 στα 11oppm περίπου καθώς και η ύπαρξη του H-16 σε δ 4.35 ppm αλλά και των μεθυλενίων 26 στα 3.47/3.33ppm επιβεβαιώνει την ύπαρξη του σπιροστανικού σκελετού. Οι χημικές μετατοπίσεις παρουσιάζονται στον Πίνακας 8-8.

Πίνακας 8-8 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAM_2

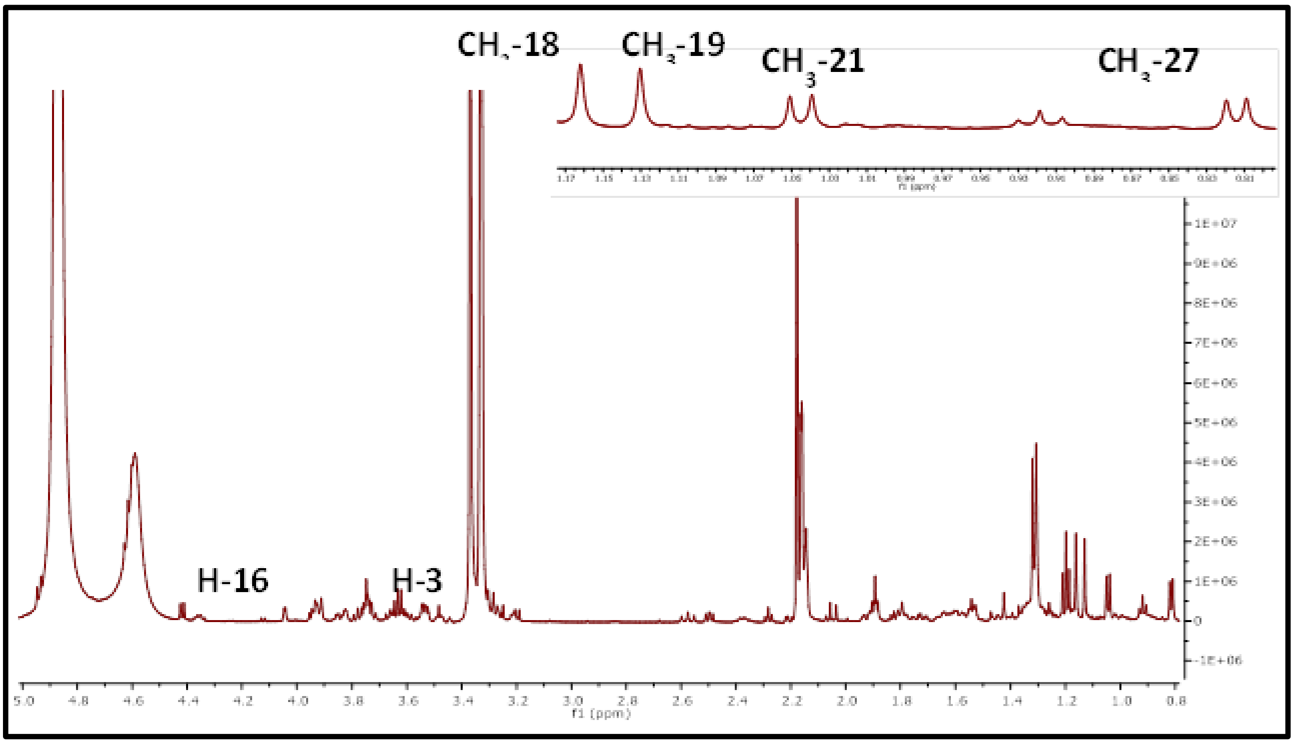


12-κετοποριγενίνη

ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	1.52 (1H, m)/1.02 (1H,m)	39.2
2	1.78/1.55	31.7
3	3.55 (1H, m)	72.1
4	1.78/ 1.74	32.2
5	1.17 (1H, m)	48.0
6	3.82	71.0
7	1.86/1.18	41.2
8	2.38 (1H, m)	31.0
9	1.20 (1H, m)	55.4
10	-	36.5
11	2.59/2.22 (1H, dd)	38.0
12	-	214.2
13	-	54.1
14	1.52	57.0
15	2.15 (1H, m)/ 1.54 (1H, m)	31.5
16	4.35 (1H, m)	80.5
17	2.49 (1H, dd)	53.7
18	1.13 (3H, s)	16.2
19	1.16 (3H, s)	15.0
20	1.8 (1H, t, 6.7)	43.2
21	1.04 (3H, d, 7.8)	13.0
22	-	109.2
23	1.71/1.61(2H, m)	32.0
24	1.64 (1H, m), 1.44 (1H, m)	29.8
25	1.54 (1H, m)	31.7
26	3.47 (1H, m), 3.33 (1H,m)	67.6
27	0.81 (3H, d, 7.8)	17.1

9. <u>Μεταβολίτης ΑΑΜ_8</u>

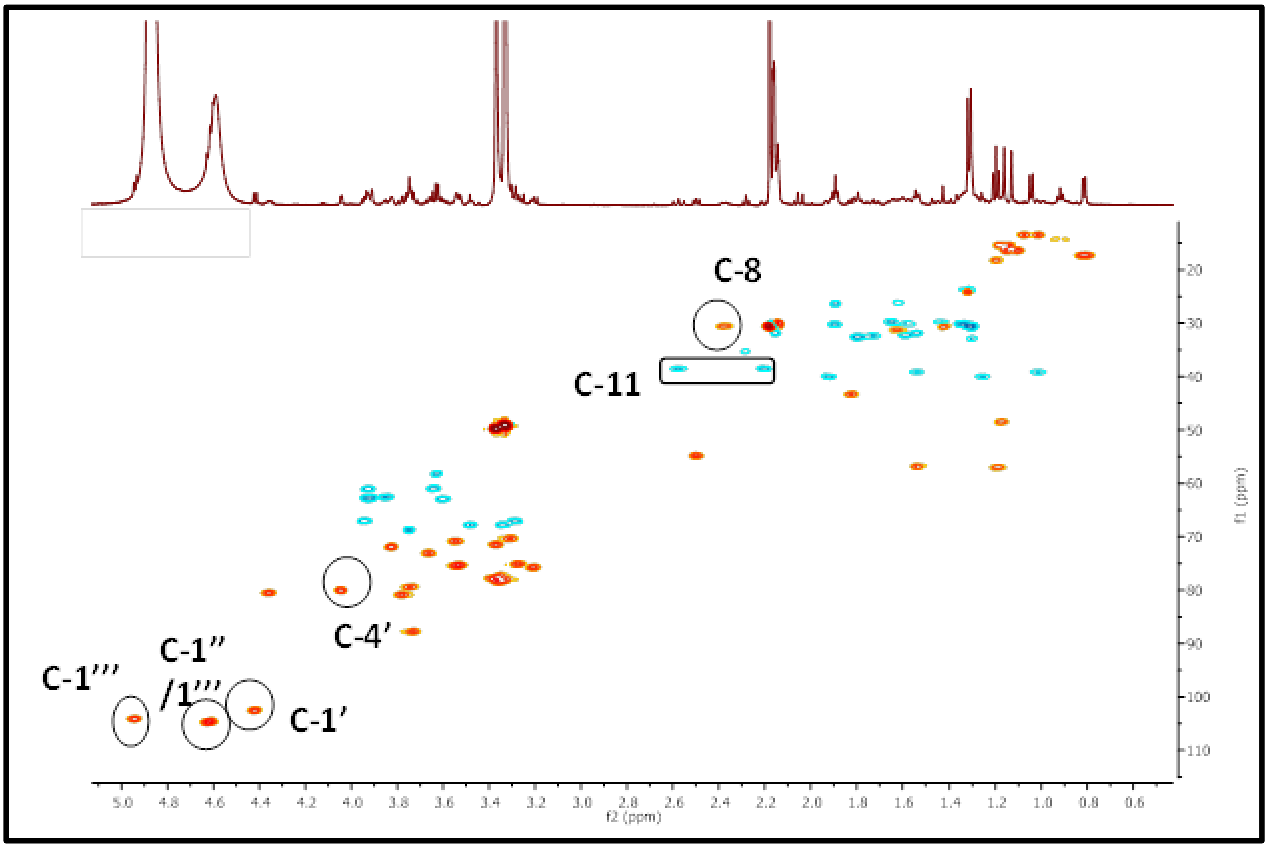
Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης αποτελεί την αντίστοιχη σαπωνίνη του μεταβολίτη ΑΑΜ2 και ταυτοποιήθηκε ως σακχαριδικό παράγωγο της 12-κετοποριγενίνης και παρατηρώντας το χρωματογράφημα TLC δεν παρουσίασε απορρόφηση στα 254 και 365 nm ενώ



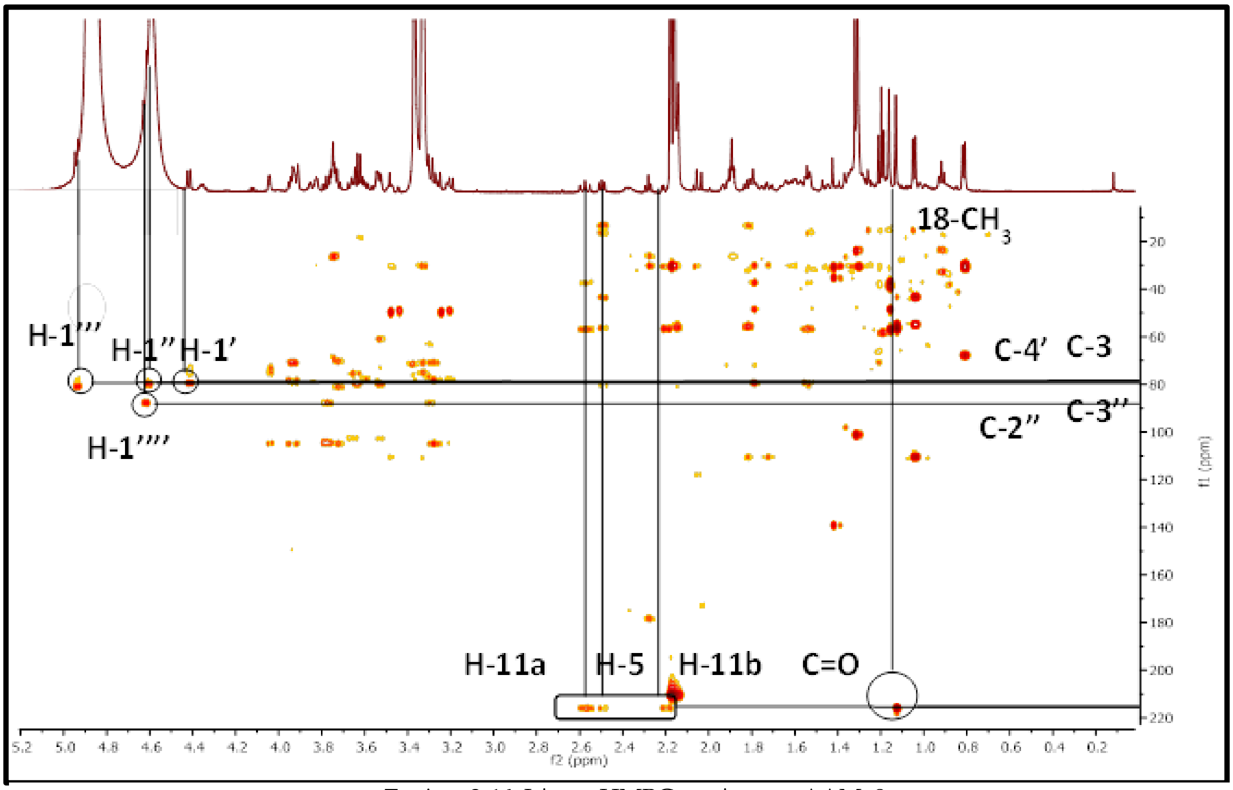
Εικόνα 8-12 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης ΑΑΜ_8

μετά από ψεκασμό και θέρμανση με το διάλυμα θεϊκής βανιλλίνης εμφάνισε σκούρα γκρι χρώση.

Από το φάσμα πρωτονίου παρατηρούμε την ύπαρξη στα 1.15 1.09 ppm δυο απλών κορυφών που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια και στα 1.04 0.81 ppm δυο διπλών κορυφών με J=7.8Hz που ολοκληρώνουν επίσης για τρια πρωτόνια και αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 19 18,21 και 27 αντιστοίχως. Αξίζει να σημειωθέι πως το πρωτόνιο Η-16 εμφανίζεται ελαφρώς θωρακισμένο σε δ 4.36 ενώ το μεθύλιο της θέσης 18 του σπιροστανικού δακτυλίου εμφανίζεται εμφανώς αποθωρακισμένο γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη καρβονυλίου στη θέση 12.



Εικόνα 8-13 Φάσμα HMQC ένωσης AAM_8

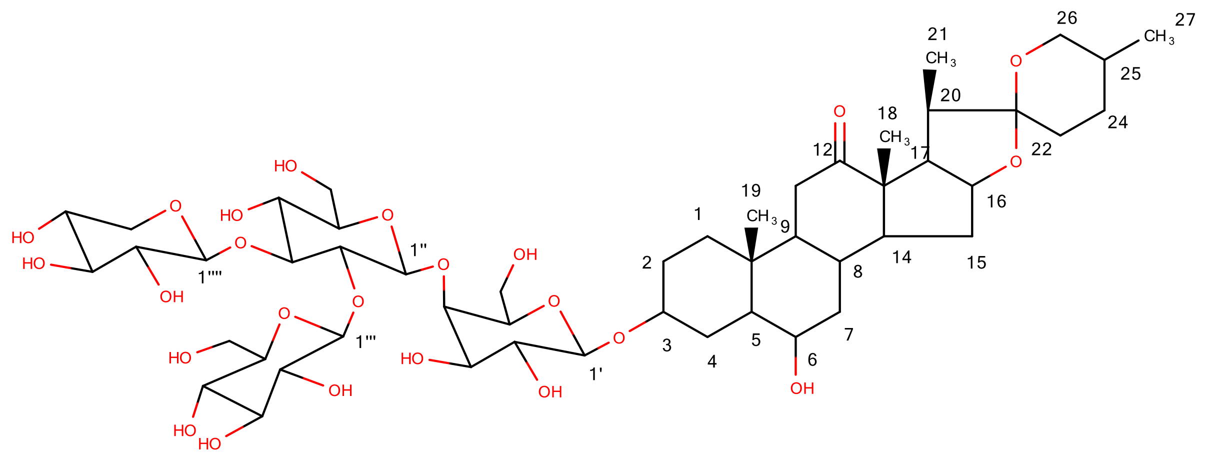


Εικόνα 8-14 Φάσμα HMBC της ένωσης AAM_8

Η θέση του του καρβονυλίου προσδιορίστηκε από το φάσμα HMBC καθώς το μεθύλιο της θέσης 18 παρουσιάζει σύζευξη με καρβονυλικό άνθρακα στα 216 ppm και με έναν άλλο με δ 56.9 που αντιστοιχεί στον άνθρακα 17 ο οποίος εμφανίζεται θωρακισμένος. Σύζευξη με το καρβονύλιο επίσης παρατηρείται ανάμεσα σε δύο πρωτόνια με δ 2.21 και 2.58 με κοινό μεθυλενικό άνθρακα 38.5 τα οποία αντιστοιχούν στο μεθυλένιο της θέσης 11 καθώς και με το πρωτόνιο της θέσης 17 σε δ 2.5. Το πρωτόνιο της θέσης 3 συντονίζεται στα 3.74 ppm με άνθρακα 79.5 ενώ το πρωτόνιο της θέσης 6 στα 3.81 ppm.

Τα ανωμερικά πρωτόνια που συντονίζονται σε δ 4.94, 4.62, 4.61 και 4.40 αντιστοιχούν σε δυο γλυκόζες, μια ξυλόζη και μια γαλακτόση αντίστοιχα. Η γαλακτόση συνδέεται στη θέση 3 της γενίνης ενώ η γλυκόζη 1 στον C-4′ της γλυκόζης γεγονός που δικαιολογεί την αποθωράκισή του. Η γλυκόζη 2 συνδέεται στον C-2′′της πρώτης ενώ στον C-3′′ συνδέεται η ξυλόση με χαρακτηριστικό μεθυλένιο στη θέση 5 σε δ 3.93 και 3.28 και άνθρακα στα 67.2 ppm. Όλες οι θέσεις σύνδεσης προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του φάσματος HMBC και οι χημικές μετατοπίσεις που παρουσιάζονται στον πίνακα με χρήση των φασμάτων HSQC-DEPT, COSY και HMBC και σύγκριση με τη βιβλιογραφία.

Πίνακας 8-9 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAM_8



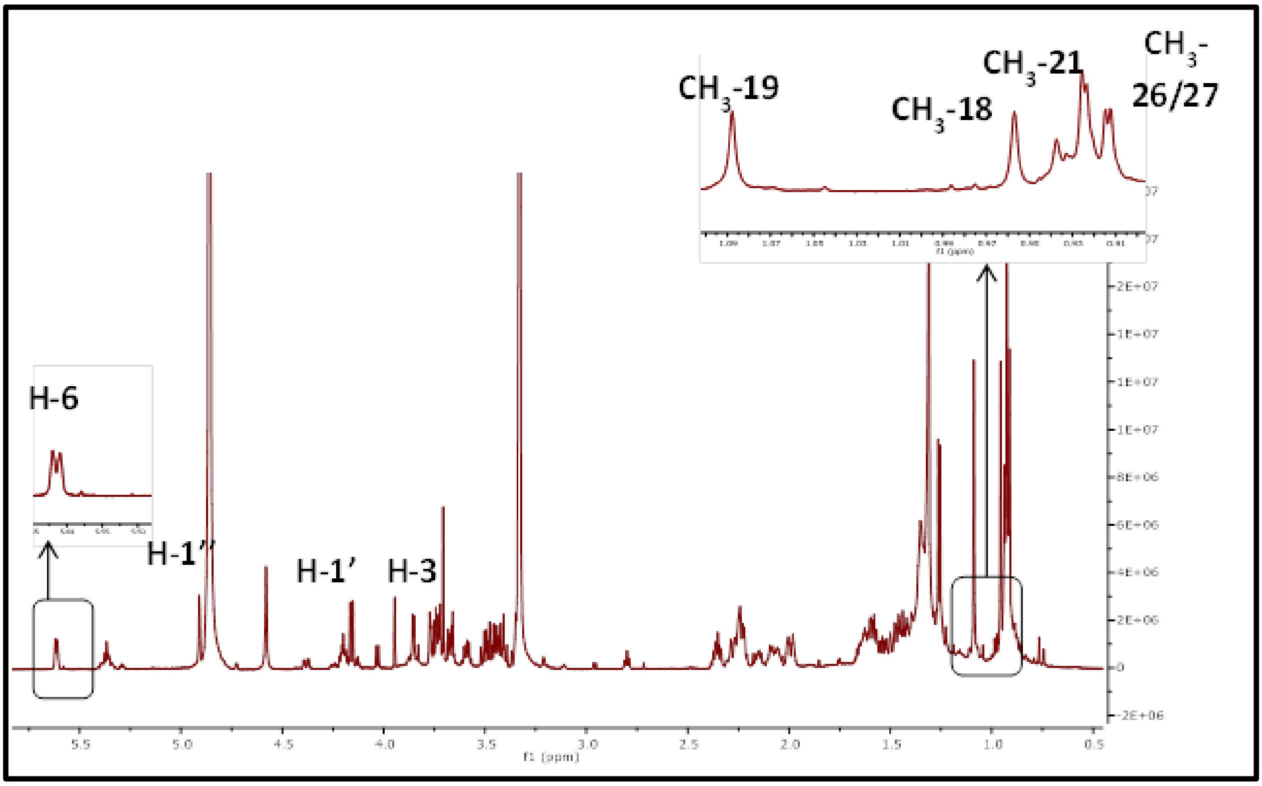
Σακχαριδικό παράγωγο της 12-κετοποριγενίνης

ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	1.52 (1H, m)/1 (1H,m)	39.6
2	1.88/1.57	30.6
3	3.74 (1H, m)	79.5
4	1.78/ 1.74	32.9
5	1.16 (1H, m)	48.4
6	3.81	72.3
7	1.91/1.24	40,4
8	2.36 (1H, m)	31.0
9	1.20 (1H, m)	57.0
10	-	38.0
11	2.58/2.21 (1H, dd)	38.5
12	-	216.2

13	-	56.7
14	1.54 (1H, m)	57.3
15	2.17 (1H, m)/ 1.54 (1H, m)	32.4
16	4.36 (1H, m)	80.7
17	2.5 (1H, dd)	54,8
18	1.09 (3H, s)	16.9
19	1.15 (3H, s)	16.1
20	1.8 (1H, t, *6,7*)	43.6
21	1.04 (3H, d, 7.8)	14.0
22	-	111.2
23	1.7/1.6 (2H, m)	32.0
24	1.64 (1H, m), 1.44 (1H, m)	30.0
25	1.61 (1H, m)	31.9
26	3.47 (1H, m), 3.33 (1H,m)	68.1
27	0.81 (3H, d, 7.8)	17.4
	3-Galactose-1	
1′	4.41 (1H, d, 7.7)	102.7
2′	3.65	73.4
3′	3.53	75.8
4′	4.04	80.0
5′	3.53	75.8
6′a, b	3.92(1H, d, 12) 3.64(1H, dd, 12/5)	61.4
	4′-Glucose-1	
1′′	4.61 (1H, d, 8.0)	105.1
2′′	3.77(1H, m)	81.2
3′′	3.72(1H, m)	88.4
4′′	3.30(1H, m)	70.8
5′′	3.26(1H, m)	75.6
6′′a, b	3.92 (1H, d, 12) 3.60 (1H, dd, 12/5)	63.2
	2′′-Glucose-2	
1′′′	4.94 (1H, d, 8.8)	104.6
2′′′	3.20 (1H, m)	76.2
3′′′	3.36 (1H, m)	78.2
4′′′′	3.36 (1H, m)	71.6
5′′′	3.36 (1H, d, 12)	78.2
6′′′a, b	3.84 (1H, d, 12) 3.61 (1H, dd, 12/5)	63.0
	3′′-Xylose	
1′′′′	4.61 (1H, d, 8.0)	105.1
2′′′′	3.25 (1H, m)	75.2
3′′′′	3.30 (1H, m)	78.1
4′′′′′	3.53 (1H, m)	71.4
5′′′′	3.28 (1H, d, 12) 3.93 (1H, dd, 12/5)	67.4

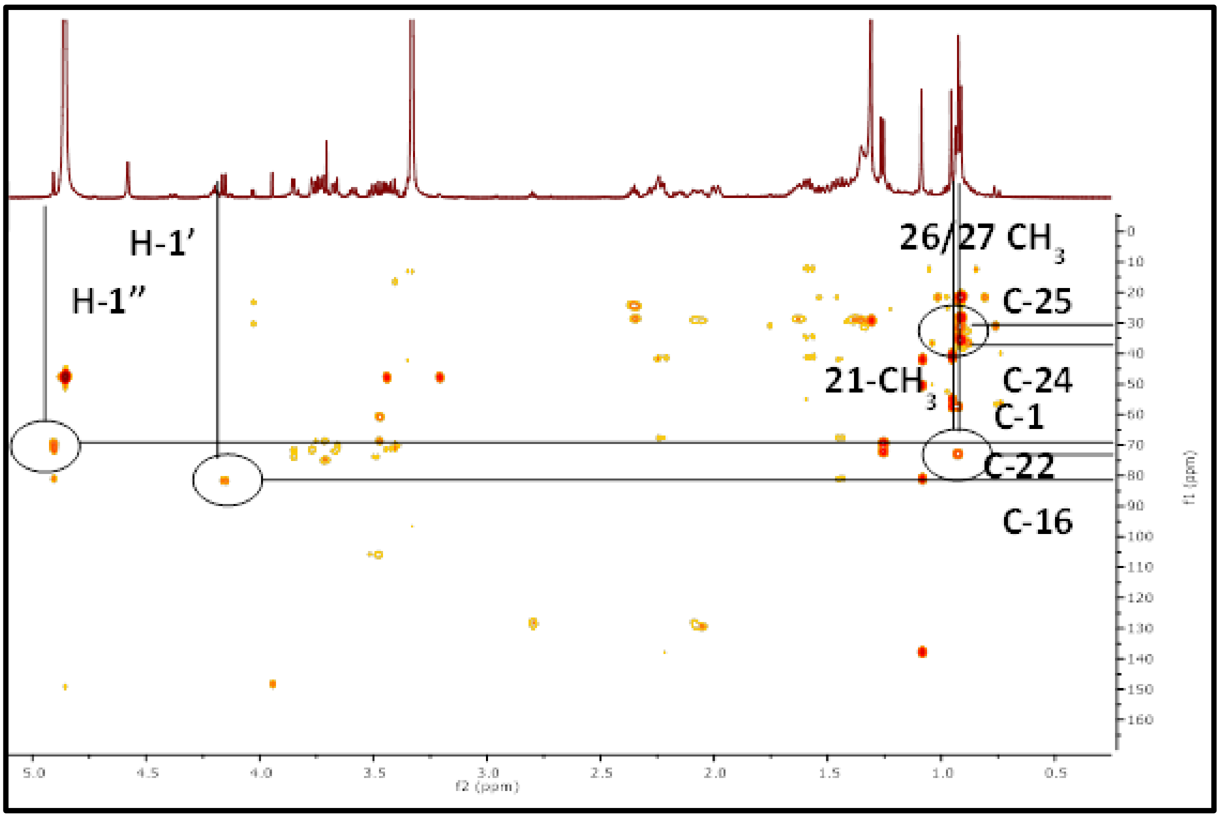
10. Μεταβολίτης AAM_5

Με βάση το χρωματογράφημα TLC ο εν λόγω μεταβολίτης δεν παρουσιάζει καμά απορρόφηση στα 254 και 365 nm αλλά έπειτα από ψεκασμό με διάλυμα θεϊκής βανιλλίνης έδωσε μια πολύ σκούρα πράσινη χρώση. Πρόκειται για μια σαπωνίνη και πιο συγκεκριμένα ονομάζεται cholest-5-ene-1β,3β,16β,22-tetrol-1-*O*-α-l-rhamnopyranosyl-16-*O*-β-d-glucopyranoside.



Εικόνα 8-15 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης AAM_5

Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης ανήκει στην των σαπωνινών που φέρουν σκελετό χολεστανίου και όχι σπιροστανίου όπως αυτές που έχουμε εξετάσει μέχρι στιγμής. Η βασική διαφορά τους είναι ότι στη θέση 17 υπάρχει ανοιχτή αλυσίδα η οποία δεν κυκλοποιείται στη θέση 22 και τα μόρια αυτής της κατηγορίας χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη πέντε και όχι τεσσάρων μεθυλίων. Πιο συγκεκριμένα, στην αλειφατική περιοχή του φάσματος στα 1.09-0.92 ppm πράγματι παρατηρούμε την ύπαρξη τριών απλών και δυο διπλών κορυφών που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 18, 19, 21 26 και 27.



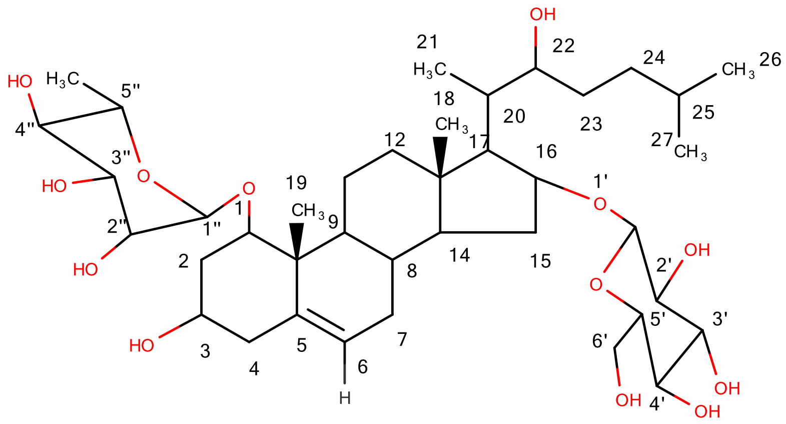
Εικόνα 8-16 Φάσμα HMBC της ένωσης AAM_5

Από το φάσμα HMBC παρατηρούμε πως το μεθύλιο της θέσης 18 παρουσιάζει σύζευξη με τον άνθρακα 17 στα 58.8 ppm με έναν οξυγονωμένο άνθρακα με δ 74.3 ο οποίος αντιστοιχεί στον άνθρακα 22, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη ανοιχτής αλυσίδας. Επίσης, τα μεθύλια των θέσεων 26 και 27 εμφανίζουν κοινές συζεύξεις με τον μεθινικό άνθρακα 25 στα 29.6 και τον μεθυλενικό άνθρακα 24 στα 35.6 ppm.

Επίσης, στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρατηρούμε την ύπαρξη δυο διπλών κορυφών που παραπέμπουν σε ανωμερικά πρωτόνια σακχάρων. Στα 4.9 ppm συντονίζεται το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόσης η οποία συνδέεται στη θέση 1 της γενίνης όπως υποδεικνύεται από το φάσμα HMBC. Το δεύτερο σάκχαρο της σαπωγενίνης είναι η γλυκόση με ανωμερικό πρωτόνιο στα 4.16 ppm και θέση σύνδεσης τη θέση 16. Το χαρακτηριστικό πρωτόνιο H-16 συντονίζεται στα 4.20 ppm με άνθρακα 83 ppm εμφανίζωντας μικρή αποθωράκιση λόγω σύνδεσης της γλυκόζης. Τα χαρακτηριστικά πρωτόνια της γενίνης H-3 και H-6 συντονίζονται στα 3.85 και 5.61 ppm αντίστοιχα με το τελευταίο εμφανώς αποθωρακισμένο.

Στον Πίνακας 8-10 αποτυπώνονται όλες οι χημικές μετατοπίσεις έπειτα από μελέτη των φασμάτων δυο διαστάσεων και βιβλιογραφικών αναφορών.

Πινακας 8-10 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAM_5 (*: αλληλεπικάλυψη σημάτων)

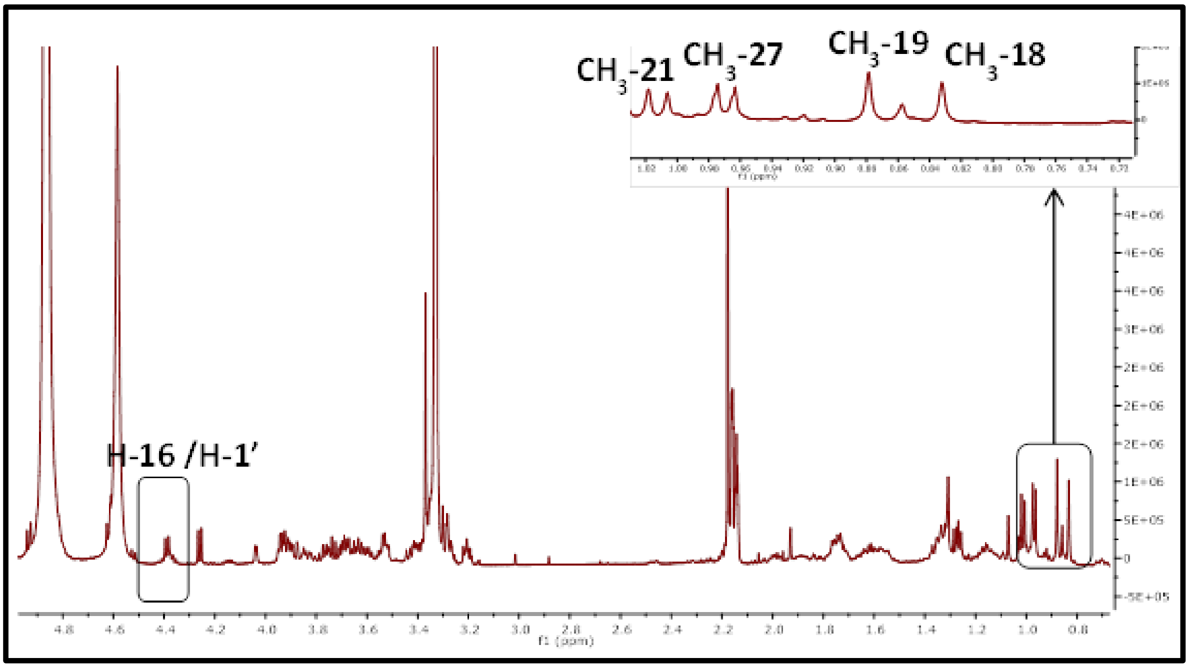


ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	3.34 (1H, m)	82.4
2	1.45 (2H, *m)	36.9
3	3.85(1H, m)	69.9
4	2.26 (2H, *)	43.2
5	-	140.0
6	5.61 (1H, brd, 5.95)	126.3
7	1.99 (1H, m), 1.49(1H, m)	32.1
8	1.44 (1H, m)	34.5
9	1.08(1H, *)	52.0
10	-	44.0
11	2.24(1H,*m) /1.62 (H, *m)	25.5
12	1.99 (1H, m), 1.24(1H, *)	41.5
13	-	42.0
14	0.92 (1H, m)	56.4
15	2.23 (1H, m), 1.59(1H, m)	37.6
16	4.20 (1H, m)	83.0
17	1.58 (1H, m)	58.8
18	0.96 (3H, s)	14.1
19	1.09 (3H, s)	14.5
20	2.15 (1H,*)	36.2
21	0.93 (3H, d, 6.7)	12.0
22	3.73 (1H, m)	74.3
23	1.99(1H, m), 1.48(1H, m)	32.2
24	2.25 (1H, m), 1.45 (1H, m)	35.6
25	1.54 (1H, m)	29.6
26	0.92 (3H, d, 6.7)	20.6
27	0.92 (3H,d, 6.7)	23.1
	16-O-γλυκόζη	
1′	4,16 (1H,d, *7.6*)	107.3

2′	3.52 (1H, m)	78.0
3′	3.4 (1H, m)	78.1
4′	3.8 (1H, m)	73.2
5′	3.5 (1H, m)	75.8
6′	4.38 (1H, d, 12) 4.18 (1H, dd, 12/5)	63.0
	1-O-ραμνόζη	
1′′	4.90 (1H, d, 1.2)	98.0
2′′	3,8 (1H, m)	74.5
3′′	3.68 (1H, m)	74.6
4′′	3.42 (1H, m)	76.4
5′′	3.6 (1H, m)	72.3
5′′-CH3	1.25 (3H, d, 6.0)	18.7

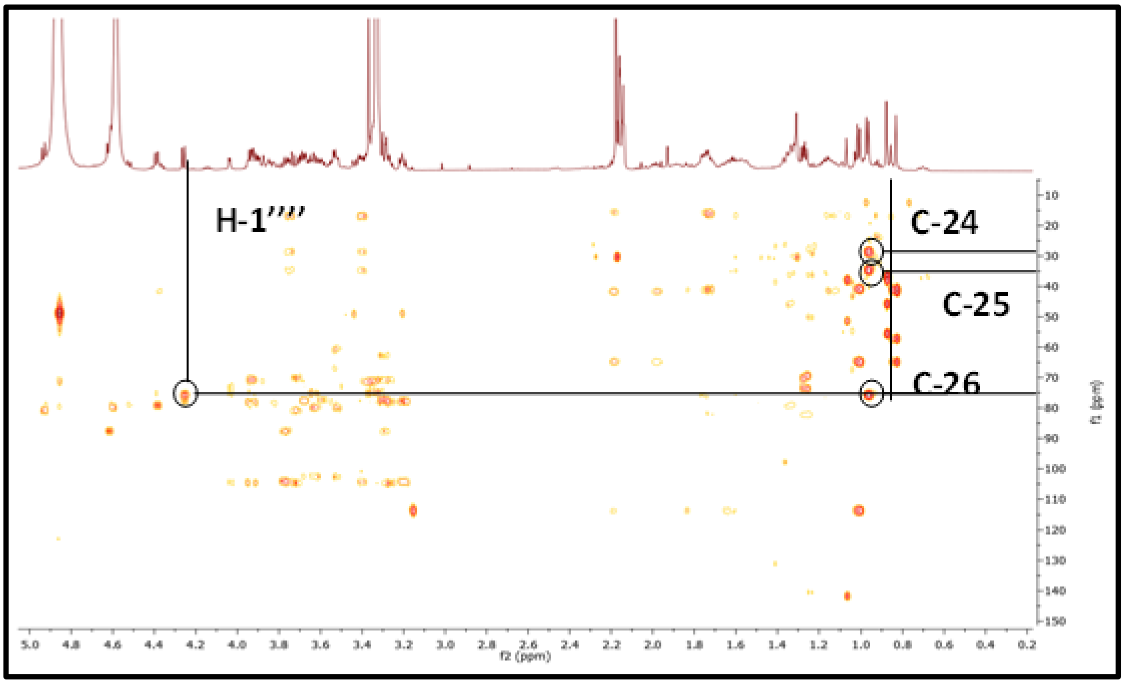
11. <u>Μεταβολίτης AAM_9</u>

Το συγκεκριμένο παράγωγο παρουσίασε ίδια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά με τα παραπάνω. Πρόκειται για μια σαπωνίνη με σκελετό φουροστανίου και ταυτοποιήθηκε ως λευκοφουρανοσίδης Α. Η διαφορά του φουροστανικού από τον σπιροστανικό σκελετό εντοπίζεται στην ύπαρξη ανοιχτής αλυσίδας στη θέση του άνθρακα 22 και όχι κλειστού δακτυλίου, γεγονός που επηρεάζει κάποια χαρακτηριστικά πρωτόνια.



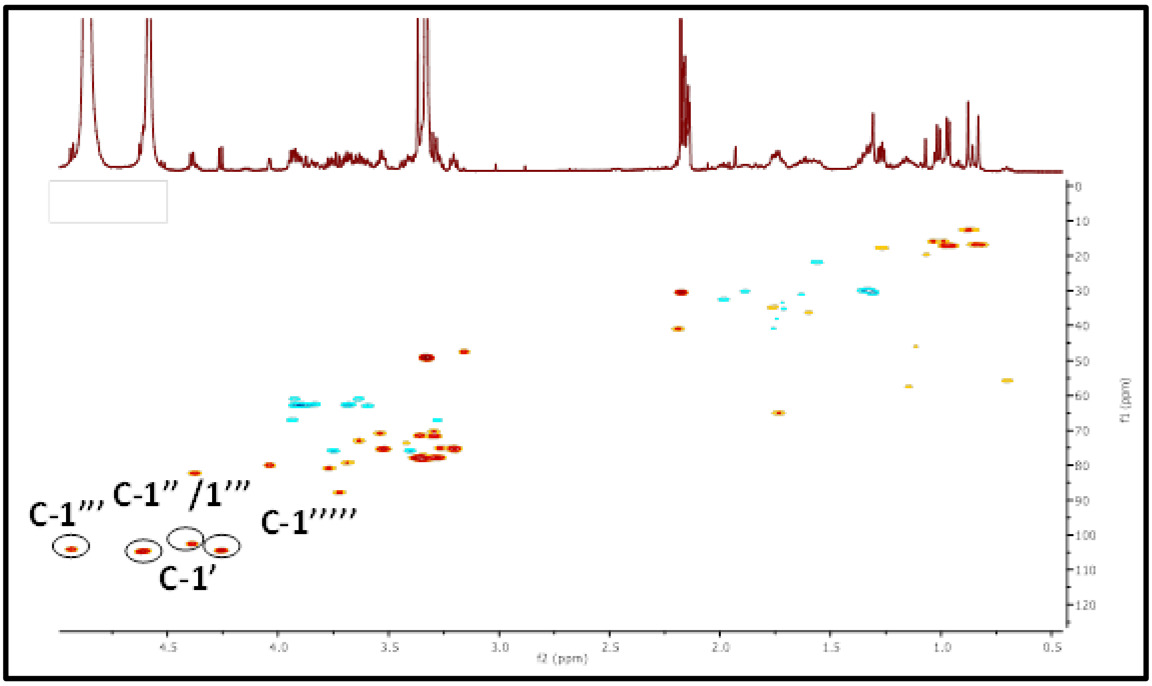
Εικόνα 8-17 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης AAM_9

Αρχικά, στο φάσμα πρωτονίου παρατηρούμε την ύπαρξη των τεσσάρων μεθυλικών κορυφών που αντιστοιχούν στα μεθύλια των θέσεων 18, 19, 21 και 27. Αξίζει να σημειωθεί πως τα μεθύλια 21 και 27 εμφανίζονται αρκετά αποθωρακισμένα σε δ 1.01 και 0.97 γεγονός που οφείλεται στην διαμόρφωση του φουροστανικού σκελετού. Το χαρακτηριστικό πρωτόνιο H-16 εμφανίζεται όπως είναι αναμενόμενο στα 4.37 ppm καθώς και ο επίσης χαρακτηριστικός άνθρακας 22 συντονίζεται στα 113.8 ppm.



Εικόνα 8-18 Φάσμα HMBC της ένωσης AAM_9

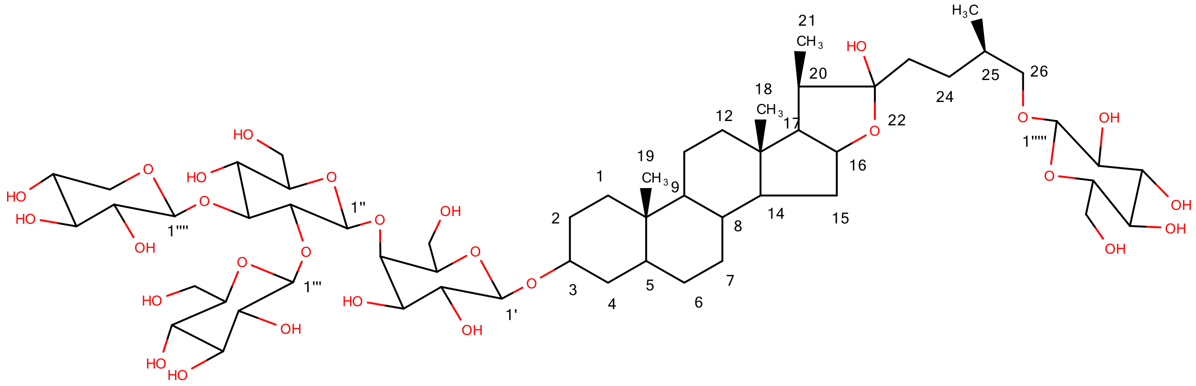
Από το φάσμα HMBC παρατηρούμε τη σύζευξη του μεθυλίου 27 με έναν μεθυλενικό άνθρακα στα 28.8 ppm που αντιστοιχεί στη θέση 24, με τον μεθινικό άνθρακα 25 στα 34 ppm και με τον οξυγονωμένο C-26 σε δ 75.7. Στη θέση 6 συναντάμε ένα μεθυλένιο σε δ πρωτονίου 1.33 και άνθρακα στα 29 ενώ ο άνθρακας 7 συντονίζεται στα 33ppm.



Εικόνα 8-19 Φάσμα HMQC της ένωσης AAM_9

Σημειώνεται πως το πωτόνιο της θέσης 8 εμφανίζεται πιο θωρακισμένο στα 1.3 ppm. Και στην περίπτωση αυτή παρατηρούμε την ύπαρξη πέντε ανωμερικών πρωτονίων με ανωμερικούς άνθρακες περίπου στα 100 ppm. Το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης 3 φαίνεται από το φάσμα HMBC να συνδέεται με τον οξυγονωμένο άνθρακα 26 της αλυσίδας. Τα υπόλοπα σάκχαρα συνδέονται μεταξύ τους στις ίδιες θέσεις όπως έχει περιγραφεί και προηγουμένως και συνδέονται με τη γενίνη μέσωτης γαλακτόσης πάντα στη θέση 3 όπως επιβεβαιώθηκε και από το HMBC. Με χρήση και των φασμάτων COSY και HSQC-DEPT καθορίστηκαν όλες οι θέσεις σύνδεσεις και οι χημικές μετατοπίσεις πάντα σε σύγκριση με τη βιβλιογραφία.

Πίνακας 8-11 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAM_9 (*: αλληλεπικάλυψη σημάτων)



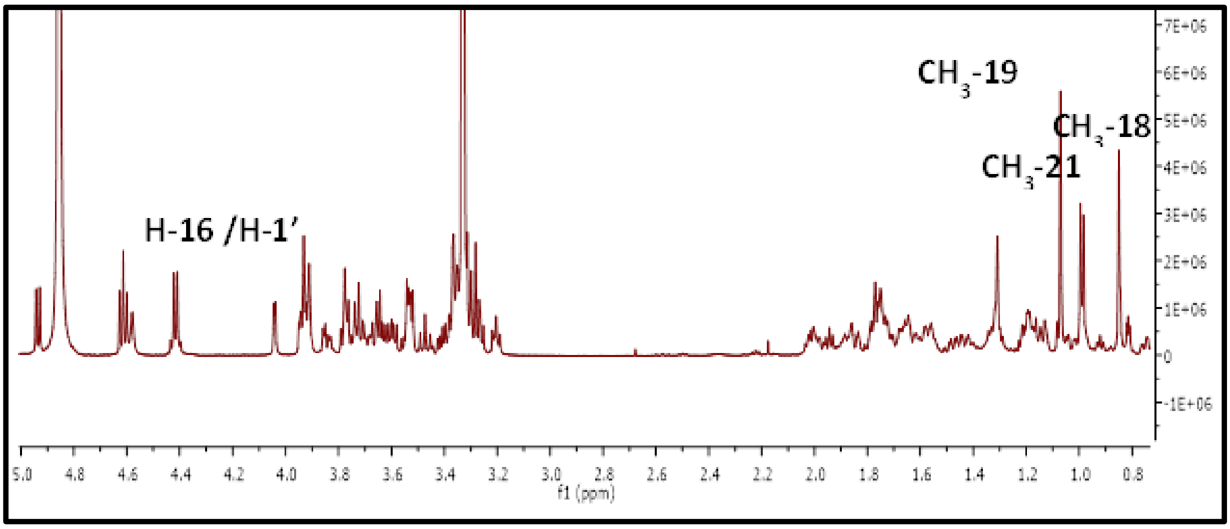
ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	1.74/1.0 (1H, m)	38.0
2	1.33/1.56 (2H, m)	30.4
3	3.68 (1H, m)	79.3
4	1.89(1H, m)/1.34(1H, m)	30.3
5	1.11	46.2
6	1.33 (2H, m)	29.3
7	0.96/1.72	33.3
8	1.6 (1H, m)	37.4
9	0.71(1H, *)	55.6
10	-	37.1
11	1.56/1.36	21.9
12	1.76/1.16	41.5
13	-	41.5
14	1.14 (1H, m)	57.2
15	1.99 (1H, m),1.27(1H, m)	32.6
16	4.37 (1H, m)	82.3
17	1.73 (1H, m)	64.8
18	0.83 (3H, s)	16.7
19	0.88 (3H, s)	12.7
20	2.18 (1H,*)	41.1
21	1.01 (3H, d, 7.1)	16.0

22	-	113.8
23	1.83(1H, m), 1.64H, m)	31.5
24	1.17 (1H, m), 1.61 (1H, m)	28.8
25	1.76 (1H, m)	34.0
26	3.75 / 3.41 (3H, d, 6.7)	75.7
27	0.97 (3H,d, 7.1)	17.0
	3-Galactose-1	
1′	4.39(1H, d, 7.7)	102.7
2′	3.65 (1H, m)	73.4
3′	3.53 (1H, m)	75.8
4′	4.04 (1H, m)	80.0
5′	3.53 (1H, m)	75.8
6′a, b	3.92 (1H, d, 12) 3.64 (1H, dd, 12/5)	61.4
	4′-Glucose-1	
1′′	4.62 (1H, d, 8.0)	104.6
2′′	3.77 (1H, m)	81.2
3′′	3.72 (1H, m)	88.4
4′′	3.30 (1H, m)	70.8
5′′	3.26 (1H, m)	75.6
6′′a, b	3.92 (1H, d, 12) 3.60 (1H, dd, 12/5)	63.2
	2′′-Glucose-2	
1′′′	4.93(1H, d, 8.8)	104.1
2′′′	3.20 (1H, m)	76.2
3′′′	3.36 (1H, m)	78.2
4′′′′	3.36 (1H, m)	71.6
5′′′	3.36 (1H, m)	78.2
6′′′a, b	3.84 (1H, d, 12) 3.61 (1H, dd, 12/5)	63.0
	3′′-Xylose	
1′′′′	4.62(1H, d, 8.0)	104.6
2′′′′	3.25 (1H, m)	75.2
3′′′′	3.30 (1H, m)	78.1
4′′′′′	3.53 (1H, m)	71.4
5′′′′	3.28 (1H, d, 12) 3.93 (1H, dd, 12/5)	67.4
	26-Glucose-3	
1′′′	4.24 (1H, d, 8.0)	104.5
2′′′	3.21 (1H, m)	75.4
3′′′	3.30 (1H, m)	71.4
4′′′′	3.36 (1H, m)	71.6
5′′′	3.30 (1H, m)	77.8
6′′′a, b	3.69 (1H, d, 12) 3.84 (1H, dd, 12/5)	62.6

12. Μεταβολίτης AAM_10

Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης ανήκει και αυτός στην κατηγορία των σαπωνινών και έχει τα ίδια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά με τους προαναφερόμενους μεταβολίτες. Παρατηρώντας το φάσμα πρωτονίου σε πρώτο επίπεδο μπορούμε να πούμε πως παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με το μεταβολίτη AAM_6. Η βασική διαφοροποίηση των δυο μεταβολιτών έγκειται στην απουσία μια κορυφής μεθυλενίου. Πιο συγκεκριμένα, στο φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη παρατηρούμε την ύπαρξη τριών μεθυλενικών κορυφών που αναλογούν στα μεθυλένια 19, 21 και 28 με δ 1.07, 0.99 και 0.85 αντίστοιχα.

Μελετώντας τις συζεύξεις στο φάσμα HMBC παρατηρούμε πως το μεθύλιο στη θέση 21 έχει

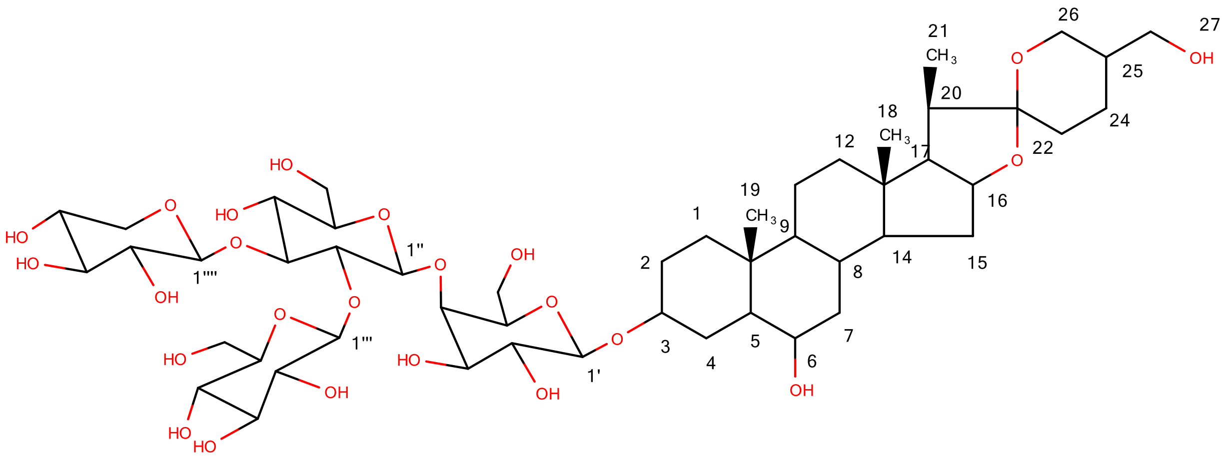


Εικόνα 8-20 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης AAM10

σύζευξη με τον άνθρακα 22 ο οποίος συντονίζεται στα 113 ppm και με έναν λανθρακα στα 64 ppm που αντιστοιχεί στον άνθρακα 17. Ο μεθυλενικός πλέον άνθρακας 27 συντονίζεται στα 64 ppm με πρωτόνια στα 3.4 και 3.33 ppm που παρυσιάζουν σύζευξη με τον μεθυλινικό άνθρακα 26 επιβεβαιώνοντας τη δομή. Παρατηρούμε την ύπαρξη των ανωμερικών πρωτονίων που αντιστοιχούν στην ύπαρξη των ήδη περιγεγραμμένων σακχάρων όπως ακριβώς και στο μεταβολίτη AAM_6.

Όλες οι χημικές μετατοπίσεις αποδώθηκαν με τη βοήθεια των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC και παρουσιάζονται στον Πίνακας 8-12

Πίνακας 8-12 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAM10



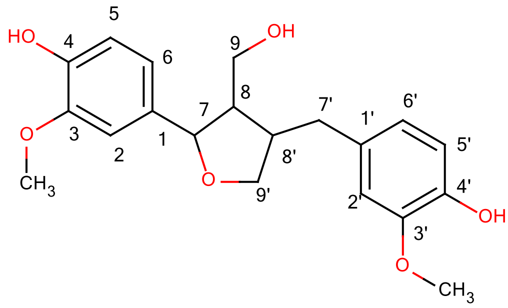
ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	1.67 (1H, m), 0.99 (1H,m)	39.6
2	1.88 /1.57 (2H, m)	30.4
3	3.73 (1H, m)	80.0
4	1.71/1.63 (2H, m)	31.9
5	1.13 (1H ,m)	48.8
6	3.77 (1H, brd, 2.7)	72.2
7	1.84 (1H ,m)/1.19 (1H ,m)	40.8
8	1.99 (1H, m)	31.4
9	0.73 (1H, m)	55.6
10	-	37.1
11	1.56/1.42 (2H, m)	21.2
12	1.76 (1H, m) / 1.18(1H, m)	41.0
13	-	41.3
14	1.19 (1H, m)	57.2
15	2.0 (1H, m)/ 1.75 (1H, m)	32.7
16	4.41 (1H, d)	82.2
17	1.76 (1H, m)	64.0
18	0.85 (3H, s)	16.8
19	1.07 (3H, s)	16.1
20	1.93 (1H, t, 6.7)	42.8
21	0.99 (3H, d, 7.4)	14.7
22	-	111.2
23	1.6 (1H, m)/ 1.3 (1H, m)	32.2
24	1.65 (1H, m), 1.47 (1H, m)	24.0
25	1.74(1H, m)	39.3
26	3.69 (1H, m) / 3.47 (1H,m)	64.4
27	3.41/3.34	65.0
	3-Galactose-1	
1′	4.41 (1H, d, 7.7)	102.7
2′	3.65	73.1
3′	3.53	73.4
4′	4.04	80.0
5′	3.53	73.4

6′a, b	3.92 (1H, d, 12) 3.64 (1H, dd, 12/5)	61.4
	4′-Glucose-1	
1′′	4.61 (1H, d, 8.0)	104.8
2′′	3.78 (1H, m)	80.8
3′′	3.73 (1H, m)	87.9
4′′	3.29 (1H, m)	70.4
5′′	3.29 (1H, m)	75.2
6′′a, b	3.92 (1H, d, 12) 3.60 (1H, dd, 12/5)	63.0
	2′′-Glucose-2	
1′′′	4.94(1H, d, 8.8)	104.3
2′′′	3.20 (1H, m)	75.9
3′′′	3.36 (1H, m)	78.2
4′′′′	3.36 (1H, m)	71.6
5′′′	3.36 (1H, m)	78.2
6′′′a, b	3.84 (1H, d, 12) 3.61 (1H, dd, 12/5)	62.7
	3′′-Xylose	
1′′′′	4.61 (1H, d, 8.0)	104.7
2′′′′	3.25 (1H, m)	75.2
3′′′′	3.30 (1H, m)	78.1
4′′′′′	3.53 (1H, m)	71.0
5′′′′	3.28 (1H, d, 12) 3.93 (1H, dd, 12/5)	67.0

13. Μεταβολίτης AAE_4

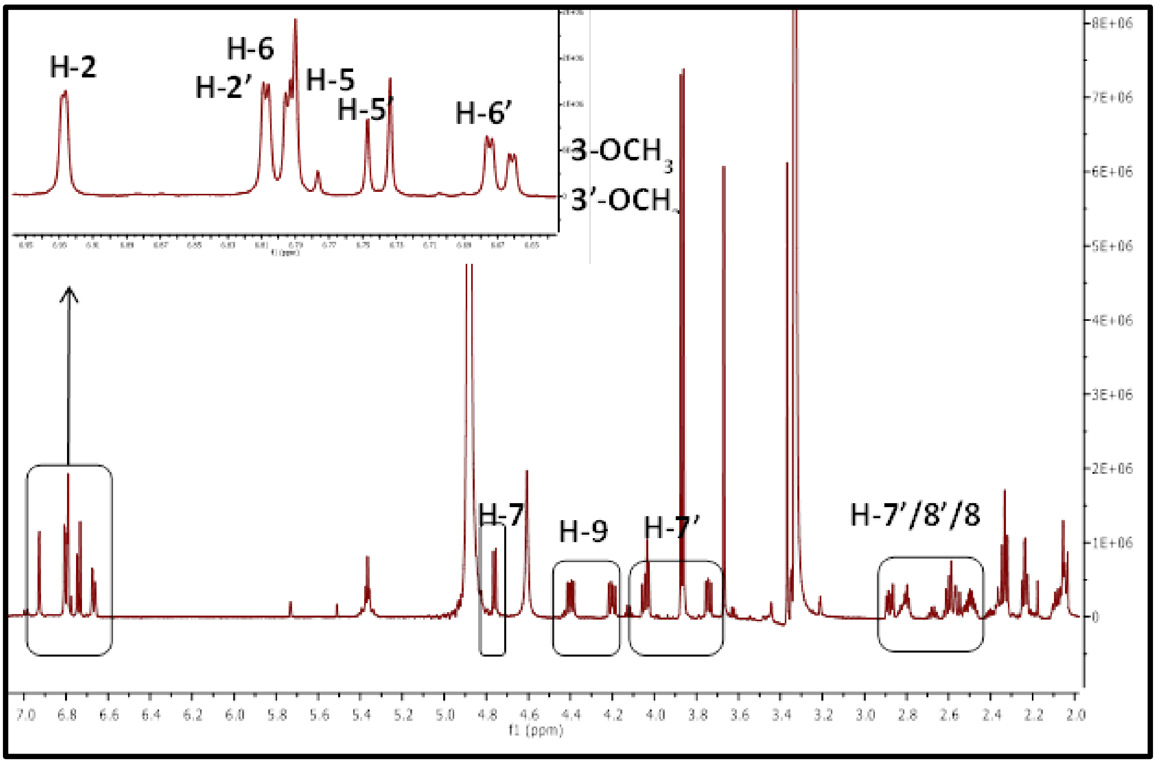
Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης στο χρωματογράφημα TLC παρουσίασε μια ελαφριά απορρόφηση στα 254 nm ενώ μετά από εμφάνιση με το αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης εμφάνισε γκρι χρώση. Έπειτα από φασματοσκοπική μελέτη με χρήση πειραμάτων μιας και δυο διαστάσεων ο μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως λαρισιρεσινόλη και στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα έπειτα από σύγκριση με τη βιβλιογραφία.

Πίνακας 8-13 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAE_4



Λαρισιρεσινόλη

ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	-	133.2
2	6.93 (1H, d, 1.4)	110.8
3	-	148.8
4	-	147.8
5	6.78 (1H, d, 8.0)	116.0
6	6.80 (1H, dd, 8.0/1.4)	120.1
7	4.76 (1H, d, 7.5)	85.0
8	2.59 (1H, m)	50.3
9	4.20 (1H, dd, 11.7/7.3) 4.40 (1H, dd, 11.7/7.3)	62.2
1′	-	133.2
2′	6.81 (1H, d, 1.4)	113
3′	-	148.9
4′	-	145.5
5′	6.74 (1H, d, 8.0)	116.2
6′	6.67 (1H, dd, 8.0/ 1.4)	122.3
7′	2.89 (1H, dd, 13/5.0) 2.56 (1H, dd, 13/5.0)	34.09
8′	2.79 (1H, m)	43.6
9′	4.04 (1H, dd, 8.7/6.0) 3.74 (1H dd, 8.7/6.0)	73.5

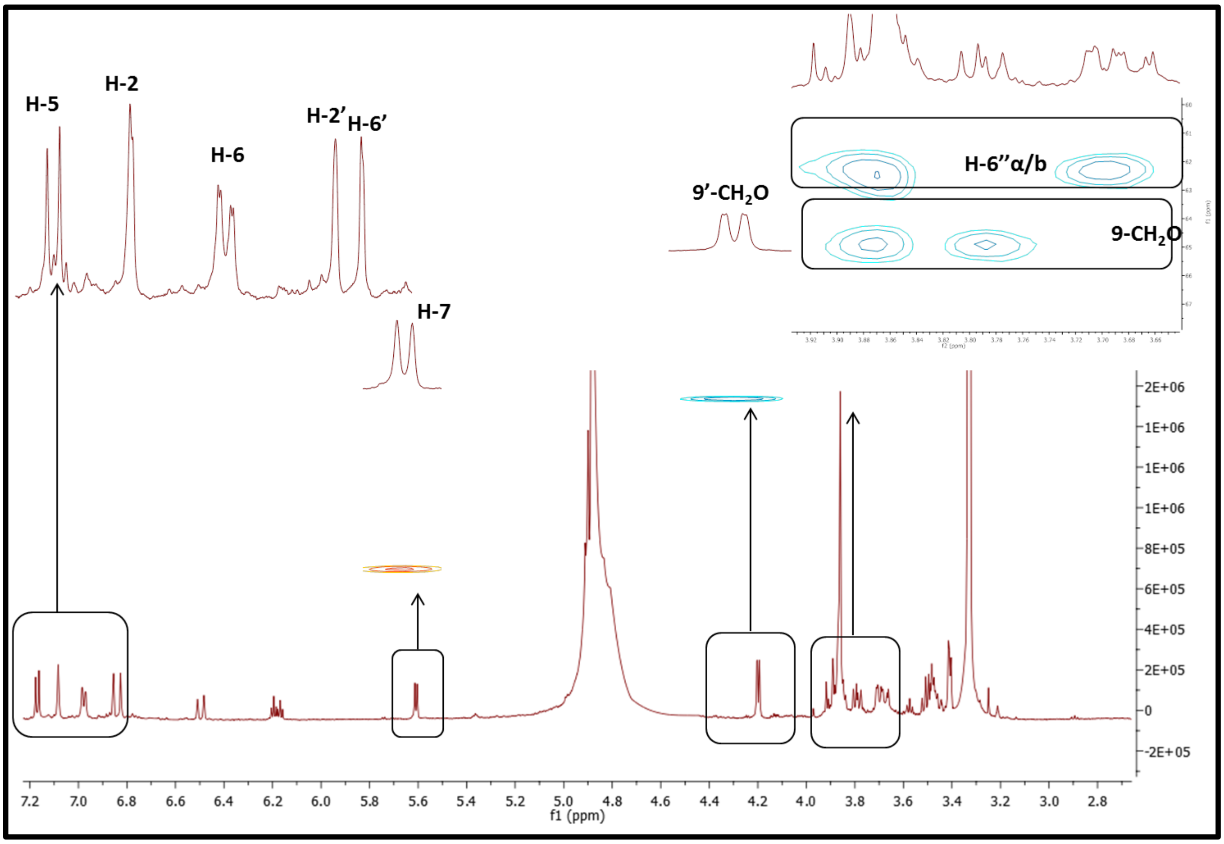


Εικόνα 8-21 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης AAE_4

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8-21 τα πρωτόνια των δύο αρωματικών δακτυλίων συντονίζονται στην αρωματική περιοχή του φάσματος εμφανίζοντας χαρακτηριστικό a, b, x σύστημα τρισυποκατάστασης για τον κάθε δακτύλιο. Το πρωτόνιο της θέσης 7 συντονίζεται στα 4.76 ppm ως μια διπλή κορυφή και στα με άνθαρακα στα 85 ppm στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος ενώ η πολλαπλή κορυφή στα 2.79 ppm αντιστοιχεί στο H-8′. Το πρωτόνιο της θέσης 8 εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή ενώ τα μεθυλένια της πλευρικής αλυσίδας στη θέση 9 ως δυο διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης *J* = 11.7/7.3 Hz. Οι απλές κορυφές που ολοκληρώνουν για τρια πρωτόνια αντιστοιχούν στις μεθόξυ ομάδες των θέσεων 3 και 3′. Τα μεθυλένια των θέσεων 9′ και 7′ συντονίζονται στα 4.04/3.74 και 2.89/2.56 ppm αντίστοιχα. Οι θέσεις σύνδεσης των μεθοξυλίων καθώς και οι τιμές των ανθράκων αποδόθηκαν με τη βοήθεια των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC και διασταυρώθηκαν με τη βιβλιογραφία.

14. <u>Μεταβολίτης AAM_13</u>

Ο μεταβολίτης αυτός ανήκει στην κατηγορία των νεολιγνανίων. Στο χρωματογράφημα TLC παρουσίασε μια ελαφριά απορρόφηση στα 254 nm ενώ μετά από εμφάνιση με το αντιδραστήριο θειϊκής βανιλλίνης εμφάνισε μπλε χρώση. Έπειτα από φασματοσκοπική μελέτη με χρήση πειραμάτων μιας και δυο διαστάσεων ο μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως ένα παράγωγο διυδροβενζοφουρανίου.

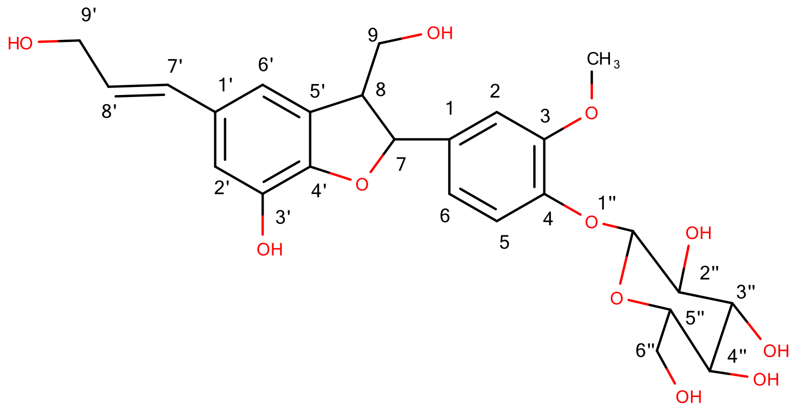


Εικόνα 8-22 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης AAM_13

Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 8-22, από τα 7,17 έως τα 6,83 ppm συντονίζονται τα πρωτόνια των δυο αρωματικών δακτυλίων. Τα πρωτόνια 7′(6,50 ppm) και 8′ (6.18 ppm) του διπλού δεσμού της πλευρικής αλυσίδας εμφανίζονται σαν δυο διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης J = 16 Hz, ένδειξη trans- υποκατάστασης, ενώ το μεθυλένιο της 9 της αλυσίδας συντονίζεται στα 4,20 ppm με τη μορφή dd κορυφής με J = 6.32/1.6 Hz.

Η διπλή κορυφή στα 5,61 ppm με άνθρακα στα 88,5 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 7, ενώ το πρωτόνιο της θέσης 8 συντονίζεται στα 3,47 ppm. Το μεθυλένιο της θέσης 9 συντονίζεται στα 3,87/376 ppm με μεθυλενικό άνθρακα 65ppm και η μεθόξυ ομάδα της θέσης 3 εμφανίζεται ως απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρίαπρωτόνια στα 3,85 ppm. Τέλος, το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης συντονίζεται στα 4,91 ppm ως διπλή κορυφή με J =7.6 Hz και ανωμερικό άνθρακα στα 102,7 ppm ένδειξη *O* γλυκοζυλίωσης. Οι θέσεις σύνδεσης και οι λοιπές τιμές των ανθράκων προσδιορίστηκαν από το φάσμα HMBC και οι τιμές απεικονίζονται στον Πίνακας 8-14.

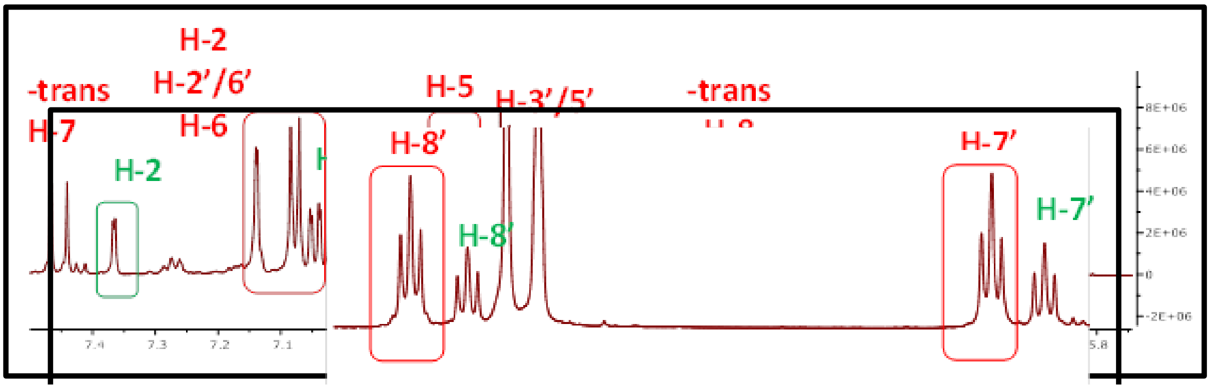
Πίνακας 8-14 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAM_13



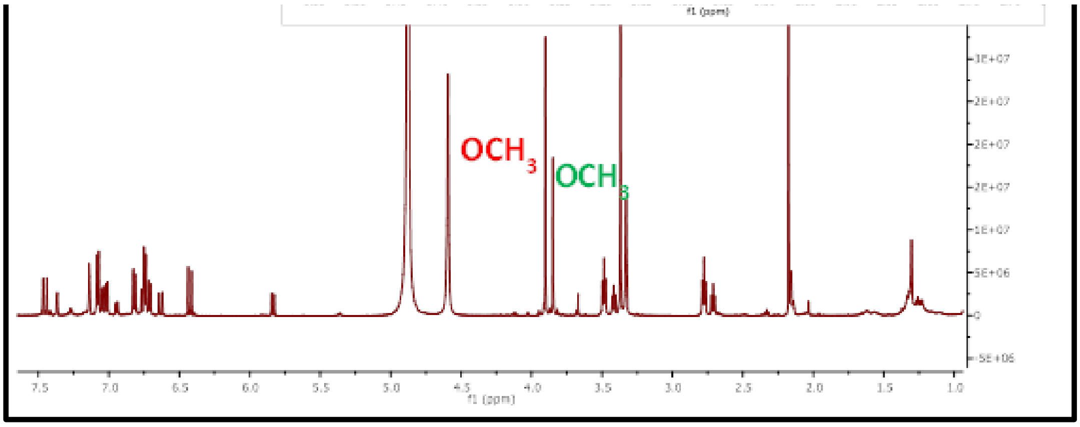
ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	-	138.4
2	7.08 (1H, d, 2.0)	111.0
3	-	150.7
4	-	147.6
5	7.17 (1H, d, 8.0)	117.8
6	6.98 (1H, dd, 8/2)	119.5
7	5.61 (1H, d, 5.7)	88.5
8	3.47 (1H, m, H-8)	57.0
9	3.87 (1H, d, 16),/3.76 (1H, dd, 10/6)	65.0
1′	-	132.4
2′	6.86 (1H, br s)	115.3
3′	-	142.3
4′	-	148.0
5′	-	130.1
6′	6.83(1H, br s)	115.3
7′	6.5(1H, d, 16)	132.4
8′	6.18 (1H, d, 16)	127.2
9′	4.20 (2H, d 6.32/1.6)	63.7
3-OCH$_3$	3.85 (3H, s)	56.5
	Glucose	
1′′	4.91(1H, d, 7.6)	102.7
2′′	3.50 (1H, m)	75.0
3′′	3.47 (1H, m)	78.0
4′′	3.40(1H, m)	72.0
5′′	3.41 (1H, m)	78.0
6′′ a/b	3.87(1H, d, 12)	62.2
	3.69 (1H, dd, 12/5)	

14 Μεταβολίτης AAE_7

Ο μεταβολίτης αυτός απορροφά πολύ έντονα στα 254 nm ενώ έπειτα από ψεκασμό με το αντδραστήριο εμφάνισης δίνει πολύ ελαφριά χρώση. Έπειτα από φασματοσκοπική μελέτη καταλήξαμε ότι στην περίπτωση αυτή πρόκειται για το *trans* και το *cis* ισομερές του μεταβολίτη N-feruloyl tyramine. Στα φάσματα ^{1}H που ακολουθούν παρακάτω με σκοπό να διευκολυνθεί η διάκριση των δυο ισομερών με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το *trans* παράγωγο που φαίνεται να περιέχεται και σε μεγαλύτερο ποσοστό, ενώ με πράσινο χρώμα απεικονίζεται το *cis* παράγωγο.



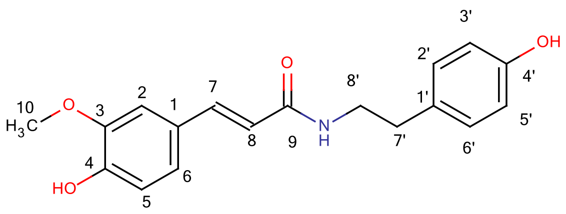
Εικόνα 8-23 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης AAE_7



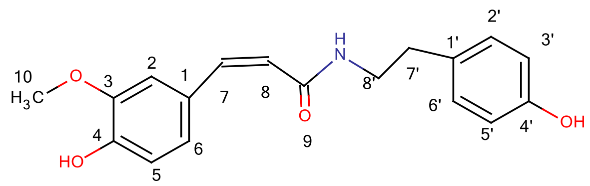
Εικόνα 8-24 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης AAE_7

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος συντονίζονται τα πρωτόνια των δυο αρωματικών δακτυλίων όπου όπως φαίνεται και στην εικόνα στην μια περίπωση του Α δακτυλίου σχηματίζουν ένα a, b, x σύστημα ενώ στο Β δακτύλιο συναντάμε δυο διπλές κορυφές με ortho σύζευξη που ολοκληρώνουν για δυο πρωτόνια, χαρακτηριστικό para υποκατάστασης αρωματικού πυρήνα. Τα πρωτόνια του διπλόυ δεσμού συντονίζονται στα 7.45 και 6.42 ppm με σταθερά σύζευξης *J= 15.6 Hz* στην περίπτωση του *trans* ισομερούς, ενώ αντίστοιχα για το *cis* ισομερές στα 6.63 και 5.83 ppm με *J= 12.3 Hz*.

Χαρακτηριστικές οι κορυφές των δύο μεθοξυλομάδων των ισομερών που συντονίζονται στα 3.90 και 3.85 ppm καθώς και οι κορυφές των 2 μεθυλομάδων των θέσεων 8′ και 7′. Τα μεθυλένια εμφανίζονται σαν τριπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για δυο πρωτόνια με υ άνθρακα περίπου στα 40 ppm για τη θέση 8′ και 35 για τη θέση 7′. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και ανθράκων και για τα δυο ιοσομερή που απεικονίζονται στον πίνακα 8 15 είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία.



N-trans –φερουλουλ-τυραμίνη



N –cis -φερουλουλ-τυραμίνη

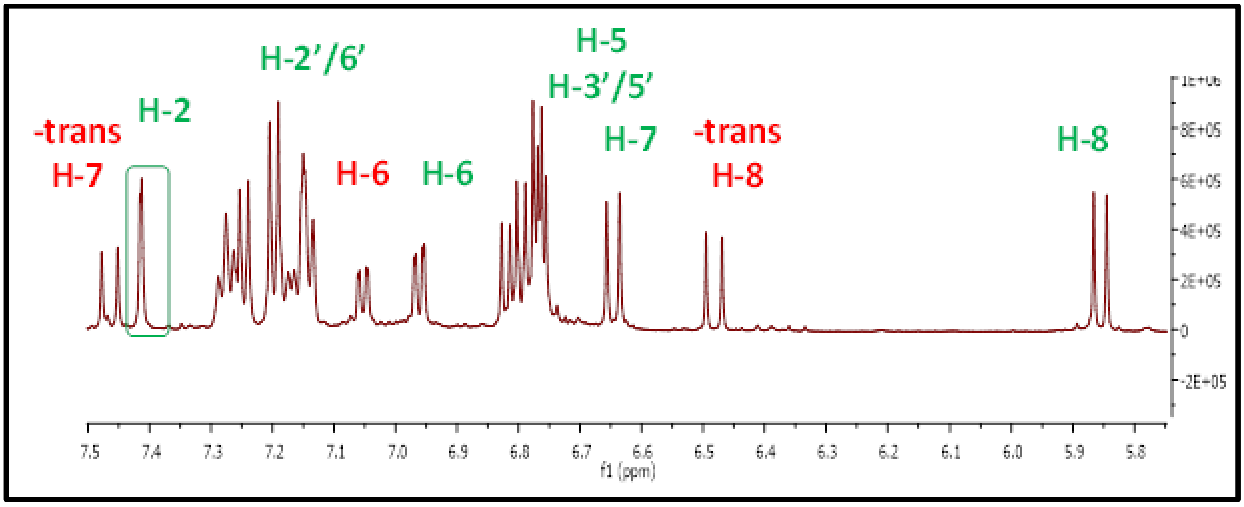
ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm	1H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	-	128.6	-	127.5
2	7.13 (1H, d, 1.82)	111.5	7.35 (1H, d, 1.9)	113.7
3	-	149.2	-	148.8
4	-	149.7	-	148.6
5	6.81 (1H, d, 8.2)	116.7	6.69 (1H, d, 8.2)	116.7
6	7.03(1H, dd, 8.2/1.82)	130.9	6.93 (1H, dd, 8.2/1.9)	124.6
7	7.43 (d, 1H, 15.62	142	6.61 (d, 1H, 12.7)	138.3
8	6.405 (1H, d, 15.62)	119	5.81 (1H, d, 12.7)	121.6
9	-	169.3	-	170.4
10	3.887 (3H, s, OCH_3)	56.5	3.83 (3H, s, OCH_3)	56.2
8′	3.47 (2H, t, 7.5)	42.2	3.40 (2H, t, 7.7)	42.2
7′	2,76 (2H, t, 7.5)	35.7	2,69 (2H, t, 7.5)	35.4
1′	-	131.3	-	131.0
2′	7.06 (1H, d, 8.5)	130.7	7.00 (1H, d, 8.5)	130.6
3′	6.72 (1H, d, 8.5)	116.1	6.69 (1H, d, 8.5)	116.1
4′	-	156.5	-	157.2

5′	6.72 (1H, d, 8.5)	116.1	6.69 (1H, d, 8.5)	116.1
6′	7.06 (1H, d, 8.5)	130.7	7.00 (1H, d, 8.5)	130.6

Πίνακας 8-15 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAE_7

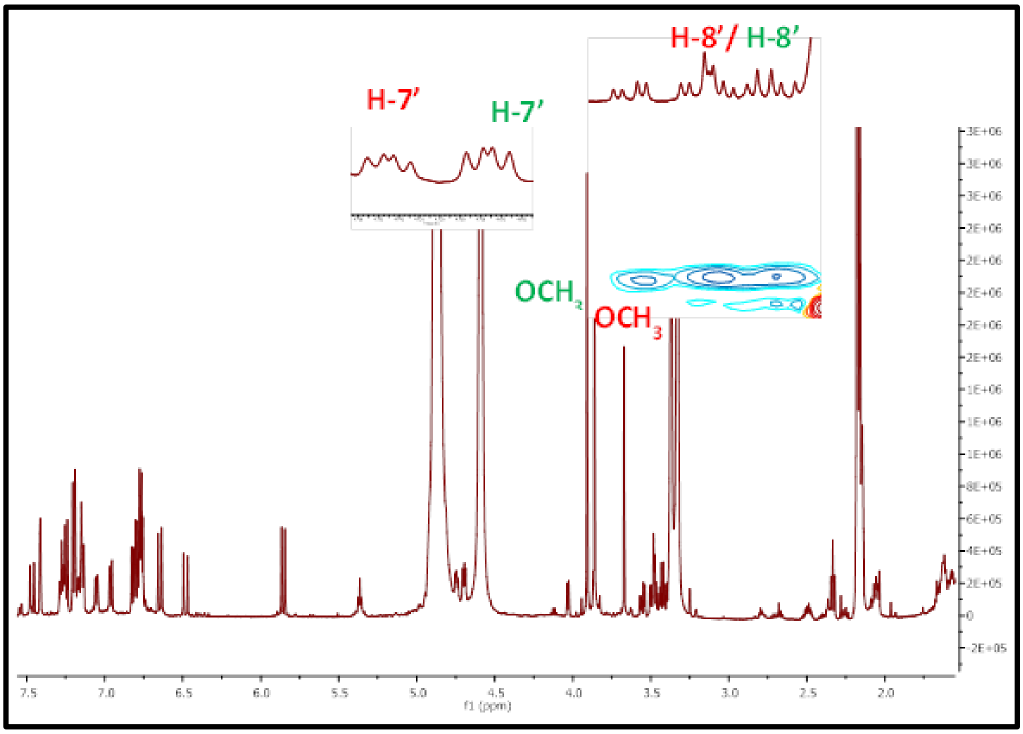
16. <u>Μεταβολίτης AAE_8</u>

Ο μεταβολίτης αυτός παρουσίασε παρόμοια εικόνα στο χρωματογράφημα TLC με τον παραπάνω αλλά ελαφρώς αυξημένη πολικότητα. Πρόκειται για το υδροξυλιωμένο παράγωγό του στη θέση 7′ και ονομάζεται N-trans-Feruloyloctopamine. Ομοίως και στην περίπτωση αυτή συναντάμε και τα δυο ισομερή και χρησιμοποιούνται τα ίδια χρώματα για την επισήμανση των κορυφών τους με σκοπό τη διάκρισή τους.



Εικόνα 8-25 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης AAE_8

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος συντονίζονται τα πρωτόνια των δυο αρωματικών δακτυλίων όπου όπως περιγράφηκε και στο προηγούμενο παράγωγο σχηματίζουν φαίνεται στην περίπωση του A δακτυλίου ένα a, b, x σύστημα ενώ στην περίπτωση του B δακτυλίου συναντάμει τη χαρακτηριστική para υποκατάσταση.

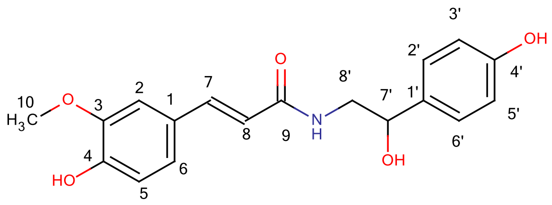


Τα πρωτόνια του διπλού δεσμού συντονίζονται στα 7.44 και 6.46 ppm με σταθερά σύζευξης *J= 15.6 Hz* στην περίπτωση του *trans* ισομερούς, ενώ αντίστοιχα για το *cis* ισομερές στα 6.62 και 5.83 ppm με *J= 12.3 Hz*. Οι κορυφές των δύο μεθοξυλομάδων των ισομερών συντονίζονται στα 3.89 και 3.83 ppm καθώς και οι κορυφές των 2 μεθυλομάδων των θέσεων 8′ και 7′. Στην περίπτωση αυτή έχουμε μόνο ένα μεθυλένιο στην αλυσίδα στη θέση 8′ καθώς η 7′ έχει υποκατασταθεί από ένα OH. Για το λόγο αυτό το πρωτόνιο της θέσης 7′ εμφανίζεται πολύ αποθωρακισμένο και στις δυο περιπτώσεις των ισομερών και με πολλαπλή κορυφή.

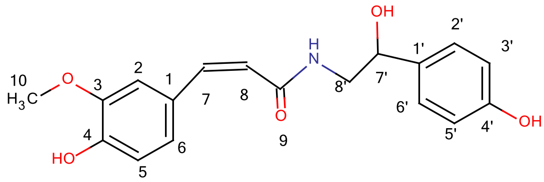
Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και ανθράκων και για τα δυο ιοσομερή που απεικονίζονται στον Πίνακας 8-16 είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία.

Πίνακας 8-16 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης ΑΑΕ_8

Εικόνα 8-26 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης ΑΑΕ_8



N-trans- φερουλουλοκταπαμινη



N-cis-φερουλουλοκταπαμινη

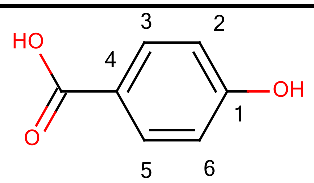
ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm	1H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	-	127.1	-	127.8
2	7.13 (1H, d, *1.8*)**	128.6	7.40 (1H, d, 1.9)	114.0
3	-	148.2	-	147.4
4	-	149.4	-	147.5
5	6.80 (1H, d, 8.2)	116.1	6.75 (1H, d, 8.5)	115.9
6	7.03 (1H, dd, 8.2/1.8)	123.2	6.94 (1H, dd, 8.5/2)	124.8
7	7.44 (d, 1H, 15.7)	142.2	6.62 (d, 1H, 12.8)	138.9
8	6.46 (1H, d, 15.7)	118.5	5.83 (1H, d, 12.8)	121.2

9	-	168.3	-	169.4
10	3.89 (3H, s, OCH_3)	56.3	3.84 (3H, s, OCH_3)	56.1
8′a,b	3.53 (1H, dd, 13.6/5.5) 3.45 (1H, dd, 13.6/5.5	48.1	3.40 (2H, *)	48.03
7′	4.72 (2H, m)	73.3	4.68 (2H, *, 7.8)	73.1
1′	-	133.5	-	133.5
2′	7.23 (1H, d, 8.5)	128.3	7.18 (1H, d, 8.4)	128.3
3′	6.77 (1H, d, 8.5)	115.9	6.74 (1H, d, 8.4)	116.1
4′	-	157.2	-	169.4
5′	6.77 (1H, d, 8.5)	115.9	6.74 (1H, d, 8.5)	116.1
6′	7.23 (1H, d, 8.5)	128.3	7.18 (1H, d, 8.4)	128.3

15 Μεταβολίτης AAM_1

Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης πρόκειται για ένα απλό φιανολικό οξύ, το π-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ. Στο χρωματογραφικό έλεγχο με TLC παρουσιάζει απορρόφηση στα 254 nm και ψεκάζεται πολύ ελαφριά έπειτα από ψεκασμό με διάλυμα θεϊκής βανιλλίνης. Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρήθηκαν δυο διπλές κορυφές με ortho σύζευξη που ολοκληρώνουν για δυο πρωτόνια χαρακτηριστικό para υποκατάστασης.

Πίνακας 8-17 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAM_1



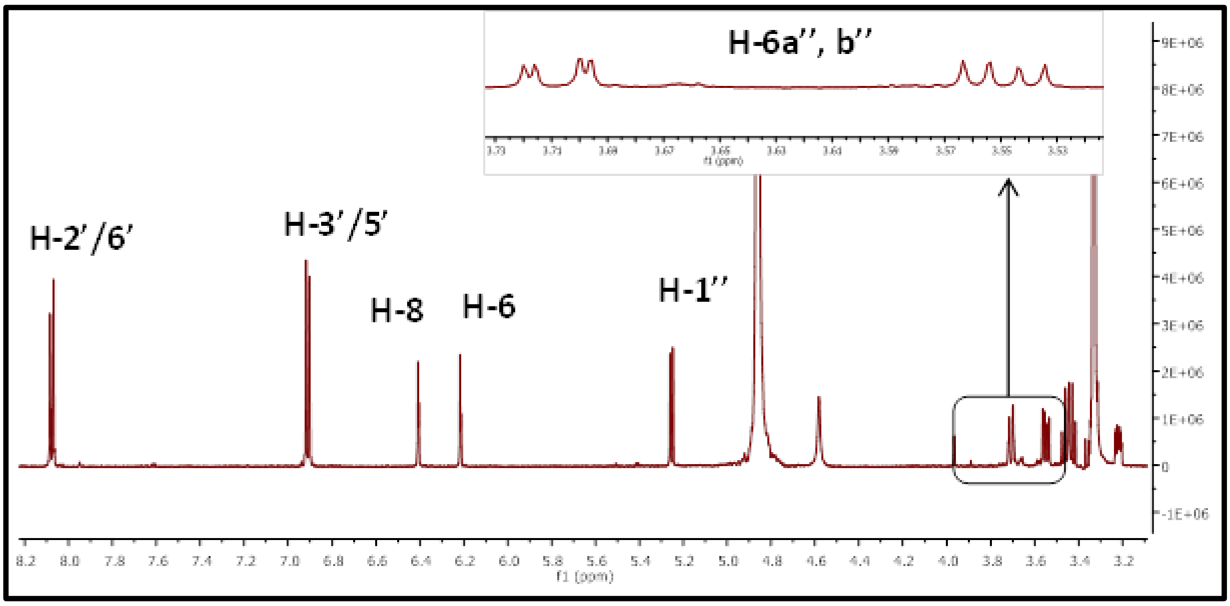
π-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ

ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13}C NMR δ σε ppm
1	-	122.8
2/6	7.78 (2H, d, 8.78)	132.0
3/5	6.82(2H,d, 8.78)	115.8
4	-	163.4

7	-	170.5

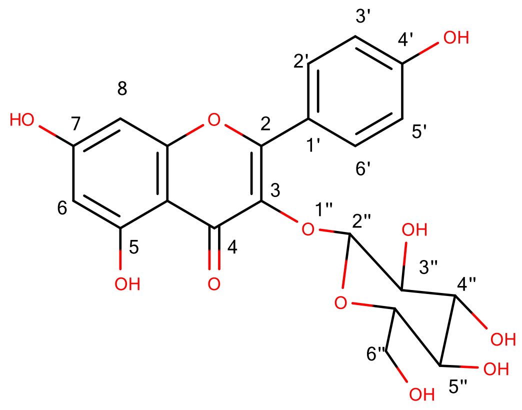
16 Μεταβολίτης AAM_3

Ο μεταβολίτης αυτός ταυτοποιήθηκε ως ο 3-*O*-γλυκοσίδης της καιμφερόλης. Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειϊκής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται καφέ. Όπως μπορούμε να διακρίνουμε και στο φάσμα πρωτονίου, παρατηρείται το χαρακτηριστικό para σύστημα υποκατάστασης του δακτυλίου B που αποτελείται από δυο διπλές κορυφές που ολκληρώνουν για δυο πρωτόνια και έχουν σταθερά σύζευξης 8.8 Hz. Το πρωτόνιο H-8 του A δακτυλίου συντονίζεται στα 6.41 ppm δίνοντας μια δπλή κορυφή όπως επίσης και το πρωτόνιο H-6 το οποίο εμφανίζεται στα 6.22 ppm.Το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης συντονίζεται στα 5.25 ppm, με σταθερά σύζευξης 7.5 Hz και με ανωμερικό άνθρακα στα 104.1 ppm τιμή που υποδεικνύει *O* - γλυκοζυλίωση. Η θέση σύνδεσής της γλυκόζης στον σκελετό προσδιορίστηκε με τη βοήθεια φασμάτων HSQC και HMBC όπως και οι τιμές των ανθράκων



Εικόνα 8-27 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης AAM_3

Πίνακας 8-18 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAM_3



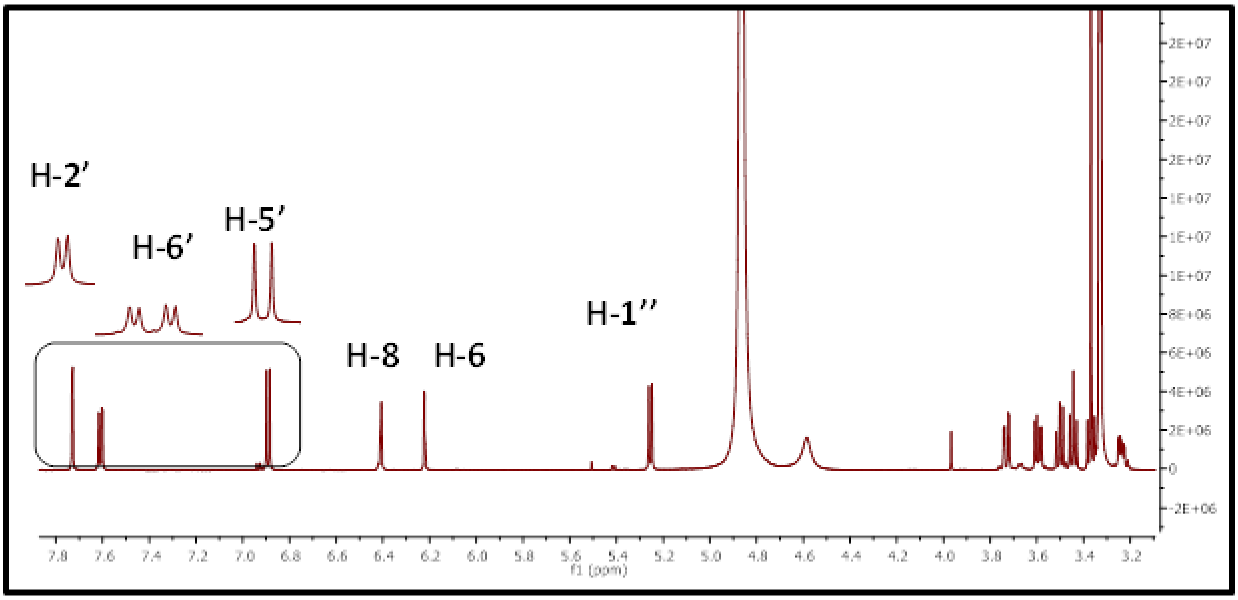
3-*O*-γλυκοσίδης της καιμφερόλης

ΘΕΣΗ	^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)	^{13} C NMR δ σε ppm
1	-	
2	-	158.3
3	-	134.1
4	-	174.4
5	-	162.3
6	6.20 (1H, d, 1.77)	100.3
7	-	165.0
8	6.39 (1H, d, 1.77)	95.2
9	-	157.4
10	-	104.7
1′	-	121.9
2′	8.06 (1H,d, 8.8)	133.0
3′	6.89 (1H, d, 8.8)	116.7
4′	-	161.0
5′	6.89 (1H, d, 8.8)	116.7
6′	8.06 (1H, d, 8.8)	133.0
	Glucose	
1′′	5.23 (1H,d, 7.6)	104.1
2′′	3.20 (1H, m)	73.1
3′′	3.43*(1H, m)	76.4
4′′	3.43*(1H, m)	69.6
5′′	3.43*(1H, m)	77.2
6′′a,b	3.53 (1H, dd, 12/5.6) 3.69 (1H, dd12/2.3)	60.6

17 <u>Μεταβολίτης AAM_4</u>

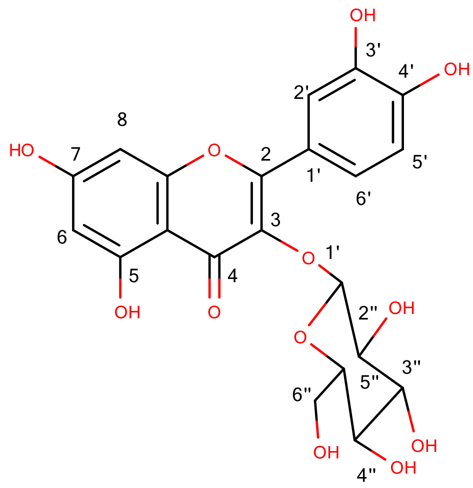
Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης ανήκει και αυτός στην κατηγορία των φλαβονοειδών και ταυτοποιήθηκε ως ο 3- *O*-γλυκοσίδης της κερκετίνης. Στο χρωματογράφημα TLC όπωε ήταν αναμενόμενο εμφάνισε απορρόφηση στα 254 και 365 nm και έπειτα παό ψεακσμό με σιάλυμα θεϊικής βανιλλίνης εμφάνσε καφέ χρώση.

Στο φάσμα 1H στην αρωματική περιοχή του φάσματος παρατηρούμε την ύπαρξη μιας διπλής κορυφής με J= 2.0Hz που αντιτοιχεί στο H2′ B δακτυλίου, μια διπλή διπλής κορυφή στα 7.6 ppm και μια διπλή κορυφή στα 6.88 ppm που αντιστοιχούν στα H-6′ και H-5′ αντίστοιχα. Οι τρείς αυτές κορυφές σχηματίζουν ένα a,b,x σύστημα χαρακτηριστικό τρισυποκατάστασης. Τα πρωτόνια του δακτλίου A συντονίζονται στα 6.4 και 6.2 ppm και εμφανίζονται ως απλές κορυφές με σταθερά σύζευξης *J=2.0Hz*. Αξίζει να σημειωθείπως παρατηρείται στην οξυγωνομένη περιοχή του φάσματος κορυφή ανωμερικού πρωτονίου γλυκόζης με ανωμερικό άνθρακα 104.3 χαρακτηριστικό *O*- γλυκοζυλίωσης. Ο μεθυλενικός άνθρακας της γλυκόζης συντονίζεται στα 62.4 ppm ενώ η θέση σύνδεσης του σακχάρου προσδιορίστηκε με τη βοήθεια φάσματος HMBS και ορίστηκε στη θέση 3 του φλαβονοειδούς.



Εικόνα 8-28 Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης AAM_4

Πίνακας 8-19 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAM_4



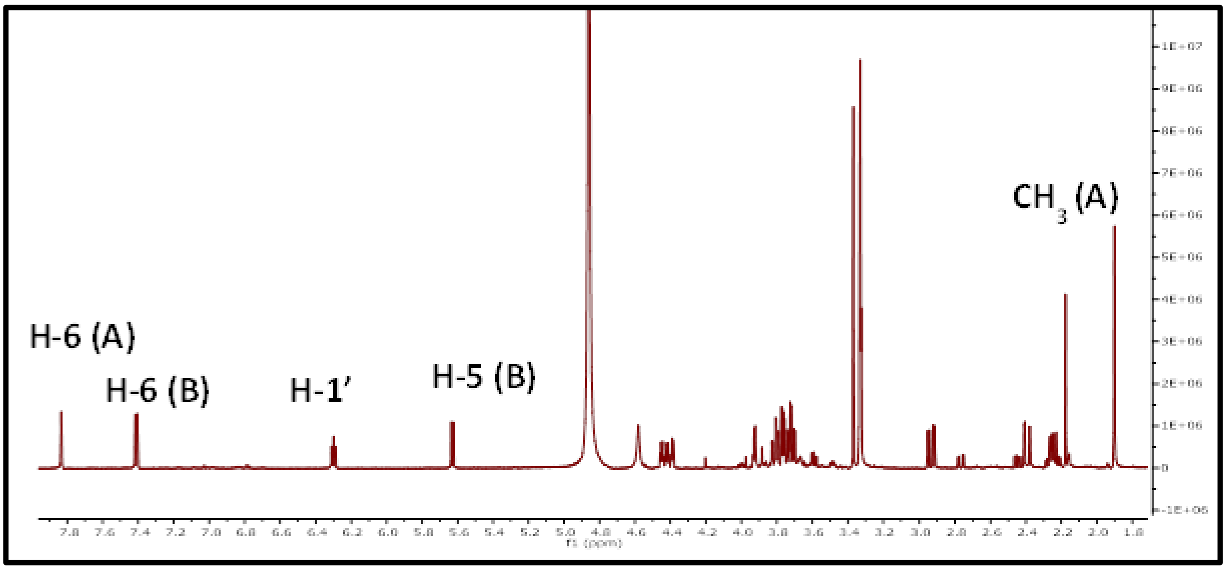
3- *O*-γλυκοσίδης της κερκετίνης

ΘΕΣΗ	**^{1}H NMR δ σε ppm (*J* σε Hz)**	**^{13} C NMR δ σε ppm**
1	-	-
2	-	158.4
3	-	135.5
4	-	179.8
5	-	162.8
6	6.20 (1H, d, 2.05)	99.9
7	-	166.6
8	6.39 (1H, d, 2.05)	94.7
9	-	158.9
10	-	105.5
1′	-	123.1
2′	7.72 (1H,d, 2.33)	117.4
3′	-	149.8
4′	-	145.8
5′	6.88 (1H, d, 8.5)	115.9
6′	7.6 (1H, dd 8,5/ 2.33)	123.0
	Glucose	
1′′	5.24 (1H,d, 7.6)	104.2
2′′	3.48 (1H, m)	75.7
3′′	3.42 (1H, m)	78.1
4′′	3.35 (1H, m)	71.2
5′′	3.22 (1H, m)	78.3
6′′a,b	3.58 (1H, dd, 12/5.4) 3.71 (1H, dd, 12/2.4)	62.5

18 Μεταβολίτες ΑΑΜ_11 και ΑΑΜ_12

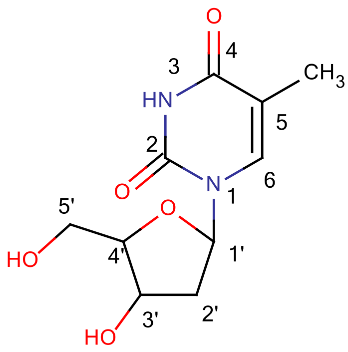
Στην περίπτωση αυτή ταυτοποιήθηκαν η θυμιδίνη και η ουρακίλη σε μίγμα. Στο φάσμα πρωτονίου το πρωτόνιο 6 της θυμιδίνης συντονίζεται στα 7.83ppm σηματίζοντας μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 2.3Hz. από το φάσμα HMBC παρατηρούμε τη σύζευξη με τους καρβονυλικούς άνθρακες 4 και 2 καθώς και με το μεθύλιο στη θέση 5. Αντίστοιχα στην περίπτωση της ουρακίλης, το πρωτόνιο 6 συντονίζεται στα 7.41 και παρουσιάζει σύζευξη με τον άνθακα της θέσης 5 καθώς και με τα καρβονύλια στις θέσεις 4 και 2.

Το ανωμερικό πρωτόνιο της θυμιδίνης συντονίζεται στα 6.30 ppm ενώ τα μεθυλένια της θέσης 5 στα 3.81 και 3.76 ppm. Τέλος, το μεθύλιο της θέσης 5 συντονίζεται στα 1.9 ppm ως απλή κορυφή που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια.

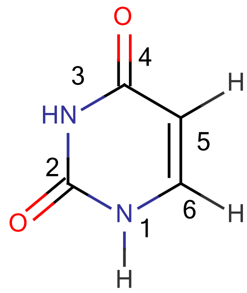


Εικόνα 8-29 Φάσμα 1H-NMR της ένωσης AAM11&AAM12

Πίνακας 8-20 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAM11&AAM12



Θυμιδίνη (A)

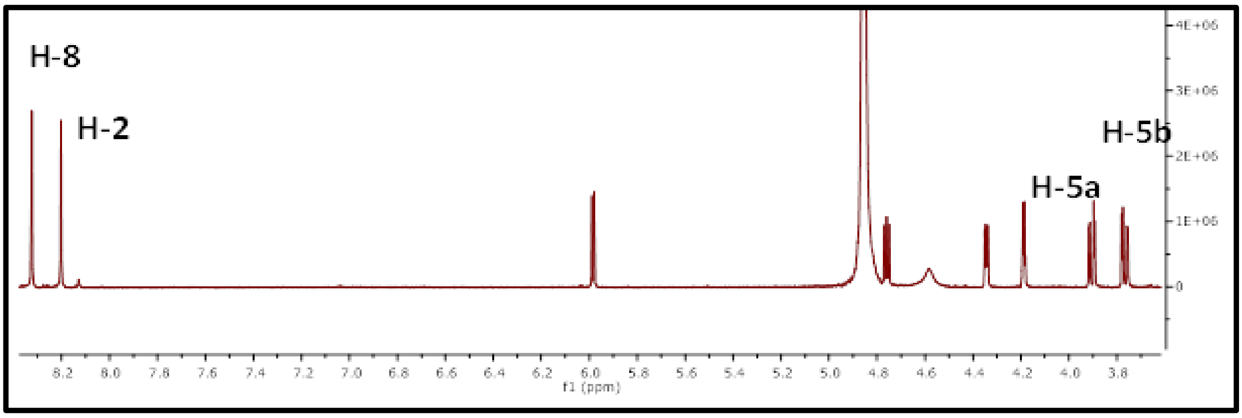


Ουρακίλη (B)

ΘΕΣΗ	**1H NMR** **δ σε ppm (J σε Hz)**	**13 C NMR** **δ σε ppm**	**1H NMR** **δ σε ppm (J σε Hz)**	**13 C NMR** **δ σε ppm**
1	-	-		-
2	-	152.3	-	153.6
3	-	-		-
4	-	166.3	-	167.3
5	-	111.4	5.63 (1H, d, 7.75)	101.7
6	7.83 (1H, d, 2.3)	138.5	7.41 (1H, d, 7.75)	143.5
7	1.90 (3H, s)	12.9	-	-
1′	6.30 (1H, t, 7.0)	86.5	-	-
2′	2.25 (2H, m)	41.2	-	-
3′	4.42 (1H, m)	72.3	-	-
4′	3.93 (1H, dd, 6.8 7/3.4)	88.8	-	-
5′a,b	3.81 (1H, dd, 12.0/3.4) 3.76 (1H, dd, 12.0/3.4)	62.8	**-**	**-**
5-CH_3	1.9 (3H, d, 2.3)		**-**	**-**

19 Μεταβολίτης AAM_14

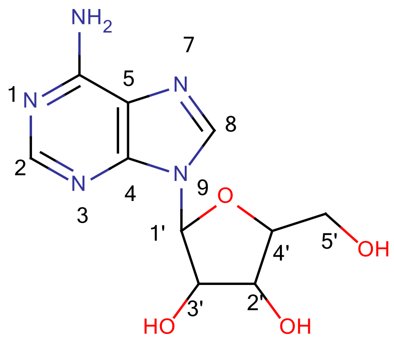
Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε ως αδενοσίνη και στο χρωματογράφημα TLC παρουσίασε έντονη απορρόφηση στα 254 nm και έπειτα από ψεκασμό με διάλυμα θεϊκής βανιλλίνης και θέρμανση εμφάνισε καφέ χρώση. Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές του μεταβολίτη.



Εικόνα 8-30 Φάσμα 1H-NMR της ένωσης AAM_14

Στα 8.2 και 8.33 παρατηρούνται δυο απλές κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2 H-8 αντίστοιχα. Η ριβόζη συνδέεται στη βάση με N-γλυκοσιδικό δεσμό και το ανωμερικό της πρωτόνιο συντονίζεται στα 5.98 ppm ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης *J*= 6.4Hz. Τα μεθυλένια της θέσης 5 εμφανίζονται σα δυο dd κορυφές σε δ 3.77 3.90. οι χημικές μετατοίσεις παρουσιάζονται στον Πίνακας 8-21.

Πίνακας 8-21 Φασματοσκοπικά δεδομένα 1H-NMR και 13C-NMR της ένωσης AAM_14



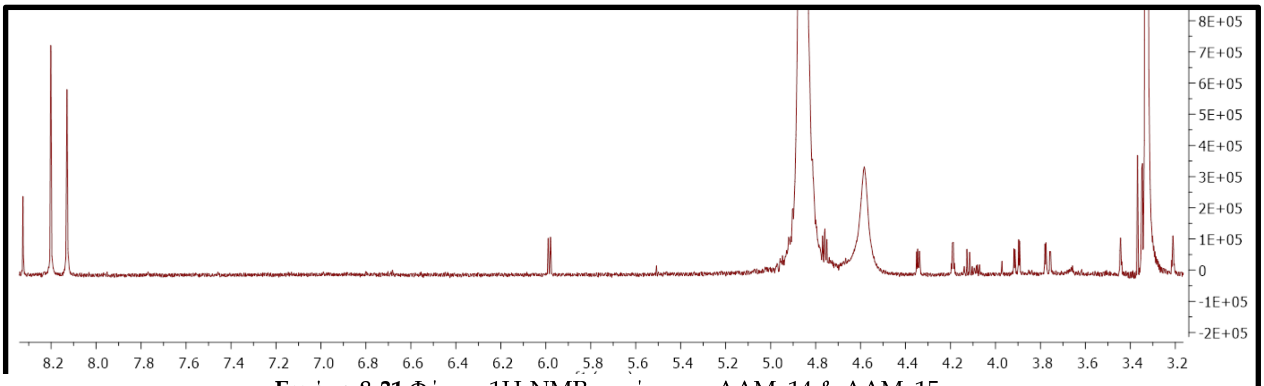
Αδενοσίνη

ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	-	
2	8.20 (1H, s)	153.24
3	-	-
4	-	149.9

5	-	121.0
6	-	-
7	-	-
8	8.33 (1H, s)	141.9
9	-	-
1'	5.98 (1H, d, 6.4)	91.2
2'	4.19 (1H, q, 5.21/2.6)	88.1
3'	4.76 (1H, dd, 6.4)	75.3
4'	4.33 (1H, m)	72.5
5'a,b	3.77 (1H , dd, 12.5/2.5) 3.90 (1H , dd, 12.5/2.5)	63.3

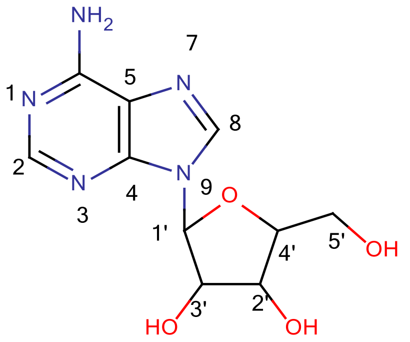
20 Μεταβολίτες AAM_14 ΚΑΙ AAM_15

Στην περίπτωση αυτή ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες αδενοσίνη και αδενίνη ως μίγμα. Ο μεταβολίτης αδενίνη αποτελέι τη βάση του μεταβολίτη αδενοσίνη και στο χρωματογράφημα TLC παρουσίασε απορρόφηση στα 254 nm αλλά μετά από ψεκασμό δεν εμφάνισε κάποια χρώση. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μετατοπίσεις και για του δυο μεταβολίτες.

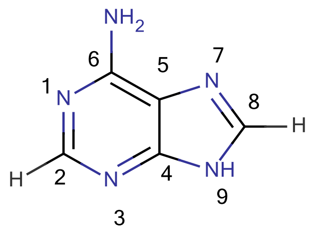


Εικόνα 8-31 Φάσμα 1H-NMR της ένωσης AAM_14 & AAM_15

Πίνακας 8-22 Φασματοσκοπικά δεδομένα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR της ένωσης AAM_14 & AAM_15



Αδενοσίνη



Αδενίνη

ΘΕΣΗ	1H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm	1H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	13 C NMR δ σε ppm
1	-		-	-
2	8.20 (1H, s)	153.2	8.20	152.4
3	-	-	-	-
4	-	149.9	-	152.3
5	-	121.0	-	118.6
6	-	-	-	155.3
7	-	-	-	-
8	8.33 (1H, s)	141.9	8.13	138.9
9	-	-	-	-
1′	5.98 (1H, d, 6.4)	91.2	-	-
2′	4.19 (1H, q, 5.21/2.6)	88.1	-	-
3′	4.76 (1H, dd, 6.4)	75.3	-	-
4′	4.33 (1H, m)	72.5	-	-
5′a,b	3.77 (1H , dd, 12.5/2.5) 3.90 (1H , dd, 12.5/2.5)	63.3	-	-

9 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αξιοποιώντας πληροφορίες από την εγχώρια λαϊκή θεραπευτική και τη διεθνή βιβλιογραφία, σε μια προσπάθεια ανάδειξης της ελληνικής χλωρίδας ως μια πλούσια πηγή βιοδραστικών προϊόντων, ασχοληθήκαμε με τη μελέτη ενός εδώδιμου ελληνικού φυτού, του αγριόπρασσου, *Allium ampeloprasum* με σκοπό την συσχέτισή του με την πρόληψη και την θεραπεία της οστεοπόρωσης.

Σκοπός μας ήταν η φυτοχημική μελέτη και η απομόνωση των κυριότερων δευτερογενών μεταβολιτών του και η μετέπειτα αξιολόγησή τους ως πιθανοί οστεοπροστατευτικοί παράγοντες.

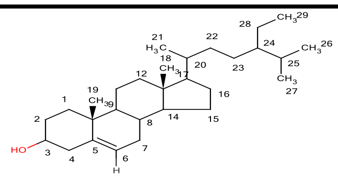
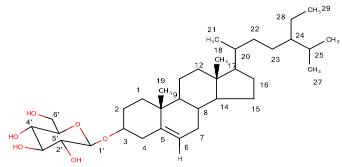
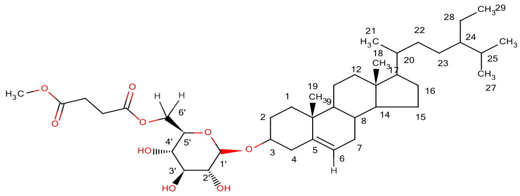
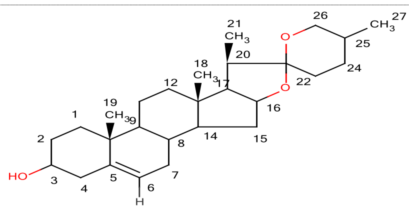
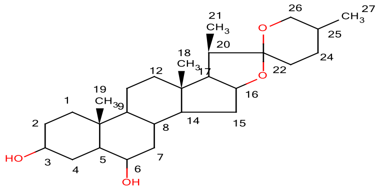
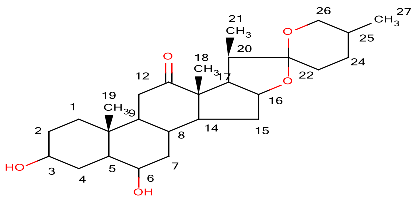
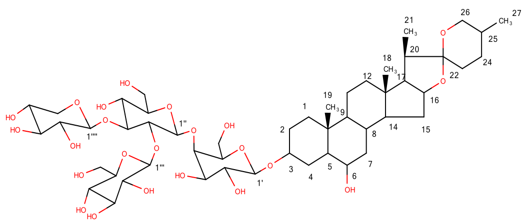
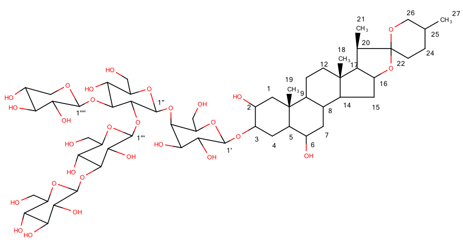
Αρχικά, παρασκευάστηκαν διαδοχικά εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστρέρα και μεθανόλης με χρήση της τεχνικής υπερήχων με σκοπό να απομονώσουμε όσο το δυνατόν περισσότερους μεταβολίτες διαφορετικών κατηγοριών. Τα εκχυλίσματα κλασματώθηκαν και στις δυο περιπτώσεις με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής ενώ τα κλάσματα που προέκυψαν επεξεργάστηκαν με τη χρήση διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών, όπως είναι η υγρή χρωματογραφία στήλης, η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

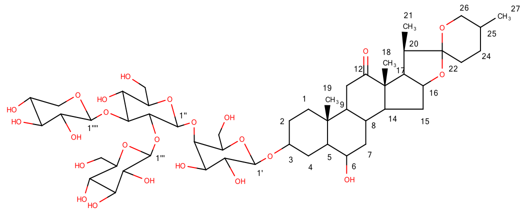
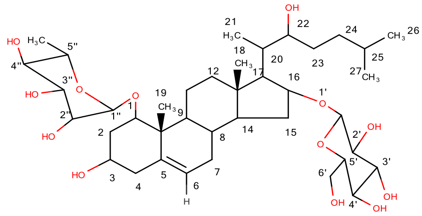
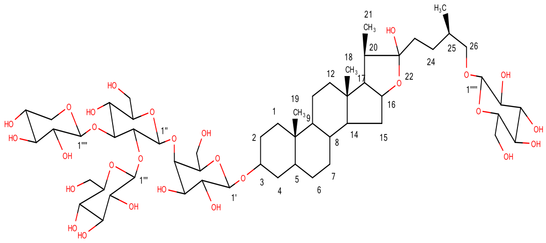
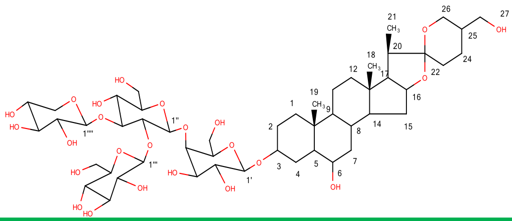
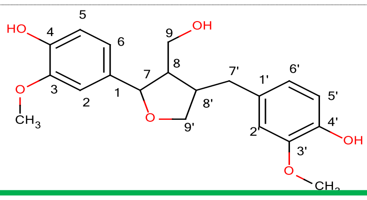
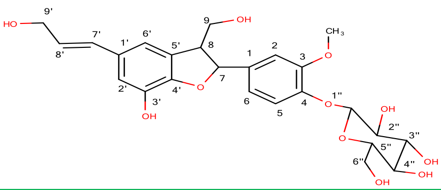
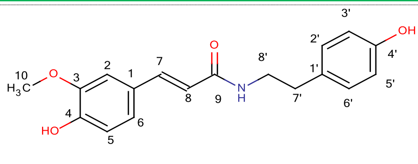
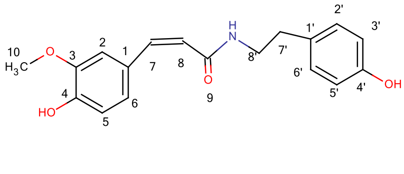
Από το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα ταυτοποιήθηκαν συνολικά 8 δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι απομονωμένες ουσίες ταυτοποιήθηκαν με χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών και ανήκουν στις εξής κατηγορίες: τερπένια και 2 γλυκοσιδικά παράγωγα (ΑΑΕ1, ΑΑΕ2, ΑΑΕ5), τρεις σαπωγενίνες (ΑΑΕ3, ΑΑΕ6), ένα λιγνάνιο (ΑΑΕ4) και δύο *cis*/*trans* παράγωγα κινναμωμικού οξέος (ΑΑΕ7, ΑΑΕ8) και λιπαρά οξέα και υδρογονάνθρακες.

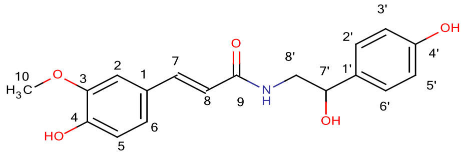
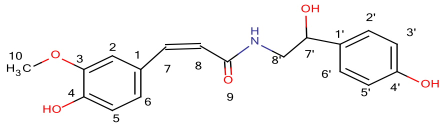
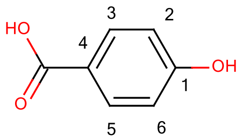
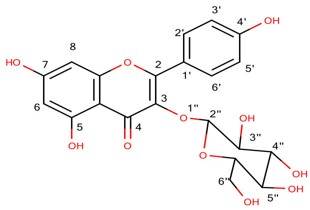
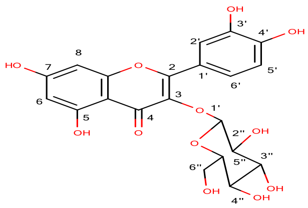
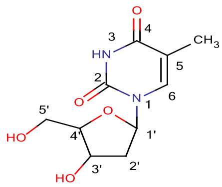
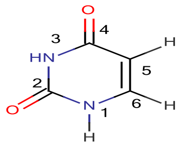
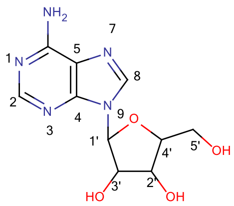
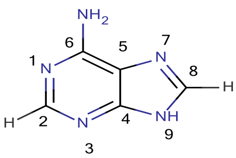
Από το μεθανολικό εκχύλισμα ταυτοποιήθηκαν συνολικά 15 μεταβολίτες οι οποίοι ανήκουν στις κατηγορίες των: φαινολικών οξέων (ΑΑΜ1), γλυκοσίδες φλαβονοειδών (ΑΑΜ3, ΑΑΜ4) σαπωγενινών (ΑΑΜ2), σαπωνινών (ΑΑΜ5, ΑΑΜ6, ΑΑΜ7, ΑΑΜ8, ΑΑΜ9, ΑΑΜ10), απλών αζωτούχων βάσεων (ΑΑΜ11, ΑΑΜ12, ΑΑΜ14, ΑΑΜ15) καθώς και διυδροβενζοφουρανίων (ΑΑΜ13).

Συνολικά λοιπόν απομονώθηκαν 23 μεταβολίτες. Η πλειοψηφία των μεταβολιτών έχει αναφερθεί στο γένος *Allium* εκτός από τους μεταβολίτες (ΑΑΜ5, ΑΑΜ6, ΑΑΜ9) που απομονώνονται πρώτη φορά από το είδος *ampeloprasum* ενώ οι μεταβολίτες (ΑΑΜ10 και ΑΑΜ13) με βάση τις βάσεις δεδομένων φυσικών προιόντων φαίνεται να αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα.

Πίνακας 9-1 Μεταβολίτες που απομονώθηκαν από το εκχύλισμα EtOAc και MeOH του *Allium ampeloprasum*

Απομονωμένοι μεταβολίτες			Πηγή προέλευσης	
Κωδικός	**Κοινόχρηστο όνομα**	**Δομή**	**Εκχύλισμα EtOAc**	**Εκχύλισμα MeOH**
AAE1	β-sitosterol		√	
AAE5	3- *O* -γλυκοσίδης της σιτοστερόλης		√	√
AAE2			√	
AAE3	Διοσγενίνη		√	
AAE6	β- χλωρογενίνη		√	
AAM2	12- κετοποριγενίνη			√
AAM6	Αγαμενοσίδης Β			√
AAM7	Αιαγιοσαπωνίνη Α			√

AAM8			√
AAM5			√
AAM9			√
AAM10			√
AAE4	Λαρισιρεσινόλη		√
AAM13			√
AAE7	N-*trans* –φερουλουλ-τυραμίνη		√
	N –*cis* -φερουλουλ-τυραμίνη		

AAE8	N-trans-φερουλουλοκταπαμινη N-cis-φερουλουλοκταπαμινη	 	√	
AAM1	π-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ			√
AAM3	3-O-γλυκοσίδης της καιμφερόλης			√
AAM4	3- O-γλυκοσίδης της κερκετίνης			√
AAM11 & AAM12	Θυμιδίνη & Ουρακίλη	 		√
AAM14 & AAM15	Αδενοσίνη & Αδενίνη	 		√

Τέλος, μελλοντικό στόχο αποτελεί η ολοκλήρωση της φυτοχημικής μελέτης του *Allium ampeloprasum* και η βιολογική αξιολόγηση των απομονωμένων ουσιών ως προς την οιστρογονική αλλά κυρίως την οστεοπροστατευτική τους δράση.

[1] Τσαμέτης Χ.Π., Ηλιάδου Π.Κ., Γουλής, Δ.Γ., Παπαδήμας Ι., Μπόντης Ι., "Μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση : θεραπευτική αντιμετώπιση," *Ελληνική Μαιευτική & Γυναικολογία*", vol. 19, no. 2, pp. 180–190, 2007.

[2] Jeong J.C., Lee B.T., Yoon C.H., Kim H.M., Kim C.H., "Effects of *Drynariae rhizoma* on the proliferation of human bone cells and the immunomodulatory activity," *Pharmacol Res.* vol. 51, no. 2, pp. 125–136, 2005.

[3] Jeong J.C., Lee J.W., Yoon C.H., Kim H.M., Kim C.H., "*Drynariae Rhizoma* promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells through regulation of bone morphogenetic protein-2 , alkaline phosphatase , type I collagen and collagenase-1," *Toxicol In Vitro.*, vol. 18, no. 6, pp. 829–834, 2004.

[4] Suh K.S., Koh G., Park C.Y., Woo J.T., Kim S.W., Kim J.W,. Park I.K., Kim Y.S., "Soybean isoflavones inhibit tumor necrosis factor- a - induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E 2 in osteoblastic cells," *Phytochemistry*, vol. 63, no. 2, pp. 209–215, 2003.

[5] Duncan A.M., Phipps W.R., Kurzer M.S., "Phyto-oestrogens," *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab., vol.* 17, no. 2, pp. 253–271, 2003.

[6] Viereck V., Gründker C., Friess S.C., Frosch K.H., Raddatz D., Schoppet M., Nisslein T., Emons G., Hofbauer L.C., "Isopropanolic extract of black cohosh stimulates osteoprotegerin production by human osteoblasts.," *J Bone Miner Res*, vol. 20, no. 11, pp. 2036–2043, 2005.

[7] Kim C., Ha H., Lee J.H., Kim J.S., Song K., Park S.W., "Herbal extract prevents bone loss in ovariectomized rats," *Arch Pharm Res.*, vol. 26, no. 11, pp. 917–924, 2003.

[8] Dontas I., Halabalaki M., Moutsatsou P., Mitakou S., Papoutsi Z., Khaldi L., Galanos A., Lyritis G.P., "Protective effect of plant extract from *Onobrychis ebenoides* on ovariectomy -induced bone loss in rats," *Maturitas*, vol. 53, no. 2, pp. 234–242, 2006.

[9] Senthilkumar K., Venkatesan J., and Kim S.K., "Marine derived natural products for osteoporosis," *Biomed. Prev. Nutr.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–7, 2014.

[10] Moreira A.C.,. Silva A.M,. Santos M.S, Sardão V.A., "Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause : What is real , what is unknown," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 143, pp. 61–71, 2014.

[11] "Συστηματική Σπερματίφυτων" http://www.env.upatras.gr/files/announcements/1402002061_file_1.pdf.

[12] Song L., "Chorology of Liliaceae (S. Str.) and Its Bearing on the Chinese Flora," *Acta Phytotaxon. Sin.*, vol. 33, no. 1, pp. 27–51, 1995.

[13] Καραβοκύρου Ε., "Μελέτη του φυτικού γένους Allium στην ανατολική Ελλάδα", [Διδακτορική Διατριβή], Πάτρα, Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 1994.

[14] Fritsch R.M., Friesen N., "Chapter 1: Evolution, Domestication and Taxonomy," in *Allium crop science: recent advances*, ed. Rabinowitch, H.D., Currah. L. (Wallingford, UK: CABI publishing), pp. 5–30, 2002.

[15] Fenwick G.R., Hanley A.B., Whitaker J. R., "The genus *allium* – part 1," *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 22, no. 3, pp. 199–271, 1985.

[16] "Διεθνής Σύμβαση CITES – LILIACEAE (Λειριοειδή)," pp. 1–36.

[17] Tzanoudakis D., Vosa C.G., "The cytogeographical distribution pattern of *Allium* (Alliaceae) in the Greek Peninsula and Islands," *Plant Syst. Evol.*, vol. 159, no. 3–4, pp. 193–215, 1988.

[18] Bernaert N.,. De Clercq H, Van Bockstaele E., De Loose M., Van Droogenbroeck B., "Antioxidant changes during postharvest processing and storage of leek (*Allium ampeloprasum var. porrum*)," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 86, pp. 8–16, 2013.

[19] Monemi M.B., Kazemitabar S.K., Khaniki G.B., Yasari E., Sohrevardi F., Pourbagher R., "Tissue Culture Study of The Medicinal Plant Leek (*Allium Ampeloprasum L*)," *Int J Mol Cell Med,* vol. 3, no. 1, pp. 118–1258, 2014.

[20] Hirschegger P., Jakse J., Trontelj P., Bohanec B., "Origins of *Allium ampeloprasum* horticultural groups and a molecular phylogeny of the section *Allium* (*Allium*: Alliaceae)," *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 54, no. 2, pp. 488–497, 2010.

[21] Garcia-Herrera P., Morales P., Fernndez-Ruiz V., Sanchez-Mata M.C., Camara M., Carvalho A.M., Ferreira I.C.F.R., Pardo-de-Santayana M., Molina M., Tardio J., "Nutrients, phytochemicals and antioxidant activity in wild populations of *Allium ampeloprasum L.*, a valuable underutilized vegetable," *Food Res. Int.*, vol. 62, pp. 272–279, 2014.

[22] Rensheng X., Yang Y., Weimin Z., *Introduction to Natural Products Chemistry*. USA, Taylor & Francis Group, CRC Press, 2011.

[23] Pontin M., Bottini R., Luis, Piccoli P., "Phytochemistry *Allium sativum* produces terpenes with fungistatic J. properties in response to infection with *Sclerotium cepivorum*," *Phytochemistry*, vol. 115, pp. 152–160, 2015.

[24] Hostettmann K., Hostettmann M. Marston A. , "Saponins," *Methods in Plant Biochem.*, vol. 7, pp. 435–471, 1991.

[25] Lanzotti V., "The analysis of onion and garlic," *J. Chromatogr. A*, vol. 1112, no. 1–2, pp. 3–22, 2006.

[26] Sobolewska D., Michalska K., Podolak I., Grabowska K., "Steroidal saponins from the genus *Allium*," *Phytochem. Rev.*, vol. 15, pp. 1-35, 2014.

[27] Lanzotti V., "Bioactive polar natural compounds from garlic and onions," vol. 11, no.2 pp. 179–196, 2012.

[28] K. Yoshida, K. Oyama, and T. Kondo, "Chemistry of Flavonoids in Color," vol. 3, .

[29] Soininen T.H., Jukarainen N., Auriola S.O., Julkunen-Tiitto R., Karjalainen R., Vepsäläinen J.J., "Quantitative metabolite profiling of edible onion species by NMR and HPLC – MS," *Food Chem.*, vol. 165, pp. 499–505, 2014.

[30] Carotenuto A., Fattorusso E., Lanzotti V., Magno S., De Feo V., Cicala C., "The flavonoids of *Allium neapolitanum*," *Phytochemistry*, vol. 44, no. 5, pp. 949–957, 1997.

[31] Fattorusso E., Lanzotti V., Taglialatela-scafati O., Cicala C., "The flavonoids of leek , *Allium porrum*," *Phytochemistry*, vol. 57, no. 4, pp. 565–569, 2001.

[32] Carotenuto A., De Feo V., Fattorusso E., Lanzotti V., Magno S., Cicala C., "The flavonoids of *Allium ursinu*m," *Phytochemistry*, vol. 41, no. 2, pp. 531–536, 1996.

[33] Fenwick G.R., Hanley A.B., J. R. Whitaker, G. R. Fenwick, "The genus *allium* . Part 2," *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 22, no. 4, pp. 273-377, 1985.

[34] Τσιαγκάνης Μιχάλης, "Μελέτη τάξεων των λιπιδίων εδώδιμων φυτών του γένους Allium", [Διδακτορική Διατριβή], Αθήνα, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Τομέας ΙΙ: Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων, 2005.

[35] Block E., Naganathan S., Putman D., Zhao S.H., "*Allium* Chemistry - Hplc Analysis of Thiosulfinates From Onion, Garlic, Wild Garlic (Ramsoms), Leek, Scallion, Shallot, Elephant (Great-Headed) Garlic, Chive, and Chinese Chive - Uniquely High Allyl To Methyl Ratios in Some Garlic Samples," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 40, no. 12, pp. 2418–2430, 1992.

[36] Dey P., Khaled K.L., "An Extensive Review on *Allium ampeloprasum* A Magical Herb," *International Journal of Science and Research (IJSR)*, vol. 4, no. 7, pp. 371–377, 2015.

[37] García-Herrera P. , Morales P., Fernández-Ruiz V., Sánchez-Mata M.C., Cámara M. Carvalho A.M., Ferreira I.C.F.R., Pardo-de-Santayana M., Molina M. Tardio J., "Nutrients, phytochemicals and antioxidant activity in wild populations of *Allium ampeloprasum L.*, a valuable underutilized vegetable," *Food Research International,* vol. 62,

pp 272-279, 2014
[38] Sata N., Matsunaga S., Fusetani N., Nishikawa H., Takamura S., Saito T., "New Antifungal and Cytotoxic Steroidal Saponins from the Bulbs of an Elephat Garlic Mutant," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 62, no. 10, pp. 1904–1911, 1998.
[39] Adão C.R, da Silva B.P., Parente J.P., "A new steroidal saponin with antiinflammatory and antiulcerogenic properties from the bulbs of *Allium ampeloprasum var. porrum*," *Fitoterapia*, vol. 82, no. 8, pp. 1175–1180, 2011.
[40] Adão C.R, da Silva B.P., Parente J.P, "A new steroidal saponin from *Allium ampeloprasum var . porrum* with antiinflammatory and gastroprotective effects," *Phytochemistry Letters,* vol. 4, no.3, pp. 306–310, 2011.
[41] Acharya C. CHOUBEY A., ACHARYA M., "Biologically Active Saponin from Seeds of *Allium Ampeloprasum*," *Chemistry and Materials Research,* vol. 3, no. 6, 2013.
[42] Bernaert N., Wouters D., De Vuyst L., De Paepe D., De Clercq H. Van Bockstaele E., De Loose M., Van Droogenbroeck B., "Antioxidant changes of leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) during spontaneous fermentation of the white shaft and green leaves," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 93, no. 9, pp. 2146–2153, 2013.
[43] Bernaert N., "Valorisation of leek leaves (*Allium ampeloprasum var . porrum*)," *Institute for Agricultural and Fisheries Research*, 2014.
[44] Sadeghi M., Zolfaghari B., Senatore M., Lanzotti V., "Antifungal cinnamic acid derivatives from Persian leek (*Allium ampeloprasum Subsp. Persicum*)," *Phytochem. Lett.*, vol. 6, no. 3, pp. 360–363, 2013.
[45] Malafaia C.R., da Silva B.P., Tinoco L.W., Parente J.P., "Structural characterization and gastroprotective property of a novel glucofructan from *Allium ampeloprasum var . porrum*," *Carbohydr. Res.*, vol. 402, pp. 44–49, 2015.
[46] Dioscorides, P., Osbaldeston, T. A., & Wood, R. P., *De materia medica: Being an herbal with many other medicinal materials: written in Greek in the first century of the common era : a new indexed version in modern English*. Johannesburg, IBIDIS, 2000.
[47] Rassi C.M., Lieberherr M., Chaumaz G., Pointillart A., Cournot G., "Modulation of osteoclastogenesis in porcine bone marrow cultures by quercetin and rutin," *Cell Tissue Res.*, vol. 319, no. 3, pp. 383–393, 2005.
[48] Wattel A., Kamel S., Mentaverri R., Lorget F., Prouillet C., Petit J.P., Fardelonne P., Brazier M., "Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption," vol. 65, no. 1, pp. 35–42, 2003.
[49] Tsuji M., Yamamoto H., Sato T., Mizuha Y., Kawai Y., Taketani Y., Kato S., Terao J., Inakuma T., Takeda E., "Dietary quercetin inhibits bone loss without effect on the uterus in ovariectomized mice,"vol. 27, no. 6, pp. 673–681, 2009.
[50] Horcajada-Molteni M.N., Crespy V., Coxam V., Davicco M.J., Rémésy C., Barlet J.P., "Rutin Inhibits Ovariectomy-Induced Osteopenia in Rats," *J Bone Miner Res.*, vol. 15, no. 11, pp. 2251–2258, 2000.
[51] Mukherjee M., Das A.S., Mitra S., Mitra C., "Prevention of Bone Loss by Oil Extract of Garlic (*Allium sativum Linn* .) in an Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis," *Phytother Res.*, vol. 18, no. 5, pp. 389–394, 2004.
[52] Mukherjee M., Das A.S., Das D., Mukherjee S., Mitra S., Mitra C., "Role of oil extract of garlic (*Allium sativum Linn.*) on intestinal transference of calcium and its possible correlation with preservation of skeletal health in an ovariectomized rat model of osteoporosis.," *Phytother Res.*, vol. 20, no. 5, pp. 408–415, 2006.
[53] Oliveira T., Figueiredo C.A., Brito C., Stavroullakis A., Ferreira A.C., Nogueira-Filho G., Prakki A., "*Allium cepa L.* and Quercetin Inhibit RANKL/Porphyromonas gingivalis LPS-Induced Osteoclastogenesis by Downregulating NF-κB Signaling Pathway.," *Evid Based Complement Alternat Med.,* vol. 2015, 11 pages, 2015.
[54] Wetli H.A., Brenneisen R., Tschudi I., Langos M., Bigler P., Sprang T., Schürch S.,

Mühlbauer R.C., "A gamma-glutamyl peptide isolated from onion (*Allium cepa L.*) by bioassay-guided fractionation inhibits resorption activity of osteoclasts." *J Agric Food Chem.*, vol. 53, no. 9, pp. 3408–3414, 2005.

[55] Karamian R., Hosseini D.A., "Screening of Total Phenol and Flavonoid Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of the Methanolic Extract of *Allium Ampeloprasum L.* (Alliaceae) from Iran," *J. Sci. Kharazmi University,* vol. 14, no. 3, pp. 225-238, 2014.

[56] Bernaert N., De Paepe D., Bouten C., De Clercq H., Stewart D., Van Bockstaele E., De Loose M., Van Droogenbroeck B., "Antioxidant capacity, total phenolic and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (*Allium ampeloprasum var. porrum*)," *Food Chem.*, vol. 134, no. 2, pp. 669–677, 2012.

[57] Jaffat H.S., Nassir A.S., Hassan A.B., "Protective Effect of *Allium Ampeloprasum* Against Toxicity Induced by CCL4 in Male White Rats," *International Journal of Scientific & Engineering Research,* vol. 5, no. 10, pp. 10–13, 2014.

[58] Roghani M., Mahbobeh A., "The effect of Allium ampeloprasum on nociceptive response intensity in diabetic rats," *J Gorgan Uni Med Sci,* vol. 9, no. 3, pp. 10-14, 2007.

[59] Huang Z., Ren J., "Antibacterial activity of elephant garlic and its effect against U2OS human osteosarcoma cells," *Iran. J. Basic Med. Sci.*, vol. 16, no. 10, pp. 1088–1094, 2013.

[60] Elshenawy S., Yassin N., Badary O.A., EL-Moneem M.A., Al-shafeiy H.M, "Study of the effect of *Allium porrum* on osteoporosis induced in rats," *Der Pharmacia Lettre*, vol. 5, no. 1, pp. 188–198, 2013.

[61] L. L. Pierre and M. N. Moses, "Isolation and Characterisation of Stigmasterol and Β -Sitosterol from *Odontonema Strictum* (Acanthaceae)." *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences,* vol. 2, no. 1, pp. 88-95, 2015

[62] Bulama J.S., Dangoggo S.M., Mathias S.N., "Isolation and Characterization of Beta-Sitosterol from ethyl acetate extract of root bark of Terminalia," *International Journal of Scientific and Research Publications*, vol. 5, no. 3, pp. 8–10, 2015.

[63] Tada Y.,. Kanda N, Haratake A., Tobiishi M., Uchiwa H., Watanabe S., "Novel effects of diosgenin on skin aging," *Steroids*, vol. 74, no. 6, pp. 504–511, 2009.

[64] Chang C.C., Kuan T.C., Hsieh Y.Y., Ho Y.J., Sun Y.L., Lin C.S., "Effects of diosgenin on myometrial matrix metalloproteinase-2 and -9 activity and expression in ovariectomized rats.," *Int J Biol Sci.*, vol. 7, no. 6, pp. 837-847, 2011.

[65] Chen P. S., Shih Y.W., Huang H.C., Cheng H.W., "Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer PC-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression," *PLoS One*, vol. 6, no. 5, pp. 1–10, 2011.

[66] Folwarczna J., Zych M., Nowińska B., Pytlik M., Bialik M., Jagusiak A., Lipecka-Karcz M., Matysiak M., "Effect of diosgenin, a steroidal sapogenin, on the rat skeletal system," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 63, no. 2, pp. 287–295, 2016.

[67] Maisashvili M.R., Eristavi L.I., Gvazava L. N., Gugunishvili D.M., "Steroidal sapogenins from *Allium rotundum*," *Chem. Nat. Compd.*, vol. 43, no. 6, pp. 756–757, 2007.

[68] Milder I.E., Arts I.C., van de Putte B., Venema D.P., Hollman P.C., "Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol.," *Br. J. Nutr.*, vol. 93, no. 3, pp. 393–402, 2005.

[69] Kucukboyaci N., Orhan I., Sener B., Nawaz S.A., Choudhary M.I., "Assessment of Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activities of Lignans from *Taxus baccata L* .," *Z Naturforsch C.*, vol 65, no. 3-4, pp. 187-194, 2010.

[70] Hwang B., Cho J., Hwang I., Jin H.G., Woo E.R.., Gun D.G., "Biochemical and Biophysical Research Communications Antifungal activity of lariciresinol derived from *Sambucus williamsii* and their membrane-active mechanisms in *Candida albicans*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 410, no. 3, pp. 489–493, 2011.

[71] Alphonse P.A.S., Aluko R.E., "Anti - carcinogenic and anti - metastatic effects of flax seed

lignan secolariciresinol diglucoside (SDG)," *Discovery Phytomedicine,* vol. 2, pp. 12-17, 2015.

[72] Mofiz Uddin Khan N.M., Sagar Hossain Md., "Scopoletin and β -sitosterol glucoside from roots of *Ipomoea digitata*," *J. Pharmacogn. Phytochem.*, vol. 4, no. 2, pp. 5–7, 2015.

[73] K. Rahman and G. M. Lowe, "Significance of Garlic and Its Constituents in Cancer and Cardiovascular Disease" *J. Nutr*, vol. 136, pp. 736–740, 2006.

[74] Carotenuto A., Fattorusso E., Lanzotti V., Magno S., "Spirostanol saponins of *Allium porrum L*.," *Phytochemistry*, vol. 51, no. 8, pp. 1077–1082, 1999.

[75] Shyam K.G., "Sebum Control Compositions Based on Saponins and Sapogenins," *Patent Application Publication U.S*, Pub. No.: US 2007/0041924 A1, 2007.

[76] Park J.B., "Isolation and characterization of N-feruloyltyramine as the p-selectin expression suppressor from garlic (*Allium sativum*)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 19, pp. 8868–8872, 2009.

[77] Sadeghi M., Zolfaghari B., Senatore M., Lanzotti V., "Antifungal cinnamic acid derivatives from Persian leek (*Allium ampeloprasum Subsp. Persicum*)," *Phytochem. Lett.*, vol. 6, no. 3, pp. 360–363, 2013.

[78] Al-Taweel A. M., Perveen S., El-Shafae A.M.,. Fawzy G.A, Malik A., Afza N., Iqbal L., Latif M., "Antifungal cinnamic acid derivatives from Persian leek (*Allium ampeloprasum Subsp. Persicum*)," *Molecules*, vol. 17, no. 3, pp. 2675–2682, 2012.

[79] Min Y.D., Choi S.U., Lee K.R., "Aporphine alkaloids and their reversal activity of multidrug resistance (MDR) from the stems and rhizomes of S*inomenium acutum*.," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 29, no. 8, pp. 627–632, 2006.

[80] Efdi M., Ohguchi K., Akao Y., Nozawa Y., Koketsu M., Ishihara H., "N-trans-feruloyltyramine as a melanin biosynthesis inhibitor.," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 30, no. 10, pp. 1972–1974, 2007.

[81] Schmidt J.S., Nyberg N.T., Staerk D., "Assessment of constituents in *Allium* by multivariate data analysis, high-resolution α-glucosidase inhibition assay and HPLC-SPE-NMR," *Food Chem.*, vol. 161, pp. 192–198, 2014.

[82] Ichikawa M., Ryu K., Yoshida J., Ide N., Kodera Y., Sasaoka T., Rosen RT., "Identification of Six Phenylpropanoids from Garlic Skin as Major Antioxidants," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 25, pp. 7313–7317, 2003.

[83] Wu Y., Wu Z.R., Chen P., Yang-Li, Deng W.R., Wang Y.Q., Li H.Y., "Effect of the tyrosinase inhibitor (S)-N-trans-feruloyloctopamine from garlic skin on tyrosinase gene expression and melanine accumulation in melanoma cells," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 25, no. 7, pp. 1476–1478, 2015.

[84] . Fattorusso E, Lanzotti V., Magno S., Taglialatela-scafati O.,"Sapogenins of *Allium porrum L*.," *J. Agric. Food Chem*.,vol. 46, no. 16, pp. 4904–4908, 1998.

[85] Calderón-Montaño J.M., Burgos-Morón E., Pérez-Guerrero C., López-Lázaro M., "A review on the dietary flavonoid kaempferol.," *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 11, no. 4, pp. 298–344, 2011.

[86] Choi J., Kang H.J., Kim S.Z., Kwon T.O., Jeong S.I., Jang S.I., "Antioxidant effect of astragalin isolated from the leaves of *Morus alba L*. against free radical-induced oxidative hemolysis of human red blood cells," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 36, no. 7, pp. 912–917, 2013.

[87] Wang Y., Tang C., Zhang H., "Hepatoprotective effects of kaempferol 3-*O*-rutinoside and kaempferol 3-*O*-glucoside from *Carthamus tinctorius L.* on CCl4-induced oxidative liver injury in mice," *J. Food Drug Anal.*, vol. 23, no. 2, pp. 310–317, 2015.

[88] Mskhiladze L., Chincharadze D., Tits M., Wauters J., Bellahcène A., Castronovo V., Mouithys-mickalad A., Franck T., Frédérich M., "Identification of Cytotoxic and Antioxidant Compounds from *Allium gramineum* Flowers," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, vol. 7, no. 1, pp. 78–82, 2015.

[89] Liu H., Mou Y., Zhao J., Wang J., Zhou L., Wang M., Wang D., Han J., Yu Z., Yang F.,

"Flavonoids from halostachys caspica and their antimicrobial and antioxidant activities," *Molecules*, vol. 15, no. 11, pp. 7933–7945, 2010.

[90] Orfali Gd., Duarte A.C., Bonadio V., Martinez N.P., de Araújo M.E., Priviero F.B., Carvalho P.O., Priolli D.G., "Review of anticancer mechanisms of isoquercitin.," *World J. Clin. Oncol.*, vol. 7, no. 2, pp. 189–99, 2016.

[91] Olthof M.R., Hollman Peter. C.H., Vree T.B., Katan M.B., "Bioavailabilities of Quercetin-3- Glucoside Do Not Differ in Humans," *J. Nutr.*, vol. 2, no. 5, pp. 1200–1203, 2000.

[92] Bai H., Li W., Zhao H., Anzai Y., Li H., Guo H., Kato F., Koike K., "Isolation and structural elucidation of novel cholestane glycosides and spirostane saponins from *Polygonatum odoratum*," *Steroids*, vol. 80, pp. 7–14, 2014.

[93] Mimaki Y., Kuroda M., Yokosuka A., Sashida Y., "Five new polyoxygenated cholestane bisdesmosides from the bulbs of *Galtonia candicans*," *J. Nat. Prod.*, vol. 64, no. 8, pp. 1069–1072, 2001.

[94] Mimaki Y., Ishibashi N., Ori K., Sashida Y., "Steroidal glycosides from the bulbs of *Lilium dauricum*.," *Phytochemistry*, vol. 31, no. 5, pp. 1753–1758, 1992.

[95] Mimaki Y., Kawashima K., Kanmoto T., Sashida Y., "Steroidal glycosides from *Allium albopilosum* and *A. ostrowskianum*," *Phytochemistry*, vol. 34, no. 3, pp. 799–805, 1993.

[96] Fattorusso E., Lanzotti V., Taglialatela-Scafati O., Di Rosa M., Ianaro A., "Cytotoxic saponins from bulbs of *Allium porrum L.*," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, no. 8, pp. 3455–3462, 2000.

[97] Yahara S., Ura T., Sakamoto C., Nohara T., "Steroidal glycosides from *Capsicum annuum*," *Phytochemistry*, vol. 37, no. 3, pp. 831–835, 1994.

[98] Ahmad V.U., Basha A., "Chapter 344: Proto-Degalactotigonin," in *Spectroscopic Data of Steroid Glycosides: Stigmastanes, Furostanes, Spirtostanes*. ed. Ahmad V.U., Basha A., (Springer US), vol. 2, pp. 1054–1055, 2007.

[99] Omar S. H., Al-Wabel N.A., "Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer," *Saudi Pharm. J.*, vol. 18, no. 1, pp. 51–58, 2010.

[100] Cho J.Y., Baik K.U., Yoo E.S., Yoshikawa K., Park M.H., "*In vitro* antiinflammatory effects of neolignan woorenosides from the rhizomes of *Coptis japonica*," *J. Nat. Prod.*, vol. 63, no. 9, pp. 1205–1209, 2000.

[101] Tung N.H., Ding Y., Choi E.M., Minh C.V., Kim Y.H., "New neolignan component from *Camellia amplexicaulis* and effects on osteoblast differentiation.," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*., vol. 57, no. 1, pp. 65–68, 2009.

[102] Zhang Z., Tudi T., Liu Y., Zhou S., Feng N., Yang Y., Tang C., Tang Q., Zhang J., "Preparative isolation of cordycepin, N6-(2-hydroxyethyl)-adenosine and adenosine from *Cordyceps militaris* by macroporous resin and purification by recycling high-speed counter-current chromatography," *J. Chromatogr. B*, vol. 1033, pp. 218–225, 2016.

[103] Mohamed T. A., Shabaan I. A., Zoghaib W. M., Husband J., Farag R.S., Alajhaz Abd El-Nasser M.A., "Tautomerism, normal coordinate analysis, vibrational assignments, calculated IR, Raman and NMR spectra of adenine," *J. Mol. Struct.*, vol. 938, no. 1–3, pp. 263–276, 2009.