



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

ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ
***Crepis dioscoridis* L.-Asteraceae**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΠΑΡΑΓΩΓΗ & ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΤΣΟΥΚΑΛΑΣ ΜΙΧΑΗΛ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ
2012

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Δρ. Ελένη Σκαλτσά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Μέλη τριμελούς εξεταστικής επιτροπής

Δρ. Αλέξιος Λέανδρος Σκαλτσούνης, Καθηγητής

Δρ. Ελένη Σκαλτσά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Δρ. Νεκτάριος Αληγιάννης, Επίκουρος Καθηγητής

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμώς την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ελένη Σκαλτσά, για την επιλογή του θέματος και τη συνεχή επιμέλεια και καθοδήγηση, που μου παρείχε ως επιβλέπουσα καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ την τριμελή εξεταστική επιτροπή μεταπτυχιακών σπουδών του Τομέα Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων.

Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή, Δρ. Θεοφάνη Κωνσταντινίδη (Τομέας Οικολογίας & Ταξινομικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ) για την ταυτοποίηση του φυτικού υλικού.

Ευχαριστώ θερμώς τις διδάκτορες κ. Χριστιάνα Γουσιάδη και κ. Αικατερίνη Αργυροπούλου για τη βοήθεια και τη συμπαράστασή τους.

Ευχαριστώ την καθηγήτρια Rosa M. Giner Pons (Departamento de Farmacología y Farmacognosia, Universitat de València, España) για τη καθοδήγηση και την παροχή υλικού και εξοπλισμού για τη διεξαγωγή των βιολογικών δοκιμασιών.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Anna Rita Bilia (Department of Pharmaceutical Sciences, University of Florence, Italy) για τα φάσματα μάζης.

Επίσης, ευχαριστώ και όλους τους συναδέλφους, που εργάστηκαν μαζί μου στο εργαστήριο για το ευχάριστο & φιλικό περιβάλλον.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την στήριξή της.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
A.1. Βοτανική περιγραφή- Βοτανική κατάταξη	2
A.1.1. Το tribe Cichorieae (synonym: Lactuceae)	2
A.1.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες των Cichorieae	2
A.1.3. Κατανομή των σесκιτερπενίων στα γένη του tribe Cichorieae	2
A.1.4. Οικονομική σημασία των Cichorieae	3
A.1.5. Το γένος <i>Crepis</i>	4
A.2. Δρογοφαρμακολογία-Εθνοφαρμακολογία	7
A.3. Δρογοχημεία	8
A.4. Σεσκιτερπενικές λακτόνες	13
A.4.1. Βιοσύνθεση	14
A.4.2. Νεότερα δεδομένα για την αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση των σεσκιτερπενικών λακτονών	16
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
B.1. Τεχνικές	18
B.2. Εκχύλιση της δρόγης	21
B.3. Χρωματογραφικός διαχωρισμός	
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
Γ.1. ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΕΝΙΚΕΣ ΛΑΚΤΟΝΕΣ	
Γ.1.1. Ουσία 1 : 8-δεοξυλακτουκίνη	25
Γ.1.2. Ουσία 2 : Κρεπισίδης C	28
Γ.1.3. Ουσία 3 : 11β-13διυδρο-κρεπισίδης C	32
Γ.1.4. Ουσία 4 : Ιντεγκριφολίνη	36
Γ.1.5. Ουσία 5 : 3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της ιντεγκριφολίνης	39
Γ.1.6. Ουσία 6 : 11β-13 διυδροϊντεγκριφολίνη	45
Γ.1.7. Ουσία 7 : 3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της 11β-13 διυδροϊντεγκριφολίνης	47
Γ.1.8. Ουσία 8 : Μακροκλινισίδης F	51
Γ.1.9. Ουσία 9 : 11β-13, 4α-15-τετραϋδροϊντεγκριφολίνη	55
Γ.1.10. Ουσία 10 : 8-επι-γροσεΐμίνη	59
Γ.1.10. 1. <i>In vitro</i> βιολογικές δοκιμασίες	62

Γ.2. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Γ2.11. Ουσία **11**: ισοραμνετίνη 64

Γ2.12. Ουσία **12**: απιγενινο-4'-β-D-γλυκοσίδης 64

Γ.3. ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ/ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ

Γ.3.13. Ουσία **13**: *E*-καφεϊκό οξύ 65

Γ.3.14. Ουσία **14**: *E*-φερουλικό οξύ 65

Γ.3.15. Ουσία **15**: ισοσαλικίνη 66

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 68

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 72

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η απομόνωση και ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων, αλλά και η διερεύνηση της βιολογικής τους δράσης είναι μία από τις κύριες κατευθύνσεις του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η παρούσα μελέτη έχει ως αντικείμενο την απομόνωση και προσδιορισμό της δομής των δευτερογενών μεταβολιτών του φυτού *C. dioscoridis* L., κυρίως των σесκιτερπενικών λακτονών.

Η επιλογή του *C. dioscoridis* L. έγινε με βάση την γνώση, ότι τα είδη του γένους *Crepis* βιοσυνθέτουν ποικιλία σесκιτερπενικών λακτονών. οι οποίες χρησιμοποιούνται ως χημειοταξινομικοί δείκτες και ότι ποικίλοι εκπρόσωποι του γένους χρησιμοποιούνται στη λαϊκή θεραπευτική ή καταναλώνονται σαν σαλάτα.

Το είδος *C. dioscoridis* L. έχει εξάπλωση μεγαλύτερη του ελλαδικού χώρου και δεν έχει μελετηθεί κατά το παρελθόν.

A.1. Βοτανική περιγραφή - Βοτανική κατάταξη

A.1.1. Το tribe Cichorieae (synonym: Lactuceae)

Το tribe των Cichoriae αποτελείται από συγγενικά γένη της οικογένειας Asteraceae, τα οποία αναγνωρίζονται εύκολα από τα κεφάλια, που συνήθως αποτελούνται από πεντάλοβα γλωσσοειδή ανθίδια. Επιπλέον χαρακτηριστικό είναι αυτό του γαλακτώδους χυμού που εκκρίνουν. Οι γυρεόκοκκοι φέρουν άκανθες σε εντοπισμένα σημεία σε αντίθεση με τους γυρεόκοκκους των λοιπών γενών της οικογένειας Asteraceae στους οποίους οι άκανθες είναι ομοιογενώς καταναμημένες στην επιφάνεια του κόκκου. Ο πάππος συνήθως αποτελείται από λέπια ή σκληρές τρίχες. Σύμφωνα με τον Bremer (Kilian *et al.*, 2010) το tribe αποτελείται από 100 γένη και 1500 είδη. Ορισμένα γένη χρησιμοποιούνται σε σαλάτες (π.χ. *Cichorium*, *Lactuca*, *Taraxacum*, *Cicerbita*, *Scorzonera*, *Tragopogon*), ενώ άλλα στη λαϊκή θεραπευτική (π.χ. *Crepidiasrum*, *Ixeris*, *Lactuca*, *Pilosella*, *Taraxacum*, *Youngia*).

A.1.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες των Cichoriae.

Φυτοχημικές μελέτες σε διάφορα γένη του tribe Cichoriae έδειξαν ότι είναι πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες, ειδικά σε σεκιτερπενικές λακτόνες: ευδεσμανολίδια, γερμακρανολίδια και κυρίως γουαϊανολίδια. (Zidorn, 2008)

Καθώς τα απομονωμένα σεσκιτερπένια εκδηλώνουν ποικιλία βιολογικών δράσεων, οι οποίες περιλαμβάνουν κυτταροτοξικότητα έναντι ορισμένων καρκινικών σειρών, αντιφλεγμονώδη δράση και επαγωγή αποτοξινωτικών ενζύμων, το φυτοχημικό φορτίο των βρώσιμων ειδών του tribe Cichoriae θα μπορούσε να τους αποδώσει εφαρμογές με θεραπευτικά οφέλη.

Από αντιπροσώπους του tribe έχουν απομονωθεί φαινολικά παραγωγα, φλαβονοειδή και κουμαρίνες, καθώς και τριτερπένια.

A.1.3. Κατανομή των σεσκιτερπενίων στα γένη του tribe Cichoriae

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα μέχρι το τέλος του 2007 έδειξαν 360 σεσκιτερπενικές λακτόνες και παράγωγα αυτών να απαντώνται σε 139 είδη, που ανήκουν στο tribe των Cichoriae (Zidorn, 2008).

Η συγκεντρωτική μελέτη του Zidorn (Zidorn, 2008) γι'αυτά τα είδη, έδειξε ότι τα περισσότερα σεσκιτερπένια των Cichoriae είναι γουαϊανολίδια και συγκεκριμένα: 92 εκπρόσωποι λακτονών τύπου *Costus*, 75 τύπου λακτουκίνης και 29 τύπου ιερακίνης. Στη συνέχεια προχώρησε σε μια κατηγοριοποίηση των 31 μελετημένων γενών σε επτά κύριες ομάδες βάσει ομοιότητας στο φυτοχημικό προφίλ.

Ομάδα 1: περιέχει τα γένη *Andryala*, *Chondrilla*, *Soroseris*, *Taeckholmia*, *Willemetia*, *Crepis*, *Nabalus*, *Ixeris*, *Mycelis*, *Picris*, *Youngia*, *Scorzonera*, και

Lapsana. Η ομάδα χαρακτηρίζεται από την επικράτηση των γουαϊανολιδίων και κυρίως των γουαϊανολιδίων τύπου *Costus*.

Ομάδα 2: περιέχει τα γένη *Scorzoneroides*, *Notoseris*, *Lactuca*, *Cichorium*, *Launaea*, *Crepidiastrum*, *Reichardia*, *Cicerbita*, *Taraxacum*, *Helminthotheca*, και *Hypochaeris*. Η ομάδα χωρίζεται σε τέσσερις υποομάδες:

a) *Scorzoneroides*

b) *Notoseris*, *Lactuca* και *Cichorium*

c) *Launaea*, *Crepidiastrum*, *Reichardia* και *Cicerbita*

d) *Taraxacum*, *Helminthotheca* και *Hypochaeris*.

Η ομάδα χαρακτηρίζεται από την επικράτηση των γουαϊανολιδίων και κυρίως των γουαϊανολιδίων τύπου λακτουκίνης.

Ομάδα 3: περιέχει μόνο το γένος *Warionia*. Είναι το μόνο γένος των Cichoriae, που βισυνθέτει εποξυγουαϊαν-12,5-ολίδια.

Ομάδα 4: περιέχει τα γένη *Dendroseris* και *Sonchus*. Τα δύο αυτά γένη χαρακτηρίζονται από ευδεσμανολίδια τύπου ρεϋνοσίνης.

Ομάδα 5: περιέχει το γένος *Hieracium*. Χαρακτηρίζεται από την κυριαρχία λακτονών τύπου τουμπεριφερίνης και των μη λακτονοποιημένων πρόδρομων οξέων.

Ομάδα 6: περιέχει τα γένη *Hedynopsis* και *Leontodon*. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία υποκρετενολιδίων.

Ομάδα 7: Περιέχει το γένος *Urospermum*, το οποίο χαρακτηρίζεται από την παρουσία μελαμπολιδίων.

A.1.4. Οικονομική σημασία των Cichoriae

Εξετάζοντας τα Cichoriae σαν ολόκληρα, ο αριθμός των καλλιεργούμενων ειδών είναι μάλλον μικρός. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται είδη που ανήκουν στα γένη *Chondrilla*, *Cichorium*, *Crepidiastrum*, *Gundelia*, *Hololeion*, *Ixeridium*, *Lactuca*, *Launaea*, *Pterocypsela* (= *Lactuca*), *Reichardia*, *Scolymus*, *Scorzonera*, *Sonchus*, *Taraxacum* και *Tragopogon*. Μόνο είδη των *Cichorium*, *Lactuca* και *Scorzonera* καλλιεργούνται εκτενώς. Τα υπόλοιπα είδη φαίνεται να καλλιεργούνται σε τοπικό επίπεδο. Κυρίως καλλιεργούνται για χρήση σε σαλάτες και για ζωτροφές και η εμπορική δραστηριότητα είναι περιορισμένη. Βασικά τα Cichoriae καλλιεργούνται για τα φύλλα ή τις ρίζες τους. Με τη διαδικασία της επιλογής οδηγηθήκαμε σε καλλιεργούμενες ποικιλίες με μαλακά πράσινα φύλλα, φτωχά σε πικρά συστατικά όπως το μαρούλι (*Lactuca sativa*) ή σε ποικιλίες με χρώμα και μικρή περιεκτικότητα σε πικρά συστατικά όπως το "radiccio" (*Cichorium intybus*).

Σε άλλες περιπτώσεις η σύνθεση πικρών συστατικών καταστρέφεται με ανάπτυξη της ποικιλίας σε σκοτάδι όπως τα βελγικά "endives" (*Cichorium endivia*). Σε

ορισμένες περιπτώσεις τρώγονται τα νεαρά φύλλα, αφού βραστούν όπως τα γαλλικά βελγικά “endives” (*Cichorium endivia*)

Τα υπόγεια τμήματα διαφόρων ειδών είναι επίσης βρώσιμα (*Scorzonera hispanica*, *Tragopogon porrifolius*), ενώ αξιοσημείωτη είναι η χρήση των ριζών της *Scorzonera deliciosa* σε γλυκίσματα.

Η χρήση των ψημένων ριζών του κιχώριου σαν υποκατάστατο καφέ είναι γνωστή ιστορικά, αλλά και μέχρι και σήμερα όπου χρησιμοποιείται σε ροφήματα.

Άλλα τμήματα των Cichoríae καταναλώνονται ως λαχανικά εποχιακά, όπως οι ανθικοί οφθαλμοί του φυτού *Gundelia tournefortii*.

Αξίζει να αναφερθεί ότι τόσο ο Stalin όσο και ο Hitler, επιδιώκοντας την αυτάρκεια, προώθησαν την έρευνα στην παραγωγή καουτσούκ από το γαλακτώδη χυμό των Cichoríae χωρίς όμως να βρεθεί κάποια βιώσιμη λύση (Kilian *et al.*, 2010).

Η χρήση των Cichoríae ως διακοσμητικά φυτά είναι επίσης περιορισμένη, καθώς τα συνήθως κίτρινα ανθίδια θεωρούνται συνηθισμένα. Έτσι προτιμώνται είδη με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά όπως:

(1) ανθίδια σε άλλα χρώματα, όπως ανοιχτό κυανούν (*Catananche caerulea*, *Cicerbita alpina* (L.) Wall., *C. bourgaei* (Boiss.) Beauverd, *Cichorium intybus*), ανοιχτό ιώδες (*Crepis incana* Sm., *C. rubra* L.) ή έντονο πορτοκαλί (*Crepis aurea*, *Pilosella aurantiaca* (L.) F.W. Schultz & Sch. Bip.),

(2) κεφάλια με δύο τόνους χρωμάτων, όπως απαντώνται στα φυτά *Reichardia tingitana* και *Tolpis barbata*.

Όστόσο τα Cichoríae δεν έχουν μόνο θετικό οικονομικό ενδιαφέρον, καθώς πολλά είδη θεωρούνται από τα πλέον επεκτατικά ζιζάνια, εισβάλλοντας σε κήπους και καλλιέργειες σε μέρη, όπου έχουν εισαχθεί και όχι εκεί που ενδημούν. Έτσι τα είδη *Chondrilla juncea* L. και *Sonchus asper* (L.) Hill έχουν επεκταθεί στην Αυστραλία και στη Βόρειο Αμερική προκαλώντας ζημιές σε καλλιέργειες και τόπους βοσκής.

A.1.5. Το γένος *Crepis*

Αποτελείται από 250 περίπου είδη, που ενδημούν στις εύκρατες περιοχές του βόρειου ημισφαιρίου και στην τροπική Αφρική. Μονοετείς, διετείς ή πολυετείς πόες με τα κατώτερα φύλλα συνήθως έμμισχα και τα ανώτερα επιφυή ή περιβλαστα. Κεφάλια με ποδίσκο μονήρη ή σε φόβη με όλα τα ανθίδια γλωσσοειδή κίτρινα, πορτοκαλόχρωμα, ερυθρά περιβαλλόμενα από άνισα βράκτια στυλοειδώς επάλληλα. Τα αχαίνια είναι υποκυλινδρικά, ακρότομα ή ατρακτοειδή, στενούμενα προς την κορυφή σχηματίζοντας οξύ ράμφος. Ο πάππος αποτελείται από λευκές, σπανίως ξανθές, τρίχες τεταγμένες σε πολλούς σπονδύλους.

Τα περισσότερα είδη αναφέρονται ως ενοχλητικά ζιζάνια ενώ ορισμένα χρησιμοποιούνται σε σαλάτες με τα ονόματα: πικραλίδες, πικραλίθρες,

πικροράδικα, φραγκοράδικα, γλυκοσειριδες-τσιβίρια (*Crepis commutata* L.), πικροσειρίδες-χρες-κοκκινόραδικα-χοιρομουρίδες (*Crepis vesicaria* L.), μαρουλίδες (*Crepis fraasi* L.), μαργιές, πικρούσες, αγριομάρουλα (*Crepis auriculifolia* L.), περδικόχορτα (*Crepis bulbosa* L.) Συχνά συγχέονται με τα συγγενικά ιεράκια (*Hieracium* spp.) (Καββάδας, 1956).

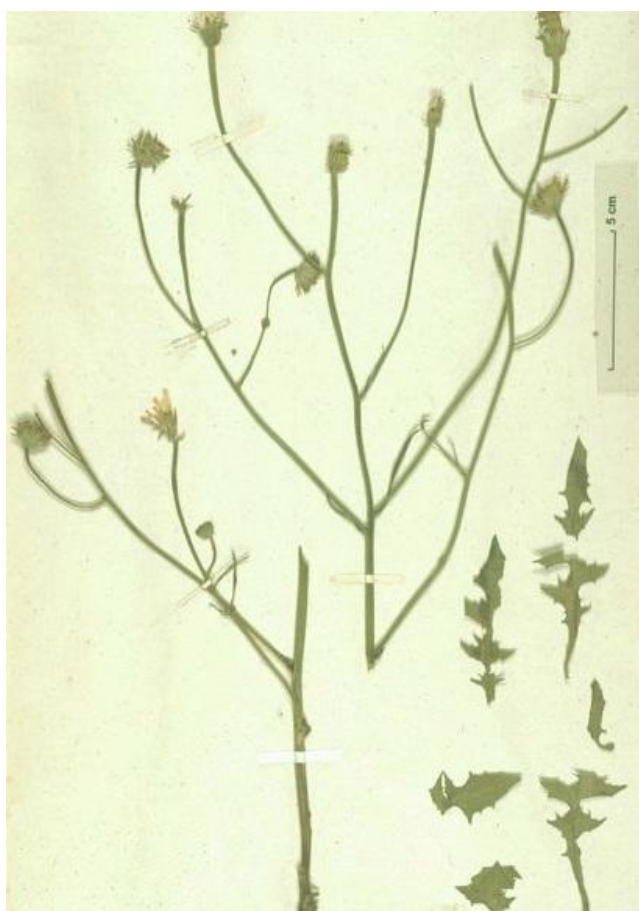
Ο όρος «crepis» θεωρείται ότι προέρχεται από τον αρχαίο ελληνικό όρο «κρήπις» που σημαίνει σαντάλι κι αυτό λόγω της παραπομπής στη διχάλα του σανδαλιού από τα γραμμικά φύλλα, που περικλείουν οι ανθικοί οφθαλμοί του φυτού (Philips, 1824). Στα αγγλικά το κοινό όνομα είναι hawk-beard, στα γαλλικά crépide, στα γερμανικά rippau ή grundfeste, στα ιταλικά Radichiella, στα σουηδικά Fibblor και στα πολωνικά Perawa.

***Crepis dioscoridis* L.** (syn *Endoptera dioscoridis* (L.) DC., *Pterotheca dioscoridis* (L.) Rchb., *Hieracioides dioscoridis* (L.) Kuntze, *Gatyona dioscoridis* (L.) Rchb., *Crepis dentata* Gaterau, Descr., *Crepis tomentosa* Moench.)

Μονοετής πόα με διακλαδισμένο βλαστό όρθιο ή ανιόντα, 10-50 cm ύψους. Κατώτερα φύλλα 4-15 x 1-3cm έμμισχα, προμήκη-αντρωειδή, οδοντωτά ή πτερόλοβα. Τα υπόλοιπα επιφυή, λογχοειδή, βελοειδή στη βάση ή γραμμοειδή. Λεία ή με αραιές αδενώδεις τρίχες. Βράκτια φύλλα γραμμοειδή προς λογχοειδή, οξύληκτα, συχνά φέρουν αδενώδεις τρίχες. Ποδίσκοι κεφαλών λεπτοί, όρθιοι. Περίβλημα αδενώδες. Ανθίδια 11-18mm κίτρινα, ερυθρά-ιώδη στην εξωτερική επιφάνεια.

Απαντάται σε σχεδόν όλη την Ελλάδα, συχνά αναφέρεται με τα ονόματα γαλασιίδα, πικραλίθρα, πικραλίδα. Επίσης απαντάται σε Αλβανία, Ιταλία, Κροατία, ενώ έχει εισαχθεί σε Γαλλία και Νότιο Αυστραλία. Είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό είδος. Έχουν περιγραφεί υποείδη από τον Babcock, αλλά χρειάζονται περαιτέρω πληροφορίες για την επιβεβαίωση του status αυτών.

Regnum - Βασίλειο	Plantae
Divisio - Διαίρεση	Magnoliophyta
Classis - Κλάση	Dicotyledonas
Ordo - Τάξη	Asterales
Tribus - Φυλή	Cichoriae (Lactucae)
Familia - Οικογένεια	Asteraceae (Compositae)
Genus - Γένος	<i>Crepis</i>
Species - Είδος	<i>C. dioscoridis</i> L.



A.2. Δρογοφαρμακολογία-Εθνοφαρμακολογία

Παρά την πληθώρα φυτοχημικών μελετών σε είδη *Crepis*, οι μελέτες για φαρμακολογικές δράσεις του γένους είναι περιορισμένες. Οι Freurentin *et al.* (1986) έδειξαν ότι το αιθανολικό εκχύλισμα του *Crepis ruerpelli* έχει ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες μειώνοντας σημαντικά τη θνησιμότητα σε επίμυες που εκτέθηκαν σε τοξικές δόσεις αιθανόλης. Επιπλέον, το ίδιο εκχύλισμα μείωσε τη δράση της GTP τρανσαμινάσης κατόπιν ηπατίτιδας από τετραχλωράνθρακα. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι το εκχύλισμα του *Crepis vesicaria* προστατεύει το DNA από βλάβης κατόπιν επίδρασης υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα (Kariszewska *et al.*, 2005). Σε άλλη μελέτη, ο γλυκοσίδης του ταραξινικού οξέος απομονωθείς από το *Crepis parifera*, αναστέλλει σημαντικά τις γαστρικές βλάβες, που προκλήθηκαν σε επίμυες με ακετυλοσαλικυλικό οξύ (Wu *et al.*, 2002).

Τα είδη του γένους *Crepis* χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική με ποικίλες εφαρμογές. Στην Ισπανία, από το *Crepis vesicaria* ετοιμάζεται έγχυμα από τα υπέργεια τμήματα και τα άνθη του φυτού, στην οποία αποδίδονται θεραπευτικές ιδιότητες έναντι διαταραχών του στομάχου, καθώς και σε προβλήματα αρτηριακής κυκλοφορίας. Η εξωτερική εφαρμογή του παρασκευάσματος μέσω πλύσεων, κομπρεσών ή καταπλάσμάτων χρησιμοποιείται σε φλεγμονές και ως αναλγητικό σε μώλωπες. Επιπλέον, έχει επουλωτικές και αντισηπτικές ιδιότητες. Στη βορειοδυτική επαρχία της Γρανάδα, μια ομάδα φυτών που φέρουν κίτρινα άνθη περιλαμβάνοντας τα *Crepis vesicaria* ssp. *haenseleri*, *Centaurea granatensis* και *Inula montana* ονομάζονται “άρνικα” και χρησιμοποιούνται με τον ίδιο τρόπο με την πραγματική *Arnica montana* γνωστή για την αντιφλεγμονώδη δράση της, η οποία δεν απαντάται στην περιοχή (González-Tejero *et al.*, 1995).

Στην Ιταλία, στην περιφέρεια Lucca, το *Crepis capillaris* χρησιμοποιείται για την αποτοξίνωση του αίματος και των εντοσθίων (Pieroni, 1999).

Στα Ιμαλαΐα, ο νωπός χυμός του *Crepis flexuosa* αραιωμένος με νερό, καταναλώνεται για την καταπολέμηση του ίκτερου (Singh & Brij, 2007).

Στην Κίνα το *Crepis parifera* χρησιμοποιείται ως αντιβηχικό και αντιφλεγμονώδες.

Στο Καμερούν αναφέρεται η χρήση του *Crepis cameroonica* για την αντιμετώπιση της διάρροιας, πληγών και μυκητιάσεων (Ndorm *et al.*, 2006).

A.3. Δρογοχημεία

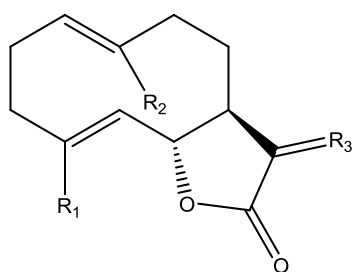
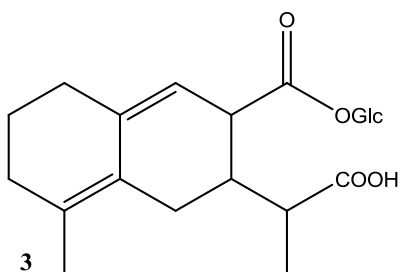
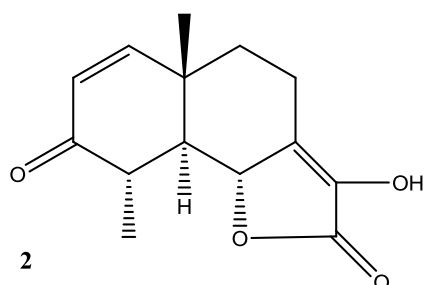
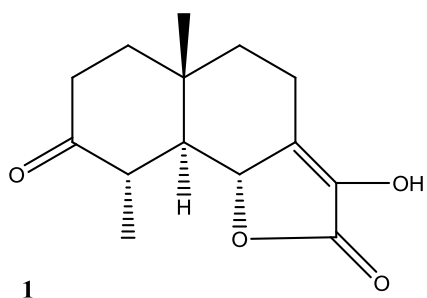
Στην παρούσα βιβλιογραφική μελέτη θα επικεντρώσουμε το ενδιαφέρον μας σε ορισμένες κατηγορίες χημικών ενώσεων, τις σесκιτερπενικές λακτόνες και τα φλαβονοειδή, που έχουν ως σήμερα απομονωθεί από το γένος *Crepis*.

Το σύνολο των βιβλιογραφικών δεδομένων παρουσιάζεται συνοπτικά στον πίνακα που ακολουθεί. Οι ενώσεις ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες των σесκιτερπενίων. Οι ενώσεις 1-3 ανήκουν στα ευδεσμανολίδια και οι ενώσεις 4-6 στα γερμακρानολίδια. Οι ενώσεις 7-9 είναι υποκρετενολίδια. Η πλειονότητα των απομονωθέντων ουσιών 10-46 ανήκει στην κατηγορία των γουαϊανολιδίων.

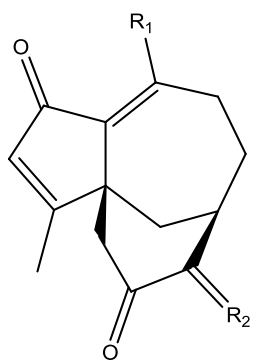
Είδος	Σεσκιτερπενικές λακτόνες	Βιβλιογραφία
<i>Crepis capillaris</i>	Ιντεγκριφολίνη (20) 3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της ιντεγκριφολίνης (21) (22), (24) 8-επι-ισολιπιδιόλη (36) 3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της 8-επι-ισολιπιδιόλης (37) 8-επι-γροσεΐμίνη (44) 8-επι-ισοαμπερμβοΐνη (45)	Berbetti <i>et al.</i> , 1979; Kisiel, 1983
<i>Crepis biennis</i>	Ιξερίνη F (15)	Kisiel <i>et al.</i> , 1987
<i>Crepis pygmaea</i>	1,2-4,5-τετραϋδρο-11νορ-11-υδροξυ-Δ ^{7,11} -σαντονίνη (1) 4,5-διυδρο-11νορ-11-υδροξυ-Δ ^{7,11} -σαντονίνη (2)	Rossi <i>et al.</i> , 1984
<i>Crepis tenctorum</i>	Ιντεγκριφολίνη (20) (22),(24) Τενκτοροσίδης (25) Ισολιπιδιόλη (32) 8-επι-ισολιπιδιόλη (36) 3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της 8-επι-ισολιπιδιόλης (37)	Kisiel <i>et al.</i> , 1989 Adekenov <i>et al.</i> , 1991 Fazylova <i>et al.</i> , 2001
<i>Crepis setosa</i>	11β,13-διυδρο-ζαλουζανίνη C (12) 9α-υδροξυ-11β-13διυδροζαλουζανίνη C (14) Ιξερίνη F (15) (19)	Kisiel <i>et al.</i> , 1990

<i>Crepis crocea</i>	<p>Ιντεγκριφολίνη (20)</p> <p>11βΗ-13-διυδρο Ιντεγκριφολίνη (27)</p> <p>8-επι-ισοαμπερμβοΐνη (45)</p>	Kisiel <i>et al.</i> , 1994
<i>Crepis pulchra</i>	<p>γλυκοζαλουζανίνη C (10)</p> <p>Μακροκλινισίδης A (13)</p> <p>Διασπανοσίδης A (17)</p> <p>8-επι-ισοαμπερμβοΐνη (45)</p>	Kisiel <i>et al.</i> , 1994
<i>Crepis aurea</i>	<p>14-υδροξυ-υποκρετενολίδιο (7)</p> <p>(8), (9)</p>	Kisiel, 1994
<i>Crepis pyrenaica</i>	<p>Μακροκλινισίδης A (13)</p> <p>Ιξερίνη F (15)</p> <p>3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της ιντεγκριφολίνης (21)</p> <p>(22), (24), (35)</p> <p>3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της 8-επι-ισολιπιδιόλης (37)</p>	Kisiel, 1995
<i>Crepis sibirica</i>	<p>γλυκοζαλουζανίνη C (10)</p> <p>3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της ιντεγκριφολίνης (21)</p> <p>8-επι-ισοαμπερμβοΐνη (45)</p>	Kisiel, 1995
<i>Crepis rhoeadifolia</i>	<p>11β,13-διυδρο-γλυκοζαλουζανίνη C (12)</p> <p>Ιξερίνη F (15)</p> <p>(32),(38)</p>	Kisiel, 1996
<i>Crepis foetida</i>	<p>11β,13-διυδρο-γλυκοζαλουζανίνη C (12)</p> <p>(14)</p> <p>Ιξερίνη F (15)</p> <p>(32), (38)</p>	Kisiel, 1999
<i>Crepis aspera</i>	<p>8-επι-ισολιπιδιόλη (36)</p>	Ahmed <i>et al.</i> , 2000
<i>Crepis mollis</i>	<p>Πικρισίδης B (6)</p> <p>11β,13-διυδροζαλουζανίνη C (11)</p> <p>Ιξερίνη F (15)</p> <p>Integrifolina-3β-D-glucopiranosido (21)</p> <p>(22), (24), (27)</p> <p>3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της 11β,13-διυδρο-ιντεγκριφολίνης (28)</p>	Kisiel <i>et al.</i> , 2000

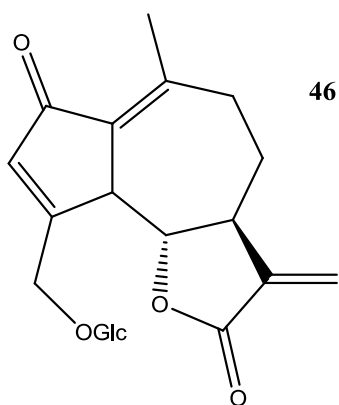
	8-επι-ισολιπιδιόλη (36) 3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της 8-επι-ισολιπιδιόλης (37) (42) 8-επι-γροσεϊμίνη (44)	
<i>Crepis conyzifolia</i>	(33) 8β-υδροξυ-4β,15-διυδροζαλουζανίνη C (34) 8-επι-ισολιπιδιόλη (36) 3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της 8-επι-ισολιπιδιόλης (37)	Kisiel & Michalska, 2001
<i>Crepis multicaulis</i>	Κρεπιδιασίδης A (46)	Fazylova <i>et al.</i> , 2000
<i>Crepis napifera</i>	Ναπιφεροσίδης (3) 1'-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης του ταραξινικού οξέος (4) 1'-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης του 11β,13-διυδρο-ταραξινικού οξέος (5)	Wu <i>et al.</i> , 2002
<i>Crepis zacintha</i>	Πικρισίδης B (6) 11β,13-διυδροζαλουζανίνη C (12) Ιξερίνη F (15) 3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της ιντεγκριφολίνης (21) Ιξερίνη M (23) 8β-υδροξυ-4β,15-διυδροζαλουζανίνη C (34) 3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της 8-επι-ισολιπιδιόλης (37) (32), (35), (38), (40), (41)	Kisiel <i>et al.</i> , 2002
<i>Crepis cameroonica</i>	Διασπανοσίδης A (16) 8-δεσακυλοκυναροπικρίνη (18) (39)	Ndorm <i>et al.</i> , 2006

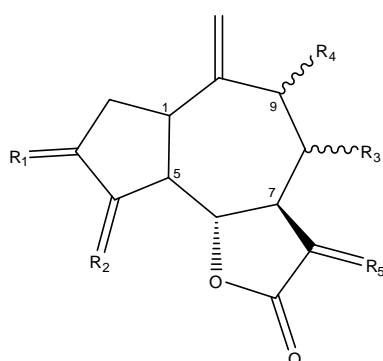


	R₁	R₂	R₃
4	CH ₃	COOGlc	CH ₂
5	CH ₃	COOGlc	αCH ₃ ,β H
6	CH ₂ OGlc	CH ₃	CH ₂



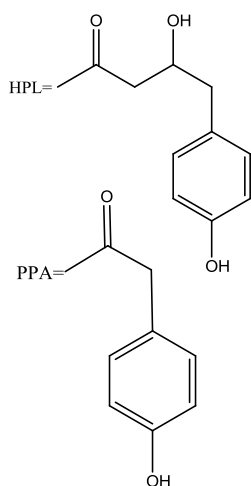
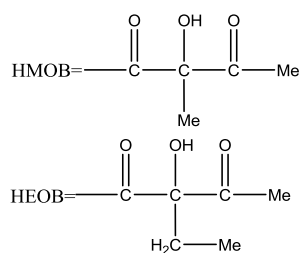
	R₁	R₂
7	CH ₂ OH	CH ₂
8	CH ₂ OGlc	CH ₂
9	CH ₂ OGlc	αH,βCH ₃





[10-45]

Glc= Γλυκόζη



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
10	αH,BOGlc	CH ₂	H	H	CH ₂
11	αH,BOH	CH ₂	H	H	α CH ₂ ,βH
12	αH,BOGlc	CH ₂	H	H	α CH ₂ ,βH
13	αH,BOGlc	CH ₂	H	αOH	CH ₂
14	αH,BOH	CH ₂	H	αOH	α CH ₂ ,βH
15	αH,BOGlc	CH ₂	H	αOH	α CH ₂ ,βH
16	αH,BOH	CH ₂	H	βOH	CH ₂
17	αH,BOGlc	CH ₂	H	βOH	CH ₂
18	αH,BOH	CH ₂	αOH	H	CH ₂
19	αH,BOGlc	CH ₂	αOH	H	α CH ₂ ,βH
20	αH,BOH	CH ₂	βOH	H	CH ₂
21	αH,BOGlc	CH ₂	βOH	H	CH ₂
22	αH,BOGlc	CH ₂	βO-HEOB	H	CH ₂
23	αH,BOGlc	CH ₂	βO-HMOB	H	CH ₂
24	αH,BOGlc	CH ₂	βO-HMOB	H	CH ₂
25	αH,BOGlc	CH ₂	βO-HPL	H	CH ₂
26	αH,BOGlc	CH ₂	βO-PPA	H	CH ₂
27	αH,BOH	CH ₂	βOH	H	α CH ₂ ,βH
28	αH,BOGlc	CH ₂	βOH	H	α CH ₂ ,βH
29	αH,BOGlc	CH ₂	βOH	H	α CH ₂ ,βH
30	αH,BOGlc	α CH ₂ ,βH	H	H	α CH ₂ ,βH
31	αH,BOH	α CH ₂ ,βH	H	αOH	CH ₂
32	αH,BOH	α CH ₂ ,βH	H	αOH	α CH ₂ ,βH
33	αH,BOH	α CH ₂ ,βH	αOH	H	α CH ₂ ,βH
34	αH,BOH	α CH ₂ ,βH	βOH	H	CH ₂
35	αH,BOGlc	α CH ₂ ,βH	βOH	H	CH ₂
36	αH,BOH	α CH ₂ ,βH	βOH	H	α CH ₂ ,βH
37	αH,BOGlc	α CH ₂ ,βH	βOH	H	α CH ₂ ,βH
38	αH,BOH	αH,β CH ₂	H	αOH	α CH ₂ ,βH
39	αH,BOH	αH,β CH ₂	αOH	H	α CH ₂ ,βH
40	αH,BOGlc	αH,β CH ₂	βOH	H	CH ₂
41	αH,BOGlc	αH,β CH ₂	βOH	H	α CH ₂ ,βH
42	O	α CH ₂ ,βH	H	αOH	α CH ₂ ,βH
43	O	α CH ₂ ,βH	αOH	H	CH ₂
44	O	α CH ₂ ,βH	βOH	H	CH ₂
45	O	α CH ₂ ,βH	βOH	H	α CH ₂ ,βH

A.4. Σεσκιτερπενικές λακτόνες (Σκαλτσά Ε., 2004).

Οι σεσκιτερπενικές λακτόνες είναι παράγωγα πολυμερισμού τριών ισοπρενικών μονάδων [$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{CH}_2$], ενωμένων μεταξύ τους κατά κεφαλή με ουρά (head to tail). Χημικά ανήκουν στα τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή. Το 1960 ήταν γνωστές μόνο 12, ενώ σήμερα ο αριθμός τους ανέρχεται περίπου σε 5000. Σαν κοινό δομικό χαρακτηριστικό φέρουν επιπλέον στο μόριό τους έναν γ -βουτυρολακτονικό δακτύλιο. Ο σχηματισμός τους εξαρτάται από τη βιοσυνθετική πορεία που ακολουθεί το φυτό που τις συνθέτει. Ταξινομούνται σε διάφορες ομάδες, ανάλογα με τον καρβοκυκλικό σκελετό (Εικ.3).

Η κατάληξη - ολίδιο αναφέρεται στην παρουσία του γ -λακτονικού δακτυλίου στον σεσκιτερπενικό σκελετό βάσει μη επίσημης ονοματολογίας (το εμπειρικό όνομα σχετίζεται με τη βοτανική προέλευση).

Η χαρακτηριστική ομάδα της λακτόνης συνήθως σχηματίζεται με ένωση ανάμεσα στους άνθρακες C-6 και C-12, αν και υπάρχουν επίσης προϊόντα στα οποία η ένωση λαμβάνει χώρα ανάμεσα στους άνθρακες C-8 και C-12.

Οι σεσκιτερπενικές λακτόνες έχουν έναν εξωμεθυλενικό διπλό δεσμό στον C-11 και αυτή η κατηγορία των σεσκιτερπενικών λακτονών είναι γνωστή με το όνομα: α-μεθυλενο- γ -λακτόνες. Όταν ο διπλός δεσμός έχει αναχθεί, τότε ονομάζονται α-μεθυλο- γ -λακτόνες.

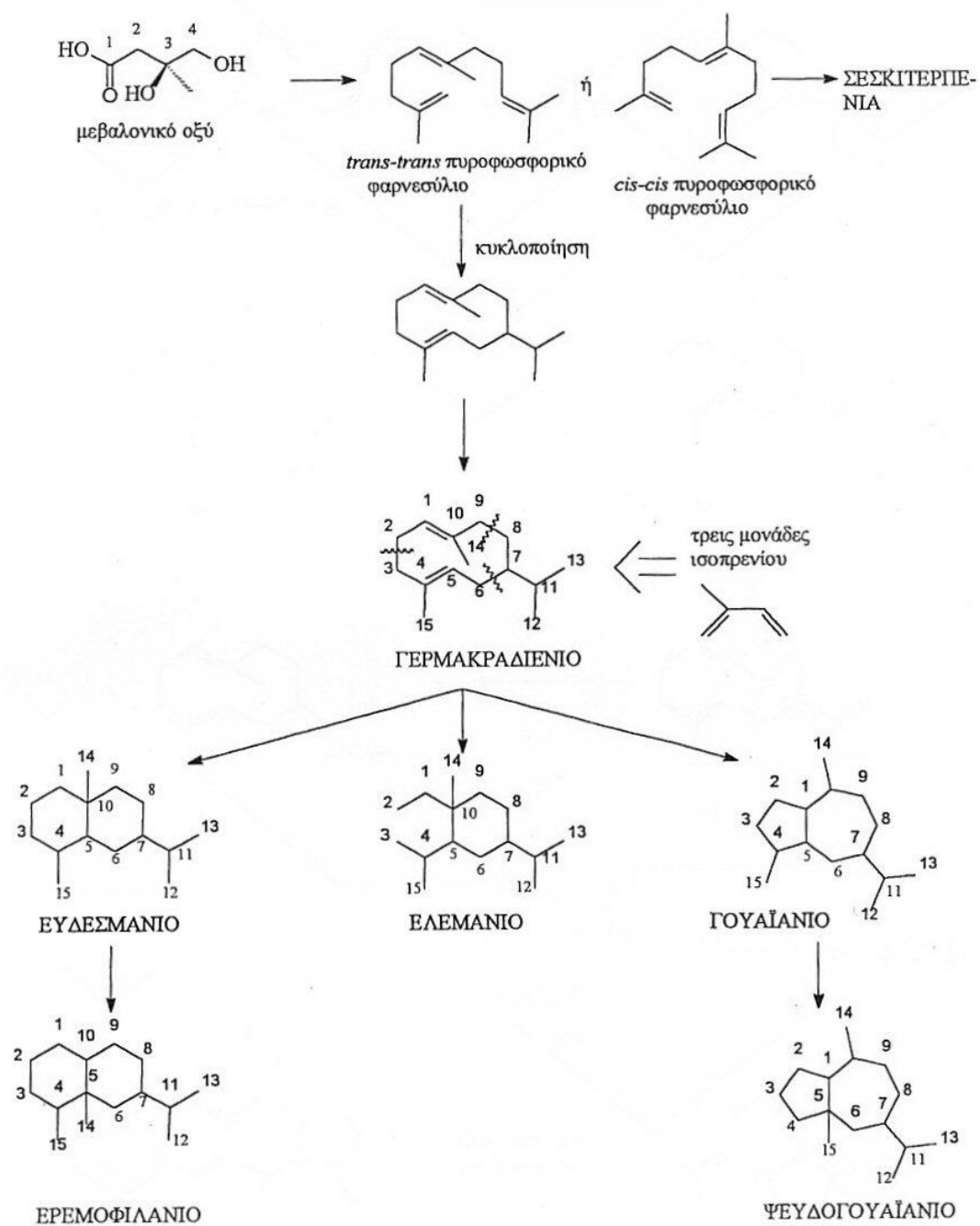
Περιέχουν επίσης ένα πλήθος άλλων χαρακτηριστικών ομάδων, όπως διπλούς δεσμούς, αλκοολικές ομάδες, αιθερομάδες, κετονομάδες, εστερομάδες, καθώς και ετεροάτομα όπως Cl και N. Συχνά τα αλκοολικά υδροξύλια είναι εστεροποιημένα, κυρίως όταν βρίσκονται στις θέσεις 6 και 8, ενώ τα βινυλικά μεθύλια είναι δυνατόν να σχηματίσουν εποξειδία, αλδεΐδες, αλκοόλες, καρβοξυλικά οξέα.

Οι σεσκιτερπενικές λακτόνες, είναι ουσίες άχρωμες, συνήθως ελαιώδεις, άπολες ή αμφίφιλες. Ανευρίσκονται κυρίως στα υπέργεια τμήματα των φυτών, πρωτίστως στα φύλλα, στα άνθη, στις αδενώδεις τρίχες, σπανίως δε στις ρίζες και στη γύρη των ανθέων. Η περιεκτικότητά τους κυμαίνεται από 0.001- 5% του βάρους της ξηρής δρόγης.

Περίπου το 95% των σεσκιτερπενικών λακτονών έχουν απομονωθεί από την οικογένεια Asteraceae (Seaman, 1982, Wagner, 1977, Zdero and Bohlmann, 1990). Δεύτερη σε σειρά η οικογένεια Apiaceae. Συνολικά απαντώνται σε 14 οικογένειες: Acanthaceae, Amaranthaceae, Anacardiaceae, Apiaceae (= Umbelliferae), Aristolochiaceae, Asteraceae, Burseraceae, Cortiariaceae, Cannellaceae, Euphorbiaceae, Hepaticae, Iliaceae, Lauraceae, Lamiaceae, Menispermaceae, Magnoliaceae, Rutaceae, Winteraceae.

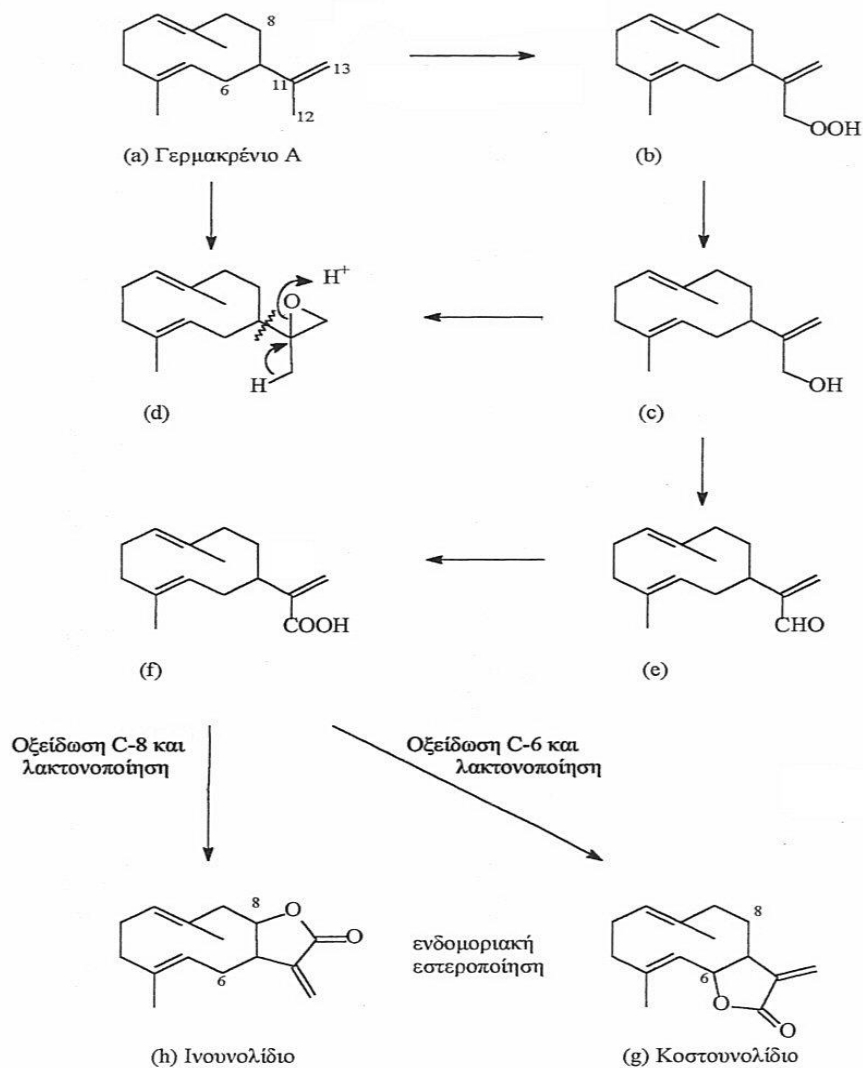
A.4.1. Βιοσύνθεση

Η παραδοχή του ισοπρενίου ως δομικής μονάδας των τερπενίων αποδείχθηκε πολύ χρήσιμη στη μελέτη της βιοσύνθεσης των σεσκιτερπενικών λακτονών. Είναι γενικά παραδεκτό, ότι δύο ισοπρενικά ισομερή προερχόμενα από την βιοσυνθετική οδό



Εικ. 1. Σχηματική πορεία βιοσύνθεσης Σεσκιτερπενικών Λακτονών

του μεβαλονικού οξέος, το πυροφωσφορικό ισοπεντύλιο και το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο αλληλοπροστίθενται σε αναλογία 2:1 και οδηγούν στο *trans-trans* πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο. Τα επόμενα βήματα δεν είναι επακριβώς γνωστά. Σύμφωνα με την επικρατέστερη άποψη το πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο κυκλοποιείται και δίνει το σκελετό του γερμακραδιενίου. Στη συνέχεια αυτό σταθεροποιείται με το σχηματισμό ενός διπλού δεσμού μεταξύ C-11 και C-13 (γερμακρένιο A). Το τελευταίο οξειδώνεται στη μεθυλομάδα της ισοπροπυλικής πλευρικής αλυσίδας, οπότε σχηματίζεται καρβοξυλομάδα. Τέλος εισάγεται μια υδροξυλομάδα στον C-6 ή στον C-8, η οποία αντιδρά με την καρβοξυλομάδα (ενδομοριακή εστεροποίηση) και δίνει τον γ- λακτονικό δακτύλιο. Πριν ή μετά τη λακτονοποίηση είναι δυνατόν να λάβουν χώρα διάφορες μεταβολές στο μόριο του πρόδρομου γερμακρενίου, οπότε λαμβάνουμε τους βασικότερους σκελετικούς τύπους των σεσκιτερπενικών λακτονών. Γενικά, τα πρώτα βιοσυνθετικά στάδια περιλαμβάνουν αντιδράσεις αναγωγής ενώ τα επόμενα αντιδράσεις οξείδωσης (Εικ.4, 5).



Εικ. 2. Βιοσύνθεση του Λακτονικού Δακτυλίου.

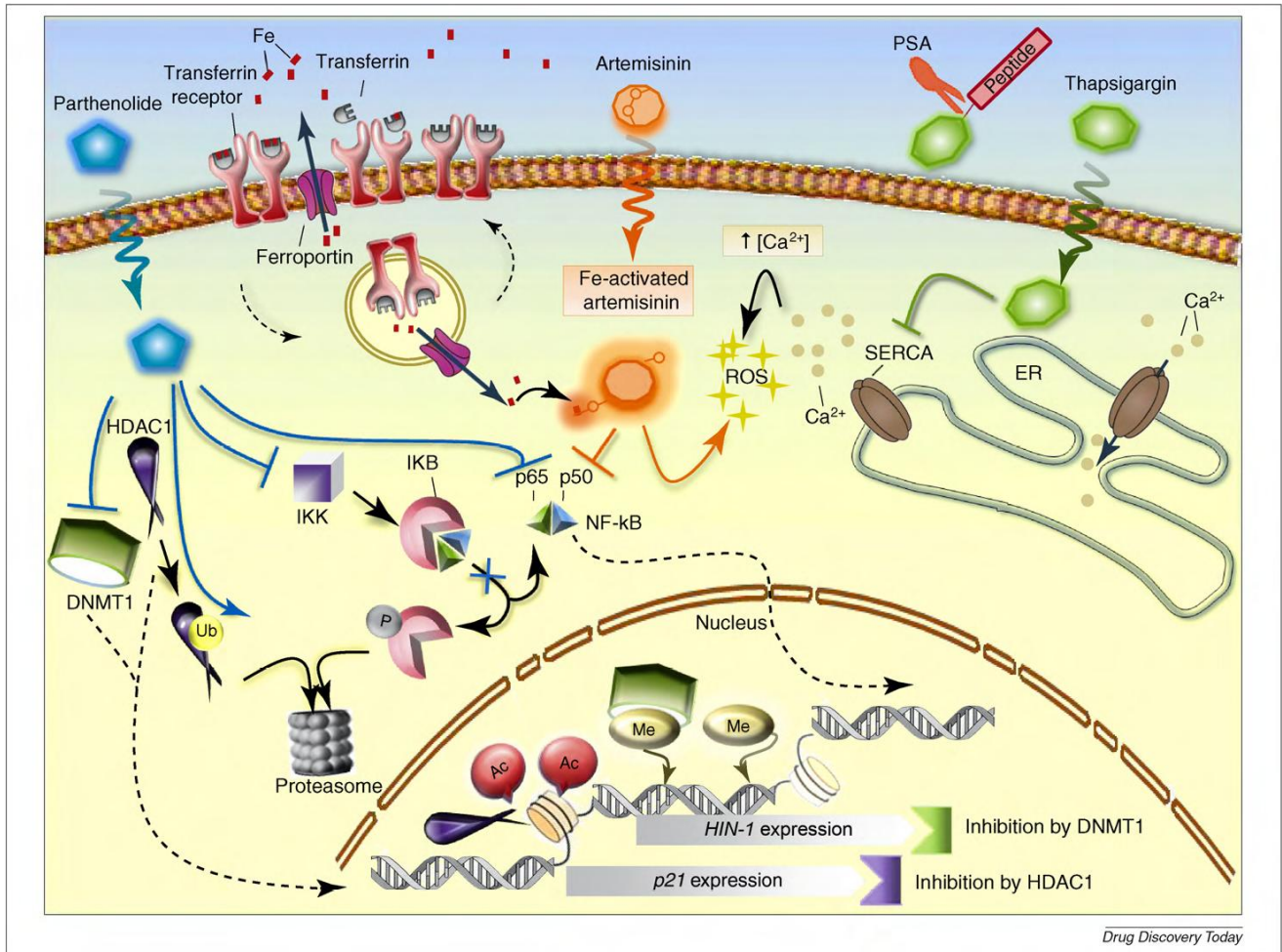
A.4.2. Νεότερα δεδομένα για την αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση των σεσκιτερπενικών λακτονών

In vivo μελέτες έδειξαν ότι οι σεσκιτερπενικές λακτόνες ασκούν αντιφλεγμονώδη δράση μέσω αναστολής της εξωκύττωσης της καθεψίνης G και όξινης φωσφατάσης από πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα επιμυος, μέσω της αναστολής έκκρισης ισταμίνης από ανθρώπινα ουδετερόφιλα, μέσω αναστολής της δράσης της 5-λιποοξεγενάσης και της C4 συνθάσης των λευκοτριενίων. Το πιο σημαντικό σημείο επέμβασης των σεσκιτερπενικών λακτονών είναι η αναστολή των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB, NFAT και την ενεργοποιού πρωτεΐνης 1(AP-1) (Siedle *et al.*, 2004). Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη φλεγμονή και στο ανοσοποιητικό σύστημα και εμπλέκονται στο τοξικό shock, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και τον καρκίνο. ως απάντηση σε ουσίες-σήματα της φλεγμονής όπως οι ιντερλευκίνες 1, 2 και 6, ο NF-κB ρυθμίζει τουλάχιστον 150 γονίδια-κλειδιά όπως αυτά της κωδικοποίησης ανοσοϋποδοχέων, της έκκρισης παραγόντων συγκόλλησης κυττάρων και της μεταγραφής των ενζύμων iNOs και κυκλοοξεγενάσης-2. Οι σεσκιτερπενικές λακτόνες αναστέλλουν τον NF-κB αλκυλιώνοντας την υπομονάδα p65 που βρίσκεται στο κυτοσόλιο και εμποδίζουν τη μετάβασή της στον πυρήνα του κυττάρου. Σεσκιτερπενικές λακτόνες που φέρουν α,β- ή α,β,γ- ακόρεστα καρβονύλια όπως ο α,β-μεθύλενο λακτόνικό δακτύλιο ή α,β ακόρεστη κυκλοπεντενόνη δρουν μέσω πυρηνόφιλης προσθήκης τύπου Michael, αντιδρώντας με πυρηνόφιλα κέντρα όπως αυτά των σουλφυδριλικών ομάδων.

Σήμερα, η αρτεμισινίνη από το φυτό *Artemisia annua* L. , το παρθενολίδιο από το *Tanacetum parthenum* της οικογένειας Compositae και η θαψιγαρίνη από το γένος *Thapsia* της οικογένειας Apiaceae καθώς και ημισυνθετικά παράγωγα αυτών βρίσκονται σε κλινικές μελέτες. Τα παράγωγα της αρτεμισινίνης βρίσκονται ήδη σε κλινικές φάσεις I και II κατά του ερυθρματώδους λύκου, της νεφρίτιδας και των καρκίνων του μαστού, του παχέος εντέρου και του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Τα προφάρμακα της θαψιγαρίνης βρίσκονται σε κλινική φάση I κατά των καρκίνων του μαστού, του ήπατος και του προστάτη. Τέλος το *per os* βιοδιαθέσιμο διμεθυλάμινο-παρθενολίδιο (LC-1) είναι σε κλινική φάση I κατά της λευχαιμίας και διαφόρων τύπων καρκίνων λεμφαδένων. Η εκλεκτικότητα στη δράση των παραπάνω φαρμάκων εντοπίζεται στην ικανότητά τους να στοχεύουν την ΑΤΡάση του σαρκοενδοπλασματικού δικτύου, ειδικές πρωτεάσες και το υψηλό επίπεδο υποδοχέων τρανσφερίνης που εκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα, τη δράση στο μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, την αποδόμηση του ογκογόνου παράγοντα MDM2, την αναστολή της αγγειογένεσης και της μετάστασης.

Επιπλέον, βρέθηκε πως ορισμένα γουαϊανολίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά των οιστογονοεξαρτόμενων καρκίνων όπως αυτόν του μαστού, καθώς έχουν

τη δυνατότητα να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου αρωματάση (Blanco *et al.*, 1997). Σημειώνεται, πως αυτή η δράση είναι ανεξάρτητη από την ύπαρξη της δραστικής α-μεθυλενο-γ-λακτόνης, που συνήθως είναι υπαίτια για την τοξική δράση των σεσκιτερπενικών λακτονών (Blanco *et al.*, 2001).



Εικόνα 3: Σχηματική απόδοση του μοριακού μηχανισμού αντικαρκινικής δράσης των σεσκιτερπενικών λακτονών σε κλινική μελέτη (Ghantus *et al.*, 2010)

1. Το παρθενολίδιο αναστέλλει τη DNA μεθυλοτρανσφεράση DNMT1 καθώς και το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB ο οποίος υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα.
2. Η αρτεμισίνη στα καρκινικά κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν υποδοχείς τρανσφερίνης, ενεργοποιείται προς κυτταροτοξικά παράγωγα αυτής
3. Η θαψιγαρίνη αποδεσμεύεται από το πεπτιδίο-φορέα της χάρη στη πεπτιδάση PSA η οποία εκφράζεται μόνο από τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Στη συνέχεια αναστέλλει τις αντλίες ασβεστίου του ενδοπλασματικού δικτύου με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου στο κυττόςολιο και στη συνέχεια τον κυτταρικό θάνατο.

B.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

B.1.1. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

α. Χρωματογραφία επί λεπτής στιβάδας

Γέλη οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20cm. Πάχος στιβάδας 0.1mm (Kieselgel F254, Merck, Art. 5554) (αναλυτική χρωματογραφία).

Γέλη οξειδίου του πυριτίου αντιστρόφου φάσεως με δείκτη φθορισμού σε γυάλινες πλάκες 5 x 10cm. Πάχος στιβάδας 0.25mm (Kieselgel F254, Merck, Art. 15685) (αναλυτική χρωματογραφία).

Κελλουλόση χωρίς δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20 cm. Πάχος στιβάδος 0.1mm (Merck, Art. 5552) (αναλυτική χρωματογραφία).

β. Χρωματογραφία στήλης

Γέλη οξειδίου του πυριτίου 60H για χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Kieselgel 60H, Merck, Art. 7736). Λόγω του εξαιρετικά μικρού μεγέθους των κόκκων, ο ρυθμός έκλουσης είναι βραδύς και αντιμετωπίστηκε με εφαρμογή κενού.

Γέλη οξειδίου του πυριτίου 60, 230-400 mesh ASTM, για χρωματογραφία στήλης (SDS 2050044).

γ. Χρωματογραφία στήλης υπό κενό [VLC, Vacuum Liquid Chromatography]
(Coll & Bowden, 1986)

δ. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) (Hostettmann *et al.*, 1998).

Χρησιμοποιήθηκε, επίσης, η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (**HPLC, High Performance Liquid Chromatography**) στον ακόλουθο χρωματογράφο: Ανιχνευτής διαθλασιμέτρου: RID Detector Shimadzu 10A με αντλία Jasco PU-2080 Plus Isocratic. Στήλη αντιστρόφου φάσης (reversed phase): Kromasil C18 Semi-prep (250 x10 mm). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν μίγματα μεθανόλης:νερού. Ταχύτητα ροής: 1.5-2 ml/min. Περιεκτικότητα των προς μελέτη κλασμάτων: 7mg/ml.

Χρωματογραφικά αντιδραστήρια

Τα χρωματογραφήματα παρατηρούνται κατ' αρχήν στο υπεριώδες φως (254nm, 366nm). Για την εμφάνισή τους χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

➤ για τις σεσκιτερπενικές λακτόνες:

α. Διάλυμα ανισαλδεΐδης-θειϊκού οξέος (0.5 ml ανισαλδεΐδης + 1 ml πυκνό θειϊκό οξύ + 50 ml οξικού οξέος) και στη συνέχεια θερμαίνονται επί 5 λεπτά στους

105 °C. Οι σεσκιτερπενικές λακτόνες μετά από ψεκάσμο εμφανίζουν διάφορους χρωματισμούς.

β. Αντιδραστήριο βανιλίνης:

- Διάλυμα Α: βανιλίνη (Merck, Art. No. S26047 841) 5% σε μεθανόλη.
- Διάλυμα Β: π. H₂SO₄ 5% σε μεθανόλη (Liskens 1959).

Ίσοι όγκοι αναμιγνύονται αμέσως πριν τον ψεκάσμο και το χρωματογράφημα θερμαίνεται για 5 min στους 105 °C.

➤ **για τα φαινολικά παράγωγα:**

γ. Αντιδραστήριο Neu:

β-αμινοαιθυλεστέρας του διφαινυλοβορικού οξέος, διάλυμα 1% σε μεθανόλη (Neu, 1957).

B.1.2. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

α. Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR) Τα φάσματα υπερύθρου ελήφθησαν από φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer FT-IR Spectrometer Paragon 500, χρησιμοποιώντας CHCl₃ (Lab-Scan Code no. A3505E) επί κρυστάλλων KBr.

β. Φασματοσκοπία Υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) (Mabry *et al.*, 1970).

Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-160 A.

γ. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Για την λήψη των φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού **NMR** (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι φασματογράφοι:

❖ Φασματογράφος Bruker AC 200 (200.13 MHz για ¹H-NMR και 50.3 MHz για ¹³C-NMR)

❖ Φασματογράφος Bruker DRX 400 (399.95 MHz για ¹H-NMR).

Τα φάσματα ελήφθησαν με τους ακόλουθους διαλύτες: CDCl₃ δίχως εσωτερικό πρότυπο, λαμβάνοντας το σήμα του διαλύτη ως αναφορά (7.24 ppm για ¹H-NMR και 77.0 ppm για ¹³C-NMR) και CD₃OD (3.31 ppm για ¹H-NMR και 49.5 ppm για ¹³C-NMR).

Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε δ (ppm) και οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hertz (Hz).

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες τεχνικές:

DEPT (Distorsionless Enhancement by Polaritation Transfer) για τον προσδιορισμό της πολυπλοκότητας των σημάτων στα φάσματα ¹³C-NMR.

COSY (COrrrelation SpectroscopY).

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).

HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy).

ROESY (Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy).

δ. Φασματοσκοπία μάζης

HR-EI-MS: *Thermo LTQ Orbitrap* (FT-MSn) mass spectrometer; in *m/z* (University of Florence, Italy).

ε. Ειδική γωνία στροφής $[\alpha]_D^{20}$

Πολωσίμετρο Perkin-Elmer Polarimeter 341. Κυψελίδα μήκους 10 cm. Χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα των ουσιών σε CH₃OH (g/100 ml) (Lab-Scan Code no. A3505E).

B.1.3. ΔΙΑΛΥΤΕΣ

Η χρήση των διαλυτών έγινε κατόπιν αποστάξεως με εξαίρεση τη μεθανόλη.

Για την HPLC χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι διαλύτες: μεθανόλη, νερό. Πριν χρησιμοποιηθούν οι διαλύτες στην HPLC διηθήθηκαν υπό κενό και απαερώθηκαν.

B.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΗΣ ΔΡΟΓΗΣ

Crepis dioscoridis L.

Φυτικό υλικό: Το φυτό συλλέχθηκε τον Ιούνιο του 2008 από το όρος Μπούμιστος του νομού Αιτωλοακαρνανίας. Χρησιμοποιήθηκαν 0.22 kg υπέργειων τμημάτων ξηρού φυτού, αδρομερώς τετμημένων.

Εκχύλιση: Αρχικά, η δρόγη εκχυλίσθηκε σε θερμοκρασία δωματίου με το μίγμα των διαλυτών: κυκλοεξάνιο-αιθέρα-μεθανόλη (1:1:1). Στη συνέχεια εκχυλίστηκε με μίγμα μεθανόλη: νερό (5:1).

Τα εκχυλίσματα, από το πρώτο μίγμα διαλυτών, εκπλύθηκαν με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl και στην συνέχεια η υδατική στιβάδα εκχυλίσθηκε με EtOAc. Η οργανική φάση [CRE-A] περιείχε τις προς μελέτη ουσίες, οπότε υποβλήθηκε σε περαιτέρω κατεργασία.

Από την εκχύλιση της δρόγης με το μίγμα διαλυτών μεθανόλη: νερό (5:1) παραλήφθηκε το κλάσμα CRE-B.

Κατά την μελέτη αυτή, τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα, καθώς και τα κλάσματα από τις χρωματογραφίες στήλης και HPLC, εξατμίζοντο σε χαμηλή θερμοκρασία (40°C) σε περιστροφική συσκευή αποστάξεως υπό κενό. Όλα τα υπολείμματα, καθώς και οι ουσίες, που απομονώθηκαν διατηρήθηκαν σε ξηραντήρα υπό κενό, που περιείχε γέλη πυριτικού οξέος με δείκτη υγρασίας, καθώς και πεντοξείδιο του φωσφόρου (P2O5, Merck, Art. 540).

B.3. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ

- CRE-A

Το υπόλειμμα του EtOAc (2.58 g) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης υπό κενό (V.L.C., 7.0 cm x 10.0 cm) επί γέλης πυριτίου με υγρό έκλυσης μίγματα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας: κυκλοεξάνιο, οξικό αιθυλεστέρα, ακετόνη και μεθανόλη.

Για τον έλεγχο και ομαδοποίηση των εκλούμενων κλασμάτων χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επί γέλης πυριτίου, χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο εμφάνισης θειική βανιλίνη. Η περαιτέρω μελέτη κάθε κλάσματος ή ομάδας βασίσθηκε στα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας ¹H-NMR.

Ελήφθησαν εννέα κλάσματα.

Το πρώτο, το δεύτερο, τρίτο, τέταρτο και το πέμπτο κλάσμα: CRE-AA (29.5 mg) {κυκλοεξάνιο 100%}, CRE-AB (3.1 mg) {κυκλοεξάνιο: EtOAc 75:25}, CRE-AC (54.1 mg) {κυκλοεξάνιο: EtOAc 50:50}, CRE-AD (47.3 mg) {κυκλοεξάνιο: EtOAc 25:75}, CRE-AE (25.8 mg) {EtOAc 100%} δεν αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης, διότι τα φάσματα ¹H-NMR δεν έδειξαν την παρουσία σεσκιτερπενικών λακτονών ή φλαβονοειδών.

Το έκτο, έβδομο, όγδοο, ένατο και δέκατο κλάσμα: CRE-AF (55.2 mg) {EtOAc: Me₂CO 90:10}, CRE-AG (25.5mg) { EtOAc: Me₂CO 75:25}, CRE-AH (18.5 mg) {Me₂CO 100%}, CRE-AI (43.6 mg) {Me₂CO: MeOH 50:50}, CRE-AJ (681,2 mg) {MeOH 100%}, αποτέλεσαν αντικείμενο αναλυτικής μελέτης και απομονώθηκαν 15 ουσίες. Λόγω ομοιότητας του φάσματος ¹H-NMR και του αναπτύγματος της χρωματογραφίας TLC, τα κλάσματα CRE-AG και CRE-AH συνενώθηκαν στο κλάσμα CRE-AG' (44.0 mg)

Κλάσμα CRE-AF (55.2 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP-HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH:H₂O 3:2 (HPLC-CRE-1). Απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε η ουσία **10** [8-επι-γροσειμίνη] (Rt= 9.45 min, 3.4 mg), η ουσία **1** [8-δεοξολακτουκίνη] (Rt= 10.45 min, 1.1 mg), η ουσία **4** [ιντεγριφολίνη] (Rt= 11.08 min, 1.4 mg) και η ουσία **6** [11β-13-διυδρο-ιντεγκριφολίνη] (Rt= 12 min, 2.4 mg).

Κλάσμα CRE-AG' (25.5mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP-HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH: H₂O 3:2 (HPLC-CRE-2). Δεν απομονώθηκε κάποια καθαρή ουσία.

Κλάσμα CRE-AI (43.6 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP-HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH: H₂O 3:2 (HPLC-CRE-3). Δεν απομονώθηκε κάποια καθαρή ουσία.

Κλάσμα CRE-AJ (681.2 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (12.0 cm x 3.5 cm) επί γέλης πυριτίου με υγρό έκλουσης μίγματα διαλυτών κυκλοεξάνιο: CH₂Cl₂: MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 95 κλάσματα μέσου όγκου 30 ml, τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες:

CRE-AJA (1&2, 2.8 mg) {κυκλοεξάνιο 100%}, CRE-AJB (3→10, 6.6 mg) {CH₂Cl₂ 100%-CH₂Cl₂: MeOH 98:2}, CRE-AJC (11 →13, 6.6 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 98:2 - CH₂Cl₂: MeOH 97:3}, CRE-AJD (14, 3.2 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 97:3}, CRE-AJE (15 →19, 1.3 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 95:5}, CRE-AJF (20 →22, 21.3mg) {CH₂Cl₂: MeOH 95:5}, CRE-AJG (23 →25, 1.6 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 95:5}, CRE-AJH (26 →29, 2.7 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 95:5 - CH₂Cl₂:

MeOH 90:10}, CRE-AJI (30 →36, 7.7 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 90:10}, CRE-AJJ (37 →46) {CH₂Cl₂: MeOH 90:10 - CH₂Cl₂: MeOH 85:5}, CRE-AJK (47 →48, 38.2 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 85:5 - CH₂Cl₂: MeOH 80:20}, CRE-AJL (49 →55, 122.3 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 80:20}, CRE-AJM (56 →67, 52.5 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 75:25}, CRE-AJN (68 →78, 54.4 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 70:30- CH₂Cl₂: MeOH 65:35}, CRE-AJO (79 →84, 35.9 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 60:40}, CRE-AJP (85 →94, 41.1 mg) {CH₂Cl₂: MeOH 50:50- MeOH 100%}, CRE-AJQ (95, 60.3 mg) {MeOH 100%}.

Το κλάσμα CRE-AJF (21.3 mg) ταυτοποιήθηκε ως *E*-φερουλικό οξύ (ουσία **14**). Τα κλάσματα CRE-AJK, CRE-AJL, CRE-AJM παρουσίασαν ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη κατόπιν χρωματογραφικού και φασματοσκοπικού ελέγχου.

Κλάσμα CRE-AJK (38.2 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP-HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH: H₂O 9:11 (HPLC-CRE-6). Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι ουσίες **5** [3-β-D-γλυκοκυρανοσίδης της ιντεγκριφολίνης] (Rt=18.49 min, 3.9 mg), **15** (7-β-D-γλυκοκυρανοσίδης της σαλκυλικής αλκοόλης] (Rt=9.73, 4.4 mg), **2** [κρεπισίδης C] (Rt= 11.1 min, 3.9 mg), **3** [11β-13-διυδρο κρεπισίδης C] (Rt=12.91 min, 1.6 mg), **7** [3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της 11β-13 διυδρο-ιντεγκριφολίνης] (Rt=21.71 min, 2.2 mg), **8** [μακροκλινισίδης F] (Rt=15.68, 1.4mg), **9** (Rt=10.42 min, 1.0 mg) και **12** [απιγενινο-4'-β-D-γλυκοσίδης] (Rt= 24.42 min, 1.1 mg).

Κλάσμα CRE-AJL (122.3 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP-HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH: H₂O 1:1 (HPLC-CRE-4). Δεν απομονώθηκε κάποια καθαρή ουσία.

Κλάσμα CRE-AJM (52.5 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (6.0 cm x 3.5 cm) επί γέλης πυριτίου με υγρό ισοκρατικής έκλουσης μίγματα CH₂Cl₂ : MeOH 85:15. CRE-AJMA (1 →18, 22.6 mg), CRE-AJMB (19 →34, 13.1 mg), CRE-AJMC (36 →39, 3.0 mg)

Το κλάσμα CRE-AJMC ταυτοποιήθηκε ως ουσία **5** [3-β-D-γλυκοκυρανοσίδης της ιντεγκριφολίνης.

- CRE-B

Από το εκχύλισμα μεθανόλης: νερού 5:1 (CRE-B) λήφθηκαν 3.14g και υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία στήλης (10.0 cm x 3.5 cm) επί γέλης πυριτίου με υγρό έκλουσης μίγματα διαλυτών κυκλοεξάνιο: CH₂Cl₂:MeOH αυξανόμενης πολικότητας. Ελήφθησαν 90 κλάσματα μέσου όγκου 30 ml, τα οποία κατόπιν ελέγχου με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας συνενώθηκαν στις ακόλουθες ομάδες: CRE-BA (1→13, 20.4mg), CRE-BB (14→16, 36.5 mg), CRE-BC (17→21, 9.0 mg), CRE-BD (22→39, 104.1 mg), CRE-BE (40→44, 62.4 mg), CRE-BF (45→50, 158 mg), CRE-BG (51→61, 310.5 mg), CRE-BH (62→69, 547.6 mg), CRE-BI (70→90, 1.28 g)

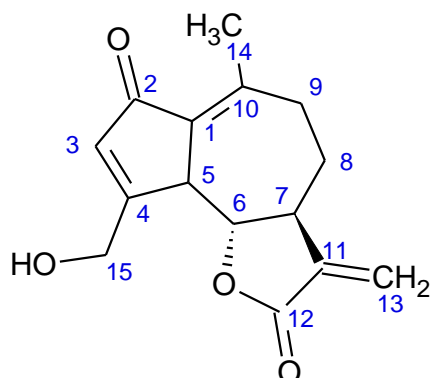
Το κλάσμα CRE-BE παρουσίασε ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη κατόπιν χρωματογραφικού ελέγχου.

Κλάσμα CRE-BE (62.4 mg)

Υποβλήθηκε σε χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως (RP-HPLC) με διαλύτη έκλουσης MeOH: H₂O 1:1 (HPLC-CRE-5). Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι ουσίες **13** [E-καφεϊκό οξύ] (Rt= 15.2 min, 6.3 mg) και **15** [ισοσαλικίνη] (Rt=8.7 min, 9.3 mg). Επίσης απομονώθηκε η ουσία **5** [3-β-D-γλυκοκυρανοσίδης της ιντεγκριφολίνης] (Rt= 16.31 min, 1.1 mg) με προσμίξεις.

Ουσία 1:

(3a*S*,9a*S*,9b*S*)-9-(υδροξυμεθυλο)-6-μεθυλο-3-μεθυλενο-3,3a,4,5-τετραϋδρο-αζουλενο[4,5-*b*]φουρανο-2,7-διόνη [= 8-δεοξυλακτουκίνη]



Η ουσία **1** έχει απομονωθεί σχεδόν από όλα τα γένη του tribe Cichoriae (Zidorn, 2008) και είναι σημαντική ένδειξη, καθώς θεωρείται ο κατά ένα βήμα μεταγενέστερος του κοστουνολιδίου βιοσυνθετικός προπάτορας των γουαϊανολιδίων.

Η παρουσία της στο εκχύλισμα του *Cichorium intibus* L. του αποδίδει ισχυρές αντιμυκητησιακές ιδιότητες (Mares *et al.*, 2005). Επίσης, η παρουσία της στο γαλακτώδη σπό του *Cichorium intibus* L. ενισχύει την αντιτροφική δράση που έχει το έκκριμα (Rees *et al.*, 1985).

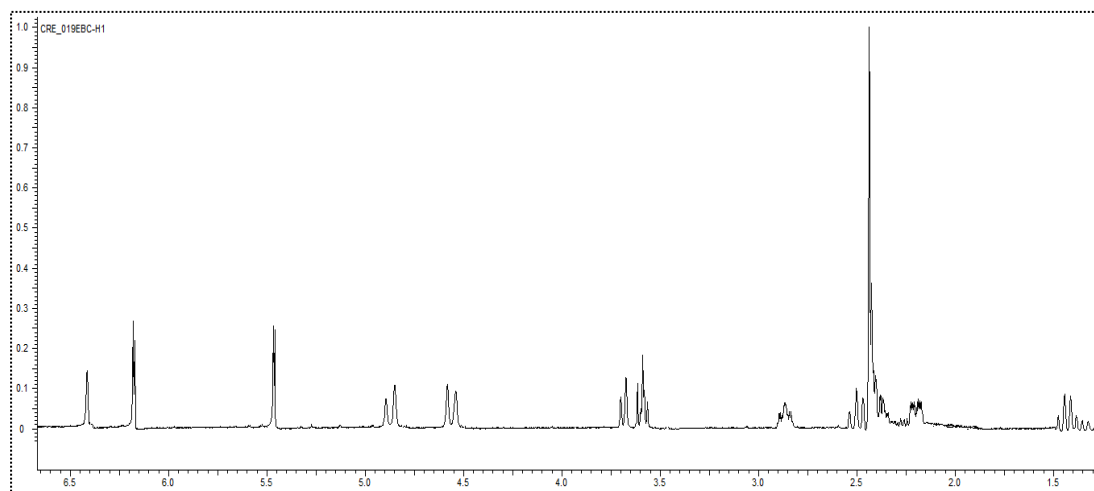
Η χημική μετατόπιση των ανθράκων C₁-C₅, καθώς και του όξινου πρωτονίου H-3 υποδεικνύουν την ύπαρξη δομής κυκλοπεντενόνης. Η χημική μετατόπιση του πρωτονίου H-3 ερμηνεύεται από τη συμμετοχή του στη συζυγία μεταξύ του διπλού δεσμού των θέσεων 3,4 και του καρβονυλίου της θέσης 2 (α,β ακόρεστη κετόνη).

Από το spin σύστημα H-5, H-6, H-7, H-8, H-9 και H-7, H-13 φαίνεται ότι στο δακτύλιο της κυκλοπεντενόνης είναι προσαρτημένος ένας επταμελής δακτύλιος. Στο φάσμα ¹H-NMR παρατηρείται το εξωμεθυλένιο της θέσης 13, το βινυλικό μεθύλιο της θέσης 14 και η υδροξυμεθυλομάδα στην οποία συμμετέχει ο C15. Οι θέσεις των παραπάνω χαρακτηριστικών ομάδων επιβεβαιώνονται από το φάσμα HMBC. Το πρωτόνιο H-6 σε δ 4.43 (dd, J_{6,5}=10.30 Hz, J_{6,7}=9.90 Hz) με τις μεγάλες συζεύξεις δείχνει ότι βρίσκεται σε *trans*-*diaxial* διάταξη με τα πρωτόνια H-5 και H-7 .

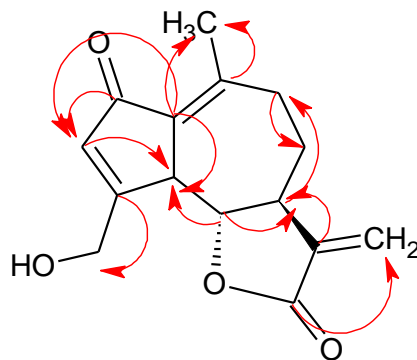
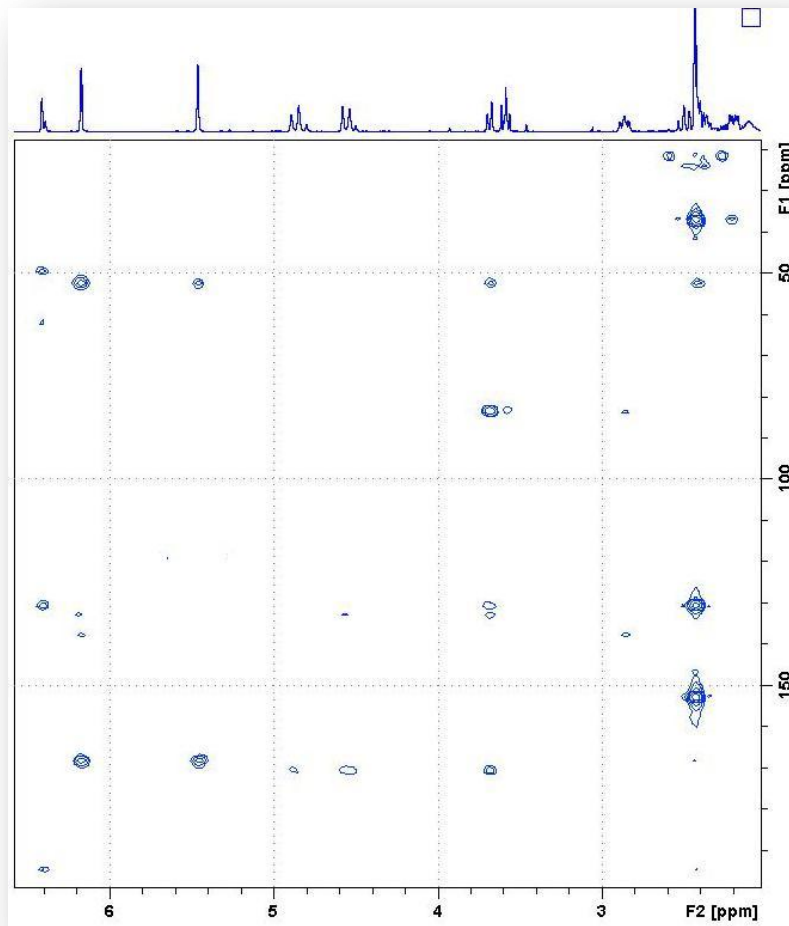
Πίνακας 1: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ ουσίας 1 (CDCl_3 , 400MHz).

Θέση	$\delta \text{ C}^*$	Τύπος	$\delta \text{ H}$	Αριθμός H	Πολλαπλότητα	J (Hz)
1	130.8	C				
2	194.7	C				
3	133.2	CH	6.41	1	s	-
4	170.5	C				
5	49.5	CH	3.67	1	d	10.3
6	83.7	CH	3.59	1	dd	10.3, 9.8
7	52.6	CH	2.87	1	td	9.8, 3.1
8a	24.0	CH ₂	2.20	1	m	-
8b			1.41	1	m	-
9a	37.3	CH ₂	2.50	1	m	-
9b			2.38		m	-
10	152.8	C				
11	137.9	C				
12	168.3	C				
13a	119.1	CH ₂	6.18	1	d	3.1
13b			5.46	1	d	3.1
14	21.7	CH ₃	2.44	3	s	-
15a	62.4	CH ₂	4.87	1	d	17.2
15b			4.56	1	d	17.2

*Οι χημικές μετατοπίσεις των των ανθράκων αποδόθηκαν από τα πειράματα HSQC και HMBC.



Εικόνα 4: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ ουσίας 1



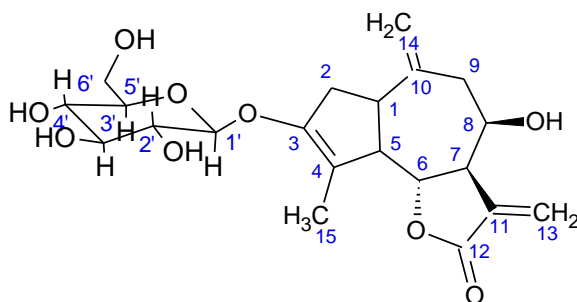
Εικόνα 5: Φάσμα HMBC και σχηματική απόδοση των σημάτων C->H της ουσίας 1

Ουσία 2:

(3aR,4R,6aR,9aR,9bR)-4-υδροξυ-9-μεθυλο-3,6-διμεθυλενο-8-(2S,3R,4R,5S,6R)-

3,4,5-τριυδροξυ-6-(υδροξυμεθυλο)τετραϋδρο-2H-πυρανοϋλο-2-οξυ)-

3a,4,5,6,6a,7,9a,9b-οκταϋδρο-αζουλενο[4,5-b]φουραν-2(3H)-όνη [= Κρεπισίδης C]



Η ουσία απομονώθηκε υπό τη μορφή άχρωμων βελονοειδών κρυστάλλων.

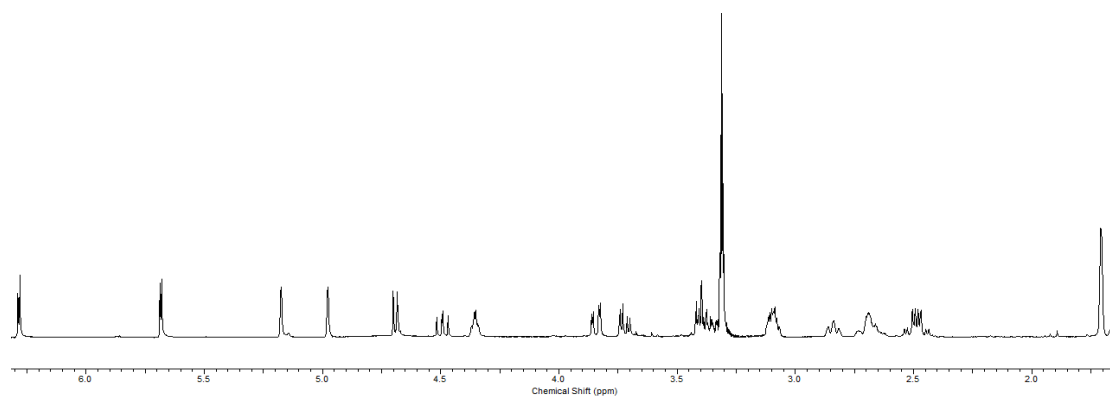
Έχει απομονωθεί από τα φυτά *Crepis japonica* Benth. (Miyase *et al.*, 1985) και *Youngia japonica* DC. (Emico *et al.*, 2009), ενώ περιγράφεται και ως προϊόν υδρόλυσης του υδροξυϊσοβαλεριανικού εστέρα της από το φυτό *Ixeris stolonifera* A. Gray (Nishimura *et al.*, 1984). *In vitro* έδειξε ισχυρή αντιαλλεργική δράση, αναστέλλοντας 100% το λυσοσωμικό ένζυμο εξοζαμινιδάση (Emico *et al.*, 2009).

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούμε την ύπαρξη δύο εξωμεθυλενίων και ενός βινυλικού μεθυλίου. Η χαρακτηριστική μετατόπιση των πρωτονίων των θέσεων 13 και 14, καθώς και το spin σύστημα H-2, H-1, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το βινυλικό μεθύλιο βρίσκεται στη θέση 15. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από τα σήματα του φάσματος HMBC μεταξύ CH_3 -15 (1.71ppm, 3H, s), C-3 (152.0 ppm) και C-5 (55.2 ppm). Επίσης, από το φάσμα HMBC φαίνεται η σύνδεση της γλυκόζης στη θέση 3 του σκελετού (H-1', δ 4.69 / C-3, δ 152.0). Από τη σταθερά σύζευξης του ανωμερικού πρωτονίου με το H-2' της γλυκόζης, συμπεραίνουμε ότι συμμετέχει σε β -γλυκοσιδικό δεσμό. Ο λακτονικός δακτύλιος έχει *trans* διαμόρφωση, καθώς το πρωτόνιο H-6 βρίσκεται σε *trans-diaxial* διάταξη με τα πρωτόνια H-5 και H-7 ($J_{\text{H-5,H-6}}=9.90$ Hz και $J_{\text{H-6,H-7}}=8.80$ Hz). Η α διάταξη του πρωτονίου H-8 φαίνεται τόσο από τις μικρές τιμές στις συζεύξεις που παρατηρούνται όσο και από το σήμα NOE που δίνει το H-8 με το H-7.

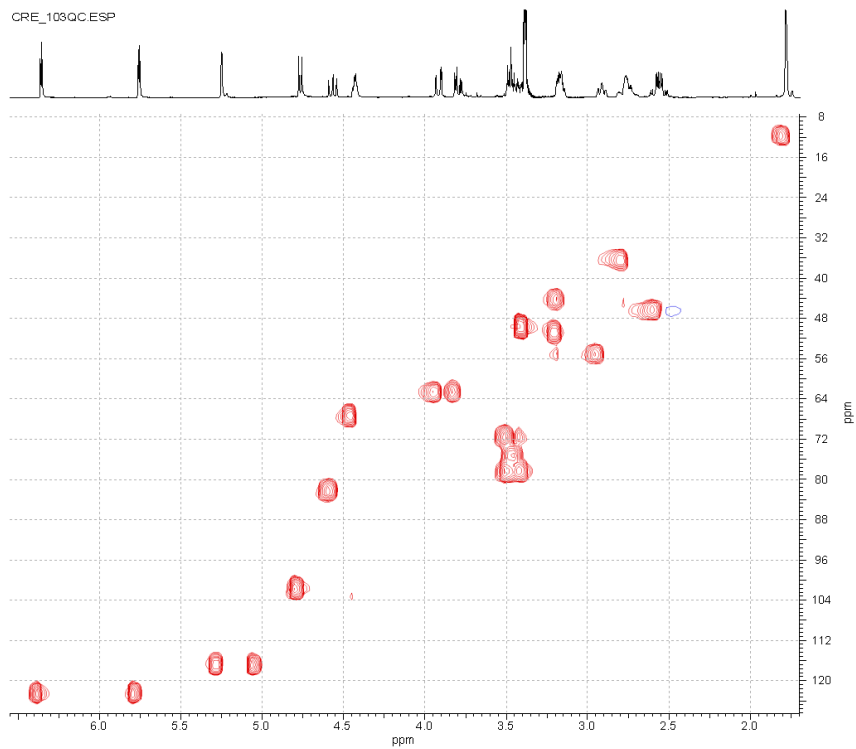
Πίνακας 2: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ ουσίας 2 (CD_3OD , 400MHz).

Θέση	δC^*	Τύπος	δH	Αριθμός H	Πολλαπλότητα	J (Hz)
1	44.0	CH	3.09	1	m^a	-
2a	36.3	CH ₂	2.69	1	m^b	-
2b			2.69	1	m^b	-
3	152.0	C				
4	114.0	C				
5	55.2	CH	2.84	1	br t	9.9
6	82.2	CH	4.49	1	dd	9.9, 8.8
7	50.5	CH	3.09	1	m^a	
8	67.2	CH	4.36	1	ddd	4.7, 3.9, 2.4
9a	46.2	CH ₂	2.49	1	m^c	-
9b			2.49	1	m^c	-
10	145.6	C				
11	138.1	C				
12	172.6	C				
13a	122.2	CH ₂	5.68	1	d	3.1
13b			6.28	1	d	3.1
14a	117.1	CH ₂	4.95	1	s	-
14b			5.18	1	s	-
15	11.8	CH ₃	1.71	3	s	-
1'	101.6	CH	4.69	1	d	7.8
2'	75.0	CH	3.37	1	m^d	-
3'	78.0	CH	3.37	1	m^d	-
4'	71.5	CH	3.37	1	m^d	-
5'	78.4	CH	3.37	1	m^d	-
6'a	62.5	CH ₂	3.84	1	dd	11.7, 2.4
6'b			3.72	1	dd	11.7, 3.7

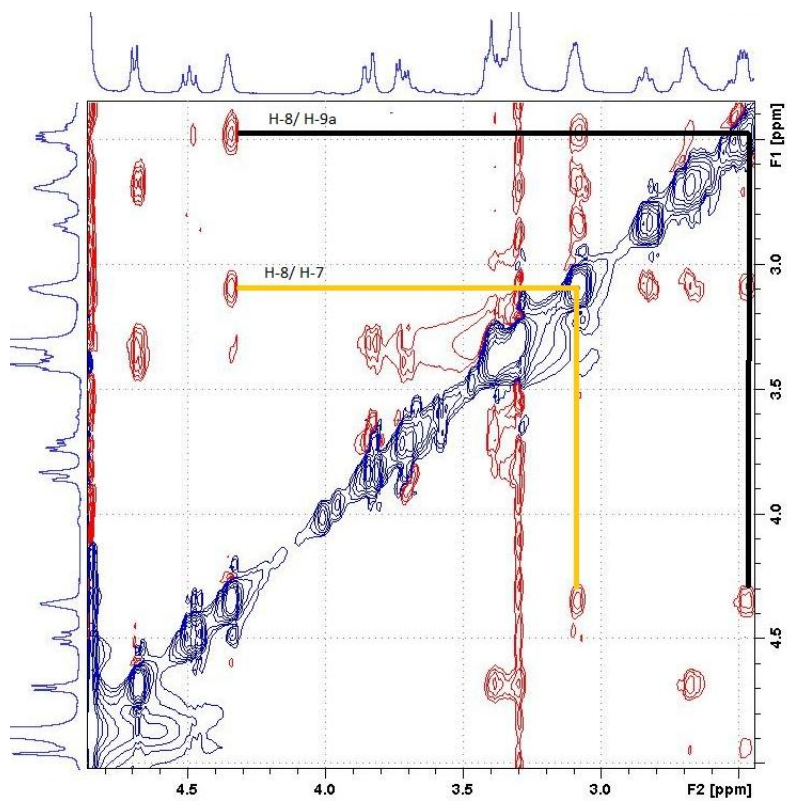
*Οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων αποδόθηκαν από τα πειράματα HSQC και HMBC.
^{a,b,c,d} Επικαλυπτόμενα σήματα στο φάσμα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$.



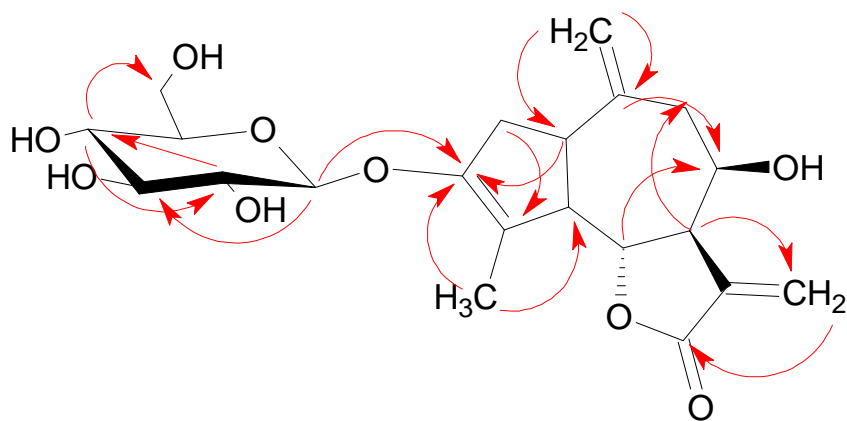
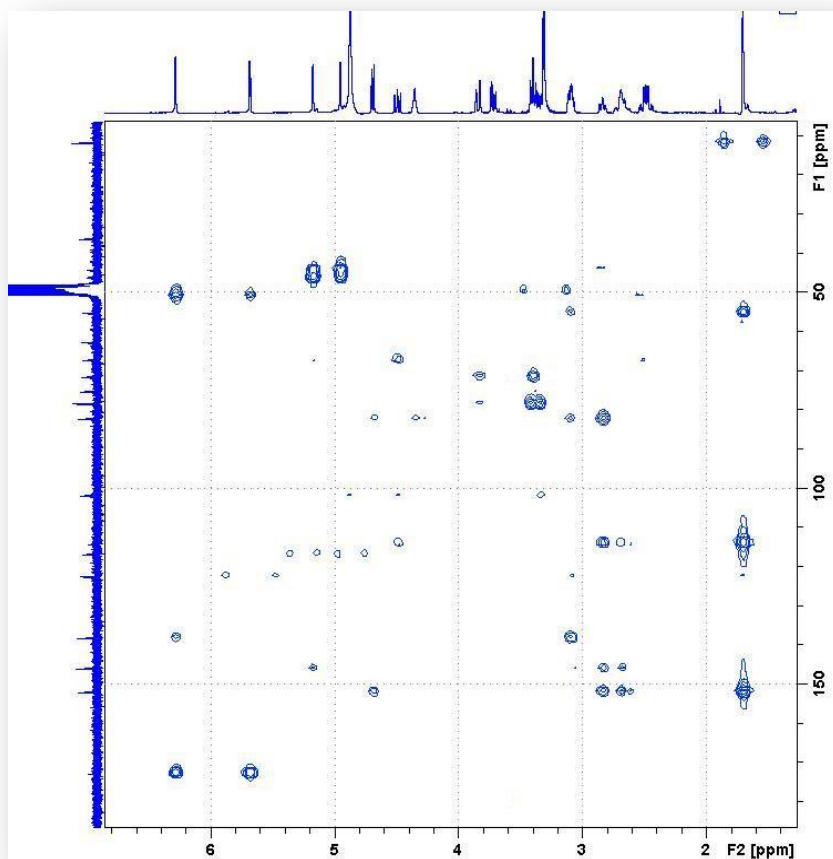
Εικόνα 3: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ ουσίας 2



Εικόνα 4: Φάσμα HSQC της ουσίας 2



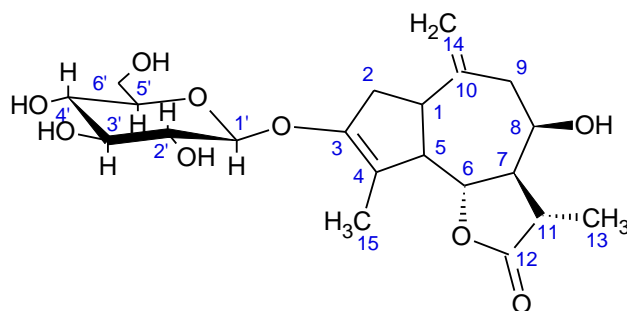
Εικόνα 5: Λεπτομέρεια από το φάσμα ROESY της ουσίας 2



Εικόνα 6: Φάσμα HMBC ουσίας 2 και σχηματική απόδοση των σημάτων C->H της ουσίας 2

Ουσία 3:

(3S,3aR,4R,6aR,9aR,9bR)-4-υδροξυ-3,9-διμεθυλο-6-μεθυλενο-8-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-τριυδροξυ-6-(υδροξυμεθυλο)τετραϋδρο-2H-πυρανοϋλο-2-οξυ]-3a,4,5,6,6a,7,9a,9b-οκταϋδρο-αζουλενο[4,5-b]φουραν-2(3H)-όνη
[= 11β-13 διυδρο-κρεπισίδης C]



$[\alpha]_D^{20} = +16.0$ (CHCl₃, *c*, 0.1).

Η ουσία **3** είναι νέο φυσικό προϊόν. Πρόκειται για το 11β-13 διυδρο παράγωγο της ουσίας **2**. Το ανηγμένο 11-13 εξωμεθυλένιο οδηγεί στις εξής τροποποιήσεις στο φάσμα ¹H-NMR:

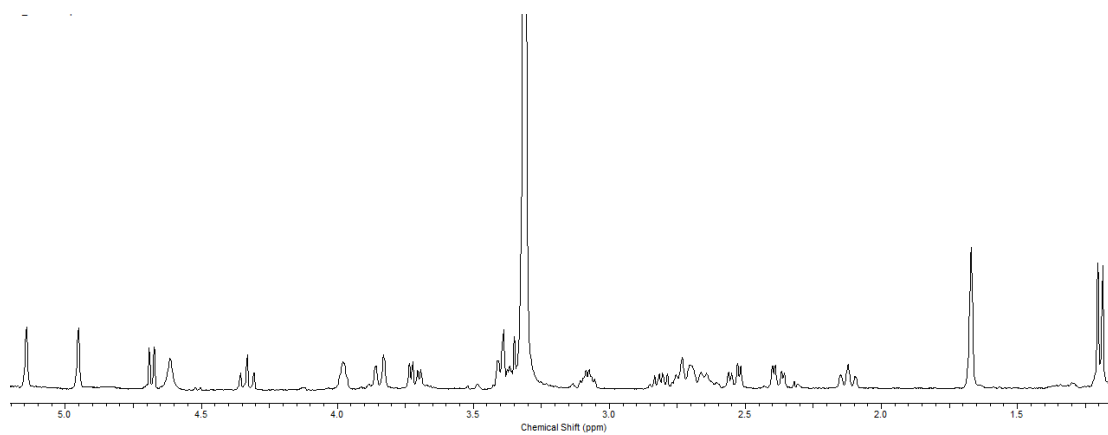
- Το συντονισμό ενός μεθυλίου [CH₃-13 σε δ 1.20, d (7.0 Hz)] προσαρτημένου πάνω σε μεθίλιο
- Το συντονισμό του πρωτονίου H-11 σε δ 2.81, dq (13.0, 7.0 Hz)
- Τη θωράκιση των πρωτονίων H-7, H-8 και H-6.

Η α διάταξη του μεθυλίου CH₃-13 γίνεται αντιληπτή από το συντονισμό αυτού σε δ 1.20, ενώ βάσει βιβλιογραφίας μεθύλια σε β διάταξη συντονίζονται σε τιμές κατώτερες του 1.0 ppm. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε από τη σταθερά σύζευξης $J_{H-7,H-11} = 13.00$ Hz που δείχνει την *trans* διάταξη των δυο πρωτονίων, καθώς και από το φάσμα NOESY, όπου το H-7 (α διάταξη) δε δίνει σήμα με το H-11 (β διάταξη), επαγωγικά συμπεραίνεται ότι το μεθύλιο CH₃-13 είναι σε α διάταξη. Η διάταξη του υδροξυλίου της θέσης 8 συμπεραίνεται με τον ίδιο τρόπο, καθώς το H-7 ($J_{H-7,H-8} = 1.60$ Hz) δίνει σήμα με το H-8 στο φάσμα NOESY, οπότε γίνεται αντιληπτό ότι το υδροξύλιο είναι σε β προσανατολισμό. Από το φάσμα HMBC επιβεβαιώνεται η δομή του μορίου, καθώς και η σύνδεση της γλυκόζης στη θέση 3 της γενίνης. Τέλος, αποδίδονται οι τιμές των τεταρτοταγών ανθράκων C-3, C-4, C-10, C-12.

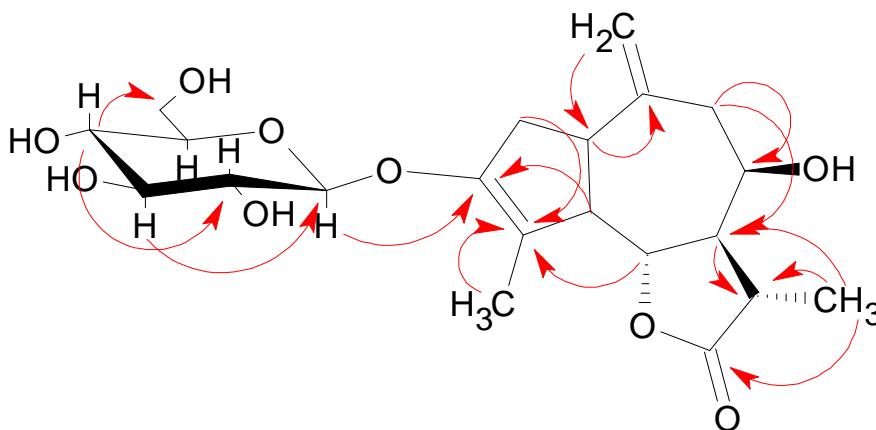
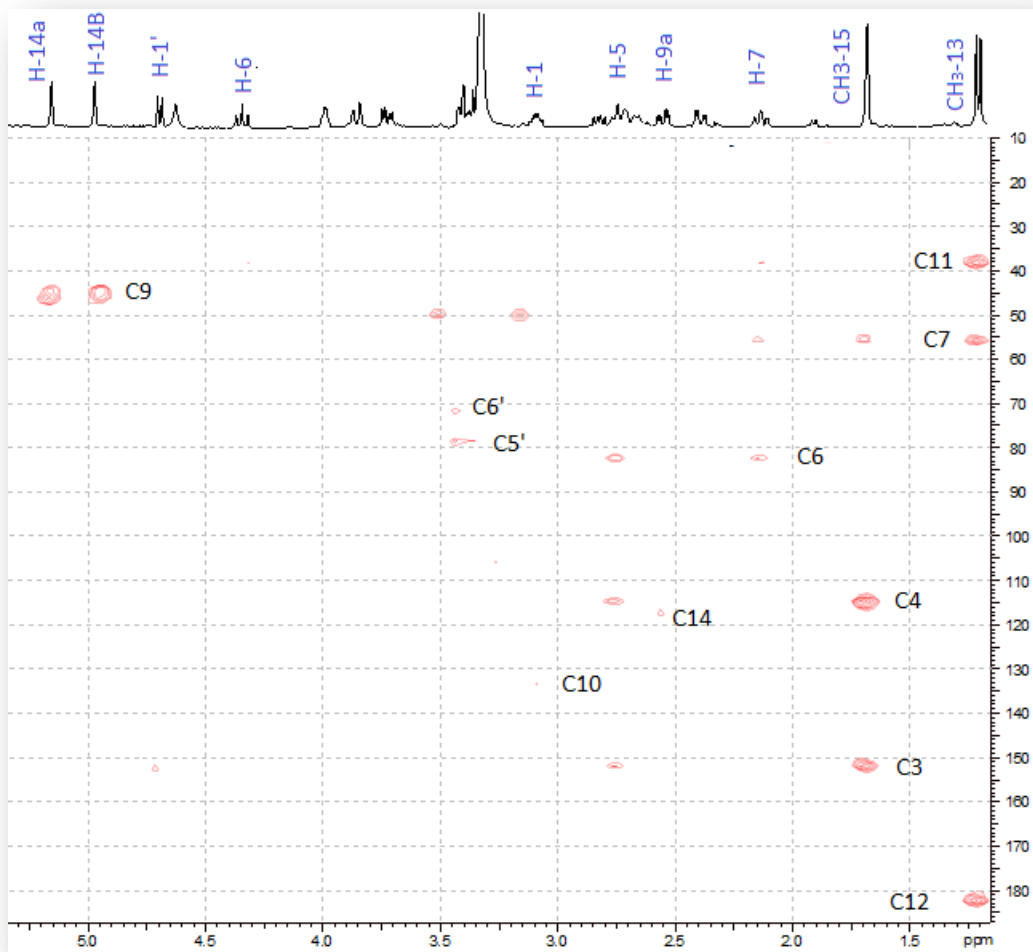
Πίνακας 3: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ουσίας 3 (CD_3OD , 400MHz).

Θέση	δC^*	Τύπος	δH	Αριθμός H	Πολλαπλότητα	J (Hz)
1	44.2	CH	3.08	1	td	8.0, 4.7
2a	36.0	CH_2	2.70	1	m^a	-
2b			2.70	1	m^a	-
3	151.7	C				
4	114.0	C				
5	55.2	CH	2.73	1	dd	8.0, 10.2
6	81.9	CH	4.33	1	t	10.2
7	55.3	CH	2.12	1	ddd	13.0, 10.2, 1.6
8	65.5	CH	3.98	1	m	-
9a	46.1	CH_2	2.54	1	dd	13.3, 4.7
9b			2.38	1	dd	13.3, 3.9
10	146.0	C				
11	37.6	CH	2.81	1	dq	13.0, 7.0
12	181.0	C				
13	13.5	CH_3	1.20	3	d	7.0
14a	116.1	CH_2	5.14	1	br s	-
14b			4.92	1	br s	-
15	11.2	CH_3	1.71	3	br s	-
1'	101.6	CH	4.68	1	d	7.8
2'	75.0	CH	3.38	1	mb	-
3'	78.0	CH	3.38	1	m^b	-
4'	71.5	CH	3.38	1	m^b	-
5'	78.4	CH	3.38	1	m^b	-
6'a	62.5	CH_2	3.84	1	dd	12.1, 1.6
6'b			3.71	1	dd	12.1, 5.1

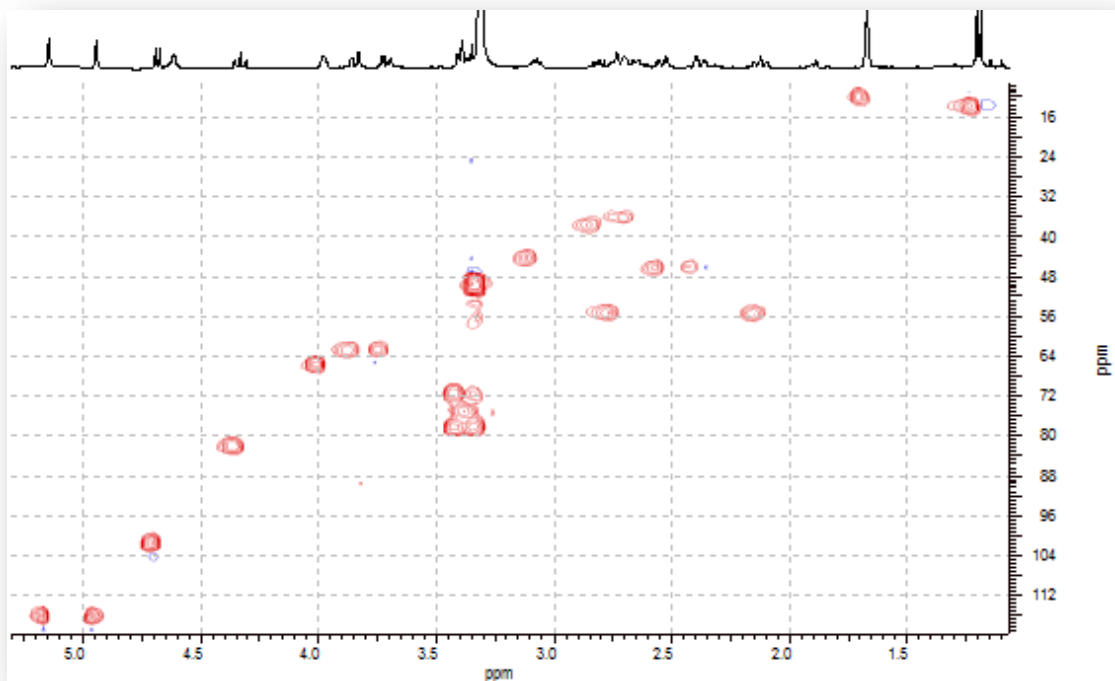
*Οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων αποδόθηκαν από τα πειράματα HSQC και HMBC.
^{a,b} Επικαλυπτόμενα σήματα στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$.



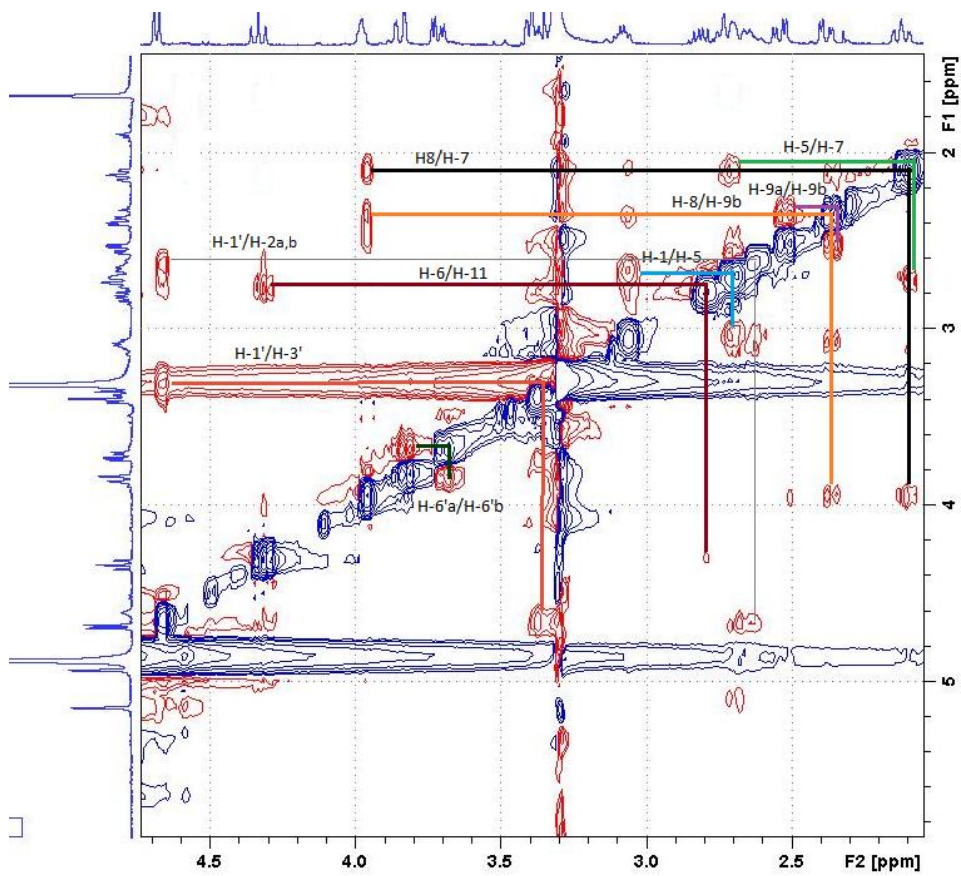
Εικόνα 7: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 3



Εικόνα 8: Φάσμα HMBC της ουσίας 3 και σχηματική απόδοση των σημάτων



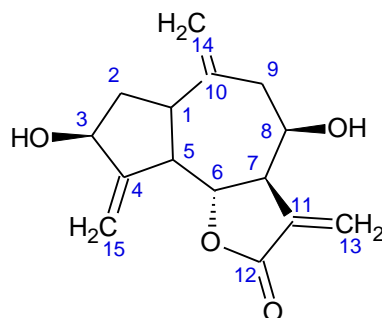
Εικόνα 9: Φάσμα HSQC της ουσίας 3



Εικόνα 10: Βασικά σήματα στο φάσμα NOESY της ουσίας 3

Ουσία 4:

(3aR,4R,8S,9bR)-4,8-διυδροξυ-3,6,9-τριμεθυλιδανο-δεκαϋδρο-αζουλενο [4,5-b] φουρανο-2(3H)-όνη [= Ιντεγκριφολίνη, 8-επι-δεσακυλο-κυναροπικρίνη]



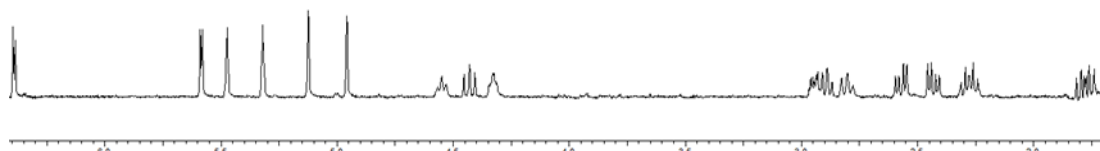
Η ουσία απομονώθηκε ως λευκό άμορφο προϊόν.

Η ουσία **4** έχει απομονωθεί ως φυσικό προϊόν από τα κάτωθι φυτά: *Crepis capillaris* (Kisiel *et al.*, 1984), *Ixeris dentata* (Seto *et al.*, 1986), *Crepis tectorum* (Kisiel *et al.*, 1989), *Andryala integrifolia* (Massanet *et al.*, 1993), *Crepis crocea* (Kisiel *et al.*, 1994), *Saussurea pygmaea* (Zong *et al.*, 1994) και *Sorosseris hookerriana* subsp. *erysimoides* (Meng *et al.*, 2000). *In vitro* έχει δείξει σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες (Zong *et al.*, 1994).

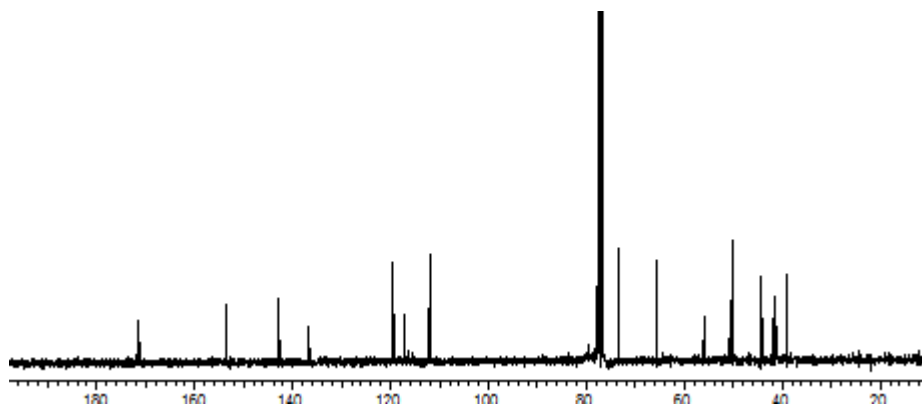
Η ύπαρξη υδροξυλίου στη θέση 3 γίνεται εμφανής από την ύπαρξη ενός πρωτονίου, που συντονίζεται στην περιοχή των οξυγονομένων πρωτονίων σε δ 4.55 (dd, $J=7.0, 9.0$ Hz). Το περιβάλλον των πρωτονίων της θέσης 2 δεν είναι το ίδιο με αποτέλεσμα το H-2a να συντονίζεται σε δ 2.27 (dt, $J_{2a,2b}=14.10$ Hz, $J_{2a,1,3}=7.80$ Hz) και το H-2b σε δ 1.78 (dt, $J_{2a,2b}=14.10$ Hz, $J_{2a,1,3}=8.20$ Hz). Η πολλαπλότητα και οι συζεύξεις των πρωτονίων της θέσης 2 δείχνουν ότι τα πρωτόνια H-1 και H-3 βρίσκονται σε *cis* διάταξη μεταξύ τους, γεγονός που επιβεβαιώνεται από το φάσμα NOESY. Βιογενετικά το H-1 στα γουαϊανολίδια του tribe των Cichoriae βρίσκεται σε α προσανατολισμό, επαγωγικά και το H-3 έχει α προσανατολισμο και το υδροξύλιο της θέσης 3 β προσανατολισμό. Το πρωτόνιο H-6 σε δ 4.43 (dd, $J_{6,5}=8.60$ Hz, $J_{6,7}=9$ Hz) με τις μεγάλες συζεύξεις δείχνει ότι βρίσκεται σε *trans-diaxial* διάταξη με τα πρωτόνια H-5 και H-7 και ότι ο λακτονικός δακτύλιος κλείνει στη θέση 6 και όχι στην 8, καθώς $\delta_{H-8} < \delta_{H-6}$ με την προϋπόθεση ότι το υδροξύλιο της θέσης 8 δεν είναι εστεροποιημένο. Η β διάταξη του υδροξυλίου της θέσης 8 επαληθεύεται από το σήμα NOE μεταξύ του πρωτονίου H-7 και του H-8.

Πίνακας 4: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz) και $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50.3 MHz) ουσίας 4.

Θέση	δC^*	Τύπος	δH	Αριθμός H	Πολλαπλότητα	J (Hz)
1	44.70	CH	2.91	1	br q	7.8
2a	39.15	CH ₂	2.27	1	dt	14.1, 7.8
2b			1.78	1	dt	13.8, 8.2
3	73.2	CH	4.55	1	dd	7.0, 9.0
4	154.6	C		-		
5	49.50	CH	2.81	1	dd	10.2, 8.6
6	78.00	CH	4.43	1	dd	10.2, 8.7
7	50.08	CH	2.95	1	dddd	9.0, 3.5, 3.1, 2.5
8	65.70	CH	4.33	1	ddd	5.8, 5.5, 2.5
9a	43.86	CH ₂	2.57	1	dd	13.7, 5.5
9b			2.43	1	dd	13.7, 5.8
10	142.90	C		-		
11	136.00	C		1		
12	169.20	C		-		
13a	121.8	CH ₂	6.39	1	d	3.5
13b			5.59	1	d	3.1
14a	116.40	CH ₂	5.12	1	s	-
14b			4.96	1	s	-
15a	111.96	CH ₂	5.32	1	br. s	-
15b			5.47	1	br. s	-

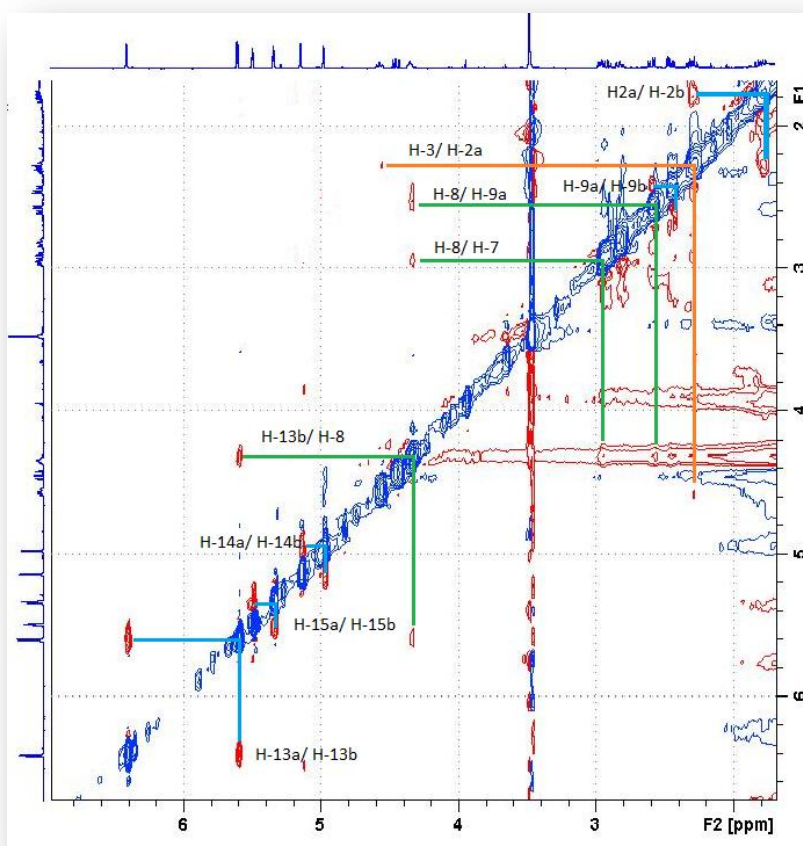


Εικόνα 11: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 4



Εικόνα 12: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ ουσίας 4

Η ακριβής δομή του μορίου έχει προσδιοριστεί επακριβώς με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ από τους Adekenon *et al.*, 1991. Η απόδοση της δομής συμφωνεί απόλυτα με αυτή της βιβλιογραφίας.

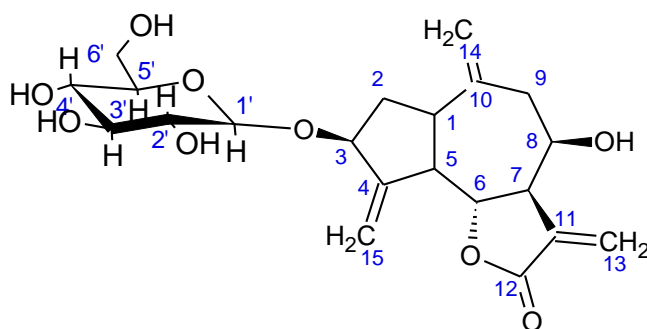


Εικόνα 16: Φάσμα NOESY ουσίας 4

Ουσία 5:

(3aR,4R,6aR,8S,9aR,9bR)-4-υδροξυ-3,6,9-τριμεθυλενο-8-((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-τριυδροξυ-6-(υδροξυμεθυλο)τετραϋδρο-2H-πυρανοϋλο-2-οξυ) δεκαϋδρο-αζουλενο[4,5-b]φουραν-2H-όνη

[=3β-D-γλυκοπυρανοσίδης της ιντεγκριφολίνης, 3β-D-γλυκοπυρανοσίδης της 8-επι-δεσακυλοκυναροπικρίνης]



Η ουσία απομονώθηκε ως λευκή άμορφη κόνις.

Είναι κοινός μεταβολίτης στο tribe των Cichoriae (Lactucace), συγκεκριμένα έχει απομονωθεί από τα εξής είδη: *Crepis capillaris* L. (Kisiel *et al.*, 1984), *Ixeris stolonifera* A.Gray (Nishimura *et al.*, 1985), *Ixeris dentata* Nakai (Seto *et al.*, 1986), *Soroseris hookeriana* subsp. *erysimoides* Stebbins (Meng *et al.*, 1986), *Nabalus acerifolia* Benth (Miyase *et al.*, 1987), *Ixeris debilis* A.Gray (Warashina *et al.*, 1990), *Ixeris repens* A.Gray (Warashina *et al.*, 1990), *Andryala integrifolia* L. (Massanet *et al.*, 1993), *Andryala ragusina* L. (Massanet *et al.*, 1994), *Ixeris chinensis* Nakai (Lee *et al.*, 1994), *Crepis sibirica* L. (Kisiel *et al.*, 1995), *Crepis pyrenaica* L. (Kisiel *et al.*, 1995), *Crepis tingitana* Ball. (Zidorn *et al.*, 1999), *Crepis mollis* Aschers. (Kisiel *et al.*, 2000), *Crepis zacintha* L. (Kisiel *et al.*, 2002), *Ixeris dentata* forma *albiflora* (Bang *et al.*, 2004), *Ixeris sonchifolia* Hance (Na *et al.*, 2007).

In vitro έχει δείξει σημαντική κυτταροτοξική δράση μέσω αναστολής των ενζύμων ACAT, DGAT και FPT τρανσφεράσης (Bang *et al.*, 2004).

Το επιμερές στη θέση 8 έχει απομονωθεί από την κινέζικη δρόγη 'Xingxiang Tuerfeng', που είναι τα υπέργεια τμήματα του φυτού *Aisnliaea fragrans* Champ. της οικογένειας Compositae. Η δρόγη έχει αιμοστατική, αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική δράση, ενώ αξιοσημείωτη είναι η μέχρι σήμερα φυτοθεραπευτική

της εφαρμογή σε χρόνιες μολύνσεις της πυέλου. Ο απομονωθείς γλυκοσίδης της δεσακυλοκυναροπικρίνης έδειξε σημαντική αναστολή των ενζύμων COX-1 και COX-2 (Xingshang *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2009).

Επίσης, έχει απομονωθεί και από τη δρόγη “Palo Azul” από την Παραγουάη, που είναι φλοιός του φυτού *Haematoxylon campachiacum* L. της οικογένειας Leguminosae με χρήση στη λαϊκή θεραπευτική ως αντιδιαβητικό, αντιδιαρροϊκό, ανθελονοσιακό και διουρητικό. Η υπογλυκαιμική δράση της δρόγης έχει αποδειχτεί *in vivo* (Arjun *et al.*, 2003). Ο γλυκοσίδης της δεσακυλοκυναροπικρίνης απομονώθηκε από το πλέον δραστικό κλάσμα του εκχυλίσματος της δρόγης (Banskota *et al.*, 2003).

Στο φάσμα ^1H NMR παρατηρούμε τα τρία χαρακτηριστικά εξωμεθυλένια του σκελετού των γουαϊανολιδίων. Το πλέον χαρακτηριστικό είναι αυτό της θέσης 13, που εμφανίζεται ως δύο διπλές κορυφές σε δ 5.66 και 6.29, σε σύζευξη με το πρωτόνιο H-7 με σταθερά σύζευξης 3.13 Hz. Το εξωμεθυλένιο της θέσης 14 εμφανίζεται ως δύο απλές κορυφές σε δ 4.92 και 5.09 και το εξωμεθυλένιο της θέσης 15 εμφανίζεται ως δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 5.38 και 5.45 με μη μετρήσιμη σύζευξη με το πρωτόνιο H-3. Οι συζεύξεις που μετρήθηκαν μεταξύ των πρωτονίων του σκελετού του μορίου επιβεβαιώνονται και από το spin σύστημα που παρατηρείται στο φάσμα COSY. Έτσι το πρωτόνιο H-1 συζεύγνυται με το H-5 με σταθερά σύζευξης 8.60 Hz, που αν και οριακή τιμή, δείχνει τη *cis* διαταξη μεταξύ των δύο πρωτονίων, η οποία επιβεβαιώνεται και από το φάσμα NOESY. Σήματα nOe εμφανίζονται μεταξύ H-1, H-2a και H-2a, H-3 και με αυτόν τον τρόπο συμπεραίνεται η β διαμόρφωση του υδροξυλίου της θέσης 3.

Το πρωτόνιο H-6 βρίσκεται σε *trans-diaxial* διάταξη με τα πρωτόνια H-5 και H-7 καθώς $J_{\text{H-6,H-5}}=10.60$ Hz και $J_{\text{H-6,H-7}}=11.00$ Hz, έτσι γίνεται αντιληπτό ότι ο λακτονικός δακτύλιος έχει *trans* διαμόρφωση. Δεδομένου ότι το υδροξύλιο της θέσης 8 δεν είναι δεσμευμένο, συγκρίνοντας τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων $\delta_{\text{H-6}} > \delta_{\text{H-8}}$ μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο λακτονικός δακτύλιος κλείνει στη θέση 6 και όχι στην 8. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από το φάσμα HMBC.

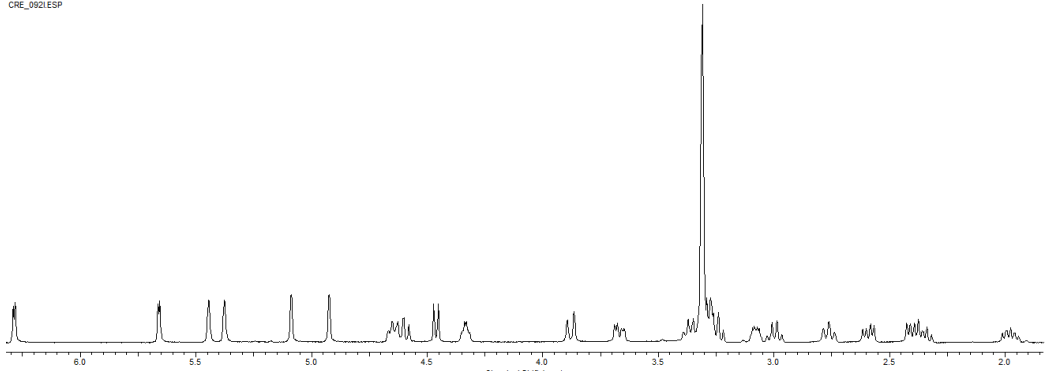
Το πρωτόνιο H-7 συζεύγνυται και με τα εξωμεθυλενικά πρωτόνια της γ -λακτόνης με $J_{\text{H-13a,b-H-7}}=3.13$ Hz. Λόγω της μικρής σύζευξης με το πρωτόνιο H-8 ($J_{\text{H-7,H-8}}=2.60$ Hz)

γίνεται αντιληπτό ότι βρίσκονται σε *cis* διάταξη μεταξύ τους, γεγονός που επιβεβαιώνεται από το φάσμα ROESY. Καθώς βιοσυνθετικά το πρωτόνιο H-7 προκύπτει σε α διάταξη (Drew *et al.*, 2009), τότε και το πρωτόνιο H-8 είναι σε α διάταξη, επομένως το υδροξύλιο της θέσης 8 είναι σε β διάταξη.

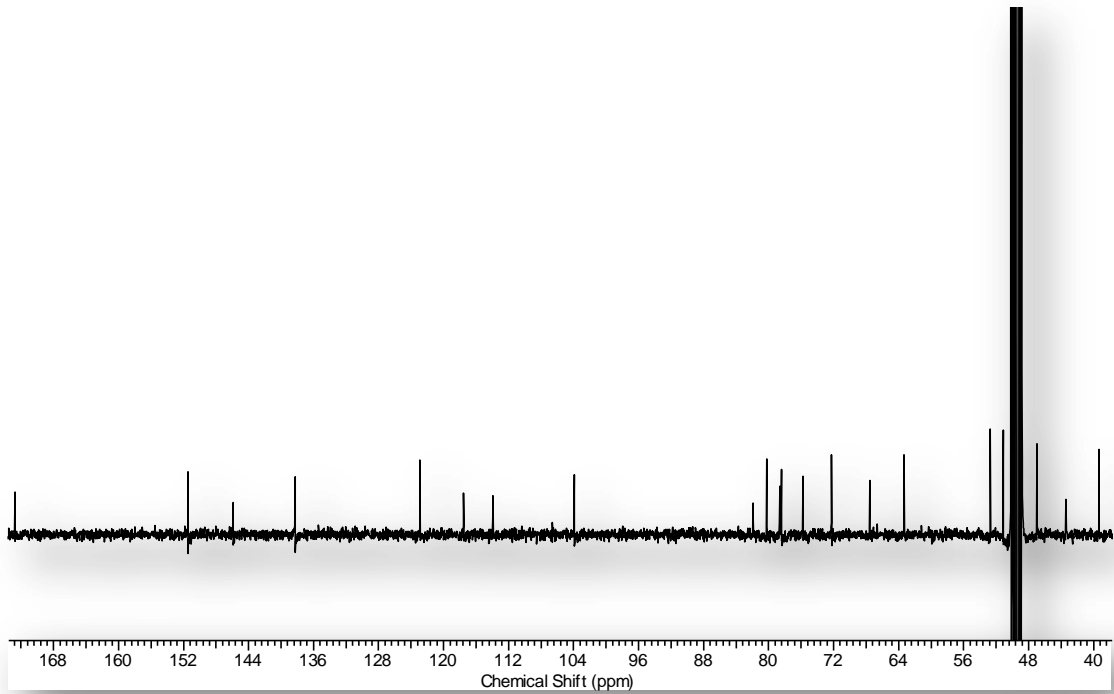
Πίνακας 5: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400MHz) και $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 50.3 MHz) ουσίας 5

Θέση	δC	Τύπος	δH	Πολλαπλότητα	J (Hz)
1	46.9	CH	3.00	br q	8.6
2a	39.3	CH ₂	2.34	m	-
2b			1.98	dt	14.1, 7.0
3	81.9	CH	4.66	m	-
4	151.4	C			
5	51.1	CH	2.67	dd	10.6, 8.6
6	80.2	CH	4.60	dd	11.0, 10.6
7	52.7	CH	3.08	dtd	11.0, 3.1, 2.6
8	67.6	CH	4.33	ddd	6.3, 5.5, 2.3
9a	43.4	CH ₂	2.59	dd	13.3, 6.6
9b			2.40	dd	13.3, 6.2
10	145.9	C			
11	138.2	C			
12	172.7	C			
13a	122.7	CH ₂	6.29	d	3.1
13b			5.66	d	3.1
14a	117.5	CH ₂	5.09	s	-
14b			4.92	s	-
15a	112.9	CH ₂	5.45	br s	-
15b			5.38	br s	-
1'	103.9	CH	4.46	d	7.8
2'	75.8	CH	3.22-3.39	m	-
3'	78.6	CH	3.22-3.39	m	-
4'	72.2	CH	3.22-3.39	m	-
5'	78.4	CH	3.22-3.39	m	-
6'a	63.3	CH ₂	3.88	dd	12.0, 1.6
6'b			3.67	dd	12.0, 5.0

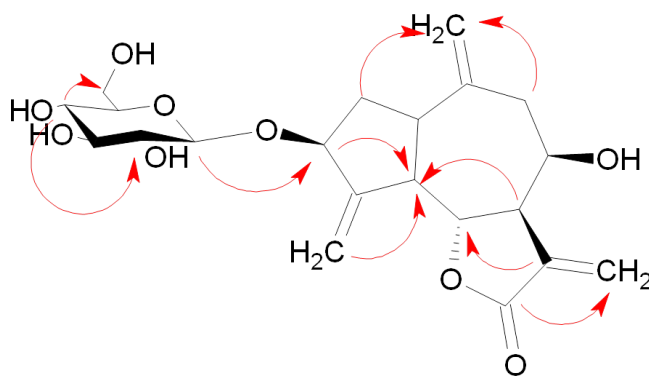
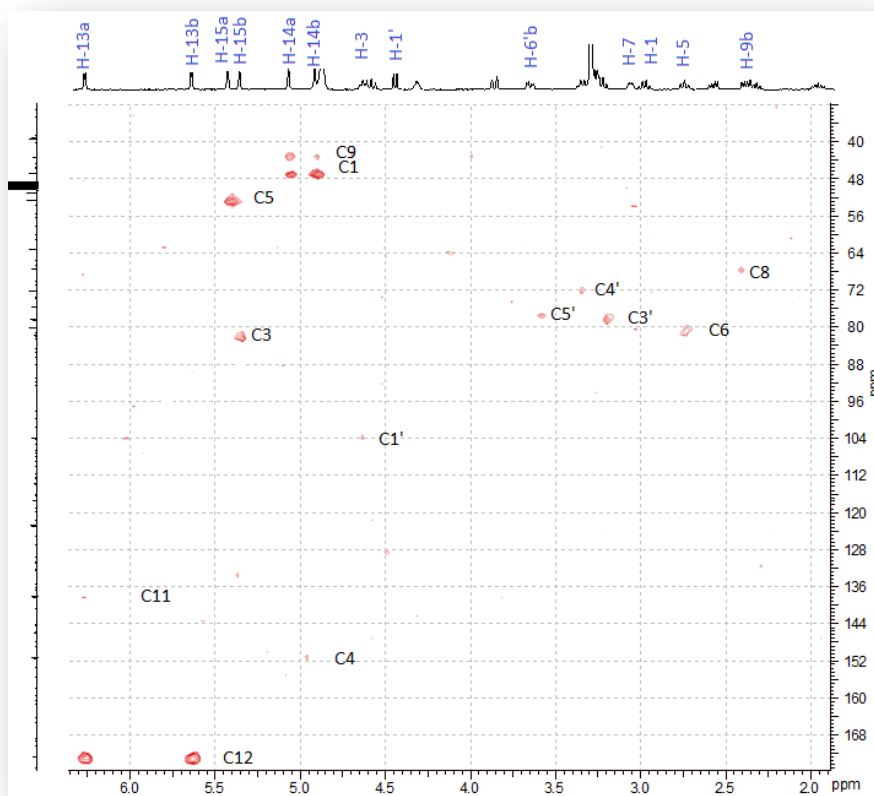
CRE_0921ESP



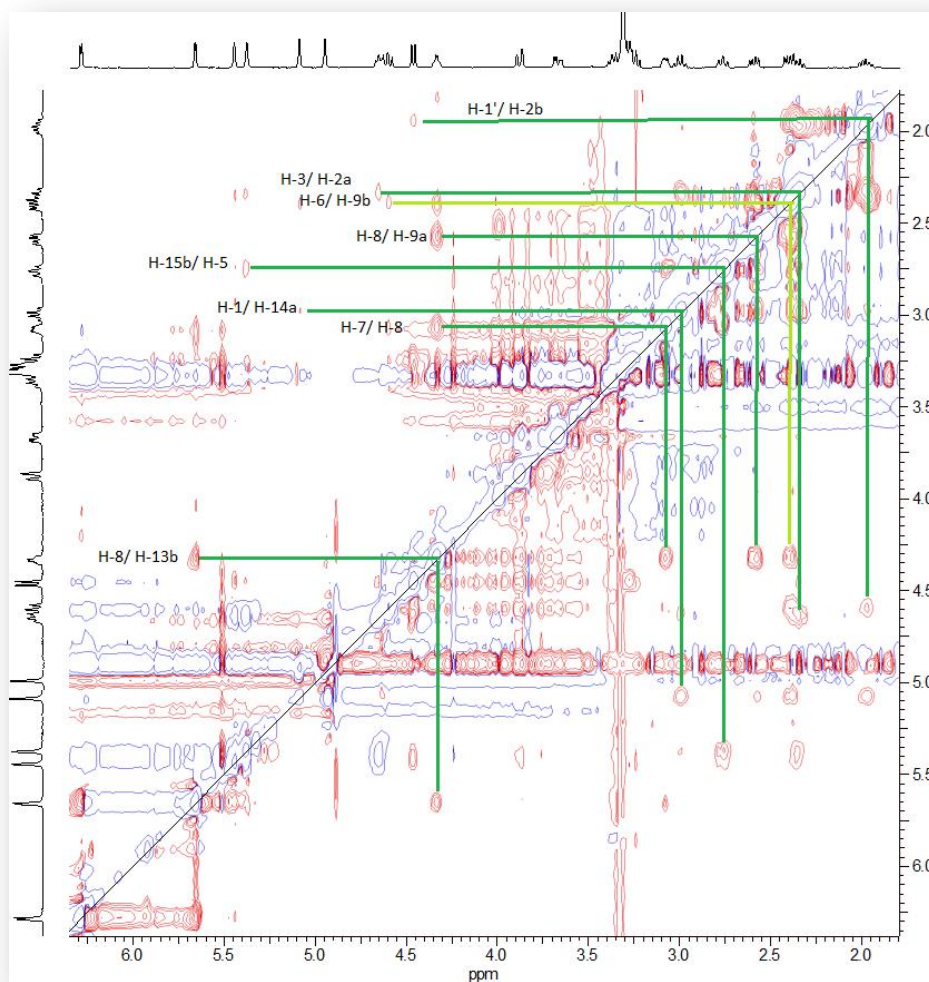
Εικόνα 14: Φάσμα ¹H-NMR της ουσίας 5



Εικόνα 15: Φάσμα ¹³C-NMR της ουσίας 5



Εικόνα 16: Φάσμα HMBC της ουσίας 5 και σχηματική απόδοση των σημάτων C->H της ουσίας 5.

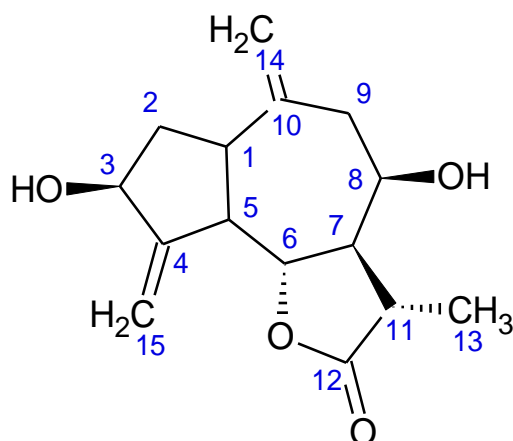


Εικόνα 17: Φάσμα ROESY ουσίας 5

Ουσία 6:

(3S,3aR,4R,6aR,8S,9aR,9bR)-4,8-διυδροξυ-3-μεθυλο-6,9-διμεθυλιδανο-δεκαϋδρο-αζουλενο[4,5-b]φουραν-2-όνη

[=11β-13 διυδρο-ιντεγκριφολίνη]



Η ουσία απομονώθηκε ως λευκό κομώδες προϊόν.

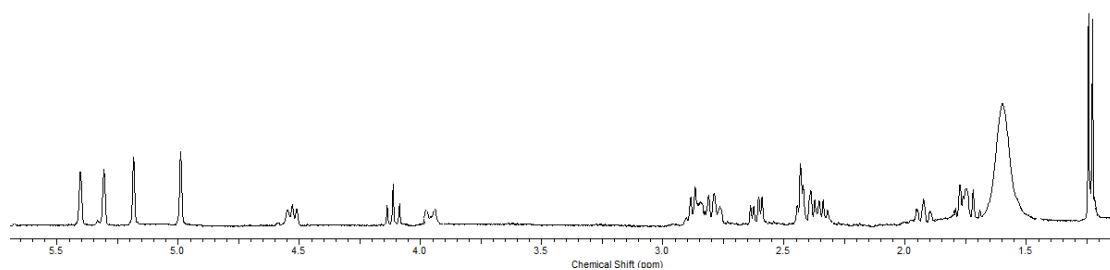
Έχει απομονωθεί από τα φυτά *Crepis crocea* (Kisiel *et al.*, 1994), *Crepis micracantha* (Zidorn, 2008) και *Andryala integrifolia* (Massanet *et al.*, 1996).

Το φάσμα ¹H-NMR του σκελετού του μορίου είναι σχεδόν ταυτόσημο με αυτό της ουσίας **4**. Παρατηρείται όμως αντικατάσταση των δύο διπλών κορυφών του λακτονικού εξωμεθυλενίου με μία διπλή κορυφή σε υψηλό πεδίο (CH₃-13, 3 H, 1.25 ppm, d, 7.20 Hz). Ταυτόχρονα, εμφανίζεται το πρωτόνιο H-11 σε δ 2.83, το οποίο συζεύγνυται με το πρωτόνιο H-7 με σταθερά σύζευξης 12.0 Hz αποδεικνύοντας την β διάταξή του και την α διάταξη του μεθυλίου της θέσης 13.

Λόγω της διαφοροποίησης του χημικού περιβάλλοντος τα πρωτόνια H-7 και H-8 θωρακίζονται σημαντικά σε σχέση με το συντονισμό τους στο φάσμα της ουσίας **4**.

Πίνακας 6: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 6 (CDCl_3 , 400MHz).

Μετατόπιση(ppm)	Αριθμός H	Πολλαπλότητα	J (Hz)	Ταυτοποίηση
2.88	1	br q	8.6	H-1
1.76	1	m	-	H-2b
2.36	1	m	-	H-2a
4.53	1	br t	7.8	H-3
2.78	1	m	-	H-5
4.11	1	dd	10.2, 10.0	H-6
1.92	1	ddd	12.0, 10.0, 2.4	H-7
3.97	1	m	-	H-8
2.61	1	dd	13.3, 5.3	H-9a
2.41	1	dd	13.4, 4.2	H-9b
2.83	1	m	-	H-11
1.25	3	d	7.2	H-13
4.99	1	s	-	H-14b
5.18	1	s	-	H-14a
5.31	1	t	1.8	H-15b
5.40	1	br s	1.8	H-15a

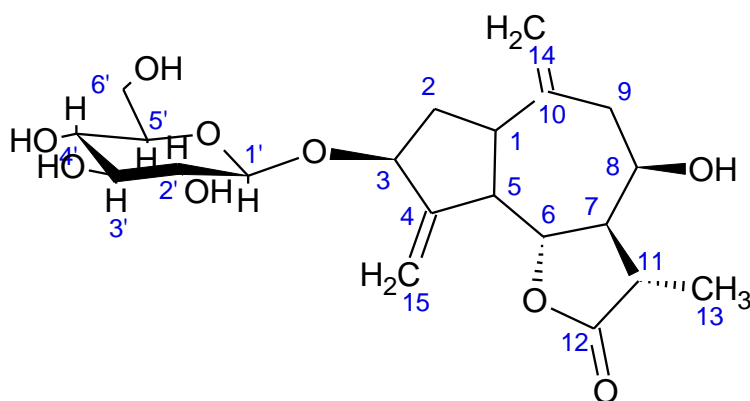


Εικόνα 18: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 6

Ουσία 7:

(3S,3aR,4R,8S,9bR)-4-υδροξυ-3-μεθυλο-6,9-διμεθυλιδενο-8-((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-τριυδροξυ-6-(υδροξυμεθυλο)τετραϋδρο-2H-πυρανοϋλο-2-οξυ)δεκαϋδρο-αζουλενο[4,5-b]φουραν-2-όνη

[=3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της 11β-13 διυδρο-ιντεγκριφολίνης]



Η ουσία απομονώθηκε ως λευκή άμορφη κόνις.

Έχει απομονωθεί από τα φυτά *Andryala integrifolia* (Massanet *et al.*, 1996) και *Crepis mollis* (Kisiel *et al.*, 2000).

Πρόκειται για τον 3β-D-γλυκοκυρανοσίδη της ουσίας 6. Η ουσία 7, όμως μπορεί να προσεγγιστεί και ως το 11β-13 διυδρο παράγωγο της ουσίας 5. Λόγω λήψης των φασμάτων στον ίδιο δευτεριωμένο διαλύτη (CH₃OD) και λόγω παρόμοιων συντονισμών των πρωτονίων του σκελετού, το φάσμα της ουσίας 7 θα παρουσιαστεί συναρτήσει της ουσίας 5.

Όπως και στην περίπτωση των ουσιών 4 και 6, στο φάσμα ¹H-NMR παρατηρούμε την απουσία των δύο διπλών κορυφών του λακτονικού εξωμεθυλενίου και την εμφάνιση μιας διπλής κορυφής στα υψηλά πεδία, που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια. Το μεθύλιο της θέσης 13 συζεύγνυται με το πρωτόνιο H-11 με J= 7.04 Hz και το H-11 με το πρωτόνιο H-7 με J_{H-7, H-11}= 12.00 Hz υποδεικνύοντας την *trans* διάταξη μεταξύ τους. Δεδομένου ότι το H-7 βιοσυνθετικά έχει α διάταξη, το H-11 έχει β διάταξη και το CH₃-13 α διάταξη. Το πρωτόνιο H-7 είναι σε *trans* διάταξη με το πρωτόνιο H-6 (J_{H-6, H-7}=10.00 Hz) και σε *cis* διάταξη με το πρωτόνιο H-8 (J_{H-7, H-8}=

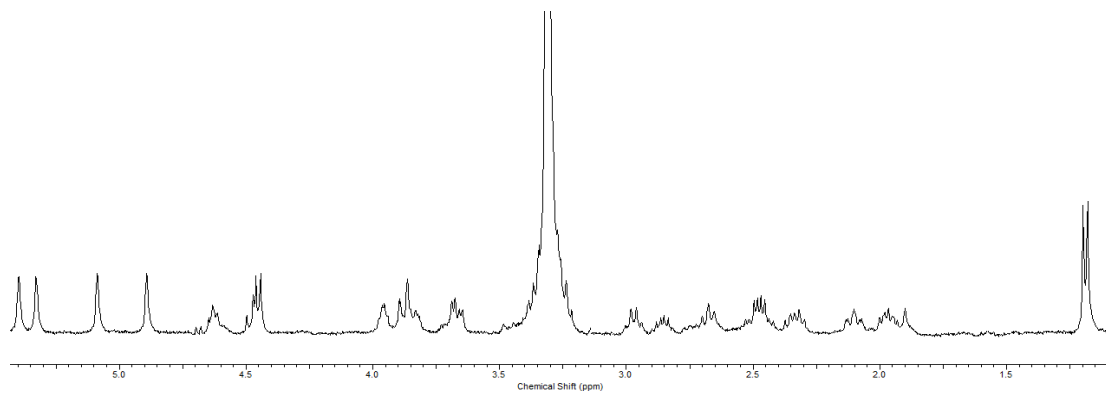
3.00 Hz) υποδεικνύοντας την α διάταξη του πρωτονίου H-8 και τη β διάταξη του υδροξυλίου της θέσης 8, γεγονός που επιβεβαιώνεται από το φάσμα NOESY.

Πίνακας 7: Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H-NMR και ¹³C-NMR της ουσίας 7 (CD₃OD, 400MHz).

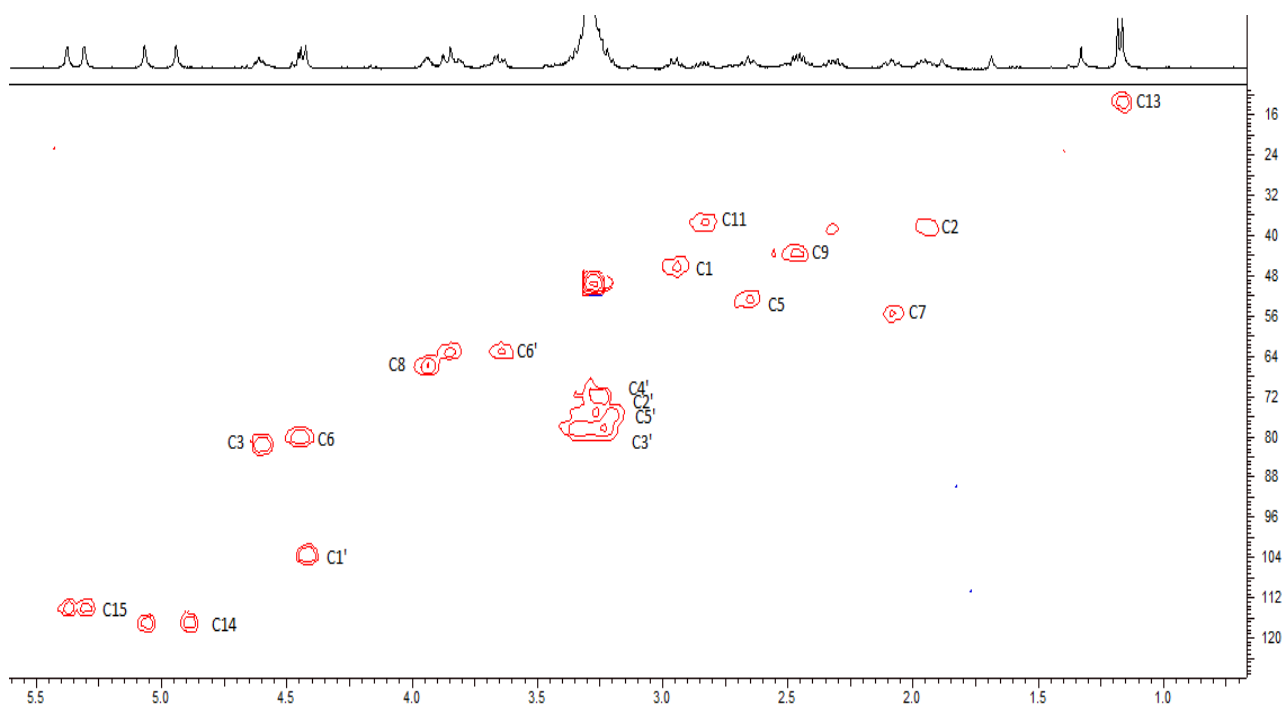
Θέση	δC*	Τύπος	δH	Αριθμός H	Πολλαπλότητα	J (Hz)
1	46.3	CH	2.97	1	ddd	8.6, 8.0, 6.5
2a	38.7	CH ₂	2.33	1	m	-
2b			1.97	1	m	-
3	81.6	CH	4.63	1	m	-
4		C				
5	52.7	CH	2.68	1	dd	10.2, 8.6
6	80.1	CH	4.45	1	m ^a	
7	55.5	CH	2.10	1	ddd	12.0, 10.0, 3.0
8	65.8	CH	3.95	1	m	-
9a	43.6	CH ₂	2.50	1	dd	12.0, 5.5
9b			2.45	1	dd	12.0, 6.5
10		C				
11	37.6	CH	2.86	1	dq	12.0, 7.0
12		C				
13	13.6	CH ₃	1.19	3	d	7.0
14a	116.8		5.09	1	s	-
14b		CH ₂	4.92	1	s	-
15a	113		5.39	1	brs	-
15b		CH ₂	5.33	1	brs	-
1'	103.2	CH	4.44	1	d ^a	7.8
2'	75.8	CH	3.22-3.39	1	m ^b	-
3'	78.6	CH	3.22-3.39	1	m ^b	-
4'	72.2	CH	3.22-3.39	1	m ^b	-
5'	78.4	CH	3.22-3.39	1	m ^b	-
6'a	62.9	CH ₂	3.88	1	dd	11.0, 1.6
6'b			3.67	1	dd	11.0, 5.5

*Οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων αποδόθηκαν από το φάσμα HSQC.

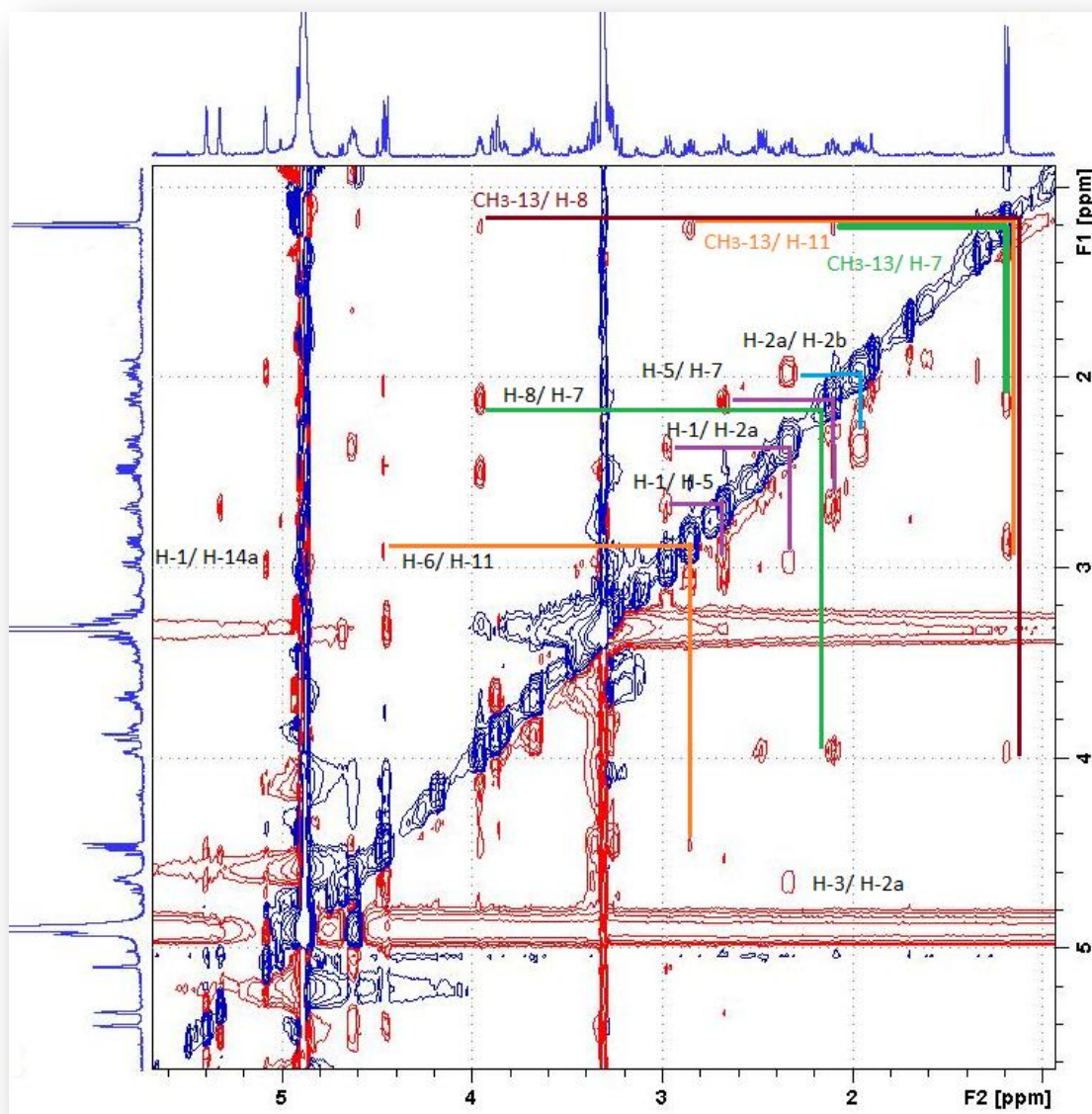
^{a,b} Επικαλυπτόμενα σήματα στο φάσμα πρωτονίου ¹H-NMR.



Εικόνα 19: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 7



Εικόνα 20: Φάσμα HSQC της ουσίας 7

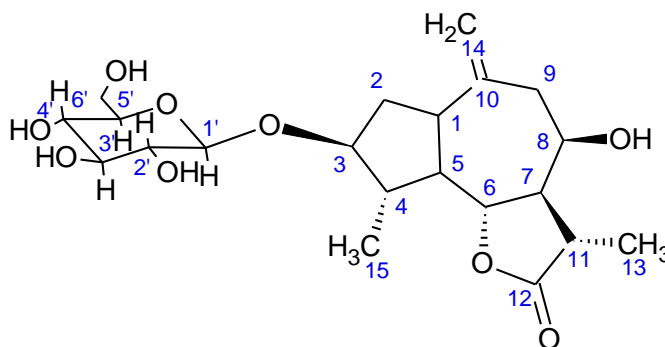


Εικόνα 21: Φάσμα NOESY ουσίας 7

Ουσία 8:

(3S,3aR,4R,8S,9S,9bR)-4-υδροξυ-3,9-διμεθυλο-6-μεθυλενο-8-((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-τριυδροξυ-6-(υδροξυμεθυλο)τετραϋδρο-2H-πυρανοϋλο-2-οξυ)δεκαϋδρο-αζουλενο[4,5-b]φουραν-2-όνη

[=Μακροκλινισίδης F]



Η ουσία απομονώθηκε ως λευκή άμορφη κόνις.

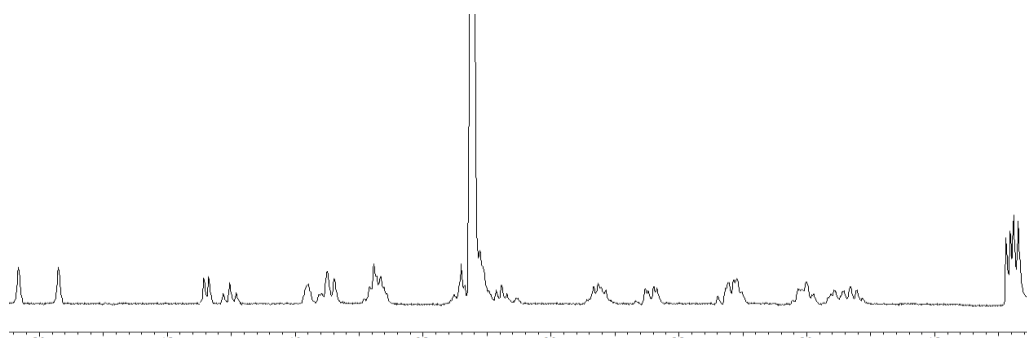
Έχει απομονωθεί από τα φυτά *Macrocladium trilobum* Makino (Miyase *et al.*, 1985), *Crepis capillaris* L. (Kisiel, 1984), *C. conyzifolia* Kern. (Kisiel *et al.*, 2001), *C. mollis* Aschers. (Kisiel *et al.*, 2000), *C. pyrenaica* L. (Kisiel *et al.*, 1995), *C. tectorum* L. (Zidorn, 2008) και *C. zacintha* L. (Kisiel *et al.*, 2002).

Η δομή της ουσίας μπορεί να προσεγγιστεί ως το 4β-15, 11β-13 τετραϋδρο παράγωγο της ουσίας 6. Παρατηρώντας το φάσμα ¹H-NMR είναι εμφανής η απουσία των κορυφών των εξωμεθυλενίων των θέσεων 13 και 15. Τη θέση τους έχουν πάρει δυο σχεδόν επικαλυπτόμενες διπλές κορυφές στα υψηλά πεδία (CH₃-15, 3H, 1.21 ppm, d, J=6.3 Hz και CH₃-13, 3H, 1.17 ppm, d, J=7.04 Hz). Ο συντονισμός των μεθυλίων σε δ > 1 είναι επαρκής απόδειξη ότι έχουν α διάταξη, καθώς σε αντίθετη περίπτωση συντονίζονται σε δ < 1. Η αναγωγή των εξωμεθυλενίων σε μεθύλια οδηγεί στην εμφάνιση των πρωτονίων H-4 (δ 2.00, m) και H-11 (δ 2.81, m) των οποίων τα σήματα αν και σχεδόν επικαλύπτονται από τα σήματα των πρωτονίων H-7 και H-1 αντίστοιχα, γίνεται εμφανής τόσο από την ολοκλήρωση των κορυφών στο φάσμα ¹H-NMR, όσο και από το spin σύστημα στο φάσμα COSY. Σημειώνεται ότι η ύπαρξη μεθυλίου αντί για μεθυλένιο πάνω στον άνθρακα C4 οδηγεί τα πρωτόνια H-2b, H-3 και H-5 να συντονίζονται σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με τα αντίστοιχα πρωτόνια της ουσίας 7.

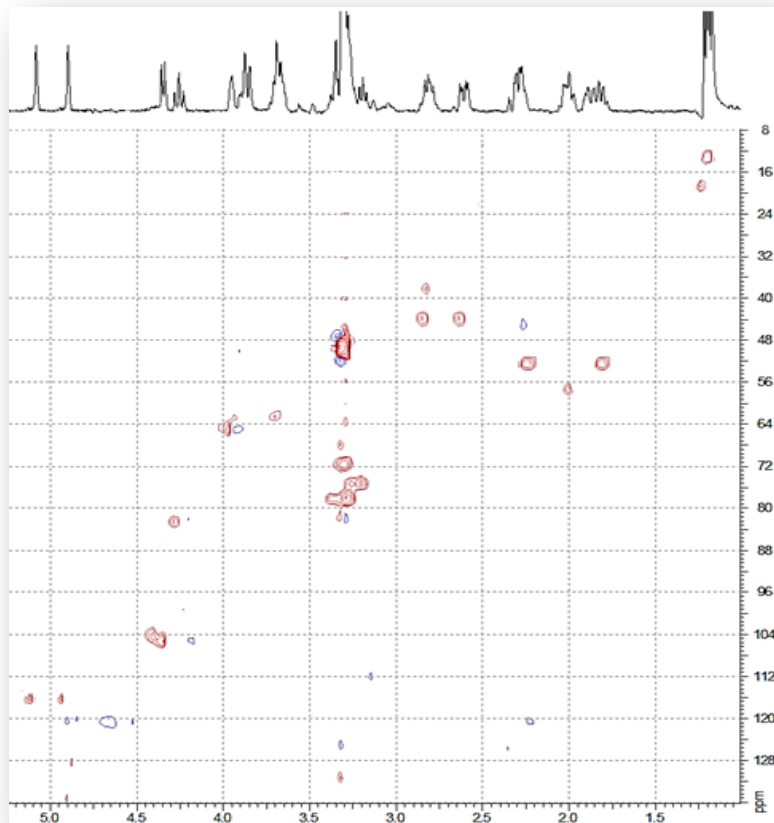
Πίνακας 8: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 8 (CD_3OD , 400 MHz).

Θέση	δC^*	Τύπος	δH	Αριθμός H	Πολλαπλότητα	J (Hz)
1	43.8	CH	2.83	1	br q	8.6
2a	39.0	CH ₂	2.28	1	dd	12.5, 3.9
2b			1.88	1	dd	12.5, 5.5
3	88.5	CH	3.95	1	m	-
4	46.6	CH	2.02	1	m	-
5	52.3	CH	1.82	1	ddd	11.0, 8.6, 2.5
6	82.6	CH	4.26	1	dd	10.2, 10.0
7	57.2	CH	2.00	1	ddd	12.0, 10.0, 2.6
8	64.8	CH	3.67	1	m	-
9a	43.0	CH ₂	2.61	1	m	
9b			2.31	1	m	-
11	43.9	CH	2.81	1	m	-
12		C				
13	13.5	CH ₃	1.17	3	d	7.0
14a	116.3	CH ₂	5.08	1	s	-
14b			4.92	1	s	-
15	18.2	CH ₃	1.21	3	d	6.3
1'	105.3	CH	4.35	1	d	7.8
2'	75.2	CH	3.19	0	dd	8.6, 7.8
3'	78.5	CH	3.32	3	m	-
4'	72.0	CH				
5'	78.1	CH				
6'a	62.7	CH ₂	3.86	1	dd	11.0, 1.7
6'b			3.67	1	dd	11.0, 5.5

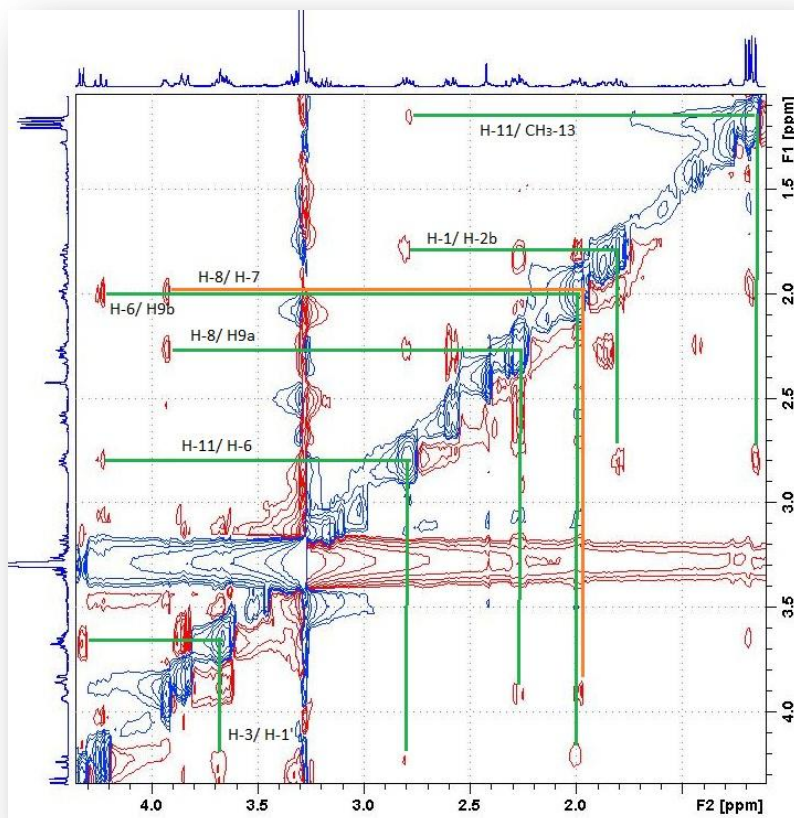
*Οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων αποδόθηκαν από το φάσμα HSQC.



Εικόνα 22: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 8

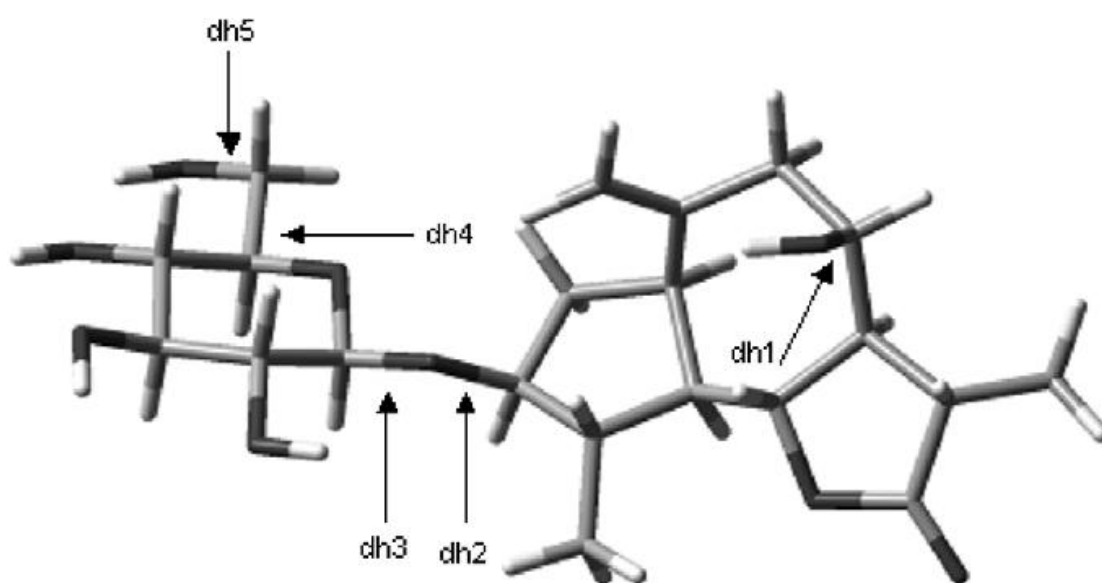


Εικόνα 23: Φάσμα HSQC ουσίας 8

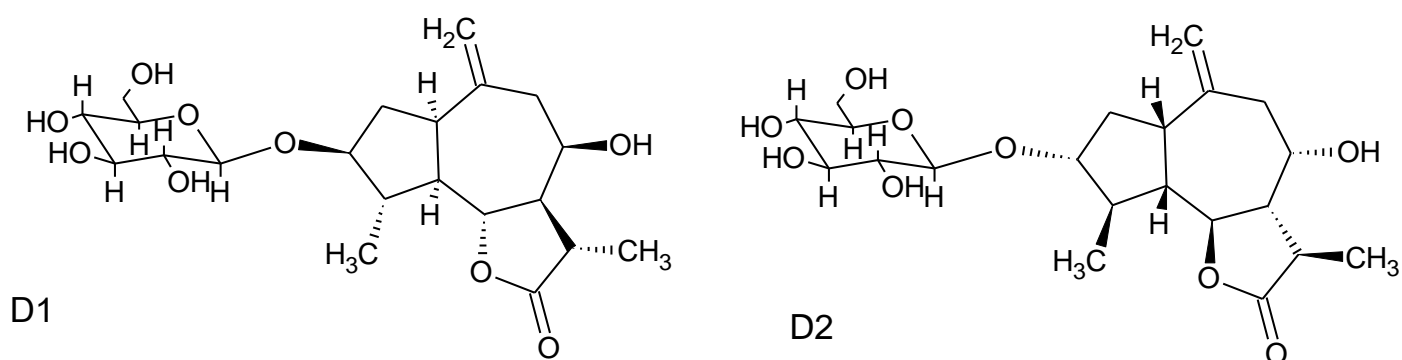


Εικόνα 27: Φάσμα NOESY ουσίας 8

Στο σημείο αυτό, αξίζει να αναφερθεί ότι η ουσία **8** ήταν η πρώτη σεσκιτερπενική λακτόνη της οποίας η απόλυτη διαμόρφωση προσδιορίστηκε με την τεχνική VCD κυκλικού διχρωισμού (Vibrational circular dichroism). Οι Michalski *et al.* (2007) απέδειξαν ότι το διαστερομερές D1 ανταποκρίνεται στην απόλυτη στερεοδιαμόρφωση του 3β-D-γλυκοκυρανοσίδη της 8-επι-ισολιπιδιόλης εξετάζοντας της διεδρες γωνίες dh1-dh5.

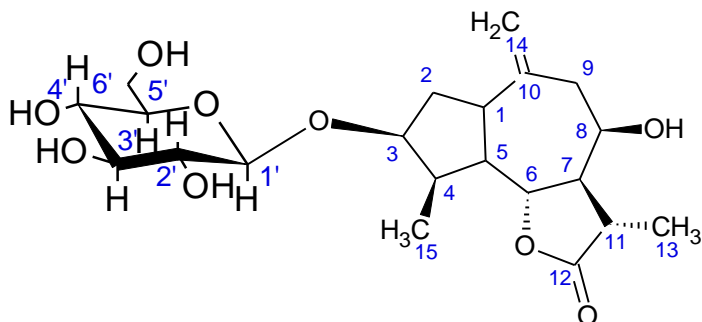


Εικόνα 25: Δομή της επικρατούς διαμόρφωσης του διαστερομερούς D₁



Ουσία 9:

(3S,3aR,4R,6aR,8S,9R,9aR,9bR)-4-υδροξυ-3,9-διμεθυλο-6-μεθυλενο-8-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-τριυδροξυ-6-(υδροξυμεθυλο)] τετραϋδρο-2H-πυρανοϋλο-2-οξυ)δεκαϋδρο-αζουλενο[4,5-b]φουραν-2(9bH)-όνη



Η ουσία απομονώθηκε ως λευκή άμορφη κόνις.

Απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυτό *Crepis zacintha* L. (Kisiel *et al.*, 2002), ενώ έχει απομονωθεί και από το φυτό *Ixeris dentata* forma *albiflora* (Bang *et al.*, 2004). Το επιμερές στη θέση 8 έχει απομονωθεί από το φυτό *Youngia japonica* DC. (Emico *et al.*, 2009).

Πρόκειται για το επιμερές στη θέση 4 της ουσίας **8**. Η β διάταξη του μεθυλίου της θέσης 15 γίνεται γνωστή από το φάσμα ¹H-NMR, καθώς παρατηρούμε ότι το CH₃-15 είναι πιο θωρακισμένο δεδομένου ότι συντονίζεται σε διαφορετικό χημικό περιβάλλον απ' ό,τι το CH₃-15 της ουσίας **7**. Το πρωτόνιο της θέσης 4, πάνω στην οποία συνδέεται το μεθύλιο CH₃-15 παρουσιάζεται ως τετραπλώς τριπλή κορυφή με σταθερές σύζευξης $J_{H-4, CH_3-15} = 7.02\text{Hz}$ και $J_{H-4,H-3} = J_{H-4,H-5} = 6\text{Hz}$, γεγονός που αποδεικνύει τη *cis* διάταξη των πρωτονίων H-3, H-4, H-5. Δεδομένου ότι το H-5 είναι σε α διάταξη στα γουαϊανολίδια του tribe *Cichoriae* το ίδιο προκύπτει και για το H-4.

Η *trans* διαμόρφωση του λακτονικού δακτυλίου και ο β προσανατολισμός του πρωτονίου H-6 αποδεικνύονται από την *trans-diaxial* διευθέτηση που έχει το πρωτόνιο H-6 με τα πρωτόνια H-5 και H-7, καθώς $J_{H-5,H-6} = 11.1\text{ Hz}$ και $J_{H-6,H-7} = 10.5\text{ Hz}$.

Το υδροξύλιο της θέσης 8 είναι, όπως και σε όλα τα απομονωθέντα γουαϊανολίδια από το *Crepis dioscoridis* L., σε β προσανατολισμό που αποδεικνύεται από τη σταθερά σύζευξης μεταξύ του πρωτονίου H-7 και του πρωτονίου H-8 ($J_{H-7,H-8} = 2.6$ Hz), που δείχνει ότι βρίσκονται σε *cis* διάταξη μεταξύ τους.

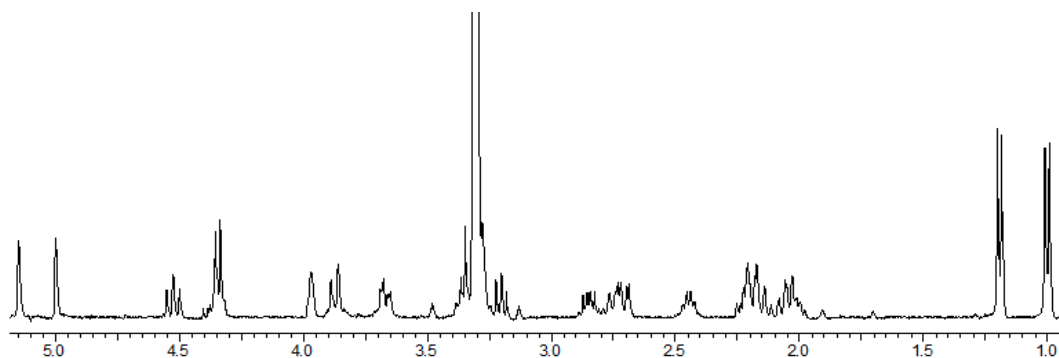
Το πρωτόνιο της θέσης 11 έχει το συνήθη β προσανατολισμό όταν στη θέση 13 υπάρχει μεθύλιο, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την *trans* διάταξη που έχει σε σχέση με το πρωτόνιο H-7 καθώς $J_{H-11,H-7} = 12.0$ Hz.

Στο φάσμα NOESY παρατηρούνται σήματα μεταξύ των CH₃-15, H-6 και H-11 καθώς και H-1, H-3, H-4, H-5, H-7, H-8 γεγονός που επαληθεύει ότι τα πρώτα είναι σε β προσανατολισμό και τα δεύτερα σε α προσανατολισμό.

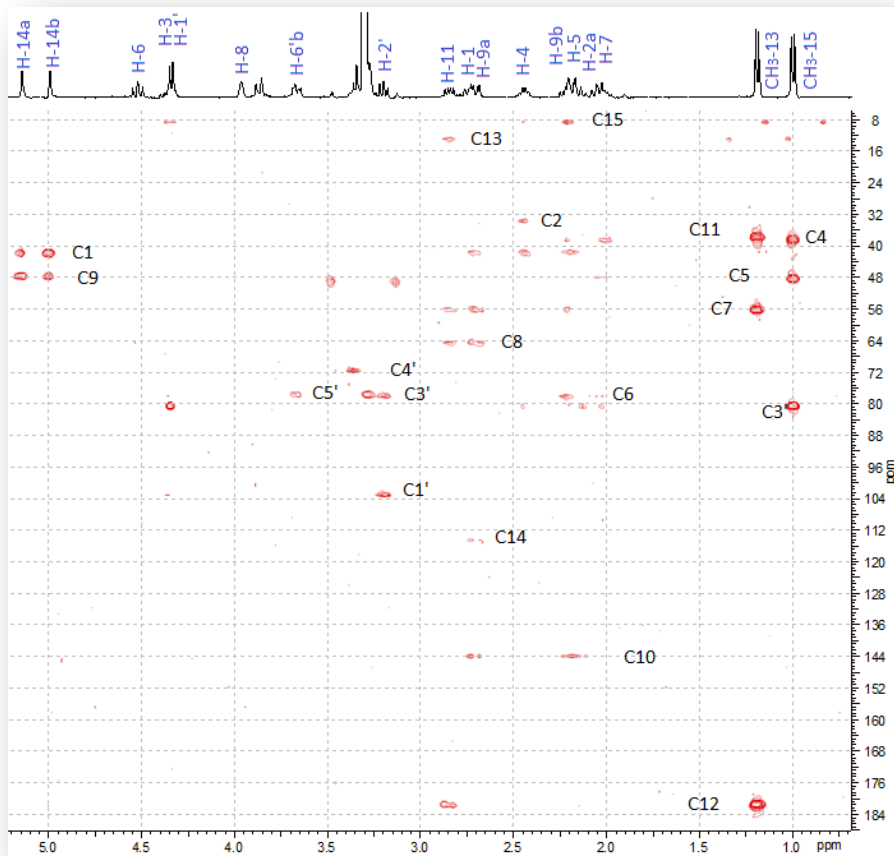
Πίνακας 9: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ της ουσίας 9 (CD_3OD , 400MHz).

Θέση	δC^*	Τύπος	δH	Αριθμός H	Πολλαπλότητα	J (Hz)
1	41.7	CH	2.73	1	m^a	-
2a	33.9	CH_2	2.14	1	m^b	
2b			2.03	1	m	-
3	80.5	CH	4.36	1	m^c	-
4	38.7	CH	2.45	1	qt	7.0, 6.0
5	48.3	CH	2.23	1	m	
6	80.1	CH	4.52	1	dd	11.1, 10.5
7	56.1	CH	2.07	1	ddd	12.0, 10.5, 2.6
8	64.6	CH	3.97	1	m	-
9a	47.8	CH_2	2.71	1	dd^a	14.0, 4.7
9b			2.19	1	m^b	-
10	143.9	C				
11	37.8	CH	2.85	1	dq	12.0, 7.0
12	181.3	C				
13	13.0	CH_3	1.19	3	d	7.0
14a	114.0	CH_2	5.15	1	s	-
14b			5.00	1	s	-
15	8.7	CH_3	1.00	3	d	7.0
1'	102.9	CH	4.34	1	d^c	7.8
2'	75.8	CH	3.20	1	dd	9.4, 8.2
3'	77.80	CH	3.26-3.39	1	m^d	
4'	71.40	CH	3.26-3.39	1	m^d	
5'	77.70	CH	3.26-3.39	1	m^d	
6'a	63.3	CH_2	3.87	1	dd	12.00, 1.80
6'b			3.67	1	dd	12.00, 5.30

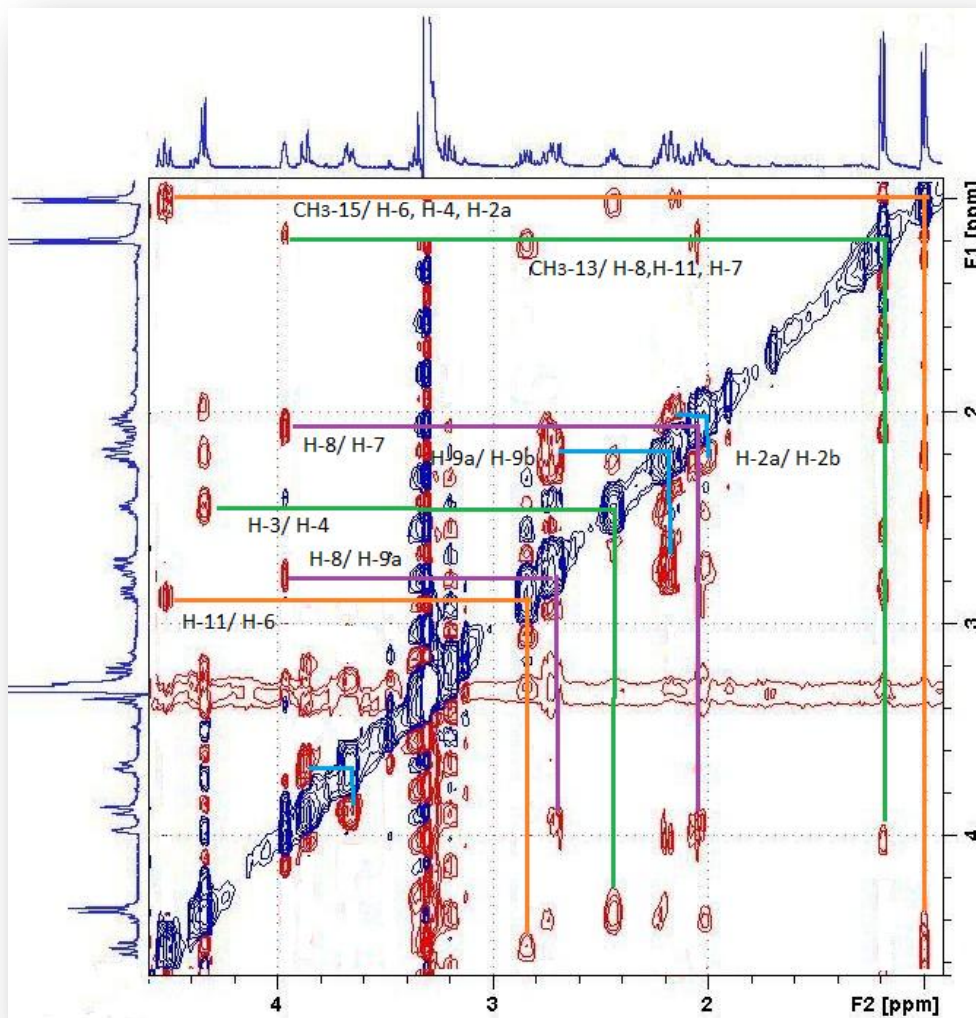
*Οι χημικές μετατοπίσεις των των ανθράκων αποδόθηκαν από τα πειράματα HSQC και HMBC a,b,c,d Επικαλυπτόμενα σήματα στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$



Εικόνα 26: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 9



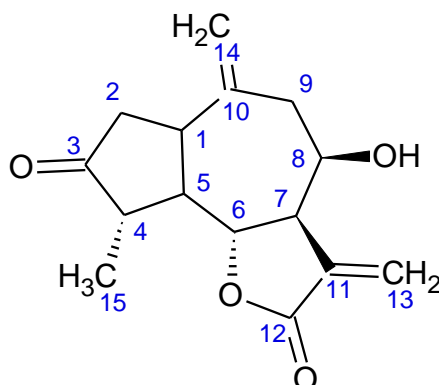
Εικόνα 27: Φάσμα HMBC της ουσίας 9



Εικόνα 28: Φάσμα NOESY ουσίας 9

Ουσία 10:

(3aR,4R,9S,9bR)-4-υδροξυ-9-μεθυλο-3,6-διμεθυλιδενο-οκταϋδρο-αζουλενο[4,5-b]φουρανο-2,8(3H,4H)-διόνη [= 8-επι-γροσεϊμίνη]



Η ουσία απομονώθηκε ως ελαιώδες, άχρωμο προϊόν και η δομή της προσδιορίστηκε μέσω μελέτης του φάσματος $^1\text{H-NMR}$, καθώς και με σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων, που είναι ήδη δημοσιευμένα στη βιβλιογραφία (Zidorn, 2008)

Η ουσία έχει απομονωθεί από το *Crepis virens* [syn. *Crepis capillaries*] και από το *Crepis mollis* (Zidorn, 2008).

Η 8-επι-γροσεϊμίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυτό *Grossheimia macrocephala* (Rybalko et al., 1965), καθώς και από τα ακόλουθα φυτά: *Youngia japonica* (Miyase et al., 1985; Jang et al., 2000; Chen et al., 2006), *Chartolepis pterocaula* (Nowak, 1989), *Onoseris onoserioides* (Zdero et al., 1989), *Grosheimia macrocephala* (Rybalko et al, 1965), *Cynara scolymus* (Miyase et al., 1985), *Chartolepis intermedia* (Mukhametzhanov et al., 1969), *Amberboa lippii* (Breton et al., 1968). Επίσης έχει παρασκευασθεί και συνθετικά (Χιαοhua et al., 2009).

Σε *in vitro* δοκιμασίες έδειξε έντονη αντιφλεγμονώδη δράση. Συμπλέκεται με πυρηνόφιλη προσβολή με την υπομονάδα p65 του NF-κB και εμποδίζει την μετακίνησή της στον πυρήνα του κυττάρου. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB με αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται και δε μεταγράφονται γονίδια υπεύθυνα για την παραγωγή ενζύμων, που εμπλέκονται στη διαδικασία της φλεγμονής όπως η κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2) και το iNOs (Giner et al., 2009)

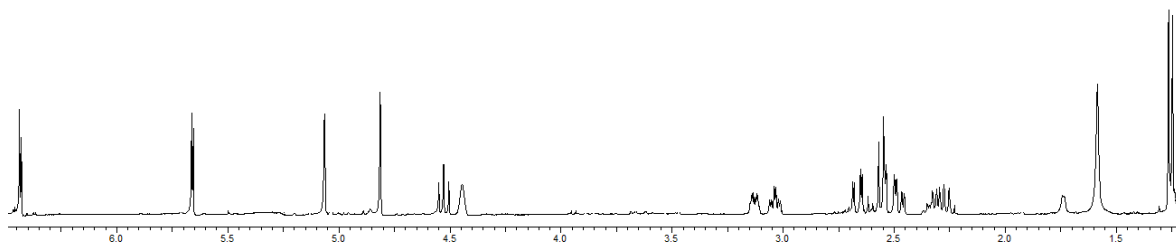
Επίσης, η 8-επι-γροσεϊμίνη έχει δείξει αντικαρκινική (Woynarowski *et al.*, 1980), αντιυπερλιπιδαιμική (Shimoda *et al.*, 2002) και αντιπρωτοζωική δράση (Χιαοχουα *et al.*, 2009).

Στο φάσμα ^1H NMR παρατηρούμε τα χαρακτηριστικά σήματα του εξωμεθυλενικού διπλού δεσμού της α -μεθυλενο- γ -λακτόνης σε δ 6.43 (d, $J=3.9$) και 5.66 (d, $J=3.1$). Στο φάσμα υπάρχει ακόμα ένας εξωμεθυλενικός διπλός δεσμός, αυτός της θέσης 14 σε δ 5.07 (br s) και 4.81 (br s). Στη θέση 15 βρίσκεται ένα μεθύλιο, εντοπισμένο πάνω σε μεθίλιο και συντονίζεται στην περιοχή υψηλού πεδίου σε δ 1.26 (d, $J=7.0$ Hz). Ωστόσο η χημική του μετατόπιση είναι υψηλότερη από την αναμενόμενη και αυτό ερμηνεύεται από τη β διάταξή του και τη γειτνίαση με το καρβονύλιο της θέσης 3.

Το πρωτόνιο H-6 είναι πιο αποθωρακισμένο από το πρωτόνιο H-8 υποδηλώνοντας το κλείσιμο του λακτονικού δακτυλίου στις θέσεις 6-7. Οι μεγάλες συζεύξεις με το H-5 και το H-7 αποδεικνύουν την *trans-diaxial* διάταξη μεταξύ των H-6 β , H-5 α και H-7 α και τη συνεπαγόμενη *trans* διαμόρφωση του λακτονικού δακτυλίου. Μεταξύ του H-1 και του H-5 παρατηρείται $J_{1,5}=8$ Hz, η οποία παρά την υψηλή τιμή δεν παύει να αποδεικνύει την *cis* διάταξη μεταξύ τους, γεγονός που συμφωνεί με τη βιοσυνθετική πορεία που ακολουθείται στο γένος. Το H-5 συζεύγνυται με το H-4 με $J_{4,5}=10.2$ Hz γεγονός που δείχνει την *trans* διάταξή τους. Η β διάταξη του H-4 επιβεβαιώνει την α διάταξη του μεθυλίου της θέσης 15.

Πίνακας 10: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 10 (CDCl_3 , 400MHz).

Μετατόπιση(ppm)	Αριθμός H	Πολλαπλότητα	J (Hz)	Ταυτοποίηση
3.04	1	td	8.0, 3.5	H-1
2.55	2	m	-	H-2a, H2b
2.33	1	ddq	10.2, 7.0, 1.4	H-4
2.26	1	ddd	10.3, 9.2, 8.0	H-5
4.52	1	dd	9.4, 8.7	H-6
3.13	1	dddd	10.2, 3.9, 2.3, 2.00	H-7
4.45	1	m	-	H-8
2.48	1	dd	13.3, 3.9	H-9b
2.67	1	dd	14.1, 3.1	H-9a
5.66	1	d	3.1	H-13b
6.43	1	d	3.9	H-13a
4.81	1	br s	-	H-14b
5.07	1	br s	-	H-14a
1.26	3	d	7.0	H-15



Εικόνα 29: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ουσίας 10

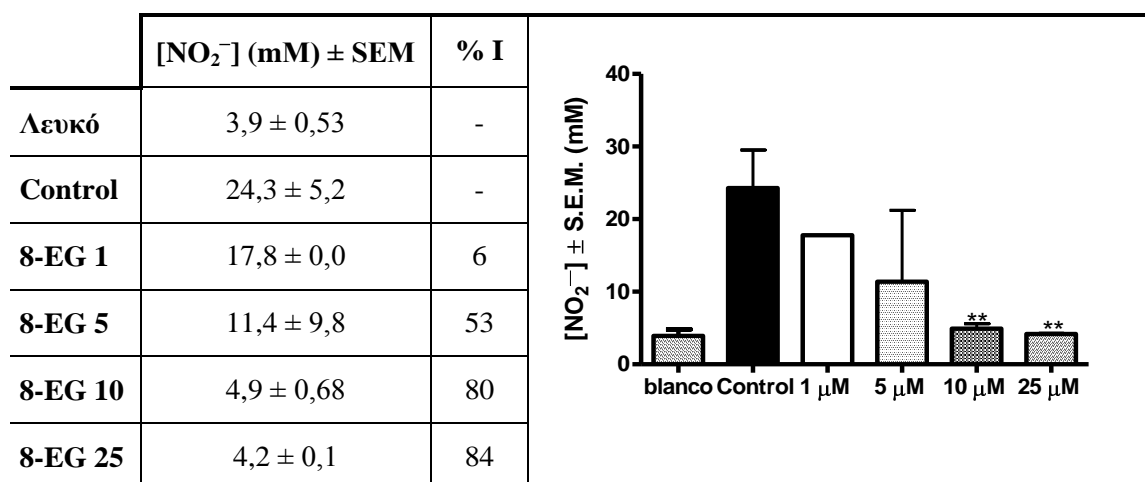
Δ. IN VITRO ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ (Giner *et al.*, 2009)

Δοκιμασία κυττατοτοξικότητας με το αντιδραστήριο MTT

Βρέθηκε ότι η ουσία **10** είναι τοξική για τα μακρόφαγα κύτταρα RAW 264.7 σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 50 μM . Η αντίστοιχη τοξική συγκέντρωση για τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα Jurkat ήταν της τάξης των 10 μM . Έτσι η ουσία **10** δοκιμάστηκε μέχρι συγκέντρωση 25 μM για τα κύτταρα RAW 264.7 και 10 μM για τα κύτταρα Jurkat .

Δοκιμασία αναστολής παραγωγής νιτρωδών με το αντιδραστήριο GRIESS

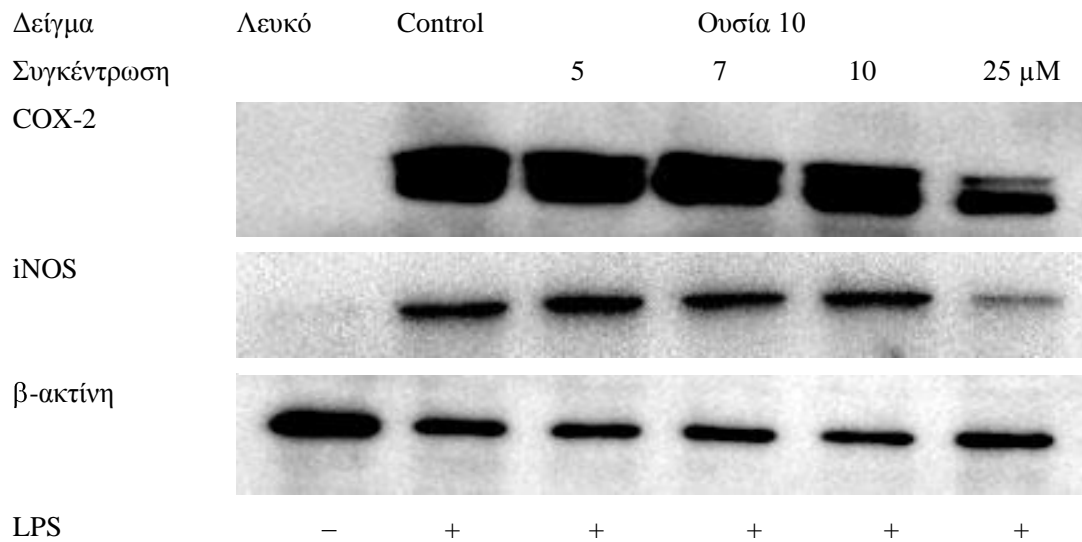
Μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων της ουσίας **10** (1-25 μM) στην απελευθέρωση νιτρωδών στο υπερκύμενο υγρό του καλλιεργήματος κυττάρων RAW 265.7, τα οποία είχαν εκτεθεί σε LPS (λιποπολυσακχαρίτης *Escherichia coli* 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) μια ώρα πριν εκτεθούν στις διάφορες συγκεντρώσεις της ουσίας **10**. Βρέθηκε ότι η ουσία **10** αναστέλλει την παραγωγή νιτρωδών με δοσοεξαρτώμενο τρόπο $\text{CI}_{50} = 6,1 \mu\text{M}$ ($r^2 = 0,9908$).



Εικόνα 30. Επίδραση της ουσίας **10** στην παραγωγή νιτρωδών από κύτταρα RAW 265.7 κατόπιν έκθεσης σε LPS. ** $p < 0,01$ (Test t του Dunnett).

Δοκιμασία αναστολής έκφρασης των ενζύμων iNOs και COX-2

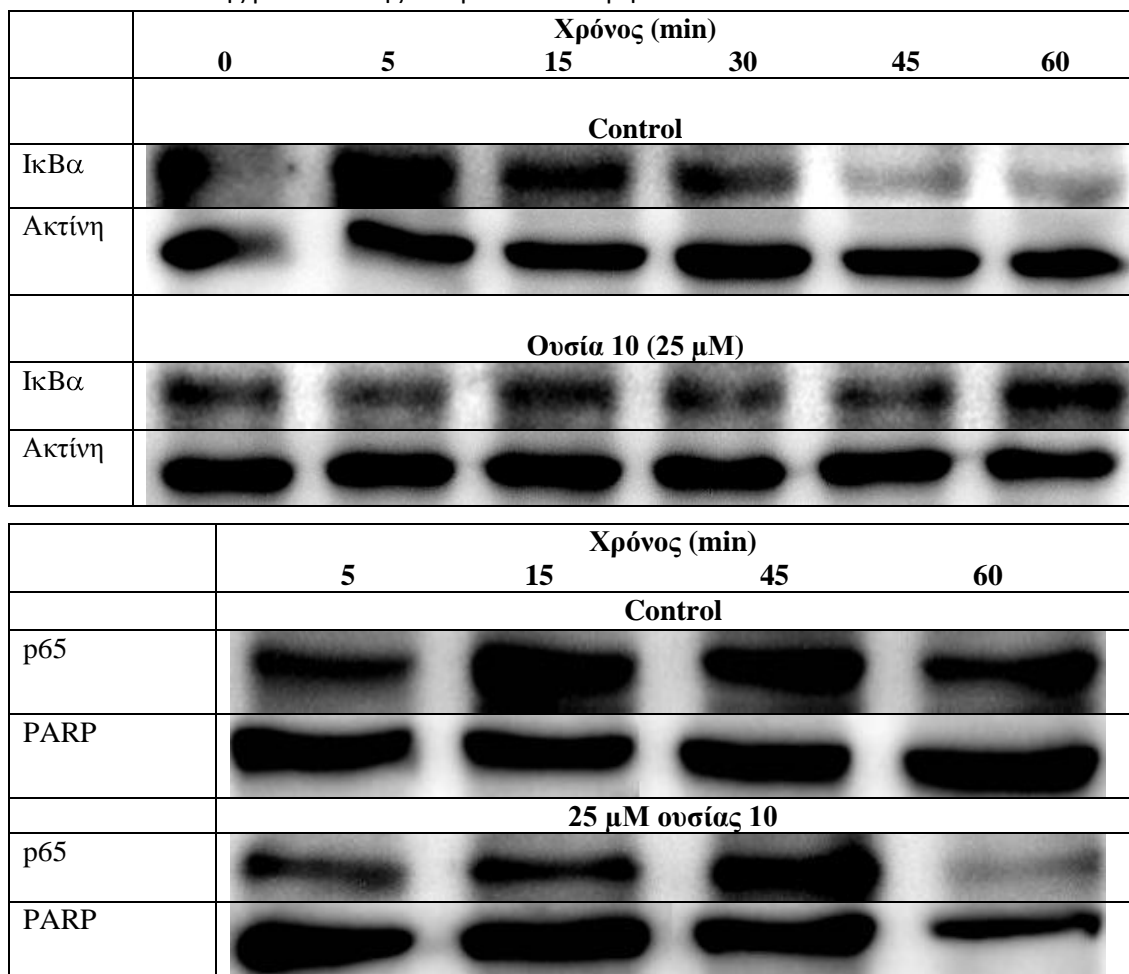
Με την τεχνική του *Western Blotting* σε κύτταρα RAW 265.7 διεγερμένα με LPS εκτιμήθηκε η αναστολή της έκφρασης των δυο ενζύμων κατόπιν έκθεσης σε συγκέντρωση της ουσίας **10** μέχρι 25 μM . Σε συγκέντρωση 25 μM η ουσία **10** ανέστειλε την COX-2 κατά 41.9% και τον iNOs κατά 43.6%.



Εικόνα 31. Εικόνες από τη western blot που δείχνουν την αναστολή της έκφρασης των ενζύμων iNOS και COX-2 σε κύτταρα RAW 264.7 διεγερμένα με LPS. n = 3-4.

Κινητική του IκBα και του p65 παρουσία της ουσίας 10

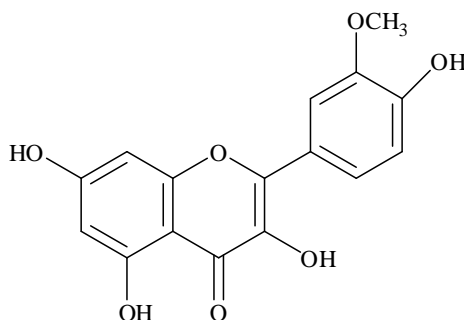
Κατά τη φυσιολογική απόκριση του κυττάρου σε φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως ο LPS, η πρωτεΐνη IκBα, που συγκρατεί της υπομονάδες p55 και p65, αποδομείται και η υπομονάδα p65 μετατοπίζεται από το κυτοσόλιο στον πυρήνα για να ρυθμίσει τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB. Υπό την επίδραση της ουσίας **10** παρατηρήθηκε άρση της αποδόμησης του IκBα και της μετατόπισης του p65 στον πυρήνα.



ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ (Mabry *et al.*, 1970, Markham, 1989, Markham & Geiger, 1994).

Ουσία **11**: **3,5,7,4'-τετραϋδροξυ-3'-μεθοξυ-φλαβονόλη (ισοραμνετίνη)**:

UV-Vis λ_{\max} nm MeOH: 254, 267^{sh}, 355, MeONa: 273, 320^{sh}, 400 \uparrow , AlCl₃: 266^{sh}, 300, 358, 398, AlCl₃+ HCl: 271, 298^{sh}, 354, 390, NaOAc: 273, 320, 376, NaOAc+H₃BO₃: 254, 266^{sh}, 356.

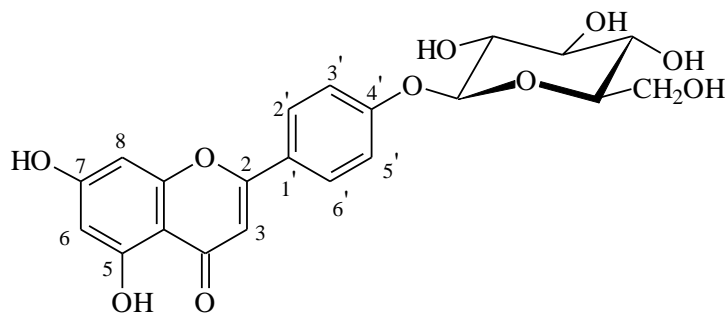


¹H NMR: δ (ppm: CD₃OD): 7.89 (*d*, J=1.5 Hz, H-2'), 7.56 (*dd*, J=7.8, 1.8 Hz, H-6'), 6.87 (*d*, J=8.5 Hz, H-5'), 6.28 (*d*, J=1.5 Hz, H-8), 6.10 (*d*, J=1.5 Hz, H-6), 3.94 (*s*, CH₃O-).

R_f (AcOH-30%): 0.06. UV₃₆₆ nm: κίτρινη κηλίδα. Χρώση (UV₂₅₄ nm) με το αντιδραστήριο του Neu (Neu, 1957): έντονη κίτρινη.

Ουσία **12**: **απιγενινο-4'-β-D-γλυκοσίδης**:

UV-Vis λ_{\max} nm MeOH: 268, 334, MeONa: 268, 338^{sh}, 393 \downarrow , AlCl₃: 275, 294^{sh}, 347, 383, AlCl₃+ HCl: 275, 294^{sh}, 343, 382, NaOAc: 276, 388, NaOAc+H₃BO₃: 267, 339.



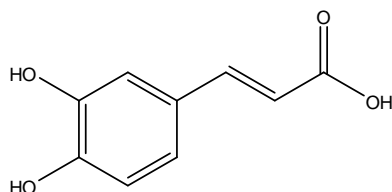
¹H NMR: δ (ppm: CD₃OD): 7.87 (*d*, J=8.8 Hz, H-2', 6'), 6.90 (*d*, J=8.9 Hz, H-3', 5'), 6.80 (*d*, J=1.5 Hz, H-8), 6.64 (*s*, H-3), 6.48 (*d*, J=1.6 Hz, H-6), 5.05 (*d*, J=7.9 Hz, H-1''), 3.92 (*dd*, J = 12.3, 2.4, H-6a''), 3.70 (*dd*, J = 12.3, 5.5, H-6b''), 3.55-3.35 (*m*, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'').

R_f (AcOH-30%): 0.45. UV₃₆₆ nm: σκοτεινή κηλίδα. Χρώση (UV₂₅₄ nm) με το αντιδραστήριο του Neu: κιτρινοπράσινη, μετά 24 h καστανή στο ορατό.

ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ/ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ

Ουσία **13**: (*E*)-3-(3, 4-διυδροξυ-φαινυλο)-ακρυλικό οξύ [=E-καφεϊκό οξύ]:

UV-Vis λ_{\max} nm MeOH: 242, 295^{sh}, 325, MeONa: 252, 301, 344, NaOAc: 286, 314, NaOAc+H₃BO₃: 293, 330.



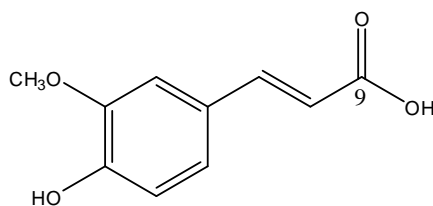
¹H NMR: δ (ppm: CD₃OD): 7.65 (*d*, J=15.4 Hz, H-7), 6.38 (*d*, J=15.4 Hz, H-8), 7.09 (*d*, J=2.2 Hz, H-2), 6.99 (*dd*, J=8.6, 2.2 Hz, H-6), 6.79 (*d*, J=8.5 Hz, H-5).

R_f (AcOH-30%): 0.64. UV_{366 nm}: κυανό. Χρώση (UV_{254 nm}) με το αντιδραστήριο του Neu: κυανοκίτρινο.

Η ουσία **13** είναι ένα από τα πιο ευρέως διαδεδομένα φαινολικά οξέα με πλούσια βιολογική δράση (Marquez *et al*, 2004, Beyer *et al.*, 2003, Watabe *et al.*, 2003, Ichikawa *et al* 2003).

Ουσία **14**: (*E*)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυ-φαινυλο)-ακρυλικό οξύ [=E-φερουλικό οξύ]:

UV-Vis λ_{\max} nm MeOH: 236, 295^{sh}, 322, MeONa: 288, 311, 345, NaOAc: 286, 312, NaOAc+H₃BO₃: 286, 312.

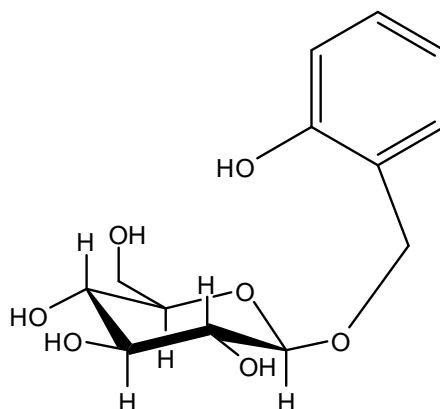


¹H NMR: δ (ppm: CD₃OD): 7.59 (*d*, J=15.8 Hz, H-7), 7.19 (*d*, J=2.2 Hz, H-2), 7.06 (*dd*, J=8.1, 2.0 Hz, H-6), 6.81 (*d*, J=8.1 Hz, H-5). 6.32 (*d*, J=15.8 Hz, H-8), 3.89 (*s*, -OCH₃).

R_f (AcOH-30%): 0.50. UV_{366 nm}: κυανό. Χρώση (UV_{254 nm}) με το αντιδραστήριο του Neu: κυανό.

Ουσία 15: 2-(2-υδροξυ-βενζυλοξυ)-6-(υδροξυμεθυλο)τετραϋδρο-πυρανο-3,4,5-τριόλη [=ισσοσαλικίνη]:

UV-Vis λ_{\max} nm MeOH: 255, 275, 279^{sh}, 308.

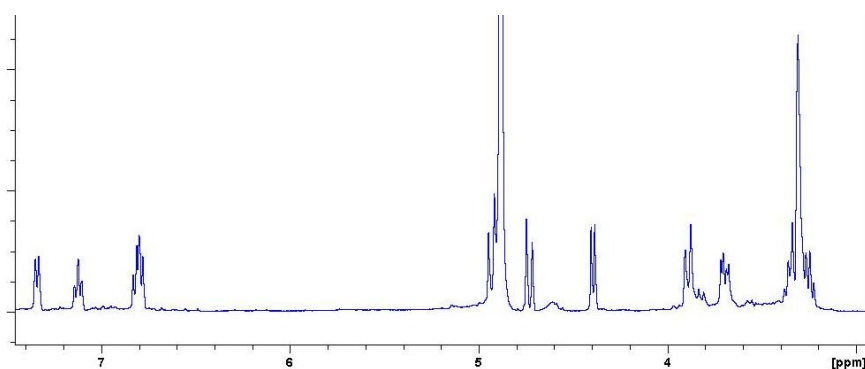


^1H NMR: δ (ppm: CD_3OD): 7.35 (br d, $J=7.3$ Hz, H-5), 7.12 (dd, $J=7.6, 7.3$ Hz, H-2), 6.81 (dd, $J=7.6, 7.3$ Hz, H-4), 6.79 (dd, $J=7.6, 7.3$ Hz, H-3), 4.93 (d, $J=12.10$ Hz, H-7a), 4.73 (d, $J=12.0$ Hz, H-7b), 4.39 (d, $J=7.8$ Hz, H-1'), 3.89 (br d, $J=11.9$ Hz, H-6'a), 3.70 (dd, $J=12.0, 5.30$ Hz, H-6'b), 3.20-3.39 (m, H-2'-H-5').

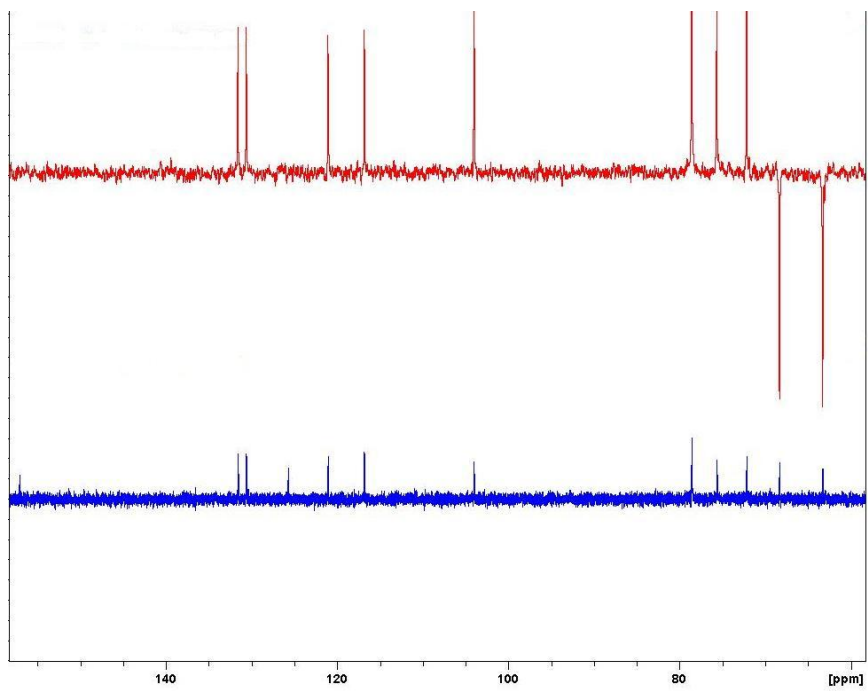
^{13}C NMR: δ (ppm: CD_3OD): 157.1 (C-1), 131.6 (C-5), 130.6 (C-3), 125.7 (C-6), 121.1 (C-4), 116.8 (C-2), 104.0 (C-1'), 78.6 (C-5'), 75.7 (C-3'), 72.2 (C-2'), 68.3 (C-7), 63.2 (C-6').

Η απόδοση της σύνδεσης της γλυκόζης στη θέση 7, κρίθηκε από τη μετατόπιση του C-7 στα 68.3 ppm καθώς στην περίπτωση της σαλικίνης ο C-7 συντονίζεται στα 61.0 ppm (Kanho *et al.*, 2004)

R_f (AcOH-30%): 0.96. UV_{366 nm}: υποκίτρινη. Χρώση (UV_{254 nm}) με το αντιδραστήριο του Neu: λευκοκυανό.

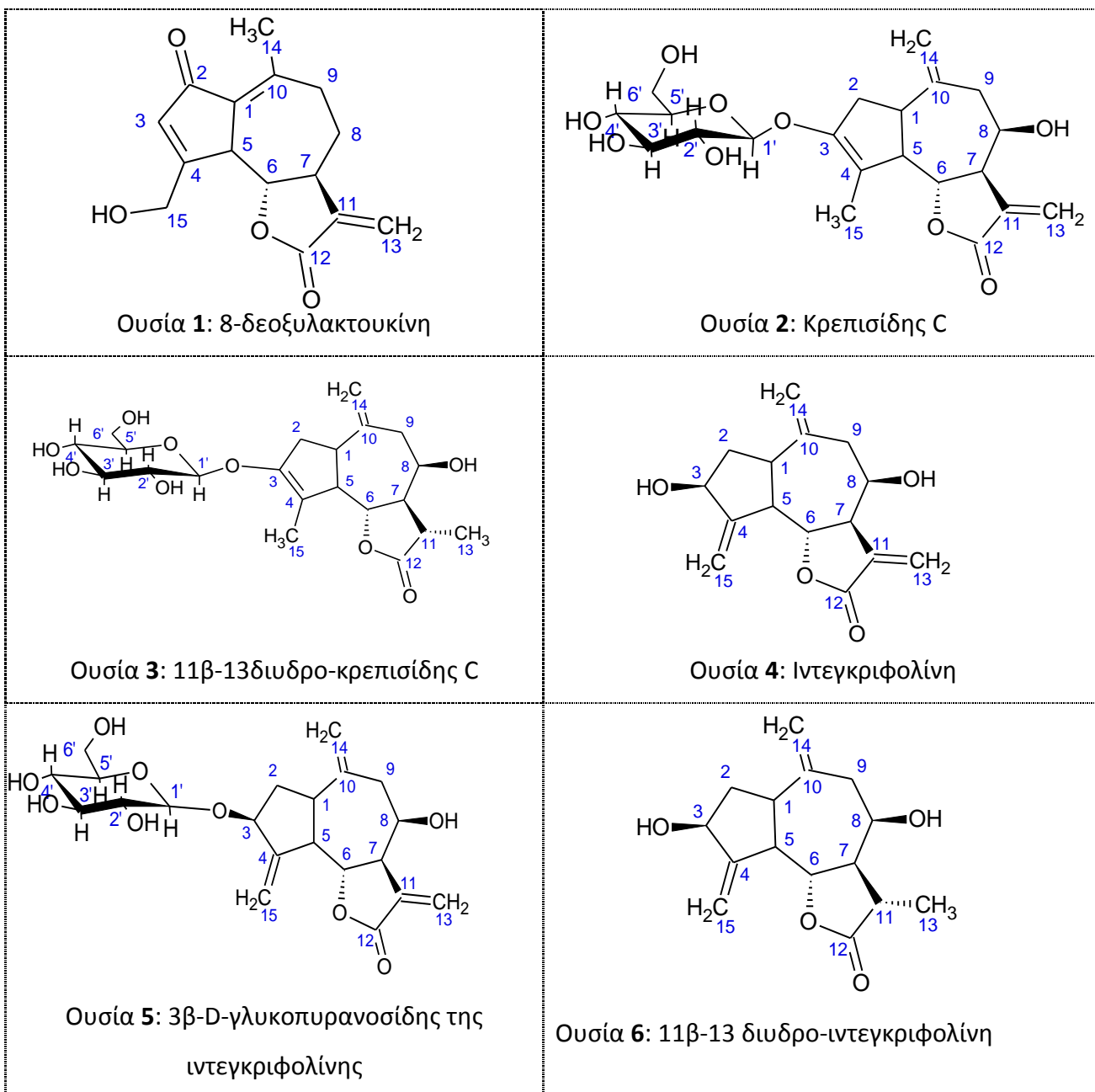


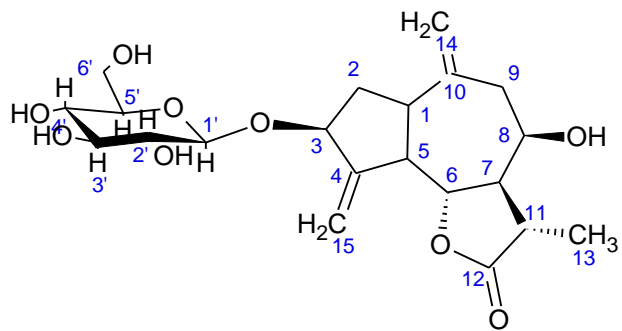
Εικόνα 29: Φάσμα ^1H -NMR ουσίας 15



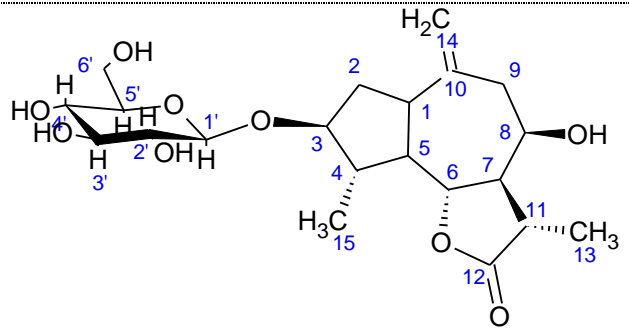
Εικόνα 30: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ & $^{13}\text{C-NMR/DEPT}$ της ουσίας 15

Από τη μελέτη των δευτερογενών μεταβολιτών του φυτού *Crepis dioscoridis* L. απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν συνολικά δεκαπέντε φυσικά προϊόντα: δέκα σεσκιτερπενικές λακτόνες (ουσίες **1-10**), δύο φλαβονοειδή (ουσίες **11, 12**), δύο φαινολικά οξέα (ουσίες **13, 14**) και ένας απλός φαινολικός γλυκοσίδης (ουσία **15**). Πιο συγκεκριμένα από το εκχύλισμα με το μίγμα των διαλυτών: κυκλοεξάνιο-αιθέρα-μεθανόλη (1:1:1) (CRE-A) απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι εξής ουσίες:

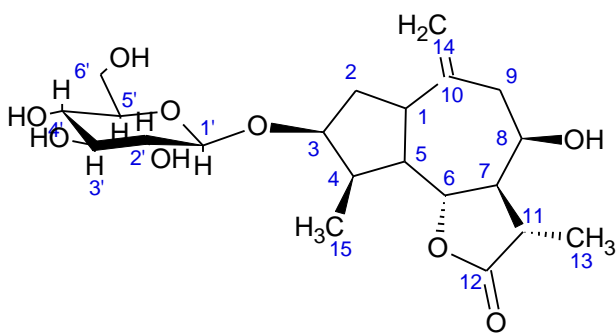




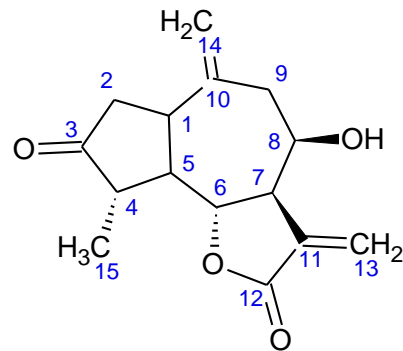
Ουσία 7: 3β-D-γλυκοκυρανοσίδης της 11β-13
διυδρο-ιντεγκριφολίνης



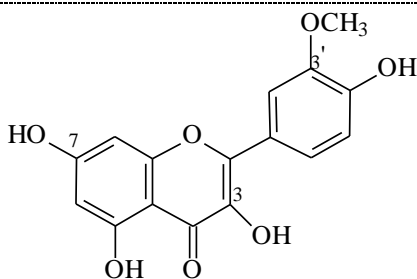
Ουσία 8: Μακροκλινσίδης F



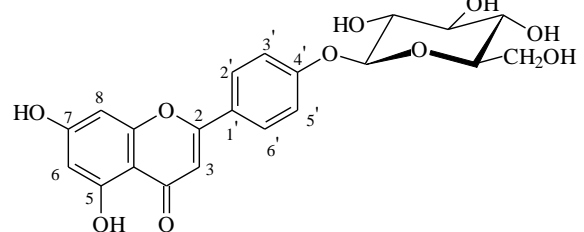
Ουσία 9: 11β-13, 4α-15-τετραύδρο-ιντεγκρι-
φολίνη



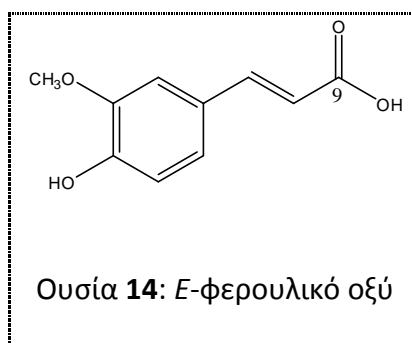
Ουσία 10: 8-επι-γροσειμίνη



Ουσία 11: 3,5,7,4'-τετραύδροξυ-3'-μεθοξυ-
φλαβονόλη (ισοραμνετίνη)



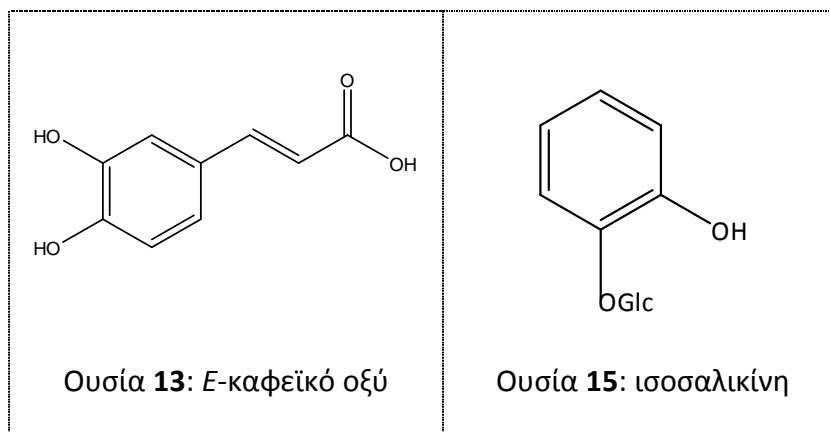
Ουσία 12: απιγενινο-4'-β-D-γλυκοσίδης



Ουσία 14: E-φερουλικό οξύ

Επίσης από το εκχύλισμα αυτό απομονώθηκε και η ουσία 15.

Από το πολικό εκχύλισμα μεθανόλης: νερού 5:1 (CRE-B) απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι παρακάτω ουσίες:



Επίσης από το εκχύλισμα αυτό απομονώθηκε εκ νέου η ουσία **5**.

Με βάση τα ανωτέρω αξίζει να αναφερθούν τα εξής:

- Είναι η πρώτη φυτοχημική μελέτη στο είδος *Crepis dioscoridis* L.
- Η ουσία **3** αποτελεί νέο φυσικό προϊόν.

Όπως αναμενόταν, το *Crepis dioscoridis* L. είναι πλούσιο σε σεσκιτερπενικές λακτόνες. Κύριοι μεταβολίτες του φυτού είναι οι ουσίες **5**, **2** και **10**.

Το χημικό φορτίο του φυτού συμφωνεί με το στατιστικά επεξεργασμένο προφίλ του γένους. Η παρούσα μέλετη επιβεβαιώνει την κατάταξη του γένους *Crepis* στην ομάδα 1 με βάση την συγκεντρωτική χημειοταξινομική μελέτη των taxa του tribe *Cichoriae* (Zidorn, 2008), όπου επικρατούν τα γουαϊανολίδια τύπου *Costus* (βλ. σελ. 2). Επιπλέον αξίζει να αναφερθεί ότι το *Crepis dioscoridis* L. έχει συγγενές χημικό προφίλ με τα είδη το *C. mollis* L. και *C. capillaris* L.

Επίσης έγινε αντιφλεγμονώδης έλεγχος της ουσίας **10**. Βρέθηκε ότι ασκεί δοσοεξαρτώμενη αναστολή της έκκρισης νιτρωδών ριζών από Β-λεμφοκύτταρα RAW 264.7. Προσδιορίστηκε η αναστολή της έκφρασης των ενζύμων COX-2 και iNOs, ύστερα από κατεργασία των κυττάρων με 25 μM της ουσίας, σε 41.9% και 43.6%, αντίστοιχα.

Η έκφραση των ενζύμων αυτών ρυθμίζεται από το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB οπότε αναζητήθηκε πώς δρα η ουσία **10** επ' αυτού. Μελετώντας την κινητική της υπομονάδας p65 και της σταθεροποιητικής πρωτεΐνης ικΒα βρέθηκε ότι η ουσία **10** σταθεροποιεί το σύμπλεγμα p65-ικΒα μη επιτρέποντας την υπομονάδα p65 να μετακινηθεί στον πυρήνα του κυττάρου και κατ' επέκταση την παραπέρα απόκριση του κυττάρου στο ερέθισμα από το φλεγμονώδη παράγοντα.

Τα αποτελέσματα επί των άλλων σεσκιτερπενικών λακτονών αναμένονται στο μέλλον.

Adekenov S.M., Kadirberlina G. M., K. M. Turdybekov, Yu. T. Struchkov (1991) "Terpenoids of *Crepis tectorum*. Molecular and crystal structure of the sesquiterpene lactone 8-epidesacylcynaropicrin" *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, **5**, 638-642.

Ahmed, A.A., Mahmoud, A.A., Hammam, M.A.S., Abd El-Razek, M.H., Mabry, T.J. (2000) "A sesquiterpene lactone and furocoumarin from *Crepis aspera*." *Rev. Latinoam. Quim.* **28**, 143-145.

Arjun Banskota H., Jianping Li, Tezuka Y., Kadota S. (2003) "Hypoglycemic effect of *Aemotoxylon campechanum* on streptozotocin (STZ) induced diabetic rats" *J. Trad. Med.* **20**, 57-61.

Bang, M.-H., Jang, T.-O., Song, M.-C., Kim, D.-H., Kwon, B.-M., Kim, Y.-K., Lee, H.-S., Chung, I.-S., Kim, D.-K., Kim, S.-H., Park, M.-H., Baek, N.-I. (2004) "Isolation and identification of sesquiterpene lactones isolated from the root of *Ixeris dentate* forma *albiflora*; inhibition effects on ACAT, DGAT and FTPase activity." *Han'guk Eungyong Sangmyong Hwahakhoeji* **47**, 251-257.

Barbetti, P., Casinovi, C.G., Santurbano, B., Longo, R. (1979) "A grosheimin from *Crepis virens*." *Collect. Czech. Chem. Commun.* **44**, 3123-3127.

Beyer G., Melzig M. F. (2003) "Effects of selected flavonoids and caffeic acid derivatives on hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity in cultivated human cells", *Planta Med.*, **69**, 1125-1129.

Blanco JG, Gil RR, Alvarez CI, Patriito LC, Genti-Raimondi S, Flury A. (1997) "A novel activity for a group of sesquiterpene lactones: inhibition of aromatase." *FEBS Lett.* **16**, **409**(3), 396-400.

Blanco JG, Gil RR, Bocco JL, Meragelman TL, Genti-Raimondi S, Flury A. (2001) "Aromatase inhibition by an 11,13-dihydroderivative of a sesquiterpene lactone." *J Pharmacol Exp Ther.* **297**(3), 1099-105.

Breton Funes, Jose L. Garcia Marrero, B., Gonzalez Antonio (1968) "Sesquiterpene lactones of *Amberboa lippii*. Structure of grosshemine" *Anales de Quimica* **64**(11), 1015-16

Coll J.C., Bowden B.F. (1986) "The application of Vacuum Liquid Chromatography to the separation of terpene mixtures" *J. Nat. Prod.* **49**(5), 934-936.

Drew Damian Paul, Nadja Krichau, Kirsten Reichwald, Henrik Toft Simonsen (2009) "Guaianolides in apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis" *Phytochem Rev*, **8**, 581-599.

Emiko Yae, Shoji Yahara, a Mona El-aasr, Tsuyoshi Ikeda, Hitoshi Yoshimitsu, Chikako Masuaka, Masateru Ono, Izumi Hide, Yoshihiro Nakata, Toshihiro Nohara (2009) "Studies on the Constituents of Whole Plants of *Youngia japonica*" *Chem. Pharm. Bull.* **57**(7), 719-723.

Eun-Mi Ahn, Myun-Ho Bang, Myoung-Chong Song, Mi-Hyun Park, Hwa-Young Kim, Byoung-Mog Kwon, Nam-In Baek (2006) "Cytotoxic and ACAT-inhibitory Sesquiterpene Lactones from the Root of *Ixeris dentata* forma *albiflora*" *Arch. Pharm. Res.* **29**(11), 937-941,

Fazylova A.S., Turdybekov K.M., Kadirberlina G.M., Rakhimova B.B., Adekenov S.M., 2000. "Molecular structure of crepidoside A and isolipidiol from *Crepis multicaulis*". *Chem. Nat. compd.* **36**, 177-180.

Fernandes B. in: Tutin T. G. et al. (Eds.) "Flora Europea" Cambridge University Press, 1976, 4, 145.

Fleurentin J, Hoefler C, Lexa A, Mortier F, Pelt JM. (1986) "Hepatoprotective properties of *Crepis rueppellii* and *Anisotes trisulcus*: two traditional medicinal plants of Yemen." J. Ethnopharmacol. **16**(1), 105-11.

Ghantous Akram, Gali-Muhtasib Hala, Vuorela Heikki, Saliba A. Najat, Darwiche Nadine (2010) "What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?" Drug Discovery Today, **15**, Numbers 15/16.

Giner R. M., Tsoukalas M., Skaltsa E., Recio M. C., Rios J. L. (2009) "8-epigrosheimin, from *Crepis dioscoridis*, reduces i-NOs and COX-2 expression in Raw 264.7 macrophages via inhibition of NF-kB" Methods and findings in experimental and clinical pharmacology **31**, sup A.

Hostettman, K., Marston, A., Hostettman, M. (1998) "Preparative chromatography techniques: Application in natural products isolation". Springer-Verlag, Berlin.

Ichikawa M., Ryu K., Yoshida J., Ide N., Kodera Y., Sasaoka T., Rosen R. T. (2003) "Identification of six phenylpropanoids from garlic skin as major antioxidants", *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7313-7317.

Jan-Willem de Kraker, Maurice C.R. Franssen, Maaikje Joerink, Aede de Groot, Harro J. Bouwmeester (2002) "Biosynthesis of Costunolide, Dihydrocostunolide, and Leucodin. Demonstration of Cytochrome P450-Catalyzed Formation of the Lactone Ring Present in Sesquiterpene Lactones of Chicory" *Plant Physiology*, **129**, 257–268.

Kanho H, Yaoya S, Kawahara N, Nakane T, Takase Y, Masuda K, Kuroyanagi M. (2005) "Biotransformation of benzaldehyde-type and acetophenone-type derivatives by *Pharbitis nil* hairy roots." *Chem Pharm Bull* **53**(4), 361-5.

Kapiszewska, M., E. Soltys, F. Visioli, A. Cierniak, G. Zajac (2005) "The protective ability of Mediterranean plant extracts against the oxidative DNA damage. The role of the oxygen species and the polyphenol content" *Journal of Physiology and Pharmacology*, **56**(1), 183-197.

Kilian N., Gemeinholzer B., Lack H. W.: Cichorieae (2009) in: Funk, V. A., Susanna, A., Stuessy, T. E. & Bayer, R. J. (ed.), *Systematics, evolution and biogeography of Compositae*. – Vienna: IAPT, pp. 343-383.

Kisiel W. (1983) "8-Epidesacylcynaropicrin from *Crepis capillaris*." *Planta Med.* **49**, 246-247.

Kisiel W. (1984) "Sesquiterpene lactone glycosides from *Crepis capillaris*." *Phytochemistry*, **23**, 1955–1958.

Kisiel W., Kohlmünzer S. (1987) "Ixerin F from *Crepis biennis*." *Planta Med.* **53**, 390.

Kisiel W., Kohlmunzer S. (1989) "A sesquiterpene lactone glucoside from *Crepis tectorum*" *Phytochemistry*, **28** (9) 2403-2404.

Kisiel W. (1994) "Hypocretenolides from *Crepis aurea*." *Fitoterapia* **65**, 381.

Kisiel W., Japukovic J., Huneck S. (1994) "Guaianolides from *Crepis crocea*" *Phytochemistry* **35** (1), 269-270.

- Kisiel W. (1995) "Guaianolides from *Crepis sibirica*." *Fitoterapia* **66**, 276.
- Kisiel W., Barszcz B. (1995) "Sesquiterpene lactone glycosides from *Crepis pyrenaica*." *Phytochemistry* **39**, 1395–1397.
- Kisiel W., Barszcz B. (1996) Sesquiterpene lactone lactones from *Crepis rhoeadifolia*." *Phytochemistry* **43**, 823–825.
- Kisiel W., Barszcz B. (1999) "Sesquiterpenoids and phenolics from roots of *Crepis foetida*." *Pol. J. Chem.* **73**, 569–571.
- Kisiel W., Gromek D. (1994) "Guaianolides from *Crepis pulchra*." *Pol. J. Chem.* **68**, 535–538.
- Kisiel W., Zielinska K., Joshi S.P. (2000) "Sesquiterpenoids and phenolics from *Crepis mollis*." *Phytochemistry*, **54**, 763–766.
- Kisiel W., Michalska K. (2001) "Sesquiterpenoids and phenolics from *Crepis conyzifolia*." *Z. Naturforsch.* **56c**, 961–964
- Kisiel W., Michalska K., Szneler E. (2002) "Sesquiterpene Lactones from *Crepis zacintha*" *Polish J. Chem.*, **76**, 1571–1576.
- Lee, S.-W., Chen, Z.-T., Chen, C.-M. (1994) "A new sesquiterpene lactone glucoside from *Ixeris chinensis*." *Heterocycles* **38**, 1933–1936.
- Linskens H. F. (1959) "Papierchromatographie in der Botanik" *Belin-Göttingen-Heidelberg*, p. 93.
- Mabry T. G., Markham K. R., Thomas M. B. (1970) "The systematic identification of flavonoids", Berlin-Heidelberg-New York.
- Mares D., Romagnoli C., Tosi B., Andreotti E., Chillemi G., Poli F. (2005) "Chicory extracts from *Cichorium intybus* L. as potential antifungals" *Mycopathologia*, **160**(1), 85-91.
- Marco J. Alberto, Juan F. Sanz, Remedios Albiach (1992) "A Sesquiterpene ester from *Lactuca serriola*", *Phytochemistry* **31**, 2539-2540.
- Marco J. Alberto, Cervera Juan, Sanz F., Yuste Alberto, Oriola M. Carmen (1994) "Sesquiterpene lacones and dihydroflavonols from *Andryala* and *Urospermum* species" *Phytochemistry* **36**(3), 725-729.
- Markham K. R. (1981) "Techniques of flavonoid identification", Academic Press.
- Markham K. R. & Geiger H. in: Harborne J. B. (1994) "The flavonoids. Advances in research since 1986" Chapman and Hall Ltd. pp. 441-497.
- Marquez N., Sancho R., Macho A., Calzado M. A., Fiebich B. L., Munoz E. (2004) "Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-kappa B transcription factors" *J. Pharm Exp. Ther.* **308**, 993-1001.
- Massanet Guillermo, Rodriguez-Luis Francisco, Chozaz V. Consolacion, Guerra M. Francisco, Dorado M. Javier (1993) "Guaianolides and an ethylcyclohexane lactone from *Andryala integrifolia*" *Phytochemistry* **34**(6), 1565-1567.
- Meng JC, Zhu QX, Tan RX. (2000) "New antimicrobial mono- and sesquiterpenes from *Sorooseris hookeriana* subsp. *erysimoides*." *Planta Med.* **66**(6), 541-4.
- Michalski Oskar, Wanda Kisiel, Klaudia Michalska, Vladimir Setnicka, Marie Urbanova (2007) "Absolute configuration and conformational analysis of sesquiterpene lactone glycoside

studied by vibrational circular dichroism spectroscopy" *Journal of Molecular Structure* **871**, 67–72.

Miyase Toshio, Kuroyanagi M., Noro T., Ueno A., Fukushima S. (1984) "Studies on sesquiterpenes from *Macroclinidium trilobum* Makino." *Chem. Pharm. Bull.* **32**(10), 3912-3917.

Miyase T., Yamada M., Fukushima S. (1987) "Studies on sesquiterpene glycosides from *Prenanthes acerifolia* Benth." *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 1969–1974.

Mukhametzhanov M. N., Sheichenko V. I., Rybalko K. S., Boryaev K. I. (1969) "Isolation of grosshemin from *Chartolepis intermedia*" *Khimiya Prirodnykh Soedinenii* **5**(3), 184-6.

Neu R. (1957) "Chelate von diarybosäuren mit aliphatischen oxyalkylaminen als reagenzien für den nachweis von oxyphenyl-benzo- γ -pyronen" *Naturwissenschaften* **44**(6), 181-182.

Myun-Ho Bang, Tae-O Jang, Myoung-Chong Song, Dong-Hyun Kim, Byoung-Mog Kwon, Young-Kuk Kim (2004) "Screening of Biologically Active Compound from Edible Plant Sources-IX. Isolation and Identification of Sesquiterpene Lactones isolated from the Root of *Ixeris dentata* forma *albiflora*; Inhibition Effects on ACAT, DGAT and FPTase Activity", *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**(2), 251-257.

Na, Z., Cho, J.-Y., Lee, H.J., Chung, J.H., Park, K.D., Lee, Y.J., Shin, S.C., Rim, Y.S., Park, K.-H., Moon, J.-H., 2007. "Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments of sesquiterpene glucosides from *Ixeris sonchifolia*." *Magn. Res. Chem.* **45**, 275–278.

Ndom J.C., Mbafor J.T., Wansi J.D., Kamdem A. W., Meva L. M., Vardamides J. C., Toukam F., Pegyemb D., Ngando T. M., Laatsch H., Fomum Z. T. (2006) "Sesquiterpene lactones from *Crepis camerronica*" *Natural Product Research* **20**(5), 435–442.

Nishimura K., Miyase T., Ueno A., Noro T., Kuroyanagi M., Fukushima S. (1985) "Sesquiterpene lactones from *Ixeris stolonifera* A. Gray" *Chem. Pharm. Bull.* **33**(8), 3361-3368.

Nowak Gerard (1990) "Dunnschichtchromatographie von Guajanoliden des Unterstammes Centaureinae" *Journal of Chromatography*, **505**, 417-423.

Philips Henry (1824) "Flora historica: The three seasons of the British parterre" E. Lloyd and Son, Vol. 2, p. 424.

Pieropni A. (2000) "Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy" *Journal of Ethnopharmacology* **70**, 235-273.

Qi Song, Marco L Gomez-Barrios, Elise L. Hopper, Martin A. Hjortso, Nicolaus H. Fishcer (1995) "Biosynthetic studies of lactucin derivatives in hairy root cultures of *Lactuca floridiana*" *Phytochemistry* **40**(6), 1659-1665.

Rees B. Sarah, Harborne B. Jeffrey (1985) "The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defense of the cichory plant" *Phytochemistry* **24**, 2225-2231.

Rivera D., Obon C., Inocencio C., Heinrich H., Verde A., Fajardo J., Llorach R. (2005) "The ethnobotanical study of local Mediterranean food plants as medicinal resources in southern Spain" *Journal of Physiology and Pharmacology*, **56**(1), 97-114.

Rybalko K. S., Sheichenko V. I. (1965) "Structure of grosshemin, the sesquiterpene lactone from *Grossheimia macrocephala*" *Russian Journal of General Chemistry* **35**(3), 580-4.

Seto M., Miyase T., Fukushima S. (1986) "Sesquiterpene lactones from *Ixeris dentata* Nakai" Chem. Pharm. Bull. **34**(10), 4170-4176.

Seto M., Miyase T., Umehara K., Ueno A., Hirano Y., Otani N. (1988) "Sesquiterpene lactones from *Cichorium endivia* L. and *C. intybus* and Cytotoxic activity" Chem. Pharm. Bull **36**(7), 2423-2429.

Seung-Heon Yoon, D. Bruce Fultonb, John F. Robyt (2004) "Enzymatic synthesis of two salicin analogues by reaction of salicyl alcohol with *Bacillus macerans* cyclomaltodextrin glucanyltransferase and *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB dextrantransferase" Carbohydrate Research, **339**, 1517–1529.

Shimoda Hiroshi, Kiyofumi Ninomiya, Norihisa Nishida, Tomoe Yoshino, Toshio Morikawa, Hisashi Matsuda, Masayuki Yoshikawa. (2003) "Anti-Hyperlipidemic Sesquiterpenes and New Sesquiterpene Glycosides from the Leaves of Artichoke (*Cynara scolymus* L.): Structure Requirement and Mode of Action" Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **13**, 223–228.

Siedle B., Garcia-Pineros A. J., Murillo R., Schulte-Monting J., Castro V., Rungeler P., Klaas C. A., Da Cosa F. B., Kisiel W., Merfort I. (2004) "Quantitative Structure-Activity Relationship of Sesquiterpene Lactones as Inhibitors of the Transcription Factor NF- κ B" J. Med. Chem. **47**, 6042-6054.

Singh K.N., Lal Brij. (2005) "Ethnomedicines used against four common ailments by the tribal communities of Lahaul-Spiti in western Himalaya" Journal of Ethnopharmacology **115**, 147–159.

Tejero-Gonzalez, J. Molero-Mesa, M. Casares-Porcel, M.J. Martinez Lirola (1995) "New contributions to the ethnopharmacology of Spain" Journal of Ethnopharmacology **45**, 157-165.

Wang Hao, Ting Wu, Ming Yan, Ge Liu, Ping Li, Xiao-Qi Zhang, Wen-Cai Ye, Lu-Yong Zhang (2009) "Sesquiterpenes from *Ainsliaea fragrans* and Their Inhibitory Activities against Cyclooxygenases-1 and 2" Chem. Pharm. Bull. **57**(6), 597–599.

Warashina Tsumomu, Mie Ishino, Toshio Miyase, Akira Ueno (1990) "Sesquiterpene glucosides from *Ixeris debilis* and *Ixeris repens*" Phytochemistry, **29**(10), 3217-3224.

Watabe M, Hishikawa K., Takayanagi A., Shimizu N., Nakaki T. (2004) "Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NF kappa B and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells" J. Biol. Chem., **279**, 6017-6026.

Woynarowski J. M., Konopa J. (1980) "Inhibition of DNA Biosynthesis in HeLa Cells by Cytotoxic and Antitumor Sesquiterpene Lactones" Molecular pharmacology, **19**, 97-102.

Wu S., Luo X. D., Ma Y. B., Hao X. J., Wu D. G. (2002) "Anti-gastric ulcer sesquiterpene lactone glycosides from *Crepis napifera*" Yao-Xue-Xue-Bao **37**(1), 33.

Xiaohua Xu, Yang Haishen, Qiao Xiaoxiao, Xie Longguan (2009) "Anti-amoeba protozoon disease compounds of 8-Epigroshiemin and synthesis thereof" PRC Invention Application Publication CN200810153168.

Xingshang Li, Jiangyun Liu, Jinna Cai, Peilie Cai (2008) "Complete ^1H and ^{13}C data assignments of two new guaianolides isolated from *Ainsliaea fragrans*" Magn. Reson. Chem. **46**, 1070–1073.

Zdero H., Bohlman F. (1989) "Sesquiterpene lactones from *Oldenburgia arbuscula* and

Pleiotaxis rugosa" Phytochemistry **28**(12), 3345-3346.

Zidorn C., Ellmerer-Müller, E.P., Stuppner, H. (1999) Guaianolides from *Calycocorsus stipitatus* and *Crepis tingitana*." Phytochemistry **50**, 1061–1062.

Zidorn Christian (2008) "Sesquiterpene lactones and their precursors as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae" Phytochemistry **69**, 2270–2296.

Zong Yuying, Mantang Yu, Licheng Huang, Yeping Chang, Yi Wang, Chun-Tao Che, (1994) "Studies of Tibetan Medicinal Plants II. Antitumour Activity of *Saussurea eorygmaea*" Pharm. Biol. **32**(3), 284 – 293.

Αντωνίου Μαρία (2006) "Παραδοσιακή διατροφή στην Ελλάδα & χρήση λαχανικών και φρούτων από τις αρχές του 20ου αιώνα" Μεταπτυχιακή εργασία, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

Καββάδας, Δ. (1956) "Εικονογραφημένον Βοτανικόν - Φυτολογικόν Λεξικόν" Τόμος Δ, Αθήνα, σελ. 2137-2140.

Σκαλτσά Ε. (2004) "Χημεία Φυσικών Προϊόντων ΙΙ" Αθήνα, σελ. 30-38.
