

εланнікн днмократіа Εдνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αдηνών

Φυτοχημική μελέτη και αποτίμηση της βιολογικής δράσης του χυμού του *Citrus bergamia* (Κεφαλονιάς)

#### ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων»

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**Τσιοκάνου Ευαγγελία,** Φαρμακοποιός **Αθήνα 2017**  Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών Τμήμα Φαρμακευτικής Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

#### Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα:

Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

Τίτλος Εργασίας:

**Φοιτήτρια:** Τσιοκάνου Ευαγγελία Φαρμακοποιός

#### Επιβλέπων Καθηγητής:

Επίκουρος Καθηγητής κ. Νικόλας Φωκιαλάκης

### Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Καθηγητής κ. Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Νεκτάριος Αληγιάννης Επίκουρος Καθηγητής κ. Νικόλας Φωκιαλάκης

# Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του τμήματος Φαρμακευτικής Αθηνών, στα πλαίσια της ολοκλήρωσης των μεταπτυχιακών σπουδών.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

- Τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, το Διευθυντή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλα Φωκιαλάκη, οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διπλωματική εργασία.
- Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλα Φωκιαλάκη που δέχτηκε να συνεργαστεί μαζί μου, για την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για το γενικότερο ενδιαφέρον και στήριξη στα επόμενα βήματα της ερευνητικής μου πορείας.
- Το Δρ. Νικόλαο Τσαφαντάκη για τη βοήθειά του, την υπομονή του, τη στήριξη του και την καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, τις πολύτιμες συμβουλές του και την άριστη συνεργασία που είχαμε.
- Την Κατερίνα Γεωργουσάκη και την Σταυρούλα Μαμούχα για την εκτέλεση των βιοδοκιμών.
- Τη Δρ. Ειρήνη Μπαΐρα για τη λήψη φασμάτων LC-HRMS και μάζας.
- Τον μεταπτυχιακό και φίλο μου, Νίκο Κατσίνα, για την άψογη συνεργασία και την στήριξη που μου παρείχε σε καθημερινή βάση.
- Όλο το προσωπικό του εργαστηρίου, τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές, για το υπέροχο κλίμα συνεργασίας.
- Τα υπέροχα κορίτσια που γνώρισα κατά την διάρκεια του μεταπτυχιακού, για την στήριξη και συμπαράσταση τους καθημερινά κυρίως σε αυτό το καινούργιο βήμα της ζωής μου.
- Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου που πάντα με στηρίζει σε όλα μου τα βήματα, αλλά και τους στενούς μου φίλους, για την υπομονή τους και την συμπαράσταση τους σε κάθε περίοδο της ζωής μου.

# Περιεχόμενα

Α' μέι	ρος : Εισαγωγή	14
Α.	Ταξινόμηση και μορφολογικά χαρακτηριστικά	15
в.	Δρογοϊστορία	18
С.	Χημική σύσταση	19
1	Ι. Φαινολικά παράγωγα	19
	a. Φλαβονοειδή	19
	b. Κουμαρίνες και φουρανοκουμαρίνες	
2	2. Τερπενοειδή	25
	<ul> <li>Μονοτερπένια</li> </ul>	
	<ul> <li>Σεσκιτερπενια</li> <li>Το το πόμα</li> </ul>	27
р		·····2 ······
E	φαρμακολογικές τοιοτητές	
L.	באטאטל נווך בפירעטנעלייייייייייייייייייייייייייייייייייי	
Β' μέρ	ρος : Πειραματικό μέρος	34
Α.	Οργανολογία και τεχνικές	35
1	l. Χρωματογραφία προσρόφησης XAD-4	35
2	2. Χρωματογραφία επί λεπτής στιβάδας – TLC	35
3	3. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης - HPLC	37
Z	↓.     Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση − CPC	38
5	5. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού – Sephadex	40
e	5. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού – NMR	40
7	7. Υγρή χρωματογραφία - Φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας – LC	-HRMS
	41	
в.	Δοκιμές βιολογικής δραστικότητας	43
1	Ι. Μελέτη DPPH – αντιοξειδωτική δράση	43
2	2. Μελέτη Λευκαντικής δράσης	45
Э	3. Μελέτη αντιμιρκοβιακής δράσης	46
В.	Φυτοχημική μελέτη	
1	L. Συλλογή του καρπού του φυτού Citrus bergamia Risso	
2	2. Εκχύλιση του χυμού με χρήση ρητίνης προσρόφησης XAD-4	
3	3. Ανάλυση HPLC	
Ζ.	<ol> <li>Κλασμάτωση και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών</li> </ol>	
	<ul> <li>Απομονωση μεταβολιτων Ι &amp; ΙΙ</li> <li>Χου ματομοαφία καταγομάς με φυγοκάντου ση</li> </ul>	
	<ul> <li>Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκεντρήση</li> <li>Παρασκειμαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας</li> </ul>	
	<ul> <li>Απομόνωση μεταβολιτών   &amp; ΙΙΙ</li> </ul>	
	<ul> <li>Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση</li> </ul>	
	ii. Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	53
	iii. Παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	53
	c. Απομόνωση μεταβολιτών V - XIV	54
	i. Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση	
	ii. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού – Sephadex	
	III. Παρασκευαστική χρωματογραφια λεπτής στιβαδας	5/
	ιν. παρασκεσαστική σγρη χρωματογραφία σψηλής αποσσσής	
Γ' μέρ	οος : Αποτελέσματα και συζήτηση	61
Α.	Απομόνωση μεταβολιτών του Citrus bergamia	62
В.	Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών	65
1	L. Μεταβολίτης Ι : Νεοεριοσιτρίνη (Neoeriocitrin)	65
2	2. Μεταβολίτης ΙΙ : Ναρινγίνη (Naringin)	70
3	3. Μεταβολίτης ΙΙΙ : Νεοεσπεριδίνη (Neohesperidin)	74
Z	<ol> <li>Μεταβολίτης IV : 7-Ο-γλυκοσίδης της Εριοδικτυόλης (Eriodictyol-7-O-glucoside)</li> </ol>	77

5. Μεταβολίτης V : 7-Ο-νεοεσπεριδοσίδης της Πινοσεμπρίνης –	80	
(Pinocembrin-7-O-neohesperoside)	80	
6. Μεταβολίτης VI : 6"-μαλονυλναρινγίνη (6"-malonylnaringin)	83	
7. Μεταβολίτης VII : Μελιτιδίνη (Melitidin)	87	
8. Μεταβολίτης VIII : Μπεργαπτόλη (Bergaptol)	91	
9. Μεταβολίτης ΙΧ : 6',7'-διυδροξυμπεργαμοτίνη (6',7'- dihydroxybergamottin)	93	
10. Μεταβολίτης Χ : Λιμονίνη (Limonin)	98	
11. Μεταβολίτης ΧΙ : Νομιλίνη (Nomilin)	101	
12. Μεταβολίτης XII: Νομιλινικό οξύ (Nomilinic acid)	104	
13. Μεταβολίτης XIII : Πικρακουάσιοσίδη Α (Picraquassioside Α)	108	
14. Μεταβολίτης XIV : Αμπσισικό οξύ (Abscisic acid)	112	
C. Αποτελέσματα βιολογικής δραστικότητας των δειγμάτων	115	
<ol> <li>Μελέτη DPPH – αντιοξειδωτική δράση</li> </ol>	115	
2. Μελέτη λευκαντικής δράσης	117	
<ol> <li>Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης</li> </ol>	118	
Συμπεράσματα		
Βιβλιογραφία	120	

# Λίστα περιεχόμενων εικόνων & πινάκων

<b>Εικόνα 1</b> . Καρποί του φυτού, ποικιλία Κεφαλονιάς	17
<b>Εικόνα 2</b> . Τμήματα του καρπού	17
<b>Εικόνα 3</b> . Aqua mirabilis	18
Εικόνα 4. Σκελετός μιας φλαβανόνης (αριστερά) και μιας φλαβόνης (δεξιά)	20
Εικόνα 5. Κύριες φλαβανόνες άγλυκες (αριστερά) και γλυκοσυλιωμένες (δεξιά) του φυτ	ó. 21
<b>Εικόνα 6.</b> Δομή νεοεσπεριδόζης	21
<b>Εικόνα 7</b> . Δομή ρουτινόζης	22
<b>Εικόνα 8</b> . Κύριες δομές άγλυκων φλαβόνων του φυτού	22
Εικόνα 9. Γλυκοσυλιωμένες φλαβόνες του φυτού	23
<b>Εικόνα 10</b> . Δομή γλυκόζης	23
<b>Εικόνα 11</b> . Δομές βασικών κουμαρινών του φυτού	24
Εικόνα 12. Δομές βασικών φουρανοκουμαρινών του φυτού	24
Εικόνα 13. Συνένωση των δύο μονάδων C5 με την μέθοδο « κεφαλή-ουρά»	25
<b>Εικόνα 14</b> . Δομές λιμονενίου και γ-τερπινενίου	26
<b>Εικόνα 15</b> . Δομή οξικού λιναλυλεστέρα	26
<b>Εικόνα 16</b> . Δομή λιναλόλης	26
<b>Εικόνα 17</b> . Δομές βασικών σεσκιτερπενίων του φυτού	27
<b>Εικόνα 18</b> . Δομή ενός τετρανόρτριτερπενοειδές, η λιμονίνη	27
<b>Εικόνα 19</b> . Δομές των μορίων "statin-like"	30
<b>Εικόνα 20</b> . Απεικόνιση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας	35
<b>Εικόνα 21</b> . Μηχάνημα CPC - Kromaton	39
Εικόνα 22. Απεικόνιση αρχής λειτουργίας της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού.	40
Εικονα 23. Αντιδραση του μοριου DPPH με αντιοξειδωτικο παραγωγο	43
Εικονα 24. Μηχανισμος δρασης της τυροσινασης	45
Είκονα 25. Τριδλία καλλιεργείας δακτηρίων	47
<b>Εικόνα 26</b> . Μευσούς διαχυσής αντιμικροδιακής ουσίας σε διερεό υποσιρωμα	47 10
<b>Εικόνα 27.</b> Καρπος του φυτου, συλλογη στην κεφαλονία, 05.2017	40 ЛQ
<b>Εικόνα 20</b> . Απεικονιση της οιασικασίας εκχοπισης του χομου	40 50
<b>Εικόνα 29</b> . Παροσοιαση των 15 τελικών κλασματών του $CFC_1$ μεσώ ΤΕ στο σρατο	50
<b>Εικόνα 30.</b> Διαγραμματική απεικονισή της απομονωσης των μετασολιτών 7 & π	51
<b>Εικόνα 31.</b> Παροσοιασή των 14 τελικών κλασματών του ει <u>C_2</u> μεσώ ττε στο ορατο	52
<b>Εικόνα 32</b> . Διαγραμματική απεικονισή της απομονωσης των μετασολιτων 7 α m	ive
στο ορατό	
Εικόνα 34. Παρουσίαση των συνενώσεων 1-15 της Sephadex ΙΙ μέσω TLC Preparative στ	0
ορατό	56
Εικόνα 35. ΤLC στο ορατό των συνενώσεων των κλασμάτων 17-30 της Sephadex II	57
Εικόνα 36. Χρωματογράφημα HPLC-DAD του εκχυλίσματος του χυμού περγαμόντων	
Κεφαλονιάς στα 280nm	62
Εικόνα 37. TLC στο ορατό του ολικού εκχυλίσματος	62
Εικόνα 38. Διαγραμματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας απομόνωσης των	
μεταβολιτών	64
Εικόνα 39. Παρουσίαση των διαστερεοϊσομερών 2S/2R της νεοεριοσιτρίνης	65
Εικόνα 40. Νεοεριοσιτρίνη	66
Εικόνα 41. Φάσμα <sup>1</sup> Η NMR του μεταβολίτη Ι	67

Εικόνα 4	<b>2</b> . Φάσμα COSY του μεταβολίτη Ι	68
Εικόνα 4	<b>3</b> . Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη Ι	68
Εικόνα 4	<b>4</b> . Φάσμα ΗΜΒC του μεταβολίτη Ι	69
Εικόνα 4	<b>5</b> . Φάσμα μάζας HR-MS ESI (-) του μεταβολίτη Ι	69
Εικόνα 4	<b>6</b> . Παρουσίαση των διαστερεοϊσομερών 2S/2R της ναρινγίνης	70
Εικόνα 4	7. Ναρινγίνη	71
Εικόνα 4	<b>8</b> . Φάσμα <sup>1</sup> Η NMR του μεταβολίτη ΙΙ	72
Εικόνα 4	<b>9</b> . Φάσμα μάζας HR-MS ESI (-) του μεταβολίτη ΙΙ	73
Εικόνα 🗄	<b>0</b> . Νεοεσπεριδίνη	74
Εικόνα 🗄	1. Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη ΙΙΙ	75
Εικόνα 🗄	<b>2</b> . Φάσμα μάζας HR-MS ESI (-) του μεταβολίτη ΙΙΙ	76
Εικόνα 🗄	<b>3</b> . 7-Ο-γλυκοσίδης της Εριοδικτυόλης	77
Εικόνα !	<b>4</b> . Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη ΙV	78
Εικόνα 🗄	<b>5</b> . Φάσμα HSQC DEPT του μεταβολίτη IV	78
Εικόνα 🗄	<b>6</b> . Φάσμα μάζας HRMS ESI (-) του μεταβολίτη ΙV	79
Εικόνα !	7. 7-Ο-νεοεσπεριδοσίδη της Πινοσεμπρίνης	80
Εικόνα !	<b>8</b> . Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη V	81
Εικόνα !	<b>9</b> . Φάσμα μάζας HRMS ESI (+) του μεταβολίτη V	82
Εικόνα (	<b>0</b> . 6''- μαλονυλναρινγίνη	83
Εικόνα (	<b>1.</b> Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη VI	84
Εικόνα θ	<b>2</b> . Φάσμα COSY του μεταβολίτη VI	85
Εικόνα θ	<b>3</b> . Φάσμα HSQC DEPT του μεταβολίτη VI	85
Εικόνα (	<b>4</b> . Φάσμα ΗΜΒC του μεταβολίτη VI	86
Εικόνα (	<b>5</b> . Φάσμα μάζας HRMS ESI (-) του μεταβολίτη VI	86
Εικόνα (	<b>6</b> . Μελιτιδίνη	87
Εικόνα (	7. Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη VII	88
Εικόνα (	8. Φάσμα COSY του μεταβολίτη VII	89
Εικόνα (	9. Φάσμα HSQC DEPT του μεταβολίτη VII	89
Εικόνα	<b>Ο</b> . Φάσμα ΗΜΒC του μεταβολίτη VII	90
Εικονα	1. Φασμα HRMS ESI (-) του μεταβολιτη VII	90
Εικονα	2. Μπεργαπτολη	91
Εικονα	3. Φασμα πρωτονίου του μεταβολίτη VIII	92
Εικονα	<b>4.</b> Φασμα μαζας HRMS ESI (-) του μεταβολιτή VIII	92
Εικονα	<b>5</b> . 6΄, /΄-διυδροξυμπεργαμοτινη	93
Εικονα	<b>6</b> . Φασμα πρωτονίου του μεταβολίτη ΙΧ	94
Εικονα Α	7. Φάσμα COSY του μεταθολίτη ΙΧ	95
Εικονα	8. Φάσμα HSQC DEPT του μεταβολίτη ΙΧ	95
Εικονα Α	9. Φάσμα ΗΝΙΒΕ του μεταθολίτη ΙΧ	96
Εικονα α	<b>Ο</b> . Φασμα μαζας ΗΚΙΝΙS ESI (+) του μεταθολιτή ΙΧ	97
Εικονα α	1. Λιμονινή	98 100
Εικόνα α	2. Φάσμα μάζας ΗΡΜς Εςι ( ) του μεταβολίτη Χ	100
	ο. Ψασμα μαζας ΠΚΙνΙΟ ΕΟΙ (-) ΙΟυ μετασολιτή Χ	100
	τ. Νομσιινη	101
	3. Φασμα πρωτονιου του μεταθολίτη Χι	102 102
	ο. φασμα μαζας πτινίο εσί (-) του μετασολιτή λι	103
Εικόνα θ	7. Νομοιινικό όξο	104
Εικόνα θ	9. Φάσμα ΗΣΟΓ DEPT του μεταβολίτη ΧΙΙ	105
Εικόνα ά	9. Φάσμα ΗΜΒΟ του μεταβολίτη ΧΙΙ	100
LINUVUS	• φασμα πινιδε του μετασολιτή λη	100

Εικόνα 91. Φάσμα μάζας HRMS ESI (-) του μεταβολίτη XII	107
Εικόνα 92. Πικρακουασιοσίδη Α	
Εικόνα 93. Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη XIII	109
Εικόνα 94. Φάσμα COSY του μεταβολίτη XIII	
Εικόνα 95. Φάσμα HSQC DEPT του μεταβολίτη XIII	110
Εικόνα 96. Φάσμα ΗΜΒC του μεταβολίτη ΧΙΙΙ	110
Εικόνα 97. Φάσμα μάζας HRMS ESI (+) του μεταβολίτη XIII	111
<b>Εικόνα 98</b> . Αμπσισικό οξύ	112
Εικόνα 99. Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη ΧΙV	113
Εικόνα 100. Φάσμα μάζας HRMS ESI (+) του μεταβολίτη XIV	113
Εικόνα 101. Αποτελέσματα των αντιμικροβιακών μελετών	118

# 2. Πίνακες

Πίνακας 1. Βοτανική ταξινόμηση του Citrus bergamia1	6
Πίνακας 2. Πειραματικές συνθήκες του LC-HRMS-ESI	!2
Πίνακας 3. Σύστημα διαχωρισμού της ανάλυσης HPLC του ολικού εκχυλίσματος	!9
Πίνακας 9. Συνοπτικός πίνακας τον απομονωμένων μεταβολιτών	;3
<b>Πίνακας 14</b> . Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup> Η & <sup>13</sup> C-NMR του μεταβολίτη V	31
Πίνακας 15. Χημικές μετατοπίσεις 1Η & 13C-NMR του μεταβολίτη VI (MeOD)8	24
Πίνακας 16. Χημικές μετατοπίσεις 1Η & 13C-NMR του μεταβολίτη VII (MeOD)	8
Πίνακας 17. Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup> Η και <sup>13</sup> C NMR του Μεταβολίτη VIII (d6-Acetone) 9	1
<b>Πίνακας 18.</b> Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup> Η και <sup>13</sup> C NMR του Μεταβολίτη ΙΧ (CD <sub>3</sub> OD)	14
<b>Πίνακας 19</b> . Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup> Η και <sup>13</sup> C NMR του Μεταβολίτη Χ (CDCl <sub>3</sub> )	19
<b>Πίνακας 20.</b> Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup> Η και <sup>13</sup> C NMR του Μεταβολίτη ΧΙ (CDCl <sub>3</sub> ) 10	12
<b>Πίνακας 21</b> . Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup> Η και <sup>13</sup> C NMR του Μεταβολίτη XII (CDCl <sub>3</sub> ) 10	15
<b>Πίνακας 22</b> . Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup> Η και <sup>13</sup> C NMR του μεταβολίτη XIII (CD <sub>3</sub> OD) 10	18
<b>Πίνακας 23</b> . Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup> Η και <sup>13</sup> C NMR του μεταβολίτη XIV (CD <sub>3</sub> OD) 11	2
Πίνακας 24. Αποτελέσματα της μελέτης αντιοξειδωτικής δράσης	5
Πίνακας 25. Αποτελέσματα της αναστολής της ελεύθερης ρίζας σχετικά με την βαθμιδωτή	
συγκέντρωση δείγματος11	6
Πίνακας 26. Αποτελέσματα της μελέτης λευκαντικής δράσης	7

# Συντομογραφίες

- <sup>13</sup>C NMR : Carbon Nuclear Magnetic Resonance
- <sup>1</sup>H NMR : Proton Nuclear Magnetic Resonance
- **BuOH**: Butanol
- **c-Hex**: Cyclohexane
- **COSY**: Correlation Spectroscopy
- **CPC**: Centrifugal Partition Chromatography
- **DAD**: Diode Array Detector
- **DMAPP**: Dimethylalyl Pyrophosphate
- **DMSO**: Dimethyl Sulfoxide
- **DOPA:** Dihydroxyphenylalanine
- **DPPH:** 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- ESI: Electrospray Ionization
- **EtOAc**: Ethyl Acetate
- EtOH: Ethanol
- GA: Gallic acid
- **HMBC** : Heteronuclear Multiple Bond Correlation
- **HMG-CoA** : Hydroxymethylglutaryl-CoA
- HPLC: High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography
- HR-MS: High Resolution Mass Spectrometry
- **HSQC** : Heteronuclear Single Quantum Coherence
- IC<sub>50</sub>: Inhibition Concentration
- IPP: Isopentenyl pyrophosphate
- **LC** : Liquid Chromatography
- **MeOH** : Methanol
- MIC: Minimal Inhibitory Concentration
- NMR : Nuclear magnetic resonance
- **TLC** : Thin layer chromatography

# Περίληψη

Στα πλαίσια της έρευνας, επιλέχθηκε να μελετηθεί ο χυμός μιας ιδιαίτερης ποικιλίας περγαμόντων προερχόμενη από το νησί της Κεφαλονιάς, από την περιοχή Βλαχάτα.

Η φυτοχημική ανάλυση του αιθανολικού εκχυλίσματος του χυμού πραγματοποιήθηκε με διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές, όπως την χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση, την χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, την παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας αλλά και την χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

Οι κλασματώσεις και αναλύσεις οδήγησαν στην απομόνωση μεταβολιτών, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας NMR (1D & 2D) και UHPLC-HRMS.

Στην συνέχεια, μελετήθηκαν τα ολικά αιθανολικά εκχυλίσματα, καθώς και τα καθαρά μόρια, για την διερεύνηση της αντιοξειδωτικής (DPPH) και λευκαντικής δράσης (antityrosinase). Μελετήθηκε επίσης η αντιμικροβιακή δράση του εμπλουτισμένου εκχυλίσματος XAD-4 του χυμού καθώς και επιλεγμένων κλασμάτων, ως προς τα στελέχη *Micrococcus luteus, Bacillus subtilis* και *Escherichia coli αλλά και Staphylococcus aureus*.

Συνολικά απομονώθηκαν 14 μεταβολίτες από διάφορες χημικές κατηγορίες όπως γλυκοσυλιωμένα παράγωγα φλαβονοειδών, φουρανοκουμαρίνες και τριτερπένια.

Δύο μόρια, η νεοεριοσιτρίνη και ο 7-*Ο*-γλυκοσίδης της εριοδικτυόλης, παρουσίασαν μέτρια δράση έναντι της ελεύθερης ρίζας DPPH, με IC<sub>50</sub> = 90,8 μM και 114,4 μM αντίστοιχα, ενώ η μελέτη λευκαντικής δράσης δεν επέδειξε αξιοσημείωτα αποτελέσματα. Όσο αφορά την αντιμικροβιακή μελέτη, δύο κλάσματα παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση.

#### Abstract

In the context of the research, it was chosen to study the juice of a particular variety of bergamot coming from the island of Kefalonia, from the Vlachata region.

The phytochemical analysis of the ethanolic extract of the juice was performed by various chromatographic techniques, such as centrifugal partition chromatography, molecular exclusion chromatography, preparative thin layer chromatography, and high performance liquid chromatography. This procedure led to the isolation of 14 metabolites. that were identified by NMR (1D & 2D) and UHPLC-HRMS spectroscopy.

Seven of them (naringin, neoeriocitrin, neohesperdin, eriodictyol-7-O-glucoside, pinocembrin-7-O-neoesperidoside, 6"-malonylnaringin and melitidin) belong to the flavonoid compounds and more precisely they are derivatives of glycosylated flavanones.

In addition, two furanocoumarins (bergaptol and 6'-7'-dihydroxybergamottin) as well as three triterpenes (limonin, nomilin and nominilic acid) were indentified. Two others phenolic derivaties (Picraquassioside A and Abscisic acid) were also indentified.

Finaly, bioligical assays, DPPH (antioxidant activity) and tyrosinase inhibition (whitening activity), were performed, both to the total ethanolic extracts as well as pure molecules. The antibacterial activity of some fractions were also tested against Gram (+) (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphyloccocus aureus*) and Gram (-) (*Escherichia coli*) strains.

Overall this work has shown that two molecules, neoerocitrin and eriodictyol-7-*O*-glucoside, showed moderate activity against free DPPH, with  $IC_{50} = 90.8 \ \mu\text{M}$  and 114.4  $\mu\text{M}$  respectively, while the whitening effect did not show any remarkable results. As for the antimicrobial study, two fractions showed an obvious antimicrobial effect, that are under further investigation.

Bergamot form Kefalonia is a promising source of bioactive compounds and can be further exploited.

Εισαγωγή

# Α' μέρος : Εισαγωγή

# Α. Ταξινόμηση και μορφολογικά χαρακτηριστικά

Η οικογένεια **Rutaceae** ανήκει στην τάξη των Sapindales. Είναι μια οικογένεια η οποία περιέχει περίπου 150 γένη και πάνω από 1500 είδη φυτών, και χωρίζεται σε τρείς υποοικογένειες : *Rutoideae* (120 γένη), *Aurantioideae* (30 γένη) και *Spathelioideae* (5 γένη). Τα φυτά της οικογένειας φύονται κυρίως σε τροπικές αλλά και εύκρατες περιοχές ιδίως στην Αυστραλία και Νότια Αφρική [1].

Παρά τη σημαντική κατανομή και τη μεγάλη οικονομική σημασία του, η προέλευση και η εξέλιξη του γένους *Citrus* εξακολουθούν να είναι ασαφείς. Το γένος αυτό περιέχει μεγάλη ποικιλία ειδών λόγω της εύκολης τάσης για μετάλλαξη και υβριδοποίηση, με αποτέλεσμα να περιπλέκεται η ταξινόμηση. Οι διαφορές μεταξύ των ειδών, των νέων βοτανικών παραλλαγών ή των ποικιλιών που καλλιεργούνται με διαφορετικό τρόπο, μπορεί να είναι εξαιρετικά μικρές και μόνο οι νέες μοριακές μέθοδοι είναι σε θέση να διακρίνουν τα διαφορετικά είδη. Ωστόσο, οι παραλλαγές που προκύπτουν μέσω αυθόρμητης μετάλλαξης, δε διευκολύνουν την ταξινόμηση των ειδών ούτε με τη χρήση βιοχημικών ή γενετικών δεικτών [2].

Σύμφωνα με τους βοτανολόγους, η ταξινόμηση των εσπεριδοειδών βασίστηκε κυρίως στα μορφολογικά και γεωγραφικά δεδομένα. Από τα πολλά συστήματα ταξινομήσεως του γένους Citrus L. που διατυπώθηκαν τον περασμένο αιώνα, αυτά που προτάθηκαν από τους *Swingle* and *Reece* (1967) και *Tanaka* (1977) έχουν γίνει ευρέως αποδεκτά, με αποτέλεσμα να διακριθούν περίπου 16 είδη σύμφωνα με τους *Swingle* & *Reece* και 162 σύμφωνα με τον *Tanaka* [2,3].

Το φυτά του γένους *Citrus* παρουσιάζονται ως δέντρα ή θάμνοι, τα οποία μπορούν να φτάσουν τα 15m ύψος. Τα φύλλα έχουν χρώμα σκούρο πράσινο, είναι δερματώδη και κηρώδη, διαθέτουν μίσχο και λογχοειδές έλασμα και μπορούν να αντέξουν περιόδους με έντονο κρύο. Τα άνθη είναι άσπρα, άτριχα και αρωματικά, βρίσκονται μόνα τους ή σε δέσμες των δυο στην βάση του κλαδιού. Οι καρποί είναι συνήθως ωοειδείς με μια εξέχουσα θηλή στην αντίθετη πλευρά του ποδίσκου καρποφορίας. Το περικάρπιο, η αλλιώς "flavedo", περιέχει κυρίως αιθέριο έλαιο. Το μεσοκάρπιο, ή αλλιώς "albedo", είναι άσπρο και σπογγώδες και το ενδοκάρπιο που αντιστοιχεί στο βρώσιμο μέρος του καρπού, χωρίζεται σε 8-10 μέρη τα οποία περιέχουν τα σπόρια [3,4]. Το είδος *Citrus bergamia* (περγαμόντο) ανήκει στην οικογένεια *Rutaceae* [5]. Σε αντίθεση με τα άλλα είδη του γένος, υπάρχουν πολλές αντιφατικές απόψεις για την ταξινόμηση του φυτού και μεγάλη αβεβαιότητα για την ονομασία του, καθώς τα βιβλιογραφικά δεδομένα δεν συγκλίνουν σε μια κοινή γνώμη. Το είδος αναφέρεται για πρώτη φορά από τους Pierre Antoine **Poiteau** et Joseph Antoine **Risso** [2].

Σύμφωνα με το ολοκληρωμένο σύστημα ταξινομικών πληροφοριών (ITIS 2011) [6], το *Citrus aurantium* L. περιλαμβάνει δύο υποείδη: *Citrus aurantium ssp. aurantium* L. και *Citrus aurantium ssp. bergamia* (Risso & Poiteau) Wight & Arn. Ex Engler, και ως εκ τούτου, το *Citrus bergamia* (Risso & Poiteau) Wight & Arn. Ex Engler πρέπει να θεωρηθεί συνώνυμο με το *Citrus aurantium ssp. bergamia* (Risso & Poiteau) Wight & Arn. Ex Engler (ITIS 2011).

Ταξινομική κατάταξη του είδους <i>Citrus bergamia</i> Risso						
Βασίλειο	Plantae					
Υποβασίλειο	Steptophyta					
Υπερσυνομοταξία	Embryophyta					
Συνομοταξία	Tracheophyta					
Υποσυνομοταξία	Spermatophytina					
Ομοταξία	Magnolopsida					
Υφομοταξία	Rosanae					
Τάξη	Sapindales					
Οικογένεια	Rutaceae					
Γένος	Citrus					
Είδος	C. bergamia					

Πίνακας 1. Βοτανική ταξινόμηση του Citrus bergamia

Έχει προταθεί για το *C. bergamia* ότι πρόκειται για μια υβριδοποίηση μεταξύ του νεραντζιού (*C. aurantium* L.) και του λεμονιού (*C. limon* [L.] Burm.f.) ή ακόμα μεταξύ του νεραντζιού (*C. aurantium* L.) και του lime (*C. aurantiifolia*).

Το φυτό καλλιεργείται κυρίως στην Ιταλία, στην περιοχή της Καλαβρίας και υπάρχουν κυρίως τρείς ποικιλίες: τα Feminello, τα Castagnero και τα Fantastico. Φύονται όμως και σε άλλες περιοχές όπως στην Ελλάδα, στα νησία της Κεφαλονιάς και της Κέρκυρας, στη Βραζιλία, στην Τουρκία , στην Αργεντινή και στην Ακτή Ελεφαντοστού. Οι γεωγραφικές και κλιματικές συνθήκες αποδεικνύουν ότι το Ιόνιο πέλαγος αποτελεί το πιο ευνοϊκό μέρος για την σωστή ανθοφορία του φυτού [7,8]. Το φυτό είναι ένα δέντρο το οποίο μπορεί να φτάσει τα 12m ύψος, ωστόσο, στην



καλλιέργεια κλαδεύεται μέχρι τα 3 με 4 μέτρα. Τα κλαδιά είναι πολύ λεπτά και ακανόνιστα και έχουν αγκάθια, χαρακτηριστικό αυτού του εσπεριδοειδούς. Τα φύλλα έχουν χρώμα σκούρο πράσινο στην επιφάνεια τους, και ελαφρώς πιο ανοιχτό από κάτω. Είναι δερματώδη και κηρώδη, άτριχα περιέχουν μίσχο και λογχοειδές έλασμα. Το δέντρο και τα φύλλα του είναι ιδιαίτερα

Εικόνα 1. Καρποί του φυτού, ποικιλία Κεφαλονιάς

ανθεκτικά ακόμα και σε ακραίες καιρικές συνθήκες. Τα άνθη είναι άσπρα, άτριχα και αρωματικά, βρίσκονται μόνα τους ή σε δέσμες των δυο στην βάση του κλαδιού. Η ανθοφορία του φυτού παρατηρείται το Απρίλιο και τον Μάϊο [2,3].

Ο καρπός, το περγαμόντο, έχει ιδιαίτερο σχήμα και ονομάζεται «hesperidium». Συνήθως είναι ωοειδής με μια εξέχουσα θηλή προς την μια κατεύθυνση , μπορεί όμως να

είναι ασύμμετρο και αυτό καθορίζεται από τον τόπο προέλευσής του. Τα φρούτα ωριμάζουν από τον Νοέμβριο έως τον Μάρτιο [2].

Ο χυμός έχει όξινη και πικρή γεύση, και σχετικά με τα άλλα εσπεριδοειδή, δεν καταναλώνεται [7-9]. Ο φλοιός του έχει έντονο κίτρινο χρώμα καθώς ωριμάζει, είναι επίσης κηρώδης, και χωρίζεται σε τρία μέρη : flavedo, albedo και ενδοκάρπιο.



Εικόνα 2. Τμήματα του καρπού

# Β. Δρογοϊστορία

Όπως αναφέρεται και για την ονομασία του φυτού, η ακριβής γεωγραφική και βοτανική προέλευση του φυτού παραμένουν ασαφείς. Φήμες λένε ότι προέρχεται από τα Κανάρια νησιά ή ακόμα από τις Αντίλλες και ότι ανακαλύφθηκε από τον Χριστόφορο Κολόμβο, ο οποίος είχε φέρει το φυτό μαζί του στο ταξίδι της επιστροφής. Πιθανώς να προέρχεται και από την Καλαβρία, από διάφορες μεταλλάξεις άλλων ειδών εσπεριδοειδών, ή από το Berga στην Ισπανία, ή ακόμα και από την Ελλάδα [2]. Στις μέρες μας, το φυτό καλλιεργείται ιδιαίτερα στη νότια πλευρά της Καλαβρίας, στην Ιταλία. Αποτελεί ένα πολύ σημαντικό μερίδιο της ιταλικής αγοράς, και κατ' επέκταση σημαντικό οικονομικό στήριγμα.

Το κοινό όνομα του φρούτου, περγαμόντο, προέρχεται από το "berg-armudi" που σημαίνει "πρίγκιπας του αχλαδιού" λόγω της ομοιότητας του σχήματος του καρπού με το αχλάδι.

Το φρούτο γνωρίζει την πρώτη του επιτυχία στην Γαλλία, ως «eau de bergamote» στην αυλή του βασιλιά Λουδοβίκου XIV που λάτρεψε την γλυκιά μυρωδιά του. Πολύ γρήγορα αντικατέστησε τα βαριά αρώματα της εποχής και χρησιμοποιούταν ιδιαίτερα για τις αντισηπτικές ιδιότητές του.

Η φήμη του φυτού αυξήθηκε περαιτέρω κατά τη διάρκεια του 18<sup>ου</sup> αιώνα. Το αιθέριο έλαιο πλούσιο σε τερπένια, χρησιμοποιήθηκε από έναν Γάλλο ιταλικής προέλευσης αρωματοποιό - σχεδιαστή στην Κολωνία, και δημιούργησε το πρώτο άρωμα με όνομα «Aqua mirabillis».

Στην συνέχεια το άρωμα αυτό έγινε διάσημο και ονομάζεται μέχρι και σήμερα «eau de Cologne». Έτσι, η καλλιέργεια του φυτού γίνεται

πυλώνας της ιταλικής οικονομίας και παρατηρείται μια σημαντική εξέλιξη λόγω της αυξημένης ζήτησης του αρώματος.

Το περγαμόντο και τα παράγωγα του, χρησιμοποιήθηκαν στην Καλαβριακή ιατρική ως αντισηπτικό, ανθελμινθικό, επουλωτικό πληγών και αντιφλεγμονώδες.

Πλέον, το αιθέριο έλαιο του περικαρπίου χρησιμοποιείται στη βιομηχανία καλλυντικών και αρωμάτων από διάσημους οίκους (Guerlain, Lanvin,κ.α.), όπως και στην μαγειρική για την παρασκευή λικέρ, παγωτών, γλυκισμάτων, μαρμελάδων κτλ. Τα έντονα αρωματικά του φύλλα αποτελούν το βασικό υλικό του γνωστού τσαγιού "Earl Grey" [5-7].



**Εικόνα 3**. Aqua mirabilis

### **C. Χημική σύσταση**

Το περγαμόντο ήταν γνωστό από την αρχαιότητα κυρίως για την σύσταση και τις θεραπευτικές ιδιότητες του αιθέριου ελαίου που περιέχει. Τα albedo και flavedo όπως και ο χυμός θεωρούνταν απόβλητα. Δεν ήταν τόσο δημοφιλές όσο τα άλλα εσπεριδοειδή κυρίως για την πικρή του γεύση [10].

Τα τελευταία χρόνια, τα υποπροϊόντα του φυτού, χάρη στην ανακάλυψη της πλούσιας σύστασης τους σε φλαβονοειδή και άλλα βιοδραστικά συστατικά, έχουν γίνει το επίκεντρο πολλών ερευνών. Κάποιες από αυτές τις ενώσεις έχουν πολύ ενδιαφέρουσες φαρμακευτικές ιδιότητες και αποτελούν βασικό συστατικό σε διάφορα συμπληρώματα διατροφής (neutraceuticals) σε όλο τον κόσμο [5].

#### 1. Φαινολικά παράγωγα

Τα φαινολικά παράγωγα αποτελούνται από ένα πολύ ευρύ φάσμα ουσιών οι οποίες έχουν ως βασικό δομικό στοιχείο την παρουσία ενός τουλάχιστον βενζολικού δακτυλίου, ο οποίος είναι άμεσα ενωμένος με τουλάχιστον μια υδροξυομάδα. Προκύπτουν από δύο βιοσυνθετικές οδούς, η πρώτη και συνηθέστερη του σικιμικού οξέος, και η δεύτερη των πολυοξικών [11][12].

#### α. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι δευτερογενείς μεταβολίτες του φυτού και ανήκουν στην οικογένεια των φαινολικών ενώσεων. Αποτελούνται από δυο βενζολικούς δακτυλίους και μια γ-πυρόνη.

Το όνομα «φλαβονοειδές» προέρχεται από τα λατινικά "flavus" που σημαίνει κίτρινο. Οι ουσίες αυτές θεωρούνται φυσικές χρωστικές και δίνουν χρώμα στο φυτό όπως και στους καρπούς [13]. Παράγονται από τον οργανισμό ως άμυνα, όπως π.χ. προστατεύοντας τον οργανισμό από τις υπεριώδεις ακτίνες του ηλίου [12]. Είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο τα βρίσκουμε σε μεγάλη ποσότητα στην διατροφή μας, καθώς παράγονται από αρωματικά φυτά. Υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες στα φρούτα, στα λαχανικά και συγκεκριμένα σε ένα μεγάλο βαθμό στα εσπεριδοειδή όπως το λεμόνι, το πορτοκάλι, το γκρέιπφρουτ και το περγαμόντο. Τα συγκεκριμένα φρούτα περιέχουν κοινά μόρια αλλά σε διαφορετικές αναλογίες [10-15].

Έχουν επισημανθεί σημαντικές ιδιότητες όπως αντιοξειδωτική δράση, παγιδεύοντας τις ελεύθερες ρίζες και μειώνοντας έτσι την αθηρογένεση [16], αναστολή του ενζύμου της

19

ελαστάσης, της c-AMP φωσφοδιεστεράσης, της οξειδάσης της ξανθίνης, κτλ. [17][12]. Είναι αγγειοπροστατευτικά [12], αντιφλεγμονώδη [16], οιστρογονομιμητικά [18] κ.α.

Έρευνες αποδεικνύουν ότι υπάρχουν πάνω από 2000 γνωστές ενώσεις και ακόμα πάρα πολλές άγνωστες. Το ένα τέταρτο των γνωστών μορίων είναι άγλυκα, και τα υπόλοιπα είναι γλυκοσυλιωμένα πάνω σε άνθρακα ή σε οξυγόνο (–C/-O-glycosides). Διακρίνονται τρεις κύριες κατηγορίες ανάλογα με την οξυγόνωση του άνθρακα 2-3 : οι φλαβόνες, φλαβονόνες και φλαβανόλες [17] και άλλες όπως οι κατεχίνες, ισοφλαβονοειδή, κτλ.



Εικόνα 4. Σκελετός μιας φλαβανόνης (αριστερά) και μιας φλαβόνης (δεξιά)

Τα παραπάνω μόρια αποτελούνται από τρείς δακτυλίους, C6-C3-C6 [19]. Δύο αρωματικούς που βρίσκονται και στις δυο ομάδες, ένα δακτύλιο πυρόνης για τις φλαβόνες και μια δι-υδροπυρόνη για τις φλαβανόνες [16]. Η φλαβόνη προκύπτει από μια αφυδρογώνοση της φλαβανόνης με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός διπλού δεσμού C=C στην θέση 2-3.

Ο μεγάλος αριθμός φλαβονοειδών στο γένος *Citrus* αποτελείται από άπειρους διαφορετικούς συνδυασμούς γενινών και σακχάρων [14]. Όσο αφορά το είδος *C. bergamia,* σχετικά με τα υπόλοιπα εσπεριδοειδή, περιέχει μια μεγαλύτερη ποικιλία φλαβονοειδών και κυρίως σε υψηλότερη περιεκτικότητα [13]. Υπάρχουν φλαβανόνες σε σημαντικότερο βαθμό, ακολουθούν οι φλαβόνες σε μικρότερη ποσότητα και ελάχιστες φλαβονόλες. Υπάρχουν κυρίως σε μορφή γλυκοσιδών και σε μικρότερη περιεκτικότητα, άγλυκα μόρια. • Φλαβανόνες



	R1	R2		R1	R2	R3
Eriodictyol	-OH	-OH	Neoriocitrin	-O-Nh	-OH	-OH
Naringin	-H	-OH	Naringin	-O-Nh	-H	-OH
Hesperitin	-OH	-OMe	Neohesperidin	-O-Nh	-OH	-O-Me

\* Nh : neohesperidose

Εικόνα 5. Κύριες γενίνες φλαβονονών (αριστερά) και γλυκοσυλιομένες (δεξιά) του φυτού

Ο χυμός περιέχει φλαβανόνες σε άγλυκη μορφή, σε πολλή μικρή ποσότητα, αλλά και γλυκοσυλιωμένες, οι οποίες υπάρχουν σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα. Τα κύρια άγλυκα βρίσκονται παραπάνω. Οι γενίνες, το άγλυκο κομμάτι του μορίου, έχουν μια υδροξυομάδα στην θέση του άνθρακα C-5 και C-7. Η εσπερεντίνη περιέχει και μια μεθοξυομάδα στη θέση του άνθρακα C-4 του δεύτερου βενζολίου [14][16][18]. Οι γλυκοσίδες αποτελούνται από μία γενίνη και ένα σάκχαρο όπως τον νεοεσπεριδοσίδη ή τον ρουτινοσίδη.



Εικόνα 6. Δομή νεοεσπεριδόζης



Εικόνα 7. Δομή ρουτινόζη

Για τις φλαβόνες, ο σύνδεση του άγλυκου με το σάκχαρο γίνεται συνήθως στο οξυγόνο του άνθρακα C-7 του μορίου [14-16]. Τα τρία κύρια μόρια, του περγαμόντου στην κατηγορία των φλαβονών, είναι η νεοεριοσιτρίνη, η ναρινγίνη και η νεοεσπεριδίνη, τα οποία και τα τρία είναι νεοεσπεριδοσίδες [18].

• Φλαβόνες



Εικόνα 8. Κύριες δομές άγλυκων φλαβόνων του φυτού

Για τις φλαβόνες διακρίνουμε επίσης δύο μορφές παραγόγων. Τα άγλυκα, που υπάρχουν σε μικρή ποσότητα στο φυτό, περιέχουν επίσης μια υδροξυομάδα στις θέσεις C-5 και C-7. Η διοσμετίνη περιέχει μια μεθόξυ-ομάδα στην θέση του άνθρακα C-4' του αρωματικού δακτυλίου, ενώ η κερκετίνη εμφανίζει μια υδροξυομάδα στον άνθρακα C-3 και χαρακτηρίζεται ως φλαβονόλη [14-15;20].



	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Vincenin-2	-H	-Glu	-OH	-Glu	-H	-OH
Lucenin-2	-H	-Glu	-OH	-Glu	-H	-O-Me
Rhoifolin	-H	-H	-O-Nh	-H	-OH	-OH
Rutin	-O-Ru	-H	-OH	-H	-OH	-OH
Diosmin	-H	-H	-O-Ru	-H	-OH	-O-Me

\* Nh : neohesperidose ; Glu : glucose

#### Εικόνα 9. Γλυκοσυλιομένες φλαβόνες

Οι γλυκοσίδες των φλαβονών έχουν πιο ιδιαίτερους και περίπλοκούς συνδυασμούς άγλυκων και σακχάρων. Η σύνδεση γίνεται συνήθως με τον οξυγόνο του άνθρακα C-7 αλλά και με τον οξυγόνο του άνθρακα C-4. Εκτός από τους Ο-γλυκοσίδες, βρίσκονται με την μορφή C-γλυκοσίδων στους οποίους η σύνδεση των σακχάρων γίνεται με τον άνθρακα C-6 και C-8. Οι γλυκοσίδες διακρίνονται στους μονο-γλυκοσίδες και στους δι-γλυκοσίδες, οι οποίοι υπάρχουν σε μεγαλύτερη αναλογία. Τα κύρια σάκχαρα στην κατηγορία των φλαβονών είναι η νεοσπεριδόζη, η ρουτινόζη αλλά και η γλυκόζη.



Εικόνα 10. Δομή γλυκόζης

#### b. Κουμαρίνες και φουρανοκουμαρίνες

Οι κουμαρίνες και φουρανοκουμαρίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν επίσης στην οικογένεια των φαινολικών ενώσεων.

Οι κουμαρίνες αποτελούνται από δυο δακτυλίους, ένα βενζόλιο και μια α-πυρόνη. Προκύπτουν από το βιοσυνθετικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Από το μεταβολισμό της φαινυλαλανίνης προκύπτει το 4-κουμαρικό οξύ το οποίο μετατρέπεται σε κουμαρίνη.

Όσο αφορά τις φουρανοκουμαρίνες, περιέχουν ακόμα ένα δακτύλιο που προέρχεται από την ισοπρενυλίωση του άνθρακα C-6 ή C-8 του βενζολικού δακτυλίου της κουμαρίνης με την βοήθεια του παραγώγου του μεβαλονικού οξέος, διμεθυλαλλυλοπυροφωσφορικό εστέρα (DMAPP). Γίνεται υδροξυλίωση, ισομερισμός του διπλού δεσμού και αυτόματη λακτονοποίηση, σχηματίζοντας αντίστοιχα γραμμικές και γωνιακές φουρανοκουμαρίνες [11][12]. Τα δυο μόρια βρίσκονται κυρίως στο γένος *Citrus* και στην οικογένεια Rutaceae [21][22].



Εικόνα 11. Δομές βασικών κουμαρινών του φυτού

Στο είδος *C. bergamia* υπάρχουν σε μεγάλο βαθμό στο αιθέριο έλαιο [23], στο φρούτο, όπως στο περικάρπιο αλλά και στο χυμό [15,18,24]. Τα κύρια μόρια είναι το 5-γερανυλόξυ-7-μεθοξυκουμαρίνη και η λιμετίνη για τις κουμαρίνες αλλά και το μπεργαπτένιο, η μπεργαμοτίνη και το ψωραλένιο για τις φουρανοκουμαρίνες. Υπάρχουν και πολλά άλλα, όμως σε ίχνη [15,18,21].





Κάποια από αυτά τα μόρια, είναι φωτοευαίσθητα, είχαν για καιρό θεραπευτική ένδειξη ως θεραπεία της ψωρίασης, της λεύκης, της ατοπικής δερματίτιδας κτλ. σε συνδυασμό με υπεριώδεις ακτίνες [4;12;24]. Η τοπική χορήγηση ψωραλενίων, όπως το μπεργαπτένιο, (πχ. PUVA therapy) έχει δυστυχώς μακροχρόνιες παρενέργειες και μπορεί να εμφανίσει δερματική τοξικότητα [25] αλλά και καρκίνο [26]. Θεωρούνται μόρια φωτοτοξικά και κυρίως τα γραμμικά όπως το ψωραλένιο, το μπεργαπτένιο και η ξανθοτοξίνη [12]. Πλέον, είναι μια θεραπεία έκτακτης ανάγκης για σοβαρές μορφές της πάθησης γιατί η σχέση κινδύνου-οφέλους είναι πολλή χαμηλή.

Στο παρελθόν υπήρχαν και στις αντηλιακές κρέμες ως παράγωγο επιτάχυνσης μαυρίσματος αλλά με τον καιρό αποσύρθηκε από όλα τα καλλυντικά για τη μείωση του κινδύνου [12].

Το τελευταίο καιρό, έρευνες έχουν αποδείξει ότι ο χυμός εσπεριδοειδών όπως του γκρέιπφρουτ παρεμβαίνει στην βιοδιαθεσιμότητα ορισμένων φαρμάκων όπως της κυκλοσπορίνης, τριαζολάμης, φελοδιπίνης, κτλ. και αυτό μπορεί να ωφελείται στα ψωραλένια που είναι αναστολείς του εντερικού κυτοχρώματος CYP3A4 με αποτέλεσμα την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των φαρμάκων [21,24,27].

#### 2. Τερπενοειδή

Τα τερπενοιδή αποτελούν την ευρύτερη οικογένεια φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών. Είναι οργανικά μόρια τα οποία εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία ως προς την δομή τους. Μεταξύ αυτών, παρατηρούμε τα μονοτερπένια, διτερπένια, σεσκιτερπένια, τριτερπένια ή στεροειδή αλλά και τα καροτενοειδή.

Βιοσυνθετικά ακολουθούν την οδό του μεβαλονικού οξέος, το οποίο μεταβολίζεται σε δύο ομάδες πέντε ανθράκων, το διμεθυλαλλυλοπυροφοσφορικό εστέρα (DMAPP) και το ισοπεντενυλοπυροφοσφορικό εστέρα (IPP). Το βασικό δομικό στοιχείο κάθε ομάδας τερπενοειδών είναι ότι τα μόρια αποτελούνται από έναν μεταβλητό και ακέραιο αριθμό μονάδων ισοπρενίων με το γνωστό τρόπο «κεφαλή-ουρά», η πιο σπάνια «κεφαλή-κεφαλή» [12].



Εικόνα 13. Συνένωση των δύο μονάδων C5 με την μέθοδο « κεφαλή-ουρά»

Εισαγωγή

#### α. Μονοτερπένια

Τα μονοτερπένια είναι η απλούστερη υποκατηγορία των τερπενίων και προέρχονται από την συνένωση δύο μονάδων C5. Είναι ουσίες με σχετικά μικρό μοριακό βάρος, είναι πτητικά και αποτελούνται βασικό στοιχείο των αιθέριων ελαίων αρωματικών φυτών. Στο είδος *Citrus bergamia* αντιπροσωπεύουν τα κύρια μόρια του αιθέριου ελαίου που προκύπτει από την πίεση εν ψυχρώ του περικαρπίου του φρούτου[12,28,29].

#### Μονοκυκλικά μονοτερπένια

Τα δύο βασικά μονοκυκλικά τερπένια που έχουν απομονωθεί από το έλαιο του είδους *C.bergamia* είναι το **λιμονένιο** και το **γ-τερπινένιο**. Αντίστοιχα τα ποσοστά τους είναι 33-42% και 6-10,5%. Προκύπτουν και τα δύο από την κυκλοποιήση του γερανυλοπυροφοσφορικού εστέρα προς έναν εξαμελή δακτύλιο [8,28].



Εικόνα 14. Δομές λιμονενίου και γ-τερπινενίου

#### Εστέρες μονοτερπενίων



Το κύριο συστατικό αυτής της ομάδας είναι ο **οξικός λιναλυλεστέρας** ο οποίος είναι το δεύτερο κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου με ποσοστά 22-33%.

Βιοσυνθετικά προκύπτουν επίσης από το γερανυλοπυροφοσφερικό εστέρα [28].

**Εικόνα 15**. Δομή οξικού λιναλύλεστέρα

#### Αλκοόλες μονοτερπενίων

Η **λιναλόλη** αποτελεί επίσης ένα από τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου με ποσοστά 7-15% και ανήκει στην κατηγορία των αλκοολών. Βιοσυνθετικά, ακολουθεί την ίδια οδό με τις παραπάνω ενώσεις [28].



Ε**ικόνα 16**. Δομή λιναλόλης

#### **b.** Σεσκιτερπένια

Τα σεσκιτερπένια ανήκουν στην οικογένεια των τερπενίων και αποτελούνται από τρείς μονάδες ισοπρενίων. Συνολικά κατέχουν 15 άνθρακες και όλα τα παράγωγα συνθέτονται



**Εικόνα 17**. Δομές βασικών σεσκιτερπενίων του Φυτού

από το φαρνεσυλοπυροφοσφορικό εστέρα. Όπως για τα μονοτερπένια, ενδομοριακές κυκλοποιήσεις και οξειδώσεις οδηγούν σε ένα μεγάλο αριθμό παραγώγων.

Τα τρία κύρια σεσκιτερπένια του είδους С. bergamia είναι ßτο μπισαμπολένιο (A), το trans-(B) καρυοφυλλένιο και το α-transμπεργαμοπτένιο (C).

Θεωρούνται και τα τρία σεσκιτερπένια

ενώ αποτελούνται από διαφορετικές και περίπλοκες αναδιατάξεις και κυκλοποιήσεις του φαρνεσυλοπυροφοσφορικού εστέρα [11].

#### *c.* Τριτερπένια

Τα τριτερπένια ανήκουν στην οικογένεια των τερπενίων και αποτελούνται από έξι μονάδες ισοπρενίων και κατέχουν 30 άνθρακες.

Τα **λιμονοειδή** είναι μια ιδιαίτερη κατηγορία των τριτερπενίων, ιδιαίτερα οξυγονωμένα

και τροποποιημένα και βρίσκονται στο καρπό αλλά С. bergamia του και σε άλλα εσπεριδοειδή. Αποτελεί μια τάξη με περίπλοκα δομικά στοιχεία και διάφορες υποκατηγορίες όπως τα άθικτα λιμονοειδή (intact limonoids), τα τροποποιημένα λιμονοειδή (modified limonoids) ή ακόμα τα seco-limonoids. Οι κατηγορίες διαφέρουν η μία με την άλλη κυρίως στο πεντακυκλικό δακτύλιο το οποίο υφίσταται πολλές παραλλαγές.



τετρανόρτριτερπενοειδές, η λιμονίνη

Τα άθικτα λιμονοειδή (intact limonoids), όπως η λιμονίνη, αποτελούνται από 26 άνθρακες. Η κατηγορία ονομάζονται **τετρανορτερπενοειδηή** λόγω της έλλειψης τεσσάρων ανθράκων της πλευρικής αλυσίδας στον άνθρακα C-17, σχετικά με ένα τριτερπενοειδές όπως η λανοστερόλη, με αποτέλεσμα την κυκλοποίηση σε φουρανικό δακτύλιο [2,30].

# **D. Φαρμακολογικές ιδιότητες**

Το είδος *Citrus bergamia* παρουσιάζει πολλές βιολογικές ιδιότητες ανάλογα με το με το εάν πρόκειται για το εκχύλισμα του φυτού ή το αιθέριο έλαιό του. Περιέχουν διαφορετικές κατηγορίες ουσιών και αυτό οδηγεί στο να έχουν διαφορετικές δράσεις.

Το εκχύλισμα του φυτού περιέχει σε πολύ μεγάλο βαθμό, φαινολικά παράγωγα όπου τα κύρια είναι η νεοεριοσιτρίνη, η ναρινγίνη και η νεοεσπεριδίνη, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως. Το αιθέριο έλαιο από την άλλη, αποτελείται κυρίως από τερπένια και συγκεκριμένα μονοτερπένια.

Τα τελευταία χρόνια έρευνες έχουν αποδείξει *"in vitro"* όπως και *"in vivo"* την δράση πολλών φυσικών προϊόντων ως δευτερεύουσα αγωγή κατά την υπερλιπιδαιμία και την υπεργλυκαιμία όπως τα φαινολικά παράγωγα του γένους *Citrus*.

Το εκχύλισμα του είδους *C. bergamia* παρουσιάζει ένα ιδιαίτερο προφίλ ουσιών σε σχέση με τα άλλα εσπεριδοειδή, τόσο στην ποικιλία, όσο και στην ποσότητα των ουσιών. Έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά στην μείωση των επιπέδων χοληστερόλης που επάγουν καρδιακά προβλήματα, και αυτό ίσως οφείλεται στην συνέργεια όλων των μορίων.

Τα μόρια έχουν αντιοξειδωτική δράση, παγιδεύοντας ελεύθερες ρίζες [10,31,32], αλλά και αντιφλεγμονώδη [33]. Η ρουτίνη και η νεοεριοσιτρίνη αναστέλλουν την οξείδωση της LDL-χοληστερόλης [34]. Η ναρινγίνη και η νεοεσπεριδίνη, όπως και τα άγλυκα τους, ναρινγενίνη και εσπεριδίνη, έχουν δράση στην μείωση την αθηρογένεσης ενισχύοντας το μεταβολισμό της χοληστερίνης [35-38].

Έχουν αναφερθεί πολλά οφέλη από την ημερήσια κατανάλωση εσπεριδοειδών λόγω της μείωσης των τριγλυκεριδίων, λιπιδίων και LDL-χοληστερόλης αλλά και αύξησης HDLχοληστερόλης. Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει πως η καθημερινή χρήση εμπορικά διαθέσιμων συμπληρωμάτων διατροφής, όπως το Bergavit©, το οποίο περιέχει τα τρία βασικά μόρια του, μειώνουν τον κίνδυνο καρδιακών παθήσεων λόγω της υψηλής χοληστερόλης [35]. Οι δράσεις τους συναγωνίζονται με αυτές των χημικών μορίων, όπως π.χ. με τις στατίνες, σε περιπτώσεις ελαφρώς αυξημένων επιπέδων χοληστερίνης [13].

Μια πρόσφατη επιστημονική έρευνα απέδειξε ότι κλασικά φάρμακα μπορούν να ληφθούν ταυτόχρονα με το φυσικό παράγωγο, και μειώνοντας την δοσολογία του χημικού παραγώγου, να διατηρηθούν τα ίδια αποτελέσματα. Το φυσικό παράγωγο μπορεί εν δυνάμει να μειώσει τις αρνητικές παρενέργειες των κλασικών φαρμάκων, δηλαδή των στατινών [34].

29

Τα τελευταία χρόνια έγινε μια ενδιαφέρουσα ανακάλυψη δύο μορίων στο φυτοχημικό προφίλ του εκχυλίσματος του χυμού αλλά και του περικαρπίου, διαφορετικά με όσα είχαν απομονωθεί στο παρελθόν.

Το πρώτο είναι η μελιτιδίνη και το δεύτερο η μπρουτιεριδίνη, τα οποία είναι παράγωγα 3-μέθυλο-3-υδρόξυ-γλουταρυλονεοεσπεριδοσίδης της ναρινγενίνης και της εσπεριτίνης αντίστοιχα [39]. Οι δυο ουσίες περιέχουν μια παρόμοια ομάδα με την 3-υδρόξυ-3-μέθυλογλουταρύλ–CoA που μετατρέπεται σε μεβαλονάτη με την βοήθεια της HMG-CoA αναγωγάσης, βασικό ένζυμο για τον σχηματισμό μορίων χοληστερόλης. Ως εκ τούτου, είναι φυσικοί ανταγωνιστές του ενζύμου και τις ονομάζουμε «statin-like» [5,13,34].



#### Εικόνα 19. Δομές των μορίων "statin-like"

Φαρμακολογικά, θα μπορούσαν να έχουν την ίδια αποτελεσματικότητα με τις στατίνες με βάση την δομή τους. Οι στατίνες αποτελούν ομάδα φαρμάκων πρώτης επιλογής για την καταπολέμηση υψηλών επιπέδων χοληστερόλης. Έχουν αξιοσημείωτη δράση αναστέλλοντας την εσωτερική HMG-CoA αναγωγάση, μειώνοντας έτσι την χοληστερίνη αλλά και την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου. Είναι συνήθως ανεκτές [5] αλλά είναι δυνατό να προκαλέσουν μυαλγίες αλλά και ραβδομυόλυση σε πιο ακραίες περιπτώσεις ταυτόχρονης χορήγησης με αναστολείς ηπατικού ενζύμου [13, 34].

Μια ερευνητική ιταλική ομάδα έχει συγκρίνει «*in vivo*» τις επιπτώσεις μιας ημερήσιας κατανάλωσης εκχυλίσματος με κύριο περιεχόμενο τα δύο καινούργια μόρια σε σχέση με την πιο γνωστή στατίνη, την σιμβαστατίνη. Η έρευνα έχει πραγματοποιηθεί σε πειραματόζωα χωρισμένα σε 4 ομάδες, ενώ οι δύο από αυτές ακολουθούσαν μια

30

υπερχολιστερολαιμική διατροφή. Οι μισοί έπαιρναν ημερήσια δόση 20mg/kg/ημέρα σιμβαστατίνη, ενώ οι υπόλοιποι 60mg/kg/ημέρα μείγμα φλαβονοειδών. Από τις άλλες δυο ομάδες η μία ακολουθούσε ισορροπημένη διατροφή, ενώ η άλλη μια δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, χωρίς καμία αγωγή ως ομάδες ελέγχου.



Τα αποτελέσματα επέδειξαν ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διακρίσεις αναμεσά στις δύο ομάδες με υπερχολιστερολαιμική διατροφή, οι οποίες λάμβαναν μια διαφορετική ημερήσια αγωγή, αν και σημειώθηκε αύξηση της HDL-χοληστερόλης στην ομάδα με την χορήγηση φλαβονοειδών [5].

Οι δύο φυσικές ουσίες επέδειξαν σημαντικά αποτελέσματα στα πειραματόζωα, εάν και πρέπει να σημειωθεί ότι η δόση της σιμβαστατίνης αποτελούσε μόνο το ένα τρίτο της καθημερινής δόσης των φλαβονοειδών. Για να μπορέσει να εγκριθεί η δράση των ουσιών θα έπρεπε να επαναληφθεί το πείραμα σε ανθρώπους σε μεγαλύτερη κλίμακα και με παρόμοιες συνθήκες για επιβεβαίωση των ίδιων προσδοκώμενων αποτελεσμάτων.

Το αιθέριο έλαιο από την άλλη, γνωστό από την αρχαιότητα ως αντισηπτικό, έχει αντιβακτηριακές [40-41] ιδιότητες όντας δραστικό σε στελέχη Gram- και Gram+ [40], αλλά και αντιμυκητιακές [42], καθώς χρησιμοποιείται στη θεραπεία της καντιντάσης.

Έχει επίσης αντικαρκινική και αντιπολλαπλασιαστική ικανότητα προς ορισμένες μορφές καρκίνων [43], όπως το νευροβλάστωμα [44-46]. Ενεργοποιεί μηχανισμούς που προκαλούν κυτταροτοξικότητα και οδηγούν στην αναστολή του καρκίνου, κυρίως λόγω της παρουσίας των μεγάλων περιεκτικοτήτων d-λιμονενίου [45] και οξικού λιναλυλεστέρα[44].

Το αιθέριο λάδι του περγαμόντου χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στην βιομηχανία τροφίμων μετά από αφαίρεση των τοξικών ουσιών όπως οι φουρανοκουμαρίνες. Τα τρόφιμα είναι ευαίσθητα στις οξειδώσεις λόγω της σύστασης τους σε λιπαρά οξέα που προκαλείται από το φως ή ακόμα από ενζυμικές αντιδράσεις. Γι' αυτό το λόγο η χρήση συντηρητικών θεωρείται απαραίτητη για την πρόληψη της μικροβιακής μόλυνσης των τροφίμων και για την καλή τους συντήρηση. Η ανάπτυξη φυσικών μεθόδων είναι ενδιαφέρουσα, λιγότερο επιβλαβής για την υγεία και πιο φιλική προς το περιβάλλον. Χάρη στην αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή τους δράση, το αιθέριο έλαιο αποτελεί μια ποιοτική εναλλακτική λύση για χημικά συντηρητικά εναντίον παθογόνων [3,47,48]. Το έλαιο του είδους *C. bergamia* έχει αποδεδειγμένη δράση κατά το παθογόνο *Aspergillus flavus,* χάρη στην σύσταση του πλούσια σε λιμονένιο και λιναλοόλη [42,49]. Το αρνητικό της υπόθεσης είναι ότι τα λάδια αποτελούν ακριβότερα προϊόντα απ' ότι τα συνθετικά μόρια [42].

Εισαγωγή

# Ε. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιοποίηση του χυμού μίας ποικιλίας καρπών του φυτού *Citrus bergamia* προερχόμενη από το νησί της Κεφαλονιάς.

Το πρώτο βήμα ήταν η απομόνωση των τριών κύριων φλαβανονών του εκχυλίσματος με μια γρήγορη και μικρή κλασμάτωση. Στην συνέχεια, η πραγματοποίηση κλασμάτωσης μεγάλης κλίμακας για την μελέτη των υπόλοιπων συστατικών, και κυρίως για τον διαχωρισμό του πολικού μέρους του εκχυλίσματος από το άπολο, το οποίο έχει μελετηθεί λιγότερο στο παρελθόν.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της αντιοξειδωτικής, της λευκαντικής και της αντιμικροβιακής δράσης των απομονωμένων μεταβολιτών αλλά και του αρχικού ολικού εκχυλίσματος.

Συμπερασματικά, η εργασία αυτή επικεντρώθηκε στην ανεύρεση εκχυλισμάτων και μορίων με βιολογική δράση, αποτελώντας έτσι μια πηγή βιοδραστικών ενώσεων.

# Β' μέρος : Πειραματικό μέρος

## Α. Οργανολογία και τεχνικές

Για την εκπόνηση της ερευνητικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω τεχνικές και συσκευές για την ανάλυση, κλασμάτωση του εκχυλίσματος αλλά και απόδοση δομής των μεταβολιτών.

#### 1. Χρωματογραφία προσρόφησης XAD-4

✓ Η υδρόφοβη ρητίνη XAD-4 αποτελείται από ένα μη πολικό συμπολυμερές του πολυστυρενίου - διβινυλοβενζολίου. Είναι μία μη ιονική μακροσκοπική ρητίνη, αδιάλυτη στο νερό και οργανικούς διαλύτες, προσροφά και απελευθερώνει ιόντα μέσω υδρόφοβων και πολικών αλληλεπιδράσεων. Χρησιμοποιείται για την προσρόφηση οργανικών ενώσεων από υδατικά συστήματα και πολικούς διαλύτες αλλά και στη φαρμακευτική βιομηχανία για απομάκρυνση φυτοφαρμάκων, χλωριωμένων οργανικών ενώσεων κτλ. [50].

Γειραματικά, η ρητίνη προσρόφησης χρησιμοποιείται για την εκτέλεση του εκχυλίσματος του χυμού με σκοπό την απομάκρυνση κυρίως σακχάρων και παραλαβή των δραστικών μορίων. Πριν την χρήση της, πραγματοποιείται ενεργοποίηση διάρκειας δυο ημερών ως εξής : έκπλυση πρώτα με νερό, στην συνέχεια έκπλυση και συντήρηση σε MeOH για 12 ώρες και τέλος, έκπλυση και συντήρηση πάλι σε νερό, ώστε να εκδηλώσει την προσροφητική της ικανότητα.

#### 2. Χρωματογραφία επί λεπτής στιβάδας - TLC

 Η χρωματογραφία επί λεπτής στιβάδας είναι μέθοδο μια χρωματογραφική από τις πιο συνηθισμένες για τον έλεγχο μιγμάτων και ταυτοποίηση καθαρών ουσιών. Η τεχνική αποτελείται από δύο φάσεις, όπως όλες τις μεθόδους διαχωρισμού. Ωστόσο, η στατική φάση είναι συνήθως μία πλάκα αλουμινίου επιστρωμένη με γέλη πυριτίου με πάχος λεπτής στιβάδας, μπορεί να είναι κανονικής φάσης ή αντίστροφης. Το δείγμα τοποθετείται σε κηλίδες στην βάση της πλάκας και τα μόρια προσροφούνται στην επιφάνεια των σωματιδίων.



Εικόνα 20. Απεικόνιση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας

#### Αποτελέσματα και συζήτηση

Η ανάπτυξη γίνεται σε θάλαμο ανάπτυξης με μίγμα οργανικών διαλυτών διαφορετικής πολικότητας, μέσω τριχοειδούς φαινόμενου. Κάθε ουσία έχει το δικό της χρόνο κατακράτησης και αυτό οφείλεται στην συγγένεια των μορίων ανάμεσα στις δύο φάσεις [51] [52].

✓ Καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των μειγμάτων, πλάκες αλουμινίου 20 cm x 20 cm κανονικής φάσης με επίστρωση γέλης πυριτίου και με πάχος στιβάδας 0.1mm (Silica gel 60 F<sub>254</sub>-Merck).

Για την απομόνωση και τον διαχωρισμό μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC Preparative) που αποτελείται από μια υάλινη πλάκα 20 cm x 20 cm ή 10cm x 20cm, κανονικής φάσης επιστρωμένη με γέλη πυριτίου με πάχος 0.25mm (Silica gel 60 F<sub>254</sub>-Merck). Το δείγμα τοποθετείται με τη χρήση μιας πιπέτας pasteur ως μια οριζόντια λεπτή γραμμή, 2cm από την βάση της πλάκας. Αναπτύσσεται σ' ένα σφραγισμένο θάλαμο με 100 ml συστήματος μέχρι να φτάσει το μέτωπο του διαλύτη 1,5cm από το τέλος της πλάκας. Οι λωρίδες που περιέχουν τις ενδιαφερόμενες ουσίες αφαιρούνται μ' ένα κοπίδι, συλλέγονται και εκχυλίζονται στην συνέχεια μ' ένα κατάλληλο σύστημα διαλυμάτων το οποίο είναι ικανό να αποδεσμεύσει το περιεχόμενο από την Silica.

Η παρατήρηση των πλακών γίνεται σε λάμπα υπεριώδους - ορατού (UV-Vis, CAMAG TLC Visualizer) σε μήκη κύματος 254 nm και 366 nm. Για την παρατήρηση των μορίων στον ορατό, χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο εμφάνισης ένα μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης, το οποίο ψεκάζεται και θερμαίνεται για την εμφάνιση κηλίδων. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται από ίσους όγκους δύο διαλυμάτων: το Α που περιείχε βανιλίνη (Merck, Art. No. S26047 841) 5% (w/v) σε μεθανόλη και το Β που περιείχε πυκνό H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% (v/v) σε μεθανόλη.

Αυτό εφαρμόζεται κυρίως στην απλή TLC, η οποία ψεκάζεται εξολοκλήρου, αλλά και στην παρασκευαστική, στην οποία ψεκάζεται μόνο ένα μικρό τμήμα όταν δεν φαίνονται κάποιες ουσίες στο UV. Η αρχή μεθόδου της χρωματογραφίας αποτελεί ίδια όσο για την απλή TLC τόσο για την παρασκευαστική, με σημαντική διαφορά το πάχος της πλάκας.

36
## 3. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης - HPLC

✓ Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποτελεί μια ισχυρή αναλυτική και παρασκευαστική μέθοδο για τον διαχωρισμό, την ανίχνευση και τον προσδιορισμό ενώσεων. Είναι μια εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης περιέχοντας επίσης δύο φάσεις. Η κινητή φάση, η οποία αποτελείται από ένα ή μίγμα διαλυτών, ρέει μέσω της στατικής, η οποία αποτελείται από μικρών σωματιδίων στερεό πληρωτικό υλικό, με βοήθεια μιας αντλίας υψηλής πίεσης. Διακρίνεται η χρωματογραφία σε κανονική και σε αντίστροφη φάση και αυτό αναλογεί με την πολικότητα των διαλυτών αλλά και του πληρωτικού υλικού της στήλης. Ο διαχωρισμός των ουσιών βασίζεται στην διαφορετική κατανομή των μορίων ανάμεσα στις δύο φάσεις, με αποτέλεσμα να κυμαίνονται με διαφορετική ταχύτητα μέσα στην στήλη [51].

✓ Πειραματικά, χρησιμοποιήθηκαν δύο υγρές χρωματογραφίες υψηλής απόδοσης, για την ανάλυση και διαχωρισμό κλασμάτων αλλά και απομόνωση καθαρών μεταβολιτών. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος.

- Η αναλυτική HPLC αποτελείται από ένα σύστημα Thermo Finnigan με μια αντλία SpectraSystem P4000, με ικανότητα ανάμειξης τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών, έναν απαερωτή SpectraSystem 1000, έναν αυτόματο δειγματολήπτη SpectraSystem AS3000 και έναν ανιχνευτή UV SpectraSystem UV2000. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις αναλύσεις είναι αντίστροφης φάσης C18 HS Supelco (25 cm x 4,6 mm, 5 μm). Τα συστήματα διαχωρισμού που επιλέχθηκαν είναι ισοκρατικά ή βαθμιδωτά αναλόγως τον σκοπό της ανάλυση και οι διαλύτες αποτελούνται από H<sub>2</sub>O, με 0,1% AA ή TFA, και MeOH ή ACN. Η λήψη και επεξεργασία χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ChromQuestTM 4.1.
- Η ημιπαρασκευαστική HPLC (Semi-Prep HPLC), αποτελείται από δύο αντλίες Prep Pump – Lab Alliance, με την ικανότητα ανάμειξης δύο διαφορετικών διαλυτών, σε οποιαδήποτε αναλογία και έναν ανιχνευτή UV Ecom Flash 06S DAD 800. Σχετικά με την αναλυτική HPLC, έχει την δυνατότητα να διαχωρίσει ουσίες από κλάσματα πιο πυκνά εφόσον η στήλη που χρησιμοποιείται είναι ημιπαρασκευαστική και είναι αντίστροφης φάσης C 18 Fortis (25cm x 10mm, 5μm). Χρησιμοποιείται για

37

κλασμάτωση και απομόνωση ουσιών από μίγματα και τα συστήματα που επιλέχθηκαν είναι βαθμιδωτά με διαφορετικές αναλογίες H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA και ACN. Για την λήψη και την επεξεργασία των δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Clarity 3.0.07.662.

#### 4. Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση - CPC

✓ Η Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση αποτελεί μια χρωματογραφία συστημάτων υγρού-υγρού χωρίς στερεό υπόστρωμα με βάση την κατανομή της διαλυμένης ουσίας μεταξύ τουλάχιστον δύο μη αναμείξιμων υγρών φάσεων ενός συστήματος σύμφωνα με τον συντελεστή κατανομής K<sub>d</sub> [53][54].

K= [A] static
A = κατανομή της ουσίας σε κάθε φάση
[A] moblie

Το μηχάνημα αποτελείται από μια σειρά από κανάλια που συνδέονται σε σειρά με αγωγούς και ευθυγραμμίζονται σε δίσκους κυκλικά γύρω από ένα στροφέα. Η κίνηση του στροφέα υποβάλλει ένα σταθερό φυγοκεντρικό πεδίο.

Οι δυο υγρές φάσεις του διφασικού συστήματος έχουν παρασκευαστεί με ανάμειξη δύο ή περισσότερων διαλυτών. Η μία χρησιμοποιείται ως στατική φάση και διατηρείται στη στήλη με βοήθεια της φυγόκεντρου δύναμης, και η δεύτερη φάση του διφασικού συστήματος χρησιμοποιείται ως κινητή φάση, η οποία στη συνέχεια διηθείται διαμέσου της στατικής, χάρη σε μια αντλία και στο φυγοκεντρικό πεδίο.

Ο διαλύτης που αντιπροσωπεύει την στατική φάση εισάγεται πρώτος στο όργανο και ακολουθεί αυτός που αντιπροσωπεύει την κινητή φάση, ωστόσο και οι δυο φάσεις μπορούν να επιλεγούν ως κινητή ή στατική αντίστοιχα. Το σύστημα μπορεί επίσης να δουλέψει είτε σε ανιούσα είτε σε κατιούσα λειτουργία, ανάλογα με την επιλογή της κινητής και στατικής φάσης. Στην ανιούσα λειτουργία, η ελαφρύτερη φάση διηθείται μέσα από τη βαρύτερη, με μια κατεύθυνση αντίθετη από το πεδίο φυγοκέντρισης, ενώ στην κατιούσα λειτουργία η βαρύτερη φάση διηθείται μέσω της ελαφρύτερης, στην κατεύθυνση του φυγοκεντρικού πεδίου [55].

Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η απουσία στερεού προσροφητή όπως η Silica που μπορεί να καταστρέψει τα πιο ευαίσθητα μόρια. Είναι μια γρήγορη τεχνική που μπορεί να εφαρμοστεί για την κλασμάτωση πολύπλοκων εκχυλισμάτων όπως των φυσικών προϊόντων, αλλά και για την απομόνωση καθαρών ουσιών, με μικρότερο όγκο διαλυτών

38

αναλογικά με τις υπόλοιπες τεχνικές κλασμάτωσης και απομόνωσης, και κυρίως με επαναληψιμότητα.

✓ Για την πειραματική πορεία, έγινε χρήση τριών χρωματογραφιών κατανομής κατ'αντιροής FCPC<sup>®</sup> Rousselet-Robatelet Kromaton με στήλη χωρητικότητας 50ml, 250ml και 1000ml αντίστοιχα με σκοπό την κλασμάτωση του εκχυλίσματος σε διαφορετική κλίμακα για την πλήρη φυτοχημική μελέτη του χυμού.

Η ταχύτητα περιστροφής των μηχανημάτων κυμαίνεται από 200 έως 2000rpm, παράγοντας έτσι φυγόκεντρο δύναμη ίση με 120 x g στα 1000 rpm και 480 x g στα 2000 rpm. Η κινητή φάση εισέρχεται σε ανιούσα ή κατιούσα φάση μέσα από την ειδική αντλία (LabAlliance, Scientific Scientific System, Inc). Τα κλάσματα συλλέγονται χειροκίνητα για την πρώτη κλασμάτωση αλλά αυτόματα για τις δύο επόμενες μέσω του συλλέκτη Buchi B-684.

Για τον έλεγχο των συστημάτων πραγματοποιήθηκαν μερικές δοκιμές σε δοκιμαστικούς σωλήνες μέχρι να γίνει η επιλογή του κατάλληλου διφασικού συστήματος, κάθε κλασμάτωσης, για τον διαχωρισμό των ουσιών. Αρχικά, διαλύθηκαν 8 mg του αρχικού εκχυλίσματος σε 10 ml κάθε υπό εξέταση συστήματος σε δοκιμαστικούς σωλήνες, ανακινήθηκαν και αφέθηκαν σε ηρεμία. Τα συστήματα τα οποία δεν πληρούσαν τις κατάλληλες προϋποθέσεις όπως παρουσία προβλημάτων διαλυτότητας ή εξισορρόπησης απορρίφθηκαν αμέσως. Για τα υπόλοιπα συστήματα, ελέγχθηκαν οι πάνω και κάτω φάσεις με ίσο όγκο διαλυμάτων, με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και στην συνέχεια με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Τα συστήματα πραγματοποιούνται με την βοήθεια μια διαχωριστικής χοάνης, στην οποία αναμείχθηκαν οι διαλύτες, αναδεύτηκαν και αφέθηκαν σε ηρεμία μέχρι τον διαχωρισμό των δύο φάσεων. Η κάτω φάση αντιστοιχεί στην πολική ενώ η πάνω φάση στην άπολη. Επιλέχθηκε ένα ισοκρατικό σύστημα για τις δυο πρώτες χρωματογραφίες, ενώ το σύστημα της τρίτης και πιο σημαντικής κλασμάτωσης ήταν βαθμιδωτό όπως αναφέρεται παρακάτω.



Εικόνα 21. Μηχάνημα CPC - Kromaton

## 5. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού – Sephadex

✓ Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού είναι μια τεχνική, ο οποίος σκοπός της



**Εικόνα 22**. Απεικόνιση αρχής λειτουργείας της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού

είναι ο διαχωρισμός μορίων του αναλυόμενου δείγματος, ανάλογα με το μέγεθος τους. Είναι μια χρωματογραφία στήλης με στερεή στατική φάση (gel) και υγρή κινητή φάση. Τα μεγαλύτερα μόρια εκλούονται πρώτα από την στήλη γιατί δεν μπορούν να εισχωρήσουν στο gel, ενώ αντιθέτως, τα μικρότερα μόρια, εισέρχονται στους πόρους της στατικής φάσης και εκλούονται τελευταία από την στήλη.

Ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα gel είναι το Sephadex, κυρίως για το διαχωρισμό πρωτεϊνών και άλλων μεγάλων μορίων βιοχημικού ενδιαφέροντος. Το Sephadex έχει πολικό χαρακτήρα και παρασκευάζεται από τις δεξτράνες των πολυσακχαριτών, που παράγονται με την επίδραση ενός βακτηρίου στο καλαμοσάκχαρο.

✓ Επιβλήθηκαν δύο χρωματογραφίες μοριακού αποκλεισμού για τον διαχωρισμό μεταβολιτών από πλουσίων κλασμάτων του εκχυλίσματος του χυμού. Χρησιμοποιήθηκε ρητίνη Sephadex LH-20 (γέλη υδροξυλιωμένης δεξτράνης με μέγεθος κόκκων 25 – 100μm).

Πριν την χρήση, η στατική φάση αφήνεται να διογκωθεί με τον διαλύτη έκλουσης για 24 ώρες, και πακετάρεται στη συνέχεια χωρίς την χρήση παροχής αέρα. Στην συνέχεια ακολουθεί η διέλευση του διαλύτη έκλουσης με σκοπό την σωστή πλήρωση της στήλης και την αποφυγή δημιουργίας κενών αέρα.

#### 6. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού – NMR

✓ Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) βασίζεται στην ιδιότητα που έχουν οι πυρήνες των ατόμων που εισέρχονται σε μαγνητικό πεδίο να απορροφούν και να επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Χρησιμοποιείται ακτινοβολία στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων για τη διέγερση ατόμων, συνήθως πρωτονίων ή ατόμων άνθρακα<sup>13</sup>C, έτσι ώστε τα spin τους να αλλάζουν από παράλληλα σε αντιπαράλληλα προς ένα εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο. Η περιοχή συχνοτήτων, που

απαιτούνται για τη διέγερση και την πολλαπλότητα των κορυφών που προκύπτουν, είναι πολύ χαρακτηριστική της δομής του μορίου. Πρόκειται για μια ισχυρή τεχνική, η οποία παρέχει πολύ περισσότερες πληροφορίες για τη μοριακή δομή από κάθε άλλη τεχνική.

✓ Η λήψη των φασμάτων μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού εφαρμόστηκε σε φασματογράφο Bruker Ultrashield<sup>™</sup> PLUS 600MHz. Καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής πορείας λήφθηκαν φάσματα μιας διάστασης <sup>1</sup>H-NMR, καθώς και δύο διαστάσεων COSY (Correlation spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) και HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence), για την ταυτοποίηση και την διαπίστωση καθαρότητας των απομονωμένων μεταβολιτών.

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε 550 μl δευτεριωμένων διαλυτών όπως δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD), δευτεριωμένη ακετόνη (d6-acetone), δευτεριωμένο διμεθυλσουλφοξείδιο DMSO (d6-DMSO), δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl<sub>3)</sub> και δευτεριομένη πυριδίνη (d-pyridine).

Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) εκφράζονται σε ppm και οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Τέλος, η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως s (απλή), brs (ευρεία απλή), d (διπλή), t (τριπλή), q (τετραπλή), dd (διπλή-διπλή) και m (πολλαπλή).

## 7. Υγρή χρωματογραφία - Φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας – LC-HRMS

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική αναγνώρισης και ποσοτικοποίησης ενώσεων αλλά και διευκρίνησης της δομής τους σχετικά με την μάζα των μορίων αυτών. Το φασματόμετρο μαζών λειτουργεί με το σχηματισμό φορτισμένων μορίων ή μοριακών θραυσμάτων, σε περιοχές υψηλού κενού ή αμέσως πριν την εισαγωγή του δείγματος σε περιοχές υψηλού κενού. Τα ιόντα σχηματίζονται στην αέρια φάση, αρνητικά ή θετικά, ωστέ να μπορέσουν να διαχειριστούν με την εφαρμογή ενός μαγνητικού ή ηλεκτρικού πεδίου και στην συνέχεια να προσδιοριστούν τα μοριακά βάρη κάθε θραύσματος. Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την υγρη χρωματογραφία (LC-MS) μπορώντας έτσι να προσδιοριστούν τα μοριακά βάρη των ενδιαφερόμενων ενώσεων ακόμα και αν αυτές συνυπάρχουν με προσμίξεις [51].

Η τεχνική πραγματοποιήθηκε σε μηχάνημα LTQ-Orbitrap platform της εταιρείας Thermo Fisher Scientific, το οποίο συνδυάζει αναλυτή μάζας γραμμικής παγίδας (linear

41

trap) με αναλυτή μάζας τροχιακής παγίδας (orbitrap). Δίνει μετρήσεις μοριακού βάρους με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων, παρέχοντας τη δυνατότητα απόδοσης των μοριακών τύπων και των βαθμών ακορεστότητας με μεγάλη ακρίβεια. Για μεγαλύτερη ακρίβεια λήφθηκαν και φάσματα MS/MS. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν σε διάλυμα 1ml MeOH ή MeOH : H<sub>2</sub>O αναλυτικής καθαρότητας σε αναλογία 50:50 σε τελική συγκέντρωση 300 μg/ml για τα κλάσματα και 100μg/ml για τις καθαρές ουσίες.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις αναλύσεις είναι αντίστροφης φάσης Fortis C18 (100 mm x 2.1 mm, 1.7 u) και ο όγκος ένεσης είναι 2 mL. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 40 ° C και το σύστημα έκλουσης δειγμάτων στο LC-HRMS/MS όπως και οι συνθήκες ιονισμού και θραυσμάτωσης είχαν ως εξής :

Χρόνος	A (%)	B (%)	Ροή
(min.)	H <sub>2</sub> O + 0,1% F.A	ACN	(ml/min)
0	95	5	0,35
3	95	5	0,35
23	-	100	0,35
25	-	100	0,35
27	95	5	0,35
31	95	5	0,35

Εύρος μάζας	100 – 1500 (FS & MS/MS)	
Διακριτική Ικανότητα Μάζας	30 000	
Ρυθμισμένη Ενέργεια Πρόσκρουσης	35% (Act.Q 0.250)	
Ανιχνευτής Ιονισμού	Positive & Negative mode	
Συνθήκες ESI	Capillary temp. 300°C	
	Capillary voltage: -3.5V	
	tube lens: -98 V	
	Sheath gas nitrogen: 40 arb. units	
	auxiliary gas nitrogen: 10 arb. Units	

Πίνακας 2. Πειραματικές συνθήκες του LC-HRMS-ESI

# Β. Δοκιμές βιολογικής δραστικότητας

Στην συνέχεια την πειραματικής πορείας, πραγματοποιήθηκαν ορισμένες βιοδοκιμές με στόχο τον προσδιορισμό βιολογικής δραστικότητας των καθαρών μορίων αλλά και εκχυλισμάτων. Πιο συγκεκριμένα, το ολικό αιθανολικό εκχύλισμα του χυμού των περγαμόντων Κεφαλονιάς συγκρίθηκε με το αιθανολικό εκχύλισμα του χυμού περγαμόντων Καλαβρίας, το οποίο προήλθε από μια προηγούμενη συγκριτική μελέτη των δύο χυμών και παρασκευάστηκε ακριβώς με τον ίδιο τρόπο, αλλά και οι 14 ταυτοποιημένοι μεταβολίτες. Οι βιοδοκιμές που υποβλήθηκαν τα εν λόγω κλάσματα ήταν η μελέτη της αντιοξειδωτικής και λευκαντικής δράσης, αλλά και της αντιμικροβιακής ως προς τέσσερα στελέχη.

## 1. Μελέτη DPPH – αντιοξειδωτική δράση

✓ Το DPPH ή 2,2-διφενύλ-1-πικρυλυδραζίλιο, αποτελεί μια σταθερή και εμπορικά διαθέσιμη ελεύθερη ρίζα αζώτου με έντονο και χαρακτηριστικό μωβ χρώμα. Όταν τα αντιοξειδωτικά συστατικά των δειγμάτων προς ανάλυση βρεθούν σε επαφή με την ρίζα, η ίδια παγιδεύεται, με αποτέλεσμα να αποχρωματίζεται το διάλυμα σε ένα κίτρινο χρώμα. Έτσι, η ελάττωση της ποσότητας της ρίζας οδηγεί στην μείωση της μέγιστης απορρόφησης του μορίου στα 517nm [56].



Εικόνα 23. Αντίδραση του μορίου DPPH με αντιοξειδωτικό παράγωγο

✓ Για την πραγματοποίηση της μελέτης αντιοξειδωτικής δράσης παρασκευάστηκαν το αντιδραστήριο αλλά και τα δείγματα με τις παρακάτω συγκεντρώσεις :

- Διάλυμα DPPH: 12,4 mg αντιδραστηρίου για 100 ml EtOH. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε σκούρο μπουκάλι λόγω της φωτοευαισθησίας του διαλύματος και στην συνέχεια σε υδατόλουτρο υπερήχων μέχρι πλήρους διάλυση.
- Θετικός μάρτυρας : παρασκευάστηκε αιθανολικό διάλυμα γαλλικού οξέος ως αναστολέας της ρίζας με IC<sub>50</sub>= 29,39 μM
- Εκχυλίσματα: παρασκευή των δειγμάτων στον ίδιο διαλύτη σε C=10mg/ml
- Καθαρές ουσίες: μελετήθηκαν σε συγκέντρωση C= 100μM

Στην συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε πηγάδι 96-τρυπής πλάκας, 10 μl του κάθε δείγματος προς ανάλυσης και 190 μl αιθανολικού διαλύματος DPPH. Για όλα τα δείγματα προς ανάλυση, πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Χρησιμοποιήθηκαν δυο πηγάδια ως μάρτυρες, το ένα θετικό και το δεύτερο αρνητικό, για την επιβεβαίωση της σωστής λειτουργίας της ανάλυσης,. Στο πρώτο, τοποθετήθηκαν 10 μl αιθανόλης με 190 μl αιθανολικού διαλύματος DPPH, και στο δεύτερο, με την ίδια διαδικασία, τον αναστολέα της ρίζας. Δημιουργήθηκαν πηγάδια ως blank, αντίστοιχα για τον αναστολέα και τον αρνητικό μάρτυρα, αλλά και για όλα τα δείγματα, τα οποία αποτελούνται από 10 μl δείγματος και 190 μl αιθανόλης, χωρίς της παρουσία της ρίζας. Τέλος, η πλάκα τοποθετήθηκε στο σκοτάδι για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και στην συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση στα 517 nm.

Το ποσοστό δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας υπολογίστηκε με την παρακάτω εξίσωση:

#### [(A-B)-(C-D)] x100 (A-B)

A : αρνητικός μάρτυρας – B: blank (EtOH) – C: δείγμα – D: blank δείγματος

Για την έκφραση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης IC<sub>50</sub>. Εκφράζει την ακριβή απαιτούμενη συγκέντρωση του δείγματος για την μείωση της αρχικής συγκέντρωσης του τυφλού διαλύματος DPPH κατά 50%, η οποία βρέθηκε από την γραφική παράσταση των ποσοστών δέσμευσης του DPPH με την συγκέντρωση των δειγμάτων.

## 2. Μελέτη Λευκαντικής δράσης

✓ Η τυροσινάση είναι ένα ένζυμο ευρέως διαδεδομένο σε βακτήρια, μύκητες, ανώτερα φυτά και ζώα. Πρόκειται για μία μονοοξυγέναση που περιέχει χαλκό, στο ενεργό της κέντρο και εμπλέκεται στην βιοσύνθεση της μελανίνης. Καταλύει την υδροξυλίωση της τυροσίνης, μιας μονοφαινόλης, σε DOPA ή 3,4-διϋδρόξυφαινυλαλανίνη, μια ο-διφαινόλη.
Η οξείδωση της DOPA σε ντοπακουινόνη μπορεί στη συνέχεια να μετασχηματιστεί σε μελανίνη μέσα από μια σειρά ενζυματικών και μη ενζυματικών αντιδράσεων.



Εικόνα 24. Μηχανισμός δράσης της τυροσινάσης

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η ικανότητα των δειγμάτων να παρεμποδίσουν την οξείδωση της L-DOPA σε ντοπακουινόνη και ακολούθως σε ντοπαχρώμη από τυροσινάση μανιταριού[57,58].

Για την μελέτη της λευκαντικής δράσης παρασκευάστηκαν το αντιδραστήριο αλλά και τα δείγματα με τις παρακάτω συγκεντρώσεις :

- **Ρυθμιστικό Διάλυμα**: 49,4g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 82,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 1L H<sub>2</sub>O. Μαγνητική ανάδευση για μισή ώρα και μέτρηση pH=6,7±0,02. Διατήρηση στους 4<sup>°</sup>C.
- L-DOPA: 5 mg + 10 mL H<sub>2</sub>O (σε σκοτάδι). Το διάλυμα αναδεύτηκε με τη βοήθεια vortex και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων για 15 λεπτά. Ακολούθησε

φυγοκέντρηση στις 2900rpm, για 10 λεπτά και μεταφορά του υπερκείμενου σε falcon. Το υπόστρωμα διατηρήθηκε σε σκοτεινό περιβάλλον και σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα Τυροσινάσης: 92 Ug/ml Τυροσινάση μανιταριού (L-Tyrosine, 25.000units, Sigma- Aldrich) διαλυμένη σε Potassium Buffer.
- Εκχυλίσματα: παρασκευή των δειγμάτων στον ίδιο διαλύτη σε C=10mg/ml
- Καθαρές ουσίες: μελετήθηκαν σε συγκέντρωση C=100μM

Στην συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε πηγάδι 96-τρυπής πλάκας, 40 μl του κάθε δείγματος προς ανάλυσης, 80 μl ρυθμιστικού διαλύματος, και 40 μl τυροσινάσης. Για τα δείγματα προς ανάλυση, πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Σαν πρότυπο αναστολέα του ενζύμου, ή θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε το κοζικό οξύ (IC<sub>50</sub>=14,07 μM) και ως αρνητικός μάρτυρας, ένα διάλυμα το οποίο αποτελείται από 40 μl τυροσινάσης και 120 μl ρυθμιστικού διαλύματος. Για το κάθε δείγμα, δημιουργήθηκε ένα πηγάδι ως blank, αντίστοιχα για τους αναστολείς και τον αρνητικό μάρτυρα, αλλά και για όλα τα δείγματα, τα οποία αποτελούνται από 40 μl δείγματος και 120 μl ρυθμιστικού διαλύματος, χωρίς της παρουσία της τυροσινάσης. Η πλάκα επωάστηκε στο σκοτάδι για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και στην συνέχεια προστέθηκαν σε όλα τα πηγάδια 40 μl L-DOPA. Ακολούθησε επώαση, στο σκοτάδι, για άλλα 5 λεπτά και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 475 nm. Μετρήθηκε η παραγόμενη ποσότητα ντοπαχρώμης και υπολογίστηκε το ποσοστό

### 3. Μελέτη αντιμιρκοβιακής δράσης

✓ Η μέθοδος διάχυσης με δίσκους αναφέρεται στην διάχυση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα, μιας γνωστής συγκέντρωσης, από δίσκους, μέσα σε ένα στερεό μέσο καλλιέργειας το οποίο έχει εμβολιαστεί με ένα επιλεγμένο βακτηριακό στέλεχος.

Σχηματίζεται μια ζώνη αναστολής γύρω από τον δίσκο, η οποία είναι ανάλογη προς την αντιμικροβιακή δράση του παράγοντα που υπάρχει στο δίσκο προς το εξεταζόμενο στέλεχος. Η διάμετρος αυτής της ζώνης αναστολής γύρω από τον αντιμικροβιακό δίσκο σχετίζεται με την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) για το συγκεκριμένο συνδυασμό βακτηρίου / αντιμικροβιακού παράγοντα. Όμως, όσο μεγαλύτερη είναι η ζώνη αναστολής, τόσο χαμηλότερη είναι η συγκέντρωση του αντιμικροβιακού που απαιτείται για

την αναστολή της ανάπτυξης των οργανισμών, εφόσον η διάμετρος και η MIC του συγκεκριμένου βακτηρίου συσχετίζονται αντιστρόφως με τη MIC του μελετώμενου βακτηρίου [59].

✓ Κατά την ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν τριβλία Petri με θρεπτικό υλικό Nutrient Agar (NA), στα οποία τοποθετήθηκαν με την βοήθεια απενιονισμένου νερού για ομοιόμορφη διασπορά, καλλιέργειες βακτηρίων Gram-(Escherichia Coli) Gram και + (Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis και Micrococcus luteus).

Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν με μία αποστειρωμένη λαβίδα, περιμετρικά,



Εικόνα 25. Τριβλία καλλιέργειας βακτηρίων

δισκάκια διάμετρου 6mm στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού, τα οποία εμποτίστηκαν με 10μl των δειγμάτων (C=100mg/ml DMSO) προς ανάλυση. Ως αρνητικός μάρτυρας,



**Εικόνα 26**. Μέθοδος διάχυσης αντιμικροβιακής ουσίας σε στερεό υπόστρωμα

χρησιμοποιήθηκε ένας δίσκος εμποτισμένος με 10 μl DMSO και ως θετικός ένα δισκίο ερυθρομυκίνης.

Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 24 ώρες, την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις της διαμέτρου την ζώνης αναστολής γύρω από το δισκίο με την βοήθεια αριθμημένου χάρακα.

Όλη η διαδικασία έλαβε χώρα υπό ασηπτικές συνθήκες, μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής, και πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις των αναλύσεων.

# Β. Φυτοχημική μελέτη

## 1. Συλλογή του καρπού του φυτού Citrus bergamia Risso

Το φυτικό υλικό συλλέχθηκε από το κτήμα Κουρή στην περιοχή Βλαχάτα του νησιού της Κεφαλονιάς. Περίπου 150 κομμάτια μεταφέρθηκαν στο Πανεπιστήμιο Αθηνών τέλη Ιουνίου του 2016. Τα φρούτα ήταν ώριμα, αρωματικά με έντονο κίτρινο χρώμα. Η περιοχή διαθέτει μια ιδιαίτερη ποικιλία περγαμόντων που διαφέρει οργανοληπτικά με τα γνωστά περγαμόντα της Καλαβρίας. Το περικάρπιο του φυτού είναι πολύ παχύ και εξωτερικά

έντονα ρυτιδωμένο. Αποτελείται κυρίως από το σπογγώδες και λευκό μεσοκάρπιο ή albedo το οποίο επικαλύπτεται από μια λεπτή στρώση κίτρινου flavedo. Τα φρούτα δεν είναι όμοια μεταξύ τους, και συγκριτικά με την ιταλική ποικιλία, ζυγίζουν πιο πολύ. Μπορούν να φτάσουν το 1,5-2 κιλά και 20cm διάμετρο.



Για την φαρμακογνωστική μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ο χυμός των αποφλοιωμένων

Εικόνα 27. Καρπός του φυτού, συλλογή στην Κεφαλονιά , 05.2017

φρούτων, από τα οποία παραλάβαμε 13 λίτρα χυμού με την χρήση αποχυμωτή [60].

## 2. Εκχύλιση του χυμού με χρήση ρητίνης προσρόφησης XAD-4

Για την παρασκευή του εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκαν 10,5 λίτρα του χυμού. Πριν



**Εικόνα 28**. Απεικόνιση της διαδικασίας εκχύλισης του χυμού.

γίνει οποιαδήποτε επεξεργασία, ο χυμός τοποθετήθηκε σε βάζα των 500ml και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 4000rpm/min επί 30 λεπτά, ώστε να να παραλάβουμε μόνο το καθαρό υπερκείμενο.

Τοποθετήθηκαν σε μια κωνική φιάλη των πέντε λίτρων, προστέθηκε ένα λίτρο ρητίνης XAD-4 [60] για τρία λίτρα χυμού, και το οποίο διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για μια περίπου 10 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Στην συνέχεια, διηθήθηκε η ρητίνη με

φίλτρο Buchner por.3 υπό κενό, ενώ το υδατικό διάλυμα δεν συλλέχθηκε εφόσον τα

δραστικά συστατικά έχουν απορροφηθεί στην ρητίνη. Για την παραλαβή των δραστικών συστατικών, εκπλύθηκε η ρητίνη με οργανικό διαλύτη, δυο λίτρα αιθανόλης (EtOH), αφέθηκε υπό ανάδευση για 4-5 ώρες, το οποίο επαναλήφθηκε δύο φορές. Κατόπιν, η ρητίνη διηθήθηκε και παραλήφθηκε το αιθανολικό διάλυμα πλούσιο σε δευτερογενείς μεταβολιτές, το οποίο συμπυκνώθηκε στο Rotavapor μέχρι ξηρού υπολείμματος. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για την εκχύλιση των συνολικά 10,5 λίτρων, τα οποία απέδωσαν 115g ξηρού εκχυλίσματος.

## 3. Ανάλυση HPLC

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης του ολικού εκχυλίσματος με σκοπό την ανίχνευση και τον προσδιορισμό βασικών ουσιών του δείγματος. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική HPLC, με το παρακάτω σύστημα διαχωρισμού, και το δείγμα είχε ως τελική συγκέντρωση 1mg/ml MeOH.

Χρόνος	A (%)	B (%)	Poή (ml/min)
(min.)	H2O + AA 0,1%	MeOH	
0	100	-	1
15	83	17	1
17	83	17	1
22	75	25	1
30	65	35	1
50	50	50	1
60	50	50	1
65	-	100	1
75	-	100	1
80	100	-	1
95	100	-	1

Πίνακας 3. Σύστημα διαχωρισμού της ανάλυσης HPLC του ολικού εκχυλίσματος

## 4. Κλασμάτωση και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών

Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης HPLC του ολικού εκχυλίσματος, τέθηκε αρχικά ως στόχος η απομόνωση των κύριων φλαβανονών για την επιβεβαίωση των βιβλιογραφικών δεδομένων και γι αυτό τον λόγο πραγματοποιήθηκαν δύο κλασματώσεις μικρής κλίμακας. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια τελευταία μεγάλης κλίμακας κλασμάτωση για την φυτοχημική ανάλυση με σκοπό την απομόνωση και τον προσδιορισμό των υπόλοιπων ουσιών σε μικρότερη περιεκτικότητα στο χυμό.

#### a. Απομόνωση μεταβολιτών Ι & ΙΙ

#### i. Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση

Πραγματοποιήθηκε μια πρώτη κλασμάτωση μικρής κλίμακας του ξηρού εκχυλίσματος με την χρήση χρωματογραφίας κατανομής με φυγοκέντρηση. Μόνο 110,03 mg προχώρησαν σε ανάλυση με σκοπό την γρήγορη απομόνωση των βασικών συστατικών του εκχυλίσματος με ένα ισοκρατικό σύστημα έκλουσης.

Η κλασμάτωση CPC εφαρμόστηκε σε μηχάνημα FCPC<sup>®</sup> Rousselet-Robatel Kromaton με στήλη χωρητικότητας 50 ml και το σύστημα που επιλέχθηκε ήταν ισοκρατικό EtOAc : BuOH : H<sub>2</sub>O σε αναλογία 4:1:5.

Παρασκευάστηκαν 500ml συστήματος από το οποίο παραλήφθηκε η κάτω φάση που ορίστηκε ως κινητή, και η πάνω φάση ως στατική. Η στήλη πληρώθηκε πρώτα με την στατική φάση, με κατιούσα λειτουργία με ροή 4ml/min και στροφές 200rpm/min. Ακολούθως, έγινε εισαγωγή της κινητής φάσης, με κατιούσα λειτουργία, με ροή 2ml/min και στροφές 1300 rpm/min ώστε να γίνει εξισορρόπηση των δυο φάσεων. Τα 110,03 mg εκχυλίσματος διαλύθηκαν σε 2ml στατικής και 2ml κινητής φάσης, και εισήχθη στο ισορροπημένο σύστημα ενέσιμα με βρόχο των 5ml. Στην συνέχεια έγινε η συλλογή των κλασμάτων των 2ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες με ροή 2ml/min και στροφές 1300 rpm/min.

Εισήχθησαν δύο όγκοι στήλης της κινητής φάσης με κατιούσα λειτουργία και στην συνέχεια, ένας όγκος στήλης της στατικής φάσης με ανούσια λειτουργία. Συλλέχθηκε επίσης ένας όγκος στήλης στατικής φάσης σε μια κωνική με σκοπό την απομάκρυνση όλων των συστατικών από την στήλη.



Εικόνα 29. Παρουσίαση των 13 τελικών κλασμάτων του CPC\_1 μέσω TLC στο ορατό

Συνολικά συλλέχθηκαν 75 κλάσματα και μια εξώθηση της στήλης, τα οποία ελέγχθηκαν ως προς το περιεχόμενο τους μέσω TLC, με σύστημα ανάπτυξης την οργανική φάση του διφασικού συστήματος CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O, σε αναλογία 13:9:3 και συνενώθηκαν σε 13 κλάσματα συνολικά.

#### ii. Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Οι μεταβολίτες Ι & ΙΙ απομονώθηκαν μέσω TLC preparative από τις συνενώσεις 5-7 και 9-13 του CPC αντίστοιχα, όπως αναφέρεται πιο πάνω.

Αρχικά, συνενώθηκαν τα κλάσματα 5-7, διαλύθηκαν σε 400μl και εφαρμόστηκαν εξ' ολοκλήρου με μια πιπέτα pasteur σε μια πλάκα 10cm x 20cm ως λεπτή οριζόντια στρώση των 10cm, 2cm πάνω από την βάση. Τα κλάσματα 11-12-13 συνενώθηκαν και διαλύθηκαν σε 400μl MeOH, ενώ τα κλάσματα 9 και 10 διαλύθηκαν σε 200μl. Στην πρώτη φάση εφαρμόστηκε η συνένωση 11-13 σε μια οριζόντια γραμμή των 8cm, ενώ σε δεύτερη και τρίτη φάση εφαρμόστηκαν τα κλάσματα 9 και 10 σε μια οριζόντια γραμμή των 4cm, με πιπέτα pasteur, όλα σε μια πλάκα.

Οι πλάκες αναπτύχθηκαν σε ένα σφραγισμένο θάλαμο με 100ml της οργανικής φάσης του διφασικού συστήματος CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O σε αναλογία 13:9:3 και παρατηρήθηκε στην συνέχεια στα 254nm.

Τέλος, κάθε λωρίδα συλλέχθηκε ξεχωριστά, ακολούθησε η εκχύλιση με 5 ml του μίγματος MeOH:CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O σε αναλογία 14:6:1. Τα δείγματα εξατμίστηκαν και ζυγίστηκαν ξεχωριστά.

Από την πρώτη TLC preparative, απομονώθηκε ο μεταβολίτης Ι και από την δεύτερη χρωματογραφία απομονώθηκε ο μεταβολίτης ΙΙ.



Εικόνα 30. Διαγραμματική απεικόνιση της απομόνωσης των μεταβολιτών Ι & ΙΙ

#### b. Απομόνωση μεταβολιτών Ι & ΙΙΙ

#### i. Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση

Πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη κλασμάτωση του αιθανολικού εκχυλίσματος αντίστοιχη με την προηγούμενη, με μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος και όγκο στήλης με σκοπό την απομόνωση των προηγούμενων μεταβολιτών σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα.

Η κλασμάτωση CPC εφαρμόστηκε σε μηχάνημα FCPC<sup>®</sup> Rousselet-Robatel Kromaton με στήλη χωρητικότητας 250 ml με το ακριβώς ίδιο ισοκρατικό σύστημα διαλυτών. Παρασκευάστηκαν 2000ml συστήματος, όπως προηγούμενος και παραλήφθηκαν η πολική κάτω φάση και η άπολη πάνω φάση. Το πείραμα έτρεξε επίσης σε κατιούσα λειτουργία με την πολική φάση ως κινητή και την άπολη ως στατική. Η στήλη πληρώθηκε με την στατική φάση, σε κατιούσα λειτουργία με ροή 20ml/min και στροφές 600rpm/min. Ακολούθως, έγινε εισαγωγή της κινητής φάσης, σε κατιούσα λειτουργία επίσης, με ροή 10ml/min και στροφές 1500 rpm/min ώστε να γίνει εξισορρόπηση των δυο φάσεων.

Σ' αυτή την φάση, 1g εκχυλίσματος προχώρησε σε διαχωρισμό και διαλύθηκε σε 8ml στατικής φάσης και 2ml κινητής φάσης, καθώς το δείγμα διαλύεται καλύτερα στην πολική φάση λόγω της περιεκτικότητά του σε πολικά συστατικά. Εισήχθη στο ισορροπημένο σύστημα ενέσιμα με βρόχο των 10ml.

Στην συνέχεια έγινε η συλλογή των κλασμάτων των 10ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες με poή 10ml/min και στροφές 1500 rpm/min. Εισήχθησαν δύο όγκοι στήλης κινητής φάσης όπως και στατικής , πρώτα σε κατιούσα λειτουργία και στην συνέχεια σε ανούσια λειτουργία με poή 10ml/min και στροφές 600 rpm/min. Συλλέχθηκε επίσης ένας όγκος στήλης στατικής φάσης σε μια κωνική με σκοπό την απομάκρυνση όλων των συστατικών από την στήλη με poή 30ml/min και στροφές 600 rpm/min.



Εικόνα 31. Παρουσίαση των 14 τελικών κλασμάτων του CPC\_2 μέσω TLC στο ορατό

Τέλος, συλλέχθηκαν 90 κλάσματα και μια εξώθηση της στήλης τα οποία ελέγχθηκαν ως προς το περιεχόμενο τους μέσω TLC, με σύστημα ανάπτυξης διαλυτών την οργανική φάση του διφασικού συστήματος CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, σε αναλογία 13:9:3 και συνενώθηκαν σε 14 κλάσματα συνολικά.

#### ii. Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Ακολούθησε η απομόνωση των μεταβολιτών Ι & ΙΙΙ μέσω TLC preparative από την συνένωση 8 του CPC όπως αναφέρεται πιο πάνω.

Η ανάπτυξη της πλάκας πραγματοποιήθηκε σε ένα θάλαμο με 100ml της οργανικής φάσης του διφασικού συστήματος CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O σε αναλογία 13:9:3. Όταν το μέτωπο του διαλύτη φτάσει στο επιθυμητό σημείο, αφαιρείται από τον θάλαμο και στην συνέχεια παρατηρείται στα 254nm.

Δυο ζώνες συλλέγονται ξεχωριστά και ακολουθεί η εκχύλιση με 5 ml του μίγματος MeOH:CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O σε αναλογία 14:6:1. Τέλος, εξατμίζονται τα δείγματα και ζυγίζονται ξεχωριστά.

Απο το αρχικό κλάσμα απομονώθηκαν δύο ουσίες. Πιο συγκεκριμένα ο μεταβολίτης Ι, ο οποίος παραλήφθηκε και από την προηγούμενη κλασμάτωση CPC, αλλά και ο μεταβολίτης ΙΙΙ σε μίγμα.

#### iii. Παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Το μίγμα ουσιών, το οποίο περιέχει τον μεταβολίτη ΙΙΙ, προχώρησε σε μια επιπλέον επεξεργασία για την παραλαβή καθαρής ουσίας.

Αρχικά, το δείγμα διαλύθηκε εξολοκλήρου σε 1ml MeOH και εισήχθη ενέσιμα στον βρόχο των 100μl. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 30 ενέσεις με όγκο των 20 έως 45 μl με μέγιστη απορρόφηση της ουσίας στα 280nm. Η μέθοδος διαχωρισμού που επιλέχθηκε, ήταν ισοκρατική και αποτελείται από ένα σύστημα διαλυτών, με 68% H<sub>2</sub>O και 32% MeOH με ροή 1ml/min.



Εικόνα 32. Διαγραμματική απεικόνιση της απομόνωσης των μεταβολιτών Ι & ΙΙΙ

#### c. Απομόνωση μεταβολιτών V - XIV

#### i. Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση

Για την φυτοχημική ανάλυση και απομόνωση περαιτέρω ουσιών, έγινε μια τρίτη και τελευταία κλασμάτωση μεγάλης κλίμακας του αιθανολικού εκχυλίσματος μέσω της χρωματογραφίας κατ' αντιρροής. Περίπου 30g του αρχικού εκχυλίσματος προχώρησαν σε διαχωρισμό με σκοπό την παραλαβή μορίων που βρίσκονται σε ίχνη στο αρχικό εκχύλισμα τα οποία δεν βρισκόταν σε ποσότητα στις προηγούμενες κλασματώσεις.

Η κλασμάτωση CPC εφαρμόστηκε σε μηχάνημα FCPC<sup>®</sup> Rousselet-Robatel Kromaton με στήλη χωρητικότητας 1000 ml.

Για τον καλύτερο διαχωρισμό των δευτερογενών μεταβολιτών, αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί βαθμιδωτή έκλουση των προϊόντων. Τα συστήματα που επιλέχθηκαν λόγω του ικανοποιητικού διαχωρισμού σε δοκιμαστικούς σωλήνες, φαίνονται στο πίνακα παρακάτω.

Συστήματα	c-Hexane	EtOAc	BuOH	EtOH	H <sub>2</sub> O	Ογκος (ml)
1	10	5	-	5	10	4200
2	5	10	-	5	10	2100
3	2,5	12,5	-	5	10	2100
4	1	14	2	5	10	2100
5	1	9	7	5	10	2100

#### Πίνακας 4. Συστήματα διαλυτών του CPC\_3

Όλα τα συστήματα παρασκευάστηκαν με την βοήθεια μια διαχωριστικής χοάνης και παραλήφθηκαν οι δυο φάσεις. Αντιθέτως με τις προηγούμενες κλασματώσεις, η πολική φάση ορίστηκε ως στατική και η άπολη ως κινητή. Η μόνη πολική φάση που χρησιμοποιήθηκε για την πλήρωση της στήλης ήταν αυτή του πρώτου συστήματος. Εισήχθη στο μηχάνημα με ανούσια λειτουργία, με ροή 4ml/min και στροφές 200rpm/min. Ακολούθως, έγινε εισαγωγή της κινητής φάσης, την άπολη του πρώτου συστήματος, με ροή 4ml έως 8ml/min και στροφές 800 rpm/min ώστε να γίνει εξισορρόπηση των δυο φάσεων. Το δείγμα (30 g εκχυλίσματος) διαλύθηκε σε δύο ίσους όγκους των 25ml (12,5ml στατικής και 12,5ml κινητής φάσης) και εισήχθη στο ισορροπημένο σύστημα ενέσιμα σε δύο φάσεις των 25 ml σε βρόγχο των 50ml. Στην συνέχεια ξεκίνησε η συλλογή των κλασμάτων των 50ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες με ροή έως και 6ml/min. Εισήχθηκαν οι άπολες φάσεις των συστημάτων η μια μετά την άλλη συλλέγοντας 25 κλάσματα για την καθεμιά.

Λόγω αυξημένης απώλειας στατικής φάσης από τη στήλη στο τρίτο σύστημα, αναγκαστήκαμε να αλλάξουμε τις συνθήκες του πειράματος κατά την διάρκεια της κλασμάτωσης, όπως την ταχύτητα περιστροφής αλλά και την ροή. Έτσι, καταφέραμε να συγκρατήσουμε στατική φάση εντός της στήλης ως το τέλος της κλασμάτωσης. Στο τέλος, έγινε χρήση της κάτω φάσης, την πολική, του πρώτου συστήματος σε κατιούσα λειτουργία με σκοπό την απομάκρυνση όλων των συστατικών που είχαν παραμείνει στην στήλη, απ' όπου συλλέχθηκαν 25 κλάσματα επιπλέον.

Συνολικά 150 κλάσματα συλλέχθηκαν από την κλασμάτωση τα οποία ελέγχθηκαν ως προς το περιεχόμενο τους μέσω TLC, με σύστημα ανάπτυξης διαλυτών την οργανική φάση του διφασικού συστήματος CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O, σε αναλογία 13:9:3, και συνενώθηκαν σε 39 κλάσματα συνολικά.

#### ii. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού – Sephadex

Δυο κλάσματα με πλούσια σύσταση ουσιών της προηγούμενης κλασμάτωσης υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, Sephadex LH-20, με σκοπό την απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών.

Αρχικά, συνενώθηκαν τα κλάσματα 5 και 6 (36,7 mg συνολικά) του προηγούμενου διαχωρισμού και διαλύθηκαν σε μικρό όγκο οξικού αιθυλεστέρα ενώ το κλάσμα 16 διαλύθηκε σε μικρό όγκο μεθανόλης. Στην συνέχεια, τοποθετείται το δείγμα με προσοχή στο πάνω μέρος στης στήλης με μια πιπέτα pasteur, και προστίθεται στην συνέχεια ο διαλύτης έκλουσης για να ξεκινήσει η συλλογή κλασμάτων.

Η πρώτη στήλη μοριακού αποκλεισμού (Sephadex\_1), πραγματοποιήθηκε με τα κλάσματα 5 – 6 και είχε ως διαλύτη έκλουσης οξικό αιθυλεστέρα.



Εικόνα 33. Παρουσίαση των 9 τελικών συνενώσεων της Sephadex\_Ι μέσω TLC preparative στο ορατό

Συλλέχθηκαν 65 κλάσματα των 2ml τα οποία ελέγχθηκαν μέσω TLC με σύστημα ανάπτυξης CHCl<sub>3</sub>:MeOH με αναλογία 90:10 καθώς τα συστατικά των κλασμάτων ήταν κυρίως άπολα μόρια, και συνενώθηκαν σε 9 κλάσματα συνολικά.

Το κλάσμα 16 ( 200mg) υποβλήθηκε σε δεύτερη στήλη (Sephadex\_II) ενώ η έκλουση των μορίων πραγματοποιήθηκε με βαθμιδωτό σύστημα διαλυτών. Οι δύο διαλύτες του συστήματος είναι το H<sub>2</sub>O και η MeOH σε διαφορετική περιεκτικότητα κατά τον διαχωρισμό. Καθώς το σύστημα περιέχει νερό, διογκώνονται σημαντικά τα μόρια της ρητίνης με αποτέλεσμα να συγκρατεί αποτελεσματικά τις ουσίες του δείγματος. Αφού αυξηθεί σιγά σιγά η ποσότητα μεθανόλης, απελευθερώνονται τα μόρια από την ρητίνη με αποτέλεσμα έναν επιτυχημένο διαχωρισμό. Τα ποσοστά των δύο διαλυτών ήταν ως εξής :

Συστήματα	H <sub>2</sub> O (%)	MeOH (%)	Όγκος (ml)
1	80	20	40
2	70	30	100
3	60	40	170
4	50	50	40
5	30	70	20
6	-	100	50

Πίνακας 5. Συστήματα έκλουσης των ουσιών της Sephadex\_II

Όπως αναφέρεται στον πίνακα 5, χρησιμοποιήθηκε περισσότερο το τρίτο σύστημα, εφόσον ο διαχωρισμός των ουσιών ήταν ο πιο αποτελεσματικός (κλάσματα 17-30).

Στο τέλος, χρησιμοποιήθηκαν περίπου 50ml μεθανόλης για την απομάκρυνση των μεταβολιτών που δεν αποδεσμεύτηκαν από την στήλη. Συλλέχθηκαν 170 κλάσματα των 2ml περίπου τα οποία ελέγχθηκαν με χρωματογραφία TLC με σύστημα ανάπτυξης CHCl<sub>3</sub>:MeOH με αναλογία 90:10, και συνενώθηκαν σε 36 κλάσματα.



Εικόνα 34. Παρουσίαση των συνενώσεων 1-15 της Sephadex\_ΙΙ μέσω TLC Preparative στο ορατό



Εικόνα 35. TLC στο ορατό των συνενώσεων των κλασμάτων 17-30 της Sephadex\_ΙΙ

#### iii. Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Από τον διαχωρισμό του CPC\_3 και των δύο στηλών μοριακού αποκλεισμού, υποβλήθηκαν συνολικά 9 κλάσματα σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, με σκοπό την απομόνωση καθαρών ουσιών.

Όμως, υπήρχαν ουσίες οι οποίες δεν εμφανίζονται στο UV, και γι' αυτό το λόγο ψεκάστηκε ένα μικρό τμήμα στο πλάι της TLC με το αντιδραστήριο βανιλίνης για να εμφανιστεί το σημείο στο οποίο βρίσκονται. Η απομόνωση έγινε ως εξής :

## • 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> TLC Preparative :

Από το κλάσμα 3 προερχόμενο από το CPC\_3, μόνο 12 mg του δείγματος προχώρησαν σε ανάλυση. Η πλάκα αναπτύχθηκε σ' ένα σφραγισμένο θάλαμο με 100ml ενός συστήματος CHCl<sub>3</sub>:MeOH με αναλογία 95:5.

Πραγματοποιήθηκε η ίδια ανάλυση για δεύτερη φορά με σκοπό την παραλαβή μεγαλύτερης ποσότητας των ίδιων ουσιών. Στην συνέχεια, η εκχύλιση των μορίων από την Silica πραγματοποιήθηκε με 5ml ακετόνης.

Απομονώθηκαν από τις δύο πλάκες, οι μεταβολίτες VIII, Χ και ΧΙ, τα οποία είχαν ικανοποιητική καθαρότητα για περαιτέρω ανάλυση NMR, αλλά και το μεταβολίτη ΙΧ ,το οποίο βρίσκεται σε μίγμα.

#### • 3<sup>n</sup> TLC Preparative :

Οι συνενώσεις 4, 5 και 8 της Sephadex\_ΙΙ υποβλήθηκαν σε μία μόνο παρασκευαστική TLC, με το ένα δείγμα δίπλα από το άλλο σε μια οριζόντια γραμμή στην ίδια πλάκα, η οποία αναπτύχθηκε σε ένα θάλαμο με 100ml συστήματος CHCl<sub>3</sub>:MeOH με αναλογία 95:5. Παραλήφθηκαν δύο ουσίες, οι οποίες εκχυλίστηκαν από την Silica με 5ml ακετόνης. Ο μεταβολίτης XI έχει σε ικανοποιητική καθαρότητα, ενώ ο μεταβολίτης XIII βρίσκεται σε μίγμα.

#### • 4<sup>n</sup> TLC Preparative :

Πραγματοποιήθηκε μια τέταρτη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, του κλάσματος 26 της Sephadex\_II. Μόνο 12mg του κλάσματος εφαρμόστηκαν στην υάλινη πλάκα, η οποία αναπτύχθηκε στην οργανική φάση του διφασικού συστήματος CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O με αναλογία 13:9:3.

Παραλήφθηκαν δύο λωρίδες και εκχυλίστηκαν με 5ml του συστήματος MeOH:CHCL<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O σε αναλογία 14:6:1. Η πρώτη, αποτελεί ουσία με καλή καθαρότητα και έχει παραληφθεί από προηγούμενη κλασμάτωση, είναι ο μεταβολίτης II.

Η δεύτερη ζώνη παραλήφθηκε ως μίγμα δυο ουσιών, καθώς δεν είχε αναπτυχθεί σωστά η πλάκα στην βάση της. Ξαναεφαρμόστηκε σε μισή πλάκα 10cm x 20cm (**5<sup>n</sup> TLC Preparative**) και αναπτύχθηκε στο ίδιο σύστημα όπως προηγούμενως.

Παραλήφθηκαν δύο ουσίες με το σύστημα MeOH:CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O σε αναλογία 14:6:1 με καλή καθαρότητα ως μεταβολίτης XII και XIII.

#### • 6<sup>n</sup> TLC Preparative :

Τα κλάσματα 19 – 21 της στήλης Sephadex\_ΙΙ συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε μια τελευταία χρωματογραφία TLC Preparative. Το δείγμα προχώρησε εξολοκλήρου σε ανάλυση και αναπτύχθηκε στην οργανική φάση του διφασικού συστήματος CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O με αναλογία 13:9:3.

Παραλήφθηκε ο μεταβολίτης V με καλή καθαρότητα, ο οποίος παραλήφθηκε από την Silica με 5ml του συστήματος MeOH:CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O σε αναλογία 14:6:1.

58

#### iv. Παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Από τις παραπάνω κλασματώσεις, κάποια δείγματα περιέχουν μίγμα ουσιών, οι οποίες είναι δύσκολο να διαχωριστούν με μια παρασκευαστική TLC. Γι' αυτό το λόγο αναπτύχθηκαν μέθοδοι διαχωρισμού στην παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με σκοπό την ακριβή απομόνωση μεταβολιτών. Τέσσερα κλάσματα υποβλήθηκαν σε διαχωρισμό μέσω HPLC με τις εξής συνθήκες :

Το δείγμα το οποίο περιέχει τον μεταβολίτη XIV σε μίγμα, προχώρησε σε περαιτέρω διαχωρισμό με HPLC Preparative με σκοπό την απομόνωση του μορίου σε απόλυτη καθαρή μορφή. Σε πρώτη φάση, το δείγμα διαλύθηκε εξολοκλήρου σε 1ml MeOH, και στην συνέχεια εισήχθη ενέσιμα, με όγκο ένεσης 20 έως 150 μl, στον βρόγχο των 200 μl. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και η μέγιστη απορρόφηση της ουσίας παρατηρήθηκε στα 254 nm.

Η μέθοδο που επιλέχθηκε για τον διαχωρισμό ήταν βαθμιδωτή και αποτελείται από δύο διαλύτες με τις παρακάτω αναλογίες :

Χρόνος (min.)	ACN (%)	H2O+ 0,1% TFA (%)	Ροή (ml/min)
0	5	95	1
15	24	76	1
33	24	76	1
35	5	95	1
45	5	95	1

Πίνακας 6. Συνθήκες HPLC απομόνωσης του μεταβολίτη XIV

Το πρώτο δείγμα, αφορά το μίγμα του μεταβολίτη IX, το οποίο διαλύθηκε σε 1ml MeOH και εισήχθη ενέσιμα με όγκο ένεσης έως 180 μl στον βρόγχο των 200μL. Η μέγιστη απορρόφηση της ενδιαφερόμενης ουσίας σημειώθηκε στα 254 nm.

min.	ACN (%)	H2O+ 0,1% TFA (%)	Poή (ml/min)
0	5	95	2
20	30	70	2
35	30	70	2
37	100	100	2
47	100	100	2
50	5	95	2
60	5	95	2

Πίνακας 7. Βαθμιδωτή μέθοδο απομόνωσης του μεταβολίτη ΙΧ

Τα άλλα δύο δείγματα αφορούν τα κλάσματα 17 και 30 της Sephadex\_2 τα οποία διαλύθηκαν επίσης σε 1ml MeOH και εισήχθησαν ενέσιμα στο βρόγχο των 200 μl με όγκο ένεσης των 140 μl. Απομονώθηκαν οι μεταβολίτες IV και XII με παρατήρηση της μέγιστης απορρόφησης των ουσιών στα 249 nm και 280 nm αντίστοιχα. Η μέθοδος διαχωρισμού είχε ως εξής :

Χρόνος (min.)	ACN (%)	H2O+ 0,1% TFA (%)	Ροή (ml/min)
0	5	95	2
19	26	74	2
38	26	74	2
40	5	95	2
50	5	95	2

Πίνακας 8. Συνθήκες απομόνωσης των μεταβολιτών IV και XII

# Γ' μέρος : Αποτελέσματα και συζήτηση

# Α. Απομόνωση μεταβολιτών του Citrus bergamia

Σε πρώτη φάση, αφού παραλήφθηκε το ολικό αιθαλονικό εκχύλισμα, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση HPLC-DAD του δείγματος σε συγκέντρωση 1mg/ml ωστέ να ληφθεί ένα προφίλ των ουσιών που περιέχει το εκχύλισμα.

Από τις συνθήκες ανάλυσης του πίνακα 3 όπως αναφέρεται παραπάνω, παραλήφθηκε το παρακάτω χρωματογράφημα :



Εικόνα 36. Χρωματογράφημα HPLC-DAD του εκχυλίσματος του χυμού περγαμόντων Κεφαλονιάς στα 280nm

Διακρίνονται τρεις βασικές κορυφές, οι οποίες, με βάση τις βιβλιογραφικές αναφορές και τον χρόνο κατακράτησης των ουσιών στην στήλη, αναφέρονται σε φλαβανόνες, και πιο



συγκεκριμένα σε μόρια της κατηγορίας των Ο-γλυκοσιδών.

Αποδόθηκαν οι κορυφές, με βάση δεδομένων προηγούμενων ερευνών, ως **νεοεριοσιτρίνη** (1), στην **ναρινγίνη** (2) και στην **νεοεσπεριδίνη** (3) [61- 64].

Πραγματοποιήθηκε μια ανάλυση TLC του ίδιου δείγματος, σε σύστημα ανάπτυξης 13:9:3 CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, με αποτέλεσμα την εμφάνιση των ίδιων κύριων κορυφών, και άλλες μη ταυτοποιημένες δομές, σε μικρότερη περιεκτικότητα.

Η νεοεριοσιτρίνη, με βάση των δύο αναλύσεων, φαίνεται να είναι η βασική δομή του εκχυλίσματος, και χαρακτηριστική αυτής της ποικιλίας περγαμόντων.

Εικόνα 37. ΤLC στο ορατό του ολικού εκχυλίσματος

Το αιθαλονικό εκχύλισμα επεξεργάστηκε στην συνέχεια με διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές για την απομόνωση των μεταβολιτών του.

Όπως αναφέρεται παραπάνω, σε πρώτο στάδιο απομονώθηκαν οι τρείς βασικές ουσίες του εκχυλίσματος, και στην συνέχεια μόρια σε μικρότερη περιεκτικότητα στον χυμό.

Συνολικά βρέθηκαν σε καθαρή μορφή 14 μεταβολίτες, τα οποία ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες όπως φλαβονοειδή, φουρανοκουμαρίνες, τερπένια κ.α., τα οποία αναφέρονται στον πίνακα παρακάτω :

Μεταβολίτης Ι	Νεοεριοσιτρίνη	
Μεταβολίτης ΙΙ	Ναρινγίνη	
Μεταβολίτης ΙΙΙ	Νεοεσπεριδίνη	
Μεταβολίτης IV	7- <i>Ο</i> -γλυκοσίδης της Εριοδικτυόλης	
Μεταβολίτης V	7-Ο-νεοεσπεριδοσίδης της Πινοσεμπρίνης	
Μεταβολίτης VI	6΄΄-μαλονυλναρινγίνη	
Μεταβολίτης VII	Μελιτιδίνη	
Μεταβολίτης VIII	Μπεργαπτόλη	
Μεταβολίτης ΙΧ	6',7'-διυδροξυμπεργαμοτίνη	
Μεταβολίτης Χ	Λιμονίνη	
Μεταβολίτης ΧΙ	Νομιλίνη	
Μεταβολίτης XII	Νομιλινικό οξύ	
Μεταβολίτης XIII	Πικρακουασιοσίδη Α	
Μεταβολίτης XIV	Αμπσισικό οξύ	

Πίνακας 9. Συνοπτικός πίνακας τον απομονωμένων μεταβολιτών

Οι ουσίες ταυτοποιήθηκαν με τη λήψη φασμάτων πρωτονίου και δύο διαστάσεων NMR και επιβεβαιώθηκαν με το φάσμα μάζας και τις βιβλιογραφικές αναφορές.



# **Β. Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών**

## 1. Μεταβολίτης Ι : Νεοεριοσιτρίνη (Neoeriocitrin)

Ο μεταβολίτης Ι απομονώθηκε από το αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού και συγκεκριμένα από το κλάσμα 5-6-8 του CPC\_Ι και από το κλάσμα 8 του CPC\_ΙΙ, κατόπιν διαχωρισμού μέσω TLC Preparative. Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων των φασμάτων NMR 1D και 2D όπως και η μελέτη του φάσματος μάζας HR-MS ESI (+) έχουν ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση της **Νεορεριοσιτρίνης** (neoeriocitrin). Η ένωση αυτή ανήκει στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων και είναι μια γλυκοσυλιωμένη φλαβανόνη.

Οι μετατοπίσεις των σημάτων στα φάσματα NMR όπως και τα αποτελέσματα των φασμάτων μάζας ταιριάζουν απόλυτα με την βιβλιογραφία [65,66].

Φυτοχημικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι στα εκχυλίσματα του είδους Citrus, υπάρχει μείγμα των δύο μορφών διαστερεοϊσομερών πολλών φλαβανονών καθώς η γενίνη τους έχει μια στροφική ικανότητα και ένα χειρόμορφο κέντρο στην θέση του άνθρακα C-2. Καθώς ωριμάζει το φρούτο, το ποσοστό των μορίων αλλάζει με αποτέλεσμα η αναλογία 2S/2R να μην είναι ίδια στο κάθε στάδιο ανάπτυξης του φρούτου. Στην αρχή της ανάπτυξης οι φλαβανόνες βρίσκονται σε πολύ μεγάλο ποσοστό στην μορφή 2S, αλλά κατά την ωρίμανση η αναλογία 2S/2R μπορεί να φτάσει και το 60%:40%. Η μορφή 2S αποτελεί τη συνηθέστερη που βρίσκεται στην φύση [57-60,66-67]. Η παρουσία διαστερεοϊσομερών παρατηρείται με διπλά σήματα στο φάσμα πρωτονίου, όπως βλέπουμε παρακάτω.



Εικόνα 39. Παρουσίαση των διαστερεοϊσομερών 2S/2R της νεοεριοσιτρίνης



Εικόνα 40. Νεοεριοσιτρίνη

J	С	В	Κ	3	1
			_		

2S/2R-neoeriocitrin

	<sup>1</sup> H N	<sup>13</sup> C	
Θέση	(600 MHz	, CD₃OD,	(600 MHz,CD₃OD,
	δppm, J	σε HZ)	δppm, J σε HZ)
	2S	2R	
2	5.31, dd	5.32, dd	80.57, CH
	(1H, 12.63 ; 3.34)	(1H, 12.63 ; 3.34)	
<b>3</b> a	3.11, dd	2.77, dd	
	(1H, 12.63 ; 17.13)	(1H <i>,</i> 17.30; 3.34)	44.01, CH <sub>2</sub>
3b	2.75 <i>,</i> dd	3.11, dd	
	(1H, 17.30 ; 3.34)	(1H <i>,</i> 12.63; 17.13)	
6	6.14 <i>,</i> d	6.14 <i>,</i> d	97.54 <i>,</i> CH
	(1H, 2.20)	(1H <i>,</i> 2.20)	
8	6.17, d	6.17, d	96.51 <i>,</i> CH
	(1H, 2.20)	(1H <i>,</i> 2.20)	
2′	6.91, s	6.91, s	114.45 <i>,</i> CH
5′	6.78 <i>,</i> d	6.78 <i>,</i> d	115.98, CH
	(1H, 8.02)	(1H <i>,</i> 8.02)	
6'	6.80, dd	6.80, dd	119 <i>,</i> CH
	(1H, 1.87)	(1H <i>,</i> 1.87)	
1"	5.09, d	5.10, d	99.03 <i>,</i> CH
	(1H, 7.48)	(1H <i>,</i> 7.48)	
1‴	5.23 <i>,</i> d	5.24 <i>,</i> d	102.15, CH
	(1H, 1.48)	(1H, 1.48)	
6′′′	1.28, d	1.28, d	17.96, CH <sub>3</sub>
	(3H, 5.99)	(3H, 5.99)	

Πίνακας 10. Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η και <sup>13</sup>C-NMR του Μεταβολίτη Ι (MeOD)

Από το φάσμα <sup>14</sup>NMR του μεταβολίτη Ι φαίνονται στην αρωματική περιοχή τα ανωμερικά πρωτόνια H-1", H-1" του σακχάρου στα υψηλότερα πεδία, στα 5.09/5.10 ppm και 5.23/5.24 ppm αντίστοιχα. Οι κορυφές των σημάτων εμφανίζονται διπλές λόγω της παρουσίας των διαστερεοϊσομερών της νεοεριοσιτρίνης στο εκχύλισμα. Στα χαμηλότερα πεδία, εμφανίζονται οι κορυφές των πρωτονίων H-2', ως μια απλή κορυφή στα 6.91ppm, και H-5'/H-6' ως μια διπλή των 8.02 Hz και μια διπλή-διπλής των 8.02/2.20 Hz που εμφανίζονται στα 6.78ppm και 6.80 ppm αντίστοιχα. Τα πρωτόνια ανήκουν στον B αρωματικό δακτύλιο του φλαβονοειδούς. Οι διπλές κορυφές στα 6.14 ppm και στα 6.17ppm με J=2.20 Hz, οι οποίες αντιστοιχούν στο πρωτόνιο H-6 και στο πρωτόνια H-8, ανήκουν στον αρωματικό δακτύλιο. Στα 1.28 ppm εμφανίζεται επίσης μια διπλή κορυφή με σύζευξη J=5.99 Hz, χαρακτηριστική του μεθυλίου της ραμνόζης. Τα πρωτόνια H-3a και H-3b αντιστοιχούν σε δύο κορυφές με πολλαπλότητα διπλή-διπλής στην αλειφατική περιοχή. Έχουν διαφορετικές μετατοπίσεις ανάλογα την μορφή που βρίσκεται το μόριο, 2S ή 2R. H σταθερά σύζευξη του πρωτονίου H-3a είναι 12.63/17.13 Hz ενώ του πρωτονίου H-3b είναι 17.13/3.34 Hz.



Εικόνα 41. Φάσμα <sup>1</sup>Η NMR του μεταβολίτη Ι

Το φάσμα COSY επιβεβαιώνει τις θέσεις των πρωτονίων H-2 και H-3a/H-3b καθώς εμφανίζονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Αυτό παρατηρείται και στις δύο μορφές του μορίου. Η αλληλεπίδραση των πρωτονίων H-5 και H-6 στο φάσμα COSY δεν είναι εμφανής επειδή οι μετατοπίσεις στους συγκαλύπτονται, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 42. Φάσμα COSY του μεταβολίτη Ι

Με την βοήθεια του φάσματος 2D HSQC-DEPT και της βιβλιογραφίας αποδόθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων όπως αναφέρεται στο πίνακα 2.



Εικόνα 43. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη Ι

Από το φάσμα HMBC μπορέσαμε να προσδιορίσουμε τους άνθρακες του αρωματικού δακτυλίου C-5 στα 164.87 ppm χάρη στην <sup>2</sup>J σύζευξη με το πρωτόνιο H-6, τον άνθρακα C-7 στα 165.92 ppm για την <sup>2</sup>J σύζευξη με τα πρωτόνια H-6 και H-8 αλλά και την <sup>3</sup>J σύζευξη με το ανωμερικό πρωτόνιο H-1" του σακχάρου, τον άνθρακα C-4 στα 197.78 ppm για την <sup>2</sup>J σύζευξη με τα πρωτόνια H-3a/H-3b και <sup>3</sup>J σύζευξη με το πρωτόνιο H-2. Προσδιορίστηκαν επίσης οι άνθρακες του υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου C-1 στα 130.76 ppm από τις <sup>2</sup>J συζεύξεις με τα πρωτόνια H-2, H-2' και H-6' και τις <sup>3</sup>J συζεύξεις με τα πρωτόνια H-3a/H-3b και H-5', αλλά και οι άνθρακες C-3'/ C-4' που συμπίπτουν στα 146.03 ppm από τις <sup>2</sup>J και <sup>3</sup>J συζεύξεις με τα πρωτόνια H-2', H-5' και H-6'.



Εικόνα 44. Φάσμα ΗΜΒC του μεταβολίτη Ι

Τέλος, ο μοριακός τύπος, ο οποίος προσδιορίστηκε ως C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub>, καθώς και το μοριακό βάρος του μεταβολίτη Ι (596.54) επιβεβαιώθηκαν από την παρουσία του ψευδομοριακού ιόν στα 597.1785 *m/z* στο φάσμα μάζας HR-MS ESI (+) [63].



Εικόνα 45. Φάσμα μάζας HR-MS ESI (-) του μεταβολίτη Ι

## 2. Μεταβολίτης ΙΙ : Ναρινγίνη (Naringin)

Ο μεταβολίτης ΙΙ απομονώθηκε από το αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού και συγκεκριμένα από το κλάσμα 11-13 του CPC\_Ι και από το κλάσμα 6 της Sephadex\_Ι, κατόπιν διαχωρισμού μέσω TLC Preparative. Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων του φάσματος πρωτονίου όπως και η μελέτη του φάσματος μάζας HR-MS ESI (-) έχουν ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση της **Ναρινγίνης** (naringin). Ανήκει επίσης στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων και συγκεκριμένα στις γλυκοσυλιωμένες φλαβανόνες. Οι μετατοπίσεις των σημάτων στα φάσματα NMR όπως και τα αποτελέσματα των φασμάτων μάζας ταιριάζουν απόλυτα με την βιβλιογραφία [66].

Όπως για τον προηγούμενο μεταβολίτη, παρατηρούνται οι δύο μορφές διαστερεοϊσομερών του μορίου και αυτό φαίνεται στο φάσμα πρωτονίου καθώς τα σήματα είναι διπλά όπως στην παρακάτω εικόνα [67-71].



Εικόνα 46. Παρουσίαση των διαστερεοϊσομερών 2S/2R της ναρινγίνης

Στα χαμηλότερα πεδία, παρατηρούνται τα σήματα των δύο διπλών κορυφών, με σταθερά σύζευξη 7.48 Hz του ανωμερικού πρωτονίου H-1", στα 5.09 και 5.10 ppm της μορφής 2S και 2R αντίστοιχα. Οι διπλές κορυφές των 1.48 Hz στα 5.23 ppm και 5.24 ppm αντιστοιχούν στο δεύτερο ανωμερικό πρωτόνιο H-1" της ραμνόζης ,της μορφής 2S και 2R. Τέλος, τα σήματα στα 5.37 και 5.39 ppm με πολλαπλότητα διπλή-διπλής και J= 1.48 Hz αντιπροσωπεύουν τα πρωτόνια H-2 των διαστερεοϊσομερών.



Εικόνα 47. Ναρινγίνη

JCBK_	_17_	_2
2S/2R-r	naring	gin

	<sup>1</sup> H NMR		<sup>13</sup> C *
Θέση	(600 MHz, CD <sub>3</sub> OD,		(600 MHz,CD <sub>3</sub> OD,
	δρρm, J σε ΗΖ)		δppm, J σε HZ)
	25	2R	
2	5.37, dd	5.39, dd	80.7, CH
	(1H, 12.32 ; 3,50)	(1H, 12.32 ; 3.50)	
<b>3</b> a	3.11, dd	2.76, dd	
	(1H <i>,</i> 12.32 ; 17.64)	(1H, 17.64 ; 3.50)	44, CH <sub>2</sub>
3b	2.75, dd	3.12, dd	
	(1H, 17.64 ; 3.50)	(1H, 12.32 ; 17.64)	
6	6.15, d	6.15, d	97.8 <i>,</i> CH
-	(1H, 2.27)	(1H, 2.27)	
8	6.17, d	6.17, d	96.7, CH
	(1H, 2.27)	(1H, 2.27)	
2′/6′	7.31, d	7.31, d	129.1, CH
ol /=/	(2H, 8.04)	(2H, 8.04)	
37/57	6.81, d	6.81, d	116.3, CH
411	(2H, 8.04)	(2H, 8.04)	00.2 CU
1	5.09, 0	5.10, 0	99.3, CH
1///	(IH, 7.48)	(1H, 7.48)	
T	5.23, U (111 1.49)	5.24, 0 (11 1.49)	102.5, CH
<i>c</i> '''	(10, 1.48) 1 29 d	(10, 1.48) 1 29 d	10.2 CU
O	1.20, U	1.20, U (211 6.26)	10.2, CH3
	(30,0.20)	(30,0.20)	

\*Οι χημικές μετατοπίσεις του άνθρακα αποδόθηκαν με βάση την βιβλιογραφία λόγω της απουσίας φάσματος 2D NMR

Πίνακας 11. Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η & <sup>13</sup>C-NMR του μεταβολίτη ΙΙ (MeOD)

Από το φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη ΙΙ παρατηρούμε ότι τα σήματα της αρωματικής περιοχής έχουν σημαντική ομοιότητα ως προς τα σήματα του προηγούμενου μορίου. Κάποιες κορυφές έχουν την ίδια πολλαπλότητα και σχεδόν ίδιες χημικές μετατοπίσεις. Πιο συγκεκριμένα, αναφερόμαστε στα ανωμερικά πρωτόνια H-1" και H-1", στο πρωτόνιο H-2 (διπλή-διπλής κορυφή στα 5.37 ppm με σταθερά σύζευξη 12.32/3.5 Hz) αλλά και στα πρωτόνια της αρωματικής περιοχής H-6 και H-8 (διπλή κορυφή στα 6.15 και 6.17 ppm αντίστοιχα με J= 2.27 Hz). Τα πρωτόνια H-3a και H-3b , όπως και για τον μεταβολίτη Ι, εμφανίζονται ως διπλή-διπλής κορυφή με σύζευξη 12.32/17.64 Hz και 17.64/3.50 Hz στα 3.11 και 2.75 ppm αλλά και στα 3.12 και 2.76 ppm αντίστοιχα, αναλόγως την μορφή 2S/2R του μεταβολίτη. Το πρωτόνιο H-6‴ που αντιστοιχεί στο μεθύλιο της ραμνόζης, εμφανίζεται όπως και προηγουμένως στα 1.28 ppm με την χαρακτηριστική σταθερά σύζευξη 6.26 Hz.

Οι διαφορές διακρίνονται στα τέσσερα πρωτόνια του Β υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου, τα οποία χωρίζονται σε ομάδες των δύο. Τα πρωτόνια H-2' και H-6' έχουν την ίδια χημική μετατόπιση, αντιστοιχούν στην διπλή κορυφή στο φάσμα πρωτονίου στα 7.31 ppm J=8.04 Hz που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια. Παρομοίως, τα πρωτόνια H-3'και H-5' αντιστοιχούν στην διπλή κορυφή στα 6.81 ppm με σταθερά σύζευξη 8.54 Hz και ολοκληρώνει επίσης για δύο πρωτόνια.

Τα σήματα των πρωτονίων υπάρχουν και για τις δύο μορφές 2S/2R του μορίου όπως και για τον μεταβολίτη Ι.



Εικόνα 48. Φάσμα <sup>1</sup>Η NMR του μεταβολίτη ΙΙ
Από την μελέτη του φάσματος πρωτονίου και την σύγκριση των δεδομένων με την βιβλιογραφία, αποδόθηκε ο μοριακός τύπος C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>14</sub> με μοριακό βάρος 580,53. Η υπόθεση του μοριακού τύπου επιβεβαιώθηκε με το φάσμα μάζας HR-MS ESI (-) στο οποίο παρατηρήθηκε το ψευδομοριακό ιόν 579,1715 *m/z*.



Εικόνα 49. Φάσμα μάζας HR-MS ESI (-) του μεταβολίτη ΙΙ

### 3. Μεταβολίτης ΙΙΙ : Νεοεσπεριδίνη (Neohesperidin)

Ο μεταβολίτης ΙΙΙ απομονώθηκε από το κλάσμα 8 του CPC\_II, κατόπιν διαχωρισμού μέσω HPLC Preparative. Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων του φάσματος πρωτονίου και η μελέτη του φάσματος μάζας HR-MS ESI (-) έχουν ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση της **Νεοεσπεριδίνης** (neohesperidin).



Εικόνα 50. Νεοεσπεριδίνη

	<sup>1</sup> H NMR		<sup>13</sup> C *
Oáca	(600 MHz, CD₃OD,		(600 MHz,CD₃OD,
0201	δppm, J	σε HZ)	δppm, J σε HZ)
	25	2R	
ſ	5.37, dd	5.38, dd	80.27, CH
2	(1H, 12.32 ; 3.50)	(1H, 12.32 ; 3.50)	
20	3.11, dd	2.76, dd	
Sd	(1H, 12.32 ; 17.64)	(1H, 17.64 ; 3.50)	44.07, CH <sub>2</sub>
26	2.75, dd	3.12, dd	
50	(1H, 17.64 ; 3,50)	(1H, 12.32 ; 17.64)	
6	6.16, d	6.16 <i>,</i> d	97.07 <i>,</i> CH
U	(1H, 2.07)	(1H, 2.07)	
Q	6.19, d	6.19, d	96.19, CH
0	(1H, 2.07)	(1H, 2.07)	
2'	6.94, s	6.94, s	114.53, CH
$A' \cap M_{0}$	3.87, s	3.87, s	
4-0-1416	(3H)	(3H)	149.33, -0-013
5'	6.92, m	6.92 <i>,</i> m	112 50 CH
5	(1H)	(1H)	112.39, CH
6'	6.96 m	6.96 m	118 99 CH
0	(1H)	(1H)	110.39, CH

JCBK\_7\_1 2S/2R-neohesperidin

1"	5.10, d (1H, 7.64)	5.12, d (1H, 7.64)	97.43, CH
1‴	5.24, d (1H, 1.68)	5.25, d (1H, 1.68)	100.35, CH
6‴	1.29, d (3H, 6.15)	1.29, d (3H, 6.15)	17.97, CH₃

\*Οι χημικές μετατοπίσεις του άνθρακα αποδόθηκαν όπως προηγουμένος με βάση την βιβλιογραφία

Πίνακας 12. Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η & <sup>13</sup>C-NMR του μεταβολίτη ΙΙΙ

Από την μελέτη του φάσματος πρωτονίου, παρατηρούμε ότι κάποια σήματα του αρωματικού δακτυλίου έχουν την ίδια πολλαπλότητα και σχεδόν ίδιες μετατοπίσεις με τους μεταβολίτες Ι και ΙΙ. Αυτό αφορά τα ανωμερικά πρωτόνια Η-1" και Η-1" των σακχάρων, το πρωτόνιο Η-2, τα πρωτόνια Η-6 και Η-8 ως μια διπλή κορυφή των 2.07 Ηz στα 6.16 και 6.19 ppm αντίστοιχα, τα πρωτόνια Η-3a/H-3b αλλά και το χαρακτηριστικό πρωτόνιο Η-6" του μεθυλίου της ραμνόζης. Οι διαφορές σημειώνονται στα τρία πρωτόνια του Β υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Το πρωτόνιο Η-2' εμφανίζεται ως μια απλή κορυφή στα 6.94 ppm και πολύ κοντά εμφανίζονται και τα πρωτόνια Η-5' και Η-6' ως μια πολλαπλή κορυφή στα 6.92 και 6.96 ppm αντίστοιχα. Σημαντική διαφορά σχετικά με τους δυο προηγούμενους μεταβολίτες, αποτελεί η παρουσία μιας απλής κορυφής στα 3.87 ppm που ολοκληρώνει για τα τρία πρωτόνια της μεθόξυ ομάδας στην θέση C-4'.



Εικόνα 51. Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη ΙΙΙ

Με τα δεδομένα του φάσματος πρωτονίου αποδόθηκε ο μοριακός τύπος  $C_{28}H_{34}O_{15}$  με μοριακό βάρος 610,57, το οποίο επιβεβαιώθηκε με το φάσμα μάζας HR-MS ESI (-) από την παρουσία του ψευδομοριακού ιόν στα m/z = 609,1819 [63].



# 4. Μεταβολίτης IV : 7-Ο-γλυκοσίδης της Εριοδικτυόλης (Eriodictyol-7-O-glucoside)

Ο μεταβολίτης ΙV απομονώθηκε από το κλάσμα 30 της Sephadex\_II, κατόπιν διαχωρισμού μέσω HPLC preparative. Η μελέτη των χημικών μετατοπίσεων του φάσματος πρωτονίου και του φάσματος μάζας HR-MS ESI (-) είχαν ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση μεταβολίτη ως γλυκοσυλιωμένο παράγωγο της **Εριοδικτυόλης**. Η ένωση αυτή ανήκει στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων και συγκεκριμένα στις φλαβανόνες. Οι μετατοπίσεις των σημάτων στα φάσματα NMR όπως και τα αποτελέσματα των φασμάτων μάζας επιβεβαιώθηκαν συγκριτικά με την βιβλιογραφία [72-73].



Εικόνα 53. 7-Ο-γλυκοσίδης της Εριοδικτυόλης

	<sup>1</sup> H NMR		<sup>13</sup> C
Θέση	(600 MHz, CD₃OD,		(600 MHz,CD₃OD,
	δppm, J	σε HZ)	δppm, J σε HZ)
	2S	2R	
2	5.32, dd	5.34, dd	80.7 <i>,</i> CH
	(1H, 12.45 ; 3.41)	(1H, 12.45 ; 3.41)	
<b>3</b> a	3.12, dd	2.77, dd	
	(1H, 12.45 ; 17.14)	(1H, 17.14 ; 3,41)	44.2, CH <sub>2</sub>
3b	2.76, dd	3.14, dd	
	(1H, 17.14 ; 3.41)	(1H <i>,</i> 12.45 ; 17.14 )	
6	6.19, d	6.19 <i>,</i> d	97.9 <i>,</i> CH
	(1H, 1,96)	(1H, 1,96)	
8	6.21, d	6.22, d	96.9 <i>,</i> CH
	(1H <i>,</i> 1.96)	(1H, 1.96)	
2'	6.92, s	6.92, s	114.8 <i>,</i> CH
	(1H)	(1H)	
5′	6.79, dd	6.79 <i>,</i> dd	116.2 <i>,</i> CH
	(1H, 1.79, 8.18)	(1H, 1.79, 8.18)	
6'	6.80 <i>,</i> d	6.80, d	119.3, CH
	(1H, 1.79)	(1H, 1.79)	
1"	4.98, d	4.98, d	101.2, CH
	(1H, 6.78)	(1H, 6.78)	

JCBK\_23 2S/2R-Eriodictyol-7-O-glucoside

Πίνακας 13. Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η & <sup>13</sup>C-NMR του μεταβολίτη IV (MeOD)

Κατά την εξέταση του φάσματος πρωτονίου παρατηρούνται κοινές χημικές μετατοπίσεις με τον μεταβολίτη Ι. Χαρακτηριστική διαφορά στο φάσμα είναι η έλλειψη ενός δεύτερου ανωμερικού πρωτονίου. Παρατηρείται μια χαρακτηριστική διπλή κορυφή στα 4,98 ppm με J=6,78 Hz της γλυκόζης, με αποτέλεσμα το μόριο να είναι μονογλυκοσίδης. Οι μετατοπίσεις των πρωτονίων αναφέρονται στον πίνακα 12 και είναι συγκρίσιμες με τις μετατοπίσεις των πρωτονίων του μεταβολίτη Ι.



Εικόνα 54. Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη ΙV

Από την λήψη του 2D φάσματος HSQC-DEPT, προσδιορίστηκαν οι μετατοπίσεις των ανθράκων του μορίου, οι οποίες είναι παρόμοιες με τις μετατοπίσεις των ανθράκων του μεταβολίτη Ι.



Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων των φασμάτων με τις προτεινόμενες δομές τις βιβλιογραφίας, έδωσαν την δυνατότητα να προσδιοριστεί ο μοριακός τύπος του μεταβολίτη IV ως  $C_{21}H_{22}O_{11}$ . Η ανάλυση του φάσματος μάζας HR-MS ESI (-) επιβεβαίωσε την δομή του μορίου, με την παρουσία ενός ψευδομοριακού ιόν με *m/z* = 449,1073.





# 5. Μεταβολίτης V : 7-Ο-νεοεσπεριδοσίδης της Πινοσεμπρίνηs – (Pinocembrin-7-O-neohesperoside)

Ο μεταβολίτης V απομονώθηκε από τα κλάσμα 19-21 της Sephadex\_II, κατόπιν διαχωρισμού μέσω TLC preparative. Η μελέτη του φάσματος πρωτονίου του μεταβολίτη και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές τις βιβλιογραφίας έχουν ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του **7-Ο-νεοεσπεριδοσίδης της Πινοσεμπρίνης** ή αλλιώς Σαροτανοσίδης (Sarotanoside) [74-75].



Εικόνα 57. 7-Ο-νεοεσπεριδοσίδης της Πινοσεμπρίνης

	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C *
Θέση	(600 MHz, CD₃OD,	(600 MHz,CD <sub>3</sub> OD,
	δppm, J σε HZ)	δppm, J σε HZ)
2	5.50, dd	77.1 <i>,</i> CH
	(1H, 12.80 ; 3.04)	
<b>3</b> a	3.14, dd	
	(1H, 12.80 ; 17.20)	42.2, CH <sub>2</sub>
3b	2.83, dd	
	(1H, 17.20 ; 3.04)	
6	6.17, d	96.4, CH
	(1H, 2.30)	
8	6.20, d	95.2 <i>,</i> CH
	(1H, 2.30)	
2'/6'	7.50 <i>,</i> d	126.7, CH
	(2H, 7.51)	
3'/5'	7.42, d	128.6, CH
	(2H, 7.51)	
4'	7.37, d	128.6, CH
	(1H, 7.27)	

#### JCBK\_19\_1

Pinocembrin-7-O-neohesperidose ή Sarotanoside

1"	5.11 <i>,</i> d	97.4 <i>,</i> CH
	(1H, 7.86)	
1‴	5.25 <i>,</i> d	100.4, CH
	(1H, 1.81)	

Αποτελέσματα και συζήτηση

\*Οι χημικές μετατοπίσεις του άνθρακα αποδόθηκαν όπως προηγουμένως με βάση την βιβλιογραφία

#### **Πίνακας 14**. Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>H & $^{13}$ C-NMR του μεταβολίτη V

Η ανάλυση του φάσματος <sup>1Η</sup>ΝΜR ανέδειξε σήματα που ανήκουν στα πρωτόνια των αρωματικών δακτυλίων. Πιο συγκεκριμένα, στα χαμηλότερα πεδία εμφανίζονται τρεις διπλές κορυφές στα 7.50 ppm με σταθερά σύζευξη των 7.51 Hz, στα 7.42 ppm με σταθερά σύζευξη των 7.51 Hz, αι στα 7.37 ppm με σταθερά σύζευξη των 7.27 Hz, οι οποίες αντιστοιχούν στα πέντε πρωτόνια του Β υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Στα υψηλότερα πεδία εμφανίζονται σήματα που μοιάζουν χαρακτηρίστηκα με τα αντίστοιχα των μεταβολιτών Ι – ΙΙΙ. Διακρίνονται στα 6.17 ppm και 6.20 ppm, δύο διπλές κορυφές των 2.30 Hz που αντιστοιχούν στα πρωτόνια Η-6 και H-8 του πρώτου αρωματικού δακτυλίου, αλλά και στα 5.50 ppm μια διπλή-διπλής των 12.80/3.04 Hz, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-2.



#### Εικόνα 58. Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη V

Τα πρωτόνια H-3a και H-3b φαίνονται στα 3.14 και 2.83 ppm, τα οποία σήματα ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο αντίστοιχα και έχουν ως πολλαπλότητα μια διπλή-διπλής, όπως αναφέρεται στον πίνακα παραπάνω. Τα ανωμερικά πρωτόνια της γλυκόζης και

ραμνόζης έχουν δύο χαρακτηριστικές διπλές κορυφές στα 5.11 ppm και 5.25 ppm με σταθερά σύζευξη των 7.86 και 1.81 Hz.

Τα σήματα που εντοπίστηκαν στο φάσμα πρωτονίου σε συνδυασμό με τις πληροφορίες που μας δίνει το φάσμα μάζας HR-MS ESI (+) συνηγορούν στην ομοιότητα του μεταβολίτη V συγκριτικά με τον μεταβολίτη ΙΙ, εφόσον η μόνη διαφορά μεταξύ των δύο ουσιών είναι η αντικατάσταση του υδροξυλίου στην θέση C-4' του υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου με ένα πρωτόνιο, το οποίο επιβεβαιώνεται με την παρουσία μιας επιπλέον διπλής κορυφής στα 7.37 ppm.

Με βάση τα δεδομένα, αποδόθηκε ο μοριακός τύπος  $C_{27}H_{32}O_{13}$ , το οποίο βεβαιώθηκε με την παρουσία του ψευδομοριακού ιόν στο φάσμα μάζας στα m/z= 565,1906.



Εικόνα 59. Φάσμα μάζας HRMS ESI (+) του μεταβολίτη V

## 6. Μεταβολίτης VI : 6"-μαλονυλναρινγίνη (6"-malonylnaringin)

Ο μεταβολίτης VI απομονώθηκε από το κλάσμα 26 της Sephadex\_II, κατόπιν διαχωρισμού μέσω TLC preparative. Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων του φάσματος πρωτονίου και η μελέτη του φάσματος μάζας HR-MS ESI (-) έχουν ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του **6''- μαλονυλναρινγίνης**. Η ένωση αυτή ανήκει στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων και συγκεκριμένα στις φλαβανόνες.



Εικόνα 60. 6"- μαλονυλναρινγίνη

#### JCBK\_18\_1

2S/2R-6"-Malonyl-naringin

Θέση	<sup>1</sup> Η NMR (600 MHz, CD₃OD, δppm, J σε HZ)		<sup>13</sup> C (600 MHz,CD₃OD, δppm, J σε HZ)
	2S	2R	
2	5.42, dd (1H, 12.90 ; 3.10)	5.44, dd (1H, 12.90 ; 3.10)	80.58 <i>,</i> CH
3a	3.19, dd (1H, 12,90 ; 17,36)	2.76, dd (1H, 17,36 ; 3,10)	44.01, CH <sub>2</sub>
3b	2.75, dd (1H, 17,36 ; 3,10)	3.17, dd (1H, 12,90 ; 17,36)	
6	6.15, d (1H, 2.28)	6.15, d (1H, 2.28)	97.05 <i>,</i> CH
8	6.16, d (1H, 2,41)	6.16, d (1H, 2.41)	97.05 <i>,</i> CH
2'/6'	7.33, d (2H, 8.32)	7.33, d (2H, 8.32)	129.06, CH
3'/5'	6.82, d (2H, 8.59)	6.82, d (2H, 8.59)	116.3, CH

1‴	5.09, d	5.10, d	99.10, CH
	(1H <i>,</i> 7.75)	(1H <i>,</i> 7.75)	
6a''	4.37, dd	4.37	
	(1H, 2.28, 12.03)	(1H, 2.28, 12.03)	62.15, CH <sub>2</sub>
6b''	4.31, dd	4.31, dd	
	(1H, 5.75, 12.03)	(1H, 5.75, 12.03)	
1′′′	5.25, d	5.26 <i>,</i> d	102.23, CH
	(1H, 1.54)	(1H <i>,</i> 1.54)	
6′′′	1.29, d	1.29, d	18.2, CH₃
	(3H, 6.09)	(3H <i>,</i> 6.09)	
2a''''			
	3,25, m	3,25 <i>,</i> m	64.37, CH <sub>2</sub>
2b''''	(2H)	(2H)	

Πίνακας 15. Χημικές μετατοπίσεις 1Η & 13C-NMR του μεταβολίτη VI (MeOD)

Η μελέτη του φάσματος πρωτονίου απέδειξε ότι ο μεταβολίτης VII έχει παρόμοια δομικά στοιχεία με τον μεταβολίτη II με αποτέλεσμα οι μετατοπίσεις των αρωματικών δακτυλίων όπως και των ανωμερικών πρωτονίων να είναι ίδιες. Η διαφορά των δύο μορίων παρουσιάζεται στην υποκατάσταση του τελικού υδροξυλίου στον άνθρακα C-6 της γλυκόζης με ένα μαλονύλ. Έτσι, παρουσιάζεται μια σημαντική και χαρακτηριστική διαφορά της μετατόπισης στα πρωτόνια H-6'a/H-6'b τα οποία αντιστοιχούν πλέον σε δύο κορυφές με πολλαπλότητα διπλή-διπλής στα 4.31 ppm και 4.37 ppm με σταθερά σύζευξη 2.28/12.03 Hz οντίστοιχα. Επίσης, εμφανίζονται δύο επιπλέον πρωτόνια στα 3.20 ppm τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2'''' της πλευρικής αλυσίδας.





Με την μελέτη του φάσματος COSY επιβεβαιώθηκε η θέση των πρωτονίων Η-2 και Η-3 αλλά και των πρωτονίων Η-2'/Η-3' και Η-5'/Η-6'. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκαν οι μετατοπίσεις των δύο πρωτονίων Η-6' της γλυκόζης του μορίου.



Εικόνα 47. Φάσμα COSY του μεταβολίτη VI

Μέσω του φάσματος ετεροπυρινικής συσχέτισης HSQC-DEPT , αποδόθηκαν οι μετατοπίσεις των ανθράκων των παραπάνω πρωτονίων όπως αναφέρεται στον πίνακα παραπάνω.



Εικόνα 63. Φάσμα HSQC DEPT του μεταβολίτη VI

Αντιθέτως, η ταυτοποίηση των τεταρτοταγών ανθράκων, όπως και των δύο οξυγονωμένων της πλευρικής αλυσίδας καθώς και των αρωματικών δακτυλίων, πραγματοποιήθηκε μέσω του φάσματος HMBC.



Εικόνα 64. Φάσμα ΗΜΒC του μεταβολίτη VI

Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η <sup>3</sup>J σύζευξη του άνθρακα C-1<sup>'''</sup> στα 171.71 ppm με τα πρωτόνια H-6<sup>''</sup> της γλυκόζης καθώς και η <sup>2</sup>J σύζευξη με τα πρωτόνια H-2a<sup>'''</sup>/ H-2b<sup>''''</sup> όπως και η <sup>2</sup>J σύζευξη του άνθρακα C-3<sup>'''</sup> με τα H-2a<sup>''''</sup>/ H-2b<sup>''''</sup> της πλευρικής αλυσίδας. Οι άνθρακες του αρωματικού δακτυλίου έχουν παρόμοιες μετατοπίσεις με τους άνθρακες του μεταβολίτη II και έχουν αναφερθεί παραπάνω. Τέλος, με την μελέτη των παραπάνω δεδομένων, αποδόθηκε στον μεταβολίτη VI ο μοριακός τύπος C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>O<sub>17</sub>. Η λήψη του φάσματος μάζας ESI (-) HR-MS επιβεβαιώνει την δομή, με την παρουσία του ψευδομοριακού ιόντος με *m/z*= 665,1710.



Εικόνα 48. Φάσμα μάζας HRMS ESI (-) του μεταβολίτη VI

### 7. Μεταβολίτης VII : Μελιτιδίνη (Melitidin)

Ο μεταβολίτης VII απομονώθηκε από το κλάσμα 26 της Sephadex\_II, κατόπιν TLC preparative. Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων του φάσματος πρωτονίου και η μελέτη του φάσματος μάζας HR-MS ESI (-) έχουν ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση της **Μελιτιδίνης**. Η ένωση αυτή ανήκει στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων και συγκεκριμένα στις φλαβανόνες. Οι μετατοπίσεις των σημάτων στα φάσματα NMR όπως και τα αποτελέσματα των φασμάτων μάζας επιβεβαιώθηκαν με την μελέτη βιβλιογραφίας [39].



Εικόνα 66. 2S/2R Μελιτιδίνη

JCB	_۲	1	8_	2
20/20	N /	- 1		

2S/2R Melitidin	
-----------------	--

	<sup>1</sup> H N	MR	<sup>13</sup> C *
Θέση	(600 MHz)	, CD₃OD,	(600 MHz,CD₃OD,
	δppm, J	σε HZ)	δppm, J σε HZ)
	2S	2R	
2	5.39, dd	5,39, dd	80.40 <i>,</i> CH
	(1H, 12.56 ; 2,75)	(1H, 12.56 ; 2,75)	
3a	3.11, dd	2.76, dd	
	(1H, 12.56 ; 17,55)	(1H, 17.55 ; 2,75)	49.26 CH <sub>2</sub>
3b	2.75, dd	3.11, dd	
	(1H, 17.55 ; 2,75)	(1H, 12.56 ; 17.55)	
6	6.17, d	6,17, d	97.51 <i>,</i> CH
	(1H, 1,97)	(1H, 1,97)	
8	6.20, d	6.20, d	96.53 <i>,</i> CH
	(1H, 1.97)	(1H, 1.97)	
2'/6'	7.32, d	7.32, d	129.2, CH
	(2H, 8.40)	(2H, 8.40)	
3'/5'	6.82, d	6.82, d	118.11, CH
	(2H, 8.40)	(2H, 8.40)	

1"	5.09 <i>,</i> d	5.07 <i>,</i> d	99.04, CH
	(1H <i>,</i> 7.51)	(1H <i>,</i> 7.51)	
6a''	4.20, dd	4.20, dd	
	(1H <i>,</i> 7,11, 11,84)	(1H, 7,11, 11,84)	64.38, CH <sub>2</sub>
6b''	4.45,dd	4.45,dd	
	(1H, 1.97,11.84)	(1H, 1.97,11.84)	
1‴	5.24 <i>,</i> d	5.26 <i>,</i> d	102.03 <i>,</i> CH
	(1H, 1.60)	(1H <i>,</i> 1.60)	
6′′′	1.28, d	1.28, d	18.17, CH₃
	(3H, 6.26)	(3H, 6.26)	
2a''''			
	2.50 – 2.65 <i>,</i> m	2.50 – 2.65, m	47.52, CH <sub>2</sub>
2b''''	(2H)	(2H)	
4a''''			
	2.50 – 2.65, m	2.50 – 2.65, m	47.14, CH <sub>2</sub>
4b''''	(2H)	(2H)	
	ζ, γ	ζ, γ	
6''''	1,23, s	1,23, s	27.8, CH <sub>3</sub>
	(3H)	(3H)	
	• •	• •	

Πίνακας 16. Χημικές μετατοπίσεις 1H & 13C-NMR του μεταβολίτη VII (MeOD)

Κατά την ανάλυση του <sup>1</sup>Η NRM φάσματος, διακρίνονται μετατοπίσεις πρωτονίων συγκρίσιμες με αυτές του μεταβολίτη VI καθώς και του μεταβολίτη II. Τα μόρια είναι πολύ κοντά δομικά με διαφορά την παρουσία μιας πλευρικής αλυσίδας, η οποία αντιστοιχεί σ΄ ένα υδροξυμεθυλογλουταρύλ υποκατεστημένο στην θέση του άνθρακα C-6''της γλυκόζης. Στην περιοχή 2.50 – 2.65 ppm, βρίσκονται δύο πολλαπλές κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H2a''''/H2b'''' και H4a''''/H4b''''. Στα 3.93 ppm, παρατηρείται μια πενταπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια, και αντιστοιχούν στο μεθύλιο στην θέση του άνθρακα 6'''' της πλευρικής αλυσίδας.



Εικόνα 49. Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη VII

Τα υπόλοιπα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου είναι συγκρίσιμα με τον προηγούμενο μεταβολίτη. Επίσης, τα σήματα του κάθε πρωτονίου είναι διπλά, με συμπέρασμα το δείγμα να είναι μίγμα των διαστερεοϊσομερών 2S/2R της μελιτιδίνης όπως παρουσιάζεται σε όλους τους προηγούμενους μεταβολίτες.

Με το φάσμα COSY, επιβεβαιώνονται οι θέσεις των πρωτονίων H2'/H3'και H5'/H6' του δεύτερου αρωματικού δακτυλίου, τα πρωτόνια H6a''/H6b'' του σακχάρου καθώς και των πρωτονίων H2a''''/H2b'''' και H4a''''/H4b'''' του υποκατεστημένου υδροξυμεθυλογλουταρύλ.



Εικόνα 68. Φάσμα COSY του μεταβολίτη VII

Η προσδιόριση των ανθράκων των πρωτονίων πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση του 2D φάσματος HSQC-DEPT όπως αναφέρεται στον πίνακα παραπάνω.



Εικόνα 69. Φάσμα HSQC DEPT του μεταβολίτη VII

Οι τεταρτοταγείς άνθρακες των αρωματικών δακτυλίων όπως και των σακχάρων έχουν αναφερθεί παραπάνω και είναι συγκρίσιμα με τα δεδομένα του φάσματος HMBC του μεταβολίτη VII.

Οι οξυγονωμένοι και τεταρτοταγείς άνθρακες της πλευρικής αλυσίδας έχουν αποδοθεί επίσης από το φάσμα HMBC. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν η <sup>3</sup>J σύζευξη του άνθρακα C-1<sup>''''</sup> στα 172.95 ppm με τα πρωτόνια του μεθυλίου στον άνθρακα C-6<sup>''''</sup> καθώς και η <sup>2</sup>J σύζευξη με τα πρωτόνια H-6a<sup>''</sup>/H-6b<sup>''</sup> του σακχάρου και τα πρωτόνια H-2a<sup>''''</sup>/H-2b<sup>''''</sup> της αλυσίδας. Παρομοίως, προσδιορίστηκαν η <sup>3</sup>J σύζευξη του άνθρακα C-5<sup>''''</sup> στα 179.84 ppm με τα πρωτόνια του μεθυλίου στον άνθρακα C-6<sup>''''</sup> καθώς και η <sup>2</sup>J σύζευξη με τα πρωτόνια του μεθυλίου στον άνθρακα C-6<sup>''''</sup> καθώς και η <sup>2</sup>J σύζευξη με τα πρωτόνια του μεθυλίου στον άνθρακα C-5<sup>''''</sup> στα 179.84 ppm με τα πρωτόνια του μεθυλίου στον άνθρακα C-6<sup>''''</sup> καθώς και η <sup>2</sup>J σύζευξη με τα πρωτόνια του μεθυλίου στον άνθρακα C-6<sup>''''</sup>



Εικόνα 70. Φάσμα ΗΜΒC του μεταβολίτη VII

Ο μοριακός τύπος του μεταβολίτη προσδιορίστηκε ως  $C_{33}H_{40}O_{18}$ , το οποίο επιβεβαιώθηκε με το φάσμα HR-MS ESI (-) στο οποίο εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν με m/z= 723,2128.



Εικόνα 71. Φάσμα HRMS ESI (-) του μεταβολίτη VII

#### 8. Μεταβολίτης VIII : Μπεργαπτόλη (Bergaptol)

Ο μεταβολίτης VIII απομονώθηκε από το κλάσμα 3 του CPC\_III, κατόπιν διαχωρισμού μέσω TLC Preparative. Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων του φάσματος πρωτονίου και η μελέτη του φάσματος μάζας HR-MS ESI (-) έχουν ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση της **Μπεργαπτόλης**. Η ένωση αυτή ανήκει στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων και συγκεκριμένα στις φουρανοκουμαρίνες. Οι μετατοπίσεις των σημάτων στα φάσματα NMR όπως και τα αποτελέσματα των φασμάτων μάζας επιβεβαιώθηκαν με την μελέτη βιβλιογραφίας [76].



Εικόνα 72. Μπεργαπτόλη

JCBK\_9\_1 Bergaptol

	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C *
Θέση	(600 MHz, d6-acetone,	(600 MHz, d6-acetone,
	δppm, J σε HZ)	δppm, J σε HZ)
3	6.22, d	111.01, CH
	(1H <i>,</i> 9.77)	
4	8.28, d	139.79, CH
	(1H <i>,</i> 9.77)	
8	7.03, s	91.07, CH
	(1H)	
1'	7.17 <i>,</i> d	104.73 <i>,</i> CH
	(1H, 2.24)	
2'	7.78, d	145.02, CH
	(1H, 2.24)	

**Πίνακας 17**. Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η και <sup>13</sup>C NMR του Μεταβολίτη VIII (d6-Acetone)

• Οι χημικές μετατοπίσεις του άνθρακα αποδόθηκαν όπως προηγουμένως με βάση την βιβλιογραφία

Η ανάλυση της αρωματικής περιοχής του φάσματος του μεταβολίτη VIII ανέδειξε την παρουσία χαρακτηριστικών σημάτων μιας κουμαρίνης. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο διπλές κορυφές, η πρώτη στα 6.22 ppm με J= 9.77 Hz και η δεύτερη στα 8.28 ppm με J= 9.77 Hz. Αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-3 και H-4 αντίστοιχα του διπλού δεσμού του δακτυλίου της α-πυρόνης.

Παρουσιάζονται επίσης άλλες δύο χαρακτηριστικές κορυφές, οι οποίες είναι οι δύο διπλές στα 7.17 και 7.78 ppm με σταθερά σύζευξη των 2.24 Hz και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-1' και H-2' του διπλού δεσμού του φουρανικού δακτυλίου της φουρανοκουμαρίνης. Τέλος, η απλή κορυφή στα 7.03 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8 του βενζολίου.



Εικόνα 73. Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη VIII

Όπως σημειώθηκε παραπάνω, οι άνθρακες αποδόθηκαν με τις τιμές της βιβλιογραφίας.

Έτσι, με βάση τα δεδομένα του φάσματος <sup>1H</sup> NMR και με συγκριτική εξέταση με την βιβλιογραφία, καταλήξαμε στον μοριακό τύπο  $C_{11}H_6O_4$  με μοριακό βάρος 202.17 m/z. Η υπόθεση επιβεβαιώθηκε με το φάσμα HR-MS ESI (-) στο οποίο παρατηρήθηκε το ψευδομοριακό ιόν στα m/z= 201.0183.



Εικόνα 74. Φάσμα μάζας HRMS ESI (-) του μεταβολίτη VIII

# 9. Μεταβολίτης ΙΧ : 6',7'-διυδροξυμπεργαμοτίνη (6',7'dihydroxybergamottin)

Ο μεταβολίτης ΙΧ απομονώθηκε από το κλάσμα 3 του CPC\_III, κατόπιν διαχωρισμού μέσω TLC preparative. Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων του φάσματος πρωτονίου και η μελέτη του φάσματος μάζας HR-MS ESI (+) έχουν ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση της **6',7'-διυδρόμπεργαμοτινής**. Οι μετατοπίσεις των σημάτων στα φάσματα NMR όπως και τα αποτελέσματα των φασμάτων μάζας επιβεβαιώθηκαν με την μελέτη βιβλιογραφίας [77].



Εικόνα 75. 6',7'-διυδροξυμπεργαμοτίνη

	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C *
Θέση	(600 MHz, CD <sub>3</sub> OD,	(600 MHz, d, CD₃OD
	δppm, J σε Hz)	δppm, J σε Hz)
3	6.29, d	112.68, CH
	(1H, 9.72)	
4	8.28, d	141.25 <i>,</i> CH
	(1H, 9.72)	
8	7.21, s	95.37 <i>,</i> CH
	(1H)	
1'	5.05, d	70.49, CH <sub>2</sub>
	(2H <i>,</i> 6.96)	
2'	5.62 <i>,</i> t	120.75, CH
	(1H <i>,</i> 6.90)	
4'a	2.32, m	
	(1H)	37.95, CH <sub>2</sub>
4'b	2.10, m	
	(1H)	
5'a	1.62, m	
	(1H)	30.33, CH <sub>2</sub>
5'b	1.26, m	
	(1H)	

JCBK_2	4_1
6',7'-dihydroxyb	ergamottin

6'	3.20, m (1H)	78.69 <i>,</i> CH
8'	1.11, s (3H)	26.05, CH₃
9'	1.15, s (3H)	24.97, CH <sub>3</sub>
10'	1.70, s (3H)	16.26, CH₃
1"	7.19, d (1H, 2.34)	104.97, CH
2"	7.80, d (1H, 2.34)	146.47, CH

**Πίνακας 18.** Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η και <sup>13</sup>C NMR του Μεταβολίτη IX (CD<sub>3</sub>OD)

Το φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη ΙΧ μοιάζει χαρακτηριστικά με στο αντίστοιχο φάσμα του μεταβολίτη VIII. Οι διπλές κορυφές στα 6.29 ppm και 8.28 ppm τα οποία έχουν σταθερά σύζευξη των 9.72 Hz αλλά και οι διπλές κορυφές στα 7.19 ppm και 7.80 ppm με σταθερά σύζευξη των 2.34 Hz, χαρακτηριστικά μιας φουρανοκουμαρίνης, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-3/H-4 του δακτυλίου της λακτόνης και στα πρωτόνια H-1"/H-2" του φουρανικού δακτυλίου.



Σχετικά με τον προηγούμενο μεταβολίτη, η διαφορά βρίσκεται στον υποκατάστατη στην θέση του άνθρακα C-5, ο οποίος αντιστοιχεί σε μια πλευρική αλυσίδα. Παρατηρούνται μια διπλή κορυφή στα 5.05 ppm με σύζευξη 6.96 Hz και μια τριπλή κορυφή στα 5.62 ppm με σύζευξη 6.90 Hz που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο, τα οποία σήματα αντιστοιχούν στα δύο πρωτόνια της θέσης C-1" και το πρωτόνιο H-2" της πλευρικής αλυσίδας. Στην περιοχή των μεθυλίων διακρίνονται τρείς απλές κορυφές στα 1.11 ppm και στα 1.15 ppm που αντιστοιχούν στα μεθύλια στις θέσεις 8' και 9' αλλά και στα 1.70 ppm, η οποία μετατόπιση αντιστοιχεί στο μεθύλιο της θέσης 10' της αλυσίδας.

Από το φάσμα COSY, επιβεβαιώθηκαν οι θέσεις των πρωτονίων του λακτονικού αλλά και του φουρανικού δακτυλίου αλλά και οι θέσεις των πρωτονίων H-1' και H-2' της πλευρικής αλυσίδας. Επίσης, προσδιορίστηκαν οι τρείς πολλαπλές κορυφές στα 1.36ppm και 1.72ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-5', στα 2.10ppm και 2.32ppm οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-5', στα 2.10ppm και 2.32ppm οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-4, αλλά και στα 3.20 ppm η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-6' του υποκαταστάτη, εφόσον τα πέντε πρωτόνια βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο στην πλευρική αλυσίδα.



Εικόνα 77. Φάσμα COSY του μεταβολίτη ΙΧ

Οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων του μορίου προσδιορίστηκαν στην συνέχεια βάση του φάσματος 2D HSQC-DEPT όπως αναφέρεται στον πίνακα παραπάνω.



Στην συνέχεια, προσδιορίστηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των τεταρτοταγών ανθράκων και επιβεβαιώθηκαν οι θέσεις των πρωτονίων ως προς τις <sup>3</sup>J συζεύξεις μεταξύ ανθράκων και πρωτονίων.

Έτσι, ο άνθρακας C-2 προσδιορίστηκε στα 163.14 ppm με <sup>3</sup>J με το πρωτόνιο H-4 αλλά και <sup>2</sup>J με το πρωτόνιο H-3. Στα 116.74 ppm , ο άνθρακας C-6 εμφάνισε <sup>3</sup>J συζεύξεις με τα πρωτόνια H-2" και H-8, αλλά και <sup>2</sup>J σύζευξη με το πρωτόνιο H-1". Στα 160.13 ppm, προσδιορίστηκε ο άνθρακας C-7 έχοντας <sup>3</sup>J με τα πρωτόνια H-2" και H-1" και <sup>2</sup>J με το πρωτόνιο H-8. Ο άνθρακας C-9 προσδιορίστηκε στα 108.22 ppm, έχοντας <sup>3</sup>J σύζευξη με τα πρωτόνια H-3 και H-8, και αντίστοιχα άνθρακας C-10 προσδιορίστηκε στα 154.34 ppm με <sup>3</sup>J με το πρωτόνια H-4 αλλά και <sup>2</sup>J με το πρωτόνιο H-8.





Επιβεβαιώθηκαν οι θέσεις της πλευρικής αλυσίδας με την μετατόπιση στα 150 ppm, η οποία αντιστοιχεί στον άνθρακα C-5 έχοντας <sup>3</sup>J με τα πρωτόνια H-1' και H-4. Στην συνέχεια προσδιορίστηκε ο άνθρακας C-3' με μετατόπιση στα 144,78 ppm , έχοντας <sup>3</sup>J με τα πρωτόνια H-1' και H-5', αλλά και ο άνθρακας C-7' στα 73,78 ppm με <sup>2</sup>J σύζευξη με τα πρωτόνια των μεθυλενίων στις θέσεις C-8' και C-9'.

Τέλος, με την εξέταση των δεδομένων των φασμάτων συγκριτικά με την βιβλιογραφία, καταλήξαμε στον μοριακό τύπου  $C_{21}H_{24}O_6$  με μοριακό βάρος 372,42. Η υπόθεση επιβεβαιώθηκε με το φάσμα HR-MS ESI (+) στο οποίο παρατηρήθηκε το ψευδομοριακό ιόν στα m/z= 373,1651.





# 10. Μεταβολίτης Χ : Λιμονίνη (Limonin)

Ο μεταβολίτης Χ απομονώθηκε από το κλάσμα 3 του CPC\_III, κατόπιν διαχωρισμού μέσω TLC Preparative. Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων του φάσματος πρωτονίου και η μελέτη του φάσματος μάζας HR-MS ESI (-) έχουν ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση της **Λιμονίνης**. Η ένωση αυτή ανήκει στην κατηγορία των τερπενίων και συγκεκριμένα στα τετρανορτερπένια. Οι μετατοπίσεις των σημάτων στα φάσματα NMR όπως και τα αποτελέσματα των φασμάτων μάζας επιβεβαιώθηκαν με την μελέτη βιβλιογραφίας [78-80].



Εικόνα 81. Λιμονίνη

JCBK\_9\_5 Limonin

	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C *
Θέση	(600 MHz, CD₃Cl₃, δppm, J σε HZ)	(600 MHz,CDCl <sub>3</sub> , δppm, J σε HZ)
1	4.03, brs (1H)	79.2 , CH
2a	2.66, dd (1H, 1,9, 16,8)	35.7, CH <sub>2</sub>
2b	2.95, dd (1H, 3,9, 16,8)	35.7, CH <sub>2</sub>
5	2.22, dd (1H, 3,29, 15,85)	60.7 , CH
6а	2.43, dd (1H, 3,29, 14,79)	36.4, CH <sub>2</sub>
6b	2.84,dd (1H, 14,79, 15,85)	36.4, CH <sub>2</sub>
9	2.54, dd (1H, 2.94, 12,62)	48.2 , CH
10		46 <i>,</i> C

Αποτελέσ	ματα κα	α συζι	ίτηση
	p		1

11a	1.49, m	19, CH <sub>2</sub>
11b	(11) 1.88, m (1H)	19,CH <sub>2</sub>
12a 12b	1.78, m (2H)	30.9,CH <sub>2</sub>
15	4.02, s (1H)	53.9, CH
17	5.45, s (1H)	77.8, CH
18	1.15, s (3H)	20.7, CH
<b>19</b> a	4.45, d (1H, 13)	66.4, CH <sub>2</sub>
19b	4.75, d (1H, 13)	65.4,CH <sub>2</sub>
20		120,1, C
21	7.37, brs (1H)	143.3, CH
22	6.34, brs (1H)	109.7, CH
23	7.39, m (1H)	141.2, CH
24	1.05, s (3H)	17.7, CH <sub>2</sub>
<b>25</b> a	1.27, s (3H)	30.2, CH₃
25b	1.15, s (3H)	21.4, CH <sub>3</sub>

Πίνακας 19. Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η και <sup>13</sup>C NMR του Μεταβολίτη Χ (CDCl<sub>3</sub>)

\*Οι χημικές μετατοπίσεις του άνθρακα αποδόθηκαν όπως προηγουμένως με βάση την βιβλιογραφία

Η ανάλυση της αρωματικής περιοχής του φάσματος <sup>1Η</sup> NMR του μεταβολίτη Χ, ανέδειξε την παρουσία τριών σημάτων με πολλαπλότητα μιας απλής κορυφής, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο, στα 6.34 ppm , 7.37 ppm και 7.39 ppm και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-21, H-22 και H-23 του φουρανικού δακτυλίου ενός τριτερπενίου, και πιο συγκεκριμένα, ενός λιμονοειδές. Στα 4.02 ppm και στα 5.45 ppm, εμφανίζονται δύο απλές κορυφές, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο, και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-15 και H-17. Υπάρχουν δύο διπλές κορυφές των 13 Hz στα 4.45 και 4.75 ppm και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-19a και H-19b του τριτερπενίου. Η απλή κορυφή στα 4.03 ppm αντιστοιχοί στο πρωτόνια H-1. Στα υψηλότερα πεδία, παρατηρούνται έξι κορυφές με πολλαπλότητα διπλή-διπλής . Οι δύο, οι οποίες εμφανίζονται στα 2.43 ppm και 2.84 ppm έχουν σταθερά σύζευξη των 3.29/14.79 και 14,79/15,85 Hz και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6a/H-6b. Παρομοίως, οι μετατοπίσεις στα 2.66 ppm και 2.95 ppm, με σύζευξη των 1.94/16.80 και 3.86/16.80, αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2a/H-2b.

Οι δύο τελευταίες, στα 2.22ppm με σύζευξη 3.29/15.85 Hz και στα 2.54 ppm με σύζευξη 2.94/12.62 Hz αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-5 και H-9.



Εικόνα 82. Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη Χ

Στα 1.49 και 1.88 ppm, βρίσκονται δύο πολλαπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο, αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-11a/H-11b. Παρομοίως, στα 1.78 ppm, υπάρχει μια ακόμη πολλαπλή, η οποία αντιστοιχεί στα δύο πρωτόνια του άνθρακα C-12.

Τέλος, στην περιοχή των μεθυλίων, υπάρχουν τρείς απλές κορυφές στα 1.05ppm, 1.15 ppm η οποία ολοκληρώνει για 6 πρωτόνια , καθώς και στα 1.27 ppm , οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια των μεθυλιίων H-24, H-18/H-25b και H-25α αντίστοιχα.

Από την μελέτη του φάσματος συγκριτικά με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, προσδιορίστηκε ο μοριακός τύπος C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub>, το οποί επιβεβαιώθηκε με την λήψη του φάσματος μάζας HR-MS ESI (-) με ψευδομοριακό ιόν *m/z*= 469,1861.



Εικόνα 83. Φάσμα μάζας HRMS ESI (-) του μεταβολίτη Χ

#### 11.Μεταβολίτης XI: Νομιλίνη (Nomilin)

Ο μεταβολίτης XI απομονώθηκε από το κλάσμα 5-6 του CPC\_III, κατόπιν διαχωρισμού μέσω TLC preparative. Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων του φάσματος πρωτονίου και η μελέτη του φάσματος μάζας HR-MS ESI (-) έχουν ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση της **Νομιλίνης**. Η ένωση αυτή ανήκει στην κατηγορία των τερπενίων και συγκεκριμένα στα seco-limonoids. Οι μετατοπίσεις των σημάτων όπως και η μάζα επιβεβαιώθηκαν με την μελέτη βιβλιογραφίας [78].



**Εικόνα 50**. Νομιλίνη

ICB	Κ	10	4
	_		_

Nomilin

	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C *
Θέση	(600 MHz, CD <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> ,	(600 MHz,CDCl <sub>3</sub> ,
	δppm, J σε HZ)	δppm, J σε HZ)
1	5.01, s	70.7 <i>,</i> CH
	(1H)	
<b>2</b> a	3.09, dd	35.3, CH <sub>2</sub>
	(1H, 7.24, 15.56)	
2b	3.20 <i>,</i> d	35.3, CH₂
	(1H, 15.56)	
5	2.76, t	50.9 <i>,</i> CH
	(1H, 15.32)	
6a	2.57, dd	38.8, CH <sub>2</sub>
-	(1H, 3.69, 12.14)	
6b	2.60, dd	38.8, CH <sub>2</sub>
•	(1H, 1.14, 15.32)	
9	2.48, dd	44.3 , CH
	(1H, 2.42, 10.59)	
10		44,2, C
11a	4.60	
	1.62, m	16.5, CH <sub>2</sub>
11b	(1H)	

Αποτελέσματα	και συζήτηση
--------------	--------------

12a	1.1, m (1H)	32.3,CH <sub>2</sub>
12b	1.78, ddd (1H, 2,15, 7,14, 13,83)	32.3, CH <sub>2</sub>
15	3.79, s (1H)	53.4, CH
17	5.43, s (1H)	77.9, CH
18	1.17, s (3H)	17.2, CH
19	1.32, s (3H)	17.1, CH
20		120,1, CH
21	7.32, brs (1H)	143.2, CH
22	6.34 <i>,</i> m (1H)	109.1, CH
23	7.39, brs (1H)	140.9, CH
24	1.08, s (3H)	20.8, CH <sub>2</sub>
25a	1.55, s (3H)	33.4, CH <sub>3</sub>
25b	1.46, s (3H)	32.4, CH <sub>3</sub>
CH <sub>3</sub> -C=O	2,01, s (3H)	20.7, CH <sub>3</sub>

**Πίνακας 20.** Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η και <sup>13</sup>C NMR του Μεταβολίτη XI (CDCI<sub>3</sub>)

\* Οι χημικές μετατοπίσεις του άνθρακα αποδόθηκαν όπως προηγούμενος με βάση την βιβλιογραφία

Κατά την μελέτη του φάσματος πρωτονίου του μεταβολίτη ΧΙ διακρίνονται σήματα παρόμοια με τον μεταβολίτη Χ με συμπέρασμα να ανήκουν στην ίδια κατηγορία ουσιών.



Εικόνα 85. Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη ΧΙ

Οι κύριες διαφορές παρουσιάζονται στα 3.09 και 3.20 ppm με πολλαπλότητα των κορυφών ως διπλή-διπλής, τα σήματα ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνια και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2a/ H-2b, καθώς και στα 2.76 ppm όπου εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-5. Πλέον, το πρωτόνιο H-1 εμφανίζεται ως μια απλή στα 5.01 ppm ,καθώς και βρίσκεται μια επιπλέον και χαρακτηριστική απλή κορυφή στα 2ppm, η οποία ολοκληρώνει για τα τρία πρωτόνια του μεθυλίου του εστέρα στην θέση C-1.

Τέλος, εμφανίζεται μια απλή κορυφή στα 1.32 ppm, η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-19 του μεθυλίου.

Βάση των φασμάτων <sup>1</sup>Η NMR και μάζας HR-MS ESI (-), αποδόθηκε ο μοριακός τύπος  $C_{28}H_{34}O_9$  και με ψευδομοριακό ιόν στα m/z= 513,2123.



Εικόνα 86. Φάσμα μάζας HRMS ESI (-) του μεταβολίτη XI

### 12.Μεταβολίτης XII: Νομιλινικό οξύ (Nomilinic acid)

Ο μεταβολίτης XII απομονώθηκε από το κλάσμα 5-6 του CPC\_III, κατόπιν διαχωρισμού μέσω στήλης μοριακού αποκλεισμού Sephadex και TLC preparative του κλάσματος 6-8 της στήλης. Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων του φάσματος πρωτονίου και η μελέτη του φάσματος μάζας HR-MS ESI (-) έχουν ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του **Νομιλινικού οξέος**.



Εικόνα 87. Νομιλινικό οξύ

JCBK\_13\_6

	Nomilinic acid	
Θέση	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C
	(600 MHz, CD <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> ,	(600 MHz,CDCl <sub>3</sub> ,
1		
1	(1H)	70,72 , CH
<b>2</b> a	3.19, d	
	(1H, 15,09)	43,52, CH <sub>2</sub>
2b	3.09, m	
-	(1H)	
5	2.58, 00	50,97, CH
63	(II) 2 77 dd	38.84 CH
0a	(1H 1 73 14 48)	50,04, CH <sub>2</sub>
6b	2.77.dd	38.84. CH <sub>2</sub>
	(1H, 13.19, 14.48)	
9	2.45, dd	39 <i>,</i> CH
	(1H, 5.27, 14.71)	
10		44,82, C
11a	1.49, m	21,4, CH <sub>2</sub>
	(1H)	
11b	1.88, m	21,4,CH <sub>2</sub>
	(1H)	

104

12a 12b	1.77, m (2H)	32.20,CH <sub>2</sub>
15	3.67, s (1H)	53.03, CH
17	5.43, s (1H)	77.88 <i>,</i> CH
18	1.10, s (3H)	20.85, CH
19	1.30, s (3H)	16.58, CH <sub>2</sub>
20		119,69, C
21	7.39, brs (1H)	140.58 <i>,</i> CH
22	6.35, brs (1H)	109.41 <i>,</i> CH
23	7.40, brs (1H)	142.84 <i>,</i> CH
24	1.15, s (3H)	16.77, CH <sub>2</sub>
25a	1,34, s (3H)	33,96, CH <sub>3</sub>
25b	1.24, s (3H)	29.48, CH <sub>3</sub>
CH₃-C=O	2.05 s (3H)	22.03, CH <sub>3</sub>

**Πίνακας 21**. Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η και <sup>13</sup>C NMR του Μεταβολίτη XII (CDCl<sub>3</sub>)

Η ανάλυση του φάσματος πρωτονίου του μεταβολίτη ΧΙ, σημαντικές ομοιότητες με εκείνο του μεταβολίτη ΧΙΙ, υποδηλώνοντας έτσι την κοινή χημική κατηγορία των ενώσεων.





Στην συνέχεια προσδιορίστηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων του μορίου μέσω των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC, οι οποίες συγκριτικά με το προηγούμενο μόριο ήταν όμοιες, και αναφέρονται στον πίνακα παραπάνω.



Εικόνα 89. Φάσμα HSQC DEPT του μεταβολίτη XII

Πιο συγκεκριμένα, στα 119.69 παρουσιάζεται η μετατόπιση του άνθρακα C-20 με <sup>3</sup>J σύζευξη με το πρωτόνιο H-23 καθώς και μια <sup>2</sup>J σύζευξη με τα πρωτόνια H-17, H-21 και H-22.





Ο οξυγονωμένος άνθρακας C-16 προσδιορίστηκε στα 166.60 ppm έχοντας μια  $^{2}$ J σύζευξη με το πρωτόνιο H-15. Στα 65.07 ppm , ο άνθρακας C-14 εμφάνισε μια  $^{3}$ J σύζευξη με το πρωτόνιο H-17, καθώς και μια  $^{2}$ J σύζευξη με τα πρωτόνια H-15 και H-24,H-18 των μεθυλίων. Στα 38.74 ppm προσδιορίστηκε ο άνθρακας C-13 έχοντας μια  $^{3}$ J σύζευξη με τα πρωτόνια H-15 και H-24 του μεθυλίου αλλά και μια  $^{2}$ J σύζευξη με τα πρωτόνια H-15 και H-24 του μεθυλίου αλλά και μια  $^{2}$ J σύζευξη με τα πρωτόνια H-15 και H-24 του μεθυλίου αλλά και μια  $^{2}$ J σύζευξη με τα πρωτόνια H-18 του μεθυλενίου και το πρωτόνιο H-17. Ο άνθρακας C-9 προσδιορίστηκε στα 45,16 ppm καθώς έχει μια  $^{4}$ J σύζευξη με τα πρωτόνια H-2 και H-6, μια  $^{3}$ J σύζευξη με τα πρωτόνια H1,H-5 και H-12 αλλά και μια  $^{2}$ J σύζευξη με τα πρωτόνια H-19 και H-24 των μεθυλίων. Στα 52.09 ppm παρατηρείται η μετατόπιση του άνθρακα C-5 με  $^{3}$ J σύζευξη με τα πρωτόνια H-1, H-9 ,H-25a και H-25b καθώς και μια  $^{2}$ J σύζευξη με τα πρωτόνια H-6 και H-19 του μεθυλενίου.

Ο άνθρακας C-8 παρατηρείται στα 52.60 ppm έχοντας μια <sup>3</sup>J σύζευξη με τα πρωτόνια H-19 του μεθυλίου αλλά και μια <sup>2</sup>J σύζευξη το πρωτόνιο H-9. Ο άνθρακας C-4 εμφανίζεται στα 84,81 ppm έχοντας μια <sup>3</sup>J σύζευξη με τα πρωτόνια H-5 και H-6, αλλά και μια <sup>2</sup>J σύζευξη με τα πρωτόνια των μεθυλίων H-25a και H-25b. Τέλος παρατηρούνται δύο ακόμη άνθρακες στα 170.08 και 169.22 που αντιστοιχούν στους οξυγονωμένους άνθρακες στην θέση C-3 και C-26.

Με βάση των δεδομένων των φασμάτων 1D και 2D ,αλλά και με την βοήθεια του φάσματος μάζας HR-MS ESI (-) προσδιορίστηκε ο μοριακός τύπος C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>O<sub>10</sub> με ψευδομοριακό ιόν στα m/z= 531,2228. Επιβεβαιώθηκε η ομοιότητα του μεταβολίτη XII με τον προηγούμενο, καθώς η μόνη διαφορά σημειώνεται στο άνοιγμα του δακτυλίου στον άνθρακα C-4 με αποτέλεσμα την παρουσία δύο υδροξυλίων.



Εικόνα 91. Φάσμα μάζας HRMS ESI (-) του μεταβολίτη XII

### 13.Μεταβολίτης XIII : Πικρακουάσιοσίδη Α (Picraquassioside A)

Ο μεταβολίτης XIII απομονώθηκε από το κλάσμα 16 της Sephadex\_II, κατόπιν διαχωρισμού μέσω TLC preparative. Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων του φάσματος πρωτονίου και η μελέτη του φάσματος μάζας HR-MS ESI (+) έχουν ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του Πικρακουασιοσίδη Α. Οι μετατοπίσεις των σημάτων όπως και η μάζα επιβεβαιώθηκαν με την μελέτη βιβλιογραφίας [81].



Εικόνα 92. Πικρακουασιοσίδη Α

	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C
Θέση	(600 MHz, CD <sub>3</sub> OD,	(600 MHz, CD <sub>3</sub> OD,
	δppm, J σε HZ)	δppm, J σε HZ)
2	7.59, d	144.36, CH
	(1H, 2.05)	
3	6.97, d	105.87, CH
	(1H, 2.05)	
7	7.10, s	94.63, CH₃
	(3H)	
8	3.07 <i>,</i> m	20.51, CH <sub>2</sub>
	(2H)	
9	2.51 <i>,</i> m	35.42, CH <sub>2</sub>
	(2H)	
10	4.07, s	60.48, CH <sub>3</sub>
	(3H)	
1'	4.93, d	102.94, CH
	(1H, 7.41)	

JCBK\_22 Picraguassioside A

**Πίνακας 22**. Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η και <sup>13</sup>C NMR του μεταβολίτη XIII (CD<sub>3</sub>OD)
#### Αποτελέσματα και συζήτηση

Κατά την ανάλυση του φάσματος πρωτονίου, παρουσιάζονται τρία χαρακτηριστικά σήματα. Οι μετατοπίσεις της αρωματικής περιοχής στα 6.97 ppm και 7.59 ppm με σταθερά σύζευξη στα 2.05 και 2.28 Hz, με πολλαπλότητα μια διπλής κορυφής, αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2 και H-3 του φουρανίου. Στα 4.94 ppm παρατηρείται το χαρακτηριστικό σήμα του ανωμερικού πρωτονίου του σακχάρου, το οποίο έχει ως πολλαπλότητα μια διπλή κορυφή με σύζευξη στα 7.41 Hz. Στην αρωματική περιοχή, παρουσιάζεται άλλη μια κορυφή, απλή, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο, το H-7.



Εικόνα 93. Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη XIII

Τα πρωτόνια Η-8 και Η-9 της πλευρικής αλυσίδας, παρατηρούνται στα 3.07 και 2.51 ppm ως δυο πολλαπλές κορυφές. Τέλος, το μεθοξύλιο στην θέση C-10, παρουσιάζεται ως μια απλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια, στα 4.07 ppm.



Εικόνα 94. Φάσμα COSY του μεταβολίτη XIII

Αποτελέσματα και συζήτηση

Από το φάσμα COSY, επιβεβαιώθηκαν οι θέσεις των πρωτονίων του φουρακινού δακτυλίου, αλλά και τα πρωτόνια Η-8 και Η-9 της υποκατεστημένης πλευρικής αλυσίδας.

Στην συνέχεια, αποδόθηκαν οι μετατοπίσεις των ανθράκων με την βοήθεια του 2D φάσματος HSQC-DEPT όπως παρατηρείται στον παραπάνω πίνακα.



Εικόνα 95. Φάσμα HSQC DEPT του μεταβολίτη XIII

Με την εξέταση του φάσματος 2D HMBC, αποδόθηκαν οι μετατοπίσεις των τεταρτοταγών ανθράκων και παρατηρήθηκαν οι <sup>3</sup>J και <sup>2</sup>J συζεύξεις μεταξύ ανθράκων και πρωτονίων.



**Εικόνα 96**. Φάσμα ΗΜΒC του μεταβολίτη ΧΙΙΙ

Έτσι, παρατηρείται στα 157.90 ppm ο άνθρακας C-3 έχοντας  $^3$ J συζεύξεις με τα πρωτόνια H-2 και H-7 αλλά και μια  $^2$ J σύζευξη με το πρωτόνια H-3 του φουρανίου.

Ο άνθρακας C-7 εμφανίζεται στα 115.19 ppm έχοντας αντίστοιχα <sup>3</sup>J συζεύξεις με τα πρωτόνια H-3 και H-2 του φουρανίου αλλά και μια <sup>2</sup>J σύζευξη με το πρωτόνια H-7 του αρωματικού δακτυλίου. Ο άνθρακας στην θέση C-6 βρίσκεται στα 156.79 ppm με <sup>3</sup>J συζεύξεις με το ανωμερικό πρωτόνιο του σακχάρου και H-8 της πλευρικής αλυσίδας, αλλά και μια <sup>2</sup>J σύζευξη με το πρωτόνιο H-7 του αρωματικού δακτυλίου. Στα 118.43 παρουσιάζεται ο άνθρακας C-5 με <sup>3</sup>J συζεύξεις με τα πρωτόνια H-7 του αρωματικού δακτυλίου χαι μια <sup>2</sup>J σύζευξη με το πρωτόνιο H-7 του αρωματικού δακτυλίου. Στα 118.43 παρουσιάζεται ο άνθρακας C-5 με <sup>3</sup>J συζεύξεις με τα πρωτόνια H-7 του αρωματικού δακτυλίου και H-9 αλλά και μια <sup>2</sup>J σύζευξη με το πρωτόνιο H-7 που πρωτόνιο H-8 της πλευρικής αλυσίδας. Τέλος, η μετατόπιση στα 179.5 ppm αντιστοιχεί στον άνθρακα C-9 της πλευρικής αλυσίδας με <sup>3</sup>J σύζευξη με τα πρωτόνια H-8 και <sup>2</sup>J σύζευξη με τα πρωτόνια H-9.

Η ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων της βιβλιογραφίας, προσδιορίστηκε ο μοριακός τύπος του μεταβολίτη ως C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>. Βεβαιώθηκε με την παρουσία του ψευδομοριακού ιόν το οποίο εμφανίζεται στο φάσμα μάζας με *m/z*= 399,1284.



Εικόνα 97. Φάσμα μάζας HRMS ESI (+) του μεταβολίτη XIII

## 14.Μεταβολίτης XIV : Αμπσισικό οξύ (Abscisic acid)

Ο μεταβολίτης XIV απομονώθηκε από το κλάσμα 6-7-8 της Sephadex\_II, κατόπιν διαχωρισμού μέσω TLC preparative. Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων του φάσματος πρωτονίου και η μελέτη του φάσματος μάζας HR-MS ESI (+) έχουν ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του **Αμπσισικού οξέος**. Οι μετατοπίσεις των σημάτων όπως και η μάζα επιβεβαιώθηκαν με την μελέτη βιβλιογραφίας [82,83].



Εικόνα 98. Αμπσισικό οξύ

# JCBK\_15\_2

<b>۱</b>	ncr	10	-	~	$\sim$	~
A I	1151	15		~		
•	ມມູ		-	u	<b>~</b> 1	ч.

	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C *
Θέση	(600 MHz, CD <sub>3</sub> OD,	(600 MHz, CD <sub>3</sub> OD,
	δppm, J σε HZ)	δppm, J σε HZ)
2	5.79, s	118.6, CH
	(1H)	
4	7.75, d	128.6 <i>,</i> CH
	(1H, 15.99)	
5	6.18, d	138.4 <i>,</i> CH
	(1H <i>,</i> 15.99)	
6	2.02, s	19.2, CH <sub>3</sub>
	(3H)	
3'	5.92 <i>,</i> s	127.3 <i>,</i> CH
5a'	2.18, d	
	(1H, 16.66)	50.03 <i>,</i> CH
5b'	2.54, d	
	(1H, 16.66)	
7'	1.94, brs	21.2, CH <sub>3</sub>
	(3H)	
8'	1.07, s	23.5, CH
	(3H)	
9'	1.04, s	24.7 <i>,</i> CH
	(3H)	

**Πίνακας 23**. Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η και <sup>13</sup>C NMR του μεταβολίτη XIV (CD<sub>3</sub>OD)

#### Αποτελέσματα και συζήτηση

Η αναλυτική εξέταση του φάσμα πρωτονίου παρουσίασε δυο χαρακτηριστικά σήματα ενός διπλού δεσμού trans τα οποία φαίνονται στα 6.18 ppm και 7.75 ppm με την πολλαπλότητα μιας διπλής κορυφής των 15.99 Hz, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-5 και H-4 αντίστοιχα της πλευρικής αλυσίδας. Παρατηρούνται δύο απλές κορυφές, στα 5.79 ppm και στα 5.92 ppm, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούν στα H-2 της πλευρικής αλυσίδας και H-3 του δακτυλίου. Στα υψηλότερα πεδία, παρατηρούνται τα πρωτόνια στην θέση H-5' του δακτυλίου, τα οποία αντιστοιχούν σε δύο διπλές κορυφές στα 2.18 ppm και 2.54 ppm με σταθερά σύζευξη 16.66 Hz.



Εικόνα 99. Φάσμα πρωτονίου του μεταβολίτη XIV

Τέλος, στην περιοχή των μεθυλίων διακρίνονται τρείς απλές κορυφές στα 1,04 ppm, 1,07 ppm και στα 2,02 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 8' και 9' του δακτυλίου αλλά και H-6 της πλευρικής αλυσίδας.



Εικόνα 100. Φάσμα μάζας HRMS ESI (+) του μεταβολίτη XIV

Με βάση του φάσματος <sup>1Η</sup>NMR και ύστερα από συγκριτική εξέταση με την βιβλιογραφία, αποδόθηκε στον μεταβολίτη XIV ο μοριακός τύπος  $C_{15}H_{20}O_4$ . Στο φάσμα μάζας HR-MS ESI (+), εμφανίζεται το ψευδομοριακό ιόν στα m/z = 265,1438 , το οποίο βεβαιώνει την δομή.

## **C. Αποτελέσματα βιολογικής δραστικότητας των δειγμάτων**

Πραγματοποιήθηκαν βιοδοκιμές τόσο στα ολικά αιθανολικά εκχυλίσματα των χυμών περγαμόντων Κεφαλονιάς και Καλαβρίας, όσο και στις απομονωμένες καθαρές ουσίες προερχόμενες από τις διάφορες κλασματώσεις του χυμού.

#### 1. Μελέτη DPPH – αντιοξειδωτική δράση

Οι 14 μεταβολίτες και τα δύο ολικά εκχυλίσματα εξετάστηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση μελετώντας την ικανότητα δέσμευσης τους της ελεύθερης ρίζας DPPH. Πραγματοποιήθηκαν τρείς επαναλήψεις κάθε ανάλυσης και ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων εκφράζονται σε ποσοστά % αναστολής.

	<b>C</b> = 100 μM		
Ουσίες	% Αναστολής ρίζας	σ	
JCBK_6_1	59,35	2,09	
JCBK_17_2	1,87	1,10	
JCBK_7_1	13,30	1,88	
JCBK_9_1	32,37	1,51	
JCBK_9_5	-0,69	0,78	
JCBK_10_4	-0,64	0,30	
JCBK_13_6	0,82	0,66	
JCBK_15_2	-0,70	0,72	
JCBK_18_1	4,17	0,81	
JCBK_18_2	9,94	1,29	
JCBK_22_1	2,34	3,10	
JCBK_23_1	46,45	1,21	
JCBK_24_1	-0,29	1,24	
JCBK_19_1	-1,02	0,67	
	<b>C</b> = 200ug/ml		
Εκχυλίσματα	% Αναστολής ρίζας	σ	
JCBK_1	16,25	0,07	
JCBC_1	8,95 0,36		

Πίνακας 24. Αποτελέσματα της μελέτης αντιοξειδωτικής δράσης

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα αποτελεσμάτων, δύο ουσίες παρουσιάζουν φανερή αναστολή της ρίζας, τα οποία είναι η **νεοεριοσιτρίνη** (JCBK\_6\_1) και ο **7-Ογλυκοσίδης της εριοδικτυόλης** (JCBK\_23), τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών με ποσοστά αναστολής 59,35 και 46,45 % αντίστοιχα. Το ολικό αιθανολικό εκχυλίσμα του χυμού των φρούτων Κεφαλονιάς εμφανίζει ωστόσο πολύ χαμηλή δράση σχετικά με τις καθαρές ουσίες, αλλά σημαντικότερη απ' ότι η δράση του ολικού εκχυλίσματος της ιταλικής ποικιλίας. Αυτό εξηγείται με την παρουσία της νεοεριοσιτρίνης ως βασικό μόριο του εκχυλίσματος.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια καμπύλη αναφοράς των ποσοστών δέσμευσης της ρίζας συγκριτικά με την βαθμιδωτή συγκέντρωση του πρότυπου αναστολέα ωστέ να βρεθεί η απαιτούμενη συγκέντρωση για την αναστολή της ρίζας κατά 50% (IC<sub>50</sub>) των δύο δραστικών δειγμάτων.

μ	% Αναστολής του DPPH		
100	55,19615319		
50	27,25173699 13,30918488		
25			
10	4,994916116		
5	2,675394001		
1	4,185731232		





μM	% Αναστολής του DPPH		
100	44,04338248		
50	21,96873411		
25	11,73953567		
10	5,359261142		
5	3,431621759		
1	1,260379597		

#### Πίνακας 25. Αποτελέσματα της αναστολής της ελεύθερης ρίζας σχετικά με την βαθμιδωτή συγκέντρωση δείγματος

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα, ορίστηκαν τα IC<sub>50</sub> των δύο ουσιών ως 90,80μM και 114,35 μM για την νεοεριοσιτρίνη (JCBK\_6\_1) και τον 7-*Ο*-γλυκοσίδη της Εριοδικτυόλης (JCBK\_23) συγκριτικά με το IC<sub>50</sub> του γαλλικού οξέος με συγκέντρωση 29,39 μM.

### 2. Μελέτη λευκαντικής δράσης

Οι απομονωμένοι μεταβολίτες και τα δύο ολικά εκχυλίσματα των χυμών εξετάστηκαν ως προς την παρεμπόδιση του ενζύμου της τυροσινάσης για την μελέτη της λευκαντικής δράσης των μορίων. Πραγματοποιήθηκαν τρείς επαναλήψεις κάθε ανάλυσης και ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων της λευκαντικής δράσης των δειγμάτων εκφράζονται σε ποσοστά % αναστολής, όπως για την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης παραπάνω.

	<b>C</b> = 100 μM		
Ουσίες	% Αναστολής τυροσινάσης	σ	
JCBK_6_1	-7,98	1,29	
JCBK_17_2	6,51	0,33	
JCBK_7_1	28,52	5,05	
JCBK_9_1	-2,82	0,82	
JCBK_9_5	1,67	1,79	
JCBK_10_4	-0,36	2,45	
JCBK_13_6	-6,93	3,47	
JCBK_15_2	0,75	2,58	
JCBK_18_1	9,14	1,65	
JCBK_18_2	6,67	1,76	
JCBK_22_1	-2,18	4,06	
JCBK_23_1	0,38	2,65	
JCBK_24_1	-1,93	3,64	
JCBK_19_1	-6,07	5,35	
	<b>C</b> = 300ug/ml		
Εκχυλίσματα	% Αναστολής τυροσινάσης	σ	
JCBK_1	3,46	3,66	
JCBC_1	0,71	3,22	

Πίνακας 26. Αποτελέσματα της μελέτης λευκαντικής δράσης

Όπως φαίνεται στον πίνακα παραπάνω, τα καθαρά μόρια καθώς και τα εκχυλίσματα, δεν δείχνουν κάποια δράση ως προς το ένζυμο της τυροσινάσης. Η νεοεσπεριδίνη (JCBK\_7\_1), δείχνει ένα αποτέλεσμα διαφορετικό από όλα τα υπόλοιπα δείγματα, χωρίς όμως να θεωρείται σημαντική δράση.

#### 3. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης

Τα δύο ολικά εκχυλίσματα του χυμού και τα 14 κλάσματα προερχόμενα από το CPC\_3 μελετήθηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση σε τέσσερα διαφορετικά στελέχη Gramκαι Gram+. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων δείχνουν αναστολή δύο μόνο κλασμάτων, με ενδιαφέρον αντιμικροβιακή δράση στους τρία από τα τέσσερα ελεγχόμενα στελέχη. Το κλάσμα

20 έχει ως βασικό μόριο του δείγματος την **ναρινγίνη**, το κλάσμα 22 περιέχει κυρίως



Εικόνα 51. Αποτελέσματα των αντιμικροβιακών μελέτων

**νεοεριοσιτρίνη** και **νεοεσπεριδίνη**, ενώ το 23 και το 24 περιέχουν βασικότερα την **νεοεριοσιτρίνη**. Κανένα από τα τρία κλάσματα δεν έδειξε δράση προς τους στελέχους, αντιθέτως το κλάσμα 21 πλούσιο στα τρία βασικά μόρια, έδειξε μια φανερή δράση και ίσως

να	οφείλ	εται στη	ν συνεργε	ία των	τριών μορίων.
C= 10mg/100µl S.		S. aureus	M. luteus	Bacillus subt.	E. coli
JCB	K_8_2	0	0	0	0
JCB	K_8_4	0	0	0	0
JCB	K_8_8	+/-	0	0	+/-
JCBł	<_8_10	+/-	0	0	+/-
JCB	<_8_13	+/-	0	0	+/-
JCB	<_8_16	0	0	0	0
JCB	<_8_18	+/-	1,1	0,8	1
JCB	<_8_20	0	+/-	0	0
JCB	<_8_21	0	0,7	0,8	1,4
JCB	<_8_22	0	0	0	0
JCB	<_8_23	0	0	0	0
JCB	<_8_24	0	0	0	0
JCB	<_8_28	0	0	0	0
JCB	<_8_31	0	0	0	0
JC	BK_1	0	0	0	0
JC	BC_1	0	0	0	0

Πίνακας 27. Αποτελέσματα της μελέτης αντιμικροβιακής δράσης

# Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, μελετήθηκε ο καρπός μιας ιδιαίτερης ποικιλίας του φυτού Citrus Bergamia.

Επεξεργάστηκαν περίπου 150 καρποί, παραλήφθηκε ο χυμός και στην συνέχεια με την χρήση ρητίνης XAD-4, παραλήφθηκε το αιθανολικό εκχύλισμα, πλούσιο σε δευτερογενείς μεταβολίτες.

Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε η ανάλυση HPLC-DAD του ολικού εκχυλίσματος, η οποία επέδειξε την παρουσία τριών κυρίων μορίων, της **νεοεριοσιτρίνης**, της **ναρινγίνης** και της **νεοσπεριδίνης**. Στην συνέχεια, με την χρήση CPC, πραγματοποιήθηκαν δυο διαδοχικές κλασματώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος, από τις οποίες απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή οι κύριοι μεταβολίτες.

Για την φυτοχημική μελέτη του φυτού, πραγματοποιήθηκε μια τρίτη κλασμάτωση, μεγάλης κλίμακας CPC, από την οποία παραλήφθηκαν συνολικά 36 κλάσματα, δύο εκ των οποίων προχώρησαν σε περαιτέρω κλασμάτωση με την χρήση στήλης Sephadex LH-20. Συνολικά απομονώθηκαν 14 μεταβολίτες. Τα μόρια ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες, όπως φλαβονοειδή, φουρανοκουμαρίνες και τριτερπένια.

Τα καθαρά μόρια όπως και τα ολικά εκχυλίσματα Κεφαλονιάς και Καλαβρίας (προερχόμενο από μια προηγούμενη μελέτη) προχώρησαν σε διερεύνηση της αντιοξειδωτικής (DPPH) και λευκαντικής δράσης (anti-tyrosinase). Η νεοεριοσιτρίνη και ο 7γλυκοσίδης της Εριοδικτυόλης παρουσίασαν μέτρια αντιοξειδωτική δράση, με IC<sub>50</sub> 90,80μM και 114,35μM αντίστοιχα, ενώ η μελέτη της λευκαντικής δράσης δεν επέδειξε κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα.

Μελετήθηκε επίσης η αντιμικροβιακή δράση των εμπλουτισμένων εκχυλισμάτων XAD-4 των δυο χυμών καθώς και επιλεγμένων κλασμάτων του CPC\_3. Δύο από τα κλάσματα παρουσίασαν αξιοσημείωτη δράση ως προς τα στελέχη *Micrococcus luteus, Bacillus subtilis* και *Escherichia coli*.

Στο μέλλον, θα μπορούσαν να μελετηθούν τα δύο κλάσματα με εμφανή αντιμικροβιακή δράση με σκοπό την απομόνωση των βιοδραστικών μορίων. Επίσης, θα μπορούσαν να μελετηθούν τα μίγματα διαστερεοϊσομερών των φλαβονοειδών, με σκοπό τον διαχωρισμό τους με τη χρήση σύγχρονων χρωματογραφικών μεθόδων.

119

# Βιβλιογραφία

[1] O P Sharma, *Plant taxonomy*, second edition vols. Tata McGraw Hill, 2009.

[2] Giovanni Dugo Ivana Bonaccorsi, *Citrus bergamia Bergamot and Its Derivatives*. CRC Press - Taylor & Francis Group, 2014.

[3] Ebehard Teuscher, Robert Anton, Annelise Lobstein, *Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles.* Lavoisier, 2005.

[4] Ikhlas A. Khan, Ehab A. Abourashed., *Leung's encyclopedia of common natural ingredients. (used in Food, Drugs ans Cosmetics.)*, 4ème édition. John Wiley and sons.

[5] L. Di Donna *et al.*, "Hypocholesterolaemic activity of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl flavanones enriched fraction from bergamot fruit (Citrus bergamia): 'In vivo' studies," *J. Funct. Foods*, vol. 7, pp. 558–568, Mar. 2014.

[6]

"https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\_topic=TSN&search\_v alue=825215#null."

[7] Consorizo di Tutela del Bargamotto di Reggio Calabria, "Il frutto che fa nascere i profumi (The fruit which gives us fragrance)."

[8] M. Eleni, M. Antonios, K. George, S. Alexios-Leandros, and M. Prokopios, "High Quality Bergamot Oil from Greece: Chemical Analysis Using Chiral Gas Chromatography and Larvicidal Activity against the West Nile Virus Vector," *Molecules*, vol. 14, no. 2, pp. 839–849, Feb. 2009.

[9] Chapot H., *Le bergamotier*. 1962.

[10] R. Pernice, G. Borriello, R. Ferracane, R. C. Borrelli, F. Cennamo, and A. Ritieni, "Bergamot: A source of natural antioxidants for functionalized fruit juices," *Food Chem.*, vol. 112, no. 3, pp. 545–550, Feb. 2009.

[11] Pierre Duez, *Pharmacognosie - Phytochimie et études des médicaments d'origine végétale*, 2ème édition 2011-2012. Presses universitaires - Université Libre de Bruxelles.
[12] Jean Bruneton, *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales*, 4ème édition. Lavoisier.

[13] V. Mollace *et al.*, "Hypolipemic and hypoglycaemic activity of bergamot polyphenols: From animal models to human studies," *Fitoterapia*, vol. 82, no. 3, pp. 309–316, Apr. 2011.

[14] G. Gattuso, D. Barreca, C. Gargiulli, U. Leuzzi, and C. Caristi, "Flavonoid Composition of Citrus Juices," *Molecules*, vol. 12, no. 8, pp. 1641–1673, Aug. 2007.

[15] D. Barreca, E. Bellocco, C. Caristi, U. Leuzzi, and G. Gattuso, "Distribution of C- and O-glycosyl flavonoids, (3-hydroxy-3-methylglutaryl)glycosyl flavanones and furocoumarins in Citrus aurantium L. juice," *Food Chem.*, vol. 124, no. 2, pp. 576–582, Jan. 2011.

[16] E. Tripoli, M. L. Guardia, S. Giammanco, D. D. Majo, and M. Giammanco, "Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review," *Food Chem.*, vol. 104, no. 2, pp. 466–479, 2007.

[17] Kerry Bolle, Simon Mills, *Principles and practice of Phytotherapy. Modern herbal medecine*, 2ème édition. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto: Chruchill Livingstone Elsevier.

[18] C. Gardana, F. Nalin, and P. Simonetti, "Evaluation of Flavonoids and Furanocoumarins from Citrus bergamia (Bergamot) Juice and Identification of New Compounds," *Molecules*, vol. 13, no. 9, pp. 2220–2228, Sep. 2008.

[19] S. W. Annie Bligh, Olumuyiwa Ogegbo, and Zheng-Tao Wang, "Flavonoids by

HPLC," *Natural Products*, pp. 2108–2137, 2013.

[20] G. Gattuso, C. Caristi, C. Gargiulli, E. Bellocco, G. Toscano, and U. Leuzzi, "Flavonoid Glycosides in Bergamot Juice (Citrus bergamia Risso)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 11, pp. 3929–3935, May 2006.

[21] A. Dugrand, A. Olry, T. Duval, A. Hehn, Y. Froelicher, and F. Bourgaud, "Coumarin and furanocoumarin quantitation in citrus peel via ultraperformance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 45, pp. 10677–10684, 2013.

[22] G. Gattuso, D. Barreca, C. Caristi, C. Gargiulli, and U. Leuzzi, "Distribution of flavonoids and furocoumarins in juices from cultivars of Citrus bergamia risso," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 24, pp. 9921–9927, 2007.

[23] M. Poiana, R. Fresa, and B. Mincione, "Supercritical carbon dioxide extraction of bergamot peels. Extraction kinetics of oil and its components," *Flavour Fragr. J.*, vol. 14, no. 6, pp. 358–366, Nov. 1999.

[24] G. Gattuso, D. Barreca, C. Caristi, C. Gargiulli, and U. Leuzzi, "Distribution of flavonoids and furocoumarins in juices from cultivars of Citrus bergamia risso," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 24, pp. 9921–9927, 2007.

[25] "The review of natural products. Bergamot oil." juillet-2004.

[26] C. A. L. Cardoso, W. Vilegas, and N. K. Honda, "Rapid determination of furanocoumarins in creams and pomades using SPE and GC," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 22, no. 2, pp. 203–214, 2000.

[27] P. C. Ho, D. J. Saville, P. F. Coville, and S. Wanwimolruk, "Content of CYP3A4 inhibitors, naringin, naringenin and bergapten in grapefruit and grapefruit juice products," *Pharm. Acta Helv.*, vol. 74, no. 4, pp. 379–385, 2000.

[28] G. Mazza, "Étude sur la composition aromatique de l'huile essentielle de bergamote (citrus aurantium subsp. bergamia risso et poiteau engler) par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse," *J. Chromatogr. A*, vol. 362, pp. 87–99, 1986.

[29] R. Costa, P. Dugo, M. Navarra, V. Raymo, G. Dugo, and L. Mondello, "Study on the chemical composition variability of some processed bergamot (Citrus bergamia) essential oils," *Flavour Fragr. J.*, vol. 25, no. 1, pp. 4–12, Jan. 2010.

[30] M. Russo, A. Arigò, M. L. Calabrò, S. Farnetti, L. Mondello, and P. Dugo, "Bergamot (Citrus bergamia Risso) as a source of nutraceuticals: Limonoids and flavonoids," *J. Funct. Foods*, vol. 20, pp. 10–19, Jan. 2016.

[31] V. Sicari, M. R. Loizzo, V. Branca, and T. M. Pellicanò, "Bioactive and Antioxidant Activity from Citrus bergamia Risso (Bergamot) Juice Collected in Different Areas of Reggio Calabria Province, Italy," *Int. J. Food Prop.*, vol. 19, no. 9, pp. 1962–1971, 2016.

[32] R. Tundis *et al.*, "Comparative Study on the Antioxidant Capacity and Cholinesterase Inhibitory Activity of Citrus aurantifolia Swingle, C. aurantium L., and C. bergamia Risso and Poit. Peel Essential Oils," *J. Food Sci.*, vol. 77, no. 1, pp. H40–H46, Jan. 2012.

[33] D. Impellizzeri *et al.*, "The anti-inflammatory and antioxidant effects of bergamot juice extract (BJe) in an experimental model of inflammatory bowel disease," 2014.

[34] M. Gliozzi *et al.*, "Bergamot polyphenolic fraction enhances rosuvastatin-induced effect on LDL-cholesterol, LOX-1 expression and protein kinase B phosphorylation in patients with hyperlipidemia," *Int. J. Cardiol.*, vol. 170, no. 2, pp. 140–145, Dec. 2013.

[35] P. P. Toth *et al.*, "Bergamot reduces plasma lipids, atherogenic small dense LDL, and subclinical atherosclerosis in subjects with moderate hypercholesterolemia: A 6 months prospective study," *Front. Pharmacol.*, vol. 6, no. JAN, 2016.

[36] U. J. Jung *et al.*, "Naringin supplementation lowers plasma lipids and enhances erythrocyte antioxidant enzyme activities in hypercholesterolemic subjects," *Clin. Nutr.*,

vol. 22, no. 6, pp. 561–568, Dec. 2003.

[37] H. K. Kim, T.-S. Jeong, M.-K. Lee, Y. B. Park, and M.-S. Choi, "Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats," *Clin. Chim. Acta*, vol. 327, no. 1–2, pp. 129–137, Jan. 2003.

[38] C. Mannucci, M. Navarra, F. Calapai, R. Squeri, S. Gangemi, and G. Calapai, "Clinical Pharmacology of Citrus bergamia: A Systematic Review," *Phytother. Res.*, vol. 31, no. 1, pp. 27–39, Jan. 2017.

[39] L. Di Donna *et al.*, "Statin-like Principles of Bergamot Fruit (Citrus bergamia): Isolation of 3-Hydroxymethylglutaryl Flavonoid Glycosides," *J. Nat. Prod.*, vol. 72, no. 7, pp. 1352–1354, Jul. 2009.

[40] K. A. Hammer, C. F. Carson, and T. V. Riley, "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 86, no. 6, pp. 985–990, Jun. 1999.

[41] K. Fisher and C. a. Phillips, "The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of Campylobacter jejuni, Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus and Staphylococcus aureus in vitro and in food systems," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 101, no. 6, pp. 1232–1240, Dec. 2006.

[42] M. Cháfer, L. Sánchez-González, C. González-Martínez, and A. Chiralt, "Fungal Decay and Shelf Life of Oranges Coated With Chitosan and Bergamot, Thyme, and Tea Tree Essential Oils," *J. Food Sci.*, vol. 77, no. 8, pp. E182–E187, Aug. 2012.

[43] C. Celia *et al.*, "Anticancer activity of liposomal bergamot essential oil (BEO) on human neuroblastoma cells," *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 112, pp. 548–553, Dec. 2013.

[44] R. Russo *et al.*, "Implication of limonene and linalyl acetate in cytotoxicity induced by bergamot essential oil in human neuroblastoma cells," *Fitoterapia*, vol. 89, pp. 48–57, Sep. 2013.

[45] R. Russo *et al.*, "Role of D-Limonene in Autophagy Induced by Bergamot Essential Oil in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 11, p. e113682, Nov. 2014.
[46] L. Berliocchi *et al.*, "Toxic profile of bergamot essential oil on survival and

proliferation of SH-SY5Y neuroblastoma cells," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 49, no. 11, pp. 2780–2792, Nov. 2011.

[47] L. Sánchez-González, M. Cháfer, A. Chiralt, and C. González-Martínez, "Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on Penicillium italicum," *Carbohydr. Polym.*, vol. 82, no. 2, pp. 277–283, Sep. 2010.
[48] L. Sánchez-González, C. Pastor, M. Vargas, A. Chiralt, C. González-Martínez, and M. Cháfer, "Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 60, no. 1, pp. 57–63, Apr. 2011.

[49] H. Aloui *et al.*, "Efficacy of the combined application of chitosan and Locust Bean Gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by Aspergillus flavus in dates," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 170, pp. 21–28, Jan. 2014.
[50]

"http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/xad4?lang=en&region=GR."

[51] Skoog, West, Holler, *Chimie Analytique*, Traduction et révision scientifique de la 7ème édition américaine. De boeck et Larcier, 1997.

[52] David G Watson ; Μηχαήλ Α. Κουππάρης, *Φαρμακευτική ανάλυση*, Δεύτερη έκδοση. Επιστημονικές εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε.

[53] "http://www.kromaton.com/fr/la-cpc/technologies."

[54] M. Hamzaoui, J.-H. Renault, R. Reynaud, and J. Hubert, "Centrifugal partition extraction in the pH-zone-refining displacement mode: An efficient strategy for the screening and isolation of biologically active phenolic compounds," *J. Chromatogr. B*, vol.

937, pp. 7–12, Oct. 2013.

[55] L. Marchal, J. Legrand, and A. Foucault, "Centrifugal partition chromatography: A survey of its history, and our recent advances in the field," *Chem. Rec.*, vol. 3, no. 3, pp. 133–143, Jul. 2003.

[56] E. A. Yu *et al.*, "Flavonoid profile and biological activity of Korean citrus varieties (II): Pyunkyul (Citrus tangerina Hort. ex Tanaka) and overall contribution of its flavonoids to antioxidant effect." *J. Funct. Foods*, vol. 6, pp. 637–642, Jan. 2014.

[57] C. Zhang, Y. Lu, L. Tao, X. Tao, X. Su, and D. Wei, "Tyrosinase inhibitory effects and inhibition mechanisms of nobiletin and hesperidin from citrus peel crude extracts," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 22, no. 1, pp. 83–90, Jan. 2007.

[58] "Nobiletin as a Tyrosinase Inhibitor from the Peel of Citrus Fruit."

[59] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibnsouda, "Methods for in vitro evaluating

antimicrobial activity: A review," *J. Pharm. Anal.*, vol. 6, no. 2, pp. 71–79, Apr. 2016. [60] A. C. E. Graziano *et al.*, "Protective effects of an extract from Citrus bergamia against inflammatory injury in interferon-gamma and histamine exposed human keratinocytes," *Life Sci.*, vol. 90, no. 25–26, pp. 968–974, Jun. 2012.

[61] R. Salerno, F. Casale, C. Calandruccio, and A. Procopio, "Characterization of flavonoids in Citrus bergamia (Bergamot) polyphenolic fraction by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC/HRMS)," 2015.

[62] E. de Rijke, P. Out, W. M. A. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, and U. A. T. Brinkman, "Analytical separation and detection methods for flavonoids," *J. Chromatogr. A*, vol. 1112, no. 1–2, pp. 31–63, Apr. 2006.

[63] K. Robards, X. Li, M. Antolovich, and S. Boyd, "Characterisation of citrus by chromatographic analysis of flavonoids," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 75, no. 1, pp. 87–101, Sep. 1997.

[64] S. Kawaii, Y. Tomono, E. Katase, K. Ogawa, and M. Yano, "Quantitation of Flavonoid Constituents in Citrus Fruits," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 47, no. 9, pp. 3565–3571, Sep. 1999.

[65] Active Constituents from Drynaria fortunei Rhizomes on the Attenuation of Aβ25-35-induced Axonal Atrophy, "Supporting Information : Active Constituents from Drynaria fortunei Rhizomes on the Attenuation of Aβ25-35-induced Axonal Atrophy."

[66] "Active Constituents from Drynaria fortunei Rhizomes on the Attenuation of  $A\beta 25-35$ -Induced Axonal Atrophy."

[67] "C-2 Steremistry of Naringin and Its Relation to Taste and Biosynthesis in Maturinring grapefruit.".

[68] "Racemization at C-2 of Naringin in Sour Oranges with Increasing Maturity Determined by Chiral High-Performance Liquid Chromatography.".

[69] "Racemization at C-2 of naringin in pummelo (Citrus grandis) with increasing maturity determined by chiral high-performance liquid chromatography.".

[70] "HPLC separation of naringin, neohesperidin and their C-2 epimers in commercial samples and herbal medicines.".

[71] "Chiral HPLC separation and CD spectra of the C-2 diastereomers of naringin in grapefruit during maturation.".

[72] "THIRTY-SEVEN FLAVONOIDS FROM FLOWERS OF ARNICA LONGIFOLIA.".

[73] M. N. Vieira, P. Winterhalter, and G. Jerz, "Flavonoids from the flowers of Impatiens glandulifera Royle isolated by high performance countercurrent chromatography," *Phytochem. Anal.*, vol. 27, no. 2, pp. 116–125, Mar. 2016.

[74] BENAICHE Ghania, "Extraction, separation and biological activities of some secondary metabolites from the plant Cytisus purgans," University Mohamed Boudiaf-M'sila Faculty of Sciences Department of Chemistry, Algeria, 2016. [75] M. A. Zaki *et al.*, "Bioactive Formylated Flavonoids from Eugenia rigida: Isolation, Synthesis, and X-ray Crystallography," *J. Nat. Prod.*, vol. 79, no. 9, pp. 2341–2349, Sep. 2016.

[76] "Radical scavenging and cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of bergaptol and geranylcoumarin from grapefruit.".

[77] K. Myung, J. A. Manthey, and J. A. Narciso, "Biotransformations of 6',7'dihydroxybergamottin and 6',7'-epoxybergamottin by the citrus-pathogenic fungi diminish cytochrome P450 3A4 inhibitory activity," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 22, no. 6, pp. 2279–2282, Mar. 2012.

[78] D. Hamdan *et al.*, "Chemical composition and biological activity of Citrus jambhiri Lush," *Food Chem.*, vol. 127, no. 2, pp. 394–403, Jul. 2011.

[79] A. P. Breksa, K. Dragull, and R. Y. Wong, "Isolation and Identification of the First C-17 Limonin Epimer, Epilimonin," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 14, pp. 5595–5598, Jul. 2008.

[80] L. C. Tavares *et al.*, "Limonin Derivatives: Synthesis Using Methodology in Solution and Heterogeneous Medium and Evaluation of the Antimicrobial Activity," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 27, no. 1, pp. 161–178, Jan. 2016.

[81] K. Yoshikawa, S. Sugawara, and S. Arihara, "Phenylpropanoids and other secondary metabolites from fresh fruits of Picrasma quassioides," *Phytochemistry*, vol. 40, no. 1, pp. 253–256, Sep. 1995.

[82] Y. Todoroki, N. Hirai, and H. Ohigashi, "Analysis of Isomerization Process of 8'-Hydroxyabscisic Acid and its 3'-Fluorinated Analog in Aqueous Solutions," *Tetrahedron*, vol. 56, no. 12, pp. 1649–1653, Mar. 2000.

[83] X. Ma, W. Wang, E. Li, F. Gao, L. Guo, and Y. Pei, "A new sesquiterpene from the entomogenous fungus Phomopsis amygdali," *Nat. Prod. Res.*, vol. 30, no. 3, pp. 276–280, 2016.