



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

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ
ΦΥΛΛΩΜΑΤΟΣ ΑΠΟ 54 ΤΑΧΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *PINUS L.*
-
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΕΙΔΗ
PINUS HELDREICHII CHRIST., *PINUS PINEA L.* ΚΑΙ
PINUS NIGRA SUBSP. *NIGRA* ARN.**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΚΟΥΤΣΑΒΙΤΗ

**ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΛΙΟΣ 2016**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Όλγα Τζάκου (Επιβλέπουσα)

Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Βασίλειος Ρούσσης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μαρία-Μαρίνα Κουλάδη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Όλγα Τζάκου

Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Βασίλειος Ρούσσης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευγένιος Κοκκάλου

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Μαρία-Μαρίνα Κουλάδη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Πέτρος Ταραντίλης

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευσταθία Ιωάννου

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μαρία Ζερβού

Ερευνήτρια Β', Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας & Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	v
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	ix
ABSTRACT	xi
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	xiii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xv
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1.1. Το Γένος <i>Pinus</i> L.	1
1.1.1. <i>Pinus heldreichii</i> Christ.....	2
1.1.2. <i>Pinus nigra</i> Arn.....	6
1.1.3. <i>Pinus pinea</i> L.	8
1.1.4. Είδη του γένους <i>Pinus</i> L.-Γενικά χαρακτηριστικά	11
1.2. Κατηγορίες χημικών συστατικών του γένους <i>Pinus</i>	33
1.2.1. Φαινολικά παράγωγα	33
1.2.2. Λιγνάνια	35
1.2.3. Τερπένια	37
1.2.4. Αλκαλοειδή	40
1.3. Βιολογικές δράσεις	41
1.3.1. Αντιοξειδωτική δράση	41
1.3.2. Αντιμικροβιακή δράση.....	44
1.3.3. Αντική δράση	45
1.3.4. Αντιφλεγμονώδης-αναλγητική δράση	45
1.3.5. Αντιθρομβωτική δράση.....	46
1.3.6. Κυτταροτοξική δράση.....	46
1.3.7. Ακαρεοκτόνος δράση	48
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	49
2.1. Οργανολογία	49
2.2. Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια	50
2.3. Συλλογή του φυτικού υλικού.....	51
2.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών... 56	
2.4.1. Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το είδος <i>Pinus heldreichii</i>	56
2.4.2. Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το είδος <i>Pinus nigra</i> subsp.	

<i>nigra</i>	101
2.4.3. Απομόνωση μεταβολιτών από το είδος <i>Pinus pinea</i>	122
2.4.4. Συνοπτική παρουσίαση απομονωμένων μεταβολιτών.....	127
2.5. Παραλαβή αιθερίων ελαίων.....	128
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	129
3.1. Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών από το είδος <i>Pinus heldreichii</i>	129
3.1.1. Μεταβολίτης 1: 12α-Υδροξυ-7,13-αβιεταδιεν-18-οϊκό οξύ (12α-υδροξυ-αβιετικό οξύ).....	129
3.1.2. Μεταβολίτης 2: 12β-Υδροξυ-7,13-αβιεταδιεν-18-οϊκό οξύ (12β-υδροξυ-αβιετικό οξύ).....	135
3.1.3. Μεταβολίτης 3: 15-Μεθόξυ-7,13-αβιεταδιεν-18-οϊκό οξύ (15-μεθόξυ-αβιετικό οξύ).....	140
3.1.4. Μεταβολίτης 4: 7(8),13(14),15(16)-Αβιετατριenoϊκό οξύ.....	145
3.1.5. Μεταβολίτης 5: 7α-Υδροξυ-13β-μεθοξυ-8(14)-αβιετενοϊκό οξύ	150
3.1.6. Μεταβολίτης 6: 7-Οξο-αβιετα-8(14),12-διεν-18-οϊκό οξύ	158
3.1.7. Μεταβολίτης 7: 9,13α-Επιδιοξυ-8(14)-αβιετεν-18-οϊκό οξύ.....	163
3.1.8. Μεταβολίτης 8: 8,12α-Επιδιοξυ-13(14)-αβιετεν-18-οϊκό οξύ.....	170
3.1.9. Μεταβολίτης 9: 8,11,13-Αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (δεϋδροαβιετικό οξύ)..	175
3.1.10. Μεταβολίτης 10: Μεθυλεστέρας του 8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκού οξέος (μεθυλεστέρας του δεϋδροαβιετικού οξέος).....	180
3.1.11. Μεταβολίτης 11: 8,11,13-Αβιετατριεν-18-άλη (δεϋδροαβιετάλη)	184
3.1.12. Μεταβολίτης 12: 8,11,13-Αβιετατριεν-18-όλη (δεϋδροαβιετόλη)	188
3.1.13. Μεταβολίτης 13: 15-Υδροξυ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (15-υδροξυ-δεϋδροαβιετικό οξύ).....	191
3.1.14. Μεταβολίτης 14: 15-Μεθοξυ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (15-μεθοξυ-δεϋδροαβιετικό οξύ).....	196
3.1.15. Μεταβολίτης 15: 12-Υδροξυ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (12-υδροξυ-δεϋδροαβιετικό οξύ).....	201
3.1.16. Μεταβολίτης 16: 7α-Υδροξυ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (7α-υδροξυ-δεϋδροαβιετικό οξύ).....	205
3.1.17. Μεταβολίτης 17: 7-Οξο-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (7-οξο-δεϋδροαβιετικό οξύ).....	214
3.1.18. Μεταβολίτης 18: 7-Οξο-15-υδροξυ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (7-οξο-15-υδροξυ-δεϋδροαβιετικό οξύ)	219

3.1.19. Μεταβολίτης 19: 7-Οξο-8,11,13-αβιετατριένιο (αβιετατριενόνη).....	224
3.1.20. Μεταβολίτης 20: 7-Οξο-18-νορ-8,11,13-αβιετατριένιο (18-νορ-αβιετατριενόνη).....	227
3.1.21. Μεταβολίτης 21: 7,15-Πιμαραδιεν-18-όλη (ισοπιμαρόλη)	230
3.1.22. Μεταβολίτης 22: 13-επι-Πιμαρα-7,15-διεν-18-οϊκό οξύ (ισοπιμαρικό οξύ)	234
3.1.23. Μεταβολίτης 23: Πιμαρικό οξύ	239
3.1.24. Μεταβολίτης 24: 7α-Υδροξυ-13-επι-πιμαρα-8(14),15-διεν-18-οϊκό οξύ .	244
3.1.25. Μεταβολίτης 25: 7α-Υδροξυ-πιμαρα-8(14),15-διεν-18-οϊκό οξύ	251
3.1.26. Μεταβολίτης 26: 7-Οξο-13-επι-πιμαρα-8(9),15-διεν-18-οϊκό οξύ	257
3.1.27. Μεταβολίτης 27: 7-Οξο-14α-υδροξυ-13-επι-πιμαρα-8(9),15-διενοϊκό οξύ	259
3.1.28. Μεταβολίτης 28: 19-νορ-Ισοπιμαρα-7,15-διεν-3-όνη	266
3.1.29. Μεταβολίτης 29: Αγαθοδιόλη.....	273
3.1.30. Μεταβολίτης 30: Ισοκουπρεσσικό οξύ	277
3.1.31. Μεταβολίτης 31: <i>trans</i> -Κομμουνικό οξύ	282
3.1.32. Μεταβολίτης 32: 15-νορ-Λαβδα-8(17),12Ε-διεν-14-καρβοξαλδεϋδ-19-οϊκό οξύ	284
3.1.33. Μεταβολίτης 33: 4-επι-Ισοκεμβρόλη.....	288
3.1.34. Μεταβολίτης 34: Ισοκεμβρόλη (Θουνμπεργκόλη)	293
3.1.35. Μεταβολίτης 35: 13-Οξο-8(14)-ποδοκαρπεν-18-οϊκό οξύ	298
3.1.36. Μεταβολίτης 36: 13-Υδροξυ-8,11,13-ποδοκαρπατριεν-18-οϊκό οξύ	302
3.1.37. Μεταβολίτης 37: 4-Στιγμαστεν-3-όνη	306
3.1.38. Μεταβολίτης 38: Οξείδιο του καρνοφυλλενίου.....	308
3.2. Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών από το είδος <i>Pinus nigra</i> subsp. <i>nigra</i>	310
3.2.1. Δεϋδροαβιετικό οξύ (βλ. 3.1.9.).....	310
3.2.2. Μεταβολίτης 39: Μεθυλεστέρας του 15-υδροξυ-δεϋδροαβιετικού οξέος..	310
3.2.3. Μεταβολίτης 40: 8,12α-Επιδιοξυ-αβιετ-13-εν-18-οϊκό οξύ	316
3.2.4. Μεταβολίτης 41: Μεθυλεστέρας του 15-υδροξυ-8,12α-επιδιοξυ-αβιετ-13-εν-18-οϊκού οξέος	323
3.2.5. Μεταβολίτης 42: 15-Υδροϋπεροξυ-8,12α-επιδιοξυ-αβιετ-13-εν-18-οϊκό οξύ	329
3.2.6. Μεταβολίτης 43: 18-Μεθυλεστέρας του 8(17)-λαβδεν-15,18-διοϊκού οξέος	

.....	336
3.2.7. Μεταβολίτης 44: 15-Οξο-8(17)-λαβδεν-18-οϊκό οξύ	342
3.2.8. Μεταβολίτης 45: 15-Υδροξυλαβδ-8(17)-εν-18-οϊκό οξύ	347
3.2.9. Μεταβολίτης 46: 15-Υδροξυλαβδ-8(17)-εν-18-οϊκός μεθυλεστέρας	352
3.2.10. Μεταβολίτης 47: β-Σιτοστερόλη.....	357
3.2.11. Μεταβολίτης 48: (+)-Κατεχίνη	359
3.2.12. Μεταβολίτης 49: 5,6,4'-Τριυδροξυ-3,7,8-τριμεθοξυ-φλαβόνη (6,8- διυδροξυ-καιμπερόλη 3,7,8-τριμεθυλαιθέρας)	362
3.3. Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών από το είδος <i>Pinus pinea</i>	367
3.3.1. Μεταβολίτης 50: (+)-Ταξιφολίνη (διυδροκερκετίνη)	367
3.3.2. Μίγμα 51: Μίγμα λιπαρών εστέρων του φερουλικού οξέος.....	371
3.4. Συγκριτική μελέτη των αιθερίων ελαίων 54 <i>taxa</i> του γένους <i>Pinus</i>	377
3.4.1. Ανάλυση των αιθερίων ελαίων	377
3.4.2. Ανάλυση εναντιομερών των αιθερίων ελαίων	411
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	417
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	439

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε η χημική σύσταση των οργανικών εκχυλισμάτων διαφορετικών φυτικών τμημάτων των ειδών *Pinus heldreichii* Christ., *Pinus nigra* subsp. *nigra* Arn. και *Pinus pinea* L. Επίσης, μελετήθηκε η χημική σύσταση των αιθερίων ελαίων από το φύλλωμα 46 ειδών του γένους *Pinus* (54 taxa) που συλλέχθηκαν είτε από φυσικές θέσεις είτε από βοτανικούς κήπους.

Οι κώνοι του είδους *P. heldreichii* υποβλήθηκαν σε εξαντλητική εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες και το εκχύλισμα που προέκυψε υποβλήθηκε σε σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών μέσω των οποίων απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν συνολικά 38 μεταβολίτες, συγκεκριμένα είκοσι διτερπένια αβιετικού τύπου, οκτώ με σκελετό πιμαρανίου, τέσσερα λαβδανικού τύπου, δύο μακροκυκλικά διτερπένια τύπου κεβρανίου, δύο διτερπένια παράγωγα ποδοκαρπενίου, ένα οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο και ένα στεροειδές. Μεταξύ αυτών, τρεις διτερπενικοί μεταβολίτες (δύο πιμαρικού και ένας αβιετικού τύπου) ήταν νέα φυσικά προϊόντα, ένας μεταβολίτης σκελετού αβιετανίου αναφέρεται πρώτη φορά σε Γυμνόσπερμα, τέσσερις μεταβολίτες αναφέρονται πρώτη φορά στο γένος *Pinus*, ενώ εικοσιεπτά απομονώνονται πρώτη φορά από το είδος *P. heldreichii*. Επιπλέον, για είκοσι γνωστούς μεταβολίτες πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά η πλήρης απόδοση των φασματοσκοπικών τους δεδομένων.

Τα βελονοειδή φύλλα του είδους *P. nigra* subsp. *nigra* εκχυλίστηκαν εξαντλητικά με οργανικούς διαλύτες και το εκχύλισμα που παραλήφθηκε υποβλήθηκε σε επιμερισμό μέσω υγρής-υγρής εκχύλισης και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών. Συνολικά απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 12 μεταβολίτες και συγκεκριμένα τέσσερα διτερπένια λαβδανικού τύπου, πέντε διτερπένια με σκελετό αβιετανίου, ένα στεροειδές και δύο φαινολικά παράγωγα. Μεταξύ αυτών, δύο μεταβολίτες αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα, πέντε αναφέρονται πρώτη φορά από το συγκεκριμένο είδος, ενώ για έξι γίνεται η πλήρης απόδοση των φασματοσκοπικών τους δεδομένων για πρώτη φορά.

Επίσης, σε εξαντλητική εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες υποβλήθηκε ο φλοιός του είδους *P. pinea* και το εκχύλισμα που παραλήφθηκε αναλύθηκε χρωματογραφικά οδηγώντας στην απομόνωση ενός φλαβονοειδούς και μίγματος λιπαρών εστέρων του

φερουλικού οξέος.

Νωπά βελονοειδή φύλλα από 37 *taxa* του υπογένους *Pinus* και 17 *taxa* του υπογένους *Strobis* υποβλήθηκαν σε υδραπόσταξη και τα αιθέρια έλαια που παραλήφθηκαν, αναλύθηκαν μέσω GC-FID και GC-MS. Μεταξύ των δειγμάτων παρατηρήθηκαν σημαντικές ποσοτικές, αλλά και ποιοτικές διαφορές. Μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και διτερπένια κυριαρχούσαν στις αναλύσεις, με τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες α - και β -πινένιο και το σεσκιτερπένιο γερμακρένιο D να χαρακτηρίζουν την πλειοψηφία των δειγμάτων. Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκε για πρώτη φορά το αιθέριο έλαιο των βελόνων εικοσιενός *taxa*, συμπεριλαμβανομένων δεκαπέντε του υπογένους *Pinus* και έξι του υπογένους *Strobis*.

ABSTRACT

In the framework of this study, the chemical composition of the organic extracts of three *Pinus* species, as well as the needle essential oils of 54 *Pinus* taxa were investigated. Specifically, cones of *Pinus heldreichii*, fresh needles of *Pinus nigra* subsp. *nigra* and bark of *Pinus pinea* were exhaustively extracted and the crude extracts were subjected to a series of chromatographic separations.

The cones of *P. heldreichii* yielded 38 metabolites in total. Specifically, twenty abietane diterpenes, eight diterpenes featuring the pimarane skeleton, four labdane diterpenes, two macrocyclic cembrane diterpenes, two podocarpene derivatives, one oxygenated sesquiterpene and one steroid. Among these, three metabolites were new natural products (one abietane and two pimarane diterpenes), one abietane diterpene was isolated for the first time from Gymnospermae, four metabolites were isolated for the first time from the genus *Pinus* and twenty-seven diterpenes were reported for the first time from *P. heldreichii*. In addition, the spectroscopic data of 20 metabolites were fully assigned for the first time.

In total, 12 metabolites were isolated from the fresh needles of *P. nigra* subsp. *nigra*, five of which were identified as abietane diterpenes, four diterpenes possessed a labdane skeleton, one was a steroid and two were phenolic compounds. Among these metabolites, one abietane diterpene and one phenolic compound were new natural products, five metabolites were reported for the first time from this species, while full assignment of the spectroscopic data for six diterpenes was reported.

Furthermore, the chromatographic separation of *P. pinea* bark extract resulted in the isolation of a flavonoid derivative and a mixture of ferulic acid esters.

The fresh needles of 46 pine species, including 37 and 17 taxa of the subgenera *Pinus* and *Strobus*, respectively, were subjected to hydrodistillation and the essential oils obtained were analyzed by means of GC–FID and GC–MS. Among the analyzed taxa, significant quantitative and qualitative differences were observed. Monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes dominated the pine foliage oils, with most of the oils characterized by the presence of the monoterpene hydrocarbons α - and β -pinene and the sesquiterpene hydrocarbon germacrene D. This is the first report on the chemical composition of the essential oils of 21 pine taxa, including 15 taxa of the subgenus *Pinus* and six taxa of the subgenus *Strobus*.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια κ Όλγα Τζάκου και τον Καθηγητή κ Βασίλειο Ρούσση για την ανάθεση του θέματος, την επίβλεψη και τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή: Καθ. κ Όλγα Τζάκου και Καθ. κ Βασίλειο Ρούσση, υπό την άμεση επίβλεψη των οποίων εκπονήθηκε η διατριβή, και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ Μαρία-Μαρίνα Κουλάδη για τη στήριξη και τις χρήσιμες παρατηρήσεις.

Ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, την Καθηγήτρια κ Όλγα Τζάκου, τον Καθηγητή κ Βασίλειο Ρούσση, τον Καθηγητή κ Ευγένιο Κοκκάλου, την Αν. Καθηγήτρια κ Μαρία-Μαρίνα Κουλάδη, τον Αν. Καθηγητή κ Πέτρο Ταραντίλη, την Επικ. Καθηγήτρια κ Ευσταθία Ιωάννου και την Ερευνήτρια Β' κ Μαρία Ζερβού, που με προθυμία δέχτηκαν να μελετήσουν και να κρίνουν την παρούσα εργασία.

Θερμά ευχαριστώ τον εκλιπόντα Αναπληρωτή Καθηγητή Κωνσταντίνο Βάγια για την πολύτιμη βοήθειά του, την καθοδήγηση, τις εύστοχες παρατηρήσεις, τόσο κατά την πρώτη γνωριμία μου με το χώρο του εργαστηρίου σε προπτυχιακό επίπεδο, όσο και κατά την πορεία των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια κ Ευσταθία Ιωάννου για την πολύτιμη βοήθεια, την καθοδήγηση και υποστήριξη κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο καθώς και για τη συλλογή του φυτικού υλικού.

Ευχαριστώ την Ερευνήτρια Β' Δρ. Μαρία Ζερβού (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών) για τη λήψη ορισμένων φασμάτων NMR.

Ευχαριστώ επίσης τον Ερευνητή Α' Δρ. Πάνο Πετράκη (Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας) για την πολύτιμη συμβολή του στη συλλογή φυτικού υλικού (*P. heldreichii*).

Θα ήθελα τέλος να ευχαριστήσω όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου για τη φιλία και το ευχάριστο κλίμα.

Ακόμη, ευχαριστώ τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας για την οικονομική ενίσχυση μέσω των ερευνητικών προγραμμάτων 09ΣΥΝ-23-879 και ΑΡΙΣΤΕΙΑ-2587-BIOMARACT.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου για όλα όσα μου έχει προσφέρει.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

1D NMR	πείραμα NMR μίας διάστασης
2D NMR	πείραμα NMR δύο διαστάσεων
¹H NMR	1D NMR πείραμα πυρήνων υδρογόνου (πρωτονίου)
¹³C NMR	1D NMR πείραμα πυρήνων άνθρακα, με ευρεία ετεροπυρηνική αποσύζευξη (proton-noise decoupled)
[α]_D	ειδική στροφική ικανότητα
br	ευρεία (NMR)
CDCl₃	δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
CD₃OD	δευτεριωμένη μεθανόλη
C₆D₆	δευτεριωμένο βενζόλιο
(CD₃)₂CO	δευτεριωμένη ακετόνη
CH₂Cl₂	διχλωρομεθάνιο
CHCl₃	χλωροφόρμιο
COSY	2D NMR πείραμα ομοπυρηνικού συσχετισμού ¹ H- ¹ H για ² J και ³ J (Correlated Spectroscopy)
δ	χημική μετατόπιση της απορρόφησης ενός πυρήνα σε σχέση με το τετραμεθυλοσιλάνιο (σε ppm) (NMR)
d	διπλή (NMR)
DMSO	διμεθυλοσουλφοξείδιο
EIMS	φασματομετρία μάζας με μέθοδο ιονισμού τον βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (Electron Impactmass Spectrometry)
EtOAc	οξικός αιθυλεστέρας
EtOH	αιθανόλη
cHex	κυκλοεξάνιο
n-Hex	κανονικό εξάνιο
HMBC	2D NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού ¹ H- ¹³ C για ² J και ³ J (Heteronuclearmultiple-Bond Correlation)
HPLC	υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography)
HRMS	φασματομετρία μάζας υψηλής ευκρίνειας (High Resolutionmass Spectrometry)
HSQC	2D NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού ¹ H- ¹³ C για ¹ J (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
GC	αέριος χρωματογραφία (Gas Chromatography)
GC-MS	αέριος χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
IR	φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας
J	σταθερά σύζευξης (σε Hz) (NMR)
m	πολλαπλή (NMR)
Me₂CO	ακετόνη
MeOH	μεθανόλη
MS	φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry)
m/z	λόγος μάζας προς φορτίο
NMR	φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclearmagnetic Resonance)
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	2D NMR πείραμα ομοπυρηνικού συσχετισμού ¹ H- ¹ H στο χώρο (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

nd	δεν καθορίστηκε
PCIMS	φασματομετρία μάζας με μέθοδο ιονισμού τον θετικό χημικό ιονισμό (C hemical I onization m ass S pectrometry in positive mode)
RI	δείκτης διάθλασης (R efractive I ndex)
q	τετραπλή (NMR)
s	απλή (NMR)
septet	Επταπλή (NMR)
t	τριπλή (NMR)
TLC	χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (T hin L ayer C hromatography)
t_R	χρόνος ανάσχεσης (retention time)
UV-Vis	φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατής ακτινοβολίας

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Το Γένος *Pinus* L.

Το όνομα του γένους *Pinus* προέρχεται από το ελληνικό πίτυς, όνομα που χρησιμοποιεί ο Θεόφραστος για το άγριο πεύκο. Οι Benigni et al. 1971 αναφέρουν ότι πιθανά προέρχεται από το κέλτικο pen = κεφάλι, πιθανά λόγω της εντύπωσης που δημιουργείται από την κόμη των πεύκων.

Το γένος *Pinus* περιλαμβάνει περίπου 90 είδη, τα περισσότερα των οποίων συναντώνται στο Β. ημισφαίριο (Hegnauer, 1962). Πρόκειται για δένδρα (σπανιότατα θάμνους) δασικά, ευμεγέθη, με εμπορική αξία λόγω της ξυλείας που παρέχουν στη ναυπηγική και στη δόμηση κτιρίων. Χρησιμοποιούνται επίσης στην παραγωγή χάρτου και κυτταρίνης, αλλά και ως καύσιμη ύλη. Ο φλοιός πολλών ειδών χρησιμοποιείται στη βυρσοδεψία, ενώ πολλά είδη προσφέρουν επίσης καλής ποιότητας ρητίνη. Τα φύλλα αυτών των ειδών έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή φυτικού μαλλιού ενώ τα σπέρματα ορισμένων ειδών είναι βρώσιμα.

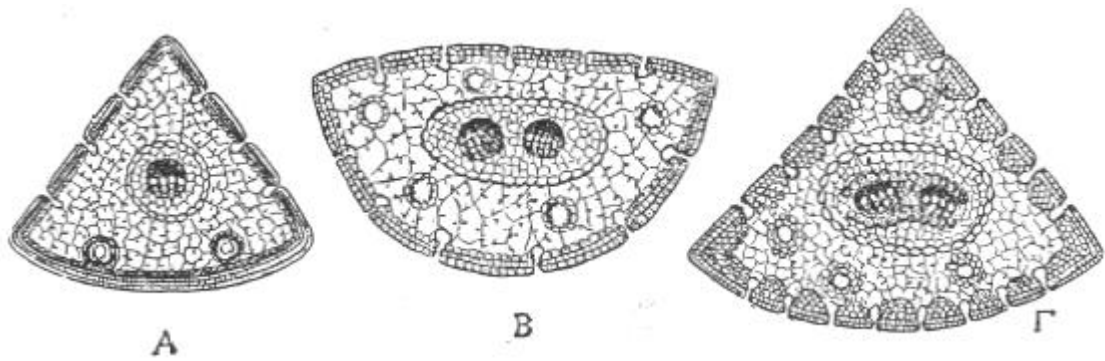
Όλα τα είδη του γένους πολλαπλασιάζονται εγγενώς. Είναι δένδρα μόνοικα, αειθαλή και φέρουν βελονοειδή φύλλα, που φύονται ανά 2, 3 ή 5 και στη βάση τους περιβάλλονται από μεμβρανώδη θήκη. Ο καρπός τους ονομάζεται **κώνος** ή **στρόβιλος** (κν. **κουκουνάρι**, και στην Κύπρο **μάμπουρος**) και έχει ωοειδές ή κωνικό και σχεδόν κυλινδρικό σχήμα. Τα σπέρματά τους είναι ελαιώδη και συνήθως φέρουν μεμβρανώδες πτερύγιο (Γεννάδιος 1914).

Σύμφωνα με παλαιότερη βοτανική ταξινόμηση, τα είδη της Πεύκης κατατάσσονται σε δυο υπογένη (Καββάδας, 1956):

I. Υπογένος **Haploxyton** Koehne (soft pines), τα είδη του οποίου φέρουν απλή αγωγό δεσμίδα, δηλαδή μία ηθμαγγειώδη δεσμίδα στο κέντρο της βελόνας (Εικ. 1, Α).

II. Υπογένος **Diploxyton** Koehne, (hard pines) με διπλή ηθμαγγειώδη και συνεπώς διπλή ξυλώδη δεσμίδα στο κέντρο της βελόνας (Εικ. 1, Β&Γ).

Τα δύο αυτά υπογένη δεν διαφοροποιούνται μόνο μορφολογικά. Διαφορές παρουσιάζουν και στο χημικό τους προφίλ και μάλιστα σύμφωνα με παλαιότερη μελέτη το υπογένος **Haploxyton** θεωρείται λιγότερο εξελιγμένο (Norin 1972).

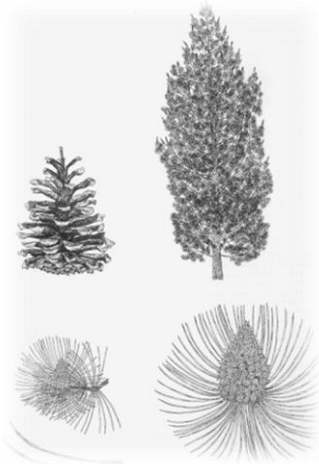


Εικόνα 1. Απεικόνιση εγκάρσιας τομής φύλλων

Ωστόσο, σύμφωνα με νεότερη μελέτη σχετικά με τη βοτανική ταξινόμηση των ειδών του γένους, τα δύο υπογένη στα οποία χωρίζεται περαιτέρω το γένος *Pinus* είναι το υπογένος *Strobus* (soft pines) και το υπογένος *Pinus* (hard pines) (Gernandt 2005). Παρακάτω παρατίθενται τα βοτανικά χαρακτηριστικά των ειδών, από τους οποίους απομονώθηκαν οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παρουσιάζονται σε αυτήν τη μελέτη, ενώ ακολούθως γίνεται αναφορά στα γενικά χαρακτηριστικά των ειδών, που μελετήθηκαν, ως προς το αιθέριο έλαιο (Farjon 1984), σύμφωνα με τη βοτανική ταξινόμηση αυτών (Gernandt 2005):

1.1.1. *Pinus heldreichii* Christ.

Βοτανικά χαρακτηριστικά: Δένδρο ύψους έως 20 m, με σχήμα κόμης ωοειδές-κωνικό, και μέγιστη διάμετρο κορμού τα 2 m. Φλοιός γκριζός, με σταδιακά αυξανόμενο πάχος, που στα γηραιότερα άτομα «σπάει» δημιουργώντας ρομβοειδή «μπαλώματα». Οφθαλμοί, μη ρητινώδεις, ευρέως ωοειδείς, οξυτενείς. Λεπτά λέπια βάσης, με ελαφρώς κόκκινο κέντρο και συχνά βλεφαριδοειδή κράσπεδα. Νεαροί κλάδοι, αρχικά ανοιχτόχρωμοι καφέ, με λίγα γκρι-μπλε άνθη και αργότερα ελαφρώς γκρι ή ανοιχτόχρωμοι κιτρινοκαφέ, λείοι. Φύλλα σε ζεύγη, σκουρο πράσινο, (60-)65-80(-85) x (1,3-)1,4-1,7(-1,9)mm. Ρητινοφόροι αγωγοί ενδιάμεσοι (1-)4-8(-10). 2-6 στρώσεις παχύτοιχων υποδερμικών κυττάρων. Αγγειώδεις δεσμίδες που χωρίζονται από 2-3 σειρές κυττάρων. Κολεοί 12-21mm. Θηλυκοί κώνοι διαρρηκτοί και εύπτωτοι, επιφυσείς ή με βραχύ ποδίσκο, συμμετρικοί ή υποσυμμετρικοί, (5-)7-8 cm, ωοειδείς. Καρπικά



λέπια ± μονόχρωμα, χρώματος ανοιχτού καφέ. Η απόφυση των λεπίων των κόνων με εμφανείς προεκβολές. Ομφαλός με μικρή αιχμηρή άκανθα. Πτερύγιο σπέρματος περίπου 25mm, αρθρωτό. – $2n = 24$



Εικόνα 2. *P. heldreichii* σε φυσική θέση στο νομό Ιωαννίνων



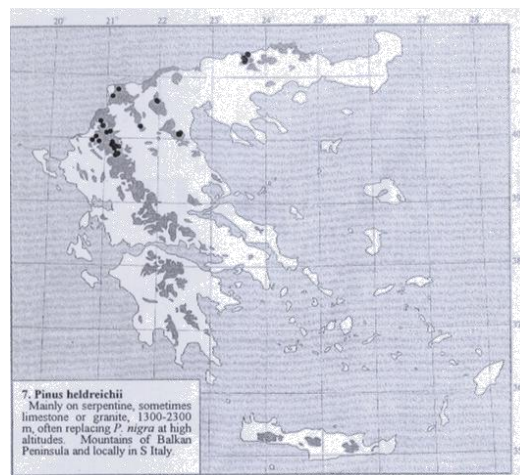
Εικόνα 3. Τελικός οφθαλμός και νεαροί θηλυκοί κώνοι *P. heldreichii*



Εικόνα 4. Θηλυκοί κώνοι *P. heldreichii*

Ενδιαίτημα: Φύεται κυρίως σε οφιολιθικά εδάφη, σε ορισμένες περιπτώσεις ασβεστολιθικά ή πετρώδη, σε υψόμετρο 1300-2300m, ορισμένες φορές συναντάται ακόμα και στα 2600 m (Όλυμπος). Συχνά αντικαθιστά την *P. nigra* σε μεγάλα υψόμετρα.

Εξάπλωση: Σχηματίζει αμιγείς πληθυσμούς στη Β. Ελλάδα. Συναντάται επίσης στη Ν. Ιταλία σε περιορισμένη εξάπλωση, ενώ στα όρη της Βαλκανικής Χερσονήσου η εξάπλωση της εκτείνεται από τη Β. Ελλάδα μέχρι τη ΝΔ Βουλγαρία και προς τα βόρεια μέχρι την περιοχή του Split (Κροατία) (Christensen 1997).



Εικόνα 5. Χάρτης εξάπλωσης στην Ελλάδα του είδους *P. heldreichii* (Flora Hellenica 1997)

1.1.2. *Pinus nigra* Arn.

Βοτανικά χαρακτηριστικά: Δένδρο ύψους έως 30 m, κωνικό σε νεαρή ηλικία και συχνά με επίπεδη κορυφή όταν είναι μεγάλο σε ηλικία, με κορμό μέχρι 1,5 m σε διάμετρο. Φλοιός καστανός ή σκούρος γκριζωπός, αποφλοιωμένος αφήνοντας περιοχές με χρώμα όπως η κανέλλα ή κιτρινωπές. Οφθαλμοί ευρέως ωοειδείς, με απότομη αιχμηρή απόληξη, ρητινώδη και λέπια με υπόλευκο βλεφαριδωτό κράσπεδο. Νεαροί κλάδοι σκούροι καστανοί ή καστανοπορτοκαλί, λείοι. Φύλλα σε ζεύγη, (7-)8-12(-18) cm x (1,1-)1,3-1,7(-1,9) mm, περιελισσόμενα ή ανωμάτως καμπυλωτά, σκούρα πράσινα και ρητινοφόρους αγωγούς ενδιάμεσους ή πολύ σπάνια κάποιους εξωτερικούς, (0-)3-8(-11), με (2)3-4(-5) στρώσεις παχύτοιχων υποδερμικών κυττάρων και αγγειώδεις δεσμίδες διαχωριζόμενες με κάποιες σειρές κυττάρων. Κολοί φύλλων παραμένοντες, (12-)14-20(-28) mm. Θηλυκοί κώνοι διαρρηκτοί και εύπτωτοι, επιφυείς ή βραχύ ποδίσκο, 5-9(-12) cm, ωοειδείς, με καρπικά λέπια τρίχρωμα, με ομφαλό και μία ζώνη ακριβώς κάτω από την απόφυση χρώματος ανοικτού καστανού, απόφυση λεπίων των κώνων χρώματος σαν άχυρο, τα υπόλοιπα μαύρα ή μαύρο-ιώδη. Η απόφυση λεπίων των κώνων σχεδόν λεία και ±στιλπνή. Πτερύγιο σπέρματος περίπου 25 mm, αρθρωτό (Christensen 1997).



Εικόνα 6. Θηλυκός κώνος και κλάδος με βελονοειδή φύλλα *P. nigra*

Ενδιαίτημα: Φύεται σε οροσειρές και πλαγιές ορέων σε μικτά δάση με *Fagus*, *Abies*, *Pinus heldreichii* ή σχηματίζει αμιγείς πληθυσμούς, συνήθως σε ασβεστολιθικά και οφιολιθικά εδάφη, σε υψόμετρο 200-2000 m.

Εξάπλωση: Ν. Ευρώπη, εξαπλώνεται βόρεια μέχρι την Αυστρία και νότια Καρπάθια όρη. Ευρέως καλλιεργούμενο είδος στη Β. Ευρώπη (Gaussen, Heywood & Chater 1993).

Το *P. nigra* είναι ένα ποικιλόμορφο είδος με ευρεία εξάπλωση, το οποίο διαιρείται σε διάφορα taxa, συχνά σε επίπεδο υποείδους. Σύμφωνα με τους Deloy και Christensen είναι δυνατό να αναγνωριστούν δύο εμφανώς διακριτά αλλοπάτρια υποείδη: το subsp. *salzmannii* Franco (=subsp. *occidentalis*) με εύκαμπτα φύλλα και λεπτότοιχα υποδερμικά κύτταρα, που απαντάται στη Β. Δ. Αφρική, Δ. Ισπανία μέχρι Ν. Γαλλία, Κορσική, Ν. Ιταλία και Σικελία και το subsp. *nigra* (=subsp. *orientalis*) με άκαμπτα φύλλα και παχύτοιχα υποδερμικά κύτταρα, που απαντάται στη Κεντρική και Β. Α. Ιταλία, Αυστρία, Βαλκανική Χερσόνησο, Τουρκία και Κριμαία. Παρόλο που τα δύο υποείδη είναι διακριτά, μπορούν να διαιρεθούν σε ένα αριθμό τοπικών ποικιλιών (Christensen 1997).



Εικόνα 7. *P. nigra* σε φυσική θέση στην Αυστρία

1.1.3. *Pinus pinea* L.

Πεύκη η πίκυς. Ο Carnoy 1959 στο λήμμα *reuke* (πεύκη) αναφέρεται στο πεύκο και γράφει ότι το όνομα αυτό σημαίνει άκανθα (*le riquant*) από το λατινικό *pungo*, αναφερόμενο στα βελονοειδή φύλλα των πεύκων. Επίσης στο λήμμα *pitys* (πίκυς) αναφέρεται πάλι στο πεύκο και γράφει ότι το όνομα *pitys* υπαινίσσεται τη ρητίνη, παραγόμενο από τη ρίζα *rei, roi, ri* που σημαίνει είναι παχύς, λιπαρός.

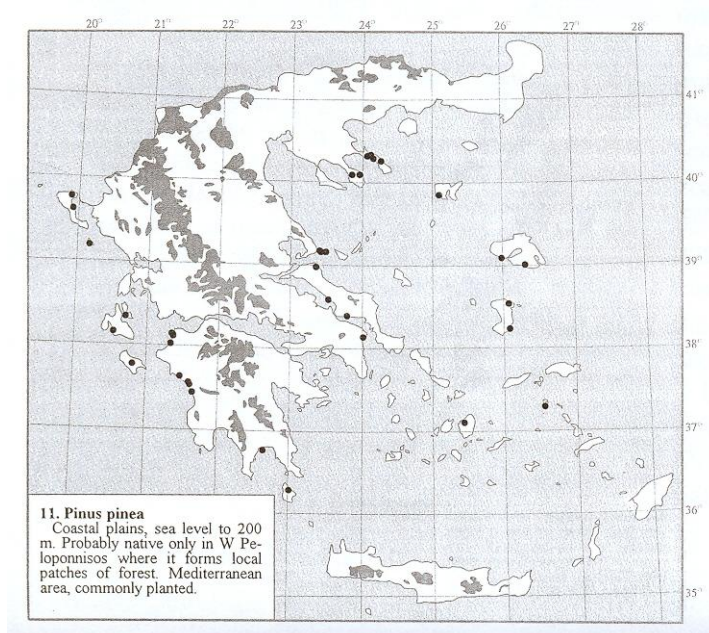
Βοτανικά χαρακτηριστικά: Δένδρο με μεγάλη στρογγυλεμένη, σπάνια επίπεδη, κόμη σαν ομπρέλα. Οφθαλμοί κυλινδρικοί, όχι ρητινώδεις, με λέπια στρεφόμενα προς τα πίσω, με κράσπεδα βλεφαριδωτά. Νεαροί κλάδοι, καφετιοί ή κίτρινο-γκρι, λείοι. Φύλλα σε ζεύγη, ανοικτό πράσινο, (6-)8,5-13(-16) cm x 1,0-1,5 mm, με ρητινοφόρους αγωγούς εξωτερικά, 0-2, 1-3 στρώσεις υποδερμικών κυττάρων. Κολεοί φύλλων 5-6 mm. Οι θηλυκοί κώνοι ωριμάζουν τον τρίτο χρόνο, είναι διαρρηκτοί και εύπτωτοι, ευρέως ωοειδείς ή υποστρόγγυλοι, συμμετρικοί, (5,5-)8-9,5(-14)cm, ανοικτοκάστανοι και ±στιλπνοί, επιφυείς, με καρπικά λέπια στη βάση που δεν αποπίπτουν και συχνά παραμένουν πάνω στο δένδρο. Απόφυση λεπίων των κώνων ασθενώς πυραμιδοειδής, με κεντρικό ομφαλό κατά μήκος τροπιδωτό φέροντα ακτινοειδώς ακμές. Πτερύγιο σπέρματος λιγότερο από 10 mm, αρθρωτό (Christensen 1997).



Εικόνα 8. Ωριμος θηλυκός κώνος *P. pinea*

Ενδιαίτημα: Φύεται σε υψόμετρο από 0 m μέχρι 200 m, σε παράκτιες επίπεδες θέσεις.

Εξάπλωση: Σε όλη τη περιοχή της Μεσογείου και στη Πορτογαλία. Στη Δ. Πελοπόννησο σχηματίζει δάση τα οποία είναι ιθαγενή. Μερικές φορές καλλιεργείται και συχνά διαφεύγει φυόμενο εκτός της φυσικής εξάπλωσης του στην Ελλάδα (Christensen 1997).



Εικόνα 9. Χάρτης εξάπλωσης στην Ελλάδα του είδους *P. pinea* (Flora Hellenica 1997)

Γνωστή με τα ονόματα *κουκουναριά*, *ήμερο πεύκο*, *στροφιλιά*. Πιθανά η Πίτυς η Πίτυς του Πausanias και Πεύκη η κωνοφόρος του Θεοφράστου την οποία κατατάσσει μαζί με την κοινή πεύκη, την οποία καλεί «πίτυν φθειροποιόν ή φθειροφόρον» στα ήμερα δένδρα, «μάλιστα δε τούτων ο φοίνιξ δοκεί διαμένειν ώσπερ ειπείν τελείως από σπέρματος και πεύκη η κωνοφόρος και πίτυς η φθειροποιός. ταυτα μέν ουν εν τοις ημερομένοις» (Καββάδας 1956).

Στην εποχή του Ομήρου «Πεύκαι» φαίνεται ότι ονομάζονταν τα πεδινά είδη και «Πίτυες» τα ορεινά. Από την εποχή του Θεόφραστου εντούτοις, ίσως και νωρίτερα, ονομάζονταν στα περισσότερα μέρη της Ελλάδος καθώς και σε πολλά νησιά, «Πεύκαι» τα ορεινά είδη (η ορεινή και φιλόψυχρος Πεύκη του Θεόφραστου, που αναφέρεται στην Π. την λαρικοειδή) και «Πίτυες» τα πεδινά είδη (Π. η κοινή και Π. η παράλιος) (Γεννάδιος 1914).



Εικόνα 10. P. pinea σε φυσική θέση στο νομό Ηλείας

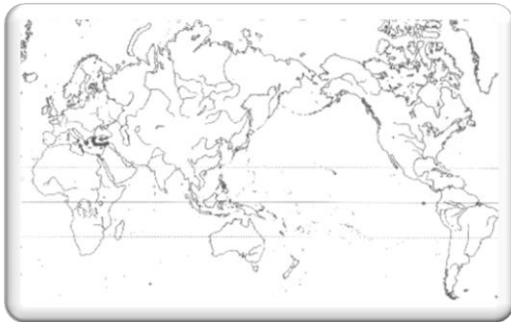
1.1.4. Είδη του γένους *Pinus* L.-Γενικά χαρακτηριστικά

Υπογένος *Pinus* (*Diploxylon*)

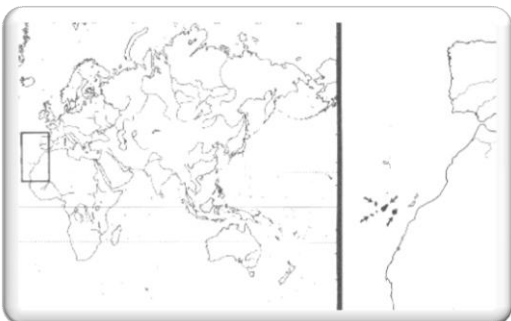
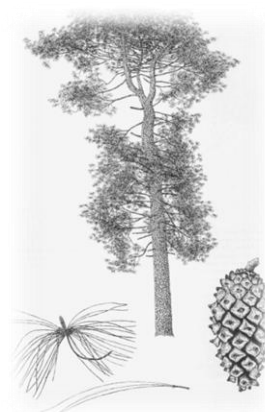
Section Pinus

Subsection Pinaster

Pinus brutia: Φύεται σε υψόμετρο 100-1500 m, συνήθως σε ζεστές, φωτεινές σχετικά ξηρές περιοχές. Συναντάται στην ανατολική Μεσόγειο: Ιράκ, Συρία, Λίβανο και Τουρκία, στην Κύπρο, στην Κρήτη και σε κάποια νησιά της Μεσογείου, καθώς και στην ελληνική ηπειρωτική χώρα. Υπάρχει και στην περιοχή Καλαβρία της Ιταλίας (κατά τη Ρωμαϊκή εποχή: Brutia), αλλά πιθανόν να μην είναι αυτοφύες.



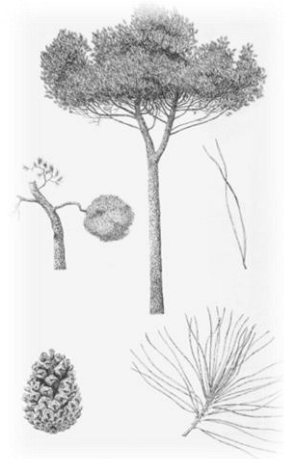
Pinus canariensis: Ευδοκίμει σε ξηρές και εκτεθειμένες πλαγιές, ηφαιστειακής προέλευσης. Είναι υποτροπικό είδος, ευαίσθητο στον παγετό, γεγονός που καθιστά αδύνατη την «ανάβασή» του σε υψόμετρα μεγαλύτερα των 2200 μέτρων, με αποτέλεσμα να συναντάται σε ζώνες μεταξύ 1200 και 2200 μέτρων στα βουνά των Καναρίων Νήσων, όπου ενδημεί. Πλέον δεν συναντάται σε άλλα μέρη, ενώ δεν είναι γνωστός ο τρόπος μετανάστευσής του από την ηπειρωτική χώρα.



Pinus halepensis: Αναπτύσσεται κυρίως σε ξηρά και βραχώδη ασβεστολιθικά εδάφη, από το επίπεδο της θάλασσας και έως τα 1700 m περίπου και εμφανίζει εξαιρετική αντοχή στην ξηρασία και τις υψηλές θερμοκρασίες. Είναι μεσογειακό είδος, από τα λίγα που συναντώνται σε φυσικές θέσεις στην Αφρική, ιδιαίτερα στο Μαρόκο και στις παραθαλάσσιες περιοχές της Αλγερίας, ενώ συγκεκριμένα στο Μαρόκο

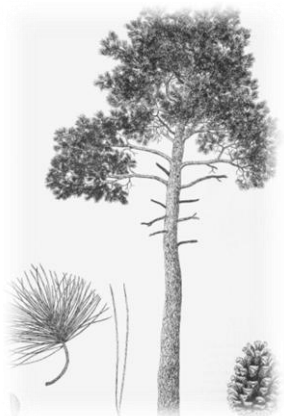


συναντάται στο μέγιστο δυνατό υψόμετρο, στο οποίο μπορεί να αναπτυχθεί (1700 m).



Pinus heldreichii: Περιγραφή στην παράγραφο 1.1.1.

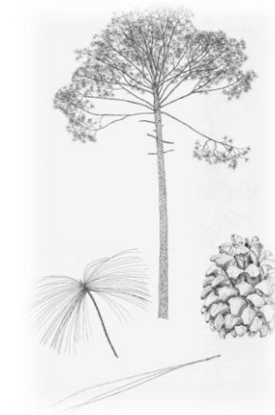
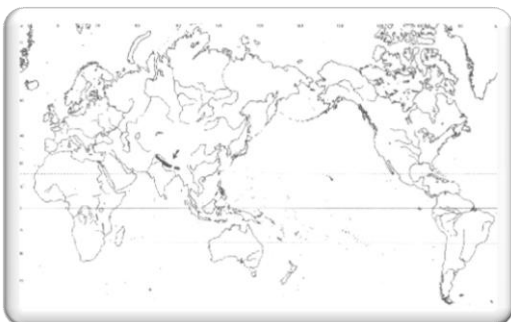
Pinus pinaster: Φύεται συνήθως σε χαμηλό υψόμετρο, ακόμη και σε αμμώδη εδάφη κοντά σε ακτές. Ωστόσο, στην οροσειρά του Άτλαντα, στο Μαρόκο, συναντάται σε ύψος 2000 m. Γενικά εξαπλώνεται στη Δ. Ευρώπη, από την Ιταλία, στη Ν. Γαλλία, αλλά και στις ακτές του Ατλαντικού, την Ισπανία (και στην ενδοχώρα), μέχρι το Β. Μαρόκο. Συναντάται επίσης σε κάποιες θέσεις στην Κορσική, τη Σαρδηνία και στις ΒΔ ακτές της Βαλκανικής χερσονήσου.



Pinus pinea: Αναπτύσσεται κατ' εξοχήν σε παράκτιες περιοχές, αλλά μπορεί να συναντηθεί μέχρι τα 600 m. Χαρακτηρίζεται από το ιδιαίτερο σχήμα της κόμης του (σχήμα ομπρέλας). Η εξάπλωσή του εκτείνεται στην περιοχή της Μεσογείου, από την Ισπανία μέχρι και την Κύπρο, εντοπίζεται εντούτοις και στις νότιες ακτές της Μαύρης Θάλασσας.

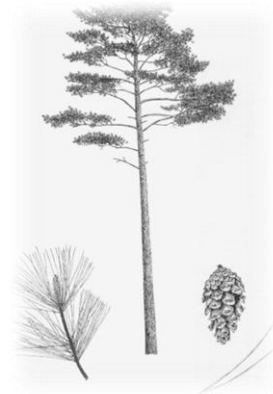


Pinus roxburghii: Συναντάται σε πρόποδες βουνών, αλλά και στις πλαγιές της οροσειράς των Ιμαλαΐων, από το Αφγανιστάν στη Δύση, μέχρι το Μπουτάν στα ανατολικά, σε υψόμετρο από 400 μέχρι και 2300 m. Καλύπτει μεγάλες περιοχές σχηματίζοντας αμιγείς πληθυσμούς, αλλά συναντάται και μαζί με άλλα είδη δένδρων. Προσαρμόζεται σε μεγάλη ποικιλία εδαφών και θεωρείται καλή πηγή ρητίνης.

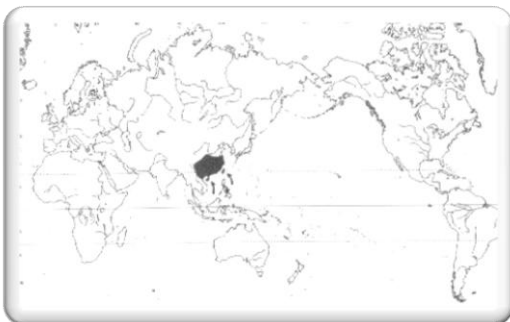


Subsection Pinus

Pinus densiflora: Στην Ιαπωνία σχηματίζει εκτενή δάση σε υψόμετρο που κυμαίνεται από 0 έως 2300m. Οικολογικά, ομοιάζει της *P. sylvestris* της Β. Ευρώπης. Το είδος αυτό συναντάται στα νησιά της Ιαπωνίας, Shikoku και Kyushu, καθώς και στο Βορειότερο τμήμα του Hokaido. Στην Ασιατική ηπειρωτική χώρα εντοπίζεται στην Κορέα και στις κινεζικές επαρχίες της Shandong και Jiangsu.



Pinus massoniana: Αναπτύσσεται τόσο σε χαμηλά, όσο και σε μεγαλύτερα υψόμετρα, από μερικές εκατοντάδες μέτρα μέχρι και 2000m, για αυτόν το λόγο συναντάται σε ποικίλες κλιματολογικές συνθήκες, από τις χαμηλότερου υψομέτρου και υγρού κλίματος παραποτάμιες κοιλάδες μέχρι τα ξηρά οροπέδια της Κινεζικής ενδοχώρας. Συγκεκριμένα, καλύπτει μία ευρεία περιοχή της Κίνας, περιλαμβάνοντας περισσότερες από 10 επαρχίες, κυρίως στο Νότο, κεντρικά και ανατολικά της χώρας. Συναντάται επίσης στην Taiwan και τη Hainan.

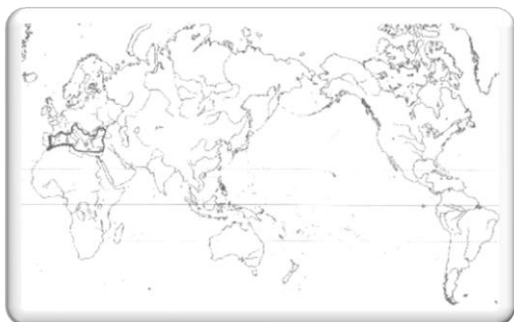


Pinus mugo: Αναπτύσσεται ως μικρό δένδρο, αλλά και ως θάμνος σε πλαγιές. Θεωρείται κυρίως υποαλπικό είδος, αλλά συναντάται και σε πεδινές περιοχές της Ευρώπης, σε φτωχά, αμμώδη εδάφη. Στις Άλπεις και στα Καρπάθια συναντάται σε υψόμετρο έως και 2300 m, συχνά σε εκτεθειμένες ορεινές πλαγιές. Εξαπλώνεται στις Άλπεις, κεντρικά και προς τα ανατολικά στην Αυστρία και σε περιοχές της πρώην Γιουγκοσλαβίας και νοτιότερα στη Βαλκανική χερσόνησο, στη Βουλγαρία και τη Ρουμανία. Επίσης, στα Απέννινα όρη της

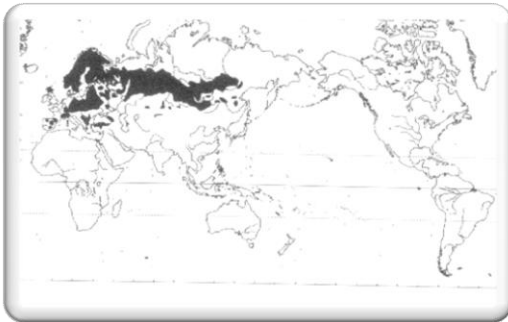


Ιταλίας, και στα Καρπάθια φύεται η *Pinus mugo* var. *rumilio*, ενώ σε άλλες περιοχές στην Ευρώπη, καλλιεργείται ως καλλωπιστικό.

Pinus nigra: Αν και ορεινό είδος, κάποια υποείδη του συναντώνται σε χαμηλότερα υψόμετρα, με αποτέλεσμα το υψομετρικό εύρος να κυμαίνεται μεταξύ 250-1800 m. Το πιο κοινό υποείδος είναι η *Pinus nigra* subsp. *nigra*, η οποία απεικονίζεται στο διπλανό σχήμα, με εξάπλωση στην Αυστρία, στην Α. Ελβετία, στην κεντρική Ιταλία και στη Βαλκανική Χερσόνησο. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η εξάπλωση της *Pinus nigra*, συμπεριλαμβάνοντας όλα τα υποείδη.

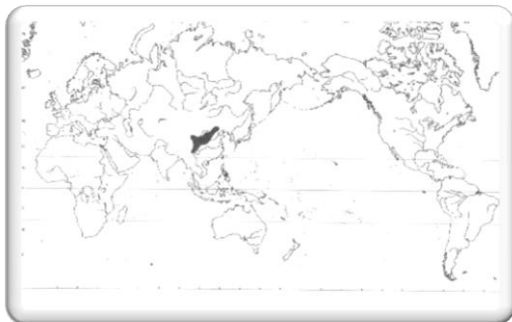


Pinus sylvestris: Το είδος αυτό έχει προσαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών. Σε μεσοφυτικά περιβάλλοντα ο οργανισμός προτιμάει πιο ξηρα ενδιατήματα, αλλά σε πιο υγρές περιοχές εμφανίζεται σε πιο υγρές θέσεις. Συνεπώς, αναπτύσσεται τόσο σε υγρό κλίμα όσο και σε ξηρότερο περιβάλλον. Είναι το είδος με τη μεγαλύτερη εξάπλωση, συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη Πεύκης, που εκτείνεται από την Ιβηρική Χερσόνησο και προς τα ανατολικά μέχρι τη Βαλκανική Χερσόνησο και την Τουρκία, φτάνοντας μέχρι τις παράκτιες περιοχές της Μαύρης Θάλασσας. Στη Β.

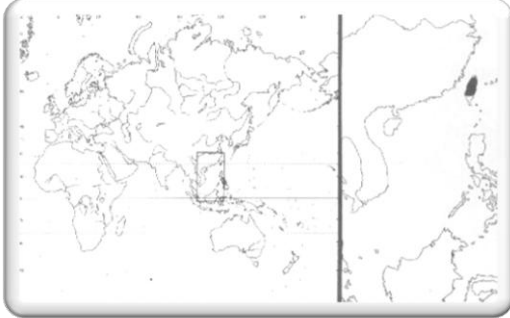


Ευρώπη συναντάται στη Σκωτία, σε όλη τη Σκανδιναβία, και την Α. Ευρώπη. Επίσης, στη Σιβηρία καλύπτει εκτεταμένη έκταση, από τα Ουράλια Όρη μέχρι τον Ειρηνικό Ωκεανό και νότια μέχρι τη Μογγολία.

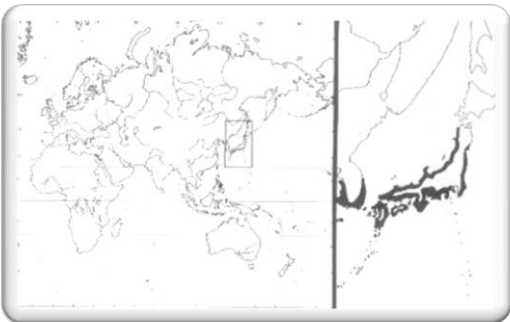
Pinus tabulaeformis: Κυρίως ορεινό είδος, συναντάται ιδιαίτερα στις ημι-άνυδρες περιοχές της ΒΔ Κίνας, αλλά και κοντά στο Πεκίνο, δηλαδή σε περιοχές δηλαδή χαμηλού υψομέτρου. Γενικά αναπτύσσεται σε υψόμετρο από 50 έως 3000 m ενώ εκτεταμένοι πληθυσμοί αυτού του είδους ευδοκιμούν κυρίως σε βορινές πλαγιές.



Pinus taiwanensis: Είναι ενδημικό της Ταϊβάν, και συναντάται τόσο στην ενδοχώρα, όσο και κατά μήκος της ακτογραμμής, στα 750-2800 m σχηματίζοντας δάση καλύπτοντας μεγάλες εκτάσεις κυρίως σε μέτριο υψόμετρο.



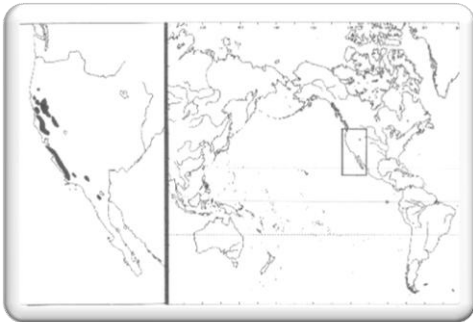
Pinus thunbergii: Είδος, που ομοιάζει της ευρωπαϊκής Μαύρης Πεύκης (*P. nigra*). Φτάνει σε ύψος τα 40 m και είναι ενδημικό είδος της Ιαπωνίας, σχηματίζοντας δάση στις παράκτιες περιοχές των Νήσων Honshu, Shikoku και Kyushu, καθώς και κατά μήκος της ακτογραμμής της Ν. Κορέας, από το επίπεδο της θάλασσας μέχρι και τα 1000 m.



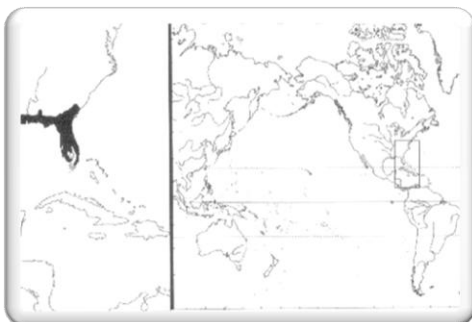
Section Trifoliae

Subsection Australes

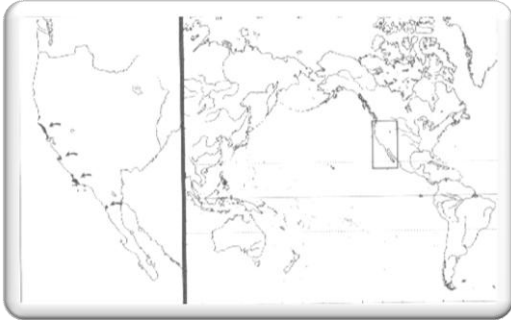
Pinus attenuata: Συναντάται στις ΝΔ Η.Π.Α., που συνήθως επικρατεί ξηρή καλοκαιρία. Συναντάται σε υψόμετρο μεταξύ 300 και 1700 m. Φτάνει τα 20 m, κυρίως στις βορειότερες περιοχές εξάπλωσής του, ενώ συναντάται ως δένδρο θαμνώδους μορφής νοτιότερα στην Καλιφόρνια. Χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτού του είδους είναι οι κώνοι των νεαρών ατόμων, που αναπτύσσονται απ' ευθείας στον κορμό ενώ αργότερα εμφανίζονται και στους κλάδους.



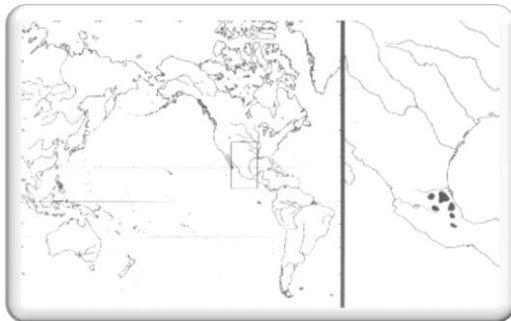
Pinus elliotii: Χαρακτηριστικό του γνώρισμα είναι η ταχεία ανάπτυξή του και για αυτό το λόγο επιλέγεται στις αναδασώσεις. Φτάνει σε μέγιστο ύψος τα 25-30 m και ευδοκίμει σε υδροβιότοπους, όπως στα αμμώδη νησιά και στους εκτενείς βαλτότοπους στο νότιο τμήμα των Πολιτειών, Florida και Georgia.



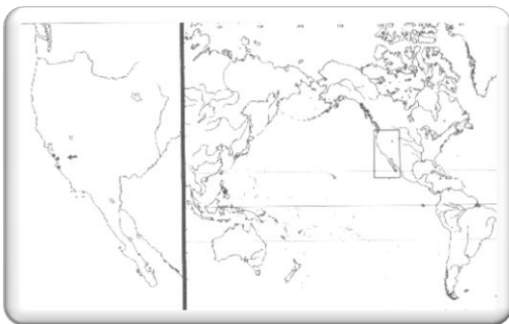
Pinus muricata: Αναπτύσσεται στις βραχώδεις ακτές της Καλιφόρνια και φτάνει σε υψόμετρο τα 300 m. Είναι μάλλον σπάνιο είδος και υπάρχει σε διάσπαρτες θέσεις, καλά προσαρμοσμένο στον ισχυρό θαλάσσιο άνεμο, παράγοντας, ο οποίος σαφώς και επηρεάζει την ανάπτυξή του και για αυτό το λόγο το ύψος του συνήθως δεν υπερβαίνει τα 15 m και σε σπάνιες περιπτώσεις φτάνει τα 25 m.



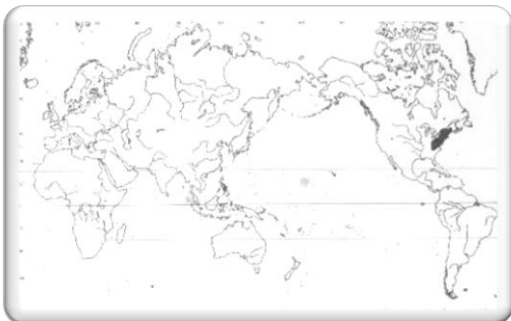
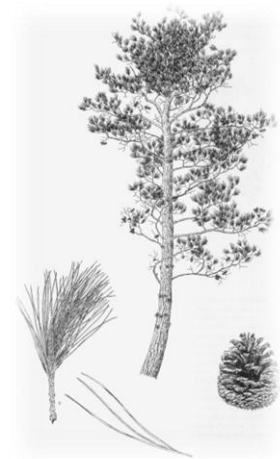
Pinus patula: Λεπτό δένδρο που φτάνει σε ύψος τα 20 m και αναπτύσσεται σε ζεστά και εύκρατα υψίπεδα του κεντρικού Μεξικό, σε υψόμετρα μεταξύ 1500 και 3000 m και σε περιοχές με αυξημένη κατακρύμνηση (βροχή, χιόνι, χαλάζι, πάχνη).



Pinus radiata: Αναπτύσσεται σε βραχώδη και ξηρά εδάφη και φαίνεται να είναι ανθεκτική σε ψεκασμούς θαλασσινού νερού και σε θαλάσσιους ανέμους. Είναι μάλλον σπάνιο είδος που εντοπίζεται σε περιορισμένη έκταση κατά μήκος της ακτογραμμής νότια του San Francisco, ενώ έχει καλλιεργηθεί και σε άλλα μέρη στον κόσμο, κυρίως στη Ν. Ζηλανδία. Όταν βρεθεί σε κατάλληλες συνθήκες αναπτύσσεται σχετικά γρήγορα και για αυτό το λόγο επιλέγεται στις αναδασώσεις.



Pinus rigida: Αναπτύσσεται σε φτωχά και ξηρά εδάφη και αυτός είναι και ένας λόγος που και αυτή η Πεύκη αποτελεί είδος επιλογής για αναδάσωση. Συναντάται στις Η.Π.Α., κατά μήκος της ακτογραμμής του Ατλαντικού, από το επίπεδο της θάλασσας μέχρι τα 900 m.

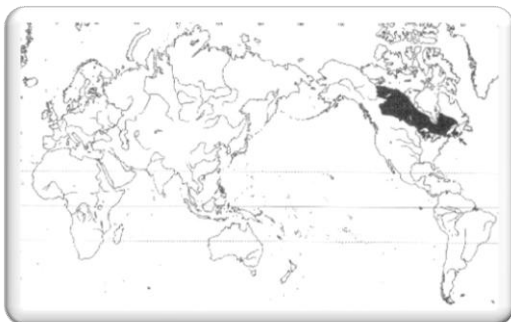


Pinus teocote: Συναντάται στα νότια υψίπεδα του Μεξικό στα 1500 έως 3000 m, φτάνοντας σε ύψος τα 30 m και χαρακτηρίζεται από λεπτό και ίσιο κορμό.

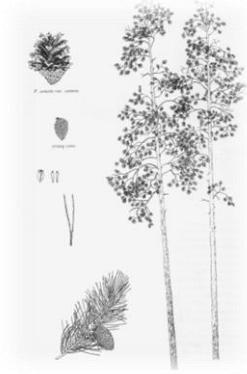
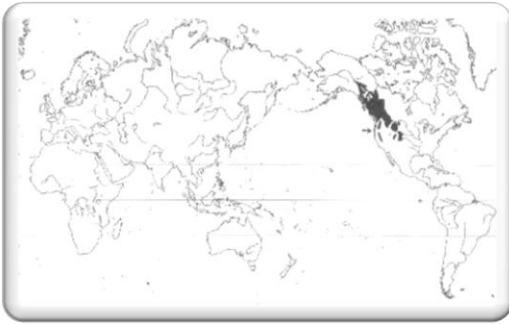


Subsection Contortae

Pinus banksiana: Αναπτύσσεται ως θάμνος στο βόρειο τμήμα της εξάπλωσής του (Καναδική Αρκτική τούνδρα), ενώ νοτιότερα φτάνει σε ύψος τα 18 m. Στις περιοχές που συνυπάρχει με την *P. contorta*, η οποία «αντικαθιστά» την *P. banksiana* στο δυτικό τμήμα του Καναδά, σχηματίζει υβρίδια. Φύεται σε πεδινές περιοχές και σε υψόμετρο που δεν ξεπερνά τα 700 m, σε εδάφη συνήθως αμμώδη και σχετικά ξηρά.

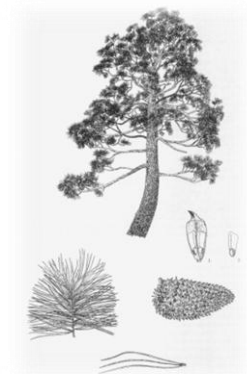
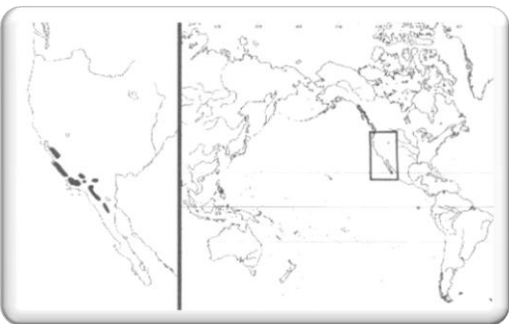


Pinus contorta: Αναπτύσσεται σε μεγάλο υψομετρικό εύρος, από το επίπεδο της θάλασσας μέχρι και τα 3350 m. Συναντάται στο Yukon (δυτικότερη Πολιτεία του Καναδά, που συνορεύει με την Αλάσκα), στις παράκτιες περιοχές της Ν. Αλάσκας, νοτιότερα, στα Βραχώδη Όρη και φτάνει μέχρι τη Sierra Nevada της California.

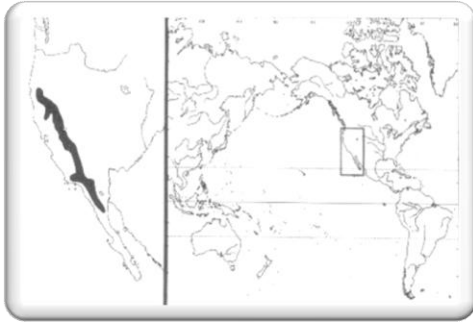


Subsection Ponderosae:

Pinus coulteri: Οι σχετικά ξηρές θέσεις σε πρόποδες, αλλά και σε βουνά, σε υψόμετρο που φτάνει τα 2300 m συχνά σε εύφορα, βραχώδη εδάφη, αποτελούν το σύνθηρες ενδιαίτημα αυτής της Πεύκης. Σχηματίζει διάσπαρτες ομάδες στις ορεινές περιοχές κατά μήκος των Δυτικών παραλίων της Β. Αμερικής (Pacific Coast Ranges). Χαρακτηριστικό γνώρισμα του είδους είναι οι ασυνήθιστα μεγάλοι κώνοι που φέρει, το βάρος των οποίων είναι δυνατό να φτάσει τα 2kg. Οι πιο κοντινοί του συγγενείς είναι η *P. sabiniana* και η *P. torreyana*, επίσης ενδημικά της California.



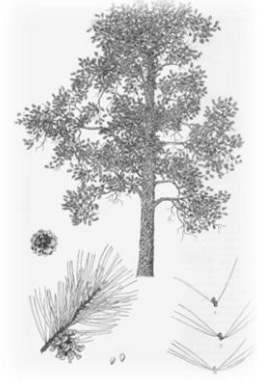
Pinus jeffreyi: Ενδημικό είδος της California, που φτάνει σε ύψος τα 50m, όταν δεν παρεμποδίζεται η ανάπτυξή του από τις δριμείες κλιματολογικές συνθήκες. Συναντάται σε υψόμετρο 1000-3000 m, και πιο συγκεκριμένα εντοπίζεται κατά μήκος της Sierra Nevada, αλλά και σε διάσπαρτους πληθυσμούς σε υψηλότερα σημεία και νοτιότερα, στην Baja California.



Pinus ponderosa: Αναπτύσσεται και προσαρμόζεται αρκετά καλά σε ποικίλες συνθήκες και ως εκ τούτου συναντάται σε μεγάλο υψομετρικό εύρος, από πεδινές περιοχές έως και πάνω από τα 3300m. Όπως τα περισσότερα είδη Πεύκης, έτσι και αυτό είναι καλά προσαρμοσμένο στην υπερίωδη ακτινοβολία, αλλά και σε εκτεταμένες περιόδους ξηρασίας, που χαρακτηρίζουν το κλίμα των Δυτικών Πολιτειών των Η.Π.Α., όπου και συναντάται.

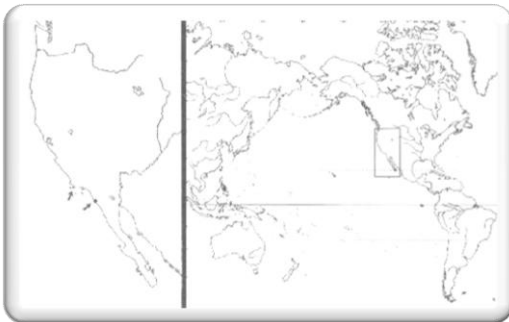
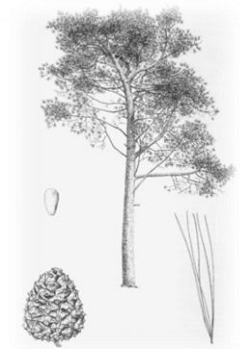


Pinus sabiniana: Φθάνει σε ύψος περίπου τα 15 m, με τα νεαρά άτομα να διαφέρουν από τα γηραιότερα στο σχήμα του κορμού, ο οποίος στα τελευταία έχει ακανόνιστο σχήμα, με διακλαδώσεις που ξεκινούν λίγα μέτρα από το έδαφος. Χαρακτηριστικά είναι τα μεγάλα σπέρματα που φθάνουν σε μήκος τα 2 cm. Αναπτύσσεται σε ξηρό κλίμα στους πρόποδες των βουνών της California, νότια μαζί με *P. monophylla* και σε βορειότερες περιοχές μαζί με *P. coulteri*, μεταξύ 150 και 1500



m. Δεν σχηματίζει πυκνά δάση είναι όμως από τους πρώτους οργανισμούς που αναπτύσσονται σε περιοχές που έχουν καταστραφεί από πυρκαγιά. Το είδος αυτό μαζί με την *P. torreyana* και την *P. coulteri*, θεωρούνται «απομεινάρια» της Τριτογενούς περιόδου και η περιοχές όπου συναντώνται σήμερα είναι τμήματα μόνο της πρότερης ευρείας εξάπλωσής τους.

Pinus torreyana: Στη φυσική του θέση φθάνει σε ύψος τα 5-15 m με γαμπό κορμό, ενώ όταν είναι καλλιεργημένο, το ύψος του μπορεί να φθάσει τα 20 m και ο κορμός του είναι μόνο ελαφρώς κυρτός, όπως φαίνεται στην πλαϊνή εικόνα. Είναι εξαιρετικά σπάνιο είδος και πλέον οι φυσικές του θέσεις περιορίζονται σε δυο τοποθεσίες στην ακτογραμμή της California, όπου και προστατεύεται από το νόμο. Όπως και οι κοντινοί του συγγενείς



P. coulteri και *P. sabiniana*, κατά την Τριτογενή περίοδο είχε πολύ πιο εκτεταμένη εξάπλωση. Σήμερα έχει φυτευτεί σε πάρκα και άλλα μέρη, όπου φαίνεται να ευδοκίμει καλύτερα συγκριτικά με τις φυσικές του θέσεις και ως εκ τούτου, επι του παρόντος, θεωρείται ότι έχει διασωθεί.

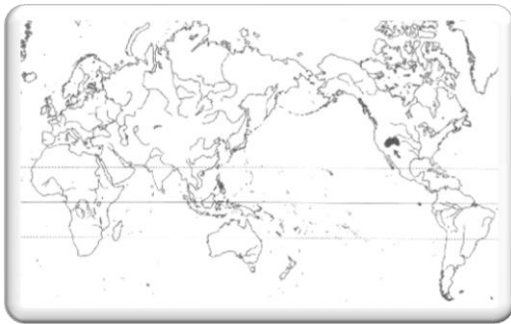
Υπογένος *Strobus* (*Haploxyton*)

Section Parrya

Subsection Balfourianae

Pinus aristata: Υποαλπικό είδος, συναντάται σε υψόμετρο μέχρι και 3700 m (Λευκά Όρη), συνήθως σε ομάδες μαζί με άλλα είδη Πεύκης (*P. albicaulis*, *P. flexilis*, *P. longaeva*). Έχει αυξημένη αντοχή στην ξηρασία και για αυτό μπορεί και αναπτύσσεται στους δολομιτικούς σχηματισμούς στα Λευκά Όρη. Εξαπλώνεται από τα Βραχώδη

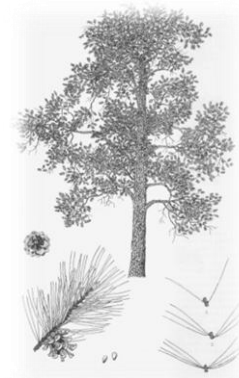
Όρη στο Κολοράντο, μέχρι το Νέο Μεξικό, την έρημο της Νεβάδα και μέχρι τα Λευκά Όρη στην Α. Καλιφόρνια. Εκπρόσωποι αυτού του είδους έχει αποδειχθεί, ότι αποτελούν από τους αρχαιότερους ζώντες οργανισμούς στη Γή (μέχρι και 4800 ετών).



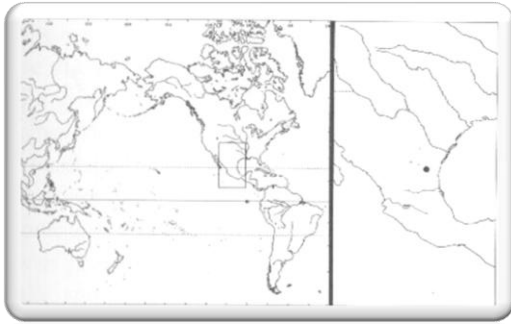
Subsection Cembroides

Pinus cembroides: Το μέγιστο ύψος που φτάνει είναι 15 m, αν και είναι συνήθως πιο μικρό. Συναντάται μεταξύ 1400 και 2700 m και με ενδιαίτημα τα ξηρά ή ημιάνυδρα οροπέδια της Arizona, Utah και Colorado, σχηματίζοντας χαρακτηριστικά μικτά δάση με είδη *Juniperus*. Τα εδώδιαμα σπέρματα της Πεύκης είχαν αξία για τους ιθαγενείς πληθυσμούς της περιοχής αλλά ακόμα και σήμερα εξακολουθούν να είναι δημοφιλή και να πωλούνται σε

διάφορα σημεία.



Pinus culminicola: Θάμνος που φτάνει σε ύψος τα 5m, με ιδιαίτερα περιορισμένη εξάπλωση. Συγκεκριμένα, συναντάται στα Μεξικανικά υψίπεδα μεταξύ 3350 και 3700 m πάνω από το επίπεδο της θάλασσας, ξεπερνώντας κατά πολύ σε υψόμετρο τα άλλα είδη Πεύκης που φύονται στην ευρύτερη περιοχή, τα οποία δεν συναντώνται πάνω από τα 3000 m.

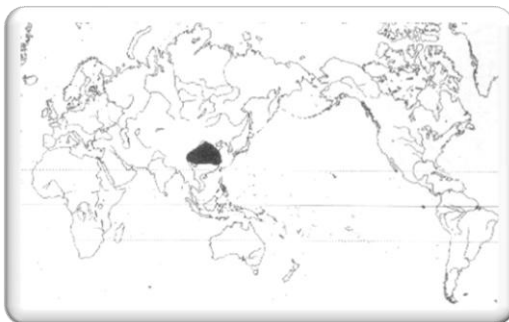


Pinus monophylla: Είναι κοινό είδος στη Utah και τη Nevada. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του συγκριτικά με άλλα είδη Πεύκης είναι τα μονήρη βελονοειδή του φύλλα.

Section Quinquefoliae

Subsection Gerardianae

Pinus bungeana: Δενδρύλιο που φτάνει τα 15 m με ιδιαίτερα λείο εξωτερικό φλοιό, χρώματος λαδί προς καφέ. Ο φλοιός φαίνεται να διαρρηγνύεται εύκολα τοπικά με τρόπο που ομοιάζει αυτόν των ειδών του γένους *Platanus*, αφήνοντας εκτεθειμένες στο φώς μικρές περιοχές χρώματος κιτρινο-πράσινου, που σταδιακά αποκτούν χρώμα μωβ-καφέ (lacebark pine). Καταλαμβάνει μία ευρεία έκταση στην περιοχή της

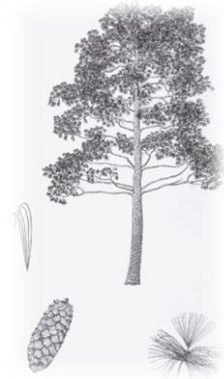


κεντρικής Κίνας, αλλά δεν σχηματίζει εκτεταμένα δάση, συναντάται όμως μέσα σε δάση διαφορετικών ειδών σε διάσπαρτες θέσεις, συνήθως μαζί με την *P. tabulaeformis*, σε υψόμετρο μεταξύ 1400 και 2800 m μεταξύ ασβεστολιθικών

βράχων, σε προσανατολισμένες προς το Νότο πλαγιές. Επίσης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στον παγετό. Χρησιμοποιείται ως καλλωπιστικό φυτό στις πεδινές περιοχές σε ναούς, σε πάρκα κ.α.

Subsection Strobis

Pinus armandii: Αναπτύσσεται συνήθως μαζί με άλλα κωνοφόρα, φτάνοντας σε ύψος τα 20 m και ενώ συναντάται σε υψόμετρο μεταξύ 1500 και 3600 m δεν έχει ωστόσο μεγάλη ανθεκτικότητα στον έντονο παγετό. Η περιοχή εξάπλωσής της στην Κίνα είναι ευρεία, αλλά σε διάσπαρτες θέσεις και συναντάται κυρίως στην επαρχία Yunnan στην κεντρική Κίνα, καθώς και στις Taiwan και Hainan.



Pinus cembra: Υποαλπικό είδος που φτάνει σε ύψος τα 20 m και συναντάται σε υψόμετρο 1200 και 2600 m στις ελβετικές Άλπεις, στις κοιλάδες του ποταμού Ροδανού και του Ινν, στην περιοχή High Tatras της Σλοβακίας και στα Α. Καρπάθια. Κοντά στο μέγιστο υψόμετρο που μπορεί να ευδοκιμήσει, συναντάται σε μικρότερες ομάδες και ορισμένες φορές ως μεμονωμένα άτομα, πολλές φορές πάνω σε βράχους στις πλαγιές, όπως φαίνεται στην εικόνα.



Pinus flexilis: Είδος υποαλπικού κλίματος, το οποίο μπορεί να απαντηθεί σε υψόμετρο 1000 m στο νοτιότερο σημείο της εξάπλωσής του, μέχρι και τα 3700 m στα Βραχώδη Όρη του Κολοράντο. Σπανίως ξεπερνά τα 20 m (συνήθως φτάνει περίπου τα 10 m), ενώ στις περιοχές που είναι κοντά στο μέγιστο υψόμετρο του ενδιαιτημάτος του, αναπτύσσεται ως θάμνος.



Εξαπλώνεται στα Βραχώδη Όρη από τον Καναδά μέχρι τα σύνορα του Μεξικό, ενώ φτάνει στη Sierra Nevada και τα Λευκά Όρη της Καλιφόρνια. Κυρίως όμως συναντάται στα Βραχώδη Όρη του Wyoming και του Colorado.



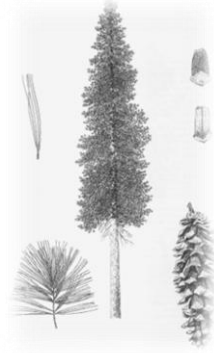
Pinus koraiensis: Έχει ευρεία εξάπλωση στη ΒΑ Κίνα, στη Σιβηρία βόρεια του Amur και στην Κορέα, ενώ συναντάται και στη νήσο Honshu της Ιαπωνίας. Στη Σιβηρία συναντάται στα 600 m, αλλά στην Ιαπωνία αναπτύσσεται μέχρι και τα 2500 m. Το είδος αυτό αναπτύσσεται σε ξηρά μέρη μεταξύ πλατύφυλλων δένδρων. Στα παράλια της Σιβηρίας στη θάλασσα της Ιαπωνίας, είναι εξίσου επικρατές με την *Abies holophylla* σχηματίζοντας μικρές ομάδες



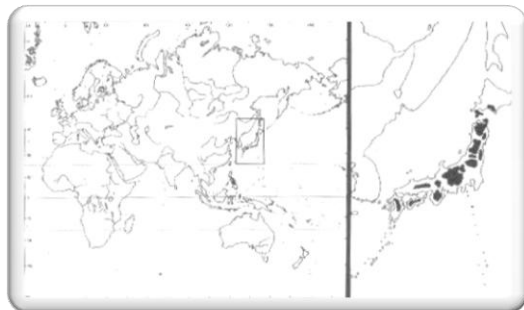
κωνοφόρων δένδρων σε δάση πλατύφυλλων, ενώ στην Ιαπωνία συναντάται μαζί με άλλα είδη Πεύκης. Ο πληθυσμός του στην Κίνα (Μαντζουρία) και στην Κορέα έχει μειωθεί δραματικά λόγω της εκμετάλλευσής του για την παραγωγή ξυλείας.



Pinus monticola: Ο μεγαλύτερος πληθυσμός του είδους αυτού βρίσκεται στη ΒΔ Αμερική (Idaho), στο Εθνικό Πάρκο Coeur d' Alene. Στα πυκνά δάση που σχηματίζει εκεί, φθάνει σε ύψος τα 50-55 m και σε ηλικία τα 500 χρόνια. Ο κορμός του είναι ίσιος και σωληνοειδής και τα κλαδιά του πολυάριθμα και κοντά, με αποτέλεσμα η κόμη που σχηματίζεται να ομοιάζει με εκείνη των ειδών του γένους *Picea*. Συναντάται σε ένα ευρύ φάσμα υψομέτρου, από το επίπεδο της θάλασσας (Washington) μέχρι και τα 3300 m (California), συνήθως όμως φύεται στα 1300 m.



Pinus parviflora: Δένδρο μέγιστου ύψους 15-30 m, με σχετικά ίσιο κορμό που φέρει διακλαδώσεις στο ανώτερο τμήμα. Συναντάται σε ευρύ φάσμα υψομέτρου, από το επίπεδο της θάλασσας και μέχρι τα 2500 m περίπου, όμως το βέλτιστο εύρος είναι μεταξύ 1000 και 1500 m. Έχει εξάπλωση στις νήσους Hokaido, Honshu και Kiushu της Ιαπωνίας.



Pinus peuce: Φθάνει τα 30 m και αναπτύσσεται γενικά μεταξύ 800 και 2000 m. Συναντάται νοτιοδυτικά των Βαλκανίων κυρίως στην Π.Γ.Δ.Μ., καθώς και στις περιοχές της Ελλάδας και της Αλβανίας που συνορεύουν με αυτή. Σε πολλές περιοχές εμφανίζεται σε μάλλον διάσπαρτες θέσεις ενώ στο παρελθόν φαίνεται να είχε μεγαλύτερη εξάπλωση. Στην Π.Γ.Δ.Μ. σχηματίζει αμιγείς πληθυσμούς σε ήπιες πλαγιές.



Pinus pumila: Θάμνος που δεν ξεπερνά τα 4 m, καλά προσαρμοσμένος στις ακραίες κλιματολογικές συνθήκες της ΒΑ Σιβηρίας, της ΒΑ Κίνας και της Ιαπωνίας, όπου έχει ευρεία εξάπλωση. Νότια της περιοχής εξάπλωσης που καταλαμβάνει, συνορεύει με δάση *P. sylvestris*, ενώ στις βορειότερες περιοχές



και σε μεγάλο υψόμετρο αντικαθιστά τη *Larix sibirica*.

Pinus strobiformis: Φθάνει τα 20-30 m και αναπτύσσοντας συνήθως ίσιο κορμό με πυκνούς οριζόντιους κλάδους, σχηματίζοντας μία ευρεία και κωνική κόμη. Συναντάται στο βόρειο τμήμα του Μεξικό, αλλά και στις πολιτείες New Mexico και Arizona. Στη Sierra Madre του Μεξικό αναπτύσσεται μεταξύ 1500 και 3000 m σχηματίζοντας μικτά δάση με άλλα είδη Πεύκης, αλλά και άλλων δένδρων.

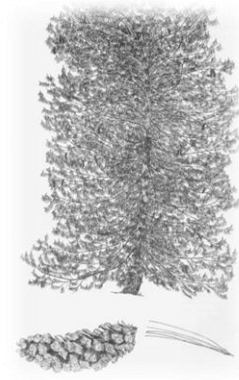


Pinus strobus: Ο κορμός είναι ίσιος και κυλινδρικός, που συνήθως χωρίζεται σε περισσότερα από ένα στελέχη κοντά στην κορυφή ή φέρει βαρείς κλάδους. Έφτανε σε ύψος τα 80 m και αποτελούσε την κύρια πηγή ξυλείας για την κατασκευή καταρτιών των πλοίων του Βρετανικού Βασιλικού Ναυτικού. Πλέον το ύψος στο οποίο συναντάται δεν ξεπερνά τα 40 m. Εξαπλώνεται σε μία ευρεία περιοχή του ανατολικού τμήματος



της Β. Αμερικής, λίγα μέτρα πάνω από το επίπεδο της θάλασσας και μέχρι τα 1500 m. Εντούτοις, πάνω από τα 500 m συναντάται μόνο σπάνια. Αναπτύσσεται καλά σε μη ασβεστολιθικά εδάφη, μαζί με άλλα κωνοφόρα και άλλα είδη πλατύφυλλων δένδρων.

Pinus wallichiana: Θεωρείται ως το πλέον «κομψό» είδος Πεύκης και φθάνει σε ύψος τα 40 m, με ίσιο κορμό και μάλλον κοντούς κλάδους σε όλο το μήκος του. Τα άτομα που αναπτύσσονται σχετικά απομονωμένα, φέρουν μακρύτερους κλάδους που έχουν προσανατολισμό προς τα κάτω, δίνοντας στην κόμη σχήμα θόλου, όπως δείχνει η εικόνα. Αναπτύσσεται στα Ιμαλία, σε κοιλάδες και σε πρόποδες σε υψόμετρο που φθάνει τα 2500 m, ενώ στο Μπουτάν συναντάται μέχρι και τα



3400 m. Σχηματίζει αμιγή και μικτά δάση, με άλλα είδη όπως *Quercus*, *Acer* και *Ilex* (Θιβέτ) και *Cedrus deodara* (Δ. Ιμαλία). Χρειάζεται ηλιοφάνεια, ιδιαίτερα στην τελευταία φάση ανάπτυξής της και για το λόγο αυτόν συχνά την ανταγωνίζονται άλλα δένδρα στη διαδοχή.

1.2. Κατηγορίες χημικών συστατικών του γένους *Pinus*

Το γένος *Pinus* χαρακτηρίζεται από την παρουσία φαινολικών παραγώγων, όπως είναι τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και τα γλυκοσιδικά παράγωγά τους, από την ύπαρξη τερπενίων, κυρίως μονοτερπενίων και σεσκιτερπενίων (στο αιθέριο έλαιο) αλλά και διτερπενίων, καθώς και λιγνανίων, ενώ αναφορές υπάρχουν ακόμα και για την ύπαρξη αλκαλοειδών (Hegnauer 1962).

1.2.1. Φαινολικά παράγωγα

Τα πιο κοινά φαινολικά παράγωγα που συναντώνται στο ξύλο ειδών *Pinus* είναι παράγωγα φλαβονοειδών συνοδευόμενα από στυλβενικά παράγωγα. Συγκεκριμένα στο καρδιόξυλο εντοπίζονται παράγωγα στυλβενίου και φλαβόνες, ενώ στο νεαρό ξύλο αυτά ανιχνεύονται μόνο σε ίχνη (Hegnauer 1962).

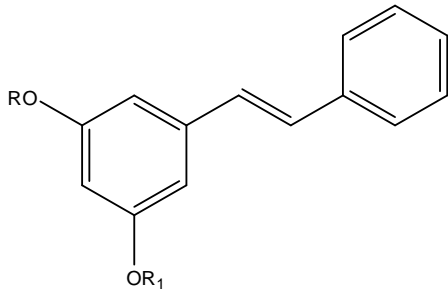
Οι μεταβολίτες πινοσιλβίνη, ο μονομεθυλαιθέρας της και τα φλαβονοειδή (-)-πινοκεμβρίνη και (+)-πινομπανξίνη συντίθενται σχεδόν από όλα τα είδη *Pinus* και αντιπροσωπεύουν κυρίως το υπογένος *Diploxylon* (Norin 1972).

Επίσης ο βενζολικός πυρήνας των μεταβολιτών που εντοπίζονται στο καρδιόξυλο είναι συνήθως μη υποκατεστημένος, σε αντίθεση με τους μεταβολίτες αυτής της κατηγορίας που βιοσυντίθενται στο φλοιό ή στα φύλλα.

Αξίζει να αναφερθεί ότι οι ενώσεις αυτές συχνά εμφανίζονται ως ζεύγη, τα μέλη των οποίων διαφέρουν κατά δύο περισσότερα ή λιγότερα άτομα υδρογόνου.

Ενδεικτικά αναφέρονται οι παρακάτω ενώσεις:

Στιλβένια

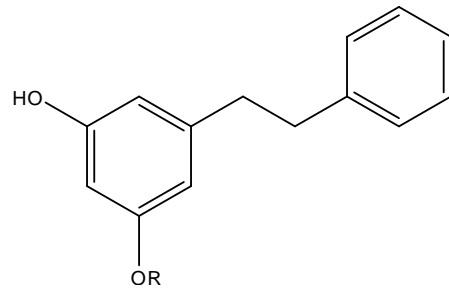


R=R₁=H πινοςυλβίνη

R=CH₃, R₁=H μονομεθυλαιθέρας

R=R₁=CH₃ διμεθυλαιθέρας

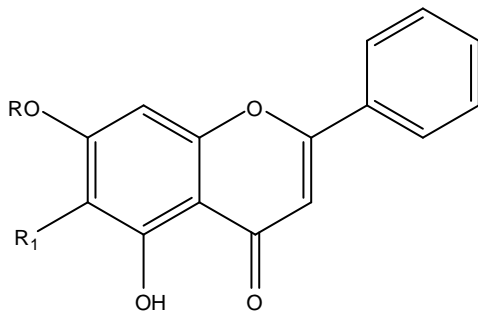
Διυδροστιλβένια



R=H διυδροπινοςυλβίνη

R=CH₃ μονομεθυλαιθέρας

Φλαβόνες

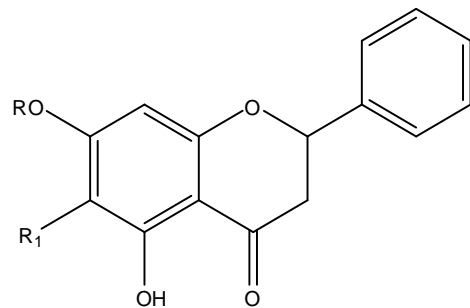


R=R₁=H χρυσίνη

R=CH₃, R₁=H τεκτοχρυσίνη

R=H, R₂=CH₃ στρομποχρυσίνη

Διυδροφλαβόνες

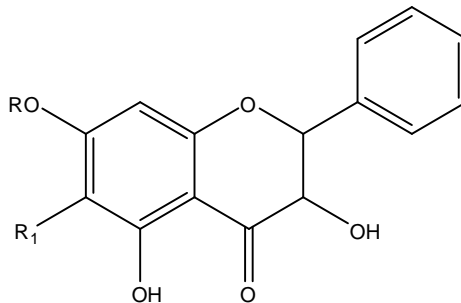


R=R₁=H πινοκεμβρίνη

R=CH₃, R₁=H πινοστρομπίνη

R=H, R₂=CH₃ στρομποπινίνη

Διυδροφλαβονόλες

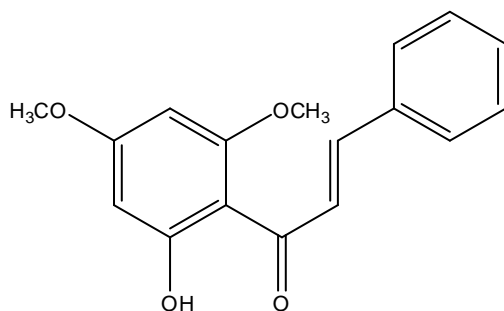


R=R₁=H πινομπαξίνη

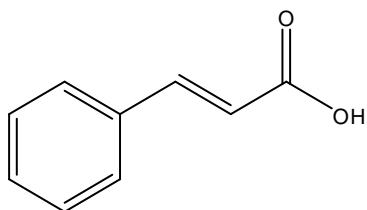
R=CH₃, R₁=H μονομεθυλαιθέρας της πινομπαξίνης

R=H, R₂=CH₃ στρομπομπαξίνη

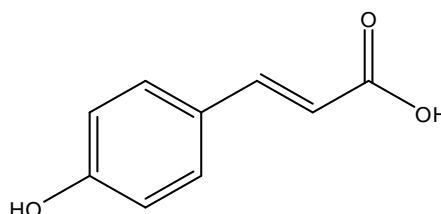
Επίσης από το ξύλο της *Pinus wallichiana* έχει απομονωθεί η χαλκόνη φλαβοκαβίνη (2,4-διμεθοξυ-6-υδροξυχαλκόνη):



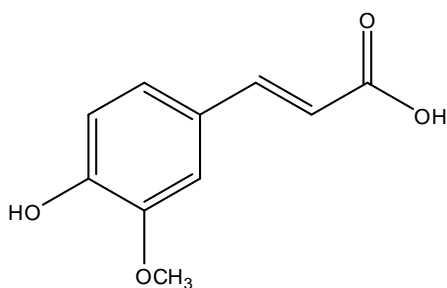
Επιπλέον στα επιδερμικά κύτταρα των φύλλων περιέχονται φαινολικά παράγωγα, όπως φλαβονοειδή, κινναμωμικό οξύ και παράγωγα, λιγνίνη, φερουλικό οξύ, 4-κουμαρικό οξύ και αστραγαλίνη (Laakso et al. 1998):



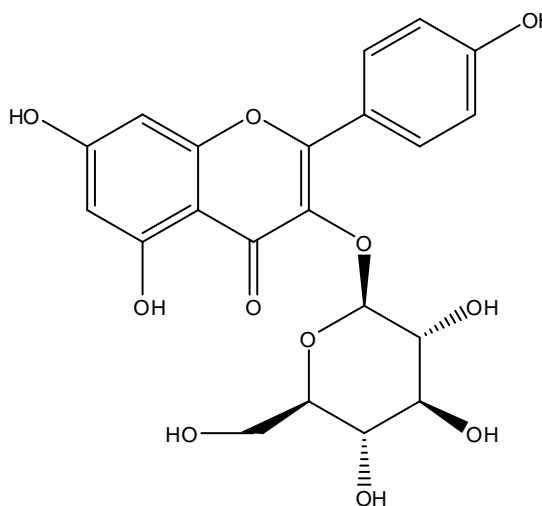
κινναμωμικό οξύ



4-κουμαρικό οξύ



φερουλικό οξύ

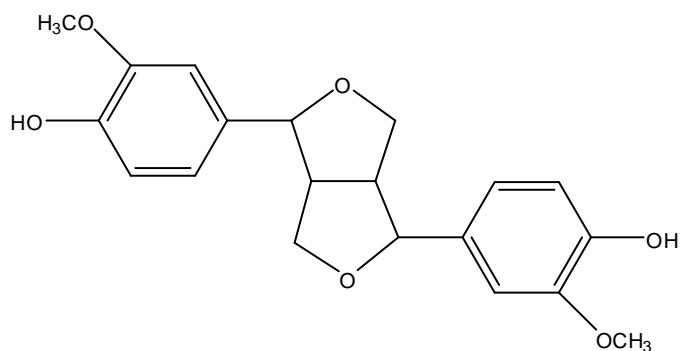


αστραγαλίνη

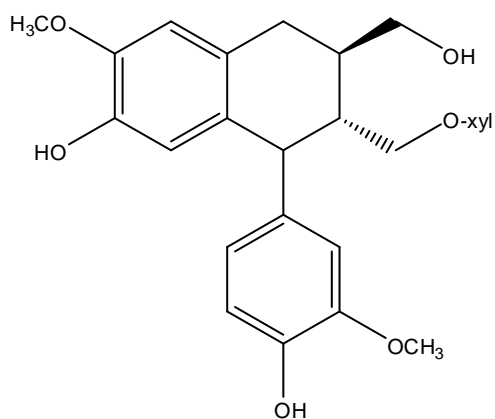
1.2.2. Λιγνάνια

Παράγωγα αυτής της κατηγορίας συναντώνται κυρίως στο ξύλο των ειδών της οικογένειας Pinaceae. Ωστόσο έχουν απομονωθεί και από φύλλα (Jung et al. 2003).

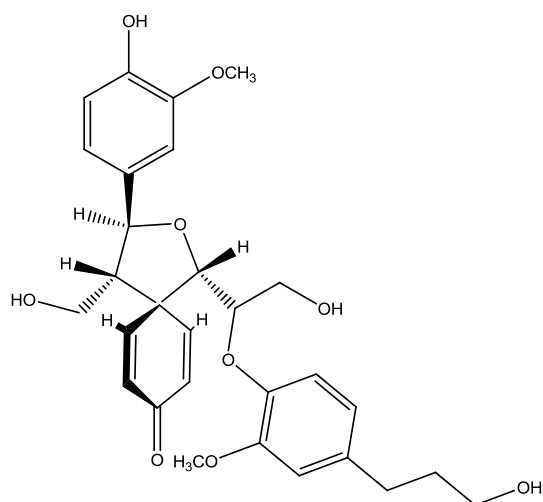
Ως συστατικό της ρητίνης έχει απομονωθεί η πινορεσινόλη:



Επιπρόσθετα από τα φύλλα της *Pinus densiflora* απομονώθηκε ο ξυλοπυρανοσίδης της (+)-ισολαρισερινόλης (Jung et al. 2003):



Αξίζει να αναφερθεί ωστόσο και το παρακάτω σεσκινεολιγνάνιο με δομή σπιροδιενόνης, που απομονώθηκε σχετικά πρόσφατα από το φλοιό της *Pinus sylvestris* L. (Sinkkonen et al. 2007):



πινοπατόλη

1.2.3. Τερπένια

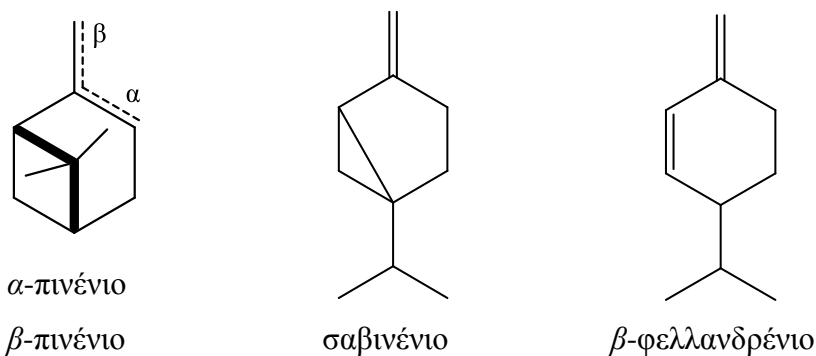
Αιθέριο έλαιο: Το αιθέριο έλαιο που παραλαμβάνεται κατόπιν απόσταξης από τα βελονοειδή φύλλα, κυριαρχείται από μονοτερπένια, ενώ σχεδόν πλήρης είναι η απουσία φαινυλοπροπανοϊκών παραγώγων, γνωρίσματα που χαρακτηρίζουν και την ελαιορητίνη. Σε αντίθεση όμως με την ελαιορητίνη, στο αιθέριο έλαιο συναντώνται σε υψηλότερα ποσοστά μονοτερπενικές αλκοόλες, καθώς και οι εστέρες αυτών (Hegnauer 1962).

Ελαιορητίνη: Πρόκειται για μίγμα αιθερίου ελαίου και ρητίνης, το οποίο εκρέει από εντομές του κορμού και των βλαστών. Το πτητικό κλάσμα αποτελείται κυρίως από μονοτερπένια (κυρίως α - και β -πινένιο) και σεσκιτερπένια (λονγκιφολένιο, καδινένιο). Το μη πτητικό κλάσμα της ελαιορητίνης (κολοφώνιο) χαρακτηρίζεται από ρητινικά οξέα (οξέα διτερπενίων) και παράγωγά τους.

Παρακάτω αναφέρονται οι πιο χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι κάθε ομάδας:

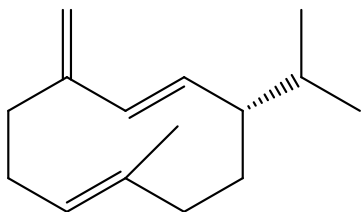
Μονοτερπένια

Η ελαιορητίνη καθώς και το αιθέριο έλαιο από τα φύλλα κυριαρχείται στα περισσότερα είδη από τα μονοτερπένια (+)- α -πινένιο και (-)- β -πινένιο:

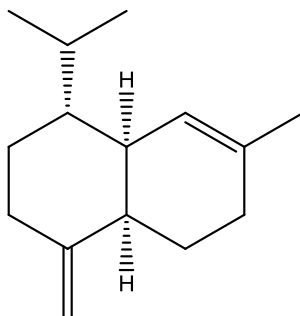


Σεσκιτερπένια

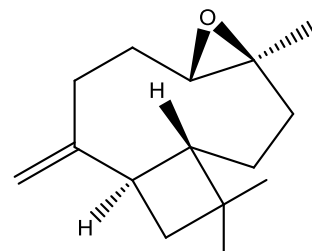
Παρακάτω αναφέρονται ενδεικτικά τρεις από τους σημαντικότερους εκπροσώπους της ομάδας αυτής, που χαρακτηρίζει τη σύσταση του πτητικού κλάσματος των φύλλων πολλών ειδών του γένους.



γερμακρένιο D



γ-μουουρολένιο

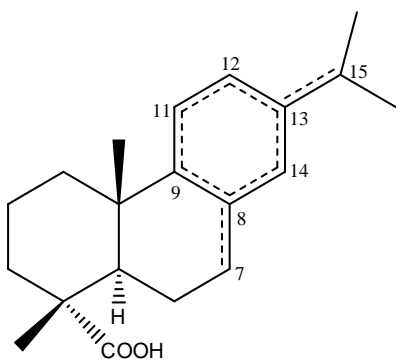


οξείδιο του καρυοφυλλενίου

Διτερπένια

Στη συνέχεια αναφέρονται ενδεικτικά εκπρόσωποι των πιο χαρακτηριστικών, για το γένος, ομάδων διτερπενίων:

Αβιετικού τύπου διτερπένια



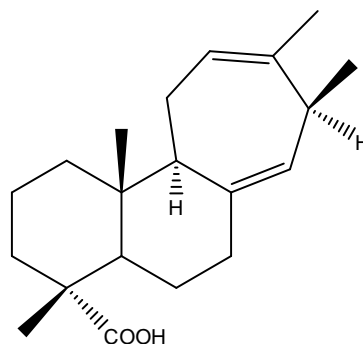
αβιετικό οξύ 7,13-διένιο

λεβοπιμαρικό οξύ 8(14),12-διένιο

παλουστρικό οξύ 8,13-διένιο

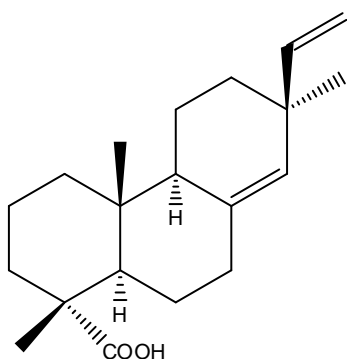
νεοαβιετικό οξύ 8(14),13(15),-διένιο

δεϋδροαβιετικό οξύ 8,11,13-τριένιο

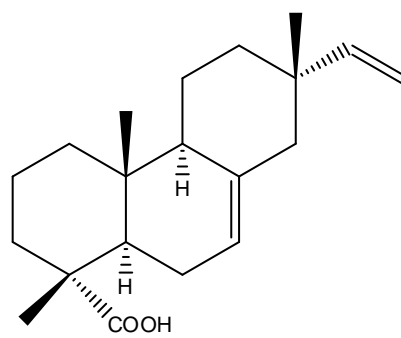


στρομπικό οξύ

Πιμαρικού τύπου διτερπένια

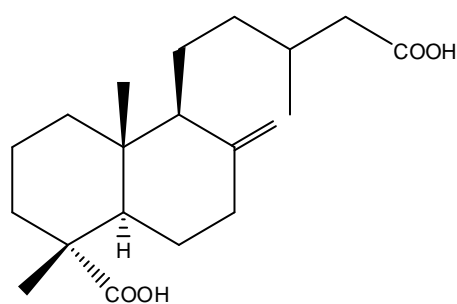


πιμαρικό οξύ

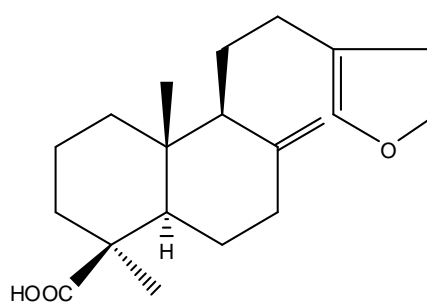


ισοπιμαρικό οξύ

Λαβδανικού τύπου διτερπένια

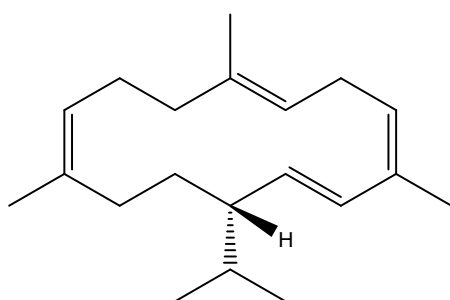


πινιφολικό οξύ

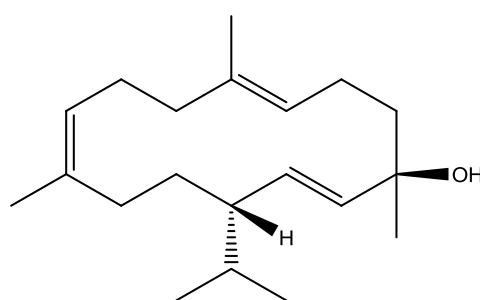


λαμπερτιανικό οξύ (αντιδανιελλικό οξύ)

Διτερπένια τύπου κεμβρανίου



θουνμπεργκένιο (κεμβρένιο)

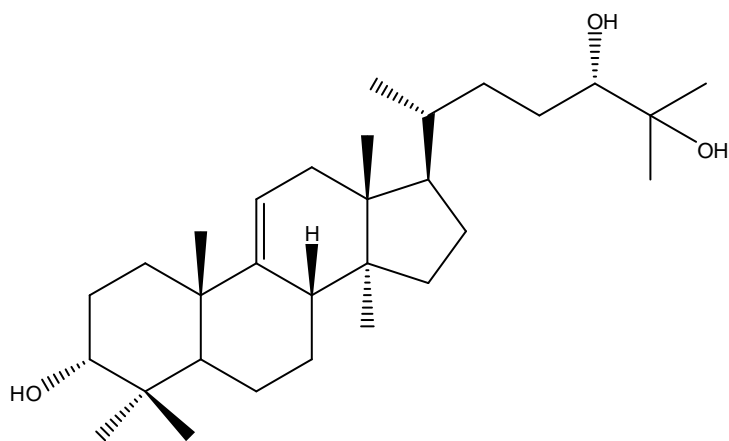


ισοκεμβρόλη

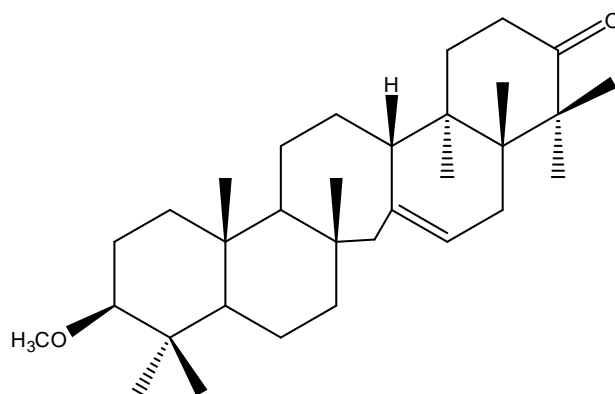
Τριτερπένια

Από το γένος *Pinus* έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα τριτερπενικά παράγωγα, κυρίως σκελετού σερατανίου και λανοστανίου. Ενδεικτικά αναφέρονται παρακάτω κάποια παραδείγματα:

Από το φλοιό της *Pinus luchuensis* έχει απομονωθεί το τριτερπένιο με σκελετό λανοστενίου λανοστ-9,(11)-εν-3α,24S,25-διόλη, καθώς και το σερατανικού τύπου παράγωγο 3β-μεθόξυσερατ-14-εν-21-όνη (Wada et al. 2001).



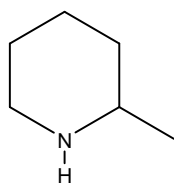
λανοστ-9,(11)-εν-3α,24S,25-διόλη



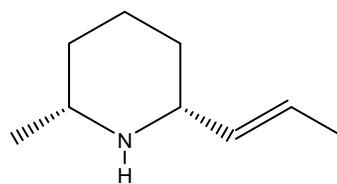
3β-μεθόξυσερατ-14-εν-21-όνη

1.2.4. Αλκαλοειδή

Ελάχιστες αναφορές υπάρχουν για την ύπαρξη αλκαλοειδών σε είδη του γένους *Pinus*. Μόνο στα φύλλα ορισμένων ειδών *Pinus* έχουν βρεθεί παράγωγα αλκαλοειδών, ενώ πρώτη φορά απομονώθηκαν από τα βελονοειδή φύλλα της *Pinus sabiniana* οι εξής δύο πτητικές βάσεις (Hegnauer 1962, Tawara et al. 1993):



α-πιπεκολίνη



(-)-πινιδίνη

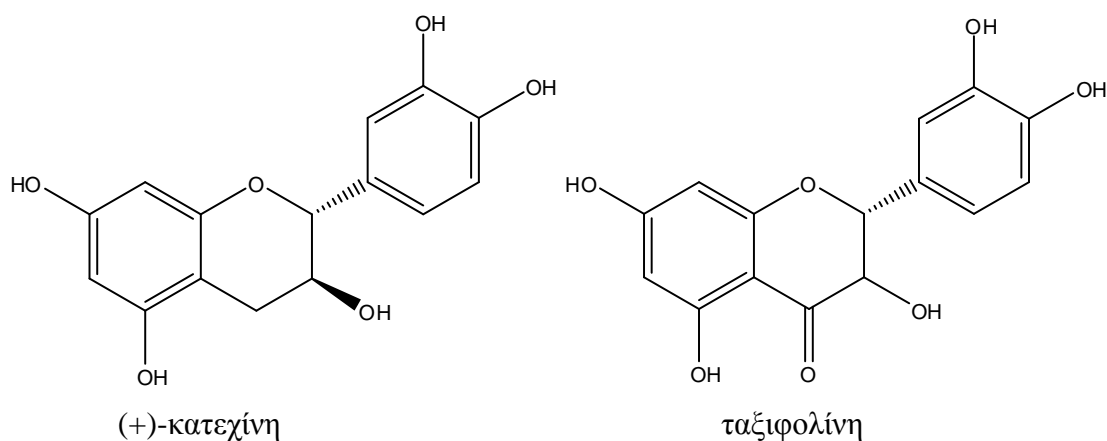
1.3. Βιολογικές δράσεις

Στο παρελθόν έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλα σκευάσματα με βάση την Πεύκη στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Κονιοποιημένος ο φλοιός έχει βρει εφαρμογή ως θεραπευτικό μέσο στην αντιμετώπιση του Λύκου, καθώς και στη θεραπεία ελκών ευαίσθητου δέρματος, ενώ εισπνοή του καπνού του φλοιού προκαλεί αποβολές σε εγκύους. Εάν καταποθεί προκαλεί διάρροια, αλλά επίσης βοηθά και στην αποβολή του ουρικού οξέος. Κατάπλασμα των φύλλων της Πεύκης επάγουν την επούλωση πληγών και εμποδίζουν το σχηματισμό φλεγμονής. Επιπλέον τα πολτοποιημένα φύλλα της έχουν χρησιμοποιηθεί ως στοματικό διάλυμα στην καταπράυνση οδονταλγίας (Berendes 1902).

Με βάση ποικίλες μελέτες με αντικείμενο τις φαρμακολογικές δράσεις ειδών του γένους *Pinus*, αυτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

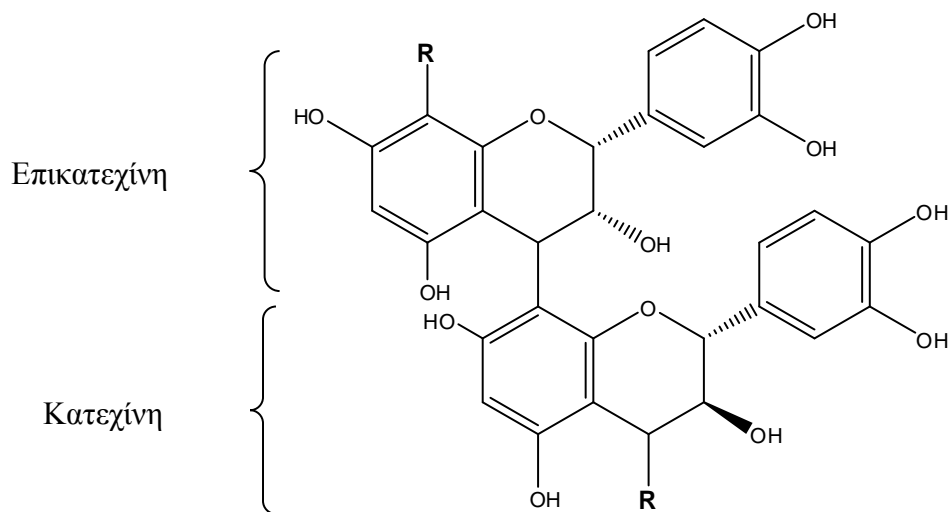
1.3.1. Αντιοξειδωτική δράση

Το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον εύρεσης νέων αντιοξειδωτικών παραγόντων ιδιαίτερα φυσικής προέλευσης, έχει οδηγήσει πολλούς ερευνητές στην επεξεργασία πιθανών φυσικών πηγών αντιοξειδωτικών, όπως είναι ο φλοιός ειδών του γένους *Pinus*. Κυριότερα συστατικά του φλοιού είναι τα φαινολικά παράγωγα κατεχίνη και ταξιφολίνη, τα οποία εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Yesil-Celictas et al. 2009):



Αν και η χρήση του φλοιού χρονολογείται από την αρχαιότητα, μόλις πρόσφατα βρήκε ευρεία εφαρμογή στον τομέα της διατροφής και της ιατρικής.

Το πλέον γνωστό παρασκεύασμα με βάση το εκχύλισμα από το φλοιό Πεύκης είναι το **Pycnogenol®**. Πρόκειται για το σταθεροποιημένο εκχύλισμα του φλοιού του είδους *Pinus maritima*, η σύσταση του οποίου χαρακτηρίζεται από την παρουσία προκυανιδινών και φαινολικών οξέων, καθώς και από ένα μίγμα φλαβονοειδών. Έρευνες έχουν δείξει ότι τα συστατικά του σκεύασματος εμφανίζουν υψηλή βιοδιαθεσιμότητα, αλλά και ότι το μίγμα τους είναι δραστικότερο συγκριτικά με τα απομονωμένα συστατικά του. Έχει αναφερθεί ότι το σταθεροποιημένο αυτό εκχύλισμα έχει ευεργετικές δράσεις σε περιπτώσεις καρδιαγγειακών προβλημάτων, όπως αγγειοδιασταλτική δράση, την ικανότητα να αναστέλλει το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ΜΕΑ) καθώς και να ενισχύει τη μικροκυκλοφορία αυξάνοντας τη διαπερατότητα των τριχοειδών. Σύμφωνα με έρευνες ο μηχανισμός δράσης των θεραπευτικών αυτών αποτελεσμάτων σε κυτταρικό επίπεδο σχετίζεται με την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των συστατικών του μίγματος και συγκεκριμένα με την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν οξυγονούχες και αζωτούχες ελεύθερες ρίζες. Ιδιαίτερα τα ολιγομερή φαινολικά παράγωγα φαίνεται να έχουν τη μεγαλύτερη ικανότητα εκκαθάρισης των ελευθέρων ριζών. Παρακάτω φαίνονται οι βασικοί δομικοί λίθοι των μορίων αυτών:



Εκτός από την άμεση αντιοξειδωτική δράση, το σκεύασμα αυτό φαίνεται να δρα και έμμεσα προστατεύοντας την ενδογενή βιταμίνη Ε και τη γλουταθειόνη, φυσικά αντιοξειδωτικά του οργανισμού, από το οξειδωτικό στρες. Επιπλέον το Pycnogenol® ρυθμίζει το μεταβολισμό του ΝΟ στα ενεργοποιημένα μακροφάγα αποικοδομώντας τις ελεύθερες ρίζες του. Επιπρόσθετα δρα ανασταλτικά στην iNOS συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου. Στην ίδια εργασία έχει αναφερθεί, πως συστατικά του

εκχυλίσματος προσδένονται σε πρωτεΐνες μεταβάλλοντας την αλλοστερική τους διάταξη και ως εκ τούτου τροποποιούν τη λειτουργικότητα ενζύμων και πρωτεϊνών που παίρνουν μέρος στα μεταβολικά μονοπάτια (Packer et al. 1999).

Οι Yesil-Celictas et al. (2009) σύγκριναν το ολικό φαινολικό φορτίο του φλοιού από τέσσερα είδη Πεύκης (*P. brutia*, *P. pinea*, *P. nigra* και *P. sylvestris*) και την αντιοξειδωτική δράση αυτών με σκοπό τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με το σταθεροποιημένο εκχύλισμα **Pycnogenol**[®]. Τα εκχυλίσματα των *P. pinea* και *P. nigra* εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ικανότητα εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το εμπορικά πλέον γνωστό σταθεροποιημένο εκχύλισμα Pycnogenol[®] ήταν αυτό με την ασθενέστερη δραστηριότητα μεταξύ των δειγμάτων που εξετάστηκαν. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στη χαμηλότερη περιεκτικότητα φαινολικών παραγώγων στο σκεύασμα συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα.

Σύμφωνα με τους Kolayli et al. (2009) το αιθέριο έλαιο από τον φλοιό του *P. nigra* έδειξε επίσης μία μέτρια ικανότητα εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών.

Οι Zulaica-Villagomez et al. (2005) μέτρησαν το ολικό φορτίο σε φαινολικά παράγωγα από εκχυλίσματα διαφόρων ειδών Πεύκης και στη συνέχεια αξιολόγησαν την αντιοξειδωτική τους δράση. Όπως ήταν αναμενόμενο η περιεκτικότητα σε φαινολικά προϊόντα ήταν ανάλογη της αντιοξειδωτικής δράσης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει εντούτοις το γεγονός ότι το εκχύλισμα των νεαρών κώνων ήταν μακράν το πλουσιότερο σε φαινολικά συστατικά και παράλληλα το δραστηκότερο συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Συμπερασματικά η μελέτη αυτή έδειξε ότι η περιεκτικότητα σε φαινολικά παράγωγα καθώς και η αντιοξειδωτική δράση ακολουθεί την εξής φθίνουσα σειρά: πολύ νέοι κώνοι > φύλλα > νέοι κώνοι > φλοιός > γηραιότεροι κώνοι > ξύλο.

Επιπλέον αξίζει να αναφερθεί ότι η ελαιορητίνη της *P. nigra* Arn. subsp. *pallsiana* (Lamb.) Holmboe εμφάνισε ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από τη βιταμίνη E σε όλες τις δόσεις, στις οποίες διεξήχθη ο έλεγχος, παρεμποδίζοντας την λιπιδική υπεροξείδωση του λινολεϊκού οξέος

Σύμφωνα με τους Guri et al. (2006), οι οποίοι εξέτασαν το ολικό φαινολικό φορτίο διαφόρων φυτικών τμημάτων έξι ειδών *Pinus* και κατόπιν μέτρησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα των αντίστοιχων δειγμάτων, τη μεγαλύτερη δραστηριότητα την εμφάνισαν τα ξηρά φύλλα της *P. brutia* ακολουθούμενη από το φλοιό της *P. pinea*.

Η αντιοξειδωτική δράση ενός μεταβολίτη ή και ενός μίγματος μεταβολιτών (Pycnogenol[®]) είναι δυνατόν να έχει κατ' επέκταση και άλλες φαρμακολογικές δράσεις σε ένα σύστημα, εφ' όσον το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε ορισμένες

περιπτώσεις σε αθηροσκλήρωση, επαγωγή της διαδικασίας της γήρανσης, καρκίνο, φλεγμονώδεις αντιδράσεις καθώς και σε άλλες εκφυλιστικές ασθένειες.

1.3.2. Αντιμικροβιακή δράση

Είναι ήδη γνωστό ότι τα ρητινικά οξέα διαθέτουν αντιβακτηριακές ιδιότητες και για αυτόν το λόγο έχουν αξιοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική ως αντισηπτικά.

Από τους νεαρούς κώνους της *P. nigra* έχουν απομονωθεί τα διτερπενικά οξέα ισοπιμαρικό και αβιετικό, τα οποία εξετάστηκαν ως προς τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες κατά στελεχών *Staphylococcus aureus* ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (multidrug resistant) και ανθεκτικών ειδικά στη μεθικιλίνη (methicillin resistant). Διαπιστώθηκε ότι και οι δύο μεταβολίτες έχουν υψηλή δραστηριότητα κατά των στελεχών που ελέγχθηκαν. Επιπρόσθετα ελέγχθηκε εάν η παρουσία των ρητινικών αυτών οξέων ενισχύει τη δράση των πρότυπων αντιβιοτικών κατά τη συγχορήγησή τους, κάτι το οποίο δεν ισχύει (Smith et al. 2005).

Επιπλέον ελέγχθηκε η αντιβακτηριακή και η αντιμυκητιασική δράση των οργανικών εκχυλισμάτων διαφόρων τμημάτων από τα είδη *P. brutia* και *P. nigra*. Κανένα από τα εξετασθέντα δείγματα δεν εμφάνισε αντιμυκητιασική δράση ενώ το Gram (-) βακτήριο *Escherichia coli* ήταν ανθεκτικό επίσης σε όλα τα δείγματα εκτός από το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα των κώνων της *P. nigra*. Ωστόσο, όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν είχαν από καλή έως μέτρια δράση κατά των υπολοίπων βακτηριακών στελεχών που ελέγχθηκαν (Digrak et al. 1999).

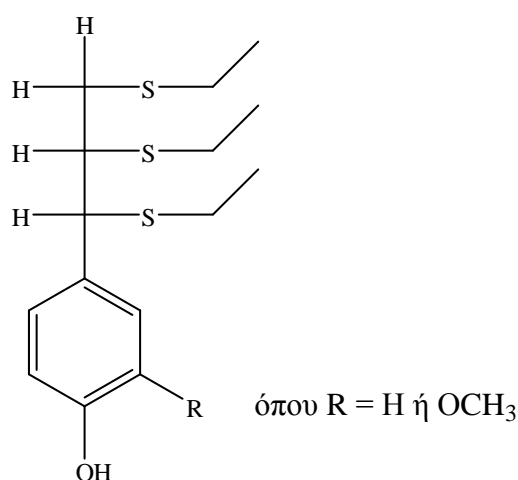
Οι Eberhardt et al. (1994) απέδειξαν ότι τα πολυμερή των προανθοκυανιδινών προσφέρουν στους ώριμους κώνους φυσική άμυνα έναντι των μυκητιασικών προσβολών.

Οι Kolayli et al. (2009), εξέτασαν το αιθέριο έλαιο του φλοιού διαφόρων ειδών δένδρων, μεταξύ αυτών και της *P. nigra*, το οποίο εμφάνισε ισχυρή αντιμυκητιασική δράση ενάντια στο μύκητα *Candida tropicalis*.

Σύμφωνα με τους Caetano da Silva et al. (2014) η ελαιορητινή της *P. elliottii* όπως και το κύριο συστατικό της, το δεϋδροαβιετικό οξύ, εκδήλωσαν *in vitro* δράση απέναντι σε ενδοδοντικά αναερόβια βακτήρια.

1.3.3. Αντιική δράση

Σύμφωνα με την εργασία των Eberhardt et al. (1996) φαινυλοπροπανοειδή παράγωγα, που βρίσκονται στους ώριμους κώνους της *P. nigra* εμφανίζουν δράση κατά του ιού HIV. Συγκεκριμένα παρεμποδίζεται ο ιός να ασκήσει την επιβλαβή του δράση στα κύτταρα-στόχους του, τα T₄ λεμφοκύτταρα. Το κλάσμα που εμφάνισε αυτή τη δράση παραλήφθηκε από τους ιστούς των κώνων, αφού αυτοί είχαν υποστεί εκχύλιση με αιθανόλη και νερό, κατόπιν προσθήκης διαλύματος NaOH και παραλαβής του υπερκείμενου διαλύματος. Το διάλυμα αυτό υπέστη υδρόλυση με θειικό οξύ, όπου διασπάστηκαν οι β-O-4 δεσμοί των πολυμερών της λιγνίνης και προέκυψαν μονομερή παράγωγα του τύπου:



Ο μηχανισμός δράσης, σύμφωνα με τον οποίο εικάζεται ότι δρουν αυτής της κατηγορίας τα μόρια συμπεριλαμβάνει σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ των φαινυλοπροπανοειδών παραγώγων της λιγνίνης του ξύλου και πρωτεϊνών (Haslam et al. 1989).

1.3.4. Αντιφλεγμονώδης-αναλγητική δράση

Σύμφωνα με τους Packer et al. (1999) το εμπορικά γνωστό εκχύλισμα του φλοιού *P. maritima* εμφανίζει εκτός της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδη δράση.

Οι Cho et al. (2000) αναφέρουν ότι το σύνθετο μίγμα των φλαβονοειδών που συνιστούν το εκχύλισμα του φλοιού της *P. maritima* έχει την ιδιότητα να αναστέλλει τη γονιδιακή έκφραση και παραγωγή της ιντερλευκίνης 1β, μίας κυττοκίνης που παίζει βασικό ρόλο στην εκδήλωση της φλεγμονής.

Επίσης η ρητίνη που εκρέει από το φλοιό της *P. nigra* subsp. *pallsiana* έχει

εμφανίσει *in vivo* αναλγητική δράση (Gülcin et al. 2003).

Επιπλέον, το υδατικό εκχύλισμα των φύλλων της *P. massoniana* επιτυγχάνει σημαντική αύξηση στον ουδό του πόνου σε ποντίκια (Li et al. 2013).

1.3.5. Αντιθρομβωτική δράση

Τα αιμοπετάλια είναι τα μικρότερα συστατικά της κυκλοφορίας του αίματος. Είναι απύρρηνα κύτταρα με σχήμα δισκοειδές όταν είναι αδρανή, ενώ παρουσία κάποιου ενεργοποιητή, όπως του αραχιδονικού οξέος, μετασχηματίζονται σε ακανθώδη σφαιρίδια. Αυτά συνδέονται με το ινωδογόνο, συσσωρεύονται και απελευθερώνουν το περιεχόμενο ενδοκυτταρικών κοκκίων όπως η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και η σεροτονίνη. Το ADP και ένα παράγωγο του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος (AA), το θρομβοξάνιο A_2 (TXA₂) επάγουν την περαιτέρω συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Παρατηρείται θετική ανατροφοδότηση στη δράση των ουσιών αυτών και ως εκ τούτου η συσσώρευση των αιμοπεταλίων μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια αυτοκαταλυτική διαδικασία.

Σύμφωνα με τους Tognolini et al. (2006) το αιθέριο έλαιο της *P. nigra* εμφανίζει καλή *in vitro* ανασταλτική δράση κατά της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, όταν αυτή επάγεται από AA και από έναν αγωνιστή TXA₂. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι το αιθέριο έλαιο της *P. nigra* βρέθηκε δραστικότερο έναντι του ακετυλοσαλικυλικού οξέος ως προς την αναστολή σχηματισμού θρόμβων.

1.3.6. Κυτταροτοξική δράση

Ορισμένες αναφορές υπάρχουν επίσης σχετικά με την κυτταροτοξική ικανότητα παραγόντων, που προέρχονται από διάφορα είδη του γένους *Pinus*.

Σύμφωνα με τους Cui et al. (2005) το εκχύλισμα του φλοιού της *P. massoniana* είχε *in vitro* ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη ηπατικών καρκινικών κυττάρων, ενώ έδειξε ελαφρώς επαγωγική δράση στην ανάπτυξη των κανονικών κυττάρων. Συγκρινόμενο με τον ευρέως χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό παράγοντα cisplatin, το εκχύλισμα του φλοιού της *P. massoniana* εμφάνισε υψηλότερη δραστικότητα κατά του συγκεκριμένου καρκινικού τύπου.

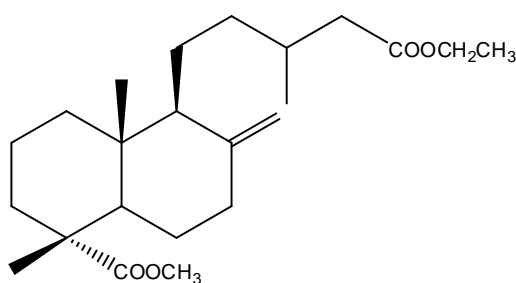
Στην εργασία των Hsu et al. (2005) μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση παράλληλα με την κυτταροτοξική των υδατικών εκχυλισμάτων των φύλλων, του

φλοιού και των θηλυκών κώνων της *P. morrisonicola*. Το υδατικό εκχύλισμα των φύλλων εμφάνισε αφ' ενός τη μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης υπεροξειδικών ανιόντων και αναστολής του σχηματισμού τους, αφ' ετέρου το υψηλότερο ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης λευχαιμικών καρκινικών κυττάρων της σειράς U937.

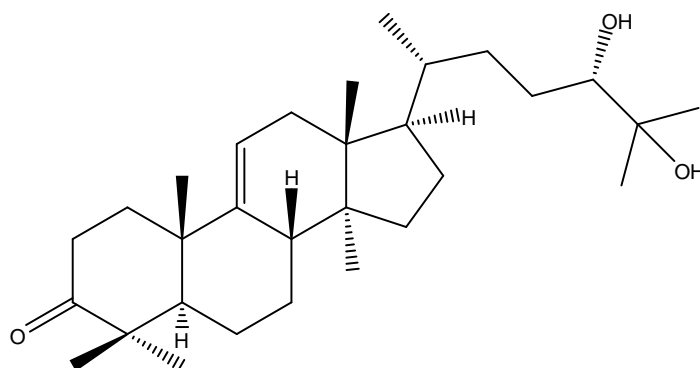
Εξαιρετικά ισχυρή κυτταροτοξική δράση έχει επίσης αναφερθεί για το υδατοακετονικό εκχύλισμα σπερμάτων της *P. sibirica* έναντι του ογκογόνου νευροβλαστώματος SH-SY5Y (Lantto et. al. 2009).

Σύμφωνα με τους Yi et al. (2015) το πολυφαινολικό κλάσμα των κώνων της *P. sibirica* επέδειξε σημαντική κυτταροστατική δράση έναντι των κυτταρικών σειρών LoVo, HT29 και HeLa.

Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι, σημαντική κυτταροτοξική δράση έναντι των σειρών HeLa, SK-N-SH και BEL-7402 εμφάνισε το λαβδανικού τύπου διτερπένιο, που φαίνεται παρακάτω (Wang et al. 2008):



Από το φλοιό της *Pinus luchuensis* απομονώθηκε ο αναστολέας της τοποϊσομεράσης II, 3-οξολανοστ-9(11)-εν-24S,25-διόλη (Wada et al. 2001).



1.3.7. Ακαρεοκτόνος δράση

Οι Macchioni et al. (2002) ανέλυσαν το αιθέριο έλαιο από τους κλάδους τεσσάρων ειδών *Pinus* (*P. pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster*, και *P. nigra*) και εξέτασαν την ακαρεοκτόνο δράση τους απέναντι στο παράσιτο που αναπτύσσεται συνήθως στα αποθηκευμένα τρόφιμα, *Tyrophagus putrescentiae*. Όλα τα εξετασθέντα δείγματα επέδειξαν υψηλή δραστηριότητα, το αιθέριο έλαιο ωστόσο της *P. pinea* καθώς και δύο από τα κύρια συστατικά του, τα μονοτερπένια 1,8-κινεόλη και λιμονένιο, εμφάνισαν την ισχυρότερη δράση.

1.4. Σκοπός μελέτης

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως στόχο την απομόνωση και την ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών από τους κώνους της *P. heldreichii*, τα βελονοειδή φύλλα της *P. nigra* subsp. *nigra* και από το φλοιό της *P. pinea*, καθώς και τη συγκριτική χημική μελέτη των αιθερίων ελαίων των βελονοειδών φύλλων 54 taxa του γένους *Pinus*, συλλεγμένων είτε από φυσικές θέσεις, είτε από βοτανικούς κήπους.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Οργανολογία

Τα φάσματα NMR ελήφθησαν σε φασματογράφους Bruker AC 200 και Bruker DRX 400. Τα 2D NMR πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τις τυποποιημένες ακολουθίες παλμών Bruker. Για τη λήψη όλων των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκε CDCl_3 , εκτός και αν αναφέρεται διαφορετικά. Οι ^1H και ^{13}C NMR χημικές μετατοπίσεις δίνονται στη κλίμακα δ (ppm) λαμβάνοντας ως αναφορά την κορυφή του CHCl_3 στα 7,24 και 77,0 ppm, αντίστοιχα, ενώ οι σταθερές σύζευξης J (Hz) δίνονται σε παρενθέσεις.

Τα φάσματα μάζας χαμηλής ευκρίνειας καταγράφηκαν σε φασματογράφο μάζας Hewlett-Packard 5973 με μέθοδο ιονισμού τον βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (EIMS) ή σε φασματογράφο μάζας Thermo Electron Corporation DSQ με μέθοδο ιονισμού τον θετικό χημικό ιονισμό χρησιμοποιώντας CH_4 ως το αέριο ιονισμού (PCIMS).

Τα φάσματα μάζας υψηλής ευκρίνειας (HRMS), με μέθοδο ιονισμού τον ηλεκτροσπασμό (ESIMS), καταγράφηκαν σε φασματογράφο μάζας Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos.

Τα φάσματα UV καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-160A χρησιμοποιώντας κυψελίδα πάχους 1 cm.

Η ειδική στροφική ικανότητα ($[\alpha]_D$) μετρήθηκε σε πολωσίμετρο Perkin-Elmer model 341 χρησιμοποιώντας κυψελίδα μήκους 1 dm σε θερμοκρασία 20°C.

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί HPLC πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο CECIL 1100 Series Liquid Chromatography Pump με μονή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και ανιχνευτή RI GBC LC-1240 και Agilent 1100 series RI Detector.

Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς HPLC ήταν οι ακόλουθες: (i) στήλη κανονικής φάσης διαστάσεων 25 cm x 10 mm (Econosphere 100 SIL 10u), (ii) στήλη κανονικής φάσης διαστάσεων 25 cm x 10 mm (Econosphere 100 SIL 10u), (iii) στήλη κανονικής φάσης διαστάσεων 25 cm x 8 mm (Kromasil 100 SIL 5 μm), (iv) στήλη κανονικής φάσης διαστάσεων 25 cm x 10 mm (Nucleosil SIL 50-7), (v) στήλη κανονικής φάσης διαστάσεων 25 cm x 22 mm (Techsil 10 Silica) (vi) στήλη αντίστροφης φάσης διαστάσεων 25 cm x 8 mm (Kromasil 100 C18 5 μm), (vii) στήλη αντίστροφης φάσης διαστάσεων 25 cm x 10 mm (Econosphere C18 10u).

Για τις αναλύσεις GC-MS χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος Hewlett-Packard 6890, εξοπλισμένος με τριχοειδή στήλη HP-5MS (30 m x 0,25 mm, film thickness 0,25 μm)

ή χειρόμορφη στήλη Cydex B συνδεδεμένος σε σειρά με φασματογράφο μάζας Hewlett-Packard 5973. Η μέθοδος ιονισμού ήταν ο βομβαρδισμός με δέσμη ηλεκτρονίων στα 70 eV (EIMS). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε το αδρανές αέριο He (2 mL/min).

Το θερμικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις των αιθερίων ελαίων που πραγματοποιήθηκαν μέσω της στήλης HP-5MS είχε θερμοκρασία έναρξης 60°C, η οποία με ρυθμό αύξησης 3°C/min, έφτανε 300°C όπου και παρέμενε σταθερή για 10 min. Η θερμοκρασία εισόδου ήταν 200°C και η θερμοκρασία ανίχνευσης 250°C. Το θερμικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις με την στήλη Cydex B είχε ως σημείο έναρξης τους 65°C, σταθερά για 10 min και έφτανε τους 75°C με ρυθμό 1°C/min, ακολούθως με ρυθμό 2°C/min έφτανε τους 105°C, από όπου με ρυθμό 5°C/min έφτανε τους 260°C, όπου και παρέμενε για 14 min.

Η ταυτοποίηση των χημικών συστατικών έγινε με σύγκριση του χρόνου ανάσχεσης κάθε συστατικού σε σχέση με τους χρόνους ανάσχεσης πρότυπων ενώσεων και τη μελέτη των φασμάτων μάζας με τη βοήθεια βιβλιοθηκών (Wiley library spectra, NIST/NBS) και δεδομένων της βιβλιογραφίας (Adams, 2007). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών βασίστηκε στον ολικό αριθμό των θραυσμάτων των συστατικών, όπως αυτά ανιχνεύτηκαν από τον φασματογράφο μάζας.

Η συμπύκνωση των υπολειμμάτων και των κλασμάτων υπό κενό έγινε σε συσκευή ταχείας εξάτμισης διαλύτη με μηχανικά περιστρεφόμενη φιάλη απόσταξης και εφαρμογή ελαττωμένης πίεσης τύπου BÜCHI Rotavapor R-200 σε θερμοκρασία έως 38°C.

Οι στερεοχημικές διαμορφώσεις δομής ελάχιστης ενέργειας σχεδιάστηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα μοριακής μοντελλοποίησης HyperChem 7.0 (Hypercube, Inc.).

2.2. Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί υγρής χρωματογραφίας με υποβοήθηση κενού πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης της στήλης γέλη πυριτίου κανονικής φάσης Kieselgel 60H της εταιρείας Merck.

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

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί εκχύλισης στερεής φάσης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας προκατασκευασμένες στήλες γέλης πυριτίου κανονικής (SiOH) ή αντίστροφης (C₁₈) φάσης τύπου SEP-PAK silica cartridge for rapid sample preparation της

εταιρείας Waters Associates ή Chromafix της εταιρείας Macherey-Nagel.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός με παρασκευαστική χρωματογραφία επι λεπτής στοιβάδας πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας γυάλινες πλάκες με επίστρωση κυτταρίνης.

Οι χρωματογραφικοί προσδιορισμοί TLC πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πλάκες αλουμινίου με επίστρωση Kieselgel 60 G/UV₂₅₄ (20 x 20 cm, πάχους 0,2 mm) της εταιρείας macherey-Nagel. Μετά την ανάπτυξη τους σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών, οι πλάκες ελέγχονταν σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV) στα 254 nm και 365 nm και οι κηλίδες ανιχνεύονταν ύστερα από ψεκασμό με διάλυμα 5% H₂SO₄ σε μεOH και θέρμανση της πλάκας στους 100°C για περίπου 2min.

Οι διαλύτες cHex, EtOAc και CH₂Cl₂ ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences, οι οποίοι πριν από τη χρήση τους αποστάχθηκαν. Οι διαλύτες μεOH, Me₂CO και EtOH ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Οι διαλύτες n-Hex και CHCl₃ ήταν καθαρότητας HPLC της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Όλοι οι διαλύτες πριν από τη χρήση τους σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς HPLC διηθήθηκαν υπό κενό και απαερώθηκαν.

Για τη λήψη των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκε CDCl₃ χωρίς εσωτερικό πρότυπο των εταιρειών Deutero GmbH ή Aldrich-Sigma Chemical Company, και C₆D₆ και CD₃OD χωρίς εσωτερικό πρότυπο της εταιρείας Deutero GmbH.

Το H₂O που χρησιμοποιήθηκε ήταν απεσταγμένο που στη συνέχεια διηθήθηκε μέσω συστήματος ρητινών.

2.3. Συλλογή φυτικού υλικού

Πηγή απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη αποτέλεσαν οι κώνοι του είδους *P. heldreichii*, που συλλέχθηκαν το Μάρτιο του 2010 από τη Β. Πίνδο (Μηλιά, νομός Ιωαννίνων), δείγμα βελόνων του οργανισμού *P. nigra* subsp. *nigra*, που συλλέχθηκε τον Ιούνιο του 2007 από το Βοτανικό Κήπο της Μαδρίτης, δείγμα φλοιού του οργανισμού *Pinus pinea*, που συλλέχθηκε το Νοέμβριο του 2007 από την περιοχή του Σχοινιά Ν. Αττικής.

Η παραλαβή των αιθερίων ελαίων πραγματοποιήθηκε κατόπιν συλλογής νωπών βελονοειδών φύλλων από 54 *taxa* του γένους *Pinus*, είτε από φυσικές θέσεις, είτε από διάφορους βοτανικούς κήπους, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1 Τα είδη που μελετήθηκαν, σύμφωνα με τη βοτανική τους ταξινόμηση (Gernandt et al. 2005) και πληροφορίες συλλογής

Taxon	Κωδικός	Τόπος & Περίοδος Συλλογής
<u>Υπογένος <i>Pinus</i></u>		
<u>Section <i>Pinus</i></u>		
<u>Subsection <i>Pinaster</i></u>		
1. <i>P. brutia</i>	PVF3A	Υμηττός, Αθήνα, Οκτώβρης 2006
2. <i>P. canariensis</i>	PVF3B	Εθνικός Κήπος Αθηνών, Οκτώβρης 2006
3. <i>P. halepensis</i>	PVF3C	Υμηττός, Αθήνα, Οκτώβρης 2006
4. <i>P. heldreichii</i>	PVF3F	Πίνδος, Μέτσοβο, Οκτώβρης 2006
5. <i>P. pinaster</i>	PVF7D	Βασιλικός Βοτανικός Κήπος της Μαδρίτης, Ιούνιος 2007
6. <i>P. pinea</i>	PVF3G	Σχινιάς, Εθνικό Πάρκο Μαραθώνα, Οκτώβρης 2006
7. <i>P. roxburghii</i>	PVF4F	Βασιλικοί Βοτανικοί Κήποι του Σίδνεϋ, Φεβρουάριος 2007
<u>Section <i>Pinus</i></u>		
<u>Subsection <i>Pinus</i></u>		
8. <i>P. densiflora</i>	PVF7I	Βασιλικός Βοτανικός Κήπος της Μαδρίτης, Ιούνιος 2007
9. <i>P. massoniana</i>	PVF4D	Βασιλικοί Βοτανικοί Κήποι του Σίδνεϋ, Φεβρουάριος 2007
10. <i>P. mugo</i>	PVF5E	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
11. <i>P. mugo</i> var. <i>prostrata</i>	PVF5F	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
12. <i>P. mugo</i> var. <i>pumilio</i>	PVF5G	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
13. <i>P. nigra</i> subsp. <i>caramanica</i>	PVF6G	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
14. <i>P. nigra</i> subsp. <i>laricio</i>	PVF5H	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
15. <i>P. nigra</i> subsp. <i>nigra</i>	PVF7F	Βασιλικός Βοτανικός Κήπος της Μαδρίτης, Ιούνιος 2007
16. <i>P. nigra</i> subsp. <i>salzmanii</i>	PVF5I	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007

Taxon	Κωδικός	Τόπος & Περίοδος Συλλογής
17. <i>P. sylvestris</i>	PVF5M	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
18. <i>P. sylvestris</i> subsp. <i>scotica</i>	PVF1M	Βασιλικός Βοτανικός Κήπος του Εδιμβούργου, Ιανουάριος 2006
19. <i>P. tabuliformis</i>	PVF7E	Βασιλικός Βοτανικός Κήπος της Μαδρίτης, Ιούνιος 2007
20. <i>P. taiwanensis</i>	PVF5N	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
21. <i>P. thunbergii</i>	PVF9C	Βοτανικός Κήπος της Ναπολι, Σεπτέμβρης 2007
<u>Section Trifoliae</u>		
<u>Subsection Australes</u>		
22. <i>P. attenuata</i>	PVF3E	Πάρνηθα, Αθήνα, Οκτώβρης 2006
23. <i>P. elliottii</i>	PVF4C	Βασιλικοί Βοτανικοί Κήποι του Σίδνεϋ, Φεβρουάριος 2007
24. <i>P. muricata</i>	PVF1I	Βασιλικός Βοτανικός Κήπος του Εδιμβούργου, Ιανουάριος 2006
25. <i>P. patula</i>	PVF9B	Βοτανικός Κήπος της Ναπολι, Σεπτέμβρης 2007
26. <i>P. radiata</i>	PVF3H	Πάρνηθα, Αθήνα, Οκτώβρης 2006
27. <i>P. rigida</i>	PVF2M	Βοτανικός Κήπος και Δενδρώνας του Γκράιφσβαλντ, Ιούνιος 2006
28. <i>P. teocote</i>	PVF5O	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
<u>Section Trifoliae</u>		
<u>Subsection Contortae</u>		
29. <i>P. banksiana</i>	PVF8A	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Ελσίνκι, Αύγουστος 2007
30. <i>P. contorta</i> var. <i>contorta</i>	PVF1E	Βασιλικός Βοτανικός Κήπος του Εδιμβούργου, Ιανουάριος 2006
31. <i>P. contorta</i> var. <i>latifolia</i>	PVF1F	Βασιλικός Βοτανικός Κήπος του Εδιμβούργου, Ιανουάριος 2006
32. <i>P. contorta</i> var. <i>murrayana</i>	PVF2C	Βοτανικός Κήπος και Δενδρώνας του Γκράιφσβαλντ, Ιούνιος 2006

Taxon	Κωδικός	Τόπος & Περίοδος Συλλογής
<u>Section Trifoliae</u>		
<u>Subsection Ponderosae</u>		
33. <i>P. coulteri</i>	PVF6C	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
34. <i>P. jefferyi</i>	PVF2F	Βοτανικός Κήπος και Δενδρώνας του Γκράιφσβαλντ, Ιούνιος 2006
35. <i>P. ponderosa</i>	PVF2K	Βοτανικός Κήπος και Δενδρώνας του Γκράιφσβαλντ, Ιούνιος 2006
36. <i>P. sabineana</i>	PVF5K	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
37. <i>P. torreyana</i>	PVF10A	Σαν Ντιέγκο (Torrey Pines State Natural Reserve), Ιούνιος 2010
<u>Υπογένος Strobis</u>		
<u>Section Parrya</u>		
<u>Subsection Balfourianae</u>		
38. <i>P. aristata</i>	PVF5A	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
<u>Section Parrya</u>		
<u>Subsection Cembroides</u>		
39. <i>P. cembroides</i>	PVF1D	Βασιλικός Βοτανικός Κήπος του Εδιμβούργου, Ιανουάριος 2006
40. <i>P. culminicola</i>	PVF1G	Βασιλικός Βοτανικός Κήπος του Εδιμβούργου, Ιανουάριος 2006
41. <i>P. monophylla</i>	PVF5C	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
<u>Section Quinquefoliae</u>		
<u>Subsection Gerardianae</u>		
42. <i>P. bungeana</i>	PVF5B	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
43. <i>P. gerardiana</i>	PVF5D	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
<u>Section Quinquefoliae</u>		
<u>Subsection Strobis</u>		

Taxon	Κωδικός	Τόπος & Περίοδος Συλλογής
44. <i>P. armandii</i>	PVF1A	Βασιλικός Βοτανικός Κήπος του Εδιμβούργου, Ιανουάριος 2006
45. <i>P. cembra</i>	PVF1C	Βασιλικός Βοτανικός Κήπος του Εδιμβούργου, Ιανουάριος 2006
46. <i>P. flexilis</i>	PVF6D	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
47. <i>P. koraiensis</i>	PVF2G	Βοτανικός Κήπος και Δενδρόνας του Γκράιφσβαλντ, Ιούνιος 2006
48. <i>P. monticola</i>	PVF1H	Βασιλικός Βοτανικός Κήπος του Εδιμβούργου, Ιανουάριος 2006
49. <i>P. parviflora</i>	PVF1K	Βασιλικός Βοτανικός Κήπος του Εδιμβούργου, Ιανουάριος 2006
50. <i>P. peuce</i>	PVF8C	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Ελσίνκι, Αύγουστος 2007
51. <i>P. pumila</i>	PVF2L	Βοτανικός Κήπος και Δενδρόνας του Γκράιφσβαλντ, Ιούνιος 2006
52. <i>P. strobiformis</i>	PVF8E	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Ελσίνκι, Αύγουστος 2007
53. <i>P. strobus</i>	PVF5L	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007
54. <i>P. wallichiana</i>	PVF6M	Βοτανικός Κήπος του Πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, Απρίλιος 2007

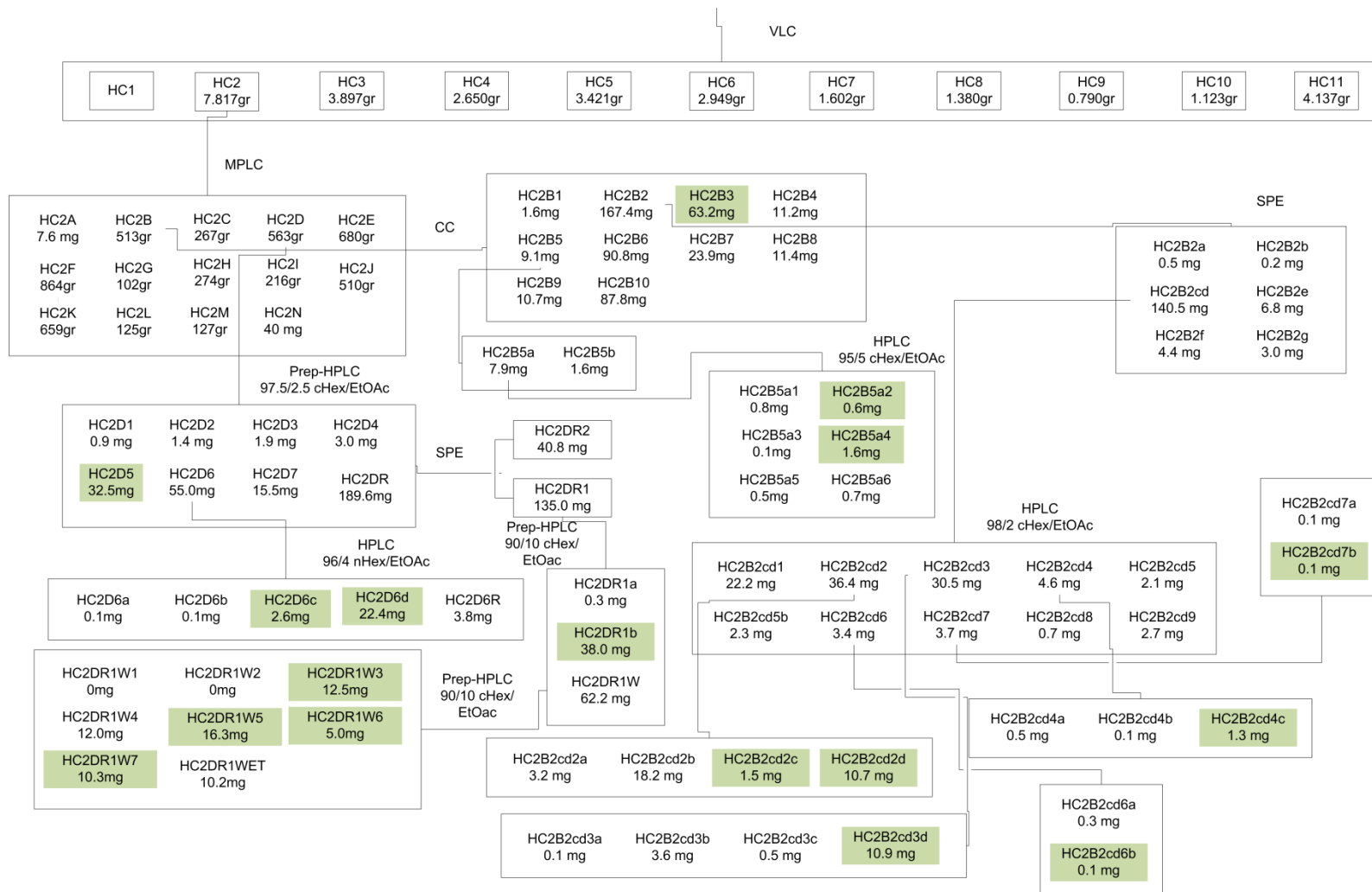
2.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών

2.4.1. Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το είδος *Pinus heldreichii*

Λεπτά κονιοποιημένοι κώνοι (365,0 gr) εκχυλίστηκαν εξαντλητικά σε θερμοκρασία δωματίου με μίγμα διαλυτών $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1). Μετά την εξάτμιση των διαλυτών προέκυψε σκούρο καφέ χρώματος υπόλειμμα, το βάρος του οποίου κατόπιν ξήρανσης σε ξηραντήρα ήταν 53,901 gr. Μέρος του ολικού εκχυλίσματος (31,0 gr) υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό σε στήλη υπό κενό, από όπου προέκυψαν 11 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα cHex , EtOAc και MeOH . Συνολικά παρελήφθησαν 30 κλάσματα, όγκου 300 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με χρωματογραφία TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 11 (Πίνακας 2). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR προκειμένου να αποκτηθεί μία γενική άποψη για τις κατηγορίες των ενώσεων που περιείχαν.

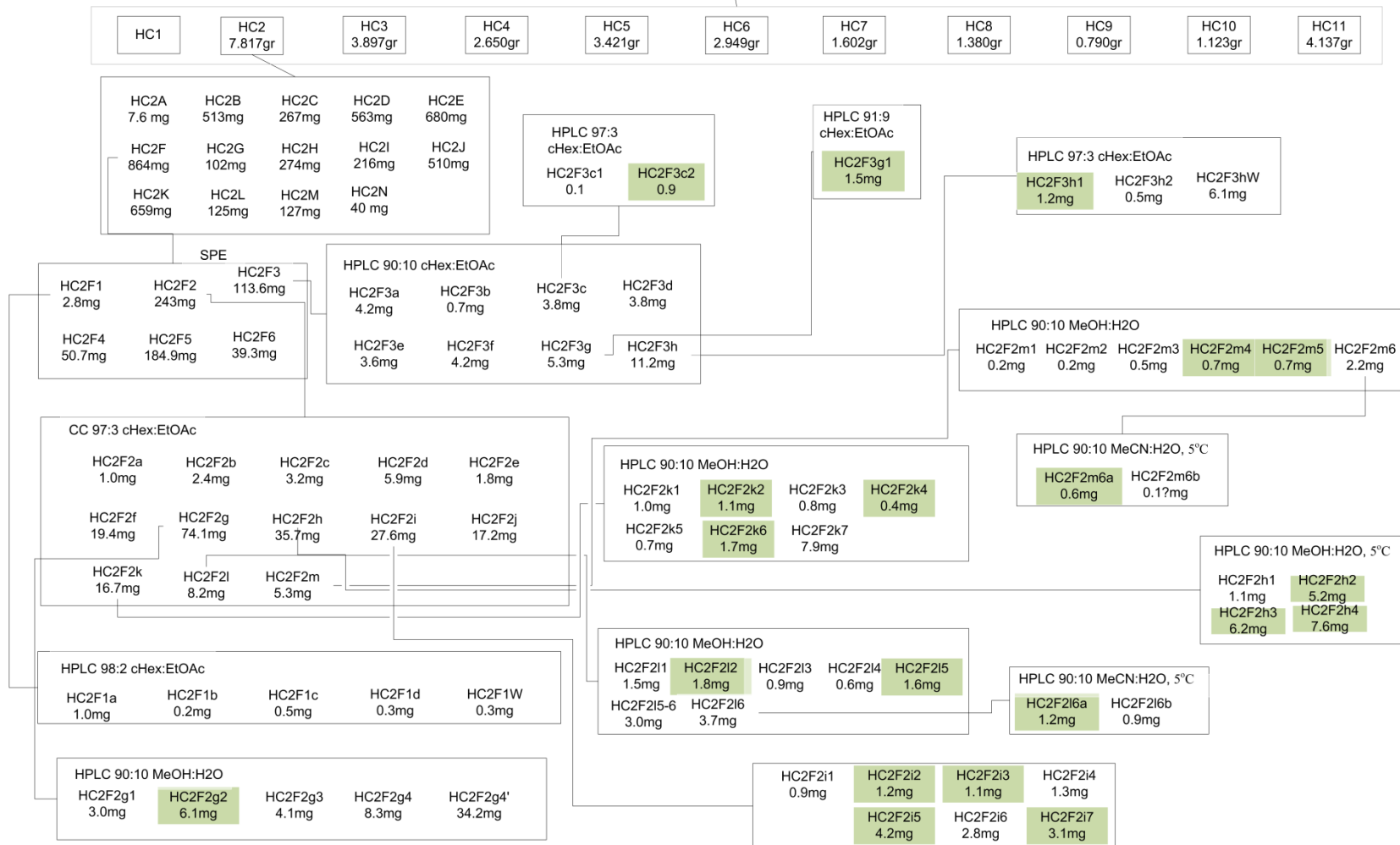
Η πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το υπόλειμμα PHC φαίνεται διαγραμματικά στις Εικόνες 11-16, όπου με πράσινο χρώμα συμβολίζονται οι γνωστοί μεταβολίτες, ενώ με κόκκινο τα νέα φυσικά προϊόντα.

Αρχικό εκχύλισμα κώνων ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{MeOH}$ 1:1) *Pinus heldreichii*



Εικόνα 11. Πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το υπόλειμμα PHC_Μέρος Ι.

Αρχικό εκχύλισμα κώνων ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{MeOH}$ 1:1) *Pinus heldreichii*

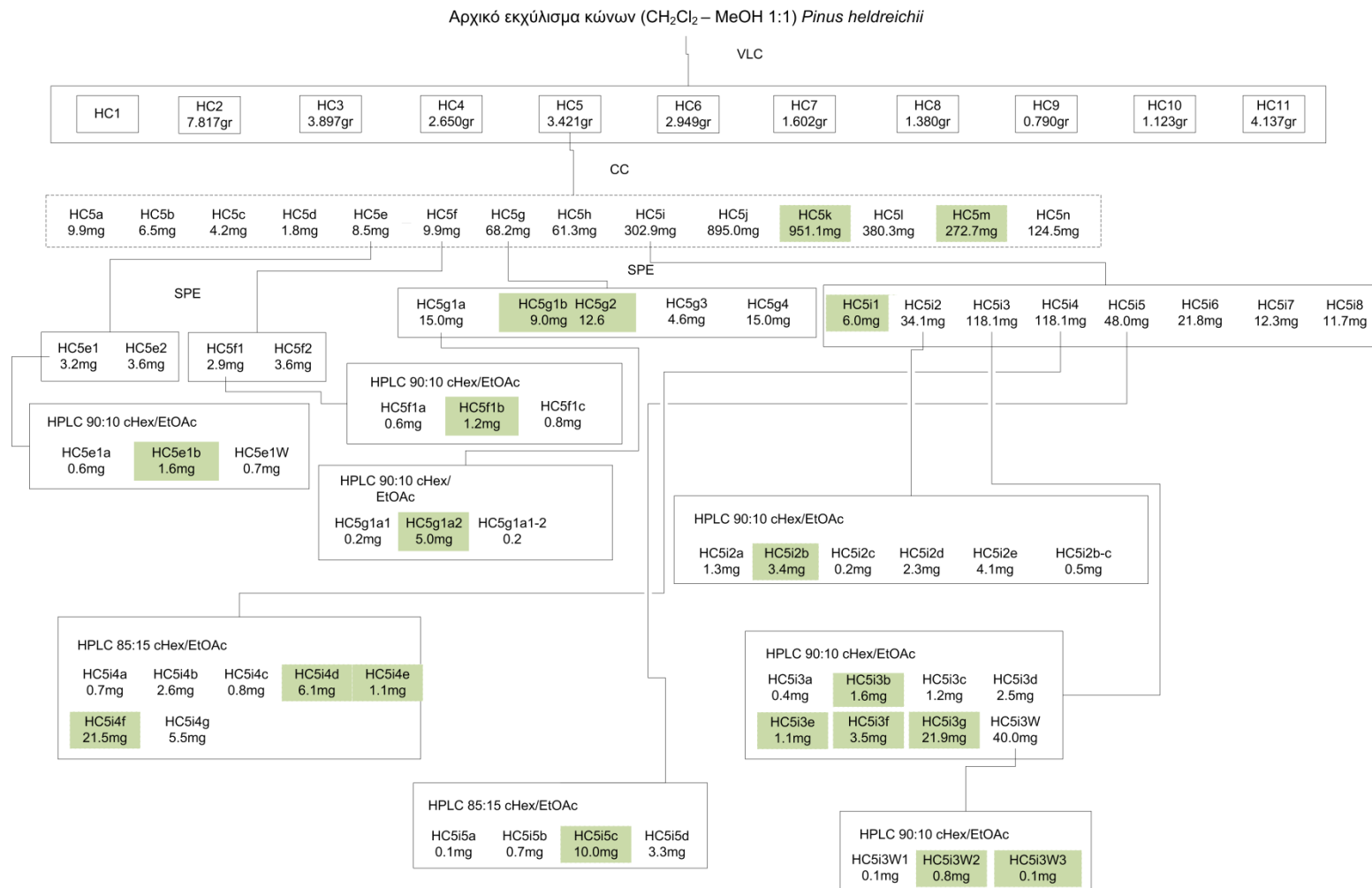


Εικόνα 12. Πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το υπόλειμμα PHC_Μέρος II.

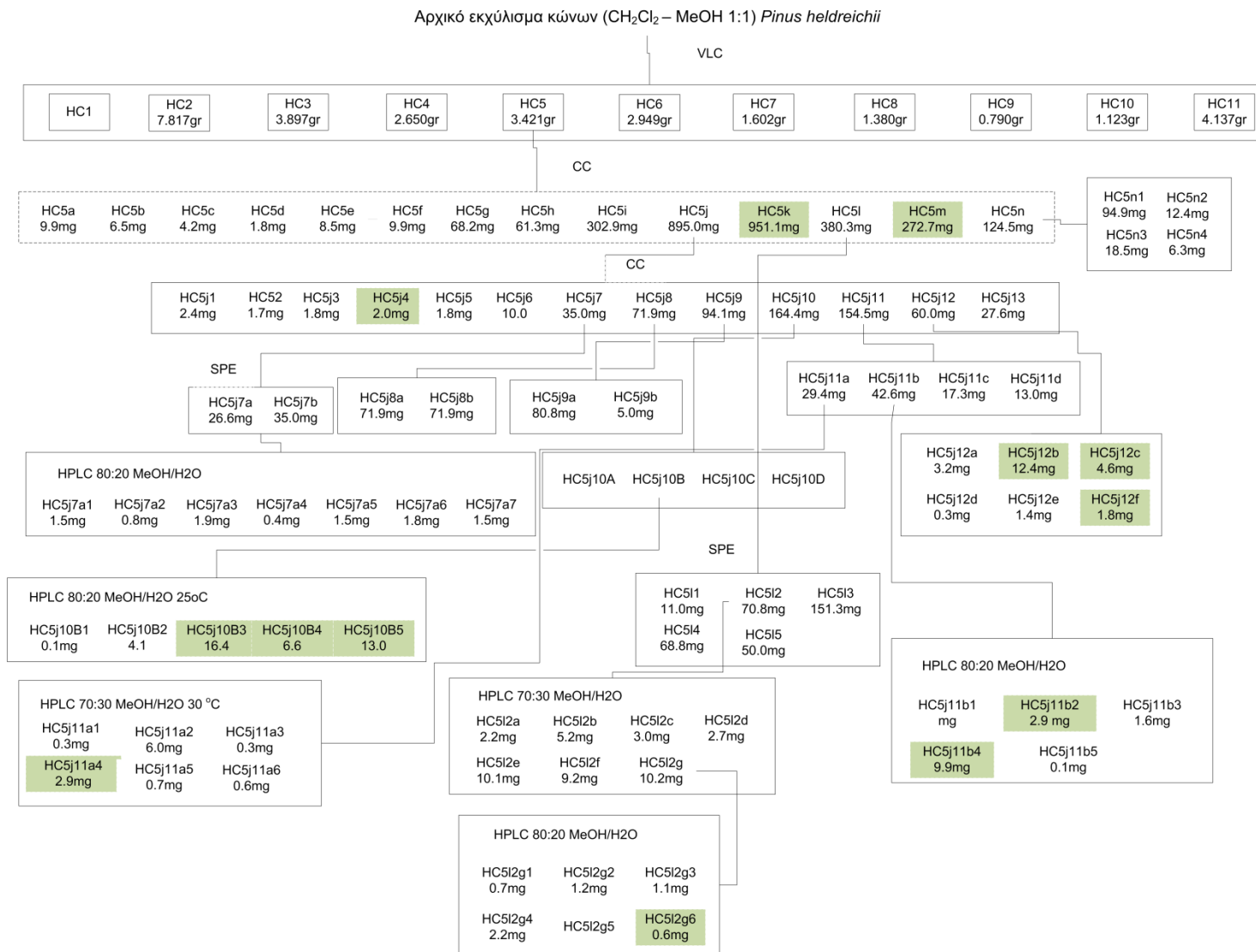
Αρχικό εκχύλισμα κώνων ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{MeOH}$ 1:1) *Pinus heldreichii*



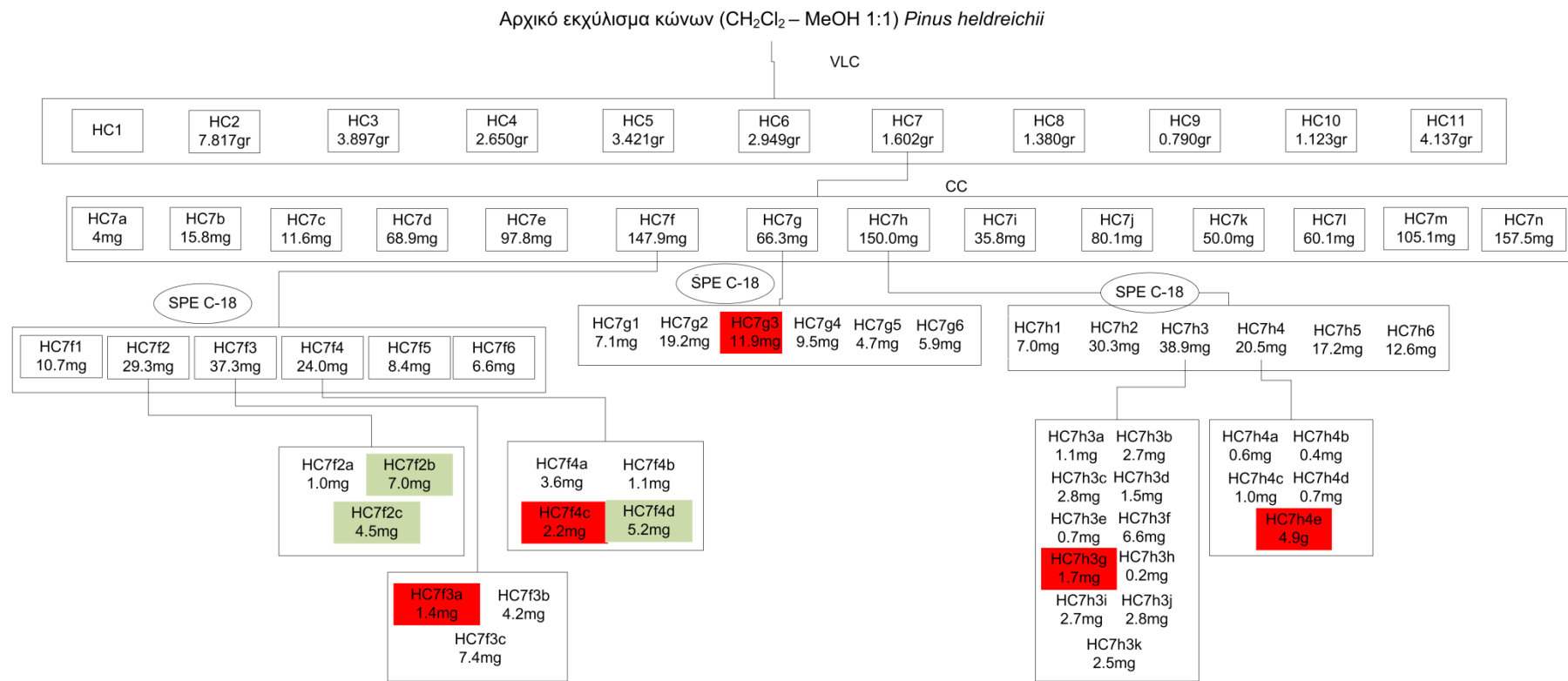
Εικόνα 13. Πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το υπόλειμμα ΡΗC_Μέρος ΙΙΙ.



Εικόνα 14. Πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το υπόλειμμα PHC_Μέρος IV.



Εικόνα 15. Πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το υπόλειμμα PHC_Μέρος V.



Εικόνα 16. Πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το υπόλειμμα ΡΗC_Μέρος VI.

Πίνακας 2

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης (% v/v)						Κωδικός	Μάζα (g)
	από			έως				
	cHex	EtOAc	MeOH	cHex	EtOAc	MeOH		
1-6	100	-	-	90	10	-	HC1	0,330
7-8	80	20	-	80	20	-	HC2	7,817
9-10	70	30	-	70	30	-	HC3	3,897
11-12	60	40	-	60	40	-	HC4	2,650
13-14	50	50	-	50	50	-	HC5	3,421
15-17	40	60	-	30	70	-	HC6	2,949
18-19	30	70	-	20	80	-	HC7	1,602
20-22	20	80	-	10	90	-	HC8	1,380
23-24	-	100	-	-	100	-	HC9	0,790
25-28	-	95	5	-	50	50	HC10	1,123
29-30	-	-	100	-	-	100	HC11	1,137

Το υπόλειμμα HC2 μάζας 7,817 g υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό με υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης κανονικής φάσης, από όπου πρόεκυψαν 14 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγματα cHex και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 326 κλάσματα, όγκου 26 mL το καθένα ενώ ο όγκος των δυο τελευταίων κλασμάτων ήταν 300 mL, τα οποία αφού εξετάστηκαν με χρωματογραφία TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 14 (Πίνακας 3). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR.

Πίνακας 3

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης (% v/v)				Κωδικός	Μάζα (mg)
	από		έως			
	cHex	EtOAc	cHex	EtOAc		
1-125	100	-	90	10	HC2a	7,6
126-140	90	10	90	10	HC2b	513,0
141-147	90	10	90	10	HC2c	267,0
148-157	90	10	90	10	HC2d	437,7
158-170	90	10	85	15	HC2e	680,0
171-205	85	15	85	15	HC2f	864,0
206-211	85	15	85	15	HC2g	102,0

212-250	80	20	80	20	HC2h	274,0
251-259	70	30	70	30	HC2i	216,0
260-271	70	30	65	35	HC2j	510,0
272-292	65	35	65	35	HC2k	659,0
293-299	65	35	65	35	HC2l	125,0
300-325	50	50	-	100	HC2m	127,0
326	-	100	-	100	HC2n	40,0

Το υπόλειμμα HC2b μάζας 513,0 mg υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη βαρύτητας, από όπου πρόεκυψαν 10 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγματα cHex και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 94 κλάσματα, όγκου 17 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με χρωματογραφία TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 10 (Πίνακας 4). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR.

Πίνακας 4

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης (% v/v)				Κωδικός	Μάζα (mg)
	από		έως			
	cHex	EtOAc	cHex	EtOAc		
1-46	100	-	97	3	HC2b1	1,6
47-48	97	3	97	3	HC2b2	167,4
49-50	97	3	97	3	HC2b3	63,2
51	97	3	97	3	HC2b4	11,2
52-53	97	3	97	3	HC2b5	9,1
54-56	97	3	97	3	HC2b6	90,8
57-60	97	3	97	3	HC2b7	23,9
61-73	97	3	95	5	HC2b8	11,4
74-84	95	5	90	10	HC2b9	10,7
85-94	90	10	-	100	HC2b10	87,8

Όπως διαπιστώθηκε κατόπιν λήψης φασμάτων αερίου χρωματογραφίας και μάζας καθώς και ^1H NMR, τα υπολείμματα HC2b3 και HC2b4 ταυτοποιήθηκαν ως ο μεταβολίτης

38.

Το υπόλειμμα HC2B2 μάζας 167,4 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα *n*-Hex:EtOAc. Συλλέχθηκαν επτά κλάσματα (Πίνακας 5).

Πίνακας 5

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HC2b2a	100% <i>n</i> Hex	0,5
HC2b2b	99:1 <i>n</i> Hex-EtOAc	0,2
HC2b2c	98:2 <i>n</i> Hex-EtOAc	90,0
HC2b2d	97:3 <i>n</i> Hex-EtOAc	50,5
HC2b2e	96:4 <i>n</i> Hex-EtOAc	6,8
HC2b2f	95:5 <i>n</i> Hex-EtOAc	4,4
HC2b2g	94:6 <i>n</i> Hex-EtOAc	3,0

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Τα υπολείμματα HC2b2c και HC2b2d συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε περαιτέρω διαχωρισμό με χρωματογραφία HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 6 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 6

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Econosphere 100 SIL 10u (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	98:2 <i>c</i> Hex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (<i>t_R</i> ,min)
HC2b2cd1	22,2	9,4
HC2b2cd2	36,4	12,5
HC2b2cd3	30,5	13,3
HC2b2cd4	4,6	13,8

HC2b2cd5	2,1	14,7
HC2b2cd5β	2,3	15,2
HC2b2cd6	3,4	15,9
HC2b2cd7	3,7	17,6
HC2b2cd8	0,7	20,6
HC2b2cd9	2,7	21,6

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR και στη συνέχεια τα κλάσματα HC2b2cd2, HC2b2cd3, HC2b2cd4, HC2b2cd6 και HC2b2cd7 υποβλήθηκαν σε περαιτέρω κλασματοποίηση μέσω HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 7, 8, 9 και 10 αντίστοιχα.

Πίνακας 7

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Econosphere 100 SIL 10u (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	99:1 <i>n</i> Hex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
HC2b2cd2a	3,2	17,0
HC2b2cd2b	18,2	19,9
HC2b2cd2c	1,4	20,7
HC2b2cd2d	10,7	23,5

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπόλειμμα HC2b2cd2d ήταν καθαρός μεταβολίτης (μεταβολίτης **11**).

Πίνακας 8

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Econosphere 100 SIL 10u (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	99:1 <i>n</i> Hex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	

Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC2b2cd3a	0,1	10,8
HC2b2cd3b	3,6	19,6
HC2b2cd3c	0,5	21,6
HC2b2cd3d	10,9	23,7

Το υπόλειμμα HC2b2cd3d ήταν καθαρός μεταβολίτης (**11**) όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR.

Πίνακας 9

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Econosphere 100 SIL 10u (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	99:1 <i>n</i> Hex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC2b2cd4a	0,5	22,1
HC2b2cd4b	0,1	23,3
HC2b2cd4c	1,3	26,0

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC2b2cd4c ήταν καθαρός μεταβολίτης (**10**).

Πίνακας 10

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Econosphere 100 SIL 10u (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	99:1 <i>n</i> Hex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC2b2cd6a	0,3	32,4
HC2b2cd6b	0,1	36,3

Όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR, το υπόλειμμα HC2b2cd6b ήταν καθαρός μεταβολίτης (**19**).

Πίνακας 11

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Econosphere 100 SIL 10u (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	99:1 <i>n</i> Hex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
HC2b2cd7a	0,1	40,2
HC2b2cd7b	0,1	41,2

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC2b2cd7b ήταν καθαρός μεταβολίτης (**20**).

Το υπόλειμμα HC2B5 μάζας 9,1 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα *n*Hex-EtOAc. Συλλέχθηκαν δύο κλάσματα όπως φαίνονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HC2b5a	95:5 <i>n</i> Hex-EtOAc	7,5
HC2b5b	100% EtOAc	1,6

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ^1H NMR. Το υπόλειμμα HC2b5a υπέστη περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (0).

Πίνακας 13

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Econosphere 100 SIL 10u (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	95:5 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC2b5a1	0,8	11,9
HC2b5a2	0,6	14,5
HC2b5a3	0,1	14,6
HC2b5a4	1,6	16,2
HC2b5a5	0,5	16,4
HC2b5a6	0,7	20,7

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα HC2b5a2 και HC2b5a4 ήταν καθαροί μεταβολίτες (**38** και **28** αντίστοιχα).

Το υπόλειμμα HC2d μάζας 437,7 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό με παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία HPLC κανονικής φάσης, από όπου πρόεκυψαν επτά κλάσματα, οι συνθήκες της οποίας αναγράφονται στον Πίνακα 14 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 14

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Techsil 10 Silica (25 cm x 22 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	97,5:2,5 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	12,0 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC2d1	0,9	1,0-7,0
HC2d2	1,4	7,7
HC2d3	1,9	10,0-20,0
HC2d4	3,0	20,0-28,0
HC2d5	32,5	27,0

HC2d6	55,0	29,7
HC2d7	15,5	33,4-46,0

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC2d5 ήταν καθαρός μεταβολίτης (**34**). Κατόπιν έκπλυσης της στήλης με 100% EtOAc παραλήφθηκε το υπόλειμμα HC2dR, το οποίο υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεάς φάσης από όπου προέκυψαν δύο κλάσματα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλυσης	Μάζα (mg)
HC2dR1	90:10 cHex-EtOAc	135,0
HC2dR2	100% EtOAc	40,8

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ^1H NMR. Το υπόλειμμα HC2dR1 μάζας 135,0 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό με παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία HPLC κανονικής φάσης, από όπου προέκυψαν δύο κλάσματα, οι συνθήκες της οποίας αναγράφονται στον Πίνακα 16 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλυσης.

Πίνακας 16

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	90:10 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (t_R , min)
HC2dR1a	0,3	6,6
HC2dR1b	38,0	9,9

Κατόπιν ελέγχου των υπολειμμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα HC2dR1b ήταν καθαρός μεταβολίτης (**31**).

Το υπόλειμμα HC2d6 υπέστη περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 17) μαζί με

τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλυσης.

Πίνακας 17

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Econosphere 100 SIL 10u (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	96:4 nHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (t_R , min)
HC2d6a	0,1	15,2
HC2d6b	0,1	15,3
HC2d6c	2,6	25,1
HC2d6d	22,4	27,1

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC2d6c και HC2d6d ήταν καθαροί μεταβολίτες (**34** και **33** αντίστοιχα).

Το υπόλειμμα HC2f μάζας 864,0 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex-EtOAc. Συλλέχθηκαν έξι κλάσματα όπως φαίνονται στον Πίνακας 18.

Πίνακας 18

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλυσης	Μάζα (mg)
HC2f1	95:5 cHex-EtOAc	2,8
HC2f2	95:5 cHex-EtOAc	243,4
HC2f3	90:10 cHex-EtOAc	113,6
HC2f4	90:10 cHex-EtOAc	50,7
HC2f5	100% EtOAc	164,9
HC2f6	100% EtOAc	39,3

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ^1H NMR.

Το υπόλειμμα HC2f2 μάζας 243,4 mg υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη βαρύτητας, από όπου προέκυψαν 13 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση

σύστημα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγματα cHex και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 67 κλάσματα, όγκου 17 mL το καθένα, εκτός από το 1^ο και το 2^ο κλάσμα όγκου 100 mL και 50 mL αντίστοιχα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 13 (Πίνακας 19). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ¹H NMR προκειμένου να αποκτηθεί μία γενική άποψη για τις κατηγορίες των ενώσεων που περιέχονταν στα κλάσματα.

Πίνακας 19

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης (% v/v)				Κωδικός	Μάζα (mg)
	από		έως			
	cHex	EtOAc	cHex	EtOAc		
1	97	3	97	3	HC2F2a	1,0
2	97	3	97	3	HC2F2b	2,4
3-4	97	3	97	3	HC2F2c	3,2
5-9	97	3	97	3	HC2F2d	5,9
10-19	97	3	97	3	HC2F2e	1,8
20-24	97	3	97	3	HC2F2f	19,4
25-30	97	3	97	3	HC2F2g	74,1
31-36	97	3	97	3	HC2F2h	35,7
37-41	97	3	97	3	HC2F2i	27,6
42-46	97	3	97	3	HC2F2j	17,2
47-53	97	3	97	3	HC2F2k	16,7
54-58	97	3	95	5	HC2F2l	8,2
59-67	95	5	95	5	HC2F2m	5,3

Το υπόλειμμα HC2F2g υποβλήθηκε σε διαχωρισμό μέσω HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (0) μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 20

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	90:10 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	2,0 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (<i>t_R</i> ,min)
HC2f2g1	3,0	17,5
HC2f2g2	6,1	17,7
HC2f2g3	4,1	22,4
HC2f2g4	42,5	23,2

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC2f2g2 ήταν καθαρός μεταβολίτης (**31**).

Το υπόλειμμα HC2f2h μάζας 35,7 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 21) μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 21

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	90:10 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	2,0 mL/min	
Θερμοκρασία	5°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (<i>t_R</i> ,min)
HC2f2h1	1,1	22,0
HC2f2h2	5,2	30,1
HC2f2h3	13,8	33,5

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC2f2h2 και HC2f2h3 ήταν καθαροί μεταβολίτες (**23**, **22** αντίστοιχα).

Το υπόλειμμα HC2f2i μάζας 27,6 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα

(Πίνακας 22) μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλυσης.

Πίνακας 22

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5 μ m (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	90:10 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	2,0 mL/min	
Θερμοκρασία	5°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (t_R ,min)
HC2f2i1	0,9	10,5
HC2f2i2	1,2	11,5
HC2f2i3	1,1	20,0
HC2f2i4	1,3	23,5
HC2f2i5	4,2	31,4
HC2f2i6	2,8	33,8
HC2f2i7	3,1	35,0

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC2f2i1, HC2f2i2 (**16**), HC2f2i3 (**9**), HC2f2i5 (**23**) και HC2f2i7 (**22**) ήταν καθαροί μεταβολίτες.

Το υπόλειμμα HC2f2k μάζας 27,6 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 23) μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλυσης.

Πίνακας 23

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5 μ m (250 x 8mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	90:10 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	2,0 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (t_R ,min)
HC2f2k1	1,0	5,0
HC2f2k2	1,1	15,0

HC2f2k3	0,8	17,2
HC2f2k4	0,4	18,5
HC2f2k5	0,7	21,5
HC2f2k6	1,7	22,8
HC2f2k7	7,9	24,1

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC2f2k2 και HC2f2k6 ήταν καθαροί μεταβολίτες (**9** και **23** αντίστοιχα).

Το υπόλειμμα HC2f2l1 μάζας 8,2 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 24) μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 24

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	90:10 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	2,0 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_{R} ,min)
HC2f2l1	1,5	14,0
HC2f2l2	1,8	15,4
HC2f2l3	0,9	17,2
HC2f2l4	0,6	18,5
HC2f2l5	1,6	21,0
HC2f2l6	3,7	24,0

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC2f2l2 και HC2f2l5 ήταν καθαροί μεταβολίτες (**9** και **23** αντίστοιχα).

Το υπόλειμμα HC2f2m μάζας 5,3 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 25 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 25

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	90:10 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	2,0 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (<i>t_R</i> ,min)
HC2f2m1	0,2	11,3
HC2f2m2	0,2	12,9
HC2f2m3	0,5	14,4
HC2f2m4	0,7	15,8
HC2f2m5	0,7	22,0
HC2f2m6	2,3	24,0

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC2f2m4 και HC2f2m5 ήταν καθαροί μεταβολίτες (**9** και **23** αντίστοιχα).

Το υπόλειμμα HC2f3 μάζας 113,6 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 26 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 26

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Econosphere 100 SIL 10u (250x10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	90:10 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (<i>t_R</i> ,min)
HC2f3a	4,2	9,9
HC2f3b	0,7	14,2
HC2f3c	3,8	14,6
HC2f3d	3,8	15,7
HC2f3e	3,6	16,4
HC2f3f	2,1	16,7

HC2f3g	5,3	18,0
HC2f3h	11,2	19,6

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR.

Το υπόλειμμα HC2f3c μάζας 3,8 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 27 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 27

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Econosphere 100 SIL 10u (250x10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	93:7 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC2f3c1	0,1	16,2
HC2f3c2	0,9	16,8

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC2f3c2 ήταν καθαρός μεταβολίτης (**34**).

Το υπόλειμμα HC2f3g μάζας 5,3 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 28 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 28

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Econosphere 100 SIL 10u (250x10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	91:9 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC2f3g1	1,5	19,8

Κατόπιν ελέγχου με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC2f3g1 ήταν καθαρός μεταβολίτης (**37**).

Το υπόλειμμα HC2f3h μάζας 11,2 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 29 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 29

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Econosphere 100 SIL 10u (250x10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	91:9 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC2f3h1	1,2	21,9
HC2f3h2	0,5	24,0

Κατόπιν ελέγχου με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC2f3h1 ήταν καθαρός μεταβολίτης (**21**).

Το υπόλειμμα HC2f4 μάζας 50,7 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 30 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 30

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	90:10 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	2,0 mL/min	
Θερμοκρασία	5°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC2f4a	0,7	11,1
HC2f4b	5,1	17,3
HC2f4c	6,1	17,5

HC2f4d	1,5	20,5
HC2f4e	0,4	23,0
HC2f4f	2,9	30,4
HC2f4g	5,9	33,1
HC2f4h	7,9	34,2
HC2f4i	1,8	38,1

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC2f4a (**16**), HC2f4b (**9**), HC2f4c (**9**) και HC2f4d (**55**) ήταν καθαροί μεταβολίτες.

Το υπόλειμμα HC2f5 μάζας 164,9 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 31 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 31

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	85:15 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_{R} , min)
HC2f5a	27,7	8,0
HC2f5b	5,9	10,2
HC2f5c	4,4	12,4
HC2f5d	4,9	14,0
HC2f5e	9,5	15,9
HC2f5f	4,3	17,2
HC2f5g	5,2	19,8
HC2f5h'	1,6	25,0
HC2f5h	4,5	27,0
HC2f5i	10,0	38,2

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC2f5b και HC2f5i ήταν καθαροί μεταβολίτες (**13** και **9** αντίστοιχα).

Το υπόλειμμα HC2f5c μάζας 4,4 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 32 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 32

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	80:20 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (<i>t_R</i> ,min)
HC2f5c1	1,0	21,1
HC2f5c2	0,1	22,5

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC2f5c1 ήταν καθαρός μεταβολίτης (**32**).

Το υπόλειμμα HC2f6 μάζας 39,3 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 33 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 33

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	85:15 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (<i>t_R</i> ,min)
HC2f6a	1,6	7,5
HC2f6b	2,6	8,2
HC2f6c	1,1	10,6
HC2f6d	4,4	19,3
HC2f6e	1,5	26,4

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα HC2f6d ήταν καθαρός μεταβολίτης (**16**).

Το υπόλειμμα HC5 μάζας 3.421 mg υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη βαρύτητας, από όπου προέκυψαν 14 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγματα cHex και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 135 κλάσματα, όγκου 20 mL το καθένα, εκτός από το 1^ο και το 2^ο κλάσμα όγκου 100 mL και 50 mL αντίστοιχα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 13 (Πίνακας 34). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR προκειμένου να αποκτηθεί μία γενική άποψη για τις κατηγορίες των ενώσεων που περιέχονταν στα κλάσματα.

Πίνακας 34

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης (% v/v)				Κωδικός	Μάζα (mg)
	από		έως			
	cHex	EtOAc	cHex	EtOAc		
1-16	95	5	95	5	HC5a	9,9
17-29	95	5	93	7	HC5b	6,5
30-34	93	7	93	7	HC5c	4,2
35-39	93	7	93	7	HC5d	1,8
40-51	93	7	92	8	HC5e	8,5
52-62	92	8	90	10	HC5f	9,9
63-75	87	13	87	13	HC5g	68,2
76-84	87	13	85	15	HC5h	61,3
85-104	85	15	82	18	HC5i	302,9
105-119	82	18	75	25	HC5j	895,0
120-128	70	30	70	30	HC5k	951,1
129-133	50	50	50	50	HC5l	380,3
134	-	100	-	100	HC5m	272,7
135	-	100	-	100	HC5n	124,5

Το υπόλειμμα HC5m ήταν καθαρός μεταβολίτης όπως προέκυψε κατόπιν ελέγχου με φασματοσκοπία ^1H NMR (μεταβολίτης **8**). Τα κλάσματα HC5e και HC5f υποβλήθηκαν σε

εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex-EtOAc. Συλλέχθηκαν δύο κλάσματα όπως φαίνονται στον Πίνακα 35 και 36 αντίστοιχα.

Πίνακας 35

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HC5e1	90:10 cHex-EtOAc	3,2
HC5e2	100% EtOAc	3,6

Πίνακας 36

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HC5f1	90:10 cHex-EtOAc	2,9
HC5f2	100% EtOAc	5,2

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Τα υπολείμματα HC5e1 και HC5f1 υποβλήθηκαν σε περαιτέρω διαχωρισμό με χρωματογραφία HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 37 και 38 αντίστοιχα μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 37

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	90:10 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (<i>t_R</i> ,min)
HC5e1a	0,6	12,3
HC5e1b	1,6	13,4

Πίνακας 38

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	90:10 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
HC5f1a	0,6	12,8
HC5f1b	1,2	13,7

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα HC5e1b και HC5f1b ήταν ο ίδιος καθαρός μεταβολίτης (**9**).

Το κλάσμα HC5g υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex-EtOAc. Συλλέχθηκαν τέσσερα κλάσματα όπως φαίνονται στον Πίνακα 39.

Πίνακας 39

Κωδικός Υπολείμματος	Δ /της έκλουσης	Μάζα (mg)
HC5g1	90:10 cHex-EtOAc	15,0
HC5g2	85:15 cHex-EtOAc	12,6
HC5g3	80:20 cHex-EtOAc	4,6
HC5g4	100% EtOAc	19,2

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ^1H NMR.

Το υπόλειμμα HC5g1 μάζας 15,0 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 40 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 40

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	90:10 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
HC5g1a	0,5	15,3
HC5g1b	5,0	15,8

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC5g1b ήταν ο μεταβολίτης **4**.

Το κλάσμα HC5i μάζας 302,9 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex-EtOAc. Συλλέχθηκαν 13 κλάσματα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε οκτώ όπως φαίνονται στον Πίνακα 41.

Πίνακας 41

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης (% v/v)				Κωδικός	Μάζα (mg)
	από		έως			
	cHex	EtOAc	cHex	EtOAc		
1	95	5	95	5	HC5i1	6,0
2	95	5	95	5	HC5i2	34,1
3	90	10	90	10	HC5i3	108,1
4	90	10	90	10	HC5i4	99,0
5-6	90	10	90	10	HC5i5	48,0
7-9	90	10	85	15	HC5i6	21,8
10-12	80	20	80	20	HC5i7	12,3
13	-	100	-	100	HC5i8	11,7

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC5i1 ήταν ο μεταβολίτης **4**.

Το κλάσμα HC5i2 υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό με HPLC κανονικής

φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 42 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλυσης.

Πίνακας 42

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	90:10 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (t_R ,min)
HC5i2a	1,3	15,5
HC5i2b	3,4	16,3
HC5i2c	0,2	17,8
HC5i2d	2,3	32,8
HC5i2e	4,1	35,8

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC5i2b (**4**) και HC5i2e ήταν καθαροί μεταβολίτες.

Το υπόλειμμα HC5i3 μάζας 108,1 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω κλασματοποίηση με HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 43 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλυσης.

Πίνακας 43

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	90:10 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (t_R ,min)
HC5i3a	0,4	16,9
HC5i3b	1,6	17,5
HC5i3c	1,2	17,6

HC5i3d	2,5	30,1
HC5i3e	1,1	32,5
HC5i3f	3,5	34,6
HC5i3g	21,9	37,1

Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ^1H NMR και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC5i3b, HC5i3d, HC5i3e, HC5i3f και HC5i3g ήταν οι μεταβολίτες **4**, **15**, **6**, **7**.

Το υπόλειμμα HC5i3W μάζας 40,0 mg, που προέκυψε κατόπιν χρωματογραφικού διαχωρισμού του δείγματος HC5i3 υποβλήθηκε εκ νέου σε διαχωρισμό μέσω HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακας 44 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 44

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250x8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	90:10 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC5i3W1	0,1	18,0
HC5i3W2	0,8	33,9
HC5i3W3	12,6	41,0

Τα υπολείμματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ^1H NMR και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα HC5i3W2 και HC5i3W3, ήταν οι μεταβολίτες **7** και **17**.

Το κλάσμα HC5i4 υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό με HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον 0 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 45

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250x8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	85:15 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC5i4a	0,7	12,7
HC5i4b	2,6	16,9
HC5i4c	0,8	20,3
HC5i4d	6,1	21,7
HC5i4e	1,1	23,7
HC5i4f	21,5	24,9
HC5i4g	5,5	27,5

Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ^1H NMR και διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC5i4d, HC5i4e και HC5i4f ήταν οι μεταβολίτες **7**, **2** και **17**.

Το κλάσμα HC5i5 υποβλήθηκε σε διαχωρισμό με HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακας 46 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 46

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250x8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	85:15 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC5i5a	0,1	16,2
HC5i5b	0,7	23,1
HC5i5c	10,0	24,9
HC5i5d	3,3	28,9

Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ^1H NMR και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC5i5c ήταν καθαρός μεταβολίτης (**17**).

Το υπόλειμμα HC5j μάζας 695,0 mg υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη βαρύτητας, από όπου προέκυψαν 13 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγματα cHex και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 116 κλάσματα, όγκου 20 mL το καθένα, εκτός από το 1^ο και το 2^ο κλάσμα όγκου 100 mL και 50 mL αντίστοιχα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 13 (Πίνακας 47). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR προκειμένου να αποκτηθεί μία γενική άποψη για τις κατηγορίες των ενώσεων που περιέχονταν στα κλάσματα.

Πίνακας 47

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης (% v/v)				Κωδικός	Μάζα (mg)
	από		έως			
	cHex	EtOAc	cHex	EtOAc		
1-24	95	5	92	8	HC5j1	2,4
25-37	92	8	90	10	HC5j2	1,7
38-45	90	10	88	12	HC5j3	1,8
46-53	88	12	86	14	HC5j4	2,1
54-57	86	14	86	14	HC5j5	1,8
58-61	86	14	86	14	HC5j6	15,0
62-66	86	14	86	14	HC5j7	34,9
67-72	86	14	85	15	HC5j8	71,9
73-78	85	15	84	16	HC5j9	94,1
79-86	84	16	82	18	HC5j10	164,4
87-100	80	20	75	25	HC5j11	154,5
101-108	75	25	70	30	HC5j12	58,0
109-116	70	30	-	100	HC5j13	65,9

Το υπόλειμμα HC5j4 ήταν καθαρός μεταβολίτης (**3**) όπως προέκυψε κατόπιν ελέγχου με φασματοσκοπία ^1H NMR. Το κλάσμα HC5j7 υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex-EtOAc. Συλλέχθηκαν δύο

κλάσματα όπως φαίνονται στον Πίνακας 48.

Πίνακας 48

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HC5j7a	83:17 cHex/EtOAc	26,6
HC5j7b	100% EtOAc	1,9

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ¹H NMR και το υπόλειμμα HC5j7a αναλύθηκε περαιτέρω με HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακας 49 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 49

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Nucleosil SIL 50-7 (250x 10mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	80:20 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (<i>t_R</i> ,min)
HC5j7a1	1,5	7,9
HC5j7a2	0,8	11,2
HC5j7a3	1,9	14,4
HC5j7a4	0,4	17,0
HC5j7a5	1,5	18,7
HC5j7a6	1,8	20,0-30,0
HC5j7a7	7,1	37,1

Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ¹H NMR και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC5j7a5 ήταν ο μεταβολίτης 4.

Το κλάσμα HC5j10 υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης (C-18) και κινητή φάση σύστημα MeOH:H₂O. Συλλέχθηκαν τέσσερα κλάσματα ως εξής όπως φαίνεται στον Πίνακας 50.

Πίνακας 50

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλυσης	Μάζα (mg)
HC5j10a	70:30 MeOH-H ₂ O	35,9
HC5j10b	80:20 MeOH-H ₂ O	55,1
HC5j10c	90:10 MeOH-H ₂ O	33,7
HC5j10d	100% MeOH	20,7

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Το κλάσμα HC5j10b υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακας 51 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλυσης.

Πίνακας 51

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	80:20 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (t _R ,min)
HC5j10b1	0,2	8,3
HC5j10b2	2,1	16,9
HC5j10b3	16,4	17,6
HC5j10b4	0,8	19,6
HC5j10b5	13,0	24,0

Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ¹H NMR και διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC5j10b2, HC5j10b3 (μεταβολίτης **30**), HC5j10b4 (μεταβολίτης **26**) και HC5j10b5 (μεταβολίτης **1**) ήταν καθαροί μεταβολίτες.

Το κλάσμα HC5j11 υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης (C-18) και κινητή φάση σύστημα MeOH-H₂O. Συλλέχθηκαν τέσσερα κλάσματα ως εξής όπως φαίνεται στον 0.

Πίνακας 52

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HC5j11a	70:30 MeOH-H ₂ O	33,0
HC5j11b	80:20 MeOH-H ₂ O	47,8
HC5j11c	90:10 MeOH-H ₂ O	20,6
HC5j11d	100% MeOH	37,7

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Το υπόλειμμα HC5j11a υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό μέσω HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακας 53 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 53

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	70:30 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	30°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (<i>t_R</i> ,min)
HC5j11a1	0,3	4,0
HC5j11a2	6,0	5,0-10,0
HC5j11a3	0,3	10,6
HC5j11a4	1,5	19,4
HC5j11a5	0,7	21,6
HC5j11a6	0,6	24,0

Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ¹H NMR και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC5j11a4 ήταν καθαρός μεταβολίτης (**36**).

Το υπόλειμμα HC5j11b υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό μέσω HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακας 54 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 54

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5 μ m (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	80:20 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC5j11b1	0,1	4,8-12,5
HC5j11b2	2,9	20,0
HC5j11b3	1,6	22,5
HC5j11b4	9,9	27,1
HC5j11b5	0,1	34,5

Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ¹H NMR και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα HC5j11b2 και HC5j11b4 ήταν οι μεταβολίτες **30** και **1**.

Το υπόλειμμα HC5j12 υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό μέσω HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακας 55 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 55

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5 μ m (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	100% MeOH	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	4°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC5j12a	3,2	4,7-6,0
HC5j12b	12,4	6,3
HC5j12c	4,6	8,0
HC5j12d	0,3	9,1
HC5j12e	1,4	9,6
HC5j12f	1,8	13,6

Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ^1H NMR και διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC5j12b, HC5J12c και HC5j12f ήταν οι μεταβολίτες **13**, **14** και **4**.

Το κλάσμα HC5I υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης (C-18) και κινητή φάση σύστημα MeOH-H₂O. Συλλέχθηκαν 5 κλάσματα ως εξής όπως φαίνεται στον Πίνακα 56.

Πίνακας 56

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HC5I1	60:40 MeOH-H ₂ O	11,0
HC5I2	70:30 MeOH-H ₂ O	70,8
HC5I3	80:20 MeOH-H ₂ O	151,3
HC5I4	90:10 MeOH:H ₂ O	68,8
HC5I5	100% MeOH	47,9

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ^1H NMR.

Το κλάσμα HC5I2 υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 57 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 57

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	70:30 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC5I2a	2,2	4,0
HC5I2b	5,2	5,0
HC5I2c	3,0	8,9
HC5I2d	2,7	9,1
HC5I2e	10,1	12,0
HC5I2f	9,2	14,0

HC512g

10,2

29,2

Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ^1H NMR και διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC512c, και HC512e ήταν καθαροί μεταβολίτες.

Το κλάσμα HC512g υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 58 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 58

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	80:20 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
HC512g1	0,7	3,5-5,7
HC512g2	1,2	7,2
HC512g3	1,1	10,4
HC512g4	2,2	12,1
HC512g5	0,1	13,1
HC512g6	0,6	18,7

Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ^1H NMR και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC512g6 **29** ήταν καθαρός μεταβολίτης.

Το υπόλειμμα HC7 μάζας 1,602 g υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη βαρύτητας. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγματα cHex και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 107 κλάσματα, όγκου 27 mL το καθένα, εκτός από το 1^ο και το 2^ο κλάσμα όγκου 100 mL και 50 mL αντίστοιχα, καθώς και το 105^ο, 106^ο και 170^ο κλάσμα όγκου 100 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 16 (Πίνακας 59). Σε κάθε

κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR προκειμένου να αποκτηθεί μία γενική άποψη για τις κατηγορίες των ενώσεων που περιέχονταν στα κλάσματα και όπως διαπιστώθηκε τα υπολείμματα HC7d και HC7e περιείχαν σε πολύ υψηλό ποσοστό το μεταβολίτη **16**.

Πίνακας 59

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης (% v/v)					Κωδικός	Μάζα (mg)
	από		έως		MeOH		
	cHex	EtOAc	cHex	EtOAc			
1-7	65	35	65	35	-	HC7a	4,0
8-15	65	35	65	35	-	HC7b	15,8
16-19	65	35	65	35	-	HC7c	11,6
20-27	65	35	65	35	-	HC7d	68,9
28-34	65	35	65	35	-	HC7e	97,8
35-43	65	35	63	37	-	HC7f	147,9
44-48	63	37	63	37	-	HC7g	66,3
49-55	63	37	63	37	-	HC7h	150,0
56-58	63	37	63	37	-	HC7i	35,8
59-65	63	37	63	37	-	HC7j	80,1
66-72	63	37	60	40	-	HC7k	50,0
73-78	60	40	60	40	-	HC7l	60,1
79-90	60	40	50	50	-	HC7m	105,1
91-100	50	50	30	70	-	HC7n	54,8
101-106	-	100	-	100	-	HC7o	87,6
107	-	-	-	-	100	HC7p	157,5

Το κλάσμα HC7f υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης (C-18) και κινητή φάση σύστημα MeOH-H₂O. Συλλέχθηκαν έξι κλάσματα ως εξής όπως φαίνεται στον Πίνακας 60.

Πίνακας 60

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HC7f1	50:50 MeOH-H ₂ O	10,7
HC7f2	60:40 MeOH-H ₂ O	29,3

HC7f3	70:30 MeOH-H ₂ O	37,3
HC7f4	80:20 MeOH-H ₂ O	24,0
HC7f5	90:10 MeOH-H ₂ O	8,4
HC7f6	100% MeOH	6,6

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Το κλάσμα HC7f2 υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό με HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 61 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 61

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	60:40 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	2,0 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t _R ,min)
HC7f2a	1,0	22,0
HC7f2b	7,0	29,2
HC7f2c	4,5	31,1

Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ¹H NMR και διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC7f2b και HC7f2c ήταν καθαροί μεταβολίτες (**35** και **50**).

Το κλάσμα HC7f3 υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό με HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 62 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 62

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5 μ m (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	80:20 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	2,5 mL/min	
Θερμοκρασία	10°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC7f3a	1,4	22,0
HC7f3b	4,2	25,9
HC7f3c	7,4	34,9

Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ¹H NMR και διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC7f3a, και HC7f3c ήταν οι μεταβολίτες **5**, **16**.

Το κλάσμα HC7f4 υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό με HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακας 63 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 63

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5 μ m (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	85:15 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R ,min)
HC7f4a	3,6	22,5
HC7f4b	1,1	28,4
HC7f4c	2,2	31,1
HC7f4d	5,2	32,3

Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ¹H NMR και διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC7f4a, HC7f4c και HC7f4d ήταν οι μεταβολίτες **16**, **25**, **24**.

Το κλάσμα HC7h υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη

πυριτίου αντίστροφης φάσης (C-18) και κινητή φάση σύστημα MeOH:H₂O. Συλλέχθηκαν έξι κλάσματα ως εξής όπως φαίνεται στον Πίνακας 64.

Πίνακας 64

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλυσης	Μάζα (mg)
HC7h1	50:50 MeOH-H ₂ O	7,0
HC7h2	60:40 MeOH-H ₂ O	30,3
HC7h3	70:30 MeOH-H ₂ O	38,9
HC7h4	80:20 MeOH-H ₂ O	20,5
HC7h5	90:10 MeOH-H ₂ O	17,2
HC7h6	100% MeOH	12,6

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Το κλάσμα HC7h3 υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό με HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακας 65 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλυσης.

Πίνακας 65

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	70:30 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (t _R ,min)
HC7h3a	1,1	12,5
HC7h3b	2,7	16,0
HC7h3c	2,8	19,2
HC7h3d	1,5	20,0
HC7h3e	0,7	22,0
HC7h3f	6,6	23,5
HC7h3g	1,7	25,0

HC7h3h	0,2	26,1
HC7h3i	2,7	29,2
HC7h3j	2,8	35,1
HC7h3k	2,5	36,5

Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ^1H NMR και διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC7h3c (μεταβολίτης **18**), HC7h3g (μεταβολίτης **27**) και HC7h3i ήταν καθαροί μεταβολίτες.

Το κλάσμα HC7h4 υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό με HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 66 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλυσης.

Πίνακας 66

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	80:20 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (t_R , min)
HC7h4a	0,6	4,8
HC7h4b	0,4	7,3
HC7h4c	1,0	9,1
HC7h4d	0,7	21,9
HC7h4e	4,9	29,0

Τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ^1H NMR και διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα HC7h4e (μεταβολίτης **5**) ήταν καθαρός μεταβολίτης.

Το κλάσμα HC7g υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλης πυριτίου αντίστροφης φάσης (C-18) και κινητή φάση σύστημα meOH:H₂O. Συλλέχθηκαν έξι κλάσματα ως εξής όπως φαίνεται στον 0.

Πίνακας 67

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HC7g1	50:50 MeOH-H ₂ O	7,1
HC7g2	60:40 MeOH-H ₂ O	19,2
HC7g3	70:30 MeOH-H ₂ O	11,9
HC7g4	80:20 MeOH-H ₂ O	9,5
HC7g5	90:10 MeOH-H ₂ O	4,7
HC7g6	100% MeOH	5,9

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ¹H NMR και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HC7g3 ήταν καθαρή ουσία (μεταβολίτης **5**).

2.4.2. Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το είδος *Pinus nigra subsp. nigra*

Ποσότητα νωπών βελονοειδών φύλλων (60 gr) εκχυλίστηκε εξαντλητικά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με μίγμα διαλυτών CH₂Cl₂-EtOH (2:1). Μετά την εξάτμιση των διαλυτών προέκυψε βαθυπράσινο υπόλειμμα, το οποίο υπέστη διαχωρισμό σε χοάνη με CH₂Cl₂ και H₂O. Κατόπιν, η υδατική φάση υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό σε χοάνη με βουτανόλη (BuOH) και H₂O. Τέλος η διχλωρομεθανική φάση συνενώθηκε με την βουτανολική και κατόπιν ξήρανσης σε ξηραντήρα προέκυψε τελικό υπόλειμμα βάρους 1,373 gr. Ακολούθησε χρωματογραφικός διαχωρισμός του τελικού υπολείμματος σε στήλη βαρύτητας, από όπου παρελήφθησαν 16 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγματα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 100 κλάσματα, όγκου 25 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 16 (Πίνακας 68). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ¹H NMR προκειμένου να αποκτηθεί μία γενική άποψη για τις κατηγορίες των ενώσεων που περιείχαν.

Πίνακας 68

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης (% v/v)						Κωδικός	Μάζα (mg)
	από			έως				
	cHex	EtOAc	MeOH	cHex	EtOAc	MeOH		
1-21	100	0	0	80	20	0	P1	155,1
22-24	80	20	0	80	20	0	P2	55,5
25-26	80	20	0	80	20	0	P3	28,8
27-30	70	30	0	60	40	0	P4	47,6
31-33	60	40	0	60	40	0	P5	24,9
34-36	50	50	0	50	50	0	P6	49,5
37-40	50	50	0	50	50	0	P7	60,8
41-43	40	60	0	40	60	0	P8	34,7
44-50	40	60	0	30	70	0	P9	51,2
51-55	30	70	0	30	70	0	P10	22,2
56-61	20	80	0	10	90	0	P11	11,7
62-73	10	90	0	0	95	5	P12	19,5

74-82	0	95	5	0	80	20	P13	9,5
83-86	0	80	20	0	60	40	P14	40,1
87-90	0	60	40	0	40	60	P15	184,0
91-100	0	40	60	0	0	100	P16	222,1

Το υπόλειμμα P3, μάζας 28,8 mg, υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας αναγράφονται στον Πίνακα 69.

Πίνακας 69

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	85:15 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P3a	1,2	10,7
P3b	6,4	6,4
P3c	1,1	14,6
P3d	4,7	22,3

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα P3d και P3b ήταν οι μεταβολίτες **47** και **9** αντίστοιχα.

Το υπόλειμμα P4 μάζας 47,6 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex-EtOAc. Συλλέχθηκαν τρία κλάσματα όπως φαίνονται στον Πίνακα 70.

Πίνακας 70

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
P4a	85:15 cHex-EtOAc	41,2
P4b	80:20 cHex-EtOAc	3,4
P4c	100% EtOAc	7,5

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία

¹H NMR.

Το υπόλειμμα P4a υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακας 71 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλυσης.

Πίνακας 71

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	85:15 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (<i>t_R</i> , min)
P4a1	0,2	12,5
P4a2	2,8	12,9
P4a3	0,6	15,2
P4a4	4,3	15,8
P4a5	6,3	16,8
P4a6-7-8	8,2	20,5
P4a9	3,1	23,9
P4a10	1,1	25,5
P4a11	2,2	28,2

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα P4a2 και P4a11 ήταν οι μεταβολίτες **9** και **43** καθώς και η ομοιότητα των φασμάτων ¹H NMR των κλασμάτων P3c και P4a4, τα οποία ήταν μίγματα των ίδιων ουσιών.

Στη συνέχεια τα κλάσματα P4a4 και P3c υποβλήθηκαν HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον 0 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλυσης.

Πίνακας 72

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	88:12 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P4a4a	0,7	21,0
P4a4b	0,7	23,2
P4a4c	1,2	23,9

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα P4a4b και P4a4c ήταν ταυτόσημα και επρόκειτο για καθαρό μεταβολίτη που βρίσκεται στο στάδιο της ταυτοποίησης.

Επίσης το κλάσμα P4a10 υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακας 73 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 73

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	85:15 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P4a10a	0,5	25,6

Κατόπιν ελέγχου του υπολείμματος P4a10a με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για τον μεταβολίτη **39**.

Το υπόλειμμα P5 μάζας 24,9 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex-EtOAc. Συλλέχθηκαν τρία

κλάσματα όπως φαίνονται στον Πίνακας 74.

Πίνακας 74

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
P5a	85:15 cHex-EtOAc	14,5
P5b	80:20 cHex-EtOAc	2,6
P5c	100% EtOAc	2,9

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ^1H NMR.

Το υπόλειμμα P5a υποβλήθηκε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακας 75 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 75

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	85:15 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P5a1	0,3	14,0
P5a2	1,0	15,5
P5a3	0,8	16,3
P5a4	2,8	18,0
P5a5	0,8	20,5
P5a6	0,2	25,5
P5a7	1,0	28,3

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα P5a4, P5a5 και P5a7 ήταν καθαροί μεταβολίτες, που βρίσκονται στο στάδιο της ταυτοποίησης (**44**, **43** και **46** αντίστοιχα).

Το υπόλειμμα P6 μάζας 49,5 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex-EtOAc. Συλλέχθηκαν τρία

κλάσματα όπως φαίνεται στον Πίνακα 76.

Πίνακας 76

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλυσης	Μάζα (mg)
P6a	85:15 cHex-EtOAc	40,4
P6b	80:20 cHex-EtOAc	9,3
P6c	100% EtOAc	12,2

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ^1H NMR.

Το υπόλειμμα P6a υποβλήθηκε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 77 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλυσης.

Πίνακας 77

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	85:15 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (t_R , min)
P6a1	0,3	18,0
P6a2	0,7	19,5
P6a3	1,1	20,7
P6a4	3,0	22,0
P6a5	1,2	22,5
P6a6	2,5	23,5
P6a7	9,9	24,8
P6a8	2,1	28,1
P6a9	0,7	31,1
P6a10	1,5	38,0
P6a11	0,6	48,4

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι τα

υπολείμματα P6a3 και P6a4 καθώς και τα υπολείμματα P6a6, P6a7 και P6a8 ήταν καθαροί μεταβολίτες (**44** και **43** αντίστοιχα).

Το υπόλειμμα P6a10 υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό με HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας φαίνονται στον Πίνακα 78.

Πίνακας 78

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	78:22 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P6a10a	0,1	16,6
P6a10b	0,3	16,9
P6a10c	0,9	20,2

Τα υπολείμματα P6a10a και P6a10c ήταν καθαροί μεταβολίτες, όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR και αντιστοιχούν στους μεταβολίτες **43** και **49**.

Το υπόλειμμα P7 μάζας 60,8 mg υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 79 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 79

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	75:25 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P7a	3,2	9,7
P7b	14,0	10,2
P7c	4,2	16,4

P7d	1,5	17,6
P7e	3,8	22,3
P7f	1,5	27,0

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$, με βάση τον οποίο επιλέχθηκαν τα κλάσματα P7a, P7b, P7c και P7e για περαιτέρω διαχωρισμό με HPLC.

Τα κλάσματα P7a, P7b, P7c και P7e υποβλήθηκαν σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στους Πίνακες 80, 81, 82 και 83 αντίστοιχα, μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 80

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	75:25 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P7a1	0,9	10,3
P7a2	1,4	11,6

Πίνακας 81

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	75:25 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P7b1	1,6	9,3
P7b2	6,8	11,7
P7b3	4,5	12,8

Πίνακας 82

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	78:22 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P7c1	0,8 mg	20,4

Πίνακας 83

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	80:20 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P7e1	0,1	30,5
P7e2	0,5	34,6
P7e3	0,5	37,3

Με βάση τον έλεγχο με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε πως τα υπολείμματα P7a1, P7b2, P7c1 και P7e2 ήταν καθαρές ουσίες. Τα υπολείμματα P7a1, P7b2 και P7c1 αντιστοιχούν στους μεταβολίτες **44**, **43** και **49**, ενώ το υπόλειμμα P7e2 βρίσκεται στο στάδιο της ταυτοποίησης.

Επιλέχθηκαν τα κλάσματα P7a2 και P7b1, που με βάση τη φασματοσκοπία ^1H NMR επρόκειτο για μίγμα των ίδιων μεταβολιτών, για περαιτέρω διαχωρισμό με HPLC, οι συνθήκες της οποίας φαίνονται στον 0, μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 84

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	78:22 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P7ab1	0,8	12,6
P7ab2	0,3	14,8
P7ab3	0,5	16,6
P7ab4	0,4	17,9

Όπως διαπιστώθηκε με βάση τα φάσματα ^1H NMR τα υπολείμματα P7ab1 και P7ab3 ήταν καθαρές ουσίες και αντιστοιχούν στους μεταβολίτες **44** και **43**.

Ακολούθως, επιλέχθηκε το κλάσμα P7b3 για περαιτέρω διαχωρισμό με HPLC, οι συνθήκες της οποίας φαίνονται στον Πίνακας 85, μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 85

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	78:22 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P7b3a	0,2	12,2
P7b3b	0,5	14,3
P7b3c	2,9	15,1

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR επιλέχθηκε το κλάσμα P7b3c για επιπλέον διαχωρισμό με HPLC.

Το υπόλειμμα P7b3c υποβλήθηκε σε περαιτέρω διαχωρισμό με HPLC, οι συνθήκες της οποίας φαίνονται στον Πίνακας 86, μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους

έκλυσης.

Πίνακας 86

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μ m (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	82:18 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (t_R , min)
P7b3c1	0,5	18,0
P7b3c2	0,2	18,5
P7b3c3	1,5	19,9

Αφού έγινε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR, το κλάσμα P7b3c3 υποβλήθηκε ακολούθως σε διαχωρισμό μέσω HPLC όπως δείχνει ο Πίνακας 87.

Πίνακας 87

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μ m (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	82:18 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (t_R , min)
P7b3c3a	0,4	18,5
P7b3c3b	0,5	20,0

Όπως διαπιστώθηκε με βάση τον έλεγχο με φασματοσκοπία ^1H NMR, το υπόλειμμα P7b3c3b ήταν καθαρός μεταβολίτης, ο οποίος βρίσκεται στο στάδιο της ταυτοποίησης.

Το υπόλειμμα P8 μάζας 34,7 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex-EtOAc. Συλλέχθηκαν δύο κλάσματα όπως φαίνεται στον Πίνακα 88.

Πίνακας 88

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλυσης	Μάζα (mg)
P8a	78:22 cHex-EtOAc	27,2
P8b	100% EtOAc	3,8

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ^1H NMR.

Το υπόλειμμα P8a υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακας 89 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλυσης.

Πίνακας 89

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	75:25 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (t_R , min)
P8a1	0,8	13,5
P8a2	2,0	14,8
P8a3	0,7	18,2
P8a4	3,0	19,9
P8a5	0,8	20,1
P8a6	1,4	23,3
P8a7	1,8	29,0
P8a8	6,9	39,8

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα P8a2, P8a8 και P8a4 ήταν καθαροί μεταβολίτες, ενώ τα υπολείμματα P8a8 και P8a4 αντιστοιχούν στους μεταβολίτες **41** και **40**.

Το υπόλειμμα P9 μάζας 51,2 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex-EtOAc. Συλλέχθηκαν δύο κλάσματα όπως φαίνεται στον Πίνακας 90.

Πίνακας 90

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλυσης	Μάζα (mg)
P9a	78:22 cHex-EtOAc	40,0
P8b	100% EtOAc	9,1

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ^1H NMR.

Το υπόλειμμα P9a υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακας 91 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλυσης.

Πίνακας 91

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	75:25 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (t_R , min)
P9a1	0,3	15,1
P9a2	0,8	19,9
P9a3	4,6	20,2
P9a4	5,5	27,0
P9a5	5,7	28,5
P9a6	1,0	35,0
P9a7	1,0	40,0

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα P9a1, P9a4 και P9a5 ήταν καθαροί μεταβολίτες. Συγκεκριμένα τα φάσματα ^1H NMR των υπολειμμάτων P9a4 και P9a5 ήταν πανομοιότυπα μεταξύ τους, οπότε και συνενώθηκαν (μεταβολίτης **45**). Το κλάσμα P9a3 υποβλήθηκε σε περαιτέρω καθαρισμό μέσω HPLC, όπως περιγράφεται στον στον 0.

Πίνακας 92

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	78:22 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P9a3a	1,0	19,0
P9a3b	1,9	20,7

Όπως διαπιστώθηκε κατόπιν λήψης των φασμάτων ^1H NMR το υπόλειμμα P9a3a ήταν καθαρός μεταβολίτης, που βρίσκεται στο στάδιο της ταυτοποίησης.

Το υπόλειμμα P10 μάζας 22,2 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex-EtOAc. Συλλέχθηκαν δύο κλάσματα όπως φαίνεται στον Πίνακα 93.

Πίνακας 93

Κωδικός Υπολείμματος	Δ /της έκλουσης	Μάζα (mg)
P10a	78:22 cHex-EtOAc	11,3
P10b	100% EtOAc	11,1

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ^1H NMR.

Το υπόλειμμα P10a υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 94 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 94

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	70:30 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P10a1	0,7	4,2
P10a2	1,6	14,5
P10a3	1,4	14,9
P10a4	0,3	23,0
P10a5	4,7	24,9
P10a6	0,1	40,9

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα P10a3 και P10a5 ήταν καθαροί μεταβολίτες. Το υπόλειμμα P10a5 αντιστοιχεί στο μεταβολίτη **42**, ενώ το υπόλειμμα P10a3 βρίσκεται στο στάδιο της ταυτοποίησης.

Το κλάσμα P10a2 υποβλήθηκε σε ανάλυση με HPLC, από όπου προέκυψε το υπόλειμμα P10a2b, το οποίο όπως διαπιστώθηκε με βάση το φάσμα ^1H NMR ήταν ταυτόσημο με το υπόλειμμα P10a3:

Πίνακας 95

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	70:30 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P10a2a	0,1	14,9
P10a2b	0,3	15,3

Τα υπολείμματα P11 μάζας 11,7 mg και P12 μάζας 9,5 mg υποβλήθηκαν ξεχωριστά σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα

cHex-EtOAc, όπως φαίνεται στους Πίνακες 96 και 97.

Πίνακας 96

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλυσης	Μάζα (mg)
P11a	78:22 cHex-EtOAc	4,0
P11b	100% EtOAc	5,7

Πίνακας 97

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλυσης	Μάζα (mg)
P12a	78:22 cHex-EtOAc	0,7
P12b	100% EtOAc	8,2

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και με φασματοσκοπία ^1H NMR. Στη συνέχεια συνενώθηκαν τα υπολείμματα P11a και P12a, τα οποία υποβλήθηκαν σε HPLC με τον κωδικό P11a, όπως φαίνεται στον Πίνακα 98.

Πίνακας 98

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλυσης	70:30 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλυσης (t_R , min)
P11a1	0,5	5,1
P11a2	0,2	27,0
P11a3	0,7	27,5

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR, όπως και διαπιστώθηκε ότι όλα τα κλάσματα αντιστοιχούσαν σε μίγματα ουσιών.

Στη συνέχεια συνενώθηκαν τα κλάσματα P10b και P11b και το υπόλειμμα που προέκυψε υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex-EtOAc. Συλλέχθηκαν δύο κλάσματα όπως φαίνεται στον Πίνακα 99.

Πίνακας 99

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
P10b1	70:30 cHex-EtOAc	4,7
P10b2	100% EtOAc	7,8

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία TLC και το υπόλειμμα P10b1 υποβλήθηκε σε HPLC, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακας 100 μαζί με τη μάζα των υπολειμμάτων και τους χρόνους έκλουσης.

Πίνακας 100

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 SIL 5 μm (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	70:30 cHex-EtOAc	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
P10b1a	0,1	17,3
P10b1b	1,2	23,8

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR, όπου και διαπιστώθηκε πως το υπόλειμμα P10b1b είναι καθαρός μεταβολίτης, κι επιπλέον ταυτόσημος με το υπόλειμμα P10a5 (Μεταβολίτης **45**).

Στη συνέχεια συνενώθηκαν τα υπολείμματα P10b2 και P12b και το υπόλειμμα που προέκυψε υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης (C-18) και κινητή φάση σύστημα MeOH-H₂O. Συλλέχθηκαν τέσσερα κλάσματα ως εξής όπως φαίνεται στον Πίνακας 101.

Πίνακας 101

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
P12b1	60:40 MeOH-H ₂ O	6,1
P12b2	80:20 MeOH-H ₂ O	3,0
P12b3	100% MeOH	3,6
P12b4*	-	1,2

*(παραλήφθηκε ως το υπόλειμμα που παρέμεινε στον περιέκτη του αρχικού δείγματος κατόπιν παραλαβής και του τελευταίου κλάσματος).

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και με φασματοσκοπία ¹H NMR. Το κλάσμα P12b1 υποβλήθηκε σε HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας αναγράφονται στον Πίνακας 102.

Πίνακας 102

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Econosphere C18 10u (250x10mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	60:40 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (<i>t_R</i> , min)
P12b1a	0,7	6,0
P12b1b	1,0	10,0
P12b1c	0,4	13,5
P12b1d	1,5	19,5

Σε όλα τα κλάσματα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ¹H NMR και όπως διαπιστώθηκε, επρόκειτο για μίγματα μεταβολιτών.

Το υπόλειμμα P13 υποβλήθηκε σε HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας περιγράφονται στον Πίνακας 103.

Πίνακας 103

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Econosphere C18 10μ (250x10mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	60:40 MeOH-H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (<i>t_R</i> , min)
P13a	0,1	7,4
P13b	1,3	10,7
P13c	0,3	12,2
P13d	0,9	13,8
P13e	0,8	14,8

Σε όλα τα κλάσματα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ¹H NMR και όπως διαπιστώθηκε τα κλάσματα P13b και P13c καθώς και τα P13d και P13e ήταν ταυτόσημα μεταξύ τους.

Το κλάσμα P14 υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης (C-18) και κινητή φάση σύστημα MeOH:H₂O. Συλλέχθηκαν τρία κλάσματα όπως φαίνεται στον Πίνακα 104.

Πίνακας 104

Κωδικός Υπολείμματος	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
P14a	60:40 MeOH-H ₂ O	18,5
P14b	80:20 MeOH-H ₂ O	3,7
P14c	100% MeOH	3,2

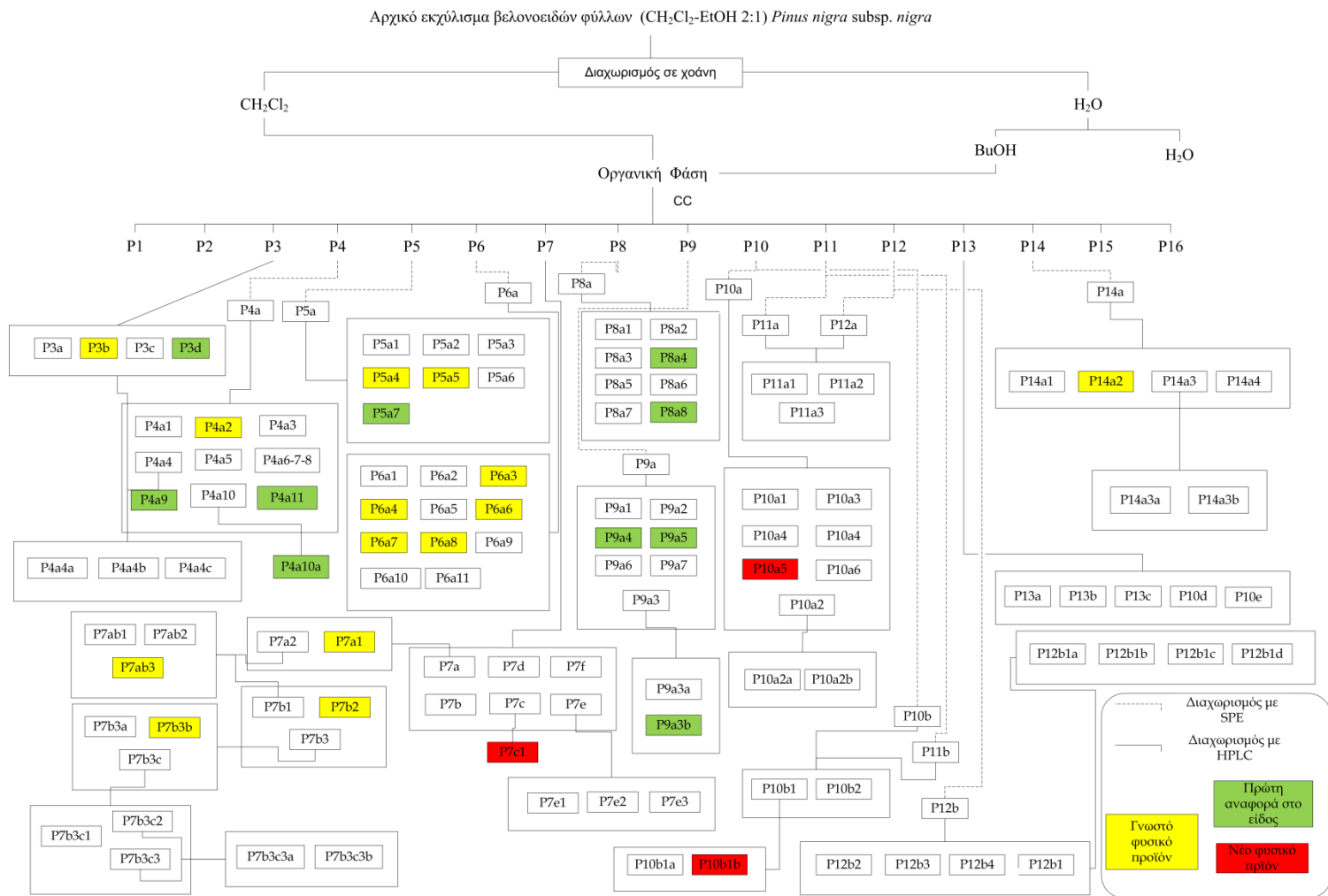
Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και με φασματοσκοπία ¹H NMR. Το κλάσμα P14a υποβλήθηκε σε HPLC αντιστρόφου φάσης, οι συνθήκες της οποίας αναγράφονται στον Πίνακα 105.

Πίνακας 105

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Econosphere C18 10μ (250x10mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	50:50 MeOH:H ₂ O	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25°C	
Ανιχνευτής	R.I.	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (<i>t_R</i> , min)
P14a1	1,0	6,3
P14a2	3,5	8,5
P14a3	2,7	10,5
P14a4	1,8	13,0

Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ¹H NMR, όπου και διαπιστώθηκε πως το υπόλειμμα P14a2 είναι ο μεταβολίτης **48**.

Η πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το υπόλειμμα PNL φαίνεται διαγραμματικά στην Εικόνα 17.



Εικόνα 17. Πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το υπόλειμμα PNL..

2.4.3. Απομόνωση μεταβολιτών από το είδος *Pinus pinea*

Λεπτά κονιοποιημένος φλοιός (300 gr) εκχυλίστηκε εξαντλητικά σε θερμοκρασία δωματίου με μίγμα διαλυτών CH₂Cl₂:MeOH (1:1). Μετά την εξάτμιση των διαλυτών προέκυψε σκούρο ερυθρό υπόλειμμα, το βάρος του οποίου κατόπιν ξήρανσης σε ξηραντήρα ήταν 18,750 gr. Το ολικό εκχύλισμα υπέστη χρωματογραφικό διαχωρισμό σε στήλη υπό κενό, από όπου προέκυψαν 11 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγματα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 29 κλάσματα, όγκου 200 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 11 (Πίνακας 106). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ¹H NMR προκειμένου να αποκτηθεί μία γενική άποψη για τις κατηγορίες των ενώσεων που περιείχαν.

Πίνακας 106

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης (% v/v)						Κωδικός	Μάζα (mg)
	από			έως				
	cHex	EtOAc	MeOH	cHex	EtOAc	MeOH		
1-7	100	-	-	70	30	-	B1	4,2
8-10	70	30	-	60	40	-	B2	680,5
11	50	50	-	50	50	-	B3	244,8
12-13	50	50	-	40	60	-	B4	372,4
14-15	40	60	-	30	70	-	B5	222,8
16	30	70	-	30	70	-	B6	154,9
17-20	20	80	-	10	90	-	B7	1242,1
21-23	-	100	-	-	90	10	B8	202,8
24-26	-	90	10	-	50	50	B9	144,2
27-28	-	-	100	-	-	100	B10	1824,1
29	-	-	100	-	-	100	B11	3498,2

Το υπόλειμμα B2 μάζας 680,5 mg υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη βαρύτητας, από όπου προέκυψαν 10 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση

σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγματα cHex και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 100 κλάσματα, όγκου 17 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 10 (Πίνακας 107). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR προκειμένου να αποκτηθεί μία γενική άποψη για τις κατηγορίες των ενώσεων που περιέχονταν στα κλάσματα.

Πίνακας 107

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης (% v/v)				Κωδικός	Μάζα (mg)
	από		έως			
	cHex	EtOAc	cHex	EtOAc		
1-17	97	3	95	5	B2a	56,3
18-30	95	5	95	5	B2b	42,9
31-40	95	5	93	7	B2c	22,0
41-48	93	7	93	7	B2d	51,9
49-53	93	7	93	7	B2e	50,7
54-72	93	7	93	7	B2f	337,1
73-75	93	7	93	7	B2g	35,1
76-77	93	7	93	7	B2g'	15,1
78-96	93	7	85	15	B2h	60,0
97-100	80	20	80	20	B2i	116,3

Όπως διαπιστώθηκε με βάση τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και το φάσμα ^1H NMR, το υπόλειμμα B2g ήταν μίγμα λιπαρών εστέρων του φερουλικού οξέος και αντιστοιχεί στο μίγμα **51**.

Το υπόλειμμα B7 μάζας 1242,1 mg υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη βαρύτητας, από όπου πρόεκυψαν 11 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση ισοκρατικό σύστημα διαλυτών. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγμα cHex EtOAc 70:30 αλλά για την παραλαβή των τριών τελευταίων κλασμάτων της στήλης χρησιμοποιήθηκαν μίγματα EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 60 κλάσματα, όγκου 25 mL το καθένα, με εξαίρεση τα τρία τελευταία με όγκο 100 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με

σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 11 (Πίνακας 108). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR προκειμένου να αποκτηθεί μία γενική άποψη για τις κατηγορίες των ενώσεων που περιείχαν.

Πίνακας 108

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης (% v/v)						Κωδικός	Μάζα (mg)
	από			έως				
	cHex	EtOAc	MeOH	cHex	EtOAc	MeOH		
1-19	70	30	-	70	30	-	B7a	36,9
20-21	70	30	-	70	30	-	B7b	20,0
22	70	30	-	70	30	-	B7c	17,1
23-24	70	30	-	70	30	-	B7d	140,9
25	70	30	-	70	30	-	B7e	106,0
26-28	70	30	-	70	30	-	B7f	287,9
29-36	70	30	-	70	30	-	B7g	164,9
37-48	70	30	-	70	30	-	B7h	35,7
49-56	70	30	-	70	30	-	B7i	7,5
57-58	70	30	-	-	100	-	B7j	7,3
59-60	-	50	50	-	-	100	B7k	212,6

Το υπόλειμμα B7f μάζας 287,9 mg υποβλήθηκε σε περαιτέρω χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη βαρύτητας, από όπου πρόεκυψαν εννέα κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγματα CH_2Cl_2 και MeOH με προσθήκη στο μίγμα και 0,75% οξικού οξέος (AcOH) και 1,0% ύδατος (H_2O). Συνολικά παρελήφθησαν 26 κλάσματα, όγκου 15 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε εννέα (Πίνακας 109). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR προκειμένου να αποκτηθεί μία γενική άποψη για τις κατηγορίες των ενώσεων που περιείχαν.

Πίνακας 109

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης (% v/v)				Κωδικός	Μάζα (mg)
	από		έως			
	CH ₂ Cl ₂	MeOH	CH ₂ Cl ₂	MeOH		
1	90	10	90	10	B7f1	16,7
2	90	10	90	10	B7f2	6,5
3-4	90	10	90	10	B7f3	3,2
5	90	10	90	10	B7f4	0,6
6	90	10	90	10	B7f5	24,5
7	90	10	90	10	B7f6	122,6
8-9	90	10	90	10	B7f7	25,8
10-16	90	10	90	10	B7f8	28,6
17-26	85	15	50	50	B7f9	10,0

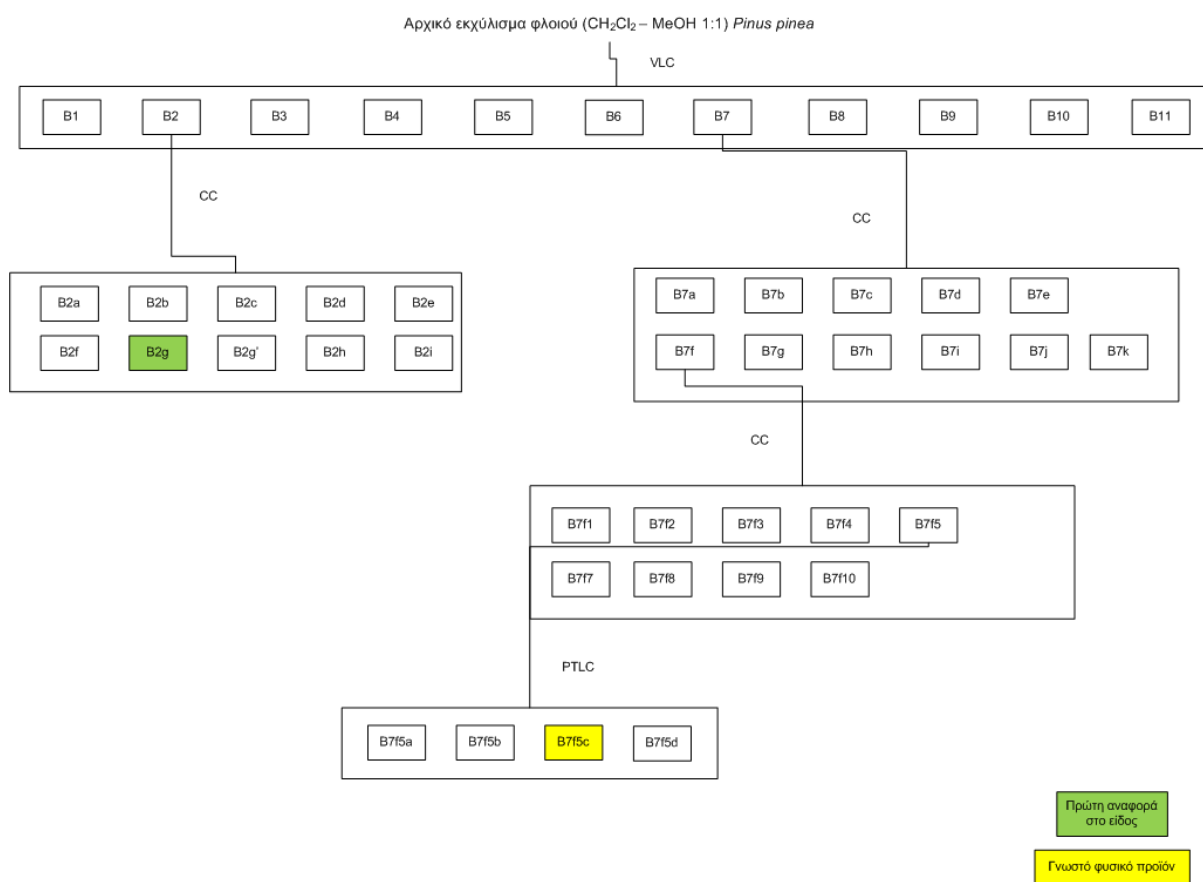
Το υπόλειμμα B7f5 μάζας 24,5 mg υποβλήθηκε σε διαχωρισμό με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, με κελλουλόζη ως στατική φάση και υδατικό διάλυμα οξικού οξέος (AcOH) 30% ως κινητή. Παραλήφθηκαν τέσσερα ζώνες. Στον Πίνακα 110 αναγράφεται η μάζα των υπολειμμάτων από την κάθε ζώνη, καθώς και το R_f, που αντιστοιχεί στην κάθε μία:

Πίνακας 110

Κωδικός	R _f	Μάζα (mg)
B7f5a	0,1	1,4
B7f5b	0,5	1,2
B7f5c	0,6	10,7
B7f5d	0,7	1,6

Κατόπιν ελέγχου των υπολειμμάτων με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα B7f5c ήταν ο μεταβολίτης **50**.

Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνεται διαγραμματικά η πορεία απομόνωσης του μεταβολίτη **50** και παραλαβής του μίγματος **51**. Η πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το υπόλειμμα PPB φαίνεται διαγραμματικά στην Εικόνα 18.



Εικόνα 18. Πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το υπόλειμμα PPB.

2.4.4. Συνοπτική παρουσίαση απομονωμένων μεταβολιτών

Συνολικά απομονώθηκαν 50 μεταβολίτες και ένα μίγμα. Συγκεκριμένα 38 μεταβολίτες από τους κώνους του είδους *P. heldreichii*, 12 από το φύλλωμα της *P. nigra* subsp. *nigra* και ένας μεταβολίτης, εκ των οποίων ο ένας ήταν κοινός με ένα μεταβολίτη από τους κώνους της *P. heldreichii* (μεταβολίτης 9) καθώς και ένα μίγμα από το φλοιό της *P. pinea*. Αναλυτικότερα περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα ο αριθμός κάθε μεταβολίτη, όπως αυτός παρουσιάστηκε στην περιγραφή της πειραματικής πορείας, ο κωδικός του, τα κλάσματα, τα οποία αντιστοιχούσαν στο συγκεκριμένο μεταβολίτη και η συνολική του μάζα σε mg.

Μεταβολίτης	Κωδικός	Κλάσματα	Συνολική μάζα (mg)
1	PHC37	HC5J11b4, HC5J10B5	22.9
2	PHC32	HC5i4e	1.1
3	PHC34	HC5J4	2.2
4	PHC25	HC5g1a2, HC5i1, hc5i2b, hc5i3b, HC5J12f	17.8
5	PHC45	hc7h4e, hc7f3a, hc7g3	18.2
6	PHC26	HC5i3f	3.5
7	PHC27	HC5i3g, HC5i3W2, HC5i4d	28.9
8	PHC33	HC5m	272.1
9	PHC18	HCf2k2, HC2f2l2, HC2f2m4, HC2f5i, HC 2f4b+c, HC2f2i3, P3b, P4a2	26.7
10	PHC08	HC2B2cd4c	1.3
11	PHC07	HC2B2cd3d, HC2b2cd2d	21.6
12	PHC55	HC2f4d	1.1
13	PHC20	HC2f5b, hc5j12b	17.6
14	PHC41	hc5j12c	4.6
15	PHC31	HC5i3e	1.1
16	PHC19	HC2f6d, HC 2f2i2, HC2f4a	6.3
17	PHC28	HC5i3W3, HC5i4f, HC5i5c	44.1
18	PHC50	HC7f2c	4.5
19	PHC10	HC2B2cd6b	0.1
20	PHC11	HC2B2cd7b	0.1
21	PHC15	HC2f3h1	1.2
22	PHC04	HC2dR1W5, HC2dR1W6, HC2k7b2	21.8
23	PHC17	HC2f2k6, HC2f2l5, HC2f2m5, hc2f2i5, hc2f2h2	13.2
24	PHC49	HC7f4d	5.2
25	PHC48	HC7f4c	2.2

Μεταβολίτης	Κωδικός	Κλάσματα	Συνολική μάζα (mg)
26	PHC38	HC5J10b4	0.8
27	PHC53	HC7h3g	1.0
28	PHC06	HC2B5a4	1.6
29	PHC44	hc5l2g6	0.6
30	PHC36	HC5J11b2 , HC5J10b3	19.3
31	PHC03	HC2dR1W3, HC2dR1b, HC2f2g2, HC2f2j3, HC2f2k4	57.6
32	PHC54	HC2f5c1	0.5
33	PHC01	HC2d6d	22.4
34	PHC02	HC2d5, HC2d6c	35.1
35	PHC46	hc7f2b	7.0
36	PHC35	HC5J11a4	1.5
37	PHC16	HC2f3g1	1.5
38	PHC05	HC2B3	63.2
39	PN09	P4a10a	0.5
40	PN12	P9a4	4.9
41	PN13	P8a8	0.8
42	PN20	P10a5	4.7
43	PN3	P7ab3, P7b2, P6a10a, P6a6-8, P5a5, P4a11	22.0
44	PN5	P5a4, P6a3, P6a4, P7a1, P7ab1	11.6
45	PN17	P9a4-5, P10a5	11.2
46	PN4	P5a7, P4a11	3.2
47	PN1	P3d	4.7
48	PN22	P14a2	3.5
49	PN6	P7c1	0.8
50	PB1	B7f5c	9.0
Μίγμα 51	PB2	B2g	35.0

2.5. Παραλαβή αιθερίων ελαίων

Το προς εξέταση φυτικό υλικό (νωπά βελονοειδή φύλλα 54 *taxa*) τμήθηκε αδρομερώς και υποβλήθηκε σε υδραπόσταξη. Για την πραγματοποίηση της απόσταξης χρησιμοποιήθηκε συσκευή τύπου Clevenger με τροποποιημένο ψυχόμενο υποδοχέα αιθερίων ελαίων. Η επιπλέον ψύξη που εφαρμόστηκε είχε σκοπό τη μείωση των παραπροϊόντων της θερμικής κατεργασίας. Η απόσταξη διήρκεσε 3 ώρες. Κατόπιν, το αιθέριο έλαιο παραλήφθηκε με μικρή ποσότητα πεντανίου, ενώ στη συνέχεια έγινε προσθήκη άνυδρου θειικού νατρίου για την απομάκρυνση της υγρασίας. Το αιθέριο έλαιο διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 4°C μέχρι να αναλυθεί.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

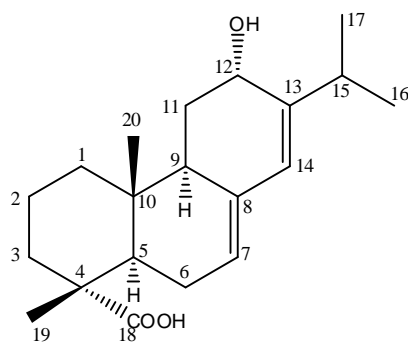
3.1. Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών από το είδος *Pinus heldreichii*

Η ταυτοποίηση των απομονωμένων μεταβολιτών βασίστηκε στην ανάλυση των φασματοσκοπικών τους δεδομένων (NMR, MS) και στη σύγκρισή τους με τα δεδομένα ανάλογων δομών της βιβλιογραφίας.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα των δευτερογενών μεταβολιτών **1–38** και περιγράφεται ο καθορισμός της χημικής τους δομής.

3.1.1. *Μεταβολίτης 1*: 12α-Υδροξύ-7,13-αβιεταδιεν-18-οϊκό οξύ (12α-υδροξύ-αβιετικό οξύ)

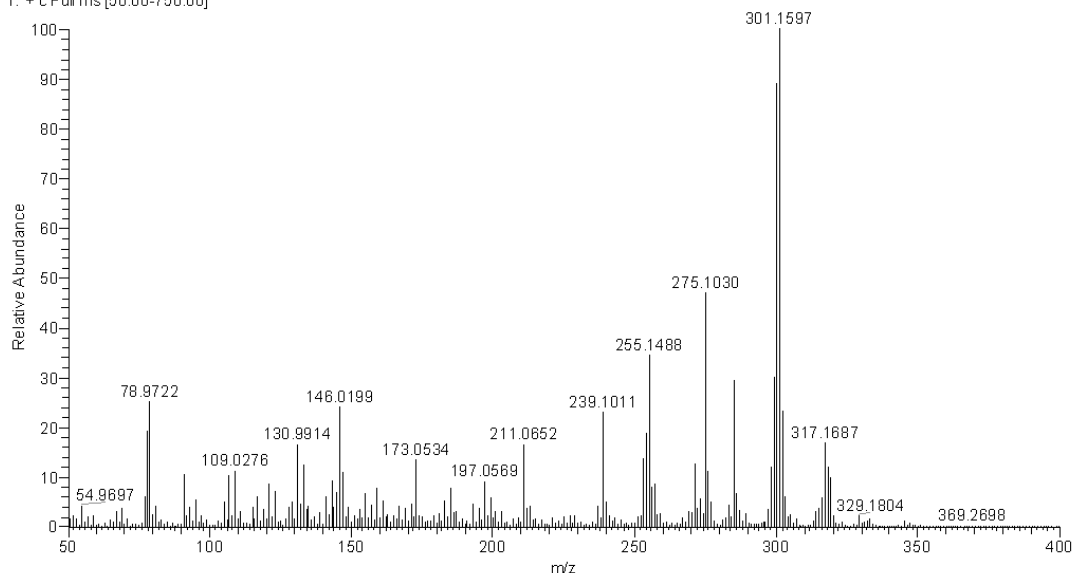
Ο μεταβολίτης **1** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 22.9 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **1** οδήγησε στο μοριακό τύπο C₂₀H₃₀O₃.



1

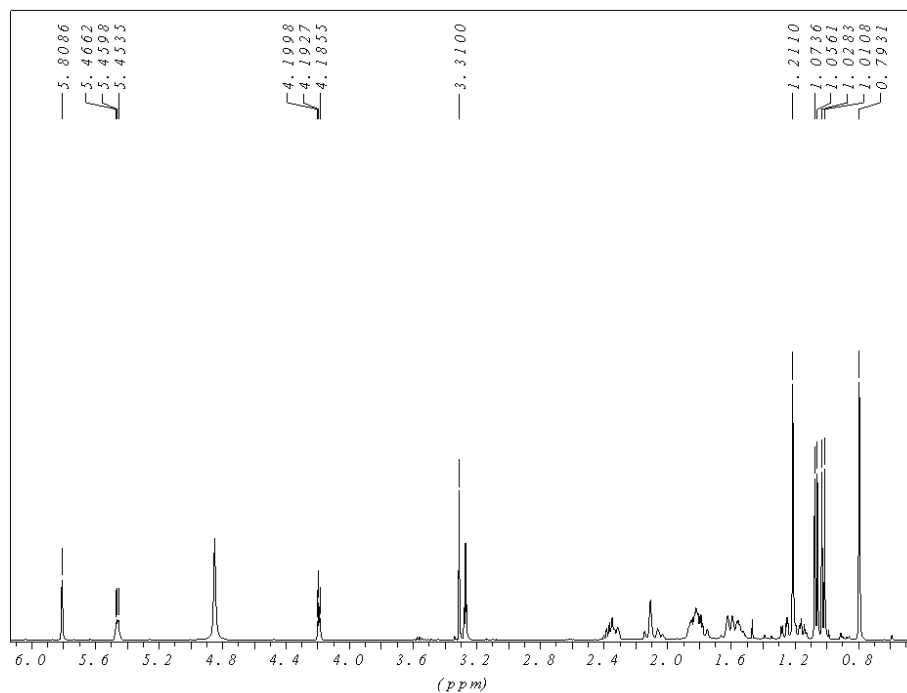
Συγκεκριμένα, το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **1** (Εικ. 19) εμφάνισε μοριακό ιόν [M]⁺ σε *m/z* 318 και θραύσμα [M-H₂O]⁺ σε *m/z* 300.

PHC37 #32 RT: 0.78 AV: 1 NL: 4.79E6
T: + c Full ms [50.00-750.00]



Εικόνα 19. Φάσμα μάζας (PCIMS) του μεταβολίτη **1**.

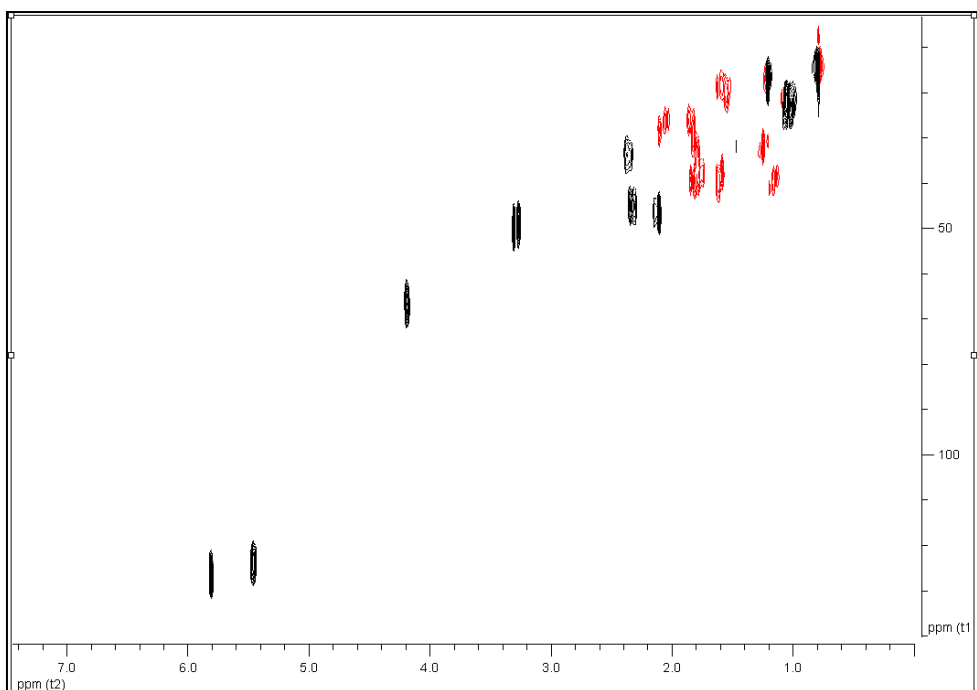
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **1** (Εικ. 20) παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.21 και 0.79, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) δύο διπλές κορυφές σε δ 1.06 και 1.02, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια και αποδόθηκαν στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τριτοταγές άτομο άνθρακα, (iii) μία πολλαπλή κορυφή στα 4.26 ppm, που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε στο πρωτόνιο ενός οξυγονωμένου μεθινίου, και (iv) μια ευρεία απλή και μία απλή κορυφή δ 5.46 και 5.81, αντίστοιχα, που η κάθε μία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσαν σε δυο ολεφινικά πρωτόνια.



Εικόνα 20. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **1**.

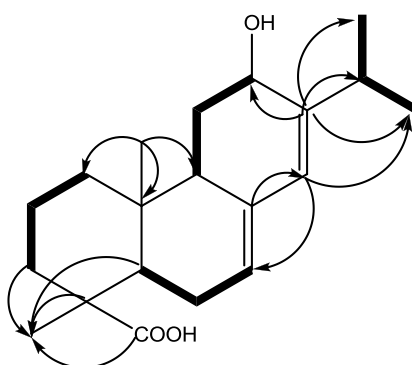
Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **1** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT (Εικ. 21), COSY (Εικ. 23) και HMBC (Εικ. 24).

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τεσσάρων μεθυλίων, πέντε μεθυλενίων και έξι μεθινίων, εκ των οποίων δύο ήταν ολεφινικά και ένα οξυγονωμένο. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

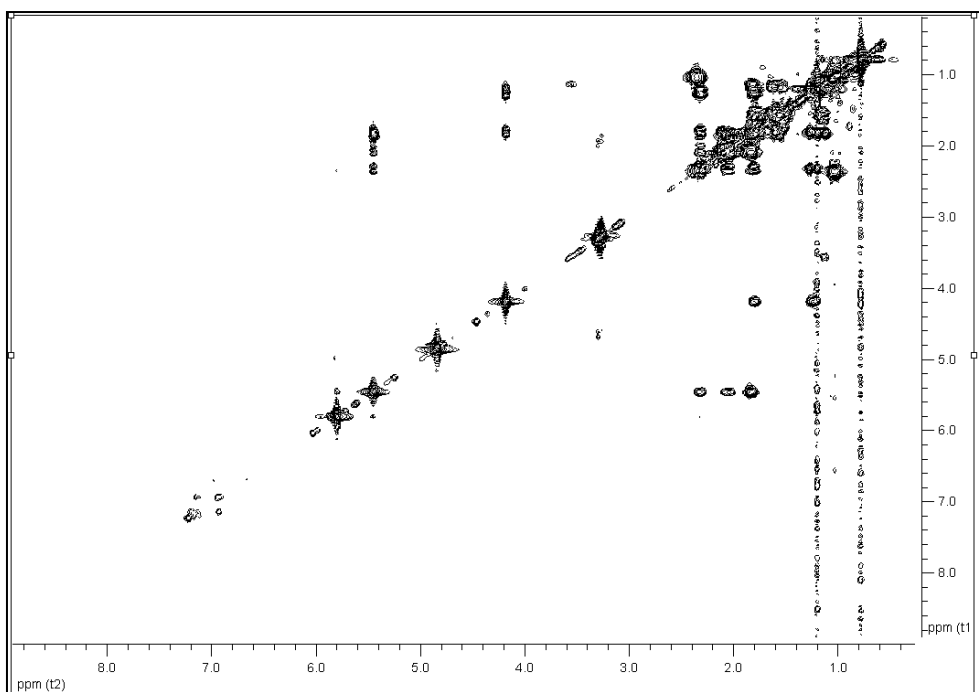


Εικόνα 21. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **1**.

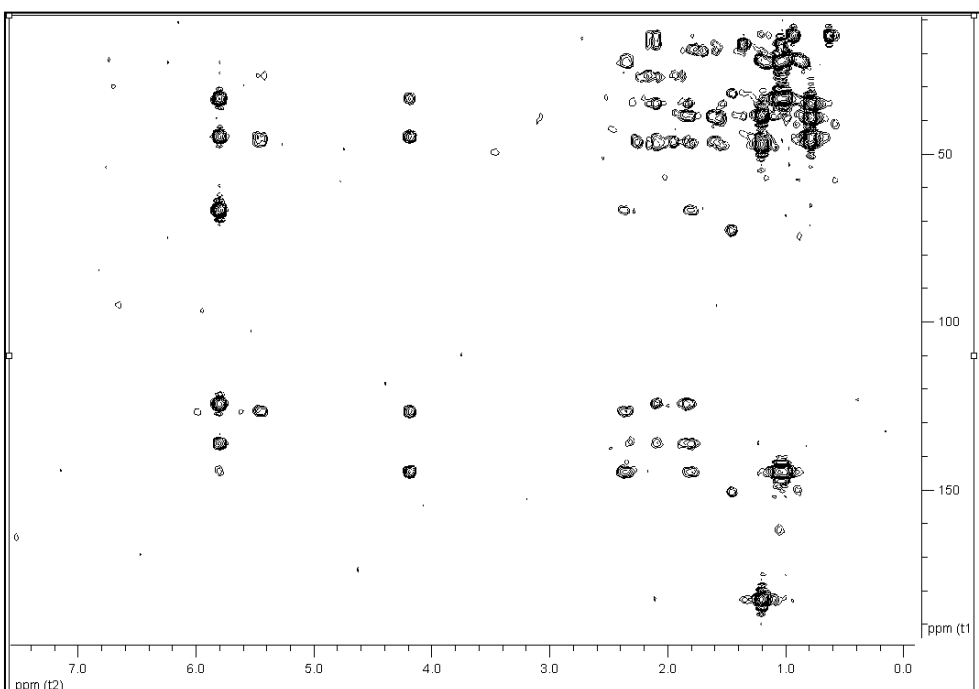
Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY μεταξύ των μεθυλενικών πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/ H₂-3, όπως και των H-5/H₂-6, H₂-6/H-7 καθώς και των H-9/H₂-11 και H₂-11/H-12 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6 και C-7 και των C-9, C-11 και C-12, αντίστοιχα. Επίσης, παρατηρήθηκαν συζεύξεις των H₃-16 και H₃-17 με το μεθινικό πρωτόνιο H-15, υποδεικνύοντας την ύπαρξη ομάδας ισοπροπυλίου. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC, οι σημαντικότερες εκ των οποίων διακρίνονται στην Εικ. 22, προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο.



Εικόνα 22. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **1**.



Εικόνα 23. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 1.



Εικόνα 24. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 1.

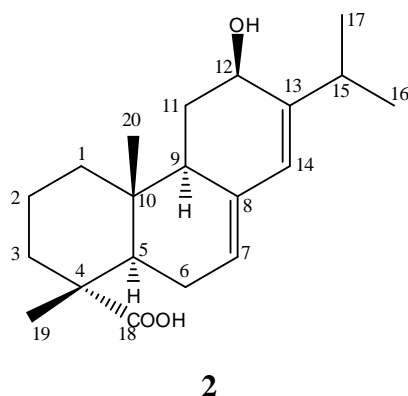
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 12 α -υδρόξυ-7,13-αβιεταδιεν-18-οϊκό οξύ (12 α -υδρόξυ-αβιετικό οξύ) (Bleif et al. 2011), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 111.

Πίνακας 111 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **1** σε CD₃OD (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

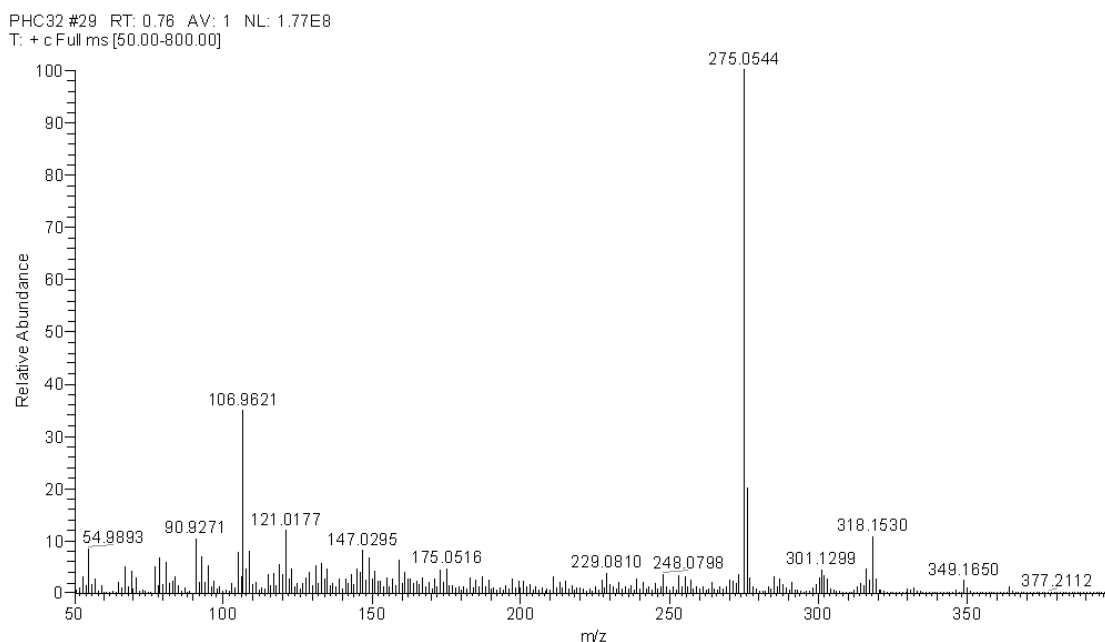
Θέση	δ_C	δ_H
1a		1.59 m
1b	39.4	1.14 m
2	19.1	1.58 m
3a		1.79 m
3b	38.6	1.76 m
4	47.0	-
5	46.5	2.12 m
6a		2.06 m
6b	26.9	1.83 m
7	124.5	5.46 m
8	136.2	-
9	44.7	2.31 m
10	35.1	-
11a		1.79 m
11b	32.0	1.24 dd (13.3, 3.5)
12	66.8	4.19 t (2.9)
13	144.8	-
14	126.7	5.81 s
15	33.7	2.36 m
16	22.7	1.02 s (7.0)
17	22.1	1.06 s (7.0)
18	182.5	-
19	17.5	1.21 s
20	14.3	0.78 s

3.1.2. Μεταβολίτης 2: 12β-Υδροξύ-7,13-αβιεταδιεν-18-οϊκό οξύ (12β-υδροξύ-αβιετικό οξύ)

Ο μεταβολίτης **2** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 1.1 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **2** οδήγησε στο μοριακό τύπο C₂₀H₃₀O₃.



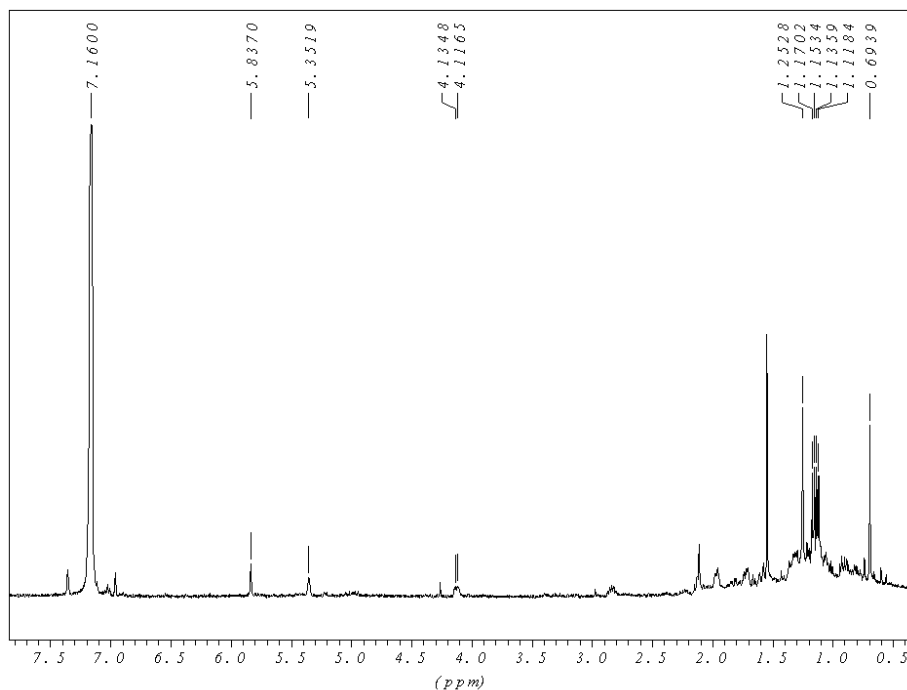
Συγκεκριμένα, το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **2** (Εικ. 25) εμφάνισε μοριακό ιόν [M]⁺ σε *m/z* 318 και θραύσμα [M-H₂O]⁺ σε *m/z* 300.



Εικόνα 25. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **2**.

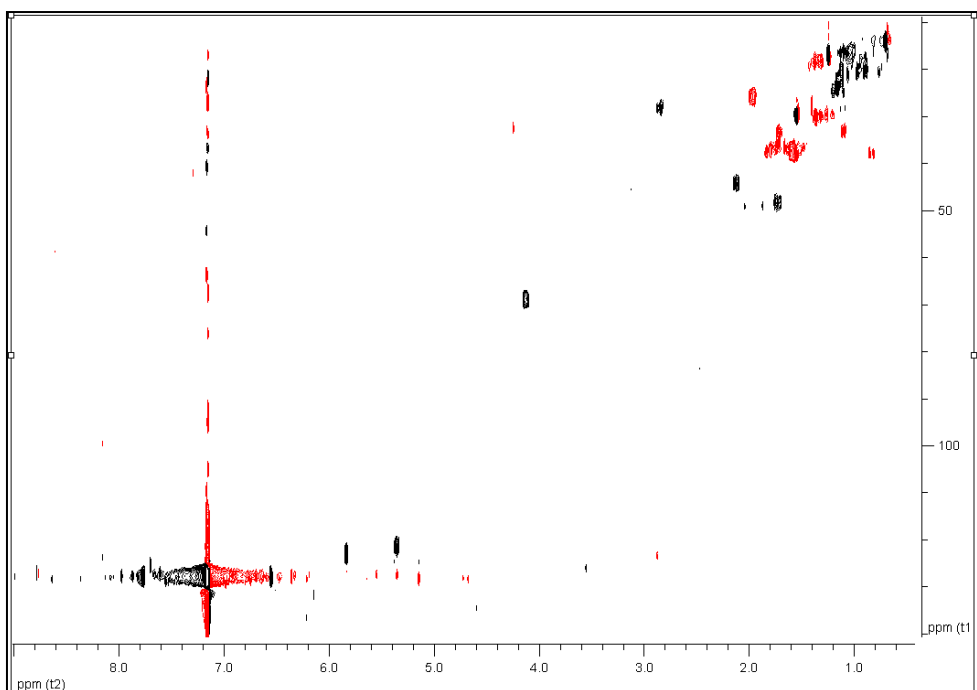
Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **2** (Εικ. 26) παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.25 και 0.69, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) δύο διπλές κορυφές σε δ 1.12 και 1.16, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια και αποδόθηκαν στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τριτοταγές άτομο άνθρακα, (iii) μία πολλαπλή

κορυφή στα 4.12 ppm, που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε στο πρωτόνιο ενός οξυγονωμένου μεθινίου, και (iv) μια ευρεία απλή και μία απλή κορυφή δ 5.35 και 5.84 αντίστοιχα, που η κάθε μία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο.



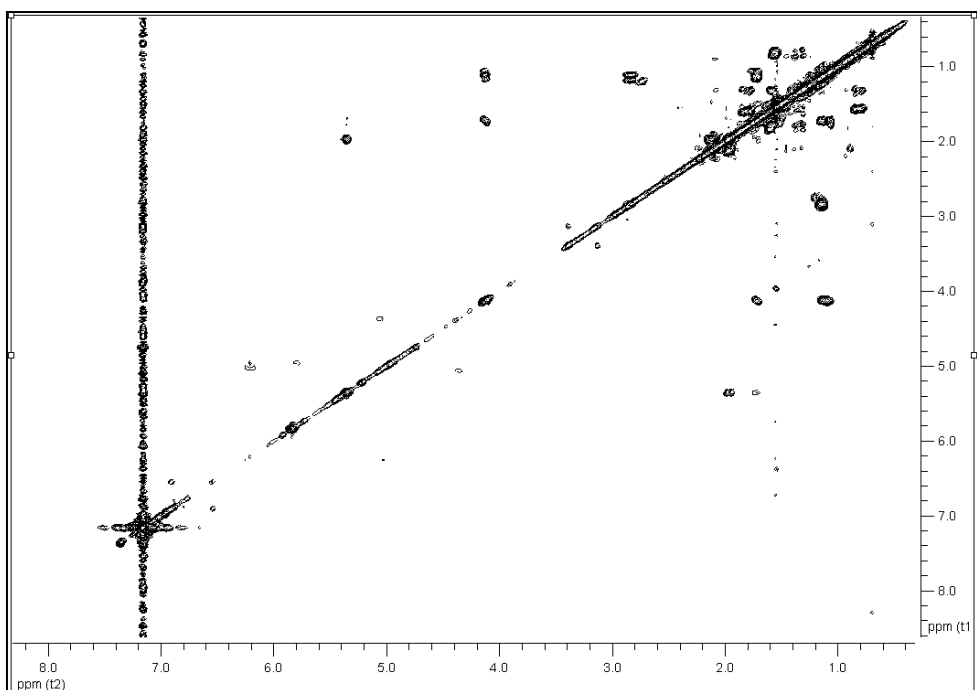
Εικόνα 26. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **2**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 27) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τεσσάρων μεθυλίων, πέντε μεθυλενίων και έξι μεθινίων, δύο εκ των οποίων ολεφινικά και ένα οξυγονωμένο. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

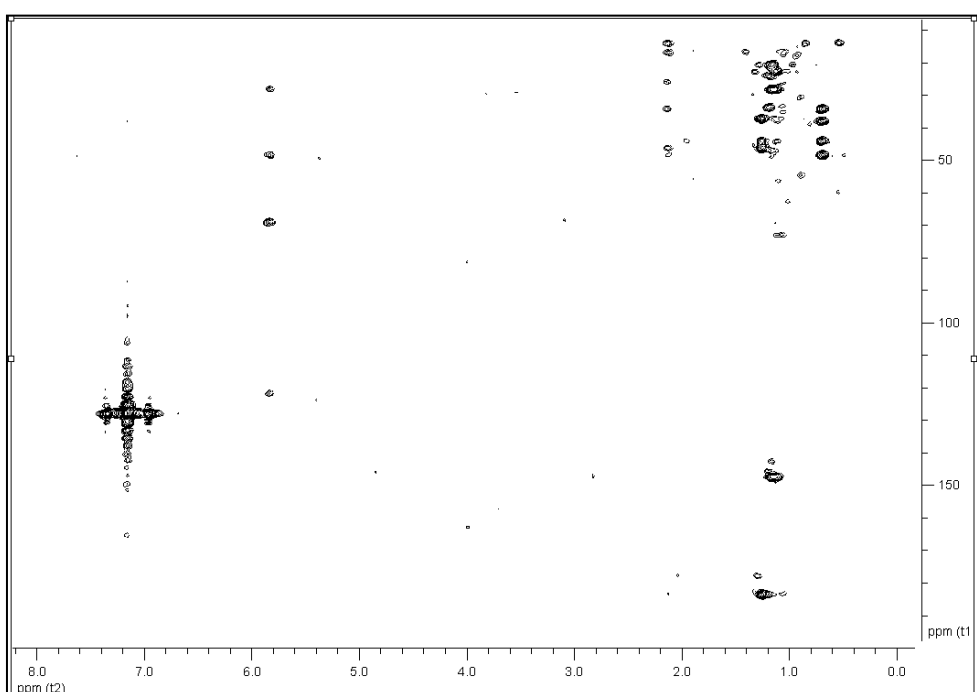


Εικόνα 27. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **2**.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **2** με τα αντίστοιχα του **1** κατέστησε φανερή τη δομική ομοιότητα των μορίων. Ανάλυση των φασμάτων HSQC-DEPT (Εικ. 27), COSY (Εικ. 28) και HMBC (Εικ. 29) του μεταβολίτη **2** οδήγησε στο συμπέρασμα ότι επρόκειτο για κάποιο στερεοϊσομερές του μεταβολίτη **1**, πιθανότατα στον C-12, εφόσον ο συγκεκριμένος άνθρακας συντονιζόταν σε εμφανώς χαμηλότερα πεδία, ενώ διαφορές στη χημική μετατόπιση παρατηρήθηκαν και στους γειτονικούς άνθρακες. Λόγω αστάθειας του μορίου δεν ήταν δυνατή η λήψη φάσματος NOESY, ώστε να επιβεβαιωθεί πειραματικά η υπόθεση αυτή.



Εικόνα 28. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 2.



Εικόνα 29. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 2.

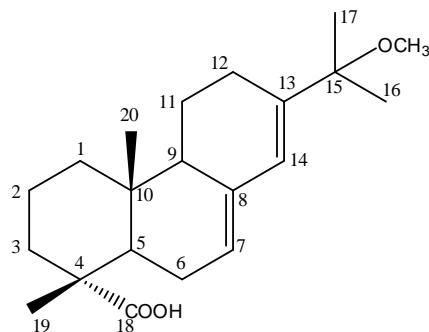
Ωστόσο, κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το αβιετικού σκελετού διτερπένιο 12β-υδρόξυ-7,13-αβιεταδιεν-18-οϊκό οξύ (12β-υδρόξυ-αβιετικό οξύ), επιμερές του μεταβολίτη 1 στον C-12 (Bleif et al. 2011). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη 2 παρουσιάζονται στον Πίνακα 112.

Πίνακας 112 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **2** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a	37.9	1.55 m
1b		0.84 m
2a	18.2	1.37 m
2b		1.31, m
3a	37.6	1.81 m
3b		1.59 m
4	46.5	-
5	44.4	2.11 dd (10.2, 6.7)
6	25.9	1.98 m
7	121.4	5.35 brs
8	nd	-
9	48.6	1.72 m
10	34.4	-
11a	33.1	1.72 m
11b		1.10 m
12	69.0	4.12 brd (10.9)
13	147.4	-
14	123.0	5.83 s
15	28.2	2.83 septet (6.8)
16	20.5	1.12 d (7.0)
17	23.1	1.16 d (7.0)
18	183.1	-
19	16.9	1.25 s
20	14.0	0.69 s

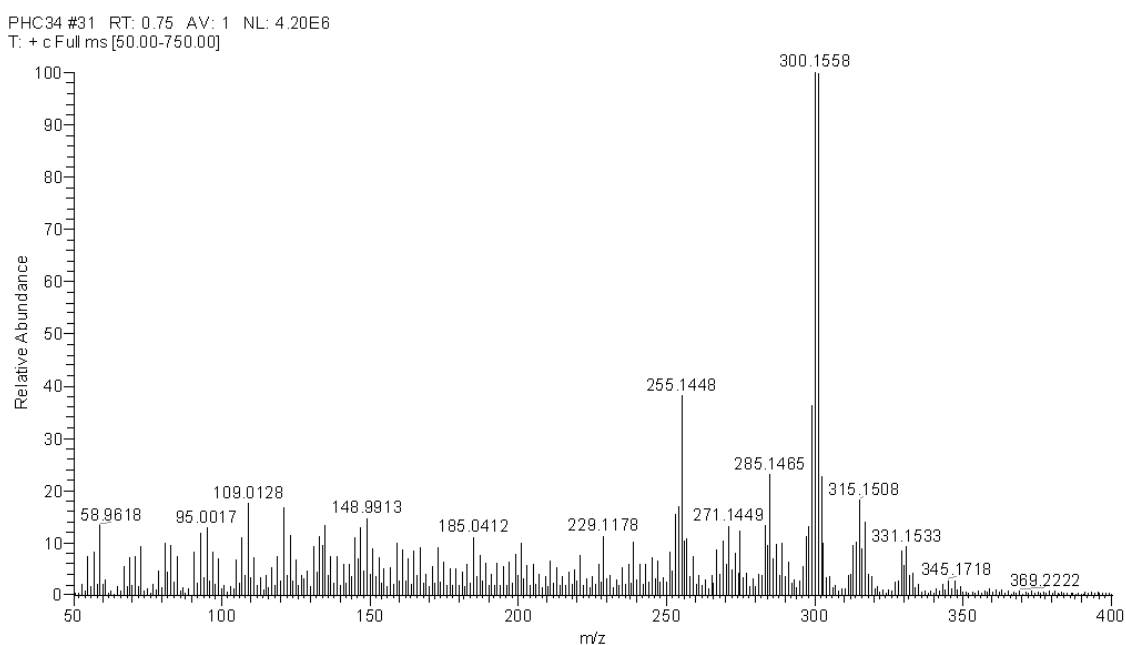
3.1.3. Μεταβολίτης 3: 15-Μεθόξυ-7,13-αβιεταδιεν-18-οϊκό οξύ (15-μεθόξυ-αβιετικό οξύ)

Ο μεταβολίτης **3** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 2,2 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **3** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₁H₃₂O₃.



3

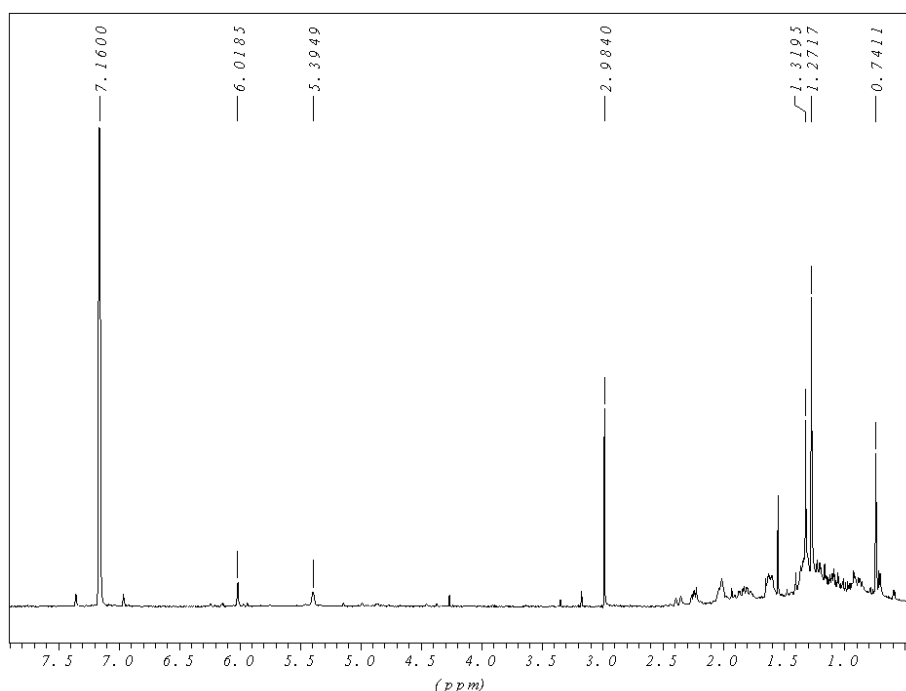
Συγκεκριμένα, το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **3** (Εικ. 30) εμφάνισε μοριακό ιόν [M]⁺ σε *m/z* 332 και θραύσμα [M-OCH₃]⁺ σε *m/z* 300.



Εικόνα 30. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **3**.

Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 31) του μεταβολίτη **3** εμφανίστηκαν (i) μία απλή κορυφή σε δ 1.27, που ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα, δύο απλές κορυφές σε δ 1.32 και 0.74, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια

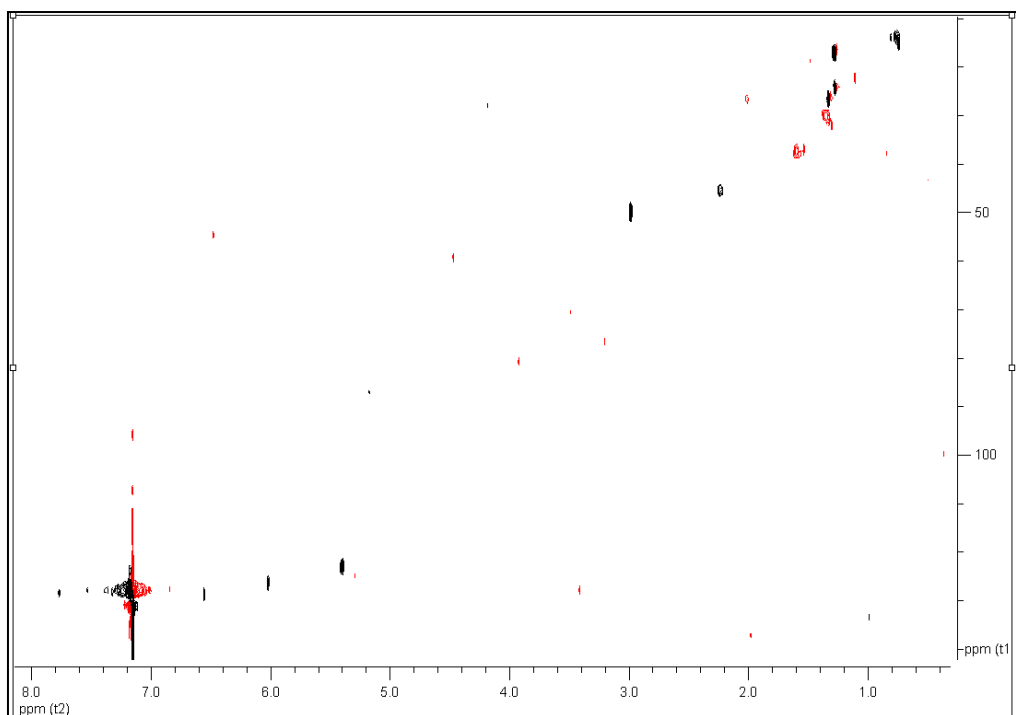
δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία απλή κορυφή στα 2.98 ppm, που ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε ένα οξυγονωμένο μεθύλιο και (iv) δύο ολεφινικών πρωτονίων σε δ 6.02 (brd, 2.1 Hz) και 5.39 (brs).



Εικόνα 31. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **3**.

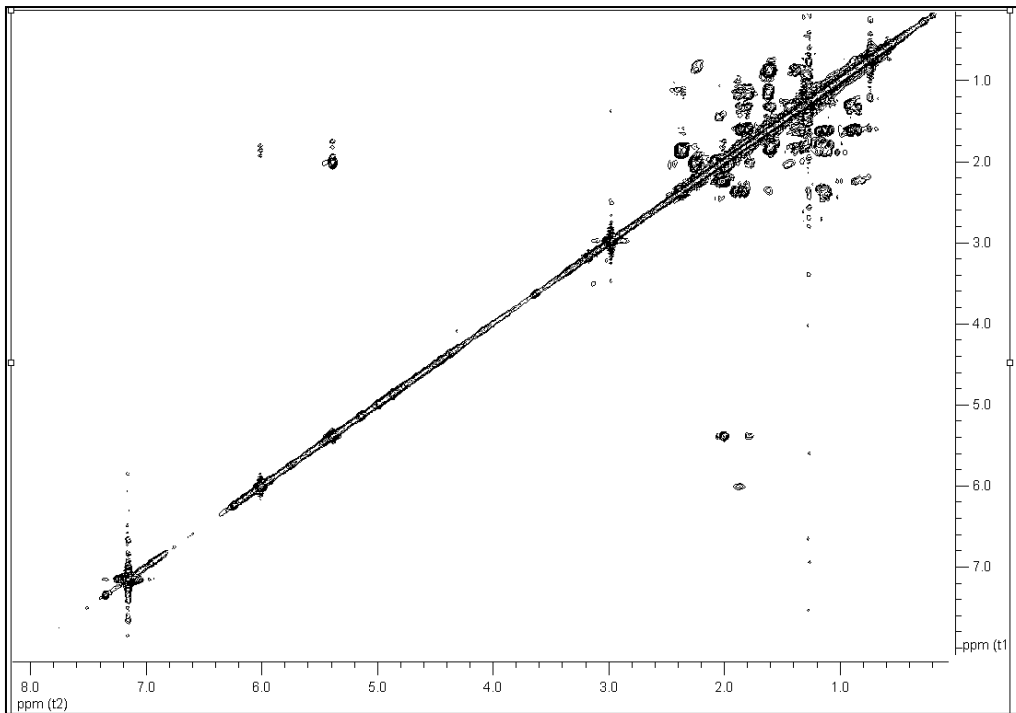
Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **3** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT (Εικ. 32), COSY (Εικ. 33) και HMBC (Εικ. 34)

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τεσσάρων μεθυλίων, έξι μεθυλενίων και τεσσάρων μεθινίων, δύο εκ των οποίων ολεφινικά. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

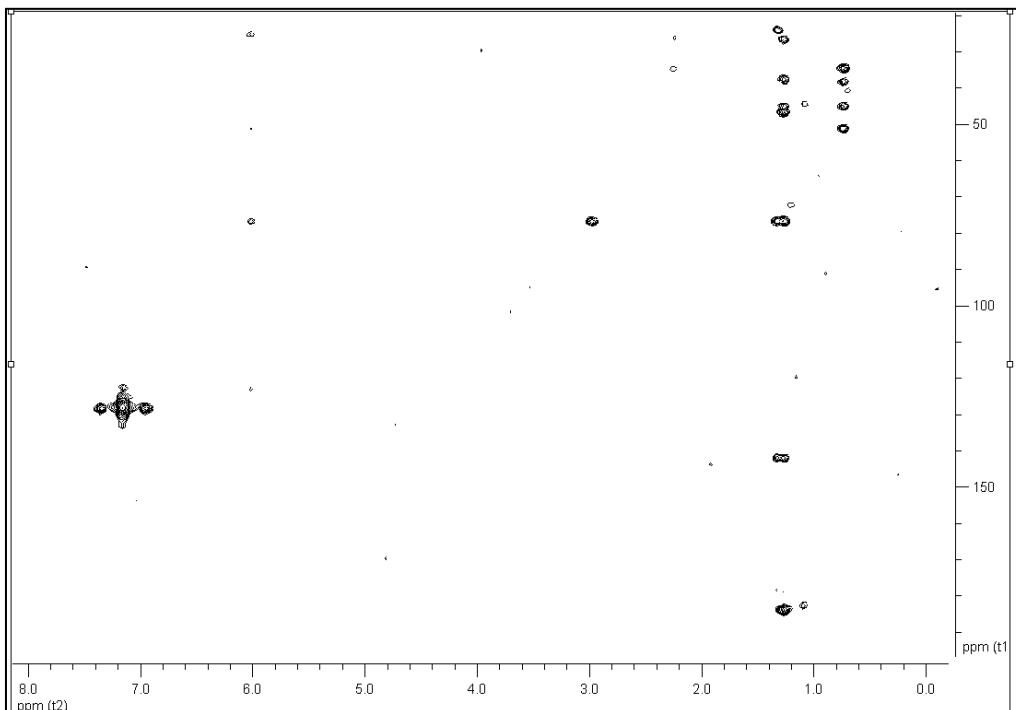


Εικόνα 32. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 3.

Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY μεταξύ των μεθυλενικών πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/ H₂-3 όπως και των H-5/H₂-6, H₂-6/H-7 καθώς και των H-9/H₂-11 και H₂-11/H₂-12 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6 και C-7 και των C-9, C-11 και C-12 αντίστοιχα. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο.



Εικόνα 33. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 3.



Εικόνα 34. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 3.

Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 15-μεθόξυ-7,13-αβιεταδιεν-18-οϊκό οξύ (15-μεθόξυ-αβιετικό οξύ) (Ohmoto et al. 1987), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 113, ενώ για

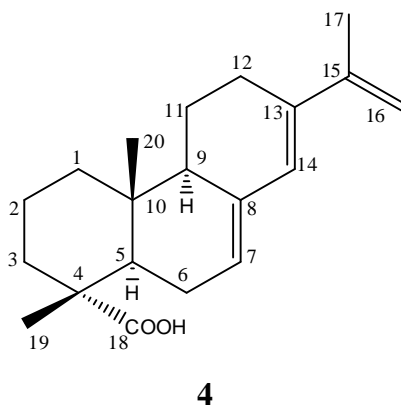
πρώτη φορά γίνεται η πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 113 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **3** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

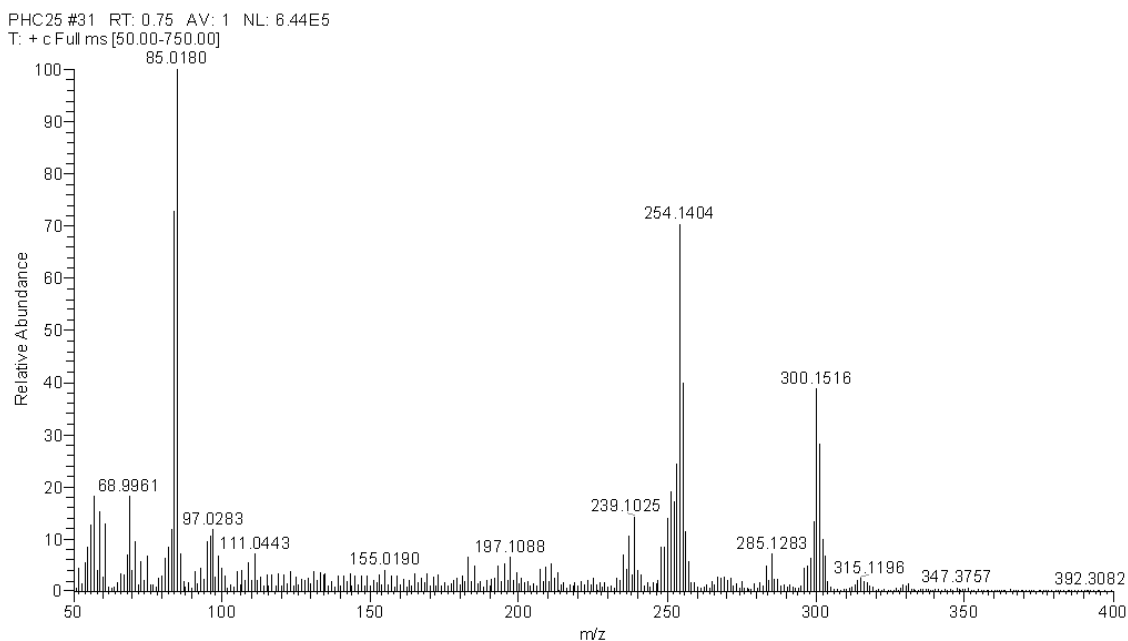
Θέση	δ_C	δ_H
1	38.5	1.60 m
2a	18.7	1.49 m
2b		1.35 m
3	37.5	1.53 m
4	46.5	-
5	45.0	2.24 dd (10.6, 6.4)
6a	26.7	2.01 m
6b		1.44 m
7	122.9	5.39 brs
8	135.5	-
9	51.0	1.87 dd (12.5, 4.03)
10	34.7	-
11	22.0	1.14 m
12a	26.5	2.36 ddd (17.0, 3.5, 2.6)
12b		2.01 m
13	142.1	-
14	126.5	6.02 d (2.1)
15	76.4	-
16	26.5	1.32 s
17	24.2	1.27 s
18	183.8	-
19	16.8	1.27 s
20	14.2	0.74 s
21	50.1	2.98 s

3.1.4. Μεταβολίτης 4: 7(8),13(14),15(16)-Αβιετατριενοϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **4** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 54.5 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **4** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₂₈O₂.



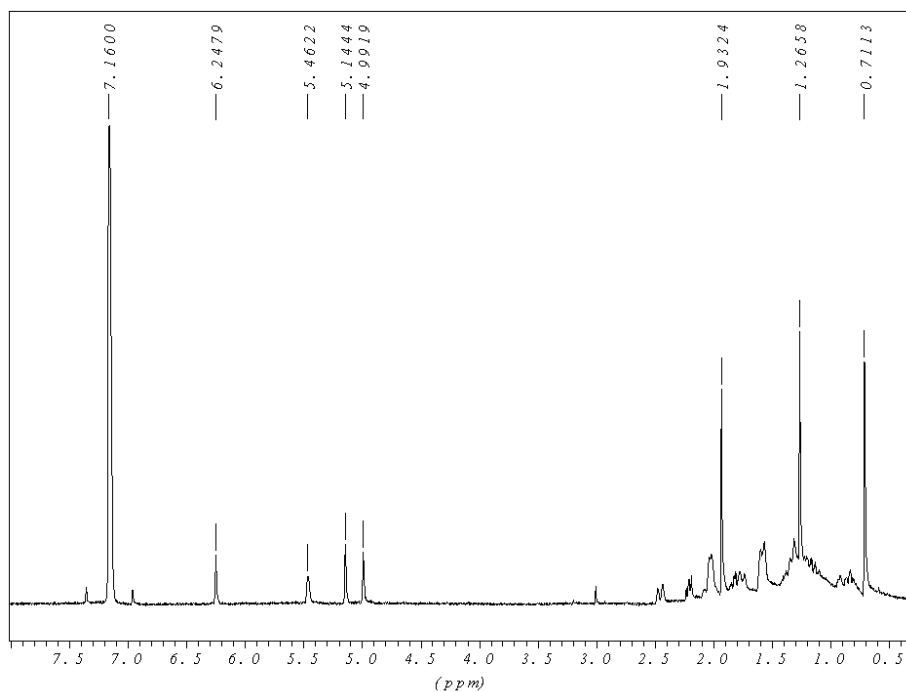
Συγκεκριμένα, το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **4** (Εικ. 35) εμφάνισε μοριακό ιόν [M]⁺ σε *m/z* 300.



Εικόνα 35. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **4**.

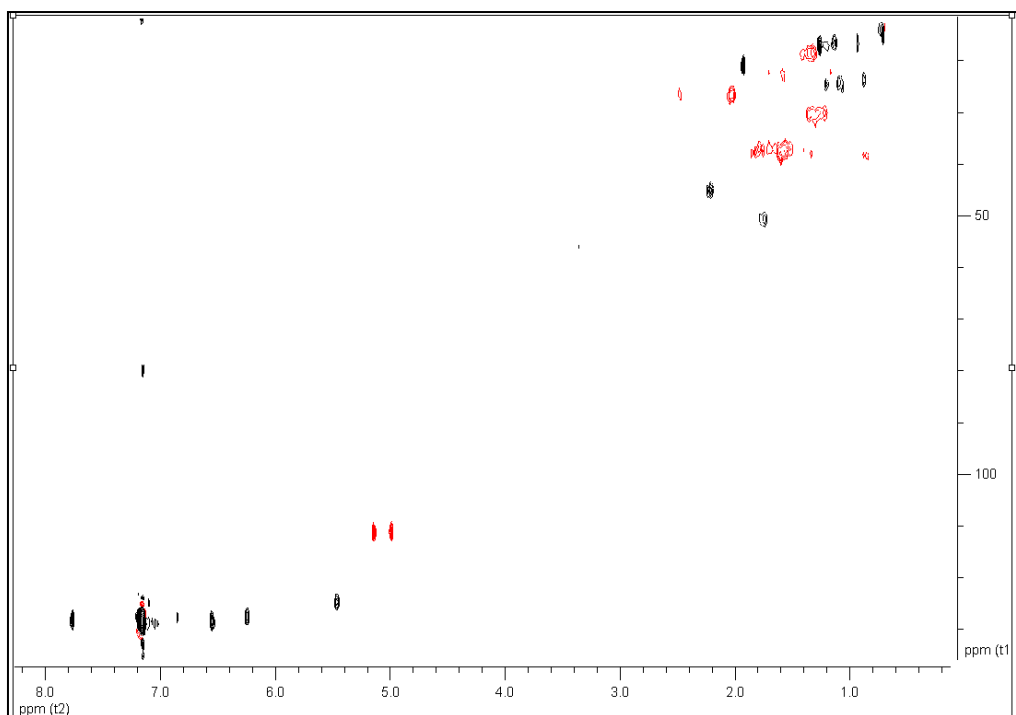
Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 35) του μεταβολίτη **4** παρατηρήθηκαν: (i) δυο απλές κορυφές σε δ 1.27 και 0.71, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δυο αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία απλή κορυφή σε δ 1.93, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια ενός βινυλικού μεθυλίου σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα, (iii) δύο ευρείες απλές

κορυφές σε δ 5.14 και 4.99, οι οποίες ολοκληρώναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου, και (iv) δύο ολεφινικών πρωτονίων σε δ 5.46 (brs) και 6.25 (s).



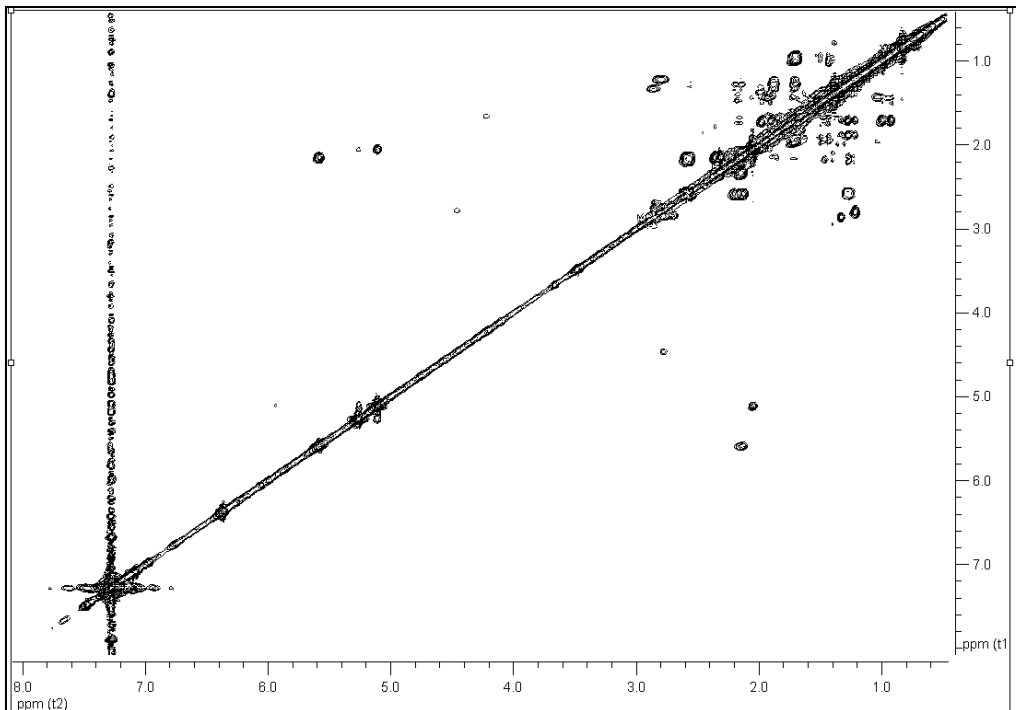
Εικόνα 36. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 4.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 37) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τριών μεθυλίων, έξι μεθυλενίων και ενός εξωμεθυλενίου, και ακόμα τεσσάρων μεθινίων, δύο εκ των οποίων ολεφινικά. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

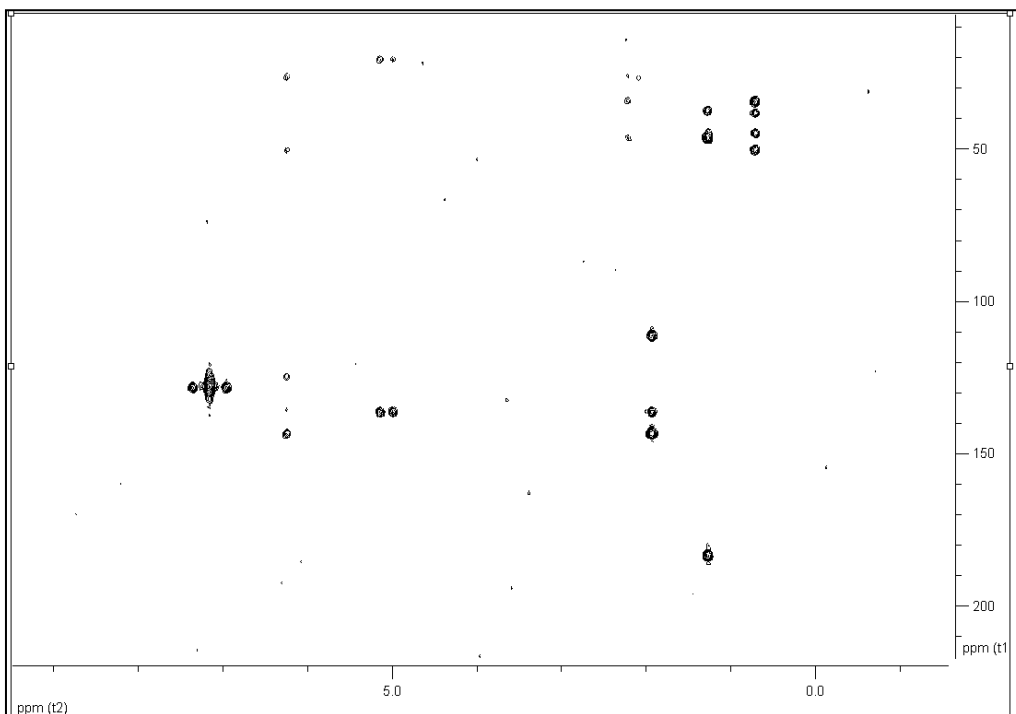


Εικόνα 37. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **4**.

Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY (Εικ. 38) μεταξύ των μεθυλενικών πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/H₂-3 όπως και των H-5/H₂-6, H₂-6/H-7 καθώς και των H-9/H₂-11 και H₂-11/H₂-12 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6 και C-7 και των θέσεων C-9, C-11 και C-12 αντίστοιχα. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC (Εικ. 39) προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο.



Εικόνα 38. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 4.



Εικόνα 39. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 4.

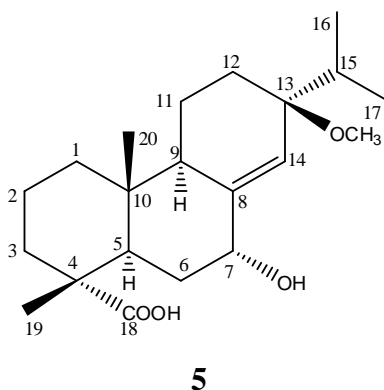
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 7(8),13(14),15(16)-αβιετατριενοϊκό οξύ (Cheung et al. 1993), τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 114, ενώ για πρώτη φορά γίνεται πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 114 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **4** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

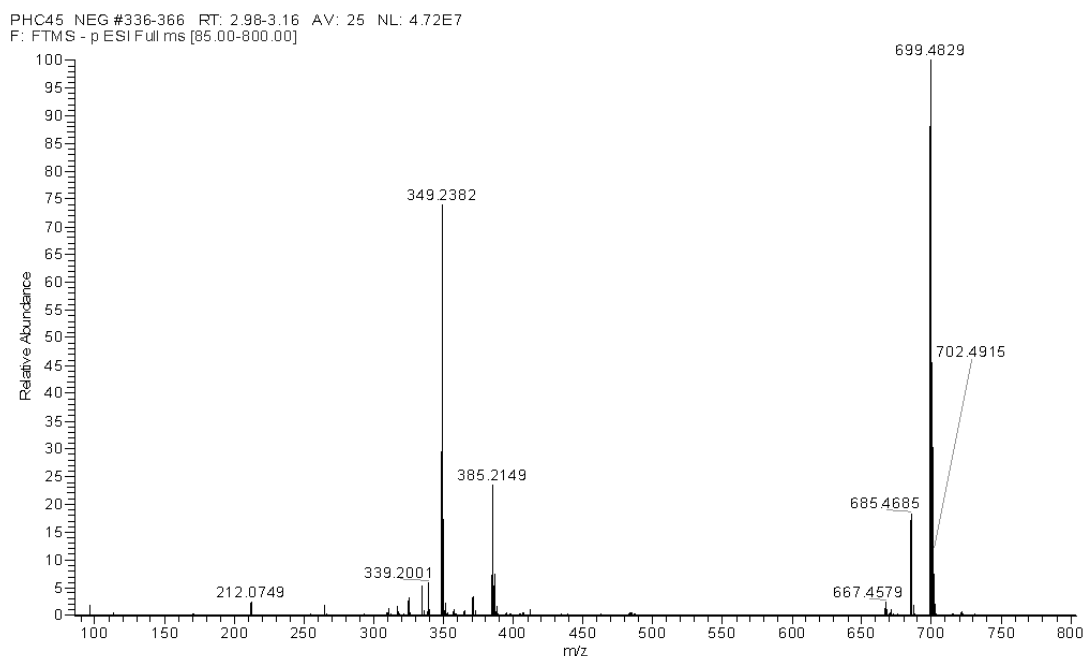
Θέση	δ_C	δ_H
1	37.9	1.58 m
2	17.4	1.32 m
3	37.4	1.56 m
4	46.3	-
5	45.8	2.20 dd (9.9, 6.5)
6	25.8	2.02 m
7	124.1	5.46 brs
8	135.4	-
9	50.1	1.76 m
10	34.6	-
11a	21.6	1.59 m
11b		1.16 m
12a	26.6	2.45 m
12b		2.01 m
13	144.6	-
14	127.4	6.25, s
15	136.3	-
16	20.0	1.93 s
17a	110.4	5.14 brs
17b		4.99 brs
18	183.2	-
19	16.1	1.27 s
20	13.2	0.71 s

3.1.5. Μεταβολίτης 5: 7α-Υδροξυ-13β-μεθοξυ-8(14)-αβιετενοϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **5** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 18.2 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **5** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₁H₃₄O₄.



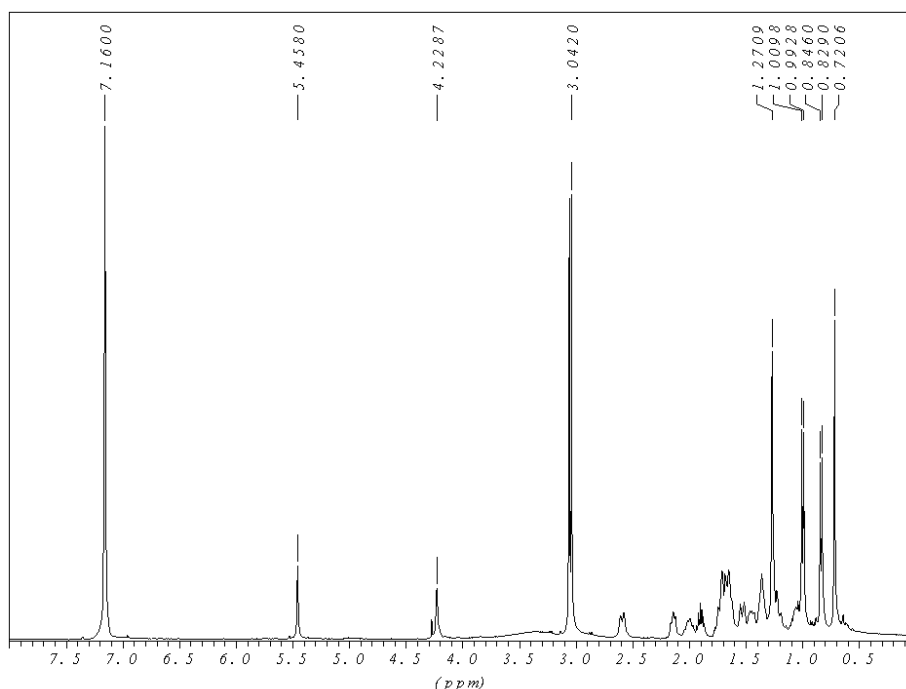
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 40) εμφανίσθηκε το ψευδομοριακό ιόν [M-H]⁺ σε *m/z* 349.2382.



Εικόνα 40. Φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας (HR-ESI-MS) του μεταβολίτη **5**.

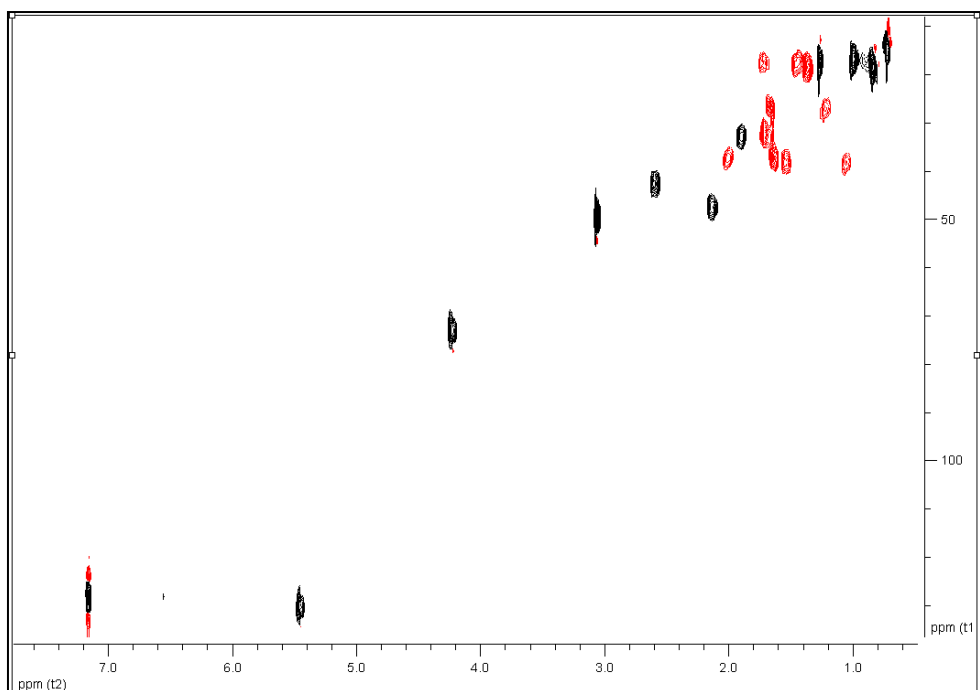
Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 41) του μεταβολίτη **5** εμφανίστηκαν (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.27 και 0.72, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια τριών αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) δύο διπλές κορυφές σε δ 1.00 (7.0 Hz) και 0.84 (7.0 Hz), οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η

κάθε μία και αποδόθηκαν σε δύο μεθύλια σε τριτοταγές άτομο άνθρακα, (iii) μία απλή κορυφή στα 3.04 ppm που ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια ενός οξυγονωμένου μεθυλίου, (iv) μία ευρεία απλή κορυφή στα 4.23 ppm, που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα οξυγονωμένο μεθίνιο και (v) μία απλή κορυφή σε δ 5.46, που αντιστοιχούσε σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο.



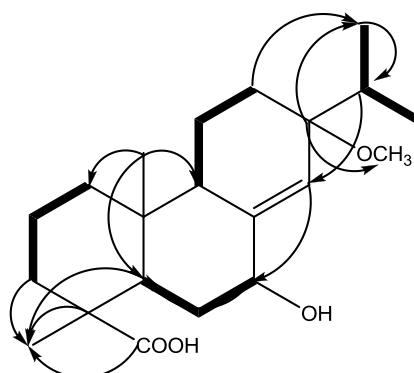
Εικόνα 41. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **5**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 41) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά πέντε μεθυλίων, ένα εκ των οποίων οξυγονωμένο, έξι μεθυλενίων και πέντε μεθινίων, ένα εκ των οποίων ολεφινικό και ένα οξυγονωμένο. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

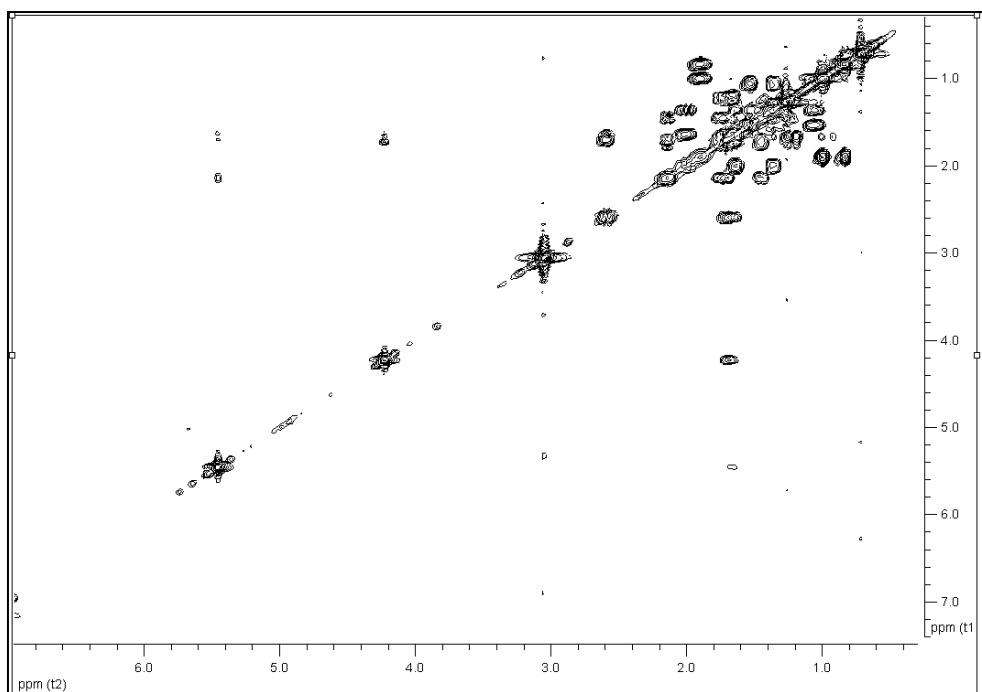


Εικόνα 42. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 5.

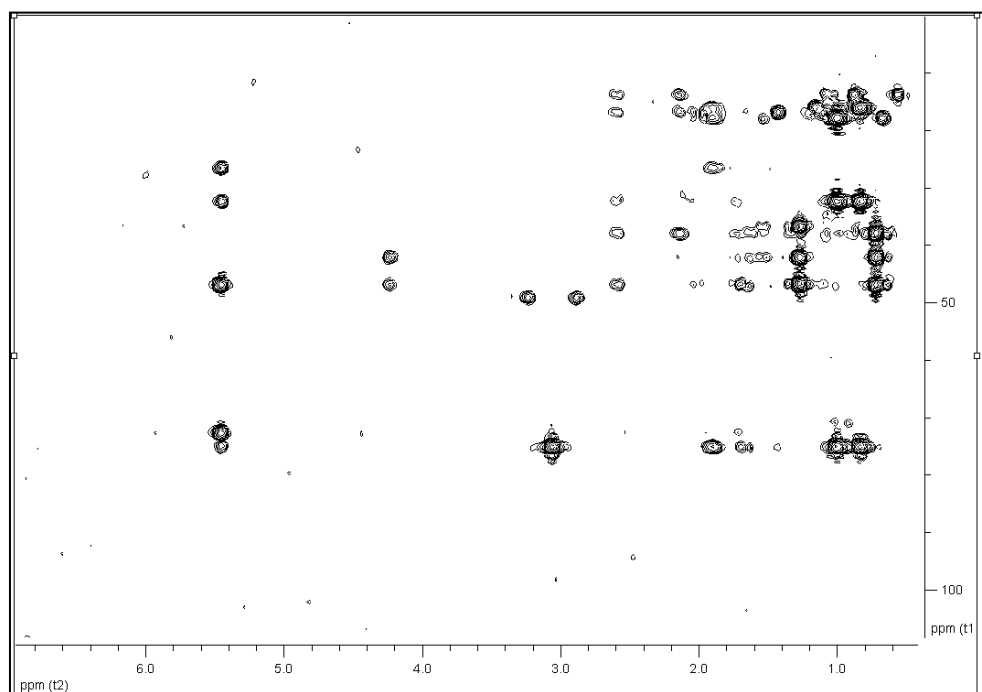
Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY (Εικ. 44) μεταξύ των μεθυλενικών πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/H₂-3 όπως και των H-5/H₂-6, H₂-6/H-7 καθώς και των H-9/H₂-11 και H₂-11/H₂-12 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6 και C-7 και των C-9, C-11 και C-12 αντίστοιχα. Επίσης, οι συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των H₃-16/H-15 και H₃-17/H-15, απέδειξαν την παρουσία ισοπροπυλίου. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC (Εικ. 45) προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο (Εικ. 43), επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη σκελετού αβιετανίου.



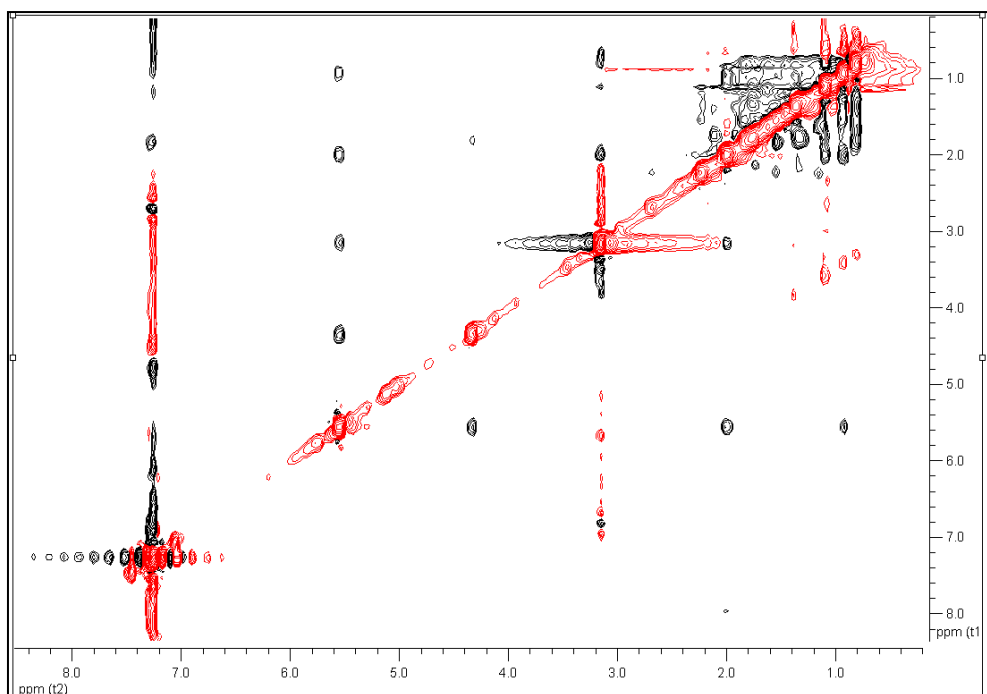
Εικόνα 43. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη 5.



Εικόνα 44. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 5.

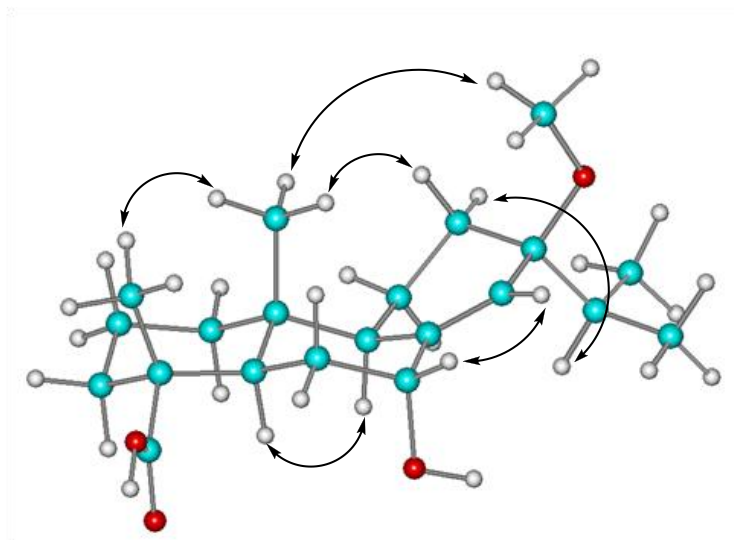


Εικόνα 45. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 5.

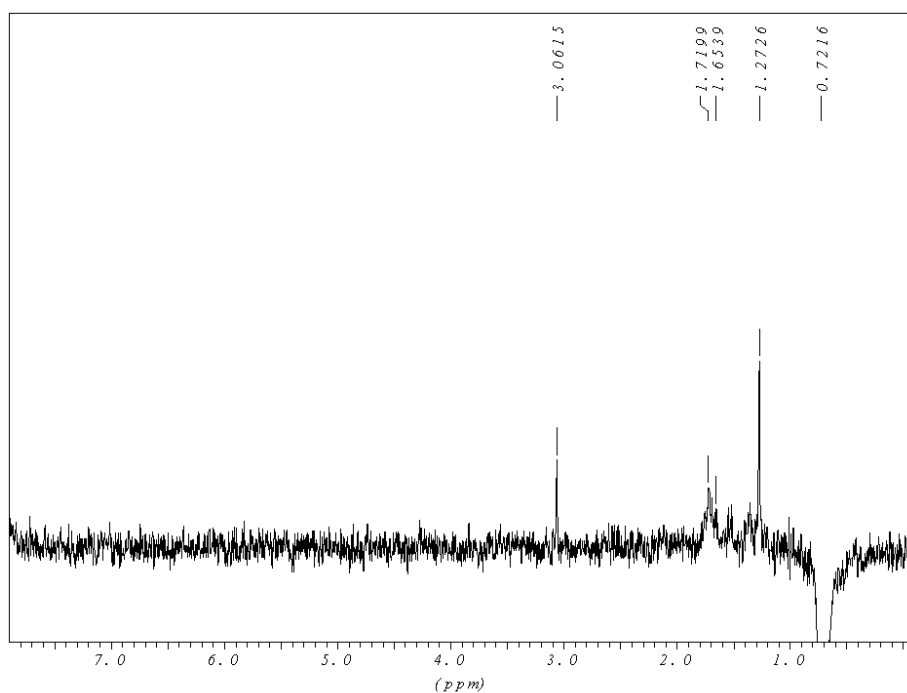


Εικόνα 46. Φάσμα NOESY του μεταβολίτη **5**.

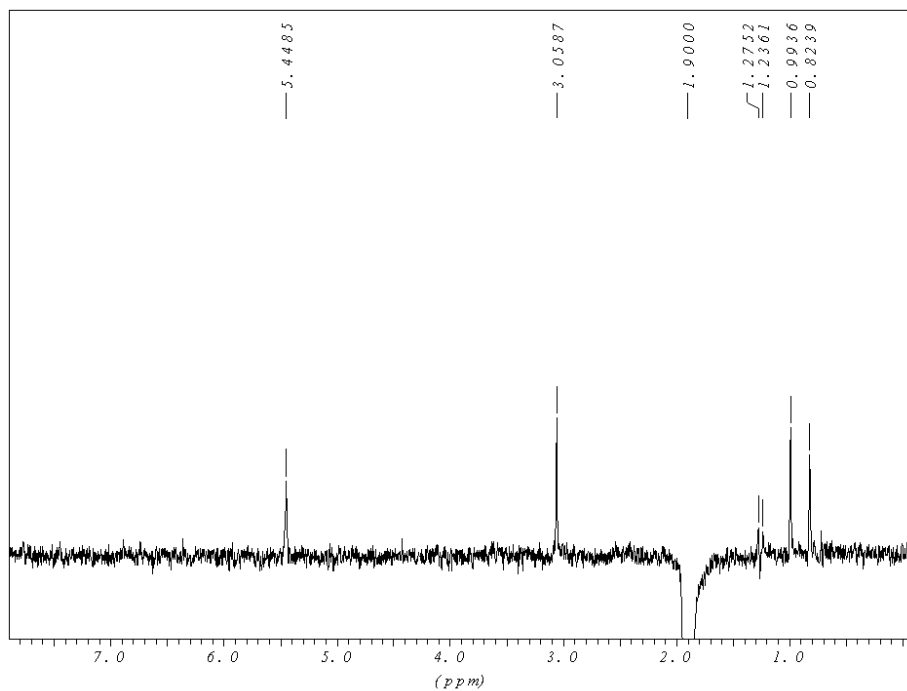
Κατόπιν λήψης φάσματος NOESY (Εικ. 46) και συμπληρωματικά φασμάτων 1D-NOE (Εικ. 48-50), αποδόθηκε η σχετική στεreoχημεία στα ασύμμετρα κέντρα C-4, C-5, C-7, C-9, C-10 και C-13. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν οι συσχετίσεις H₃-20/H₃-19, δίχως όμως να παρατηρείται συσχέτιση των μεθυλικών αυτών πρωτονίων με τα μεθινικά H-5 και H-9. Ωστόσο παρατηρήθηκε η συσχέτιση H-9/H-5. Συνεπώς, τα H₃-19 και H₃-20 είναι αξονικά και έχουν προσανατολισμό πάνω από το επίπεδο, ενώ τα μεθινικά πρωτόνια H-5 και H-9 είναι επίσης αξονικά αλλά με προσανατολισμό κάτω από το επίπεδο. Η σχετική στεreoχημεία στον C-7 καθορίστηκε με βάση την ύπαρξη της συσχέτισης H-7/H-14, προϋπόθεση της οποίας ήταν ο β-προσανατολισμός του H-7. Επιπρόσθετα, δεν υπήρχε συσχέτιση του H-7 με τα αξονικά πρωτόνια H-9 και H-5. Έτσι διαπιστώθηκε ότι το H-7 ήταν ισημερινό με προσανατολισμό πάνω από το επίπεδο και άρα η υδροξυλομάδα αξονική με προσανατολισμό κάτω από το επίπεδο. Τέλος, η σχετική στεreoχημεία στον C-13 καθορίστηκε με βάση τις συσχετίσεις H₃-20/H-12β, H-12α/H-15 και H₃-20/H₃-21. Συνεπώς, η μεθοξυλομάδα έχει προσανατολισμό πάνω από το επίπεδο και είναι ισημερινή, ενώ η ομάδα του ισοπροπυλίου αξονική με προσανατολισμό κάτω από το επίπεδο. Στην Εικ. 47 παρουσιάζονται οι σημαντικότερες συσχετίσεις NOE του μεταβολίτη **5**.



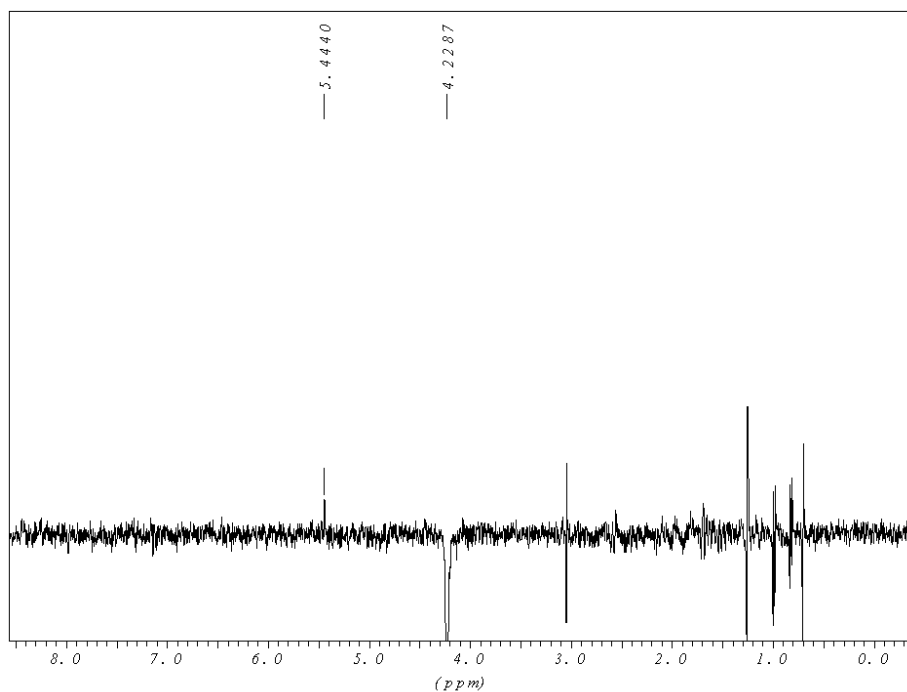
Εικόνα 47. Στερεοχημική διαμόρφωση δομής ελάχιστης ενέργειας και οι πιο σημαντικές συσχετίσεις NOE για τον μεταβολίτη **5**.



Εικόνα 48. Φάσμα 1D-NOE του μεταβολίτη **5**: στοχευμένη ακτινοβολή των H₃-20



Εικόνα 49. Φάσμα 1D-NOE του μεταβολίτη **5**: στοχευμένη ακτινοβολήση του H-15



Εικόνα 50. Φάσμα 1D-NOE του μεταβολίτη **5**: στοχευμένη ακτινοβολήση του H-7

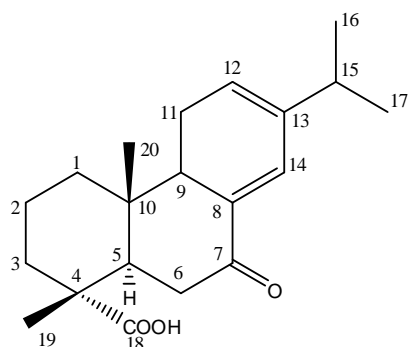
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι ο μεταβολίτης **5** είναι νέο φυσικό προϊόν, ενώ στο παρελθόν έχει απομονωθεί το 13-υδροξυ-παράγωγό του (Prinz et al. 2002).

Πίνακας 115 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **5** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a	37.7	1.54 m
1b		1.06 m
2	18.3	1.37 m
3a	36.7	2.01 m
3b		1.63 m
4	46.6	-
5	42.0	2.59 brd (10.9)
6	32.2	1.71 m
7	73.0	4.23 brs
8	145.0	-
9	47.1	2.13 m
10	37.4	-
11a	17.7	1.73 m
11b		1.45 m
12 α	27.0	1.24m
12 β		1.67 m
13	75.0	-
14	130.6	5.46 s
15	32.8	1.89 septet (6.8)
16	18.6	0.84 d (6.8)
17	16.7	0.99 d (6.8)
18	182.6	-
19	17.3	1.27 s
20	14.7	0.72 s
21	49.4	3.04 s

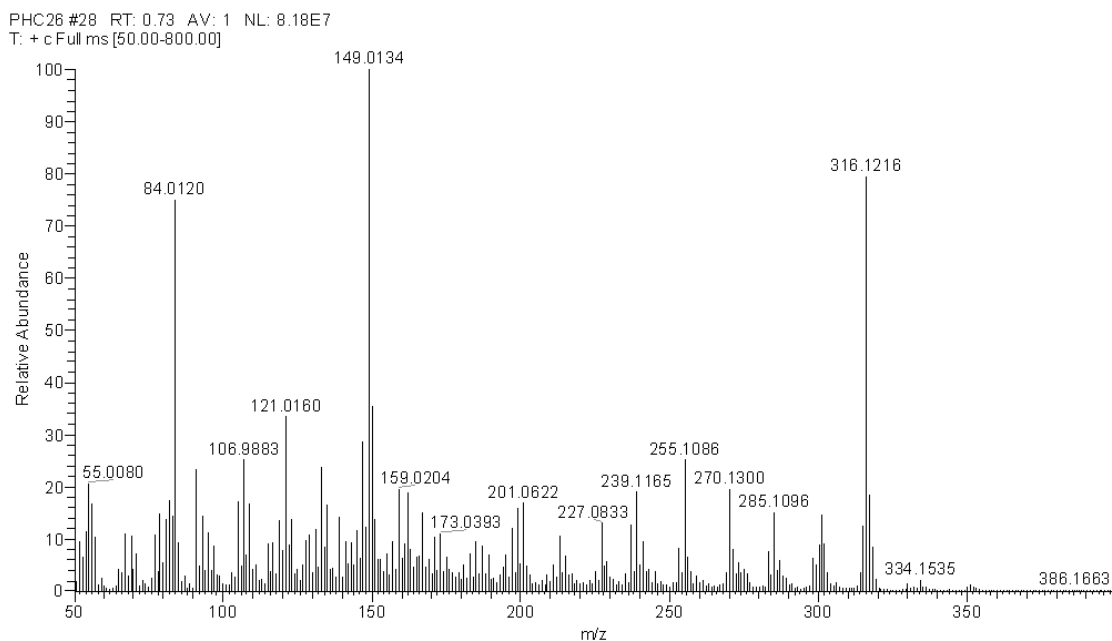
3.1.6. Μεταβολίτης 6: 7-Οξο-αβιετα-8(14),12-διεν-18-οϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **6** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 3.5 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **6** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₂₈O₃.



6

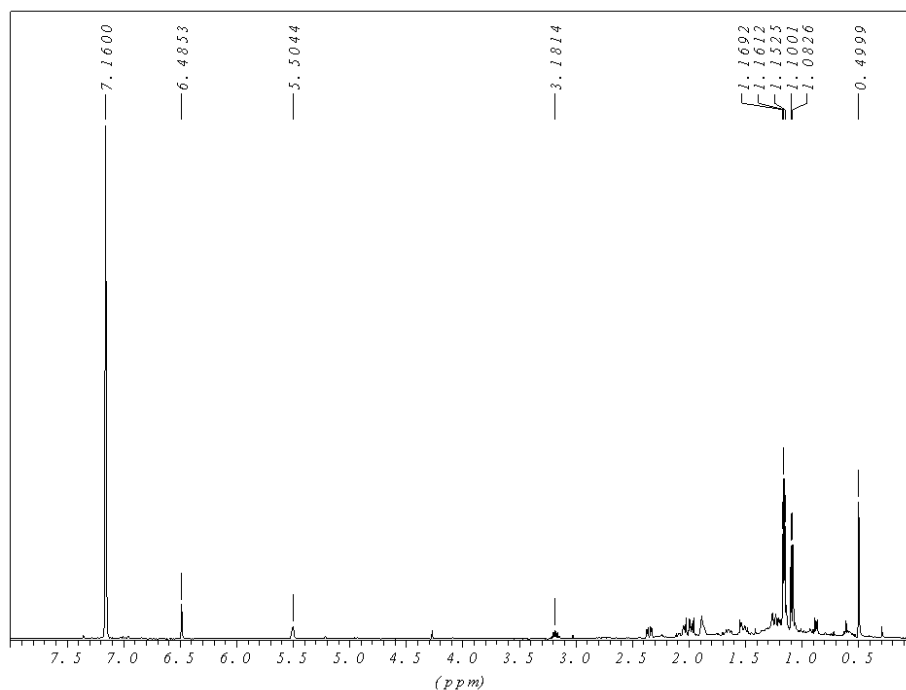
Συγκεκριμένα, το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **6** (Εικ. 51) εμφάνισε μοριακό ιόν [M]⁺ σε *m/z* 316.



Εικόνα 51. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **6**.

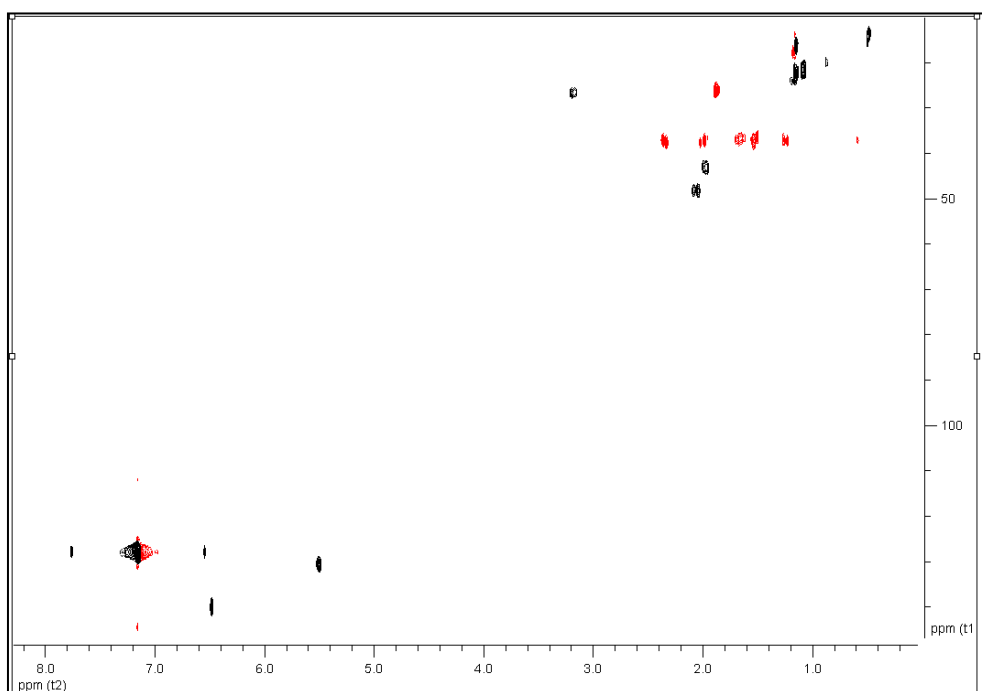
Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **6** (Εικ. 52) παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.16 και 0.50, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) δύο διπλές κορυφές σε δ 1.16 (7.0 Hz) και 1.09 (7.0 Hz), οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε

τριτοταγές άτομο άνθρακα και (iii) δύο ολεφινικών πρωτονίων σε δ 6.49 (s) και 5.50 (brs).



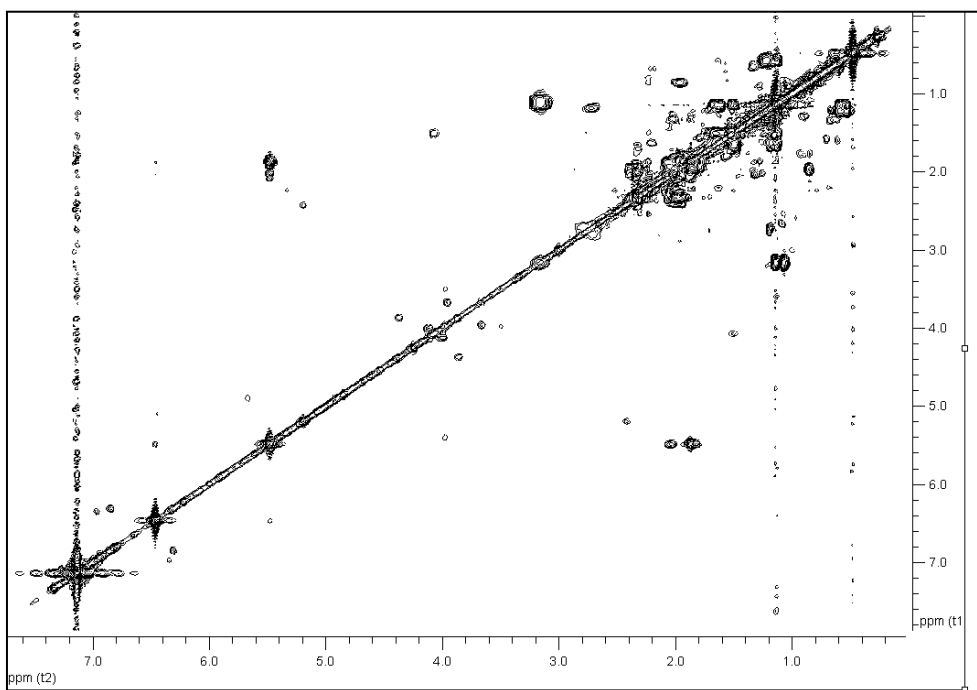
Εικόνα 52. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **6**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 53) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τεσσάρων μεθυλίων, πέντε μεθυλενίων και πέντε μεθινίων, δύο εκ των οποίων ολεφινικά. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

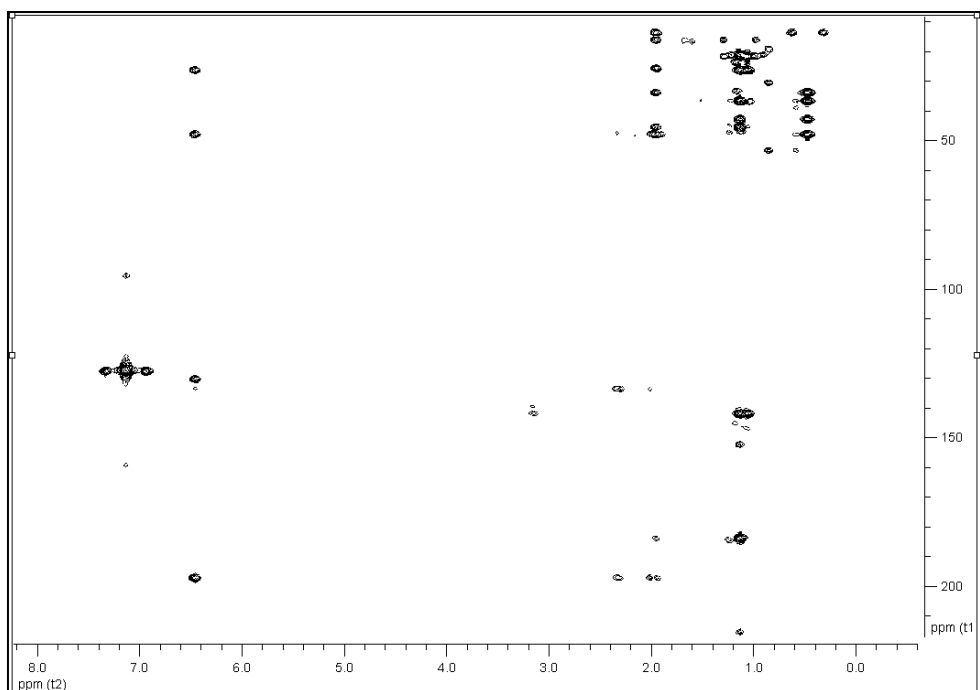


Εικόνα 53. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **6**.

Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY (Εικ. 54) μεταξύ των μεθυλενικών πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/H₂-3, των H-5/H₂-6, καθώς και των H-9/H₂-11 και H₂-11/H₂-12 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6 και των C-9, C-11 και C-12 αντίστοιχα. Επίσης, οι συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των H₃-16/H-15 και H₃-17/H-15, απέδειξαν την παρουσία ισοπροπυλίου. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο (Εικ. 55), επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη σκελετού αβιετανίου.



Εικόνα 54. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 6.



Εικόνα 55. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **6**.

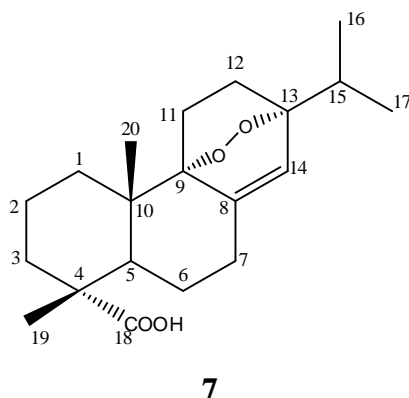
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 7-οξοαβιετα-8(14),12-διεν-18-οϊκό οξύ (Yang et al. 2010), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 116.

Πίνακας 116 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **6** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

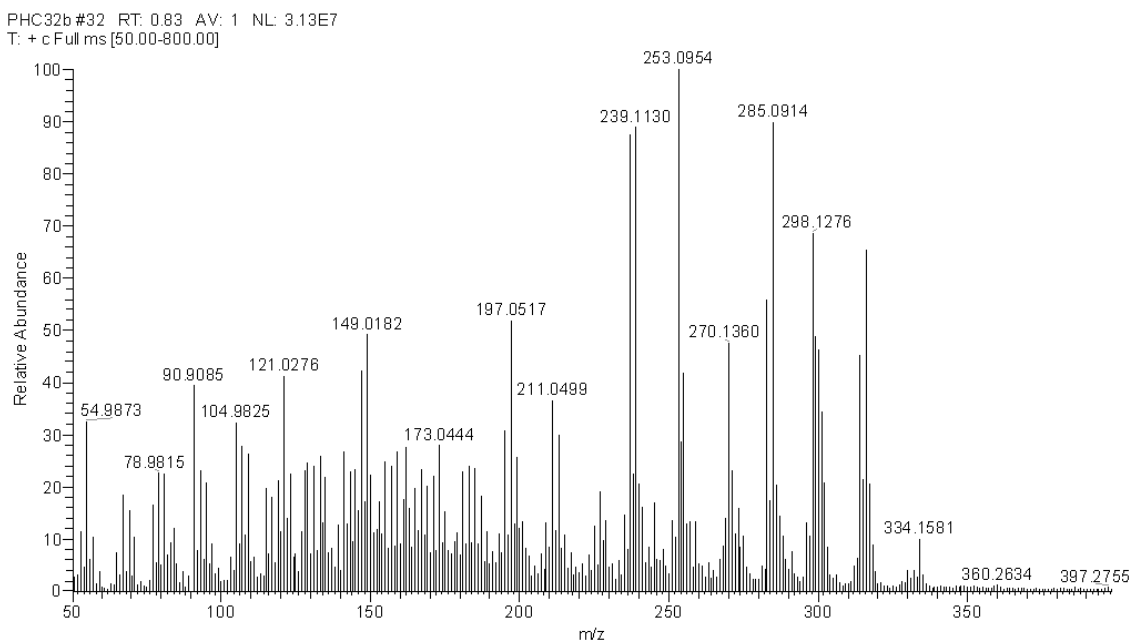
Θέση	δ_C	δ_H
1a		1.52 m
	36.9	
1b		1.25 m
2	17.9	1.17 m
3	36.8	1.65 m
4	45.7	-
5	43.1	1.98 m
6a		2.36 dd (13.1, 3.5)
	37.3	
6b		1.99 m
7	197.1	-
8	130.1	-
9	48.3	1.88, m
10	33.5	-
11	26.3	1.87 m
12	130.4	5.50 brs
13	141.8	-
14	139.8	6.49 s
15	26.6	3.18 septet (6.9)
16	21.4	1.08 d (6.9)
17	22.1	1.16 (6.9)
18	184.0	-
19	16.3	1.16 s
20	13.7	0.50 s

3.1.7. Μεταβολίτης 7: 9,13α-Επιδιοξυ-8(14)-αβιετεν-18-οϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **7** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 28.9 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **7** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₃₀O₄.



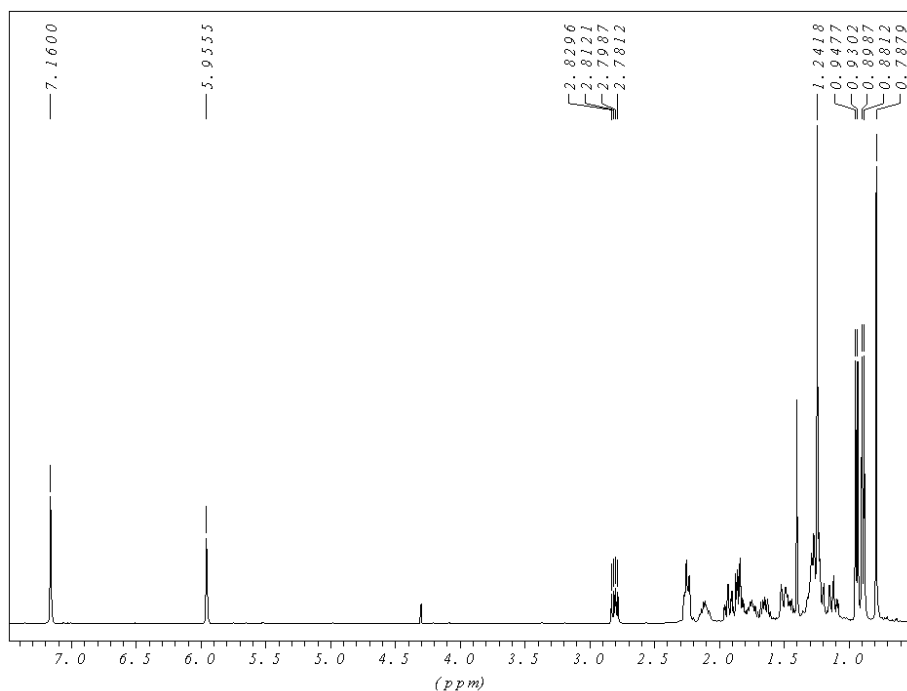
Συγκεκριμένα, το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **7** (Εικ. 56) εμφάνισε μοριακό ιόν [M]⁺ σε *m/z* 334.



Εικόνα 56. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **7**.

Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 57) του μεταβολίτη **7** παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.24 και 0.79, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) δύο διπλές κορυφές σε δ 0.93 (7.0 Hz) και 0.89 (7.0 Hz) που ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε

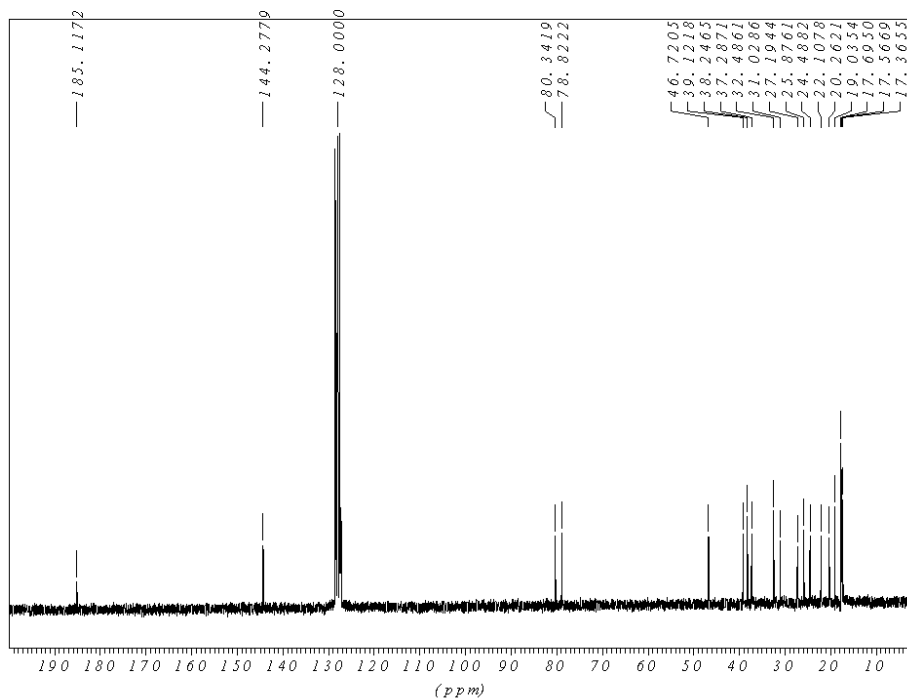
τριτοταγές άτομο άνθρακα και (iii) μία απλή κορυφή στα 5.96 ppm που αντιστοιχούσε σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο.



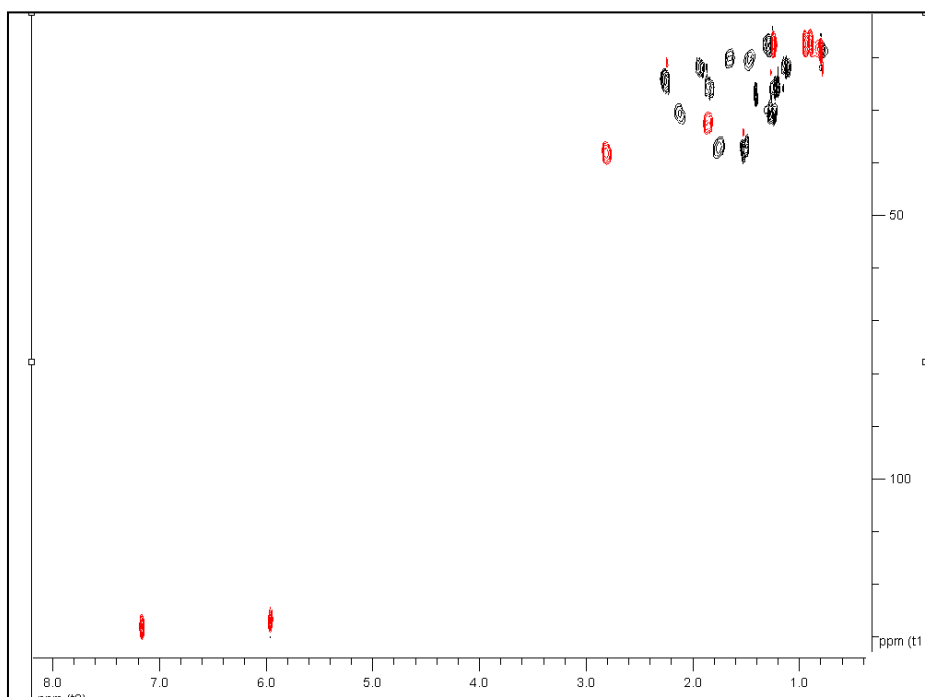
Εικόνα 57. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 7.

Στο φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη 7 (Εικ. 58) εμφανίσθηκαν δεκαεννέα κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε 20 άτομα άνθρακα, συγκεκριμένα σε τέσσερα πρωτοταγή, επτά δευτεροταγή, τρία τριτοταγή και τέσσερα τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών είναι εμφανής η παρουσία δύο οξυγονωμένων τεταρτοταγών ατόμων άνθρακα (80.2 και 78.8 ppm) καθώς και δύο ολεφινικών, ενός τριτοταγούς σε δ 127.2 και ενός τεταρτοταγούς σε δ 144.3 που υποδείκνυαν την ύπαρξη ενός διπλού δεσμού, μίας καρβονυλικής ομάδας στα 185.2 ppm.

Με βάση το φάσμα ^{13}C NMR και σε συνδυασμό με το φάσμα HSQC-DEPT (Εικ. 59), αποδεικνύεται η ύπαρξη συνολικά τεσσάρων μεθυλίων, επτά μεθυλενίων και δύο μεθινίων. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.



Εικόνα 58. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη 7.

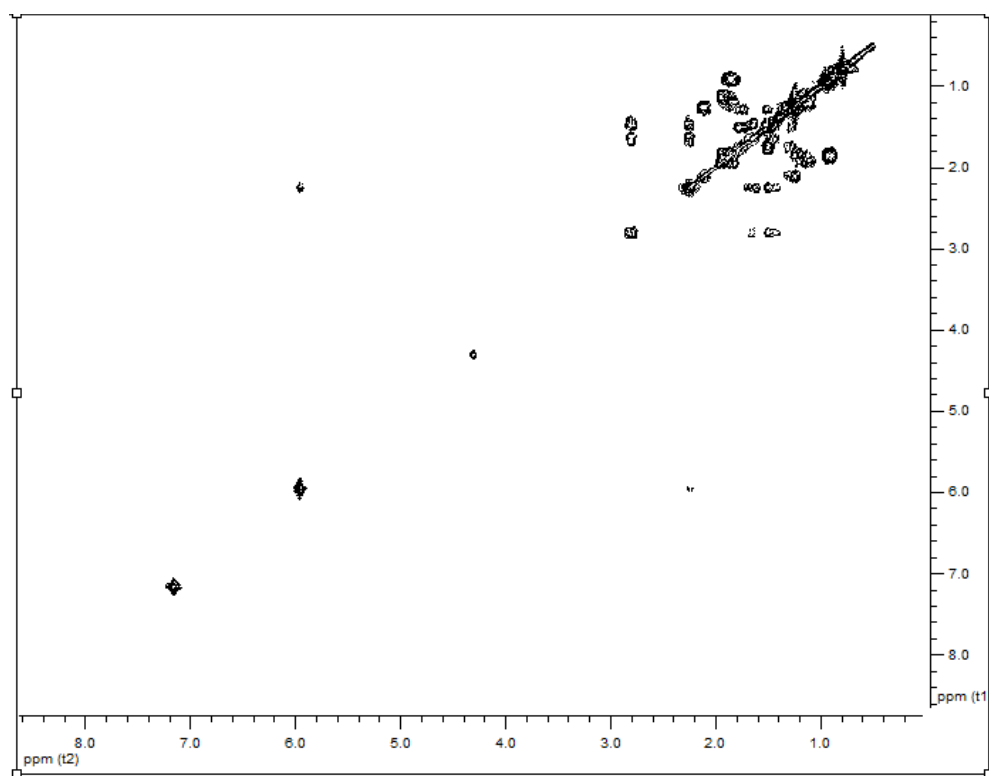


Εικόνα 59. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 7.

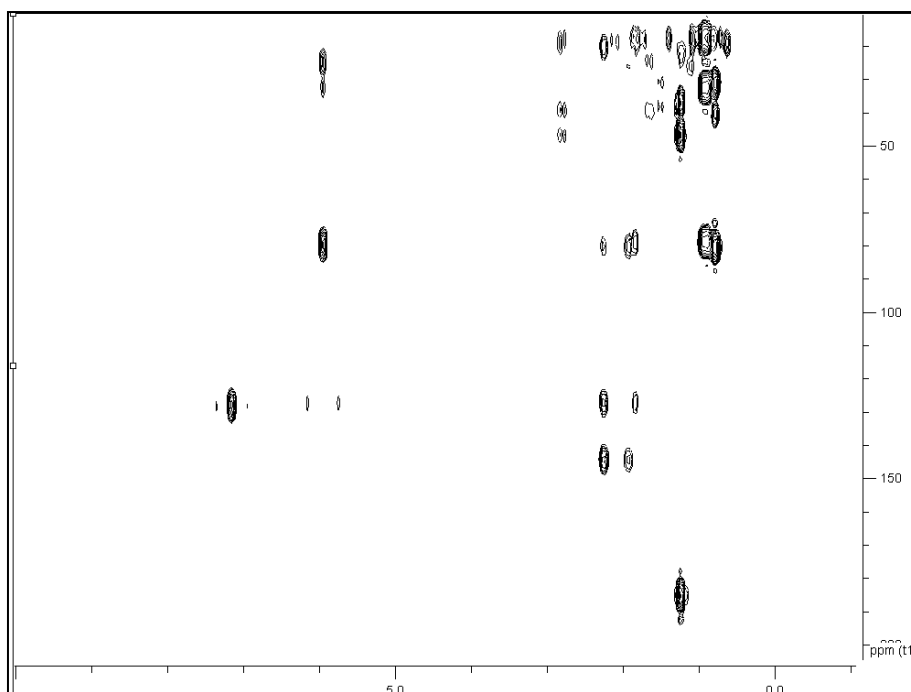
Ο βαθμός ακορεστότητας υπολογίστηκε σε $\Omega=6$, οπότε εκτός από την παρουσία του διπλού δεσμού και της καρβονυλικής ομάδας θα έπρεπε να υπάρχουν και τέσσερις δακτύλιοι στο μόριο.

Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY (Εικ. 60) μεταξύ των μεθυλενικών

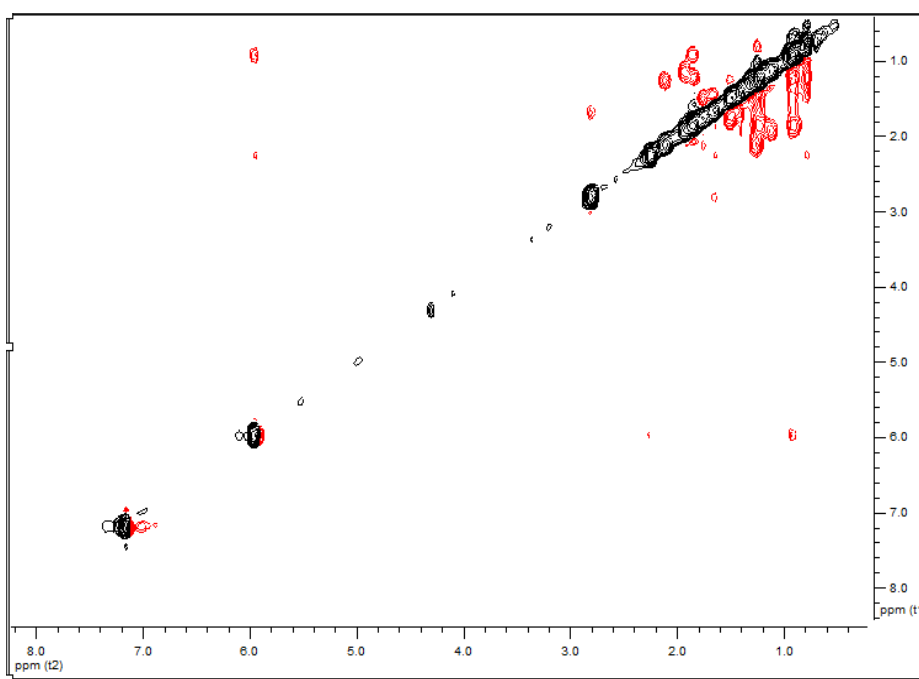
πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/H₂-3, των H-5/H₂-6 και H₂-6/H₂-7, καθώς και των H₂-11/H₂-12 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6, C-7 και των C-11 και C-12 αντίστοιχα. Επίσης, όπως και στους μεταβολίτες **1**, **2**, **5** και **6**, οι συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των H₃-16/H-15 και H₃-17/H-15, επιβεβαίωσαν την παρουσία ομάδας ισοπροπυλίου. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο (Εικ. 61), αποδεικνύοντας την ύπαρξη σκελετού αβιετανίου. Επομένως, ο έκτος βαθμός ακορεστότητας, όπως υπολογίστηκε για το υπο εξέταση μόριο θα έπρεπε να οφείλεται στην ύπαρξη υπεροξειδικής γέφυρας μεταξύ των C-9 και C-13.



Εικόνα 60. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **7**.



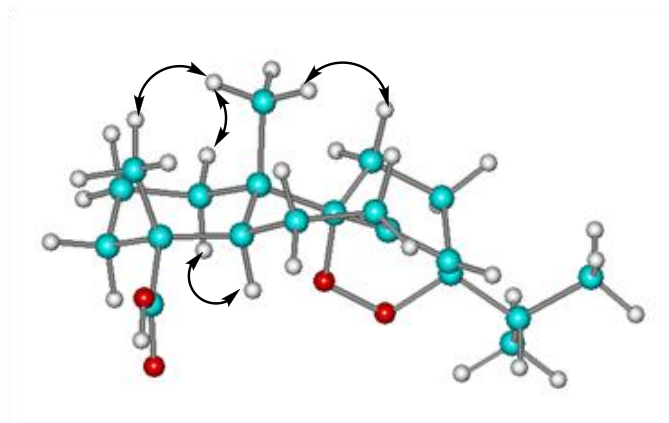
Εικόνα 61. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 7.



Εικόνα 62. Φάσμα NOESY του μεταβολίτη 7.

Κατόπιν λήψης φάσματος NOESY (Εικ. 62) παρατηρήθηκαν οι συσχετίσεις H₃-20/H₃-19, H₃-20/H-1β, H-5/H-1α και καθορίστηκε η σχετική στερεοχημεία των ασύμμετρων κέντρων C-4, C-5 και C-10. Όσον αφορά στον καθορισμό του προσανατολισμού της υπεροξειδικής γέφυρας, αυτός καθορίστηκε με βάση τη συσχέτιση H-11β/H₃-20 και στην απουσία της H-11α/H-5. Έτσι τεκμηριώνεται ότι η υπεροξειδική γέφυρα έχει

προσανατολισμό προς τα κάτω και καθορίζεται η σχετική στεreoχημεία των C-9 και C-13. Στην αντίθετη περίπτωση θα είχε παρατηρηθεί σύζευξη NOE H-5/H-11 α και όχι H-11 β /H₃-20. Παρακάτω απεικονίζονται οι σημαντικές συσχετίσεις NOE που περιγράφηκαν (Εικ. 63).



Εικόνα 63. Στεreoχημική διαμόρφωση δομής ελάχιστης ενέργειας και οι πιο σημαντικές συσχετίσεις NOE για τον μεταβολίτη 7.

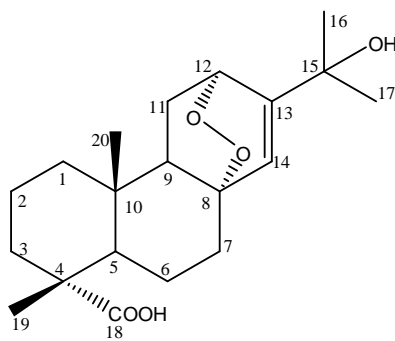
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 9,13 α -επιδιοξυ-8(14)-αβιετεν-18-οϊκό οξύ (Monaco et al. 1987), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 117 ενώ για πρώτη φορά γίνεται πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 117 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **7** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1 α	31.1	1.26 m
1 β		2.12 m
2	17.6	1.29 m
3 α	37.1	1.51 m
3 β		1.76 m
4	46.4	-
5	38.1	2.81 dd (12.3, 7.0)
6 α	20.3	1.65 m
6 β		1.46 m
7	24.5	2.25, m
8	144.3	-
9	80.2	-
10	40.7	-
11 α	21.9	1.94 m
11 β		1.12 m
12 α	25.5	1.83 m
12 β		1.22 m
13	78.8	-
14	127.2	5.96 s
15	32.6	1.85 septet (7.0)
16	17.4	0.89 d (7.0)
17	17.4	0.93 d (7.0)
18	185.2	-
19	17.7	1.24 s
20	18.7	0.79 s

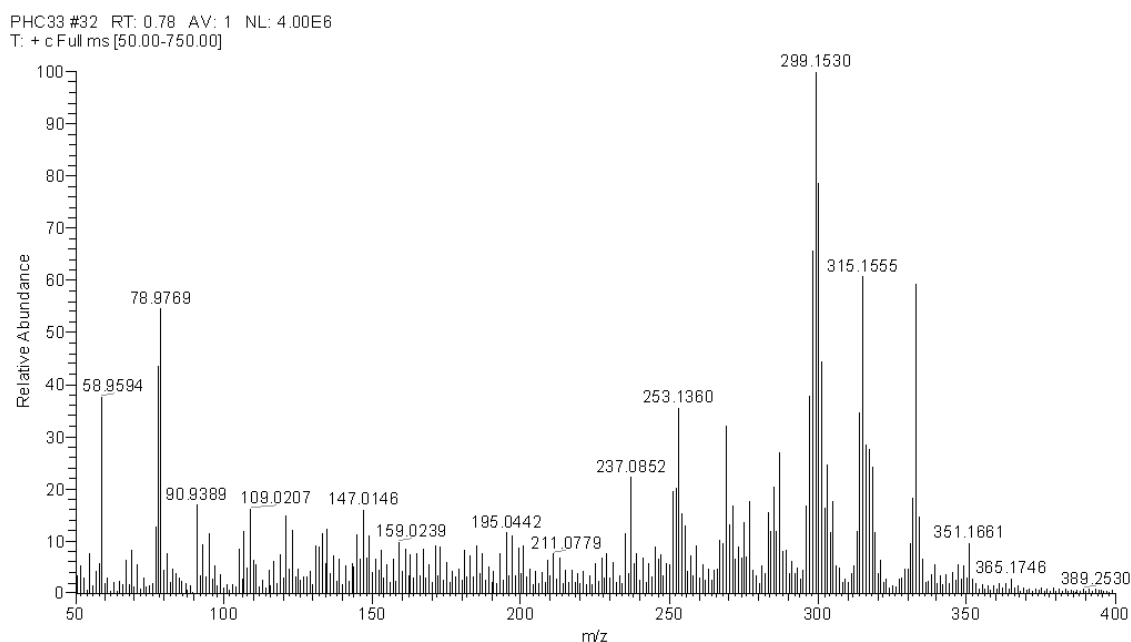
3.1.8. Μεταβολίτης 8: 8,12α-Επιδιοξυ-13(14)-αβιετεν-18-οϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **8** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 272.1 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **8** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₃₀O₅.



8

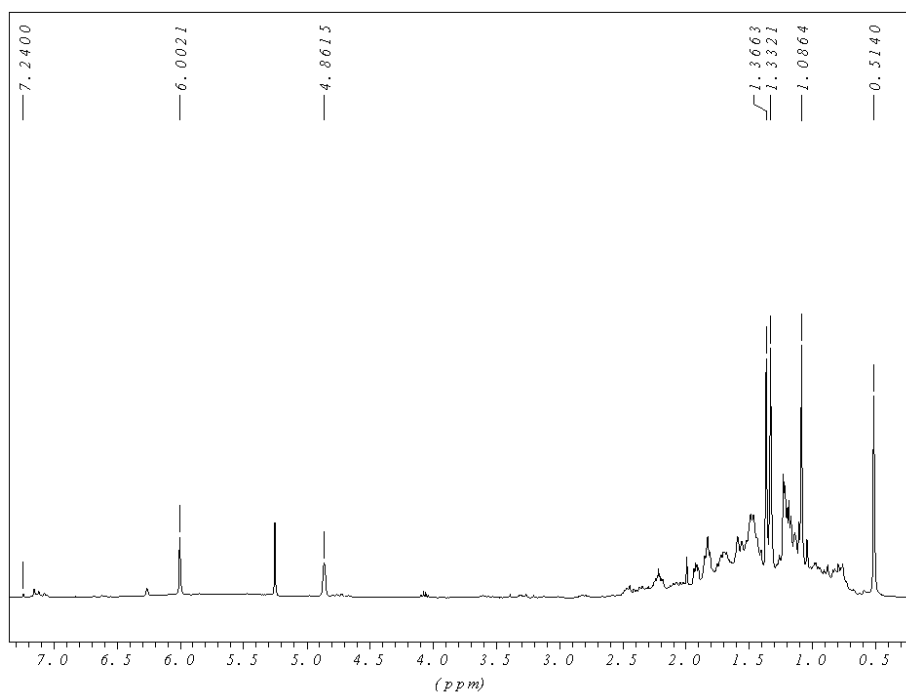
Όπως φαίνεται στο φάσμα μάζας (Εικ. 64) το θραύσμα σε m/z 351 αντιστοιχούσε στο ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$.



Εικόνα 64. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **8**.

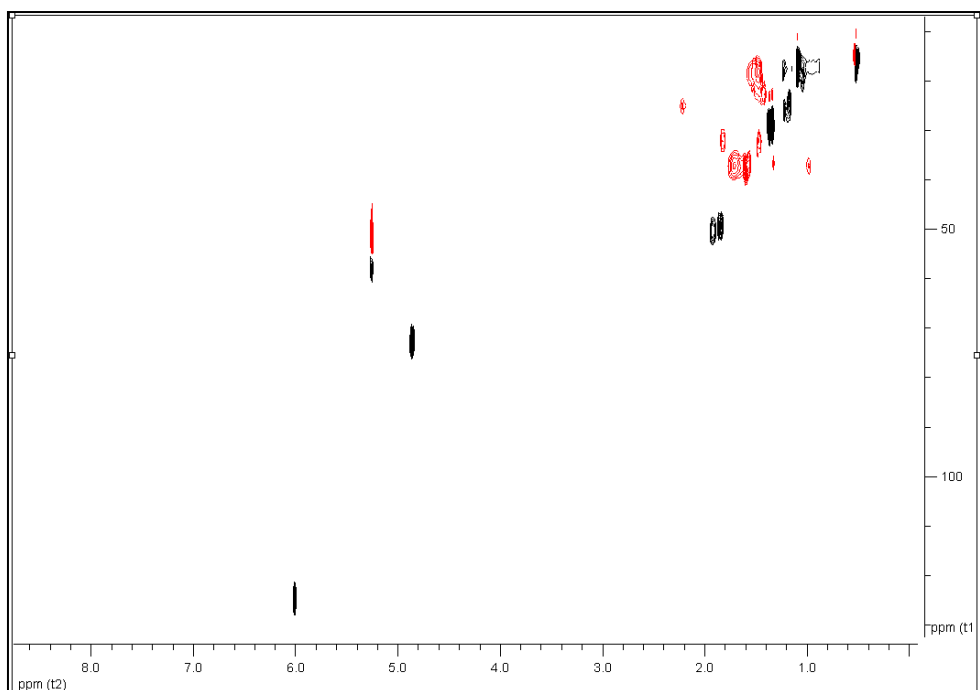
Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **8** (Εικ. 65) παρατηρήθηκαν: (i) τέσσερις απλές κορυφές σε δ 1.37, 1.33, 1.09 και 0.51, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια τεσσάρων αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία ευρεία απλή στα 4.86 ppm, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα οξυγονωμένο μεθίλιο και (iii) μία απλή κορυφή στα 6.00 ppm, που

ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο.



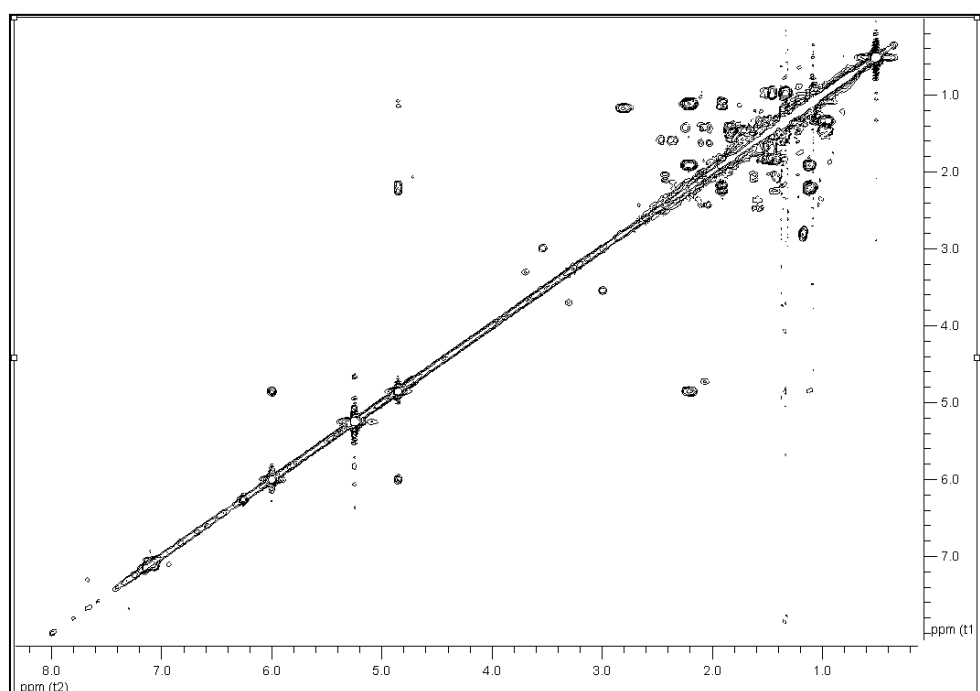
Εικόνα 65. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **8**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 66) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τεσσάρων μεθυλίων, έξι μεθυλενίων και τεσσάρων μεθινίων, το ένα εκ των οποίων οξυγονωμένο και ένα ολεφινικό. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

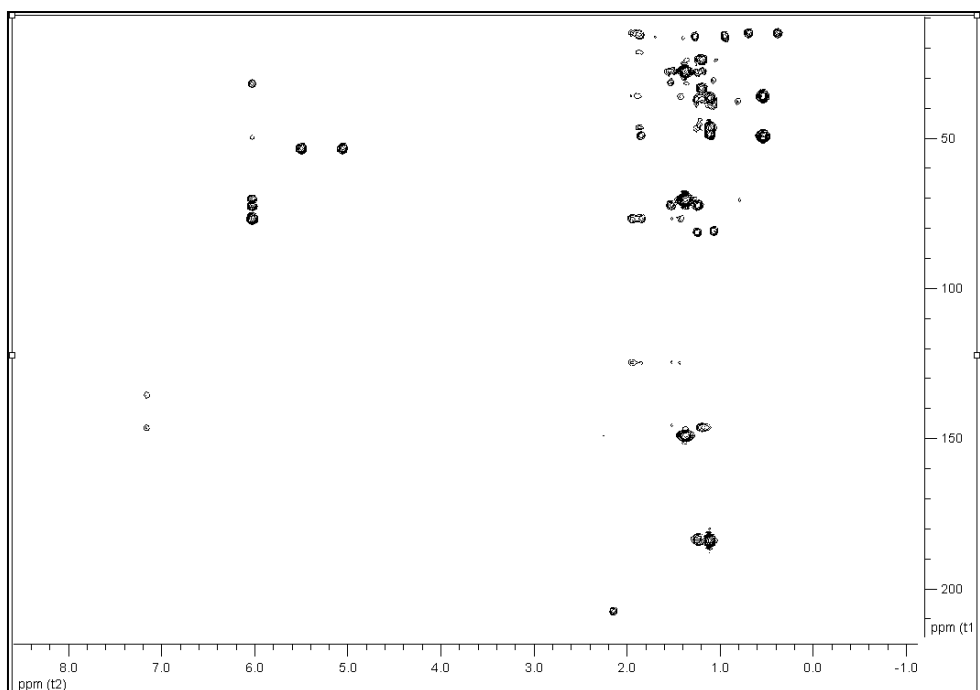


Εικόνα 66. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 8.

Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY (Εικ. 67) μεταξύ των μεθυλενικών πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/H₂-3, των H-5/H₂-6 και H₂-6/H₂-7, καθώς και των H-9/H₂-11, H₂-11/H₂-12 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6, C-7 και των C-9, C-11 και C-12 αντίστοιχα. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο (Εικ. 68), αποδεικνύοντας την ύπαρξη σκελετού αβιετανίου.



Εικόνα 67. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 8.



Εικόνα 68. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **8**.

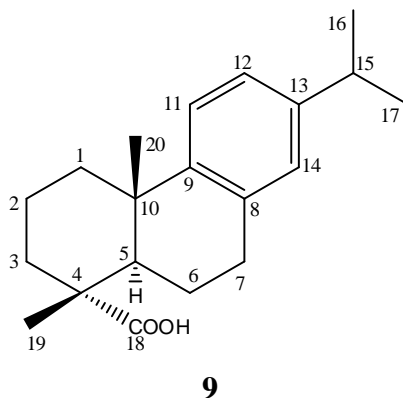
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 8,12α-επιδιοξυ-13(14)-αβιετεν-18-οϊκό οξύ (Ohtsu et al. 2001), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρατίθενται στον Πίνακα 118 ενώ για πρώτη φορά γίνεται η πλήρης απόδοσή τους.

Πίνακας 118 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **8** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

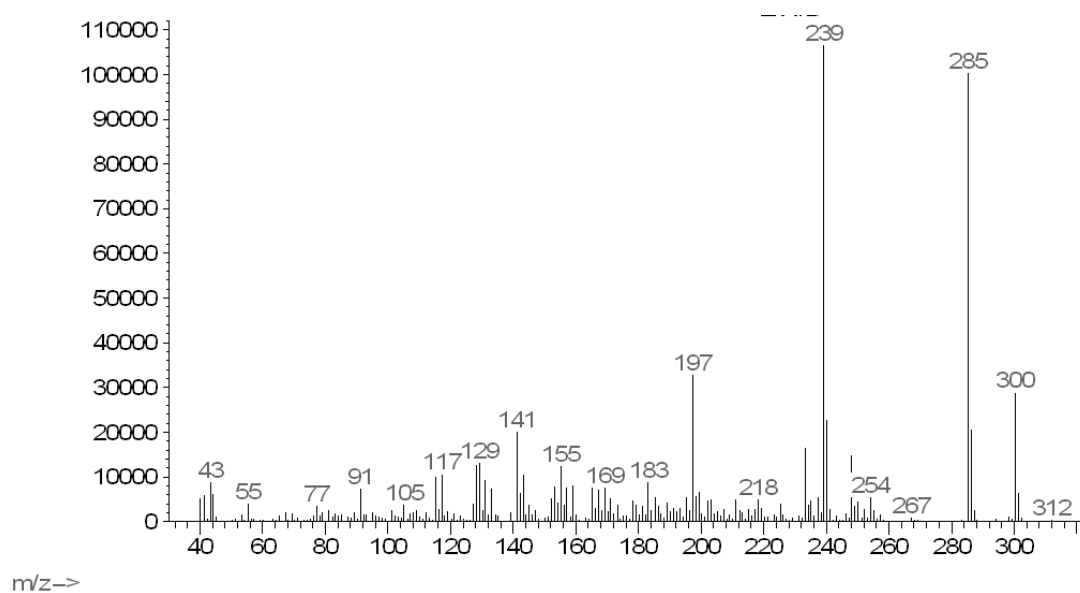
Θέση	δ_C	δ_H
1a		1.34 m
1b	36.0	0.99 m
2	16.9	1.47 m
3a		1.71 m
3b	36.3	1.58 m
4	46.6	-
5	47.9	1.84 m
6	21.4	1.421 m
7a		1.83 m
7b	31.1	1.46 m
8	76.6	-
9	49.2	1.92 dd (8.9, 5.2)
10	36.2	-
11	24.0	2.22 m
12	71.6	4.86 m
13	148.8	-
14	123.3	6.00 s
15	70.4	-
16	28.9	1.37 s
17	28.3	1.33 s
18	183.9	-
19	17.0	1.09 s
20	16.0	0.51 s

3.1.9. Μεταβολίτης 9: 8,11,13-Αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (δεϋδροαβιετικό οξύ)

Ο μεταβολίτης **9** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 17.5 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **9** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₂₈O₂.



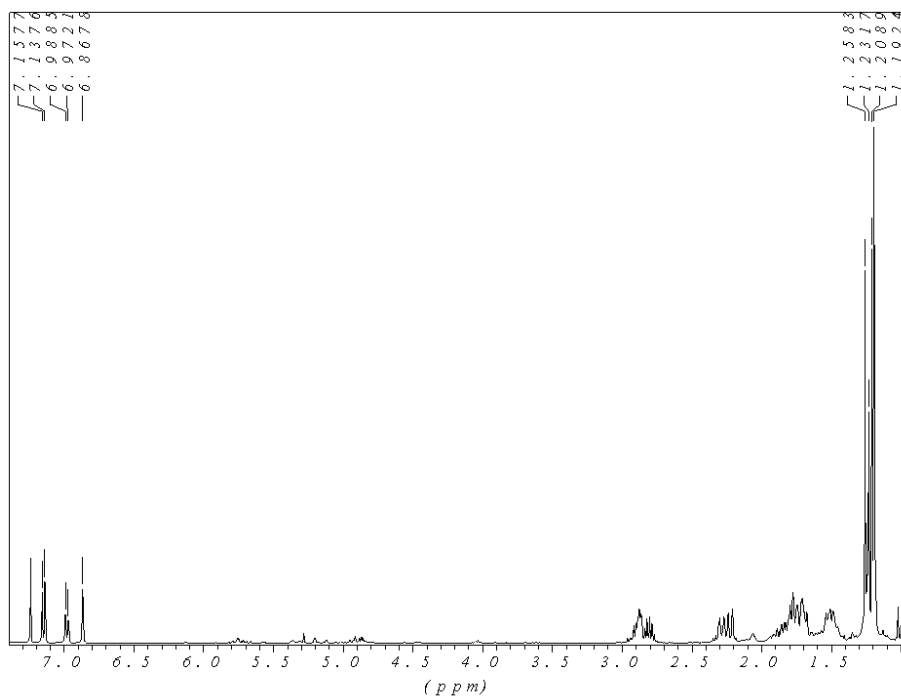
Συγκεκριμένα, το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **9** (Εικ. 69) εμφάνισε μοριακό ιόν [M]⁺ σε *m/z* 300.



Εικόνα 69. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **9**.

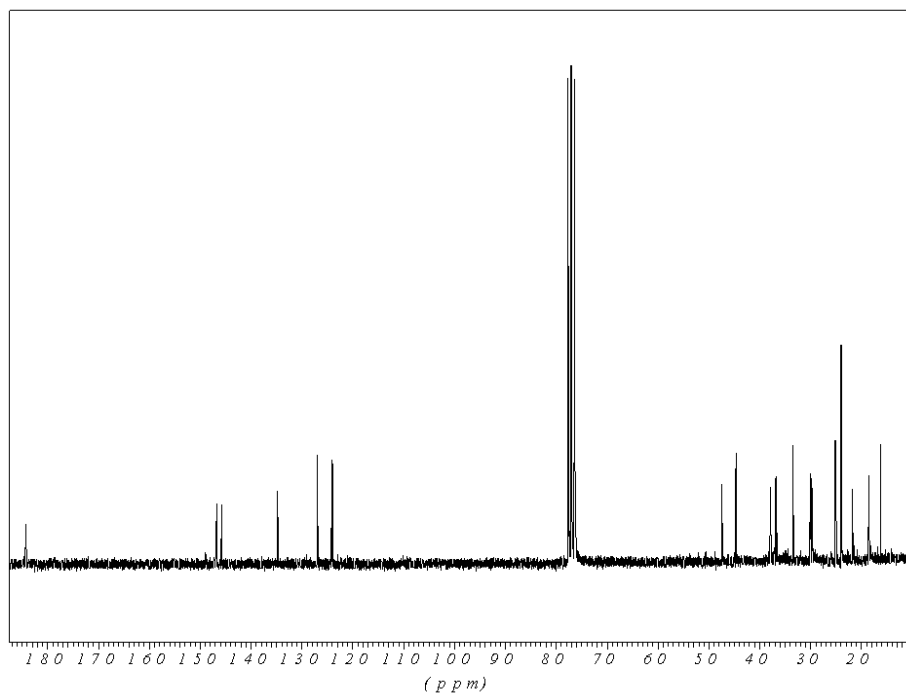
Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **9** (Εικ. 70) παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.23 και 1.26, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία διπλή κορυφή σε δ 1.20 (6.6 Hz) η οποία ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγές άτομο άνθρακα, (iii) δύο διπλές στα 7.14 ppm (7.7 Hz) και 6.98 ppm (7.7 Hz) και μία ευρεία απλή κορυφή σε δ

6.87, που ολοκληρώναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός αρωματικού πυρήνα.



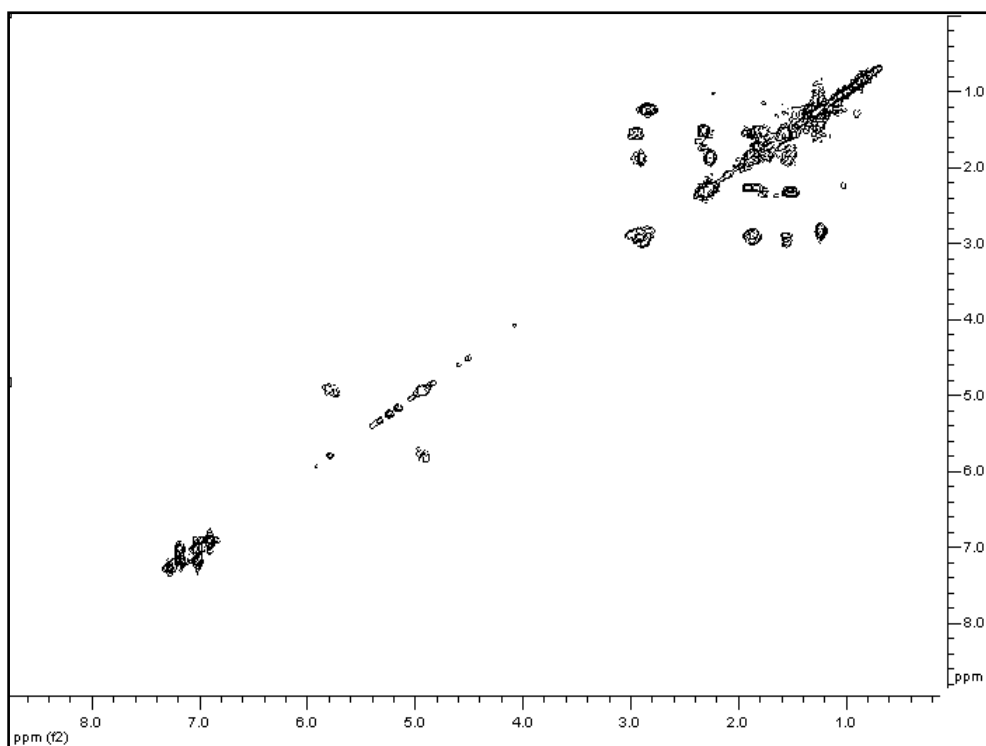
Εικόνα 70. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **9**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **9** (Εικ. 71) εμφανίσθηκαν είκοσι κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε τέσσερα πρωτοταγή, πέντε δευτεροταγή, πέντε τριτοταγή και έξι τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν έξι αρωματικοί άνθρακες σε δ 123.9, 124.1, 126.1, 134.7, 145.7, 146.8 και ένας άνθρακας καρβονυλίου στα 184.3 ppm.

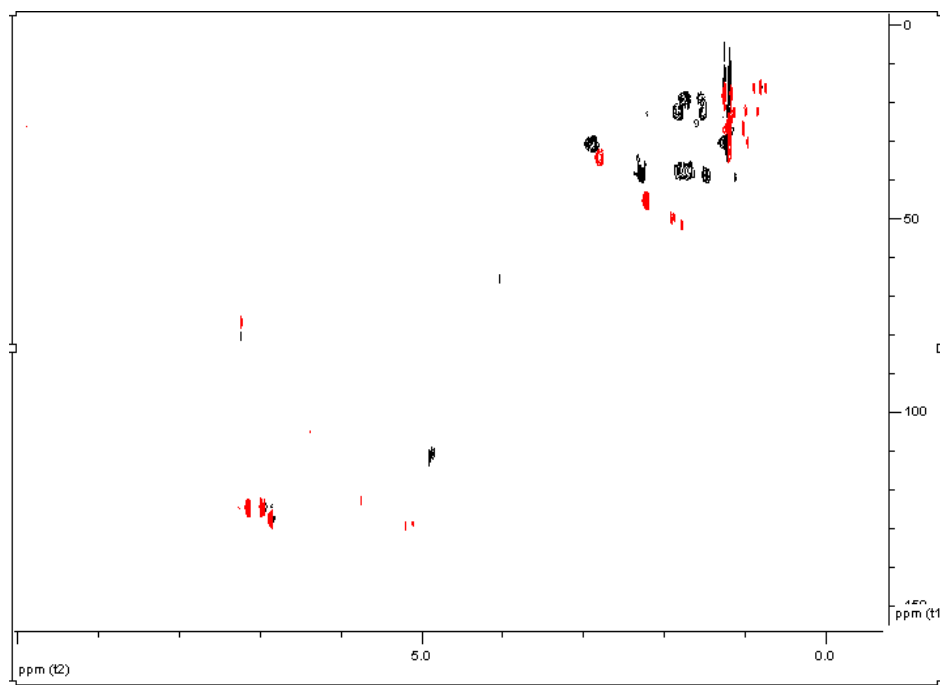


Εικόνα 71. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **9**.

Με τη βοήθεια των φασμάτων HSQC-DEPT (Εικ. 73) και COSY (Εικ. 72) έγινε πλήρης απόδοση των φασματοσκοπικών δεδομένων, τα οποία βρίσκονται σε συμφωνία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας για το μεταβολίτη δεϋδροαβιετικό οξύ (van Beek et al. 2007).



Εικόνα 72. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **9**.



Εικόνα 73. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **9**.

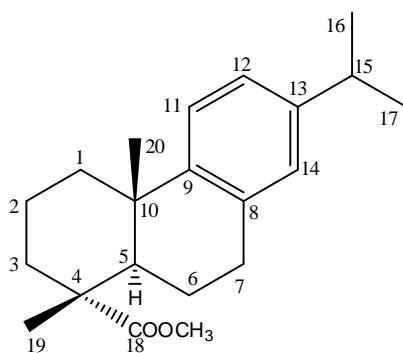
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **9** παρατίθενται στον Πίνακα 119.

Πίνακας 119 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **9** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a		2.28 m
1b	37.9	1.47 m
2	18.5	1.72 m
3a		1.77 m
3b	36.7	1.68 m
4	47.4	-
5	44.6	2.21 dd (12.5, 1.8)
6a		1.83 m
6b	21.8	1.51 m
7	30.0	2.88 m
8	134.7	-
9	146.8	-
10	36.9	-
11	124.1	7.14 d (7.7)
12	123.9	6.98 d (7.7)
13	145.7	-
14	126.9	6.87 s
15	33.5	2.80 septet (7.0)
16	24.0	1.20 d (6.6)
17	24.0	1.20 d (6.6)
18	184.3	-
19	16.2	1.26 s
20	25.1	1.23 s

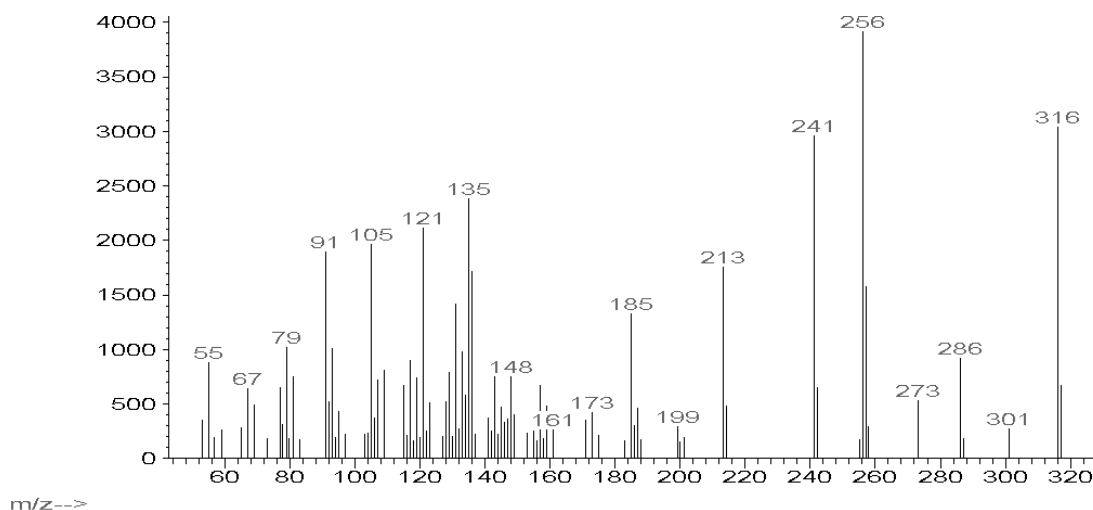
3.1.10. Μεταβολίτης 10: Μεθυλεστέρας του 8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκού οξέος (μεθυλεστέρας του δεϋδροαβιετικού οξέος)

Ο μεταβολίτης **10** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 1.3 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **10** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₁H₃₀O₂.



10

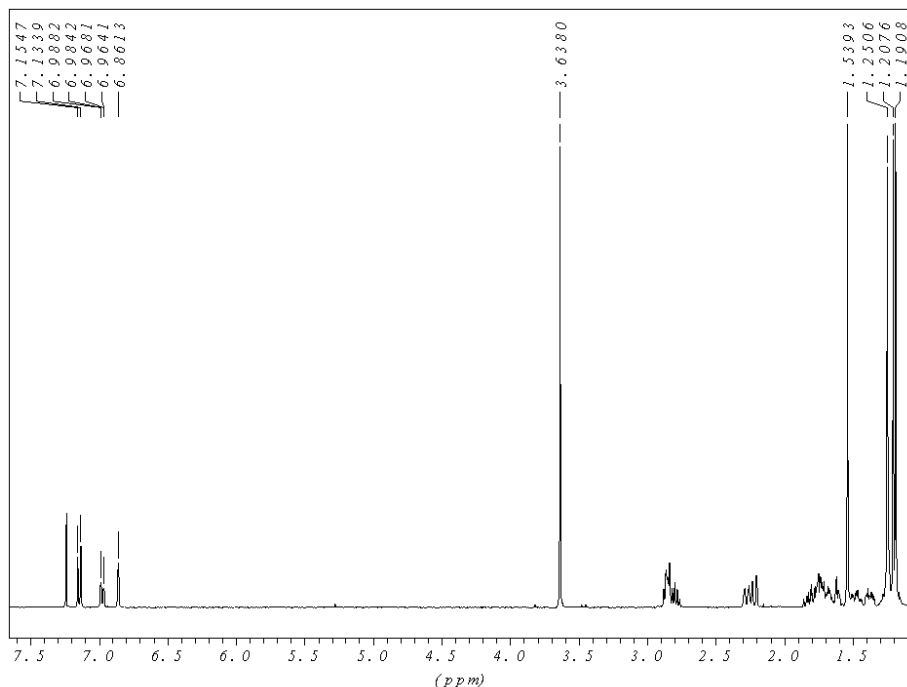
Το μοριακό ιόν στο φάσμα μάζας (Εικ. 74) εμφανίσθηκε σε m/z 316, ενώ τα θραύσματα [M-CH₃] και [M-COOCH₃] παρατηρήθηκαν σε m/z 301 και m/z 256, ενώ το ιόν που προκύπτει κατόπιν απόσπασης της εστερικής ομάδας και της ομάδας του ισοπροπυλίου, [M-COOCH₃-*i*Pro], εμφανιζόταν σε m/z 213.



Εικόνα 74. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **10**.

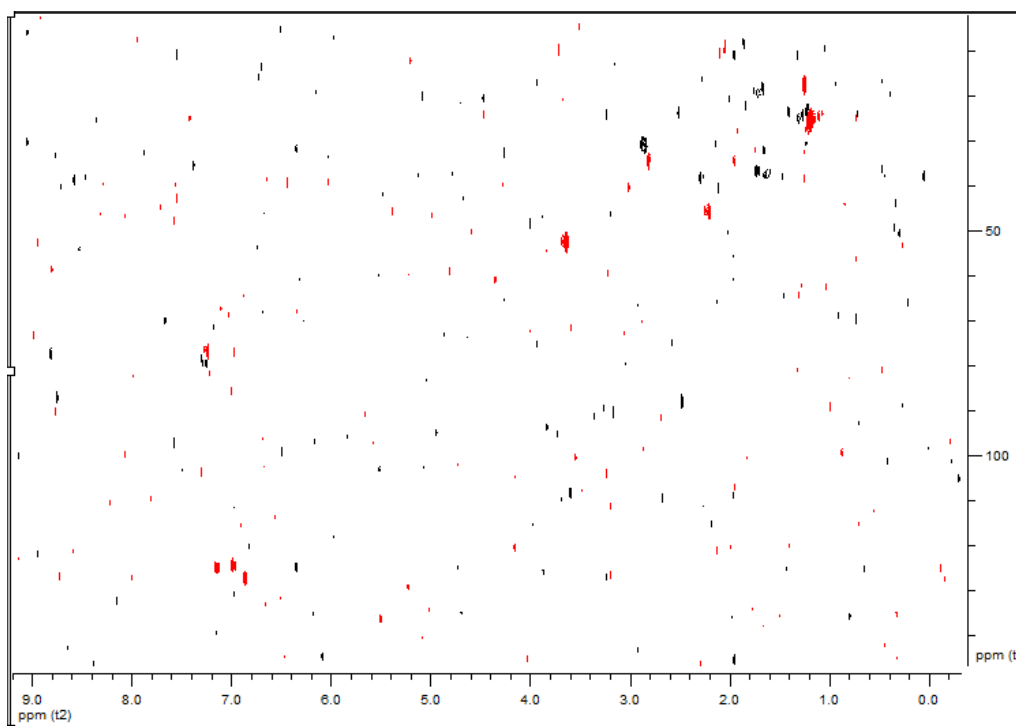
Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **10** (Εικ. 75) παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.25 και 1.19, οι οποίες ολοκληρώναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα,

(ii) μία διπλή κορυφή σε δ 1.20 (6.9 Hz) η οποία ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγές άτομο άνθρακα, (iii) μία διπλή σε δ 7.14 (8.2 Hz), μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 6.99 (8.1, 1.9 Hz) και και μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 6.86, που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός αρωματικού πυρήνα.



Εικόνα 75. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **10**.

Στο φάσμα HSQC-DEPT (Εικ. 76) παρατηρήθηκαν πέντε μεθύλια -το ένα οξυγονωμένο-, πέντε μεθυλένια και πέντε μεθίνια, τρία εκ των οποίων αρωματικά (Εικ. 76).



Εικόνα 76. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **10**.

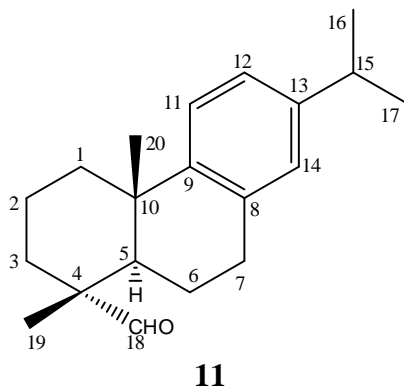
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική έρευνα, αποδείχθηκε ότι ο μεταβολίτης **10** αντιστοιχούσε στον μεθυλεστέρα του δεύδροαβιετικού οξέος (Gonzalez et al. 2010). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **10** παρατίθενται στον Πίνακα 120, ενώ για πρώτη φορά γίνεται πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 120 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **10** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

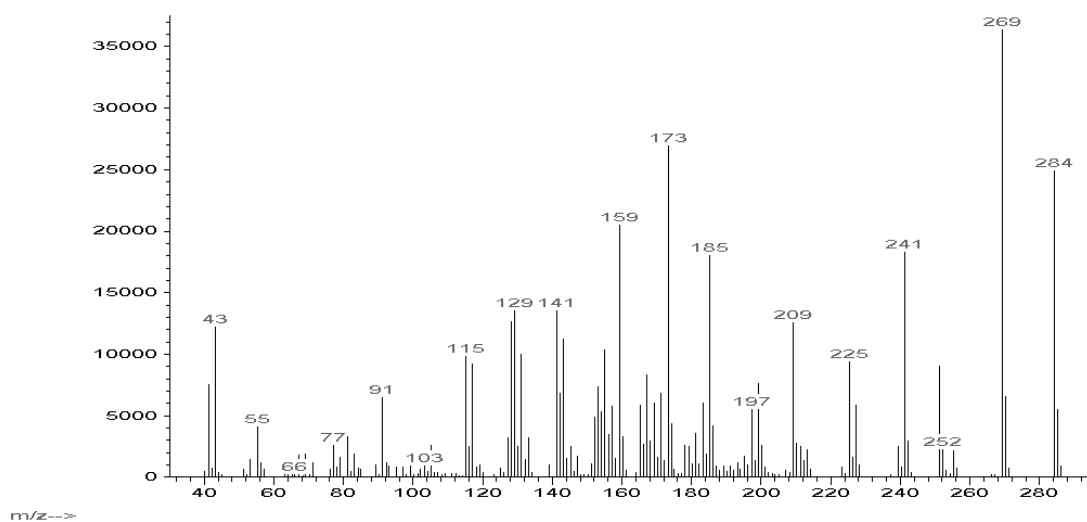
Θέση	δ_C	δ_H
1a	38.3	2.30 brd (12.3)
1b		1.50 m
2	19.2	1.71 m
3a	37.6	1.78 m
3b		1.64 m
4	nd	-
5	45.7	2.22 dd (12.5, 2.2)
6a	22.4	1.82 m
6b		1.30 m
7	30.8	2.87 m
8	nd	-
9	nd	-
10	nd	-
11	124.9	7.14 d (8.2)
12	124.2	6.99 dd (8.1, 1.9)
13		-
14	127.3	6.86 brs
15	34.0	2.80 septet (6.9)
16	24.8	1.20 d (6.9)
17	24.8	1.20 d (6.9)
18	179.9	-
19	17.4	1.19 s
20	25.9	1.25 s
21	52.4	3.64 s

3.1.11. Μεταβολίτης 11: 8,11,13-Αβιετατριεν-18-άλη (δεϋδροαβιετάλη)

Ο μεταβολίτης **11** απομονώθηκε κατόπιν διαχωρισμού με HPLC ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 1.0 mg. Η ταυτοποίησή του έγινε με συνδυασμό των φασματοσκοπικών δεδομένων ^1H NMR και του φάσματος μάζας (EI-MS) με μοριακό τύπο $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}$.



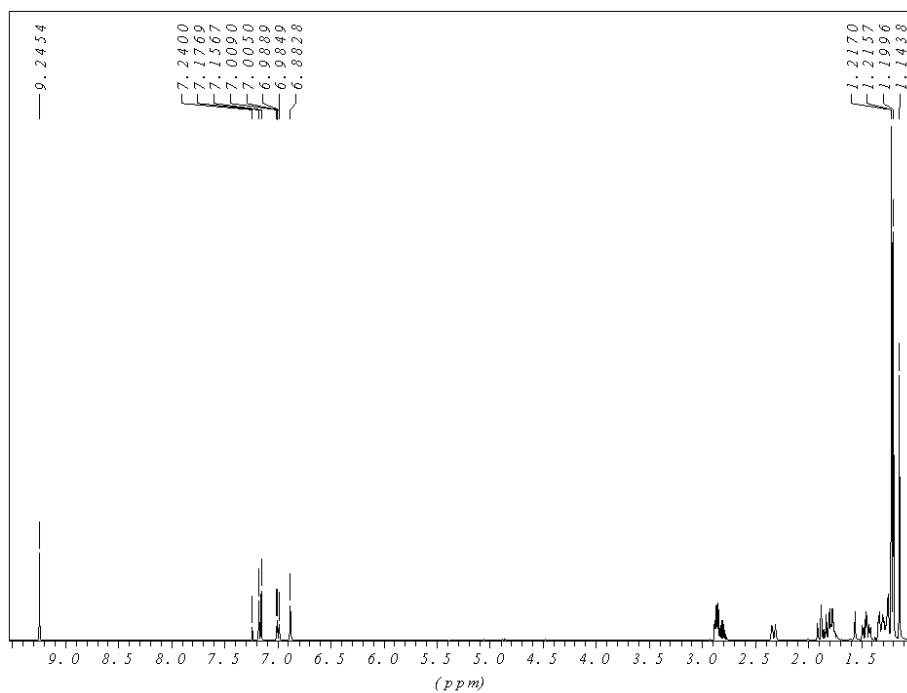
Το μοριακό ιόν $[\text{M}]^+$ στο φάσμα μάζας (Εικ. 77) εμφανίστηκε σε m/z 284, καθώς και τα θραύσματα $[\text{M}-\text{CH}_3]$ και $[\text{M}-i\text{PrO}]$ σε m/z 269 και m/z 241.



Εικόνα 77. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **11**.

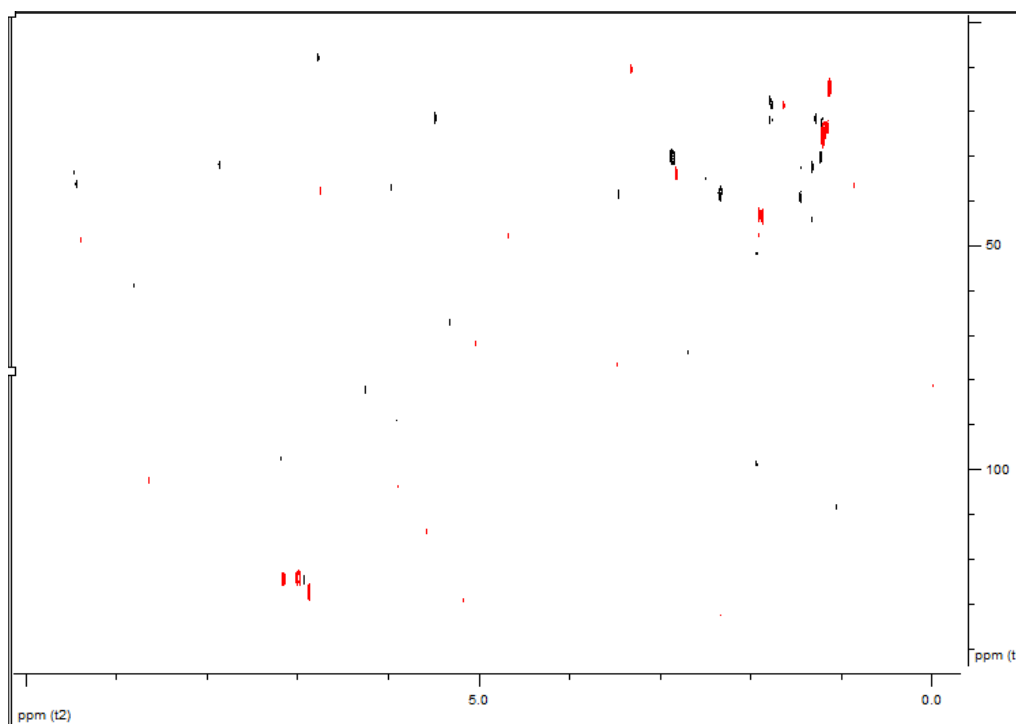
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **11** (Εικ. 78) παρατηρήθηκαν: (i) μια διπλή κορυφή στα 1.21 ppm (d, 6.9 Hz), που ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε δύο μεθύλια σε τριτοταγές άτομο άνθρακα, (ii) δύο απλές κορυφές στα 1.22 ppm και 1.14 ppm, που ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (iii) χαρακτηριστικές κορυφές τριών αρωματικών πρωτονίων σε δ 7.15 (d, 8.2 Hz), 6.97 (dd, 8.2, 1.8 Hz) και 6.87 (brs) και (iv) μια απλή κορυφή στα 9.24

ppm, που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα αλδεϋδικό πρωτόνιο.



Εικόνα 78. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **11**.

Στο φάσμα HSQC-DEPT (Εικ. 79) του μεταβολίτη **11** παρατηρήθηκαν τέσσερα μεθύλια, πέντε μεθυλένια και πέντε μεθίνια, τρία εκ των οποίων αρωματικά, καθώς και μία αλδεϋδική ομάδα (Εικ. 79).



Εικόνα 79. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **11**.

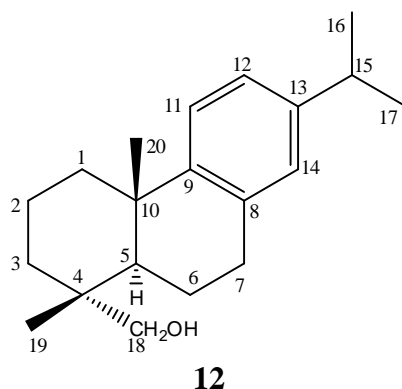
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική έρευνα που ακολούθησε, αποδείχθηκε ότι ο μεταβολίτης **11** αντιστοιχούσε στο γνωστό διτερπένιο αβιετικού τύπου δεϋδροαβιετάλη (Nishida et al. 1977). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **11** παρατίθενται στον Πίνακα 121 ενώ για πρώτη φορά γίνεται πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 121 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **11** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

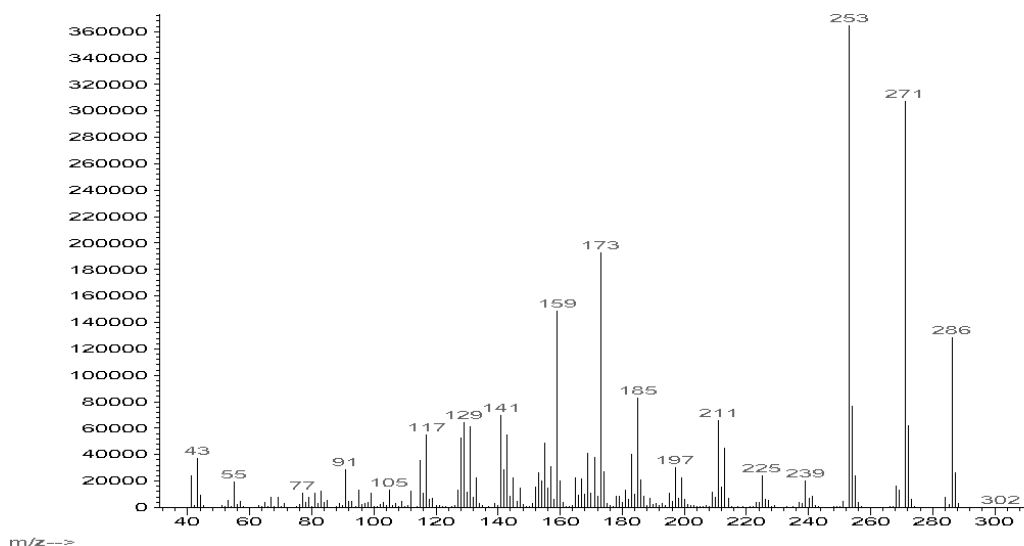
Θέση	δ_C	δ_H
1a	38.4	2.32 m
1b		1.43 m
2	18.0	1.81 m
3	32.5	1.46 m
		1.31 m
4	nd	-
5	43.2	2.30 brd (12.9)
6a	21.9	1.79 m
6b		1.30 m
7	30.3	2.90 m
8	nd	-
9	nd	-
10	nd	-
11	124.4	7.16 d (8.2)
12	124.1	7.00 dd (1.6, 8.1)
13	nd	-
14	127.3	6.87 brs
15	33.8	2.82 septet (6.9)
16	23.8	1.21 d (6.9)
17	23.8	1.21 d (6.9)
18	206.2	9.24 s
19	14.4	1.22 s
20	24.7	1.14 s

3.1.12. Μεταβολίτης 12: 8,11,13-Αβιετατριεν-18-όλη (δεϋδροαβιετόλη)

Ο μεταβολίτης **12** απομονώθηκε κατόπιν διαχωρισμού με HPLC ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα 1.1 mg. Η ταυτοποίησή του έγινε με συνδυασμό των φασματοσκοπικών δεδομένων ^1H NMR και του φάσματος μάζας (EI-MS) με μοριακό τύπο $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$.



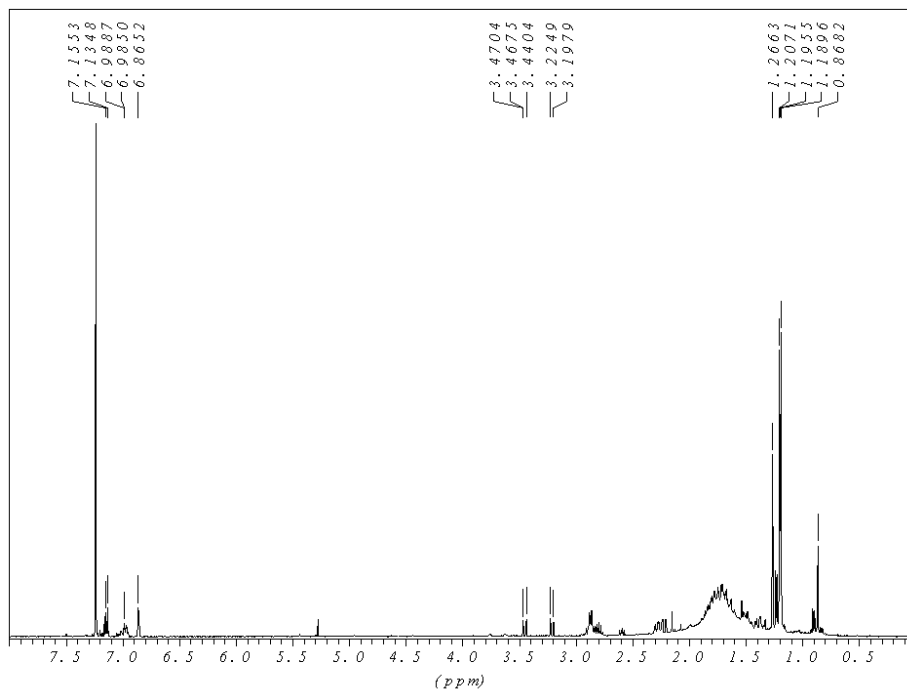
Το μοριακό ιόν $[\text{M}]^+$, όπως διακρίνεται στο φάσμα μάζας, εμφανίσθηκε σε m/z 286 (Εικ. 80).



Εικόνα 80. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **12**.

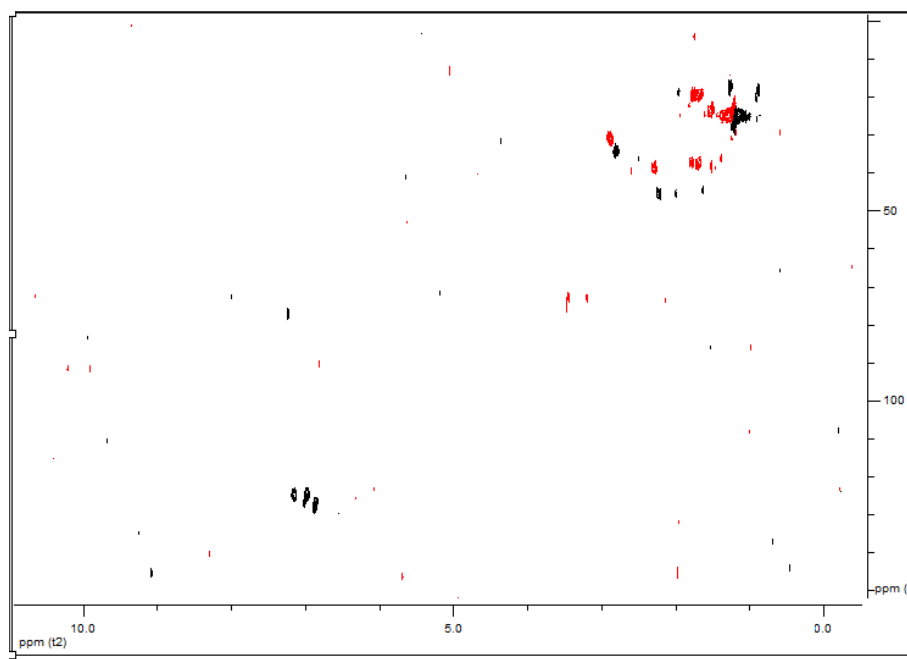
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **12** (Εικ. 81) παρατηρήθηκαν: (i) μια διπλή κορυφή στα 1.20 ppm (6.9 Hz), που ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε δύο μεθύλια σε τριτοταγές άτομο άνθρακα, (ii) δύο απλές κορυφές στα 1.19 ppm και 0.87 ppm, που ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (iii) δύο διπλές κορυφές στα 3.45 ppm (10.8 Hz) και 3.21 ppm (10.9 Hz) που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα δύο

πρωτόνια μίας ομάδας υδρόξυ-μεθυλενίου σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα, και (iv) χαρακτηριστικές κορυφές τριών αρωματικών πρωτονίων σε δ 7.15 (d, 8.2 Hz), 6.97 (dd, 8.2, 1.8 Hz) και 6.87 (brs).



Εικόνα 81. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **12**.

Στο φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **12** παρατηρήθηκαν τέσσερα μεθύλια, έξι μεθυλένια, εκ των οποίων το ένα οξυγονωμένο και πέντε μεθίνια, τρία εκ των οποίων αρωματικά (Εικ. 82).



Εικόνα 82. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **12**.

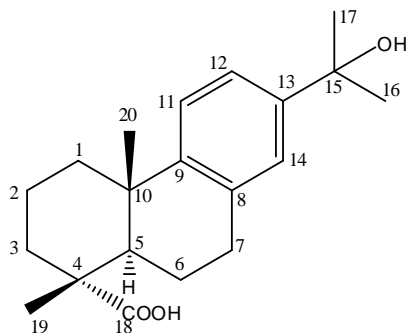
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική έρευνα που ακολούθησε, αποδείχθηκε ότι ο μεταβολίτης **12** αντιστοιχούσε στο γνωστό διτερπένιο αβιετικού τύπου δεϋδροαβιετόλη (Fraga et al. 1994). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR του μεταβολίτη **12** παρατίθενται στον Πίνακα 122, ενώ για πρώτη φορά γίνεται πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 122 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **12** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a		2.29 m
1b	38.6	1.52 m
2	19.0	1.64 m
3	35.9	1.40 m
4	nd	-
5	44.5	2.23 dd (12.5, 2.0)
6a		1.76, m
6b	19.3	1.72, m
7	30.6	2.88, m
8	nd	-
9	nd	-
10	nd	-
11	124.7	7.15, d (8.2)
12	124.5	6.97, dd (8.2, 1.8)
13	nd	-
14	127.3	6.87 brs
15	33.9	2.80 septet (6.9)
16	24.9	1.20, d (6.9)
17	24.9	1.20, d (6.9)
18a		3.45, d (10.8)
18b	72.5	3.21, d (10.9)
19	17.6	1.19 s
20	25.0	0.87 s

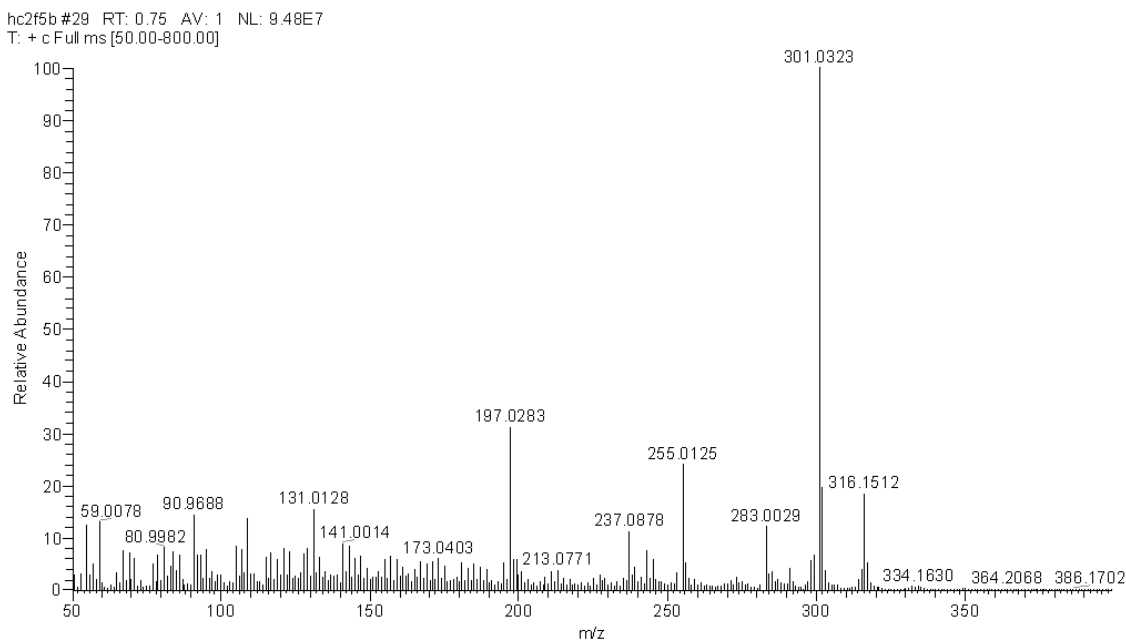
3.1.13. Μεταβολίτης 13: 15-Υδροξύ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (15-υδροξύ-δεϋδροαβιετικό οξύ)

Ο μεταβολίτης **13** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 18.3 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **13** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₂₈O₃.



13

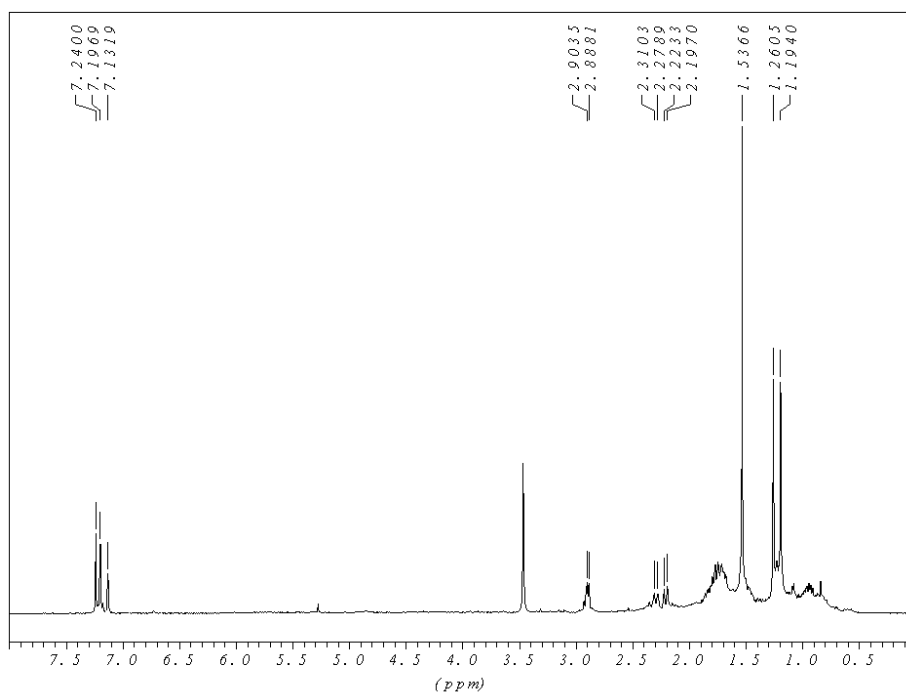
Το μοριακό ιόν [M]⁺ στο φάσμα μάζας εμφανίστηκε σε *m/z* 316 (Εικ. 83).



Εικόνα 83. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **13**.

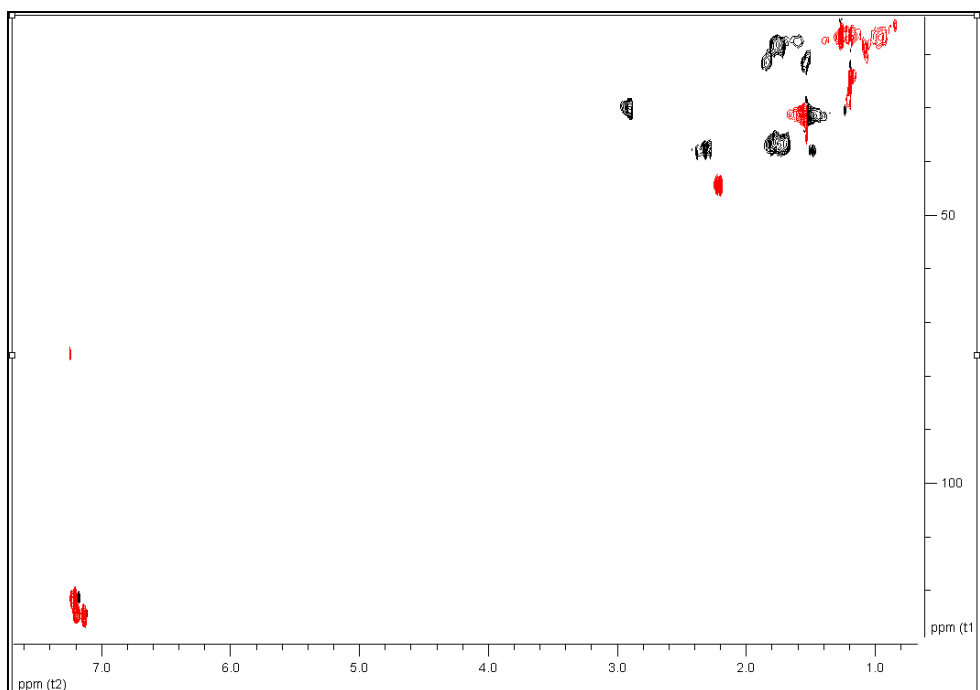
Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **13** (Εικ. 84) παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.26 και 1.19, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο μεθυλιών σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία απλή κορυφή σε δ 1.54, η οποία ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια δύο μεθυλιών σε τεταρτοταγές, οξυγονωμένο άτομο άνθρακα και (iii) τρεις ευρείες απλές

κορυφές στα 7.13, 7.19 και 7.19 ppm, που ολοκληρώναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε τρία αρωματικά πρωτόνια.



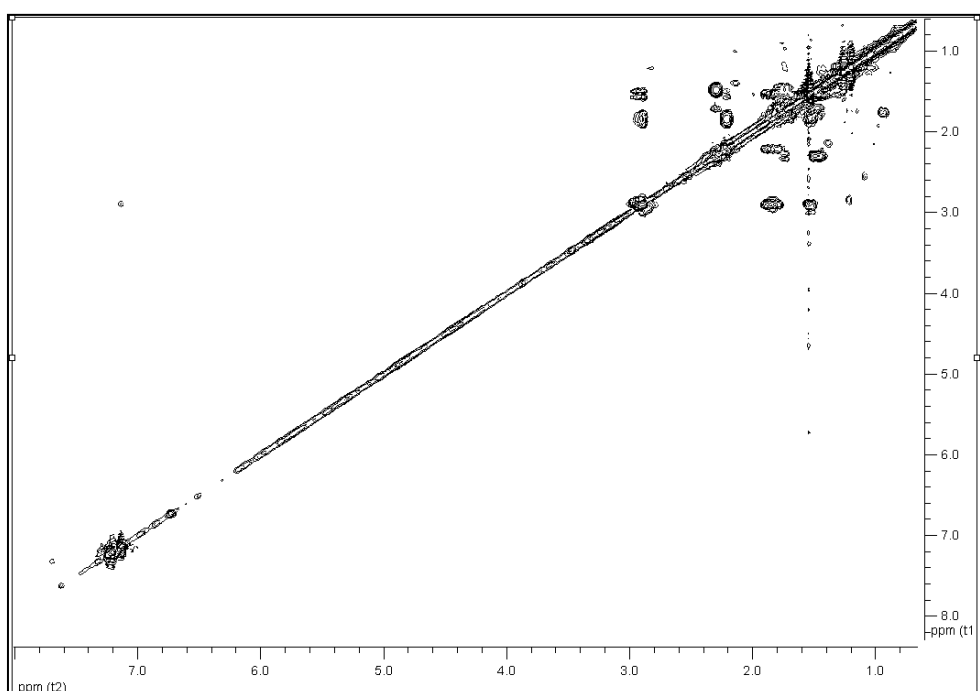
Εικόνα 84. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **13** (CDCl_3).

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 85) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τεσσάρων μεθυλίων, πέντε μεθυλενίων και τεσσάρων μεθινίων, τρία εκ των οποίων αρωματικά. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

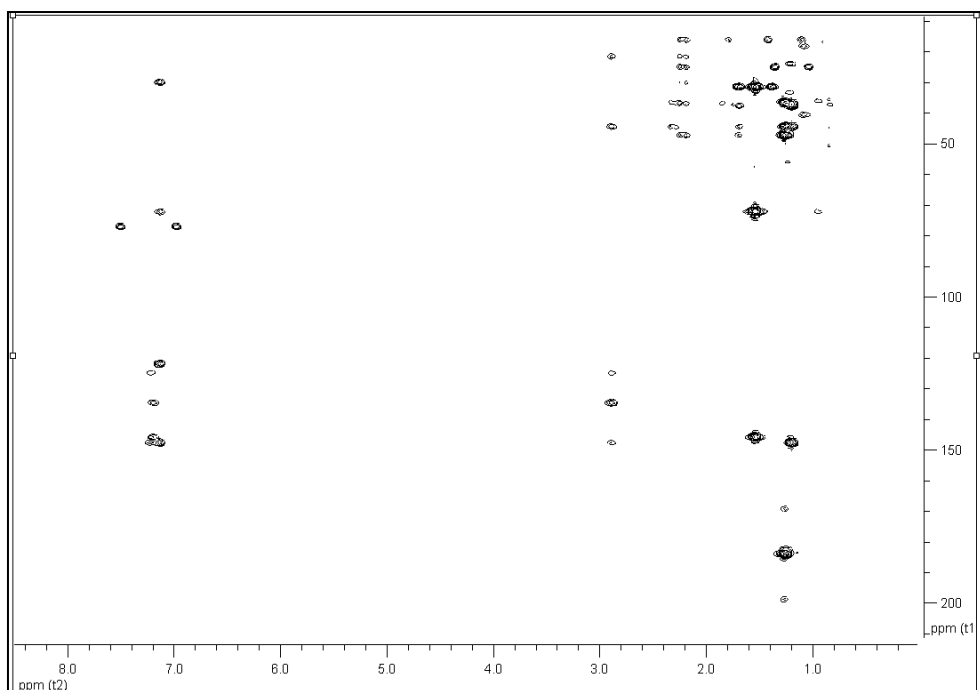


Εικόνα 85. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **13** (CDCl_3).

Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY (Εικ. 86) μεταξύ των μεθυλενικών πρωτονίων $\text{H}_2\text{-1}/\text{H}_2\text{-2}$, $\text{H}_2\text{-2}/\text{H}_2\text{-3}$, των $\text{H-5}/\text{H}_2\text{-6}$ και $\text{H}_2\text{-6}/\text{H}_2\text{-7}$, καθώς και των $\text{H}_2\text{-11}/\text{H}_2\text{-12}$ καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6, C-7 και των θέσεων C-11 και C-12 αντίστοιχα. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο (Εικ. 87), αποδεικνύοντας την ύπαρξη σκελετού αβιετανίου.



Εικόνα 86. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **13** (CDCl_3).



Εικόνα 87. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **13** (CDCl₃).

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα ήταν εμφανής η δομική ομοιότητα των μεταβολιτών **9** και **13**. Η διαφορά τους εντοπίστηκε στην ύπαρξη μίας απλής κορυφής σε δ 1.53 στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **13** που αντιστοιχεί σε δύο μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομο άνθρακα, ενώ στην περίπτωση του μεταβολίτη **9** παρατηρείται μία διπλή κορυφή σε υψηλότερα πεδία (1.21 ppm) που ολοκλήρωνε για δύο μεθύλια.

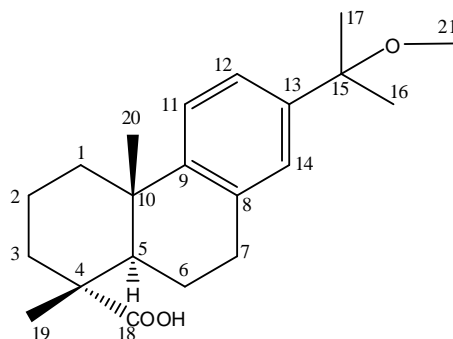
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 15-υδρόξυ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (15-υδρόξυ-δεϋδροαβιετικό οξύ) (Yang et al. 2010), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 123, ενώ για πρώτη φορά γίνεται η πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 123 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **13** σε CDCl₃ και C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	CDCl ₃		C ₆ D ₆	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	37.8	a. 2.29 brd (12.9) b. 1.49 m	38.7	a. 2.07 brd (12.6) b. 1.31 m
2	18.4	1.74 m	19.3	a. 1.51 m b. 1.42 m
3	36.7	1.75 m	37.4	a. 1.81 ddd (12.7, 12.7, 3.1) b. 1.60 m
4	47.0	-	47.7	-
5	44.5	2.21 dd (12.6, 1.7)	45.4	2.36 d (12.0)
6	21.6	1.54 m	22.5	a. 1.74 m b. 1.59 m
7	30.1	2.91 m	30.9	a. 2.88 m b. 2.77 dd (17.3, 6.3)
8	134.6	-	134.5	-
9	147.8	-	147.6	-
10	36.9	-	36.9	-
11	124.9	7.19 brs	124.4	7.13 d (8.3)
12	122.2	7.19 brs	122.8	7.27 brd (8.3)
13	146.0	-	146.7	-
14	124.1	7.13 brs	125.4	7.19 brs
15	72.3	-	72.1	-
16	30.3	1.54 s	31.4	1.54 s
17	30.3	1.54 s	31.4	1.54 s
18	183.9	-	184.6	-
19	16.7	1.26 s	17.0	1.28 s
20	25.1	1.19 s	25.7	1.08 s

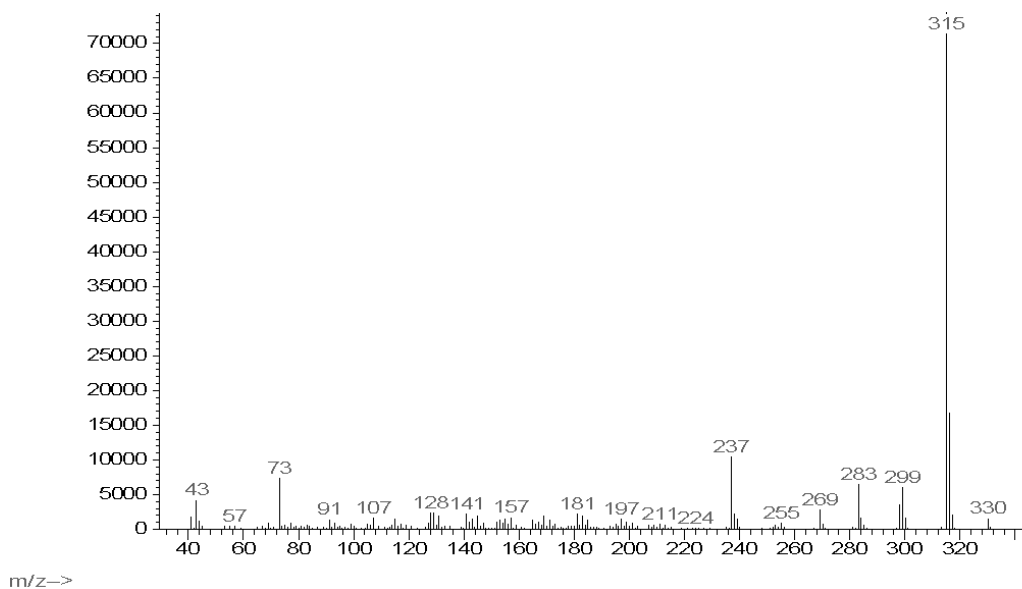
3.1.14. Μεταβολίτης 14: 15-Μεθοξυ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (15-μεθοξυ-δεϋδροαβιετικό οξύ)

Ο μεταβολίτης **14** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 4.6 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **14** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₁H₃₀O₃.



14

Το μοριακό ιόν [M]⁺ στο φάσμα μάζας (Εικ. 88) εμφανίστηκε σε *m/z* 330, ενώ το θραύσμα [M-CH₃]⁺ σε *m/z* 315.

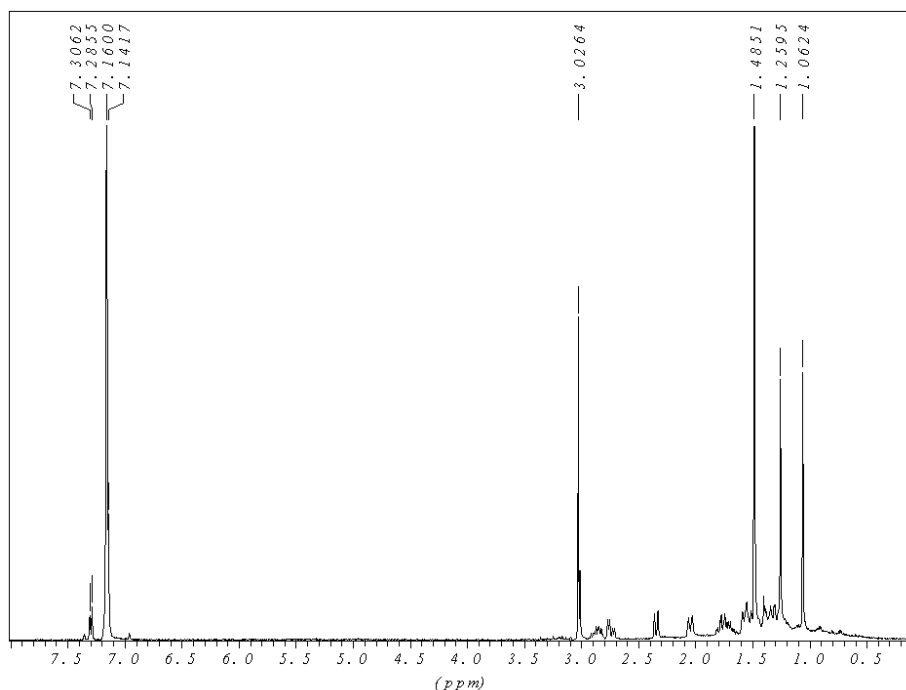


Εικόνα 88. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **14**.

Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **14** (Εικ. 89) παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.27 και 1.07, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία απλή κορυφή σε δ 1.53, η οποία ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα, (iii) μία απλή κορυφή σε δ 3.02, που ολοκλήρωνε

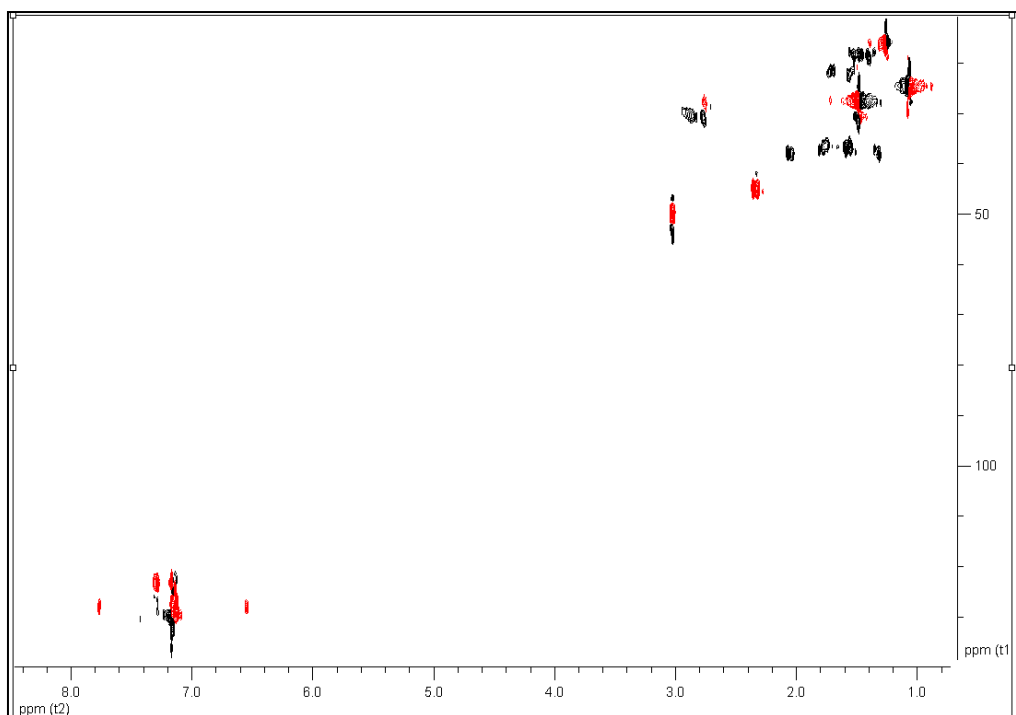
για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια μιάς ομάδας μεθοξυλίου, και (iv) τρεις κορυφές σε δ 7.29 (brs), 7.17 (brs) και 7.13 (brd, 8.3), που η κάθε μία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός τρισυποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα.

Η δομική ομοιότητα των μεταβολιτών **13** και **14** με βάση το φάσμα ^1H NMR ήταν εμφανής και συγκεκριμένα η βασική διαφορά τους εντοπίστηκε στην ύπαρξη μίας απλής κορυφής σε δ 3.02 που αντιστοιχεί σε ένα οξυγονωμένο μεθύλιο.



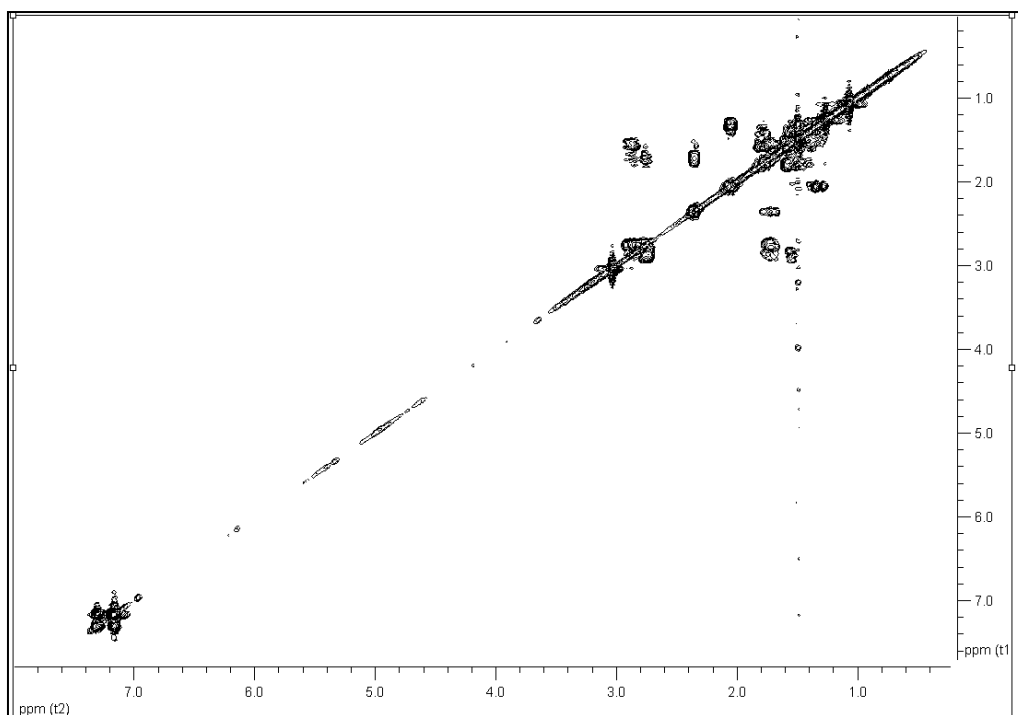
Εικόνα 89. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **14**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 90) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά πέντε μεθυλίων, πέντε μεθυλενίων και τεσσάρων μεθινίων, τρία εκ των οποίων αρωματικά. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

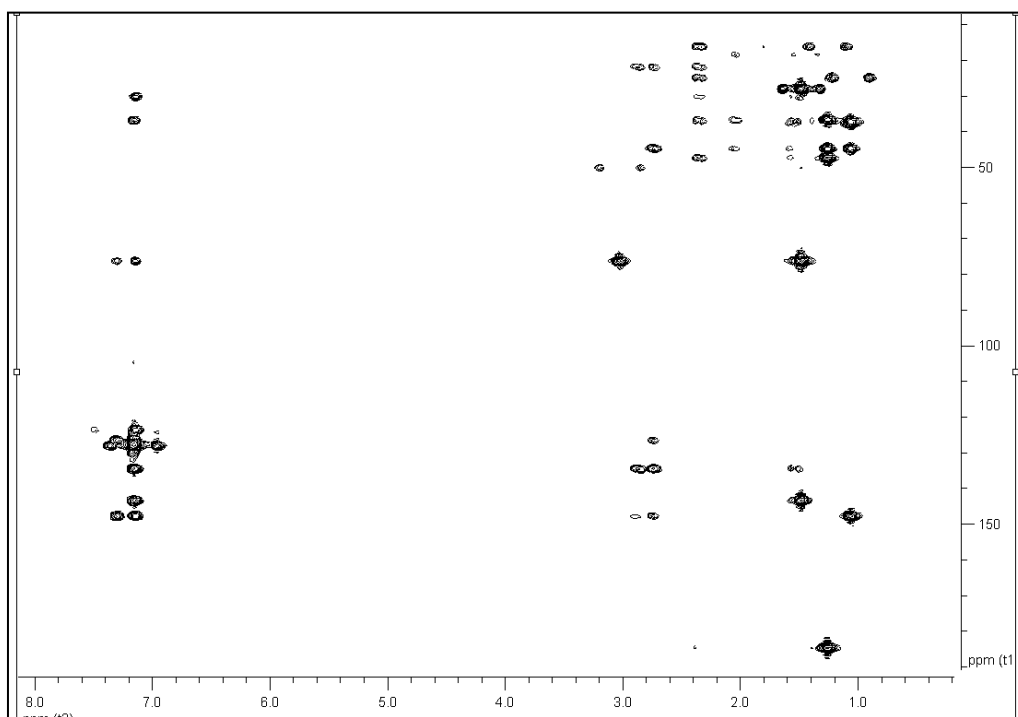


Εικόνα 90. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **14**.

Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY (Εικ. 91) μεταξύ των μεθυλενικών πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/H₂-3, των H-5/H₂-6 και H₂-6/H₂-7, καθώς και των H₂-11/H₂-12 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6, C-7 και των C-11 και C-12 αντίστοιχα. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο (Εικ. 92) και διαπιστώθηκε ότι ο μεταβολίτης **14** είναι ο 15-μεθυλαιθέρας του μεταβολίτη **13**.



Εικόνα 91. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **14**.



Εικόνα 92. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **14**.

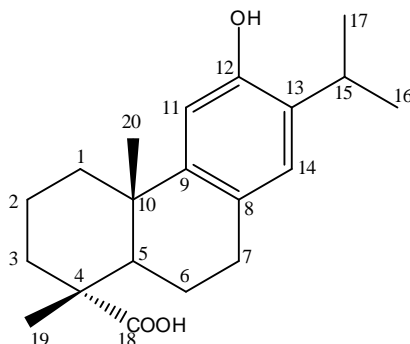
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 15-μεθοξυ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (15-μεθοξυ-δεϋδροαβιετικό οξύ) (Yang et al. 2010), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 124.

Πίνακας 124 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **14** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a	37.2	2.05 brd (12.8)
1b		1.32 m
2	18.6	1.40 m
3a	36.7	1.76 m
3b		1.58 m
4	47.1	-
5	44.8	2.34 brd (11.9)
6a	22.1	1.71 m
6b		1.57 m
7a	30.9	2.87 m
7b		2.77 m
8	134.7	-
9	147.4	-
10	36.8	-
11	124.7	7.13 brd (8.3)
12	123.4	7.29 brs
13	143.2	-
14	126.3	7.17 brs
15	76.2	-
16	27.7	1.48 s
17	27.7	1.48 s
18	184.5	-
19	16.7	1.27 s
20	25.1	1.10 s
21	50.0	3.03 s

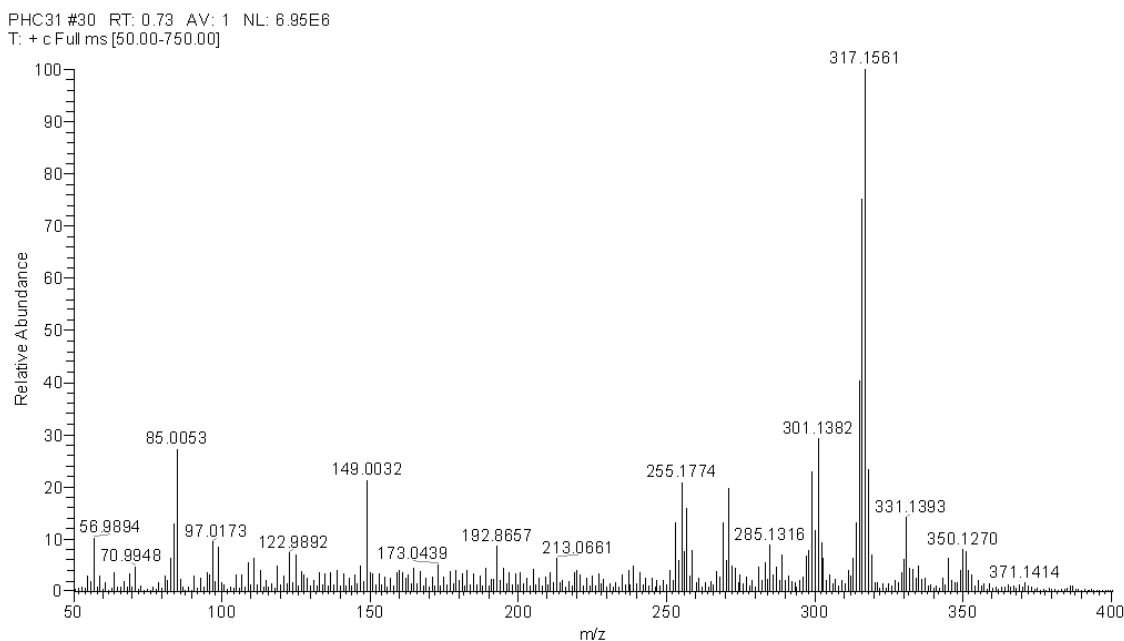
3.1.15. Μεταβολίτης 15: 12-Υδροξύ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (12-υδροξύ-δεϋδροαβιετικό οξύ)

Ο μεταβολίτης **15** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 0.9 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **15** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₂₈O₃.



15

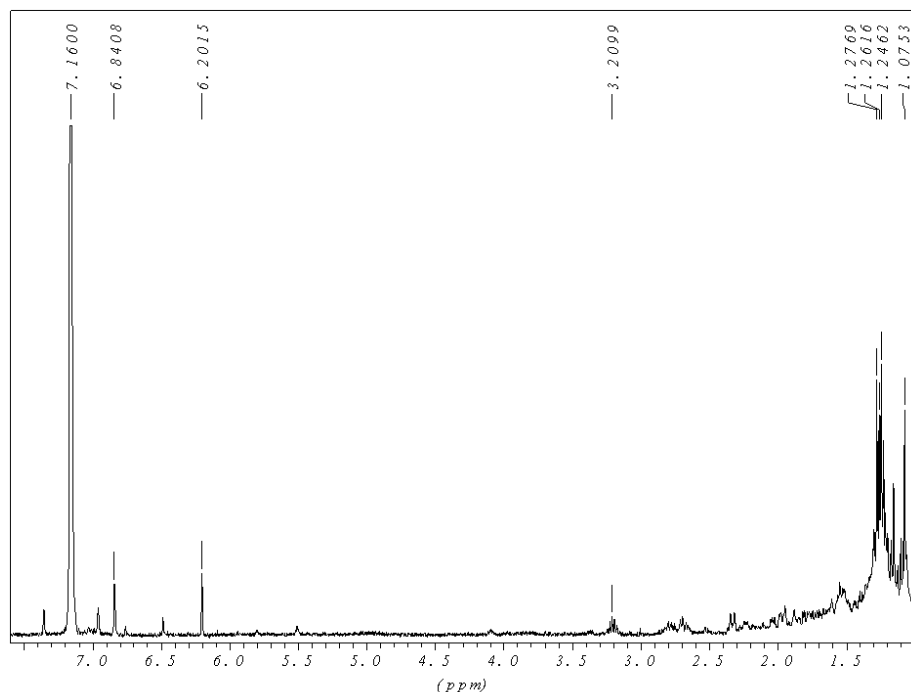
Στο φάσμα μάζας του μεταβολίτη **15** εμφανίστηκε ψευδομοριακό ιόν [M+H]⁺ σε *m/z* 317 (Εικ. 93).



Εικόνα 93. Φάσμα μάζας (PCIMS) του μεταβολίτη **15**.

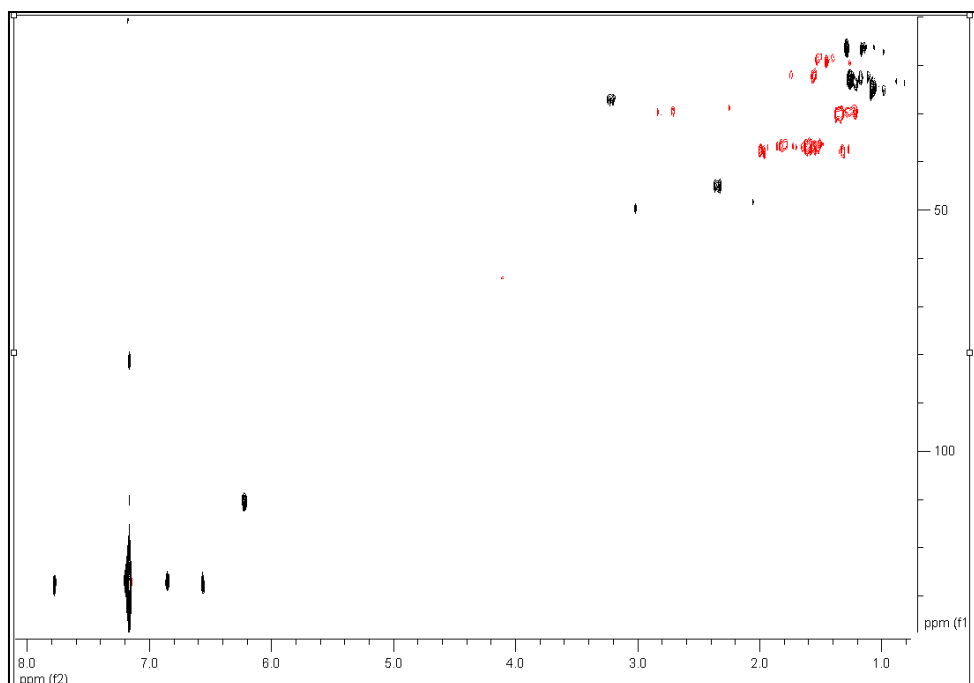
Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **15** (Εικ. 94) παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.08 και 1.28, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) δύο διπλές

κορυφές σε δ 1.24 (6.4 Hz) και 1.26 (6.4 Hz), η οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκε στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τριτοταγές άτομο άνθρακα και (iii) δύο απλές κορυφές σε δ 6.20 και 6.84, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο αρωματικά πρωτόνια.



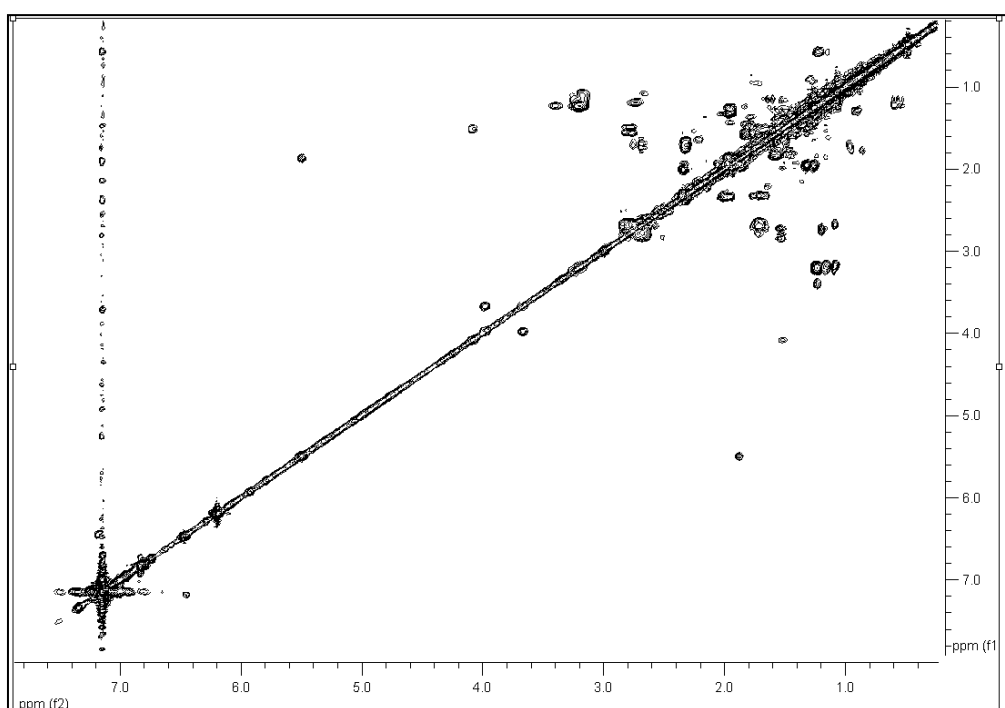
Εικόνα 94. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **15**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 95) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά πέντε μεθυλίων, πέντε μεθυλενίων και τεσσάρων μεθινίων, δύο εκ των οποίων αρωματικά. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.



Εικόνα 95. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **15**.

Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY (Εικ. 96) μεταξύ των μεθυλενικών πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/H₂-3 και των H-5/H₂-6 και H₂-6/H₂-7 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6, C-7. Παρατηρήθηκε επίσης ομοπυρηνική σύζευξη COSY H₃-16/H-15 και H₃-17/H-15 επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη ομάδας ισοπροπυλίου, χαρακτηριστικής του αβιετανικού σκελετού.



Εικόνα 96. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **15**.

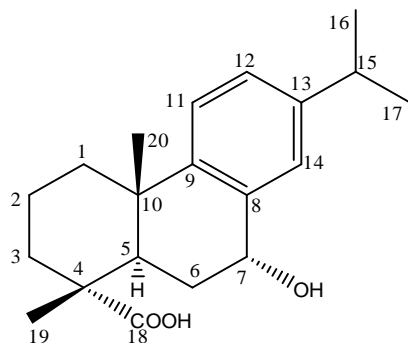
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική έρευνα που ακολούθησε, αποδείχθηκε ότι ο μεταβολίτης **15** αντιστοιχούσε στο γνωστό 12-υδρόξυ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (12-υδρόξυ-δεϋδροαβιετικό οξύ) (Kinouchi et al. 2000). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR του μεταβολίτη **15** παρατίθενται στον Πίνακα 125, δίχως την απόδοση των τεταρτοταγών ατόμων άνθρακα λόγω μη επαρκούς ποσότητας του μεταβολίτη για τη λήψη φάσματος HMBC.

Πίνακας 125 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **15** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ _C	δ _H
1a	38.2	2.00 m
1b		1.60 m
2	19.4	1.56 m
3a	37.5	1.81 m
3b		1.77 m
4	nd	-
5	46.0	2.32 dd (12.3, 2.2)
6	20.1	1.72 m
7a	28.5	2.80 m
7b		2.70 m
8	nd	-
9	nd	-
10	nd	-
11	110.0	6.20 s
12	nd	-
13	nd	-
14	127.5	6.84 s
15	27.0	3.22 septet (6.4)
16	23.3	1.26 d (6.4)
17	23.3	1.24 d (6.4)
18	nd	-
19	17.5	1.28 s
20	25.3	1.08 s

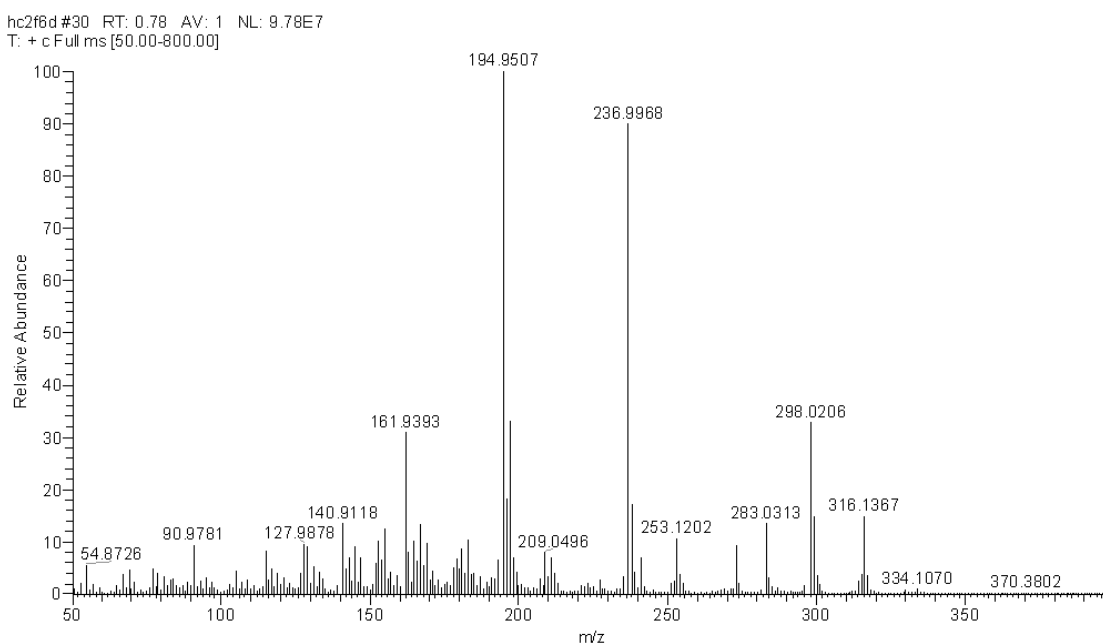
3.1.16. Μεταβολίτης 16: 7α-Υδροξύ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (7α-υδροξύ-δεϋδροαβιετικό οξύ)

Ο μεταβολίτης **16** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 6.3 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **16** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₂₈O₃.



16

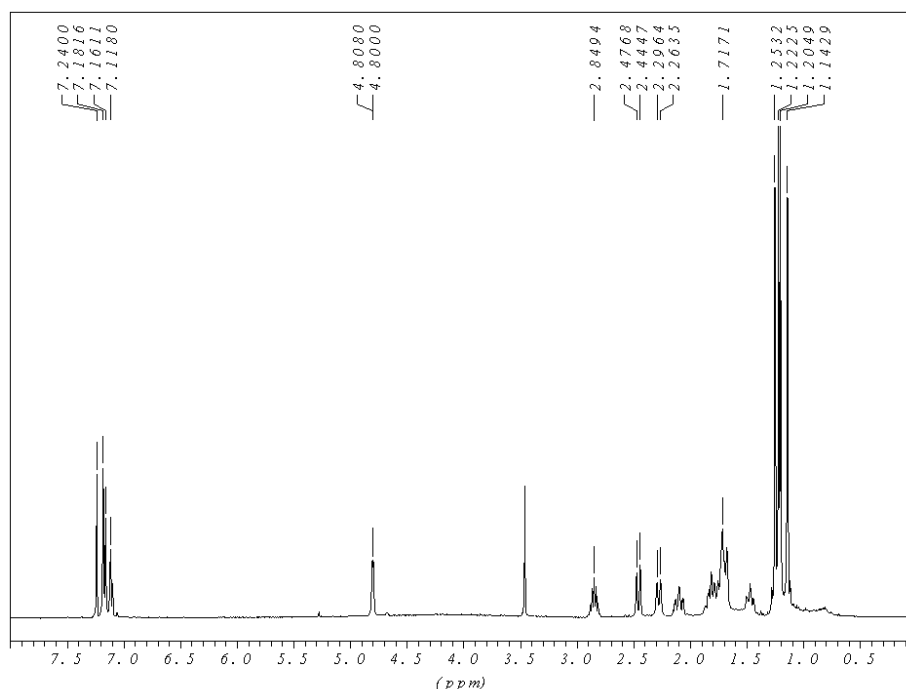
Το μοριακό ιόν στο φάσμα μάζας του μεταβολίτη **16** εμφανίστηκε σε m/z 316 (Εικ. 97).



Εικόνα 97. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **16**.

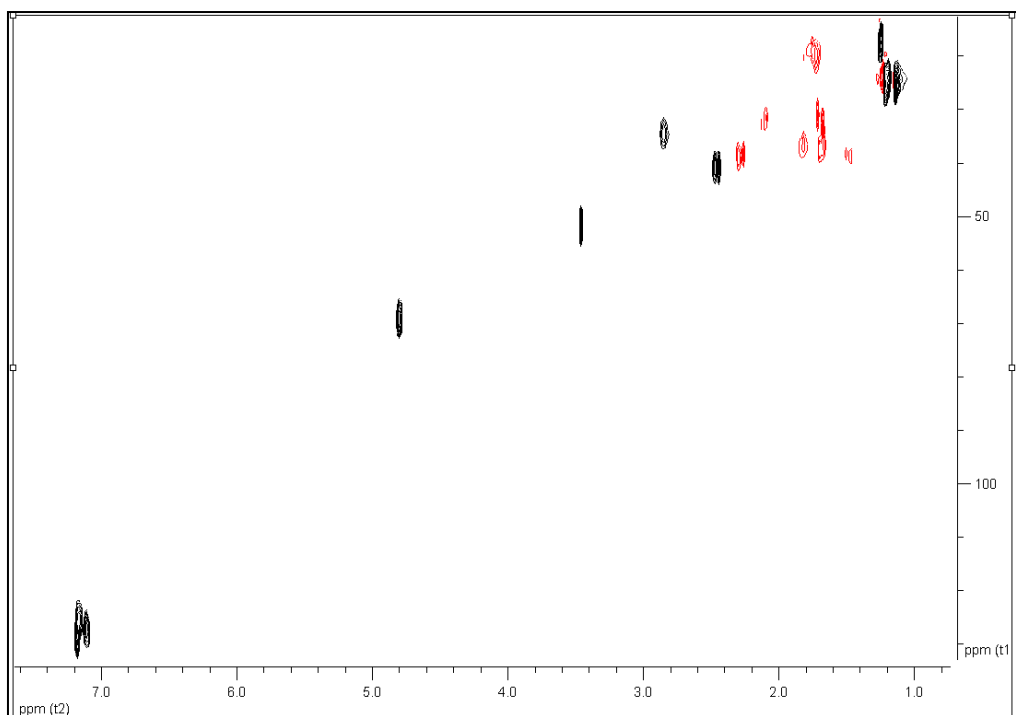
Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **16** (Εικ. 98) παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.25 και 1.14, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία διπλή κορυφή σε δ 1.21 (7.0 Hz), η οποία ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αποδόθηκε στα

πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τριτοταγές άτομο άνθρακα, (iii) μια διπλή κορυφή σε δ 4.80 (3.2 Hz), η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε στο πρωτόνιο ενός οξυγονωμένου μεθινίου και (iv) μία διπλή κορυφή στα 7.17 ppm (8.2 Hz), μία διπλή διπλών κορυφή στα 7.12 (8.8, 1.5 Hz) και μία απλή σε δ 7.17, η κάθε μία εκ των οποίων ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσαν σε τρία αρωματικά πρωτόνια.



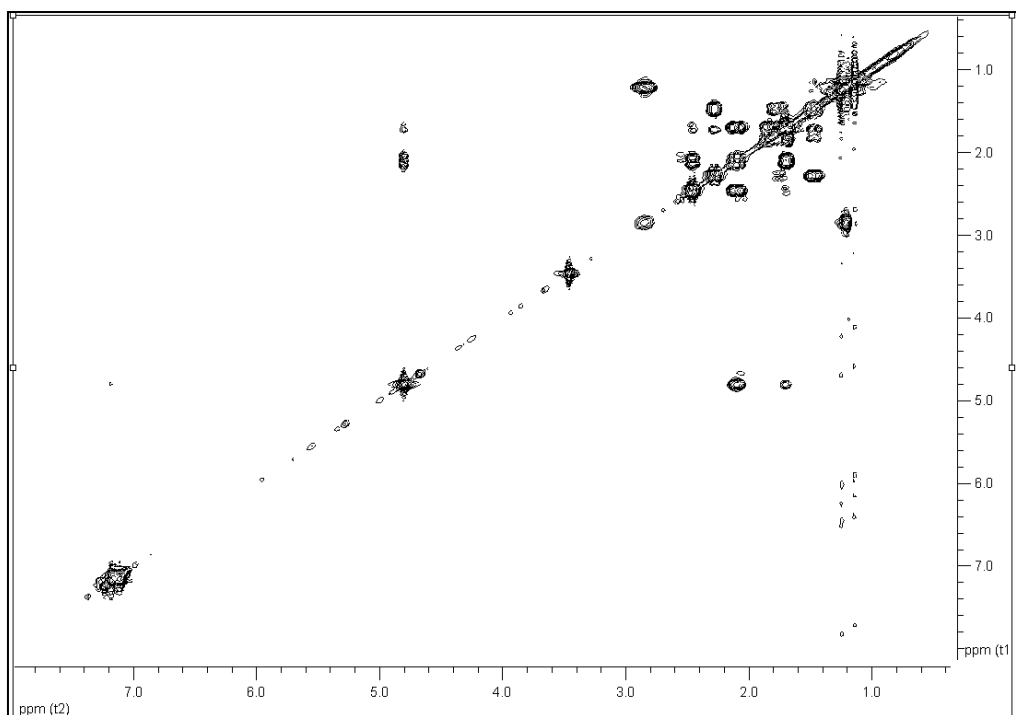
Εικόνα 98. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **16**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 99) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τεσσάρων μεθυλίων, πέντε μεθυλενίων και έξι μεθινίων, τρία εκ των οποίων αρωματικά και ένα οξυγονωμένο. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

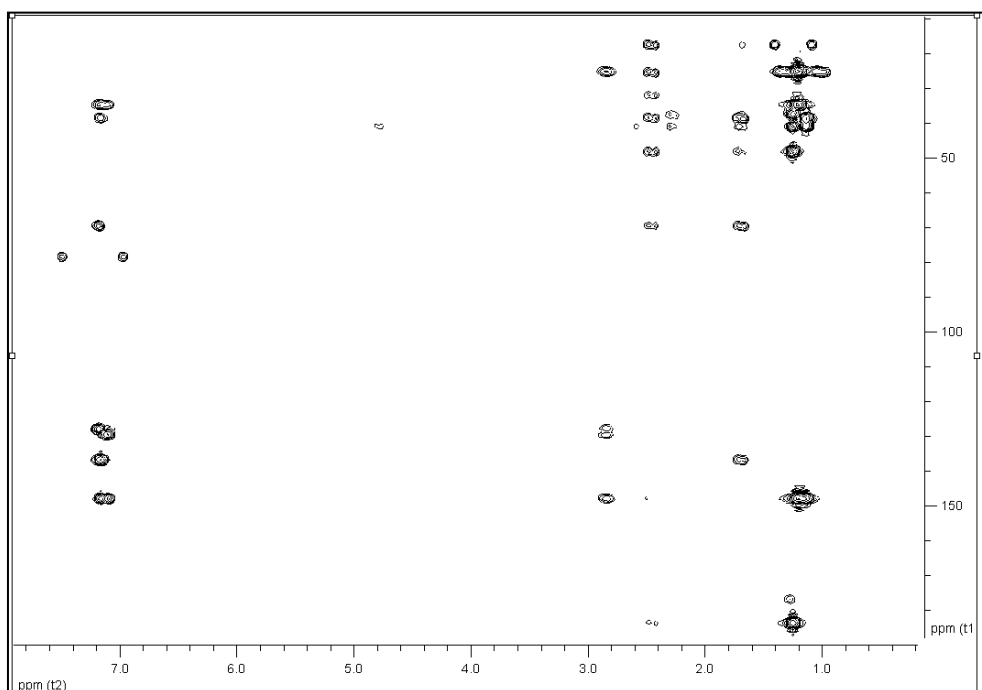


Εικόνα 99. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **16**.

Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY (Εικ. 100) μεταξύ των μεθυλενικών πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/H₂-3 και των H-5/H₂-6 και H₂-6/H-7 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 C-3, και των C-5, C-6, C-7. Παρατηρήθηκε επίσης ομοπυρηνική σύζευξη COSY μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων H-11/H-12 και των H₃-16/H-15 και H₃-17/H-15, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη ομάδας ισοπροπυλίου, χαρακτηριστικής του αβιτανικού σκελετού. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο (Εικ. 101).



Εικόνα 100. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 16.



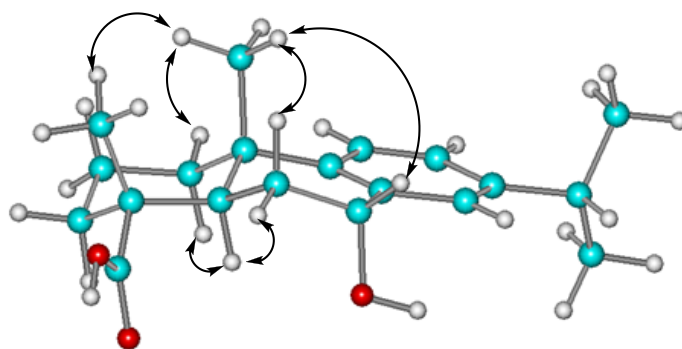
Εικόνα 101. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 16.

Κατόπιν λήψης φασμάτων 1D-NOE (Εικ. 103-107) επιβεβαιώθηκε η συσχέτιση H₃-20/H₃-19 ενώ δεν παρατηρήθηκε η συσχέτιση H₃-20/H-5. Έτσι, εάν το H₃-20 έχει θέση αξονική, τότε και το H₃-19 είναι αξονικό και πάνω από το επίπεδο και εφόσον δεν έχει συσχέτιση με το H-5, τότε αυτό θα είναι επίσης αξονικό και θα έχει προσανατολισμό κάτω

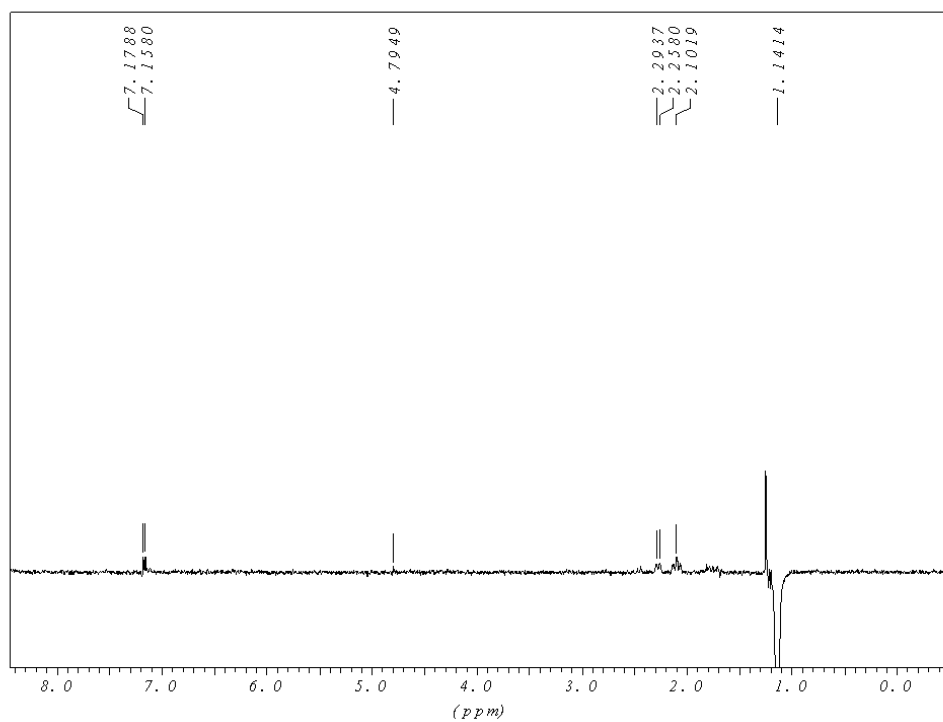
από το επίπεδο. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε συσχέτιση NOE H-1β/H₃-20 και H-1α/H-5 επιβεβαιώνοντας την αξονική θέση του H-5. Κατά αυτόν τον τρόπο προσδιορίστηκε η σχετική στεreoχημεία του μορίου στα ασύμμετρα κέντρα C-4, C-5 και C-10. Η σχετική στεreoχημεία αυτών των ασύμμετρων κέντρων ήταν αναμενόμενη, κατόπιν σύγκρισης των φασματοσκοπικών δεδομένων και κυρίως των δεδομένων του φάσματος ¹³C NMR του μεταβολίτη **16** με τα αντίστοιχα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **11** (δεϋδροαβιετικό οξύ).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε συσχέτιση NOE H-6α/H-5 και H-6β/H₃-20 και H-6β/H₃-19, προσδιορίζοντας τον προσανατολισμό των μεθυλενικών πρωτονίων του C-6.

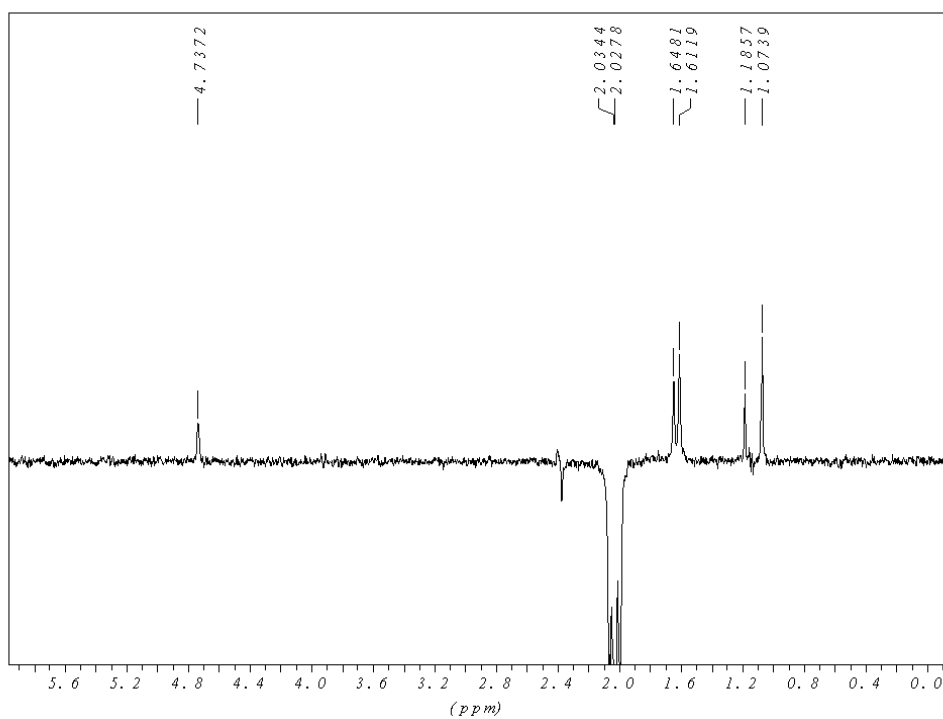
Διακρίθηκε επίσης μία ασθενής συζευξη NOE H-7/H₃-20, αποτελώντας ένδειξη ότι το H-7 είναι ισημερινό πρωτόνιο και άρα με προσανατολισμό επίσης πάνω από το επίπεδο όπως διακρίνεται στην Εικ. 102. Η σχετική στεreoχημεία, ωστόσο του οξυγονωμένου C-7 επιβεβαιώνεται από τους Miguel del Corral et al. 1994, οι οποίοι απέδωσαν πλήρως τις μετατοπίσεις των ανθράκων σε ένα πλήθος παραγώγων με σκελετό 8,11,13-αβιετατριενίου και όπως διαπιστώθηκε, ο προσανατολισμός του υποκαταστάτη του C-7 -σε αυτήν την περίπτωση, του υδροξυλίου- επηρεάζει τις μετατοπίσεις των γειτονικών ανθράκων και συγκεκριμένα, εάν έχει προσανατολισμό πάνω από το επίπεδο τότε παρατηρείται θωράκιση του C-5 περίπου κατά 1 ppm, ενώ στην αντίθετη περίπτωση, η θωράκιση που προκαλείται στον C-5 από την ύπαρξη 7α-υδροξυλίου φτάνει περίπου τα 4 ppm. Έτσι, επιβεβαιώνεται ο προσανατολισμός του υδροξυλίου της θέσης 7 ως α- εφόσον ο άνθρακας της θέσης 5 εμφανίζεται κατά 3.8 ppm πιο θωρακισμένος, συγκριτικά με τον ομόλογο άνθρακα του μη οξυγονωμένου παραγώγου (δεϋδροαβιετικό οξύ).



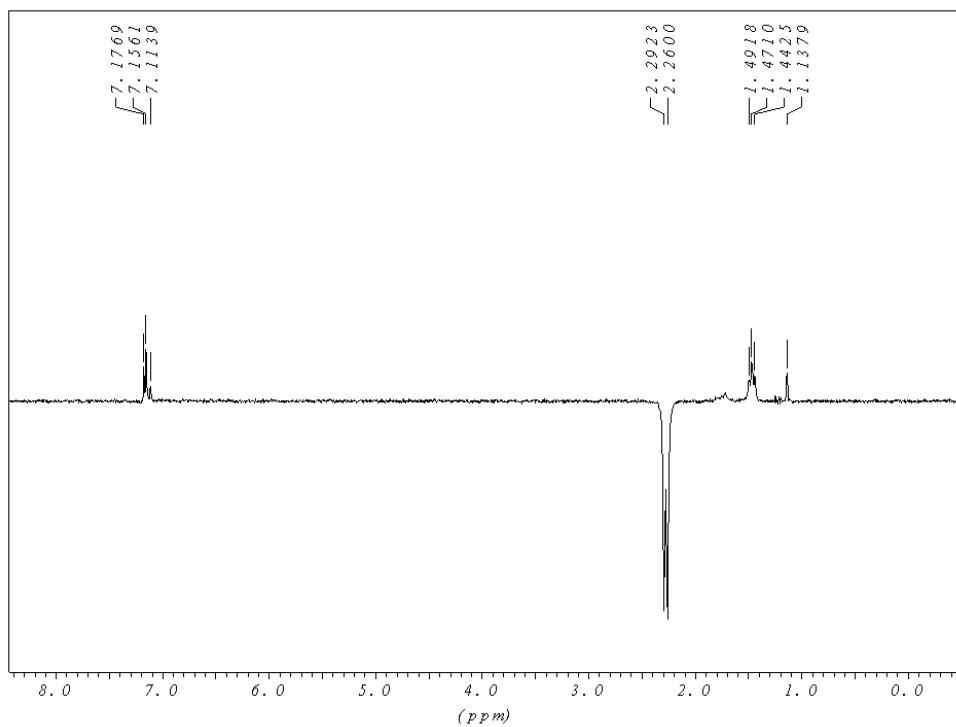
Εικόνα 102. Στεreoχημική διαμόρφωση δομής ελάχιστης ενέργειας και οι πιο σημαντικές συσχετίσεις NOE για τον μεταβολίτη **16**.



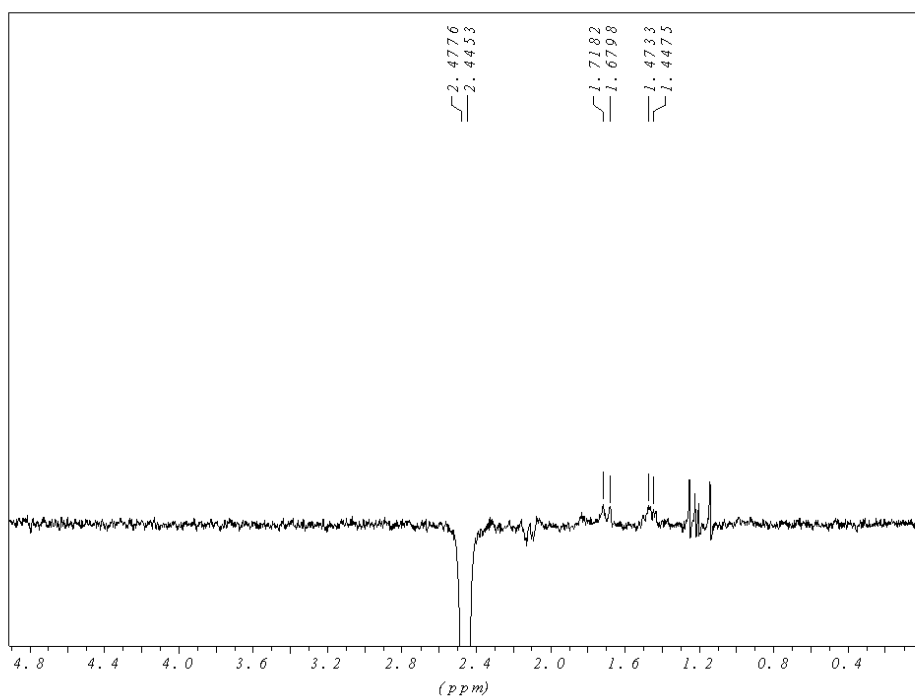
Εικόνα 103. Φάσμα 1D-NOE του μεταβολίτη **16**: στοχευμένη ακτινοβολή των H₃-20.



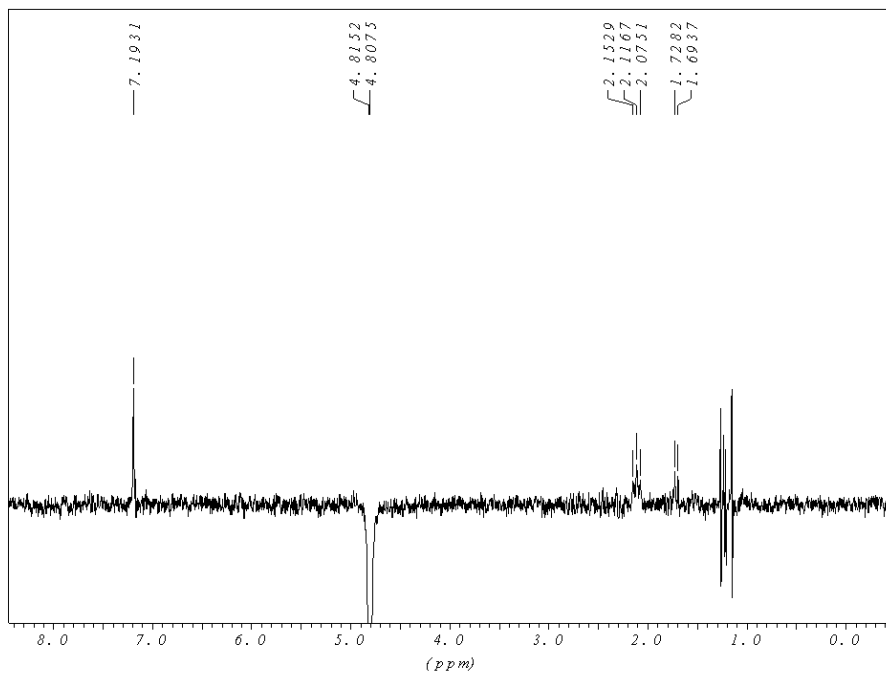
Εικόνα 104. Φάσμα 1D-NOE του μεταβολίτη **16**: στοχευμένη ακτινοβολή του H-6β.



Εικόνα 105. Φάσμα 1D-NOE του μεταβολίτη **16**: στοχευμένη ακτινοβολήση του H-1β.



Εικόνα 106. Φάσμα 1D-NOE του μεταβολίτη **16**: στοχευμένη ακτινοβολήση του H-5.



Εικόνα 107. Φάσμα 1D-NOE του μεταβολίτη **16**: στοχευμένη ακτινοβολήση του H-7.

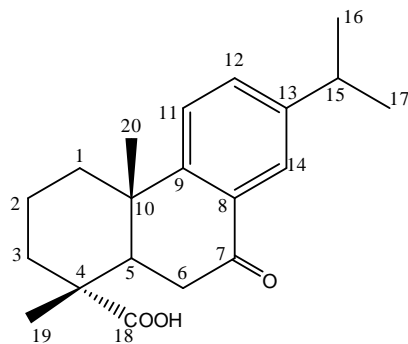
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 7α-υδρόξυ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (7α-υδρόξυ-δεϋδροαβιετικό οξύ) (Cheung et al. 1993), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 126, ενώ για πρώτη φορά γίνεται η πλήρης απόδοση των μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 126 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **16** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1 α	38.5	1.47 m
1 β		2.28 m
2	19.8	1.73 m
3	36.6	1.81 m
4	48.4	-
5	40.8	2.45 d (12.8)
6 α	31.4	1.71 d (14.5)
6 β		2.09 ddd (13.4, 13.4, 4.4)
7	69.2	4.80 d (3.2)
8	136.5	-
9	147.7	-
10	37.6	-
11	125.6	7.17 d (8.2)
12	127.2	7.12 dd (8.8, 1.5)
13	147.7	-
14	128.8	7.17 brs
15	34.7	2.84 septet (7.0)
16	24.9	1.21 d (7.0)
17	24.9	1.21 d (7.0)
18	182.9	-
19	17.5	1.25 s
20	25.4	1.14 s

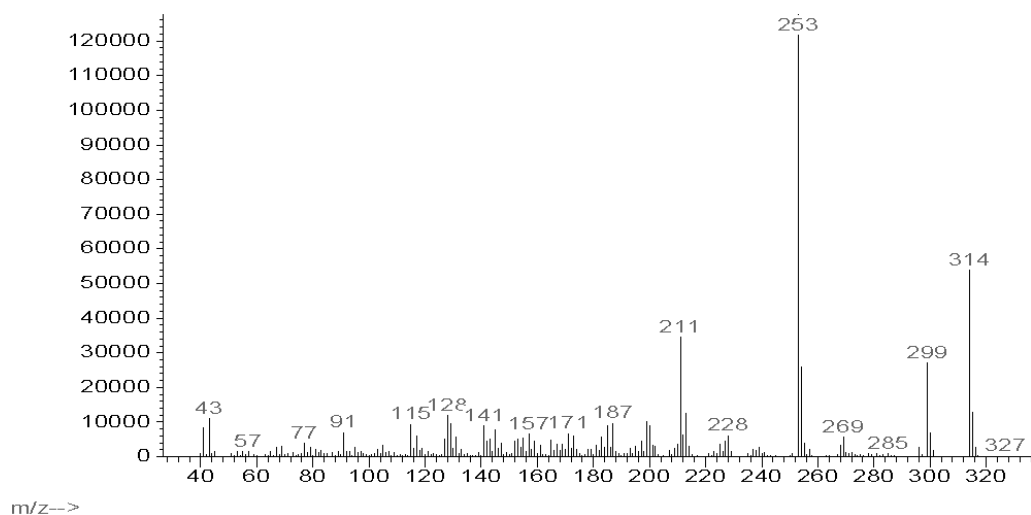
3.1.17. Μεταβολίτης 17: 7-Οξο-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (7-οξο-δεϋδροαβιετικό οξύ)

Ο μεταβολίτης **17** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 44.1 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **17** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₂₆O₃.



17

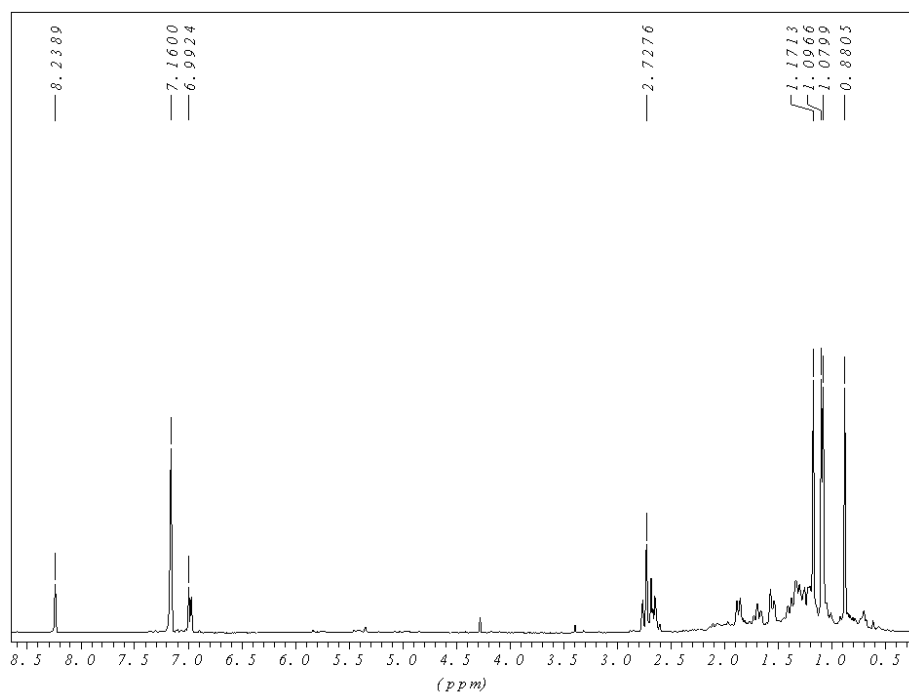
Το μοριακό ιόν στο φάσμα μάζας του μεταβολίτη **17** εμφανίστηκε σε m/z 314 (Εικ. 108).



Εικόνα 108. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **17**.

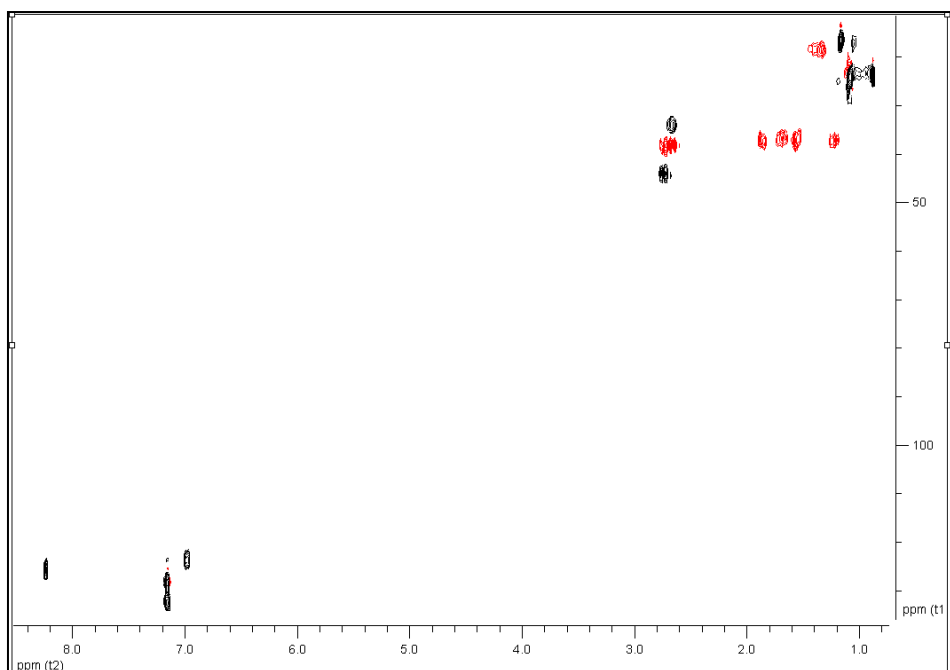
Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **17** (Εικ. 109) παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.17 και 0.88, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) δύο διπλές κορυφές σε δ 1.10 και 1.08, η οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τριτοταγές άτομο άνθρακα και (iii) μία διπλή σε δ 8.24 (2.0 Hz), μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 7.16 (η οποία επικαλύπτεται από την κορυφή του διαλύτη)

και μία διπλή σε δ 6.99 (8.0), που η κάθε μία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα αρωματικό πρωτόνιο.



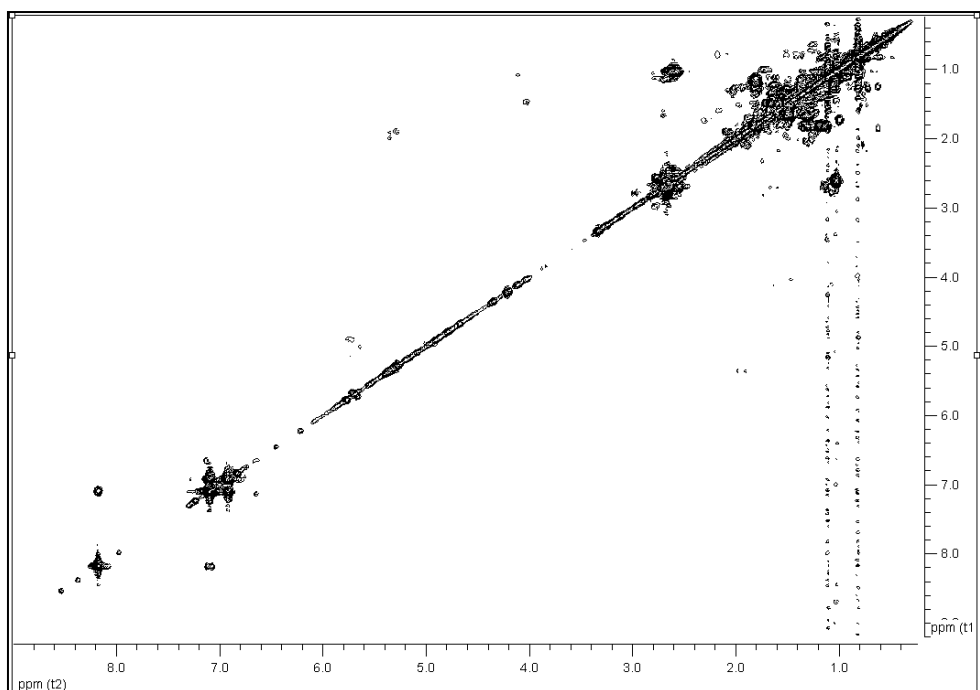
Εικόνα 109. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 17.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 110) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τεσσάρων μεθυλίων, τεσσάρων μεθυλενίων και πέντε μεθινίων, τρία εκ των οποίων αρωματικά. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

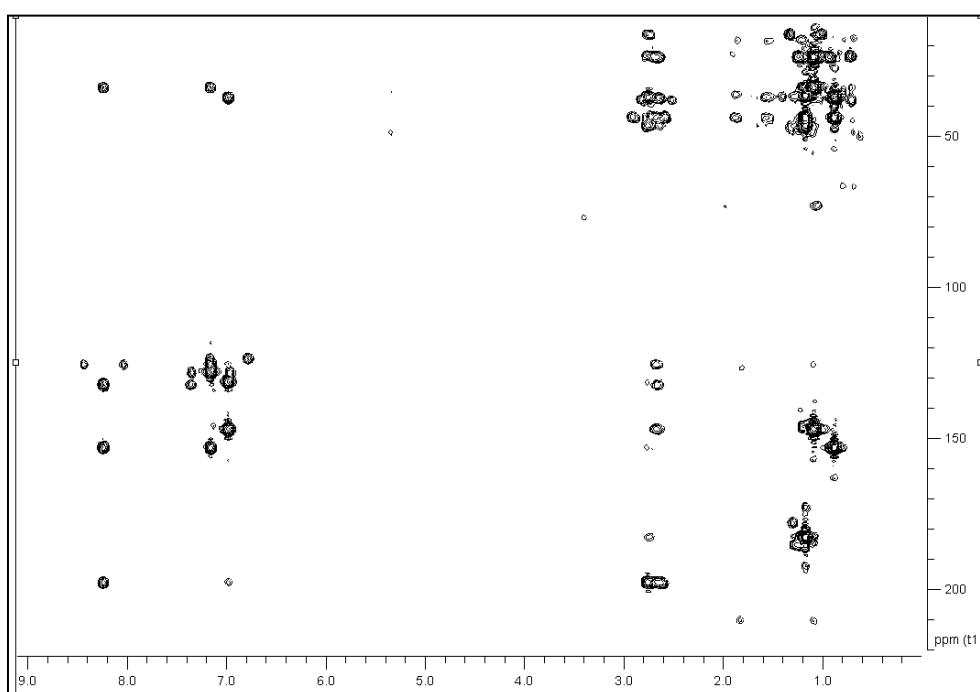


Εικόνα 110. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **17**

Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY (Εικ. 111) μεταξύ των μεθυλενικών πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/H₂-3 και των H-5/H₂-6 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, και των C-5, C-6. Παρατηρήθηκε επίσης ομοπυρηνική σύζευξη COSY μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων H-11/H-12 και των μεθυλικών πρωτονίων των C-16 και C-17 με το μεθινικό πρωτόνιο του C-15 (H₃-16/H-15 και H₃-17/H-15), επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη ομάδας ισοπροπυλίου, χαρακτηριστικής του αβιετανικού σκελετού. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC (Εικ. 112) προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο.



Εικόνα 111. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 17.



Εικόνα 112. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 17.

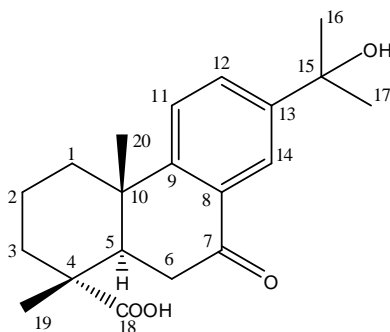
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 7-οξο-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (7-οξο-δεϋδροαβιετικό οξύ) (Ayer et al. 1987), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 127, ενώ για πρώτη φορά γίνεται η πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 127 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **17** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a		1.86 m
1b	37.1	1.22 m
2	18.3	1.34 m
3a		1.68 m
3b	36.9	1.55 m
4	45.9	-
5	43.6	2.73 m
6a		2.74 m
6b	38.0	2.66 m
7	197.8	-
8	131.3	-
9	152.8	-
10	37.3	-
11	123.7	6.99 d (8.0)
12	132.5	7.16 brs
13	146.7	-
14	125.7	8.24 d (2.0)
15	33.8	2.66 m
16	24.1	1.08 d (7.0)
17	24.1	1.10 d (7.0)
18	182.4	-
19	16.4	1.17 s
20	23.4	0.88 s

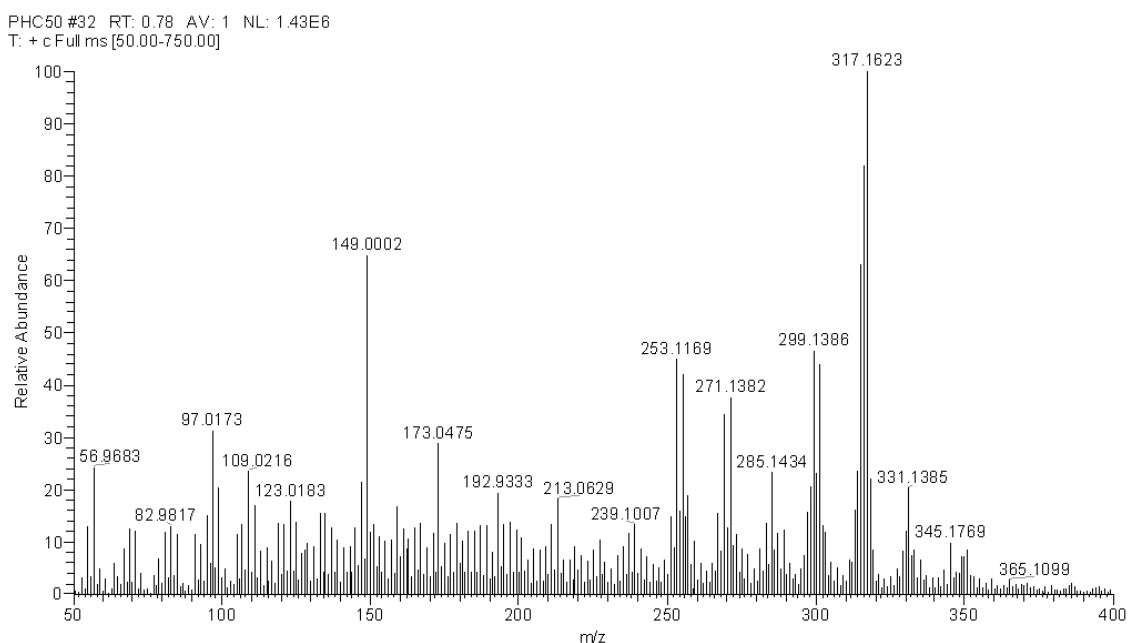
3.1.18. Μεταβολίτης 18: 7-Οξο-15-υδροξυ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (7-οξο-15-υδροξυ-δεϋδροαβιετικό οξύ)

Ο μεταβολίτης **18** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 4.5 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **18** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₂₆O₄.



18

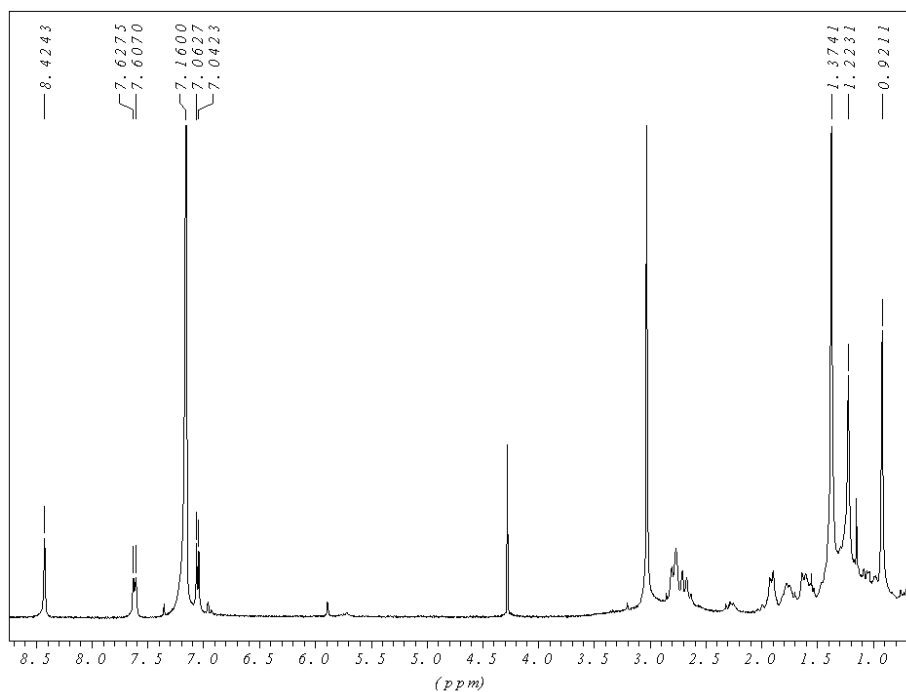
Στο φάσμα μάζας του μεταβολίτη **18** (Εικ. 113) εμφανίστηκε ψευδομοριακό ιόν [M+H]⁺ σε *m/z* 331.



Εικόνα 113. Φάσμα μάζας (PCIMS) του μεταβολίτη **18**

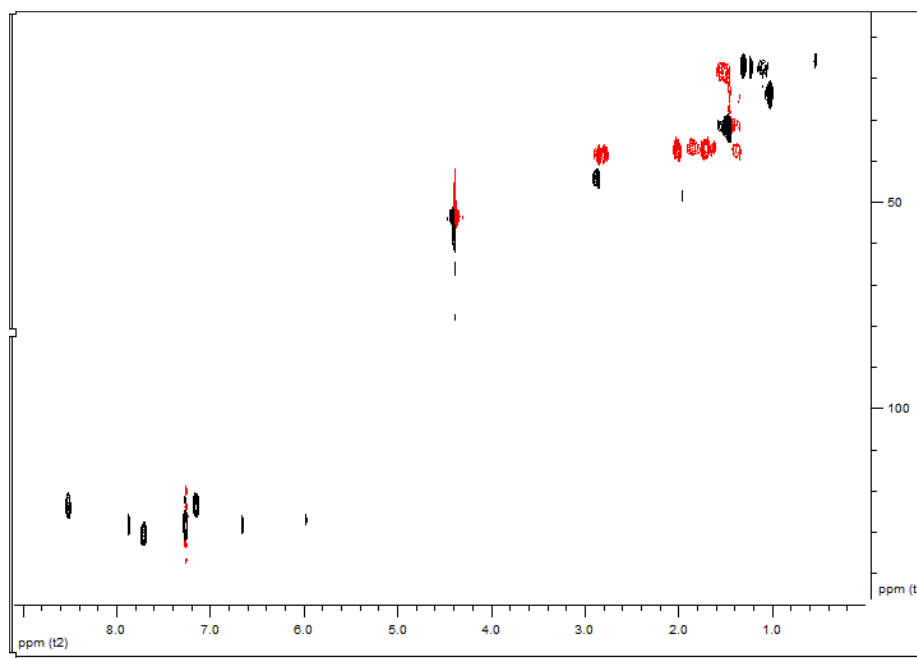
Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **18** (Εικ. 114) παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.22 και 0.92, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο μεθυλιών σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία απλή κορυφή σε δ 1.37, η οποία ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε δύο μεθύλια

σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα και (iii) μία ευρεία απλή σε δ 8.42, μία διπλή σε δ 7.61 και μία διπλή κορυφή σε δ 7.05, η κάθε μία εκ των οποίων ολοκλήρωσε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα αρωματικό πρωτόνιο.



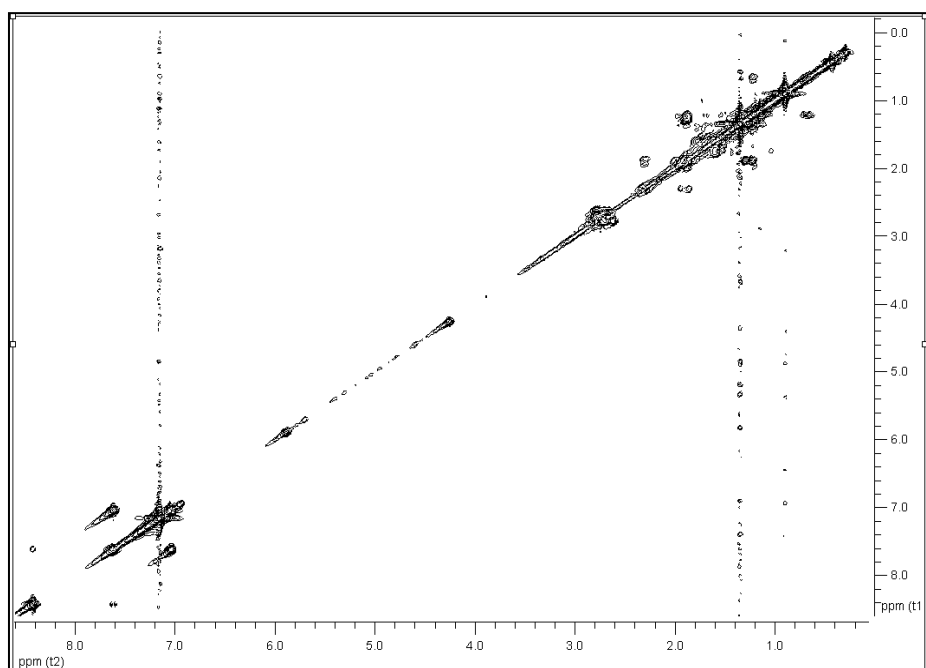
Εικόνα 114. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **20**

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 115) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τεσσάρων μεθυλίων, τεσσάρων μεθυλενίων και τεσσάρων μεθινίων, τρία εκ των οποίων αρωματικά. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

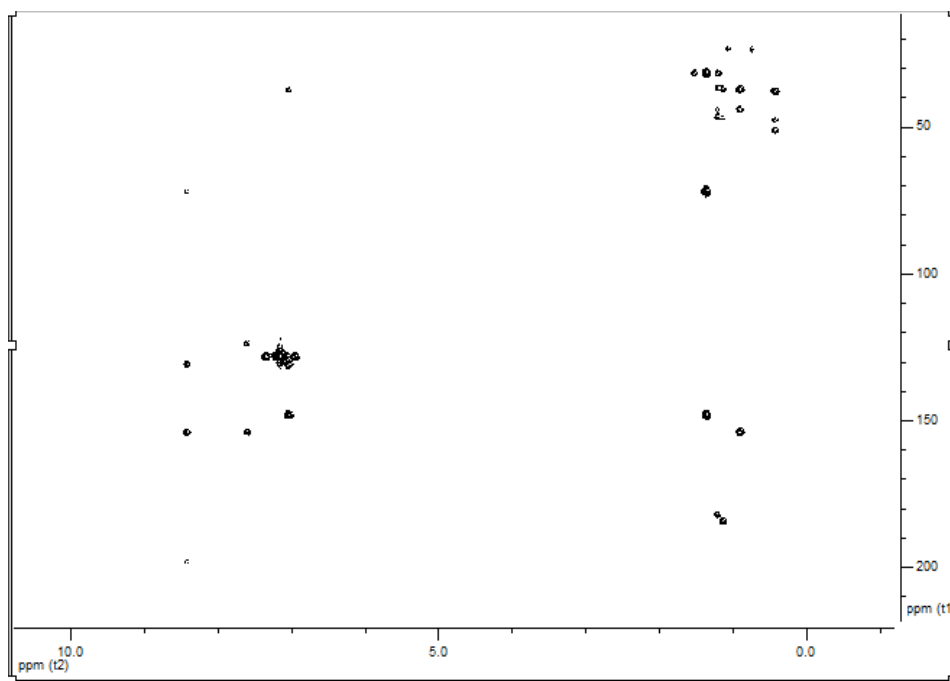


Εικόνα 115. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **18**.

Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY (Εικ. 116) μεταξύ των μεθυλενικών πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/H₂-3 και των H-5/H₂-6 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, και των C-5, C-6. Παρατηρήθηκε επίσης ομοπυρηνική σύζευξη COSY μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων H-11/H-12. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο (Εικ. 117).



Εικόνα 116. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **18**.



Εικόνα 117. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **18**.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα ήταν εμφανής η δομική ομοιότητα των μεταβολιτών **17** και **18**. Η διαφορά τους εντοπίστηκε στην ύπαρξη δύο απλών κορυφών σε δ 1.37 που αντιστοιχούσαν σε δύο μεθύλια, ενώ στην περίπτωση του μεταβολίτη **17** παρατηρήθηκαν δύο απλές κορυφές που αντιστοιχούσαν σε 2 μεθύλια σε δ 0.91 και 0.98.

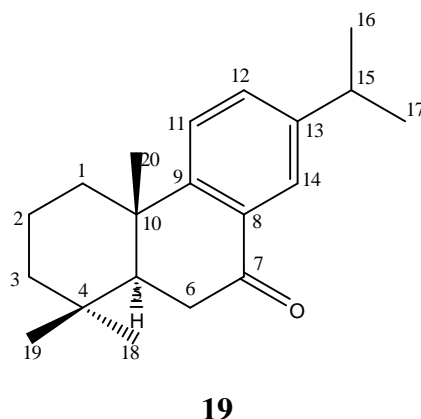
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 15-οξο-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (15-οξο-δεϋδροαβιετικό οξύ) (Ayer et al. 1987), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 128, ενώ για πρώτη φορά γίνεται η πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 128 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **18** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

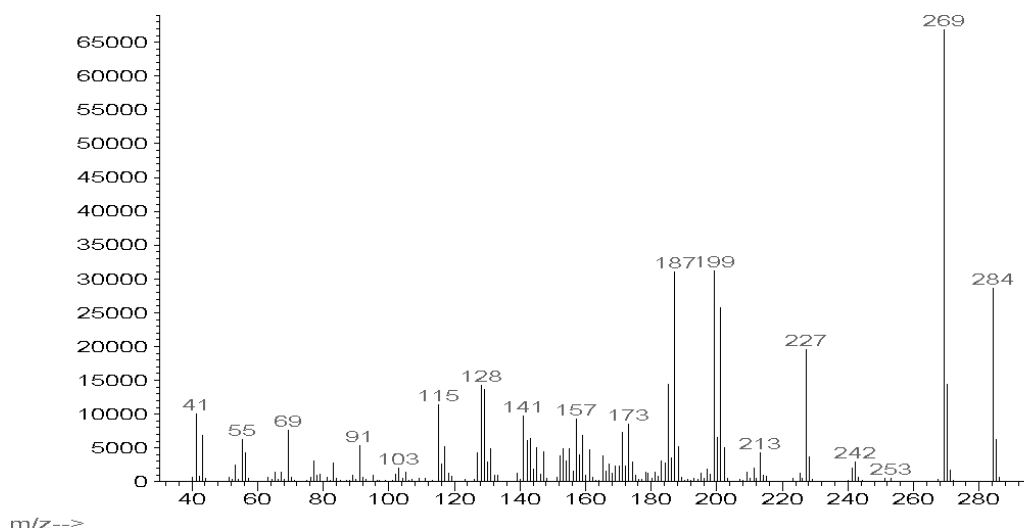
Θέση	δ_C	δ_H
1a		1.90 m
1b	37.2	1.27 m
2	18.4	1.41 m
3a		1.75 m
3b	36.8	1.61 m
4	46.3	-
5	44.0	2.78 m
6	38.1	2.71 m
7	198.3	-
8	130.2	-
9	153.7	-
10	36.9	-
11	123.2	7.05 d (8.1)
12	130.3	7.61 dd (8.1, 1.6)
13	148.1	-
14	123.5	8.42 brs
15	71.7	-
16	31.7	1.37 s
17	31.7	1.37 s
18	181.8	-
19	16.8	1.22 s
20	23.5	0.92 s

3.1.19. Μεταβολίτης 19: 7-Οξο-8,11,13-αβιετατριένιο (αβιετατριενόνη)

Ο μεταβολίτης **19** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 0.1 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **19** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₂₈O.



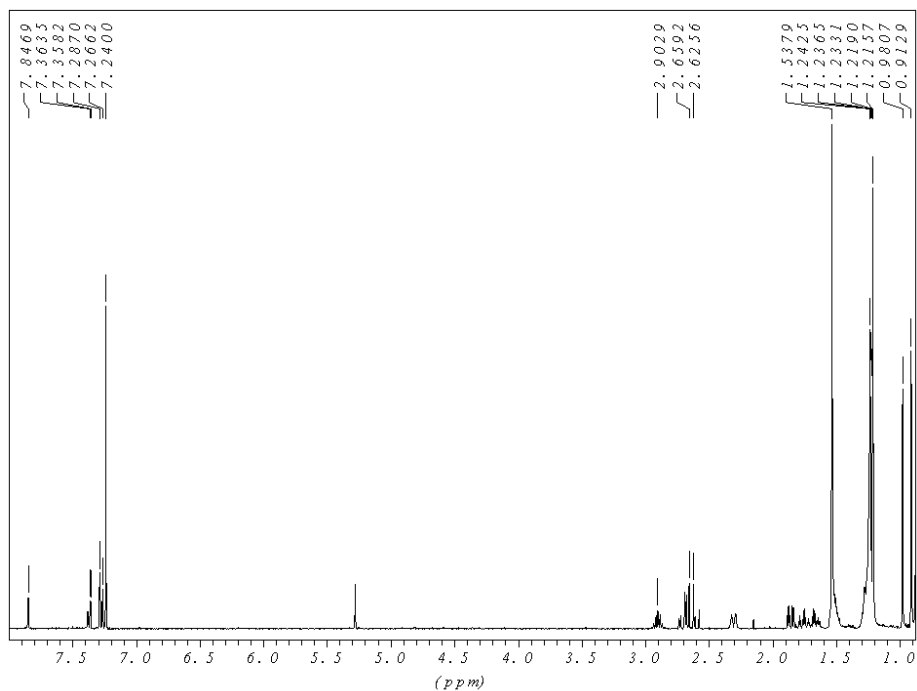
Το μοριακό ιόν [M]⁺ στο φάσμα μάζας (Εικ. 118) μεταβολίτη **19** εμφανίστηκε σε *m/z* 284.



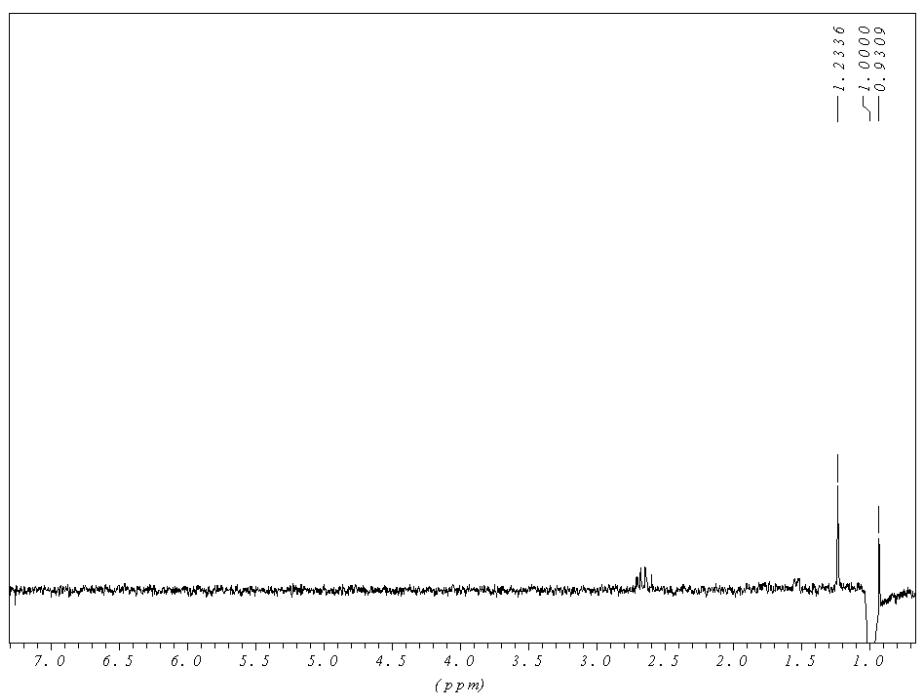
Εικόνα 118. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **19**.

Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **19** (Εικ. 119) παρατηρήθηκαν: (i) τρεις απλές κορυφές σε δ 1.22, 0.98 και 0.91, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια τριών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία διπλή κορυφή σε δ 1.23, η οποία ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τριτοταγές άτομο άνθρακα, και (iii) μία διπλή κορυφή σε δ 7.85 (2.2 Hz), μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 7.37 (8.1, 2.2 Hz) και μία διπλή κορυφή στα 7.27 ppm (8.3 Hz), η κάθε μία εκ των οποίων ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε ένα αρωματικό

πρωτόνιο.



Εικόνα 119. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **19**.



Εικόνα 120. Φάσμα 1D-NOE του μεταβολίτη **19**: στοχευμένη ακτινοβολήση του H_3 -19.

Κατόπιν λήψης φάσματος 1D-NOE (Εικ. 120), διαπιστώθηκε ότι το αξονικό μεθύλιο του C-4 (H_3 -19) συντονίζεται στα 0.98 ppm ενώ το ισημερινό στα 0.91 ppm (H_3 -18). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική έρευνα που ακολούθησε, αποδείχθηκε ότι ο μεταβολίτης **19**

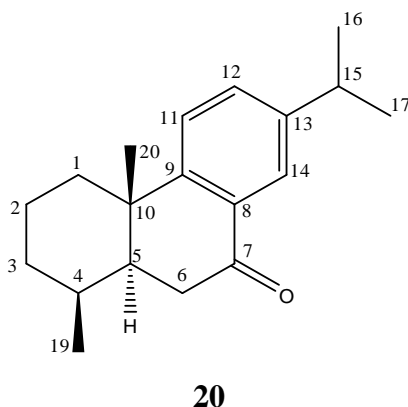
αντιστοιχούσε στο γνωστό 7-οξο-8,11,13-αβιετατριένιο (αβιετατριενόνη) (Conner et al. 1980). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **19** παρατίθενται στον Πίνακα 129.

Πίνακας 129 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **19** σε C_6D_6 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

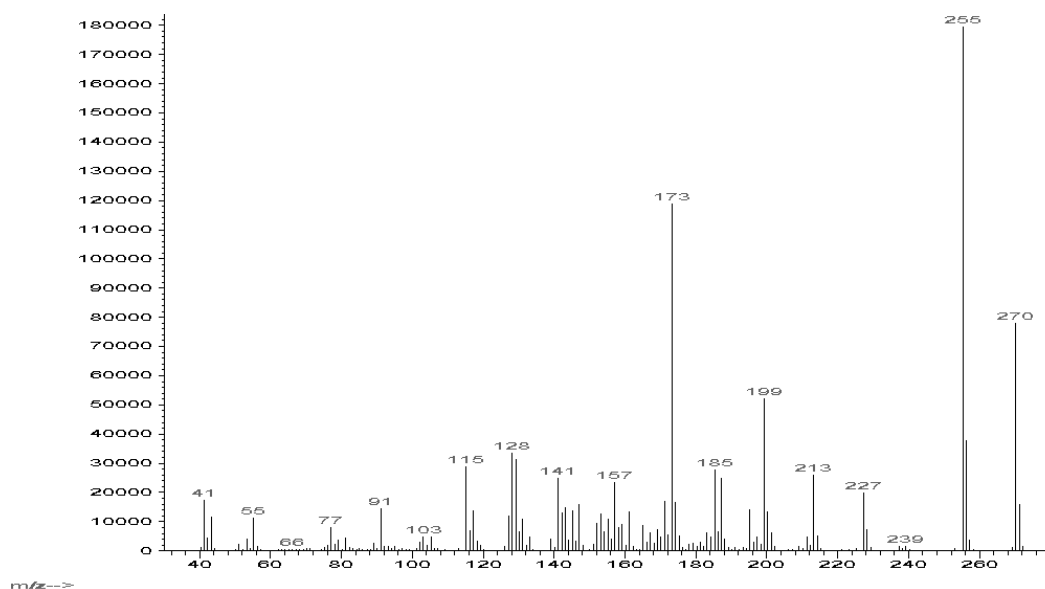
Θέση	δ_{H}
11	7.27 d (8.3)
12	7.37 dd (8.1, 2.2)
14	7.85 d (2.2)
15	2.90 septet (7.0)
16	1.23 d (7.0)
17	1.23 d (7.0)
18	0.91 s
19	0.98 s
20	1.22 s

3.1.20. Μεταβολίτης 20: 7-Οξο-18-νορ-8,11,13-αβιετατριένιο (18-νορ-αβιετατριενόνη)

Ο μεταβολίτης **20** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 0.1 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **20** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₉H₂₆O.



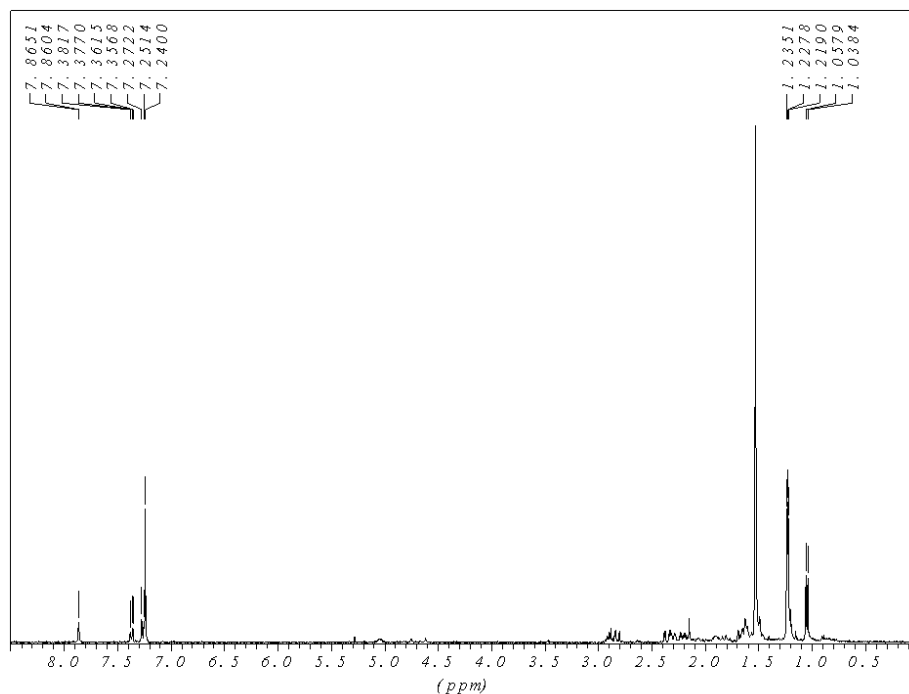
Το μοριακό ιόν στο φάσμα μάζας (Εικ. 121) του μεταβολίτη **20** εμφανίζεται σε m/z 270.



Εικόνα 121. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **20**.

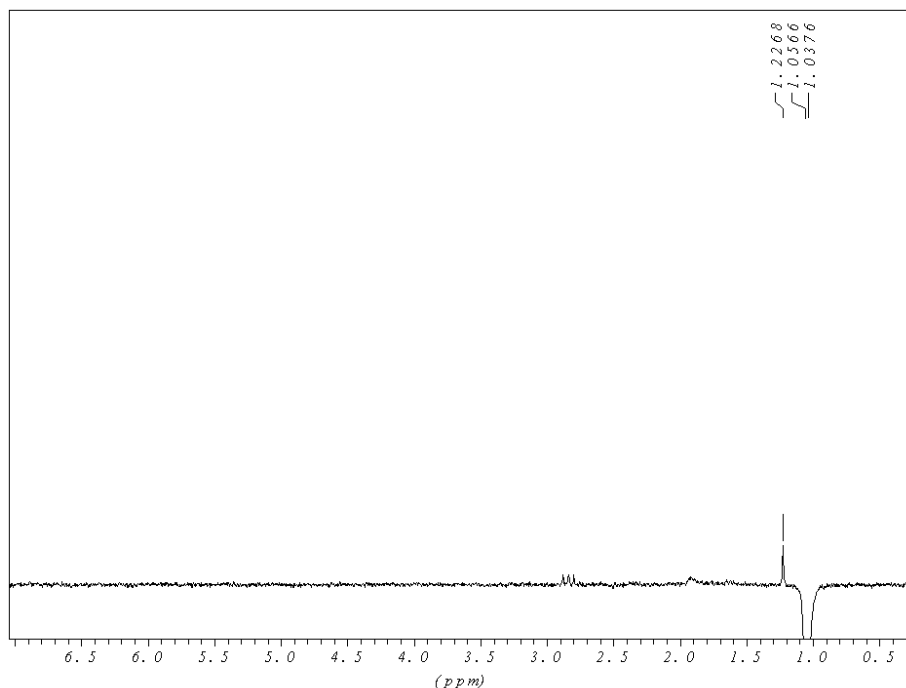
Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **20** (Εικ. 122) παρατηρήθηκαν: (i) μία διπλή κορυφή σε δ 1.04 (7.0 Hz), που ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε ένα μεθύλιο σε τριτοταγή άτομο άνθρακα, (ii) μία απλή κορυφή σε δ 1.23, που ολοκλήρωνε για τρία άτομα άνθρακα και αντιστοιχούσε σε ένα μεθύλιο σε τεταρτοταγή άτομο άνθρακα, (iii) μία διπλή κορυφή σε δ 1.23, η οποία ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αποδόθηκε στα

πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τεταρτοταγες άτομο άνθρακα και (iv) μία διπλή κορυφή σε δ 7.86 (2.1 Hz), μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 7.37 (8.1, 2.1 Hz) και μία διπλή κορυφή στα 7.26 ppm (8.1 Hz), η κάθε μία εκ των οποίων ολοκλήρωσε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε ένα αρωματικό πρωτόνιο.



Εικόνα 122. Φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **20**.

Για τον καθορισμό της σχετικής στερεοχημείας του ασύμμετρου κέντρου C-4 πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος 1D-NOE (Εικ. 123), όπου παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ του μεθυλίου του C-4 με το H₃-20, όπως φαίνεται στο παρακάτω φάσμα (Εικ. 123).



Εικόνα 123. Φάσμα 1D-NOE του μεταβολίτη **20**: στοχευμένη ακτινοβολήση των H₃-20

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα ήταν εμφανής η δομική ομοιότητα των μεταβολιτών **19** και **20**. Η διαφορά τους εντοπίστηκε στην ύπαρξη μίας διπλής κορυφής σε δ 1.04 (d, 7.0), που αντιστοιχεί σε ένα μεθύλιο.

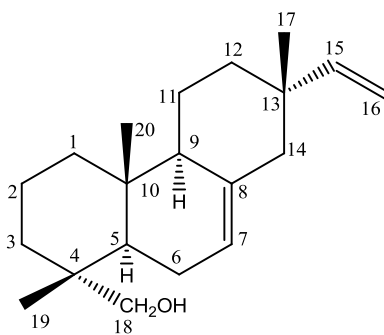
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική έρευνα που ακολούθησε, αποδείχθηκε ότι ο μεταβολίτης **18** αντιστοιχούσε στο γνωστό 7-οξο-18-νορ-8,11,13-αβιετατριένιο (18-νορ-αβιετατριενόνη) (Huffman, 1970). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR του μεταβολίτη **20** παρατίθενται στον Πίνακα 130.

Πίνακας 130 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **20** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ _H
11	7.26 d (8.1)
12	7.37 dd (8.1, 2.1)
14	7.86 d (2.1)
15	2.89 septet (7.0)
16	1.23 d (7.0)
17	1.23 d (7.0)
19	1.04 d (7.0)
20	1.23 s

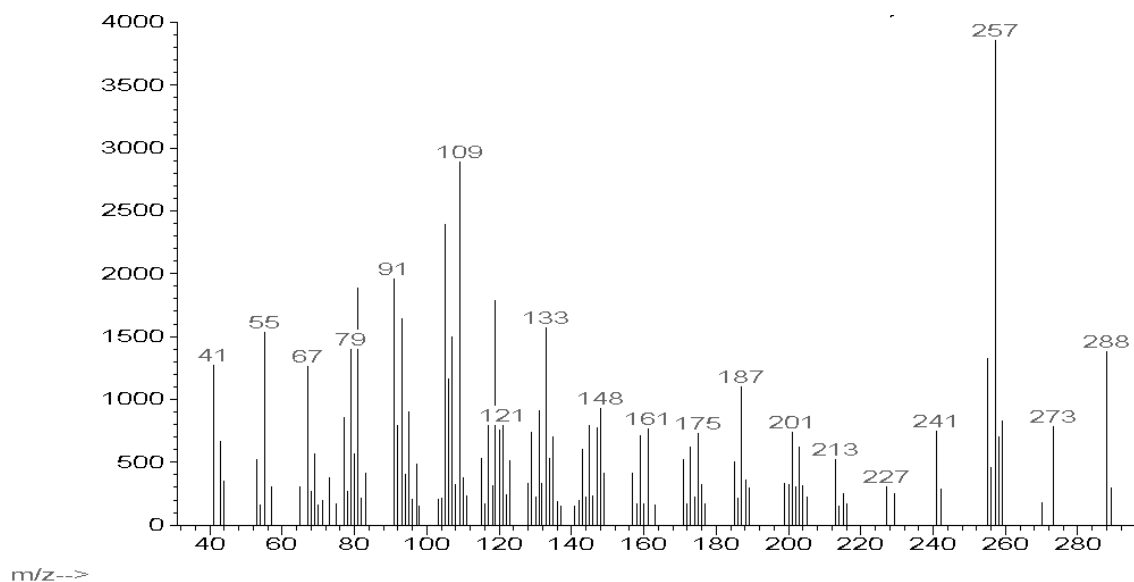
3.1.21. Μεταβολίτης 21: 7,15-Πιμαραδιεν-18-όλη (ισοπιμαρόλη)

Ο μεταβολίτης **21** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 1.2 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **21** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₃₂O.



21

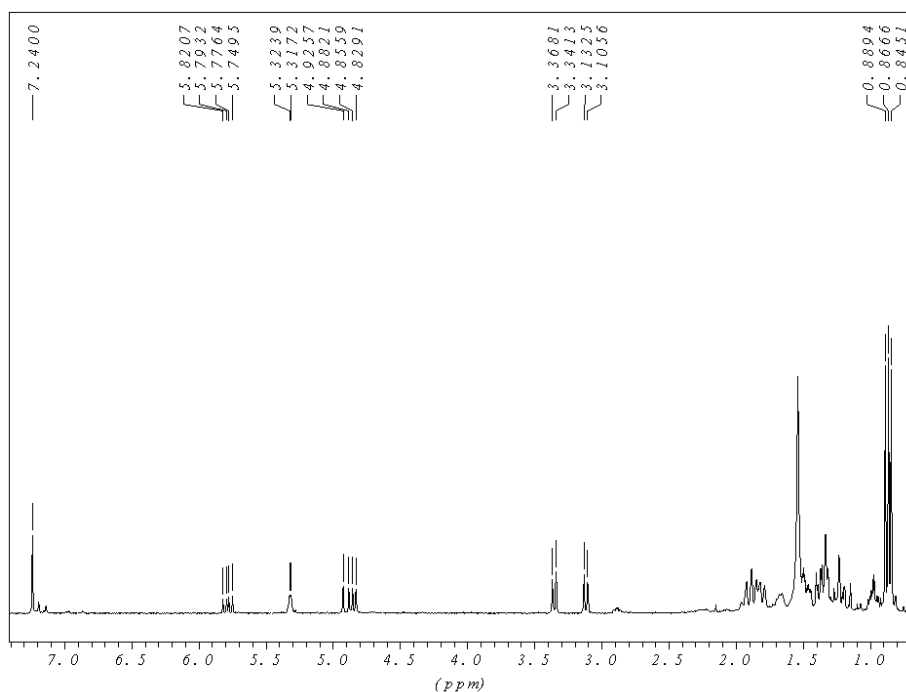
Συγκεκριμένα, το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **21** (Εικ. 124) εμφάνισε μοριακό ιόν [M]⁺ σε *m/z* 288 και θραύσμα [M-CH₂OH]⁺ σε *m/z* 257.



Εικόνα 124. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **21**.

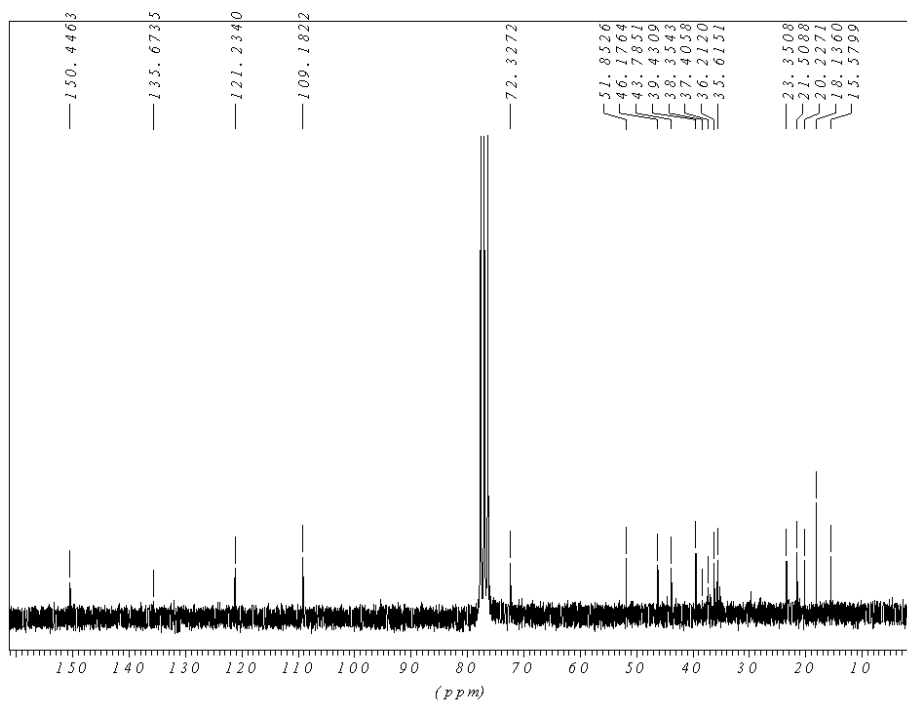
Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 125) του μεταβολίτη **21** εμφανίστηκαν (i) χαρακτηριστικά σήματα ενός ABX συστήματος πρωτονίων σε δ 5.79 (dd 17.7, 11.0 Hz), δ 4.90 (d 17.0 Hz) και δ 4.84 (d 10.7 Hz) (ii) μια ευρεία πολλαπλή κορυφή σε δ 5.32, που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο, (iii) δύο διπλές κορυφές στα 3.35 ppm (10.7 Hz) και 3.12 ppm (10.8 Hz), που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός υδροξυμεθυλενίου και (iv) τρεις απλές κορυφές σε δ 0.85,

0.87 και 0.89, που ολοκληρώναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν συνολικά σε τρία μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.



Εικόνα 125. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **21**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **21** (Εικ. 126) εμφανίσθηκαν είκοσι κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε τρία πρωτοταγή, εννέα δευτεροταγή, τέσσερα τριτοταγή και τέσσερα τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν τέσσερα ολεφινικά άτομα άνθρακα, ένα τεταρτοταγές σε δ 135.5, δύο τριτοταγή σε δ 121.2 και 150.4 και ένα δευτεροταγές σε δ 109.2, που υποδείκνυαν την ύπαρξη ενός τρισυποκατεστημένου ολεφινικού δεσμού και ενός ολεφινικού μεθυλενίου στο μόριο, ενώ παρατηρήθηκε επίσης και ένας οξυγονωμένος δευτεροταγής άνθρακας σε δ 72.3.



Εικόνα 126. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **21**.

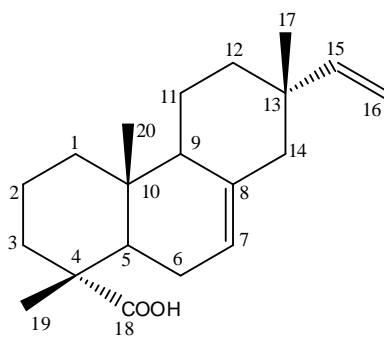
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη ισοπιμαρόλη (7,15-ισοπιμαραδιεν-18-όλη) (Garcia-Alvarez et al. 1979, Wenkert et al. 1972), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 131.

Πίνακας 131 Φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **21** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz)

Θέση	δ_C	
1	39.4	nd
2	18.1	nd
3	35.6	nd
4	37.4	nd
5	43.8	nd
6	23.3	nd
7	121.2	nd
8	135.5	nd
9	51.8	nd
10	35.2	nd
11	20.2	nd
12	36.2	nd
13	36.8	nd
14	46.2	nd
15	150.4	5.79 dd (17.7, 11.0)
16a	109.2	4.90 d (17.0)
16b		4.84 d (10.7)
17	21.5	0.89 s
18a	72.3	3.36 d (10.7)
18b		3.12 d (10.7)
19	18.1	0.87 s
20	15.6	0.85 s

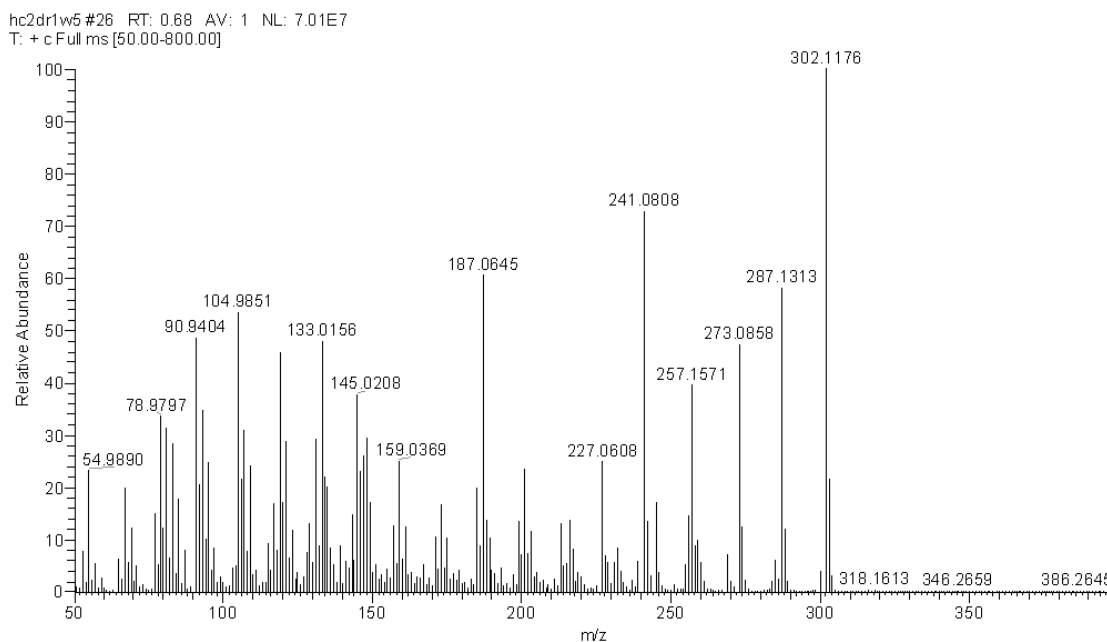
3.1.22. Μεταβολίτης 22: 13-επι-Πιμαρα-7,15-διεν-18-οϊκό οξύ (ισοπιμαρικό οξύ)

Ο μεταβολίτης **22** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 42.8 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **22** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₃₀O₂.



22

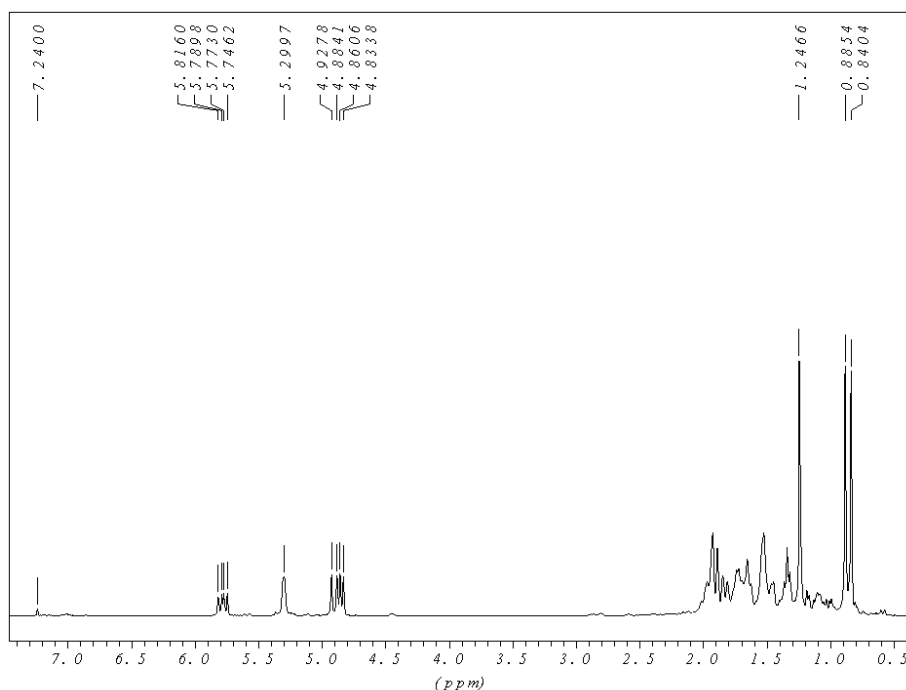
Το μοριακό ιόν στο φάσμα μάζας (Εικ. 127) εμφανίστηκε σε m/z 302, ενώ παρατηρήθηκε το θραύσμα σε m/z 287 που προκύπτει κατόπιν απόσπασης ενός μεθυλίου και το θραύσμα σε m/z 257 κατόπιν απόσπασης μίας ομάδας καρβοξυλίου.



Εικόνα 127. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **22**.

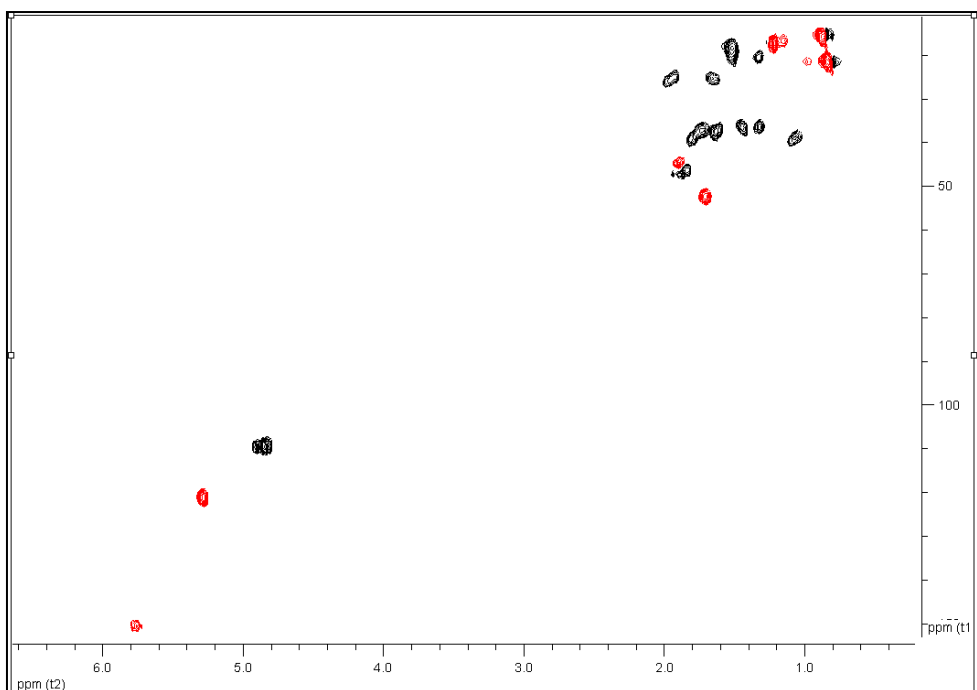
Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 128) του μεταβολίτη **22** εμφανίστηκαν (i) χαρακτηριστικά σήματα ενός ABX συστήματος πρωτονίων σε δ 5.77 (dd 17.2, 10.8 Hz), δ 4.89 (d 17.5 Hz)

και δ 4.83 (d 10.8 Hz), (ii) μια ευρεία πολλαπλή κορυφή σε δ 5.30, που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο και (iii) τρεις απλές κορυφές σε δ 0.84, 0.88 και 1.25, οι οποίες ολοκληρώναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν συνολικά σε τρία μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.



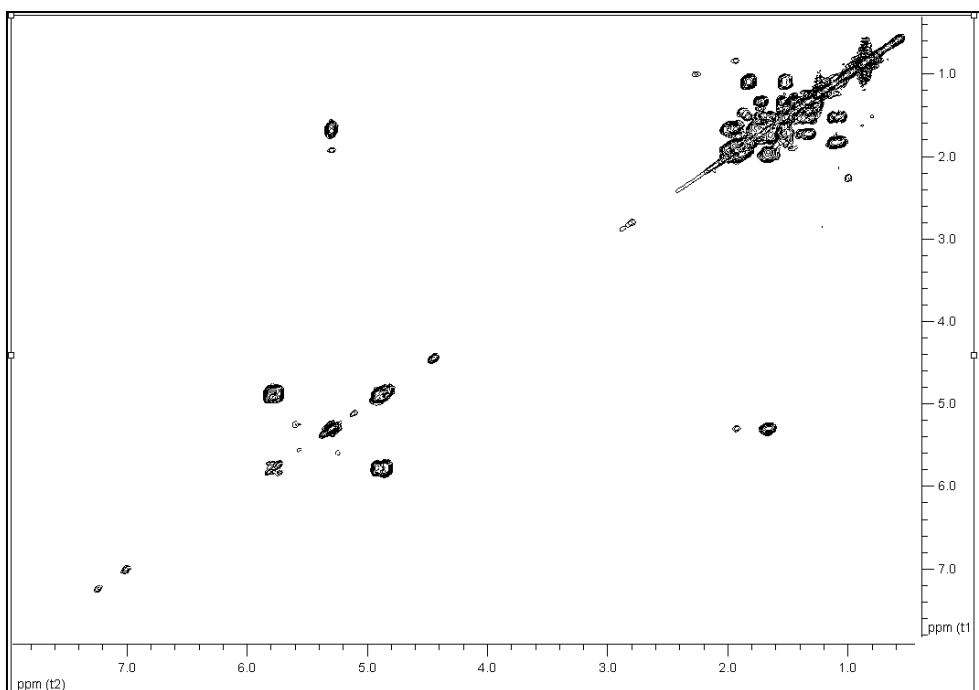
Εικόνα 128. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **22**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 129) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τριών μεθυλίων, επτά μεθυλενίων και τριών μεθινίων, ένα εκ των οποίων ολεφινικό. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

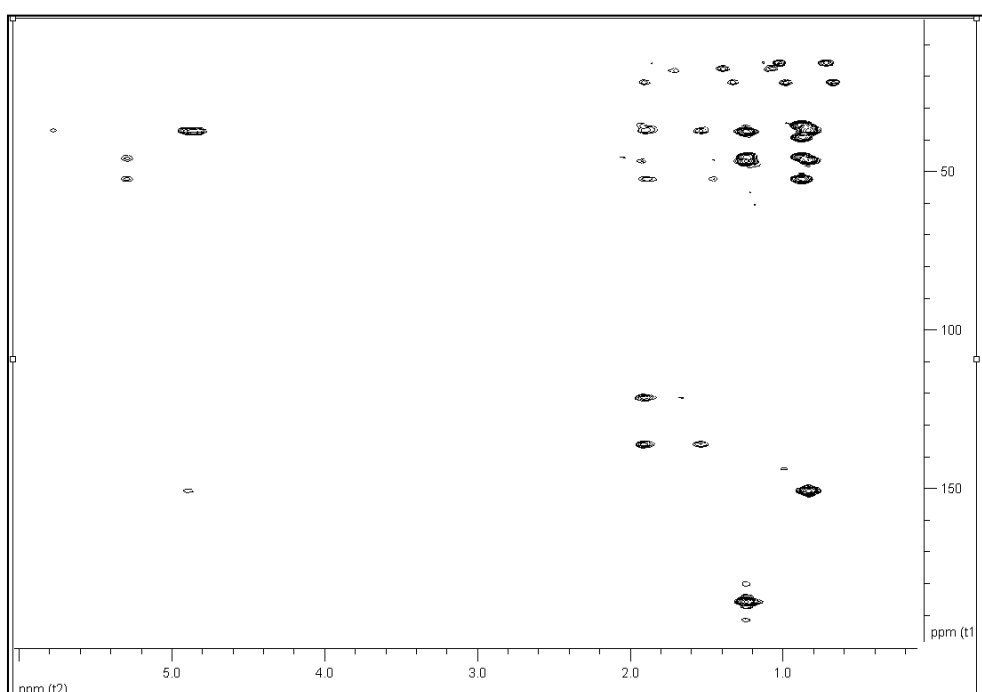


Εικόνα 129. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **22**.

Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY (Εικ. 130) μεταξύ των μεθυλενικών πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/H₂-3 όπως και των H-5/H₂-6, H₂-6/H-7 καθώς και των H-9/H₂-11 και H₂-11/H₂-12 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6 και C-7 και των C-9, C-11 και C-12 αντίστοιχα. Επίσης, οι συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των H₃-15/H-16 επιβεβαίωσαν την αλληλουχία 15, 16 και την παρουσία ολεφινικού μεθυλενίου. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC (Εικ. 131) προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη σκελετού πιμαρανίου.



Εικόνα 130. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 22.



Εικόνα 131. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 22.

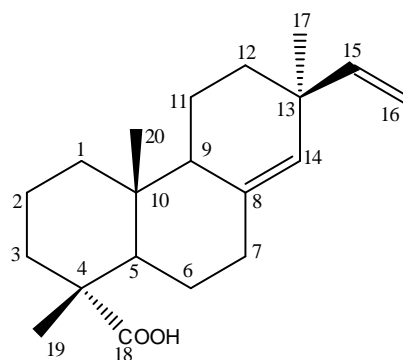
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη ισοπιμαρικό οξύ (Wenkert et al. 1972), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 132, ενώ για πρώτη φορά γίνεται πλήρης απόδοση των μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 132 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **22** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a		1.80 m
1b	39.3	1.06 m
2	18.3	1.52 m
3a		1.74 m
3b	37.1	1.61 m
4	46.7	-
5	45.4	1.89 m
6	25.4	1.95 m
7	121.2	5.30 brs
8	137.6	-
9	52.3	1.71 m
10	35.4	1.70 m
11	20.2	1.32 m
12a		a 1.44 m
12b	36.4	b 1.32 m
13	37.3	-
14	47.1	1.93 m
15	150.6	5.77 dd (17.2, 10.8)
16a		a 4.89 d (17.5)
16b	109.5	b 4.83 d (10.8)
17	21.5	0.84 s
18	185.9	-
19	17.0	1.25 s
20	15.7	0.88 s

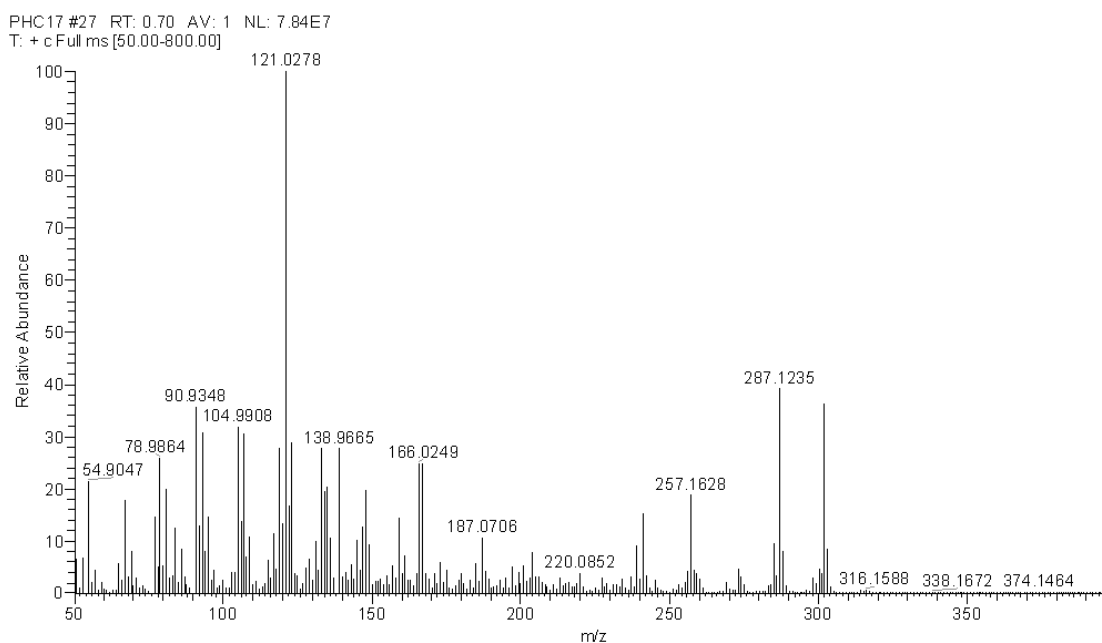
3.1.23. Μεταβολίτης 23: Πιμαρικό οξύ

Ο μεταβολίτης **23** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 13.2 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **23** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₃₀O₂.



23

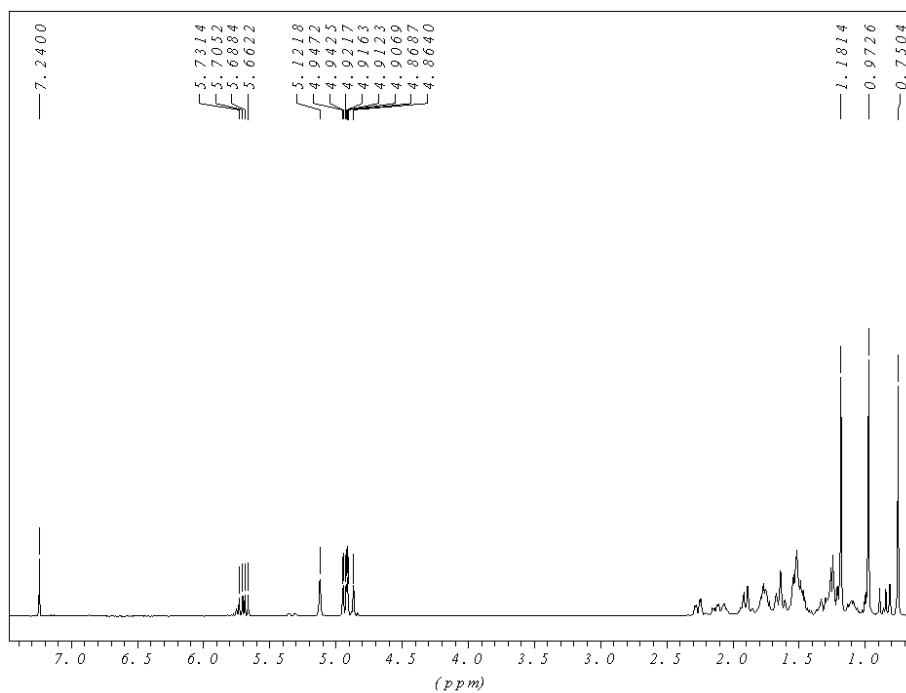
Συγκεκριμένα, το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **23** (Εικ. 132) εμφάνισε μοριακό ιόν [M]⁺ σε *m/z* 302 και θραύσματα [M-CH₃]⁺ και [M-COOH]⁺ σε *m/z* 287 και 257, αντίστοιχα.



Εικόνα 132. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **23**.

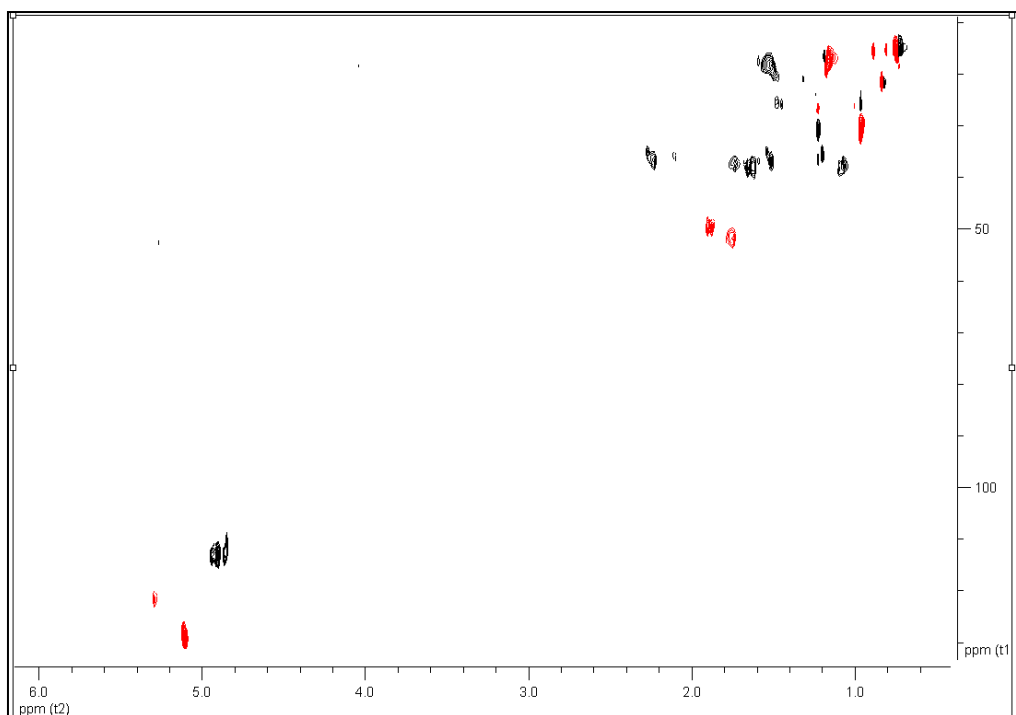
Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 133) του μεταβολίτη **23** εμφανίστηκαν χαρακτηριστικά σήματα (i) ενός ABX συστήματος πρωτονίων σε δ 5.70 (dd 17.5, 10.2 Hz), δ 4.92 (dd 17.5, 2.0 Hz) και δ 4.87 (dd 10.8, 2.0 Hz) (ii) μια ευρεία απλή κορυφή σε δ 5.12, που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο και (iii) τρεις απλές κορυφές σε

δ 1.18, 0.97 και 0.75, που ολοκληρώναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν συνολικά σε τρία μεθύλια.



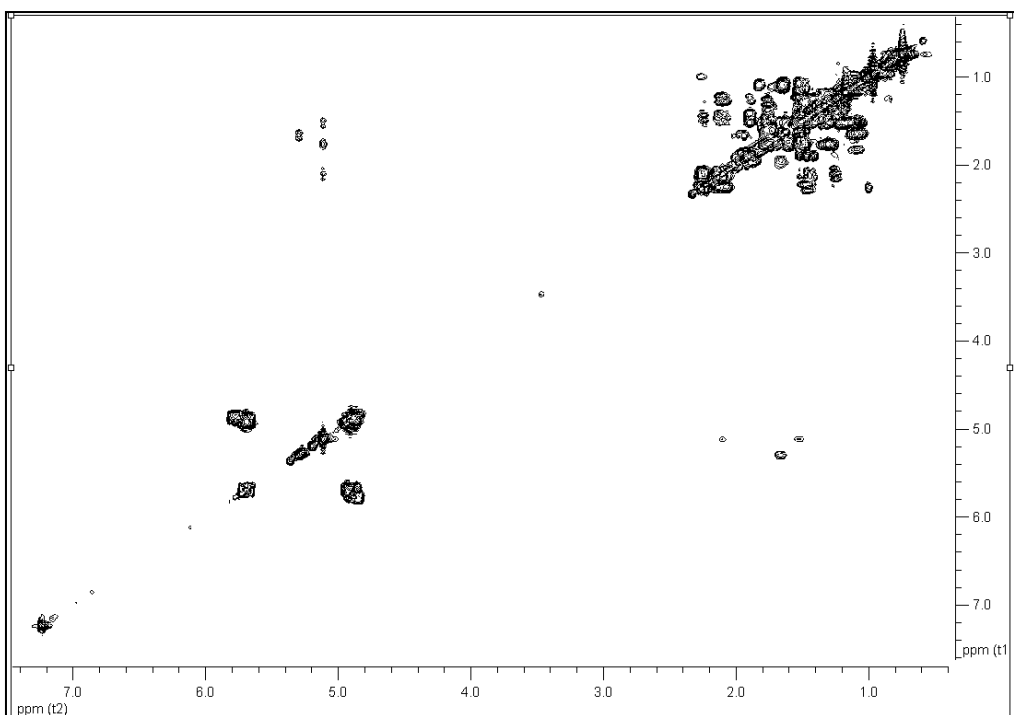
Εικόνα 133. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **23**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 134) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τριών μεθυλίων, επτά μεθυλενίων και τριών μεθινίων, ένα εκ των οποίων ολεφινικό. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

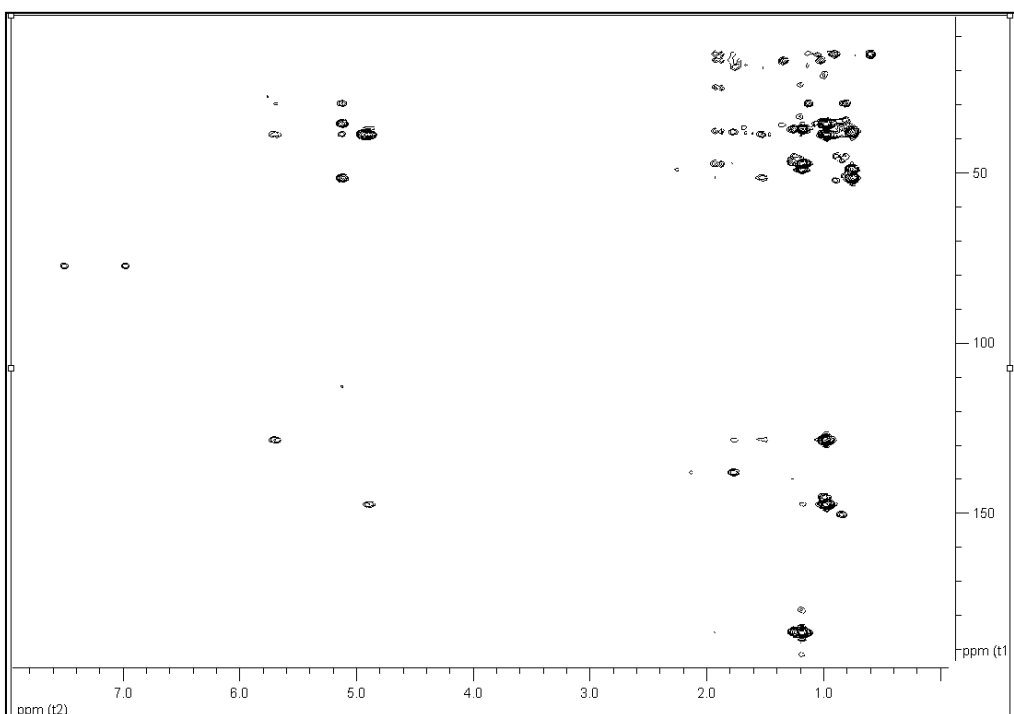


Εικόνα 134. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **23**.

Ομοίως με τον μεταβολίτη **22**, οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY (Εικ. 135) μεταξύ των μεθυλενικών πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/H₂-3 όπως και των H-5/H₂-6, H₂-6/H₂-7 καθώς και των H-9/H₂-11 και H₂-11/H₂-12 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6 και C-7 και των C-9, C-11 και C-12 αντίστοιχα. Επίσης, οι συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των H₃-15/H-16 επιβεβαίωσαν την αλληλουχία των C-15, C-16 και την παρουσία ολεφινικού μεθυλενίου. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC (Εικ. 136) προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη σκελετού πιμαρανίου.



Εικόνα 135. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **23**.



Εικόνα 136. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **23**.

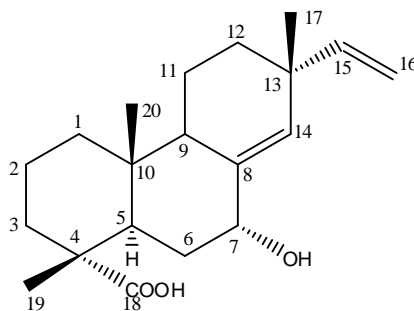
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη πιμαρικό οξύ (Dang et al. 2005), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 133, ενώ για πρώτη φορά γίνεται πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 133 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **23** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a	38.0	1.64 m
1b		1.07 m
2	18.3	1.51 m
3	36.9	1.73 m
4	47.3	-
5	49.1	1.89 m
6	25.4	1.46 m
7a	36.0	2.11 m
7b		1.21 m
8	nd	-
9	51.5	1.76 m
10	nd	-
11	20.5	1.32
12a	36.7	2.24 m
12b		1.51 m
13	38.8	-
14	128.3	5.11 s
15	147.4	5.70 dd (17.5, 10.2)
16a	113.1	4.92 dd (17.5, 2.0)
16b		4.87 dd (10.2, 2.0)
17	29.9	0.97 s
18	185.7	-
19	17.0	1.18 s
20	15.6	0.75 s

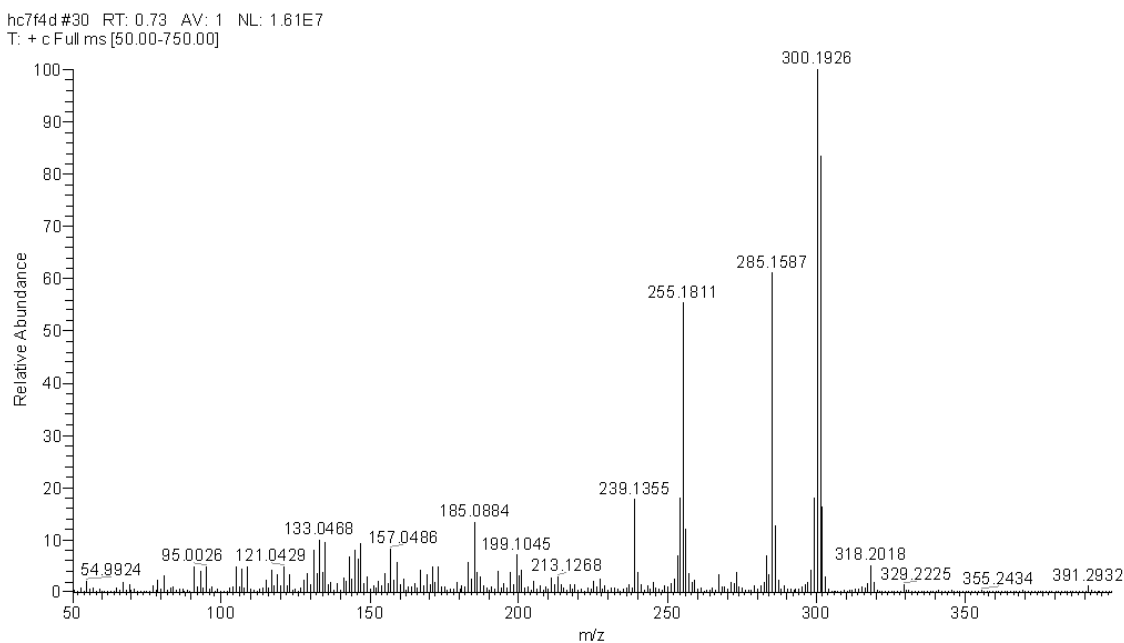
3.1.24. Μεταβολίτης 24: 7α-Υδροξυ-13-επι-πιμαρα-8(14),15-διεν-18-οϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **24** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα ($[\alpha]_D^{20} = -43.8$ c 0.52, CHCl₃), συνολικής μάζας 5.2 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **24** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₃₀O₃.



24

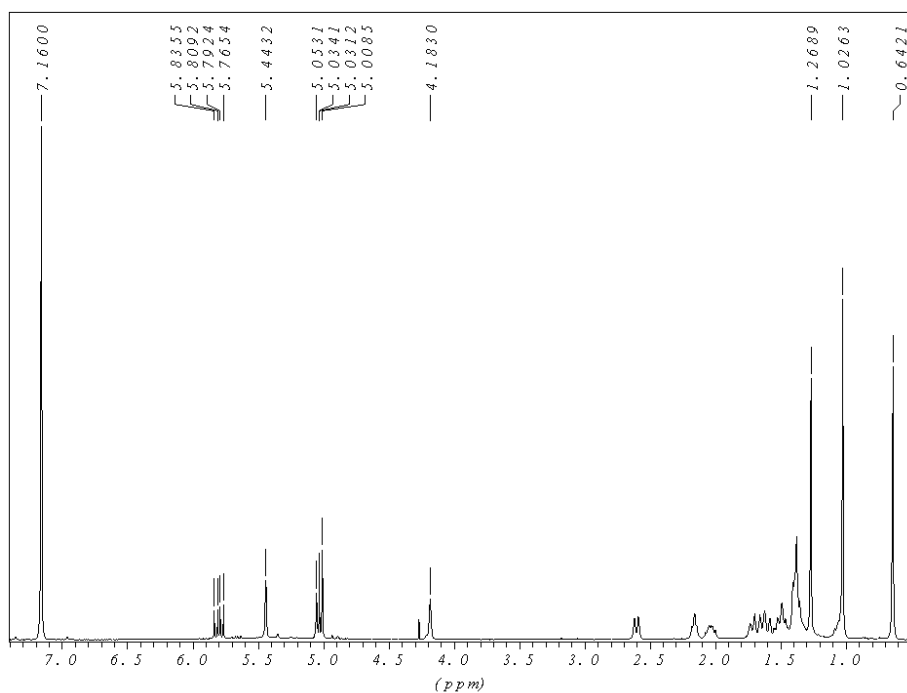
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **24** (Εικ. 137) εμφάνισε μοριακό ιόν [M]⁺ σε m/z 318 και θραύσμα [M-H₂O]⁺ σε m/z 300.



Εικόνα 137. Φάσμα μάζας (PCIMS) του μεταβολίτη **24**.

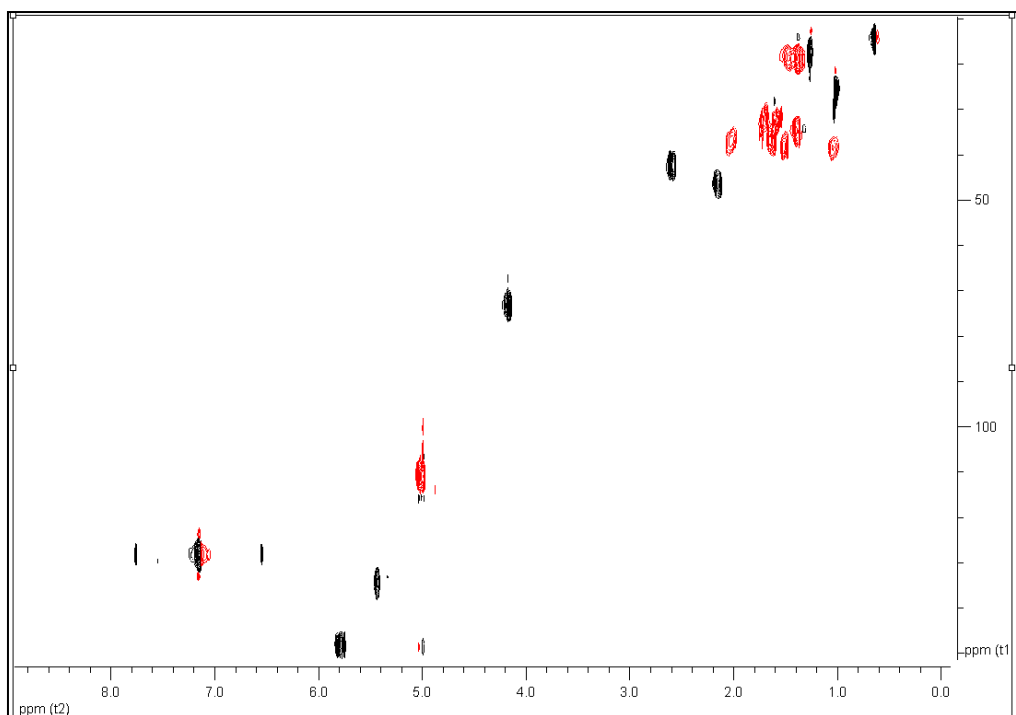
Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 138) του μεταβολίτη **24** εμφανίστηκαν (i) χαρακτηριστικά σήματα ενός ABX συστήματος πρωτονίων σε δ 5.80 (dd 17.4, 10.7 Hz), δ 5.04 (d 17.9 Hz) και δ 5.02 (d 10.3 Hz), (ii) μια ευρεία απλή κορυφή στα 4.18 ppm, που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο, στην περιοχή των οξυγονωμένων πρωτονίων και αντιστοιχούσε σε ένα μεθινικό πρωτόνιο, (iii) μία απλή κορυφή στα 5.44 ppm, που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και

αντιστοιχούσε σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο και (iv) τρεις απλές κορυφές δ 1.27, 1.02 και 0.64, που ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν συνολικά σε τρία μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.



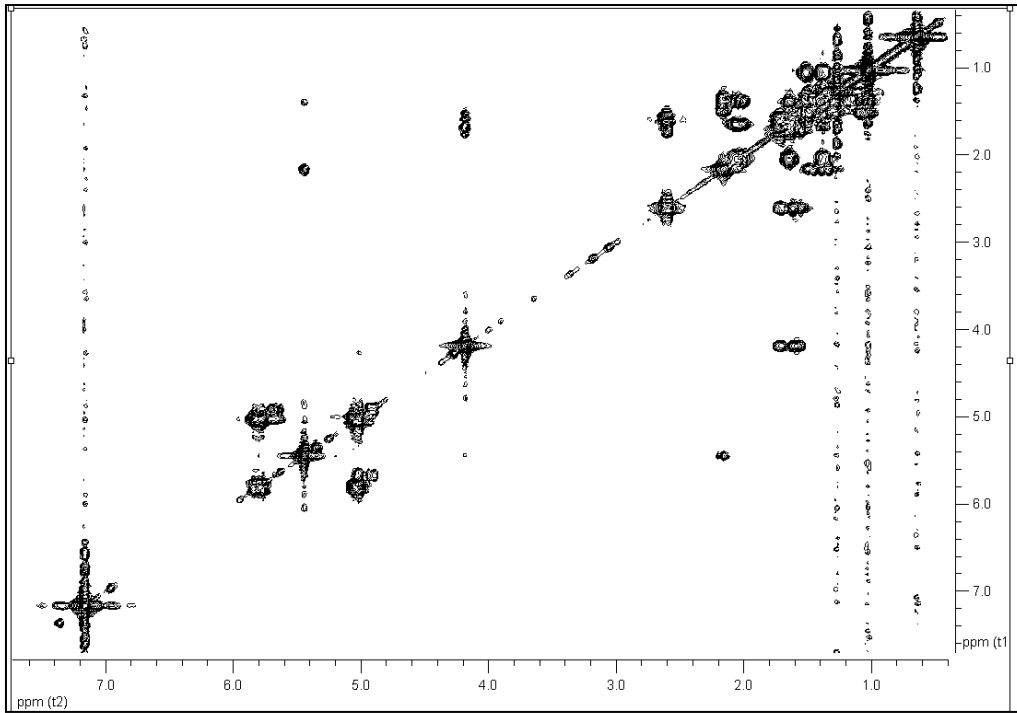
Εικόνα 138. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **24**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 139) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τριών μεθυλίων, έξι μεθυλενίων και πέντε μεθινίων, δύο εκ των οποίων ολεφινικά, καθώς και ένα οξυγονωμένο. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

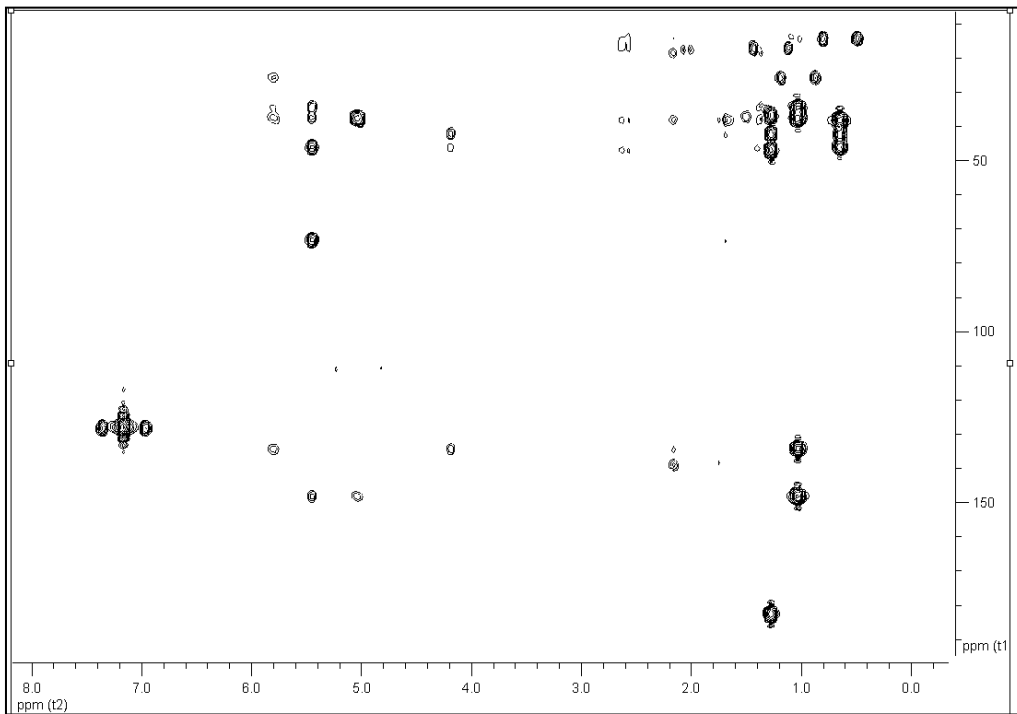


Εικόνα 139. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **24**.

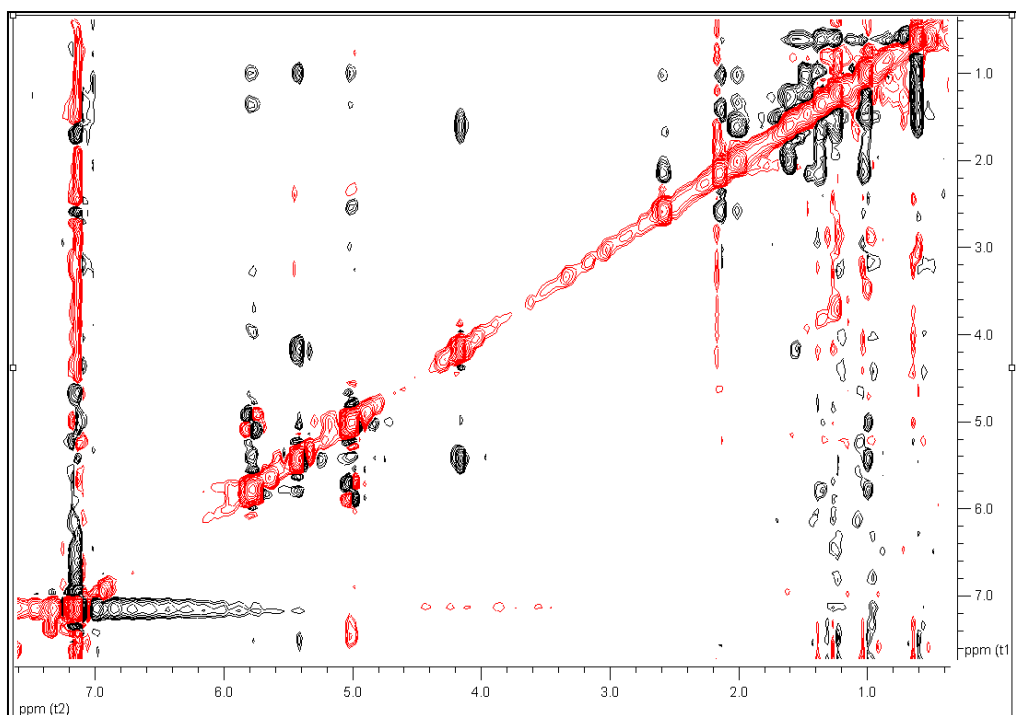
Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY (Εικ. 140) μεταξύ των μεθυλενικών πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/H₂-3 όπως και των H-5/H₂-6, H₂-6/H-7 καθώς και των H-9/H₂-11 και H₂-11/H₂-12 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6 και C-7 και των C-9, C-11 και C-12 αντίστοιχα. Επίσης, οι συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των H₃-15/H-16 επιβεβαίωσαν την αλληλουχία των C-15, C-16 και την παρουσία ολεφινικού μεθυλενίου. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC (Εικ. 141) προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη σκελετού πιμαρανίου.



Εικόνα 140. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 24.

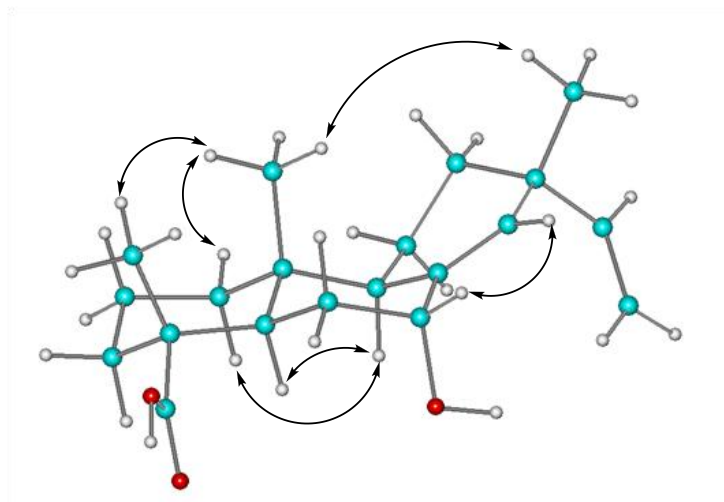


Εικόνα 141. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 24.



Εικόνα 142. Φάσμα NOESY του μεταβολίτη **24**.

Με βάση τα δεδομένα από το φάσμα NOESY (Εικ. 142) καθορίστηκε η σχετική στερεοχημεία των C-4, C-5, C-7, C-9, C-10 και C-13. Συγκεκριμένα παρατηρείται συσχέτιση NOE H₃-20/H₃-19, ενώ παράλληλα το μεθύλιο H₃-20 δεν έχει σύζευξη με το H-5, άρα η συμπύκνωση (fusion) των δακτυλίων A και B είναι *trans*. Επιπλέον, το H₃-20 έχει σύζευξη με το H-1β πρωτόνιο, ενώ το H-1α πρωτόνιο έχει σύζευξη με το H-9 (H-1α/H-9). Έτσι εάν το H₃-20 μεθύλιο έχει θέση αξονική, τότε το H-9 θα έχει επίσης θέση αξονική και προσανατολισμό κάτω από το επίπεδο. Επίσης, η σχετική στερεοχημεία του ασύμμετρου κέντρου C-7 προσδιορίστηκε λόγω της ύπαρξης συσχέτισης NOE με το ολεφινικό πρωτόνιο της H-14. Εάν το H-7 είχε θέση αξονική, τότε δεν θα είχε σύζευξη με το H-14, άρα το υδροξύλιο του C-7 είναι αξονικό. Επίσης θα είχε παρατηρηθεί συσχέτιση NOE μεταξύ των H-7/H-5 ή H-7/H-9, συζεύξεις, οι οποίες δεν παρατηρήθηκαν. Τέλος, η σχετική στερεοχημεία του ασύμμετρου κέντρου C-13 προσδιορίστηκε λόγω της ύπαρξης συσχέτισης NOE του H₃-20 με το H₃-17, άρα το μεθύλιο H₃-17 είναι επίσης αξονικό με προσανατολισμό πάνω από το επίπεδο (Εικ. 143). Επιπρόσθετο στοιχείο που επιβεβαιώνει τον αξονικό προσανατολισμό του H₃-17 είναι η χημική μετατόπιση του C-17, στα 25.7 ppm, και όχι σε χαμηλότερα πεδία όπως θα αναμενόταν στην περίπτωση ισημερινού μεθυλίου στην ίδια θέση (Beier 1978).



Εικόνα 143. Στερεοχημική διαμόρφωση δομής ελάχιστης ενέργειας και οι πιο σημαντικές συσχετίσεις NOE για τον μεταβολίτη **24**.

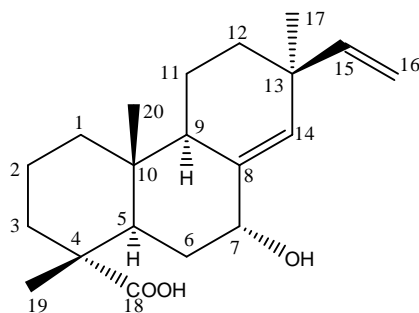
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 7α-υδροξυ-13-επι-πιμαρα-8(14),15-διεν-18-οϊκό οξύ (Esquivel et al. 1987), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 134, ενώ για πρώτη φορά γίνεται πλήρης απόδοση των φασματοσκοπικών του δεδομένων.

Πίνακας 134 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **24** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1 α	38.2	1.03 m
1 β		1.51 m
2	18.2	1.38 m
3 α	37.0	2.03 m
3 β		1.63 m
4	47.0	-
5	42.6	2.60 brd (12.0)
6 α	32.2	1.70 m
6 β		1.59 m
7 β	73.3	4.18 brs
8	nd	-
9	46.2	2.15 m
10	nd	-
11 α	18.3	1.47 m
11 β		1.38 m
12	34.8	1.38 m
13	37.4	-
14	134.4	5.44 s
15	148.3	5.80 dd (17.4, 10.7)
16 α	111.1	5.04 d (17.8)
16 β		5.02 d (10.7)
17	25.7	1.02 s
18	182.2	-
19	17.3	1.27 s
20	14.4	0.64 s

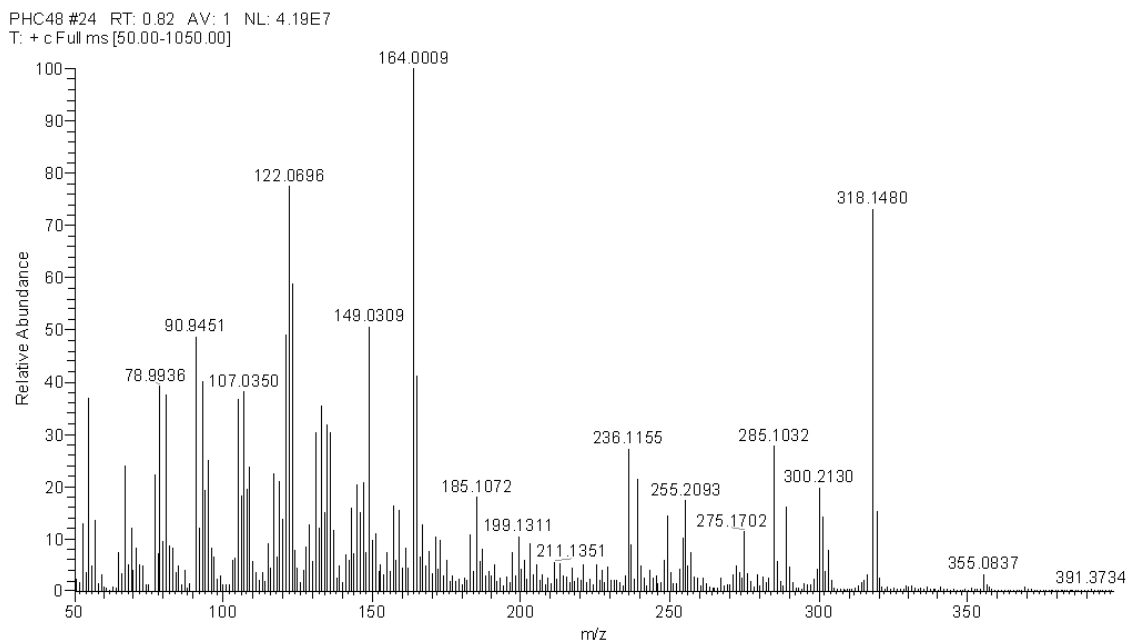
3.1.25. Μεταβολίτης 25: 7α-Υδροξυ-πιμαρα-8(14),15-διεν-18-οϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **25** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα ($[\alpha]_D^{20} = +10.0$ c 0.22, CHCl₃), συνολικής μάζας 2.2 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **25** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₃₀O₃.



25

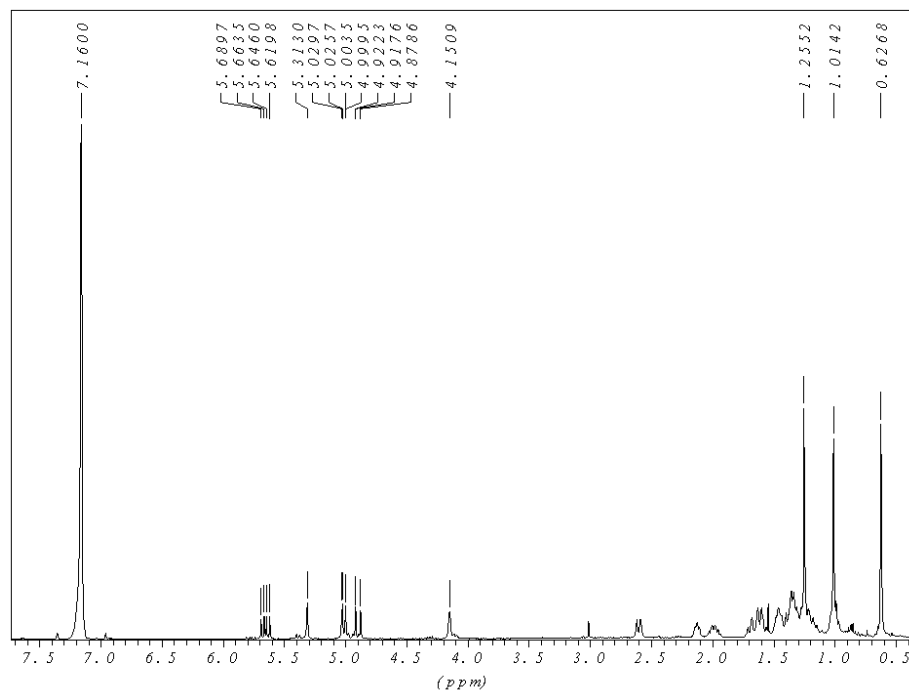
Το μοριακό ιόν στο φάσμα μάζας (Εικ. 144) εμφανίστηκε σε m/z 318, ενώ παρατηρήθηκε το θραύσμα σε m/z 300 που προκύπτει κατόπιν απόσπασης ενός μορίου H₂O.



Εικόνα 144. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **25**.

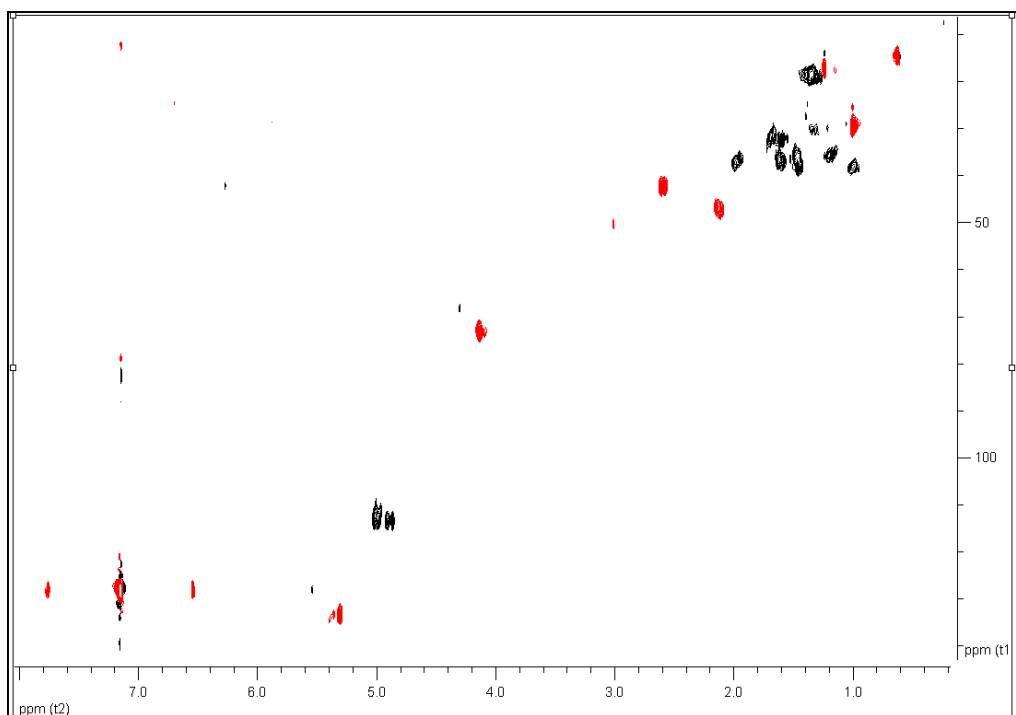
Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **25** εμφανίστηκαν (i) χαρακτηριστικά σήματα ενός ABX συστήματος πρωτονίων σε δ 5.64 (dd 17.5, 10.5 Hz), δ 5.00 (dd 10.5, 1.6 Hz) και δ 4.90 (dd 17.5, 1.6 Hz), (ii) μια ευρεία απλή κορυφή, σε δ 4.15 στην περιοχή των οξυγονωμένων πρωτονίων, που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα μεθινικό πρωτόνιο,

(iii) μία απλή κορυφή σε δ 5.31, που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο και (iv) τρεις απλές κορυφές σε δ 1.25, 1.01 και 0.63, που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν συνολικά σε τρία μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.



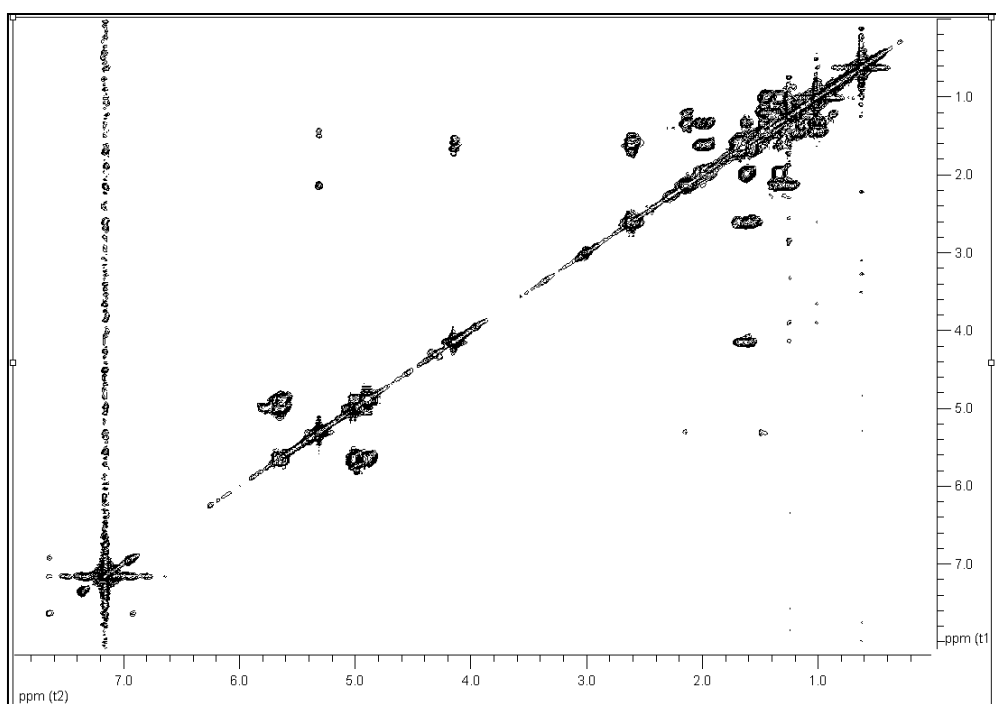
Εικόνα 145. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **25**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 146) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τριών μεθυλίων, έξι μεθυλενίων και πέντε μεθινίων, δύο εκ των οποίων ολεφινικά, καθώς και ένα οξυγονωμένο. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

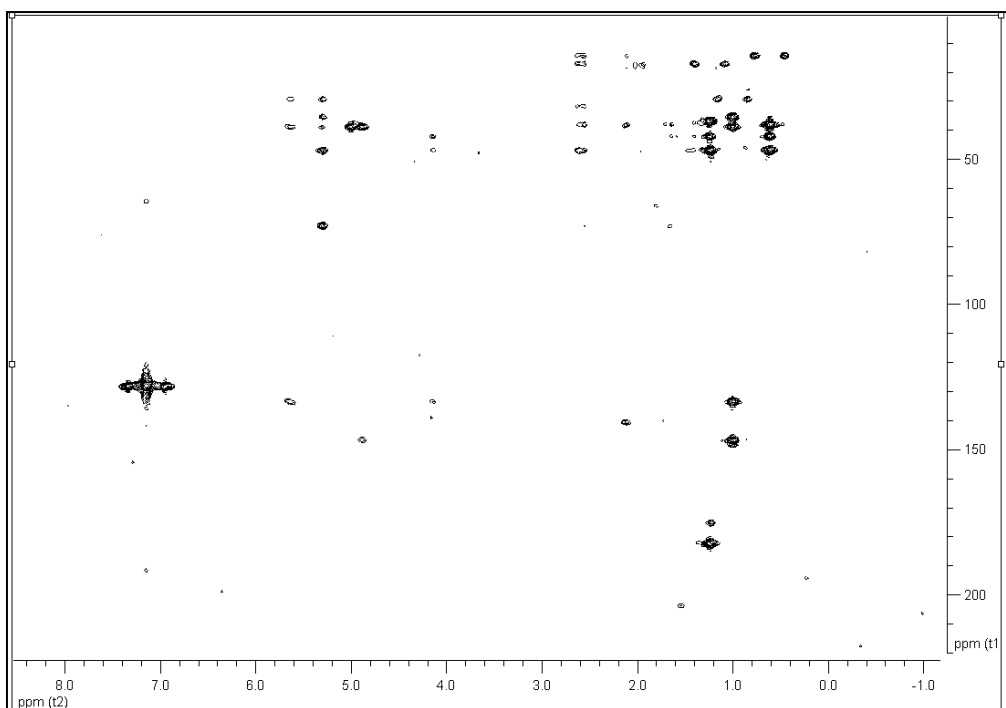


Εικόνα 146. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **25**.

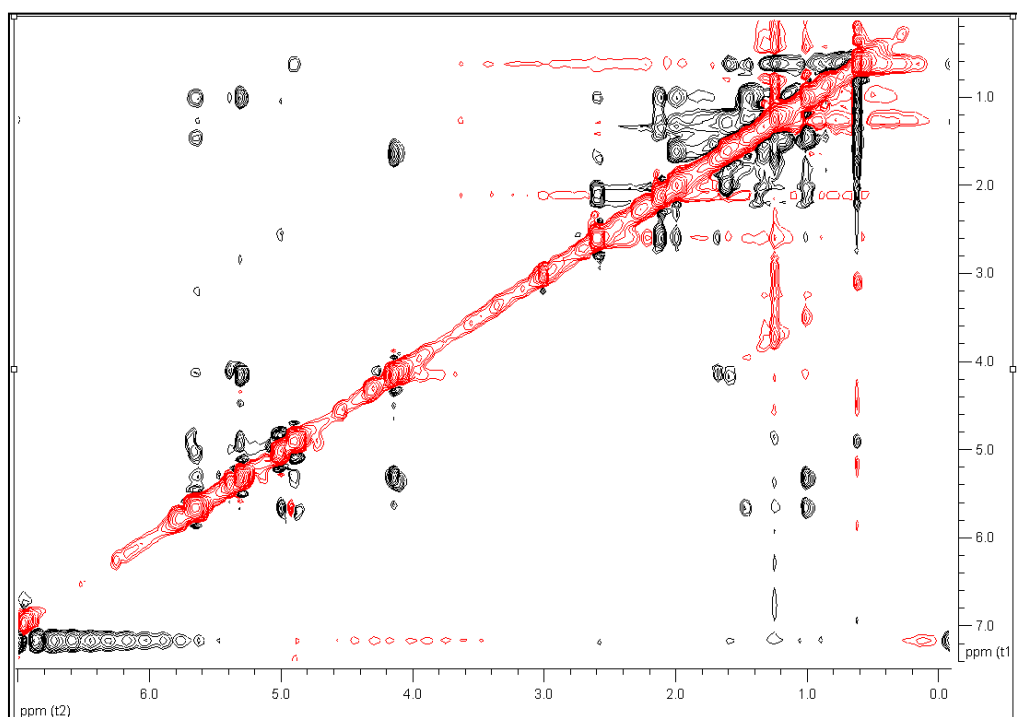
Το ομοπυρηνικό φάσμα COSY (Εικ. 147) καθόρισε την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, και των C-5, C-6, C-7, των C-9, C-11, C-12 και των C-15 και C-16, ενώ με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC (Εικ. 148) προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο, και όπως διαπιστώθηκε, σε πλήρη αναλογία με το μεταβολίτη **24**.



Εικόνα 147. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **25**.



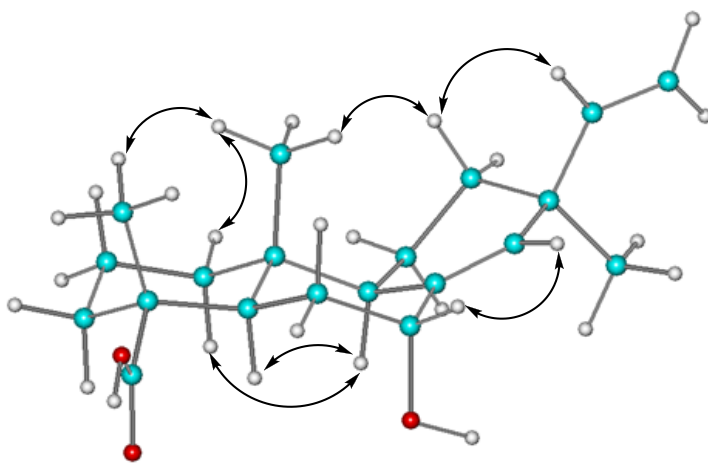
Εικόνα 148. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 25.



Εικόνα 149. Φάσμα NOESY του μεταβολίτη 25.

Με βάση τα δεδομένα από το φάσμα NOESY (Εικ. 149) καθορίστηκε η σχετική στερεοχημεία των ασύμμετρων κέντρων C-4, C-5, C-7, C-9, C-10 και C-13. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε συσχέτιση NOE των H₃-19/H₃-20, ενώ παράλληλα το μεθύλιο H₃-20 δεν είχε σύζευξη με το μεθίλιο H-5, άρα η συμπύκνωση (fusion) των δακτυλίων A και B ήταν *trans*.

Επιπλέον, το H₃-20 είχε σύζευξη με το H-1β, ενώ το H-1α είχε σύζευξη με το πρωτόνιο H-9. Έτσι, καθορίστηκε η αξονική διεύθυνση του μεθυλίου στον C-10, καθώς και η αξονική διεύθυνση του H-9. Επίσης, η σχετική στεreoχημεία του ασύμμετρου κέντρου C-7 προσδιορίστηκε λόγω της ύπαρξης συσχέτισης NOE των H-14/H-7, σε συνδυασμό με την απουσία συσχέτισης H-9/H-7. Εάν το H-7 ήταν αξονικό, τότε δεν θα είχε σύζευξη με το H-14 αλλά με το H-9. Συνεπώς, το υδροξύλιο στον C-7 είναι αξονικό και ως εκ τούτου έχει προσανατολισμό κάτω από το επίπεδο. Επιπρόσθετα, η σχετική στεreoχημεία του ασύμμετρου κέντρου C-13 προσδιορίστηκε λόγω της ύπαρξης συσχέτισης NOE των H-15/H-12β και H-12β/H₃-20. Άρα η ομάδα βινυλίου έχει β-προσανατολισμό και είναι αξονική και το μεθύλιο του C-13 είναι ισημερινό και έχει προσανατολισμό κάτω από το επίπεδο (α-). Όπως και στην περίπτωση του μεταβολίτη **24**, η χημική μετατόπιση του C-17 (29.2 ppm) είναι ένα επιπρόσθετο στοιχείο που επιβεβαιώνει τον ισημερινό προσανατολισμό του μεθυλίου στον C-13. Στην αντίθετη περίπτωση, ο ίδιος άνθρακας θα αναμενόταν να συντονίζεται σε υψηλότερα πεδία (Beier, 1978). Σύμφωνα με τα παραπάνω είναι προφανές ότι οι μεταβολίτες **24** και **25** είναι δομικά όμοιοι και συγκεκριμένα εμφανίζουν επιμέρεια στον C-13.



Εικόνα 150. Στεreoχημική διαμόρφωση δομής ελάχιστης ενέργειας και οι πιο σημαντικές συσχέτισεις NOE για τον μεταβολίτη **25**.

Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι η ουσία **25** είναι νέο φυσικό προϊόν.

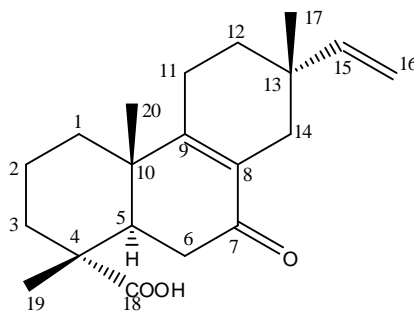
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **25** παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 135 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **25** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1 α	38.3	1.00 m
1 β		1.45 m
2	18.5	1.34 m
3 α	36.9	1.98 m
3 β		1.61 m
4	46.8	-
5	42.1	2.59 dd (13.4, 2.2)
6 α	32.1	1.68 m
6 β		1.61 m
7	72.9	4.15 brs
8	nd	-
9	47.0	2.13 m
10	nd	-
11 α	19.2	1.33 m
11 β		1.27 m
12 α	35.7	1.19 m
12 β		1.47 m
13		-
14	133.4	5.31 s
15	146.6	5.64 dd (17.5, 10.5)
16 α	113.3	5.00 dd (10.5, 1.61)
16 β		4.90 dd (17.5, 1.61)
17	29.2	1.01 s
18	182.4	-
19	16.9	1.25 s
20	14.3	0.63 s

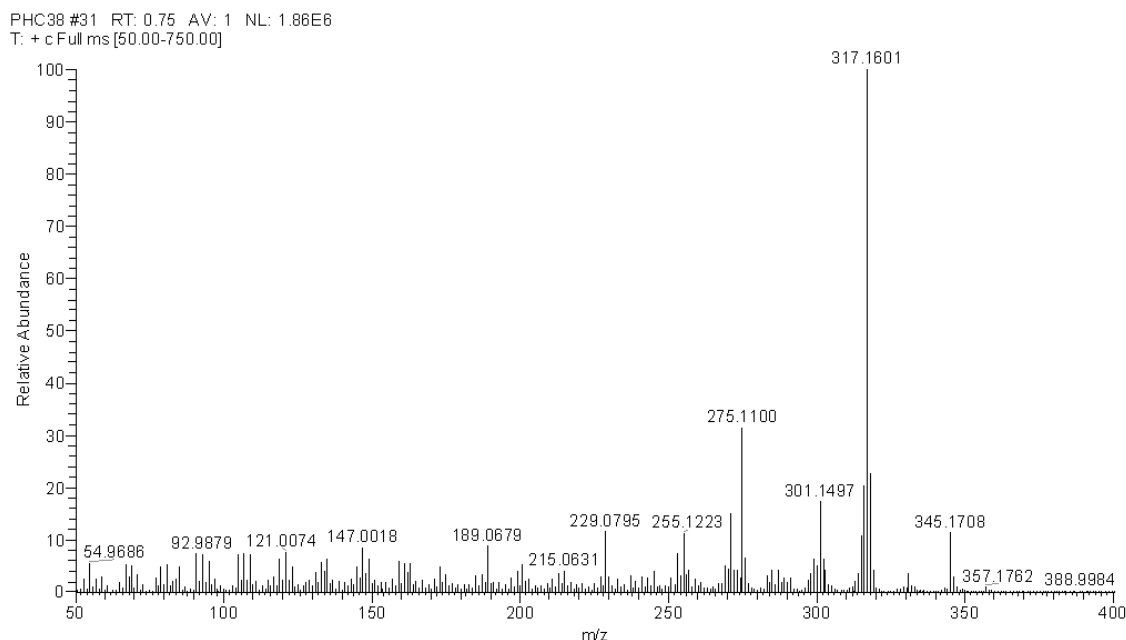
3.1.26. Μεταβολίτης 26: 7-Οξο-13-επι-πιμαρα-8(9),15-διεν-18-οϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **26** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 0.8 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **26** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₂₈O₃.



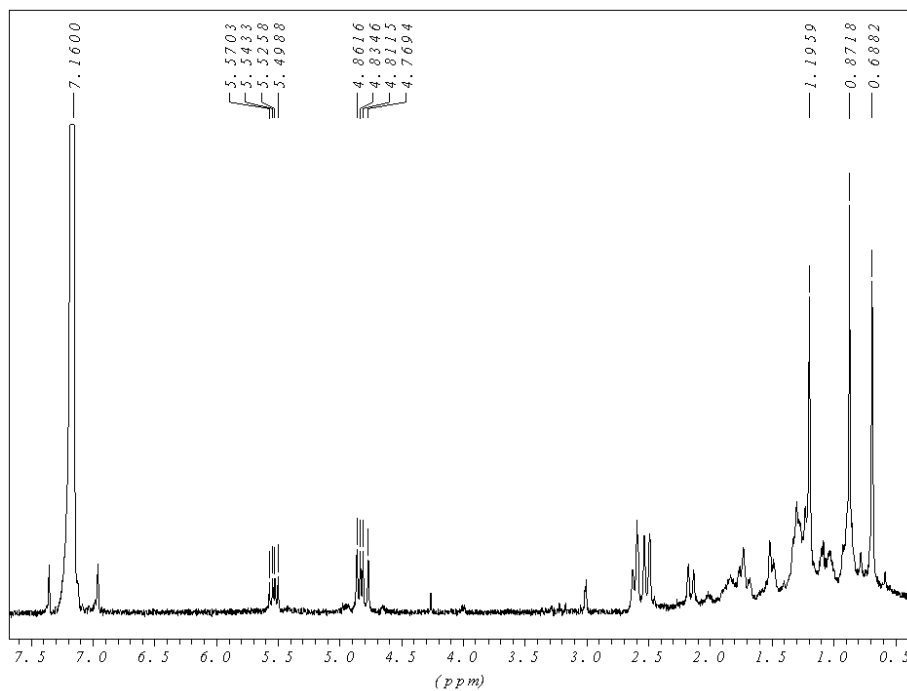
26

Στο φάσμα μάζας του μεταβολίτη **26** (Εικ. 151) η κορυφή σε m/z 317 αντιστοιχεί στο ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$.



Εικόνα 151. Φάσμα μάζας (PCIMS) του μεταβολίτη **26**.

Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 152) του μεταβολίτη **26** (σε C₆D₆) εμφανίστηκαν χαρακτηριστικά σήματα (i) ενός ABX συστήματος πρωτονίων σε δ 5.53 (dd 17.8, 10.8 Hz), δ 4.84 (d 10.8 Hz) και δ 4.79 (dd 16.8 Hz) και (ii) τρεις απλές κορυφές, που αντιστοιχούσαν συνολικά σε τρία μεθύλια σε δ 1.20, 0.87 και 0.69.



Εικόνα 152. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **26**

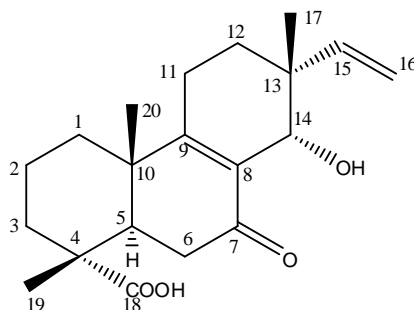
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 7-οξο-13-επι-πιμαρα-8(9),15-διεν-18-οικό οξύ (Urones et al. 1988, de Pascual Teresa et al. 1980), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 136.

Πίνακας 136 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **26** σε CDCl_3 και C_6D_6 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}(\text{CDCl}_3)$	$\delta_{\text{H}}(\text{C}_6\text{D}_6)$
15	5.66 dd (17.8, 10.9)	5.53 dd (17.8, 10.8)
16	a. 4.92 dd (11.9, 1.1)	a. 4.84 d (10.8)
	b. 4.84 dd (17.5, 1.1)	b. 4.79 d (16.8)
17	1.11 s	0.87 s
19	1.26 s	1.20 s
20	0.99 s	0.69 s

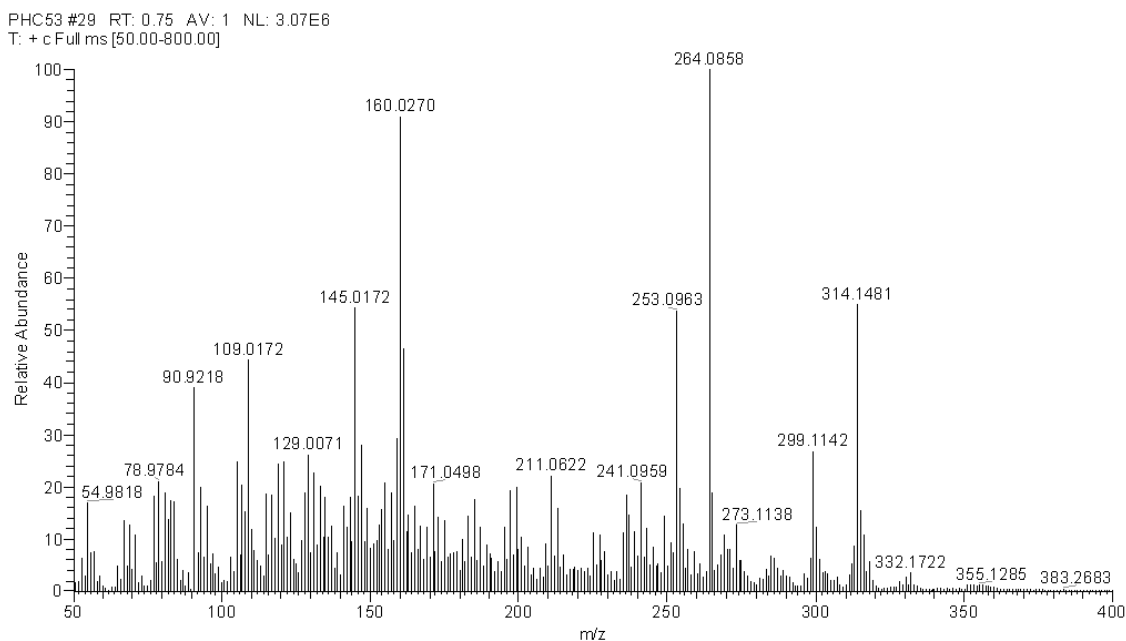
3.1.27. Μεταβολίτης 27: 7-Οξο-14α-υδροξυ-13-επι-πιμαρα-8(9),15-διενοϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **27** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 1.0 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **27** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₂₈O₄.



27

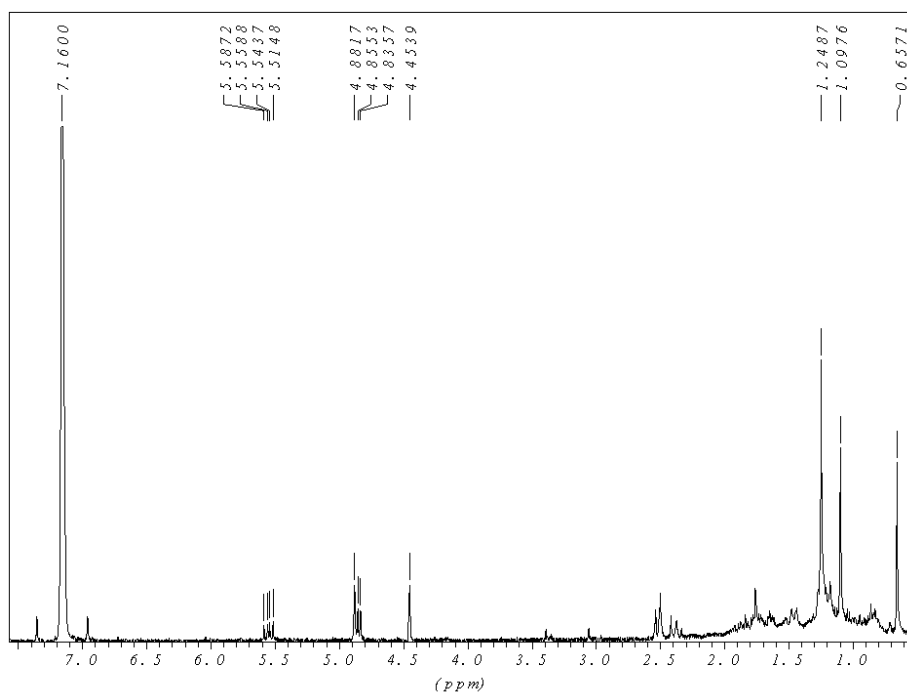
Το μοριακό ιόν [M]⁺ στο φάσμα μάζας του μεταβολίτη **27** (Εικ. 153) εμφανίστηκε σε *m/z* 332.



Εικόνα 153. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **27**.

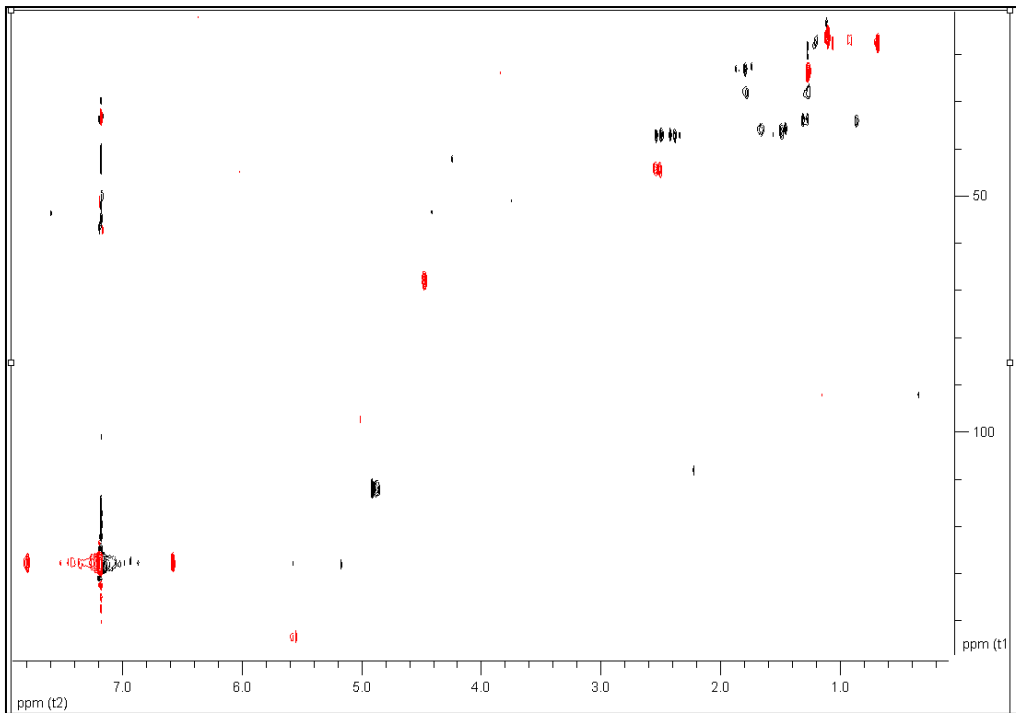
Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 154) του μεταβολίτη **27** εμφανίστηκαν (i) χαρακτηριστικά σήματα ενός ABX συστήματος πρωτονίων σε δ 5.57 (dd 17.5, 11.4 Hz), δ 4.88 (dd 10.6 Hz) και δ 4.86 (dd 17.7 Hz), όπως και στους μεταβολίτες **21-26**, (ii) μία απλή κορυφή στα 4.45 ppm που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα οξυγονωμένο μεθίλιο και

(iii) τρεις απλές κορυφές, που ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν συνολικά σε τρία μεθύλια σε δ 1.25, 1.10 και 0.66.



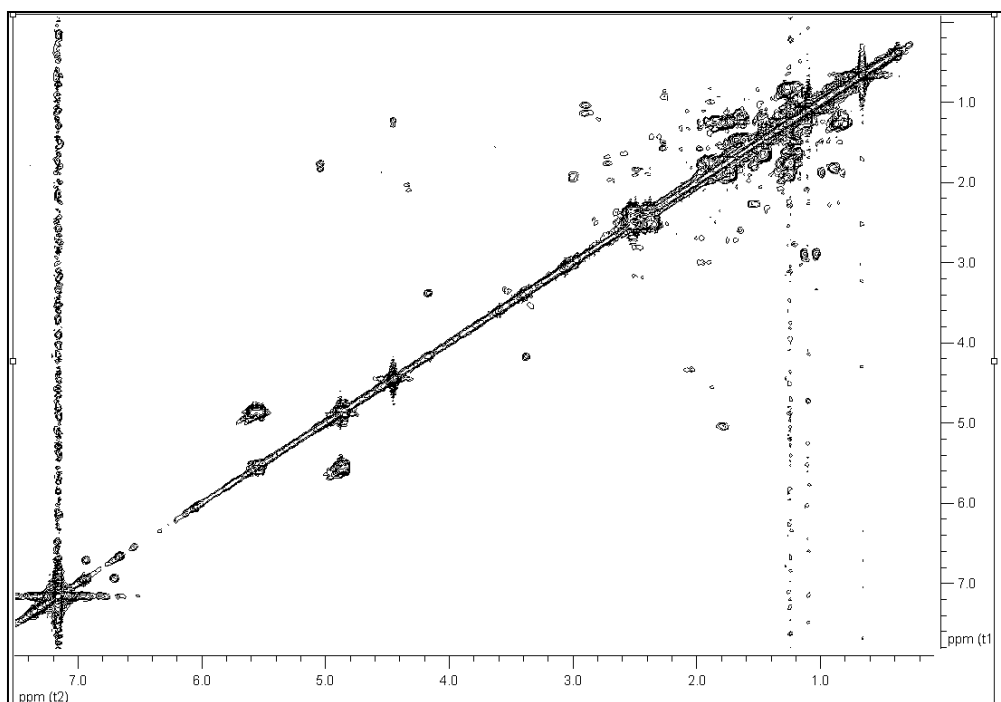
Εικόνα 154. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 27.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 155) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τριών μεθυλίων, επτά μεθυλενίων, ένα εκ των οποίων είναι ολεφινικό και τριών μεθινίων, ένα εκ των οποίων ολεφινικό και ένα οξυγονωμένο. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

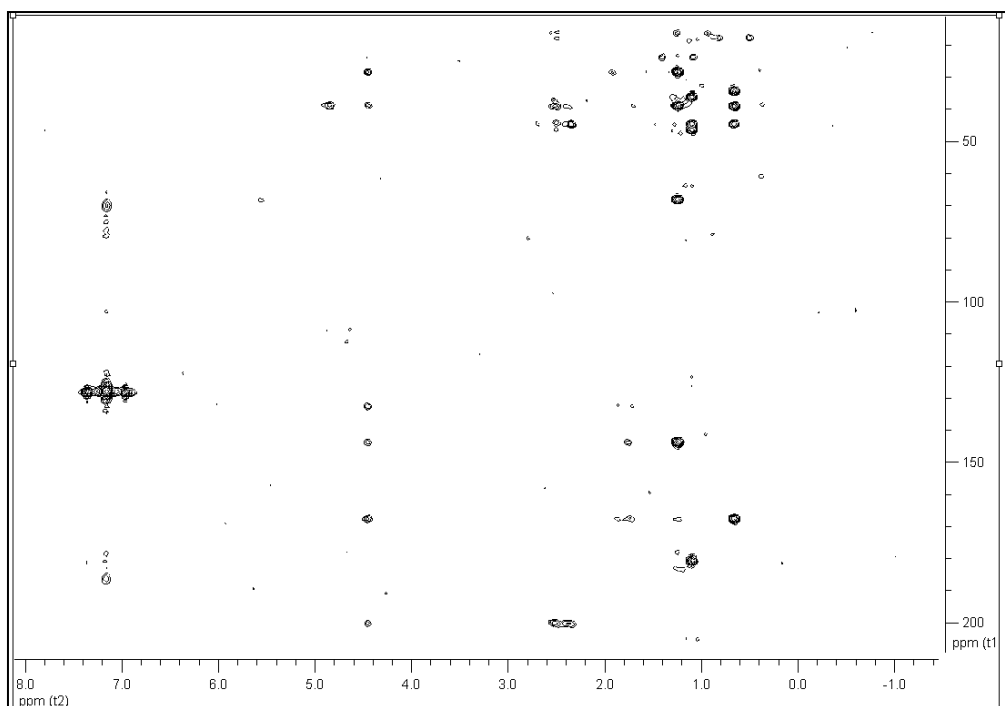


Εικόνα 155. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 27.

Το ομοπυρηνικό φάσμα COSY (Εικ. 156) επιβεβαίωσε την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, και των C-5, C-6, των C-11, C-12 και των C-15, C-16, ενώ με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC (Εικ. 157) προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο, ενώ επιβεβαιώθηκε ότι επρόκειτο για σκελετό πιμαρανίου.



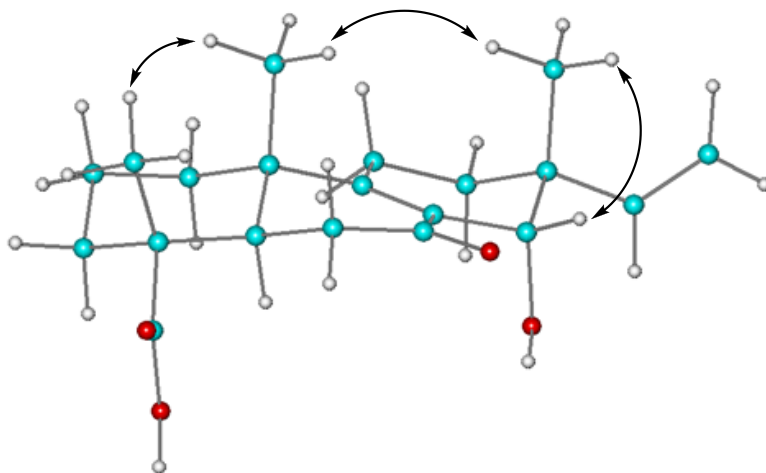
Εικόνα 156. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 27.



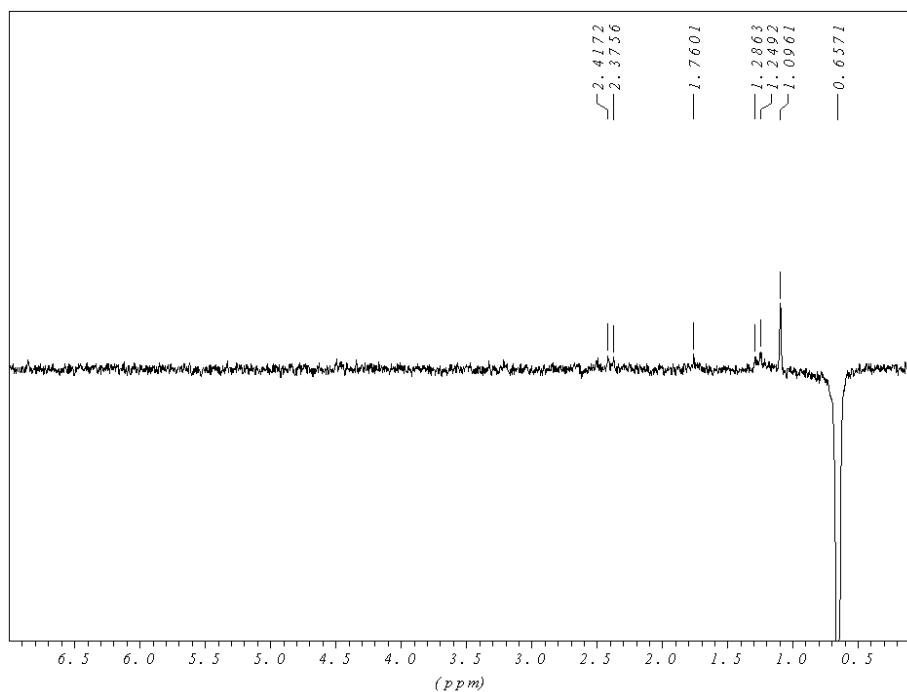
Εικόνα 157. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **27**.

Με βάση τα δεδομένα από τα φάσματα 1D-NOE (Εικ. 159-160) και της βιβλιογραφίας καθορίστηκε η σχετική στερεοχημεία των ασύμετρων κέντρων C-4, C-5, C-10, C-13 και C-14. Παρατηρήθηκε συσχέτιση NOE H₃-20/H₃-19, ενώ το μεθινικό πρωτόνιο της θέσης 5 δεν είχε συσχέτιση με το μεθύλιο H₃-20, άρα επιβεβαιώνεται η σχετική στερεοχημεία των ασύμετρων κέντρων C-4, C-5 και C-10, όπου εάν τα μεθύλια H₃-19 και H₃-20 είναι αξονικά και έχουν προσανατολισμό πάνω από το επίπεδο, τότε το H-5 είναι επίσης αξονικό και έχει προσανατολισμό κάτω από το επίπεδο, άρα η συμπύκνωση (fusion) των δακτυλίων A και B είναι *trans*. Ο προσανατολισμός του μεθυλίου H₃-17 στο χώρο καθορίστηκε με βάση το φάσμα 1D-NOE, όπου διακρίνεται η συσχέτιση H₃-20/H₃-17, συνεπώς και το μεθύλιο στον C-13 θα είναι αξονικό και πάνω από το επίπεδο (β^-). Η χημική μετατόπιση του C-17, ο οποίος συντονίζεται σε σχετικά υψηλά πεδία (24.0 ppm), επιβεβαιώνει τον αξονικό β^- -προσανατολισμό του H₃-17, όπως έχει αποδειχθεί για τους άνθρακες αξονικών μεθυλίων στον C-13 των παραγώγων πιμαραδιενίου, τα οποία υφίστανται στερεοχημικά μεγαλύτερη θωράκιση σύμφωνα με τον Beier (1978). Επιπλέον, το H-14 έχει συσχέτιση στο χώρο με το αξονικό H₃-17 και συνεπάγεται ότι το οξυγονωμένο μεθινικό πρωτόνιο H-14 έχει προσανατολισμό πάνω από το επίπεδο και είναι ισημερινό, άρα το υδροξύλιο του C-14 θα είναι αξονικό και με προσανατολισμό κάτω από το επίπεδο (α -OH), όπως φαίνεται στην Εικ. 158. Σε περίπτωση που το H-14 ήταν αξονικό (και άρα α^-) δεν θα είχε συσχέτιση με το H₃-17, αλλά με το ολεφινικό πρωτόνιο H-15, συσχέτιση η οποία δεν

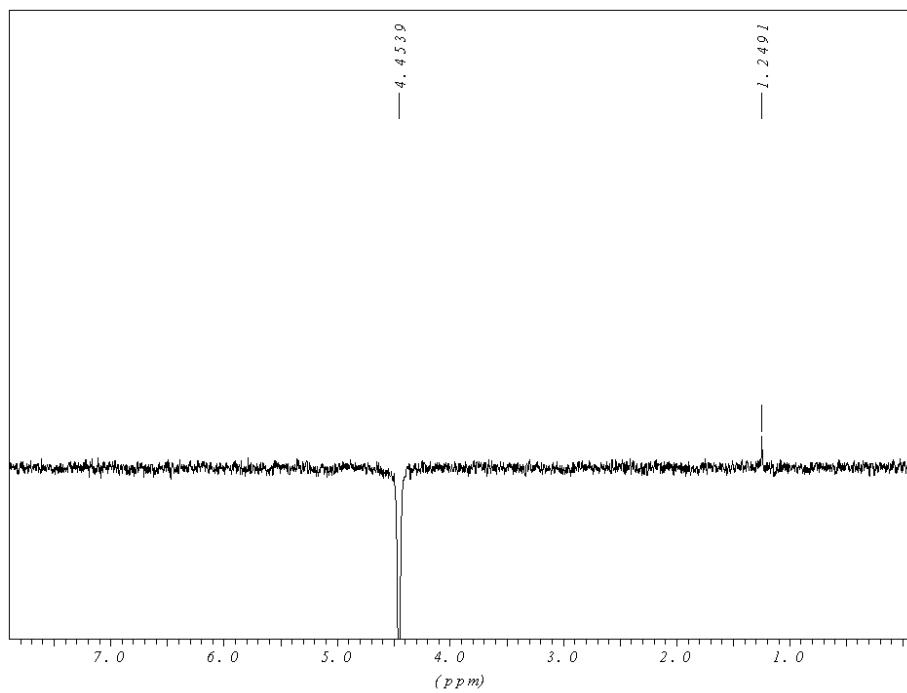
παρατηρείται στο φάσμα 1D-NOE (Εικ. 160).



Εικόνα 158. Στερεοχημική διαμόρφωση δομής ελάχιστης ενέργειας και οι πιο σημαντικές συσχετίσεις NOE για τον μεταβολίτη **27**.



Εικόνα 159. Φάσμα 1D-NOE του μεταβολίτη **27**: στοχευμένη ακτινοβολή των H₃-20



Εικόνα 160. Φάσμα 1D-NOE του μεταβολίτη **27**: στοχευμένη ακτινοβολήση του H-14

Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι η ουσία **27** είναι νέο φυσικό προϊόν.

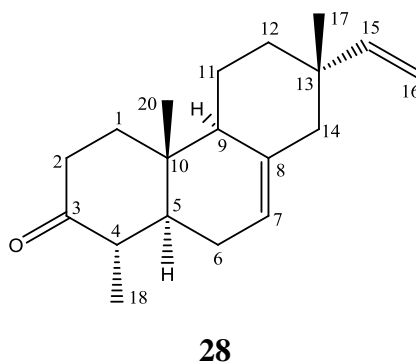
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **27** παρατίθενται στον Πίνακα 137.

Πίνακας 137 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **27** σε C₆D₆ (δ ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

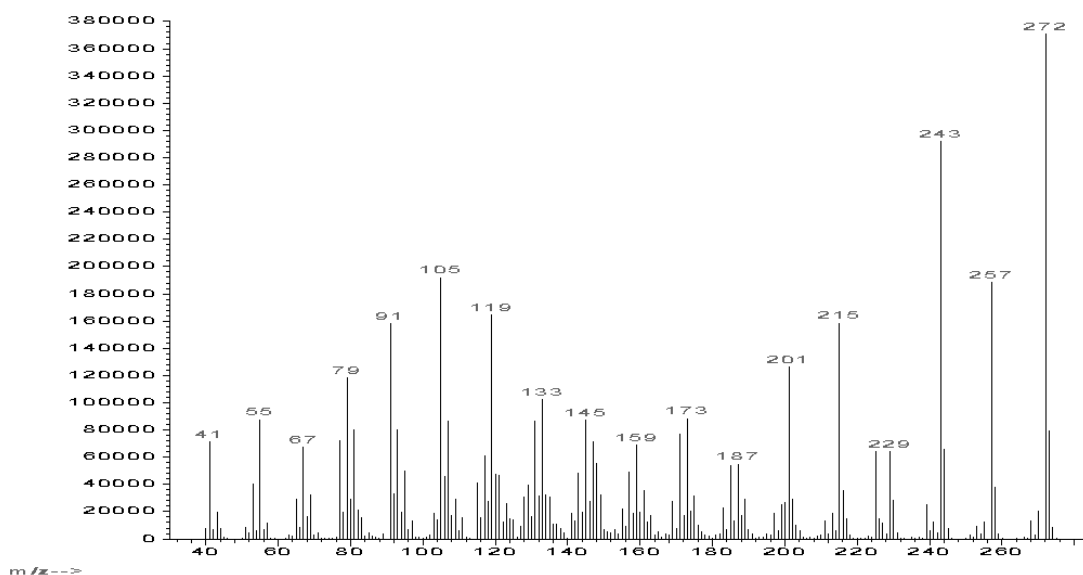
Θέση	δ_C	δ_H
1 α	34.0	0.86 m
1 β		1.29 m
2	17.9	1.21 m
3 α	36.0	1.66 m
3 β		1.44 brd (14.0)
4	46.3	-
5	44.4	2.52 brd (14.2)
6 α	37.3	2.52 m
6 β		2.40 m
7	200.1	-
8	132.5	-
9	167.0	-
10	39.3	-
11	23.0	1.79 m
12 α	28.5	1.78 m
12 β		1.26 m
13	38.8	-
14	68.0	4.45 s
15	143.4	5.55 dd (17.5, 11.4)
16 α	112.0	4.87 d (10.6)
16 β		4.84 d (17.7)
17	24.0	1.25 s
18	180.4	-
19	16.6	1.10 s
20	17.9	0.66 s

3.1.28. Μεταβολίτης 28: 19-νορ-Ισοπιμαρα-7,15-διεν-3-όνη

Ο μεταβολίτης **28** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 1.6 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **28** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₉H₂₈O.

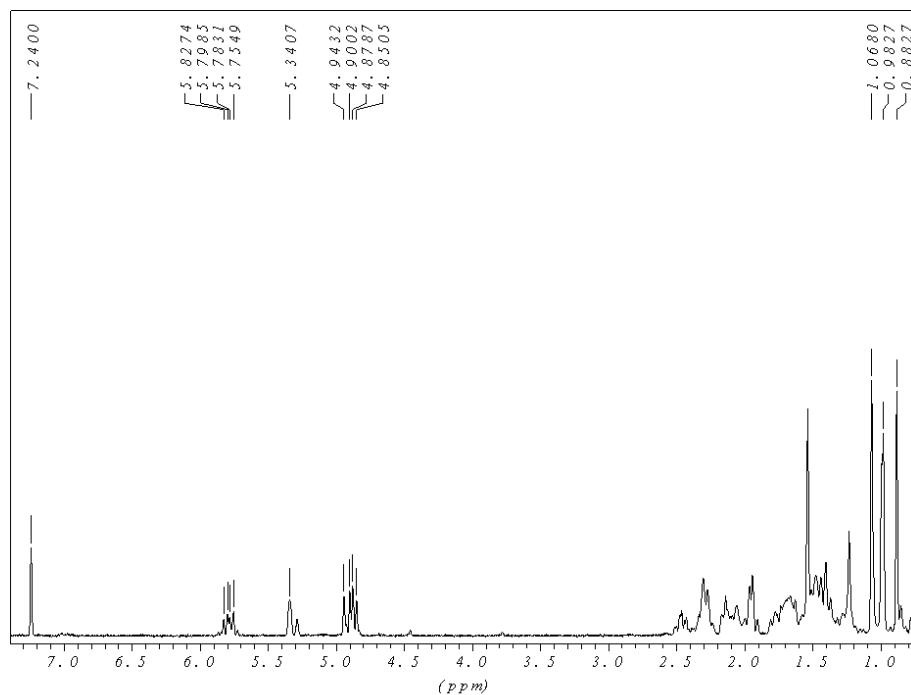


Το μοριακό ιόν στο φάσμα μάζας (Εικ. 161) εμφανίστηκε σε m/z 272 ενώ το θραύσμα σε m/z 257 υποδηλώνει την απόσπαση μιας ρίζας οξυγόνου.



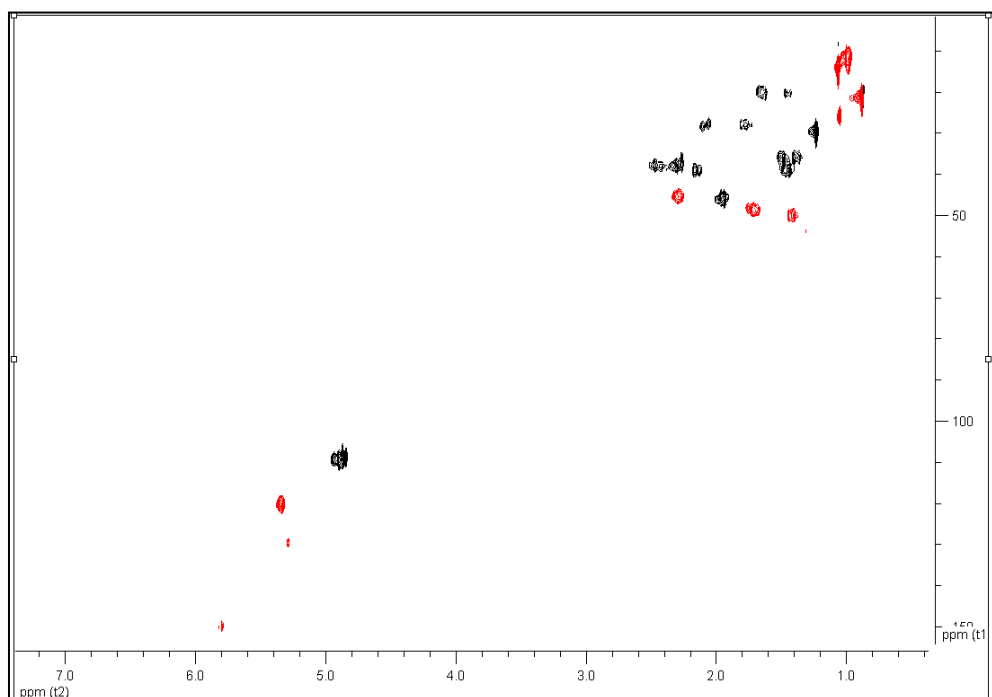
Εικόνα 161. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **28**.

Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 162) του μεταβολίτη **28** εμφανίστηκαν (i) χαρακτηριστικά σήματα ενός ABX συστήματος πρωτονίων σε δ 5.79 (dd 17.7, 10.7 Hz), δ 4.92 (d 17.7 Hz) και δ 4.86 (dd 10.7 Hz), όπως και στην περίπτωση των μεταβολιτών **21-27**, (ii) μια πολλαπλή κορυφή, στην περιοχή των ολεφινικών πρωτονίων στα 5.34 ppm, που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο, (iii) μία διπλή κορυφή στα 0.98 ppm (d 7.0 Hz), που αντιστοιχούσε σε ένα μεθύλιο σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα και δύο απλές κορυφές σε δ 1.07 και 0.88, που ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν συνολικά σε δύο μεθύλια.



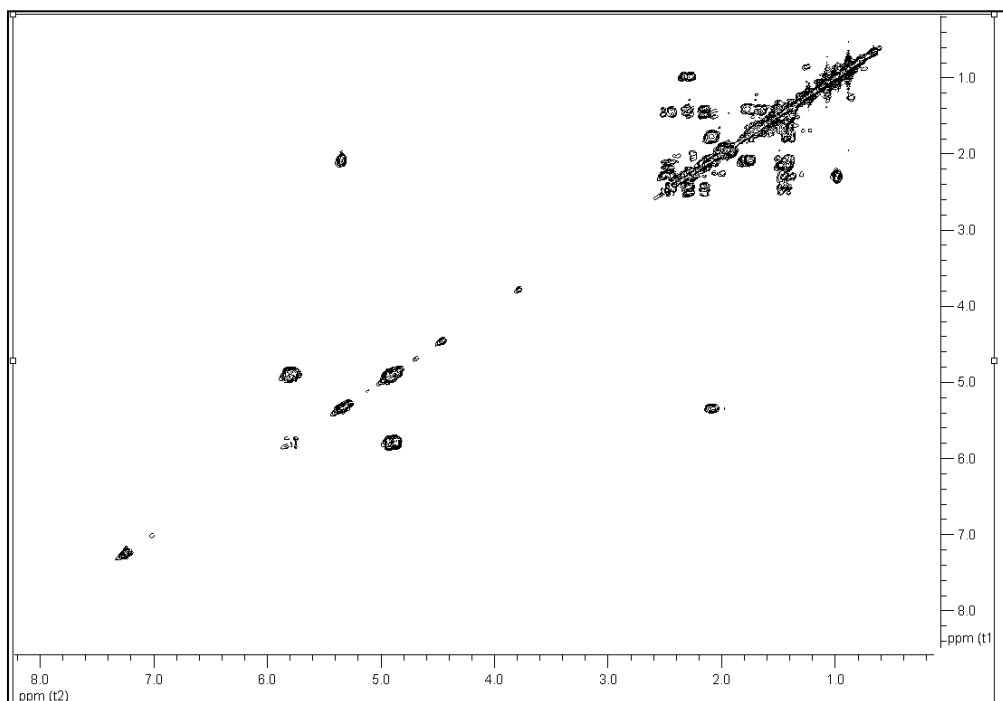
Εικόνα 162. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **28**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 163) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τριών μεθυλίων, έξι μεθυλενίων και τεσσάρων μεθινίων, ένα εκ των οποίων ολεφινικό. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

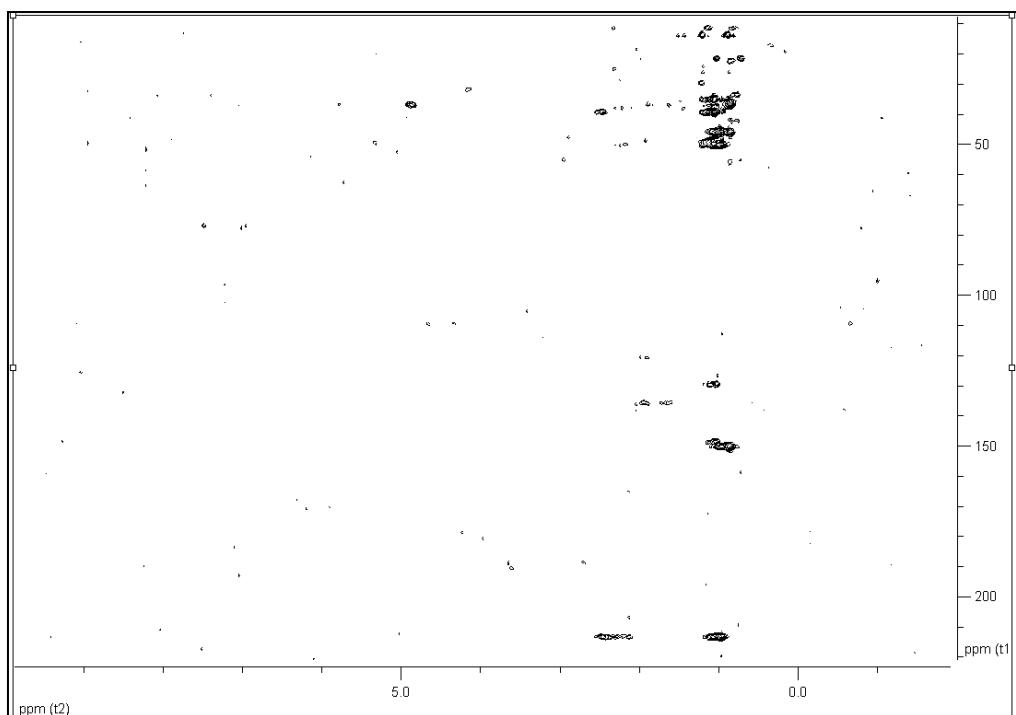


Εικόνα 163. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **28**.

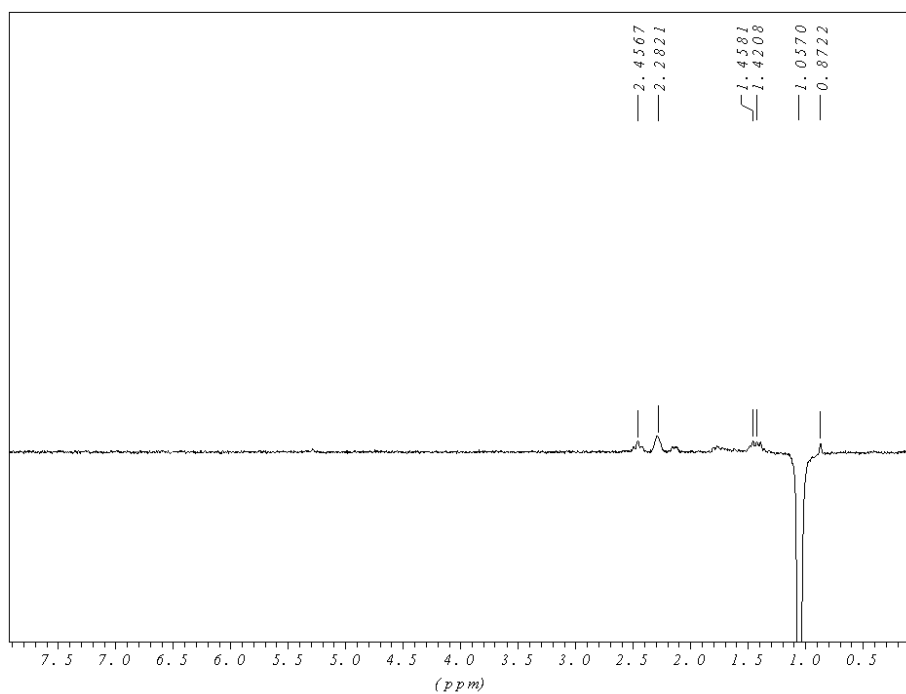
Στο ομοπυρηνικό φάσμα COSY (Εικ. 164) παρατηρήθηκαν οι συζεύξεις H₂1/H₂-2, H-4/H-5, H-5/H₂-6, H₂-6/H-7, H-9/H₂-11, H₂-11/H₂-12, H-15/H₂-16 και H-4/H₃-18, που καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2, των C-4, C-5, C-6, C-7, των C-9, C-11, C-12, των C-15 και C-16 και των C-4, C-18, ενώ με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC (Εικ. 165) προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο.



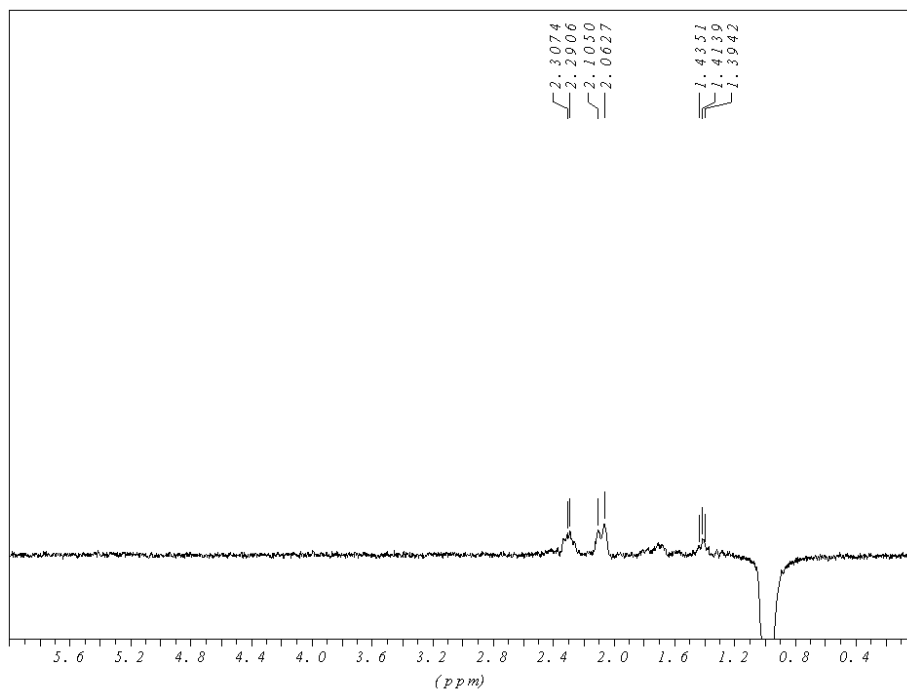
Εικόνα 164. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **28**.



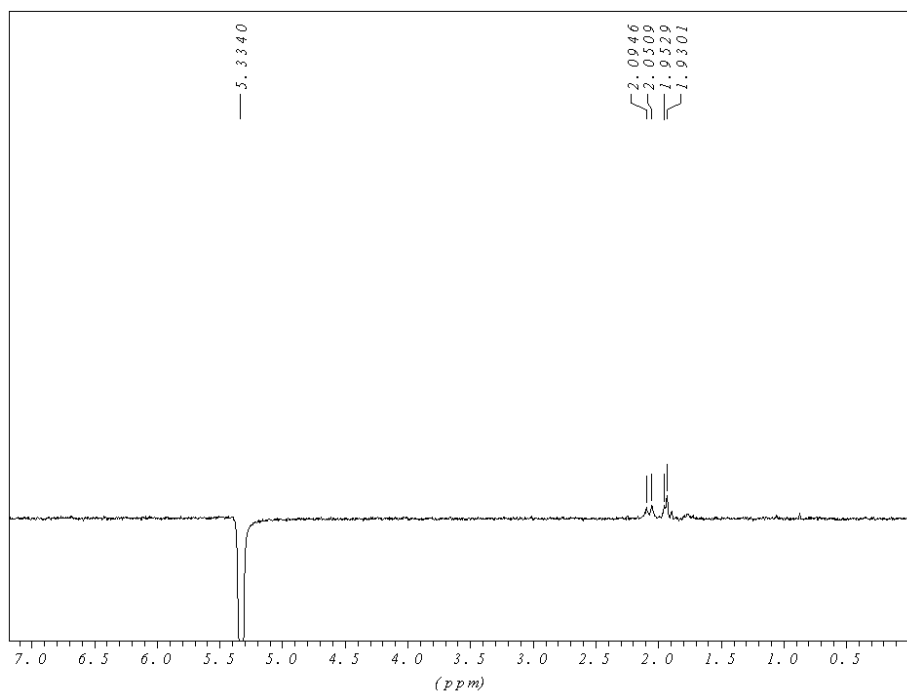
Εικόνα 165. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **28**.



Εικόνα 166. Φάσμα 1D-NOE του μεταβολίτη **28**: στοχευμένη ακτινοβολή των H₃-20.



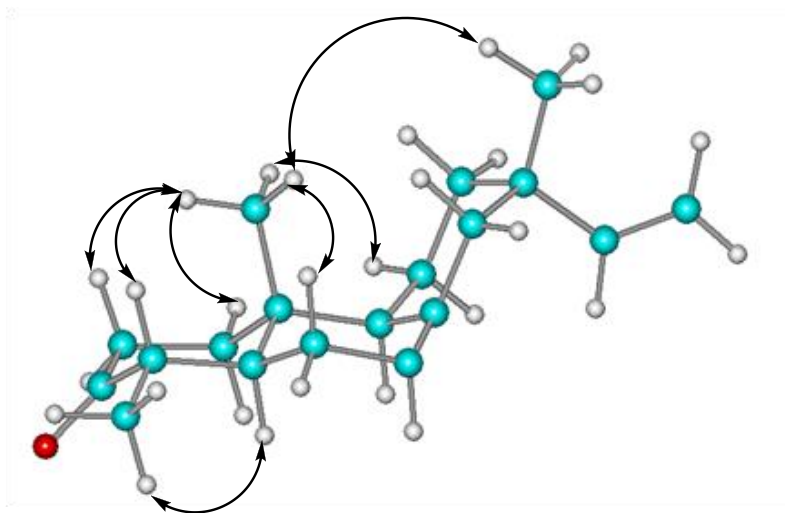
Εικόνα 167. Φάσμα 1D-NOE του μεταβολίτη **28**: ακτινοβόληση των H₃-18



Εικόνα 168. Φάσμα 1D-NOE του μεταβολίτη **28**: στοχευμένη ακτινοβόληση του H-7

Με βάση τα δεδομένα από τα φάσματα 1D-NOE (Εικ. 166-168) καθορίστηκε η σχετική στεreoχημεία των C-4, C-5, C-9, C-10 και C-13. Συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση NOE μεταξύ των H₃-18 και H₃-20. Άρα εάν το μεθύλιο H₃-20 έχει θέση αξονική, τότε το H₃-18 θα είναι ισημερινό. Παράλληλα, δεν παρατηρείται σύζευξη μεταξύ του H₃-20

με το μεθίνιο H-5, ενώ παρατηρείται η συσχέτιση H₃-18/H-5, άρα η συμπύκνωση (fusion) των δακτυλίων A και B είναι *trans*. Επιπλέον, το H₃-20 δεν έχει σύζευξη με το μεθίνιο H-9, ενώ διακρίνεται η συσχέτιση H₃-18/H-9, άρα το H-9 θα έχει θέση αξονική και κάτω από το επίπεδο του μορίου. Επιπρόσθετα, παρατηρείται η συσχέτιση NOE H₃-20/H₃-17, άρα το μεθύλιο του C-13 θα έχει προσανατολισμό πάνω από το επίπεδο και θα έχει αξονική θέση. Η διαμόρφωση του ασύμμετρου κέντρου C-13 επιβεβαιώνεται και από τον Beier (1978), σύμφωνα με τον οποίο ο άνθρακας των αξονικών μεθυλίων της θέσης 13 των πιμαραδιενίων, εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία συγκριτικά με τα ισημερινά, εφόσον τα πρώτα υφίστανται στερεοχημικά θωράκιση. Άρα το H₃-17 είναι αξονικό, διότι εάν είχε προσανατολισμό προς τα κάτω και άρα ήταν ισημερινό, τότε τα πρωτόνια του θα συντονίζονταν σε χαμηλότερα πεδία, ακόμα και κατά 10 ppm. Επίσης, παρατηρήθηκαν οι συζεύξεις H₃-18/H-6α, H₃-20/H-2β, H₃-20/H-4, H₃-20/H-1β, H₃-20/H-6β, H₃-20/H-11β, προσδιορίζοντας τον προσανατολισμό των μεθυλενικών πρωτονίων H₂-1, H₂-2, H₂-6 και H₂-11.



Εικόνα 169. Στερεοχημική διαμόρφωση δομής ελάχιστης ενέργειας και οι πιο σημαντικές συσχετίσεις NOE για τον μεταβολίτη **28**.

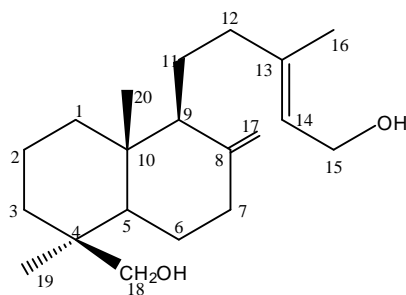
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 19-νορ-ισοπιμαρα-7,15-διεν-3-όνη (Cagnoli et al. 1980), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 138, ενώ για πρώτη φορά γίνεται πλήρης απόδοση αυτών.

Πίνακας 138 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **28** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1 α	39.2	1.44 m
1 β		2.14 m
2 α	37.5	2.28 m
2 β		2.46 ddd (14.0, 14.0, 5.8)
3	213.1	-
4	45.4	2.30 m
5	49.8	1.42 m
6 α	27.9	2.07 m
6 β		1.78 m
7	120.4	5.34 m
8	135.2	-
9	48.6	1.71 m
10	34.9	-
11 α	20.5	1.64 m
11 β		1.45 m
12 α	36.3	1.49 m
12 β		1.37 m
13	36.8	-
14	45.7	1.94 d
15	149.8	5.79 dd (17.7, 10.7)
16 α	109.1	4.92 d (17.7)
16 β		4.86 d (10.7)
17	21.1	0.88 s
18	11.4	0.98 d (7.0)
19	-	-
20	14.3	1.07 s

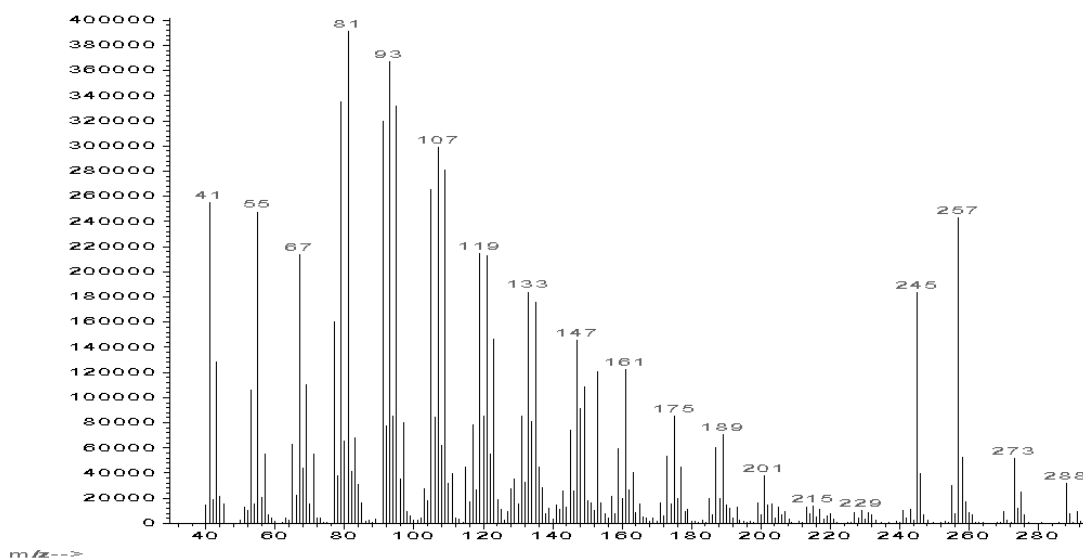
3.1.29. Μεταβολίτης 29: Αγαθοδιόλη

Ο μεταβολίτης **29** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 0.6 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **29** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₃₄O₂.



29

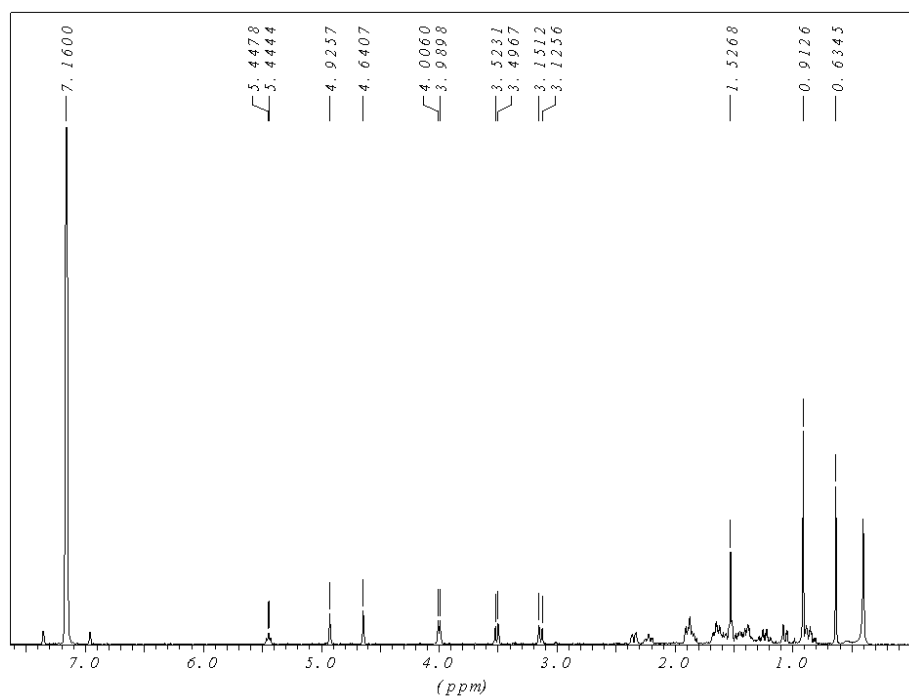
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 170) εμφανίστηκε το ιόν [M-H₂O] και [M-H₂O-CH₂OH]⁺ σε *m/z* 288 και *m/z* 257 αντίστοιχα.



Εικόνα 170. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **29**.

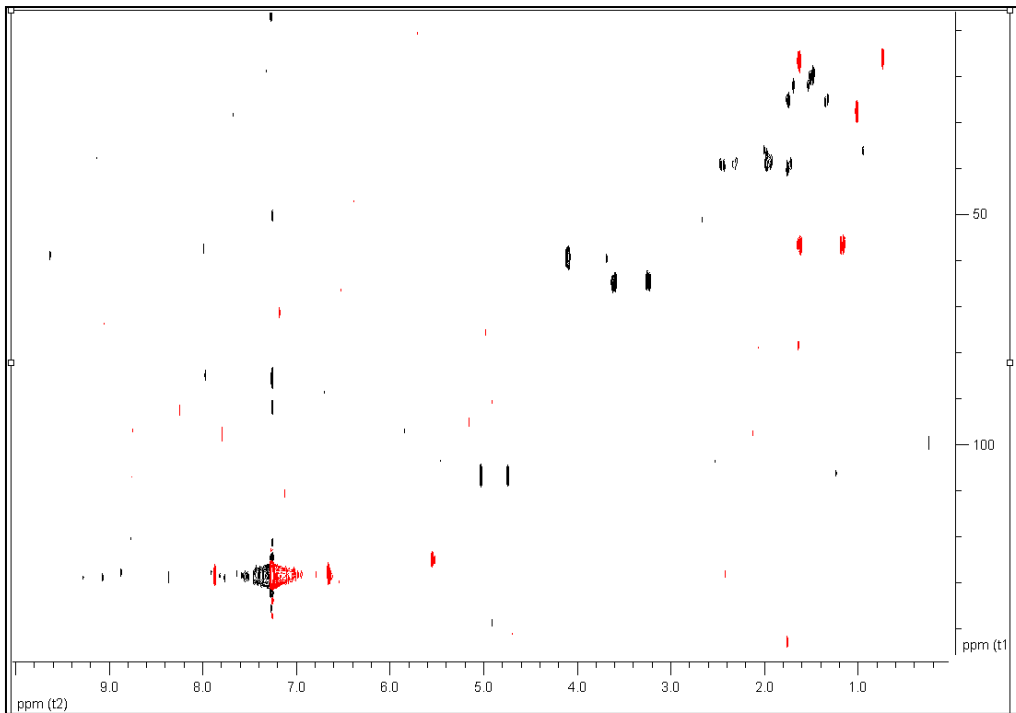
Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 171) παρατηρήθηκαν (i) τρεις απλές κορυφές σε δ 1.53, 0.91 και 0.63, που ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν συνολικά σε τρία μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μια διπλή κορυφή σε δ 4.00 (6.6 Hz), που ολοκλήρωνε για δύο πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε ένα οξυγονωμένο μεθυλένιο, (iii) δύο διπλές κορυφές σε δ 3.51 (10.9 Hz) και 3.13 (11.0 Hz), που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε ένα υδροξυμεθυλένιο, (iv) δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.93 και 4.64, που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και

αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου, και (ν) μία τριπλή κορυφή σε δ 5.44 (6.9 Hz), που αντιστοιχούσε σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο.



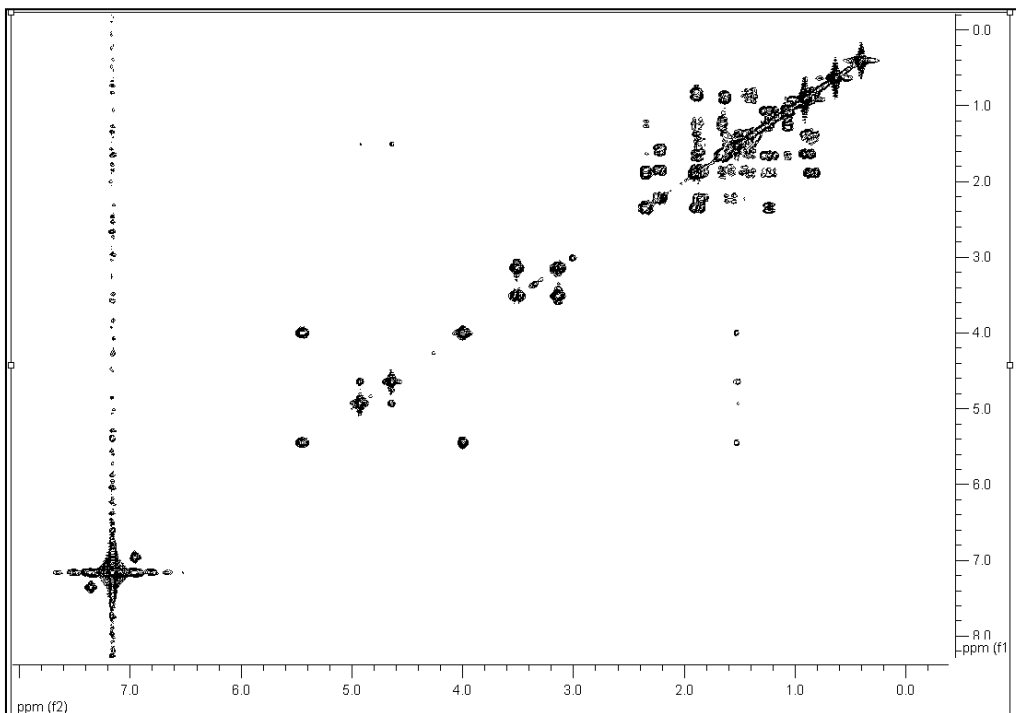
Εικόνα 171. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **29**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 172) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τριών μεθυλίων, δέκα μεθυλενίων, εκ των οποίων το ένα ολεφινικό και τριών μεθινίων, ένα εκ των οποίων ολεφινικό. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.



Εικόνα 172. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **29**.

Το ομοπυρηνικό φάσμα COSY (Εικ. 173) καθόρισε την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, και των C-5, C-6, C-7, των C-9, C-11, C-12 και των C-14 και C-15.



Εικόνα 173. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **29**.

Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό

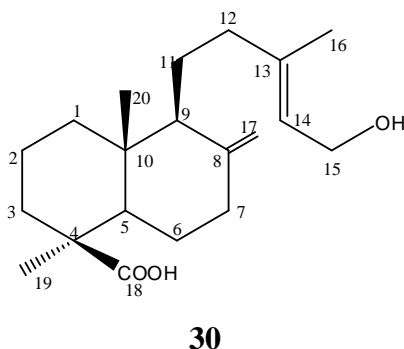
μεταβολίτη αγαθαδιόλη (Norin et al. 1972), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 139, ενώ για πρώτη φορά γίνεται η πλήρης απόδοση των μετατοπίσεων των πρωτονίων, δίχως ωστόσο να έχει γίνει απόδοση των τεταρτοταγών ανθράκων C-4, C-8, C-10 και C-13, εφόσον η ποσότητα, στην οποία απομονώθηκε ο μεταβολίτης **29** δεν ήταν επαρκής για τη λήψη φάσματος HMBC.

Πίνακας 139 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **29** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

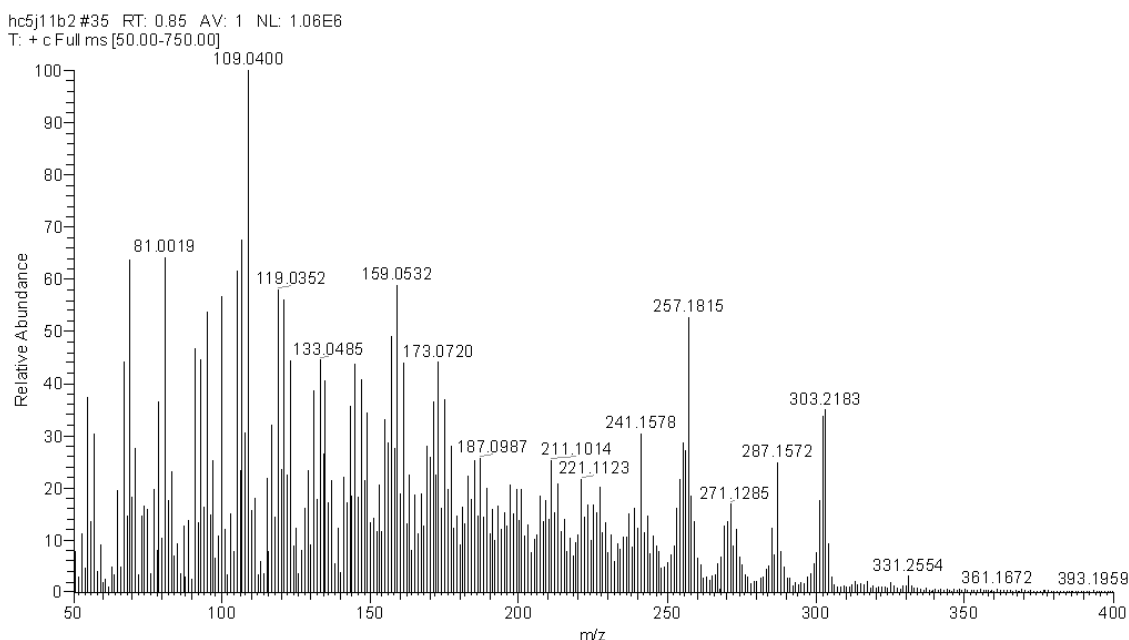
Θέση	δ_C	δ_H
1	39.6	1.53 m
2	19.9	1.39 m
3a	36.0	1.88 m
3b		0.83 m
4	nd	-
5	56.1	1.53 m
6a	21.5	1.59 m
6b		1.42 m
7	38.3	1.85 m
8	nd	-
9	56.1	1.06 m
10	nd	-
11a	24.7	1.64 m
11b		1.24 m
12a	38.9	2.35 ddd (12.6, 3.8, 2.2)
12b		2.22 m
13	nd	-
14	124.3	5.43 tr (6.9)
15	60.0	4.00 d (6.6)
16	16.0	1.53 s
17a	106.2	4.93 brs
17b		4.64 brs
18	27.3	0.91 s
19a	64.0	a. 3.51 d (10.6)
19b		b. 3.13 d (10.7)
20	15.6	0.63 s

3.1.30. Μεταβολίτης 30: Ισοκουπρεσσικό οξύ

Ο μεταβολίτης **30** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 19.3 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **30** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₃₂O₃.



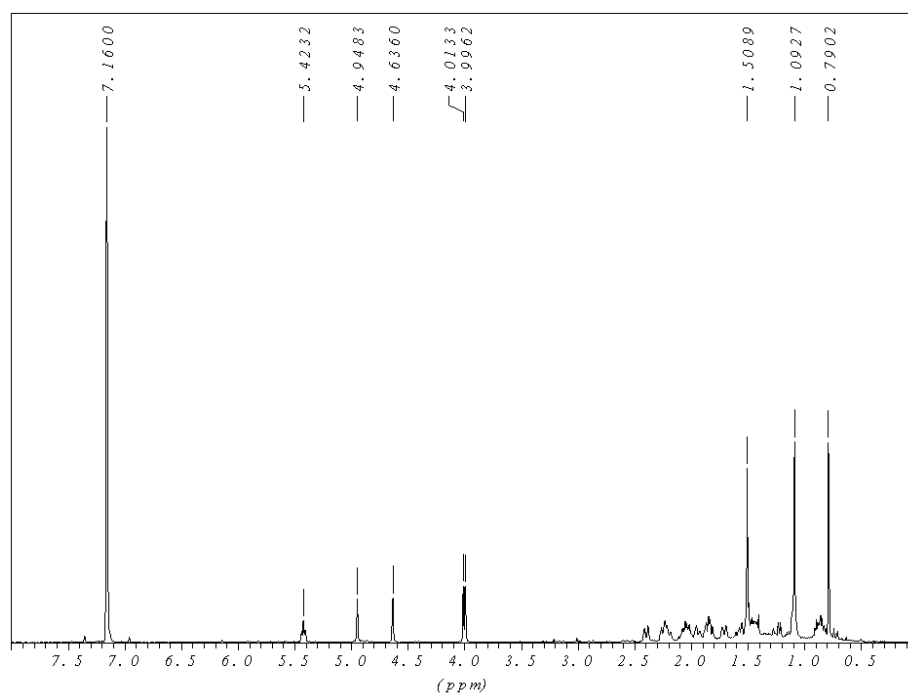
Το φάσμα μάζας (Εικ. 174) του μεταβολίτη **30** εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν [M-OH]⁺ σε *m/z* 303.



Εικόνα 174. Φάσμα μάζας του μεταβολίτη **30**.

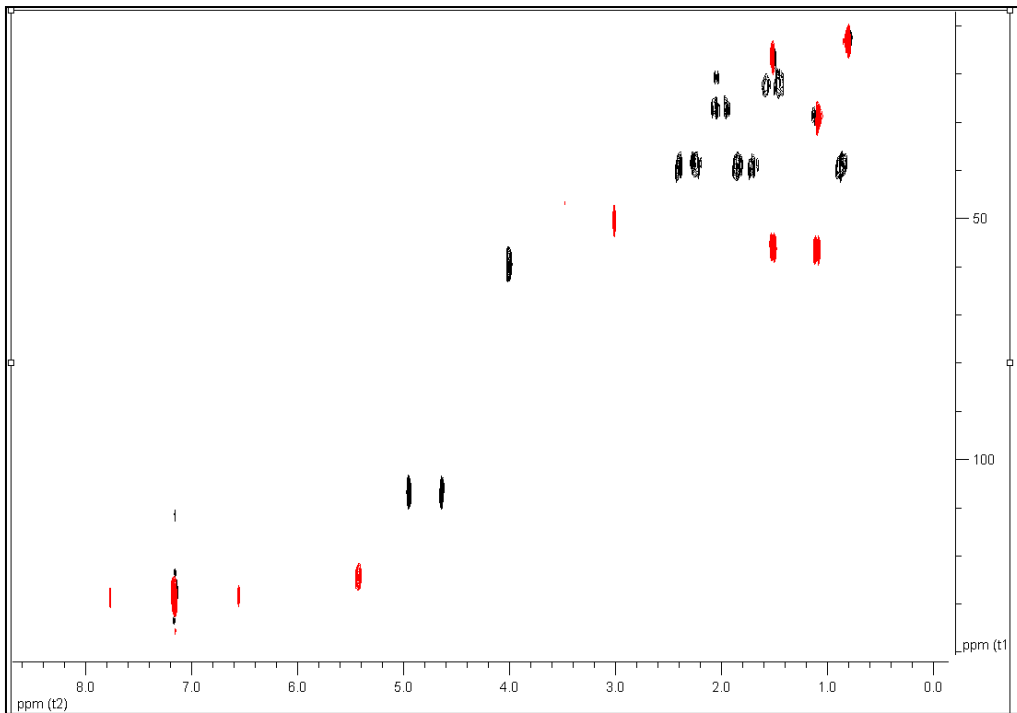
Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 175) παρατηρήθηκαν (i) τρεις απλές κορυφές σε δ 1.51, 1.10 και 0.79, που ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν συνολικά σε τρία μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μια διπλή κορυφή σε δ 4.00 (6.7 Hz), που ολοκλήρωνε για δύο πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε ένα οξυγονωμένο μεθυλένιο, (iii)

δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.95 και 4.64, που ολοκληρώναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου και (v) μία τριπλή κορυφή σε δ 5.42 (6.5 Hz), που αντιστοιχούσε σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο. Σύμφωνα με τα παραπάνω ήταν εμφανής η δομική ομοιότητα των **29** και **30**.



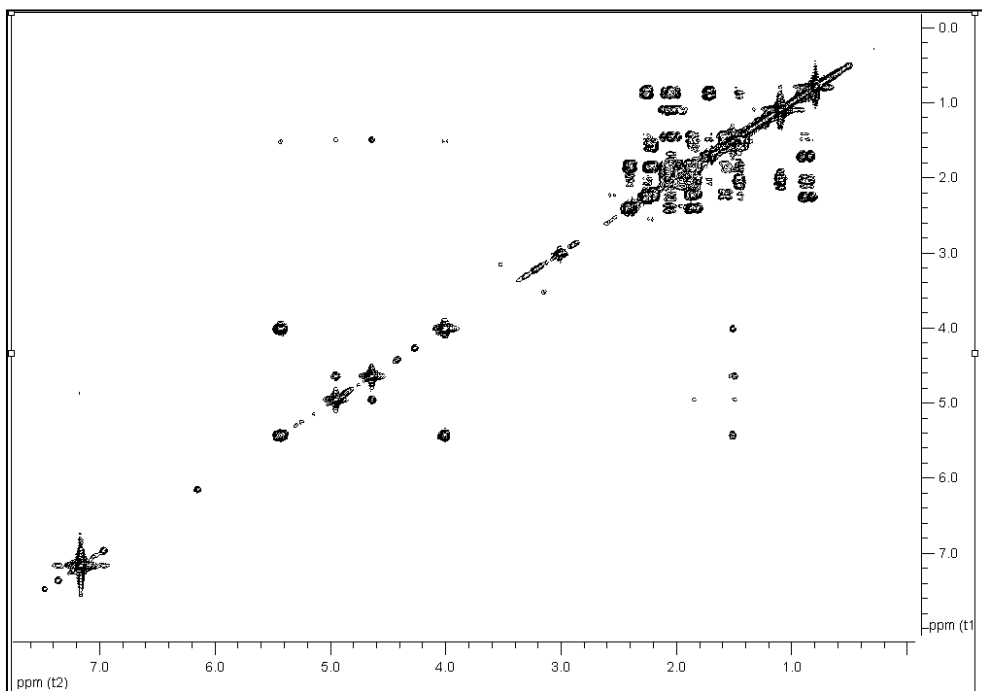
Εικόνα 175. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **30**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 176) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τριών μεθυλίων, εννέα μεθυλενίων, εκ των οποίων η μία εξωμεθυλενική και τριών μεθινίων, ένα εκ των οποίων ολεφινικό. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

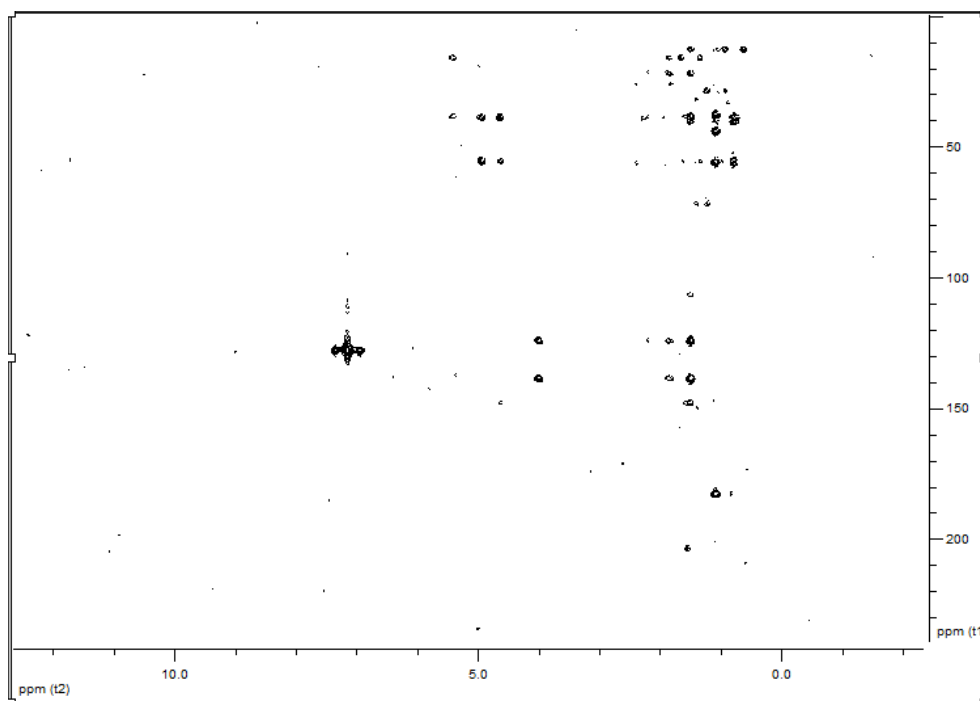


Εικόνα 176. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **29**

Το ομοπυρηνικό φάσμα COSY (Εικ. 177) καθόρισε την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, και των C-5, C-6, C-7, των C-9, C-11, C-12 και των C-14 και C-15.



Εικόνα 177. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **30**.



Εικόνα 178. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **30**.

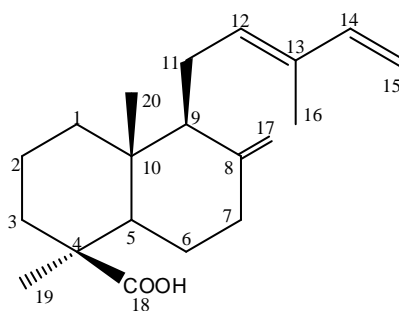
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για οξειδωμένο παράγωγο του **29** στη θέση 18, το γνωστό μεταβολίτη ισοκουπρεσσικό οξύ (Gardner et al. 1994), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 140, ενώ για πρώτη φορά γίνεται η πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 140 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **30** σε C₆D₆ (δ ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a	39.1	1.86 m
1b		1.71 m
2a	20.4	2.05 m
2b		1.44 m
3a	37.9	1.82 m
3b		1.66 m
4	44.1	-
5	56.6	1.10 m
6a	26.6	2.04 m
6b		1.92 m
7a	39.2	2.40 m
7b		0.87
8	147.7	-
9	56.3	1.50 m
10	40.8	-
11a	22.3	1.60 m
11b		1.45 m
12	38.7	2.23 m
13	138.7	-
14	124.5	5.429 tr (6.5)
15	59.2	3.994 d (6.8)
16	16.5	1.52 s
17a	106.8	4.82 brs
17b		4.34 brs
18	29.1	1.09 s
19	182.8	-
20	13.2	0.80 s

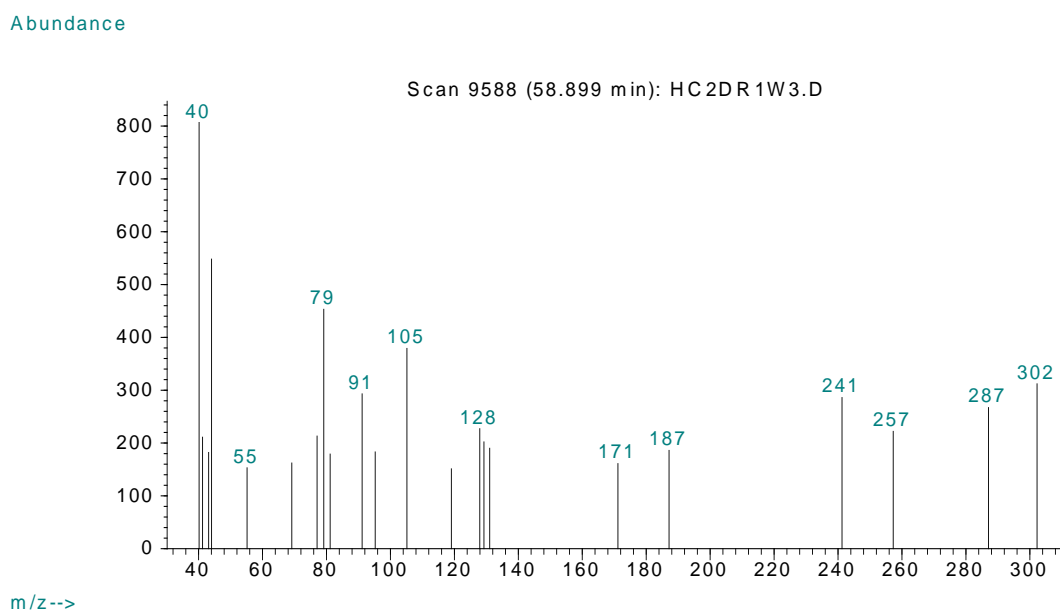
3.1.31. Μεταβολίτης 31: *trans*-Κομμουνικό οξύ

Ο μεταβολίτης **31** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 57.6 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **31** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₃₀O₂.



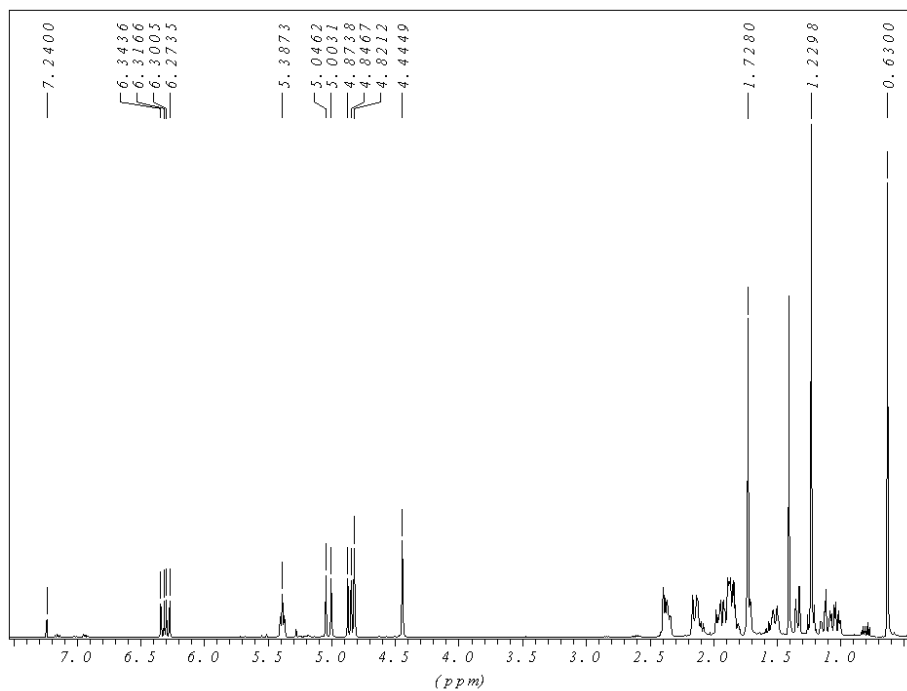
31

Το μοριακό ιόν [M]⁺ στο φάσμα μάζας (Εικ. 179) εμφανίσθηκε σε *m/z* 302.



Εικόνα 179. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **31**.

Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 180) παρατηρήθηκαν (i) τρεις απλές κορυφές σε δ 1.73, 1.23 και 0.63, που ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε τρία μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.82 και 4.45, που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου, (iii) χαρακτηριστικά σήματα ενός ABX συστήματος πρωτονίων σε δ 6.31 (dd 17.3, 10.8 Hz), δ 5.02 (d 17.4 Hz) και δ 4.86 (d 10.7 Hz) και (iv) μία τριπλή κορυφή ολεφινικού πρωτονίου σε δ 5.39 (tr, 6.4 Hz).



Εικόνα 180. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **31**.

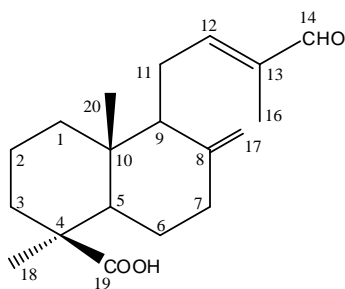
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη *trans*-κομμουνικό οξύ (Fukushima et al. 2002), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 141.

Πίνακας 141 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **31** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_{H}
12	5.39 tr (6.4)
14	6.31 dd (17.3, 10.8)
15a	5.02 d (17.4)
15b	4.86 d (10.7)
16	1.73 s
17a	4.82 s
17b	4.45 s
19	1.23 s
20	0.63 s

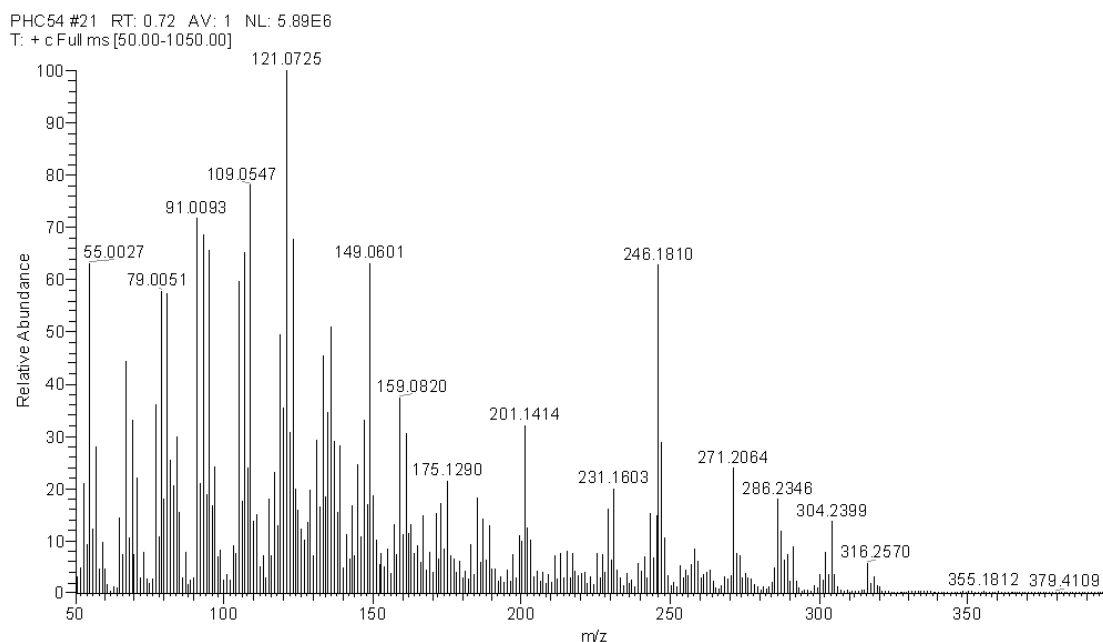
3.1.32. Μεταβολίτης 32: 15-νορ-Λαβδα-8(17),12*E*-διεν-14-καρβοξαλδεϋδ-19-οϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **32** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 0.5 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **32** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₉H₂₈O₃.



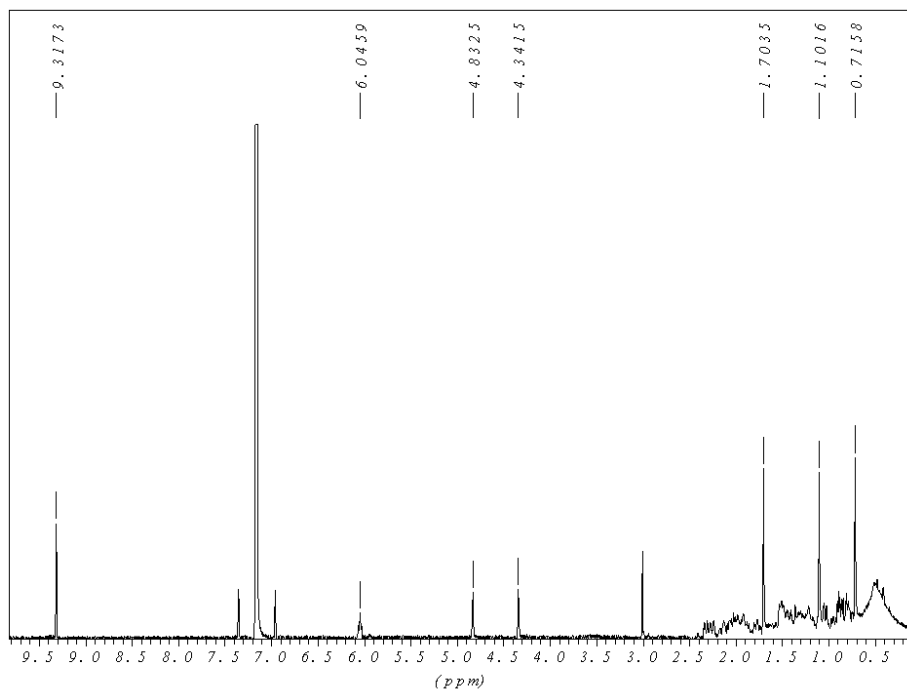
32

Το μοριακό ιόν [M]⁺ στο φάσμα μάζας (Εικ. 181) εμφανίστηκε σε *m/z* 304.



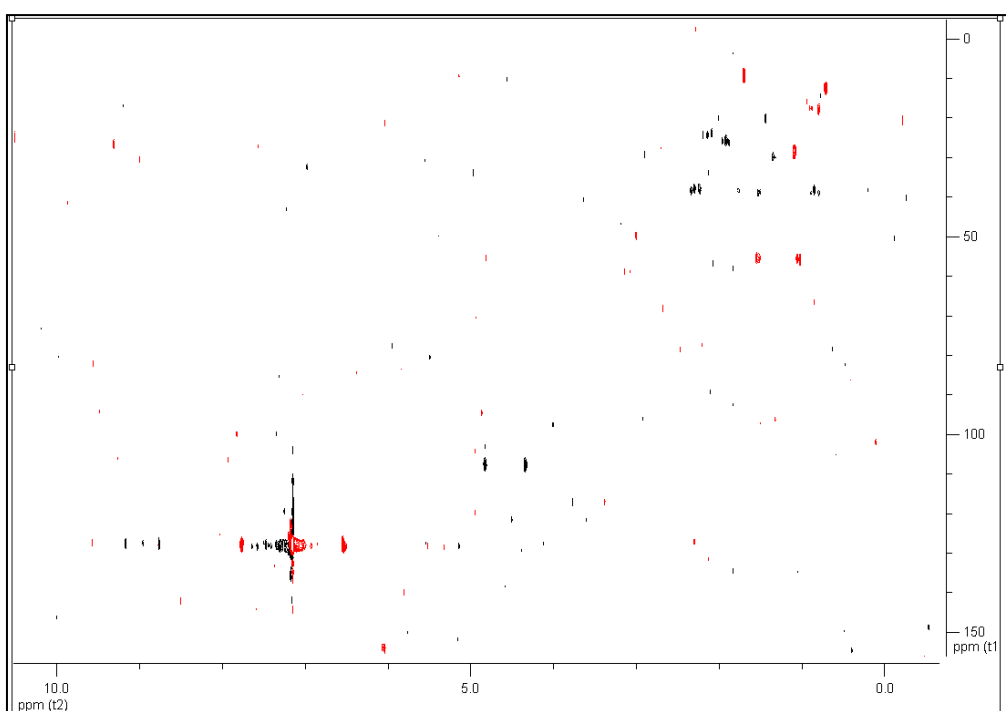
Εικόνα 181. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **32**.

Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 182) παρατηρήθηκαν (i) τρεις απλές κορυφές σε δ 1.70, 1.10 και 0.72, που αντιστοιχούσαν σε τρία μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία τριπλή κορυφή σε δ 6.05 (tr, 6.5 Hz), που αντιστοιχεί σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο, (iii) δύο απλές κορυφές σε δ 4.83 και 4.34, που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου, (iv) μία απλή κορυφή σε δ 9.32 και αντιστοιχούσε σε ένα αλδεϋδικό πρωτόνιο.



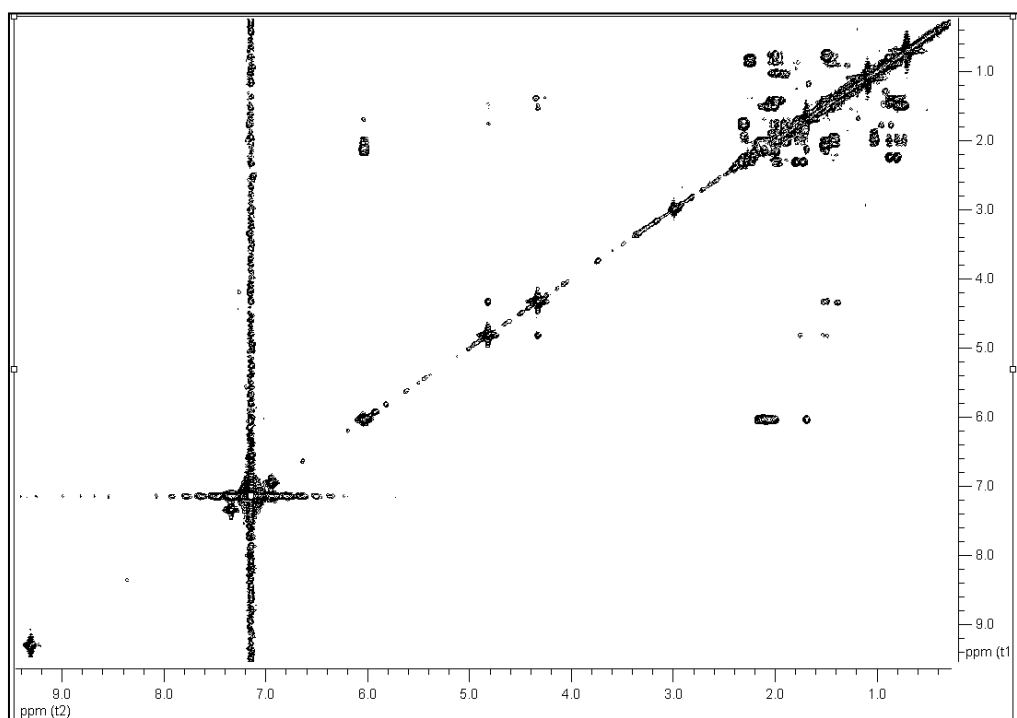
Εικόνα 182. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **32**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 183) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τριών μεθυλίων, επτά μεθυλενίων, εκ των οποίων το ένα ολεφινικό και τεσσάρων μεθινίων, ένα εκ των οποίων ολεφινικό και ένα αλδεϋδικό. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.



Εικόνα 183. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **32**.

Το ομοπυρηνικό φάσμα COSY (Εικ. 184) καθόρισε την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6, C-7 και των C-9, C-11, C-12.



Εικόνα 184. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **32**.

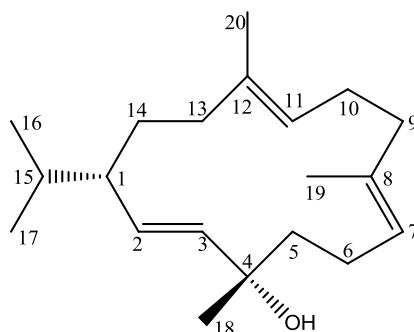
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 15-νορ-λαβδα-8(17),12E-διεν-14-καρβοξαλδεϋδ-19-οϊκό οξύ (Kobayashi et al. 1991), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 142, ενώ για πρώτη φορά γίνεται πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων. Δεν έχει γίνει ωστόσο απόδοση των τεταρτοταγών ανθράκων των θέσεων 4, 8, 10 και 13 και του καρβονυλικού άνθρακα της θέσης 19, εφόσον η ποσότητα στην οποία απομονώθηκε ο μεταβολίτης **32** δεν ήταν επαρκής για τη λήψη φάσματος HMBC.

Πίνακας 142 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **32** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a	38.5	0.79 m
1b		2.33 m
2a	20.8	1.43 m
2b		1.99 m
3a	37.5	0.85 m
3b		1.51 m
4	nd	-
5	55.7	1.04 m
6	25.9	1.91 m
7a	38.5	2.33 m
7b		1.76 m
8	nd	-
9	55.3	1.54 m
10	nd	-
11a	24.3	a. 2.19 m
11b		b. 2.14 m
12	154.3	6.03 tr (6.4)
13	nd	-
14	192.3	9.32 s
15	-	-
16	9.3	1.71 s
17a	107.4	a. 4.82 s
17b		b. 4.34 s
18	28.5	1.10 s
19	nd	-
20	12.6	0.70 s

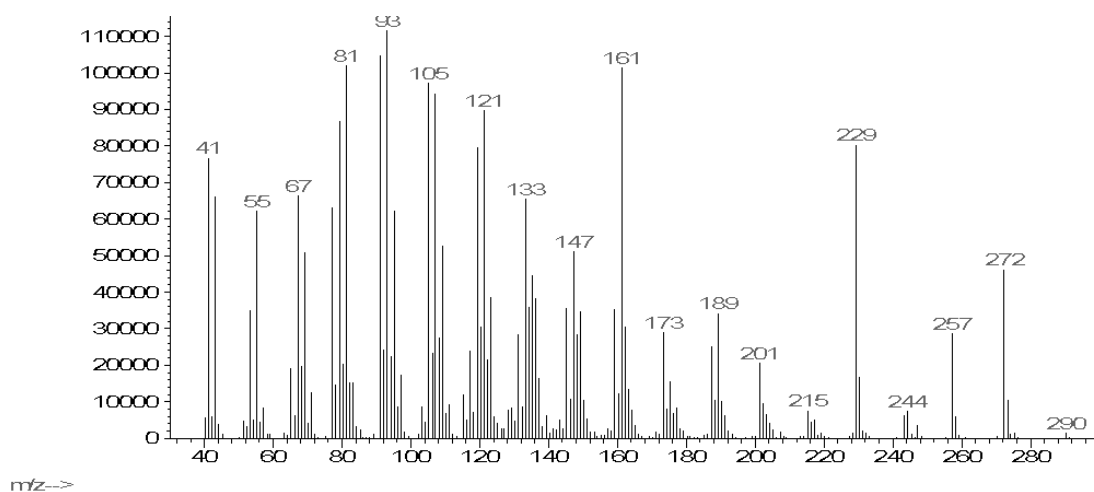
3.1.33. Μεταβολίτης 33: 4-επι-Ισοκεμβρόλη

Ο μεταβολίτης **33** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 22.4 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **33** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₃₄O.



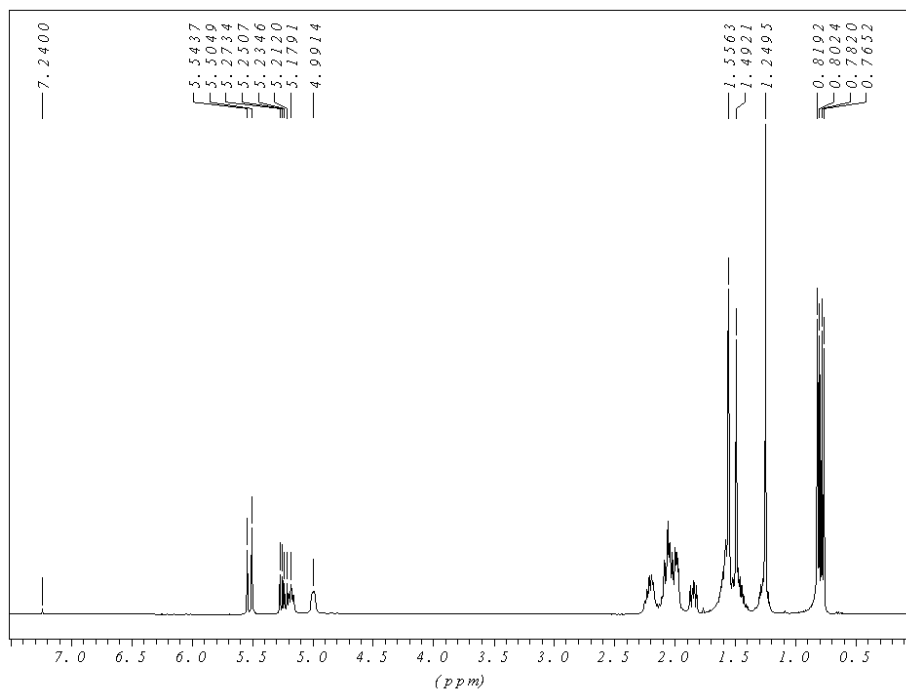
33

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **33** (Εικ. 185) εμφάνισε μοριακό ιόν [M]⁺ σε *m/z* 290 και θραύσμα [M-H₂O]⁺ σε *m/z* 272.



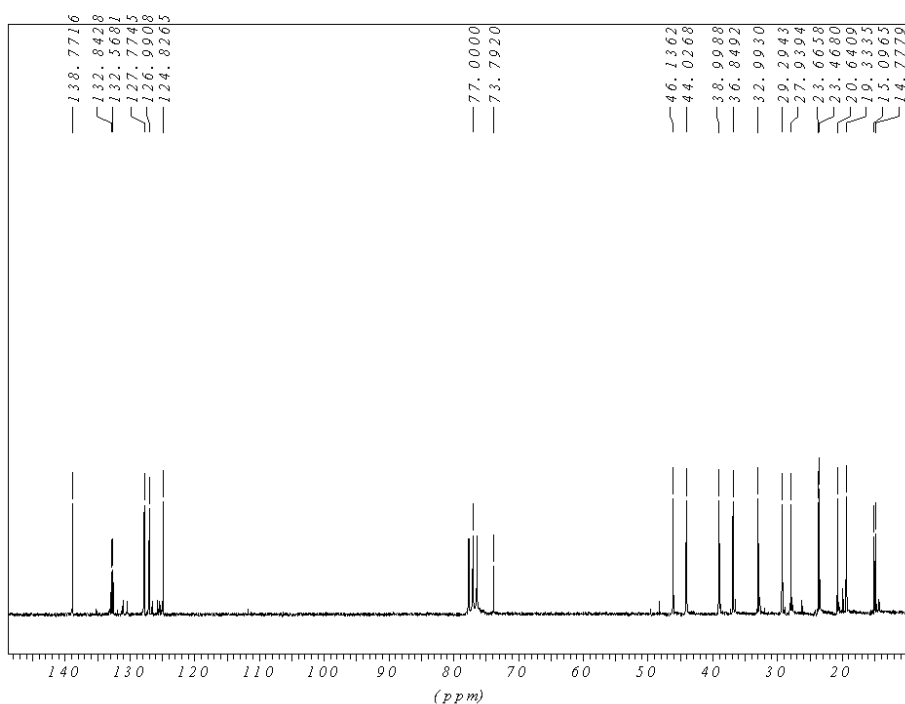
Εικόνα 185. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **33**.

Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **33** (Εικ. 186) παρατηρήθηκαν (i) τρεις απλές κορυφές σε δ 1.56, 1.49 και 1.25, που ολοκληρώναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε τρία μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) δύο διπλές κορυφές σε δ 0.81 και 0.77, που η κάθε μία αντιστοιχεί σε ένα μεθύλιο σε τριτοταγή άνθρακα και (iii) χαρακτηριστικά σήματα τεσσάρων ολεφινικών πρωτονίων σε δ 5.52 (d, 15.4 Hz), 5.24 (dd, 15.4, 9.1 Hz), 5.18 (tr, 7.4 Hz) και 5.00 (brs).



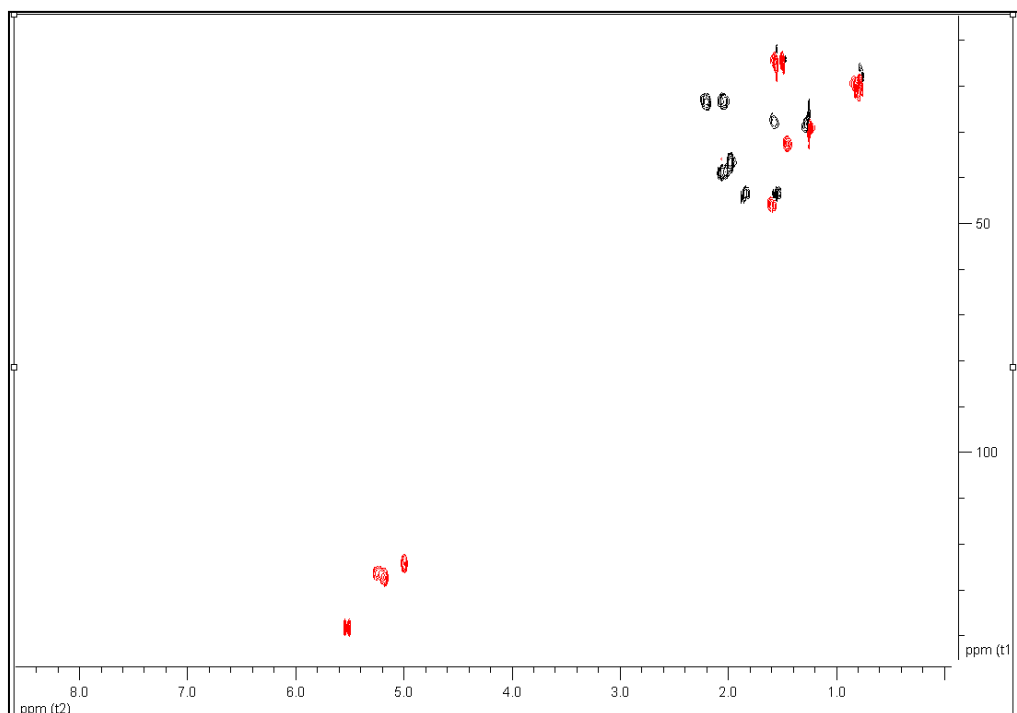
Εικόνα 186. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **33**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **33** (Εικ. 187) εμφανίσθηκαν είκοσι κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε πέντε πρωτοταγή, έξι δευτεροταγή, έξι τριτοταγή και τρία τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν έξι ολεφινικά άτομα άνθρακα σε δ 126.9, 124.4 127.3, 133.2, 133.7 και 138.8 καθώς και ένα τεταρτοταγές οξυγονωμένο άτομο άνθρακα στα 73.8 ppm.



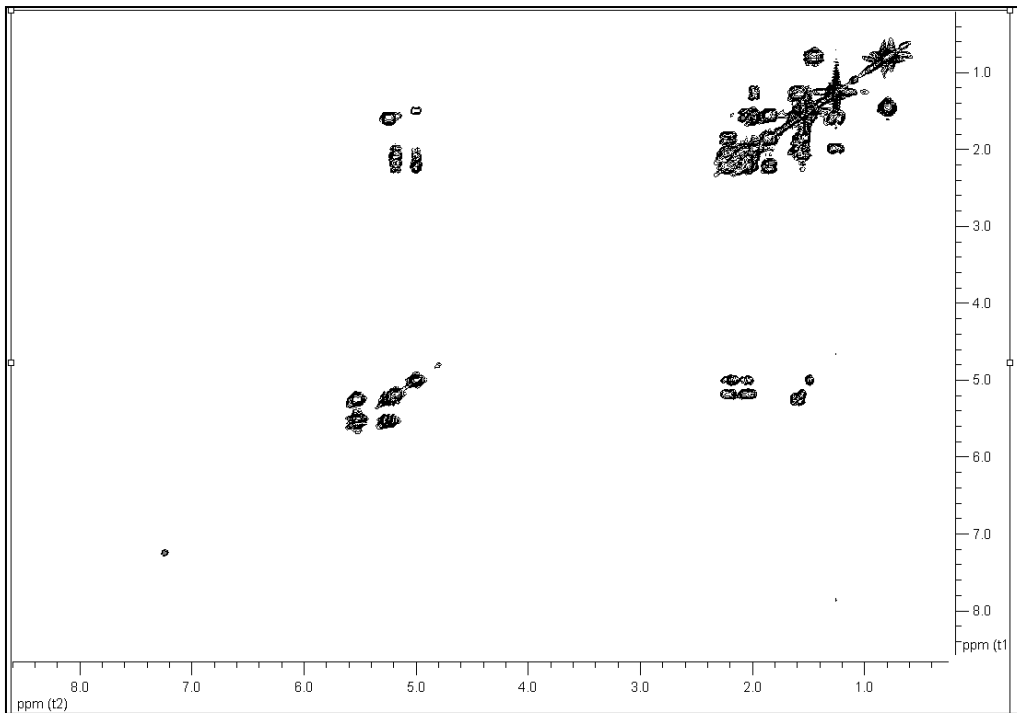
Εικόνα 187. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **33**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 188) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά πέντε μεθυλίων, έξι μεθυλενίων και έξι μεθινίων, τέσσερα εκ των οποίων ολεφινικά. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

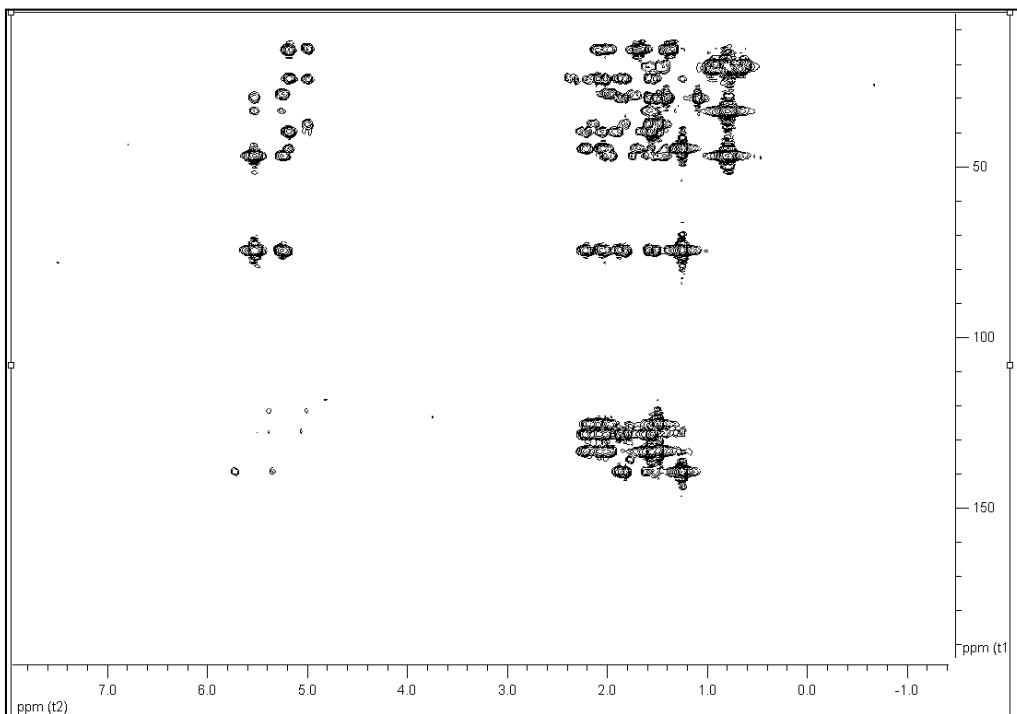


Εικόνα 188. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **33**.

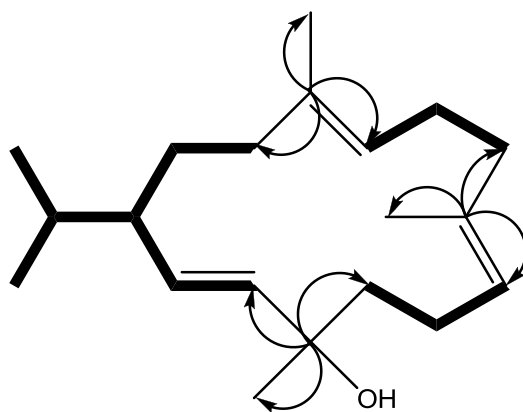
Το ομοπυρηνικό φάσμα COSY (Εικ. 189) καθόρισε την αλληλουχία των C-13, C-14, C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6 και C-7 και των C-9, C-10 και C-11, ενώ με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC (Εικ. 191) προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο. Στην εικόνα 192 διακρίνονται οι βασικές συσχετίσεις COSY και HMBC του μεταβολίτη **33**.



Εικόνα 189. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 33



Εικόνα 190. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 33.



Εικόνα 191. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **33**.

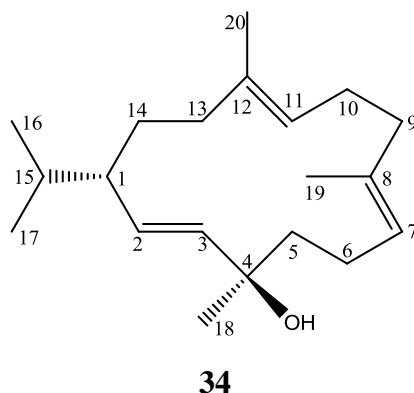
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 4-επι-ισοκεμβρόλη (Wahlberg et al. 1981), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 143, ενώ για πρώτη φορά γίνεται η πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 143 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **33** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

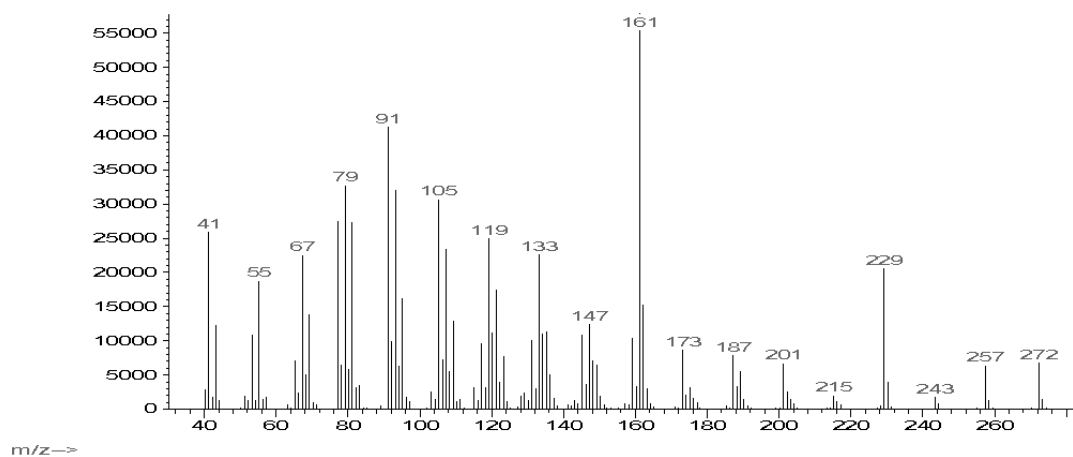
Θέση	δ_C	δ_H
1	46.1	1.59 m
2	126.9	5.25 dd (15.5, 9.0)
3	138.8	5.52 d (15.5)
4	73.8	-
5a		1.85 ddd (13.2, 8.7, 1.9)
5b	44.0	1.55 m
6	23.5	2.20 m
7	124.4	5.00 brs
8	133.2	-
9	36.7	1.98 m
10a		2.20 m
10b	23.1	2.05 m
11	127.3	5.17 brs
12	133.7	-
13	39.0	2.06 m
14	27.9	1.57 m
15	32.8	1.46 septet (6.7)
16	20.2	0.82 d (6.8)
17	19.2	0.78 d (6.7)
18	29.3	1.25 s
19	14.7	1.49 s
20	15.0	1.56 s

3.1.34. Μεταβολίτης 34: Ισοκεμβρόλη (Θουνμπεργκόλη)

Ο μεταβολίτης **34** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 35.1 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **34** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₃₄O.

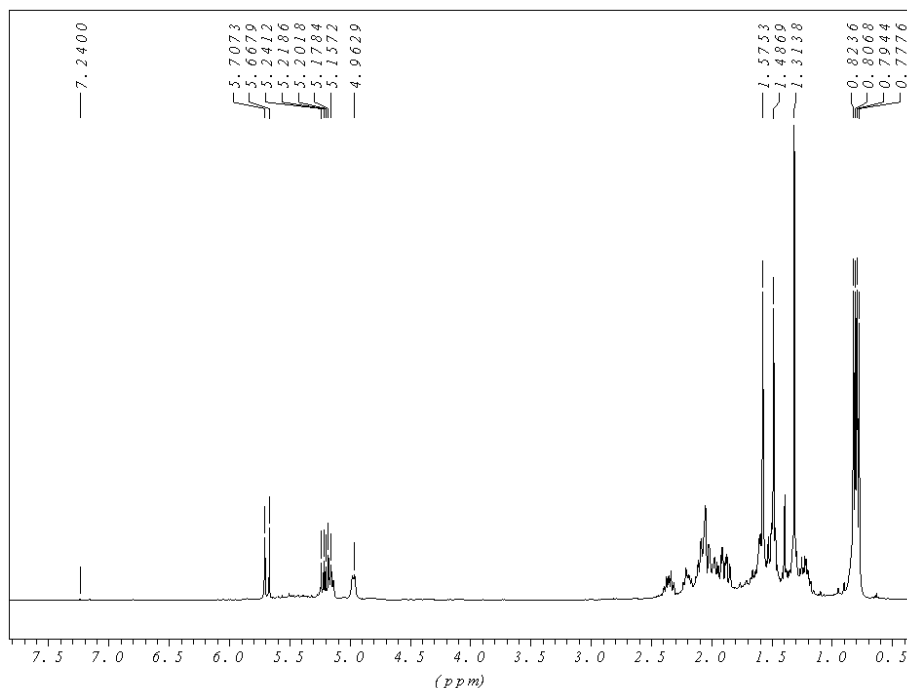


Στο φάσμα μάζας (Εικ. 192) εμφανίσθηκε το θραύσμα [M-H₂O]⁺ σε *m/z* 272.



Εικόνα 192. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **34**.

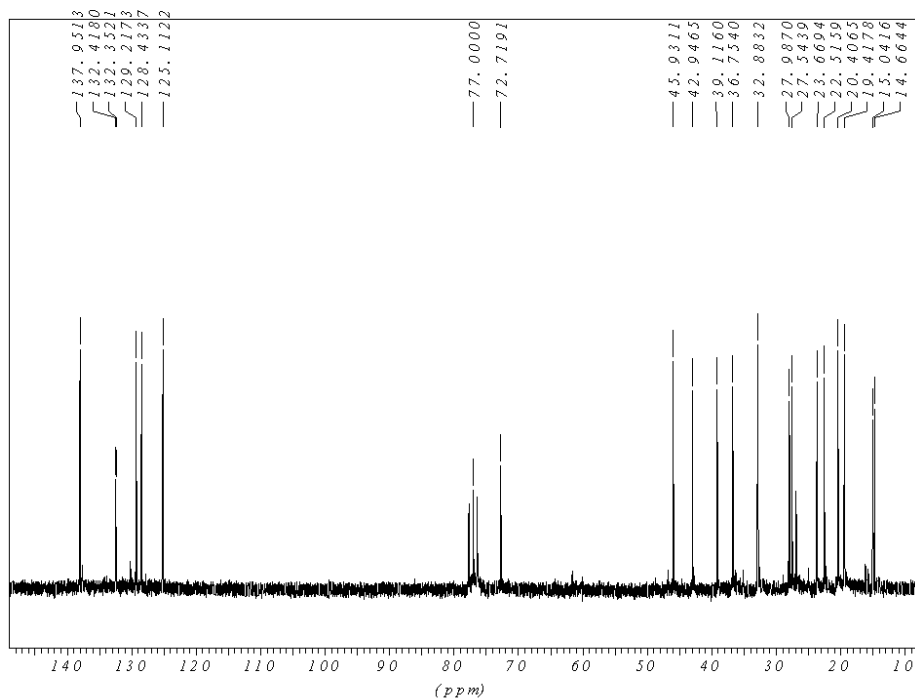
Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 193) του μεταβολίτη **34** παρατηρήθηκαν (i) τρεις απλές κορυφές σε δ 1.58, 1.49 και 1.31, που ολοκληρώναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε τρία μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) δύο διπλές κορυφές σε δ 0.82 (6.7 Hz) και 0.79 (6.8 Hz), που η κάθε μία αντιστοιχεί σε ένα μεθύλιο σε τριτοταγή άνθρακα και (iii) χαρακτηριστικά σήματα τεσσάρων ολεφινικών πρωτονίων σε δ 5.68 (d, 15.7 Hz), 5.23 (dd, 15.7, 9.1 Hz), 5.16 (tr, 7.4 Hz) και 4.96 (brs).



Εικόνα 193. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **34**.

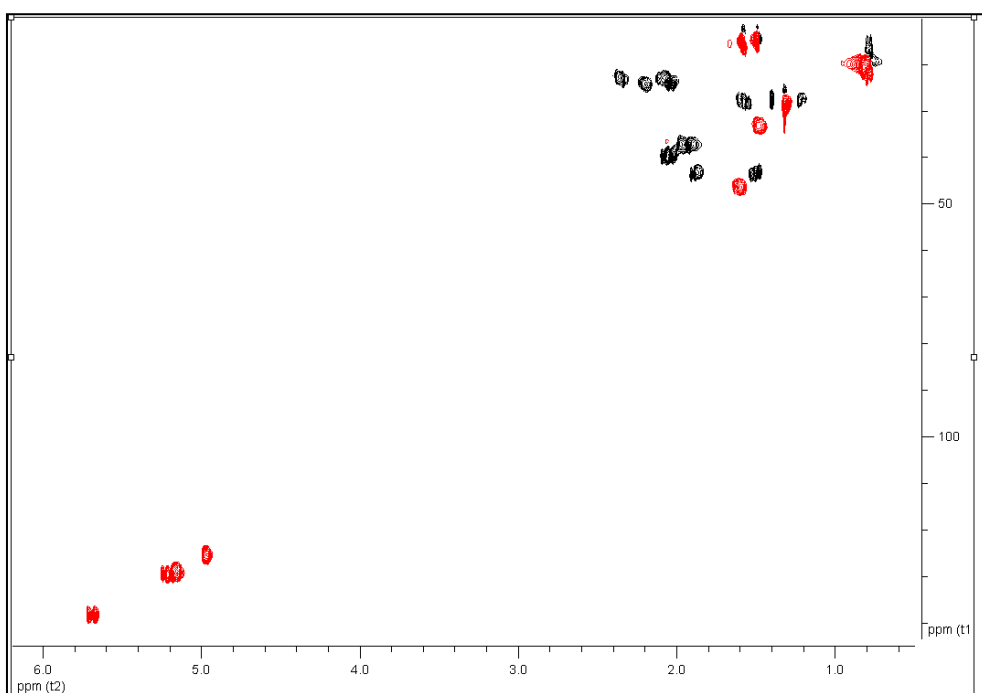
Στο φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **34** (Εικ. 194) εμφανίσθηκαν είκοσι κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε πέντε πρωτοταγή, έξι δευτεροταγή, έξι τριτοταγή και τρία τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν έξι ολεφινικά άτομα άνθρακα σε δ 125.3, 128.9, 129.6, 132.3, 132.4 και 138.3 καθώς και ένα τεταρτοταγές οξυγονωμένο άτομο άνθρακα στα 72.8 ppm.

Με βάση τα φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR είναι προφανές ότι οι μεταβολίτες **33** και **34** εμφανίζουν δομική ομοιότητα και συγκεκριμένα έχουν τον ίδιο συντακτικό τύπο, όπως επιβεβαιώνεται από τα δισδιάστατα φάσματα HSQC-DEPT και COSY (Εικ. 193 και 194).



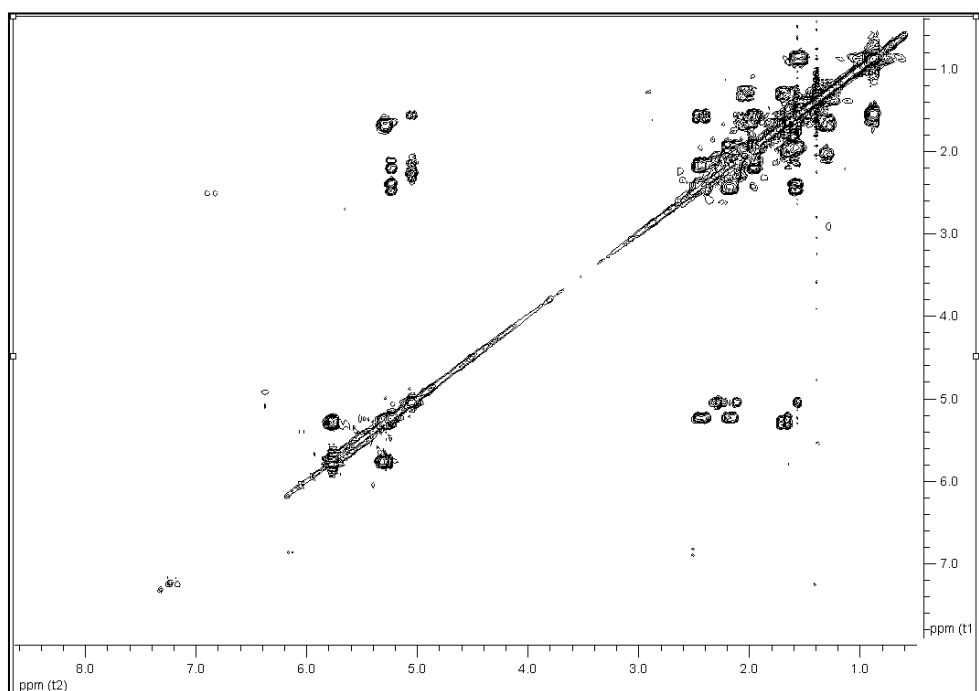
Εικόνα 194. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **34**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 195) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά πέντε μεθυλίων, έξι μεθυλενίων και έξι μεθινίων, τέσσερα εκ των οποίων ολεφινικά. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.



Εικόνα 195. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **34**.

Το ομοπυρηνικό φάσμα COSY (Εικ. 196) επιβεβαίωσε την αλληλουχία των C-13, C-4, C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6 και C-7 και των C-9, C-10 και C-11.



Εικόνα 196. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **34**.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα ήταν εμφανής η δομική ομοιότητα των μεταβολιτών **33** και **34**. Η κύρια διαφορά τους στο φάσμα ^1H NMR εντοπίστηκε στο γεγονός ότι τα τα μεθυλικά πρωτόνια H₃-18 του μεταβολίτη **34** συντονίζονται σε χαμηλότερα πεδία (1.32 ppm), ενώ τα ομόλογα πρωτόνια του μεταβολίτη **33** εμφανίζονται σε υψηλότερα πεδία (1.25 ppm), όπως και το ολεφινικό πρωτόνιο, H-3, η κορυφή του οποίου διακρίνεται επίσης σε χαμηλότερα πεδία (5.68 ppm, d 15.7 Hz), συγκριτικά με το ανάλογο πρωτόνιο του μεταβολίτη **33** (5.52, d 15.4 Hz). Παρά την ομοιότητα που εμφανίζουν και τα φάσματα ^{13}C NMR των δυο μεταβολιτών, δύο είναι οι σημαντικότερες διαφορές που παρατηρούνται σε αυτά: ο C-2 συντονίζεται δ 129.6, ενώ στο μεταβολίτη **33**, ο άνθρακας αυτός εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία (126.6 ppm). Επίσης, ο οξυγονωμένος τεταρτοταγής C-4, συντονίζεται σε υψηλότερα πεδία (72.7 ppm) συγκριτικά με τον C-4 του μεταβολίτη **32** (74.6 ppm).

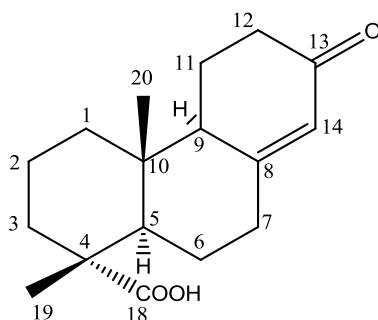
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας, διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη ισοκεμβρόλη (Wahlberg et al. 1981), το 4-επιμερές του μεταβολίτη **33**, τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 144, ενώ για πρώτη φορά γίνεται η πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 144 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **34** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1	46.4	1.60 m
2	129.6	5.23 dd (15.7, 9.1)
3	138.3	5.68 d (15.7)
4	72.7	-
5a	43.5	1.89 m
5b		1.50 m
6	24.1	2.19 m
7	125.3	4.96 m
8	132.3	-
9a	37.1	1.97 m
9b		1.58 m
10a	22.8	2.36 m
10b		2.07 m
11	128.9	5.16 tr (7.3)
12	132.4	-
13	39.7	2.06 m
14	28.0	1.56 m
15	33.2	1.49 m
16	20.5	0.82 d (6.7)
17	19.2	0.79 d (6.8)
18	28.7	1.31 s
19	14.7	1.50 s
20	15.7	1.58 s

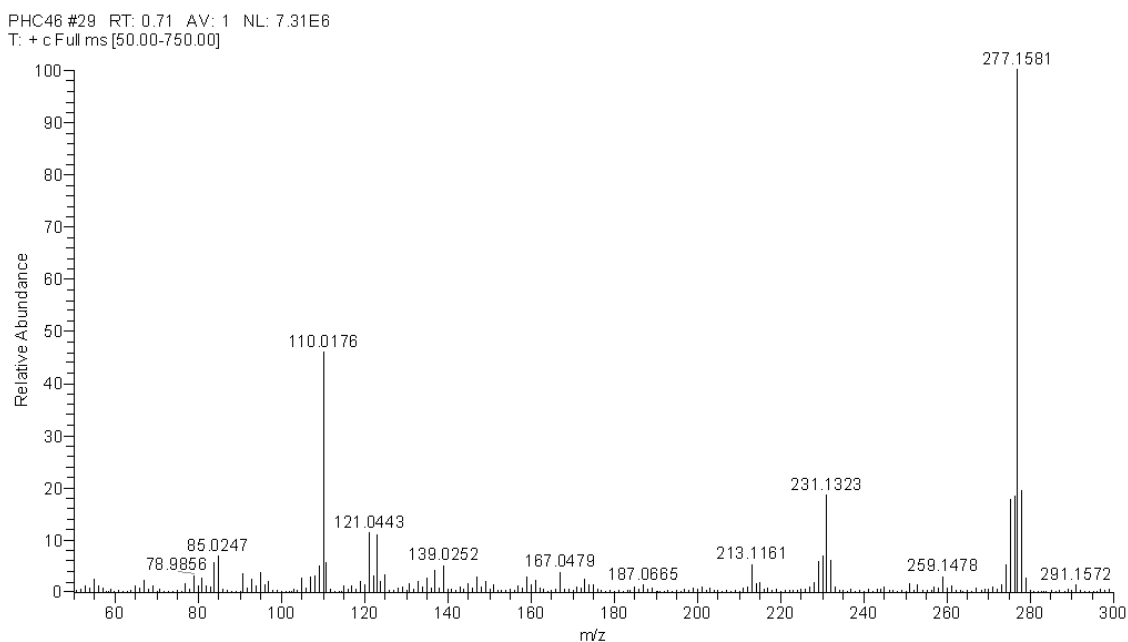
3.1.35. Μεταβολίτης 35: 13-Οξο-8(14)-ποδοκαρπεν-18-οϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **35** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 7.0 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **35** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₇H₂₄O₃.



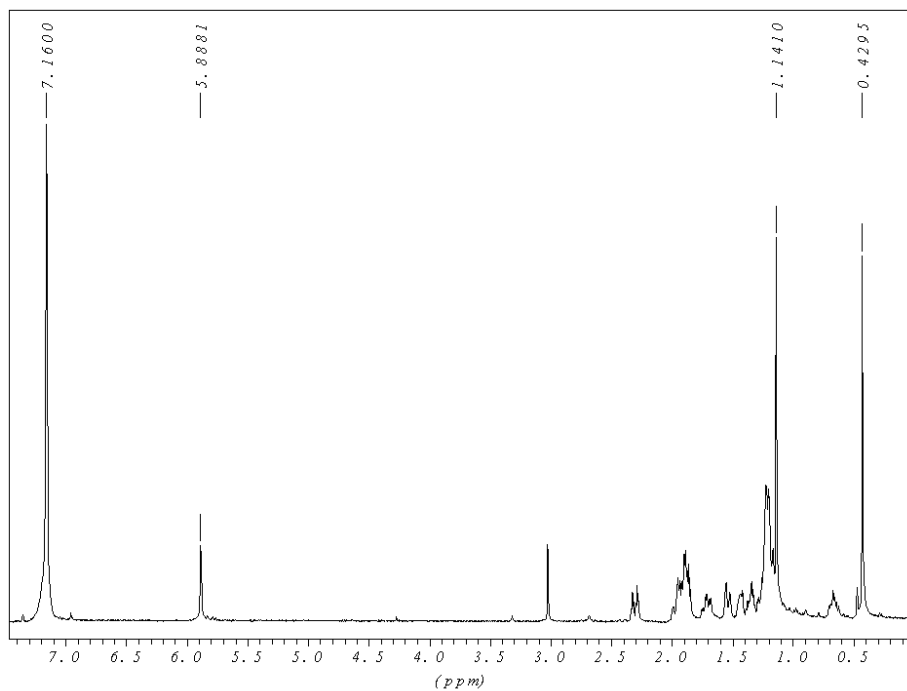
35

Το ψευδομοριακό ιόν [M+1] στο φάσμα μάζας του μεταβολίτη **35** εμφανίζεται σε m/z 277, ενώ το θραύσμα σε m/z 231 προκύπτει κατόπιν απόσπασης μίας ομάδας καρβοξυλίου (Εικ. 197).



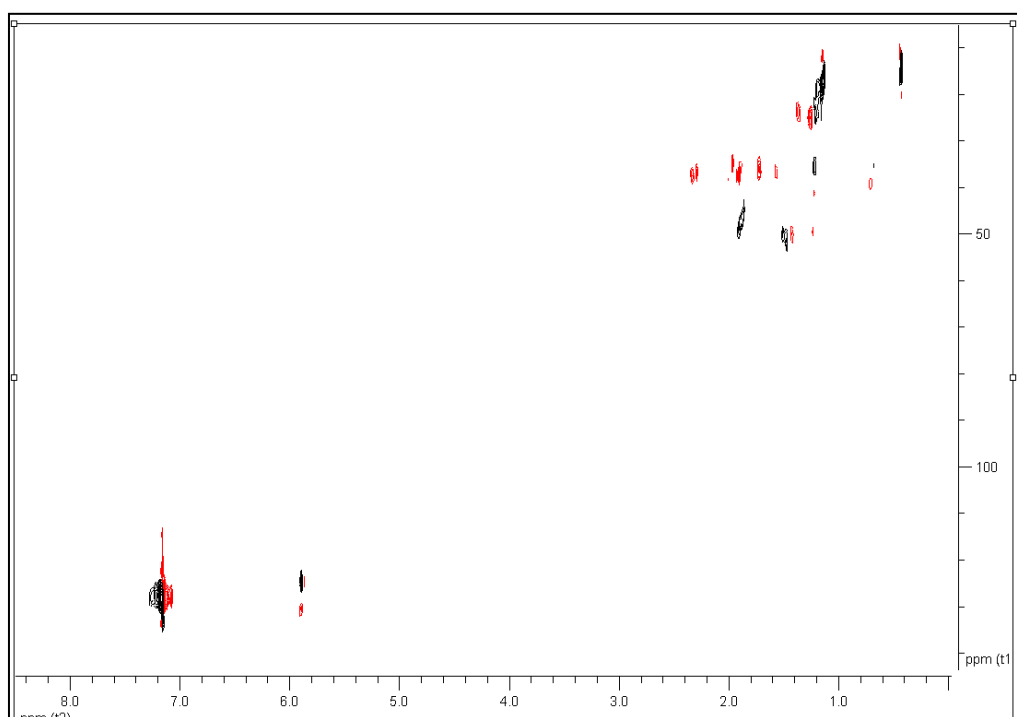
Εικόνα 197. Φάσμα μάζας (PCIMS) του μεταβολίτη **35**.

Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **35** (Εικ. 198) παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 0.43 και 1.14, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία απλή κορυφή σε δ 5.89, που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο.



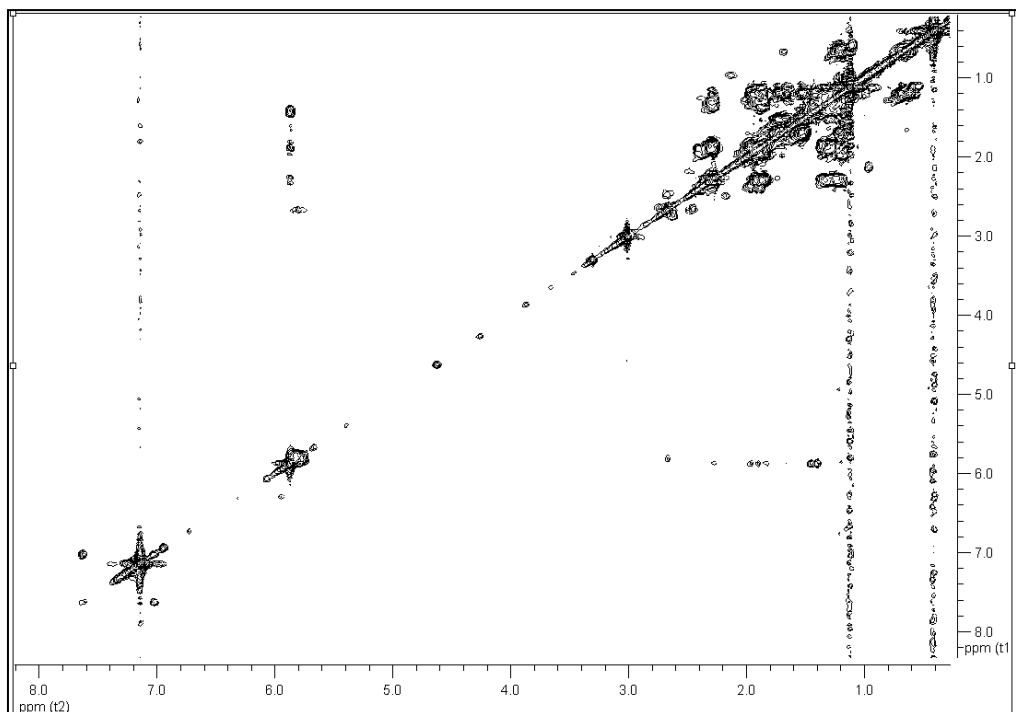
Εικόνα 198. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **35**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 199) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά δύο μεθυλίων, επτά μεθυλενίων και τριών μεθινίων, ένα εκ των οποίων ολεφινικό. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

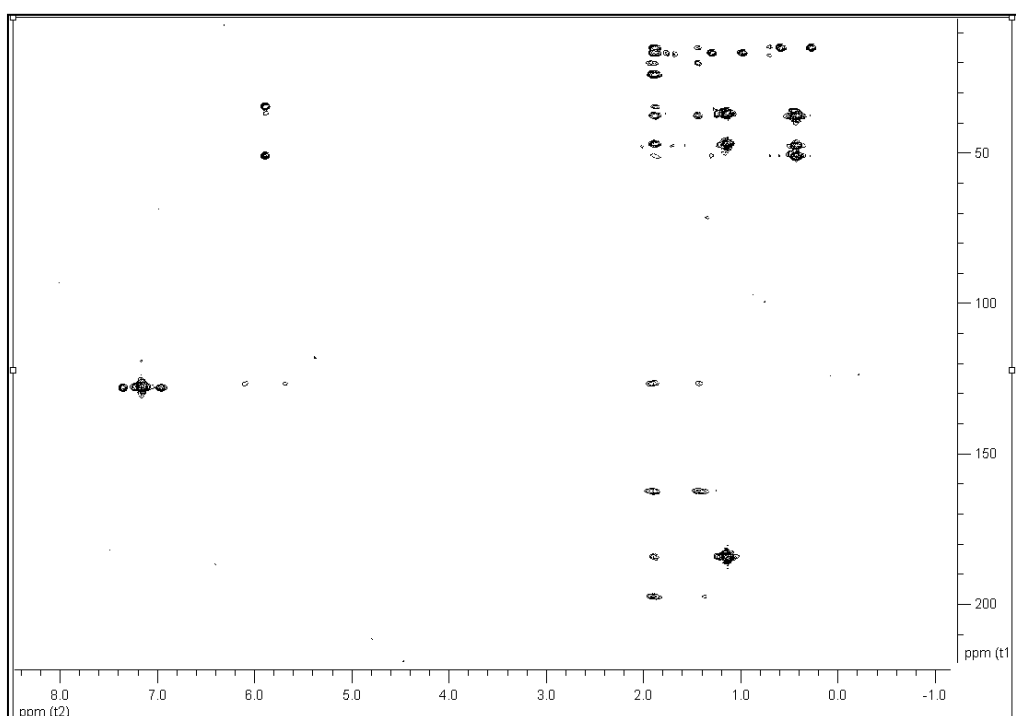


Εικόνα 199. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **35**.

Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις στο φάσμα COSY (Εικ. 200) των πρωτονίων H₂-1/H₂-2, H₂-2/H₂-3, H-5/H₂-6, H₂-6/H₂-7, H-9/H₂-11 και H₂-11/H₂-12 και H₂-10/H₂-11 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2, C-3 των C-5, C-6, C-7 και των C-9, C-11 και C-12, ενώ οι συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC (Εικ. 201) επιβεβαίωσαν τη θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο.



Εικόνα 200. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 35.



Εικόνα 201. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 35.

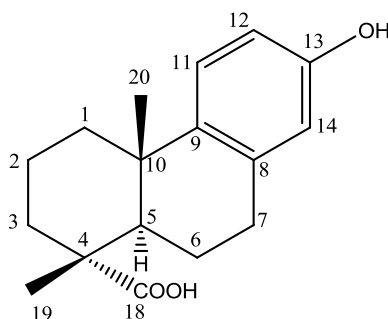
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 8(14)-ποδοκαρπέν-13-ον-18-οϊκό οξύ (Cheung et al. 1993), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 145, ενώ για πρώτη φορά γίνεται η πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 145 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **35** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1	37.5	1.92 m
2	25.1	1.26 m
3a		1.71 m
3b	36.3	1.57 ddd (12.7, 4.9)
4	47.4	-
5	46.8	1.88 m
6	23.8	1.32 m
7a		2.32 ddd (15.6, 4.1)
7b	36.8	1.96 m
8	162.5	-
9	50.6	1.49 m
10	37.8	-
11	25.3	1.20 m
12a		2.00 m
12b	38.7	0.71 m
13	197.3	-
14	124.2	5.89 m
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	183.7	-
19	16.1	1.14 s
20	14.7	0.43 s

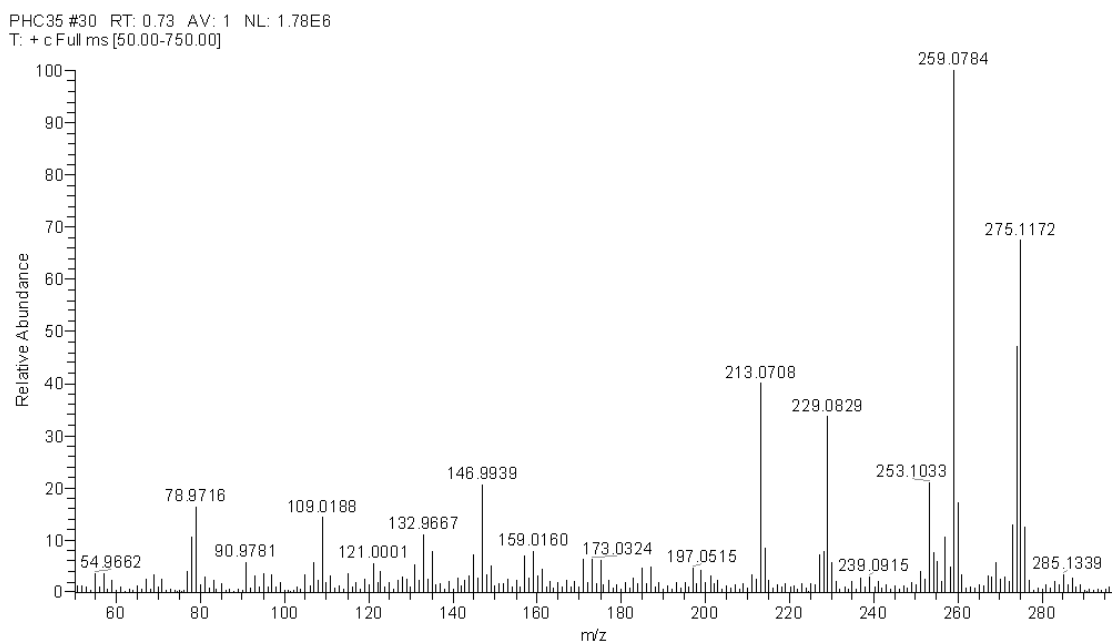
3.1.36. Μεταβολίτης 36: 13-Υδροξυ-8,11,13-ποδοκαρπατριεν-18-οϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **36** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 1.5 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **36** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₇H₂₂O₃.



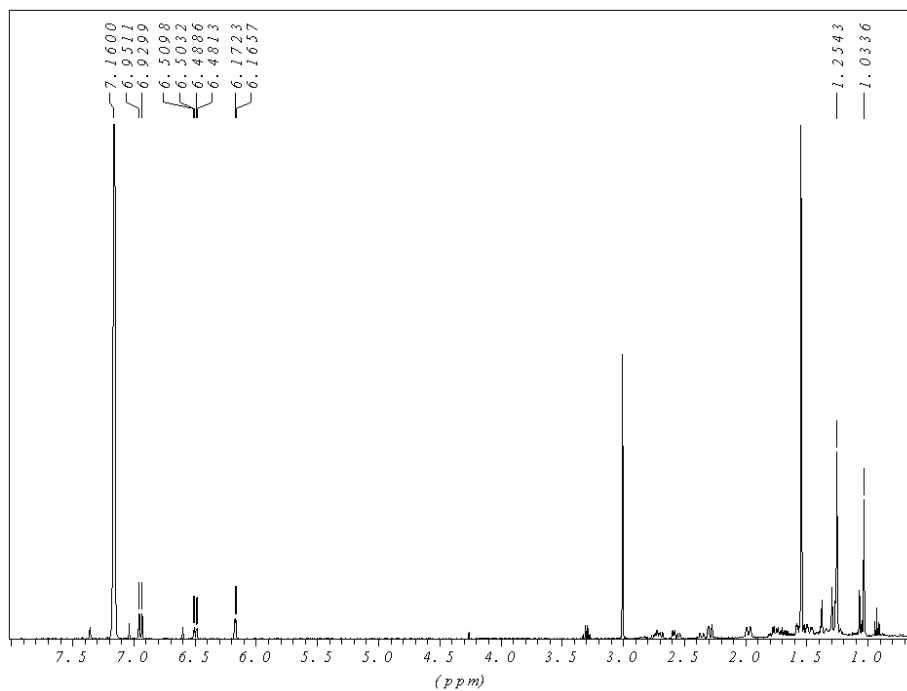
36

Το ψευδομοριακό ιόν [M+1] στο φάσμα μάζας του μεταβολίτη **36** εμφανίστηκε σε m/z 259.



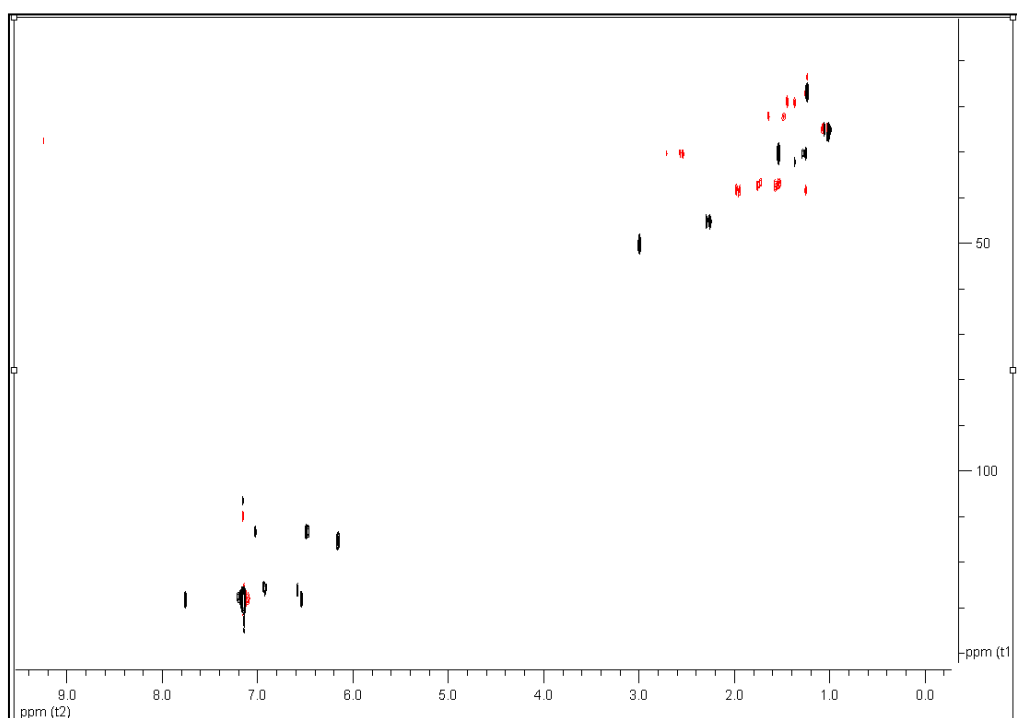
Εικόνα 202. Φάσμα μάζας (PCIMS) του μεταβολίτη **36**.

Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **36** (Εικ. 203) παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.03 και 1.25, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα και (ii) κορυφές τριών αρωματικών πρωτονίων σε δ 6.17 (d, 2.6 Hz), 6.49 (dd, 8.5, 2.7 Hz) και δ 6.94 (d, 8.6 Hz).



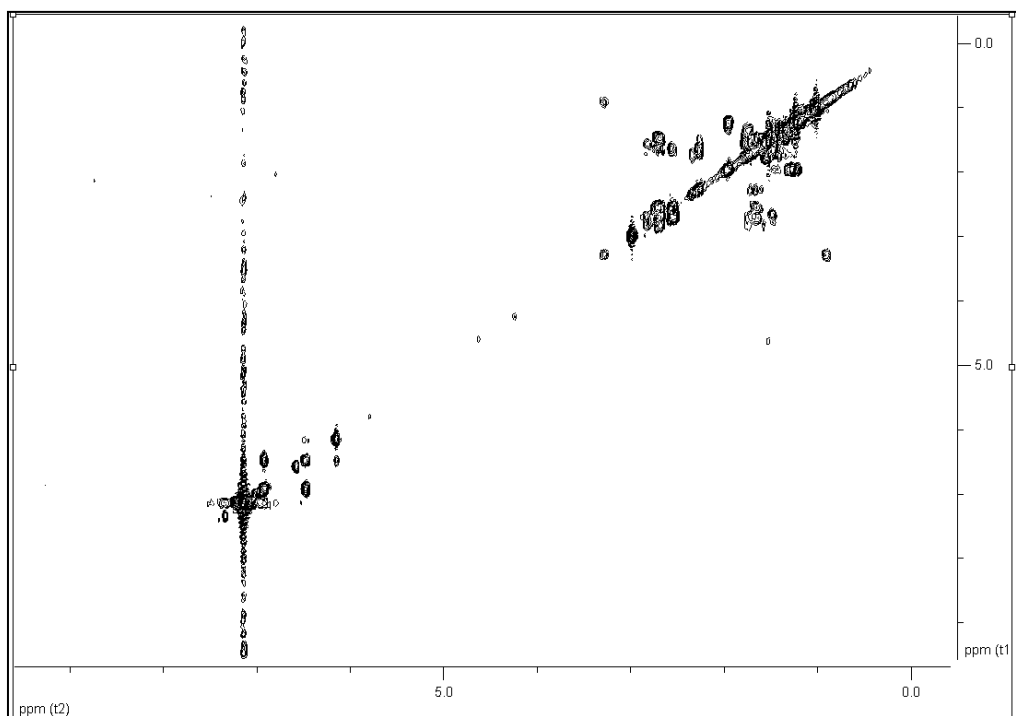
Εικόνα 203. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **36**.

Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 204) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά δύο μεθυλίων, πέντε μεθυλενίων και τεσσάρων μεθινίων, τρία εκ των οποίων αρωματικά. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.

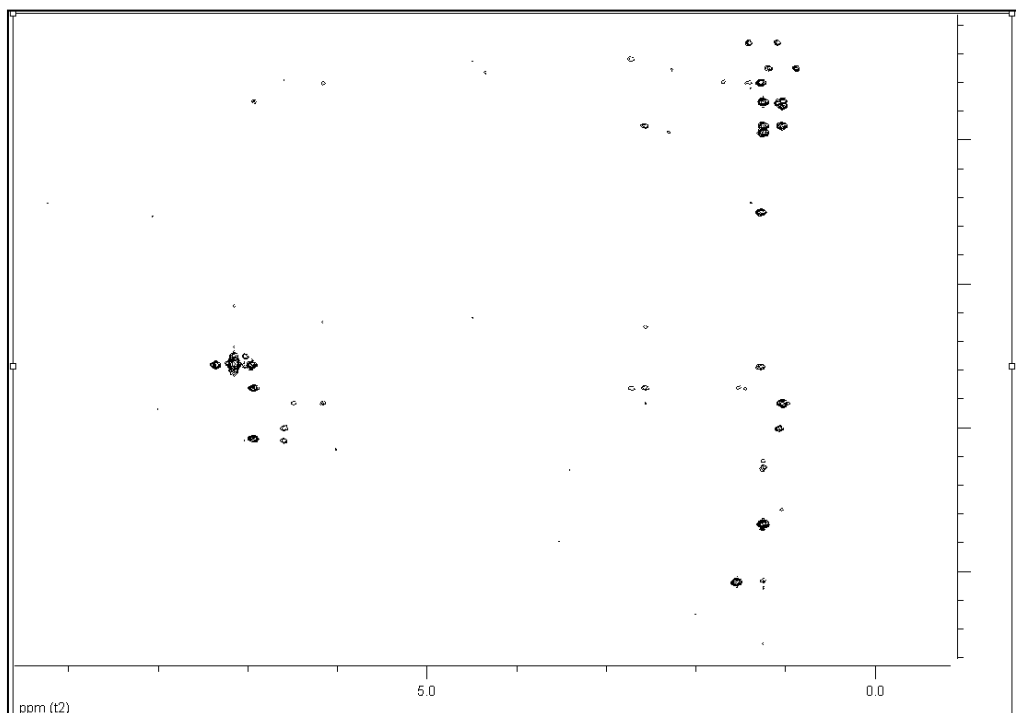


Εικόνα 204. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **36**.

Το ομοπυρηνικό φάσμα COSY (Εικ. 205) καθόρισε την αλληλουχία των θέσεων 1, 2, 3 και των 5, 6, 7, ενώ οι συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC (Εικ. 206) επιβεβαίωσαν τη θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο, χωρίς εντούτοις να προσδιορίζεται ο τεταρτοταγής άνθρακας της θέσης 10.



Εικόνα 205. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **36**.



Εικόνα 206. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **36**.

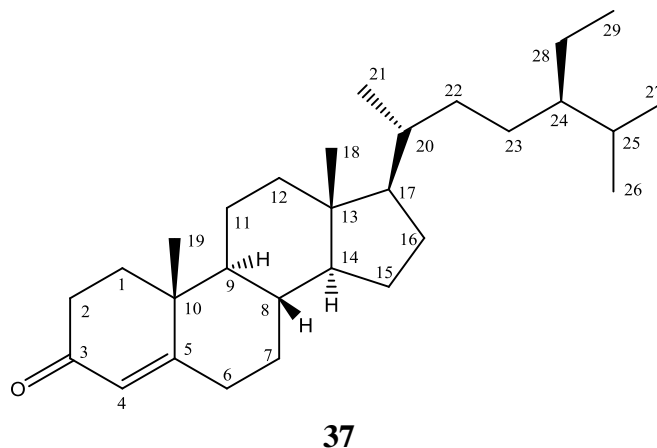
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 13-υδρόξυ-8,11,13-ποδοκαρπέν-18-οϊκό οξύ (Cheung et al. 1993), τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 146, ενώ για πρώτη φορά γίνεται η πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων.

Πίνακας 146 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **36** σε C₆D₆ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

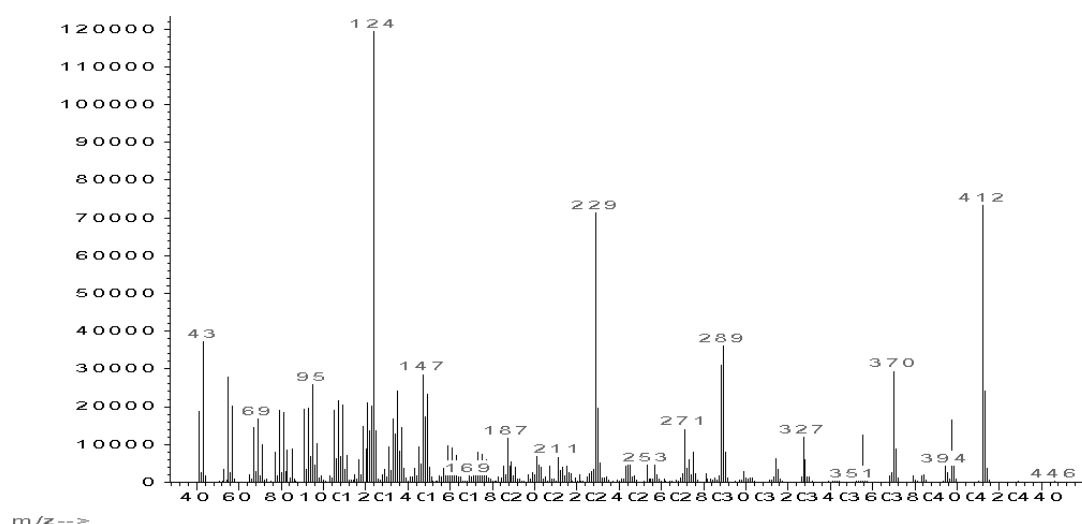
Θέση	δ _C	δ _H
1	38.4	1.96 m
2a	18.2	1.45 m
2b		1.36 m
3a	36.5	1.45 m
3b		1.36 m
4	47.8	-
5	45.0	2.27 dd (12.3, 2.0)
6a	22.2	1.64 m
6b		1.48 m
7a	30.3	2.72 m
7b		2.58 brd (6.4)
8	135.9	-
9	141.5	-
10	nd	-
11	126.0	6.94 d (8.6)
12	113.1	6.49 dd (8.5, 2.7)
13	154.2	-
14	115.4	6.17 d (2.6)
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	183.7	-
19	17.0	1.25 s
20	25.4	1.03 s

3.1.37. Μεταβολίτης 37: 4-Στιγμαστεν-3-όνη

Ο μεταβολίτης **37** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 1.5 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **37** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₉H₄₈O.



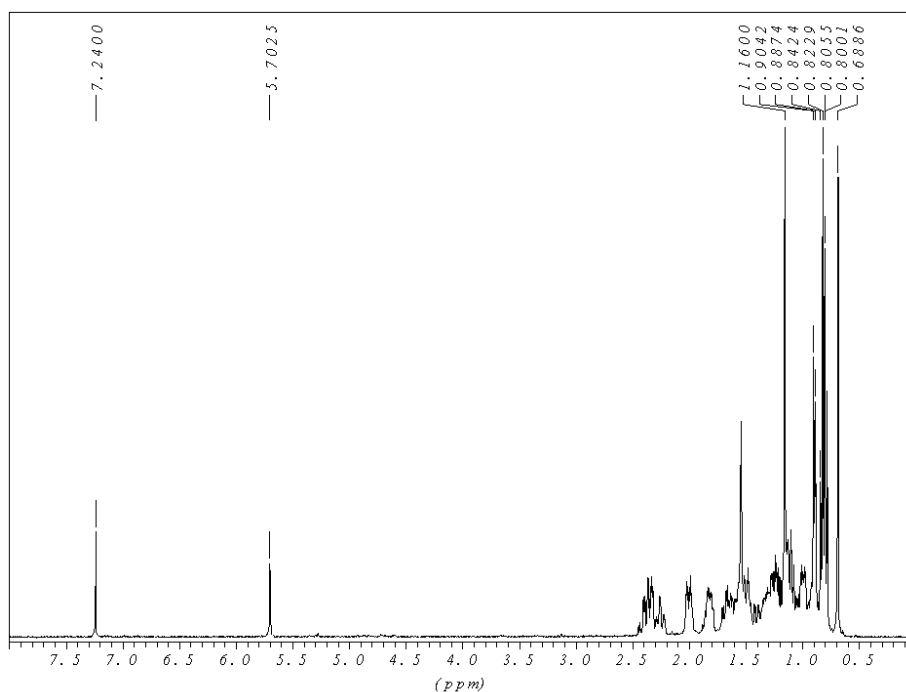
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **37** (Εικ. 207) εμφάνισε μοριακό ιόν [M]⁺ σε *m/z* 412, ενώ το θραύσμα σε *m/z* 397 υποδηλώνει την απόσπαση μίας ρίζας οξυγόνου.



Εικόνα 207. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **37**.

Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **37** (Εικ. 208) παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 0.69 και 1.16, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) τρεις απλές κορυφές σε δ 0.89 (d, 6.5 Hz), 0.83 (d, 7.6 Hz) και 0.79 (d, 6.9 Hz), η οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια τριών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα, (iii) μία τριπλή κορυφή σε δ 0.82 (tr, 7.6 Hz), που

αντιστοιχούσε σε ένα μεθύλιο σε δευτεροταγές άτομο άνθρακα και (iv) μία απλή κορυφή σε δ 5.70, που αντιστοιχούσε σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο.



Εικόνα 208. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **37**.

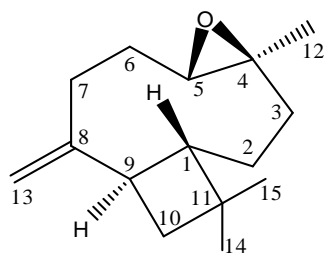
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική έρευνα που ακολούθησε, αποδείχθηκε ότι ο μεταβολίτης **37** αντιστοιχούσε στο γνωστό στεροειδές 4-στιγμαστεν-3-όνη (Kontiza et al. 2006). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H -NMR του μεταβολίτη **37** παρατίθενται στον Πίνακα 147.

Πίνακας 147 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **37** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_{H}
4	5.70 s
18	0.69 s
19	1.16 s
21	0.89 d (6.5)
26	0.83 d (7.6)
27	0.79 d (6.9)
29	0.82 tr (7.6)

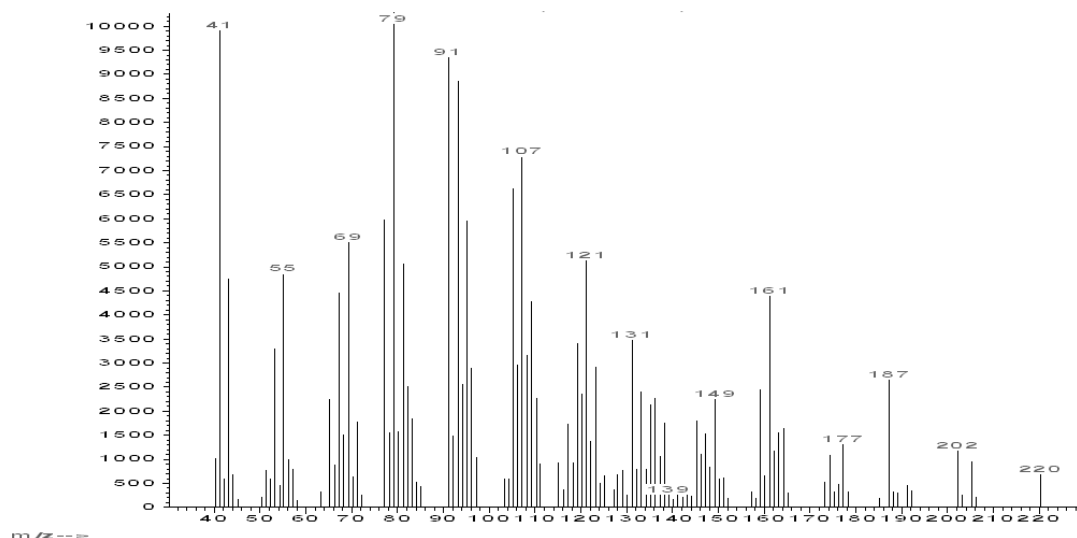
3.1.38. Μεταβολίτης 38: Οξείδιο του καρνοφυλλενίου

Ο μεταβολίτης **38** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 63.2 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **38** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₅H₂₄O.



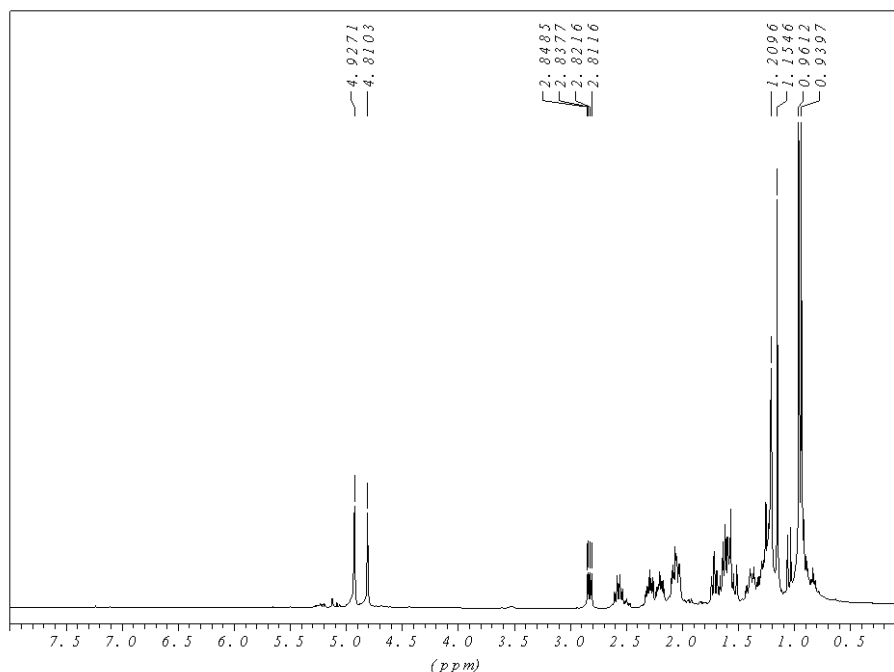
38

Το μοριακό ιόν [M]⁺ στο φάσμα μάζας (Εικ. 209) εμφανίστηκε σε *m/z* 220.



Εικόνα 209. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **38**.

Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **38** (Εικ. 205) παρατηρήθηκαν: (i) τρεις απλές κορυφές σε δ 0.94, 0.96 και 1.16, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια τριών αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα και (ii) δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.82 και 4.93, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.



Εικόνα 210. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **38**.

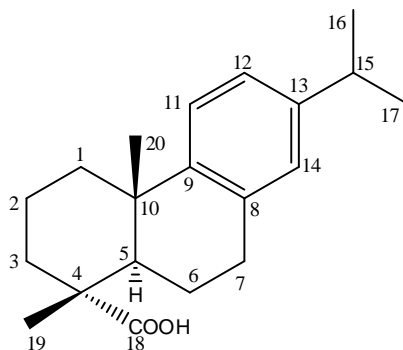
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική έρευνα που ακολούθησε, αποδείχθηκε ότι ο μεταβολίτης **38** αντιστοιχούσε στο γνωστό σεσκιτερπένιο, οξείδιο του καρνοφυλλενίου (Ragasa et al. 2003). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **38** παρατίθενται στον Πίνακα 148.

Πίνακας 148 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **38** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_{H}
5	2.83 dd (10.6, 4.2)
12	1.16 s
13a	4.93 brs
13b	4.82 brs
14	0.96 s
15	0.94 s

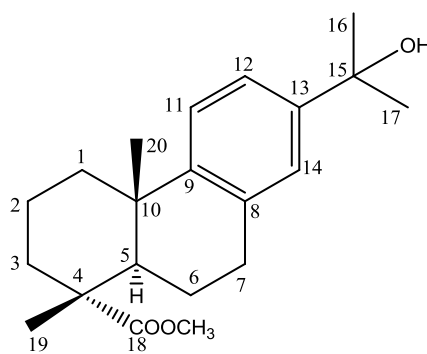
3.2. Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών από το είδος *Pinus nigra* subsp. *nigra*

3.2.1. Δεϋδροαβιετικό οξύ (βλ. 3.1.9.)



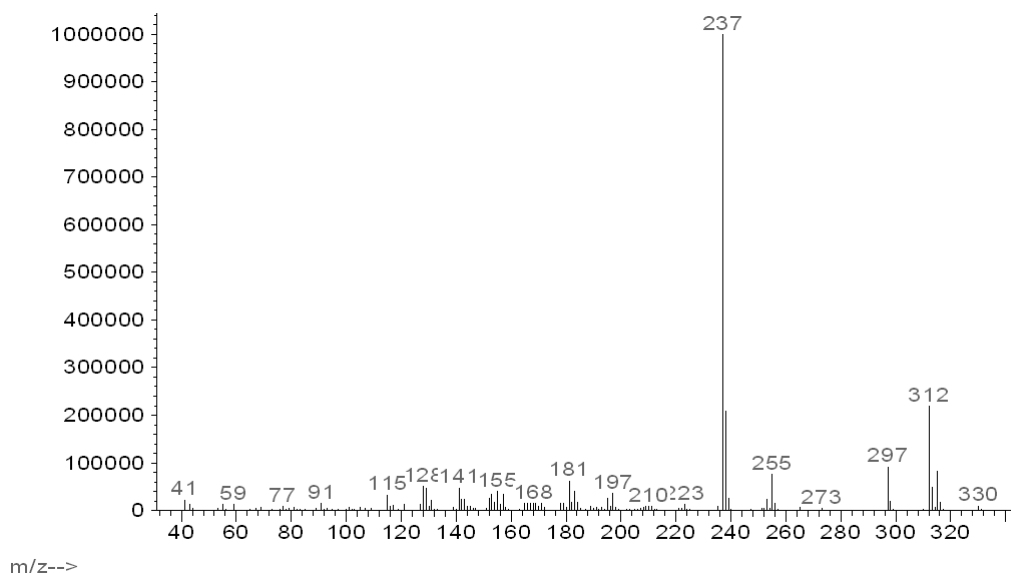
3.2.2. Μεταβολίτης 39: Μεθυλεστέρας του 15-υδροξυ-δεϋδροαβιετικού οξέος

Ο μεταβολίτης **39** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 0.5 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **39** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{21}H_{30}O_3$.



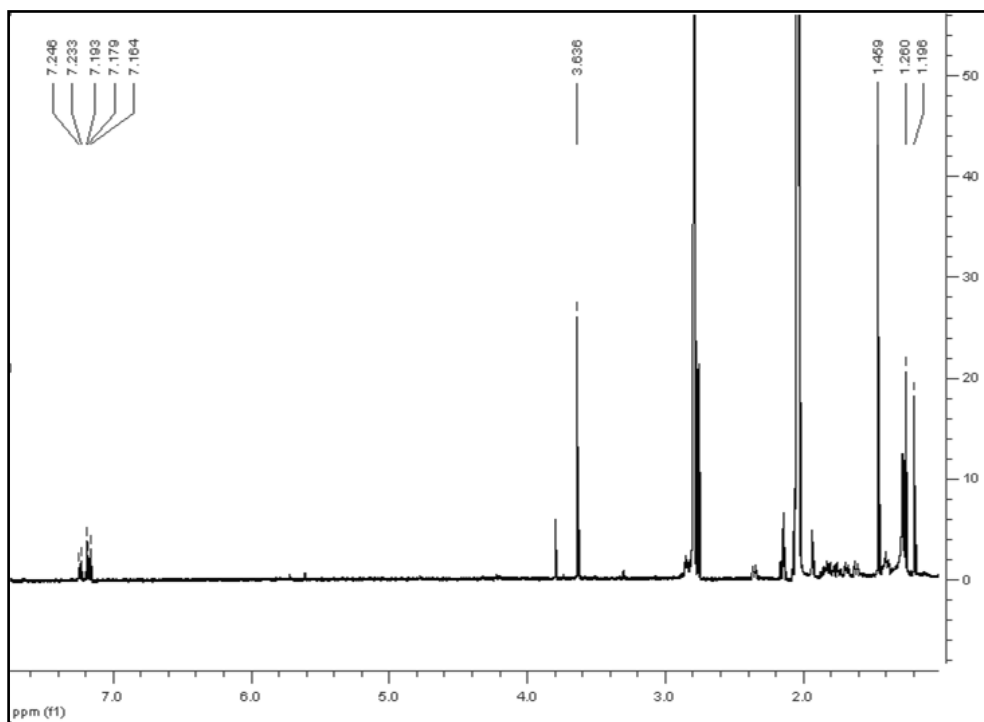
39

Στο φάσμα μάζας του μεταβολίτη **39** (Εικ. 211) εμφανίστηκε το μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 330, ενώ σε m/z 312 παρατηρήθηκε το θραύσμα $[M-COOCH_3]^+$.



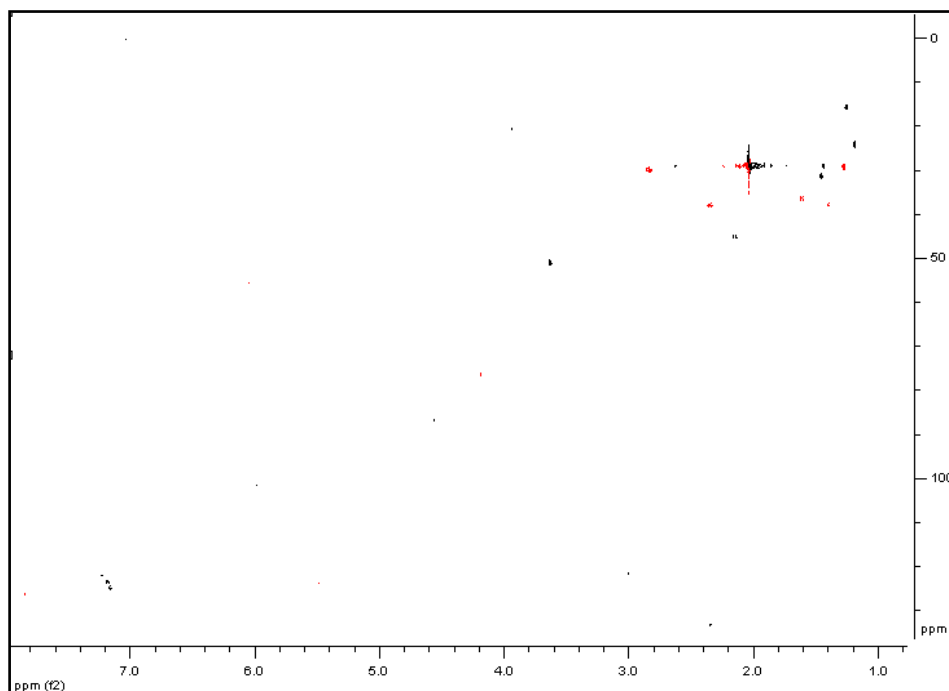
Εικόνα 211. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **39**.

Στο φάσμα ^1H NMR (Εικ. 212) παρατηρήθηκαν (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.20 και 1.26, που ολοκληρώναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομο άνθρακα, (ii) μία απλή κορυφή στα 1.46 ppm, που ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα, (iii) μία απλή κορυφή σε δ 3.63, που αντιστοιχούσε στα πρωτόνια ενός οξυγονωμένου μεθυλίου και (iv) χαρακτηριστικά σήματα τριών αρωματικών πρωτονίων σε δ 7.18 (d, 8.4 Hz), 7.24 (dd, 8.4, 1.7 Hz) και 7.16 (brs).



Εικόνα 212. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **39**.

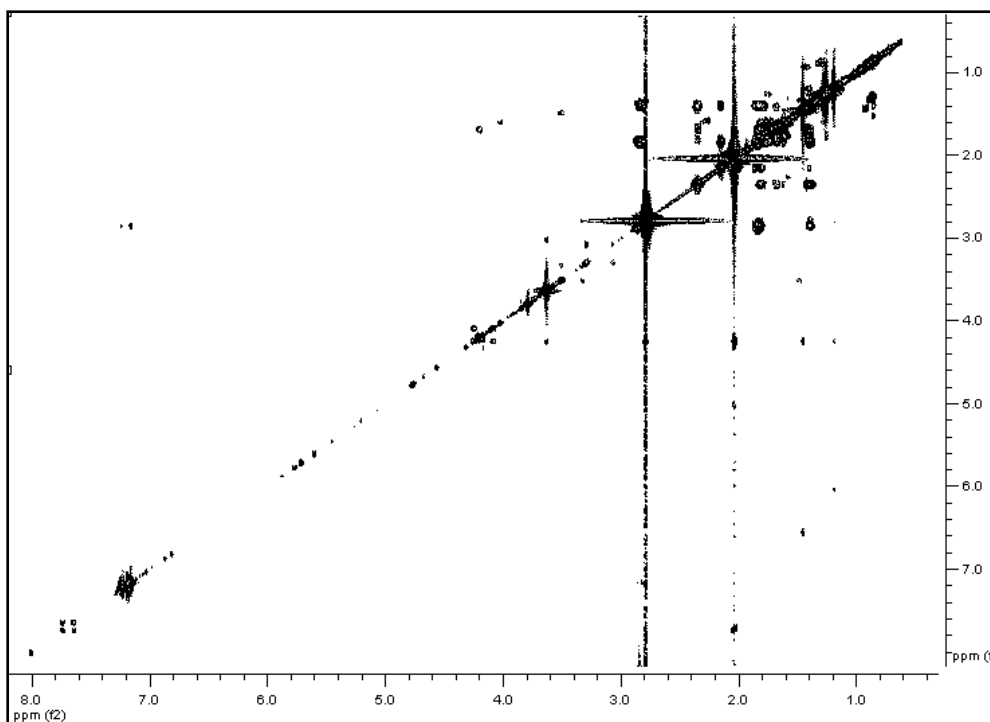
Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 213) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά πέντε μεθυλίων, το ένα εκ των οποίων είναι οξυγονωμένο, πέντε μεθυλενίων και τεσσάρων μεθινίων. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.



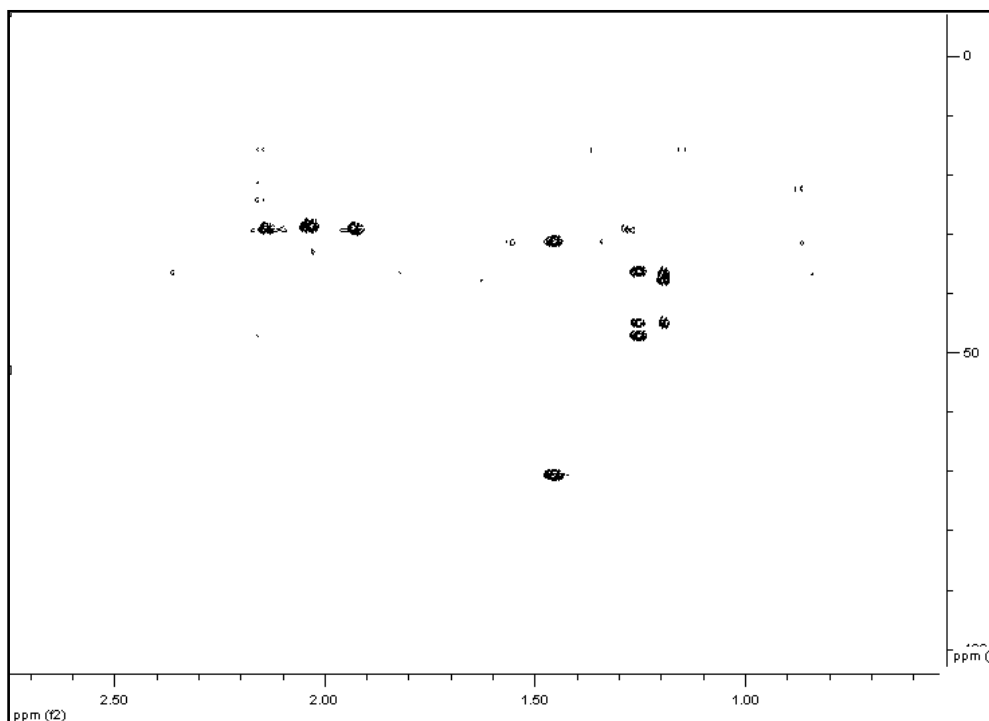
Εικόνα 213. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **39**.

Το ομοπυρηνικό φάσμα COSY (Εικ. 214) επιβεβαίωσε την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, και των C-5, C-6 και C-7, ενώ με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC (Εικ. 215) προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ανθράκων και πρωτονίων στο μόριο.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα ήταν εμφανής η δομική ομοιότητα των μεταβολιτών **39** και **13** (15-υδροξυ-δεϋδροαβιετικό οξύ). Η διαφορά τους εντοπίστηκε στην ύπαρξη μίας απλής κορυφής σε δ 3.63 στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **39**, που αντιστοιχεί στα πρωτόνια μιας ομάδας μεθοξυλίου.

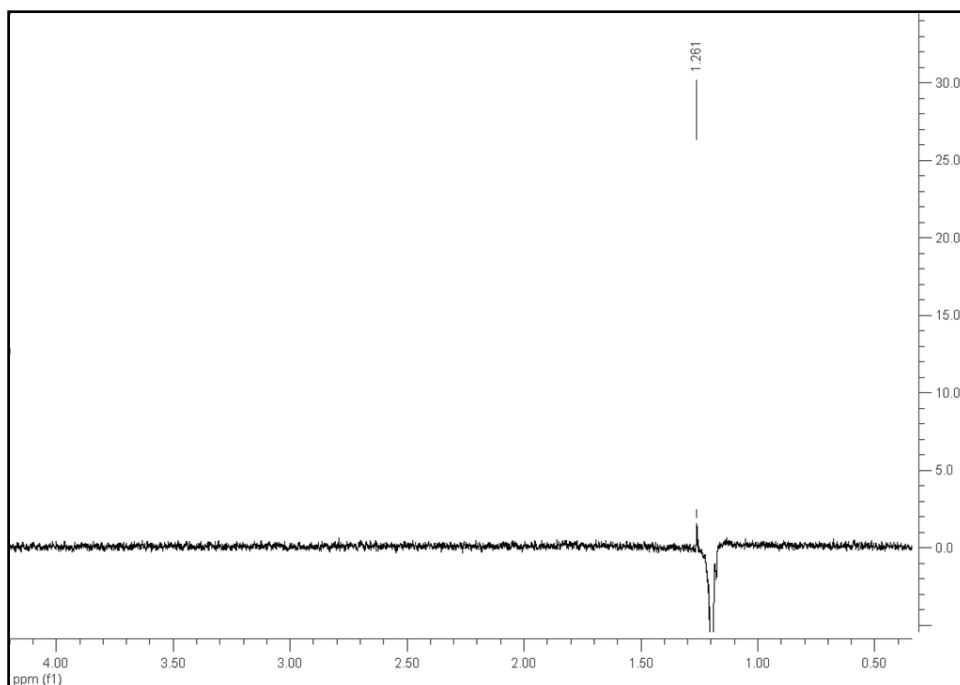


Εικόνα 214. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **39**.



Εικόνα 215. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **39**.

Κατόπιν λήψης φασμάτων 1D-NOE (Εικ. 216) διαπιστώθηκε ότι το μεθύλιο της θέσης 20 έχει συσχέτιση μόνο με το μεθύλιο της C-19 και κατά αυτόν τον τρόπο προσδιορίστηκε η σχετική στερεοχημεία του μορίου στις C-4 και C-10.



Εικόνα 216. Φάσμα 1D-NOE - στοχευμένη ακτινοβολή των H₃-20.

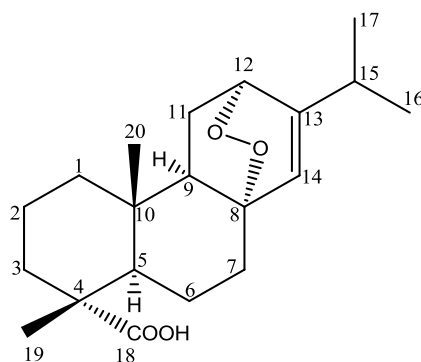
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη μεθυλεστέρα του 15-υδροξυ-δεϋδροαβιετικού οξέος (Carman et al. 1970) τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 149, ενώ για πρώτη φορά γίνεται η πλήρης απόδοση τους.

Πίνακας 149 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **39** σε C₃D₆O (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a	37.8	2.34 m
1b		1.40 m
2a	18.5	1.80 m
2b		1.67 m
3a	36.1	1.74 m
3b		1.61 m
4	47.4	-
5	45.1	2.15 m
6a	21.5	1.80 m
6b		1.38 m
7a	29.8	2.84 m
7b		2.35 m
8	133.6	-
9	147.8	-
10	36.5	-
11	123.5	7.18 d (8.4)
12	122.1	7.24 dd (8.4, 1.7)
13	146.7	-
14	124.8	7.16 brs
15	70.7	-
16	31.5	1.46 s
17	31.5	1.46 s
18	177.6	-
19	15.6	1.26 s
20	24.2	1.20 s
18-OMe	51.1	3.63 s

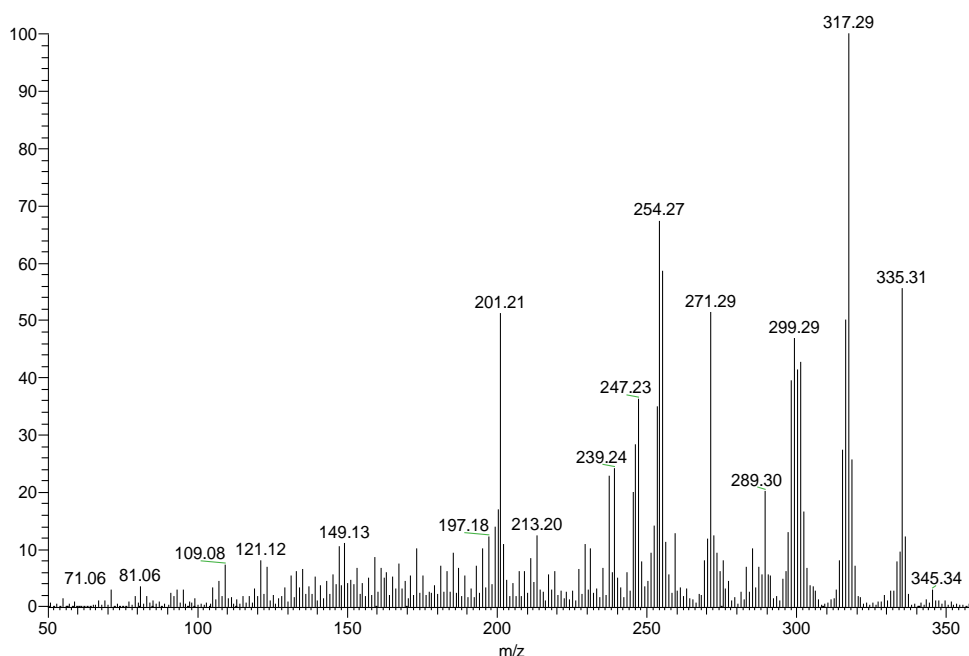
3.2.3. Μεταβολίτης 40: 8,12α-Επιδιοξυ-αβιετ-13-εν-18-οϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **40** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 4.9 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **40** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₃₀O₄.



40

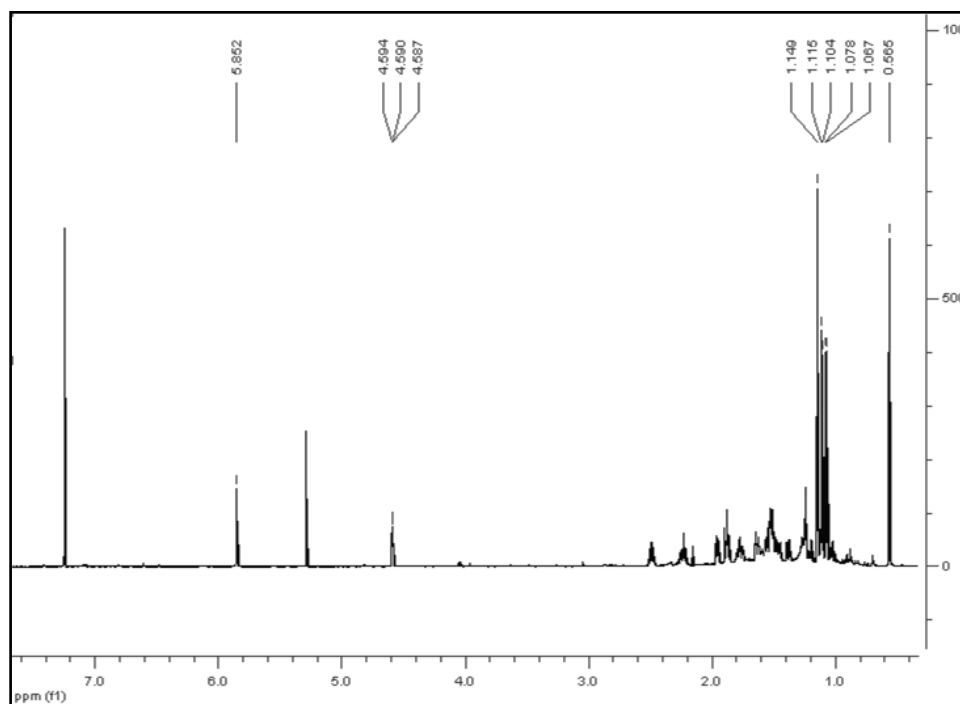
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 217) η κορυφή σε m/z 335 αντιστοιχεί στο ιόν $[M+H]^+$, ενώ σε m/z 317 διακρίνεται το θραύσμα $[M-H_2O]^+$.



Εικόνα 217. Φάσμα μάζας (PCIMS) του μεταβολίτη **40**.

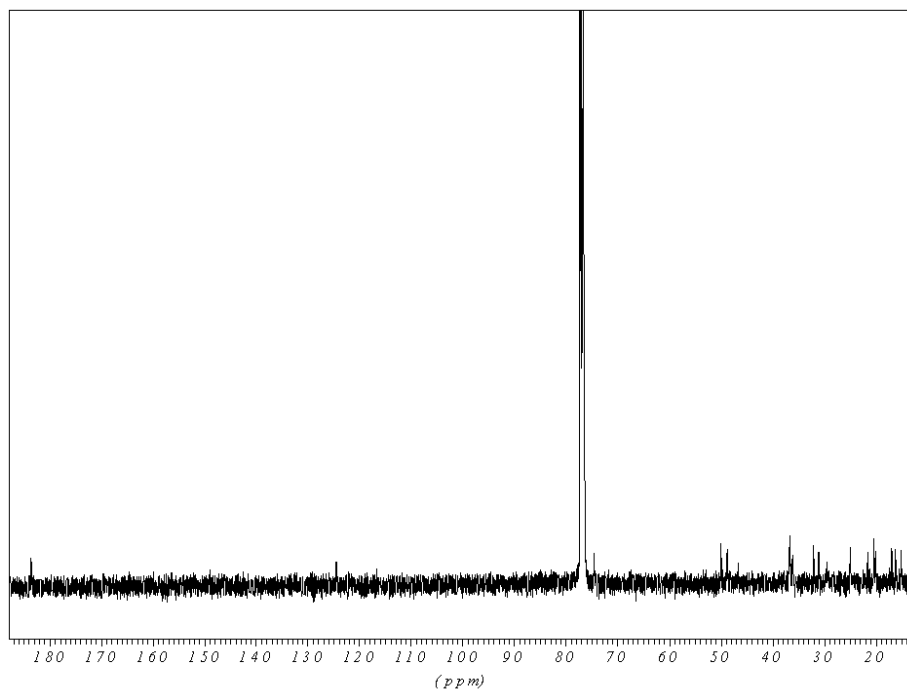
Μεταξύ των σημάτων που εμφανίστηκαν στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 218) παρατηρήθηκαν (i) δύο απλές κορυφές σε δ 0.56 και 1.15, που ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) δύο διπλές κορυφές στα 1.07 ppm (7.0 Hz) και 1.11 ppm (7.0 Hz), που αντιστοιχούσαν σε

δύο μεθύλια σε τριτοταγές όμως άτομο άνθρακα, (iii) μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 4.58, που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα οξυγονομένο μεθινικό πρωτόνιο και (iv) μία ευρεία απλή κορυφή στα 5.85 ppm που αντιστοιχούσε σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο.

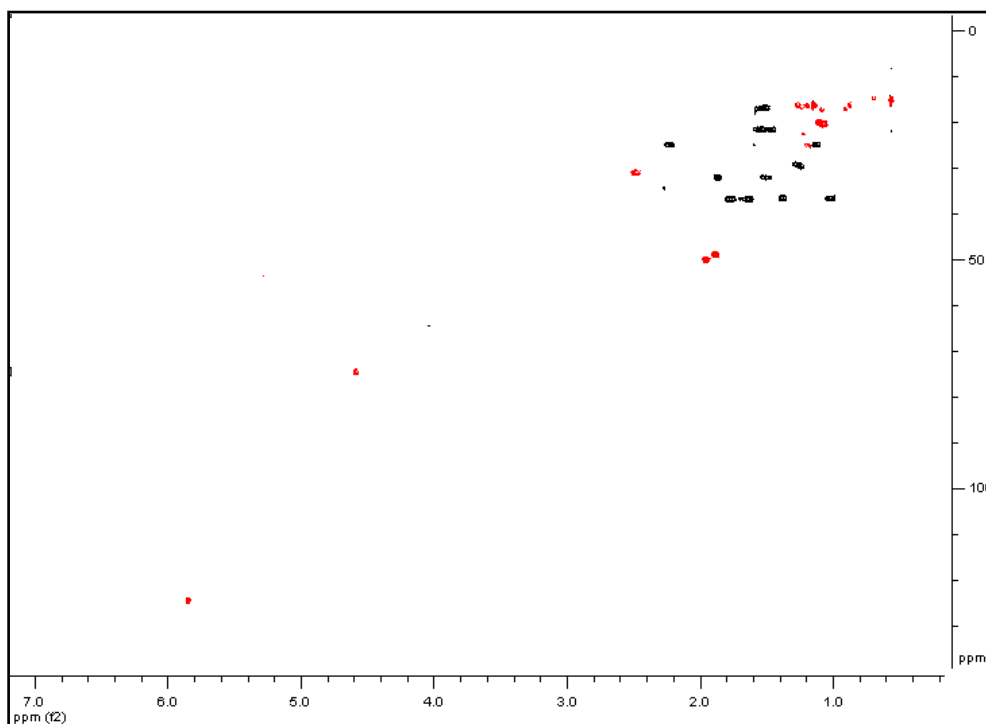


Εικόνα 218. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **40**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR (Εικ. 219) διακρίνονται συνολικά 20 άτομα άνθρακα και κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 220) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη τεσσάρων μεθυλίων, έξι μεθυλενίων και πέντε μεθινίων, το ένα εκ των οποίων είναι οξυγονομένο. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT και σε συνδυασμό με το φάσμα ^{13}C NMR έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.



Εικόνα 219. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **40**.

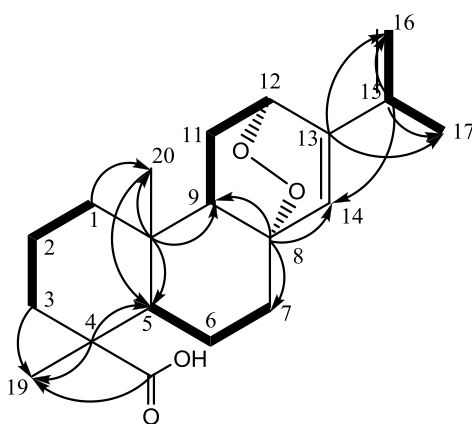


Εικόνα 220. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **40**.

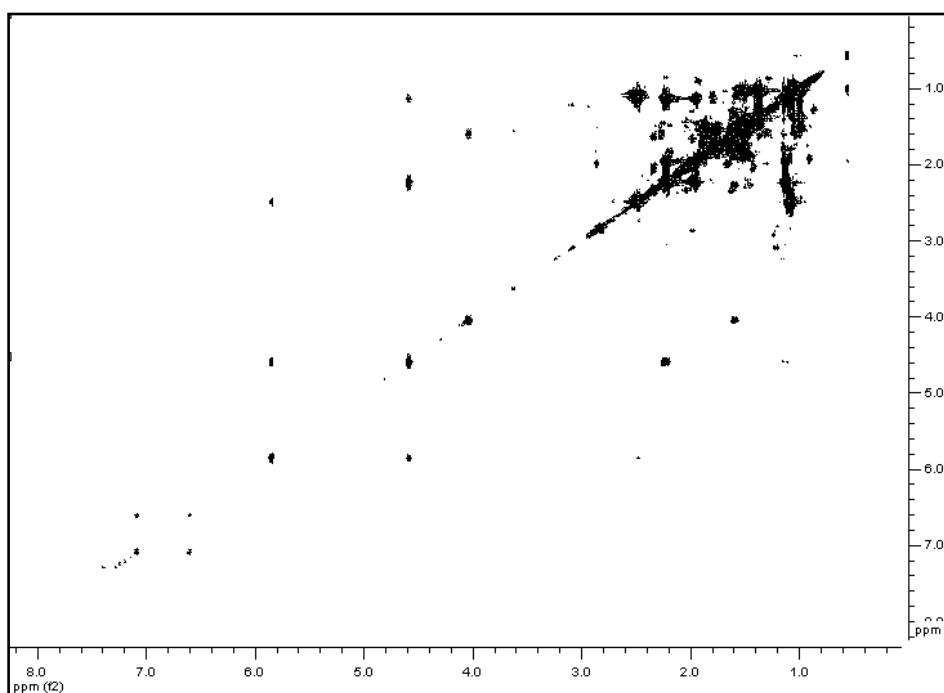
Το ομοπυρηνικό φάσμα COSY (Εικ. 222) καθόρισε την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6 και C-7 καθώς και των C-9, C-11 και C-12, ενώ εμφανίζεται και η σύζευξη μεταξύ των πρωτονίων του μεθινίου, που συντονίζεται σε δ 2.49 (septet, 7.0 Hz) και αντιστοιχεί στο μεθίνιο της ισοπροπυλομάδας, με τα πρωτόνια των μεθυλίων στα 1.07 ppm

και 1.11 ppm (θέσεις 15, 16, 17).

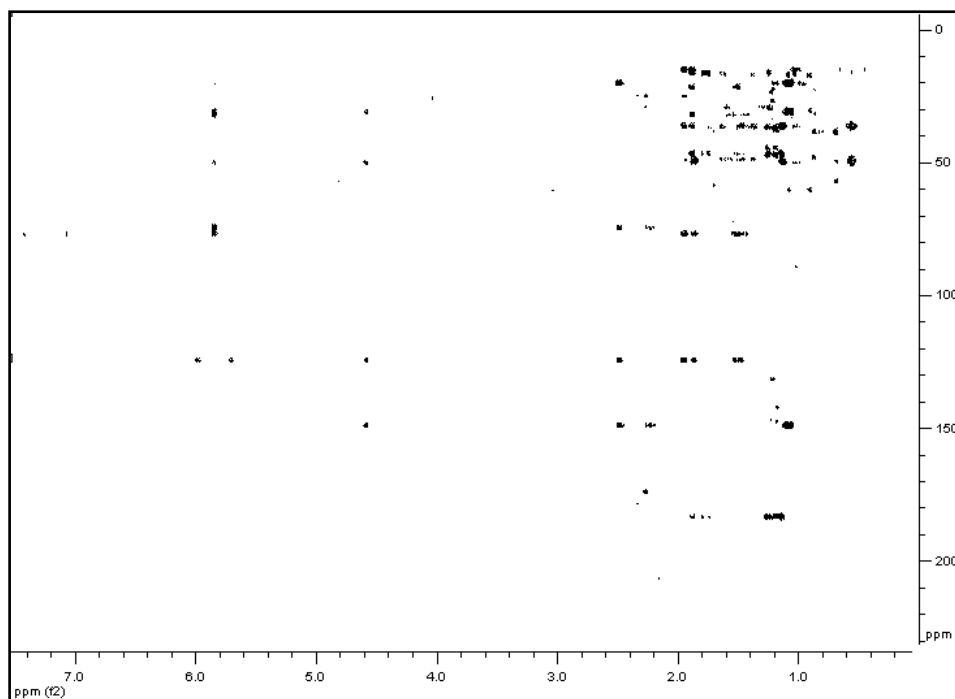
Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρούνται στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC (Εικ. 223) προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ατόμων στο μόριο. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται οι συζεύξεις C-4/H₃-19 καθώς και C-4/H-5. Διακρίνονται επίσης οι συζεύξεις C-18/H₃-19 και C-3/H-19 καθώς και C-10/H₃-20, C-10/H-5 και C-10/H-9. Επίσης, ο μεθυλενικός άνθρακας C-1 έχει σύζευξη με τα πρωτόνια του μεθυλίου H₃-20. Επιπλέον, ο τεταρτοταγής ολεφινικός άνθρακας C-13 καθώς και ο μεθινικός άνθρακας C-15 έχει σύζευξη με τα δύο μεθύλια των H₃-16 και H₃-17. Τέλος, ο τεταρτοταγής οξυγονωμένος άνθρακας C-8 έχει σύζευξη με το ολεφινικό πρωτόνιο H-14. Οι συζεύξεις HMBC και COSY φαίνονται στην Εικόνα 221.



Εικόνα 221. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **40**.

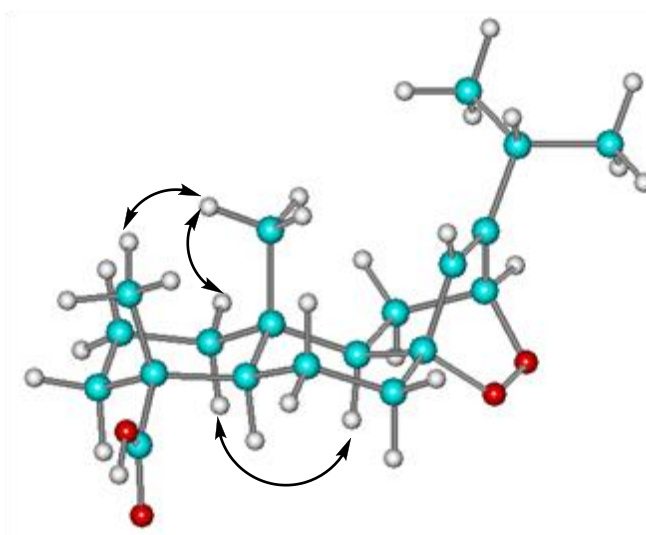


Εικόνα 222. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **40**.

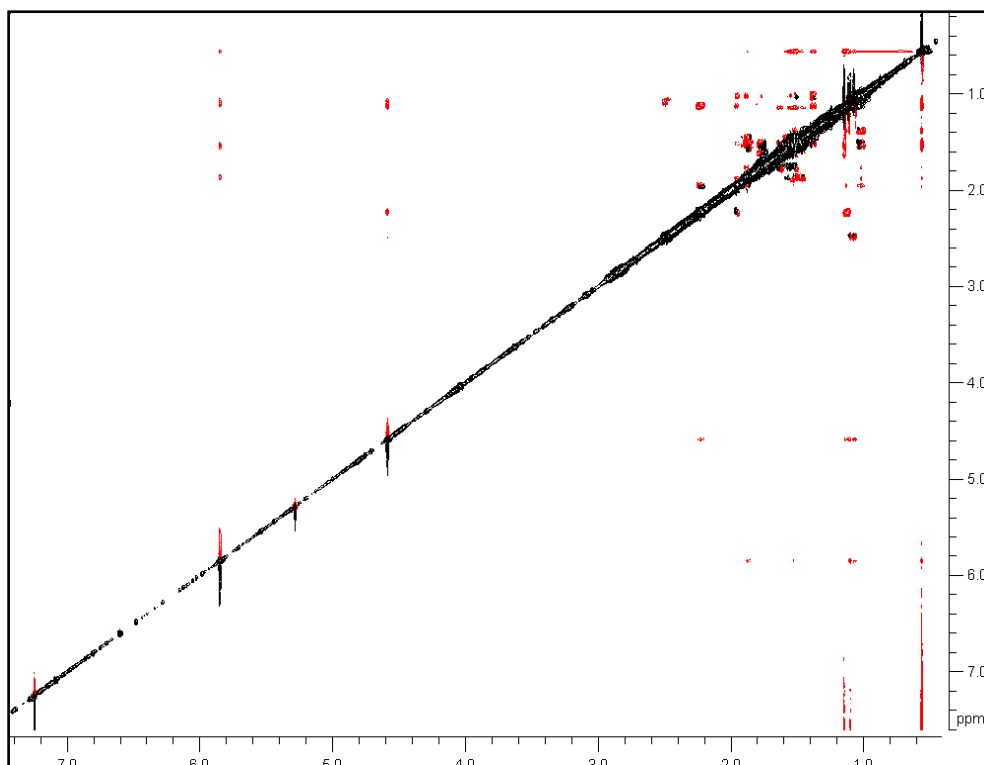


Εικόνα 223. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **40**.

Με βάση τα δεδομένα από το φάσμα NOESY (Εικ. 225) καθορίστηκε η σχετική στερεοχημεία των ασύμμετρων κέντρων C-4, C-5, C-10 και C-12. Συγκεκριμένα παρατηρείται συσχέτιση NOE H₃-19/H₃-20, ενώ δεν παρατηρείται η σύζευξη H₃-20/H-5, άρα η συμπύκνωση (fusion) των δακτυλίων A και B είναι *trans*. Επιπλέον, διακρίνονται οι συσχετίσεις H₃-20/H-1β και H-1α/H-9. Έτσι, εάν το C-20 μεθύλιο έχει θέση αξονική, τότε το H-9 θα έχει θέση αξονική. Επίσης, η σχετική στερεοχημεία του ασύμμετρου κέντρου C-12 προσδιορίστηκε λόγω της απουσίας συσχέτισης NOE του H-9 με το οξυγονωμένο μεθίλιο H-12.



Εικόνα 224. Στερεοχημική διαμόρφωση δομής ελάχιστης ενέργειας και οι πιο σημαντικές συσχετίσεις NOE για τον μεταβολίτη **40**.



Εικόνα 225. Φάσμα NOESY του μεταβολίτη **40**.

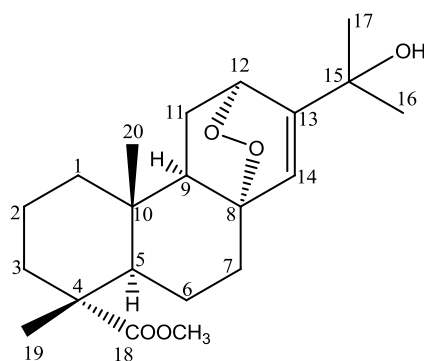
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας ο μεταβολίτης **40** είναι γνωστό φυσικό προϊόν (Hironori et al. 2001). Στον Πίνακα 150 φαίνονται οι χημικές του μετατοπίσεις ενώ για πρώτη φορά γίνεται η πλήρης απόδοση αυτών.

Πίνακας 150 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **40** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1 α	36.5	1.38 m
1 β		1.02 m
2	16.9	1.52 m
3a	36.8	1.77 m
3b		1.63 m
4	46.6	-
5	48.8	1.89 m
6a		1.55m
6b	21.5	1.45 m
7a		1.87 m
7b	32.0	1.50 m
8	76.5	-
9	49.9	1.95 dd, (9.4, 5.6)
10	35.9	-
11a		2.23 ddd (13.4, 9.4, 4.2)
11b	24.9	1.13 m
12	74.5	4.58 m
13	148.6	-
14	124.4	5.85 brs
15	30.8	2.49 septet (7.0)
16	20.0	1.11 d (7.0)
17	20.4	1.07 d (7.0)
18	183.1	-
19	16.1	1.15 s
20	14.9	0.56 s

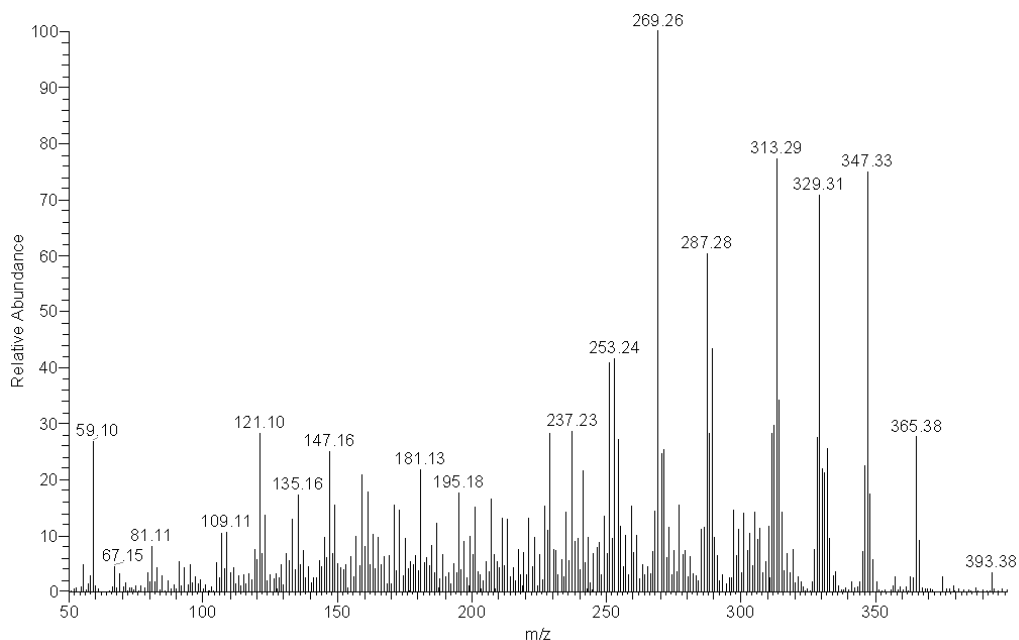
3.2.4. Μεταβολίτης 41: Μεθυλεστέρας του 15-υδροξυ-8,12α-επιδιοξυ-αβιετ-13-εν-18-οϊκού οξέος

Ο μεταβολίτης **41** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 0.8 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **41** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₁H₃₂O₅.



41

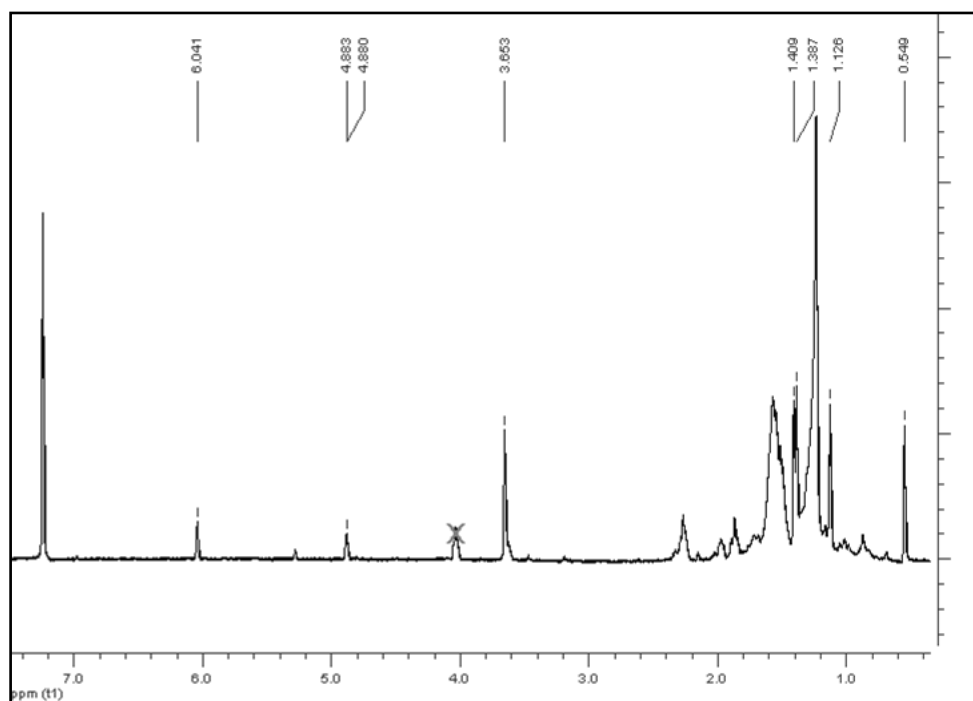
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 226) η κορυφή σε m/z 365 αντιστοιχούσε στο ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$, ενώ σε m/z 347 εμφανίστηκε το θραύσμα $[M-H_2O]^+$.



Εικόνα 226. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **41**.

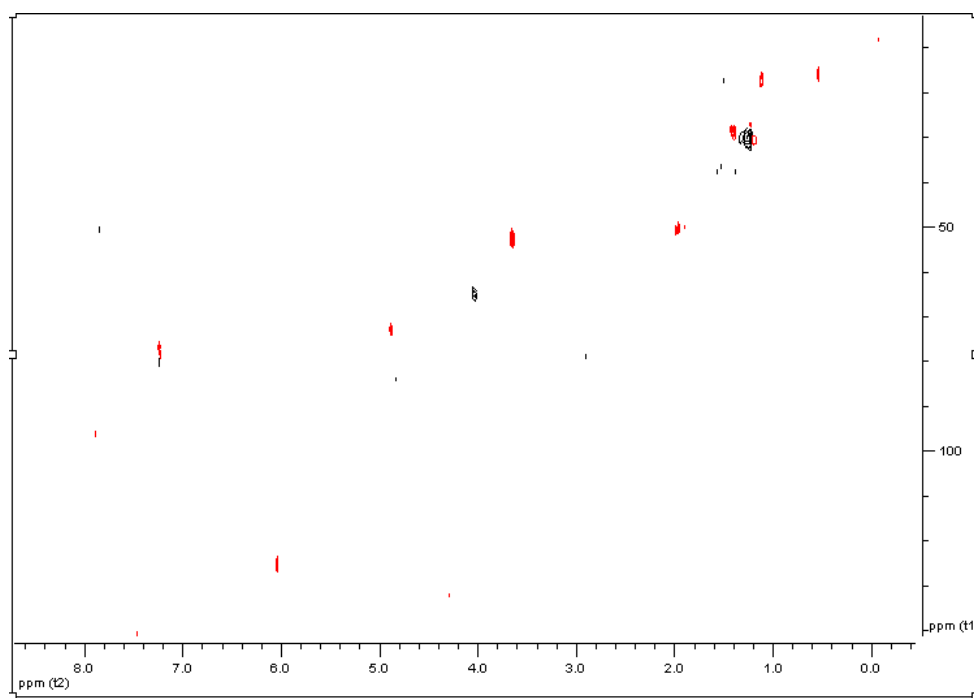
Μεταξύ των σημάτων που εμφανίζονται στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 227) παρατηρήθηκαν (i) τέσσερις απλές κορυφές, σε δ 0.56, 1.15, 1.39 και 1.41, που ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε τέσσερα μεθύλια σε

τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία απλή κορυφή στα 3.65 ppm, που ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια ενός οξυγονωμένου μεθυλίου, (iii) μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 4.87, που αντιστοιχούσε σε ένα οξυγονωμένο μεθινικό πρωτόνιο και (iv) μία απλή κορυφή στα 6.03 ppm, που αποδόθηκε σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο. Με βάση τα δεδομένα από το φάσμα μάζας και το φάσμα ^1H NMR του **41** ήταν εμφανής η δομική του ομοιότητα με το μεταβολίτη **40**.



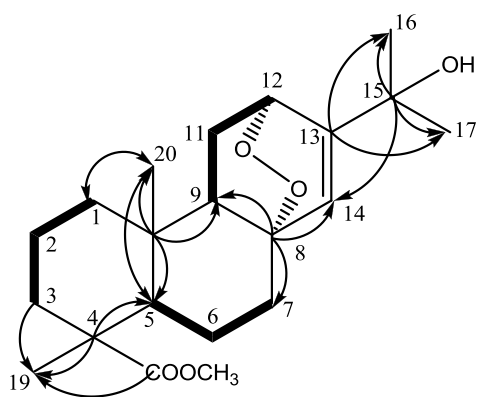
Εικόνα 227. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **41**.

Με βάση τα δεδομένα του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 228) επιβεβαιώνεται η ύπαρξη πέντε μεθυλίων, το ένα εκ των οποίων οξυγονωμένο, έξι μεθυλενίων και τεσσάρων μεθινίων, εκ των οποίων ένα οξυγονωμένο και ένα ολεφινικό.

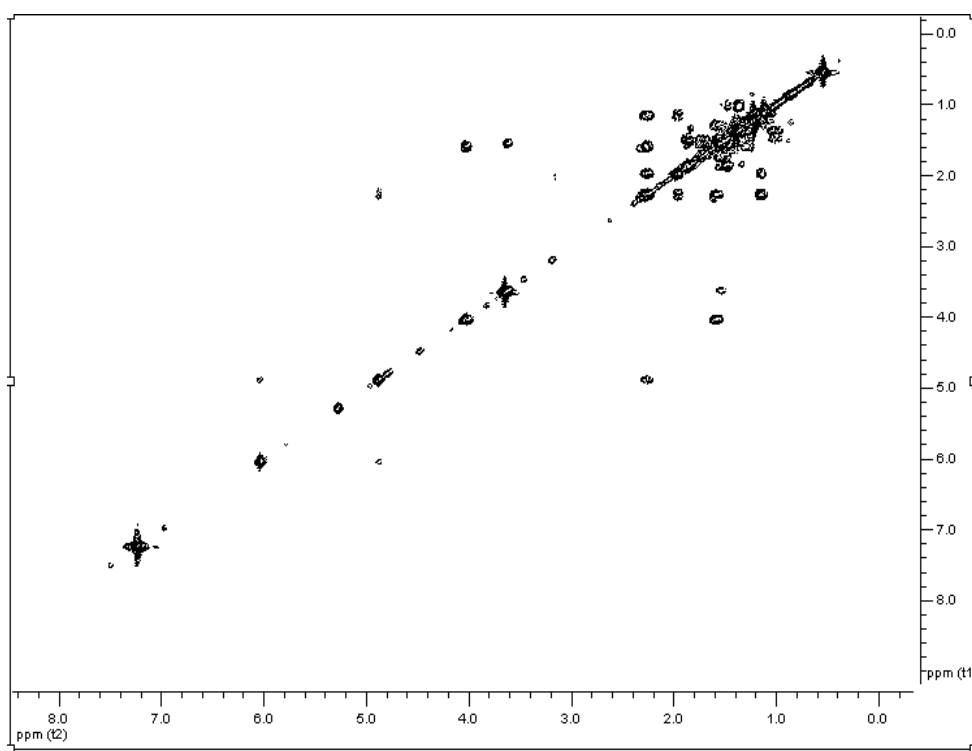


Εικόνα 228. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **41**.

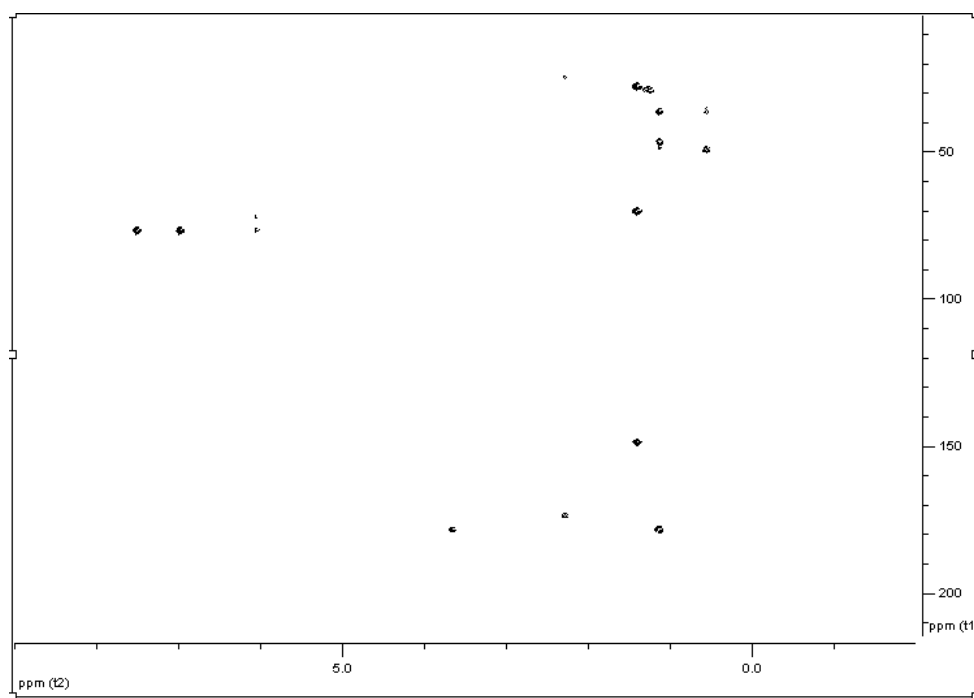
Το φάσμα COSY (Εικ. 230) επιβεβαίωσε την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6 και C-7 καθώς και των C-9, C-11 και C-12. Με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC (Εικ. 231) προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ατόμων άνθρακα και πρωτονίων στο μόριο. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν συζεύξεις μεταξύ του C-4 με τα πρωτόνια H₃-19 καθώς και με το μεθίνιο H-5. Επίσης, παρατηρήθηκαν οι συζεύξεις του C-18 καρβονυλίου, και του C-3 με τα μεθυλικά πρωτόνια H₃-19, αλλά και η σύζευξη του μεθυλίου του μεθυλεστέρα (H₃-21) με τον C-18. Επιπρόσθετα, ο τεταρτοταγής άνθρακας C-10 είχε σύζευξη με τα πρωτόνια H₃-20- καθώς και με τα μεθινικά πρωτόνια H-5 και H-9. Επίσης ο C-1 είχε σύζευξη με τα πρωτόνια H₃-20. Επιπλέον ο τεταρτοταγής ολεφινικός άνθρακας C-13, καθώς και ο τεταρτοταγής οξυγονωμένος άνθρακας C-15 είχε σύζευξη με τα δύο μεθύλια H₃-16 και H₃-17. Επίσης, ο ολεφινικός άνθρακας C-14 είχε σύζευξη με το οξυγονωμένο μεθινικό πρωτόνιο H-12 και ο τεταρτοταγής οξυγονωμένος άνθρακας C-8 είχε σύζευξη με το ολεφινικό πρωτόνιο H-14. Οι συζεύξεις HMBC και COSY φαίνονται στην Εικόνα 229.



Εικόνα 229. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **41**.



Εικόνα 230. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **41**.



Εικόνα 231. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **41**.

Χωρίς να έχει ληφθεί το φάσμα NOESY για τον μεταβολίτη **41**, προτείνεται ότι οι μεταβολίτες **40** και **41** έχουν την ίδια σχετική στεροχημεία εφόσον οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων και των πρωτονίων δεν μεταβάλλονται σημαντικά, εκτός των C-12, C-13, C-14, C-15, C-16 και C-17, όπου παρατηρείται και η διαφορά μεταξύ των δύο μορίων. Συνεπώς, η σχετική στεροχημεία των ασύμμετρων κέντρων C-4, C-9 και C-10 είναι η ίδια για τους μεταβολίτες **40** και **41**. Επιπρόσθετα, είναι αναμενόμενη η αποθωράκιση του H-12 σε συνδυασμό με τη ταυτόχρονη θωράκιση του C-12 λόγω της παρουσίας της ομάδας υδροξυλίου στον C-15. Συνεπώς η σχετική στεροχημεία για του C-12 του μεταβολίτη **41** προτείνεται ότι είναι η ίδια με του μεταβολίτη **40** και άρα η υπεροξειδική γέφυρα έχει προσανατολισμό κάτω από το επίπεδο του μορίου.

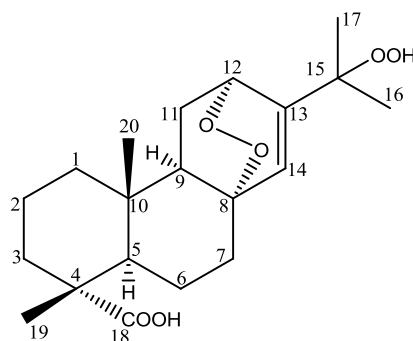
Κατόπιν βιβλιογραφικής αναζήτησης διαπιστώθηκε ότι ο μεταβολίτης **41** είναι γνωστό φυσικό προϊόν, του οποίου τα φασματοσκοπικά δεδομένα συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας (Barrero et al. 1994), ενώ για πρώτη φορά γίνεται η πλήρης απόδοση τους (Πίνακα 151).

Πίνακας 151 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **41** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a	37.0	1.56 m
1b		1.38 m
2	17.0	1.50 m
3a	36.9	1.74 m
3b		1.59 m
4	47.2	-
5	49.0	1.89 m
6	21.0	1.50 m
7a	32.8	1.82 m
7b		1.51 m
8	76.8	-
9	50.3	1.97 m
10	37.0	-
11a	24.2	1.15 m
11b		1.25 m
12	72.7	4.87 m
13	149.5	-
14	124.7	6.03 s
15	70.7	-
16	28.0	1.41 s
17	28.0	1.39 s
18	179.0	-
19	17.0	1.13 s
20	16.0	0.53 s
18-OMe	52.3	3.65 s

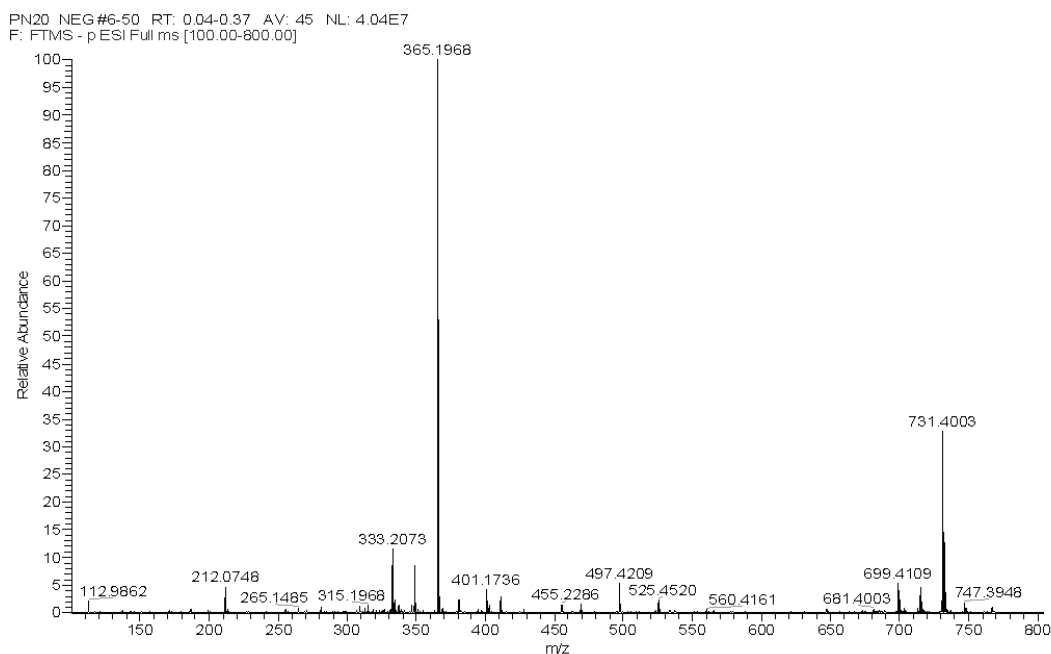
3.2.5. Μεταβολίτης 42: 15-Υδροϋπεροξυ-8,12α-επιδιοξυ-αβιετ-13-εν-18-οϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **42** απομονώθηκε ως υποκίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 4.7 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **42** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₃₀O₆.



42

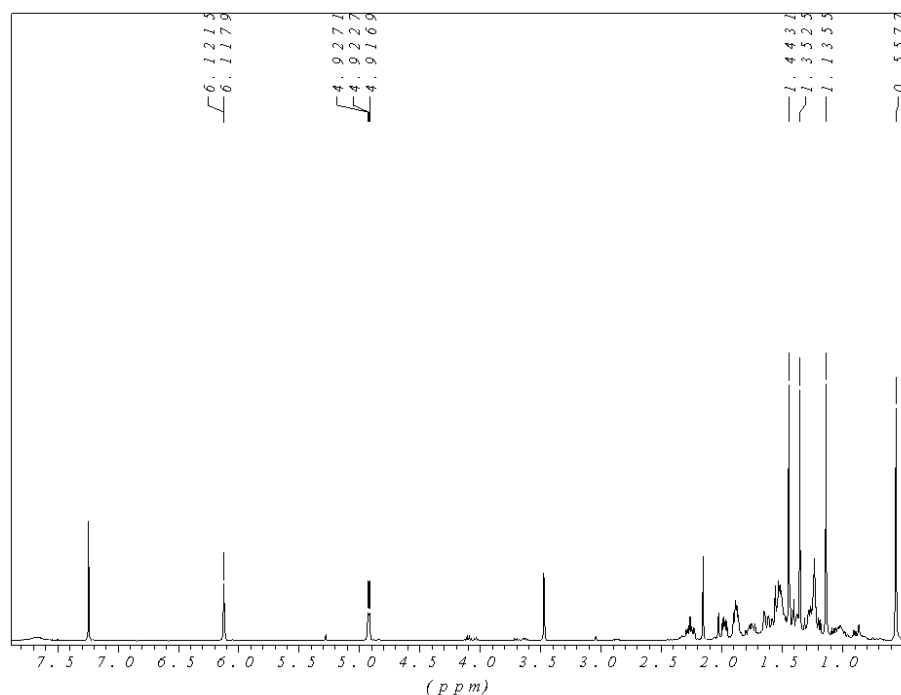
Στο φάσμα μάζας του μεταβολίτη **42** (Εικ. 232) παρατηρήθηκε ψευδομοριακό ιόν [M-H]⁺ σε *m/z* 365.1968.



Εικόνα 232. Φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας (HR-EI-MS) του μεταβολίτη **42**.

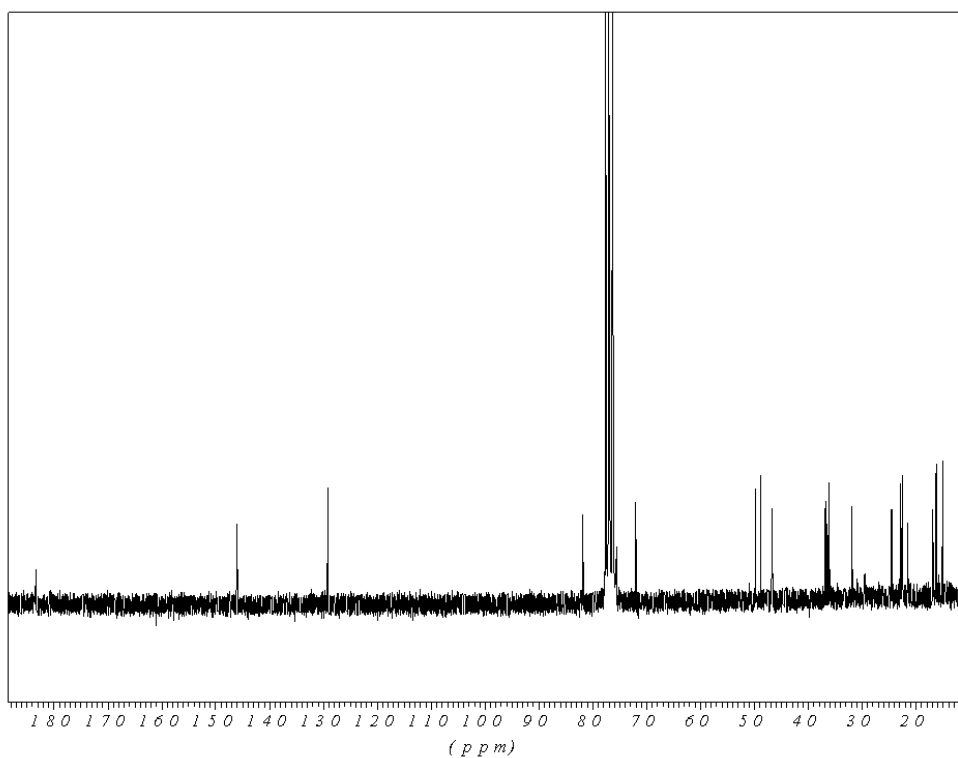
Μεταξύ των σημάτων που εμφανίστηκαν στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 232) παρατηρήθηκαν (i) τέσσερις απλές κορυφές μεθυλίων σε δ 0.56, 1.14, 1.35 και 1.44, (ii) μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 4.92, που αποδόθηκε σε ένα οξυγονωμένο μεθινικό πρωτόνιο, (iii) μία διπλή κορυφή (1.5 Hz) που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα

ολεφινικό πρωτόνιο.

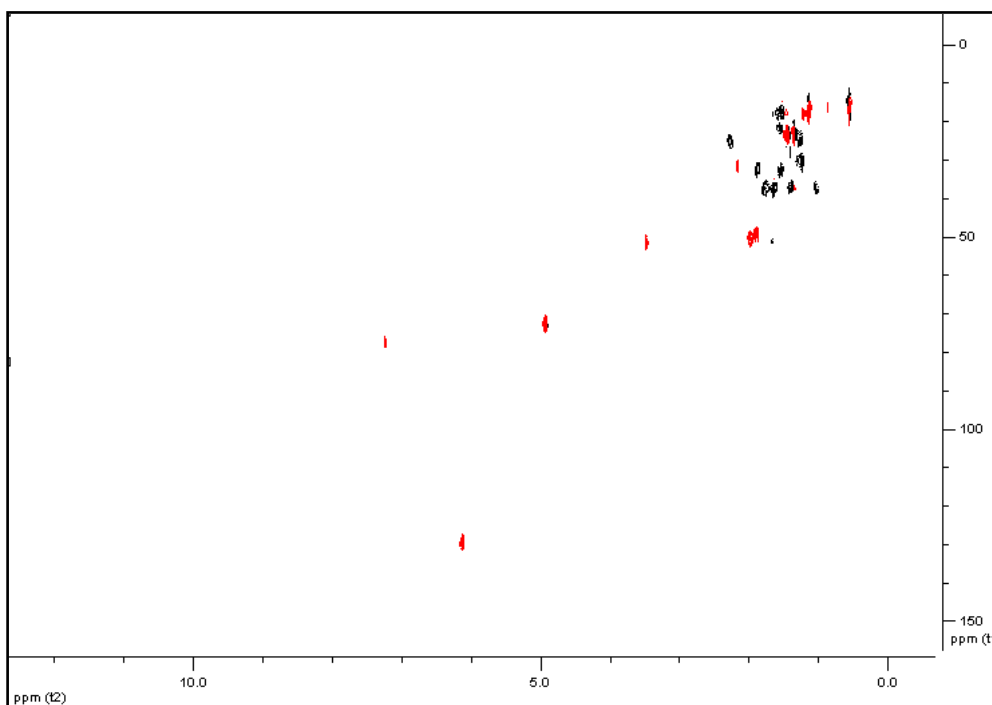


Εικόνα 233. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **42**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR (Εικ. 234) διακρίνονται συνολικά 20 άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών είναι εμφανής η παρουσία ενός καρβονυλικού ατόμου άνθρακα και δύο ολεφινικών εκ των οποίων ο ένας είναι τεταρτοταγής, όπως διαπιστώθηκε κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 235). Επιπλέον, εμφανής ήταν η ύπαρξη τριών οξυγονομένων ατόμων άνθρακα, τα δύο εκ των οποίων ήταν τεταρτοταγή και η ύπαρξη ακόμη δύο τεταρτοταγών ατόμων άνθρακα, δύο μεθινίων, έξι μεθυλενίων και τεσσάρων μεθυλίων. Με τη βοήθεια του φάσματος HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες. Κατόπιν σύγκρισης των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **42** με αυτά του μεταβολίτη **41** έγινε φανερή η δομική τους ομοιότητα. Εντούτοις ο άνθρακας C-15 συντονιζόταν σε αρκετά χαμηλότερα πεδία από τον αντίστοιχο άνθρακα του μεταβολίτη **41**, ενώ ταυτόχρονα οι μεθυλικοί άνθρακες C-16 και C-17 συντονίζονταν σε υψηλότερα πεδία συγκριτικά με το μεταβολίτη **41**. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται στην περίπτωση της αντικατάστασης μίας ομάδας υδροξυλίου από μία υδροϋπεροξυ-ομάδα (hydroperoxy-), δηλαδή ο άνθρακας που φέρει αυτή τη χαρακτηριστική ομάδα αποθωρακίζεται, ενώ οι άνθρακες σε β θέση θωρακίζονται (Smyrniotopoulos et al. 2008).



Εικόνα 234. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη 42.

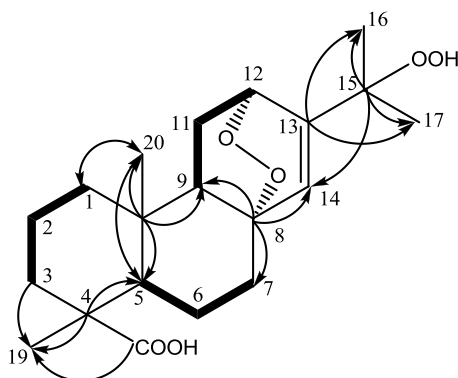


Εικόνα 235. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 42.

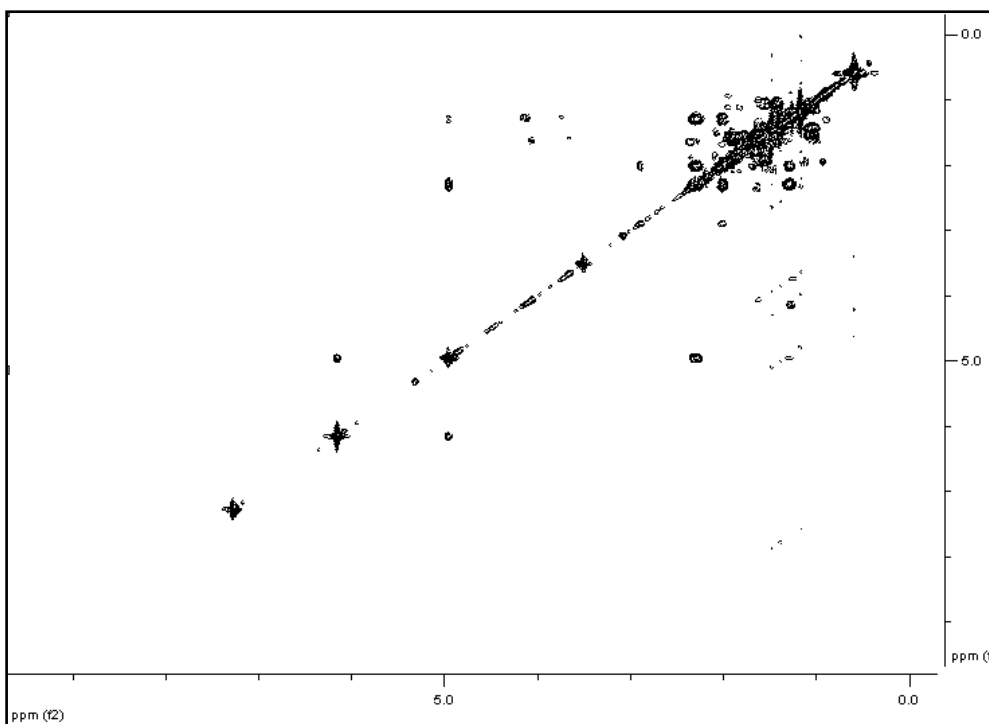
Ο βαθμός ακορεστότητας υπολογίστηκε σε $\Omega=6$, οπότε εκτός από την παρουσία της καρβονυλομάδας και του διπλού δεσμού θα έπρεπε να υπάρχουν και τέσσερις δακτύλιοι στο

μόριο.

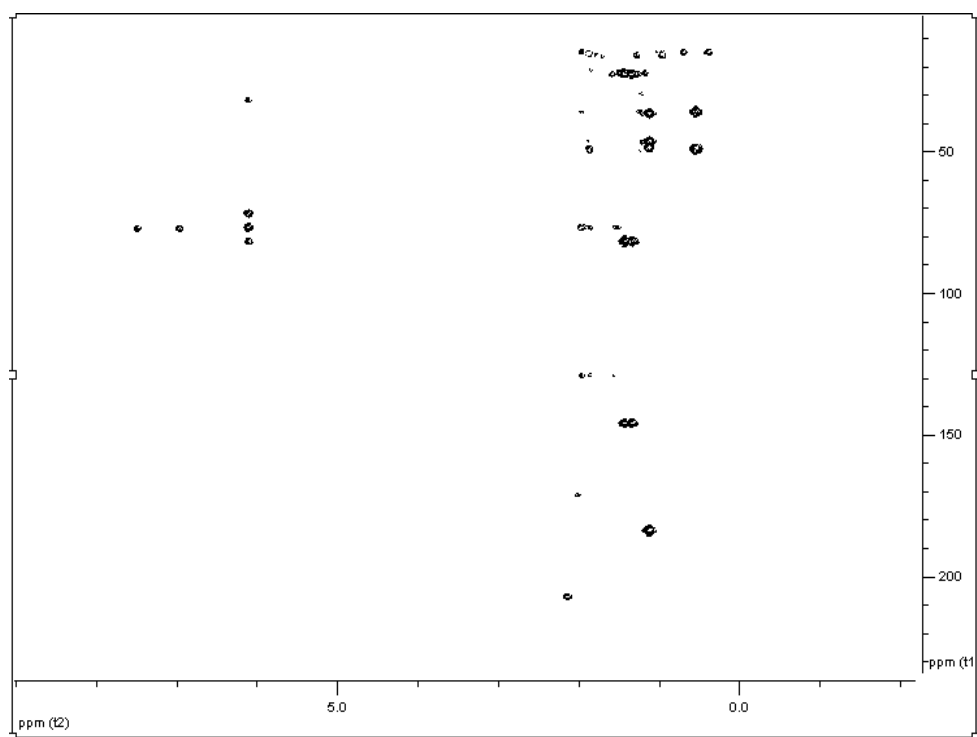
Το φάσμα COSY (Εικ. 237) καθόρισε την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6 και C-7 καθώς και των C-9, C-11 και C-12, ενώ με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC προσδιορίστηκε πλήρως η θέση των ατόμων άνθρακα και πρωτονίου στο μόριο. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν συζεύξεις μεταξύ του άνθρακα C-4 με τα πρωτόνια H₃-19, και του H-5 μεθινικού πρωτονίου με τον C-18 καρβονυλικό άνθρακα. Επίσης εμφανής ήταν η συσχέτιση του C-3 με τα μεθυλικά πρωτόνια H₃-19. Επιπρόσθετα, ο τεταρτοταγής άνθρακας C-10 είχε σύζευξη με τα πρωτόνια H₃-20 καθώς και με τα μεθινικά πρωτόνια H-5 και H-9. Επίσης ο άνθρακας C-1 είχε σύζευξη με τα πρωτόνια H₃-20. Επιπλέον ο τεταρτοταγής ολεφινικός άνθρακας C-13 καθώς και ο τεταρτοταγής οξυγονωμένος άνθρακας C-15 είχε σύζευξη με τα δύο μεθύλια των θέσεων 16 και 17. Τέλος, ο ολεφινικός άνθρακας C-14 είχε σύζευξη με το οξυγονωμένο μεθινικό πρωτόνιο H-12 και ο τεταρτοταγής οξυγονωμένος άνθρακας C-8 είχε σύζευξη με το ολεφινικό πρωτόνιο H-14. Οι σημαντικότερες συζεύξεις HMBC και COSY φαίνονται στην εικόνα 236.



Εικόνα 236. Ομοκυρηγικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροκυρηγικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **42**.



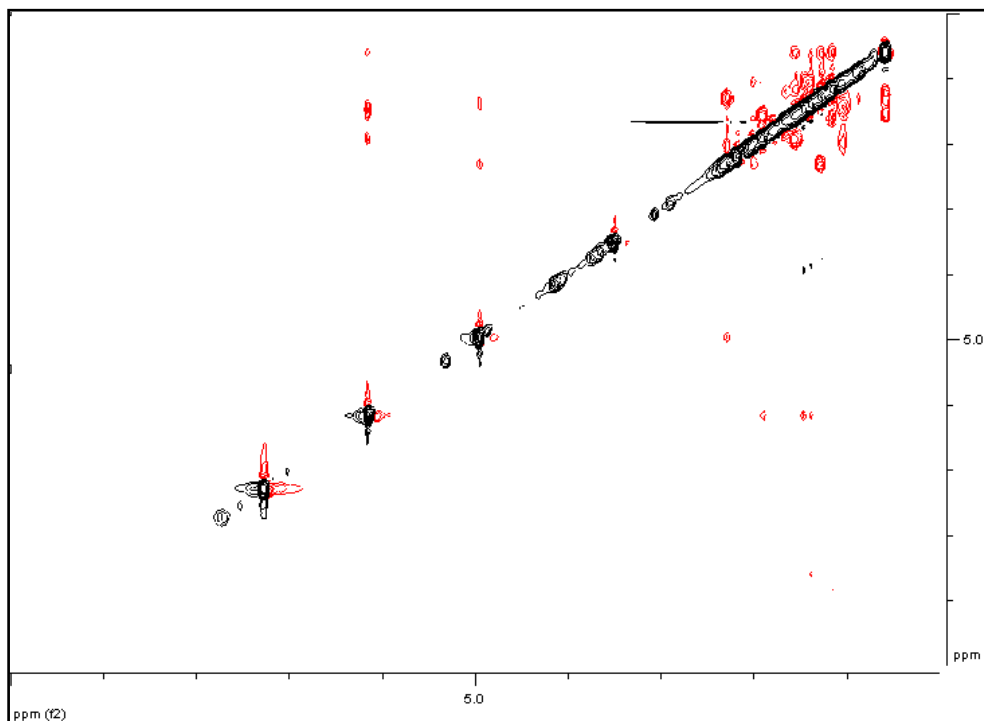
Εικόνα 237. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **42**.



Εικόνα 238. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **42**.

Με βάση τα δεδομένα από το φάσμα NOESY (Εικ. 239) καθορίστηκε η σχετική στεreoχημεία των ασύμμετρων κέντρων C-4, C-5, C-10 και C-12. Όπως διαπιστώθηκε και στην περίπτωση του μεταβολίτη **40**, παρατηρήθηκε συσχέτιση NOE H₃-19/H₃-20, ενώ παράλληλα το H₃-20 μεθύλιο δεν είχε σύζευξη με το H-5 μεθίλιο, άρα η συμπύκνωση των

δακτυλίων είναι *trans*. Επιπλέον, το μεθύλιο H₃-20 είχε σύζευξη με το H-1β, ενώ το H-1α είχε σύζευξη με το μεθίλιο H-9. Έτσι εάν το H₃-20 έχει θέση αξονική, τότε το H-9 θα έχει θέση ισημερινή. Επίσης το H-9 δεν είχε σύζευξη με το H-12, προσδιορίζοντας έτσι τη σχετική στεreoχημεία του ασύμμετρου κέντρου C-12. Ακόμη, το ολεφινικό πρωτόνιο H-14 έχει συσχέτιση NOE και με τα δύο μεθυλενικά πρωτόνια H₂-7, επομένως όπως ισχύει για το μεταβολίτη **40**, έτσι και στην περίπτωση του μεταβολίτη **42** η συμπύκνωση των δακτυλίων Β και Γ προτείνεται είναι *trans*.



Εικόνα 239. Φάσμα NOESY του μεταβολίτη **42**.

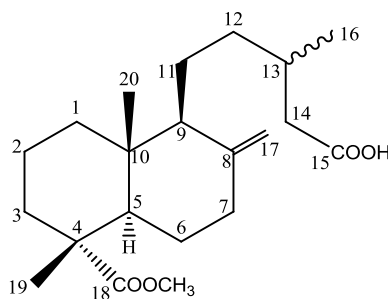
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική έρευνα που ακολούθησε διαπιστώθηκε ότι ο μεταβολίτης **42** αποτελεί νέο φυσικό προϊόν, το οποίο έχει αναφερθεί από τους Schuller et al. (1964) ως προϊόν ημισύνθεσης. Στον Πίνακα 152 παρουσιάζονται τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **42**.

Πίνακας 152 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **42** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1 α	36.5	1.40 m
1 β		1.03 m
2	16.9	1.52 m
3a	36.8	1.76 m
3b		1.64 m
4	46.7	-
5	48.8	1.90 m
6	21.6	1.55 m
7a	31.9	1.88 m
7b		1.54 m
8	77.2	-
9	49.8	1.98 dd (9.4, 5.5)
10	36.2	-
11a	24.5	2.27 ddd (13.6, 9.4, 4.3)
11b		1.26 m
12	72.0	4.91 m
13	146.0	-
14	129.2	6.13 d (1.5)
15	81.8	-
16	22.5	1.44 s
17	22.9	1.35 s
18	183.4	-
19	16.2	1.14 s
20	15.0	0.56 s

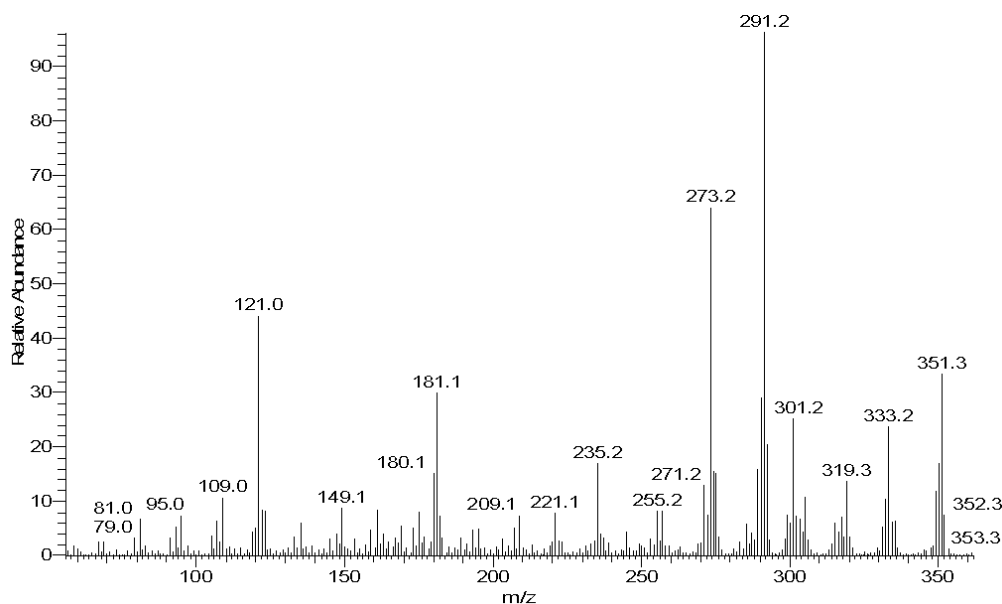
3.2.6. Μεταβολίτης 43: 18-Μεθυλεστέρας του 8(17)-λαβδεν-15,18-διοϊκού οξέος

Ο μεταβολίτης **43** απομονώθηκε ως υποκίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα ($[\alpha]_D^{20} = +13.4$, c 0.65, CHCl_3), συνολικής μάζας 22.0 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **43** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_4$.



43

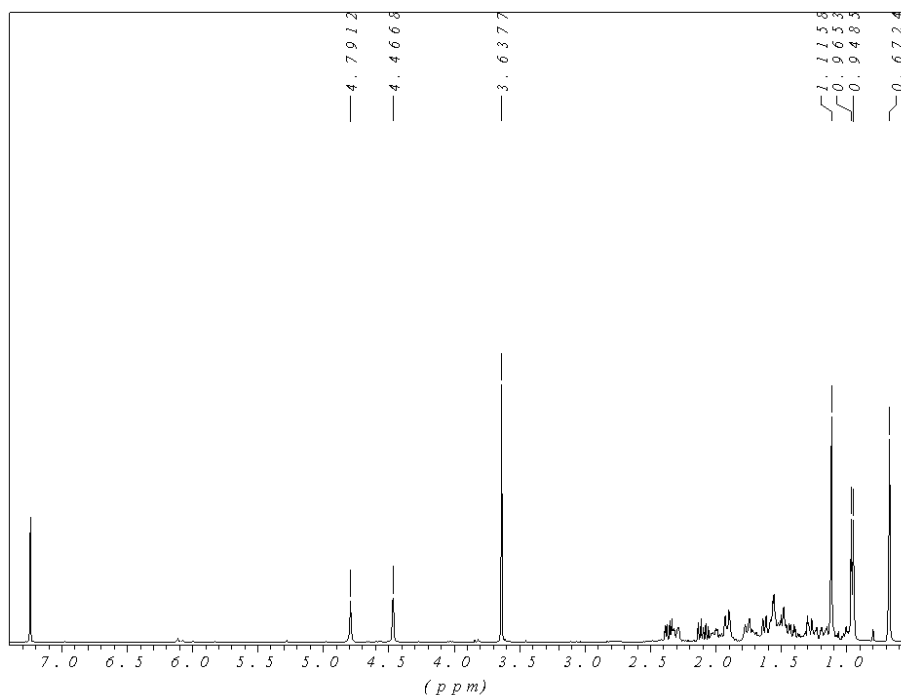
Στο φάσμα μάζας εμφανίστηκε το ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ σε m/z 351, και το θραύσμα $[\text{M}-\text{COOCH}_3]^+$ σε m/z 291 (Εικ. 240).



Εικόνα 240. Φάσμα μάζας (PCIMS) του μεταβολίτη **43**

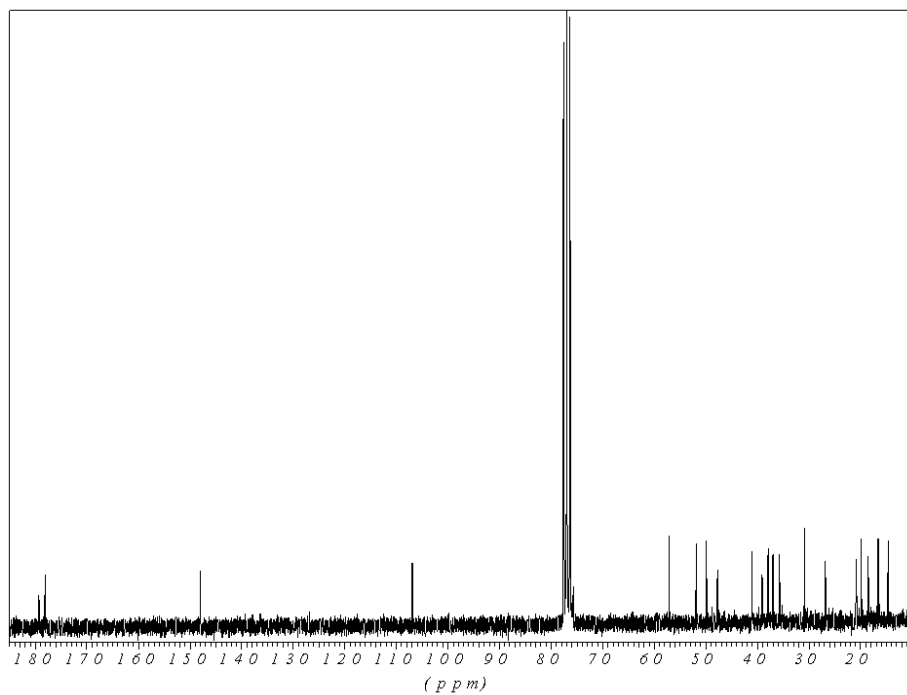
Στο φάσμα ^1H NMR (Εικ. 241) διακρίθηκαν (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.13 και 0.64, που ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία διπλή κορυφή σε δ 0.95 (d, 6.7 Hz), που ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια ενός μεθυλίου σε τριτοταγή άτομο άνθρακα, (iii) μία απλή κορυφή στα 3.64 ppm, που ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια μίας ομάδας μεθοξυλίου και (iv) δύο ευρείες απλές κορυφές σε

δ 4.47 και 4.79, που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.

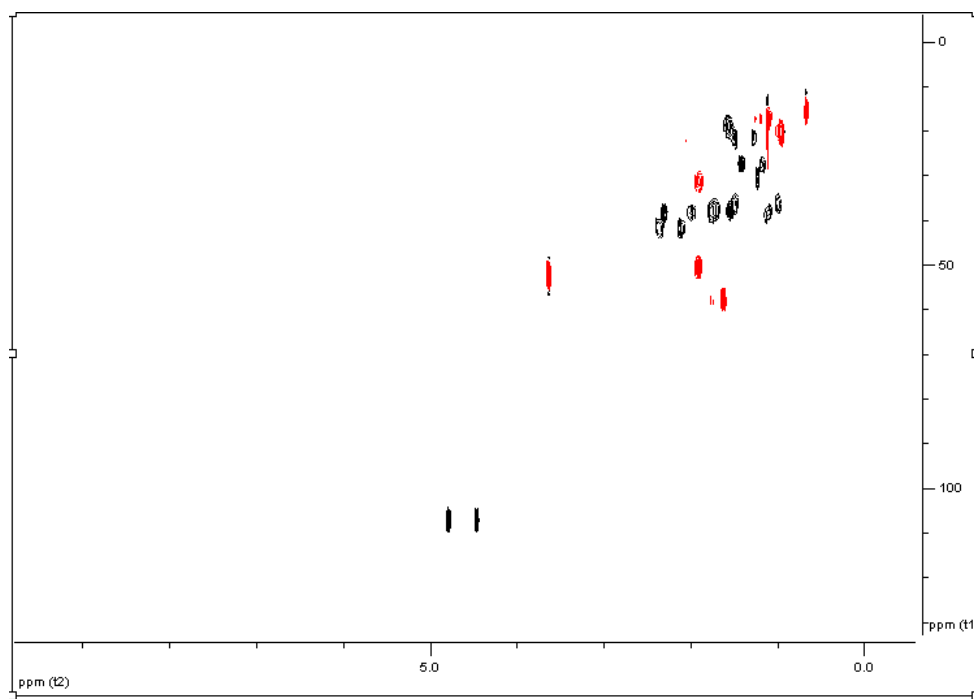


Εικόνα 241. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **43**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR (Εικ. 242) διακρίνονται συνολικά 21 άτομα άνθρακα. Συγκεκριμένα, τεσσάρων πρωτοταγών, εννέα δευτεροταγών, τριών τριτοταγών και πέντε τεταρτοταγών ατόμων άνθρακα. Μεταξύ αυτών είναι εμφανής η παρουσία δυο καρβονυλικών ανθράκων (δ 179.3 και 178.1) και δύο ολεφινικών (δ 106.9 και 148.0), εκ των οποίων ο ένας είναι τεταρτοταγής, όπως επιβεβαιώθηκε κατόπιν λήψης φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 243). Επιπλέον με βάση το φάσμα ^{13}C NMR και σε συνδυασμό με το φάσμα HSQC-DEPT, αποδεικνύεται η ύπαρξη συνολικά τεσσάρων μεθυλίων, εννέα μεθυλενίων, τριών μεθινίων καθώς και πέντε τεταρτοταγών ατόμων άνθρακα. Επίσης με τη βοήθεια του φάσματος HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.



Εικόνα 242. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **43**.



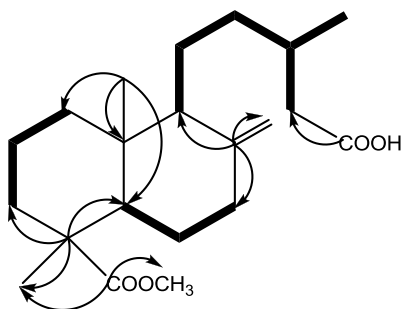
Εικόνα 243. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **43**.

Ο βαθμός ακερεστότητας υπολογίστηκε σε $\Omega=5$, οπότε εκτός από την παρουσία των δύο καρβονυλικών ομάδων και του διπλού δεσμού θα έπρεπε να υπάρχουν και δύο δακτύλιοι στο μόριο.

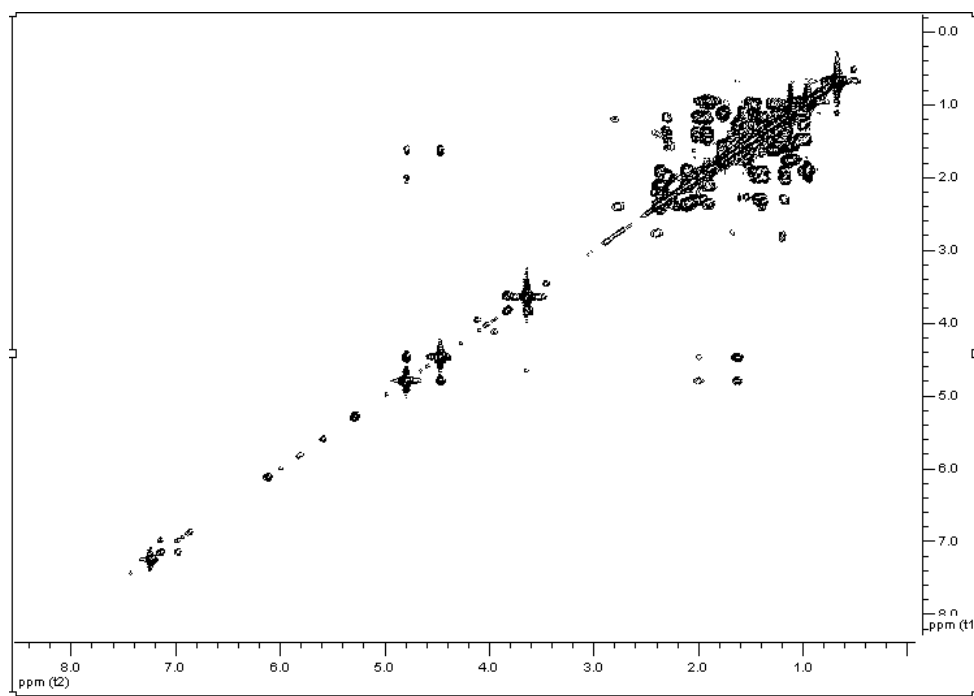
Οι ομοπυρηνικές συσχετίσεις COSY, $\text{H}_2\text{-1}/\text{H}_2\text{-2}$, $\text{H}_2\text{-2}/\text{H}_2\text{-3}$, $\text{H-5}/\text{H}_2\text{-6}$, $\text{H}_2\text{-6}/\text{H}_2\text{-7}$, H-

9/H₂-11, H₂-11/H₂-12, H₂-12/H-13, H-13/H₂-14 και H-16/H₃-16 καθόρισαν την αλληλουχία των C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6 και C-7, καθώς και τη σειρά των πρωτονιομένων ανθράκων της πλευρικής αλυσίδας.

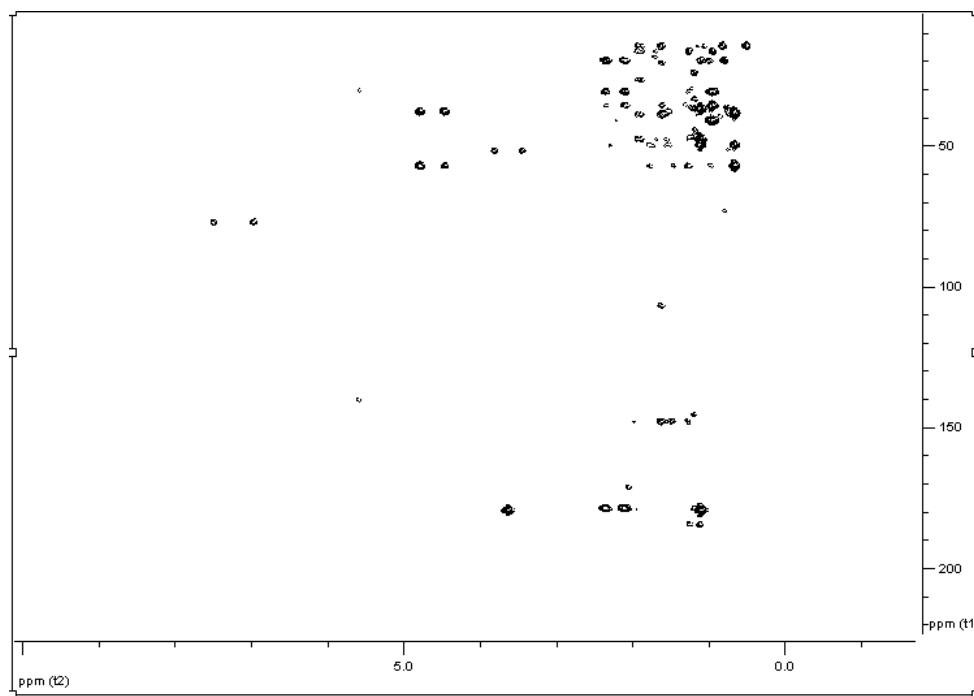
Επίσης τα πρωτόνια του εξωμεθυλενίου εμφανίζουν μακράς απόστασης (long range) σύζευξη με το H-9 και με ένα από τα πρωτόνια του H₂-7. Με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο ετεροπυρηνικό φάσμα HMBC (Εικ. 246) προσδιορίστηκαν πλήρως οι θέσεις των ανθράκων στο μόριο (Εικ. 244).



Εικόνα 244. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη 43.



Εικόνα 245. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 43.



Εικόνα 246. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **43**.

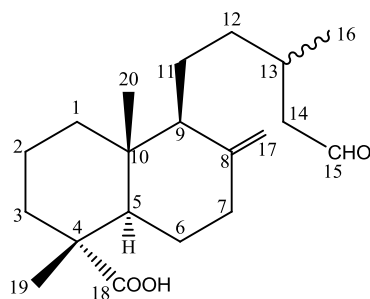
Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των ασύμμετρων κέντρων C-9 και C-10 και το συμπέρασμα ότι το μόριο ανήκει στην σειρά των κανονικών λαβδανικών διτερπενίων βασίστηκε στο θετικό πρόσημο της στροφικής ικανότητας (Carreras et al. 1998, Enzell et al. 1962). Επιπρόσθετα, η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας του C-4 βασίστηκε στο γεγονός ότι το τεταρτοταγές μεθύλιο H₃-20 δεν υφίσταται θωράκιση από το μεθυλεστέρα, που σημαίνει ότι εάν το μεθύλιο H₃-20 έχει θέση αξονική, τότε ο μεθυλεστέρας θα έχει θέση ισημερινή (Kuo et al. 1996). Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 18-μεθυλεστέρα του 8(17)-λαβδεν-15,18-διοϊκού οξέος (18-μεθυλεστέρα του πινοφολικού οξέος) (Zinkel et al. 1985). Στον Πίνακα 153 φαίνεται η απόδοση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **43**.

Πίνακας 153 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **43** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a	38.4	1.75 m
1b		1.10 m
2	18.5	1.56 m
3a	38.1	1.73 m
3b		1.55 m
4	47.8	-
5	50.7	1.91 dd (12.6, 2.6)
6a	27.4	1.41 m
6b		1.17 m
7a	38.5	2.30 m
7b		1.99 m
8	148.0	-
9	57.1	1.62 m
10	39.1	-
11a	20.8	1.45 m
11b		1.27 m
12a	35.7	1.50 m
12b		0.99 m
13	31.3	1.89 m
14a	41.1	2.35 m
14b		2.10 m
15	178.1	-
16	19.9	0.96 d (6.7)
17a	106.9	4.78 brs
17b		4.45 brs
18	179.3	-
19	16.6	1.12 s
20	14.7	0.67 s
18-OMe	51.9	3.63 s

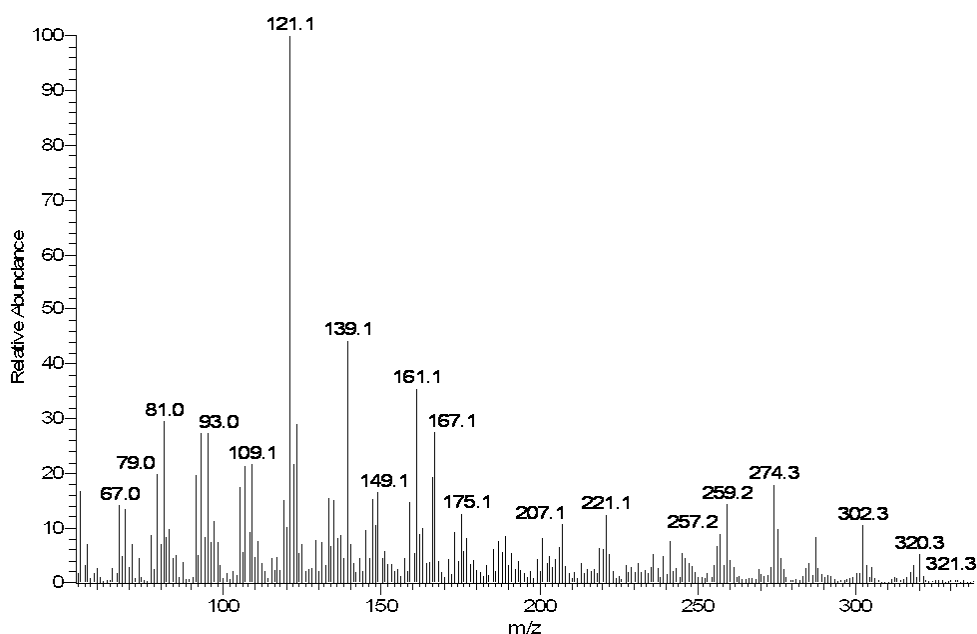
3.2.7. Μεταβολίτης 44: 15-Οξο-8(17)-λαβδεν-18-οϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **44** απομονώθηκε ως υποκίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα ($[\alpha]_D^{20} = +13.0$, c 1.12, CHCl_3), συνολικής μάζας 11.6 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **44** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$.



44

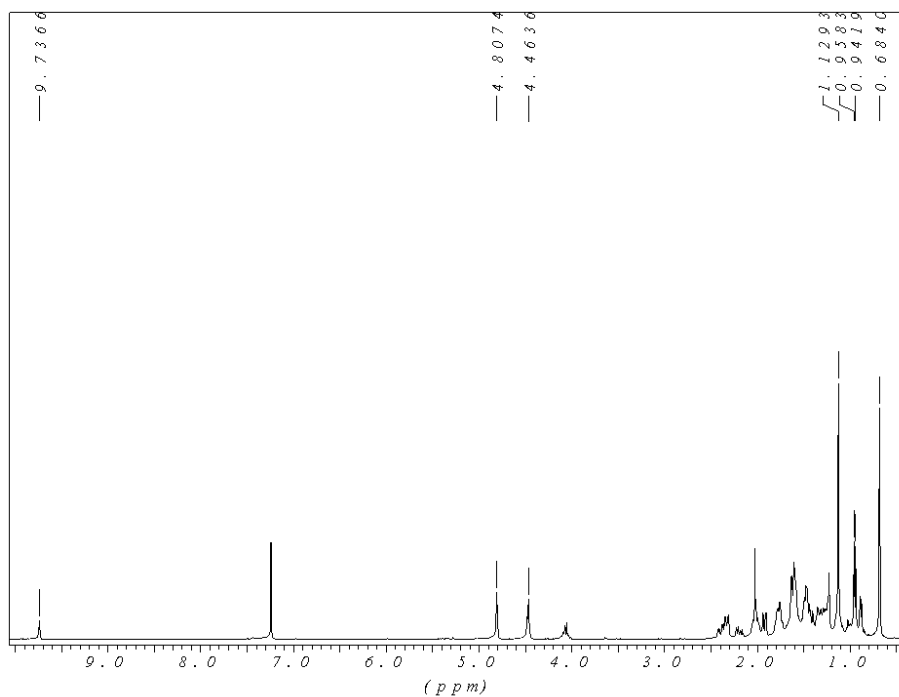
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 247) παρατηρήθηκε το μοριακό ιόν $[\text{M}]^+$ σε m/z 320, καθώς και το θραύσμα $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ σε m/z 302.



Εικόνα 247. Φάσμα μάζας (PCIMS) του μεταβολίτη **44**.

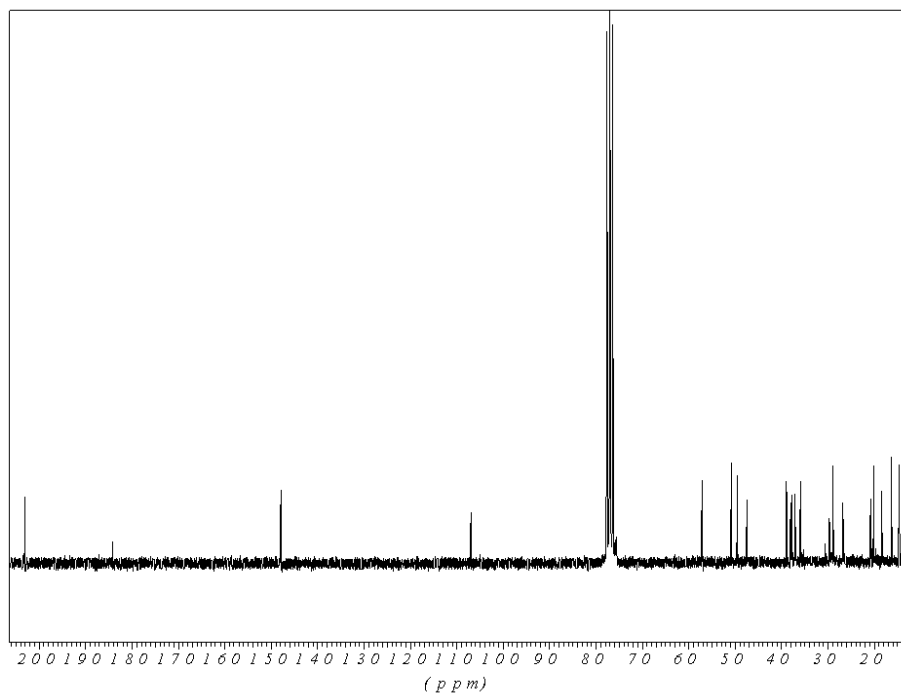
Στο φάσμα ^1H NMR (Εικ. 248) διακρίθηκαν (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.13 και 0.68, που ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο μεθυλίων ε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία διπλή κορυφή στα 0.95 ppm (6.6 Hz), που επίσης ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε ένα μεθύλιο σε τριτοταγές άτομο άνθρακα, (iii) δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.46 και 4.81, που ολοκλήρωναν για ένα

πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου και (iv) μια τριπλή κορυφή σε δ 9.74 (t, 2.0 Hz), που αντιστοιχούσε σε ένα αλδεϋδικό πρωτόνιο.

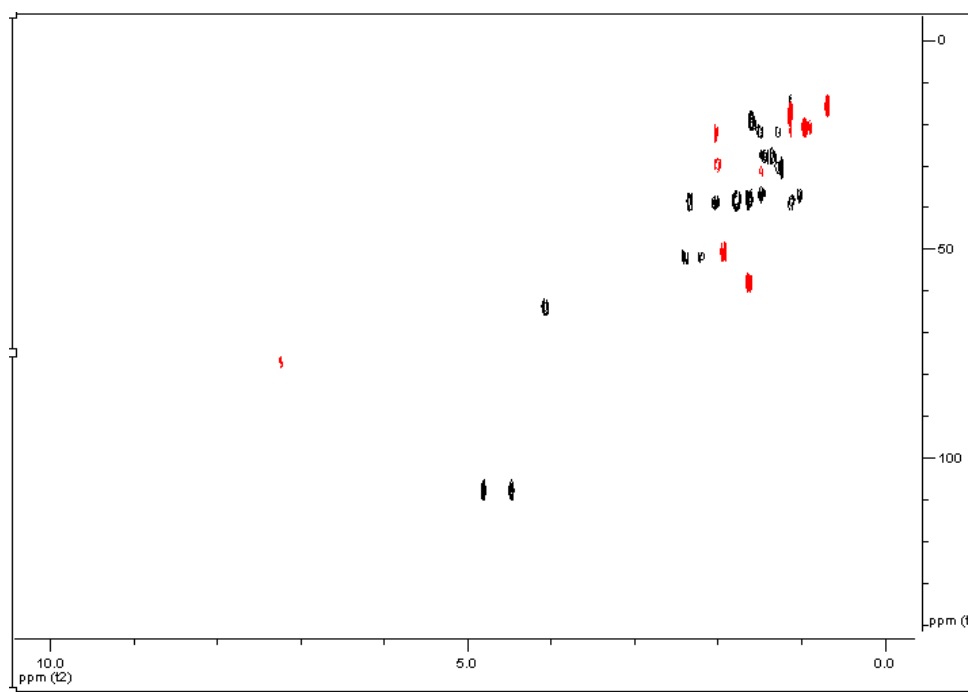


Εικόνα 248. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **44**.

Σύμφωνα με τα δεδομένα του φάσματος ^{13}C NMR (Εικ. 249) και του δισδιάστατου φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 250) επιβεβαιώνεται η ύπαρξη συνολικά τριών μεθυλίων, εννέα μεθυλενίων, τεσσάρων μεθινίων, και τεσσάρων τεταρτοταγών ανθράκων. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.



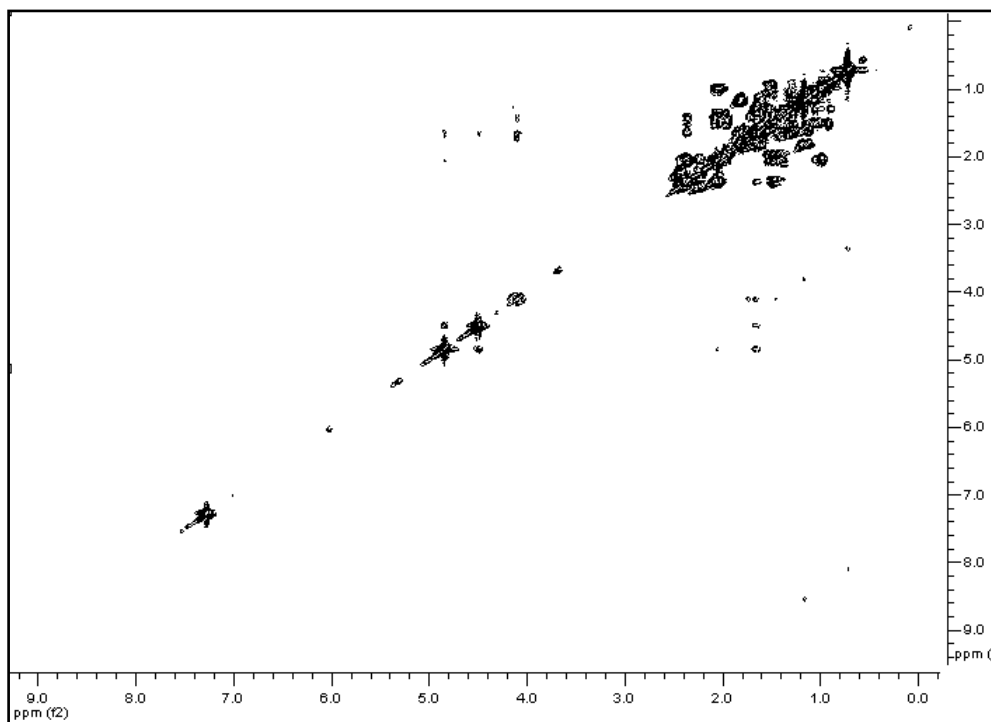
Εικόνα 249. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **44**.



Εικόνα 250. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **44**.

Με βάση το ομοπυρηνικό φάσμα COSY (Εικ. 251) καθορίστηκε η αλληλουχία των μεθυλενίων C-1, C-2 και C-3, των C-5, C-6 και C-7 καθώς και η αλληλουχία των πρωτονίων της πλευρικής αλειφατικής αλυσίδας, σε πλήρη αναλογία με το μεταβολίτη **43**. Ομοίως, τα πρωτόνια του εξωμεθυλενίου εμφάνισαν μακράς απόστασης (long range) σύζευξη με το H-9

και με ένα από τα πρωτόνια του H₂-7.



Εικόνα 251. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **44**.

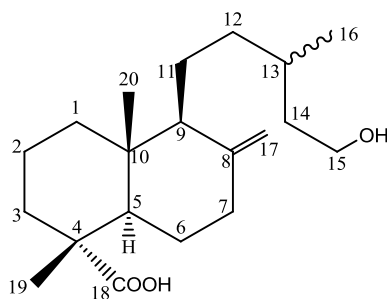
Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 15-οξο-8(17)-λαβδεν-18-οϊκό οξύ (Zinkel et al. 1985). Στον Πίνακα 154 φαίνεται η απόδοση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **44**, ενώ γίνεται πρώτη φορά η πλήρης απόδοση τους.

Πίνακας 154 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **44** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a	38.9	a 1.79 m
1b		b 1.12 m
2	18.4	1.60 m
3a	37.8	a 1.78 m
3b		b 1.62 m
4	47.5	-
5	49.6	1.94 dd (12.4, 2.2)
6a	26.8	a 1.44 m
6b		b 1.35 m
7a	38.0	a 2.34 m
7b		b 2.01 m
8	147.9	-
9	57.1	1.64 m
10	36.0	-
11a	20.8	a 1.49 m
11b		b 1.27 m
12a	37.1	a 1.48 m
12b		b 1.02 m
13	28.9	2.00 m
14a	50.8	a 2.39 m
14b		b 2.20 m
15	203.0	9.75 t (2.0)
16	20.2	0.95 d (6.6)
17a	107.0	a 4.49 brs
17b		b 4.80 brs
18	184.1	-
19	16.3	1.13 s
20	14.7	0.68 s

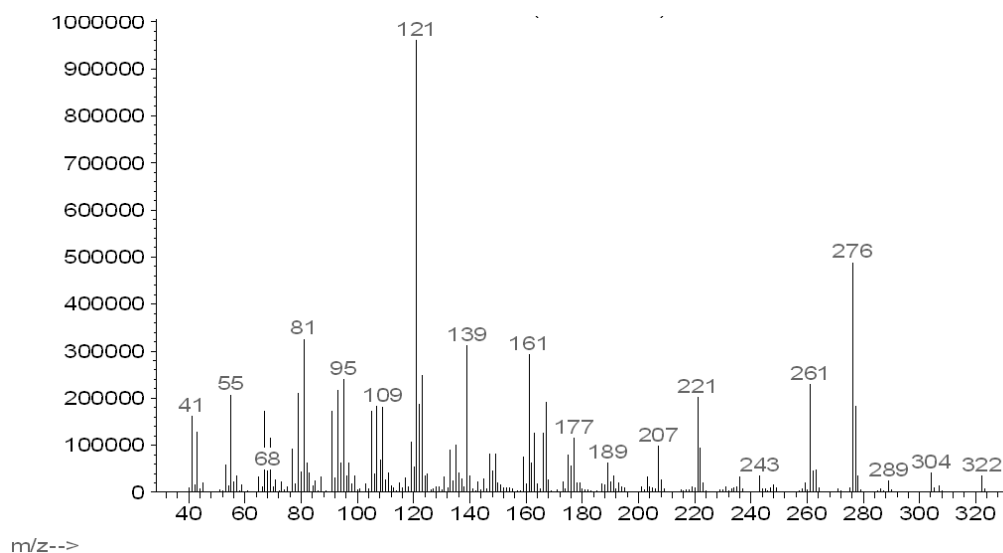
3.2.8. Μεταβολίτης 45: 15-Υδροξυλαβδ-8(17)-εν-18-οϊκό οξύ

Ο μεταβολίτης **45** απομονώθηκε ως κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα ($[\alpha]_D^{20} = +18.2$ c 0.28, CHCl₃), συνολικής μάζας 11.2 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **45** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₀H₃₄O₃.



45

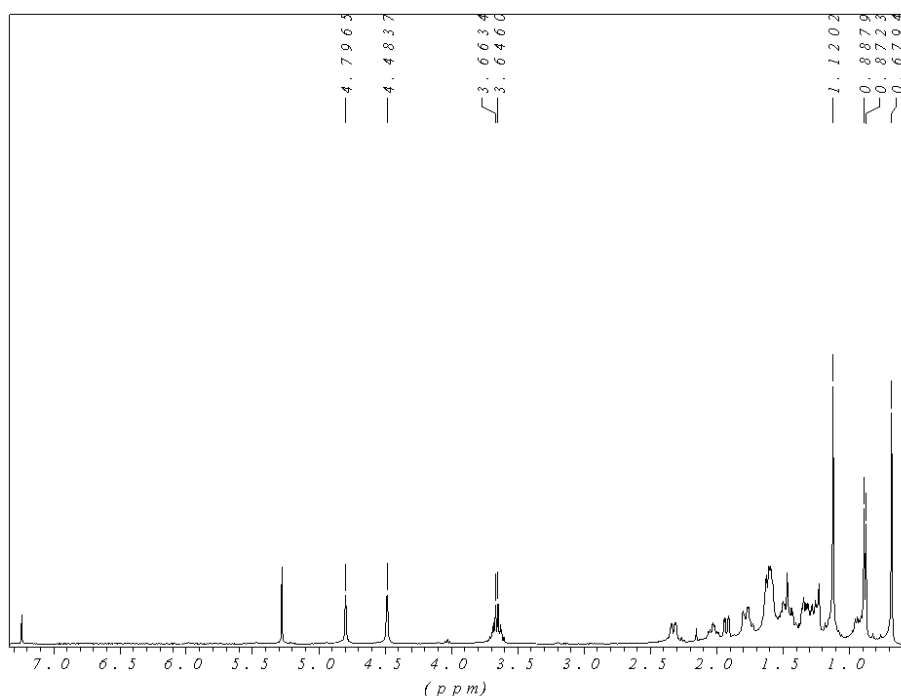
Στο φάσμα μάζας εμφανίστηκε το μοριακό ιόν [M]⁺ σε m/z 322 και τα θραύσματα [M-H₂O]⁺ και [M-HCOOH]⁺ σε m/z 304 και σε m/z 276 αντίστοιχα (Εικ. 252). Επιπλέον το θραύσμα σε m/z 221 αντιστοιχεί στο ιόν που προκύπτει μετά την απόσπαση της πλευρικής αλυσίδας.



Εικόνα 252. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **45**.

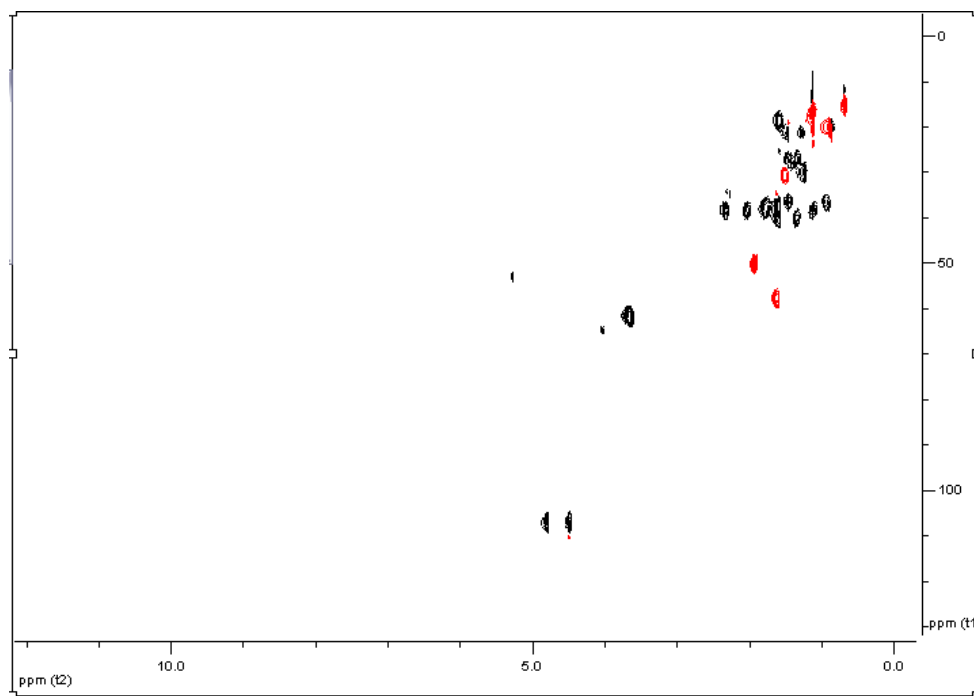
Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 253) παρατηρήθηκαν (i) δύο απλές κορυφές σε τεταρτοταγείς άνθρακες σε δ 1.12 και 0.68, που ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο μεθύλια σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία διπλή στα 0.88 ppm (d, 6.2Hz), που αντιστοιχούσε σε ένα μεθύλιο σε τριτοταγή άνθρακα, (iii) μία πολλαπλή κορυφή σε δ 3.65, που ολοκλήρωνε για δύο πρωτόνια και αποδόθηκε στα

πρωτόνια ενός οξυγονωμένου μεθυλενίου και (iv) δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.48 και 4.80, που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο εξωμεθυλικά πρωτόνια. Κατόπιν σύγκρισης των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **45** με αυτά του μεταβολίτη **44** έγινε φανερή η δομική τους ομοιότητα, ενώ η βασική διαφορά τους εντοπίστηκε στην αντικατάσταση της τριπλής κορυφής του αλδεϋδικού πρωτονίου στα 9.75 ppm από μία πολλαπλή κορυφή μίας οξυγονωμένης μεθυλενικής ομάδας στα 3.65 ppm.



Εικόνα 253. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **45**.

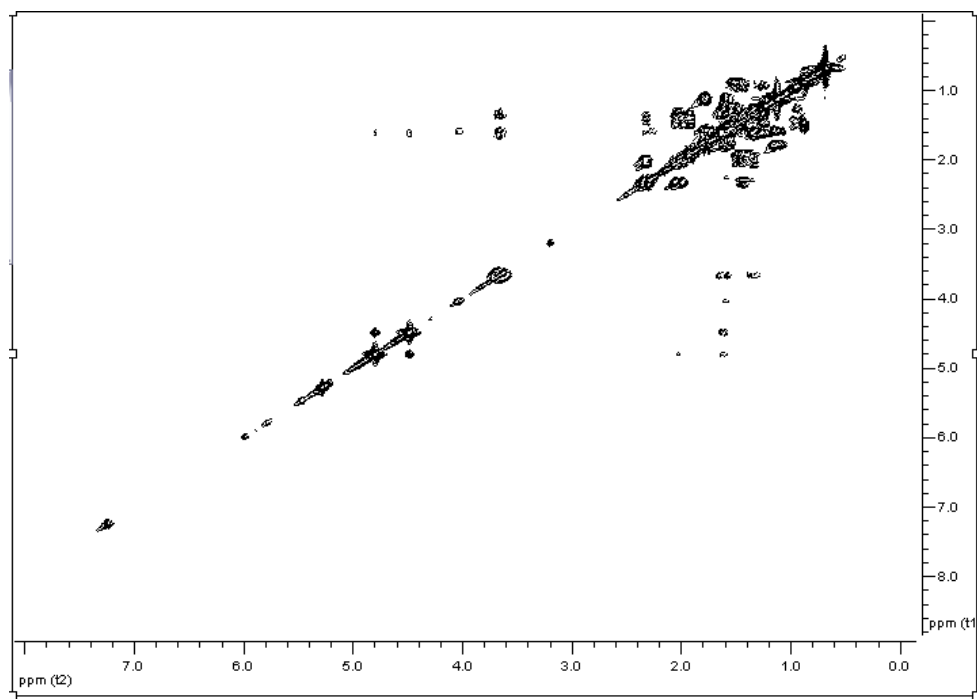
Κατόπιν λήψης του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 254) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τριών μεθυλίων, δέκα μεθυλενίων, το ένα εκ των οποίων οξυγονωμένο και τριών μεθινίων. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.



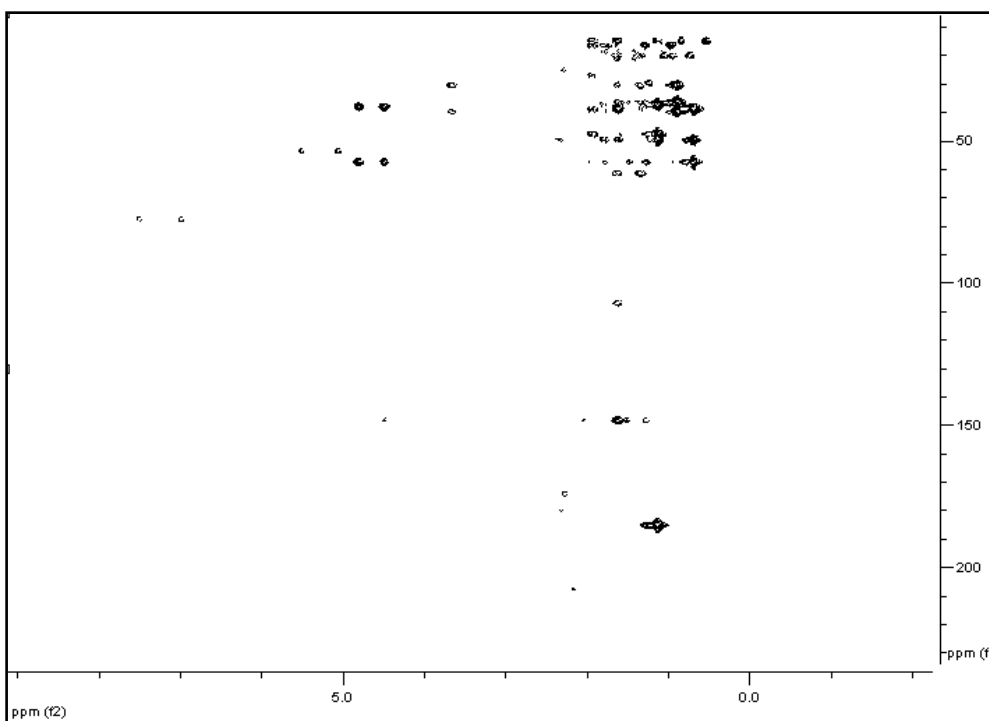
Εικόνα 254. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **45**.

Το ομοπυρηνικό φάσμα COSY (Εικ. 255) επιβεβαιώνει την αλληλουχία των μεθυλενίων των C-1, C-2 και C-3, καθώς και των C-5, C-6 και C-7. Επίσης τα πρωτόνια του εξωμεθυλενίου εμφανίζουν μακράς απόστασης (long range) σύζευξη με το πρωτόνιο του μεθινίου της θέσης 9 και με ένα από τα πρωτόνια H₂-7, όπως και στην περίπτωση των μεταβολιτών **43** και **44**. Επιπρόσθετα, επιβεβαιώνεται η αλληλουχία των πρωτονίων της πλευρικής αλειφατικής αλυσίδας.

Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη 15-υδροξυλαβδ-8(17)-εν-18-οϊκό οξύ (Zdero et al. 1991). Στον Πίνακα 155 φαίνονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **45**, ενώ γίνεται πρώτη φορά η πλήρης απόδοση τους.



Εικόνα 255. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 45.



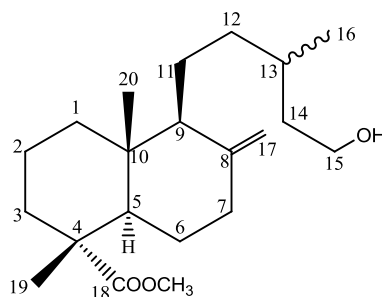
Εικόνα 256. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 45.

Πίνακας 155 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **45** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a	38.4	a 1.79 m
1b		b 1.13 m
2	18.6	1.58 m
3a	37.7	a 1.78 m
3b		b 1.62 m
4	47.4	-
5	50.0	1.92 dd (12.4, 2.6)
6a	27.0	a 1.46 m
6b		b 1.35 m
7a	38.0	a 2.32 m
7b		b 2.02 m
8	147.7	-
9	57.8	1.61 m
10	38.5	-
11a	21.2	a 1.46 m
11b		b 1.27 m
12a	36.4	a 1.45 m
12b		b 0.93 m
13	30.6	1.51 m
14	40.0	1.35 m
15	61.0	3.67 m
16	19.9	0.88 d (6.2)
17a	106.9	a 4.80 brs
17b		b 4.48 brs
18	184.7	-
19	16.7	1.12 s
20	15.1	0.68 s

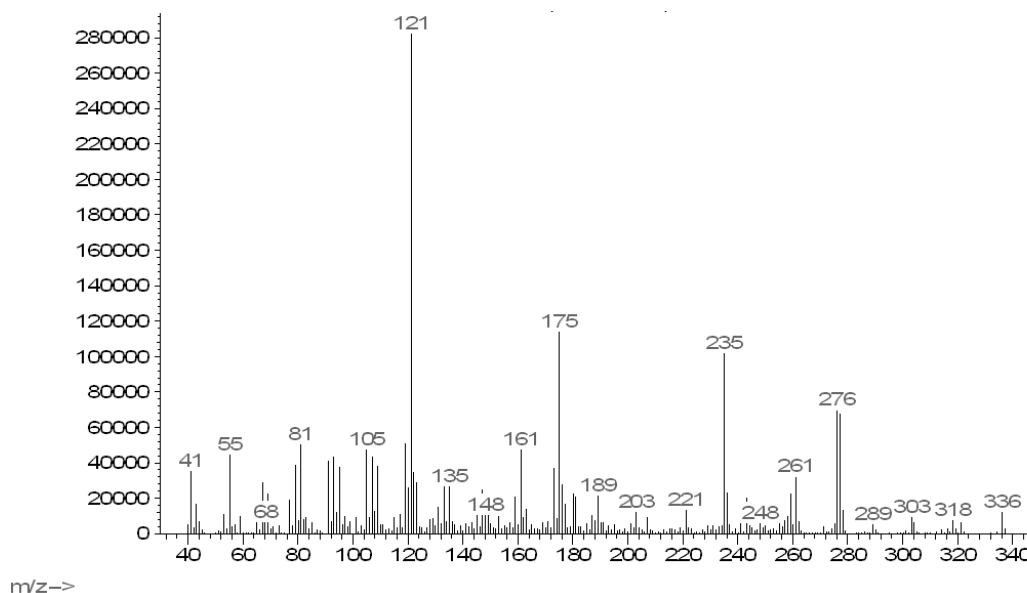
3.2.9. Μεταβολίτης 46: 15-Υδροξυλαβδ-8(17)-εν-18-οϊκός μεθυλεστέρας

Ο μεταβολίτης **46** απομονώθηκε ως υποκίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα ($[\alpha]_D^{20} = +10.0$ c 0.22, CHCl₃), συνολικής μάζας 3.2 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **46** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₁H₃₆O₃.



46

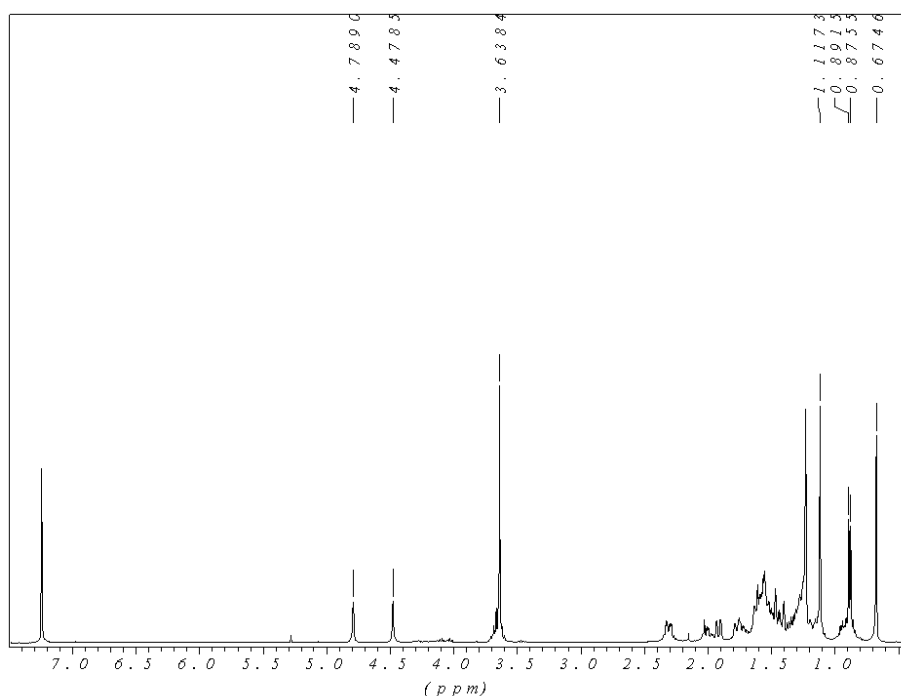
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 257) εμφανίσθηκε το μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 336 ενώ παρατηρήθηκε το θραύσμα $[M-COOCH_3]^+$ σε m/z 276, ενώ σε m/z 235 εμφανίζεται το θραύσμα που προκύπτει κατόπιν απόσπασης της πλευρικής αλυσίδας.



Εικόνα 257. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **46**.

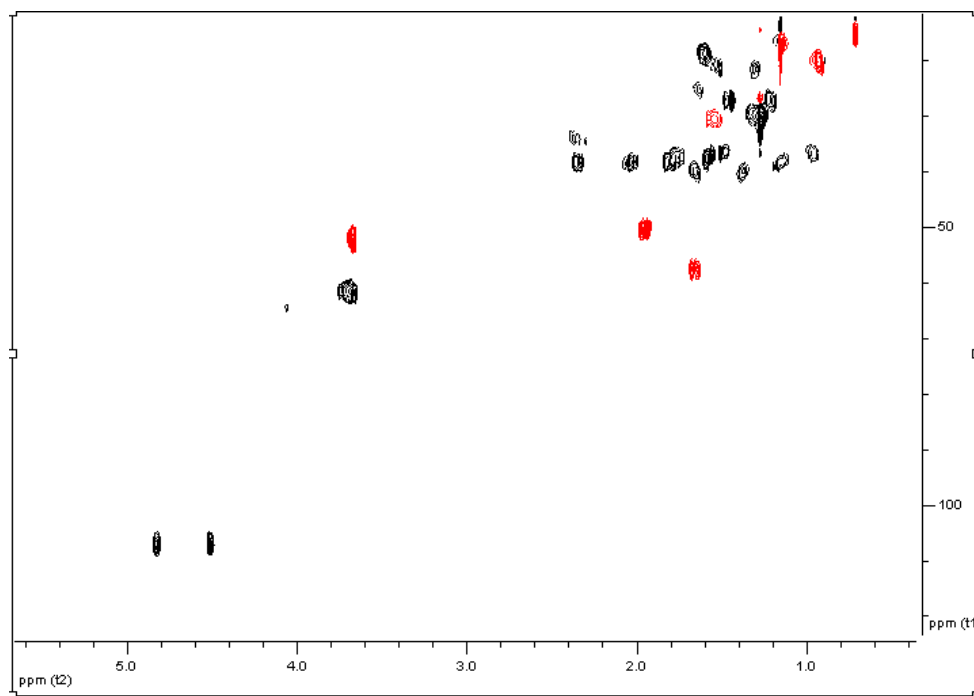
Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 258) παρατηρήθηκαν (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.12 και 0.67, που ολοκληρώναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) μία διπλή κορυφή σε δ 0.88 (d, 6.7 Hz) που ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια ενός μεθυλίου σε τριτοταγή άτομο άνθρακα, (iii) μία απλή κορυφή στα 3.64 ppm, που ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια μίας ομάδας μεθοξυλίου και (iv) δύο ευρείες απλές κορυφές σε

δ 4.48 και 4.80, που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου και (iv) μία πολλαπλή κορυφή σε δ 3.68, που ολοκλήρωνε για δύο πρωτόνια και αποδοθηκε στα πρωτόνια ενός υδροξυλιωμένου μεθυλενίου, τα σήματα του οποίου επικαλύπτονται μερικώς από την απλή κορυφή του οξυγονωμένου μεθυλίου. Έτσι, από τη σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **46** με αυτά του μεταβολίτη **45** έγινε φανερή η δομική τους ομοιότητα με μόνη βασική διαφορά την ύπαρξη ενός οξυγονωμένου μεθυλίου στα 3.64 ppm στο φάσμα ^1H NMR του **46**.



Εικόνα 258. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **46**.

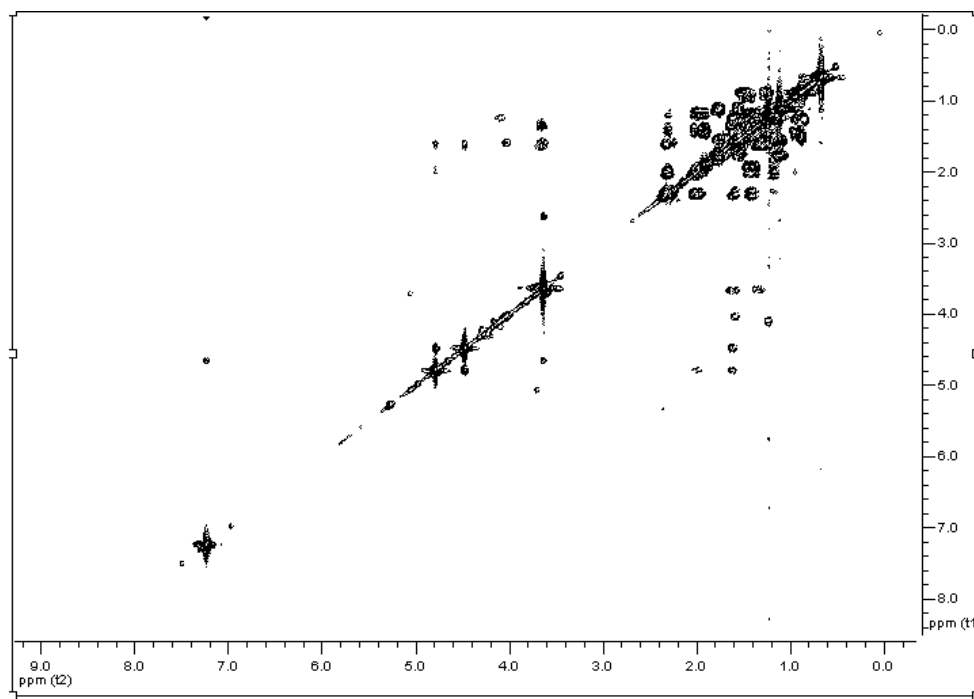
Κατόπιν λήψης του δισδιάστατου φάσματος ετεροπυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, HSQC-DEPT (Εικ. 259) επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη συνολικά τεσσάρων μεθυλίων, το ένα εκ των οποίων είναι οξυγονωμένο, δέκα μεθυλενίων, το ένα εκ των οποίων οξυγονωμένο και τριών μεθινίων. Με βάση το φάσμα HSQC-DEPT έγινε η απόδοση όλων των πρωτονίων στους αντίστοιχους άνθρακες.



Εικόνα 259. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **46**.

Το φάσμα COSY (Εικ. 260) επιβεβαιώνει την αλληλουχία των μεθυλενίων των C-1, C-2 και C-3, καθώς και των C-5, C-6 και C-7. Επίσης τα πρωτόνια του εξωμεθυλενίου εμφανίζουν μακράς απόστασης (long range) σύζευξη με το H- 9 και με ένα από τα μεθυλενικά πρωτόνια H₂-7. Επιπρόσθετα, επιβεβαιώνεται και η αλληλουχία των πρωτονίων της πλευρικής αλειφατικής αλυσίδας.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική έρευνα που ακολούθησε, διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το μεθυλεστέρα του **45**, γνωστό μεταβολίτη 15-υδροξυλαβδ-8(17)-εν-18-οϊκό μεθυλεστέρα. Στον Πίνακα 156 φαίνονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **46**, τα οποία για πρώτη φορά αποδίδονται πλήρως.



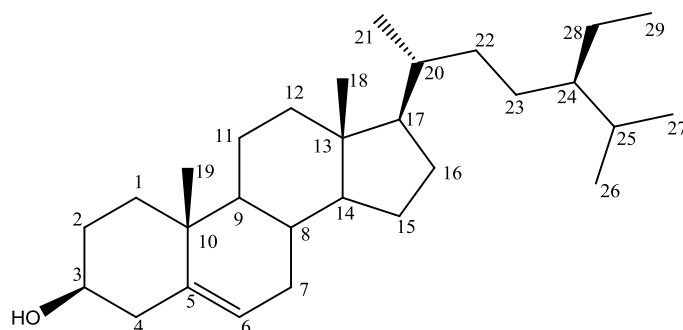
Εικόνα 260. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **46**.

Πίνακας 156 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **46** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1a	38.4	1.77 m
1b		1.15 m
2	18.9	1.61 m
3a	37.7	1.78 m
3b		1.59 m
4	nd	-
5	50.3	1.95 dd (12.6, 2.9)
6a	27.4	1.44 m
6b		1.21 m
7a	38.4	2.34 m
7b		2.02 m
8	nd	-
9	57.4	1.66 m
10	nd	-
11a	21.5	1.50 m
11b		1.29 m
12a	36.4	1.48 m
12b		0.95 m
13	30.3	1.54 m
14a	40.0	1.65 m
14b		1.37 m
15	61.7	3.66 m
16	20.2	0.93 d (6.4)
17a	107.3	4.50 brs
17b		4.81 brs
18	nd	-
19	17.0	1.12 s
20	15.1	0.67 s
18-OMe	51.9	3.67 s

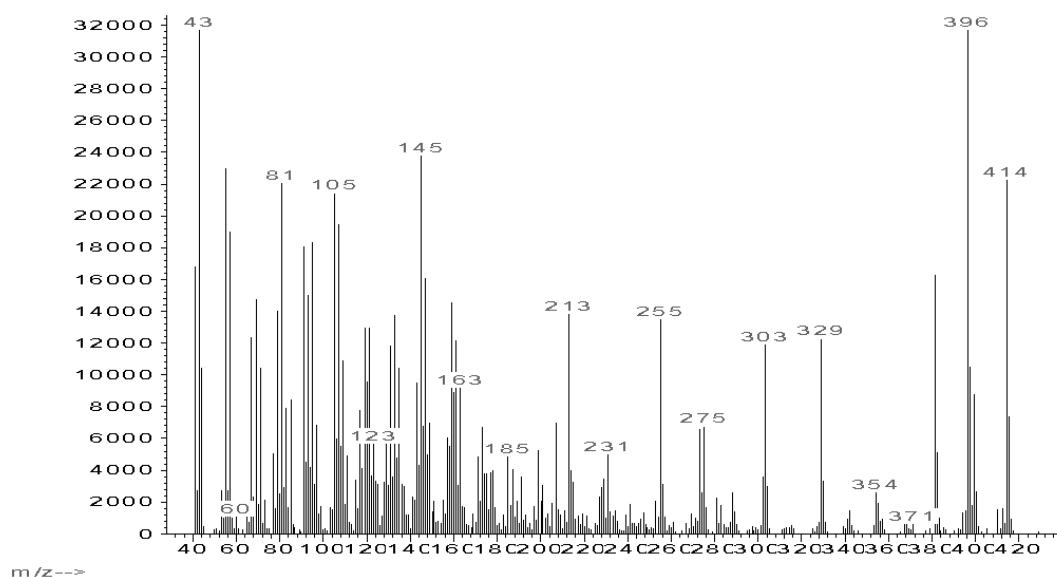
3.2.10. Μεταβολίτης 47: β-Σιτοστερόλη

Ο μεταβολίτης **47** απομονώθηκε ως υποκίτρινο στερεό υπόλειμμα, συνολικής μάζας 4.7 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **47** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₂₉H₅₀O.



47

Το μοριακό ιόν στο φάσμα μάζας (Εικ. 261) εμφανίστηκε σε m/z 414, ενώ το χαρακτηριστικό θραύσμα σε m/z 396 υποδηλώνει την απόσπαση ενός μορίου H₂O.

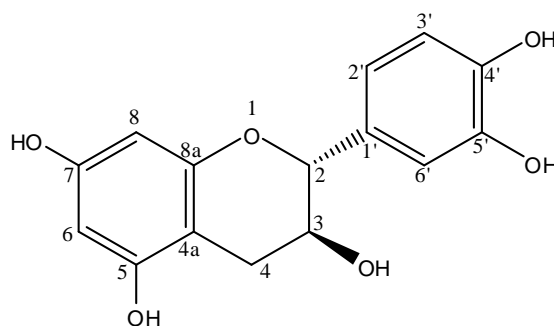


Εικόνα 261. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **47**.

Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 262) του μεταβολίτη **47** παρατηρήθηκαν (i) δύο απλές κορυφές σε δ 0.66 και 0.99, που ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, (ii) τρεις διπλές κορυφές στα 0.90, 0.80 και 0.79 ppm, που ομοίως ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε τρία μεθύλια σε τριτοταγή άτομα άνθρακα, (iii) μία τριπλή κορυφή σε δ

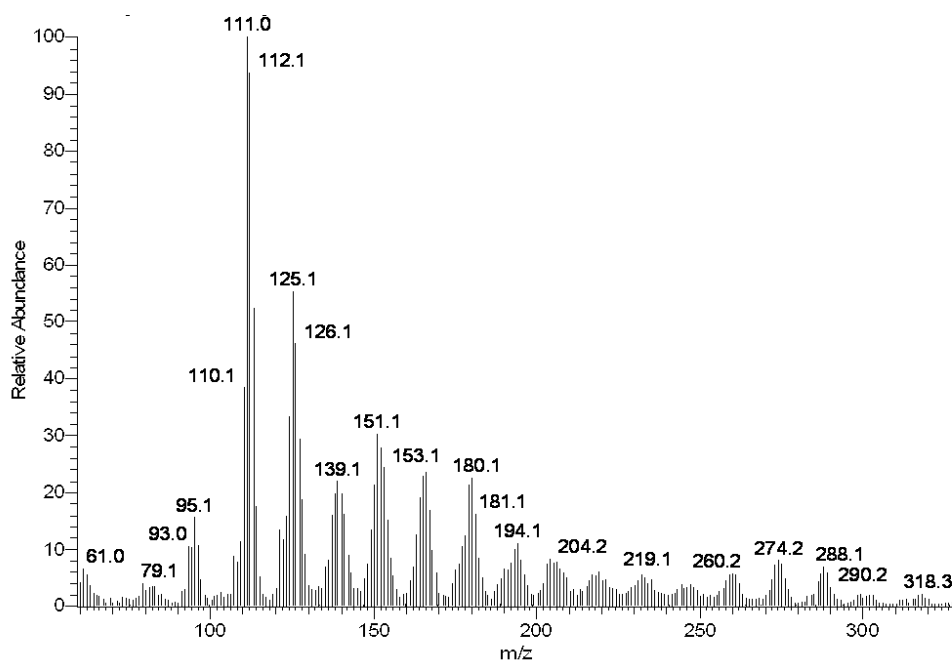
3.2.11. Μεταβολίτης 48: (+)-Κατεχίνη

Ο μεταβολίτης **48** απομονώθηκε ως κίτρινο στερεό υπόλειμμα, συνολικής μάζας 3.5 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **48** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₅H₁₄O₆.



48

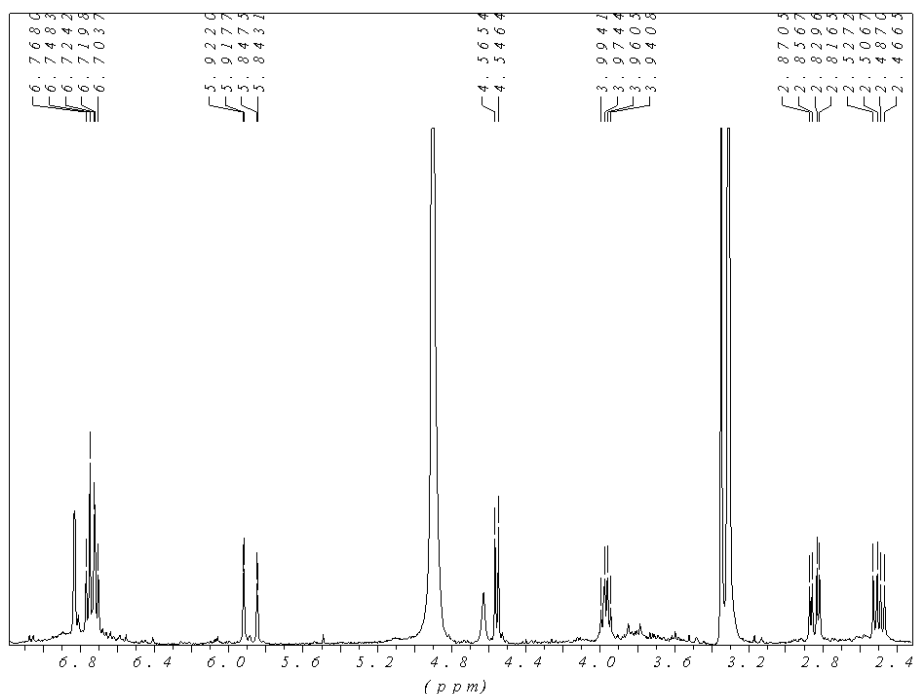
Το μοριακό ιόν [M]⁺ στο φάσμα μάζας εμφανίστηκε σε m/z 290 (Εικ. 263).



Εικόνα 263. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **48**.

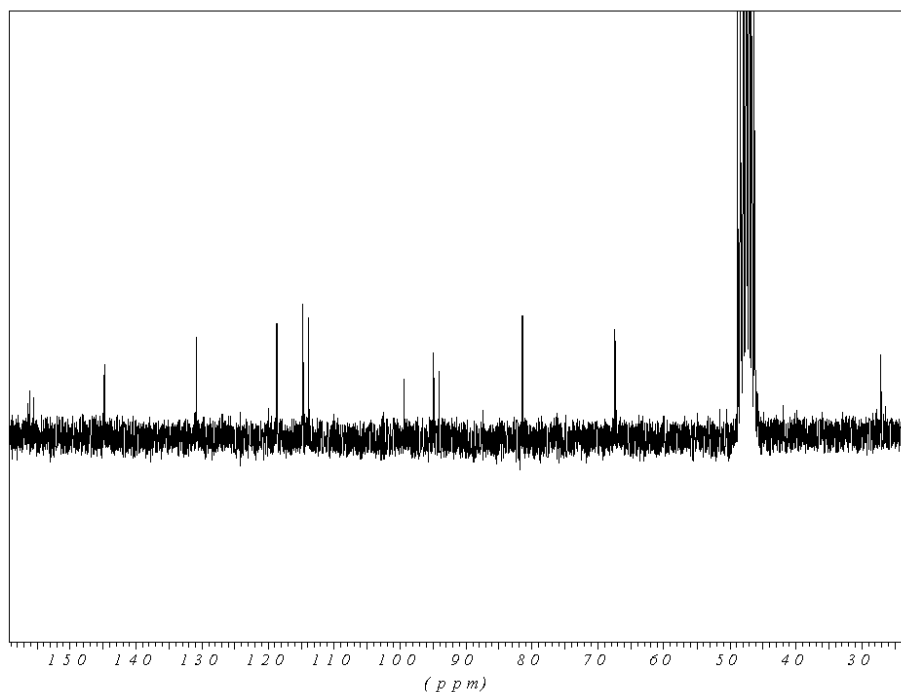
Στο φάσμα ¹H NMR (Εικ. 264) του μεταβολίτη **48** διακρίθηκαν (i) δύο διπλές διπλών κορυφές στα 2.50 ppm (16.1, 8.2Hz), στα 2.84 ppm (16.1, 5.4Hz), που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια του ίδιου μεθυλενίου εφόσον έχουν την ίδια geminal σταθερά σύζευξης, (ii) μια πολλαπλή κορυφή στα 3.97 ppm, που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο, (iii) μία διπλή κορυφή σε δ 4.56 (7.6 Hz), που αντιστοιχούσε σε ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε ένα οξυγονωμένο μεθινικό πρωτόνιο, (iv) δύο διπλές κορυφές

στα 5.85 και 5.92 ppm που ολοκληρώναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και με την ίδια σταθερά σύζευξης (1.8 Hz), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα πρωτόνια, στα οποία αντιστοιχούν, έχουν μεταξύ τους σύζευξη, (ν) δύο διπλές κορυφές σε δ 6.76 (7.9 Hz) και 6.83 ppm (1.8 Hz), που ολοκληρώναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία, καθώς και μία διπλή διπλών κορυφή στα 6.71 ppm (7.9, 1.8 Hz), σήματα χαρακτηριστικά τρισυποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα.



Εικόνα 264. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **48**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR (Εικ. 265) διακρίνονται συνολικά 15 άτομα άνθρακα, η πλήρης απόδοση των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 158.



Εικόνα 265. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **48**.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική έρευνα που ακολούθησε διαπιστώθηκε ότι επρόκειτο για το γνωστό μεταβολίτη (+)-κατεχίνη (Foo et al. 1989, Batterham et al. 1964). Στον Πίνακα 158 φαίνεται η πλήρης απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μορίου.

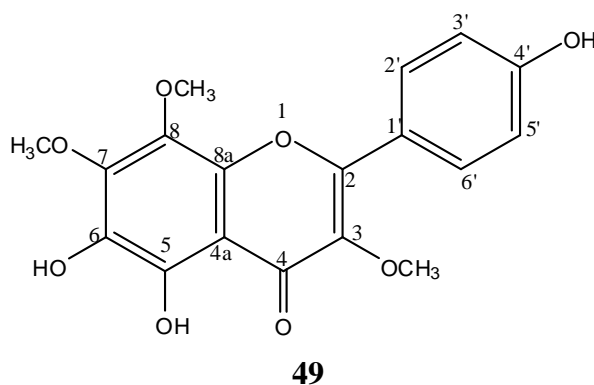
Πίνακας 158 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **48** σε CD_3OD (δ σε ppm), πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_{C}	δ_{H}
1	-	-
2	83.7	4.56 d (7.6)
3	69.7	3.97 m
4 α	29.4	2.84 dd (16.1, 5.4)
4 β		2.50 dd (16.1, 8.2)
4a	101.7	-
5	157.8	-
6	97.2	5.90 d (1.8)*
7	158.4	-
8	96.4	5.92 d (1.8)*
8a	158.7	-
1'	133.1	-
2'	116.1	6.71 dd (7.9, 1.8)
3'	147.1	6.76 d (7.9)
4'	147.1	-
5'	116.9	-
6'	120.9	6.83 d (1.8)

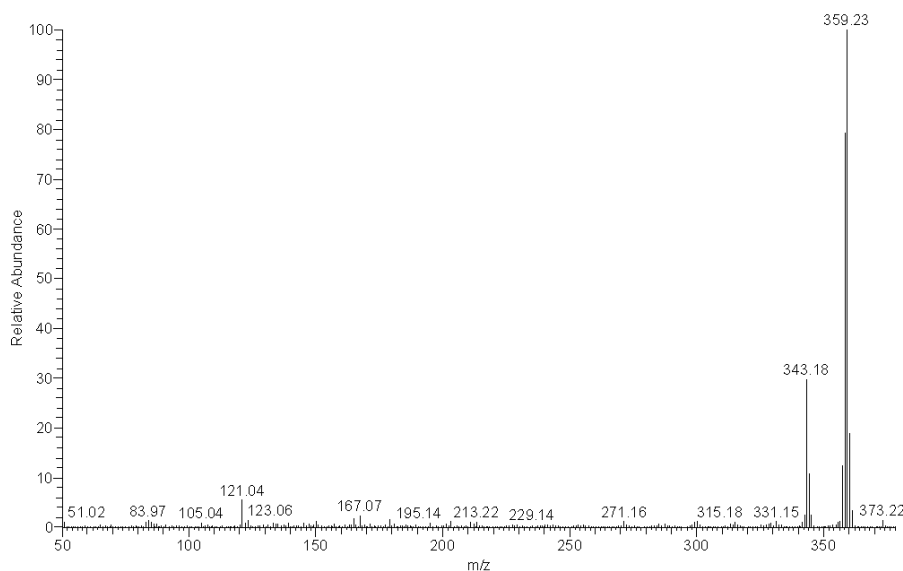
*οι τιμές μπορούν να ανταλλαχθούν

3.2.12. Μεταβολίτης 49: 5,6,4'-Τρωδροξυ-3,7,8-τριμεθοξυ-φλαβόνη (6,8-διυδροξυ- καιμπερόλη 3,7,8-τριμεθυλαιθέρας)

Ο μεταβολίτης **49** απομονώθηκε ως κίτρινο στερεό υπόλειμμα, συνολικής μάζας 0.7 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **49** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₈H₁₆O₈.

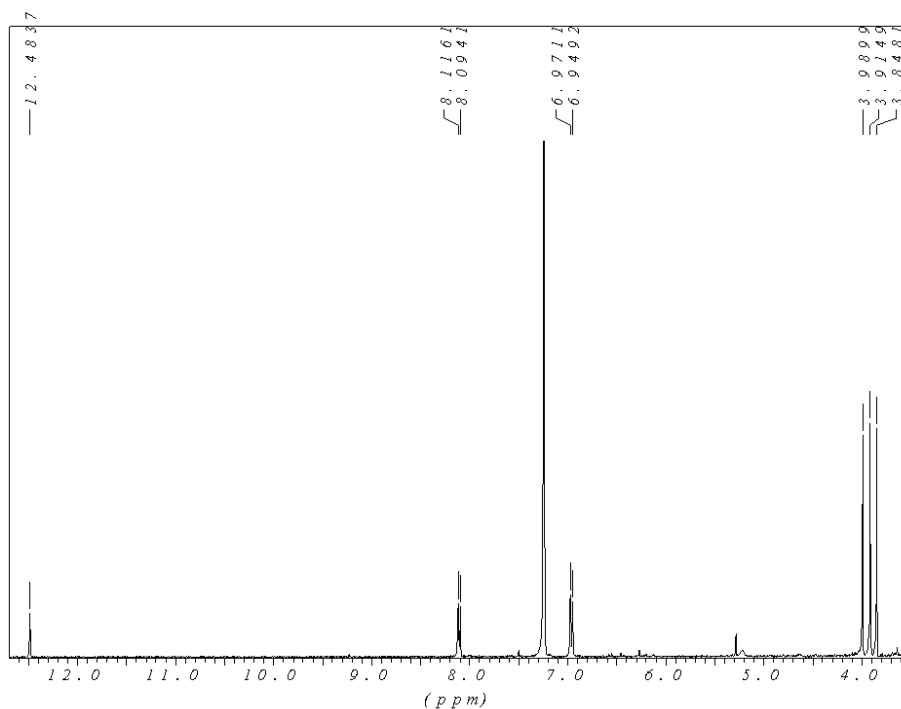


Στο φάσμα μάζας του μεταβολίτη **49** (Εικ. 266) το θραύσμα σε m/z 359 αντιστοιχούσε στο ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^+$.



Εικόνα 266. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **49**.

Στο φάσμα ¹H NMR του μεταβολίτη **49** (Εικ. 267) παρατηρήθηκαν (i) τρεις απλές κορυφές που αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια μίας ομάδας μεθοξυλίου η κάθε μία σε δ 3.99, 3.91 και 3.85 και (ii) δύο διπλές κορυφές στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων σε δ 6.95 (8.8 Hz) και 8.10 (8.8 Hz), χαρακτηριστικές ενός δισυποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα.



Εικόνα 267. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **49**.

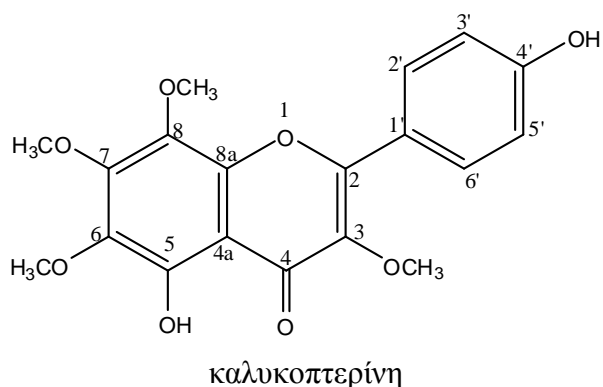
Ελήφθησαν φάσματα υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), κατά τη μελέτη των οποίων, παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικές κορυφές με τα ακόλουθα μέγιστα (nm):

	Κορυφή II	Κορυφή I		Δλ (nm)	
		Ιβ	Ια	II	Ιβ
Μεθανολικό διάλυμα	278	333			
Μεθ. Διαλ. + NaOMe	278	399			+56
Μεθ. Διαλ. + AlCl_3	285	360			+27
Μεθ. Διαλ.+ AlCl_3 + HCl	288	358			+25
Μεθ. Διαλ.+ NaOAc	277	337		no	
				shift	
Μεθ. Διαλ.+ NaOAc + H_3BO_3	278	334			no
					shift

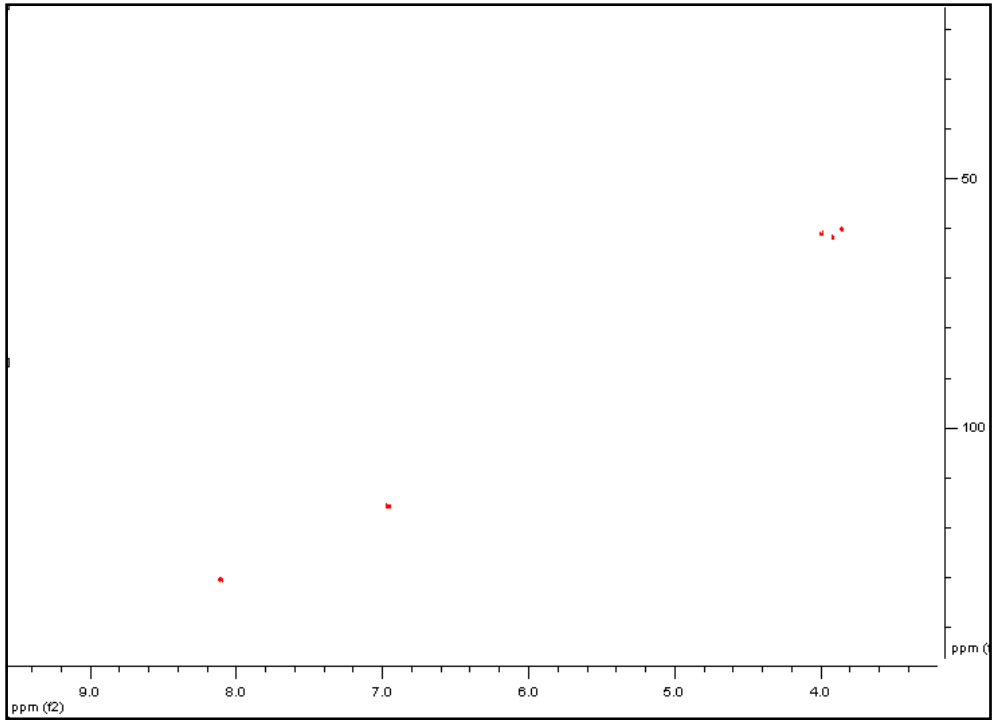
Η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 27 nm της κορυφής Ιβ μετά την προσθήκη AlCl_3 και η βαθυχρωμική μετατόπιση κατά 25 nm της κορυφής Ιβ μετά την προσθήκη πυκνού HCl υποδηλώνει την παρουσία ελεύθερου -OH στη θέση 5 και στη θέση 6, ενώ είναι χαρακτηριστική των 3-OMe υποκατεστημένων φλαβονολών. Η βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής Ιβ κατα 56 nm κατόπιν προσθήκης NaOMe στο μεθανολικό διάλυμα δηλώνει

την παρουσία μιας ελεύθερης υδροξυλομάδας στη θέση 4' του Β αρωματικού δακτυλίου. Η προσθήκη NaOAc και σε συνδυασμό με H₃BO₃ στο μεθανολικό διάλυμα δεν επέφερε αλλαγή στις απορροφήσεις, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει ελεύθερο –OH στον C-7, καθώς και ότι υπάρχει –OMe στον C-6 και/ή 8 (Mabry et al. 1970).

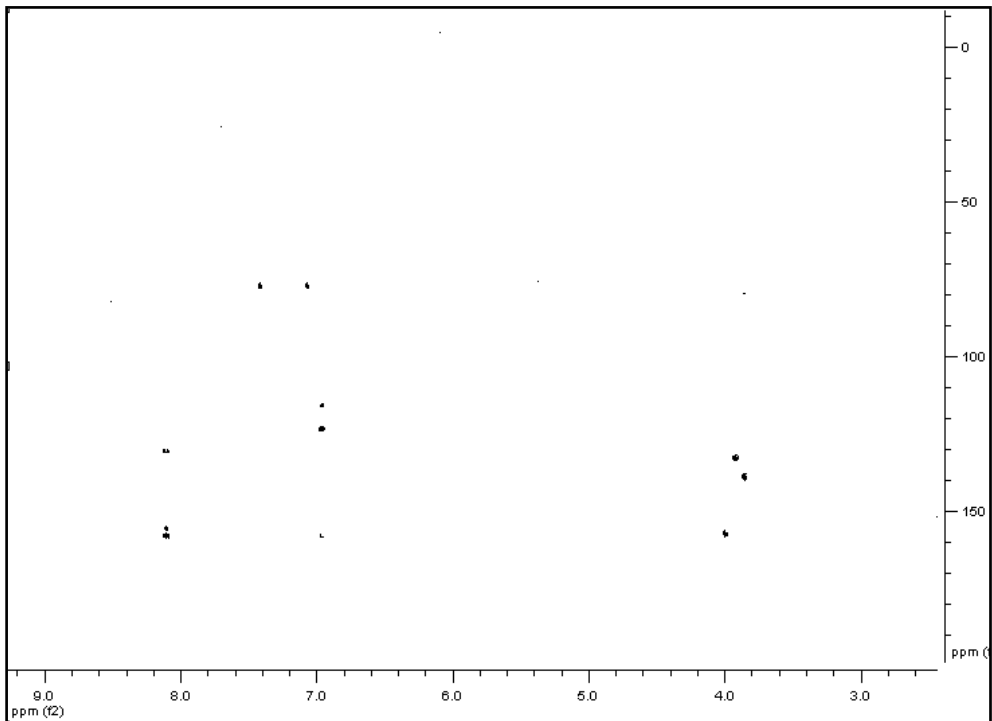
Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα και κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας ο μεταβολίτης **49** είναι νέο φυσικό προϊόν της κατηγορίας των φλαβονολών, το οποίο έχει αναφερθεί από τους Mahal et al. (1935) ως προϊόν ημισύνθεσης με πρώτη ύλη το φυσικό προϊόν καλυκοπερίνη.



Κατόπιν λήψης δισδιάστατων φασμάτων HSQC-DEPT (Εικ. 268) και HMBC (Εικ. 269) και σύγκριση με τα δεδομένα αντίστοιχων μορίων (Guerreiro et al. 1982, Rashid et al. 1992) έγινε μερική απόδοση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **49** όπως φαίνεται στον Πίνακα 159.



Εικόνα 268. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **49**.



Εικόνα 269. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **49**.

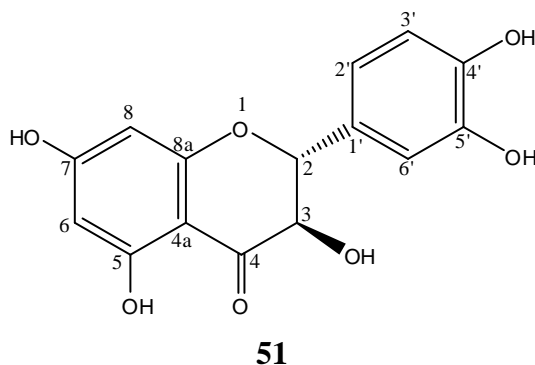
Πίνακας 159 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **49** σε CD₃OD (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
2	155.4	-
3	138.9	-
4	nd	-
4a	nd	-
5	nd	-
6	nd	-
7	157.2	-
8	132.6	-
8a	nd	-
1'	123.3	-
2'	130.4	8.11 d (8.8)
3'	115.6	6.97 d (8.8)
4'	157.8	-
5'	115.6	6.97 d (8.8)
6'	130.4	8.11 d (8.8)
3-OMe	60.0	3.86 s
7-OMe	60.9	3.99 s
8-OMe	61.7	3.92 s

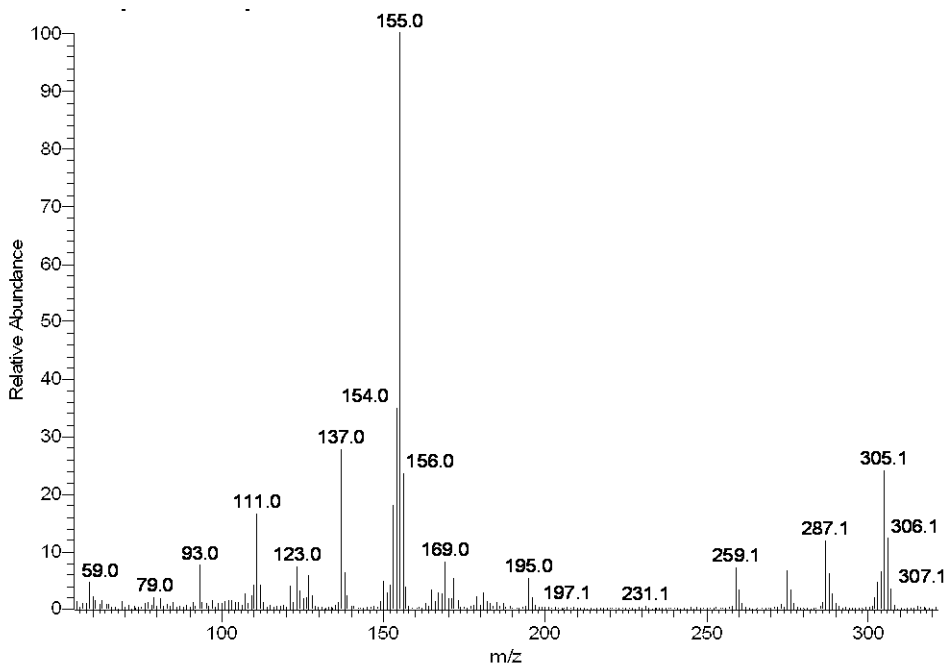
3.3. Ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών από το είδος *Pinus pinea*

3.3.1. Μεταβολίτης 50: (+)-Ταξιφολίνη (διδροκερκετίνη)

Ο μεταβολίτης **50** απομονώθηκε ως κίτρινο στερεό υπόλειμμα ($[\alpha]_D^{20} = +14.4$, c 0.9, MeOH), συνολικής μάζας 9.0 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **50** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{15}H_{12}O_7$, ενώ πραγματοποιήθηκε και η λήψη φασμάτων UV-Vis.



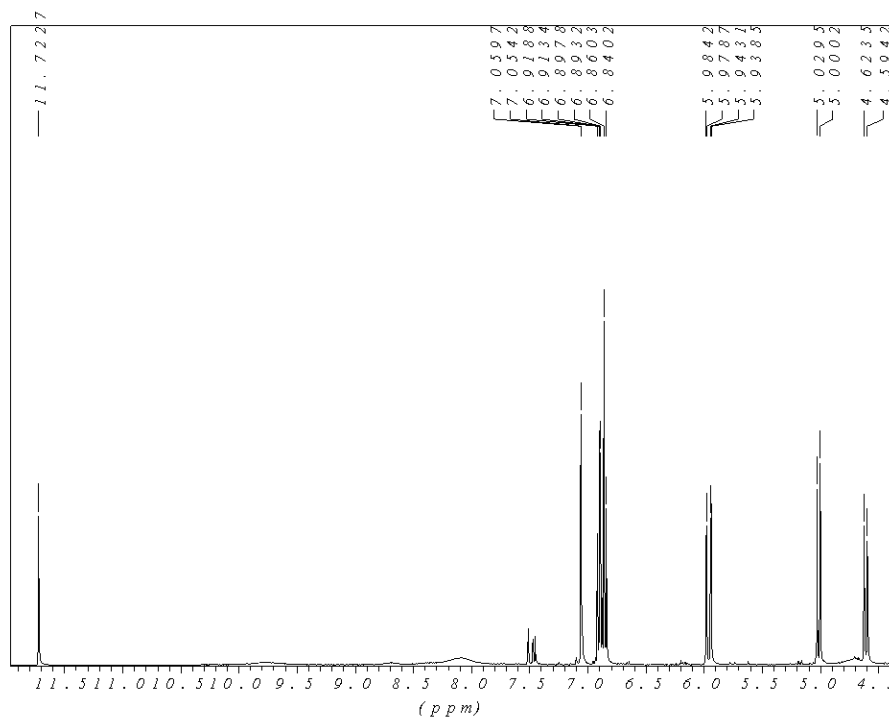
Στο φάσμα μάζας εμφανίστηκε το ιόν $[M+H]^+$ σε m/z 305 (Εικ. 270).



Εικόνα 270. Φάσμα μάζας (PCIMS) του μεταβολίτη **50**.

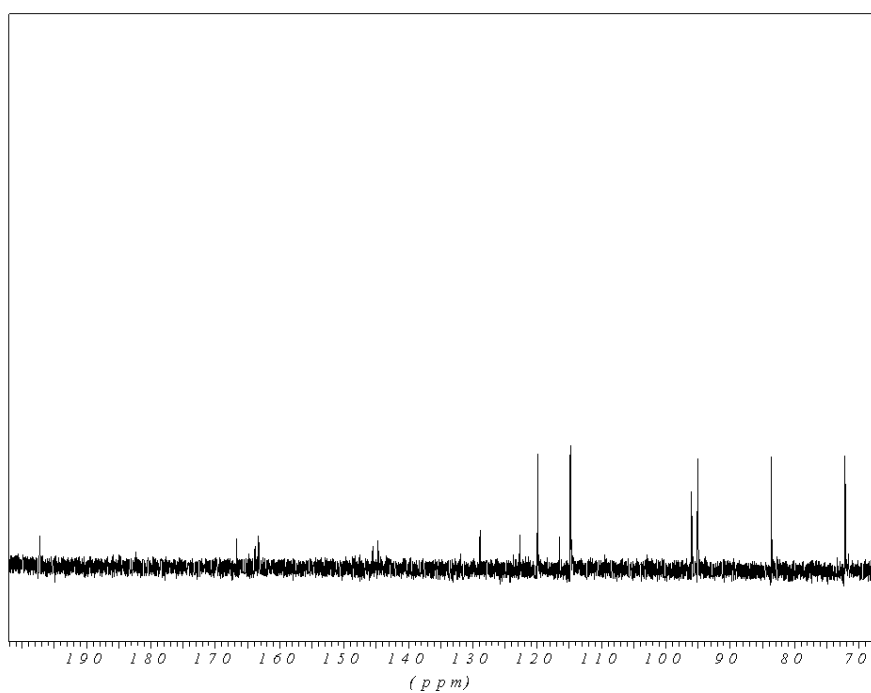
Στο φάσμα 1H NMR (Εικ. 271) παρατηρήθηκαν (i) δύο διπλές κορυφές σε δ 4.61 (11.7 Hz) και 5.02 (11.7 Hz), που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία, και τα πρωτόνια, στα οποία αντιστοιχούσαν, είχαν μεταξύ τους σύζευξη, (ii) δύο διπλές κορυφές σε δ 5.93 (2.0 Hz) και 5.98 (2.0 Hz) και αντιστοιχούσαν επίσης σε δυο πρωτόνια, που

συζεύγνυται αλλά με μικρότερη σταθερά σύζευξης, (iii) τρία αρωματικά πρωτόνια στα 6.88 ppm, d (8.0 Hz), 6.92 ppm, dd (8.0, 2.0 Hz) και στα 7.06 ppm, d (2.0 Hz) και (iv) μία απλή κορυφή στα 11.72 ppm που αντιστοιχούσε στο πρωτόνιο μίας ομάδας υδροξυλίου.



Εικόνα 271. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **50**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR (Εικ. 272) παρατηρούνται 12 άτομα άνθρακα, η απόδοση των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 160.



Εικόνα 272. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **50**.

Ελήφθησαν φάσματα υπεριώδους-ορατού, κατά τη μελέτη των οποίων, παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικές κορυφές με τα ακόλουθα μέγιστα (nm):

	<u>Κορυφή II</u>	<u>Κορυφή I</u>		Δλ (nm) II
		Iβ	Iα	
Μεθανολικό διάλυμα	291	335		
Μεθ. Διαλ. + NaOMe	324			+33
Μεθ. Διαλ. + AlCl ₃	297	378	310	no shift
Μεθ. Διαλ.+ AlCl ₃ + HCl	311	380		+20
Μεθ. Διαλ.+ NaOAc	325			+34
Μεθ. Διαλ.+ NaOAc + H ₃ BO ₃	292	331sh		no shift

Η βαθυχρωμική μετατόπιση της κορυφής II κατά 33nm παρουσία NaOMe, αλλά και κατά 34nm παρουσία NaOAc υποδηλώνει την ύπαρξη διυδροφλαβονόλης με ελεύθερες υδροξυλομάδες στους άνθρακες C-5 και C-7 του Α αρωματικού δακτυλίου. Επιπλέον η μετατόπιση της κορυφής II παρουσία AlCl₃ και π.HCl κατά +20nm αποδεικνύει επίσης την ύπαρξη ελεύθερης υδροξυλομάδας στον C-5. Εντούτοις η λήψη φασμάτων UV σε NaOAc/H₃BO₃ και HCl δεν βοηθάει στην διαπίστωση της ύπαρξης 3',4'-διυδροξυ-συστήματος στο Β δακτύλιο, γιατί στην περίπτωση των διυδροφλαβονολών ο Β δακτύλιος δεν έχει επαρκή σύζευξη με το κυρίως χρωμοφόρο τμήμα του μορίου (Mabry et al. 1970).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική έρευνα που ακολούθησε διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για το γνωστό μεταβολίτη (+)-ταξιφολίνη (Sawai et al. 2005, Agrawal et al. 1980). Στον Πίνακα 160 φαίνονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **50**.

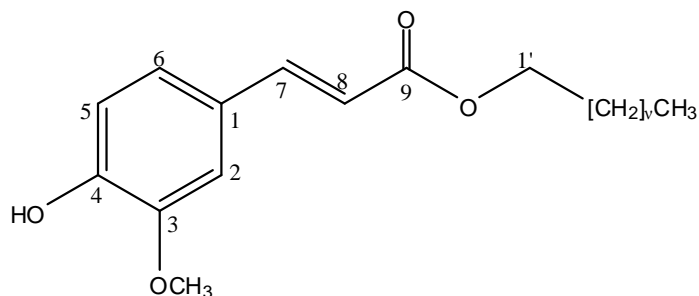
Πίνακας 160 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **50** σε C₃D₆O (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1	-	-
2	84.1	5.02 d (11.7)
3	72.8	4.61 d (11.7)
4	197.8	-
4a	nd	-
5	164.4	-
6	96.6	5.93 d (2.0)*
7	167.3	-
8	95.6	5.98 d (2.0)*
8a	163.9	-
1'	129.5	-
2'	115.5*	7.06 d (2.0)
3'	145.3	-
4'	nd	-
5'	115.4*	6.88 d (8.0)
6'	120.5	6.92 dd (8.0, 2.0)

*οι τιμές μπορούν να ανταλλαχθούν

3.3.2. Μίγμα 51: Μίγμα λιπαρών εστέρων του φερουλικού οξέος

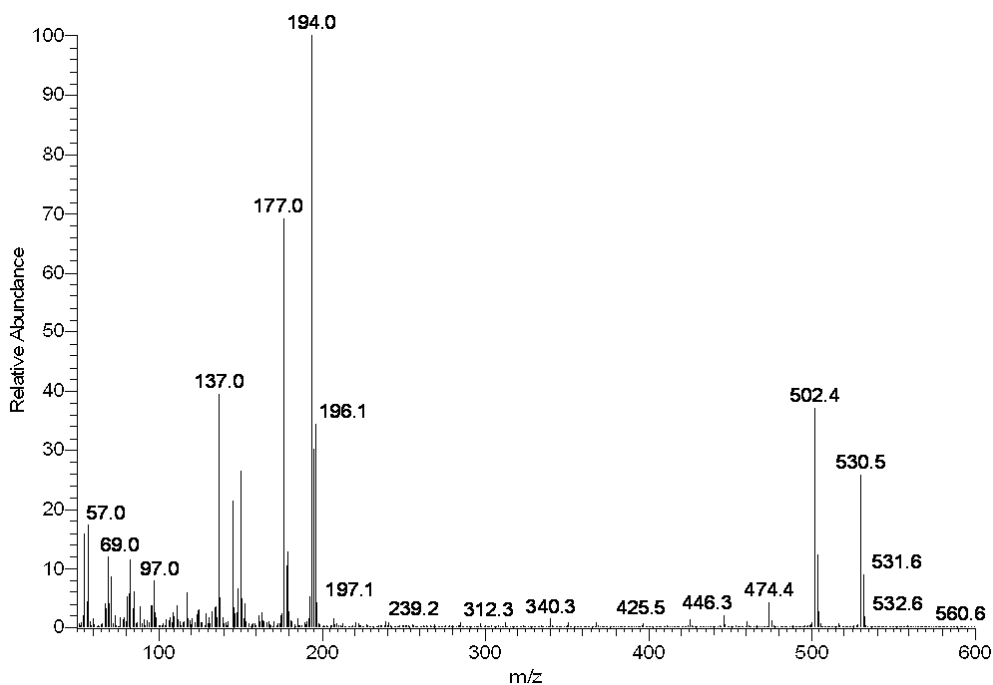
Το μίγμα **51** παραλήφθηκε ως το υπόλειμμα B2g (35.0 mg) κατόπιν χρωματογραφικού διαχωρισμού με στήλη βαρύτητας. Η ταυτοποίησή του έγινε με συνδυασμό των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR και του φάσματος μάζας (PCI-MS).



Μίγμα 51

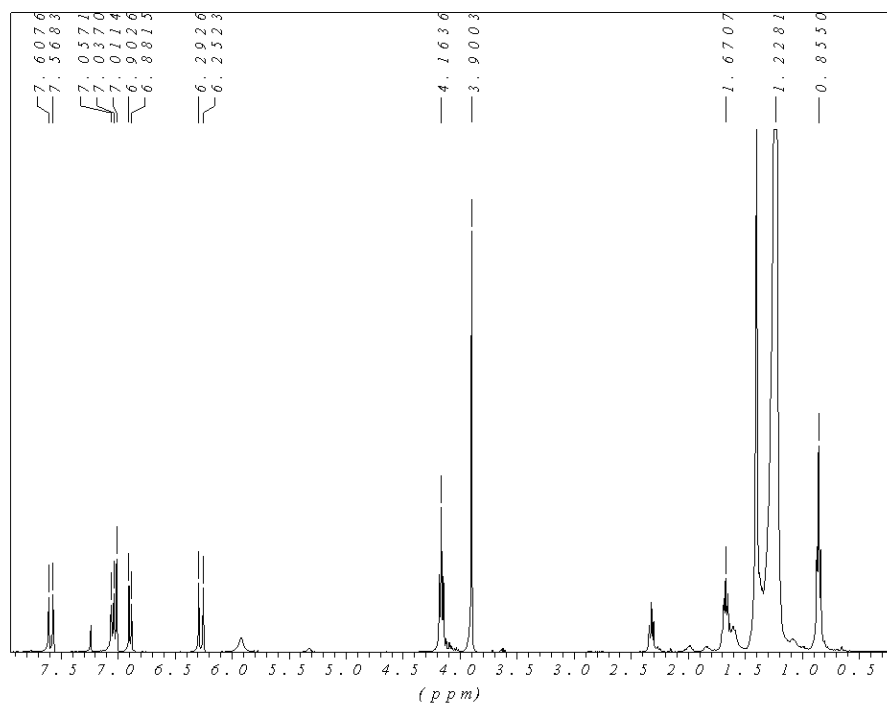
όπου $n=22, 20, 18, 16$

Στο φάσμα μάζας (Εικ. 273) εμφανίστηκε το μοριακό ιόν [M1]⁺ σε m/z 530, που αντιστοιχούσε στο φερουλικό εικοσιτετρανυλεστέρα, το μοριακό ιόν [M2]⁺ σε m/z 502, που αντιστοιχούσε στο φερουλικό εικοσιδιανυλεστέρα, το μοριακό ιόν [M3]⁺ σε m/z 474, που αντιστοιχούσε στο φερουλικό εικοσανυλεστέρα και το [M4]⁺ σε m/z 446, που αντιστοιχούσε στο φερουλικό δεκαοκτανυλεστέρα. Για την ταυτοποίηση των λιπαρών αλκοολών που εστεροποιήθηκαν με το φαινυλοπροπανοϊκό οξύ πραγματοποιήθηκε όξινη υδρόλυση του μίγματος με μεθανολικό διάλυμα HCl 1M σε θερμοκρασία 100°C για 24 ώρες. Το μίγμα των λιπαρών αλκοολών που παραλήφθηκε, αναλύθηκε με αέριο χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματογράφο μάζας (GC-MS), οπότε και επιβεβαιώθηκαν τα παραπάνω συμπεράσματα.



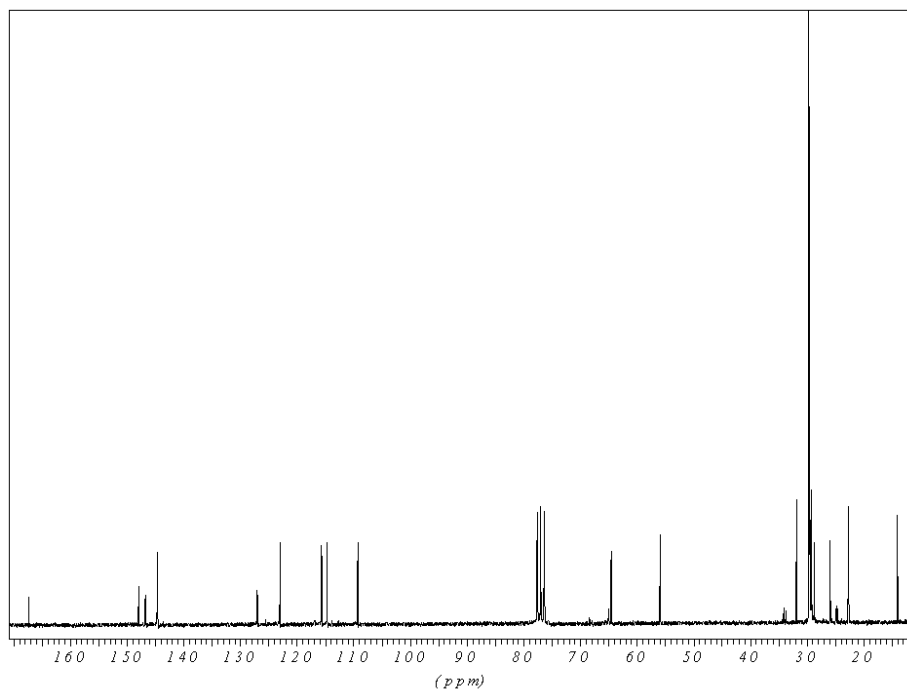
Εικόνα 273. Φάσμα μάζας (EIMS) του μίγματος **51**.

Στο φάσμα ^1H NMR (Εικ. 274) εμφανίσθηκαν (i) δύο διπλές κορυφές σε δ 7.58 και 6.27, που αντιστοιχούσαν σε ένα πρωτόνιο η κάθε μία, με σταθερά σύζευξης 16.0 Hz, τυπική για *trans*-ολεφινικά πρωτόνια, (ii) κορυφές τριών αρωματικών πρωτονίων σε δ 6.90 (d, 8.2Hz), 7.04 (m, 8.2Hz) και στα 7.01 ppm (brs), (iii) μία απλή κορυφή σε δ 3.90, που ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια ενός οξυγονωμένου μεθυλίου, (iv) μία τριπλή κορυφή στα 0.85 ppm (6.2 Hz), που ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια ενός μεθυλίου σε δευτεροταγές άτομο άνθρακα, (v) μια τριπλή κορυφή στα 4.17 ppm (6.6 Hz), που αντιστοιχούσε σε ένα οξυγονωμένο μεθυλένιο και (vi) μία πολλαπλή κορυφή στα 1.67 ppm που ολοκλήρωνε για δύο πρωτόνια.

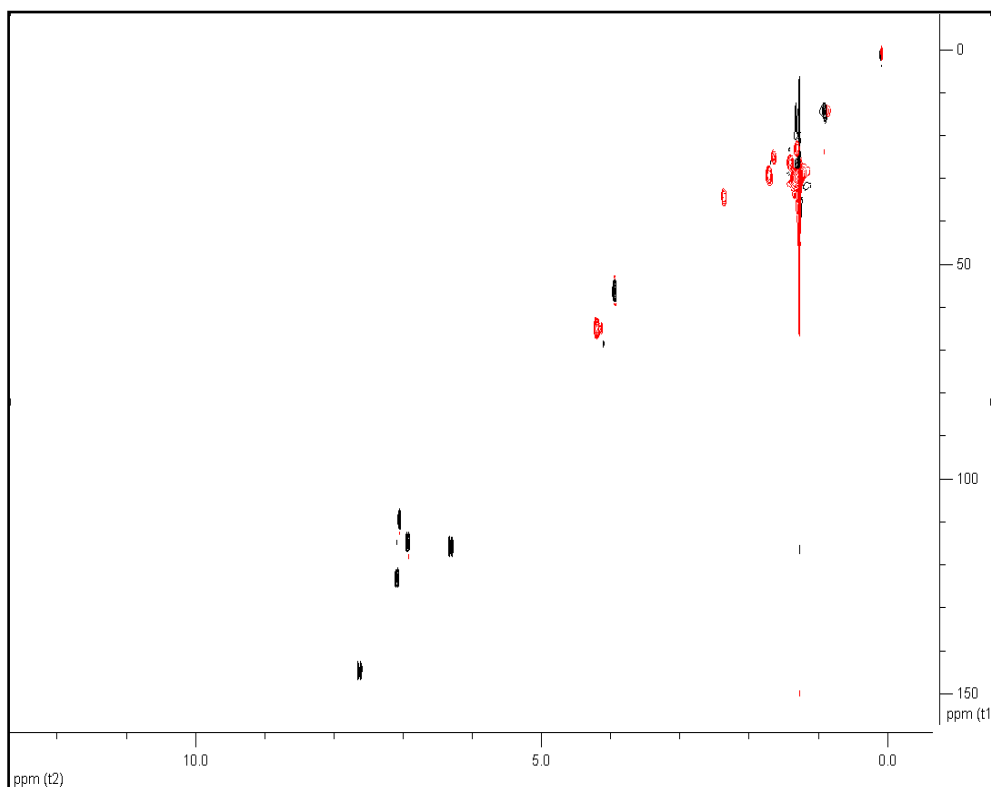


Εικόνα 274. Φάσμα ^1H NMR του μίγματος **51**.

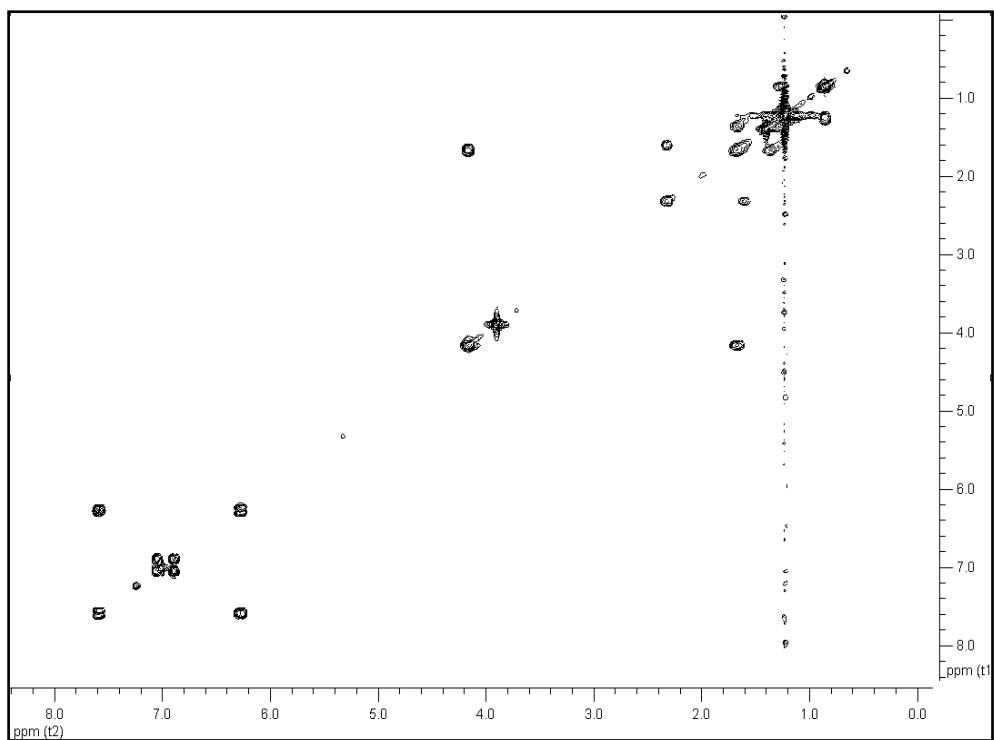
Στο φάσμα ^{13}C NMR (Εικ. 275) διακρίνονταν μεταξύ των υπολοίπων σημάτων οι αρωματικοί άνθρακες σε δ 127.1 (C-1), 109.3 (C-2), 147.9 (C-3), 146.7 (C-4), 114.6 (C-5) και στα 123.0 (C-6), ενώ διακρίνονται επίσης και οι ολεφινικοί C-7 και C-8 στα 144.6 ppm και 115.7 ppm αντίστοιχα. Εμφανίσθηκε επίσης ο άνθρακας του οξυγονωμένου μεθυλίου (55.9 ppm), καθώς και ο C-1' (64.6 ppm) και ο C-2' (29.3 ppm). Επιπρόσθετα, διακρινόταν ο καρβονυλικός άνθρακας σε δ 167.4. Τα υπόλοιπα σήματα που εμφανίσθηκαν στην περιοχή των αλειφατικών μεθυλενίων αντιστοιχούσαν στα μεθυλένια των αλειφατικών αλυσίδων. Η απόδοση των παραπάνω φασματοσκοπικών δεδομένων έγινε με τη βοήθεια των φασμάτων ^{13}C NMR, HSQC-DEPT (Εικ. 276), COSY (Εικ. 277) και HMBC (Εικ. 278).



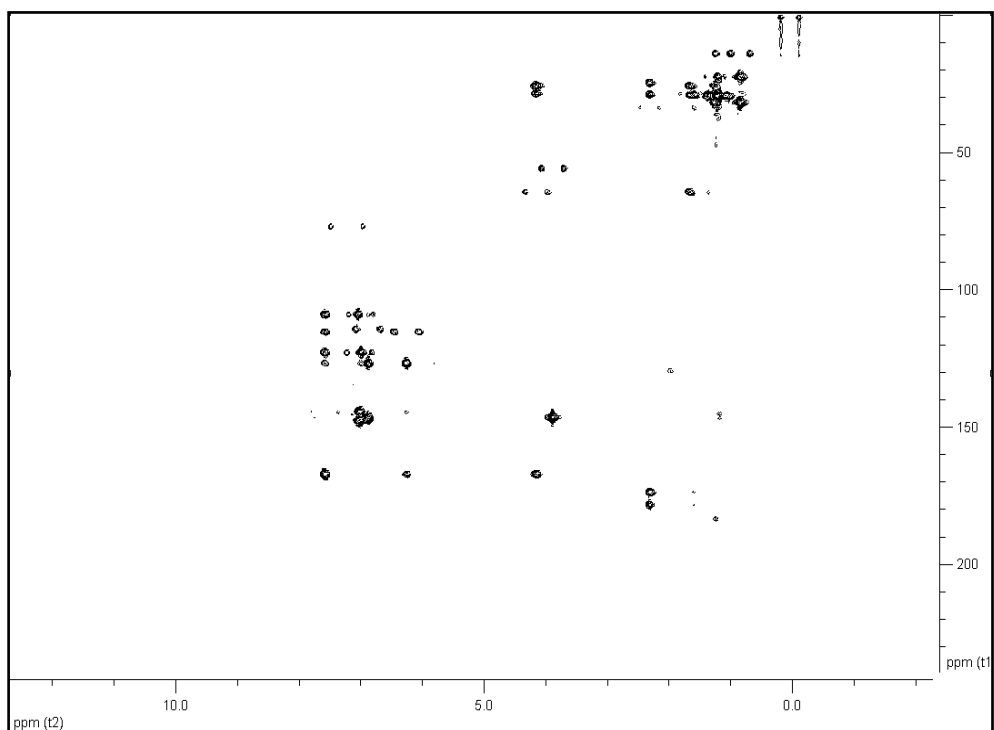
Εικόνα 275. Φάσμα ^{13}C NMR του μίγματος **51**.



Εικόνα 276. Φάσμα HSQC-DEPT του μίγματος **51**.



Εικόνα 277. Φάσμα COSY του μίγματος **51**.



Εικόνα 278. Φάσμα HMBC του μίγματος **51**.

Στον Πίνακα 161 παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα των συστατικών του μίγματος **51**.

Πίνακας 161 Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μίγματος **51** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	δ_C	δ_H
1	126.7	-
2	109.5	7.01 brs
3	146.4	-
4	145.1	-
5	114.7	6.90 d (8.2)
6	123.1	7.04 d (8.2)
7	144.5	7.62 d (16.0)
8	116.0	6.28 d (16.0)
9	167.0	-
1'	64.9	4.17 t (6.6)
2'	29.3	1.67 m
3' έως ν'	29.5-26.0	1.24 m
(ν+1)'	31.9	1.22 m
τελικό -CH ₃	14.1	0.85 t (6.2)
3-OMe	51.9	3.90 s

3.4. Συγκριτική μελέτη των αιθερίων ελαίων 54 taxa του γένους *Pinus*

3.4.1. Ανάλυση των αιθερίων ελαίων

Συνολικά παραλήφθηκαν με υδραπόσταξη τα αιθέρια έλαια 54 taxa γένους *Pinus*, τα οποία στη συνέχεια αναλύθηκαν ως προς τη χημική τους σύσταση με GC-FID και GC-MS. Συγκεκριμένα, 30 είδη (37 taxa) από το υπογένος *Pinus* (Πιν. 162-163) και 17 είδη (17 taxa) που ανήκουν στο υπογένος *Strobilus* (Πιν. 164).

3.4.1.1. Υπογένος *Pinus*

Σύμφωνα με τους Gernandt et al. (2005), το υπογένος *Pinus* χωρίζεται σε δύο *Section* (*Pinus* και *Trifoliae*) και πέντε *Subsection* (*Australes*, *Contortae*, *Pinaster*, *Pinus* και *Ponderosae*). Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδώσει στο συγκεκριμένο υπογένος 71-72 είδη (Farjon 2005, Gernandt et al. 2005), 30 εκ των οποίων έχουν μελετηθεί στην παρούσα εργασία ως προς τη χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου των φύλλων τους (Πιν. 162-163).

Πίνακας 162 Χημική σύσταση του αιθερίου των βελονοειδών φύλλων από *taxa* του γένους *Pinus* που ανήκουν στο υπογένος *Pinus*, *Section Pinus*, *Subsection Pinaster* (1-7) και *Subsection Pinus* (8-21).

Συστατικά ^{β,γ}	RRI ^δ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Tricyclene	918	tr	tr	tr	0.3	tr	–	–	0.8	tr	0.5	1.6	1.7	0.1	tr	0.2	tr	0.5	0.5	0.6	0.6	0.2
α -Thujene	927	–	–	0.1	–	–	tr	0.1	–	–	1.2	–	–	–	–	–	–	0.6	tr	–	–	–
α -Pinene	933	20.3	14.6	8.0	11.1	5.2	5.8	8.4	9.9	26.9	13.7	12.9	14.1	18.0	18.0	19.5	12.2	34.4	9.5	9.7	12.1	8.7
α -Fenchene	944	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Camphene	945	0.8	tr	tr	0.8	0.2	tr	–	2.1	0.8	2.4	6.5	6.3	1.0	1.2	1.0	1.0	2.1	2.2	2.0	1.8	0.6
Sabinene	964	tr	tr	1.7	0.6	–	tr	6.2	tr	tr	1.1	0.7	4.8	–	0.8	–	tr	tr	tr	–	tr	0.2
β -Pinene	973	31.2	1.2	1.9	3.6	0.6	2.7	–	7.1	16.3	2.1	2.8	0.8	20.7	0.9	12.1	4.1	6.8	5.7	6.2	11.5	13.2
Myrcene	981	2.6	6.4	15.1	2.2	0.2	1.7	2.1	2.4	1.3	6.9	2.6	3.2	1.9	2.3	1.3	4.0	0.8	0.8	4.1	7.4	5.4
α -Phellandrene	994	0.1	–	–	–	0.1	0.7	–	–	tr	tr	0.6	tr	0.6	tr	tr	1.7	–	tr	tr	0.2	0.3
δ -3-Carene	1003	–	–	0.5	18.6	–	–	15.9	0.1	–	9.9	6.4	12.0	0.1	16.1	0.1	tr	–	10.7	0.1	0.1	–
α -Terpinene	1010	tr	–	0.2	0.2	tr	0.1	1.5	–	–	0.5	0.8	0.3	tr	0.3	–	tr	–	0.1	tr	0.1	0.1
<i>p</i> -Cymene	1017	–	–	–	tr	–	–	0.4	–	–	–	–	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	–
Limonene	1019	1.9	7.9	1.0	23.7	0.3	31.7	–	–	–	–	2.4	3.0	3.1	9.7	3.1	12.5	0.7	–	1.2	–	–
Sylvestrene	1020	1.6	–	0.8	–	–	7.9	–	–	–	–	2.3	3.0	–	tr	–	–	0.6	–	1.2	–	–
β -Phellandrene	1024	–	–	–	–	–	–	1.9	–	6.8	2.6	–	tr	3.0	–	–	0.1	–	0.6	–	15.6	14.5
(<i>Z</i>)- β -Ocimene	1029	0.1	–	–	–	0.6	–	–	8.9	–	tr	tr	–	tr	–	0.4	–	–	tr	tr	tr	tr
(<i>E</i>)- β -Ocimene	1040	1.7	0.6	1.2	–	–	0.6	–	0.1	1.4	0.6	1.1	1.0	0.6	1.1	–	2.3	1.3	1.4	0.3	0.5	0.1
γ -Terpinene	1052	0.1	–	0.3	0.3	–	0.1	2.8	–	–	0.4	0.3	0.3	tr	0.5	–	0.1	–	0.2	0.1	0.2	0.2
<i>p</i> -Mentha-2,4(8)-diene	1075	–	–	–	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.1	–	–	–	0.9	–	–
Terpinolene	1078	0.4	tr	1.9	2.1	–	0.5	10.5	2.5	tr	3.8	1.5	2.5	0.5	3.3	–	1.0	0.7	1.3	–	5.6	1.0
Borneol	1157	0.1	–	–	–	–	–	–	0.1	–	–	0.2	tr	–	–	–	–	–	–	tr	tr	tr
Terpinen-4-ol	1169	0.1	–	0.2	0.1	–	tr	3.5	tr	–	0.2	0.1	tr	–	0.1	–	tr	–	tr	–	tr	0.1
α -Terpineol	1183	1.8	–	tr	tr	tr	0.4	–	tr	–	–	–	–	–	tr	–	0.3	–	–	–	–	0.8
Thymol methyl ether	1220	–	–	–	–	–	–	–	0.5	2.5	tr	tr	tr	–	tr	–	1.5	–	–	–	0.4	1.2
Linalyl acetate	1247	–	–	–	–	tr	–	–	–	–	0.2	0.5	–	0.6	0.1	–	–	–	–	–	–	–

Συστατικά^{β,γ}	RRI^δ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Bornyl acetate	1275	0.2	tr	0.1	0.3	tr	0.1	tr	3.7	–	3.8	14.1	7.6	0.4	0.9	0.5	0.4	–	0.8	4.7	4.3	1.3
<i>trans</i> -Sabinyl acetate	1284	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.5	–	–	–	–	–	–	–	tr
Myrtenyl acetate	1313	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	0.1	0.1	–	–	–	–	–
Bicycloelemene	1321	tr	–	–	–	–	–	–	0.1	–	0.4	0.6	0.3	0.1	tr	–	0.2	tr	0.1	0.1	tr	–
δ -Elemene	1323	–	–	0.1	–	–	0.8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
α -Longipinene	1336	–	–	–	0.1	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
α -Cubebene	1337	–	0.2	0.1	–	0.1	–	–	0.1	tr	tr	0.1	–	–	tr	0.1	0.2	tr	tr	0.1	0.1	0.4
α -Terpinyl acetate	1338	2.5	tr	–	–	–	–	0.8	–	–	1.3	1.0	0.7	1.5	0.8	–	–	–	0.1	–	–	–
α -Ylangene	1357	–	0.1	tr	tr	tr	tr	–	tr	tr	–	–	–	–	tr	–	0.1	–	–	tr	tr	0.2
α -Copaene	1366	0.1	0.3	0.4	0.1	0.4	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.3	0.1	0.2	0.2	0.2	0.4	0.3	0.1	0.3	0.2	0.5
β -Bourbonene	1369	0.1	0.4	–	tr	tr	tr	–	0.1	tr	0.2	–	0.1	–	0.1	tr	0.2	tr	tr	0.3	tr	tr
β -Cubebene	1370	–	–	tr	–	tr	–	–	tr	tr	–	tr	–	0.1	tr	0.1	0.1	tr	tr	0.1	0.1	0.3
β -Elemene	1373	0.2	0.2	0.1	0.1	4.5	0.1	–	1.0	0.2	2.8	3.7	2.1	0.1	tr	0.1	–	1.6	1.6	1.7	0.4	–
Geranyl acetate	1375	0.6	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.6	–	–	–	–	–
Junipene	1388	tr	–	–	1.5	0.3	0.2	0.1	tr	–	–	–	–	0.4	0.2	–	–	–	–	tr	–	–
β -Caryophyllene	1395	11.7	8.7	19.0	8.6	–	2.4	20.5	8.7	11.6	5.3	3.4	6.8	7.8	13.9	16.1	17.8	4.7	2.6	15.9	14.9	9.4
β -Copaene	1411	0.1	0.4	tr	0.1	0.1	tr	–	–	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	–	0.6	tr	tr	0.2	0.1	0.2
α - <i>trans</i> -Bergamotene	1415	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.6
Aromadendrene	1417	tr	tr	tr	tr	–	0.5	–	0.1	tr	tr	0.1	tr	–	tr	–	0.1	0.5	tr	0.2	0.2	tr
6,9-Guaiadiene	1427	–	–	0.1	–	tr	1.2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
α -Humulene	1431	2.5	1.8	3.8	1.5	0.9	0.5	4.2	1.6	2.2	1.1	0.7	1.2	1.5	2.8	3.2	3.9	0.9	0.5	3.4	tr	0.2
<i>cis</i> -Cadina-1(6),4-diene	1440	–	–	–	tr	–	–	–	0.2	tr	0.3	0.1	0.1	–	–	–	–	–	–	0.2	–	0.1
Sesquisabinene	1443	–	–	–	–	0.1	tr	–	0.1	–	–	–	0.3	–	tr	–	0.2	tr	–	–	–	–
(<i>E</i>)- β -Farnesene	1448	–	–	0.2	tr	–	–	tr	–	–	–	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.3	–	–	–	0.1	–
<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-diene	1458	–	–	0.1	–	–	–	–	12.7	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	0.1	–	–	–
<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-diene	1460	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.1	–	–	–	–	–	–	0.1	–	–	–
γ -Muurolole	1464	tr	tr	0.1	0.1	tr	0.2	tr	0.1	tr	tr	–	tr	tr	tr	tr	tr	0.9	tr	tr	tr	tr

Συστατικά ^{β,γ}	RRI ^δ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Germacrene D	1468	12.8	44.0	0.6	21.3	11.2	4.6	0.2	tr	20.7	12.1	2.8	8.0	20.0	12.7	32.1	18.5	3.7	5.1	14.5	5.2	18.7
<i>cis</i> -β-Guaiene	1468	–	0.3	–	–	–	tr	–	–	0.4	–	–	–	tr	0.1	tr	–	–	–	–	–	–
β-Selinene	1471	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.2	0.5	0.2	–	–	–	–	1.6	0.2	0.6	0.4	0.2
Phenyl ethyl 2-methyl butanoate	1472	0.2	–	0.7	–	0.3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2.6	–	–	–	–	–
δ-Selinene	1473	–	–	–	–	–	1.5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Bicyclogermacrene	1474	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4.2	5.7	2.9	–	–	–	–	6.0	3.2	4.3	2.0	–
γ-Amorphene	1475	–	0.8	–	–	–	–	–	–	0.9	–	–	–	0.3	0.2	0.5	–	–	–	–	–	–
<i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-diene	1475	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	0.1	–	tr	–	tr	0.1	0.3	tr	0.1	0.2	0.1	1.0
Phenyl ethyl 3-methyl butanoate	1478	0.7	–	5.1	–	0.5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
γ-Curcumene	1480	–	–	–	–	–	–	–	2.3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
α-Muurolene	1481	0.3	1.0	–	0.2	0.5	–	0.1	0.4	0.4	0.6	1.5	0.3	0.2	0.3	0.5	0.5	1.1	0.6	0.8	0.4	0.5
Germacrene A	1485	–	–	–	–	–	–	–	1.6	–	–	0.2	–	–	–	–	–	0.7	0.2	0.5	0.2	–
δ-Amorphene	1490	0.1	0.4	–	tr	0.1	0.3	–	0.2	0.2	tr	–	–	0.7	0.1	0.2	2.5	tr	tr	0.1	0.1	0.4
Isobornyl isovalerate	1493	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.0	–	–	–	–	–	–	–	–	–
γ-Cadinene	1493	0.2	1.5	–	0.2	0.5	0.1	–	–	0.6	1.3	1.6	0.5	0.3	0.4	1.0	1.3	3.8	0.9	1.8	1.0	2.0
Cubebol	1498	–	–	0.2	–	–	–	–	–	–	0.3	–	–	–	tr	–	–	–	0.4	–	–	–
δ-Cadinene	1500	0.9	4.1	0.7	0.6	1.2	0.5	0.1	2.2	2.2	2.2	–	1.5	–	1.0	2.3	–	7.1	3.5	4.5	2.0	4.0
<i>trans</i> -Cadina-1,4-diene	1510	tr	tr	–	tr	tr	–	–	0.1	tr	0.2	–	–	–	tr	0.1	0.1	tr	0.2	0.2	0.1	0.2
α-Cadinene	1516	tr	0.1	–	tr	tr	–	–	0.1	tr	0.2	–	tr	–	–	0.1	0.1	tr	0.2	0.2	0.1	0.2
Germacrene B	1540	–	–	–	–	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.5
(<i>E</i>)-Nerolidol	1548	–	–	–	–	–	–	–	–	1.8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.1	–	tr
Unidentified 1 (161, 222)	1554	–	–	–	–	–	0.6	–	–	–	–	–	–	1.1	–	0.2	–	8.7	0.1	3.8	1.1	–
Unidentified 2 (161, 220)	1558	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.3	–	–	–	1.0	–	tr	0.5	–
Germacrene D-4-ol	1564	tr	tr	–	0.1	–	–	–	0.2	–	6.1	6.0	4.1	tr	0.3	tr	0.4	tr	10.0	tr	tr	–
Spathulenol	1567	–	–	–	–	–	–	–	0.2	–	1.5	0.6	0.8	–	–	–	–	–	tr	0.6	–	–
Caryophyllene oxide	1567	0.1	tr	0.3	0.2	0.1	–	0.3	0.1	–	–	–	0.2	–	0.4	0.4	0.6	–	–	0.4	–	–
Guaiol	1581	–	–	1.1	–	0.3	4.0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Συστατικά ^{β,γ}	RRI ^δ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	1593	–	–	–	tr	0.1	–	–	0.1	–	tr	0.1	tr	–	–	–	–	tr	0.1	0.2	–	–
Geranyl isovalerate	1595	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.5	–	–	–	–	–
10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol	1599	–	–	–	–	tr	1.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1- <i>epi</i> -Cubenol	1606	–	tr	0.1	–	–	–	–	0.1	–	0.1	0.2	tr	–	tr	–	tr	tr	0.2	0.2	tr	0.1
γ -Eudesmol	1614	–	–	0.2	–	–	0.7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>epi</i> - α -Cadinol	1619	tr	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	0.5	–	0.6	1.2	0.4	–	tr	0.2	0.2	1.8	1.5	1.3	0.4	0.1
<i>epi</i> - α -Muurolol	1625	tr	0.4	0.1	tr	0.1	0.1	tr	0.6	–	0.9	1.4	0.7	–	0.1	–	0.4	1.8	1.7	1.5	0.4	0.2
α -Muurolol	1625	tr	0.3	0.1	tr	0.1	–	–	0.3	–	0.4	0.6	0.2	0.2	tr	tr	0.1	–	0.5	0.5	0.2	0.2
α -Cadinol	1635	tr	1.3	–	0.3	0.3	–	tr	1.5	–	1.9	3.5	1.4	0.4	0.2	0.3	0.7	3.5	4.1	4.0	0.9	0.4
(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-Farnesol	1714	–	–	–	–	–	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	–	0.3	–	–	–	–	–
14-hydroxy- α -Muurolene	1746	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.1	0.1	–	0.1	–	–	–	–	–
(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-Farnesyl acetate	1837	–	–	–	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	0.2	tr	–	0.3	–	–	–	–	0.1
Cembrene	1921	–	–	6.5	tr	0.2	–	4.9	1.2	–	–	–	–	–	–	–	0.2	–	–	1.0	0.1	–
Unidentified 3 (259, 274)	1922	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.6	–	0.7	1.5	1.2	–	–	–	–	–	–	–
Thunbergol	1928	–	–	2.5	–	–	–	2.4	0.7	–	–	–	–	–	–	–	tr	–	–	0.2	tr	–
Pimaradiene	1953	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.2	–	–	–	–	–	–	–	0.1	0.2
(3 <i>Z</i>)-Cembrene A	1954	–	–	1.3	–	–	–	0.6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.2	–	–
Sandaracopimara-8(14),15-diene	1969	–	–	–	tr	–	–	–	0.7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Manool oxide	1976	–	–	–	–	0.3	–	–	–	–	2.1	tr	0.9	1.0	0.7	–	0.2	–	0.1	0.1	0.1	1.2
Isopimaradiene	1982	–	0.4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Unidentified 4 (81, 272)	2002	–	–	–	–	–	–	0.4	3.9	0.9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	0.8	–
13- <i>epi</i> -Manool oxide	2004	–	–	–	–	–	–	–	0.2	–	–	–	–	0.2	0.2	–	–	–	0.1	–	–	1.6
Sclarene	2008	–	–	–	–	18.0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Abieta-8,12-diene	2010	–	–	–	–	1.4	tr	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Unidentified 5 (95, 290)	2029	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.5	–	0.2	2.5	2.4	–	–	–	0.3	–	–	–
4- <i>epi</i> -Isocembrol	2037	–	–	–	–	–	–	5.5	8.5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3.1	1.3
Unidentified 6 (81, 290)	2047	–	–	18.0	0.2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.2	–	–	–	–	–

Συστατικά ^{β,γ}	RRI ^δ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Abietatriene	2048	-	-	-	-	4.0	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1
Unidentified 7 (95, 290)	2054	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.7	1.7	-	-	-	-	-	-	-	-
Abietadiene	2070	tr	tr	0.3	-	10.6	tr	-	0.5	tr	-	tr	0.8	-	-	0.3	0.2	-	tr	-	0.8	0.5	
Neobienol	2101	-	-	-	-	0.4	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	
Isoabienol	2117	-	-	-	-	19.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25.9	-	-	-	
Abieta-8(14),13(15)-diene	2128	tr	tr	-	-	2.8	-	-	tr	-	-	tr	tr	0.1	tr	tr	tr	-	-	0.1	0.1	0.1	
Abienol	2141	-	-	-	-	4.7	12.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2-keto-Manool oxide	2183	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.0	-	-	2.3	1.7	-	-	-	-	-	-	-	
Sandaracopimarinal	2204	-	-	tr	-	0.1	-	-	0.4	-	-	-	-	-	tr	0.1	0.1	-	-	-	-	0.1	0.2
Unidentified 8 (187, 286)	2212	-	1.2	-	-	-	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	tr	-	-	-	-	-	
Unidentified 9 (81, 286)	2217	-	-	-	0.2	-	-	0.3	3.8	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	0.8
Unidentified 10 (271, 286)	2223	-	-	0.5	-	2.0	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Unidentified 11 (91, 286)	2230	-	-	0.4	-	1.7	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	
Methyl pimarate	2239	-	-	tr	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	tr	
Methyl sandaracopimarate	2249	-	-	0.1	-	-	-	0.1	tr	tr	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	0.3	0.8
3 α -hydroxy-Manool	2260	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
(<i>E</i>)-Methyl communate	2277	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Methyl isopimarate	2291	-	0.3	-	-	-	0.3	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	-	0.1	-	tr	
Methyl levopimarate	2299	-	0.5	1.2	-	0.3	3.2	0.3	tr	-	-	-	tr	0.4	0.2	-	-	-	tr	-	-	-	
Isopimarol	2302	-	-	-	-	0.1	-	-	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4- <i>epi</i> -Abietal	2305	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Abieta-8,13-dien-18-ol	2316	-	-	-	-	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Methyl dehydroabietate	2335	-	tr	tr	-	tr	tr	tr	-	-	-	-	-	0.1	tr	0.2	tr	-	-	tr	tr	0.1	
Dehydroabietol	2359	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Abieta-8(14),13(15)-dien-18-al	2370	-	-	0.2	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	0.1	tr	0.4	0.2	-	-	0.1	tr	0.2	
Methyl abietate	2380	-	tr	-	-	-	tr	tr	-	-	-	-	-	-	tr	0.2	tr	-	-	-	0.1	0.2	
Methyl neoabietate	2437	tr	tr	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	tr	0.3	0.1	-	tr	tr	-	0.1	

Συστατικά ^{β,γ}	RRI ^δ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Σύνολο		96.1	99.7	97.6	99.4	96.3	91.1	94.4	96.7	99.1	99.8	93.7	97.5	97.1	97.6	97.9	96.7	98.2	98.2	99.0	95.9	95.7
Μονοτερπένια		65.5	30.7	33.0	63.9	7.2	52.3	54.1	38.2	56.5	51.2	58.4	61.3	52.6	56.1	38.4	41.3	48.5	33.9	31.1	60.4	47.9
Σεσκιτερπένια		29.7	66.6	27.5	35.1	21.0	19.6	25.6	35.5	41.7	43.4	35.3	33.4	34.3	33.4	57.9	51.6	49.7	37.9	62.8	31.2	41.7
Διτερπένια		tr	2.4	31.3	0.4	67.3	19.2	14.7	23.0	0.9	5.2	tr	2.8	10.2	8.1	1.6	1.2	0.0	26.4	5.1	4.3	6.1
Άλλες ενώσεις		0.9	0.0	5.8	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

^α Αρίθμηση των *taxa* σύμφωνα με τον Πίνακα 1

^β Σειρά παρουσίασης των συστατικών σύμφωνα με τη σειρά έκλουσης αυτών από στήλη HP-5MS, υπο τις πειραματικές συνθήκες που έχουν περιγραφεί.

^γ Η αρίθμηση των μη ταυτοποιημένων συστατικών είναι μοναδική στους Πιν. 162-164 σύμφωνα με τη σειρά έκλουσης αυτών στην παρένθεση περιλαμβάνονται η βασική κορυφή και το μοριακό ιόν.

^δ Οι σχετικοί δείκτες έκλουσης έχουν υπολογιστεί με βάση τους χρόνους έκλουσης των συστατικών, σε σύγκριση με τους χρόνους έκλουσης προτύπων κανονικών υδρογονανθράκων (C₈-C₂₅), που αναλύθηκαν υπό τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες.

tr: ίχνη (< 0.05)

–: δεν ανιχνεύθηκε

Πίνακας 163 Χημική σύσταση του αιθερίου των βελονοειδών φύλλων από *taxa* του γένους *Pinus* που ανήκουν στο υπογένος *Pinus*, *Section Trifoliae*, *Subsection Australes* (22–28), *Subsection Contortae* (29–32) και *Subsection Ponderosae* (33–37).

Συστατικά ^{β,γ}	RRI ^δ	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Tricyclene	918	tr	0.2	0.2	0.7	–	tr	–	0.7	–	–	tr	tr	tr	tr	–	–
α -Thujene	927	0.6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	–	–	–	–	–
α -Pinene	933	38.1	10.6	17.3	18.5	18.9	4.7	33.3	8.2	5.9	5.6	4.8	13.6	29.8	22.5	61.6	0.3
Camphene	945	1.2	1.4	2.2	1.8	tr	tr	0.6	2.8	–	0.3	0.5	0.3	1.6	0.7	0.9	–
Sabinene	964	1.0	–	–	tr	–	tr	tr	tr	–	–	tr	0.4	–	tr	–	–
β -Pinene	973	1.0	12.9	4.8	3.7	38.7	16.7	7.8	7.8	4.7	32.8	3.0	1.1	4.7	45.0	4.5	–
Myrcene	981	1.0	0.9	0.7	1.3	1.3	3.7	1.0	6.3	–	1.8	2.0	0.8	0.7	2.2	2.0	0.4
α -Phellandrene	994	tr	0.1	tr	0.4	–	0.2	–	tr	–	0.6	1.8	0.1	tr	tr	–	–
δ -3-Carene	1003	–	tr	5.3	–	tr	tr	4.4	3.2	7.4	0.4	1.3	0.3	0.6	12.0	tr	–
α -Terpinene	1010	tr	0.1	tr	0.2	–	–	0.1	tr	–	0.4	0.6	–	tr	0.1	–	–
<i>p</i> -Cymene	1017	–	–	0.1	–	–	–	tr	tr	–	tr	tr	–	–	0.1	–	–
Limonene	1019	1.4	0.9	0.9	–	–	–	3.0	–	–	–	–	–	–	–	0.7	8.6
Sylvestrene	1020	1.0	1.4	–	–	–	–	3.6	–	–	–	–	–	–	–	–	–
β -Phellandrene	1024	–	–	1.0	14.7	5.0	13.6	–	0.9	19.9	26.0	47.0	6.2	3.4	4.4	2.0	–
(<i>Z</i>)- β -Ocimene	1029	–	–	tr	0.1	tr	–	–	–	–	4.9	4.6	1.6	1.6	–	–	–
(<i>E</i>)- β -Ocimene	1040	1.2	–	5.4	0.6	3.8	–	–	–	–	0.7	0.2	–	0.8	tr	5.2	–
γ -Terpinene	1052	–	0.1	0.5	0.2	tr	–	–	0.2	3.7	0.6	0.3	–	tr	0.2	–	–
Terpinolene	1078	0.9	0.7	0.8	1.5	tr	tr	0.3	0.5	–	0.5	0.5	tr	0.4	1.3	–	–
Linalool	1093	–	0.1	–	–	–	–	–	–	–	0.5	0.4	–	–	–	–	–
α -Fenchol	1103	–	0.2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.1	–	–
<i>cis-p</i> -Menth-2-en-1-ol	1113	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.3	–	–	tr	–	–
<i>trans</i> -Pinocarveol	1130	–	0.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.4	tr	–
Camphene hydrate	1138	–	0.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	–	–
<i>trans</i> -Pinocamphone	1148	–	tr	–	–	–	–	–	tr	–	–	–	–	–	0.2	–	–
Borneol	1157	–	0.2	–	–	–	–	–	tr	–	–	tr	–	tr	tr	–	–

Συστατικά^{β,γ}	RRI^δ	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
<i>cis</i> -Pinocamphone	1165	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.2	tr	–
Terpinen-4-ol	1169	tr	0.2	tr	0.1	–	tr	–	–	5.2	tr	0.4	–	–	0.3	–	–
α -Terpineol	1183	tr	3.2	–	–	–	0.5	–	0.4	–	tr	0.5	–	0.5	1.3	–	–
Myrtenol	1189	–	0.2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.9	–	–
Methyl chavicol	1193	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	1.9	tr	2.6	1.4	tr
Bornyl acetate	1275	0.5	2.5	0.6	2.5	–	0.2	0.3	15.7	–	tr	0.7	0.4	0.8	–	–	–
<i>trans</i> -Sabinyl acetate	1284	–	–	–	–	–	–	–	1.1	–	–	–	–	–	–	–	–
Myrtenyl acetate	1313	–	–	–	–	–	–	–	0.9	–	–	–	–	–	–	–	–
Bicycloelemene	1321	–	0.3	–	–	tr	0.6	–	–	–	–	0.2	–	tr	–	–	–
δ -Elemene	1323	tr	–	–	–	–	–	–	0.2	–	–	–	–	–	–	–	–
α -Cubebene	1337	0.3	0.1	tr	0.2	–	–	–	–	–	tr	–	0.6	tr	–	–	–
α -Terpinyl acetate	1338	0.3	0.1	–	–	–	–	0.9	0.2	–	–	tr	–	tr	–	–	–
α -Ylangene	1357	0.3	0.1	–	tr	–	tr	–	–	–	–	–	0.8	tr	–	–	–
α -Copaene	1366	0.4	0.2	tr	0.5	tr	tr	tr	0.1	–	0.3	tr	–	tr	–	–	–
β -Bourbonene	1369	tr	0.1	tr	0.1	–	–	0.1	tr	–	–	–	–	–	–	–	–
β -Cubebene	1370	0.2	0.1	tr	–	tr	tr	–	tr	–	tr	tr	0.1	tr	–	–	–
(<i>Z</i>)-Caryophyllene	1372	–	–	–	0.5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
β -Elemene	1373	tr	1.1	0.5	0.1	1.0	2.7	0.1	0.8	–	–	0.9	1.3	0.9	–	–	tr
Junipene	1388	–	–	–	–	–	–	0.9	–	–	–	–	2.7	–	–	–	–
β -Caryophyllene	1395	7.9	6.6	–	11.8	tr	4.3	9.8	1.2	–	–	0.2	0.6	–	–	tr	1.2
β -Ylangene	1400	–	–	0.6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.2	–	–	–
β -Copaene	1411	0.4	0.5	0.3	–	tr	tr	0.1	–	–	–	–	–	tr	–	–	–
α - <i>trans</i> -Bergamotene	1415	–	0.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	0.2	0.4	–	1.7
α -Guaiene	1416	–	–	–	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	0.1	–	–	–
Aromadendrene	1417	tr	0.1	–	0.1	–	tr	–	–	–	–	0.2	–	–	–	–	–
α -Humulene	1431	1.4	1.7	–	2.5	–	0.9	1.9	–	–	–	tr	–	–	–	–	0.3
<i>cis</i> -Cadina-1(6),4-diene	1440	–	0.2	–	0.1	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Συστατικά ^{β,γ}	RRI ^δ	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Sesquisabinene	1443	–	–	–	–	–	–	0.5	–	–	–	–	–	–	–	–	–
(<i>E</i>)-β-Farnesene	1448	–	0.2	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	–	–	tr	–	–
γ-Gurjunene	1457	–	1.5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-diene	1458	–	–	tr	–	tr	–	–	–	–	0.2	tr	tr	tr	–	–	–
<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-diene	1460	–	–	tr	–	–	tr	–	–	–	tr	tr	–	tr	–	–	–
γ-Muurolene	1464	tr	tr	tr	–	0.5	tr	tr	–	–	0.7	0.2	0.1	tr	–	–	–
Germacrene D	1468	29.0	24.5	41.5	21.3	6.4	15.5	27.6	14.7	–	0.5	1.1	8.8	11.5	0.4	–	tr
<i>cis</i> -β-Guaiene	1468	0.2	–	0.4	–	–	0.3	–	–	–	tr	–	–	–	–	–	–
β-Selinene	1471	–	–	–	0.1	tr	–	–	5.5	–	0.2	0.2	–	0.2	–	–	–
<i>epi</i> -Bicyclosesquiphellandrene	1472	–	–	–	–	0.3	–	–	0.1	–	–	–	–	–	–	–	–
Bicyclogermacrene	1474	–	2.1	2.3	1.8	4.7	14.1	–	–	–	–	3.8	–	2.8	tr	–	–
γ-Amorphene	1475	1.2	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	–	0.6	–	–	–	–
<i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-diene	1475	–	0.2	tr	0.3	–	tr	–	–	–	0.2	tr	0.3	tr	–	–	–
<i>epi</i> -Cubebol	1479	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.8	–	–	–	–	–	–
α-Muurolene	1481	0.8	1.8	0.6	0.8	0.9	0.7	–	0.9	–	1.1	0.4	1.0	0.6	tr	–	–
α-Bulnesene	1484	–	–	–	–	–	–	–	0.2	–	–	–	–	tr	–	–	–
α-Amorphene	1484	–	–	–	–	–	–	0.2	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Germacrene A	1485	–	–	–	0.2	–	0.3	–	–	–	–	tr	0.6	–	–	–	–
δ-Amorphene	1490	0.6	0.3	–	0.1	–	–	–	tr	–	–	–	–	tr	–	–	–
γ-Cadinene	1493	1.9	1.6	tr	0.8	1.3	0.5	–	1.7	–	0.7	0.6	0.8	0.7	–	–	–
Cubebol	1498	–	–	0.3	–	0.6	tr	–	–	–	1.5	0.1	–	–	–	–	–
δ-Cadinene	1500	5.4	3.8	2.1	3.0	3.6	2.9	0.6	4.6	tr	8.4	2.9	3.6	4.0	tr	tr	–
<i>trans</i> -Cadina-1,4-diene	1510	0.2	0.2	–	0.2	tr	tr	–	tr	–	tr	tr	0.3	tr	–	–	–
α-Cadinene	1516	0.3	0.2	tr	0.1	tr	tr	–	0.2	–	tr	tr	0.2	tr	–	–	–
(<i>E</i>)-Nerolidol	1548	–	0.1	–	–	–	–	–	–	–	–	0.4	–	–	–	–	1.4
Unidentified 1 (161, 222)	1554	–	–	–	0.4	–	–	–	1.9	–	–	–	16.9	–	–	–	–
Germacrene D-4-ol	1564	tr	1.1	2.2	tr	2.0	4.4	–	–	–	tr	1.4	–	0.9	tr	–	–

Συστατικά^{β,γ}	RRI^δ	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Spathulenol	1567	–	0.3	0.6	–	0.9	–	–	–	–	–	0.6	–	0.3	–	–	–
Caryophyllene oxide	1567	tr	0.3	–	0.2	–	0.3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Salvial-4(14)-en-1-one	1576	–	–	0.3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	1593	–	0.2	tr	–	tr	tr	–	0.2	–	–	tr	–	tr	–	–	–
1- <i>epi</i> -Cubenol	1606	tr	0.2	0.2	–	tr	–	–	0.2	–	0.4	tr	0.3	0.2	–	–	–
<i>epi</i> - α -Cadinol	1619	0.1	1.2	1.2	0.8	1.4	1.7	–	1.2	3.4	1.1	1.0	1.7	1.0	–	–	–
<i>cis</i> -Cadin-4-en-7-ol	1622	tr	–	–	0.4	–	–	–	1.8	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>epi</i> - α -Muurolol	1625	0.1	1.5	1.2	0.9	1.4	1.5	–	–	4.4	1.6	1.2	1.1	1.2	–	–	–
α -Muurolol	1625	tr	0.5	0.8	0.6	–	0.7	–	tr	tr	0.5	0.4	0.9	0.4	–	–	–
α -Cadinol	1635	0.4	3.7	4.0	2.1	2.7	4.7	–	4.4	8.9	1.4	3.3	4.7	3.4	tr	–	–
Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol	1671	–	–	0.4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
(<i>E</i>)-Nerolidyl acetate	1684	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.8
(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-Farnesol	1714	–	0.8	–	–	tr	–	–	–	–	–	2.5	–	0.4	–	–	–
Benzyl benzoate	1775	–	2.3	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	–	–	–	–	–
Hexadecanal	1813	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.5
(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-Farnesyl acetate	1837	–	0.1	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Cembrene	1921	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.1	2.3	–	–	12.7
Thunbergol	1928	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.3	0.9	–	–	7.7
Pimaradiene	1953	–	0.2	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
(3 <i>Z</i>)-Cembrene A	1954	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.4	0.2	–	–	–
Manool oxide	1976	–	0.1	–	–	0.4	–	–	0.3	3.0	–	tr	0.2	0.2	0.2	tr	–
Sclarene	2008	–	0.1	–	0.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4- <i>epi</i> -Isocembrol	2037	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	17.7	–	–	–	55.7
Unidentified 6 (81, 290)	2047	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.2	–	–	18.3	–	–	–
Abietatriene	2048	–	–	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Manool	2049	–	–	–	–	1.3	–	–	1.9	7.4	–	tr	–	–	–	–	–
Abietadiene	2070	–	0.9	–	tr	–	tr	–	0.1	–	–	tr	–	–	–	–	–

Συστατικά^{β,γ}	RRI^δ	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Isoabienol	2117	–	–	–	–	–	–	–	1.3	–	–	–	–	–	–	–	–
Abieta-8(14),13(15)-diene	2128	–	0.1	–	tr	–	tr	–	0.3	–	–	0.2	–	–	–	–	–
Pimarinal	2155	–	–	–	–	–	–	–	–	8.9	–	tr	–	–	–	–	–
Sandaracopimarinal	2204	–	–	–	–	–	–	–	tr	–	–	–	–	–	0.2	–	–
Unidentified 8 (187, 286)	2212	–	–	–	–	tr	–	–	0.3	tr	–	1.1	0.4	0.5	0.7	–	–
Unidentified 9 (81, 286)	2217	–	tr	–	–	1.6	–	–	–	–	–	2.1	–	–	–	–	–
Unidentified 10 (271, 286)	2223	–	–	–	0.7	–	–	–	–	–	–	–	–	0.6	–	–	–
Unidentified 11 (91, 286)	2230	–	0.3	–	0.6	–	0.9	0.6	1.7	–	0.4	1.5	–	0.6	0.5	2.4	–
Dehydroabietal	2266	–	–	–	tr	–	–	–	0.9	2.7	–	0.8	–	tr	0.1	–	–
Methyl isopimarate	2291	–	–	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	tr	0.2	0.1	–	–
Methyl levopimarate	2299	–	–	tr	–	tr	–	–	–	–	–	–	–	0.3	0.2	–	–
Abietal	2300	–	0.2	–	–	–	–	–	0.9	tr	–	0.8	–	–	–	–	–
Unidentified 12 (81, 286)	2332	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.5	–	–	12.1	–
Methyl dehydroabietate	2335	–	–	tr	1.0	tr	–	0.5	tr	4.7	–	–	–	tr	0.2	–	–
Abieta-8(14),13(15)-dien-18-al	2370	–	0.4	–	–	–	1.1	0.4	1.0	–	–	1.2	tr	0.2	0.3	1.1	–
Methyl abietate	2380	–	tr	–	tr	–	0.3	–	–	–	–	–	–	–	tr	–	–
Methyl neoabietate	2437	–	tr	tr	0.3	–	tr	0.5	–	–	–	tr	–	tr	0.2	1.8	–
Σύνολο		99.3	98.4	99.3	99.0	98.7	98.0	99.1	97.5	90.2	95.3	98.2	96.3	98.2	98.0	95.7	93.3
Μονοτερπένια		48.2	36.2	39.8	46.3	67.7	39.6	55.3	48.9	46.8	75.1	68.9	26.7	44.9	94.5	78.3	9.3
Σεσκιτερπένια		51.1	57.6	59.5	50.0	27.7	56.1	41.8	39.9	16.7	19.6	21.6	48.0	29.0	0.8	0.0	6.4
Διτερπένια		0.0	2.3	tr	2.7	3.3	2.3	2.0	8.7	26.7	0.6	7.7	21.6	24.3	2.7	17.4	76.1
Άλλες ενώσεις		0.0	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	tr	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5

^α Αρίθμηση των *taxa* σύμφωνα με τον Πίνακα 1

^β Σειρά παρουσίας των συστατικών σύμφωνα με τη σειρά έκλυσης αυτών από στήλη HP-5MS, υπο τις πειραματικές συνθήκες που έχουν περιγραφεί.

^γ Η αρίθμηση των μη ταυτοποιημένων συστατικών είναι μοναδική στους *Πιν. 162-164* σύμφωνα με τη σειρά έκλυσης αυτών στην παρένθεση περιλαμβάνονται η βασική κορυφή και το μοριακό ιόν.

^δ Οι σχετικοί δείκτες έκλυσης έχουν υπολογιστεί με βάση τους χρόνους έκλυσης των συστατικών, σε σύγκριση με τους χρόνους έκλυσης προτύπων κανονικών

υδρογονανθράκων (C₈–C₂₅), που αναλύθηκαν υπό τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες.

tr: ίχνη (< 0.05)

–: δεν ανιχνεύθηκε

Section Pinus

Subsection Pinaster

Το ποσοστό του β -πινενίου στο αιθέριο έλαιο των φύλλων της *Pinus brutia* (eastern mediterranean ή Calabrian pine) ήταν υψηλότερο (31,2%) συγκριτικά με τις αναλύσεις των άλλων έξι μελετημένων δειγμάτων του *Subsection Pinaster*, όπως δείχνει ο Πίνακας 162 και ακολουθείται από το α -πινένιο (20,3%), το γερμακρένιο D (12,8%) και το β -καρνοφυλλένιο. (11,7%). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής βρίσκονται γενικότερα σε συμφωνία με τα δεδομένα των Bagci et al. (2011), εφόσον παρατηρούνται μόνο μικρές ποσοτικές διαφορές. Το ποσοστό του β -πινενίου είχε αναφερθεί ελάχιστα υψηλότερο σε παλαιότερες μελέτες στο αιθέριο έλαιο της *Pinus brutia* από την Ελλάδα και την Τουρκία (45,7 και 47,5% αντιστοίχως) (Roussis et al. 1995, Ustun et al. 2012). Όμοιο ποιοτικό και ποσοτικό προφίλ εμφανίζεται και στην ανάλυση του αιθερίου ελαίου της *Pinus brutia* από το Μαρόκο, αλλά και από την Τουρκία, παρά την απουσία του γερμακρενίου D (Lahlou 2003, Tumen et al. 2010).

Στο αιθέριο έλαιο της *P. canariensis* (Canary Island pine) επικρατούν τα σεσκιτερπενικά παράγωγα (66,6%) με το γερμακρένιο D (44,0%) ως κύριο εκπρόσωπο της ομάδας αυτής, αλλά και της συνολικής ανάλυσης με το β -καρνοφυλλένιο (8,7%) να εμφανίζεται ως δεύτερος κυριότερος μεταβολίτης αυτής της ομάδας. Το κλάσμα των μονοτερπενίων εκπροσωπείται κυρίως από τα α -πινένιο (14,6%), το λιμονένιο (7,9%) και το μυρκένιο (6,4%). Σύμφωνα με τους Hamamouchi et al. (2001), ο σεσκιτερπενικός υδρογονάνθρακας γερμακρένιο D, επικρατούσε επίσης στη σύσταση του αιθερίου ελαίου της *P. canariensis* από το Μαρόκο. Υψηλό ποσοστό γερμακρενίου D αναφέρεται και στο αιθέριο έλαιο της *P. canariensis* από την Τενερίφη, μαζί με σημαντικά, αλλά μεταβλητά, ποσοστά α -πινενίου (13,2–41,5%) (Pfeifhofer 2000).

Το αιθέριο έλαιο της *P. halepensis* (Aleppo pine) χαρακτηριζόταν από την έντονη παρουσία του σεσκιτερπενικού υδρογονάνθρακα β -καρνοφυλλενίου (19,0%), ενώ ακολουθούσαν τα μονοτερπένια, μυρκένιο (15,1%) και α -πινένιο (8,0%). Σημαντικό ποσοστό καταλαμβάνει η ομάδα των διτερπενίων (31,3%), με κύριους μεταβολίτες ένα μη ταυτοποιημένο οξυγονωμένο παράγωγο (MW = 290) (18,0%) και τον υδρογονάνθρακα κεμβρένιο (6,5%). Υπάρχει ένα πλήθος αναφορών σχετικά με τη χημική σύσταση του πτητικού κλάσματος της *P. halepensis* από διάφορες περιοχές. Στο αιθέριο έλαιο των φύλλων από την κεντρική Ιταλία, το Μαρόκο, την Ελλάδα και την Τουρκία, οι μεταβολίτες β -καρνοφυλλένιο και μυρκένιο εμφανίσθηκαν σε σχετικά υψηλά επίπεδα (11,2-19,1% και 6,3-27,9% αντίστοιχα) (Lahlou 2003, Macchioni et al.

2003, Roussis et al. 1995, Tumen et al. 2010). Στις ίδιες αναλύσεις ανιχνεύθηκε επίσης σε υψηλά ποσοστά το β -πινένιο (13,4-47,1%), σε αντίθεση με το μελετηθέν στην παρούσα εργασία δείγμα, όπου έφτανε μόλις το 1,9%. Ο ίδιος μονοτερπενικός υδρογονάνθρακας αποτελούσε τον κύριο μεταβολίτη ενός άλλου δείγματος από την Τουρκία (Ustun et al. 2012) με ποσοστό 46,8% ενώ ακολουθούσαν τα α -πινένιο (18,4%) και β -καρνοφυλλένιο (9,2%) σε χαμηλότερα ποσοστά. Σύμφωνα με τους Dob et al. (2005, 2007), από τους οποίους αναλύθηκαν δείγματα από την Αλγερία, ο σεσκιτερπενικός υδρογονάνθρακας β -καρνοφυλλένιο έφτανε σε ακόμα υψηλότερα επίπεδα (19,8-40,3%), κυριαρχώντας σχεδόν στη χημική σύσταση του ελαίου. Εντούτοις, σε πιο πρόσφατη μελέτη από τους Abi-Ayad et al. (2011), το οξείδιο του καρνοφυλλενίου καταλάμβανε το 52,0% της συνολικής σύστασης, ακολουθούμενο από το οξυγονωμένο μακροκυκλικό διτερπένιο, θουνμπεργκόλη (9,0%).

Το αιθέριο έλαιο της *P. heldreichii* (Bosnian pine) ήταν πλούσιο σε λιμονένιο (23,7%), γερμακρένιο D (21,3%) και δ -3-καρένιο (18,6%) ακολουθούμενα από το α -πινένιο (11,1%) και το β -καρνοφυλλένιο (8,6%). Όμοιο χημικό προφίλ εμφάνισε το αιθέριο έλαιο βελόνων σερβικής και ελληνικής προέλευσης, με το λιμονένιο (23,2-34,3%) να καταλαμβάνει το υψηλότερο ποσοστό στην ανάλυση, ακολουθούμενο από το γερμακρένιο D (11,4-16,3%) (Bojovic et al. 2011, Nikolic et al. 2007, Petrakis et al. 2001).

Χαρακτηριστικό του δείγματος της *Pinus pinaster* (maritime ή cluster pine) ήταν η έντονη παρουσία των διτερπενικών παραγώγων (67,3%) σε συνδυασμό με τα χαμηλά επίπεδα των μονοτερπενίων (7,2%). Κύριος μεταβολίτης του σεσκιτερπενικού κλάσματος ήταν το γερμακρένιο D (11,2%), ενώ η ισοαβιενόλη (19,1%), το σκλαρένιο (18,0%) και το αβιεταδιένιο (10,6%) ήταν οι κύριοι εκπρόσωποι της ομάδας των διτερπενίων. Η βιβλιογραφική έρευνα εμφάνισε ποικίλες μελέτες με αντικείμενο την ανάλυση των πτητικών συστατικών του φυλλώματος της *P. pinaster*, με προέλευση την Τουρκία, το Ιράν, την Κορσική, την Αλγερία, το Μαρόκο, την Ιταλία, την Ελλάδα, την Ισπανία, τη Γαλλία, τη Ρωσία και την Πορτογαλία (Dob et al. 2005, Dominguez Garrido et al. 1988, Hamamouchi et al. 2001, Kolesnikova et al. 1983, Lahlou 2003, Macchioni et al. 2003, Ottavioli et al. 2008, Pauly et al. 1973, Petrakis et al. 2001, Ustun et al. 2012, Zolfaghari & Iravani 2012). Σε αυτές τις μελέτες είτε το α -, είτε το β -πινένιο εμφανιζόταν ως κύριος μεταβολίτης, ενώ διτερπενικά παράγωγα εμφανίζονταν μόνο σε χαμηλά ποσοστά. Ωστόσο, οι Ottavioli et al. (2008) αναφέρουν το αβιεταδιένιο, το δεύτερο κύριο συστατικό στο δείγμα που μελετήθηκε αναλύθηκε στην

παρούσα μελέτη, ως το βασικότερο μεταβολίτη της ανάλυσης.

Στο αιθέριο έλαιο της *P. pinea* (Mediterranean stone ή umbrella pine) ως κύριοι μεταβολίτες ταυτοποιήθηκε το λιμονένιο (31,7%) και η διτερπενική αλκοόλη αβιενόλη (12,3%), με τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες α - και β -πινένιο, από τα κυριότερα πτητικά συστατικά ειδών του γένους *Pinus*, να ανιχνεύονται σε χαμηλότερα ποσοστά (5,8% και 2,7% αντίστοιχα), ενώ το μονοτερπένιο συλβεστρένιο καταλάμβανε ασυνήθιστα υψηλότερα ποσοστά (7,9%). Επίσης οι Nasri et al. (2011) και Macchioni et al. (2003) ταυτοποίησαν ως κύριο μεταβολίτη το λιμονένιο (35,9 και 58,9%) στο αιθέριο έλαιο βελόνων *P. pinea* από τη Β. Τυνησία και κεντρική Ιταλία, δίχως όμως να έχει ανιχνευθεί η αβιενόλη στη χημική σύσταση. Οι Tumen et al. (2010) αναφέρουν ως κύρια συστατικά της σύστασης του αιθερίου ελαίου φύλλων *P. pinea* τουρκικής προέλευσης, ένα μίγμα λιμονενίου και β -φελλανδρενίου (69,5%), αλλά και το α -πινένιο (17,9%). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Ustun et al. (2012), οι οποίοι ανέλυσαν το, επίσης τουρκικής προέλευσης, αιθέριο έλαιο βελόνων, η υψηλή περιεκτικότητα σε α -πινένιο (42,4%) ήταν χαρακτηριστική της χημικής σύστασης του αιθερίου ελαίου, ενώ το λιμονένιο ανιχνεύθηκε σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα (1,4%). Επιπρόσθετα, το α -πινένιο (37,0%) ήταν ο κυριότερος μεταβολίτης του αιθερίου ελαίου μαροκινής προέλευσης, ενώ δεν ανιχνεύθηκε λιμονένιο.

Το αιθέριο έλαιο της *P. roxburghii* (Chir pine) ήταν πλούσιο σε δ -3-καρένιο (15,9%), τερπινολένιο (10,5%), α -πινένιο (8,4%) και σαβινένιο (6,2%), ενώ το σεσκιτερπενικό κλάσμα χαρακτηριζόταν από την παρουσία του β -καρνοφυλλενίου (20,5%). Ο μονοτερπενικός υδρογονάνθρακας, δ -3-καρένιο ήταν το κύριο συστατικό και στο αιθέριο έλαιο του των βελόνων αιγυπτιακής προέλευσης (Islam 2006), ενώ οι Zafar et al. (2010) ταυτοποίησαν το β -καρνοφυλλένιο (21,9%) και α -πινένιο (29,3%) ως κύρια συστατικά των αναλυθέντων δειγμάτων.

Section Pinus

Subsection Pinus

Στο αιθέριο έλαιο της *Pinus densiflora* (Japanese red pine), τα ποσοστά των μονο-, σεσκι- και διτερπενίων κυμαίνονταν στα ίδια επίπεδα (38,2%, 35,5% και 23,0% αντίστοιχα). Κύριοι μεταβολίτες ήταν τα μονοτερπένια α -πινένιο (9,9%), (*Z*)- β -οκιμένιο (8,9%) και β -πινένιο (7,1%), από την ομάδα των σεσκιτερπενίων το *trans*-καδινα-1(6),4-διένιο (12,7%) και το β -καρνοφυλλένιο (8,7%) και η διτερπενική αλκοόλη 4-επι-

ισοκεμβρόλη (8,5%). Παρά τις διαφορές, ποσοτικές και ποιοτικές, που εντοπίζονται σε προηγούμενες αναλύσεις, στην πλειοψηφία αυτών το α -πινένιο αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη, ενώ παράγωγα της ομάδας των διτερπενίων εμφανίζονται μόνο σε ίχνη (Hong et al. 2004, Lee et al. 2009, Park & Lee 2011, Teng et al. 2011). Παρ' όλα αυτά, οι Kim et al. (2013) ανίχνευσαν στο αιθέριο έλαιο των βελόνων της *P. densiflora*, κορεατικής προέλευσης, διτερπενικά παράγωγα σε μέτρια ποσοστά, με το κεμβρένιο (4,2%) να αποτελεί τον κυριότερο μεταβολίτη αυτής της κατηγορίας. Ωστόσο, το χημικό προφίλ των ελαίων της παραπάνω μελέτης διαφέρει από αυτό του δείγματος 8, στην έντονη παρουσία του α -χουμουλένιο (18,1%), που ήταν ο κύριος μεταβολίτης, ενώ στο δικό μας δείγμα εμφανίστηκε σε αρκετά χαμηλότερο ποσοστό, 1,6%.

Το αιθέριο έλαιο της *P. massoniana* (Masson pine) χαρακτηριζόταν από την παρουσία του α -πινενίου (26,9%) και του γερμακρενίου D (20,7%) καθώς και από το β -πινένιο (16,3%) και το β -καρνοφυλλένιο (11,6%), ενώ ακολουθούσε το β -φελλανδρένιο (6,8%). Ομοίως οι Yatagai & Hong 1997 ταυτοποίησαν το α -πινένιο ως κύριο μεταβολίτη στο αιθέριο έλαιο βελόνων διαφορετικών κλώνων *P. massoniana*, αλλά με χαμηλότερο ποσοστό (13-14%), ακολουθούμενο από το οξεικό βορνύλιο (7-8%).

Σύγκριση μεταξύ των αιθερίων ελαίων της *P. mugo* (dwarf mountain pine) και των ποικιλιών, *P. mugo* var. *prostrata* και *P. mugo* var. *pumilio* έδειξε κυρίως ποσοτικές διαφορές στη χημική τους σύσταση. Και τα τρία δείγματα περιείχαν α -πινένιο (12,9-14,1%) και δ -3-καρένιο (6,4-12,0%) από μέτρια έως υψηλά ποσοστά. Ωστόσο, το κύριο συστατικό της *P. mugo* var. *prostrata*, ήταν το οξεικό βορνύλιο (14,1%) και είχε σχεδόν το διπλάσιο ποσοστό συγκριτικά με την *P. mugo* var. *pumilio* (7,6%), ενώ το ποσοστό του στην *P. mugo* δεν ξεπερνούσε το 3,8%. Επιπλέον, τα ποσοστά των σεσκιτερπενικών υδρογονανθράκων β -καρνοφυλλένιο και γερμακρένιο D, ήταν υψηλότερα στα έλαια των *P. mugo* και *P. mugo* var. *pumilio*, ενώ τα επίπεδα της σεσκιτερπενικής αλκοόλης γερμακρεν-D-4-όλης ήταν περίπου τα ίδια και στα τρία δείγματα (4,1-6,1%). Οι Tsitsimpikou et al. (2001) είχαν αναφέρει το α -πινένιο ως κύριο μεταβολίτη του αιθερίου ελαίου του φυλλώματος *P. mugo* σκωτικής προέλευσης (33,3%), ενώ το δ -3-καρένιο (23,9%) χαρακτήριζε το αιθέριο έλαιο *P. mugo*, σερβικής προέλευσης (Stevanovic et al. 2005).

Παρά τις αξιοσημείωτες ποσοτικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων της *P. nigra*, παρατηρούνται σημαντικές ποιοτικές ομοιότητες και για τα τέσσερα αναλυθέντα δείγματα, δηλαδή για το αιθέριο έλαιο της *P. nigra* var. *caramanica* (Crimean pine), *P. nigra* subsp. *laricio* (Corsican pine), *P. nigra* var. *nigra* (Austrian ή Black pine) και *P.*

nigra subsp. *salzmannii* (Salzmann pine). Συγκεκριμένα, σε όλες τις αναλύσεις εμφανίζονταν ως κύρια συστατικά τα α -πινένιο (12,2-19,5%), β -καρυοφυλλένιο (7,8-17,8%) και γερμακρένιο D (12,7-20,0%), σε αντίθεση με το ποσοστό του β -πινενίου, που παρουσίασε έντονη διακύμανση και στο αιθέριο έλαιο της *P. nigra* subsp. *laricio* ανιχνεύθηκε μόνο σε ποσοστό 0,9%, παρά το γεγονός ότι στο αιθέριο έλαιο της *P. nigra* var. *caramanica* αποτελούσε τον κύριο μεταβολίτη με ποσοστό που έφτανε το 20,7%. Ομοίως, το ποσοστό του δ -3-καρενίου έφτανε το 16,1% στο έλαιο των φύλλων της *P. nigra* subsp. *laricio*, αλλά στο δείγμα της *P. nigra* subsp. *salzmannii* ανιχνεύθηκε μόνο σε ίχνη. Επιπλέον, το λιμονένιο εμφανίστηκε με ποσοστά 12,5% και 9,7% στο αιθέριο έλαιο των *P. nigra* subsp. *salzmannii* και *P. nigra* subsp. *laricio* αντίστοιχα, ενώ στα έλαια των *P. nigra* subsp. *caramanica* και *P. nigra* subsp. *nigra* εμφανίστηκε σε χαμηλότερα ποσοστά. Σύμφωνα με τους Sezik et al. (2010), που ανέλυσαν το αιθέριο έλαιο βελόνων *P. nigra*, που συλλέχθηκαν σε διαφορετικές περιόδους και από διαφορετικές τοποθεσίες στην Τουρκία, κύριοι μεταβολίτες ήταν οι τερπενικοί υδρογονάνθρακες α - και β -πινένιο, γερμακρένιο D, και β -καρυοφυλλένιο, με σειρά μειούμενης περιεκτικότητας. Το αιθέριο έλαιο της *P. nigra* από φυσική θέση στην Ελλάδα, περιείχε κυρίως α -πινένιο (52,2%) και γερμακρένιο D (14,3%) (Roussis et al. 1995). Στο αιθέριο έλαιο Μαύρης Πεύκης από την Τουρκία ταυτοποιήθηκε επίσης το α -πινένιο (45,4%) ως βασικός μεταβολίτης, όμως το γερμακρένιο D ανιχνεύθηκε μόνο σε ίχνη (Tumen et al. 2010).

Τα αιθέρια έλαια των *P. sylvestris* (Scots pine) και το υποείδος *P. sylvestris* subsp. *scotica* παρουσίασαν ορισμένες ομοιότητες, εμφάνισαν όμως και σημαντικές διαφορές σε ποιοτικό και ποσοτικό επίπεδο. Το κύριο συστατικό της *P. sylvestris* ήταν το α -πινένιο (34,4%), ενώ στο δείγμα του υποείδους της, εντοπίστηκε σε χαμηλότερο ποσοστό (9,5%). Επίσης, το έλαιο της *P. sylvestris* ήταν πλούσιο σε δ -3-καρένιο (10,7%), το οποίο δεν ανιχνεύθηκε στο δείγμα της *P. sylvestris* subsp. *scotica*. Επίσης, το δείγμα της *P. sylvestris* ήταν πλούσιο σε δ -καδινένιο (7,1%). Παρ' όλα αυτά και τα δυο δείγματα περιείχαν β -πινένιο, β -καρυοφυλλένιο και γερμακρένιο D σε μέτριες ποσότητες. Διτερπένια δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου στο αιθέριο έλαιο της *P. sylvestris*, ενώ το ποσοστό τους στο αιθέριο έλαιο της *P. sylvestris* subsp. *scotica* έφτανε το 26,4% με σχεδόν μοναδικό εκπρόσωπο την ισοαβιενόλη (25,9%). Σε προηγούμενες μελέτες έχει εμφανιστεί το α -πινένιο ως κύριο συστατικό του πτητικού κλάσματος των φύλλων της *P. sylvestris* από τη Φινλανδία, τη Σλοβενία, την Τουρκία και τη Λευκορωσία (Hitlunen & Laakso 1995, Oussalah et al. 2006, Shpak et al. 2007, Tumen et al. 2010,

Ustun et al. 2006).

Η ομάδα των σεσκιτερπενίων επικρατούσε στο αιθέριο έλαιο της *P. tabuliformis* (Chinese red pine) με ποσοστό 62,8%, συγκεκριμένα με το β -καρυοφυλλένιο (15,9%) και το γερμακρένιο D (14,5%), ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι τα μονοτερπένια α - και β -πινένιο ανιχνεύθηκαν σε μέτριες ποσότητες (9,7 και 6,2% αντίστοιχα). Σημαντικές ποσοτικές διαφορές εντοπίστηκαν στο αιθέριο έλαιο του φυλλώματος της *Pinus tabuliformis* από δυο διαφορετικά σημεία συλλογής στην Κίνα (Chen et al. 2006). Συγκεκριμένα, στο πρώτο δείγμα κύριος μεταβολίτης ήταν το β -καρυοφυλλένιο (23,6%), ενώ δεν ανιχνεύθηκε α -πινένιο. Αντιθέτως, το α -πινένιο αποτελούσε το βασικό μεταβολίτη του δεύτερου δείγματος (21,2%), ενώ το ποσοστό του β -καρυοφυλλενίου ήταν αρκετά χαμηλότερο (6,5%).

Στο αιθέριο έλαιο της *Pinus taiwanensis* (Taiwan red or Formosa pine) επικρατούσε το μονο- (60,4%) και το σεσκιτερπενικό κλάσμα (31,2%), με το β -φελλανδρένιο (15,6%) να αποτελεί τον κύριο εκπρόσωπο του μονοτερπενικού κλάσματος ακολουθούμενο από το α -πινένιο, το β -πινένιο και το μυρκένιο (12,1%, 11,5% και 7,4% αντίστοιχα). Από την ομάδα των σεσκιτερπενίων ξεχώριζε το β -καρυοφυλλένιο με ποσοστό 14,9% και ακολουθούσε το γερμακρένιο D με αρκετά χαμηλότερο ποσοστό (5,2%). Αυτή είναι η πρώτη αναφορά στη χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου του φυλλώματος του είδους *Pinus taiwanensis*.

Το αιθέριο έλαιο των βελόνων της *Pinus thunbergii* (Japanese black pine) χαρακτηριζόταν από την παρουσία του γερμακρενίου D (18,7%), του β -φελλανδρενίου (14,5%) και του β -πινενίου (13,2%), ενώ ακολουθούσε το β -καρυοφυλλένιο (9,4%) και το α -πινένιο (8,7%). Τα α -πινένιο (10,9%) και β -φελλανδρένιο αναφέρονται ομοίως ως κύριοι μεταβολίτες του αιθερίου ελαίου των βελόνων *Pinus thunbergii* από τη δυτική ακτή της Κορέας (Park & Lee 2011). Ωστόσο, το τερπινολένιο και το δ -3-καρένιο ήταν, επίσης, από τα επικρατέστερα συστατικά της παραπάνω ανάλυσης με ποσοστά 19,3% και 16,8%, αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, και σύμφωνα με τους Kim et al. (2013), το αιθέριο έλαιο των βελόνων της *Pinus thunbergii*, επίσης κορεατικής προέλευσης, αποδείχθηκε πλούσιο σε α -χουμουλένιο και 2H-βενζοκυκλοεπέν-2-όνη (19,6 και 34,3%, αντίστοιχα), συστατικά, τα οποία στο αναλυθέν δείγμα είτε ανιχνεύθηκαν σε μικρή ποσότητα, είτε δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου.

Section *Trifoliae*

Subsection *Australes*

Χαρακτηριστική ήταν η παρουσία των μονο- (48,2%) και των σεσκιτερπενίων (51,1%) στο αιθέριο έλαιο των βελόνων της *Pinus attenuata* (knobcone pine), ενώ δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου διτερπένια. Κύρια συστατικά ήταν το α -πινένιο, καθώς και οι σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες γερμακρένιο D (29,0%), β -καρνοφυλλένιο (7,9%) και δ -καδινένιο (5,4%). Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη, το β -πινένιο (19,1%) ήταν ο κύριος μεταβολίτης του αιθερίου ελαίου, με το α -πινένιο και το γερμακρένιο D να εμφανίζονται σε χαμηλότερα ποσοστά (9,6 και 4,5%, αντίστοιχα) (Pettrakis et al. 2001).

Το αιθέριο έλαιο από το φύλλωμα της *P. elliotii* (slash pine) χαρακτηριζόταν από την υψηλή περιεκτικότητα σε σεσκιτερπένια (57,6%) και ακολούθως από μονοτερπένια (36,2%), ενώ παρατηρήθηκαν και μικρά ποσοστά διτερπενίων (2,3%). Οι κύριοι μεταβολίτες του αιθερίου ελαίου ήταν το γερμακρένιο D (24,5%), το β - και α -πινένιο (12,9% και 10,6%, αντίστοιχα) και το β -καρνοφυλλένιο (6,6%). Κατόπιν βιβλιογραφικής ανασκόπησης διαπιστώθηκε, ότι πρόκειται για την πρώτη ανάλυση του αιθερίου ελαίου του φυλλώματος της *P. elliotii*.

Το σεσκιτερπενικό κλάσμα (59,5%) χαρακτήριζε το αιθέριο έλαιο της *P. muricata* (bishop pine), με το γερμακρένιο D (41,5%) να είναι ο κύριος μεταβολίτης της ολικής σύστασης. Βασικοί εκπρόσωποι του μονοτερπενικού κλάσματος ήταν το α -πινένιο (17,3%) μαζί με το δ -3-καρένιο (5,3%) και το (E)- β -οκιμένιο (5,4%). Αξιοσημείωτη ήταν η απουσία του χαρακτηριστικού μεταβολίτη αιθερίων ελαίων ειδών του γένους *Pinus*, β -καρνοφυλλενίου. Ομοίως, κατόπιν βιβλιογραφικής ανασκόπησης, διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για την πρώτη ανάλυση του αιθερίου ελαίου των βελόνων της *P. muricata*.

Το γερμακρένιο D (21,3%) αποτελούσε τον κύριο μεταβολίτη του πτητικού κλάσματος των φύλλων της *P. patula* (Mexican weeping pine), ενώ ακολουθούσε το α -πινένιο (18,5%), το β -φελλανδρένιο (14,7%) και το β -καρνοφυλλένιο (11,8%). Κυρίως ποσοτικές, αλλά και ορισμένες ποιοτικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ του δείγματος που αναλύθηκε και των δημοσιευμένων αναφορών. Οι Kurose et al. (2007) αναφέρουν ότι έλαιο των φύλλων, που συλλέχθηκαν από την Καλιφόρνια, ήταν πλούσιο σε οξείδιο του καρνοφυλλενίου (14,8%), β -φελλανδρένιο (12,1%) και σε α -πινένιο (9,8%), ενώ διτερπένια ήταν ανιχνεύσιμα σε μικρότερες ποσότητες. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, οι Amri et al. (2011), ταυτοποίησαν το α - και β -πινένιο (35,2% και 19,5%) ως κυριότερα πτητικά συστατικά των φύλλων.

Το αιθέριο έλαιο της *P. radiata* (Monterey pine) χαρακτηριζόταν από την υψηλή περιεκτικότητα σε α - και β -πινένιο (18,9% και 387% αντίστοιχα), ενώ το ποσοστό του γερμακρενίου D ήταν χαμηλότερο (6,4%), συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα του ίδιου *Subsection*. Οι Saccheti et al. (2005) αναφέρουν τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες, α - και β -πινένιο, ως κύριους μεταβολίτες του αιθερίου ελαίου των βελόνων της *P. radiata*, που διατίθεται στο εμπόριο, με την ομάδα των διτερπενίων να εμφανίζεται ομοίως σε χαμηλά επίπεδα.

Στο αιθέριο έλαιο της *P. rigida* (pitch pine) το β -πινένιο (16,7%) και το β -φελλανδρένιο (13,6%) ήταν δύο από τους βασικότερους μεταβολίτες που κυριαρχούσαν στο κλάσμα των μονοτερπενίων, ενώ από το σесκιτερπενικό κλάσμα, βασικότερα συστατικά ήταν το γερμακρένιο D (15,5%) και το δικυκλογερμακρένιο (14,1%). Σε μια πρόσφατη ανάλυση αναφέρεται, ότι κύριο πτητικό συστατικό του φυλλώματος *P. rigida*, κορεατικής προέλευσης, ήταν το σесκιτερπένιο 2H-βενζοκυκλοεπτεν-2-όνη (24,5%), το οποίο δεν ανιχνεύθηκε στο δείγμα 27 (Kim et al. 2013), ενώ οι Kurose et al. (2007), ταυτοποίησαν τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες α - και β -πινένιο ως κύριους μεταβολίτες στο αιθέριο έλαιο του φυλλώματος *P. rigida* από την Καλιφόρνια (ΗΠΑ), καταλαμβάνοντας ποσοτικά τα ίδια επίπεδα.

Το αιθέριο έλαιο των βελόνων της *Pinus teocote* (Mexican small-cone or Aztec pine) ήταν πλούσιο σε μονο- και σесκιτερπένια (55,3 και 41,8%, αντίστοιχα), ενώ τα διτερπένια καταλάμβαναν χαμηλά ποσοστά (2,0%). Ως κύριος μεταβολίτης του ελαίου ταυτοποιήθηκε το α -πινένιο (33,3%) και ακολουθούσε το γερμακρένιο D (27,6%), το β -καρυοφυλλένιο (9,8%) και το β -πινένιο (7,8%). Κατόπιν βιβλιογραφικής ανασκόπησης, διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για την πρώτη ανάλυση του αιθερίου ελαίου του φυλλώματος της *P. teocote*.

Section Trifoliae

Subsection Contortae

Κύριοι μεταβολίτες του αιθερίου ελαίου των φύλλων της *P. banksiana* (Jack pine) ήταν το οξυγονωμένο μονοτερπένιο, οξεϊκό βορνύλιο (15,7%) και ο σесκιτερπενικός υδρογονάνθρακας γερμακρένιο D (14,7%). Επίσης, οι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες α -πινένιο (8,2%), β -πινένιο (7,8%) και μυρκένιο (6,3%) ανιχνεύθηκαν σε μέτρια ποσοστά. Σημειώνεται, ότι υπάρχει μόνο μια μελέτη σχετικά με το αιθέριο έλαιο από τα φύλλα της *P. banksiana*, από την Κριμαία, σύμφωνα με την

οποία τα α - και β -πινένιο, καμφένιο, δ -3-καρένιο, λιμονένιο, γ -τερπινένιο, π -κυμένιο και τερπινολένιο, ανιχνεύθηκαν σε σημαντικά ποσοστά (Lishtvanova & Akimov 1971).

Κυρίως ποσοτικές αλλά και ορισμένες ποιοτικές διαφορές παρατηρήθηκαν στη χημική σύσταση μεταξύ των αιθερίων ελαίων των φύλλων, των τριών ποικιλιών της *P. contorta*, που αναλύθηκαν. Συγκεκριμένα, στο αιθέριο έλαιο της *P. contorta* var. *murrayana* (Sierra Nevada lodgepole pine) κυρίαρχο συστατικό ήταν το β -φελλανδρένιο (47,0%), ενώ το αιθέριο έλαιο της *P. contorta* var. *latifolia* (Rocky Mountain lodgepole pine) ήταν πλούσιο σε β -πινένιο (32,8%) και β -φελλανδρένιο (26,0%). Ωστόσο, το αιθέριο έλαιο του φυλλώματος της *P. contorta* var. *contorta* (shore or beach pine), χαρακτηριζόταν από το υψηλό ποσοστό των διτερπενίων (26,7%), με την πιμαρινάλη (8,9%) και τη μανούλη (7,4%) να επικρατούν στο κλάσμα αυτό, ενώ τα μονοτερπενικά παράγωγα, β -φελλανδρένιο και β -πινένιο ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερα ποσοστά (19,9% και 4,7%, αντίστοιχα). Έχει αναφερθεί ότι το β -πινένιο (30,5%) και το β -φελλανδρένιο (34,1%) ήταν οι κύριοι μεταβολίτες του αιθερίου ελαίου των φύλλων της *P. contorta* var. *latifolia* канаδικής προέλευσης (Pauly & Von Rudloff 1971).

Section Trifoliae

Subsection Ponderosae

Στο αιθέριο έλαιο των βελόνων της *P. coulteri* (Coulter or bigcone pine) κυριαρχούσε το σεσκιτερπενικό κλάσμα (48,0%), ενώ η ομάδες των μονο- και διτερπενίων ανιχνεύθηκαν περίπου στα ίδια επίπεδα (26,7 και 21,6%, αντίστοιχα). Ο βασικότερος μεταβολίτης στη χημική σύσταση ήταν η 4-επι-ισοκεμβρόλη (17,7%), και ακολουθούσε ένα μη ταυτοποιημένο οξυγονωμένο σεσκιτερπένιο (MW = 222) (16,9%), το α -πινένιο (13,6%) και το γερμακρένιο D (8,8%). Αξίζει να σημειωθεί ότι κοινοί τερπενικοί υδρογονάνθρακες, όπως το β -πινένιο και το β -καρνοφυλλένιο, με υψηλά ποσοστά σε άλλα *taxa* του γένους *Pinus*, ανιχνεύθηκαν μόνο σε χαμηλά ποσοστά (1,1% και 0,6%, αντίστοιχα). Κατόπιν βιβλιογραφικής ανασκόπησης, διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για την πρώτη ανάλυση του αιθερίου ελαίου του φυλλώματος της *P. teocote*.

Το αιθέριο έλαιο των φύλλων της *Pinus jeffreyi* (Jeffrey pine) ήταν πλούσιο σε α -πινένιο (29,8%) και γερμακρένιο D (11,5%) καθώς και σε ένα μη ταυτοποιημένο ισομερές της θουνμπεργκόλης (MW = 290) (18,3%). Σε μία πρόσφατη μελέτη των Adams & Wright 2012, ως κύριος μεταβολίτης αναφέρεται το α -πινένιο (20,9%), ακολουθούμενο ωστόσο από την θουνμπεργκόλη (9,2%), μία διτερπενική αλκοόλη που

ανιχνεύθηκε μόνο σε 0,9% στο δείγμα που αναλύθηκε.

Στο αιθέριο έλαιο της *P. ponderosa* (Ponderosa pine / Western yellow pine) ανιχνεύθηκαν, σχεδόν αποκλειστικά, μονοτερπενικά παράγωγα (94,5%). Συγκεκριμένα, οι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες, β -πινένιο (45,0%), α -πινένιο (22,5%) και δ -3-καρένιο (12,0%) επικρατούσαν ποσοτικά των υπολοίπων συστατικών της ανάλυσης. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, το α - και β -πινένιο ήταν ομοίως οι κυριότεροι μεταβολίτες του πτητικού κλάσματος των βελόνων της *P. ponderosa*, που συλλέχθηκαν από την Καλιφόρνια (Kurose et al. 2007), αλλά και σε πιο πρόσφατη μελέτη από τους Zheljzakov et al. (2012).

Το μονοτερπενικό κλάσμα (78,3%) επικρατούσε στο αιθέριο έλαιο της *P. sabiniana* (Foothill pine / Digger pine), με το α -πινένιο να φτάνει σε ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό (61,6%). Ωστόσο, άλλοι κοινοί μεταβολίτες της κατηγορίας των τερπενίων, χαρακτηριστικοί για τα περισσότερα έλαια που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη, όπως το γερμακρένιο D, δεν ανιχνεύθηκαν. Αξιοσημείωτο επίσης είναι, ότι σεσκιτερπένια ανιχνεύθηκαν μόνο σε ίχνη, ενώ το ποσοστό των διτερπενίων έφτασε το 17,4%. Σύμφωνα με την ανάλυση των Adams & Wright (2012), το α -πινένιο ήταν και πάλι το κυριότερο συστατικό της ανάλυσης, καταλαμβάνοντας όμως χαμηλότερο ποσοστό (39,1%), συγκρινόμενο με το δείγμα που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη, ενώ ακολουθούσαν τα παράγωγα, β -πινένιο, μυρκένιο, λιμονένιο, β -φελλανδρένιο, (Z)- β -οκιμένιο, μεθυλο-χαβικόλη, δεκανάλη και θουνμπεργκόλη σε μέτρια ποσοστά.

Η παρουσία των διτερπενίων (76,1%) ήταν χαρακτηριστική στο αιθέριο έλαιο της *Pinus torreyana* (Torrey pine) με την 4-επι-ισοκεμβρόλη να καταλαμβάνει ιδιαίτερα σημαντικό ποσοστό (55,7%) και ακολούθως το κεμβρένιο (12,7%) με τη θουνμπεργκόλη (7,7%). Παρόλο που το αιθέριο έλαιο της *P. torreyana* ήταν φτωχό σε μονοτερπενικά παράγωγα (9,3%), το λιμονένιο ήταν ένας από τους κύριους μεταβολίτες (8,6%). Αν και υπάρχουν αναφορές σχετικά με τη ρητίνη της *P. torreyana* (Haagen-Smit et al. 1947, Zavarin et al. 1967), αυτή είναι η πρώτη χημική μελέτη του αιθερίου ελαίου των βελονοειδών φύλλων αυτού του είδους.

3.4.1.2. Υπογένος *Strobus*

Σύμφωνα με τους Gernandt et al. (2005), δυο *section* (*Parrya* και *Quinquifoliae*) και έξι *subsection* (*Balfourianae*, *Cembroides*, *Gerardianae*, *Krempfianae*, *Nelsoniae* και *Strobus*) αναγνωρίζονται στο υπογένος *Strobus*. Πρόσφατες ταξινομήσεις του υπογένους έχουν αναγνωρίσει 36-40 είδη (Farjon 2005, Gernandt et al. 2005), με απόλυτη ταύτιση σε 34 από αυτά και εναλλακτική κατηγοριοποίηση, εντούτοις, στα υπόλοιπα είδη του υπογένους. Μεταξύ αυτών, 17 είδη μελετήθηκαν ως προς την χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου των φύλλων τους (Πίνακας 164).

Πίνακας 164 Χημική σύσταση του αιθερίου των βελονοειδών φύλλων από *taxa* του γένους *Pinus* που ανήκουν στο υπογένος *Strobus*, *Section Parrya*, *Subsection Balfourianae* (38), και *Subsection Cembroides* (39–41) και *Section Quinquifoliae*, *Subsection Gerardianae* (42–43) και *Subsection Strobus* (44–54).

Συστατικά ^{β,γ}	RRI ^δ	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
Santene	885	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	0.1	–	0.2	tr	0.1	–	–	0.1
Tricyclene	918	tr	0.8	tr	0.1	2.9	tr	0.2	tr	0.8	0.9	0.2	0.4	0.5	0.5	0.1	0.3	0.3
<i>α</i> -Thujene	927	tr	–	–	0.2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>α</i> -Pinene	933	6.6	30.9	33.6	18.7	21.1	26.4	48.0	21.1	24.5	14.3	14.9	21.1	30.1	17.0	8.0	14.7	13.8
Camphene	945	0.8	3.5	2.0	1.2	8.3	0.7	1.2	0.5	9.0	6.1	2.1	4.5	5.9	3.5	1.4	2.8	3.1
Sabinene	964	3.1	tr	tr	tr	tr	–	tr	tr	tr	tr	tr	tr	–	2.0	tr	tr	–
<i>β</i> -Pinene	973	6.4	5.6	20.2	27.2	5.6	39.1	1.4	4.6	8.6	1.5	14.2	12.5	10.8	1.4	12.5	5.8	18.1
Myrcene	981	1.6	5.0	1.8	4.6	2.8	5.7	0.8	0.7	1.0	2.0	1.6	1.5	1.5	1.9	0.5	2.4	1.2
<i>α</i> -Phellandrene	994	tr	0.1	0.3	0.2	tr	0.2	tr	tr	0.1	0.3	1.2	0.3	0.5	tr	0.1	1.8	0.1
<i>δ</i> -3-Carene	1003	38.4	0.3	0.8	0.8	tr	0.2	tr	0.1	0.6	tr	tr	–	0.1	20.8	0.7	–	tr
<i>α</i> -Terpinene	1010	1.4	0.1	0.2	tr	0.1	0.1	tr	tr	–	0.1	tr	tr	0.1	0.3	0.1	–	tr
Limonene	1019	–	–	–	6.8	4.6	–	1.1	–	1.9	5.4	tr	–	–	4.6	–	–	2.9
Sylvestrene	1020	–	–	–	–	–	–	–	–	1.9	–	–	–	4.7	–	2.3	–	–
<i>β</i> -Phellandrene	1024	12.7	3.7	16.9	4.6	–	5.3	–	13.5	–	–	6.0	31.9	–	3.0	–	5.2	–
(<i>Z</i>)- <i>β</i> -Ocimene	1029	–	–	–	0.8	0.5	–	0.6	–	–	–	–	–	tr	–	–	–	–
<i>γ</i> -Terpinene	1052	1.7	0.2	0.3	0.2	0.2	tr	tr	tr	–	0.1	tr	tr	tr	0.5	tr	–	tr
<i>p</i> -Mentha-2,4(8)-diene	1075	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.8	–	–
Terpinolene	1078	8.6	0.5	0.7	1.5	0.2	0.5	0.5	0.3	0.8	6.6	1.2	0.5	0.9	6.0	–	0.4	0.5
<i>trans</i> -Pinocamphone	1148	–	–	tr	tr	0.1	tr	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	–	tr
<i>cis</i> -Pinocamphone	1165	–	–	–	–	–	0.1	–	–	–	tr	tr	–	–	–	tr	–	–
Terpinen-4-ol	1169	1.9	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2	tr	tr	–	tr	tr	tr	0.1	0.1	0.2	–	tr
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1182	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.3	–	–	–	–
<i>α</i> -Terpineol	1183	–	0.5	0.6	0.9	tr	0.9	tr	tr	–	0.1	0.1	0.1	–	tr	–	–	–
<i>γ</i> -Terpineol	1184	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.1	–	–	–	tr

Συστατικά ^{β,γ}	RRI ^δ	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
Methyl chavicol	1193	–	–	–	–	–	–	–	0.3	–	–	–	–	–	0.3	–	–	–
Thymol methyl ether	1220	11.4	1.8	–	1.7	–	–	–	0.2	–	0.1	–	0.7	–	tr	tr	–	tr
Bornyl acetate	1275	0.8	0.2	0.8	1.3	–	0.3	0.3	tr	3.8	8.3	2.2	3.0	6.5	0.9	1.3	–	2.8
Bicycloelemene	1321	–	–	–	–	–	–	0.2	0.2	–	0.1	–	–	tr	tr	0.1	tr	tr
α-Cubebene	1337	–	–	0.1	0.3	0.5	tr	tr	0.1	–	0.4	tr	tr	0.4	tr	0.1	–	tr
α-Terpinyl acetate	1338	2.2	–	0.3	0.4	–	1.5	–	–	–	0.1	tr	–	0.2	0.2	–	–	–
α-Ylangene	1357	–	–	tr	0.1	0.3	tr	tr	tr	tr	0.2	–	tr	–	–	–	–	tr
α-Copaene	1366	–	0.2	0.2	0.6	0.7	1.7	0.1	0.2	–	0.5	tr	–	0.4	0.1	0.1	0.2	0.2
β-Bourbonene	1369	–	tr	tr	0.3	0.4	–	tr	tr	0.2	tr	tr	0.1	0.2	–	0.2	–	0.1
β-Cubebene	1370	–	–	tr	0.3	0.4	0.1	tr	tr	–	0.3	–	–	–	–	0.1	–	0.1
β-Elemene	1373	–	0.2	–	–	0.1	–	0.5	0.2	0.3	0.1	15.0	0.4	0.6	0.2	0.4	1.1	0.2
Sibirene	1382	–	–	–	–	–	0.8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
β-Caryophyllene	1395	–	19.2	–	0.7	11.0	2.9	14.3	1.5	0.1	8.4	0.9	0.4	9.8	3.0	–	2.1	7.2
β-Copaene	1411	–	0.1	tr	0.3	0.8	0.2	0.1	0.2	tr	0.5	tr	0.1	0.1	tr	tr	tr	0.1
β-Gurjunene	1412	–	–	–	–	0.1	–	–	–	–	0.1	–	–	–	–	0.2	–	–
Aromadendrene	1417	–	–	–	–	0.1	–	tr	0.2	tr	0.2	–	tr	–	tr	tr	tr	–
6,9-Guaiadiene	1427	–	–	–	–	–	–	0.2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	tr
α-Humulene	1431	–	3.2	–	0.1	2.4	0.4	2.5	0.3	tr	1.5	0.2	0.1	1.8	1.9	–	0.7	1.5
trans-Muurolo-3,5-diene	1433	–	–	–	0.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.2	–	–
cis-Cadina-1(6),4-diene	1440	–	–	–	0.2	0.4	–	–	–	–	0.2	–	–	–	–	tr	–	0.1
cis-Muurolo-4(14),5-diene	1460	–	0.1	tr	–	–	–	0.1	tr	–	–	0.2	–	–	0.1	–	–	–
γ-Muuroloene	1464	–	–	tr	2.4	10.0	0.1	–	–	1.4	tr	tr	tr	tr	0.2	tr	tr	–
Germacrene D	1468	–	9.4	7.9	4.9	11.2	0.1	19.0	21.2	12.2	18.7	6.8	12.8	17.0	1.8	25.5	11.1	10.3
β-Selinene	1471	–	–	–	tr	0.2	–	0.1	0.1	–	0.1	1.2	0.1	–	tr	–	–	–
Bicyclogermacrene	1474	–	–	–	–	–	–	1.8	4.7	2.0	2.8	–	0.7	1.2	1.3	4.1	3.2	1.5
γ-Amorphene	1475	–	–	–	0.5	1.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
trans-Muurolo-4(14),5-diene	1475	–	–	tr	0.2	0.2	0.1	tr	0.1	–	0.2	tr	tr	–	0.1	0.2	–	–

Συστατικά ^{β,γ}	RRI ^δ	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
<i>α</i> -Selinene	1478	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.7	–	–	–	–	–	–
<i>epi</i> -Cubebol	1479	–	0.1	tr	0.5	0.3	0.1	–	–	–	–	0.5	–	–	–	–	–	–
<i>α</i> -Muurolene	1481	–	0.4	0.2	1.0	0.9	0.8	0.3	0.4	0.7	0.7	0.7	0.2	0.2	0.5	0.9	0.7	0.8
Germacrene A	1485	–	–	–	–	–	–	tr	–	–	–	2.0	–	0.1	–	–	0.6	0.1
<i>δ</i> -Amorphene	1490	–	–	tr	0.4	0.4	–	tr	tr	–	0.2	–	tr	tr	–	0.1	–	–
<i>γ</i> -Cadinene	1493	–	0.2	tr	3.5	1.9	–	–	2.1	1.1	1.3	0.6	0.3	tr	0.8	2.0	1.1	1.6
Cubebol	1498	–	0.1	0.3	0.9	0.6	–	–	0.5	–	1.3	0.2	tr	–	0.3	–	–	0.5
<i>δ</i> -Cadinene	1500	–	1.8	1.3	7.2	4.7	1.1	1.1	4.3	3.3	4.8	2.8	0.8	0.5	2.5	6.4	3.5	4.6
<i>trans</i> -Cadina-1,4-diene	1510	–	tr	tr	0.3	0.4	–	tr	0.1	0.2	0.3	tr	–	–	0.1	0.3	–	0.3
<i>α</i> -Cadinene	1516	–	0.1	tr	0.3	0.3	2.4	tr	0.3	–	0.2	0.1	tr	–	0.1	0.4	tr	0.2
(<i>E</i>)-Nerolidol	1548	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	–	–	–	1.5	–
Unidentified 1 (161, 222)	1554	–	–	–	–	–	–	–	–	6.2	–	–	–	0.4	–	8.2	8.4	6.1
<i>β</i> -Copaen-4- <i>α</i> -ol	1557	–	–	–	–	0.2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4.2	–
Germacrene D-4-ol	1564	–	1.5	0.2	–	0.5	–	tr	9.4	tr	1.9	7.2	tr	tr	4.4	2.0	tr	6.7
Spathulenol	1567	–	–	–	–	–	–	0.1	tr	1.2	–	–	0.2	–	–	–	–	–
Caryophyllene oxide	1567	–	0.2	–	–	0.3	0.4	0.3	–	–	0.1	–	–	–	0.1	–	–	–
1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	1593	–	tr	–	tr	0.3	–	–	tr	0.2	0.1	0.2	–	–	tr	0.2	tr	0.1
1- <i>epi</i> -Cubenol	1606	–	0.1	tr	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	tr	tr	0.1	0.4	0.2	0.2
<i>epi-α</i> -Cadinol	1619	–	0.8	0.2	0.5	0.3	–	0.4	1.3	0.1	0.9	1.3	0.3	0.5	0.9	2.1	1.6	1.4
<i>epi-α</i> -Muurolol	1625	–	1.0	0.2	0.5	0.4	tr	0.4	1.0	–	0.7	1.4	0.2	–	0.9	3.2	1.7	1.6
<i>α</i> -Muurolol	1625	–	0.5	tr	0.3	0.3	0.3	0.2	0.4	0.7	0.3	0.6	0.2	0.5	0.3	0.9	1.0	0.6
<i>α</i> -Cadinol	1635	–	3.0	0.5	0.6	1.0	–	1.1	2.6	3.4	1.9	4.2	0.8	–	2.3	8.1	5.5	4.3
Eudesma-4(15),7-dien-1 <i>β</i> -ol	1671	–	tr	–	–	–	–	–	tr	–	–	0.2	tr	–	–	–	–	–
<i>α</i> -Bisabolol	1673	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.2	–	–	0.1	–	–	–
Hexadecanal	1813	tr	–	–	–	–	0.6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.5
(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-Farnesyl acetate	1837	–	–	–	–	–	0.3	–	–	–	–	–	0.5	–	–	–	–	–
Cembrene	1921	–	–	–	–	–	–	0.1	tr	–	0.2	–	0.1	–	0.4	–	–	0.3

Συστατικά ^{β,γ}	RRI ^δ	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
Thunbergol	1928	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.1	–	–	–	0.2	–	–	0.1
Pimaradiene	1953	–	–	–	–	–	tr	–	–	0.1	–	–	–	–	1.3	0.2	–	–
(3Z)-Cembrene A	1954	–	–	–	–	–	–	–	tr	–	tr	–	tr	–	–	–	–	0.1
Manool oxide	1976	0.3	0.1	1.9	tr	0.1	0.3	0.2	tr	0.5	–	tr	tr	tr	0.2	0.3	1.5	0.2
4- <i>epi</i> -Isocembrol	2037	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.9
Unidentified 6 (81, 290)	2047	–	–	–	–	–	–	0.6	1.5	–	1.2	–	0.7	–	2.3	–	–	–
Manool	2049	–	–	0.2	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	–	–	–	–	–
Abietadiene	2070	–	–	–	–	–	–	–	tr	tr	tr	tr	–	–	0.5	0.1	–	0.3
Abieta-8(14),13(15)-diene	2128	–	tr	–	–	–	–	tr	tr	–	–	–	–	–	0.1	–	–	0.1
Abienol	2141	–	–	1.2	–	–	–	–	–	–	–	0.9	–	–	–	–	–	–
Sandaracopimarinal	2204	–	–	–	–	–	tr	tr	tr	0.3	0.1	–	–	–	2.4	0.7	0.6	–
Unidentified 8 (187, 286)	2212	0.2	–	–	–	–	0.5	–	–	0.6	–	–	–	–	–	0.6	–	–
Unidentified 9 (81, 286)	2217	–	–	–	–	tr	2.2	–	–	–	0.4	–	–	–	–	–	3.2	–
Unidentified 10 (271, 286)	2223	0.8	–	–	–	tr	–	0.2	0.3	–	–	1.7	–	–	–	1.6	–	0.3
Unidentified 11 (91, 286)	2230	–	1.0	0.4	0.3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.1	–	–	0.2
Methyl sandaracopimarate	2249	–	–	–	–	–	0.2	tr	–	1.2	–	0.1	–	–	0.1	0.1	–	–
3 α -hydroxy-Manool	2260	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4.1	–	–	–
Dehydroabietal	2266	–	–	–	–	–	0.2	tr	–	tr	0.1	0.5	tr	0.1	–	tr	2.2	tr
Sandaracopimarinol	2267	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.7	–	–	–
Methyl isopimarate	2291	–	–	–	–	–	0.2	–	–	0.3	–	–	–	tr	–	tr	–	–
Methyl levopimarate	2299	–	–	–	–	–	0.1	–	–	2.8	–	1.9	–	–	tr	–	tr	0.3
<i>n</i> -Tricosane	2300	–	–	–	–	–	–	–	–	–	tr	–	–	0.2	–	tr	0.2	–
Abietal	2300	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.5	–	–
4- <i>epi</i> -Abietal	2305	–	–	–	–	–	0.1	–	–	–	tr	–	–	–	tr	–	–	–
Methyl daniellate	2322	–	–	–	–	–	–	1.0	4.1	–	0.8	–	4.1	–	–	–	–	0.7
Methyl dehydroabietate	2335	–	–	–	–	–	1.1	tr	tr	0.5	–	1.3	tr	tr	–	0.1	0.5	0.1
Abieta-8(14),13(15)-dien-18-al	2370	–	–	–	–	–	–	0.2	tr	–	0.2	–	–	–	0.2	–	–	0.1

Συστατικά^{β,γ}	RRI^δ	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
Methyl abietate	2380	–	–	–	–	–	tr	–	–	0.3	–	0.3	–	–	–	0.1	–	tr
Methyl neoabietate	2437	–	–	–	–	–	tr	0.1	tr	–	–	tr	–	–	–	–	–	0.1
Σύνολο		98.9	96.6	93.6	98.8	99.5	98.7	99.4	98.8	93.1	98.3	97.7	99.8	96.3	98.8	98.7	90.0	98.6
Μονοτερπένια		97.6	53.3	78.8	71.3	46.5	81.2	54.1	41.3	53.0	46.0	43.7	76.7	62.3	63.1	28.0	33.4	42.9
Σεσκιτερπένια		0.0	42.2	11.1	27.2	52.9	12.0	42.9	51.6	33.5	49.2	47.3	18.2	33.7	22.1	66.4	48.4	50.4
Διτερπένια		1.3	1.1	3.7	0.3	0.1	4.9	2.4	5.9	6.6	3.1	6.7	4.9	0.1	13.6	4.3	8.0	4.8
Άλλες ενώσεις		tr	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	tr	0.0	0.0	0.2	0.0	tr	0.2	0.5

^α Αρίθμηση των *taxa* σύμφωνα με τον Πίνακα 1

^β Σειρά παρουσίας των συστατικών σύμφωνα με τη σειρά έκλουσης αυτών από στήλη HP-5MS, υπο τις πειραματικές συνθήκες που έχουν περιγραφεί.

^γ Η αρίθμηση των μη ταυτοποιημένων συστατικών είναι μοναδική στους Πιν. 162-164 σύμφωνα με τη σειρά έκλουσης αυτών στην παρένθεση περιλαμβάνονται η βασική κορυφή και το μοριακό ιόν.

^δ Οι σχετικοί δείκτες έκλουσης έχουν υπολογιστεί με βάση τους χρόνους έκλουσης των συστατικών, σε σύγκριση με τους χρόνους έκλουσης προτύπων κανονικών υδρογονανθράκων (C₈–C₂₅), που αναλύθηκαν υπό τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες.

tr: ίχνη (< 0.05)

–: δεν ανιχνεύθηκε

Section Parrya

Subsection Balfourianae

Το αιθέριο έλαιο της *P. aristata* (Colorado bristlecone pine) συνίσταται σχεδόν αποκλειστικά από μονοτερπένια (97,6%), με κυρίαρχο συστατικό το δ-3-καρένιο (38,4%), ακολουθούμενο από το β-φελλανδρένιο (12,7%) και το μεθυλαιθέρα της θυμόλης (11,4%). Στο αιθέριο έλαιο των φύλλων της *Pinus aristata* από το Κολοράντο και το Νέο Μεξικό, το ποσοστό του δ-3-καρενίου είχε διακυμάνσεις (7,6-32,9%), ενώ δείγματα που συλλέχθηκαν από την Αριζόνα περιείχαν εκτός από δ-3-καρένιο (7,6-32,9%), τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες β-πινένιο (3,1-20,1%) και β-φελλανδρένιο (3,6-19,2%) επίσης σε υψηλά ποσοστά (Zavarin et al. 1976).

Section Parrya

Subsection Cembroides

Η ανάλυση του *P. cembroides* (Mexican pinyon) έδειξε ότι το α-πινένιο (30,9%) κυριαρχούσε στο κλάσμα των μονοτερπενίων, ακολουθούμενο, σε κατα πολύ μικρότερο ποσοστό, από το β-πινένιο (5,6%) και το μυρκένιο (5,0%). Το κλάσμα των σεσκιτερπενίων (42,2%) ήταν πλούσιο σε β-καρυοφυλλένιο (19,2%) και γερμακρένιο D (9,4%), ενώ διτερπένια ανιχνεύθηκαν στο δείγμα μόνο σε ποσοστό 1,1%.

Στο αιθέριο έλαιο των φύλλων της *P. culminicola* (Potosi pinyon) το κλάσμα των μονοτερπενίων έφτανε σε ποσοστό το 78,8%, με το α-πινένιο, το β-πινένιο και το β-φελλανδρένιο (33,6, 20,2 και 16,9% αντιστοίχως) να κυριαρχούν στη σύσταση. Ο σσεσκιτερπενικός υδρογονάνθρακας, γερμακρένιο D, ανιχνεύθηκε μόνο σε ποσοστό 7,9%.

Στο αιθέριο έλαιο της *P. monophylla* (single leaf pinyon), κυριαρχούσαν τα μονοτερπένια β- και α-πινένιο (27,2 και 18,7%). Επιπλέον, άλλοι σημαντικοί μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν στο έλαιο ήταν οι δ-καδινένιο (7,2%), λιμονένιο (6,8%) γερμακρένιο D (4,9%).

Σύμφωνα με βιβλιογραφική μελέτη αυτή είναι η πρώτη αναφορά στη χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου από τα φύλλα των *P. cembroides*, *P. culminicola* και *P. monophylla*.

Section Quinquefoliae

Subsection Gerardianae

Στο αιθέριο έλαιο της *P. bungeana* (lacebark pine) τα ποσοστά των μονοτερπενίων και των σесκιτερπενίων ήταν σχεδόν ισοδύναμα (46,5% και 52,9%), ενώ διτερπένια ανιχνεύθηκαν μόνο σε ελάχιστες ποσότητες (0,1%). Στο κλάσμα των μονοτερπενίων κυριαρχούσαν τα α -πινένιο (21,1%), καμφένιο (8,3%), β -πινένιο (5,6%) και λιμονένιο (4,6%). Από τα σесκιτερπενικά παράγωγα, μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισαν οι υδρογονάνθρακες, γερμακρένιο D (11,2%), β -καρυοφυλλένιο (11,0%) και γ -μουρολένιο (10,0%). Η χημική σύσταση του πτητικού κλάσματος των βελόνων της *P. bungeana* από τη ΒΔ Κίνα εμφάνισε διαφορετικό προφίλ σε σύγκριση με την ανάλυση του δείγματος αναλύθηκε στην παρούσα μελέτη, με τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες, α - και β -πινένιο (37,7 και 54,9%) να κυριαρχούν στην ανάλυση των Chen et al. (2006).

Η ομάδα των μονοτερπενίων κυριαρχούσε στη χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου των φύλλων της *P. gerardiana* (Chilgoza pine / Gerard's pine), με τα β - και α -πινένιο (39,1% και 26,4%) να επικρατούν ποσοτικά στην ανάλυση, ακολουθούμενα επίσης από τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες μυρκένιο (5,7%) και β -φελλανδρένιο (5,3%). Σημειώνεται ότι πρόκειται για την πρώτη ανάλυση του αιθερίου ελαίου των βελονοειδών φύλλων της *P. gerardiana*.

Section Quinquefoliae

Subsection Strobilus

Ως κύριο συστατικό στο αιθέριο έλαιο της *P. armandii* (Chinese white pine / Armand's pine) ταυτοποιήθηκε το α -πινένιο (48,0%), ακολουθούμενο από το γερμακρένιο D (19,0%) και το β -καρυοφυλλένιο (14,3%). Τα αποτελέσματά μας βρίσκονται σε συμφωνία με εκείνα των Domrachev et al. (2012), που μελέτησαν το αιθέριο έλαιο των φύλλων της *P. armandii* από την κεντρική Κίνα, ωστόσο σύμφωνα με τους Chen et al. (2006), το α -πινένιο ανιχνεύθηκε σε πολύ χαμηλότερα ποσοστά (0,1%) ή και καθόλου στο αιθέριο έλαιο της *P. armandii* από την ΝΔ Κίνα.

Το αιθέριο έλαιο της *P. cembra* (Swiss stone or Arolla pine) χαρακτηριζόταν από την παρουσία του γερμακρενίου D (21,2%) και του α -πινενίου (21,1%) καθώς και των σесκιτερπενικών παραγώνων β -φελλανδρένιο (13,5%) και γερμακρεν-D-4-όλη (9,4%). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, ο μονοτερπενικός υδρογονάνθρακας α -

πινένιο κυριαρχεί στις αναλύσεις του αιθερίου ελαίου των φύλλων καλλιεργούμενων και μη, ατόμων *P. cembra* (Domrachev et al. 2012, Apetrei et al. 2013) από τη Ρουμανία (47,6 και 69,1% αντίστοιχα), ενώ το γερμακρένιο D ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 15,6% από τους Domrachev et al. (2012), ενώ μόνο σε ίχνη από τους Apetrei et al. (2013).

Στο αιθέριο έλαιο των βελόνων της *P. flexilis* (limber pine / Rocky mountain white pine) κυριαρχούσε η ομάδα των μονοτερπενίων, που χαρακτηριζόταν από την παρουσία του α -πινενίου (24,5%), καμφενίου (9,0%), β -πινενίου (8,6%) και της οξεικής βορνεόλης (3,8%). Από το κλάσμα των σесκιτερπενίων κυριαρχούσε το γερμακρένιο D (12,2%) και ένα μη ταυτοποιημένο οξυγονωμένο παράγωγο (MW = 222) (6,2%). Σύμφωνα με βιβλιογραφική ανασκόπηση, αυτή είναι η πρώτη ανάλυση του αιθερίου ελαίου των βελόνων της *P. flexilis*.

Κύρια συστατικά στην ανάλυση των πτητικών της *P. koraiensis* (Korean stone pine) ήταν τα γερμακρένιο D (18,7%), α -πινένιο (14,3%), οξεικό βορνύλιο (8,3%) και τερπινολένιο (6,6%). Στην ανάλυση των Domrachev et al. (2012), το γερμακρένιο D ήταν επίσης το κυριότερο συστατικό στο αιθέριο έλαιο βελόνων καλλιεργημένων ατόμων, ακολουθούμενο, εντούτοις, από το δ -3-καρένιο (15,3%), ένα μονοτερπενικό υδρογονάνθρακα, που ανιχνεύθηκε μόνο σε ίχνη στο δείγμα της παρούσας μελέτης. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Kurose et al. (2007), το αιθέριο έλαιο φύλλων, επίσης καλλιεργούμενων ατόμων, στην Ιαπωνία, χαρακτηριζόταν από την παρουσία του α -πινενίου (22,3%), ενώ το γερμακρένιο D, το κυριότερο συστατικό του δείγματός μας, δεν ανιχνεύθηκε. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τους Kim et al. (2012) το αιθέριο έλαιο των βελόνων της *P. koraiensis*, χαρακτηριζόταν από την παρουσία του καμφενίου (21,1%) και του λιμονενίου (20,0%), τα οποία, στο υπο μελέτη δείγμα, ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερα ποσοστά (6,1 και 5,4%), ενώ ακολουθούσε το α -πινένιο με ποσοστό 16,7%.

Στο έλαιο της *P. monticola* (western white pine), οι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες α - και β -πινένιο (14,9 και 14,3%) και τα σесκιτερπένια β -ελεμένιο (15,0%), γερμακρέν-D-4-όλη (7,2%) και γερμακρένιο D (6,8%) ήταν οι κυρίαρχοι μεταβολίτες. Υπάρχει μία αναφορά σχετικά με το αιθέριο έλαιο των βελόνων της *P. monticola*, από τους Hunt et al. (1990), οι οποίοι χρησιμοποίησαν μορφολογικά γνωρίσματα και τις συγκεντρώσεις των συστατικών οξεικό βορνύλιο, β -ελεμένιο και α -χουμουλένιο, ως παράγοντες διάκρισης μεταξύ των ειδών *P. monticola* and *P. strobus*.

Στο αιθέριο έλαιο της *P. parviflora* (Japanese white pine) επικρατούσε το

κλάσμα των μονοτερπενίων (76,7%), με κύριο συστατικό το β -φελλανδρένιο να εμφανίζεται σε ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό (31,9%), ακολουθούμενο από το α - (21,1%), και το β -πινένιο (12,5%). Και σε αυτήν την περίπτωση ο σεσκιτερπενικός υδρογονάνθρακας γερμακρένιο D (12,8%) ήταν το κυρίαρχο σεσκιτερπένιο. Αξιοσημείωτο, εντούτοις, είναι το εξαιρετικά χαμηλό ποσοστό του β -φελλανδρενίου (0,7–2,6%) σε προηγούμενες αναλύσεις των Domrachev et al. (2012) και Kurose et al. (2007), με το οξεικό βορνύλιο να αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά της ανάλυσης (12,4–12,7%) και στις δυο παραπάνω μελέτες, ενώ στο υπο μελέτη δείγμα ανιχνεύθηκε σε αρκετά χαμηλότερο ποσοστό (3,0%).

Στο αιθέριο έλαιο της *P. peuce* (Macedonian pine / Balkan white pine) ως κύριος μεταβολίτης ταυτοποιήθηκε το α -πινένιο (30,1%), ακολουθούμενο από το γερμακρένιο D (17,0%), το β -πινένιο (10,8%), το β -καρνοφυλλένιο (9,8%), το οξεικό βορνύλιο (6,5%) και το καμφένιο (5,9%). Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τη μελέτη των Nikolic et al. (2008), οι οποίοι ανέλυσαν τη σύσταση του αιθερίου ελαίου αυτοφυών ατόμων *P. peuce* από τη Σερβία και το Μαυροβούνιο. Εντούτοις, σε προηγούμενη μελέτη των Koukos et al. (2000), βελονοειδή φύλλα *P. peuce* από τη Β. Ελλάδα απέδωσαν σε υψηλότερο ποσοστό το μονοτερπενικό υδρογονάνθρακα β -πινένιο (22,0%) μαζί με κιτρονελλόλη (13,4%), μια μονοτερπενική αλκοόλη, η οποία δεν ανιχνεύθηκε στο δικό μας δείγμα, ενώ δεν ανιχνεύθηκε το γερμακρένιο D.

Η παρουσία των μονοτερπενικών υδρογονανθράκων δ -3-καρένιο (20,8%), α -πινένιο (17,0%) και τερπινιολένιο (6,0%) χαρακτήριζαν το αιθέριο έλαιο της *Pinus pumila* (dwarf stone pine), ενώ οι μεταβολίτες β -πινένιο και γερμακρένιο D, που πολύ συχνά χαρακτηρίζουν το αιθέριο έλαιο ειδών του γένους *Pinus*, ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερα ποσοστά (1,4 και 1,8% αντίστοιχα). Παρά το σχετικά υψηλό ποσοστό των σεσκιτερπενίων στο δείγμα (22,1%), τα μεμονωμένα παράγωγα που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία συναντώνται σε μέτριο ποσοστό (χαμηλότερο του 5%). Το κλάσμα των διτερπενίων (13,6%) χαρακτηρίζεται από την παρουσία της 3 α -υδροξυ-μανοόλης (4,1%). Σύμφωνα με τους Domrachev et al. (2012), οι οποίοι μελέτησαν τα πτητικά συστατικά φύλλων *P. pumila* συλλεγμένων από δύο διαφορετικές περιοχές της Β. και Α. Ευρασίας, ο μονοτερπενικός υδρογονάνθρακας δ -3-καρένιο (16,0%) ήταν επίσης το βασικότερο συστατικό, ενώ σε διαφορετικό δείγμα της συγκεκριμένης μελέτης κυριότερος μεταβολίτης ήταν το α -πινένιο (32,9%). Επίσης, οι Kurose et al. (2007) ταυτοποίησαν το α -πινένιο (18,3%) ως κύριο μεταβολίτη του αιθερίου ελαίου *P. pumila* από την Ιαπωνία, ακολουθούμενο από το δ -3-καρένιο (10,4%).

Το έλαιο της *P. strobiformis* (Mexican white pine / southwestern white pine) περιείχε β-πινένιο σε σχετικά μεγαλύτερη ποσότητα συγκριτικά με το α-πινένιο (12,5% και 8,0%). Η κυρίαρχη ομάδα των σесκιτερπενίων (66,4%) χαρακτηριζόταν από την παρουσία του γερμακρενίου D (25,5%), ενός μη ταυτοποιημένου οξυγονωμένου σесκιτερπενίου (MW = 222) (8,2%) και της σесκιτερπενικής αλκοόλης α-καδινόλης (8,1%). Σύμφωνα με βιβλιογραφική ανασκόπηση αυτή είναι η πρώτη αναφορά σχετικά με το αιθέριο έλαιο από βελονοειδή φύλλα της *P. strobiformis*.

Το αιθέριο έλαιο της *Pinus strobus* (eastern white pine) χαρακτηριζόταν από την παρουσία του α-πινενίου (14,7%) και του γερμακρενίου D (11,1%), ενώ ο σесκιτερπενικός υδρογονάνθρακας β-πινένιο και τα οξυγονωμένα σесκιτερπενικά παράγωγα, α-καδινόλη και β-κοπαέν-4α-όλη ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερα ποσοστά (5,8, 5,5 και 4,2%). Σύμφωνα με τον Von Rudloff 1985, στο αιθέριο έλαιο των φύλλων της *P. strobus* από τον Καναδά, επικρατούσαν οι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες, α- και β-πινένιο (21,2%-57,8% και 15,8%-35,5% αντίστοιχα).

Τα μονοτερπένια α- και β-πινένιο (13,8% και 18,1%) επικρατούσαν στο έλαιο της *Pinus wallichiana* (Himalayan blue pine), ακολουθούμενα από τα γερμακρένιο D (10,3%), το οξυγονωμένο του παράγωγο γερμακρέν-D-4-όλη (6,7%) και β-καρνοφυλλένιο (7,2%). Κυρίαρχο συστατικό της ανάλυσης στο αιθέριο έλαιο της *P. wallichiana* από τη Β. Ινδία, ήταν το β-πινένιο (46,8%), ενώ δεν ανιχνεύθηκαν σесκιτερπενικά παράγωγα (Yousuf Dar et al. 2012).

3.4.2. Ανάλυση εναντιομερών των αιθερίων ελαίων

Στα πλαίσια της μελέτης των παραπάνω αιθερίων ελαίων, ακολούθησε περαιτέρω ανάλυση αυτών μέσω GC-MS για την εύρεση της αναλογίας των περιεχόμενων εναντιομερών, συγκεκριμένα των: (+)- & (-)- α -πινενίου, (+)- & (-)- β -πινενίου, (+)- & (-)-λιμονενίου και (+)- & (-)-βορνεόλης, οι δομές των οποίων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 165 Οι οπτικοί αντίποδες των μεταβολιτών που ελέγχθηκαν

	(-)	(+)
α -πινένιο		
β -πινένιο		
λιμονένιο		
βορνεόλη		

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζεται η σχετική αναλογία των εναντιομερών των παραπάνω μονοτερπενίων:

Πίνακας 166 Υπογένος *Pinus*, *Section Pinus* – Σχετικά ποσοστά εναντιομερών

	<i>P. brutia</i>	<i>P. canariensis</i>	<i>P. halepensis</i>	<i>P. heldreichii</i>	<i>P. pinaster</i>	<i>P. pinea</i>	<i>P. roxburgii</i>	<i>P. densiflora</i>	<i>P. massoniana</i>	<i>P. mugo</i>	<i>P. mugo</i> var. <i>prostrata</i>	<i>P. mugo</i> var. <i>pumilio</i>	<i>P. nigra</i> subsp. <i>caramanica</i>	<i>P. nigra</i> subsp. <i>laricio</i>	<i>P. nigra</i> subsp. <i>nigra</i>	<i>P. P. nigra</i> subsp. <i>salzmanii</i>	<i>P. sylvestris</i>	<i>P. sylvestris</i> subsp. <i>scotica</i>	<i>P. tabulaeformis</i>	<i>P. taiwanensis</i>	<i>P. thunbergii</i>	
Εναντιομερές	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
(-)- α -pinene	94,2	85,9	67,4	79,4	66,8	74,4	84,2	80,0	74,4	36,7	61,2	53,7	91,6	19,4	88,0	96,9	40,1	64,9	65,6	32,4	84,1	
(+)- α -pinene	5,8	14,1	32,6	20,6	33,2	25,6	15,8	20,0	25,6	63,3	38,8	46,3	8,4	80,6	12,0	3,1	59,9	35,1	34,4	67,6	15,9	
(+)- β -pinene	-	9,9	6,5	6,5	6,5	5,9	6,3	tr	5,7	13,0	10,7	9,4	-	-	tr	7,7	5,7	3,0	-	-	-	
(-)- β -pinene	100	90,1	93,5	93,5	93,5	94,1	93,7	100	94,3	87,0	89,3	90,6	100	100	100	92,3	94,3	97,0	100	100	100	
(-)-limonene	61,5	94,0	77,8	87,7	76,2	99,1	71,4	58,3	80,1	76,5	80,0	82,6	68,8	94,1	74,7	93,4	73,8	-	86,7	61,5	81,1	
(+)-limonene	38,5	6,0	22,2	2,3	23,8	0,9	28,6	41,7	19,9	23,5	20,0	17,4	31,2	5,9	25,3	6,6	26,2	-	13,3	38,5	18,9	
(-)-borneol	100	-	-	-	-	-	-	100	64,7	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	100	100	100
(+)-borneol	-	-	-	-	-	-	-	-	35,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 167 Υπογένος *Pinus*, *Section Trifoliae* – Σχετικά ποσοστά εναντιομερών

	<i>P. attenuate</i>	<i>P. elliotii</i>	<i>P. muricata</i>	<i>P. patula</i>	<i>P. radiata</i>	<i>P. rigida</i>	<i>P. teocote</i>	<i>P. banksiana</i>	<i>P. contorta</i> var. <i>contorta</i>	<i>P. contorta</i> var. <i>latifolia</i>	<i>P. contorta</i> var. <i>murrayana</i>	<i>P. coulteri</i>	<i>P. jeffreyi</i>	<i>P. ponderosa</i>	<i>P. sabiniana</i>	<i>P. torreyana</i>
Εναντιομερές	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
(-)- α -pinene	91,6	74,9	73,8	93,5	68,7	56,1	63,9	52,4	59,2	58,2	62,9	58,8	90,8	64,4	81,9	100
(+)- α -pinene	8,4	25,1	26,2	6,5	31,3	43,9	36,1	47,6	40,8	41,8	37,1	41,2	9,2	35,6	18,1	-
(+)- β -pinene	7,4	-	2,4	14,5	-	-	2,9	3,8	-	1,0	9,1	8,8	8,3	2,9	8,7	-
(-)- β -pinene	92,6	100	97,6	85,5	100	100	97,1	96,2	100	99	90,9	91,2	91,7	97,1	91,3	-
(-)-limonene	75,8	71,3	79,5	87,5	80,7	82,2	85,7	77,8	100	100	100	100	100	100	100	100
(+)-limonene	24,2	28,7	20,5	12,5	19,3	17,8	14,3	22,2	-	-	-	-	-	-	-	-
(-)-borneol	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(+)-borneol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 168 Υπογένος *Strobilus*, *Section Parrya* & *Section Quinquefoliae* – Σχετικά ποσοστά εναντιομερών

	<i>P. aristata</i>	<i>P. cembroides</i>	<i>P. culminicola</i>	<i>P. monophylla</i>	<i>P. bungeana</i>	<i>P. gerardiana</i>	<i>P. armandii</i>	<i>P. cembra</i>	<i>P. flexilis</i>	<i>P. koratensis</i>	<i>P. monticola</i>	<i>P. parviflora</i>	<i>P. peuce</i>	<i>P. pumila</i>	<i>P. strobiformis</i>	<i>P. strobilus</i>	<i>P. wallichiana</i>
Εναντιομερές	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
(-)- α -pinene	54,3	88,8	55,6	84,1	46,5	79,2	11,5	7,4	60,3	57,3	63,4	52,0	37,5	30,1	89,4	36,7	42,9
(+)- α -pinene	45,7	11,2	44,4	15,9	53,5	20,8	88,5	92,6	39,7	42,7	36,6	48,0	62,5	69,9	10,6	63,3	57,1
(+)- β -pinene	4,8	13,0	-	-	18,7	-	8,1	-	-	15,7	-	-	-	-	-	12,3	
(-)- β -pinene	95,2	87,0	100	100	81,3	100	91,9	100	100	84,3	100	100	100	100	100	87,7	100
(-)-limonene	-	73,0	86,5	86,5	85,1	75,6	67,1	80,7	81,1	63,2	42,2	90,2	60,0	26,5	67,5	76,6	73,6
(+)-limonene	-	27,0	13,5	13,5	14,9	24,4	32,9	19,3	18,9	36,8	57,8	9,8	40,0	73,5	32,5	23,4	26,4
(-)-borneol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(+)-borneol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Όπως φαίνεται και στους τρεις παραπάνω πίνακες, στην πλειοψηφία των δειγμάτων, το ποσοστό των (-)-εναντιομερών κυριαρχεί έναντι των (+)-. Ωστόσο σε ορισμένα είδη παρατηρείται αύξηση του ποσοστού του (+)- α -πινενίου και δευτερευόντως του (+)-λιμονενίου.

Υπογένος *Pinus*, Section *Pinus*

Σε όλα τα δείγματα της πρώτης ομάδας (*Section Pinus*) το (-)- β -πινένιο, το (-)-λιμονένιο και η (-)-βορνεόλη υπερτερούν ποσοτικά συγκριτικά με τα (+)-εναντιομερή τους. Εντούτοις το (+)- α -πινένιο φαίνεται να κατέχει υψηλότερο ποσοστό από τον οπτικό του αντίποδα στο αιθέριο έλαιο των *P. nigra* subsp. *laricio* (80,6%), *P. taiwanensis* (67,6%), *P. mugo* (63,3%) και *P. sylvestris* (59,9%). Οι Sjödin et al. (1996) μελέτησαν το αιθέριο έλαιο οκτώ διαφορετικών ιστών από 4 διαφορετικά άτομα *P. sylvestris*, και διαπίστωσαν επίσης ότι τα επίπεδα των (-)- β -πινενίου ήταν επίσης υψηλότερα σε όλες τις περιπτώσεις και το (+)- α -πινένιο καταλάμβανε και σε αυτή την περίπτωση μεγαλύτερο ποσοστό από τον οπτικό του αντίποδα στο αιθέριο έλαιο των βελόνων, του ριζικού συστήματος (ξύλωμα και φλοιώμα), καθώς και του ξυλώματος του κορμού. Εντούτοις, το (+)-λιμονένιο επικρατούσε έναντι του εναντιομερούς του, κυρίως στο αιθέριο έλαιο του φυλλώματος.

Υπογένος *Pinus*, Section *Trifoliae*

Τα αιθέρια έλαια της δεύτερης ομάδας, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 166, αποδείχθηκε ότι περιέχουν σε υψηλότερο ποσοστό τα (-)-εναντιομερή και των τεσσάρων ζευγών που ελέγχθηκαν. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Marques et al. (2012), οι οποίοι μελέτησαν το αιθέριο έλαιο από κλάδους (συμπεριλαμβανομένων των φύλλων) πέντε ειδών Πεύκης, τα επίπεδα του (+)- α -πινενίου ήταν υψηλότερα στην περίπτωση της *P. elliotti*, σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα, όπως προέκυψαν από την ανάλυση του αιθερίου ελαίου αποκλειστικά του φυλλώματος του είδους αυτού. Επίσης και σύμφωνα με την ίδια μελέτη, το (-)- β -πινένιο επικρατούσε έναντι του οπτικού του αντίποδα στο συγκεκριμένο είδος. Επιπλέον, στο αιθέριο έλαιο της *P. patula* εμφανίστηκαν τα (+)- και (-)- α -πινένιο ομοίως σε ισοδύναμα επίπεδα, ενώ το (-)- β -πινένιο ανιχνεύθηκε επίσης σε μεγαλύτερη αναλογία από το (+)-εναντιομερές του.

Υπογένος *Strobus*, Section *Parrya* & Section *Quinquefoliae*

Τα είδη της ομάδας που παρουσιάζονται στον τρίτο πίνακα φαίνεται να

συνθέτουν στην πλειοψηφία τους επίσης τα (-)-ισομερή των ουσιών που εξετάστηκαν. Ενδιαφέρον έχει ωστόσο το γεγονός ότι σε αυτήν την ομάδα παρατηρείται σε κάποιες περιπτώσεις μεγαλύτερο το ποσοστό όχι μόνο του (+)- α -πινενίου [*P. cembra* (92,6%), *P. armandii* (88,5%), *P. pumila* (69,9%), *P. strobus* (63,3%), *P. peuce* (62,5%), *P. wallichiana* (57,1%), *P. bungeana* (53,5%)], όπως παρατηρήθηκε για την ομάδα του πρώτου πίνακα (*Section Pinus*), αλλά και του (+)-λιμονενίου [*P. pumila* (73,5%), *P. monticola* (57,8%)].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τους κώνους της πεύκης *P. heldreichii* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 38 μεταβολίτες, εκ των οποίων 20 ήταν διτερπένια με σκελετό αβιετανίου, οκτώ ήταν διτερπένια με σκελετό πιμαρανίου, 4 ήταν λαβδανικού τύπου διτερπένια, δύο ήταν διτερπένια μακροκυκλικού σκελετού της ομάδας των κεμβρενίων, δύο διτερπένια που ανήκαν στην κατηγορία των ποδοκαρπενίων, ένα στεροειδές και ένα σεσκιτερπένιο. Το συγκεκριμένο είδος απέδωσε συνολικά 35 γνωστούς μεταβολίτες και τρία νέα φυσικά προϊόντα, ένα παράγωγο αβιετικού τύπου (**5**) και δύο διτερπένια της κατηγορίας των πιμαρανίων (**25** και **27**). Από τους γνωστούς μεταβολίτες, ο μεταβολίτης **2** αναφέρεται πρώτη φορά σε Γυμνόσπερμα, ενώ τρία διτερπένια αβιετικού και ένα πιμαρικού τύπου (**3**, **6**, **7** και **24**) αναφέρονται πρώτη φορά στο γένος *Pinus*. Πρώτη φορά για το είδος *P. heldreichii* αναφέρονται δεκαπέντε αβιετικού σκελετού διτερπένια (**1**, **4**, **8-20**), μαζί με πέντε πιμαρικού (**21-23**, **26** και **28**), τέσσερα λαβδανικού τύπου διτερπένια (**29-32**), δύο παράγωγα ποδοκαρπενίου (**35-36**) και ένα στεροειδές (**37**). Επίσης, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά πλήρης απόδοση των φασματοσκοπικών δεδομένων σε είκοσι γνωστούς μεταβολίτες (**3**, **4**, **7**, **8**, **10-13**, **16**, **17**, **23**, **24**, **28-31**, **33-36**).

Από τα βελονοειδή φύλλα της πεύκης *P. nigra* subsp. *nigra* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν δώδεκα μεταβολίτες, εκ των οποίων τέσσερεις ήταν λαβδανικού τύπου διτερπένια, πέντε ήταν διτερπένια με σκελετό αβιετανίου, ένα ήταν στεροειδές και δυο ήταν φαινολικά παράγωγα. Συνολικά από το συγκεκριμένο είδος ταυτοποιήθηκαν δέκα γνωστοί μεταβολίτες και δύο νέα φυσικά προϊόντα, ένα αβιετικού τύπου διτερπένιο (**42**) και ένα φλαβονοειδές (**49**). Μεταξύ των γνωστών μεταβολιτών, δύο λαβδανικού τύπου διτερπένια (**45** και **46**), τρία διτερπένια με σκελετό αβιετανίου (**39**, **40** και **41**) και το στεροειδές β -σιτοστερόλη (**47**) απομονώθηκαν πρώτη φορά από το συγκεκριμένο είδος. Επιπλέον, για έξι γνωστούς μεταβολίτες (**39**, **40**, **41**, **44**, **46** και **45**) πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η πλήρης απόδοση των φασματοσκοπικών τους δεδομένων.

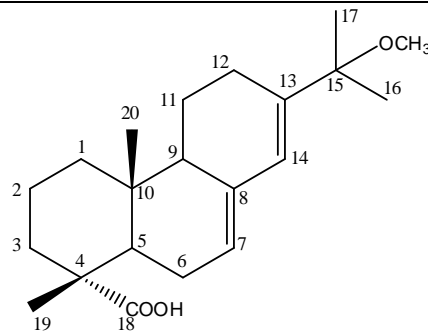
Από το φλοιό της πεύκης *P. pinea* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν το γνωστό φλαβονοειδές (+)-ταξιφολίνη (**50**) και ένα μίγμα λιπαρών εστέρων του φερουλικού οξέος (μίγμα **51**), το οποίο αναφέρεται για πρώτη φορά στο συγκεκριμένο είδος.

Στον Πίνακα 169 παρουσιάζονται συνοπτικά τα παραπάνω συμπεράσματα, καθώς και οι δομές των μεταβολιτών.

Πίνακας 169

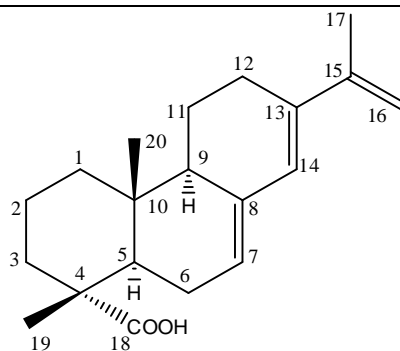
Μεταβολίτης	Δομή	<i>P. heldreichii</i>
1. 12 α -υδροξύ-7,13-Αβιεταδιεν-18-οϊκό οξύ (12 α -υδροξύ-αβιετικό οξύ)		πρώτη αναφορά για το είδος <i>P. heldreichii</i>
2. 12 β -υδροξύ-7,13-Αβιεταδιεν-18-οϊκό οξύ (12 β -υδροξύ-αβιετικό οξύ)		πρώτη αναφορά σε Γυμνόσπερμα

3. 15-μεθόξυ-7,13-Αβιεταδιεν-18-οϊκό οξύ
(15-μεθόξυ-αβιετικό οξύ)



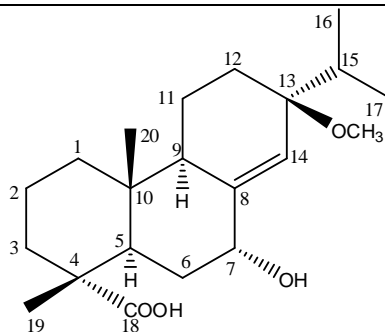
πρώτη αναφορά για το γένος *Pinus*,
πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

4. 7(8),13(14),15(16)- Αβιετατριενοϊκό
οξύ



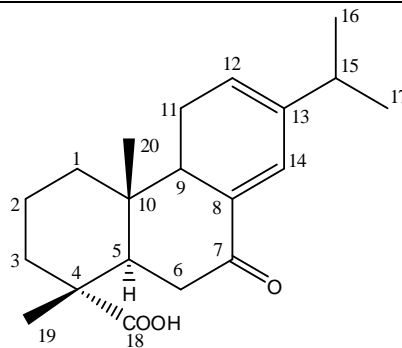
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

5. 7α-υδροξυ-13β-μεθοξυ-8(14)-
Αβιετενοϊκό οξύ



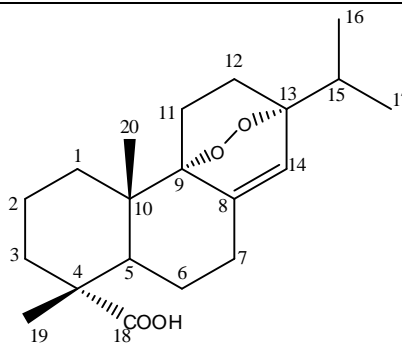
νέο φυσικό προϊόν

6. 7-οξο-Αβιετα-8(14),12-διεν-18-οϊκό
οξύ



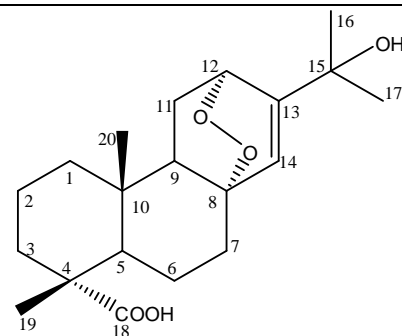
πρώτη αναφορά για το γένος *Pinus*

7. 9,13α-επιδιοξυ-8(14)-Αβιετεν-18-οϊκό
οξύ



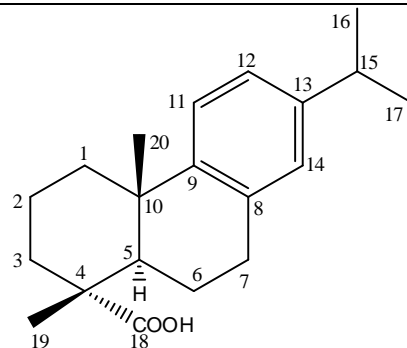
πρώτη αναφορά για το γένος *Pinus*,
πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

8. 8,12α-επιδιοξυ-13(14)-Αβιετεν-18-οϊκό
οξύ



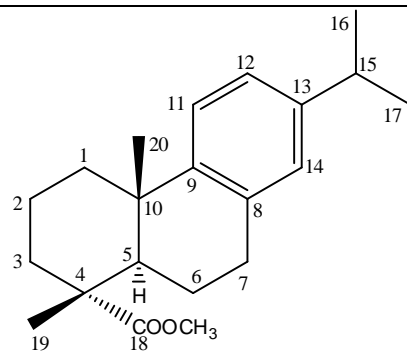
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

9. 8,11,13-Αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ
(δεϋδροαβιετικό οξύ)



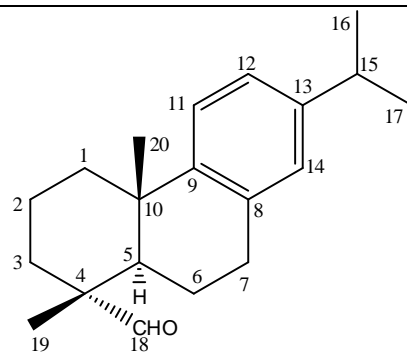
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii

10. Μεθυλεστέρας του 8,11,13-
αβιετατριεν-18-οϊκού οξέος
(μεθυλεστέρας του δεϋδροαβιετικού
οξέος)



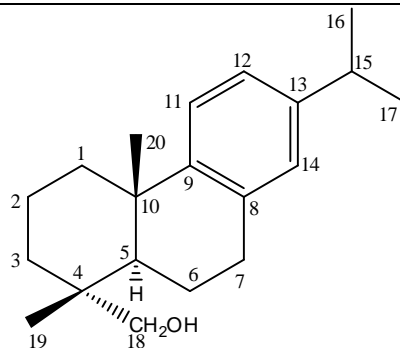
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

11. 8,11,13-Αβιετατριεν-18-άλη
(δεϋδροαβιετάλη)



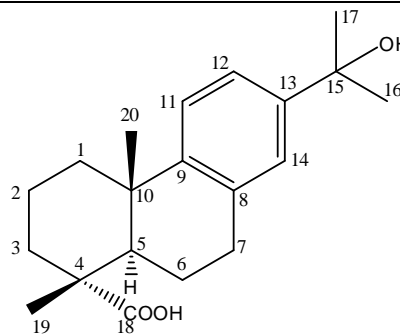
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

12. 8,11,13-Αβιετατριεν-18-όλη
(δεϋδροαβιετόλη)



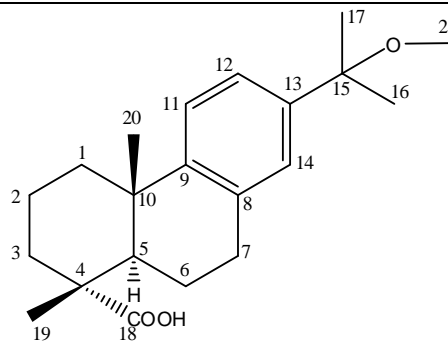
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

13. 15-Υδρόξυ-8,11,13-αβιετατριεν-18-
οϊκό οξύ (15-υδρόξυ-δεϋδροαβιετικό οξύ)



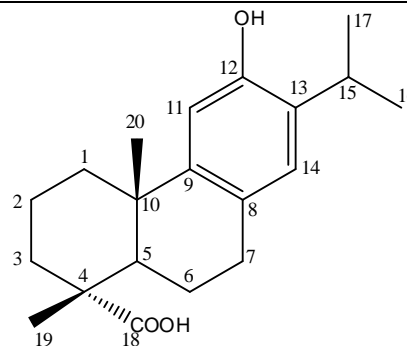
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

14. 15-Μεθοξυ-8,11,13-αβιετατριεν-18-
οϊκό οξύ (15-μεθοξυ-δεϋδροαβιετικό οξύ)



πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii

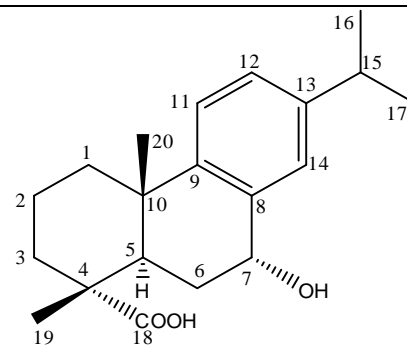
15. 12-Υδρόξυ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (12-υδρόξυ-δεύδροαβιετικό οξύ)



πρώτη αναφορά για το είδος

P. heldreichii

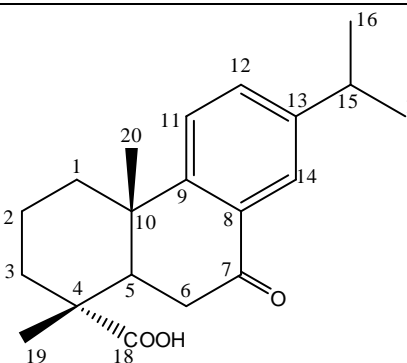
16. 7α-Υδρόξυ-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (7α-υδρόξυ-δεύδροαβιετικό οξύ)



πρώτη αναφορά για το είδος

P. heldreichii, πλήρης απόδοση των φασματοσκοπικών δεδομένων

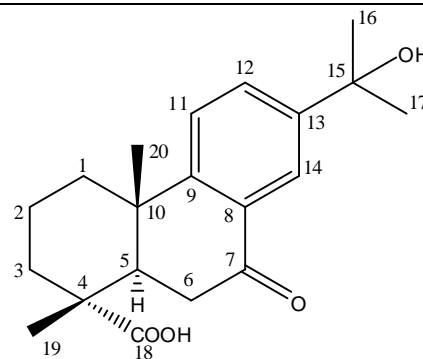
17. 7-Οξο-8,11,13-αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ (7-οξο-δέύδροαβιετικό οξύ)



πρώτη αναφορά για το είδος

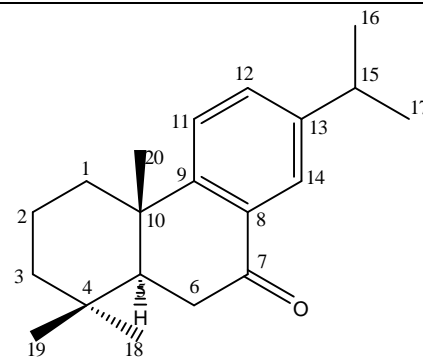
P. heldreichii, πλήρης απόδοση των φασματοσκοπικών δεδομένων

18. 7-Οξο-15-υδροξυ-8,11,13-αβιετατριεν-
18-οϊκό οξύ (7-οξο-15-υδροξυ-
δέυδροαβιετικό οξύ)



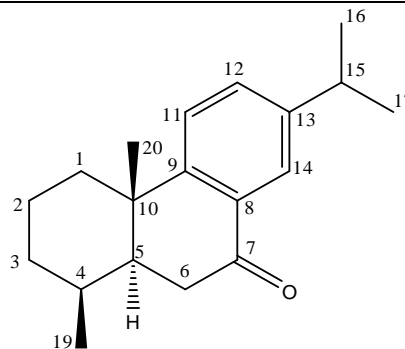
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii

19. 7-Οξο-8,11,13-αβιετατριένιο
(αβιετατριενόνη)



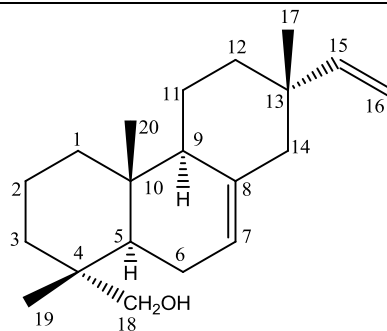
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii

20. 7-οξο-18-νορ-8,11,13-Αβιετατριένιο
(18-νορ-αβιετατριενόνη)



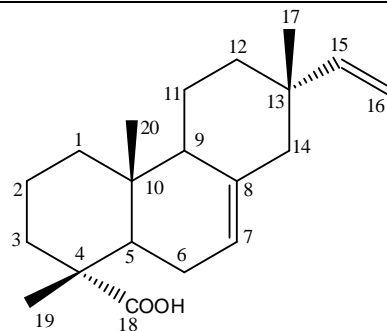
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii

21. 7,15-Πιμαραδιεν-18-όλη
(Ισοπιμαρόλη)



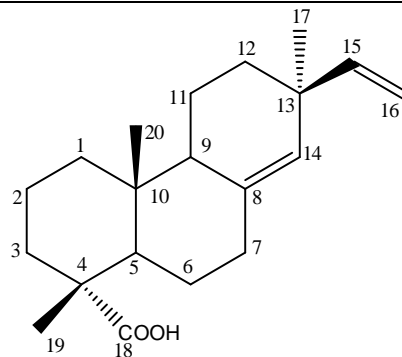
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii

22. 13-επι-Πιμαρα-7,15-διεν-18-οϊκό οξύ
(Ισοπιμαρικό οξύ)



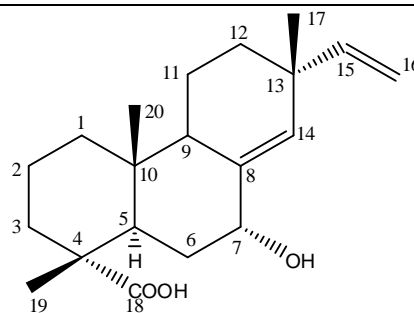
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii

23. Πιμαρικό οξύ



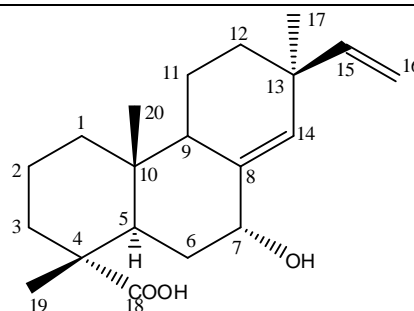
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

24. 7α-Υδροξυ-13-επι-πιμαρα-8(14),15-
διεν-18-οϊκό οξύ



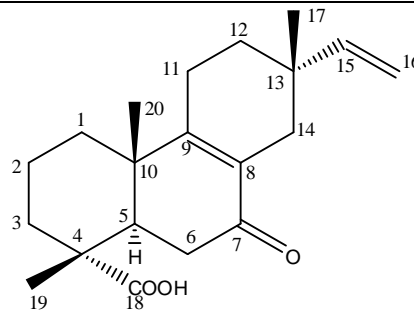
πρώτη αναφορά για το γένος *Pinus*,
πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

25. 7α-Υδροξυ-πιμαρα-8(14),15-διεν-18-
οϊκό οξύ



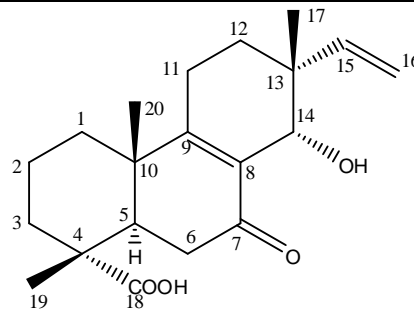
νέο φυσικό προϊόν

26. 7-Οξο-13-επι-πιμαρα-8(9),15-διεν-18-οϊκό οξύ



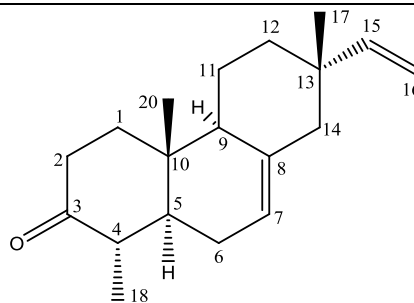
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii

27. 7-Οξο-14α-υδροξυ-13-επι-πιμαρα-8(9),15-διενοϊκό οξύ



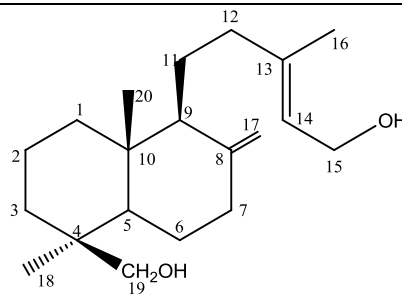
νέο φυσικό προϊόν

28. 19-νορ-Ισοπιμαρα-7,15-διεν-3-όνη



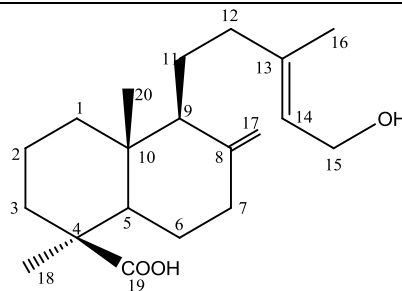
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

29. Αγαθοδιόλη



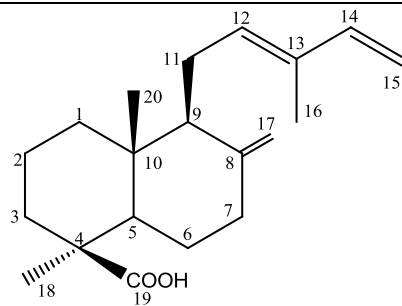
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

30. Ισοκουπρεσσικό οξύ



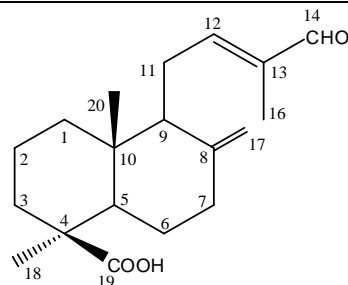
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

31. *trans*-Κομμουνικό οξύ



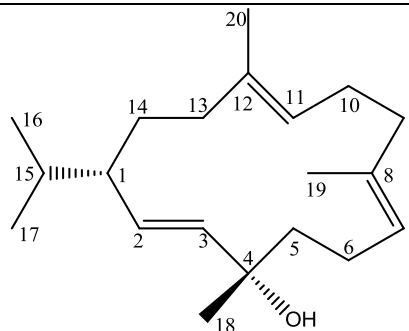
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

32. 15-νορ-Λαβδα-8(17),12*E*-διεν-14-
καρβοξαλδεϋδ-19-οϊκό οξύ



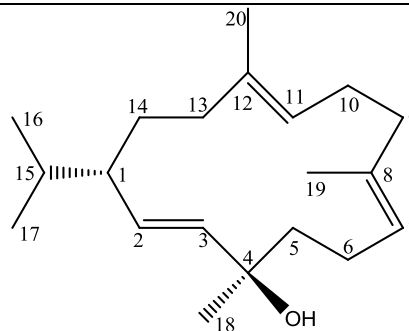
πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii

33. 4-επι-Ισοκεμβρόλη



γνωστό φυσικό προϊόν,
πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

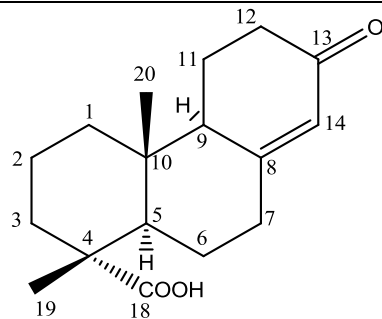
34. Ισοκεμβρόλη (Θουνπεργκόλη)



γνωστό φυσικό προϊόν,
πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

35. 13-οξο-8(14)-Ποδοκαρπεν-18-οϊκό

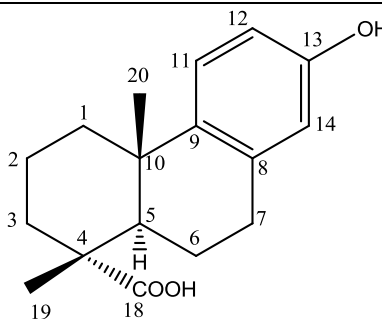
οξύ



πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

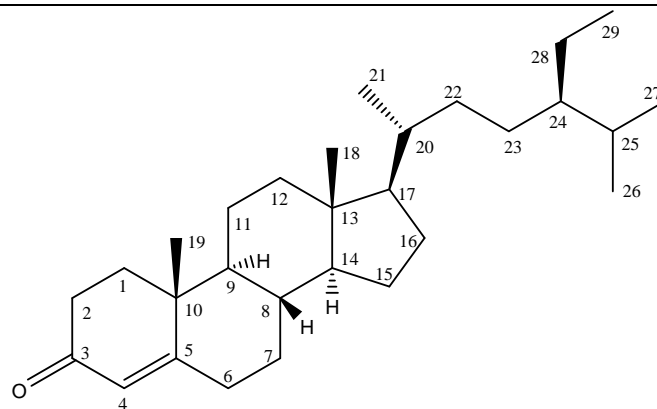
36. 13-οξο-8(14)-Ποδοκαρπεν-18-οϊκό

οξύ



πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

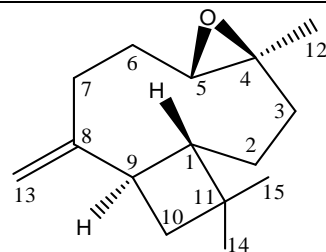
37. 4-Στιγμαστεν-3-όνη



πρώτη αναφορά για το είδος
P. heldreichii

38. Οξείδιο του καρνοφυλλενίου

γνωστό φυσικό προϊόν

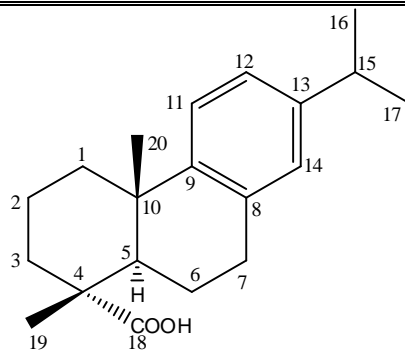


8,11,13-Αβιετατριεν-18-οϊκό οξύ

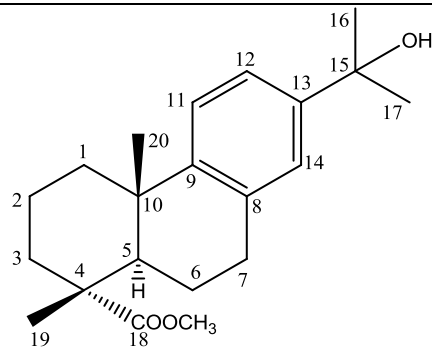
(Δεϋδροαβιετικό οξύ)

P. nigra subsp. *nigra*

γνωστό φυσικό προϊόν

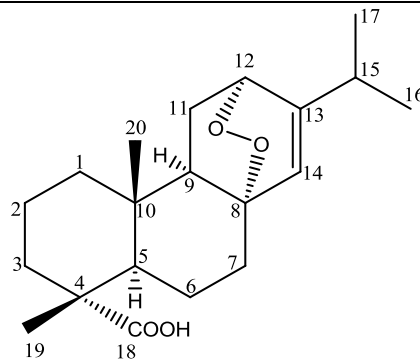


39. Μεθυλεστέρας του 15-υδροξυ-
δεϋδροαβιετικού οξέος



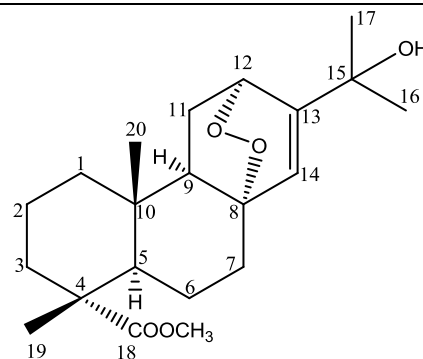
πρώτη αναφορά για το είδος
P. nigra, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

40. 8,12α-Επιδιοξυ-αβιετ-13-εν-18-οϊκό
οξύ



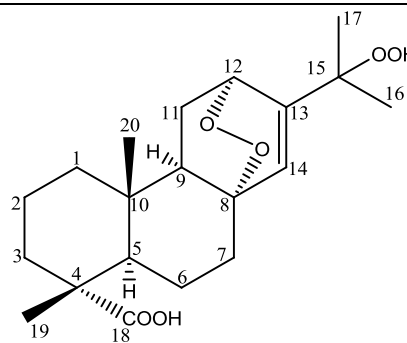
πρώτη αναφορά για το είδος
P. nigra, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

41. Μεθυλεστέρας του 15-υδροξυ-8,12α-
επιδιοξυ-αβιετ-13-εν-18-οϊκού οξέος



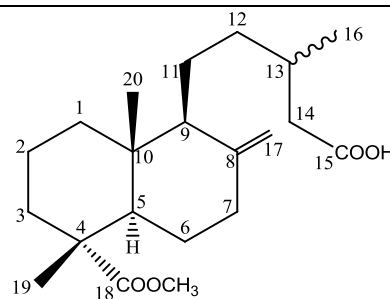
πρώτη αναφορά για το είδος
P. nigra, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

42. 15-Υδροϋπεροξυ-8,12α-επιδιοξυ-
αβιετ-13-εν-18-οϊκό οξύ



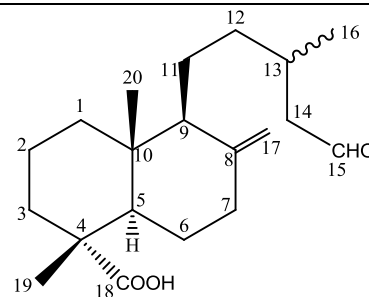
νέο φυσικό προϊόν

43. 18-Μεθυλεστέρας του 8(17)-λαβδεν-
15,18-διοϊκού οξέος



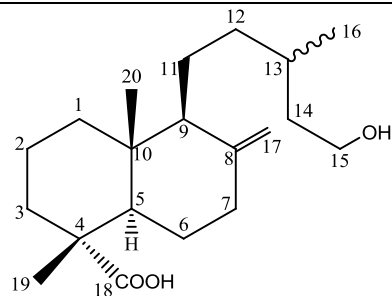
γνωστό φυσικό προϊόν

44. 15-Οξο-8(17)-λαβδεν-18-οϊκό οξύ



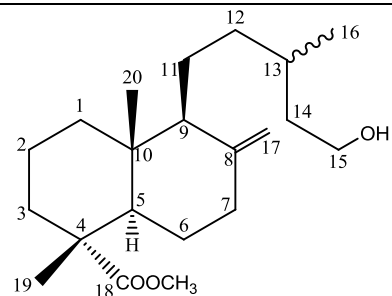
γνωστό φυσικό προϊόν, πλήρης
απόδοση των φασματοσκοπικών
δεδομένων

45. 15-Υδροξυλαβδ-8(17)-εν-18-οϊκό οξύ



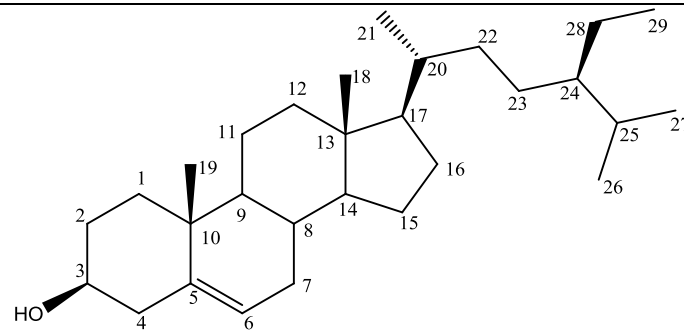
πρώτη αναφορά για το είδος
P. nigra, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

46. Μεθυλεστέρας του 15-υδροξυλαβδ-
8(17)-εν-18-οϊκού οξέος



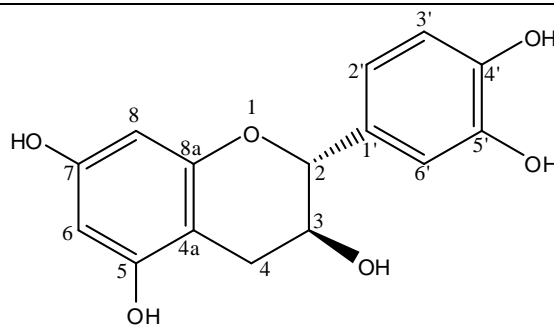
πρώτη αναφορά για το είδος
P. nigra, πλήρης απόδοση των
φασματοσκοπικών δεδομένων

47. β -Σιτοστερόλη



πρώτη αναφορά για το είδος
P. nigra

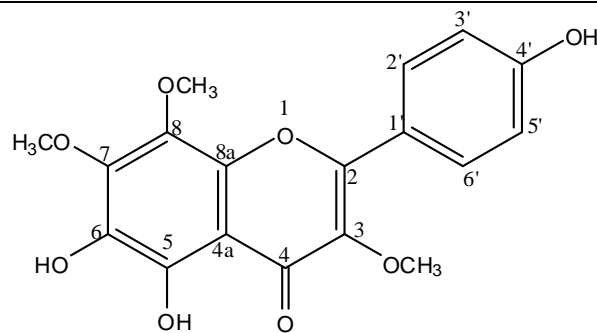
48. (+)-Κατεχίνη



γνωστό φυσικό προϊόν

49.

5,6,4'-Τριωδροξύ-3,7,8-τριμεθοξύ-
φλαβόνη



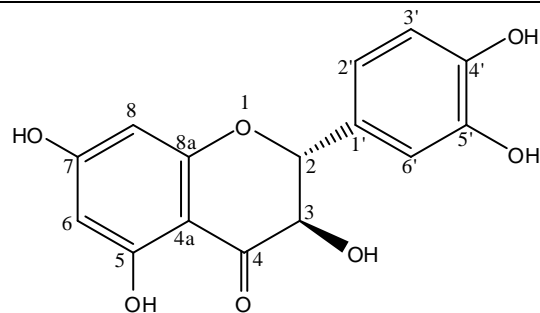
νέο φυσικό προϊόν

P. pinea L.

γνωστό φυσικό προϊόν

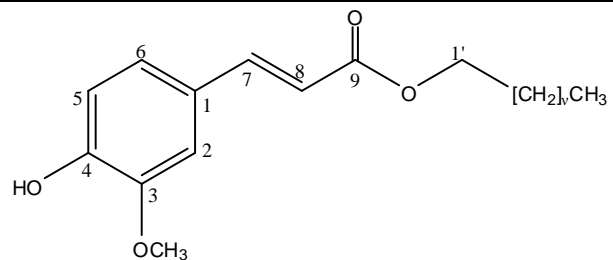
50.

(+)-Ταξιφολίνη



Μίγμα 51.

Μίγμα λιπαρών εστέρων του φερουλικού οξέος



πρώτη αναφορά για το είδος

P. pinea L.

όπου $n=22, 20, 18, 16$.

Επιπλέον, μελετήθηκε η χημική σύσταση συνολικά 46 ειδών του γένους *Pinus*, εκ των οποίων 37 και 17 *taxa* του υπογένους *Pinus* και *Strobus* αντίστοιχα, κατόπιν ανάλυσης των δειγμάτων με GC–FID και GC–MS. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 190 συστατικά περίπου, εκ των οποίων τα 161 καταλάμβαναν συνολικά το κύριο τμήμα των αναλύσεων. Επιπρόσθετα, αναφέρονται 12 μη ταυτοποιημένοι μεταβολίτες, οι οποίοι περιείχονταν σε διαφορετικά δείγματα, για λόγους σύγκρισης.

Βασικότερες, ποιοτικά και ποσοτικά, κατηγορίες μεταβολιτών στα περισσότερα δείγματα του *Section Pinus* ήταν τα μονοτερπένια και τα σεσκιτερπένια. Κύρια μονοτερπένια, τα: α - και β -πινένιο, λιμονένιο, δ -3-καρένιο και β -φελλανδρένιο, ενώ κύριοι εκπρόσωποι του σεσκιτερπενικού κλάσματος ήταν το γερμακρένιο D και το β -καρνοφυλλένιο. Τα επίπεδα των διτερπενίων παρουσίασαν μεγάλη διακύμανση, εφόσον εμφανίζονταν, είτε με εξαιρετικά υψηλά ποσοστά όπως στην περίπτωση της *P. pinaster* (67.3%), είτε δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου όπως στο αιθέριο έλαιο της *P. sylvestris*.

Μεταξύ των δειγμάτων του *Section Trifoliae* παρατηρήθηκαν ποιοτικές αλλά κυρίως ποσοτικές διαφορές. Ομοίως με τους εκπροσώπους του *Section Pinus*, έτσι και στην περίπτωση αυτή, τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονταν από την παρουσία μονο- και σεσκιτερπενίων, με κύριο μεταβολίτη το α -πινένιο στα περισσότερα δείγματα. Ωστόσο, το β -πινένιο αποτελούσε τον κύριο μεταβολίτη του πτητικού κλάσματος των φύλλων της *P. contorta* var. *latifolia*, *P. radiata* και *P. ponderosa*, ενώ το ποσοστό του β -φελλανδρενίου έφτανε σε πολύ υψηλά επίπεδα στο αιθέριο έλαιο των *P. contorta* var. *latifolia* και *P. contorta* var. *murrayana*. Κυριότερος εκπρόσωπος του σεσκιτερπενικού κλάσματος του ελαίου ήταν το γερμακρένιο D, που εμφανιζόταν σε αρκετά υψηλά ποσοστά στα περισσότερα δείγματα του *Section Trifoliae*, με εξαίρεση τα είδη *P. contorta* var. *contorta*, *P. contorta* var. *latifolia*, *P. ponderosa*, *P. sabiniana* και *P. torreyana* στα οποία ανιχνεύθηκε σε ποσοστό χαμηλότερο του 1,0%. Αξιοσημείωτη ήταν η κυριαρχία των διτερπενίων στο αιθέριο έλαιο της *P. torreyana* με ποσοστό που έφθανε το 76,1%, ενώ το ποσοστό τους ήταν επίσης σημαντικό και στο αιθέριο έλαιο των *P. contorta* var. *contorta*, *P. coulteri* και *P. jeffreyi*.

Το αιθέριο έλαιο της πλειοψηφίας των *taxa* του υπογένους *Strobus*, που αναλύθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, χαρακτηριζόταν από την κυριαρχία των μονο- και σεσκιτερπενίων. Παρ' όλα αυτά το αιθέριο έλαιο της *P. aristata* αποτελούταν σχεδόν αποκλειστικά από μονοτερπένια. Το μονοτερπενικό κλάσμα χαρακτηριζόταν από την υψηλή περιεκτικότητα του α -πινενίου, ενώ το β -πινένιο εμφανίστηκε σε υψηλότερο ποσοστό στο αιθέριο έλαιο των *P. gerardiana*, *P.*

monophylla, *P. strobiformis* και *P. wallichiana*. Ταυτόχρονα στο κλάσμα των πτητικών των *P. aristata* και *P. parviflora*, επικρατούσαν τα μονοτερπένια δ-3-καρένιο και β-φελλανδρένιο. Ένας από τους σημαντικότερους μεταβολίτες των αιθερίων ελαίων του υπογένους *Strobis* ήταν ο σεσκιτερπενικός υδρογονάνθρακας γερμακρένιο D, ο οποίος χαρακτηρίζει το σεσκιτερπενικό κλάσμα.

Τη μελέτη της χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων διαδέχθηκε η ανάλυση των εναντιομερών συγκεκριμένων μεταβολιτών, χαρακτηριστικών του αιθερίου ελαίου ειδών του γένους *Pinus* [(+)/(-)-α-πινένιο, (+)/(-)-β-πινένιο, (+)/(-)-λιμονένιο και (+)/(-)-βορνεόλη].

Τέλος, στα πλαίσια της μελέτης αυτής αναλύθηκε για πρώτη φορά το αιθέριο έλαιο 21 *taxa*, και συγκεκριμένα των *P. cembroides*, *P. contorta* var. *contorta*, *P. contorta* var. *murrayana*, *P. coulteri*, *P. culminicola*, *P. elliotii*, *P. flexilis*, *P. gerardiana*, *P. monophylla*, *P. mugo* var. *prostrata*, *P. mugo* var. *pumilio*, *P. muricata*, *P. nigra* subsp. *caramanica*, *P. nigra* subsp. *laricio*, *P. nigra* subsp. *nigra*, *P. nigra* subsp. *salzmannii*, *P. strobiformis*, *P. sylvestris* subsp. *scotica*, *P. taiwanensis*, *P. teocote* και *P. torreyana*.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abi-Ayad M, Abi-Ayad FZ, Lazzouni HA, Rebiahi SA, Ziani-Cherif C, Bessiere. Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. *J. Med. Plants Res.* **2011**, 5, 5433-5436.
- Adams R.P., Wright J.W. Alkanes and terpenes in wood and leaves of *Pinus jeffreyi* and *P. sabiniana*. *J. Essent. Oil Res.*, **2012**, 24, 435-440.
- Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, 4th edn. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL **2007**.
- Agrawal P. K., Agarwal S. K., Rastogi R. P. Dihydroflavonols from *Cedrus deodara*, *Phytochemistry*, **1980**, 19, 893-896.
- Amri I., Lamia H., Gargouri S., Hanana M., Mahfoudhi M., Fezzani T., Ezzeddine F., Jamoussi B. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Pinus patula*. *Nat. Prod. Commun.*, **2011**, 6, 1531-6.
- Apetrei C.L., Spac A., Brebu M., Tuchilus C., Miron A. Composition, and antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of a full-grown *Pinus cembra* L. tree from the Calimani Mountains (Romania). *J. Serv. Chem. Soc.*, **2013**, 78, 27-37.
- Ayer W.A, Macaulay J.B. Metabolites of the honey mushroom, *Armillaria mellea*. *Can. J. Chemistry*, **1987**, 65, 7-14.
- Bagci E., Hayta S., Dogan G. Chemical composition of essential oils from bark and leaves of *Pinus brutia* Ten. from Turkey. *Aus. J. Chem.* **2011**, 23, 2782-2784.
- Barrero A. F., Sanchez J. F., Alvarez-Manzaneda R. E. J., Dorado M. M., Haidour A. Terpenoids of the wood of *Abies marocana*, *Phytochemistry*, **1994**, 35, 1271-1274.
- Batterham T. G., Hight R. J., Nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids, *Aust. J. Chem.*, **1964**, 17, 428-439.
- Begnini R., Capra C., Cattorini P.E. *Plante Medicinali*, Vol. II, Inverni & Della Beffa, Milano, **1971**, p1409.
- Beier R. Stereochemical assignment at the C-13 carbon of pimaradienes by ¹³C NMR. A reassessment. *Organic Magnetic Resonance*, **1978**, 11, 586.
- Berendes J. *Des Pedanios Dioskurides aus Anazarbos Arzneimittellehre*, Stuttgart 1902, ανατύπωση Dr. Martin Sandig, Wiesbaden, **1970**.
- Bleif S., Hannemann F., Lisurek M., von Kries J.P., Zapp J. Identification of CYP106A2 as a regioselective allylic Bacterial diterpene hydroxylase. *ChemBiochem*, **2011**, 12, 576-582.
- Bojovic S., Nikolic B., Ristic M., Orlovic S., Veselinovic M., Rakonjac L., Draz D. Variability in chemical composition and abundance of the rare tertiary relict *Pinus heldreichii* in Serbia. *Chem. Biodivers.* **2011**, 8, 1754-1765.

- Caetano da Silva S.D., Mendez de Suza M.G., Cardoso M.J.O., da Silva Moraes T., Ambrósio S.R., Veneziani R.C.S., Martins C.H.G. Antibacterial activity of *Pinus elliottii* against anaerobic bacteria present in primary endodontic infections, *Anaerobe*, **2014**, 30, 146-152.
- Cagnoli N., Ceccherelli P., Curini M., Spagnoli N., Ribaldi M. 19-norisopimara-7,15-dien-3-one: a new norditerpenoid from *Acremonium luzulae* (Fuckel) Gams. *J. Chem. Res. –S.*, **1980**, 8, 276.
- Carreras C. R., Rossomando P. C., Giordano O. S., Ent-labdanes in *Eupatorium Buniifolium*, *Phytochemistry*, **1998**, 48, 1031-1034.
- Carman R. M., Marty R. A. Diterpenoids, *Aust. J. Chem.*, 23, **1970**, 1457-1464.
- Chen H., Tang M., Gao J., Chen X., Li Z. Changes in the composition of volatile monoterpenes and sesquiterpenes of *Pinus armandi*, *P. tabulaeformis*, and *P. bungeana* in Northwest China. *Chem. Nat. Comp.*, **2006**, 42, 534-538.
- Cheung H.T.A., Miyase T., Lenguyen M.P., Smal M.A. Further acidic constituents and neutral components of *Pinus massoniana* resin. *Tetrahedron*, 1993, 49, 7903-7915.
- Cho K.-J., Yun C.-H., Yoon D.-Y., Cho Y.-S., Rimback G., Packer L., Chung A.-S. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **2000**, 168, 64-71.
- Christensen K. I. 1997. *Pinus* L., in Strid A. and Tan K. (eds.), *Flora Hellenica*, Vol. I., Koeltz Scientific Books D-6240/Federal Republic of Germany, **1997** p.7.
- Conner A.H., Nagasampagi B.A., Rowe J.W. Terpenoid and other extractives of western white pine bark. *Phytochemistry*, **1980**, 19, 1121-1131.
- Cui Y., Xie H., Wang J. Potential biomedical properties of *Pinus massoniana* bark extract, *Phytother. Res.* **2005**, 19, 34-38.
- Γεννάδιος Π. Γ. *Λεξικόν Φυτολογικόν*, Αθήνα, **1914**, pp.768-779.
- Dang N.H., Zhang X.F., Zheng M.S., Son K.H., Hyeun Wook Chang H.W., Kim H.P., Bae K.H., Kang S.S. Inhibitory constituents against cyclooxygenases from *Aralia cordata*. *Arch. Pharm. Res.*, **2005**, 28, 28-33.
- Dob T., Berramdane T., Chelgoum C. Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria. *Comptes. Rendus. Chimie*, **2005**, 8, 1939-1945.
- Dob T., Berramdane T., Chelghoum C. Essential oil composition of *Pinus halepensis* Mill. from three different regions of Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, **2007**, 19, 40-43.
- Domrachev D.V., Karpova E.V., Goroshkevic S.N., Tkachev A.V. Comparative analysis of volatiles from needles of five needle pines of Northern and Eastern Eurasia. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **2012**, 38, 780-789.
- Digrak M., Ilcim A., Alma M. H. Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*. *Phytother. Res.*, **1999**, 13, 584-587.
- Eberhardt T. L., Young R. A. Conifer seed cone proanthocyanidin polymers: Characterization

- by ^{13}C NMR spectroscopy and determination of antifungal activities, *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, 1704-1708.
- Eberhardt T. L., Young R. A. Assessment of the anti-HIV activity of a pine cone isolate, *Planta Medica*, **1996**, 62, 63-65.
- Enzell C., Theander O. The constituents of conifer needles II*. Pinifolic acid, a new diterpene isolated from *Pinus sylvestris* L., *Acta Chem. Scand.*, **1962**, 16, 607-614.
- Esquivel B., Cardenas J., Rodriguez L. The diterpenoid constituents of *Salvia fulgens* and *Salvia microphylla*. *J. Nat. Prod.* **1987**, 50, 738-740.
- Farjon A. *Pines: drawings and description of the genus Pinus*, 3rd edn. Brill, Leiden **2005**.
- Fraga B. M., Mestres T., Diaz C. E., Arteaga J. M., Dehydroabietanes from *Nepeta teydea*, *Phytochemistry*, **1994**, 35, 1509-1512.
- Foo L. Y., Karchesy J. J., Procyanidin dimmers and trimers from Douglas fir inner bark, *Phytochemistry*, **1989**, 28, 1743-1747.
- Fukushima J., Yatagai M., Ohira T. Abietane-type and labdane-type diterpenoids from the cones of *Chamaecyparis obtusa*. *J. Wood Sci.*, **2002**, 48, 326-330.
- Garcia-Alvarez M.C., Paternostro M., Piozzi F., Rodriguez B., Savona J. Cleonic acid, a new diterpenoid from *Cleonia lusitanica*. *Phytochemistry*, **1979**, 18, 1835-1837.
- Gardner D.R., Molyneux R.J., James L.F., Panter K.E., Stegelmeier B.L. Ponderosa pine needle-induced abortion in beef cattle: Identification of isocupressic acid as the principal active compound. *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, 756-761.
- Gernandt D.S., Geadá López G., Ortiz García S., Liston A. Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon* **2005**, 54, 29-42.
- Gonzalez M.A., Pérez-Guaita D., Correa-Royero J., Zapata B., Agudelo L., Mesa-Arango A., Betancur-Galvis L. Synthesis and biological evaluation of dehydroabietic acid derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, 45, 811-815.
- Guerreiro E., Kavka J., Giordano O. S., 5,8-Dihydroxy-3,6,7-trimethoxyflavone from *Gnaphalium gaudichaudianum*, *Phytochemistry*, **1982**, 21, 2601-2602.
- Guri A., Kefalas P. and Roussis V. Antioxidant potential of six pine species. *Phytother. Res.* **2006**, 20, 263-266.
- Gülcin I., Büyükkuroglu M.E., Oktay M., Küfrevioğlu Ö. I. Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallsiana* (Lamb.) Holmboe, *J. Ethnopharmacol.*, **2003**, 86, 51-58.
- Hamamouchi M., Hamamouchi J., Zouhdi M., Bessiere J.M. Chemical and antimicrobial properties of essential oils of five Moroccan Pinaceae. *J. Essent. Oil Res.*, **2001**, 13, 298-302.
- Haslam E., Lilley T. H., Ya Cai, Martin R., Magnolato D. Traditional herbal medicines – The role of polyphenols. *Planta Medica*, **1989**, 17, 1-8.
- Haagen-Smit A.J., Redemann T., Mirov X.T. Composition of gum turpentine of Torrey pine. *J.*

- Am. Chem. Soc.*, **1947**, 69, 2014-2017.
- Hegnauer R., *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Band I., Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart, **1962**, pp.373-403.
- Herz W., Ligon R.C., Turner J.A., Blount J.F. Remote oxidation in the Fe(II)-induced decomposition of a rigid epidioxide. *J. Org. Chem.*, **1977**, 42, 1885-1894.
- Hironori O., Yasuko I., Shunyo M., Harukuni T. Hoyoku N. Abietane diterpenoids from the cones of *Larix kaempferi* and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation, *Planta Med.*, **2001**, 67, 55-60.
- Hitlunen R., Laakso I. Gas chromatographic analysis and biogenetic relationships of monoterpene enantiomers in Scots Pine and Juniper needle. *Flavour Fragr. J.*, **1995**, 10, 203-210.
- Hong E.J., Na K.J., Choi I.G., Choi K.C., Jeung E.B. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, 27, 863-866.
- Hsu T.-Y., Sheu S.-C., Liaw E.-T., Wang T.-C., Lin C.-C. Anti-oxidant activity and effect of *Pinus morrissonicola* Hay. on the survival of leukemia cell line U937. *Phytomedicine*, **2005**, 12, 663-669.
- Huffman J.W. Studies on resin acids. V. Preparation and reactions of Ring-A olefins from dehydroabietic acid. *J. Org. Chem.*, **1970**, 35, 478-483.
- Hunt R.S., Meagher M.D., Manville J.F. Morphological and foliar terpene characters to distinguish between western and eastern white pine. *Can. J. Bot.*, **1990**, 68, 2525-2530.
- Islam W.T. Volatile oils from needles and cones of Egyptian Chir pine (*Pinus roxburghii* Sarg.). *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.* **2006**, 44, 77-83.
- Jung M. J., Chung H. Y., Choi J. H., Choi J. S. Antioxidant principles from the needles of Red pine. *Pinus densiflora*, *Phytother. Res.*, **2003**, 17, 1064-1068.
- Kim J.-H., Lee H.-J., Jeong S.-J., Lee M.-H., Kim S.-H. Essential oil of *Pinus koraiensis* leaves exerts Antihyperlipidemic effects via up-regulation of low density lipoprotein receptor and inhibition of acyl co-enzyme A: cholesterol acyltransferase. *Phytother. Res.*, **2012**, 26, 1314-1319.
- Kim H., Lee B., Yun K.W. Comparison of chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from three *Pinus* species. *Ind. Crop. Prod.*, **2013**, 44, 323-329.
- Kinouchi Y., Ohtsu H., Tokuda H., Nishino H., Matsunaga S., Tanaka R. Potential antitumor-promoting diterpenoids from the stem bark of *Picea glehni*. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, 817-820.
- Kobayashi M., Ishida K., Terabayashi S., Mitsuhashi H. 10-Hydroxypheophytins and a new norlabdane diterpene from the leaves of *Cupressus funebris* Endl. *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, 39, 3348-3349.
- Kontiza I., Abatis D., Malakate K., Vagias C., Roussis V. 3-keto-Steroids from the marine organisms *Dendrophyllia cornigera* and *Cymodocea nodosa*. *Steroids*, **2006**, 71, 177-181.

- Kolayli S., Ocak M., Aliyazicioglu R., Karaoglu S. Chemical analysis and biological activities of essential oils from trunk-barks of 8 trees. *Asian J. Chem.*, **2009**, 21, 2684-2694.
- Kolesnikova R.D., Verissimo N., Ul'yanova I. Yu. () Essential oils of *Pinus pinaster* Ait. *Rastitel'nye Resursy* **1983**, 19, 364-366.
- Koukos P.K., Papadopoulou K.I., Patiaka D.T., Papagiannopoulos A.D. Chemical composition of essential oils from needles and twigs of Balkan Pine (*Pinus peuce* Grisebach) grown in Northern Greece. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 1266-1268.
- Kuo H.-K., Yu M.-T., Three labdane –type diterpenes from the bark of *Juniperus formosana* Hay. var. *concolor* Hay., *Chem. Pharm. Bull.*, **1996**, 44, 1242-1244.
- Kurose K., Okamura D., Yatagai M. Composition of the essential oils from the leaves of nine *Pinus* species and the cones of three of *Pinus* species. *Flavour Fragr. J.*, **2007**, 22, 10-20.
- Lahlou M. Composition and molluscicidal properties of essential oils of five Moroccan Pinaceae. *Pharm. Biol.*, **2003**, 41, 207-210.
- Lantto T. A., Dorman H. J. D., Shikov A. N., Pozharitskaya O. N., Tikhonov V. P., Hiltunen R., Raasmaja A. Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus siberica* Du Tour) extract. *Food Chem*, **2009**, 112, 936-943.
- Lee J.H., Lee B.K., Kim J.H., Lee S.H., Hong S.K. () Comparison of chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils from three: conifer trees; *Pinus densiflora*, *Cryptomeria japonica*, and *Chamaecyparis obtusa*. *J. Microbiol. Biotech.*, **2009**, 19, 391-396.
- Li Y.-Y., Feng J., Xiao-Lu Zhang X.-L., Cui Y.-Y. Pine Bark Extracts: Nutraceutical, Pharmacological, and Toxicological Evaluation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2015**, 353, 9-16.
- Lishtvanova L.N., Akimov Yu A. Composition of pine needle essential oil studied by capillary chromatography. *Trudy Vsesoyuznogo Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Efirnomaslichnykh Kul'tur*, **1971**, 3, 54-56.
- Mabry T.J., Markham K.R. and Thomas M.B. The systematic identification of flavonoids, Springer-Verlag N. York, **1970**.
- Macchioni F., Cioni P.L., Flamini G., Morelli I., Maccioni S., Ansaldi M. Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour Fragr. J.*, **2003**, 18, 139-143.
- Macchioni F., Cioni P. L., Flamini G., Morelli I., Perrucci S., Franceschi A., Macchioni G., Ceccarini L. Acaricidal activity of pine essential oils and their main components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored food mite. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 4586-4588.
- Mahal H. S., Venkataraman K. The constitution of Calycopterin, *Curr. Sci. India*, **1935**, 4, 311-312.
- Marques F.A., Frensch G., Zaleski S.R.M., Nagata N., Maia, Beatriz H.L.N.S., Lazzari M.N.S., Lencz C.A., Corrêad A.G. Differentiation of five Pine species cultivated in Brazil based on chemometric analysis of their volatiles identified by Gas Chromatography-Mass Spectrometry.

- J. Braz. Chem. Soc.*, **2012**, *23*, 1756-1761.
- Miguel Del Corral J.M., Gordaliza M., Salinero M.A., San Feliciano A. Reference Data Review. ¹³C NMR Data for abieta-8,11,13-triene diterpenoids. *Magn. Reson. Chem.*, **1994**, *32*, 774-781.
- Monaco P., Parilli M., Previtera L. Two endoperoxide diterpenes from *Elodea canadensis*. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *39*, 4609-4610.
- Nasri N., Tlili N., Triki S., Elfalleh W., Cheraif I., Khaldi A. Volatile constituents of *Pinus pinea* L. needles. *J. Essent. Oil Res.*, **2011**, *23*, 15-19.
- Nikolic B., Ristic M., Bohovic S., Marin P.D. Variability of the needle essential oils of *Pinus heldreichii* from different populations in Montenegro and Serbia. *Chem. Biodivers.*, **2007**, *4*, 905-916.
- Nikolic B., Ristic M., Bohovic S., Marin P.D. Variability of the needle essential oils of *Pinus peuce* from different populations in Montenegro and Serbia. *Chem. Biodivers.*, **2008**, *5*, 1377-1388.
- Nishida T., Wahlberg I., Enzell C.R. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectra of some aromatic diterpenoids. *Org. Magn. Resonance*, **1977**, *9*, 203-209.
- Norin T., Review article. Some aspects of the chemistry of the order of Pinales, *Phytochemistry*, **1972**, *11*, 1231-1242.
- Ohmoto T., Saito M., Yamaguchi K. Constituents of Pollen. XIV. Constituents of *Cedrus deodara*. *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, *35*, 2443-2447.
- Ohtsu H., Tanaka R., In Y., Matsunaga S., Tokuda H., Nishino H. Abietane diterpenoids from the cones of *Larix kaempferi* and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation. *Planta Med.* **2001**, *67*, 55-60.
- Ottavioli J., Bighelli A., Casanova J. Diterpene-rich needle oil of *Pinus pinaster* Ait. from Corsica. *Flavour. Fragr. J.* **2008**, *23*, 121-125.
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, **2006**, *73*, 236-244.
- Packer L., Rimbach G., Virgili F. Review article. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, Pycnogenol. *Free Radical Bio. Med.*, **1999**, *27*, 704-724.
- Park J.S., Lee G.H. Volatile compounds and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of the needles of *Pinus densiflora* and *Pinus thunbergii*. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*, 703-709.
- de Pascual Teresa J., Barrero A.F., Muriel L., San Feliciano A., Grande M. New natural diterpene acids from *Juniperus communis*. *Phytochemistry*, **1980**, *19*, 1153-1156.
- Pauly G., Gleizes M., Bernard-Dagan C. Identification des constituants de l' essence des aiguilles de *Pinus pinaster*. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 1395-1398.

- Pauly G., Von Rudloff E. Chemosystematic studies in the genus *Pinus*. Leaf oil of *Pinus contorta* var *latifolia*. *Can. J. Botany*, **1971**, 49, 1201-1210.
- Petrakis P.V., Tsitsimpikou C., Tzakou O., Couladis M., Vagias C., Roussis V. () Needle volatiles from five *Pinus* species growing in Greece. *Flavour Fragr J* **2001**, 16, 249-252.
- Pfeifhofer W.H. Composition of the essential oil of *Pinus canariensis* Sweet ex Sprengel. *Flavour Fragr. J.*, **2000**, 15 266-270.
- Prinz S., Müllner U., Heilmann J., Winkelmann K., Sticher O., Haslinger E., Hübner A. Oxidation products of abietic acid and its methyl ester. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 1530-1534.
- Ragasa C.Y., Ganzon J., Hofileña J., Tamboong B., Rideout J.A. A new furanoid diterpene from *Caesalpinia pulcherrima*. *Chem. Pharm. Bull.*, **2003**, 51, 1208-1210.
- Rashid M. A., Armstrong J. A., Grey A. I., Waterman P. G. Alkaloids, flavonols and coumarins from *Drummondita hasselii* and *D. calida*, *Phytochemistry*, **1992**, 31, 1265-1269.
- Roussis V., Petrakis P.V., Ortiz A., Mazomenos B.E. Volatiles constituents of needles of five *Pinus* species grown in Greece. *Phytochemistry*, **1995**, 39, 357-361.
- Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food. Chem.*, **2005**, 91, 621-632.
- Sawai Y., Moon J.-H., Sakata K., Watanabe N. Effects of structure on radical-scavenging abilities and antioxidative activities of tea polyphenols: NMR analytical approach using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 3598-3604.
- Schuller W. H., Minor J. C., Lawrence R. V. Photosensitized oxidation of Pine gum to yield peroxides, *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development*, **1964**, 3, 97-100.
- Sezik E., Üstün O., Demirci B., Baser K.H.C. Composition of the essential oils of *Pinus nigra* Arnold from Turkey. *Turk. J. Chem.*, **2010**, 34, 313-325.
- Shang-jiang D., Gariboldi P., Jommi G., Constituents of Shashen (*Adenophora axilliflora*), *Planta Med.*, **1986**, 52, 317-320.
- Shpak S.I., Lamotkin S.A., Lamotkin A.I. Chemical composition of *Pinus sylvestris* essential oil from contaminated areas. *Chem. Nat. Comp.*, **2007**, 43, 55-58.
- Sinkkonen J., Liimatainen J., Karonen M., Wiinamäki K., Eklund P., Sjöholm R., Pihlaja K. A sesquiterpene with a spirodienone structure from *Pinus sylvestris* L. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2007**, 46, 4148-4150.
- Sjödén K., Person M., Borg-Karlson A.K., Norin T. Enantiomeric compositions of monoterpene hydrocarbons in different tissues of four individuals of *Pinus sylvestris*. *Phytochemistry*, **1996**, 41, 439-445.
- Smith E., Williamson E., Zloh M., Gibbons S. Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of *Staphylococcus aureus*, *Phytother. Res.*,

2005, 19, 538-542.

Smyrniotopoulos V., Vagias C., M.Rahman M., Gibbons S., Roussis V., Brominated diterpenes with antibacterial activity from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*, *J. Nat. Prod.*, **2008**, 71, 1386-1392.

Stevanovic T., Garneau F.-X., Jean F.-I., Gagnon H., Vilotic D., Petrovic S., Ruzic N., Pichette A. The essential oil composition of *Pinus mugo* Turra from Serbia. *Flavour Fragr. J.*, **2005**, 20, 96-97.

Sultan Z.M., Jeon Y.-M., Moon S.-S. Labdane-Type Diterpenes Active against Acne from Pine Cones (*Pinus densiflora*). *Planta Med.* **2008**, 74, 449-452.

Tawara J. N., Blokhin A., Foderaro T., Stermitz F. R. Toxic piperidine alkaloids from Pine (*Pinus*) and Spruce (*Picea*) trees. New structures and a biosynthetic hypothesis. *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 4813-4818.

Teng K., Zhang H., Xu M., Zhu J. GC-MS analysis of volatile oil from Pine needles of *Pinus densiflora* and *Pinus sylvestris* var. *sylvestriformis*. *Yaowu Fenxi Zazhi* **2011**, 31, 2121-2125.

Tognolini M, Barocelli E., Ballabeni V., Bruni R., Bianchi A., Chiavarini M., Impicciatore M. Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sciences*, **2006**, 78, 1419-1432.

Tsitsimpikou C., Petrakis P.V., Ortiz A., Harvala C., Roussis V. Volatile needle terpenoids of six *Pinus* species. *J. Essent. Oil Res.*, **2001**, 13, 174-178.

Tumen I., Hafizoglu H., Kilic A., Dönmez I.E., Sivrikaya H., Reunanen M. Yields and constituents of essential oil from cones of Pinaceae spp. natively grown in Turkey. *Molecules*, **2010**, 15:5797-5806.

Urones J.G., Sanchez Marcos I., Fernández Ferreras I., Basabe Barcala P. Terpenoids from *Nepeta tuberosa* subsp. *reticulata*. *Phytochemistry*, **1988**, 27, 523-526.

Ustun O., Sezik E., Kurkcuoglu M., Baser K.H.C. Study of the essential oil composition of *Pinus sylvestris* from Turkey. *Chem. Nat. Comp.*, **2006**, 42, 26-31.

Ustun O., Senol F.S., Kurkcuoglu M., Orhan I.E., Kartal M., Baser K.H.C. Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol. *Ind. Crop. Prod.* **2012**, 38, 115-123.

Van Beek T. A., Claassen F. W., Dorado J., Godejohann M., Sierra-Alvarez R. and Wijnberg J.B.P.A. Fungal biotransformation products of dehydroabiatic acid, *J. Nat. Prod.*, **2007**, 70, 154-159.

Von Rudloff E. The leaf oil terpene composition of Eastern white pine, *Pinus strobus* L. *Flavour Fragr. J.*, **1985**, 1, 33-35.

Wada S., Lida A., Tanaka R. Triterpene constituents from the stem bark of *Pinus luchuensis* and their DNA Topoisomerase II Inhibitory effect, *Planta Medica*, **2001**, 67, 659-664.

Wahlberg I., Wallin I., Narbonne C., Nishida T., Enzell C.R. Note on the stereostructures of

thunbergol (isocembrol) and 4-*epi*-isocembrol, *Acta Chem. Scand.*, **1981**, 35, 65-68.

Wang Q., Rong Z., Teng J., Takaishi Y., Duan H.Q. Two new antitumor diterpenes from *Pinus sylvestris*. *Chinese Chem. Lett.*, **2008**, 19, 187-189.

Wenkert E., Buckwalter B.L. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of naturally occurring substances. X. Pimaradienes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 4367-4369.

Yang X.W., Feng L., Lei M.S., Liu X.H., Li Y.L., Wu L., Shen Y.H., Tian J.M., Zhang X., Liu X.R., Wang N., Liu Y., Zhang W.D. Isolation, structure and bioactivities of abiesadines A-Y, 25 new diterpenes from *Abies georgeii* Orr. *Bioorgan. Med. Chem.*, **2010**, 18, 744-754.

Yatagai M.A., Hong Y.B. Chemical composition of the essential oil of *Pinus massoniana* Lamb. *J. Essent. Oil Res.* **1997**, 9:485-487.

Yesil-Celiktas O., Ganzera M., Akgun I., Sevimli C., Korkmaz K. S., Bedir E. Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different *Pinus* species, *J. Sci. Food Agric.*, **2009**, 89, 1339-1345.

Yi J., Wang Z., Bai H., Yu X., Jing J., Zuo L. Optimization of purification, identification and evaluation of the in vitro antitumor activity of polyphenols from *Pinus koraiensis* Pinecones. *Molecules*, **2015**, 20, 10450-10467.

Yousuf Dar M., Shah W.A., Mubashir S., Rather M.A. Chromatographic analysis, anti-proliferative and radical scavenging activity of *Pinus wallichiana* essential oil growing in high altitude areas of Kashmir, India. *Phytomedicine*, **2012**, 19, 1228-1233.

Zafar I., Fatima A., Khan S.J., Rehman Z., Mehmud S. GC-MS studies of essential oil from needles of *Pinus roxburghii* and their antimicrobial activity. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.*, **2010**, 9, 468-473.

Zavarin E., Hathaway W.A., Reichert T., Linhart Y.B. Chemotaxonomic study of *Pinus torreyana* Parry turpentine. *Phytochemistry*, **1967**, 6, 1019-1023.

Zavarin E., Snajberk K., Bailey D. Variability in the Essential Oils of Wood and Foliage of *Pinus aristata* and *Pinus longaeva*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **1976**, 4, 81-82.

Zdero C., Bohlmann F., Niemeyer H.M., Friedolabdanes and other constituents from *Chilean Haplopappus* species, *Phytochemistry*, **1991**, 30, 3669-3677.

Zheljzakov V.D., Astatkie T., Schlegel V. Effects of distillation time on the *Pinus ponderosa* essential oil yield, composition, and antioxidant activity. *Hortscience*, **2012**, 47, 785-789.

Zinkel F., Magee T.V., Walter J., Major resin acids of *Pinus nigra* needles, *Phytochemistry*, **1985**, 24, 1273-1277.

Zolfaghari B., Irvani S. Essential oil constituents of the bark of *Pinus pinaster* from Iran. *J. Essent. Oil Bear. Pl.*, **2012**, 15, 348-351.

Zulaica-Villagomez H., Peterson D. M., Herrin L. and Young R. A. Antioxidant activity of different components of pine species, *Holzforschung*, **2005**, 59, 156-162.